

酱油中鲜味二肽的分离鉴定及其呈味特性研究

苏国万^{1,2}, 赵炫¹, 张佳男¹, 赵谋明^{1,2}, 吴进卫², 吴军²

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 广东天企生物科技有限公司, 广东佛山 528225)

摘要: 为了明确酱油中鲜味肽的结构序列, 本文对酱油中鲜味肽进行分离鉴定, 并系统地研究了其呈味特性。酱油经超滤膜(膜通量: 5 ku、3 ku 和 1 ku)分离获得 4 个组分(F1, F2, F3 和 F4), 通过感官评定筛选出鲜味最强的组分 F4 (<1 ku)。该组分通过 Sephadex G-15 凝胶层析色谱继续分离得到 8 个组分(P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7 和 P8), 经感官评定筛选出鲜味最强的组分 P2。采用超高压液相色谱串联质谱技术对 P2 组分进行多肽结构鉴定, 通过手动 De novo 测序得到 4 条新的鲜味肽, 其序列分别是 Asn-Pro (230.1135 u)、Ala-His (227.1026 u)、Gly-Pro (173.0929 u) 和 Gly-Leu (189.1230 u)。然后采用固相合成技术合成四条肽并通过感官评定和电子舌分析, 结果表明四条肽均具有明显的鲜味或鲜味增强作用。进一步研究发现, 酱油的鲜味不仅来自于谷氨酸和天冬氨酸等鲜味氨基酸, 小分子肽类也是构成酱油鲜味的重要成分之一。

关键词: 酱油; 鲜味肽; 分离; 鉴定; 呈味特性

文章编号: 1673-9078(2019)05-7-15

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.5.002

Isolation, Identification and Taste Characteristics of Umami Dipeptides from Soy Sauce

SU Guo-wan^{1,2}, ZHAO Xuan¹, ZHANG Jia-nan¹, ZHAO Mou-ming^{1,2}, WU Jin-wei², WU Jun²

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangdong Tianqi Biological Technology Co. Ltd., Foshan 528225, China)

Abstract: In order to determine the structural sequence of the umami peptides in soy sauce, umami peptides were isolated and identified for systematic study on their taste characteristics. Four fractions (F1, F2, F3 and F4) were obtained through membrane ultrafiltration (membrane flux: 5 ku, 3 ku and 1 ku), with F4 (< 1 ku) having the strongest umami taste based on sensory evaluation. F4 was then selected for further separation by Sephadex G-15 gel chromatography to generate eight sub-fractions (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 and P8). Among which, P2 exhibited the strongest umami taste in sensory analysis. P2 was analyzed by ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Four new umami peptides were identified through *De novo* sequencing. They were all dipeptides with sequences as Asn-Pro (230.1135 u), Ala-His (227.1026 u), Gly-Pro (173.0929 u) and Gly-Leu (189.1230 u), respectively. Then, four peptides were synthesized by solid-phase peptide synthesis and analyzed by sensory evaluation and electronic tongue analysis. The obtained results showed that all the four synthesized peptides had distinct umami taste or umami-enhancing effect. Further studies showed that the umami taste of soy sauce was not only derived from umami amino acids such as glutamic acid and aspartic acid, but also from certain small peptides (which were important contributors to the umami taste of soy sauce).

Key words: soy sauce; umami peptides; isolation; identification; taste characteristics

酱油是一种历史悠久的发酵调味品, 作为亚洲饮食文化的象征之一而备受人民的喜爱。酱油主要以大豆、豆粕等植物蛋白原料, 辅以小麦或麸皮等淀粉类物质, 在微生物的共同作用下经过长时间的发酵酿制

收稿日期: 2018-08-27

基金项目: “广东特支计划” 科技青年拔尖人才项目 (2016TQ03N728)

作者简介: 苏国万 (1981-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品生物技术、风味化学

通讯作者: 赵谋明 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术、蛋白质化学与工程、海洋资源综合利用

而成。这一过程形成的特殊香气、色泽、体态和滋味使得酱油在食品加工、烹调或佐餐中都有不可替代的作用^[1]。

鲜味肽是一类能够弥补或强化食品原有风味的肽, 它可以改善食品品质, 提高味觉感知度, 增进消费者的食欲^[2]。鲜味肽一般是通过动植物蛋白酶解或发酵得到, 其中部分固相合成的肽类也具有鲜味。在鲜味肽研究中, 科研工作者对牛肉美味肽的研究较为广泛, 牛肉美味肽最早是由 Yamasaki^[3]等采用凝胶过滤和离子交换色谱从牛肉木瓜蛋白水解液中分离纯化

得到的一个八肽,经鉴定其一级结构是 Lys-Gly-Asp-Glu-Ser-Leu-Leu-Ala,经感官评价结果表明该肽具有良好的滋味。随后,研究者们对鲜味肽进行了大量的研究,如 Yu^[4]等通过对蚕蛹(*Bombyxmori* L.)蛋白酶解物分离纯化鉴定出四条具有鲜味及鲜味增强作用的肽,分别为 VPY、TAY、AAPY 和 GFP;我们在前期研究通过对花生粕(*Arachis hypogaea* Linn.)酶解产物进行分离纯化鉴定出两条具有鲜味和鲜味增强作用的肽,分别是 EGSEAPDGSSR 和 SSRDEQSR^[5];刘源^[6]等用热加工提取暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)肌肉中的呈味肽,并通过分离纯化鉴定出两条具有鲜味的肽,分别是 CALTP 和 RPLGNC。

