

基于非靶向代谢组学的不同菌种强化发酵浏阳豆豉的代谢差异分析

刘晶晶¹, 邓高文¹, 胡嘉亮², 覃业优², 刘洋^{1*}, 蒋立文^{1*}

(1.湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南坛坛香食品科技有限公司, 湖南 长沙 410300)

摘要:为探究不同菌种强化发酵浏阳豆豉的代谢差异,测定分离菌株黄曲霉7214 (*Aspergillus flavus* 7214, AF 7214)、黄曲霉7622 (*A. flavus* 7622, AF 7622)、混合组AF 77 (AF 7214+AF 7622)、与米曲霉 (*A. oryzae*) 强化发酵及自然发酵浏阳豆豉的总酸、氨基酸态氮含量,并利用液相色谱-质谱联用技术探究其代谢产物差异。结果表明:5组豆豉中,AF 7214强化发酵豆豉的总酸质量分数、氨基酸态氮含量最高,分别为3.52%和1.47 g/100 g。根据偏最小二乘判别分析结果可知,各样品代谢产物差异明显,其中AF 7622菌株发酵样品同自然发酵豆豉代谢产物组成差异最小。进一步分析发现AF 7214、AF 7622、AF 77、米曲霉强化发酵与自然发酵豆豉的差异代谢产物主要参与氨基酸代谢通路,特别是精氨酸生物合成。以变量重要投影值>1.5、 $P<0.05$ 为标准筛选出5组样品间的关键差异代谢物共62种,其中包括赖氨酸、丝氨酸、2-甲基丝氨酸等26种氨基酸及其衍生物,说明强化发酵对豆豉发酵过程中的氨基酸代谢影响最明显。本研究可为浏阳豆豉强化发酵过程中代谢产物的形成提供新的认识。

关键词:浏阳豆豉; 强化发酵; 非靶向代谢组学; 差异代谢物; 代谢通路

Non-targeted Metabolomics Analysis of Metabolic Differences among Liuyang Douchi Fermented by Different Strains

LIU Jingjing¹, DENG Gaowen¹, HU Jialiang², QIN Yeyou², LIU Yang^{1*}, JIANG Liwen^{1*}

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Hunan Tantanxiang Food Technology Co. Ltd., Changsha 410300, China)

Abstract: In order to investigate the metabolic differences among Liuyang Douchi fermented by different starter cultures, the contents of total acid and amino nitrogen in Douchi fermented naturally and by using *Aspergillus flavus* 7214 (AF 7214), *A. flavus* 7622 (AF 7622), their mixture (AF 7214 + AF 7622) or *A. oryzae* were determined, and the difference in metabolites among these fermentation strategies was explored by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The results showed that among the five Douchi samples, Douchi fermented by AF 7214 had the highest contents of total acid (3.52%) and amino nitrogen (1.47 g/100 g). The results of partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) indicated that significant differences in metabolites were observed among the Douchi samples, and the composition of metabolites in Douchi fermented by AF 7622 showed the smallest difference from that in naturally fermented Douchi. Further analysis revealed that the differential metabolites between Douchi fermented naturally and by using starter cultures were mainly involved in amino acid metabolic pathways, especially arginine biosynthesis. A total of 62 key differential metabolites among the five samples were identified using variable importance in the projection (VIP) greater than 1.5 and $P < 0.05$ as criteria, including 26 amino acids and their derivatives such as *L*-lysine, *L*-serine and 2-methylserine, which indicated that enhanced fermentation showed the most notable influence on the metabolism of amino acids. This study has provided a new understanding of the formation of metabolites during the enhanced fermentation of Liuyang Douchi.

Keywords: Liuyang Douchi; enhanced fermentation; non-targeted metabolomics; differential metabolites; metabolic pathway

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230227-246

中图分类号: TS214.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 01-0042-08

收稿日期: 2023-02-27

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32001670); 湖南省自然科学基金青年基金项目 (2021JJ40239)

第一作者简介: 刘晶晶 (1999—) (ORCID: 0009-0004-0145-508X), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。

E-mail: liujingj0405@163.com

*通信作者简介: 刘洋 (1990—) (ORCID: 0000-0002-7450-3220), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品生物技术。

E-mail: fs_yliu@163.com

蒋立文 (1968—) (ORCID: 0000-0002-8536-8298), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。

E-mail: 1024305380@qq.com

引文格式:

刘晶晶, 邓高文, 胡嘉亮, 等. 基于非靶向代谢组学的不同菌种强化发酵浏阳豆豉的代谢差异分析[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 42-49. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230227-246. <http://www.spkx.net.cn>

LIU Jingjing, DENG Gaowen, HU Jialiang, et al. Non-targeted metabolomics analysis of metabolic differences among Liuyang Douchi fermented by different strains[J]. Food Science, 2024, 45(1): 42-49. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230227-246. <http://www.spkx.net.cn>

豆豉是中国传统特色发酵豆制品, 其历史最早可追溯至秦汉时期^[1]。豆豉中富含蛋白质、氨基酸、多肽、磷、镁、钙及多种维生素, 不仅能用于调味, 还可用于入药^[2-3]。浏阳豆豉历史悠久, 其味、香独特, 色、形俱佳, 但现阶段浏阳豆豉生产大多依靠自然发酵, 具有季节性, 因此基本呈小作坊形式生产, 工业化程度低。而强化发酵为在自然发酵基础上, 人为添加优势菌种, 使发酵过程不受季节限制, 有利于推进传统发酵食品生产的工业化^[4]。

通常, 微生物代谢是发酵食品风味产生的决定性因素, 食品中简单的营养物质如葡萄糖、蛋白质等可通过微生物代谢产生芳香风味物质和味感风味物质, 因此微生物代谢调控已成为提升食品风味的重要手段^[5]。李玉斌等^[6]利用酵母菌强化发酵增加保宁醋风味物质的种类及含量以改善风味。石媛媛等^[7]发现乳酸菌强化发酵可保留刺梨果醋中的营养物质并增加其挥发性风味物质的种类及含量。He Guiqiang等^[8]指出毛霉型豆豉在发酵完后第二年具有较高的醇类、酯类、酚类、酮类和吡嗪类等特征风味物质。而目前对于浏阳豆豉的研究多集中于微生物菌落结构分析、优势微生物的分离鉴定和挥发性物质组成及分析上, 对豆豉中微生物的代谢特征知之甚少。因此, 研究不同分离菌种强化发酵浏阳豆豉的代谢差异, 对推动浏阳豆豉工业化生产具有重要意义。

非靶向代谢组学是一种研究生物体内代谢组成和变化的方法, 它通过对整个生物体进行全面组学分析, 从而获得大量有关生物体代谢组成和变化的信息。非靶向代谢组学研究工具包括核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)、气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用以及高效液相色谱-质谱(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)联用^[9]。其中HPLC-MS因其样品制备和前处理操作简易、稳定性和灵敏度高而被广泛应用。Zhang Ping等^[10]采用HPLC-MS技术研究发现不同地区传统发酵大酱中微生物蛋白的数量和种类均存在差异。Peng Jiangying等^[11]基于HPLC-MS技术探究褐色发酵乳与传统发酵乳代谢产物差异, 发现褐色发酵乳经过美拉德反应产生了更多的风味物质。

