

热加工暗纹东方鲀肌肉中呈味肽分离鉴定及呈味特性研究

刘源, 马垒, 仇春泱, 苗晓丹, 李琳, 王正全, 王锡昌

(上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 为明确养殖暗纹东方鲀煮制时关键呈味肽的结构序列, 本文对热加工暗纹东方鲀肌肉中呈味肽进行分离鉴定并对其呈味特性进行研究。热加工暗纹东方鲀肌肉水提取物经超滤(3 ku)、纳滤(200 u)及 Sephadex G-15 凝胶过滤色谱分离得到4个多肽组分(F1、F2、F3和F4), 感官评价结合电子舌分析筛选出滋味特性最强组分F2。利用半制备 RP-HPLC 对 F2 组分进一步分离得到3个组分(F2-1、F2-2和F2-3), 电子舌评价 F2-1 组分鲜味较强。对组分 F2-1 中呈味肽的氨基酸序列采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF MS/MS)进行测定, 得到了两种新的呈味五肽和六肽结构: Cys-Ala-Leu-Thr-Pro (CA, 503.9253 u)及 Arg-Pro-Leu-Gly-Asn-Cys (RP, 659.7747 u), 2条肽链中均含有的亲水性 Cys 残基, 可能是造成肽具有浓厚感和鲜味的关键。两个肽段经固相合成后测定其呈味特性, 肽段 RP 具有较强鲜味, 且肽段 RP 还与氯化钠和谷氨酸钠具有滋味协同作用, 可增强鲜味强度。

关键词: 暗纹东方鲀; 呈味肽; 鉴定; 呈味特性

文章编号: 1673-9078(2016)3-152-157

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.3.025

Isolation, Identification, and Taste Characteristics of Flavor Peptides from Cooked Puffer Fish (*Takifugu obscurus*)

LIU Yuan, MA Lei, QIU Chun-yang, MIAO Xiao-dan, LI Lin, WANG Zheng-quan, WANG Xi-chang

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To determine the sequences of key flavor peptides from farmed puffer fish present during cooking, the flavor peptides in the cooked puffer fish (*Takifugu obscurus*) muscle were isolated and identified, and their taste characteristics were evaluated. Four peptide fractions (F1, F2, F3, and F4) were obtained by ultrafiltration (3 ku), nanofiltration (200 u), and Sephadex G-15 gel filtration chromatography of the aqueous extract of cooked puffer fish muscle, and sensory evaluation analysis combined with electronic tongue were used to screen out fraction F2 as having the strongest taste characteristics. Fraction F2 was further separated into three sub-fractions, F2-1, F2-2, and F2-3, by semi-preparative reverse-phase high-performance liquid chromatography, and electronic tongue indicated that fraction F2-1 had a relatively strong umami taste. The amino acid sequence of fraction F2-1 was measured using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight tandem mass spectrometry, and two novel flavor peptides, including a pentapeptide and a hexapeptide, were identified with the following sequences: Cys-Ala-Leu-Thr-Pro (CA, 503.9253 u) and Arg-Pro-Leu-Gly-Asn-Cys (RP, 659.7747 u). Both peptide chains contained hydrophilic cysteine residues, which may be key factors in the kokumi and umami tastes. After solid phase synthesis, the taste characteristics of the two synthesized peptides were measured. The results showed that peptide RP had a relatively strong umami taste, and RP had a taste synergistic effect with NaCl and monosodium glutamate, which may increase the strength of the umami taste.

Key words: puffer fish (*Takifugu obscurus*); flavor peptides; identification; taste characteristics

滋味是评价食品食用品质的一个重要指标之一, 氨基酸、小分子肽、核苷酸代谢产物及无机盐等均对食品

收稿日期: 2015-05-06

基金项目: 国家自然科学基金(31371790, 31271900); “十二五” 国家科技计划课题(2012BAD28B01); 上海市科委工程中心建设(11DZ2280300); 上海市教委重点学科建设项目(J50704); 上海高校知识服务平台上海海洋大学水产动物遗传育种中心(ZF1206)