酱油味感丰富,包括鲜、酸、甜、咸、苦等,其中以鲜味最为突出。不同酱油由于原料种类、原料处理方式、配方、生产制造工艺及生产过程中微生物的作用不同而在风味上有所差异^[7]。通过对酱油研究及理化分析手段检测表明,酱油中含有数百种化学物质,其中酱油原油中的鲜味主要来源于植物蛋白在发酵酶解过程中分解产生的游离氨基酸(如谷氨酸等)。酱油中鲜味物质还包括各类核苷酸,如肌苷酸、鸟苷酸、三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、腺苷酸、次黄嘌呤、次黄嘌呤核苷等^[8]。除此之外,研究表明酱油在发酵过程中生成的短肽及其衍生物也具有鲜味和增鲜特性^[9],这些物质通常含量较低,但对其他常见的鲜味物质(如味精以及核苷酸)有显著的协同增效作用,同时还能赋予酱油独特的滋味饱满感和持久感,如 Zhuang^[10]等在酱油中分离鉴定出 5 条具有鲜味和增鲜作用的肽,分别是 EQQQQ、AQALQAQA、ALPEEV、LPEEV 和 EAGIQ;Frerot^[11]等在酱油中鉴定出的 pED、pEE、pEP、pEI、pEL、pEF, Kaneko^[12]等在酱油中鉴定出的 pEG、pEQ 均具有鲜味。

为了探究实验所用酱油中关键鲜味肽的呈味特性,本试验首先利用膜分离技术和凝胶色谱分离技术对酱油中鲜味肽进行分离,随后结合感官评定和氨基酸组成分析选定鲜味较佳的组分,通过超高压液相色谱串联质谱技术(UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS)对鲜味肽进行鉴定。最后,采用多肽固相合成技术合成已知序列结构呈味肽,通过感官评定以及电子舌技术对固相合成的呈味肽进行呈味特性研究。研究结果表明四条二肽均不含鲜味氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸),却均具有明显的鲜味或鲜味增强作用,说明小分子肽类也是构成酱油鲜味的重要成分之一,庄明珠^[13]研究结果也表明具有一个或者两个鲜味氨基酸的肽不一定就具有鲜味,鲜味肽也不一定具有一个或者两个鲜味氨基酸。

1 材料与方法

1.1 原料

酱油由实验室制备^[14],具体制备方法:大豆→清洗除杂→浸泡 8 h→蒸煮 20 min→加 0.05%米曲霉曲精和面粉或麸皮→霉菌培养箱中制曲→培养 44 h 得到成曲→加 20%盐水→入发酵罐发酵→发酵 90 d 得到酱油

柠檬酸、蔗糖、咖啡因、味精、食盐由广东天企生物科技有限公司提供;Sephadex G-15 填料购于广州西谱实验室设备有限公司;乙腈和甲醇为色谱级;其他试剂均有分析纯。

1.2 主要仪器设备

电子天平(AL204 型),瑞士梅特勒-托利多集团;冷冻干燥机(SCIENTZ-12N 型),宁波新芝生物科技股份有限公司;凯式定氮仪(KDH-2C 型),上海纤检仪器有限公司;消化炉(KDN-40 型),上海新嘉电子有限公司;旋转蒸发器(RE-52A 型),上海亚荣生化仪器厂;超滤机(ZJMP10-002 型),美国 Millipore 公司;全自动氨基酸分析仪(A300 型),德国 Membra Pure 公司;高效液相色谱仪(Waters600 型),美国 Waters 公司;超高效液相色谱仪(1290 型),美国 Agilent 公司;超高分辨飞行时间质谱仪(maXis impact 型),德国 Bruker 公司;电子舌(TS-5000Z 型),日本 Insent 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 蛋白含量、盐含量及 I+G 含量的测定

蛋白含量的测定采用国家标准 GB 5009.5-2016^[15];盐含量的测定采用国家标准 GB 5009.42-2016^[16];I+G 含量的测定采用 HPLC 法^[17]。

1.3.2 水解氨基酸及游离氨基酸的测定

水解氨基酸及游离氨基酸采用氨基酸分析仪进行测定,前处理过程及试验方法参照庄明珠^[13]和郑淋^[18]的方法。

1.3.3 酱油中鲜味肽的超滤

采用 Millipore 超滤系统及截留分子量为 5 ku、3 ku、1 ku 的超滤膜进行分离。酱油在超滤前先通过旋转蒸发器浓缩,通过水分的蒸发减少使得酱油中大部分的盐分结晶析出,然后加超纯水将浓缩后的酱油稀释至固形物含量为 1%,稀释后的酱油首先通过 5 ku 的膜,随后透过液再逐步通过 3 ku 和 1 ku 的膜,分离条件为:上样量 5 L,温度 4~8 °C,压力 0.5 MPa。分级后得到 4 个组分:>5 ku 组分、3~5 ku 组分、1~3 ku

组分和<1 ku 组分, 分别命名为 F1、F2、F3 和 F4, 将其浓缩冷冻干燥成粉末, 储存于-20 ℃ 备用。

1.3.4 酱油中鲜味肽的凝胶过滤层析

将经超滤膜分离鲜味最好的组分用凝胶层析分离, 经 0.45 μm 水相滤膜过滤后, 采用 Sephadex G-15 凝胶层析色谱分离纯化。分离条件为: 层析柱 (1.6 cm×70 cm), 洗脱液为超纯水, 上样量 1 mL, 流速 1 mL/min, 检测波长 220 nm, 分别收集各凝胶层析组分峰 (P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7 和 P8), 将其浓缩冷冻干燥成粉末, 储存于-20 ℃ 备用。

1.3.5 酱油中鲜味肽的结构鉴定

参照修改的 Zhao^[19]等方法, 将经凝胶层析分离得到鲜味最好的组分 P2 进行 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 鉴定, 进样浓度为蛋白含量 2 mg/mL。色谱柱: Acquity UPLC HSS T3 柱(2.1×100 mm, 1.8 μm), 以 0.1%(V/V) 甲酸-水溶液作为流动相 A 和乙腈溶液作为流动相 B 进行洗脱, 流动相 B 在流动相 A 中以 0.2 mL/min 的流速平衡。洗脱梯度为: 0~2 min, 10% B; 2~10 min, 10%~50% B; 10~13 min, 50%~10% B; 13~15 min, 10% B。柱温为 30 ℃, 进样体积为 5 μL, 洗脱流速为 0.2 mL/min, 检测波长为 220 nm。采用电喷雾离子源 (ESI) 在正离子模式下扫描, 雾化气压力为 1.5 Bar, 干燥气温度为 180 ℃, 干燥气流速为 8.0 L/min, 质荷比 (m/z) 扫描范围为 50~2000 u, 并根据一级质谱信号强度自动选取前 6 个母离子进行碰撞诱导裂解 (CID) 获得二级质谱的数据。采用 Data Analysis 4.1 软件, 进行手动 De novo 测序, 最终得到的多肽序列应满足测定的质量数跟理论计算的质量数误差为 ±0.002 u。

