

# 蚝油鲜味肽的分离纯化和结构鉴定

杨小双<sup>1</sup>, 阚启鑫<sup>1</sup>, 郭惠超<sup>2</sup>, 徐婷<sup>2</sup>, 温林凤<sup>1</sup>, 陈大坤<sup>2</sup>, 莫凯棋<sup>1</sup>, 杨迅<sup>1</sup>, 钟国华<sup>3</sup>, 曹庸<sup>1</sup>, 宋明月<sup>1\*</sup>  
(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)(2. 阳西美味鲜食品有限公司, 广东阳江 529800)  
(3. 华南农业大学植物保护学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 为了分析蚝油中鲜味成分, 该研究通过溶剂分级提取法和柱层析技术结合人体感官综合评价方法筛选出三种鲜味强度最佳组分 E-4、F-8 和 F-8a, 并通过 EASY-nanoLC 1200-Orbitrap Exploris 480 质谱仪、数据库检索及从头测序技术, 最后鉴定得到 6 820 种肽, 其中 24 种潜在鲜味肽, 经验证得到 12 条鲜味肽, 其中 9 条为新型蚝油特征鲜味肽。12 种多肽的氨基酸序列分别为: SKGGV、TTGK、MTT、TTRQ、SGTT、LGTT、TTCCHL、ATSI、IGTT、TTAL、GSTT、TTPL。与 TIR1/TIR3 同源模型的结合作用主要涉及括离子相互作用、静电相互作用、疏水作用及盐桥等, 关键结合位点包括 Arg108、Arg220、Asp219、Asp129、Glu148、Glu217 和 Lys155。此外, 鲜味肽 SKGGV 具有最高的“-CDOCKER\_ENERGY”值(89.974 6), 表明 SKGGV 具备最强的增鲜效果。同时, 经感官评价发现, 各分离组分的酸味和甜味与鲜味成正比, 蚝熟香、中药味及焦糖味与鲜味相伴。这将为后续鲜味机制研究提供思路, 并为蚝油鲜味肽的开发利用提供了理论基础。

**关键词:** 蚝油; 鲜味肽; 质谱鉴定; 感官评价; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2025)02-94-107

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.2.1549

## Isolation, Purification, and Structural Characterization of Umami Peptides from Oyster Sauce

YANG Xiaoshuang<sup>1</sup>, KAN Qixin<sup>1</sup>, GUO Huichao<sup>2</sup>, XU Ting<sup>2</sup>, WEN Linfeng<sup>1</sup>, CHEN Dakun<sup>2</sup>, MO Kaiqi<sup>1</sup>,  
YANG Xun<sup>1</sup>, ZHONG Guohua<sup>3</sup>, CAO Yong<sup>1</sup>, SONG Mingyue<sup>1\*</sup>

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)(2. Yangxi Meiweixian Food Co. Ltd., Yangjiang 529800, China)  
(3. College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Three components with the strongest umami flavor, namely E-4, F-8, and F-8a, were identified in oyster sauce using fractional solvent extraction and column chromatography combined with comprehensive human sensory evaluation. Using an Orbitrap Exploris 480 mass spectrometer coupled to an EASY-nanoLC 1200 system, 6,820 peptides were identified through database searches and *de novo* sequencing. Among them, 24 were potential umami peptides. After

引文格式:

杨小双, 阚启鑫, 郭惠超, 等. 蚝油鲜味肽的分离纯化和结构鉴定[J]. 现代食品科技, 2025, 41(2): 94-107.

YANG Xiaoshuang, KAN Qixin, GUO Huichao, et al. Isolation, purification, and structural characterization of umami peptides from oyster sauce [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(2): 94-107.

收稿日期: 2023-12-25

基金项目: 广东省引进创新创业团队项目(2019ZT08N291)

作者简介: 杨小双(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品风味感知及品质评价研究; 天然活性物质的分离提取及结构鉴定, E-mail: 1084017589@qq.com

通讯作者: 宋明月(1986-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然活性物质的分离提取、结构鉴定; 天然活性物质及功能食品因子在化学、细胞、动物等多层次模型的功能评价, 探究其功能活性的作用机理, E-mail: songmy@scau.edu.cn

validation, 12 umami peptides are confirmed, with nine being novel characteristic umami peptides specific to oyster sauce. The sequences of the 12 umami peptides are as follows: SKGGV, TTGK, MTTT, TTRQ, SGTT, LGTT, TTCCHL, ATSL, IGTT, TTAL, GSTT, and TTPL. The binding interactions of the peptides with the homology model of T1R1/T1R3 primarily involved ionic interactions, electrostatic interactions, hydrophobic interactions, and salt bridges. Key binding sites included Arg108, Arg220, Asp219, Asp129, Glu148, Glu217, and Lys155. Additionally, the umami peptide SKGGV exhibited the highest "-CDOCKER\_ENERGY" value of 89.9746, indicating that SKGGV has the strongest umami-enhancing effect. Furthermore, sensory evaluation revealed that the sourness and sweetness of each isolated component were positively correlated with umami, whereas the aroma of cooked oysters, medicinal flavor, and caramel flavor were associated with the umami taste. This study provides insights for subsequent research on the umami mechanism and establishes a theoretical basis for the development and utilization of umami peptides in oyster sauce.

**Key words:** oyster sauce; umami peptide; mass spectrometric identification; sensory evaluation; molecular docking

我国海洋资源丰富, 但面临水产品副产物利用率较低等问题, 因此由加工副产物制备的海鲜调味品应运而生。蚝油是一种以新鲜的牡蛎肉或蚝豉为原料, 经熬煮取汁和调配而制成的极具牡蛎特征风味的鲜味复合调味品<sup>[1]</sup>。蚝油因富含氨基酸和多肽等呈现出鲜美的滋味和独特的风味<sup>[2]</sup>, 而在烹饪中广受欢迎, 尤其在粤菜的制作过程中使用频率极高。段鑫锐等<sup>[1]</sup>从六个蚝油产品中鉴别出 183 种挥发性风味成分, 包括有机酸、酚类、醛类以及吡嗪等。江津津等<sup>[3]</sup>应用电子舌味觉系统分析七种蚝油样本, 发现其有效的味觉指标是鲜味、咸味和丰富性(鲜味回味)。传统蚝油存在制作步骤较多、制备时间长、口味单一以及稳定性难以保持等一系列问题<sup>[4]</sup>。因此, 开展蚝油鲜味机理研究对于改善传统蚝油的品质和性能至关重要。

鲜味作为蚝油的有效味觉指标之一<sup>[3]</sup>, 是氨基酸、肽及核苷酸等鲜味物质与鲜味受体相互作用而产生的一种感官特征<sup>[5]</sup>, 该味觉特性直接关系到食物的口感和风味。姚玉静等<sup>[6]</sup>以虾头虾壳和牡蛎酶解液为原料, 研发出一款海鲜调味酱, 口感丰富, 经验证其中鲜味氨基酸占比超过 50%。鲜味肽是一类经蛋白质水解而成的、分子质量小于 1 500 u 的肽<sup>[7]</sup>, 因其具有较高的风味活性、营养价值及增鲜减盐的优势成为研究热点。近年来, 已陆续在 100 多种食品中鉴定出鲜味肽, 但蚝油鲜味肽却鲜有报道。Ju 等<sup>[8]</sup>采用超滤和 Sephadex G15 凝胶过滤层析技术对天然酿造酱油进行分离, 通过感官评价和分子对接技术发现 G3 鲜味强度最高; 宁梦华等<sup>[9]</sup>利用乙醇提取出暗纹东方鲀肌肉中的七条鲜味肽 NWDDMEK、KTGLSPDQF、KTDLNFENL、ASLDGEFKG、ALASLDGEFKG、ALTSLDGEFKG 和 RLGSSVEVQVQ; 肖如武<sup>[10]</sup>结合超滤、离子交

换色谱和凝胶色谱多种方法从蓝蛤中得到鲜味强度为 MSG 3 倍的鲜味肽组分 PMHs-P2。Jia 等<sup>[11]</sup>从武定鸡中筛选出的三种鲜味肽具有明显的鲜味和咸味增强作用, 且鲜味增强作用强于咸味。这些发现证实了鲜味肽对食品风味的贡献, 为研究新型蚝油的制备提供理论依据。

本研究利用溶剂提取法、正向硅胶柱层析分离法以及反向高效液相色谱技术(RP-HPLC)三种方法对蚝油中的鲜味成分进行分离纯化, 并结合感官综合评价筛选出蚝油中鲜味强度最佳的组分; 通过质谱技术鉴定和分子对接方法筛选出蚝油中鲜味特征物质。本研究为食品调味品的开发提供新的思路和方法, 也为进一步研究鲜味肽的呈鲜机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

