

## 云南不同发酵年份宣威火腿挥发性风味物质和代谢物差异分析

秦宇, 李雯雯, 张贝贝, 张文文, 曹建新, 李莉蓉\*

(昆明理工大学食品科学与工程学院 昆明 650500)

**摘要** 云南宣威火腿独特的风味与其自然发酵的时间和产生的丰富代谢物质有关。采用顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱联用技术和非靶向代谢组学技术,探究自然发酵 2 年和 3 年的宣威火腿的挥发性风味物质和代谢物的差异。对不同发酵年份的宣威火腿进行挥发性风味物质的鉴定结果显示,共鉴定出 59 种挥发性风味物质,其中有 30 种为发酵 2 年和 3 年宣威火腿共有的挥发性风味物质。气味活度值(OVA) $\geq 1$  的有 17 种挥发性化合物为宣威火腿的特征风味化合物,大部分特征风味化合物属于醛类、醇类。代谢物的多变量分析显示,不同年份宣威火腿的代谢物多样性和表达模式存在差异,共鉴定出 290 种显著差异代谢物,其中氨基酸、肽和类似物含量最高,共有 52 种(20.63%),其次为脂肪酸及其结合物,有 16 种。KEGG 通路分析表明,不同发酵年份火腿代谢物涉及氨基酸代谢和脂质代谢通路的代谢物最多,分别为 21 种和 14 种。本研究揭示了不同发酵年份宣威火腿挥发性风味物质和代谢物的差异,可为宣威火腿发酵品质区分和品质提升奠定基础。

**关键词** 宣威火腿; 挥发性风味物质; 发酵; 代谢组学; 代谢通路

**文章编号** 1009-7848(2024)12-0351-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.12.032

宣威火腿是中国著名的干腌火腿之一,产地为云南省宣威市,因其特有的外观、香气和滋味,被列为中国四大名腿之一<sup>[1]</sup>。宣威火腿的传统加工工艺主要包含切割整形、上盐腌制、堆码翻压、晾晒整形、上挂风干、发酵管理和收纳储藏<sup>[2]</sup>。火腿的风味一直是其重要的感官品质之一。不同地区的气候、地理环境、猪品种和制造过程决定了干腌火腿产品的最终品质特征<sup>[3]</sup>。发酵时间不同,火腿的挥发性风味物质在组成和含量上也会存在差异<sup>[4]</sup>。火腿在发酵过程中会发生一系列复杂的生化反应和酶促反应,如蛋白质降解、脂质氧化、糖酵解、美拉德反应等,这些复杂的反应可产生多种挥发性风味物质,包括醛、醇和酮<sup>[5]</sup>。Munoz-Rosique 等<sup>[6]</sup>研究发现脂质水解和氧化是影响干腌火腿特征风味和品质等级的关键因素。Deng 等<sup>[7]</sup>对不同发酵年份的金华火腿进行风味分析,发现贮藏 3 年的金华火腿品质最佳,火腿成熟后的特征风味物质主要为壬醛和己醛。Wang 等<sup>[8]</sup>采用微波辅助萃取法结合溶剂辅助风味蒸发法分析金华火腿、宣威火

腿和如皋火腿 3 种火腿的挥发性风味物质差异,其中宣威火腿的特异性优势挥发性物质为二氢-2-羟基-3(11H)-咪喃酮和己醛。Jiang 等<sup>[9]</sup>采用单片材料吸附萃取和 GC-MS 对云南 4 种干腌火腿(宣威、诺邓、三川和撒坝)的挥发性化合物进行表征,结果显示 2-甲基丁醛、己醛、6,1-二甲基吡嗪、3-辛烯-1-醇、二甲基三硫化物和壬醛是云南干腌火腿中最重要的香气活性化合物。不同发酵年份的宣威火腿风味各具特色,通过解析它们的关键风味物质,可以揭示不同发酵年份宣威火腿风味品质差异的物质基础。

火腿的特有风味还与原料中的蛋白质、脂肪等组分氧化分解产生的多种非挥发性物质有关,复杂的代谢物对火腿最终风味非常重要。通过非靶向代谢组学对生物体内所有小分子代谢物进行定性、定量分析,可以发现代谢物的种类/数量及其变化规律,目前该方法已应用于多种传统发酵肉制品的品质研究<sup>[9]</sup>。Mu 等<sup>[10]</sup>用高通量测序结合非靶向代谢组学研究贵州省盘县火腿自然发酵过程中微生物与代谢产物的关系,从盘县火腿中鉴定出 31 种显著差异代谢物,这些代谢物主要参与丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、精氨酸和脯氨酸代谢。研究发现,变质火腿中的肌原纤维蛋白,包括肌动蛋白、肌钙蛋白 T 和肌

收稿日期: 2023-12-23

基金项目: 云南省科技厅科技计划项目(202202AG050009);  
云南省兴滇英才支持计划项目(KKRD202023026)

第一作者: 秦宇,男,硕士生

通信作者: 李莉蓉 E-mail: lilirong-lily@126.com

球蛋白可通过嘌呤代谢和嘧啶代谢分解为氨基酸衍生物和寡肽,它们是新鲜火腿变质火腿的关键成分<sup>[1]</sup>。

目前,关于不同发酵时期宣威火腿中挥发性风味物质及代谢物变化的研究较少,对宣威火腿的研究主要集中在火腿的营养成分以及和不同品种火腿挥发性风味物质差异的比较方面<sup>[2]</sup>。本研究采用HS-SPME-GC-MS方法鉴定云南不同发酵年份宣威火腿的挥发性风味物质,根据气味活度值(Odor Activity Value, OAV, OAV值>1)筛选关键特征性风味化合物,并对不同发酵时间火腿风味化合物的组成和含量进行比较。通过非靶向代谢组学分析不同发酵年份宣威火腿代谢物的多样性和表达模式,基于KEGG和HMDB数据库对差异代谢物进行分类鉴定和代谢通路富集分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

试验所用发酵2年宣威火腿(XW2yr)、发酵3年宣威火腿(XW3yr),购买于云南省宣威市,风味物质分析样品保存在-40℃冰箱,代谢物分析样品置于冻存管中储存于-80℃冰箱保存。其中挥发性风味物质分析样品不同年份火腿设置3个重复,代谢物分析样品每组设置6个重复。4-甲基-1-戊醇标准品(CAS:626-89-1,分析纯),购自美国Sigma公司;其它试剂均为分析纯。

