

乳清炒米发酵饮料工艺优化及品质风味变化

吴涛¹, 王钰¹, 云雪艳^{1*}, 董同力嘎^{1*}, 于浩洋²

(1. 内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 畜产副产物综合利用内蒙古自治区工程研究中心, 内蒙古呼和浩特 010000) (2. 内蒙古浩源农业科技发展有限公司, 内蒙古赤峰 024000)

摘要: 乳清利用率低, 蒙古炒米深加工不足, 二者复配发酵具有高值化利用潜力。本研究以乳清和炒米为底物, 乳酸菌与酿酒酵母复合发酵制备饮料, 旨在揭示发酵前后品质与风味变化规律。通过单因素、Plackett-Burman 与响应面实验优化工艺, 并结合 HS-SPME-GC-MS 和 UPLC-MS 解析发酵前后风味物质及非挥发性代谢物变化。结果表明, 最佳工艺为乳酸菌接种量 0.60 wt.%, 发酵时间 32 h、发酵温度 37 °C, 在此条件下感官评分 93.68 分、酸度 70.94 °T。与未发酵相比, 发酵后 DPPH 和 ABTS 自由基清除率分别提高了 54.22% 和 44.90%, 总酚增加了 322.23 mg GAL L⁻¹。共鉴定 257 种挥发性成分, 发酵后酯类和醇类相对含量上升, 吡嗪及部分羰基化合物下降, 关键香气由 2,6-二乙基吡嗪等原料基调, 转向以己酸乙酯、异戊酸乙酯和 2-苯乙醇等为主的果香花香体系。代谢通路分析表明, 苯丙氨酸代谢、烟酸与烟酰胺代谢及氨基酸合成等途径与风味形成和品质提升密切相关。复合发酵显著提升饮料抗氧化活性并重塑风味特征, 为乳清资源高值化利用及地域特色谷物资源开发提供理论依据。

关键词: 乳清; 蒙古炒米; 响应面优化; 抗氧化活性; 挥发性风味物质; 差异代谢物

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.4.0231

Process Optimization and Changes in Quality and Flavor of a Whey-Roasted Rice Fermented Beverage

WU Tao¹, WANG Yu¹, YUN Xueyan^{1*}, DONG Tungalag^{1*}, YU Haoyang²

(1.College of Food Science and Engineering, Engineering Research center of Comprehensive utilization of livestock by-products of Inner Mongolia Autonomous Region, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010000, China)

(2.Inner Mongolia Haoyuan Agricultural Technology Development Co. Ltd., Chifeng 024000, China)

Abstract: Whey utilization remains low, and the deep processing of Mongolian parched rice is insufficient; therefore, their co-fermentation has considerable potential for high-value utilization. In this study, whey and parched rice were used as substrates to prepare a fermented beverage by co-fermentation with lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*, with the aim of elucidating the changes in quality and flavor before and after fermentation. Process parameters were optimized by single-factor experiments, Plackett-Burman design, and Box-Behnken response surface methodology. Changes in volatile compounds and non-volatile metabolites before and after fermentation were analyzed by HS-SPME-GC-MS and UPLC-MS, respectively. The results showed that the optimum conditions were a lactic acid bacteria inoculum of 0.60 wt.%, a fermentation time of 32 h, and a fermentation temperature of 37 °C. Under these conditions, the sensory score and titratable acidity reached 93.68 and 70.94 °T, respectively. Compared with the unfermented sample, the DPPH and ABTS radical-scavenging activities increased by 54.22% and 44.90%, respectively, after fermentation, while the total phenolic content increased by 322.23 mg GAL L⁻¹. A total of 257 volatile compounds were identified. After fermentation, the relative contents of esters and alcohols increased, whereas pyrazines and some carbonyl compounds decreased. The key aroma profile shifted from raw material-derived notes represented by compounds such as 2,6-diethylpyrazine to a fruity and floral aroma system dominated by ethyl hexanoate, ethyl isovalerate, and 2-phenylethanol. Metabolic pathway analysis indicated that phenylalanine metabolism, nicotinate and nicotinamide metabolism, and amino acid biosynthesis were closely associated with flavor formation and quality improvement. Co-fermentation significantly enhanced the antioxidant activity of the beverage and reshaped its flavor profile, providing a theoretical basis for the high-value utilization of whey and the development of regionally distinctive

收稿日期: 2026-02-09; 修回日期: 2026-04-14; 接受日期: 2026-04-20

基金项目: 中央引导地方科技发展资金 (2025ZY0128)

作者简介: 吴涛 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 农畜副产物精深加工与利用, E-mail: 15332717291@163.com

通讯作者: 董同力嘎 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品保鲜及贮藏技术, E-mail: dongtlg@imau.edu.cn; 共同通讯作者: 云雪艳 (1990-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 农产品贮藏加工, E-mail: yun_imau@163.com

cereal resources.

Key words: whey; mongolian parched rice; response surface methodology optimization; antioxidant activity; volatile flavor compounds; different metabolites

发酵是提升谷物食品营养与功能品质的有效途径。微生物代谢在形成特征风味的同时,可促进谷物中部分生物活性的生成与释放,降低植酸、单宁等抗营养因子含量,从而改善产品的营养利用率与食用品质^[1]。蒙古炒米是以内蒙古地区糜子为原料,经蒸煮、烘烤和研磨制成的全谷物食品,富含矿物质、膳食纤维、多酚及B族维生素等营养成分^[2,3]。热加工使其香气突出、消化率提高,具备作为发酵底物的潜力,但目前其开发应用仍以初加工产品为主,深度发酵转化研究相对有限。与此同时,乳清作为干酪等乳制品加工的主要副产物,虽富含乳糖、乳清蛋白、矿物质与维生素等多种营养成分,但其利用率偏低,亟需实现高值化转化^[4]。

研究表明,乳清与谷物类原料共发酵有助于改善产品风味层次并提升营养价值。乳清与小麦麸皮经乳酸菌与酵母菌协同发酵,游离氨基酸与酚酸含量提高,抗氧化活性增强^[5]。乳清与燕麦副产物混合体系经多菌种混合发酵后,有机酸等代谢产物增加^[6]。与普通谷物原料相比,蒙古炒米不仅具有全谷物的营养属性,其炒制过程还可提高淀粉糊化程度和底物可发酵性,并生成吡嗪、呋喃及醛酮等风味前体物质,为后续发酵风味构建提供了物质基础。乳清富含乳糖、乳清蛋白及矿物质等营养成分,且氨基酸组成较为均衡,因此二者复合作为发酵底物,有望实现营养互补与风味协同。与此同时,乳酸菌与酿酒酵母复合发酵相较于单一发酵更有利于底物的分级利用、风味前体转化及高级醇、酯类等关键香气物质的形成,从而促进产品品质提升。尽管已有研究为乳清与谷物共发酵提供了参考,但针对乳清与蒙古炒米这一特色复合底物的研究仍较为有限,尤其对其发酵前后营养品质变化、风味物质演变及代谢调控机制的系统解析尚显不足。

基于此,本研究以乳清与蒙古炒米为底物,采用乳酸菌与酿酒酵母复合发酵。通过单因素-响应面优化原料汁比例、接种量、发酵温度与时间,获得最佳发酵工艺。并据此制备乳清-炒米复合发酵饮料,探究发酵过程中总酚及DPPH、ABTS自由基清除率变化。同时采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用(HS-SPME-GC-MS)及超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS)技术分析发酵前后风味物质及代谢物的差异,解析发酵前后营养、风味变化与代谢物变化的内在联系。为炒米、乳清等地域特色资源的高值化利用以及复合发酵饮料的开发提供见解。

1 材料与方法

1.1 原料

炒米,乌兰察布海丰炒米厂;乳清,鄂尔多斯市蒙藏乳业;酿酒活性干酵母,安琪酵母股份有限公司;PC-01复合乳酸菌(活菌数为 1×10^{10} CFU/g),河北一然生物科技有限公司; α -淀粉酶(40 000 U/g)和糖化酶(100 000 U/g),购自北京索莱宝科技有限公司

1.1.1 试剂

K₂S₂O₈、无水乙醇、NaOH、柠檬酸、Na₂CO₃、福林酚试剂、没食子酸标准品,上海源叶生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

HR30-IIA2超净台,青岛海尔股份有限公司;WPL-230BE电热恒温培养箱,天津泰斯特仪器有限公司;DF-101S恒温水浴锅,巩义予华仪器有限公司;0-55糖度计,深圳赛普拓科技有限公司;PHSJ-3F型实验室pH计,上海雷磁科技有限公司;GC-MS,美国Agilent科技公司;Vanquish UPLC-Orbitrap Exploris 12,美国赛默飞世尔科技公司;DTX 880酶标仪,美国Beckman Coulter有限公司;DE-250多功能粉碎机,浙江红景天工贸有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 乳清-炒米复合发酵饮料工艺流程

工艺流程:炒米前处理→与乳清混合→调糖→调pH值→杀菌→接种→发酵→过滤→装瓶、灭菌→成品

炒米前处理:将炒米用粉碎机研磨1 min,之后过40目筛,与水按1:5混合(m/V)。加入0.5 wt.% α -淀粉酶在93℃下水浴恒温加热1 h,待冷却至室温后,加入1 wt.%糖化酶在65℃加热2 h,之后升温至100℃持续20 min灭酶,之后冷却至室温获得炒米液。

