

贵州米酸汤中呈味物质对滋味的影响

肖甜甜^{1,2}, 干昭波³, 吴君海^{1,2}, 冯子娟^{1,2}, 邱树毅^{1,2}, 吴鑫颖^{1,2*}

(¹ 贵州大学酿酒与食品工程学院 贵阳 550025

² 贵州大学 贵州省发酵工程与生物制药重点实验室 贵阳 550025

³ 山东百龙创园生物科技股份有限公司 山东德州 253000)

摘要 米酸汤是以糯米粉为原料,经自然发酵后制成的具有滋味酸鲜、风味独特和多种保健功能的传统发酵食品。为了解发酵后贵州传统米酸汤呈味物质对滋味的影响,采用与衍生化处理结合的气相色谱-飞行时间质谱(GC-TOF-MS)及超高效液相色谱与 QExactive HF-X 质谱联用(UHPLC-QE-MS)的非靶标代谢组学技术,全面系统地对米酸汤中呈味物质进行分析和滋味评价。结果表明:共有 49 种呈味物质被鉴定为差异代谢物(VIP > 1.00, $P < 0.05$),其中有机酸 27 种,氨基酸 4 种,糖类及其衍生物 9 种,醇类 3 种,醛类 4 种,酯类 2 种。对所涉及的代谢物通路的分析发现,共有 10 条显著影响(Impact > 0.01, $P < 0.05$)的差异代谢途径。对差异代谢物与酸汤滋味的相关性分析表明,脂肪酸(油酸、亚油酸、肉豆蔻酸等)、有机酸(乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等)与酸味之间;异麦芽酮糖、乳糖、甘氨酸与鲜味,赤藓糖、甘油和苏氨酸与适口性之间;乳果糖、 α -D-葡萄糖、毛蕊花糖、麦芽四糖、N-乙酰基-DL-天冬氨酸等与回甜味之间;琥珀酸酐、对羟基苯乳酸、乳糖等与口感丰富度之间,均呈正相关关系。本研究解析了米酸汤发酵的呈味机制,为酸汤品质的稳定和提高奠定了理论基础。

关键词 贵州米酸汤; 自然发酵; 呈味物质; 滋味; 相关性分析

文章编号 1009-7848(2022)10-0303-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.10.033

酸汤是我国贵州省黔东南苗族侗族自治州的一种传统自然发酵调味品,是贵州最具代表性的,有着近千年历史的“酸食”之一。酸汤品种根据原料、地域、色泽、风味等来划分,主要以米酸汤和红酸汤为主^[1]。米酸汤多以糯米为原料,按比例添加母液(上一次发酵成熟的酸汤液)或在自然条件下室温封闭发酵 3~5 d,即可得到具有独特发酵风味的酸汤,可配制成饮品,也可作为调料制作佳肴。酸汤味型独特,酸味适宜,清香爽口,能健脾开胃,生津止渴^[2],具有调节人体肠道微生态平衡的益生菌群,能增进人体健康和预防消化道疾病^[3-4]。酸汤因独特滋味和保健功能而受到消费者的喜爱。

为弄清对酸汤酸鲜爽口的滋味和风味起关键作用的物质,文献报道主要以气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术、高效液相色谱技术(HPLC)等技术,测定酸汤中的有机酸、氨基酸、挥发性物质,为酸汤风味成分的研究奠定了基础。如:张东亚^[5]采用 HPLC 法测定酸汤中含有乳酸、柠檬酸、乙

酸、草酸、酒石酸、苹果酸等有机酸,采用氨基酸分析仪测定酸汤中的游离氨基酸。田亚^[6]通过 GC-MS 联用技术分析贵州米酸汤的主体挥发性风味物质为有机酸、酯类物质。Liu 等^[7]研究发现米酸汤的有机酸中,乳酸含量最高,其次是苹果酸、乙酸、草酸、酒石酸和琥珀酸等。王容等^[8]研究米酸汤在发酵过程中的品质变化及其相关性分析,结果表明感官评分与乳酸、苹果酸、酒石酸呈极显著正相关。乳酸的酸味温和、爽口;苹果酸带有刺激性的爽快酸味,单纯的乙酸具有刺激性气味,草酸酸味刺激,酒石酸酸味绵长,琥珀酸给人以鲜酸的口感。

食品的柔和鲜爽的口感及味觉持久性均与多种有机酸共同作用有关^[9]。米酸汤中有机酸种类众多,多种有机酸共同作用可缓解米酸汤中较高浓度的草酸和乙酸对味觉的刺激,调和其酸味,改善质量,赋予米酸汤独特的风味特征。有机酸中具有高沸点、黏性大的难挥发性有机酸在酸汤滋味和风味中起到不可忽视的作用。它们可降低米酸汤中香味物质的挥发速度,对米酸汤香气有稳定、调和、平衡等作用。酸汤中的糖类和氨基酸也可使酸味更柔和、丰满、适口,并赋予酸汤一定的回甜味,使酸汤口感具有较长的持久感和层次感。酸类、醇

收稿日期: 2021-10-26

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2020]1Y008 号)

作者简介: 肖甜甜(1996—),女,硕士生

通信作者: 吴鑫颖 E-mail: 2513331885@qq.com

类、酯类等风味物质,赋予米酸汤愉悦香气和丰富口感,修饰调节其整体风味,对米酸汤品质有显著影响^[10]。

目前,通过传统定量技术对酸汤中的主要成分已有较深入的了解,然而,由于检测目标预先设定,导致不能全面了解酸汤在发酵前、后有哪些物质发生变化,有些物质因含量低于检出限而不被关注,却在酸汤风味上有重要贡献。随着检测技术和设备的发展,近几年发展起来的基于气相色谱-飞行时间质谱(GC-TOF-MS)联用技术、液相色谱-质谱(LC-MS)联用技术、超高效液相色谱与Q-ExactiveHF-X质谱(UHPLC-QE-MS)联用等多种检测平台的非靶标代谢组学技术,可全面系统地解析生物样本中的多种小分子代谢产物,具有灵敏度高,检测范围广,重复性好等优点,目前广泛应用于食品科学领域^[11-13]。通过多元统计学和生物信息学分析,可较好地剖析样本间或过程中物质变化的差异性,并可分析其涉及的差异代谢途径,揭示样本处理后成分变化的生理机制^[14]。食品中的物质被摄入口腔后,使感觉器官(舌头)产生感觉印象的物质,称为呈味物质,主要为强极性、难挥发或热不稳定的化合物^[15]。强极性和热不稳定性化合物可通过液相色谱-质谱检测,难挥发或热不稳定的化合物,可通过衍生化处理,将其转变成易挥发和稳定的化合物,再进行气相色谱-质谱分析^[16]。在米酸汤发酵过程中,各物质之间有着非常复杂的联系^[8],目前对米酸汤的报道主要集中于酸汤中有机酸含量或挥发性风味物质种类的研究,对米酸汤中关键呈味物质及其对滋味影响的相关研究较少。本研究采用经衍生化处理后的GC-TOF-MS和UHPLC-QE-MS技术,以及感官评定方法,全面系统地描述米酸汤发酵前、后呈味物质的差异,以及与滋味特征的相关性,解析米酸汤在发酵前、后呈味物质形成的机制,及其与酸汤品质提升的关系,为高品质米酸汤的工艺优化和工业化生产提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

