

# 罗非鱼副产物蛋白水解肽的呈味分析

甘瑞卿<sup>1</sup>, 何燕富<sup>1,2\*</sup>, 李永成<sup>1,2\*</sup>, 李来好<sup>3</sup>, 赵京菁<sup>1</sup>, 申铨日<sup>1,2</sup>, 李川<sup>1,2</sup>

(1. 海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570100)(2. 南海海洋资源利用国家重点实验室, 海南海口 570100)  
(3. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300)

**摘要:** 为了探究罗非鱼副产物蛋白水解物中滋味活性物质的来源, 该研究以罗非鱼的鱼皮、鱼头和鱼骨为原料, 采用中性蛋白酶、菠萝蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶分别对三种副产物进行酶解, 分析比较水解度、分子量、前体蛋白与滋味活性物质的关系。结果表明: 三种罗非鱼副产物经过风味蛋白酶水解8 h后获得最高水解度, 分别为14.29%、23.7%和31.86%。经过木瓜蛋白酶水解的副产物酶解液均呈现出显著苦味或酸味, 而鱼头经过碱性蛋白酶酶解得到的水解产物具有鲜味, 鱼骨则经过菠萝蛋白酶水解得到鲜味, 鱼皮经过中性蛋白酶水解表现出鲜味和酸味, 但鱼头却呈现出苦味。通过LC-MS/MS鉴定, 胶原蛋白、肌原纤维蛋白以及肌浆蛋白是罗非鱼副产物酶解液滋味活性肽的重要味觉活性前体, 这些滋味肽的分子量大部分小于1500 u, 肽段中疏水性氨基酸残基对罗非鱼副产物滋味的形成具有重要作用, 其中蛋氨酸在酶解液的鲜味的形成中起重要贡献。

**关键词:** 罗非鱼副产物; 酶解; 活性滋味物质; 前体蛋白

文章篇号: 1673-9078(2022)07-291-300

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.7.1092

## Taste Analysis of Protein Hydrolysates from Tilapia By-product

GAN Ruiqing<sup>1</sup>, HE Yanfu<sup>1,2\*</sup>, LI Yongcheng<sup>1,2\*</sup>, LI Laihao<sup>3</sup>, ZHAO Jingjing<sup>1</sup>, SHEN Xuanri<sup>1,2</sup>, LI Chuan<sup>1,2</sup>

(1.College of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou 570100, China) (2.Hainan Provincial Engineering Research Centre of Aquatic Resources Efficient Utilization in the South China Sea, Haikou 570100, China)  
(3.Key Lab of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** In this paper, the source of taste-active compounds from tilapia by-products (skin, head, and bone) was investigated. Three types of by-products were hydrolyzed by neutrase, bromelain, flavorzyme, protamex, papain, and alcalase. The relationships between the degree of hydrolysis (DH), molecular weight (MW) distribution, precursor protein, and the characteristics of taste-active compounds were analyzed. The results showed that the highest degree of hydrolysis of the three tilapia by-products was obtained after hydrolysis with flavorzyme for 8 hours, which were 14.29%, 23.7% and 31.86% respectively. The by-products of papain hydrolysis showed significant bitter or sour taste, while the hydrolysate of fish head hydrolyzed by alkaline protease had umami taste, the fish bone hydrolyzed by bromelain had umami taste, and the fish skin hydrolyzed by neutral protease showed umami and sour taste, but the fish head showed bitter taste. By LC-MS/MS, collagen, myofibril proteins, and some sarcoplasmic proteins were important taste-active precursor of the potential taste peptides of tilapia by-products. The MW of most of these potential taste peptides was lower than 1500 u. The hydrophobic amino acid residues in peptides played an important role in the formation of the taste of tilapia by-products, in which methionine contributed to generate umami taste in the by-products hydrolysates.

**Key words:** tilapia by-products; hydrolysis; taste-active compound; precursor protein

引文格式:

甘瑞卿,何燕富,李永成,等.罗非鱼副产物蛋白水解肽的呈味分析[J].现代食品科技,2022,38(7):291-300

GAN Ruiqing, HE Yanfu, LI Yongcheng, et al. Taste analysis of protein hydrolysates from tilapia by-product [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(7): 291-300

收稿日期: 2021-09-29

基金项目: 农业农村部水产品加工重点实验室开放基金 (NYJG201904); 海南大学科研启动基金 (KYQD (ZR) 20047)

作者简介: 甘瑞卿 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工, E-mail: 1023797671@qq.com

通讯作者: 何燕富 (1990-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 水产品加工与贮藏, E-mail: heyfanfu819@163.com; 共同通讯作者: 李永成 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品加工与贮藏, E-mail: lyc2360@sina.com

近年来,消费者对保健食品的需求日益增长,特别是高蛋白食品<sup>[1]</sup>。水产品加工工业每年产生许多副产物,其中鱼类在加工过程中产生的副产物包括鱼头、鱼鳞、鱼皮和内脏等副产物。这些副产物大约占据了整条鱼体的40%<sup>[2,3]</sup>。虽然这些副产物含有潜在生物活性特性的蛋白质和一些其他必需营养素,对它们的合理开发利用将为人类提供丰富的优质蛋白质资源<sup>[4]</sup>,但是这些副产物少部分制成肥料、饲料等<sup>[5]</sup>,大部分主要作为废弃物。因此充分利用这些鱼类副产物,对于更好的利用水产资源、提高水产鱼类加工的附加值和减少加工污染物排放均具有重要的现实意义。

蛋白酶水解可以从不同的样品中提取蛋白质和多肽。这种方法不仅简单有效、可控制,而且不会产生有毒有害的物质<sup>[6]</sup>,并且在蛋白水解过程中会产生各种滋味活性物质,使蛋白酶解液具有各种各样的滋味。滋味是由非挥发性的物质构成的,是鱼类产品整体风味的重要组成部分,好的滋味能为消费者带来强烈的消费欲望。不同来源的鱼副产物、不同的酶制剂和不同的水解条件下获得的鱼蛋白水解物的组分存在差异,因为不同的酶制剂在对蛋白质具有不同的酶切位点,产生不同长度和结构的多肽,因此滋味也存在差异。Yang等<sup>[7]</sup>利用复合蛋白酶水解 *Takifugu obscurus* 副产物获得具有强烈鲜味的多肽,而Fu等<sup>[8]</sup>利用木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶水解牛肌肉得到具有苦味的多肽。过去十年多年,关于呈味的氨基酸类物质的研究较多,特别是禽畜肉类上,但对于酶促蛋白质水解后产生的非挥发性关键肽及其贡献蛋白水解产品的典型味道特征的研究相当零碎。

将多肽组学工具与感官分析结合起来可能是一种很有前景的研究策略,利用这种方法可以监测蛋白酶解过程中关键滋味物质的演化,从而阐明蛋白水解物中的鲜味、苦味和其他异味物质的来源。本实验以罗非鱼鱼皮、鱼头和鱼骨为原料,比较探究中性蛋白酶、菠萝蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶6种蛋白酶的水解特性,并应用多肽组学来研究滋味活性肽的来源,为改善鱼副产物水解物的滋味提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 副产物(鱼头、鱼皮和鱼骨)获取于海口市沿江市场。

