

热处理对牛骨酶解液美拉德反应产物呈味物质及挥发性成分的影响

穆红, 罗瑞明, 李亚蕾*

(宁夏大学食品与葡萄酒学院 银川 750021)

摘要 探讨不同热处理条件(温度 110, 115, 120, 125, 130 °C 和时间 25, 40, 55, 70, 85 min) 对牛骨酶解液美拉德反应产物(EBBH-MRP) 呈味特性及挥发性风味成分的影响。结果表明: 热处理温度低于 130 °C 时, 总游离氨基酸含量降低, 这与鲜味氨基酸和苦味氨基酸变化趋势一致。风味核苷酸含量随温度上升呈增加趋势。在不同温度下, 共检测到 63 种挥发性风味物质, 包括醛类、酮类、醇类、酸类和杂环类化合物。当热处理时间超过 40 min 时, 总游离氨基酸含量不断增加, 风味核苷酸含量也缓慢增加。随着热处理时间的延长, 挥发性风味物质种类减少, 共检测到 54 种。醛类、酮类含量随时间的延长而明显增加, 至 70 min, 其含量保持相对稳定。结论: 适当的热处理条件可以提升 EBBH-MRP 的呈味及风味特性。

关键词 牛骨; 美拉德; 游离氨基酸; 核苷酸; 挥发性风味

文章编号 1009-7848(2023)09-0181-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.09.019

骨骼是家畜胴体的重要组成部分, 年产量巨大, 营养物质非常丰富, 新鲜的畜骨含有 11%~15% 的蛋白质, 酶解可将畜骨水解为小分子肽和氨基酸^[1]。牛骨酶解液经过美拉德反应产生牛肉风味, 美拉德反应是氨基、羰基化合物通过 3 个阶段的反应最终形成肉香味物质的过程^[2]。

美拉德反应过程十分复杂, 产生的风味与氨基酸种类、还原糖种类、温度、时间、pH 值等多个因素有关^[3], 其中温度和时间对滋味及风味有较大影响。潘晓倩等^[4]研究发现美拉德反应产物种类与烘焙温度和时间成正比。Jiang 等^[5]研究发现半乳糖-牛酪蛋白肽美拉德反应的游离氨基含量随温度的升高而增加。章银良等^[6]研究发现酪蛋白-木糖美拉德反应产物在不同温度条件下得到的抗氧化物质主要是醛类、酮类、酚类、烯烃和杂环类物质。

本研究将牛骨酶解液与还原糖发生美拉德反应, 采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法(HS-SPME-GC/MS) 等方法分析不同热处理温度、时间对 EBBH-MRP 呈味特性及风味品质的影响, 旨在为牛骨呈味基料的制备提供技术参考, 提高牛的副产物综合利用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜秦川牛骨购于宁夏尚农生物科技产业发展有限公司。

中性蛋白酶(酶活力 5×10^4 U)、风味蛋白酶(酶活力 1×10^5 U), 北京索莱宝科技有限公司; D-木糖、葡萄糖、维生素 B₁、L-Cys 等其它分析纯试剂(食品级), 浙江一诺生物科技有限公司; 色谱纯试剂正构系列烷烃(C7~C30)、1,2-二氯苯, 美国 Sigma 公司; 色谱纯有机试剂, 美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 仪器与设备

LA8080 氨基酸自动分析仪, 日本株式会社日立高新技术科学有限公司; 1260 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; 集热式磁力搅拌器 DF-101S(分体款), 上海力辰邦西仪器科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 牛骨酶解液的制备 牛骨经破碎后, 去除可见的残余肉和骨髓, 然后用去离子水清洗, 于 0.1 MPa 条件下, 高压蒸煮 2.5 h, 然后 50 °C 烘干 6 h。粉碎后过 100 目筛得牛骨粉, 取适量牛骨粉于 100 mL 锥形瓶中, 同时添加中性蛋白酶和风味蛋白酶, 加一定量的去离子水, 搅拌均匀后, 放入恒温振荡仪中进行酶解。酶解结束后灭酶(90 °C, 10 min), 冷却后离心(4000 r/min, 10 min), 取上清液。

1.3.2 EBBH-MRP 的制备 将牛骨酶解液 20

收稿日期: 2022-09-21

第一作者: 穆红, 女, 硕士生

通信作者: 李亚蕾 E-mail: yleili.cn@163.com

mL、L-Cys 0.6 g、D-木糖 0.4 g、葡萄糖 0.4 g、维生素 B₁ 0.04 g,混匀后放入油浴锅中,分别在(110, 115, 120, 125, 130 ℃)条件下反应 40 min; 115 ℃条件下反应 25, 40, 55, 70, 85 min, 得到 EBBH-MRP, 于 4 ℃冷藏 24 h 后进行下一步分析。

1.3.3 氨基酸含量的测定 对样品中的 16 种游离氨基酸 (Asp、Glu、Ser、His、Gly、Thr、Arg、Ala、Tyr、Cys、Val、Met、Phe、Ile、Leu、Lys) 进行定量分析。色谱柱型号为 Zorbax Eclipse-AAA(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 高效液相色谱法按照钱敏等^[7]的方法进行。

1.3.4 呈味核苷酸含量的测定 将 1 mL 酶解液放入 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 去离子水, 离心(10 000 r/min, 4 ℃, 20 min), 将上清液放入 50 mL 离心管中, 定容, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 待测。

高效液相色谱条件: 色谱柱: TSK-gel ODS-80 TM(4.6 mm×250 mm), 柱温: 30 ℃, 紫外检测波长: 254 nm, 进样量: 10 μL, 流速: 0.8 mL/min。流动相: 洗脱液 A 为 0.05 mol/L 甲醇, 洗脱液 B 为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(pH 5.4); 流动相用 0.45 μm 滤膜过滤, 室温下超声脱气 30 min。采用二元流动相进行梯度洗脱分离, 检测时间: 23 min; 磷酸二氢钾随时间配比为: 0 min: 0~100%; 11 min: 10%~90%; 18 min: 0~100%; 23 min: 0~100%。

