

果香物质与烘烤香吡嗪类化合物香气相互作用研究

田数¹, 赵怡凡^{1*}, 董露¹, 叶亚军¹, 赵星全¹, 袁彬琰², 鲁纪辰², 牛云蔚²

(1. 内蒙古昆明卷烟有限责任公司, 内蒙古呼和浩特 010010)

(2. 上海应用技术大学香料香精化妆品学部, 上海 201418)

摘要: 为了探究果香物质对烘烤香的香气风味影响, 首先用阈值法测定了 17 种常见的食用型果香香气物质的阈值。根据阈值分别将这些物质以不同质量浓度与 2,3,5- 三甲基吡嗪进行混合, 运用 S 曲线法对果香香气物质与烘烤香吡嗪类化合物的二元混合物之间香气的相互作用展开研究。研究发现, 13 种果香香气物质与吡嗪类化合物产生协同作用, 2 种物质 (杨梅醛、己酸戊酯) 表现为加成作用, 2 种物质 (圆柚酮、柠檬烯) 对吡嗪类化合物有掩盖作用。根据感官结果选取表现为协同作用的乙酸乙酯和表现为掩盖作用的圆柚酮进行 200 ns 的分子动力学模拟, 以此来进一步验证配体与受体的相互作用。通过均方根偏差 (RMSD) 以及氢键和疏水键的数量可以客观地表现出果香物质和吡嗪类化合物的加入对整个蛋白体系稳定性的影响, 用来研究两种化合物之间的相互作用, 所得出的结果与 S 曲线法获得的结果一致。因此分子动力学模拟可以对感官结果进行进一步的验证, 对化合物之间的相互作用研究提供了理论基础, 为今后的食品生产和加香提供理论指导。

关键词: 阈值法; S 曲线法; 香气协同; 分子动力学模拟; 协同机制

文章编号: 1673-9078(2026)3-323-332

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.3.1452

Aroma Interactions between Fruity Substances and Roasted Pyrazines

TIAN Shu¹, ZHAO Yifan^{1*}, DONG Lu¹, YE Yajun¹, ZHAO Xingquan¹, YUAN Binlong², LU Jichen², NIU Yunwei²

(1.Inner Mongolia Kunming Cigarette Co. Ltd., Hohhot 010010, China)

(2.School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China)

Abstract: To investigate how fruity substances influence a roasted aroma, the threshold values of 17 common edible fruity substances were determined using the threshold method. Based on the threshold values, these fruity substances were mixed with 2,3,5-trimethylpyrazine at different mass concentrations, and their interaction with roasted pyrazines in the mixtures then examined using the S-curve method. This study found that 13 of the fruity substances tested had synergistic effects with pyrazines, two substances (ethyl methylphenylglycidate and amyl caproate) exhibited enhancing effects, and another two substances (nootkatone and limonene) displayed masking effects on pyrazines. Based on the sensory results, a 200-ns molecular dynamics simulation was carried out for ethyl acetate and nootkatone, which demonstrated synergistic and masking effects, respectively, to further verify ligand-receptor interactions. The influence that the addition of fruity substances and pyrazines has on protein system stability can be objectively expressed by the root-mean-square deviation (RMSD) and number of hydrogen and hydrophobic bonds, which were used to study interactions between the two compounds. The results obtained through the RMSD and number of hydrogen and hydrophobic bonds were consistent with those obtained through the S-curve method. These findings demonstrate that molecular

引文格式:

田数,赵怡凡,董露,等.果香物质与烘烤香吡嗪类化合物香气相互作用研究[J].现代食品科技,2026,42(3):323-332.

TIAN Shu, ZHAO Yifan, DONG Lu, et al. Aroma interactions between fruity substances and roasted pyrazines [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(3): 323-332.

收稿日期: 2024-09-29; 修回日期: 2025-03-17; 接受日期: 2025-03-26

作者简介: 田数 (1992-), 男, 硕士, 研究方向: 香精香料、生物技术, E-mail: 535183785@qq.com; 共同第一作者: 董露 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 香精香料、生物技术, E-mail: donglu6826@163.com

通讯作者: 赵怡凡 (1994-), 女, 硕士, 研究方向: 香精香料、生物技术, E-mail: 1037876127@qq.com

dynamics simulations can further verify sensory results, thereby providing a theoretical basis for the study of compound interactions and theoretical guidance for future food production and flavoring.

Key words: threshold method; S-curve method; aroma synergy; molecular dynamics simulation; synergistic mechanism

近几十年来我国的食物烘烤类行业市场需求量大,消费升级明显,发展前景广阔,已经成为饮食业的重要组成部分。食物烘烤过程中产生的香气物质是影响食物感官品质和消费者接受度的关键因素。烘烤香气是由挥发性化合物所引起的,陈臣等^[1]通过气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)等手段确定巴旦木挥发性风味物质主要有吡嗪类、酮类和内酯类化合物等。吡嗪类化合物对烘烤食品的风味有重要贡献,会赋予食物独特的烤香、坚果香等令人愉悦的香气^[2,3]。目前研究食物风味的方法主要有阈值法^[4]、S型曲线^[5]、香气活度值(Odor Active Values, OAV)法^[6]、 σ - τ 图法^[7]。吴奇霄等^[8]通过阈值法, S型曲线法等研究白酒中三甲基吡嗪与三种果香物质(乙酸乙酯、丁酸乙酯和己酸乙酯)之间存在加成或协同作用,与乳酸乙酯之间是掩盖作用。然而上述这些方法多依据于实验者和测试者的主观感受为主要数据,因此需要分子层面的研究方法来自客观地验证感官数据的结果。

近年来,嗅觉受体与香气化合物的相互作用已成为研究的热点。了解嗅觉受体(ORs)与风味化合物的相互作用机制有助于预测和控制香气化合物的香气释放^[9]。嗅觉受体(ORs)属于G蛋白偶联受体的一种,能够轻易地识别不同的气味^[10-12],这些ORs都具有一定数量的活性位点^[13],特定的ORs能识别特定化学结果的气味分子^[14]。有研究者发现^[15],一些OR会优先对具有水果气味的酯类物质作出反应,例如OR5AC2对酯类物质异丁酸麦芽酯和乙酸香酯有反应、OR2T10会对酯类麦芽酯异丁酸酯和乙酸松油酯有反应,表明该受体可能优先对含有酯官能团的香气物质有反应^[16]。由此可见,嗅觉感知对食物的接受度、风味体验等方面起着重要的作用^[17]。

分子动力学模拟是一项先进的计算技术,它通过计算机算法模拟分子系统的行为和相互作用,预测食物香气分子在一定时间尺度上的动态行为,包括分子的运动轨迹、结构的动态变化、分子间的动态相互作用等^[18]。利用分子动力学模拟技术可以更清楚地研究化合物与嗅觉受体的相互作用机制和构象关系。目前研究发现,氢键和疏水相互作用是香气化合物与OR结合的重要驱动力^[19-21]。Qi等^[22]通过多光谱法和分子动力学(MD)模拟确定了BSA蛋白与紫杉醇和青蒿素之间的相互作用。由此可见分子动力学模拟可以在分子水平上更好地了解食物蛋白质和小分子之间的结构变化。