1.3.6 酱油中鲜味肽的合成

采用多肽固相合成法^[20]对鉴定得到已知序列结构的呈味肽进行合成, 并进行脱盐处理, 使其纯度大于 95%, 委托上海吉尔生化有限公司合成。

1.3.7 感官评定

感官评定分析在温度为 23±2 ℃ 的感官评价室进行, 10 名专业的感官评价人员 (5 男 5 女, 年龄 25~35 岁之间)。酸、甜、苦、鲜、咸的标准品为别为 0.08% 柠檬酸、1% 蔗糖、0.08% 咖啡因、0.35% 味精、0.35% 食盐以这 5 种溶液分别作为酸、甜、苦、鲜、咸味的评价标准品, 采用 10 点线性坐标, 以标准品为 5 分, 将某一滋味极弱计作 0, 某一滋味极强计作 10。配置超滤各组分、凝胶层析各组分、合成肽的蛋白浓度为 5 mg/mL, 并控制盐含量及 I+G 含量在同一浓度。评价员对每个样品 (约 1 mL) 进行感官品尝, 评价完一个样品后, 评价员需要使用纯净水漱口再进行下一个

样品的品尝。对酸、甜、苦、鲜、咸味进行感官评价, 分析结果采用雷达图进行标识^[20]。

1.3.8 电子舌测定

参照李露芳^[21]等方法, 利用电子舌对合成肽进行味觉评价, 将不同合成肽加超纯水统一稀释至蛋白浓度为 1 mg/mL, 置于电子舌专用烧杯中, 于室温条件下进行数据采集。评价指标包括酸、甜、苦、鲜、咸味, 其标准品分别是 0.03 mg/mL 的柠檬酸、300 mg/mL 的蔗糖、0.03 mg/mL 的咖啡因、1 mg/mL 的味精和 1 mg/mL 的食盐。设置采集条件为: 每个样本进行 4 次采集, 每次采集时间为 120 s, 每次采集结束后以味觉标准溶液进行两步清洗, 待测样品和清洗液按照交替的序列进行分析检测。

1.3.9 数据分析

所有测试均重复三次, 单因素方差分析采用 SPSS 14.0 软件的 one-way ANOVA (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 统计分析软件进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 鲜味肽的分离

2.1.1 膜超滤法分离酱油鲜味肽

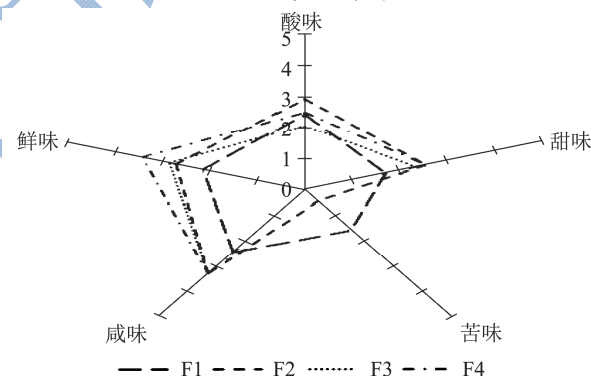


图 1 不同酱油超滤得到的组分的感官雷达图

Fig.1 Taste characteristics of different soy sauce fractions separated by ultrafiltration

膜超滤法是利用不同孔径的人工膜对混合液料按照分子大小进行筛选的分离方法^[22]。由于其高通量的分离效率及温和的分离条件, 因此广泛地用于蛋白质、肽类物质以及热敏性原料的分离纯化。稀释后的酱油依次通过 5 ku、3 ku 和 1 ku 的超滤膜后, 分别得到 4 个组分 (F1、F2、F3 和 F4), 由于酱油中原本含有较高含量的盐分和核苷酸 (I+G), 它们对分离组分的鲜味感官评分影响较大, 故在统一各组分蛋白含量 (5 mg/mL) 的基础上, 统一其盐含量及 I+G 含量 (以盐含量、I+G 含量最高的组分为指标) 后进行感官评定, 结果如图 1 所示。从图 1 中可以看出, 各肽段均具有

多种味感,其中 F4 组分的鲜味最强,其次分别是 F3 组分、F2 组分和 F1 组分,该结果与 Rhyu^[23]等研究结果相似,发现大豆提取液中的小分子肽(分子量为 500~1000 u)具有最强的鲜味特性。相对于其他三个组分, F1 组分的苦味最为突出,这可能是因为酱油中含有较大分子美拉德反应产物,许多通过反应聚合而成的美拉德反应产物通常具有突出的焦苦味,康乐^[24]等通过研究发现分子量>3 ku 的糖肽交联产物对苦味具有一定贡献。因此选定 F4 组分进行下一步的 Sephadex G-15 凝胶分离。

2.1.2 凝胶层析法分离酱油鲜味肽

与膜分离法类似,凝胶层析法主基于分子筛原理。凝胶层析色谱的介质是一些表面亲水性的多孔微球,在分离过程中由于小分子物质要连续不断地穿入介质的内部,这样的小分子物质不但其运动路程长,而且受到来自介质内部的阻力也很大,所以分子量越小的物质把它们从凝胶柱洗脱下来的时间也越长;而大分子物质可直接从介质之间的缝隙首先被洗脱下来,从而达到分离的效果^[25]。除此之外,介质表面还有微量羧基或其他基团,从而对分离物有轻微的交互保留作用。如图 2 所示, F4 组分溶液(蛋白含量为 100 mg/mL)经凝胶层析分离后获得 8 个不同组分(P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7 和 P8)。在感官预实验中,由于 P5~P8 组分鲜味较低,且样品即使在 0.1 mg/mL 浓度下其苦味依旧十分突出,因此在最终感官实验中不予考虑。在统一 P1~P4 组分蛋白含量(5 mg/mL),盐含量及 I+G 含量(以盐含量、I+G 含量最高的组分为指标)的条件下进行感官评定,感官评定结果如图 3 所示。其中 P2 组分鲜味评分最高, P1 组分其次,而 P3 和 P4 组分鲜味强度无显著性差异。除此之外,各组分还兼具其他基本滋味,如 P1、P2 组分咸味明显,酸味和甜味较弱且没有苦味;但 P3 和 P4 组分则五种基本滋味较均衡,其中咸味稍强。从四个组分的水解氨基酸和游离氨基酸结果(表 1)可知,氨基酸组成对各组分的呈味特性有重要影响, P1 和 P2 组分中均含有较高比例的鲜味氨基酸和亲水性氨基酸,这可能是它们具有较好鲜味的主要原因。值得注意的是, P1 组分的游

