

养殖暗纹东方鲀肌肉中呈味肽的分离鉴定

刘源, 仇春泱, 王锡昌, 苗晓丹, 张晶晶, 熊振海

(上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 本文旨在从生鲜暗纹东方鲀肌肉中提取呈味肽从而对暗纹东方鲀肌肉中的呈味肽的结构特性进行相应研究。将生鲜养殖暗纹东方鲀肌肉水提取物经 Sephadex G15 凝胶柱分离, 得到 3 个多肽组分 (分别为 0-F1、0-F2 和 0-F3), 感官评价结合电子舌选择出具有最强烈的鲜味和 kokumi 感的组分 0-F1。采用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 对其进行进一步分离得到 2 个组分 0-F1-1 和 0-F1-2, 电子舌鉴定显示 0-F1-1 组分有较强的鲜味。最后利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 对 RP-HPLC 分离得到组分 0-F1-1 中呈味肽氨基酸序列进行测定, 鉴定得到一种新的呈味七肽结构: Pro-A-Ala-B-Met*-Cys-Arg (810.9046 Da, A 和 B 均为氨基酸代码, Met* 表示氧化型甲硫氨酸) 虽然肽段中含有大量的疏水性氨基酸, 但该肽不具有苦味, 而且有显著的浓厚感, 其中含有的 Cys 残基可能是其具有 kokumi 感的关键。

关键词: 呈味肽; 暗纹东方鲀; 电子舌; kokumi

文章编号: 1673-9078(2014)8-38-42

Isolation and Identification of Flavor Peptides in Cultured Puffer Fish (*Takifugu obscurus*)

LIU Yuan, QIU Chun-yang, WANG Xi-chang, MIAO Xiao-dan, ZHANG Jing-jing, XIONG Zheng-hai

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The aim of this study was to isolate and study the structural properties of flavor peptides from raw, cultured puffer fish muscle. Three fractions (0-F1, 0-F2, and 0-F3) were obtained from an aqueous extraction of cultured puffer fish (*Takifugu obscurus*) muscle by Sephadex G-15 gel filtration chromatography. Using sensory evaluation analysis and an electronic tongue, it was found that fraction 0-F1 could elicit umami and kokumi tastes. Further isolation of fraction 0-F1 components was performed using reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) to yield two subfractions 0-F1-1 and 0-F1-2. The electronic tongue showed that subfraction 0-F1-1 could elicit a relatively strong umami taste. The amino acid sequence of subfraction 0-F1-1 isolated by RP-HPLC was identified using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and the structure of this new flavor peptide was Pro-A-Ala-B-Met*-Cys-Arg (810.9046 Da, where A and B are amino acid codes; Met* is oxidative methionine). Although this peptide contained a large number of hydrophobic amino acids, it did not have a bitter taste, and rather a thick and strong taste. Hydrophilic amino acid residue Cys might be the key factor contributing to the kokumi taste of this peptide.

Key words: flavor peptides; puffer fish (*Takifugu obscurus*); electronic tongue; kokumi

滋味是构成食品品质的重要元素之一, 包括甜味、咸味、苦味、酸味和鲜味。呈味肽是指从食品中提取或者由氨基酸合成的, 能够改善或掩盖食品感官特性

收稿日期: 2014-03-13

基金项目: 国家自然科学基金 (31271900, 31371790); “十二五” 国家科技计划课题 (2012BAD28B01); 上海市科委工程中心建设 (11DZ2280300); 上海市教委重点学科建设项目 (J50704); 上海高校知识服务平台上海海洋大学水产动物遗传育种中心 (ZF1206)

作者介绍: 刘源 (1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为食品营养与品质评价

通讯作者: 王锡昌 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品营养与品质评价

的短肽。食品中的肽主要来自于蛋白质合成和分解的中间产物, 存在于肉类、蔬菜、腌制食品及乳制品等各类食品中, 对食品风味起到非常重要的作用^[1]。食品中的肽可以产生特征性滋味, 赋予食品特殊的风味, 肽可与食品中其他风味物质相互作用, 明显改变原有风味^[2]。

河豚鱼又名气泡鱼, 由于其味道鲜美, 肉质柔和细腻, 营养丰富, 深受消费者喜爱, 又由于其含有剧毒所以古人有拼死吃河豚的说法。随着养殖技术的提高, 河豚鱼经过几代淡水环境养育, 毒性一代比一代低, 一些品种的河豚如暗纹东方鲀等可供安全食用, 确定为可以定点 (食用) 经营的东方鲀属淡水物种,

