

HS-SPME-GC-MS/O 联用分析酱油中的香气活性化合物

赵谋明, 蔡宇, 冯云子, 崔春, 赵海峰

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 通过顶空-固相微萃取 (HS-SPME) 和气相色谱-质谱/嗅闻技术 (GC-MS/O) 联用, 研究酱油的香气组成。GC-MS 共分离鉴定出酱油中挥发性化合物 109 种, 其中醇类物质含量最高, 占总挥发性化合物的 75.82%, 其次是醛类、酯类、酸类和呋喃 (酮) 类等。采用 GC-MS/O 鉴定出 39 种为香气活性物质, 其中, 3-甲基丁醛, 2-甲基丁醛, 2-甲基丙醛, 3-甲硫基丙醛, 乙醇, 4-羟基-2-乙基-5-甲基-3(2H)-呋喃酮 (HEMF), 苯乙醛, 1-辛烯-3-醇, 2-甲基丙酸乙酯, 2-甲基丁醇, 3-甲基丁醇, 二甲基三硫, 4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃酮 (HDMF), 乙酸和愈创木酚是 OAV 值大于 20 且香气强度评分大于 2 的关键香气活性物质, 它们为酱油整体香味贡献麦芽香, 烤土豆香味, 醇香, 焦糖香, 花香味, 蘑菇香味, 果香味, 洋葱味, 烟熏味等, 综合组成了酱油独特的发酵豆制品风味。

关键词: 酱油; 顶空-固相微萃取; 气-质联用; 气相色谱-嗅闻检测技术; 风味活性物质; 香气活性值

文章编号: 1673-9078(2014)11-204-212

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.036

Identification of Aroma-active Compounds in Soy Sauce by HS-SPME-GC-MS/O

ZHAO Mou-ming, CAI Yu, FENG Yun-zi, CUI Chun, ZHAO Hai-feng

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The aroma compositions of soy sauce were analyzed using headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME) combined with gas chromatography-mass spectrometry/olfactometry (GC-MS/O). A total of 109 volatile compounds were isolated and identified by GC-MS. Among them, alcohols were dominant (75.82%), followed by aldehydes, esters, acids, and furanones. Thirty-nine aroma-active compounds were identified by GC-MS/O. The key aroma-active compounds were 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 2-methylpropanal, 3-(methylthio)propanal, ethanol, 4-hydroxy-2-ethyl-5-methyl-3(2H)-furanone (HEMF), phenylacetaldehyde, 1-octen-3-ol, ethyl isobutyrate, 2-methylbutanol, 3-methylbutanol, dimethyl trisulfide, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF), acetic acid, and 2-methoxyphenol. Their odor activity values (OAVs) were above 20, and their aroma intensity scores were more than 2.0. They contribute malty, baked potato-like, alcoholic, caramel-like, floral, mushroom-like, fruity, onion-like, and smoky flavors to the overall flavor of soy sauce, constituting the unique aroma of fermented soy sauce.

Key words: soy sauce; headspace-solid-phase microextraction; gas chromatography-mass spectrometry; olfactometry; aroma-active compounds; odor activity value

酱油以大豆、豆粕、小麦、麸皮、水、盐为原料, 经米曲霉等微生物发酵酶解及酶促、非酶促褐变作用酿造而成。酱油起源于中国, 是东南亚地区的传统调味品, 以其独特的风味深受世界各地消费者的喜爱。据研究报道, 酱油中的风味成分有超过 300 种^[1], 高献礼等用固相微萃取 (SPME) 和直接溶剂萃取 (DSE)

收稿日期: 2014-04-17

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2013AA102106-02; 2012BAD34B03; 2012BAK17B11); 国家高技术研究发展计划 (SS2012AA022502; SS2013AA100106)

作者简介: 赵谋明 (1964-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为食品生物技术

方法共检测出传统中式酱油的 152 种挥发性化合物^[2], 严留俊和张艳芳等通过 SPME 法分别鉴定出日式酱油和低盐固态发酵酱油的 97 和 82 种挥发性化合物^[3-4]。

气相色谱-嗅闻检测技术 (GC-O) 以人的鼻子作为检测器, 能有效地在众多挥发性化合物中找到真正对食品风味有贡献的活性化合物, 因此, 近年来被广泛应用于食品研究中。其常用的前处理方法有同时蒸馏萃取法 (SDE)、直接溶剂萃取法 (DSE)、溶剂辅助蒸馏萃取法 (SAFE) 和顶空-固相微萃取法 (HS-SPME)。目前研究酱油风味活性物质多采用液体进样的方式, Steinhaus 等用 SAFE 与 GC-MS/O 联用, Kaneko 等通过大孔吸附树脂与溶剂萃取结合的方