中性蛋白酶、菠萝蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶河南圣斯德实业有限

公司。所使用的蛋白酶均为食品级。

盐酸、氢氧化钠、乙醇西陇化工股份有限公司;乙腈、三氟乙酸均为色谱级上海安普实验科技股份有限公司;L-亮氨酸上海源叶生物科技有限公司;N-乙酰-L-半胱氨酸(163.19 u),尿苷(224.2 u),抑肽酶(6512 u),细胞色素(12500 u)和肌红蛋白(17600 u)标准品上海阿拉丁生化科技股份有限公司;邻苯二甲醛混合液(50 mmol/L 邻苯二甲醛(OPA)、50 mmol/L N-乙酰半胱氨酸、20%十二烷基硫酸钠、0.1 mol/L 无水四硼酸钠以体积比 2:2:1:15 避光混合并搅拌 1 h 后使用)本实验室自制。

### 1.2 仪器与设备

高速组织捣碎机,美国 waring 商业公司;手持均质机,上海净信实业发展有限公司;MP511 型实验室 pH 计,上海三信仪器有限公司;水浴恒温振荡器,常州金坛精达仪器制造有限公司;多功能微孔板检测仪,美国伯腾仪器有限公司;TGL-16M 台式高速冷冻离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;LC-MS/MS,赛默飞世尔科技公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 罗非鱼副产物前处理

将三种副产物分别清洗,置于沸水中煮 15 min,灭内源酶活;再进行搅碎、分装,置于-20±2 °C 贮藏,待进一步实验。

#### 1.3.2 罗非鱼副产物蛋白酶解液的制备

在酶解前,分别取适量的三种罗非鱼副产物置于 4 °C 冰箱解冻。按固液比 1:3 (g/mL) 加水,冰浴匀浆(8000 r/min, 3×30 s),将匀浆好的样品用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 溶液调 pH 值至各蛋白酶的最适 pH 值,在恒温水浴震荡摇床中调温度至各蛋白酶的最适温度,分别按照 0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 和 1.0% 的酶添加量加入不同副产物中,选出各种副产物中不同蛋白酶中的最佳酶添加量后,以最佳的酶添加量制备不同副产物蛋白酶解液,酶解完毕后于 100 °C 水浴煮 10 min 灭酶,冷却到室温,在 6000 r/min, 4 °C 下离心 15 min,收集上清液备用。根据表 1 的蛋白酶最适酶解条件,按相同操作制备出相应的蛋白酶解液。

#### 1.3.3 水解度的测定

##### 1.3.3.1 标准曲线的绘制

取 24 支试管分三组,分别加入 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.12、0.16、0.24 mL 5 mg/mL 的 L-亮氨酸标准溶液,用水补足到 1 mL,然后从各个浓度分别

取 10  $\mu\text{L}$  于棕色离心管中, 分别向其中加入 1.2 mL OPA 混合液, 震荡摇匀, 静置 10 min 后, 于 340 nm 处测定吸光度。用未加 L-亮氨酸标准溶液的第 1 支试管作为空白对照。取三组测定的平均值, 以 L-亮氨酸的浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

表 1 各种蛋白酶的最适酶解条件

Table 1 Hydrolysis conditions of each enzyme

蛋白酶种类	副产物种类	酶解温度/ $^{\circ}\text{C}$	加酶量/%	pH	固液比/(g/mL)
中性蛋白酶	鱼皮		0.4		
	鱼头	50	0.8	7.0	1:3
	鱼骨		0.6		
菠萝蛋白酶	鱼皮		0.4		
	鱼头	50	0.6	7.0	1:3
	鱼骨		0.8		
风味蛋白酶	鱼皮		0.8		
	鱼头	50	0.8	7.0	1:3
	鱼骨		0.8		
复合蛋白酶	鱼皮		0.8		
	鱼头	50	0.4	7.0	1:3
	鱼骨		0.4		
木瓜蛋白酶	鱼皮		0.6		
	鱼头	55	0.8	7.5	1:3
	鱼骨		0.6		
碱性蛋白酶	鱼皮		0.6	9.0	
	鱼头	55	0.8	9.0	1:3
	鱼骨		0.8	8.0	

### 1.3.3.2 氨基的测定

取 10 mL 酶解液加入 1.2 mL 的 OPA 混合液, 避光静置 10 min 后, 在波长为 340 nm 处测定其吸光值。总氨基含量是利用 6 mol/L HCl 水解蛋白样品后测定的。按照下式计算水解度:

$$\text{水解度}/\% = \frac{(\text{NH}_2)_x - (\text{NH}_2)_0}{(\text{NH}_2)_{\text{总}} - (\text{NH}_2)_0} \times 100\%$$

式中:

$(\text{NH}_2)_x$ ——样品水解后的氨基含量, mg/mL;

$(\text{NH}_2)_0$ ——样品未水解前的自由氨基含量, mg/mL;

$(\text{NH}_2)_{\text{总}}$ ——样品含有的总氨基含量, mg/mL。

### 1.3.4 肽分子量分布

利用尺寸排阻色谱测定肽分子量的分布。检测条件: Agilent 高效液相色谱仪, BioSepSEC-S2000 色谱柱 (300 $\times$ 4.6 mm; Phenomenex, USA), 洗脱液为 20% 乙腈水溶液加入 0.1% 三氟乙酸, 流速 0.35 mL/min, 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 检测波长为 214 nm。分子量校正曲线所用标准品为 N-乙酰-L-半胱氨酸 (163.19 u), 尿昔

(224.2 u), 抑肽酶 (6512 u), 细胞色素 (12500 u) 和肌红蛋白 (17600 u), 校正曲线方程为:

$$\log \text{Mw} = -0.321t + 6.087$$

式中:

Mw——分子量, u;

t——洗脱时间, min。

### 1.3.5 感官评价

感官评价根据 Fu 等<sup>[8]</sup>提出的方法略作修改。感官评价小组由经过筛选和专业培训的年龄介于 20~25 岁之间的 8 名感官评价员所组成, 4 名男性, 4 名女性。分别以 100 mg/mL 咖啡因、100 mg/mL 谷氨酸钠、50 mg/mL 乳酸和 50 mg/mL 氯化钠作为苦味、鲜味、酸味和咸味四种味觉参比液, 对评价员提前两个月进行感官训练。在室温 (25 $\pm$ 1  $^{\circ}\text{C}$ ) 条件下, 采用九分法来评价每种酶解液的苦味、鲜味、酸味和咸味, 0~3 表示弱、4~6 表示标准和 7~9 表示强烈。

