

谷朊粉发酵液中鲜味肽的分离、鉴定与呈味分析

崔春, 钱杨鹏, 彭皖皖, 王海萍, 赵海峰

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 鲜味是五种基本味感之一, 它在人们选择食品中扮演了越来越重要的角色, 肽是氨基酸组成的混合物, 具有多种味道, 是主要的呈味物质, 利用蛋白酶解可以获得具有较强鲜味的肽段。本实验采用感官评价结合超滤(UF)、凝胶层析(GPC)和反相高效液相色谱(RP-HPLC)等技术从以盐酸脱酰胺面筋蛋白为原料的发酵液中分离纯化得到一种鲜味肽, 同时采用MALDI-TOF-MS串联质谱鉴定该鲜味肽的氨基酸序列及其分子质量; 目标定向固相合成鉴别出的鲜味肽, 并测定了其鲜味阈值及鲜味相乘效应。结果发现: 该鲜味肽的氨基酸序列为Asp-Cys-Gly(DCG), 分子质量为293.15 Da, 固相合成该鲜味肽后采用滋味稀释法评价发现该鲜味肽的鲜味阈值为100mg/mL, 是MSG阈值的1/3, 该鲜味肽对浓度为200mg/L的I+G溶液具有鲜味增强作用, 对MSG没有鲜味增强作用。

关键词: 小麦面筋蛋白; 呈味肽; 分离纯化; 结构鉴定

文章编号: 1673-9078(2015)9-175-179

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.029

Isolation, Purification, Identification, and Sensory Evaluation of Umami Peptide in Wheat Gluten Fermentation Broth

CUI Chun, QIAN Yang-peng, PENG Huan-huan, WANG Hai-ping, ZHAO Hai-feng

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Umami is one of five basic tastes, which has been playing an increasingly important role in the selection of food products. Peptides are primary tastants composed of amino acids with several tastes. Peptides with significant umami taste could be produced through proteolysis. An umami peptide was isolated and purified from wheat gluten fermentation broth by ultra-filtration (UF), gel filtration chromatography (GPC), reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), and sensory evaluation. The sequence and molecular weight of the umami peptide were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization- time-of-flight - mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The identified peptide was synthesized and taste dilution analysis (TDA) was conducted to evaluate taste characteristics of the peptide. The umami peptide was identified to be Asp-Cys-Gly (DCG) and the molecular weight was 293.15 Da. TDA results showed that the umami taste threshold of the peptide was 100 mg/mL, which was one third of MSG DCG can enhance the umami taste of I+G at a concentration of 200 mg/L, but no similar effect was found with MSG.

Key words: wheat gluten, umami peptide, isolation and purification, structural identification

小麦面筋蛋白, 又称谷朊粉, 是通过水洗生面团去除淀粉等水溶性成分后获得的主要由麦谷蛋白和麦醇溶蛋白组成的复杂粘性蛋白, 蛋白含量一般为80%左右^[3]。商品化谷朊粉是生产小麦淀粉的副产物, 具有蛋白质含量高、脂肪含量低、价格便宜等优点, 目前主要是作为蛋白质补充剂改良面粉的品质和面团增筋剂优化面包的烘焙品质^[4]。同时, 组成小麦面筋蛋白的氨基酸中含有高比例的谷氨酰胺和谷氨酸^[1], 一级结构中富含鲜味肽序列, 是生产高品质呈味基料的

的优质原料^[2]。

采用酶解/多菌种发酵处理脱酰胺后的小麦面筋蛋白可以制备出呈味效果好、鲜味强度高的呈味基料。脱酰胺处理可以显著提高面筋蛋白的溶解性^[5-13], 扩大其在食品领域内的应用范围, 酶解处理面筋蛋白可以制备多种呈味肽, 提高面筋蛋白附加值^[6], 发酵处理可利用微生物本身的复杂酶系对面筋蛋白进行改性, 可以赋予发酵物特殊的风味^[8]。瑞士联邦理工学院的Chlichtherle-Cerny等人^[7]利用风味蛋白酶对脱酰胺处理的面筋蛋白进行水解, 发现脱酰胺处理的面筋蛋白水解液具有强烈的鲜味, 并从中分离出4种鲜味肽: pGln-Pro-Ser, pGlu-Pro, pGlu-Pro-Glu, pGlu-Pro-Gln。然而小麦面筋蛋白发酵液中鲜味肽的分离、鉴定