离谷氨酸和天冬氨酸含量均显著高于 P2 组分 ($p < 0.05$),但 P1 组分的鲜味强度却弱于 P2 组分,这说明各组分的鲜味强度并不完全取决于游离鲜味氨基酸含量,由表 1 可知 P2 组分中大量鲜味氨基酸和亲水性氨基酸以非游离形态(肽的形式)存在于样品当中,这说明各组分中的短肽同样对鲜味具有重要作用:它们本身具鲜味或与其他鲜味物质产生协同增效作用。张佳男^[26]在研究花生粕酶解物不同浓度乙醇分离组分时也发现类似结果,其中用 40%浓度乙醇处理后的花生粕酶解液中游离鲜味氨基酸含量较高,但整体滋味却比较平淡。相比于 P1 和 P2 组分, P3 和 P4 组分苦味突出,这可能与具有较高含量的疏水性氨基酸(如 Tyr、Phe 等)有关。故选定 P2 组分进行接下来的 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 分析。

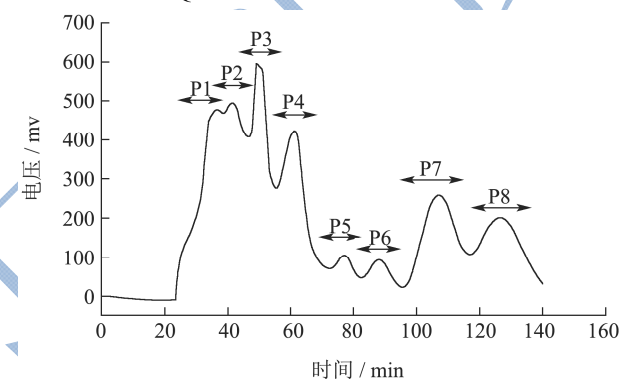


图 2 F4 组分的凝胶层析(Sephadex G-15)分离图

Fig.2 Sephadex G-15 gel chromatographic profile of fraction F4

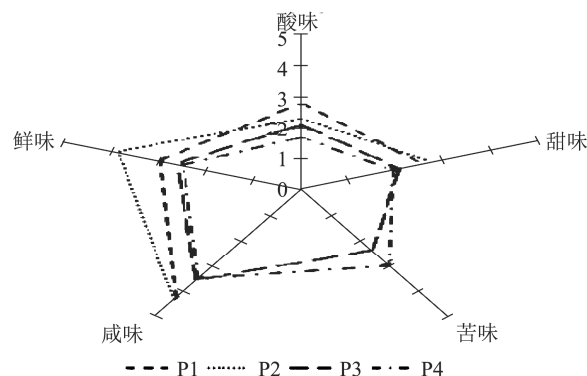


图 3 不同 Sephadex G-15 凝胶层析得到的组分的感官雷达图

Fig.3 Taste characteristics of different fractions separated by Sephadex G-15 gel chromatography

表 1 不同凝胶组分水解氨基酸和游离氨基酸含量表

Table 1 Contents of total amino acids and free amino acids of different fractions separated by gel chromatography

氨基酸	水解氨基酸/(mg/g)			
	P1	P2	P3	P4
天冬氨酸	88.10±0.20 ^a	77.73±0.04 ^b	-	-
谷氨酸	201.19±0.48 ^a	180.43±0.32 ^b	4.66±0.14 ^c	-
苏氨酸	18.71±0.05 ^a	19.99±0.11 ^b	-	-

转下页

接上页				
丝氨酸	38.80±0.33 ^a	36.93±0.08 ^b	-	-
甘氨酸	30.35±0.11 ^a	28.73±0.28 ^b	3.94±0.18 ^c	-
丙氨酸	24.21±0.13 ^a	23.83±0.10 ^a	2.05±0.02 ^b	-
缬氨酸	27.90±0.02 ^a	28.00±0.04 ^a	6.52±0.05 ^b	-
异亮氨酸	35.18±0.18 ^a	33.09±0.19 ^b	12.97±0.22 ^c	-
亮氨酸	60.25±0.08 ^a	58.08±0.24 ^b	32.49±0.32 ^c	-
苯丙氨酸	50.98±0.11 ^a	43.39±0.30 ^b	318.74±0.47 ^c	93.57±0.46 ^d
组氨酸	19.34±0.20 ^a	17.41±0.16 ^b	-	-
精氨酸	30.09±0.17 ^a	113.12±0.45 ^b	-	-
甲硫氨酸	-	5.94±0.02 ^a	12.61±0.33 ^b	-
赖氨酸	54.59±0.23 ^a	41.55±0.15 ^b	-	-
脯氨酸	55.19±0.10 ^a	47.36±0.13 ^b	-	-
半胱氨酸	9.53±0.34 ^a	5.35±0.16 ^b	-	-
酪氨酸	22.12±0.02 ^a	21.57±0.30 ^a	11.72±0.10 ^b	202.12±0.69 ^c
总计	766.50±1.61 ^a	782.53±1.96 ^b	405.70±1.13 ^c	295.69±0.91 ^d
氨基酸	游离氨基酸/(mg/g)			
	P1	P2	P3	P4
天冬氨酸	77.30±0.21 ^a	15.93±0.11 ^b	-	-
谷氨酸	109.08±0.17 ^a	14.38±0.09 ^b	-	-
苏氨酸	2.10±0.25 ^a	16.01±0.32 ^b	-	-
丝氨酸	2.08±0.05 ^a	33.70±0.19 ^b	-	-
甘氨酸	2.89±0.11 ^a	16.49±0.24 ^b	-	-
丙氨酸	-	22.52±0.02 ^a	-	-
缬氨酸	1.03±0.02 ^a	26.79±0.05 ^b	1.60±0.16 ^c	-
异亮氨酸	1.88±0.09 ^a	26.22±0.14 ^b	3.29±0.13 ^c	-
亮氨酸	2.74±0.21 ^a	41.64±22 ^b	7.07±0.23 ^c	-
苯丙氨酸	4.49±0.26 ^a	0.93±0.01 ^b	65.46±0.41 ^c	11.76±0.11 ^d
组氨酸	7.21±0.01 ^a	8.31±0.11 ^b	-	-
精氨酸	26.17±0.41 ^a	35.39±0.28 ^b	-	-
甲硫氨酸	-	2.27±0.16 ^a	4.65±0.32 ^b	-
赖氨酸	6.12±0.32 ^a	3.61±0.01 ^b	-	-
脯氨酸	33.44±0.05 ^a	24.89±0.45 ^b	-	-
半胱氨酸	3.72±0.20 ^a	-	-	-
酪氨酸	2.93±0.12 ^a	3.44±0.20 ^b	2.25±0.02 ^c	170.59±0.15 ^d
总计	283.17±2.02 ^a	292.52±2.21 ^b	84.32±0.67 ^c	182.34±0.36 ^d