有着良好地市场前景^[3]。邓捷春、刘源等^[4]对养殖暗纹东方鲀和红鳍东方鲀水溶性风味物质的检测结果显示游离氨基酸、无机离子、呈味核苷酸对其滋味贡献显著,然而其复配液体与河豚原液滋味相差明显。1978年 Yamasaki^[5]从木瓜蛋白酶处理的牛肉中分离了具有“鲜美味”的牛肉辛肽 Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala,首次表明肽可以让食品变得更美味。日本研究者将能够引起滋味浓厚感与持久感的物质统称为 kokumi (コクミ),这是继 umami (鲜味) 后又一个创新性的食品基本风味描述词汇,而小分子肽是具有 kokumi 感的主要物质之一。Zhang^[6]等人在热加工暗纹东方鲀鱼肉汤中鉴定了一种能引起鲜味和浓厚感的八肽,并在对暗纹东方鲀滋味的研究发现小分子肽是造成其味道鲜美,口感圆滑的关键之一。

本实验通过对生鲜暗纹东方鲀肌肉水提物通过膜过滤及凝胶过滤色谱 Sephadex G-15 进行分离纯化,感官评价结合电子舌筛选呈味特性强的组分,对此组分采用反向高效液相色谱 (RP-HPLC) 进一步分离纯化,最后用 MALDI-TOF/TOF MS/MS 对分离得到的主要呈味组分的氨基酸序列进行鉴定,从而对暗纹东方鲀肌肉中呈味肽的结构特性进行相应研究,对养殖暗纹东方鲀的烹饪饲养以及为食品风味研究及调味品的开发提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与样品的制备

HD-4 紫外检测仪、层析柱柱 (1.6×60 cm), 上海沪西仪器厂; 实验用膜分离装置 (RO-NF-UF-4050) 上海摩速科学器材有限公司; Waters2698 高效液相色谱仪 (配 2487 紫外检测器), 美国 waters 公司; Kromasil C18 column (100Å 250×10 mm, 5μm), 瑞典 EKA 公司; ABI4700 基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF/TOF MS/MS), 美国应用生物系统公司; FOX4000 电子舌法国, Alpha M O S 公司。

葡聚糖凝胶 Sephadex G-15 (法玛西亚化工股份有限公司); 乙腈 (上海国药试剂); 其他试剂为分析纯。

50 条 2 龄暗纹东方鲀 (平均体重 200±0.2 g) 购买与江苏中洋公司 (江苏省, 南通市), 经过中洋专门的河豚鱼厨师剖杀后冰鲜运送至实验室取肉, 称取暗纹东方鲀肌肉 200 g 用绞肉机绞碎后加 400 mL 超纯水匀浆 (10000 r, 3×10 s), 静止 1 h 后于 4 °C 下离心 20 min, 滤渣继续使用 400 mL 超纯水重新提取后离心, 合并 2 次上清液储存于 -80 °C 下备用。

1.2 呈味肽的分离纯化

1.2.1 呈味肽的超滤及凝胶柱色谱分离纯化

由于呈味肽为分子量小于 3000 Da 的短肽, 所以将暗纹东方鲀提取液分别过分子量截留 3 kDa 和 200 Da 的超滤膜最后收集分子量 200 Da 至 3 kDa 的滤液, 再将滤液进行 Sephadex G-15 凝胶过滤色谱进一步纯化。洗脱液为超纯水, 分离条件为: 玻璃层析柱 (1.6 cm×60 cm), 上样量 4 mL, 流速 0.75 mL/min, 检测波长 220 nm, 灵敏度 1.0。

1.2.2 呈味肽的 RP-HPLC 分离纯化

将凝胶层析分离筛选得到的呈味多肽组分别配成浓度为 10 mg/mL 的溶液, 进行 RP-HPLC 纯化, HPLC 条件: Kromasil C18 柱 (100Å 250×10 mm, 5 μm, EKA chemical, Sweden), 柱温 30 °C, 进样体积 20 μL, 流速 0.8 mL/min, 检测波长 210 nm, 洗脱 A 液: 超纯水, 洗脱 B 液: 纯乙腈溶液, 等度洗脱 90%A 和 10%B。将收集的组分用电子舌测定其滋味轮廓, 收集滋味特性强的组分, 冷冻干燥。