将乳清与炒米液混合，使用蔗糖将初始糖度调至 14.5 Brix，使用 0.1 mol L⁻¹ 的柠檬酸将初始 pH 值调至 5.2。在超净台中接种酿酒酵母和乳酸菌置于恒温培养箱进行发酵。在无菌条件下采用 250 目滤网进行过滤，取滤液用提前杀菌处理的容器进行灌装，之后置于 65 ℃下杀菌 30 min，制得发酵饮料。

1.2.2 乳清-炒米复合发酵饮料工艺优化

1.2.2.1 单因素实验

在上述工艺的基础上，固定原料汁比例（乳清:炒米液=7:3）、发酵温度 37 ℃、发酵时间 32 h、乳酸菌接种量 0.6 wt.%和酵母菌接种量 0.4 wt.%，除考察因素外，其余发酵条件保持不变。探究不同发酵温度（25、29、33、37 和 41 ℃）、发酵时间（24、28、32、36 和 40 h）、原料汁比例（乳清:炒米液=10:0、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5 和 0:10）、乳酸菌接种量（0.2 wt.%、0.4 wt.%、0.6 wt.%、0.8 wt.%和 1 wt.%）和酵母菌接种量（质量分数 0.2 wt.%、0.4 wt.%、0.6 wt.%、0.8 wt.%和 1 wt.%）对乳清-炒米复合发酵饮料感官评分、酸度的影响。其中原料汁比例设置了单一底物的对照组以及不同复配梯度的筛选组，其中 10:0 和 0:10 分别作为纯乳清和纯炒米对照组，9:1、8:2、7:3、6:4 和 5:5 为复配梯度组，同时设置了 5:5 的等比例节点，旨在考察随着炒米比例进一步升高，饮料感官品质与酸度变化是否出现趋势拐点。改变以上某种因素，其他条件不变，确定最佳水平。

1.2.2.2 Plackett-Burman 试验

PB 试验中各因素水平均是在单因素确定的较优区域内选取了两个相邻实际水平，并按数值大小分别编码为低水平（-1）和高水平（+1）。其中，高、低水平仅表示试验编码，不代表响应值的优劣。在单因素试验基础上采用 N=7 的 Plackett-Burman（PB）试验设计，分别考察 5 个因素对感官评分和酸度的影响，并对数据进行方差分析与模型拟合，筛选显著因子并完成重要性排序。从中选取影响最显著的 3 个因素开展响应面优化实验，试验设计见表 1。

表 1 Plackett-Burman 实验因素水平及编码
Table 1 Plackett-Burman experimental factor levels and coding

因素	发酵条件	低水平	高水平
X ₁	原料汁比例	7:3	8:2
X ₂	乳酸菌接种量/wt. %	0.4	0.6
X ₃	酵母菌接种量/wt. %	0.2	0.4
X ₄	发酵温度/℃	33	37
X ₅	发酵时间/h	32	36
X ₆ 、X ₇	虚拟因素		

1.2.2.3 响应面实验

根据 Plackett-Burman 实验结果，以乳酸菌接种量、发酵温度和发酵时间为自变量，探究发酵温度、发酵时间、乳酸菌接种量对感官评分和酸度的影响。设置三因素三水平 BBD 试验，每个样品做 3 次平行，实验因素水平见表 2。

表 2 Box-behnken 实验因素水平及编码
Table 2 Box-behnken experimental factor levels and coding

水平	影响因素		
	乳酸菌接种量/wt. %	发酵温度/℃	发酵时间/h
-1	0.5	35	30
0	0.6	37	32
1	0.7	39	34

1.2.3 感官评价

由 10 名受过专业培训的感官评价员（5 男 5 女，年龄在 22~30 岁之间）在感官评价实验室进行感官评价，打分标准参照表 3。

表 3 发酵饮料感官评分表
Table 3 Sensory evaluation criteria for the fermented beverage

指标	评分/分	评分标准
	8~10	色泽呈深黄/金黄，均匀一致；光泽明显；无浑浊异常

	6~8	色泽黄色明显，基本均匀；光泽较好
	3~6	色泽偏浅黄或略暗，均匀性一般；光泽一般
	<3	色泽暗淡不均匀，浑浊无光泽，影响外观
	15~20	体系均一稳定，无肉眼可见沉淀与分层
	10~15	轻微沉淀或少量颗粒出现，无明显分层
组织状态	5~10	沉淀较多或出现轻微分层
	<5	大量沉淀产生，分层明显
	15~20	酸甜协调，入口柔和；无明显酸涩刺激感
	10~15	略酸或略甜，整体可以接受，有轻微刺激感
酸甜度	5~10	偏酸或偏甜，酸涩、刺激感较突出
	<5	过酸或过甜，酸涩、刺激感明显，难以接受
	15~20	米香、乳香味突出，醇香较浓，风味协调无任何异味
	10~15	米香、乳香味突出，略有醇香，风味较协调，无任何异味
风味	5~10	米香、乳香味较淡，无醇香，风味不协调，有其它杂味
	<5	香气寡淡，风味明显不协调且难以接受，有明显异味
	20~30	口感细腻顺滑，回味愉悦
	10~15	口感较顺，略有涩感，回味略淡
口感	<10	口感粗糙，涩感明显，回味差，难以接受

1.2.4 功能活性及相关品质指标测定

1.2.4.1 DPPH 自由基清除率测定

使用 DPPH 自由基清除能力试剂盒进行检测。取样品与 DPPH 溶液混合，按试剂盒说明书开始操作，用酶标仪在 517 nm 测吸光度。

$$R_1 = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_w}\right) \times 100$$

(1)

式中：
 R_1 ——为 DPPH 自由基清除率，%；
 A_s ——为样品组吸光度；
 A_b ——为对照组吸光度；
 A_w ——为空白组吸光度。

1.2.4.2 ABTS 自由基清除率测定

参考 Zhou 等^[7]的方法并稍作修改，将 7.4 mmol L⁻¹ 的 ABTS 母液与 2.6 mmol L⁻¹ 的 K₂S₂O₈ 溶液等体积混合避光反应 12 h，用 95%乙醇稀释 25 倍制得 ABTS 工作液。将 ABTS 工作液与样品以 4:1 混合，在暗处反应 30 min 后于 734 nm 测吸光度，以 Vc 作为空白对照。

$$R_2 = \frac{A_b - A_s}{A_b} \times 100$$

(2)

式中：
 R_2 ——为 ABTS 自由基清除率，%；
 A_b ——为样品与 ABTS 工作液的吸光度；
 A_s ——为 Vc 与 ABTS 的吸光度。

1.2.4.3 总酚含量测定

参考 T/AHFIA 005-2018《植物提取物及其制品中总多酚含量的测定》：发酵后样品经 10 000 r min⁻¹ 离心 10 min 保留上清液，取样品 1 mL、福林酚试剂 2.5 mL 和 2.5 mL Na₂CO₃ 于 10 mL 比色管中，摇匀后加水定容至 10 mL，摇匀后置于 40 ℃水浴加热 60 min，静置冷却 20 min 后测吸光度。以没食子酸浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标，

绘制标准曲线: $Y=0.0039x+0.0018$, $R^2=0.9978$ 。

1.2.4.4 酸度测定

根据 GB 5009.239-2016《食品酸度的测定》,采用酚酞指示剂法进行酸度的测定。

1.2.4.5 酒精含量测定

根据 GB 5009.225-2023《食品安全国家标准 酒和食用酒精中乙醇浓度的测定》,采用酒精计法进行测定。

1.2.5 挥发性香气成分分析

取 1 mL 样品于 20 mL 顶空瓶, SPME 条件: 60 °C 预热 15 min, 萃取 30 min, 脱附 4 min。GC-MS: 采用色谱柱 DB-Wax (30 m×0.25 mm×0.25 μm) 进行物质分离; 氦气流速 1.0 mL min⁻¹ (进样口吹扫 3.0 mL min⁻¹)。色谱柱温度梯度: 40 °C 保持 4 min, 以 5 °C min⁻¹ 升至 245 °C 保持 5 min。质谱检测系统参数: 传输线温度 250 °C, 离子源 230 °C, 四极杆 150 °C; 质谱采用 EI (70 eV), 扫描范围 m/z 20~400, 溶剂延迟 2.37 min。

使用以下方程计算相对气味活性值 (ROAV_A):

$$R_3 = 100 \times \frac{C_A}{C_{STAN}} \times \frac{T_{STAN}}{T_A} \quad (3)$$

式中:

R_3 ——为化合物的相对气味活性值;

C_A ——为化合物的相对百分比;

T_A ——为化合物的感官阈值;

C_{STAN} ——为对样品组总体风味贡献最大化合物的相对百分比;

T_{STAN} ——为对样品组总体风味贡献最大的化合物的感官阈值。

1.2.6 UPLC-MS 测定

不同发酵阶段样品取 100 μL, 加入 400 μL 含同位素内标的甲醇/乙腈 (1:1, V/V) 提取液, 涡旋 30 min、冰水超声 10 min, -40 °C 静置 1 h 后于 4 °C、13 800 g 离心 15 min, 取上清进样; 各样品上清等体积混合作为 QC 样。采用 UPLC-MS 进行非靶向代谢组学检测, BEH Amide 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 进样量 2 μL, 流量 0.4 mL min⁻¹, 柱温 40 °C、进样器 4 °C; 流动相 A 为 25 mmol L⁻¹ 乙酸铵+25 mmol L⁻¹ 氨水溶液, B 为乙腈; 正/负离子喷雾电压 3.8/-3.4 kV (全扫描/二级分辨率 60 000/15 000, NCE 20/30/40)。原始数据经 ProteoWizard 转为 mzXML 后进行峰提取与注释 (BiotreeDB V3.0), 总离子流归一化后进行 PCA 和 OPLS-DA 及 7 折交叉验证; 以 VIP>1 且 $P<0.05$ 筛选差异代谢物, 进一步结合 KEGG 与 MetaboAnalyst 开展通路富集分析。

