

文章编号: 1000-0615(2017)06-0896-11

DOI: 10.11964/jfc.20161210666

## 不同盐度条件下鱼露发酵前期挥发性风味物质的指纹图谱

袁树昆, 李若云, 吴祖芳\*, 白政泽, 翁佩芳

(宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

**摘要:** 为探明一定盐度条件下传统鱼露发酵前期挥发性风味物质随时间变化的规律, 建立鱼露发酵前期挥发性风味物质的指纹图谱及明确主要风味物质。采用气相色谱—质谱联用(GC-MS)方法分析了180和230两种盐度条件下日本鯷鱼露发酵液的挥发性风味成分。结果显示, 有80%的鱼露样品相似度良好, 与对照图谱相似度达到了90%; 180盐度下发酵150 d的鱼露挥发性风味物质变化较大。盐度180发酵的鱼露样品组有51个共有峰, 盐度230有58个共有峰, 并在对照图谱中加以标定。通过对指纹图谱共有峰化合物指认, 确定了乙醇、丙酮、异戊醛、1-戊烯-3-醇和2-甲基丁酸为鱼露前期发酵液的主要挥发性风味物质。研究表明, 盐度180发酵的鱼露更早地进入基础物质转化阶段, 有利于鱼露海鲜味的生成; 230盐度发酵的鱼露整体发酵进程较为缓慢, 但更有利于鱼露中乳酪味和肉香味的形成。在实际生产中可根据需要选择不同的盐度进行发酵。研究结果为揭示鱼露发酵前期主要基础挥发性风味物质及变化规律和鱼露品质控制等提供科学依据。

**关键词:** 日本鯷; 鱼露; 盐度; 挥发性风味物质; GC-MS; 指纹图谱

**中图分类号:** TS 254.5

**文献标志码:** A

鱼露是一种以海产鱼为主要原料, 经多种微生物共同发酵形成的一种营养较全面的液体调味品, 含可溶性短肽、牛磺酸、 $\gamma$ -氨基丁酸并具有抗氧化活性<sup>[1]</sup>, 氨基酸组成合理, 必需氨基酸总量高于FAO/WHO理想模式<sup>[2]</sup>, 且含有多种风味成分<sup>[3-4]</sup>。鱼露的感官品质是其内含成分组成与比例的综合反映, 而鱼露风味是产品质量的重要指标之一, 传统的对单一成分或指标成分分析很难准确或有效地反映食品的风味特征。以往学者采用气相、液相、气质联用等方法对鱼露中风味物质进行整体分析<sup>[5-6]</sup>, 但评价指标单一或检测样本量较少, 不足以表征鱼露发酵过程中风味物质变化规律的整体性和普遍性。中国传统鱼露发酵时间较长, 一般分为前期自溶发酵(5~8个月)、中期发酵(1~3个月)和后期发酵(1~3个月)<sup>[7]</sup>。发酵方法(即使采用相同原料)对鱼露的质量和风味有直接的影响<sup>[7-8]</sup>。不同盐度

条件下发酵的虾油, 由于微生物菌群变化较大, 导致其产品质量和风味品质变化较大<sup>[9]</sup>。

传统鱼露发酵是自然发酵, 原料鱼没有经过灭菌处理, 这可能导致发酵期间病原体的生长和鱼体的腐败。一般认为温度和盐度是影响微生物生长和酶活性最重要的因素<sup>[10-12]</sup>。所以天然发酵生产的鱼露所含的盐度一般较高, 达到200~300, 甚至更高<sup>[7]</sup>。本实验根据Lee等<sup>[13]</sup>的研究结果, 并结合日本鯷(*Engraulis japonicus*)自然发酵微生物多样性变化预实验结果, 选择180和230的盐度发酵日本鯷。

指纹图谱是指某些复杂物质经适当处理后, 采用一定的分析手段, 得到的能够标示其化学特征的色谱图或光谱图。随着样品前处理技术和检测技术的发展, 指纹图谱已逐步用于茶叶<sup>[14]</sup>、果汁饮料<sup>[15]</sup>、鲜肉<sup>[16]</sup>等食品的质量控制和产品识别。陈林等<sup>[17]</sup>采用高效液相色谱法构建了清香型

收稿日期: 2016-12-28 修回日期: 2017-03-19

资助项目: 宁波市科技富民项目(2016C10031)

通信作者: 吴祖芳, E-mail: wzfwpf@163.com

乌龙茶品质形成过程中茶叶试样的游离氨基酸指纹图谱。詹萍等<sup>[18]</sup>采用SPME-GC-MS结合GC-O技术对不同产区的15个羊肉样品中挥发性风味成分进行分析,共筛选出34种检测频率大于50%的共有成分,作为羊肉特征风味化合物构建指纹图谱。鱼露风味也是一种复杂的多组分体系,运用指纹图谱技术综合分析发酵过程中风味物质的变化,可实现对特征风味物质的鉴别和发酵过程的监控,然而相关研究至今未见报道。本研究采用气相色谱—质谱联用(GC-MS)方法构建了2组鱼露发酵样液的挥发性风味物质指纹图谱。通过分析指纹峰的相似度,共有峰的标定和共有峰化合物指认,为阐明鱼露发酵前期风味物质的变化规律及鱼露品质的前期调控提供参考依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

日本鳀由浙江舟山兴业公司提供。

### 1.2 主要仪器设备

QP-2010 GC-MS,日本岛津科技有限公司;PMDMS 75  $\mu\text{m}$ 萃取头,美国Supelco公司;固相微萃取装置,美国Supelco公司;TE214S分析天平,成都浩驰仪器有限公司。