1.2.3 电子舌测定滋味轮廓

分别将层析组分的冻干样品用超纯水配成 0.5 mg/mL; RP-HPLC 纯化组分配成 0.1 mg/mL, 同时将 0.1 mg/mL 谷氨酸钠溶液 80 mL 作为鲜味的参比。在室温下进行测定, 每个样品数据采集时间为 120 s, 每 1 s 采集一个数据, 选取第 120 s 上的响应值作为原始数据信号进行处理。电子舌传感器每测一次清洗一次。每个样品平行重复测 7 次, 取后 3 次重复测定数据作为主成分分析 (PCA) 的原始数据进行分析。

1.2.4 感官评定

感官评定小组成员按 GB/T 16291.1-2012 进行培训。采用滋味稀释分析 (Taste dilution analysis, TDA) 法: 按照 Frank^[7] 等的方法略有改动, 分别取超滤和层析各冻干组分配成 1 mg/mL 溶液 100 mL, 按 1:1 的比例用超纯水进行逐步稀释, 取各组分逐步稀释的样品溶液每次 5 mL, 按照浓度降低的顺序呈送给经过感官培训的 8 个感官评定员, 每个稀释水平溶液采用 3 角测试法进行评定。当某个稀释水平的溶液与空白 (水) 之间的滋味差异刚好能被识别出来, 记录此时的稀释倍数, 即稀释值 (TD)。TD 值为各评定员感官结果的平均值, 评定结果之间的误差应低于或等于一个 1:1 稀释水平^[8]。另外, 感官评定时, 每个评定员须描述每次呈给样品的滋味特性。

1.2.5 MALDI-TOF/TOF MS/MS 鉴定呈味肽的结构

将 RP-HPLC 纯化所得滋味特性强的冻干粉组分解于 0.8 μL 4 mg/mL 的 α-氨基-4-羟基肉桂酸溶液（溶剂为 0.1% TFA-50%乙腈）中，然后过滤。点样品于 MALDI 不锈钢靶板上，室温下自然干燥。另点 0.8 μL 4 mg/mL 的 α-氨基-4-羟基肉桂酸溶液（未点样品）作空白对照。MALDI-TOF/TOF MS/MS 先用 Myoglobin 酶解肽段进行外标校正。基质和样品的 PMF 质量扫描范围为 200~2000 Da。根据 De Novo Explorer 软件给出的可选序列再结合人工分析确定肽段可能序列。

2 结果与讨论

2.1 Sephadex G-15 凝胶柱分离呈味肽

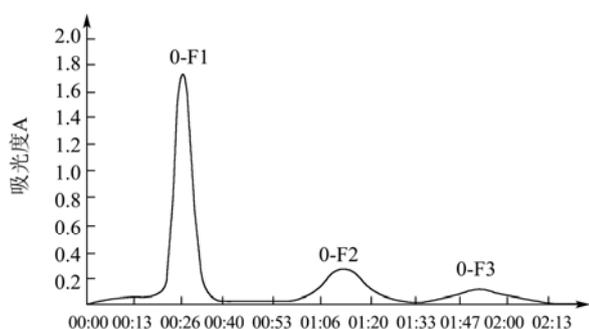


图1 暗纹东方鲀 200 Da~3 KDa 超滤组分凝胶层析色谱图

Fig.1 Sephadex G-15 gel filtration chromatogram of ultrafiltration fractions with molecular weight (MW) in 3000~200 Da obtained from *Takifugu Obscurus*

表1 暗纹东方鲀超滤滤液与凝胶分离组分感官评价结果

Table 1 Sensory evaluation of peptide fractions of *Takifugu Obscurus* separated by ultrafiltration and gel filtration chromatography

层析组分	TD 值	感官描述
0-F1	16	浓厚感、鲜味、甜味、直冲感、涩味
0-F2	2	柔和感、涩味、甜味
0-F3	2	涩味、咸味
滤液	32	鲜味、鱼腥味、浓厚感、直冲感、甜味

分子量在 200 Da~3 kDa 的滤液经凝胶分离后得到 3 个组分 0-F1、0-F2 和 0-F3（图 1），分别对其进行收集冷冻干燥后分别对其进行感官评价，其 TD 值分别为 16、2 和 2（表 1）。凝胶分离组分中，0-F1 组分的 TD 值最高，与滤液最为接近，而 0-F2 和 0-F3 的 TD 值较低，根据感官评价结果（表 1）0-F1 具有特征性鲜味和浓厚感，与滤液最为接近。