1.2.7 数据统计分析

每组试验均作 3 次平行, 使用 SPSS Statistics 20 进行方差统计分析。响应面优化试验使用 Design-Expert 13 进行模型拟合与方差分析, 使用 Origin 2021 进行图片绘制与主成分分析。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

2.1.1 原料汁比例

由图 1a 可知, 随着炒米液比例增加, 感官评分呈先升后降的趋势。纯乳清 (10:0) 和纯炒米组 (0:10) 口感酸涩, 感官评分较低, 说明单一底物不利于整体风味的形成。乳清液: 炒米液为 7:3 时感官评分最佳 (92.9 分), 显著高于其余处理组 ($P<0.05$), 该比例下口感与香气协调性较好。酸度随着炒米液比例增加呈先降后升的趋势, 纯乳清与纯炒米组酸度最高, 分别为 81.21 °T 和 84.07 °T, 中间比例组酸度呈波动趋势, 其中 7:3 组达到 70.67 °T, 与相邻两组差异不显著。这可能是由于加入炒米后, 底物体系的碳源构成和缓冲特性发生变化, 在一定程度上减缓了单一乳糖体系中酸度的过度累积, 从而使体系酸度趋于平衡^[8]。综合感官评分与酸度变化, 确定乳清液: 炒米液 7:3 为单因素最优配比, 并选取 8:2 和 7:3 作为 Plackett-Burman (PB) 试验的高、低水平。

2.1.2 乳酸菌添加量

如图 1b 所示, 随乳酸菌接种量的增加, 感官评分呈先升后降的趋势。接种量为 0.6 wt.% 时感官评分最高 (91.8

分), 显著高于 0.2 wt.% 和 1.0 wt.% 处理组 ($P<0.05$)。酸度随接种量的增加而升高, 但在 0.6~1.0 wt.% 组无显著差异, 表明接种量超过 0.6 wt.% 后体系酸度趋于稳定, 然而随着接种量的进一步增加, 感官评分迅速下降。过高的接种量可能加剧菌体间营养竞争以及代谢产物累积, 进而影响发酵体系的风味协调及乳酸菌代谢活性^[9]。综合上述指标变化, 确定乳酸菌接种量 0.6 wt.% 为单因素最佳水平, 选取 0.6 wt.% 和 0.4 wt.% 作为 PB 试验的高、低水平。

2.1.3 酵母菌添加量

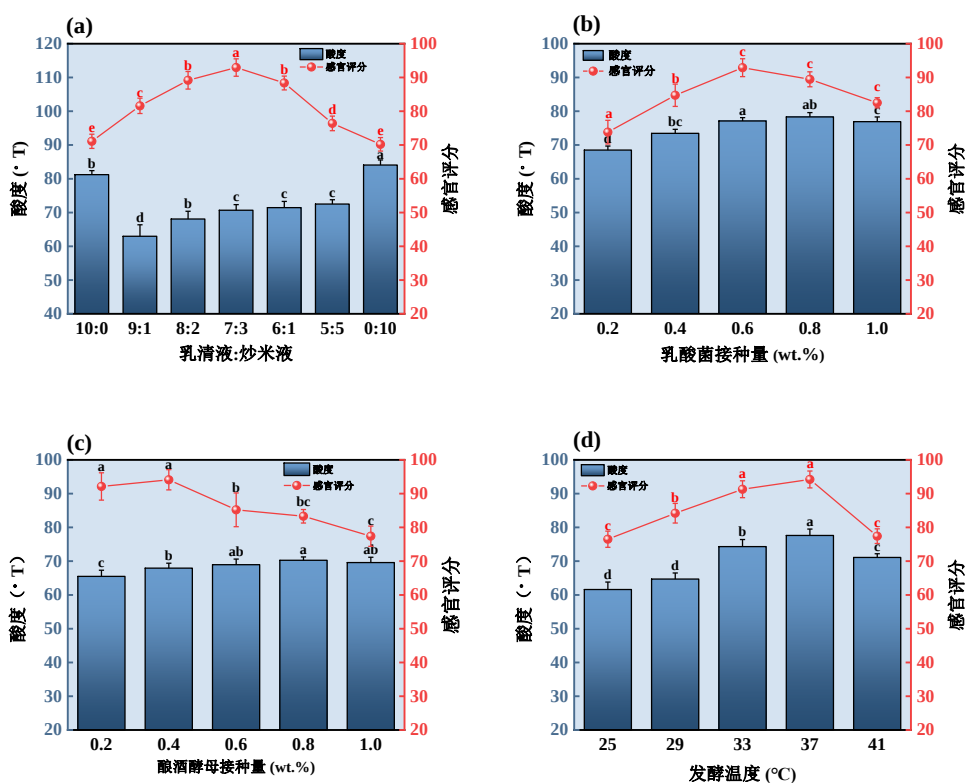
如图 1c 所示, 酸度随着酵母菌接种量整体呈上升趋势, 并在 0.8 wt.% 达到最高 70.26 °T。感官评分则呈现先升后降的趋势, 在 0.4 wt.% 达到最高 94.1 分, 而当接种量增加至 0.6~0.8 wt.% 时感官评分显著降低 ($P<0.05$), 其中 0.8 wt.%、1 wt.% 两组风味较差, 整体感官评分处于较低水平。酵母在发酵过程中可生成多种挥发性风味物质, 适宜的接种量有助于香气的构建, 然而接种量过高可能导致代谢产物积累并产生杂味, 从而降低体系感官接受度^[10]。综合上述指标变化, 确定酵母菌接种量 0.4 wt.% 为单因素最佳水平, 选取 0.4 和 0.2 wt.% 作为 PB 试验的高、低水平。

2.1.4 发酵温度

如图 1d 所示, 发酵温度对酸度和感官评分影响显著。在 25~37 °C 区间, 感官评分随着发酵温度的增加而升高, 在 37 °C 达到最高 94.6 分。同时, 酸度在 25~37 °C 逐渐升高, 在 37 °C 时达到最高。当温度超过 37 °C, 感官评分与酸度开始下降, 其中感官评分在 41 °C 时达到最低。温度是影响微生物生长与代谢的关键环境因素, 适宜温度有利于乳酸菌与酵母的协同代谢及风味物质生成, 而温度过高或过低可能会抑制代谢效率并破坏风味平衡。综合感官与酸度指标, 确定 37 °C 为单因素最佳发酵温度, 选取 37 °C 与 33 °C 作为 PB 试验的高、低水平。

2.1.5 发酵时间

如图 1e 所示, 在 24~32 h 区间, 感官评分随着发酵时间的延长而增加, 并 32 h 达到最高 93.5 分, 显著高于 24 h 和 40 h 组 ($P<0.05$), 之后感官评分开始下降。酸度随着时间延长整体呈增加趋势, 在 24~32 h 显著增加, 在 32 h 达到 77.44 °T, 32 h 后无显著增加, 表明体系酸度趋于稳定。发酵早期底物充足、微生物代谢活跃导致产酸加速, 随着时间的延长, 体系中底物逐渐消耗及代谢产物积累导致代谢速率降低, 酸度增速趋缓^[11]。综合上述指标变化, 确定 32 h 为单因素最佳发酵时间, 选取 36 h 和 32 h 作为 PB 试验的高、低水平。



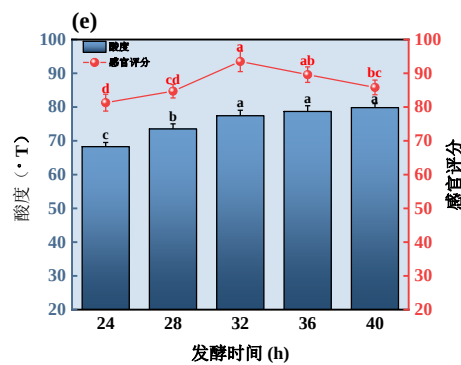


图 1 单因素试验结果

Fig.1 Results of single-factor experient

注：图中不同字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。下图同。

2.2 响应面实验

2.2.1 Plackett-Burman 试验

Plackett - Burman（PB）试验是一种两水平多因素筛选方法，可在较少试验次数下快速识别对响应值影响显著的关键因素^[12]。其显著性分析结果见表 4。两模型均达到显著水平（ $P<0.01$ ），且拟合度较好（ $R^2=0.969\ 2$ ， $R^2_{adj}=0.915\ 2$ ；酸度： $R^2=0.977\ 4$ ， $R^2_{adj}=0.937\ 8$ ），表明模型有较好的解释和预测能力。

发酵温度、原料汁比例、乳酸菌接种量及发酵时间对感官评分均产生显著影响（ $P<0.05$ ），根据表中 F 值大小，其影响强度依次为：发酵温度>原料汁比例>乳酸菌接种量>发酵时间。上述各因素对酸度的影响同样显著。影响强度依次为：乳酸菌接种量>发酵温度>原料汁比例>发酵时间。