注：“-”表示未检出；同行不同角标者表示具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.2 酱油中鲜味肽的结构鉴定

超高压液相色谱串联质谱技术 (UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS) 包括超高压液相色谱技术、电喷雾电离技术以及质谱技术三个部分, 是一种应用范围极广的分离、鉴定方法, 具有高效、快速、灵敏度高等特点^[27]。超高压液相色谱技术 (UPLC) 是一种全新的分离检测方法, 涵盖了小颗粒填料、低系统体积及快速

检测手段等全新技术; 电喷雾电离 (ESI) 是一种软电离技术, 能够电离分子量为 $10 \sim 10^6$ u 的蛋白质、肽等中等极性或者离子化合物; 质谱技术 (MS/MS) 是利用电场和磁场将运动的离子按它们的质核比分离后进行检测的方法。本研究采用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 对 P2 组分进行进一步分离和多肽结构鉴定, 自动对质谱数据进行 Deconvolute 去卷积处理, 选定二级质谱图中的母离子峰, 采用 Data Analysis 4.1 软件, 进

行手动 De novo 测序, 得到氨基酸序列为 Asn-Pro、Ala-His、Gly-Pro 和 Gly-Leu 四条二肽, 它们的质核比 (m/z) 分别是 230.1135 u、227.1026 u、173.0929 u 和 189.1230 u。其二级质谱图如图 4 所示。

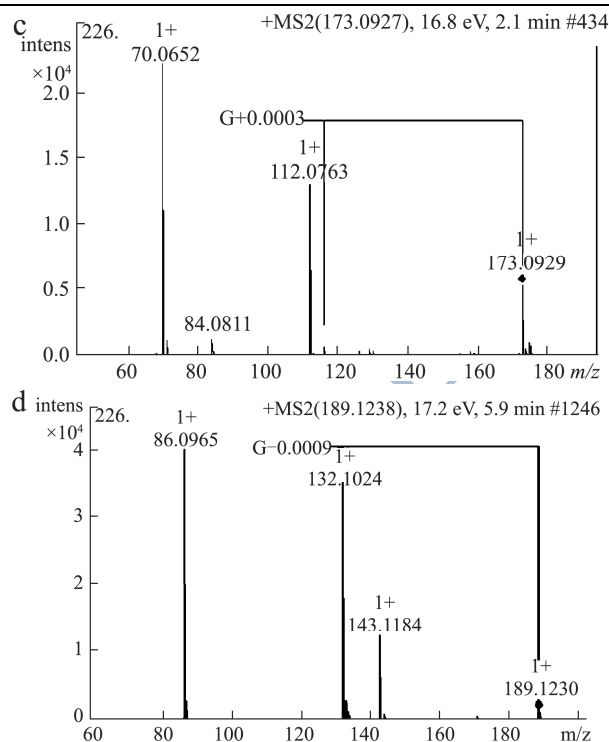
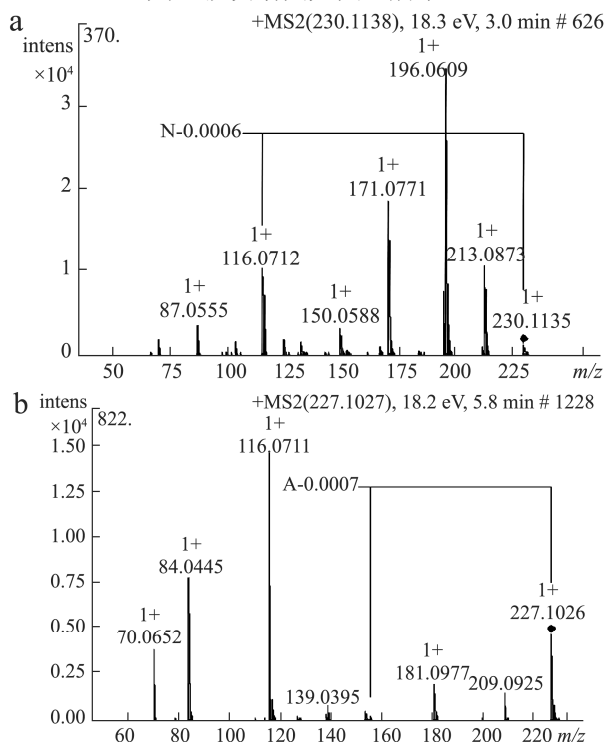


