

肖何, 王蓉蓉, 等. 湖南不同地区农家剁辣椒风味成分比较分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 310–318. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010125

XIAO He, WANG Rongrong, CHEN Mengjuan, et al. Comparison and Analysis of the Flavor Components of Chopped Peppers from Farmhouses in Different Regions of Hunan[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(22): 310–318. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010125

· 分析检测 ·

湖南不同地区农家剁辣椒风味成分比较分析

肖 何^{1,2}, 王蓉蓉^{1,2}, 陈梦娟^{1,2}, 王馨瑶^{1,2}, 尹含靓^{1,2}, 刘 洋^{1,2}, 蒋立文^{1,2,*}

(1.湖南农业大学食品科学技术学院,湖南长沙 410128;
2.食品科学与生物技术湖南省重点实验室,湖南长沙 410128)

摘要:为探索不同地区的特色农家剁辣椒的品质和风味差异,本研究选用湖南6个地区的传统农家剁辣椒为研究对象,利用高效液相色谱法和顶空固相微萃取-气质联用技术(Headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, HS-SPME-GC-MS)测定了有机酸和挥发性成分,并比较分析其在理化指标、有机酸、挥发性成分的差异。结果表明,6个不同地区的农家剁辣椒盐分、酸度、各种有机酸、挥发性成分均差异显著($P<0.05$)。在不同地区的农家剁辣椒共检测出97种挥发性成分,酯类是各样品中含量最高且种类最为丰富的挥发性物质。根据气味活度值(odor activity value, OAV)结合阈值分析,异己酸乙酯是安化乐安(LA)、怀化洪江(HJ)、宁乡(NX)剁辣椒主要香气成分,异戊酸乙酯是安化东坪(DP)剁辣椒中主要香气成分,2-甲基丁酸是浏阳(LY)剁辣椒的主要香气成分,乙酸乙酯是邵阳(SY)剁辣椒主要香气成分。本研究揭示了不同地区特色农家剁辣椒的品质和风味存在明显的差异性,为保障特色发酵辣椒风味提供科学依据。

关键词:农家剁辣椒,有机酸,气相色谱-质谱法(GC-MS),香气活度值,主成分分析

中图分类号:TS255.54 文献标识码:A 文章编号:1002-0306(2022)22-0310-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010125

本文网刊: 

Comparison and Analysis of the Flavor Components of Chopped Peppers from Farmhouses in Different Regions of Hunan

XIAO He^{1,2}, WANG Rongrong^{1,2}, CHEN Mengjuan^{1,2}, WANG Xinyao^{1,2}, YIN Hanliang^{1,2}, LIU Yang^{1,2},
JIANG Liwen^{1,2,*}

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, Changsha 410128, China)

Abstract: In order to explore the quality and flavor differences of traditional homemade chopped peppers from different regions, this study selected traditional homemade chopped peppers from six regions in Hunan as the research object, and determined the differences in organic acids and volatile components by using high performance liquid chromatography and headspace solid phase microextraction-gas chromatography (HS-SPME-GC-MS). The differences in physical and chemical parameters, organic acids and volatile components were compared and analyzed. The results showed that the salinity, acidity, various organic acids and volatile components of the farm chopped peppers in six different regions were significantly different ($P<0.05$). A total of 97 volatile components were detected in farm chopped peppers in different regions, and esters were the most abundant volatile compounds in each sample. The results of the odor activity value (OAV) combined with threshold analysis showed that ethyl isohexanoate was the main aroma component in Anhua Lean (LA), Huaihua Hongjiang (HJ) and Ningxiang (NX) chopped peppers, ethyl isovalerate was the main aroma component in Anhua Dongping (DP) chopped peppers, 2-methylbutyric acid was the main aroma component in Liuyang (LY) chopped peppers, ethyl acetate was the main aroma component of Shaoyang (SY) chopped pepper. This study revealed that there was a significant variability in the quality and flavor of the characteristic homemade chopped peppers from different regions, and

收稿日期: 2022-01-18

基金项目: 湖南特色发酵蔬菜加工关键技术及标准化研究与示范(2020NK2027);湖南省研究生科研创新项目(CX20200662)。

作者简介: 肖何(1997-),男,硕士研究生,研究方向:食品生物技术,E-mail:820143267@qq.com。

*通信作者: 蒋立文(1968-),男,博士,教授,研究方向:食品生物技术,E-mail:hnndjlw@163.com。

would provide a scientific basis for securing the flavor of the characteristic fermented peppers.

Key words: farm chopped chili; organic acid; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); odor activity value (OAV); principal component analysis

剁辣椒又名剁辣子、坛子辣椒,是湖南的特色嗜好性调味品。家庭发酵剁椒基本上就是将新鲜辣椒采摘后清洗、晾干表面水分、去把去蒂后,斩拌成为一定大小片型,加入一定比例的食盐、白酒拌匀后入陶瓷坛,厌氧发酵 1 年以上。可出坛即食,湖南很多家庭一般都会加工供自作自食用,也可以作佐料食用^[1-2],如剁椒鱼头、炊烟时代小炒黄牛肉等湘菜餐桌爆品,形成了较好的市场效应。剁辣椒尽管已经实现了工业化,但经过高盐腌渍,脱盐、调味、杀菌处理后剁辣椒风味的保真性差,所以很多餐饮企业自己采用陶瓷坛控制一定盐度发酵成为特殊“坛香”的剁辣椒,用于配料使用。

以风味物质来评价剁辣椒品质备受学者的关注,现已有不少关于辣椒风味的报道,陆宽等^[3]发现不同辣椒品种发酵后的风味能够明显被 GC-MS 技术区分,张毅等^[4]对市售剁辣椒进行研究发现风味物质中乙酸乙酯和乳酸乙酯含量较高,吴凯等^[5]对不同盐度腌渍辣椒的风味物质的分析发现低盐腌渍的辣椒中,挥发性成分少,高盐腌渍的辣椒挥发性成分较多,香气成分高。风味是影响消费者购买行为的重要评判指标^[6],风味的影响因素很多,如辣椒原料、发酵菌种、发酵工艺等。风味物质的测定有很多种方法,如气相色谱法、气相色谱-质谱联用法、红外光谱法等^[7],顶空固相微萃取-气质联用技术(Headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, HS-SPME-GC-MS)^[8-10]是目前产品风味成分分析最常用的方法,因其具有操作方便快捷、方法灵敏度高、选择性与重复性好等特点,能实现多组分混合物的定性、定量分析,较好的反映食品中挥发性物质的基本组成^[11],在发酵食品挥发性香气成分测定中具有显著的优势。

