

不同乳酸菌强化接种发酵辣椒挥发性风味成分分析

韩江雪, 丁筑红*, 李仲军, 黄卫星
(贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 为更好地了解强化接种发酵对辣椒的风味特征影响, 采用固相微萃取-气相色谱-质谱技术检测 4 株乳酸菌强化接种发酵辣椒风味成分。结果共检出挥发性风味物质 20 类 191 种。不同菌种发酵样品风味物质的种类及含量有较大差异, 发酵乳杆菌共检出挥发性风味物质 15 类 76 种, 乳链球菌共检出 8 类 20 种, 植物乳杆菌共检出 13 类 84 种, 乳酸片球菌共检出 11 类 73 种。经主成分分析方法统计显示, 发酵乳杆菌的风味物质综合评分为 11.28 分、乳酸片球菌为 3.65 分, 植物乳杆菌为 -0.08 分, 乳酸链球菌为 -11.30 分, 自然发酵为 -3.56 分。风味物质综合排名为: 发酵乳杆菌 > 乳酸片球菌 > 植物乳杆菌 > 自然发酵 > 乳链球菌, 发酵乳杆菌、乳酸片球菌以及植物乳杆菌强化发酵较自然发酵辣椒风味品质突出。

关键词: 乳酸菌; 发酵辣椒; 固相微萃取-气相色谱-质谱; 主成分分析

Volatile Analysis of Chili Fermented by Different *Lactobacillus* Species

HAN Jiang-xue, DING Zhu-hong*, LI Zhong-jun, HUANG Wei-xing
(College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: To better understand the effect of artificial inoculation on the flavor characteristics of fermented chili, SPME-GC-MS was used to analyze the flavor composition of different types of fermented chili (natural fermentation and inoculated fermentation with 4 different *Lactobacillus* species). A total of 191 volatile flavor compounds were found belonging to 20 categories. Chili fermented by different strains contained very different types and amounts of volatile flavor compounds. Seventy-six flavor compounds (15 categories) were found in *Lactobacillus fermentum* fermented chili, 20 (8 categories) in *Streptococcus lactis* fermented chili, 84 (13 categories) in *Lactobacillus plantarum*, and 73 (11 categories) in *Pediococcus acidilactici* fermented chili. The results of principal component analysis (PCA) indicated that the comprehensive scores for volatile flavor compounds in chilis fermented by inoculation of *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus plantarum* or *Streptococcus lactis* or naturally fermented were 11.28, 3.65, -0.08, -11.30 and -3.56, respectively. Five kinds of chili could be ranked in decreasing order of comprehensive score for volatile flavor compounds as follows: *Lactobacillus fermentum* > *Pediococcus acidilactici* > *Lactobacillus plantarum* > natural fermentation > *Streptococcus lactis*. Fermented chili prepared by artificial inoculation had more outstanding flavor quality than naturally fermented chili.

Key words: *Lactobacillus*; fermented chili; solid phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC-MS); principal component analysis (PCA)

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)10-0179-05

发酵辣椒是一种传统的地方发酵蔬菜制品, 在我国贵州、湖南、四川、重庆等地食用广泛, 是日常餐桌食品, 深受人们喜爱。传统的发酵辣椒是利用天然

附着在辣椒表面的微生物(主要是乳酸菌)进行发酵, 加上食盐的高渗透作用抑制其大部分杂菌的生长, 经发酵而制成^[1]。随着工业化生产及食品安全需求, 人工接种

收稿日期: 2011-05-17

基金项目: 多功能生物菌剂制备及其在发酵辣椒生产中应用研究项目([2010]筑科农合同字第 1- 农 -19 号);

贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2011]2156 号)

作者简介: 韩江雪(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品加工与贮运保鲜技术。E-mail: hjxbjc@sohu.com