### 1.2 主要设备与仪器

Centrifuge 5430R 冷冻离心机, Eppendorf; SBL-10TD 控温超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Wombio-96c 多样品冷冻研磨仪, 上海万柏生物科技有限公司; LNG-T88 台式快速离心浓缩干燥器, 太仓市华美生化仪器厂; GCMS 8890-7000D 气质联用仪, 美国安捷伦公司; JXDC-20 氮气吹扫仪, 上海净信事业发展有限公司; Vanquish Horizon system UHPLC 液相色谱系统, 美国赛默飞世尔(Thermo)科技公司; Q-Exactive HF-X 质谱仪, 美国赛默飞世尔(Thermo)科技公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 挥发性风味物质的测定 取2g火腿样品,加入5mL内标溶液(25%氯化钠,0.4mg/L 4-甲

基-1-戊醇),10000 r/min 匀浆30s。匀浆后装入进样瓶,密封后保存在-40℃。测试前将样品恢复至室温,再放入顶空固相微萃取加热器中,150 r/min,65℃预热20min,再以150 r/min,65℃萃取50min。萃取完毕后收纳针头待用。

GC-MS分析条件:GC条件:安捷伦HP-5MS气相色谱柱(30m×0.25mm,0.25μm),进样口温度250℃,进样时间5min;程序升温设定为4℃/min的速率升至150℃,然后以8℃/min的速率升至230℃;载气(N<sub>2</sub>)流速1mL/min,分流比:30:1。MS条件:离子源温度230℃,传输线温度为250℃,电子能量设定为70eV,扫描范围27~350m/z,溶剂延迟5min,质谱仪以SCAN模式操作。将获得的GC-MS谱图使与美国国家标准与技术图书馆(NIST)光谱库进行比对搜索,选择结果中相似度≥80%的化合物进行定性分析<sup>[3]</sup>;使用4-甲基-1-戊醇作为内标物进行半定量分析,公式如下:

$$W_{物} = \frac{A_{物} \times W_{内}}{A_{内}} \quad (1)$$

式中:W<sub>物</sub>为挥发性化合物的含量(μg/100g);W<sub>内</sub>为内标物的含量(μg/100g);A<sub>物</sub>为挥发性化合物的峰面积;A<sub>内</sub>为内标物的峰面积。

用气味活度值(Odor Activity Value, OAV)来判定所测定的宣威火腿风味物质中的主要活性物质<sup>[4]</sup>。根据文献中不同挥发性化合物在水中的阈值(μg/mg),然后根据定量结果计算每种化合物的OAV。公式如下:

$$OAV = \frac{W_{物}}{OT_{物}} \quad (2)$$

式中:OAV为挥发性化合物的气味活度值;W<sub>物</sub>为挥发性化合物的含量(μg/100g);OT<sub>物</sub>为挥发性化合物的气味阈值。

1.3.2 代谢组处理 精确称取50mg样品至2mL离心管中,加入研磨珠,加入400μL提取液(甲醇:水=4:1),使用冷冻组织研磨仪在-10℃,50Hz条件下研磨6min,然后在5℃、40kHz下低温超声提取30min,在-20℃条件下静置30min最后在13000 r/min,4℃下离心15min,移取上清液至带内插管的进样小瓶中上机分析。

使用赛默飞公司的超高效液相色谱串联傅里叶变换质谱UHPLC-Q Exactive HF-X系统进行

LC-MS 检测。色谱条件:ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.8 μm; 沃特世, 米尔福德, 美国) 色谱柱; 流动相 A 为 95% 水和 5% 乙腈 (含 0.1% 甲酸), 流动相 B 为 47.5% 乙腈、47.5% 异丙醇和 5% 水 (含 0.1% 甲酸), 进样量为 3 μL, 柱温为 40 °C。洗脱梯度条件: 正离子模式: 0~3 min, 100%~80% A; 3~4.5 min, 80%~65% A; 4.5~5 min, 65%~0% A; 5~6.3 min, 0%~0% A; 6.3~6.4 min, 0%~100% A; 6.4~8 min, 100%~100% A; 负离子模式: 0~1.5 min, 100%~95% A; 1.5~2 min, 95%~90% A; 2~4.5 min, 90%~70% A; 4.5~5 min, 70%~0% A; 5~6.3 min, 0%~0% A; 6.3~6.4 min, 0%~100% A; 6.4~8 min, 100%~100% A。质谱参数: 鞘气流速 50 m<sup>3</sup>/s; 辅助气流速 13 m<sup>3</sup>/s; 正、负离子电离均使用电喷雾离子源 (ESI), 正、负离子喷雾电压均为 3.50 kV; 毛细管温度 325 °C; 碰撞能 240.06 keV; 在分辨率为 6 000 下进行全扫描, 扫面范围: 70~1 050 *m/z*。

将原始数据导入代谢组学处理软件 Progenesis QI (Waters Corporation, Milford, USA) 进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐等, 最终得到含保留时间、质荷比和峰强度等信息的数据矩阵。然后将 MS 和 MS/MS 质谱信息与人类代谢组数据库 (HMDB, Human Metabolome Database) 和京都基因和基因组百科全书 (KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 进行匹配, MS 质量误差设置为小于 10<sup>-6</sup>, 同时根据二级质谱匹配得分鉴定代谢物。

将代谢物原始数据进行缺失值过滤、模拟、数据归一化、QC 验证和数据转换。使用 ropls 软件进行代谢物样品比较分析。用 scipy 进行聚类分析和相关性分析和聚类分析以及通路富集分析。用 KEGG Compound 进行 KEGG 化合物分类, KEGG Pathway 进行 KEGG 功能通路分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同年份宣威火腿挥发性风味物质

如图 1 所示, 从不同发酵年份的宣威火腿中共鉴定出 59 种挥发性风味物质, 其中 30 种为不同年份火腿共有风味物质。从发酵 2 年的宣威火腿鉴定出种类最多的物质为醇类物质, 有 12 种, 发酵 3 年的宣威火腿中鉴定出 12 种酸类和醛类

化合物 (图 1a)。不同发酵时间的宣威火腿在挥发性风味物质多样性和表达模式上存在差异, 发酵 2 年宣威火腿相对含量较高的风味物质为醛类 (51.64%) 和醇类 (16.92%), 发酵 3 年宣威火腿相对含量较高的风味物质为醛类 (24.42%)、酸类 (24.78%) (图 1d)。Wang 等<sup>[18]</sup>用 GC-MS 比较宣威、金华和如皋火腿挥发性风味物质的差异, 在宣威火腿中鉴定出 35 种挥发物, 其中检测到的醛类 (10 种) 和酸类种类较多 (10 种)。Deng 等<sup>[7]</sup>在干腌火腿中共鉴定出 61 种化合物, 其中醛类是主要组成物质, 相对含量最高的醛是己醛。

