

模糊数学评价与响应面结合优化老北京豆汁儿的发酵工艺

袁 钰¹, 李 静², 罗红霞^{1*}, 邓毛程^{2*}

(1. 北京农业职业学院食品与生物工程系, 北京 102400; 2. 广东轻工职业技术学院, 广东高校特色调味品工程技术开发中心 (GCZXB1103), 广州 510300)

摘 要: 以感官评价为指标, 通过响应面试验对豆汁儿的发酵工艺参数进行筛选, 为克服感官评分法主观性和片面性对结果的影响, 利用模糊数学进行进一步验证分析。通过豆汁儿发酵对其菌种进行 16S rDNA 鉴定, 结果表明豆汁儿中存在粪肠球菌分离株 (*Enterococcus Faecium* isolate); 豆汁儿发酵最佳工艺参数为: 发酵时间 24 h、发酵温度 37°C 和液料比为 8:1 g·g⁻¹。

关键词: 豆汁儿; 发酵; 模糊数学; 16S rDNA

中图分类号: TS201.3; TS214.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2020)03-0349-07

Fuzzy mathematics evaluation combined with response surface to optimize the fermentation process of Beijing Douzhir

YUAN Yu¹, LI Jing², LUO Hongxia¹, DENG Maocheng²

(1. Department of Food and Biological Engineering Information, Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102400;

2. The Center of Guangdong Higher Education for Engineering and Technological Development of Specialty Condiments (GCZXB1103), Guangdong Industry Polytechnic, Guangzhou 510300)

Abstract: The parameters for soybean juice in the fermentation process were screened by response surface test using sensory evaluation as an indicator. In order to overcome the subjectivity and one-sidedness of sensory evaluation, which may influence the result, check analysis was further conducted using fuzzy mathematics. The identification of 16S rDNA was conducted on the strain obtained after fermentation of Douzhir. The result revealed *Enterococcus Faecium* isolate could be found in Douzhir; the optimum technological parameters for Douzhir fermentation were as follows: fermentation for 24 h at 37°C with the liquid-to-material ratio of 8:1 g·g⁻¹.

Key words: Douzhir; fermentation; fuzzy mathematics; 16S rDNA

豆汁儿是北京的传统特色小吃, 以绿豆为主要原料, 以酸中略臭的独特风味闻名, 具有解暑降燥的功效^[1-3]。目前, 市售的豆汁儿多为小作坊生产, 不同产地与不同批次发酵的豆汁儿风味差异较大, 受自然条件影响亦较大, 因此豆汁儿的标准化生产显得尤为重要, 但目前标准化生产需要的工艺参数还有待进一步研究确定。鉴于此, 作者以感官评分为标准, 采用响应面优化法和模糊数学评价法优化豆汁儿的制作工艺^[4-7], 确定最佳的发酵工艺参数,

并运用 16S rDNA 测序, 对最佳工艺条件下发酵豆汁儿的菌种进行鉴定^[8-12], 鉴定豆汁儿中存在的菌种, 以期为豆汁儿发酵剂的研制及其工业化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料与试剂

绿豆, 市售; 安佳脱脂乳粉, 恒天然商贸(上海)有限公司; MRS 培养基, 北京奥博星生物技术有限责任公司; MRS 液体培养基, 北京奥博星生物

收稿日期: 2019-10-08

基金项目: 北京市教委科技项目 (KM201812448001), 万人计划教学名师特殊支持项目 (20181215), 教育部食品营养与安全应用技术协同创新中心项目 (XM-16) 和北京市财政支持高校建设专项-食品营养与安全应用技术协同创新中心项目 (PXM2020-157102-000025) 共同资助。

作者简介: 袁 钰, 硕士研究生。E-mail: 291180298@qq.com

* 通信作者: 罗红霞, 博士, 教授。E-mail: hongxiajun@163.com; 邓毛程, 博士, 教授。E-mail: 2003102018@gdip.edu.cn

技术有限责任公司; *Ex Taq* 酶 RR001、dNTP BK6501A、10×*Ex Taq* Buffer AB5401A, 宝日医生生物技术(北京)有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 31516KC4, 爱思进生物技术(杭州)有限公司; 一次性使用塑料培养皿、北京瑞艾正特生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

HR/T16M 台式高速冷冻离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司; LDZF-30KB- II 立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; 高通量测序仪, Illumina (Miseq); 中科美菱 DW-HL290 超低温储存箱, 上海旦鼎国际贸易有限公司; SPX-150B-Z 型生化培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 凝胶成像仪 JY04S-3C, 北京君意东方电泳设备有限公司; 超净工作台, 北京王堂蓝翼科技有限公司; PCR 仪 MG96+, 杭州郎基科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 豆汁儿的工艺流程及操作要点 泡豆→打浆→静置、粉浆分离(45 min)→过滤1(4层纱布过滤, 仿照民间摇浆的工艺操作, 除去豆渣)→装瓶发酵→生豆汁儿→过滤2→熬制→熟豆汁儿