自然发酵的剁辣椒具有浓郁的香气且美味可口、健胃消食,因而倍受人们青睐。湖南是辣椒种植、加工的重点产区之一,其中邵阳(原为宝庆)自古以来就是辣椒种植加工基地,安化乐安和东坪也有辣椒加工的传统,洪江、浏阳都有辣椒基地和种植辣椒的历史,宁乡的特色辣椒本地有名。因此,本研究以采自湖南本地这 6 个不同地区的特色农家剁辣椒为研究对象,比较分析其理化指标、有机酸、挥发性成分的差异,为建立剁辣椒香气成分数据库提供理论基础,为保障特色发酵辣椒风味提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

剁辣椒 湖南 6 个不同地区的农家古法发酵,样品来自安化、怀化、邵阳、宁乡、浏阳地区,除怀化

的剁辣椒加入少量的面油外,其余均不加油发酵,分别命名为:安化乐安(LA)、安化东坪(DP)、怀化洪江(HJ)、邵阳(SY)、宁乡(NX)、浏阳(LY)。氯化钠、铬酸钾、氢氧化钠、无水乙醇、硝酸银、邻苯二甲酸氢钾、硝酸 分析纯,国药集团化学试剂有限公司;酚酞 分析纯,天津市化学试剂研究所有限公司;甲醇、磷酸 色谱纯,天津市光复科技发展有限公司;二辛醇、草酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、乳酸、酒石酸 色谱纯,上海源叶生物科技有限公司;C7~C30 正构烷烃 美国 Supelco 公司。

7890B-5977A 气相色谱-质谱联用仪 美国 Agilent 公司; Waters e2695Alliance 超高效液相色谱仪 美国沃特世公司; HMS-901C 磁力加热搅拌器 深圳博大精科生物科技有限公司; CP114 电子天平 奥豪斯仪器有限公司; KQ3200E 超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; FE20K pH 计 梅特勒-托利多仪器有限公司; TG16-WS 台式高速离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的采集和预处理 所有剁辣椒样品均为当地农户采用新鲜成熟辣椒制作,发酵周期均在 5~6 个月,每个样品取样 5 瓶,邮寄回实验室放 4 ℃ 冰箱密封保存。

1.2.2 总酸的测定 参照 GB 12456-2021《食品中总酸的测定》^[11]。

1.2.3 盐分的测定 参照 GB 5009.44-2016《食品中氯化物的测定》^[12]。

1.2.4 有机酸含量的测定 参考 GB 5009.157-2016《食品中有机酸的测定》^[13]并稍作修改。

试样制备:称取 1.50 g 剁辣椒样品(精确 0.01 g)均匀试样,放入 50 mL 塑料离心管中,向其中加入 20 mL 水后,在 10000 r/min 的转速下均质提取 2 min,随后经 4000 r/min 离心 5 min,取上层提取液至 50 mL 容量瓶中,残留物再用 20 mL 水重复提取一次,合并提取液于同一容量瓶中,并用水定容至刻度,样品经 0.45 μm 水相滤膜过滤,后用于注入高效液相色谱仪分析。

标准曲线制备:分别配制酒石酸质量浓度为 12500 μg/mL、苹果酸 25000 μg/mL、乳酸 25000 μg/mL、柠檬酸 25000 μg/mL、丁二酸 62500 μg/mL 和草酸 500 μg/mL 的标品溶液,用 0.1% 磷酸溶液分别将其稀释 25、50、125、250、500 倍,得到不同浓度的有机酸标准溶液,经 0.45 μm 水系滤膜过滤注入高效液相色谱仪分析。以有机酸浓度为横坐标,色谱峰的面积为纵坐标绘制标准曲线。

色谱条件: 色谱柱: Agilent TC-C₁₈(2)250×4.6 mm 5 μm; 流动相: 0.1% 磷酸溶液: 甲醇=97.5:2.5(v/v); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 20 μL; 检测波长: 210 nm。

1.2.5 挥发性成分的测定 参照 Xu 等^[14]方法并稍作修改。

萃取方法: 准确称取 2.5 g 剁辣椒样品置于 15 mL 顶空进样瓶中, 加入 3 mL 饱和 NaCl 溶液, 再加入 2-辛醇(8 μL, 0.16 mg/mL), 用密封垫封口, 涡旋振荡 30 s。随后将其放入 70 °C 加热块中平衡 15 min, 使剁辣椒挥发性组分充分挥发。然后将 SPME 针插入萃取瓶中推出纤维头, 保持 70 °C 顶空吸附 40 min, 随后迅速将萃取头插入 GC 进样口, 并推出纤维头, 250 °C 解吸 5 min 后进行数据采集。

GC-MS 条件: 色谱柱为 DB-5MS(30 m×250 μm, 0.25 μm), 载气为 He(99.999%), 流速 1 mL/min; 进样模式: 不分流; 进样口温度 250 °C; 升温条件: 40 °C 保持 3 min, 以 5 °C/min 升至 150 °C, 以 10 °C/min 升至 250 °C 保持 5 min。离子源温度 230 °C, 电子能量 70 eV, 质量扫描范围 m/z33~500。

定性与定量分析: 定性: 用 AMDIS 对色谱图进行自动解卷积, 得到的峰质谱图与 NIST 文库(NIST 2011)进行比较, 在相同试验条件下测得正构烷烃标准品的保留时间, 以此计算各色谱峰的保留指数, 个别与文献值比较, 确定各个色谱峰对应的化合物。保留指数计算公式如下:

$$I = 100 \times \left(n + \frac{t_i - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right)$$

式中: I 为保留指数; n 为碳数; t_i 为待测挥发性成分的保留时间, min; t_n 为具有 n 个碳原子的正构烷烃的保留时间, min; t_{n+1} 为具有 n+1 个碳原子的正构烷烃的保留时间, min。

定量: 采用内标法。以剁辣椒样品中不含有的挥发性物质 2-辛醇作为内标, 按下式计算含量:

$$\text{各挥发性成分含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{\text{各组分峰面积} \times \text{内标物质量}(\mu\text{g})}{\text{内标峰面积} \times \text{样品质量}(\text{g})}$$