米酸汤样品,采集于贵州省凯里市某知名酸汤企业;吡啶、氯仿均为色谱纯,阿达玛斯试剂公

司;乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯,美国CNW Technologies公司;核糖醇(标准品),纯度 $\geq 99\%$,美国Sigma公司;1%三甲基氯硅烷(TMCS),分析纯,美国REGIS Technologies公司;*N,O*-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA),分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;甲氧铵盐,分析纯,日本TCI公司;饱和脂肪酸甲酯,德国Dr. Ehrenstorfer公司;*L*-2-氯苯丙氨酸(标准品),纯度 $\geq 99\%$,上海恒柏生物科技有限公司;葡萄糖、氢氧化钠等常见试剂均为分析纯级,天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

Agilent 7890A气相色谱仪、DB-5MS毛细管柱(30 m \times 250 μm , 0.25 μm)、Agilent 1290 UHPLC超高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;Q-Exactive Focus高分辨质谱仪、PEGASUS HT质谱仪,美国LECO公司;UPLC超高压液相色谱柱HSS T3(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm),沃特世公司;明澈D24 UV纯水仪,默克密理博公司;Spectra-Max iD3酶标仪,美谷分子仪器有限公司;DF-101S磁力搅拌器,郑州生化仪器有限公司;Heracus Fresco17冷冻离心机,赛默飞世尔科技公司;Forma900 series超低温冰箱,赛默飞世尔科技公司;PS-60AL超声仪,深圳市雷德邦电子有限公司;PPHSJ-4F pH计,上海仪电科学仪器股份有限公司;DHG-9023A烘箱,上海一恒科学仪器有限公司;TNG-T98真空干燥仪,太仓市华美生化仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 样品采集 样品采集过程详见图1,按照传统的发酵方法制作,口感鲜爽、风味独特、极具地方民族特色、备受消费者喜爱的贵州省黔东南苗族侗族自治州某知名企业的米酸汤产品为本研究对象。米酸汤的主要生产工艺为:以糯米粉为原料的米汤煮沸倒入发酵缸中,冷却至室温后接种适量米酸汤母液(上一次发酵成熟的酸汤),搅拌均匀,于28~30 $^{\circ}\text{C}$ 静置发酵3~5 d即得自然发酵米酸汤。在发酵车间中不同位置选取米酸汤坛,充分搅动每坛酸汤后进行采样。每样采集3个平行样,装入密封容器中,干冰保藏运输至实验室,在-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

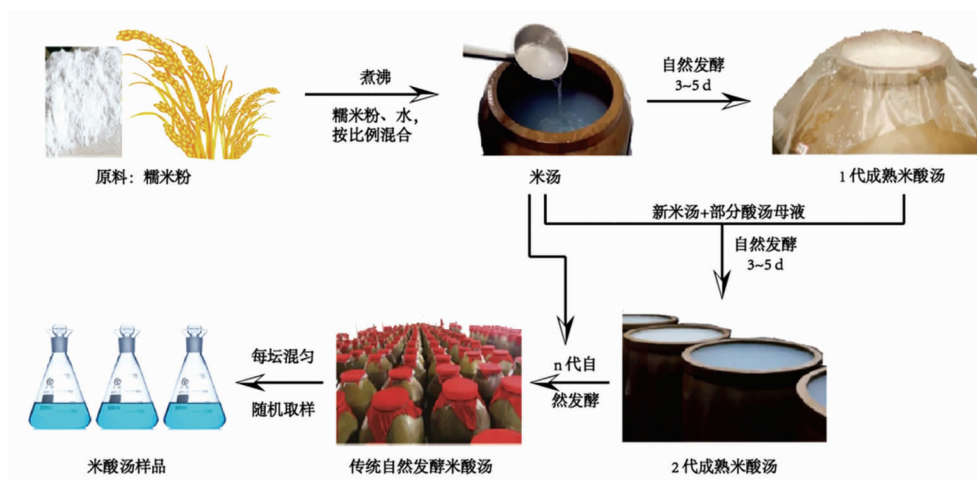


图 1 米酸汤样品取样流程图

Fig.1 Flowchart for sampling rice sour soup

1.3.2 常规理化指标分析 严格依照相关标准及方法,对米酸汤中总酸、pH 值、总糖、还原糖等理化指标进行分析。总酸参照国标 GB/T 12456-2008《食品中总酸的测定》^[17],pH 值参照国标 GB 5009.237-2016《食品安全国家标准 食品 pH 值的测定》^[18]进行测定;总糖和还原糖采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)进行测定^[19]。

1.3.3 米酸汤滋味感官分析 米酸汤滋味感官的评分标准参考王容等^[20]方法,并稍作修改。感官品评小组由经过感官培训的 10 名专业品评人员组成,5 男 5 女,年龄均在 22~26 岁之间。分别对米酸汤中的酸味、鲜味、回甜味、适口性、口感丰富度 5 个指标进行评定,评分采用百分制,具体的感官评价标准见表 1。

1.3.4 滋味性物质分析

1.3.4.1 GC-TOF-MS 分析

1) 样品衍生化处理 取米酸汤样本 200 μL 于 2 mL EP 管中,加入 600 μL 甲醇(含 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 核糖醇的内标),涡旋 30 s;冰水浴条件下,超声处理 10 min; $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h;低温($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)10 000 r/min 离心 15 min。最后,取上清液 300 μL 于 1.5 mL EP 管中,真空浓缩干燥。在获得的干燥的提取物中加 80 μL 甲氧胺盐试剂(含 20 mg/mL 甲氧胺盐盐酸盐,溶于吡啶),轻轻混匀后,置于烘箱中 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。每个样品中再加入 100 μL BSTFA 溶液(含 1%TMCS,体积分数),充分混匀后 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h 进行衍生化,最后将衍生化的提取物放入样品瓶