研究表明 OAV ≥ 1 的挥发性化合物可能是火腿风味的主要贡献者<sup>[18]</sup>, 通过查询挥发物阈值并计算 OAV, 宣威火腿中的挥发性风味物质含量及 OAV 值见表 1。筛选出的 OAV 值 ≥ 1 挥发性关键风味化合物大部分属于醛类、醇类, 从宣威火腿中共鉴定出 17 种特征风味化合物, 异戊醇、壬醛、己醛和 3-羟基-2-丁酮是发酵 2 年宣威火腿独有的风味物质, 其中异戊醇的 OAV 值最大, 为 17.75; 异戊酸、正戊醇、2-甲基丁醛和壬酸是发酵 3 年宣威火腿独有的挥发性风味物质, 其中异戊酸的 OAV 值最高, 为 1.77。通常醛类物质香气阈值较低, 是火腿挥发性风味的主要贡献者。火腿中的反-2-辛烯醛可为火腿贡献脂肪味, 庚醛和辛醛具有令人愉快的肉味<sup>[19]</sup>以及青草香和果香<sup>[20]</sup>, 己醛可能有助于火腿产生令人愉悦的香草味<sup>[21]</sup>, 壬醛具有甜味和果味<sup>[22]</sup>。苯乙醛、苯甲醛可参与 Strecker 反应和美拉德反应的芳香族氨基酸降解, 分别提供肉香和花香<sup>[23]</sup>。随着发酵时间的延长, 脂肪氧化和水解会产生酮类、酸类、醇类和醛类物质, 使发酵 3 年火腿比发酵 2 年火腿酸类和酮类的相对含量升高。与伊比利亚火腿研究结果相似, 宣威火腿中鉴定出许多醛类、醇类和酮类物质<sup>[24]</sup>。在火腿发酵和成熟过程中, 由于脂质氧化和蛋白质降解, 酸类、醇类会不断积累<sup>[25]</sup>。火腿中的直链醛、烯醛和二醛来自于不饱和脂肪酸氧化形成的过氧化物的裂解<sup>[26]</sup>。醇类通常是火腿草本、木质和脂肪味香气的关键贡献者, 如 1-辛烯-3-醇是肉制品中常见的化合物, 具有强烈的蘑菇香气<sup>[27]</sup>, 2-庚酮与烧肉香气的风味特征有关<sup>[28]</sup>, 2-戊酮可以产生苹果味<sup>[29]</sup>。不同发酵年份宣威火腿挥发性风味物质的

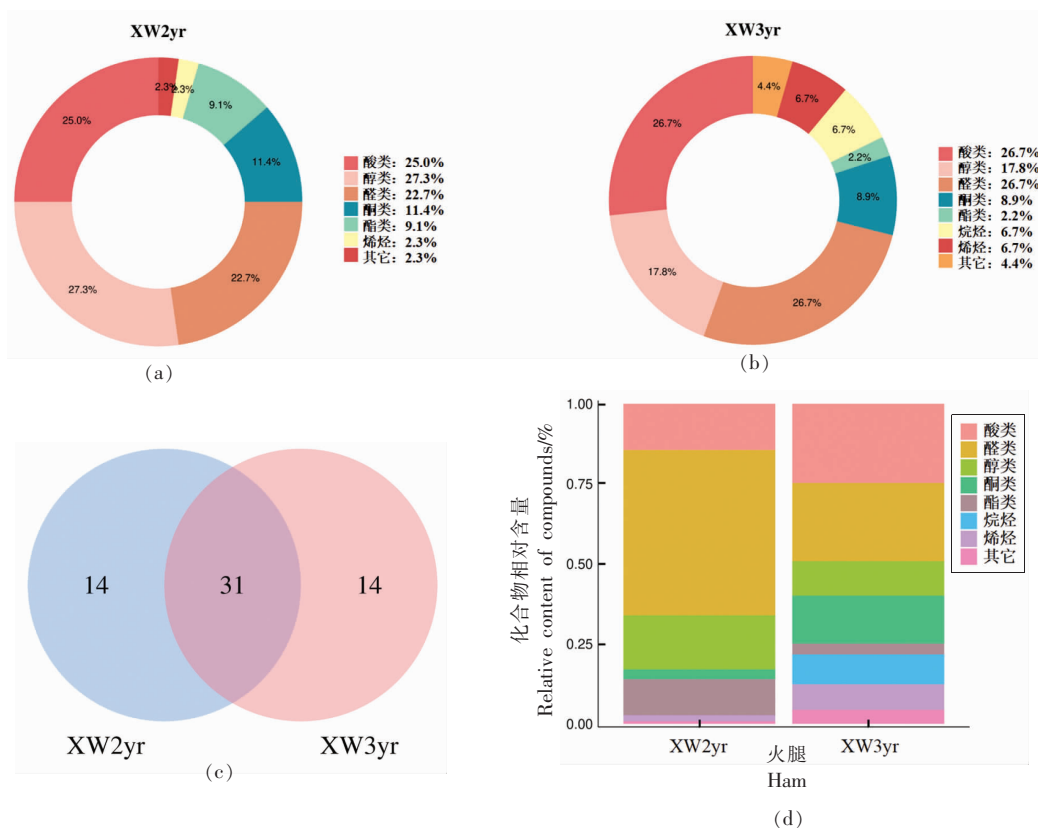


图1 不同发酵年份宣威火腿挥发性风味物质种类统计(a)、(b)以及维恩图(c)和挥发性风味物质相对含量(d)  
Fig.1 Statistical analysis of volatile flavor compounds in Xuanwei ham from different fermentation years (a), (b), as well as Venn plot (c) and relative content of volatile flavor compounds (d)

表1 不同发酵年份宣威火腿中挥发性风味物质含量及OAV值

Table 1 Contents of volatile flavor compounds and OAV values in Xuanwei ham of different fermentation years

