

钱蕾, 于海燕, 娄新曼, 等. 酶解联合高温处理对可可粉风味的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(18): 80–88. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120085

QIAN Lei, YU Haiyan, LOU Xinman, et al. Effect of Enzymatic Hydrolysis Combined with High Temperature Processing on the Flavor of Cocoa Powder[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(18): 80–88. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120085

· 研究与探讨 ·

酶解联合高温处理对可可粉风味的影响

钱 蕾^{1,2}, 于海燕¹, 娄新曼¹, 田怀香^{1,*}

(1. 上海应用技术大学香料香精技术与工程学院, 上海 201418;

2. 上海牡丹香精香料有限公司, 上海 201210)

摘 要: 本文考察了酶解和高温联合处理对可可风味的作用。首先以游离氨基酸含量为评价指标, 研究了 5 种蛋白酶对脱脂可可粉酶解液中游离氨基酸的影响, 并进一步采用顶空-气相色谱-质谱联用 (headspace gas chromatography mass spectrometry, HS-GC-MS) 结合香气活力值 (odor activity value, OAV) 以及感官评价研究了高温 (90~180 °C) 对可可挥发性物质的作用。结果表明, 酶解处理提高了总氨基酸含量, 为酶解前的 1.4~5.0 倍, 且与未经酶处理的对照样 (12 种挥发物) 相比, 5 种联合处理的样品分别检测出 29 (天冬氨酸酶)、31 (酸性蛋白酶)、29 (风味蛋白酶)、30 (菠萝蛋白酶)、32 (木瓜蛋白酶) 种挥发物, 挥发性物质种类明显增加。当反应温度达到 150 °C 以上更有助于可可中具有坚果和奶油香气的杂环化合物的生成; 由感官评价可得, 经风味蛋白酶处理并在 150 °C 反应 2 h 的可可风味最佳。基于 OAV 与感官评价的偏最小二乘 (partial least squares, PLS) 模型验证可得: 酶解和高温处理使可可可在保持原有巧克力香气的同时增加花果香和奶香风味, 有助于提升可可整体香气品质。

关键词: 可可粉, 酶解, 高温处理, 美拉德反应, 氨基酸, 可可风味, 顶空-气相色谱-质谱联用 (HS-GC-MS), 感官评价

中图分类号: TS274

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)18-0080-09

本文网刊:

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120085



Effect of Enzymatic Hydrolysis Combined with High Temperature Processing on the Flavor of Cocoa Powder

QIAN Lei^{1,2}, YU Haiyan¹, LOU Xinman¹, TIAN Huaixiang^{1,*}

(1. School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China;

2. Shanghai Peony Flavor & Fragrance Co., Ltd., Shanghai 201210, China)

Abstract: The study aimed to evaluate the effect of enzymatic hydrolysis and high temperature on the flavor of cocoa. First, the effect of five proteases on free amino acids in enzymatic hydrolysate were investigated. Subsequently, headspace gas chromatography mass spectrometry (HS-GC-MS), odor activity value (OAV) and sensory valuation were applied to explore the influence of high temperature (90~180 °C) on the volatile compounds of cocoa. The results showed that amino acids content increased by 1.4~5.0 times after enzymatic hydrolysis, and compared with the control sample untreated by enzyme (12 volatiles), five combinatorial treated samples promoted volatiles, which were identified 29 (asparaginase), 31 (acid protease), 29 (flavourzyme), 30 (bromelain), 32 (papain) volatiles, respectively. More heterocyclic compounds with nutty and creamy aroma were generated when the temperature was up to 150 °C, and the sensory evaluation indicated that flavor protease hydrolysis combined with 150 °C heating for 2 h presented the best flavor characteristics. Meanwhile, partial least squares (PLS) analysis model based on OAV and sensory evaluation showed that enzymatic hydrolysis combined with high temperature gave cocoa more flower, fruit and milk aroma while still maintained chocolate flavor, confirming its contribution to flavor promotion.

收稿日期: 2021-12-08

作者简介: 钱蕾 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然提取和香原料开发, E-mail: lilyqian0919@126.com。

* 通信作者: 田怀香 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品风味化学, E-mail: tianhx@sit.edu.cn。

Key words: cocoa powder; enzymatic hydrolysis; high temperature processing; Maillard reaction; amino acid; cocoa flavor; headspace-gas chromatography mass spectrometry (HS-GC-MS); sensory evaluation

可可粉因其特有的风味^[1](如巧克力、坚果香、花香、果香等),被广泛应用于烘焙、冰淇淋等食品加工产业。近十年,全球可可消费的平均增长率为 3%,而随着消费升级发展中国家对可可的需求增长迅速。以中国为例,2010 年可可及可可制品进口贸易额为 4.21 亿美元^[2],到 2021 年进口额达 10.45 亿美元^[3],年均增长率达 8% 以上,远高于全球平均水平。全球 60% 可可豆产自西非^[4],但其产量及品质受气候变化、种植技术以及病虫害的限制^[5]。面对原料供应限制以及需求增长,提高可可粉的质量并充分利用可可粉有助于相关食品工业和健康产品再加工。

在生可可豆中,内源酶的存在^[6],如天冬氨酸蛋白酶协同羧肽酶作用^[7],使可可豆水解形成具有可可特征香味的前体物—还原糖、氨基酸及短链肽^[8]。经过烘烤和干燥处理后,可促进氨基酸、肽与糖发生 Maillard 反应,从而形成可可特征风味的香气物质^[9]。其中,2,6-二甲基吡嗪(OAV 为 0.2-1.3)、2-乙基-6-甲基吡嗪(OAV 为 0.3~4.8)、2,5-二甲基-4-羟基呋喃酮(OAV 为 74.3~186.5)^[10],呈现焦甜烘烤香气,2-甲基丁醛(OAV 为 3~14),醛类及内酯类化合物具有乳脂香气^[1],对整体巧克力风味有重要贡献。目前,研究者已开展一系列利用生物化学技术优化可可风味的研究。Moulay 等^[11]利用蛋白酶和糖化酶处理可可粉,经过烘烤后可可粉中吡嗪类烘烤香化化合物的浓度显著上升。Voigt 等^[12]模拟重组可可豆内氨基酸混合物与糖进行美拉德反应,并进一步论证氨基酸和寡肽共同产生了可可的特征风味。然而,在自然环境中,内源性蛋白酶的酶解过程通常需要较长的时间(24~168 h),且得率相对较低^[13-14]。利用酶解、发酵等生物技术对天然动植物进行处理^[15-16],其条件温和、可控,且制备出的香料属天然等同物^[17],相较于其他香料制备方法更有优势。

基于内源性酶在风味优化应用中的局限性,为了拓展和考察酶解联合高温工艺优化可可粉风味的可行性,本实验拟采用 5 种蛋白酶对脱脂可可粉酶解过程游离氨基酸的影响进行研究,并进一步采用顶空-气相色谱-质谱联用(headspace gas chromatography mass spectrometry, HS-GC-MS)结合香气活度值(odor activity value, OAV)研究反应温度对可可挥发性物质的影响。基于 OAV 和感官评价,建立偏最小二乘(partial least squares, PLS)模型对联合作用进行验证,为进一步优化可可的风味品质研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

