



美拉德模型反应在模拟烟叶烘烤过程中的应用研究

杨伟平,徐秀娟,席辉,张文娟,刘珊,崔凯,郭亚龙,杨春强

中国烟草总公司郑州烟草研究院,河南 郑州 450001

摘要:为研究烟叶烘烤过程中美拉德反应的规律及其产物,建立固定含水率和可变含水率这种美拉德模型反应体系;运用紫外-可见光谱及成分分析,证明以吸光度变化表征美拉德反应强度的可行性;利用固定含水率模型反应,研究 L-亮氨酸(Leu)、L-苯丙氨酸(Phe)、L-脯氨酸(Pro)在烟叶不同烘烤阶段的美拉德反应规律;借助可变含水率模型反应,考查 3 种氨基酸在整个烟草烘烤过程中的产物生成情况。结果表明:3 种氨基酸在烟叶烘烤过程中的美拉德反应速率快慢依次为 Phe>Leu>>Pro,且 Phe 和 Leu 的美拉德反应主要发生在烟叶烘烤的干筋期,而 Pro 在整个烘烤阶段未发生明显的美拉德反应;3 种氨基酸在烘烤阶段生成的产物存在明显差异,Leu 的产物以异戊基取代的吡嗪类物质为主,Phe 的产物以多种芳香醛、酮类物质为主,而 Pro 未检测到相关产物。因此,建立的模型反应体系可以利用吸光度变化简单、有效地表征不同氨基酸在烟叶烘烤过程中发生美拉德反应的阶段及反应强度,对烟叶烘烤工艺的优化具有重要的应用价值。

关键词:美拉德模型反应;烟叶烘烤过程;反应规律;美拉德反应产物;氨基酸

中图分类号:TS411 **文献标识码:**A

0 引言

氨基酸在烟叶烘烤过程中与糖类物质发生的美拉德(Maillard)反应,是烟草香气物质形成的主要途径之一,对烟叶品质及香气风格的形成有重要影响^[1]。由于烟叶基质的复杂性,研究者大多采用统计学的方法来研究不同氨基酸与烟叶品质及香气风格的相关性,然而不同文献报道的关联规律并不

一致,甚至存在互相矛盾的结论^[2-4]。产生这一问题的主要原因可能与氨基酸在烟叶中的作用机制有关,氨基酸除了会在燃吸过程中产生氨类刺激性物质,其本身不直接对烟叶品质及香气风格产生影响,而是在烟草调制过程中生成的美拉德反应产物(Maillard Reaction Products,MRPs)才是影响烟叶品质的直接因素^[5-6]。因此,仅依靠统计学方法,研究不同氨基酸含量与烟叶品质和风格的相关性,并依

收稿日期:2024-08-04;修回日期:2024-09-23

基金项目:国家烟草专卖局创新平台科研活动稳定支持专项项目(国烟科(2021)171号)

作者简介:杨伟平(1984—),男,河南省郑州市人,郑州烟草研究院高级工程师,主要研究方向为烟用香精香料。E-mail:yang-wp121@163.com

通信作者:杨春强(1979—),男,山东省临沂市人,郑州烟草研究院高级工程师,主要研究方向为烟用香精香料。E-mail:cqfly-ing2008@126.com

此判定烟叶品质及香气风格形成的关键氨基酸,可能是不充分的。因此,建立烟叶烘烤环境中的美拉德模型反应方法,研究氨基酸在烟叶烘烤过程中不同阶段的反应规律及产物成分,不仅对优化烟叶的烘烤工艺研究具有重要应用价值,而且有助于探究氨基酸与烟叶品质、香气风格的相关性。

目前,针对氨基酸美拉德模型反应条件的研究多为高温(100℃以上)条件,且一般保持含水率恒定,多与香料开发相关,反应条件与烟叶烘烤环境差异较大,故相关结果对烟叶烘烤过程中香气产生阶段及机理研究作用有限^[7-9]。烟叶烘烤过程包括变黄期、定色干叶期和和干筋期3个阶段。在不同阶段,烘烤温度呈阶梯式变化,即变黄期温度维持在35~42℃,定色干叶期温度为48~55℃,干筋期温度为62~68℃^[10]。此外,在烟叶烘烤过程中,烟叶水分的变化与烘烤工艺密切相关。整体而言,烟叶经过变黄期进入定色干叶期后,水分含量由最初的约80%降至15%~45%,在干筋期继续下降到10%,甚至更低^[11-13]。潘高伟等^[14-16]对多种烤烟的pH值进行研究,发现烟叶的pH值主要集中在4.9~5.8之间,且在调制过程中,烟叶的pH值会有小幅下降。

基于此,本文拟以美拉德反应活性较强的L-亮氨酸(Leu)为模型,建立烟叶烘烤过程中固定含水率美拉德模型反应体系,并设定反应温度、含水率与烟叶实际烘烤过程中一致。由于模型反应过程中pH值会略有降低,与烟叶调制过程中pH值变化趋势一致,故使用HCl或NaOH溶液将模型反应体系初始pH值调整为5.5^[17]。运用紫外-可见光谱及成分分析结果验证吸光度变化表征模型反应强度的可行性,并选用Leu(脂肪族)、L-苯丙氨酸(Phe,芳香族)、L-脯氨酸(Pro,杂环族,烤烟中含量最高的氨基酸)这3种结构的氨基酸,以及烟叶中代表性还原糖D-葡萄糖(Glu)、果糖(Fru)为研究对象,应用固定含水率和可变含水率的模型反应方法,研究3种氨基酸在烟叶烘烤过程的美拉德反应规律及产物成分,以期作为烟叶的烘烤工艺优化提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

