

3 种优势微生物对宝泉酱挥发性香气的影响

庞惟俏¹, 郭德军^{2,*}

(1.黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319;

2.钦州学院食品工程学院, 广西 钦州 535000)

摘要: 为探究大豆酱中主要菌种与香气成分的关系, 采用气相色谱-质谱联用, 对人工接种优势菌发酵的大豆酱进行挥发性成分的测定, 并利用电子鼻技术与成品宝泉酱的香气成分进行主成分分析。结果表明: 经主成分分析, 在7个样品中确定BM6的香气与发酵34 d成品大豆酱最接近, BM7的香气差异较大; BM6的发酵风味易被人接受, 其人工感官评价与电子鼻结果相一致。利用顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱技术, 在样品中共检出15种酯类、6种醇类、6种醛酮类、3种酸酚类、8种其他类化合物; 宝泉酱中的酯类和醇类主要来源于*Zygosaccharomyces rouxii* BSZ.16910, 醛酮类主要来源于*Staphylococcus epidermidis* BSS.17312, 3种菌株之间在挥发性成分的合成上存在微妙的互作关系; 经因子分析, 菌株*S. epidermidis* BSS.17312和*Z. rouxii* BSZ.16910对宝泉酱酯和醇的产生贡献较大。

关键词: 电子鼻; 优势微生物; 大豆酱; 挥发性成分

Correlation Analysis of Three Dominant Microorganisms and Volatile Aroma Components of Baoquan Fermented Soybean Paste

PANG Weiqiao¹, GUO Dejun^{2,*}

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

2. College of Food and Engineering, Qinzhou University, Qinzhou 535000, China)

Abstract: The present study was intended to investigate the correlation between the three dominant microorganisms and aroma compounds of Baoquan fermented soybean paste. The volatile compounds of seven samples (BM1, BM2, BM3, BM4, BM5, BM6 and BM7) of fermented soybean paste artificially inoculated with pure or mixed cultures of the dominant microorganisms were identified by headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). Furthermore, we also detected the volatile aroma compounds of these samples by an electronic nose and analyzed the sensor data by principal component analysis (PCA). The PCA results showed that the aroma of BM6 was most similar to the commercial product fermented for 34 d whereas BM7 was distinct from this product. The results of sensory evaluation and electronic nose analysis consistently indicated that BM6 was more acceptable to consumers. A total of 38 volatile compounds were identified, including 15 esters, 6 alcohols, 6 aldehydes and ketones, 3 acids and phenolics, and 8 other compounds. The esters and alcohols were derived from *Zygosaccharomyces rouxii* BSZ.16910 and the aldehydes and ketones from *Staphylococcus epidermidis* BSS.17312. There existed certain interaction between the three microorganisms on the synthesis of volatile compounds in Baoquan fermented soybean paste. Factor analysis demonstrated that *S. epidermidis* BSS.17312 and *Z. rouxii* BSZ.16910 made greater contribution to the generation of esters and alcohols.

Keywords: electronic nose; dominant microorganisms; fermented soybean paste; volatile components

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201820025

中图分类号: TS261

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 20-0167-08

引文格式:

庞惟俏, 郭德军. 3种优势微生物对宝泉酱挥发性香气的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 167-174. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201820025. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2017-07-31

基金项目: 黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目 (YJSCX2016-Y41);

黑龙江大酱微生物多样性及挥发性成分相关性研究项目 (HXSP2016004)

第一作者简介: 庞惟俏 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。E-mail: 747037233@qq.com

*通信作者简介: 郭德军 (1968—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物。E-mail: guodejun356@126.com

PANG Weiqiao, GUO Dejun. Correlation analysis of three dominant microorganisms and volatile aroma components of Baoquan fermented soybean paste[J]. Food Science, 2018, 39(20): 167-174. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201820025. <http://www.spkx.net.cn>

优质大豆酱多鲜艳光泽、黏度适中、味鲜醇厚、咸甜适口, 可用作烹制各种菜肴。同时, 大豆酱富含赖氨酸和不饱和脂肪酸, 发酵过程中可产低聚肽类, 可均衡饮食结构, 促进血液循环, 并具有降血脂、调节胰岛素、预防癌症等保健功能, 备受广大消费者关注^[1-2]。

大豆酱中存在丰富的微生物资源, 这些微生物均对大豆酱的香气、品质发挥重要作用^[3]。宏基因组结合传统微生物分离技术研究表明: 鲁氏酵母、耐盐表皮葡萄球菌和解淀粉芽孢杆菌是宝泉酱中的优势菌, 鲁氏酵母经18S rDNA测序的序列丰度为97.38%, 两株细菌经16S rDNA测序的序列丰度分别为57.43%、1.57%。故预测大豆酱中的挥发性成分可能来源于这些优势微生物, 利用优势菌接种发酵, 可在不失传统风味的基础上缩短大豆酱的发酵周期。因此研究优势微生物对大豆酱风味的影响十分有意义。

