

doi:10.12301/spxb202200204

文章编号:2095-6002(2022)03-0077-11

引用格式:朱琳,李良好,李晴,等.高粱醇溶蛋白对浓香型白酒窖泥味的消减机制[J].食品科学技术学报,2022,40(3):77-87.



ZHU Lin, LI Lianghao, LI Qing, et al. Reducing effect of kafirin on pit mud-like odor in strong flavor Baijiu[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022,40(3):77-87.

高粱醇溶蛋白对浓香型白酒窖泥味的消减机制

朱琳,李良好,李晴,耿晓杰,郑福平*,李贺贺,孙金沅,
黄明泉,孙宝国

(北京工商大学食品质量与安全北京实验室/中国轻工业酿酒分子工程重点实验室/
中国轻工业酒类品质与安全重点实验室,北京100048)

摘要:窖泥味在浓香型白酒中被视为一种异臭味,添加高粱醇溶蛋白对浓香型白酒中的窖泥味有消减作用,对高粱醇溶蛋白消减窖泥味的作用机制进行了研究。浓香型白酒中的3-甲基吡啶和4-甲基苯酚是使其产生窖泥味的关键气味物质。香气轮廓实验表明,高粱醇溶蛋白的加入可显著降低浓香型白酒中的窖泥味,而对其他风味无显著影响。采用顶空固相微萃取法分析发现,高粱醇溶蛋白可使模拟酒样中的3-甲基吡啶和4-甲基苯酚的挥发度分别降低38.99%和46.39%。且当添加200 mg/L高粱醇溶蛋白后,3-甲基吡啶和4-甲基苯酚的气味阈值分别提高到1.50 $\mu\text{g/L}$ 和0.31 $\mu\text{g/L}$,气味阈值分别为添加高粱醇溶蛋白前的4.59和1.73倍。为进一步解释高粱醇溶蛋白对窖泥味物质消减作用机制,分别在25、45、65 $^{\circ}\text{C}$ 下进行紫外-可见分光光度法分析,发现高粱醇溶蛋白与3-甲基吡啶、4-甲基苯酚可自发络合形成复合物,高粱醇溶蛋白与3-甲基吡啶络合物的生成反应为焓变驱动,高粱醇溶蛋白与4-甲基苯酚络合物的生成反应为吉布斯自由能驱动。研究应用分子对接模型实验表明:高粱醇溶蛋白分子表面的疏水口袋通过空间匹配和分子间作用力将3-甲基吡啶和4-甲基苯酚包裹或连接在内,主要的分子间相互作用力为氢键和疏水作用。希望研究结果可为降低浓香型白酒中的异臭味提供解决方案,为食品中异臭味成分的消减研究提供新思路。

关键词:高粱醇溶蛋白;浓香型白酒;窖泥味;气味阈值;消减机制

中图分类号:TS261.4

文献标志码:A

浓香型白酒占中国白酒总产量的70%,是十二大香型白酒中产量最多的品种,也是中国最重要的传统蒸馏酒之一^[1]。泸州老窖、古井贡、五粮液、洋河等受欢迎的品牌白酒都是浓香型的。与其他香型白酒的生产不同,浓香型白酒的窖池以黄泥筑成,顶上覆盖窖泥^[2]。窖泥中富含腐殖质、氨基酸、有机酸以及铁、铝、钙等微量成分,并且含有长期在特定环境中驯养的窖泥功能菌,如己酸菌、丁酸菌、2,3-丁二醇菌等^[3-4]。这

样的窖池赋予了浓香型白酒以己酸乙酯为主体香的复合香气。但因为窖泥的使用,也向酒中引入了窖泥味^[5]。通常窖泥味在浓香型白酒中被视为一种异臭味,需要在生产过程中控制其产生。

4-甲基苯酚和3-甲基吡啶被发现是造成浓香型白酒中窖泥味的关键气味物质,这两种物质都带有类似马厩和动物粪便的味道。其中3-甲基吡啶的产生被认为与乳酸菌对酿酒原料中色氨酸的降解有

收稿日期:2022-02-26

基金项目:西藏自治区科技计划项目(XZ202001ZY0017N)。

第一作者:朱琳,女,博士研究生,研究方向为高粱醇溶蛋白的综合利用。

*通信作者:郑福平,男,教授,博士,博士生导师,主要从事传统酿造食品风味与品质方面的研究。

关^[6],4-甲基苯酚由窖泥中的丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)代谢产生^[7]。2017年,Du等^[7]在浓香型白酒中发现一些酚类物质,如4-甲基苯酚等,呈现马粪味和药香味混合的气味,与窖泥味十分相近。2018年,Dong等^[5]使用液液微萃取结合气相色谱-质谱-嗅味仪分析了泸州老窖酒中窖泥味的来源,发现3-甲基吡啶也是造成白酒窖泥味的重要气味物质,4-甲基苯酚和3-甲基吡啶的OAV值分别为20和8。因此,控制3-甲基吡啶和4-甲基苯酚的产生和挥发是改善浓香型白酒中窖泥臭味的关键。

对于白酒生产来说,改进发酵方式是减少成品酒中窖泥味的根本方法,但发酵方式的改变往往涉及大量的工艺调整环节,需要资金和场地支撑。因此,尝试探索以非挥发性成分减弱异味不失为一种好方法^[8]。“内寻外加,自然强化”,从白酒酿酒原料或者酒糟中提取非挥发性成分加入白酒中是比寻找非白酒相关材料更为可靠的方法^[9-10]。浓香型白酒的酿酒原料主要以高粱为主,根据白酒品种的不同也含有玉米、小麦、大米、糯米等其他材料^[11],这些材料中存在着丰富的谷物醇溶蛋白,如高粱醇溶蛋白(kafirin)、玉米醇溶蛋白(zein)、小麦醇溶蛋白(gliadin)等^[12]。研究表明,蛋白质和多肽类化合物有结合小分子气味化合物、从而降低其挥发度的作用。Huang等^[13]在模拟酒样中加入200 μg/L四肽Ala-Lys-Arg-Ala后,发现4-甲基苯酚的顶空浓度减少了47.56%。大豆蛋白^[14]、乳球蛋白^[15]和乳清蛋白^[16]等也被证明可以吸附挥发性成分,但到目前为止,还没有在白酒中应用蛋白质吸附异臭化合物的相关研究。

本研究探索了添加高粱醇溶蛋白对浓香型白酒中窖泥味的消减作用。首先探究高粱醇溶蛋白对带窖泥异味的典型酒样的香气轮廓的影响;然后以3-甲基吡啶和4-甲基苯酚作为窖泥味的典型代表化合物,结合固相微萃取探究高粱醇溶蛋白对其挥发性的影响;再探究高粱醇溶蛋白对3-甲基吡啶和4-甲基苯酚气味阈值改变的影响;结合紫外-可见分光光度法研究高粱醇溶蛋白对其结合常数、热力学参数的影响;最后结合分子对接模型探讨高粱醇溶蛋白与3-甲基吡啶、4-甲基苯酚之间的亲和能和对接位点。希望本研究结果可为降低浓香型白酒中的异臭味提供解决方案,为食品中异臭味成分的消减研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验材料