表 1 米酸汤感官评定指标

Table 1 Sensory evaluation score of rice sour soup

项目	评分标准	得分
回甜味(15分)	回甜味适中,口感柔和	10~15
	回甜味过重	5~10
	回甜味过浅	0~5
酸味(15分)	酸味适中,无刺激	10~15
	酸味过重,尖锐刺激	5~10
	酸味过浅,无刺激	0~5
鲜味(20分)	鲜爽适口	15~20
	有鲜味	10~15
	无明显鲜味	0~10
适口性(25分)	酸甜适中,口感协调	20~25
	酸味过重,口感不协调	15~20
	酸甜味不足,口感粗糙	10~15
	无酸甜味,口感粗糙	0~10
丰富度(25分)	余味绵长,层次感分明	20~25
	余味不长,层次感不明显	15~20
	余味短暂,无层次感	10~15
	无余味,无层次感	0~10

中进行上机检测。

2) GC-TOF-MS 检测条件 GC 条件: 采用 DB-5MS 毛细管柱(30 m \times 250 μm , 0.25 μm), 进样量为 1 μL ; 分流模式设为不分流; 升温程序设定为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 维持 1 min, 以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 $310\text{ }^{\circ}\text{C}$, 维持 8 min; 载气(He)流速 1 mL/min。

MS 条件: 采用电子电离源; 电子能量 -70 eV ;

进样口温度 280 ℃;传输线温度 280 ℃;离子源温度 250 ℃;质量扫描范围 50~500 m/z ;扫描速率 12.5 光谱/s;溶剂延迟时间 6.33 min。

1.3.4.2 UHPLC-QE-MS 分析

1) 样品处理 移取 200 μL 样品至 EP 管中,加入 600 μL 甲醇(含内标 *L*-2-氯苯丙氨酸 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$),其涡旋、超声、离心处理条件均同 1.3.4.1 节的方法;取上清液于样品瓶中,上机检测。

2) UHPLC-QE-MS 检测条件 色谱柱:色谱柱采用 HSS T3 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm);进样体积 2 μL ,流速 0.5 mL/min;流动相条件:A 相为水相,正离子模式含 0.1% 的甲酸,负离子模式含 5 mmol/L 的乙酸铵;B 相为乙腈。梯度洗脱程序:0~1.0 min, 1%B;1.0~8.0 min, 1%~99%B;8.0~10.0 min, 99%B;10.0~10.1 min, 99%~1%B;10.1~12 min, 1%B。柱温:35 ℃。

Thermo Q Exactive 质谱仪通过 Xcalibur 软件(版本:4.0.27, Thermo)对一级、二级质谱数据进行采集。鞘气流速 45 Arb,辅助气流速 15 Arb,毛细管温度 400 ℃,全毫秒分辨率 70 000 u ,MS/MS 分辨率设定为 17 500 u ,在 NCE 模式下碰撞能量为 20/40/60 eV;喷涂电压为 4.0 kV(正)或-3.6 kV(负)。

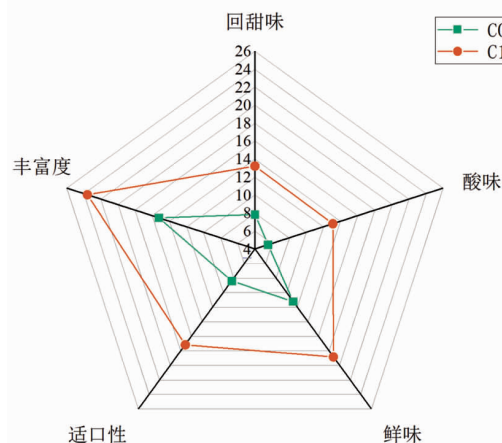
1.4 数据处理

GC-TOF-MS 原始数据使用 ChromaTOF 软件(V 4.3x, LECO),对质谱数据进行峰提取、解卷积、积分等分析^[21],最后使用 LECO-Fiehn Rtx5 数据库对峰进行定性,通过质谱匹配及保留时间指数匹配对色谱峰进行定性。UHPLC-QE-MS 原始数据经 ProteoWizard 软件转成 mzXML 格式后,使用上海百趣生物医学科技有限公司自行研发的 R 程序包(内核为 XCMS)对峰进行识别、提取、对齐和积分等处理,确定物质的匹配度,对物质进行定性分析。所有数据采用内标归一化法处理,获得各组分的半定量分析结果。最后将 GC-TOF-MS 数据和 UHPLC-QE-MS 数据进行整合,运用 SIMCA 14.1 软件、MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 模块、Excel 2020、R 语言进行数据处理,利用斯皮尔曼(Spearman)相关系数进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 感官评价结果

由图 2 可知,米酸汤在发酵后的整体感官得分均优于发酵前。发酵后,米酸汤的回甜味优于发酵前,这可能是米酸汤发酵过程中微生物将淀粉水解为麦芽糖、葡萄糖等还原糖,可使米酸汤具有一定的甜味;以及一些醇类物质,如甘油,研究表明甘油对人体味觉能感觉到的甜味有轻微影响^[22]。米酸汤发酵过程中代谢的乳酸、苹果酸、乙酸等有机酸,使酸汤口感酸爽。米酸汤中所形成的氨基酸、醇类、酯类等物质,可增加酸汤的鲜味和风味。在多种呈味物质的共同作用下,酸汤口感呈现出丰富、醇厚、余味绵长的特点。为了探究米酸汤发酵后形成酸爽、愉悦滋味的原因,本研究将对米酸汤发酵前、后理化指标和非挥发性风味物质进行测定。



注:C0表示为发酵前的米汤感官评价;C1表示为发酵后的米汤感官评价。

图 2 米酸汤发酵前后感官评分雷达图

Fig.2 Radar map of sensory evaluation for rice sour soup

2.2 理化指标分析

由表 2 可知,米酸汤发酵后总糖和还原糖含量以及 pH 值显著降低,总酸含量显著增加。这与米酸汤发酵过程中微生物通过糖酵解途径、丙酮酸代谢途径、柠檬酸盐循环等碳水化合物代谢途径消耗糖类,并代谢产乳酸等有机酸有关^[23]。

2.3 米酸汤呈味物质差异性分析

米汤发酵后获得米酸汤,在口感上存在明显

表 2 米酸汤样品发酵前、后理化指标

Table 2 Physicochemical indexes of rice sour soup before and after fermentation

理化指标	发酵阶段	
	C0	C1
总糖/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	7.599 ± 0.070^a	3.726 ± 0.457^c
还原糖/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	7.271 ± 0.077^a	1.757 ± 0.222^c
总酸/ $\text{g}\cdot(100\text{g})^{-1}$	0.103 ± 0.011^b	0.248 ± 0.005^a
pH 值	3.658 ± 0.017^a	3.236 ± 0.017^b

