

鸡肉肽在美拉德反应中对生成肉味化合物的贡献研究

刘建彬, 康乐, 刘梦娅, 何聪聪, 宋焕禄

(北京工商大学分子感官科学实验室, 北京 100048)

摘要: 以鸡肉肽为基础, 本实验构建了 8 组反应体系对鸡肉肽在美拉德反应中生成肉味化合物的贡献进行了研究。结果发现, 鸡肉肽在美拉德反应中主要贡献呈坚果香、烤香的吡嗪类物质 (增加量 14744.1 $\mu\text{g/L}$), 进一步贡献体系的肉味。另外, 对添加了游离氨基酸 Cys 的肽美拉德反应体系的研究发现, 鸡肉肽可以大幅度促进 Cys-木糖体系中含硫气味活性化合物如噻吩类和呋喃硫醇类物质的生成。而鸡肉肽-Leu-木糖体系中吡嗪的生成量大于 Leu-糖与肽-糖体系两者之和, 进一步说明添加 Leu 对鸡肉肽-木糖体系中吡嗪的生成具有促进作用。最后, 构建不同 pH 值体系进行反应, 结果发现, 较低 pH 值 (<5.0) 对鸡肉肽参与美拉德反应吡嗪的生成具有抑制作用。结合不挥发物的定量分析最终得出, 主要分布在 200-500u 的鸡肉肽在美拉德反应中在较高 pH 下对食品肉味的形成具有重要的贡献。

关键词: 鸡肉; 肽; 美拉德反应; 气味活性化合物; 风味; GC-O-MS

文章编号: 1673-9078(2015)4-301-310

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.049

The Contribution of Chicken Peptides Towards the Generation of Meat Flavor Compounds *via* Maillard Reaction

LIU Jian-bin, KANG Le, LIU Meng-ya, HE Cong-cong, SONG Huan-lu

(Laboratory of Molecular Sensory Science, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: This study established eight model reaction systems using chicken peptides, in order to investigate their contribution towards the generation of meaty flavor compounds. Chicken peptides caused an increase in pyrazine content (by 14744.1 $\mu\text{g/L}$), which imparted a nutty and roasted aroma to a Maillard reaction system, consequently increasing the meaty flavor of the system. In addition, studies with Cys-added Maillard reaction systems, such as the Cys-xylose system, revealed that chicken peptides significantly promoted the generation of sulfur-containing aroma-active compounds, such as thiophenes and furan mercaptans. The concentration of pyrazines in a chicken peptide-Leu-xylose system was higher than that in a combination of the Leu-xylose and peptide-xylose reaction systems; this further indicated that the addition of Leu could promote the generation of pyrazines in the chicken peptide-xylose system. The influence of pH on the reaction systems was also studied by building model systems with differing pH conditions. A low pH (< 5.0) condition in the Maillard reaction system containing chicken peptides was observed to inhibit the generation of pyrazines. Combined with the quantitative data of non-volatile compounds, chicken peptides distributed in the 200–500u region were concluded to contribute to the generation of a meaty flavor in food *via* a Maillard reaction at high pH.

Key words: chicken meat; peptide; Maillard reaction; aroma-active compounds; flavor; gas chromatography-olfactometry-mass spectrometry

美拉德反应是食品生产和加工过程中产生风味的重要途径。美拉德反应本质是还原糖的羰基部分与蛋白质分子的氨基部分之间的反应^[1]。能提供氨基的分子包括蛋白质、肽类和氨基酸等。

收稿日期: 2014-08-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171645)

作者简介: 刘建彬(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品风味化学

通讯作者: 宋焕禄(1961-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品风味化学

肽类广泛存在于各种风味食品及热反应基料中。作为重要的前体物质, 这些肽类对于食品风味物质的形成具有非常重要的贡献。肽类在美拉德反应中有着与氨基酸不同的反应活性, 而且, 肽类参与美拉德的机理要远比游离氨基酸的反应模式更为复杂^[2]。所以, 对肽参与美拉德反应生成风味活性化合物贡献的研究重要而迫切。

鸡肉富含蛋白类物质, 在全世界范围内都是一种

重要的动物性蛋白来源^[3]。作为一种重要的肽类来源,鸡肉酶解物还被广泛地应用到了肉味香精的制备中^[4]。迄今为止,关于肽参与美拉德反应生成风味化合物的研究较少。其中,对谷胱甘肽(GSH)美拉德反应体系有着较深入的研究并发现GSH可在反应中断裂释放出H₂S,进一步贡献含硫风味化合物^[5]。其它研究中, Eric等对葵花子蛋白水解物美拉德反应体系进行的研究发现其可以生成醛、酮、酯、酸、呋喃、含氮、含硫杂环类等多种挥发性化合物^[6]。Xu等对模型肽-木糖-Cys-V_{B1}反应体系的研究发现该反应体系可以生成大量的噻吩类物质,而肽-V_{B1}-木糖组却几乎没有含硫化合物产生^[7]。但是,现有的研究缺乏针对肽在美拉德反应中对气态化合物贡献的评价,而且,作为重要的动物性蛋白原料,鸡肉肽在美拉德反应中对生成肉味化合物的贡献还尚不清楚。

本研究构建了以鸡肉肽为研究核心的8组美拉德反应体系。应用GC-O-MS技术,对不同体系的气味活性化合物进行定性和定量研究,进一步探索鸡肉肽在美拉德反应中对肉味化合物生成的贡献。同时,对反应体系中的氨基酸类、肽类化合物进行定量分析,研究鸡肉肽参与美拉德反应中的行为。最后,综合仪器数据及感官鉴评结果,对鸡肉肽在美拉德反应中对生成气味活性化合物的贡献进行评价。

1 材料与方法

1.1 原料和试剂

新鲜鸡胸肉购自北京美廉美超市,蛋白含量为19.6%;木瓜蛋白酶 PSM500 购于比利时 Enzybel 公司;复合风味蛋白酶 Flavourzyme 购于丹麦诺维信公司;色谱级试剂 2-甲基-3-庚酮、系列烷烃(C₇~C₂₂)、氨基酸标准品、9-芴甲基氯甲酸酯试剂(FOMC)、邻苯二甲醛试剂(OPA)、硼酸盐试剂均购自美国 Agilent 公司;杆菌肽、抑肽酶、甘氨酸标准品均购自 Sigma 公司;其它肽类标准品购于上海楚肽生物科技有限公司;色谱级溶剂购自美国 Fisher 公司;色谱级超纯水由本实验室制作。

