

发酵方式对贻贝蒸煮液品质及挥发性物质的影响

宋妍灵¹, 刘晓霞¹, 王士桢¹, 郑振霄^{1*}, 徐雪姣^{2*}

¹浙江工商大学海洋食品研究院 全省食品微生物与营养健康重点实验室 杭州 310012

²浙江树人学院 生物与环境工程学院 杭州 310015)

摘要 为研究不同发酵方式对贻贝蒸煮液品质及挥发性物质的影响,采用乳酸菌单独发酵、酵母菌单独发酵以及乳酸菌/酵母菌混种发酵对贻贝蒸煮液进行发酵处理,并通过监测发酵期间样品的 pH 值、葡萄糖含量、可溶性总氮(TSN)含量、氨基酸态氮(AAN)含量、游离氨基酸(FAA)含量及有机酸(柠檬酸、苹果酸、乳酸和琥珀酸)含量的变化,研究不同发酵方式对贻贝蒸煮液品质的影响。采用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)分析发酵后贻贝蒸煮液中挥发性物质种类和含量的变化,研究不同发酵方式对贻贝蒸煮液挥发性物质的影响。结果表明,混种发酵组具有最低的 pH 值(4.6),葡萄糖含量(6.36 mg/mL)和三甲胺含量(22.15 μg/mL),最高的 TSN 含量(18.68 μg/mL)、FAA 含量(24.21 mg/mL)和 AAN 含量(77.39 mg/mL)。此外,混种发酵能够产生更多的挥发性醇类、酸类和酯类,并减少样品中不饱和醛、胺类等不愉快风味物质的含量。乳酸菌/酵母菌混种发酵使样品具有更好的品质和风味,适合贻贝蒸煮液的发酵处理。研究结果为贻贝蒸煮液的综合利用提供参考。

关键词 乳酸菌; 酵母菌; 发酵; 贻贝蒸煮液; 品质; 挥发性物质

文章编号 1009-7848(2024)11-0233-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.11.022

贻贝是一种以营足丝附着生活的双壳类软体动物,繁殖能力强,产量高,在澳大利亚、北欧、北美都有大量的贻贝养殖基地,在我国的山东、浙江、福建等沿海省份也有大量养殖^[1]。贻贝富含多种营养元素,素有“海底鸡蛋”之美誉。贻贝富含人体所需的 8 种必需氨基酸,并且,贻贝肉中的牛磺酸含量高达 3%,能促进儿童大脑的生长发育^[2]。贻贝中 n-3 PUFA 的含量也很丰富,其中 EPA 和 DHA 的含量占比高达 30%左右,EPA 和 DHA 具有促进炎症的消退,预防动脉粥样硬化等功效^[3]。因此,贻贝是人类重要的营养素来源。然而,贻贝收获季节温度较高,时间短且产量大,采捕后不及时加工处理,极易发生腐败变质。为延长贻贝的贮藏期,人们通常将收获的贻贝经蒸煮后制成干制品或冻品进行贮藏,在此过程中,会产生大量的贻贝蒸煮液。据报道,每加工 1 t 的贻贝,就会产生 1.5 t 的蒸煮液,将贻贝蒸煮液直接排放,不仅污染环境,而且造成营养素的浪费^[4-5]。对贻贝蒸煮液进行综合利用,不仅能提高贻贝产品的附加值,而且

能减少环境污染。

贻贝蒸煮液中富含蛋白质、氨基酸、多糖等营养物质,是制作海鲜酱油的优良来源^[6]。传统海鲜酱油的制作是将新鲜生鱼与盐混合,经早期发酵、中期发酵和后期发酵而得。自发发酵的海鲜酱油虽具有独特的风味,但发酵时间较长,通常为几个月甚至 1 年以上。同时,环境参数难以控制,不良菌株产生的代谢物有时会导致发酵异常,产品质量差。在原料中直接添加发酵剂(微生物、酶、曲)可以较好地控制发酵过程,并使发酵过程标准化^[7-8]。Gao 等^[9]以乳杆菌和酵母菌为发酵剂,对斑点叉尾鲷鱼骨的酶解液进行快速发酵,制得低盐且具有良好风味的海鲜酱油。Sun 等^[10]采用米曲霉对鲢鱼酶解产物进行快速发酵以制备鳃鱼鱼露,结果表明米曲霉快速发酵能显著改善样品的风味和营养价值,并减少其中生物胺的含量。然而,以贻贝蒸煮液为原料,对其进行发酵处理以制备海鲜调味料基料,并研究不同发酵方式对其品质及挥发性物质的影响还未见报道。

本研究以贻贝蒸煮液为原料,采用不同发酵方式(乳酸菌单独发酵、酵母菌单独发酵和乳酸菌/酵母菌混种发酵)对其进行发酵处理,研究发酵过程中的可溶性总氮(Total soluble nitrogen, TSN)含量、氨基酸态氮(Amino acid nitrogen,

收稿日期: 2023-11-29

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD2100004)

第一作者: 宋妍灵,女,硕士生

通信作者: 郑振霄 E-mail: zzx@zjgsu.edu.cn

徐雪姣 E-mail: xuxuejiao@zjsru.edu.cn

AAN)含量、游离氨基酸(Free amino acids, FAA)含量及有机酸(柠檬酸、苹果酸、乳酸和琥珀酸)含量的变化,阐明不同发酵方式对贻贝蒸煮液营养成分和呈味成分的影响。采用GC-MS分析发酵过程中挥发性物质的变化,为贻贝蒸煮液的综合利用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

贻贝蒸煮液,舟山市嵊泗县华利水产有限责任公司;乳酸菌(*Lactobacillus fermentum*)和酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*),中国普通微生物菌种保藏管理中心;MRS培养基、PDA培养基,杭州微生物试剂有限公司;其它试剂购于国药集团上海有限公司。

1.2 主要设备

pH计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;2695型高效液相色谱仪:沃特世科技(上海)有限公司;L-8800高速氨基酸分析仪,日本HITACHI公司;Trace GC Ultra气相色谱与DSQ II质谱联用仪,美国赛默飞世尔科技公司;DK-8D恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司;BSD-YX 2200型智能精密摇床,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;MLS-3781L型灭菌锅,日本松下电器产业株式会社。

1.3 方法

1.3.1 发酵剂的制备 取适量乳酸菌、酵母菌分别接种于MRS、PDA液体培养基中,30℃摇床内培养36 h,离心取菌体,并用0.9%的灭菌生理盐水清洗2次,调整菌悬液的浓度为 $10^8\sim 10^9$ CFU/mL。