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)技术目前已广泛应用于发酵食品的挥发性成分的研究中, 应用在大豆酱中香气成分的测定也有报道^[4]。康旭等^[5]利用GC-MS技术证实黄豆中不同类别氨基酸含量与豆酱风味物质存在相关性。庞惟俏等^[6]利用GC-MS分析工厂酱和农家酱挥发性成分的种类和含量的区别, 工厂酱更优。电子鼻^[7]是模拟动物的嗅觉, 利用气体传感器阵列的响应值来识别气味的电子系统, 响应时间短^[8]、检测快速、测定范围较广、重复性好, 能挖掘人鼻不能嗅闻的气体, 在食品行业发挥着越来越重要的作用^[9], 目前, 电子鼻用于分析面酱和花生酱等酱类中香气物质。楼飞等^[10]使用电子鼻技术区分2种花生酱香气成分的差异, 为日后鉴定不同品牌的花生酱提供理论依据; 但应用电子鼻分析大豆酱香气成分之间差异性的研究鲜有报道。鲁氏酵母属于豆酱呈味的有益酵母, 其发酵后的代谢产物包括醇类和甘油^[11]。目前, 鲜见文献报道耐盐表皮葡萄球菌在大豆酱中检出, Montel等^[12]发现木糖葡萄球菌和表皮葡萄球菌作为肉制品发酵剂, 可生成氨基酸类和其他重要的风味物质。解淀粉芽孢杆菌具有较强的淀粉酶和酸性蛋白酶活性^[13], 其水解可产生还原性单糖和氨基酸, 可促进酱的美拉德反应^[14]。本研究以从宝泉岭大豆酱中分离的优势菌*Zygosaccharomyces rouxii* BSZ.16910、*Staphylococcus epidermidis* BSS.17312和*Bacillus amyloliquefaciens* BSB.170120为研究对象, 按一定比例组合接种于无菌大

豆酱醅中进行发酵, 利用电子鼻和HS-SPME-GC-MS技术分析不同微生物对大豆酱挥发性成分的影响; 通过因子分析, 进一步确定优势菌对大豆酱香气成分的贡献, 对明确香气的微生物来源、缩短发酵时间、稳定发酵品质、揭示呈香机理、优化产品质量和生产工艺改进具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

发酵7 d的大豆酱酱醅和发酵34 d成熟大豆酱由黑龙江省宝泉岭酱厂提供。菌种: *Z. rouxii* BSZ.16910、*S. epidermidis* BSS.17312、*B. amyloliquefaciens* BSB.170120为利用宏基因组技术和传统微生物分离技术, 从成品宝泉酱中分离获得的优势菌, 现保藏于黑龙江八一农垦大学食品学院分子生物技术实验室。

1.2 仪器与设备

GC 6890-MS 5973N型GC-MS联用仪 美国Agilent公司; 50/30 μm 二乙基苯/碳分子筛/聚二甲基硅氧烷萃取头、J&W DB-5石英毛细柱(60 m \times 0.25 mm, 0.25 μm) 美国J&W Sci公司; PEN3.5型便携式电子鼻 德国Airsence公司; LDZF-30L型立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂。

1.3 方法

1.3.1 酱醅无菌化处理

7份大豆酱醅, 每份500 g, 分装在三角瓶中, 110 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌20 min, 间歇24 h后再灭菌一次, 平板法检查酱醅无菌后使用。

1.3.2 大豆酱样品制备

菌种*Z. rouxii* BSZ.16910接种在YPD液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h; *S. epidermidis* BSS.17312接种在MRS液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h; *B. amyloliquefaciens* BSB.170120接种在LB液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h。将菌液3 000 r/min制冷离心后, 经磷酸盐缓冲液洗涤2次, 在无菌环境中, 将菌液体积比按照表1进行1:1:1方式组合, 按2%的接种量, 接入酱醅中进行发酵, 参照企业的产品加工技术参数和工艺进行发酵, 发酵时间约为20 d(按照菌落计数国标法对每种样品发酵过程中微生物总数进行计数, 待其总数达到成品宝泉酱的总数时, 停止发酵), 采集样品至于无菌袋中4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 用于后续实验, 样品命名如表1所示。

表1 添加菌株组合方式发酵的大豆酱名称

Table 1 Pure and mixed starter cultures for fermented soybean paste

优势菌编号	优势菌名称	样品名称						
		BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6	BM7
M1	<i>B. amyloliquefaciens</i> BSB.170120	+	-	-	+	+	-	+
M2	<i>S. epidermidis</i> BSS.17312	-	+	-	+	-	+	+
M3	<i>Z. rouxii</i> BSZ.16910	-	-	+	-	+	+	+

注：+，添加；-，未添加。

1.3.3 感官评价

选择有经验的实验室品评人员（5位男性、5位女性）对大豆酱的稠度（10分）、硬度（10分）、色泽（20分）、气味（20分）、均匀性（20分）、总体可接受性（20分）进行感官评分，满分100分，评分规则^[11]如表2所示。

表2 大豆酱感官评分标准

Table 2 Criteria for sensory evaluation of fermented soybean paste

指标	评分标准		
稠度 (10分)	酱体很稠或很稀0~3分	酱体较稠或较稀4~7分	酱体黏稠适中8~10分
硬度 (10分)	酱体特别硬或特别软0~3分	酱体较硬或较软4~7分	酱体软硬度适中8~10分
色泽 (20分)	酱体为棕褐色，无光泽0~6分	酱体深黄色，光泽较弱7~13分	酱体为深黄色，具有光泽14~20分
气味 (20分)	酱体有异味，无酱香、酯香和鲜味0~6分	酱体无异味，酱香、酯香和鲜香气味较弱7~13分	酱体无异味，有强烈的酱香、酯香和鲜香气味14~20分
均匀性 (20分)	酱体粗糙，有许多豆瓣0~6分	酱体较粗糙，有较少的小豆瓣7~13分	酱体均匀，无豆瓣存在14~20分
整体接受程度 (20分)	酱体为棕褐色，缺少光泽，缺少酱香、酯香和鲜味，很稀或稠，质地不均匀，有大量的酱块，有异物0~6分	酱体为深黄色，光泽较弱，酱香、酯香和鲜味较弱，较稠或较稀，较粗糙，有较少的小豆瓣，少量外来异物7~13分	酱体为深黄色，具有光泽，强烈的酱香、酯香和鲜香气味，质地均匀，无酱块存在，无异物14~20分

