

滋味稀释分析及其在食品滋味活性成分分析中的应用

王春叶, 童华荣

(西南大学食品科学学院, 重庆北碚, 400716)

摘要 滋味稀释分析方法是近几年来发展起来的一种新技术,它是将高效液相色谱法等分离分析方法与感官分析技术相结合分析食品中一些非挥发性滋味活性成分的一种有效方法,目前已经用这种方法成功的检测出一些以前未知的滋味活性物质。比较滋味稀释分析方法是在滋味分析方法的基础上发展而来的,是食品滋味增强剂或者抑制剂的一种重要检测方法,目前已采用这种方法检测出一种耐味增强剂。

关键词 滋味稀释分析方法, 食品滋味活性成分, 应用

食品风味包括香味和滋味,闻到香味是由人的鼻子感觉到的一些挥发性香气活性物质所致;尝到滋味则是由人的舌头感觉到的一些非挥发性滋味活性物质所致。对于消费者对食品的可接受性来讲,二者是同样重要的。目前,关于食品风味活性物质的检测方法主要是现代分析技术和感官分析技术。现代分析技术的发展(例如色谱技术与质谱技术的应用)为风味化学的深入研究提供了极大的便利,但是无论是用定性或定量的方法,都很难准确地测定和描述食品风味,因为风味是某种或某些化合物作用于人的感觉器官的生理结果。食品风味的可接受性和人们对它的喜好程度只能通过感官品评来认定或判断,人的感官对某些风味的感觉的灵敏度超过现代最灵敏的分析仪器。感官品评和仪器分析各具特点不可相互取代,因此能够把感官分析的结果与仪器分析的数据联系起来,探索二者的相关性,是目前风味分析研究的热点之一。近几十年中,在食品中重要挥发性成分的分析方法中也有了一些新的方法,常用的有嗅闻法(GC-O技术)、风味强度法、主成分分析法、ADEA法(芳香萃取物稀释分析法)以及人工嗅觉系统等^[1]。

其中,GC-O(GC-olfactometry)是近几十年来国外发展的一种从复杂的挥发性物质中筛选出香味活性组分非常有效的方法,这种技术将气相色谱(GC)与嗅闻仪(olfactometry)相结合,通过评香人员的嗅闻实验来鉴定挥发性化合物的气味特征,为了进一步了解每种气味化合物对整体香味的重要性,Grosch^[2]等人发明了一种芳香萃取物稀释分析的方法(AEDA: aroma extract dilution analysis)以鉴定一些对整体香味有重要贡献的关键芳香化合物。

2001年,Hofmann等人建立了主要针对非挥发性滋味化合物的检测方法——滋味稀释分析方法,是检测食品中关键滋味活性物质的一种重要的方法,将仪器分析技术与感官分析方法有效的结合起来,对食品中的滋味活性物质进行定性定量分析。

1 滋味稀释分析方法

1.1 滋味稀释分析(TDA)

滋味稀释分析(Taste Dilution Analysis, TDA)是Hofmann等人于2001年在测定美拉德反应产物以前未知的苦味活性物质时建立的一种方法。TDA方法是把人的舌头作为一个生物感应器,检测食品中存在的某种滋味化合物的阈值,然后通过计算它们的滋味活性值(TAV)来评价其贡献。它可以筛选出食物中的主要滋味活性物质,根据其对于某种滋味影响的大小来为之排序,找出对滋味影响最大的那种化合物,然后运用仪器分析技术来确定这种活性物质的结构和性质。用这种方法可以拓宽滋味化合物的现有知识,并且可以更有效的控制食物中已知或未知的浓度。目前已经成功地采用这种方法将美拉德反应中一些以前未知的滋味活性物质识别出来,例如具有浓烈苦味的quinizolate和homoquinizolate(尚无中文名称),具有辛辣口感的吡喃酮类化合物,具有清凉口感的环戊烯酮衍生物,此外还有一些以前未知的涩味、鲜味物质^[3]。

综合Hofmann等人的研究,TDA分析通常包括以下几个步骤:

(1) 通过活性向导检测技术(即为TDA技术)确定具有浓烈滋味的化合物。

① 滋味混合物:对食品或反应产物进行萃取、浓缩、脱溶剂、冷冻干燥,得到滋味混合物。

② 滋味混合物的分离、部分纯化:采用超滤、高

第一作者:硕士研究生(童华荣为通讯作者)。

收稿日期:2007-06-26, 改回日期:2007-11-12

效液相色谱法(HPLC)或者凝胶渗透色谱法(GPC)等分离纯化方法对混合物进行分离、部分纯化,分别收集,然后脱溶剂,冷冻干燥。

(2) 筛选滋味活性化合物。

培训评员^[4]:配置以下标准溶液要求评员在专门的感官评定室对其进行鉴别,室温 22~25℃。

甜味:蔗糖溶液(50 mmol/L),L-丙氨酸(15 mmol/L);酸味:乳酸(20 mmol/L);咸味:NaCl 溶液(12 mmol/L);苦味:咖啡因(1 mmol/L),盐酸奎宁(0.05 mmol/L);鲜味:谷氨酸钠(8 mmol/L, Ph5.7);涩味:丹宁酸(0.05%)。

滋味稀释因子(TD 值)的测定:将部分纯化的各个分部的冷冻干燥物准确溶于 1 mL 水中,然后进行 1:1(体积比)的逐步稀释,各个分部的逐步稀释的溶液按照浓度增加的顺序呈给经过训练的评员,每个稀释水平溶液采用 3 点测定进行评定。当某个稀释水平的溶液与 2 个空白(自来水)之间的滋味差异刚好能被识别出来,那么称这个稀释倍数或者稀释水平为稀释值(TD 值),每个评定组的 TD 值采用各个评员评定结果的平均值,各评员之间的评定结果的差异和不同评定小组之间的结果差异 ≤ 1 个稀释水平。

比较各个分部的 TD 值,找出 TD 值比较高的那几个分部。这个分部有可能是一种化合物也可能是几种化合物的混合物。如果是一种化合物,我们可以对它进行下一步的研究。如果是混合物,那么要继续采用 HPLC 或 GPC 分离方法对它进行纯化分离,进行 TD 值的测定,最后筛选出 TD 值比较高的化合物,即滋味活性化合物。

定性定量分析:采用 HPLC、液-质联用(LC-MS)、紫外-可见光谱(UV-Vis)、核磁共振(NMR)等技术对活性组分进行定性定量分析,确定这些化合物的结构和含量。

(3) 滋味贡献率

滋味贡献率反应了某种滋味化合物对整个食品滋味的影响。

$$\text{贡献率}/\% = (\text{TAV}/\text{总 TD 稀释值}) \times 100$$

滋味活性值(TAV):某种滋味化合物本身的浓度与通过感官方法检测出来的味觉阈值之间的比值。

$$\text{TAV} = C_1/C_2$$

其中, C_1 为滋味化合物的浓度; C_2 为滋味阈值浓度。

总 TD 稀释值的测定:将混合物溶解于 1 mL 水中,按 1:1(体积比)将其稀释,每个稀释水平溶液采

用 3 点测定进行评定,当某个稀释水平的溶液与 2 个空白(自来水)之间的滋味差异刚好能被识别出来,那么称这个稀释倍数为总 TD 稀释值。

1.2 比较滋味稀释分析(cTDA)

比较滋味稀释分析(Comparative Taste Dilution Analysis, cTDA),是 Ottinger 等于 2003 年在研究美拉德反应中甜味增强剂时建立的方法。它是一种重要的分析滋味增强剂的方法,是在 TDA 的基础上发展起来的,在实验过程中 2 者有一些差别。

(1) 通过活性向导检测技术(即为 TDA 技术)确定具有浓烈滋味的化合物。

滋味混合物的提取、分离以及纯化与前面所讲的方法相同。

(2) 筛选具有滋味增强效果的化合物。

评员培训:同上。

TD 值的测定:将部分纯化的冷冻干燥物分为 2 个相同的部分,即部分 A 和 B。A 份 TD 值的确定与上文介绍的 TD 值确定方法相同。B 份则将各个分部溶解于某种低浓度的呈味化合物溶液中,假如我们要测定它对甜味是否具有增强作用,那么就选用低浓度的蔗糖溶液,与上述方法相同通过 3 点测定来评定 TD 值,但是这组空白对照溶液为与上述浓度相同的蔗糖溶液,得出各个分部的 TD 值。