图 4 合成肽的二级质谱图

Fig.4 MS/MS spectrum of synthetic peptides

注: a、b、c、d 分别代表 Asn-Pro、Ala-His、Gly-Pro、Gly-Leu 的二级质谱图。

表 2 合成肽的感官评分和电子舌评分表

Table 2 Sensory scores and e-tongue scores of synthetic peptides

样品	感官评分				
	酸	甜	苦	咸	鲜
标准品	5.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00
Gly-Pro	1.75±0.49	1.75±0.49	2.17±0.71	1.25±0.35	2.72±0.39
Gly-Leu	1.80±0.40	1.40±0.50	2.55±0.51	0.75±0.53	2.55±0.51
Asn-Pro	1.50±0.45	0.70±0.47	1.10±0.32	1.80±0.42	3.84±0.42
Ala-His	4.05±0.55	1.60±0.52	1.15±0.34	1.35±0.63	2.90±0.32
样品	电子舌评分				
	酸	甜	苦	咸	鲜
标准品	6.63±0.00	25.85±0.00	30.22±0.00	20.16±0.00	9.97±0.00
Gly-Pro	-23.28±0.65	19.59±0.44	11.63±0.10	-17.13±0.27	3.88±0.29
Gly-Leu	-28.50±0.79	21.65±0.72	15.62±0.61	-20.45±0.49	3.94±0.46
Asn-Pro	-30.41±0.50	10.64±0.34	6.76±0.06	12.17±0.15	7.65±0.15
Ala-His	-17.58±0.41	18.56±0.39	8.07±0.23	-5.30±0.57	4.09±0.24

2.3 酱油鲜味肽的呈味特性分析

为验证四条肽的呈味特性, 利用固相合成法分别合成四条二肽并结合高效液相色谱法对其进行分离纯化, 经检测纯度达 95% 以上。对合成的四条肽首先比较了其在相同质量浓度下基本滋味的感官评定和电子舌分析结果 (表 2)。感官评价结果显示, Asn-Pro 的

鲜味强度最高, 评分达 3.84 分; 其次为 Ala-His (2.90 分) 和 Gly-Pro (2.72 分), Gly-Leu 鲜味最弱 (2.55 分)。同时酱油鲜味肽在口腔中还呈现其他基本滋味, 如 Asn-Pro 同时也具有较强的酸味 (4.05 分), 而 Gly-Leu 苦味突出 (2.55 分)。日本 Insent 公司的 TS-5000Z 电子舌基于模拟人舌头感知原理对样品进行滋味评价, 具有客观和结果稳定等优势。电子舌输

出值显示二肽 Asn-Pro 具有最强的鲜味强度(7.65 分), 其次为 Ala-His(4.09 分)、Gly-Leu(3.94 分)和 Gly-Pro (3.88 分), 三者差异则较小。除此之外, 多肽的其他基本滋味在电子舌数据上也有体现, 如 Ala-His 的强酸味和 Gly-Leu 的强苦味。整体上感官评定数据与电子舌数据相吻合, 说明感官评价员在多肽基本滋味品评方面具有较高的可信性。

为了进一步确认酱油鲜味肽的鲜味和对味精的协同能力, 采用前期实验方法^[20], 分别利用滋味稀释分析法(TDA)和比较滋味稀释分析分析法(cTDA)分析合成肽的鲜味阈值和增鲜阈值。鲜味阈值是指当一半以上的感官评价员能感知样品加到超纯水中与两个空白样品(超纯水)的差别的质量浓度; 增鲜阈值是指当一半以上的感官评价员能感知样品加到 300 mg/L 的 MSG 溶液中与两个空白样品(300 mg/L 的 MSG 溶液)的差别的质量浓度。四条肽中 Ala-His 鲜味阈值最低, 约为 MSG 鲜味阈值的一半, 为 160 mg/L; 其次为二肽 Asn-Pro (175 mg/L)。同时, 四条酱油鲜味肽具有不同程度的增鲜能力, 其中增鲜阈值最低的是 Asn-Pro, 在 10 mg/L 时就能对 300 mg/L 的 MSG 溶液起到显著的鲜味增强作用。

表 3 合成肽的鲜味阈值及增鲜阈值

Table 3 Umami threshold and umami-enhancing threshold of synthetic peptides

样品	鲜味阈值/(mg/L)	增鲜阈值/(mg/L)
Gly-Pro	430	35
Gly-Leu	350	28
Asn-Pro	175	10
Ala-His	160	13

为了进一步验证合成肽的味道并非独立氨基酸混合物味道的简单叠加, 因此将合成肽与其等质量配比的氨基酸混合物进行感官评价对比分析。参照 Zhuang^[10]等方法并做适当修改, 分别将 Asn-Pro、Ala-His、Gly-Leu 和 Gly-Pro 与其等质量配比的氨基酸混合物配置成 5 mg/mL 的溶液进行感官评分对比, 结果见图 5。

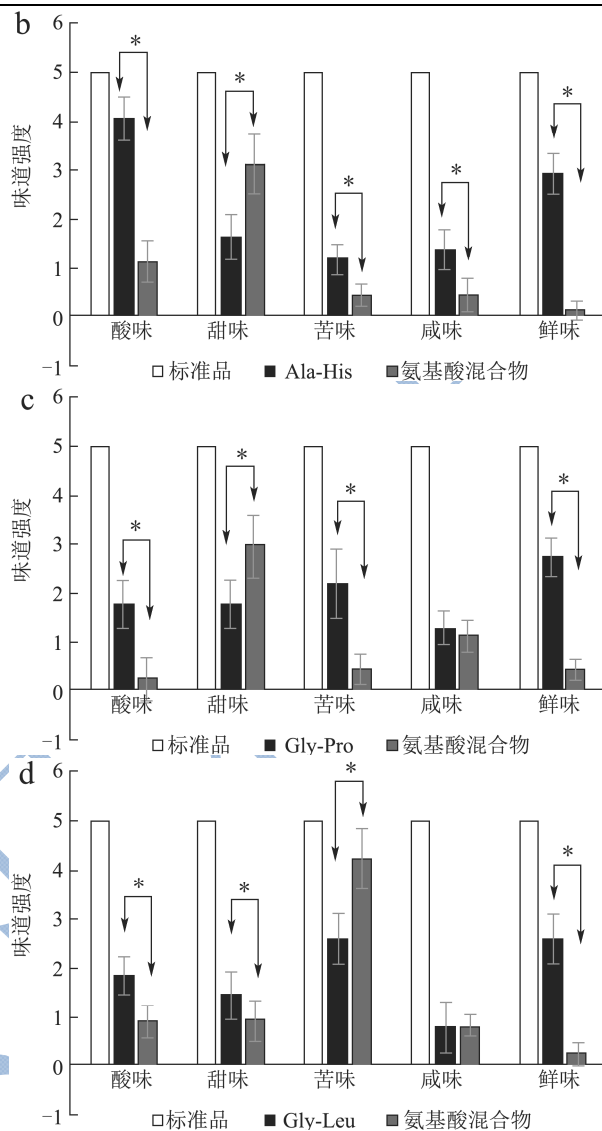
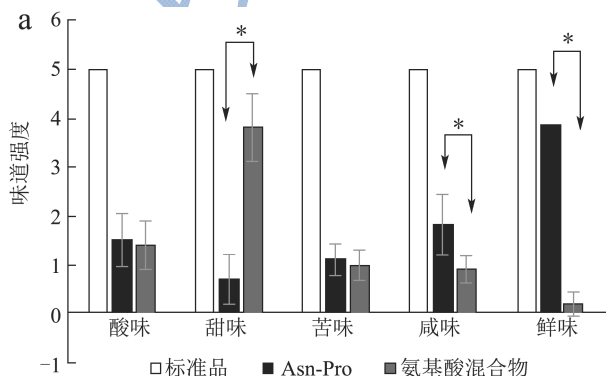