1.3.4 电子鼻检测

分别取不同种大豆酱样品约1.00 g，置于电子鼻专用瓶内。将电子鼻系统进行预热和校准，确保电子鼻采集数据时的精确度和稳定性。电子鼻分析条件：传感器清洗时间设置180 s，零点校准时间10 s，检测时间60 s，进样流量150 mL/min，进样量250 μL，注射器温度70 °C。按上述条件，每个样品准备3个重复，取48~59 s处的信号作为电子鼻分析的时间点。电子鼻传感器性能描述见表3。

表3 电子鼻传感器性能描述

Table 3 Performance description of ten electronic nose sensors

传感器序号	传感器名称	性能描述
MOS 1	W1C	对芳香烃成分灵敏
MOS 2	W5S	对氮氧化物灵敏
MOS 3	W3C	氨水，对芳香大分子成分灵敏
MOS 4	W6S	对氢气有选择性
MOS 5	W5C	烷烃，芳香成分
MOS 6	W1S	对甲烷灵敏
MOS 7	W1W	对无机硫化物灵敏
MOS 8	W2S	对醇灵敏
MOS 9	W2W	芳香成分，对有机硫化物灵敏
MOS 10	W3S	对烷烃灵敏

1.3.5 挥发性成分测定

萃取条件：取每种大豆酱约10 g加入40 mL样品瓶中，加入经过稀释的对甲氧基苯甲醛内标溶液0.01 μL，将样品瓶放入60 °C水浴中平衡10 min，将老化5 min的萃取针头插入样品瓶中，推出纤维头，顶空气中恒温60 °C萃取30 min，于250 °C解吸1 min，启动仪器采集数据。

GC条件：J&W DB-5石英毛细柱（60 m×0.25 mm，0.25 μm）；进样口温度250 °C；载气为氦气（He），流速1.0 mL/min；采用程序升温，由室温升至80 °C保持2 min，以4 °C/min升至180 °C，并保持3 min，以5 °C/min升至230 °C，保持5 min，降温至80 °C；进样方式为不分流进样。

MS条件：离子源在225 °C全扫描；电子电离源；电子能量70 eV；质量扫描范围50~500 u。

1.4 数据分析

1.4.1 GC-MS数据分析

定性分析利用计算机对采集到的质谱图进行检索，辅助人工解析图谱，与NIST 02.L标准谱库进行对照匹配。定量分析根据内标物的浓度、样品中各组分的峰面积与内标对甲氧基苯甲醛的峰面积比^[15]，大豆酱样品中各组分含量按下式计算：

$$A = \frac{\text{峰面积比} \times m_1}{m} \times 10^3$$

式中：A为大豆酱各挥发性成分含量（ng/g）；m₁为内标物对甲氧基苯甲醛的质量/μg；m为每种大豆酱样品的质量/g。

1.4.2 电子鼻数据分析

主成分分析（principal component analysis, PCA）由电子鼻自带软件完成。

1.4.3 数据处理

利用SPSS 18.0软件对主要的挥发性香气成分进行因子分析，相关关系的变量X₁、X₂…X₆代表检测出的香气化合物的种类。

2 结果与分析

2.1 优势菌接种大豆酱的感官评价结果

表4 优势菌发酵的大豆酱感官评分结果

Table 4 Sensory evaluation of fermented soybean paste samples

样品名称	感官评分						总分
	稠度	硬度	色泽	气味	均匀性	整体接受程度	
BM1	9	4	6	6	8	8	41
BM2	6	7	12	10	12	14	61
BM3	8	7	15	10	11	14	65
BM4	5	4	7	9	10	9	44
BM5	6	6	11	12	11	13	59
BM6	8	7	16	13	12	16	72
BM7	7	8	13	12	12	15	67

由表4可知,不同菌株按一定比例接种酱醅,发酵后的感官评价排名为BM6>BM7>BM3>BM2>BM5>BM4>BM1。BM6接种了鲁氏酵母菌和表皮葡萄球菌,酵母菌代谢氨基酸、分解糖,产生风味前体物质;表皮葡萄球菌具有明显的蛋白酶和脂肪酶活性^[16],有利于大酱鲜味氨基酸和风味酯类物质的产生,也可能是这2种菌在酱醅中有很好的协同作用,有利于风味物质在数量和种类上的增加。BM1的感官评分较低,有微弱的臭味,这表明仅添加解淀粉芽孢杆菌的豆酱风味较差,其发酵的大豆酱的颜色较深,均匀性较差;但BM1的稠度较大,因为解淀粉芽孢杆菌释放黏度高的黏液。张娟等^[17]证实解淀粉芽孢杆菌在大豆酱中属有益菌,可抑制杂菌生长,延长发酵食品的保质期。但解淀粉芽孢杆菌易生成芽孢而比较耐热,易造成产品杀菌不彻底,容易引起包装后的成品酱细菌总数超标。

2.2 优势菌接种大豆酱的电子鼻检测分析

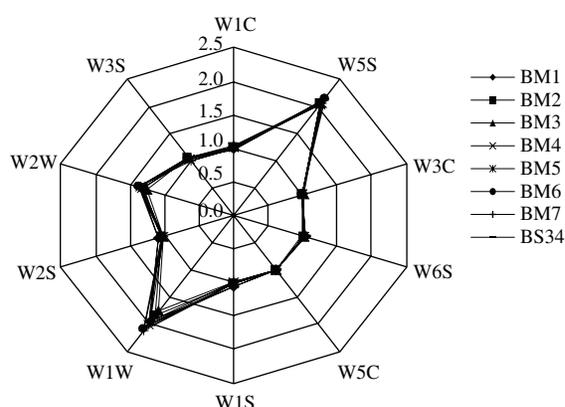


图1 优势菌种发酵的大豆酱电子鼻传感器特征响应值雷达图
Fig. 1 Radar chart of characteristic response values of fermented soybean paste samples from electronic nose