到目前为止,对烘烤香气的研究仅限于化合物的鉴定,关于烘烤吡嗪类化合物与其他香气物质之间相互作用研究较少。因此,本文选取GB2760-2024《食物添加剂使用标准》中常用的17种食用型果香香气物质,以及具有烘烤香气和坚果香气特征香气物质的2,3,5-三甲基吡嗪为研究对象,通过S曲线法和分子动力学模拟技术对果香香气物质与烘烤香吡嗪类化合物之间香气的相互作用机制进行研究,对食物香气的改善、开发适合不同食物的香精配方、研发新产品具有重要的现实意义。通过研究分子的动态行为以及体系结构的变化,揭示化合物间相互作用产生香气的机理,为食物的加香、烘烤工艺的改进提供理论指导和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

乙醇(纯度99.7wt.%),上海国药试剂股份有限公司;甲酸戊酯、丁酸戊酯、己酸戊酯、杨梅醛、丁酸香叶酯、甲酸香叶酯、乙酸乙酯、己酸乙酯、乙酸异戊酯、丁酸异戊酯、异戊酸异戊酯、苯甲酸异戊酯、丙位庚内酯、丙位癸内酯、异丁酸香叶酯、圆柚酮、柠檬烯(纯度都大于99%),上海美馨贸易有限公司;去离子水来自于美国Mill-Q净化系统。

1.2 实验方法

1.2.1 香气物质阈值的测定

S型曲线法^[23]常被用于精准测定各类物质的感知阈值。感官评价实验严格遵循ISO8589:2007这一国际标准,在专业的感官实验室环境中得以实施。实验环境的室温始终恒定在25℃,样品被盛装在容量为5毫升的棕色带盖玻璃瓶内,并且以随机的三位数字进行编码。选取20名无不良嗜好、身体健康、年龄处于22至25岁之间的学生(14名男性,6名女性),根据ASTME544-10《参考超阈值气味强度标准法》^[24]进行感官测试培训。参考方法^[25]按照GB/T 22366-2022《感官分析方法学采用三点强迫选择法(3-AFC)测定嗅觉、味觉和风味觉察阈值的一般导则》的规定,对每个目标待测物设置十个质量浓度梯度,从高到低依次使用乙醇和水体积比为1:4的溶液进行两倍稀释。感官小组成员从最高质量浓度开始进行嗅闻,遵循3-AFC的方法对各目标待测物进行嗅闻,在三个玻璃瓶中选

出其中一个含有目标待测物的玻璃瓶,另外两个则作为空白对照。每个质量浓度均嗅闻三次,根据每位成员的嗅闻结果计算检测概率。检测概率(P)指的是正确辨识样本人数在总人数中的占比。同时结合校正公式计算校正后的检测概率,校正公式为:

$$P^* = \frac{3P-1}{2} \quad (1)$$

式中:

P^* ——检测概率的校正值;

P ——实际测得的检测概率值。

由 S 型曲线拟合的质量浓度 / 响应函数:

$$P = 1/[1 + \exp(-\frac{x-x_0}{D})] \quad (2)$$

式中:

x ——质量浓度对数值;

x_0 ——阈值对数值;

D ——S 曲线斜率的倒数;

P ——检测概率。

代入公式用 Origin 软件制作, x 轴为香气物质的质量浓度对数值, y 轴为检测概率 P 的曲线, 纵坐标 $P=0.5$ 时, x_0 即为该物质的阈值^[26-30]。

1.2.2 香气物质之间的协同作用实验-S曲线法

获得每个香气物质的阈值之后, 根据不同物质的不同阈值预设每个果香香气物质的第一瓶初始质量浓度, 然后将吡嗪类香气物质(A)与果香香气物质(B)根据设定的初始质量浓度进行混合后作为第一瓶, 然后从高往低依次用乙醇和水体积比为 1:4 的溶液进行两倍稀释, 设置十个质量浓度梯度, 感官小组成员从第一瓶往后开始嗅闻。嗅闻混合物中是否含有 A 物质, 得出在 B 物质的影响下 A 物质的实际识别阈值 $P(A)$, $p(A)$ 通过阈值法测得单个物质 A 的理论识别阈值, 绘制拟合 $\log(\text{质量浓度})$ -检测概率 p 曲线。若 $P=0.5$ 时, 实际识别阈值 $P(A)$ 低于理论识别阈值 $p(A)$, 则表明 B 物质对 A 物质产生掩盖作用; 若 $P(A) > p(A)$, 则证明 B 物质对 A 物质产生加成协同作用。判断协同作用的标准: $D = \text{实验识别阈值 } P(A) / \text{理论识别阈值 } p(A)$, 当 $D > 1$ 时, 表明发生掩盖作用; 当 $0.5 < D < 1$ 时, 发生加成作用; 当 $D < 0.5$ 时, 发生协同作用^[31,32]。

1.2.3 嗅觉蛋白与香气化合物的获得

实验选用人类嗅觉受体中较为广泛应用的嗅觉受体蛋白 OR52D1^[32], 蛋白结构从 Uniport 数据库下载, 该蛋白的结构源自于 AlphaFold 的计算预测。AlphaFold 凭借其前所未有的精确度与高效性, 能够基于氨基酸序列预测蛋白质三维结构^[33]。17 种香气化合物的小分子结构从 Pubchem 数据库获取的, 获取数

据格式为 sdf, 利用 Openbabel 软件将 sdf 格式转换为 PDB 格式保存。

1.2.4 嗅觉蛋白与香气化合物构象的处理

将蛋白 OR52D1 的 PDB 文件导入到软件 AutodockTools 中, 为了排除水分子对真实相互作用的影响, 删除掉蛋白分子上水分子 (Delete Water) 和其他配体小分子, 然后对分子进行加氢操作 (Add-Hydrogens) 来完善分子的化学结构, 接着计算电荷 (Edit-Charges-Compute Gasteiger) 和添加原子类型 (Edit-Atoms-Assign AD4 type), 最后将处理好的蛋白导出至 PDBQT 格式文件; 将香气物质小分子下载并保存成 PDB 格式后, 分别导入到 AutodockTools 中同样进行加氢、计算电荷和添加原子类型操作, 然后对小分子指定 root (Ligand-Torsion Tree-Detect Root) 和可旋转键操作 (Ligand-Torsion Tree-Choose Torsions), 同样最后将经过处理的 17 种配体文件导出为 PDBQT 格式并保存。