图 5 合成肽与等质量配比的氨基酸混合物的感官评价分析对比图

Fig.5 Sensory evaluation of synthetic peptides and their artificial amino acids solution by the same quality

注: a、b、c、d 分别代表 Asn-Pro、Ala-His、Gly-Pro、Gly-Leu 与等质量配比的氨基酸混合物的感官评价分析对比图; “*”表示两者具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

四条肽的呈味特性与其等质量配比的氨基酸混合物的呈味特性均存在明显差异。Asn-Pro 与其等质量配比的氨基酸混合物在甜味、咸味及鲜味之间存在显著性差异 ($p < 0.05$), Asn-Pro 本身以鲜味为主, 而其等质量配比的氨基酸混合物以甜味为主, 其甜味主要由天冬酰胺引起; Ala-His 与其等质量配比的氨基酸混合物在酸、甜、苦、咸、鲜味之间均存在显著性差异 ($p < 0.05$), Ala-His 本身以酸味和鲜味为主, 而其等质量配比的氨基酸混合物以甜味为主, 其甜味主要由丙氨酸引起; Gly-Pro 和 Gly-Leu 两者与其等质量配比的氨基酸混合物在酸、甜、苦、鲜味之间存在显著性

差异 ($p < 0.05$), Gly-Pro 和 Gly-Leu 两者本身以苦味和鲜味为主, 而 Gly-Pro 的等质量配比的氨基酸混合物以甜味为主, 其甜味主要由甘氨酸引起, 而 Gly-Leu 的等质量配比的氨基酸混合物以苦味为主, 这主要是因为亮氨酸为强苦味氨基酸, 能掩盖甘氨酸提供的甜味。这说明肽的呈味特性并非是由单个氨基酸味道的叠加而成, 而是氨基酸通过肽键形成特定的结构与各滋味受体结合方式不同引起的, 说明空间结构是化合物呈味特性的决定性因素之一。Ohyama^[28]等发现二肽 Asp-Leu 具有鲜味, 而其氨基酸混合物主要呈现苦味; Tamura^[29]等发现 Lys-Gly 具有鲜味和咸味, 而其氨基酸混合物主要呈现甜味。

3 结论

本文首先根据分子量大小分别采用超滤和凝胶层析技术从酱油中分离纯化得到较强鲜味的肽类物质, 然后采用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 对其进行结构鉴定, 其中四条二肽分别为 Asn-Pro、Ala-His、Gly-Leu 和 Gly-Pro。采用感官评定和电子舌分析发现四条固相合成的二肽均具有明显鲜味或鲜味增强作用, 其中 Ala-His 鲜味阈值最低, Asn-Pro 增鲜能力最强, 表明小分子肽类是构成酱油鲜味的重要成分之一。合成肽和等质量配比的组成氨基酸混合物的呈味特性之间的差异说明肽的呈味特性并不是单个氨基酸味道的简单叠加, 而是氨基酸通过肽键形成特定的结构造成的。