比较 A 份和 B 份中各个分部的 TD 值,找出在 A 份中甜味的 TD 值很小同时在 B 份甜味的 TD 值最大的那个分部。如果是一种化合物则对其结构进行进一步分析;如果是混合物则应该进一步分离纯化。

结构分析:主要运用高效液相色谱法、液相色谱/质谱联用仪、紫外-可见光光度分析法、核磁共振分析仪等分析方法对它的结构进行分析。

(3) 对滋味增强剂进行定量分析。

滋味增强系数的测定:假设我们要检测某种滋味增效剂对甜味的增强系数。首先配制葡萄糖和滋味增强剂的混合溶液,然后进行 1:1(体积比)的逐步稀释;再配制只含有葡萄糖的标准溶液。要求评员选出与标准葡萄糖溶液有相同的甜味强度的那个混合液稀释水平,然后计算滋味增强系数: $f = C_1/C_2$ 。

其中, C_1 为标准葡萄糖溶液的浓度; C_2 为混合溶液的葡萄糖浓度。

2 滋味稀释分析技术的应用

2.1 TDA 技术的应用

2.1.1 检测苦味物质中的应用

(1) Cliver Frank 等人采用了 TDA 方法检测美拉德反应中产生的主要苦味物质。

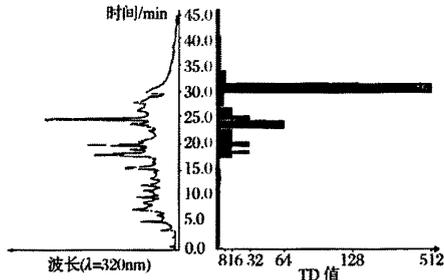


图1 左边为萃取物经 RP-HPLC 分离的各个分部；
右边为各个分部的 TD 值^[4]

混合物经过预处理后,进行反向液相色谱法分离并测定各分部 TD 值。在分离的 21 个分部中,将这些分离的组分逐步用水以体积比 1:1、1:2、1:4、1:8 一直到 1:512 的比例稀释,稀释倍数即为 TD 值。其中 2 个组分呈现甜味,4 个组分呈现涩味,14 个组分呈现苦味,如图 1 所示,no. 19 的苦味 TD 值最高达 512,因此 no. 19 分部对整个美拉德反应的苦味影响最大。经过结构分析表明这种化合物可能有 2 种结构,分别被称为 quinizolate,和 homoquinizolate,这 2 种物质是首次在美拉德反应产物中分离出来的,它们的苦味阈值分别为 0.25 和 1.0 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 水中,对整个反应产物的苦味贡献率为 73.0%。其中 quinezolate 的阈值比目前报道的美拉德反应中最苦的双(吡咯烷)己糖还原原酮的阈值低 240 倍,比苦味标准物咖啡因和盐酸奎宁的阈值分别低 2000 和 28 倍,比目前最苦的化合物苯甲酸酯仅仅高 10 倍^[4,5]。

(2) 2003 年,Czepa 等人运用 TDA 方法分析引起胡萝卜、胡萝卜汤和胡萝卜汁中的后苦味的苦味活性物质,并找出它们的剂量/活性关系。在胡萝卜和胡萝卜汤中检测出来 6 种苦味活性物质,即 6-methoxymellein (6-甲氧基蜂蜜曲菌素),eugenin (番櫻桃素),gazarin (2,4,5-三甲氧基苯甲醛),falcarindiol (镰叶芹二醇),falcarinol (镰叶芹醇),和 falcarindiol 3-acetate (镰叶芹二醇醋酸盐)。其中,eugenin 和 gazarin 在胡萝卜中的含量比较低($<0.1 \text{ mg}/\text{kg}$)而且其阈值比较高,因此不是影响后苦味的主要活性物质。通过计算 6-methoxymellein 的滋味活性值(TAV)发现,不管是在新鲜的或者是储藏过的胡萝卜中还是在胡萝卜汤中,它都对后苦味的影响都比较小。而相比较而言,falcarindiol 的被检出浓度为