发酵结束后的为生豆汁儿, 可食用。一般食用熟豆汁儿, 将豆汁儿微微煮沸并小火熬制 15 min, 即可食用。

1.3.2 豆汁儿制作工艺条件的确定 在前期单因素试验的基础上, 以感官评分(D)为响应值, 采用响应面实验法和模糊数学评价法研究发酵时间(A)、发酵温度(B)和液料比(C)3个因素对豆汁儿感官品质的影响, 从而确定豆汁儿制作的最佳工艺条件。利用响应面应用软件 Design-Expert 8.0.6 对豆汁儿的工艺条件进行优化设计, 具体因素与水平见表 1。

表 1 响应面试验设计因素与水平
Table 1 Factors and levels of independent variables used in response surface methodology

水平 Level	A/h	B/°C	C /g·g ⁻¹
-1	23	36	7:1
0	24	37	8:1
1	25	38	9:1

注: A.发酵时间; B.发酵温度; C.液料比。下同
Note: A. Fermentation time; B. Fermentation temperature; C. Liquid - material ratio. The same below

1.3.3 豆汁儿感官品质评价方法 邀请 10 名感官评价员经培训后, 对豆汁儿各项指标进行评分, 评分过程中的豆汁儿均为熬制后的熟豆汁儿。感官评定指标: 质地(2分)、色泽(2分)、气味(3分)、滋味(3分), 总分 10 分。评分标准如表 2 所示。

表 2 感官评分细则
Table 2 Sensory scoring rules

参数 Parameter	分值 Score	评分标准 Standard for evaluation
质地 Texture	2	质地均匀, 口感绵密(优: 1.8~2.0)、质地较均匀(良: 1.5~1.7)、稍有分层, 稍有颗粒感(中: 1.0~1.4)、分层明显, 颗粒感明显(差: 0~0.9)
色泽 Color	2	灰绿色(优: 1.8~2.0)、微偏灰或微偏绿(良: 1.5~1.7)、色泽寡淡(中: 1.0~1.4)、色泽异常(差: 0~0.9)
气味 Odor	3	令人愉悦的酸味, 伴有臭味和豆香(优: 2.6~3.0)、酸味合适, 臭味及豆香不明显(良: 2.1~2.5)、酸味略刺鼻或较轻, 无臭味及豆香味(中: 1.2~2.0)、酸味刺鼻或没有气味, 有霉腐味(差: 0~1.1)
滋味 Taste	3	酸味令人愉悦并伴有明显回甘(优: 2.6~3.0)、酸味适中并略有回甘(良: 2.1~2.5)、酸味偏酸或寡淡, 伴有回甘(中: 1.2~2.0)、刺激性酸味, 无回甘, 有异味(差: 0~1.1) (同档比较中, 回甘快且强烈的分值高)

1.3.4 建立模糊数学模型 以正交试验时的 9 组豆汁为评价对象集 Y, 具体为 Y1、Y2、Y3、Y4、Y5、Y6、Y7、Y8 和 Y9。

因素集 $U = \{U_1, U_2, U_3, U_4\}$ 。其中, U_1 质地、 U_2 色泽、 U_3 气味、 U_4 滋味, 即 $U = \{\text{质地, 色泽, 气味, 滋味}\}$ 。

评语集 $V = \{V_1, V_2, V_3, V_4\}$ 。其中, V_1 表示优, V_2 表示良, V_3 表示中, V_4 表示差, 即 $V = \{\text{优}$

90, 良 80, 中 70, 差 60}。

评价权重集 $W = \{W_1, W_2, W_3, W_4\}$ 。以表 2 豆汁儿感官评分细则作为依据, 质地、色泽、气味、滋味的权重系数分别为 0.2、0.2、0.3、0.3, 总和为 1, 即豆汁儿的权重集 $W = \{0.2, 0.2, 0.3, 0.3\}$ 。

模糊关系综合评判集 $Y = WRi$, 式中 Y 为综合评判集, W 为权重集, R 为模糊矩阵。

1.3.5 菌株鉴定 (1) 细菌 16S rDNA 菌株鉴定样

品处理方法。以 MRS 对豆汁儿中的菌群进行分离纯化, 为避免菌种变异以及鉴定过程中样品不纯导致双峰现象, 选择第 1 代和第 2 代菌液为鉴定对象。将生豆汁儿接入 MRS 液体培养基中, 置于 37℃ 恒温培养 15 h, 即为第 1 代菌液, 命名为 DZ I A, 置于 4℃ 备用; 将 DZ I A 转接至 MRS 固体培养基, 37℃ 培养 30 h 后再接入 MRS 液体培养基中, 15 h 后形成第 2 代菌液, 命名为 DZ II A1 和 DZ II A2, 置于 4℃ 备用。

