



热反应牛骨香精酶解工艺的优化及关键气味化合物的鉴定

王海丽¹, 关鑫¹, 唐源¹, 宋焕禄^{1,*}, 潘文清², 龚林², 陈琬盈²

(1. 北京工商大学食品与健康学院, 北京 100048;

2. 湖南省嘉品嘉味生物科技有限公司, 湖南长沙 410100)

摘要:为研究制备热反应牛骨香精的较佳酶解工艺,以牛骨素为原料,选用复合酶,利用单因素和响应面试验考察酶解温度、酶解时间、复合酶加酶量及复合酶加酶比例4因素对酶解液水解度和由酶解液与糖、氨基酸等原料经美拉德反应制备的热反应牛骨香精的感官评分的影响,并利用高效液相色谱法测定游离氨基酸质量比、利用全二维气相色谱-嗅闻-质谱技术分析牛骨素酶解前后制备的热反应牛骨香精关键气味化合物的质量比。结果表明,牛骨素的较佳酶解工艺为酶解温度50℃、酶解时间4h、加酶量1250U/g、复合风味蛋白酶与复合蛋白酶的加酶比例为1:1,在此条件下感官评分为8.24。与牛骨素相比,酶解液中有15种游离氨基酸的质量比显著增加;使用电子鼻和电子舌测定牛骨素和酶解液的气味轮廓和滋味轮廓,发现酶解液的氮氧化物气味特征增强,酶解液的鲜味、浓厚味、咸味特征更明显。使用固相微萃取结合全二维气相色谱-嗅闻-质谱技术,对牛骨素、酶解液分别制备的热反应牛骨香精的关键气味化合物进行分析,共鉴定出挥发性气味化合物164种,包含27种醛类、30种酮类、12种醇类、16种酸类、7种含硫化合物、10种酯类、18种吡嗪类、10种呋喃类、6种噻唑类、4种噻吩类和24种其它类化合物,通过气相色谱-嗅闻分析,嗅闻到74种气味活性化合物;气味活性值(OAV)大于1的关键气味化合物有22种,牛骨素与酶解液分别制备的热反应牛骨香精中最重要的关键气味化合物均为双(2-甲基-3-呋喃基)二硫醚(OAV值分别为13.078和8.052);与牛骨素制备的热反应牛骨香精相比,酶解液制备的热反应牛骨香精中出现了(*E,E*)-2,4-癸二烯醛、2-甲基-3-呋喃硫醇、甲基糠基二硫醚、己酸甲硫醇酯、 β -石竹烯5种新的关键气味化合物。研究旨在为热反应牛骨香精工业化生产中的酶解工艺提供理论依据。

关键词:酶解工艺;热反应牛骨香精;气味活性化合物;关键气味化合物;全二维气相色谱-嗅闻-质谱

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

畜禽骨是一种营养价值较高的肉类加工副产品。随着畜禽养殖业的扩大、屠宰量的增多,畜禽骨的产量随之增加,畜禽骨及其相关副产物的加工与

增值利用成为了研究热点。牛骨素是牛骨的加工粗产物,是牛骨经过粉碎、加热浸提、过滤除渣、离心除油、浓缩后制得的牛骨髓抽提物。牛骨素中的优质

蛋白含量高达约 34%,可溶性固形物含量约 50%;根据制作过程中是否离心除油,牛骨素可分为浓汤型、清汤型等产品类别。近年来,天然香料香精的需求处于不断上升的趋势,以牛骨素作为蛋白酶解物来源,与糖类、氨基酸等原料,通过美拉德反应制备的热反应牛骨香精属于天然产品的范畴,既具有牛肉的独特香味,又有骨汤的鲜味,是深受消费者喜爱的复合调味料。

蛋白质水解是食品工业中开发肉类风味香精的重要过程。在食品生产过程中,游离氨基酸和多肽可以作为重要的风味前体物对食品质量产生影响;一方面其本身能够呈现一定滋味,而且还能与其它滋味成分交互作用增强或者减弱食品风味^[1];另一方面可作为风味原料或前驱物直接与糖类发生美拉德反应,增强香气^[2]。通过定向控制骨素酶解条件可产生多样化的目标产物,用于开发各种风味浓郁、醇厚自然的肉味香精^[3]。目前,研究多集中于鸡骨素和猪骨素等^[4-7],对于酶解牛骨素制备热反应牛骨香精的研究较少,因此,制备出风味醇厚、圆润自然的热反应牛骨香精具有较高的市场价值。

Chiang 等^[8]研究报告了使用内切蛋白酶和外切蛋白酶的酶解处理方式对牛骨提取物理化性质的影响,结果证明骨素的酶解在将低值肉制品转化为具有低黏度、无凝胶特性的高值功能成分方面展示了潜力。Zheng 等^[9]研究微波和超声波对牛骨蛋白酶水解产物的水解度、抗氧化活性和风味特性的影响,结果发现微波结合超声波可以提高牛肉骨粉中蛋白质的酶解效果,改善酶解产物的抗氧化性能和风味。Dong 等^[10]从鸡骨素中高压提取蛋白质,发现鸡骨素在酶解 8 h 后,小分子肽含量与酶解 1 h 相比增加了 74 倍,结果证明鸡骨素及其酶解产物表现出一种新的潜在的适合各种食品的营养补充剂。但研究均未对酶解骨素再经热反应制得的热反应香精进行深入研究。因此,本研究以牛骨素为原料,选用复合蛋白酶,利用单因素和响应面法考察酶解温度、酶解时间、复合酶加酶量及复合酶加酶比例 4 因素对酶解液水解度,以及由酶解液与糖、氨基酸等原料经美拉德反应制备的热反应牛骨香精的感官评分的影响,并利用高效液相色谱法测定游离氨基酸质量比、利用全二维气相色谱-嗅闻-质谱技术,分析牛骨素酶解前后制备的热反应牛骨香精关键气味化合物的质量

比。旨在为热反应牛骨香精工业化生产中的酶解工艺提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛骨素(清汤型,蛋白质质量分数为 35%、氯化钠质量分数为 13%、可溶性固形物质量分数为 47%)、水解植物蛋白(hydrolyzed vegetable protein, HVP),湖南省嘉品嘉味生物科技有限公司;葡萄糖、木糖、半胱氨酸、半胱氨酸盐酸盐、胱氨酸,河南兴源化工产品有限公司;复合风味蛋白酶 Flavourzyme™ 500MG(1.0×10^5 U/g)、诺维信复合蛋白酶 Protamex™(1.5×10^5 U/g),丹麦诺维信公司;氨基酸混合标准试剂、邻苯二甲醛(o-phthalaldehyde, OPA)、9-芴甲基氯甲酸酯(9-fluorenylmethyl chloroformate, Fmoc),美国 Sigma 公司;硼酸盐缓冲溶液、甲醇、乙腈,磷酸二氢钠、甲醛、氢氧化钠,国药集团化学试剂有限公司;2-甲基-3-庚酮,上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

8890A-5977 型全二维气相色谱-嗅闻-质谱[配备的一维色谱柱为 DB-Wax(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm),二维色谱柱为 DB-17ms(1.85 m × 0.18 mm × 0.18 μm)]、1200 型高效液相色谱,美国安捷伦公司;Sniff 9100 型嗅闻仪,瑞士 Brechbuhler 公司;BSA124S 型电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司;MP511 型 pH 计,上海双旭电子有限公司;SA402B 型电子舌,日本 INSENT 公司;HH-2 型数显恒温水浴锅,北京天林恒泰科技有限公司;CR22N 型高速冷冻离心机,天美(中国)科学仪器有限公司;KD-310 型凯氏定氮仪,嘉盛(香港)科技有限公司;PEN3 型便捷式电子鼻,德国 Aisense 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酶解液的制备

酶解液的制备参考文献^[11]方法并做出优化。将 50 g 牛骨素加入锥形瓶,于恒温水浴锅中加热,待温度恒定后加酶,开启电动搅拌棒进行搅拌,保持恒温酶解。酶解反应结束后将水浴温度迅速升温至 90 °C,恒温保持 10 min 灭酶,制得牛骨素酶解液,冷却至室温备用。重复实验 3 次。

1.3.2 热反应牛骨香精的制备

根据实验室前期的方法并进行优化^[12]。称取

牛骨素酶解液 30.0 g, 添加蒸馏水 14.0 g、葡萄糖 0.5 g、木糖 1.0 g、半胱氨酸 1.0 g、半胱氨酸盐酸盐 0.5 g、硫酸素 0.5 g 和 HVP 2.5 g 于锥形瓶中, 在 pH 为 7.0、120 °C 条件下反应 1 h 制备热反应牛骨香精, 冷却至室温备用, 重复实验 3 次。

1.3.3 水解度的测定

参照文献^[13]的方法, 对牛骨素酶解液的水解度进行测定, 计算方法见式(1)。

$$DH = \frac{\text{氨基酸态氮质量}}{\text{总蛋白质量}} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, 氨基酸态氮的测定使用甲醛滴定法, g; 总蛋白质量的测定使用凯氏定氮仪, g。

1.3.4 热反应牛骨香精的感官评价

由北京工商大学分子感官科学实验室成员(平均年龄为 27 岁)组成的感官评价小组, 所有参加的评价员均符合 ISO 6658、ISO 8586-1 和 ISO 8586-2 要求。实验前对气味属性和基本五味进行 4 h 的感官训练, 对热反应牛骨香精的整体风味轮廓进行评价。实验步骤: 准确称取 10 g 样品于 40 mL 顶空瓶中, 在 55 °C 的恒温金属浴中加热。气味评价时需相邻样品之间间隔 5 min, 必要时使用咖啡豆缓解嗅觉疲劳。滋味评价时将样品稀释 10 倍, 并打乱序号, 每两个样品之间使用纯净水漱口。滋味和气味的感官评价均按照 10 分制(6 个梯度): 未感知为 0 分, 极弱为 1~2 分, 气味或滋味较弱为 3~4 分, 中等强度感知为 5~6 分, 气味或滋味感知较强为 7~8 分, 非常强烈为 9~10 分, 感官评价使用的参比标准溶液见表 1。

表 1 感官评价使用的参比标准溶液

Tab. 1 Reference standard solution for sensory evaluation

感官属性	配制方法
气味	
肉香	以水为稀释液, 将 2-甲基-3-呋喃硫醇标品稀释 100 倍
烤香	以水为稀释液, 将 2,5-二甲基吡嗪标品稀释 100 倍
焦糖	以水为稀释液, 将糠醛标品稀释 100 倍
酸味	以水为稀释液, 将乙酸标品稀释 100 倍
辛香	取辛香料为参比, 如八角、茴香、花椒等
焦糊	以水为稀释液, 将糠醇标品稀释 100 倍
滋味	
酸味	20 mmol/L 的柠檬酸溶液
甜味	50 mmol/L 的葡萄糖溶液
苦味	1 mmol/L 的咖啡因溶液
咸味	氯化钠水溶液
鲜味	10 mmol/L 的谷氨酸钠溶液

