

文章编号: 1000-0615(2018)06-0984-12

DOI: 10.11964/jfc.20170710908

基于GC-MS联用技术分析传统鱼露发酵过程中 挥发性风味成分和脂肪酸组分变化

王悦齐^{1,2}, 李春生², 李来好^{2*}, 杨贤庆², 陈胜军²,
吴燕燕², 赵永强², 魏 涯²

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266000;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部水产品加工重点实验室, 广东 广州 510300)

摘要: 为探明鱼露在不同发酵时间点挥发性物质的差异以及脂肪酸对传统鱼露的香气物质形成的影响, 实验采用气相色谱—质谱联用(GC-MS)技术分析鱼露发酵过程中的挥发性风味成分和脂肪酸组成。结果显示, 在5个不同发酵时间点的鱼露样品中共检测出7大类56种挥发性化合物, 并用内标法对各挥发性化合物进行定量。以OVA值为依据, 从56种挥发性化合物中筛选出12种对鱼露风味轮廓贡献显著的主体呈香化合物如3-甲硫基丙醛等。鱼露的主体特征风味可描述为蘑菇香味、土豆香味、麦芽香味、香草味、水果香味和鱼腥味。鱼露中的脂肪酸主要分布范围为C15~C26, 不饱和脂肪酸(UFA)相对含量高达67.23%。在鱼露发酵过程中, 风味相关的亚油酸和亚麻酸变化较为显著, 与主体挥发性风味化合物的变化呈现一定的相关性, 证明不饱和脂肪酸是鱼露发酵过程中产生特征风味的重要前体物质。

关键词: 鱼露; 风味; 脂肪酸; 气质联用; 发酵

中图分类号: TS 254.5

文献标志码: A

鱼露亦称鱼酱油, 呈琥珀棕红色, 是我国沿海地区和东南亚一带的传统特色调味品^[1-2]。传统鱼露生产一般以腌渍和自然发酵工艺为基础, 采用日本鳀(*Engraulis japonius*)、蓝圆鲹(*Decapterus maruadsi*)、沙丁鱼(*Sardina pilchardus*)等低值海水鱼为原料^[3-4]。在内源蛋白酶和微生物(如耐盐乳酸菌和酵母菌)的协同作用下, 鱼体内的蛋白质和脂肪经过高盐腌制进行发酵分解, 逐渐形成醛、酮、醇、酯等风味化合物^[5]。日晒夜露的自然发酵被认为是传统鱼露工艺的传承与延续, 赋予传统鱼露浓郁独特的香气, 深受广大消费者的青睐^[6]。

鱼露发酵过程中会产生一系列的理化反应, 包括鱼体中不饱和脂肪酸的氧化酸败和外

源腐败微生物的影响, 致使鱼露在发酵过程中容易产生己醛、三甲胺、吡嗪等不良风味物质^[7]。自20世纪90年代以来, 国内外对不同类型的鱼露挥发性风味化合物开展了大量研究, 主要集中在不同发酵工艺或不同原料的挥发性成分对比, 而缺少对挥发性风味化合物的来源和前体物质进一步探讨^[6, 8-9]。有研究表明在水产品加工过程中, 脂类物质能够降解为醛酮类等小分子化合物, 大部分脂类物质对水产品良好特征风味的形成起到关键作用^[10]。海水鱼富含多种脂肪酸, 如二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)^[11], 在鱼露发酵过程中不同脂肪酸含量的变化对其风味形成具有重要的影响。本研究采用气相色谱—质谱联用技术对鱼露发酵过程中

收稿日期: 2017-07-23 修回日期: 2017-09-28

资助项目: 国家自然科学基金(31571869); 现代农业产业技术体系专项(CARS-47); 广州市科技计划项目(201707010300); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2015TS23)

通信作者: 李来好, E-mail: laihaoli@163.com

的挥发性风味化合物和脂肪酸变化进行了检测与分析,旨在探明鱼露在不同发酵时间点挥发性物质的差异,并分析脂肪酸变化对传统鱼露的香气物质形成的影响,为进一步探讨鱼露中香气的产生机理和生产高质量鱼露产品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

日本鳀采集于中国南海,体长(20.0±3.0) cm,体质量(150.0±30.0) g,随机取200尾,于-20 °C条件下进行冻藏。对冰冻日本鳀进行流水解冻,解冻完成后将其移至发酵池中进行自然发酵。根据传统生产工艺,按照鱼体质量的20%用盐量将日本鳀和食盐进行混合,每隔2天对发酵池中的样品进行搅拌。按照发酵前中后期,取1个月(1 M)、3个月(3 M)、6个月(6 M)、9个月(9 M)、12个月(12 M)的鱼露发酵液,将每个时期5个平行样品发酵液分别混匀后用定性滤纸过滤,收集滤液保存于-80 °C冰箱待测。

1.2 试剂与仪器

2,4,6-三甲基吡啶标准品(2,4,6-trimethylpyridine, TMP),三氟化硼—甲醇溶液,日本TCI公司;十一烷酸标准品,美国Sigma公司;其他试剂均为分析纯。GC/MS-QP2010 plus气相质谱联用仪,日本岛津公司;65 μm DVB-PDMS萃取头,美国Supelco公司;DF-101S集热式恒温磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司;BS224S分析天平,美国Sartorius公司;BYDCY-24Y氮吹仪,上海秉越电子仪器有限公司。

1.3 实验方法

静态顶空固相微萃取挥发性物质 将5.00 mL过滤后的鱼露样品置于20 mL顶空进样瓶中,加入2 μg内标物TMP,用PTFE-silicone瓶盖迅速封闭瓶口,插入已老化好的65 μm DVB-PDMS的萃取头,置于60 °C的磁力搅拌台上,吸附40 min,再插入GC/MS进样口进行解析,进样口温度为250 °C,解析5 min,重复测定3次。为防止样品间交叉污染,连续进样的萃取头需要在270 °C的条件下老化10 min。