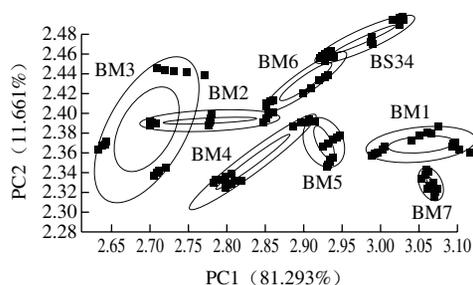


图2 优势菌发酵的大豆酱电子鼻PCA图
Fig. 2 PCA plot of electronic nose data of different soybean paste samples

根据表3中电子鼻的10个传感器性能描述,并结合图1可知,8种样品对10个传感器的特征响应值均在2.5以下,其香气成分均对传感器W1W、W2W和W5S响应强度较大;其次是传感器W2S、W3S、W1S;但传感器W5C、W6S、W3C、W1C对大豆酱的香气响应强度极小。上述结果表明,电子鼻传感器对大豆酱中的含硫化合

物、醇类及氮氧化物特别灵敏,而对烷烃类、氢气、芳香烃、芳香大分子响应不敏感。由图1可以看出,10种传感器对8个样品的响应强度值十分接近,这表明7种优势菌接种大豆酱的特征性香气成分的差异相对较小,初步判定它们与成品大豆酱(BS34)的挥发性成分组成相似。

为进一步确定不同菌种发酵大豆酱的风味与成品大豆酱的相似程度,通过PCA法对数据进行统计分析,将传感器的数值进行转换及降维^[18-19]。由图2可以看出,PC1贡献率为81.293%,PC2贡献率为11.661%,两者累计贡献率为92.954%,较全面地反映原始数据的降维信息,说明二者包含全部样品的整体香气变化信息。从7种菌种组合发酵的大豆酱与成品大豆酱之间的距离可看出,成品大豆酱与BM6的距离最小,与BM7的距离最大,这说明菌株M2和M3混合后接种大豆酱与成品大豆酱香气相接近,差异不显著,这与其感官评分结果一致;3种混合菌株发酵的大豆酱风味和成品大豆酱之间差异较显著。因此,可考虑在大豆酱发酵过程中接种M2和M3,不但缩短发酵周期,并在一定程度上满足成品大豆酱风味。同时,BM4和BM5的椭圆区有部分重叠,表明其发酵成熟后香气相近,这可能与接入的M1有关。张玉玉等^[19]利用电子鼻对7种面酱煮制前后的香气进行比较,把相似度较高的样品聚类在一起,PC1和PC2的贡献率分别为99.839%和0.1383%。大豆酱中主要的挥发性成分是醇酯类^[20],本实验中使用的电子鼻缺少酯类物质的检测器,因此,不能有效地区分样品风味之间的差异。

2.3 优势菌接种大豆酱的挥发性成分分析

为进一步阐明大豆酱挥发性成分的微生物来源及含量,明确不同菌种发酵对大豆酱挥发风味的贡献。由表5可知,利用HS-SPME-GC-MS在7种样品中共检出38种挥发性成分,包括15种酯、6种醇、6种醛酮类、3种酸酚类、8种其他化合物。在单一菌种发酵的BM1、BM2和BM3中分别检出10、15、15种挥发性成分,含量分别为190.02、101.42 ng/g和538.37 ng/g。BM3中挥发性成分含量最多,可能是因为鲁氏酵母的主要作用是醇类发酵,可合成多种酯类香气成分、甘油和多元醇,使得其挥发性成分含量较高^[21]。混合菌种发酵的BM4、BM5、BM6、BM7中共鉴定出18、12、16、11种化合物,含量分别为662.33、166.89、218.50 ng/g和721.52 ng/g。主要的挥发性成分包括亚油酸乙酯、棕榈酸乙酯、苯甲酸乙酯、3-甲基-1-丁醇、苯乙醇、苯甲醛、苯乙醛、3-甲氧基苯乙酮。每种大豆酱挥发性成分的种类较成品大豆酱挥发性成分减少约10种,含量降低在188.47~743.1 ng/g之间。

从表5可以看出,M1、M2、M3菌株无论是单独发酵还是混合发酵,酯和醇都是主要的呈香成分,其中棕榈酸乙酯是它们在大豆酱中代谢产生的主要挥发性成

表5 优势菌发酵大豆酱中主要挥发性成分分析
Table 5 Volatile compounds in fermented soybean paste samples identified by HS-SPME-GC-MS