法,分别鉴定出多种酱油的香气活性物质,包括3-甲基丁醛,3-羟基-4,5-二甲基-2(5H)-呋喃酮(sotolone),HEMF,HDMF,2-甲基丁醛,3-甲硫基丙醛,乙醇和异丁酸乙酯等^[5-7]。

然而,GC-MS液体进样时为了保护质谱不受过高浓度的溶剂损害,延迟质谱的检测时间,导致GC-MS谱图不完整及部分化合物的缺失。另外,溶剂萃取的过程易造成样品中部分低沸点组分的损失,且萃取需用大量有机溶剂,不环保,与之相比,HS-SPME无需溶剂,集采样、萃取、进样于一体,灵敏度高,选择性好,能够与气相色谱-质谱直接联用,方便快捷地分离鉴定食品中的风味物质^[3]。近年来已有学者通过SPME和GC-MS/O联用的方法测定豆酱、开心果和中草药等的风味活性化合物^[8-10]。

本文以市售酱油为原料,通过顶空-固相微萃取和气相色谱-质谱-嗅闻检测技术联用(HS-SPME-GC-MS/O),高效、准确、环保地分离鉴定酱油的风味活性物质,并对其进行定性、定量分析,通过比对GC-O实验结果与定量数据,确定其中的关键香气活性物质对酱油整体风味的贡献。

1 材料与方法

1.1 原料

市售日式酱油(龟甲万浓口大豆酱油)购于广州超市,储藏于4℃待测。

1.2 仪器

固相微萃取头,75 μm CAR/PDMS;气相色谱-质谱联用仪,DSQ II,美国Thermo公司;三合一自动进样器,ODO II嗅闻仪,澳大利亚SGE公司。

1.3 试剂

标准品:3-甲基丁醛、2-甲基丁醛、苯乙醛、3-甲基丁酸、3-甲硫基丙醛、2-乙酰基吡咯、异丁酸乙酯、HEMF购于Sigma(上海)有限公司;HDMF购于Fluka(上海)有限公司;3-甲基丁醇、2-甲基丁醇、1-辛烯-3-醇、苯乙醇、2-甲基丙醛、2-甲基丁酸、丁酸乙酯、异戊酸乙酯、苯甲酸乙酯、苯乙酸乙酯、4-乙基愈创木酚、二甲基硫醚、二甲基三硫、苯吡喃,2,5-二甲基吡嗪、2-乙基-3-甲基吡嗪和2,3,5-三甲基吡嗪购于阿拉丁试剂公司。其他试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 挥发性化合物的萃取

将8 mL酱油样品,20 μL内标(1.724 mg/L的2-甲基-3-庚酮甲醇溶液)以及1 g氯化钠加入20 mL顶空进样瓶中。45℃下保温平衡20 min后,用75 μm CAR/PDMS萃取头在45℃下萃取40 min,萃取结束后在GC进样口250℃下解析3 min。两个样品间萃取头270℃老化10 min,以防止样品间相互污染。

1.4.2 GC-MS 条件^[11]

样品分别通过TR-5ms弹性石英毛细色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)和TR-wax弹性石英毛细色谱柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm)进行分离;程序升温条件为起始温度40℃,以5℃每分钟升到120℃,保持2 min,再以7℃每分钟升至220℃,保持5 min;载气为高纯氦气(1.0 mL/min);分流比10:1。

质谱条件:电子轰击电离(EI)离子源,电子能量70 eV;电子倍增器电压350 V;离子源温度230℃;传输线温度250℃;质量范围35~350 m/z;扫描速度3.00 scans/s。

1.4.3 GC-O 分析方法

嗅闻仪以3 mL/min的氦气为载气,辅以水蒸气,缓解感官评价人员因鼻黏膜干燥而导致的不适,通过对嗅闻仪的传输管路加热以防止化合物在管路中冷凝。GC-O实验由三个有经验的感官评价人员完成,每名评价人员对每个样品至少嗅闻3次。感官评价人员在嗅闻过程中描述香气化合物的气味特征及强度(1=微弱的,可识别的味道;2=清晰,但不强烈的味道;3=强烈的味道),只有被两名以上的评价人员嗅闻到的化合物才能被确定为风味活性物质。

1.4.4 风味化合物的定性与定量

化合物的鉴定根据NIST08数据库,对比标准物质RI并参考相关文献完成,化合物的保留指数(Retention Index, RI)通过正构烷烃(C6-C26)计算得到。通过内标(2-甲基-3-庚酮)对酱油中所有挥发性香气物质进行半定量分析(响应因子=1),另外,采用GC-O嗅闻法鉴定出的酱油关键香气活性物质,用内标结合外标标准曲线法对其进行定量分析,方法参考冯云子等^[11],没有标准品的化合物用分子量相近、官能团相同、极性相似的化合物标准曲线进行计算。气相色谱-质谱数据使用Xcalibur软件(版本2.0)分析处理。