前期研究在浏阳豆豉不同阶段样品中分离出2株高产蛋白酶活性黄曲霉菌株, 经黄曲霉产毒培养基法检测

以及采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析法鉴定发现均不具备产黄曲霉毒素能力^[12]。本研究利用此两菌株及复合菌株对浏阳豆豉进行强化发酵, 并比较米曲霉菌种强化发酵豆豉和自然发酵豆豉的总酸含量、氨基酸态氮含量以及代谢产物的差异, 探究不同菌种强化发酵对浏阳豆豉代谢产物形成的影响, 以期对浏阳豆豉的工业化生产提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

麸皮 亿乡情名优农产品创业店; 陕西黄仁肾形小黑豆 湖南坛坛香食品科技有限公司。实验用菌种黄曲霉AF 7214 (*Aspergillus flavus* 7214, AF 7214) (CGMCC 20735)、黄曲霉7622 (*A. flavus* 7622, AF 7622) (实验室自藏) 系实验室前期从浏阳豆豉自然发酵不同阶段样品分离所得优势菌; 混合组AF 77为AF 7214与AF 7622等比例混合; 米曲霉 济宁玉园生物科技有限公司; 酚酞指示剂 天津市化学试剂研究所有限公司; 氢氧化钠 国药集团化学试剂有限公司; 无水乙醇 郑州派尼化学试剂厂; 甲醇、乙腈(均为色谱级) 美国赛默飞世尔科技公司; 2-氯苯丙氨酸、邻苯二甲酸氢钾 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 甲酸、甲酸铵 美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

H1850冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; VORTEX-5旋涡混合器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; KW-100TDV超声波清洗器 舒美超声仪器有限公司; SCIENTZ-48组织研磨器 宁波新芝生物科技股份有限公司; U3000液相色谱仪、QE质谱仪 美国Thermo公司; READMAX1900酶标仪 上海闪谱生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 浏阳豆豉制作工艺及操作要点

前处理(新鲜的黑豆→清洗→浸泡→蒸煮→摊凉冷却)→前发酵(自然发酵/强化发酵制曲→晾曲→洗曲)→后发酵(渥堆→转桶→渥堆→晒制)→成品

前处理: 选取50 kg新鲜饱满无虫害黑豆, 清洗杂质, 水温25℃水面高于豆豉5 cm浸泡2 h, 结束后迅速倒

入蒸笼, 蒸汽完全渗透豆子 (即顶部豆子布满水蒸气) 开始计时40 min, 将煮过后的黑豆打散摊凉, 温度控制在30 ℃以下, 防止温度过高导致制曲接入的菌种死亡。

前发酵: 将豆子与扩培后的麸皮混匀, 接种量为0.2%, 装盘制曲 (温度28~35 ℃、相对湿度50%~80%)。此阶段黑豆开始发酵, 制曲持续8 d, 室温通风7 d, 通风后放入翻缸清洗机洗净黑豆表面曲霉, 前发酵共15 d。

后发酵: 洗曲后的豆子用纱布包裹放入3 m³竹桶中室温下渥堆4 d, 其中渥堆第2天进行转桶操作并加入3%食盐混匀, 渥堆结束晒制2 d, 得到豆豉成品, 后发酵时间共6 d。

采用分离的优势菌株以及米曲霉对小黑豆进行强化发酵制曲, 得到AF 7214强化发酵豆豉 (AF 72D)、AF 7622强化发酵豆豉 (AF 76D)、AF 7214和AF 7622等比例混合强化发酵豆豉 (AF 77D)、米曲霉强化发酵豆豉 (AOD)、自然发酵豆豉 (NFD)。

1.3.2 取样

AF 72D、AF 76D、AF 77D、AOD、NFD取制曲第2、5、8天、洗曲、转桶、渥堆第4天共30个样品进行总酸及氨基酸态氮含量测定, 取豆豉成品进行代谢物的多元统计分析。为消除随机误差, 每次取样在豆豉堆的上层、中层、下层分别取样50 g并混和, 作为该阶段代表性样品, 重复3次。

1.3.3 指标测定

总酸测定: 采用pH计电位滴定法, 参考GB 12456—2021《食品中总酸的测定》^[13]; 氨基酸态氮测定: 采用酸度计法, 参考GB 5009.235—2016《食品中氨基酸态氮的测定》^[14]。

1.3.4 HPLC-MS分析

样品前处理: 参考Vasilev等^[15]方法, 称量200 mg样本与0.6 mL质量浓度4 μg/mL的2-氯苯丙氨酸混合于EP管中, 涡旋振荡30 s, 加入玻璃珠60 Hz下研磨90 s, 而后室温下超声处理15 min, 4 ℃、12 000 r/min离心15 min, 取上清液过0.22 μm膜, 滤液进行HPLC-MS检测。

色谱条件: 参考Omnia等^[16]的方法。洗脱条件: 自动进样器温度8 ℃; 流速0.25 mL/min; 柱温40 ℃; 进样2 μL。流动相为正离子模式0.1%甲酸溶液-0.1%甲酸乙腈溶液; 负离子模式5 mmol/L甲酸铵溶液-乙腈。

质谱条件: 参考Gustavo等^[17]方法。仪器使用电喷雾离子源, 条件设置如下: 鞘气体流量为30 arb, 辅助气体流量为10 arb, 毛细管温度325 ℃, 分辨率为70 000, 扫描范围81~1 000, 喷雾电压分别为3.5 kV (正) 或-2.5 kV (负), 进行峰值检测、提取、比对和整合。

1.4 数据分析

总酸及氨基酸态氮的测定实验重复3次, 测定数据通过Origin 2021软件进行分析, 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。HPLC-MS原始数据通过峰识别、对其等数据预处理操作得到数据矩阵, 并根据Student *t*检验的 $P < 0.05$, 以及多维统计变量重要投影 (variable importance in projection, VIP) > 1.5 筛选差异代谢物, 利用OmicStudio (<https://www.omicstudio.cn/tool>) 进行热图绘制; 代谢通路分析结合京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 数据库, 并采用网络图进行进一步信息挖掘, 在<https://www.biodeep.cn/login>网站上进行绘图。

2 结果与分析

2.1 不同菌种强化发酵浏阳豆豉各阶段总酸、氨基酸态氮含量的变化

2.1.1 总酸含量的变化

由图1可知, 5组不同菌种强化发酵浏阳豆豉随着发酵时间的延长, 总酸含量均呈现上升的趋势。其中, 在制曲、洗曲阶段 (1~15 d), 总酸含量的增长相对缓慢。而渥堆前期 (15~17 d) 总酸含量增长迅速, 渥堆后期变化较小, 这可能系渥堆前期无盐导致微生物大量繁殖, 乳酸菌等细菌产生大量的有机酸。而在渥堆后期 (17~19 d), 由于食盐的添加抑制了微生物的生长及代谢, 总酸含量变化趋于稳定^[18]。其中AF 72D的总酸增速最大, 发酵结束后总酸质量分数高达3.52%, 增幅为2.48%; 其次是AOD、NFD、AF 77D, 而AF 76D的总酸质量分数最低仅有1.64%, 这可能与豆豉接入微生物和自然发酵微生物的种类及其分泌酶系有关。