0.04 mmol/kg ,而且在储藏过的胡萝卜和胡萝卜汤中其浓度分别为它检出浓度的 9 倍和 13 倍,因此认为 falcarindiol 对胡萝卜产品的后苦味有着很大的贡献^[6]。由于在以前的研究中,一直认为 6-methoxymellein 是影响胡萝卜后苦味的关键物质,为了进一步验证实验结果,2004 年 Czepa 等人又分别做了这几种化合物的定量分析实验,结果表明 falcarindiol 与胡萝卜,胡萝卜汤以及胡萝卜汁中的苦味有很大的相关性^[7]。

2.1.2 涩味物质的检测中的应用

Scharbert 等人在研究红茶中涩味活性物质时,采用这种方法研究红茶茶汤中一些未知的化合物对茶汤涩味的贡献。将红茶进行预处理后,超滤膜超滤,将茶汤分成 3 个分部:高于 10 ku(I)、1 ku~10 ku 之间(II)、低于 1 ku(III),运用 TDA 方法测定各分部的稀释值。第 I 分部几乎无味,仅表现出很弱的涩味感,其 TD 值仅为 16。低分子量的分部 III 有典型的红茶滋味,其涩味的 TD 值为 1024,苦味和酸味的 TD 值很低。第 II 分部也有涩味,但比第 III 分部低 4 倍。将 3 个分部 I、II、III 重组,其涩味 TD 值为 2048,与原茶汤的 TD 值接近。而将分部 I 除去后,其 TD 值与 3 个分部全重组的一样,表明高分子量的多酚对红茶茶汤典型滋味没有影响。对第 III 分部采用 RP-HPLC 进行分离得到 43 个组分,然后进行稀释分析得到涩味 TD 值。第 33 和 34 组分的 TD 值最高达到 8192,然后是组分 30~32 和 23,TD 值为 1024、4096,其他各组分的 TD 值低(<128)。运用仪器分析方法对组分 23、30~34 作进一步的分析鉴定,这些组分中的化合物是 1 个黄酮苷和 13 个黄酮醇苷,由此认为黄酮苷和黄酮醇苷是红茶涩味的主要主体^[8]。

2.1.3 检测清凉感活性物质中的应用

Ottinger 在检测黑麦芽中有葡萄糖和 L-脯氨酸产生的具有清凉口感的化合物的实验中,采用 TDA 技术来识别对这种滋味具有最大影响的化合物。将原料葡萄糖和 L-脯氨酸混合物进行处理,结果表明对清凉口感影响最大的 3 种化合物为 3-甲基-2-(1-吡咯烷基)-2-烯-1-酮(称为 3-MPC),5-甲基-2-(1-吡咯烷基)-2-环戊-1-酮(称为 5-MPC)和 2,5-二甲基-4-(1-吡咯烷基)-3(2H)-咪唑酮(称为 DMPF),其阈值分别为 9.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,101.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 11.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[9],尽管这些化合物在以前相关的美拉德反应中报道过,但是这是第一次通过评员品尝和仪器分析方法相

结合在美拉德反应种检测出来的几种清凉感化合物。随后, Hofmann 等人在检测麦芽啤酒中的清凉感化合物的实验中采用 TDA 方法, 检出 3-MPC, 5-MPC 和 DMPF 是对黑烤啤酒麦芽中的清凉感贡献最大的物质^[10]。

2.1.4 检测其他滋味物质中的应用

目前, 采用 TDA 检测方法检测在羊肚菌蘑菇中能引起鲜味和口干感的滋味活性成分。研究发现, 在蘑菇中除了已经知道的谷氨酸、天冬氨酸和琥珀酸几种鲜味物质以外, 还由 HPLC 检测发现了另外 1 种能引起鲜味的物质即 S-苹果酸-1-O-D-吡喃葡萄糖苷, 被称为(S)-morelid。研究表明这种物质是以前从未报道过的, 对其水溶液进行感官分析, 其干燥口感的阈值为 0.02 mmol/L; 鲜味阈值为 6.0 mmol/L; 另外, 还有轻微的酸味^[11]。