1.2.5 分子动力学模拟

将经过多配体分子对接获得的复合物构象 PDB 格式文件导入 Desmond 程序 (美国薛定谔公司), 以此构象为基础进行分子动力学模拟以获得更加稳定的构象。分子动力学模拟的一般流程为: (1) 创建分子拓扑文件, 将配体小分子和受体蛋白保存为能被 Desmond 程序识别的 pdb 或 mol2 格式; (2) 选择合适力场: Desmond 可选用 OPLS2005、AMBER 等力场, 需根据目标分子化学性质和特点选择; (3) 设定单位盒子并填充溶剂: 设定一个以受体蛋白为中心构建了形状为立方体的盒子, 通常称为单位盒子, 并向盒子中填充 OR52D1 水模型, 向盒中添加钠离子及氯离子, 以构建模拟复合物所需的环境。(4) 设定模拟参数: 根据目标分子特点和模拟需求, 设定温度、压力、步长、模拟时间、离子浓度、边界条件等参数。

均方根偏差 (RMSD) 是一个关键的度量指标, 用于定量评估模拟分子结构与参考分子结构之间的差异。具体而言, RMSD 的计算涉及对每个原子在模拟结构和参考结构间的位置偏差进行平方, 求得平均值, 再取平方根。因此, 较小的 RMSD 值代表模拟分子结构与参考结构之间的相似度较高, 而较大的 RMSD 值则暗示两者之间存在显著的差异。

在分子动力学模拟的实施过程中, RMSD 是评价模拟稳定性和结果可靠性的重要工具。例如, 若在模拟过程中, 系统的 RMSD 值随时间的变化幅度较小, 这则表明模拟过程的稳定性较好, 系统达到稳定状态, 即配体与受体可以稳定结合。

1.2.6 数据分析

利用 Origin 2022 绘制非线性拟合图，根据图来判断协同作用效果；利用 Maestro 13.5 软件分析蛋白受体与小分子配体间相互作用并生成动态轨迹数据。

2 结果与讨论

2.1 识别阈值的测定

采用 3-AFC，结合 S 曲线对实验涉及的所有果香香气物质进行阈值测定，识别阈值的结果如表 1 所示：乙酸异戊酯 ($0.31\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、杨梅醛 ($5.13\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、丁酸香叶酯 ($4.39\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、甲酸香叶酯 ($1.97\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、己酸乙酯 ($2.83\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、己酸戊酯 ($28.28\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、乙酸乙酯 ($9.10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、丁酸异戊酯 ($3.71\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、异戊酸异戊酯 ($25.67\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、苯甲酸异戊酯 ($13.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、丙位庚内酯 ($4.49\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、丙位癸内酯 ($3.71\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、丁酸戊酯 ($23.42\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、甲酸戊酯 ($11.70\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、异丁酸香叶酯 ($44.01\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、圆柚酮 ($6.73\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、柠檬烯 ($6.73\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。图 1 为单个物质（乙酸乙酯、杨梅醛、乙酸异戊酯、异丁酸香叶酯、圆柚酮、己酸戊酯）质量浓度对数值检测概率 P 曲线，以及根据 S 曲线公式得出的实测拟合 S 曲线。

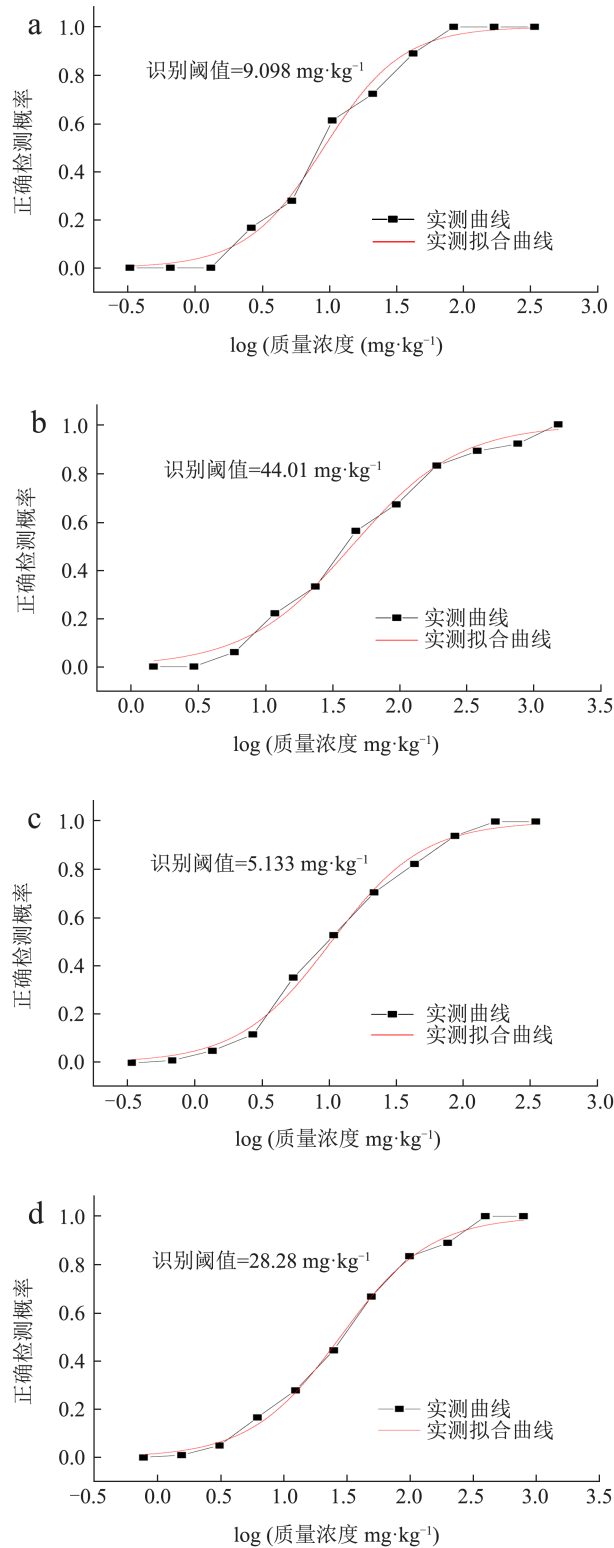
表 1 单一物质的识别阈值
Table 1 Identification threshold for a single substance

香料名称	识别阈值/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
乙酸异戊酯	0.31
杨梅醛	5.13
丁酸香叶酯	4.39
甲酸香叶酯	1.97
己酸乙酯	2.83
己酸戊酯	28.28
乙酸乙酯	9.10
丁酸异戊酯	3.71
异戊酸异戊酯	25.67
苯甲酸异戊酯	13.25
丙位庚内酯	4.49
丙位癸内酯	3.71
丁酸戊酯	23.42
甲酸戊酯	11.70
异丁酸香叶酯	44.01
圆柚酮	6.73
柠檬烯	0.07