感官评分的计算见式(2)。

$$\begin{aligned} \text{感官评分} = & 0.6 \times (0.5 \times \text{肉香分} + 0.3 \times \text{烤香分} + \\ & 0.2 \times \text{焦糖分} + 0.2 \times \text{辛香分} - 0.1 \times \text{酸味分} - 0.1 \times \\ & \text{焦糊分}) + 0.4 \times (0.5 \times \text{鲜味分} + 0.5 \times \text{咸味分} + \\ & 0.2 \times \text{甜味分} - 0.1 \times \text{苦味分} - 0.1 \times \text{酸味分}) \end{aligned} \quad (2)$$

1.3.5 牛骨素酶解工艺的优化

1.3.5.1 单因素实验

控制其它条件不变, 依次考察酶解温度(45、50、55、60、65 °C)、酶解时间(1、2、3、4、5、6 h)、复合酶加酶量(750、1 000、1 250、1 500、1 750 U/g)、复合酶加酶比例(复合风味蛋白酶的加酶量: 复合蛋白酶的加酶量为 1:2、2:2、3:2、4:2、5:2)对牛骨素酶解液水解度和制备的热反应牛骨香精感官评分的影响。

1.3.5.2 响应面试验

在单因素实验基础上, 以酶解温度、酶解时间、复合酶加酶量和复合酶加酶比例(复合风味蛋白酶的加酶量: 复合蛋白酶的加酶量)4 个因素作为自变量, 以不同条件下制备的热反应牛骨香精感官评分为响应值, 设计 4 因素 3 水平的响应面试验。采用 Design-Expert 8.0 软件 Box-Behnken 方法进行试验设计, 确定较优的酶解条件。

1.3.6 游离氨基酸的测定

1.3.6.1 游离氨基酸的定性定量

游离氨基酸的定性定量参考文献方法进行^[14]。利用高效液相色谱, 采用安捷伦的柱前衍生法对牛骨素、酶解液、热反应牛骨香精中的 16 种游离氨基酸进行定量分析。分别取 2 g 牛骨素、酶解液、热反应牛骨香精加入 6 g 0.1 mol/L 的 HCl, 在 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 过 0.45 μm 尼龙滤膜, 待仪器检测, 每个样品做 3 次平行, 结果以“平均数 ± 标准偏差”表示。

测定条件。色谱柱为 Zorbax Eclipse - AAA (4.6 mm × 150 mm × 5 μm), 流动相 A 为 40 mmol/L 的 NaH₂PO₄ 溶液, pH 值为 7.8; 流动相 B 为 V(甲醇): V(乙腈): V(水) = 45:45:10, 流速为 1 mL/min, 进样量 1 μL, 检测波长设置为 338 nm, 柱温设置为 45 °C。梯度洗脱程序为 0 min, 0% 流动相 B; 1.9 min, 0% 流动相 B; 18.1 min, 37% 流动相 B; 23.2 min, 37% 流动相 B; 24 min, 100% 流动相 B; 26 min, 100% 流动相 B; 27 min, 0% 流动相 B; 30 min, 0% 流动相 B。

1.3.6.2 游离氨基酸滋味活性值的计算

参考文献方法^[15]测定游离氨基酸。利用滋味活性值(taste activity value, TAV)判断呈味氨基酸对牛骨素、酶解液、热反应牛骨香精滋味的影响。TAV的计算见式(3)。

$$TAV = \frac{C_x}{R} \quad (3)$$

式(3)中, C_x 表示味觉成分的质量比, mg/100g; R 表示味觉成分的识别阈值, mg/100 g。

1.3.7 电子鼻测定气味轮廓

参考文献方法^[16]使用电子鼻对牛骨素、酶解液测定气味轮廓。准确称取样品 5 mL 于 40 mL 顶空瓶中, 55 °C 条件下加热 30 min, 然后依次用电子鼻对挥发性气味进行分析检测, 电子鼻载气为干燥空气, 设置测试时间为 300 s, 清洗时间 100 s, 每组样品做 3 个平行。

1.3.8 电子舌测定滋味轮廓

参考文献方法^[17]使用电子舌对牛骨素、酶解液测定滋味轮廓。准确移取 20 mL 样品于烧杯中, 按照 1:4 加入蒸馏水, 以 10 000 r/min 离心 15 min 后通过 0.45 μm 滤膜抽滤至澄清, 分别取 30 mL 样品放于电子舌专用杯中进行检测, 采样时间为 120 s, 每组样品检测 4 次。

1.3.9 关键气味化合物的鉴定

1.3.9.1 挥发性气味化合物的测定

参考 Wang 等^[18]的方法, 利用全二维气相色谱-嗅闻-质谱(comprehensive two-dimensional gas chromatography-olfactometry-mass spectrometry, GC × GC-O-MS)对牛骨素、酶解液分别制备的热反应牛骨香精的挥发性气味化合物进行测定。

准确称取 5 g 样品于 20 mL 干净无异味的顶空瓶中, 加入 1 μL 浓度为 0.816 μg/μL 的内标化合物 2-甲基-3-庚酮(溶于正己烷), 盖好瓶盖。设置自动化进样程序, 使样品在 55 °C 的条件下平衡 20 min, 插入萃取头吸附 40 min, 在 250 °C 条件下解析 8 min。每个样品做 3 个平行。

气相条件。升温程序为初始温度 40 °C, 保持 3 min, 以 3 °C/min 的速率升至 230 °C, 保持 5 min, 调制周期为 3.5 s, 进样口温度为 250 °C。高纯氮气作为载气, 进样分流比为 2:1, 分流流量为 2 mL/min。

质谱条件。离子源温度为 230 °C, 电子轰击源为 70 eV, 质谱扫描范围为全扫描, m/z 范围为 40 ~ 500 u, 四极杆温度为 150 °C, 检测器温度为 250 °C。

1.3.9.2 挥发性气味化合物的定性定量分析

挥发性气味化合物由质谱(mass spectrometry, MS)结果、化合物保留指数(retention index, RI)和气味(odor, O)描述共同确定, 化合物的质谱结果通过 Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 和 NIST17 数据库根据结构和匹配度检索鉴定, 匹配度一般要求超过 700, 然后根据正构烷烃($C_7 \sim C_{30}$)获得保留指数对化合物二次鉴定^[19]。用内标化合物 2-甲基-3-庚酮对热反应牛骨香精中的挥发性气味化合物进行半定量, 计算公式见式(4)。

$$C_x = \frac{A_x \times C_o \times V \times 1\,000}{A_o \times m} \quad (4)$$

式(4)中, C_x 为待测化合物的质量比, ng/g; C_o 为内标的质量浓度, 0.816 μg/μL; A_x 为待测挥发性气味化合物的峰面积; A_o 为内标化合物的峰面积; m 为样品的质量, g; V 为内标的体积, μL。

1.3.9.3 关键气味化合物的气味活性值计算

使用气味活性值(odor activity value, OAV)评估关键气味化合物对热反应牛骨香精整体香气的贡献。OAV 值计算公式见式(5)。

$$OAV = \frac{C_i}{OT_i} \quad (5)$$

式(5)中, C_i 表示挥发性气味化合物的质量比, ng/g; OT_i 表示该化合物在水中的阈值, ng/g。

1.4 数据统计处理

采用 Microsoft Excel 2019 和 Origin 2021 软件对数据进行整理, 采用 SPSS Statistics 19.0 软件对酶解液的水解度和牛骨素制备的热反应牛骨香精的感官评分进行显著性分析, 结果表示为“平均值 ± 标准差”, 采用 Design-Expert V8.0.6 软件分析响应面试验结果。

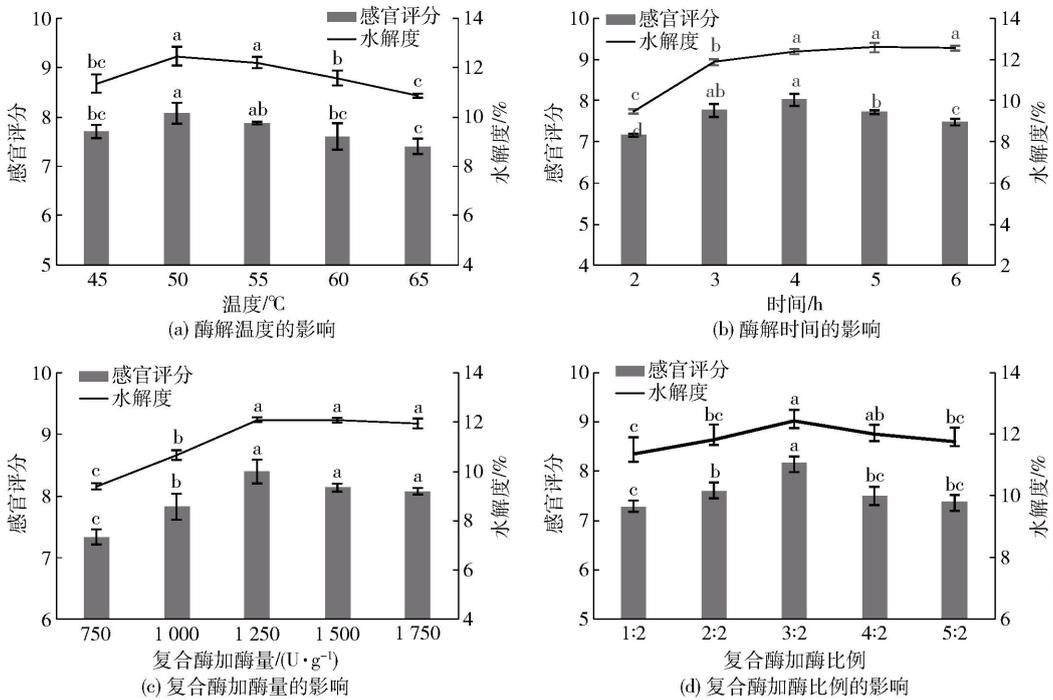
2 结果与分析

2.1 牛骨素酶解工艺的优化结果

2.1.1 单因素实验结果

不同酶解条件对酶解液水解度和制备热反应牛骨香精感官评分的影响见图 1。

酶解效果可以由水解度反映, 水解度越高, 释放的化合物越多^[20]。DH 的标准测定较复杂, 本研究用式(1)的计算值进行粗略估算。复合风味蛋白酶和复合蛋白酶的较适酶解温度均为 50 ~ 55 °C, 45 ~ 65 °C 范围内, 随着酶解温度的升高, 水解度和感官