2.2 cTDA 在一些滋味增效剂和滋味抑制剂的检测中的应用

(1) Harald Ottinger 等人研究美拉德反应中甜味增效剂时最先采用了这种方法。

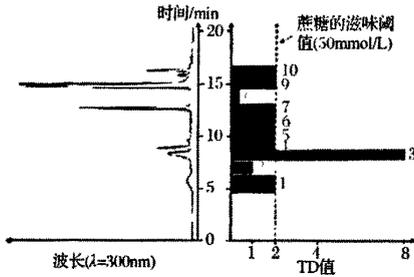


图2 左边为萃取物经 RP-HPLC 分离得到的各个分部; 右边为各个分部的 TD 值^[17]

如图所示, 左边为经反向液相色谱法分离的组分, 右边为 B 组的 TD 值结果。结果表明: A 组不呈现任何甜味, 而 B 组则呈现出一系列变化的 TD 值, 其中最高的为分部 3, TD 值为 8。其他分部的 TD 值均 ≤ 2 , 由于 B 组的各个分部都溶解在低浓度的蔗糖溶液中, 因此这些 TD 值均为蔗糖溶液本身的甜味所致, 说明这些分部对甜味没有增强作用。因此分部 3 被确定为甜味增强剂, 称为 alapyridaine。这种化合物是文献报道中的第 1 种美拉德反应非挥发性甜味增强剂。研究表明, alapyridaine 的甜味增强系数与蔗糖浓度和 alapyridaine 本身的浓度都有很大关系。当低浓度蔗糖溶液中含有 125 mmol/L 的 alapyridaine 时, 其甜味增强系数为 8; 将混合溶液中 alapyridaine 溶液的浓度减少为 50 mmol/L 时, 其甜味增强

系数减小为 4。而且在高浓度的蔗糖溶液中, 例如浓度为 267 mmol/kg 水的蔗糖溶液, 加入 alapyridaine 时其溶液的甜味增强系数 ≤ 5 ^[12]。接着, 这位科学家又运用 cTDA 方法在牛肉汤中首次分离出来 alapyridaine, 证明它对牛肉汤整个的滋味都有很大的影响, 尤其是甜味和鲜味^[13]。

(2) Soldo 等人采用 HPLC 和 cTDA 方法成功的识别出来 1-羧甲基-5-羟基-2-羟甲基吡啶内盐是一种苦味抑制剂的主要成分。这种物质本身没有任何滋味, 但是可以降低各种苦味物质的苦味, 例如有苯丙氨酸, 咖啡碱, 以及水杨素和柚皮甙等^[14]。

3 展望

通过上述介绍可得, 滋味稀释分析方法是测定食品中活性滋味化合物的一种重要的方法, 尤其是可以测定一些滋味增强剂。这些滋味增强剂本身没有滋味但是可以增强某种滋味, 这种物质在将来很有可能使烹调中不可缺少的调料成分, 例如, 毫无滋味的 alapyridaine 呈现出增强甜味的性质, 未来它有可能被开发为低能量, 低糖食品的重要组成成分。

但是这种方法也有它本身的缺点, (1)它是建立在简单的假设滋味强度是浓度的线性函数的基础上的, 也就是说它提供的是在没有食品介质和不考虑风味化合物相互影响的情况下的信息, 而这些被忽略的因素很可能会影响到整个食品的滋味。(2)在整个评定过程中人的主观因素影响比较大, 每个人的味觉灵敏度在长时间甚至是同一天的不同时段都存在差异, 而且对于这种稀释分析的影响甚大。希望在以后的研究应用过程中加强对评员进行专业的培训, 尽量减少人为的误差。

参 考 文 献

- 1 郭 凯, 芮汉明. 食品中挥发性风味成分的分离、分析技术和评价方法研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(4): 110~115
- 2 Grosch W. Detection of potent odorants in food by aroma extract dilution analysis [J]. Trends Food Sci Technol, 1993, 4: 68~73
- 3 Hofmann T. Taste-Active Maillard Reaction Products: The Tasty World of Nonvolatile Maillard Reaction Products[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005, 1 043(6): 20~29
- 4 Frank O, Ottinger H, Hofmann T. Characterization of an intense bitter-tasting 1H, 4H-Quinolizinium-7-olate by application of taste dilution analysis, a novel bioassay for the

