

蛋白酶对黄酒中苦味多肽 pGlu-LFNPSTNPWHSP 的降解作用

谢广发¹, 鲁振东^{2,3,4}, 吴殿辉^{2,3,4}, 杨丽霞^{2,3,4}, 陆健^{2,3,4*}

¹ 浙江树人学院 浙江省污染暴露与健康干预重点实验室 生物与环境工程学院 杭州 310015

² 江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心 江苏无锡 214122

³ 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏无锡 214122

⁴ 江南大学 江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心 江苏无锡 214122)

摘要 苦味多肽 pGlu-LFNPSTNPWHSP (PGP) 是黄酒中的关键苦味物质之一。本文利用 6 种蛋白酶降解 PGP, 以 PGP 降解率和对黄酒品质的影响为评价指标, 考察不同蛋白酶在黄酒降苦方面的应用潜能。结果表明, 在模拟黄酒溶液中, 不同蛋白酶降解 PGP 的差异较大, 其中风味蛋白酶、木谷蛋白酶和酸性蛋白酶的降解效果较好, PGP 降解率分别为 95.7%, 79.8% 和 24.7%。将其应用于成品黄酒中, 3 种蛋白酶处理对黄酒的理化指标和挥发性风味物质无明显影响, 以风味蛋白酶的降苦效果最佳, PGP 降解率为 25.2%, 苦味强度由 7.2 降至 5.8。利用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术 (UPLC-QTOF-MS) 分析不同蛋白酶酶解产物, 结果显示风味蛋白酶作用 PGP 的多个位点, 得到苦味强度较低的色氨酸 (W)、焦谷氨酰亮氨酸 (pGlu-L) 等小分子氨基酸和多肽片段, 达到降低黄酒苦味的效果。

关键词 黄酒; 苦味多肽; 蛋白酶酶解; 降苦

文章编号 1009-7848(2023)03-0187-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.03.020

苦味是黄酒的基本滋味之一, 适宜的苦味能赋予黄酒刚劲、爽口的感觉, 然而, 苦味过重则会破坏酒的协调性^[1-2]。黄酒中的苦味氨基酸和多肽通常被认为是黄酒苦味的来源之一^[1-3]。苦味氨基酸的阈值为 724~13 050 mg/L^[4-5], 而黄酒中的苦味氨基酸含量均未不能达到该苦味阈值, 并不是影响黄酒苦味的主要物质^[6-7]。Lu 等^[8]基于苦味感官导向, 从黄酒中分离得到苦味焦谷氨酸肽 pGlu-LFNPSTNPWHSP (PGP)^[8]。该多肽在日本清酒中为苦味肽, 并且具有较低的觉察阈值和苦味识别阈值, 分别为 0.160 mg/L 和 0.437 mg/L^[9]。对 14 款黄酒中的定量分析结果表明, PGP 含量为 0~32.97 mg/L, 活性味觉值 (dose over threshold, DoT) 为 0.0~75.4, 且 PGP 含量和苦味强度有较好的相关性。焦谷氨酸肽在食品中普遍存在^[10-12], 其 N 端为焦谷氨酸 (pyroglutamic acid, pGlu), 是谷氨酰胺的 α -氨基和 γ -侧链缩合形成的 2-吡咯烷酮-5-羧酸 (焦谷氨酸)^[13]。

大多数苦味肽具有较高的疏水性。在完整的球蛋白分子中, 大部分疏水性侧链藏在内部, 它们不接触味蕾, 不易产生苦味, 而当蛋白质水解时, 肽链含有的疏水性氨基酸被充分暴露出来, 接触味蕾产生苦味^[14]。苦味肽进一步水解成分子质量更小的多肽和氨基酸后, 苦味随之下降^[14-16]。刘伯业^[17]利用 Protease 酶处理小麦面筋蛋白, 4 h 后苦味肽肽段的平均疏水性降低, 相对分子质量下降, 苦味值由 1.75 降到 0.82。周俊清^[18]利用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、Neutrane 和 Protamex 4 种蛋白酶水解酪蛋白肽, 发现木瓜蛋白酶和 Protamex 水解物的苦味强度较低, 平均肽链长度为 3.66, 平均相对分子量为 420.6, 苦味值为 1.01。Shimamura 等^[19]以来源于 β -酪蛋白的苦味七肽 GPFPIIV 为研究对象, 筛选乳酸菌肽酶对其进行降解, 其中乳酸乳杆菌 (*L. lactis* ssp. *lactis*) 527 的降苦效果最佳, 降解率达 92%。可见, 通过筛选合适的蛋白酶降解食品中的苦味肽, 能有效降低食品中的苦味。本研究旨在通过筛选降解 PGP 的蛋白酶, 在保证风味的前提下, 达到降低黄酒苦味的效果, 并利用 UPLC-Q-TOF-MS 分析蛋白酶酶解苦味肽 PGP 后的产物差异, 解析降低黄酒苦味的原因, 为进一步降低黄酒苦味提供理论基础。

收稿日期: 2022-03-18

基金项目: 浙江省绍兴黄酒产业创新综合体科技创新项目;
浙江省公益技术研究计划项目 (LGN20C200016)