高粱醇溶蛋白。高粱醇溶蛋白依据前人方法从酒糟(由河北衡水老白干有限公司提供)中自提^[17]。凯氏定氮法测得其蛋白质纯度为98.36%,聚丙烯酰胺凝胶电泳实验显示高粱醇溶蛋白由α-高粱醇溶蛋白和β-醇溶蛋白构成。

高粱醇溶蛋白储备液。将高粱醇溶蛋白粉末在55℃水浴,pH值为3的条件下分散在体积分数为70%的乙醇水溶液中,转速300 r/min不间断搅拌2 h,8 000 r/min离心30 min,去除不溶物。最终高粱醇溶蛋白质量浓度由Bradford法测得,为10.0 mg/mL^[18]。

带窖泥味的浓香型白酒样品。国家级评酒师评出的带有明显窖泥味的浓香型酒样。

1.1.2 实验试剂

3-甲基吡啶、4-甲基苯酚标准品,阿拉丁试剂有限公司。邻二氯苯,百灵威试剂有限公司。乙醇和氯化钠,国药集团化学试剂有限公司。超纯水由GenPure UV-TOC Xcad plus超纯水仪制得。实验所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

全二维气相色谱/氮化学发光检测器(comprehensive two-dimensional gas chromatography-nitrogen chemiluminescence detector, GC × GC-NCD)联用仪,美国力可公司,具体配置如下:气相色谱仪部分为Agilent 7890B型,氮化学发光检测器为Agilent 255型,四喷口液氮型调制器为Pegasus III型;UV-3600型紫外可见光谱仪,日本Shimadzu公司;DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器,河南予华仪器有限责任公司;VORTEX2型涡旋仪,德国IKA公司;50/30 μm DVB/CAR/PDMS萃取头,美国Supelco公司;固相微萃取手动进样器,美国Supelco公司。

1.3 实验方法

1.3.1 浓香型白酒风味轮廓分析法

测定添加高粱醇溶蛋白前后两种浓香型白酒样品风味轮廓的变化。向带有窖泥异味的浓香型白酒样品中加入高粱醇溶蛋白,使高粱醇溶蛋白的最终质量浓度为30 mg/L。

感官品评实验室温度24~26℃,湿度33%~

36%。感官品评小组由10位来自中国轻工业酿酒分子工程重点实验室的工作人员组成(4位男士、6位女士),均有两年以上感官分析的经验。为了呈现最佳的香气,使用郁金香形状的白酒品评杯盛放样品,每杯盛放25 mL样品。

品评小组成员对添加高粱醇溶蛋白前后两种浓香型白酒样品中以下8种香气属性的强度进行0~3分的打分:果香、花香、甜香、酸味、醇香、烤香、青香、窖泥味。由50倍阈值浓度的乙酸乙酯(果香)、苯乙醇(花香)、 γ -壬内酯(甜香)、丁酸(酸味)、 $\varphi = 52\%$ 的乙醇水溶液(醇香)、2,3,5-三甲基吡嗪(烤香)、癸醇(青香)和3-甲基吡啶(窖泥味)作为气味参考标准溶液。最终结果由Origin 2021进行可视化处理。

1.3.2 窖泥味物质挥发度的测定

浓香型白酒中窖泥味主要是由3-甲基吡啶和4-甲基苯酚造成的。以顶空固相微萃取法(headspace solid-phase microextraction, HS-SPME)为挥发性物质的前处理方法,测定高粱醇溶蛋白添加至白酒模拟体系(体积分数为52%的乙醇水溶液)前后,3-甲基吡啶和4-甲基苯酚的挥发度变化。其中,3-甲基吡啶的挥发度由HS-SPME结合GC×GC-NCD测定,4-甲基苯酚的挥发度由HS-SPME结合GC-MS测得。

1.3.2.1 顶空固相微萃取法

HS-SPME实验设置对照组和实验组,对照组为3-甲基吡啶或4-甲基苯酚的体积分数为52%乙醇水溶液,实验组在对照组的基础上增加了质量浓度200 mg/L高粱醇溶蛋白。3-甲基吡啶和4-甲基苯酚的最终浓度由表1所示。3-甲基吡啶溶液中添加70 μ L 100 mg/L的正戊基吡嗪作为内标,4-甲基苯酚溶液中添加10 μ L 200 μ g/L的邻二氯苯溶液作为内标。

HS-SPME参数采用前人工作中的方法,并根据实际情况进行了调整^[13]。萃取纤维型号为50/30 μ m DVB/CAR/PDMS,平衡和萃取温度均为35 $^{\circ}$ C,平衡10 min,萃取45 min,搅拌速度为300 r/min。萃取完成后,萃取头转移到GC进样口解析5 min。

采用标准品保留时间比对和谱库质谱比对进行定性,采用内标法进行定量。

1.3.2.2 全二维气相色谱-氮化学发光检测法

3-甲基吡啶的顶空浓度由HS-SPME结合GC×GC-NCD测得。全二维气相色谱条件在前人基础上进行了调整^[19];配置第二柱温箱,第一二维柱分别

为DB-WAX(30 m×0.25 mm×0.25 μ m)和DB-5(0.1 m×0.15 mm×0.25 μ m),两根色谱柱以串联方式连接;载气为氦气,纯度为99.999%,流速为1 mL/min;进样口温度为250 $^{\circ}$ C,不分流。主柱温箱升温程序:初始温度50 $^{\circ}$ C,保持2 min,以3 $^{\circ}$ C/min升至120 $^{\circ}$ C,以2 $^{\circ}$ C/min升至150 $^{\circ}$ C,以5 $^{\circ}$ C/min升至230 $^{\circ}$ C,保持10 min。第二柱温箱升温程序高于主柱温箱5 $^{\circ}$ C,调制器温度高于主柱温箱15 $^{\circ}$ C。调制周期5 s;热吹时间0.7 s,冷吹时间1.8 s。

氮化学发光检测器条件:检测器温度为250 $^{\circ}$ C,双等离子体控制器温度为900 $^{\circ}$ C。氢气和氧气流速分别为5、11 mL/min。

1.3.2.3 气相色谱-质谱检测法

4-甲基苯酚的顶空浓度由HS-SPME结合GC-MS测得。色谱柱为PerkinElmer DB-5(30 m×0.25 mm×0.25 μ m)。升温程序:40 $^{\circ}$ C保持5 min,以10 $^{\circ}$ C/min升至240 $^{\circ}$ C,保持5 min。载气为He气,流速1.0 mL/min,进样口温度250 $^{\circ}$ C,压力49.6 kPa,进样量1 μ L,不分流进样。

电子轰击(EI)离子源;电子能量70 eV;传输线温度250 $^{\circ}$ C;离子源温度230 $^{\circ}$ C;激活电压1.9 V;质量扫描范围 m/z 35~500 u。