* 通信作者: 丁筑红(1966—), 女, 教授, 学士, 研究方向为农产品加工与综合利用。E-mail: gzdxdzh@163.com

乳酸菌发酵技术已有研究和应用尝试,该技术在缩短发酵周期、提高安全品质方面取得良好效果^[2]。

在外源菌种强化发酵中,由于菌种差异性可能导致发酵产品风味差异性,从而影响产品风味。本实验在传统发酵辣椒的基础上,选用不同属的乳酸菌进行强化接种,采用固相微萃取-气相色谱-质谱法(solid phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry, SPME-GC-MS)提取样品中的挥发性风味物质^[3],并对风味物质进行分析鉴定,旨在比较不同属乳酸菌发酵后的风味特性,为生产中合理选用优良乳酸菌提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

新鲜辣椒:购于本地农贸市场。选用颜色鲜红,无虫蛀、无霉变、无损伤的新鲜辣椒。清水冲洗后备用。

蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、葡萄糖、乙酸钠、柠檬酸钠、磷酸氢二钾、硫酸镁、硫酸锰、吐温80、氯化钠均为分析纯。

发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)、乳链球菌(*Streptococcus lactis*) 贵州轻工中心;植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) 中国工业微生物菌种保藏管理中心。

HP6890/5975C 气相色谱质谱联用仪 美国安捷伦公司;固相微萃取器(2cm-50/30 μ m DVB) 美国 Supelco 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

将洗净鲜辣椒去果柄,切成0.5cm $\times$ 0.5cm的小块,加入质量分数8%的氯化钠溶液,搅拌均匀后装入发酵瓶中。将活化好的乳酸菌按质量分数10%的接种量接入发酵瓶中。30 $^{\circ}$ C发酵6d。

取发酵成熟的辣椒80g,装入进样瓶中加热到60 $^{\circ}$ C。将活化好的萃取头插入进样瓶,顶空萃取30min。

1.2.2 GC-MS 操作条件

色谱柱:HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane(30m $\times$ 0.25mm, 0.25 μ m)弹性石英毛细管柱,柱温45 $^{\circ}$ C(保留0.5min),以5 $^{\circ}$ C/min升温至290 $^{\circ}$ C,保持2min;汽化室温度250 $^{\circ}$ C;载气为高纯He(99.999%);柱前压7.62psi,载气流量1.0mL/min;分流比20:1。

离子源为电子轰击电离源(electron impact, EI);离子源温度230 $^{\circ}$ C;四极杆温度150 $^{\circ}$ C;电子能量70eV;发射电流34.6 μ A;倍增器电压1037V;接口温度280 $^{\circ}$ C;质量范围20~550u^[4]。

1.2.3 数据分析

采用主成分分析方法(principal component analysis, PCA)。计算步骤如下:

原始指标数据的标准化采集, p 维随机向量 $x = (x_1,$

$x_2, \dots, x_p)^T$ n 个样品, $x_i = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ip})^T$, $i = 1, 2, \dots, n$, $n > p$, 构造样本阵, 对样本阵元进行如下标准化变换:

$$Z_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{S_j}, \quad i = 1, 2, \dots, n, \quad j = 1, 2, \dots, p.$$

式中: $\bar{x}_j = \frac{\sum_{i=1}^n x_{ij}}{n}$, $S_j^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{n-1}$ 。得标准化矩阵 Z 。对标准化阵 Z 求相关系数矩阵, 得:

$$R = [r_{ij}]_{p \times p} = \frac{Z^T Z}{n-1}$$

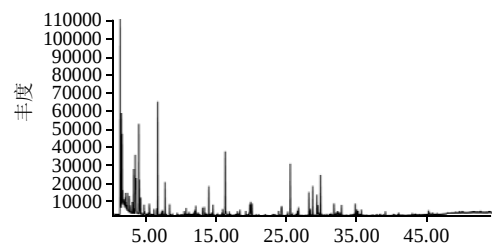
式中: $r_{ij} = \frac{\sum_{i=1}^n Z_{i1} \cdot Z_{ij}}{n-1}$, $i, j = 1, 2, \dots, p$ 。

