

动物源咸味增强肽的研究与应用进展

李欣怡¹, 王晓静², 董馨然¹, 王倩倩¹, 王兆明¹, 徐宝才¹, 徐斐然^{1*}

(1. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 动物源食品绿色制造与资源挖掘安徽省重点实验室, 安徽合肥 230009) (2. 宁夏农农产品质量标准与检测技术研究所, 宁夏银川 750002)

摘要: 长期高钠饮食与多种健康问题直接相关, 包括血压升高、患心血管疾病等。随着人们健康意识的提高, 减盐行动已迫在眉睫, 咸味增强肽因其本身独特的优势成为了目前理想的低钠替代物, 对于减盐产品的开发具有重要的意义和广泛的应用前景。动物源咸味增强肽的开发不仅能够高效利用鸡骨、牛骨、虾蟹等动物产物, 还能作为高效的食盐替代物, 显示出巨大的开发潜力和较高应用价值。因此, 动物源咸味增强肽的研究和开发已成为当前食品科学领域的研究热点。该文以动物源咸味增强肽为对象, 通过综述动物源咸味增强肽的来源、制备技术、分离纯化技术、鉴定技术以及应用现状和前景, 以期为未来动物源咸味增强肽的深入研究和相关减盐产品的研发提供参考依据及理论支撑。

关键词: 动物源咸味增强肽; 制备; 分离纯化; 鉴定; 应用

文章编号: 1673-9078(2025)08-349-358

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.8.0502

Progress on the Research and Application of Savory-enhancing Peptides of Animal Origin

LI Xinyi¹, WANG Xiaojing², DONG Xinran¹, WANG Qianqian¹, WANG Zhaoming¹, XU Baocai¹, XU Feiran^{1*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Key Laboratory for Animal Food Green Manufacturing and Resource Mining of Anhui Province Hefei, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

(2. Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agroproducts of Ningxia, Yinchuan 750002, China)

Abstract: Long-term high-sodium diets are directly related to a variety of health problems, including increase of blood pressure and incidence of cardiovascular diseases. As people's health awareness increases, salt reduction actions are imminent, savory-enhancing peptides have become an ideal low-sodium substitute due to their own unique advantages, which is of great significance for the development of salt reduction products and has a wide range of application prospects. The development of animal-derived savory-enhancing peptides can not only make efficient use of animal products (such as chicken bones, cattle bones, shrimps and crabs), but also serve as efficient salt substitutes, showing great development potential and high application value. Therefore, the research and development of animal-derived savory-enhancing peptides have become a current research hotspot in the field of food science. In this paper, the sources, preparation technologies,

引文格式:

李欣怡,王晓静,董馨然,等.动物源咸味增强肽的研究与应用进展[J].现代食品科技,2025,41(8):349-358.

LI Xinyi, WANG Xiaojing, DONG Xinran, et al. Progress on the research and application of savory-enhancing peptides of animal origin [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(8): 349-358.

收稿日期: 2024-04-17

基金项目: 宁夏回族自治区农业科技自主创新项目 (NKYG-23-04); 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2023BDE03012); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (JZ2024HGTB0226)

作者简介: 李欣怡 (2002 年), 女, 本科生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 1582569609@qq.com

通讯作者: 徐斐然 (1991-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 肉类加工与营养, E-mail: feiranxu@hfut.edu.cn

separation and purification technologies, identification techniques, and application status and prospects of animal-derived savory-enhancing peptides are reviewed, in order to provide a reference basis and theoretical support for the in-depth study of animal-derived savory-enhancing peptides, and the research and development of related salt-reducing products in the future.

Key words: salt-enhancing peptides of animal origin; preparation; isolation and purification; identification; application

人类可区分甜、苦、酸、咸和鲜味五种基本味道, 目前有最新研究证明还有第六种味觉氯化铵^[1]。其中, 咸味是人类必不可少的基本味道之一。然而, 世界卫生组织(WHO)在2023年9月14日发布统计, 全球成人的平均钠摄入量为4 310 mg/d(相当于10.78 g/d的盐), 而世界卫生组织建议的成人钠摄入量应低于2 000 mg/d(相当于<5 g/d的盐)^[2]。高钠饮食与多种健康问题直接相关, 包括血压升高, 患心血管疾病、胃癌、肥胖症、骨质疏松症、梅尼埃病和肾脏疾病的风险增加。据估计, 每年有189万人的死亡与摄入过多的钠有关。

随着公众健康意识的提高, 减盐行动已迫在眉睫。但是, 一味追求降低食品中的食盐添加量可能会损害事物的风味, 降低消费者的食欲和接受度, 无法达到人们对食物“色香味”俱全的期盼。因此, 在提升食品加工品质的过程中需要开发食盐替代物, 以达到为食品生产者提供合适的减盐措施。