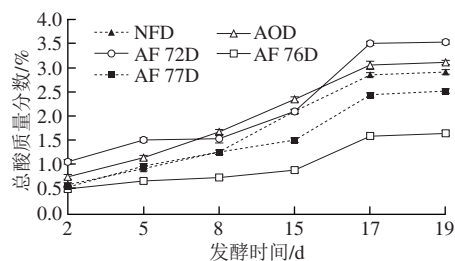


图1 不同菌种强化发酵浏阳豆豉总酸含量的变化

Fig. 1 Changes of total acid contents in Liuyang Douchi fermented by different strains

2.1.2 氨基酸态氮含量的变化

氨基酸态氮不仅是判定发酵豆制品发酵程度的特性指标, 还可以衡量浏阳豆豉发酵过程中蛋白质的水解程度, 同时也是浏阳豆豉的滋味来源之一^[19]。如图2所示,

随着浏阳豆豉发酵时间的延长,氨基酸态氮含量不断增加,其中渥堆前期(15~17 d)氨基酸态氮含量上升尤为明显,与总酸变化趋势类似。渥堆后期(17~19 d)由于添加食盐抑制了微生物的活性,氨基酸态氮增长速率逐渐趋于平缓并达到最大值,AF 72D的氨基酸态氮含量最高,为1.47 g/100 g,AF 76D的氨基酸态氮含量最低,仅有0.82 g/100 g,这可能由于AF 7214的蛋白酶活性高于AF 7622所致^[12]。由此可见AF 7214菌株发酵特性较好,可作为浏阳豆豉良好的发酵剂。

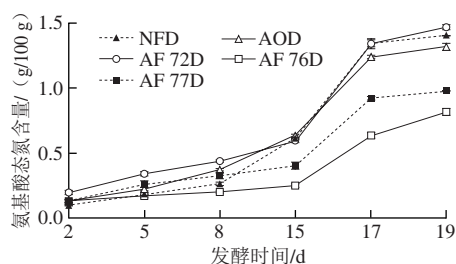


图2 不同菌种强化发酵浏阳豆豉氨基酸态氮含量的变化
Fig.2 Changes of amino nitrogen contents in Liuyang Douchi fermented by different strains

2.2 不同菌种强化发酵浏阳豆豉的代谢差异分析

2.2.1 偏最小二乘判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)

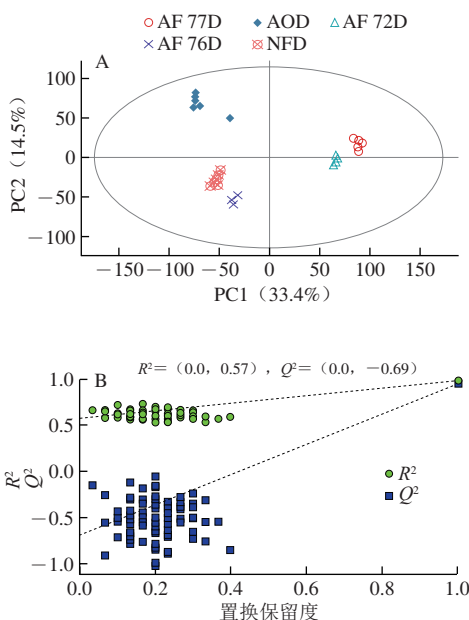


图3 不同菌种强化发酵浏阳豆豉代谢物的PLS-DA得分图(A)和置换检验图(B)

Fig.3 PLS-DA score plot (A) and permutation test (B) of metabolites in Liuyang Douchi fermented by different strains

PLS-DA对相关性较小的变量较敏感,能够忽略组内误差、消除与研究目的无关的随机误差,常

用于分析不同样品之间的相似度以及差异性。根据图3A可以发现,样本在PC1维度可以分为两组,包括正方向的AF 72D和AF 77D,以及负方向的NFD、AOD和AF 76D,各样本点可良好区分,说明样本之间差异明显。此外,AF 77D和AF 72D距离较近,表明两种样品之间代谢产物组成相似。图3B置换检验图中 Q^2 值为0.967, Q^2 回归线在 $X=0$ 的交点为(0.0, -0.69),说明该PLS-DA模型稳定性较好且没有出现过拟合现象,具有较好的预测能力,数据有效可进行后续分析。 R_x^2 、 R_y^2 值分别为0.645、0.993,均大于0.5且 R_y^2 值接近于1,说明该模型能很好的解释样本之间的差异。

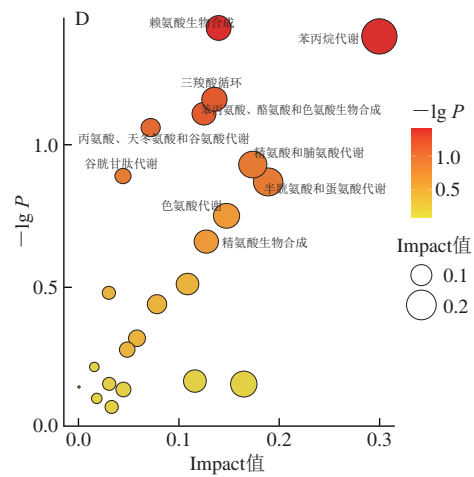
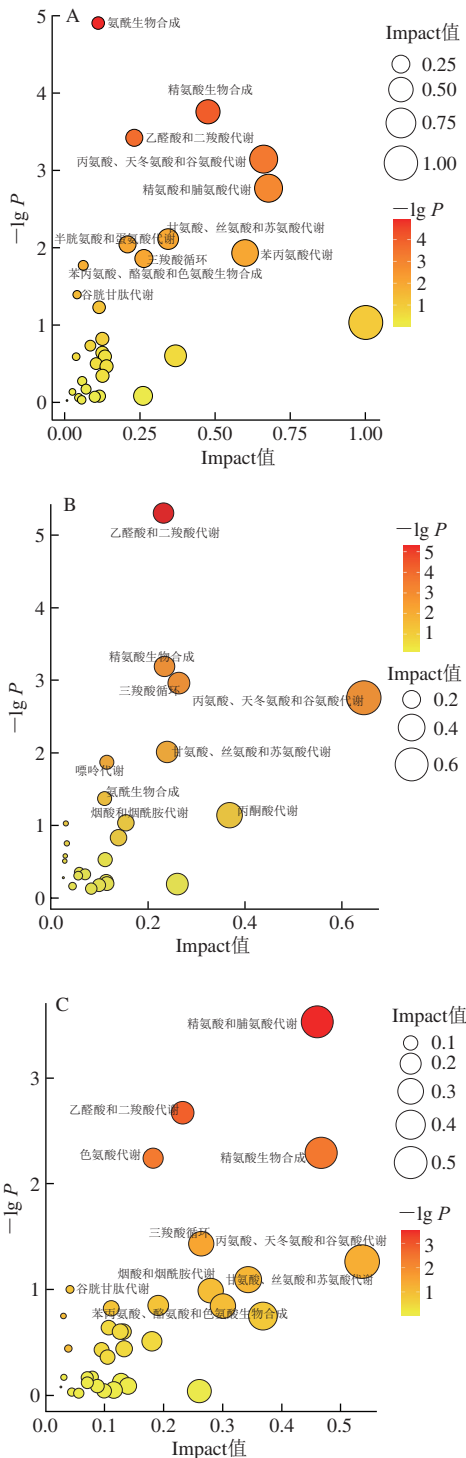
2.2.2 差异代谢通路分析