### 1.3 实验方法

**供试样品制备** 将日本鳀常温下解冻,取2.0 kg并分别加入360和460 g的食盐,于常温下放入透明的玻璃坛中自溶3 d。第3天测定溶液中的盐度<sup>[19]</sup>,补充食盐至规定浓度( $W/V$ )。坛口用薄膜封口,具体操作详见参考文献[20]。用虹吸管分别吸取发酵30、45、60、90和150 d的发酵液作为供试样品,将180和230盐度发酵组样品分别编码为YD1-30、YD1-45、YD1-60、YD1-90、YD1-150和YD2-30、YD2-45、YD2-60、YD2-90、YD2-150。

**样品预处理** 样品准备:取各发酵时期日本鳀发酵原液适量,经过滤后,吸取滤液3 mL放入标准顶空进样小瓶内,待分析。

**固相微萃取:**将装有PDMS萃取头的SPME手动进样器的针头通过隔垫插入顶空进样小瓶内,推出纤维头,于50  $^{\circ}\text{C}$ 恒温吸附40 min,再移至20  $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中平衡10 min,缩回纤维头,

快速进样,上机分析<sup>[21]</sup>。

**气相色谱与质谱条件** 色谱条件:色谱柱长60 m,内径0.32 mm,膜厚180  $\mu\text{m}$ ,载气为氦气,柱流速0.8 mL/min,气相进样口温度210  $^{\circ}\text{C}$ 。升温程序为初始柱温35  $^{\circ}\text{C}$ ,保持3 min,以3  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至40  $^{\circ}\text{C}$ ,保持1 min,再以5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至210  $^{\circ}\text{C}$ ,保持16 min。

质谱条件:接口温度210  $^{\circ}\text{C}$ ,离子源温度200  $^{\circ}\text{C}$ ,溶剂剪切时间0.6 min,检测器电压0.8 kV,质谱扫描范围:30~650 a,检索谱库为WILEY和NIST谱库。

## 1.4 数据统计分析

色谱实验数据中,未知化合物质谱图经由LabSolutions数据分析系统完成检索,通过WILEY和NIST谱库确认并定性(800<匹配度 $\leq$ 1000),通过峰面积归一化法求得鱼露中各风味物质的百分含量。

为实现挥发性风味物质指纹图谱的模式识别,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版软件(国家药典委员会),将各供试样品指纹峰面积分别经数据标准化预处理后(公式1),再采用夹角余弦法进行指纹图谱的相似度(公式2)和共有峰分析<sup>[22]</sup>。通过中位数法(公式3)和平均数法进行对照图谱的计算(公式4)。

$$\chi'_{ij} = \frac{\chi_{ij}}{S_j} \quad (1)$$

式中, $\chi_{ij}$ 为*i*样品挥发性风味化合物*j*的指纹峰面积; $S_j$ 为挥发性风味化合物*j*指纹峰面积的标准差; $\chi'_{ij}$ 为*i*样品挥发性风味化合物*j*标准化处理后的指纹峰面积。

$$\cos \alpha_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^P \chi_{ik} \chi_{jk}}{\sqrt{\sum_{k=1}^P \chi_{ik}^2 \sum_{k=1}^P \chi_{jk}^2}} \quad (2)$$

式中, $\chi_{ik}$ 和 $\chi_{jk}$ 分别表示样品*i*和*j*色谱图中第*k*个峰的面积。*P*代表色谱峰总数。 $\cos \alpha_{ij}$ 的值越大,2张色谱图的相似性就越高;反之,则越小<sup>[23]</sup>。

$$\text{平均矢量} = \sum_j (\chi_{1j}, \chi_{2j}, \dots, \chi_{nj}) / m \quad (3)$$

$$\text{中位数矢量} = \text{median} [(\chi_{1j}, \chi_{2j}, \dots, \chi_{nj})] \quad (4)$$

式中, $\chi_{1j}, \chi_{2j}, \dots, \chi_{nj}$ 分别表示样品1, 2, ..., *n*的化合物*j*的指纹峰面积,*m*为样品个数。

## 2 结果与分析

### 2.1 日本鳀鱼露样品指纹图谱分析

指纹图谱相似度分析 将YD1和YD2的5批日本鳀发酵液的GC-MS图谱导入相似度评价软件,得到YD1样品和YD2样品指纹图谱,对应的共有峰分别如图1和图2所示。

采用中位数法分别计算2组样品指纹图谱的

相似度。在发酵的前3个月,随着发酵时间的延长,盐度180日本鳀发酵样品挥发性物质的变化较为缓慢,与对照图谱的相似度都在90%以上(表1)。在发酵的第5个月,样品的GC-MS图谱与对照图谱的相似度只有0.274,可见发酵的第3-5个月日本鳀发酵液中的挥发性成分变化较大。这可能是由于这一阶段发酵液的菌相变化较大所导致<sup>[24]</sup>。

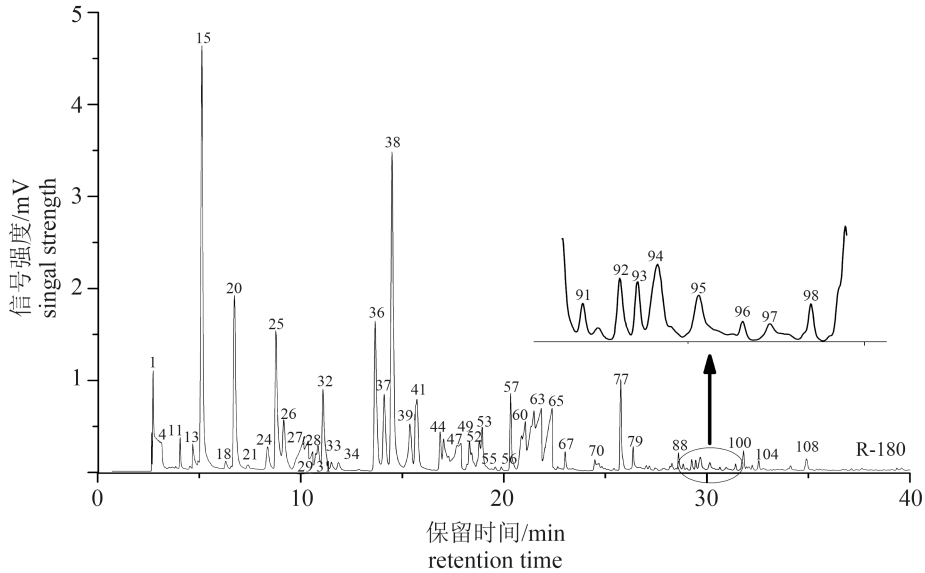


图1 YD1样品GC-MS对照图谱

共有峰编号参照表2;R为采用中位数法输出的对照图谱,下同

Fig. 1 GC-MS reference fingerprint of YD1 samples

See Table 2 for common peak numbers; R is a reference fingerprint output by the median method, the same below

