

猪骨素组分对鲜味及鸡汤模型香气鼻后感受强度的增强作用

刘贺^{1*}, 张彬², 任禛¹, 彭声静¹, 张瑜瑜¹

(1. 昆明学院农学与生命科学院, 云南昆明 650214)

(2. 德州职业技术学院谷物及油脂工程学院, 山东德州 253034)

摘要: 该研究采用分子量截留法将猪骨素分为3个组分, 并以感官分析法对猪骨素组分增鲜及增鼻后香气能力进行评价, 进一步对猪骨素中蛋白组分的分子量分布、疏水性情况进行评价分析, 探讨其蛋白质组分疏水性聚集与其增鲜、增香能力间关系。结果表明, 变性剂处理后, 猪骨素中>30 ku组分可由36.07%降至2.95%, 说明其蛋白存在聚集现象; 将3个组分分离冻干后感官分析发现, PBE(10~30 ku)组分在以NaCl为基底的溶液中评分分别为咸味7.6、浓厚度8.6、连续性7.6、口感丰富度8.0, 高于另两种组分的感官评分, 而其香气鼻后感受评分为7.5, 也高于另两种组分。对3个组分进行分析发现, PBE(10~30 ku)的鲜味及甜味氨基酸含量分别为14.7%及44.19%, 与PBE(>30 ku)差异不具显著性, 但其增鲜效果显著高于该组分, 而分析疏水性后发现, PBE(10~30 ku)组分的疏水性指数为60.00±1.33, 与另两种组分差异存在显著性, 据此推测呈味氨基酸(鲜味、甜味)含量高对PBE(10~30 ku)组分的增鲜增香效果起到一定提升作用, 但只有蛋白质或肽的整体疏水性在一定范围内时, 其鲜味及香气增强作用才最佳。最后, 疏水性与增鲜、增鼻后香气感受方面关系由40及70℃加热处理实验所证明。

关键词: 猪骨素; kokumi; 增鲜; 香气鼻后感受

文章编号: 1673-9078(2021)11-317-327

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0097

Enhancement of Umami Taste and Intensity of Retronasally Perceived Model Aroma of Chicken Soup by Pork Bone Essence Constituents

LIU He^{1*}, ZHANG Bin², REN Zhen¹, PENG Shengjing¹, ZHANG Yuyu¹

(1. College of Agricultural and Life Science, Kunming University, Kunming 650214, China)

(2. Department of Grain and Oil Projects, Dezhou Vocational and Technical College, Dezhou 253034, China)

Abstracts: In this study, the molecular weight cut-off method was used to divide pork bone essence (PBE) into three fractions, and sensory analysis was performed to evaluate the enhancing effect of the constituents in PBE on umami and retronasal aroma. The molecular weight distribution and hydrophobicity of the peptide fractions from PBE were further analyzed to elucidate the relationship between hydrophobic aggregation of the peptide components and their umami-/aroma-enhancing abilities. The results showed that after the treatment with a denaturant, the content of the fraction >30 ku of PBE dropped from 36.07% to 2.95%, indicating that there was aggregation of proteins in this PBE fraction. After the three fractions were freeze dried, sensory evaluation was performed. It was found that the PBE (10~30 ku) fraction in a NaCl-based solution had a score of 7.6 for saltiness, 8.6 for thickness, 7.6 for continuity and 8.0 for mouthfulness, which were all higher than those of the other two fractions. In addition, the intensity of retronasally perceived aroma of the PBE (10~30 ku) fraction scored 7.5, which was also higher than those of the other two fractions. Analyses of the three fractions revealed that the contents of umami and sweet

引文格式:

刘贺,张彬,任禛,等.猪骨素组分对鲜味及鸡汤模型香气鼻后感受强度的增强作用[J].现代食品科技,2021,37(11):317-327

LIU He, ZHANG Bin, REN Zhen, et al. Enhancement of umami taste and intensity of retronasally perceived model aroma of chicken soup by pork bone essence constituents [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 317-327

收稿日期: 2021-01-28

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(32001684); 云南省地方本科高校基础研究联合专项资金面上项目(2018FH001-037); 云南省科技厅应用基础研究计划青年项目(2017FD086)

作者简介: 刘贺(1986-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 蛋白质加工与利用, E-mail: 314496981@qq.com

amino acids of the PBE (10~30 ku) fraction were 14.7% and 44.19% respectively, which were insignificantly different from those of PBE (>30 ku), and the kokumi effect of the PBE (10~30 ku) fraction was significantly greater than that of PBE (>30 ku). After the hydrophobicity was analyzed, it was found that the hydrophobicity index of the PBE (10~30 ku) fraction was 60.00 ± 1.33 , which differed significantly from those of the other two fractions. It could be speculated that the high content of taste-active amino acids (umami and sweet) could increase the intensities of the umami taste and retronasally perceived aroma to some extents, but only when the overall hydrophobicity of proteins or peptides was within a certain range, the enhancement of the umami taste and retronasal aroma was the greatest. Finally, the relationship between hydrophobicity and the enhancement of umami taste and retronasally perceived aroma were confirmed by the heat treatment experiments at 40 °C and 70 °C.

Key words: pork bone essence; kokumi; umami enhancement; retronasal aroma perception

利用动物鲜骨提取“骨素”的方法最早起源于日本,随着消费习惯的改变,加之骨素以及骨素下游新产品味美、天然、无毒副作用的特殊优势,在短短的十年间得到了迅速发展,进而取代了大部分的化学调味料,到80年代中期进入了全盛时代^[1]。

目前有关猪骨素的研究集中在三个方面,一是猪骨素提取工艺的研究,如白艳红等^[2]以猪骨为原料,将不同蛋白酶复配并优化酶解工艺以制取猪骨素;张杰等^[3]对提取压力、时间及料液比进行优化,确定了猪骨素的最佳提取工艺;二是猪骨素酶解制备肉味香精,肖作兵等^[4]以猪骨素酶解液为原料,通过美拉德反应制备了肉味香精前体物质,秦小滨等^[5]则通过用不同酶对猪骨素进行酶解处理后发现风味酶处理后挥发性物质增加;三是发酵猪骨素以改良风味,如马国霞等^[6]、张宇等^[7]研究表明红曲霉与米曲霉双菌发酵有利于改良猪骨素风味。综上,猪骨素在食品工业中常用来增加食物的浓厚感(thickness)、饱满感(mouthfulness)、持续性(continuity),而用以描述这些感觉的物质被称为kokumi物质^[8],该类物质添加到基本味道溶液中时,会提升鲜味的呈味强度^[9]。

目前已报道的kokumi物质多为短肽类,如 γ -谷氨酰多肽^[10-13],它们可增强食物浓厚味、延长回味或提升鲜味强度。夏秀芳^[14]研究发现,鲜骨中蛋白质含量为11%左右,而加工成骨素后其蛋白质含量能达到30%以上。Chiti等^[15]指出,聚合或形成聚集是所有蛋白质的固有特性,有研究^[16-19]表明,蛋白及肽类物质在制备及储存过程中会通过疏水性相互作用等发生聚集,形成分子量较大的聚合物。而目前有关kokumi肽的研究多在于提取、合成较小肽段(2~3肽)^[20-26],经计算,其分子量范围一般在10 ku以下。研究kokumi单体小肽的增鲜作用,而忽视了肽的聚集作用与增鲜作用间的关系。

在食品适口性领域,味道及香气之间的相互作用,尤其是鼻后香气,从研究角度讲是一个有趣的领域。在日本,kokumi与味道(taste)、香气(aroma)、质构等共同用来评价食品的适口性。最近有一些关于鼻