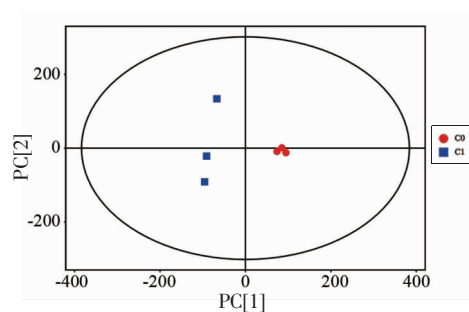
注:同一行上标不同小写字母者表示差异显著($P < 0.05$)。C0 表示发酵前,C1 表示发酵后,下同。

差异,其呈味物质差异分析详见图 3。通过非监督模型的主成分分析(Principal component analysis, PCA)及监督模型正交偏最小二乘法-判别分析(Orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)可知,在 95%置信区间内,米酸汤发酵前、后两组样本成分具有良好区分度。OPLS-DA 置换检验中, R^2Y 、 Q^2 用于评估 OPLS-DA 模型的有效性, $R^2(0, 0.99)$ 和 $Q^2(0, -0.13)$ 值越接近于 1,说明模型构建得越好,可以很好地解释米酸汤两组样本之间的差异性。这与米汤成分在自然发酵过程中,通过微生物作用将淀粉、脂肪等大分子物质分解为小分子物质,代谢产生有机酸、氨基酸、脂肪酸等小分子风味物质,由此使发酵前、后样品中物质组成具有明显差异^[7]。

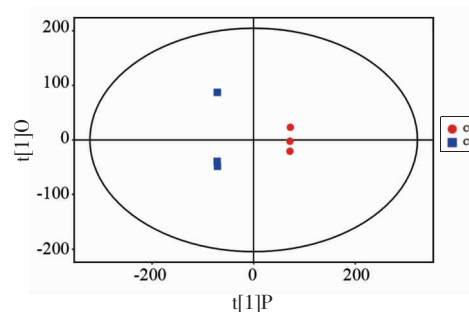
2.4 主要呈味物质及其代谢途径分析

2.4.1 主要呈味物质 为解析对米酸汤滋味产生影响的主要物质,对发酵前、后的强极性、难挥发或热不稳定的化合物(呈味物质)的相对含量进行比较,通过 OPLS-DA 模型分析,共鉴定出差异代谢物 49 种,包括 27 种有机酸,4 种氨基酸,9 种糖类及其衍生物,3 种醇类,4 种醛类,2 种酯类。发酵前、后样本的中差异代谢物的含量变化情况详见图 4。

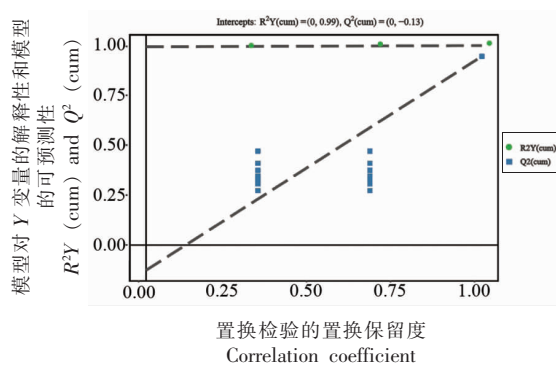
米酸汤发酵后,乳酸、琥珀酸、酒石酸等有机酸,以及一些脂肪酸在含量上发生了显著上调。有机酸在米酸汤中有呈香和呈味作用,同时也可在发酵过程中抑制杂菌生长。米酸汤中的有机酸由微生物发酵产生^[7],乳酸菌、酵母菌作为米酸汤中的优势微生物,发酵过程中对乳酸、乙酸、琥珀酸等有机酸含量的增加具有重要贡献^[7]。苹果酸和草



(a)



(b)



(c)

注:a、b、c 分别表示米酸汤发酵前、后全部样本 PCA-X 得分散点图、OPLS-DA 模型得分散点图、OPLS-DA 置换检验结果。

图 3 米酸汤发酵前、后呈味物质差异分析

Fig.3 Analysis of difference components of rice sour soup before and after fermentation

酸,作为柠檬酸盐循环中的重要中间产物,在米酸汤发酵过程中,可能被进一步代谢为其它物质,或进入其它代谢途径而被分解消耗。由图 4 可知,苹果酸和草酸在米酸汤发酵后含量降低,草酸酸味刺激,其含量降低可减缓米酸汤中酸味的刺激感。而乙酸对米酸汤的刺激感,可通过乳酸、酒石酸、琥珀酸等有机酸的相互协同,对米酸汤口感起到调节作用,使酸味变得柔和、醇厚,此外,研究表明琥珀酸还可起到增鲜作用^[24]。除此以外,研究中还

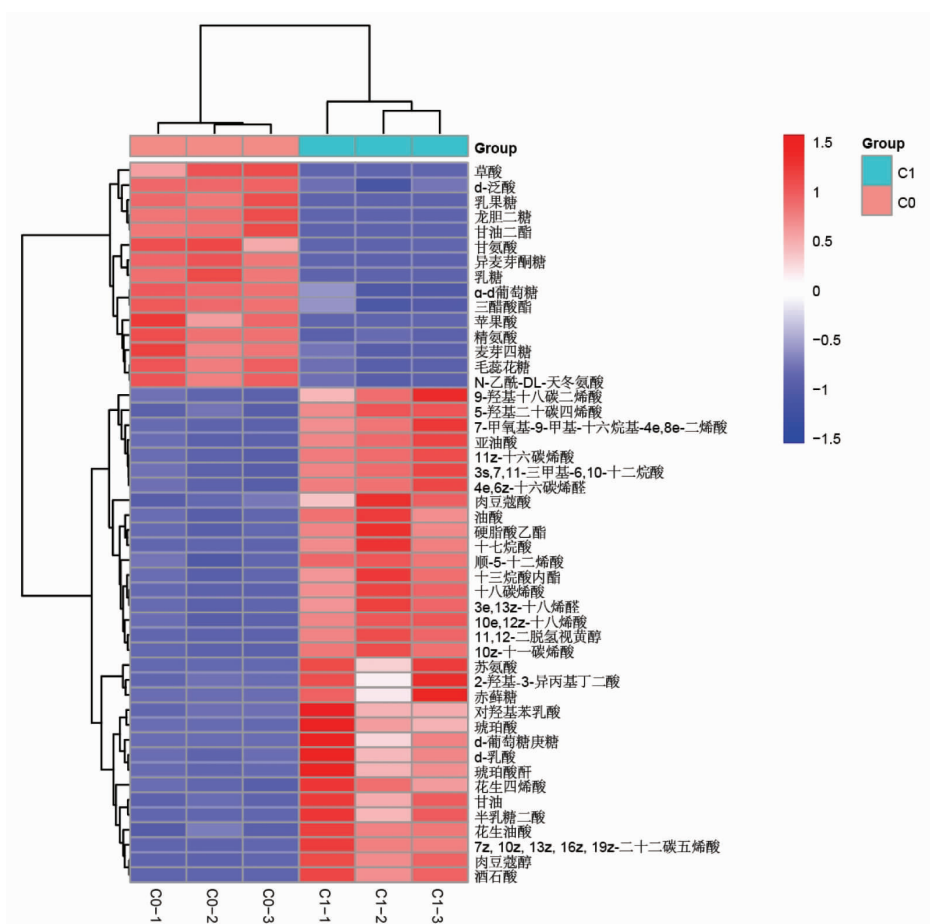


图4 米酸汤发酵前、后差异代谢物热图

Fig.4 Heat map of differential metabolites in rice sour soup before and after fermentation