浓缩蚝汁, 阳西美味鲜食品有限公司; 蔗糖, 莲花健康产业集团股份有限公司; 食盐, 广东省盐业集团有限公司; 味精, 莲花健康产业集团股份有限公司; 柠檬酸、异亮氨酸, 上海麦克林生化科技有限公司; 乙腈(色谱纯), 德国 Merck 公司; 甲醇(色谱纯), 德国 SIMARK 公司; 甲酸(色谱纯), 上海麦克林生化科技有限公司; 石油醚、乙酸乙酯、无水乙醇, 天津大茂化学试剂厂; 100~200 目正向柱层析硅胶, 青岛海洋化工厂; Phenomenex Strata-X 33  $\mu\text{m}$  聚合物固相萃取柱, 天津博纳艾杰尔科技有限公司; 纯净水, 广州屈臣氏食品饮料有限公司。所有感官用试剂均为食品级, 所用试剂均为色谱级。

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司; RE212 真空旋转蒸发器, 广州科朋科学仪器有限公司; FD-1PF 真空冷冻干燥

机, 美国赛默飞科技有限公司; ST16R 台式离心机, 美国赛默飞科技有限公司; XPE205 电子天平, 梅特勒托利多科技有限公司; LC-20A 分析液相, 日本岛津公司; Nano LC-Q-Orbitrap-MS/MS, 美国赛默飞科技有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 浓缩蚝汁冻干粉 (COSP)

取适量浓缩蚝汁样品于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  至  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$  的条件下预冻 24 h, 在温度为  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  至  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、真空值为  $-97\text{ kPa}$  至  $-95\text{ kPa}$  的低温负压条件下将浓缩蚝汁样品继续干燥 72 h 后研磨成粉末, 过 60 目筛后即得冻干蚝汁粉 (COSP)。

### 1.2.2 溶剂分级提取

参考 Chang 等<sup>[12]</sup>的方法并略加调整。分别使用石油醚 (PE), 乙酸乙酯 (EA), 乙醇 (E)、80% 乙醇 (V/V) (80E)、50% 乙醇 (V/V) (50E)、20% 乙醇 (V/V) (20E) 和水 (W) 分级提取。将 COSP 按 1:10 料液比 ( $m/V$ ) 加入溶剂后, 于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴搅拌 30 min 提取鲜味组分, 得到鲜味粗提物。将粗提物在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 条件下离心 20 min, 取上清液。重复提取 3 次后合并上清液, 即得到富含鲜味物质的提取液。将各液体组分在  $(25\pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$  下冷冻浓缩 10 h 后即得固体粉末。将各粉末放置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱内储存, 用于感官评价和成分分析, 并依次命名为 E-1、E-2、E-3、E-4、E-5、E-6、E-7。以鲜味强度最佳的组分用于下一步分离纯化。具体流程如图 1 所示。

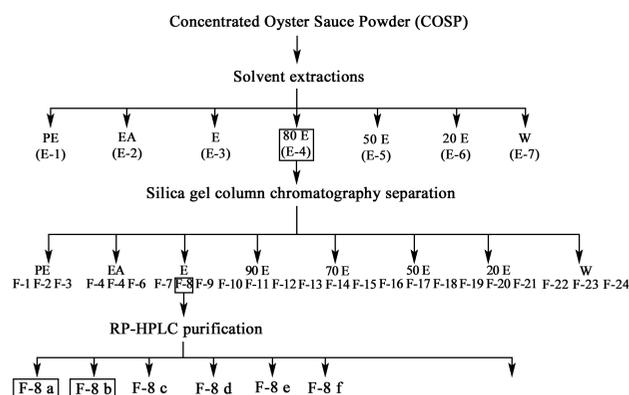


图 1 COSP 中鲜味肽的分离纯化流程图

Fig.1 Technical flowchart of the isolation and purification process of umami peptides in COSP

### 1.2.3 正向硅胶柱层析分离

选择 100~200 目正向柱层析硅胶为填料, 称取足量活化后的硅胶浸泡于石油醚中, 不断搅拌使其充分膨胀, 倒入玻璃层析柱中进行装

柱 ( $80\text{ mm}\times 1\ 000\text{ mm}$ ;  $3\ 000\text{ mL}$ )。用石油醚进行压柱, 待填料稳定后便可上样。

将待分离组分用适量超纯水复溶, 与适量硅胶粉混合均匀, 并于  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下旋转蒸发为干燥粉末。在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  环境温度条件下, 将该干燥粉末均匀装载至层析柱上进行分离纯化。以石油醚、乙酸乙酯、无水乙醇、90% 乙醇 (V/V)、70% 乙醇 (V/V)、50% 乙醇 (V/V)、20% 乙醇 (V/V) 和超纯水为洗脱液, 依次洗脱三个柱体积, 洗脱速度为  $16\sim 18\text{ mL/min}$ , 最后共收集 72 L 样品。共 24 个组分, 依次命名为 F-1、F-2、F-3、F-4、F-5、F-6、F-7、F-8、F-9、F-10、F-11、F-12、F-13、F-14、F-15、F-16、F-17、F-18、F-19、F-20、F-21、F-22、F-23、F-24。收集、浓缩、冻干各个组分后进行感官评价, 筛选出鲜味感官最佳的组分用于后续纯化。

### 1.2.4 RP-HPLC 分离纯化

将从硅胶柱层析分离得到的鲜味最佳组分溶解于 50% 乙醇 (V/V) 中, 配置成  $50\text{ mg/mL}$  的溶液, 经  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后, 滤液进入 RP-HPLC 系统进行纯化并收集各组分, 经真空冷冻浓缩后, 贮存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。依次对各纯化组分进行感官评价分析, 筛选出鲜味强度最高的组分进行结构鉴定。

分离条件: 日本 YMC C18 ( $4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ) 色谱柱; 柱温:  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 流动相 A: 超纯水, 流动相 B: 甲醇。梯度洗脱程序为:  $0\sim 5\text{ min}$ : 5% B,  $5\sim 30\text{ min}$ : 5%~95% B;  $30\sim 35\text{ min}$ : 95% B;  $35\sim 40\text{ min}$ : 5% B, 流量为  $1\text{ mL/min}$ 。检测波长为  $254\text{ nm}$ , 进样量为  $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

### 1.2.5 RP-HPLC 组分的质谱鉴定

采用 EASY-nanoLC 1200-Orbitrap Exploris 480 质谱仪进行定性分析和结构鉴定。共上样  $1\text{ }\mu\text{L}$  样品 (分析柱: 美国赛默飞 Acclaim PepMap C18,  $75\text{ }\mu\text{m}\times 25\text{ cm}$ ), 以  $60\text{ min}$  的梯度分离样品, 柱流量控制在  $350\text{ nL/min}$ , 柱温为  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 电喷雾电压  $2\text{ kV}$ , 梯度从 2.2% 的 B 相起始, 在  $51\text{ min}$  以非线性梯度升高到 50%,  $3.5\text{ min}$  内升高到 90%, 维持  $5.5\text{ min}$ 。

质谱仪在数据依赖采集模式下运行, 自动在 MS 和 MS/MS 采集间切换。质谱参数设置如下: (1) MS: 扫描范围 ( $m/z$ ):  $200\sim 1\ 500$ ; 分辨率:  $60\ 000$ ; Normalized AGC target: 300%; 最大注入时间:  $25\text{ ms}$ ; (2) HCD-MS/MS: 分辨率:  $15\ 000$ ; Normalized AGC target: 50%; 最大注入时间:  $22\text{ ms}$ ; 碰撞能量: 30%; 动态排除时间:  $30\text{ s}$ 。串联质谱图

经过 PEAKS Studio version 10.6 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canada) 分析。数据库为 uniprot-*Crassostrea gigas* (version 2023, 30272 entries) 数据库, 设置 none。搜库参数: 碎片离子质量容许误差: 0.02 Da, 母离子质量容许误差:  $1 \times 10^{-5}$ , 可变修饰: Oxidation (M) 15.99, Deamidation (NQ) 0.98。蛋白卡值为至少含 1 unique peptide; 肽段卡值为  $-101 \text{ gP} \geq 15$ 。

