

郫县豆瓣后发酵过程中挥发性呈香物质测定及主成分分析

罗 静¹, 赵红宇¹, 徐炜桢¹, 杨国华², 岳 鹏², 张 良^{1,*}

(1. 西华大学食品与生物工程学院, 食品生物技术四川省高校重点实验室, 四川 成都 610039;

2. 四川省丹丹郫县豆瓣集团股份有限公司国家企业技术中心, 四川省豆瓣酿制技术工程实验室,

食品用酶生物发酵技术国家地方联合工程研究中心, 四川 成都 611732)

摘 要: 为揭示郫县豆瓣特有“味辣香醇, 酱香浓郁”的产品特征与挥发性呈香物质之间的关联关系, 本研究以稳定发酵(6个月)至发酵末期(5a)合计5个不同发酵阶段郫县豆瓣为对象, 通过顶空固相微萃取及气相色谱-质谱联用技术测定5个不同后发酵期郫县豆瓣样品中挥发性呈香物质, 并采用主成分分析进一步分析测定结果。结果表明, 共检测出9个类别超过140种挥发性呈香物质, 其中占优势的有乙酸乙酯、4-乙基愈创木酚、苯乙醇、乙醇、苯乙醛, 平均相对含量分别为18.39%、10.58%、7.64%、7.16%、6.59%。随着后发酵时间延长, 醛类、酯类、烃类及杂环类物质的相对含量增加, 而醇类、酚类及酮类则呈下降趋势。挥发性呈香物质在初熟期的变化程度远大于其在老熟期, 后发酵3a后, 其变化已非常缓慢, 再继续发酵, 也不会明显变化。

关键词: 郫县豆瓣; 挥发性呈香物质; 主成分分析

Analysis of Volatile Compounds in Pixian Soybean Paste during Post-Fermentation by SPME-GC-MS Combined with PCA

LUO Jing¹, ZHAO Hongyu¹, XU Weizhen¹, YANG Guohua², YUE Peng², ZHANG Liang^{1,*}

(1. Key Laboratory of Food Biotechnology of Sichuan Province, College of Food and Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China; 2. Soybean Paste Brewing Technology and Engineering Laboratory of Sichuan Province,

Sichuan Dandan Pixian Soybean Paste Co. Ltd., National Enterprise Technology Center,

National & Local Joint Engineering Research Center of Food Enzyme Fermentation, Chengdu 611732, China)

Abstract: In this study, head-space solid phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) was applied to analyze the main volatile flavor substances of Pixian soybean paste (PSP) sampled at five different fermentation stages from stable fermentation (six months) to the end (five years), and the obtained data were analyzed by principal component analysis (PCA). The results revealed that over 140 volatile flavor substances were detected in all PSP samples, mainly including ethyl acetate (18.39%), 4-ethyl gualacol (10.58%), phenethyl alcohol (7.64%), alcohol (7.16%) and phenylacetaldehyde (6.59%). The relative contents of aldehydes, esters, hydrocarbons and heterocyclic compounds increased with fermentation time, while the relative contents of alcohols, phenols and ketones decreased. The change of volatile aroma compounds was far greater during the early maturation stage than during the late maturation stage and it was very slow after 3 years of post-fermentation and did not significantly change subsequently.

Keywords: Pixian soybean paste; volatile compounds; principal component analysis

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201818033

中图分类号: TS264.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2018)18-0209-08

收稿日期: 2017-07-16

基金项目: 国家教育部春晖计划项目(Z2015117); 四川省战略性新兴产业重点研发项目(2015GZX0021); 四川省重点研发项目(2016NZ0093); 成都市科技惠民技术研发项目(2015-HM01-00003-SF); 成都市农业技术成果应用示范项目(2015-NY01-00001-NC); 成都市农业技术研发项目(2015-NY02-00097-NC); 成都市产学研联合实验室项目(2015-YF04-00047-JH); 西华大学食品生物技术重点实验室建设项目(川教2006-313)

第一作者简介: 罗静(1985—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: 313778004@qq.com

*通信作者简介: 张良(1982—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: zhang-liang@foxmail.com

引文格式:

罗静, 赵红宇, 徐炜桢, 等. 郫县豆瓣后发酵过程中挥发性呈香物质测定及主成分分析[J]. 食品科学, 2018, 39(18): 209-216. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201818033. <http://www.spkx.net.cn>

LUO Jing, ZHAO Hongyu, XU Weizhen, et al. Analysis of volatile compounds in Pixian soybean paste during post-fermentation by SPME-GC-MS combined with PCA[J]. Food Science, 2018, 39(18): 209-216. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201818033. <http://www.spkx.net.cn>

郫县豆瓣属中国传统地方特色发酵食品, 迄今为止已有300多年的历史, 被列为中国非物质文化遗产。郫县豆瓣不仅生产工艺独特, 也以其味辣香醇、黏稠绒实、红棕油亮、酱香浓郁等特点在我国酱类产品中独树一帜, 堪称川菜之魂^[1-2]。截止2015年末, 郫县豆瓣品牌价值已达607.16亿元, 位列“加工食品类地理标志产品”全国第一; 当年产品总产量达到110万 t, 实现工业产值102亿元, 出口世界绝大部分国家和地区, 创汇超过4 000万美元^[3]。