第一作者: 谢广发, 男, 硕士, 教授级高级工程师

通信作者: 陆健 E-mail: jlu@jiangnan.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄酒酒样,由浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司提供;多肽 pGlu-LFNPSTNPWHSP,由无锡亚肽生物有限公司合成;碱性蛋白酶(20万 U/g),白银赛诺生物科技有限公司;中性蛋白酶(20万 U/g),上海嘉衡生物科技有限公司;Maxipro NPU(18万 U/g),帝斯曼(中国)有限公司;木瓜蛋白酶(10万 U/g),南宁庞博生物工程有限公司;风味蛋白酶(10万 U/g)、酸性蛋白酶(10万 U/g),南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

安捷伦高效液相色谱 1260,美国 Agilent 公司;Pegasus BT 气相-高通量飞行时间质谱仪(GC-TOF-MS),美国力可公司;PHS-3E pH,瑞士 Mettler Toledo 公司;超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱联用仪(UPLC-Q-TOF-MS),美国 Waters 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 黄酒苦味肽 PGP 酶解研究

1) 模拟黄酒溶液的配制 称取一定量的苦味多肽 PGP 标准品(500 mg/L),溶解于 15%乙醇溶液中,加入体积分数 0.2%的乳酸,并用乳酸钠调整 pH 值至 4.0。

2) 外加蛋白酶的选择 取 6 种蛋白酶,分别添加到 15%乙醇的模拟黄酒溶液中,控制酶活为 20 U/mL,混匀后于 12℃放置 24 h,12 000 r/min 离心 10 min,取上清,采用 HPLC 法测定苦味多肽 PGP 含量,色谱条件同 1.3.2 节,降解率计算公式:

$$\text{降解率}(\%) = \frac{C_0 - C_a}{C_0} \times 100$$

式中 C_0 ——模拟黄酒的初始 PGP 含量(mg/L), C_a ——酶解后模拟黄酒中的 PGP 含量(mg/L)。

3) 蛋白酶对黄酒样品中 PGP 的脱除 分别用木瓜蛋白酶、风味蛋白酶和酸性蛋白酶(20 U/mL)处理黄酒样品,处理条件为 12℃下放置 72 h,12 000 r/min 离心 10 min,按 1.3.2 节方法进行预先处理,经正丁醇萃取和 C_{18} 固相萃取后,采用 HPLC 法测定苦味多肽中 PGP 含量。

1.3.2 黄酒中 PGP 含量的测定 样品前处理、色谱条件同 Lu 等^[8]方法。

前处理:取 50 mL 酒样,旋转蒸发(0.1 MPa,40℃)去除乙醇。用 50 mL 正丁醇连续萃取 3 次,合并正丁醇相,旋转蒸发去除正丁醇后,溶解于 5 mL 水中。 C_{18} SPE 固相萃取柱(1 g,6 mL),依次经 6 mL 甲醇和 6 mL 水活化后,将正丁醇萃取相溶液装在已活化的 SPE 柱上,并依次用 6 mL 水、20%甲醇和 80%甲醇洗脱,收集 80%甲醇洗脱相,定容 10 mL,经滤膜(0.45 μm)过滤后,用 HPLC 测定。

HPLC 条件:色谱仪:Agilent 1260;色谱柱:XDB- C_{18} (150 mm×4.6 mm,5 μm);流速:1 mL/min;检测波长:280 nm;进样量:20 μL;柱温:25℃;流动相:A 水(0.1%三氟乙酸)、B 甲醇(0.1%三氟乙酸);色谱条件:0 min,A/B(60:40,V/V,下同);5 min,A/B(40:60);25 min,A/B(30:70);30 min,A/B(30:70);35 min,A/B(60:40)。

1.3.3 UPLC-Q-TOF-MS 分析 色谱条件:色谱仪:Waters ACQUITY UPLC;检测器:WATERS ACQUITY PDA;色谱柱:BEH C_{18} 反向色谱柱(2.1 mm×150 mm,1.7 μm);流速:0.3 mL/min;波长扫描范围:200~400 nm;进样量:5 μL;柱温:45℃;流动相:A 乙腈、B 水(0.1%甲酸);色谱条件:0 min,A/B(2:98,V/V);0.1 min,A/B(2:98);5 min,A/B(10:90);8 min,A/B(30:70);10 min,A/B(40:60);12 min,A/B(80:20);12.1 min,A/B(2:98)。

MS 质谱条件:电离源为电喷雾电离(ESI),模式为正离子模式,毛细管电压 3 500 V,离子源温度 100℃,锥孔电压 30 V,碰撞电压 6 eV,扫描范围 m/z 20~2 000 amu。

1.3.4 黄酒挥发性风味物质的测定^[20,21] 顶空固相微萃取条件:取 3 mL 不同处理的黄酒样品,加入 3 mL 纯净水,2.5 g 氯化钠,10 μL 内标物(2-辛醇,60 mg/L),萃取温度 50℃,预热 15 min,萃取时间 40 min,GC 解吸 5 min(250℃)。

GC-MS 条件:色谱柱型号 DB-Wax 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm),柱初始温度 40℃保持 5 min,以 5℃/min 的速度上升至 150℃,再以 10℃/min 的速度上升至 230℃,然后保持 10 min。载气为高纯度氦气,流速 1.0 mL/min,进样口温度 250℃,进样方式为不分流进样。MS 条件:接口温度 230℃,电离源 EI,扫描范围(m/z)30~550

amu, 电子能量 70 eV, 离子源温度 210 °C^[20]。

定性和定量分析: 通过与标准化合物的保留时间和质谱的比较, 对挥发性风味物质进行定性分析。以 2-辛醇为内标进行半定量分析。

1.3.5 感官评价 经培训的 10 名研究生和教师参与黄酒感官品评, 分别对协调性、曲香、果香、醇香、酸味、涩味、苦味和甜味进行评价, 按 0~10 评分, 表示强度由弱到强。