### 1.2.6 鲜味活性预测

根据质谱结果, 筛选出具有潜在鲜味特性的鲜味肽, 利用前人<sup>[12]</sup>研究经验和在线数据库平台 Umami\_YYDS ([http://tastepeptides-meta.com/Umami\\_YYDS](http://tastepeptides-meta.com/Umami_YYDS)) 预测对多肽进行初步预测。鲜味肽的筛选基于三个标准: (1)  $-101 \text{ gP} > 15$ ,  $\text{ALC} \geq 90\%$ , 且分子量  $\leq 1500 \text{ u}$ ; (2) 根据网络算法 Umami\_YYDS (准确度高于 89%) 预测, Probability 大于 0.9; (3) 同时满足以上两个条件即为潜在的鲜味肽。

### 1.2.7 鲜味肽与鲜味受体的分子对接

#### 1.2.7.1 同源建模

为了获得主要的鲜味受体 TIR1/TIR3 的三维结构, 在前人研究<sup>[13]</sup>基础上利用同源建模技术构建鲜味受体。TIR1 (ID: Q7RTX1) 和 TIR3 (ID: Q7RTX0) 的氨基酸序列从 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 下载获取, 代谢型谷氨酸受体 taste-mGluR4 (1EWK) 三维结构从 PDB 网站 (<https://www.rcsb.org/>) 获取。即以 TIR1 (ID: Q7RTX1) / TIR3 (ID: Q7RTX0) 和代谢型谷氨酸受体 taste-mGluR1 (1EWK) 为模板, 在 Swiss-Model 网站 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 上进行同源建模, 经 Discovery Studio™ 2017 软件 (达索系统 BIOVIA, 美国) 优化并构建得到鲜味受体的三维结构。优化步骤包括去除溶剂分子、加氢及利用 CHARMM 力场对受体进行能量最小化处理。

#### 1.2.7.2 小分子配体准备

通过 Discovery Studio™ 2017 软件构建多肽分子的三维结构, 并去除溶剂分子、加氢, 并利用 CHARMM 力场对多肽配体分子进行能量最小化处理。

#### 1.2.7.3 分子对接

参考 Zhao 等<sup>[14]</sup>的方法, 并略做修改。构建鲜味受体结合位点的活性空腔, 通过 Discovery Studio™ 2017 软件确定对接的活性空腔。活动中心的坐标:  $x=48.6065$ ,  $y=32.6061$ ,  $z=25.8823$ 。

对接活性球的半径扩展到  $41.3 \text{ \AA}$ , 使得活性中心囊括整个蛋白受体, 以充分解释鲜味肽与受体之间的相互作用。Discovery Studio™ 2017 的 CDOCKER 程序是基于分子对接的半柔性对接, 可以测试多肽与 TIR1/TIR3 鲜味受体结合的能力。“-CDOCKER\_ENERGY” 能够准确地评估鲜味肽与 TIR1/TIR3 鲜味受体的结合效果, 因此, 以“-CDOCKER\_ENERGY” 为指标对鲜味肽进行了筛选和预测。通过分析对接能、相互作用力和对接位点来对比各鲜味肽与鲜味受体的结合模式。

### 1.2.8 感官评价

#### 1.2.8.1 感官评价小组培训

感官培训参考 Cheng 等<sup>[15]</sup>的方法并有少许改动。共招募 10 名成员 (4 名男性和 6 名女性, 年龄为 20~28 岁), 所有小组成员均健康、不吸烟、无味觉和嗅觉障碍, 在感官评价方面都有一定的经验, 并知情同意参与本研究的感官培训和测试。

分别以 0.55% NaCl (*m/V*)、1.00% 蔗糖 (*m/V*)、0.35% 味精 (*m/V*)、0.08% 柠檬酸 (*m/V*) 和 0.08% 异亮氨酸 (*m/V*) 的水溶液作为咸味、甜味、鲜味、酸味和苦味的标准品, 全过程按照国际标准评估员选择、培训和监测方法 (ISO-8586-1, 2012) 进行。对一定浓度的蚝油、浓缩蚝汁和 COSP 溶液进行描述性感官评价试验, 最终讨论确定以塑料味 (塑料)、金属味 (0.1 wt.% 亚硫酸铁水溶液)、鱼腥味 (海鱼)、焦糖味 (液体焦糖)。所有感官实验均在  $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$  的环境温度下进行。

#### 1.2.8.2 浓缩蚝汁及溶剂分级提取物的感官评价

将 COSP 以及溶剂分级提取物分别溶于超纯水中, 得到质量浓度为  $5 \text{ mg/mL}$  的溶液进行感官评价。小组成员在正常照明下, 根据标准物质味道对实验样品 (2 mL) 的味道进行评分和描述。

感官评价采用十分制, 酸、甜、苦、咸、鲜的强度范围均为 0~10 分, 由 0 至 10 分, 味感逐步增强, 0 分表示无滋味强度, 5 分表示滋味强度中等, 10 分表示滋味强度极强。评价标准如表 1 所示。在感官评价过程中, 所有样品随机用三位数字编, 以合理的顺序供小组成员品尝, 每个样品品尝三次, 结果为 3 次重复实验的平均值。样品应滴入舌面中间部位, 并做旋转运动, 使舌面、上颚均接触到样品, 味道充满口腔。整个品尝过程控制在  $(10 \pm 2) \text{ s}$  内。为避免疲劳和遗留效应, 在测试两个不同样品之间, 要求小组成员用饮用水漱口两次。

表 1 感官评价标准

Table 1 Criteria for sensory evaluation

评价标准	没有味道	刚好能感知	味道									
			很微弱	较微弱	微弱	适中	略强烈	较强烈	强烈	很强烈	极强烈	
味道强度/分	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

与此同时, 感官评价小组成员还对各组分的味觉特征进行了描述。对样品进行语言描述, 包括: 是否有塑料味、金属味、鱼腥味、焦糖味的感觉或滋味, 该味道强烈与否, 是否存在某种特别的风味。记录感官评价小组成员评价结果, 评价过程中不允许互相讨论和交流。

### 1.2.8.3 硅胶柱层析组分及RP-HPLC组分的感官评价

参照 1.2.8.2 节的方法对各级溶剂提取组分的鲜味进行感官评价。

### 1.2.9 数据处理

采用 Excel 2016 软件处理数据, 使用 Origin 2021 软件进行绘图, 在 Discovery Studio™ 2017 软件上进行分子对接。

## 2 结果与讨论

### 2.1 溶剂分级提取与感官评价

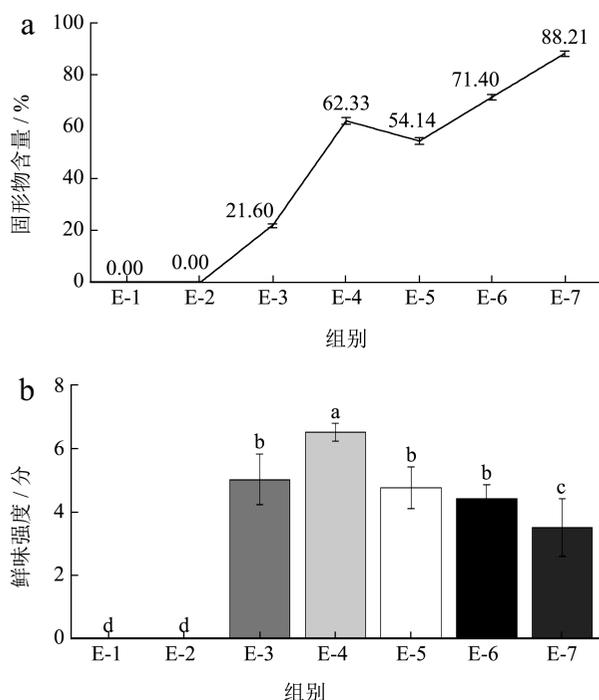


图 2 溶剂分级提取组分鲜味强度 (分) 及固形物含量 (%)

Fig.2 Umami intensity and solid content of solvent-graded extraction fractions (%)

注: 不同的小写字母表示具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

如图 2 所示, 随着对 COSP 提取溶剂极性的增加,

分离组分的固形物含量基本上呈现增加的现象。而石油醚和乙酸乙酯中基本不含任何提取物, 即 E-1 和 E-2 组分的固形物含量为零。但随着溶剂极性的增加, 固形物含量依次增加为 22.23% ( $m/V$ )、62.53% ( $m/V$ )、54.63% ( $m/V$ )、71.01% ( $m/V$ ) 和 87.34% ( $m/V$ )。由此可见, 随着溶剂极性的增加, 物质提取率也大致呈增加趋势, 结果与陈嘉辉<sup>[6]</sup>研究结果相似。根据相似相溶原理, 这也与滋味物质的呈味原理相符合<sup>[12]</sup>。

