

郫县豆瓣挥发性物质变化规律及特征香气物质形成机理

林洪斌^{1,2}, 毕小朋¹, 方佳兴¹, 刘燕¹, 刘平¹, 丁文武¹, 车振明¹, 何强^{2,*}

(1.西华大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610039; 2.四川大学轻工科学与工程学院, 四川 成都 610065)

摘要: 利用气相色谱-嗅闻仪-质谱联用和电子鼻研究郫县豆瓣中香气化合物形成过程及变化规律。分析原料、制曲、甜瓣子发酵(保温发酵)、后发酵阶段香气化合物的变化,对特征香气物质形成机理进行探究,并对不同阶段的郫县豆瓣香气物质进行相关性分析。结果发现:郫县豆瓣挥发性物质呈现先增加后减少的趋势;苯甲醇转化形成苯甲醛,糠醛主要来源于糖类降解,异戊醇由亮氨酸转化生成,4-乙基苯酚和4-乙基-2-甲氧基苯酚主要来源于椒酞,2,3,5,6-四甲基吡嗪来源于蚕豆,苯乙醇和苯乙醛主要是由微生物代谢合成,3-甲硫基丙醛可能由甲硫氨酸的降解形成。制曲阶段对香气贡献最小,保温发酵期间香气积累较多,椒酞对后发酵前期香气贡献较大,但后期大量椒酞会导致部分香气浓度下降。郫县豆瓣从后发酵开始到后发酵6个月的香气成分变化较小,在后发酵6~12个月期间香气成分出现显著的变化,在后发酵1 a以后挥发性物质呈现逐渐减少的趋势。通过相关性分析表明发酵前期和发酵后期香气物质差异较大。

关键词: 郫县豆瓣; 香气化合物; 气相色谱-嗅闻仪-质谱联用; 形成机理

Pattern of Variations in Volatile Substances and Formation Mechanism of Characteristic Aroma Substances in Pixian Broad-Bean Paste

LIN Hongbin^{1,2}, BI Xiaopeng¹, FANG Jiaying¹, LIU Yan¹, LIU Ping¹, DING Wenwu¹, CHE Zhenming¹, HE Qiang^{2,*}

(1. College of Food and Bio-engineering, Xihua University, Chengdu 610039, China;

2. College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: Gas chromatography-olfactometry-mass spectrometry (GC-O-MS) and electronic nose (E-nose) were used to study the changes in the aroma compounds in Pixian broad-bean Paste during its production process. The changes in aroma compounds were analyzed from the raw material to the starter-making, fermentation at constant temperature, and post-fermentation stages. The formation mechanism of characteristic aroma substances was explored, and correlation analysis was carried out on the aroma substances at different stages. The results showed that the number of volatile substances increased initially and then decreased during the fermentation process. Benzaldehyde was mainly converted from benzyl alcohol; furfural was mainly derived from the degradation of sugars; soamyl alcohol was produced by leucine conversion; 4-ethylphenol and 4-ethyl-2-methoxyphenol were mainly derived from fermented hot pepper; 2,3,5,6-tetramethylpyrazine was derived from board beans; phenylethanol and phenylacetaldehyde were mainly derived from microbial metabolism. Moreover, the degradation of methionine may be responsible for 3-methionyl propanal. The starter-making stage contributed minimally to the aroma, which accumulated mostly during the constant-temperature fermentation stage. Fermented hot pepper made a large contribution to the aroma at the early stage of fermentation but resulted in reduced aroma concentration at the late stage. During the first six months of post-fermentation, the concentration of aroma compounds changed slowly, but dramatically from month 6 to 12; however, it gradually reduced after 1 year. The correlation analysis showed that the aroma substances at the early stage of fermentation were significantly different from those at the late stage.

Keywords: Pixian broad-bean paste; aroma compounds; gas chromatography-olfactory-mass spectrometry; formation mechanism

收稿日期: 2019-01-04

基金项目: 成都市产业集群协同创新项目(2016XT000031NC); 四川省科技厅应用基础项目(2018JY0189)

第一作者简介: 林洪斌(1985—)(ORCID: 0000-0002-1218-7074), 男, 实验师, 博士研究生, 研究方向为农产品加工与贮藏、食品发酵。E-mail: hongbin-ok@163.com

*通信作者简介: 何强(1971—)(ORCID: 0000-0001-5901-5627), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: heq361@163.com

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190104-050

中图分类号: TS264

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2020) 02-0259-08

引文格式:

林洪斌, 毕小朋, 方佳兴, 等. 郫县豆瓣挥发性物质变化规律及特征香气物质形成机理[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 259-266. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190104-050. <http://www.spkx.net.cn>

LIN Hongbin, BI Xiaopeng, FANG Jiaying, et al. Pattern of variations in volatile substances and formation mechanism of characteristic aroma substances in Pixian broad-bean paste[J]. Food Science, 2020, 41(2): 259-266. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190104-050. <http://www.spkx.net.cn>

郫县豆瓣, 四川省成都市郫都地区特产的一种蚕豆瓣辣椒酱, 是中国地理标志产品, 具有二百余年悠久历史的地方特色发酵食品, 其制作技艺于2008年被列入第二批国家级非物质文化遗产名录^[1]。郫县豆瓣香气的形成极其复杂, 与原料、米曲霉菌、非酶化学反应生成物均可能有关^[2]。有研究表明, 蚕豆瓣热处理、制曲过程、甜瓣子发酵和后发酵是郫县豆瓣制作的关键步骤^[1-6]。