解样本相关矩阵 R 的特征方程 $|R - \lambda I_p| = 0$, 得 P 个特征根, 确定主成分。按 $\frac{\sum_{j=1}^m \lambda_j}{\sum_{j=1}^p \lambda_j} \geq 0.85$ 确定 m 值, 使信息的利用率达85%以上, 对每个 λ_j , $j = 1, 2, \dots, m$, 解方程组 $Rb = \lambda_j b$, 得单位特征向量。

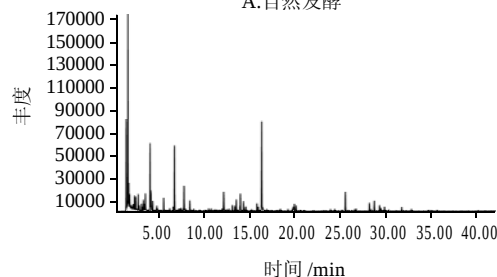
将标准化后的指标变量转换为主成分: $U_{ij} = z_{ij}^T b_j^0$, $j = 1, 2, \dots, m$, U_1 称为第1主成分、称为第 U_2 主成分、...、 U_p 称为第 P 主成分。对 m 个主成分进行加权求和, 即得最终评价价值, 权数为每个主成分的方差贡献率^[5]。

2 结果与分析

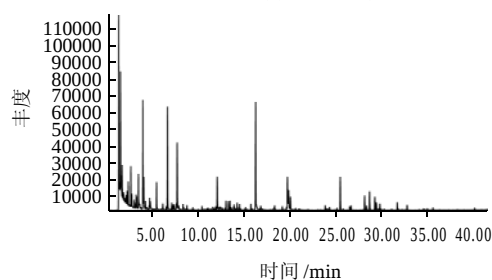
2.1 不同乳酸菌发酵样品总离子流图



A. 自然发酵



B. 乳酸片球菌强化接种发酵



C. 植物乳杆菌强化接种发酵

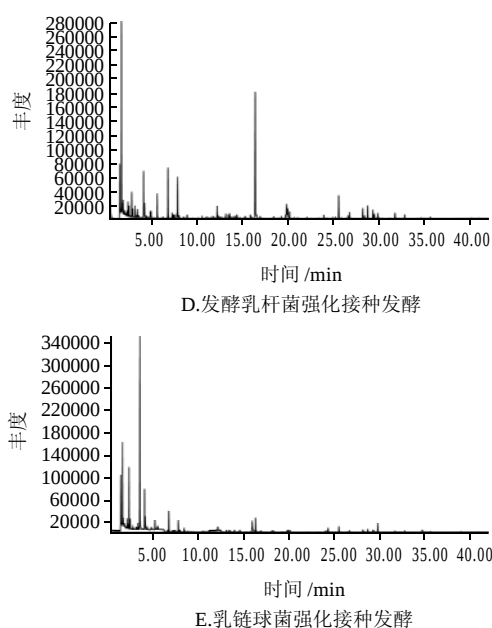


图1 不同发酵方式辣椒挥发性风味物质的总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram of the volatile components in fermented chili by *Streptococcus*

由图1可知,风味物质的出峰时间大部分集中在30min之前。各个样品的最大峰度值差异较大,乳酸片球菌最大峰度为170000,植物乳杆菌最大峰度为110000,发酵乳杆菌最大峰度为320000,乳链球菌最大峰度为340000,自然发酵样品最大峰度为110000。可从总离子图中得出强化接种的样品在峰度值上有明显的提高,自然发酵样品的仅有两个物质的峰值在60000以上,而强化接种的峰值大部分都在100000以上。说明接种对风味物质的强化有明显作用。

4种菌种强化接种以及自然发酵辣椒挥发性风味物质经SPME-GC-MS分析后总共检出18类136种。各样品检出情况如表1所示。

由表1可知,接种强化发酵的辣椒风味物质种类和数量上明显优于与自然发酵辣椒,4种菌种中植物乳杆菌和发酵乳杆菌的醇类和醛类物质含量较高,乳酸片球菌酮类和酯类物质含量较高,乳链球菌的风味物质种类较少,数量也较低。周晓媛^[6]等通过气相色谱-质谱联