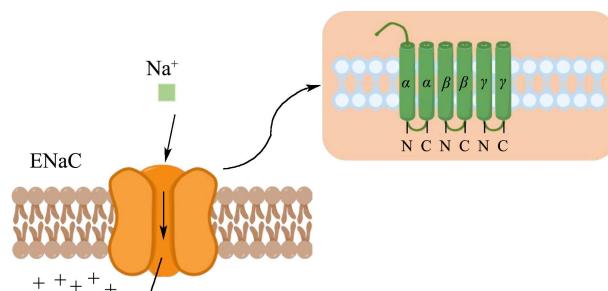


图1 ENaC 受体示意图

Fig.1 Schematic representation of ENaC receptors

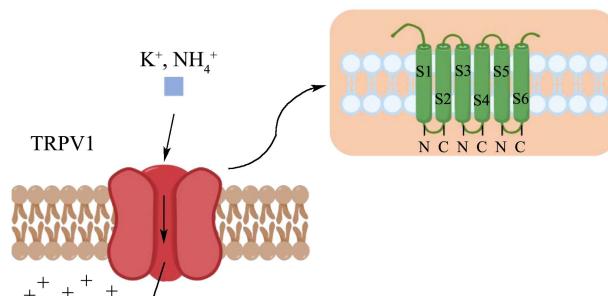


图2 TRPV1 受体示意图

Fig.2 Schematic representation of the TRPV1 receptor

咸味增强多数可通过酶解制得, 少量可以通过氨基酸合成。咸味增强肽是一种特征滋味肽, 其咸味主要与各种阳离子有关, 与阴离子无关^[3]。人体对咸味感知的方式包括利尿剂阿米洛利敏感性(低盐浓度)和阿米洛利不敏感(高盐浓度)^[4], 人类感知咸味的受体通道有ENaCs(上皮钠通道)(图1)和TRPV1(辣椒素受体)(图2), 其咸味转导机制可分为两类, 即低钠阈值刺激和高钠阈值刺激, 它们可以通过人类的偏好和排斥来调节钠的摄入。ENaC负责阿米洛利敏感作用, TRPV1介导阿米洛利不敏感效应^[5]。在中低浓度下, ENaC路线可以使咸味对于人类有吸引力, 而在中高浓度下, TRPV1通道可以调节对钠盐摄入的排斥行为^[6]。Xie等^[7]通过研究评估了260种报告的呈味肽, 推测大多数呈味肽在中性条件下可以以负离子的形式用TMC4受体代替氯离子, 从而产生咸味。

肽的咸味和强度通常受许多因素的影响, 包括氨基酸的类型, 肽链长度和序列。咸味增强肽多数为小肽, 肽链越长, 咸味越不明显^[8]。有研究学者发现, 位于或靠近C末端的氨基酸具有带正电荷的R基团, 如Arg和Lys在肽的咸味增强中起着重要作用^[4]。与带正电荷的R基团相比, 具有负电荷R基团的氨基酸数量更多的肽具有更强的咸味增强效果。精氨酸肽也可以增强咸味, 特别是当以二肽形式存在时。Schindler等^[9]发现一系列含有精氨酸的二肽, 包括Arg-Pro、Arg-Ser、Arg-Gly、Ala-Arg、Arg-Met、Arg-Ala、Val-Arg和Arg-Val具有改善鱼精蛋白消化物和发酵鱼露中咸味的潜力。

由于人体对咸味和鲜味的感知呈正相关, 具有的增进鲜味的氨基酸肽链也可以增进咸味。鲜味肽可以对味精或氯化钠产生协同作用, 从而增强鲜味和盐味^[10]。因此在寻找新的咸肽时也应考虑鲜味氨基酸的作用, 例如Glu和Asp^[11]。

畜牧业、海洋业在加工过程中会产生大量的剩余物, 畜禽、海产副产品利用率低, 如何有效合理地开发利用畜禽、海产副产品, 减少资源浪费和实现环境友好, 这已成为肉类行业的主要社会问题。

动物源咸味增强肽主要原料来源是畜禽肉类、鱼类、虾蟹及其相关副产品^[1]，例如鸡骨、畜禽肉、海产动物等。因此，开发动物源咸味增强肽既可以作为解决畜禽副产物的一种有效方法，又可作为高效的食盐替代物，具有非常好的开发潜能和较高的应用价值。

咸味增强肽作为当前研究的热点，虽然已有大量关于其应用和机制的研究，但针对动物源咸味增强肽的研究综述仍然相对缺乏。本文旨在填补这一空白，通过综合分析最新的研究文献和进展，系统阐述动物源咸味增强肽的研究现状（图3）。本文将介绍动物源咸味增强肽的来源、制备合成技术、分离纯化及鉴定技术，并概述其在食品工业中的应用。通过对以上方面的全面综述，希望为未来动物源咸味增强肽的研究提供参考和理论依据。

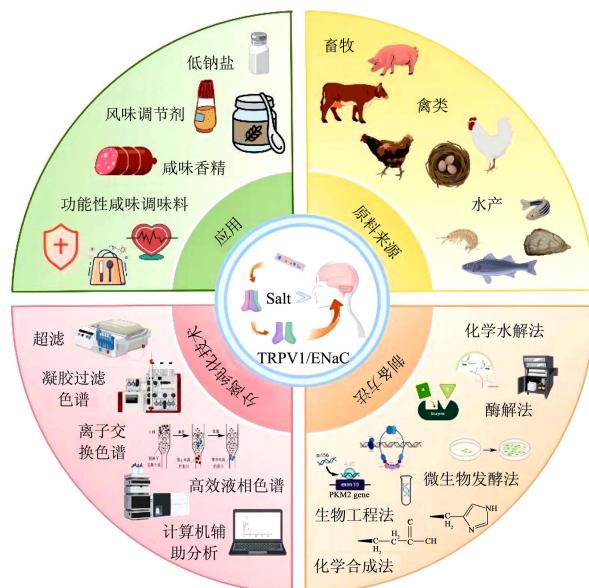


图3 动物源咸味增强肽综述图

Fig.3 Animal-derived savory-enhancing peptides synthesis map

1 动物源咸味增强肽的来源与制备

1.1 动物源咸味增强肽的来源

咸味增强肽的概念首次被明确是在1984年，当时Tada的团队发现了两种不含钠离子但能够提供与氯化钠相似的咸味感觉的多肽，标志着咸味增强肽研究的开启^[1,12,13]。

我国畜类、禽类、水产物种类繁多、资源丰富，包括动物屠宰加工过程产生的骨头、皮毛、内脏、血液等。随着人们对环境保护和资源利用重视程度

的提高且这些畜产物的加工利用率潜力巨大，国内外均快速发展动物副产物的加工技术。表1为动物源咸味增强肽来源。但是目前利用率仍然较低，开发动物源咸味增强肽不失为一种有效的解决办法。

1.1.1 畜类

以畜类为原料开发动物源咸味增强肽可以包括：牛肉、牛骨、制作火腿的边角料等。牛骨是目前开发咸味增强肽选用最多的材料，Zhang等^[14]从牛骨酶解液中分离得到相对分子质量为849.38的多肽，证明其具有较强咸味增强作用；李迎楠等^[15]同样也采用牛骨为原料粉碎后酶解得到质荷比为679.510 9的咸味增强肽组分，可以有效增强咸味；Wang等^[4]从牛骨蛋白酶解物的1 032个肽中鉴定出了肽Lys-Glu-Arg，此肽在NaCl和MSG（味精）溶液中的协同作用可使盐味强度提高65.26%。此外，在加工火腿过程中产生的边角料也可分离提取咸味增强肽，Dang等^[16]从金华火腿的边角料中分离出的呈味肽味道与火腿的肽Trp-Ser-Gl类似。