郫县豆瓣的生产包括前期发酵和后熟发酵2个阶段, 前期发酵主要是指蚕豆豆瓣子的制曲和辣椒坯的预处理^[2]。后熟发酵主要是将成熟豆瓣子和成熟辣椒坯按比例配料混合, 加入适量食盐和水, 进入发酵池发酵, 经过一定时期的翻晒和陈化, 即是郫县豆瓣特有的日晒夜露工艺^[4-5]。因此, 将郫县豆瓣的生产过程表述为: 以蚕豆瓣制曲、辣椒坯和环境微生物等复杂的物质能量代谢过程为前提, 通过独特的“日晒夜露”开发发酵工艺, 使得栖息在曲药、辣椒坯、环境中的庞大微生物区系在发酵醅固、液、气三相界面发生复杂的物质转换、能量代谢和信息传递作用, 并最终形成郫县豆瓣独特的成分构成和风味特征。

郫县豆瓣以其酱香浓郁、味辣香醇等特点而闻名于世, 其独特的风味主要来源于发酵过程中微生物相对封闭的混合发酵过程所产生的各种呈香物质^[5]。目前, 国内已有众多学者对郫县豆瓣中挥发性呈香物质进行研究, 如使用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱(head-space solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry, HS-SPME-GC-MS)联用^[6]、同时蒸馏萃取结合GC-MS^[7-8]、GC-MS联用^[9-10]、电子鼻^[11]等技术手段对郫县豆瓣中呈香物质进行了检测。

本研究通过HS-SPME-GC-MS对不同后发酵时期的郫县豆瓣中挥发性物质进行分析鉴定, 使用SPSS软件对所得数据进行处理及主成分分析。旨在研究郫县豆瓣在不同后发酵时期主要风味物质的种类及变化过程, 以期为进一步加深对本土特色调味品发酵机制的认识, 为传统产业的现代化改造和食品质量安全控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

郫县豆瓣样品取自四川省丹丹郫县豆瓣集团股份有限公司生产车间。分别采取已进行后发酵6个月, 1、2、3 a及5 a的豆瓣(分别编号为6M、1Y、2Y、3Y及5Y)。由于郫县豆瓣在后发酵时, 隔段时间需进行搅拌、翻晒, 故取样时从每个发酵池的上层(距表面0~20 cm)、中层(距表面30~50 cm)、下层(距池底0~20 cm)各取25 g左右, 混匀后密封, 低温运输, 于-70℃保存备用。为免误差, 呈香物质分析需在2 d内完成。

1.2 仪器与设备

SPME装置 美国Supelco公司; QP2010plus GC-MS联用仪 日本岛津公司; CU-420恒温循环槽 上海一恒科学仪器有限公司; 90 mm研钵 唐山市开平盛兴化学瓷厂。

1.3 方法

1.3.1 基于HS-SPME法的郫县豆瓣后发酵期挥发性风味物质提取

称取5.0 g研磨后的样品, 放入15 mL密封顶空瓶中, 置于55℃恒温水浴循环槽中平衡20 min。然后将老化后的75 μm碳分子筛/聚二甲基硅氧烷萃取头插入顶空瓶中吸附30 min, 随后再插入GC进样口, 250℃解吸5 min。

1.3.2 GC-MS分析

GC条件: DB-5MS毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 载气为氦气, 流速1 mL/min; 进样口温度250℃; 不分流进样; 升温程序: 起始温度40℃, 保持2 min, 再以3℃/min升至160℃, 随后以6℃/min升至200℃, 保留3 min, 最后以10℃/min升至230℃, 保持3 min。

MS条件: 电子电离源; 离子源温度230℃; 接口温度280℃; 质量扫描范围 m/z 40~600; 溶剂延迟时间2 min; 扫描模式为全扫描。

挥发性物质的定性: 主要采取谱库检索和保留指数2种方法进行郫县豆瓣样品中挥发性物质的定性。谱库检索: 主要依据所检测出物质的质谱信息与NIST 11谱库进行比较, 根据相似度的高低进行取舍, 一般大于80%时对该物质予以确认。保留指数鉴定: 以 $C_8 \sim C_{20}$ 的正构烷烃为标准, 计算样品中挥发性物质的保留指数, 与其他文献中相同物质的保留指数进行比较予以确认。

每个样品平行测定3次, 取其平均值进行后续分析。

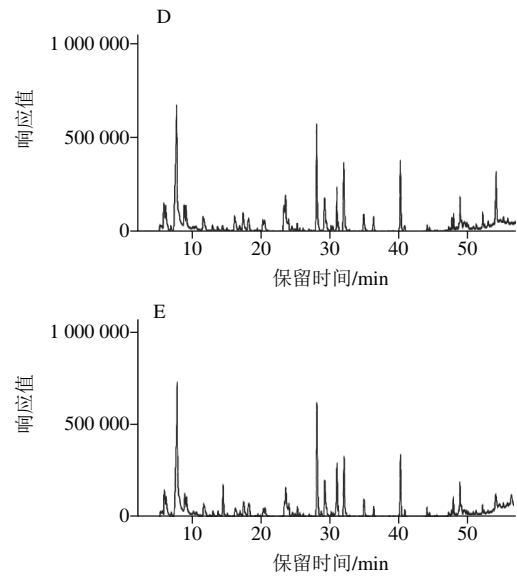
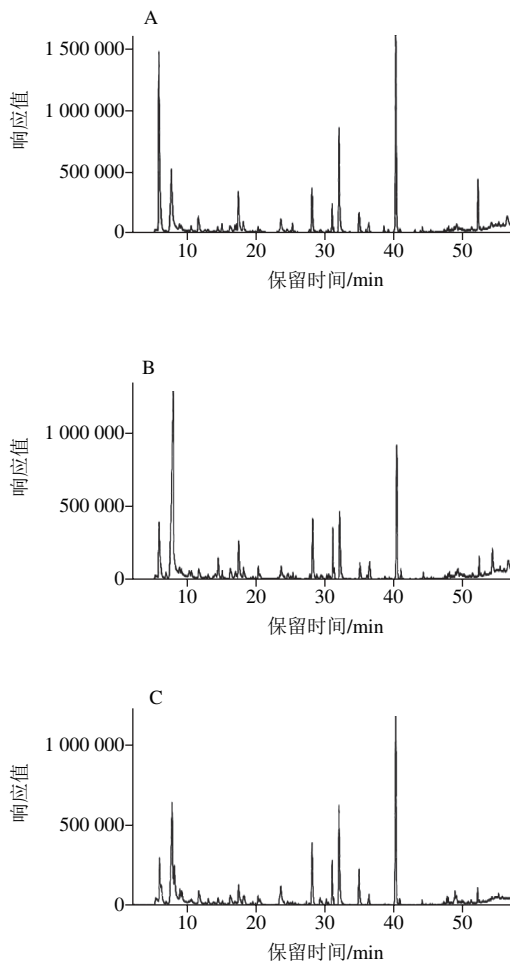
1.4 数据处理