1.3.5 HS-SPME-GC/MS 分析 固相微萃取条件: 取 2 mL 样品放入 15 mL 顶空瓶, 并加入内标液(6.42 μg/mL 的 1,2-二氯苯, 4 μL), 涡旋仪混匀, 然后用聚四氟乙烯隔膜密封顶空瓶口, 50 ℃下保温 20 min, 用活化好的 75 μm Carboxen/PDMS 萃取头在进样瓶顶空部分进行吸附, 50 ℃吸附 20 min, 然后插入 GC 进样口, 250 ℃解吸 7 min。

GC 条件: TR-35 MS 色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 载气为高纯氮气; 进样口温度 250 ℃, 不分流进样; 升温条件: 初始温度 35 ℃, 持续 3 min, 以 2.5 ℃/min 升至 70 ℃, 然后以 8 ℃/min 升至 150 ℃, 最后以 20 ℃/min 的速率上升到 230 ℃, 保持 5 min。

MS 条件: 检测器温度 280 ℃; 离子源温度 200 ℃; 电子电离源; 电子能量 70 eV; 传输线温度 250 ℃; 质量扫描范围 30~500 m/z。

1.4 数据处理

试验数据使用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行统计处理。在 NIST 标准质谱库中自动检索各组分质谱数据, 并通过挥发性风味物质与内标物 1,2-二氯苯进行相对定量。

2 结果与分析

2.1 热处理温度对 EBBH-MRP 呈味物质的影响

不同温度测定的游离氨基酸及风味核苷酸含量及变化趋势如表 1 和图 1 所示。游离氨基酸的存在使热处理样品有不同的滋味。在美拉德反应中, 寡肽可以通过热处理降解为游离氨基酸。在不同热处理温度条件下, 总游离氨基酸含量逐渐降低, 这是因为由于其参与了美拉德反应, 温度继续升高至 130 ℃时氨基酸含量增加, 这可能是因为肽在高温下降解。在温度 110~125 ℃范围内, 游离氨基酸含量随着温度的上升逐渐下降, 这可归因于美拉德反应过程中 Strecker 的增强和游离氨基酸在半胱氨酸存在下的热反应中热降解形成挥发性化合物, 此外, 还有可能是糖和游离氨基酸或结合氨基酸之间的交联形成非挥发性化合物^[8]。这与 Liu 等^[9]的研究结果相吻合。

游离氨基酸根据官能团不同分为苦味氨基酸(组氨酸、精氨酸、酪氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸和亮氨酸)、鲜味氨基酸(谷氨酸、半胱氨酸)和甜味氨基酸(包括丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、丙氨酸和赖氨酸)。在不同热处理温度条件中, 苦味氨基酸含量均较高, 呈苦味的组氨酸、精氨酸、苯丙氨酸含量均下降, 蛋氨酸含量增加。但苦味氨基酸含量与苦味并没有直接关系, 低于其阈值的苦味氨基酸具有提鲜和增加滋味复杂的作用^[10]。呈鲜味的半胱氨酸含量随着温度的上升而下降, 这可能是因为其参与美拉德反应过程中挥发性化合物的形成^[11]。甜味氨基酸稳定增加, 其中苏氨酸、丙氨酸含量升高, 赖氨酸含量下降, 这是因为加热过程中蛋白质降解形成甜味氨基酸增加。

呈味核苷酸由嘌呤碱基或嘧啶碱基、核糖或脱氧核糖和磷酸组成。核苷酸能与氨基酸协同增鲜, 并可以提升总体风味^[12]。由表 1 可知, 不同热

处理温度对核苷酸类物质的影响不同,牛骨酶解液经热处理后,检测出了 5'-GMP 和 5'-IMP 两种核苷酸,5'-GMP 和 5'-IMP 是重要的鲜味核苷酸。在美拉德反应中,ATP 在 ATP 酶等的作用下转化为 ADP,然后在磷酸激酶的作用下降解为 AMP,再脱氢形成 IMP。随着温度的升高,两种核苷酸的含量均增加,115 °C 略有下降,主要的原因可能是随着温度的升高,RNA 更容易被破坏,有利于 5'-GMP 和 5'-IMP 的释放^[13]。检测到的 5'-GMP 含量高于 5'-IMP,说明在牛骨酶解液美拉德反应中,5'-GMP 对鲜味所做的贡献大于 5'-IMP。

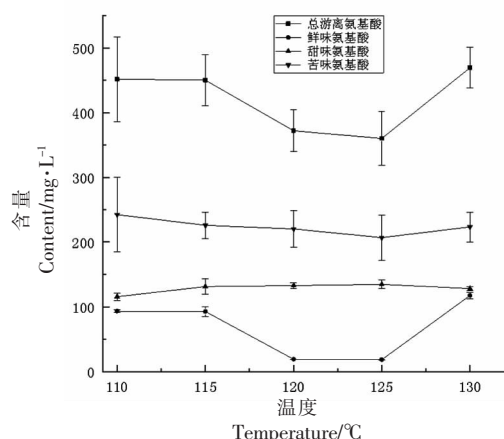


图 1 热处理样品中相关氨基酸含量随温度的变化趋势

Fig.1 Variation trend of related amino acid content in heat-treated samples with temperature

表 1 不同热处理温度 EBBH-MRP 的滋味物质及其含量 (mg/L)

