

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.02.038

藻类挥发性物质及其提取方法研究进展

Volatile compounds in algae and their extraction methods

刘璐璐^{1,2} 王宝贝^{2,3,4}LIU Lu-lu^{1,2} WANG Bao-bei^{2,3,4}

(1. 福建农林大学食品科学学院, 福建 福州 350002; 2. 泉州师范学院海洋与食品学院, 福建 泉州 362000; 3. 福建省海洋藻类活性物质制备与功能开发重点实验室, 福建 泉州 362000; 4. 近海资源生物技术福建省高校重点实验室, 福建 泉州 362000)

(1. College of Food Science, Fujian Agriculture University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2. College of Oceanology and Food Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou, Fujian 362000, China; 3. Fujian Province Key Laboratory for the Development of Bioactive Material from Marine Algae, Quanzhou, Fujian 362000, China; 4. Key Laboratory of Inshore Resources and Biotechnology Fujian Province University, Quanzhou, Fujian 362000, China)

摘要:文章介绍了藻中挥发性物质的组成及风味特征,分析了藻中挥发性醛、酮、醇的形成机制,对比了同时蒸馏萃取法、液-液萃取法、动态顶空提取法和固相微萃取技术等几种常用的藻类挥发性物质的提取方法的优缺点,并对藻类挥发性物质今后的研究方向及其提取、分离检测方法进行了展望。

关键词:藻类;挥发性物质;风味;提取方法

Abstract: The composition and flavor characteristics of volatile compounds in algae were introduced. The formation mechanism of volatile aldehydes, ketones and alcohols in algae was summarized and analyzed. The advantages and disadvantages of several common extraction methods of algae volatile compounds, including simultaneous distillation extraction, liquid-liquid extraction, dynamic headspace extraction and solid phase microextraction, were compared and analyzed. The future research direction and extraction, separation and detection methods of algae volatile compounds were prospected.

Keywords: algae; volatile compounds; flavor; extraction methods

藻类与人类的生活密切相关,因富含不饱和脂肪酸、多糖、多肽、维生素等营养物质,在食品和医药中的应用历史久远^[1]。尽管藻类的营养丰富,但不同的藻类具有

各自独特的风味,有些藻类带有宜人的青草香味和花香,如 *Staurastrum sp* 和 *Raphidocelis inclinata*,有些则带有刺鼻的腥臭味,如 *Uroglena americana* 及 *Synedra acus* 等^[2]。风味是影响藻类在食品、医药领域中应用的主要因素之一,如何提升藻类中宜人的气味,消除让人难以接受的腥臭味,是开发藻类食品需要考虑的重要因素,而风味的好坏主要由藻中挥发性物质成分和含量决定。挥发性物质(VOCs)是具有低至中等亲水性,可以穿过细胞膜自由释放到大气中的一类小分子化合物^[3]。它是决定藻类产品风味优劣的主要因素,对藻类在食品行业中的应用推广都有重要的意义^[4]。此外,藻类的挥发性物质还能实时反映微藻生长状态^[5],在防御捕食^[6]和藻类的有性繁殖^[5]等方面有着重要作用。

文章拟阐述藻类中挥发性物质的种类、风味及形成途径,并对挥发性物质的不同提取方法进行分析比较,以期对今后藻类中挥发性物质的研究提供参考。

1 藻中挥发性物质的种类及其风味特征

藻类所含的挥发性化合物种类繁多,主要包括醛、烃、醇、酮、硫化物、羧酸、卤化物、酚、酯、萜烯及吡喃等。不同藻类中含有的挥发性化合物存在一定的差异,如褐藻 *Punctaria tenuissima* 的挥发性物质主要为游离脂肪酸,其次为烃类^[7];绿藻主要为醛类、羧酸类和酯类^[8];红藻 *Pterocladia capillacea*, 醛类释放量最多(71.9%),其次为烃类(10.6%),而 *Osmundaria obtusiloba* 释放量最多的挥发性物质为烃类(65.4%),其次为醛类(30.0%)^[3]。

基金项目:国家自然科学基金(编号:41706139);福建省自然科学基金(编号:2020J01786);泉州市高层次人才创新创业项目(编号:2020C027R)

作者简介:刘璐璐,女,福建农林大学在读硕士研究生。

通信作者:王宝贝(1982—),女,泉州师范学院副教授,博士。

E-mail: baobeiw@qztc.edu.cn

收稿日期:2020-07-23

1.1 醛

醛类为分子中含有醛基(—CHO)的化合物的统称,根据醛基的数量可以分为一元醛与多元醛。藻类中的挥发性醛主要有戊醛、己醛、庚醛、壬醛、苯甲醛、 β -环柠檬醛和藏花醛等(表1)。醛类阈值普遍较低,因此对藻类风味贡献较大^[4]。与海水藻相比,淡水藻的挥发性醛类含量较低,种类也比较少(表1)。Van Durme等^[4]在对藻类挥发性物质的研究中发现,醛类在海水藻 *Botryococcus braunii*、*Rhodomonas* 和 *Tetraselmis species* 中含量最高,分别占总挥发性物质的 95.67%,87.00%,91.47%,而醛类在淡水小球藻中仅占总挥发性物质的 16.22%。Abdel-Baky等^[9]发现醛类在小球藻中仅占 3.24%。海藻中的醛种类一般在 20 种左右^[10],而淡水藻中一般只有 10 种左右^[4]。Lopez-Perez等^[10]发现海水藻 *H. elongata* 和 *P. palmata* 中分别有 22~28 种醛,而淡水的 *P. palmata*^[11] 和 *U. pinnatifida*^[12] 则仅有 7~13 种醛。

不同的醛所呈现出的风味也有一定的差异,如 2,4-七烯醛等 C₁₇ 不饱和醛,阈值较低,呈青草香,而有些不饱和醛则散发出蔬菜和鱼腥味,直链与支链醛类不仅会呈青草香,还会有草木甚至辛辣的味道^[1]。己醛则呈类似绿色植物的风味,己醛、庚醛、辛醛和壬醛由脂质过氧化和过氧自由基的降解产生^[13-14]。Yamamoto等^[15]发现苯甲醛是日本 Shizuoka 地区 *Monostroma nitidum* 中的重要挥发性物质,为水果和花卉提供甜杏仁味。