作者简介: 刘源(1979-), 副教授, 硕导, 研究方向: 肉品风味与品质评价

滋味具有重要的贡献作用。呈味肽是指从食物中提取或者由氨基酸合成得到的对食品风味具有一定贡献的分子量低于 3000 u 的寡肽类^[1]。呈味肽的氨基酸序列及肽链长度不同均会使其呈现出不同的特征性味道, 包括甜味、鲜味、苦味、咸味和酸味 5 种味道。小分子肽类存在于肉类、腌制食品和乳制品等各种食品中, 是蛋白质合成和分解的中间产物, 能够参与并影响食品滋味的形成, 提高食品的整体风味, 此外呈味肽还

可以作为挥发性风味物质的前体物参与美拉德反应,形成特殊的芳香气味^[2,3]。

河豚鱼带毒却又味道鲜美,我国自古就有“拼死吃河豚”及“吃了河豚,百味不鲜”的说法。近年来,随着我国河豚养殖产业的迅速发展,人工养殖的河豚经过几代培育已基本无毒可供安全食用。我国江浙地区盛产暗纹东方鲀,暗纹东方鲀是我国目前养殖量最大的河豚鱼品种,采用淡水养殖,主要以烹饪方式进行食用。目前,对于河豚滋味的研究主要集中在游离氨基酸、呈味核苷酸和无机离子方面^[4,5],而对河豚肌肉中呈味肽的研究鲜有报道。仇春洪^[6]等对于生鲜暗纹东方鲀肌肉中呈味肽进行分离鉴定,得到了一种兼具鲜味和浓厚感呈味七肽。

因此,本试验利用膜分离技术、凝胶层析色谱以及反相高效液相色谱对热加工处理暗纹东方鲀肌肉提取液中呈味肽进行分离纯化,相较于传统只采用超滤的膜分离技术^[7],本试验采用了超滤和纳滤结合的膜分离手段,避免了感官评价过程中分子量低于 200 u 无机盐及游离氨基酸等小分子量滋味物质对提取液感官评价的干扰。同时采用电子舌智能感官结合人工感官评价对每一步分离组分进行筛选得到呈味特性强的组分,克服了单一采用人工感官评价分析的局限性,并采用 MALDI-TOF/TOF MS/MS 对最终筛选多肽组分进行氨基酸序列鉴定。最后,采用多肽固相合成对已知序列结构的呈味肽进行合成,并采用电子舌技术对呈味肽呈味特性进行研究,从而找出暗纹东方鲀热加工过程中可能存在的呈味肽,为养殖暗纹东方鲀的烹饪以及调味料开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

30尾2龄暗纹东方鲀(平均体重 376.81 ± 29.44 g)采购于江苏中洋集团,参照标准《无公害化暗纹东方鲀安全加工操作规范(DB32/T543-2002)》对暗纹东方鲀活体进行宰杀,取肉分装于铝箔袋中抽真空后储存于 -80°C 冰箱中备用。

T25 高速分散机,德国 IKA 公司;实验用膜分离装置(RO-NF-UF-4050),上海摩速科学器材有限公司;电脑层析恒温装置 CXG-1,上海沪西仪器厂;FOX4000 电子舌,法国 Alpha M.O.S.公司;高效液相色谱仪 LC-15,日本岛津公司;色谱柱 Kromasil C18 column (100\AA 250×10 mm, $5\ \mu\text{m}$),瑞典 EKA 公司;ABI4700 基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱仪(MALDI-TOF/TOF MS/MS),美国应用生物系统公

司;beckmancoulter Avanti J-26XP 高速冷冻离心机,美国贝克曼库尔特有限公司;Milli-Q 超纯水系统;冷冻干燥机,美国 SP Scientific 公司。

交联葡聚糖凝胶 Sephadex G-15 (上海安谱);HPLC 级纯乙腈(上海安谱);其他试剂为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 热加工暗纹东方鲀肌肉中呈味肽的提取