中文名	阈值/( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	XW2yr		XW3yr	
		含量/( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	OAV	含量/( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	OAV
异丁酸	655.05	$4.55 \pm 2.51$	0.01	$6.40 \pm 0.54$	0.01
肉豆蔻酸	—	$6.49 \pm 1.65$	—	$131.64 \pm 17.97$	—
异戊酸	49	$5.32 \pm 3.82$	0.11	$86.64 \pm 9.22$	1.77
辛酸	1 258	$3.76 \pm 3.06$	0.00	$17.03 \pm 9.36$	0.01
2-甲基丁酸	—	$3.63 \pm 2.29$	—	$10.67 \pm 5.83$	—
丁酸	240	$6.00 \pm 4.75$	0.02	$18.52 \pm 9.06$	0.08
十五烷酸	—	$7.21 \pm 4.61$	—	$22.20 \pm 16.20$	—
癸酸	10	$20.09 \pm 2.29$	2.01	$33.22 \pm 10.91$	3.32
月桂酸	—	$10.23 \pm 5.71$	—	$13.24 \pm 1.01$	—
己酸	89	$16.40 \pm 7.52$	0.18	$29.04 \pm 15.63$	0.33
壬酸	15	$4.88 \pm 1.81$	0.33	$15.30 \pm 3.41$	1.02
反油酸	—	—	—	$6.38 \pm 0.00$	—
戊醇	15.02	$6.88 \pm 2.44$	0.46	$21.93 \pm 16.78$	1.46
4-壬醇	—	—	—	$12.95 \pm 9.83$	—
丙二醇	—	—	—	$30.48 \pm 0.00$	—
1-戊烯-3-醇	35.81	$1.06 \pm 0.00$	0.03	—	—
2,3-丁二醇	—	$7.16 \pm 0.00$	—	—	—
1-辛烯-3-醇	0.15	$32.42 \pm 0.27$	216.14	$44.12 \pm 0.42$	294.15

(续表 1)

中文名	阈值/( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	XW2yr		XW3yr	
		含量/( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	OAV	含量/( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	OAV
反式-2-辛烯-1-醇	4	6.35 $\pm$ 1.84	1.59	18.40 $\pm$ 6.01	4.60
2-甲基丁醇	—	1.46 $\pm$ 0.00	—	—	—
3-甲基-1-己醇	—	3.23 $\pm$ 0.89	—	—	—
异戊醇	0.4	7.10 $\pm$ 0.00	17.75	—	—
正辛醇	40.5	9.59 $\pm$ 2.62	0.24	19.91 $\pm$ 7.56	0.49
正庚醇	30	6.76 $\pm$ 1.60	0.23	11.60 $\pm$ 1.17	0.39
正己醇	2 500	11.22 $\pm$ 6.08	0.00	10.39 $\pm$ 1.61	0.00
异辛醇	—	10.41 $\pm$ 9.35	—	—	—
己醛	45	135.56 $\pm$ 9.15	3.01	17.16 $\pm$ 6.70	0.38
硬脂烷醛	—	7.05 $\pm$ 0.00	—	—	—
反式-2-癸烯醛	2	9.65 $\pm$ 3.75	4.82	150.84 $\pm$ 61.89	75.42
反-2-辛烯醛	0.3	10.16 $\pm$ 5.18	33.87	36.48 $\pm$ 34.68	121.61
壬醛	10	60.73 $\pm$ 10.76	6.07	8.04 $\pm$ 4.98	0.80
苯乙醛	40	26.32 $\pm$ 11.42	0.66	31.84 $\pm$ 12.57	0.80
癸醛	65	4.10 $\pm$ 1.24	0.06	27.97 $\pm$ 5.39	0.43
庚醛	0.28	23.45 $\pm$ 2.62	83.73	16.32 $\pm$ 1.08	58.29
戊醛	1.2	17.50 $\pm$ 0.52	14.59	12.08 $\pm$ 8.05	10.06
苯甲醛	75	21.84 $\pm$ 6.60	0.29	9.00 $\pm$ 2.90	0.12
肉豆蔻醛	140.00	—	—	27.53 $\pm$ 1.09	0.20
正辛醛	50.00	—	—	37.13 $\pm$ 0.00	0.74
2-甲基丁醛	10.00	—	—	10.37 $\pm$ 0.18	1.04
3-羟基-2-丁酮	1.4	2.08 $\pm$ 0.00	1.49	—	—
甲基庚烯酮	14.8	6.35 $\pm$ 2.04	0.43	—	—
2-辛酮	280	3.24 $\pm$ 0.82	0.01	73.49 $\pm$ 0.00	0.26
2-庚酮	60.00	2.34 $\pm$ 0.13	0.04	13.40 $\pm$ 7.82	0.22
2-戊酮	138.00	—	—	136.80 $\pm$ 19.49	0.99
2,3-辛二酮	25.20	—	—	11.64 $\pm$ 0.00	0.46
香叶基丙酮	60	4.48 $\pm$ 1.20	0.07	—	—
3-甲硫基丙醛	0.45	4.04 $\pm$ 2.06	8.98	55.70 $\pm$ 47.21	123.77
己酸异丙酯	—	17.37 $\pm$ 0.00	—	—	—
己酸甲硫醇酯	—	16.51 $\pm$ 11.27	—	—	—
丙位壬内酯	0.97	28.48 $\pm$ 16.98	29.36	54.08 $\pm$ 24.17	55.75
丙位辛内酯	—	6.88 $\pm$ 3.29	—	—	—
十五烷	—	—	—	92.42 $\pm$ 0.00	—
正十三烷	—	—	—	15.55 $\pm$ 13.29	—
正十六烷	—	—	—	38.69 $\pm$ 14.73	—
1-十一烯	—	—	—	18.25 $\pm$ 9.97	—
乙烯	—	—	—	22.18 $\pm$ 0.00	—
1-十九烯	—	—	—	85.15 $\pm$ 0.00	—
1-癸烯	—	11.46 $\pm$ 3.91	—	—	—
邻甲酚	—	—	—	13.13 $\pm$ 10.05	—

注:—表示未检测到,OT 主要参考 Garcia-Gonzalez 等<sup>[15]</sup>,Petricevic 等<sup>[16]</sup>,Wen 等<sup>[17]</sup>。

组成以及相对丰度不同,这些风味化合物赋予了不同年份宣威火腿独特的香味。

## 2.2 不同发酵年份宣威火腿代谢产物分析

由韦恩图可知,发酵 2 年的宣威火腿共鉴定

出 2 899 种代谢物,腌制 3 年的宣威火腿共鉴定出 2 975 种代谢物,其中共有代谢物有 2 833 种。通过偏最小二乘法判别分析宣威火腿代谢物的总体变化,不同发酵年份的火腿样品均在 95%置信