保留时间/min	CAS号	化合物名称	挥发性成分含量/(ng/g)							
			BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6	BM7	BS34
3.39	141-78-6	乙酸乙酯	—	—	—	—	—	1.07±0.07	—	—
9.96	123-66-0	正己酸乙酯	—	—	—	1.79±0.05	—	—	—	—
16.09	93-89-0	苯甲酸乙酯	—	1.65±0.04	6.28±0.14	9.59±0.18	2.03±0.05	1.99±0.09	12.09±0.32	1.28±0.03
16.72	106-32-1	辛酸乙酯	—	0.47±0.00	3.14±0.07	—	—	1.00±0.02	6.19±0.12	—
18.99	67662-96-8	2,2-二甲基丙酸-2-苯基乙酯	—	—	—	—	3.29±0.06	—	—	—
19.00	122-70-3	丙酸-2-苯乙酯	—	—	—	—	—	3.42±0.10	9.49±0.24	—
19.01	103-45-7	乙酸苯乙酯	—	—	9.01±0.26	—	—	—	—	—
20.75	97-90-5	2-甲基-2-丙烯酸-1,2-乙二醇酯	12.30±0.35	—	—	24.90±0.91	—	—	—	—
28.09	544-35-4	亚油酸乙酯	—	19.75±0.62	—	209.37±8.22	8.77±0.22	31.13±1.44	64.92±4.58	387.05±10.31
28.88	111-62-6	油酸乙酯	—	—	—	—	—	—	—	171.41±8.63
29.12	2462-85-3	亚油酸甲酯	—	—	—	—	—	2.28±0.05	—	2.81±0.08
29.57	84-66-2	酞酸二乙酯	30.63±1.24	—	—	—	—	—	—	—
29.86	106-33-2	月桂酸乙酯	—	—	1.82±0.05	—	—	—	—	—
33.07	111-61-5	硬脂酸乙酯	—	—	—	—	—	—	—	16.23±0.46
36.27	124-06-1	肉豆蔻酸乙酯	1.22±0.04	0.93±0.02	3.89±0.08	—	1.00±0.03	0.96±0.02	—	3.20±0.10
38.92	41114-00-5	十五酸乙酯	—	—	1.82±0.05	—	—	—	—	2.17±0.06
39.67	5129-60-2	十六烷酸甲酯	—	—	—	—	—	—	—	1.15±0.03
41.36	628-97-7	棕榈酸乙酯	63.05±4.50	45.44±3.18	212.88±8.48	106.94±6.06	69.35±4.59	59.45±4.24	186.37±6.68	207.46±8.39
43.70	1191-41-9	亚麻酸乙酯	—	—	—	—	—	—	—	1.92±0.06
44.05	14010-23-2	十七酸乙酯	—	—	—	—	—	—	—	1.92±0.06
		酯类化合物 (X ₁)	107.20	68.24	238.84	350.80	81.44	100.23	279.06	796.60
3.95	124-38-9	乙醇	—	—	—	—	—	—	—	32.47±1.46
4.28	123-51-3	3-甲基-1-丁醇	—	3.77±0.12	26.90±0.98	23.21±0.76	14.28±0.40	17.01±0.54	69.02±4.62	—
4.30	137-32-6	2-甲基-1-丁醇	—	—	—	—	—	—	38.55±1.73	1.66±0.05
5.24	123-51-3	异戊醇	—	—	—	—	—	—	—	2.05±0.06
5.90	513-85-9	2,3-丁二醇	—	—	—	—	—	—	—	1.53±0.04
9.41	3391-86-4	1-辛烯-3-醇	—	—	—	14.66±0.88	—	—	—	—
14.09	60-12-8	苯乙醇	31.36±1.77	11.82±0.30	240.99±8.97	102.62±6.00	49.12±3.28	70.63±4.98	275.96±9.25	25.05±0.96
26.29	36653-82-4	1-十六醇	—	0.44±0.00	—	—	—	—	—	—
26.39	629-76-5	1-十五醇	—	—	1.24±0.04	—	—	0.64±0.04	—	—
		醇类化合物 (X ₂)	31.36	16.03	269.13	140.49	63.40	88.28	383.53	62.76
3.64	590-86-3	3-甲基丁醛	—	0.51±0.01	—	—	—	—	—	—
3.71	96-17-3	2-甲基丁醛	—	2.07±0.05	—	7.33±0.12	—	—	—	—
9.19	100-52-7	苯甲醛	—	1.82±0.04	—	30.26±1.73	—	—	—	—
11.67	122-78-1	苯乙醛	9.41±0.20	4.72±0.14	7.19±0.10	47.08±3.22	3.35±0.10	4.31±0.16	16.88±0.58	1.92±0.06
14.81	815-24-7	2,2,4,4-四甲基-3-戊酮	—	—	—	—	—	—	—	7.16±0.10
21.12	586-37-8	3-甲氧基苯乙酮	—	—	—	58.92±3.92	—	—	—	—
21.20	1450-72-2	2-羧基-5-甲基苯乙酮	—	6.86±0.18	—	—	—	8.65±0.22	—	6.39±0.08
26.72	21834-92-4	5-甲基-2-苯基-2-己烯醛	—	—	—	—	—	—	—	1.28±0.04
		醛酮类化合物 (X ₃)	9.41	15.98	7.19	143.59	3.35	12.96	16.88	16.75
18.59	1009-67-2	α -甲基氢肉桂酸	—	—	5.79±0.17	—	3.06±0.10	3.10±0.12	—	—
40.51	57-10-3	棕榈酸	—	—	—	—	—	—	—	14.19±0.40
		酸类化合物 (X ₄)	—	—	5.79	—	3.06	3.10	—	14.19
12.55	23208-27-7	苯酚	—	—	—	0.85±0.05	—	—	—	—
14.36	118-71-8	甲基麦芽酚	—	—	—	—	—	—	—	4.35±0.11
21.08	7786-61-0	对乙烯基愈创木酚	17.42±0.61	0.89±0.06	13.20±0.38	12.11±0.30	11.54±0.29	10.55±0.24	36.96±1.79	—
		酚类化合物 (X ₅)	17.42	0.89	13.20	12.96	11.54	10.55	36.96	4.35
4.27	2245-30-9	3,3-二甲基-1,2-环氧丁烷	13.02±0.31	—	—	—	—	—	—	—
6.26	496-46-8	甘脲	—	—	—	—	—	—	—	15.34±0.41
7.24	100-42-5	苯乙炔	—	—	—	1.61±0.06	—	—	—	—
20.31	629-50-5	正十三烷	—	—	3.31±0.12	4.70±0.23	—	2.31±0.08	5.09±0.20	—
26.23	295-48-7	环15烷	—	0.28±0.02	0.91±0.04	4.70±0.23	0.45±0.03	—	—	—
26.77	629-92-5	十九烷	—	—	—	1.69±0.04	—	—	—	—
15.11	700-12-9	五甲基苯	1.97±0.05	—	—	—	—	—	—	—
16.05	90-12-0	1-甲苯	9.64±0.34	—	—	—	—	—	—	—
26.30	35953-53-8	2-十四(碳)烯	—	—	—	—	0.65±0.02	—	—	—
		其他类化合物 (X ₆)	24.63	0.28	4.22	12.70	0.45	2.31	5.09	15.34
		挥发性化合物总含量	190.02	101.42	538.37	662.33	166.89	218.50	721.52	909.99