参考邓婕春^[5]的方法,采用热加工提取呈味肽,并略有改动。准确称取绞碎后的暗纹东方鲀肌肉 200 g,加入 800 mL 超纯水混合匀浆($10000\ \text{r/min}$, $3 \times 10\ \text{s}$),匀浆后 100°C 条件下加热 2 h 提取热降解小肽,过滤后的滤液进行离心($10000\ \text{g}$, 4°C , $20\ \text{min}$),取上清液。此提取过程进行 3 次平行实验,合并 3 次提取上清液即为热加工暗纹东方鲀肌肉呈味肽提取液,储存于 -80°C 下备用。

1.2.2 呈味肽的超滤、纳滤

将呈味肽提取液采用 $0.45\ \mu\text{m}$ 水相滤膜过滤后,分别过截留分子量为 3000 u 超滤膜和 200 u 纳滤膜,最终得到分子量范围为 200 u~3000 u 提取液,将浓缩液冷冻干燥成粉,储存于 -80°C 下备用。

1.2.3 呈味肽的凝胶过滤层析

参考党亚丽^[8]的方法,对膜分离组分进行凝胶层析分离,并略有改动。将膜分离 200 u~3000 u 冻干粉用超纯水配成 $5\ \text{mg/mL}$ 的溶液,经 $0.45\ \mu\text{m}$ 水相滤膜过滤后,采用 Sephadex G-15 凝胶层析色谱分离纯化。分离条件为:层析柱($1.6\ \text{cm} \times 60\ \text{cm}$),洗脱液为超纯水,上样量 2 mL,流速 $1\ \text{mL/min}$,检测波长 220 nm,灵敏度 1.0。分别收集各凝胶层析组分峰,冷冻干燥后储存于 -80°C 下备用。

1.2.4 呈味肽的 RP-HPLC 分离纯化

将凝胶层析分离筛选组分溶于超纯水中配成浓度为 $10\ \text{mg/mL}$ 的溶液,经 $0.22\ \mu\text{m}$ 水相滤膜过滤后,采用半制备 RP-HPLC 进行分离纯化。分离条件:进样体积 $20\ \mu\text{L}$,柱温 30°C ,流速 $0.8\ \text{mL/min}$,检测波长 220 nm,洗脱 A 液:超纯水,洗脱 B 液:纯乙腈溶液,90%A 和 10%B 进行等度洗脱。分别收集各液相分离组分峰,冷冻干燥后储存于 -80°C 下备用。

1.2.5 MALDI-TOF/TOF MS/MS 鉴定呈味肽的结构

根据 Yergey^[9]等结论,采用 MALDI-TOF/TOF MS/MS 对液相筛选多肽组分进行结构序列鉴定。用 $0.8\ \mu\text{L}$ $4\ \text{mg/mL}$ 的 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CAA)溶液(溶剂为 0.1% TFA-50% 乙腈)将 RP-HPLC 纯化筛选组分进行溶解,点样于 MALDI 不锈钢靶板上,在室

温下自然干燥。另点 0.8 μL 4 mg/mL 的 CAA 溶液作空白对照。采用 De Novo Explorer 软件从头测序,再结合人工分析确定肽段的序列。

1.2.6 呈味肽的合成

采用多肽固相合成法对鉴定得到已知序列结构的呈味肽进行合成,并进行脱盐处理,使其纯度大于 97%,由上海吉尔生化有限公司合成。

1.2.7 感官评定

感官评定小组成员由 3 名男生和 5 名女生组成,评定前,参考 GB/T 16291.1-2012 对他们进行五种基本味道即苦味、咸味、酸味、甜味和鲜味的感官培训。分别将层析各冻干组分及合成肽用超纯水配成 1 mg/mL 溶液,采用滋味稀释分析 (TDA) 法^[10]进行感官评价,将溶液按 1:1 比例逐步稀释,各稀释溶液按浓度降低的顺序呈送给感官员,采用三角测试法对每个稀释水平溶液进行评定。当某个稀释水平的溶液与另外两个空白 (水) 之间的滋味差异刚好能被识别出来,记录此时的稀释倍数,即稀释值 (TD)。TD 值为各感官员感官结果的平均值,评定结果之间的误差应低于或等于一个稀释水平。另外,感官评定时,每个感官员还必须对每次呈给样品的滋味特性进行描述。