用仪对传统发酵辣椒挥发性成分进行分离鉴定,共得到10类56种化合物,其中烃类最多有20种,其次是醇类有13种和酯类有8种,另外酚类、醛类、酮类、缩羰基类、酸类、吡嗪类和其他杂环类分别是1、3、4、1、3、1、2种。与本实验结果比较,检出的风味物质种类基本相同,在风味物质的数量上存在较小差异,原因与原料选择、样品发酵及处理方式、设备差异性等有关。

2.2 挥发性成分主成分变量选择

2.2.1 主成分变量筛选

PCA法是一种将多维因子纳入同一系统中进行定量研究,理论比较完善的多元统计分析方法^[7],其基本思想是认为在众多有相关性的因子之间必然存在着支配作用的共同因子^[8]。通过确定少数几个主成分因子来表示原样本中多个复杂的、规律难寻的变量,并根据主成分因子在不同样本中贡献率的大小,得到样本间规律性与差异性的评价^[9]。

通过2.1节的分析可知,共同检出项包括乙醇、异丁醇、异戊醇、4-甲基-1-戊醇、正己醇、芳樟醇、2-甲基十三烷、 γ -雪松烯、反式- β -罗勒烯、2-正戊基呋喃、2-甲氧基-3-异丁基吡嗪。所有检出物质中相对含量在5%以上的有异戊醇、4-甲基-1-戊醇、芳樟醇、乙酸乙酯、乙醇、正己醇、2-甲基-1-丁醇、3-羟基-2-丁酮。烃类检出种类最多,但这类物质中烷烃的香气一般比较弱,在空气中也易于氧化变质^[10],故风味特征不明显。烯烃类阈值较低,加热可以促进挥发,是辣椒中的主要呈味物质^[11]。醇类的检出量仅次于烃类,醇类化合物包括脂肪族醇、萜醇、芳香族醇等几大类;脂肪族醇类的气味,其规律是随着物质的相对分子质量的增大,气味从弱到强,然后又从强到弱;萜醇类香料大多属花香、青果和蜜香香气^[12]。酯类化合物气味浓郁,香气持久,低分子质量的酯类一般具有芳香气味或特定水果香味。醛类物质的香气浓烈,多为果香及花香。酮类具有性质稳定,香味优异持久等特点^[13]。呋喃类检出量虽然较少,但多具有强烈气味。酚类多有药香及木香等。含氮类如吡嗪等,具有咖啡等香气。由于发酵辣椒的风味是由多种物质相互作用形成的,所以采用峰面积作为半定量分析风味物质的依

表1 不同发酵方式样品中检出的风味物质类别及数量

Table 1 Type and quantity of flavor compounds detected from different samples

发酵方式	烃	醇	酮	酯	醛	呋喃	苯	醚	腈	酚	胺	吡嗪	吡啶	吡咯	脂	酸酐	吡啶	酸
自然发酵	35	12	8	6	4	2	1	2		3		2		1				1
乳酸片球菌	26	16	10	9	3	3	2	1	1	1		1						
植物乳杆菌	28	22	9	6	6	3	3	1	1	2		1	1	1				
发酵乳杆菌	25	21	4	5	10	3	1	1		1	1	1		1	1	1	1	
乳链球菌	6	8	2	2	1	1				1		1						