脂肪酸提取与甲酯化 参照Metchalfe等^[12]和Folch等^[13]的方法,略做修改:取5.00 mL过滤

后的鱼露样品于50 mL离心管中,加入15 mL氯仿—甲醇(2:1, V/V),10 mg十一烷酸内标物和1 mg丁羟甲苯(BHT),振荡混匀,静置1 h后进行过滤,向滤液中加入5 mL生理盐水,于4 000 r/min离心20 min,取出离心管后弃去上层水与甲醇等液体杂质,下层溶液再次离心5 min,重复上述步骤,将下层溶液转移到50 mL离心管中,用氮气吹扫有机试剂,得到浓缩脂肪。

向装有浓缩脂肪的离心管中加入2 mL 14%三氟化硼—甲醇溶液,在60 °C水浴条件下甲酯化反应30 min,待其冷却至室温,加入1 mL正己烷溶液和1 mL蒸馏水,振荡混匀后静置10 min待其分层,吸取上层正己烷层过0.22 μm有机滤膜,取1 μL用GC-MS进行检测。

GC-MS检测条件 测定挥发性风味成分的GC-MS参数条件:色谱柱为CD-5 MS (30 m×0.25 mm, 0.25 μm);载气为氦气;载气流速为1.0 mL/min,采用恒线速度,分流比为1:20;进样量为1 μL;升温程序:起始温度为35 °C,保持1 min,以5 °C/min的速率升温到60 °C保持1 min,再以6 °C/min上升到140 °C保持1 min,最后以8 °C/min升温到230 °C,保持5 min;离子源温度为200 °C;电子能量为70 eV;质量扫描范围为35~350 m/z;无溶剂切除时间。

测定脂肪酸含量的GC-MS参数条件:色谱柱为DB-5 MS (30 m×0.25 mm, 0.25 μm);载气为氦气;载气流速为1.52 mL/min,采用恒线速度,分流比为1:30;进样量为1 μL;升温程序:起始温度为110 °C,保持4 min,再以10 °C/min的速率升温到160 °C保持1 min,最后以5 °C/min升温到240 °C,保持15 min;离子源温度为200 °C;电子能量为70 eV;质量扫描范围为35~350 m/z;溶剂切除时间为3 min。

1.4 数据分析

定性分析 挥发性风味化合物和脂肪酸的定性均由Xcalibur软件系统完成,利用计算机检索各化合物,与WILEY和NIST 05a.L谱库数据库相匹配,当化合物的正反匹配度大于800(最大值1 000)才予以报道。

定量分析 按照待测挥发物与内标物TMP的峰面积之比求得挥发性风味化合物的绝对含量,计算公式:

$$\text{挥发性风味化合物绝对含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{P \times 2}{M} \times 10^3$$

式中， P 为挥发性化合物与内标物TMP的峰面积之比； 2 为内标物TMP的质量(μg)； M 为称取的鱼露样品质量(g)。

按照待测脂肪酸与内标物十一烷酸的峰面积之比求得各脂肪酸的绝对含量，计算公式：

$$\text{脂肪酸绝对含量}(\text{mg/g}) = \frac{P \times 10}{M}$$

式中， P 为脂肪酸与十一烷酸的峰面积之比； 10 为内标物十一烷酸的质量(mg)。

2 结果

2.1 鱼露发酵过程中挥发性风味化合物的鉴定

本研究采用静态顶空固相微萃取—气质联用(HS-SPME-GC-MS)技术对鱼露发酵过程中挥发性风味化合物进行检测，在5个不同发酵时间点的鱼露样品中共检测出56种挥发性物质，包括醛

类(14种)、酮类(7种)、酸类(7种)、醇类(7种)、酯类(11种)、烃类(8种)和含氮化合物(9种)，不同发酵时间点的挥发性风味化合物差异较大(图1)。从1 M、3 M、6 M、9 M和12 M的样品中分别共检测出26、35、41、45和49种挥发性风味化合物，在鱼露发酵过程中，挥发性风味化合物的数量随发酵时间的延长大体呈现上升的趋势，酮类化合物则变化不大。有18种化合物在5个发酵阶段中同时出现(在表1中以*标注)，除酮类化合物之外，其余挥发性风味化合物的浓度值总和呈现上升趋势，并且其浓度值具有显著性差异($P < 0.05$)，醛类和醇类是主要的挥发性风味化合物，其总含量分别占1 M、3 M、6 M、9 M和12 M样品的72.76%、66.92%、70.74%、68.85%和67.15%。发酵前后挥发性风味化合物种类和含量上的差别可能是由于发酵过程中风味前体物质