1.3.6 数据处理 利用 MassLynx V4.1 软件对 MS 数据进行分析, 并利用 BioLynx Peptide Sequencing 软件对多肽进行从头测序 (*de novo*)。数据分析运用 SPSS20.0 软件, 每个试验均重复 3 次, 数据以平均值±标准偏差表示。利用单因素 ANOVA 的 Duncan 对数据之间的差异显著性进行分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的初筛

相较于苦味肽, 苦味氨基酸的阈值通常较高^[4]。通过外加蛋白酶将苦味肽水解成苦味氨基酸是脱除苦味的常用方法。对 6 种蛋白酶的降解苦味肽 PGP 水平进行比较, 结果见图 1。在模拟黄酒溶液中, 木瓜蛋白酶、风味蛋白酶和酸性蛋白酶对 PGP 的降解效果较好, 经 12 °C 酶解 24 h, 降解率分别达 95.7%, 79.8% 和 24.7%。

2.2 蛋白酶在黄酒中的应用

因实际黄酒中的组分较模拟黄酒溶液复杂, 可能会影响蛋白酶作用, 故对不同蛋白酶在成品黄酒中的应用进行研究。选用在模拟黄酒溶液中降解 PGP 效果较好的 3 种蛋白酶对黄酒进行降苦试验, 对处理后的黄酒进行常规理化指标和 PGP 含量分析, 结果见表 1。3 种蛋白酶处理对黄

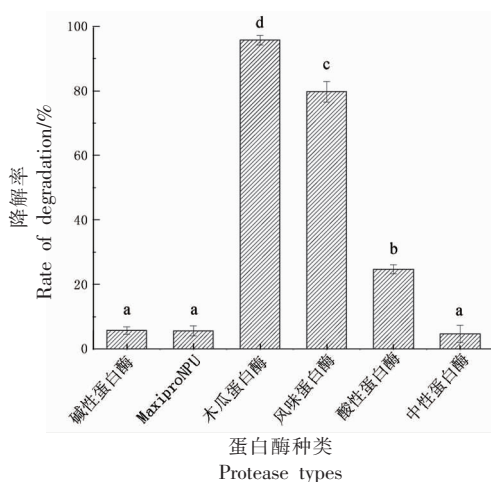


图 1 6 种蛋白酶降解模拟黄酒中的苦味多肽 PGP
Fig.1 Degradation of bitter peptide PGP in simulated Huangjiu by six proteases

酒的酒精度均无明显影响。风味蛋白酶处理后, 总酸和氨基酸态氮分别提高了 4.4% 和 2.4%, PGP 含量下降了 25.2%。木瓜蛋白酶和酸性蛋白酶处理后, 总酸、氨基酸态氮和 PGP 均无显著变化。3 种蛋白酶处理后黄酒的感官评价结果见图 2, 其苦味有明显下降, 其中风味蛋白酶效果最佳, 苦味强度由 7.2 降至 5.8, DoT 由 64.4 降至 48.1, 而酸味、甜味、协调性等均无显著变化。

利用 HS-SPME-GC-MS 对黄酒中常见的 29 种挥发性风味物质进行分析, 包括 7 种醇, 9 种酯, 4 种醛, 5 种酸和 4 种酚, 以半定量方法计算得到各物质的相对含量, 结果见表 2。经 3 种蛋白酶处理后, 黄酒中的挥发性风味物质含量均无显著性变化。综合常规理化指标、感官评定和挥发性风味物质分析结果, 风味蛋白酶在黄酒降苦方面有较好的应用潜力。

表 1 不同处理对黄酒的常规理化性质和 PGP 含量的影响

Table 1 Effect of different treatments on physicochemical properties and PGP content of Huangjiu

处理 (Treatment)	pH	酒精度/%vol (Alcohol content/%vol)	总酸/g·L ⁻¹ (Total acid/g·L ⁻¹)	氨基酸态氮/g·L ⁻¹ (Amino acid nitrogen/g·L ⁻¹)	PGP 含量/mg·L ⁻¹ (PGP content/mg·L ⁻¹)
未处理 (Untreated)	4.53 ± 0.01 ^b	16.65 ± 0.17 ^a	4.74 ± 0.06 ^a	0.53 ± 0.01 ^a	28.14 ± 1.66 ^b
木瓜蛋白酶 (Papain)	4.49 ± 0.03 ^a	16.60 ± 0.19 ^a	4.84 ± 0.03 ^a	0.53 ± 0.00 ^a	25.92 ± 1.95 ^b
风味蛋白酶 (Flavor protease)	4.49 ± 0.02 ^a	16.54 ± 0.14 ^a	4.95 ± 0.04 ^b	0.55 ± 0.00 ^b	21.04 ± 2.39 ^a
酸性蛋白酶 (Acid protease)	4.50 ± 0.03 ^a	16.58 ± 0.16 ^a	4.79 ± 0.07 ^a	0.53 ± 0.00 ^a	26.89 ± 1.18 ^b