1.2.6 OAV 计算方法 对每种挥发性化合物进行定量后, 查询各挥发性物质在水中的气味阈值^[15], 计算气味活性值(odor activity value, OAV)。

$$OAV = \frac{C_i}{OT_i}$$

式中: OAV 为物质该的香气活性值; C_i 为该化合物在剁辣椒样中的含量, μg/kg; OT_i 为该组分在水中的气味阈值, μg/kg。当 OAV ≥ 1 时, 则认定该组分对剁辣椒香气具有重要贡献^[16]。

1.3 数据处理

每组实验重复 3 次, 结果采用平均值±标准差表示, 采用 SPSS Statistic 26 进行单因素方差分析。运

用 Origin 2020 绘制柱状图。主成分分析图采用 SMICA 13.0 软件绘制。

2 结果与分析

2.1 不同地区农家剁辣椒盐分和总酸的差异性分析

食盐是剁辣椒制作过程控制发酵程度、抑制腐败、形成风味的重要物质。由图 1 可知, 不同地区剁辣椒盐度差异显著($P<0.05$), 其中 SY 剁辣椒盐度最低, 仅为 4.51%, NX 剁辣椒盐分最高, 为 12.75%。酸度直接反映了剁辣椒坯中发酵程度, 是影响其滋味口感的重要指标之一。不同地区剁辣椒总酸差异显著($P<0.05$), 其中 NX 剁辣椒总酸最低, 为 3.70 ± 0.10 g/kg, SY 剁辣椒总酸最高, 高达 12.33 ± 0.35 g/kg。从图 1 中可以看出 6 个不同地区剁辣椒中盐分与总酸呈负相关关系, 可能是高盐抑制了剁辣椒发酵过程中乳酸菌生长代谢, 盐度高总酸含量低^[17]。

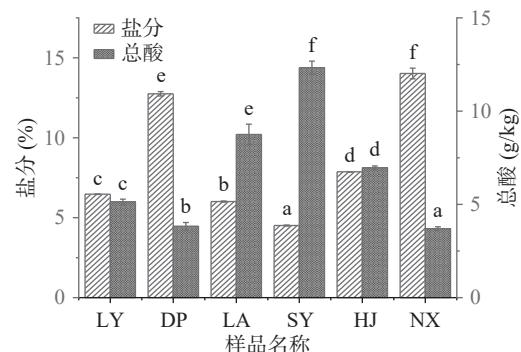


图 1 不同地区农家剁辣椒盐分和总酸变化

Fig.1 Changes of salt and total acid in farm chopped peppers in different regions

注: 不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$ 。

2.2 不同地区农家剁辣椒有机酸分析

有机酸是衡量剁辣椒风味品质的重要指标, 不同的有机酸有不同的酸味特征, 如草酸有刺激性酸味、苹果酸有特殊愉快的酸味、柠檬酸具有温和的酸味、乳酸的酸味柔和且有后酸味, 丁二酸有豆酱类的风味等。由表 1 可知, 不同地区剁辣椒有机酸含量呈显著差异($P<0.05$), 其中 DP 剁辣椒有机酸含量最高为 62.04 ± 1.49 g/kg, LA 剁辣椒有机酸含量最低, 仅为 34.51 ± 1.00 g/kg。乳酸含量占比最大(34.76%), 柠檬酸次之(25.60%)。原因是乳酸不仅能由糖酵解途径产生, 还可以直接由苹果酸脱羧生成^[18-19], 同时乳酸菌可通过三羧酸循环产生乳酸。SY 剁辣椒乳酸含量最高为 19.91 ± 0.76 g/kg, 且 SY 剁辣椒盐分最低为 4.51%; 说明低盐可能更有利于发酵产生乳酸; 而 NX 剁辣椒乳酸含量也达到 18.45 ± 1.16 g/kg, 但其盐度最高 12.75%, 这可能与 NX 剁辣椒所用辣椒品种及发酵时间有关^[20]。

2.3 不同地区农家剁辣椒中挥发性香气成分的测定

通过 GC-MS 法对 6 个不同地区农家剁辣椒样品挥发性香气成分进行检测, 其总离子流色谱图见图 2, 各样品检出风味成分见表 2。

表 1 不同地区剁辣椒中有机酸的含量(g/kg)
Table 1 Content of organic acids in chopped peppers in different regions (g/kg)

有机酸	LY	DP	LA	SY	HJ	NX
草酸	0.31±0.03 ^c	0.53±0.07 ^b	0.26±0.02 ^d	0.23±0.02 ^e	0.51±0.01 ^b	0.60±0.04 ^a
酒石酸	0.50±0.23 ^d	0.66±0.06 ^c	1.35±0.09 ^b	0.40±0.27 ^{de}	0.34±0.05 ^e	2.66±0.06 ^a
苹果酸	14.02±0.41 ^a	8.53±0.41 ^b	3.21±0.09 ^d	2.58±0.06 ^d	7.63±0.19 ^b	4.24±0.21 ^c
乳酸	12.54±0.22 ^c	17.59±0.54 ^b	19.61±0.37 ^{ab}	19.91±0.76 ^a	13.82±0.43 ^c	18.45±1.16 ^{ab}
柠檬酸	4.35±0.32 ^d	20.79±0.07 ^b	8.15±0.37 ^c	21.82±0.10 ^a	0.61±0.06 ^e	5.11±0.41 ^d
丁二酸	7.05±0.40 ^e	13.93±0.34 ^b	1.93±0.07 ^f	7.79±0.14 ^d	14.56±0.16 ^a	13.09±0.35 ^c
总计	38.77±1.60 ^d	62.04±1.49 ^a	34.51±1.00 ^f	52.73±1.34 ^b	37.48±0.91 ^e	44.16±2.24 ^c

注: 同行不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$ 。

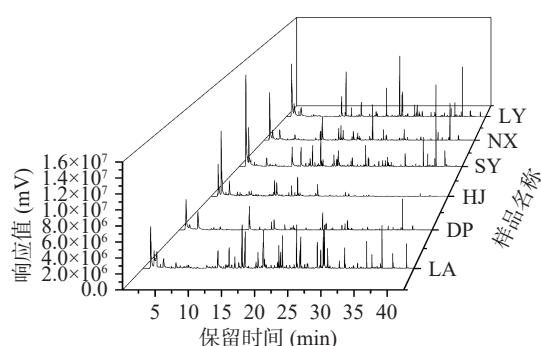


图 2 不同地区农家剁辣椒挥发性成分 GC-MS 分析总离子流色谱图

Fig.2 Total ion chromatogram of volatile components in chopped peppers in different regions analyzed by GC-MS