脱脂可可粉(*Theobroma cacao* L.) 林氏香精

公司;天冬氨酸型胃蛋白酶(1×10^5 U/g)、菠萝蛋白酶(100×10^5 U/g)、木瓜蛋白酶(100×10^5 U/g) 庞博生物科技有限公司;酸性蛋白酶(50×10^5 U/g) 河南万邦实业有限公司;风味蛋白酶(30×10^5 U/g) 东恒华道酶制剂公司;茚三酮、庚酸甲酯 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠·二水合、无水葡萄糖、果糖 上海国药试剂公司。

SW23-40 型恒温振荡水浴槽 优莱博技术有限公司;Biofuge Stratos 台式高速冷冻离心机 赛默飞科技公司;Cary60 型紫外-可见分光光度计、7697A 顶空-7890B-5977A 色谱质谱联用仪 安捷伦科技有限公司;磁力加热盘 艾卡仪器设备有限公司;pH 计 梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 可可粉酶解试验 为避免可可脂在含水的酶解过程水解生成其他小分子,选用脱脂可可粉以 1:15(g:mL)加水或磷酸盐缓冲液,磷酸缓冲液用于为蛋白酶酶解提供适宜的 pH 条件,天冬氨酸酶和酸性蛋白酶需要加缓冲液,分别配制 pH 为 2.0 和 3.5 的磷酸缓冲液,另 3 个选择加水,加水后可可粉与水混合物的 pH 为 6.4。混合均匀,分别加入天冬氨酸酶、酸性蛋白酶、风味酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶,温度和 pH 根据所添加酶的最适宜酶解条件进行设置,如表 1 所示。将混配料液置于水浴振荡锅中酶解 10 h,沸水浴 10 min 灭酶。

表 1 不同酶的酶解条件
Table 1 Enzymatic hydrolysis conditions of different enzymes

蛋白酶	简写	酶活 ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)	酶解 pH	酶解温度 ($^{\circ}\text{C}$)	酶添加量 ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)
天冬氨酸酶	Asp	100	2.0	40	10
酸性蛋白酶	Acid	500	3.5	40	10
风味蛋白酶	Fla	300	6.4	55	10
菠萝蛋白酶	Bro	1000	6.4	55	10
木瓜蛋白酶	Pap	1000	6.4	55	10

1.2.2 总游离氨基酸测定 取可可粉酶解液(0.2 mL)、pH6 磷酸盐缓冲溶液(0.5 mL)和茚三酮溶液(0.4 mL, 2% 乙醇溶液)于 50 mL 比色管中,沸水浴加热 15 min,水浴冷却,并加入去离子水定容至 50 mL 充分混合。避光放置 15 min 后,4500 r/min 离心 8 min 取上清液。采用紫外-可见分光光度计在 570 nm 波长处测定样品吸光度^[18]。以丙氨酸为标准溶液,根据标准曲线 $y=0.7273x-0.2492$ ($R^2=0.995$) 计算得出酶解液中氨基酸浓度 (mmol/L)。每个样品重复测定 3 次。

1.2.3 可可粉酶解液的高温反应试验 根据 Maillard 反应产香原理^[19],将可可粉酶解液作为原料,与糖混

合后加热反应,形成具有特征香气的 Maillard 反应产物。35 mL 耐压反应管中加入经过风味蛋白酶处理的可可粉酶解液 15 g 和糖 1.5 g(葡萄糖:果糖=3:7),油浴温度范围 90~180 ℃,混合搅拌 2 h。结束后水浴冷却,4000 r/min 离心 8 min,收集上清液,待风味物质鉴定及 OAV 计算。

1.2.4 酶解联合高温处理反应物的制备 将 5 种酶处理的可可粉酶解液按 1.2.3 进行高温反应,油浴温度为 150 ℃,待感官评价及风味物质鉴定。对对照样为未添加任何酶,加去离子水 55 ℃ 水浴加热 3 h,后续高温反应与酶解液一致。

1.2.5 感官评价 对 1.2.4 可可联合处理反应物进行感官评价。感官评价小组由 6 位受过专业训练的人员组成,通过评估标准样品的香气进行培训^[20]。可可感官描述词参照欧洲可可协会出版的可可质量要求^[21],如表 2 所示。为了屏蔽固定序列相邻样品间的相互影响,评测时,将受试样品根据拉丁方阵^[22]的顺序进行编号。各项指标按照感受强烈程度 1~10 打分,评价总分=嗅觉+0.2×味觉,总分 100。

1.2.6 顶空-气相色谱质谱联用风味物质鉴定 顶空-气相色谱质谱联用风味物质分析方法参照朱宏等^[23]和 Mohamadi Alasti 等^[24]的方法并做修改。

1.2.6.1 顶空条件 取可可粉酶解高温处理反应物 1.0 g 和 20 μL 浓度为 4.35 mg/mL 庚酸甲酯(内标)于 20 mL 顶空瓶中,加盖密封,放入进样盘。样品在 90 ℃ 下平衡 30 min,进样过程中捕集器和传输线温度分别为 105 和 110 ℃,进样时间为 1 min。

1.2.6.2 色谱条件 HP-5 色谱柱:30 m×0.25 mm×0.25 μm;载气 He 气流速度为 1.2 mL/min。柱温 35 ℃ 起始,保持 3 min,3 ℃/min 上升至 160 ℃,再以 10 ℃/min 上升至 200 ℃,保持 2 min;分流比 10:1。

1.2.6.3 质谱条件 电离方式 EI;电子能量:70 eV;离子源温度:230 ℃;传输线温度:250 ℃;扫描质量

范围:35~500。

1.2.6.4 定性、定量分析 挥发性化合物的质谱与 Wiley275、Nist11、Flavor 2 标准图谱库串联检索,保留质谱匹配度≥80;以相同色谱条件下正构烷烃(C₆~C₂₂)出峰保留时间,计算保留指数 RI 值^[25],并与 NIST 数据库的 RI 值进行比对,两种方法作为判定依据。挥发性化合物的定量采用内标(庚酸甲酯)半定量法,按式(1)计算出各成分相对含量(质量分数)。

$$C_s = \frac{A_s \times C_i}{A_i}$$

式中:C_s表示该化合物的质量分数(μg/g);A_s表示该成分的峰面积;C_i表示内标物的质量分数(μg/g);A_i表示内标峰面积。总共进行 3 次重复试验,数据取 3 次试验平均值。

1.3 数据处理

采用 Excel 2019、Origin 8 进行数据图表的基本处理,IBM SPSS 20 进行 *t* 检验及 Waller-Duncan 方差分析(显著性水平 0.05),SIMCA 14.1 进行偏最小二乘分析,聚类树图通过 R studio 制作。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白酶对可可粉水解程度的影响