后香气和味道之间相互作用的报道。Nishimura等^[27]研究发现,具有kokumi属性的浓缩洋葱汁可以让食用者产生持续的香气感受;陈年味增及高达芝士中的美拉德肽具有kokumi属性,可增强鲜味味道,当将其加入到食物中时,还可增强鼻后香气^[28,29]。此外,有些鼻后香气物质如西梅干及菱角的呈香物质加入到蔗糖溶液后会增强其甜味感受强度^[30],那么猪骨素中含有的kokumi增鲜肽与鼻后香气间相互作用如何仍需进一步研究。

因此本文选取目前常用于增鲜提鲜的蛋白/肽含量较高的猪骨素为原料,对赋予其中起到增鲜作用的kokumi蛋白质或肽组分进行分段,并对各组分的氨基酸含量、疏水性等性质进行分析评价,探索猪骨素各kokumi组分的氨基酸含量、疏水性等特性与其增鲜、增香气鼻后感受强度间关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

猪骨素,辽宁独凤轩有限公司;乙腈(HPLC级)、三氟乙酸(HPLC级);Tris碱(分析纯);L-赖氨酸、L-谷氨酸、L-苏氨酸、L-丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、DL-甲硫氨酸、L-精氨酸、L-酪氨酸、L-天冬氨酸、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸、L-缬氨酸、L-异亮氨酸、肌苷(Inosine)、次黄嘌呤(Hypoxanthine)、乳酸、醋酸、KOH、 K_2HPO_4 、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ (以上均为GR级)购自国药集团化学试剂有限公司(北京,中国);2-甲基吡嗪(GR),2-乙基-4-甲基噻唑(GR),3-(甲硫基)丙醛(GR)、2,4-癸二烯醛(GR),购自Sigma-Aldrich(美国);AMP购自Oriental Yeast Co.(日本);NaCl、MSG(食品级)。

1.2 猪骨素基本性质分析方法

蛋白质含量测定方法:分光光度法(GB 5009.5-2016);脂肪含量测定方法:索氏抽提法(GB 5009.6-2016);铁含量测定方法:火焰原子吸收光谱

法(GB 5009.90-2016); 钙含量测定方法: 火焰原子吸收光谱法(GB 5009.92-2016); 磷含量测定方法: 钼蓝分光光度法(GB/T 5009.87-2016)。

1.3 不同分子量段猪骨素肽样品制备方法

将猪骨素粉配制成为浓度为 2% (m/V) 的水溶液, 将该溶液以 10 ku 与 30 ku 超滤膜进行分段, 分别收集分子量为 <10 ku、10~30 ku 及 >30 ku 的猪骨素肽段组分, 真空冷冻干燥得到各组分冻干粉, 备用。

1.4 鲜味剂中蛋白/肽分子量分布的测定

采用体积排阻高效液相色谱法(SE-HPLC)测定。分别称取 20 mg 待测样品溶于 0.03 mol/L 的 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 配制成浓度为 5 mg/mL 的溶液, 用直径为 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后进样。色谱条件: Agilent 1100 高效液相色谱系统, 色谱柱: Protein Pak 60 凝胶色谱柱(Waters, 分离范围 1~20 ku); 流动相: 0.03 mol/L 的 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液; 检测: 214 nm; 流速 0.5 mL/min; 检测温度为 27 $^{\circ}\text{C}$ 。分子量校正曲线所用标准品为: 胰蛋白酶抑制剂(Mw20100)、蛋清溶菌酶(Mw14400)、AB2-80(Mw7823)、AB2-81(Mw5856)、AB2-95(Mw3313), 根据标准品分子量的对数与保留时间作回归分析, 获得的回归方程为 $T=35.499-5.0457 \log(\text{Mw})$ ($R^2=0.9923$, $p<0.05$), 式中, MW 为分子量, T 为保留时间。根据标准品分子量的对数与保留时间之间的回归方程计算样品的分子量分布。

1.5 反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析柱分析鲜味剂中蛋白/肽

将待测样品溶于含有 0.1% TFA 的超纯水中, 样品经过 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取滤液以 RP-HPLC 系统进行定性分析。色谱柱: 分析柱 ZORBAX SB-C18 (4.6 \times 250 mm, 5 μm); 洗脱溶剂为 0.1% TFA (A) 和 0.1% TFA 配制的 80% 的乙腈溶液 (C), 用 A 和 C 的混合液进行梯度洗脱, 溶剂 C 体积分数: 0 min-1%, 25 min-20%, 35 min-35%, 50 min-50%。洗脱时间 55 min, 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长: 214 nm, 上样量: 20 μL 。吸光值在数据上以电压的形式表示。

1.6 鲜味剂可溶性蛋白/肽含量测定

以 Folin-酚法进行样品肽含量测定。测定方法参考 Lowry 法, 以牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin,

BSA) 为标准蛋白^[31]。

1.7 鲜味剂游离氨基酸含量测定

采用色谱法进行氨基酸分析, 将 17 种氨基酸混合标样(PN: 5061-3331) 以漩涡振荡器混合, 以备进样(1 mol/L), 并绘制氨基酸混合液的校正曲线。将样品配制到合适浓度以安捷伦 1100HPLC 仪器进行测定, 所用色谱柱为 ZORBAX Eclipse-AAA。

1.8 表面疏水性指数测定

表面疏水性指数的测定采用 1-苯胺基-8-萘磺酸(1-Anilino-8-Naphthalene-Sulfonate, ANS) 荧光探针法。

将待测样品按照 1 mg/mL 的浓度溶于 pH 7.2, 0.01 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中, 搅拌至充分溶解。用统一缓冲液将 PBE 各组分溶液分别稀释至 0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg/mL; 分别取 4.5 mL 不同浓度的样品溶液, 加入 0.5 mL ANS (浓度 1.25×10^{-3} mol/L, 溶于 pH 7.2, 0.01 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液) 溶液中, 室温下混合均匀, 反应液避光静置 2 h, 测定反应液荧光强度 I。

以待测样品浓度为横坐标, 反应液荧光强度为纵坐标作图, 所得拟合直线的斜率即为待测样品的表面疏水性指数 S_0 。

1.9 品评员培训

10 位品评员(男=6, 女=4, 平均年龄 28.9) 在知情的情况下同意参与本次研究的感官测试, 并且没有已知的味觉障碍病史。感官品评团队成员筛选方法参照 GB/T 16291.1-2012、GB/T 16291.2-2010 进行。

味觉训练(用鼻夹): 使用溶解在纯净水(pH 6.0) 中的以下参考味觉化合物的水溶液(各 2 mL): 甜味用蔗糖(50 mmol/L), 酸味用乳酸(20 mmol/L), 咸味用 NaCl(30 mmol/L), 苦味用咖啡因(1 mmol/L), L-谷氨酸钠(3 mmol/L) 用于鲜味, 收敛感用单宁酸(0.05%); 粘度训练用明胶溶液(0.5%水溶液); kokumi 味觉训练: 模型鸡汤(pH 值为 6.5) 中加入不同浓度的谷胱甘肽。其中, 模型鸡汤熬制配制方法参考, 略有调整^[27]。所用物质如表 1 所示。

香气及鼻后香气训练(不用鼻夹): 选取肉汤主要香气物质壬醛(油脂香、甜橙香)、己醛(油脂香、青草香)、1-辛烯-3 醇(蘑菇香气) 等的标准物质, 用调味水溶液加入不同浓度的香气标准物质制备成训练样品。以闻香纸蘸取 1.5~2 cm 样品溶液, 横向置于鼻前 2~3 cm 处嗅闻; 然后将模型鸡汤加热到 60 $^{\circ}\text{C}$ 后, 迅