1.2.8 电子舌测定滋味轮廓

分别将层析组分冻干粉用超纯水配成 0.5 mg/mL; RP-HPLC 纯化组分配成 0.1 mg/mL; 合成肽 10 mg 溶于 0.1 mg/mL 的谷氨酸钠溶液和氯化钠溶液中各 80 mL。同时将谷氨酸钠和氯化钠配成 0.1 mg/mL、0.2 mg/mL 和 0.3 mg/mL 标准梯度溶液,柠檬酸和蔗糖配成 0.1 mg/mL。在室温下进行测定,每个样品数据采集时间为 120 s,每 1 s 采集一个数据,选取第 120 s 上的响应值作为原始数据信号进行处理,采用主成分分析 (PCA) 对原始数据进行分析。

2 结果与讨论

2.1 Sephadex G-15 凝胶层析分离呈味肽

由图 1 可知,热加工暗纹东方鲀肌肉 200 Da-3 KDa 滤过液经凝胶分离后得到 4 个组分 F1、F2、F3 和 F4,收集各组分冻干复配,对各组分进行感官评价,结果见表 1,电子舌分析结果见图 2。感官评定测定的 TD 值分别为 32、64、8 和 4,4 个组分中 F2 的呈味特性较强,TD 值和滤液最为接近,同时 F2 还具有显著的浓厚感和特征性肉汤味。从感官评价的结果可以看出,凝胶层析分离 4 个组分 TD 值较于滤液的 TD 值都低,分析主要原因可能是由于滤液相比凝胶层析分离 4 个组分成分更为复杂,是由多种滋味化合物组

成的复杂体系,滋味物质间的相互作用不可避免,各滋味化合物在感官评价过程中产生滋味的增强效应,导致感官评价滤液的 TD 值高于 4 个分离组分的 TD 值。

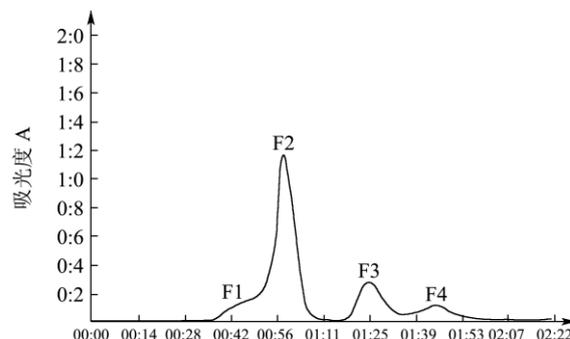


图 1 暗纹东方鲀 200 u~3 ku 滤液凝胶层析色谱图

Fig.1 Sephadex G-15 gel filtration chromatogram of the ultrafiltration fractions with molecular

表 1 暗纹东方鲀超滤组分和凝胶分离组分感官评价结果

Table 1 Sensory evaluation of peptide fractions of Takifugu obscurus separated by ultrafiltration and gel filtration chromatography

层析组分	TD 值	感官描述
F1	32	柔和感、浓厚感、鲜味、涩味
F2	64	浓厚感、肉汤味、鲜味、甜味、直冲感、咸味
F3	8	柔和感、咸味、甜味、涩味
F4	4	咸味、涩味
滤液	128	鲜味、浓厚感、肉汤味、直冲感、鱼腥味

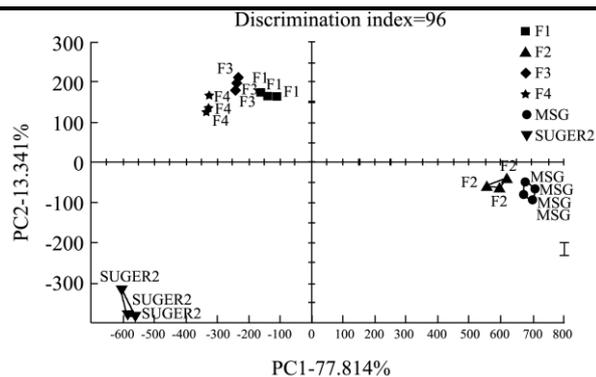


图 2 凝胶过滤组分 (F1、F2、F3 和 F4) 与谷氨酸钠 (MSG) 和蔗糖的二维主成分分析图

Fig.2 Plot of two dimensional PCA for peptide fractions separated by Sephadex G-15 gel filtration (F1, F2, F3 and F4) with monosodium glutamate (MSG) and sugar