由于响应面优化要求自变量独立连续，而原料汁比例属于比值型因素，且酵母菌接种量对响应值影响均不显著。因此，将原料汁比例及酵母菌接种量固定在单因素最佳水平，并综合上述响应值变化结果，选取乳酸菌接种量、发酵温度和发酵时间作为后续最陡爬坡试验及响应面优化的关键因素。

表 4 Plackett-Burman 实验因素、水平及显著性分析

Table 4 Plackett-Burman experiment factors, levels, and significance analysis

来源	自由度	感官评分		酸度	
		F 值	P 值	F 值	P 值
模型	7	17.95	0.007 1**	24.70	0.003 9**
A-原料汁比例	1	28.92	0.005 8**	37.28	0.003 6**
B-乳酸菌接种量/wt.%	1	28.28	0.006 0**	46.13	0.002 5**
C-酵母菌接种量/wt.%	1	1.02	0.369 6	2.86	0.166 3
D-发酵温度/℃	1	30.53	0.005 2**	38.68	0.003 4**
E-发酵时间/h	1	27.03	0.006 5**	11.15	0.028 9*
虚拟因素 F	1	0.3530	0.584 4	11.54	0.027 3
虚拟因素 G	1	9.55	0.036 6	25.29	0.007 3
残差	4				
总和	11				
R^2		0.969 2		0.977 4	
R^2_{adj}		0.915 2		0.937 8	

注：*表示显著， $P<0.05$ ；**表示极显著， $P<0.01$ 。

2.2.2 Box-behnken 试验

基于最陡爬坡试验确定的中心区域，采用 Box-behnken 设计对乳酸菌接种量（A）、发酵时间（B）和发酵温度（C）进行响应面优化（表 5）。建立二次多项式回归模型如下：

感官评分: $X=92.29+0.095A+0.532\ 5B-0.542\ 5C-1.69AB-1.54AC-0.707\ 5BC-1.89A^2-1.39B^2-0.700\ 7C^2$

酸度: $Y=71.82+0.012\ 5A+0.487\ 5B+0.025\ 0C+0.150\ 0AB-0.175\ 0AC+0.225\ 0BC-0.560\ 0A^2-0.760\ 0B^2-0.385\ 0C^2$

方差分析结果如表 6 所示。两个模型整体均显著 ($P<0.01$), 且失拟项不显著 ($P>0.05$), 表明模型拟合良好。感官评分模型 $R^2=0.955\ 0$ 、 $R^2_{\text{adj}}=0.897\ 2$, 酸度模型的 $R^2=0.986\ 2$ 、 $R^2_{\text{adj}}=0.968\ 4$, 表明模型对于响应值变化具有较强解释能力。

对于感官评分而言, 二次项 A^2 、 B^2 以及交互项 AB 、 AC 影响显著, 其中乳酸菌接种量与发酵温度、发酵时间之间的交互作用尤为明显。图 2 显示, 乳酸菌接种量与发酵时间、发酵温度的交互作用显著。对酸度而言, 二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 及交互项 AB 、 AC 、 BC 均显著 ($P<0.05$)。图 3 表明, 发酵时间在交互作用中对酸度的影响幅度较大, 发酵温度与乳酸菌接种量对酸度的影响程度相近, 二者与发酵时间的协同作用显著增强体系酸化水平。

综合模型预测, 最优工艺条件为乳酸菌接种量 0.60 wt.%、发酵时间 32.54 h、发酵温度 36.73 $^{\circ}\text{C}$, 对应预测感官评分 92.42 分、酸度 71.88 $^{\circ}\text{T}$ 。结合实际可操作性, 取乳酸菌接种量 0.6 wt.%、发酵时间 32 h、发酵温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 进行验证, 所得感官评分 93.68 分、酸度 70.94 $^{\circ}\text{T}$ 。发酵前乳清炒米复合饮料的酸度为 25.76 $^{\circ}\text{T}$, 发酵后酸度明显升高, 表明复合发酵显著促进了体系酸性代谢产物的积累。此外, 在该最优工艺条件下, 发酵饮料的酒精含量为 4.30% vol, 说明酿酒酵母在复合发酵体系中保持了较好的代谢活性。验证结果与预测结果接近, 验证了模型的可靠性。

表 5 Box-behnken 实验结果

Table 5 Results of Box-behnken experiment

序号	编码			感官评分	酸度
	A 乳酸菌接种量/wt.%	B 发酵时间/h	C 发酵温度/ $^{\circ}\text{C}$		
1	0	1	-1	92 $\pm$ 2.51	70.9 $\pm$ 0.92
2	0	-1	1	89.83 $\pm$ 1.33	70 $\pm$ 1.01
3	-1	-1	0	86.5 $\pm$ 1.02	70.2 $\pm$ 0.64
4	0	0	0	92.83 $\pm$ 2.64	71.7 $\pm$ 1.18
5	0	0	0	93 $\pm$ 1.15	71.9 $\pm$ 0.86
6	1	0	-1	91.67 $\pm$ 1.85	71.1 $\pm$ 0.77
7	0	0	0	91.83 $\pm$ 2.03	71.7 $\pm$ 1.16
8	0	-1	-1	89.33 $\pm$ 2.26	70.3 $\pm$ 0.68
9	1	1	0	88.17 $\pm$ 1.89	71.1 $\pm$ 0.88
10	0	0	0	92.37 $\pm$ 1.77	72 $\pm$ 0.36
11	0	0	0	91.44 $\pm$ 1.18	71.8 $\pm$ 0.77
12	-1	0	-1	89 $\pm$ 2.23	70.7 $\pm$ 0.80
13	-1	0	1	90.83 $\pm$ 1.67	71 $\pm$ 0.41
14	-1	1	0	90.83 $\pm$ 1.31	70.8 $\pm$ 0.84
15	1	0	1	87.33 $\pm$ 2.18	70.7 $\pm$ 0.96
16	0	1	1	89.67 $\pm$ 1.94	71.5 $\pm$ 0.57
17	1	-1	0	90.67 $\pm$ 1.31	69.9 $\pm$ 1.01

表 6 回归模型方差和显著性检验分析表

Table 6 Regression model variance and significance test analysis table

来源	自由度	感官评分		酸度	
		F 值	P 值	F 值	P 值
模型	9	16.52	0.000 6**	55.44	<0.000 1**
A-乳酸菌接种量	1	0.194 5	0.672 5	0.087 1	0.776 5
B-发酵时间	1	6.11	0.042 7*	132.43	<0.000 1**
C-发酵温度	1	6.34	0.039 9*	0.3483	0.573 6
AB	1	30.69	0.000 9**	6.27	0.040 8*

AC	1	25.64	0.001 5**	8.53	0.022 3*
BC	1	5.39	0.053 2	14.10	0.007 1**
A ²	1	40.34	0.000 4**	91.97	<0.000 1**
B ²	1	21.78	0.002 3**	169.39	<0.000 1**
C ²	1	5.57	0.050 3	43.47	0.000 3
残差	7				
失拟项	3	0.662 1	0.617 3	0.637 3	0.629 5
纯误差	4				
总误差	16				
决定系数 R ²		0.955 0		0.986 2	
预测系数 R ² _{adj}		0.897 2		0.968 4	