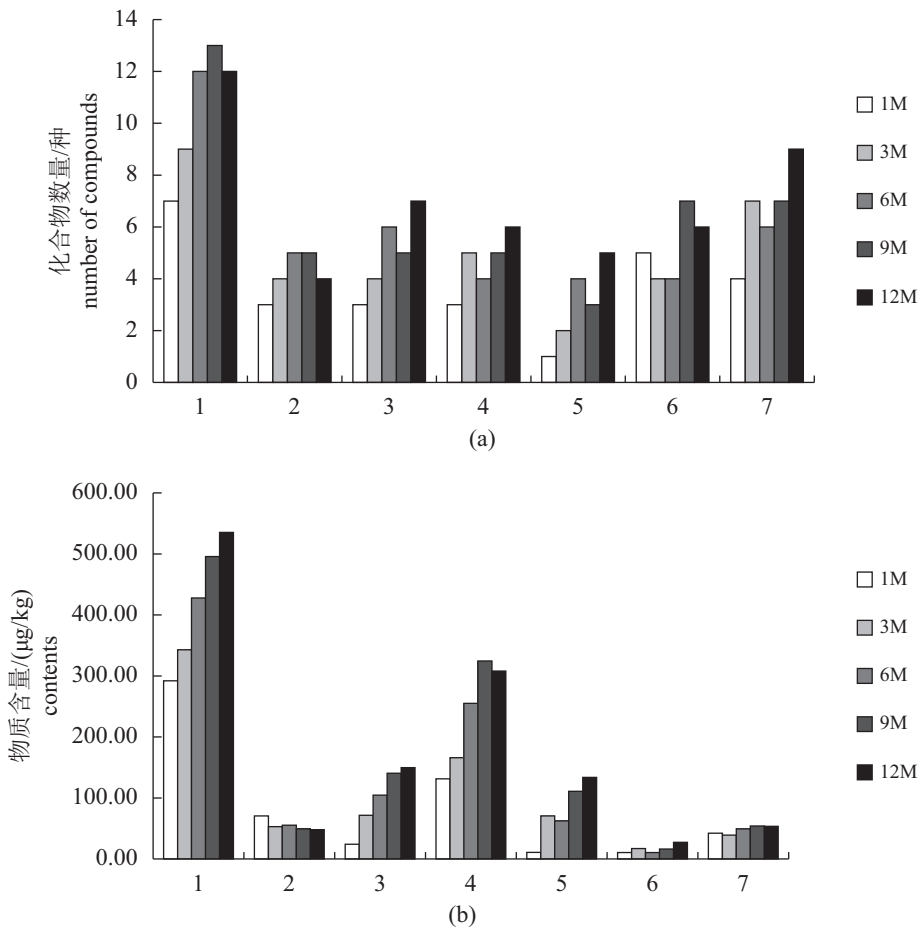


图1 鱼露不同发酵时间的挥发性风味成分组成

1. 醛类；2. 酮类；3. 酸类；4. 醇类；5. 酯类；6. 烃类；7. 含氮化合物

Fig. 1 The volatile compounds profiles of fish sauce with different fermentation time

1. aldehydes; 2. ketone; 3. acids; 4. alcohols; 5. esters; 6. alkanes; 7. nitrogenous

表 1 鱼露发酵过程中挥发性风味成分定性定量结果

Tab. 1 Qualitative and quantitative results of volatile flavor components during fish sauce fermentation

符号 sign	物质 component	阈值/(ng/g) ^[15-19] threshold	气味描述 ^[14, 16-17, 20-21] odor description	浓度/(ng/g) concentration				
				1 M	3 M	6 M	9 M	12 M
酸类								
A1	乙酸*	22 000.0	酸味	8.63	10.56	8.95	10.56	14.29
A2	丁酸	2 200.0	奶酪味、汗味	n.d.	18.58	45.81	40.25	30.54
A3	辛酸	3 000.0	奶酪味、汗味	12.68	22.37	n.d.	n.d.	27.42
A4	2-甲基丙酸	2 300.0	奶酪味、脂味	2.89	n.d.	5.03	1.89	3.47
A5	2-甲基丁酸	1 200.0	奶酪味、汗味	n.d.	20.04	10.73	3.02	10.29
A6	3-甲基丁酸	1 200.0	奶酪味、汗味	n.d.	N.D.	33.67	84.87	62.86
A7	4-甲基戊酸	1 500.0	酸味	n.d.	n.d.	0.49	n.d.	0.90
醇类								
B1	乙醇*	100 000.0	酒香味	82.44	97.37	105.66	81.14	90.81
B2	2-甲基-1-丁醇*	16.0	麦芽香味	30.01	22.03	58.61	72.03	68.26
B3	3-甲硫基丙醇	500.0	土豆香味	n.d.	5.88	n.d.	n.d.	31.21
B4	苯乙醇	390.0	花香味	n.d.	n.d.	n.d.	70.01	7.58
B5	1-戊烯-3-醇	358.1	烤洋葱味	n.d.	8.05	n.d.	22.47	n.d.
B6	2-甲基-1-丙醇	7 000.0	苦味	n.d.	n.d.	7.98	n.d.	6.03
B7	1-辛烯-3-醇*	1.5	蘑菇香味	18.98	32.69	82.97	78.78	104.12
醛类								
C1	3-甲硫基丙醛*	1.4	土豆香味	162.26	170.03	205.57	210.44	223.63
C2	2-甲基丙醛*	4.4	麦芽香味	45.12	31.45	60.28	65.21	92.75
C3	3-甲基丁醛*	1.2	麦芽香味	47.89	105.13	100.07	138.13	155.65
C4	戊醛*	9.0	水果味	6.64	5.05	7.78	8.91	9.28
C5	己醛*	4.5	青草味、油脂味	6.15	7.74	11.08	15.58	17.23
C6	庚醛*	30.0	鱼腥味	23.17	12.85	10.70	6.32	7.52
C7	(E, E)-2, 4-庚二烯醛	15.4	鱼腥味	0.83	0.05	n.d.	9.57	0.32
C8	苯甲醛	350.0	杏仁味	n.d.	n.d.	12.58	26.15	13.38
C9	苯乙醛	4.0	花香味	n.d.	n.d.	4.34	0.09	5.63
C10	(E, Z)-2, 6-壬二烯醛	0.8	青草味	n.d.	n.d.	4.55	5.13	4.25
C11	2-辛烯醛	0.1	青草味	n.d.	7.54	6.58	n.d.	n.d.
C12	2-壬烯醛	3.0	青草味	n.d.	3.15	2.12	4.03	2.85
C13	十一醛	5.0	花香味	n.d.	n.d.	n.d.	2.21	n.d.
C14	2-癸烯醛	300.0	青草味、泥土味	n.d.	n.d.	2.12	4.03	2.85
酮类								
D1	2-丁酮*	50 000.0	醚味	20.25	15.98	14.59	8.04	5.21