2 结果与讨论

2.1 酱油中风味化合物的鉴定及分析

通过HS-SPME-GC-MS方法分离鉴定出酱油中

风味化合物 109 种, 其中包括酸 (5 种)、醛 (8 种)、酮 (11 种)、酯 (19 种)、醇 (14 种)、酚 (6 种)、吡啶 (9 种) 呋喃酮 (15 种)、含硫化合物 (10 种) 及其他类 (12 种), 如表 1 所示。

表 1 酱油中的挥发性化合物组成及香气活性化合物分析

Table 1 Analysis of the composition of volatile compounds and aroma-active compounds in soysauce

保留时间/min	化合物	定量碎片/(m/z)	气味描述 ^a	文献描述 ^b	风味强度 ^c	相对峰面积 ^d	面积百分比%
酸 (5)							
14.68	乙酸	60	醋味	酸味 ^[5]	3.0	59.66	2.84
19.90	3-甲基丁酸	60	酸臭味	酸臭味 ^[12]	3.0	4.86	0.23
20.03	2-甲基丁酸	74				0.80	0.04
22.85	3-甲基戊酸	60	酸臭味	-	0.7	0.58	0.03
33.62	苯甲酸	105				12.91	0.62
	总和					78.80	3.76
醛 (8)							
1.42	2-甲基丙醛	72	麦芽香	麦芽香 ^[12]	2.0	19.09	0.91
1.81	2-甲基丁醛	57	麦芽香	麦芽香 ^[5]	2.0	55.59	2.65
1.84	3-甲基丁醛	44	麦芽香	麦芽香 ^[5]	2.0	62.43	2.98
4.11	反-2-甲基-2-丁烯醛	84				0.69	0.03
16.10	苯甲醛	105				4.18	0.20
18.93	苯乙醛	91	花香	蜂蜜香 ^[5]	3.0	12.50	0.60
25.79	2-苯基丁烯醛	117				0.44	0.02
28.51	5-甲基-2-苯基-2-己烯醛	117				0.19	0.01
	总和					155.12	7.39
酮 (11)							
2.31	2-戊酮	86				0.40	0.02
2.62	4-甲基-2-戊酮	58				0.24	0.01
4.74	4-甲基-2-己酮	43				1.04	0.05
5.44	5-甲基-2-己酮	43				2.25	0.11
7.10	3-甲基-3-戊烯-2-酮	55				0.77	0.04
8.44	6-甲基-2-庚酮	43				0.66	0.03
8.95	3-辛酮	43				1.12	0.05
9.20	2,3-辛二酮	99				0.11	0.01
10.25	1-羟基-2-丙酮	43				6.26	0.30
10.40	1-辛烯-3-酮	55	蘑菇味	蘑菇味 ^[19]	2.0	0.52	0.02
17.69	2-环戊烯-1,4-二酮	96				1.85	0.09
	总和					15.23	0.73
酯 (19)							
1.68	乙酸乙酯	61				33.88	1.62
2.13	丙酸乙酯	57				2.63	0.13
2.20	2-甲基丙酸乙酯	43	果香	果香 ^[5]	3.0	1.19	0.06
2.28	乙酸丙酯	61				0.15	0.01
2.70	乙酸异丁酯	43				4.68	0.22
3.03	丁酸乙酯	71	果香	果香 ^[12]	1.3	1.34	0.06
3.29	2-甲基丁酸乙酯	102				0.83	0.04

转下页

接上页

3.57	3-甲基丁酸乙酯	88	果香	果香 ^[12]	2.0	0.92	0.04
3.65	乙酸丁酯	43				1.78	0.08
4.91	乙酸异戊酯	43				1.44	0.07
6.66	2-甲基戊酸乙酯	88	果香	-	1.3	0.14	0.01
7.06	4-甲基戊酸乙酯	88	果香	果香 ^[12]	1.0	0.18	0.01
8.41	己酸乙酯	88				0.14	0.01
11.65	2-羟基丙酸乙酯	45				41.54	1.98
18.09	γ -戊内酯	56				1.65	0.08
19.50	苯甲酸乙酯	105	甜香	-	2.3	7.33	0.35
20.04	丁二酸二乙酯	101				8.87	0.42
22.36	苯乙酸乙酯	91	花香	花香 ^[12]	1.2	9.94	0.47
23.17	乙酸苯乙酯	104	花香	花香 ^[12]	2.0	1.46	0.07
	总和					120.09	5.72

醇 (14)