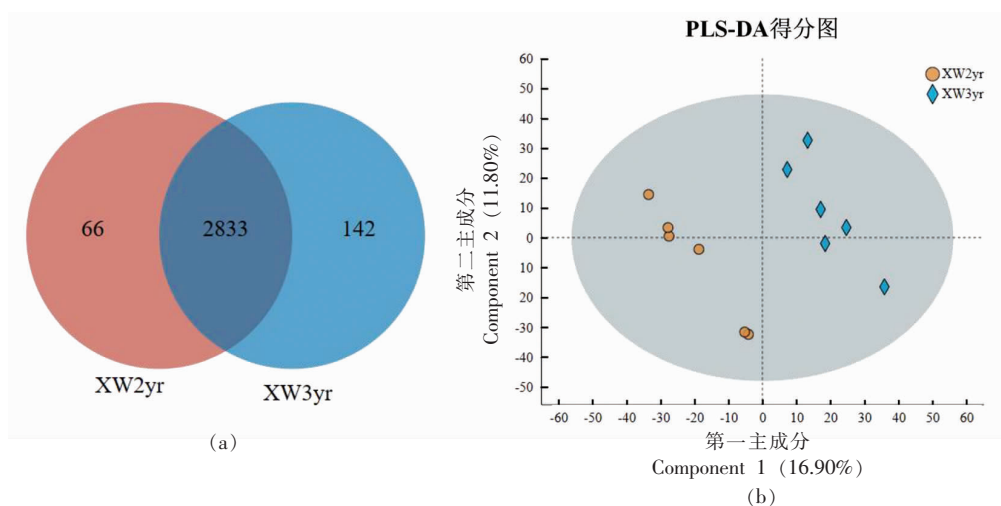


图2 不同发酵年份宣威火腿代谢产物韦恩图(a)和 PLS-DA 分析(b)

Fig.2 Venn diagram (a) and PLS-DA analysis (b) of metabolic products of Xuanwei ham in different fermentation years

区间内,不同年的火腿样品明显分离,说明不同年份的火腿代谢物组成之间差异显著。

根据  $P < 0.05$ , VIP pred OPLS-DA > 1, 上下调差异倍数 1 为筛选条件,筛选出显著差异代谢物,并建立代谢集。HMDB 包含有关人类代谢物及其生物学作用,生理浓度,疾病关联,化学反应,代谢途径和参考光谱的综合信息,是 LC-MS 非靶代谢组学物质鉴定的主要公共数据库之一<sup>[30]</sup>。将代谢集与 HMDB 数据库进行比对,共鉴定到 290 种代谢物,其中氨基酸、肽和类似物含量最高共有 52 种 (20.63%),脂肪酸及其结合物有 16 种,相对含量为 6.35%,碳水化合物和碳水化合物结合物次之,有 8 种,相对含量为 3.17%(图 3a)。

KEGG 数据库可提供整合代谢途径对催化各步反应的酶、参与反应的基因产物和代谢物的全面注解,所以通过与 KEGG 数据库比对,可以获得某代谢物参与的具体生物学通路情况以及代谢物的生物学功能分类信息<sup>[31]</sup>。如图 3b 所示,通过与 KEGG 数据库比对鉴定出不同发酵年份的宣威火腿中具有生物学作用的化合物共有 16 种,其中相对含量较高的物质分别是氨基酸类(3 种)和类固醇激素(3 种)。Zhu 等<sup>[32]</sup>比较金华、宣威、如皋、伊比利亚和帕尔马火腿的代谢物差异发现,所有火腿样品的氨基酸水平均显著高于鲜肉组,说明火腿在成熟过程中产生了大量的氨基酸代谢物,极大地影响成品火腿的风味。

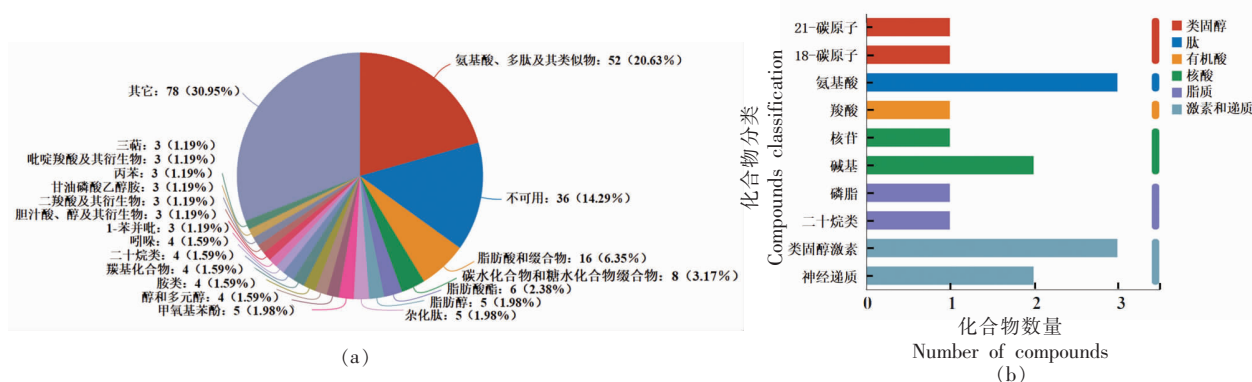


图3 不同发酵年份宣威火腿代谢产物 HMDB 化合物分类(a)和 KEGG 化合物分类(b)

Fig.3 HMDB compound classification (a) and KEGG compound classification (b) for metabolites of Xuanwei ham in different fermentation years

猪腿中的蛋白质和脂肪含量相对较高,氧化分解产生的氨基酸、脂肪酸等通常是干腌火腿中最重要的几种初级代谢物<sup>[1]</sup>。氨基酸是多种挥发性风味的前体,在干腌火腿风味形成中具有重要作用<sup>[9]</sup>。谷氨酸、焦谷氨酸和天冬氨酸与火腿的鲜味有关,丙氨酸、缬氨酸和丝氨酸与火腿甜味有关,酪氨酸和赖氨酸与火腿独特的成熟风味有关,这些氨基酸的产生可改善火腿的感官品质<sup>[33]</sup>。脂肪氧化产物也是火腿风味的主要贡献者,如醛、醇、酮和酯等脂质氧化产物比其他挥发性物质(如脂肪烃等)具有更高的挥发性和更低的气味阈值<sup>[34]</sup>。

根据代谢物在不同样品中的表达丰度以及表达模式差异对不同发酵年份宣威火腿的代谢物进行聚类分析可知(图 4a),不同分组差异显著,差异性较高的 20 种化合物主要是肽类化合物、醛类、