1.2 酮

挥发性酮的阈值较低,是影响藻类风味的重要物质^[4]。常见挥发性酮的种类及风味见表2。挥发性酮主要表现为果味和奶油味。比如: β -紫罗兰酮具有水果味且气味较浓^[18],2,3-丁二酮具有奶油味和奶酪味,3-辛酮呈草药味和坚果味,6-甲基-5-庚烯-2-酮呈甜味和水果味^[13],2-庚酮为甜味、水果味和肉桂味,3-辛烯-2-酮具有果香和柠檬香,2,3-辛二酮具有奶油香和油脂香^[19]。

1.3 醇

藻类中的挥发性醇主要有 1-戊醇、1-己醇、3-甲基丁醇、1-戊烯-3-醇等(表3),其含量丰富。Ferraces-Casais等^[20]发现海带和裙带菜中的挥发性醇分别占总挥发性物质的 29%和 25%。大多数直链醇(C₄~C₉醇)呈类似水果香味,比如:2,3-丁二醇为水果味和洋葱味,(*E*)-2-戊烯-1-醇表现为蘑菇味、甜味以及类似红酒的味道^[21],*Phormidium autumnale* 中的 3-甲基-1-丁醇则具有威士忌、麦芽和烧焦的味道^[22]。1-辛烯-3-醇在藻中有蘑菇或金属味^[23],而当其与甲氧基同时存在时则表现为土豆味^[24]。

1.4 烃

烷烃和烯烃等是藻类挥发性物质的主要成分,其含量可达总挥发性物质的 50%以上。在裙带菜 *Undaria pinnatifida* 和红藻 *O. obtusiloba* 中,烃在总挥发性成分中的占比分别达到 49.71%^[10] 和 65.40%^[9]。烃类在绿藻

表 1 藻类中的常见醛类挥发性物质
Table 1 Common volatile aldehydes in algae

醛类	海水藻 ^[3, 7, 10-11]	淡水藻 ^[4, 7, 9, 16-17]	风味
丁醛	✓		
戊醛	✓	✓	水果味
己醛	✓	✓	鱼腥味,青草香
庚醛	✓	✓	青草香
辛醛	✓		油脂味,辛辣味
壬醛	✓	✓	油脂味
癸醛	✓		青草香,香甜味
(<i>E</i>)-2-己烯醛	✓	✓	苦杏仁味
2,4-戊二烯醛			
(<i>Z,E</i>)-2,4-庚二烯醛	✓	✓	
(<i>E,E</i>)-2,4-庚二烯醛	✓		油脂味,鱼腥味
2,6-壬二烯醛		✓	油脂味,黄瓜香
(<i>E,Z</i>)-2,4-壬二烯醛		✓	油炸,坚果味
3-甲基丁醛	✓	✓	杏仁味,坚果味
苯甲醛	✓	✓	甜味
β -环柠檬醛	✓	✓	
藏花醛	✓	✓	

表 2 藻中常见酮类挥发性物质
Table 2 Common volatile ketones in algae

酮类	海水藻 ^[3, 7, 10-11]	淡水藻 ^[4, 9, 16-17]	风味
2-庚酮	✓		水果味, 肉桂味
2-辛酮	✓		肥皂味
3-辛酮	✓		草药味, 坚果味
1-戊烯-3-酮	✓		辛辣, 芥末味
1-辛烯-3-酮	✓		蘑菇, 金属味
3-辛烯-2-酮	✓		果香, 柠檬香
2,3-丁二酮	✓	✓	奶油味, 奶酪味
2,3-戊二酮	✓	✓	饼干味
2,3-辛二酮	✓		奶油香
6-甲基-5-庚烯-2-酮	✓	✓	甜味, 水果味
3-羟基-2-丁酮	✓	✓	
α-紫罗兰酮	✓	✓	甜味, 青草香
β-紫罗兰酮	✓	✓	水果味
二氢猕猴桃内酯	✓	✓	香豆素香气
麦芽酚	✓		焦糖味, 奶油味

表 3 藻中常见醇类挥发性物质
Table 3 Common volatile alcohols in algae

醇类	海水藻 ^[3, 7, 10-11]	淡水藻 ^[4, 9, 16-17]	风味
1-戊醇	✓	✓	蜡味
1-己醇	✓	✓	果味, 芳香
1-辛醇	✓		金属味, 烧焦味
3-甲基丁醇	✓	✓	酒味, 麦芽味
1-戊烯-3-醇	✓	✓	烧焦味, 肉味
(E)-2-戊烯-1-醇	✓		甜味, 蘑菇味
1-辛烯-3-醇	✓	✓	蘑菇, 金属味
2,3-丁二醇	✓		水果, 洋葱味
苯甲醇	✓	✓	水果味, 甜味

挥发性物质中的比例更高, 如在日本不同地区养殖的绿藻, 其烃类的占比均在 80% 以上^[15]。藻中挥发性烃主要为 C₈~C₁₈, 且多以饱和烷烃含量较高^[25-26], C₂₀ 以上的长链烷烃只在少数藻类中发现^[16]。Milovanovic 等^[27]发现螺旋藻中挥发性物质含量最多的是十五烷烃、十六烷烃和十七烷烃。其中, 十七烷烃在两种螺旋藻中占挥发性物质的比例分别为 82.21% 和 73.12%。

虽然挥发性烃在藻类中的含量较高, 但由于其阈值较高, 所以其对藻类的气味影响较小^[19]。其中, 龙须菜中的甲苯呈类似苯的味道, 1,2,4-三甲基苯具有塑料味, 1,2,3-三甲基苯具有金属味^[21]。