### 1.3.6 LC-MS/MS

#### 1.3.6.1 LC-MS/MS 检测

每个样品取 1  $\mu\text{L}$  总肽经 nano-UPLC 液相系统 EASY-nLC1200 进行分离后联用配备纳升离子源的质谱仪 (Q-Exactive HFX) 进行数据采集。色谱分离采用 100  $\mu\text{m}$  ID $\times$ 15 cm 反相色谱柱 (Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 1.9  $\mu\text{L}$ , Dr. Math) 进行。流动相采用乙腈-水-甲酸体系, 其中流动相 A 为 0.1% 甲酸-98% 水溶液 (乙腈为 2%), B 相为 0.1% 甲酸-80% 乙腈溶液 (水为 20%)。色谱柱以 100% 的 A 相平衡后, 样品由自动进样器直接上样到色谱柱, 再经色谱柱梯度分离, 流速 300 nL/min, 梯度时长 120 min。流动相 B 比例: 2%~5% 持续 2 min, 5%~22% 持续 88 min, 22%~45% 持续 26 min, 45%~95% 持续 2 min, 95% 持续 2 min。质谱分析使用数据依赖性采集模式, 总分析时长为 120 min, 采取正离子检测模式。一级扫描范围 350~1600  $m/z$ , 分辨率为 120 k (@ 200  $m/z$ ), AGC 为  $3e^6$ , 最大离子注入时间 (max IT) 为 50 ms; 一级扫描中强度最高的 20 个离子经四极杆筛选后使用 HCD 裂解后进行碎片离子扫描。四极杆隔离窗口为 1.2  $m/z$ , 标准化碰撞能为 27%, AGC 为  $1e^5$ , max IT 为 110 ms。二级扫描分辨率 15 k。根据色谱峰峰宽, 动态排除时间设为 45 s; 单电荷及 >6 价的离子不进行二级扫描<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.6.2 搜库鉴定和蛋白定量

原始数据文件首先使用 ProteoWizard (version 3.0.18299) 软件转换为 mzML 通用文件格式。质谱谱图数据使用 MSFragger3 软件与对应物种水平的数据库序列 (uniprot-Oreochromis+Niloticus-8128-2020-

10.fasta) 进行搜索匹配, 主要搜库参数采用官方推荐值 (详见 philosopher.yaml)。酶切特异性设为: non-specific; 允许多肽长度范围: 7~25; 可变修饰包括: 15.994915[M], 42.010565[n-term]; [C]无烷基化修饰; 母离子质量精度:  $\pm 20 \times 10^{-6}$ ; 碎片离子精度:  $\pm 20$  ppm。MSFragger 搜库结果随后使用 Philosopher (v3.3.11) [10] 工具集进行后续分析, 主要包括 PeptideProphet (v5.2.1) 用于多肽 FDR (1%) 控制, ProteinProphet (v5.2.1) 用于蛋白 FDR (1%) 控制, freequant 用于多肽 (蛋白) 定量分析, IonQuant [11] 用于蛋白 maxLFQ 定量, 最小允许 1 对离子比值。

### 1.4 数据统计分析

数据采用 SPSS 23.0 进行相关数据的方差分析和显著性检验, 每组实验重复 3 次取平均值, 采用 Origin 2019b 和 GraphPad Prism 8.0 制图; PCA 双曲线图由 SIMCA 14.1 绘制, 从国际蛋白资源库 (https://www.uniprot.org) 中获得尼罗罗非鱼参考蛋白质组。

## 2 结果与分析

### 2.1 水解度

OPA 法测定多肽含量的原理是利用氨基与苯二醛之间在 340 nm 的波长下发生荧光反应 [12]。六种不同蛋白酶对罗非鱼的鱼皮、鱼头和鱼骨的水解程度随时间的变化曲线如图 1 所示。由图可见, 三种副产物均在风味蛋白酶酶解作用下获得最高的水解度 ( $p < 0.05$ ), 其中鱼皮为 14.29% (图 1a), 鱼头为 23.7% (图 1b), 鱼骨为 31.86% (图 1c)。根据作用机制和催化位点, 蛋白酶分为内切酶和外切酶 [13]。内切酶主要作用于肽链的中间位置, 而外切酶则主要作用于肽链两端。风味蛋白酶同时含有内切和外切两种活性酶, 作用位点多, 酶解速率高于其他蛋白酶, 同时产生较多的游离氨基酸也多于其他蛋白酶 [14, 15], 这可能解释了风味蛋白酶酶解物水解度显著高于其他蛋白酶的原因 (图 1); 其他五种蛋白酶均为内切酶, 只作用于肽段中间, 缺乏足够多的端点, 而导致酶解物的水解度低。茆玉婷和丛艳君 [16] 在利用风味蛋白酶、木瓜蛋白酶等六种商业酶水解草鱼内脏蛋白的研究中, 发现经过风味蛋白酶水解的酶解液中富含氨基酸; 而 Zahra 等 [17] 采用碱性蛋白酶和风味酶对虹鳟皮进行水解, 风味酶水解物得到较高的水解度, 与罗非鱼副产物所得结果相一致。

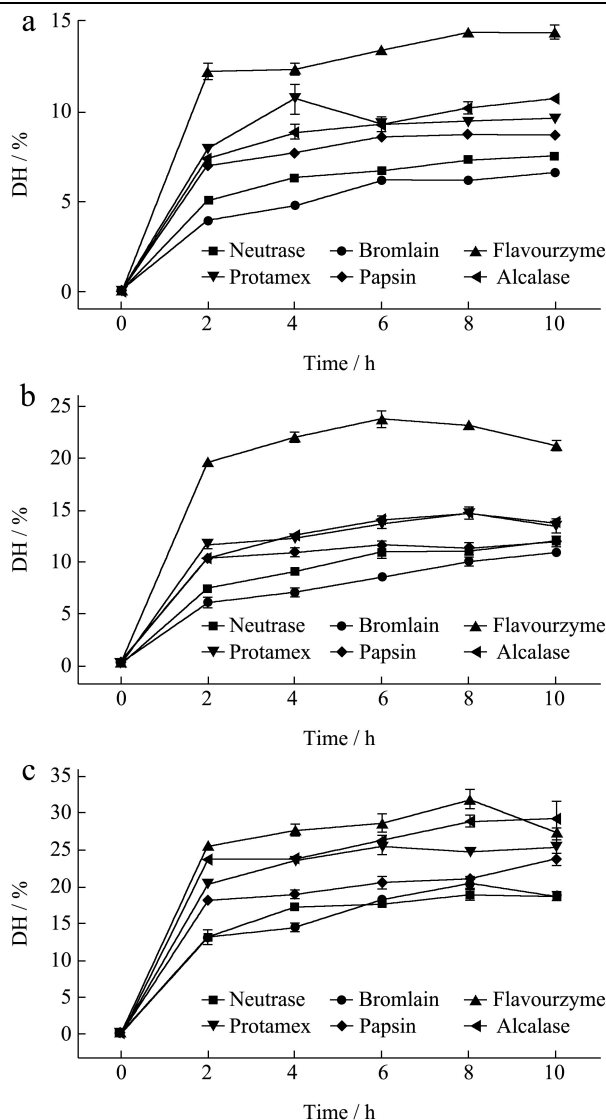


图 1 罗非鱼鱼皮 (a)、鱼头 (b) 和鱼骨 (c) 6 种不同酶解产物的水解度

Fig.1 Degree of hydrolysis curves of protein hydrolysates prepared from tilapia skin (a), head (b) and bone (c) using six different enzymes