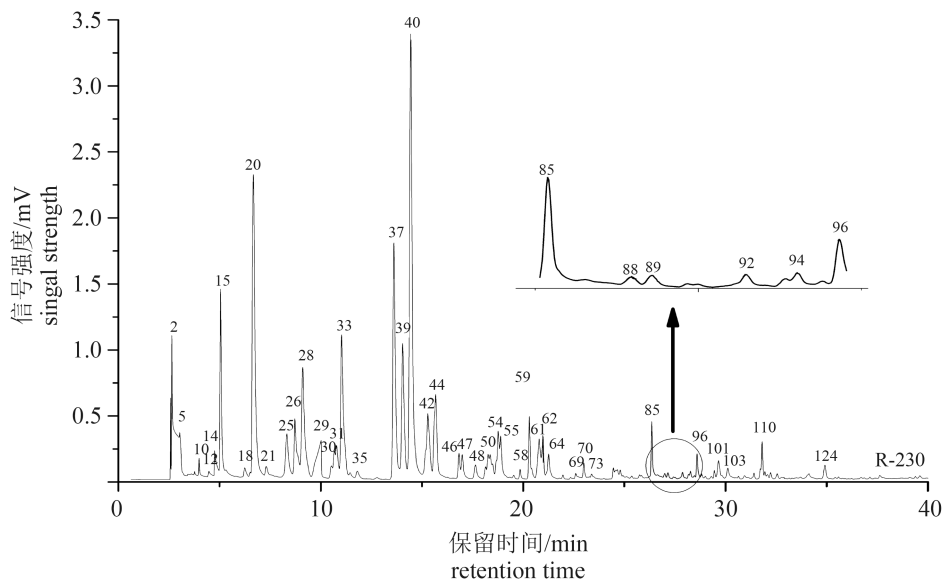


图2 YD2样品GC-MS对照图谱

Fig. 2 GC-MS reference fingerprint of YD2 samples

表1 日本鯉鱼露样品GC-MS指纹图谱相似度

Tab. 1 GC-MS fingerprint similarity of fish sauce samples salted by *E. japonicus*

发酵天数/d fermentation days	盐度 salinity	
	180	230
30	0.911	0.845
45	0.903	0.977
60	0.924	0.980
90	0.933	0.980
150	0.274	0.931
对照图谱R reference fingerprint R	1.000	1.000

注: 对照图谱R为采用中位数法输出的图谱, 下同

Notes: the reference fingerprint R is a chromatogram output by the median method, the same below

指纹图谱共有峰分析 根据相似度评价软件中指纹图谱的匹配数据, YD1样品的指纹图谱共含有51个共有峰, 占总峰面积的84.8%, 分别对应对照图谱中的1、2、4、9、11、12、15、18、19、20、24、25、26、29、31、32、33、34、36、37、38、39、44、45、47、49、52、

53、55、56、57、65、67、70、77、79、81、85、88、89、93、94、97、98、100、103、104、109、110、113、119号峰(图1); YD2样品的指纹图谱共含有58个共有峰, 占总峰面积的89.82%, 分别对应对照图谱中的1、2、5、6、9、10、12、14、15、18、19、20、21、25、26、28、29、30、31、33、35、37、39、40、42、44、46、47、48、50、54、55、57、58、59、62、64、67、68、70、73、85、88、89、92、94、96、97、99、101、103、106、110、113、114、124、134、139号峰(图2)。将10批样品的GC-MS图谱全部导入中药指纹图谱相似度评价软件2004A版, 通过软件分析发现, YD1样品和YD2样品共有43个重合的共有峰。

指纹峰的指认 各共有峰所对应的化合物经LabSolutions数据分析系统进行分析计算和图谱库检索, 所得结果如表2所示。

从10批样品中分离鉴定出67种共有化合物, 被检出的挥发性成分主要分为醛类(20种)、醇类(14种)、酮类(11种)、杂环化合物(6种)、酯类(3种)、含氮化合物(3种)、烷烃类(2种)、含硫

表2 日本鯉鱼露共有挥发性风味成分

Tab. 2 Common volatile flavor components of fish sauce salted by *E. japonicus*

编号 no.	保留时间/min retention time	化合物 compounds	分子式 molecular formula	相对分子质量 relative molecular mass	峰号 peak no.		相对含量/% relative content	
					YD1	YD2	YD1	YD2
1	2.65	氨基甲酸铵	CH <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	78	2	2	2.11	3.73
2	3.03	甲醛	CH <sub>2</sub> O	30	4	5	0.62	1.18
3	3.27	乙烯-d4	C <sub>2</sub> D <sub>4</sub>	32	-	6	-	0.02
4	3.77	甲醇	CH <sub>4</sub> O	32	9	9	0.04	0.09
5	3.99	乙醛	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O	44	11	10	0.43	0.27
6	4.47	巯基甲烷	CH <sub>4</sub> S	48	12	12	0.06	0.16
7	4.75	三甲胺	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> N	59	-	14	-	0.79
8	5.05	乙醇	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46	15	15	11.95	4.10
9	6.24	异丙醇	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	60	18	18	0.21	0.27
10	6.51	丙烯醛	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O	56	19	19	0.04	0.07
11	6.67	丙酮	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	58	20	20	5.55	11.17
12	7.31	二甲基硫	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> S	62	-	21	-	0.26
13	8.31	三甲基硅醇	C <sub>3</sub> H <sub>10</sub> OSi	90	24	25	0.90	1.79
14	8.71	正丙醇	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	60	25	26	4.65	1.90
15	9.10	2-甲基丙醛	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	72	26	28	2.09	4.57