1.5 酸

藻类中酸的种类丰富且含量也相对较高, 如在 *Punctaria tenuissima*、*Laminaria ochotensis* 和 *Laminaria angustata* 中, 酸占总挥发性物质的 96.80%^[7], 43.86%, 57.95%^[28]。藻类中的挥发性酸主要有乙酸、油酸、肉豆

蔻酸和棕榈酸等(表 4)。酸可以提高食物的特征风味, 但随着酸链长度的增加, 气味强度降低。碳原子数 < 6 的简

表 4 藻中常见酸类挥发性物质
Table 4 Common volatile acids in algae

酸类	海水藻	淡水藻 ^[4, 9, 16-17]	风味
乙酸	✓	✓	酸味
丁酸	✓		甜味, 酸臭味
己酸	✓		
十六烷酸		✓	
十八烷酸		✓	
肉豆蔻酸	✓		奶香
十五烷酸	✓	✓	
棕榈酸	✓		酸奶香
油酸	✓		油脂味
硬脂酸	✓		油脂味

单酸具有较高的气味阈值,而碳原子数 ≥ 12 的长链酸则无气味,且不饱和酸通常比饱和酸有更强烈的气味^[29]。比如丁酸具有酸臭味和甜味^[22]、肉豆蔻酸具有强烈的奶香味、棕榈酸具有酸奶香味,油酸和硬脂酸具有油脂味^[19],戊酸则具有酸味、奶酪味和牛肉味^[23]。

1.6 酯

藻类中的酯类主要有棕榈酸甲酯、肉豆蔻酸甲酯和肉

豆蔻酸异丙酯等(表5)。挥发性酯具有较强的气味,一般不饱和酯的阈值比饱和酯的阈值低^[29]。挥发性酯多呈水果味、甜味和花香^[22]。在 *Ulva prolifera*、*Ulva linza* 以及 *M. nitidumde* 中,肉豆蔻酸甲酯(十四酸甲酯)具有蜂蜜味和花香^[15];小球藻等微藻中的辛酸甲酯为新鲜水果味^[23]; *Ulva pertusa* 中的亚麻酸甲酯为甜瓜味^[15]。棕榈酸甲酯是石莼中的主要酯类,为海藻提供甜味和水果味^[8]。

表5 藻中常见酯类挥发性物质
Table 5 Common volatile esters in algae

酯类	海水藻 ^[3, 7, 10-11]	淡水藻 ^[4, 9, 16-17]	风味
辛酸甲酯		✓	新鲜水果味
棕榈酸甲酯(十六酸甲酯)	✓	✓	花香,水果味
亚麻酸甲酯	✓		甜瓜味
肉豆蔻酸甲酯(十四酸甲酯)	✓		花香,蜂蜜味
肉豆蔻酸异丙酯	✓	✓	

1.7 其他挥发性物质

除了以上介绍的挥发性物质外,藻类中的挥发性物质还含有卤代烃、硫化物和萜烯等。这些挥发性物质在藻类中含量较少,种类简单,但对藻类风味也有一定的贡献。藻类中常见的卤代烃包括二氯甲烷、三氯甲烷、六氯乙烷、碘乙烷、三溴甲烷、氯苯等,其形成与藻类的生长环境有关^[30]。硫化物在藻类中种类较少,但其阈值较低,因此对风味具有一定影响^[21]。藻类中的挥发性硫化物主要有二甲基硫醚、二甲基三硫化物、4-甲基苯磺酰胺和甲苯磺丁酰胺等。二甲基硫醚具有硫磺、卷心菜和西红柿的味道^[31]。二甲基三硫化物在浓度较高时呈肉味和熟洋葱味^[4],也有学者^[21, 31]认为二甲基三硫化物还有蒜味、腐烂的味道、金属味、绿色蔬菜的味道。

萜烯类挥发性物质是许多陆生植物中重要的挥发性化合物,在藻类中浓度较低^[7]。藻类中萜烯类挥发性物质主要有植物醇、六氢法呢基丙酮和姥鲛烷。小球藻中的植物醇源于叶绿素的降解,Lafarge等^[32]研究发现小球藻中植物醇质量浓度高达4 073 $\mu\text{g/L}$,但味道很淡基本无法嗅到。

2 藻中主要挥发性物质的形成

2.1 挥发性醛的形成

藻类中的短链和中链醛主要源自于脂肪酸^[8]。一般认为植物中的短链醛(C_6, C_9)主要来自 C_{18} 不饱和脂肪酸的氧化降解,而海洋鱼类中的短链醛则主要来自长链不饱和脂肪酸($\text{C}_{20}, \text{C}_{22}$),藻类同时存在以上两种短链醛的形成途径。中链醛(C_{10})一般由长链脂肪酸(C_{20})断裂形成的,而长链醛($\text{C}_{15}, \text{C}_{17}$)则是在脂肪酸生成2-氢过氧酸的过程中形成的^[6],其中, C_{17} 不饱和醛主要通过脂氧化酶作用于不饱和(C_{18})脂肪酸产生^[1]。

脂质氧化产物还包含一些直链烷醛、甲基烷醛、2-烯醛和二烯烷醛等,如(*E, Z*)-2,6-壬二烯醛来自于 $n-3$ 不饱和脂肪酸的降解,在食物中散发黄瓜味;2,4-癸二烯醛源于 $n-6$ 脂肪酸的自氧化,也可以进一步氧化为己醛和2-辛烯醛。而苯甲醛和甲基丁醛来自于氨基酸的Strecker降解反应。除了脂肪酸与氨基酸, β -胡萝卜素也是醛类的来源之一,如 β -环柠檬醛就是由 β -胡萝卜素的 C_7 和 C_8 之间的双键被酶裂解产生^[22]。