### 2.2 感官评价

为了研究蛋白质水解物与感官属性之间的关系, 进行了主成分分析 (PCA) (图 2)。罗非鱼鱼皮蛋白水解物的 PCA 图表示, 第一主成分 (PC1) 和第二主成分 (PC2) 贡献率分别为 50.7% 和 47.1% (图 2a)。经过中性蛋白酶处理的鱼皮蛋白水解液具有标准鲜味 (3.88) 和弱酸味 (2.38), 而经过木瓜蛋白酶处理的蛋白酶解液有标准苦味 (4.36)。图 2b 显示了罗非鱼鱼头蛋白水解度的主成分分析结果 (PC1=65.5% 和 PC2=34%)。经过碱性蛋白酶处理的蛋白酶解液呈现

标准鲜味 (3.88), 经过中性蛋白酶处理的蛋白酶解液有苦味 (4.25)。如图 2c 所示, 罗非鱼鱼骨水解物的主成分分析结果显示, PC1 和 PC2 的贡献率分别为 53.8% 和 31.5%。菠萝蛋白酶处理的蛋白水解液的鲜味强度最高 (6.88), 木瓜蛋白酶处理的水解物有标准苦味 (4.88) 和弱酸味 (2.0)。值得注意的是, 木瓜蛋白酶在三种蛋白水解液中产生不良滋味 (包括酸味和苦味), 碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶分别在鱼头和鱼骨中产生了鲜味, 而中性蛋白酶在鱼皮蛋白水解液中产生了鲜味, 但在鱼头蛋白水解液却产生了苦味。

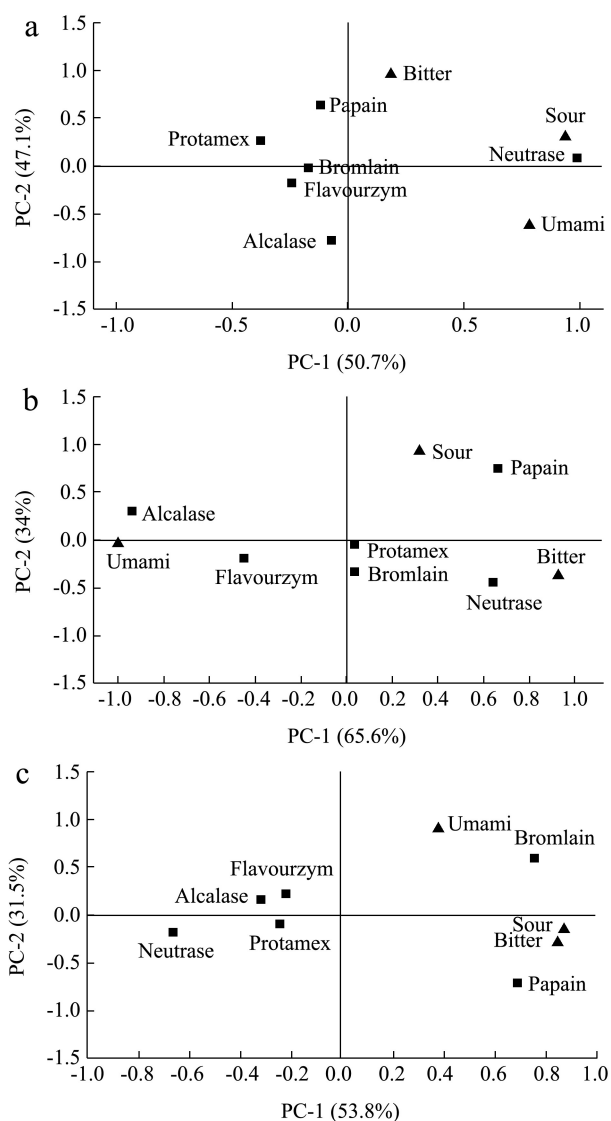


图2 罗非鱼鱼皮 (a)、鱼头 (b) 和鱼骨 (c) 蛋白酶解液感官特性 PCA 图

Fig.2 Bi-plots obtained from PCA based on sensory attributes (umami, sour, bitter and salty) for respective hydrolysates derived from tilapia skin (a), head (b) and bone(c)

蛋白酶解液的感官属性与水解度有关, 尤其与含有疏水氨基酸的低分子量肽的含量有关<sup>[13,18]</sup>。而这种低分子量肽的产生取决于所使用的酶和底物<sup>[19,20]</sup>。木

瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶均为巯基蛋白酶, 这两者的区别在于木瓜蛋白酶的活性位点具有广泛的底物特异性, 包括水解蛋白质和多肽中精氨酸和赖氨酸的羧基末端, 表明它可以释放苦味氨基酸, 如精氨酸、赖氨酸和苯丙氨酸; 而菠萝蛋白酶活性部位不具有特异性, 这可能是木瓜蛋白酶产生酸苦味而菠萝蛋白酶水解的酶解液产生鲜味的原因。同一蛋白酶的不同结果可能是由于底物特异性<sup>[13]</sup>。Maehashi 等<sup>[20]</sup>曾报道, 同一种酶可以在不同水解物中产生不同的味道。这与我们得出中性蛋白酶在不同样品中产生不同滋味的结果相同。

### 2.3 肽分子量分布

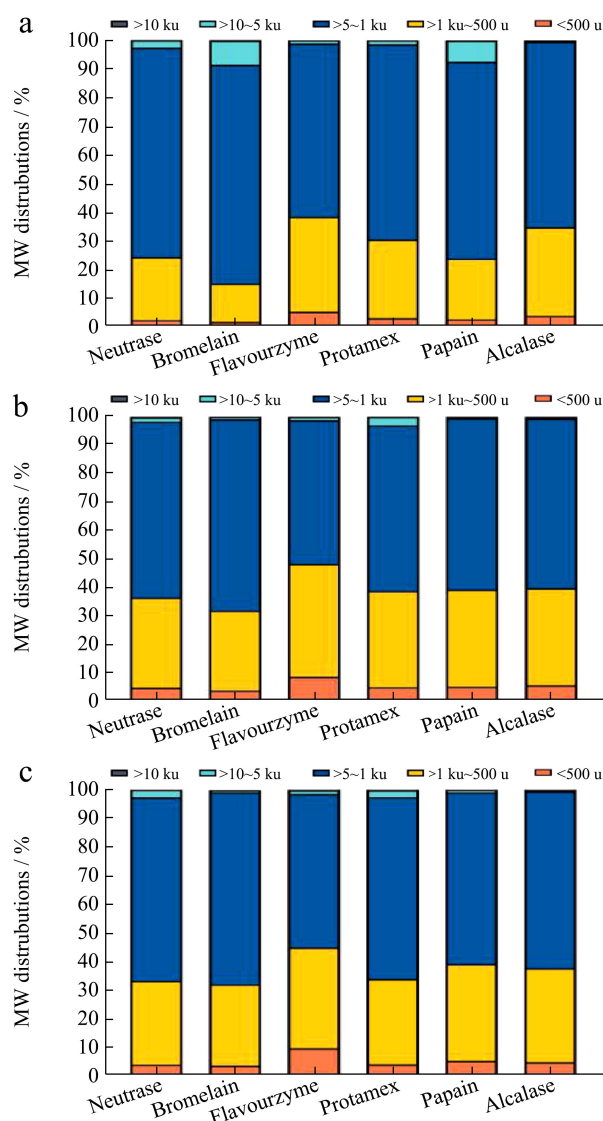


图3 罗非鱼鱼皮 (a)、鱼头 (b)、鱼骨 (c) 蛋白酶解液的肽分子量分布

Fig.3 The MW distribution of protein hydrolysates prepared from tilapia skin (a), head (b) and bone (c) using six different enzymes