可可粉在经历不同蛋白酶作用后,氨基酸浓度出现明显差异(*P*<0.05)。氨基酸被视作形成风味物质的重要前体物,为确保酶解充分,实验时设计足够长的酶解时间,定时取样测定氨基酸浓度,将达到浓度峰值所用的时长作为酶解时间。由图 1 可知,5 种蛋白酶酶解时间不同,时间最短的是风味蛋白酶,水解时间 3 h,时间最长的是菠萝蛋白酶,为 8 h。比较游离氨基酸总量,对可可粉酶解作用由大到小排序为:风味蛋白酶>菠萝蛋白酶>天冬氨酸蛋白酶>木瓜蛋白酶>酸性蛋白酶。天冬氨酸酶和酸性蛋白酶属酸性蛋白酶,水解温度为 40 ℃,得到氨基酸含量分

表 2 感官描述词和评分
Table 2 Sensory evaluation descriptions

	描述词	感官描述	参比物
嗅觉	巧克力(10分)	巧克力的特殊香气	α-异丁基苯乙醇溶液20 mg/L
	奶香(10分)	新鲜牛乳的特征风味	0.1 mg/kg δ-十二烷内酯
	焦糖(10分)	一种带有甜香、焦苦的气味	糠醇水溶液60 mg/L
	花香(10分)	鲜花特有的复合香气、带有香甜感	香叶醇水溶液1 mg/L
	果香(10分)	熟透水果浓郁香气,甜香花香合感	苹果
	坚果(10分)	烤味、木质味、油味的混合	2,6-二甲基吡嗪2 mg/L醇水溶液
	木香(10分)	新切割的木材,树皮味	10 mg/L α-蛇麻烯
	辛香(10分)	五香八角的气味	五香八角香料
	烟熏(10分)	烟气熏制食品过程产生的一类特殊风味	10 g/L 香芹酚丙二醇溶液
	甜(10分)	如糖似蜜	蔗糖质量浓度为5.0 g/500 mL)
味觉	酸(10分)	像醋的味道	柠檬酸质量浓度为0.25 g/500 mL)
	涩(10分)	舌头口腔表面收缩、收敛感	1 g/L的单宁酸水溶液
	苦(10分)	苦瓜、啤酒、咖啡等特有的味感	氯化奎宁质量浓度为0.072 g/500 mL)
	油脂(10分)	植物油、矿物油的气味	植物调和油

别为 0.09 和 0.06 mmol/g; 风味蛋白酶、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶属中性蛋白酶, 水解温度为 55 ℃, 得到氨基酸含量分别为 0.20、0.14 和 0.08 mmol/g。酶解作用差异的原因可能与酶的特异性有关, 如菠萝蛋白酶和天冬氨酸酶选择性水解 7S 大豆球蛋白^[26], 木瓜蛋白酶选择性水解 11S 大豆球蛋白, 而可可豆中 7S 球蛋白含量高于 11S^[27], 因此菠萝蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶作用后氨基酸浓度更高。Rohstus 等^[28]测定生可可豆的氨基酸含量为 5~25 mg/g; Kadow 等^[29]在 35 ℃ 观察可可发酵 5 d, 每克可可降解出的游离氨基酸含量范围 5.7~25.2 mg, 氨基酸摩尔质量为 70~180 g/mol, 换算后范围在 0.03~0.36 mmol/g, 本文酶解液中游离氨基酸含量为 0.06~0.20 mmol/g, 与文献范围符合。

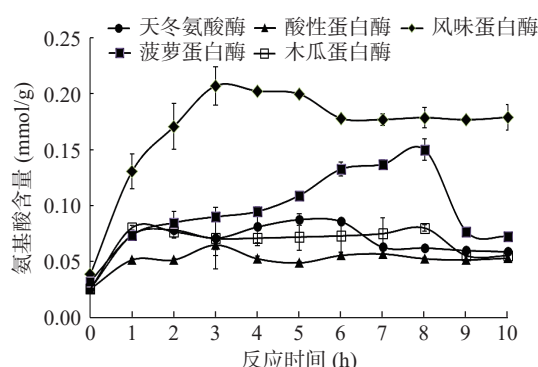


图 1 5 种蛋白酶酶解可可粉后氨基酸含量变化关系

Fig.1 Changes in the concentration of free amino acid from five enzymic hydrolysates

2.2 高温处理对可可风味物质的影响

Maillard 反应物的香气属性取决于温度和反应时间, 除了巧克力制作, 可可粉还可用作饮料冲剂以及烘焙产品的添加, 这些实际应用场景的温度在 100~200 ℃^[24]。

本文选择 2.1 中酶解作用最显著的风味蛋白酶, 考察其可可粉酶解液在 90~180 ℃ 温度中挥发性物质的变化, 试验证明高温加热有利于挥发物种类和含量的提升, 一共检测出 44 种风味物质, 不同温度条件下分别鉴定出 18(90 ℃)、15(100 ℃)、22(120 ℃)、32(135 ℃)、38(150 ℃)和 34(180 ℃)种。特征型挥发物的变化如下: 90 和 100 ℃ 产物的差异较小, 奶油香的 2,3-丁二酮(从 0.35 μg/g 增加至 1.13 μg/g)在整个温度范围始终存在, 与文献^[30]中醛酮类物质烘烤前后浓度由 0.13 μg/g 提升至 7.82 μg/g 变化一致。具有果香的 2-甲基丁醇(从 0.03 μg/g 增加至 0.19 μg/g)和巧克力香的 2-甲基丁醛(2.03 μg/g 增加至 16.65 μg/g)在 120 ℃ 产物中开始累积, 135 ℃ 产物中开始出现甲酸(从 0.50 μg/g 增加至 5.44 μg/g)、乙酸(从 0.23 μg/g 增加至 23.83 μg/g), 小分子酸为 Maillard 反应产物; 150 和 180 ℃ 产生了巧克力香的甲基吡嗪(从 0.03 μg/g 增加至 0.10 μg/g)、糠醇(0.11 μg/g 增加至 0.43 μg/g)以及焦甜香的糠醛(从

0.07 μg/g 增加至 24.10 μg/g)等杂环类物质, 天然存在于可可、咖啡、肉类中, 被视作可可香精的重要成分^[31], 整体焦甜香更浓郁。高温条件对挥发物的影响, 推测是酶解后的氨基酸在烘烤过程与糖发生 Maillard 反应, 生成更丰富的挥发物^[10]。如图 2C~2E 中, 2,3-丁二醇、糠醇、2-甲基丁醇在 135 ℃ 以上出现浓度减少的趋势(如图 2F), 醇类拥有甜蜜和花香, 它既是醛的前体, 又可参与酯化反应, 伴随着烘烤温度提升, 一部分转化成醛类或者酯类^[30], 进一步增加样本的焦甜香味物质。

不同温度处理物中鉴定出的 44 种化合物, 结合质量分数及其对应阈值, 计算 OAV^[32-33](OAV, 各成分的浓度与阈值之比)。其中, OAV>1.0 的化合物一共有 20 种, 经标准化处理后以聚类树图的方式讨论温度对样品风味的影响。