近年来, 发酵调味品香气物质在发酵过程中的变化规律逐渐受到人们的重视。国外如Lertsiri^[7]采用气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用和气相色谱-嗅觉法对泰国酱油的挥发性风味化合物及其与风味谱的关系进行研究; Song等^[8]采用培养依赖法和培养无关法对韩国酱油在发酵过程中酵母菌群落结构的变化规律进行了研究, 同时用GC-MS法对挥发性化合物的变化进行了分析; Kaneko等^[9]采用香味提取稀释法对日本生抽(未加热)和加热酱油中主要的香气化合物进行了研究。国内如田甜等^[10]采用顶空固相微萃取结合GC-MS技术探索了传统豆瓣酱香气品质最佳的发酵时期。相欢等^[11]通过固相微萃取(solid-phase microextraction, SPME)、溶剂萃取(solvent extraction, SE)以及GC-MS结合的方法, 研究不同固形物浓度对酱油香气物质的影响; 赵星贺等^[12]采用SPME对北京干黄酱中的挥发性成分进行了提取, 提取物经气相色谱-质谱-嗅觉检测器联用(gas chromatography-olfactometry-mass spectrometry, GC-O-MS)进行分离与鉴定。郫县豆瓣后发酵过程中挥发性物质变化的报道较多, 如黄湛^[13]以一级传统郫县豆瓣为研究对象, 运用SPME、GC-MS和气相色谱嗅觉(gas chromatography-olfactometry, GC-O)测量法对挥发性成分和特征香气物质进行了鉴定, 并结合偏最小二乘回归和电子鼻技术分析郫县豆瓣发酵过程中风味物质的变化规律, 探究特征风味物质的形成规律。目前郫县豆瓣发酵过程中香气变化已有报道, 然而关于郫县豆瓣中香气物质来源及其与原料和整体工艺过程的关系尚不清楚。

本研究主要探究郫县豆瓣香气化合物在郫县豆瓣生产过程的变化规律, 包括原料、制曲、保温发酵、后发酵阶段香气化合物的变化, 明确其形成的时间点, 推测

香气化合物形成途径和机理, 并探讨其与整体风味的关系, 为郫县豆瓣产品在发酵过程中的香气调控和风味的改善提供重要理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

郫县豆瓣原料及发酵过程样品取自四川郫县豆瓣股份有限公司; 取样工艺点: 原料: 干蚕豆瓣、烫漂蚕豆瓣、椒醪, 分别编号为D1、D2、J1; 制曲3、6 d(成曲)样品, 分别编号为Q1、Q2; 甜瓣子发酵15、30、60 d样品, 分别编号为H1、H2、H3; 后发酵3、6、12、24、36个月样品, 分别编号为3M、6M、1Y、2Y、3Y; 于-4℃冷藏保存。

二氯甲烷、无水硫酸钠、无水乙醚(均为分析纯)成都市科龙化工试剂厂; 1,2-二氯苯(标准品)、C₈~C₂₀正构烷烃标准品 西格玛奥德里奇贸易有限公司。

1.2 仪器与设备

SPME手动进样手柄、75μm CAR/PDMS萃取头美国Supelco公司; GCMS-QP2010 Plus GC-MS用仪日本岛津仪器公司; Olfactory Detection Port 3嗅觉仪德国Gerstel科技有限公司; PEN 3.5系统便携式电子鼻德国Airsense公司。

1.3 方法

1.3.1 SE方法

称取50.00 g郫县豆瓣样品于250 mL锥形瓶中, 加入50 mL二氯甲烷, 瓶口塞入脱脂棉并用保鲜膜密封, 置于130 r/min、18℃的摇床中萃取20 h, 然后于4℃冷冻离心15 min, 减压浓缩至5~6 mL, 再用氮气吹扫至总体积为1 mL, 于-4℃保存待GC-MS分析。

1.3.2 SPME方法

称取4.000 g样品于15 mL顶空进样瓶中, 添加2 mL 19% NaCl溶液以提高提取率, 用PTFE-silicone瓶盖密封。55℃恒温平衡30 min后, 插入CAR/PDMS(75μm)萃取头在55℃萃取40 min, 萃取结束后在GC进样口(240℃)解吸5 min。

1.3.3 挥发性风味物质的GC-MS测定

1.3.3.1 气相色谱条件

SE进样条件: Agilent DB-WAX-UI石英毛细柱(30 m×0.25 mm, 0.50 μm)。升温程序: 40 °C保持1 min, 以7 °C/min升至150 °C, 保持10 min; 以3 °C/min升至185 °C, 保持5 min; 以8 °C/min升至220 °C, 保持5 min。载气(He)流速1.1 mL/min, 进样量1 μL; 分流比为10:1。两次进样均以220 °C老化20 min, 去除色谱柱中残留杂质。

SPME进样条件: Agilent DB-WAX-UI石英毛细柱(30 m×0.25 mm, 0.50 μm)。升温程序: 40 °C保持1 min, 以7 °C/min升至150 °C, 保持10 min; 以3 °C/min升至185 °C, 保持5 min。

载气(He)流速1.0 mL/min, 压力2.4 kPa; 分流比为1:3。两次进样均以220 °C老化20 min, 去除色谱柱中残留杂质。

1.3.3.2 质谱条件

电子电离源; 电子能量70 eV; 传输线温度240 °C; 离子源温度230 °C; 母离子 m/z 285; 激活电压1.5 V; 质量扫描范围 m/z 40~350。