采用峰面积归一化法算出各成分的峰面积, 各成分峰面积与所有成分总峰面积的比值作为该成分的相对含量。采用SPSS 19.0软件对数据进行主成分分析。

2 结果与分析

2.1 不同后发酵时期郫县豆瓣样品中挥发性呈香物质测定结果

如图1所示, 共检测出超过140种挥发性物质, 相较于以往采用同时蒸馏萃取结合GC-MS联用(56^[7]、86种和78种^[10])和SPME-GC-MS(81种)^[6]更多, 这说明郫县豆瓣后发酵期的挥发性呈香物质组成和演替变化过程非常复杂, 值得进一步分析研究。从图1可以看出, 不同后发酵期的郫县豆瓣挥发性呈香物质组成差异不大(86%的物质保留时间重合), 但呈香物质含量具有一定差异。同时, 后发酵期3Y和5Y的郫县豆瓣相较6M、1Y和2Y的各物质峰分布则更为均衡, 其呈香物质综合构成更为复杂。



A~E.分别为6M、1Y、2Y、3Y及5Y。

图1 郫县豆瓣样品中挥发性成分总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatograms of volatile components in 5 PDB samples

表1 不同后发酵期郫县豆瓣中挥发性物质
Table 1 Volatile components identified in 5 PDB samples

保留 时间/min	化合物名称	相对含量/%				
		6M	1Y	2Y	3Y	5Y
醇类（14 种）						
5.85	乙醇	20.11	6.38	4.64	2.38	2.31
11.60	异戊醇	1.78	0.67	1.02	0.89	0.85
11.72	2-甲基-1-丁醇	—	0.36	0.74	1.06	0.82
12.96	正戊醇	0.20	0.23	0.44	0.41	0.35
16.34	4-甲基-1-戊醇	0.36	—	0.66	0.59	0.40
17.37	糠醇	4.44	3.30	2.21	1.74	1.51
18.06	正己醇	1.11	1.15	0.49	0.56	0.70
19.83	2-庚醇	0.05	0.07	0.07	0.05	0.09
23.73	正庚醇	0.29	—	0.28	0.41	0.14
27.75	苯甲醇	0.09	0.37	0.07	0.02	—
29.58	月桂烯醇	0.04	0.20	0.35	0.70	0.57
31.04	芳樟醇	1.93	3.10	2.96	2.39	3.40
32.04	苯乙醇	10.34	6.07	10.18	6.01	5.60
36.38	α -松油醇	1.05	1.76	1.00	1.24	0.83
	总量	41.79	23.66	25.11	18.45	17.57
醛类（18 种）						
5.59	乙醛	0.19	0.37	0.67	0.60	0.61
6.90	异丁醛	0.03	0.66	0.17	0.45	0.31
8.86	异戊醛	0.64	0.35	1.38	1.86	1.81
9.12	2-甲基丁醛	0.59	0.34	1.28	2.04	1.66
10.10	正戊醛	—	—	0.04	0.10	0.20
13.71	3-甲基-2-丁烯醛	0.05	0.17	0.15	0.26	0.32
14.42	正己醛	0.46	1.59	0.47	0.37	2.26
16.19	糠醛	0.54	1.04	0.78	1.32	0.68
20.22	3-甲硫基丙醛	0.44	0.94	0.75	0.92	0.74
23.32	5-甲基呋喃醛	0.18	0.22	0.65	1.94	1.11
23.53	苯甲醛	1.48	1.43	2.31	3.60	3.21
25.57	正辛醛	0.10	0.15	0.09	0.17	0.25
28.12	苯乙醛	4.00	5.10	5.87	8.40	9.60