如图 3 所示, 共有三类变化趋势: 第一类在 90~150 ℃ 物质含量没有显著变化($P>0.05$), 180 ℃ 产物中含量显著提高($P<0.05$), 包括乙酸、己酸甲酯、糠醛、5-甲基糠醛等, 表现出酸、果香和焦甜, 糠醛和 5-甲基糠醛为焦糖化和美拉德反应中的特征物质^[34]; 第二类随着温度升高, 含量逐步增加, 且 150~180 ℃ 增量趋势放缓, 包括丁二酮、2-甲基丁醛、2-甲基丁醇和吡嗪, 天然存在于烘烤后可可豆中^[30], 表现出巧克力和奶油香气; 第三类随着温度升高, 含量先增多后减少且在 150 ℃ 含量最高, 包括苯乙醛、壬醛和 2,3-二甲基-5-乙基吡嗪, 表现出花果香和巧克力特征香。巧克力特征香的物质集中于第二、三类, 150 和 180 ℃ 产物的巧克力特征香更丰富, 与文献^[10]可可豆烘烤温度大于 140 ℃ 各挥发物浓度提高的现象一致。当温度达 180 ℃ 时, 吡嗪的 OAV 减弱而具有洋葱味的二甲基二硫醚的 OAV 显现, 各挥发物对香气贡献从 OAV 判断不及 150 ℃ 样品。通过高温处理可可粉酶解液, 温度达 150 ℃ 能较好地发挥样品风味及其整体香气效果, 使整体巧克力风味最佳。

2.3 酶解联合高温反应物的挥发性物质分析

利用 HS-GC-MS 方法对 5 种可可粉酶解液经 150 ℃ 高温处理 2 h 后挥发性化合物进行研究。表 3 总结了 HS-GC-MS 分析结果。通过质谱库比对及保留指数, 共鉴定出 48 种挥发性成分, 其中杂环 14 种、酮 10 种、酸 9 种、醇 6 种、醛 5 种、酯 4 种, 其中有 26 种出现于相关可可粉风味分析的文献^[35-38]中。与未经酶解的高温处理样品(12 种)相比, 酶解处理后(29 种以上)挥发性化合物更加丰富, 而不同酶解样品的挥发物种类保持一定共性, 共有化合物为 15 种, 占总数的 1/3。其中, 杂环物质的数量最多, 为呋喃类和吡嗪类。不同酶处理的可可粉酶解液经高温处理后各类香气种类和质量分数上存在显著差异($P<0.05$), 可能原因是水解氨基酸组成及其加热时 Maillard 反应形成挥发物差异引起的。呋喃主要

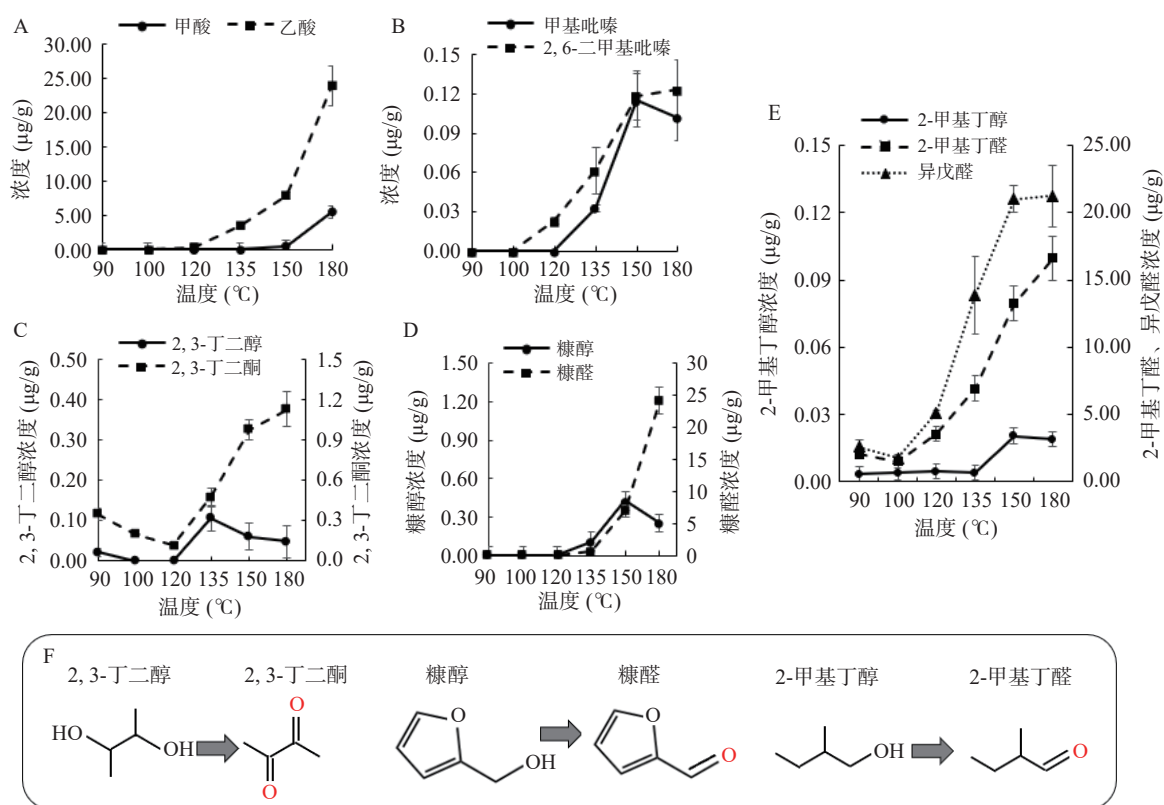


图2 不同反应温度的可可粉酶解液挥发物变化图

Fig.2 Changes of cocoa enzymic hydrolysates volatile compounds at different temperature