1.3.3 窖泥味物质阈值的测定

感官品评实验室温度24~26 $^{\circ}$ C,湿度33%~36%。感官品评小组由10位来自中国轻工业酿酒分子工程重点实验室的工作人员组成(4位男士、6位女士),均有两年以上感官分析的经验。为了呈现最佳的香气,使用郁金香形状的白酒品评杯盛放样品,每杯盛放25 mL。

高粱醇溶蛋白对3-甲基吡啶和4-甲基苯酚气味阈值的影响由十杯法测得^[20]。阈值测定实验平行进行3次,并根据以下顺序进行:1)3-甲基吡啶的阈值;2)加入200 mg/L高粱醇溶蛋白的3-甲基吡啶的阈值;3)4-甲基苯酚的阈值;4)加入200 mg/L高粱醇溶蛋白的4-甲基苯酚的阈值。所有实验采用体积分数为52%的乙醇水溶液作为背景。

十杯法具体操作方法。每组实验由以下3部分组成:已知空白、标准样品、待测样。空白样品为体积分数为52%的乙醇水溶液,标准样品为100倍阈值的3-甲基吡啶、4-甲基苯酚溶液。待测样品由2个空白溶液和6个不同浓度的3-甲基吡啶、4-甲基苯酚溶液组成,浓度以3的倍数递增。感官品评小组成员对不同溶液的气味进行描述和打分,要求分

辨出待测样中与空白不同的样品。数据采用曲线拟合合法处理,识别正确的人数达到总人数 50% 的质量浓度为最终阈值。

1.3.4 高粱醇溶蛋白与窖泥味物质络合结构及络合热力学模型的测定

1.3.4.1 络合结构的测定

采用紫外-可见分光光度法考察高粱醇溶蛋白与 3-甲基吡啶、4-甲基苯酚的结合机理,对高粱醇溶蛋白-3-甲基吡啶、4-甲基苯酚混合溶液的紫光-可见光谱进行了全波长扫描。其中高粱醇溶蛋白质量浓度为 200 mg/L,3-甲基吡啶和 4-甲基苯酚系列梯度浓度为 25、50、75、100 mg/L,溶剂为体积分数为 52% 的乙醇水溶液。采集波长范围为 220 ~ 800 nm,采集速度为 100 nm/min。

1.3.4.2 络合热力学模型的测定

1.3.4.1 节中的紫外-可见光光谱图分别在 25、45、65 °C 重复测定 3 次,结合常数和热力学参数通过 Lineweave-Burk 双倒数方程和 Van't Hoff 方程得到^[21]。

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{a \times K \times c} + \frac{1}{a} \quad (1)$$

式(1)中, A 和 A_0 分别为高粱醇溶蛋白在添加 3-甲基吡啶、4-甲基苯酚络合前后的最大吸收值, c 为 3-甲基吡啶、4-甲基苯酚的摩尔浓度 (mol/L), K 为高粱醇溶蛋白和 3-甲基吡啶、4-甲基苯酚络合前后的结合常数。

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (2)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

式(2)与式(3)中, ΔG 、 ΔH 和 ΔS 分别为吉布斯自由能变、焓变和熵变; K 为结合常数; R 为理想气体常数 [8.314 J/(mol·K)]。

1.3.5 高粱醇溶蛋白与窖泥味物质的分子对接模型实验方法

高粱醇溶蛋白和 3-甲基吡啶、4-甲基苯酚的对接构象和亲和能由分子对接软件 AutoDock Vina (v 1.1.2) 计算得到^[22]。蛋白-配体间的分子间作用力由 Ligplot (v 1.4.5) 分析得到。由于本研究中所用的高粱醇溶蛋白由 α -和 β -高粱醇溶蛋白组成,因此 α -和 β -高粱醇溶蛋白的 PDB 模型被用作对接受体。受体的 PDB 模型采用前人文献结果^[23],3-甲基吡啶和 4-甲基苯酚的 SDF 文件从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中得到,并由 PyMOL 转为 PDB 格式。

受体和配体文件在 AutoDock (v 1.5.6) 中加氢,计算 Gasteiger 电荷,选择旋转键后导出为 PD-BQT (Protein Data Bank, Partial Charge & Atom Type) 文件。采用盲对接筛选所有可能的对接位点,Exhaustiveness 设置为 200,产生 20 个对接构象。最后,根据亲和能最低原则和空间位置吻合程度筛选出最优的对接构象。对接构象和分子间相互作用力的可视化由 PyMOL 和 Ligplot (v 1.4.5) 绘制。

1.4 数据处理

所有数据重复测量 3 次,计算其平均值和标准偏差。采用 SPSS 22 软件进行方差分析,应用 Origin 2021 软件绘图。采用配对样本 t 检验来考察高粱醇溶蛋白对 3-甲基吡啶、4-甲基苯酚挥发性和阈值的影响。

2 结果与分析

2.1 高粱醇溶蛋白对浓香型白酒风味轮廓的影响

高粱醇溶蛋白对浓香型白酒风味轮廓的影响见图 1。为验证高粱醇溶蛋白对窖泥味的影响,选择了窖泥味特征较明显的浓香型酒样进行香气轮廓实验。在窖泥味浓香型白酒中添加 30 mg/L 高粱醇溶蛋白后与原酒样进行对比。实验结果显示,原始浓香型白酒的香气轮廓评分为窖泥味 (2.50 分)、糠味 (1.97 分)、醇味 (1.80 分)、酸味 (1.50 分)、果香 (1.48 分)、甜香 (1.45 分)、烤香 (1.23 分)、花香 (1.05 分) 和青香 (0.87 分)。在加入 30 mg/L 高粱醇

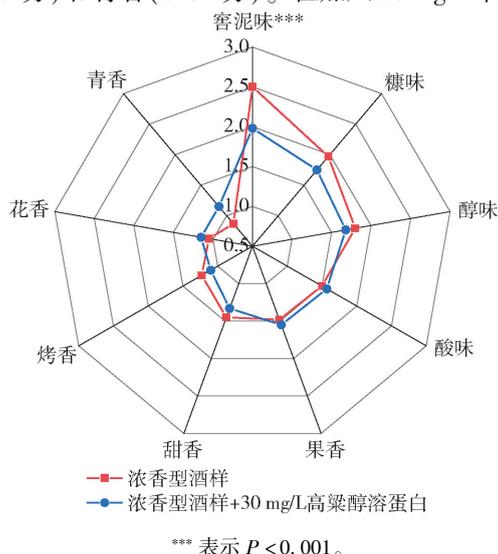


图 1 高粱醇溶蛋白对窖泥味浓香型酒样香气轮廓的影响

Fig. 1 Effects of kafirin on aroma profile of strong flavor Baijiu sample with pit mud-like odor