2.2 电子舌测定滋味轮廓

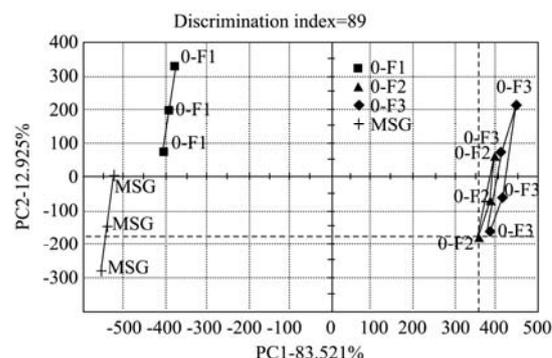


图2 凝胶过滤组分与谷氨酸钠（MSG）二维主成分分析图

Fig.2 Two principal components for peptide fractions separated by Sephadex G-15 gel filtration (0-F1, 0-F2, 0-F3) and

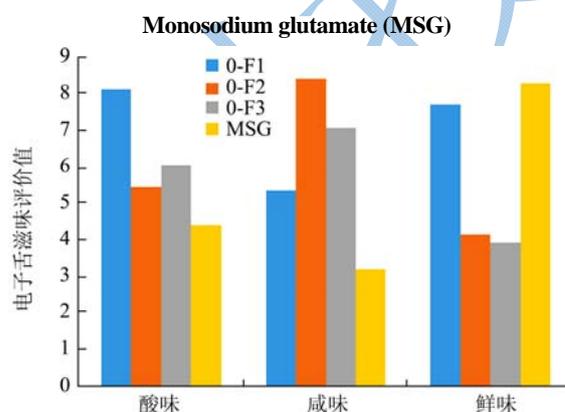


图3 多肽组分（0-F1、0-F2 和 0-F3）和谷氨酸钠（MSG）的滋味评价价值

Fig.3 Taste value of peptide fractions (0-F1, 0-F2 and 0-F3) and MSG

图 2 为电子舌对凝胶分离组分（0-F1、0-F2 和 0-F3）的 PCA 图，从图 2 中可以看到二维主成分的累积贡献率达到 96.446%，说明其数据足以代表原始数据的足够信息，判别因子为 89，表示电子舌完全可以区分 4 个组分。图中可以看到 0-F1 离谷氨酸钠较为接近，0-F2 与 0-F3 组分较为接近，两者离谷氨酸钠和 0-F1 较远，说明 0-F1 较为接近谷氨酸钠的呈味特性。进一步对电子舌数据进行分析的出其鲜味评价价值，可以看到谷氨酸钠的鲜味最高，而多肽组分中，0-F1 的鲜味值最高，接近于谷氨酸钠的鲜味值，而 0-F2 和 0-F3 的鲜味值较低，与感官评价结果吻合。同时 0-F1 的酸味值最高，略高于谷氨酸钠的酸味，而 0-F2 有最强烈的咸味，略高于谷氨酸钠的咸味值，咸味和酸味容易与鲜味物质产生协同作用，更加提升其鲜味的强度。基于此结果，选取 0-F1 组分进行 RP-HPLC 进行进一步纯化。

2.3 RP-HPLC 纯化呈味肽

如图 4 所示，0-F1 组分的保留时间在 20 min 内，

等度洗脱得到 2 个在 210 nm 处有显著吸收的组分，即 0-F1-1 和 0-F1-2，分别收集两个组分进行冷冻干燥，复配成同等浓度进行电子舌测定。图 5 为 0-F1 组分及其 RP-HPLC 分离组分的电子舌图，电子舌的前二维主成分的贡献值达到 97.774，说明二维主成分分析可以代表原始数据的整体信息。从组分和谷氨酸钠的相对距离可以看出 0-F1 离谷氨酸钠最为接近，而经过纯化的 0-F1-1 比 0-F1-2 更接近于谷氨酸钠，也离 0-F1 更为接近，所以使用 MALDI-TOF/TOF MS/MS 测定 0-F1-1 的氨基酸序列。