按照统一的标准, 对该 7 个组分分别进行了感官评价。随着极性分级, 分离组分的鲜味强度呈现先增加后减小的趋势。综合表 2 和图 3, E-1 和 E-2 组分感官评价为 0 分, 且有明显的塑料味, 感官极其不佳, 并不是理想的呈味组分, 这再一次验证了滋味成分为极性较强物质, 因此低极性溶剂无法高效提取滋味物质。从 E-3 组分开始, 提取物的腥味强度逐步增强, 而 E-6 组分腥味最重, E-7 组分咸味极重, 甚至覆盖了其他味道, 故 E-6 和 E-7 组分均不是理想的呈味组分, 这可能是因为咸味和腥味物质大都是水溶性的。E-3、E-4 和 E-5 依次为 5.03、6.52 和 4.77 分, 相比之下, E-4 组分表现出最佳的鲜味强度, 且伴随着焦糖味, 综合口感最佳, 同时 E-4 与 COSP 滋味轮廓最接近。也就是说, 中极性组分 E-4 是关键的风味活性物质, 并具有较强的鲜味感官<sup>[17]</sup>。 $\varphi=80\%$  乙醇<sup>[18]</sup> 和  $\varphi=20\%$  乙醇的牡蛎提取组分鲜味强度较其他溶剂提取的组分更佳。因此, 本研究收集鲜味最强烈的 E-4 组分, 通过硅胶柱层析的方法进行下一步分离纯化。

表 2 溶剂分级提取组分描述性感官评价

Table 2 Descriptive sensory evaluation of solvent-graded extraction fractions

萃取物	描述性感官评价
E-1	浓郁的塑料味, 无鲜味
E-2	浓郁的塑料味, 无鲜味
E-3	明显的蚝香, 伴有淡腥味
E-4	甜鲜味, 有焦糖甜, 腥味减少, 综合口感最佳
E-5	甜鲜味, 有果糖甜, 腥味更淡, 综合口感舒适
E-6	淡甜鲜味, 淡果糖甜, 腥味重
E-7	咸味极重, 基本掩盖熟鲜味

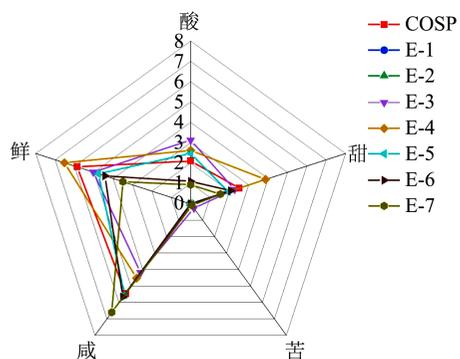


图3 COSP 和溶剂分级提取组分的感官雷达图

Fig.3 Radar map of sensory evaluation of COSP and its solvent-graded extraction fractions

### 2.2 正向硅胶柱层析与感官评价

在以往的鲜味肽研究中大部分采用分子筛和凝胶渗透色谱 (GPC) 进行分离和纯化<sup>[19]</sup>, 该方法对于分子尺寸差别比较大的物质分离效果好, 但是对于极性差别较大的物质分离效果不佳, 容易造成损失。因此, 本研究对溶剂提取组分 E-4 采取正向硅胶柱层析的方法, 以此减少鲜味物质的损失。

COSP 经过 80% 乙醇 (V/V) 提取后, 呈味物质组成仍是复杂的, 为了找出鲜味最强烈的蚝油鲜味肽, 使用硅胶柱层析对鲜味最强的 E-4 组分进行进一步的分离纯化。即依次使用不同等级极性的洗脱剂——石油醚、乙酸乙酯、无水乙醇、90% 乙醇 (V/V)、70% 乙醇 (V/V)、50% 乙醇 (V/V)、20% 乙醇 (V/V) 和超纯水洗脱, 共收集 24 个组分, 依次标记为 F-1、F-2、F-3、F-4、F-5、F-6、F-7、F-8、F-9、F-10、F-11、F-12、F-13、F-14、F-15、F-16、F-17、F-18、F-19、F-20、F-21、F-22、F-23、F-24。为了更好地评价硅胶柱层析分离得到的 24 组样品, 本研究对以上 72 L 样品进行减压旋转蒸发和冷冻干燥。同时测定了其固形物含量, 数据结果如表 3 和图 4 所示, 其中 F-8 和 F-11 固形物得率分别为 25.21% (m/m) 和 17.48% (m/m)。

正向硅胶柱层析法的分离原理<sup>[20]</sup>是根据物质在硅胶上的吸附力不同而得到分离, 一般情况下极性较大的物质易被硅胶吸附, 极性较弱的物质不易被硅胶吸附, 整个层析过程是吸附、解吸、再吸附、再解吸过程<sup>[21]</sup>。Jia 等<sup>[22]</sup>研究表明鲜味物质属于亲油亲水型, 其极性中等偏大, 通过这一研究结果, 我们预测大部分鲜味物质存在于 F-8 和 F-11 组分中。为进一步验证, 本研究继续进行感官评价。

表 3 硅胶柱层析组分得率  
Table 3 Separation yields of silica gel column chromatography fractions

柱层析组分	固形物含量/% (m/V)
F-1	0.54 ± 0.04
F-2	0.35 ± 0.05
F-3	1.90 ± 0.07
F-4	0.48 ± 0.05
F-5	0.58 ± 0.04
F-6	0.65 ± 0.04
F-7	0.51 ± 0.03
F-8	25.15 ± 0.58
F-9	5.11 ± 0.23
F-10	7.32 ± 0.63
F-11	17.25 ± 0.54
F-12	6.25 ± 0.29
F-13	1.78 ± 0.11
F-14	2.08 ± 0.07
F-15	4.90 ± 0.16
F-16	0.61 ± 0.10
F-17	1.62 ± 0.20
F-18	1.28 ± 0.19
F-19	0.89 ± 0.04
F-20	3.04 ± 0.21
F-21	0.56 ± 0.03
F-22	1.50 ± 0.17
F-23	5.73 ± 0.58
F-24	3.20 ± 0.05

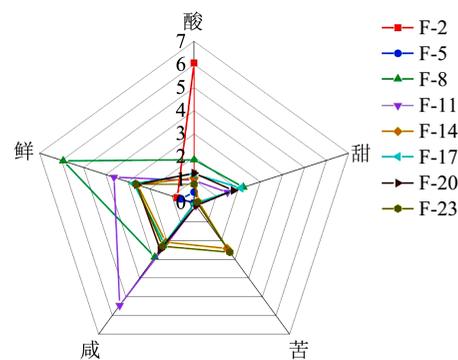


图4 硅胶柱层析组分的感官雷达图

Fig.4 Sensory radar chart of fractions separated by silica gel column chromatography

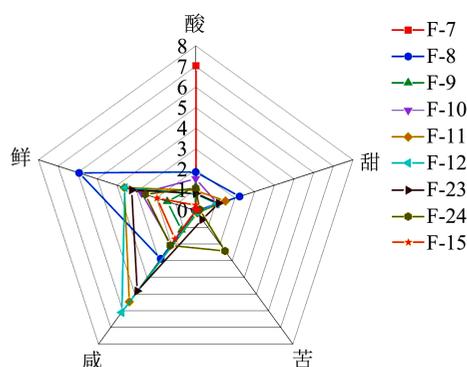


图5 硅胶柱层析分离组分的感官雷达图

Fig.5 Sensory radar chart of fractions separated by silica gel column chromatography

表4 柱层析分离样品的描述性感官评价

Table 4 Descriptive sensory evaluation of samples separated by column chromatography

组分	描述性感官评价
F-2	不溶于水, 酸味重, 滋味单一
F-5	呈棕色, 难溶于水, 明显的腥味和塑料烧焦的味道, 极度不适
F-7	酸馊味, 极度不适
F-8	固形物闻着有明显的中药味, 鲜味最突出
F-9	入口时有塑料味, 腥味和焦糊味明显
F-10	入口时有塑料味, 腥味明显, 有涩味和焦糊味
F-11	咸味强烈, 腥味明显, 淡塑料味
F-12	鲜味明显, 淡塑料味和焦糊味, 微腥
F-13	明显的浓缩蚝汁味和焦糊味
F-14	微苦, 微腥, 焦糊味
F-15	鲜味很淡, 基本在后调
F-17	甜味较鲜味明显
F-20	部分颗粒物无法溶于水
F-23	少量固形物无法溶解, 苦味突出, 和其他难以描述的异味