KEGG是大型分子数据集生成的基因组测序和其他高通量实验技术的实用程序数据库资源^[20]。图4A与图4B分别为AF 72D、AF 76D同NFD的差异代谢通路,可以看出与自然发酵样品相比,AF 72D、AF 76D在氨酰生物合成,精氨酸生物合成,乙醛酸和二羧酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,三羧酸循环通路上均具有显著性差异。其中,AF 72D同NFD影响最为显著的差异代谢通路为氨酰生物物的合成,参与氨酰生物合成的差异代谢物有L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸、L-苏氨酸以及L-酪氨酸等在内的14种氨基酸及其衍生物,其中L-天冬氨酸、L-谷氨酸为鲜味氨基酸,是豆豉的主要鲜味来源,L-谷氨酸可通过大豆蛋白降解或者L-谷氨酰胺脱酰胺产生;L-苏氨酸广泛存在于发酵食品中,与葡萄糖共热可产生焦香味,对豆豉有增香作用;L-亮氨酸是人体必需氨基酸,具有降血糖的功能。而AF 76D同NFD影响最为显著的差异代谢通路为乙醛酸和二羧酸代谢,参与乙醛酸和二羧酸代谢的差异代谢物主要为丙酮酸、琥珀酸、L-丝氨酸、柠檬酸等氨基酸及有机酸类物质,这几种差异代谢物同时也参与了多条代谢通路,例如丙酮酸可在有氧条件下转化为乙酰辅酶A,通过三羧酸循环产生柠檬酸、琥珀酸等^[21],为机体生命活动提供能量。

如图4C所示,AF 77D同NFD具有显著差异的代谢通路为精氨酸和脯氨酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢、精氨酸生物合成、色氨酸代谢、三羧酸循环。色氨酸代谢后部分色氨酸经氧化脱羧后转变为5-羟色胺,5-羟色胺具有稳定情绪的作用,常被用于抗抑郁药物^[22]。而Impact值最大的代谢通路为丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,这3种氨基酸均为生糖氨基酸,代谢后先转化为丙酮酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸或草酰乙酸,再转变为葡萄糖和糖原,可增加豆豉甜度。

图4D为AOD与NFD的差异代谢物所映射的24条代谢通路,富集到的差异代谢物较多且Impact值相对较高的前5条代谢通路分别为赖氨酸生物合成,苯丙氨酸代

谢, 三羧酸循环, 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢。其中赖氨酸生物合成与苯丙氨酸的代谢影响显著 ($P < 0.05$)。L-赖氨酸主要由 α -氨基己二酸在 α -氨基乙二酸还原酶等的催化下合成。而苯丙氨酸一方面可通过代谢产生苯乙醛、苯乙酮等致香前体物质^[23]; 另一方面, 苯丙氨酸通过苯丙氨酸羟化酶氧化生成酪氨酸, 进一步参与豆豉中的糖代谢和脂类代谢。



A. AF 72D vs NFD; B. AF 76D vs NFD; C. AF 77D vs NFD; D. AOD vs NFD.

图4 优势菌种强化发酵浏阳豆豉同自然发酵浏阳豆豉的差异代谢物KEGG富集图

Fig. 4 KEGG enrichment analysis of differential metabolites among Liuyang Douchi fermented naturally and using starter cultures

2.2.3 不同菌种强化发酵浏阳豆豉的差异性化合物分析
为进一步讨论不同菌种发酵浏阳豆豉代谢差异, 以PLS-DA模型为基础, 筛选出VIP > 1.5、 $P < 0.05$ 的差异代谢物共62种, 如表1所示。其中氨基酸及其衍生物26种、有机酸及其衍生物16种、脂类及其衍生物12种、吡啶及其衍生物4种、核苷酸类及其衍生物4种。对62种差异代谢物绘制热图进行凝聚层次聚类(图5), 可将AF 72D和AF 77D聚为一类, NFD、AOD、AF 76D聚为一类, 可见AF 76D同NFD以及AOD代谢产物更为接近, 这与PLS-DA结果(图3A)一致。

氨基酸既是豆豉的重要呈味基础, 也是风味物质形成的底物^[24-25]。表1所筛选出的氨基酸类差异代谢物包括多种呈味氨基酸, 如呈苦味的L-赖氨酸以及呈甜味的L-丝氨酸。通过比较表1中不同菌种发酵豆豉的峰面积, 可知分离菌株强化发酵豆豉的L-赖氨酸峰含量均低于NFD, 而L-丝氨酸含量高于NFD及AOD, 这可能造成分离菌株强化发酵豆豉的甜度高于NFD。同时, 分离菌株强化发酵豆豉的色胺及腐胺含量要低于NFD, 可见分离菌株强化发酵豆豉要比自然菌种发酵豆豉更加安全健康^[26]。

有机酸在发酵过程中不仅可以抑制微生物活性, 延长豆豉的保藏期, 还可以增加发酵豆豉的风味, 而豆豉中的有机酸主要来源于大豆原料以及豆豉发酵过程中微生物的代谢^[27]。本实验共筛选出16种有机酸, 其中AF 77D的香草酸、琥珀酸、芥子酸在5组豆豉中含量最高, AF 72D次之。香草酸可转化为香草醛使豆豉具有香茱兰豆香气和浓郁的奶香气; 琥珀酸是豆豉中主要存在的一类有机酸, 也是豆豉中鲜味的重要载体之一^[28]; 芥子酸是天然酚酸, 具有强氧化性, 可延长豆豉的保藏

期^[29]。此外，分离菌株强化发酵样品的甘草次酸含量要低于自然发酵样品，甘草次酸由甘草酸水解脱去糖酸链而形成，虽然其甜度为蔗糖的250倍，可使豆豉风味更佳，但是甘草次酸具有细胞毒性，人体过量食用甘草糖可能导致高血压^[30]，可见接种发酵在安全性可控方面更具有优势。