1.3.2 试验分组 发酵前在每组样品中添加质量分数为2%的葡萄糖以更好地促进发酵剂的生长。采用PBS缓冲液将样品的pH调至7.0,然后将样品煮沸10 min,以抑制样品中杂菌的繁殖。取适量的贻贝蒸煮液平均分成4组:第1组为100 mL样品+8 mL无菌生理盐水;第2组为100 mL样品+8 mL乳酸菌悬液;第3组为100 mL样品+8 mL酵母菌悬液;第4组为100 mL样品+4 mL乳酸菌悬液+4 mL酵母菌悬液,所有样品组均在37℃摇床中发酵72 h。分别在第0,1,2,3天取样分析。

1.3.3 pH值、葡萄糖含量和TSN含量的测定 采用pH计直接测量样品pH值,葡萄糖含量按照DNS(3,5-二硝基水杨酸)法进行测定^[11],TSN含量参照Jiang^[12]的方法进行测定。

1.3.4 AAN、三甲胺(Trimethylamine, TMA)和FAA含量的测定 AAN和TMA含量参照Zhu等^[13]和Dissaraphong等^[14]的方法进行测定,FAA含量参照Gao等^[15]的方法进行。

1.3.5 有机酸含量的测定 采用高效液相色谱法检测样品中柠檬酸、苹果酸、乳酸和琥珀酸的含量,并通过对应的标准品实现不同有机酸的定性和定量分析^[16]。

1.3.6 挥发性物质含量的测定 采用顶空固相微萃取-气质联用对样品中的挥发性物质进行检测。首先吸取适量的样品放置于顶空萃取进样瓶中,萃取头为50/30 μm DVB/CAR/PDMS纤维,老化温度为250℃,解析时间为10 min,自动进样。气相色谱条件和质谱条件参照陶美洁等^[9]的方法进行测定。

1.4 数据分析

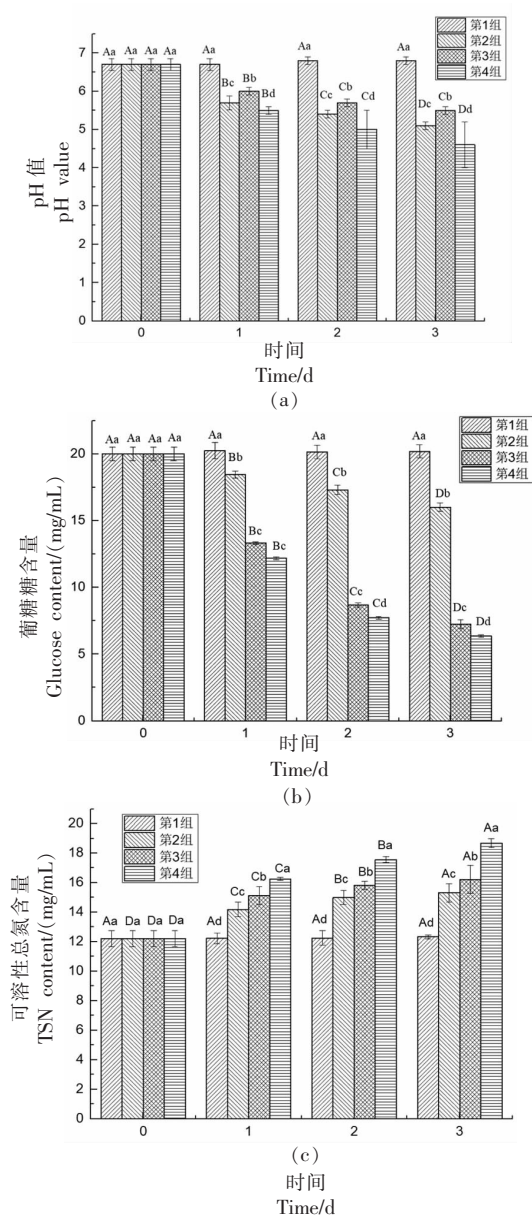
设置3次平行试验,数据采用平均值 \pm 标准差表示,采用SPSS 16.0软件进行数据分析,采用OriginPro 9.0软件作图,并通过单因素方差分析中的Duncan氏多重极差检验进行显著性分析,显著性差异表示为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 pH值、葡萄糖和TSN含量的变化

不同发酵方式对贻贝蒸煮液pH值的影响如图1a所示。第1组样品的pH值在整个发酵过程中保持稳定,其它组的pH值出现不同程度的下降。在pH值下降的样品组中,第4组的pH值下降幅度最大(从6.7下降到4.6),其次为第2组(从6.7下降到5.1),第3组(从6.7下降到5.5)。其中,第4组和第2组均接种了乳酸菌,乳酸菌在发酵过程中能产生大量乳酸等有机酸,导致样品的酸度升高,使得样品的pH值出现大幅下降。

不同发酵方式对贻贝蒸煮液葡萄糖含量的影响如图1b所示。发酵过程中,第1组样品中的葡萄糖含量保持恒定,其它组出现了不同程度的下降,其中第4组的下降趋势最为显著(从20 mg/



注: 不同小写字母表示不同处理组在相同发酵阶段的数据具有显著差异 ($P < 0.05$); 不同大写字母表示同一处理组在不同发酵阶段的数据具有显著差异 ($P < 0.05$), 下同。

图 1 不同发酵方式对贻贝蒸煮液 pH 值(a)、葡萄糖含量(b)和可溶性总氮含量(c)的影响

Fig.1 Effects of different fermentation methods on pH value (a), glucose content (b), and TSN content (c) in mussel cooking liquor

mL 下降到 6.36 mg/mL), 其次为第 3 组 (从 20 mg/mL 下降到 7.25 mg/mL), 第 2 组的下降最少 (从 20 mg/mL 下降到 16.01 mg/mL)。通常情况下, 酵母菌能参与碳水化合物的酵解, 产生诸多蛋白酶和

风味物质, 与酵母菌相比, 乳酸菌代谢利用葡萄糖的效率要低很多, 这导致单独接种乳酸菌样品组中的葡萄糖下降的趋势显著低于其它组^[17]。

在发酵过程中, TSN 含量反映了样品中蛋白质的降解程度和样品中含氮物质的含量。因此, TSN 含量是反映发酵品质的重要指标。不同发酵方式对样品中 TSN 含量的影响如图 1c 所示, 其中第 1 组的 TSN 含量总体保持稳定, 其它组均有不同程度的升高。在升高的组别中, 第 4 组的增加幅度最为显著 (从 12.21 mg/mL 增加到 18.68 mg/mL), 第 2 组和第 3 组虽也呈增加趋势, 但两者无显著差异。