2.2 不同香气物质对烘烤吡嗪类原料二元相互作用研究

借助 S 型曲线模型探讨了各香气组分之间的协同

效应，该方法便于直观揭示各香气物质相互作用的情况。实验具体体现在表 2 中，表明果香类型的香气物质与烘烤特征香气物质 2,3,5- 三甲基吡嗪之间的相互作用，结果显示有 15 种果香香气物质与 2,3,5- 三甲基吡嗪具有正向的协同作用与加成作用，而仅有圆柚酮和柠檬烯会对 2,3,5-三甲基吡嗪的香气产生掩盖作用。



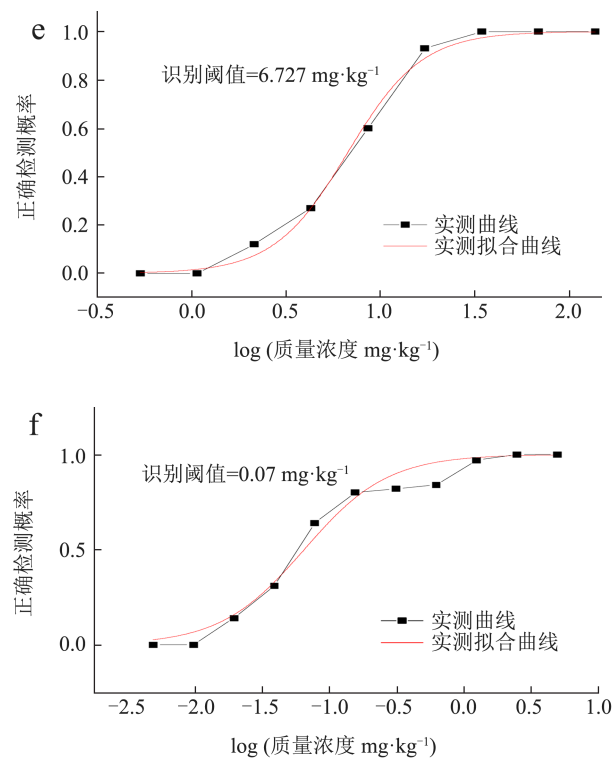


图 1 单个物质识别阈值 S 曲线

Fig.1 S-curve of recognition threshold for a single substance
注: a 为乙酸乙酯, b 为异丁酸香叶酯, c 为杨梅醛, d 为己酸戊酯, e 为圆柚酮, f 为柠檬烯。

2.2.1 与2,3,5-三甲基吡嗪产生协同作用的物质

如表 2 所示, 与 2,3,5-三甲基吡嗪产生协同作用的物有以下 13 种: 丙位庚内酯、甲酸香叶酯、丁酸异戊酯、乙酸异戊酯、苯甲酸异戊酯、丁酸香叶酯、异丁酸香叶酯、甲酸戊酯、己酸乙酯、丙位癸内酯、异戊酸异戊酯、乙酸乙酯、丁酸戊酯。例如异丁酸香叶酯对 2,3,5-三甲基吡嗪的影响结果显示, 二者组合后产生的实际 S 型曲线偏向理论 S 型曲线左侧, D(实验阈值 / 理论阈值)=0.29 小于 0.5, 根据协同作用判断规则表明异丁酸香叶酯与 2,3,5-三甲基吡嗪发生协同作用, 有助于 2,3,5-三甲基吡嗪这类香气成分的释放并且被更好地嗅闻。如图 2 所示, 曲线明显向左偏移。

2.2.2 与2,3,5-三甲基吡嗪产生加成作用的物质

如表 2 所示, 与 2,3,5-三甲基吡嗪产生加成作用的物有以下 2 种: 杨梅醛、己酸戊酯。关于杨梅醛对 2,3,5-三甲基吡嗪效应的研究发现, 二者组合后产生的实际 S 型曲线偏向理论 S 型曲线左侧, 实际测定的感知阈值低至 33.62 mg·kg⁻¹, 这一数值低于理论预测的识别阈值。计算得到的实验阈值与理论阈值之比 (D=实验阈值 / 理论阈值) 为 0.63, 不足 1, 但仍超越 0.5。这一结果证明了杨梅醛的添加能有效促进 2,3,5-三甲

基吡嗪这类香气成分的释放, 但增强效果没有异丁酸香叶酯明显。如图 2 所示, 曲线稍微向左偏移。

2.2.3 与2,3,5-三甲基吡嗪产生掩盖作用的物质

如表 2 所示, 与 2,3,5-三甲基吡嗪产生协同作用的物有以下 2 种: 圆柚酮、柠檬烯。圆柚酮对 2,3,5-三甲基吡嗪的影响结果显示, 二元混合后, 实际 S 型曲线偏向理论 S 型曲线右侧, 实测阈值为 89.82 mg·kg⁻¹, D(实验阈值 / 理论阈值)=1.67 大于 1, 根据协同作用判断规则表明表现为圆柚酮对 2,3,5-三甲基吡嗪产生掩盖作用, 由此可见圆柚酮阻碍了 2,3,5-三甲基吡嗪这类香气成分的释放以至较难被嗅闻到。如图 2 所示, 曲线向右偏移。

表 2 不同果香物质对2,3,5-三甲基吡嗪的相互作用
Table 2 Interaction of 2,3,5-trimethylpyrazine with different fruit aroma substances

序号	成分	理论 阈值	实验 阈值	比值 (实 验 / 理论)	总效应
1	丙位庚内酯	53.79	8.46	0.16	协同
2	甲酸香叶酯	53.79	10.13	0.19	协同
3	丁酸异戊酯	53.79	10.52	0.20	协同
4	乙酸异戊酯	53.79	12.02	0.22	协同
5	苯甲酸异戊酯	53.79	12.22	0.23	协同
6	丁酸香叶酯	53.79	13.70	0.25	协同
7	异丁酸香叶酯	53.79	15.72	0.29	协同
8	甲酸戊酯	53.79	17.92	0.33	协同
9	己酸乙酯	53.79	19.15	0.36	协同
10	丙位癸内酯	53.79	19.15	0.36	协同
11	异戊酸异戊酯	53.79	19.53	0.36	协同
12	乙酸乙酯	53.79	19.63	0.36	协同
13	丁酸戊酯	53.79	20.01	0.37	协同
14	杨梅醛	53.79	33.62	0.63	加成
15	己酸戊酯	53.79	35.30	0.66	加成
16	圆柚酮	53.79	89.82	1.67	掩盖
17	柠檬烯	53.79	115.82	2.15	掩盖

2.2.4 二元相互作用结果分析

综上所述, 不同的果香香气物质与 2,3,5-三甲基吡嗪产生的相互作用不同, 对于烘烤香气的影响机制也不同; 并且协同作用与加成作用虽然都是有助于 2,3,5-三甲基吡嗪更好地被嗅闻到, 但是对于香气的影响程度也是有差别的: 比如加成作用可能是在不影响烘烤香气的情况下增加其他的风味, 而协同作用则是两种风味相互促进, 使得综合的香气效果优于单个物质香气的效果总和, 深入研究这些相互作用有助于更好地把握烘烤食品加香工艺的改进, 提供广阔的思路。17 种果香香气物质与 2,3,5-三甲基吡嗪相互作用的结