2.2 挥发性酮的形成

藻类中的挥发性酮主要来自不饱和脂肪酸、类胡萝卜素和氨基酸的氧化、降解^[33-34]。Le Pape等^[11]发现 *Palmaria Palmatae* 中的3-辛酮来自脂肪酸的氧化。6-甲基-5-庚烯-2-酮、 α -紫罗兰酮、 β -紫罗兰酮主要来自番茄红素、八氢番茄红素等类胡萝卜素的氧化降解^[24]。 β -胡萝卜素在 C_9 和 C_{10} 之间的双键裂解可以得到 β -紫罗兰酮^[22]。此外,海藻晒干过程中会导致 β -胡萝卜素热降解产生2,2,6-三甲基环己酮、2,6,6-三甲基-2-羟基环己酮、5,6-环氧环离子酮和二氢内酯^[15]。然而,当前对挥发性酮在藻类中的形成研究还不够全面,有些酮的来源仍存在争议。Yaylayan等^[35]认为具有饼干风味的2,3-戊二酮是由L-丙氨酸的2个碳原子和葡萄糖的3个碳原子通过美拉德反应而得的。然而,Le Pape等^[11]在新鲜的红藻 *P. palmata* 中检测到了2,3-戊二酮,因此他认为2,3-戊二酮是鲜藻的代谢产物。

2.3 挥发性醇的形成

藻类中的醇主要来自不饱和脂肪酸的氧化^[22]。比如,1-辛烯-3-醇来自 $n-6$ 多不饱和脂肪酸的降解,1-辛醇来自 $n-9$ 多不饱和脂肪酸氧化分解^[24],(*E*)-2-戊烯-1-醇来则由 $n-3$ 多不饱和脂肪酸氧化而得^[23-24]。亚油酸和亚

麻酸在脂肪氧化酶和过氧化氢裂解酶的还可以裂解生成六碳醇^[36]133-134。此外,部分醇来自葡萄糖的分解,如 3-甲基-1-丁醇与异丁醇^[37]。葡萄糖经磷酸戊糖途径得到丙酮酸,丙酮酸通过 2-酮酸途径得到 2-酮异戊酸酯,2-酮异戊酸酯经过一系列的反应分别得到 3-甲基-1-丁醇和异丁醇(图 1)。

2.4 挥发性烃的形成

挥发性烃在藻类中种类较多,其来源也较广。烃类可以通过烷基自由基的自氧化过程或类胡萝卜素分解过程形成,如十七烷烃来自 β-胡萝卜素的热降解^[34]、辛烷和十一烷主要来自不饱和脂肪酸^[38]、1,3-(E)-5-(Z)-辛三烯来自于 n-3 脂肪酸的降解^[11]。辛烷和癸烷在海洋褐藻中起到性激素的作用,可以由 C₂₀ 不饱和脂肪酸通过 9-氢过氧化物、酶解和重排形成^[39]。一些短链烃如乙烷、乙烯和戊烷是脂质过氧化的产物^[39]。

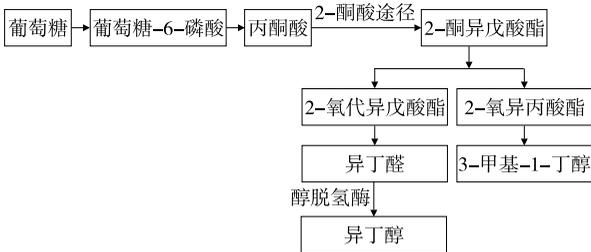


图 1 异丁醇和 3-甲基-1-丁醇合成途径^[5]

Figure 1 Synthesis of 3-methyl-1-butanol and isobutanol

2.5 其他挥发性物质的形成

挥发性卤代烃的来源之一是单卤代和二卤代脂肪酸的水解^[40];也有研究^[41]表明挥发性卤代烃的形成可能是由于清除藻类细胞中的强氧化剂,如次氯酸盐和过氧化氢。

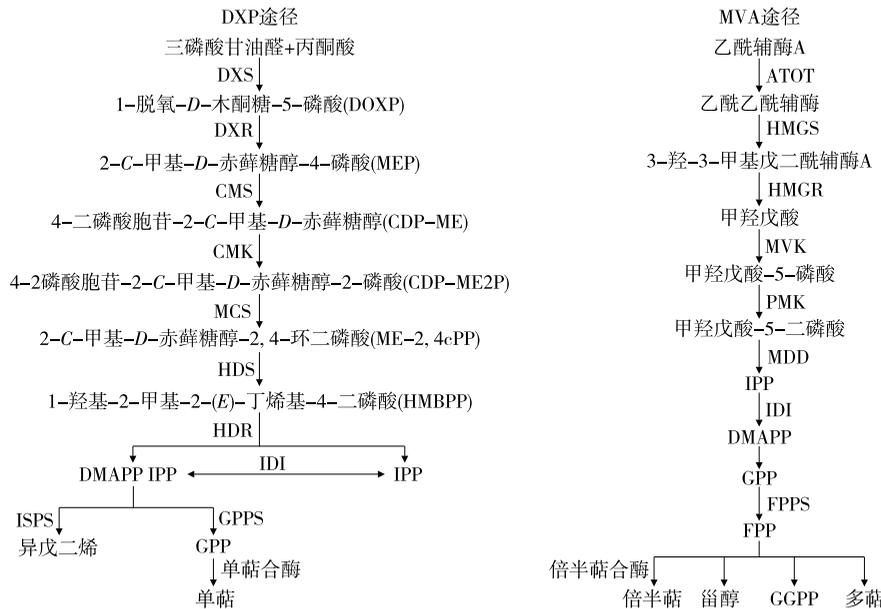
二甲基硫醚是大部分海洋藻类的特征风味物质^[4, 23],有学者^[5]认为二甲基硫醚是二甲基巯基丙酸在二甲基巯基丙酸裂解酶的作用下的产物,而二甲基巯基丙酸是甲硫氨酸在甲硫氨酸脱羧酶的作用下,经过脱羧、氧化及甲基化得到(图 2)。有学者^[42]称甲硫醇是二甲基硫醚和二甲基三硫化物的前体物质,也有文献^[36]138 报道甲硫醇是甲硫氨酸降解的产物,可以进一步被氧化成硫酯或硫醚等硫化物。