图3为罗非鱼鱼皮、鱼头和鱼骨的肽分子量的分布。三种鱼副产物的肽分子量主要分布在 1000~5000 u (60%) 和 500~1000 u (30%)，这表明鱼副产物中的大部分蛋白质被水解成肽(图 3a~c)。从图 3a 可以看出，三种副产物中鱼皮产生较多的大分子肽，这可能是因为鱼皮中含有较多胶原蛋白，使之较难水解<sup>[21]</sup>。研究表明，苦味肽<sup>[22,23]</sup>和鲜味肽<sup>[8]</sup>等滋味肽主要来源于小分子肽。

三种副产物经过风味蛋白酶酶解的蛋白水解液中小于 1000 u 的肽含量最多，这与水解度中风味蛋白酶获得最高的水解度的结果相符合。然而，在风味蛋白酶的水解液中，鲜味、酸味和苦味等滋味不突出。可以解释这个现象的原因有二：一是可能是因为鲜味、甜味或咸味等滋味对苦味有一定的掩盖作用，如鲜味肽可以通过苦味受体抑制苦味<sup>[24]</sup>，导致蛋白酶解液的滋味不显著；二是因为这些蛋白水解液中含有较少的滋味活性肽，使蛋白酶解液的滋味不突出。因此，对中性蛋白酶和木瓜蛋白酶在鱼皮水解产生的滋味特性，碱性蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶对鱼头水解的滋味特性，菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶对鱼骨水解的滋味特性进行了进一步的探究。

### 2.4 潜在滋味活性肽的鉴定

图4表示采用LC-MS/MS鉴定从三种鱼副产物的酶解液中挑选出来具有不同滋味的蛋白酶解液中肽的组成。从鱼皮蛋白酶解中一共鉴定出 5833 个肽，其中在具有鲜味和酸味的酶解液中鉴定出 2106 个肽，而在具有苦味的酶解液中鉴定出 3727 个肽；从鱼头蛋白酶解液中一共鉴定出 8952 个肽，其中具有鲜味的酶解液中鉴定出 1828 个肽，具有酸味的酶解液中鉴定出 3050 个肽，具有苦味的酶解液中鉴定出 4074 个肽；从鱼骨蛋白酶解液中一共鉴定出 6888 个肽，其中具有鲜味的酶解液中鉴定出 2586 个肽，具有苦味和酸味的酶解液中鉴定出 4074 个肽(图 4a)。分别从这些鉴定出来的肽中筛选三种副产物中共有的肽为潜在的滋味肽，分别得到 66 个潜在鲜味肽、271 个潜在酸味肽和 308 个潜在苦味肽(图 4b)。

如图 4c 所示，潜在的鲜味肽的肽段长度主要集中在 9~13 个氨基酸(68.18%)；潜在的酸味肽和苦味肽主要集中在 10~14 个氨基酸(64.21%和 60.06%)。肽段的结构和序列长度会影响其滋味特性，肽段序列长度越长对滋味的影响越大。先前有研究报道，鲜味肽(包括鲜味增强肽)的肽段长度主要集中在 2~15 个氨基酸<sup>[25-27]</sup>，然而苦味肽主要集中在 2~8 个氨基酸<sup>[22,28,29]</sup>。当苦味肽中含有 8 个或 8 个以上的氨基酸的苦味效果与 8 个以下氨基酸构成的苦味肽相差不大

<sup>[30]</sup>。这些结果与以前的研究结果相一致。

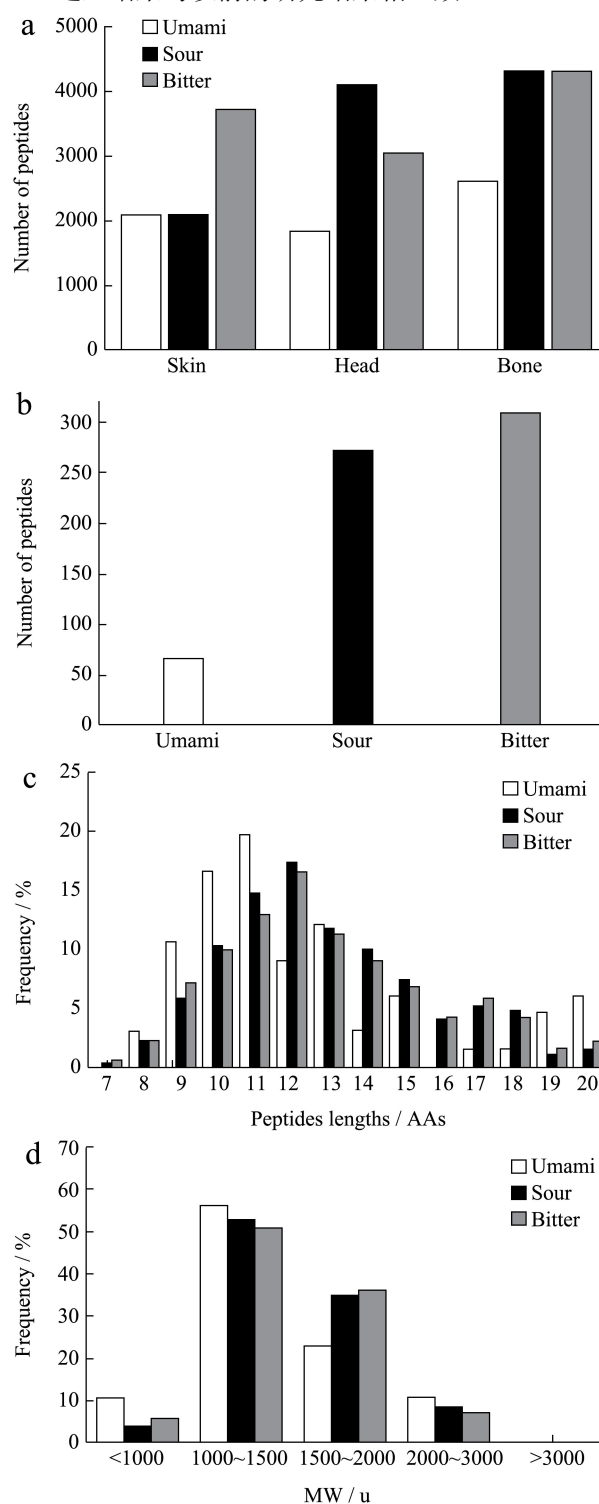


图4 罗非鱼鱼皮、鱼头和鱼骨蛋白酶解液中肽的一般特征  
Fig.4 General characteristic of peptides identified in Tilapia skin, head and bone

注：(a) 三种副产物的肽总数；(b) 潜在滋味肽的数量；(c) 潜在滋味肽的肽长度分布；(d) 潜在滋味肽的分子量分布。

滋味活性肽是一种与滋味有关的寡肽，其分子量小于 3000 u<sup>[31]</sup>由图 4d 可见，鉴定出来的潜在滋味活性肽的分子量均在 3000 u 以下，而大部分的肽的分子