由表 2 可知 6 个不同地区农家剁辣椒挥发性物质含量有明显差异。采用 GC-MS 共检测出 97 种挥发性物质, 可分为 6 大类: 醇(9 种)、醛(5 种)、烯类(14 种)、酯(46 种)、烷烃(15 种)、其他(8 种)。6 个不同地区农家剁辣椒分别检测到数量及种类差别较大, 最多 57 种(LA), 最少 23 种(HJ)。其中 HJ 剁辣椒总挥发性成分最高为(17.73 $\mu\text{g/g}$), 其次是 LA 剁辣椒(16.83 $\mu\text{g/g}$)、LY 剁辣椒(16.79 $\mu\text{g/g}$)、NX 剁辣椒(12.73 $\mu\text{g/g}$)、SY 剁辣椒(10.87 $\mu\text{g/g}$)、DP 剁辣椒(3.32 $\mu\text{g/g}$); 其中酯类物质含量占比分别为 56.06%、40.52%、56.52%、45.80%、61.18%、42.47%, 可以看出酯类是剁辣椒中含量最高且种类最为丰富的挥发性物质^[21-22], 这与欧阳晶等^[23]的研究结果一致。

表 2 不同地区农家剁辣椒样品挥发性成分化学组成与含量

Table 2 Chemical composition and content of volatile components in samples of chopped peppers from farmhouses in different regions

序号	挥发性成分	RI	含量($\mu\text{g/g}$)					
			LA	DP	HJ	SY	NX	LY
1	(2S,3S)-(+)-2,3-丁二醇	814	0.05±0.01	—	—	—	—	—
2	4-甲基-1-戊醇	850	0.10±0.01	0.08±0.00	—	—	0.10±0.02	0.18±0.03
3	糠醇	871	0.04±0.00	—	0.12±0.05	—	—	—
4	苄醇	1046	0.14±0.01	—	—	—	—	—
醇类	5 (E)-呋喃类芳樟醇氧化物	1079	0.33±0.01	—	—	0.10±0.02	—	—
6	芳樟醇	1111	1.45±0.15	0.17±0.02	1.05±0.01	1.06±0.02	0.66±0.09	0.11±0.00
7	苯乙醇	1127	1.44±0.12	0.37±0.07	0.44±0.01	0.20±0.01	0.57±0.02	0.61±0.11
8	alpha-松油醇	1201	0.49±0.05	0.06±0.01	0.18±0.02	0.24±0.02	0.13±0.01	—
9	异戊醇	780	—	0.50±0.07	1.22±0.01	—	0.85±0.13	0.86±0.00
共计			4.03	1.18	3.01	1.59	2.32	1.76
10	苯乙醛	1051	0.07±0.00	—	—	0.11±0.01	—	0.05±0.00
醛类	11 正十五碳醛	1690	—	—	—	—	—	0.06±0.02
12	苯甲醛	966	0.11±0.00	—	—	1.06±0.08	—	—
13	(2Z)-2-庚烯醛	962	0.09±0.03	—	—	—	—	—
14	糠醛	846	—	—	—	0.11±0.00	—	—
共计			0.27	0.00	0.00	1.28	0.00	0.11
15	月桂烯	990	—	—	—	—	—	0.10±0.01
16	双戊烯	1035	—	—	—	0.09±0.01	—	2.83±0.19
17	反式- β -罗勒烯	1045	0.41±0.00	0.07±0.01	—	—	—	0.06±0.01
18	罗勒烯	1046	—	—	—	0.20±0.00	—	—
19	2-甲基-1-十四烯	1457	0.51±0.02	0.08±0.01	—	—	—	0.41±0.03
20	(V4)-长叶烯	1491	0.86±0.01	0.18±0.02	—	0.21±0.02	0.47±0.00	0.18±0.02
21	十五烯	1490	—	—	—	—	—	0.10±0.01