分,因此它们是宝泉酱中主要香气物质棕榈酸乙酯的微生物来源,也影响其主要的风味,其主要来源于酵母菌M3;在天然发酵的干酪中棕榈酸乙酯也被发现^[22]。3种菌株之间在代谢产生酯类的含量和种类上存在微妙的互作关系。酯类物质是含氧酸与醇或酚类反应得到的,对大豆酱香气成分的形成贡献较大^[23,21],可增加大豆酱的酯香,满足人们味觉享受并给人愉悦感,其大多由酵母利用糖代谢产生,并可抑制霉菌的生长,可作为大豆酱自身的防腐剂^[24]。样品中的挥发性成分与发酵34 d的成品大豆酱相比,相同的酯类包括苯甲酸乙酯、亚油酸乙酯、亚油酸甲酯、肉豆蔻酸乙酯、十五酸乙酯、棕榈酸乙酯。BM4中酯类化合物总含量约为BM1和BM2的3倍和5倍,表明M1和M2菌株共同发酵对大豆酱酯类物质有增效作用;而BM5和BM6中酯类物质总含量较单一菌株发酵样品的含量降低,M1和M3、M2和M3两菌株共同发酵对酯类总量具有减效作用。具有水果香的苯甲酸乙酯未在BM1中检出,表明M1不产该种酯类。肉豆蔻酸乙酯具有温和鸢尾花香气并带有油脂香,其是由糖发酵产生的^[25],本实验在5种样品中均检出微量的该酯。微量的乙酸乙酯、正己酸乙酯、2,2-二甲基丙酸-2-苯基乙酯,分别在BM6、BM4、BM5中被检出。辛酸乙酯拥有白兰地酒香^[26],未在含有M1菌株的BM1、BM4和BM5中检出,表明M1菌株具有抑制该种酯合成的作用。具有香甜红玫瑰似香气及浓厚蜂蜜风味的丙酸-2-苯乙酯在BM6和BM7中检出,在单一菌发酵的样品中未发现,可能是菌株之间互作的产物。M1菌株产酞酸二乙酯,仅在BM1中产生,含量较少;乙酸苯乙酯和月桂酸乙酯只在BM3中被检出,表明其来源于M3菌株。

大豆酱中酵母菌^[27]在发酵麦芽糖、葡萄糖可产生异戊醇、乙醇等。BM3中醇类物质含量最高为269.13 ng/g,约为BM1和BM2的8倍和16倍,这证明菌株M3主要产醇类化合物。BM7中醇类物质总含量为383.53 ng/g,与BM1、BM2、BM3的总含量之和差异较小,表明3种菌株发酵的样品在醇类化合物合成上具有等效作用。在BM7中鉴定出2-甲基-1-丁醇,呈清快香气,含量为38.55 ng/g,仅在3种菌株共同作用下才能产生;被广泛用在食品中的增香剂苯乙醇,给人愉悦的玫瑰花香,在所有样品中均被检出;3种菌株共同发酵时,对于苯乙醇的合成具有明显的协同增效作用。乔鑫^[28]认为苯乙醇是苯丙氨酸在微生物作用下经Strecker降解产生醛后进一步还原生成,有很好的嗅感,可增加酱的醇香。BM4中检出少量的1-辛酸-3-醇,仅在M1和M2两菌株共同发酵时产生,该种化合物在大豆酱中未见检出报道。仅在BM1中未检出具有苹果白兰地香气的3-甲基-1-丁醇^[29],而在其余样品中均含有该醇,这表明菌株M1自身代谢不生成

该种化合物。同时,复合菌发酵的BM5和BM6中,该化合物的含量较单一菌发酵的BM3中的含量低,菌株M3与M1和M2共同发酵可抑制其产生。

脂肪分解可产生醛类和酮类化合物,葡萄球菌可分泌脂肪酶,促进大豆脂肪的分解。复合菌发酵的BM4中醛酮类化合物的含量比单一发酵的BM1和BM2的总量高15倍左右,菌株M1和M2共同发酵对样品中醛酮类化合物的生成有明显的增效作用。在所有的样品中,具有类似风信子和水果甜香气的苯乙醛^[30]均检出,BM4中含量最高为47.08 ng/g,约为BM5的14倍,这可能是表皮葡萄球菌代谢脂肪酶促进脂肪分解,氧化的最终产物为醛^[31]。3-甲氧基苯乙酮仅在BM4中检出,表明菌株M1和M2代谢合成该酮。3种菌株中,M2菌株产生醛酮类化合物的能力较强,表明宝泉岭大酱中醛酮类化合物主要来源于M2菌株。同时,BM4中醛酮类化合物的含量约为BM2的8倍,约为BM1的15倍,表明菌株M1和M2互作对醛酮类化合物总量的生成具有明显的增效作用。

3种菌株发酵的BM7中酸酞类化合物的总含量最高,为其他样品的35倍以上;3菌株混合发酵对大豆酱酸酞类化合物总量的生成具有增效作用。大豆酱中酸酞类化合物主要由嗜盐四联球菌、乳酸菌产生,且可与醇生成酯,为酯类风味和美拉德反应的前体物质^[28]。本实验中仅检出1种酸,为 α -甲基氢肉桂酸,存在于含有M3菌株的样品中。具有烟熏香味的对乙烯基愈创木酚在7种样品中均检出,但含量不同,其中BM7的含量最高,为36.96 ng/g。