1.1.2 禽类

以禽类为原料开发动物源咸味增强肽可以包括鸡肉、鸡碎肉、鸡骨等。Yang等^[19]通过利用复合蛋白酶酶水解鸡肉寡肽得到的咸味增强肽将50 mol/L NaCl溶液的盐度提高到63.1 mol/L NaCl溶液的盐度，有效增强了咸味呈味效果。Hong等^[20]用商业蛋白酶Alcalase水解火鸡肉得到的禽肉蛋白具有增强调味料组合物中咸味的能力。陈瑞霞^[21]通过研究证明通过木瓜蛋白酶水解淘汰蛋鸡的鸡肉蛋白酶解物，可赋予咸味风味。

1.1.3 水产

以水产品为原料开发动物源咸味增强肽可以包括鱼肉、鱼露、虾头、贝类等。几个世纪以来，发酵一直被用来增加咸味并增强食物的适口性，Schindler等^[9]证明了鱼蛋白鱼精蛋白被糜蛋白酶和胰蛋白酶消化后筛选出的肽Ser-Thr-Me在发酵鱼露中存在，且具有增咸效果。An等^[26]证实了孟买鸭鱼蛋白经过酶解所得到的肽可以增强咸味。Bu等^[28]通过AlphaFold2建模与分子模拟在海参胶原蛋白中鉴定出新型咸味增强肽Cys-Ser-Arg-Hi和肽Lys-Asp-Ile-Asn-Asn-Arg-Ph。张廷奕等^[32]通过蛋白酶水解罗非鱼鱼皮胶原得到4种咸味增强肽，可以增加18%的咸味强度。

表 1 动物源咸味增强肽来源

Table 1 Source of savory-enhancing peptides of animal origin

来源	分类	种类	拉丁学名	产地	参考文献
畜类	牛源	牛骨	—	中国	[14,15]
	火腿	金华火腿边角料	—	中国浙江	[16]
	火腿	菲律宾火腿	—	菲律宾	[11]
	火腿	巴玛火腿	<i>BamahaM</i>	意大利	[17]
	猪源	猪源肌肉、血浆	—	丹麦	[18]
禽类	鸡肉	鸡肉寡肽	—	—	[19]
	鸡肉	火鸡肉	<i>Meleagris gallopavo</i>	加拿大	[20]
	鸡肉	淘汰蛋鸡鸡肉蛋白	—	中国广东	[21]
	鸡肉	武鼎鸡	—	中国武定	[22]
	鸡肉	三黄鸡	<i>sanhuang chicken</i>	中国	[23]
	禽肉	禽肉	—	—	[24]
	鸡骨	鸡骨	—	—	[25]
	鱼露	鱼精蛋白	—	—	[7]
	鱼肉	龙头鱼(孟买鸭)	<i>Harpodon nehereus</i>	印度	[26]
水产	鱼肉	大黄鱼	<i>Larimichthys crocea</i>	中国	[27]
	鱼肉	大口黑鲈	<i>Micropterus salmoides</i>	北美洲	[28]
	鱼肉	鲟鱼肉	<i>Acipenseriformes</i>	中国	[29]
	鱼肉	鲟鱼肉	<i>Acipenseriformes</i>	中国	[30]
	鱼皮	草鱼鱼皮胶原	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	中国上海	[31]
	鱼皮	罗非鱼鱼皮胶原	<i>Oreochromis spp</i>	中国上海	[32]
	虾	哈氏仿对虾	<i>Parapenaeopsis hardwickii (Miers)</i>	—	[33]
	海参	海参胶原蛋白	<i>Holothuria</i>	—	[34]
	牡蛎	牡蛎	<i>Magallana gigas Thunberg</i>	中国大连	[35]
其他	鸡肝-鱼骨泥	白羽鸡鸡肝-鲣鱼鱼骨泥	—	中国山东	[36]

1.2 动物源咸味增强肽的制备

1.2.1 商业酶解法

酶解是制备咸味增强肽的最常见方法之一, 通过适宜的蛋白酶, 例如风味蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶等酶解蛋白中的肽键, 将大分子蛋白水解为小片段肽, 不同的蛋白酶对同一底物进行酶解也会产生不同的多肽片段^[37,38]。酶水解法可分为单一水解法和复合水解法。史智佳等^[39]以牛骨为原料, 经过酶解后, 在酶解液中会存在不同量的呈味肽, 通过单因素比较三种酶复合蛋白酶(Protamex)、风味蛋白酶(Flavourzyme)、碱性蛋白酶(Alcalase)的水解度, 得出结论: 提高水解度有助于促进酶解液感官品质的提高, 同时对呈味肽的释放具有促进作用。

单一酶的酶水解法制备得到的咸味增强肽会具

有一定的苦味值, 采用复合酶水解法可以在某种程度上克服单一酶水解具有苦味值和效率低下的弊端。高原等^[40]通过复合酶解工艺(复合蛋白酶和中性蛋白酶)从文蛤肉中提取出具有良好增咸效果的多肽含量为21.8 g/L的水解液。李文方^[25]发明出用木瓜蛋白酶、复合蛋白酶在60 °C条件下, 酶解0.53 h, 酶解鸡骨得到酶解液的一种咸味增强肽制备方法。周泓畅^[36]采用木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶1:1的配方, 在适宜的条件下酶解出来的产物具有鲜味、咸味、焦香气味等风味。Zhang等^[14]采用分步酶解法, 先后用复合动物蛋白酶酶解2 h、风味蛋白酶酶解4 h, 得到牛骨酶解物, 通过凝胶色谱柱分离纯化得到最后的咸味增强肽组分。