植物萜烯类挥发性物质通常有两种合成途径:甲羟戊酸途径(MVA)和质体非甲羟戊酸途径(DXP),其中类异戊二烯合成的基础物质为异戊烯二磷酸(IPP)和异戊烯丙基二磷酸(DMAPP)^[43-45](图 3)。MVA 途径是合成倍半萜、甾醇和多萜的主要途径,而 DXP 途径是合成单萜的主要途径。



图 2 二甲基硫醚合成^[5]

Figure 2 Synthesis of dimethyl sulfide



DXS. 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 DXR. 异构酶 CMS. 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓糖醇合酶 CMK. 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓糖醇激酶 MCS. 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-2,4-环二磷酸合酶 HDS. 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-二磷酸合酶 HDR. 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-二磷酸还原酶 IDI. 异戊烯基焦磷酸异构酶 ISPS. 异戊二烯合成酶 GPPS. 香叶基二磷酸合酶 GPP. 香叶基二磷酸 ATOT. 乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶 HMGS. 羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶 HMGR. 羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 MVK. 甲羟戊酸激酶 PMK. 磷酸甲羟戊酸激酶 MDD. 甲羟戊酸焦磷酸脱氢酶 FPP. 法尼酰二磷酸 GGPP. 香叶基香叶基焦磷酸

图 3 萜烯合成途径^[43, 45]

Figure 3 The synthetic pathway of terpenoids

3 藻类挥发性物质的提取方法

挥发性物质的分离鉴定一般采用气相色谱—质谱联用技术(GC-MS)。其提取方法主要包括同时蒸馏萃取法、液—液萃取法、动态顶空提取法和固相微萃取技术(或顶空固相微萃取技术)^[46]。不同提取方法对同一种藻提取得到的挥发性物质存在一定的差异,如 Lafarge 等^[32]分别使用固相微萃取法和超声辅助液—液萃取法对小球藻中的挥发性成分进行研究,发现固相微萃取法得到的挥发性物质中醛类含量最高,而超声辅助液—液萃取法则是以萜烯类为主,两种提取方法所得挥发性物质仅有一种共同物质 β -紫罗兰酮。不同的提取方法有各自的特点,也各有优缺点,几种常见的挥发性物质提取方法的特点及优缺点见表6。

3.1 同时蒸馏萃取法

同时蒸馏萃取法(Simultaneous distillation extraction, SDE)通过对样品的反复蒸馏和萃取,从而使样品中的挥发性物质得到浓缩,再进行气相色谱—质谱联用进行分离鉴定。SDE法适用于提取高沸点、低挥发性的物质,其优点在于能对样品中低浓度的挥发性物质进行浓缩^[50]。采用SDE法需要的样品量较多,王丽娟等^[51]采用同时蒸馏萃取法对杜氏盐藻进行挥发性成分分析,需杜氏盐藻粉10g;而宋绍华等^[52]在对浒苔进行挥发性成分进行分析时,采用固相微萃取法进行提取,则只需浒苔0.08g。

Sun 等^[18]利用同时蒸馏萃取法(SDE)和静态真空同时蒸馏萃取法(V-SDE)分别对100g新鲜藻进行挥发性物质成分研究。其中同时蒸馏萃取法是将100g绿藻切成5cm的小段,放入5L的圆底烧瓶中,加入2L双蒸馏水,再加入1mL 2,4,6-三甲基吡啶作为内标(即蒸馏水中10 μ g/mL),加入50mL重蒸馏乙醚萃取,萃取时间为3h。利用氮气(纯度99.99%)使提取物浓缩至10mL,用无水硫酸钠进行干燥,再进一步浓缩至0.2mL, -80 $^{\circ}$ C保存备用。而静态真空同时蒸馏萃取法是将100g新鲜藻和600mL重蒸馏水混合在2.5mL的烧瓶中,同样加

入1mL 2,4,6-三甲基吡啶作为内标,加入3mL异辛烷在真空下萃取3h,装置在加热前利用真空泵进行抽真空。结果表明SDE检测到的醛类比V-SDE的多15种,尤其长链醛,只有SDE法检测到,而V-SDE法检测到的酮类多于SDE法。SDE适用于高沸点挥发性物质的提取,在此过程中可能会造成一些物质的热降解,而V-SDE法弥补了这一缺陷。

3.2 液—液萃取法

液—液萃取法(liquid-liquid extraction, LLE)常以超声辅助,样品与萃取剂、内标物混合,超声后将悬浮液离心,上清液进行脱水、过滤、浓缩后,采用气相色谱—质谱联用对浓缩后的萃取物进行分离鉴定。Lafarge 等^[32]利用超声辅助LLE法对小球藻中的挥发性成分进行分析研究,将5g藻样、25mL萃取剂(摩尔比为59.55/40.45的共沸物“丙烷-2-酮/环戊烷”)和100 μ L内标物强烈搅拌5min,再将烧瓶置于超声10min,超声后立即取出悬浮液离心,离心后取上清液,并用硫酸钠脱水,提取物过滤后浓缩,利用GC-MS对浓缩液进行分析。研究发现LLE法适用于沸点较高且阈值较高的挥发性物质。若溶剂选择恰当,LLE法只需一步就可以将目的挥发性物质全部提取^[32]。然而,LLE法需要大量的萃取溶剂,且这些溶剂多数有毒,处理比较困难^[50]。LLE法相比于同时蒸馏萃取和固相微萃取法,测定所需样品中挥发性物质浓度较高^[53]。

3.3 动态顶空提取法

动态顶空提取法(Dynamic headspace extraction, DHE)是一种气体取样方法,通过惰性气体(通常为氮气)的连续流动,使挥发性物质被吸附在吸附剂上,载气从容器中循环或从容器中吹出,从样品中分离出挥发性成分,在进行GC-MS分析之前需要进行热脱附^[46]。这种方法不需要对初始产物进行加热,适用于沸点较低的挥发性物质^[11]。Takahashi 等^[28]使用动态顶空提取法对海带中的挥发性物质进行收集,然后采用SDE法进行分离,再使用气相色谱—质谱联用对挥发性物质进行鉴定,得到3种