续表1

保留 时间/min	化合物名称	相对含量/%				
		6M	1Y	2Y	3Y	5Y
28.74	反-2-辛烯醛	—	0.26	—	—	0.46
31.24	壬醛	0.30	0.62	0.52	0.52	0.63
34.61	2-壬烯醛	—	—	—	0.20	0.19
44.45	4-甲基-2-苯基-2-戊烯醛	—	—	—	0.23	0.25
48.87	5-甲基-2-苯基-2-己烯醛	0.27	0.29	0.71	1.92	2.08
	总量	9.27	13.53	15.84	24.90	26.37
	酮类 (6 种)					
10.55	3-羟基-2-丁酮	0.44	0.49	0.30	0.22	0.13
19.11	2-庚酮	0.03	0.05	0.05	0.06	0.09
23.00	3,3,6-三甲基-1,5-庚二 烯-4-酮	0.03	0.05	—	0.06	0.07
24.49	6-甲基-5-庚烯-2-酮	0.49	—	0.27	—	0.06
47.42	(E)-6,10-二甲基-5,9- 十一碳二烯-2-酮	0.09	0.05	0.05	0.11	0.12
48.73	紫罗兰酮	0.28	0.30	0.30	0.24	0.32
	总量	1.36	0.94	0.97	0.69	0.79
	酯类 (17 种)					
7.77	乙酸乙酯	11.53	31.57	15.23	16.10	17.51
15.00	乳酸乙酯	0.51	0.47	—	—	—
15.03	乙酸丁酯	—	—	0.22	0.15	0.17
17.11	异戊酸乙酯	0.49	0.14	0.12	0.15	0.15
20.48	γ-丁内酯	—	0.10	0.31	—	—
25.04	山梨酸乙酯	0.04	0.08	0.04	0.05	—
25.20	己酸乙酯	0.63	0.41	0.14	0.36	0.52
26.93	2-乙基丁酸烯丙酯	—	—	0.05	0.20	0.20
38.55	苯乙酸乙酯	0.49	0.17	0.05	0.03	0.07
39.18	乙酸苯乙酯	0.17	0.14	0.11	0.05	0.08
45.32	癸酸乙酯	0.13	0.05	0.07	—	—
48.37	3-苯基-2-丙烯酸-2- 丙烯基酯	0.22	0.13	0.09	0.12	0.17
49.85	十二酸甲酯	0.18	0.16	0.16	0.35	0.23
50.82	二氢猕猴桃内酯	0.03	0.09	0.14	0.15	0.11
52.16	十二酸乙酯	3.01	1.10	1.02	0.98	0.58
54.08	十三酸乙酯	0.53	2.34	—	4.88	1.91
55.76	十四酸甲酯	0.13	0.18	0.22	0.49	0.38
	总量	18.09	37.13	17.97	24.06	22.08
	酸类 (7 种)					
10.27	丙酸	—	0.52	0.02	0.02	—
12.60	异丁酸	0.14	0.07	—	—	—
13.99	丁酸	0.02	0.43	—	—	—
16.71	反-2-丁烯酸乙酯	0.09	—	0.08	0.07	—
16.88	异戊酸	0.72	0.46	0.32	0.56	0.52
24.50	己酸	—	0.07	—	0.35	0.35
52.95	1,7-壬二酸	0.15	0.25	0.06	0.48	0.08
	总量	1.12	1.80	0.48	1.48	0.95
	酚类 (3 种)					
30.45	愈创木酚	0.24	0.38	0.27	0.35	0.27
34.92	2-乙基苯酚	1.95	1.50	3.65	1.52	1.61
40.25	4-乙基愈创木酚	16.61	10.05	16.47	5.11	4.68
	总量	18.80	11.93	20.39	6.98	6.56
	杂环类 (6 种)					
10.36	2,5-二甲基呋喃	—	—	0.11	0.13	0.09
15.83	2-甲基吡嗪	0.06	—	0.09	0.11	—
20.53	2,6-二甲基吡嗪	0.20	0.23	0.23	1.01	0.78
24.86	2-戊基呋喃	0.15	0.23	0.04	0.06	0.12

续表1

保留 时间/min	化合物名称	相对含量/%				
		6M	1Y	2Y	3Y	5Y
29.31	2-乙酰基吡咯	0.33	0.31	0.95	3.05	3.57
30.18	2,3,5,6-四甲基吡嗪	0.08	0.31	0.42	0.37	0.29
	总量	0.82	1.08	1.84	4.73	4.85
	烃类 (9 种)					
27.25	柠檬烯	—	0.04	0.24	0.06	0.05
44.12	2-甲基十三烷	0.42	0.44	0.45	0.52	0.72
45.57	十四烷	0.04	0.06	0.03	0.04	0.08
47.91	2-甲基十四烷	0.31	0.31	0.34	0.83	1.08
49.03	红没药烯	0.83	0.38	0.32	—	0.28
49.10	十五烷	—	—	0.49	0.51	0.64
51.22	2-甲基十五烷	0.20	0.20	0.26	0.27	0.23
52.40	十六烷	0.14	0.17	0.17	0.23	0.19
55.16	十七烷	0.35	0.41	0.49	0.64	0.44
	总量	2.29	2.01	2.79	3.10	3.71

注：—未检出。

由表1可知，不同后发酵时期至少存在于2种郫县豆瓣样品中，且相对含量不小于1%的挥发性物质，合计80种。总体，随着后发酵时间的延长，郫县豆瓣中挥发性呈香物质种类越来越多，后发酵3a的样品可达到72种。

后发酵6个月的郫县豆瓣中共检测出68种可分析挥发性呈香物质，相对含量最高的3类物质分别为醇类14种（41.79%）、酚类3种（18.80%）、酯类14种（18.09%），共计78.68%。其中主要成分包括乙醇（20.11%）、4-乙基愈创木酚（16.61%）、乙酸乙酯（11.53%）、苯乙醇（10.34%）以及糠醇（4.44%），前5种物质相对含量之和为63.03%。

后发酵1a的郫县豆瓣中共检测出68种，相对含量最高的分别为酯类15种（37.13%）、醇类12种（23.66%）、醛类15种（13.53%），共计74.32%。主要成分包括乙酸乙酯（31.57%）、4-乙基愈创木酚（10.05%）、乙醇（6.38%）、苯乙醇（6.07%）以及苯乙醛（5.10%），相对含量之和为59.17%。

后发酵2a的郫县豆瓣样品中共检测出71种挥发性物质，相对含量最高的分别为醇类14种（25.11%）、酚类3种（20.39%）、酯类15种（17.97%），共计63.47%。具体包括4-乙基愈创木酚（16.47%）、乙酸乙酯（15.23%）、苯乙醇（10.18%）、苯乙醛（5.87%）、乙醇（4.64%），相对含量之和为52.39%。