2.2 AAN 含量和 TMA 含量的变化

AAN 含量反映了酱油制品中游离氨基态氮的含量, 一般来讲, AAN 含量的含量越高, 其鲜味越浓郁。不同发酵方式对贻贝蒸煮液中 AAN 含量的影响如图 2a 所示。在发酵过程中, 第 1 组 AAN 的含量保持稳定, 其它组 AAN 的含量都出现了增加, 其中第 4 组的增加最为显著 (38.15 mg/mL 增加到 77.39 mg/mL), 其次为第 3 组 (38.15 mg/mL 增加到 60.19 mg/mL), 再次为第 2 组 (38.15 mg/mL 增加到 55.32 mg/mL)。由于酵母菌在发酵过程中能产生许多蛋白酶, 蛋白酶可以分解贻贝蒸煮液中的水溶性蛋白产生相应的氨基酸, 从而增加样品中 AAN 的含量。TMA 是鱼腥味的主要成分, TMA 在新鲜的海产中以氧化三甲胺 (TMAO) 的形式存在, TMAO 赋予海产以清新的香味, 随着贮藏时间的延长, 海产中的微生物不断增殖, TMAO 在微生物分泌的还原酶的作用下, 被还原成 TMA, TMA 不仅没有海鲜香味, 且呈令人不愉快的腥味^[18]。不同发酵方式对贻贝蒸煮液中 TMA 含量的影响如图 2b 所示, 第 1 组 TMA 在发酵过程中略有增加, 其它组均出现显著下降, 这样的结果表明乳酸菌和酵母菌对 TMA 具有一定的降解作用。某些特定的微生物在新陈代谢过程中会分泌特定的酶类, 将 TMA 分解为氨和甲醛, 有关乳酸菌和酵母菌分解代谢 TMA 的机制还有待进一步研究。

2.3 FAA 含量的变化

在蒸煮贻贝的过程中, 贻贝肉中的水溶性蛋白会游离出来, 融入贻贝蒸煮液中。在发酵过程中, 发酵剂产生的蛋白酶, 能够将贻贝蒸煮液中的

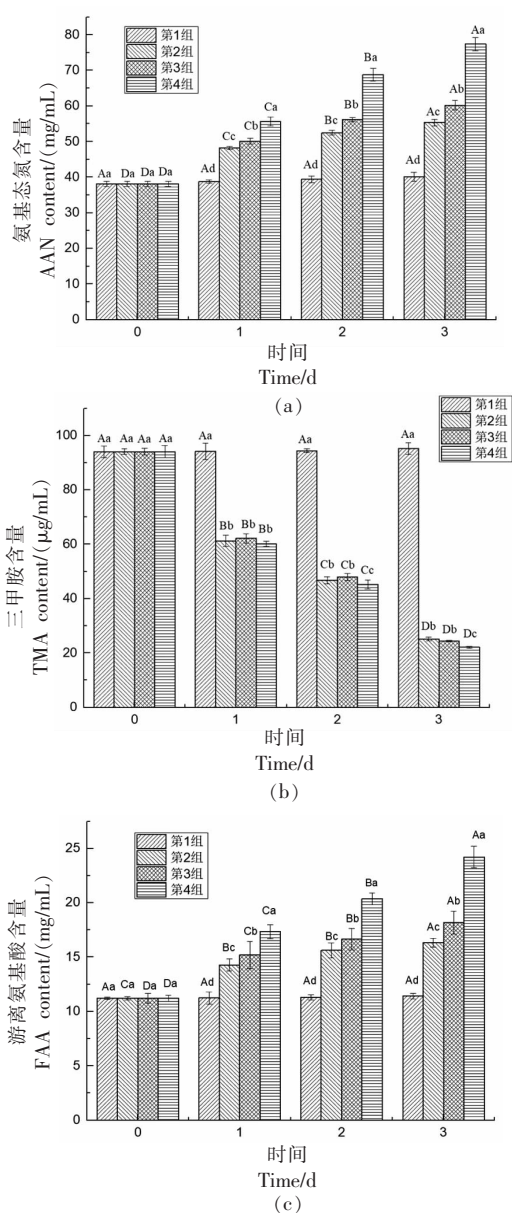


图2 不同发酵方式对贻贝蒸煮液 AAN(a)、TMA(b)和 FAA(c)含量的影响

Fig.2 Effects of different fermentation methods on content of AAN (a), TMA (b) and FAA (c) in mussel cooking liquor

蛋白降解为 FAA。FAA 可以分成甜味氨基酸、苦味氨基酸和鲜味氨基酸，这些氨基酸在发酵食品的风味形成过程中扮演了重要的角色，因此，FAA 的组成和含量在一定程度上能反映发酵品质。不同发酵方式对贻贝蒸煮液中 FAA 含量的影响如图 2c 所示，在发酵过程中，第 1 组的 FAA 含量保持相对恒定，其它组 FAA 的含量出现了不同程度