(2) 细菌 16S rDNA 菌株鉴定方法。鉴定该样品选择的引物为 27F 和 1492R, 序列分别为: 正向引物 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' 和反向引物 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'。反应体系共 50 μL : 5.0 μL 的 10 \times Ex Taq buffer, 4.0 μL 的 2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP Mix, 2.0 μL 的 10 pmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Primer 1, 2.0 μL 的 10 pmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Primer 2, 0.5 μL 的 5 U Ex Taq 酶, 2.0 μL 的 Template, 36.5 μL 的 ddH₂O。PCR 反应参数: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 共 24 个循环。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并在紫外灯照射下观察琼脂糖凝胶, 切胶纯化测序。

1.3.6 豆汁儿的理化性质及数据分析方法 酸度值的检测方法参照 GB 5009.239—2016《食品安全国家标准食品酸度的测定》中电位滴定法; 粘度值的检测方法参照 GB/T 10247—2008《粘度测量方法》。运用 Design-Expert 8.0.6 软件对工艺进行优化; 利用 Chromas 分析测序峰图, 分析鉴定菌种。

2 结果与分析

2.1 豆汁儿工艺条件响应面优化结果分析

2.1.1 二次回归方程的建立分析与验证 表 3 为响应面试验设计方案及结果, 利用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验结果进行方差分析, 数据进行多元回归拟合得到发酵时间、发酵温度、液料比的二次响应面回归方程为:

$$D=8.60+0.18A+0.21B+0.012C+0.025AB+0.075AC-0.20BC-0.50A^2-0.78B^2-0.12C^2$$

利用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验结果进行方差分析, 结果如表 4 所示。回归方程中的因变量与自变量之间存在明显的线性关系, 模型 $P<0.0001$, 该模型极显著; 失拟项 $P>0.05$, 不显著, 该模型拟合良好; 调整系数 $R^2_{\text{Adj}}=0.9514$, 该模型可以对 95.14% 的响应值变化做出解释; 相关系数 $R^2=0.9787$, 该模型拟合良好, 可用此模型进行分析和预测。显著 ($P<0.05$) 的因素有: BC; 极显著 ($P<0.01$) 的因

素有: A、B、A² 和 C²。3 个单因素对评分影响主次顺序为: B>A>C。图 1 为 AB、AC、BC 相互作用响应面图, 通过 Design-Expert 8.0.6 的进一步分析, 得出最佳工艺条件为: 发酵时间位 24.18 h, 发酵温度为 37.14℃, 液料比为 7.99:1 g \cdot g⁻¹, 此时豆汁儿的感官评分为 8.6305 分。结合实际情况, 将发酵工艺修正为: 发酵时间 24 h、发酵温度 37℃ 和液料比为 8:1 g \cdot g⁻¹, 将 3 次修正后的工艺参数进行 3 次平行验证试验, 最终感官评分的平均值为 85.7, 接近模型预测值。

表 3 响应面设计方案及结果

Table 3 Design with experiment of response surface analysis and the results

试验号 Test No.	A	B	C	感官评分 Sensory score
1	1.000	0.000	-1.000	8.2
2	-1.000	0.000	1.000	7.6
3	0.000	0.000	0.000	8.6
4	0.000	-1.000	1.000	7.8
5	-1.000	0.000	-1.000	7.9
6	0.000	0.000	0.000	8.5
7	1.000	1.000	0.000	7.7
8	1.000	-1.000	0.000	7.2
9	0.000	0.000	0.000	8.6
10	-1.000	1.000	0.000	7.4
11	0.000	0.000	0.000	8.7
12	0.000	-1.000	-1.000	7.2
13	0.000	0.000	0.000	8.6
14	-1.000	-1.000	0.000	7.0
15	0.000	1.000	-1.000	8.0
16	1.000	0.000	1.000	8.2
17	0.000	1.000	1.000	7.8