Table 1 Taste substances and their contents of EBBH-MRP at different heat treatment temperatures (mg/L)							
滋味物质	呈味特性	阈值	110 °C	115 °C	120 °C	125 °C	130 °C
谷氨酸	鲜	300	8.66 ± 0.34	8.44 ± 1.18	8.23 ± 0.15	7.86 ± 0.16	11.04 ± 0.27
丝氨酸	甜	1 500	10.51 ± 0.13	10.59 ± 0.47	10.58 ± 1.04	10.54 ± 0.15	10.43 ± 0.29
组氨酸	苦	200	28.94 ± 1.59	20.90 ± 0.80	20.14 ± 0.81	19.14 ± 0.81	22.53 ± 1.08
甘氨酸	甜	1 300	12.94 ± 0.33	12.84 ± 2.85	12.77 ± 0.30	13.77 ± 0.60	14.62 ± 0.43
苏氨酸	甜	2 600	18.70 ± 0.60	28.11 ± 3.42	28.76 ± 1.43	32.76 ± 1.43	27.30 ± 0.20
精氨酸	苦	500	34.26 ± 0.1	31.80 ± 3.72	34.26 ± 0.08	25.26 ± 0.08	31.62 ± 0.48
丙氨酸	甜	600	38.02 ± 1.43	53.55 ± 5.43	58.36 ± 0.93	59.24 ± 4.00	45.90 ± 1.86
酪氨酸	苦	910	48.64 ± 2.18	44.25 ± 2.91	49.42 ± 4.41	45.37 ± 5.39	46.81 ± 2.78
半胱氨酸	鲜	N	84.64 ± 2.05	84.56 ± 6.13	10.63 ± 0.09	10.64 ± 0.10	106.70 ± 4.67
缬氨酸	苦	400	30.58 ± 6.72	28.34 ± 1.31	26.08 ± 0.07	29.11 ± 0.25	28.11 ± 0.41
蛋氨酸	苦	300	27.28 ± 1.89	16.29 ± 0.59	38.42 ± 0.50	33.17 ± 0.24	32.01 ± 0.44
苯丙氨酸	苦	900	36.94 ± 0.87	36.52 ± 0.59	27.45 ± 0.07	22.46 ± 0.07	17.01 ± 0.40
异亮氨酸	苦	900	26.01 ± 1.29	23.81 ± 7.24	34.55 ± 0.39	22.54 ± 0.20	35.91 ± 1.35
亮氨酸	苦	1 900	9.73 ± 0.49	23.96 ± 2.83	9.99 ± 0.11	9.99 ± 0.11	9.43 ± 0.25
赖氨酸	甜	500	35.66 ± 3.28	26.40 ± 0.16	22.22 ± 0.24	19.22 ± 0.14	29.93 ± 0.28
5'-GMP	鲜	125	133.54 ± 0.67	115.81 ± 0.62	130.09 ± 0.32	156.75 ± 0.40	180.09 ± 1.26
5'-IMP	鲜	140	25.14 ± 0.14	21.84 ± 1.23	27.89 ± 0.15	35.99 ± 0.08	46.69 ± 0.26

2.2 热处理温度对 EBBH-MRP 挥发性风味成分的影响

不同热处理温度的 EBBH-MRP 的挥发性风味成分种类和含量见表 2, 通过比较峰面积和内标物的峰面积来计算这些化合物的贡献。不同热处理温度共检测出 62 种挥发性风味物质, 其主要为醇类、醛类、酮类、酸类和杂环类化合物。在不同热处理温度下均检测到 1-丁醇、1-己醇、苯甲醇、

苯基乙醇、苯甲醛、糠醛、1-(1H-吡咯-2-基)-乙酮、乙酸、苯甲酸、丁酸、3-甲基丁酸、辛酸、戊酸、丙酸、2-甲基丙酸、吡咯、1,3-二氯-苯、苜蓿、苯酚等 19 种挥发性物质。不同温度条件下的 EBBH-MRP 经 HS-SPME-GC/MS 分析, 在 110, 115, 120, 125, 130 °C 条件下分别检测出 38, 38, 34, 42, 35 种挥发性风味成分, 含量分别为 176.86, 195.33, 144.06, 142.00, 148.24 μg/kg。

热处理后形成的挥发性化合物可分为3类:1)糖脱水或破碎产物(如呋喃、羰基和酸);2)氨基酸通过降解得到的产物(例如:醛类);3)进一步作用产生的挥发性化合物(例如:吡咯、吡啶、咪唑和噻唑)。由表2及图2可知,醇类化合物含量随着热处理温度的增加明显降低,其中1-丁醇随温度升高变化明显,说明温度对1-丁醇含量影响大,醇类化合物对美拉德反应产物的气味有协同增效作用,但对风味的整体贡献较小。

醛、酮类化合物是由于氨基酸、脂肪酸降解产生的,对肉香味贡献大^[4]。随着热处理程度增加,醛类化合物含量显著增加,说明氨基酸降解加快。其中糠醛的含量变化较大。糠醛是EBBH-MRP中焦糖风味的重要来源,羰基化合物经Amadori重排后脱氨,自身环化成糠醛类化合物^[5],这些化合物除了本身有水果、奶油香或焦糖香,还能修饰肉味^[6-17]。苯甲醛在不同温度条件下均被检测到,其可能赋予产物脂香味。此外,醛类阈值低,有6~9个碳时具有水果味、清淡味和脂肪味,与其它物质具有重叠的风味效应,并对整体的风味特征有贡献。酮类化合物的阈值比醛类高,可以在较低的温度下生成,如110℃,其含量随着温度的上升而增加。酮类物质有花香、清香和水果香,对EBBH-MRP的风味形成有益,反应温度为130℃条件下醛、酮类化合物含量最多。

杂环化合物主要有吡咯、吡啶、咪唑、吡嗪和

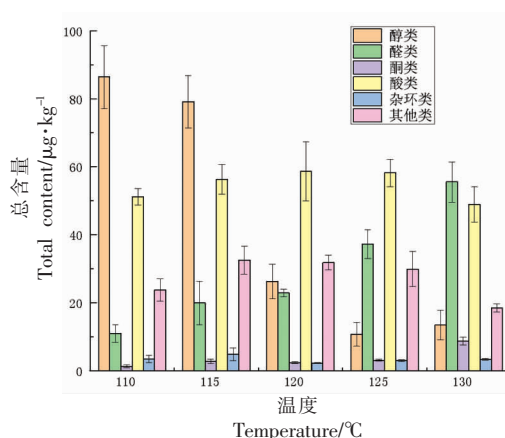


图2 不同热处理温度的EBBH-MRP中各类挥发性风味物质含量的变化趋势

Fig.2 Variation trend of volatile flavor compounds in EBBH-MRP at different heat treatment temperatures