溶蛋白后,窖泥味显著降低(1.98分)($P < 0.001$),糠味(1.75分)、醇味(1.68分)、甜香(1.33分)、烤香(1.1分)也被减弱,但趋势不明显($P > 0.05$)。酸味(1.57分)、果香(1.55分)、花香(1.15分)和青香(1.15分)微微增强,同样趋势不明显($P > 0.05$)。从整体风味质量上来说,因为窖泥味的显著减弱,带有窖泥味的浓香型白酒样品整体的风味质量得到了提高。高粱醇溶蛋白的添加量为30 mg/L,在此浓度时,窖泥味得到了明显的抑制,但不影响酒样的整体风味轮廓。当浓度继续增大,酒样的整体风味轮廓出现了失衡,使得酒样失去了原有的风格。

2.2 高粱醇溶蛋白对窖泥味物质挥发度的影响

从高粱醇溶蛋白对浓香型白酒风味轮廓的影响可以推断出,高粱醇溶蛋白对窖泥味风味化合物

(如3-甲基吲哚和4-甲基苯酚)的挥发度有影响。因此,采用HS-SPME结合GC×GC-NCD和GC-MS对加入高粱醇溶蛋白前后的3-甲基吲哚和4-甲基苯酚溶液的顶空气体浓度进行测定。为了消除其他化合物的影响,实验在体积分数为52%的乙醇水溶液和3-甲基吲哚、4-甲基苯酚组成的模拟体系中进行。3-甲基吲哚和4-甲基苯酚的原始浓度分别为963.07 μg/L和63.09 μg/L。添加200 mg/L高粱醇溶蛋白后,3-甲基吲哚的顶空浓度减少了38.99% ($P < 0.05$),而4-甲基苯酚的顶空浓度减少了46.39% ($P < 0.01$) (见表1)。这种蛋白质对气味化合物挥发度的抑制作用在以前的研究中已经被多次证明,其原理通常与蛋白质通过分子间作用力束缚了气味小分子的挥发有关^[24-25]。

表1 高粱醇溶蛋白对模拟白酒体系中3-甲基吲哚和4-甲基苯酚挥发性的影响
Tab.1 Effect of kafirin on volatility of 3-methylindole and *p*-cresol in simulated Baijiu

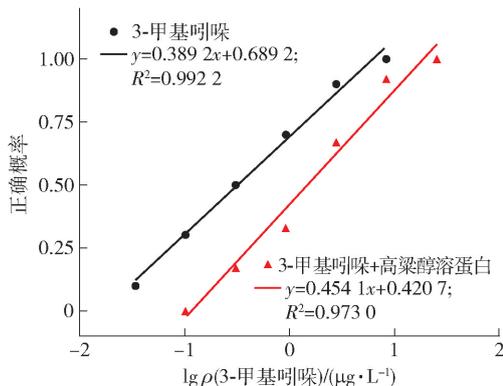
| 化合物名称 | 香气属性 | RI ^a | ρ (对照组)/(μg·L ⁻¹) | ρ (实验组) ^b /(μg·L ⁻¹) | 变化率/% |
|--------|------|-----------------|------------------------------------|--|-------|
| 3-甲基吲哚 | 窖泥臭 | 1 389 | 963.07 ± 56.26 | 587.53 ± 25.75 * | 38.99 |
| 4-甲基苯酚 | 窖泥臭 | 1 075 | 23.70 ± 1.28 | 12.71 ± 1.24 ** | 46.39 |

a:3-甲基吲哚和4-甲基苯酚的保留指数在非极性柱(DB-5)上测得;b:显著性差异值,*为 $P < 0.05$,**为 $P < 0.01$ 。

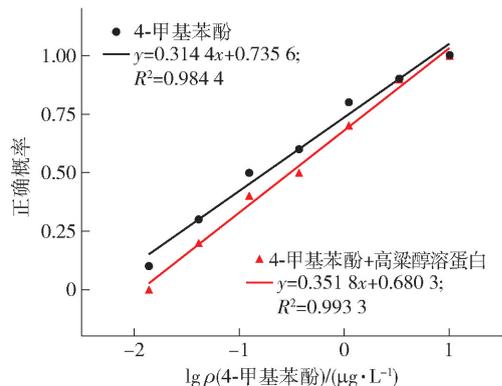
2.3 高粱醇溶蛋白对窖泥味物质阈值的影响

阈值是评估气味化合物在混合体系中呈味能力的重要参数之一,通常来说阈值低的化合物有更强的呈味能力^[26]。因此,采用十杯法对加入高粱醇溶蛋白前后3-甲基吲哚和4-甲基苯酚52%乙醇溶液的阈值进行了测定。纯品高粱醇溶蛋白本身无味,本研究中的用到的高粱醇溶蛋白纯度达到了98.36%,因此其本身的气味不会影响阈值的测定。但在预实验中发现,高粱醇溶蛋白添加量低于1 mg/L时,3-甲基吲哚和4-甲基苯酚的挥发度

会有所下降,但对其阈值和香气轮廓都不会产生很大的影响。在高粱醇溶蛋白添加量超过1 000 mg/L时,溶液的长期稳定性会变弱;但在1 000 mg/L以下不容易产生浑浊和沉淀,并且对异味有显著影响。因此,高粱醇溶蛋白添加量在1 ~ 1 000 mg/L根据异味强度和异味物质挥发度的调整比较合适。在阈值实验中,高粱醇溶蛋白添加量为200 mg/L。品评结果通过曲线拟合法进行数据处理,阈值最终计算结果见图2、表2。3-甲基吲哚和4-甲基苯酚在模拟白酒中的气味阈值分别



(a) 3-甲基吲哚在模拟白酒中的阈值拟合曲线



(b) 4-甲基苯酚在模拟白酒中的阈值拟合曲线

图2 加入高粱醇溶蛋白前后模拟白酒中3-甲基吲哚与4-甲基苯酚的阈值拟合曲线

Fig.2 Fitting curves of threshold of 3-methylindole and *p*-cresol with and without kafirin in simulated Baijiu

表2 高粱醇溶蛋白对模拟白酒中3-甲基吲哚和4-甲基苯酚气味阈值的影响

Tab. 2 Influence of kafirin on odor thresholds of 3-methylindole and *p*-cresol in simulated Baijiu

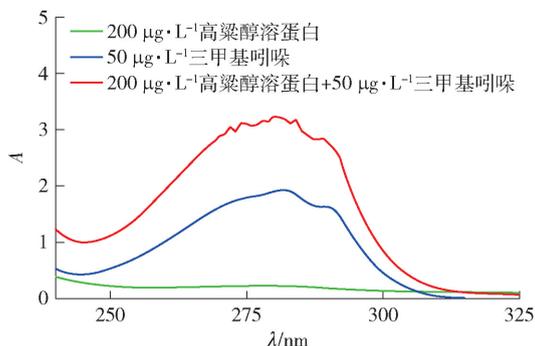
| 化合物 | 阈值 ^a /μg·L ⁻¹ | | 增加倍数 |
|--------|-------------------------------------|------------------|------|
| | 对照组 | 实验组 ^b | |
| 3-甲基吲哚 | 0.33 ± 0.01 | 1.50 ± 0.10 ** | 3.59 |
| 4-甲基苯酚 | 0.18 ± 0.01 | 0.31 ± 0.02 * | 0.73 |

a: 阈值由十杯法测得, 基质为体积分数为52%的乙醇水溶液。对照组为未加高粱醇溶蛋白的3-甲基吲哚、4-甲基苯酚, 实验组为加200 mg/L高粱醇溶蛋白的3-甲基吲哚、4-甲基苯酚; b: 显著性差异, *为 $P < 0.05$, **为 $P < 0.01$ 。