1.2 主要仪器设备

固相微萃取针(75 μ m CAR/PDMS 纤维头) 美国 Supelco 公司; 7890A-7000B 型气质联机色谱仪,配有 EI 离子源和 NIST 2.0 数据处理系统美国 Agilent 公司; ODP2 嗅闻检测仪德国 Gerstal 公司; DB-WAX 型毛细管柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m)美国 J&W 公司; 1200 Series 高效液相色谱系统美国 Agilent 公司; 切

向流超滤系统及截留 5000 u 超滤膜包, 德国 Merck Millipore 公司; 4848 型高压反应釜 美国 Parr 公司; HH-1 数显电子恒温水浴锅常州国华电器有限公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器河南省予华仪器有限公司。

1.3 鸡肉肽的制备

根据文献数据及前期优化的条件对鸡肉进行酶解^[3,8]。取新鲜鸡肉剔除肥肉后洗净绞碎, 95 °C 加热 10 min 使蛋白质变性, 冷却后加入 1:1 比例的去离子水, 用 0.1 mol/L HCl 或 NaOH 调节 pH 值为 6.5, 置于水浴锅中, 65 °C 下添加 4800U/g 底物的木瓜蛋白酶 PSM 500, 酶解 1 小时再测定调整 pH 值为 7.0, 添加 300U/g 底物的复合风味蛋白酶 Flavourzyme, 55 °C 下继续酶解 3 h。酶解结束后, 90 °C 加热 10 min 灭酶, 得到了水解度为 13.3% 的酶解液。冷却后, 将酶解液在 4 °C 以 10000 r/min 转速离心 10 min, 将上清液过 5000 u 膜包后取透过液冷冻干燥即为鸡肉肽。鸡肉肽的相关理化数据为: 游离氨基酸含量: 9.5%; 总氨基酸含量: 77.8%; 总蛋白含量: 82.4%。样品置于 -18 °C 冰箱中储藏备用。

1.4 模型反应体系的构建

表 1 八组反应体系的原料添加量和反应条件设计

Table 1 Reactants and reaction conditions of the eight model reaction systems

反应体系	反应条件参数				
	pH	鸡肉肽 (/mg/mL)	木糖 (/mg/mL)	Cys (/mg/mL)	Leu (/mg/mL)
组 1	6.5	50	0	0	0
组 2	6.5	50	10	0	0
组 3	6.5	0	10	0	0
组 4	6.5	50	10	5	0
组 5	6.5	0	10	5	0
组 6	6.5	50	10	0	5
组 7	6.5	0	10	0	5
组 8	5.0	50	10	0	0

在文献指导及前期优化的基础上, 构建 8 个反应体系, 选用木糖作为还原糖进行反应: 肽、肽-糖、糖 3 组反应体系研究鸡肉肽参与美拉德反应对气态化合物生成的影响; Cys 对美拉德反应生成肉味含硫化合物具有重要贡献, 故设计添加 Cys 的体系来衡量肽在美拉德反应中对含硫化合物生成的作用^[6-7]; 研究中发现肽与游离氨基酸在美拉德反应中具有交互作用, 而 Leu 在美拉德反应中具有较强活性, 故设计

Leu-糖组与鸡肉肽-糖-Leu 组来评价鸡肉肽和氨基酸在生成气味活性化合物中的交互作用^[9,10]；最后，变换体系 pH 值探索该指标对鸡肉肽参与美拉德反应生成气味化合物的影响。8 组反应的原料添加量和反应条件设计见表 1。所有组的反应量均为 20 mL，在高压反应釜中 120 °C 下反应 90 min。通过磷酸盐缓冲液调整反应液的 pH 值。反应完毕后由冰水快速降温，装瓶密封 4 °C 后熟一夜后进行仪器分析及感官分析。每个反应体系平行进行三组测定。

1.5 气味化合物的提取

采用 SPME 法对各反应体系中的挥发性香气化合物进行提取和浓缩，量取 2 mL 反应液，添加 1 μL 内标物（2-甲基-3-庚酮），混合后置于 30 mL 的顶空瓶中，加盖密封置于 50 °C 水浴锅中平衡 20 min。平衡后，经固相微萃取头吸附 40 min 后插入气相色谱进样口，250 °C 下解析 10 min 进样。

1.6 GC-O-MS 条件

采用 GC-O-MS 系统对萃取出的香气成分进行分析。经 GC 分离后，分离馏分分别进入质谱检测器和嗅闻检测器，实验人员在嗅闻口记录所闻到的香味特征和强度。馏分分离采用 DB-WAX 毛细管柱。升温程序：初始温度 40 °C 保持 3 min，以 5 °C/min 升温到 200 °C，保持 0 min，再以 10 °C/min 升温到 250 °C，保持 3 min，共 41 min。气相色谱使用的载气为氮气，流速为 1.2 mL/min，分流比 10:1。质谱条件：电子轰击（electron impact, EI）离子源，电子能量 70 eV，传输线温度 280 °C，离子源温度为 230 °C，四极杆温度为 150 °C，质量扫描范围 m/z 55~500。

1.7 气味活性化合物的定性和定量

化合物的鉴定由 NIST 2.0 谱库，标准化合物保留指数(RI)以及嗅闻数据比对进行鉴定。半定量采用内标法进行，每种化合物的浓度计算如下：

$$c_i = c_{is} \times A_j / A_{is}$$

注：其中 c_i 为化合物浓度； c_{is} 为内标浓度； A_j 为化合物的色谱峰面积； A_{is} 为内标物峰色谱面积。

1.8 氨基酸的定量分析

采用安捷伦专用柱前衍生法对样品的 16 种游离氨基酸（Asp、Glu、Ser、His、Gly、Thr、Arg、Ala、Tyr、Cys、Val、Met、Phe、Ile、Leu、Lys）含量进行分析。高效液相色谱法按照之前钱敏等采用的方法进行^[11]。