1.3.3.3 挥发性风味物质的定性与定量

挥发性风味物质的定性分析: GC-MS检测所得化合物质谱图经NST.2010质谱库检索, 按检索结果相似性高低进行定性, 结合保留指数法对化合物辅助定性, 即使用 $C_6\sim C_{20}$ 正构烷烃标准品在相同条件下测试, 得到一系列正构烷烃的保留时间, 并按照式(1)得到保留指数(RI):

$$RI = 100N + \frac{100n \times (t_{Ra} - t_{RN})}{t_{R(N+n)} - t_{RN}} \quad (1)$$

式中: N 为与风味物质相邻的较小烷烃的碳原子数; n 为风味物质插入到的两个系列烷烃碳原子数差值; t_{Ra} 为保留时间、 $t_{R(N+n)}$ 为相邻较小烷烃的保留时间、 t_{RN} 为相邻较大烷烃的保留时间^[4]。

定量分析采用内标法: 以邻二氯苯为内标物, 其质量浓度为250 μg/mL(二氯甲烷为溶剂)。在SE法中: 萃取液总体积为1 mL, 然后分别取50 μL萃取液与1 μL内标溶液混合, 根据式(2)、(3)进行计算。在SPME法中: 向顶空瓶中加入1 μL内标溶液再进行吸附萃取。

$$C_i = C_0 \times \frac{A_i}{A_0} \quad (2)$$

$$X = \frac{C_i \times V_i \times \frac{i}{V_0 + i}}{m} \quad (3)$$

式中: A_0 为内标物邻二氯苯的峰面积; A_i 为待测物质的峰面积; C_0 为内标溶液的质量浓度/(μg/mL); C_i 为待测物质的质量浓度/(mg/mL); X 为待测物质的含量/(μg/g); V_i 进样体积/mL; V_0 为混合液中所含的内

标物体积/mL; i 为萃取液体积/mL; m 为处理前样品的质量/g。为简化计算 $i/(v_0+i)$ 统一近似处理为1。

1.3.4 香气活性物质的测定

采用GC-O-MS对郫县豆瓣活性物质进行鉴定, GC条件同1.3.3节, 同时连接嗅闻仪装置, 流出柱子的挥发性物质1:1(V/V)分流到质谱检测器和嗅闻口。挑选3位有嗅闻描述经验的感官评定员, 按时间强度法进行嗅闻实验, 嗅闻的同时进行时间强度和香气描述。实验过程中, 每个样品每位嗅闻者重复嗅闻3次, 嗅闻时间为程序时间, 统一由一名人员对气味出现时间、气味强度、香气特征描述进行记录。

1.3.5 电子鼻分析

电子鼻测定时间240 s; 顶空温度25 °C; 内部流量300 mL/min; 进样流量300 mL/min。每种样品平行测定6次。

1.4 数据分析

采用SPSS 19.0统计分析软件进行主成分分析和聚类分析, Excel 2016和Origin 9进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 郫县豆瓣发酵过程挥发性物质变化规律

从郫县豆瓣原料到发酵整个过程共鉴定出240种挥发性风味成分, 其中有醇、醛、酸、酯、酮、烃、醚、杂环、酚、胺和其他类。各阶段检出的风味物质的组成和各挥发性风味成分的浓度均不同, D1、D2、J1、Q1、Q2、H1、H2、H3、3M、6M、1Y、2Y、3Y样品分别检出32、29、27、50、35、49、45、70、61、54、49、42、36种挥发性风味物质。

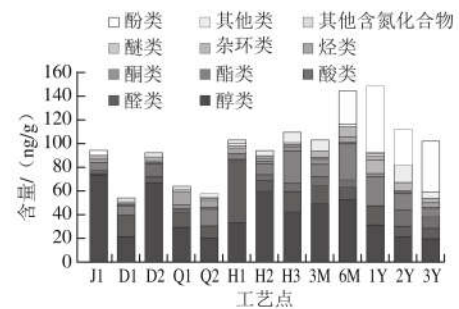


图1 郫县豆瓣发酵全过程挥发性物质种类变化
Fig. 1 Changes in the types of volatile components of Pixian broad-bean paste throughout the fermentation process

从图1可以看出, 在H1和6M两个工艺点, 挥发性风味物质增加最多, 后发酵期间挥发性物质含量呈现先增加后减少的趋势, 由此判断香气物质从制曲逐渐开始产生, 接着在甜瓣子发酵过程中大量形成并积累, 后发酵过程中挥发性物质选择性的消长, 风味逐渐形成。

在郫县豆瓣发酵的整个过程中, 各类物质的此消彼长并没有呈现明显变化规律, 其中椒胚中醇类含量最高, 占挥发性成分的67.13%; 同时, 醇类物质在整个发酵过程中呈现先增加后减少的趋势, 醛类物质在甜瓣子发酵过程中大量产生, 酯类物质在后发酵过程中逐渐积累。而结合香气化合物来看, 醛类物质对整体风味的贡献占据主导地位。

通过聚类分析对郫县豆瓣发酵过程进行相似性分析, 分析不同发酵时期郫县豆瓣香气成分差异性。由图2可知, 样品D1和样品Q1在最小距离水平上形成一个小类, 表明两者之间具有较大的相似性; 同时样品H3和样品3M也在最小距离水平上形成一个小类, 也表明两者之间具有较大的相似性, 但随着欧式距离增大到15左右时, 样品1~8聚为一类, 说明样品D1、D2、Q1、Q2、H1、H2、H3、3M的挥发性化合物具有较大差异。当欧氏距离增至将近20时, 样品6M、1Y、2Y、3Y聚为一类, 而当欧式距离到25时, 所有样品才聚在一起, 说明在整个发酵阶段郫县豆瓣的香气成分差异性很大。图2可以明显看出, 香气物质形成主要分为两个阶段, 从制曲阶段到后发酵前期的样品聚为一大类, 而后发酵中后期阶段自成一类, 说明郫县豆瓣在前发酵和后发酵阶段香气物质的含量变化很大。