后发酵3a的郫县豆瓣中共检测出72种挥发性物质，相对含量最高的分别为醛类17种（24.90%）、酯类14种（24.06%）、醇类14种（18.54%），共计67.50%。具体包括乙酸乙酯（16.10%）、苯乙醛（8.40%）、苯乙醇（6.01%）、4-乙基愈创木酚（5.11%）、十三酸乙酯（4.88%），相对含量之和为40.50%。

后发酵5a的郫县豆瓣中共检测出70种挥发性物质，相对含量最高的分别为醛类18种（26.37%）、酯类13种

(22.08%)、醇类13种(17.57%),共计66.02%。具体包括乙酸乙酯(17.51%)、苯乙醛(9.60%)、苯乙醇(5.60%)、4-乙基愈创木酚(4.68%)、2-乙酰基吡咯(3.57%),相对含量之和为40.96%。

2.2 不同后发酵期郫县豆瓣5种主体挥发性成分情况分析

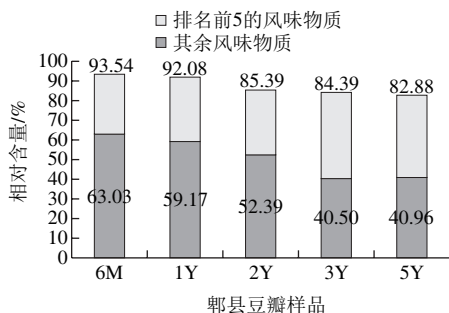


图2 郫县豆瓣中的挥发性物质总相对含量与排名前5种物质的比例
Fig. 2 Relative contents of total volatile components and percentages of top 5 dominant components in 5 PDB samples

为进一步明确郫县豆瓣中的主要挥发性物质,将总相对含量与排名前5的物质单独剥离出来分析,如图2所示。5种主体挥发性呈香物质的相对含量是随着郫县豆瓣后发酵时间的延长而递减的,即是后发酵时间越长的郫县豆瓣,单纯依靠谱库检索及保留指数分析挥发性物质峰面积占比总和越来越小,不能准确定性的比例则越来越大。究其原因可能是,随着后发酵的进行,郫县豆瓣发酵体系中半开放的微生物区系不断发生复杂的链式生化代谢反应,前期的代谢产物成为后期代谢反应的前体物质,如此循环往复,导致最后出现了不常见的、NIST谱库中没有收录的挥发性物质。

此外,3a与5a后发酵期的郫县豆瓣相比其他具有最大的相似性。6个月中相对含量前5的挥发性物质峰面积总和为63.03%,占有可分析物质峰面积总和的67.38%,随着后发酵时间的延长,其占比分别为64.26%、61.35%、47.99%、49.42%,总体来看也呈现递减的趋势。这说明,后发酵时间更长的郫县豆瓣呈香物质的相对含量分布更为均衡,组分综合组成也更复杂。挥发性呈香物质的总量下降最大的时期是后发酵1~2a阶段,相对含量前5的挥发性物质峰面积百分比之和下降最大的时期是后发酵2~3a阶段,这2个阶段可能是郫县豆瓣后发酵过程中挥发性呈香物质发生关键变化的重要阶段。

2.3 不同后发酵期郫县豆瓣挥发性呈香物质演替情况分析

醇类是构成郫县豆瓣特征风味的一类重要化合物,通常呈现出令人愉快的香味及甜味,可以被氧化成醛类、酸类等,还是酯化反应的重要前体物质^[12-13]。从表1可以看出,随着后发酵时间的延长,醇类物质相对含量

逐渐下降,这可能是郫县豆瓣后发酵过程中不断发生醇的氧化反应、酸与醇的酯化反应等。后发酵初期时(后发酵6个月至2a),由于发酵体系中营养丰富和特殊的“日晒夜露、翻池搅拌”发酵工艺,整个体系处于活跃的代谢状态。醇类的合成与消耗处于非平衡状态,代谢反应与合成反应先后分别占优势,因而醇类物质相对含量呈现出急剧降低后又升高的波动;后发酵3a后,发酵微生物趋于稳定,醇类的合成与消耗基本保持平衡态,因而后发酵3a样品与5a样品的醇类物质相对含量几乎相等。从表1可以看出,乙醇和苯乙醇是相对含量最高的2种醇类物质,有研究表明这2种醇类物质也大量存在于酱油中^[14]。

醛酮类通常呈现出令人满意的甜香及花果香,较多存在于糖果、水果及坚果中,被认为可以增强食品的风味品质^[15]。郫县豆瓣样品中醛酮类物质的相对含量随着后发酵时间的延长而不断增加。由于醛酮类主要由醇类氧化产生,其相对含量变化趋势与醇类呈负相关;醛酮类大多属于不稳定的化合反应中间体,容易被还原为醇^[16]。但其在3Y及5Y样品中大量存在,这从侧面印证了郫县豆瓣经长时间的发酵之后,其内部微生物呈现“衰弱态”,新陈代谢反应趋于平缓,累积了大量的醛酮类反应中间体。

苯甲醛和苯乙醛是相对含量最高的2种醛类物质,这2种醛类物质同时也被发现存在于其他的豆类发酵食品中^[17-19];3-羟基-2-丁酮是郫县豆瓣样品中相对含量最高的酮类物质,有研究表明其是微生物生成吡嗪类物质的重要前体化合物^[20]。