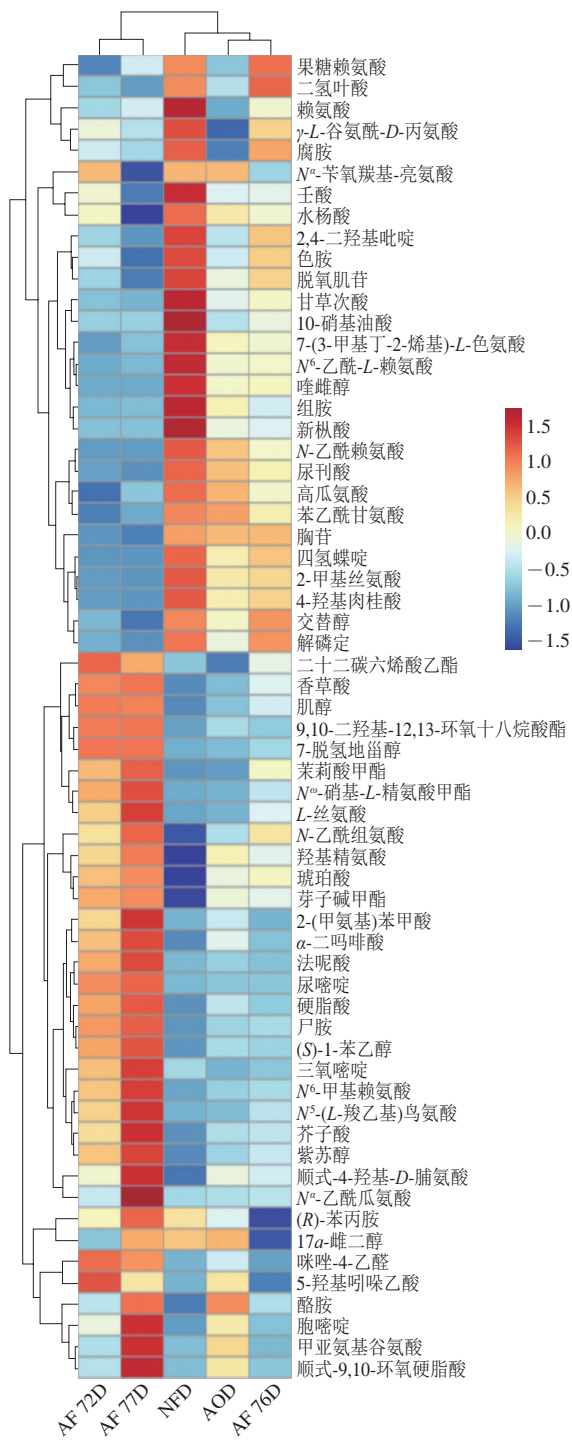


图5 不同菌株强化发酵浏阳豆豉差异代谢物热图

Fig. 5 Heatmap of differential metabolites in Liuyang Douchi fermented by different strains

表1 不同菌株强化发酵浏阳豆豉差异代谢物的筛选结果

Table 1 Screening results of differential metabolites in Liuyang Douchi fermented by different strains

序号	差异代谢物	VIP	P	峰面积				
				NFD	AOD	AF 72D	AF 76D	AF 77D
1	色胺	2.15	2.71×10^{-5}	3.72×10^{0a}	2.00×10^{0c}	1.98×10^{0c}	2.86×10^{0b}	9.80×10^{0d}
2	果糖赖氨酸	1.92	2.83×10^{-4}	2.27×10^{0a}	1.79×10^{0bc}	1.66×10^{0c}	2.32×10^{0b}	1.91×10^{0b}
3	γ -L-谷氨酰-D-丙氨酸	1.91	1.11×10^{-4}	1.63×10^{0a}	5.49×10^{0b}	1.07×10^{0ab}	1.29×10^{0ab}	9.05×10^{0b}
4	高瓜氨酸	1.85	5.24×10^{-5}	4.31×10^{0a}	3.70×10^{0b}	8.77×10^{0c}	2.78×10^{0b}	1.72×10^{0c}
5	N ^ε -乙酰-L-赖氨酸	1.83	3.84×10^{-5}	1.39×10^{0b}	8.28×10^{0b}	4.87×10^{0c}	8.36×10^{0b}	5.24×10^{0c}
6	2-甲基丝氨酸	1.82	3.93×10^{-5}	1.14×10^{0b}	7.14×10^{0b}	1.71×10^{0c}	8.07×10^{0b}	1.54×10^{0c}
7	甲亚氨基谷氨酸	1.82	1.22×10^{-4}	5.97×10^{0c}	2.52×10^{0b}	9.98×10^{0c}	5.45×10^{0b}	4.24×10^{0a}
8	N ^δ -甲基赖氨酸	1.80	2.41×10^{-5}	8.59×10^{0d}	1.36×10^{0c}	3.26×10^{0b}	1.51×10^{0c}	4.52×10^{0a}
9	羧基精氨酸	1.78	5.11×10^{-5}	8.24×10^{0b}	1.07×10^{0a}	1.11×10^{0b}	1.02×10^{0b}	1.19×10^{0b}
10	L-赖氨酸	1.77	4.48×10^{-5}	1.92×10^{0a}	3.39×10^{0d}	5.54×10^{0d}	9.21×10^{0b}	7.30×10^{0c}
11	咪唑-4-乙醛	1.76	4.18×10^{-5}	3.71×10^{0b}	6.29×10^{0b}	1.35×10^{0b}	3.13×10^{0b}	1.23×10^{0b}
12	顺式-4-羧基-D-脯氨酸	1.73	1.31×10^{-4}	3.10×10^{0c}	7.04×10^{0b}	7.41×10^{0b}	6.33×10^{0b}	1.25×10^{0b}
13	N ^ε -乙酰瓜氨酸	7.73	1.05×10^{-3}	6.80×10^{0b}	7.78×10^{0b}	9.80×10^{0b}	8.68×10^{0b}	3.94×10^{0a}
14	腐胺	1.66	3.25×10^{-5}	2.07×10^{0a}	1.01×10^{0a}	1.39×10^{0a}	1.88×10^{0a}	1.29×10^{0a}
15	7-(3-甲基丁-2-烯基)-L-色氨酸	1.65	8.18×10^{-4}	1.70×10^{0a}	1.12×10^{0b}	6.51×10^{0c}	1.07×10^{0bc}	7.69×10^{0c}
16	苯乙酰甘氨酸	1.65	1.38×10^{-4}	2.31×10^{0a}	2.19×10^{0a}	1.57×10^{0b}	1.58×10^{0b}	4.24×10^{0b}
17	尸胺	1.64	2.08×10^{-5}	1.35×10^{0d}	2.60×10^{0c}	6.75×10^{0b}	2.85×10^{0b}	7.78×10^{0b}
18	N ^δ -羧基赖氨酸	1.64	1.66×10^{-4}	9.46×10^{0b}	9.32×10^{0b}	9.32×10^{0b}	5.64×10^{0b}	2.92×10^{0b}
19	(R)-苯丙胺	1.64	2.20×10^{-4}	2.60×10^{0b}	2.41×10^{0b}	2.53×10^{0b}	1.96×10^{0b}	2.89×10^{0b}
20	N ^ε -(L-羧乙基)鸟氨酸	1.62	8.79×10^{-5}	1.05×10^{0c}	1.95×10^{0c}	1.50×10^{0b}	5.42×10^{0b}	2.55×10^{0a}
21	N-乙酰组氨酸	1.61	1.88×10^{-4}	9.24×10^{0c}	1.67×10^{0bc}	2.35×10^{0ab}	2.33×10^{0ab}	2.99×10^{0a}
22	N ^δ -硝基-L-精氨酸甲酯	1.59	2.75×10^{-5}	2.27×10^{0d}	2.40×10^{0d}	8.29×10^{0b}	4.04×10^{0c}	1.02×10^{0b}
23	酪胺	1.58	4.09×10^{-4}	6.45×10^{0b}	1.97×10^{0a}	1.12×10^{0ab}	1.09×10^{0ab}	2.07×10^{0a}
24	N-乙酰赖氨酸	1.55	2.97×10^{-5}	1.88×10^{0a}	1.53×10^{0b}	6.48×10^{0d}	1.23×10^{0b}	6.49×10^{0d}
25	组胺	1.52	2.70×10^{-5}	1.11×10^{0a}	5.67×10^{0b}	1.88×10^{0d}	3.90×10^{0c}	1.99×10^{0d}
26	L-丝氨酸	1.51	2.36×10^{-5}	8.81×10^{0d}	1.07×10^{0d}	3.90×10^{0b}	2.35×10^{0c}	5.72×10^{0b}
氨基酸及其衍生物 (26种)								
27	二氢叶酸	2.03	3.55×10^{-5}	5.14×10^{0b}	2.81×10^{0b}	2.42×10^{0c}	5.57×10^{0b}	1.91×10^{0c}
28	顺式-9,10-环氧硬脂酸	1.97	1.72×10^{-4}	1.95×10^{0c}	5.57×10^{0b}	3.02×10^{0c}	2.16×10^{0c}	1.00×10^{0b}
29	甘草次酸	1.92	2.46×10^{-5}	1.95×10^{0a}	1.02×10^{0b}	7.30×10^{0c}	1.15×10^{0b}	6.83×10^{0c}
30	2-(甲氨基)苯甲酸	1.89	5.85×10^{-5}	9.41×10^{0d}	1.27×10^{0c}	1.83×10^{0b}	9.56×10^{0d}	2.53×10^{0a}
31	壬酸	1.88	1.67×10^{-4}	7.97×10^{0b}	7.54×10^{0ab}	7.60×10^{0ab}	7.56×10^{0ab}	7.30×10^{0b}
32	硬脂酸	1.86	8.61×10^{-5}	1.68×10^{0b}	1.90×10^{0b}	2.28×10^{0b}	1.81×10^{0b}	2.42×10^{0a}
33	10-硝基油酸	1.76	1.54×10^{-4}	7.48×10^{0b}	3.97×10^{0bc}	3.67×10^{0c}	4.55×10^{0b}	3.68×10^{0c}
34	新枞酸	1.72	2.50×10^{-4}	4.70×10^{0c}	2.43×10^{0b}	1.58×10^{0b}	2.25×10^{0b}	1.57×10^{0b}
35	芥子酸	1.69	1.38×10^{-4}	1.98×10^{0c}	2.93×10^{0c}	4.49×10^{0b}	3.13×10^{0c}	6.42×10^{0a}
36	水杨酸	1.66	1.07×10^{-4}	4.64×10^{0b}	3.82×10^{0b}	3.66×10^{0b}	3.60×10^{0b}	2.12×10^{0c}
37	法呢酸	1.61	6.92×10^{-5}	6.46×10^{0c}	7.71×10^{0c}	1.84×10^{0b}	6.95×10^{0c}	2.27×10^{0b}
38	香草酸	1.61	3.15×10^{-5}	2.18×10^{0c}	2.69×10^{0c}	5.27×10^{0c}	3.53×10^{0b}	5.43×10^{0a}
39	4-羟基肉桂酸	1.55	8.15×10^{-5}	6.68×10^{0a}	4.11×10^{0b}	1.04×10^{0c}	4.80×10^{0b}	9.96×10^{0c}
40	尿刊酸	1.54	1.81×10^{-5}	1.14×10^{0a}	8.73×10^{0b}	1.03×10^{0d}	6.71×10^{0c}	4.96×10^{0d}
41	5-羟基咪唑乙酰胺	1.53	6.06×10^{-3}	1.80×10^{0a}	1.99×10^{0a}	2.15×10^{0b}	1.74×10^{0b}	1.99×10^{0a}
42	琥珀酸	1.52	3.46×10^{-5}	4.06×10^{0d}	2.16×10^{0c}	2.97×10^{0b}	2.35×10^{0c}	3.31×10^{0b}
有机酸及其衍生物 (16种)								
43	紫苏醇	1.87	2.53×10^{-5}	1.48×10^{0d}	2.62×10^{0c}	5.28×10^{0b}	3.17×10^{0c}	6.95×10^{0a}
44	芽子碱甲酯	1.97	5.08×10^{-5}	9.80×10^{0c}	6.69×10^{0b}	9.86×10^{0b}	6.35×10^{0b}	1.04×10^{0b}
45	茉莉酸甲酯	1.86	3.36×10^{-5}	8.26×10^{0c}	8.42×10^{0c}	1.51×10^{0ab}	1.28×10^{0b}	1.73×10^{0b}
46	交替醇	1.77	4.72×10^{-5}	4.75×10^{0a}	3.30×10^{0b}	1.85×10^{0c}	4.62×10^{0a}	1.16×10^{0b}