从图 2 电子舌主成分分析图可以看出,二维主成分的累积贡献率达到 91.155%,判别因子 96,说明其数据可以代表原始数据的全部信息。相同样品的散点图聚集在一起,形成一个组,每组之间独立分开,表

明不同组分的滋味具有差异性, 间隔越远, 滋味差异越大。主成分图中 F2 组分与谷氨酸钠最为接近, 而其余 3 个组分则相距较远, 说明 F2 组分与谷氨酸钠的呈味特性最接近, 这也与感官评定结果相吻合, 因此结合感官评定和电子舌的分析结果, 选取 F2 组分进行 RP-HPLC 进行进一步纯化。

2.2 RP-HPLC 纯化呈味肽

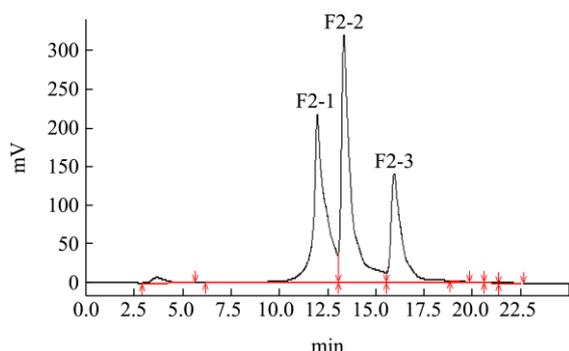


图 3 F2 组分的 RP-HPLC 分析洗脱图

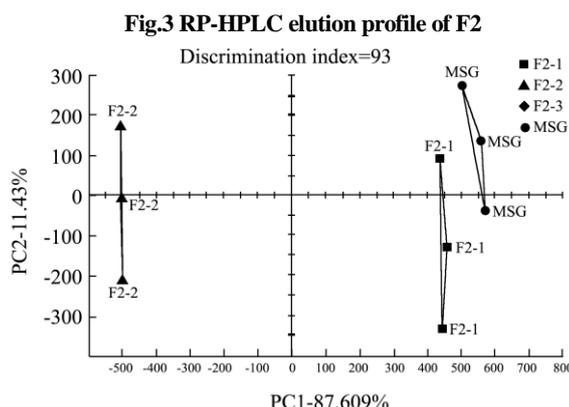


图 4 多肽组分 (F2-1、F2-2 和 F2-3) 与谷氨酸钠电子舌二维主成分分析图

Fig.4 Plot of two dimensional PCA for peptide sub-fractions F2-1, F2-2, F2-3 and MSG measured by electronic tongue

从图 3 可知, F2 组分经 RP-HPLC 分离后得到 3 个组分 F2-1、F2-2 和 F2-3, 从色谱图中可以看出, 相较于常采用的酶解样品提取分离呈味肽的方法^[11], 本试验采用热加工方式提取的组分极性差异不是很大, 并没有产生酶解样品组分经液相分离后的复杂峰型, 便于分离组分的收集, 分别收集 3 个组分冻干复配进行电子舌分析筛选。从图 4 电子舌结果可以看出, F2-1 离谷氨酸钠最为接近, 表明 F2-1 的滋味最接近于鲜味, 所以采用 MALDI-TOF/TOF MS/MS 测定 F2-1 的氨基酸序列。

2.3 暗纹东方鲀呈味肽的结构鉴定

采用 MALDI-TOF/TOF MS/MS 对 F2-1 组分进行

氨基酸序列测定, 从图 5 一级谱图可以看出, 主要的母离子为 m/z 503.9253 (m/z 541.8687 为其同一物质的加钾峰) 和 m/z 659.7747, 其母离子丰度高于其他母离子, 分析两个母离子对于 F2-1 组分整体的鲜味特征起主要的贡献作用, 选择这两个主要的母离子进入 MS-MS 分析, 对得到的 MS-MS 碎片信息进行分析, 获得它们的氨基酸序列为 Cys-Ala-Leu-Thr-Pro (CA5, 503.9253 u) 及 Arg-Pro-Leu-Gly-Asn-Cys (RP6, 659.7747 u)。