酯类主要由醇类与酸类的酯化反应生成,酯类通常呈现出令人愉悦的甜香及果香,除此之外,酯类还可掩盖游离脂肪酸带来的不愉快气味^[21]。有研究表明,短链酯类通常具有较低的阈值(小于相应醇类近10倍)且在常温条件下即可大量挥发,从而即使在浓度很低的条件下也能对食品的风味产生较大的影响^[22-23]。郫县豆瓣中的酯类物质相对含量,由6M中的18.09%上升至1Y中的37.13%,后又降至2Y样品中的17.97%,最后再缓慢地上升。究其原因,可能是6M样品的气味仍然主要由原辅料所具有的天然气味所构成;1Y样品则因大量合成的酯类而具有浓郁的风味特征;2Y样品,其酯香明显锐减,但仍是产品风味的重要组成部分;对于3Y及5Y样品,相比于2Y样品酯香稳定增强,表现出醇厚感。酯类相对含量的变化而导致的风味变化几乎与郫县豆瓣后发酵过程中感官变化相符。由表1可以看出,乙酸乙酯和十三酸乙酯是郫县豆瓣中相对含量最高的2种酯类,前者呈现出清香、果香及酒香;后者则因其风味阈值较高(大分子脂肪酸酯类)而提供风味上的厚重感^[8]。

郫县豆瓣中存在的3种酚类物质为愈创木酚、2-乙基

苯酚和4-乙基愈创木酚，其中4-乙基愈创木酚相对含量最高，占豆瓣样品中酚类物质的80%以上（6M及1Y样品中达到90%）。酚类由于其易氧化的性质，在后发酵过程中会不断被消耗，其相对含量应不断减少。从表1可看出这一趋势，总体上随着后发酵时间的延长，酚类物质的相对含量逐渐下降，但在后发酵2 a时出现波动，2Y样品具有相对含量最高的酚类物质，可能与后发酵前期时活跃的微生物新陈代谢反应有关。有研究表明，4-乙基愈创木酚呈现出酱香、辛香的风味^[24]。郫县豆瓣后发酵前期（2 a前）具有较高相对含量的4-乙基愈创木酚（10%以上），到后期（3 a以后）则锐减至5%左右；这也与实际生产中，“老”豆瓣酱香醇厚绵长而新豆瓣酱香浓郁突出的情况相符。烃类物质由于相对含量极低，而风味阈值较高，对郫县豆瓣的风味贡献较小，在此处不进行详细讨论。

郫县豆瓣后发酵期的杂环类物质，主要是呋喃、吡嗪和吡咯。杂环类物质主要在后发酵过程中由Maillard反应和Strecker降解产生的氨基酮经缩合反应生成，这类物质在郫县豆瓣中相对含量较低，但具有较低的风味阈值^[21,25-26]。杂环类物质频繁出现于各类白酒的研究报道中，被认为对白酒的特征风味具有突出的贡献^[27-28]。由表1可看出，随着后发酵时间的延长，杂环类相对含量不断上升；其中2-乙酰基吡咯及2,6-二甲基吡嗪是郫县豆瓣中相对含量最高的2种杂环类物质。

酸类主要由醇类氧化产生，通常因其特有的酸性气味而对整体风味产生不利影响，但其阈值较高，对豆瓣总体的风味贡献不大^[24]。由表1可以看出，随着后发酵时间的延长，郫县豆瓣样品中酸类物质相对含量呈现升降反复的波动状态。1Y样品中酸类物质相对含量最高，达到1.80%，是2Y和5Y样品的2倍多，可能是因为后发酵初期微生物生化代谢反应活跃，生成了大量初级代谢产物乙酸；也可能是因为在不同季节进行后发酵而导致的差异性。

2.4 主成分分析结果

利用SPSS 19.0软件对5个不同后发酵时期郫县豆瓣中挥发性物质的相对含量进行主成分分析，得到主成分相关矩阵的特征值、方差贡献率及累计贡献率如表2所示。

表2 4个主成分的特征值及贡献率
Table 2 Eigenvalues and cumulative contribution rates of 4 principal components

主成分	特征值	贡献率/%	累计贡献率/%
1	48.831	47.409	47.409
2	24.622	23.905	71.314
3	16.685	16.199	87.513
4	12.861	12.487	100.000

按照主成分分析理论，当前 r 个主成分的累计贡献率达到85%的要求时，这 r 个主成分即可反映原指

标中足够多的信息^[29]。由表2可知，主成分1贡献率为47.409%，主成分2贡献率为23.905%，主成分3的贡献率为16.199%，三者累计贡献率为87.513%，说明此3个主成分已包含绝大多数样本信息量，故依据其贡献率大小依次编号为第1、2、3主成分。由于三维构图不易观察样品分布情况，故只取第1、2主成分生成样品的主成分得分图，如图3所示。

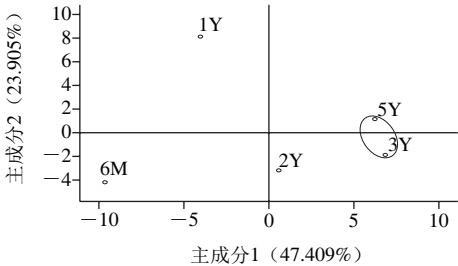


图3 郫县豆瓣样品的主成分得分图
Fig. 3 PCA score plot of PC1 vs. PC2 for 5 PDB samples

由图3可看出，本研究将5个后发酵阶段的郫县豆瓣显著区分成4类，即是6M、1Y及2Y各自单独成1类，3Y与5Y聚成1类。本研究虽然没有将不同后发酵时间作为变量代入主成分构图中，但可以明显看出，郫县豆瓣的后发酵时间的长短在第1主成分上得到了体现，说明第1主成分与后发酵时间这一变量有一定的相关性。