·续表2·

编号 no.	保留时间/min retention time	化合物 compounds	分子式 molecular formula	相对分子质量 relative molecular mass	峰号 peak no.		相对含量/% relative content	
					YD1	YD2	YD1	YD2
16	10.01	乙酸	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	60	—	29	—	2.35
17	10.52	(R)-(-)-2-丁醇	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	74	29	30	1.55	0.36
18	10.67	2,3-丁二酮	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	86	—	31	—	0.82
19	10.78	丁醛	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	72	31	—	0.89	—
20	11.03	2-丁酮	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	72	32	33	2.84	5.29
21	11.45	乙酸乙酯	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88	33	—	0.27	—
22	11.79	异丁醇	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	74	34	—	0.29	—
23	11.80	三氯甲烷	CHCl <sub>3</sub>	65.5	—	35	—	0.27
24	13.61	异戊醛	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	86	36	37	5.13	8.02
25	14.05	2-甲基丁醛	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	86	37	39	2.91	4.79
26	14.45	1-戊烯-3-醇	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	86	38	40	11.60	17.00
27	15.30	2-乙基呋喃	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O	96	39	42	2.19	2.82
28	15.67	3-戊酮	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	86	—	44	—	2.95
29	16.82	异戊醇	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	88	44	46	0.96	0.64
30	16.99	3-羟基-2-丁酮	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88	45	47	1.10	0.73
31	17.65	—	—	—	47	48	2.80	0.51
32	18.26	2-甲基-2-丁烯醛	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O	84	49	50	0.78	0.63
33	18.75	顺-2-戊烯-1-醇	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O	86	52	54	0.85	1.39
34	18.88	反式-2-戊烯醛	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O	84	53	55	1.27	1.25
35	19.53	乙酰基丁酰	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	114	55	57	0.07	0.06
36	19.84	1-羟基-2-丁酮	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88	56	58	0.07	0.19
37	20.30	己醛	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	100	57	59	1.71	1.38
38	20.98	—	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O	102	—	62	—	1.56
39	21.26	1-丁氧基-2-丙醇	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	132	—	64	—	0.73
40	21.97	2-甲基-2-戊烯醛	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O	98	—	67	—	0.10
41	22.30	2-甲基-丁酸	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	102	65	—	11.49	—
42	22.30	2-甲基吡嗪	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub>	94	—	68	—	0.05
43	22.99	青叶醛	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O	98	67	70	0.44	0.35
44	23.38	糠醇	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	98	—	73	—	0.14
45	24.46	正庚醛	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O	114	70	—	0.38	—
46	25.74	(E, E)-2,4-己二烯醛	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O	96	77	—	2.04	—
47	26.35	3-甲硫基丙醛	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> OS	104	79	85	0.69	1.14
48	27.00	反式-2-壬烯-1-醇	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	142	81	—	0.17	—
49	27.15	—	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	126	—	89	—	0.13
50	27.85	γ-丁内酯	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	86	85	92	0.12	0.17

· 续表2 ·

编号 no.	保留时间/min retention time	化合物 compounds	分子式 molecular formula	相对分子质量 relative molecular mass	峰号 peak no.		相对含量/% relative content	
					YD1	YD2	YD1	YD2
51	28.27	正辛醛	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	128	-	94	-	0.18
52	28.59	苯甲醛	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O	106	88	96	0.44	0.55
53	28.82	(E, E)-2,4-庚二烯醛	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O	110	89	97	0.25	0.11
54	29.29	-	-	-	-	99	-	0.06
55	29.65	十甲基环五硅氧烷	C <sub>10</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> Si <sub>5</sub>	450	93	101	0.56	0.63
56	30.11	八甲基环四硅氧烷	C <sub>8</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> Si <sub>4</sub>	296	94	103	0.38	0.40
57	30.97	胆酸	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub>	374	97	-	0.14	-
58	31.40	3,5-辛二烯-2-酮	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O	124	98	-	0.13	-
59	31.79	1-癸醇	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O	158	100	-	0.54	-
60	31.80	1,4-环己二酮	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	112	-	110	-	0.81
61	32.22	-	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O	124	103	113	0.11	0.13
62	32.55	γ-己内酯	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	114	104	114	0.25	0.13
63	34.12	反-2,6-壬二烯醛	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O	138	109	-	0.20	-
64	34.90	十二甲基环六硅氧烷	C <sub>12</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub> Si <sub>6</sub>	444	110	124	0.38	0.45
65	35.57	4-乙基苯甲醛	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O	134	113	-	0.07	-
66	37.62	2-吡嗪酮	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO	99	119	134	0.09	0.11
67	39.59	十四甲基环七硅氧烷	C <sub>14</sub> H <sub>56</sub> O <sub>7</sub> Si <sub>7</sub>	532	-	139	-	0.07
总相对质量分数 total relative mass fraction							84.80	89.82