2.2 豆汁儿模糊数学综合评价结果

运用模糊数学综合评价方法, 根据表 2 感官评分标准对不同参数组合条件下的豆汁儿进行感官评分, 评分结果见表 5。

由表 5 可知, 10 名感官评价员的评分结果存在差异, 以此可建立模糊矩阵。感官评定员认为 1 号样品, 质地优: 2 人, 良: 3 人, 中: 5 人, 差: 0 人, 则: $U_1=(0.2, 0.3, 0.5, 0)$; 对色泽感官评分中, 选择优: 8 人, 良: 2 人, 中: 0 人, 差: 0 人, 则: $U_2=(0.8, 0.2, 0, 0)$; 同理, $U_3=(0.3, 0.5, 0.2, 0)$, $U_4=(0.3, 0.5, 0.2, 0)$ 。4 个因素组成一个矩阵 R1 为:

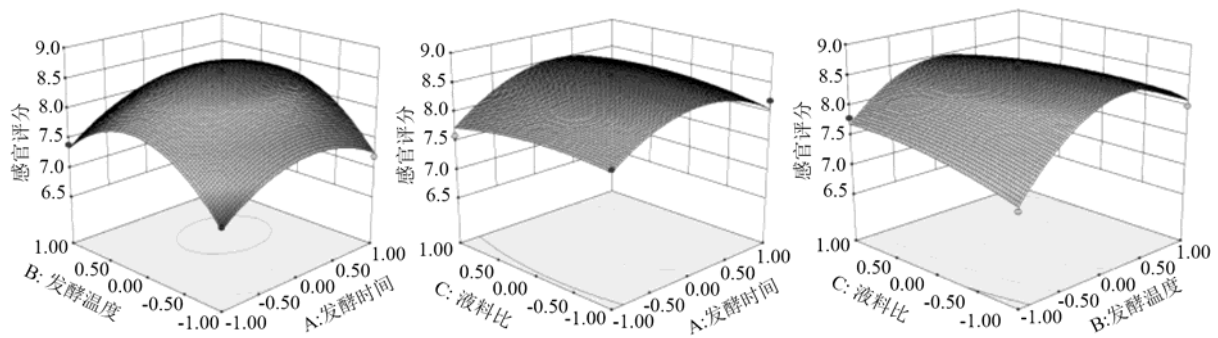
$$R1 = \begin{bmatrix} 0.2 & 0.3 & 0.5 & 0 \\ 0.8 & 0.2 & 0 & 0 \\ 0.3 & 0.5 & 0.2 & 0 \\ 0.3 & 0.5 & 0.2 & 0 \end{bmatrix}$$

表 4 方差分析结果
Table 4 Analysis of variance

方差来源 Source of variance	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Statistical significance
模型 Model	4.720 0	9	0.520 0	35.810 0	< 0.000 1	**
A	0.250 0	1	0.250 0	16.730 0	0.004 6	**
B	0.360 0	1	0.360 0	24.670 0	0.001 6	**
C	0.001 2	1	0.001 2	0.085 0	0.778 6	
AB	0.002 5	1	0.002 5	0.170 0	0.691 8	
AC	0.023 0	1	0.023 0	1.540 0	0.255 1	
BC	0.160 0	1	0.160 0	10.930 0	0.013 0	*
A ²	1.050 0	1	1.050 0	71.890 0	< 0.000 1	**
B ²	2.530 0	1	2.530 0	172.710 0	< 0.000 1	**
C ²	0.066 0	1	0.066 0	4.490 0	0.071 8	
回归 Regression	0.100 0	7	0.015 0			
失拟项 Lack of fit	0.082 0	3	0.027 0	5.500 0	0.066 6	不显著
纯误差 Pure error	0.020 0	4	0.005 0			
总回归 Total regression	4.820 0	16				

注：“*”表示差异显著 (P<0.05)；“**”差异极显著 (P<0.01)

Note: “*” and “**” mean significant difference at the 0.05 and 0.01 level, respectively



a. 发酵时间与发酵温度交互作用 b. 发酵时间与液料比交互作用 c. 发酵温度与液料比交互作用

a. Interaction between fermentation time and temperature; b. Interaction between fermentation time and liquid-material ratio; c. Interaction between fermentation temperature and liquid- material ratio

图 1 工艺参数交互作用对豆汁儿感官评分响应面图

Figure 1 Response surface map of interaction between technological parameters on sensory score of Douzhir