Leu、Phe、Pro、Glu、Fru、1,2-丙二醇(分析纯),

北京伊诺凯科技有限公司。

1.2 主要仪器与设备

Easymax 102 型平行反应器,美国 Melter Toledo 公司;Cary 60 型紫外-可见分光光度计、8890/5977B 型气相色谱-质谱联用(GC-MS)仪,美国 Agilent 公司;Q-Exactive 型高分辨质谱(MS),美国 Thermo Fisher 公司;MPS robotic 型多功能全自动样品前处理平台(配备热脱附模块(TDU)和冷进样系统(CIS))、PDMS 型涂层搅拌子(10 mm×1.0 mm),德国 Gerstel 公司;CP224S 型分析天平(感量 0.0001 g),德国 Sartorius 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 固定含水率模型反应方法 根据文献报道的烟叶烘烤过程中含水率及温度变化,设定烟叶不同烘烤阶段参数见表1。将丙二醇和去离子水按照一定比例配制不同含水率的混合溶剂。将适量的氨基酸/Glu(氨基酸与 Glu 物质的量比为 1 : 1)分别加入到 20 mL 混合溶剂中,用 0.01 mol/L 的 HCl 或 NaOH 溶液调节体系 pH 值至 5.5,得到氨基酸和 Glu 浓度均为 0.02 mol/L 的固定含水率氨基酸-Glu 美拉德反应体系。将上述不同氨基酸反应体系置于平行反应器螺口试管中,分别在设定温度条件下反应 96 h。反应过程中,每隔 12 h 取 1 mL 反应产物进行紫外-可见光谱分析,以不同体系模型反应产物在 294 nm 处吸光度的变化,研究反应活性不同的 Leu、Phe、Pro 与 Glu 发生美拉德反应时的反应规律。

1.3.2 可变含水率模型反应方法 按照氨基酸与糖物质的量比为 1 : 1 的比例,分别取适量 Leu、Phe、Pro 与 Glu 或 Fru 加入到 30 mL 含水率 45% 的丙二醇/水混合溶剂中,用 0.01 mol/L 的 HCl 或 NaOH 溶液调节体系 pH 值至 5.5,得到 6 种氨基酸和 Glu 或 Fru 浓度均为 0.02 mol/L 的可变含水率美拉德反应体系。将 6 种氨基酸可变含水率美拉德反应体系置于平行反应器 50 mL 三口反应釜中,反应釜一侧口连接温度传感器,中间口连接冷凝管,另一口径侧口(19 mm)敞开;在 48℃ 条件下反应 20 h 后,升温到 55℃ 反应 20 h,此时体系含水率由 45% 降至 15%;升温到 62℃ 反应 1 h 25 min,此时体系

含水率由 15% 降至 12%, 封闭侧口继续反应 18 h 35 min; 升温至 68 ℃ 反应 20 h 后, 停止反应。由于体系反应温度较低, 认为体系内溶液质量减少均为水分蒸发所致, 据此计算体系含水率变化。反应完毕后产物用冷水迅速冷却, 得到 MRPs。

1.3.3 MRPs 紫外-可见光谱分析 将每隔 12 h 取得的 MRPs 立即冷却, 按照适宜倍数用相应含水率的溶剂稀释后进行紫外-可见光谱全扫描分析, 波长范围为 200~800 nm; 扫描方式为全扫描; 扫描精度为 1 nm。分析每种 MRPs 时需扣除相应溶剂的吸光度。

1.3.4 MRPs MS 分析 将所得 MRPs 直接进行全物质 MS 分析, 进样量 1 μL; 扫描模式为正离子扫描 (ESI⁺); 喷雾电压为 3.5 kV; 毛细管温度为 320 ℃; 离子源加热温度为 300 ℃; 质量扫描范围 (*m/z*) 为 106.7~1600 amu; 质量分辨率为 70 000; 自动增益控制为 3E6; 最大注入时间为 200 ms。

1.3.5 MRPs 成分分析方法 利用搅拌棒吸附萃取-气质联用 (SBSE-GC-MS) 技术对 MRPs 成分进行分析, 分析样品中添加丙酸苏合香酯作为内标^[18]。取 2 mL 样品 (添加内标丙酸苏合香酯 5 mg/L), 加入饱和 NaCl 溶液定容至 10 mL 后转移至 20 mL 顶空瓶中, 盖上瓶盖混匀, 加入 PDMS 搅拌子, 放在磁力搅拌器上以 600 rpm 速率搅拌吸附 1 h, 取出吸附后的磁子, 使用纯水冲洗磁子表面附着的 NaCl 颗粒, 无尘纸擦干磁子表面水分后放入干净的脱附管进行热脱附-气质联用分析, 利用 NIST 和 Wiley 谱库, 以匹配度高于 85% 者定性。

热脱附模块参数: 初始温度 30 ℃, 以 100 ℃/min 速率升至 250 ℃, 保持 8 min。

冷进样系统参数: 初始温度-30 ℃, 以 12 ℃/s

速率升至 250 ℃, 保持 10 min。

GC 条件: DB-5MS 毛细管柱 (60 m×250 μm×0.25 μm); 载气为 He; 柱流量为 1 mL/min; 进样口温度为 250 ℃; 程序升温为 40 ℃ 保持 2 min, 以 5 ℃/min 的速率升温至 280 ℃, 保持 20 min; 溶剂放空模式。

MS 条件: 传输线温度为 250 ℃; 电离方式为 EI; 离子源温度为 230 ℃; 四极杆温度为 150 ℃; 电离能量为 70 eV; 扫描模式为全扫描; 质量扫描范围 (*z/m*) 为 33~500 amu; 溶剂延迟时间为 3 min。

1.4 数据处理与分析

采用 Origin 2019 进行常规数据统计分析; 利用 Agilent MSD 工作站进行 GC-MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 固定含水率美拉德模型反应分析