噻唑。吡嗪、噻唑、吡咯类呈甜烤香味,其中吡嗪是肽美拉德反应系统中最典型的挥发性化合物,它们的阈值非常低,这对酶解产物的风味贡献较大^[8]。酯类化合物有甜的水果香,酯类和酮类物质共存时能协调和平衡整体风味^[9]。不同温度下检测出了丁酸甲酯、乙酸丁酯、苯乙酸辛酯等酯类。不同热处理温度的EBBH-MRP产生的酸类化合物相对含量相差不大,相对含量最高的是具有不良气息的乙酸,但酸的阈值非常高,对酶解产物的风味几乎没有影响。

表2 不同热处理温度的EBBH-MRP的挥发性风味物质及其含量

Table 2 Volatile flavor compounds and their contents of EBBH-MRP at different heat treatment temperatures

分类	保留时间/min	挥发性成分	含量/μg·kg ⁻¹					
			110 °C	115 °C	120 °C	125 °C	130 °C	
醇类	6.69	1-甲氧基-2-丙醇	-	-	-	-	1.51	
	7.23	1-丁醇	83.65	74.87	22.97	6.09	7.06	
	9.69	1-戊醇	0.12	0.38	-	-	-	
	10.78	2-甲基-3-呋喃硫醇	0.04	-	-	-	-	
	12.52	1-己醇	0.31	0.61	0.50	0.41	0.26	
	14.07	2-糠基硫醇	0.13	-	0.22	0.71	1.75	
	15.06	1-庚醇	0.14	0.22	0.13	0.17	-	
	15.82	2-乙基-1-己醇	-	-	0.50	-	-	
	22.11	苯甲醇	0.21	0.31	0.20	0.29	0.27	
	22.64	苯基乙醇	1.80	2.72	1.75	3.03	2.58	
	醛类	4.90	己醛	0.72	1.65	1.42	1.25	-
		13.32	壬醛	0.18	0.32	0.36	0.30	-
		14.76	糠醛	9.08	14.95	19.53	20.55	46.22
16.01		苯甲醛	0.97	2.68	1.52	1.76	0.81	

(续表2)

分类	保留时间/min	挥发性成分	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$				
			110 °C	115 °C	120 °C	125 °C	130 °C
酮类	24.55	2,4-二羟基-苯甲醛	-	-	-	13.35	8.51
	29.73	5-羟甲基糠醛	-	0.30	-	-	-
	9.61	二氢-2-甲基-3(2H)-呋喃酮	-	0.63	0.62	0.41	0.85
	10.29	丁酮	0.64	0.80	-	-	0.88
	10.59	1-羟基-2-丙酮	0.38	1.13	1.22	-	1.40
	15.71	1-(2-呋喃基)-乙酮	-	-	-	1.47	3.61
	18.56	苯乙酮	-	-	0.22	-	-
	23.40	1-(1H-吡咯-2-基)-乙酮	0.14	0.13	0.14	0.60	0.89
	23.61	2H-吡喃-2,6(3H)-二酮	0.07	-	0.12	0.11	0.18
	25.88	1-(4-甲氧基苯基)-2-丙酮	-	-	-	0.26	-
	27.15	2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4H-吡喃-4-酮	-	-	-	0.20	27.145
	酸类	29.68	1,7-二氢-6H-嘌呤-6-酮	-	-	-	-
14.59		乙酸	19.99	25.37	34.94	28.79	29.14
15.64		蚁酸	-	1.69	1.22	1.99	1.61
16.50		丙酸	2.43	2.64	3.21	3.99	3.43
17.13		2-甲基丙酸	3.08	2.77	2.14	2.29	1.86
17.98		4-羟基丁酸	-	-	-	-	0.37
18.21		丁酸	8.84	9.29	8.81	9.42	8.06
18.96		3-甲基丁酸	9.91	7.92	5.06	5.76	3.89
20.06		戊酸	0.84	0.82	0.61	0.68	0.61
21.09		4-甲基戊酸	0.52	-	-	0.31	-
21.71		己酸	3.21	2.79	1.49	1.85	-
23.25		庚酸	0.62	0.72	-	0.31	-
24.69		辛酸	0.71	0.78	0.53	0.98	0.76
26.07		壬酸	0.47	0.65	-	0.73	0.67
杂环类		28.96	苯甲酸	0.48	0.84	0.63	1.04
	33.24	2-乙基己基酯-辛酸	0.06	-	-	-	-
	35.94	正十六烷酸	-	-	-	0.06	-
	7.72	吡啶	0.10	-	-	-	-
	9.22	噻唑	-	0.21	-	0.17	0.61
	10.15	4-甲基噻唑	-	0.63	0.19	0.32	0.29
	15.91	吡咯	3.19	3.95	2.04	2.44	2.44
	18.44	2-乙酰噻唑	0.12	-	-	-	-
	26.86	4-甲基-1H 咪唑	-	0.08	-	-	-
	其它	3.11	丁酸甲酯	0.57	-	-	2.08
3.49		癸烷	-	-	-	-	1.79
3.50		4-乙基-辛烷	-	-	0.83	-	-
3.94		甲苯	6.46	14.22	11.47	10.99	-
4.77		乙酸丁酯	-	-	-	0.24	-
7.38		右旋柠檬烯	-	-	-	0.35	-
15.25		1,3-二氯-苯	12.84	12.84	12.84	12.84	12.84
22.77		苜蓿	3.51	4.55	2.88	2.88	3.55
23.83		苯酚	0.23	0.32	0.21	0.27	0.25
24.06		乙基麦芽酚	-	-	3.52	-	-
24.86		对甲酚	-	0.37	-	0.27	-
29.13		吡啶	0.14	-	-	-	-
30.34		苯乙酸辛酯	0.12	-	-	-	-
31.28	1,2,3-三甲氧基-己烷	0.03	-	-	-	-	