酮类、磷酸酯和糖苷。代谢差异物火山图(图 4b)显示,表达差异下调的代谢物共有 108 种,表达差异上调的代谢物有 66 种。不同发酵年份宣威火腿中差异较显著的几种代谢物为磷脂酰丝氨酸(16:0/22:0)、多巴胺苯醌、不对称二甲基精氨酸、*N*-乙酰-3-甲基组氨酸和 1-(3,5-二甲基-1-苯基-4-吡唑基)-*N*-[4-(苯基甲基)-1-哌嗪基]甲亚胺。随着发酵时间的延长,火腿中蛋白质、脂质、糖类会在内源酶以及微生物等多种因素的作用下分解为小分子物质,导致不同发酵年份的宣威火腿在肽类、醛类、酮类、磷酸酯和糖苷等几类化合物相对含量上出现差异<sup>[35]</sup>。Zhu 等<sup>[32]</sup>研究发现,金华、宣威、如皋、伊比利亚和帕尔马火腿的差异代谢物主要是肽类化合物。

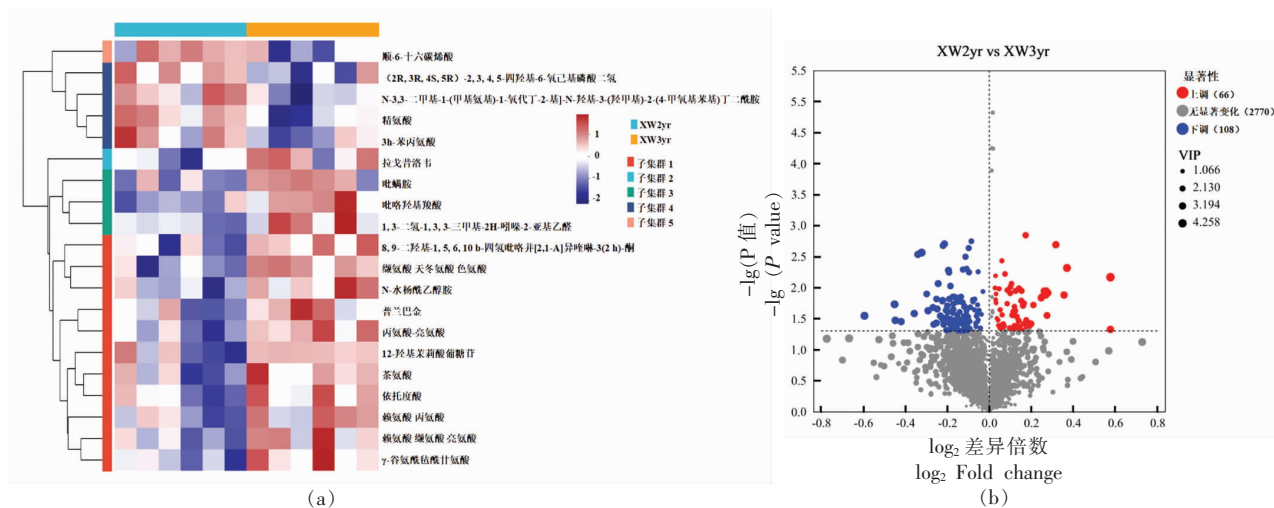


图 4 不同发酵年份火腿的差异代谢物聚类分析热图(a)和差异火山图(b)

Fig.4 Cluster analysis of different metabolites in Xuanwei ham from different fermentation years heat map (a) and differential volcano map (b)

根据代谢物比对到 KEGG compound ID 的信息,利用 KEGG 数据库,可将代谢集中的代谢物按照其参与的 pathway 通路或行使的功能分类,获知代谢物参与的代谢通路信息,从而评价其对生物新陈代谢过程的影响。如图 5a 所示,两种不同发酵年份火腿代谢物主要涉及 6 种一级代谢通路,包含涉及氨基酸代谢通路的 21 种代谢物、涉及脂质代谢通路的 14 种代谢物,这两个通路注释到的代谢物较多。在干腌火腿的加工过程中,甘油三酯和磷脂分别被脂肪酶和磷脂酶水解,产生游

离脂肪酸,游离脂肪酸比甘油三酯更容易氧化,导致挥发性物质的形成<sup>[36]</sup>。Mu 等<sup>[10]</sup>研究了不同发酵年份盘县火腿差异代谢物的主要代谢途径发现,31 种显著差异代谢物主要参与了 30 条代谢途径,包括丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、精氨酸和脯氨酸代谢。

不同发酵年份宣威火腿的代谢物进行 KEGG 通路富集分析结果以气泡图表示,气泡越大,表示通路在火腿中的重要性越大。KEGG 功能通路富集气泡图(图 5b)显示,重要性较高的几个代谢通

路为丙氨酸代谢、天冬氨酸和谷氨酸代谢、色氨酸代谢、氨酰基 tRNA 生物合成、维生素 B<sub>6</sub> 代谢、嘌呤代谢,通路重要性较高的前 10 个通路中,有 6 个涉及氨基酸代谢。另外,色氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、类固醇激素生物合成这 3 个代谢通路富集显著性较高。通过 KEGG 通路分析发现,火腿发酵涉及脂肪酸氧化和氨基酸降解这两类通路的化合物较多。氨基酸以及脂质代谢会产生许多

挥发性风味物质,如半胱氨酸和胱氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸等氨基酸的降解可形成支链醛、支链酮、甲苯和苯乙醛,异亮氨酸和亮氨酸的降解可产生苯甲醛<sup>[37]</sup>,Storrustlokken 等<sup>[38]</sup>研究火腿发酵过程代谢物的变化发现,脂质的降解和氧化是火腿产生独特风味的重要因素。甘油三酯和磷脂的水解和氧化是形成火腿风味物质的基本反应<sup>[39]</sup>。