在模型体系或复杂的食品体系中, 美拉德反应中期阶段会生成大量的不饱和醛、酮类和杂环类小分子物质, MRPs 使其逐渐在近紫外光区产生光吸收。研究者^[19]通常以 294 nm 处吸光度来表征此阶段无色小分子物质的生成情况。当反应进行到后期阶段时, MRPs 在可见光区逐渐产生光吸收, 这主要是因为此时体系中的类黑精等有色物质开始生成, 在 360~490 nm 范围内均有光吸收, 但无特征吸收峰, 所以可以测定 420 nm、450 nm、490 nm 等波长处的吸光度来表征大分子类黑精的生成情况^[19-20]。本文通过紫外-可见光谱对不同含水率及反应温度下 Leu 的 MRPs 在 294 nm 和 420 nm 处吸光度进行检测, 并利用 SBSE-GC-MS 对 MRPs 成分进行分析, 结果如图 1 所示。由图 1a) 和 b) 可知, MRPs 在 294 nm 处的吸光度远远大于 420 nm 处吸光度。含水率越低, 温度越高, MRPs 吸光度越大。部分条件下 MRPs 中小分子物质含量较低, 且溶剂中含有大量的水^[21]。因此, 进一步利用对水样中的溶质有较好的萃取富集能力且灵敏度较高的 SBSE-GC-MS 对不同体系内挥发性半挥发性产物进行了检测, 与 294 nm 吸光度检测结果相互印证, 检测结果见表 2。

表 1 烟叶不同烘烤阶段参数

Table 1 Conditions of different tobacco flue-curing stages

烘烤阶段	温度/℃	含水率/%	总反应时间/h	pH 值
变黄期	38	80	96	5.5
	48	45		
定色干叶期	55	30		
	62	15		
干筋期	68	10		

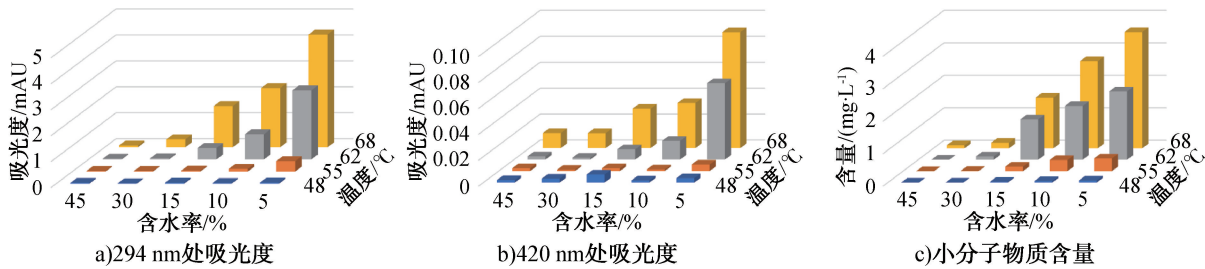


图 1 Leu 的 MRP_s 吸光度及小分子物质含量
Fig. 1 Absorbance and small molecule substance content of leucine MRP_s

结合图 1c) 可知,随着反应温度升高及含水率降低,MRPs 中小分子物质含量逐渐增多,且生成物以含氮小分子物质(12 种)为主,其中吡嗪类物质有 10 种。吡嗪类物质中 $n-\pi^*$ 等类型电荷的跃迁导致 MRP_s 在 294 nm 附近产生了明显的光吸收,使小分子物质含量与 MRP_s 吸光度变化趋势高度一致,因此检测反应体系产物在 294 nm 处吸光度可以表征美拉德模型反应中小分子物质的生成情况。

美拉德反应中类黑精等有色物质相对分子质量一般较大,且挥发性较弱,利用 GC 无法检测到相关产物,因此选择 MS 对 Leu 的 MRP_s 内的全物质进行了检测,结果如图 2 所示,其中样品编号中 1、3、4 和 5 分别代表溶剂含水率 45%、15%、10% 和 5%,48、55、62 和 68 为反应温度(℃)。由图 2 可知, m/z 为 132.10 和 294.15 分别归属 Leu 及其 Amadori 化合物 Fru-Leu 的 $[M+H]^+$ 峰^[22]。 m/z 为 179.15 和 193.17 分别归属 2,5-二甲基-3-异戊基吡嗪(m/z 为 179.15)、2,3-二甲基-5-异戊基吡嗪(m/z 为 179.15)和 2,3,5-三甲基-6-异戊基吡嗪(m/z 为 193.17)的 $[M+H]^+$ 峰。图 2 中高含水率及低温条件下产物的基峰为 Leu,此外还有相对丰度较低的 Amadori 化合物 Fru-Leu 的峰,表明体系内有大量原料未发生明显的美拉德反应。当体系含水率降低到 15% 以下,反应温度为 62℃ 和 68℃ 后,反应产物中 m/z 为 179.15 和 193.17 的峰逐渐变为基峰和次高峰,表明体系内发生了美拉德反应,且生成了较多的含氮小分子物质,这与 SBSE-GC-MS 检测结果一致。然而,即使在反应最强烈的 Leu-5-68 中也未发现相对分子质量较大的物质,因此可以确定在烟叶烘烤过程中由于反应条件较温和,产生的大分子有色物质较少,这也是 420 nm 处远远低于 294 nm 处吸光度的原因。由于 MRP_s 在 294 nm 和

420 nm 处的光吸收是在反应过程中先后产生的,因此对比紫外-可见吸收光谱及产物分析结果,可以确定 MRP_s 在 294 nm 和 420 nm 处的吸光度变化,且能够较准确地反映美拉德模型反应中无色小分子及有色大分子物质的生成情况。

2.2 固定含水率模型反应在研究烟叶烘烤过程中美拉德反应规律的应用

3 种氨基酸模型反应产物在不同烘烤阶段吸光度变化结果如图 3 所示,其中样品编号中 0、1、2、3 和 4 分别代表溶剂含水率 80%、45%、30%、15%、10%,38、48、55、62 和 68 为反应温度(℃)。由图 3 可知,3 种氨基酸在变黄期、定色干叶期时,除了 Phe 在定色干叶期高温阶段(55℃)吸光度有较弱的增长外,其余产物吸光度均没有明显变化,表明这 3 种氨基酸在烘烤前两个阶段均不会发生明显的美拉德反应;干筋期阶段时,Pro 产物的吸光度变化依旧不明显,Leu 和 Phe 产物在此阶段吸光度增长较大,表明在干筋期时 Pro 未发生明显美拉德反应,而 Leu 和 Phe 的美拉德反应较为活跃。