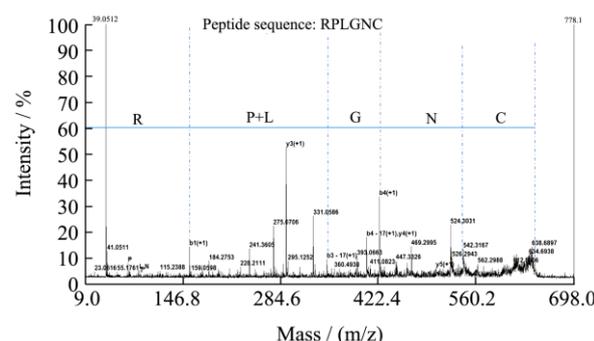
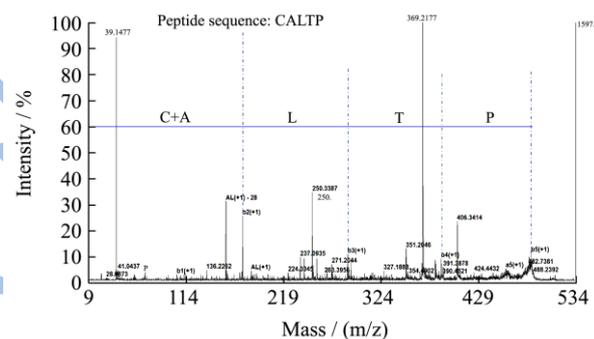
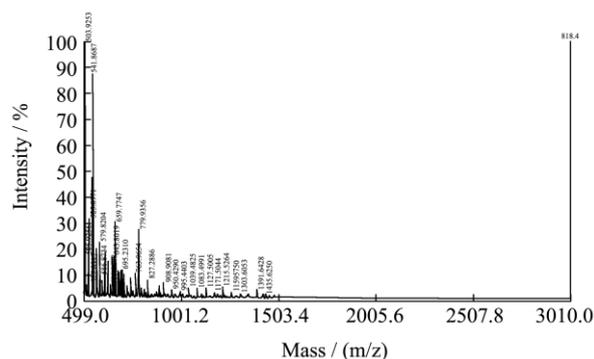


图 5 多肽组分 F2-1 的 MALDI-TOF/TOF MS/MS 质谱图

Fig.5 MALDI-TOF/TOF MS/MS spectra of the peptide sub-fraction F2-1

在鉴定得到的两种肽中都含有 Cys, 有研究表明 Cys 可能是造成肽段具有浓厚感的主要原因, 含有 Cys 的肽段因氨基酸侧链基团上含有的-SH 在舌头上产生一种轻微的收敛感, 从而显著增加味觉上的浓厚感, 浓厚感是一般小分子肽具有的感官特性, 可以提升鲜味的强度^[12]。日本味之素株式会社发现谷胱甘肽具有

强烈增加食品浓厚感的功能，能增强和维持食品的风味，而谷胱甘肽作为一种3肽，其结构中同样含有Cys残基^[13]。肽段RP6所含的疏水性氨基酸在N端，亲水性氨基酸在C端，其肽段中含有亲水性氨基酸Gly，Labow^[14]认为，肽段所含有的鲜味是由于带正电的分子团、负电分子团和疏水性分子团对应在不同受体上所产生的，而此肽具备了条件，可能是其具有鲜味的关键。

2.4 暗纹东方鲀呈味肽的呈味特性

为验证两个肽段的呈味特性，对CA和RP两个肽合成后采用电子舌进行分析，结果见图6，感官评价结果见表2。从二维主成分分析图中可以看出，RP与谷氨酸钠的距离最近，说明其鲜味较为强烈，而CA与柠檬酸较近，说明其具有一定的酸味。两个呈味肽的感官评定TD值都为32，从感官描述词来看，RP具有鲜味和浓厚感，这也与电子舌结果相吻合，CA感官评定时具有药味，这可能是合成肽中残留的试剂味道所造成的。