注:-表示未检出。

2.3 热处理时间对 EBBH-MRP 呈味物质的影响

如表 3 和图 3 所示,不同热处理时间(25,40,55,70,85 min)检测到的总游离氨基酸含量整体呈上升趋势,70 min 时最多。70 min 后游离氨基酸含量下降,过长时间的热处理不利于游离氨基酸的积累,其较少的原因与热预处理温度下的原因分析相一致。随着时间的延长,苦味氨基酸增加明显,主要由于酪氨酸含量的增加,但其含量均低于呈味阈值,这时可增加其它氨基酸的鲜味和甜味。呈苦味的苯丙氨酸含量下降,这可能因为其转化为苯甲醛等挥发性风味。呈现鲜味的天冬氨酸和谷氨酸含量增加,其钠盐具有类似味精的鲜味,有助于改善酸味^[20]。甜味氨基酸则整体呈下降趋势,其中呈甜味的丙氨酸含量高,下降幅度大,丙氨酸在美拉德反应过程中呈现焦糖味,说明随着时间的延长,EBBH-MRP 的焦糖味不断减弱。热处理时间的长短影响各氨基酸的含量变化,合理控制热处理时间能降低游离氨基酸损失,提升滋味。

随着热处理时间的延长,检测到 5'-GMP、5'-IMP 两种呈味核苷酸,其含量呈现稳定上升的趋势。5'-IMP 可以提供令人愉悦的肉香味,Murata

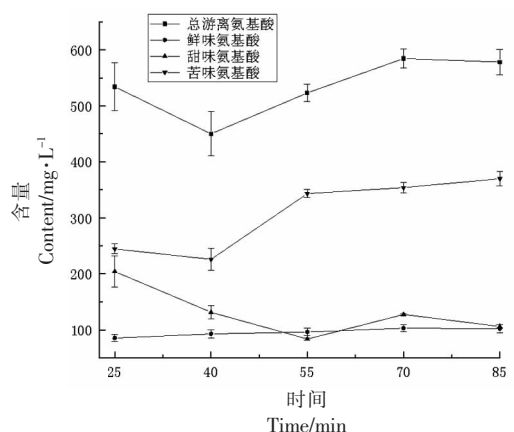


图 3 热处理样品中相关氨基酸含量随时间的变化趋势
Fig.3 Variation trend of related amino acid contents in heat-treated samples with time

& Sakaguchi 研究发现黄尾鱼中 IMP 被降解后,其提取物鲜味显著降低,当添加 2 mL IMP 后口感恢复,而添加味精则没有恢复味觉的作用^[21]。呈味核苷酸与谷氨酸混合可改善食品风味,使得风味更加圆润、浓郁^[22]。核苷酸随时间延长含量增加的原因可能是由于 RNA 逐渐被破坏,释放出了更多的 5'-GMP 和 5'-IMP。

表 3 不同热处理时间 EBBH-MRP 的滋味物质及其含量 (mg/L)

Table 3 Taste substances and their contents of EBBH-MRP with different heat treatment time (mg/L)

滋味物质	呈味特性	阈值	25 min	40 min	55 min	70 min	85 min
谷氨酸	鲜	300	4.74 ± 0.10	8.44 ± 1.18	5.86 ± 0.15	12.07 ± 0.18	11.97 ± 0.76
丝氨酸	甜	1 500	7.0 ± 0.13	10.59 ± 0.47	9.01 ± 0.09	14.25 ± 0.09	15.34 ± 0.34
组氨酸	苦	200	22.03 ± 2.69	20.90 ± 0.80	18.91 ± 0.58	30.10 ± 0.72	30.47 ± 1.31
甘氨酸	甜	1 300	10.41 ± 1.40	12.84 ± 2.85	6.02 ± 0.51	14.30 ± 0.05	12.33 ± 0.34
苏氨酸	甜	2 600	7.98 ± 1.17	28.11 ± 3.42	15.26 ± 0.76	8.217 ± 0.10	7.59 ± 0.28
精氨酸	苦	500	32.09 ± 2.05	31.80 ± 3.72	32.54 ± 0.65	48.94 ± 1.71	46.56 ± 1.76
丙氨酸	甜	600	157.23 ± 24.73	53.55 ± 5.43	33.35 ± 0.65	65.11 ± 0.87	48.39 ± 1.07
酪氨酸	苦	910	22.16 ± 0.31	44.25 ± 2.91	132.76 ± 3.45	105.46 ± 3.28	131.99 ± 5.13
半胱氨酸	鲜	N	80.64 ± 6.02	84.56 ± 6.13	90.34 ± 6.25	91.06 ± 6.19	90.13 ± 6.11
缬氨酸	苦	400	71.29 ± 3.01	28.34 ± 1.31	77.41 ± 1.22	84.38 ± 2.56	86.21 ± 2.94
蛋氨酸	苦	300	21.06 ± 0.12	16.29 ± 0.59	27.03 ± 0.32	34.95 ± 0.17	28.74 ± 0.74
苯丙氨酸	苦	900	37.14 ± 0.21	36.52 ± 0.59	24.37 ± 0.15	18.04 ± 0.17	25.14 ± 0.74
异亮氨酸	苦	900	25.07 ± 0.29	23.81 ± 7.24	9.15 ± 0.10	22.15 ± 0.33	11.26 ± 0.18
亮氨酸	苦	1 900	13.62 ± 0.14	23.96 ± 2.83	21.20 ± 0.60	9.94 ± 0.12	9.56 ± 0.33
赖氨酸	甜	500	21.58 ± 0.54	26.40 ± 0.16	19.86 ± 0.24	25.59 ± 0.06	22.32 ± 0.70
5'-GMP	鲜	125	112.38 ± 0.67	115.81 ± 0.62	119.43 ± 0.61	120.84 ± 0.45	122.96 ± 0.67
5'-IMP	鲜	140	21.41 ± 0.14	21.84 ± 1.23	22.65 ± 0.41	23.89 ± 0.48	24.39 ± 0.14