表6 几种常见挥发性物质提取方法

Table 6 Common extraction methods of volatile compounds

提取方法	特点	优点	缺点
同时蒸馏萃取	适用于高沸点,挥发性低的物质 ^[47]	有利于微量成分提取 ^[48]	所需样品量大,操作复杂,易产生副产物 ^[47]
液—液萃取	适用于沸点较高,阈值较高的物质 ^[32]	可提取低浓度的物质,溶剂合适则只需一次提取 ^[32]	成本高,许多溶剂有毒,致癌且处理较难,耗时 ^[32, 49]
动态顶空提取	适用于沸点低的挥发性物质 ^[11]	灵活,应用范围广 ^[46]	仪器复杂,富集物质浓度难以达到 ^[46, 48]
固相微萃取	利用“相似相溶原理”,适用于沸点低,阈值低的物质 ^[32]	简便,快捷,成本低,样品量少,应用范围广 ^[49]	对低挥发性物质不敏感 ^[32]

海带的挥发性物质分别为 47, 49, 41 种。

Lepape 等^[11]采用 DHE 法提取红藻 *P. palmata* 的挥发性物质, 先对藻进行破碎, 使用吹扫捕集器, 在 60 mL/min 下用氦气吹扫样品的顶部空间, 并在 25 °C 下扫入多孔吸附剂聚合物, 挥发性化合物在 -40 °C 下使用二氧化碳进行冷聚焦, 并通过在 195 °C 下加热捕集器进行热解吸, 最后利用气相色谱—质谱联用对挥发性物质进行分离鉴定, 共得到挥发性物质 23 种, 包括醛类 7 种, 卤化物 7 种, 烃类 4 种, 醇类 3 种和酮类 2 种。

3.4 固相微萃取法

固相微萃取法 (Solid-phase microextraction, SPME) 的概念最早由 Belardi 和 Pawliszyn 在 1982 年率先提出, 随后由 Pawliszyn 及其同事继续发展了这一概念^[50]。SPME 技术利用“相似相溶”的原理, 依赖装置中的纤维萃取头对挥发性物质进行吸附, 再将萃取头放置于气相色谱进样口进行高温解吸, 利用气相色谱—质谱联用对所解析的挥发性物质进行分离鉴定。SPME 适用于挥发性和半挥发性的物质^[11]。Lafarge 等^[32]研究发现, SPME 更适合于沸点 < 160 °C 的挥发性物质。SPME 具有操作简便快速、样品需求量少、应用广泛等优点^[49]。近年来, 越来越多的学者采用此法对挥发性物质进行研究。如 Hosoglu 等^[23]采用固相微萃取法对 3 种海水微藻和 2 种淡水微藻进行挥发性物质和气味研究, 鉴定了 21 种芳香活性物质, 另外有 6 种无法鉴定。

张敏等^[55]利用顶空固相微萃取法分别对鼠尾藻、浒苔、龙须菜、红毛菜和条斑紫菜进行挥发性物质的提取, 再利用气相色谱—质谱对挥发性物质进行分析。顶空固相微萃取法只需 0.3 g 风干粉碎的藻样, 将其放入 15 mL 固相微萃取顶空瓶中, 水浴后将老化后的萃取头插入顶空瓶中萃取 0.5 h, 静置 10 min 后立刻将萃取头放置在进样口解吸, 利用气相色谱—质谱联用对挥发性物质进行分析。采用此法鉴定出鼠尾藻中挥发性物质共 29 种, 浒苔中 22 种, 龙须菜中 29 种, 红毛菜中 32 种, 条斑紫菜中 28 种, 其中烃类在 5 种藻中种类最多。固相微萃取法在提取挥发性物质过程中所需样品量少, 用时短, 并且无有机溶剂参与, 因此提高了分析速率, 保障了环境安全。

当前, 藻类挥发性物质的提取方法还是基于以上几种食品常用的提取方法, 要更好地了解和分析藻类挥发性物质的组成特点, 除了清楚各种方法的优缺点外, 还应根据试验目的充分考虑传统提取方法是否能够将藻类特有的挥发性物质提取出来。比如, 微藻的尺寸小且细胞壁坚硬, 使用传统方法提取前, 先进行破壁处理, 有利于挥发性物质提取完全。此外, 溶剂的选择也是至关重要的。

4 展望

藻类独特的风味主要是由其挥发性物质成分决定。

合理设计脱腥方案可以将藻类中的腥臭味物质脱除, 从而使藻类能够更好地应用于产品中。此外, 了解藻类中的挥发性物质特别是风味物质的形成途径, 将有利于今后采用培养条件优化或基因工程等方法提高藻类目的风味物质的含量。

当前关于绝大多数挥发性物质的形成机制还不是很清楚。若能对藻类挥发性物质的形成机制有更深入的了解, 将为今后从源头调节藻类挥发性物质的形成提供理论依据。藻类挥发性物质的研究, 提取方法的选择也非常重要。开发一种快捷、简便、灵敏, 且能够更全面地将藻类中挥发性物质提取出来的方法是促进挥发性物质研究的关键。