速加入上述不同浓度香气物质制备成训练样品, 让品评员在吞下训练样品后迅速评价鼻后香气强度。调味水溶液配制方法: 将 0.38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 2-甲基吡嗪, 0.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 2-乙基-4-甲基噻唑, 3.79 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3-(甲硫基)丙醛及 19.49 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 2,4-癸二烯醛加入到 0.4% NaCl 溶液中。

表1 模型鸡汤添加的化合物及其浓度

Table 1 Composition of taste compounds in model chicken soup

序号	化合物	浓度/(mg/L)
1	L-赖氨酸	23.1
2	L-谷氨酸	21.3
3	甘氨酸	16.8
4	L-苏氨酸	16.0
5	L-丙氨酸	14.5
6	L-脯氨酸	13.5
7	L-丝氨酸	13.1
8	DL-甲硫氨酸	11.7
9	L-精氨酸	9.64
10	L-天冬氨酸	5.44
11	L-亮氨酸	5.04
12	L-苯丙氨酸	4.00
13	L-缬氨酸	2.68
14	L-组氨酸	1.96
15	L-异亮氨酸	1.80
16	L-酪氨酸	8.12
17	肌苷	60.0
18	5'-肌苷酸二钠 (IMP)	1328
19	单磷酸腺苷 (AMP)	50.0
20	次黄嘌呤	5.60
21	乳酸	814
22	醋酸	360
23	KOH	190
24	K ₂ HPO ₄	1800
25	MgCl ₂	1500
26	CaCl ₂	0.44

1.10 猪骨素不同组分的增鲜效果评价方法

10 位品评员在小组讨论中列出样品属性词语, 并对属性所表达的感觉达成共识。最后, 小组品评员依据训练情况并参考文献开发了 5 个属性: 咸味、鲜味、浓厚度 (thickness, 品尝后 5 s 内的味觉增强)、连续性 (continuity, 品尝后 20 s 的味觉强度)、口感丰富度 (mouthfulness, 整个口腔的味觉增强, 而不仅仅是舌头上的味觉) [32,33], 其中浓厚度、连续性及口感丰富度为增鲜效果评价主要指标。

将猪骨素组分 (<10 ku、10~30 ku 及>30 ku) 分

别加入到对照溶液 (浓度为 10 mmol/L 的 NaCl 或 MSG) 中, 使各组分终浓度为 1%。将样品溶液随机提供给品评员。样品和对照溶液均在口中放置 10 s 后吞咽, 每个样品在 25 s 内评分。每个样品的评分从 1 到 9, 对照溶液给定评分为“5”。以各个属性值的平均得分绘制雷达图, 以确定猪骨素不同组分的增鲜效果。

1.11 猪骨素不同组分对鼻后香气感受强度的影响作用

将猪骨素组分 (<10 ku、10~30 ku 及>30 ku) 加入到 1.9 中调味水溶液中, 使各组分终浓度为 1%。10 位品评员按照 1.9 中方法进行鼻后香气强度评分, 其中调味水溶液为对照, 给定评分为“5”。提供纯净水给品评员以恢复味觉。

1.12 热处理下猪骨素各组分疏水性与其增鲜、增鼻后香气感受效果验证

将猪骨素各组分 (<10 ku、10~30 ku 及>30 ku) 溶液 (终浓度 1%) 置于相应设定温度 (40、70 $^{\circ}\text{C}$) 的水浴锅中进行加热, 当温度达到设定温度后进行 30 min 保温处理, 将达到设定热处理温度和时间的猪骨素溶液迅速冷却至室温按 1.8 中方法进行表面疏水性指数测定, 并按 1.10、1.11 中方法进行增鲜、增鼻后香气感受程度的评价。

1.13 数据处理及分析

所有的实验重复至少三次, 数据采用平均值 \pm 标准差 (Means \pm SD) 表示, 以方差分析 ANOVA 来检测平均值之间的显著性差异, $p<0.05$ 。用 Origin Pro 8.0 统计分析数据并作图。

2 结果与分析

2.1 猪骨素的基本性质

表2 猪骨素的产品性质分析

Table 2 Properties of PBEs

检测项目	规格值
pH 值	7.1
蛋白质/(g/g)	72/100
氨基酸总量/(g/g)	67.6/100
脂肪/(g/g)	3.84/100
氯化钠/(g/g)	9.53/100
磷/(mg/g)	48.1/100

以可溶性蛋白质含量较高的 PBEs 为研究材料, 分析其基本性质, 探讨其增鲜属性与 PBEs 蛋白质/肽含量的关系。通过进一步的分离和分析, 探讨了 PBEs 各分子量段组分增强鲜味强度的机理, 为食品工业的味觉调节提供理论依据。按国家标准或实验室方法对 PBEs 的组成和基本性能进行了分析。

结果表明, PBEs 蛋白含量极高 (72.0%), 总氨基酸含量 (包括甘氨酸、谷氨酸、脯氨酸、精氨酸等 16 种氨基酸, 不含半胱氨酸) 为 67.6%。产品本身含有 NaCl, 其含量为 9.53 g/100 g, 可能与鲜味增强相关。磷含量为 48.1 mg/100 g, 有研究表明磷酸盐的存在可能对鲜味物质的鼻后香气感受起到一定增强作用^[27]。

2.2 猪骨素的氨基酸组成分析

采用氨基酸自动测定仪对猪骨素的氨基酸组成进行测定, 结果如表 3 所示。由表 3 可见, 猪骨素中氨基酸的种类基本齐全, 不含 Cys 半胱氨酸, 呈味氨基酸占氨基酸总量的 72.90%, 其中呈鲜味氨基酸 (天冬氨酸、谷氨酸) 占 17.30%, 呈甜味氨基酸 (丝氨酸、甘氨酸和丙氨酸、脯氨酸) 55.60%。此外, 疏水性氨基酸 (丙氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸和亮氨酸) 占 34.70%。

表 3 猪骨素及各组分的氨基酸组成 (%)

Table 3 Amino acid composition of PBEs and each fraction (%)

氨基酸	PBEs	>30 ku	10~30 ku	<10 ku
Glu 谷氨酸	7.97	11	9.95	2.66
Asp 天冬氨酸	3.73	5.22	4.75	1.24
Ala 丙氨酸	6.59	9.33	7.73	2.08
Gly 甘氨酸	20	29	23.1	4.7
Val 缬氨酸	1.58	2.31	2.09	0.5
Ser 丝氨酸	1.38	2.04	1.66	0.48
Phe 苯丙氨酸	1.98	3.06	2.94	0.68
Ile 异亮氨酸	0.95	1.34	1.33	0.28
Leu 亮氨酸	2.37	3.57	2.8	0.02
Lys 赖氨酸	2.67	3.59	3.52	0.79
Thr 苏氨酸	0.56	0.80	0.60	0.20
Met 甲硫氨酸	0.38	0.50	0.56	0.05
Tyr 酪氨酸	1.94	2.73	1.75	0.61
His 组氨酸	0.75	0.89	0.78	0.47
Arg 精氨酸	5.16	7.52	6.45	1.34
Pro 脯氨酸	9.62	13.60	11.70	2.57