注: 同一列不同字母(a, b, c)表示存在显著差异。

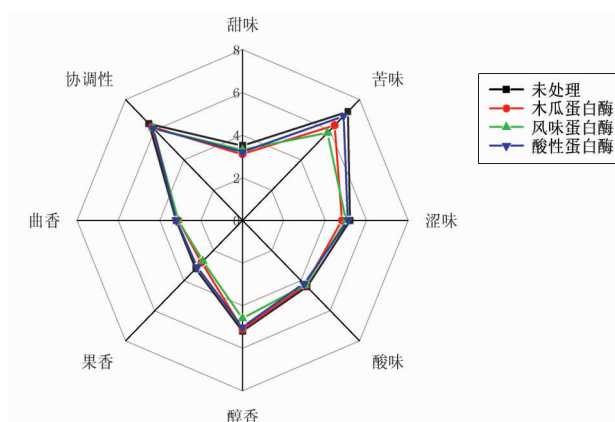


图2 黄酒及其处理后的风味雷达图

Fig.2 Odor radar map of *Huangjiu* and it was treated

表2 不同处理对黄酒中挥发性风味物质的影响(mg/L)

Table 2 Effect of different treatments on volatile flavor compounds in *Huangjiu* (mg/L)

	未处理	木瓜蛋白酶	风味蛋白酶	酸性蛋白酶[A1]
A1 正丙醇	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00
A2 异丁醇	78.44 ± 3.25	79.7 ± 2.13	75.81 ± 1.31	77.17 ± 1.89
A3 异戊醇	260.01 ± 8.94	258.19 ± 6.86	265.49 ± 4.08	261.91 ± 5.24
A4 β-苯乙醇	283.53 ± 6.48	285.22 ± 7.02	280.27 ± 6.55	282.9 ± 7.65
A5 正丁醇	0.79 ± 0.11	0.71 ± 0.08	0.84 ± 0.06	0.74 ± 0.08
A6 苯甲醇	4.47 ± 0.08	4.5 ± 0.13	4.1 ± 0.11	4.26 ± 0.10
A7 1-辛烯-3-醇	1.53 ± 0.03	1.47 ± 0.04	1.46 ± 0.02	1.48 ± 0.01
B1 乙酸乙酯	37.49 ± 1.84	38.36 ± 0.64	36.45 ± 0.61	36.62 ± 0.14
B2 乳酸乙酯	61.45 ± 2.9	63.32 ± 1.74	61.22 ± 2.01	60.11 ± 0.77
B3 乙酸异戊酯	2.34 ± 0.89	3.04 ± 0.18	2.42 ± 0.16	2.41 ± 0.06
B4 辛酸乙酯	9.01 ± 0.39	7.88 ± 0.33	7.11 ± 0.49	7.93 ± 0.62
B5 己酸乙酯	13.88 ± 1.36	14.77 ± 0.36	13.88 ± 0.34	13.73 ± 0.27
B6 乙酸苯乙酯	26.66 ± 1.78	28.35 ± 0.70	26.63 ± 1.13	25.58 ± 1.09
B7 丁二酸二乙酯	237.53 ± 3.77	228.01 ± 11.35	238.97 ± 4.18	232.82 ± 5.07
B8 苯甲酸乙酯	13.96 ± 0.89	14.49 ± 0.39	14.08 ± 0.29	13.85 ± 0.3
B9 苯乙酸乙酯	12.43 ± 0.44	11.38 ± 0.28	10.98 ± 0.32	11.52 ± 0.39
C1 糠醛	13.56 ± 0.6	12.42 ± 0.47	12.76 ± 0.10	12.93 ± 0.13
C2 5-甲基糠醛	0.22 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.01
C3 苯甲醛	61.14 ± 2.41	61.54 ± 2.48	62.7 ± 1.31	60.92 ± 1.7
C4 苯乙醛	3.47 ± 0.11	3.35 ± 0.08	3.06 ± 0.06	3.23 ± 0.17
D1 乙酸	7.84 ± 0.65	8.68 ± 0.29	8.20 ± 0.21	8.40 ± 0.23
D2 辛酸	3.12 ± 0.35	2.87 ± 0.04	3.33 ± 0.13	2.89 ± 0.43
D3 丁酸	0.49 ± 0.04	0.38 ± 0.06	0.36 ± 0.03	0.39 ± 0.08
D4 己酸	51.64 ± 1.48	50.31 ± 1.23	48.52 ± 1.23	50.54 ± 1.43
D5 苯甲酸	1.56 ± 0.02	1.58 ± 0.05	1.46 ± 0.03	1.52 ± 0.04
E1 2,4-二叔丁基苯酚	183.6 ± 4.11	181.23 ± 4.59	179.16 ± 4.42	181.34 ± 1.52
E2 4-乙基愈创木酚	0.39 ± 0.02	0.37 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.37 ± 0.01
E3 苯酚	0.37 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.00
E4 香兰素	0.12 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.12 ± 0.00

2.3 蛋白酶酶解后的多肽片段差异分析

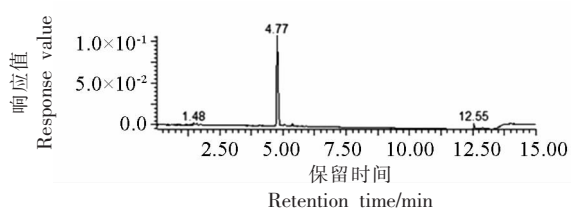
模拟黄酒溶液中的蛋白酶初筛结果表明,木瓜蛋白酶的酶解速率优于风味蛋白酶和酸性蛋白酶,而将其应用于成品黄酒时,风味蛋白酶酶解产物的氨基酸态氮含量最高,对 PGP 的降解率最高。由于黄酒组分过于复杂,难以直接利用 UPLC-Q-TOF-MS 分析苦味肽酶解产物,因此选用成分