的增加，其中第 4 组的增加最为显著（从 11.21 mg/mL 增加到 23.67 mg/mL），接下来是第 3 组（11.21 mg/mL 至 18.21 mg/mL），第 2 组（从 11.21 mg/mL 至 16.19 mg/mL）。不同发酵方式对贻贝蒸煮液中 FAA 组成的影响如表 1 所示，原料中鲜味、甜味和苦味氨基酸的含量分别为 287.44, 574.88 mg/100 mL 和 252.35 mg/100 mL，第 1 组鲜味、甜味和苦味氨基酸的含量为 285.41, 574.16 mg/100 mL 和 260.55 mg/100 mL，与原料相似。第 2 组、第 3 组和第 4 组样品中的 FAA 含量都呈现出增加的趋势，第 2 组样品中的鲜味、甜味和苦味氨基酸的含量分别为 534.11, 717.55 mg/100 mL 和 367.37 mg/100 mL，第 3 组样品中的鲜味、甜味和苦味氨基酸的含量分别为 630.81, 773.05 mg/100 mL 和 417.87 mg/100 mL，第 4 组样品中的鲜味、甜味和苦味氨基酸的含量分别为 810.72, 973.81 mg/100 mL 和 582.22 mg/100 mL。可以看出，在乳酸菌和酵母菌的作用下，样品中的鲜味、甜味和苦味氨基酸含量均有所增加，其中鲜味氨基酸的增幅最大，其次是苦味氨基酸和甜味氨基酸。贻贝蒸煮液原料中含量最高的 5 种氨基酸分别为 Gly (301.25 mg/100 mL, 甜味)、Ala (170.16 mg/100 mL, 甜味)、Glu (158.20 mg/100 mL, 鲜味)、Asp (129.24 mg/100 mL, 鲜味) 和 Arg (92.15 mg/100 mL, 苦味)，第 1 组样品中含量最高的 5 种氨基酸分别为 Gly (302.24 mg/100 mL, 甜味)、Ala (168.27 mg/100 mL, 甜味)、Glu (157.16 mg/100 mL, 鲜味)、Asp (128.25 mg/100 mL, 鲜味) 和 Arg (93.13 mg/100 mL, 苦味)，其组成和含量与贻贝蒸煮液原料相似。第 2 组样品中含量最高的 5 种氨基酸分别为 Gly (321.31 mg/100 mL, 甜味)、Glu (298.22 mg/100 mL, 鲜味)、Asp (235.89 mg/100 mL, 鲜味)、Ala (195.31 mg/100 mL, 甜味) 和 Arg (92.85 mg/100 mL, 苦味)。第 3 组样品中含量最高的 5 种氨基酸分别为 Glu (348.25 mg/100 mL, 鲜味)、Gly (341.13 mg/100 mL, 甜味)、Asp (282.29 mg/100 mL, 鲜味)、Ala (230.81 mg/100 mL, 甜味) 和 Thr (100.47 mg/100 mL, 甜味)。第 4 组样品中含量最高的 5 种氨基酸分别为 Glu (420.16 mg/100 mL, 鲜味)、Asp (390.56 mg/100 mL, 鲜味)、Gly (380.76 mg/100 mL, 甜味)、Ala (287.16 mg/100 mL, 甜味) 和 Thr

(176.35 mg/100 mL, 甜味)。可以看出,不同发酵处理组中含量前 5 的氨基酸种类虽然相似,但含量相差很大,相较而言, Glu 和 Asp 这 2 种鲜味氨基酸在第 4 组中的增加最为显著。Glu 是一种在食品工业中广泛应用的氨基酸,可显著改善食品的

风味,此外, Glu 还可用作保鲜剂^[19]。Asp 是与三羧酸循环 (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) 关联最为紧密的氨基酸, Asp 可以参与 TCA 循环,产生能量,此外, Asp 还是甜味剂——阿斯巴甜的前体^[20]。

表 1 不同发酵方式对贻贝蒸煮液中游离氨基酸组成的影响 (mg/100 mL)

Table 1 Effects of different fermentation methods on FAA composition in mussel cooking liquor (mg/100 mL)						
名称	味道	原料	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组
谷氨酸 (Glu)	鲜味	158.20 ± 2.15	157.16 ± 2.25	298.22 ± 3.32	348.52 ± 2.28	420.16 ± 2.86
天冬氨酸 (Asp)	鲜味	129.24 ± 0.75	128.25 ± 1.11	235.89 ± 2.26	282.29 ± 1.00	390.56 ± 3.15
鲜味 (总)		287.44	285.41	534.11	630.81	810.72
甘氨酸 (Gly)	甜味	301.25 ± 1.73	302.24 ± 2.75	321.31 ± 2.12	341.13 ± 3.16	380.76 ± 2.25
丙氨酸 (Ala)	甜味	170.16 ± 1.36	168.27 ± 0.36	195.31 ± 1.36	230.81 ± 0.35	287.16 ± 0.75
丝氨酸 (Ser)	甜味	30.15 ± 1.25	30.50 ± 2.15	65.31 ± 0.25	50.31 ± 0.25	56.25 ± 0.75
* 苏氨酸 (Thr)	甜味	42.27 ± 0.75	41.06 ± 0.25	86.47 ± 1.03	100.47 ± 1.00	176.35 ± 1.00
脯氨酸 (Pro)	甜味	31.05 ± 1.00	32.09 ± 0.36	49.15 ± 0.25	50.33 ± 2.25	73.29 ± 2.26
甜味 (总)		574.88	574.16	717.55	773.05	973.81
精氨酸 (Arg)	苦味	92.15 ± 1.00	93.13 ± 2.28	92.85 ± 1.05	87.25 ± 0.12	150.68 ± 1.39
* 赖氨酸 (Lys)	苦味	54.13 ± 0.15	55.87 ± 1.38	77.16 ± 0.75	87.58 ± 1.16	140.38 ± 1.57
酪氨酸 (Tyr)	苦味	7.15 ± 1.21	8.05 ± 0.12	7.03 ± 0.15	8.03 ± 0.36	1.05 ± 0.05
* 亮氨酸 (Leu)	苦味	21.23 ± 0.36	22.15 ± 0.36	42.46 ± 1.00	52.23 ± 1.03	55.22 ± 1.06
* 缬氨酸 (Val)	苦味	15.45 ± 0.25	16.24 ± 0.15	66.81 ± 0.75	86.18 ± 0.65	166.16 ± 2.69
组氨酸 (His)	苦味	28.16 ± 0.39	28.75 ± 0.24	33.15 ± 0.65	38.29 ± 0.85	22.16 ± 0.21
* 异亮氨酸 (Ile)	苦味	10.25 ± 0.15	11.25 ± 0.50	18.52 ± 0.38	25.12 ± 0.12	33.30 ± 0.31
* 苯丙氨酸 (Phe)	苦味	3.99 ± 0.10	4.11 ± 0.10	6.02 ± 0.05	7.02 ± 0.33	4.44 ± 0.15
* 蛋氨酸 (Met)	苦味	12.48 ± 0.31	13.25 ± 0.05	15.31 ± 0.21	18.09 ± 0.15	2.29 ± 0.12
半胱氨酸 (Cys)	苦味	7.36 ± 0.25	7.75 ± 0.25	8.06 ± 0.36	8.08 ± 0.25	6.54 ± 0.10
苦味 (总)		252.35	260.55	367.37	417.87	582.22
氨基酸总量		1 114.67	1 120.12	1 619.03	1 821.73	2 366.75