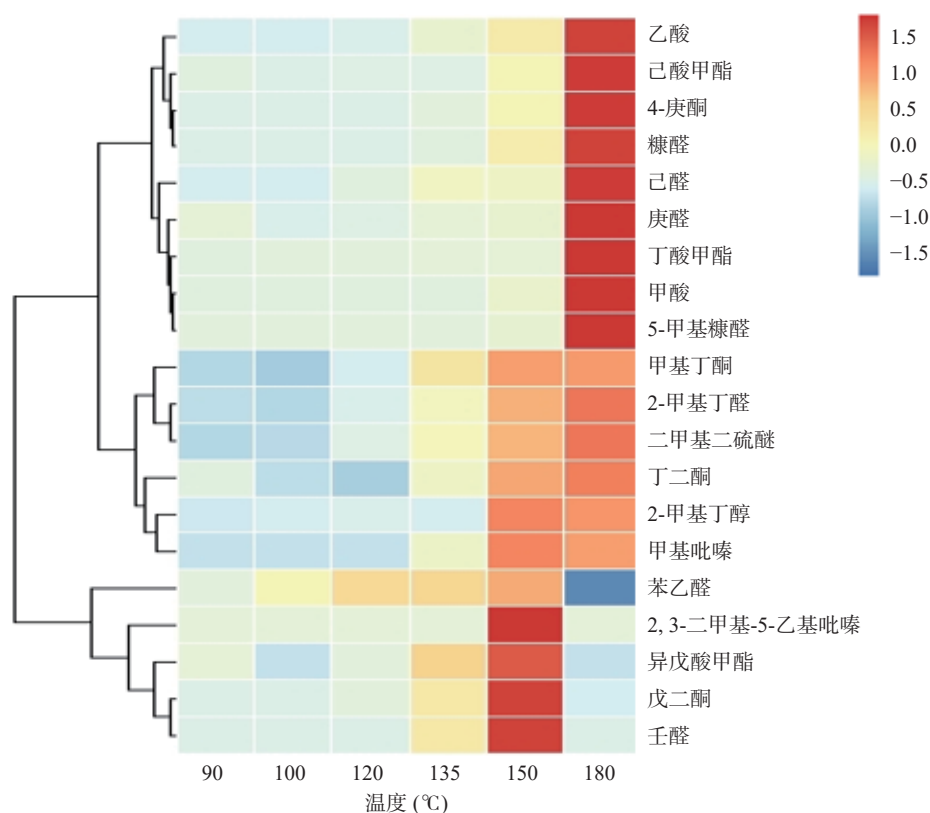


图3 不同反应温度对可可挥发物 OAV 的聚类树图

Fig.3 Tree graph of different temperature on the volatile OAV of cocoa

由糖自降解和焦糖化过程中生成^[39], 2-乙酰基呋喃具有坚果烤甜香, 5 个反应样中均检测到, 风味酶处理样中含量最高(133.79±6.55) μg/g。吡嗪类物质由 α-

二羰基化合物与氨基酸发生 Strecker 降解生成^[40], 阈值低, 香气作用强。对于 2,6-二甲基吡嗪、2-乙基-6-甲基吡嗪和四甲基吡嗪 3 种吡嗪化合物的总量, 天

表 3 可可联合处理反应物的挥发物 HS-GC-MS 分析
Table 3 Contents of volatile compounds from cocoa combined reactants by HS-GC-MS

化合物	RI		鉴别方式	阈值	香气描述	对照样	天冬氨酸酶	酸性蛋白酶	风味蛋白酶	菠萝蛋白酶	木瓜蛋白酶
	文献值	计算值		μg/g		挥发物质量分数(μg/g)					
甲酸	543	538	MS, RI	0.046	强烈的刺激性	—	10.8±0.78 ^b	12.56±2.38 ^b	77.77±73.30 ^a	—	7.98±2.28 ^b
2,3-丁二酮	600	615	MS, RI	0.005	稀释奶油	6.67±0.40 ^b	13.07±0.97 ^{ab}	7.64±1.80 ^b	22.43±3.66 ^a	1.77±0.41 ^b	3.15±0.91 ^b
乙酸乙酯	610	626	MS, RI	5	菠萝果香、白兰地	—	—	2.77±0.55 ^b	158.91±7.75 ^a	3.43±0.70 ^b	—
异丁醇	622	634	MS, RI	3.3	透发的酒样香气	7.62±0.51 ^b	—	—	29.84±1.46 ^a	6.39±1.36 ^b	—
乙酸	646	644	MS, RI	10000	强烈的酸	305.41±21.42 ^b	2128.74±697.42 ^a	1948.8±77.17 ^a	1133.43±239.48 ^a	14.62±3.02 ^b	17.20±12.74 ^b
丙二酸	—	675	MS, RI	—	—	—	—	—	—	0.22±0.08	0.26±0.13
异戊醛	655	650	MS, RI	—	辛辣、苹果杏仁	1.53±0.03 ^b	—	3.32±0.59 ^b	23.54±23.75 ^a	5.42±1.32 ^b	6.73±1.79 ^b
戊醛	658	660	MS, RI	0.012~0.1	发酵面包、坚果	—	—	1.36±0.24 ^b	—	0.49±0.11 ^b	14.71±4.32 ^a
2-甲基丁醛	661	661	MS, RI	10	咖啡和可可	—	—	—	32.67±12.71 ^a	2.12±0.50 ^b	2.44±1.20 ^b
2-戊酮	686	687	MS, RI	0.07	酒和丙酮样透发	—	—	—	—	0.36±0.10	—
羟基丙酮	688	681	MS, RI	—	—	25.17±1.69 ^b	154.23±3.98 ^a	129.46±42.92 ^a	53.53±64.19 ^b	—	12.52±3.65 ^b
戊二酮	696	686	MS, RI	0.07~0.1	—	6.42±0.38 ^b	—	—	13.47±0.66 ^a	—	—
3-羟基-2-丁酮	720	705	MS, RI	10000	奶油	—	—	—	20.88±0.96 ^a	2.22±0.46 ^b	20.23±5.89 ^a
丁酸甲酯	724	714	MS, RI	0.001~0.043	苹果和干酪	—	—	—	—	—	0.22±0.06
3-甲基丁醇	726	733	MS, RI	0.25~4.1	威士忌特征的辛辣	—	—	—	—	5.07±1.08 ^a	1.10±0.32 ^b
2-甲基丁醇	733	739	MS, RI	0.0017	水果和酒精	—	—	—	—	2.03±0.43 ^a	0.28±0.08 ^b
二甲基二硫醚	761	764	MS, RI	0.0012	洋葱	3.37±0.45 ^b	3.84±0.58 ^b	4.87±0.93 ^b	13.11±0.64 ^a	—	—
己醛	799	795	MS, RI	0.0228	青草、苹果	—	—	—	—	0.25±0.06	0.21±0.05
羟基丁酮	803	796	MS, RI	—	咖啡、奶油、香甜	—	17.99±0.38	—	—	—	—
2,3-丁二醇	803	808	MS, RI	—	甜巧克力	—	38.92±6.59 ^b	10.23±1.94 ^b	491.92±65.69 ^a	23.10±9.17 ^b	24.83±5.52 ^b
糠醛	818	828	MS, RI	0.28~8	面包发酵、焦糖	93.73±6.59 ^b	268.99±22.86 ^{ab}	250.12±61.51 ^{ab}	431.13±40.50 ^a	26.00±8.81 ^b	19.22±11.14 ^b
异戊酸	834	840	MS, RI	2.8	腐臭的、奶酪	—	—	—	8.14±5.16	—	—
糠醇	865	863	MS, RI	1.0~2.0	发酵、奶油、焦糖	—	12.75±0.11 ^b	22.61±4.31 ^a	—	—	—
环戊烯二酮	880	880	MS, RI	—	—	—	2.75±0.47 ^a	1.85±0.35 ^{ab}	—	—	0.22±0.06 ^b
2-庚酮	889	884	MS, RI	160	水果、辛香	—	—	—	—	—	0.27±0.08
2-乙酰基呋喃	910	902	MS, RI	10	甜杏仁坚果、烟熏	—	47.35±2.11 ^{ab}	42.21±14.13 ^{ab}	133.79±6.55 ^a	6.22±1.31 ^b	3.21±0.94 ^b
2,6-二甲基吡嗪	916	908	MS, RI	1.5	坚果、可可、咖啡	—	0.55±0.02 ^b	0.37±0.06 ^b	0.98 ±0.28 ^a	0.47 ±0.11 ^b	0.45 ±0.08 ^b
己酸甲酯	936	926	MS, RI	0.087	菠萝	—	2.86±0.05 ^b	1.34±0.27 ^b	16.82±10.64 ^a	0.32±0.09 ^b	0.28±0.07 ^b
甲基糠醇	953	940	MS, RI	—	焦糖	—	3.21±0.07 ^a	1.63±0.31 ^b	—	—	—
5-甲基糠醛	957	954	MS, RI	6	焦糖的香甜	—	2.47±0.05 ^b	5.18±1.06 ^a	—	—	—
苯甲醛	964	969	MS, RI	0.33	苦杏仁	3.11±0.16 ^b	3.99±3.38 ^b	2.77±0.51 ^b	15.45±0.74 ^a	1.92±0.46 ^b	1.46±0.40 ^b
乙酸糠醇酯	998	991	MS, RI	50	发酵奶油、焦糖	—	2.95±0.55 ^a	1.09±0.22 ^b	—	—	—
2-乙基-6-甲基吡嗪	997	993	MS, RI	0.1	可可、坚果、烤土豆	—	0.18 ±0.19 ^b	0.19 ±0.19 ^b	0.46 ±0.15 ^a	0.47 ±0.04 ^a	0.28 ±0.28 ^{ab}
2-乙基-3-甲基吡嗪	1003	997	MS, RI	2	玉米花、坚果	—	0.24 ±0.04	0.24 ±0.02	—	0.16 ±0.07	—
苯乙醛	1045	1038	MS, RI	0.004	强烈风信子花香	2.87±0.03 ^b	4.42±2.92 ^b	12.28±2.49 ^{ab}	31.70±2.42 ^a	1.77±0.77 ^b	2.31±0.63 ^b
4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃酮	1072	1069	MS, RI	0.06	烤面包、焦糖	—	2.35±0.07 ^a	2.58±0.52 ^a	—	—	0.40±0.10 ^b
庚酸	1071	1081	MS, RI	10.4	酸臭、汗臭、脂肪味	2.67±0.04 ^c	124.22±34.65 ^a	44.77±10.73 ^b	41.70±2.04 ^b	7.85±1.68 ^c	7.16±2.10 ^c
2,3,5,6-四甲基吡嗪	1087	1080	MS, RI	1	坚果、可可、奶油	—	1.80±1.08 ^a	0.47 ±0.17 ^b	0.14 ±0.10 ^b	—	0.21 ±0.20 ^b
庚酸乙酯	1108	1096	MS, RI	—	菠萝	—	—	—	—	0.38±0.07	—
苯乙醇	1121	1108	MS, RI	3.5	玫瑰花香	14.42±0.98 ^a	2.83±0.54 ^c	1.36±0.26 ^c	6.94±0.33 ^b	9.53±4.02 ^b	2.44±0.71 ^c
乙基环戊烯醇酮	1140	1145	MS, RI	500	焦糖、烟熏、咖啡	—	2.70±0.05	—	—	—	—
2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4(H)-吡喃-4-酮	1154	1161	MS, RI	—	焦糖样甜香	—	—	1.28±0.23 ^b	8.33±0.92 ^a	—	—
辛酸	1186	1178	MS, RI	1-19	果香	—	18.63±1.53 ^{bc}	40.02±8.06 ^b	80.41±34.93 ^a	2.74±0.70 ^c	1.35±0.36 ^c
5-羟甲基糠醛	1233	1224	MS, RI	—	黄油、焦糖	—	8.97±2.69 ^a	1.64±0.33 ^b	—	—	—
癸酸	1380	1374	MS, RI	2.2~102	蜡、水果	—	4.71±0.44 ^b	5.55±1.12 ^b	14.63±9.26 ^a	1.38±0.36 ^{bc}	0.40±0.10 ^c
月桂酸	1562	1566	MS, RI	100000	乳脂香	—	8.22±6.32 ^b	13.93±2.71 ^b	388.66±246.19 ^a	23.99±0.18 ^b	9.44±2.42 ^b
肉豆蔻酸	1761	1749	MS, RI	10	—	—	—	—	15.16±9.60 ^a	0.26±0.06 ^b	0.58±0.16 ^b
咖啡因	1840	1857	MS, RI	29	—	—	—	—	62.03±39.31 ^a	1.04±0.27 ^b	0.79±0.22 ^b