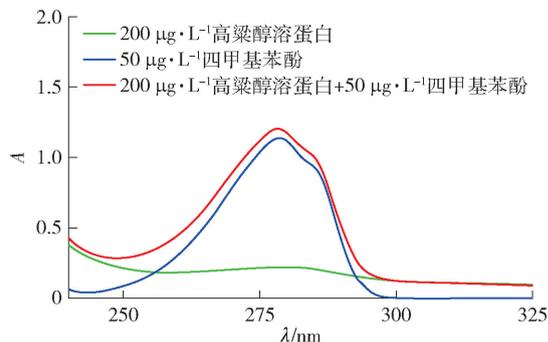
为0.33 μg/L和0.18 μg/L。而添加200 mg/L高粱醇溶蛋白后, 二者气味阈值分别提高到了1.50 μg/L ($P < 0.01$)和0.31 μg/L ($P < 0.05$), 分别增加了3.59倍和0.73倍。因此, 高粱醇溶蛋白可以显著提高浓香型白酒中的窖泥味物质的气味阈值, 从而达到减弱其呈味能力的效果。

2.4 高粱醇溶蛋白与窖泥味物质的络合结构及络合热力学模型分析

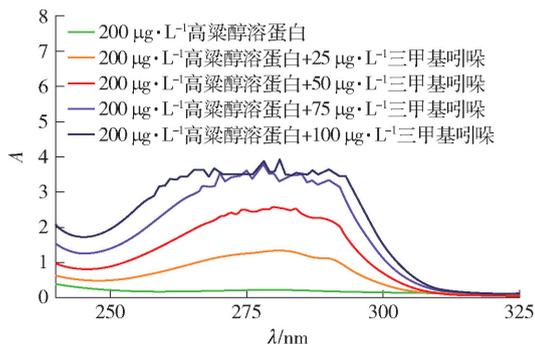
为了验证高粱醇溶蛋白结合窖泥臭味物质的能力, 使用紫外-可见分光光度法对高粱醇溶蛋白结合3-甲基吲哚、4-甲基苯酚前后在280 nm附近的紫外吸收峰进行了研究, 见图3。



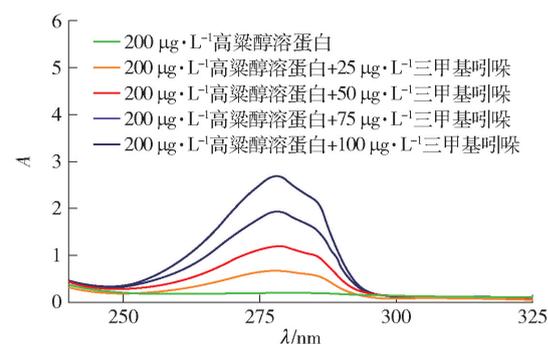
(a) 高粱醇溶蛋白、3-甲基吲哚及其络合物的紫外-可见光光谱



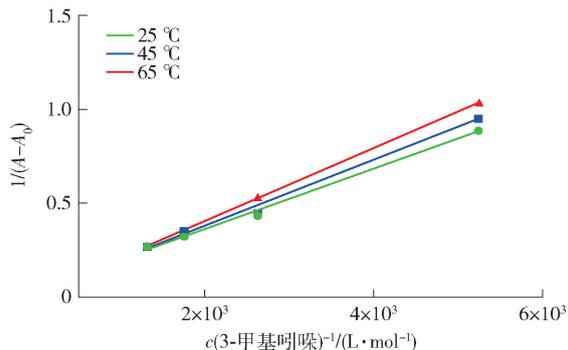
(b) 高粱醇溶蛋白、4-甲基苯酚及其络合物的紫外-可见光光谱



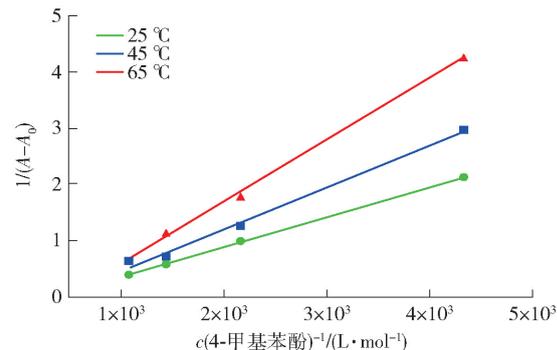
(c) 高粱醇溶蛋白与不同质量浓度3-甲基吲哚的紫外-可见光光谱



(d) 高粱醇溶蛋白与不同质量浓度4-甲基苯酚的紫外-可见光光谱



(e) 高粱醇溶蛋白与3-甲基吲哚的Lineweaver-Burk双倒数曲线



(f) 高粱醇溶蛋白与4-甲基苯酚的Lineweaver-Burk双倒数曲线

图3 高粱醇溶蛋白与3-甲基吲哚和4-甲基苯酚络合体系的紫外-可见光光谱和热力学参数分析

Fig. 3 UV-Vis spectra and thermodynamic parameters analysis of mixture of kafirin-3-methylindole and *p*-cresol

2.4.1 络合结构

图3(a)和3(b)为高粱醇溶蛋白、3-甲基吲哚、4-甲基苯酚和两者混合体系的紫外-可见光光谱。由于含有酪氨酸和苯丙氨酸,高粱醇溶蛋白在279 nm处有明显的吸收峰^[27]。3-甲基吲哚和4-甲基苯酚的最大吸收波长为282 nm和279 nm,即在加入3-甲基吲哚后,高粱醇溶蛋白的最大吸收峰出现红移,而加入4-甲基苯酚对高粱醇溶蛋白的最大吸收峰影响不大。蛋白质的最大吸收峰位置改变可能由产生紫外吸收的酪氨酸和苯丙氨酸微环境的变化引起,也说明了3-甲基吲哚造成了高粱醇溶蛋白的结构变化,这种变化可能由两者之间结合形成了复合物有关^[28]。