发现油酸、花生四烯酸、十八碳烯酸等高级脂肪酸含量也在发酵后有所增加。高级脂肪酸与小分子有机酸的协同作用可赋予发酵食品特有的酸香味和醇香味,增加滋味的丰富度和层次感^[25-26]。

氨基酸也是发酵食品中重要的风味物质,氨基酸所赋予的如甜、鲜、酸等诸多味感,可赋予米酸汤丰富的味觉层次感,使其具有鲜美、浓郁、柔和、协调等特征。从米酸汤中筛选出的氨基酸差异代谢物质有 *N*-乙酰-*L*-天冬氨酸、苏氨酸、精氨酸、甘氨酸。天冬氨酸是 20 种蛋白质氨基酸之一,与谷氨酸同属酸性氨基酸^[27]。苏氨酸作为一种必需氨基酸,对人体具有重要的生理性能,如抗氧化,促进生长发育,增强人体免疫系统等,此外苏氨酸混合在食品中还可产生特殊香气^[28]。精氨酸与苏氨酸相似,具有多种生理功能^[29],甘氨酸作为一种增味剂,能缓和酸味和碱味。

糖作为微生物生长代谢所需的主要碳源,通

过碳水化合物代谢途径为其生长提供能量^[30]。乳果糖、乳糖、龙胆二糖、赤藓糖、异麦芽酮糖等 9 种糖类及其衍生物被鉴定为差异代谢物质。米酸汤发酵过程中,微生物将大分子糖类分解为小分子糖,或将糖类经过酶等作用后生成新的糖。葡萄糖相互作用可制得龙胆二糖,龙胆二糖是一种功能性低聚糖,用于糖果、饮料、冷饮中,可使其甜味更纯。蔗糖在 α -葡萄糖基转移酶、蔗糖异构酶的作用下可生成异麦芽酮糖,异麦芽酮糖是一种特殊甜味剂,甜味纯正,温和细致,有诸多健康生理功能。可遮蔽异味,平衡口感,改善食物风味^[31]。此外,米酸汤中筛选的差异代谢物质甘油,发酵后含量明显增加,可调节米酸汤的口感。甘油二酯口感柔软、丰满、润滑,风味特殊,还可作为食品的功能性油脂使用^[32-33]。

2.4.2 主要代谢途径分析 发酵后各种呈味物质的产生与微生物的代谢作用密不可分,本研究借

助 MetaboAnalyst 4.0 富集分析对所有差异代谢物进行代谢通路的生物信息学分析,共获得 27 条代谢途径;通过影响值(Impact > 0.01)对关键代谢途径进行筛选^[34],由图 5 可知,共有甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(Impact = 0.306)、甘油酯代谢(Impact = 0.285)、丙酮酸代谢(Impact = 0.109)、乙醛酸和二羧酸代谢(Impact = 0.104)等 10 条关键代谢途径。

10 条关键代谢途径中主要参与的差异代谢物有甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、琥珀酸酯、草酸盐、乳酸、泛酸、甘油。米酸汤发酵过程中原料中的淀粉、蔗糖等多糖可被微生物水解为葡萄糖和果糖等,葡萄糖可通过微生物在糖酵解途径中代谢的酶(如葡萄糖激酶、丙酮酸激酶、磷酸丙酮异构酶等)的作用下,生成丙酮酸,进入三羧酸循环,进而产生米酸汤中的多种有机酸。甘油酯代谢途径中,甘油可通过米酸汤原料中的脂肪在各种酶的作用下降解产生;甘油也可在氨基酸代谢途径中通过羟基丙酮酸进一步合成;此外,乳糖在酶的作用下也可生成甘油。有研究表明,酵母菌在乙醇发酵阶段的重要副产物甘油,能帮助细胞适应发酵液中的环境变化^[35]。随后,甘油在酶的作用下生成磷酸烯醇式丙酮酸,进入丙酮酸代谢、柠檬酸盐循环,以及泛酸和 CoA 生物合成途径。琥珀酸主要通过柠檬酸盐循环产生,具有酸味,可调和米酸汤的酸味。精氨酸可在乙醛酸和二羧酸代谢、精氨酸生物合成途径中生成,甘氨酸、苏氨酸可在甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、甲烷代谢、谷胱甘肽代谢中生成,精氨酸、甘氨酸、苏氨酸均可在酶的作用下进入柠檬酸盐循环。部分有机酸和氨基酸共同作用还可促进风味的形成,如琥珀酸与鲜味氨基酸合用时,对鲜味起到增效的作用^[36]。米酸汤中微生物通过各种代谢途径产生的多种呈味物质,共同为米酸汤独特滋味的形成做贡献。

2.5 米酸汤滋味特征与差异代谢物的相关性

本研究通过关联分析,分析了米酸汤滋味指标与关键差异代谢物间的关联性,通过两者的斯皮尔曼(spearman)相关系数,绘制了热图(图 6),图中颜色越红,说明两者间呈现越紧密的正相关关系,越蓝呈现越紧密的负相关关系。其中,米酸汤中酸味主要与油酸、亚油酸、肉豆蔻酸、3s,7,