1.9 肽分布分析

采用高效凝胶色谱法对样品的肽分布进行测定。色谱柱为 TSK GLSW 2000 型(300 mm×7.8 mm, 5 μm)，流动相为用甲酸调整 pH 为 3.0 的 20% 乙腈水溶液，流速为 0.5 mL/min，柱温为 25 °C。测定 220 nm 下馏分的吸光度。为了确定肽分布，同样条件下用抑肽酶（6512 u）、杆菌肽（1422 u）、七肽（TEDVDVK, 804 u）、五肽（GASST, 421 u）、谷胱甘肽（ECG, 307 u）二肽（CG, 175 u）、Gly(75 u) 制作分子量标准曲线。

1.10 感官鉴评

感官鉴评小组由 7 名成员（3 男 4 女）组成。对不同反应体系进行描述性感官鉴评，描述统计不同组 MRPs 的风味特点。

1.11 数据分析

HPLC 定量数据采用 Agilent 化学工作站 B.02.01 进行分析；其它差异性分析均采用 SPSS 19.0 进行分析。

2 结果与讨论

2.1 模型反应体系气味特性描述和气味活性化合物的鉴定

表 2 8 组模型反应体系的气味特性描述

Table 2 Description of the aroma of the eight model reaction systems

体系	气味描述
1	轻微的肉香；轻微烤香
2	中等的烤香，坚果香；较强的肉香
3	轻微的焦糖香
4	强烈的，令人愉快的、柔和的肉香气息
5	臭鸡蛋气息；强烈的硫磺味
6	强烈的烤香和坚果香；中等的肉香
7	强烈焦香、麦芽味和坚果气息
8	轻微的焦糖香；轻微的烤香和坚果香

对八组模型反应体系的气味特性进行感官鉴评，各组的气味特性描述见表 2，各组的反应产物的气味特性有着很大的差异。总体看来，鸡肉肽的存在对于反应体系肉香味的提升具有非常重要的作用，尤其是在组 4（肽-糖-Cys）中。与组 4 比较，组 5（糖-Cys）在本次反应条件下仅体现出了强烈的臭鸡蛋气息和硫磺气息，这是由于 Cys 的降解释放出大量的 H₂S 的结

果。通过后续的 GC-MS 测定结果得知, 组 5 中的 H₂S 并未有效的作为前体物质生成重要的肉香味含硫化物。对比组 1 (肽) 和组 3 (糖), 单独对鸡肉肽或糖进行加热反应并没有强烈的气味产生, 仅有轻微的肉香、烤香或焦糖香, 说明体系中并未产生具有强烈气味活性的香气物质。值得注意的是, 与组 2 (肽-糖) 相比, 添加了 Leu 的组 7 (Leu-肽-糖) 具有更强的烤香, 坚果香及焦香, 而肉香的强度却有所下降; 对于组 8 (低 pH), 降低 pH 值对肽-糖体系的气味强度具有明显的镇压作用。进一步的 GC-O-MS 分析将对此

做出解释。

肉香是多种气味化合物综合起来的复合的气味, 应用 GC-MS 和 GC-O 技术对八个体系中的气味活性化合物进行定性, 结果见表 3。通过谱库比对(MS)、保留指数比对(RI)和气味特性对比(GC-O), 共从 8 个组中鉴定出 42 种气味活性化合物, 主要包括有醛类、酮类、吡嗪类、噻吩类、吡咯类、噻唑类和呋喃类, 这些典型的美拉德反应产物 (MRPs) 都被报道对食品的肉味具有重要的贡献^[6~7]。

表 3 8 组反应体系中鉴定出的气味活性化合物定性数据

Table 3 Qualitative data pertaining to the aroma-active compounds present in the eight model reaction systems analyzed in this study

序号	化合物名称	CAS 号	MS 匹配度 ^a	保留时间 /min	RI 值 / (DB-WAX) ^b	文献 RI 值 ^c	鉴定方法 ^d	存在体系	气味描述 ^e
1	2-甲基丙醛	78-84-2	746	4.51	815	807	RI,MS,GCO	2,4,7,8	可可香, 麦芽味
2	2-丁酮	78-93-3	846	5.82	900	893	RI,MS,GCO	2,3,4,6,7	甜香
3	3-甲基丁醛	590-86-3	805	6.12	914	906	RI,MS,GCO	2,4,6,7,8	可可香, 麦芽味
4	2,3-丁二酮	431-03-8	795	7.46	963	955	RI,MS,GCO	2,3,4,6,7	奶油味
5	噻吩	110-02-1	798	8.60	1017	1023	RI,MS,GCO	4	硫味
6	2-甲基噻吩	554-14-3	717	10.40	1080	1095	RI,MS,GCO	4,5	硫味, 葱香
7	吡嗪	290-37-9	865	14.41	1238	1249	RI,MS,GCO	2,4,6,7	烤香
8	2-甲基噻唑	3581-87-1	876	15.01	1268	1279	RI,MS,GCO	4	焦香, 肉香
9	噻唑	288-47-1	849	15.34	1270	1283	RI,MS,GCO	4,5	焦香
10	甲基吡嗪	109-08-0	890	15.99	1272	1263	RI,MS,GCO	1,2,4,6,7	烤香, 坚果香
11	3-羟基-2-丁酮	513-86-0	873	16.53	1278	1286	RI,MS,GCO	2,3,4,6,7	奶油味
12	2-甲基-3-呋喃硫醇	28588-74-1	757	16.76	1300	1303	RI,MS,GCO	4	肉香
13	1-羟基-2-丙酮	116-09-6	723	17.11	1312	1298	RI,MS,GCO	2,3,4,6,7	奶油味
14	2,5-二甲基吡嗪	123-32-0	810	17.45	1324	1316	RI,MS,GCO	1,2,4,6,7,8	爆米花香
15	2,3-二甲基吡嗪	5910-89-4	745	18.17	1351	1335	RI,MS,GCO	2,4,6,7	爆米花香
16	2-甲基-5-甲硫基呋喃	13678-59-6	729	18.73	1371	- ^f	MS,GCO	4	肉香, 硫味
17	2-乙基-5-甲基吡嗪	13360-64-0	875	19.31	1392	1383	RI,MS,GCO	1,2,4,6,7,8	烤香, 坚果香
18	三甲基吡嗪	14667-55-1	761	19.73	1408	1391	RI,MS,GCO	1,2,4,6,7,8	坚果香
19	2-糠基硫醇	98-02-2	800	20.17	1424	1425	RI,MS,GCO	4,5	肉香, 硫味
20	3-乙基-2,5-二甲基吡嗪	13360-65-1	872	20.7	1444	1439	RI,MS,GCO	1,2,4,6,7	爆米花香
21	糠醛	98-01-1	729	21.09	1459	1447	RI,MS,GCO	1,2,3,4,5,6,7,8	甜香
22	甲基糠基硫醚	1438-91-1	787	21.59	1468	1357	RI,MS,GCO	4	蒜香, 肉香
23	乙酰基呋喃	1192-62-7	729	22.18	1501	1483	RI,MS,GCO	2,3,4,5,6,7,8	焦香, 甜香
24	2-丁基呋喃	4466-24-4	842	22.47	1523	-	RI,MS	2,3,4,5,6,7,8	-
25	苯甲醛	100-52-7	711	22.67	1531	1530	MS,GCO	1,2,4,5,6,7,8	苦杏仁味
26	2-甲基-6-丙烯基吡嗪	18217-82-8	757	23.07	1537	-	MS,GCO	2,6,7	烤香, 青香