注: *表示显著, $P<0.05$; **表示极显著, $P<0.01$ 。

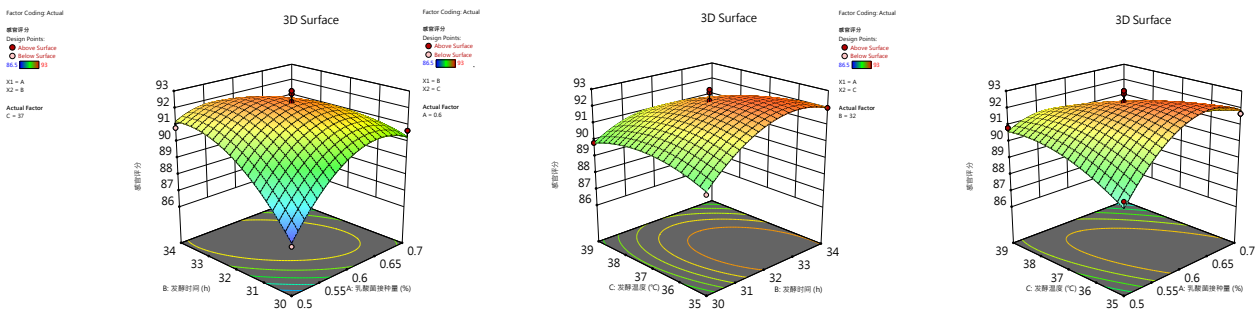


图 2 各因素交互作用对感官评分的等高线图

Fig.2 Contour plots of the interactions between various factors on sensory score

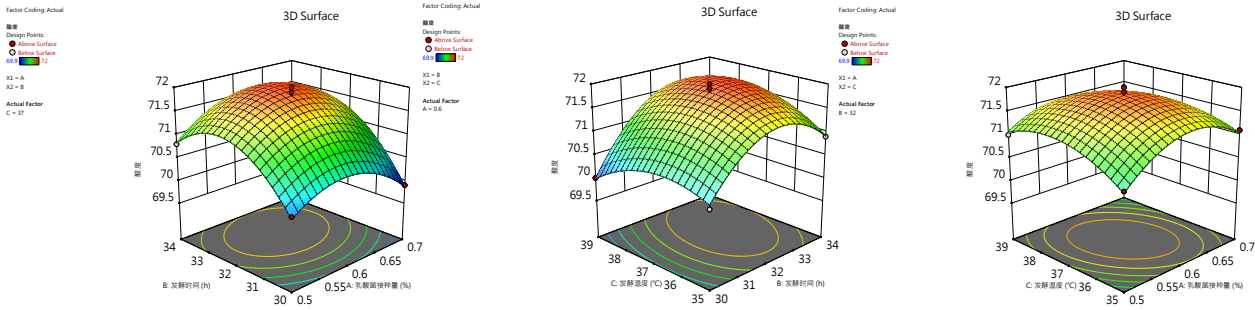


图 3 各因素交互作用对酸度的等高线图

Fig.3 Contour plots of the interactions between various factors on acidity

2.3 抗氧化活性变化

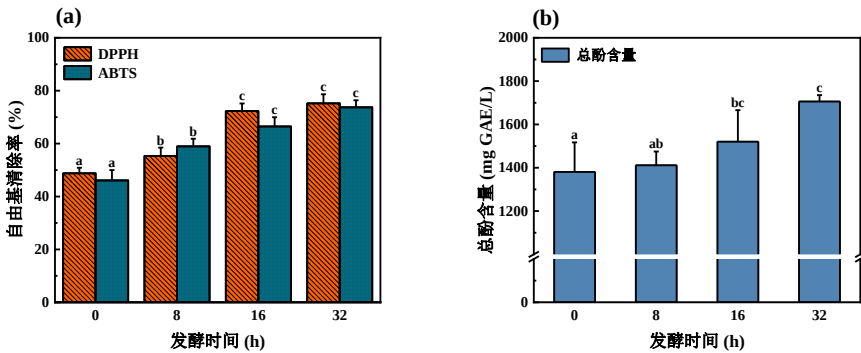


图 4 发酵饮料抗氧化活性变化

Fig.4 Changes in antioxidant activity during fermentation of the beverage

注: (a) DPPH、ABTS 自由基清除率变化; (b) 总酚含量变化。

乳清-炒米复合发酵饮料在发酵过程中的抗氧化活性变化见图 4。随着发酵进行, DPPH 与 ABTS 自由基清除率整体上升(图 4a)。与发酵前(0 h)相比, 32 h 时 DPPH 自由基清除率由 48.78% 提高至 75.23%, 提高了 54.22%; ABTS 自由基清除率由 46.11% 提高至 73.74%, 提高了 44.9%。与之相对应, 总酚含量在发酵过程中持续增加(图 4b), 由 0 h 的 $1\ 383.33\ \text{mg GAL L}^{-1}$ 增加至 $1\ 705.56\ \text{mg GAL L}^{-1}$ 。上述结果表明, 复合发酵显著提升了饮料的抗氧化性。王琪等^[13]采用植物乳杆菌、德氏乳杆菌等乳酸菌对燕麦和藜麦进行复合发酵, 发酵后藜麦和燕麦的多酚含量分别提升了 51.59% 和 55.01%。谷物中含有大量的酚类物质, 而发酵过程中微生物的 β -葡萄糖苷酶、纤维素酶等酶类可以分解植物细胞壁从而促进其结合态酚类物质的释放, 导致发酵后体系中总酚含量和抗氧化能力大幅提升^[14]。

2.4 风味物质测定结果分析

2.4.1 模型分析

与发酵前(0 h)相比, 发酵结束后(32 h)乳清-炒米复合发酵饮料的挥发性风味谱发生明显变化(图 5)。共鉴定出 257 种挥发性化合物, 包括酯类 60 种、醇类 58 种、酮类 40 种、吡嗪类 28 种、醛类 23 种、酚类 17 种、酸类 11 种及其它类 20 种。与发酵前相比, 发酵后乳清-炒米复合发酵饮料中醇类、酯类、酸类和酚类化合物的相对含量增加, 而醛类、酮类及吡嗪类的相对含量下降, 表明发酵过程显著重塑了饮料的挥发性风味组成。

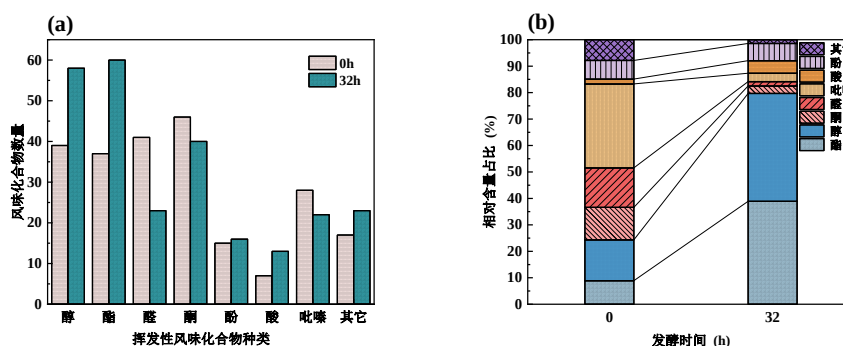


图 5 发酵饮料风味化合物物质变化

Fig.5 Changes in volatile flavor compounds during fermentation of the beverage

2.4.2 差异风味物质分析

采用主成分分析 (PCA) 对发酵前后样品整体挥发性风味物质差异进行多变量分析 (图 6a)。所有样本均落入 95% 置信区间内, PC1 与 PC2 累积解释总方差的 77%。发酵前(0 h)与发酵后(32 h)样品在得分图中形成清晰的聚类且相距较远, 说明发酵前后整体风味特征发生了明显的变化。PCA 主要用于反映样品间整体差异与聚类趋势, 但对于分类无关变异的区分能力有限。因此, 在 PCA 分析基础上, 进一步建立正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 模型, 以剔除与分类无关的正交变量、增强组间判别能力, 并更可靠地筛选关键差异风味物质^[15]。OPLS-DA 得分图 (图 6b) 显示, 发酵前后样品组内聚集、组间分离明显, 说明数据具有较好的重复性与稳定性。

基于 PCA 与 OPLS-DA 分析结果, 以 $VIP > 1$ 、 P 值 < 0.05 、 $|\log_2 FC| \geq 1$ 作为差异挥发性代谢物的筛选标准, 并绘制了聚类热图 (图 7) 表示发酵前后差异性风味物质的相对含量变化。结果显示, 发酵显著重塑了饮料的挥发性风味物质组成, 其中酯类与醇类的变化最为突出。酯类化合物是发酵饮料风味的重要来源, 主要由醇与酸在微生物代谢作用下发生酯化反应形成, 赋予饮料独特的风味。发酵后酯类相对含量较未发酵增加了 59.1%。其中异戊酸乙酯、丁酸乙酯、乙酸异戊酯和乙酸乙酯等酯类物质在 32 h 显著上升 ($P < 0.05$), 说明发酵过程强化了以乙酸酯、脂肪酸乙酯为核心的果香体系。Cai 等^[16]在蓝莓酒发酵中也观察到产酯酵母可显著促进酯类物质积累并增强花果香特征。本研究酯类相对含量的显著升高同样是发酵后果香增强的重要原因; 但不同于果酒体系, 本研究所用乳清-炒米复合底物同时保留了谷物热加工形成的基础香气特征, 因此体现出与果酒体系不同的底物风味特征。

醇类是仅次于酯类的第二大类挥发物, 发酵后其相对含量相较于未发酵增加约 45%。其中, 2-苯乙醇、2-甲基-1-丁醇、异戊醇、1-己醇和 1-庚醇等在发酵后显著增加。2-苯乙醇具有典型玫瑰样香气, 是多种发酵饮料中的

关键特征组分^[17]。Scott 等^[18]发现异戊醇和 2-甲基-1-丁醇是酿酒酵母产生的典型高级醇，可作为乙酸异戊酯等果香酯的重要前体。本研究中级醇的增加为酯化反应提供了更充足的前体底物，并进一步促进果香酯的合成与积累。与此同时，2-苯乙醇的显著富集增强了饮料的花香层次，说明复合发酵不仅促进了果香形成，也提升了整体香气的丰富度与协调性。

醛类与酮类在发酵后整体呈下降趋势，其中醛类相对含量较未发酵降低 43.9%，酮类降低 13.0%。该变化可能与酵母代谢过程有关，酿酒酵母的乙醇脱氢酶（ADH）可将部分醛类物质还原为相应的醇类，从而降低最终产品的醛类水平^[19]。具体来说，丙烯醛、4-乙基苯甲醛和苯甲醛等在发酵过程中显著下降，丙烯醛具有明显的辛辣味，4-乙基苯甲醛具有苦杏仁气味，二者含量过高易产生不良刺激性气味，从而影响饮料的感官协调性。上述化合物在发酵后显著下降，表明发酵过程有效削弱了刺激性羰基化合物所带来的不良气味，使整体香气表现更加柔和。

吡嗪类化合物通常呈坚果、烘烤及泥土样香气，常与谷物热加工过程形成的特征挥发物相关^[20]。在未发酵的样品中，吡嗪类丰度较高，可能主要来源于蒙古炒米的热处理过程所带来的烘焙基调；然而当其占比过高时容易造成原料背景香气偏重，削弱整体香气的和谐性。发酵后，2,6-二乙基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪和 2,6-二甲基吡嗪等吡嗪显著下降，其中 2,5-二甲基吡嗪和 2,6-二甲基吡嗪是烘焙食品中常见的坚果、烘烤风味标志物。上述结果表明，发酵过程削弱了炒米来源的烘焙和焦香基调，并增强了果香、花香相关酯类和醇类物质的积累，从而重塑了乳清-炒米复合发酵饮料的整体风味特征。