图中标注的不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图1 不同酶解工艺对酶解液水解度和热反应牛骨香精感官评分的影响

Fig. 1 Effects of different enzymatic hydrolysis processes on hydrolysis degree of enzymatic hydrolysate and sensory score of thermal reaction bovine bone flavoring

评分先上升后下降,50 °C 时水解度较高,肉香味厚重,当酶解温度高于较适温度后,酶活性降低或者部分活性丧失,水解度和感官评分呈下降趋势。酶解时间为 4 h 时制备的热反应牛骨香精感官评分较高,肉味浓厚,随着酶解时间的延长,感官评分逐渐降低,可能是由于酶解时间过长,分解出的氨基酸与其它成分发生反应产生了不良气味。4~6 h 水解度无明显差异,推测是因为底物与酶活性位点基本完全结合,无多余的酶活位点参与反应,考虑到节能,选择 4 h 为较优酶解时间。复合酶加酶量为 750~1 250 U/g 时,酶解液水解度和热反应牛骨香精的感官评分显著增加 ($P < 0.05$) 且与复合酶加酶量呈正相关,但加酶量继续增加时,水解度和感官评分逐渐减缓但差异不显著,这是因为底物一定时,随着加酶量的不断增加,没有过多的底物与酶结合,且过量的酶反而会抑制酶反应的进行,因此,较适复合酶加酶量为 1 250 U/g。复合酶加酶量一定,随着复合风味蛋白酶与复合蛋白酶的加酶比例逐渐增加,当复合风味蛋白酶与复合蛋白酶加酶比例为 3:2 时感官评分与水解度达到较大值,当复合酶加酶比例继续增加时,感官评分和水解度呈明显下降趋势,这与复合蛋白酶单独作用时水解度大于复合风味蛋白酶单独

作用有关,因此随着复合风味蛋白酶比重的继续增加会降低酶解液水解度。

2.1.2 响应面试验结果

响应面试验设计与结果分析见表 2 和图 2。

对表 2 中的数据进行回归分析,得到二次多项回归方程为 $y = 8.06 + 0.17A + 0.38B - 0.3C + 0.013D - 0.16AB - 0.23AC + 0.12AD - 0.32BC + 0.18BD + 0.025CD - 0.28A^2 - 0.4B^2 - 0.99C^2 - 0.2D^2$ 。

因素间相互作用的强弱可以通过响应曲面反映,响应面呈凸形,表明因素之间的交互作用较强,作用显著。由图 2 可知,随着各因素值的增加,感官评分呈现不同程度的上升趋势,当各因素达到一定值继续增加时,响应值逐渐降低,说明热反应牛骨香精的感官评分与酶解温度、酶解时间、复合酶加酶量、复合酶加酶比例之间呈非线性关系。只有在特定的酶解条件下制备热反应牛骨香精,感官评分才会有较大值。通过模型得到的较优条件为酶解温度 50 °C、时间 4 h、复合酶加酶量 1 250 U/g、复合风味蛋白酶与复合蛋白酶的加酶比例为 1:1,感官评分为 8.24,进行 3 次重复实验后,感官评分为 8.17,与理论值无显著性差异,说明该工艺具有可行性。

表2 酶解工艺优化的响应面设计及结果

Tab.2 Optimized response surface design and results for enzymatic hydrolysis process

编号	酶解温度/℃	酶解时间/h	复合酶加酶量/(U·g ⁻¹)	复合酶加酶比例	感官评分	编号	酶解温度/℃	酶解时间/h	复合酶加酶量/(U·g ⁻¹)	复合酶加酶比例	感官评分
1	50	3	1 000	3:2	6.33	16	50	4	1 250	3:2	7.97
2	50	4	1 250	3:2	8.18	17	45	4	1 000	3:2	6.58
3	50	3	1 250	4:2	6.77	18	55	4	1 250	2:2	7.48
4	55	5	1 250	3:2	7.68	19	55	3	1 250	3:2	7.37
5	50	3	1 500	3:2	6.31	20	50	5	1 250	4:2	7.96
6	50	4	1 000	2:2	7.08	21	50	4	1 500	2:2	6.54
7	45	5	1 250	3:2	7.63	22	50	4	1 500	4:2	6.63
8	55	4	1 250	4:2	7.91	23	50	4	1 250	3:2	7.96
9	50	4	1 250	3:2	8.15	24	50	4	1 000	4:2	7.07
10	45	4	1 250	4:2	7.53	25	50	5	1 250	2:2	7.75
11	55	4	1 500	3:2	6.47	26	50	3	1 250	2:2	7.27
12	45	4	1 250	2:2	7.60	27	50	4	1 250	3:2	8.02
13	45	3	1 250	3:2	6.68	28	45	4	1 500	3:2	6.43
14	50	5	1 500	3:2	6.45	29	50	5	1 000	3:2	7.77
15	55	4	1 000	3:2	7.56						

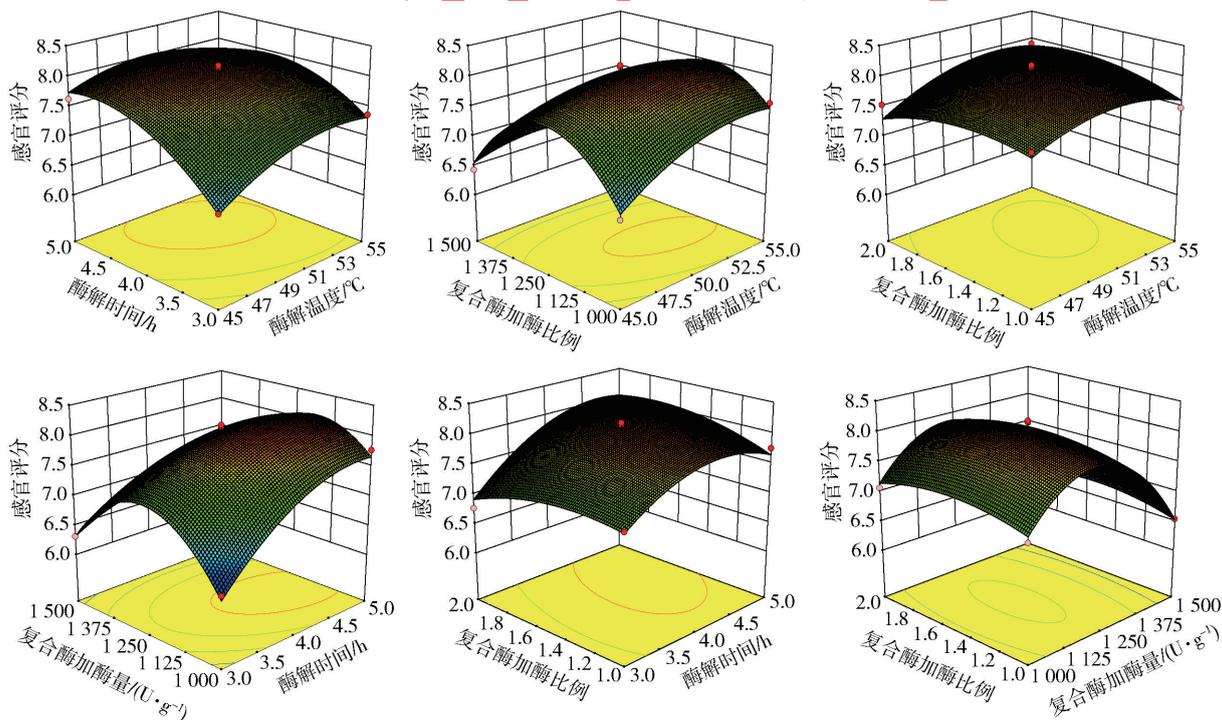


图2 不同的酶解因素交互作用对热反应牛骨香精感官评分的响应曲面

Fig.2 Response surface of the interaction of different enzymatic hydrolysis factors on sensory score of thermal reaction beef bone flavoring

2.2 牛骨素、酶解液及热反应牛骨香精中游离氨基酸的变化

牛骨素、酶解液及热反应牛骨香精中游离氨基

酸的质量比变化见表3。

游离氨基酸具有鲜味、甜味、苦味、无味等呈味特征^[21], TAV 用来表征化合物滋味活性的大小。

表3 牛骨素、酶解液、热反应牛骨香精中游离氨基酸的质量比、阈值、TAV 值

Tab.3 Mass ratio, thresholds in water and TVA value of free amino acids in BBE, enzymatic hydrolysate and thermal reaction bovine bone flavoring