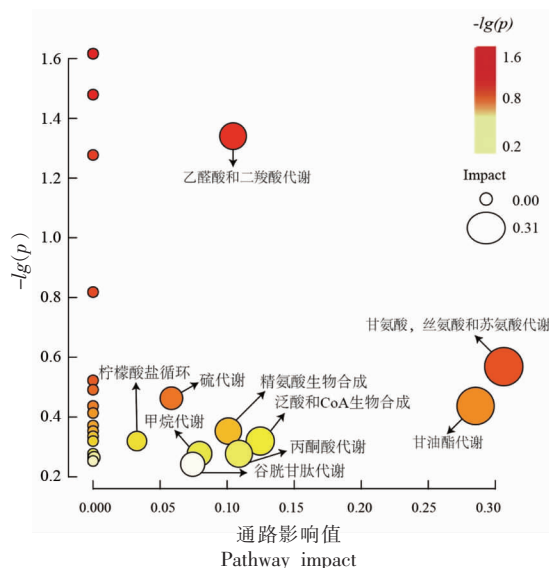


图 5 差异代谢物通路富集分析

Fig.5 Enrichment analysis of differential metabolite pathways

11-三甲基-6,10-十二烷酸(月桂酸)等脂肪酸呈正相关关系。这与魏光强等^[25]研究的传统酸凝乳饼中,酸味与月桂酸、亚油酸、肉豆蔻酸等脂肪酸呈正相关的结果相似。科学家研究发现脂肪酸具有酸、甜、苦、咸、鲜 5 种基本味道^[37],脂肪酸与舌面味蕾细胞的 GPR40 受体和 GPR120 受体相互作用^[37],随后通过延迟整流钾通路或刺激 CD36 糖蛋白受体等途径而被感知^[38-39]。乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等有机酸也与酸味呈正相关关系,有机酸中的氢离子刺激舌黏膜而引起的味感,即为酸感,食品中多数有机酸能赋予食品爽口的酸感。食品的酸感与有机酸酸根的种类,pH 值大小,共存的其它物质所带来的缓冲效应有关,如糖能很好地缓解食品中酸性物质带来的酸感。异麦芽酮糖、乳糖、甘氨酸与米酸汤的鲜味呈正相关,鲜味具有平衡酸、甜、苦、咸和风味增强的综合作用,并不是作为一种简单的味觉存在。呈鲜物质通过激活 α -味觉蛋白,传递促发与呈鲜物质相关的反应,通过特定的神经感觉系统传导至大脑的味觉中枢,以产生味感^[40]。异麦芽酮糖可平衡口感^[31],甘氨酸作为呈味氨基酸,可有效丰富食品的味道^[41]。赤藓糖甜味爽口^[42],甘油和苏氨酸具有轻微甜味^[22,25],其均与米酸汤的适口性呈正相关。乳果糖、 α -D-葡萄糖、毛蕊花糖、麦芽四糖、N-乙酰基-DL-天冬氨酸、三醋酸酯等与米酸汤回甜味呈正相关。甜味感

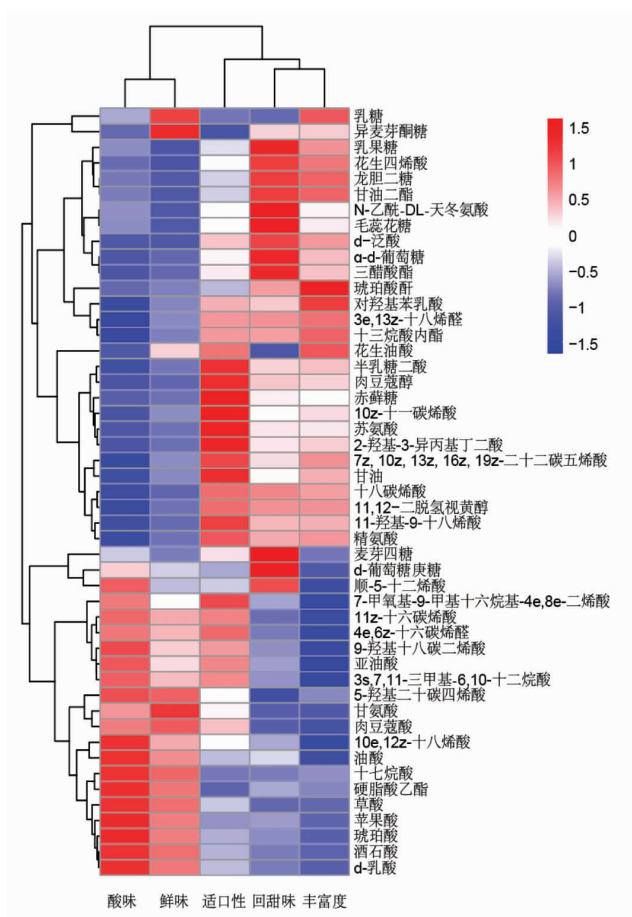


图6 米酸汤滋味指标与差异代谢物的相关性热图

Fig.6 Heat map of correlation between taste indicators and differential metabolites of rice sour soup

觉主要是呈味物质分子中含有的羟基与甜味感受蛋白中的氨基结合形成氢键,以刺激味觉感受器,进而由神经递质传入大脑,使人感到甜味^[43],肽的氨基端是天门冬氨酸的二肽衍生物也有强烈的甜味^[44]。琥珀酸酐、对羟基苯乳酸、乳糖等与米酸汤口感丰富度呈正相关关系。

3 结论

米酸汤因其独特的口感和风味,成为我国贵州黔东南地区传统发酵食品的典型代表,现正以其保健功能和独特的口感受到广大消费者的青睐。为了解米酸汤主要呈味物质及形成机理,以及对滋味的影响。本研究通过衍生化结合 GC-TOF-MS 和 UHPLC-QE-MS 非靶标代谢组学联用技术,以及感官分析,对贵州传统自然发酵米酸汤发酵前、后的理化成分,差异代谢物进行分析。结果表明,米酸汤发酵后,总体感官结果均与发酵前呈

显著差异,总糖、还原糖含量和 pH 值呈明显下降趋势,总酸含量则相反。米酸汤发酵前、后主要呈味物质中,有 49 种非挥发性差异代谢物,使用 MetaboAnalyst 4.0 对其代谢通路进行分析,发现在 27 条代谢途径中有 10 条被鉴定为关键代谢途径。将滋味指标与 49 种差异代谢物质进行相关性分析,获悉油酸、亚油酸、肉豆蔻酸等脂肪酸,乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等有机酸与米酸汤的酸味呈正相关。异麦芽酮糖、乳糖、甘氨酸与鲜味,赤藓糖、甘油和苏氨酸与适口性,乳果糖、 α -D-葡萄糖、毛蕊花糖、麦芽四糖、N-乙酰基-DL-天冬氨酸、三醋酸酯与回甜味,琥珀酸酐、对羟基苯乳酸、乳糖等与口感丰富度均呈正相关关系。

本研究借助先进的检测手段和多元统计分析,解析了对酸汤滋味有重要影响的物质,为下一步筛选能干预或强化酸汤发酵的功能微生物筛选,优化酸汤发酵工艺及稳定和提高工业化生产中酸汤品质奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [1] 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, 97(4): 137-148.
- [2] 肖甜甜, 冯子娟, 邱树毅, 等. 苗家白酸汤中微生物群落多样性研究及其优势微生物的筛选[J]. 食品与发酵科技, 2021, 57(1): 1-11, 45.
- [3] XIAO T T, FENG Z J, QIU S Y, et al. Microbial community diversity and acquisition of dominant microorganisms in Hmong rice acid soup[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2021, 57(1): 1-11, 45.
- [4] 汤庆莉, 杨占南, 吴天祥. 贵州省苗族发酵型酸汤中特征性成分的初步研究[J]. 食品工业科技, 2005, 26(9): 165-166.
- [5] TANG Q L, YANG Z N, WU T X. Preliminary study on the characteristic components of Miao fermented acid soup in Guizhou province[J]. Science and Technology of Food Industry, 2005, 26(9): 165-166.
- [6] 周文美. 苗家珍珠-酸汤[J]. 江苏调味副食品, 2004, 21(4): 27-28.