续表 2

序号	挥发性成分	RI	含量(μg/g)					
			LA	DP	HJ	SY	NX	LY
烯类	22 (-)-b-榄香烯	1400	—	0.02±0.00	—	—	—	—
	23 苯乙烯	895	0.08±0.02	—	—	—	0.06±0.01	—
	24 右旋萜二烯	1033	0.04±0.01	—	0.09±0.01	—	—	—
	25 2-莰烯	1236	0.06±0.01	—	—	—	—	—
	26 (+)-α-长叶蒎烯	1381	0.09±0.01	—	—	—	—	—
	27 薯蓣烯	1064	—	—	—	—	—	0.52±0.06
	28 巴伦西亚橘烯	1492	—	—	—	—	0.07±0.00	—
	共计		2.06	0.35	0.09	0.53	0.60	4.21
	29 乙酸甲酯	635	—	—	0.62±0.10	—	—	—
	30 乙酸乙酯	741	0.50±0.06	0.11±0.02	6.42±0.22	1.17±0.25	0.57±0.06	1.22±0.29
	31 L(-)-乳酸乙酯	735	0.36±0.03		0.42±0.09	0.46±0.08	—	—
	32 2-甲基丁酸乙酯	763	0.03±0.00	0.02±0.00	—	—	0.37±0.02	0.08±0.03
	33 3-甲基丁酸己酯	1215	—	—	—	—	—	0.13±0.00
	34 正己酸乙酯	1008	—	—	0.53±0.07	0.28±0.04	1.28±0.07	—
	35 正戊酸己酯	1215	—	—	—	—	0.08±0.01	—
	36 异戊酸己酯	1209	—	—	—	—	0.14±0.01	0.21±0.00
	37 异戊酸乙酯	634	0.03±0.00	0.08±0.00	—	—	—	0.09±0.02
	38 乙酸异戊酯	900	0.11±0.02	—	0.35±0.09	—	—	0.09±0.02
	39 异戊酸异戊酯	1114	—	—	—	—	—	0.04±0.00
	40 异己酸乙酯	972	0.03±0.01	—	0.08±0.00	—	0.13±0.04	—
	41 乙酸己酯	1022	0.03±0.01	—	—	—	—	0.10±0.02
	42 水杨酸甲酯	1203	1.17±0.11	0.06±0.01	0.15±0.03	0.51±0.04	0.41±0.04	0.19±0.01
	43 辛酸乙酯	1210	0.14±0.04	0.05±0.01	0.69±0.02	0.08±0.00	0.06±0.03	0.06±0.01
	44 苯甲酸乙酯	1180	—	—	—	0.37±0.04	—	—
	45 苯乙酸乙酯	1256	0.02±0.00	—	—	0.06±0.00	—	—
	46 乙酸苯乙酯	1265	0.14±0.02	0.03±0.01	—	—	—	0.07±0.01
	47 壬酸乙酯	1271	0.43±0.09	—	—	0.12±0.00	0.18±0.03	0.90±0.10
	48 水杨酸乙酯	1278	0.39±0.05	—	—	0.06±0.02	0.22±0.00	0.06±0.00
酯类	49 2-己烯酸乙酯	1053	0.07±0.01	—	—	0.05±0.01	—	—
	50 反式-4-癸烯酸乙酯	1355	0.93±0.01	0.30±0.02	—	—	0.45±0.01	3.30±0.23
	51 癸酸乙酯	1373	0.43±0.09	0.14±0.01	0.07±0.00	—	0.23±0.03	0.87±0.06
	52 月桂酸乙酯	1607	0.32±0.05	0.06±0.01	—	0.25±0.00	0.14±0.00	0.12±0.01
	53 十四酸乙酯	1808	0.35±0.01	0.05±0.01	—	0.40±0.02	0.21±0.03	0.16±0.01
	54 十五酸乙酯	1873	0.17±0.01	0.03±0.00	—	0.17±0.00	0.07±0.02	0.26±0.01
	55 棕榈酸甲酯	1942	0.03±0.00	—	—	—	—	—
	56 9-十六碳烯酸乙酯	1925	0.07±0.00	0.03±0.00	—	0.12±0.00	0.07±0.02	0.10±0.01
	57 棕榈酸乙酯	1978	0.59±0.06	—	0.12±0.03	—	—	—
	58 亚油酸乙酯	2007	0.18±0.00	0.04±0.01	—	0.18±0.00	0.10±0.02	0.11±0.01
	59 油酸乙酯	2192	0.06±0.01	0.06±0.02	—	0.09±0.00	0.12±0.03	0.14±0.02
	60 己二酸二辛酯	2420	0.20±0.00	—	—	—	—	—
	61 甲酸叶醇酯	865	—	0.02±0.00	—	—	—	—
	62 十六酸乙酯	2011	—	0.31±0.04	—	0.15±0.03	0.40±0.01	0.99±0.08
	63 异氰酸甲酯	781	—	—	0.16±0.03	—	0.19±0.05	—
	64 2-羟基异己酸乙酯	1066	—	—	0.22±0.00	0.52±0.09	—	—
	65 正戊酸异戊酯	1114	—	—	—	0.06±0.01	—	—
	66 丁二酸二乙酯	1193	—	—	—	0.14±0.02	—	—
	67 菠萝酯	1433	—	—	—	0.12±0.01	—	—
	68 异丁酸乙酯	794	—	—	—	—	0.06±0.02	—
	69 丁酸乙酯	821	—	—	—	—	0.12±0.04	0.04±0.01
	70 (Z)-2-丁烯酸乙酯	856	—	—	—	—	0.17±0.04	—
	71 戊酸乙酯	908	—	—	—	—	0.07±0.02	—
	72 己酸己酯	1324	—	—	—	—	—	0.04±0.01
	73 十一酸乙酯	1470	—	—	—	—	—	0.12±0.01

续表 2

序号	挥发性成分	RI	含量(μg/g)					
			LA	DP	HJ	SY	NX	LY
74	戊酸己酯	1124	0.04±0.00	0.04±0.01	—	—	—	—
总计			6.82	1.41	9.94	6.65	5.83	9.49
75	3-(1-甲基乙基)- 氧杂环丁烷	778	0.28±0.02	—	—	—	—	—
76	丙基环丙烷	879	0.09±0.01	0.11±0.01	—	0.09±0.01	0.13±0.03	0.06±0.01
77	2-甲基-十三烷	1373	0.62±0.01	0.11±0.01	0.15±0.01	0.17±0.01	—	—
78	十四烷	1409	0.07±0.02	—	—	—	—	0.12±0.01
79	2-甲基-十四烷	1474	0.33±0.02	0.11±0.01	—	—	—	—
80	2-甲基十五烷	1576	0.13±0.03	0.03±0.00	—	—	—	0.13±0.01
81	正十六烷	1612	0.07±0.01	—	—	—	—	0.07±0.00
烷类	82	2-甲基-十六烷	1677	0.04±0.01	—	—	—	—
83	十七烷	1712	0.08±0.01	0.02±0.00	—	—	0.05±0.01	0.08±0.02
84	正辛烷	818	—	—	0.30±0.02	—	—	—
85	戊基环丙烷	962	—	—	—	0.07±0.00	—	—
86	1,1-二甲基-2-壬基环丙烷	1456	—	—	—	0.11±0.00	—	0.05±0.00
87	3-甲基十三烷	1473	—	—	—	0.14±0.01	0.09±0.01	0.43±0.03
88	2-甲基丙烷	742	—	—	—	—	0.35±0.03	—
89	十五烷	1510	—	—	—	—	—	0.16±0.01
总计			1.70	0.38	0.45	0.58	0.62	1.10
90	4-乙基-2-甲氧基苯酚	1288	0.73±0.02	—	—	—	2.00±0.06	—
91	大马士酮	1393	0.07±0.01	—	—	—	—	—
92	间二甲苯	874	0.03±0.00	—	—	—	—	—
其它	93	乙酸	889	1.03±0.05	—	3.44±0.27	0.24±0.01	—
94	2-羟基-4-甲基-乙酯戊酸	1066	0.09±0.01	—	—	—	0.04±0.01	—
95	2-正戊基呋喃	997	—	—	0.80±0.07	—	—	—
96	愈创木酚	1095	—	—	—	—	0.71±0.05	—
97	4-乙基苯酚	1178	—	—	—	—	0.61±0.01	—
总计			1.95	0.00	4.24	0.24	3.36	0.12