参考文献

- [1] SUGISAWA H, NAKAMURA K, TAMURA H. The aroma profile of the volatiles in marine green algae (*Ulva pertusa*) [J]. Food Reviews International: Seafoods: Quality and Evaluation, 1990, 6(4): 573-589.
- [2] PERSSON P. Odorous algal cultures in culture collections [J]. Water Science and Technology, 1988, 20(8/9): 211-213.
- [3] DE ALENCAR D B, DINIZ J C, ROCHA S A S, et al. Chemical composition of volatile compounds in two red seaweeds, *Pterocladia capillacea* and *Osmundaria obtusiloba*, using static headspace gas chromatography mass spectrometry [J]. Journal of Applied Phycology, 2017, 29(3): 1 571-1 576.
- [4] VAN DURME J, GOIRIS K, DE WINNE A, et al. Evaluation of the volatile composition and sensory properties of five species of microalgae [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(46): 10 881-10 890.
- [5] ACHYUTHAN K, HARPER J, MANGINELL R, et al. Volatile metabolites emission by in vivo microalgae an overlooked opportunity? [J]. Metabolites, 2017, 7(3): 1-46.
- [6] AKAKABE Y, KAJIWARA T. Bioactive volatile compounds from marine algae: Feeding attractants [J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20(5): 661-664.
- [7] KAMERANSKA Z, DIMITROVA-KONAKLIEVA S, STEFANOV K, et al. Comparative study of the volatile compounds from some black sea brown algae [J]. Botanica Marina, 2002, 45(6): 502-509.
- [8] SÁNCHEZ GARCÍA F, MIRZAYEVA A, ROLDÁN A, et al. Evolution of volatile compounds and sensory characteristics of edible green seaweed (*Ulva rigida*) during storage at different temperatures [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(12): 5 475-5 482.
- [9] ABDEL-BAKY H H, SHALLAN M A, BAROTY G E, et al. Volatile compounds of the microalga *Chlorella vulgaris* and their phytotoxic effect [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2002, 5(1): 61-65.
- [10] LÓPEZ-PÉREZ O, PICON A, NUÑEZ M. Volatile com-

- pounds and odour characteristics of seven species of dehydrated edible seaweeds[J]. *Food Research International*, 2017, 99: 1 002-1 010.
- [11] LE PAPE M, GRUA-PRIOI J, PROST C, et al. Optimization of dynamic headspace extraction of the edible red algae *Palmaria palmata* and identification of the volatile components [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(3): 550-556.
- [12] BALBAS J, HAMID N, LIU Ting-ting, et al. Comparison of physicochemical characteristics, sensory properties and volatile composition between commercial and New Zealand made wakame from *Undaria pinnatifida*[J]. *Food Chemistry*, 2015, 186: 168-175.
- [13] 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.
- [14] ENOIU M, WELLMAN M, LEROY P, et al. Gas and liquid chromatography-mass spectrometry of aldehydic products from lipid peroxidation[J]. *Analisis*, 2000, 28(4): 285-290.
- [15] YAMAMOTO M, BALDERMANN S, YOSHIKAWA K, et al. Determination of volatile compounds in four commercial samples of Japanese green algae using solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry[J]. *The Scientific World Journal*, 2014, 2 014: 1-8.
- [16] KAMENARSKA Z G, DIMITROVA-KONAKLIEVA S D, NIKOLOVA C, et al. Volatile components of the freshwater algae *Spirogyra* and *Mougeotia*[J]. *Zeitschrift Fur Naturforschung C A Journal of Bioences*, 2000, 55(7/8): 495-499.
- [17] AGUERO J, LORA J, ESTRADA K, et al. Volatile components of a commercial sample of the blue-green algae *Spirulina platensis*[J]. *Journal of Essential Oil Research*, 2003, 15(2): 114-117.
- [18] SUN Sang-mi, CHUNG Gyu-hwa, SHIN Tai-sun. Volatile compounds of the green alga, *Capsosiphon fulvescens*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24(5): 1 003-1 013.
- [19] 杨少玲, 于刚, 戚勃, 等. 顶空固相微萃取法分析龙须菜干品中的挥发性成分[J]. *南方水产科学*, 2016, 12(6): 115-122.
- [20] FERRACES-CASAI S P, LAGE-YUSTY M A, RODRÍGUEZ-BERNALDO DE QUIRÓS A, et al. Rapid identification of volatile compounds in fresh seaweed[J]. *Talanta*, 2013, 115: 798-800.
- [21] TANCHOTIKUL U, HSIEH T C Y. Volatile flavor components in crayfish waste[J]. *Journal of Food Science*, 1989, 54(6): 1 515-1 520.
- [22] SANTOS A B, FERNANDES A S, WAGNER R, et al. Biogenesis of volatile organic compounds produced by *Phormidium autumnale* in heterotrophic bioreactor [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(3): 1 561-1 570.
- [23] HOSOGLU M I. Aroma characterization of five microalgae species using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry/olfactometry[J]. *Food Chemistry*, 2018, 240: 1 210-1 218.
- [24] PENNARUN A, PROST C, DEMAIMAY M. Identification and origin of the character-impact compounds of raw oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2002, 82(14): 1 652-1 660.
- [25] DEMBITSKY V M, SHKROB I, DOR I. Separation and identification of hydrocarbons and other volatile compounds from cultured blue-green alga *Nostoc* sp. by gas chromatography-mass spectrometry using serially coupled capillary columns with consecutive nonpolar and semipolar stationary phases [J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 862(2): 221-229.
- [26] ALI G. Identification of volatile organic compounds produced by algae [J]. *Egyptian Journal of Phycology*, 2004, 5(1): 71-81.
- [27] MILOVANOVIC I, MIŠAN A, SIMEUNOVIC J, et al. Determination of volatile organic compounds in selected strains of Cyanobacteria[J]. *Journal of Chemistry*, 2015, 2 015: 1-6.
- [28] TAKAHASHI H, SUMITANI H, INADA Y, et al. Identification of volatile compounds of Kombu (*Laminaria* spp.) and their odor description[J]. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 2002, 49(4): 228-237.
- [29] GARICANO VILAR E, OSULLIVAN M G, KERRY J P, et al. Volatile compounds of six species of edible seaweed: A review[J]. *Algal Research*, 2020, 45: 101740.
- [30] PAUL C, POHNERT G. Production and role of volatile halogenated compounds from marine algae [J]. *Natural Product Reports*, 2011, 28(2): 186-195.
- [31] BLANK I. Sensory relevance of volatile organic sulfur compounds in food [J]. *Heteroatomic Aroma Compounds*, 2002, 826: 25-53.
- [32] LAFARGE C, CAYOT N. Insight on a comprehensive profile of volatile compounds of *Chlorella vulgaris* extracted by two "green" methods[J]. *Food Science & Nutrition*, 2019, 7(3): 918-929.
- [33] ZHOU Lv, CHEN Jiao, XU Ji-lin, et al. Change of volatile components in six microalgae with different growth phases[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(3): 761-769.
- [34] NOR QHAIRUL IZZREEN M N, VIJAYA RATNAM R. Volatile compound extraction using Solid Phase Micro Extraction coupled with Gas Chromatography Mass Spectrometry (SPME-GCMS) in local seaweeds of *Kappaphycus al-*