- ZHOU W M. Miao family treasure-sour soup[J]. *Jiangsu Condiment and Subsidiary Food*, 2004, 21(4): 27-28.
- [5] 张东亚. 红酸汤发酵工艺优化及品质控制研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2018.
- ZHANG D Y. Study on fermentation technology and quality control of red acid soup[D]. Guiyang: Guizhou University, 2018.
- [6] 田亚. 贵州米酸汤优势微生物与品质特性的相关性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
- TIAN Y. Study on the correlation between dominant microorganism and quality characteristics of Guizhou rice acid soup [D]. Guiyang: Guizhou University, 2020.
- [7] LIU N, PAN J, 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, 1(1): 137-147.
- [8] 王容, 赵良忠, 李明, 等. 米酸汤在发酵过程中品质变化及发酵动力学研究[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(1): 82-90.
- WANG R, ZHAO L Z, LI M, et al. Study on the quality change and fermentation kinetics of rice sour soup during fermentation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(1): 82-90.
- [9] 汪建国, 冯德明. 嘉兴玫瑰米醋中有机酸风味特征的分析探讨[J]. *江苏调味副食品*, 2011, 28(1): 27-29.
- WANG J G, FENG D M. Analysis of organic acid flavor in Jiaying rose rice vinegar[J]. *Jiangsu Condiment and Subsidiary Food*, 2011, 28(1): 27-29.
- [10] HARADA R, YUZUKI M, ITO K, et al. Microbe participation in aroma production during soy sauce fermentation[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 125(6): 688-694.
- [11] SUZUKI-IWASHIMA A, MATSUURA H, IWASAWA A, et al. Metabolomics analyses of the combined effects of lactic acid bacteria and *Penicillium camemberti* on the generation of volatile compounds in model mold-surface-ripened cheeses[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 129(3): 333-347.
- [12] ZHANG J, YI Y, PAN D, et al. H-1 NMR-based metabolomics profiling and taste of boneless dry-cured hams during processing[J]. *Food Research International*, 2019, 12(2): 114-122.
- [13] PAVLIDIS D E, MALLOUCHOS A, ERCOLINI D, et al. A volatilomics approach for off-line discrimination of minced beef and pork meat and their admixture using HS-SPME GC/MS in tandem with multivariate data analysis[J]. *Meat Science*, 2019, 151(10): 43-53.
- [14] 任向楠, 梁琼麟. 基于质谱分析的代谢组学研究进展[J]. *分析测试学报*, 2017, 36(2): 161-169.
- REN X N, LIANG Q L. Progress in metabolomics based on mass spectrometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2017, 36(2): 161-169.
- [15] LI Q, JIN Y, JIANG R, et al. Dynamic changes in the metabolite profile and taste characteristics of Fu brick tea during the manufacturing process[J]. *Food Chemistry*, 2021, 344(15): 354-362.
- [16] 宋鸣, 贾薇. 用于 GC-MS 分析的衍生化方法[J]. *分析测试学报*, 2001, 20(21): 135-136.
- SONG M, JIA W. Derivatization procedures for gas chromatography-mass spectrometric determination[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2001, 20(21): 135-136.
- [17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 食品中总酸的测定: GB/T 12456-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 12.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, China Standardization Administration. Determination of total acids in food: GB/T 12456-2008[S]. Beijing: China Standards Press, 2008: 12.
- [18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品 pH 值的测定: GB 5009.237-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 8.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Determination of pH of food: GB 5009.237-2016 [S]. Beijing: China Standards Press, 2016: 8.
- [19] 刘彩婷, 周鸿翔. 不同发酵工艺对蓝莓果酒品质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(4): 172-179.
- LIU C T, ZHOU H X. Effects of different fermentation techniques on the quality of blueberry wine[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(4): 172-179.
- [20] 王容, 赵良忠, 莫鑫, 等. 米酸汤发酵工艺优化及贮存稳定性预测模型[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(6): 191-198.