据。故选择其中 12 个成分及类别作为主成分变量,以峰面积大小为标准进行主成分分析(表 2)。

表 2 不同样品中同类风味物质峰面积
Table 2 Peak area of similar flavor in different samples

风味物质种类	自然发酵	乳酸片球菌	植物乳杆菌	发酵乳杆菌	乳链球菌
丁醇类	170261	880266	496517	824649	598277
戊醇类	2609303	2569155	2926622	3258424	2219691
芳樟醇	1002433	2034456	1921247	5524536	716124
脂类	1498363	947457	1152312	1229018	2105219
丁醛类	197217	309628	585814	859034	83077
雪松烯	365912	208968	263388	412114	67706
2-甲基十三烷	885698	489390	348573	1003549	197121
呋喃类	193923	619405	19077	719904	183094
2-甲氧基-3-异丁基吡嗪	66789	37059	67446	90819	27268
反式- β -罗勒烯	9506	249556	27614	72449	5043
酮类	1512555	1210074	481179	420447	8994630
酚类	266950	36349	72422	65325	708635

2.2.2 挥发性成分主成分分析

由特征值的累计百分率大于 85%(表 3)确定主成分个数,由此选择主成分 $M=3$ 。最终得到主成分得分表并依据贡献率计算综合得分(表 4)。

表 3 主成分积累方差贡献率
Table 3 Accumulated variance contribution rate of principal component

序号	特征值	百分率	累计率
1	7.125212709	0.593767726	0.59376773
2	2.60979781	0.217483151	0.81125088
3	1.409310777	0.117442565	0.92869344
4	0.855678596	0.07130655	0.99999999
5	6.33091×10^{-8}	5.27576×10^{-9}	1
6	3.89735×10^{-8}	3.24779×10^{-9}	1
7	2.26259×10^{-9}	1.88549×10^{-10}	1
8	2.03128×10^{-9}	1.69273×10^{-10}	1
9	3.2601×10^{-10}	2.71675×10^{-11}	1
10	1.61948×10^{-10}	1.34957×10^{-11}	1
11	1.01542×10^{-11}	8.46186×10^{-13}	1
12	3.81083×10^{-12}	3.17569×10^{-13}	1

表 4 不同样品综合评分及排名
Table 4 Composite score and ranking of different samples

序号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	综合评分	排名
自然发酵	-0.330173434	-1.850993443	-0.7898899	-3.5550551	4
乳酸片球菌	0.438714364	2.530898607	-0.8535355	3.65433687	2
植物乳杆菌	0.429982488	-0.732549107	-0.9424999	-0.0755721	3
发酵乳杆菌	3.463664581	-0.160162435	1.45572517	11.2751376	1
乳链球菌	-4.002187999	0.212806378	1.13020014	-11.298847	5

依据综合评分高低对样品进行综合排名。依次为:发酵乳杆菌>乳酸片球菌>植物乳杆菌>空白>乳链球菌。依据综合评分,发酵乳杆菌,乳酸片球菌的风味较好。

发酵乳杆菌的风味成分中,芳樟醇、丁醛类、雪松烯、2-甲基十三烷、呋喃类、2-甲氧基-3-异丁基吡嗪的峰面积都属于最高值。其中,芳樟醇具有花香、木香、柑橘香、浆果香、玫瑰香等^[14];丁醛类中,3-甲基丁醛稀释后具有愉快的水果香气,2-甲基丁醛具有果香、巧克力、坚果香、青香,正己醛具有青香、叶香、果香,(*E*)-2-庚烯醛具有油脂香,苯甲醛具有苦杏仁、樱桃及坚果香气,2-十一烯醛具有柑橘香、脂肪香、蜡香等;雪松烯具有香柏香、木香等;呋喃类中,2-正戊基呋喃具有豆香、泥土香及类似蔬菜的香韵;2-甲氧基-3-异丁基吡嗪具有胡椒、咖啡的香气。这些主要成分相互作用,构成了发酵乳杆菌强化接种产生的感官信息。而对照样品相对而言,仅酮类和酚类相对发酵乳杆菌含量较高,虽然含有大量的烷烃类物质,但是香气较弱,其他挥发性物质的种类都较少并且含量较低。