同理:

$$\begin{aligned}
 R2 &= \begin{Bmatrix} 0.1 & 0.3 & 0.6 & 0 \\ 0.8 & 0.1 & 0.1 & 0 \\ 0.1 & 0.3 & 0.6 & 0 \\ 0 & 0.1 & 0.6 & 0.3 \end{Bmatrix} & R3 &= \begin{Bmatrix} 0.4 & 0.6 & 0 & 0 \\ 0.8 & 0.2 & 0 & 0 \\ 0.6 & 0.4 & 0 & 0 \\ 0.7 & 0.3 & 0 & 0 \end{Bmatrix} & R4 &= \begin{Bmatrix} 0.1 & 0.2 & 0.2 & 0.5 \\ 0.5 & 0.5 & 0 & 0 \\ 0.1 & 0.7 & 0.2 & 0 \\ 0.1 & 0.5 & 0.4 & 0 \end{Bmatrix} \\
 R5 &= \begin{Bmatrix} 0.2 & 0.3 & 0.5 & 0 \\ 0.7 & 0.3 & 0 & 0 \\ 0.2 & 0.4 & 0.4 & 0 \\ 0.1 & 0.4 & 0.5 & 0 \end{Bmatrix} & R6 &= \begin{Bmatrix} 0.3 & 0.7 & 0 & 0 \\ 0.8 & 0.2 & 0 & 0 \\ 0.5 & 0.5 & 0 & 0 \\ 0.6 & 0.3 & 0.1 & 0 \end{Bmatrix} & R7 &= \begin{Bmatrix} 0 & 0.1 & 0.3 & 0.6 \\ 0.6 & 0.4 & 0 & 0 \\ 0.2 & 0.6 & 0.2 & 0 \\ 0.1 & 0.4 & 0.5 & 0 \end{Bmatrix} \\
 R8 &= \begin{Bmatrix} 0 & 0.3 & 0.7 & 0 \\ 0.5 & 0.1 & 0.4 & 0 \\ 0 & 0.1 & 0.8 & 0.1 \\ 0 & 0.1 & 0.6 & 0.3 \end{Bmatrix} & R9 &= \begin{Bmatrix} 0.8 & 0.2 & 0 & 0 \\ 0.9 & 0.1 & 0 & 0 \\ 0.7 & 0.2 & 0.1 & 0 \\ 0.7 & 0.3 & 0 & 0 \end{Bmatrix} & R10 &= \begin{Bmatrix} 0.1 & 0.3 & 0.6 & 0 \\ 0.8 & 0.1 & 0.1 & 0 \\ 0 & 0.2 & 0.8 & 0 \\ 0 & 0.1 & 0.6 & 0.3 \end{Bmatrix}
 \end{aligned}$$

$$R_{11} = \begin{Bmatrix} 0.7 & 0.3 & 0 & 0 \\ 0.8 & 0.2 & 0 & 0 \\ 0.6 & 0.4 & 0 & 0 \\ 0.6 & 0.4 & 0 & 0 \end{Bmatrix} \quad R_{12} = \begin{Bmatrix} 0 & 0.4 & 0.6 & 0 \\ 0.5 & 0.2 & 0.3 & 0 \\ 0 & 0.2 & 0.8 & 0 \\ 0 & 0 & 0.6 & 0.4 \end{Bmatrix} \quad R_{13} = \begin{Bmatrix} 0.6 & 0.4 & 0 & 0 \\ 0.6 & 0.3 & 0.1 & 0 \\ 0.7 & 0.2 & 0.1 & 0 \\ 0.7 & 0.3 & 0 & 0 \end{Bmatrix}$$

$$R_{14} = \begin{Bmatrix} 0 & 0.4 & 0.6 & 0 \\ 0.3 & 0.1 & 0.6 & 0 \\ 0 & 0.2 & 0.6 & 0.2 \\ 0 & 0 & 0.5 & 0.5 \end{Bmatrix} \quad R_{15} = \begin{Bmatrix} 0.1 & 0.5 & 0.4 & 0 \\ 0.7 & 0.2 & 0.1 & 0 \\ 0.3 & 0.5 & 0.2 & 0 \\ 0.2 & 0.3 & 0.5 & 0 \end{Bmatrix} \quad R_{16} = \begin{Bmatrix} 0.3 & 0.5 & 0.2 & 0 \\ 0.7 & 0.2 & 0.1 & 0 \\ 0.3 & 0.5 & 0.2 & 0 \\ 0.2 & 0.6 & 0.2 & 0 \end{Bmatrix}$$

$$R_{17} = \begin{Bmatrix} 0.1 & 0.2 & 0.2 & 0.5 \\ 0.6 & 0.4 & 0 & 0 \\ 0.2 & 0.6 & 0.2 & 0 \\ 0.1 & 0.5 & 0.4 & 0 \end{Bmatrix}$$

依照模糊数学变换原理, 用矩阵乘法计算 17 组豆汁儿对各因素的模糊关系综合评判集 $Y=WR_i$, 并将综合评判结果分别乘以其对应的分值 (优: 90 分, 良: 80 分, 中: 70 分, 差: 60 分) 再进行加和, 最终结果为每个样品的最后总得分, 结果见表