名称	阈值/ (mg·100g ⁻¹)	质量比/(mg·100g ⁻¹)			TAV 值		
		牛骨素	酶解液	热反应牛骨香精	牛骨素	酶解液	热反应牛骨香精
鲜味氨基酸							
天冬氨酸(Asp)	100	11.40 ± 0.09 ^c	33.8 ± 0.70 ^b	45.70 ± 3.38 ^a	0.11 ± 0.01 ^c	0.34 ± 0.01 ^b	0.46 ± 0.03 ^a
谷氨酸(Glu)	30	29.21 ± 1.01 ^c	121.6 ± 1.45 ^a	86.28 ± 2.10 ^b	0.97 ± 0.03 ^c	4.05 ± 0.05 ^a	2.88 ± 0.07 ^b
甜味氨基酸							
苏氨酸(Thr)	260	22.23 ± 0.74 ^c	57.84 ± 2.87 ^b	82.76 ± 7.69 ^a	0.09 ± 0.01 ^c	0.22 ± 0.01 ^b	0.32 ± 0.03 ^a
丝氨酸(Ser)	150	5.92 ± 0.30 ^c	27.82 ± 0.54 ^b	109.66 ± 2.67 ^a	0.04 ± 0.01 ^c	0.19 ± 0.02 ^b	0.73 ± 0.02 ^a
甘氨酸(Gly)	130	61.90 ± 3.25 ^c	101.36 ± 5.07 ^b	1212.96 ± 16.25 ^a	0.48 ± 0.03 ^c	0.78 ± 0.04 ^b	9.33 ± 0.13 ^a
精氨酸(Arg)	50	9.29 ± 0.58 ^c	122.93 ± 5.68 ^a	73.48 ± 1.66 ^b	0.19 ± 0.01 ^c	2.46 ± 0.11 ^a	1.47 ± 0.03 ^b
丙氨酸(Ala)	60	38.83 ± 1.89 ^c	50.78 ± 1.61 ^b	75.70 ± 4.12 ^a	0.65 ± 0.03 ^c	0.02 ± 0.01 ^b	1.26 ± 0.07 ^a
苦味氨基酸							
亮氨酸(Leu)	190	11.48 ± 0.93 ^c	132.22 ± 6.49 ^a	62.25 ± 1.51 ^b	0.06 ± 0.01 ^c	0.79 ± 0.03 ^a	0.33 ± 0.01 ^b
苯丙氨酸(Phe)	90	13.54 ± 0.37 ^c	75.43 ± 2.39 ^a	34.36 ± 2.73 ^b	0.15 ± 0.01 ^c	0.84 ± 0.03 ^a	0.38 ± 0.03 ^b
异亮氨酸(Ile)	90	5.62 ± 0.31 ^c	43.41 ± 3.03 ^a	26.39 ± 2.94 ^b	0.06 ± 0.00 ^c	0.48 ± 0.03 ^a	0.29 ± 0.03 ^b
赖氨酸(Lys)	50	7.69 ± 0.11 ^c	18.42 ± 0.61 ^a	14.05 ± 0.51 ^b	0.15 ± 0.02 ^c	0.37 ± 0.01 ^a	0.28 ± 0.01 ^b
缬氨酸(Val)	40	12.86 ± 0.3 ^c	45.81 ± 2.93 ^a	39.74 ± 2.2 ^b	0.32 ± 0.01 ^c	1.15 ± 0.07 ^a	0.99 ± 0.06 ^b
蛋氨酸(Met)	30	2.60 ± 0.15 ^c	23.39 ± 0.67 ^a	10.07 ± 0.83 ^b	0.09 ± 0.01 ^c	0.78 ± 0.02 ^a	0.34 ± 0.03 ^b
组氨酸(His)	20	9.94 ± 1.34 ^a	6.54 ± 0.20 ^b	1.33 ± 0.18 ^c	0.50 ± 0.07 ^a	0.33 ± 0.01 ^b	0.07 ± 0.01 ^c
酪氨酸(Tyr)	—	3.66 ± 0.44 ^a	32.79 ± 1.56 ^a	15.57 ± 0.53 ^b	0.12 ± 0.01 ^c	1.09 ± 0.05 ^a	0.52 ± 0.02 ^b
无味氨基酸							
半胱氨酸(Cys)	—	14.98 ± 0.92 ^b	34.22 ± 5.61 ^a	18.23 ± 1.13 ^b	—	—	—

不同小写字母上标表示同行不同样品之间存在显著性差异(P<0.05)。

酶解液中除组氨酸外,所有游离氨基酸的 TAV 相对于酶解前均显著提升。鲜味氨基酸在酶解液中质量比较高,丙氨酸虽然主要提供甜味,但是对鲜味氨基酸具有协同提鲜的作用^[22]。酶解液中苦味氨基酸约占游离氨基酸总质量比的一半,这与 Kong 等^[23]的研究结果相似,其指出苦味氨基酸是鸡肉酶解液中的主要氨基酸。另外,有研究表明,苦味氨基酸通常不具备味觉活性,苯丙氨酸和酪氨酸是苦味氨基酸也是芳香族氨基酸,当芳香族氨基酸阈值高于含量时,可以提高酶解液的鲜味和甜味^[24]。由于美拉德反应过程的消耗,大部分氨基酸质量比均显著性降低,推测这部分氨基酸转变为其它重要的呈味物质^[25],甜味氨基酸总量增加,可能与美拉德过程中涉及到的 Strecker 降解、羰氨反应和肽降解等反应有关。所有苦味氨基酸质量比均减少且 TAV 值均小于 1,这与李娇等^[26]的研究一致,他们发现美拉德反应可以改善酶解液的滋味并改变氨基酸的组成

和比例。因此,经酶解大量的呈味氨基酸被释放出来,美拉德反应可以帮助减少酶解液中的苦味,增加鲜味和甜味,使热反应牛骨香精的滋味得到改善。

2.3 牛骨素酶解前后的气味轮廓分析结果

电子舌分析牛骨素、酶解液的气味轮廓主成分分析(principal component analysis,PCA)和雷达图见图3。

由图3(a)可知,PC1为86.8%,PC2为9.1%,贡献率之和接近95.9%,说明两个主成分能够反映样品之间的综合信息。PC1的方差贡献率远大于PC2,表明PC1轴向右距离越大,样品差异性越大。两个样品在横坐标上距离相对较近,但相互间无重叠部分,说明两个样品的挥发性物质有一定差异。由图3(b)可看出R3、R4、R5、R9变化几乎无影响,说明酶解后氨类、氢化物、有机硫化物、短链烷烃芳香等化合物的种类和含量变化不大。牛骨素和酶解液在R2(对氮氧化物敏感)、R8(对乙醇、部分芳香化合物敏感)和R10(对长链烷烃类化合物敏感)的

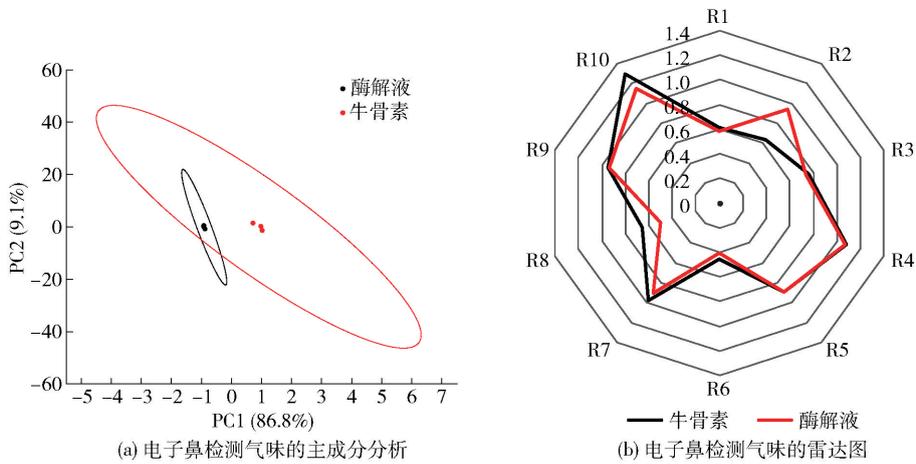


图3 牛骨素和酶解液电子鼻响应值的PCA和雷达图

Fig. 3 PCA and radar plot of electronic nose response values of BRE and enzymatic hydrolysis

响应值变化较为明显,推测这三个感应器是区分两个样品的重要指标。说明在酶解后,酶解液产生更多的氮氧化物,同时使牛骨素烷烃类中具有不愉快气味化合物的含量降低,在一定程度上可以改善牛骨素的整体风味。

2.4 牛骨素酶解前后的滋味轮廓分析结果

电子鼻分析牛骨素、酶解液的滋味轮廓主成分分析(PCA)和雷达图见图4。

由图4(a)可知PC1为77.1%,PC2为22.5%,贡献率之和为99.6%,说明酶解前后两个样品的滋味存在显著性差异。通过电子舌对牛骨素和酶解液中的4种基本味(酸、苦、咸、鲜)以及浓厚味、涩味进行滋味分析。由图4(b)可知,酶解后鲜味值较大,酶解使鲜味氨基酸大量释放,这与游离氨基酸的测定结果相符。浓厚味、咸味的响应值增加,可能是因为蛋白质水解后产生了具有咸味或类似咸味作用的肽^[27]。酸味响应值小于-30,说明样品中无该味

道^[28]。苦味响应值降低但无明显变化,分析其原因,一方面可能是因为酶解过程中使用的复合风味蛋白酶包含内切蛋白酶和外切肽酶两种活性,可以用来降低水解产物的苦肽链,将其彻底降解为氨基酸,另一方面可能与苦味氨基酸不具备味觉活性,苦味易被其它味道掩盖有关。

2.5 热反应牛骨香精关键气味化合物的鉴定结果

牛骨素、酶解液分别制备热反应牛骨香精的特征风味二维谱图见图5。

运用GC×GC-O-MS对牛骨素、酶解液分别制备的热反应牛骨香精进行色谱分析,结合嗅闻检测,共鉴定出挥发性化合物164种,包含27种醛类、30种酮类、12种醇类、16种酸类、7种含硫化物、10种酯类、18种吡嗪类、10种咪唑类、6种噻吩类、4种噻吩类和24种其它类化合物,其中74种是气味活性化合物。牛骨素制备热反应牛骨香精样品鉴定出145种挥发性化合物,酶解液制备热反应牛骨香精

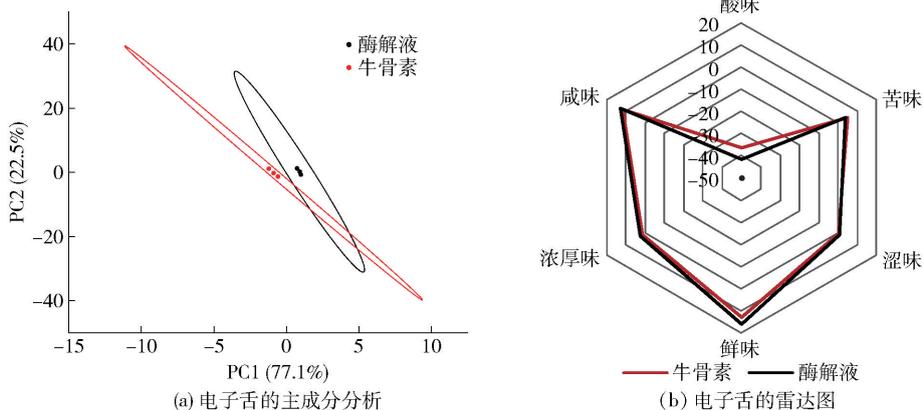
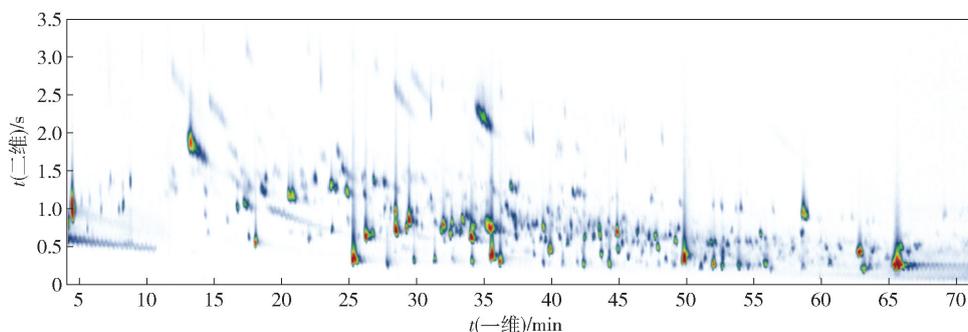
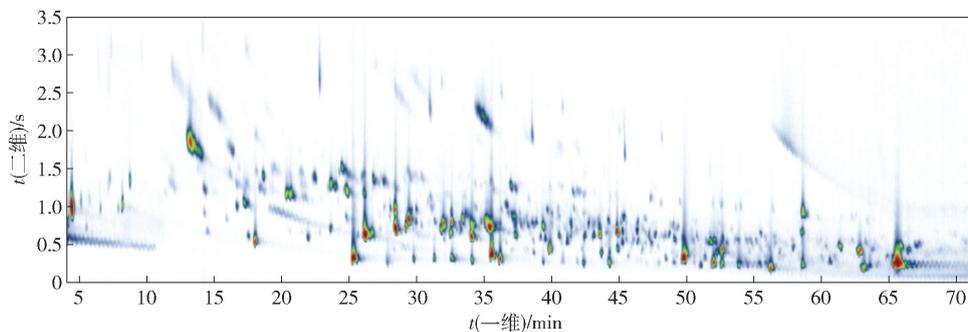