加入3-甲基吲哚和4-甲基苯酚后,对高粱醇溶蛋白的紫外吸收强度也造成了影响,并且这种影响不符合 Lambert-Beer 定律。在282 nm处,高粱醇溶蛋白的紫外吸收强度为0.223,3-甲基吲哚的紫外吸收强度为1.912,而高粱醇溶蛋白和3-甲基吲哚混合体系的紫外吸收强度为3.173,远大于两者单独存在时的紫外吸收强度之和。同样的,在279 nm处,高粱醇溶蛋白、4-甲基苯酚、高粱醇溶蛋白和4-甲基苯酚的混合体系紫外吸收强度分别为0.226、1.142和1.205。当混合物紫外吸收强度与单质紫外吸收强度之和不一致时,表示混合体系偏离了 Lambert-Beer 定律的紫外吸收强度,这就预示混合体系中有络合物的形成^[28]。本研究发现,高粱醇溶蛋白与4-甲基苯酚混合体系的紫外吸收强度与两种单质紫外吸收强度之和不一致,即偏离了 Lam-

bert-Beer 定律的紫外吸收强度,可以推知体系中生成了高粱醇溶蛋白-4-甲基苯酚络合物。

2.4.2 络合热力学模型

图3(c)和3(d)为高粱醇溶蛋白和窖泥臭味物质混合体系的紫外-可见光光谱图。随着3-甲基吲哚、4-甲基苯酚质量浓度的增加(25~100 mg/L),混合体系的紫外吸收强度逐渐增加。高粱醇溶蛋白与3-甲基吲哚和4-甲基苯酚的结合常数由 Lineweaver-Burk 方程的截距与斜率之比得到,见图3(e)和3(f)。高粱醇溶蛋白与3-甲基吲哚和4-甲基苯酚络合的热力学方程见表3。高粱醇溶蛋白和3-甲基吲哚的结合常数随着温度增加而降低,而与4-甲基苯酚的结合常数随温度增加而增加。当结合常数随温度增加而增加时,化合物之间的相互作用为吸热反应,反之则为放热反应^[29],因此,高粱醇溶蛋白与3-甲基吲哚之间的相互作用为放热反应,而与4-甲基苯酚之间的相互作用为吸热反应。反应的 ΔH 、 ΔG 和 ΔS 由 Van't Hoff 方程计算得到,结果见表3。高粱醇溶蛋白与3-甲基吲哚、4-甲基苯酚的 ΔG 均为负值(25 °C时为-13.46 kJ/mol和-14.42 kJ/mol,45 °C时为-12.77 kJ/mol和-15.83 kJ/mol,65 °C时为-12.08和-17.24 kJ/mol),说明高粱醇溶蛋白对窖泥臭味气味物质的结合在3个不同温度下均为自发进行^[30]。另外,高粱醇溶蛋白与3-甲基吲哚相互作用的 ΔH 值为负值(-23.75 kJ/mol),表明两者的反应为焓变驱动。而高粱醇溶蛋白与4-甲基苯酚相互作用的 ΔH 为正值(-6.55 kJ/mol),表明两者的反应为吉布斯自由能驱动^[31]。

表3 高粱醇溶蛋白对3-甲基吲哚和4-甲基苯酚络合的热力学参数

Tab.3 Thermodynamic parameters of binding process of kafirin to 3-methylindole and *p*-cresol

| 配体 ^a | 温度/K | $K/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$ | R^2 | $\Delta H/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$ | $\Delta G/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$ | $\Delta S/(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$ |
|-----------------|------|------------------------------------|---------|--|--|---|
| 3-甲基吲哚 | 298 | 219.00 | 0.995 8 | -23.75 | -13.46 | -34.53 |
| | 318 | 138.00 | 0.993 9 | -23.75 | -12.77 | -34.53 |
| | 338 | 70.00 | 0.999 2 | -23.75 | -12.08 | -34.53 |
| 4-甲基苯酚 | 298 | 337.40 | 0.999 1 | 6.55 | -14.42 | 70.37 |
| | 318 | 397.86 | 0.992 0 | 6.55 | -15.83 | 70.37 |
| | 338 | 461.36 | 0.999 8 | 6.55 | -17.24 | 70.37 |

a:受体为高粱醇溶蛋白,反应在体积分数为52%的乙醇水溶液中进行。

2.5 高粱醇溶蛋白与窖泥味物质分子对接亲和能、作用力和对接位点分析

采用 Autodock Vina (v 1.1.2) 和 Ligplot (v 1.4.5) 对高粱醇溶蛋白与窖泥味气味物质分子

之间的亲和能、分子间作用力和对接位点进行分析^[32]。本研究使用的高粱醇溶蛋白含有 α -和 β -高粱醇溶蛋白,因此这两种蛋白质被用来当做受体。利用分子对接软件 Autodock Vina 在可能的对接构

象中筛选出亲和能最低、空间匹配程度最高的一个作为最优对接构象,最终结果见图4。高粱醇溶蛋白和窖泥臭味异臭味物质之间的亲和能较高,显示出较强的结合倾向。其中, α -高粱醇溶蛋白、 β -高粱醇溶蛋白与3-甲基吲哚的亲和能(-26.79 kJ/mol和 -23.02 kJ/mol)微强于其与4-甲基苯酚的亲和能(-21.77 kJ/mol和 -20.09 kJ/mol)(见图5)。作为配体的3-甲基吲哚和4-甲基苯酚通过氢键和疏水作用被包裹在高粱醇溶蛋白的疏水口袋中。疏水口袋为蛋白质三级结构表面的凹陷或孔洞结构,可以为配体提供疏水环境或者氢键对接位点^[32]。

由于 α -高粱醇溶蛋白为在高粱醇溶蛋白中含量更多(77%),因此其对配体的影响占有主要地位。3-甲基吲哚与 α -高粱醇溶蛋白通过疏水作用相互吸引,参与的氨基酸残基包括 Thr1、Leu105、Phe101、Val251、Phe267、Phe4 和 Ile3;而4-甲基苯酚与 α -高粱醇溶蛋白主要通过氢键连接,键长为 3.20 Å。而在与 β -高粱醇溶蛋白的相互作用中,3-甲基吲哚主要表现为氢键和疏水作用,氢键键长为 3.00 Å,而4-甲基苯酚表现为疏水作用,参与的氨基酸残基包括 Gln102、Gly42、Thr39、Ser99、Met38、Ala103 和 Gln102。