注: —表示未查到文献值或未检出。相关数据根据webbook.nist.gov和<https://www.chemicalbook.com>及文献[42-43]查得;同行不同字母表示显著性差异, $P<0.05$ 。

冬氨酸酶处理样中最高(2.53±1.51) μg/g, 赋予产品巧克力风味。糠醇和糠醛、苯乙醇和苯乙醛两组化合物成对存在, 醇类贡献花果香气, 它既是醛的前体, 又参与酯化反应^[41], 因此随着反应进程推进, 醇含量

逐步减少,而醛含量不断累积。具有强烈花香的苯乙醛,风味酶处理样中最高含量(31.70 ± 22.42) $\mu\text{g/g}$,是对照样品中含量(2.87 ± 0.03) $\mu\text{g/g}$ 的 10 倍,原因是其在反应过程中大量的苯乙醇转化为苯乙醛,这也解释了苯乙醇在对照样中含量最高(14.42 ± 0.98) $\mu\text{g/g}$ 。酸性酶处理样中酸类物质含量丰富,主要是小分子乙酸,但乙酸的阈值较高且易挥发,对整体香气作用较弱。此外,庚酸的存在为样品增加乳脂的香味。菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶处理样产物种类最丰富,具有菠萝香的庚酸乙酯为菠萝蛋白酶解物独有的,但挥发物总量不具优势,从水解出氨基酸总量的劣势侧面解释了菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶单一作用时的不足,若进一步与多种酶协同作用,既能弥补水解程度不足的缺点,还能发挥产物丰富的优势。

2.4 可可联合处理反应物的感官评价

可可粉经酶解和 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高温处理 2 h 后,其感官评价如图 4 所示。与未经酶处理的对照样相比,巧克力、奶香、焦糖、辛香、烟熏 5 项指标有极显著差异($P < 0.01$),花香、坚果和木香感官指标有显著差异($P < 0.05$)。其中,风味蛋白酶组在巧克力、奶香、坚果香气方面表现最佳,酸性蛋白酶的酸味、辛香最显著,菠萝蛋白酶的焦糖和甜味表现更好。综合比较反应物的总体风味,风味蛋白酶组的总分最高。