6。表中 Y3、Y6、Y9、Y11 和 Y13 分数较高, 分别为: 86.3、84.9、87.3、86.6 及 86.1, 其对应工艺参数与响应面模型预测值吻合, 最终工艺参数确定为: 发酵时间 24 h、发酵温度 37℃和液料比为 8:1 $g \cdot g^{-1}$ 。

表 5 豆汁感官评分

Table 5 Sensory evaluation of Douzhir

样品编号 Sample No.	质地 Texture				色泽 Color				气味 Odor				滋味 Taste			
	优	良	中	差	优	良	中	差	优	良	中	差	优	良	中	差
1	2	3	5	0	8	2	0	0	3	5	2	0	3	5	2	0
2	1	3	6	0	8	1	1	0	1	3	6	0	0	1	6	3
3	4	6	0	0	8	2	0	0	6	4	0	0	7	3	0	0
4	1	2	2	5	5	5	0	0	1	7	2	0	1	5	4	0
5	2	3	5	0	7	3	0	0	2	4	4	0	1	4	5	0
6	3	7	0	0	8	2	0	0	5	5	0	0	6	3	1	0
7	0	1	3	6	6	4	0	0	2	6	2	0	1	4	5	0
8	0	3	7	0	5	1	4	0	0	1	8	1	0	1	6	3
9	8	2	0	0	9	1	0	0	7	2	1	0	7	3	0	0
10	1	3	6	0	8	1	1	0	0	2	8	0	0	1	6	3
11	7	3	0	0	8	2	0	0	6	4	0	0	6	4	0	0
12	0	4	6	0	5	2	3	0	0	2	8	0	0	0	6	4
13	6	4	0	0	6	3	1	0	7	2	1	0	7	3	0	0
14	0	4	6	0	3	1	6	0	0	2	6	2	0	0	5	5
15	1	5	4	0	7	2	1	0	3	5	2	0	2	3	5	0
16	3	5	2	0	7	2	1	0	3	5	2	0	2	6	2	0
17	1	2	2	5	6	4	0	0	2	6	2	0	1	5	4	0

2.3 理化性质及菌种鉴定结果

2.3.1 理化性质 根据响应面优化试验得到的豆汁儿制作工艺 (发酵时间 24 h, 发酵温度 37℃, 液料比为 8:1 $g \cdot g^{-1}$) 制作豆汁儿, 其感官评分为 85.7, 酸度 48.9°T, 粘度 4.6 mPa·s。

2.3.2 菌种鉴定结果 根据响应面优化试验得到的豆汁儿制作工艺 (发酵时间 24 h, 发酵温度 37℃,

液料比为 8:1 $g \cdot g^{-1}$) 制作豆汁儿, 分离培养后对 DZ I A、DZ II A1 和 DZ II A2 进行鉴定。运用 Chromas 软件对峰图加以分析, 以 DZ I A 为例, 其部分基因序列为: GGGTGTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGC GGTGTGTACAAGCCCCGGAACGTATTACCG CGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAG。图 2 是该序列对应的峰图。

表 6 模糊数学评价结果
Table 6 Fuzzy mathematics evaluation results

Y	评价结果集 Evaluation result set	模糊处理评价分数/分 Fuzzy processing evaluation score / score
Y1	{0.38, 0.40, 0.22, 0}	81.6
Y2	{0.21, 0.20, 0.50, 0.09}	75.3
Y3	{0.63, 0.37, 0, 0}	86.3
Y4	{0.18, 0.50, 0.22, 0.10}	77.6
Y5	{0.27, 0.36, 0.37, 0}	79.0
Y6	{0.55, 0.42, 0.03, 0}	84.9
Y7	{0.21, 0.40, 0.27, 0.12}	77.0
Y8	{0.10, 0.14, 0.64, 0.12}	72.2
Y9	{0.76, 0.21, 0.03, 0}	87.3
Y10	{0.18, 0.17, 0.56, 0.09}	74.4
Y11	{0.66, 0.34, 0, 0}	86.6
Y12	{0.10, 0.18, 0.60, 0.12}	72.6
Y13	{0.66, 0.29, 0.05, 0}	86.1
Y14	{0.06, 0.16, 0.57, 0.21}	70.7
Y15	{0.31, 0.38, 0.31, 0}	80.0
Y16	{0.35, 0.47, 0.18, 0}	81.7
Y17	{0.23, 0.45, 0.22, 0.10}	78.1