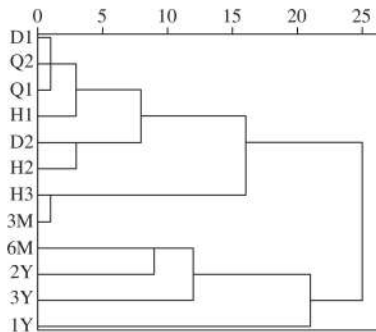


图2 郫县豆瓣挥发性物质聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of volatile compounds of Pixian broad-bean paste

2.2 郫县豆瓣香气活性物质的鉴定

在两种提取方式得到的郫县豆瓣挥发性物质体系中, GC-O嗅闻结果总共检出36种香气化合物, 见表1、2。SE法、SPME法GC-O嗅闻分别得到18、21种香气化合物, 为醛、醇、酮、酚、酯、吡嗪、吡咯类, 其中醛类为最主要的香气化合物。共同嗅闻到的物质仅有2,3,5,6-四甲基吡嗪和4-乙基愈创木酚2种。通过GC-O检测出郫县豆瓣中的香气活性物质共29种, 分为6类, 分别为: 酱香、烤土豆类似香味; 水果醇香; 蜂蜜、甜香; 类似大曲的霉味; 苦辣刺激气味; 草木、烟熏、生青味。

表1 郫县豆瓣GC-O测定的香气化合物 (SE法萃取)

Table 1 Important aroma compounds identified in Pixian broad-bean paste by SE-GC-O

序号	RI ^a	气味描述 ^b	气味强度 ^c	化合物
1	498	烧焦臭味	2	丙烯醛
2	717	甜香	2	3-羟基-2-丁酮
3	806	青草香味	2	正己醛
4	811	果香	2	异戊醇
5	831	焦香、辛香	4	糠醛
6	845	难闻气味, 酸臭	3	异戊酸
7	858	烤土豆味、酱香	3	3-甲硫基丙醛
8	885	苦辣气味	2	糠醇
9	—	生青味, 辣味	4	U
10	910	酸草药味	2	3-甲基戊酸
11	982	烤坚果味	3	苯甲醛
12	1 090	烟熏味	2	4-乙基愈创木酚
13	1 121	咸香、烤土豆味	3	2,3,5,6-四甲基吡嗪
14	1 035	焦香, 脂香	3	2-乙酰基吡咯
15	1 136	玫瑰花香气	3	苯乙醇
16	1 229	香甜味	4	苯乙酸乙酯
17	1 381	甜香	2	癸酸乙酯
18	—	中药味	4	U

注: a.在色谱柱DB-WAX-UI上的保留指数; b.嗅闻评价人员给出的香气描述; c.由评价人员给出的强度值; —.未能计算出保留指数; U.由于痕量未能鉴定出。下同。

表2 郫县豆瓣GC-O检测到的香气化合物 (SPME法萃取)

Table 2 Important aroma compounds identified in Pixian broad-bean paste by SPME-GC-O

序号	RI ^a	气味描述 ^b	气味强度 ^c	化合物
1	597	略带酸臭味	3	异丁醇
2	643	花果香	2	异戊醛
3	650	类似消毒水气味	2	2-甲基丁醛
4	717	甜香	2	3-羟基-2-丁酮
5	811	果香, 略带酸味	2	异戊醇
6	831	坚果香	2	糠醛
7	841	酒香、李子香气	2	2-甲基丁酸乙酯
8	845	酸臭味	3	异戊酸
9	858	酱香, 烤土豆香	4	3-甲硫基丙醛
10	932	炒花生香	4	2,5-二甲基吡嗪
11	957	不愉快气味	2	5-甲基呋喃醛
12	982	坚果香	4	苯甲醛
13	1 035	烤土豆味	3	2-乙酰基吡咯
14	1 108	咸香	3	壬醛
15	1 081	蜂蜜、香甜味	3	苯乙醛
16	1 121	酱香	2	2,3,5,6-四甲基吡嗪
17	1 135	玫瑰花味	3	苯乙醇
18	1 168	生辣椒、生青味	4	4-乙基苯酚
19	1 229	花香	2	苯乙酸乙酯
20	1299	呈甜而暖的香辛料及中草药香	3	4-乙基愈创木酚
21	—	草木香、涩味	4	U

2.3 郫县豆瓣重要特征香气化合物形成机理

在本课题组早前的研究中确定了11种香气物质为郫县豆瓣重要特征香气化合物^[4], 包括3-甲硫基丙醛、苯甲醛、异戊醇、2-乙酰基吡咯、2,5-二甲基吡嗪、糠醛、

2,3,5,6-四甲基吡嗪、苯乙醛、苯乙醇、2-乙基苯酚和4-乙基-2-甲氧基苯酚。在郫县豆瓣的整个发酵过程中, 各类物质含量变化与发酵阶段的关系如图3所示。

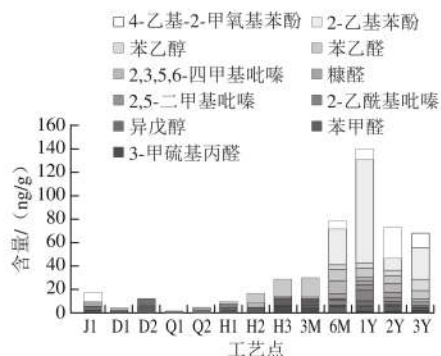


图3 郫县豆瓣发酵全过程重要香气化合物组成及含量

Fig. 3 Changes in the composition and contents of important aroma compounds in Pixian broad-bean paste throughout the fermentation process