Leu 和 Phe 在干筋期发生美拉德反应时,吸光度在反应初期缓慢增长,在反应后期呈现近线性增长,即吸光度变化在反应后期符合零级反应的规律,类似现象在文献[23]中也有报道。以反应后期吸光度对时间进行线性拟合,可计算吸光度变化速率常数。在 55℃ 条件下,Phe 的吸光度早于 Leu 出现线性增长现象,但吸光度变化速率常数较小。在干筋期时,相同条件下 Phe 反应产物的吸光度变化速率常数大于 Leu。由此判断在烟叶烘烤阶段,3 种氨基酸的美拉德反应速率为 $Phe>Leu>>Pro$ 。

上述结论能够较好地解释烟叶烘烤过程中的一些现象。如过伟民等^[4]报道了烟叶烘烤过程中 Phe、Leu、Pro 含量的变化规律,发现 3 种氨基酸在烘烤前期因蛋白质降解而含量大幅增加,而在烘烤

表 2 MRP_s 中小分子物质含量
Table 2 Contents of small molecule substances in MRP_s

化合物	含量/(mg·L ⁻¹)															
	Leu-1-48	Leu-2-48	Leu-3-48	Leu-4-48	Leu-5-48	Leu-1-55	Leu-2-55	Leu-3-55	Leu-4-55	Leu-5-55	Leu-1-62	Leu-2-62	Leu-3-62	Leu-4-62	Leu-5-62	Leu-1-68
三甲基吡嗪	—	—	0.006 0	0.007 1	0.010 0	—	—	0.038 6	0.045 1	0.041 1	—	0.031 6	0.095 8	0.125 9	0.095 6	0.038 7
2-甲基-5-异丙基吡嗪	—	—	0.009 1	0.014 7	0.017 1	0.001 8	0.005 3	0.013 4	0.057 4	0.064 7	0.001 9	0.008 4	0.083 1	0.087 3	0.076 2	0.005 6
2,5-二甲基-3-乙基吡嗪	—	—	0.005 8	0.008 4	0.005 3	—	0.003 6	0.027 3	0.044 6	0.027 1	—	0.021 2	0.110 9	0.081 4	0.070 7	0.027 0
3,5-二甲基-2-乙基吡嗪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.002 6	0.007 2	—
四甲基吡嗪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N-甲基-2-乙酰基吡咯	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.020 8	0.023 5
2,5-二甲基-3-丙烯基吡嗪	—	—	—	—	—	—	—	—	0.011 8	0.010 2	—	0.005 6	0.078 9	0.065 3	0.054 8	—
2-甲基-6-异戊基吡嗪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.003 7	—	—	0.013 3	0.016 2	0.032 3	—
N-异丙基-3,5-二甲基苯胺	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2,5-二甲基-3-异戊基吡嗪	—	—	0.004 8	0.016 8	0.031 6	—	—	0.058 9	0.174 8	0.211 9	—	0.033 6	0.828 8	1.167 1	1.318 5	0.020 7
2,3-二甲基-5-异戊基吡嗪	—	—	—	—	—	—	—	—	0.008 4	0.026 6	—	—	0.021 1	0.071 7	0.253 7	—
2,3,5-三甲基-6-异戊基吡嗪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.004 1	—	—	0.011 0	0.036 5	0.129 7	—
合计	0	0	0.025 7	0.047 0	0.064 0	0.001 8	0.008 9	0.138 2	0.342 1	0.389 4	0.001 9	0.100 4	1.242 9	1.654 0	2.104 3	0.092 0