2.4 热处理时间对 EBBH-MRP 挥发性成分的影响

不同热处理时间的 EBBH-MRP 的挥发性风味物质种类和含量如表 4 所示。不同热处理温度共检测出 54 种挥发性风味物质,比不同温度下检测出的挥发性风味物质种类少 8 种,说明温度对 EBBH-MRP 挥发性风味的影响较大。在不同热处理时间中均检测到吡咯、苯甲醇、壬醛、糠醛、苯甲醛、蚁酸、丙酸、2-甲基丙酸、丁酸、3-甲基丁酸、戊酸、甲苯、苜蓿、苯酚等 14 种挥发性化合物。经 HS-SPME-GC/MS 分析,在 25,40,55,70,85 min 条件下分别检测出 30,38,37,36,29 种挥发性风味成分,含量分别为 83.55,197.76,146.65,254.05,219.88 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。其中,40 min 产生的挥发性风味化合物含量是 25 min 的 2 倍多,热处理时间 40 min 以上则含量上升较为平缓。由此可见,适当的温度有助于美拉德反应挥发性成分的积累。

不同热处理时间的 EBBH-MRP 挥发性风味化合物总含量差异比较分析如图 4,醇类化合物含量随着热处理时间的增加而增加,其中 40 min 检测出的 1-丁醇含量较高,这可能是因为适当的热处理可以引起特定脂肪酸降解,释放某些醇类化合物。醛类化合物含量不断增加,至 85 min 时又减少,含有肉的特征风味的醛具有低阈值。不同热处理时间均检测出壬醛、糠醛、苯甲醛,它们由不饱和脂肪酸氧化和氨基酸降解生成,本身具有香味,是美拉德反应后续阶段的重要前体,与醇类、醛类、氨基类发生缩合或聚合反应,产生挥发性风味物质,从而影响 EBBH-MRP 的色泽和风味。壬醛能表现出新鲜味。糠醛是一种不含硫呋喃类化合物,是焦糖风味的重要来源,由半胱氨酸-A-madori 经 1,2-烯醇化形成 3-脱氧邻酮醛糖,然后脱水而成,它也是如糠硫醇等其它杂环化合物的重要前体物质,其含量随时间的延长显著增加。苯甲醛能产生脂香风味,来源于苯丙氨酸,随时间的延长,苯丙氨酸含量下降,苯甲醛含量上升。

酮是主要的糖类化合物,具有芳香活性,是美拉德反应体系中的风味前体,阈值低,对香气的贡献很大。酮类化合物随时间的延长缓慢增加,在 25 min 未检测到酮类,说明酮类化合物的形成需要较长的时间。其中,二氢-2-甲基-3(2H)-呋喃

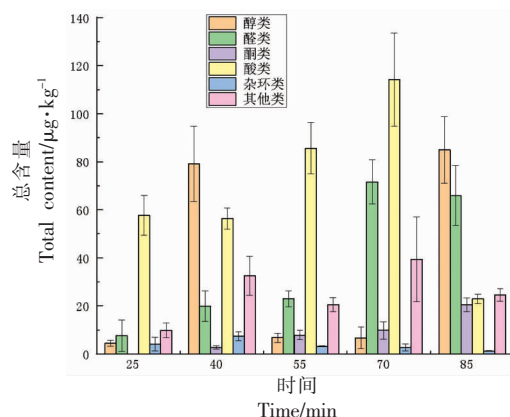


图 4 不同热处理时间的 EBBH-MRP 中各类挥发性风味物质含量的变化趋势

Fig.4 Variation trend of volatile flavor compounds in EBBH-MRP with different heat treatment time

酮、1-(2-呋喃基)-乙酮含量随时间的延长不断增加,这些呋喃衍生物在热加工食品风味的形成中发挥了重要作用^[23]。酸类化合物一方面来自醇、醛在美拉德反应过程中高温氧化,另一方面来自长链脂肪酸降解。不同热处理时间的酸类化合物的种类分别为 13,12,12,11,9 种。其中 55 min 后酸类化合物总含量上升,主要表现在乙酸含量的上升,说明较长的时间将增加不良气味。除乙酸外其余酸类化合物随时间变化相对含量相差不大,酸类化合物对整体的香气贡献不大。

还检测到噻唑、4-甲基噻唑、吡咯、2-乙酰噻唑、4-甲基-1H 咪唑等杂环化合物,噻唑、吡咯类呈甜烤香气,这些物质通常被认为是造成熟肉中烘烤风味的原因,它们的阈值非常低,对 EBBH-MRP 的风味有很大贡献。热处理 55 min 后未检测到噻唑及其化合物,且吡咯等风味化合物含量降低,说明较长的热处理时间对美拉德反应风味贡献不大。

3 结论

本研究采用游离氨基酸、核苷酸测定及 HS-SPME-GC/MS 等方法,分析了热处理温度和时间对 EBBH-MRP 的游离氨基酸、风味核苷酸和挥发性风味化合物的影响。结果表明,随着温度的上升,游离氨基酸含量逐渐减少。此外,还检测出了 5'-GMP 和 5'-IMP 两种核苷酸,其含量均随温度

表4 不同热处理时间 EBBH-MRP 的挥发性风味物质及其含量

Table 4 Volatile flavor compounds and their contents in EBBH-MRP with different heat treatment time