对第1主成分贡献率较大的呈香物质有4种醇类（乙醇、2-甲基-1-丁醇、糠醇、月桂烯醇）、10种醛类（乙醛、异戊醛、5-甲基呋喃醛、苯甲醛、苯乙醛等）、5种酯类（乙酸乙酯、乳酸乙酯、苯乙酸乙酯等）、1种酸类（异丁酸）、2种杂环类（2,5-二甲基呋喃、2-乙酰基吡咯）以及3种烃类物质（十五烷等）。因此第1主成分可以归结为“醇类、醛类、酯类影响因子”，其中2-甲基-1-丁醇、月桂烯醇、2-乙酰基吡咯、十五烷、十六烷、乙醛、异戊醛、2-甲基丁醛、3-甲基-2-丁烯醛、5-甲基呋喃醛、苯甲醛、苯乙醛及5-甲基-2-苯基-2-己烯醛的相对含量都随样品后发酵时间的延长而增加；而乙醇、糠醇、3-羟基-2-丁酮、苯乙酸乙酯以及红没药烯的相对含量都呈相反的变化趋势。

在第2主成分上，5个发酵阶段呈现出上下波动但波动幅度逐渐变小的趋势。说明随着后发酵时间的延长，郫县豆瓣中的挥发性风味物质的组成及含量逐渐趋于平稳。同时还可以看出，郫县豆瓣中挥发性风味物质随时间变化而发生的边际变化越来越小，在郫县豆瓣后发酵的前2 a中，其挥发性风味物质的组成及含量发生了较大的变化；而当后发酵进行到2 a后，郫县豆瓣的挥发性风味物质的变化速度开始放缓；当后发酵进行到3 a后，挥发性风味物质的变化速度尤其缓慢，远低于之前的变化速度。

对第2主成分贡献率较大的呈香物质为正庚醇、异丁醛、乙酸乙酯、丙酸、丁酸、己酸,其中有一半(3种)都是酸类物质,因此第2主成分可以归结为“酸类影响因子”。其中,乙酸乙酯、己酸的相对含量都随样品后发酵时间的延长而升高;丙酸呈现随样品后发酵时间的延长而降低的趋势;正庚醇、异丁醛、丁酸则没有明显的变化规律。值得注意的是,与上面列出的6种物质相比,对第1主成分贡献率较大的26种呈香物质中有18种(占70%)都呈现出相对含量随后发酵时间的延长而升高或下降的趋势,从而进一步印证了第1主成分与后发酵时间这一变量有一定的相关性。

刘平等^[8]发现糠醛、异戊醛等一级传统郫县豆瓣中的特征香气物质,也是本研究的第1主成分贡献因子相一致。但是,也有学者认为棕榈酸乙酯、亚油酸乙酯、油酸乙酯、4-乙基苯酚、4-乙基愈创木酚及苯乙醇才是构成郫县豆瓣的特殊香味贡献最大的组分^[9]。本研究认为,郫县豆瓣的特色香味是多种芳香物质相乘作用赋予的,因此还需要对不同发酵阶段郫县豆瓣的挥发性呈香物质进行连续追踪和大量分析,与此同时还要建立菌落演替情况与呈香物质的联系关系^[30],才能获得“真正揭示”各组分的贡献及其变化情况和形成规律。

3 结 论

使用HS-SPME-GC-MS分析了5个不同后发酵时间的郫县豆瓣中挥发性呈香物质。最终共检测出超过140种挥发性呈香物质,其中有80种至少存在于2个样品中且相对含量不小于1%。

检测出的挥发性呈香物质主要分为醇类、醛类、酯类、酸类、酚类、酮类、杂环类及烃类。随着样品后发酵时间的延长,醛类、酯类、烃类及杂环类物质的相对含量呈上升趋势;而醇类、酚类及酮类呈下降趋势;酸类则没有明显的变化趋势。

无论是可鉴定呈香物质的总量还是呈香物质集中度以及呈香物质种类构成方面,初熟期郫县豆瓣(后发酵半年至2a)和老熟期郫县豆瓣(后发酵3a以后)之间都有较大的差异。初熟期的可鉴定呈香物质的总量以及相对含量前5的呈香物质所占比例都随后发酵时间的延长而下降,而对于老熟期(即3Y和5Y),这2个指标则没有明显变化;在呈香物质种类构成方面,初熟期间差异较大,各类呈香物质有明显的变化演替过程,而3Y和5Y没有显著差异。

以挥发性呈香物质相对含量作为变量进行主成分分析,5个后发酵阶段的郫县豆瓣在基于第1主成分和第2主成分的得分图上得到了较好区分。6M、1Y及2Y 3个样品各自单独成1类,3Y与5Y样品聚成1类。挥发性呈香

物质在初熟期间的变化程度远大于其在老熟期间的变化程度。同时,第1主成分可以归结为“醇类、醛类、酯类影响因子”,“后发酵时间”这一变量与第1主成分有一定相关性;第2主成分可以归结为“酸类影响因子”。

郫县豆瓣行业内一直有“豆瓣越‘老’越香”的说法,各生产厂家都保存有后发酵时间持续3、5a,甚至更长的豆瓣醪池。但根据本研究结果来看,当处于后发酵3a后,其挥发性呈香物质的种类及含量变化都趋于缓慢,再进行发酵,挥发性呈香物质也不会产生明显的变化。或许可以为郫县豆瓣生产企业改良生产方式、提高企业效益提供一定的借鉴意义。

参考文献:

- [1] 李幼筠. “郫县豆瓣”剖析[J]. 中国酿造, 2008, 27(11): 83-86. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2008.06.027.
- [2] 余浪, 阚建全. 传统豆瓣的研究进展[J]. 中国调味品, 2008, 33(5): 26-31. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2008.05.002.
- [3] 杜敬秋, 刘浏. 607亿元郫县豆瓣跻身中国品牌价值榜[N]. 成都日报, 2015-12-14.
- [4] 石磊, 李诚. HACCP在郫县豆瓣生产中的应用[J]. 中国调味品, 2007, 32(6): 25-27. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2007.06.002.
- [5] 高岭. 郫县豆瓣的生产工艺改进[J]. 中国调味品, 2006, 31(5): 34-39. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2006.05.009.
- [6] 黄明泉, 韩书斌, 孙宝国, 等. 固相微萃取/气质联机分析郫县豆瓣酱挥发性香成分的研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(4): 147-152.
- [7] 黄明泉, 韩书斌, 孙宝国, 等. 同时蒸馏萃取/气质联机分析郫县豆瓣酱风味成分的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(4): 136-139.
- [8] 刘平, 翟刚, 陈功, 等. 郫县豆瓣特征香气物质的研究鉴定[J]. 中国酿造, 2015, 34(1): 27-32. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2015.01.007.
- [9] 黄著, 彭熙敏, 刘超兰, 等. 郫县豆瓣挥发性香气成分剖析及其在陈酿过程中的变化研究[J]. 中国调味品, 2009, 34(3): 106-111. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2009.03.026.
- [10] 冯军, 陈海涛, 黄明泉, 等. 不同品牌郫县豆瓣酱挥发性成分的比较研究[J]. 食品科学技术学报, 2010, 28(3): 17-22. DOI:10.3969/j.issn.1671-1513.2010.03.004.
- [11] 贾洪峰, 何江红, 袁新宇, 等. 电子鼻在不同豆瓣产品识别中的应用[J]. 食品科学, 2011, 32(12): 178-182. DOI:10.3321/j.issn.1002-6630.2011.12.079.
- [12] STEINHAUS M, SINUCO D, POLSTER J, et al. Characterization of the aroma-active compounds in pink guava (*Psidium guajava* L.) by application of the aroma extract dilution analysis[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2008, 56(11): 4120-4127. DOI:10.1021/jf8005245.
- [13] SHASHIREKHA M N, BASKARAN R, RAO L J, et al. Influence of processing conditions on flavor compounds of custard apple (*Annona squamosa* L.)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(2): 236-243. DOI:10.1016/j.lwt.2007.03.005.
- [14] KOB K, AHN H J, BERG F V D, et al. Metabolomic insight into soy sauce through (1)H NMR spectroscopy[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(15): 6862-6870. DOI:10.1021/jf901454j.
- [15] FORS S. Sensory properties of volatile Maillard reaction products and related compounds[J]. Computer Methods in Applied Mechanics & Engineering, 1983, 74(3): 307-326. DOI:10.1021/bk-1983-0215.ch012.
- [16] GONZALEZ M I, GONZALEZ M, HERNANDEZ J M, et al. Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of volatile

- components in cheeses[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 55(2): 666-673. DOI:10.1016/j.lwt.2013.10.008.
- [17] JEONG D W, HEO S, LEE B, et al. Effects of the predominant bacteria from meju and doenjang on the production of volatile compounds during soybean fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 262(4): 8-13. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.011.
- [18] CHO K M, LIM H J, KIN M S, et al. Time course effects of fermentation on fatty acid and volatile compound profiles of Cheonggukjang using new soybean cultivars[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2017, 25(3): 637-653. DOI:10.1016/j.jfda.2016.07.006.
- [19] PARK H K, GIL B, KIM J K. Changes in proteases and chemical compounds in the exterior and interior of sufu, a Chinese fermented soybean food, during manufacture[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 87: 225-233. DOI:10.1016/j.lwt.2017.08.047.
- [20] 许伟. 镇江香醋醋酸发酵过程微生物群落及其功能分析[D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- [21] 章建浩, 周光宏, 朱健辉, 等. 金华火腿传统加工过程中游离氨基酸和风味物质的变化及其相关性[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(4): 96-100. DOI:10.3321/j.issn:1000-2030.2004.04.022.
- [22] FERNANDEZ E, CARBONELL M, GAYA P, et al. Evolution of the volatile components of ewes raw milk Zamorano cheese. Seasonal variation[J]. International Dairy Journal, 2004, 14(8): 701-711. DOI:10.1016/j.idairyj.2003.12.011.
- [23] RAGHAVENDRA T, SAYANIA D, MADAMWAR D. Synthesis of the 'green apple ester' ethyl valerate in organic solvents by *Candida rugosa*, lipase immobilized in MBGs in organic solvents: effects of immobilization and reaction parameters[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010, 63(1/2): 31-38. DOI:10.1016/j.molcatb.2009.11.015.
- [24] 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.
- [25] MCL N, LUBACHEVSKY G, RANKIN S A. A study of the volatile composition of Minas cheese[J]. LWT-Food Science and Technology, 2005, 38(5): 555-563. DOI:10.1016/j.lwt.2004.07.019.
- [26] 胡见曙. 食品风味化学中的美拉德反应[J]. 食品与生物技术学报, 1989(2): 85-90.
- [27] 胡国栋. 景芝白干特征香味组份的研究[J]. 酿酒, 1992, 19(1): 83-88.
- [28] 范文来, 徐岩. 中国白酒风味物质研究的现状与展望[J]. 酿酒, 2007, 34(4): 31-37. DOI:10.3969/j.issn.1002-8110.2007.04.013.
- [29] 王钦德, 杨坚. 食品试验设计与统计分析[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2010: 386-387.
- [30] 关统伟, 向慧平, 王鹏昊, 等. 基于高通量测序的郫县豆瓣不同发酵期细菌群落结构及其动态演替[J]. 食品科学, 2018, 39(4): 106-111. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201804016.