根据经验, 首先对 F-2、F-5、F-8、F-11、F-14、F-17、F-20、F-23 共 8 个组分进行感官评价。滋味轮廓图及描述性感官评价结果如图 5 和表 4 所示, F-2 和 F-5 组分均难溶于水, 且有明显的酸味, 极度不舒适, 并不是理想的鲜味组分。这可能是因为低极性物质难以被口腔内的部分滋味受体识别, 从而导致风味不佳<sup>[23]</sup>。F-8、F-11 和 F-17 相对得分更高一些, 鲜味得分分别为 5.93、3.63 和 2.73 分, 这三种组分的极性明显比前两者更大, 与前人研究结论一致<sup>[22]</sup>。为了进一步确认最鲜组分, 继续对 F-7~F-15 共 9 个组分进行感官评价, 数据结果如图 5 所示, F-7 组分的滋味以酸味为主, F-11、

F-12 和 F-13 组分的滋味以咸味为主, 鲜味均次之。F-13 和 F-14 均有明显的焦糊味, 这与 E-4 组分的特征相吻合, 说明呈焦糊味的物质集中在 90% 乙醇 (V/V) 和 70% 乙醇 (V/V) 洗脱之间, 极性相对较大。从 F-15 组分开始, 鲜味强度逐渐降低, 直至 F-20 和 F-23 组分均出现不溶于水的物质, 且苦味突出, 有难以描述的异味, 故自 F-15 至 F-24 组分均不是理想的鲜味组分。综上, F-8 与 COSP 的滋味轮廓最相似, 并以鲜味为主要滋味, 虽然伴有中药味, 但其鲜味强度最高且为 5.93, 显示出最强的鲜味潜力, 因此将以 F-8 组分进行后续 RP-HPLC 分离纯化。

### 2.3 RP-HPLC 纯化与感官评价

收集硅胶柱层析分离的鲜味最强烈的 F-8 组分进行 RP-HPLC 分离纯化。如图 6 所示, 在 4~18 min 保留时间内, F-8 组分分离后共得到了 6 个在 254 nm 波长处有明显吸收的组分, 依次命名为 F-8a、F-8b、F-8c、F-8d、F-8e、F-8f。相应的出峰时间为: 4.588、4.776、6.369、10.777、15.612、18.041 min 左右。高极性物质优先通过洗脱过程被分离, 因此蚝油中的鲜味肽普遍具有较强的极性。F-8a 组分的出峰时间最短, 表明其具有较高的极性和较弱的疏水性<sup>[24]</sup>。研究表明, 氨基酸呈味特性与其疏水性强弱有关<sup>[25]</sup>。一般苦味氨基酸, 如 Val、Ile、Leu、Met、Phe 为疏水性氨基酸, 多数的甜鲜味氨基酸, 如 Glu、Asp、Gly、Lys、Ser、Thr 为亲水性氨基酸<sup>[17]</sup>, 这说明纯化的 6 个组分中可能会含有亲水性的甜鲜氨基酸。表明 F-8a 组分可能是含较多鲜味氨基酸、甜味氨基酸和酸味氨基酸较多的多肽。

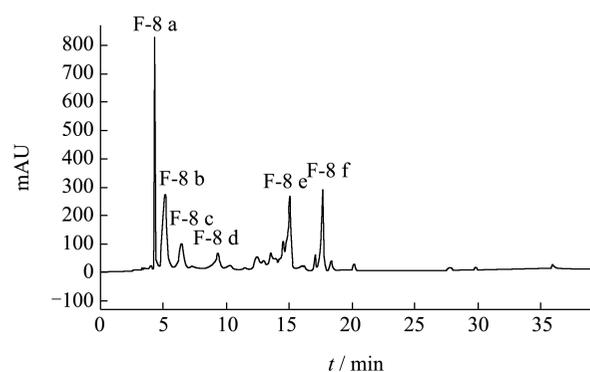


图6 F-8 的 RP-HPLC 色谱图

Fig.6 RP-HPLC Chromatogram of F-8

根据表 5 结果显示, 经处理后得到的固体样品中, F-8a、F-8b 两组分为白色粉末, 而 F-8c、F-8d、F-8e、F-8f 四种组分呈浅棕色。如图 7 所示, F-8a、

F-8b、F-8e 和 F-8f 四种组分鲜味强度均超过 5 分，说明 F-8 组分鲜味成分丰富，再次证明了 F-8 组分的鲜味优势。F-8a 鲜味强度最高，鲜味得分为 6.32，得分最低的为 F-8c 组分，鲜味得分为 2.30 分。6 种组分均未呈现苦味特征。F-8a 组分酸味最重，其口感与文献上对鲜味<sup>[26]</sup>和厚味<sup>[27]</sup>的定义和描述最相似，口感醇厚能促进唾液分泌<sup>[28]</sup>，增强食欲，是理想的鲜味肽。考虑到 F-8a 组分鲜味强度最佳，因此对此组分进行定性分析和结构鉴定。

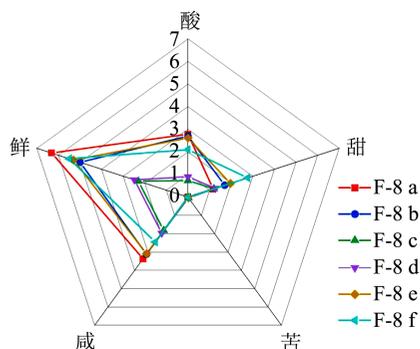


图 7 RP-HPLC 组分滋味轮廓图

Fig.7 Sensory radar chart of fractions separated by RP-HPLC

表 5 RP-HPLC 纯化样品的描述性感官评价  
Table 5 The descriptive sensory evaluation of liquid-phase-purified samples

纯化样品	描述性感官评价
F-8a	蚝汁味和酸味，口感醇厚，口感接近 IMP+GMP 溶液，无腥味
F-8b	基本无蚝汁味，淡酸味，口感接近谷氨酸钠水溶液
F-8c	鲜味强度减弱，基本无酸味
F-8d	蚝汁味最明显
F-8e	蚝汁味明显，甜味残留明显
F-8f	蚝汁味减淡，甜味残留明显

## 2.4 质谱鉴定

质谱鉴定是物质结构鉴定和分析的重要技术方法，广泛应用于科研领域中，能够对大分子物质进行实时数据分析，具有灵敏度高、准确度高等技术优势。因此本研究将在前人的基础上，应用 EASY-nanoLC 1200-Orbitrap Exploris 480 质谱仪对蚝油特征鲜味肽进行分离和鉴定。

对鲜味最强的组分 F-8a 进行的质谱鉴定，数据库中共检索出 13 条多肽，分别为 HIGPCADP、MTTT、GAPLLLLL、WCGPCQ、SSSKV、LLSK、LGTT、IGTT、SGTT、ATSI、ATSL、GSTT、

TTRQ。二级质谱图如图 8 所示。而 de novo 从头测序得到 6 817 条肽段，对 ALC $\geq$ 90% 的多肽进行筛选，得到 88 条潜在鲜味肽。对以上 101 条多肽进行进一步的筛选，即 (1)  $-10l\text{gP} > 15$ ，ALC $\geq$ 90%，且分子量 $\leq$ 1 500 Da；(2) 根据网络算法 Umami\_YYDS (准确度高于 89%) 预测，probability 大于 0.9；(3) 同时满足以上两个条件即为潜在的鲜味肽。结果如表 6 所示。最终共筛查出 24 条潜在鲜味肽，分别为 ATSI、GSTT、HHQQ、HIGPCADP、IGTT、LGTT、LPPVEYDSLRL、LPRKV、LYKKGK、MTTT、QPQAGPFPTT、RMRE、SGTT、SKGGV、SSSKV、TTAL、TTCCHL、TTGK、TTPL、TTRQ、WCGPCQ、YKSTS、YLKN、YLQQ。继续对这 24 个潜在鲜味肽进行分子对接，进行进一步的验证。

表 6 Umami\_YYDS 预测结果

序号	多肽	Probability
1	ATSI	1.000 0
2	GSTT	1.000 0
3	HHQQ	0.998 6
4	HIGPCADP	0.976 4
5	IGTT	1.000 0
6	LGTT	0.999 9
7	LPPVEYDSLRL	1.000 0
8	LPRKV	0.999 6
9	LYKKGK	0.962 9
10	MTTT	1.000 0
11	QPQAGPFPTT	1.000 0
12	RMRE	0.999 6
13	SGTT	1.000 0
14	SKGGV	0.978 8
15	SSSKV	0.991 7
16	TTAL	1.000 0
17	TTCCHL	0.999 3
18	TTGK	1.000 0
19	TTPL	1.000 0
20	TTRQ	1.000 0
21	WCGPCQ	0.998 0
22	YKSTS	1.000 0
23	YLKN	0.957 9
24	YLQQ	1.000 0