参考文献

- [1] 黄持都, 鲁绯, 纪凤娣, 等. 酱油研究进展[J]. 中国酿造, 2009, 28(10): 7-9
HUANG Chi-du, LU Fei, JI Feng-di, et al. Research process on soy sauce [J]. China Brewing, 2009, 28(10): 7-9
- [2] 张梅秀, 王锡昌, 刘源. 食品中的呈味肽及其呈味机理研究进展[J]. 食品科学, 2012, 7: 320-326
ZHANG Mei-xiu, WANG Xi-chang, LIU Yuan. Research progress in flavor peptides in foods and corresponding taste mechanisms [J]. Food Science, 2012, 7: 320-326
- [3] Yamasaki Y, Maekawa K. A peptide with delicious taste [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1978, 42(9): 1761-1765
- [4] Yu Z, Jiang H, Guo R, et al. Taste, umami-enhance effect and amino acid sequence of peptides separated from silkworm pupa hydrolysate [J]. Food Research International, 2018, 108: 144-150
- [5] Su G, Cui C, Zheng L, et al. Isolation and identification of two novel umami and umami-enhancing peptides from peanut hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS [J]. Food Chemistry, 2012, 135(2): 479-485
- [6] 刘源, 马垒, 仇春决, 等. 热加工暗纹东方鲀肌肉中呈味肽分离鉴定及呈味特性研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(3): 152-157
LIU Yuan, MA Lei, QIU Chun-yang, et al. Isolation, identification, and taste characteristics of flavor peptides from cooked puffer fish (*Takifugu obscurus*) [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(3): 152-157
- [7] 高献礼, 赵谋明, 曹鸣凯. 酱油风味物质研究进展[J]. 中国酿造, 2009, 28(4): 1-4
GAO Xian-li, ZHAO Mou-ming, CAO Ming-kai. Research advances on soy sauce flavor compounds [J]. China Brewing, 2009, 28(4): 1-4
- [8] Giri A, Osako K, Okamoto A, et al. Olfactometric characterization of aroma active compounds in fermented fish paste in comparison with fish sauce, fermented soy paste and sauce products [J]. Food Research International, 2010, 43(4): 1027-1040
- [9] Zhao C, Schieber A, Gänzle M. Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations - A review [J]. Food Research International, 2016, 89(1): 39-47
- [10] Zhuang M, Lin L, Zhao M, et al. Sequence, taste and umami-enhancing effect of the peptides separated from soy sauce [J]. Food Chemistry, 2016, 206: 174-181
- [11] Frerot E, Chen T. Identification and quantitation of new glutamic acid derivatives in soy sauce by UPLC/MS/MS [J]. Chemistry and Biodiversity, 2013, 10(10): 1842-1850
- [12] Kaneko S, Kumazawa K, Nishimura O. Isolation and identification of the umami enhancing compounds in Japanese soy sauce [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2011, 75(7): 1275-1282
- [13] 庄明珠. 酱油鲜味肽的分离纯化鉴定及呈味特性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015
ZHUANG Ming-zhu. The purification and identification of umami peptides from soy sauce and the study of its taste characteristic [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015
- [14] 赵谋明, 许瑜, 苏国万, 等. 不同淀粉质原料对高盐稀态酱油香气品质的影响[J]. 现代食品科技, 2018, 34(6): 1-13
ZHAO Mou-ming, XU Yu, SU Guo-wan, et al. The influence of starch materials on the aroma qualities of high-salt liquid fermentation soy sauce [J]. Modern Food Science and

- Technology, 2018, 34(6): 1-13
- [15] GB 5009.5-2016, 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定[S]
GB5009.5-2016, National food safety standard: determination of protein in food [S]
- [16] GB 5009.42-2016, 食品安全国家标准食盐指标的测定[S]
GB 5009.42-2016, National food safety standard: Determination of salt [S]
- [17] 欧雅莉.HPLC 法测定食品添加剂 I+G 含量[C]//2010 中国食品安全高峰论坛,2010
OU Ya-li. HPLC determination of guanosine 5'-monophosphate and inosine 5'-monophosphate in I+G [C] // 2010 China Food Safety Summit Forum, 2010
- [18] 郑淋.抗氧化肽的构效关系及定向制备的研究[D].广州:华南理工大学,2015
ZHENG Lin. Structure-activity relationship and directional preparation of antioxidant peptide [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015
- [19] Zhao T, Zhang Q, Wang S, et al. Effects of Maillard reaction on bioactivities promotion of anchovy protein hydrolysate: The key role of MRPs and newly formed peptides with basic and aromatic amino acids [J]. Food Science and Technology, 2018, 97: 245-253
- [20] 苏国万.花生粕酶解及其产物呈味特性研究[D].广州:华南理工大学,2012
SU Guo-wan. Study on enzymatic hydrolysis of defatted peanut meal and sensory taste of its hydrolysate [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012
- [21] 李露芳,赵谋明,张佳男,等.不同底物浓度花生粕酶解产物特性的研究[J].现代食品科技,2017,33(11):83-88
LI Lu-fang, ZHAO Mou-ming, ZHANG Jia-nan, et al. Characteristics of enzymatic hydrolysis of defatted peanut meal with different substrate concentrations [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(11): 83-88
- [22] 杨方威,冯叙桥,曹雪慧,等.膜分离技术在食品工业中的应用及研究进展[J].食品科学,2014,35(11):330-338
YANG Fang-wei, FENG Xu-qiao, CAO Xue-hui, et al. Application in the food industry and development of membrane separation technology [J]. Food Science, 2014, 35(11): 330-338
- [23] Rhyu M R, Kim E Y. Umami taste characteristics of water extract of Doenjang, a Korean soybean paste: Low-molecular acidic peptides may be a possible clue to the taste [J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 1210-1215
- [24] 康乐,宋焕禄.pH 值对牛肉酶解物美拉德产物风味特性的影响[J].食品科学,2017,38(11):25-32
KANG Le, SONG Huan-lu. Effect of pH on flavor characteristics of Maillard reaction products from enzymatic hydrolysates of beef [J]. Food Science, 2017, 38(11): 25-32
- [25] 李建杰,叶磊,荣瑞芬.生物活性肽的酶法制备及分离鉴定研究进展[J].食品研究与开发,2012,33(2):195-199
LI Jian-jie, YE Lei, RONG Rui-fen. Research advances on enzymatic preparation and separation identification of bioactive peptides [J]. Food Research and Development, 2012, 33(2): 195-199
- [26] 张佳男.花生鲜味肽的释放及其鲜味强度提升作用研究[D].广州:华南理工大学,2016
ZHANG Jia-nan. The study of releasing-regulation and umami promotion of peanut umami peptide [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016
- [27] 仇春泱,王锡昌,刘源.食品中的呈味肽及其分离鉴定方法研究进展[J].中国食品学报,2013,13(12):129-138
QIU Chun-yang, WANG Xi-chang, LIU Yuan. Research progress on taste peptides in food and their separation and identification methods [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(12): 129-138
- [28] Ohyama S, Ishibashi N, Tamura M, et al. Synthesis of bitter peptides composed of aspartic acid and glutamic acid [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1988, 52(3): 871-872
- [29] Tamura M, Nakatsuka T, Tada M, et al. The relationship between taste and primary structure of a delicious peptide (Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala) from beef soup [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1989, 53(2): 319-325

(上接第 6 页)

- [24] 韩伟东,李丽秋,马淑霞,等.香菇多糖对溃疡性结肠炎大鼠肠道微生态失调的调整作用研究[J].中国微生态学杂志,2011,23(5):423-425
HAN Wei-dong, LI Li-qiu, MA Shu-xia, et al. Effect of lentinan on intestinal microecological imbalance in ulcerative colitis rats [J]. Chinese Journal of Microecology, 2011, 23(5): 423-425