乳酸片球菌的风味成分中,反式- β -罗勒烯的峰面积高达 249556,具有青香、热带果香、茴香、木香;酮类物质含量也较高,3-羟基-2-丁酮峰面积为 328282,具有甜香、奶香和脂肪的油腻气息;2-庚酮具有香蕉、奶酪及轻微的药香。

乳链球菌与对照相比,风味物质种类非常少,其中乙酸乙酯含量非常高,具有果香及酒样味道,芳樟醇、烯炔类、醛类等具有优良风味特征的物质含量很低,对照中各个风味组分含量较均衡,风味特征融合较好。

3 结 论

经过 SPME-GC-MS 分析挥发性风味物质,采用主成分分析方法,最终得到不同菌种发酵辣椒风味特征的综合排名为,发酵乳杆菌>乳酸片球菌>植物乳杆菌>自然发酵>乳链球菌。与自然发酵相比较,风味物质在种类上差别不大,但是在种类和含量上有较大差别,强化接种可以提高发酵辣椒的优良风味特性。结果显示发酵乳杆菌、乳酸片球菌适宜强化接种发酵,为自然发酵辣椒增加了醛类、醇类和酯类等有益的风味物质;植物乳杆菌强化发酵特点不明显,乳链球菌在辣椒中的发酵特性表现不佳。

乳酸菌在发酵辣椒制作过程中对风味物质的呈现发挥了重要的作用,不同的乳酸菌产生的风味物质的种类及含量有较大区别。强化接种发酵可以有效提高产品风味品质。吴元锋^[15]等人通过分析接入不同乳酸菌和自然

发酵泡菜过程中各项指标的变化,发现人工接入混合菌种泡菜风味较好,是一种较好的低盐度泡菜生产方法。强化接种的发酵辣椒与未接种自然发酵的辣椒相比较,挥发性风味物质的类型没有改变,但含量及组分分布上有较大改变,在醇类、醛类、烯炔类的含量变化上尤为明显。科学选用外源菌种,采用强化接种的方式提高发酵辣椒的综合品质特性是可行的。

参考文献:

- [1] 罗凤莲, 欧阳建勋, 夏延斌. 发酵辣椒中主要风味物质的研究进展[J]. 食品工业科技, 2009(7): 346-351.
- [2] 余有贵, 曹智华, 曾传广. 乳酸菌强化发酵生产辣椒酱的工艺研究[J]. 中国酿造, 2009(12): 94-97.
- [3] 余泽红, 贺小贤, 丁勇. 固相微萃取在食品挥发性组分测定方面研究进展[J]. 粮食与油脂, 2010(7): 44-46.
- [4] 李达, 王知松, 丁筑红. 固相微萃取-气-质联用法对干椒烘焙前后风味化合物的分析评价[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 269-271.
- [5] 傅德印, 张旭东. EXCEL 与多元统计分析[M]. 北京: 中国统计出版社, 2007: 250-261.
- [6] 周晓媛, 邓靖, 李福枝. 发酵辣椒的挥发性风味成分分析[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(1): 54-59.
- [7] 高惠璇. 应用多元统计分析[M]. 北京: 北京大学出版社, 2006: 189-193.
- [8] JOHNSON R A, WIEHERN D W. Applied multivariate statistical analysis[M]. London: Prentice Hall, 2001: 235-256.
- [9] 尹建军, 饶静. 多变量统计分析技术在白酒风味特征研究中的应用[J]. 酿酒科技, 2010(11): 57-60.
- [10] 范成有. 香料及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 1990: 81-95.
- [11] 吴谋成. 食品分析与感官评定[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 55-56.
- [12] 尹显洪. 醇类香料的合成及其结构与香气特征的关系[J]. 广西民族学院学报, 1996, 2(1): 74-78.
- [13] LI Yonghong. Cetal (Ketal) perfume and its development of synthesis studies[J]. 滁州学院学报, 2007, 9(6): 57-62.
- [14] 孙国宝. 食用调香术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 690-740.
- [15] 吴元锋, 邹礼根, 李亚飞. 纯种接种生产优质泡菜的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(4): 175-177.