· 续表1 ·

符号 sign	物质 component	阈值/(ng/g) ^[15-19] threshold	气味描述 ^[14, 16-17, 20-21] odor description	浓度/(ng/g) concentration				
				1 M	3 M	6 M	9 M	12 M
D2	2-庚酮	140.0	奶酪味	30.15	n.d.	6.92	4.76	12.83
D3	2-辛酮	28.0	醚味	n.d.	5.27	8.12	7.55	6.98
D4	3, 5-辛二烯-2-酮	150.0	焦香味	n.d.	15.85	11.24	20.91	23.14
D5	3-羟基-2-丁酮	800.0	奶酪味	20.25	15.98	14.59	8.04	n.d.
酯类								
E1	乙酸乙酯*	5.0	水果香味	10.76	50.91	30.15	80.14	95.29
E2	丙酸乙酯	10.0	水果香味	n.d.	n.d.	4.35	8.63	4.24
E3	异戊酸乙酯	3.0	水果香味	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.25
E4	苯甲酸甲酯	73.0	花香味	n.d.	n.d.	4.07	n.d.	0.53
E5	乙酸苯乙酯	249.6	花香味	n.d.	19.75	23.93	22.13	32.55
含氮化合物								
F1	三甲胺*	2.4	鱼腥味	12.07	8.11	9.53	6.26	4.42
F2	2-甲基吡嗪	27 000.0	坚果味	15.04	14.13	n.d.	4.03	3.88
F3	2, 6-二甲基吡嗪	2 600.0	坚果味	n.d.	n.d.	0.65	0.29	0.44
F4	2, 3, 5-三甲基吡嗪	297.0	焦臭味	n.d.	2.31	n.d.	3.21	0.84
F5	2-异戊基-6-甲基吡嗪*	9 000.0	橡胶味	21.23	18.25	31.12	16.27	20.08
F6	2-甲基呋喃	9.0	辛辣味	n.d.	0.41	0.77	n.d.	1.07
F7	2-乙基呋喃*	2.3	青草味	6.01	3.05	14.55	28.25	19.52
F8	2-戊基呋喃	5.8	豆香味	n.d.	1.02	n.d.	n.d.	3.68
F9	3-苯基呋喃	5.9	豆香味	n.d.	n.d.	2.34	1.98	4.09
烃类								
G1	正十二烷	2 040.0	刺激性气味	n.d.	1.24	n.d.	0.38	n.d.
G2	2-癸烯	-	-	0.11	n.d.	2.85	n.d.	3.12
G3	十三烷	2 140.0	刺激性气味	3.11	n.d.	n.d.	2.34	n.d.
G4	十五烷*	-	-	6.33	2.48	2.12	4.25	4.13
G5	(E)-9-二十烯	-	-	0.33	n.d.	n.d.	1.23	0.87
G6	1-十七烯	-	-	n.d.	7.70	2.15	1.68	3.09
G7	十八烷*	-	-	0.80	5.78	3.37	4.27	7.59
G8	二十一烷	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	2.14	8.45

注：“-”表示未检索到相关报道或无法得到相关数值；n.d.表示未检出

Notes:“-” indicated no relevant report was retrieved or related values could not be obtained; n.d. indicated not detected

发生分解代谢反应所致。

进一步分析表1可知，酸类化合物主要是由脂肪酸甘油三酯发生水解或氧化反应生成^[22]，大部分酸类的阈值较高，因此对主体风味贡献不

大。在鱼露中检测到的挥发性酸以短链酸(C2~C5)为主，发酵后期(9 M和12 M)酸类化合物的总量明显升高，低浓度的乙酸具有柔和的酸味，在所有发酵阶段均被检出，7种酸类化合物中，丁

酸和3-甲基丁酸的含量相对较高。

醇类化合物来源于脂肪的氧化、氨基酸和碳水化合物的代谢^[23], 不饱和醇的阈值较低, 对鱼露的特征风味有一定的贡献, 乙醇(酒香味)、2-甲基-1-丁醇(麦芽香味)和1-辛烯-3-醇(蘑菇香味)的含量相对较高, 在5个发酵阶段均被检出。在发酵前期, 醇类化合物的含量相对较低, 随着发酵时间的延长, 醇类化合物的含量和种类逐渐升高, 冯云子^[14]研究高盐稀态酱油关键香气风味化合物形成机理, 发现品质等级越高的酱油中醇类化合物的含量和种类越丰富, 一级酱油醇类的含量约为二、三级酱油的3倍, 由此可推测, 适当延长发酵时间可能有利于提升鱼露的整体品质。

醛类化合物是脂质氧化的降解产物, 一般具有令人愉快的气味, 如青草味、麦芽香味、水果香味和奶酪味^[24-25]。鱼露中的醛类物质种类较多, 其中3-甲硫基丙醛、2-甲基丙醛和3-甲基丁醛含量较高, 这3种化合物总浓度分别高达971.93、294.81和546.87 ng/g。苯甲醛是由氨基酸的Strecker(斯特克雷尔)反应生成的, 已被鉴定为烤花生中的主要羰基化合物, 具有令人愉快的杏仁味, 也是存在于水产品中的一种特征风味化合物。庚醛和三甲胺都是鱼腥味的主体成分, 经过12个月的发酵, 鱼露中的庚醛和三甲胺含量分别比发酵前期(1 M)降低了67.54%和63.38%, 说明发酵时间的延长有利于降低鱼露的腥味。

酯类来源于鱼露发酵过程中醇类和酸类物质的酯化反应, 并且基本以乙酯类物质为主, 这主要是与鱼露发酵产生高浓度的乙醇有关, 其中乙酸乙酯的含量最高, 与现有的文献报道一致^[14, 26]。异戊酸乙酯和苯甲酸甲酯是鱼露发酵后期(12 M)的独有物质, 具有水果香味和花香味, 但其浓度相对较低。含氮化合物来源于碳水化合物和氨基酸发生Maillard(美拉德)反应或者氨基酸的热分解, 2-异戊基-6-甲基吡嗪和2-乙基咪唑在5个发酵阶段均被检出, 咪唑类化合物虽然含量相对较低, 但其阈值较低, 能产生一定的青草味或豆香味。烷烃类化合物通常被认为不具有气味活性, 主要来源于烷氧自由基的裂解^[10], 但一部分烯烃可在一定条件下生成醛酮类化合物如2-癸烯, 可能会对鱼露的整体风味有一定的影响。