果可以为未来烘烤风味食品的研发提供理论指导,例如具有奶油、椰子特征香气丙位庚内酯、香蕉和梨香气的乙酸异戊酯等果香物质加香到烘烤食品中,让食品风味更加丰富,更醇厚。此外,依靠这些感官数据,可以为进一步研究分子层面香气物质小分子之间的相互作用机制提供参考价值。

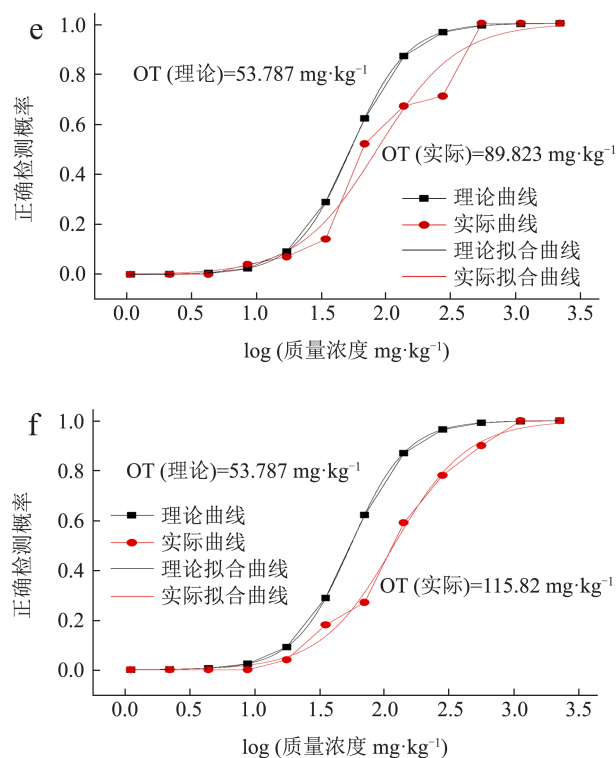
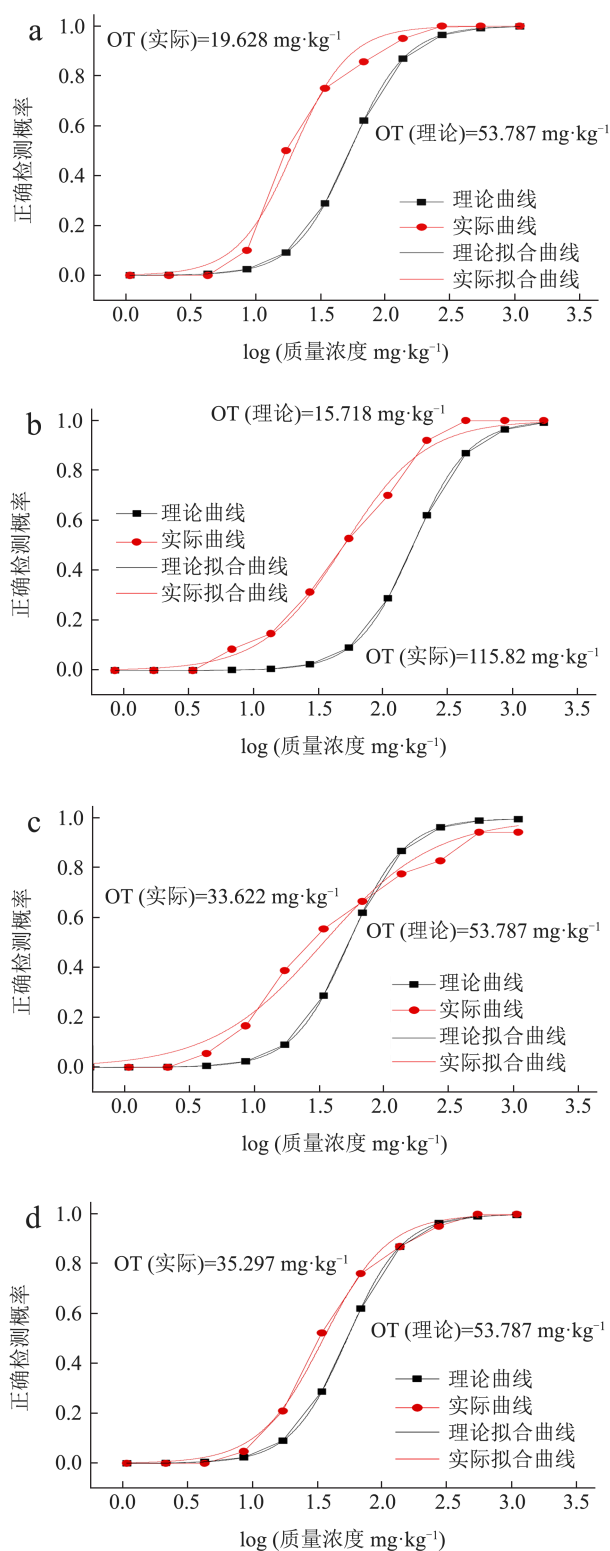


图2 果香香气物质与2,3,5-三甲基吡嗪混合的S型曲线

Fig.2 S-curve of fruit aroma substance mixed with 2,3,5-trimethylpyrazine

注: a 为乙酸乙酯对2,3,5-三甲基吡嗪的影响, b 为异丁酸香叶酯对2,3,5-三甲基吡嗪的影响, c 为杨梅醛对2,3,5-三甲基吡嗪的影响, d 为己酸戊酯对2,3,5-三甲基吡嗪的影响, e 为圆柚酮对2,3,5-三甲基吡嗪的影响, f 为柠檬烯对2,3,5-三甲基吡嗪的影响。

2.3 分子动力学模拟

根据S曲线实验结果和分子对接结果,挑选出圆柚酮(具有掩盖作用、与嗅觉受体结合产生的结合能明显减弱)和乙酸乙酯(具有协同作用、嗅觉受体结合产生的结合能明显增强)作为分子动力学模拟的研究对象,使其与嗅觉受体OR52D1进行模拟,同时单独模拟2,3,5-三甲基吡嗪与嗅觉受体蛋白作为对照。

2.3.1 MD结果收敛性分析

选取圆柚酮,乙酸乙酯和2,3,5-三甲基吡嗪与OR52D1蛋白进行100 ns的MD模拟,并对其分子动力学轨迹进行分析。如图3a为在圆柚酮的影响下2,3,5-三甲基吡嗪与OR52D1蛋白的RMSD对模拟时间的构象稳定性,其中较小的波动表明所有的配合物都获得了稳定的构象,结果显示2,3,5-三甲基吡嗪与OR52D1蛋白在30 ns之后相对稳定,系统处于平衡状态。分子对接评分和自由结合能(MM-GBSA)分析结果参考MM-GBSA dG Bind,当该值低于 $-30 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,