收稿日期: 2014-11-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201416); 中央高校基本业务费项目(2014ZZ0053);

作者简介: 崔春(1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品生物技术

鲜见报道。笔者以脱酰胺小麦面筋蛋白为原料,通过发酵法制备出呈味效果好、蛋白质回收率高的呈味基料。本文以呈味强度为标的,利用超滤、凝胶层析、反相液相色谱、MALDI-TOF-MS 等方法从小麦面筋蛋白发酵液发酵液中分离、纯化、鉴定得到一种鲜味肽,并人工合成该鲜味肽,研究了其呈味阈值和呈味特性,为工业化生产谷朊粉源呈味基料提供了理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

小麦,市售;焙炒小麦,实验室自行小火炒制30分钟;小麦面筋蛋白,河南莲花味精集团;光明曲精(沪酿3.042米曲霉孢子粉,孢子发芽率 $\geq 80\%$,孢子数 $\geq 10^{10}/g$ 干基,水分 $\leq 10\%$),上海酿造一厂;乳酸菌CICC6064,中国工业微生物菌种保藏管理中心;Sephadex G-15 填料,广州西谱实验室设备有限公司;味精、异亮氨酸、蔗糖、柠檬酸和食盐,均为食品级。

1.1.2 仪器设备

精密电子天平JJ500型,常熟市双杰测试仪器厂;雷磁PHS-3E型pH计,上海雷磁仪器设备有限公司;高速冷冻离心机GL-21M型,长沙湘仪离心机仪器有限公司;LABCONCO冻干机,美国LABCONCO公司;SHA-C水浴恒温振荡器,江苏省金坛市农仪器厂;超滤系统Pellicon型,上海默克化工技术有限公司;高效液相色谱Waters600型,美国沃特斯(Waters)有限公司;SHIMADZU高效液相色谱仪,岛津分析技术研发(上海)有限公司,等。

1.2 实验方法

脱酰胺小麦面筋蛋白发酵工艺:

全小麦焙炒 \rightarrow 粉碎并过60目筛 \rightarrow 润水并接种乳酸菌(水:小麦=1.2:1(g:g)),接种量为 10^7 cfu/g乳酸菌 \rightarrow 造粒 \rightarrow 接种米曲霉(接种量为0.05%) \rightarrow 出曲^[9] \rightarrow 与脱酰胺度50%的小麦面筋蛋白和盐水混合(小麦面筋蛋白:大曲:盐水=1:1:5(g:g),18%盐水) \rightarrow 入发酵罐常温发酵1个月 \rightarrow 发酵液

发酵液中鲜味肽分离纯化的技术路线见图1。

1.3 测定方法

1.3.1 膜超滤法分离纯化

使用Pellicon膜超滤分离纯化发酵液,选取3KDa、5KDa和10KDa的膜进行超滤,得到4个组分,分别命名为WGFL-I(MW >10 KDa),WGFL-II(5~10

KDa),WGFL-III(3~5KDa)和WGFL-IV(MW <3 KDa),其成分如括号内所示,浓缩、冻干,保存待测。

1.3.2 凝胶层析法分离纯化

将冻干粉配成15mg/mL的溶液,取2mL上柱(1.6cm \times 70cm),填料为Sephadex G-15葡聚糖凝胶树脂,蒸馏水洗脱,流速1mL/min,每2mL分管收集。214nm波长检测,多次分离,合并每次分离时相同位置的组分峰,冻干保存待测。