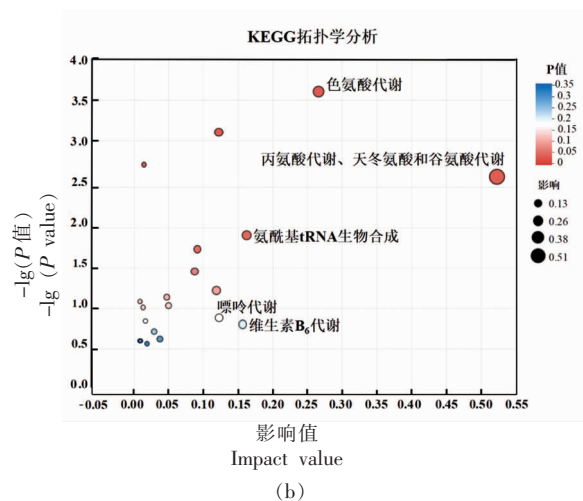
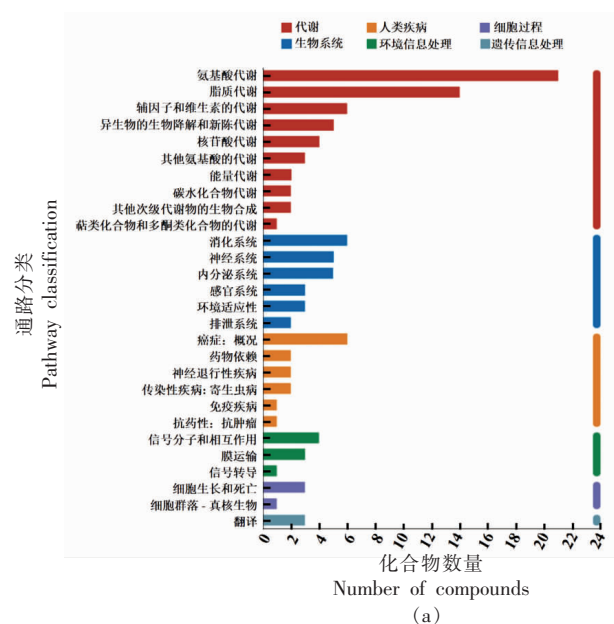


图 5 不同发酵年份宣威火腿 KEGG 功能通路统计

Fig.5 Statistics of KEGG functional pathways of Xuanwei ham in different fermentation years

### 3 结论

采用顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱联用技术和非靶向代谢组学技术比较不同发酵年份宣威火腿的挥发性风味物质以及代谢物差异。从宣威火腿中鉴定出 17 种特征风味化合物,主要是醛类和醇类化合物。发酵 2 年宣威火腿产生的 4 种独有风味物质,异戊醇、壬醛、己醛和 3-羟基-2-丁酮中异戊醇的 OAV 值最大;发酵 3 年的宣威火腿中 4 种独有挥发性风味物质,异戊酸、正戊醇、2-甲基丁醛和壬酸,其中异戊酸 OAV 较高。通过 LC-MC 共鉴定到 290 种代谢物,主要是氨基酸、肽和类似物和脂肪酸及其结合物,这些物质可通过氨基酸和脂质代谢途径产生醛类、醇类等挥发性风味物质,导致不同年份的火腿在风味物质和代谢物组成上出现差异。宣威火腿中挥发性风

味物质以及代谢物的鉴定对了解宣威火腿特征风味和品质差异具有重要意义,为宣威火腿的生产加工奠定理论基础。

### 参 考 文 献

- [1] ZHOU G H, ZHAO G M. Biochemical changes during processing of traditional Jinhua ham[J]. Meat Science, 2007, 77(1): 114-120.
- [2] JIANG S, XIA D, WANG X M, et al. Analysis of aroma-active compounds in four Chinese dry-cured hams based on GC-O combined with AEDA and frequency detection methods[J]. Lwt-Food Science and Technology, 2022, 153: 112497.
- [3] LIU S Y, WANG G Y, XIAO Z C, et al. H-1-NMR-based water-soluble low molecular weight



- compound characterization and free fatty acid composition of five kinds of Yunnan dry-cured hams[J]. *Lwt - Food Science and Technology*, 2019, 108: 174-182.
- [4] PEREZ-JUAN M, FLORES M, TOLDRA F. Generation of volatile flavour compounds as affected by the chemical composition of different dry-cured ham sections[J]. *European Food Research and Technology*, 2006, 222(5/6): 658-666.
- [5] SKRLEP M, CANDEK -POTOKAR M, LUKAC N B, et al. Comparison of entire male and immunocastrated pigs for dry-cured ham production under two salting regimes[J]. *Meat Science*, 2016, 111: 27-37.
- [6] MUNOZ-ROSIQUE B, SALAZAR E, TAPIADOR J, et al. Effect of salt reduction on the quality of boneless dry-cured ham from Iberian and white commercially crossed pigs[J]. *Foods*, 2022, 11(6): 812.
- [7] DENG J, XU H, LI X, et al. Correlation of characteristic flavor and microbial community in Jinhua ham during the post-ripening stage[J]. *Lwt - Food Science and Technology*, 2022, 171: 114067.
- [8] WANG W L, FENG X, ZHANG D N, et al. Analysis of volatile compounds in Chinese dry-cured hams by comprehensive two-dimensional gas chromatography with high-resolution time-of-flight mass spectrometry[J]. *Meat Science*, 2018, 140: 14-25.
- [9] SHI Y N, LI X, HUANG A X. A metabolomics-based approach investigates volatile flavor formation and characteristic compounds of the Dahe black pig dry-cured ham[J]. *Meat Science*, 2019, 158: 109704.
- [10] MU Y, SU W, MU Y C, et al. Combined application of high-throughput sequencing and metabolomics reveals metabolically active microorganisms during Panxian ham processing[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 3012.
- [11] LIAO R Y, XIA Q, ZHOU C Y, et al. LC-MS/MS-based metabolomics and sensory evaluation characterize metabolites and texture of normal and spoiled dry-cured hams[J]. *Food Chemistry*, 2022, 371: 131156.
- [12] WANG W L, LI Y, ZHOU X R, et al. Changes in the extent and products of in vitro protein digestion during the ripening periods of Chinese dry-cured hams[J]. *Meat Science*, 2021, 171: 108290.
- [13] ZHONG A A, CHEN W, DUAN Y F, et al. The potential correlation between microbial communities and flavors in traditional fermented sour meat[J]. *Lwt - Food Science and Technology*, 2021, 149: 111873.
- [14] TAN F L, WANG P, ZHAN P, et al. Characterization of key aroma compounds in flat peach juice based on gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry (GC-MS-O), odor activity value (OAV), aroma recombination, and omission experiments[J]. *Food Chemistry*, 2022, 366: 130604.
- [15] GARCIA-GONZALEZ D L, TENA N, APARICIO-RUIZ R, et al. Relationship between sensory attributes and volatile compounds qualifying dry-cured hams[J]. *Meat Science*, 2008, 80(2): 315-325.
- [16] PETRICEVIC S, RADOVICIC N M, LUKIC K, et al. Differentiation of dry-cured hams from different processing methods by means of volatile compounds, physico-chemical and sensory analysis[J]. *Meat Science*, 2018, 137: 217-227.
- [17] WEN R X, SUN F D, LI X A, et al. The potential correlations between the fungal communities and volatile compounds of traditional dry sausages from Northeast China[J]. *Food Microbiology*, 2021, 98: 103787.
- [18] WANG Y Q, LI C S, ZHAO Y Q, et al. Novel insight into the formation mechanism of volatile flavor in Chinese fish sauce (Yu-lu) based on molecular sensory and metagenomics analyses[J]. *Food Chemistry*, 2020, 323: 126839.
- [19] GARCIA-GARCIA A B, FERNANDEZ-VALLE M E, CASTEJON D, et al. Use of MRI as a predictive tool for physicochemical and rheological features during cured ham manufacturing[J]. *Meat Science*, 2019, 148: 171-180.
- [20] GARCIA-GONZALEZ D L, APARICIO R, APARICIO-RUIZ R. Volatile and amino acid profiling of dry cured hams from different swine breeds and processing methods[J]. *Molecules*, 2013, 18(4): 3927-3947.
- [21] BENET I, GUARDIA M D, IBANEZ C, et al. Analysis of SPME or SBSE extracted volatile compounds from cooked cured pork ham differing in intramuscular fat profiles[J]. *Lwt - Food Science and Technology*, 2015, 60(1): 393-399.
- [22] THERON L, TOURNAYRE P, KONDOYAN N, et