2.3 PBEs 分子量分布特征及聚集驱动力

PBE (5 mg/mL) 在 pH 7.4 下溶解于 Tris-HCl 以及尿素、十二烷基磺酸钠处理的 PBE 的分子量分布情

况如图 1 所示。尿素和十二烷基磺酸钠是蛋白质变性剂, 可以破坏肽链之间的氢键和疏水相互作用, 导致蛋白质结构或聚集体的分解^[19]。经分子量计算, 未经变性剂处理时, PBE 中, PBE (>30 ku) 和 PBE (10~30 ku) 的组分分别占 36.07%和 61.93%, 基本不含 PBE (<10 ku) 组分, 即 PBE 中的蛋白质或肽可能发生了聚集, 因其分子量分布集中在高分子量部分。

当用 6 mol/L 尿素处理后, 低分子蛋白质 PBE (<10 ku) 组分被释放出来, 含量达到 25.78%, PBE (10~30 ku) 组分也增加至 68.65%, 相应的 PBE (>30 ku) 组分降低至 5.57%; 而以 6 mol/L 尿素和 0.5% 十二烷基磺酸钠处理时, 变性剂的作用强度更为明显, PBE (<10 ku) 组分含量可增至 36.73%, PBE (10~30 ku) 组分增加至 60.32%, 而 PBE (>30 ku) 组分降低至 2.95%。该结果表明, 本研究中使用的 PBE 会通过氢键和分子间疏水相互作用形成聚集体。

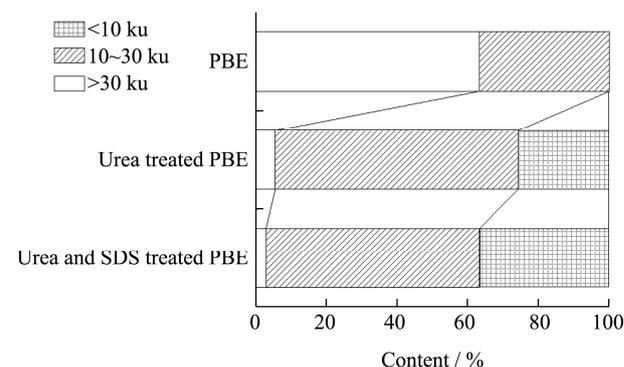


图 1 PBE、用 6 M 尿素处理的 PBE、6 M 尿素和 0.5% 十二烷基磺酸钠处理的 PBE 的分子量分布图

Fig.1 Molecular weight distribution profile of PBE, PBE treated with 6 M urea, and PBE treated with 6 M urea and 0.5% SDS

2.4 PBE 中 kokumi 组分增鲜及增香气鼻后感受强度评价

由以上分析可知, PBEs 可以形成聚集体。因此, 在本研究中, 采用分子量截留法将 PBE 分为三个组分, 即 PBE (<10 ku)、PBE (10~30 ku) 和 PBE (>30 ku), 并对 PBE 中各 kokumi 组分的增鲜及增香程度的影响作用进行了评价。

2.4.1 PBE 各 kokumi 组分的增鲜效果评价

用 NaCl 或 MSG 作为参考溶液, 评估 PBEs 各 kokumi 组分的鲜味增强特性 (图 2), 其中厚度、口感丰富度和连续性通常用于评估 kokumi 肽类物质的鲜味增强能力^[20]。

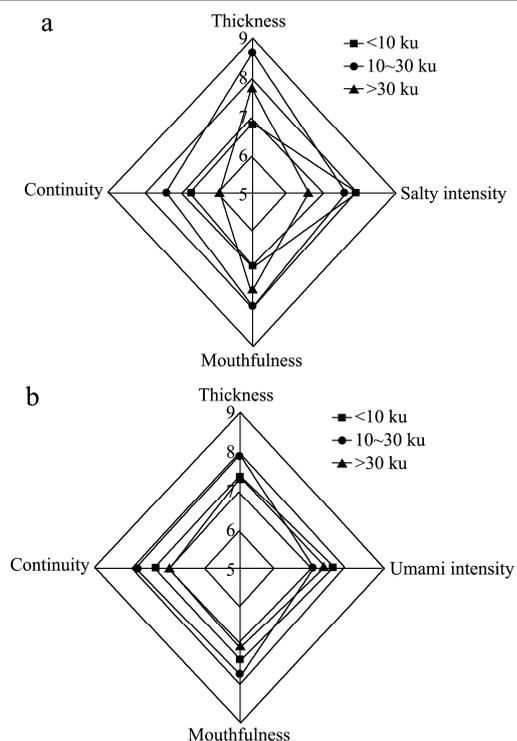


图2 感官谱图

Fig.2 Sensory radar charts

注: a: NaCl 为对照; b: MSG 为对照。

如图2所示,在分别以NaCl和MSG为对照溶液的感官评估中,PBE(10~30 ku)组分得分均高于其他两个部分。在以NaCl为对照的感官评价中(图2a),PBE(<10 ku)的咸味、浓厚度、连续性、口感丰富度评分分别为7.9、6.8、6.7、6.9,PBE(10~30 ku)和PBE(>30 ku)的咸味、浓厚度、连续性、口感丰富度评分则分别为7.6、8.6、7.6、8.0及6.6、7.7、6.0、7.5。即PBE(<10 ku)和PBE(10~30 ku)组分显著提高了对照溶液的咸味和连续性,而PBE(10~30 ku)和PBE(>30 ku)则显著增加了溶液的厚度和口感丰富度。综上,PBE(10~30 ku)组分在以NaCl为基底的溶液中,对各指标的增鲜能力均强于另两种组分。

与NaCl组相比,以MSG为对照溶液的感官评价结果(图2b)与上述结果一致,PBE(<10 ku)的鲜味、浓厚度、连续性、口感丰富度评分分别为7.7、7.4、7.4、7.5,PBE(10~30 ku)和PBE(>30 ku)的鲜味、浓厚度、连续性、口感丰富度评分则分别为7.1、7.9、7.9、7.8及7.4、7.3、7.0、7.2。但变化程度明显低于以NaCl为对照的组。PBE(10~30 ku)鲜味感受强度评分略低于另两组分,但差异不具显著性($p>0.05$),而浓厚度、连续性、口感丰富度等指标的评分均显著高于另两组分($p<0.05$)。

由上述分析可知,无论以NaCl还是以MSG为基底的溶液中,PBE(10~30 ku)和PBE(>30 ku)的

增鲜效果均强于PBE(<10 ku)组分,而PBE(10~30 ku)组分的增鲜能力又高于PBE(>30 ku)组分。这显然与一些研究认为只有低分子量短肽才能发挥kokumi效果的结论有所不同。

2.4.2 PBE各kokumi组分对调味溶液香气鼻后感受强度的影响评价

尽管味道和香味提供了不同的感觉,并被不同的器官感知,但当食物放进嘴里时,它们通常是同时被感知的。因此,通常认为在食用食品时,很难清楚的区分味道的感受及食品的鼻后香气。有研究表明,西梅干及菱角的呈香物质加入到蔗糖溶液中会增强溶液的甜味强度^[30],而苯酚类化合物(芹菜中主要呈香物质之一)以阈下感受浓度加入到鸡肉汤中时可增强鸡汤香气^[34]。Nishimura等^[35]提出,在屠宰肉的老化过程中添加Glu和IMP可能会增强陈肉提取物中的鼻后香气感受及鲜味感受。因此,本研究评估了PBEs组分对模型鸡汤香气强度的影响。