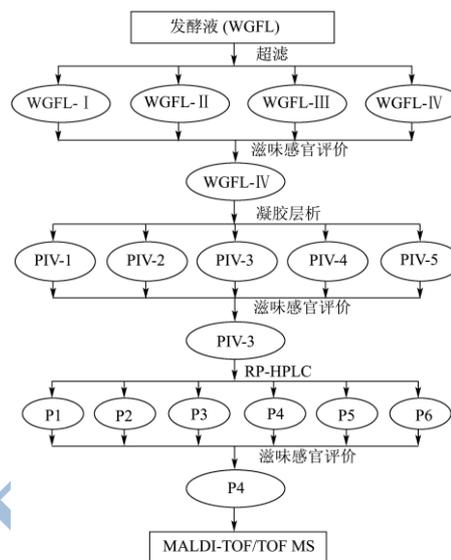


图1 发酵液鲜味肽的分离纯化流程图

Fig.1 Flow chart of the separation and purification of WGFL

1.3.3 反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 分离纯化

将冻干粉配成20mg/L的溶液,使用0.45 μ m滤膜过滤,用HPLC系统进行分离纯化过滤后的滤液。半制备柱Atlantis Prep T3 OBDTM (ID 19 \times 150mm, 5 μ m);上液量300 μ L;流动相A为乙腈,B为含有0.05%三氟乙酸(TFA)的水溶液;洗脱条件:流速5mL/min,梯度洗脱25min(A液10~35%,B液90~65%),214nm波长检测,收集不同组分,冻干保存待测。

1.3.4 MALDI-TOF-MS/MS 鉴定鲜味肽

使用含有0.05%TFA的蒸馏水溶解冻干粉,基质溶液为乙腈/去离子水/TFA,比例为1:1:0.1%,质谱仪为德国Bruker公司的Autoflex III型TOF-TOF Proteomics Analyzer;频率为220Hz,YAG激光器波长为337nm;加速电压为25kV;检测器电压为1kV;反射式阳离子方式检测。1:1混合1 μ L样品溶液与基质溶液,用加样枪点于192孔不锈钢MALDI靶板上。混合液干燥后进行MALDI-TOF-MS/MS分析。质谱仪的内标校正液为肌红蛋白的胰蛋白酶水解物。利用4700 ExplorerTM软件获取质谱数据并进行分析处理,用De novo Explorer软件从串联质谱数据从头测序法

(de novo peptide sequencing) 解析多肽的氨基酸序列。

1.3.5 感官评价分析

参照 cheung 等的方法略有改动^[14], 选取 5 男, 5 女共 10 名年龄在 25 至 35 岁的感官评分员在温度为 23±2 °C 的感官评价室进行感官评价分析。进行评价的标准品分别是甜味 (1%蔗糖), 苦味 (0.08%咖啡因), 酸味 (0.08%柠檬酸), 咸味 (0.7%食用盐), 鲜味 (0.35%味精)。使用 5 点线性坐标, 0 为极弱, 5 为极强。对面筋蛋白发酵液液进行分析, 结果采用雷达图味进行表示。

采用定量分析法对面筋蛋白发酵液分离组分进行感官评价。在膜超滤纯化实验中, 选取 1%面筋蛋白发酵液的各项指标为标准, 评分定为 10 分, 比较分离后的样品和标准品的鲜味特性并进行打分。在凝胶柱层析纯化实验中, 选取在膜超滤实验中鲜味效果最好的组分为标准, 评分定为 10 分, 比较层析后的样品和标准品的鲜味特性并进行打分。在反相色谱纯化实验中, 选取在柱层析实验中鲜味效果最好的组分为标准, 评分定为 10 分, 比较 RP-HPLC 分离后的各组分间的鲜味特性并进行打分。样品间的滋味特性差异使用方差分析法进行分析。

采用滋味稀释分析法^[10]对合成的鲜味肽进行感官评价。将合成的多肽粉溶于蒸馏水中, 配成浓度为 1% 的溶液, 逐步稀释, 获得浓度为 20 mg/L 至 300 mg/L 的以 20 mg/L 为梯度增加的一系列稀释液, 按浓度上升的顺序对样品的稀释液进行评定, 各稀释水平平均用 3 点测定进行评价。当某稀释液与空白 (纯净水) 的鲜味差异正好被识别出来时, 称此时的样品浓度为可识别的阈值。该结果为多次评定结果的平均值。