续表1

序号	差异代谢物	VIP	P	峰面积				
				NFD	AOD	AF 72D	AF 76D	AF 77D
47	(S)-1-苯乙醇	1.75	1.20×10 ⁻⁴	6.29×10 ^{0b}	1.06×10 ^{0b}	2.20×10 ³	9.93×10 ^{0b}	2.58×10 ³
48	肌醇	1.74	6.29×10 ⁻⁵	3.23×10 ^{3c}	5.24×10 ^{3c}	1.56×10 ^{0b}	7.84×10 ³	1.53×10 ^{0b}
49	二十二碳六烯酸乙酯	1.7	8.28×10 ⁻⁵	2.56×10 ^{0bc}	2.38×10 ^{0bc}	3.24×10 ^{0b}	2.77×10 ^{0b}	3.09×10 ^{0b}
50	喹唑醇	1.66	5.30×10 ⁻⁵	3.23×10 ³	1.42×10 ^{0b}	2.34×10 ^{0c}	1.48×10 ^{0b}	2.27×10 ^{0c}
51	17α-雌二醇	1.57	1.53×10 ⁻⁴	6.24×10 ^{0b}	6.31×10 ^{0b}	5.38×10 ^{0b}	4.87×10 ^{0b}	6.36×10 ^{0b}
52	9,10-二羟基-12,13-环氧十八烷酸酯	1.57	4.99×10 ⁻⁵	2.96×10 ^{0b}	6.63×10 ^{0b}	1.98×10 ^{0b}	5.67×10 ^{0b}	2.03×10 ^{0b}
53	α-二吗啡酸	1.55	2.76×10 ⁻³	2.48×10 ^{0b}	2.71×10 ^{0ab}	2.92×10 ^{0ab}	2.57×10 ^{0b}	3.10×10 ^{0a}
54	7-脱氢地甾醇	1.52	6.17×10 ⁻⁵	4.06×10 ^{3c}	6.39×10 ^{3c}	4.44×10 ^{0b}	1.0 ⁷ ×10 ^{0b}	4.42×10 ^{0b}
脂类及其衍生物 (12种)								
55	解磷定	2.04	2.83×10 ⁻⁵	7.28×10 ³	4.21×10 ^{0b}	2.13×10 ³	6.88×10 ³	1.58×10 ³
56	三氧嘧啶	1.85	2.81×10 ⁻⁵	5.13×10 ^{3c}	3.82×10 ^{3c}	1.02×10 ^{0b}	4.44×10 ³	1.37×10 ^{0b}
57	2,4-二羟基吡啶	1.82	2.50×10 ⁻⁴	4.60×10 ³	2.14×10 ^{0bc}	1.88×10 ^{0bc}	3.53×10 ³	1.27×10 ³
58	四氢蝶啶	1.63	2.91×10 ⁻⁵	6.35×10 ^{0b}	3.97×10 ^{0b}	9.31×10 ³	4.94×10 ^{0b}	8.83×10 ³
吡啶及其衍生物 (4种)								
59	脱氧肌苷	2.03	3.25×10 ⁻⁵	6.81×10 ³	4.22×10 ^{0bc}	3.32×10 ³	5.24×10 ³	2.27×10 ³
60	胞嘧啶	1.62	6.93×10 ⁻³	7.33×10 ^{0b}	9.06×10 ^{0b}	8.59×10 ^{0b}	7.69×10 ^{0b}	1.08×10 ^{0b}
61	胸苷	1.61	1.40×10 ⁻⁴	3.39×10 ³	3.14×10 ³	6.97×10 ^{0b}	3.15×10 ³	5.11×10 ^{0b}
62	尿嘧啶	1.5	4.89×10 ⁻⁵	3.45×10 ^{0c}	2.37×10 ³	4.52×10 ^{0b}	2.16×10 ³	5.15×10 ^{0b}
核苷酸类及其衍生物 (4种)								