图4 牛骨素和酶解液电子舌响应值的PCA和雷达图

Fig. 4 PCA and radar plot of electronic tongue response values of BBE and enzymatic hydrolysis



(a) 牛骨素制备热反应牛骨香精的全二维气相色谱-嗅闻-质谱谱图



(b) 酶解液制备热反应牛骨香精的全二维气相色谱-嗅闻-质谱谱图

图5 牛骨素和酶解液分别制备热反应牛骨香精的全二维气相色谱-嗅闻-质谱谱图

Fig. 5 GC × GC-O-MS spectrum of thermal reaction bovine bone flavoring prepared by BBE and enzymatic hydrolysate

鉴定出 129 种挥发性化合物。

牛骨素和酶解液分别制备热反应牛骨香精中挥发性气味化合物的质量比和关键气味化合物的 OAV 见表 4 和表 5。已鉴别出的物质中,酶解液制备的热反应牛骨香精产物中酸类物质总质量比显著增加,可能是由于氨基酸降解后经过氧化或还原作用产生,也可能是由饱和脂肪酸本身氧化降解产生^[29],牛骨素经酶解后发生美拉德反应生成了乙酸,乙酸具有强烈刺激性气味,属于低级饱和酸,虽然酸类化合物阈值较大,但酸类化合物与其它香气成分之间具有协同效应,可以使热反应牛骨香精整体气味更加丰富和强烈。醛类物质与其它类型化合物相比,总质量比较高,酶解液制备的热反应牛骨香精中产生了 (*E, E*)-2,4-癸二烯醛,其阈值很低, OAV 大于 7,具有油味和鸡肉香味,对热反应牛骨香精的脂肪气息具有贡献作用。酮类化合物种类虽然较多,但其阈值相对较高,因此对热反应牛骨香精风味的贡献并不突出,然而有些酮类是形成杂环类化合物的重要中间体,对肉香味的形成有着必不可少的作用^[30],4-羟基-2,5-二甲基-3(2*H*)-呋喃酮呈现焦糖气息,具有明显的增香增甜效果。含硫化合物主要来自美拉德反应的产物或者氨基酸的热解,是

决定肉味的关键物质,酶解液制备的热反应牛骨香精中产生了 2-甲基-3-呋喃硫醇、糠基甲基硫醚和甲基糠基二硫醚这几种典型的肉香味化合物。含硫化合物阈值一般较低,因此这些化合物的产生对香精整体的肉香味特征形成具有重要的作用,这也是酶解液比牛骨素制备的热反应牛骨香精肉香味更浓郁突出的原因之一。呋喃类化合物通常在焦糖化和糖降解过程中产生,能增加热反应牛骨香精的焦糖味,对整体香气有较好的修饰作用。噻吩和噻唑类主要由硫胺素降解产生,是肉制品中主要的香气化合物。

此外,由表 5 可知,牛骨素和酶解液所制备热反应牛骨香精产物中 OAV > 1 的关键气味化合物共有 22 种,包括醛类 6 种、酮类 2 种、醇类 1 种、酯类 2 种、吡嗪类 3 种、呋喃类 2 种、烯类 2 种、含硫化合物 4 种。主要差异为牛骨素制备的热反应牛骨香精产物以果味、焦糖、烤香味为主,酶解液制备的热反应牛骨香精具有更多的脂肪、肉味气息,含硫化合物种类较多且贡献较高,主要贡献硫磺味、肉味和葱香味。其次是醛类化合物,主要贡献果香、花香、脂肪味。此外,酶解液制备的热反应牛骨香精产物中新产生了 β -石竹烯, OAV > 1,增强了香料、辛香味,使美拉德产物香气的丰富度与整体强度得以提升。

表4 牛骨素和酶解液制备的热反应牛骨香精中的挥发性气味化合物

Tab.4 Volatile odor compounds in thermal reaction bovine bone flavoring prepared by BBE and enzymatic hydrolysate

编号	物质名称	CAS	RI	鉴定方式 ^a	质量比/(ng·g ⁻¹)	
					牛骨素-热反应牛骨香精	酶解液-热反应牛骨香精
醛类						
1	2-甲基丁醛	96-17-3	877	MS,RI,O	219.85 ± 8.86	313.22 ± 10.65
2	2-甲基-2-丁烯醛	1115-11-3	1073	MS,RI	0.16 ± 0.01	—
3	辛醛	124-13-0	1228	MS,RI,O	4.95 ± 0.38	1.79 ± 0.11
4	可可醛	35158-25-9	1340	MS,RI,O	—	1.32 ± 0.86
5	壬醛	124-19-6	1371	MS,RI,O	28.19 ± 2.52	16.52 ± 6.1
6	2-乙基丁醛	97-96-1	1402	MS,RI	—	0.32 ± 0.02
7	糠醛	98-01-1	1444	MS,RI	202.8 ± 19.64	92.73 ± 1.87
8	苯甲醛	100-52-7	1480	MS,RI	83.12 ± 6.98	116.61 ± 7.62
9	癸醛	112-31-2	1489	MS,RI	1.79 ± 0.11	—
10	5-甲基呋喃醛	620-02-0	1533	MS,RI	12.58 ± 1.13	7.23 ± 0.67
11	苯乙醛	122-78-1	1606	MS,RI,O	30.87 ± 2.76	16.04 ± 1.69
12	(E)-2-癸烯醛	3913-81-3	1639	MS,RI	10.76 ± 1.01	—
13	2-噻吩甲醛	98-03-3	1655	MS,RI,O	7.43 ± 0.59	6.57 ± 0.55
14	十一醛	112-44-7	1611	MS,RI,O	—	1.38 ± 0.12
15	1-甲基-2-吡咯甲醛	1192-58-1	1671	MS,RI	5.91 ± 0.59	13.46 ± 1.21
16	十二醛	112-54-9	1705	MS,RI,O	0.67 ± 0.04	—
17	(E)-2-十一烯醛	2463-77-6	1750	MS,RI,O	1.43 ± 0.11	0.50 ± 0.04
18	(E,E)-2,4-癸二烯醛	25152-84-5	1751	MS,RI,O	—	0.54 ± 0.02
19	5-甲基-2-噻吩甲醛	13679-70-4	1767	MS,RI	7.05 ± 0.17	—
20	2-甲基-3-(2-呋喃基)丙烯醛	874-66-8	1800	MS,RI,O	3.32 ± 0.17	2.52 ± 0.22
21	α-亚乙基-苯乙醛	4411-89-6	1879	MS,RI	3.77 ± 0.21	4.3 ± 0.21
22	4-甲基-2-苯基-2-戊烯醛	26643-91-4	1887	MS,RI,O	3.56 ± 0.27	4.48 ± 0.33
23	2-吡咯甲醛	1003-29-8	1884	MS,RI	45.52 ± 3.77	—
24	椰子醛	104-61-0	1981	MS,RI	2.69 ± 0.21	1.49 ± 0.13
25	可卡醛	21834-92-4	1992	MS,RI	4.37 ± 0.23	11.2 ± 1.21
26	十五醛	2765-11-9	2031	MS,RI	22.05 ± 1.99	24.28 ± 2.29
27	十六醛	629-80-1	2081	MS,RI	—	51.41 ± 3.79
酮类						
28	2-丁酮	78-93-3	855	MS,RI,O	9.12 ± 0.67	13.2 ± 0.37
29	2,3-丁二酮	431-03-8	962	MS,RI,O	1.17 ± 0.11	1.51 ± 0.09
30	2-戊酮	107-87-9	969	MS,RI	1.58 ± 0.14	1.5 ± 0.14
31	4-甲基-2-戊酮	108-10-1	997	MS,RI	—	1.33 ± 0.08
32	2,3-戊二酮	600-14-6	1049	MS,RI,O	1.78 ± 0.12	2.63 ± 0.25
33	菊苣酮	19322-27-1	1079	MS,RI,O	46.26 ± 2.61	—
34	2,3-庚二酮	96-04-8	1110	MS,RI	0.88 ± 0.04	2.34 ± 0.21
35	3,4-己二酮	4437-51-8	1112	MS,RI,O	0.31 ± 0.02	0.3 ± 0.02
36	2-庚酮	110-43-0	1154	MS,RI	1.2 ± 0.09	0.36 ± 0.03
37	2-甲基四氢呋喃-3-酮	3188-00-9	1206	MS,RI,O	5.65 ± 0.34	5.35 ± 0.35
38	6-甲基-2-庚酮	928-68-7	1208	MS,RI	0.74 ± 0.04	2.98 ± 0.24