从图3可知, 椒醪中共检出4种关键香气物质: 苯甲醛、异戊醇、2-乙基苯酚和4-乙基-2-甲氧基苯酚。

苯乙醇具有柔和、愉快而持久的玫瑰香气, 在郫县豆瓣中表现出草木香气、植物的生青味, 在自然界中广泛存在于植物中, 在多种发酵粮食酒、果酒中均有检出, 同时在柿醋、枣醋、腌菜、豆酱以及酸肉、南京酱牛肉、火腿股二头肌等产品中香气成分分析时, 也都检测到苯乙醇的存在。苯乙醇是杂醇油的重要组成部分之一, 部分微生物(如酿酒酵母、黑曲霉、白地霉等)可通过代谢生成苯乙醇, 从而赋予发酵产品(如面包、干酪、酒和酱油等)香气^[15]。苯乙醇在郫县豆瓣成曲中第1次检出, 制曲过程中米曲霉大量繁殖代谢, 是苯乙醇的主要来源^[16]。苯乙醛在郫县豆瓣中表现为花香、甜香、蜂蜜香, 与苯丙氨酸的代谢相关, 也是郫县豆瓣重要香气化合物, 其第1次检出晚于苯乙醇, 在甜瓣子发酵H2阶段产生, 这也符合苯乙醇与苯乙醛生成顺序。

异戊醇的风味特点为果香, 略带酸味, Yoshimoto等^[17]认为异戊醇、异丁醇、乙酸异戊酯是酿酒酵母发酵果酒中的重要香味物质; Kang等^[18]研究表明异戊醇由亮氨酸生成, 并带有香蕉果香, 是韩国果酒和日本米酒里面的重要香味物质; 但Watanabe等^[19]研究认为过量的异戊醇使面包的风味有不好的感受。成熟的郫县豆瓣异戊醇的含量适中, 对郫县豆瓣的整体香气贡献显著。

苯甲醛广泛存在于植物中, 特别是在蔷薇科植物中, 主要以苷的形式存在于植物的茎皮, 叶或种子中, 具有坚果香味。本研究在蚕豆原料与辣椒醪中都检出了苯甲醛, 说明蚕豆和辣椒中都含有苯甲醛。苯甲醛在风味研究领域有着特殊的意义, Martres^[20]首次从苦杏仁中提取并鉴定为香味物质, 后来被报道苯甲醛是日本和韩

国酱油中的香气活性物质, 其在霉菌发酵的食品中常被检出, 如腐乳、发酵干香肠和韩式豆酱等^[21-23]。苯甲醛在郫县豆瓣中呈现类似酱油的咸香、酱香, 与壬醛、糠醛、3-甲硫基丙醛一起使郫县豆瓣的酱香更加丰富。除原料带入外, 低分子质量挥发醛的主要来源还有氨基酸降解和微生物的转化, 它们的阈值都比较低, 能够带来清香、花果香和类似坚果香的芳香特质。本实验各组检出的支链醛主要是2-甲基丁醛和苯甲醛, 它们可以由微生物利用支链氨基酸降解产物得到。在发酵过程中, 苯甲醇、苯甲醛和苯甲酸等中间物质被检出, 他们可能相互转化。

糠醛在干蚕豆瓣中初次检出, 含量较低, 糠醛在蚕豆瓣烫漂后含量升高, 其气味描述为坚果香味, 但其气味强度比苯甲醛较低。有报道糠醛来源于麦芽糖、乳糖等与氨基酸的热反应或糖类物质的热降解^[24], 在制曲过程中持续检出, 保温发酵期间没有检出, 与董丹等^[25]的研究结果一致。在保温发酵H2~H3期间检出了较高含量的糠醇, 可能是此期间糠醛在微生物的作用下氧化反应生成糠醇, 部分糠醇进一步被氧化为糠酸。后发酵期间随着郫县豆瓣中蔗糖被利用, 转化成糖醛, 戊聚糖又再降解生成糠醛, 所以随着糠醛呈现先增加后减少的趋势, 减少的同时检出糠醇下游产物5-甲基呋喃醛。

3-甲硫基丙醛具有醇厚的酱香和烤土豆香气, 也是郫县豆瓣中酱香味的主要来源物质, 在韩式酱油、高盐稀态酱油、酵母抽提物等的香气物质研究中被认为是主要贡献成分, 然而, 并非所有食品中的Strecker醛为大家所喜闻乐见, 有研究表明, 3-甲硫基丙醛和苯乙醛在啤酒中的含量与其质量呈负相关, 随啤酒贮藏期的延长而有所增加, 是啤酒老化风味的来源之一^[26]。3-甲硫基丙醛在甜瓣子发酵H3时期第1次检出, 可能来自甲硫氨酸的降解, 也是发酵过程中蛋氨酸的Strecker降解产物, 并可能进一步在微生物的作用下转化成3-甲硫基丙醇。

2-乙基苯酚、4-乙基-2-甲氧基苯酚两种酚类仅在椒醪原料中检出, 在蚕豆、制曲及甜瓣子中均没有检出, 后发酵时期椒醪和甜瓣子混合后再次检出, 由此可知椒醪是酚类物质的主要来源, 并且在后发酵时会继续生成。有报道在威士忌^[27]、香草^[28]、咖啡^[29]里发现其具有木香、辛香、丁香香气, 其中4-乙基愈创木酚被认为是日韩酱油诱人香味的重要贡献物质, 并且其与酵母的代谢活动有关^[30]。