1.98	乙醇	45	酒味	酒味 ^[12]	2.0	1143.04	54.49
3.11	1-丙醇	59				1.48	0.07
4.18	2-甲基丙醇	43				12.85	0.61
5.70	1-丁醇	56				28.11	1.34
7.70	3-甲基丁醇	55	麦芽香	麦芽香 ^[5]	2.3	76.64	3.65
7.67	2-甲基丁醇	41	麦芽香	麦芽香 ^[5]	2.3	53.81	2.57
12.54	3-乙氧基-1-丙醇	58				0.46	0.02
13.29	3-辛醇	59				1.70	0.08
14.73	1-辛烯-3-醇	57	蘑菇味	蘑菇味 ^[12]	2	19.14	0.91
15.56	1,5-辛二烯-3-醇	57				9.97	0.48
16.91	(R,R)-2,3-丁二醇	45				47.30	2.25
17.83	meso-2,3-丁二醇	45				87.68	4.18
24.76	苯甲醇	79				0.86	0.04
25.48	苯乙醇	91	花香	花香 ^[5]	2.7	107.43	5.12
	总和					1590.48	75.82

酚 (6)

3.64	苯酚	94				0.65	0.03
24.33	愈创木酚	109	烟熏味	熏烤味 ^[12]	2.7	6.56	0.31
27.41	苯酚	94				1.32	0.06
27.78	4-乙基愈创木酚	137	烟熏味	熏烤味 ^[12]	2.7	8.62	0.41
30.15	4-乙基苯酚	107				1.60	0.08
30.42	4-乙基愈创木酚	150	烟熏味	烟熏味 ^[12]	2.8	2.27	0.11
	总和					21.02	1.00

含硫化合物 (10)

1.28	甲硫醚	62	臭味	-	1.0	0.68	0.03
3.52	二甲基二硫	94				1.04	0.05
12.04	二甲基三硫	126	刺激味	硫磺味 ^[12]	3.0	0.89	0.04
12.21	5-甲基-2-咪喃甲硫醇	95	金属味	-	3.0	0.76	0.04
14.44	3-甲硫基丙醛	48	土豆味	土豆味 ^[5]	3.0	1.98	0.09

转下页

接上页

15.22	糠基甲硫醚	81				0.21	0.01
17.30	3-甲硫基丙酸乙酯	74	甜香	果香 ^[12]	1.3	0.58	0.03
17.61	硫代己酸丁酯	99				5.20	0.25
20.77	3-甲硫基丙醇	106				4.20	0.20
29.26	3-苯基噻吩	160				0.34	0.02
	总和					27.06	0.76

吡嗪 (9)

9.30	甲基吡嗪	94				2.31	0.11
10.96	2,5-二甲基吡嗪	108				2.09	0.10
11.10	2,6-二甲基吡嗪	108	玉米味	坚果香 ^[12]	3.0	5.69	0.27
12.65	2-乙基-6-甲基吡嗪	122				1.90	0.09
13.25	三甲基吡嗪	122	巧克力香	焦香味 ^[12]	2.5	2.70	0.13
14.31	2-乙基-3,5-二甲基吡嗪	135	巧克力香	木头香 ^[12]	1.3	2.02	0.10
15.12	四甲基吡嗪	136				0.26	0.01
15.36	2-异丁基-3-甲基吡嗪	108				0.59	0.03
18.64	2-异戊基-6-甲基吡嗪	108				1.52	0.07
	总和					19.08	0.91

咪喃 (酮) (15)

1.37	咪喃	68				1.72	0.08
1.60	2-甲基咪喃	82				1.25	0.06
2.08	2,5-二甲基咪喃	96				1.20	0.06
10.01	甲酸糠酯	81	甜香	-	1.5	11.19	0.53
13.84	5-甲基-2(3H)-咪喃酮	98				0.27	0.01
14.85	糠醛	95				1.86	0.09
15.61	苯吡咪喃	118				0.64	0.03
15.82	2-乙酰基咪喃	95	熏烤香	烟熏味 ^[12]	1.0	1.76	0.08
17.51	2-丙酰咪喃	95				3.62	0.17
19.63	糠醇	98				10.34	0.49
20.59	3-甲基-2(5H)-咪喃酮	69				1.32	0.06
21.42	2(3H)-咪喃酮	55				2.32	0.11
24.08	3-苯基咪喃	144	甜香	-	2.7	2.02	0.10
27.95	4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)-咪喃酮 (HDMF)	128	焦糖香	焦糖香 ^[5]	2.5	2.96	0.14
28.45	4-羟基-5-乙基-2-甲基-3(2H)-咪喃酮 或 4-羟基-2-乙基-5-甲基-3(2H)-咪喃酮 (HEMF)	142	焦糖香	焦糖香 ^[5]	3.0	0.83	0.04
	总和					32.10	2.06

其他 (12)

6.93	柠檬烯	68				1.66	0.08
8.86	苯乙烯	104				0.87	0.04
14.69	未知 (135)	135	甜香	-	1.0	1.42	0.07
16.74	吡咯	67				2.50	0.12