分类	保留时间/min	挥发性成分	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$				
			25 min	40 min	55 min	70 min	85 min
醇类	6.56	1-甲氧基-2-丙醇	-	-	-	2.02	-
	7.18	1-丁醇	-	74.87	-	-	83.62
	9.69	1-戊醇	0.22	0.38	-	-	-
	12.49	1-己醇	0.85	0.61	0.67	0.75	0.42
	14.02	2-糠基硫醇	-	-	0.17	0.47	0.61
	15.05	1-庚醇	0.26	0.22	-	-	-
	15.79	2-乙基-1-己醇	-	-	3.37	-	-
	22.10	苯甲醇	0.27	0.31	0.26	0.36	0.22
	22.64	苯基乙醇	2.89	2.72	2.24	3.05	-
	醛类	3.56	庚醛	-	-	-	0.42
4.86		己醛	0.62	1.65	0.71	1.67	-
13.35		壬醛	0.34	0.32	0.30	0.37	0.24
14.75		糠醛	3.84	14.95	17.76	64.37	62.92
16.01		苯甲醛	2.71	2.68	3.95	4.47	2.76
29.73		5-羟甲基糠醛	-	0.30	0.17	0.23	-
酮类	7.34	环戊酮	-	-	2.02	1.46	-
	9.62	二氢-2-甲基-3(2H)-呋喃酮	-	0.63	0.98	3.09	3.28
	10.40	丁酮	-	0.80	1.17	1.66	1.35
	10.69	1-羟基-2-丙酮	-	1.13	1.48	4.58	5.23
	15.71	1-(2-呋喃基)-乙酮	-	-	1.40	7.57	8.72
	18.55	苯乙酮	-	-	-	-	0.77
	23.40	1-(1H-吡咯-2-基)-乙酮	-	0.13	-	0.35	0.62
	23.59	2H-吡喃-2,6(3H)-二酮	-	-	0.16	0.48	0.50
	27.14	2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4H-吡喃-4-酮	-	-	0.60	0.62	-
酸类	14.60	乙酸	18.18	25.37	44.95	67.81	-
	15.62	蚁酸	0.92	1.69	2.02	3.29	2.37
	16.50	丙酸	2.20	2.64	4.42	5.99	3.97
	17.13	2-甲基丙酸	3.44	2.77	4.35	3.97	2.00
	17.97	4-羟基丁酸	-	-	-	0.95	0.93
	18.21	丁酸	10.15	9.29	14.39	15.77	8.42
	18.96	3-甲基丁酸	12.56	7.92	10.79	7.98	2.93
	20.06	戊酸	1.17	0.82	1.24	1.45	0.69
	20.55	2-甲基戊酸	0.10	-	-	-	-
	21.09	4-甲基戊酸	0.73	-	0.52	-	-
	21.71	己酸	5.19	2.79	-	4.26	-
	23.24	庚酸	1.01	0.72	-	-	-
	24.69	辛酸	1.29	0.78	0.86	1.30	0.78
	26.06	壬酸	0.77	0.65	0.95	-	-
	28.96	苯甲酸	-	0.84	0.89	1.39	0.83
	杂环类	9.22	噻唑	-	2.64	-	-
10.10		4-甲基噻唑	0.65	0.63	0.24	-	-
15.90		吡咯	3.07	3.95	2.91	2.65	1.19
18.44		2-乙酰噻唑	0.31	-	-	-	-
26.86		4-甲基-1H 咪唑	-	0.08	-	-	-

(续表 4)

分类	保留时间/min	挥发性成分	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$				
			25 min	40 min	55 min	70 min	85 min
其它	3.91	甲苯	5.15	14.22	2.89	18.55	5.18
	15.22	1,3-二氯-苯	-	12.84	12.84	12.84	12.84
	20.37	乙酰胺	-	-	0.10	-	-
	22.76	苜蓿	3.84	4.55	3.80	7.37	6.21
	23.83	苯酚	0.30	0.32	0.33	0.51	0.29
	24.44	N,N-二甲基-1-十七胺	0.14	-	-	-	-
	24.86	对甲酚	0.35	0.37	0.33	-	-
	29.12	吡啶	-	0.14	-	-	-
	30.35	苯乙酸癸酯	-	-	0.22	-	-
	31.28	1,2,3-三甲氧基-己烷	-	0.03	-	-	-

注:-:未检出。

的升高而增加。经 HS-SPME-GC/MS 分析,不同温度条件下分别检测出 38,38,34,42,35 种挥发性风味成分,含量分别为 176.86,195.33,144.06,142.00,148.24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。随着时间的延长,游离氨基酸含量整体呈增加趋势,检测出的 5'-GMP 和 5'-IMP 含量也上升。经 HS-SPME-GC/MS 分析,不同时间条件下分别检测出 30,38,37,36,29 种挥发性风味成分,含量分别为 83.55,197.76,146.65,254.05,219.88 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

参 考 文 献

- [1] 张春晖. 骨源食品加工技术[M]. 北京: 科学出版社, 2015: 1-27.
ZHANG C H. Bone source food processing technology[M]. Beijing: Science Press, 2015: 1-27.
- [2] 邵澜媛, 周建伟, 刘东红. 食品中美拉德反应机理及动力学模型的研究进展[J]. 中国食品学报, 2012, 12(12): 103-112.
SHAO L Y, ZHOU J W, LIU D H. Research progress of Maillard reaction mechanism and kinetic model in food[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(12): 103-112.
- [3] 侯莉, 梁晶晶, 赵健, 等. pH 值对“半胱氨酸-木糖-甘氨酸”体系肉香味形成的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(8): 129-138.
HOU L, LIANG J J, ZHAO J, et al. Effect of pH value on the formation of meat flavor in cysteine-xylose-glycine system[J]. Food Science, 2017, 38(8): 129-138.
- [4] 潘晓倩, 成晓瑜, 张顺亮, 等. 不同发酵剂对北方风干香肠色泽和风味品质的改良作用[J]. 食品科学, 2015, 36(14): 81-86.
PAN X Q, CHENG X Y, ZHANG S L, et al. Effects of different fermentation agents on improving the color and flavor quality of northern air-dried sausage[J]. Food Science, 2015, 36(14): 81-86.
- [5] JIANG Z M, WANG L Z, CHE H X, et al. Effects of temperature and pH on angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and physicochemical properties of bovine casein peptide in aqueous Maillard reaction system[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 59(1): 35-42.
- [6] 章银良, 张陆燕, 周文权, 等. 不同温度对酪蛋白-木糖模式美拉德反应产物抗氧化性的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(4): 211-219.
ZHANG Y L, ZHANG L Y, ZHOU W Q, et al. Effects of different temperatures on antioxidant activity of Maillard reaction products in casein-xylose mode [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(4): 211-219.
- [7] 钱敏, 白卫东, 赵文红, 等. 酵母抽提物中游离氨基酸的测定与分析[J]. 现代食品科技, 2012, 28(7): 878-881.
QIAN M, BAI W D, ZHAO W H, et al. Determination and analysis of free amino acids in yeast extract[J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(7): 878-881.
- [8] ERIC K, RAYMOND L V, ABBAS S, et al. Temperature and cysteine addition effect on formation of sunflower hydrolysate Maillard reaction products and corresponding influence on sensory characteristics