除了采用复合酶解法降低苦味, 也可采用其他技术辅助酶解法, 例如超声辅助酶解。芦江会

等^[41]研究表明超声辅助酶解法可以通过大幅增加鲜味游离氨基酸的含量,降低龙头鱼蛋白肽的苦味。

酶解法生产咸味增强肽具有许多优点:酶解具有高效性和选择性,可以实现对蛋白质特定肽段的精确切割;反应条件温和、安全性高,所以对环境友好;酶解副反应少并且不会降低蛋白质的营养价值^[37];最值得注意的是对比其他制备方法,酶解法在风味方面可以得到最大的保留。以上优点均为其标准化生产奠定了基础。然而,如何避免酶水解法制备咸味增强肽具有苦味的问题是目前亟待研究的热点。

1.2.2 微生物发酵法

微生物发酵法制备咸味增强肽是指在特定的环境下,利用微生物将原料经过特定的代谢途径发酵产生可水解目标底物的蛋白酶,再通过该酶将蛋白质水解为多肽。目前,微生物发酵中常用的菌种包括乳酸菌、酵母菌和霉菌等,这些微生物可以促进蛋白质水解形成多肽并增强食品风味。传统的鱼露是用高浓度的盐(25%~30%)自然发酵的,其风味物质是通过嗜盐微生物,特别是嗜盐菌的代谢逐渐形成的^[10]。Schindler 等^[9]从鱼露中分离出可以增强咸味的 L-精氨酸二肽^[8]。L-精氨酸二肽则被证明是由担子菌的肽酶从酪蛋白和溶菌酶中释放出来的^[42]。

微生物发酵不需使用化学试剂,安全性更高,可以利用可再生资源作为原料,生产过程环保且可持续;通过控制发酵条件和优化提取纯化技术,可以获得高质量、高纯度的咸味肽。且微生物在酶解的过程中可与多肽水解液协同合作,提高生长能力,效率更高^[43]。但是微生物中不同菌种产生的食品风味效果差异较明显,发酵及代谢过程复杂,不易控制,实际生产应用较少。

1.2.3 化学合成法

化学合成主要是通过氨基酸脱水缩合反应来实现,化学合成法又分为固相合成法和液相合成法。咸味增强肽的肽段不能过长,随着肽段长度的增加,咸味特征会减淡,且液相合成技术适用于大分子的多肽,固相合成技术适用于小分子肽,因此制备咸味增强肽多使用固相合成方法。

固相合成目前主要采用 FMOC 和 BOC 两种方法,合成快捷、容易实现自动化,多应用于小分子多肽的合成^[44]。Feng 等^[45]利用固相合成技术成功合成了具有 kokumi 味道(增强咸味、鲜味、甜味)

的两种咸味增强肽,分别为 Gly-Leu-Pro-Asp 和 Gly-His-Gly-Asp,并通过在鸡汤中的感官评估表明 Gly-His-Gly-Asp 具有强烈的咸味和鲜味。与液相合成法相比,固相合成法由于在合成过程中不需要将肽段从固相载体中脱落,因此具有高效性、高纯度、可自动化以及可控性、灵活性高等特点。目前,固相合成法在咸味增强肽的制备中应用广泛^[46]。

液相合成方法分为逐步合成法和片段合成法。逐步合成法简单快速,适合大部分多肽合成,而片段合成适用于更大的多肽(含有超过 10 个氨基酸)。液相方法由于副产物较多,反应操作较为复杂等原因已逐渐被固相合成方法所替代^[47]。

表 2 动物源咸味增强肽制备方法比较

Table 2 Comparison of methods for the preparation of savory-enhancing peptides of animal origin

制备方法	优点	缺点	参考文献
酶水解法	具有高效性和选择性、副反应少、不会降低蛋白质的营养价值、风味方面可以得到最大的保留	酶解过程会产生苦味	[39]
微生物发酵法	效率高、安全性高、环保可持续、产品纯度高	不同菌种效果差异大、发酵及代谢过程复杂、不易控制、实际生产应用较少	[37]
固相合成法	合成快捷、容易实现自动化	多应用于小分子肽合成	[45]
液相合成法	成本较低	副产物较多,反应操作较为复杂	[50]
生物工程法	成本低、效率高、底物广泛、具有特异性	产物纯度低、对生产条件要求严格、技术尚未成熟	[44]

1.2.4 生物工程法

生物工程法可以通过分析已知咸味肽的氨基酸序列,找到编码这些肽的基因序列,再利用基因重组技术,将这些基因序列插入到适当的载体中,构建出能够表达咸味肽的工程菌或细胞株。这些工程菌或细胞株在适当的培养条件下,能够大量表达并分泌出咸味增强肽^[48]。该方法成本低、效率高、底物广泛,所制备的肽具有良好的特异性^[49]。但微生物生长周期长、产物纯度低,该技术在过程中对生产条件例如温度、pH 值、氧气供应等有严格要求。生物工程法目前技术理论趋于成熟,然而技术尚未应用于动物源咸味增强肽的制备,期望未来进一步研究开发生物工程技术应用于动物源咸

味增强肽的制备。

综上所述,微生物发酵法安全性更高、效率高,但是不同种的微生物产生的风味效果差异较大,不易控制;化学合成多使用固相合成法,液相合成法应用较少;酶水解法反应条件温和、专一性强、副反应少,是目前制备动物源咸味增强肽应用最广泛的制备方法,但是需要注意的是酶水解法会产生不良风味(如苦味)。生物工程法虽成本低、特异性强,但是反应操作要求严格,未来还需进一步研究开发应用于动物源咸味肽的制备。表2汇总了动物源咸味增强肽制备方法。

2 动物源咸味增强肽的分离纯化技术

动物源咸味增强肽的分离纯化技术通常包括超滤、凝胶过滤色谱、离子交换色谱、高效液相色谱等技术。一般只用单一的分离纯化技术无法得到纯度较高的肽,所以通常使用多种分离纯化技术联用的方法,即多级色谱联用技术。