注:样品编号中1、2、3、4和5分别代表溶剂含水率45%、30%、15%、10%和5%;48、55、62和68代表反应温度/℃;—表示未检出,下同。

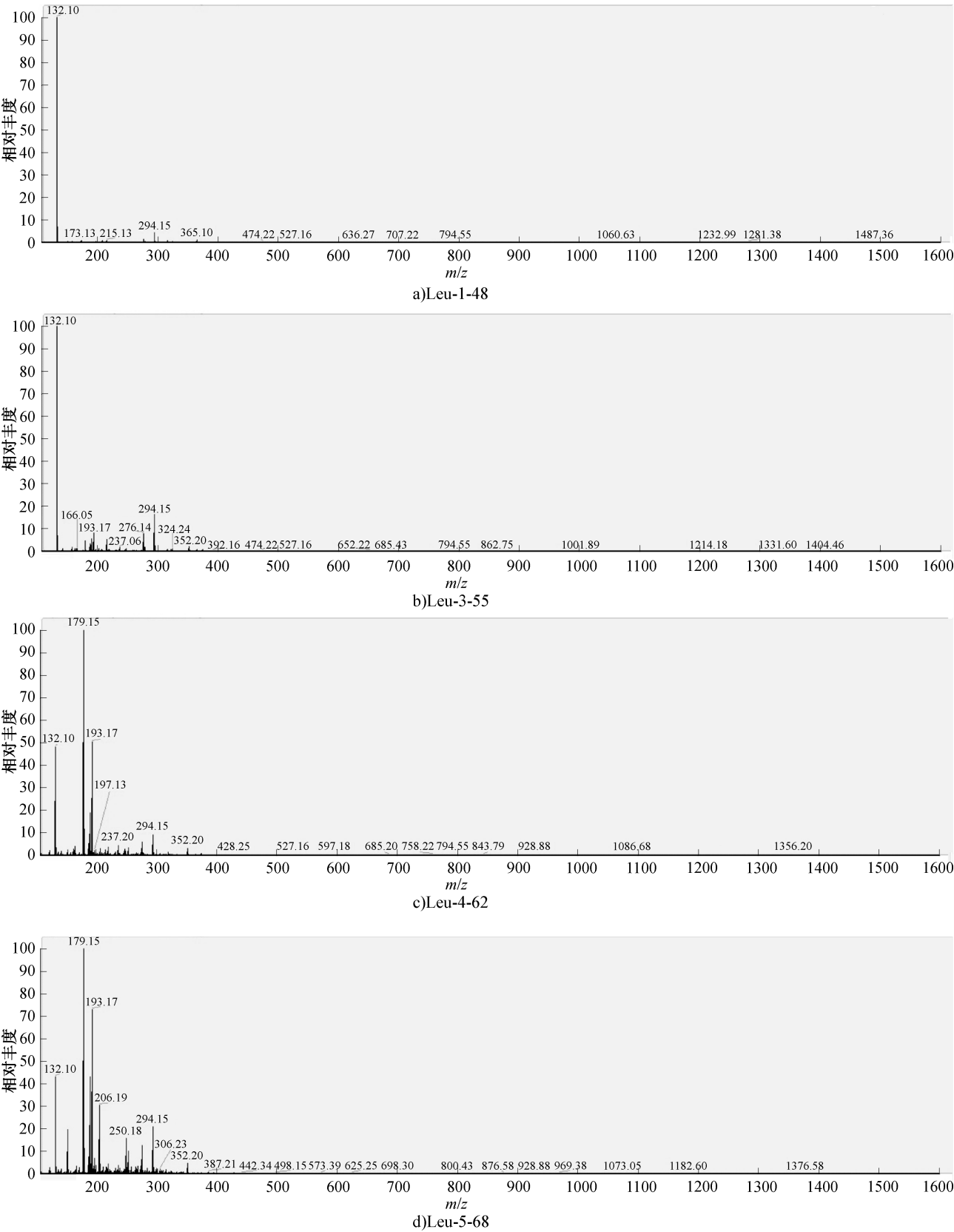


图 2 Leu 的 MRPs MS 图

Fig. 2 Mass spectra of leucine MRPs

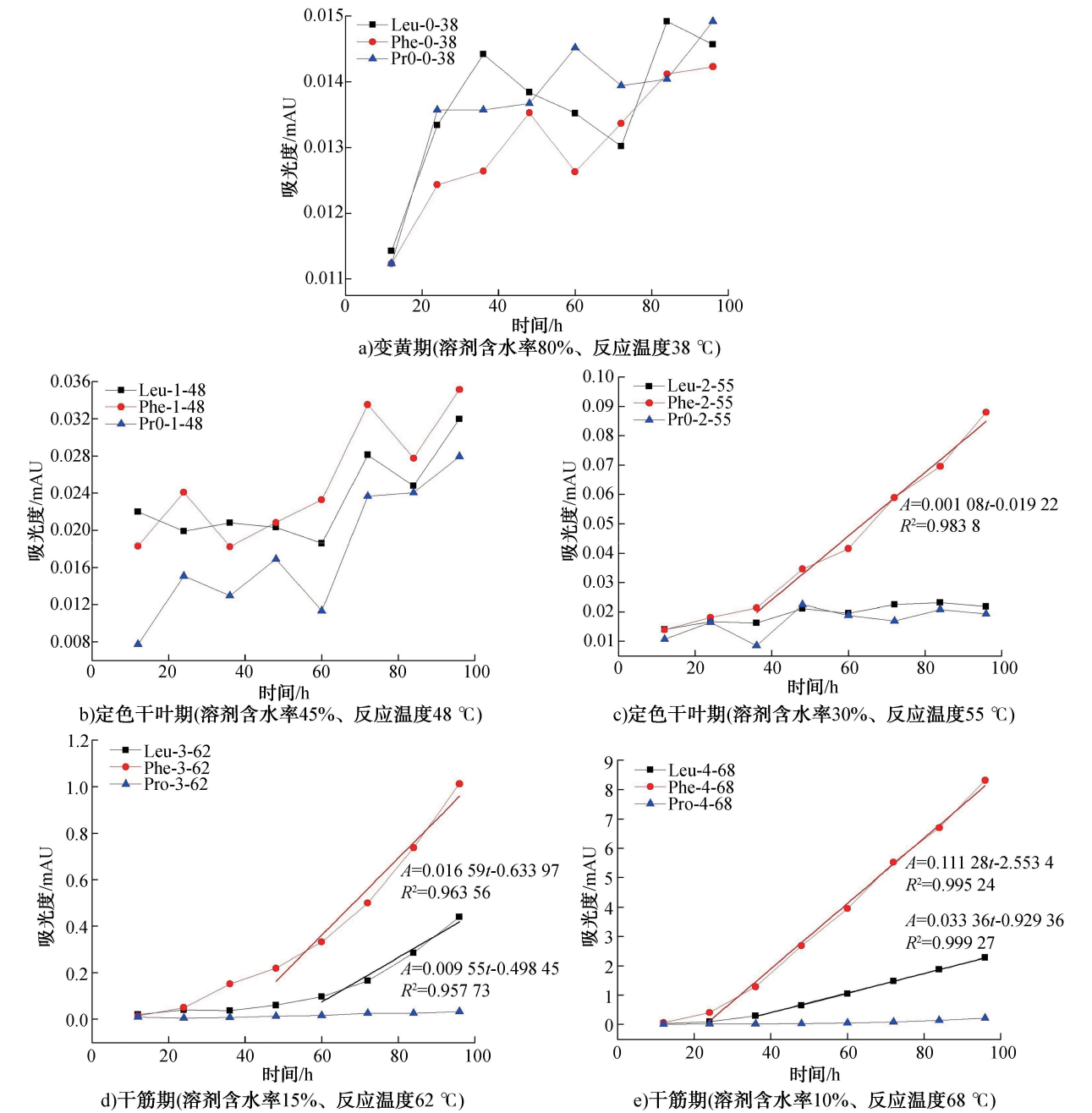


图 3 3 种氨基酸模型反应产物在不同烘烤阶段吸光度变化结果

Fig. 3 The changes in absorbance of the reaction products of three amino acid modes at different flue-curing stages