则表明结合自由能低，配体与蛋白结合稳定。根据表 3 结果所示，0、30、100 ns 时，2,3,5-三甲基吡嗪与 OR52D1 对接 MM-GBSA 结果分别为 -32.36、-30.78、-35.25 kcal·mol⁻¹，结合自由能低，表明 2,3,5-三甲基吡嗪与 OR52D1 在模拟的这三个时段均结合稳定。

而图 3b 为在乙酸乙酯的影响下 2,3,5-三甲基吡嗪与 OR52D1 蛋白的 RMSD 对模拟时间的构象稳定性，其中此构象从 0 ns 开始到 85 ns 一直处于比较大的波动，波动幅度较大且持续时间长；根据表 4 综合分析 XP 对接与 MM-GBSA 结果，0 ns 时，2,3,5-三甲基吡嗪与 OR52D1 对接 MM-GBSA 结果为 -26 kcal·mol⁻¹，表明 0 ns 时 2,3,5-三甲基吡嗪与 OR52D1 结合不是非常稳定。47、100 ns 时，2,3,5-三甲基吡嗪与 OR52D1 对接 MM-GBSA 结果分别为 -34.79、-32.14 kcal·mol⁻¹，结合自由能低，表明 2,3,5-三甲基吡嗪与 OR52D1 在 47 ns 和 100 ns 时均结合稳定。

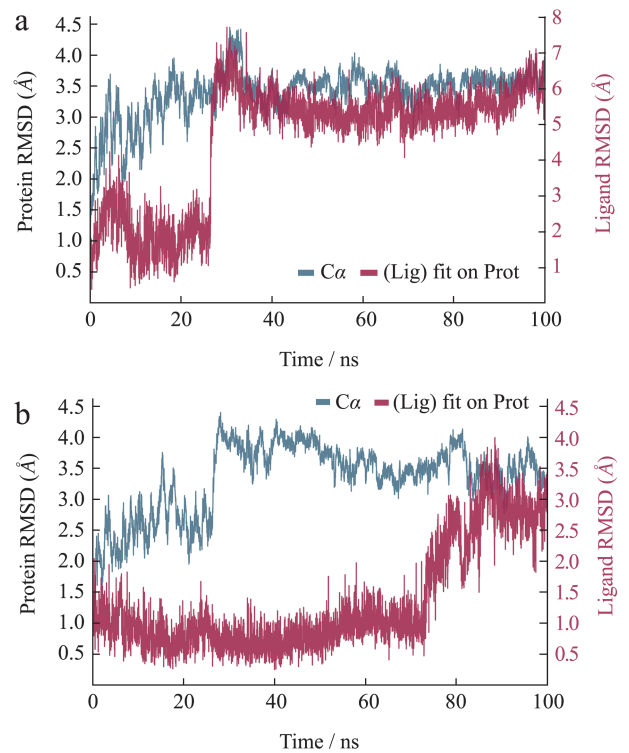


图 3 (a) 圆柚酮与吡嗪和蛋白结合体系
(b) 乙酸乙酯与吡嗪和蛋白结合体系

Fig.3 (a) Naringone binding system with pyrazine and protein
(b) ethyl acetate binding system with pyrazine and protein

注：a、b 为蛋白（蓝色）和配体（红色）的 RMSD 结。

将图 3a 与图 3b 进行对比，表 3 与表 4 进行对比可以得出：相比圆柚酮，乙酸乙酯的加入使整个受体蛋白体系的构象产生大幅度变化，导致蛋白与配体模拟稳定时间延后，整体体系较晚地形成平衡状态，破坏了原有蛋白体系的稳定。随着蛋白体系稳定性下降

而引起受体蛋白展开使得更多的氨基酸残基暴露从而引起新的氢键生成，残基的暴露也增强蛋白质与香气物质的相互作用。因此可以得出乙酸乙酯对于 2,3,5-三甲基吡嗪形成的蛋白体系起着加成协同作用；而圆柚酮对于 2,3,5-三甲基吡嗪形成的蛋白体系起着掩盖作用。

表 3 在圆柚酮影响下MM-GBSA结果

Table 3 MM-GBSA results under the influence of naringone			
时间/ns	化合物	受体	分子对接评分和自由结合能
0	2,3,5-三甲基吡嗪	OR52D1	-32.36
30			-30.78
100			-35.25

表 4 在乙酸乙酯影响下MM-GBSA结果

Table 4 Results of MM-GBSA under the influence of ethyl acetate			
时间/ns	化合物	受体	分子对接评分和自由结合能
0	2,3,5-三甲基吡嗪	OR52D1	-26
47			-34.79
100			-32.14

2.3.2 受体与小分子配体间相互作用情况分析

图 4 显示在选定轨迹中发生超过 10.0% 模拟时间（即在 100 ns 中互作时间超过 10 ns）的相互作用，在圆柚酮影响下，2,3,5-三甲基吡嗪与 OR52D1 蛋白 A 链的残基 HIS184（24%）、ARG266（39%）、HIS265（15%）、HIS184（66%）通过水桥间接形成氢键，与残基 HIS265（15%）直接形成 π - π 键。模拟时间可用于定量评价相互作用的稳定性或强度。右图为蛋白与配体 -30 ns 模拟时的截图，由图可见：2,3,5-三甲基吡嗪深入在 OR52D1 蛋白的活性口袋内部，与 OR52D1 蛋白无非共价键结合。

图 5 所示，在乙酸乙酯影响下，2,3,5-三甲基吡嗪与 OR52D1 蛋白 A 链的残基 HIS108（89%）、SER261（49%）直接形成氢键，与残基 TYR111（36%）直接形成 π - π 键。右图为蛋白与配体 -27 ns 模拟时的截图，由图可见：2,3,5-三甲基吡嗪深入在 OR52D1 蛋白的活性口袋内部，OR52D1 蛋白残基 TYR111、TYR284、VAL285 等对 2,3,5-三甲基吡嗪形成疏水作用力。该配体与 OR52D1 蛋白残基 SER261、HIS108 各形成一个氢键。

因此在圆柚酮影响下，对 2,3,5-三甲基吡嗪与 OR52D1 蛋白的结合产生的相互作用主要为水桥和 π - π 键；而在乙酸乙酯影响下，对 2,3,5-三甲基吡嗪与 OR52D1 蛋白的结合起到重要作用的相互作用主要为氢键和 π - π 键。 π - π 堆叠是一种发生在含有 π 电子的芳香环之间的相互作用，这种相互作用在蛋白质内部的芳香氨基酸之间，以及蛋白质与含有芳香环的小分子之间常见。所以 π - π 键并不是判断小分子之间协同作用的判断标准。