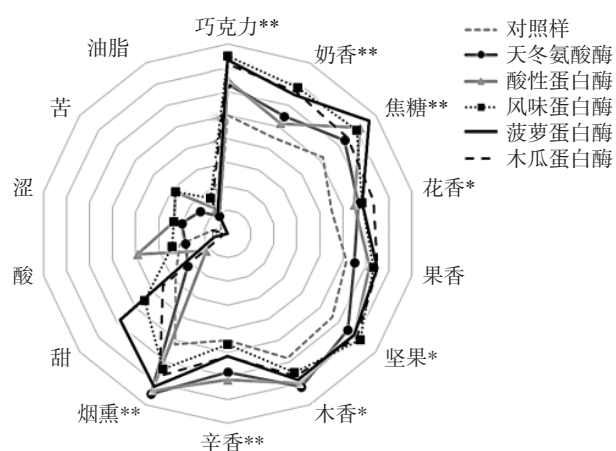


图 4 可可联合处理反应物的感官评价

Fig.4 Sensory evaluation on enzymatic hydrolysis combined with high temperature of cocoa

注: *表示存在显著性差异($P < 0.05$); **表示存在极显著性差异($P < 0.01$)。

2.5 PLS 分析可可联合处理反应物与感官属性的关系

为了探究不同反应物的感官属性和挥发性风味物质的差异,以其挥发物的 OAV 为自变量,通过对 5 种联合处理可可粉的感官评价,各感官属性得分作为因变量进行偏最小二乘分析。利用 Simca 软件的 PLS 模块对风味成分和感官属性进行相关性分析,前三个主成分共解释了 88.8% 的差异,分析结果具有代表性。经不同联合处理的可可粉,感官属性预测分析如图 5 所示。

比较分析感官属性分布,联合处理样品与未经

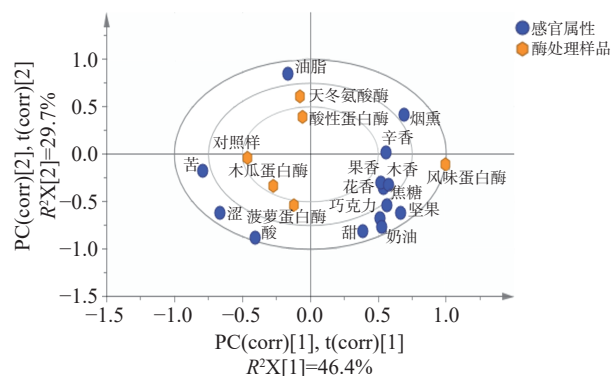


图 5 不同酶处理样品与感官属性的 PLS 图

Fig.5 Partial least squares regression of cocoa samples and sensory indicators

酶处理的对照样有显著差异($P < 0.05$),苦、酸等负面感受的感官属性处于第三象限,可可特征香属性分布于第四象限。5 种酶解样品中木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶距离对照样最近,在酶解过程释放游离氨基酸较少,导致其风味与对照样较接近,整体香气除具备一定可可粉特征香气外,还带有一定的果酸味。天冬氨酸酶与酸性蛋白酶的风味接近,具备一定烟熏辛香,还带有明显的油脂味;风味蛋白酶样品与对照样香气感官差异最明显,与巧克力特征香有更强的相关性,坚果香、奶香作用显著,同时果甜香更丰富,果香也是突出于普通可可粉的风味优势^[7],这也与感官评价的结果相一致。

3 结论

本文深入探究了酶解联合高温处理对可可粉风味特性的影响。蛋白酶解作用提升了游离氨基酸的浓度,因蛋白酶的特异性对脱脂可可粉的酶解效果造成差异,风味蛋白酶、菠萝蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、木瓜蛋白酶、酸性蛋白酶处理后游离氨基酸浓度分别提升至 0.20、0.14、0.09、0.08 和 0.06 mmol/g。 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上的高温处理使游离氨基酸与还原糖发生 Maillard 反应,促进风味物质的生成,表现出花果香和巧克力特征香。由偏最小二乘模型验证,酶解联合高温处理有助于提高样品的奶香味和花果香,经风味蛋白酶处理 3 h 的可可粉在 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 2 h,既保有其本身的巧克力、焦甜和奶油香气,同时额外的花果香使香气更加丰富。由此可得,酶解工艺有助于提高可可粉中游离氨基酸的含量,高温促使可可特征风味的形成,酶解联合高温处理对可可风味的优化及香精制备工艺提供了理论以及和技术支持。

参考文献

- [1] SEYFRIED C, GRANVOGL M. Characterization of the key aroma compounds in two commercial dark chocolates with high cocoa contents by means of the sensomics approach[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(20): 5827–5837.
- [2] OEC. The observatory of economic complexity online data visualization [DB]. 2018. <https://oec.world/en/profile/hs92/cocoa-powder?redirect=true>.