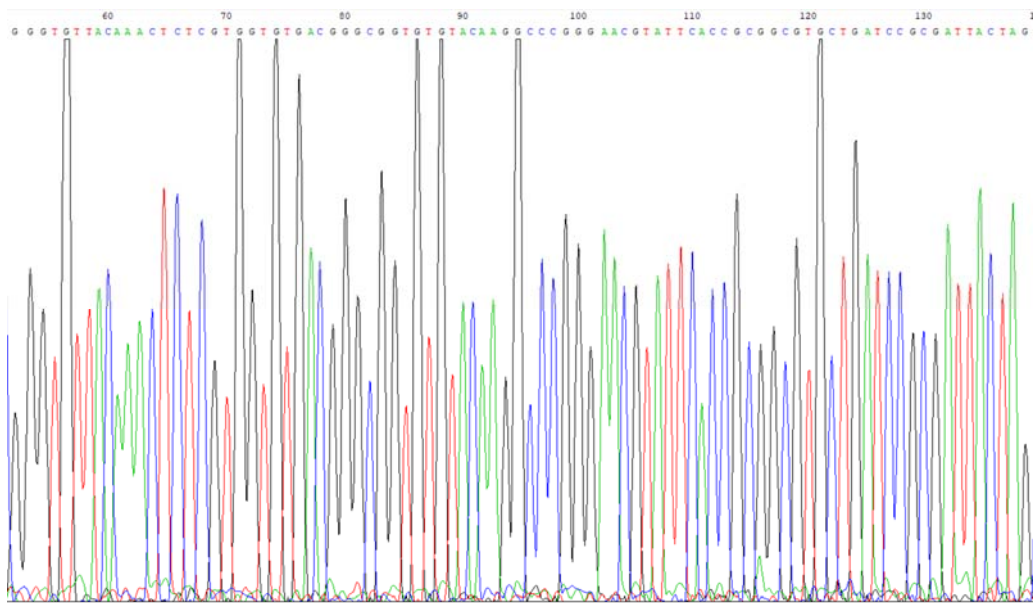


图 2 DZ I A 峰图
Figure 2 DZ I A peak map

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecium OJ150 DNA, complete genome	2508	15008	100%	0.0	100.00%	AP019394.1
Enterococcus faecium isolate E8461 genome assembly, chromosome_1	2508	10035	100%	0.0	100.00%	LR536670.1
Enterococcus faecium isolate E8407 genome assembly, chromosome_1	2508	15342	100%	0.0	100.00%	LR536659.1
Enterococcus faecium isolate E7496 genome assembly, chromosome_1	2508	12544	100%	0.0	100.00%	LR536650.1
Enterococcus faecium isolate E8020 genome assembly, chromosome_1	2508	15047	100%	0.0	100.00%	LR536640.1
Enterococcus faecium strain FS8168820 chromosome, complete genome	2508	15025	100%	0.0	100.00%	CP028727.1
Enterococcus faecium strain GM71_16S_ribosomal RNA gene, partial sequence	2508	2508	100%	0.0	100.00%	MG533774.1
Enterococcus faecium strain 301281DY6244127 genome assembly, chromosome_1	2508	17528	100%	0.0	100.00%	LR215989.1
Enterococcus faecium isolate E8043 genome assembly, chromosome_1	2508	15036	100%	0.0	100.00%	LR134195.1
Enterococcus faecium isolate E1334 genome assembly, chromosome_1	2508	15047	100%	0.0	100.00%	LR134095.1
Enterococcus faecium isolate E0130 genome assembly, chromosome_1	2508	15031	100%	0.0	100.00%	LR132057.1
Enterococcus faecium strain JE1 chromosome, complete genome	2508	14953	100%	0.0	100.00%	CP033041.1

图 3 测序比对结果
Figure 3 Sequence comparison results

鉴定豆汁儿中 DZ I A、DZ II A1 和 DZ II A2 均为粪肠球菌分离株 (*Enterococcus faecium* isolate), 图 3 是菌种鉴定测序后的比对结果。粪肠球菌存在于食用动物、动物尸体、红酒及部分发酵食品中^[13-16]。有研究发现, 从发酵食品中分离的粪肠球菌对部分抗生素具有较高的耐药性, 如: 克林霉素、新霉素等; 在断奶仔猪饲料中添加该菌也可改善其生长性能, 提高免疫力, 降低腹泻率; 该菌株也可作为一种潜在的生物保鲜剂, 抑制水产品中杀鲑气单胞菌、希瓦氏菌等腐败菌生长, 延长水产品的货架期, 利于水产品保鲜^[17-20]。