2.2 主体呈香风味化合物的筛选

挥发性风味化合物的浓度值高低并不能反映其对鱼露香气的贡献程度, 不同化合物的嗅觉最低感受浓度(阈值)不同, 当浓度一定时, 阈值越低的化合物越容易被嗅觉器官感知^[19]。因此, 众多挥发性化合物中仅有小部分化合物对鱼露的香气有贡献。本研究采用OAV值筛选鱼露发酵过程中的主体呈香风味化合物, OAV值是香气化合物浓度与其阈值的比值, 已广泛应用于特征性香气活性化合物的筛选。OAV ≥ 1 则可认为此挥发性物质为主体呈香风味化合物, 且OAV值越大对整体香气贡献程度越高。表2展示了鱼露发酵过程中活性香气化合物, 55种挥发性风味化合物中, 检出12种化合物的浓度大于其阈值, 其中3-甲硫基丙醛(土豆香味)的平均OAV值最大(138.85), 其次是3-甲基丁醛(麦芽香味, 91.15)、1-辛烯-3-醇(蘑菇香味, 42.34)和2-辛烯醛(青草味, 35.30)。另外, OAV值大于10的化合物还有2-甲基丙醛(麦芽香味, 13.40)和乙酸乙酯(水果香味, 10.69), 这些风味物质都是对鱼露的整体香气轮廓有显著贡献的主体呈香风味化合物, 此结果与Fukami等^[6]对鱼露的特征挥发性风味物质鉴定结果较为一致。此外, 2-甲基-1-丁醇、1-辛烯-3-醇、3-甲硫基丙醛、2-甲基丙醛、3-甲基丁醛、乙酸乙酯、三甲胺和2-乙基咪唑在不同发酵阶段的样品中OAV值均大于1, 上述这12种化合物的风味特征在文献中描述为蘑菇香味、土豆香味、麦芽香味、香草味、水果香味和鱼腥味, 主体呈香风味化合物在鱼露发酵初期就开始形成, 其中部分化合物也被证实为豆瓣酱^[27]和酱油^[8, 28]等发酵食品的关键香气化合物。

2.3 鱼露发酵过程中脂肪酸组成的鉴定

本研究从1 M、3 M、6 M、9 M和12 M的鱼露样品中分别检测出15、16、16、18、17种脂肪酸, 包括7种饱和脂肪酸(saturated fatty acid, SFA), 6种单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acids, MUFA), 5种多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFA), 鱼露中的脂肪酸主要分布范围为C15~C26(表3)。含量较高的脂肪酸有棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0), 油酸(C18:1n9)、亚油酸(C18:2 n6)、花生四烯酸(C20:4 n6)、亚麻酸(C18:3n3)、二十碳五烯酸(EPA, C20:5n3)和二十二碳六烯酸(DHA, C20:6n3), 这与Dincer等^[29]的研

表2 鱼露发酵过程中的主体呈香化合物(OVA \geq 1)

Tab. 2 Principal aroma compounds during fish sauces fermentation

符号 sign	物质 component	气味描述 odor description	OAV值 odor activity value				
			1 M	3 M	6 M	9 M	12 M
B2	2-甲基-1-丁醇	麦芽香	1.88	1.38	3.66	4.50	4.27
B7	1-辛烯-3-醇	蘑菇香味	12.65	21.79	55.31	52.52	69.41
C1	3-甲硫基丙醛	土豆香味	115.90	121.45	146.83	150.31	159.74
C2	2-甲基丙醛	麦芽香味	10.25	7.15	13.70	14.82	21.08
C3	3-甲基丁醛	麦芽香味	39.91	87.61	83.39	115.11	129.71
C5	己醛	青草味、脂味	1.37	3.46	1.72	2.46	3.83
C10	(E, Z)-2, 6-壬二烯醛	青草味	-	-	5.69	6.41	5.31
C11	2-辛烯醛	青草味	-	94.25	82.25	-	-
C12	2-壬烯醛	青草味	-	1.05	0.71	1.34	0.95
D7	乙酸乙酯	水果香味	2.15	10.18	6.03	16.03	19.06
F1	三甲胺	鱼腥味	5.03	3.38	3.97	2.61	1.84
F7	2-乙基呋喃	青草味	2.61	1.33	6.33	12.28	8.49

究结果较为一致。

随着发酵时间的延长, SFA和MUFA的总含量呈现上升的趋势, SFA的总含量由8.71 mg/g增加到13.31 mg/g, MUFA的总含量由5.61 mg/g增加到11.69 mg/g, 而PUFA则由12.00 mg/g减少到15.18 mg/g, 鱼露发酵过程中PUFA的含量下降主要是由亚油酸(C18:2 n6)和亚麻酸(C18:3n3)所致, 有研究表明PUFA在食品加工过程中会发生氧化, 降解生成具有独特风味的小分子化合物^[30], 这与本研究结果一致。不同发酵阶段的鱼露UFA含量远高于SFA的含量, UFA的含量高达67.23%。PUFA的n3/n6比值由0.93(1 M)升至1.56(12 M), ω -3系列的多烯酸的EPA和DHA是人体生长发育所必需的营养物质^[31], 一定程度上能够反映鱼露具有良好的风味和丰富的营养价值。

2.4 鱼露发酵过程中脂肪酸对挥发性风味成分形成的作用

发酵为挥发性风味物质的形成提供了丰富的酶系和各类前体物质, 如碳水化合物、游离氨基酸、脂肪酸等^[32]。为进一步探讨鱼露发酵过程中挥发性风味成分和脂肪酸组分的变化, 本研究根据12种主体呈香风味化合物和7种主要脂肪酸的含量对5个样品进行聚类分析, 5个样品整体被分为3组, 可分为发酵前期(1 M、3 M)、中

期(6 M)和后期(9 M、12 M), 这与本研究采样点选择一致, 表明实验结果可信度较高(图2)。热图能更清晰地反映鱼露发酵过程中主体呈香风味化合物和主要脂肪酸含量的动态变化, 随着发酵时间的延长, 大部分风味化合物和脂肪酸呈现增长的趋势, 仅有E1(三甲胺)、P1(亚油酸)和P3(亚麻酸)呈现下降的趋势, 因此亚油酸和亚麻酸可能作为主要的前体物质, 与鱼露的主体风味形成具有密切的联系。

脂质衍生的挥发性风味化合物是由甘油三酯和磷脂水解成脂肪酸, 脂肪酸进一步发生氧化降解生成的小分子化合物^[10]。鱼露发酵过程中主体风味化合物的前体物质大部分与脂肪氧化代谢有关, 其主体特征气味可描述为麦芽香味、土豆香味、蘑菇香味和青草味, 同时伴随着水果香味和鱼腥味。醛类的变化最为明显, 直链醛是由不饱和脂肪酸氧化降解形成的^[33], 其中烷基醛、烯醛和二烯醛是亚油酸酯或者亚麻酸酯氢过氧化物的降解产物^[10], 本研究检测到的醛类物质[己醛、庚醛、2-甲基丙醛、(E, Z)-2, 6-壬二烯醛、2-辛烯醛]在一定程度上反映鱼露发酵过程中脂肪酸组分的变化。Chung等^[34]发现己醛是亚油酸的降解产物, 这与本研究中鱼露发酵过程中亚油酸含量逐渐降低的结果一致, 己醛与亚油酸含量变化呈负相关, 其相关系数 $R^2=0.9587$ 。