2,3,5,6-四甲基吡嗪的风味描述是酱香味, 在干蚕豆瓣中初次检出, 在H3时期第2次检出, 在甜瓣子发酵后期开始逐渐积累在后发酵3个月时含量到达峰值, 随后逐渐下降。说明2,3,5,6-四甲基吡嗪开始来源于蚕豆, 随后在发酵过程中可以由微生物作用产生和降解。吴建峰^[31]认为在白酒酿造中, 细菌制曲阶段所生成的4-甲基吡嗪

是酒中4-甲基吡嗪的主要来源之一。Huang等^[32]研究了葡萄糖氨基酸体系下二甲基吡嗪和三甲基吡嗪反应动力学,发现2-甲基吡嗪和2,5-二甲基吡嗪是赖氨酸葡萄糖系统中两种最丰富的生物碱。本研究在制曲阶段到甜瓣子发酵2个月期间并未检出2,3,5,6-四甲基吡嗪,在郫县豆瓣中制曲及甜瓣子阶段的优势菌为米曲霉,细菌和酵母菌可能在这个阶段被抑制,而在后发酵过程中逐渐积累,证实了细菌与四甲基吡嗪的紧密联系。另外氨基酸在氨基酸脱氢酶的作用下脱氢生成氨,与3-羟基-2-丁酮通过缩合作用合成四甲基吡嗪。3-羟基-2-丁酮是2,3,5,6-四甲基吡嗪的主要上游基础物质,3-羟基丁酮主要由双乙酰途径获得,双乙酰是合成3-羟基丁酮和2,3-丁二醇的前体物质^[33]。2,3-丁二醇在郫县豆瓣后发酵过程中持续检出且含量较高,Yaylayan等^[34-35]通过研究碳标记的葡萄糖和丙氨酸之间的热反应,发现2,3-丁二酮来自于单一的葡萄糖降解途径。2,3-丁二酮和3-羟基丁酮在蚕豆、制曲、甜瓣子发酵期间也不连续的检出,为2,3,5,6-四甲基吡嗪的合成提供物质基础。研究四甲基吡嗪生成途径可为提高其含量提供参考。

2-乙酰基吡咯检出于甜瓣子发酵前期,随后其含量开始逐渐降低,后发酵阶段随发酵时间延长含量逐渐增高,后发酵中后期含量增加较为明显。Arsa等^[36]研究酶水解米糠蛋白浓缩液发现2-乙酰基吡咯是其中一种重要风味物质,主要呈可可香、坚果香。Jeong等^[37]研究认为2-乙酰基吡咯是韩国大酱的香气活性物质之一。

2.4 不同阶段的郫县豆瓣香气相关性分析

2.4.1 郫县豆瓣各发酵阶段香气主成分分析

表3 总方差解释
Table 3 Total variance interpretation

成分	初始特征值		
	总计	方差/%	累积/%
1	4.921	44.734	44.734
2	2.331	21.190	65.924
3	1.566	14.232	80.156

对郫县豆瓣不同阶段11种重要香气成分进行主成分分析。上表表明3个主成分贡献率达80.156%,即可以用这3个主成分代替上述11种重要香气成分物质对不同时期的豆瓣进行区分。根据成分矩阵得: $Z_1=0.883X_1+0.832X_2+0.828X_3+0.802X_4+0.399X_5+0.337X_6+0.535X_7-0.525X_8+0.206X_9-0.080X_{10}+0.001X_{11}$; $Z_2=-0.189X_1-0.109X_2-0.181X_3-0.031X_4-0.208X_5-0.216X_6-0.099X_7+0.948X_8+0.852X_9+0.612X_{10}-0.387X_{11}$; $Z_3=-0.161X_1+0.263X_2+0.428X_3-0.375X_4-0.334X_5-0.305X_6+0.427X_7+0.005X_8+0.017X_9+0.408X_{10}+0.770X_{11}$ 。

由图4可以看出,以主成分1(33.50%)和主成分2(23.83%)作得分散点图能够得到郫县豆瓣不同发酵阶段的样品分布情况。在前发酵时期,甜瓣子发酵H1至H3期间每个样品之间都有一定间距,说明在甜瓣子发酵期

间微生物持续频繁的活动,物质反应变化较快,所以香气成分变化较大,3-甲基硫基丙醛、吡嗪等香气成分主要在此阶段产生。后发酵阶段3M和6M以及1Y之间距离最大,说明后发酵3~12个月阶段郫县豆瓣中挥发性风味物质变化最大。样品2Y和3Y的间距相较1Y间距较小,说明样品2Y和3Y差异较小,即发酵后期,特征香气成分趋于稳定。

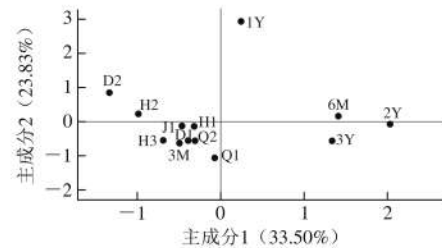


图4 郫县豆瓣各发酵阶段香气主成分分析

Fig. 4 Score scatter plot of principal component 1 versus 2 for aroma compounds in Pixian broad-bean paste

2.4.2 电子鼻分析不同发酵阶段对郫县豆瓣香气物质的贡献性

线性判别式分析(linear discriminant analysis, LDA)是一种常用的多变量统计分类方法,该方法需要样本空间呈正态分布,并有相等的离差。原始变量经过线性组合后得到判别函数,从而压缩空间维数,同时减少信息的丢失^[38]。使用电子鼻对样品Q1、Q2、H1、H2、H3、3M、6M、1Y、2Y、3Y进行测定,并作LDA图。