1.3.6 数据分析

将所有测试重复进行 3 次, 用 SPSS14.0 软件的统计分析软件对所有数据进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 发酵液的呈味特性

面筋蛋白发酵液冻干, 将冻干粉溶于蒸馏水中, 配制成浓度为 1% 的溶液进行滋味感官评价分析, 结果如图 2 所示, 发现得分最高的鲜味, 达到了 9.8, 之后分别咸味 (8.9), 酸味 (6.1), 甜味 (6.0), 苦味得分最低, 仅有 4.1。该结果说明小麦面筋蛋白发酵液具有较为突出的鲜味作用。故选取鲜味强度为指标分析发酵液的呈味特性, 并进行下一步的实验。

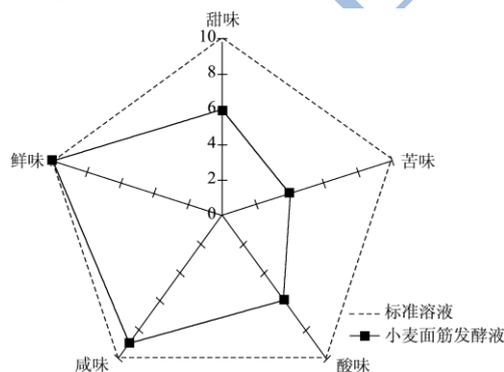


图 2 发酵液的呈味特性

Fig.2 Sensory characteristics of the fermentation liquor

2.2 鲜味肽的分离纯化

2.2.1 膜超滤法分离纯化发酵液鲜味肽

膜超滤是利用分子孔径对混合液料进行筛选分离的物理分离过程^[11], 常用于热敏性原料、蛋白质和活性肽等易变性的物质的分离纯化。发酵液经超滤后得到 4 种组分: WGFL-I($M_w > 10$ ku), WGFL-II(5~10 ku), WGFL-III(3~5 ku)和 WGFL-IV($M_w < 3$ ku)。各组分的基本呈味属性如表 1 所示, 由结果可知, 随分子量的减小, 鲜味, 咸味的呈味强度逐渐增强, 其中 WGFL-IV 的鲜味和咸味得分最高, 分别达到了 15.67 和 13.87, 同时该组分还具有最弱的苦味, 其他研究中发现的小于 3 ku 的组分具有更强烈鲜味^[12], 这和本试验的结果一致。故选取 WGFL-IV 组分进行进一步分离纯化。

表 1 发酵液超滤分离及各组分的呈味特性分析

Table 1 Basic taste effect of the hydrolysates and their fractions obtained by ultrafiltration

分子量分布/ku	WGFL	WGFL- I >10	WGFL- II 5-10	WGFL-III3-5	WGFL-IV <3
鲜味	10 ^a	5.83±0.76 ^b	9.03±0.45 ^c	12.53±0.45 ^d	15.67±0.51 ^e
咸味	10 ^{ab}	8.03±0.45 ^d	9.10±0.36 ^a	10.93±0.70 ^b	13.87±0.71 ^c
苦味	10 ^a	8.10±0.36 ^{bc}	8.67±0.35 ^b	10.53±0.45 ^a	7.50±0.55 ^c
酸味	10 ^a	7.33±0.49 ^b	11.17±0.76 ^c	9.17±0.35 ^a	8.10±0.36 ^b
甜味	10 ^a	11.47±0.45 ^c	8.80±0.36 ^b	6.87±0.71 ^d	8.13±0.35 ^b

注: 所有数据均表示为平均值±标准偏差, 每列数据上的不同字母表示具有显著性差异(p < 0.05)。

2.2.2 凝胶层析法分离纯化发酵液鲜味肽

凝胶层析是将物质依据其相对分子质量, 利用分

子筛原理进行分离的一种方法。它常作为活性肽的初步分离技术，现已广泛应用于鲜味肽的分离纯化。本次研究选用的 Sephadex G15 交联葡聚糖作为凝胶层析填料，常用于分离小分子量的多肽。如图 3 所示，超滤后的组分 WGFL-IV 经柱分离后被分成 5 个组分，记为：PIV-1、PIV-2、PIV-3、PIV-4、PIV-5。将各组分肽含量浓度调为 1 mg/mL 进行鲜味特性的感官评价，得到结果如图 4 所示，发现 PIV-3 具有最高的鲜味强度，因此选取 PIV-3 进行下一步的分离纯化。