量在 1000~1500 u。潜在的鲜味肽的分子量范围小于 1500 u，而潜在的苦味肽和酸味肽的分子量范围小于 2000 u。据相关报道，鲜味肽的分子量均小于或等于 1000 u<sup>[31,32]</sup>；然而，苦味肽与分子量之间的关系尚不明确<sup>[14,15]</sup>。Cheung<sup>[33]</sup>的研究表明虾酶解液中的肽在 3000 u 时，苦味最大；同样有研究表明分子量在 1900~3300 u 之间的肽是高苦肽段，而较大或较小分子量的肽段则表现出温和的苦度<sup>[34]</sup>。至于酸味肽，其分子量与滋味强度之间的关系尚不明确，仍需要进一步验证。

### 2.5 蛋白酶酶切特异性

利用 LC-MS/MS 确定了三种潜在滋味肽的序列特异性。主要分析四个位置的酶切位点：N 端第二个氨基酸 (P2')，N 端第一个氨基酸 (P1')，C 端第一个氨基酸 (P1)，C 端第二个氨基酸 (P2)。根据酶的特异性，不同的酶可以产生不同类型的肽<sup>[35]</sup>。通常认为肽段的 C 端处含有亲水性的氨基酸残基会产生较好的滋味，而含有疏水性的氨基酸如苯丙氨酸和缬氨酸会增加苦度<sup>[36]</sup>。在三种滋味活性肽中，P1 和 P1' 的位置主要均以异亮氨酸和丙氨酸为主 (图 5)。对比三种滋味活性肽的酶切位点可以发现，蛋氨酸出现在潜在滋味肽的频率高于其他两种。蛋氨酸作为含硫氨基酸虽然本身不会产生肉味，但对酶解液风味的形成具有重要作用<sup>[37]</sup>。图 5a 表明，三种内肽酶 (中性蛋白酶、碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶) 在 P1 和 P1' 处有对不带电荷的非支链残基有优先裂解作用，并且可以发现潜在苦味肽和酸味肽具有相似的酶切位点 (图 5b 和 5c)。这与感官评价结果相一致。并且，三种潜在的滋味肽两端的氨基酸残基均为疏水性。多肽的苦味与肽中是

否存在亲水性基团和碱性氨基酸残基有关，并认为亲水性基团与疏水性基团在空间相距 0.3 nm 时便会产生苦味<sup>[34]</sup>。有报道鲜味肽中含有疏水性氨基酸，而这些疏水性氨基酸通常是与苦味肽有关的<sup>[38]</sup>。从文蛤中鉴定并合成的鲜味多肽和鲜味增强肽的肽段序列中含有较多疏水性氨基酸<sup>[27]</sup>；Ruan 等<sup>[39]</sup>从罗非鱼下颚中提取了五个鲜味肽，其氨基酸序列中多数为疏水性氨基酸。因此，罗非鱼副产物蛋白水解滋味肽可能与疏水性氨基酸有关，并且蛋氨酸可能在有鲜味的酶解液中起到重要作用。

### 2.6 前体蛋白

图 6a 为鉴定的与潜在滋味活性肽相关的前体蛋白，图 6b 表示潜在鲜味肽的前 19 个前体蛋白，图 6c 和图 6d 分别表示潜在酸味肽和苦味肽的前 20 个前体蛋白。胶原蛋白和肌原纤维蛋白，特别是肌动蛋白、肌钙蛋白和肌球蛋白等是潜在滋味活性肽的主要来源蛋白。另外，肌浆蛋白，如 2-磷酸-D-甘油酸水解酶和 L-乳酸脱氢酶等同样对对滋味肽作出贡献 (图 6b~6d)。

先前有研究报道与滋味有关的氨基酸或者小肽可能是肌浆蛋白和肌原纤维蛋白的水解产物<sup>[29,40]</sup>并且由肌钙蛋白 T 产生的多肽可以促进牛肉味的产生<sup>[41]</sup>。然而，肌浆蛋白和肌原纤维蛋白的蛋白水解也会导致不良的滋味<sup>[42]</sup>。这说明肌浆蛋白和肌原纤维蛋白是蛋白酶解液中各种滋味的主要来源蛋白。在目前的实验中，发现滋味活性物质不仅来源于肌浆蛋白和肌原纤维蛋白，而且也有可能来源于胶原蛋白。但是胶原蛋白与滋味活性物质之间的关系还需要进一步探究。

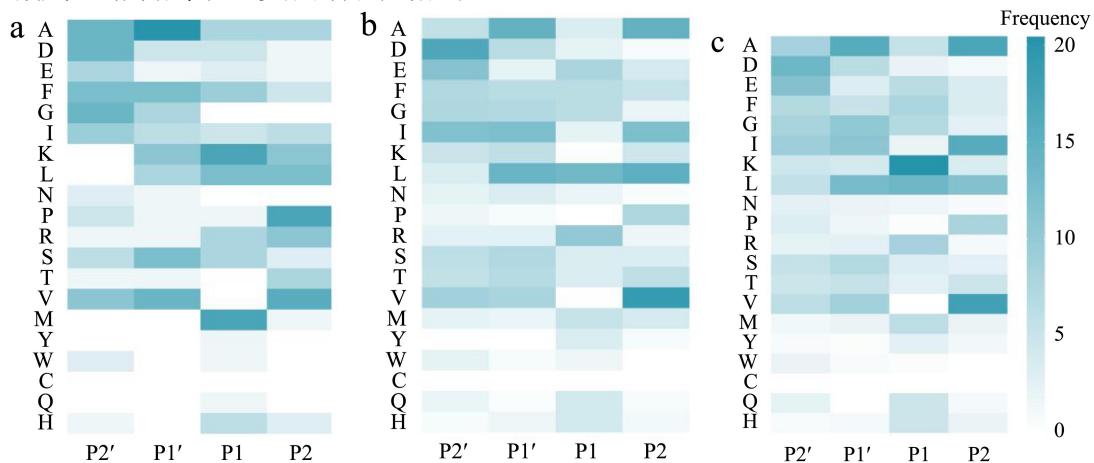


图 5 三种潜在滋味肽末端的序列特异性

Fig.5 Sequence specificity in the terminome of three kinds of potential taste peptides

注：(a) 潜在鲜味肽；(b) 潜在酸味肽；(c) 潜在苦味肽；每列对应 P2~P2'。每种氨基酸的相对丰度如下所示：每种肽在其末端含有氨基酸的总面积除以氨基酸在整个肽链中出现的频率。