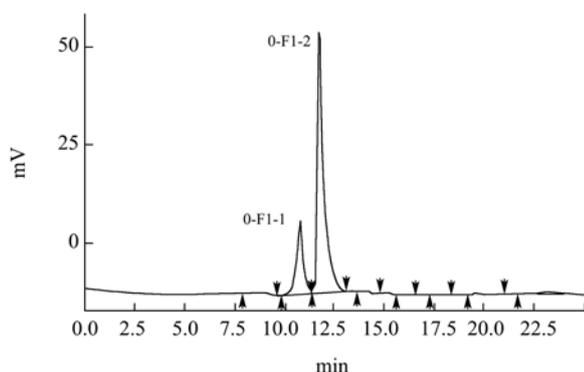


图 4 0-F1 组分 RP-HPLC 分析洗脱图

Fig.4 RP-HPLC elution profile of 0-F1

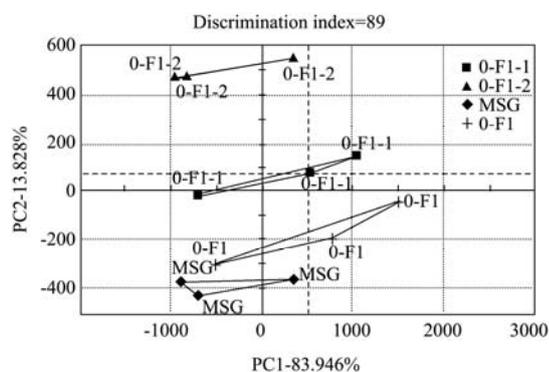


图 5 多肽组分 (0-F1-1 和 0-F1-2)、谷氨酸钠和 0-F1 组分电子舌二维主成分分析图

Fig.5 Two principal components for peptide fractions 0-F1-1, 0-F1-2, 0-F1 and MSG

2.4 养殖暗纹东方鲀呈味肽的结构鉴定

采用 MALDI-TOF/TOF MS/MS 测定 0-F1-1 组分的一级质谱，从图 6 中可以看到，组分中的主要物质是小于 1000 Da 的小肽，其主要母离子为 m/z 810.9046，而 m/z 848.8542 的离子峰为其加钾峰，两者为同一物质。所以选择主要母离子 m/z 810.9046 进入 MS-MS 继续分析，对得到的 MS-MS 碎片信息进行分析，获得他们的氨基酸序列为 Pro-A-Ala-B-Met*-Cys-Arg (810.9046 Da, Met*为氧化型甲硫氨酸)。

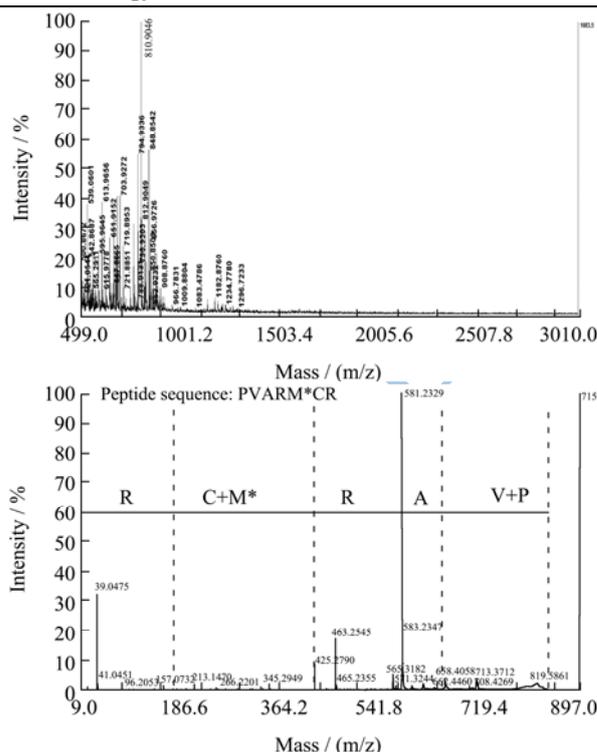


图 6 暗纹东方鲀提取物 0-F1-1 的 MALDI-TOF/TOF MS/MS 质谱图

Fig.6 Identification of the flavor peptides 0-F1-1 by MALDI-TOF/TOF MS/MS

通过超滤、纳滤、凝胶层析色谱和反相高效液相色谱分离纯化，利用感官评价和电子舌及 MALDI-TOF/TOF MS/MS 鉴定出了暗纹东方鲀肌肉中具有鲜味和浓厚感的七肽 Pro-A-Ala-B-Met*-Cys-Arg (810.9046 Da, Met*为氧化型甲硫氨酸)。Medina M^[9] 等人研究发现疏水氨基酸残基在肽链的 C-端时会产生苦味，然而此七肽中的疏水性氨基酸 Arg 处于肽段的 C 端，但此肽并没有苦味，其原因可能是 N 端的 Pro、Val 也是疏水性氨基酸，而非亲水性氨基酸。Ueda^[10] 在洋葱提取液中发现了具有 kokumi 特性的活性成分，推测其原因为 Cys 的肽段因氨基酸侧链基团上含有的巯基 (-SH)，在舌头上产生一种轻微的收敛感，从而显著增加味觉的浓厚感，此类肽没有味道或者有轻微的味道，但在一定浓度下，这类肽与适当浓度的其他呈味组分 (盐、味精、酸味剂等) 有协同或者增味的功效。此七肽中含有的 Cys 残基可能是其具有显著浓厚感的关键，同时 Cys 为亲水性氨基酸，可能与其具有略微的鲜味有关^[11]，而此肽与其他呈味组分的协同效应有待继续研究。Dunkel^[12-13] 等人对豆类和 Gouda 奶酪的研究表明， γ -谷酰基肽是使其具有 kokumi 感的关键，鉴定的肽都具有 Glu-Glu 或 Glu-Asp 片段，但是在本研究中，并没有发现 γ -谷酰基肽，可