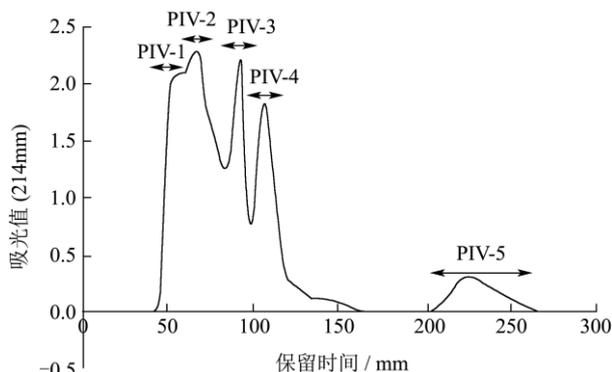


图3 凝胶层析 (Sephadex G-15) 分离纯化组分 WGFL-IV
Fig.3 Separation of fraction WGFL-IV by gel permeation chromatogram (Sephadex G-15)

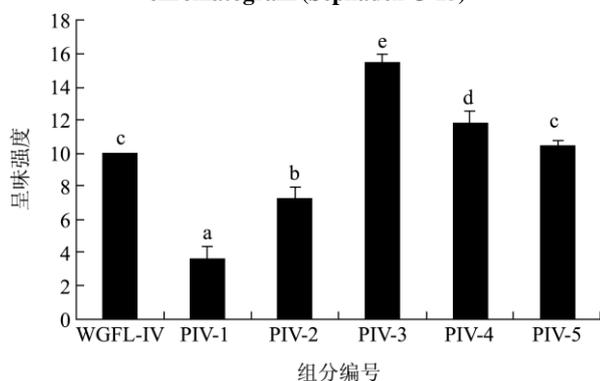


图4 组分 WGFL-IV 及其 Sephadex G-15 凝胶层析分离纯化组分的鲜味
Fig.4 Umami taste effect of WGFL-IV and its fractions obtained by Sephadex G-15 chromatography

2.2.3 RP-HPLC 分离纯化发酵液鲜味肽

RP-HPLC 因其操作简便，柱效高，重复性好等优点在分离，制备肽和控制产品品质方面得以广泛应用。凝胶层析后的组分 PIV-3 经 RP-HPLC 分离后得到 6 个组分，如图 5 所示，分别为 P1、P2、P3、P4、P5 和 P6。将各组分调为肽含量浓度为 1mg/mL 后进行鲜味感官评价分析，结果如图 6 所示，发现鲜味得分最高的组分为 P3，故选取 P3 使用基质辅助激光解吸/电离飞行时间进行分析鉴定。

2.3 鲜味肽的分子量及鲜味肽的序列鉴定

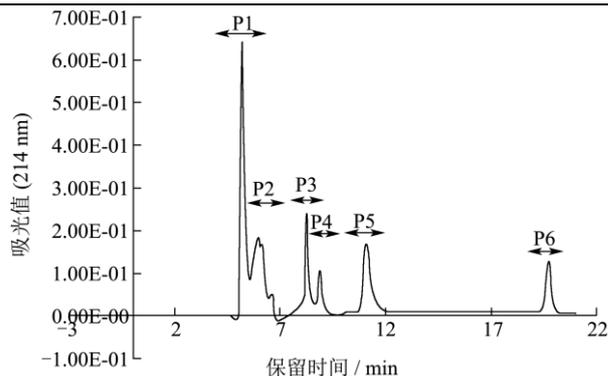


图5 RP-HPLC (XBridge™ BEH130 pre C18) 分离纯化组分 PIV-3
Fig.5 Separation of fraction PIV-3 by RP-HPLC (XBridge™ BEH130 pre C18)