- screening and identification of taste-active compounds in foods [J]. *Agric Food Chem*, 2001, 49(1):231~238
- 5 Hofmann T, Ottinger H, Frank O. The taste activity concept; a powerful tool to trace the key tastants in foods. In *Challenges in taste chemistry and biology* [C]. ACS Symposium Series 867, American Chemical Society, Washington D C 2004, 104~124
 - 6 Czepa A, Hofmann T. Structural and sensory characterization of compounds contributing to the bitter off-taste of carrots (*Daucus carota* L.) and carrot puree [J]. *Agric Food Chem*, 2003, 51(13):3865~3873
 - 7 Czepa A, Hofmann T. Quantitative Studies and Sensory Analyses on the Influence of Cultivar, Spatial Tissue Distribution, and Industrial Processing on the Bitter Off-Taste of Carrots (*Daucus carota* L.) and Carrot Products [J]. *Agric Food Chem*, 2004, 52(14): 4508~4514
 - 8 童华荣,金孝芳,龚雪莲. 茶多酚感官性质及其对茶叶涩味的影响[J]. *茶叶科学*, 2006, 26(2):79~86
 - 9 Ottinger H, Bareth A, Hofmann T. Characterization of natural "cooling" compounds formed from glucose and L-proline in dark malt by application of taste dilution analysis. [J]. *Agric Food Chem*, 2001, 49(3):1336~1344
 - 10 Hofmann T, Bareth A, Ottinger H. Activity-Guided Screening and Identification of Natural "Cooling" Compounds Formed from Carbohydrates and L-proline in Beer Malt[J]. ACS Symposium Series 871 [C]. Washington DC 2004, 338~352
 - 11 Rotzoll N, Dunkel A, Hofmann T. Activity-Guided Identification of (S)-Malic Acid 1-O-D-Glucopyranoside (Morelid) and γ -Aminobutyric Acid as Contributors to Umami Taste and Mouth-Drying Oral Sensation of Morel Mushrooms (*Morchella deliciosa* Fr.) [J]. *Agric Food Chem*, 2005, 53 (10):4149~4156
 - 12 Ottinger H, Soldo T, Hofmann T. Discovery and structure determination of a novel Maillard-Derived sweetness enhancer by application of the comparative taste dilution analysis [J]. *Agric Food Chem*, 2003. 51(4):1035~1041
 - 13 Ottinger H, Hofmann T. Identification of the taste enhancer aiapyridaine in beef broth and evaluation of its sensory impact by taste reconstitution experiments[J]. *Agric Food Chem*, 2003, 51(23):6791~6796
 - 14 Soldo T, Hofmann T. Application of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography/Comparative Taste Dilution Analysis for Identification of a Bitter Inhibitor by a Combinatorial Approach Based on Maillard Reaction[J]. *Agric Food Chem*, 2005, 53 (23):9165~9171

Taste Dilution Analysis and It's Applications in Evaluating Taste-Active Compounds in Foods

Wang Chunye, Tong Huarong

(College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China)

ABSTRACT Taste is an important sensory character in foods. Taste dilution analysis is a new method developed in these years. Combining the high performance liquid chromatography and sensory analysis is a useful tool to evaluate the nonvolatile taste-active compounds in food. This screening technique can be used in the identification of previously unknown taste compounds. Comparative taste dilution analysis is an important method to evaluate the taste enhancer or inhibitor based on the TDA. The new method and it's application are reviewed.

Key words taste dilution analysis, taste-active compounds, application

信
息
窗

英国将建首套食品级 PET 再生装置

Petagain 有限公司宣布它有意采用化学技术建造英国首套大规模食品级 PET 再生装置。该装置计划 2009 年开建,将使用连续化学工艺,以生产符合转化成热塑包装瓶子或片材的食品级再生 PET。

到 2012 年,Petagain 估计该装置每年将再循环 2 万 t 用过的 PET 废物,占欧洲再生 PET 市场的 3% 份额。

目前,英国再生 PET 需求大大超过供应,欧洲再生 PET 供应保守估计为潜在需求 57 万吨的 20%。