注:“*”为必需氨基酸。

2.4 有机酸含量的变化

有机酸对食物的味道有显著贡献,并赋予水产调味品独特的鲜味^[21]。不同发酵方式对贻贝蒸煮液中的有机酸(柠檬酸、苹果酸、乳酸和琥珀酸)含量的影响如图 3 所示。柠檬酸是 TCA 循环的第一个产物,由乙酰辅酶 A 和草酰乙酸缩合而成,在 TCA 循环中发挥了重要的作用。不同发酵方式对贻贝蒸煮液中柠檬酸含量的影响如图 3a 所示。在整个发酵过程中,柠檬酸含量在第 1 组中的含量保持恒定,然而在其它组中出现了不同程度的下降,其中第 2 组和第 3 组柠檬酸的含量均从 0.09 mg/mL 下降到了 0.06 mg/mL,第 4 组则从 0.09

mg/mL 下降到了 0.05 mg/mL。研究表明,在乳酸菌存在的条件下,柠檬酸可以通过 TCA 循环被部分还原成琥珀酸。此外,某些特定的菌群能够利用柠檬酸生成 α -乙酰乳酸,并最终通过脱羧反应将其转化为具有黄油味的双乙酰乳酸,这可能是导致柠檬酸下降的原因^[22]。苹果酸是天然存在于自然界中的一种二羧酸,是水果酸甜味的重要来源,在 TCA 循环中,苹果酸由延胡索酸和水分子结合而成,处在 TCA 循环的下游阶段^[23]。不同发酵方式对贻贝蒸煮液中苹果酸的影响如图 3b 所示,第 1 组样品中苹果酸的含量在整个发酵过程中保持相对稳定,而其它组均出现了不同程度的下降,其中第

4组的下降最为显著(从0.25 mg/mL下降到0.13 mg/mL),其次为第2组(从0.25 mg/mL下降到0.15 mg/mL)和第3组(从0.25 mg/mL下降到0.16 mg/mL)。苹果酸的减少可能归因于苹果酸乳酸发酵,在苹果酸乳酸发酵过程中,苹果酸在乳酸菌的作用下脱羧产生乳酸和二氧化碳^[24]。

乳酸是乳酸菌代谢利用碳水化合物产物,乳酸赋予产品独特的风味,不同发酵方式对贻贝蒸煮液中乳酸的影响如图3c所示。第1组和第3组的乳酸在发酵过程中保持稳定,第2组(从4.10 mg/mL增加到13.51 mg/mL)和第4组(从4.10

mg/mL增加到13.49 mg/mL)则出现了显著地增加,且第2组和第4组之间并无显著差异。琥珀酸是乳酸菌代谢葡萄糖和柠檬酸的代谢终产物,是水产品中的重要有机酸,它赋予水产品以强烈的鲜味。不同发酵方式对贻贝蒸煮液中琥珀酸的影响如图3d所示,第1组样品中的琥珀酸在整个发酵过程中保持稳定,而其它组样品则出现了不同程度的升高,其中第4组的增幅最大(从0.21 mg/mL增加到1.32 mg/mL),其次是第2组(从0.21 mg/mL增加到0.93 mg/mL),增加最少的是第3组(从0.21 mg/mL增加到0.62 mg/mL)。

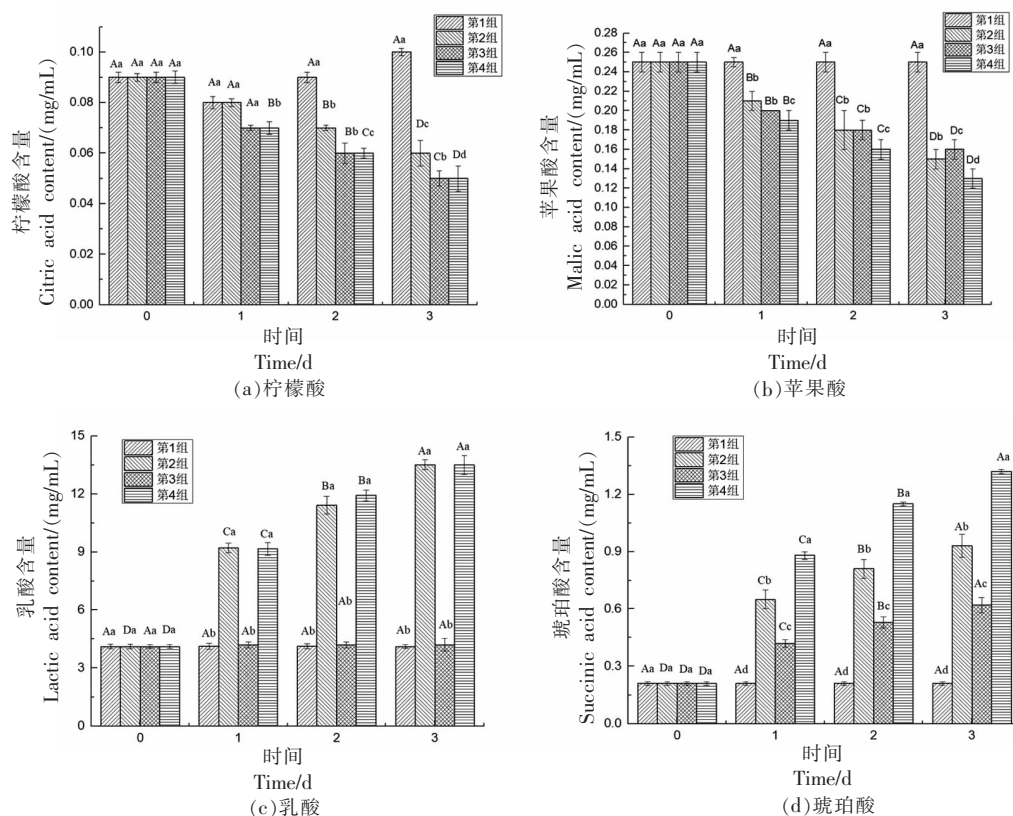


图3 不同发酵方式对贻贝蒸煮液有机酸含量的影响

Fig.3 Effects of different fermentation methods on organic acids content in mussel cooking liquor

2.5 挥发性物质的变化

不同发酵方式对贻贝蒸煮液中挥发性物质的影响如图4和图5所示。在第1组样品中共检测到了39种挥发性物质,其相对含量为45.60%,包括3种酯类、1种醇类、2种酸类、9种醛类、1种酮类、1种吡嗪类和其它类物质22种。第2组样品中共检测出36种挥发性物质,其含量为55.51%,

第3组样品中共检出45种挥发性物质,其相对含量为66.63%,第4组样品中共检出挥发性物质78种,其相对含量为78.68%。由此看出,乳酸菌和酵母菌混种发酵可以更显著地增加样品中挥发性物质的种类和相对含量。在所有挥发性物质中,醇类物质的种类(1种到23种)和相对含量(0.69%到21.78%)增加最为显著(图4a)。虽然醇类物质的