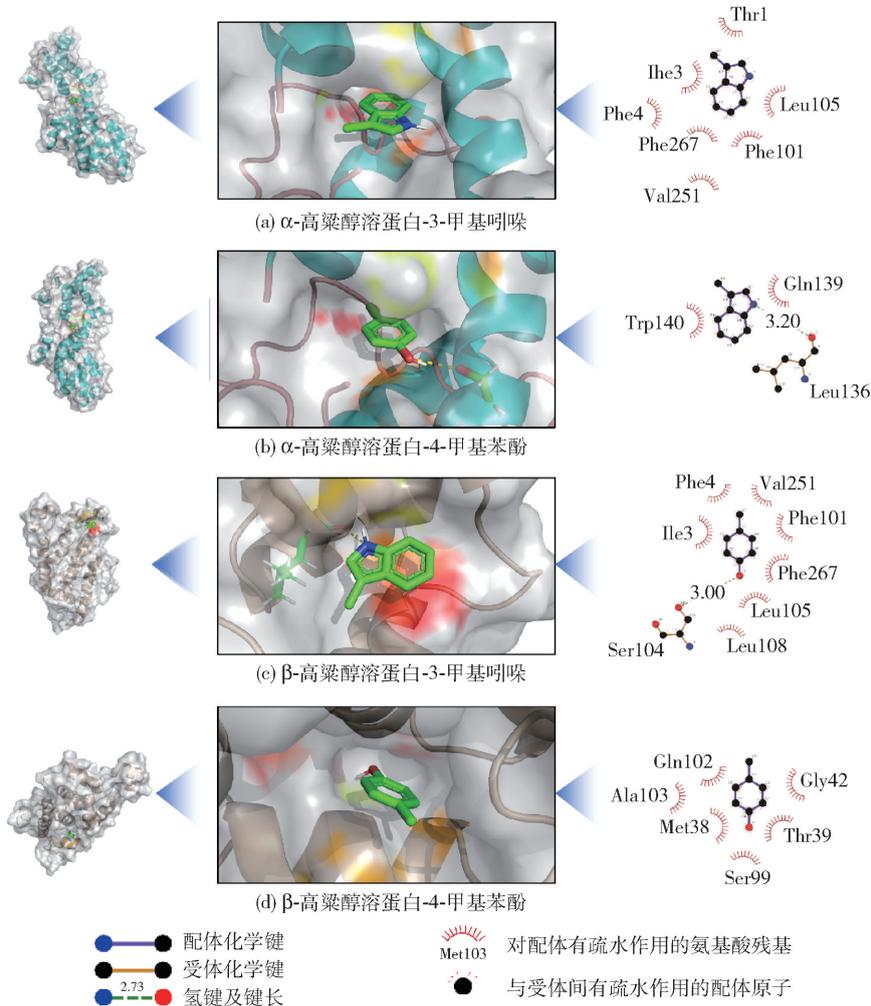


图4 高粱醇溶蛋白与3-甲基吲哚和4-甲基苯酚的对接构象和对接位点

Fig. 4 Docking conformations and binding sites of kafirin with 3-methylindole and kafirin with *p*-cresol

3 结论

高粱醇溶蛋白对浓香型白酒风味轮廓中的窖泥味有消减作用,这种消减作用主要通过高粱醇溶蛋

白对窖泥味物质分子的结合作用产生。香气轮廓实验表明,高粱醇溶蛋白的加入可显著降低浓香型白酒中的窖泥味,而对其他风味无显著影响。采用顶空固相微萃取法分析发现,高粱醇溶蛋白可使模拟

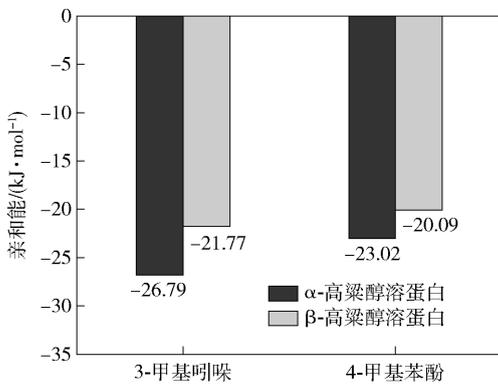


图5 高粱醇溶蛋白与3-甲基吲哚和4-甲基苯酚相互作用的亲和能

Fig. 5 Affinities of interactions of kafirin with 3-methylindole and kafirin with *p*-cresol

酒样中的3-甲基吲哚和4-甲基苯酚的挥发度分别降低38.99%和46.39%。且当添加200 mg/L高粱醇溶蛋白后,两者阈值分别为添加高粱醇溶蛋白前的4.59和1.73倍。分别于25、45、65℃下进行紫外-可见分光光度法分析,发现高粱醇溶蛋白与3-甲基吲哚、4-甲基苯酚可自发络合形成复合物。分子对接模型实验表明,高粱醇溶蛋白分子表面的疏水口袋通过空间匹配和分子间作用力将3-甲基吲哚和4-甲基苯酚包裹或连接在内,主要的分子间相互作用力为氢键和疏水作用。前人对非挥发性成分与食品体系中气味化合物的作用主要集中在研究气味化合物顶空浓度变化和热力学参数计算上,本研究在前人工作的基础上首次考察了高粱醇溶蛋白对窖泥味物质气味阈值的影响,并采用分子对接的手段考察了高粱醇溶蛋白与窖泥味物质的亲和能、对接位点和分子间相互作用力类型。另外,本研究将从白酒糟中的高粱醇溶蛋白提取出来再应用到白酒中以消除异味,这也为很多食品工艺副产物的处理提供了新的思路。但高粱醇溶蛋白在白酒体系中的稳定性和高粱醇溶蛋白对白酒体系中的其它挥发性成分的选择性吸附未来需要进一步考察。希望本研究结果可为降低浓香型白酒中的异臭味提供解决方案,为食品中异臭味成分的消减研究提供新思路。

参考文献:

[1] LIU H L, SUN B G. Effect of fermentation processing on the flavor of Baijiu[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018,66(22): 5425-5432.

[2] JIN G Y, ZHU Y, XU Y. Mystery behind Chinese liquor fermentation[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017,63(2): 18-28.

[3] XU Y Q, SUN B G, FAN G S, et al. The brewing process and microbial diversity of strong flavour Chinese spirits: a review[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2017,123(1): 5-12.

[4] 余乾伟. 传统白酒酿造技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2010: 61-69.

[5] DONG W, SHI K, LIU M, et al. Characterization of 3-methylindole as a source of a "mud"-like off-odor in strong-aroma types of base Baijiu[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(48): 12765-12772.

[6] YOKOYAMA T, CARLSON R. Microbial metabolites of tryptophan in the intestinal tract with special reference to skatole[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1979,32(1): 173-178.

[7] DU H, LIU B, WANG X S, et al. Exploring the microbial origins of *p*-cresol and its co-occurrence pattern in the Chinese liquor-making process[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017,260: 27-35.

[8] WANG G W, JING S, SONG X B, et al. Reconstitution of the flavor signature of Laobaigan-type Baijiu based on the natural concentrations of its odor-active compounds and nonvolatile organic acids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022,374: 131641.

[9] 孙宝国, 李贺贺, 胡萧梅, 等. 健康白酒的发展趋势[J]. 中国食品学报, 2016,16(8): 1-6.

SUN B G, LI H H, HU X M, et al. The development trend of healthy Baijiu[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016,16(8): 1-6.

[10] 吴继红, 黄明泉, 郑福平, 等. 健康白酒的研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2019,37(2): 17-23.

WU J H, HUANG M Q, ZHENG F P, et al. Research progress of healthy Baijiu[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019,37(2): 17-23.

[11] HONG J, TIAN W, ZHAO D. Research progress of trace components in sesame-aroma type of Baijiu[J]. Food Research International, 2020,137: 109695.

[12] 李倩, 裴朝曦, 王之盛, 等. 不同类型酒糟营养成分组成差异的比较研究[J]. 动物营养学报, 2018, 30(6): 2369-2376.

LI Q, PEI C X, WANG Z S, et al. Comparative study on nutrients compositions of different types of distillers' grains[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(6): 2369-2376.