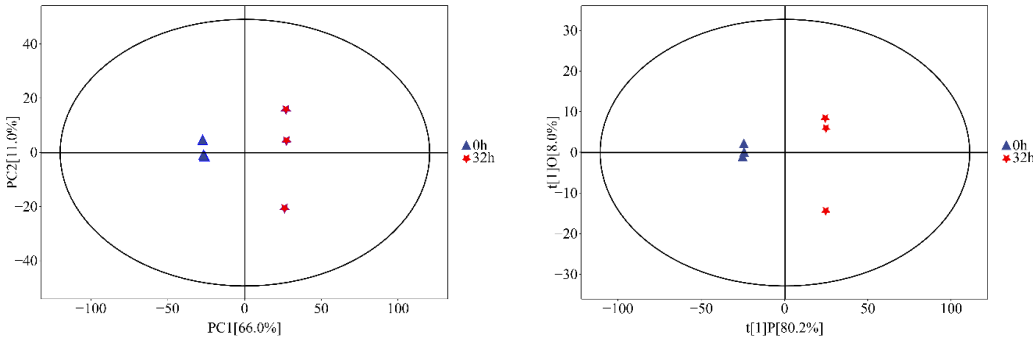


图 6 差异风味物质 PCA 得分图与 OPLS-DA 得分图

Fig.6 PCA score plot and OPLS-DA score plot of different volatile compounds

注：（a）PCA 得分图；（b）OPLS-DA 得分图。

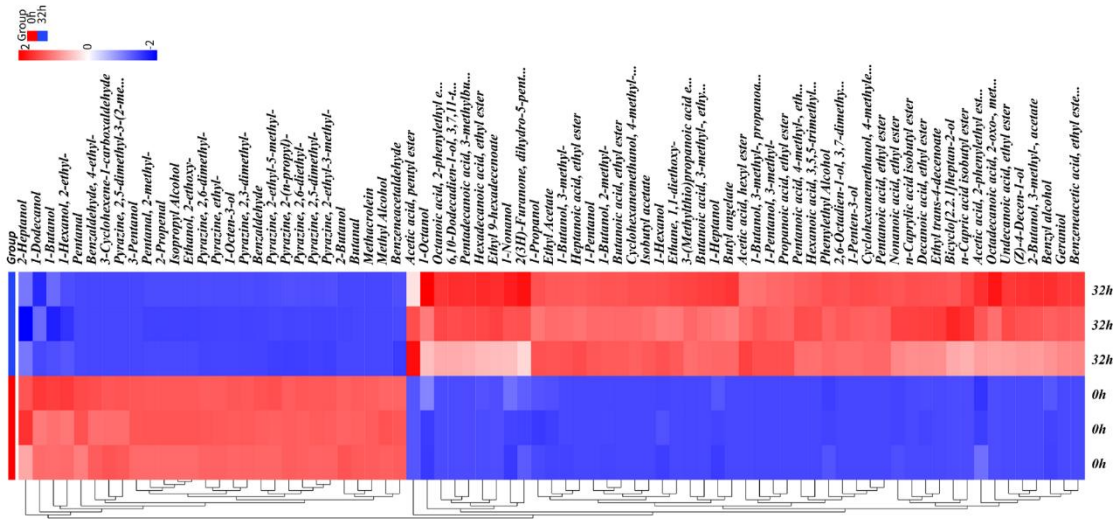


图 7 差异风味物质物聚类热图

Fig.7 Hierarchical clustering heatmap of differential volatile compounds

2.4.3 ROAV 分析

ROAV ≥ 1 的化合物通常可视为样品的主要风味贡献者, 0.1 $\leq$ ROAV < 1 的化合物多表现为对整体风味的修饰和补充, ROAV 值越高表明其潜在贡献越大。由表 7 可知, 发酵前后共有 12 种挥发性风味化合物的 ROAV ≥ 1 。未发酵样品(0 h)中共有 7 种化合物的 ROAV ≥ 1 , 其中 1-辛烯-3-醇(ROAV=100)、苯甲醛(15.755)、2,6-二乙基吡嗪(1.644)作为主要的风味贡献物质, 整体呈现出青草样与烘烤谷物的原料特征性风味基调。发酵结束(32 h)后, ROAV ≥ 1 的化合物增至 12 种, 关键风味物质发生明显变化。酯类成为主要香气来源, 其中己酸乙酯(ROAV=100)、异戊酸乙酯(88.269)与丁酸乙酯(32.927)为主要风味贡献物质, 乙酸乙酯(1.330)与乙酸异戊酯(1.744)也对风味有一定的贡献, 整体赋予了饮料清爽的果香与甜香^[21]。同时, 2-苯乙醇(10.71)在发酵后显著增加并带来玫瑰香气, 进一步丰富了发酵后的香气层次。这一结果与 Li 等^[22]关于酿酒酵母发酵促进苯乙醇积累、改善产品风味品质的报道一致, 说明复合发酵同样有利于花香型高级醇的形成。

值得注意的是, 发酵后 1-辛烯-3-醇显著下降, 该化合物具有蘑菇、甘草样气息, 在某些食品中会产生异味^[23]。此外, 苯甲醛、正戊醛及 2,6-二乙基吡嗪的相对含量及 ROAV 值均显著下降, 表明发酵过程削弱了原料体系中的青草样、刺激性及烘焙型风味成分的主导作用。该结果进一步表明, 混合菌种发酵促进了乳清-炒米复合体系挥发性风味物质的重构, 一方面削弱了刺激性风味物质与部分原料烘焙基调组分的影响, 另一方面显著强化了酯类、醇类为核心的果香、花香风味体系, 使整体风味由原料香气为主导逐步转为以醇类、酯类物质为主的发酵香型, 从而有利于整体香气协调性的提升。

表 7 不同发酵时间的关键挥发性有机物的 ROAV
Table 7 ROAV of key VOCs at different fermentation times

序号	类别	化合物	保留时间 /(RT/min)	ROAV		Log-Foldchange	风味描述
				0 h	32 h		
1	醇类	1-己醇	15.07	1.70	1.18	0.71	香草香、果香
2		1-庚醇	17.79	1.63	1.05	0.59	甜香、椰子香
3		1-辛烯-3-醇	17.64	100	9.23	-2.20	蘑菇香、草香
4		2-苯乙醇	23.97	0.001	10.71	18.09	玫瑰香
5	酯类	己酸乙酯	11.53	1.09	100	7.76	果香、菠萝香
6		乙酸乙酯	2.87	0.72	1.33	2.13	甜香、白兰地香
7		丁酸乙酯	5.79	0.001	32.93	18.71	苹果香、菠萝香、奶酪香
8		乙酸异戊酯	8.13	0.02	1.74	7.43	香蕉香、果香
9		异戊酸乙酯	25.93	0.002	88.27	16.86	苹果香、菠萝香
10	醛类	苯甲醛	19.22	15.76	1.34	-2.32	苦杏仁味
11		正戊醛	4.34	1.12	2.62 $\times 10^{-7}$	-20.80	辛辣味
12	吡嗪类	2,6-二乙基吡嗪	17.11	1.64	0.17	-2.02	坚果香

2.5 非挥发性差异代谢物分析

2.5.1 差异代谢物筛选及分析

为系统探究乳清-炒米复配发酵饮料发酵前后非挥发性代谢谱的变化, 采用 UPLC-MS 分别对发酵前(0 h)与发酵后(32 h)样品进行比较分析。共检测出 1 323 个代谢物, 按一级分类主要包括有机杂环化合物(23.13%)、脂质和类脂分子(20.56%)、有机酸及其衍生物(17.23%)、苯环型化合物(14.13%)和有机含氧化合物(8.47%)。PCA 得分图显示两组样本明显分离(图 8a), PC1 和 PC2 共解释了总方差的 82.5%, 表明发酵引起非挥发性代谢谱整体重构。进一步基于 OPLS-DA 模型($R^2X=0.677$, $R^2Y=0.999$, $Q^2=0.825$)(图 8b), 按 VIP > 1 、 $P<0.01$ 、 $|\log_2FC| \geq 1$ 的标准筛选差异代谢物。火山图(图 9a)显示共筛选出 714 个差异代谢物, 其中显著上调 334 个, 下调 380 个。按一级分类统计, 有机酸及其衍生物、有机含氧化合物、苯丙素类与聚酮类变化显著。

筛选得到的关键差异代谢物如图 9b 所示。发酵后, 丙酮酸、苹果酸、琥珀酸和富马酸等有机酸显著积累, 可赋予饮料酸味与鲜味, 并对其风味特征形成产生重要影响。乳酸作为发酵体系中的常见有机酸, 可能虽有积累, 但其变化幅度或统计学差异未达到上述阈值, 因而未被筛选出来。同时, 亮氨酸、异亮氨酸及赖氨酸等游离氨基酸下降, 而 α -酮戊二酸及部分 α 酮酸(3-甲基-2-氧代丁酸、4-甲基-2-氧代戊酸)上升, 表明转氨作用加强及氨基