- assessed by partial least square regression[J]. *Food Research International*, 2014, 57: 242–258.
- [9] LIU J B, LIU M Y, HE C C, et al. Effect of thermal treatment on the flavor generation from Maillard reaction of xylose and chicken peptide[J]. *LWT – Food Science and Technology*, 2015, 64(1): 316–325.
- [10] LIOE H N, APRIYANTONO A, TAKARA K, et al. Umami taste enhancement of MSG/NaCl mixtures by subthreshold L- α -aromatic amino acids [J]. *Journal of Food Science*, 2005, 70(7): s401–s405.
- [11] CHIANG J H, EYRES G T, SILCOCK P J, et al. Changes in the physicochemical properties and flavour compounds of beef bone hydrolysates after Maillard reaction [J]. *Food Research International*, 2019, 123: 642–649.
- [12] 李学鹏, 刘晏玮, 谢晓霞, 等. 热预处理对蓝蛤酶解及酶解液呈味特性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(2): 133–140.
- LI X P, LIU Y W, XIE X X, et al. Effect of thermal pretreatment on enzymatic hydrolysis of blue clam and flavor characteristics of enzymatic hydrolysate[J]. *Food Science*, 2020, 41(2): 133–140.
- [13] 赵静, 丁奇, 孙颖, 等. 香菇菌汤及酶解液中滋味成分及呈味特性的对比分析[J]. *食品科学*, 2016, 37(24): 99–104.
- ZHAO J, DING Q, SUN Y, et al. Comparative analysis of flavor components and flavor characteristics in mushroom soup and enzymatic hydrolysate[J]. *Food Science*, 2016, 37(24): 99–104.
- [14] 李迎楠, 刘文营, 成晓瑜. GC-MS结合电子鼻分析温度对肉味香精风味品质的影响[J]. *食品科学*, 2016, 37(14): 104–109.
- LI Y N, LIU W Y, CHENG X Y. GC-MS combined with electronic nose to analyze the influence of temperature on the flavor quality of meat flavor[J]. *Food Science*, 2016, 37(14): 104–109.
- [15] BOEKEL M A J S V. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction[J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(2): 230–233.
- [16] CROSS C K, ZIEGLER P. A comparison of the volatile fractions from cured and uncured meat [J]. *Journal of Food Science*, 2006, 30(4): 610–614.
- [17] 孙圳, 韩东, 张春晖, 等. 定量卤制鸡肉挥发性风味物质剖面分析[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(15): 3030–3045.
- SUN Z, HAN D, ZHANG C H, et al. Quantitative profile analysis of volatile flavor compounds in braised chicken [J]. *Chinese Agricultural Sciences*, 2016, 49(15): 3030–3045.
- [18] MAGA J A, SIZER C E. Pyrazines in foods: A review[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1973, 21(1): 22–30.
- [19] 周惠健, 袁静瑶, 朱丹, 等. 杀菌方式对红烧老鹅脂肪酸组成和挥发性风味的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(18): 216–222.
- ZHOU H J, YUAN J Y, ZHU D, et al. Effect of sterilization methods on fatty acid composition and volatile flavor of braised old goose[J]. *Food Science*, 2019, 40(18): 216–222.
- [20] 衣美艳, 侯虎, 毛毛, 等. 响应面优化庸鲮鱼骨酶解条件及其酶解物氨基酸组成分析[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(22): 175–180, 196.
- YI M Y, HOU H, MAO M, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions of flatfish bone and analysis of amino acid composition of enzymatic hydrolysate[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2019, 40(22): 175–180, 196.
- [21] MICHIO MURATA M S. The Effects of phosphatase treatment of yellow tail muscle extracts and subsequent addition of IMP on flavor intensity [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1989, 55(9): 1599–1603.
- [22] 单启梅. 冷藏期对滩羊肉食用品质的影响[D]. 银川: 宁夏大学, 2021.
- SHAN Q M. Effect of cold storage period on eating quality of tan mutton[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2021.
- [23] SUN H M, WANG J Z, ZHANG C H, et al. Changes of flavor compounds of hydrolyzed chicken bone extracts during Maillard reaction[J]. *Journal of Food Science*, 2014, 79(12): C2415–C2426.

Effects of Heat Treatment on Flavor and Volatile Components of Maillard Reaction Products from Bovine Bone Hydrolysate

Mu Hong, Luo Ruiming, Li Yalei*

(School of Food and Wine, Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract The purpose of this study is to investigate the effects of different heat treatment conditions (temperature 110, 115, 120, 125, 130 °C and time 25, 40, 55, 70 and 85 min) on Maillard reaction products (EBBH-MRP) of bovine bone hydrolysate. The results showed that when the heat treatment temperature was lower than 130 °C, the content of total free amino acids decreased, which was consistent with the change trend of umami amino acids and bitter amino acids. Flavor nucleotide content increased with the increase of temperature. At different temperatures, 63 volatile flavor compounds were detected, including aldehydes, ketones, alcohols, acids and heterocyclic compounds. When the heat treatment time is longer than 40 min, the total free amino acid content increases continuously, and the flavor nucleotide content also increases slowly. With the extension of heat treatment time, the types of volatile flavor compounds decreased, and 54 kinds were detected. The contents of aldehydes and ketones increased significantly with time, and remained relatively stable at 70 min. Proper heat treatment conditions can improve the flavor and flavor characteristics of EBBH-MRP.

Keywords bovine bone; Maillard; free amino acid; nucleotide; volatile flavor