转下页

接上页

27	5-甲基-2-糠醛	620-02-0	826	23.86	1568	1555	RI,MS,GCO	3,8	硫味
28	2-丙酰呋喃	3194-15-8	736	23.92	1581	-	RI,MS	1,2,4,6,7,8	-
29	3-巯基噻吩	7774-73-4	787	24.04	1563	1555	RI,MS,GCO	4	烤香, 肉香, 焦香
30	5-甲酰基糠醛	823-82-5	707	24.79	1607	-	MS,GCO	2,6,7,8	烤香, 甜香
31	2-甲基-5-甲 硫基噻吩	40990-29-2	794	25.18	1613	1585	RI,MS,GCO	4	烤香, 肉香
32	3-甲硫基噻吩	20731-74-2	759	25.46	1635	-	MS,GCO	4	硫味
33	苯乙醛	122-78-1	838	25.58	1640	1623	RI,MS,GCO	2,4,7,8	玫瑰香
34	2-乙酰基噻唑	24295-03-2	772	25.71	1646	1643	RI,MS,GCO	2,4,7,8	烤香
35	2-呋喃甲醇	98-00-0	772	25.94	1655	1573	RI,MS,GCO	1,2,4,5,6,7,8	药香
36	3-噻吩甲醛	498-62-4	805	26.83	1693	-	MS,GCO	2,4,5,7,8	焦香, 肉香
37	5-甲基-2-噻 吩甲醛	13679-70-4	709	27.23	1741	1759	RI,MS,GCO	4	焦香, 肉香
38	2-甲基-3-甲 硫基呋喃	63012-97-5	730	28.54	1768	-	MS,GCO	4	肉香, 硫味
39	2-乙酰基噻吩	88-15-3	857	28.69	1775	1762	RI,MS,GCO	4	肉香, 硫味
40	糠基吡咯	1438-94-4	809	29.75	1824	1823	RI,MS,GCO	2,4,6	烤香, 坚果香
41	2-丙酰基噻吩	13679-75-9	721	30.04	1837	-	MS,GCO	4	硫味, 肉香
42	2,5-二甲酰 基噻吩	932-95-6	835	31.18	1919	-	MS,GCO	4	硫味, 肉香

注: a.物质的MS匹配度由NIST 2.0 谱库比对得出; b.保留指数(RI)的计算方法为 $100 \times n + 100(t_a - t_n) / (t_{n+1} - t_n)$; 其中: a为样品a的保留时间; n为正构烷烃 C_n 的保留时间(样品a的保留时间落在正构烷烃 C_n 和 C_{n+1} 之间); c.文献RI值来源于学术网站 <http://www.odour.org.uk>; d.MS指在质谱中检测到, RI指根据文献报道或标样的RI值确定, O指在嗅闻口处嗅闻到; e.实验员在嗅闻口闻到的香味描述; f.指未有此数据。

2.1.1 醛类

各体系中鉴定出的醛类主要为Strecker降解醛类, 包括分别具有麦芽味、可可香、苦杏仁味和玫瑰花香的2-甲基丙醛、3-甲基丁醛、苯甲醛和苯乙醛。这些醛类在美拉德反应中是通过Strecker降解由缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或苯丙氨酸生成的。除了直接贡献气味, Strecker降解产生的氨基酮类还是生成含氮杂环化合物的重要途径。本次鉴定的Strecker降解醛类大量地存在于所有的含有肽和糖的反应组中。

2.1.2 酮类和呋喃类

本次发现的酮类主要为呈奶油气息的丁酮、丁二酮、3-羟基-2-丁酮和1-羟基-2-丙酮, 这些酮类都是还原糖的断裂产物, 生成的 C_3 、 C_4 的骨架是随后发生Strecker降解反应或缩合反应生成杂环化合物的重要中间产物。而大量的呋喃类物质如糠醛、乙酰基呋喃等也是随后生成的以呋喃为基础的杂环化合物的前体物质。在公认的美拉德反应的途径中, Amadori产物会根据pH值的不同有着不同的反应途径, C_3 、 C_4 的酮类可以在偏碱环境下产生^[1]。本次各体系在pH值6.5下同时生成了酮类与呋喃类产物, 而在低pH值下

(5.0, 组8)并未有酮类化合物生成, 而只是生成了大量的呋喃类物质。

2.1.3 吡嗪类和吡咯类

本身呈烤香和坚果香的吡嗪类和吡咯类是贡献烤肉香味的重要香气化合物。吡嗪类也是本次研究中鸡肉肽美拉德反应体系中最主要的产物。本次检测出的吡嗪全部为烷基取代吡嗪, 除了存在于组6和7中的2-甲基-6-丙烷基吡嗪和乙丙烷基吡嗪之外, 其它吡嗪类都为饱和取代基吡嗪。在两组游离氨基酸-糖反应体系中, Leu-糖组中也有大量的吡嗪类被发现, 而Cys-糖组中几乎没有吡嗪类物质被检测出。糠基吡咯存在于所有的肽-糖体系中, 它是肽美拉德反应中一种重要的吡咯类产物, 其中的N原子已明确是由肽类物质提供^[7]。