注: - 未检出

Notes: - . not detected

化合物(2种)和酸类(2种)共9大类。其中质量分数超过4%的共有化合物主要有乙醇(YD1, 11.95%; YD2, 4.1%)、丙酮(YD1, 5.55%; YD2, 11.17%)、异戊醛(YD1, 5.13%; YD2, 8.03%)、1-戊烯-3-醇(YD1, 11.60%; YD2, 17.00%)。YD1和YD2醇类化合物的总峰面积占比分别达到了34%和29%, 成为日本鳀发酵液挥发性风味物质的最主要组成成分, 其中含量较高的1-戊烯-3-醇通常带有刺激性的黄油的味道, 而乙醇通常具有微甜的醇香。YD1和YD2中醛类化合物总峰面积占比分别为20.3%和24.6%; 酮类化合物总峰面积占比分别为9.7%和22.07%; 酸类化合物总峰面积占比分别为11.49%和2.35%, 与GC-MS检测数据手动归纳结果相比较一致。一般鱼露具有氨香、类乳酪香和肉香3种特征气味, 其中氨香主要是由一些含氮物质产生的, 如吡嗪、2-甲基吡嗪和2-乙基吡嗪等; 类乳酪香主要是由一些重

要的酮类物质产生, 如2-丁酮、丙酮、3-甲基-2-丁酮、2-己酮和2-戊酮; 而一些醛类物质, 如2-甲基丙醛, 2-甲基丁醛和3-甲基丁醛则对鱼露的肉香味有积极的贡献<sup>[25]</sup>。肖宏艳等<sup>[5]</sup>对潮汕鱼露发酵过程中挥发性风味成分分析发现, 风味化合物酸类、醇类以及醛酮类等鱼露发酵前期均被检测出, 且醇类化合物的含量较高, 这与本实验的研究结果较为一致。比较研究2种盐度下醛、酮和酸类化合物的含量发现, 180盐度下的鱼露发酵液中醛、酮类化合物比230盐度下含量低, 而酸类化合物较高; 这可能是由于微生物和空气的氧化作用, 醛、酮类化合物被逐渐地氧化为酸类化合物。据此, 可以推测低盐有利于鱼露中醛、酮类化合物提前转化为酸类化合物。比较2种盐度下的共有峰化合物, 发现在230盐度下, 所有样品都检测出三甲胺(0.79%)、二甲基硫(0.26%)、乙酸(2.35%)、2,3-丁二酮

(0.82%)、3-戊酮(2.95%)、2-甲基吡嗪(0.05%)、1,4-环己二酮(0.81%)。三甲胺被认为具有强烈的鱼腥味<sup>[26]</sup>，对鱼露生产较为不利，在鱼露发酵前期容易被检测出；二甲基硫化物也是鱼露中鱼香味的来源<sup>[27]</sup>，有利于鱼露特有风味的形成。

## 2.2 发酵前期日本鳀鱼露品质形成过程中主要风味物质的动态变化

通过之前的分析，发现乙醇、丙酮、异戊醛、1-戊烯-3-醇和2-甲基丁酸为鱼露前期发酵液样品的主要挥发性物质，进一步比较了这些成分随发酵时间的变化，结果如图3所示。

在传统鱼露形成的前期，2种盐度发酵的10批样品主要挥发性风味物质以2-甲基丁酸的含量变化最为明显。180盐度发酵150 d时，乙醇、丙酮、异戊醛和1-戊烯-3-醇4种共有挥发性风味物质的含量较之前都出现了不同程度的下降，而2-甲基丁酸的含量出现了明显的升高，为39.22%。这可能是由于前3个月形成的醇类、醛类和酮类风味物质被氧化为酸类<sup>[51]</sup>；230盐度下，整个发酵前期中的2-甲基丁酸的含量都较低，而1-戊烯-3-醇的含量始终较高，江航等<sup>[28]</sup>的

研究表明，有机酸能够促进挥发性风味物质，尤其是海鲜味风味物质的释放。比较2种盐度下同一时间段乙醇、丙酮和异戊醛的含量发现，在发酵的各个时间段，180盐度下的鱼露发酵液中，乙醇含量比230盐度下的高；而丙酮和异戊醛的含量正好相反。这可能是因为较低的盐度对发酵液中微生物抑制作用较小，导致在发酵前期产乙醇的微生物大量繁殖。一些转化丙酮和异戊醛的微生物在高盐度下被抑制，导致在230盐度发酵液中这2种化合物不断累积，含量较高，使鱼露呈现较浓的类乳酪香和肉香味。研究表明，在鱼露发酵前期，可通过控制盐度使鱼露发酵液呈现不同的特征气味，低盐有利于海鲜味的形成，高盐有利于类乳酪和肉香味的形成。综合分析指纹图谱相似度，推测在180盐度下，发酵150 d时鱼露挥发性风味变化较大可能是由于2-甲基丁酸的含量变化较大导致。