后期,Phe 和 Leu 因美拉德反应的消耗,含量逐渐下降。由于 Phe 反应速率高于 Phe,烟叶中 Phe 含量的下降速度也快于 Phe,相比之下,Pro 在整个烘烤过程中均未发生明显的美拉德反应,因此其含量在烘烤后期保持稳定。通过建立美拉德模型反应,研究不同氨基酸在烟叶烘烤阶段的反应规律,可以根据不同种类烟叶氨基酸种类及含量差异,合理设计烟叶烘烤工艺的温度、湿度及烘烤时间等参数,优化烟叶烘烤工艺,提高烤烟品质。

2.3 可变含水率模型反应在研究烟叶烘烤过程中香气物质生成中的应用

3 种氨基酸在可变含水率条件下的主要产物及含量见表 3。由表 3 可知,Pro 反应活性较低,其与 Glu 或 Fru 反应无明显 MRPs 生成。Leu 产物中吡嗪类物质含量高于 Phe,但小分子物质总量略低。对于同种氨基酸分别与 Glu、Fru 反应的情况,产物种类相近,但与 Fru 反应的产物含量更高。这可能是因为尽管 Glu 生成糖胺化化合物的活性强于 Fru,但

表3 3种氨基酸在可变含水率体系中的主要产物及含量

Table 3 The main products and their contents of three amino acids in variable moisture content systems							
保留时间/ min	化合物	含量/(mg · L ⁻¹)					
		Leu+Glu	Leu+Fru	Phe+Glu	Phe+Fru	Pro+Glu	Pro+Fru
5. 701	乙酸	—	—	0. 032 3	0. 047 0	—	—
6. 981	1-羟基-2-丙酮	—	—	0. 029 8	0. 043 1	—	—
16. 890	2,5-二甲基吡嗪	—	—	0. 127 5	0. 571 7	—	—
19. 654	苯甲醛	—	—	1. 197 6	3. 409 4	—	—
20. 747	苯腈	—	—	0. 019 0	0. 075 6	—	—
21. 382	2-甲基-6-乙基吡嗪	—	—	0. 011 6	0. 021 2	—	—
21. 615	三甲基吡嗪	0. 932 6	1. 279 5	0. 255 7	0. 451 9	—	—
23. 390	苯甲醇	—	—	0. 562 3	1. 055 9	—	—
23. 931	苯乙醛	—	—	0. 760 6	1. 092 5	—	—
24. 426	2-甲基-5-异丙基吡嗪	0. 229 2	0. 529 1	—	—	—	—
25. 127	苯乙酮	—	—	1. 562 5	3. 020 8	—	—
25. 510	2,5-二甲基-3-乙基吡嗪	0. 083 4	0. 353 0	0. 202 7	0. 650 8	—	—
25. 612	甲酸苄酯	—	—	0. 043 1	0. 081 0	—	—
25. 818	3,5-二甲基-2-乙基吡嗪	—	—	0. 035 7	0. 155 7	—	—
25. 921	四甲基吡嗪	—	—	0. 011 4	0. 011 4	—	—
25. 958	2,7-二甲基-4-辛酮	2. 725 3	2. 390 7	—	—	—	—
26. 976	α-甲基苯乙醛	—	—	0. 115 7	0. 066 6	—	—
27. 219	5-甲基-2-异丙基-2-己烯醛	16. 815 5	20. 552 0	—	—	—	—
28. 181	苯基丙酮	—	—	0. 128 2	0. 226 0	—	—
28. 760	苯乙腈	—	—	0. 101 2	0. 161 2	—	—
29. 946	乙酸苄酯	—	—	0. 180 0	0. 579 0	—	—
30. 030	苯丙醛	—	—	0. 107 0	0. 336 6	—	—
30. 151	1-苯基-1-丙酮	—	—	0. 473 1	1. 002 7	—	—
31. 701	3,5-二甲基-2-异丁基吡嗪	0. 054 3	0. 187 9	—	—	—	—
32. 383	2,5-二甲基-3-异丁基吡嗪	0. 138 9	0. 322 9	—	—	—	—
33. 037	3-苯基呋喃	—	—	1. 147 3	1. 418 1	—	—
33. 326	2,5-二甲基-3-丙烯基吡嗪	—	—	0. 099 6	0. 143 2	—	—
34. 232	2-甲基-6-异戊基吡嗪	1. 403 8	2. 592 4	—	—	—	—
34. 867	2-甲基-5-异戊基吡嗪	0. 686 5	1. 053 6	—	—	—	—
34. 961	N-异丙基-3,5-二甲基苯胺	1. 605 0	1. 055 4	—	—	—	—
35. 269	苯甲醛丙二醇缩醛	—	—	7. 022 8	10. 785 9	—	—
35. 372	2-苯基-2-丁烯醛	—	—	4. 110 4	5. 720 3	—	—
37. 193	2,5-二甲基-3-异戊基吡嗪	8. 401 7	17. 287 3	—	—	—	—
37. 828	2,3-二甲基-5-异戊基吡嗪	3. 924 9	11. 436 4	—	—	—	—
38. 239	2,6-二甲基-3-异戊基吡嗪	0. 953 5	1. 091 6	—	—	—	—
38. 668	5-苯基-2-戊酮	—	—	—	0. 740 9	—	—
39. 294	苯叉丙酮	—	—	0. 167 6	0. 333 8	—	—
39. 864	2-甲基-5-苯基-噁唑	—	—	0. 453 1	0. 662 0	—	—
40. 583	2,3,5-三甲基-6-异戊基吡嗪	3. 443 5	5. 948 6	—	—	—	—
43. 562	2-苯基嘧啶	—	—	1. 028 4	1. 159 7	—	—
43. 684	1-苯基-1-戊烯-3-酮	—	—	0. 110 7	0. 604 4	—	—
43. 964	3-苯基吡啶	—	—	0. 084 3	0. 094 4	—	—
43. 982	2-(2-甲基丙基)-3,5-二异丙基吡啶	1. 370 2	1. 137 1	—	—	—	—
47. 755	5-甲基-2-苯基嘧啶	—	—	11. 057 9	19. 197 5	—	—
54. 489	二苯基乙酮	—	—	0. 234 1	0. 571 4	—	—
57. 543	4-甲酰-二苯基乙烯	—	—	2. 006 6	3. 779 4	—	—
63. 819	查尔酮	—	—	11. 979 6	19. 944 4	—	—
66. 023	二苯甲酰基甲烷	—	—	1. 150 0	2. 072 3	—	—
合计		42. 768 3	67. 217 5	46. 609 4	80. 287 8	0	0