能是肽段来源的不同所产生的。

3 结论

暗纹东方鲀在冷藏过程中呈味肽变化不明显,采用超滤、纳滤凝胶层析色谱和反相高效液相色谱分离纯化得到暗纹东方鲀肌肉中水提取物中具有呈味特性的组分 0-F1-1。采用 MALDI-TOF/TOF MS/MS 分析得出 0-F1-1 组分的氨基酸序列为 Pro-A-Ala-B-Met^{*}-Cys-Arg (810.9046 Da, Met^{*}为氧化型甲硫氨酸),具有浓厚感和鲜味,其中 Cys 可能是其具有特征性浓厚感的关键。

参考文献

- [1] 周雪松,赵谋明.肽的呈味功能研究[J].中国调味品,2005,6: 38-42
ZHOU Xue-song, ZHAO Mou-ming. Study on the seasoning effect of peptides [J]. China Condiment, 2005, 6: 38-42
- [2] Ueda Y, Sakaguchi M, Hirayama K. Characteristic flavor constituents in water extract of garlic [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1990, 54(1): 163-169
- [3] 张磊,邱从乾,陈俊.上海市鲜河豚鱼人群试食试验可行性研究[J].上海食品药品监管情报研究,2010,105(4):17-22
ZHANG Lei, QIU Cong-quan, CHEN Jun. Study on feasibility of eating raw puffer fish in shanghai [J]. Shanghai Food and Drug Information Research, 2010, 105(4): 17-22
- [4] 邓捷春,王锡昌,刘源.暗纹东方鲀与红鳍东方鲀滋味成分差异研究[J].食品工业科技,2010,227(3):106-108
DENG Jie-chun, WANG Xi-chang, LIU Yuan. Study on difference of taste compounds between fugu obscurus and fugu rubripes [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 227(3): 106-108
- [5] Yamasaki Y, Maekawa K. A peptide with delicious taste [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1978, 42(9): 1761-1765
- [6] ZHANG Mei-xiu, WANG Xi-chang, LIU Yuan. Isolation and identification of flavour peptides from puffer fish (takifugu obscurus) muscle using an electronic tongue and MALDI-TOF/TOF MS/MS [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1463-1470
- [7] Frank O, Jezussek M, Hofmann T. Sensory activity, chemical structure, and synthesis of maillard generated bitter-tasting 1-oxo-2, 3-dihydro-1H-indolizinium-6-olates [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(9): 2693-2699
- [8] 党亚丽,张中健,闫小伟.巴马火腿酶解物中呈味肽的分离纯化及其结构研究[J].食品科学,2010,32(13):127-131
DANG Ya-li, ZHANG Zhong-jian, YAN Xiao-wei. Isolation, purification and structural identification of flavor peptides from enzymolyzed parma ham [J]. Food Science, 2010, 32(13): 127-131
- [9] Medina M, Nunmez M. Relationship between level of hydrophobic peptides and bitterness in cheese made from pasteurized and raw milk [J]. Journal of Dairy Research, 1997, 64: 289-297
- [10] Ueda Y, Tsubuku T, Miyajima R. Composition of sulfur-containing components in onion and their flavor characters [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1994, 58(1): 108-110
- [11] Spanier AM, Edwards JV. Chromatographic isolation of presumptive peptide flavor principles from red meat [J]. Journal of Liquid Chromatography. 1987, 10(12): 2745-2758
- [12] Dunkel A, Koester J, Hofmann T. Molecular and sensory characterization of gamma-glutamyl peptides as key contributors to the kokumi taste of edible beans (phaseolus vulgaris) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(16): 6712-6719
- [13] Toelstede S, Dunkel A, Hofmann T. A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured gouda cheese [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(4): 1440-1448