如图3所示,PBE的所有组分均能增强模型鸡汤的鼻后香气感受强度,PBE(<10 ku)、PBE(10~30 ku)和PBE(>30 ku)的香气感受强度评分分别为6.0、7.0及6.5,如1.11中所述,对照调味水溶液的给定评分为“5”,因此,PBE(<10 ku)组分和PBE(>30 ku)组分分别使鼻后香气强度提高了1.2倍和1.38倍,但两者之间差异不具显著性($p>0.05$)。而PBE(10~30 ku)组分可使鼻后香气感受强度提高1.5倍,与前两组分相比有显著性差异($p<0.05$)。即PBE(10~30 ku)组分对香气鼻后感受的增强作用强于另两组分。Nishimura等^[27]研究认为MSG及IMP等鲜味化合物可通过增强模型鸡汤的鼻后香气感受强度来达到类似于kokumi物质的增鲜效果。

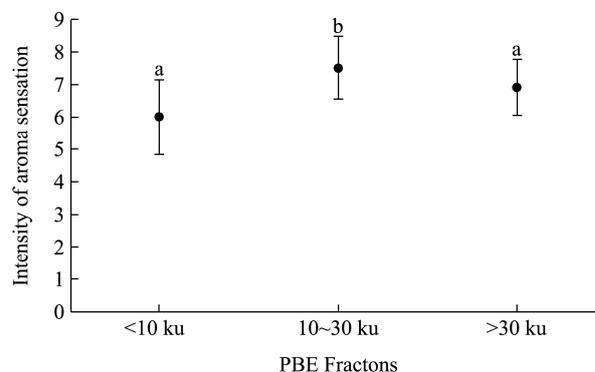


图3 不同PBE组分对鼻后香气感受强度的影响作用

Fig.3 Different PBE fractions and their influence on the intensity of aroma sensation

那么猪骨素中各组分的增鲜增香效果机制如何仍需进一步研究,因此本研究对PBE中三种组分PBE(<10 ku)、PBE(10~30 ku)和PBE(>30 ku)的基

本特性如氨基酸组成和疏水性进行了研究,以期对猪骨素各 kokumi 组分的增鲜及增强香气鼻后感受的机制进行初步探索。

2.5 PBE 各 kokumi 组分的特性分析

2.5.1 PBEs 各 kokumi 组分的氨基酸组成分析

有研究表明目前已报道的 kokumi 物质多含有谷氨酸^[8], Nishimura 等^[27]研究发现谷氨酸和 IMP 均可通过增强香气感受强度而增强样品的鲜味感受。由此可推测,蛋白质或肽的 kokumi 增鲜特性及香气鼻后感受增强作用可能与其中各种氨基酸含量相关。但呈味氨基酸含量与增鲜及香气鼻后感受增强作用间关系尚未见报道。本研究将主要对增鲜起到贡献作用的氨基酸分为呈鲜味氨基酸(Asp、Glu)、呈甜味氨基酸(Ser、Gly 和 Ala、Pro),并对其含量与增鲜、增香气感受间关系进行分析。

如表 3 所示, PBE (>30 ku) 和 PBE (10~30 ku) 中谷氨酸含量分别为 11.00% 及 9.95%, 差异不具有显著性 ($p>0.05$), 但均显著高于 PBE (<10 ku) 的 2.66% ($p<0.05$)。进一步对各组分中本身所含有的呈味氨基酸含量进行分析, 结果发现 PBE (>30 ku) 和 PBE (10~30 ku) 中呈鲜味氨基酸含量分别为 16.22% 及 14.7%, 呈甜味氨基酸分别为 53.97% 及 44.19%, 同上, 两组分的呈鲜味及呈甜味氨基酸间差异均不具有显著性 ($p>0.05$), 但也均显著高于 PBE (<10 ku) 的 9.83% (甜味氨基酸) 及 3.9% (鲜味氨基酸) ($p<0.05$)。结合上述感官分析结果, 组分 PBE (>30 ku) 和 PBE (10~30 ku) 的增鲜效果均显著高于组分 PBE (<10 ku), 由此可推测呈味氨基酸含量可能与蛋白或肽的 kokumi 增鲜效果具有一定相关性, 但尽管组分 PBE (>30 ku) 和 PBE (10~30 ku) 的呈味氨基酸含量间差异不具显著性, 组分 PBE (10~30 ku) 的增鲜效果却显著高于组分 PBE (>30 ku) (图 2), 这说明除呈味氨基酸外还有其他因素可影响猪骨素各组分的 kokumi 增鲜效果。

2.5.2 PBEs 各 kokumi 组分的疏水性

有报道称, 目前已报道的 kokumi 物质多为短肽类, 分子量较低^[36], 但本研究中感官评价结果显示, PBE (10~30 ku) 组分的 kokumi 增鲜效果(浓厚度、连续性、口感丰富度)要强于 PBE (<10 ku) 组分。Chiti 等^[15]指出聚合或形成聚集体是所有蛋白质及肽的固有特性, 蛋白质或肽聚集一般会导致其疏水性氨基酸暴露, 这种变化会使蛋白质或肽类呈现苦味^[37]。但也有研究指出, 疏水性对一些味觉的呈现起着重要作用, 如有研究报告表明, monellin (广为人知的甜

蛋白)中的疏水区域对其味觉呈现至关重要^[38,39]。Lioe 等^[40]研究表明含有谷氨酸以及较多疏水性氨基酸的组分可增强鲜味感受。因此, 对这 3 种组分的疏水性进行了分析。

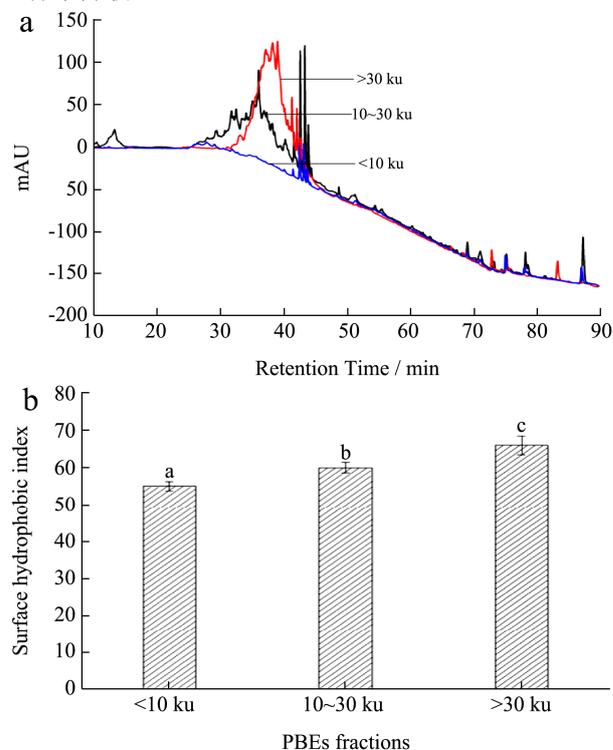


图 4 (a)PBE 各组分的 RP-HPLC 谱图; (b)PBE 各组分的表面疏水性指数

Fig.4 (a) RP-HPLC profiles of PBE fractions; (b) Surface hydrophobicity indices of PBE fractions

结果表明, PBE (>30 ku) 组分、PBE (10~30 ku) 组分和 PBE (<10 ku) 组分的疏水性氨基酸含量分别为 36.44%、30.9% 和 6.77%。由于蛋白质或肽聚集后的疏水性呈现是整体性行为, 故进一步分析了 3 种组分的 RP-HPLC 谱图, 如图 4a 所示, PBE (10~30 ku) 组分的保留时间(RT)主要集中在 10~15 min 和 25~45 min, 而 PBE (>30 ku) 组分的 RT 则主要集中在 32~45 min, 根据 RP-HPLC 原理, 疏水性较强的样品其 RT 相对较晚。因此, 从 RT 即可推断, PBE (>30 ku) 组分的疏水性强于 PBE (10~30 ku) 组分。而 PBE (<10 ku) 组分的保留时间 (RT) 集中在 40~45 min, 虽然整体 RT 要晚于另两种组分, 但由于该 RT 内出峰组分含量较低(峰面积小于另两种组分), 故其疏水性较难判断。