2.1 超滤技术

超滤技术是膜过滤技术的一种,膜过滤多作为多肽纯化的第一步。超滤技术即一种以超滤膜为分离介质,以膜两侧的压力差(0.2~0.6 MPa)为推动力,利用不同孔径的超滤膜对物质进行筛分的过程^[37]。超滤技术的优点是一般在常温下进行,且过滤过程中不发生相变。相比色谱技术,超滤技术也更适合进行物质的大量分离。然而,超滤膜分离最大的问题在于超滤膜的污染和堵塞,这会大大缩短膜的使用寿命。超滤法主要用于1~10 ku分子量肽段的分离。超滤是一种快速高效,可以获得且浓缩目标肽的方法^[50],但需要得到纯化的肽还需要用色谱再次分离纯化,得到单一纯化的肽^[43]。Zheng等^[51]通过对酵母抽提物进行超滤分离,后续结合了凝胶渗透色谱分离和制备型液相色谱分离,经鉴定肽Asp-Asp、Glu-Asp、Asp-Asp-Asp、Ser-Pro-Glu和Phe-Ile均具有呈咸味的特征,可以用做咸味增强肽。

膜过滤一般应用于粗分离的预处理,后续需要再结合其他纯化技术进一步分离纯化得到目标肽。

2.2 凝胶过滤色谱技术

凝胶过滤色谱技术(Gel Filtration Chromatography, GFC)是一种常用的蛋白质纯化分离技术,可以根据分子的流体动力学体积或大小差异来进行分离。

由于GFC通常用于蛋白质纯化的最后一步,因此可以将蛋白洗脱至所需缓冲液中。同时凝胶过滤色谱技术也可脱盐,样品中的盐组分与大分子存在巨大的分子量差异,可以很容易去除掉。Zhang等^[14]通过Sephadex G-15和G-50凝胶色谱柱分离牛骨酶解产物,均在峰II处分别得到一种咸味增强肽,两种咸味增强肽组分的极性较强,具有较强的咸味。凝胶过滤色谱技术具有操作简便、分离效果好、样品回收率高和柱污染小等优点。然而,对样品的纯度要求较高,对于存在较多的杂质或不同分子量的肽混合在一起难以实现良好分离;料液处理量较小,且样品粘度不宜过高以避免分离操作速度过慢。

2.3 离子交换色谱技术

离子交换色谱(Ion-Exchange Chromatography, IEC)是根据固定相与流动相中带电不同的物质间电荷作用的不同,经过交换,从而达到分离效果的一种层析技术,是多肽分离纯化过程中应用广泛的色谱技术^[51]。离子交换色谱柱可分为阳离子柱与阴离子柱,阳离子交换柱用于吸附分离正电荷离子,阴离子交换柱用于吸附分离带负电荷离子^[52]。不同的多肽分离条件有所不同,洗脱剂的离子强度、盐浓度等对纯化效果具有关键性影响。通常情况下,粗颗粒的离子交换树脂用于最初的纯化阶段,离子交换色谱更适用于纯化的早期阶段,而高分辨率的离子交换树脂用于后续的纯化阶段^[53]。

2.4 制备型/半制备型高效液相色谱技术

高效液相色谱技术(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)在多肽的分离纯化和鉴定中应用最多的是反相高效液相色谱(RP-HPLC)。由于多肽具有疏水性氨基酸,可以利用多肽的疏水性在不同介质下进行分离纯化。RP-HPLC具有操作简便、分辨率高和灵敏度高等特点,对比其他动物源咸味增强肽的分离纯化技术,RP-HPLC具有独特的优越性。Kuroda等^[54]通过RP-HPLC分离和定量出加热牛肉汤液中大分子组分中 γ -谷氨酰- β -丙氨酰组氨酸异肽,具有良好的咸味。

2.5 多级色谱联用技术

然而,通常使用单一的分离纯化技术并不能得到目的纯度的组分,从而许多研究者联用多种技术进行肽的分离纯化。Yan等^[55]从罗非鱼下颌中使用了超滤和Sephadex G-15凝胶过滤色谱,分

离纯化出 5 种具有强烈咸味特征的新型肽 Val-Ala-Asp-Leu-Met、Ser-Thr-Glu-Leu-Phe-Lys、Phe-Val-Gly-Leu-Gln-Glu-Arg、Asp-Ala-Leu-Lys-Lys-Lys 和 Val-Val-Leu-Asn-Pro-Val-Ala-Arg-Val-Glu。Dang 等^[16]从金华和帕尔马火腿的水溶性提取物中通过使用 Sephadex G-25 凝胶过滤色谱法和反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 分离纯化得到了来自金华火腿的鲜味肽 Cys-Cys-Asn-Lys-Ser-Val 和来自帕尔马火腿的 Ala-His-Ser-Val-Arg-Phe-Tyr, 结果表明均具有强烈的鲜味特征, 从而可以与 TMC4 受体结合增强咸味^[6]。贾茜^[56]通过使用超滤、凝胶过滤色谱 (GFC) 和反相高效液相色谱 (HPLC) 从金华火腿边角料提取液中分离和纯化咸味呈味肽。党亚丽等^[17]采用 SephadexG-15 凝胶色谱柱和半制备 RP-HPLC 分离纯化得到巴马火腿酶解物 9 个组分, 结合感官分析和电子舌测定得出呈味组分为 G-15-P2-E2, 具有鲜味特征, 从而达到增强咸味的效果。

3 动物源咸味增强肽的鉴定技术

咸味增强肽的风味效果与它的结构有紧密的联系, 氨基酸的种类和肽的空间排列方式可以直接影响到咸味增强肽的风味效果, 因此鉴定咸味增强肽的空间结构和序列对于咸味增强肽的开发利用具有必要性^[11]。目前在鉴定动物源咸味增强肽中可应用的鉴定技术包括液质联用技术、质谱法、计算机辅助分析技术和软电离技术等。

3.1 质谱法

Yang 等^[19]通过 UPLC-MS/MS 鉴定了来自鸡肉肽的两种肽 Asp-Pro-Ser-Asn-Ile-Lys 和 Arg-Thr-Glu-Glu-Leu-Glu-Glu-Ala 具有咸味增强作用。李文婷等^[57]利用液相色谱和质谱联用进行分离、鉴定出五百多个肽, 再结合感官评价与 L-谷胱甘肽进行比较, 结果证明鸡粉溶液的鲜味可以被合成的十肽显著增强, 证明了该肽具有增鲜进而增咸的效果。周泓畅^[36]对鸡肝-鱼骨泥呈味肽分离纯化后, 使用质谱检测法鉴定出氨基酸 D、E、K 和 P 具有咸味的特征。