3 结论

豆汁儿发酵工艺参数的确立: 通过二次回归模型的预测豆汁儿的最佳工艺条件, 并将修正后的工艺参数做 3 次平行试验, 确定工艺为: 发酵时间 24 h、发酵温度 37℃和液料比为 8:1 g·g⁻¹。为使评定结果更趋于合理化, 运用模糊数学对响应面试验确立的 17 组样品进行综合评价, 通过感官评分确立豆汁儿的最佳发酵工艺参数组合, 模糊数学综合评价结果中 Y3、Y6、Y9、Y11 和 Y13 评分高, 其对应参数与响应面模型预测值吻合, 最终确立豆汁儿发酵工艺参数为: 发酵时间 24 h、发酵温度 37℃和液料比为 8:1 g·g⁻¹, 酸度 48.9°T, 粘度 4.6 mPa·s。该结果可为豆汁儿的统一化生产提供参考。

最佳工艺参数发酵豆汁儿中的菌种鉴定: 利用最佳发酵工艺参数发酵豆汁儿, 并运用细菌 16S rDNA 进行菌种鉴定, 确定豆汁儿中存在粪肠球菌分离株 (*Enterococcus faecium* isolate), 该菌在抗生素耐药性、食品保鲜等领域都发挥了一定的作用。而在豆汁儿中鉴定出该菌, 加快豆汁儿发酵剂研发的进程。

参考文献:

- [1] 王立东, 刘婷婷, 张丽达, 等. 机械活化处理对绿豆淀粉理化性质的影响[J]. 中国酿造, 2016, 35(8): 137-141.
- [2] 卢晓丹, 张敏. 豆汁的加工工艺研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(3): 266-270, 311.
- [3] LI W H, SHU C, ZHANG P L, et al. Properties of starch separated from ten mung bean varieties and seeds processing characteristics[J]. Food Bioprocess Technol, 2011, 4(5): 814-821.
- [4] 刘军, 段月, 张喜康, 等. 模糊数学评价结合响应面法优化枸杞真空微波干燥工艺[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(15): 127-135.

- [5] 陈书明. 利用模糊数学感官评价法优化豆渣桃酥配方[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(7): 66-69.
- [6] 陈琼玲, 赵永娟, 孙亚莉, 等. 模糊数学感官评价法优化花生桃酥加工工艺[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(9): 59-62.
- [7] 魏劲松, 徐洲, 黄宪龙, 等. 模糊数学结合响应面法优化葛根酒发酵工艺参数及其香气成分分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(5): 193-200.
- [8] 张莉力, 韩梅, 刘黎莹, 等. 一株乳酸乳球菌的分离鉴定及其发酵豆汁工艺优化[J]. 食品工业科技, 2017, 38(11): 134-139.
- [9] BORRELL N, ACINAS S G, FIGUERAS M J, et al. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(7): 1671-1674.
- [10] 杨柳, 杨捷琳, 湛鸿超, 等. 16S rDNA 在乳酸菌菌种鉴定及聚类分析上的应用[J]. 食品工业科技, 2013, 34(14): 182-186.
- [11] 兰欣, 李杰, 李贵阳, 等. 发病鲟鳇类分离菌株的 16S rRNA 基因测序分析[J/OL]. 渔业科学进展: 1-10[2020-04-21]. <https://doi.org/10.19663/j.issn2095-9869.20190128001>.
- [12] 马晓凡, 李林. 日照大豆、菜豆根瘤菌的 16S rDNA 多样性分析[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(15): 2938-2941.
- [13] TAMANG M D, MOON D C, KIM S R, et al. Detection of novel oxazolidinone and phenicol resistance gene *optrA* in enterococcal isolates from food animals and animal carcasses[J]. Vet Microbiol, 2017, 201: 252-256.
- [14] DÜNDAR H. Bacteriocinogenic potential of *Enterococcus faecium* isolated from wine[J]. Probiotics & Antimicro Prot, 2016, 8(3): 150-160.
- [15] 宝冠媛, 郭海燕, 佳木太, 等. 一株粪肠球菌 8-1 所产抑菌物质的生物学特性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(18): 147-151.
- [16] 李红玉, 吴燕峰, 江从海, 等. HLAR 粪肠球菌和屎肠球菌医院感染分布特征及耐药性分析[J]. 中国实用医药, 2008, 3(30): 23-24.
- [17] 吴大明. 纳米银对牙本质粪肠球菌生物膜的抗菌效果研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2014.
- [18] 孙雅如, 李伟程, 余中节, 等. 基于全基因组关联分析研究粪肠球菌发酵食品分离株的耐药性[J]. 微生物学报, 2019, 59(1): 113-122.
- [19] 沈勇, 刘文茹, 梅俊, 等. 花鲈鱼肠道中产细菌素粪肠球菌的筛选和抑菌效果研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(14): 15-19.
- [20] 史自涛, 姚焰础, 江山, 等. 粪肠球菌替代抗生素对断奶仔猪生长性能、腹泻率、血液生化指标和免疫器官的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(6): 1832-1840.