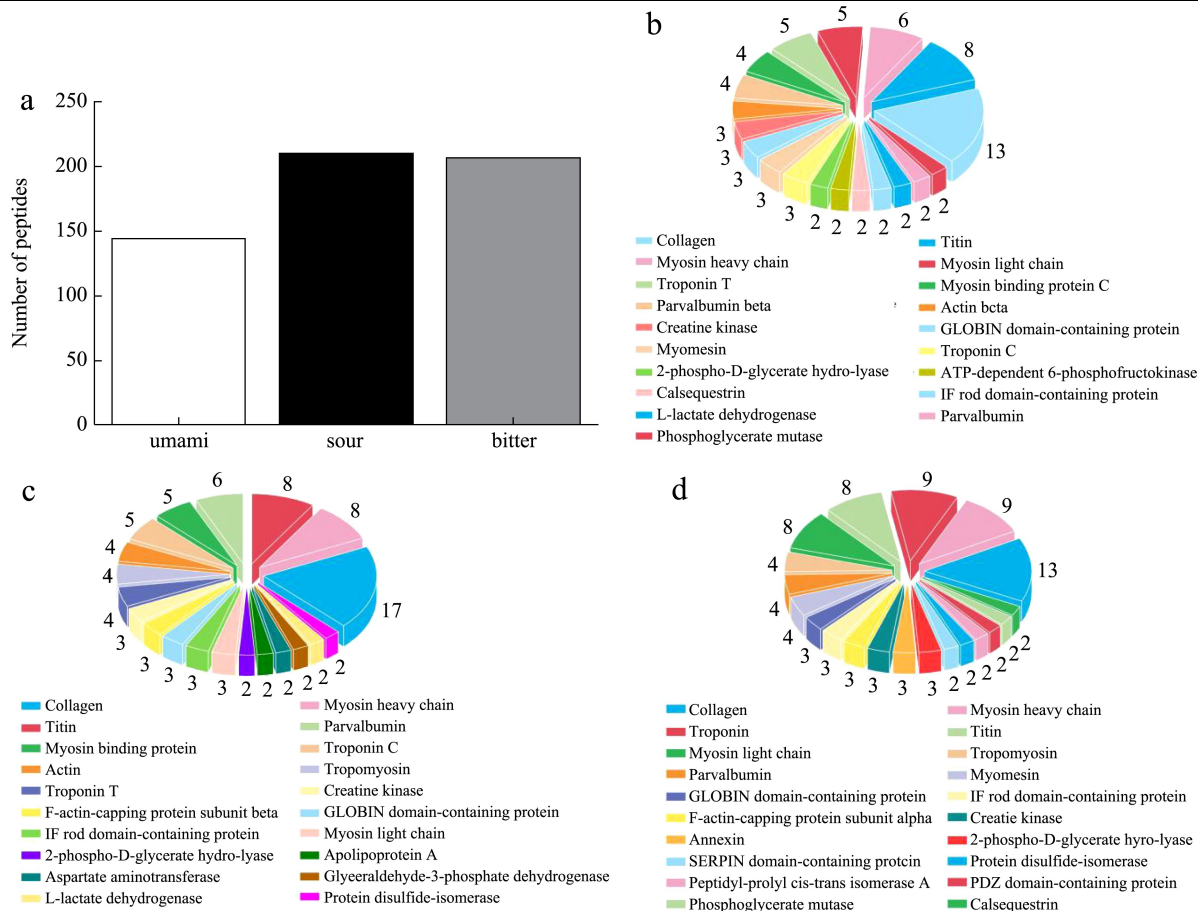


图 6 三种潜在滋味肽前体蛋白的特性

Fig.6 The characteristic of precursor proteins from three potential taste peptide

注：(a) 三种滋味肽的前体蛋白总数；(b) 潜在鲜味肽的前 19 种前体蛋白；(c) 潜在酸味肽的前 20 种前体蛋白；(d) 潜在苦味肽的前 20 种前体蛋白。

### 3 结论

采用六种商业酶来水解罗非鱼三种副产物(鱼皮、鱼头和鱼骨) 选出具有代表性滋味的酶解液, 通过 LC-MS/MS 分析罗非鱼副产物的滋味来源。结果表明鱼皮、鱼头和鱼骨分别经过风味蛋白酶酶解的水解度最高, 分别为 14.29%、23.7%和 31.86%。鱼皮经过中性蛋白酶处理的酶解液具有显著鲜味和弱酸味, 经过木瓜蛋白酶处理的酶解液具有苦味; 鱼头经过碱性蛋白酶处理的酶解液具有显著鲜味, 经过中性蛋白酶处理的具有苦味, 经过木瓜蛋白酶处理的具有酸味; 鱼骨经过菠萝蛋白酶处理的酶解液具有强显著鲜味, 经过木瓜蛋白酶水解的具有显著苦味。罗非鱼副产物蛋白酶解液中潜在滋味肽主要是由胶原蛋白、肌浆蛋白和肌原纤维蛋白降解得到, 其分子量小于 1500 u, 疏水性氨基酸在这些潜在滋味肽中起重要作用, 其中蛋氨酸对鲜味酶解液作出重要贡献。

### 参考文献

- [1] Mullen A M, Alvarez C, Zeugolis D I, et al. Alternative uses for co-products: Harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains [J]. Meat Sci, 2017, 132: 90-98
- [2] Zamorano-Apodaca J C, Garcia-Sifuentes C O, Carvajal-Millan E, et al. Biological and functional properties of peptide fractions obtained from collagen hydrolysate derived from mixed by-products of different fish species [J]. Food Chem, 2020, 331: 127350
- [3] Ponce L E, Gernat A G. The effect of using different levels of tilapia by-product meal in broiler diets [J]. Poult Sci, 2002, 81(7): 1045-1049
- [4] Aspevik T, Oterhals A, Ronning S B, et al. Valorization of proteins from Co- and by-products from the fish and meat industry [J]. Top Curr Chem (Cham), 2017, 375(3): 53
- [5] 张晓岷,戴志远.鱼副产物蛋白水解物生物活性及应用研究进展[J].食品科学,2021,13:335-343

ZHANG Xiaodi, DAI Zhiyuan. Progress in bioactive properties and applications of fish by-product protein