3.2 液质联用技术

液质联用技术 (UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS) 是一种新发展起来的前沿液质联用技术, 该技术具有不仅具有 UOLC 的高分辨率, 且定性和定量能力较强特点^[58]。Chen 等^[23]以三黄鸡为原料, 采用凝胶

过滤色谱法和反相高效液相色谱法从三黄鸡水解液中分离出 10 种新型肽。接着采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析氨基酸序列得到鲜味增强作用最突出的肽段, 从而达到增咸的效果。

3.3 计算机辅助分析技术

与传统呈味肽研究方法相比, 以计算机辅助分析等技术为代表的新型呈味肽研究方法具有多方面优点, 例如鉴定范围更广、效率更高、结果更准确等^[59]。计算机辅助分析技术包括同源建模、分子对接、分子动力学模拟、虚拟筛选、深度学习等。Wang 等^[4]以牛骨为原料通过 LC-MS/MS 测定了 G5 组分中的肽序列, 为了进一步筛选咸味增强肽, 通过分子对接计算机辅助筛选分析了肽与咸受体之间的相互作用。朱文慧等^[29]以加州鲈鱼为原料, 通过分子对接技术即将 TMC4 受体蛋白模型与筛选得到的肽段进行分子对接, 并根据分子对接结果进行感官评价和电子舌分析筛选得到具有增咸作用的 Glu-Ile-Phe、Asp-Ala-Phe、Arg-Pro-Ala-Leu、Ile-Pro-Val-Met 肽段。Ren 等^[60]以罗非鱼加工副产物为原料, 通过批量分子对接和筛选鉴定出 4 种咸味增强肽, 其中 His-Leu-Asp-Asp-Ala-Leu-Arg 的咸度最高, 其次是 Val-Ile-Glu-Pro-Leu-Asp-Ile-Gly-Asp-Asp-Lys-Val-Arg、Phe-Pro-Gly-Ile-Pro-Asp-His-Leu 和 Asp-Phe-Lys-Ser-Pro-Asp-Asp-Pro-Ser-Arg-His。Bu 等^[28]从大口黑鲈 (Micropterus salmoides) 的肌球蛋白中选取肽。利用 AlphaFold2 软件通过同源建模成功构建了 TMC4 的三维 (3D) 结构, 并通过分子对接鉴定了盐增强肽。

3.4 软电离技术

此外还有近年来随着“软电离”技术的出现而发展起来的新型多肽鉴定技术: 基质辅助激光解吸飞行时间质谱法 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS) 和电喷雾电离质谱法 (Electrospray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS)^[12]。党亚丽等^[17]通过 MALDI-TOF-MS 质谱呈味肽的结构鉴定测定出具有咸味特征的鲜味肽序列。Zhang 等^[14]通过 RP-HPLC 和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 分析纯化得到组分, 鉴定具有出较强极性的咸味增强肽。

各技术在动物源咸味增强肽的鉴定中有各自的优势和局限。LC-MS 和质谱法在高灵敏度和精确度

上表现突出,但成本和操作复杂度较高。软电离技术适合快速、高通量的定性分析,但定量能力有限。计算机辅助分析技术提高了数据处理效率和准确性,是目前较为先进的鉴定技术。根据具体的研究需求和资源,选择最适合的技术或组合技术进行综合分析。

4 动物源咸味增强肽的应用

4.1 低钠盐

目前国民普遍食盐量摄入过高,随着健康观念的普及以及减盐政策的出台,减盐行动已迫在眉睫。目前减盐方法有使用食盐替代物、直接减少食盐、优化食盐结构、优化食品结构以及开发高新加工技术等^[61]。其中最便捷有效的就是开发低钠盐,而作为可以替代钠盐达到减盐不减咸的效果的咸味增强肽成为了首选。张廷奕等^[32]以罗非鱼鱼皮胶原为原料,制备了4种胶原肽的美拉德反应产物,并通过研究发现氨基葡萄糖美拉德反应产物能够使溶液的咸味强度提高18%,具有作为咸味增强肽应用于减盐食品的良好前景^[31]。

4.2 风味调节剂

咸味增强肽除了提供咸味外,还具有改善食品色泽、质地和风味的作用,使得食品外观更加丰富多样或口感更加柔软多汁^[62]。这在加工肉制品、面包和乳制品时尤其有用。此外,咸味增强肽还有一些特殊功能,如抑制酸味和甜味,增强咸味和鲜味^[63]。蔡茜茜等^[64]发明了一种可食用、亲水性、抗氧化性的鱼源咸味增强肽,并标明可以作为风味调节剂,有效增强产品的咸味风味。

4.3 咸味香精

咸味香精是用来增强或模拟食品中的咸味的风味添加剂,可以应用于低钠或无钠食品,也可应用于加工肉类增强风味,有研究学者报道咸味香精调味料的风味正在从刺激嗅觉转向天然柔和的味觉享受,不断创新的健康特征使得这类产品的价值不断提升^[65]。郑家伦等^[66]讨论了两种咸味香精的制备方法:热反应制备和分离纯化制备美拉德反应肽,均具有增强咸香味风味的特征。

4.4 特医食品

咸味增强肽除了具有减盐功能外,部分还具有潜在的健康益处,例如,咸味增强肽可水解为小分

子氨基酸,有望成为制备氨基酸代谢障碍人群的特医食品的成分。此外,咸味增强肽还具有抗氧化、降血压、补充氨基酸的效果,使得咸味增强肽成为开发功能性食品和营养补充剂的可能成分。Schindler等^[9]从发酵鱼露中分离出可以增强咸味的Ser-Thr-Met肽,其结构中Met为人体必需氨基酸,在增强食品咸味的同时,也能具有补充氨基酸的营养功能^[67]。张修正^[68]以海湾扇贝为原料开发出了一种呈味肽,该呈味肽具有提高GSH-Px(谷胱甘肽过氧化物酶)、SOD(超氧化物歧化酶)和CAT(过氧化氢酶)等抗氧化酶的活性,降低体内脂质过氧化产物的堆。类似具有特异功能的咸味增强肽正在开发,并有望应用于特医食品的制备。