转下页

接上页							
18.40	未知 (43,81,99)	81				3.49	0.17
20.91	茶酚	128				4.27	0.20
23.20	未知 (106)	106				1.36	0.06
26.40	3-羟基-2,6-二甲基-4H-吡喃-4-酮	69				1.24	0.06
26.63	3-羟基-2-甲基-4-吡喃酮 (maltol)	126	焦糖香	焦糖香 ^[5]	1.3	1.63	0.08
26.69	2-乙酰基吡咯	94	焦糖香	甜香 ^[12]	2.0	13.30	0.63
30.96	2-苯基吡啶	155				2.09	0.10
31.46	4-乙基-2-甲基吡咯	109				0.53	0.03
	总和					34.38	1.64

注: ^a GC-MSO 实验中感官评价人员对闻到气味的描述; ^b 参考文献中对该化合物的气味描述; ^c GC-MSO 实验中感官评价人员对闻到气味的强度评分; ^d 化合物峰面积与内标峰面积的比值。

风味化合物中醇类物质的含量最高, 占挥发性化合物总含量的 75.82%, 酱油中醇类物质一部分是酵母转化相关的醛类物质而生成, 另有部分源自氨基酸和糖类物质在有氧条件下的反应^[13]。在检出的 14 种醇类物质当中, 乙醇含量占 54.49%, 这与孙舒扬、严留俊等对高盐稀态酱油风味的研究结果类似^[3, 13]。一些杂醇类物质也具有风味活性, 如: 苯乙醇 (5.12%), 3-甲基丁醇 (3.65%) 和 2-甲基丁醇 (2.57%), 它们被认为是酱醪发酵过程中苯丙氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解产生的^[1], 本实验结果和 Steinhaus, Giri 等的相吻合^[5, 12]。另外, 2, 3-丁二醇的两个同分异构体共占了挥发性化合物总量的 6.43%, 曾经被认为是豆瓣酱和酱油的风味活性化合物^[8, 13], 然而在本实验中, 它们并没有被嗅闻到。

酱油中共检测出 8 种醛类物质, 其中 2-甲基丙醛 (0.91%), 2-甲基丁醛 (2.65%), 3-甲基丁醛 (2.98%) 和苯乙醛 (0.60%) 是香气活性物质。醛类物质是游离氨基酸在微生物作用下脱氨和去羧基反应生成, 也有研究认为醛类物质的生成与美拉德反应有关^[5, 14]。另外, 有 11 种酮类物质被检测出来, 只有 1-辛烯-3-酮被鉴定出具有香气活性, 其味道和 1-辛烯-3-醇一样, 都被认为是蘑菇香味。

酯类物质广泛存在于发酵食品中, 挥发性高且阈值通常较低, 极易被人的嗅觉感受器所感知, 因此对食品风味组成起着极其重要的作用^[8]。本文检测出 19 种酯类化合物 (5.72%), 仅次于醇类、醛类物质。乙酸乙酯 (1.62%), 乳酸乙酯 (1.98%) 是含量最高的两种酯类物质, 但并未被嗅闻到, 这可能与其中阈值 (5000 $\mu\text{g/L}$) 较高有关系。而部分阈值较低的酯类化合物, 如异丁酸乙酯 (0.06%)、丁酸乙酯 (0.06%)、异戊酸乙酯 (0.04%), 2-甲基戊酸乙酯 (0.01%), 4-

甲基戊酸乙酯 (0.01%), 苯乙酸乙酯 (0.47%) 和乙酸苯乙酯 (0.07%) 在 GC-O 实验中检出, 被描述为果香或花香味。乙酯类物质与酱油酿造中酵母发酵作用有密切关系, 酵母降解脂质产生大量醇和酸发生酯化反应, 日式酱油较长的低温发酵阶段及大量的酵母更促进了酯化反应的进程^[13]。

检出的五种酸类物质占酱油总挥发性化合物的 3.76%, 乙酸、3-甲基丁酸和 3-甲基戊酸都是具有香气活性的, 是酱油中酸味的重要贡献化合物, 多数豆类发酵食品如: 酱油、豆酱、腐乳等都会含有乙酸、3-甲基丁酸、2-甲基丁酸等, 并被认为对食品风味体系有酸味、奶酪味的贡献^[15]。

值得注意的是, 烟熏味和焦糖香是酱油风味组成的两类重要味道。以愈创木酚、4-乙基愈创木酚和 4-乙烯基愈创木酚为代表的烟熏味、熏烤味香气化合物在酱油中含量很低 (0.31%, 0.41%, 0.11%), 但这些酚类通常被认为是酱油中较为重要的香气物质^[4]。它们的香气强度评分 ≥ 2.7 , 为酱油贡献浓烈的烟熏香。酱油发酵过程降解木质素糖苷产生酚类物质, 而酿造酱油原料中的谷物麸皮则是木质素最大的来源, 多数研究认为, 甲氧基酚类贡献的烟熏味对酱油整体风味有积极作用, 且酱油加热能一定程度提升烟熏味^[3, 7]。而日式酱油中焦糖香的主要来源是 HEMF, HDMF, 2-乙酰基吡咯和 3-羟基-2-甲基-4-吡喃酮 (maltol)。本实验检出的 HDMF (0.14%), HEMF (0.04%), 2-乙酰基吡咯 (0.63%) 和 maltol (0.08%) 虽然峰面积比例很小, 但却有 1.3-3.0 的香气强度评分。HEMF 俗称酱油酮, 是酱油中最重要的风味活性物质, Steinhaus 等和 Kaneko 等采用芳香萃取物稀释分析法 (AEDA) 对酱油活性风味物质进行研究, HEMF 和 HDMF 的 FD 稀释因子均为最高^[5, 7]。酱油发酵过程中, HEMF