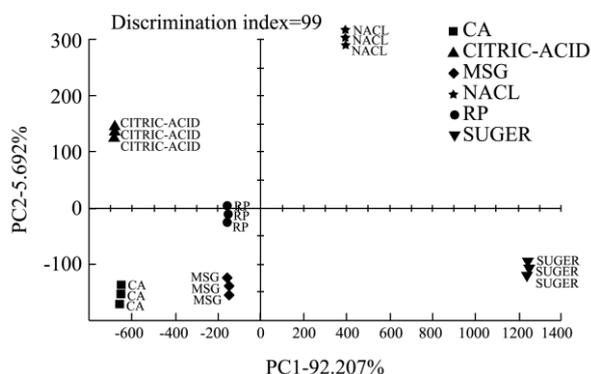


图6 两种呈味肽与蔗糖、氯化钠、柠檬酸和谷氨酸钠电子舌二维主成分分析图

Fig.6 Plot of two dimensional PCA for two flavor peptides, sugar, NaCl, citric acid, and MSG measured by electronic tongue

表2 两种呈味肽感官评价结果

Table 2 Sensory evaluation of two flavor peptides

呈味肽序列	TD值	感官描述
CALTP	32	浓厚感、涩味、苦味、药味
RPLGNC	32	鲜味、浓厚感、涩味、苦味

氯化钠和谷氨酸钠都具有增加鲜味物质鲜味的的作用，而小分子肽具有的特征性浓厚感也可以提升鲜味物质的鲜味。从图7中可以看到不同浓度的MSG和NaCl呈特规律性分布，根据不同浓度MSG和NaCl的分布来确认样品的鲜味和咸味的滋味强度。CA在添加MSG后并没有明显靠近的趋势，而RP在加入MSG后都显著向高浓度的MSG靠近，可以判断RP

和MSG具有良好的协同作用。而在加入NaCl后，CA远离NaCl浓度趋势，说明NaCl对其具有消杀作用，可能是肽段的缓冲作用削弱了NaCl本身具有的咸味。而RP在添加了NaCl后显著地靠近了其标准梯度溶液，说明RP和NaCl有着显著的协同作用。综合以上结论RP与MSG和NaCl具有协同作用，可增加鲜味强度。

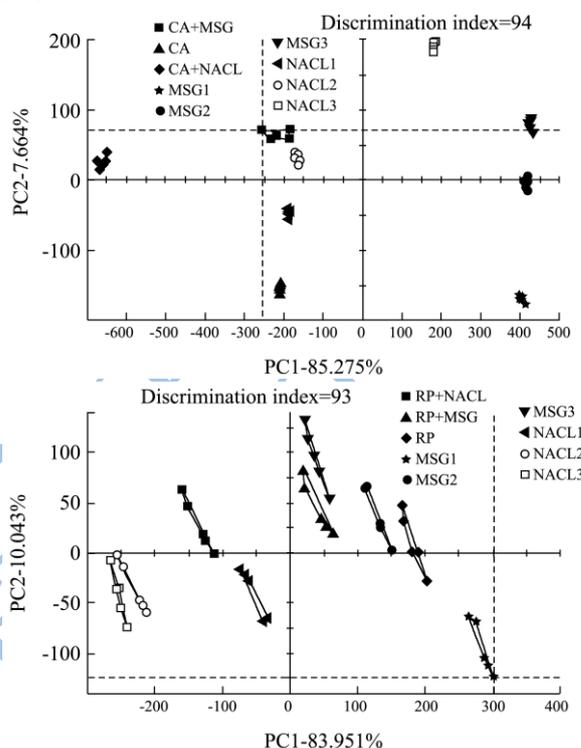


图7 CA和RP与氯化钠和谷氨酸钠的电子舌二维主成分分析图
Fig.7 Plot of two dimensional PCA for CA and RP with NaCl and MSG measured by electronic tongue