- varezi*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*[J]. International Food Research Journal, 2011, 18(4): 1 449-1 456.
- [35] YAYLAYAN V A, KEYHANI A. Origin of 2,3-pentanedione and 2,3-butanedione in *D*-glucose/*L*-alanine maillard model systems[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(8): 3 280-3 284.
- [36] JELEN H, GRACKA A. Characterization of aroma compounds; Structure, physico-chemical and sensory properties[M]// Elisabeth Guichard. Flavour: From Food to Perception. New Jersey: John Wiley & Sons Ltd, 2016.
- [37] SANTOS A B, VIEIRA K R, NOGARA G P, et al. Bio-generation of volatile organic compounds by microalgae: Occurrence, behavior, ecological implications and industrial applications[M]//Frank Columbus. Volatile Organic Compounds: Occurrence, Behavior and Ecological Implications. New York: Nova Science Publishers, 2016: 1-23.
- [38] WENDEL T, JÜTTNER F. Lipoygenase-mediated formation of hydrocarbons and unsaturated aldehydes in freshwater diatoms [J]. Phytochemistry, 1996, 41 (6): 1 445-1 449.
- [39] POHNERT G, BOLAND W. The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms[J]. Natural Product Reports, 2002, 19(1): 108-122.
- [40] GSCHWEND P M, MACFARLANE J K, NEWMAN K A. Volatile halogenated organic compounds released to seawater from temperate marine macroalgae[J]. Science, 1985(227): 1 033-1 035.
- [41] EKDAHL A, PEDERSEN M, ABRAHAMSSON K. A study of the diurnal variation of biogenic volatile halocarbons[J]. Marine chemistry, 1998, 63(1/2): 1-8.
- [42] BONNARME P, ARFI K, DURY C, et al. Sulfur compound production by *Geotrichum candidum* from *L*-methionine: importance of the transamination step[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 205(2): 247-252.
- [43] WITHERS S T, KEASLING J D. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(5): 980-990.
- [44] HSIEH M, GOODMAN H M. The arabidopsis IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis[J]. Plant Physiology, 2005, 138(2): 641-653.
- [45] 左照江. 藻类挥发性有机化合物研究进展[J]. 水生生物学报, 2017, 41(6): 1 369-1 379.
- [46] GRESSLER V, COLEPICOLOB P, PINTO A E. Useful strategies for algal volatile analysis[J]. Current Analytical Chemistry, 2009, 5(3): 271-292.
- [47] 刘百战. 固相微萃取和同时蒸馏萃取与气相色谱-质谱法分析芥末膏制品的风味成分[J]. 分析化学, 2000, 28(12): 1 489-1 492.
- [48] 郭凯, 芮汉明. 食品中挥发性风味成分的分离、分析技术和评价方法研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(4): 110-115.
- [49] ALONSO A, FERNÁNDEZ-TORROBA M A, TENA M T, et al. Development and validation of a solid-phase micro-extraction method for the analysis of volatile organic compounds in groundwater samples [J]. Chromatographia, 2003, 57(5): 369-378.
- [50] 衣宇佳, 田怀香, 郑小平, 等. 同时蒸馏萃取和固相微萃取法提取国产干酪中风味物质[J]. 食品与机械, 2008, 24(2): 65-69.
- [51] 王丽娟, 刘晓燕, 杨宋琪, 等. HS-GC-MS 法和 SDE-GC-MS 法分析杜氏盐藻挥发性成分[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(7): 136-142.
- [52] 宋绍华, 裘迪红. 浒苔挥发性风味成分分析[J]. 食品科学, 2012, 33(12): 177-180.
- [53] SÁNCHEZ-PALOMO E, ALAÑÓN M E, DÍAZ-MAROTO M C, et al. Comparison of extraction methods for volatile compounds of Muscat grape juice[J]. Talanta, 2009, 79(3): 871-876.
- [54] 张敏, 丁洪流, 金琦, 等. 5 种不同种属经济海藻挥发性成分的比较分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(19): 251-255.
-
- (上接第 214 页)
- [28] LOHANI U C, MUTHUKUMARAPPAN K. Application of the pulsed electric field to release bound phenolics in sorghum flour and apple pomace[J]. Innovative Food Ence & Emerging Technologies, 2016, 35: 29-35.
- [29] 齐娜. 新疆红肉苹果多酚的提取纯化[D]. 西安: 陕西师范大学, 2018: 3-6.
- [30] 贺金娜, 曹栋, 史苏佳, 等. 大孔树脂纯化苹果多酚的工艺优化[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(5): 135-141.
- [31] 王振宇, 刘春平. 大孔树脂 AB-8 对苹果多酚的分离纯化[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(4): 21-24.
- [32] 贺金娜, 曹栋, 史苏佳, 等. 苹果多酚的固相萃取纯化研究[J]. 食品工业科技, 2014(14): 290-293.
- [33] 张素宁, 彭子芳, 张光瑞, 等. 磁性固相萃取-液相色谱法测定果汁中的 3 种双酚类物质[J]. 河南工业大学学报, 2020, 41(2): 83-89.
- [34] CAO Xue-li, WANG Cong, PEI Hai-run, et al. Separation and identification of polyphenols in apple pomace by high-speed counter-current chromatography and high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1 216: 4 268-4 274.
- [35] 李志华. 苹果多酚的提取、分离及降血糖活性成分研究[D]. 徐州: 中国矿业大学, 2014: 14-29.
- [36] 郭娟. 苹果渣中苹果多酚的提取、纯化及功效研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2006: 13-44.