注: “—”表示未检出; 表3同。

HJ 剁辣椒挥发性成分种类最少, 但酯类物质占比高达 56.06%, 乙酸占比高达 19.40%。原因可能是 HJ 剁辣椒中加入少量植物油影响了挥发性物质的挥出, 使得检测到挥发性物质种类少, 而油脂在酸性环境下又能水解成甘油和脂肪酸, 使得酯类物质和乙酸含量高^[24]。

6 个不同地区农家剁辣椒共有的挥发性物质共有 5 种, 分别为芳樟醇、苯乙醇、乙酸乙酯、水杨酸甲酯、辛酸乙酯, 可以赋予剁辣椒花香及果香^[25-26]。6 个不同地区农家剁辣椒挥发性成分差异较大可能是因为所用辣椒品种及地理位置和当地自然发酵微生物差别等因素造成的^[27]。

2.4 不同地区剁辣椒香气活度值分析

采用 OAV 表征剁辣椒中各香气化合物对主体香气成分的贡献, 通过文献查询各挥发性物质的阈值, 通过各个挥发性物质的浓度与感官阈值的比值计算 OAV 值。当 OAV 值 ≥ 1 时, 可以认为该挥发性物质对样品的整体风味具有贡献作用^[28]。从表 3 可以看出 6 个不同地区农家剁辣椒 OAV 值 ≥ 1 的共有 28 种, 分别为芳樟醇、苯乙醇、异戊醇、苯乙醛、苯甲醛、月桂烯、反式- β -罗勒烯、苯乙烯、乙酸甲

酯、乙酸乙酯、2-甲基丁酸乙酯、正己酸乙酯、异戊酸乙酯、乙酸异戊酯、异己酸乙酯、水杨酸甲酯、辛酸乙酯、苯甲酸乙酯、癸酸乙酯、异丁酸乙酯、丁酸乙酯、戊酸乙酯、十一酸乙酯、十四烷、乙酸、2-正戊基呋喃、愈创木酚、4-乙基苯酚。LA、DP、HJ、SY、NX、LY 剁辣椒特征风味物质(OAV ≥ 1)数量分别为 15、7、11、7、13、13 种。异己酸乙酯具有曲香、菠萝香型的香气^[29], 在 LA、HJ、NX 剁辣椒中 OAV > 1000 , 且均为最高, 是 LA、HJ、NX 剁辣椒主要香气成分。异戊酸乙酯具有苹果、桑子香气^[30], 在 DP 剁辣椒中 OAV 值为最高, 是构成 DP 剁辣椒的主要香气成分。周晓媛等^[26]在自然发酵剁辣椒中也检测出了类似物质。2-甲基丁酸乙酯具有水果香味, 在 LY 剁辣椒中 OAV 值为最高, 是构成 LY 剁辣椒的主要香气成分。乙酸乙酯具有清灵、微带甜果香的酒香^[31], 在 SY 剁辣椒中 OAV 值为最高, 是构成 SY 剁辣椒的主要香气成分。6 个剁辣椒样品共有的 5 种挥发性物质中有乙酸乙酯、水杨酸甲酯、辛酸乙酯 3 种物质在样品中 OAV 值均大于 1, 说明乙酸乙酯、水杨酸甲酯、辛酸乙酯可能是构成发酵剁辣椒香气的主要挥发性物质。

表 3 不同地区农家剁辣椒样品主要挥发性成分的 OAV 值
Table 3 OAVs of main volatile components in the samples of farm chopped peppers in different regions

化合物名称	阈值 ^[14] (μg/kg)	香气活度值(OAV)					
		LA	DP	HJ	SY	NX	LY
芳樟醇	1082	1.34	0.16	0.97	0.98	0.61	0.10
苯乙醇	1200	1.20	0.31	0.37	0.17	0.48	0.51
异戊醇	980	—	0.51	1.24	—	0.87	0.88
苯乙醛	4	17.50	—	—	27.50	—	12.50
苯甲醛	350	0.31	—	—	3.03	—	—
月桂烯	4.9	—	—	—	—	—	20.41
反式-β-罗勒烯	34	12.06	2.06	—	—	—	1.76
苯乙烯	65	1.23	—	—	—	0.92	—
乙酸甲酯	1500	—	—	41.33	—	—	—
乙酸乙酯	5	100.00	22.00	1284.00	234.00	114.00	244.00
2-甲基丁酸乙酯	0.063	476.19	317.46	—	—	5873.02	1269.84
正己酸乙酯	5	—	—	106.00	56.00	256.00	—
异戊酸乙酯	0.11	272.73	727.27	—	—	—	818.18
乙酸异戊酯	0.15	733.33	—	2333.33	—	—	600.00
异己酸乙酯	0.01	3000.00	—	8000.00	—	13000.00	—
水杨酸甲酯	40	29.25	1.50	3.75	12.75	10.25	4.75
辛酸乙酯	19.3	7.25	2.59	35.75	4.15	3.11	3.11
苯甲酸乙酯	55.56	—	—	—	6.66	—	—
癸酸乙酯	5	86.00	28.00	14.00	—	46.00	174.00
异丁酸乙酯	0.22	—	—	—	—	272.73	—
丁酸乙酯	3	—	—	—	—	40.00	13.33
戊酸乙酯	5.8	—	—	—	—	12.07	—
十一酸乙酯	5	—	—	—	—	—	24.00
十四烷	2.6	26.92	—	—	—	—	46.15
乙酸	940	1.10	—	3.66	0.26	—	0.13
2-正戊基呋喃	5.8	—	—	137.93	—	—	—
愈创木酚	21	—	—	—	—	33.81	—
4-乙基苯酚	21	—	—	—	—	29.05	—

2.5 不同地区剁辣椒香气成分的主成分分析

应用主成分分析对不同地区的农家剁辣椒 OAV 值 ≥ 1 的关键香气成分进行分析, 主成分得分图以散点图为基础, 每个点代表一个样品, 点之间的距离代表样品之间特征差异的大小, 得到图 3 不同农家剁辣椒的主要挥发性主成分得分图。由图 3 可以看出主成分 PC1 和主成分 PC2 的方差贡献率分