和 HDMF 主要通过乳酸菌磷酸戊糖途径由美拉德反应的某些中间产物转化而成^[14-15]。

含硫化合物在酱油中的含量很低 (0.76%)，但却对整体风味有很大影响。它们来自含硫氨基酸、肽等的降解^[13]，在水中的阈值很低，如 3-甲硫基丙醛 (1.4 μg/kg)，甲硫醚 (1.1 μg/kg)，二甲基三硫 (0.016 μg/kg)，含硫化合物通常会有土豆味、洋葱味、硫磺味等，多次在酱油、豆瓣酱等发酵食品中检测到^[13-14]，而甲硫醚和 5-甲基-2-呋喃甲硫醇是首次在酱油中被确认具有香气活性。吡嗪也是一类含量较低的物质 (0.91%)，检测到的 9 种吡嗪中，2, 6-二甲基吡嗪，三甲基吡嗪和 3-乙基-2,5-二甲基吡嗪呈现出玉米、巧克力般的味道，与文献报道的坚果香，焦香味类似^[12]。

2.2 酱油中风味活性物质的定量分析

香气活性值 (Odor activity value, OAV) 是评价香气化合物重要性的一个指标，GC-O 实验得到的结果很可能因为香气化合物之间的相互作用或者食品基质的影响而产生误差，而 OAV 值通过计算化合物浓度和在该食品体系中阈值的比值，可以消除这一误差。一般认为，OAV 值大于 1 则对样品香气组成有贡献，OAV 值越大，该香气化合物贡献越大。酱油的主要成分是水，故本文通过香气化合物的定量数据和文献报道该物质在水中的阈值计算关键香气组分的 OAV 值，结果如表 2 所示。

表 2 酱油中香气活性物质浓度及其香气活性值

Table 2 Concentrations and OAVs of the aroma-active compounds in soysauce

香气活性物质	浓度/(μg/L)	阈值 ^a /(μg/L)	OAV 值
3-甲基丁醛	2658.23	1.2 ^[5]	2215
2-甲基丁醛	3388.92	4.4 ^[5]	770
2-甲基丙醛	2459.14	4.4 ^[16]	559
3-甲基戊酸	455.61	0.886 ^[17]	514
3-甲硫基丙醛	676.62	1.4 ^[12]	483
4-甲基戊酸乙酯	1.05	0.003 ^[18]	351
乙醇	14690068.09	100000 ^[5]	147
4-羟基-2-乙基-5-甲			
基-3(2H)-呋喃酮	2536.32	20 ^[5]	127
(HEMF)			
苯乙醛	369.02	4 ^[5]	92
甲硫醚	86.15	1.1 ^[12]	78
1-辛烯-3-醇	105.50	1.5 ^[14]	70
2-甲基丙酸乙酯	4.33	0.1 ^[5]	43
2-甲基丁醇	12603.54	320 ^[19]	39

3-甲基丁醇	31321.34	1000 ^[19]	31
二甲基三硫	2.95	0.1 ^[14]	29
4-羟基-2,5-二甲基			
-3(2H)-呋喃酮	675.18	25 ^[5]	27
(HDMF)			
乙酸	451025.66	22000 ^[5]	21
3-甲硫基丙酸乙酯	181.42	8.5 ^[12]	21
愈创木酚	193.81	9.5 ^[12]	20
4-乙基愈创木酚	27.05	3 ^[14]	9
苯乙醇	2861.15	390 ^[12]	7
丁酸乙酯	5.68	1 ^[19]	6
3-羟基-2-甲基-4-吡			
喃酮(maltol)	13294.93	2500 ^[20]	5
4-乙基愈创木酚			
	247.92	50 ^[14]	5
2-乙基-3,5-二甲基吡			
嗪	31.48	7.5 ^[9]	4
1-辛烯-3-酮			
	3.51	1 ^[19]	4
3-甲基丁酸乙酯	5.49	3 ^[12]	2
3-甲基丁酸	1501.16	1200 ^[5]	1
2-乙酰基吡咯	1311.09	1000 ^[21]	1
2,6-二甲基吡嗪	653.52	1500 ^[20]	<1
2-甲基丁酸	539.66	1200 ^[14]	<1
三甲基吡嗪	124.20	297 ^[12]	<1
苯乙酸乙酯	38.37	650 ^[22]	<1
苯甲酸乙酯	18.82	53 ^[23]	<1
乙酸苯乙酯	6.87	249.6 ^[12]	<1
3-苯基呋喃	3.68	5.9 ^[14]	<1
5-甲基-2-呋喃甲硫			
醇	60.78	-	
甲酸糠酯			
	60.32	-	
2-乙酰基呋喃	9.88	-	
2-甲基戊酸乙酯	0.81	-	