2.1.4 含硫化合物

所有反应体系中的含硫化合物包括噻吩类、噻唑类和呋喃硫醇类三种。鸡肉肽本身并未对含硫挥发性化合物具有贡献作用, 仅有3-噻吩甲醛在肽-糖反应体系中被发现。其它体系中, Cys-木糖(组5)反应体系并未发现大量的含硫化合物, 但该体系中有呈强烈

肉香，硫香的 2-糠基硫醇生成。本次鉴定出的大量含硫化合物大部分都存在于肽-糖-Cys（组 4）体系中。半胱氨酸加热可产生 H₂S，作为前体可以生成大量的含硫气味化合物，如 2-甲基-3-呋喃硫醇、糠基硫醇等^[12]。Eric 等还发现 Cys 的添加能促进葵花籽蛋白酶解物-糖体系肉香味的增加并且对含硫化合物的生成有

显著的促进作用^[6]。本研究也在动物性蛋白的美拉德反应中证实了此结论。

2.2 鸡肉肽对美拉德反应生成肉香化合物的贡献

表 4 模型体系 1, 2 和 3 中气味活性化合物定量结果

Table 4 Quantitative data of the aroma-active compounds present in reaction systems 1, 2, and 3

化合物	保留时间/min	浓度/(μg/L)		
		鸡肉肽+木糖 (组 3)	木糖 (组 2)	鸡肉肽 (组 1)
Strecker 醛				
2-甲基丙醛	4.51	259±3.5 ^a	- ^b	23.4±1
3-甲基丁醛	6.12	279.1±22.2	-	17.1±0.4
苯甲醛	22.67	247.2±19.4	-	121.3±0.4
苯乙醛	25.58	121.4±10.5	-	-
吡嗪类				
吡嗪	14.41	628.9±53.4	-	-
甲基吡嗪	15.01	558.8±40.3	-	28.1±2.1
2,5-二甲基吡嗪	17.45	10845.3±985.6	-	279.2±21.1
2,3-二甲基吡嗪	18.17	258.2±20.8	-	-
2-乙基-5-甲基吡嗪	19.31	480.6±36.2	-	17.9±1.0
三甲基吡嗪	19.73	791.9±74	-	25.6±2.5
3-乙基-2,5-二甲基吡嗪	20.17	1005.9±91.7	-	87.9±2.9
2-甲基-6 丙烯基吡嗪	23.07	176.9±6.2	-	-
酮类				
2-丁酮	5.82	-	47.1±3.8	-
2,3-丁二酮	6.12	118.7±7.2	156.9±10.0	-
3-羟基-2-丁酮	16.53	66±2.9	27.4±0.2	-
1-羟基-2-丙酮	17.11	265.7±23.2	373.2±0.1	-
呋喃类				
糠醛	21.09	2812.6±233.6	273.4±9.2	27.6±2.3
乙酰基呋喃	22.18	91.4±2.4	153.7±6.9	-
2-丁基呋喃	22.47	52.2±0.7	215.8±5.6	-
丙酰基呋喃	23.92	96.2±0.6	125.9±10.0	-
5-甲酰基糠醛	24.79	228.3±8.9	298.6±5.9	-
2-呋喃甲醇	25.94	386.3±32.9	125.1±2.7	-
糠基吡咯	29.75	74.6±4.9	-	-
5-甲基-2-糠醛	23.86	-	173.2±16.1	-
含硫化合物				
3-噻吩甲醛	26.83	52.2±0.6	-	-
2-乙酰基噻唑	25.71	62.5±2.1	-	57.3±2.2

注: a.表示平均值±SD值(n=3); b.表示未检出。

对组 1, 2 和 3 中的挥发性化合物进行定量对比, 结果见表 4。由定量结果可知, 鸡肉肽参与美拉德反应直接主要贡献了大量的吡嗪类物质, 包含吡嗪、甲基吡嗪、2,5 二甲基吡嗪、2,3-二甲基吡嗪、2-乙基-5-甲基吡嗪、三甲基吡嗪、3-乙基-2,5-二甲基吡嗪和 2-

甲基-6 丙烯基吡嗪, 尤其是呈爆米花香气的 2,5-二甲基吡嗪, 浓度高达 10845 μg/L。而单独对鸡肉肽进行热降解反应生成的气味活性物质的含量却非常有限, 且没有大量贡献有肉味香气的物质生成。对模型肽的研究也表明肽参与美拉德反应可以贡献吡嗪类物质且

与 N 端氨基酸类型及肽链长度都关系密切^[13]。除了吡嗪类物质,相比于焦糖化反应,鸡肉肽-糖体系中的一些呋喃类如糠醛(从 273.4 到 2812.6 $\mu\text{g/L}$)、呋喃甲醇(从 125.1 到 386.3 $\mu\text{g/L}$)含量也显著增高($p<0.05$),而 2-丁酮(从 47.1 到 0.0 $\mu\text{g/L}$)、2,3-丁二酮(从 156.9 到 118.7 $\mu\text{g/L}$)、1-羟基-2-丙酮(从 373.2 到 265.7 $\mu\text{g/L}$)的含量却降低,这可能是由于反应中肽的参与促进了糖 Amadori 重排产物向脱水环化方向进行的结果。含硫化合物中,鸡肉肽-糖体系中仅发现有 3-噻吩甲醛和 2-乙酰基噻唑两种含硫物质。其中,2-乙酰基噻唑同时存在于热降解体系和美拉德反应体系中,可能是鸡肉肽的热降解反应产物。后续对酶解物中的游离氨基酸的分析表明,体系中缺少含硫氨基酸尤其是 Cys 可能是引起含硫化合物含量较少的主要原因。

2.3 鸡肉肽对含 Cys 美拉德反应体系生成含硫化合物的贡献

表 5 模型体系 4 和 5 中关键含硫气味活性化合物定量结果

Table 5 Quantitative data of the key aroma-active compounds present in reaction systems 4 and 5