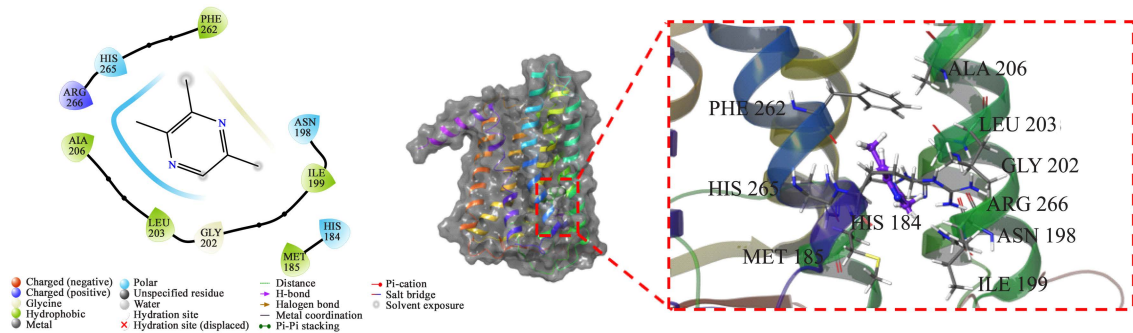


图 4 在圆柚酮的影响下 2,3,5- 三甲基吡嗪与 OR52D1 蛋白 - 相互作用分析

Fig.4 Analysis of protein - interaction between 2,3, 5-trimethylpyrazine and OR52D1 under the influence of naringone

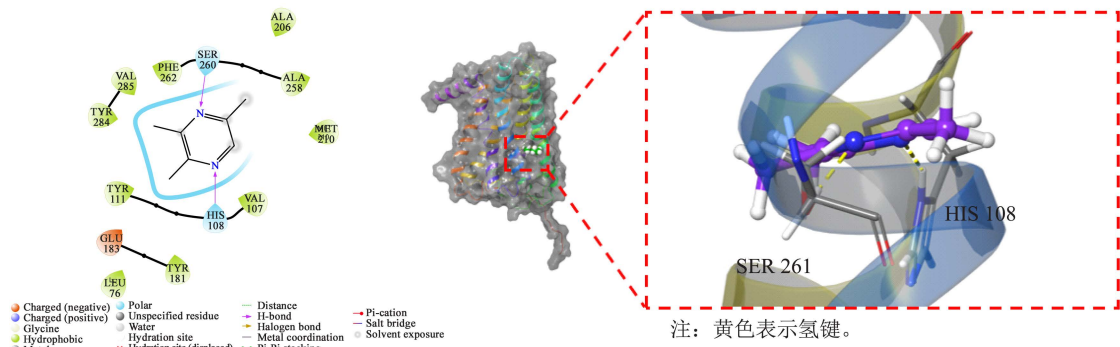


图 5 在乙酸乙酯的影响下 2,3,5- 三甲基吡嗪与 OR52D1 蛋白 - 相互作用分析

Fig.5 Analysis of the interaction between 2,3, 5-trimethylpyrazine and OR52D1 protein-under the influence of ethyl acetate

而氢键是一种偶极 - 偶极相互作用，发生在一个带部分正电的氢原子和一个带部分负电的电负性较大的原子（如氧、氮）之间。这种相互作用在生物分子的结构中起着重要的作用，例如 DNA 的双螺旋结构和蛋白质的二级结构（ α -螺旋和 β -折叠）。氢键作为一种非共价相互作用，能够使配体与受体结合地更加稳定，它普遍存在于食品体系中^[34]。通过分子动力学模拟能够看出配体和受体间氢键的数量，氢键越多代表相互作用力越强。此外，氢键的存在时间也是判断其强弱的重要标准，氢键的形成与断裂的动态变化反映了其稳定性，即形成氢键的时间越长则氢键越稳定。从乙酸乙酯直接形成氢键且在模拟过程中产生两个氢键以及圆柚酮只形成水桥中可见，乙酸乙酯对于 2,3,5-三甲基吡嗪起着加成协同作用；而圆柚酮对于 2,3,5-三甲基吡嗪起着掩盖作用。

在生物分子层面上，目前关于吡嗪类化合物相互作用的研究是采用一系列光谱和分子对接技术，探讨了吡嗪风味物质与溶菌酶 (Lyz) 之间的相互作用机制，证实了吡嗪风味物质与 Lyz 的紧密结合破坏了 Lyz 的天然氢键网络结构，导致了 Lyz α -Helix 结构的逐渐释放，表明了吡嗪风味物质对 Lyz 的构象有影响^[35]。相比分子对接的静态对接数据，分子动力学的模拟更真实且详细地说明香气物质在分子层面对于人体嗅觉受

体所产生的影响，在原有方法的基础上用分子动力学代替分子对接进一步地深入探究香气化合物之间的协同作用机制，通过分子动力学技术动态地模拟以及测试香气物质在分子层面相互作用的具体情况。因此本文在参考了利用氢键来研究小分子间相互作用的方法上，运用分子动力学模拟技术进一步地观察不同时间段氢键的生成数量，并且根据整个蛋白体系的稳定性来多角度地研究相互作用的机制。

3 结论

本研究通过阈值法和 S 曲线法研究 17 种果香香气物质与烘烤香吡嗪类化合物 2,3,5 三甲基吡嗪的协同作用，其结果较为直观地表明 15 个果香物质（例如丙位庚内酯、甲酸香叶酯等）会对 2,3,5-三甲基吡嗪产生协同加成作用，2 个物质会产生掩盖作用，这些结果可以对食品香气的改善以及加香提供理论支持。利用分子动力学代替分子对接进一步地深入探究香气化合物之间的协同作用机制，通过分子动力学技术动态地模拟以及测试香气物质在分子层面相互作用的具体情况，真实且详细地说明香气物质在分子层面对于人体嗅觉受体所产生的影响，解释了协同作用产生的机制，提升科研人员对研究体系深层次认知，便于调整实验条件和优化实验设计；感官实验的结果可以帮助研究

分子动力学模拟哪些数据可以证明物质间的相互作用,例如通过比较均方根偏差(RMSD)比较香气化合物的加入前后对整个蛋白体系稳定性的影响大小、通过分析香气化合物与嗅觉受体 OR52D1 上的氨基酸残基变化、通过氢键是否形成、形成数量、持续时间等因素来判断香气化合物的相互作用。

同时从客观角度进一步地证实通过阈值法、S 型曲线、OAV 法、 σ - τ 图法所得到的香气协同的结果,使得所得结果更具说服力和可信度,有助于解释协同作用机制的形成,为实际烘烤食品加工过程中香气控制提供理论支持并为烘烤风味的调整和改良提供理论依据。