表3 鱼露发酵过程中的脂肪酸组成
Tab. 3 The fatty acid composition during fish sauces fermentation

符号 sign	脂肪酸 fatty acid	含量 composition					mg/g
		1 M	3 M	6 M	9 M	12 M	
S1	C15:0	0.42±0.04	0.46±0.07	0.81±0.05	0.84±0.08	0.74±0.06	
S2	C16:0	2.86±0.04	3.48±0.04	3.67±0.08	4.14±0.06	3.97±0.08	
S3	C17:0	0.57±0.01	0.66±0.01	0.81±0.11	0.96±0.06	1.01±0.03	
S4	C18:0	3.48±0.05	3.78±0.10	5.03±0.07	5.38±0.18	5.55±0.10	
S5	C19:0	-	0.38±0.04	0.73±0.16	0.93±0.06	1.00±0.01	
S6	C23:0	0.90±0.07	0.73±0.06	0.49±0.08	0.61±0.05	0.68±0.05	
S7	C26:0	-	-	-	0.38±0.04	-	
M1	C14:1n3	0.82±0.09	1.01±0.08	1.66±0.16	1.90±0.06	1.94±0.13	
M2	C16:1n10	0.38±0.04	0.45±0.04	0.61±0.05	0.82±0.01	0.74±0.06	
M3	C16:1n7	0.43±0.03	0.49±0.12	0.77±0.11	0.98±0.05	1.05±0.09	
M4	C18:1n9	3.17±0.08	3.80±0.10	-	4.95±0.09	4.56±0.47	
M5	C19:1n9	0.81±0.10	1.28±0.11	1.57±0.08	1.74±0.10	1.78±0.04	
M6	C20:1n9	-	-	0.70±0.06	0.80±0.01	0.89±0.05	
M7	C24:1n9	-	0.42±0.09	0.57±0.06	0.67±0.08	0.75±0.09	
P1	C18:2n6	7.63±0.59	6.45±0.62	4.34±0.31	3.15±0.23	2.62±0.29	
P2	C20:4n6	1.38±0.04	1.74±0.18	2.58±0.13	3.08±0.08	2.93±0.08	
P3	C18:3n3	4.02±0.23	3.18±0.18	2.52±0.09	1.37±0.06	0.89±0.03	
P4	C20:5n3	1.69±0.08	1.90±0.06	2.12±0.16	2.39±0.25	2.65±0.37	
P5	C22:6n3	2.71±0.04	3.01±0.13	4.25±0.37	5.17±0.37	5.13±0.15	
	SFA	8.71	9.91	11.74	13.23	13.31	
	MUFA	5.61	7.44	5.85	11.84	11.69	
	PUFA	12.00	13.11	14.59	15.22	15.18	

在不同鱼露样品中检出各种烷烃及对应的C15:0至C22:0的脂肪酸,在一定程度上说明烷烃主要来源于脂肪酸烷氧自由基的均裂^[10]。烷氧自由基和脂肪酸能够发生反应生成醇类物质,鱼露发酵过程中1-辛烯-3-醇与亚油酸含量的变化也呈负相关,其相关系数 $R^2=0.9735$ 。Iglesias等^[35]研究鱼肌肉中脂肪酸氧化程度与挥发性风味成分的关系时也得到类似的结果,证明1-辛烯-3-醇是亚油酸的氧化产物,其含量的高低能在一定程度上反映鱼肉脂肪氧化分解程度。综上所述,在鱼露发酵过程中部分脂质氧化生成的挥发性风味化合物的含量增加,而其对应的脂肪酸减少,二者含量变化存在着一定的线性关系,证

明鱼肉中丰富的脂肪酸是鱼露发酵过程中挥发性风味化合物的重要前体物质,这些物质无论作为呈香物质还是中间体都对鱼露的特征风味起着关键作用。

3 结论

采用HS-SPME-GC-MS技术对鱼露发酵过程中挥发性风味化合物进行检测,5个不同发酵时间点的鱼露样品中共检测出56种挥发性物质,不同发酵时间点的挥发性风味化合物差异较大。在鱼露发酵过程中挥发性风味化合物的数量和含量大体呈现上升的趋势,酮类化合物则变化不大。通过OVA值筛选出12种对鱼露发酵过程