含硫化合物	保留时间/min	含量/ $\mu\text{g/L}$	
		Cys+木糖 (组 5)	Cys+木糖+鸡 肉肽(组 4)
噻吩	8.6	- ^b	36.4 \pm 2.2 ^a
2-甲基噻吩	10.4	45.7 \pm 3.3 ^a	371.4 \pm 16.5
2-甲基噻唑	15.01	36.3 \pm 3.2	47.3 \pm 1.2
噻唑	15.34	17.3 \pm 0.8	72.4 \pm 6.0
2-甲基-3-呋喃硫醇	16.76	-	173.5 \pm 3.2
2-甲基-3-甲硫基呋喃	18.73	-	152.7 \pm 11.7
2-糠基硫醇	20.17	1462.8 \pm 32.0	1627.4 \pm 28.0
甲基糠基硫醚	21.59	-	73.8 \pm 2.4
3-巯基噻吩	24.04	-	52.4 \pm 1.3
3-甲硫基噻吩	25.46	-	31.3 \pm 3.0
2-乙酰基噻唑	25.71	-	104.7 \pm 6.4
3-噻吩甲醛	26.83	36.1 \pm 2.1	47.3 \pm 0.2
5-甲基-2-噻吩甲醛	27.23	13.2 \pm 0.7	57.3 \pm 4.9
2-乙酰基噻吩	28.69	11.5 \pm 0.9	62.7 \pm 4.8
2-丙酰基噻吩	30.04	-	67.4 \pm 0.5
2,5-二甲酰基噻吩	31.18	-	47.2 \pm 2.1

注: a.表示平均值 \pm SD 值($n=3$); b.表示未检出。

含硫化合物是贡献肉香味的最重要的一类化合物, Cys 也是通过美拉德反应产生含硫化合物不可缺少的物质^[12]。对组 4 和 5 中的含硫挥发性化合物含量

进行对比分析,结果见表 5。相比于单 Cys 体系,鸡肉肽的存在对挥发性含硫化合物的产生具有明显的促进作用,尤其是噻吩类化合物。Cemy 曾报道 Cys 与羰基化合物通过美拉德反应可生成噻吩类物质,而对比本实验组 4 和组 5 的结果表明,鸡肉肽的参与可以促进这一反应^[12]。结合感官鉴评结果表明,含有鸡肉肽的体系中 Cys 降解产生的 H_2S 可能更容易地参与到反应中。以 2-甲基-3-呋喃硫醇为代表的呋喃硫醇类化合物对肉香气具有重要的贡献,定量结果表明,鸡肉肽的参与对 2-糠基硫醇(从 1462.8 到 1627.4 $\mu\text{g/L}$), 2-甲基-3-呋喃硫醇(由 0.0 到 173.5 $\mu\text{g/L}$)和 2-甲基-3-甲硫基呋喃(由 0.0 到 152.7 $\mu\text{g/L}$)的生成都具有显著的促进作用($p<0.05$)。有研究表明 2-糠基硫醇, 2-甲基-3-呋喃硫醇可能是由糠醛与 H_2S 反应生成的,而本研究的结果表明鸡肉肽的参与可以使得这一反应途径更加活跃^[7]。

2.4 鸡肉肽对含 Leu 美拉德反应体系生成含硫化合物的影响

除了多肽以外,蛋白酶解物中通常还含有一些游离氨基酸类物质,进一步的研究发现,肽类与游离氨基酸类在美拉德中具有一定的交互作用。亮氨酸在美拉德反应很容易发生 Strecker 降解而具有非常强的反应活性,在鸡肉肽-糖反应体系中额外添加 Leu 进行反应,定量对比组 2,6 和 7 的挥发性化合物数据见表 6。可以清晰的看出,除去 Leu 本身生成的吡嗪, Leu 的添加对于鸡肉肽-糖反应体系中的吡嗪类的生成具有进一步的促进作用,尤其是 2,5-二甲基吡嗪(从 10845.3 到 18154.3 $\mu\text{g/L}$), 三甲基吡嗪(791.9 到 1739.2 $\mu\text{g/L}$)和 3-乙基-2,5-二甲基吡嗪(从 1005.9 到 1725.7 $\mu\text{g/L}$)。而鸡肉肽的参与对于 Leu 的 Strecker 降解也有显著的($p<0.05$)促进作用而生成大量的 3-甲基丁醛(从 12987.0 到 23902.0 $\mu\text{g/L}$)。同时,相比单独的 Leu-糖体系或肽-糖体系,Leu-肽-糖体系中的以糠醛和 1-羟基-2-丙酮为代表的美拉德反应中间产物的含量也显著增加($p<0.05$)。这也从另一个角度解释了 Zhang 等之前在酪蛋白美拉德反应体系的发现,即相同条件下纯肽反应中吡嗪的生成量要少于原始的酶解物体系^[14]。

2.5 鸡肉肽美拉德反应体系不挥发化合物的分析

游离氨基酸和肽类是鸡肉酶解物中最主要的

挥发物质。

表 6 模型体系 2, 6 和 7 中关键气味活性化合物定量结果

Table 6 Quantitative data of the key aroma-active compounds present in the reaction systems 2, 6, and 7

化合物	保留时间/min	浓度/($\mu\text{g/L}$)		
		Leu+糖 (组 7)	鸡肉肽+糖 (组 2)	鸡肉肽+Leu+糖 (组 6)
2-甲基丙醛	4.51	- ^b	259 \pm 3.5	105.6 \pm 0.3
3-甲基丁醛	6.12	12987.0 \pm 817.9 ^a	279.1 \pm 22.2	23902.0 \pm 2166.6
吡嗪	14.41	266.1 \pm 3.1	628.9 \pm 53.4	971.4 \pm 74.8
甲基吡嗪	15.01	543.5 \pm 49.6	558.8 \pm 40.3	1371.8 \pm 17.2
2,5-二甲基吡嗪	17.45	1253.7 \pm 12.2	10845.3 \pm 985.6	18154.3 \pm 484.5
2,3-二甲基吡嗪	18.17	45.1 \pm 3.1	258.2 \pm 20.8	326.3 \pm 1.3
2-乙基-5-甲基吡嗪	19.31	272.1 \pm 6.7	480.6 \pm 36.2	972.6 \pm 94.1
三甲基吡嗪	19.73	536.1 \pm 51.6	791.9 \pm 74.0	1739.2 \pm 75.1
3-乙基-2,5-二甲基吡嗪	20.17	336.5 \pm 8.0	1005.9 \pm 91.7	1725.7 \pm 159.6
糠醛	21.09	1500.4 \pm 16.2	2812.6 \pm 233.6	5791.4 \pm 202.7
2-丁基呋喃	22.47	153.4 \pm 5.2	52.2 \pm 0.7	297.2 \pm 24.6
5-甲酰基糠醛	24.79	427.1 \pm 28.0	228.3 \pm 8.9	921.8 \pm 70.9
3-羟基-2-丁酮	16.53	23.6 \pm 0.6	66 \pm 2.9	72.3 \pm 4.6
1-羟基-2-丙酮	17.11	172.5 \pm 14.2	265.7 \pm 23.2	762.3 \pm 54.2