注：- 表示查询不到该化合物在水中阈值；^a 指文献报道该化合物在水中的阈值

从表 2 可知，3-甲基丁醛 (OAV=2215)，2-甲基丁醛 (OAV=770) 和 2-甲基丙醛 (OAV=559) 是风味活性物质中香气活性值最高的，它们都是贡献强烈麦芽香的醛类物质。前人对日本酱油和两种中式酱油的风味研究结果均表明，3-甲基丁醛是其中 OAV 值最高的香气化合物^[5, 11]。实验发现，3-甲基丁醛和 2-甲基丁醛是共流出组分，保留时间十分相近，GC-O 实验中一般只能嗅闻到一个浓烈的麦芽香气，但由于它们的 OAV 值均大于 700，所以认为 3/2-甲基丁醛都是对酱油特征香气有重要贡献的化合物。

此外，本文还检测出 5 种 OAV 值大于 90 的化合

物, 分别是 3-甲基戊酸 (酸臭味, OAV=514), 3-甲硫基丙醛 (土豆味, OAV=483), 4-甲基戊酸乙酯 (果香, OAV=351), 乙醇 (醇味, OAV=147), HEMF (焦糖香, OAV=127) 和苯乙醛 (花香, OAV=92)。其中 3-甲硫基丙醛、HEMF 均多次被报道在酱油中检出, 是酱油的关键风味化合物^[5, 11], 与本研究结果相符, 这两个化合物不仅具有较大的 OAV 值, 且 GC-O 嗅闻评分均为 3 分。同时, 乙醇在本研究中被鉴定为 OAV=147 的重要香气活性化合物, 但前人的研究中少有涉及, 原因可能是之前的研究普遍采用液体进样的方法, GC-O 实验过程为避免有机溶剂峰对感官评价人员健康造成不良影响而错过了乙醇峰的流出。3-甲基戊酸在本实验中被描述为酸臭味, 而此前它在低盐固态酱油中被认为具有酸香或青草香^[11], 4-甲基戊酸乙酯则首次在酱油中被检出具有香气活性, 这两个物质都是阈值极低的化合物。本实验中检出苯乙醛的 OAV=92, 这与 Steinhaus 等对日本酱油的研究结果相近^[5], 但却两倍高于冯云子等对中式高盐稀态酱油的研究结果^[11], 苯乙醛在嗅闻实验中评分为 3 分, 其代表的花香是日式酱油的重要风味组成之一。

有意思的是, 三甲基吡嗪 (巧克力香), 2, 6-二甲基吡嗪 (玉米味), 苯甲酸乙酯 (甜香), 苯乙酸乙酯 (花香), 乙酸苯乙酯 (花香) 和 3-苯基呋喃 (甜香) 的 OAV<1, 但它们的香气强度评分均大于 1。香气活性值分析与 GC-O 实验结果有一定差异, 该现象也在此前的研究中出现过^[24]。原因可能是化合物在水中的阈值与其在酱油体系中的阈值有一定偏差, 也或许因为香气化合物在食品基质中的协同与拮抗作用, 这些 OAV<1 的化合物能被感官评价人员闻见很可能是因为某些其他化合物的协同作用^[24]。另外, 根据史蒂文斯定律, 每个香气化合物对感官的刺激与其浓度的关系均可以描绘为一条独特的 S 型曲线, 刺激量并不简单地随浓度增大而增强, 因此, OAV 值只能在一定程度辅证 GC-O 实验的结果^[24-25]。

3 结论

3.1 本研究通过 HS-SPME 的方法萃取酱油的风味物质, 并采用 GC-MS 和 GC-O 联用的方法分离鉴定出 109 种挥发性香气化合物, 其中 39 种为香气活性化合物。酱油中香气物质共分为 11 类, 其中醇类 (75.82%), 醛类 (7.39%), 酯类 (5.72%), 酸类 (3.76%), 呋喃 (酮) 类 (2.06%), 酚类 (1.00%), 吡嗪类 (0.91%), 酮类 (0.73%), 含硫化合物类 (0.76%) 和其他类 (1.64%)。