- hydrolysates [J]. Food Science, 2021, 13: 335-343
- [6] Zamora-Sillero J, Gharsallaoui A, Prentice C. Peptides from fish by-product protein hydrolysates and its functional properties: an overview [J]. Mar Biotechnol (NY), 2018, 20(2): 118-130
- [7] Yang Y, Wang W, Liu Y. Umami and bitterness profile of enzymatic protein hydrolysates from cultured *Takifugu obscurus* by-products [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 14(1): 476-484
- [8] Fu Y, Liu J, Hansen E T, et al. Structural characteristics of low bitter and high umami protein hydrolysates prepared from bovine muscle and porcine plasma [J]. Food Chem, 2018, 257: 163-171
- [9] Muller J B, Geyer P E, Colaco A R, et al. The proteome landscape of the kingdoms of life [J]. Nature, 2020, 582(7813): 592-596
- [10] da Veiga Leprevost F, Haynes S E, Avtonomov D M, et al. Philosopher: a versatile toolkit for shotgun proteomics data analysis [J]. Nat Methods, 2020, 17(9): 869-870
- [11] Yu F C, Sarah E H, Teo G C, et al. Fast quantitative analysis of timsTOF pasef data with msfragger and ionquant [J]. Molecular & Cellula Proteomics, 2020, 19: 1575-1585
- [12] P M Nielsen D P, C Dambmann. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis [J]. Journal of Food Science, 2001, 66: 643-646
- [13] García Arteaga V, ApésteGUI Guardia M, Muranyi I, et al. Effect of enzymatic hydrolysis on molecular weight distribution, techno-functional properties and sensory perception of pea protein isolates [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2020, 65: 102449
- [14] Humiski L M, Aluko R E. Physicochemical and bitterness properties of enzymatic pea protein hydrolysates [J]. J Food Sci, 2007, 72(8): S605-611
- [15] Zhou X, Cui H, Zhang Q, et al. Taste improvement of Maillard reaction intermediates derived from enzymatic hydrolysates of pea protein [J]. Food Research International, 2021, 140: 109985
- [16] 茆玉婷, 丛艳君. 蛋白内脏蛋白质的水解特性[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 5-9  
TONG Yuting, CONG Yanjun. Hydrolysis characteristics of proteins from grass carp viscera [J]. Food Science, 2013, 34(9): 5-9
- [17] Yaghoobzadeh Z, Peyravii Ghadikolaii F, Kaboosi H, et al. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptides from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin hydrolysate [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2019, 26(1): 625-632
- [18] K Machashi, Huang L. Bitter peptides and bitter taste receptors [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009, 66(10): 1661-1671
- [19] Raksakulthai R, F H N. Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2003, 43(4): 401-445
- [20] Kenji M, Masato M, Yasushi Y, et al. Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysate of food proteins and characterization of their taste properties [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63: 555-559
- [21] Ahmed R, Haq M, Chun B S. Characterization of marine derived collagen extracted from the by-products of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 135: 668-676
- [22] Teruyoshi M, Hata T. Relationship between bitterness of peptides and their chemical structure [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 2014, 36(8): 1423-1431
- [23] Leksrisompong P P, Miracle R E, Drake M. Characterization of flavor of whey protein hydrolysates [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(10): 6318-6327
- [24] Kim M J, Son H J, Kim Y, et al. Umami-bitter interactions: the suppression of bitterness by umami peptides via human bitter taste receptor [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 456(2): 586-590
- [25] Zhang Y, Gao X, Pan D, et al. Isolation, characterization and molecular docking of novel umami and umami-enhancing peptides from *Ruditapes philippinarum* [J]. Food Chem, 2021, 343: 128522
- [26] Escudero E, Mora L, Fraser P D, et al. Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham [J]. Food Chemistry, 2013, 138(2-3): 1282-1288
- [27] Li X, Xie X, Wang J, et al. Identification, taste characteristics and molecular docking study of novel umami peptides derived from the aqueous extract of the clam *Meretrix meretrix* Linnaeus [J]. Food Chem, 2020, 312: 126053
- [28] Zhao D, Xu Y, Gu T, et al. Peptidomic Investigation of the interplay between enzymatic tenderization and the digestibility of beef semimembranosus proteins [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(4): 1136-1146
- [29] M A Sentandreu, S Stoeva, M C Aristoy, et al. Identification of small peptides generated in Spanish dry-cured ham [J]. Journal of Food Science, 2003, 68(1): 64-69
- [30] 王知非, 林璐, 孙伟峰, 等. 苦味肽和苦味受体研究进展[J]. 中

- 国调味品,2016,41:152-156
- WANG Zhifei, LIN Lu, SUN Weifeng, et al. Research progress of bitter peptides and bitter receptors [J]. China Condiment, 2016, 41: 152-156
- [31] Zhang M X, Wang X C, Liu Y, et al. Isolation and identification of flavour peptides from puffer fish (*Takifugu obscurus*) muscle using an electronic tongue and MALDI-TOF/TOF MS/MS [J]. Food Chem, 2012, 135(3): 1463-1470
- [32] Su G W, 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 Chem, 2012, 135(2): 479-485
- [33] Cheung I W Y, Li-Chan E C Y. Application of taste sensing system for characterisation of enzymatic hydrolysates from shrimp processing by-products [J]. Food Chemistry, 2014, 145: 1076-1085
- [34] 毕继才,崔震昆,张令文,等.苦味传递机制与苦味肽研究进展[J].食品工业科技,2018,39(11):333-338
- BI Jicai, CUI Zhenkun, ZHANG Lingwen, et al. Review in bitter taste transfer mechanism and bitter peptides [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(11): 333-338
- [35] Newman J, Egan T, Harbourne N, et al. Correlation of sensory bitterness in dairy protein hydrolysates: Comparison of prediction models built using sensory, chromatographic and electronic tongue data [J]. Talanta, 2014, 126: 46-53
- [36] Normah I, Jamilah B, Saari N, et al. Chemical and taste characteristics of threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) hydrolysate [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004, 84(11): 1290-1298
- [37] Ong O X H, Seow Y X, Ong P K C, et al. High-intensity ultrasound production of Maillard reaction flavor compounds in a cysteine-xylose model system [J]. Ultrason Sonochem, 2015, 26: 399-407
- [38] Zhang Y, Chandrasekar V, Pan Zh L, et al. Novel umami ingredients: umami peptides and their taste [J]. J Food Sci, 2017, 82(1): 16-23
- [39] Shiyang 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 Chem, 2021, 362: 130249
- [40] Jorge Ruiza, Carmen Garcíá, Mariá del Carmen Díaz, et al. Dry cured Iberian ham non-volatile components as affected by the length of the curing process [J]. Food Research International, 1999, 32: 643-651
- [41] Nishimura T, Ra Rhue M, Okitani A, et al. Components contributing to the improvement of meat taste during storage [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1988, 52(9): 2323-2330
- [42] Harkouss R, Astruc T, Lebert A, et al. Quantitative study of the relationships among proteolysis, lipid oxidation, structure and texture throughout the dry-cured ham process [J]. Food Chemistry, 2015, 166: 522-530
- 
- (上接第 263 页)
- [26] 鞠葛金悦,徐红雨,温靖,等.毛酸浆乳酸菌发酵果汁的体外消化耐受性及抗氧化活性变化[J].现代食品科技,2021,37(7):108-114,56
- JUGE Jinyue, XU Hongyu, WEN Jing, et al. *In vitro* assessment of the digestive tolerance and antioxidation of juice from *Physalis pubescens* L. fermented by *Lactic acid bacteria* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(7): 108-114, 56
- [27] 金迅,刘冬梅,阮晖.凝结芽孢杆菌 13002 的益生特性[J].食品工业科技,2018,39(6):97-101
- JIN Xun, LIU Dongmei, RUAN Hui. Probiotic properties of *Bacillus coagulans* 13002 [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(6): 97-101
- [28] 王金果,张日俊.产乳酸凝结芽孢杆菌 N001 的抗逆性研究 [C]//第六次全国饲料营养学术研讨会暨动物营养学会成立三十周年大会,2010
- WANG Jinguo, ZHANG Rijun. Stress resistance of lactic acid-producing *Bacillus coagulans* [C]// The Sixth National Symposium on Feed Nutrition and the 30th Anniversary of the Founding of the Animal Nutrition Branch, 2010
- [29] 郭芸,董双涛,刘娜丽,等.功能性益生菌菌种的选育和益生性研究[J].中国奶牛,2021,4:42-46
- GUO Yun, DONG Shuangtao, LIU Nali, et al. Research on breeding and probiotics of functional probiotic strains [J]. China Dairy Cattle, 2021, 4: 42-46