3 结论

3.1 采用超滤、纳滤、凝胶层析以及RP-HPLC，分离纯化得到热加工养殖暗纹东方鲀肌肉中具有较强呈味特性的组分F2-1，采用MALDI-TOF/TOF MS/MS分析得出F2-1组分可能的氨基酸序列为Cys-Ala-Leu-Thr-Pro(CA, 503.9253 u)及Arg-Pro-Leu-Gly-Asn-Cys(RP, 659.7747 u)，两条肽段中的Cys残基可能是其具有浓厚感的关键。对这两种呈味肽进行固相合成，采用电子舌进行呈味特性分析，结果表明肽段Arg-Pro-Leu-Gly-Asn-Cys(RP, 659.7747 u)具有强烈的鲜味，且与谷氨酸钠和氯化钠具有协同作用。

3.2 本文通过热加工模拟暗纹东方鲀煮制过程，提取液经分离鉴定得到了两种新的呈味肽，这表明小分子肽类是构成暗纹东方鲀鲜美浓郁味感的重要成分之一，为进一步探究暗纹东方鲀鲜美的奥秘，可考虑采用酶解制备呈味肽的方式，进一步挖掘暗纹东方鲀肌

肉中的特征呈味肽,对呈味肽进行溯源,分析其可能的形成机制,为利用生物技术开发暗纹东方鲀调味料提供理论基础。

参考文献

- [1] Claeys E, De Smet S, Balcaen A, et al. Quantification of fresh meat peptides by SDS-PAGE in relation to ageing time and taste intensity [J]. *Meat science*, 2004, 67(2): 281-288
- [2] Lu C Y. Peptides as flavor precursors in Maillard reaction [D]. Rutgers University, 2006
- [3] Ogasawara M, Katsumata T, Egi M. Taste properties of Maillard-reaction products prepared from 1000 to 5000 Da peptide [J]. *Food Chemistry*, 2006, 99(3): 600-604
- [4] TAO Ning-ping, WANG Li-ya, GONG Xi, et al. Comparison of nutritional composition of farmed pufferfish muscles among *Fugu obscurus*, *Fugu flavidus* and *Fugu rubripes* [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2012, 28(1): 40-45
- [5] 邓捷春.暗纹东方鲀与红鳍东方鲀食用口感及风味差异研究[D].上海:上海海洋大学,2009
DENG Jie-chun. Research on the differences of mouthfeel and flavor between *fugu obscurus* and *fugu rubripes* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2009
- [6] 刘源,仇春泱,王锡昌.养殖暗纹东方鲀肌肉中呈味肽的分离鉴定[J].现代食品科技,2014,30(8):38-42
LIU Yuan, QIU Chun-yang, WANG Xi-chang. Isolation and identification of flavor peptides in cultured puffer fish (*takifugu obscurus*) [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(8): 38-42
- [7] Liu J, Song H, Liu Y, et al. Discovery of kokumi peptide from yeast extract by LC-Q-TOF-MS/MS and sensomics approach [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015
- [8] 党亚丽.金华火腿和巴马火腿风味的研究[D].无锡:江南大学,2009
DANG Ya-li. Study on the flavor of jinhua ham and parma ham [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009
- [9] Yergey A L, Coorssen J R, Backlund P S, et al. De novo sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2002, 13(7): 784-791
- [10] Frank O, Jezussek M, Hofmann T. Sensory activity, chemical structure, and synthesis of maillard generated bitter-tasting 1-Oxo-2, 3-dihydro-1 H-indolizinium-6-olates [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(9): 2693-2699
- [11] 王蓓.酶法制备天然牛奶风味基料及牛奶香精的研究[D].无锡:江南大学,2009
WANG Bei. Study on the materials of natural milk flavor and milk flavoring by enzymes [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009
- [12] Ueda Y, Tsubuku T, Miyajima R. Composition of sulfur-containing components in onion and their flavor characters [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1994, 58(1): 108-110
- [13] Ueda Y, Yonemitsu M, Tsubuku T, et al. Flavor characteristics of glutathione in raw and cooked foodstuffs [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1997, 61(12): 1977-1980
- [14] Labows J N, Cagan R H. Complexity of flavor recognition and transduction [C]//ACS symposium series (USA). 1993