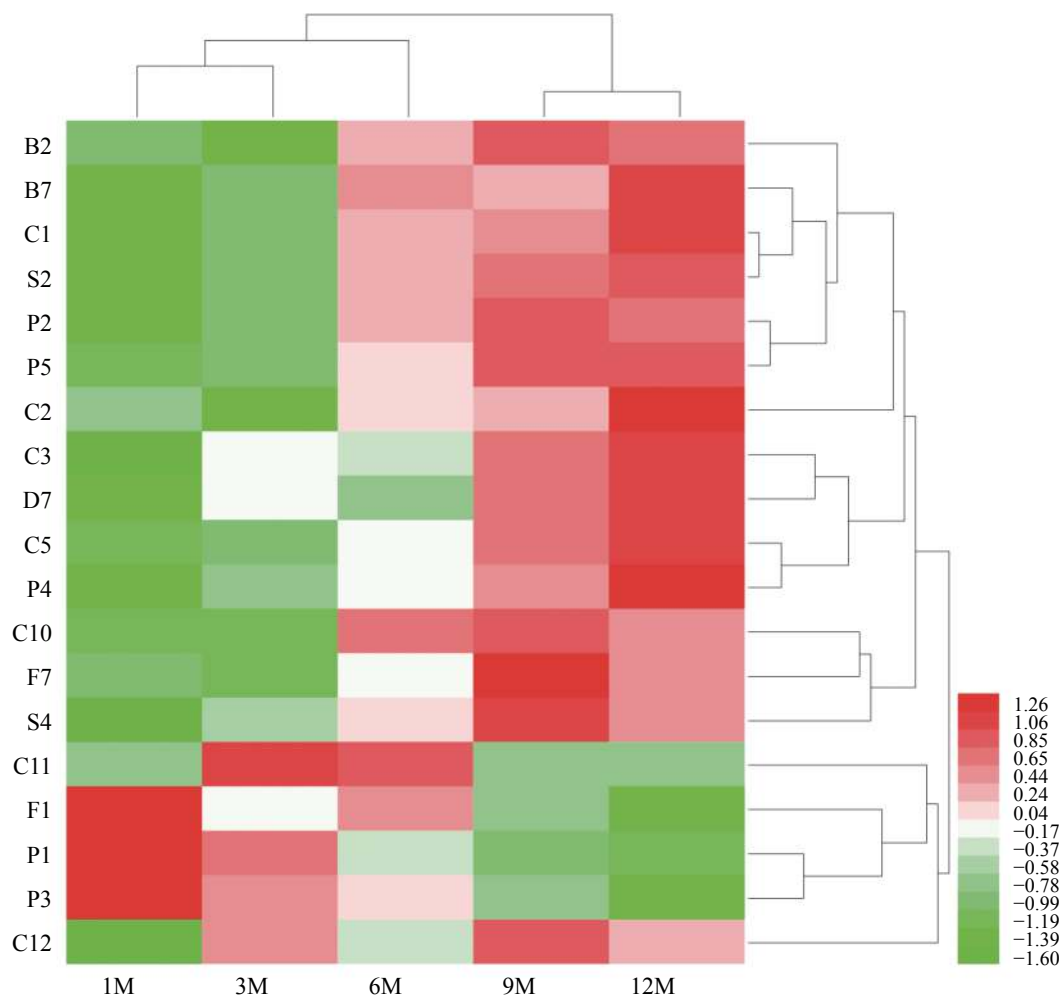


图 2 鱼露发酵过程主体呈香化合物与脂肪酸聚类分析热图

Fig. 2 Heat map of cluster analysis of aroma compounds and fatty acid during fish sauces fermentation

中主体风味贡献显著的风味物质(OAV>1), 其中大部分为饱和及不饱和醛类, 鱼露的主体特征风味可描述为蘑菇香味、土豆香味、麦芽香味、香草味、水果香味和鱼腥味。随着发酵时间的延长, 经过12个月发酵的鱼露样品整体感官香味更加浓郁, 味觉分布更加均匀, 庚醛和三甲胺等腥味化合物的含量明显下降, 风味更佳。鱼露中的脂肪酸主要分布范围为C15~C26, UFA的含量高达67.23%, 含量较高的脂肪酸有棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1n9)、亚油酸(C18:2 n6)、花生四烯酸(C20:4 n6)、亚麻酸(C18:3n3)、二十碳五烯酸(EPA, C20:5n3)和二十二碳六烯酸(DHA, C20:6n3)。随着发酵时间的延长, SFA和MUFA的总含量呈现上升的趋势, PUFA呈现下降的趋势, 其中风味相关较大的亚

油酸和亚麻酸变化较为显著。主体风味化合物与脂肪酸变化趋势存在着一定的线性关系, 证明脂肪酸是鱼露发酵过程中产生特征风味的重要前体物质。

参考文献:

- [1] Jiang J J, Zeng Q X, Zhu Z W, *et al.* Chemical and sensory changes associated Yu-lu fermentation process—a traditional Chinese fish sauce[J]. *Food Chemistry*, 2007, 104(4): 1629-1634.
- [2] Udomsil N, Chen S, Rodtong S, *et al.* Quantification of viable bacterial starter cultures of *Virgibacillus* sp. and *Tetragenococcus halophilus* in fish sauce fermentation by real-time quantitative PCR[J]. *Food Microbiology*, 2016, 57: 54-62.

- [3] Lee H W, Choi Y J, Hwang I M, *et al.* Relationship between chemical characteristics and bacterial community of a Korean salted-fermented anchovy sauce, *Myeolchi-Aekjeot*[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 73: 251-258.
- [4] 江津津,梁兰兰,林婉玲,等. 鱼露特征挥发性化合物的研究进展[J]. *水产学报*, 2017, 41(6): 984-992.
Jiang J J, Liang L L, Lin W L, *et al.* Research progress of characteristic volatile compounds of fish sauce[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(6): 984-992(in Chinese).
- [5] 杨远帆,陈申如,吴光斌,等. 鱼露风味成分的萃取及气相色谱分离条件的优化[J]. *食品科学*, 2008, 29(6): 346-349.
Yang Y F, Chen S R, Wu G B, *et al.* Extraction of fish sauce flavor compounds and optimization of gas chromatographic separation conditions[J]. *Food Science*, 2008, 29(6): 346-349(in Chinese).
- [6] Fukami K, Ishiyama S, Yaguramaki H, *et al.* Identification of distinctive volatile compounds in fish sauce[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(19): 5412-5416.
- [7] 吴帅,杨锡洪,解万翠,等. 鱼露的发酵新技术及风味改良研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2014, 40(10): 184-188.
Wu S, Yang X H, Xie W C, *et al.* Research progress on new technology for fermentation of fish sauce and improvement of its flavor[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2014, 40(10): 184-188(in Chinese).
- [8] Jiang J J, Zeng Q X, Zhu Z W. Analysis of volatile compounds in traditional Chinese fish sauce (Yu Lu)[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2011, 4(2): 266-271.
- [9] 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).
- [10] 高先楚,王锡昌,顾赛麒,等. 中华绒螯蟹性腺加热熟制前后挥发性成分和脂肪酸组成分析[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(9): 265-274.
Gao X C, Wang X C, Gu S Q, *et al.* Analysis of volatile components and fatty acids derived from *Eriocheir sinensis* gonad before and after cooking[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(9): 265-274(in Chinese).
- [11] Olivares-Rubio H F, Vega-López A. Fatty acid metabolism in fish species as a biomarker for environmental monitoring[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 218: 297-312.
- [12] Metcalfe L D, Schmitz A A, Pelka J R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 1966, 38(3): 514-515.
- [13] Folch J, Lees M, Sloane S G H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226(1): 497-509.
- [14] 冯云子. 高盐稀态酱油关键香气物质的变化规律及形成机理的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015.
Feng Y Z. The evolution and formation mechanism of key aroma compounds during the process of high-salt liquid fermentation soy sauce[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015 (in Chinese).
- [15] Frank D, Poole S, Kirchoff S, *et al.* Investigation of sensory and volatile characteristics of farmed and wild barramundi (*Lates calcarifer*) using gas chromatography-olfactometry mass spectrometry and descriptive sensory analysis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(21): 10302-10312.
- [16] Pérez-Palacios T, Petisca C, Melo A, *et al.* Quantification of furanic compounds in coated deep-fried products simulating normal preparation and consumption: Optimisation of HS-SPME analytical conditions by response surface methodology[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 1337-1343.
- [17] Giri A, Osako K, Ohshima T. Identification and characterisation of headspace volatiles of fish *miso*, a Japanese fish meat based fermented paste, with special emphasis on effect of fish species and meat washing[J]. *Food Chemistry*, 2010, 120(2): 621-631.
- [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.
- [19] 顾赛麒,王锡昌,陶宁萍,等. 顶空固相微萃取-气质联用及电子鼻技术检测中华绒螯蟹不同可食部位中的香气成分[J]. *食品科学*, 2013, 34(18): 239-244.
Gu S Q, Wang X C, Tao N P, *et al.* Analysis of aroma