续表 4

编号	物质名称	CAS	RI	鉴定方式 ^a	质量比/(ng·g ⁻¹)	
					牛骨素-热反应牛骨香精	酶解液-热反应牛骨香精
39	2,3-辛二酮	585-25-1	1 220	MS,RI	2.29 ± 0.13	—
40	羟基丙酮	116-09-6	1 230	MS,RI,O	60.52 ± 2.85	38.08 ± 2.59
41	仲辛酮	111-13-7	1 254	MS,RI	1.99 ± 0.17	1.05 ± 0.07
42	5-甲基-5-己烯-2-酮	3240-09-3	1 278	MS,RI	0.81 ± 0.04	—
43	乙基环戊烯醇酮	21835-01-8	1 278	MS,RI	2.04 ± 0.16	1.68 ± 0.13
44	3-羟基-2-丁酮	513-86-0	1 281	MS,RI	4.13 ± 0.11	2.91 ± 0.14
45	2-十五酮	2345-28-0	1 281	MS,RI	1.33 ± 0.16	0.85 ± 0.09
46	2-羟基-3-戊酮	5704-20-1	1 343	MS,RI	0.16 ± 0.01	0.24 ± 0.02
47	1-羟基-2-丁酮	5077-67-8	1 336	MS,RI,O	4.31 ± 0.23	2.23 ± 0.29
48	甲基庚烯酮	110-93-0	1 398	MS,RI	0.68 ± 0.02	—
49	二氢-2-甲基-3(2H)-噻吩酮	13679-85-1	1 484	MS,RI,O	3.76 ± 0.08	2.15 ± 0.15
50	异佛尔酮	78-59-1	1 559	MS,RI,O	8.9 ± 0.66	10.71 ± 0.53
51	2-十一酮	112-12-9	1 598	MS,RI	0.92 ± 0.05	—
52	2(5H)-呋喃酮	497-23-4	1 712	MS,RI,O	44.36 ± 1.69	41.06 ± 0.09
53	3-甲基环戊烷-1,2-二酮	765-70-8	1 773	MS,RI,O	8.78 ± 0.79	9.09 ± 0.88
54	甲基环戊烯醇酮	80-71-7	1 773	MS,RI,O	11.23 ± 0.46	—
55	2-十三酮	593-08-8	1 781	MS,RI	0.82 ± 0.07	0.44 ± 0.05
56	2-十二酮	6175-49-1	1 781	MS,RI	0.89 ± 0.07	—
57	4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃酮	3658-77-3	1 898	MS,RI,O	22.39 ± 1.65	13.87 ± 1.23
醇类						
58	异戊醇	123-51-3	1 167	MS,RI	1.81 ± 0.19	0.49 ± 0.04
59	辛醇	589-98-0	1 366	MS,RI	0.05 ± 0.01	—
60	2-辛醇	123-96-6	1 452	MS,RI	0.47 ± 0.04	—
61	芳樟醇	78-70-6	1 524	MS,RI,O	3.47 ± 0.43	3.71 ± 0.22
62	丙二醇	57-55-6	1 552	MS,RI	8.29 ± 0.79	3.17 ± 0.31
63	糠醇	98-00-0	1 615	MS,RI,O	280.1 ± 23.68	196.06 ± 19.06
64	5-甲基-2-呋喃甲醇	3857-25-8	1 684	MS,RI	1.46 ± 0.11	2.33 ± 0.19
65	α-松油醇	98-55-5	1 685	MS,RI	—	4.4 ± 0.18
66	苯甲醇	100-51-6	1 795	MS,RI	1.54 ± 0.14	2.95 ± 0.26
67	2-噻吩甲醇	636-72-6	1 827	MS,RI	3.25 ± 0.25	2.45 ± 0.23
68	十一醇	112-42-5	1 856	MS,RI,O	3.11 ± 0.25	—
69	十二醇	112-53-8	1 958	MS,RI	5.97 ± 0.54	—
酸类						
70	乙酸	64-19-7	1 389	MS,RI,O	—	249.53 ± 11.57
71	甲酸	64-18-6	1 453	MS,RI,O	—	3.61 ± 0.37
72	丙酸	79-09-4	1 488	MS,RI	5.88 ± 0.61	4.68 ± 0.52
73	异丁酸	79-31-2	1 524	MS,RI	1.83 ± 0.19	7.02 ± 0.22
74	丁酸	107-92-6	1 581	MS,RI,O	12.73 ± 1.15	12 ± 1.17
75	异戊酸	503-74-2	1 629	MS,RI,O	50.04 ± 4.97	46.64 ± 3.2
76	戊酸	109-52-4	1 700	MS,RI,O	4.9 ± 0.08	4.35 ± 0.37
77	3-甲基戊酸	105-43-1	1 753	MS,RI	2.56 ± 0.12	2.29 ± 0.18

续表 4

编号	物质名称	CAS	RI	鉴定方式 ^a	质量比/(ng·g ⁻¹)	
					牛骨素-热反应牛骨香精	酶解液-热反应牛骨香精
78	己酸	142-62-1	1 779	MS,RI	20.07 ± 0.91	20.42 ± 0.65
79	2-甲基己酸	4536-23-6	1 792	MS,RI,O	0.64 ± 0.04	—
80	4-甲基戊酸	646-07-1	1 858	MS,RI,O	9.17 ± 0.28	14.74 ± 1.03
81	庚酸	111-14-8	1 934	MS,RI,O	3.86 ± 0.44	3.16 ± 0.16
82	辛酸	124-07-2	1 996	MS,RI,O	21.15 ± 2.11	16.22 ± 1.49
83	壬酸	112-05-0	2 081	MS,RI	15.74 ± 0.98	2.28 ± 0.21
84	乙酰丙酸	123-76-2	2 175	MS,RI	1.19 ± 0.18	—
85	癸酸	334-48-5	2 195	MS,RI	7.72 ± 0.56	4.33 ± 0.42
含硫化物						
86	二甲基二硫醚	624-92-0	1 055	MS,RI,O	1.1 ± 0.06	0.82 ± 0.03
87	2-甲基-3-呋喃硫醇	28588-74-1	1 343	MS,RI	—	0.52 ± 0.04
88	糠硫醇	98-02-2	1 378	MS,RI,O	1.69 ± 0.13	1.44 ± 0.09
89	糠基甲基硫醚	1438-91-1	1 440	MS,RI,O	—	3.3 ± 0.32
90	甲基糠基二硫醚	57500-00-2	1 762	MS,RI,O	—	6.49 ± 0.57
91	双(2-甲基-3-呋喃基)二硫醚	28588-75-2	2 028	MS,RI,O	9.94 ± 0.36	6.12 ± 0.33
92	二糠基硫醚	13678-67-6	2 085	MS,RI	7.5 ± 0.34	3.18 ± 0.27
酯类						
93	己酸甲硫醇酯	2432-77-1	1 229	MS,RI,O	—	0.70 ± 0.04
94	亚硝酸乙酯	109-95-5	1 389	MS,RI,O	7.09 ± 0.57	3.72 ± 0.15
95	异戊酸甲硫醇酯	28747-45-7	1 420	MS,RI,O	—	16.25 ± 1.23
96	醋酸呋喃甲酯	623-17-6	1 493	MS,RI	2.79 ± 0.26	3.71 ± 0.31
97	乳酸丙酯	616-09-1	1 577	MS,RI,O	0.48 ± 0.04	0.44 ± 0.03
98	癸酸乙酯	110-38-3	1 638	MS,RI	0.50 ± 0.04	0.16 ± 0.01
99	壬酸乙酯	123-29-5	1 539	MS,RI	—	0.20 ± 0.04
100	3-巯基己基乙酸酯	136954-20-6	1 747	MS,RI,O	12.32 ± 1.16	—
101	乙酸丁酯	123-86-4	1 061	MS,RI,O	0.24 ± 0.02	—
102	肉豆蔻酸异丙酯	110-27-0	2 039	MS,RI	0.11 ± 0.01	0.43 ± 0.03
吡嗪类						
103	吡嗪	290-37-9	1 162	MS,RI	1.44 ± 0.08	1.32 ± 0.11
104	2-甲基吡嗪	109-08-0	1 215	MS,RI,O	18.75 ± 1.86	21.84 ± 1.28
105	2,5-二甲基吡嗪	123-32-0	1 278	MS,RI,O	46.38 ± 1.88	40.49 ± 2.19
106	2,6-二甲基吡嗪	108-50-9	1 285	MS,RI,O	35.25 ± 2.72	41.24 ± 0.87
107	2,3-二甲基吡嗪	5910-89-4	1 306	MS,RI,O	3.89 ± 0.11	4.16 ± 0.25
108	6-甲基-2-乙基吡嗪	13925-03-6	1 353	MS,RI	22.98 ± 1.43	33.22 ± 2.91
109	5-甲基-2-乙基吡嗪	13360-64-0	1 360	MS,RI,O	19.41 ± 1.87	—
110	2,3,5-三甲基吡嗪	14667-55-1	1 379	MS,RI	24.34 ± 0.77	27.65 ± 2.53
111	2-丙基吡嗪	18138-03-9	1 387	MS,RI	5.11 ± 0.67	3.89 ± 0.24
112	3,5-二甲基-2-乙基吡嗪	13925-07-0	1 409	MS,RI,O	3.60 ± 0.32	—
113	2,5-甲基-3-乙基吡嗪	13360-65-1	1 423	MS,RI,O	17.33 ± 1.86	13.65 ± 0.33
114	2,3-二甲基-5-乙基吡嗪	15707-34-3	1 441	MS,RI	10.68 ± 0.14	9.51 ± 0.87
115	四甲基吡嗪	1124-11-4	1 462	MS,RI	4.4 ± 0.23	8.05 ± 0.77