阈值相对较高,但醇类物质是诸多呈味物质的前体和载体,因而醇类物质对于食品风味的形成发挥了重要作用。第 4 组样品中含量最高的 3 种醇类物质分别是顺-9-十四碳烯醇(2.90%),2-十三醇(2.52%)和 1-辛烯-3-醇(2.32%),其中 1-辛烯-3-醇呈现出蘑菇香气,是不饱和脂肪酸的氧化产物,1-辛烯-3-醇是鱼露和鱼糜的特征性风味物质^[25-26]。酸类物质的增加仅次于醇类,在第 1 组样品中仅检测出了醋酸和月桂酸,其含量仅为 1.52%,第 4 组中共检测出 11 中挥发性酸类物质,其相对含量增加到 11.69%,在所有的挥发性酸类物质中(图 4b),乙酸和丙酸是增加最多的两种,这两种酸作为酯的前体物质有助于风味物质

的形成,是传统鱼露的典型香气成分。酯类物质种类从 3 种增加到了 13 种,相对含量从 11.60%增加到了 17.79%。酯类物质有助于产生清新的果香味,其与酮类物质共存对风味具有协调和平衡的作用,在所有的酯类中(图 4c),乙酸乙酯的增加最为显著(从 0 增加到 4.97%),研究表明乙酸乙酯对酱油独特风味的形成具有显著的贡献^[27]。醛类物质因其阈值较低,对食品风味形成的影响较大。醛类物质主要源于氨基酸或脂肪酸的 Strecker 降解,通常情况下,直链和支链醛呈现出青草香气,而不饱和醛则呈现出鱼腥味和腐败味^[28]。乳酸菌和酵母菌发酵降低了样品中不饱和醛的含量,提高了直链醛的含量,改良了贻贝蒸煮液的风味。

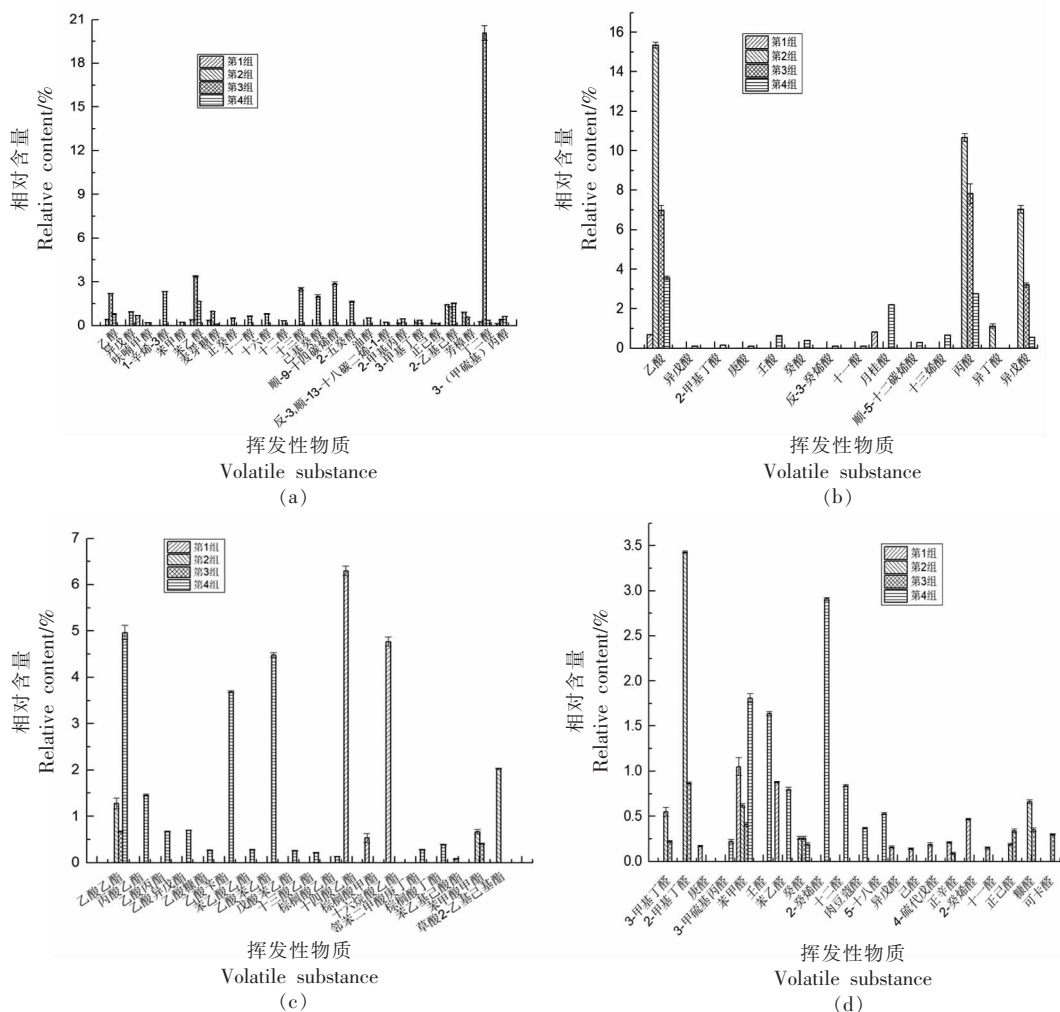


图 4 不同发酵方式对贻贝蒸煮液中挥发性醇类(a)、酸类(b)、酯类(c)和醛类(d)物质的影响

Fig.4 Effects of different fermentation methods on volatile alcohols (a), acids (b), esters (c), and aldehydes (d) in mussel cooking liquor