脂类衍生物包括酯类、醇类。表1中，共鉴定出12种脂类及其衍生物，这些物质中有部分是芳香物质，可为豆豉增加风味。如(S)-1-苯乙醇带有清甜的草莓香以及栀子花香气味^[31]，茉莉酸甲酯有茉莉花香^[32]，而分离菌株强化发酵豆豉中的苯乙醇和茉莉酸甲酯的含量高于NFD，这赋予了分离菌株强化发酵豆豉较之NFD更加明显的清爽花果香气味，说明分离微生物是浏阳豆豉发酵中的优势微生物。

图5共筛选出4种吡啶及其衍生物（解磷定、三氧嘧啶、2,4-二羟基吡啶、四氢蝶啶），以及4种核苷酸及其衍生物（脱氧肌苷、胞嘧啶、胸苷、尿嘧啶）。其中解磷定医药上被用于烷基磷酸酯类家药中毒的解毒剂。而胞嘧啶与尿嘧啶均为核酸主要碱基组成成分之一，胞嘧啶是合成抗癌药物以及抗艾滋病药物的重要中间体，尿嘧啶与核糖生成的尿苷则是抗心脑血管疾病药物的关键原料，说明浏阳豆豉具有一定的药用价值^[33]。

2.2.4 不同菌种强化发酵浏阳豆豉差异代谢通路及代谢物关系分析

根据不同菌种强化发酵豆豉的差异代谢物构建了差异代谢通路及代谢物关系网络图（图6）。氨基酸的生物合成通路富集到的差异代谢物最多，涉及多种氨基酸如L-精氨酸、L-酪氨酸、L-谷氨酸、L-丝氨酸等。其中L-谷氨酸参加了7条关键代谢通路，是参加关键代谢通路最多的物质，有利于改善豆豉鲜味。其在精氨酸和脯氨酸代谢通路中由精氨酸的中间体N²-琥珀酸-L-鸟氨酸和N-琥珀酰-L-谷氨酸-5-半醛等以及脯氨酸的中间体1-吡诺林-5-

羧酸酯等反应生成，在N-乙酰谷氨酸合成酶[EC 2.3.1.1]的作用下转化为N-乙酰-L-谷氨酸可进一步生成苏氨酸。L-丝氨酸呈甜味，在豆豉发酵过程中共参与了4条代谢通路，其在L-丝氨酸脱水酶[EC 4.3.1.17]的催化下产生丙酮酸，而丙酮酸是豆豉中产酱香味的重要中间代谢物^[34]。L-精氨酸则参与了6条关键代谢通路，其在精氨酸和脯氨酸代谢通路中可转化生成L-脯氨酸参与蛋白质的消化吸收及ABC转运通路。L-酪氨酸参与了4条关键代谢通路，它可由苯丙氨酸在苯丙氨酸-4-羟化酶[EC 1.14.6.1]的作用下转化生成，也可在氨基酸的生物合成通路中由对羟苯丙酮酸通过芳香氨基酸转氨酶[EC 2.6.1.57]的作用生成。L-酪氨酸是合成多巴胺的原料，其被摄入人体后可在酪氨酸羟化酶的作用下转化为左旋多巴，并进一步生成多巴胺^[35]。

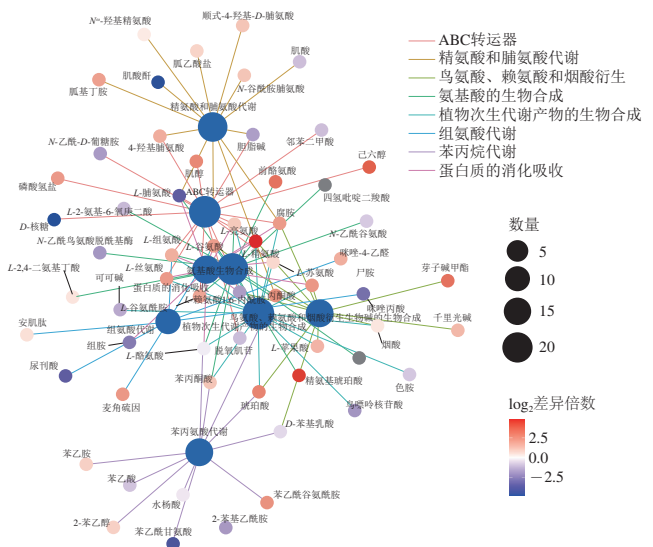


图6 不同菌种强化发酵浏阳豆豉差异代谢物及其代谢通路的富集关系图
Fig.6 Enrichment relationship network of differential metabolites and metabolic pathways in Liuyang Douchi fermented by different strains

3 结论

本研究通过测定分离菌株强化发酵同自然发酵以及米曲霉强化发酵浏阳豆豉的总酸、氨基酸态氮含量并采用HPLC-MS非靶向代谢组学技术对其代谢产物进行分析，发现AF 72D的总酸质量分数、氨基酸态氮含量最高，分别为3.52%、1.47 g/100 g，且渥堆后期较发酵初期总酸含量增长显著。PLS-DA结果显示5组豆豉中AF 76D和NFD的代谢产物差异最小。AF 72D、AF 76D、AF 77D同NFD在精氨酸生物合成、乙醛酸和二羧酸代谢、三羧酸循环代谢通路上均具有显著差异，而米曲霉强化发酵同NFD的差异体现在赖氨酸生物合成与苯丙氨酸的代谢等通路上。5组豆豉的差异代谢产物共62种，其中氨基酸类（26种）、脂类（12种）、有机酸类（16种）、吡

啉类(4种)及其核苷酸类(4种),并发现在其所映射的8条关键代谢通路中,氨基酸的生物合成通路富集到的差异代谢物最多,富集到21种。其中L-谷氨酸参与了7条关键代谢通路,可见分离菌株强化发酵对豆豉发酵过程中氨基酸代谢的影响最为显著。同时结合代谢组学发现浏阳豆豉中部分物质被应用于医药或为药用物质的重要前体,下一步将对关键核心物质成分进行目标调控,为浏阳豆豉成为药食同源提供重要的物质基础和理论依据。

参考文献:

- [1] 郑伟. 论四川饮食中的豆豉文化[J]. 中国调味品, 2021, 46(11): 187-190.
- [2] PAPADAKI E, MANTZOURIDOU F T. Citric acid production from the integration of Spanish-style green olive processing wastewaters with white grape pomace by *Aspergillus niger*[J]. Bioresource Technology, 2019, 280: 59-69. DOI:10.1016/j.biortech.2019.01.139.
- [3] ZHANG Y, ZENG T, WANG H W, et al. Correlation between the quality and microbial community of natural-type and artificial-type Yongchuan Douchi[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 140: 110788. DOI:10.1016/j.lwt.2020.110788.
- [4] 吴拥军, 孟望霓, 李耀中, 等. 纯种强化发酵细菌型豆豉研究[J]. 中国酿造, 2011(9): 56-60.
- [5] MCFETERS R F. Fermentation microorganisms and flavor changes in fermented foods[J]. Journal of Food Science, 2004, 69(1): 35-37. DOI:10.1111/j.1365-2621.2004.tb17876.x.
- [6] 李玉斌, 邓静, 吴华昌, 等. 3株功能菌在四川保宁醋强化发酵中的应用[J]. 食品科学, 2017, 38(12): 75-82. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201712012.
- [7] 石媛媛, 胡萍, 张琚, 等. 乳酸菌强化发酵对刺梨果醋风味品质的影响[J]. 食品与发酵科技, 2022, 58(2): 22-30.
- [8] HE G Q, HUANG J, LIANG R, et al. Comparing the differences of characteristic flavour between natural maturation and starter culture for *Mucor*-type Douchi[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2016, 51(5): 1252-1259. DOI:10.1111/ijfs.13077.
- [9] 郑心, 杨番, 夏程程, 等. 代谢组学在发酵食品研究中的应用[J]. 中国酿造, 2019, 38(7): 10-15.
- [10] ZHANG P, ZHANG P F, XIE M X, et al. Metaproteomics of microbiota in naturally fermented soybean paste, *da-jiang*[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(5): 1342-1349. DOI:10.1111/1750-3841.14146.
- [11] PENG J Y, MA L Q, KWOK L Y, et al. Untargeted metabolic footprinting reveals key differences between fermented brown milk and fermented milk metabolomes[J]. Journal of Dairy Science, 2022, 105(4): 2771-2790. DOI:10.3168/jds.2021-20844.
- [12] CHEN Y, LI P, HE W W, et al. Analysis of microbial community and the characterization of *Aspergillus flavus* in Liuyang Douchi during fermentation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 154: 112567. DOI:10.1016/j.lwt.2021.112567.
- [13] 国家卫生健康委员会. 食品中总酸的测定: GB 12456—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.
- [14] 国家卫生健康委员会. 食品中氨基酸态氮的测定: GB 5009.235—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [15] VASILEV N, BOCCARD J, LANG G, et al. Structured plant metabolomics for the simultaneous exploration of multiple factors[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37390. DOI:10.1038/srep37390.
- [16] OMNIA H A, EMAN M O, JOHN R F, et al. Metabolomics analysis and biological investigation of three Malvaceae plants[J]. Phytochemical Analysis, 2020, 31(2): 204-214. DOI:10.1002/pca.2883.
- [17] GUSTAVO M, FERNANDO S, JOSEPH A, et al. Aging-related compensated hypogonadism: role of metabolomic analysis in physiopathological and therapeutic evaluation[J]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2018, 183: 39-50. DOI:10.1016/j.jsbmb.2018.05.005.
- [18] 邓高文, 刘洋, 李跑, 等. 基于Illumina MiSeq高通量测序技术分析贵州水豆豉中细菌多样性[J]. 食品科学, 2021, 42(24): 61-66. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200902-017.
- [19] 张雪梅, 张玲, 高飞虎, 等. 大豆品种对毛霉豆豉传统发酵过程中营养成分的影响[J]. 南方农业, 2018(12): 51-53.
- [20] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 27-30. DOI:10.1093/nar/27.1.29.
- [21] CHAUHAN A S, ZHUANG L, GAN B. Antagonism between antiviral signaling and glycolysis[J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2019, 30(9): 571-573. DOI:10.1016/j.tem.2019.07.010.
- [22] SABITU B O, ADAMU U, et al. Profiling the antidepressant properties of phenyl piperidine derivatives as inhibitors of serotonin transporter (SERT) via cheminformatics modeling, molecular docking and ADMET predictions[J]. Scientific African, 2020, 9: e00517. DOI:10.1016/j.sciaf.2020.e00517.
- [23] 黎旺姐, 李勇, 崔明昆, 等. 烟草氨基酸代谢及其调控机制[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(21): 15-19.
- [24] 程远, 万红建, 姚祝平, 等. 不同品种樱桃番茄氨基酸组成及风味分析[J]. 核农学报, 2019, 33(11): 2177-2185.
- [25] 侯娜, 赵莉莉, 魏安智, 等. 不同种质花椒氨基酸组成及营养价值评价[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 113-118. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718018.
- [26] 胡鹏, 索化夷, 阚建全, 等. 中国传统发酵豆豉中生物胺含量[J]. 食品科学, 2013, 34(20): 108-112. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201320021.
- [27] SAJAD A M, FAROOQ A M. Use of organic acids for preservation and safety of traditional meat products[J]. Journal of Food Safety, 2018, 38(6): e12514. DOI:10.1111/jfs.12514.
- [28] 黄煜燃, 汪薇, 赵文红, 等. 不同鲜味物质对干腌马鲛鱼鲜味的贡献与比较分析[J]. 食品科学, 2021, 42(16): 138-144. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200903-033.
- [29] URSZULA G, DARIUSZ D, WIOLETTA P, et al. Phenolic acids proliferate and antioxidant properties of bread enriched with sprouted wheat flour[J]. Journal of Food Biochemistry, 2017, 41(4): e12386. DOI:10.1111/jfbc.12386.
- [30] ADAMCZAK M, WIECEK A. Food products that may cause an increase in blood pressure[J]. Current Hypertension Reports, 2020, 22(1): 2. DOI:10.1007/s11906-019-1007-y.
- [31] ZHOU Y, PENG Q Y, ZHANG L, et al. Characterization of enzymes specifically producing chiral flavor compounds (*R*)- and (*S*)-1-phenylethanol from tea (*Camellia sinensis*) flowers[J]. Food Chemistry, 2018, 280: 27-33. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.12.035.
- [32] FENG Z H, LI M, LI Y F, et al. Characterization of the orchid-like aroma contributors in selected premium tea leaves[J]. Food Research International, 2020, 129: 108841. DOI:10.1016/j.foodres.2019.108841.
- [33] 李宝宗. 5-氟尿嘧啶和5-氯尿嘧啶及其互变异构体的理论计算研究[J]. 化学学报, 2005(16): 1495-1499; 1466.
- [34] 曾金兴. 枯草芽孢杆菌酱香味基因 *bglH*、*sdhC* 和 *exuT* 的功能研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2021. DOI:10.27047/d.cnki.ggudu.2021.001690.
- [35] DONZELLA S, COLACCICCO A, NESPOLI L, et al. Mimicking natural metabolisms: cell-free flow preparation of dopamine[J]. ChemBiochem, 2022, 23(24): e202200462. DOI:10.1002/cbic.202200462.