## 3 讨论

数据预处理是实现化学指纹图谱模式识别的前期重要环节。通过数据预处理可去除信息

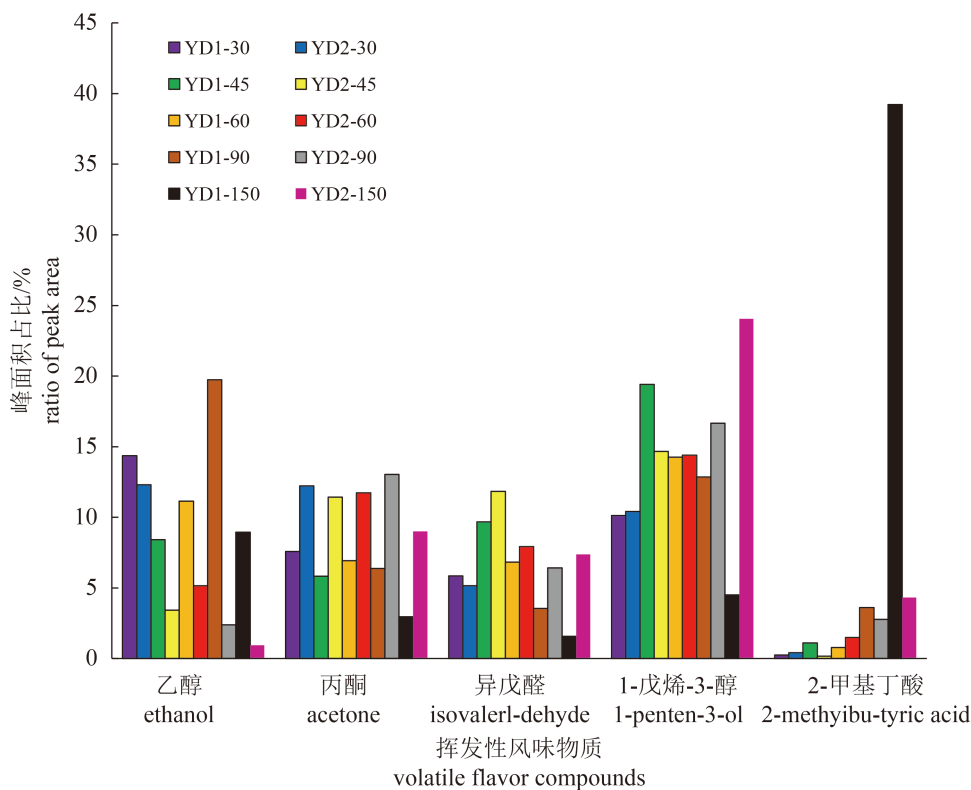


图3 YD1、YD2样品发酵过程中主要挥发性风味物质质量分数变化

Fig. 3 Mass fraction change of main volatile flavor compounds in YD1 and YD2 samples during fermentation

获取过程中掺入的干扰和噪声, 人为地增强有用信息, 并对各种因素造成的退化现象进行复原<sup>[29]</sup>。本实验通过对各供试样品指纹峰峰面积标准化后, 进行夹角余弦计算, 得出大部分的样品相似度良好, 与GC-MS手动分析结果相吻合, 但是样品相对峰面积的相对标准偏差(RSD)大于3%不符合要求<sup>[30]</sup>。有关鱼露化学指纹图谱的数据预处理和模式识别目前尚无可靠的计量标准。因此, 在鱼露样品化学模式识别过程中有必要了解更多分类和判别模型构建的数学原理, 并根据实际情况予以选择和检验。为了能够全面反映日本鲷发酵过程的品质变化, 可以通过相似度分析、主成分分析、聚类分析、差异代谢物分析以及代谢通路分析等代谢组学分析手段, 建立日本鲷鱼露化学指纹图谱, 从而实现鱼露发酵过程和品质的调控<sup>[31]</sup>。

通过对日本鲷发酵过程挥发性风味化合物的分析, 发现醇类物质的含量占有绝对优势。以往研究表明, 传统鱼露发酵在第2—4个月时酵母菌繁殖量较大, 在第3个月时数量达到最大, 成为这一阶段的优势菌群, 酵母菌通过厌氧发酵产生大量的醇类化合物, 进而促进各种香气成分的形成<sup>[24, 32]</sup>。醛类化合物的含量次之, 主要来源于脂类氧化降解, 在发酵过程中多种醛类物质的相对含量不断增多, 赋予了鱼露芳香特质<sup>[33]</sup>。酮类和酸类化合物的含量相对较低, 多种酮类物质具有法国卡门波特蓝纹乳酪味<sup>[34]</sup>, 这些酮以及一些挥发性脂肪酸对鱼露有奶酪味贡献。酸类化合物的存在可提高发酵液体系中氢离子浓度, 促进羧基和氨基的离子化, 而这些基团的离子化是非常关键的, 羧基缩合具有pH依赖性, 是吡嗪形成的第一步<sup>[35]</sup>, 也是非酶褐变的限速步骤, 且美拉德反应速率随介质pH的升高而增大<sup>[25]</sup>。冯滢滢等<sup>[36]</sup>研究表明, 吡嗪类化合物是虾油具有独特海鲜风味的物质基础, 而本实验中检测出的该类化合物含量较少, 这可能是由于发酵前期体系中酸类化合物含量较少, pH较高, 不利于羧基和氨基化合物的转化。本实验通过对主要挥发性物质乙醇、丙酮、异戊醛、1-戊烯-3-醇和2-甲基丁酸随发酵时间变化的分析发现, 180盐度发酵的鱼露更早地进入基础物质转化阶段, 这可能因为微生物生长和整体酶活性在低盐度下都表现较好, 加快了鱼体蛋白质的降解和风味物质的形成<sup>[9]</sup>。

## 4 结论

本研究通过中药指纹图谱相似度软件建立了不同盐度条件下发酵鱼露样品挥发性物质的指纹图谱。通过对指纹图谱的相似度分析, 发现180盐度发酵至第5个月时, 鱼露样品挥发性风味物质较前3个月的样品发生了明显的变化; 230盐度发酵的鱼露中, 第1个月与发酵4个月的挥发性风味物质相比, 其变化较明显。通过对共有峰化合物指认, 发现乙醇、丙酮、异戊醛、1-戊烯-3-醇和2-甲基丁酸为鱼露样品的主要挥发性风味物质。对主要挥发性物质的变化分析发现, 180盐度发酵的鱼露更早地进入基础物质转化阶段。研究表明, 180盐度更有利于鱼露前期快速发酵和基础风味物质的形成; 230盐度发酵的鱼露整体进程较为缓慢, 但更有利于鱼露类乳酪味和肉香味的形成。在实际生产中可根据需要选择不同的盐度进行发酵。关于微生物菌群结构组成、变化以及与之发酵品质之间的关系, 后期将继续深入研究。