别为 48.5% 和 28.8%, 累计方差贡献为 77.3%, 能够反映剁辣椒样本的主要特征^[32]。可以看出与 HJ、LA、NX 剁辣椒香气成分比较相似, 原因可能是 3 个样品中都含有异己酸乙酯, 而异己酸乙酯的阈值比很低, 仅为 0.01 g/kg, 使得香气活度值(OAV)极高。DP、LY 剁辣椒香气成分较相似; SY 剁辣椒香气成分则与其它样品差异较大, 可能与在其它样品中 OAV 值较高的 2-甲基丁酸乙酯、异戊酸乙酯、乙酸异戊酯、异己酸乙酯等物质都未在 SY 样品中检测中有关。

3 结论

对湖南 6 个不同地区农家剁辣椒进行了基本理化指标和挥发性成分比较分析, 发现不同地区农家剁辣椒盐度、总酸和有机含量差异显著($P < 0.05$), 且盐分和总酸呈负相关。采用 HS-SPME-GC-MS 对 6 个不同地区农家剁辣椒挥发性成分进行了检测分析, 测出 97 种挥发性物质, 可分为 6 大类: 醇(9 种)、醛(5 种)、烯类(14 种)、酯(46 种)、烷烃(15 种)、其他(8 种), 共有成分为 5 种, 分别为芳樟醇、苯乙醇、乙酸乙酯、水杨酸甲酯、辛酸乙酯。结合 OAV 分析和

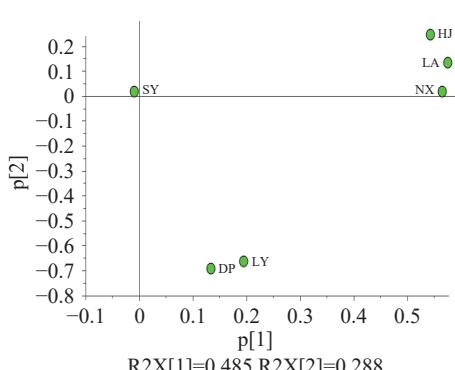


图 3 不同地区农家剁辣椒挥发性组分主成分分析得分图

Fig.3 Principal component analysis scores of volatile components of farm chopped peppers in different regions

主成分分析发现不同地区农家剁辣椒关键香气成分存在差异, 异己酸乙酯是 LA、HJ、NX 剁辣椒主要香气成分, 异戊酸乙酯是 DP 剁辣椒中主要香气成分, 2-甲基丁酸是 LY 剁辣椒的主要香气成分, 乙酸乙酯是 SY 剁辣椒主要香气成分。HJ、LA、NX 剁辣椒风味相近, DP、LY 剁辣椒风味相近, SY 剁辣椒则与其它样品风味差别较大, 邵阳宝庆辣椒全国有名, 其余地方均有一定的地方特色, 加上辣椒品种多种多样, 环境不同微生物来源也有差异, 所以尽管都是传统工艺制作, 但剁辣椒香气成分差异较大, 下一步将研究这几种发酵辣椒微生物的差异, 借此分析微生物与风味的关联性, 为传统发酵辣椒风味保真性研究奠定基础。

参考文献

- [1] 邓放明, 李罗明, 尹华, 等. 碎鲜辣椒发酵制品发酵用乳酸菌的选育与接种发酵试验 [J]. 食品科学, 2005(3): 106–109.
- [2] DENG F M, LI L M, YIN H, et al. Breeding of lactic acid bacteria for fermentation and inoculation fermentation tests of fermented fresh pepper fermented products [J]. Food Science, 2005(3): 106–109.]
- [3] LI J Y, ZHAO F, LIU H H, et al. Fermented minced pepper by high pressure processing, high pressure processing with mild temperature and thermal pasteurization [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2016, 36: 34–41.
- [4] 陆宽, 王雪雅, 孙小静, 等. 电子鼻结合顶空 SPME-GC-MS 联用技术分析贵州不同品种辣椒发酵后挥发性成分 [J]. 食品科学, 2018, 39(4): 199–205. [LU K, WANG X Y, SUN X J, et al. Analysis of volatile components of different varieties of peppers in Guizhou after fermentation using electronic nose combined with headspace SPME-GC-MS [J]. Food Science, 2018, 39(4): 199–205.]
- [5] 张毅, 杨成聪, 余雅倩, 等. 市售剁辣椒风味品质的评价 [J]. 食品研究与开发, 2018, 39(23): 129–133. [ZHANG Y, YANG C C, SHE Y Q, et al. Evaluation of the flavor quality of chopped peppers in the market [J]. Food Research and Development, 2018, 39(23): 129–133.]
- [6] 吴凯, 覃业优, 蒋立文, 等. 不同质量分数食盐腌渍艳红辣椒的风味物质分析 [J]. 食品科学, 2021, 42(24): 175–182. [WU K, QIN Y Y, JIANG L W, et al. Analysis of flavor compounds of red peppers pickled with different mass fractions of salt [J]. Food Science, 2021, 42(24): 175–182.]
- [7] 刘嘉, 陈杰, 孙文彬, 等. 顶空固相微萃取-气质联用技术分析发酵辣椒的挥发性成分 [J]. 食品科学, 2011, 32(24): 256–260. [LIU J, CHEN J, SUN W B, et al. Analysis of volatile components in fermented peppers by headspace solid-phase microextraction-GC-MS [J]. Food Science, 2011, 32(24): 256–260.]
- [8] 曹佳, 王立钊, 孙学华, 等. 浅谈食品风味物质分析测定方法 [J]. 农业工程技术 (农产品加工), 2007(6): 19–22. [CAO J, WANG L Z, SUN X H, et al. On the analysis and determination method of food flavor substances [J]. Agricultural Engineering Technology (Agricultural Product Processing), 2007(6): 19–22.]
- [9] 唐鑫, 夏延斌, 吴灿, 等. 顶空固相微萃取-气质联用分析酵母菌对发酵辣椒汁挥发性成分的影响 [J]. 现代食品科技, 2013, 29(6): 1420–1423. [TANG X, XIA Y B, WU C, et al. Headspace solid-phase microextraction-GC-MS analysis of the effect of yeast on volatile components of fermented pepper juice [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(6): 1420–1423.]
- [10] FAN X J, LIU G F, QIAO Y L, et al. Characterization of volatile compounds by SPME-GC-MS during the ripening of Kedong Sufu, a typical Chinese traditional bacteria-fermented soybean product [J]. Journal of Food Science, 2019, 84(9): 14760.
- [11] SAM A D, ZHENG F P, LI H H, et al. Characterization of volatile compounds in three commercial Chinese vinegars by SPME-GC-MS and GC-O [J]. LWT, 2019, 112: 108264.
- [12] 中国人民共和国国家质量监督检验总局, 中国国家标准化管理委员会. GB 12456-2021 食品安全国家标准食品总酸的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2021. [General Administration of Quality Supervision and Inspection of the People's Republic of China, China National Standardization Administration. GB/T 12456-2021 National food safety standard determination of total food acid [S]. Beijing: China Standards Press, 2021.]
- [13] 中国人民共和国国家质量监督检验总局, 中国国家标准化管理委员会. GB 5009.44-2016 食品安全国家标准食品氯化物的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [General Administration of Quality Supervision and Inspection of the People's Republic of China, China National Standardization Administration. GB 5009.44-2016 National food safety standard for the determination of chloride in food [S]. Beijing: China Standards Press, 2016.]
- [14] XU X X, WU B B, ZHAO W T, et al. Shifts in autochthonous microbial diversity and volatile metabolites during the fermentation of chili pepper (*Capsicum frutescens* L.) [J]. Food Chemistry, 2021, 335: 127512.
- [15] VAN G L. Compilations of odour threshold values in air, water and other media [M]. The Netherlands: Oliemans, Punter & Partners BV, 2011: 207–359.
- [16] 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 J B, LIU M Y, HE C C, et al. Application of AEDA combined with OAV value calculation to identify key odorant active compounds in cocoa liquor [J]. Food and Fermentation Industry, 2013, 39(9): 180–184.]
- [17] 叶陵, 王晶晶, 王蓉蓉, 等. 剁辣椒发酵过程中菌群与有机酸变化规律分析 [J]. 食品科学, 2018, 39(6): 116–121. [YE L, WANG J J, WANG R R, et al. Analysis on the change of bacterial flora and organic acids during the fermentation process of chopped pepper [J]. Food Science, 2018, 39(6): 116–121.]
- [18] CHEN D, LIU S Q. Transformation of chemical constituents of lychee wine by simultaneous alcoholic and malolactic fermentations [J]. Food Chemistry, 2016, 196: 988–995.