- al. Analysis of the volatile profile and identification of odour-active compounds in Bayonne ham[J]. *Meat Science*, 2010, 85: 453-460.
- [23] ZHU L, HE S Y, LU Y, et al. Metabolomics mechanism of traditional soy sauce associated with fermentation time[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(2): 297-304.
- [24] CARRAPISO A I, GARCIA C. Iberian ham headspace: Odorants of intermuscular fat and differences with lean[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004, 84(15): 2047-2051.
- [25] MONTANARI C, GATTO V, TORRIANI S, et al. Effects of the diameter on physico-chemical, microbiological and volatile profile in dry fermented sausages produced with two different starter cultures [J]. *Food Bioscience*, 2018, 22: 9-18.
- [26] YAO W S, CAI Y X, LIU D Y, et al. Analysis of flavor formation during production of Dezhou braised chicken using headspace-gas chromatography-ion mobility spec-trometry (HS-GC-IMS) [J]. *Food Chemistry*, 2022, 370: 139089.
- [27] WU H Z, ZHUANG H, ZHANG Y Y, et al. Influence of partial replacement of NaCl with KCl on profiles of volatile compounds in dry-cured bacon during processing[J]. *Food Chemistry*, 2015, 172: 391-399.
- [28] LI P, ZHOU H, WANG Z Q, et al. Analysis of flavor formation during the production of Jinhua dry-cured ham using headspace-gas chromatography-ion mobility spectrometry (HS-GC-IMS)[J]. *Meat Science*, 2022, 194: 108992.
- [29] HUAN Y J, ZHOU G H, ZHAO G M, et al. Changes in flavor compounds of dry-cured Chinese Jinhua ham during processing [J]. *Meat Science*, 2005, 71(2): 291-299.
- [30] WISHART D S, GUO A C, OLER E, et al. HMDB 5.0: The human metabolome database for 2022[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(D1): D622-D631.
- [31] ZHANG C, CHEN Z W, ZHANG M M, et al. KEGG\_Extractor: an effective extraction tool for KEGG orthologs[J]. *Genes*, 2023, 14(2): 386.
- [32] ZHU Y Y, GUO Y, YANG F H, et al. Combined application of high-throughput sequencing and UH-PLC-Q/TOF-MS-based metabolomics in the evaluation of microorganisms and metabolites of dry-cured ham of different origins[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 359: 109422.
- [33] ZHENG J Y, TAO N P, GONG J, et al. Comparison of non-volatile taste-active compounds between the cooked meats of pre- and post-spawning Yangtze Coilia ectenes[J]. *Fisheries Science*, 2015, 81(3): 559-568.
- [34] 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.
- [35] SEGURA J, ESCUDERO R, DE AVILA M D R, et al. Effect of fatty acid composition and positional distribution within the triglyceride on selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat[J]. *Meat Science*, 2015, 103: 90-95.
- [36] GUO X, LU S L, WANG Y Q, et al. Correlations among flavor compounds, lipid oxidation indices, and endogenous enzyme activity during the processing of Xinjiang dry-cured mutton ham[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2019, 43(11): e14199.
- [37] RUIZ J, VENTANAS J, CAVA R, et al. Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process[J]. *Meat Science*, 1999, 52(1): 19-27.
- [38] STORRUSTLOKKEN L, DEVLE H M, HASETH T T, et al. Lipid degradation and sensory characteristics of *M. biceps femoris* in dry-cured hams from Duroc using three different processing methods [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2015, 50(2): 522-531.
- [39] PETROVA I, AASEN I M, RUSTAD T, et al. Manufacture of dry-cured ham: a review. Part 1. biochemical changes during the technological process [J]. *European Food Research and Technology*, 2015, 241(5): 587-599.

## Difference Analysis of Volatile Flavor Compounds and Metabolites in Yunnan Xuanwei Ham in Different Fermentation Years

Qin Yu, Li Wenwen, Zhang Beibei, Zhang Wenwen, Cao Jianxin, Li Lirong\*

(Faculty of Food Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500)

**Abstract** The unique flavor of Yunnan Xuanwei ham is related to its natural fermentation time and the rich metabolites produced by fermentation. In this study, headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry and non targeted metabolomics techniques were used to explore the differences in volatile flavor compounds and metabolites of Xuanwei ham that had been naturally fermented for two years and fermented for three years. The identification results of volatile flavor compounds in Xuanwei ham from different fermentation years showed that a total of 59 volatile flavor compounds were identified, of which 30 were common volatile flavor compounds in Xuanwei ham fermented for 2 and 3 years. According to the odor activity value (OVA)  $\geq 1$ , 17 volatile compounds were characteristic flavor compounds of Xuanwei ham, with most of the characteristic flavor compounds belonging to aldehydes and alcohols. Multivariate analysis of metabolites showed that there were differences in the diversity and expression patterns of metabolites in Xuanwei ham from different years. A total of 290 significantly different metabolites were identified, with the highest content of amino acids, peptides, and analogues, totaling 52 species (20.63%), followed by fatty acids and their complexes, with 16 species. KEGG pathway analysis showed that there were 21 and 14 metabolites involved in amino acid metabolism and lipid metabolism pathways in ham metabolites from different fermentation years, respectively. This study revealed the differences in volatile flavor compounds and metabolites of Xuanwei ham in different fermentation years, which can lay a foundation for distinguishing and improving the fermentation quality of Xuanwei ham.

**Keywords** Xuanwei ham; volatile flavor compounds; fermentation; metabolomics; metabolic pathway