酸向 α -酮酸转化加快。 α -酮酸是发酵体系中高级醇生物合成的重要前体，与高级醇的合成密切相关^[24]。苯丙素与聚酮类中，黄酮糖苷、鞣花酸、咖啡酸和阿魏酸等多酚相关代谢物上调，咖啡酸、阿魏酸是广泛存在于植物、谷物中的酚酸类化合物，具有抗氧化、抗炎等多种生理活性^[25]，该变化表明发酵促进了结合态酚类物质的释放与转化，提升了发酵饮料的抗氧化性。此外，有机含氧化合物中松二糖和甘露糖下降，烟酰胺核糖、蔗糖等功能性分子含量上升，同时烟酸等有机杂环化合物增加。Dhiman 等^[26]发现烟酸具有抗氧化和抗炎作用，在植物发酵食品中，烟酸的存在有助于减少抗营养素，从而提高必需营养素的消化率和吸收率，上述变化表明，复合发酵不仅促进了底物利用，还提高了体系中氧化还原调控相关代谢物 and 功能性代谢物的富集水平。

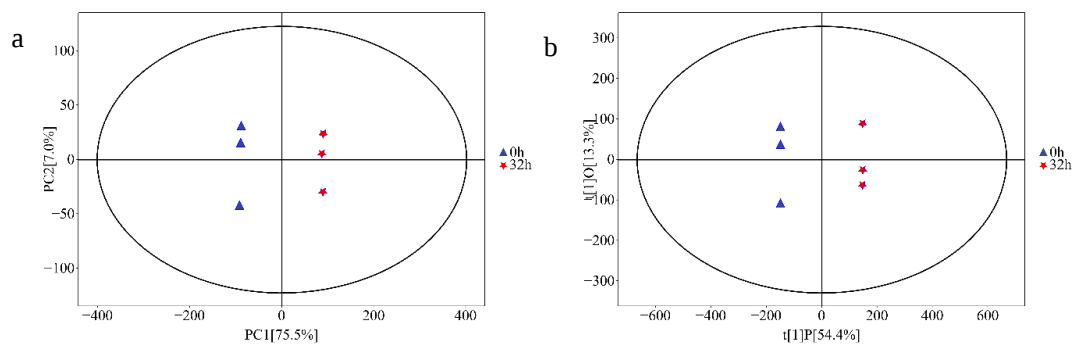


图 8 差异代谢物 PCA 得分图与 OPLS-DA 得分图

Fig.8 PCA score plot and OPLS-DA score plot of differential metabolites

注：(a) PCA 得分图；(b) OPLS-DA 得分图。

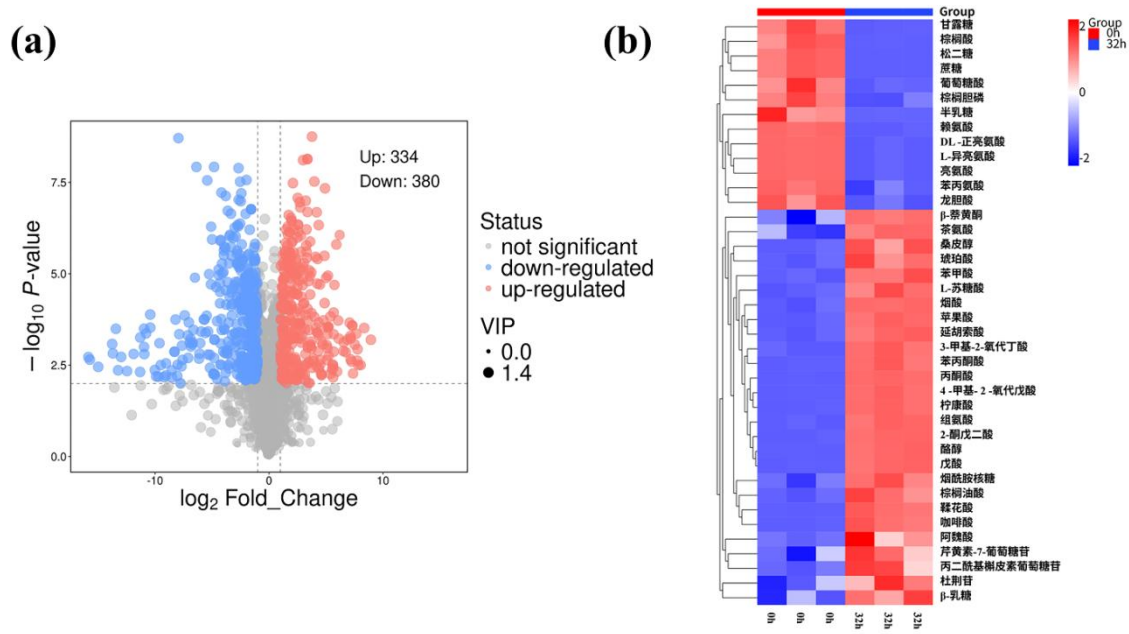


图 9 差异代谢物火山图与聚类热图

Fig.9 Volcano plot and hierarchical clustering heatmap of differential metabolites

注：(a) 火山图；(b) 聚类热图。

2.5.2 KEGG 代谢通路分析

为了阐明发酵前后差异代谢物变化的生物学基础及其与品质、风味形成的关联，本研究基于筛选得到的差异代谢物进行 KEGG 富集分析，共注释到 77 条代谢通路。前 15 条显著富集的通路如图 10 所示，气泡大小表示通路命中差异代谢物数量，颜色表示富集显著性。与未发酵（0 h）相比，发酵后（32 h）样品在氨基酸相关通路（如缬氨酸/亮氨酸/异亮氨酸生物合成、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢、D-氨基酸代谢）富集增强。为进一步探究差异

代谢物在富集通路中的调节特征, 计算了各代谢通路的差异丰度得分 (图 11), 并结合通路富集显著性及生物学相关性, 筛选出差异代谢物显著上调的关键代谢通路: 苯丙氨酸代谢 (Phenylalanine metabolism)、缬氨酸/亮氨酸/异亮氨酸生物合成 (Valine, leucine and isoleucine biosynthesis)、烟酸和烟酰胺代谢 (Nicotinate and nicotinamide metabolism) 以及 2-氧羧酸代谢 (2-Oxocarboxylic acid metabolism)。结果显示, 在苯丙氨酸代谢通路中, 苯丙酮酸含量增加可通过一系列生化反应间接促进丙酮酸、琥珀酸及富马酸的积累, 潜在推动饮料中风味有机酸的形成^[27]。在烟酸/烟酰胺代谢中, 烟酸与烟酰胺核糖作为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 的前体物质, 其含量的增加促进了 NAD⁺的合成与转化, NAD⁺及其还原形式 NADH 参与维持细胞氧化还原平衡, 这对维持正常生理活动和防止氧化损伤至关重要^[28]。2-氧羧酸代谢通路中, 赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等氨基酸通过转氨酶生成 α 酮酸, 促进了 3-甲基-2-氧代丁酸、4-甲基-2-氧代戊酸等相关 α -酮酸的积累, 后者经 Ehrlich 途径脱羧、还原生成高级醇, 间接促进了饮料中高级醇的形成^[29]。总之, 通路分析揭示了发酵通过氨基酸前体转化及 NAD 相关氧化还原代谢网络, 共同驱动了乳清-炒米复合发酵饮料风味与功能品质的提升。

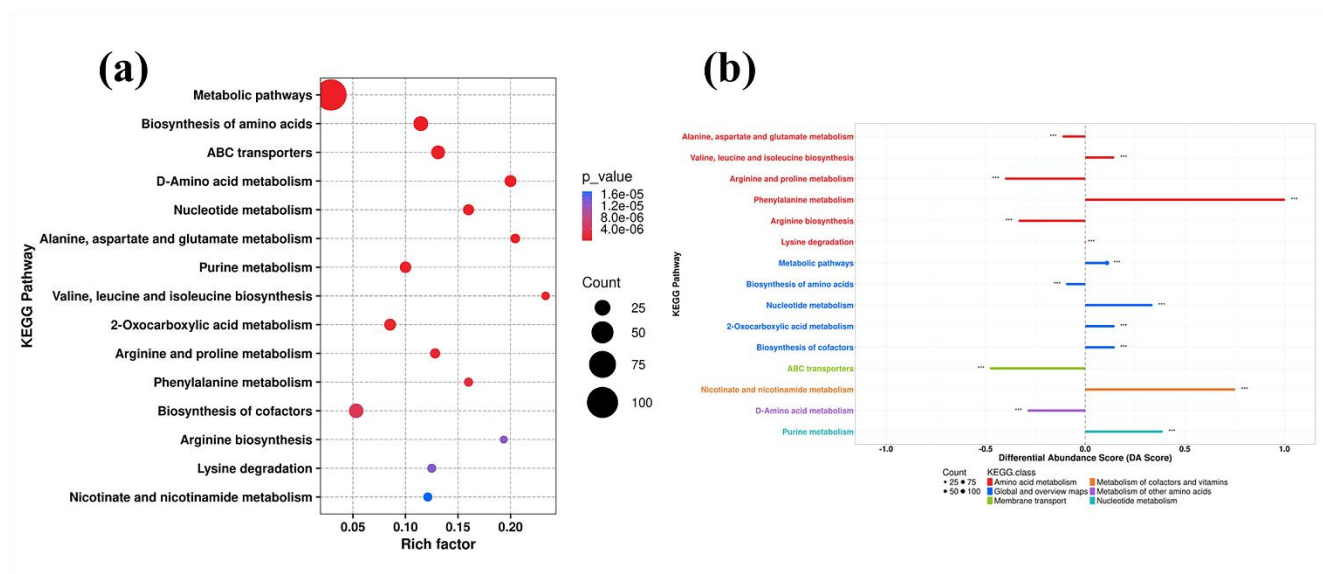


图 10 差异代谢物 KEGG 富集图与差异丰度得分图

Fig.10 KEGG enrichment plot and differential abundance score plot of differential metabolites