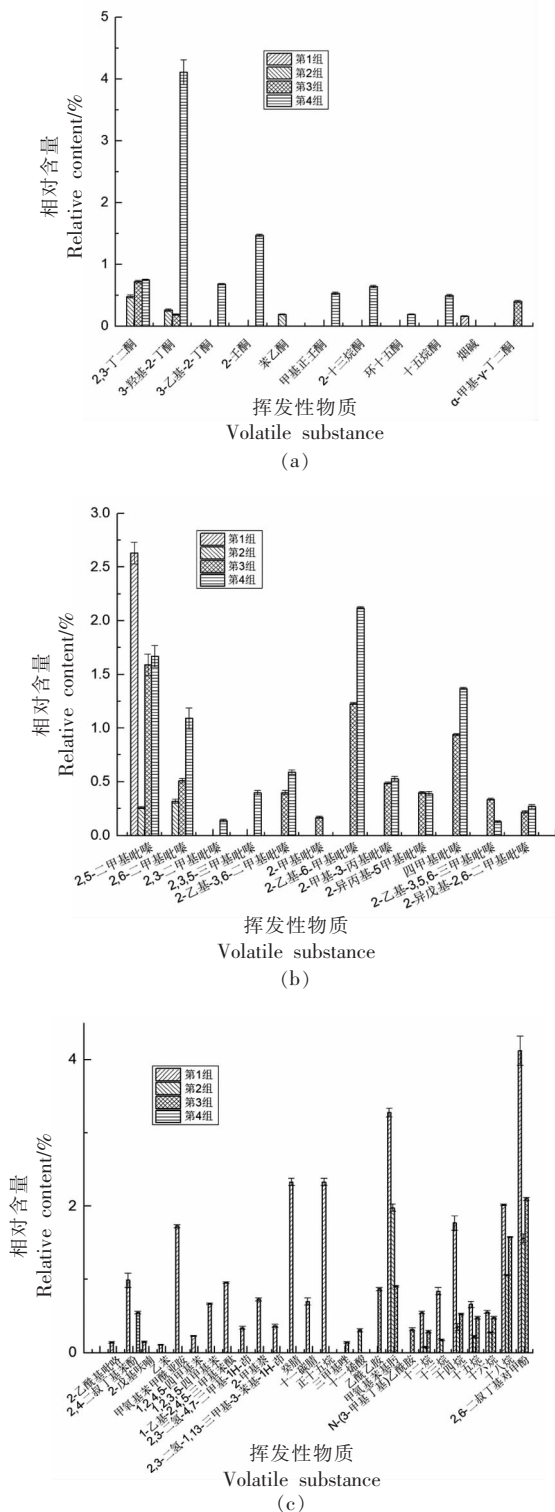


图5 不同发酵方式对贻贝蒸煮液中挥发性酮类(a)、吡嗪类(b)和其它类(c)物质的影响

Fig.5 Effects of different fermentation methods on volatile alcohols (a), pyrazines (b) and others (c) in mussel cooking liquor

酮类物质主要源自氢过氧化物和氨基酸氧化后形成的脂肪酸,不同发酵处理后贻贝蒸煮液中酮类物质的含量如图5a所示,第4组样品中的酮类物质最多为8.86%,接下来是第3组(1.31%)和第2组(0.93%),第1组中的含量最少,仅为0.16%,这表明混种发酵更能促进样贻贝蒸煮液中酮类物质的增加。在所有的酮类物质中,3-羟基-2-丁酮的增加最为显著(0到4.11%)。3-羟基-2-丁酮是合成诸多香料物质的中间体,赋予鱼露以独特的黄油气味。2-壬酮、2-十三酮和2-十一酮等甲基酮的含量也出现了显著增加,这些物质对于鱼露特征风味的形成也发挥了重要的作用^[29]。吡嗪类物质通常具有坚果或烤面包的香气,吡嗪类物质在第3组和第4组样品中出现了显著的增加,种类从1种分别增加到了10种和11种,含量则从2.63%增加到了6.29%和8.70%,这说明酵母菌在促进吡嗪类物质的形成方面比乳酸菌更加有效。

3 结论

本文以贻贝蒸煮液为研究对象,分别采用乳酸菌单独发酵、酵母菌单独发酵、乳酸菌/酵母菌混种发酵对其进行发酵处理,以发酵产品的pH值、葡萄糖含量、TSN含量、AAN含量、FAA含量、有机酸及挥发性物质含量为指标,研究不同发酵方式对贻贝蒸煮液品质及挥发性风味物质的影响。结果表明,混种发酵法制备的样品中的TSN含量、AAN含量、FAA含量及琥珀酸含量最高且呈味物质更为丰富,适合用于贻贝蒸煮液的发酵处理。然而,对于发酵食品来讲,微生物代谢对其品质影响非常显著,而微生物的代谢活动又受其中活性基因表达的调控,后续的研究可以采用代谢组学结合转录组学技术从微生物代谢的转录调控规律角度深入研究相关的发酵机制。

参 考 文 献

- [1] NAIK A S, HAYES M. Bioprocessing of mussel by-products for value added ingredients[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 92: 111-121.
- [2] HAWKINS A J S, BAYNE B L. Nutrition of marine mussels: Factors influencing the relative utilizations

- of protein and energy[J]. *Aquaculture*, 1991, 94(2/3): 177-196.
- [3] PANAYOTOVA V, MERDZHANOVA A, STANCHEVA R, et al. Farmed mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Black Sea reveal seasonal differences in their neutral and polar lipid fatty acids profile[J]. *Regional Studies in Marine Science*, 2021, 44: 101782.
- [4] NAIK A S, MORA L, HAYES M. Characterisation of seasonal *Mytilus edulis* by-products and generation of bioactive hydrolysates[J]. *Applied Sciences*, 2020, 10(19): 6892.
- [5] 陶美洁, 孟粉, 董焯, 等. 贻贝蒸煮液酶解工艺的优化[J]. *中国食品学报*, 2021, 20(12): 209-220.
- TAO M J, MENG F, DONG Y, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions of mussel cooking liquor[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 20(12): 209-220.
- [6] CROS S, IGNOT B L, RAZAFINTSALAMA C, et al. Electrodialysis desalination and reverse osmosis concentration of an industrial mussel cooking juice: Process impact on pollution reduction and on aroma quality[J]. *Journal of Food Science*, 2004, 69(6): 435-442.
- [7] ZHU W H, LUAN H W, BU Y, et al. Changes in taste substances during fermentation of fish sauce and the correlation with protease activity[J]. *Food Research International*, 2021, 144: 110349.
- [8] HAN J R, KONG T, WANG Q, et al. Regulation of microbial metabolism on the formation of characteristic flavor and quality formation in the traditional fish sauce during fermentation: A review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(25): 7564-7583.
- [9] GAO P, ZHANG Z Q, GE Y, et al. Co-inoculation of *Lactiplantibacillus pentosus* 1 and *Saccharomyces cerevisiae* 31 for a salt-free fish sauce production from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) bone[J]. *Food Bioscience*, 2022, 50: 102137.
- [10] SUN J N, YU X H, FANG B, et al. Effect of fermentation by *Aspergillus oryzae* on the biochemical and sensory properties of anchovy (*Engraulis japonicus*) fish sauce[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2016, 51(1): 133-141.
- [11] WOOD I P, ELLISTON A, RYDEN P, et al. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay[J]. *Biomass and bioenergy*, 2012, 44: 117-121.
- [12] JIANG J J, ZENG Q X, ZHU Z W, et al. Chemical and sensory changes associated Yu-lu fermentation process -A traditional Chinese fish sauce[J]. *Food Chemistry*, 2007, 104(4): 1629-1634.
- [13] ZHU W H, LUAN H W, BU Y, et al. Flavor characteristics of shrimp sauces with different fermentation and storage time[J]. *LWT*, 2019, 110: 142-151.
- [14] DISSARAPHONG S, BENJAKUL S, VIESSANGUAN W, et al. The influence of storage conditions of tuna viscera before fermentation on the chemical, physical and microbiological changes in fish sauce during fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(16): 2032-2040.
- [15] GAO P, CAO X, JIANG Q X, et al. Improving the quality characteristics of rice mash grass carp using different microbial inoculation strategies[J]. *Food Bioscience*, 2021, 44: 101443.
- [16] KONG Y, YANG X, DING Q, et al. Comparison of non-volatile umami components in chicken soup and chicken enzymatic hydrolysate[J]. *Food Research International*, 2017, 102: 559-566.
- [17] 唐洁, 王海燕, 徐岩. 酿酒酵母和异常毕赤酵母混菌发酵对白酒液态发酵效率和风味物质的影响[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(7): 921-930.
- TANG J, WANG H Y, XU Y. Effect of mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia anomala* on fermentation efficiency and flavor compounds in Chinese liquor[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(7): 921-930.
- [18] 金洋, 薛张芝, 张洪超, 等. 金乌贼肌肉中三甲胺脱甲基酶的分离纯化及酶学性质[J]. *水产学报*, 2017, 41(6): 845-853.
- JIN Y, XUE Z Z, ZHANG H C, et al. Purification and enzymatic properties of TMAOase from muscles of *Sepia esculenta*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(6): 845-853.
- [19] 陈咏竹, 孙启玲. γ -多聚谷氨酸的性质, 发酵生产及其应用[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(1): 122-126.
- CHEN Y Z, SUN Q L. The properties, fermentation production, and application of γ -polyglutamic acid[J]. *Microbiology*, 2004, 31(1): 122-126.