- WANG R, ZHAO L Z, MO X, et al. Research on the optimization of fermentation technology and the prediction model of storage stability of rice acid soup[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(6): 191-198.
- [21] KIND T, WOHLGEMUTH G, LEE D Y, et al. FiehnLib: Mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(24): 10038-10048.
- [22] SEO S H, PARK S E, YOO S A, et al. Metabolite profiling of Makgeolli for the understanding of yeast fermentation characteristics during fermentation and aging[J]. Process Biochemistry, 2016, 51(10): 1363-1373.
- [23] 姜丽, 苏伟, 母应春, 等. 基于 GC-TOF-MS 代谢组学研究高度黑糯米酒后发酵阶段代谢差异[J]. 食品科学, 2020, 41(14): 88-94.
- JIANG L, SU W, MU Y C, et al. Metabolic differences in post-fermentation stage of high black glutinous rice wine based on GC-TOF-MS metabolomics[J]. Food Science, 2020, 41(14): 88-94.
- [24] 郑梦林, 田争福, 徐沁怡, 等. 镇江香醋陈酿过程中主要呈味物质的分析[J]. 食品工业科技, 2021, 42(6): 241-246, 251.
- ZHENG M L, TIAN Z F, XU Q Y, et al. Analysis of main flavor substances in aging of Zhenjiang aromatic vinegar[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(6): 241-246, 251.
- [25] 魏光强, 李子怡, 黄艾祥, 等. 基于游离氨基酸、挥发性组分和感官评价的 2 种酸化技术加工乳饼的滋味特征差异分析[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 263-269.
- WEI G Q, LI Z Y, HUANG A X, et al. Differential taste characteristics of milk cakes processed by two acidification methods revealed by free amino acids, volatile compounds and sensory evaluation[J]. Food Science, 2021, 42(22): 263-269.
- [26] KRUIS A J, BOHNENKAMP A C, PATINIOS C, et al. Microbial production of short and medium chain esters: Enzymes, pathways, and applications[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(7): 156-161.
- [27] 徐煜, 蒋德意, 韩迪. 植物乳杆菌 Lp-G18 谷氨酰胺合成酶活力发酵工艺优化[J]. 乳业科学与技术, 2019, 42(2): 13-17.
- XU Y, JIANG D Y, HAN D. Optimization of *Lactobacillus plantarum* Lp-G18 glutamine synthetase activity fermentation technology[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2019, 42(2): 13-17.
- [28] 赵磊. 大肠杆菌 L-苏氨酸生产菌代谢工程改造优化[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- ZHAO L. Optimization of metabolic engineering of *Enterobacter L*-threonine production bacteria[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [29] LIU T, LI Y, YANG Y, et al. The influence of different lactic acid bacteria on sourdough flavor and a deep insight into sourdough fermentation through RNA sequencing[J]. Food Chemistry, 2020, 307(1): 307-318.
- [30] LEE D E, LEE S, JANG E S, et al. Metabolomic profiles of *Aspergillus oryzae* and *Bacillus amyloliquefaciens* during rice koji fermentation[J]. Molecules, 2016, 21(6): 15.
- [31] HOLUB I, GOSTNER A, THEIS S, et al. Novel findings on the metabolic effects of the low glycaemic carbohydrate isomaltulose (Palatinose™)[J]. British Journal of Nutrition, 2010, 103(12): 1730-1737.
- [32] 陈琼, 杨雪, 赵金利, 等. 酶法制备甘油二酯与甘油三酯的结晶特性研究[J]. 中国油脂, 2015, 40(11): 48-53.
- CHEN Q, YANG X, ZHAO J L, et al. Crystallization characteristics of diglycerol and triglyceride prepared by enzymatic method[J]. China Oils and Fats, 2015, 40(11): 48-53.
- [33] MATSUMIYA K, SASAKI M, MURAKAMI H, et al. Oil droplet coalescence does not necessarily affect the flavor release from oil-in-water emulsions[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2015, 475: 19-26.
- [34] WEN B, JIN S R, CHEN Z Z, et al. Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) revealed by conventional biochemical assays and GC-TOF-MS metabolomics[J]. Science of the Total Environment, 2018, 640: 1372-1381.
- [35] FAIRBAIRN S, ENGELBRECHT L, SETATI M E, et al. Combinatorial analysis of population dynamics, metabolite levels and malolactic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*/ *Lachancea thermotolerans* mixed fermentations[J]. Food Microbiology, 2021, 96: 1037-1042.

- [36] 吴娜, 顾赛麒, 陶宁萍, 等. 鲜味物质间的相互作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(10): 389-392, 400.
WU N, GU S Q, TAO N P, et al. Research progress on interaction between flavor substances[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(10): 389-392, 400.
- [37] 日本发现脂肪酸为酸、甜、苦、咸、鲜后第6种基本味道的证据[J]. 中国食品学报, 2019, 19(2): 46.
Evidence found in Japan for acid, sweet, bitter, salty, fresh sixth basic taste[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(2): 46.
- [38] 胡小雪, 陈建设, 王鑫森. 食品中脂肪的感官机制研究进展[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 370-376.
HU X X, CHEN J S, WANG X M. Research progress on sensory mechanism of fat in food[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(1): 370-376.
- [39] KULKARNI B, MATTES R. Evidence for presence of nonesterified fatty acids as potential gustatory signaling molecules in humans [J]. Chemical Senses, 2013, 38(2): 133-140.
- [40] NELSON G, CHANDRASHEKAR J, HOON M A, et al. An amino-acid taste receptor[J]. Nature: International Weekly Journal of Science, 2002, 416(6877): 122-133.
- [41] HONG L, XIAOXUE W, BIN Z, et al. Comparison of taste components between triploid and diploid oyster[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2002, 1(1): 11-23.
- [42] NIANG P M, ARGUELLES-ARIAS A, STEELS S, et al. In *Yarrowia lipolytica* erythritol catabolism ends with erythrose phosphate[J]. Cell Biology International, 2020, 44(2): 651-660.
- [43] 史卿. 人工甜味剂诱发小鼠葡萄糖耐受性改变及饮食调节机制研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2019.
SHI Q. Changes of glucose tolerance induced by artificial sweeteners and the mechanism of diet regulation in mice[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2019.
- [44] 杨荣华. 食品的滋味研究(上)[J]. 中国调味品, 2003(6): 39-41, 48.
YANG R H. Study on the taste of food (above)[J]. China Condiment, 2003(6): 39-41, 48.

Effects of Flavor Components on Taste in Guizhou Rice Sour Soup

Xiao Tiantian^{1,2}, Gan Zhaobo³, Wu Junhai^{1,2}, Feng Zijuan^{1,2}, Qiu Shuyi^{1,2}, Wu Xinying^{1,2*}

(¹School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025

²Guizhou Key Lab of Fermentation Engineering and Biological Pharmacy, Guizhou University, Guiyang 550025

³Shandong Bailong Chuangyuan Biotechnology Co., Ltd., Dezhou 253000, Shandong)

Abstract Rice sour soup is a traditional fermented food with sour taste, unique flavor and various health functions, which is formed by spontaneous fermentation with glutinous rice flour. To understand the effect of flavors on the taste of rice sour soup, we systematically evaluated the taste of rice sour soup and analyzed the taste-related compounds and using untargeted metabolomics techniques based on gas chromatography time-of-flight mass spectrometer (GC-TOF-MS) coupled with derivatization and ultrahigh-performance liquid chromatography coupled with QExactive HF-X mass spectrometry (UHPLC-QE-MS). The results showed that 49 different metabolites were identified based on VIP (variable importance of projection) > 1.00 and $P < 0.05$, including 27 organic acids, four amino acids, nine carbohydrates, three alcohols, four aldehydes and two esters. And then, the metabolite pathways related different metabolites were revealed that there were ten significant differential metabolic pathways (Impact > 0.01, $P < 0.05$). Finally, the correlation analysis of different metabolites and taste indicators of sour soup revealed that there were the statistically significant positive relationships between fatty acids (oleic acid, linoleic acid, and myristic acid), organic acids (lactic acid, tartaric acid, malic acid, succinic acid) and the sour taste; between isomaltulose, lactose, glycine and umami; between erythritol, glycerol, threonine and palatability; between lactulose, α -D-glucose, mullein, maltotetraose, N-acetyl-DL-aspartic acid and after-taste; between succinic anhydride, p-hydroxyphenyl lactate, lactose and mouthfeel richness. Therefore, this study analyzed the relationship between flavors and taste of fermented rice sour soup, and laid an important theoretical foundation for the stability and improvement of sour soup quality in industry.

Keywords Guizhou rice sour soup; spontaneous fermentation; taste-related compounds; taste; correlation analysis