续表 4

编号	物质名称	CAS	RI	鉴定方式 ^a	质量比/(ng·g ⁻¹)	
					牛骨素-热反应牛骨香精	酶解液-热反应牛骨香精
116	3-甲基-2-异丁基吡嗪	13925-06-9	1 474	MS,RI	0.86 ± 0.06	0.54 ± 0.02
117	5-甲基-2,3-二乙基吡嗪	18138-04-0	1 475	MS,RI,O	0.44 ± 0.03	—
118	2,3-二甲基-5-异丁基吡嗪	54410-83-2	1 525	MS,RI	—	0.22 ± 0.03
119	2-乙酰基吡嗪	22047-25-2	1 596	MS,RI,O	—	0.93 ± 0.07
120	3,5-二甲基-2-乙酰基吡嗪	54300-08-2	1 670	MS,RI	0.49 ± 0.04	1.06 ± 0.11
呋喃类						
121	2-甲基呋喃	534-22-5	888	MS,RI	0.68 ± 0.02	0.21 ± 0.01
122	2,5-二甲基呋喃	625-86-5	943	MS,RI	4.48 ± 0.29	1.68 ± 0.11
123	2-戊基呋喃	3777-69-3	1 201	MS,RI,O	10.37 ± 1.01	4.89 ± 0.37
124	2-丁基呋喃	4466-24-4	1 475	MS,RI,O	20.12 ± 1.73	24.09 ± 2.01
125	2-乙酰基呋喃	1192-62-7	1 498	MS,RI	143.73 ± 4.73	185.62 ± 10.29
126	5-甲基-2-乙酰基呋喃	1193-79-9	1 584	MS,RI	33.97 ± 1.49	23.31 ± 1.88
127	2-(呋喃-2-基甲基)呋喃	1197-40-6	1 598	MS,RI,O	26.77 ± 1.62	22.66 ± 2.23
128	2-丁酰呋喃	4208-57-5	1 629	MS,RI	11.51 ± 0.12	0.43 ± 0.03
129	2-己酰基呋喃	14360-50-0	1 771	MS,RI	4.07 ± 0.12	—
130	2-戊酰呋喃	3194-17-0	1 771	MS,RI	—	5.94 ± 0.44
噻唑类						
131	噻唑	288-47-1	1 193	MS,RI	0.52 ± 0.05	1.08 ± 0.11
132	4-甲基噻唑	693-95-8	1 223	MS,RI	3.58 ± 0.32	—
133	4,5-二甲基噻唑	3581-91-7	1 337	MS,RI,O	0.33 ± 0.02	—
134	4-甲基-5-乙基噻唑	31883-01-9	1 408	MS,RI	12.69 ± 0.71	8.4 ± 0.71
135	4-甲基-5-乙炔基噻唑	1759-28-0	1 493	MS,RI	2.23 ± 0.15	2.28 ± 0.21
136	4-甲基-5-羟乙基噻唑	137-00-8	2 273	MS,RI,O	678.43 ± 13.95	541.18 ± 53.61
噻吩类						
137	噻吩	110-02-1	1 001	MS,RI	2.87 ± 0.21	2.45 ± 0.23
138	2-甲基噻吩	554-14-3	1 095	MS,RI	10.54 ± 0.42	5.35 ± 0.33
139	2-乙酰基噻吩	88-15-3	1 744	MS,RI,O	2.65 ± 0.17	—
140	5-甲基-2-乙酰基噻吩	13679-74-8	1 898	MS,RI	0.52 ± 0.02	—
其它						
141	甲苯	108-88-3	1 028	MS,RI	2.5 ± 0.12	2.8 ± 0.19
142	(+)-柠檬烯	5989-27-5	1 171	MS,RI	14.65 ± 0.78	3.33 ± 0.22
143	苯乙烯	100-42-5	1 205	MS,RI,O	3.92 ± 0.37	3.79 ± 0.17
144	1,4-二异丙基苯	104-93-8	1 220	MS,RI	0.68 ± 0.05	—
145	4-异丙基甲苯	99-87-6	1 231	MS,RI	3.03 ± 0.08	1.69 ± 0.11
146	二甲醚	115-10-6	1 444	MS,RI,O	26.31 ± 2.17	—
147	吡咯	109-97-7	1 496	MS,RI	0.29 ± 0.02	0.26 ± 0.02
148	2-甲基-3,5-二乙基吡嗪	18138-05-1	1 502	MS,RI	1.03 ± 0.11	2.71 ± 0.27
149	β-石竹烯	87-44-5	1 603	MS,RI,O	52.79 ± 3.93	82.02 ± 1.03
150	草蒿脑	140-67-0	1 679	MS,RI,O	5.44 ± 0.43	—
151	萘	91-20-3	1 715	MS,RI,O	3.79 ± 0.32	2.15 ± 0.21
152	乙酰胺	60-35-5	1 731	MS,RI	4.07 ± 0.12	4.4 ± 0.36

续表 4

编号	物质名称	CAS	RI	鉴定方式 ^a	质量比/(ng·g ⁻¹)	
					牛骨素-热反应牛骨香精	酶解液-热反应牛骨香精
153	α-姜黄烯	644-30-4	1 759	MS, RI, O	0.73 ± 0.06	0.80 ± 0.07
154	茴香烯	4180-23-8	1 779	MS, RI	6.62 ± 0.57	—
155	1-(2-呋喃基甲基)-1H-吡咯	1438-94-4	1 791	MS, RI, O	26.93 ± 0.93	17.82 ± 1.06
156	乙基麦芽酚	4940-11-8	1 889	MS, RI	7.84 ± 0.55	—
157	2,6-二叔丁基对甲酚	128-37-0	1 923	MS, RI	1.35 ± 0.12	—
158	2-乙酰基吡咯	1072-83-9	1 943	MS, RI, O	192.89 ± 17.02	235.25 ± 21.82
159	甲基麦芽酚	118-71-8	1 944	MS, RI, O	21.1 ± 1.36	—
160	苯酚	108-95-2	1 963	MS, RI	6.44 ± 0.59	6.09 ± 0.61
161	4-乙基愈创木酚	2785-89-9	1 998	MS, RI, O	26.1 ± 1.96	10.70 ± 0.89
162	间甲酚	108-39-4	2 043	MS, RI	7.68 ± 0.68	2.36 ± 0.22
163	对甲酚	106-44-5	2 047	MS, RI	—	7.6 ± 0.04
164	香芹酚	499-75-2	2 173	MS, RI	6.43 ± 0.49	6.97 ± 0.61

“—”未检测到。

表 5 牛骨素和酶解液制备热反应牛骨香精中关键气味化合物的 OAV

Tab. 5 OAV of key odor compounds of thermal reaction bovine bone flavoring prepared by BBE and enzymatic hydrolysate

编号	物质名称	水中阈值/ (ng·g ⁻¹)	质量比/(ng·g ⁻¹)				OAV	香气
			牛骨素-热反应		酶解液-热反应			
			牛骨香精	牛骨香精	牛骨香精	牛骨香精		
1	2-甲基丁醛	1	219.85 ± 8.86	313.22 ± 10.65	219.85 ± 8.86	313.22 ± 10.65	可可、坚果	
2	辛醛	0.587	4.95 ± 0.38	1.79 ± 0.11	8.43 ± 0.65	3.05 ± 0.19	橘皮、清新	
3	(E,E)-2,4-癸二烯醛	0.077	—	0.54 ± 0.02	—	7.01 ± 0.26	油味、脂肪	
4	壬醛	1.1	28.19 ± 2.52	16.52 ± 6.10	25.63 ± 2.29	15.02 ± 5.55	玫瑰	
5	十二醛	0.13	0.67 ± 0.04	—	5.15 ± 0.31	—	柑橘	
6	苯乙醛	6.5	30.87 ± 2.76	16.04 ± 1.69	4.90 ± 0.44	2.55 ± 0.27	蜂蜜、可可	
7	2,3-丁二酮	0.059	1.17 ± 0.11	1.51 ± 0.09	19.83 ± 1.86	25.59 ± 1.53	黄油	
8	4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃酮	22.3	22.39 ± 1.65	13.87 ± 1.23	1.00 ± 0.07	0.62 ± 0.06	焦糖	
9	芳樟醇	0.22	3.47 ± 0.43	3.71 ± 0.22	15.77 ± 1.95	16.86 ± 1.00	柑橘、花香	
10	2-甲基-3-呋喃硫醇	0.007	—	0.52 ± 0.04	—	74.29 ± 5.71	硫磺味	
11	糠硫醇	0.08	1.69 ± 0.13	1.44 ± 0.09	21.13 ± 1.63	18.00 ± 1.13	硫磺味、烟熏	
12	甲基糠基二硫醚	0.04	—	6.49 ± 0.57	—	162.25 ± 14.25	硫磺味、咖啡味	
13	双(2-甲基-3-呋喃基)二硫醚	0.000 76	9.94 ± 0.36	6.12 ± 0.33	13 078.95 ± 473.68	8 052.63 ± 434.21	葱味、硫磺味	
14	己酸甲硫醇酯	0.3	—	0.70 ± 0.04	—	2.33 ± 0.13	水果味	
15	3-巯基己基乙酸酯	0.02	12.32 ± 1.16	—	616 ± 58	—	果味	
16	5-甲基-2-乙基吡嗪	16	19.41 ± 1.87	—	1.21 ± 0.12	—	坚果	
17	3,5-二甲基-2-乙基吡嗪	0.04	3.60 ± 0.32	—	90 ± 8	—	烤坚果、咖啡	
18	2,5-甲基-3-乙基吡嗪	8.6	17.33 ± 1.86	13.65 ± 0.33	2.02 ± 0.22	1.59 ± 0.04	烤坚果	
19	2-戊基呋喃	5.8	10.37 ± 1.01	4.89 ± 0.37	1.79 ± 0.17	—	水果、蔬菜味	
20	2-丁基呋喃	5	20.12 ± 1.73	24.09 ± 2.01	4.02 ± 0.35	4.82 ± 0.40	葡萄酒	
21	苯乙烯	3.6	3.92 ± 0.37	3.79 ± 0.17	1.09 ± 0.10	1.05 ± 0.05	塑料	
22	β-石竹烯	64	52.79 ± 3.93	82.02 ± 1.03	—	1.28 ± 0.02	香料	

“—”表示未检测到或 OAV 小于 1。

3 结 论

本研究通过单因素和响应面试验优化热反应牛骨香精的酶解工艺,较佳酶解条件为酶解温度 50 ℃、时间 4 h、复合酶加酶量 1 250 U/g、复合风味蛋白酶与复合蛋白酶的加酶比例为 1:1。利用高效液相色谱分析牛骨素、酶解液和热反应牛骨香精中的游离氨基酸,发现酶解液中释放出大量的呈味氨基酸,酶解液中谷氨酸、甘氨酸、精氨酸和丙氨酸的 TAV 大于 1,鲜味和甜味突出;热反应牛骨香精中的所有苦味氨基酸质量比减少,使热反应牛骨香精的滋味得到改善。通过电子鼻和电子舌分析牛骨素、酶解液的气味和滋味轮廓,发现酶解液中氮氧化物的气味特征增强,且酶解液中的鲜味、浓厚味、咸味响应值更高。利用 GC×GC-O-MS 测定牛骨素、酶解液所制备热反应牛骨香精中的挥发性气味化合物,共鉴定出 164 种挥发性化合物,牛骨素制备的热反应牛骨香精有 145 种挥发性气味化合物, OAV > 1 的关键气味化合物有 17 种,主要贡献烤香味、果味和甜香味;酶解液制备的热反应牛骨香精中共鉴定出 129 种挥发性化合物,有 17 种关键气味化合物,但脂肪味、肉香味和葱香味更明显,与牛骨素制备的热反应牛骨香精中的关键气味化合物相比,酶解液制备的热反应牛骨香精中新产生了 (*E,E*)-2,4-癸二烯醛、2-甲基-3-呋喃硫醇、甲基糠基二硫醚己酸甲硫醇酯和 β -石竹烯 5 种关键气味化合物。后续将进一步研究酶解液中的其它呈味物质,分离鉴定其滋味肽,探索风味的形成机制,为牛骨素在呈味调味料中的开发提供参考。

参考文献:

- [1] ZHUANG M Z, LIN L Z, ZHAO M M, et al. Sequence, taste and umami-enhancing effect of the peptides separated from soy sauce[J]. *Food Chemistry*, 2016, 206: 174 - 181.
- [2] YU M, HE S D, TANG M M, et al. Antioxidant activity and sensory characteristics of Maillard reaction products derived from different peptide fractions of soybean meal hydrolysate[J]. *Food Chemistry*, 2018, 243: 249 - 257.
- [3] DAO D, HIEN L T M, THINH N P, et al. Recovery of amino acids and peptides from pig bone soup using thermal pre-treatment and enzymatic hydrolysis[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2022, 46 (7): e16700.
- [4] 郝志林, 梁莉, 刘贺, 等. 热预处理对鸡胸肉和鸡骨泥滋味物质的影响[J]. *食品科学技术学报*, 2022, 40(4): 107 - 115.
- HAO Z L, LIANG L, LIU H, et al. Effect of thermal pretreatment on taste components of chicken breast meat and chicken bone paste[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2022, 40(4): 107 - 115.
- [5] SHEN D Y, ALIM A, RAZA A, et al. The dual functions of flavor and antioxidant potential of porcine bone marrow extract (PBME) [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56(7): 3239 - 3253.
- [6] WANG W L, ZHANG L, WANG Z Q, et al. Physicochemical and sensory variables of Maillard reaction products obtained from *Takifugu obscurus* muscle hydrolysates [J]. *Food Chemistry*, 2019, 290: 40 - 46.
- [7] YOU M C, YANG P, SONG H L, et al. Effects of three types of bone marrow extracts treated with different treatment methods on the taste of chicken soup[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 57(2): 638 - 649.
- [8] CHIANG J H, LOVEDAY S M, HARDACRE A K, et al. Effects of enzymatic hydrolysis treatments on the physicochemical properties of beef bone extract using endo- and exoproteases [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2019, 54(1): 111 - 120.
- [9] ZHENG Z L, ZHANG M, FAN H Z, et al. Effect of microwave combined with ultrasonic pretreatment on flavor and antioxidant activity of hydrolysates based on enzymatic hydrolysis of bovine bone[J]. *Food Bioscience*, 2021, 44: 101399.
- [10] DONG X B, LI X, ZHANG C H, et al. Development of a novel method for hot-pressure extraction of protein from chicken bone and the effect of enzymatic hydrolysis on the extracts [J]. *Food Chemistry*, 2014, 157: 339 - 346.
- [11] XU X R, YOU M C, SONG H L, et al. Investigation of umami and kokumi taste-active components in bovine bone marrow extract produced during enzymatic hydrolysis and Maillard reaction [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 53 (11): 2465 - 2481.
- [12] XU X R, ZHENG Y Y, SONG H L, et al. The effects of enzymatic hydrolysis degree of bovine bone marrow extract on flavor generation via the Maillard reaction [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2019, 13(1): 521 - 535.
- [13] ZHANG Y Y, ZHANG Y, SONG H L, et al. The fishy

- off-odor removal and umami enhancing effect of enzymatic hydrolysis of fish by-products by proteases[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2023, 32(2): 218–234.
- [14] 汤龙, 宋焕禄, 王丽金. 不同分子质量大豆蛋白和鸡肉酶解物的美拉德反应产物风味特征分析[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(3): 1–15.
TANG L, SONG H L, WANG L J. Flavor characterizations of Maillard reaction products of enzymatical hydrolysates of soybean and chicken with different molecular weights[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(2): 1–15.
- [15] ZHOU F, WANG X C. Effect of heat extraction on water-soluble taste substances in processing products of chilled large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(12): 3863–3872.
- [16] GAO L H, LIU T, AN X J, et al. Analysis of volatile flavor compounds influencing Chinese-type soy sauces using GC–MS combined with HS–SPME and discrimination with electronic nose[J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 54(1): 130–143.
- [17] ZHU W H, ZHU L W, YANG W L, et al. Optimization of the enzymatic hydrolysis assisted by ultra-high pressure processing of Alaska pollock frame for improving flavour[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2020, 29(6): 567–576.
- [18] WANG H L, YANG P, LIU C, et al. Characterization of key odor-active compounds in thermal reaction beef flavoring by SGC × GC–O–MS, AEDA, DHDA, OAV and quantitative measurements [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 114: 104805.
- [19] LIU C, YANG P, WANG H L, et al. Identification of odor compounds and odor-active compounds of yogurt using DHS, SPME, SAFE, and SBSE/GC–O–MS[J]. LWT, 2022, 154: 112689.
- [20] WANG Y Y, TANG X H, LUAN J J, et al. Effects of ultrasound pretreatment at different Powers on flavor characteristics of enzymatic hydrolysates of cod (*Gadus macrocephalus*) head[J]. Food Research International, 2022, 159: 111612.
- [21] YANG J H, LIN H C, MAU J L. Non-volatile taste components of several commercial mushrooms[J]. Food Chemistry, 2001, 72(4): 465–471.
- [22] KAWAI M, OKIYAMA A, UEDA Y. Taste enhancements between various amino acids and IMP[J]. Chemical Senses, 2002, 27(8): 739–745.
- [23] KONG Y, YANG X, DING Q, et al. Comparison of non-volatile umami components in chicken soup and chicken enzymatic hydrolysate[J]. Food Research International, 2017, 102: 559–566.
- [24] CHEN D W, ZHANG M. Non-volatile taste active compounds in the meat of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Food Chemistry, 2007, 104(3): 1200–1205.
- [25] MAEHASHI K, MATSUZAKI M, YAMAMOTO Y, et al. Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysate of food proteins and characterization of their taste properties [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1999, 63(3): 555–559.
- [26] 李娇, 周志帅, 申光辉. 美拉德反应改善熟化马铃薯冻融酶解汁液风味[J]. 中国食品学报, 2022, 22(11): 190–203.
LI J, ZHOU Z S, SHEN G H. Maillard reaction improves the flavor of frozen-thawed enzymatic juice derived from cooked potato[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(11): 190–203.
- [27] 汪少芸, 黄心澄, 高婷婷, 等. 咸味感知与咸味肽的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(1): 1–13.
WANG S Y, HUANG X C, GAO T T, et al. Progress in research on saltiness perception and salty peptides [J]. Food Science, 2023, 44(1): 1–13.
- [28] 刘洪波, 姜涛, 骆仁军, 等. 味觉分析系统对不同产地中华绒螯蟹滋味强度值的区分[J]. 食品科学, 2020, 41(16): 132–137.
LIU H B, JIANG T, LUO R J, et al. Evaluation of the taste-active values of Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) from different geographic origins using a taste sensing system [J]. Food Science, 2020, 41(16): 132–137.
- [29] 李泽林, 王秋婷, 郭其洪, 等. 鸡骨液酶解工艺优化及其酶解前后风味物质分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(10): 206–215.
LI Z L, WANG Q T, GUO Q H, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process of chicken bone homogenate and its flavor components analysis before and after enzymatic hydrolysis [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(10): 206–215.
- [30] TANAKA T, YAMAUCHI T, KATSUMATA R, et al. Comparison of volatile components in commercial itohikinnatto by solid-phase microextraction and gas chromatography [J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 2003, 50(6): 278–285.

Optimization of Enzymatic Hydrolysis Process of Thermal Reaction Bovine Bone Flavoring and Identification of Key Odor Compounds

WANG Haili¹, GUAN Xin¹, TANG Yuan¹, SONG Huanlu^{1,*}, PAN Wenqing²,
GONG Lin², CHEN Wanying²

(1. School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;
2. Hunan Province Jiapinjiawei Biotechnology Co Ltd, Changsha 410100, China)

Abstract: In order to study the optimal enzymatic hydrolysis process for preparing thermal reaction bovine bone flavoring, bovine bone extract (BBE) was used as raw material, and compound enzyme was selected. The effects of enzymatic hydrolysis temperature, enzymatic hydrolysis time, compound enzyme addition amount and compound enzyme addition ratio on the degree of hydrolysis of enzymatic hydrolysate and the sensory score of thermal reaction bovine bone flavoring prepared by Maillard reaction of enzymatic hydrolysate with sugar, amino acid and other raw materials were investigated by single factor and response surface test. The mass ratio of free amino acid was determined by high performance liquid chromatography (HPLC), and the mass ratio of key odor compounds of thermal reaction bovine bone flavoring prepared before and after enzymatic hydrolysis of BBE was analyzed by comprehensive two-dimensional gas chromatography-olfactometry-mass spectrometry (GC × GC-O-MS). The results showed that the better enzymatic hydrolysis process of BBE was enzymatic hydrolysis temperature of 50 °C, enzymatic hydrolysis time of 4 h, enzyme addition amount of 1 250 U/g, and the ratio of compound flavor protease to compound protease was 1:1. Under this condition, the sensory score was 8.24. Compared with BBE, the mass ratio of 15 free amino acids in the enzymatic hydrolysate increased significantly. The odor profile and taste profile of BBE and enzymatic hydrolysate were measured by electronic nose and electronic tongue. It was found that the nitrogen oxide odor characteristics of enzymatic hydrolysate were enhanced, and the umami, richness and salty taste characteristics of enzymatic hydrolysate were more obvious. The key odor compounds of thermal reaction bovine bone flavoring prepared by BBE and enzymatic hydrolysate were analyzed by solid phase microextraction (SPME) combined with GC × GC-O-MS. A total of 164 volatile odor compounds were identified, including 27 aldehydes, 30 ketones, 12 alcohols, 16 acids, 7 sulfur-containing compounds, 10 esters, 18 pyrazines, 10 furans, 6 thiazoles, 4 thiophenes and 24 other compounds. Through gas chromatography-olfactometry (GC-O) analysis, 74 odor-active compounds were detected. There were 22 key odor compounds with odor activity value (OAV) greater than 1. The most important key odor compounds in the thermal reaction bovine bone flavoring prepared by BBE and enzymatic hydrolysate both were bis (2-methyl-3-furyl) disulfide (OAV was 13 078 and 8 052, respectively). Compared with the thermal reaction bovine bone flavoring prepared by BBE, 5 new key odor compounds (*E, E*)-2, 4-decadienal, 2-methyl-3-furanthiol, methyl furfuryl disulfide, *S*-methyl thiohexanoate and β -caryophyllene appeared in the thermal reaction bovine bone flavoring prepared by enzymatic hydrolysate. The purpose of this study was to provide a theoretical basis for the enzymatic hydrolysis process in the industrial production of thermal reaction bovine bone flavoring.

Keywords: enzymatic hydrolysis process; thermal reaction bovine bone flavoring; odor-active compounds; key odor compounds; GC × GC-O-MS