2.4 样品挥发性成分的因子分析

为进一步确定不同优势菌对大豆酱挥发性成分的影响,利用因子分析将主要挥发性成分归为少量的因子变量,以便确定不同菌株发酵的大豆酱风味的差异。由表6可知,KMO值为0.835,在0.5~1之间,相关性较大,证明表5的数据可进行因子分析^[10]。根据表7、8可知,前2个主成分的累计贡献率达到97.059%,其涵盖了6种香气成分的所有信息。第1个公因子代表酯类、醇类,不同菌株发酵的大豆酱中的酯和醇含量及种类也不相同,因此,二者对豆酱的香气成分贡献较大,含量越多,醇酯香就越浓郁,豆酱香气就更佳;第2个公因子代表酸类、酚类、醛类、酮类、其他类,尽管这几类化合物对大豆酱的香气贡献较小,但其均可作为醇和酯化合物的前体物质并丰富大豆酱风味的多样性^[15]。

表6 KMO和Bartlett's检验
Table 6 KMO and Bartlett's test

KMO 样本量检测	Bartlett球形检验		
	均方差	自由度	P值
0.835	72.352	10	0.000

表7 优势菌接种大豆酱香气成分的特征值和方差贡献率

Table 7 Eigenvalues and variance contributions of aroma components of different soybean pastes

主成分	初始特征值			提取平方和载荷			提取旋转平方和载荷		
	特征值	贡献率/%	累计贡献率/%	特征值	贡献率/%	累计贡献率/%	特征值	贡献率/%	累计贡献率/%
1	3.245	69.387	69.387	3.245	69.387	69.387	2.732	63.386	63.386
2	1.374	27.415	97.059	1.374	27.415	97.059	1.917	38.746	97.059
3	0.856	12.254	98.429						
4	0.129	2.576	99.650						
5	0.092	1.257	99.969						
6	0.000	0.004	100.000						

表8 旋转后的载荷矩阵和因子得分系数矩阵

Table 8 Loading and component score coefficient matrix after rotation

指标	成分1		成分2	
	载荷	因子得分系数	载荷	因子得分系数
酯类 (X ₁)	0.962	0.282	-0.162	-0.022
醇类 (X ₂)	0.841	0.348	0.207	0.189
醛酮类 (X ₃)	0.098	0.132	0.964	0.584
酸类 (X ₄)	-0.565	-0.174	0.623	0.396
酚类 (X ₅)	-0.296	-0.307	0.087	-0.028
其他类 (X ₆)	-0.133	-0.347	0.509	0.238
因子得分模型F ₁	$F_1=0.282X_1+0.348X_2+0.132X_3-0.174X_4-0.307X_5-0.347X_6$			
因子得分模型F ₂	$F_2=-0.022X_1+0.189X_2+0.584X_3+0.396X_4-0.028X_5+0.238X_6$			
综合因子得分F	$F=0.53296F_1+0.35857F_2$			

表9 因子综合得分

Table 9 Component composite scores

样品名称	F ₁	F ₂	因子综合得分	排序
BM1	-1.144 1	-0.282 1	-0.710 9	7
BM2	0.964 7	-0.840 8	0.213 0	4
BM3	-0.304 7	-0.238 6	-0.247 9	3
BM4	-0.488 6	-0.840 8	-0.561 8	6
BM5	-0.509 7	0.531 8	0.089 5	5
BM6	1.726 2	1.526 3	1.467 1	1
BM7	0.956 7	-0.173 7	0.447 6	2

综上所述,并结合表9可知,不同菌接种大豆酱的因子分析排序为BM6>BM7>BM3>BM2>BM5>BM4>BM1,这与感官评价的结果相一致,B. amyloliquefaciens BSB.170120和S. epidermidis BSS.17312发酵的BM6醇酯香更浓郁,香气更好;同时,也进一步证实这2株菌可产生大量的醇和酯。

3 结论

本实验采用感官评价、电子鼻技术和HS-SPME-GC-MS法,对不同组合菌种发酵的大豆酱的风味属性和挥发性成分的种类、含量进行较全面的分析。接种鲁氏酵母和表皮葡萄球菌混合发酵的BM6整体品质更易被人接受。电子鼻的分析结果显示,7种发酵样品的香气特征成分与成品宝泉酱的差异性相对较小,BM6的风味属性更接近发酵34 d宝泉成品酱。单一菌发酵的样品与成品

大豆酱相比,苯甲酸乙酯、肉豆蔻酸乙酯、棕榈酸乙酯和苯乙醇主要来源Z. rouxii BSZ.16910; 2-羟基-5-甲基苯乙酮来源于S. epidermidis BSS.17312。从组合菌发酵的样品来看,与成品大豆酱相比,苯甲酸乙酯、2-甲基-1-丁醇、苯乙醇的含量在3种优势菌的作用下含量增加; B. amyloliquefaciens BSB.170120和S. epidermidis BSS.17312组合发酵具有促进亚油酸乙酯、苯乙醛的含量增加的作用; S. epidermidis BSS.17312和Z. rouxii BSZ.16910组合可促进亚油酸甲酯的产生,而抑制肉豆蔻酸乙酯。基于因子分析,优势菌M2 (S. epidermidis BSS.17312)和M3 (Z. rouxii BSZ.16910)对宝泉酱香气成分酯和醇的产生贡献较大,是大豆酱发酵的有益菌株,有利于大豆酱风味的形成,因此具有在大豆酱发酵中应用的潜质。