注: (a) KEGG 富集图; (b) 差异丰度得分图。

3 结论

本研究以乳清和蒙古炒米为原料, 采用乳酸菌-酿酒酵母协同发酵, 通过工艺优化并结合抗氧化活性、风味物质以及非挥发性代谢物变化, 系统解析发酵对产品品质及风味的影响。

在单因素筛选基础上, 结合 Plackett-Burman 筛选与响应面优化, 获得最佳工艺参数: 乳清液:炒米液=7:3、发酵温度 37 °C、发酵时间 32 h、乳酸菌接种量 0.6 wt.%、酵母菌接种量 0.4 wt.%。在此条件下, 发酵饮料的酸度和感官评分均达到最佳。验证实验与模型预测值偏差较小, 说明模型具有良好的预测性。

与发酵前相比, 发酵后饮料的 DPPH 和 ABTS 自由基清除率显著提高, 总酚含量随着发酵持续增加, 表明复合发酵显著提升了乳清炒米复合发酵饮料的抗氧化活性。同时, HS-SPME-GC-MS 结合多元统计分析结果表明, 发酵显著重塑了饮料的挥发性风味组成。发酵后, 乙酸异戊酯、丁酸乙酯等酯类及 2-苯乙醇、异戊醇等醇类增加, 共同构成了以果香、花香为主的风味特征; 而 1-辛烯-3-醇、苯甲醛等青草样和刺激性气味成分, 以及 2,6-二乙基吡嗪等烘焙基调的吡嗪类物质下降。ROAV 分析进一步证实, 关键香气贡献由原料来源的烘焙与青草基调转变为以醇和酯类为主的甜香与果香体系, 从而提升整体风味协调性与接受度。

UPLS-MS 分析表明, 发酵前后非挥发性代谢物发生明显变化, 共筛选出 714 个显著差异代谢物。其中苹果酸、琥珀酸及 α -酮酸等有机酸类和阿魏酸、咖啡酸等酚酸类物质显著积累, 显著改变了发酵后饮料的风味特征及品质特性。KEGG 富集分析表明, 苯丙氨酸代谢、缬氨酸/亮氨酸/异亮氨酸生物合成、烟酸和烟酰胺代谢等通路是驱动品质与风味提升的关键通路, 从代谢网络层面阐释了发酵驱动品质提升的内在机制。

本研究证实了乳清与蒙古炒米复配发酵的可行性,为乳清高值化利用及地域特色谷物资源开发提供了理论依据。但本研究主要聚焦于复合发酵体系的工艺优化及发酵前后品质、风味和代谢变化,尚未系统比较单一菌种发酵与复合菌种发酵的差异,也未进一步评价产品贮藏稳定性及工业化适用性。后续研究可结合单菌对照、菌种互作机制解析及产品贮藏稳定性评价,进一步完善乳清-炒米复合发酵饮料的品质调控与应用研究。

参考文献

- [1] KITESSA D. A. Review on effect of fermentation on physicochemical properties, anti-nutritional factors and sensory properties of cereal-based fermented foods and beverages [J]. *Annals of Microbiology*, 2024, 74(1): 32.
- [2] ZHU Y, XIE F, REN J, et al. Structural analysis, nutritional evaluation, and flavor characterization of parched rice made from proso millet [J]. *Food Chemistry: X*, 2023, 19: 100784.
- [3] KARMAKAR M, KHETO A, SEHRAWAT R, et al. Exposure of Proso millet starch to superheated steam: Effect on physicochemical, techno-functional, rheological behavior, digestibility, and related mechanism [J]. *Food Chemistry*, 2025, 468: 142383.
- [4] BARTKIENE E, KLUPSAITE D, STARKUTE V, et al. Characteristics of lacto-fermented whey, milk, hemp and lupine proteins [J]. *LWT*, 2024, 201: 116259.
- [5] BERTSCH A, ROY D, LAPOINTE G. Fermentation of wheat bran and whey permeate by mono-cultures of *Lactocaseibacillus rhamnosus* strains and co-culture with yeast enhances bioactive properties [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 956.
- [6] KLEPS C, MALCHOW R, ETTINGER J, et al. Utilization of acid whey and oat pomace in succinic acid fermentation [J]. *New Biotechnology*, 2025, 86: 31-38.
- [7] ZHOU X, LIU D, HADIATULLAH H, et al. Evaluating the total antioxidant capacity of processed milk: Utilising applicable antioxidant assays and key antioxidant components [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2024, 59(3): 1351-1362.
- [8] IVASHCHENKO O, KHONKIV M, STABNIKOV V, et al. Influence of starch products on the vitality and activity of lactic acid bacteria in yogurt [J]. *Ukrainian Food Journal*, 2024, 13(1): 162-174.
- [9] ZHOU Y, HUA J. Current updates on lactic acid production and control during Baijiu brewing [J]. *Fermentation*, 2025, 11(8): 431.
- [10] CHE X, LI B, ZENG J, et al. Effect of co-fermentation of *non-Saccharomyces* yeasts with *Saccharomyces cerevisiae* on the quality and flavor of blueberry wine [J]. *Food Research International*, 2024, 196: 115051.
- [11] XIA Y, LI J, LIU Y, et al. Novel insights into the metabolic characteristics and potential probiotic activity of fermented *Malus prunifolia* juice [J]. *LWT*, 2025, 221: 117613.
- [12] 石晓涵,陈家宝,忻晓东,等. Plackett-Burman 结合 Box-Behnken 响应面法优化燥湿止痒乳膏制剂工艺[J]. *中药材*, 2025, 12: 3119-3125.
- [13] 王琪,薛润泽,彭佳伟,等. 乳酸菌发酵藜麦和燕麦工艺优化及抗氧化活性研究[J]. *中国调味品*, 2025, 50(9): 18-28.
- [14] DHIMAN S, KAUR S, THAKUR B, et al. Nutritional enhancement of plant-based fermented foods: Microbial innovations for a sustainable future [J]. *Fermentation*, 2025, 11(6): 346.
- [15] KANG C, ZHANG Y, ZHANG M, et al. Screening of specific quantitative peptides of beef by LC-MS/MS coupled with OPLS-DA [J]. *Food Chemistry*, 2022, 387: 132932.
- [16] CAI W, LI B, CHEN Y, et al. Increase the content of ester compounds in blueberry wine fermentation with the ester-producing yeast: *Candida glabrata*, *Pichia anomala*, and *Wickerhamomyces anomalus* [J]. *Foods*, 2022, 11(22): 3655.
- [17] HAO Y, LI J, ZHAO Z, et al. Flavor characteristics of Shanlan rice wines fermented for different time based on HS-SPME-GC-MS-O, HS-GC-IMS, and electronic sensory analyses [J]. *Food Chemistry*, 2024, 432: 137150.
- [18] SCOTT W T, HENRIQUES D, SMID E J, et al. Dynamic genome-scale modeling of *Saccharomyces cerevisiae* unravels mechanisms for ester formation during alcoholic fermentation [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2023, 120(7): 1998-2012.
- [19] XU X, NIU C, LIU C, et al. Unraveling the mechanisms for low-level acetaldehyde production during alcoholic fermentation in *Saccharomyces pastorianus* lager yeast [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(7): 2020-2027.
- [20] JIANG W, WANG X, MA Y, et al. Mechanism of carbon skeleton formation of 2, 3, 5-trimethylpyrazine via a conversion reaction between methylglyoxal and glyoxal [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(13): 5337-5344.
- [21] HOU Z, FAN S, ZHANG J, et al. Study on the interaction between high-yielding ethyl acetate yeast and lactic acid degrading bacteria in

- the fermentation microorganisms of Light-Flavored Baijiu [J]. Food Bioscience, 2025, 75, 108116.
- [22] LI H, CHEN X, LIU J, et al. Regulating fermentation based on dominant genus: Effects of phenethyl alcohol-producing *Saccharomyces cerevisiae* on microbial succession and flavor compounds in fermented grains [J]. Food Bioscience, 2025, 65: 106079.
- [23] XIA N, YANG M, ZHAO J, et al. Genome-wide association analysis of 1-octen-3-ol content related to soymilk off-flavor in soybean seed [J]. Crop and Pasture Science, 2019, 70(2): 133-139.
- [24] SUTIONO S, CARSTEN J, SIEBER V. Structure-guided engineering of α -Keto Acid Decarboxylase for the production of higher alcohols at elevated temperature [J]. ChemSusChem, 2018, 11(18): 3335-3344.
- [25] KUMAR M, KAUSHIK D, SHUBHAM S, et al. Ferulic acid: extraction, estimation, bioactivity and applications for human health and food [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2025, 105(8): 4168-4177.
- [26] DHIMAN S, KAUR S, THAKUR B, et al. Nutritional enhancement of plant-based fermented foods: Microbial innovations for a sustainable future [J]. Fermentation, 2025, 11(6): 346.
- [27] LIU X, ZHAO G, SUN S, et al. Biosynthetic pathway and metabolic engineering of succinic acid [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 843887.
- [28] CHEN L, XING X, ZHANG P, et al. Homeostatic regulation of NAD (H) and NADP (H) in cells [J]. Genes & Diseases, 2024, 11(5): 101146.
- [29] RUMPL A E, GOODHEW J R, KELLY P F, et al. Brews, fuels, and opioids: Expanding the yeast ehrlich pathway for chemical and pharmaceutical manufacturing [J]. Biotechnology Advances, 2025, 84: 108684.