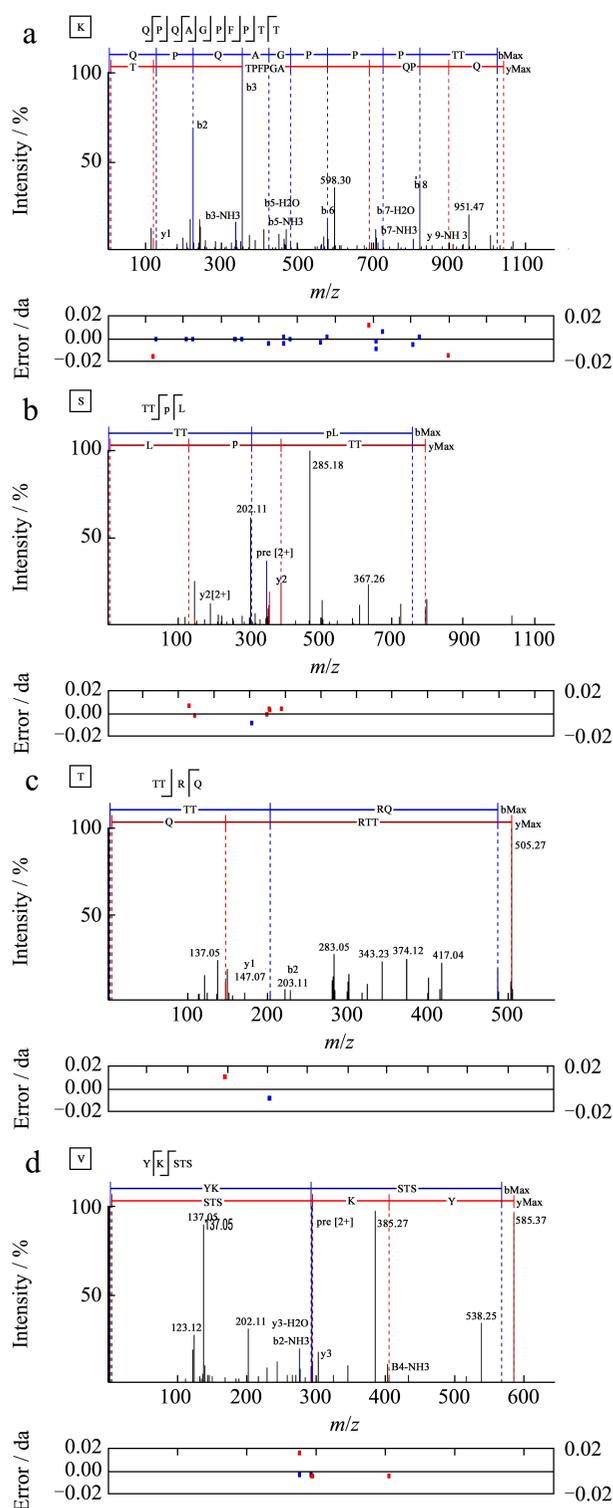


图 8 鲜味肽二级质谱

Fig.8 Secondary mass spectra of umami peptides

## 2.5 鲜味肽与鲜味受体的分子对接

### 2.5.1 同源建模

本研究按照序列统一性-拉氏图空间验证-Verify 3D 的 3D-1D score 三个参数进行综合评估。

由于一个蛋白质的结构由其氨基酸序列唯一决

定，且三级结构的保守性远远大于其一级结构的保守性。序列同一性在 30% 以上是一个理想的序列对齐预期。而若目标模板序列相似度低于 30% 时，可靠性大幅降低，是不能继续进行建模和分子对接的。而本模型的序列同一性为 35.37%，满足高精度条件。

Ramachandran Plot（也称为拉氏图）被广泛用于系统分析蛋白质或肽链中肽键内  $\alpha$  碳原子和羰基碳原子的键旋转度，以明确  $\alpha$  碳原子和氮原子之间键的旋转程度。其主要作用在于阐述蛋白质或肽类结构中氨基酸残基可能采用的构象以及不允许的构象<sup>[29]</sup>。因此本研究根据前人经验继续运用拉氏图进行评价。利用 Discovery Studio™ 2017 软件对同源模型进行优化后通过 SAVES V6.0 进行评估。图 9a 和 9b 分别给出了 T1R1/T1R3 同源模型的三维结构图和拉氏图结果，数据结果显示了 96.3% 的氨基酸残留处于合理区（其中边界区域为 3.3%，不允许区域为 0.3%）。综上，结合 SAVES V6.0 评估中 90% 的批判性评价原则认为模型的构象是合理的。

为进一步 Verify 3D 程序主要通过计算蛋白 3D 模型与其本身的氨基酸一级结构的兼容性来评价蛋白质模型。T1R1 和 T1R3 蛋白模型的 Verify 3D 评分如图 9c 和 9d 所示分别有 81.51% 的氨基酸残基的评分在 0.1 以上，符合评价程序的要求。因此，综合拉氏图和 Verify 3D 评分可知，构建得到的蛋白结构是合理的，可以作为后续分子对接的同源受体进行实验。

### 2.5.2 分子对接

通过半柔性分子对接技术对上述 24 种多肽进行筛选，结果显示有 12 种多肽可以与 T1R1/T1R3 同源模型结合。其他 12 种多肽无法与鲜味受体结合的原因可能有两方面。一方面这些多肽可能不属于鲜味肽的范畴，无法被鲜味受体识别<sup>[30]</sup>。另一方面，可能由于它们的肽链长度较长，导致无法顺利进入受体结合腔，受限受体结合腔的尺寸，从而阻碍了这些相对较大分子与受体的结合<sup>[29]</sup>。所以本研究只针对能与受体结合的 12 种多肽进行研究。

鲜味肽的呈鲜味机理涉及多个方面的因素，其中包括肽链长度<sup>[31]</sup>、氨基酸序列以及与其他化合物（如游离氨基酸、有机酸、核苷酸）的相互作用<sup>[32]</sup>，同时还受合成肽的制备方法<sup>[33]</sup>等因素的影响。根据以往经验，分子量 1 500 u 以下的肽会引起鲜味<sup>[34]</sup>，特别是一些包含同类型氨基酸的二肽或三肽，其对味觉特征的影响较为显著<sup>[35]</sup>，与本研究结果一致。而针对长链肽来讲，情况更为复杂，需要从肽空间结构两方面考虑其呈味特性。