注: a.表示平均值 \pm SD 值(n=3); b.表示未检出。

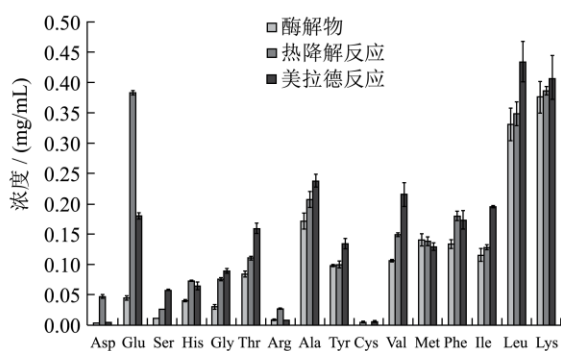


图 1 原始酶解物、热降解反应和美拉德反应体系中游离氨基酸的含量

Fig.1 Free amino acid content in the original hydrolysate, thermal degradation products, and Maillard reaction products

经测定, 本次酶解物中的主要游离氨基酸有丙氨酸、色氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和赖氨酸。在热降解反应中, 各游离氨基酸尤其是谷氨酸含量(从 0.04 到 0.38 mg/mL)明显的升高 ($p < 0.05$), 表明了肽类经热降解可以释放出游离氨基酸。而对比热降解反应组和美拉德反应组的数据可知, 还原糖的添加还可以进一步促进游离氨基酸含量的增加(总量从 2.38 到 2.50 mg/mL)。所以, 在本实验的反应条件下, 还原糖对鸡肉肽热降解为氨基酸的促进作用要大于美拉德反应的消耗作用。值得注意的是, 在所有体系中几乎没有半胱氨酸, 表明该酶解物-糖体系中不会有相当量的 H_2S 参与到反应中。体

系中的另一种含硫氨基酸即甲硫氨酸含量较高, 而在热降解反应中鉴定出的 2-乙酰基噻唑有可能是甲硫氨酸的热降解产物。

根据标准肽的保留时间绘制肽分子量-时间标准曲线, 对原始酶解物, 热降解反应产物和美拉德产物中的肽分布进行测定。根据不同肽段的 220 nm 下吸收色谱图的峰面积百分比进行定量分析, 结果见图 2。由结果可知, 对鸡肉肽进行热降解反应导致 >1000 u 的肽段和 $200\sim 500$ u 的肽段剧烈减少, 同时 $500\sim 1000$ u 及 <200 u 的肽段明显增多, 表明热降解反应主要由 >1000 u 及 $200\sim 500$ u 肽段分别向 $500\sim 1000$ u 及 <200 u 肽段转变。与热降解反应产物相比, 美拉德反应的 $200\sim 500$ u 肽段明显减少, <200 u 氨基酸类反而增多, $500\sim 3000$ u 肽段略微减少, 而 >3000 u 大肽增多。这个结果表明鸡肉肽中的 $200\sim 500$ u 肽段主要参与美拉德反应, 而 <200 u 和 >3000 u 的增多表明还原糖可以促进肽水解同时还可以实现肽的交联。有研究表明肽与还原糖可在反应中实现交联, 而肽与肽的交联可能通过肽与糖的交联引起的^[14]。

2.6 pH 值对鸡肉肽参与美拉德反应的影响

pH 值是影响美拉德反应进程的重要指标, 对美拉德反应生成的挥发性化合物的种类和含量具有重要的影响。对鸡肉肽美拉德反应体系的研究中同样发现了此现象, 构建 pH 值分别为 6.5 (组 2) 与 5.0 (组 8) 的两

个体系,各体系的气味化合物的定量结果如表7所示。可以清晰的得出,低pH值对体系中吡嗪的生成具有明显的抑制作用,而呋喃类的含量却剧烈升高。现有的研究表明,游离氨基酸-还原糖体系中吡嗪的生成需要较高的pH值,对反应历程的研究也表明较低的pH值会引导Amadori产物脱水成环形成一系列呋喃类产物。由本研究的数据可知,肽参与美拉德反应主要贡献吡嗪类气味活性化合物,进一步贡献肉味,而吡嗪类的生成需要较高的pH值。

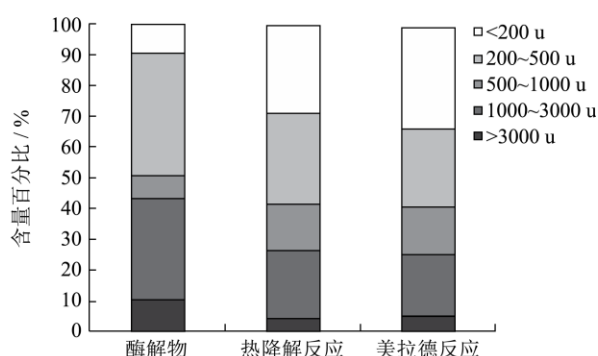


图2 原始酶解物、热降解反应和美拉德反应体系中的肽分布

Fig.2 Peptide distribution in the original hydrolysate, thermal degradation products, and Maillard reaction products

表7 模型体系2和8中关键气味活性化合物定量对比结果

Table 7 Results of the quantitative comparison of the key aroma-active compounds in reaction systems 2 and 8