3.2 此外, 通过香气活性值 (OAV) 的计算, 39 种

风味活性物质中有 29 种 OAV>1。香气强度评分大于 2, 且 OAV 值大于 20 的 15 个香气活性化合物按照 OAV 值从大到小依次排序是: 3-甲基丁醛, 2-甲基丁醛, 2-甲基丙醛, 3-甲硫基丙醛, 乙醇, HEMF, 苯乙醛, 1-辛烯-3-醇, 2-甲基丙酸乙酯, 2-甲基丁醇, 3-甲基丁醇, 二甲基三硫, HDMF, 乙酸和愈创木酚。OAV 值高的香气物质为酱油整体香味贡献出麦芽香、烤土豆香味, 醇香, 焦糖香, 花香味, 蘑菇香味, 果香味, 洋葱味, 烟熏味等, 它们综合组成了酱油独特的发酵豆制品风味。

参考文献

- [1] 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
- [2] Gao X L, Zhao H F, Zhao M M, et al. Comparative study on volatile flavor compounds of traditional Chinese-Type soy sauces prepared with soybean and defatted soy meal [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2009, 18(6): 1447-1458
- [3] Yan L J, Zhang Y F, Tao W Y, et al. Rapid determination of volatile flavor components in soy sauce using head space solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2008, 26(3): 285-291
- [4] Zhang Y F, Tao W Y. Flavor and taste compounds analysis in Chinese solid fermented soy sauce [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8(4): 673-681
- [5] 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
- [6] Kaneko S, Kumazawa K, Nishimura O. Comparison of key aroma compounds in five different types of Japanese soy sauces by aroma extract dilution analysis (AEDA) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(15): 3831-3836
- [7] 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
- [8] Zhao J X, Dai X J, Liu X M, et al. Comparison of aroma compounds in naturally fermented and inoculated Chinese soybean pastes by GC-MS and GC-Olfactometry analysis [J]. *Food Control*, 2011, 22(6): 1008-1013

- [9] Aceña L, Vera L, Guasch J, et al. Determination of roasted pistachio (*Pistacia vera* L.) key odorants by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-olfactometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(6): 2518-2523
- [10] Choi H S, Min K C. Aroma-active compounds of *Elsholtzia splendens* using AEDA and HS-SPME-GC-O dilution analysis [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2008, 23(1): 58-64
- [11] 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
- [12] Giri A, Osako K, Okamoto A, et al. Olfactometric characterization of aroma active compounds in fermented fish paste in comparison with fish sauce, fermented soy paste and sauce products [J]. Food Research International, 2010, 43(4): 1027-1040
- [13] 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
- [14] Dragone G, Mussatto S I, Oliveira J M, et al. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation [J]. Food Chemistry, 2009, 112(4): 929-935
- [15] 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
- [16] 孙宝国.食用调香术[M].北京:化学工业出版社,2003
SUN Bao-guo. Food perfumery technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003
- [17] 刘玉平,尹德才,李宁,等.甲基戊酸的甲基位置对其香气强度的影响[J].食品科学,2010,20:69
LIU Yu-ping, YIN De-cai, LI Ning, et al. Effect of methyl position on aroma intensity of methylvaleric acids [J]. Food Science, 2010, 31(20): 325-328
- [18] Fritsch H T, Schieberle P. Identification based on quantitative measurements and aroma recombination of the character impact odorants in a bavarian pilsner-type beer [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(19): 7544-7551
- [19] Buettner A, Schieberle P. Evaluation of aroma differences between hand-squeezed juices from Valencia late and Navel oranges by quantitation of key odorants and flavor reconstitution experiments [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(5): 2387-2394
- [20] Buttery R G, Ling L C, Stern D J. Studies on popcorn aroma and flavor volatiles [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(3): 837-843
- [21] 刘建彬,刘梦娅,何聪聪,等.应用AEDA结合OAV值计算鉴定可可液中关键气味活性化合物[J].食品与发酵工业,2013, 39(9):180-184
LIU Jian-bin, LIU Meng-ya, HE Cong-cong, et al. Identification of key aroma-active compounds in coco mass by AEDA and OAV calculation [J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(9): 180-184
- [22] Pino J A, Queris O. Analysis of volatile compounds of pineapple wine using solid-phase microextraction techniques [J]. Food Chemistry, 2010, 122(4): 1241-1246
- [23] Steinhaus M, Sinuco D, Polster J, et al. Characterization of the key aroma compounds in pink guava (*Psidium guajava* L.) by means of aroma re-engineering experiments and omission tests [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(7): 2882-2888
- [24] Pang X L, Guo X F, Qin Z H, et al. Identification of aroma-active compounds in Jiashi muskmelon juice by GC-O-MS and OAV calculation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(17): 4179-4185
- [25] Nuzzi M, Scalzo R L, Testoni A, et al. Evaluation of fruit aroma quality: comparison between gas chromatography-olfactometry (GC-O) and odour activity value (OAV) aroma patterns of strawberries [J]. Food Analytical Methods, 2008, 1(4): 270-282