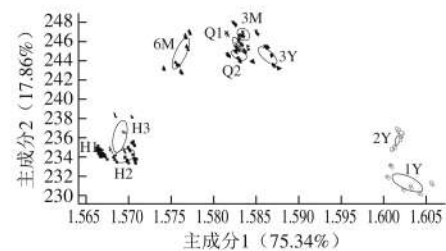


图5 发酵全过程样品电子鼻区分的LDA图

Fig. 5 LDA plot of samples distinguished by electronic nose

由图5可知,第1主成分和第2主成分的贡献率分别为75.34%和17.86%。制曲阶段的样品存在明显的重复区域,说明制曲阶段样品的比较接近。后发酵3个月和发酵6个月的样品在第1主成分上有区别,但在第2主成分上表现出相似性。后发酵6个月的样品与发酵12个月的样品在第1主成分和第2主成分上都存在十分明显的区别。这也表明,郫县豆瓣从后发酵开始到后发酵6个月的香气成分持续变化,在发酵6个月到12个月开始挥发性物质出现显著的变化。后发酵12个月、后发酵24个月的样品相对独立且与发酵前期的样品存在明显的差异。

3 结论

通过对郫县豆瓣原料到后发酵3 a期间的13个样品进行了挥发性成分测定,发现在整个郫县豆瓣的发酵过程中,总体风味物质呈先增加后减少的趋势,醛类物质在甜瓣子发酵过程中大量产生,发酵过程中醇类、醛类、酯类呈先增加后减少的趋势,其他类物质没有明显变化规律。

本实验补充了苯甲醛的天然来源,即蚕豆与辣椒。同时苯甲醛可以由微生物利用支链氨基酸降解得到。2-乙基苯酚、4-乙基-2-甲氧基苯酚的主要来源是椒醌,并认为与酵母的代谢活动有关。糠醛的主要合成途径是蔗糖转化成糖醛、戊聚糖,再降解生成糠醛。3-甲硫基丙醛可能来自甲硫氨酸的Strecker降解,并可能进一步在微生物的作用下转化成3-甲硫基丙醇。苯乙醇主要通过微生物代谢产生。2,3,5,6-四甲基吡嗪在干蚕豆瓣中初次检出,第2次检出是在H3时期,2,3,5,6-四甲基吡嗪的来源是蚕豆原料及生物途径代谢产生。

利用电子鼻探讨发酵过程中各阶段对郫县豆瓣香气物质的贡献性发现:制曲阶段对香气贡献最小,甜瓣子期间香气积累较多,但因为后发酵时混合大量椒醌导致贡献率下降,椒醌对发酵前期香气贡献较大,郫县豆瓣在后发酵开始到后发酵6个月的香气成分变化明显,在发酵6~12个月,香气成分出现显著的变化。

本研究针对郫县豆瓣整个发酵阶段的香气成分的规律进行详细分析,同时对某些特征香气成分的合成机理进行探究,但是某些特征香气成分的形成机制还有待后续进一步研究论证。

参考文献:

- [1] 高岭. 郫县豆瓣生产中质量控制点剖析[J]. 中国调味品, 1998(9): 20-23.
- [2] 徐岩泽. 发酵食品微生物学[M]. 2版. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 264-265.
- [3] 马世玲. 郫县豆瓣产品特点、工艺特征、纯种分离及生产应用[J]. 食品与发酵科技, 2009, 45(1): 20-22. DOI:10.3969/j.issn.1674-506X.2009.01.006.
- [4] 李幼筠. 郫县豆瓣剖析[J]. 中国酿造, 2008, 27(11): 19-23. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2008.06.027.
- [5] 李治华, 王自鹏, 胡静, 等. 传统与商品郫县豆瓣酱挥发性成分的比较分析[J]. 现代食品科技, 2014, 30(4): 268-273. DOI:1673-9078(2014)4-268-273.
- [6] 刘永琪. 豆瓣酱发酵的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014: 4-5.
- [7] LERTSIRI S. Volatile flavor compounds and flavor profiles of Thai soy sauce[J]. ACS Symposium Series, 2010, 1059(23): 375-387. DOI:10.1021/bk-2010-1059.ch023.
- [8] SONG Y R, JEONG D Y, BAIK S H. Monitoring of yeast communities and volatile flavor changes during traditional Korean soy sauce fermentation[J]. Journal of Food Science, 2015, 80(9): M2005-M2014. DOI:10.1111/1750-3841.12995.
- [9] KANEKO S, KUMAZAWA K, NISHIMURA O. Studies on the key aroma compounds in raw (unheated) and heated Japanese soy sauce[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(14): 3396-3402. DOI:10.1021/jf400353h.
- [10] 田甜, 武俊瑞, 岳喜庆. 基于因子分析研究豆酱香气品质最佳的发酵时期[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(8): 163-170. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2014.08.020.
- [11] 相欢, 尹文颖, 崔春. SPME-DSE联用分析不同固形物浓度发酵对酱油香气物质的影响[J]. 现代食品科技, 2016, 32(10): 259-267. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.039.
- [12] 赵星贺, 黄佳, 刘玉平. 固相微萃取结合气-质联用确定北京干黄酱中关键香气成分[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(3): 266-272. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.016423.
- [13] 黄湛. 郫县豆瓣特征香气的鉴定及其形成规律研究[D]. 成都: 西华大学, 2016.
- [14] LIN H B, LIU Y, HE Q, et al. Characterization of odor components of Pixian Douban (Broad-bean Paste) by aroma extract dilute analysis and odor activity values[J]. International Journal of Food Properties, 2019, 22(1): 1223-1234. DOI:10.1080/10942912.2019.1636816.
- [15] 赵修报, 唐育岐, 刘天明. β -苯乙醇的研究进展[J]. 中国酿造, 2011, 30(8): 1-4. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2011.08.001.
- [16] JOLLIVET N, BEZINGER M C, VAYSSIER Y, et al. Production of volatile compounds in liquid cultures by six strains of coryneform bacteria[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 1992, 36(6): 790-794. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2011.08.001.
- [17] YOSHIMOTO H, FUKUSHIGE T, YONEZAWA T, et al. Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(4): 501-508. DOI:10.1007/s00253-002-1041-5.
- [18] KANG H R, HWANG H J, LEE J E, et al. Quantitative analysis of volatile flavor components in Korean alcoholic beverage and Japanese sake using SPME-GC/MS[J]. Food Science and Biotechnology, 2016, 25(4): 979-985. DOI:10.1007/s10068-016-0159-7.
- [19] WATANABE M, FUKUDA K, ASANO K, et al. Mutants of bakers' yeasts producing a large amount of isobutyl alcohol or isoamyl alcohol, flavour components of bread[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990, 34(2): 154-159. DOI:10.1007/BF00166772.
- [20] MAARS E H. Volatile compounds in foods and beverages[M]. CRC Press, 1991: 289-290.
- [21] CHUNGH Y, FUNG P K, KIM J S. Aroma impact components in commercial plain sufu[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(5): 1684-1691. DOI:10.1021/jf048617d.
- [22] BRUNAJ M, HIERRO E M, LORENZO D L H, et al. The contribution of *Penicillium aurantiogriseum* to the volatile composition and sensory quality of dry fermented sausages[J]. Meat Science, 2001, 59(1): 97-107. DOI:10.1016/S0309-1740(01)00058-4.
- [23] LEES J, AHN B. Comparison of volatile components in fermented soybean pastes using simultaneous distillation and extraction (SDE) with sensory characterisation[J]. Food Chemistry, 2009, 114(2): 600-609. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.09.091.
- [24] GARDE-CERDAN T, LORENZO C, CAROT J M, et al. Statistical differentiation of wines of different geographic origin and aged in barrel according to some volatile components and ethylphenols[J]. Food chemistry, 2008, 111(4): 1025-1031. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.05.006.
- [25] 董丹, 王猛, 车振明, 等. 甜瓣子发酵不同时期挥发性风味物质组成分析[J]. 中国酿造, 2015, 34(6): 139-144. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.

- [26] 田玉红, 陈嵘, 尹花, 等. 啤酒中关键老化物质的确定及其在贮存过程中的变化规律[J]. 酿酒科技, 2015(3): 81-83. DOI:10.13746/j.njkj.2014206.
- [27] POISSON L, SCHIEBERLE P. Characterization of the most odor-active compounds in an American Bourbon whisky by application of the aroma extract dilution analysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(14): 5813-5819. DOI:10.1021/jf800382m.
- [28] PEREZ-SILVA A, ODOUX E, BRAT P, et al. GC-MS and GC-olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans[J]. Food Chemistry, 2006, 99(4): 728-735. DOI:10.1016/j.foodchem.2005.08.050.
- [29] AKIYAMA M, MURAKAMI K, IKEDA M, et al. Characterization of flavor compounds released during grinding of roasted robusta coffee beans[J]. Food Science and Technology Research, 2005, 11(3): 298-307. DOI:10.3136/fstr.11.298.
- [30] NUNOMURA N, SASAKI M, YOKOTSUKA T. Shoyu (soy sauce) flavor components: acidic fractions and the characteristic flavor component[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1980, 44(2): 339-351. DOI:10.1080/00021369.1980.10863951.
- [31] 吴建峰. 白酒中四甲基吡嗪全程代谢机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 38-40.
- [32] HUANG T C, BRUECHERT L J, CHI-TANG H O. Kinetics of pyrazine formation in amino acid-glucose systems[J]. Journal of Food Science, 1989, 54(6): 1611-1614. DOI:10.1111/j.1365-2621.1989.tb05172.x.
- [33] 崔真真, 毛雨丰, 陈聪, 等. 生物法合成双乙酰的研究进展[J]. 生物加工过程, 2017, 15(5): 57-64. DOI:10.3969/j.issn.1672-3678.2017.05.007.
- [34] YAYLAYAN V A, KEYHANI A. Origin of 2,3-pentanedione and 2,3-butanedione in *D*-glucose/*L*-alanine Maillard model systems[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(8): 3280-3284. DOI:10.1021/jf9902292.
- [35] YAYLAYAN V A, KEYHANI A. Origin of carbohydrate degradation products in *L*-alanine/*D*-[¹³C]glucose model systems[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(6): 2415-2419. DOI:10.1021/jf000004n.
- [36] ARSA S, THERAKULKAIT C. Preparation, aroma characteristics and volatile compounds of flavorings from enzymatic hydrolyzed rice bran protein concentrate[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2018, 98(12): 4479-4487. DOI:10.1002/jsfa.8972.
- [37] JEONG E J, CHO W J, CHA Y J. Aroma-active compounds in Omandungi (*styela plicata*)-Doenjang (soybean paste) stew[J]. Korean Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, 2008, 41(6): 414-418. DOI:10.5657/kfas.2008.41.6.414.
- [38] 安莹, 孙桃. 基于电子鼻不同识别模式对不同品牌酱油的区分与识别[J]. 中国调味品, 2016, 41(2): 60-64. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2016.02.012.