组成较为简单的模拟黄酒溶液进行研究。将模拟黄酒溶液分别经 3 种蛋白酶酶解 48 h,用 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定酶解产物,结果见表 2 和图 3、图 4。木瓜蛋白酶和酸性蛋白酶酶解 PGP 为内切酶作用,木瓜蛋白酶酶切位点在 TN 之间,形成了 $[M+H]^+$ m/z 为 789.4 (pGlu-LFNPST) 和 737.4 (NPWHSP) 的 2 个多肽片段;酸性蛋白酶将 PGP

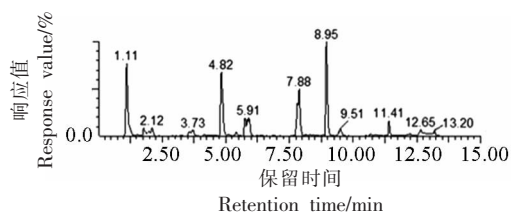
表 3 苦味多肽 PGP 在蛋白酶酶解下形成的多肽片段

Table 3 Identification peptide fragments of PGP degradation under three proteases

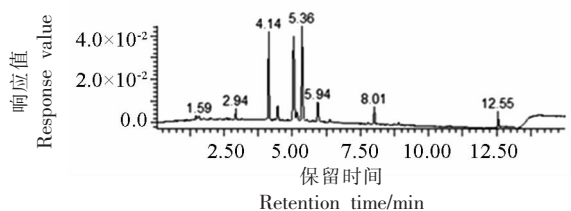
序号	蛋白酶种类	酶解后的多肽片段 $[M+H]^+$ m/z (保留时间/min, 多肽序列)
1#	木瓜蛋白酶	789.4(7.88, pGlu-LFNPST), 737.4(4.84, NPWHSP)
2#	风味蛋白酶	205.1 (4.14, W), 243.1 (5.88, pGlu-L), 280.1 (2.69, FN), 302.1 (5.40, PW), 377.2(4.57, FNP), 688.3(7.88, pGlu-LFNPS), 838.4(5.09, TNPWHSP)
3#	酸性蛋白酶	688.3(7.88, pGlu-LFNPS), 838.4(5.09, TNPWHSP), 1 507.6(8.91, pGlu-LFNPSTNPWHSP)



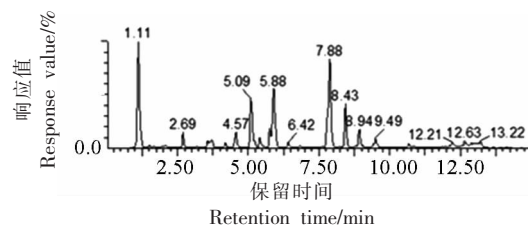
(a)木瓜蛋白酶酶解苦味多肽 PGP 的色谱图(280 nm)



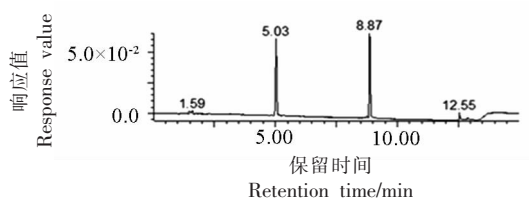
(b)木瓜蛋白酶酶解苦味多肽 PGP 的总离子流图



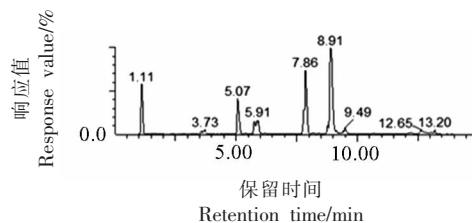
(c)风味蛋白酶酶解苦味多肽 PGP 的色谱图(280 nm)



(d)风味蛋白酶酶解苦味多肽 PGP 的总离子流图



(e)酸性蛋白酶酶解苦味多肽 PGP 的色谱图(280 nm)



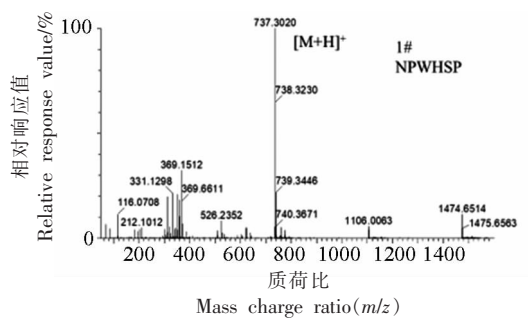
(f)酸性蛋白酶酶解苦味多肽 PGP 的总离子流图

图 3 不同蛋白酶酶解苦味多肽 PGP 的色谱图(280 nm)和总离子流图(TIC)