- [13] HUANG M Q, HUO J Y, WU J H, et al. Interactions between *p*-cresol and Ala-Lys-Arg-Ala (AKRA) from sesame-flavor-type Baijiu [J]. *Langmuir*, 2018, 34(42): 12549 – 12559.
- [14] ZHOU Q, CADWALLADER K R. Inverse gas chromatographic method for measurement of interactions between soy protein isolate and selected flavor compounds under controlled relative humidity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(20): 6271 – 6277.
- [15] TAVEL L, ANDRIOT I, MOREAU C, et al. Interactions between β -lactoglobulin and aroma compounds; different binding behaviors as a function of ligand structure[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(21): 10208 – 10217.
- [16] WEEL K G C, BOELRIJK A E M, BURGER J J, et al. Effect of whey protein on the *in vivo* release of aldehydes [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(16): 4746 – 4752.
- [17] TAYLOR J, TAYLOR J R N, DUTTON M F, et al. Glacial acetic acid: a novel food-compatible solvent for kafirin extraction[J]. *Cereal Chemistry*, 2005, 82(5): 485 – 487.
- [18] REKOWSKI A, LANGENKAEMPER G, DIER M, et al. Determination of soluble wheat protein fractions using the Bradford assay [J]. *Cereal Chemistry*, 2021, 98(5): 1059 – 1065.
- [19] SONG X B, ZHU L, WANG X L, et al. Characterization of key aroma-active sulfur-containing compounds in Chinese Laobaigan Baijiu by gas chromatography-olfactometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with sulfur chemiluminescence detection[J]. *Food Chemistry*, 2019, 297: 34286.
- [20] 中国国家标准化管理委员会. 白酒风味物质阈值测定指南:GB/T 33406—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [21] STEPHANOS J J. Drug-protein interactions: two-site binding of heterocyclic ligands to a monomeric hemoglobin [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1996, 62(3): 155 – 169.
- [22] PAN F, LI J X, ZHAO L, et al. A molecular docking and molecular dynamics simulation study on the interaction between cyanidin-3-*O*-glucoside and major proteins in cow's milk[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45(1): 13570.
- [23] ZHU L, SONG X B, PAN F, et al. Interaction mechanism of kafirin with ferulic acid and tetramethyl pyrazine: multiple spectroscopic and molecular modeling studies[J]. *Food Chemistry*, 2021, 363: 130298.
- [24] HAN Z, CAI M J, CHENG J H, et al. Effects of constant power microwave on the adsorption behaviour of myofibril protein to aldehyde flavour compounds [J]. *Food Chemistry*, 2021, 336: 127728.
- [25] LESME H, ALLEAUME C, BOUHALLAB S, et al. Aroma-retention capacities of functional whey protein aggregates: study of a strawberry aroma in solutions and in fat-free yogurts [J]. *Food Research International*, 2020, 136: 109491.
- [26] SONG X B, WANG G, N ZHU L, et al. Comparison of two cooked vegetable aroma compounds, dimethyl disulfide and methional, in Chinese Baijiu by a sensory-guided approach and chemometrics[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021: 111427.
- [27] GENG S, JIANG Z J, MA H J, et al. Interaction mechanism of flavonoids and bovine β -lactoglobulin: experimental and molecular modelling studies[J]. *Food Chemistry*, 2020, 312: 126066.
- [28] GONG S X, YANG C Y, ZHANG J H, et al. Study on the interaction mechanism of purple potato anthocyanins with casein and whey protein[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 111: 106223.
- [29] HUANG M Q, HUO J Y, WU J H, et al. Structural characterization of a tetrapeptide from sesame flavor-type Baijiu and its interactions with aroma compounds [J]. *Food Research International*, 2019, 119: 733 – 740.
- [30] CONDUCT L, KAUR J, HUNG A, et al. Combined spectroscopic, molecular docking and quantum mechanics study of β -casein and ferulic acid interactions following UHT-like treatment [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 89: 351 – 359.
- [31] KAUR J, KATOPO L, HUNG A, et al. Combined spectroscopic, molecular docking and quantum mechanics study of β -casein and *p*-coumaric acid interactions following thermal treatment [J]. *Food Chemistry*, 2018, 252: 163 – 170.
- [32] EBERHARDT J, SANTOS-MARTINS D, TILLACK A F, et al. AutoDock Vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and Python bindings[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2021, 61(8): 3891 – 3898.

Reducing Effect of Kafirin on Pit Mud-Like Odor in Strong Flavor Baijiu

ZHU Lin, LI Lianghao, LI Qing, GENG Xiaojie, ZHENG Fuping*, LI Hehe,

SUN Jinyuan, HUANG Mingquan, SUN Baoguo

(*Beijing Laboratory of Food Quality and Safety/Key Laboratory of Brewing Molecular Engineering of China Light Industry/Key Laboratory of Alcoholic Quality and Safety of China Light Industry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China*)

Abstract: The pit mud-like odor is an unpleasant odor in strong flavor Baijiu, and the addition of kafirin can reduce the pit mud-like odor in strong flavor Baijiu. In this study, the underlying mechanism of the effect of kafirin on reducing the pit mud-like odor was studied. 3-Methylindol and *p*-cresol were regarded as the key aroma compounds that caused pit mud-like odor in strong flavor Baijiu. The aroma profile analysis showed that the addition of kafirin significantly suppressed the pit mud-like off-odor, while did not significantly affect other flavors. Headspace solid-phase microextraction analysis verified that kafirin had a reduction effect on the volatility of 3-methylindol and *p*-cresol, and the headspace concentrations were reduced by 38.99% and 46.39%, respectively. Moreover, addition of 200 mg/L kafirin could increase the odor thresholds of 3-methylindol and *p*-cresol to 1.50 $\mu\text{g/L}$ and 0.31 $\mu\text{g/L}$, which were 4.59 and 1.74 times as those of the original ones separately. In order to explain the mechanism of the reducing effect of kafirin on the pit mud-like odor, the ultraviolet-visible spectrophotometers analyses at 25 $^{\circ}\text{C}$, 45 $^{\circ}\text{C}$ and 65 $^{\circ}\text{C}$ were conducted. The results showed that kafirin-3-methylindol or kafirin-*p*-cresol complexes could be spontaneously formed. The formation process of the kafirin-3-methylindol complex was enthalpy driven, while that of the kafirin-*p*-cresol was Gibbs free energy driven. In addition, molecular docking analysis showed that the hydrophobic cavity wrapped or linked 3-methylindol and *p*-cresol inside by spatial matching and intermolecular force, and the major forces between kafirin and 3-methylindol/*p*-cresol were hydrogen bonds and hydrophobic interactions. The results of this study could provide a solution for weakening the pit mud-like odor in strong flavor Baijiu, and could offer a novel method to reduce the off-odors in the food matrix.

Keywords: kafirin; strong flavor Baijiu; pit mud-like odor; odor threshold; reducing effect

(责任编辑:李 宁)