## 参考文献:

- [1] Kuda T, Tanibe R, Mori M, *et al.* Microbial and chemical properties of *aji-no-susu*, a traditional fermented fish with rice product in the Noto Peninsula, Japan[J]. *Fisheries Science*, 2009, 75(6): 1499-1506.
- [2] 江津津, 黎海彬, 曾庆孝, 等. 潮汕鱼酱油营养成分分析与品质评价[J]. *食品科学*, 2012, 33(23): 310-313. Jiang J J, Li H B, Zeng Q X, *et al.* Nutritional composition analysis and quality evaluation of Chaoshan fish sauce[J]. *Food Science*, 2012, 33(23): 310-313(in Chinese).
- [3] Dougan J, Howard G E. Some flavouring constituents of fermented fish sauces[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1975, 26(7): 887-894.
- [4] McIver R C, Brooks R I, Reineccius G A. Flavor of fermented fish sauce[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1982, 30(6): 1017-1020.
- [5] 肖宏艳, 曾庆孝. 潮汕鱼露发酵过程中挥发性风味成分分析[J]. *中国调味品*, 2010, 35(2): 92-96. Xiao H Y, Zeng Q X. Analysis of volatile aroma compounds during Chaoshan Yu-lu fermentation[J]. *China Condiment*, 2010, 35(2): 92-96(in Chinese).
- [6] 曾庆孝, 江津津, 阮征, 等. 固相微萃取和同时蒸馏萃



- 取分析鱼露的风味成分[J]. 食品工业科技, 2008, 29(1): 84-87.
- Zeng Q X, Jiang J J, Ruan Z, *et al.* Analysis of volatile aroma components in Yu-lu by SPME and SDE[J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(1): 84-87(in Chinese).
- [7] 朱志伟, 曾庆孝, 阮征, 等. 鱼露及加工技术研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 96-100.
- Zhu Z W, Zeng Q X, Ruan Z, *et al.* Advance in fish sauce and process technology[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(5): 96-100(in Chinese).
- [8] 吕英涛, 周明明, 徐伟, 等. 发酵生产鱼酱油过程中生化特性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(9): 140-143.
- Lü Y T, Zhou M M, Xu W, *et al.* Changes in biochemical characteristics of fish sauce during fermentation process[J]. Food Science, 2009, 30(9): 140-143(in Chinese).
- [9] 段杉, 胡小喜, 廖广强, 等. 盐度对虾油中蛋白酶系、微生物和及其品质的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(7): 38-43, 204.
- Duan S, Hu X X, Liao G Q, *et al.* Effects of salinity on proteases composition, bacterial population and quality of shrimp sauce during fermentation[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(7): 38-43, 204(in Chinese).
- [10] Mok C K, Lee J Y, Song K T, *et al.* Changes in physicochemical properties of salted and fermented shrimp at different salt levels[J]. Korean Journal of Food Science and Technology, 2000, 32(1): 187-191.
- [11] Gildberg A, Thongthai C. The effect of reduced salt content and addition of halophilic lactic acid bacteria on quality and composition of fish sauce made from sprat[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2001, 10(1): 77-88.
- [12] Paludan-Müller C, Madsen M, Sophanodora P, *et al.* Fermentation and microflora of *plaa-som*, a thai fermented fish product prepared with different salt concentrations[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 73(1): 61-70.
- [13] Lee S H, Jung J Y, Jeon C O. Microbial successions and metabolite changes during fermentation of salted shrimp (saeujeot) with different salt concentrations[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e90115.
- [14] 周有祥, 赵明明, 丁华, 等. 茶叶中氨基酸特征指纹图谱的初步研究[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(32): 5463-5466.
- Zhou Y X, Zhao M M, Ding H, *et al.* Preliminary study on the amino acids' fingerprint of tea[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2012, 51(32): 5463-5466(in Chinese).
- [15] 王鹏, 田洪磊, 张海轮, 等. 基于GC-MS结合化学计量学方法的蟠桃鲜果指纹图谱的构建及应用[J]. 现代食品科技, 2016, 32(5): 258-263, 282.
- Wang P, Tian H L, Zhang H L, *et al.* Development of a chromatographic fingerprint for fresh flat peach by GC-MS combined with chemometric methods[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(5): 258-263, 282(in Chinese).
- [16] 张同刚, 曲云卿, 刘雨杨, 等. 宁夏清真手抓羊肉特征指纹图谱的构建[J]. 食品工业科技, 2015, 35(10): 78-82.
- Zhang T G, Qu Y Q, Liu Y Y, *et al.* Establishment of halal hand-grabbed lamb of Ningxia characteristic flavor fingerprint[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 35(10): 78-82(in Chinese).
- [17] 陈林, 陈键, 张应根, 等. 清香型乌龙茶品质形成中游离氨基酸指纹图谱变化规律[J]. 农业工程学报, 2012, 28(27): 244-252.
- Chen L, Chen J, Zhang Y G, *et al.* Variations in free amino acid fingerprints during quality formation of fresh scent-flavor Oolong tea[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2012, 28(27): 244-252(in Chinese).
- [18] 詹萍, 田洪磊, 李卫国, 等. 羊肉特征风味指纹图谱的构建[J]. 现代食品科技, 2013, 29(10): 2522-2527.
- Zhan P, Tian H L, Li W G, *et al.* Establishment of mutton characteristic flavor fingerprint[J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(10): 2522-2527(in Chinese).
- [19] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 12457-2008 食品中氯化钠的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 1245-2008 Determination of sodium chloride in foods[S]. Beijing: China Standard Press, 2008 (in Chinese).
- [20] 陈苍林. 鱼露的天然发酵工艺[J]. 中国酿造, 2001, 20(3): 39-40.
- Chen C L. Nztive fermented technology of fish sauce[J]. China Brewing, 2001, 20(3): 39-40(in Chinese).
- [21] Reboredo-Rodríguez R, González-Barreiro C, Cancho-