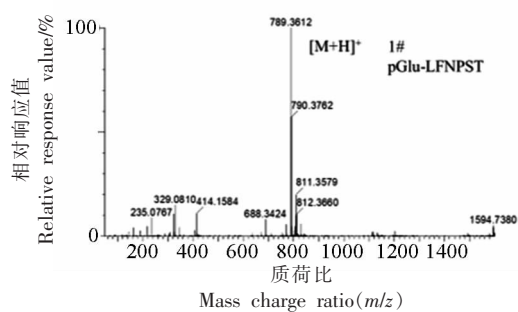
Fig.3 Chromatographic profile at 280 nm and total ion chromatography of bitter peptide PGP enzymolysis by different proteases

酶解形成 $[M+H]^+$ m/z 为 688.3 (7.88 min, pGlu-LFNPS) 和 838.4 (5.09 min, TNPWHSP) 2 个多肽片段; 风味蛋白酶则酶解形成分子质量更小的多肽和氨基酸, 如色氨酸(W)、脯氨酰亮氨酸(PW)、焦

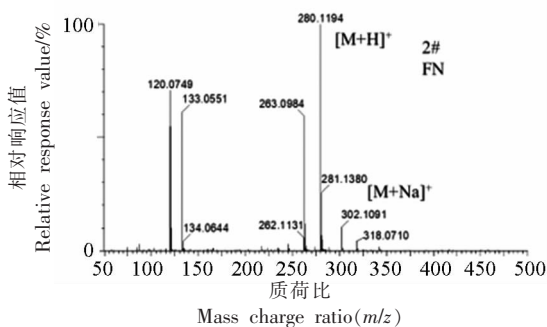
谷氨酰亮氨酸(pGlu-L)等。其中, 色氨酸虽然被认为是苦味氨基酸, 但是其苦味阈值较大, 为 816 mg/L^[5], 而小分子的焦谷氨酰肽如 pGlu-P, pGlu-PQ 具有鲜味^[12]。