- [19] ANSANAY V, DEQUIN S, BLONDIN B, et al. Cloning, sequence and expression of the gene encoding the malolactic enzyme from *Lactococcus lactis* [J]. FEBS Letters, 1993, 332(1/2): 74–80.
- [20] FLEMING H P, MCFEETERS R F, DAESCHEL M A. The lactobacilli, pediococci, and leuconostocs: Vegetable products[M]. Boca Raton: CRC Press, 1985: 97–118.
- [21] 许弯, 刘伟, 胡小琴, 等. 湖南剁辣椒中优良乳酸菌的筛选鉴定及其发酵辣椒汁风味研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(8): 96–103. [XU W, LIU W, HU X Q, et al. Screening and identification of excellent lactic acid bacteria in Hunan chopped peppers and research on the flavor of fermented pepper juice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(8): 96–103.]
- [22] 甘增鹏, 蒋立文, 廖卢艳, 等. 剁辣椒加工的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(13): 4278–4283. [GAN Z P, JIANG L W, LIAO L Y, et al. Research progress of chopped pepper processing[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2019, 10(13): 4278–4283.]
- [23] 欧阳晶, 陶湘林, 李梓铭, 等. 高盐辣椒发酵过程中主要成分及风味的变化[J]. 食品科学, 2014, 35(4): 174–178. [OU Y J, TAO X L, LI Z M, et al. Changes in main ingredients and flavor of high-salt pepper during fermentation[J]. Food Science, 2014, 35(4): 174–178.]
- [24] 胡瑶, 蒋筑阳, 章楚君, 等. 常见植物油水解工艺研究进展[J]. 广州化工, 2018, 46(12): 16–18, 20. [HU Y, JIANG Z Y, ZHANG C J, et al. Research progress of common vegetable oil hydrolysis technology[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2018, 46(12): 16–18, 20.]
- [25] LEE K E, LEE S M, CHOI Y H, et al. Comparative volatile profiles in soy sauce according to inoculated microorganisms[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2013, 77(11): 2192–2200.
- [26] 周晓媛, 邓靖, 李福枝, 等. 发酵辣椒挥发性成分分析及复合香味剂调配[J]. 中国食品学报, 2007(3): 138–143. [ZHOU X Y, DENG J, LI F Z, et al. Analysis of volatile components of ferment- ed pepper and blending of compound flavors[J]. Chinese Journal of Food Science, 2007(3): 138–143.]
- [27] 田红玉, 马变变, 孙宝国, 等. 辣椒挥发性成分研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2015, 33(6): 31–39. [TIAN H Y, MA B B, SUN B G, et al. Research progress of volatile components in pepper[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 33(6): 31–39.]
- [28] 张曼, 汤艳燕, 魏雪, 等. 不同产地鲊辣椒风味成分比较分析[J]. 食品与发酵工业, 2021(14): 264–270. [ZHANG M, TANG Y Y, WEI X Z, et al. Comparative analysis of the flavor components of chili peppers from different origins[J]. Food and Fermentation Industry, 2021(14): 264–270.]
- [29] 李涛, 司梦鑫, 李冲, 等. 顶空固相微萃取-气质联用(HS-SPME-GC-MS)技术分析浓香型竹酒中香气成分[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2020, 43(3): 364–372. [LI T, SI M X, LI C, et al. Analysis of aroma components in Luzhou-flavored bamboo wine by headspace solid-phase microextraction-GC-MS (HS-SPME-GC-MS)[J]. Sichuan Normal University Chinese Journal (Natural Science Edition), 2020, 43(3): 364–372.]
- [30] 李玉珠. 玫瑰茄酒的研制及其活性成分变化分析[D]. 重庆: 西南大学, 2018. [LI Y Z. Development of roselle wine and analysis of changes in its active components[D]. Chongqing: Southwest University, 2018.]
- [31] 尹小庆, 汤艳燕, 阚建全, 等. 小米辣鲊辣椒发酵过程中风味物质及微生物多样性的变化[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(5): 74–82. [YIN X Q, TANG Y Y, KAN J Q, et al. Changes in flavor substances and microbial diversity during the fermentation of millet chili pepper[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(5): 74–82.]
- [32] CHENG H, QIN Z H, GUO X F, et al. Geographical origin identification of propolis using GC-MS and electronic nose combined with principal component analysis[J]. Food Research International, 2013, 51(2): 813–822.