RP-HPLC 谱图反应的是各样品中疏水性不同的组分的分布, 而 ANS 荧光探针法测定的则是蛋白质或肽分子的表面疏水性指数, 该指数可反应蛋白质或肽的表面疏水性。因此, 进一步采用 ANS 荧光探针法测定了各样品的表面疏水性指数, 结果如图 4b

所示。如图所示，PBE (>30 ku) 组分的疏水性指数为 66 ± 2.51 ，高于 PBE (10~30 ku) 组分的 60.00 ± 1.33 及 PBE (<10 ku) 组分的 55.00 ± 1.20 ，且差异具有显著性 ($p < 0.05$)。

而由前面感官分析结果可知，PBE (10~30 ku) 组分的增鲜及增强鲜味溶液的香气鼻后感受强度能力均高于另外两种组分。结合疏水性结果分析表明，只有在一定的疏水范围内，猪骨素组分的鲜味及香气增强作用较强。究其原因，可能是 PBE (>30 ku) 组分聚集，导致过多疏水性氨基酸暴露，而过多疏水性氨基酸暴露不会起到增鲜及增香作用，只会导致溶液产生苦味^[41]，从而影响该组分的增鲜效果。

2.6 热处理下猪骨素各组分疏水性与其增鲜、增鼻后香气感受效果验证

2.6.1 不同热处理温度下猪骨素各组分疏水性指数

由前所述，疏水性可能与猪骨素组分的增鲜及增香气鼻后感受强度能力相关，且只有在一定的疏水性范围内，猪骨素组分的鲜味及香气增强作用较强，为了进一步研究猪骨素的表面疏水性及其鲜味、香气鼻后感受增强作用间关系，有研究表明，加热处理可增加蛋白质或肽的疏水性^[42]，故本研究进一步以加热方式在不改变猪骨素组分氨基酸组成等条件前提下，改变猪骨素组分的疏水性，以进行上述关系研究。

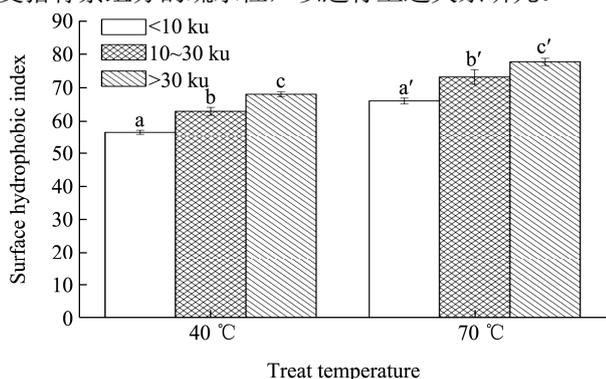


图5 不同热处理温度下PBE各组分的表面疏水性指数

Fig.5 Surface hydrophobicity indices of PBE fractions under different treat temperatures

如图5所示，40 °C及70 °C下加热30 min猪骨素各肽段的表面疏水性指数均显著增加 ($p < 0.05$)。其中，40 °C下时，PBE (>30 ku) 组分的疏水性指数为 68.0 ± 0.70 ，高于 PBE (10~30 ku) 组分的 62.90 ± 1.22 及 PBE (<10 ku) 组分的 57.10 ± 0.61 ，且差异具有显著性 ($p < 0.05$)。而70 °C下时，PBE (>30 ku) 组分的疏水性指数升高至 77.70 ± 1.14 ，高于 PBE (10~30 ku)

组分的 73.20 ± 2.16 及 PBE (<10 ku) 组分的 60.00 ± 0.95 ，且差异具有显著性 ($p < 0.05$)。

进一步对热处理下各组分的增鲜及增鼻后香气感受效果进行了评价。

2.6.2 不同温度处理下PBEs各kokumi组分疏水性与增鲜效果关系

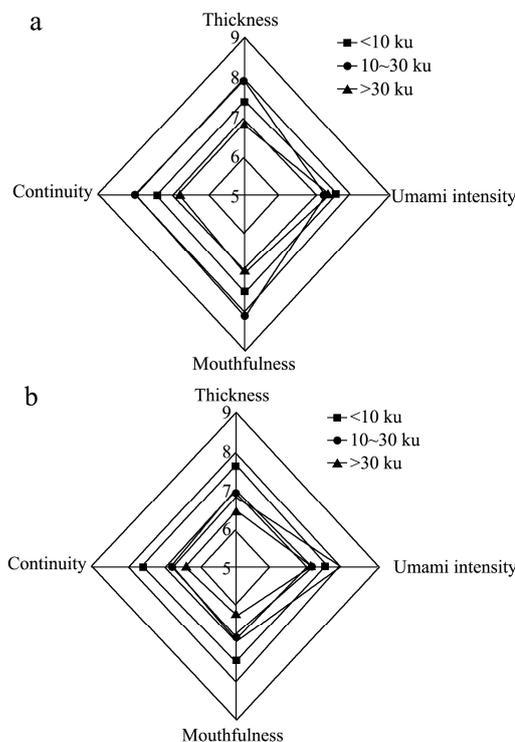


图6 感官谱图

Fig.6 Sensory radar charts

注：a: 40 °C；b: 70 °C。

以MSG为对照溶液的感官评价结果如图6所示，40 °C处理下，PBE (<10 ku) 的鲜味、浓厚度、连续性、口感丰富度评分分别为7.5、7.4、7.4、7.5，而70 °C处理下，其鲜味、浓厚度、连续性、口感丰富度评分则为7.5、7.5、7.6、7.6，该肽段中两种处理下疏水性指数显著性增加 ($p < 0.05$)，而增鲜效果指标各评分也相应增加，但差异尚不具显著性 ($p > 0.05$)。

而PBE (10~30 ku) 在40 °C处理下，鲜味、浓厚度、连续性、口感丰富度评分分别为7.2、7.9、8.0、8.1，该组分的疏水性指数在40 °C热处理后均显著高于热处理前，但其增鲜效果较热处理前(图6b)浓厚度、连续性、口感丰富度等各指标评分增加，且差异具有显著性 ($p < 0.05$)。而70 °C处理下，其鲜味、浓厚度、连续性、口感丰富度评分则为7.3、6.8、6.8、7.0，70 °C热处理后的该组分疏水性指数高于40 °C处理下的指数，且差异具有显著性，但其增鲜各指标(浓厚度、连续性、口感丰富度)的评分却与上述处理相比显著降低 ($p < 0.05$)。

PBE (>30 ku) 在 40 °C 处理下的鲜味、浓厚度、连续性、口感丰富度评分则分别为 7.3、6.8、6.8、7.0, 而 70 °C 处理下的鲜味、浓厚度、连续性、口感丰富度评分分别为 7.1、6.3、6.4、6.4。该组分的疏水性指标在不同热处理温度下均显著增加 ($p<0.05$), 但浓厚度、连续性、口感丰富度等指标评分均显著低于未经过热处理时评分 ($p<0.05$)。需要注意的是, 70 °C 处理下该组分已出现明显苦味, 推测是由过多疏水性氨基酸暴露所引起的。