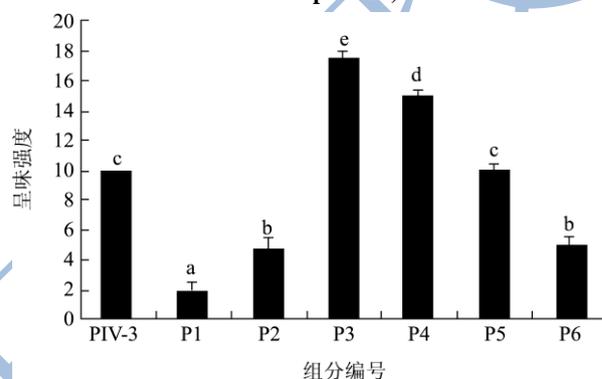


图6 组分 PIV-3 及其 RP-HPLC 分离纯化组分的鲜味及鲜味增强特性
Fig.6 Umami taste effect of PIV-3 and its fractions obtained by RP-HPLC

基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 因其灵敏，用量少，分子精确度高等优点常用于多肽类物质的分子量测定，MALDI-TOF MS 质谱仪可用于测定肽段的氨基酸序列。结果如图 7 所示，利用 MALDI-TOF 仪器自带软件鉴别出组分 P3 为 293.15 Da 的短肽，经手动质谱解析软件和氨基酸组成分析鉴定出 P3 的氨基酸序列为 Asp-Cys-Gly (DCG)。

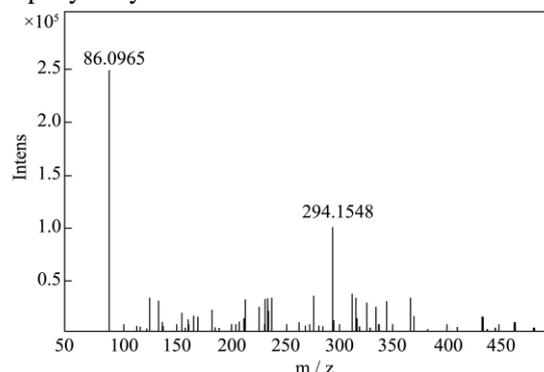


图7 组分 P3 的 MALDI-TOF-MS 一级结构质谱
Fig.7 MS spectrum of fraction P3 obtained from RP-HPLC 使用 PepPepSearch (<http://www.cbrg.ethz.ch/>)

services/PepPepSearch)生物活性肽数据库对鉴定出来的肽结构进行搜索,未见该肽呈味特性的报道,故认定此肽为一种新的鲜味肽。该肽和谷胱甘肽在结构上只有1个肽的差异,即天冬氨酸替换开头第1个的谷氨酸。食品工业上,主要利用谷胱甘肽抗氧化的性质,延长肉制品等食品的保鲜期,改善食品的品质和风味。同时在与其它混合物共存时,能起到强的增味效果,DCG与谷胱甘肽在结构上相似,这种结构的相似与呈味效果的联系还需要进一步的研究。

2.4 化学合成肽的呈味特性

委托上海吉尔生化有限公司进行DCG的固相化学合成,得到DCG的纯度达到95%以上,满足实验要求。

滋味稀释分析(TDA, Taste Dilution Analysis)检测食物中存在的滋味活性物质的感知阈值,是分析食品中非挥发性滋味活性物质的有效方法。利用TDA法检测合成DCG的鲜味阈值及其呈味特性,结果如表2所示。

表2 合成多肽的阈值及增鲜效果

Table 2 Umami and umami-enhancing threshold value of peptides obtained from chemical synthesis

样品	在水中的滋味阈值	
	鲜味/(mg/L)	增鲜/(mg/L)
MSG	300	/
合成 DCG	100	无/MSG 200/I+G

由表2可知,合成DCG在低浓度时即有明显鲜味,其阈值低达100 mg/L,是味精的1/3左右,但其对味精没有显著的鲜味增强作用。该肽在200 mg/L的浓度下对200 mg/L的I+G溶液有显著的增鲜效果。

3 结论

采用超滤、凝胶层析、RP-HPLC和MALDI-TOF-MS从小麦面筋蛋白发酵液中分离、纯化、鉴定出一种鲜味肽,并评价了其呈味特性,结论如下:

3.1 利用超滤、凝胶层析、RP-HPLC结合MALDI-TOF-MS技术从脱酰胺小麦面筋蛋白发酵液中鉴定出一种鲜味肽,其氨基酸序列为Asp-Cys-Gly(DCG),分子量为293.15 Da。

3.2 该鲜味肽的鲜味阈值为100 mg/L,仅为MSG阈值的1/3,对浓度为200 mg/L的I+G溶液有明显的鲜味增强作用,但对MSG溶液无明显鲜味增强作用。

3.3 由于呈味肽能增强食品风味,且易于吸收,正受到越来越多的关注,但国内关于呈味肽的研究主要还

是处于发掘阶段。现在已有多种利用肉制品,水产品制备呈味肽的报道,鲜有使用植物蛋白为原料,同时目前主要利用化学法或者酶解法制备短肽,但酶的专一性会导致形成的多肽风味单一。发酵法则能利用微生物自身的酶系获得多种风味的短肽,为开发新型呈味肽提供了一条思路。

参考文献

- [1] Yessie W S, Arno C A, Rene F, et al. Glutamic acid production from wheat by-products using enzymatic and acid hydrolysis [J]. Biomass and Bioenergy, 2014, 67: 451-459
- [2] Drake S L, Carunchia M E, Drake M A, et al. Sources of umami taste in Cheddar and Swiss cheeses [J]. Journal of Food Science, 2007.72(6): S360-S366
- [3] Chaoying Qiu, Weizheng Sun, Qiangzhong Zhao, et al. Emulsifying and surface properties of citric acid deamidated wheat gliadin [J]. Journal of Cereal science, 2013, 58: 68-75
- [4] 王叔全.谷朊粉应用概述[J].粮油食品科技,2000,8(2):5-7
- [5] WANG Shu-quan. Application of Wheat gluten [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods., 2000, 8(2): 5-7
- [6] Chaoying Qiu, Weizheng Sun, Chun Cui, et al. Effect of citric acid deamidation on *in vitro* digestibility and antioxidant properties of wheat gluten [J]. Food Chemistry, 2013, 141: 2772-2778
- [7] Kirimural J, Shimizu A, Kimizuka A, et al. The contribution of peptides and amino acids to the taste of food stuffs [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1969, 17(4): 689-695
- [8] Schlichtherle-Cerny, H. and R. Amadà. 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
- [9] Luh B S. Industrial production of soy sauce [J]. Journal of industrial Microbiology, 1995. 14(6): 467-471
- [10] 黄婵媛,崔春,赵谋明.米曲霉全小麦制曲条件的优化[J].食品与发酵工业,2010,36(4):88-91
- [11] HUANG Chan-yuan, CUI Chun, ZHAO Mou-ming. Study of Optimization of Whole Wheat Koji-making Conditions of *Aspergillus oryzae* [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(4): 88-91
- [12] Baek H H, H J Kim. Solid phase microextraction-gas chromatography-olfactometry of soy sauce based on sample dilution analysis [J]. Food Science and Biotechnology, 2004: 13
- [13] Dushkova M, K Dinkov. Composition and process

- characteristics during ultrafiltration of whey from kashkaval [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2009, 33(1): 1-10
- [12] Smith D D. Modifications to the N-terminus but not the C-terminus of calcitonin gene-related peptide (8-37) produce antagonists with increased affinity [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2003, 46(12): 2427-2435
- [13] 胡庆玲,尹文颖,赵谋明,等.小麦面筋蛋白盐酸脱酰胺工艺优化及其酶解敏感性[J].食品发酵与工业,2013,39(4): 7-11
HU Qing-ling, YI Wen-ying, ZHAO Mou-ming, et al. The Optimization of HCl-deamidation to Wheat Gluten and Research on its Susceptibility to Enzymatic Hydrolysis [J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(4): 7-11
- [14] Imelda W Y, Cheung, Eunice C Y Li-Chan. Application of taste sensing system for characterisation of enzymatic hydrolysates from shrimp processing by-products [J]. Food Chemistry, 2014, 145: 1076-1085