其重排后形成的二羰基化合物活性低于 Fru 重排产物,致使 Fru 反应生成的吡嗪类和 Strecker 降解醛类物质更多^[24-25]。

对比固定含水率体系与可变含水率体系下 Leu 与 Glu 的反应产物可知,二者吡嗪类物质种类相近,但可变含水率体系中吡嗪类物质含量显著提升,且生成大量的异戊醛(Leu 的 Strecker 降解产物)羟醛缩合产物 5-甲基-2-异丙基-2-己烯醛,推测是水分蒸发使反应物浓度增加,促进了缩合反应发生。

Leu 与 Phe 的 MRPs 种类差异明显,其中 Leu 的 MRPs 以 5-甲基-2-异丙基-2-己烯醛和异戊基取代吡嗪类物质为主,可赋予烟叶烘焙、坚果香韵;Phe 的 MRPs 则富含 5-甲基-2-苯基嘧啶、查尔酮及芳香醛酮类物质,贡献了果香、花香等清甜香韵^[26]。Leu 的 MRPs 中吡嗪类物质大多含有异戊基取代基,这主要是因为吡嗪形成过程中,两分子氨基酮缩合产生了二氢吡嗪类物质,此类物质可以与异戊醛发生加成反应,进一步生成异戊基取代吡嗪^[27]。由此可见,在生成吡嗪类物质时,Leu 不仅提供氮源,还会影响吡嗪的取代基种类,使吡嗪产物具有氨基酸特异性。Phe 的 Strecker 降解后主要生成苯甲醛,其亲核加成活性小于烷基醛,因此 Phe 的 MRPs 中吡嗪类物质没有苯环取代基。由此可见,Phe 在吡嗪类物质生成时以提供氮源为主,而 MRPs 中各类芳香醛酮类物质则具有明显的氨基酸特异性。

3 结论

本研究构建了固定含水率与可变含水率两种美拉德模型反应体系,系统模拟了烟叶烘烤过程中的温度、含水率、pH 值等关键参数变化。通过紫外-可见光谱分析结合 SBSE-GC-MS 等成分分析技术,验证了利用 294 nm 和 420 nm 处吸光度变化可分别表征反应生成的无色小分子物质及有色物质(如类黑精)的生成规律,明确了吸光度变化作为反应强度与阶段特征量化指标的可行性。在此基础上,以 Leu、Phe 和 Pro 这 3 种代表性氨基酸为研究对象,结合两种模型反应体系,揭示了其在烟叶烘烤不同阶段的反应特性及产物差异:在反应规律

上,三种氨基酸的反应速率呈现 Phe>Leu>>Pro 的显著差异,其中 Phe 和 Leu 的美拉德反应主要集中于干筋期(62~68 ℃、低含水率条件),而 Pro 在整个烘烤过程中未发生明显反应;在产物特征上,Leu 的反应产物以异戊基取代吡嗪类物质为主,Phe 则主要生成芳香醛酮类物质,Pro 未检测到特征产物,且相同氨基酸与果糖(Fru)反应的产物含量显著高于与葡萄糖(Glu)反应的产物。不同氨基酸在烘烤过程中发生美拉德反应时反应规律及产物研究成果,可以为烟叶烘烤工艺优化研究提供参考,同时为溯源烟叶中产生香气物质的关键氨基酸提供实验依据,有利于氨基酸与烟叶品质和香气风格的相关性研究。

参考文献:

[1] 王荣浩,李林林,陈栋,等. 美拉德反应在烟草加工中的应用研究进展[J]. 食品工业科技,2019,40(3):345-350,356.

[2] 沈晗,葛炯,王逸枫,等. 福建烟叶游离氨基酸等主要含氮化合物与感官质量的关系[J]. 中国烟草学报,2022,28(5):23-31.

[3] 贾国涛,王晓瑜,孙溢明,等. 我国八大香型生态区域烤烟游离氨基酸含量与烟叶品质的关系分析[J]. 作物杂志,2023(3):195-199.

[4] 过伟民,郭建华,董洪旭,等. 烤烟游离氨基酸与感官品质的关联及烘烤过程的变化规律研究[J]. 中国烟草学报,2018,24(6):16-25.

[5] 韶济民,张海燕,李奇,等. 四川烤烟游离氨基酸含量特征及其与烟叶品质关联分析[J]. 南方农业学报,2023,54(8):2279-2288.

[6] 董洪旭,李小兰,奚家勤,等. 不同香型产区烤烟游离氨基酸含量及组成差异分析[J]. 烟草科技,2017,50(3):15-22.

[7] 朱龙杰,曹毅,朱怀远,等. 美拉德反应产物中三类官能团化合物的质量分布与主体香气特征[J]. 食品工业科技,2020,41(24):256-263,329.

[8] XIAO Q,WOO M W,HU J W,et al. The role of heating time on the characteristics, functional properties and antioxidant activity of enzyme-hydrolyzed rice proteins-glucose Maillard reaction products[J]. Food Bioscience, 2021,43:101225.