5 总结与展望

在追求健康饮食的趋势下,减少食盐摄入已成为公众的一大关注点。咸味增强肽可以提供一种健康的替代方式来减少食品中的钠含量,且同时能保证不牺牲产品的风味特征。目前,动物源咸味增强肽是食品科学与技术领域研究的热点之一,动物源咸味增强肽来源广泛,不仅可以从动物产品中得到,并且在副产物中也存在较丰富的原料。因此,通过开发动物源咸味增强肽,可以有效促进副产品的转化利用,进而为乡村振兴事业提供有力支持。

然而,动物源咸味增强肽的开发仍处于初步阶段,存在亟待解决的问题。首先,在五种基本味觉中,咸味的呈味机理是目前最难探究的,因此动物源咸味增强肽的识别机制、呈味机制、氨基酸组成、空间结构、构效关系等尚未有明确的研究结论。其次,动物源咸味增强肽的制备技术不同,会直接影响产品的品质以及感官评价,目前多数方法仅适用于实验室,为了咸味增强肽的广泛应用,未来需开发出可以投入中试和大规模实际生产的动物源咸味增强肽制备技术;此外,目前动物源咸味增强肽的制备成本较高,出产率较低,还需进一步结合同源建模、分子对接、分子动力学模拟、虚拟筛选、深度学习等计算机辅助技术以及其他新兴技术探索更加高效经济、安全性高的制备技术。动物源咸味增强肽不仅有助于提供减盐健康的食品选择,还可促进可持续发展和资源利用的效率。随着消费者对健康饮食的需求持续增长,动物源咸味增强肽的创新和应用展现出巨大的潜力。

参考文献

- [1] LIANG Z, WILSON C E, TENG B, et al. The proton channel OTOP1 is a sensor for the taste of ammonium chloride [J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 61-94.
- [2] World Health Organization, 2023. Sodium reduction [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction> (accessed 5.26.24).
- [3] 张杰,赵志峰,郝罗,等.减盐策略及低钠盐研究进展[J].中国调味品,2021,46(3):179-184.
- [4] WANG H Y, CHEN D, LU W J, et al. Novel salty peptides derived from bovine bone: identification, taste characteristic, and salt-enhancing mechanism [J]. *Food Chemistry*, 2024, 447: 139035.
- [5] HU Y, BADAR I H, LIU Y, et al. Advancements in production, assessment, and food applications of salty and saltiness-enhancing peptides: a review [J]. *Food Chemistry*, 2024, 453(30): 139664.
- [6] LE B, YU B, AMIN M S, et al. Salt taste receptors and associated salty/ salt taste-enhancing peptides: A comprehensive review of structure and function [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 129: 657-666.
- [7] XIE X, DANG Y, PAN D, et al. The enhancement and mechanism of the perception of saltiness by umami peptide from *ruditapes philippinarum* and ham [J]. *Food Chemistry*, 2023, 405: 134886.
- [8] 张康逸,屈凌波,温青玉,等.咸味增强肽的制备技术研究进展[J].中国调味品,2022,47(6):204-211.
- [9] SCHINDLER A, DUNKEL A, STAHLER F, et al. Discovery of salt taste enhancing arginyl dipeptides in protein digests and fermented fish sauces by means of a sensomics approach [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(23): 12578-12588.
- [10] LI C S, LI W J, LI L H, et al. Microbial community changes induced by a newly isolated salt-tolerant *Tetragenococcus muriaticus* improve the volatile flavor formation in low-salt fish sauce [J]. *Food Research International*, 2022, 156: 111153.
- [11] LI X P, XIE X X, WANG J X, 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 Chemistry*, 2020, 312: 126053.
- [12] GAO T, HUANG X, CHEN X, et al. Advances in flavor peptides with sodium-reducing ability: a review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024, 64(26): 9568-9584.
- [13] TADA M, SHINEDA I, OKAI H. L-ORNITHYLTAURINE, a new salty peptide [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1984, 32(5): 992-996.
- [14] ZHANG S, CHENG X, QIAO X, et al. Isolation, purification and composition analysis of salty peptides from enzymolized bovine bone [J]. *Food Science*, 2012, 33(6): 29-32.
- [15] 李迎楠,刘文营,张顺亮,等.色谱纯化和质谱分析法研究牛骨源咸味增强肽[J].肉类研究,2016,30(3):25-28.
- [16] DANG Y, GAO X, MA F, et al. Comparison of umami taste peptides in water-soluble extractions of Jinhua and Parma hams [J]. *Food Science and Technology*, 2015, 60(2): 1179-1186.
- [17] 党亚丽,张中健,闫小伟,等.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,2010,31(13):127-131.
- [18] FU Y, LIU J, ZHANG W, et al. Exopeptidase treatment combined with Maillard reaction modification of protein hydrolysates derived from porcine muscle and plasma: structure-taste relationship [J]. *Food Chemistry*, 2020, 306: 125613.
- [19] YANG C, MU W, ZHANG C, et al. Isolation and analysis of flavor-presenting substances and umami peptides from soybean and chicken peptides by consecutive chromatography and UPLC-MS/MS [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2024, 126: 105902.
- [20] HONG P K, NDAGIJIMANA M, BETTI M. Glucosamine-induced glycation of hydrolyzed meat proteins in the presence or absence of transglutaminase: Chemical modifications and taste-enhancing activity [J]. *Food Chemistry*, 2016, 197: 1143-1152.
- [21] 陈瑞霞.淘汰蛋鸡蛋白咸味增强肽的制备及其在广式腊肠中的应用研究[D].烟台:烟台大学,2021.
- [22] JIA R, YANG Y, LIAO G, et al. Flavor characteristics of umami peptides from Wuding chicken revealed by molecular dynamics simulation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(7): 3673-3682.
- [23] CHEN M, GAO X, PAN D, et al. Taste characteristics and umami mechanism of novel umami peptides and umami-enhancing peptides isolated from the hydrolysates of Sanhuang chicken [J]. *European Food Research and Technology*, 2021, 247: 1633-1644.
- [24] 向君毅,连晓蔚,谭敏捷,等.一种咸味增强肽及其制备方法和用途:中国,202311247574.4[P].2024-01-26.
- [25] 李文方.一种咸味增强肽的制备方法:中国,201911012484.0[P].2024-03-18.
- [26] CAN A N, XIN W, MEI LING C, et al. Fish enzymatic hydrolysis protein enhances salt taste of Bombay duck [J]. *Journal of China Food Additives*, 2017(1): 135-140.
- [27] LI W, SU G, SUN W. Study on characteristics of salt-enhanced peptides prepared by enzymatic hydrolysis of *Larimichthys crocea* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(6): 184-190.
- [28] BU Y, SUN C, GUO J, et al. Identification novel salt-enhancing peptides from largemouth bass and exploration their action mechanism with transmembrane channel-like 4 (TMC4) by molecular simulation [J]. *Food Chemistry*, 2024, 435: 137614.
- [29] 朱文慧,步营,栾宏伟,等.一种从加州鲈鱼中筛选的咸味增强肽及其应用:中国,202310849863.5[P].2024-04-10.
- [30] WANG N, HAN G, ZHAO Y, et al. Identification and verification of novel umami peptides isolated from hybrid