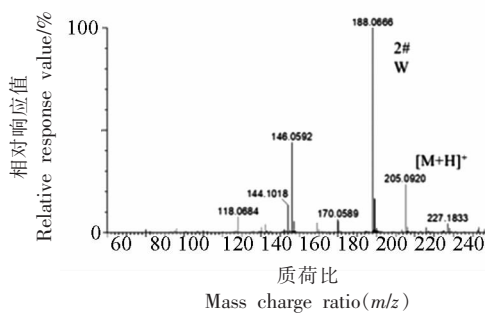
(a) 多肽 NPWHSP 的质谱图



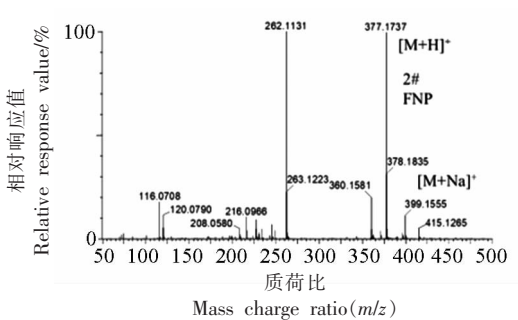
(b) 多肽 pGlu-LFNPS 的质谱图



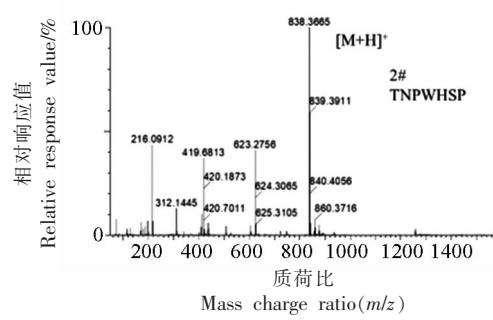
(c) 多肽 FN 的质谱图



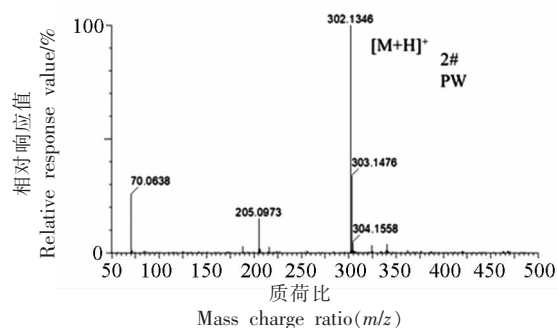
(d) 色氨酸的质谱图



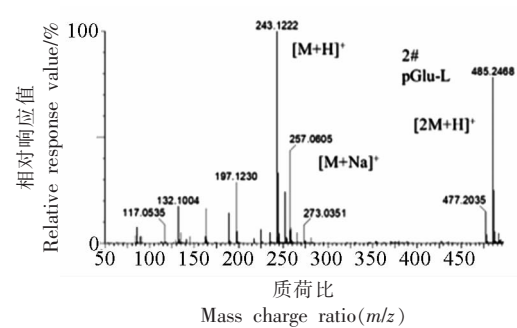
(e) 多肽 FNP 的质谱图



(f) 多肽 TNPWHSP 的质谱图



(g) 多肽 PW 的质谱图



(h) 多肽 pGlu-L 的质谱图

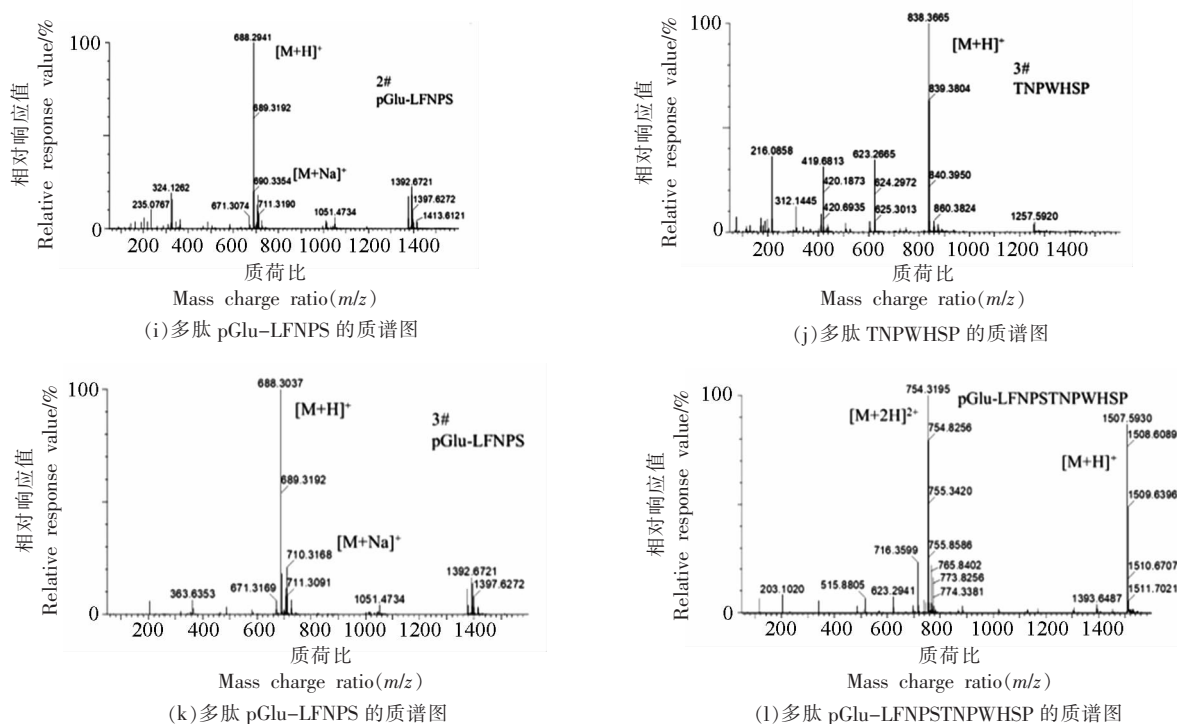


图 4 不同蛋白酶酶解苦味肽 PGP 的质谱图

Fig.4 MS spectrogram of bitter peptide PGP enzymolysis by different proteases

3 结论

苦味肽是黄酒苦味物质的主要组成,通过降低黄酒苦味肽含量,可有效降低黄酒的苦味。本研究比较了 6 种蛋白酶在模拟黄酒溶液中的降苦能力,其中风味蛋白酶、木瓜蛋白酶和酸性蛋白酶降解 PGP 效果较好,分别达 95.7%,79.8%和 24.7%。将这些酶应用于成品黄酒中,不同蛋白酶处理对黄酒挥发性风味物质均无显著影响。其中,风味蛋白酶处理效果最佳,总酸和氨基酸态氮分别提高了 4.4%和 2.4%,PGP 含量下降了 25.2%,苦味强度由 7.2 降到 5.8。采用 UPLC-Q-TOF-MS 分析 3 种蛋白酶酶解 PGP 的产物,酸性蛋白酶和木瓜蛋白酶仅发生单位点酶切,而风味蛋白酶存在多位点酶解,形成 W、PW、pGlu-L 等苦味强度较低的小分子氨基酸和多肽。

参 考 文 献

[1] 毛青钟. 影响机械化黄酒中产生苦(涩)味物质的因素及控制[J]. 酿酒, 2001, 28(1): 43-45.
MAO Q. Effect of production of bitter (astringent)

compounds in mechanized Chinese Rice Wine and their controls[J]. Liquor Making, 2001, 28(1): 43-45.

- [2] 杨国军. 黄酒中苦味物质及其来源探讨[J]. 酿酒, 2003, 30(3): 44-46.
YANG G. Discussion on the bitter compounds in Chinese rice wine and their sources[J]. Liquor Making, 2003, 30(3): 44-46.
- [3] 杨国军. 黄酒中的苦味物质及其来源探讨[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(2): 87-90.
YANG G. Discussion on the bitter compounds in chinese rice wine and their sources[J]. Food and Fermentation Industries, 2004 30(2): 87-90.
- [4] HUFNAGEL J C, HOFMANN T. Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(19): 9190-9199.
- [5] HILLMANN H, HOFMANN T. Quantitation of key tastants and re-engineering the taste of parmesan cheese[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(8): 1794-1805.
- [6] 芮鸿飞, 张晓瑜, 刘兴泉, 等. PIBC 柱前衍生-反相高效液相色谱法测定黄酒中游离氨基酸和生