- Grande B. Effects of sedimentation plus racking process in the extra virgin olive oil aroma fingerprint obtained by DHS-TD/GC-MS[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2013, 6(5): 1290-1301.
- [22] 盛菲亚, 卢君蓉, 彭伟, 等. 香附炮制前后挥发油的GC-MS指纹图谱对比研究[J]. *中草药*, 2013, 44(23): 3321-3327.
- Sheng F Y, Lu J R, Peng W, *et al.* Comparative study on GC-MS fingerprints of volatile oil in crude and processed *Cyperus rhizoma*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2013, 44(23): 3321-3327(in Chinese).
- [23] 范晓辉, 叶正良, 程翼宇. 基于信息融合的中药多元色谱指纹图谱相似性计算方法[J]. *高等学校化学学报*, 2006, 27(1): 26-29.
- Fan X H, Ye Z L, Cheng Y Y. A computational method based on information fusion for evaluating the similarity of multiple chromatographic fingerprints of TCM[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2006, 27(1): 26-29(in Chinese).
- [24] 黄紫燕, 朱志伟, 曾庆孝, 等. 传统鱼露发酵的微生物动态分析[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(7): 18-22.
- Huang Z Y, Zhu Z W, Zeng Q X, *et al.* Study on the trends of microorganisms in traditional fermentation fish sauce[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 36(7): 18-22(in Chinese).
- [25] Shimoda M, Peralta R R, Osajima Y. Headspace gas analysis of fish sauce[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44(11): 3601-3605.
- [26] 赵华杰, 何忻, 杨荣华, 等. 鱼露风味的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(7): 123-128.
- Zhao H J, He X, Yang R H, *et al.* Research advances on the flavor of fish sauce[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2007, 33(7): 123-128(in Chinese).
- [27] 肖宏艳, 曾庆孝. Maillard反应对加曲发酵鲮制鱼露风味的影响[J]. *中国酿造*, 2009, 28(11): 39-42.
- Xiao H Y, Zeng Q X. Influence of Maillard reaction on volatile aroma compounds in anchovy Yulu[J]. *China Brewing*, 2009, 28(11): 39-42(in Chinese).
- [28] 江航, 王锡昌. 顶空固相微萃取与GC-MS联用的鱼露挥发性风味成分分析[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(23): 9838-9841.
- Jiang H, Wang X C. Analysis of volatile flavor of fish sauce by HS-SPME combined with GC-MS[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2008, 36(23): 9838-9841(in Chinese).
- [29] 李晶皎, 赵丽红, 王爱侠. 模式识别[M]. 北京: 电子工业出版社, 2010: 1-5.
- Li J J, Zhao L H, Wang A X. *Pattern Recognition*[M]. Beijing: Electronic Industry Press, 2010: 1-5 (in Chinese).
- [30] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. *中成药*, 2000, 22(10): 671-675.
- China Drug Administration. Technical requirements for the study of fingerprint of traditional chinese medicine injection (temporary)[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2000, 22(10): 671-675(in Chinese).
- [31] Ingerslev A K, Karaman I, Bağcıoğlu M, *et al.* Whole grain consumption increases gastrointestinal content of sulfate-conjugated oxylipins in pigs-a multicompartmental metabolomics study[J]. *Journal of Proteome Research*, 2015, 14(8): 3095-3100.
- [32] 李开雄, 唐明翔, 蒋彩虹, 等. 酵母菌在发酵香肠中的运用[J]. *肉类工业*, 2002(8): 14-17.
- Li K X, Tang M X, Jiang C H, *et al.* The application of yeast in fermented sausage[J]. *Meat Industry*, 2002(8): 14-17(in Chinese).
- [33] 晁岱秀, 曾庆孝. 盐渍鱼酶解制备鱼露及挥发性风味物质的研究[J]. *食品科技*, 2010, 35(2): 262-267.
- Chao D X, Zeng Q X. Study on enzymatic hydrolysis fish sauce with salted fish and volatile odor compounds [J]. *Food Science and Technology*, 2010, 35(2): 262-267(in Chinese).
- [34] Azzara C D, Campbell L B. Off-flavors of dairy products[J]. *Developments in Food Science*, 1992, 28: 329-374.
- [35] Yeo H C H, Shibamoto T. Microwave-induced volatiles of the Maillard model system under different pH conditions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991, 39(2): 370-373.
- [36] 冯滢滢, 段杉, 李远志. 食盐浓度对虾油风味成分形成的影响研究[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(2): 269-273.
- Feng Y Y, Duan S, Li Y Z. Influence of salt concentration on formation of flavour ingredients in fermentation of shrimp sauce[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(2): 269-273(in Chinese).

## Volatile flavor compounds fingerprints during fish fermentation at different salt concentrations

YUAN Shukun , LI Ruoyun , WU Zufang\* , BAI Zhengze , WENG Peifang

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** The main volatile flavor compounds of fish sauce were determined in order to investigate their changes and establish the fingerprints of volatile flavor compounds during pre-fermentation of fish sauce and clarify the main flavor compounds at 180 and 230 salinity. The volatile flavor compounds in samples were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in the fermentation process. The results showed that the similarity of eight samples of fish sauce was good and reached 90% compared to the control. The volatile flavor compounds of the fish sauce were changed significantly at 180 salt concentration for 150 days. The fish sauce fermented in 180 salinity (YD1) group gained 51 common peaks and 58 as the fish sauce fermented in 230 salinity (YD2) group. All of those common peaks were calibrated to their respective reference fingerprint. Ethanol, acetone, isovaleraldehyde, 1-penten-3-ol and 2-methylbutyric acid were identified as the main volatile compounds in the pre-fermentation of fish sauce by the identification of the common peaks of the fingerprints. The results showed that fermentation changes of the YD1 group samples (180 salinity) occurred earlier and it is beneficial to the formation of delicious taste. But its changes of fermentation process happened slowly for the samples of 230 salinity. It is beneficial to the formation of cheese and meat flavor in fish sauce. The results of this study can provide effective references for revealing the regularity of main volatile flavor compounds and the quality control of fish sauce.

**Key words:** *Engraulis japonicas*; fish sauce; salinity; volatile flavor compounds; GC-MS; fingerprints

**Corresponding author:** WU Zufang. E-mail: wzfwpf@163.com

**Funding projects:** Science and Technology Enriching the People Project of Ningbo (2016C10031)