参考文献

- [1] 陈臣,周洁,周琦,等.烘烤前后巴旦木感官评价和挥发性化合物变化[J].食品工业科技,2025,46(8):293-301.
- [2] 刘雨微.腰果烘烤过程中热加工伴生危害物和香气成分形成规律及其品质评价[D].南昌:南昌大学,2024.
- [3] 陆婷婷.烘焙条件对咖啡果皮品质的影响及其在饼干中的应用研究[D].镇江:江苏大学,2023.
- [4] DAAN S, DAVID P D S, BREGT U, et al. Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds [J]. Food Chemistry, 2009, 114(4): 1206-1215.
- [5] YAN L C, LIU J M, FANG D. Use of a modified vector model for odor intensity prediction of odorant mixtures [J]. Sensors, 2015, 15(3): 5697-5709.
- [6] YE Y H, ZHENG S Y, WANG Y X. Analysis of aroma components changes in Gannan navel orange at different growth stages by HS-SPME-GC-MS, OAV, and multivariate analysis [J]. Food Research International, 2024, 175: 113622.
- [7] 肖作兵,朱建才,牛云蔚,等.香气成分的协同作用研究进展[J].食品科学技术学报,2018,36(4):1-7.
- [8] 吴奇霄,赵兴蓉,余松柏,等.白酒中吡嗪类化合物分析及与酯的感知交互作用[J].现代食品科技,2024,40(11):345-357.
- [9] ZHANG X G, LU Y C, ZHAO R, et al. Study on simultaneous binding of resveratrol and curcumin to β -lactoglobulin: Multi-spectroscopic, molecular docking and molecular dynamics simulation approaches [J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124: 107331.
- [10] 陈臣,袁佳杰,杨仁琴,等.食品风味协同作用研究进展[J].食品安全质量检测学报,2020,11(3):663-668.
- [11] 王品品.樱桃酒香气协同作用机制研究[D].上海:上海应用技术大学,2019.
- [12] FIRESTEIN S. How the olfactory system makes sense of scents [J]. Nature, 2001, 413: 6852.
- [13] BERGHARD A, BUCK L B, LIMAN E R. Evidence for distinct signaling mechanisms in two mammalian olfactory sense organs [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(6): 2365-2369.
- [14] MARIENDE B, RENEE S, ELIZABETH Z, et al. Functional and molecular evolution of olfactory neurons and receptors for aliphatic esters across the *Drosophila* genus [J]. Journal of Comparative Physiology A-neuroethology Sensory Neural and Behavioral, 2010, 196: 97-109.
- [15] LIANG L, DUAN W, ZHANG J C, et al. Characterization and molecular docking study of taste peptides from chicken soup by sensory analysis combined with nano-LC-Q-TOF-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132455.
- [16] WANG Y M, XIN M L, LI Z Y, et al. Food-Oral Processing: Current progress, future directions, and challenges [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(19): 10725-10736.
- [17] POURMORADY A, LOMVARDAS S. Olfactory receptor choice: A case study for gene regulation in a multi-enhancer system [J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2022, 72: 101-109.
- [18] COMETTO-MUNIZ J E, ABRAHAM M H. Dose-response functions for the olfactory, nasal trigeminal, and ocular trigeminal detectability of airborne chemicals by humans [J]. Chemical Senses, 2016, 41(1): 3-14.
- [19] 王逸雯.基于分子动力学模拟和机器学习的配体-靶标相互作用研究[D].济南:山东交通学院,2024.
- [20] XIAO Z B, QU H L, MAO C T, et al. Study on the sweetening mechanism of aroma compounds in yangshan peach using sensory analysis, molecular docking, and molecular dynamics simulation techniques [J]. LWT-Food Science and Technology, 2024, 191: 115562.
- [21] SUN Z C, LIN Y C, YANG H, et al. Characterization of honey-like characteristic aroma compounds in Zunyi black tea and their molecular mechanisms of interaction with olfactory receptors using molecular docking [J]. LWT-Food Science and Technology, 2024, 191: 115640.
- [22] QI H Y, WANG Y, WANG X W, et al. The different interactions of two anticancer drugs with bovine serum albumin based on multi-spectrum method combined with molecular dynamics simulations [J]. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2021, 259: 119809.
- [23] MIYAZAWA T, GALLAGHER M, PRETI G, et al. Odor detection of mixtures of homologous carboxylic acids and coffee aroma compounds by humans [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(21): 9895-9901.
- [24] 牛云蔚,朱全,肖作兵.茅台酒香气组成及关键香气成分间的协同作用[J].中国食品学报,2021,21(10):215-226.
- [25] 徐志强,熊文,冯俊俏,等.春黄菊干花特征香气成分鉴定及香气协同作用变化评估[J].现代食品科技,2023,39(1):291-299.
- [26] MIYAZAWA T, GALLAGHER M, PRETI G, et al. Psychometric functions for ternary odor mixtures and their unmixed components [J]. Chemical Senses, 2009, 34(9): 753-761.
- [27] MIYAZAWA T, GALLAGHER M, PRETI G, et al. The impact of subthreshold carboxylic acids on the odor intensity of suprathreshold flavor compounds [J]. Chemosensory Perception, 2008, 1(3): 163-167.
- [28] COMETTO-MUNIZ J E, ABRAHAM M H. Odor detection by humans of lineal aliphatic aldehydes and helional as gauged by dose-response functions [J]. Chemical Senses, 2010, 35: 289-299.
- [29] COMETTO-MUNIZ J E, CAIN W S, ABRAHAM M H, et al.

Concentration-detection functions for the odor of homologous n-acetate esters [J]. Physiology & Behavior, 2008, 95(5): 658-667.

[30] COMETTO-MUNIZ J E, ABRAHAM M H. Olfactory detectability of homologous n-alkylbenzenes as reflected by concentration- detection functions in humans [J]. Neuroscience, 2009, 161: 236-248.

[31] CAMELEYRE M, LYTRA G, TEMPERE S, et al. Olfactory impact of higher alcohols on red wine fruity ester aroma expression in model solution [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(44): 9777-9788.

[32] XIAO Z B, SHEN T Y, KE Q F, et al. Identification of characteristic aroma compounds of Longjing tea and their molecular mechanisms of interaction with olfactory receptors using molecular docking [J]. European Food Research and Technology, 2021, 250: 1363-1378.

[33] TONG T, WANG Y A, KANG S G, et al. Ectopic odorant receptor responding to flavor compounds: Versatile roles in health and disease [J]. Pharmaceutics, 2021, 13: 1314.

[34] 鞠佳楠.基于分子动力学模拟研究三唑并嘧啶类抑制剂对EED蛋白的抑制机理[D].长春:吉林大学,2024.

[35] TONG W H, LI Y Y, HUANG Z J, et al. Mechanism of molecular interaction between pyrazine flavor substances and Lysozyme: Based on spectroscopy and molecular docking studies [J]. Journal of Molecular Liquids, 2023, 389: 122876.