- compounds from different edible parts of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) by HS-SPME-GC-MS and E-Nose[J]. Food Science, 2013, 34(18): 239-244(in Chinese).
- [20] 吴燕燕, 王悦齐, 李来好, 等. 基于电子鼻与HS-SPME-GC-MS技术分析不同处理方式腌干带鱼挥发性风味成分[J]. 水产学报, 2016, 40(12): 1931-1940.
Wu Y Y, Wang Y Q, Li L H, *et al.* Analysis of volatile components in various cured hairtail by electronic nose and HS-SPME-GC-MS[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(12): 1931-1940(in Chinese).
- [21] Feng Y Z, Cai Y, Su G W, *et al.* Evaluation of aroma differences between high-salt liquid-state fermentation and low-salt solid-state fermentation soy sauces from China[J]. Food Chemistry, 2014, 145: 126-134.
- [22] Feng Y Z, Cui C, Zhao H F, *et al.* Effect of *koji* fermentation on generation of volatile compounds in soy sauce production[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2013, 48(3): 609-619.
- [23] Sidira M, Kandylis P, Kanellaki M, *et al.* Effect of immobilized *Lactobacillus casei* on the evolution of flavor compounds in probiotic dry-fermented sausages during ripening[J]. Meat Science, 2015, 100: 41-51.
- [24] Wang Y, Jiang Y T, Cao J X, *et al.* Study on lipolysis-oxidation and volatile flavour compounds of dry-cured goose with different curing salt content during production[J]. Food Chemistry, 2016, 190: 33-40.
- [25] Wah T T, Walaisri S, Assavanig A, *et al.* Co-culturing of *Pichia guilliermondii* enhanced volatile flavor compound formation by *Zygosaccharomyces rouxii* in the model system of thai soy sauce fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 160(3): 282-289.
- [26] Sun S Y, Jiang W G, Zhao Y P. Profile of volatile compounds in 12 Chinese soy sauces produced by a high-salt-diluted state fermentation[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2010, 116(3): 316-328.
- [27] Lee S 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.
- [28] Steinhaus P, Schieberle P. Characterization of the key aroma compounds in soy sauce using approaches of molecular sensory science[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(15): 6262-6269.
- [29] Dincer T, Cakli S, Kilinc B, *et al.* Amino acids and fatty acid composition content of fish sauce[J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2010, 9(2): 311-315.
- [30] Elmore J S, Mottram D S, Enser M, *et al.* Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(4): 1619-1625.
- [31] Rai A K, Bhaskar N, Baskaran V. Bioefficacy of EPA-DHA from lipids recovered from fish processing wastes through biotechnological approaches[J]. Food Chemistry, 2013, 136(1): 80-86.
- [32] Wei Q Z, Wang H B, Lv Z J, *et al.* Search for potential molecular indices for the fermentation progress of soy sauce through dynamic changes of volatile compounds [J]. Food Research International, 2013, 53(1): 189-194.
- [33] Drumm T D, Spanier A M. Changes in the content of lipid autoxidation and sulfur-containing compounds in cooked beef during storage[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(2): 336-343.
- [34] Chung H, Choi A, Cho I H, *et al.* Changes in fatty acids and volatile components in mackerel by broiling[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2011, 113(12): 1481-1490.
- [35] Iglesias J, Medina I. Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1192(1): 9-16.

Analysis of volatile flavor components and fatty acids in fish sauces during fermentation by GC-MS

WANG Yueqi^{1,2}, LI Chunsheng², LI Laihao^{2*}, YANG Xianqing², CHEN Shengjun²,
WU Yanyan², ZHAO Yongqiang², WEI Ya²

(1. College of Food Science and Engineering, China Ocean University, Qingdao 266000, China;

2. Key Lab of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: In order to explore the differences of volatile components at different time points of fish sauce fermentation and the influence of fatty acids on the formation of flavor components, GC-MS techniques were applied to identify volatile flavor components and fatty acids in fish sauces during fermentation process. As a result of GC-MS analysis, 56 volatiles components that can be divided into 7 types were identified in fish sauce samples during different fermented time and further quantified based on internal standard analysis. And 12 kinds of key flavor compounds were selected as main aroma compounds, such as 3-Methylthiopropional. Therefore, the main characteristics flavors of fish sauces can be described as mushroom, potatoes, malt, vanilla, fruity and fishy flavors. The main distribution of fatty acids in fish sauce ranged for C15–C26, and the content of unsaturated fatty acid was high up to 67.23%. Moreover, the contents of linoleic acid and linolenic acid related to flavor changed significantly which were correlated with the changes of volatile compounds during fermentation. Accordingly, fatty acids were important precursor substances for characteristic flavor during fish sauces fermentation.

Key words: fish sauces; flavor; fatty acids; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); fermentation

Corresponding author: LI Laihao. E-mail: laihaoli@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31571869); China Agriculture Research System (CARS-47); Science and Technology Program of Guangzhou of China (201707010300); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (2015TS23)