化合物	保留时间/min	浓度/($\mu\text{g/L}$)	
		pH 5.0 (组 8)	pH 6.5 (组 2)
吡嗪	14.41	- ^b	628.9 \pm 53.4 ^a
甲基吡嗪	15.01	-	558.8 \pm 40.3
2,5-二甲基吡嗪	17.45	2489.2 \pm 125.6	10845.3 \pm 985.6
2,3-二甲基吡嗪	18.17	-	258.2 \pm 20.8
2-乙基-5-甲基吡嗪	19.31	32.7 \pm 2.6	480.6 \pm 36.2
三甲吡嗪	19.73	147.9 \pm 12.6	791.9 \pm 74.0
3-乙基-2,5-二甲基吡嗪	20.17	124.6 \pm 11.7	1005.9 \pm 91.7
糠醛	21.09	5243.4 \pm 29.8	2812.6 \pm 233.6
2-丁基呋喃	22.47	326.5 \pm 16.9	52.2 \pm 0.7
5-甲酰基糠醛	24.79	756.4 \pm 65.1	228.3 \pm 8.9
3-羟基-2-丁酮	16.53	-	66 \pm 2.9
1-羟基-2-丙酮	17.11	-	265.7 \pm 23.2

注: a表示平均值 \pm SD 值(n=3); b表示未检出。

3 结论

本研究以鸡肉酶解物为基础,构建了8组模型反应体系,对鸡肉肽参与美拉德反应贡献肉味化合物进行了研究。结果发现,鸡肉肽在美拉德反应中主要贡献了大量吡嗪类物质,增加量高达14744.1 $\mu\text{g/L}$,从而进

一步贡献肉香气息。而相比于焦糖化反应,鸡肉肽-糖体系中的一些呋喃类如糠醛(从273.4到2812.6 $\mu\text{g/L}$)、呋喃甲醇(从125.1到386.3 $\mu\text{g/L}$)含量也显著增高($p<0.05$),2-丁酮(从47.1到0.0 $\mu\text{g/L}$)、2,3-丁二酮(从156.9到118.7 $\mu\text{g/L}$)、1-羟基-2-丙酮(从373.2到265.7 $\mu\text{g/L}$)的含量却降低,从而指示出反应中肽的参与可能促进了糖Amadori重排产物向脱水成环方向进行。进一步对添加游离氨基酸Cys的反应体系的研究表明,鸡肉肽可以大幅度促进含Cys体系中含硫气味活性化合物如2-甲基噻吩、噻吩、3-巯基噻吩、3-甲硫基噻吩、3-噻吩甲醛、5-甲基-2-噻吩甲醛、2-乙酰基噻吩、2,5-二甲酰基噻吩、2-丙酰基噻吩2-甲基-3-呋喃硫醇、2-甲基-3-甲硫基呋喃及2-糠基硫醇的生成;而Leu-鸡肉肽-糖体系中的吡嗪生成量大于Leu-糖与肽-糖体系两者之和,说明Leu的添加对鸡肉肽-糖体系中吡嗪的生成具有促进作用。最后,构建了不同pH值的体系进行反应,结果发现pH值对鸡肉肽参与美拉德反应生成吡嗪类需要较高的pH值。综合挥发性物质测定数据得出,以木糖为代表的还原糖,以Leu为代表的游离氨基酸,以Cys为代表的含硫氨基酸对鸡肉肽参与美拉德反应生成肉香味物质都具有促进作用;而对不挥发物的定量分析表明,鸡肉酶解物中200~500 u的肽段可通过美拉德反应对食品的肉香气味形成具有重要的贡献。

参考文献

- [1] Martins S I F S, Jongen W M F, van Boekel M A J S. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling [J]. Trends in Food Science & Technology, 2000, 11(9-10): 364-373
- [2] Yang C, Wang R, Song H. The mechanism of peptide bonds cleavage and volatile compounds generated from pentapeptide to heptapeptide via Maillard reaction [J]. Food Chemistry, 2012, 133(2): 373-382
- [3] Kurozawa L E, Park K J, Hubinger M D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology [J]. Journal of Food Science, 2008, 73(5): C405-C412
- [4] 宋焕禄,廖国洪.鸡肉酶解物/酵母抽提物-Maillard反应产生肉香味化合物的研究[J].食品科学,2001,10:83-85
SONG Huan-lu, LIAO Guo-hong. The isolation & identification of volatile compounds of enzymatically hydrolyzed chicken dominated maillard reaction system [J]. Food Science, 2001, 10: 83-85
- [5] Wang R, Yang C, Song H. Key meat flavour compounds formation mechanism in a glutathione--xylose Maillard

- reaction [J]. Food Chemistry, 2012, 131(1): 280-285
- [6] Eric K, Raymond L V, Huang M, et al. Sensory attributes and antioxidant capacity of Maillard reaction products derived from xylose, cysteine and sunflower protein hydrolysate model system [J]. Food Research International, 2013, 54(2): 1437-1447
- [7] Xu Q, Liu J, Song H, et al. Formation mechanism of volatile and non-volatile compounds in peptide-xylose Maillard reaction [J]. Food Research International, 2013, 54(1): 683-690
- [8] 陈海涛,徐晓兰,张宁等.鸡肉酶解工艺对热反应鸡肉香精香气的影响[J].食品科学,2013,9:150-154
CHEN Hai-tao, XU Xiao-lan, ZHANG Ning et al. Optimal chicken enzymatic hydrolysate for the preparation of chicken flavoring [J]. Food Science. 2013, 9: 150-154
- [9] Samsudin M W, Rongao S, Said I M. Volatile compounds produced by the reaction of leucine and valine with glucose in propylene glycol [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(1): 247-250
- [10] Zhang Y, Dorjpalam B, Ho C T. Contribution of peptides to volatile formation in the Maillard reaction of casein hydrolysate with glucose [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(12): 2467-2471
- [11] 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 Min, BAI Wei-dong, ZHAO Wen-hong et al. Determination and analysis of free amino acid in yeast extract [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(7): 878-881
- [12] Cerny C, Davidek T. Formation of aroma compounds from ribose and cysteine during the maillard reaction [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(9): 2714-2721
- [13] Van Lancker F, Adams A, De Kimpe N. Impact of the n-terminal amino acid on the formation of pyrazines from peptides in maillard model systems [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(18): 4697-4708
- [14] Jakas A, Katić A, Bionda N, et al. Glycation of a lysine-containing tetrapeptide by d-glucose and d-fructose-influence of different reaction conditions on the formation of Amadori/Heyns products [J]. Carbohydrate Research, 2008, 343(14): 2475-2480