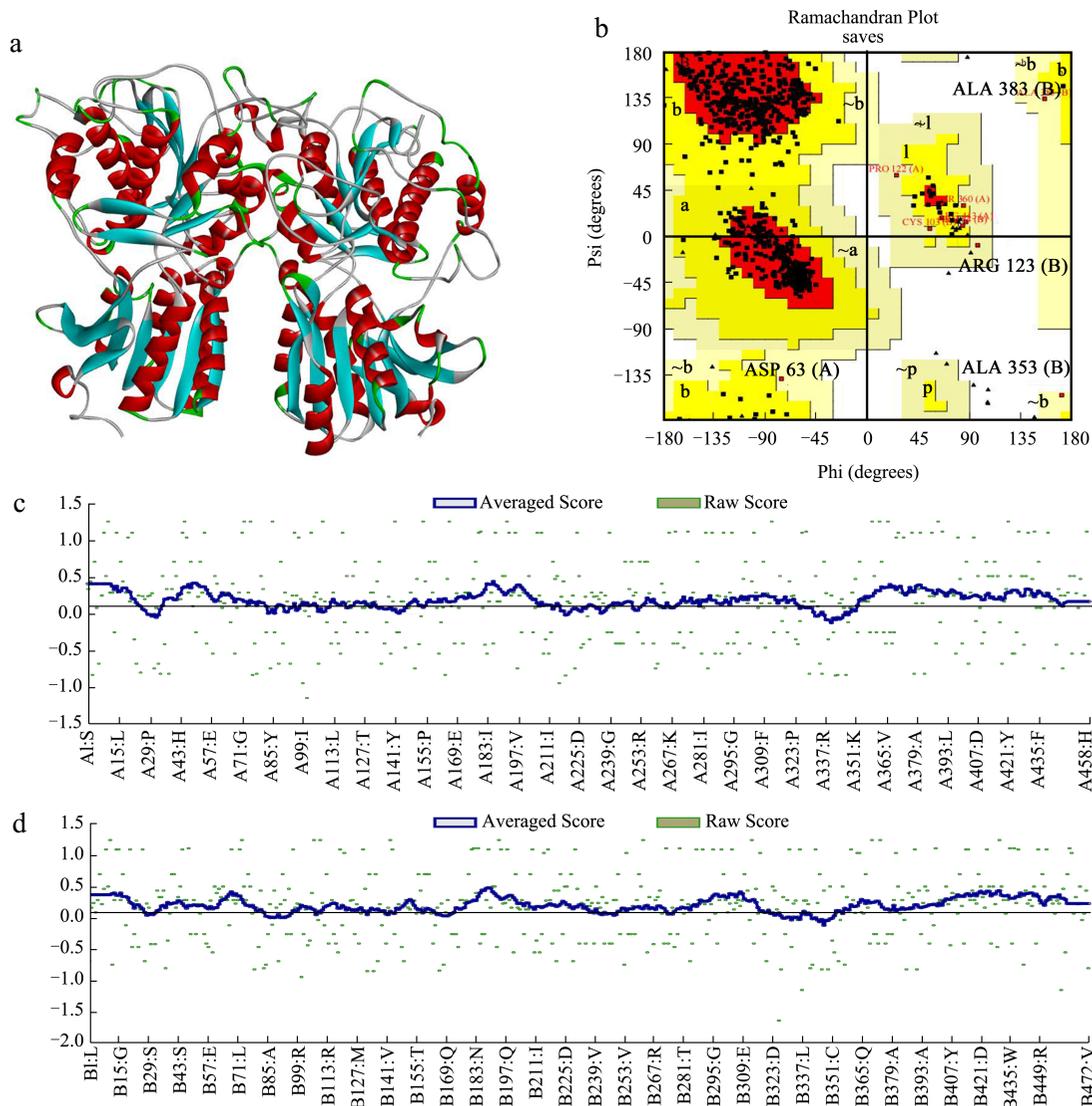


图9 T1R1/T1R3 同源模型

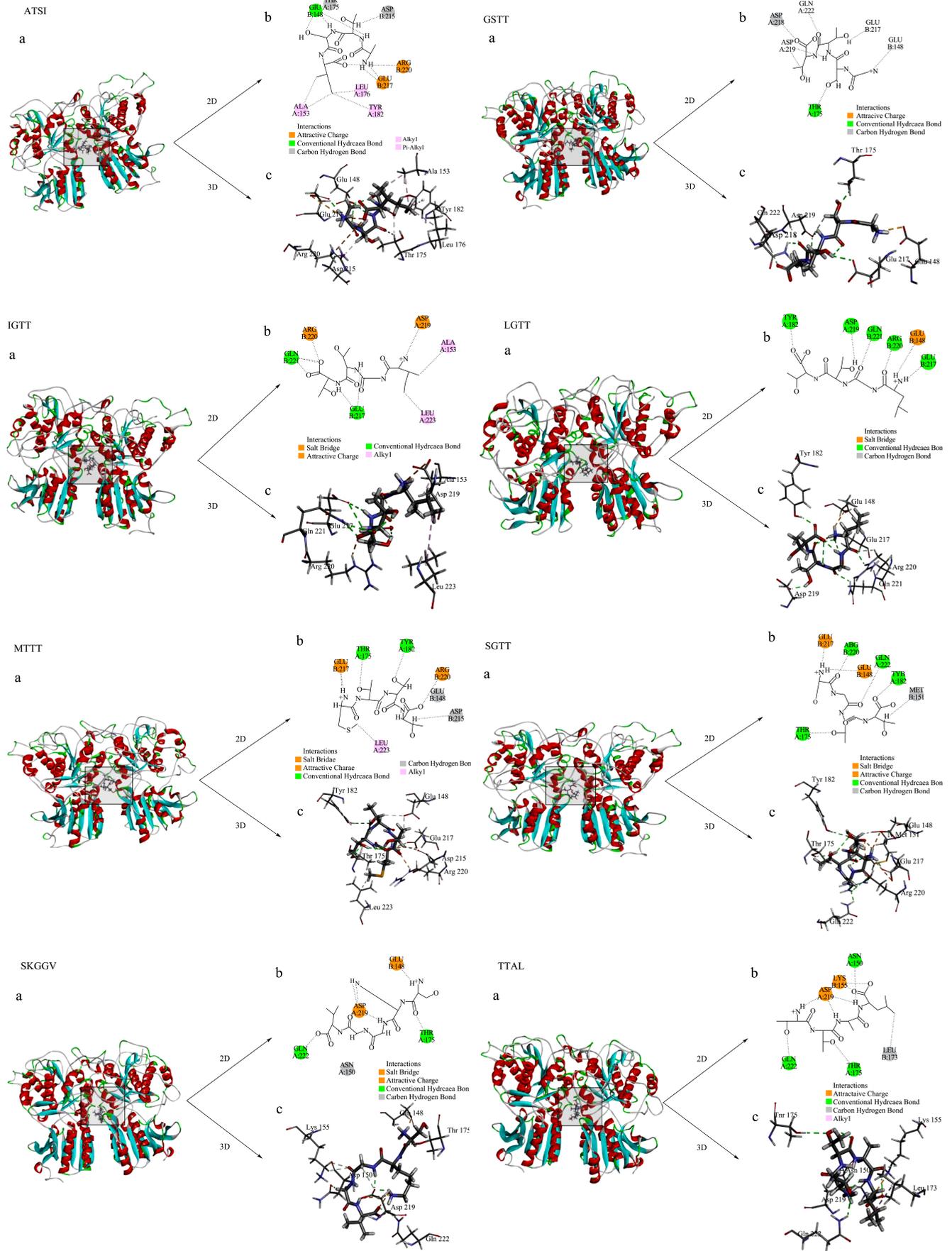
Fig.9 Homology model of T1R1/T1R3

注: (a) 和 (b) 分别为鲜味受体 T1R1/T1R3 同源模型的三维结构和拉氏图; (c) 和 (d) 分别表示 T1R1 和 T1R3 的 Verify 3D 评分。

表 7 F-8a组中筛选的鲜味肽

Table 7 Umami peptides identified in F-8a

序号	多肽	Probability	-CDOCKER_ENERGY/(kcal/mol)	-CDCKER_INTERACTION_ENERGY/(kcal/mol)
1	ATSI	1.000 0	69.857 7	53.829 6
2	GSTT	1.000 0	60.968 3	51.140 4
3	IGTT	1.000 0	66.294 9	53.694 6
4	LGTT	0.999 9	73.558 1	57.068 4
5	MTTT	1.000 0	78.992	53.968 5
6	SGTT	1.000 0	77.697 4	50.806
7	SKGGV	0.978 8	89.974 6	69.317 9
8	TTAL	1.000 0	65.914	62.305 8
9	TTCCHL	0.999 3	72.262 2	70.085 6
10	TTGK	1.000 0	80.337 8	72.251 9
11	TTPL	1.000 0	46.412 6	51.458 7
12	TTRQ	1.000 0	78.709 6	9





T1R1/T1R3 同源受体具有最强的相互作用力, 与受体的周围残基 Asn150、Lys155、Thr175、Gln222 形成氢键; 同时与受体周围残基 Glu148、Asp219 通过离子相互作用和静电相互作用形成盐桥和 Attractive Charge, 而 Dang 等<sup>[40]</sup>研究表明这种离子相互作用产生的稳定性又比氢键相互作用产生的稳定能高出许多倍, 因此 SKGGV 展示出最佳的鲜味强度。相比之下, 鲜味强度较弱的 TTPL 与鲜味受体仅在氨基酸残基 Glu148 处形成一个盐桥, 其他相互作用力分别为氢键相互作用和疏水相互作用, 远不如离子相互作用稳定, 因此, TTPL 明显不如 SKGGV 的鲜味强度高。此外, 能产生离子相互作用的位点还包括: Arg108、Arg220、Asp219、Asp129、Glu217 和 Lys155。

综上, 鲜味肽与鲜味受体的相互作用力主要包括离子相互作用、静电相互作用、疏水作用及盐桥等, 而离子相互作用能够明显增强鲜味肽的鲜味感知能力, 因此, Arg108、Arg220、Asp219、Asp129、Glu148、Glu217 和 Lys155 是重要的作用位点。