[9] YU H,ZHANG R Y,YANG F W,et al. Control strategies of pyrazines generation from Maillard reaction[J]. Trends in Food Science & Technology,2021,112:795-807.

[10] 陈颐,张笑,杨志怀,等. 烟叶烘烤过程中蛋白质的降



- 解及相关酶活性的变化[J]. 中国烟草学报, 2019, 25(5): 70-76.
- [11] 李峥, 邱坤, 方明, 等. 基于形态学和色度学的烘烤过程中烟叶水分含量变化的模型[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(19): 209-214.
- [12] 张佳佳, 过伟民, 段卫东, 等. 上 6 片烟叶烘烤过程中水分与颜色及化学成分的协同变化[J]. 烟草科技, 2021, 54(3): 17-23, 57.
- [13] 李生栋, 付宗仁, 胡蓉花, 等. 烟叶烘烤过程中水分变化及干燥数学模型构建[J]. 南方农业学报, 2018, 49(1): 121-129.
- [14] 潘高伟, 郭伟雄, 韩佳彤, 等. 广东烤烟不同区位叶面的 pH 值差异化分析[J]. 河南农业科学, 2022, 51(8): 174-180.
- [15] 刘兴余, 刘德水, 马莉, 等. 打叶复烤环节碳酸钠缓冲液处理对贮藏片烟 TSNA 累积和烟叶品质的影响[J]. 中国烟草学报, 2020, 26(3): 33-42.
- [16] 汪季涛, 朱徐睿, 舒俊生, 等. 不同醇化方式对烤烟品种翠碧一号片烟醇化效果的影响[J]. 中国烟草科学, 2023, 44(3): 62-68.
- [17] 张凤梅, 汤高奇, 田玮, 等. 模式体系谷氨酸-葡萄糖美拉德反应程度研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(3): 49-59.
- [18] 刘雅芳, 滕杰, 刘洋, 等. SBSE-GC-MS 分析不同等级宁红茶的差异香气成分[J]. 食品工业科技, 2023, 44(11): 254-264.
- [19] HU J X, LI X, YU Q T, et al. Understanding the impact of pectin physicochemical variation on browning of simulated Maillard reaction system in thermal and storage processing[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 240: 124347.
- [20] CAO J R, YAN H X, LIU L. Optimized preparation and antioxidant activity of glucose-lysine Maillard reaction products[J]. LWT, 2022, 161: 113343.
- [21] WANG M Q, MA W J, SHI J, et al. Characterization of the key aroma compounds in Longjing tea using stir bar sorptive extraction (SBSE) combined with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), gas chromatography-olfactometry (GC-O), odor activity value (OAV), and aroma recombination[J]. Food Research International, 2020, 130: 108908.
- [22] ZHANG X M, SHI Y P, WANG L Z, et al. Metabolomics for biomarker discovery in fermented black garlic and potential bioprotective responses against cardiovascular diseases[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(44): 12191-12198.
- [23] KAEWTATHIP T, WATTANA-AMORN P, BOON-SUPTHIP W, et al. Maillard reaction products-based encapsulant system formed between chitosan and corn syrup solids: Influence of solution pH on formation kinetic and antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2022, 393: 133329.
- [24] 朱龙杰, 张华, 吴洋, 等. 碱性体系下美拉德反应产物中关键香味成分的种类及质量分数[J]. 烟草科技, 2020, 53(6): 41-47, 80.
- [25] THENG A H P, OSEN R, CHIANG J H. Influence of reducing sugars and protein-to-sugar ratios on volatile profile, pH, and browning intensity of Maillard-reacted nutritional yeast hydrolysate[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2024, 59(9): 6325-6339.
- [26] 陈芝飞, 蔡莉莉, 陈小龙, 等. 基于香韵活性值的不同产地中间香型烤烟风格特征差异分析[J]. 轻工学报, 2022, 37(1): 79-86.
- [27] SCALONE G L L, LAMICHHANE P, CUCU T, et al. Impact of different enzymatic hydrolysates of whey protein on the formation of pyrazines in Maillard model systems[J]. Food Chemistry, 2019, 278: 533-544.

Study on the application of Maillard model reaction in the simulation of tobacco flue-curing process

YANG Weiping, XU Xiujuan, XI Hui, ZHANG Wenjuan, LIU Shan, CUI Kai, GUO Yalong, YANG Chunqiang

Zhengzhou Tobacco Research Institute of CNTC, Zhengzhou 450001, China

Abstract: In order to study the Maillard reaction rules and products in tobacco flue-curing process, fixed and variable moisture content Maillard model reaction systems were established. The feasibility of using absorbance changes to characterize the intensity of the Maillard reaction was demonstrated through ultraviolet-visible spectroscopy and compositional analysis. Using fixed moisture content model reaction, Maillard reaction rules of leucine, phenylalanine, and proline at different tobacco curing stages were studied. Using variable moisture content model reaction, the products of three amino acids during the entire tobacco curing process were studied. The results indicated: The order of Maillard reaction rates during tobacco flue-curing process of the three amino acids was phenylalanine>leucine>>proline. The Maillard reactions of phenylalanine and leucine primarily occurred during the stem-drying stage, while significant reactions did not occur throughout the entire curing stage for proline. The products genera-



ted by the three amino acids during the curing stage were distinctly different. The main products of Leucine were isoamyl substituted pyrazines, while those of phenylalanine were various aromatic aldehydes and ketones, and no relevant products were detected for proline. The established model reaction system enables the simple and effective characterization of the stages and intensity of Maillard reactions of different amino acids during tobacco leaf curing through changes in absorbance, which holds significant application value for optimizing tobacco leaf curing processes.

Key words: Maillard model reaction; tobacco flue-curing process; reaction rule; Maillard reaction products; amino acid

[责任编辑:杨晓娟 贾学伟]