综上所述, 在以 MSG 为基底的溶液中, 40 °C 处理下, PBE (10~30 ku) 的增鲜效果强于 PBE (<10 ku)、PBE (>30 ku) 组分; 但 70 °C 处理下, PBE (<10 ku) 组分的增鲜效果评分则高于 PBE (10~30 ku)、PBE (>30 ku) 组分, 即 PBE (10~30 ku) 的增鲜效果随着疏水性进一步增强反而下降。

2.6.3 PBEs 各 kokumi 组分疏水性与增鼻后香气效果关系

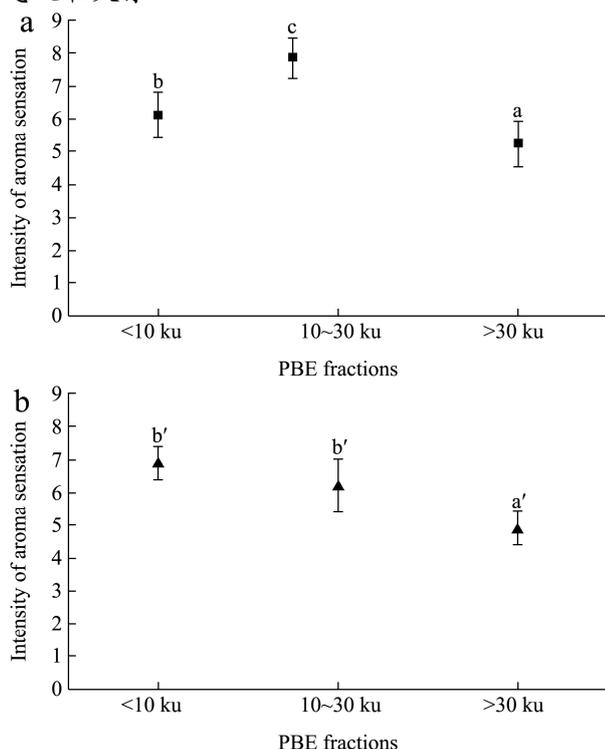


图7 不同温度处理 PBE 组分对鼻后香气感受强度的影响作用

Fig.7 PBE fractions and their influence on the intensity of aroma sensation under different temperature

注: a: 40 °C; b: 70 °C。

如图 7 所示, 40 °C 处理下时 (图 7a), PBE 各组分均能增强模型鸡汤的鼻后香气感受强度, PBE (<10 ku)、PBE (10~30 ku) 和 PBE (>30 ku) 的香气感受强度评分分别为 6.1、7.4、5.2, 前两组分分别使鼻后香气强度提高了 1.22 倍和 1.48 倍, 且两者之间差异具有显著性 ($p<0.05$)。与疏水性指数及增鲜指标评分相

对应发现, 该处理下前两种组分的疏水性指数及增鲜指标评分也均显著性增加; 而 PBE (>30 ku) 较未进行热处理的组分疏水性指数显著性增加, 但增鲜指标评分及增鼻后香气评分却均降低, 且差异具有显著性 ($p<0.05$)。

而 70 °C 处理下时 (图 7b), PBE (<10 ku)、PBE (10~30 ku) 和 PBE (>30 ku) 的香气感受强度评分分别为 6.9、6.2、4.8, 前两组分分别使鼻后香气强度提高了 1.38 倍和 1.24 倍, 但两者之间差异不具显著性 ($p>0.05$), 但 PBE (>30 ku) 的香气感受强度却不及未处理及 40 °C 处理, 且差异具有显著性 ($p<0.05$)。再与疏水性指数及增鲜指标评分相对应发现, 该处理下 PBE (<10 ku) 的疏水性指数增鲜指标评分显著性增加, 而 PBE (10~30 ku) 组分的疏水性指数显著增加, 但其增鲜指标评分却低于未处理及 40 °C 处理下评分, 且差异具有显著性 ($p<0.05$); 而 PBE (>30 ku) 组分疏水性指数进一步显著性增高, 但其增鲜指标评分及增鼻后香气评分却均进一步降低, 且差异具有显著性 ($p<0.05$)。

综上所述, 猪骨素各组分不同温度处理下的疏水性指数、增鲜、增香气鼻后感受能力间存在一定关系。以 PBE (10~30 ku) 组分为例, 未处理时, 其增鲜指标评分、增香气鼻后感受能力均强于另两组分, 当 40 °C 处理时, 其疏水性指数显著增加, 增鲜及增香气鼻后感官能力评分也均显著性增强, 但当 70 °C 处理时, 其疏水性指数进一步显著性增加, 但其增鲜及增香气鼻后感受能力评分却显著性下降。即只有在一定的疏水范围内, 猪骨素组分的鲜味及香气增强作用较强。

3 结论

3.1 在我国, 猪骨素是常用的增鲜剂, 主要依赖其中含量较高 (72.0%) 的蛋白质含量起到 kokumi 效果。本研究发现 PBEs 会发生蛋白质聚集作用, 而疏水相互作用是其聚集的驱动力, 换言之, PBEs 可能以聚集的蛋白质或肽的形式而不是单体肽形式来起到 kokumi 的增鲜作用。

3.2 进一步以分子量截留法将 PBEs 分为三个组分 (<10 ku、10~30 ku 及 >30 ku), 对各组分特性及感官分析研究发现, 呈味氨基酸 (鲜味、甜味) 含量高可能对猪骨素中蛋白质或肽的增鲜增香效果起到一定提升作用, 而只有蛋白质或肽的整体疏水性在一定范围内时, 其鲜味及香气增强作用才最佳; 若整体疏水性过高, 即使含有呈味氨基酸含量高其增鲜增香效果也较差。但 PBE (10~30 ku) 组分是直接增强鲜味感, 还是通过鼻后香气间接增强了鲜味味觉感受仍需进一