### 3 结论

本研究经分离提取和感官评价筛选得到蚝油中的主要鲜味组分 F-8a 后, 利用 EASY-nanoLC 1200-Orbitrap Exploris 480 质谱仪对 F-8a 组分鉴定得到 24 种潜在鲜味肽, 通过分子对接技术鉴定和验证得到 12 条鲜味肽, 其鲜味强度依次为: SKGGV > TTGK > MTTT > TTRQ > SGTT > LGTT > TTCCHL > ATSI > IGTT > TTAL > GSTT > TTPL。综上, 本研究共鉴定和筛选得到 12 条鲜味肽, 其中 9 条 (SKGGV、TTGK、TTRQ、LGTT、TTCCHL、IGTT、TTAL、TTPL、SGTT) 为首次发现的鲜味肽。鲜味肽与鲜味受体的相互作用力主要包括离子相互作用、静电相互作用、疏水作用及盐桥等, 而离子相互作用能够明显增强鲜味肽的鲜味感知能力, 因此, Arg108、Arg220、Asp219、Asp129、Glu148、Glu217 和 Lys155 是重要的作用位点。这一研究结果丰富了蚝油鲜味物质研究系统, 也为蚝油的工艺升级提供了理论基础。

### 参考文献

- [1] 段鑫锐, 康波, 张小龙, 等. 蚝油挥发性风味成分比较分析[J]. 中国调味品, 2022, 47(11): 144-150.
- [2] CHEN Y Y, CHEN S S, QIU W Q, et al. Identification of different varieties of oyster juice based on the comparison of free amino acids [J]. *Advanced Materials Research*, 2013, 781-784: 1534-1539.
- [3] 江津津, 陈庆, 李轩, 等. 蚝油的滋味与质构特征分析[J]. 广州城市职业学院学报, 2023, 17(2): 80-86.
- [4] 李兆周, 陈秀金, 王耀, 等. 蚝油的增香与体态稳定性控制研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(11): 337-346.
- [5] 何颖, 吕东霖, 廖国周, 等. 武定鸡肉中鲜味肽分离鉴定及呈味特性[J]. 食品科学, 2022, 43(22): 232-238.
- [6] 姚玉静, 杨昭, 黄佳佳, 等. 即食海鲜调味酱的研制[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(14): 146-150.
- [7] ZHAO Y, ZHANG M, DEVAHASTIN S, et al. Progresses on processing methods of umami substances: A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 93: 125-135.
- [8] JU Y, SUN L, ZHANG X, et al. Fractionation, identification and umami characteristics of flavor peptides in natural brewed soy sauce [J]. *Food Chemistry*, 2023, 425: 136501.
- [9] 宁梦华, 王文利, 陈高乐, 等. 养殖暗纹东方鲀中 7 种醇提鲜味肽的鉴定及其呈鲜特性[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 16-23.
- [10] 肖如武. 蓝蛤蛋白源鲜味肽的制备及分离研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011.
- [11] JIA R, HE Y, LIAO G, et al. Identification of umami peptides from Wuding chicken by Nano-HPLC-MS/MS and insights into the umami taste mechanisms [J]. *Food Research International*, 2023, 172: 113208.
- [12] CHANG R, ZHOU Z, DONG Y, et al. Sensory-guided isolation, identification, and active site calculation of novel umami peptides from ethanol precipitation fractions of fermented grain wine (Huangjiu) [J]. *Foods*, 2023, 12(18): 3398.
- [13] LI M, ZHANG X, ZHU Y, et al. Identifying umami peptides specific to the T1R1/T1R3 receptor via phage display [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(31): 12004-12014.
- [14] ZHAO J, WANG T, ZHANG C, et al. A comparative analysis of the umami taste of five fresh edible mushrooms by simulating the chemical environment of oral digestion *in vitro* [J]. *LWT*, 2023, 176: 114522.
- [15] CHENG S, TU M, LIU H, et al. A novel heptapeptide derived from *Crassostrea gigas* shows anticoagulant activity by targeting for thrombin active domain [J]. *Food Chemistry*, 2021, 334: 127507.
- [16] 陈嘉辉. 酱油中呈味肽的分离鉴定及呈味特性的对比分析[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
- [17] FU B, WU D, CHENG S, et al. Three novel umami peptides derived from the alcohol extract of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Identification, characterizations and interactions with T1R1/T1R3 taste receptors [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2024, 13(1): 146-153.

- [18] ZHU X, SUN WATERHOUSE D, CHEN J, et al. Comparative study on the novel umami-active peptides of the whole soybeans and the defatted soybeans fermented soy sauce [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(1): 158-166.
- [19] SONG S, ZHUANG J, MA C, et al. Identification of novel umami peptides from *Boletus edulis* and its mechanism via sensory analysis and molecular simulation approaches [J]. *Food Chemistry*, 2023, 398(1): 133835.
- [20] 李存能.塔宾曲霉次生代谢产物的分离合成及活性测定[D].济南:山东第一医科大学,2022.
- [21] 刘德禄.多模式硅胶色谱固定相制备及其在磷脂和膜蛋白质中的分离性能研究[D].保定:河北大学,2023.
- [22] JIA R, YANG Y, LIAO G, et al. Excavation, identification and structure-activity relationship of heat-stable umami peptides in the processing of Wuding chicken [J]. *Food Chemistry*, 2024, 430: 137051.
- [23] CUI Z, ZHANG N, ZHOU T, et al. Conserved sites and recognition mechanisms of T1R1 and T2R14 receptors revealed by ensemble docking and molecular descriptors and fingerprints combined with machine learning [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(14): 5630-5645.
- [24] 乌日娜,武俊瑞,曹恺欣,等.一种新型豆基鲜味肽及其制备方法与应用:中国,CN116813702A[P].2023-12-27.
- [25] CHEN Z, FANG X, WU W, et al. Effects of fermentation with *Lactiplantibacillus plantarum* GDM1.191 on the umami compounds in shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*) [J]. *Food Chemistry*, 2021, 364: 130398.
- [26] SUESS B, FESTRING D, HOFMANN T. 15-Umami Compounds and Taste Enhancers[M]//PARKER J K, ELMORE J S, METHVEN L. *Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages*. Woodhead Publishing, 2015: 331-351.
- [27] XIA X, FU Y, MA L, et al. Protein Hydrolysates from *Pleurotus geesteranus* Modified by *Bacillus amyloliquefaciens*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase exhibit a remarkable taste-enhancing effect [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(38): 12143-12155.
- [28] MOERDIJK-POORTVLIET T C W, DE JONG D L C, FREMOUW R, et al. Extraction and analysis of free amino acids and 5'-nucleotides, the key contributors to the umami taste of seaweed [J]. *Food Chemistry*, 2022, 370: 131352.
- [29] YU Z, KANG L, ZHAO W, et al. Identification of novel umami peptides from myosin via homology modeling and molecular docking [J]. *Food Chemistry*, 2021, 344: 128728.
- [30] YU X, ZHANG L, MIAO X, et al. The structure features of umami hexapeptides for the T1R1/T1R3 receptor [J]. *Food Chemistry*, 2017, 221: 599-605.
- [31] SHIYAN R, LIPING S, XIAODONG S, et al. Novel umami peptides from tilapia lower jaw and molecular docking to the taste receptor T1R1/T1R3 [J]. *Food Chemistry*, 2021, 362: 130249.
- [32] 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.
- [33] 贾蓉,何颖,王桂瑛,等.食品中鲜味肽的研究进展[J].*肉类研究*,2022,36(4):65-71.
- [34] 高丙宏.皮蛋蛋黄特征呈味物质研究及关键鲜味肽的分离鉴定[D].南昌:南昌大学,2023.
- [35] 赵孟斌,顾华蓉,穆洪涛,等.基于感官评价和分子对接的Pro、Glu二肽与鲜味受体构效关系[J].*现代食品科技*, 2023,39(9):123-136.
- [36] FU B, XU X, ZHANG X, et al. Identification and characterisation of taste-enhancing peptides from oysters (*Crassostrea gigas*) via the Maillard reaction [J]. *Food Chemistry*, 2023, 424: 136412.
- [37] AFTABUDDIN MD, KUNDU S. Hydrophobic, hydrophilic, and charged amino acid networks within protein [J]. *Biophysical Journal*, 2007, 93(1): 225-231.
- [38] DANG Y, HAO L, CAO J, et al. Molecular docking and simulation of the synergistic effect between umami peptides, monosodium glutamate and taste receptor T1R1/T1R3 [J]. *Food Chemistry*, 2019, 271: 697-706.
- [39] 张传玺.靶向人源鲜味受体T1R1的鲜味多肽检测系统及呈鲜机制研究[D].上海:华东理工大学,2023.
- [40] DANG Y, GAO X, XIE A, et al. Interaction between umami peptide and taste receptor T1R1/T1R3 [J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2014, 70(3): 1841-1848.