- [20] 方莉, 谭天伟. 聚天门冬氨酸的合成及其应用[J]. 化工进展, 2001, 20(3): 24–28.
FANG L, TAN T W. Chemical syntheses and application of polyaspartates [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2001, 20(3): 24–28.
- [21] WANG Y Q, LI C S, LI L H, et al. Application of UHPLC-Q/TOF-MS-based metabolomics in the evaluation of metabolites and taste quality of Chinese fish sauce (Yu-lu) during fermentation [J]. Food Chemistry, 2019, 296: 132–141.
- [22] HUGENHOLTZ J, KLEEREBEZEM M, STARRENBURG M, et al. *Lactococcus lactis* as a cell factory for high-level diacetyl production [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(9): 4112–4114.
- [23] 闫道江, 王彩霞, 周杰民, 等. 酿酒酵母产苹果酸的还原 TCA 路径构建及发酵调控[J]. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1484–1493.
YAN D J, WANG C X, ZHOU J M, et al. Construction and fermentation control of reductive TCA pathway for malic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(10): 1484–1493.
- [24] RADLER F, BRÖHL K. The metabolism of several carboxylic acids by lactic acid bacteria [J]. Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und-forschung, 1984, 179(3): 228–231.
- [25] WANG Y Q, LI C S, ZHAO Y Q, et al. Novel insight into the formation mechanism of volatile flavor in Chinese fish sauce (Yu-lu) based on molecular sensory and metagenomics analyses [J]. Food Chemistry, 2020, 323: 126839.
- [26] LIANG F, LIN L, ZHU Y J, et al. Comparative study between surimi gel and surimi/crabmeat mixed gel on nutritional properties, flavor characteristics, color, and texture [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2020, 29(7): 681–692.
- [27] FUKAMI K, ISHIYAMA S, YAGURAMAKI H, et al. Identification of distinctive volatile compounds in fish sauce [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(19): 5412–5416.
- [28] IZZREEN M N N Q, HANSEN Å S, PETERSEN M A. Volatile compounds in whole meal bread crust: The effects of yeast level and fermentation temperature [J]. Food chemistry, 2016, 210: 566–576.
- [29] GIRI A, OSAKO K, OKAMOTO A, et al. Olfactometric characterization of aroma active compounds in fermented fish paste in comparison with fish sauce, fermented soy paste and sauce products [J]. Food Research International, 2010, 43(4): 1027–1040.

Effects of Fermentation Methods on the Quality and Volatile Substances of Mussel Cooking Liquor

Song Yanling¹, Liu Xiaoxia¹, Wang Shizhen¹, Zheng Zhenxiao^{1*}, Xu Xuejiao^{2*}

¹Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Nutrition Health, Institute of Seafood, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012

²College of Biology and Environmental Engineering, Zhejiang Shuren University, Hongzhou 310015)

Abstract In order to study the effect of different fermentation methods on the quality and volatile substances of mussel cooking liquor. The mussel cooking liquor was fermented by lactic acid bacteria alone, yeast alone and lactic acid bacteria/yeast mixture. Effects of different fermentation methods on the qualities of mussel cooking liquor were studied through the changes of pH value, glucose, total soluble nitrogen (TSN), amino acid nitrogen (AAN), free amino acids (FAA) and organic acids (citric acid, malic acid, lactic acid and succinic acid) content. Moreover, the changes of volatile substances in mussel cooking liquor after fermentation were analyzed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS), and the effects of different fermentation methods on the volatile substances of mussel cooking liquor were studied. The results showed that the mixed fermentation group had the lowest pH (4.6), glucose content (6.36 mg/mL) and trimethylamine content (22.15 $\mu\text{g/mL}$), and the highest TSN content (18.68 $\mu\text{g/mL}$), FAA content (24.21 mg/mL) and AAN content (77.39 mg/mL), indicating that the mixed fermentation had the best quality. In addition, mixed fermentation could produce more alcohols and esters, and reduce unpleasant flavor substances such as unsaturated aldehydes and

amines in the sample. Lactic acid bacteria/yeast mixed fermentation could give samples better quality and flavor, suitable for the fermentation of mussel cooking liquid. This paper aimed to study the effects of different fermentation methods on the quality and volatile substances of mussel cooking liquor, and provide reference for the valorization of mussel cooking liquor.

Keywords lactic acid bacteria; yeast; fermentation; mussel cooking liquor; quality; volatile substances