- [3] 中华人民共和国海关总署. 2021 年 12 月进出口商品类章总值表 (美元值) [EB/OL](2022-01-18)[2022-01-22]. <http://www.customs.gov.cn/customs/302249/zfxgk/2799825/302274/302277/302276/4127446/index.html>.
- [4] CUMMINGD N, MATEO J. Main objectives emphasized at first regional fisheries data and statistics working group [C]// FAO. Proceedings of the Food and Agriculture Organization of the United Nations, Bridgetown, Barbados, FAO, 2018: 1-2.
- [5] WIAH E N, TWUMASI-ANKRAH S. Impact of climate change on cocoa yield in ghana using vector autoregressive model[J]. *Ghana Journal of Technology*, 2017, 1(2): 32-39.
- [6] ACULEY P C, SNITKJAER P, OWUSU M, et al. Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics[J]. *Journal of Food Science*, 2010, 75(6): 300-307.
- [7] JANEK K, NIEWIENDA A, WÖSTEMEYER J, et al. The cleavage specificity of the aspartic protease of cocoa beans involved in the generation of the cocoa-specific aroma precursors[J]. *Food Chemistry*, 2016, 211: 320-328.
- [8] AFOAKWA E O, QUAO J, BUDU A S, et al. Effect of pulp preconditioning on acidification, proteolysis, sugars and free fatty acids concentration during fermentation of cocoa (*Theobroma cacao*) beans[J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2011, 62(7): 755-764.
- [9] HINNEH M, SEMANHIA E, VAN DE WALLE D, et al. Assessing the influence of pod storage on sugar and free amino acid profiles and the implications on some Maillard reaction related flavor volatiles in Forastero cocoa beans[J]. *Food Research International*, 2018, 111: 607-620.
- [10] HINNEH M, VAN W D, TZOMPA S D A, et al. Tuning the aroma profiles of Forastero cocoa liquors by varying pod storage and bean roasting temperature[J]. *Food Research International*, 2019, 125: 108550.
- [11] MOULAY L, MANZANARES P, VALLÉS S, et al. Effect of enzyme treatments and drying temperatures on methylpyrazine content in cocoa (*Theobroma Cacao* L.) powder extract[J]. *Journal of Food Science*, 2006, 71(9): 621-625.
- [12] VOIGT J, JANEK K, TEXTORIS-TAUBE K, et al. Partial purification and characterisation of the peptide precursors of the cocoa-specific aroma components[J]. *Food Chemistry*, 2016, 192: 706-713.
- [13] D'SOUZA R N, GRIMB A, GRIMB S, et al. Degradation of cocoa proteins into oligopeptides during spontaneous fermentation of cocoa beans[J]. *Food Research International*, 2018, 109: 506-516.
- [14] BERGER R G. From fermentation to white biotechnology: How microbial catalysts generate flavours [M]. *Modifying Flavour in Food*. Berger; Woodhead Publishing Limited, 2013: 64-94.
- [15] 康超, 杨玉霞, 刘俐俐, 等. 响应面法优化百香果的酶解工艺[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(21): 157-161. [KANG C, YANG Y X, LIU L L, et al. Optimization of enzymolysis technology of passifloraceae by response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(21): 157-161.]
- [16] TIAN H X, SHI Y H, ZHANG Y, et al. Screening of aroma-producing lactic acid bacteria and their application in improving the aromatic profile of yogurt[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(10): e12837.
- [17] 李明, 王培义, 田怀香. 香料香精应用基础 [M]. 北京: 中国纺织出版社, 2010: 197, 199-203. [LI M, WANG P Y, TIAN H X. Fundamental and application of fragrance and flavor[M]. Beijing: China Textile Publisher, 2010: 197, 199-203.]
- [18] 刘长姣, 杨越越, 王妮, 等. 茚三酮比色法测定秋葵中氨基酸含量条件的优化[J]. *中国食品添加剂*, 2018(1): 187-193. [LIU C J, YANG Y Y, WANG N, et al. Optimization of detection conditions of amino acids in Okra by ninhydrin colorimetric method[J]. *China Food Additive*, 2018(1): 187-193.]
- [19] 孙文佳, 王雪梅, 李亚隆, 等. 外源添加氨基酸对郫县豆瓣模拟体系感官及特征风味的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(22): 283-290. [SUN W J, WANG X M, LI Y L, et al. Effects of exogenous amino acid addition on Pixian broad-bean paste simulation system[J]. *Food Science*, 2021, 42(22): 283-290.]
- [20] 赵镭, 邓少平, 刘文. 食品感官分析词典 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2015. [ZHAO L, DENG S P, LIU W. Food sensory analysis vocabulary[M]. Beijing: China light industry publisher, 2015.]
- [21] END, M J, DAND R. Cocoa beans: Chocolate and cocoa industry quality requirements [M]. CAOBISCO/ECA/FCC, 2015: 11-18.
- [22] SAPAM S, MANDAL N, SINHA B. Latin square designs with neighbor effects-part II[J]. *Communications in Statistics-Theory and Methods*, 2021, 50(14): 3371-3379.
- [23] 朱宏, 王爱莉, 仇菊, 等. 动态顶空结合气质联用法测定山西老陈醋发酵过程中挥发性物质的变化[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(1): 264-271. [ZHU H, WANG A L, QIU J, et al. Changes of aroma compounds in Shanxi aged vinegar during its fermentation determined by dynamic headspace-gas chromatography[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(1): 264-271.]
- [24] MOHAMADI ALASTI F, ASEFI N, MALEKI R, et al. Investigating the flavor compounds in the cocoa powder production process[J]. *Food Science & Nutrition*, 2019, 7(12): 3892-3901.
- [25] 王姣, 王绒雪, 张晋华, 等. 乳扇加工工艺优化及其风味成分分析[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(23): 189-198. [WANG J, WANG R X, ZHANG J H, et al. Optimization of Rushan processing technology and analysis of flavor components[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(23): 189-198.]
- [26] 段春红. 7S、11S 酶解产物的特性及其在肉肠中的应用研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009. [DUAN C H. Study on properties of 7S and 11S modified by enzyme and application in pork sausage[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.]
- [27] CABALLERO B T L, FINGLAS P. Encyclopedia of food sciences and nutrition [M]. 2nd Ed. USA: Academic Press, 2005: 1436-1448.
- [28] ROHSIUS C, REINHARD M, LIEBEREI R. Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins[J]. *European Food Research and Technology*, 2006, 222: 432-438.
- [29] KADOW D, NIEMENAK N, ROHN S, et al. Fermentation-

like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) – Reconstruction and guidance of the fermentation process[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, 62(1): 357–361.

[30] MARSEGLIA A, MUSCI M, RINALDI M, et al. Volatile fingerprint of unroasted and roasted cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from different geographical origins[J]. *Food Research International*, 2020, 132: 109101.

[31] RAMLIN N, HASSAN O, SAID M, et al. Influence of roasting condition on volatile flavour of roasted Malaysian cocoa beans[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2006, 30: 280–298.

[32] 胡梓妍, 刘伟, 何双, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 法分析 3 种金橘的香气挥发性成分[J]. *食品科学*, 2021, 42(16): 176–184. [HU Z Y, LIU W, HE S, et al. Analysis of volatile components in three kinds of Kumquat by HS-SPME-GC-MS[J]. *Food Science*, 2021, 42(16): 176–184.]

[33] ZHANG W C, TANG J M. Tracing the production area of citrus fruits using aroma - active compounds and their quality evaluation models[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(2): 517–526.

[34] 王丹, 况丹妮, 刘若阳, 等. 焦糖化与美拉德反应中 DDMP、HMF 及糠醛的生成研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(12): 100-107.

[WANG D, KUANG D N, LIU R Y, et al. Study on the formation of DDMP, HMF and furfural in caramelization and Maillard reaction[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(12): 100-107.]

[35] AFOAKWA E O, PATERSON A, FOWLER M, et al. Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates[J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(1): 208–215.

[36] AFOAKWA E O, QUAO J, TAKRAMA F, et al. Changes in total polyphenols, o-diphenols and anthocyanin concentrations during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans[J]. *International Food Research Journal*, 2012, 19(3): 1071–1077.

[37] RAMOS C L, DIAS D R, MIGUEL M G D C P, et al. Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation[J]. *Food Research International*, 2014, 64: 908–918.

[38] FEBRIANTO N A, ZHU F. Changes in the composition of methylxanthines, polyphenols, and volatiles and sensory profiles of cocoa beans from the Sul 1 genotype affected by fermentation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(32): 8658–8675.

[39] MIRALLES G J. Chemical composition and flavour development of cocoa products by thermal and enzymatic technologies [J]. University of Salford, 2008.

[40] YAYLAYAN V A, HAFFENDEN L J. Mechanism of imidazole and oxazole formation in [¹³C-2]-labelled glycine and alanine model systems[J]. *Food Chemistry*, 2003, 81(3): 403–409.

[41] SMIT G, SMIT B A, ENGELS W J. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(3): 591–610.

[42] GEMERT L J V. Odour_thresholds [M]. 2nd Ed. The Netherlands: Oliemans Punter & Partners BV, 2011.

[43] BURDOCK G A. Fenaroli's handbook of flavor ingredients [M]. 6th Ed. Boca Raton: CRC Press, 2016.