参考文献:

- [1] 武俊瑞, 王晓蕊, 唐筱扬, 等. 辽宁传统发酵豆酱中乳酸菌及酵母菌分离鉴定[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 78-83. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201509015.
- [2] CHOI S J, NAN H L, CHOI U K. Comparison of the quality characteristics of Korean fermented red pepper-soybean paste (Gochujang) Meju made with soybeans (Glycine max L.) germinated under dark and light conditions[J]. Food Science and Biotechnology, 2014, 23(5): 1223-1230. DOI:10.1007/s10068-014-0167-4.
- [3] 王静. 传统豆酱中微生物多样性分析[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2012: 4-8.
- [4] XIE J C, SUN B G, ZHENG F P, et al. Volatile flavor constituents in roasted pork of Mini-pig[J]. Food Chemistry, 2008, 109(3): 506-511. DOI:10.1515/ijfe-2013-0042.
- [5] 康旭, 乔鑫, 李冬生, 等. 豆酱中黄豆氨基酸变化与挥发性物质的关系[J]. 食品科技, 2011, 36(6): 281-286. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2011.06.068.
- [6] 庞惟俏, 姜雪, 杨洋, 等. 宝泉大豆酱及农家酱香气成分的比较分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2016(3): 1130-1137.
- [7] 潘冰燕, 鲁晓翔, 张鹏, 等. GC-MS结合电子鼻分析1-MCP处理对线椒低温贮藏期挥发性物质的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(2): 238-243. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201602042.
- [8] GHASEMI V M, MOHTASEBI S S, SIADAT M, et al. Meat quality assessment by electronic nose (machine olfaction technology)[J]. Sensors, 2009, 9(8): 6058-6083. DOI:10.3390/s90806058.
- [9] 楼飞, 刘源, 孙晓红, 等. 花生酱挥发性风味成分的鉴定[J]. 食品科学, 2009, 30(24): 293-296. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2009.24.089.
- [10] 庞惟俏, 姜雪, 杨洋, 等. 宝泉大豆酱发酵过程中挥发性成分GC-MS分析[J]. 现代食品科技, 2016, 32(1): 359-365. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.054.
- [11] 张海. 大豆酱发酵过程中乳酸菌和酵母菌的作用[J]. 中国调味品, 1993(6): 5-8.
- [12] MONTEL M C, MASSON F, TALON R. Bacterial role in flavour development[J]. Meat Science, 1998, 49: 111-123. DOI:10.1016/S0309-1740(98)90042-0.
- [13] FRANCOISE L. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products[J]. Food Microbiology, 2010, 27: 698-709. DOI:10.1515/ijfe-2013-0042.
- [14] 张荣. 产酱香功能细菌的筛选及其特征风味化合物的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009: 4-9.

- [15] 田甜, 武俊瑞, 岳喜庆. 基于因子分析研究豆酱香气品质最佳的发酵时期[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(8): 163-170. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2014.08.020.
- [16] 张鹤, 吴佳佳, 张记桓, 等. 不同腌制工艺中大黄鱼品质及微生物菌群变化[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(8): 72-77. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2014.08.026.
- [17] 张娟, 杨彩梅, 曹广添, 等. 解淀粉芽孢杆菌及其作为益生菌的应用[J]. 动物营养学报, 2014, 26(4): 863-867. DOI:10.3969/j.issn.1006-267x.2014.04.005.
- [18] 田怀香, 张雅敬, 吴譞, 等. 气相色谱-质谱联用和电子鼻用于鉴别鸡精调味品香气成分[J]. 食品科学, 2017, 38(2): 191-197. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201702031.
- [19] 张玉玉, 黄明泉, 陈海涛, 等. 7种面酱的电子鼻和电子舌辨别分析[J]. 中国食品学报, 2012, 12(1): 198-205. DOI:10.16429/j.1009-7848.2012.01.032.
- [20] 庞惟俏, 曲鹏宇, 魏程程, 等. 黑龙江地区6种大豆酱挥发性成分及理化特征分析[J]. 中国酿造, 2017, 35(6): 81-88. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2017.06.017.
- [21] 田甜. 东北豆酱自然发酵过程中风味品质与微生物变化规律研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2015: 32-42.
- [22] COSIO M S, BENEDETT S, BURATTI S, et al. Application of the electronic nose in olive oil analyses[M]//Olives and olive oil in health and disease prevention. Elsevier Inc., 2010: 553-559.
- [23] 陈丽. 传统发酵豆酱制品菌群动态分析及功能菌的筛选[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2009: 4-10.
- [24] BENESETTI S, SINELLI N, BURATTI S, et al. Shelf life of Crescenza cheese as measured by electronic nose[J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(9): 3044-3051. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(05)72985-4.
- [25] LEDUC F, TOURNAYRE P, KONDJAYAN N, et al. Evolution of volatile odorous compounds during the storage of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Food Chemistry, 2012, 131(4): 1304-1311. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.09.123.
- [26] 孙洁雯, 李燕敏, 刘玉平. 固相微萃取结合气质分析东北大酱的挥发性成分[J]. 中国酿造, 2015, 34(8): 139-142.
- [27] 张巧云. 豆酱中微生物多样性及人工接种多菌种发酵豆酱的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013: 5-8.
- [28] 乔鑫. 黄豆酱挥发性成分形成特征的研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2011: 31-40.
- [29] 孟鹭. 甜面酱发酵过程中挥发性成分的研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2011: 2-5.
- [30] 孙洁雯, 杨克玉, 李燕敏, 等. 东北特产许氏大酱中挥发性成分的提取与分析[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(14): 115-120. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2015.14.029.
- [31] 张鹤. 腌制大黄鱼品质及微生物菌群变化研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2014: 1-7.