- 物胺[J]. 食品科学, 2016, 37(8): 159-163.
- RUI H F, ZHANG X Y, LIU X Q, et al. Simultaneous determination of free amino acids and biogenic amines in Chinese rice wine by RP-HPLC with pre-column phenylisothiocyanate (PITC) derivatization[J]. Food Science, 2016, 37(8): 159-163.
- [7] 张辉, 袁军川, 毛严根, 等. 机制黄酒酿造生产过程中氨基酸变化研究[J]. 酿酒科技, 2009, 176(2): 37-39.
- ZHANG H, YUAN J C, MAO Y G, et al. Research on the change of amino acid content in mechanized production of yellow rice wine [J]. Liquor-making Science and Technology, 2009, 176(2): 37-39.
- [8] LU Z, XIE G, WU D, et al. Isolation and identification of the bitter compound from Huangjiu[J]. Food Chemistry, 2021, 349: 129133.
- [9] HASHIZUME K, OKUDA M, NUMATA M, et al. Bitter-tasting sake peptides derived from the N-terminus of the rice glutelin acidic subunit[J]. Food Science and Technology Research, 2007, 13(3): 270-274.
- [10] HASHIZUME K, ITO T, NAGAE Y, et al. Quantitation and sensory properties of three newly identified pyroglutamyl oligopeptides in sake[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2019, 83(2): 357-364.
- [11] MASOTTI F, NONI I, CATTANEO S, et al. Occurrence, origin and fate of pyroglutamyl- γ 3-casein in cheese[J]. International Dairy Journal, 2013, 33(2): 90-96.
- [12] SCHLICHOTHERLE-CERNY H, AMADÒ R. Analysis of taste-active compounds in an enzymatic hydrolysate of deamidated wheat gluten[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(6): 1515-1522.
- [13] GAZME B, BOACHIE R T, TSOPMO A, et al. Occurrence, properties and biological significance of pyroglutamyl peptides derived from different food sources[J]. Food Science and Human Wellness, 2019, 8(3): 268-274.
- [14] 冯红霞, 陆兆新, 尤华. 苦味肽的形成及脱苦方法的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(5): 151-154.
- FENG H, LU Z, YOU H. Study on forming mechanism and debittering methods of bitter peptides[J]. Food Science, 2002, 23(5): 151-154.
- [15] LIU B, ZHU K, PENG W, et al. Effect of sequential hydrolysis with endo- and exo-peptidase on bitterness properties of wheat gluten hydrolysates[J]. Rsc Advances, 2016, 6(33): 27659-27668.
- [16] 李萍. 大豆肽脱苦及其生理功能的研究[D]. 济南: 济南大学, 2014.
- LI P. Study on soybean peptide debittering and physiological function[D]. Jinan: Jinan University, 2014.
- [17] 刘伯业. 小麦蛋白低苦味肽的制备及其脱苦机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- LIU B. Study on the preparation of low-bitterness peptide powders from gluten and debittering mechanism[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [18] 周俊清. 酪蛋白肽及其苦味肽功能特性的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- ZHOU J Q. Study on functional properties of casein peptide and its bitter peptides[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008.
- [19] SHIMAMURA T, NISHIMURA T, IWASAKI A, et al. Degradation of a bitter peptide derived from casein by lactic acid bacterial peptidase[J]. Food Science and Technology Research, 2009, 15(2): 191-194.
- [20] LUO T, FAN W, YAN X. Characterization of volatile and semi-volatile compounds in Chinese rice wines by headspace solid phase microextraction followed by gas chromatography mass spectrometry[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2012, 114(2): 172-179.
- [21] CHEN S, XU Y, QIAN M C. Comparison of the aromatic profile of traditional and modern types of Huang Jiu (Chinese rice wine) by aroma extract dilution analysis and chemical analysis[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2018, 33(3): 263-271.

Effect of Hydrolysis with Peptidase on Bitter Peptide pGlu-LFNPSTNPWHSP from *Huangjiu*

Xie Guangfa¹, Lu Zhendong^{2,3,4}, Wu Dianhui^{2,3,4}, Yang Lixia^{2,3,4}, Lu Jian^{2,3,4*}

(¹Zhejiang Shuren University, Laboratory of Pollution Exposure and Health Intervention of Zhejiang Province, College of Biology and Environmental Engineering, Hangzhou 310015

²Jiangnan University, National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Wuxi 214122, Jiangsu

³School of Biotechnology, Jiangnan University, Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, Jiangsu

⁴Jiangnan University, Jiangsu Provincial Research Center for Bioactive Product Processing Technology, Wuxi 214122, Jiangsu)

Abstract Bitter pyroglutamate peptide pGlu-LFNPSTNPWHSP (PGP) is one of the crucial compounds in *Huangjiu*. In this paper, six proteases were screened to degrade bitter peptide PGP in the simulated *Huangjiu*, and the degradation rate of PGP combined with effect on the quality of *Huangjiu* was studied to evaluate potential application of different proteases in reducing the bitterness of *Huangjiu*. Results showed different proteases had great differences in the degradation of bitter peptides, among them, flavor protease, papain and acid protease had better degradation effects, reaching 95.7%, 79.8% and 24.7%, respectively. Then three effective proteases were applied to commercially *Huangjiu*, flavor protease had the best effect on reducing bitterness, degradation of PGP reaching 25.2%, and bitterness intensity from 7.2 to 5.8, while volatile compounds had no significant effect. Using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-MS (UPLC-QTOF-MS), results showed that the flavor protease was a multi-site enzymatic hydrolysis, which could enzymatically hydrolyze PGP to form tryptophan (W) and pyroglutamate leucine (pGlu-L) and other small molecule amino acids and peptide fragments. This study revealed new insights into reducing bitterness of *Huangjiu*, which may offer a possibility to reduce the bitterness and improve the quality of *Huangjiu*.

Keywords *Huangjiu*; bitter peptide; hydrolysis with protease; reducing bitterness