步研究。

参考文献

- [1] 赵永敢,李超敏,李岳桦.高温高压法提取牛骨素工艺研究[J].中国调味品,2015,40(3):70-73
ZHAO Yonggan, LI Chaomin, LI Yuehua. Study on extraction technology of bovine ossein by high temperature and high pressure [J]. China Condiment, 2015, 40(3): 70-73
- [2] 白艳红,张相生,赵电波,等.分步酶解猪骨粉提取猪骨素的工艺研究[J].现代食品科技,2012,28(12):1696-1699
BAI Yanhong, ZHANG Xiangsheng, ZHAO Dianbo, et al. Preparation of pork bone extracts by two-step enzymolysis with compound enzyme and flavourzyme [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(12): 1696-1699
- [3] 张杰,潘风光,刘婧,等.响应面分析法优化猪骨素提取工艺条件的研究[J].食品工业科技,2011,32(6):286-289
ZHANG Jie, PAN Fengguang, LIU Jing, et al. Optimization of extraction technology conditions of swine bone extract using response surface methodology (RSM) [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(6): 286-289
- [4] 肖作兵,牛云蔚,张健,等.酶解对肉味香精前体物的品质影响[J].食品工业科技,2006,27(10):153-155
XIAO Zuobing, NIU Yunwei, ZHANG Jian, et al. Effect of enzymatic hydrolysis on the quality of meat flavor precursors [J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(10): 153-155
- [5] 秦小滨.猪骨素酶解过程蛋白质及呈味物质变化研究[D].雅安:四川农业大学,2013
QIN Xiaobin. Study on the changes of protein and taste substance in the process of enzymatic hydrolysis of pig bone extract [D]. Ya'an: Sichuan Agriculture University, 2013
- [6] 马国霞,郭应龙,刘凌志.猪骨素发酵及其产物的电泳分析[J].食品与发酵工业,2011,37(8):56-60
MA Guoxia, WU Yinglong, LIU Lingzhi. Porcine bone extract fermentation and electrophoretic analysis [J]. Food and Fermentation Industry, 2011, 37(8): 56-60
- [7] 张宇.猪骨素固态发酵产水解酶及降解产物呈味特性的研究[D].雅安:四川农业大学,2013
ZHANG Yu. Study on solid-state fermentation of pig bone extract to produce hydrolase and taste characteristics of degradation products [J]. Ya'an: Sichuan Agriculture University, 2013
- [8] 伍圆明,伍伦杰,王莉,等. γ -kokumi 肽及其合成酶 γ -谷氨酰转氨酶的研究进展[J].食品科学,2020,41(5):256-265
WU Yuanming, WU Lunjie, WANG Li, et al. Recent advances in γ -kokumi peptide and its synthetase γ -glutamyl transpeptidase [J]. Food Science, 2020, 41(5): 256-265
- [9] Kuroda M, Yamanaka T, Miyamura N. Change in taste and flavor of food during the aging with heating process. Generation of "kokumi" flavor during the heating of beef soup and beef extract [J]. Japanese Journal of Taste and Smell Research, 2004, 11: 175-180
- [10] 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, 95(15): 3183-3194
- [11] Miyaki T, Kawasaki H, Kuroda M, et al. Effect of a kokumi peptide, γ -glutamyl-valyl-glycine, on the sensory characteristics of chicken consommé [J]. Flavour, 2015, 4(1): 17
- [12] Hillmann H, Behr J, Ehrmann M A, et al. Formation of kokumi-enhancing γ -glutamyl dipeptides in parmesan cheese by means of γ -glutamyltransferase activity and stable isotope double-labeling studies [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(8): 1784-1793
- [13] Shibata M, Hirotsuka M, Mizutani Y, et al. Isolation and characterization of key contributors to the "kokumi" taste in soybean seeds [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2017, 81(11): 2168-2177
- [14] 夏秀芳,王锬.骨素及其应用[J].肉类工业,2007,7:22-25
XIA Xiufang, WANG Kun. Osseine and its application [J]. Meat Industry, 2007, 7: 22-25
- [15] Chiti F, Taddei F B, Capanni M S, et al. Kinetic partitioning of protein folding and aggregation [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2002, 9: 137-143
- [16] Vilotte A, Bodiguel H, Ako K, et al. Kinetic and structural characterization of whey protein aggregation in a millifluidic continuous process [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 6: 1-5
- [17] Mulcahy E M, Lagrange M F, Mulvihill D M, et al. Characterisation of heat-induced protein aggregation in whey protein isolate and the influence of aggregation on the availability of amino groups as measured by the *ortho*-phthalaldehyde (OPA) and trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) methods [J]. Food Chemistry, 2017, 229(15): 66-74
- [18] Qiao J T, Wang X Y, Liu L Q, et al. Nonenzymatic browning and protein aggregation in royal jelly during room-temperature storage [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(8): 1881-1888
- [19] Liu H, Lv Y, Xu J T, et al. Soybean peptide aggregates

- improved calcium binding capacity [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2016, 67: 174-180
- [20] Toelstede S, Dunkel A, Hofmann T. A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured gouda cheese [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(4): 1440-1448
- [21] Miyamura N, Iida Y, Kuroda M, et al. Determination and quantification of kokumi peptide, gamma-glutamyl-valyl-glycine, in brewed alcoholic beverages [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 120(3): 311-314
- [22] Zhao C J, Ganzle M G. Synthesis of taste-active γ -glutamyl dipeptides during sourdough fermentation by *Lactobacillus reuteri* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(40): 7561-7568
- [23] Lee Y C, Chi M C, Lin M G, et al. Biocatalytic synthesis of γ -glutamyl-L-leucine, a kokumi-imparting dipeptide, by *Bacillus licheniformis* γ -glutamyltranspeptidase [J]. *Food Biotechnology*, 2018, 32(2): 130-147
- [24] Yang J, Sun D X, Cui C, et al. Synthesis and sensory characteristics of kokumi γ -[Glu]_n-Phe in the presence of glutamine and phenylalanine: glutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens* or *Aspergillus oryzae* as the catalyst [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(39): 8696-8703
- [25] Yang J, Sun D X, Xie J, et al. Comparison of kokumi γ -[Glu]_(n>1)-Val and γ -[Glu]_(n>1)-Met synthesized through transpeptidation catalyzed by glutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. *Food Chemistry*, 2018, 247: 89-97
- [26] Ohsu T, Takeshita S, Eto Y, et al. Kokumi-imparting agent: US, 89395376.B2 [P]. 2016-07-19.
- [27] Nishimura T, Goto S, Miura K, et al. Umami compounds enhance the intensity of retronasal sensation of aromas from model chicken soups [J]. *Food Chemistry*, 2016, 196: 577-583
- [28] Ogasawara M, Katsumata E, Egi M. Taste properties of Maillard-reaction products prepared from 1000 to 5000 Da peptide [J]. *Food Chemistry*, 2006a, 99: 600-604
- [29] Ogasawara M, Yamada Y, Egi M. Taste enhancer from the long-term ripening of miso (soybean paste) [J]. *Food Chemistry*, 2006, 99: 736-741
- [30] Prescott J, Johnstone V, Francis J. Odor-taste interactions: effects of attentional strategies during exposure [J]. *Chemical Senses*, 2004, 29: 331-340
- [31] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. *Journal of Biology Chemistry*, 1951, 193: 265-275
- [32] Shah A K M A, Ogasawara M, Egi M, et al. Identification and sensory evaluation of flavour enhancers in Japanese traditional dried herring (*Clupea pallasii*) fillet [J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(1): 249-253
- [33] Miyamura N, Jo S C, Kuroda M, et al. Flavour improvement of reduced-fat peanut butter by addition of a kokumi peptide, γ -glutamyl-valyl-glycine [J]. *Flavor*, 2015, 4: 16-20
- [34] Kurobayashi Y, Katsumi Y, Fujita A, et al. Flavor enhancement of chicken broth from boiled celery constituents [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56: 512-516
- [35] Nishimura T, Egusa S A, Nagao A, et al. Phytosterols in onion contribute to a sensation of lingering of aroma, a koku attribute [J]. *Food Chemistry*, 2016, 192: 724-728
- [36] 曾贞,江洪.浓厚感物质的研究进展[J].食品科学,2015,36(19):297-301
ZENG Zhen, JIANG Hong. Recent advances in kokumi substances [J]. *Food Science*, 2015, 36(19): 297-301
- [37] Idowu A T, Benjakul S. Bitterness of fish protein hydrolysate and its debittering prospects [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(9): e12978
- [38] Shallenberger R S, Acree T E. Molecular theory of sweet taste [J]. *Nature*, 1967, 216: 480-482
- [39] Kier L B. A molecular theory of sweet taste [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1972, 61(9): 1394-1397
- [40] 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: 401-405
- [41] Zhang C L, Alashi A M, Singh N, et al. Beef protein-derived peptides as bitter taste receptor T2R4 blockers [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(19): 4902-4912
- [42] 畅鹏,谢艳英,王浩,等.热处理温度及时间对镜鲤鱼肌原纤维蛋白热聚集行为的影响[J].食品科学,2021,42(1):101-107
CHANG Peng, XIE Yanying, WANG Hao, et al. Effects of heat treatment temperature and time on thermal aggregation behavior of myofibrillar proteins from mirror carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Food Science*, 2021, 42(1): 101-107