- sturgeon meat (*Acipenser baerii* × *Acipenser schrenckii*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(45): 17273-17283.
- [31] YU B, WU W, WANG B, et al. Maillard-reacted peptides from glucosamine-induced glycation exhibit a pronounced salt taste-enhancing effect [J]. *Food Chemistry*, 2022, 374: 131776.
- [32] 张廷奕,王灿,李治衡,等.四种还原糖对鱼皮胶原肽美拉德反应产物的理化性质及增咸作用影响[J].食品与发酵工业,2021,47(13):6.
- [33] WANG X, CAN A, CHEN M L, et al. Enzymatic hydrolysis of *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers) protein for enhancing saltiness [J]. *China Condiment*, 2017, 42(5): 12-16.
- [34] BU Y, YING Z, SUN CN, et al. Identification novel salty-enhancing peptides from sea cucumber collagen: alphaFold2 modeling and molecular simulation [J]. *Food and Bioprocess Technology* 2024, 17: 2435-2445.
- [35] FU B, XU X, ZHANG X, et al. Identification and characterization of taste-enhancing peptides from oysters (*Crassostrea gigas*) via the Maillard reaction [J]. *Food Chemistry*, 2023, 424(30): 136412.
- [36] 周泓畅.鸡肝-鱼骨泥呈味肽的制备及其呈鲜机制研究 [D].镇江:江苏大学,2023.
- [37] 罗永康,张恒,洪惠,等.生物活性肽功能与制备[M].北京:中国轻工业出版社,2019.03.
- [38] 汪少芸,杨倩,蔡茜茜,等.食源性功能肽的研究进展[J].食品与机械,2020,36(6):10.
- [39] 史智佳,成晓瑜,陈文华,等.牛骨蛋白酶解制备呈味肽工艺优化[J].肉类研究,2010,2:37-41.
- [40] 高原,陆震鸣,李恒,等.蛋白酶复合水解文蛤肉制备海鲜香料的工艺[J].食品与生物技术学报,2014,33(9):6.
- [41] 芦江会,陈跃文,付晶晶,等.超声辅助酶解对龙头鱼蛋白理化性质及风味特性的影响[J].食品与机械,2023, 11:38-44.
- [42] HARTH L, KRAH U, LINKE D, et al. Salt taste enhancing l-arginyl dipeptides from casein and lysozyme released by peptidases of basidiomycota [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 66(10): 2344-2353.
- [43] 李晓杰,李富强,朱丽萍,等.生物活性肽的制备与鉴定进展[J].齐鲁工业大学学报,2021,35(1):23-28.
- [44] 苏平如.基于配位作用的荧光传感器及其生物成像应用研究[D].兰州:兰州大学,2024.
- [45] FENG T, WU Y, ZHANG Z, et al. Purification, identification, and sensory evaluation of kokumi peptides from agaricus bisporus mushroom [J]. *Foods*, 2019, 8(2): 43.
- [46] 杨明哲,赵子莹,汤华成,等.植物源咸味增强肽制备与应用研究进展[J].食品工业科技,2023,44(20):467-474.
- [47] 朱玥.反向固相多肽合成方法新策略及其应用[D].衡阳:南华大学,2021.
- [48] 丛峰松.神奇的小分子活性肽[M].上海:上海交通大学出版社,2015,5.
- [49] 宋明媚,鞠培培,曹建军,等.化学法合成RGD三肽的研究 [J].生物加工过程,2005,2:23-26.
- [50] KAPEL R, KLINGENBERG F, FRAMBOISIER X, et al. An original use of size exclusion-HPLC for predicting the performances of batch ultrafiltration implemented to enrich a complex protein hydrolysate in a targeted bioactive peptide [J]. *Journal of Membrane Science*, 2011, 383(1-2): 26-34.
- [51] ZHENG Y, TANG L, YU M, et al. Fractionation and identification of salty peptides from yeast extract [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 58: 1199-1208.
- [52] 韩香,顾军.高效液相色谱法在合成多肽分离与纯化中的应用[J].天津药学,2003,6:42-44.
- [53] 李天平,徐斑,吴逢波,等.多肽类物质分离纯化与鉴定方法的研究进展[J].中国药房,2009,20(22):1750-1752.
- [54] KURODA M, OHTAKE R, SUZUKI E, et al. Investigation on the formation and the determination of γ -glutamyl- β -alanylhistidine and related isopeptide in the macromolecular fraction of beef soup stock [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(12): 6317-6324.
- [55] UAN S Y, SUN L P, SUN X D, et al. Novel umami peptides from tilapia lower jaw and molecular docking to the taste receptor T1R1/T1R3 [J]. *Food Chemistry*, 2021, 362: 130249.
- [56] 贾茜.金华火腿天然香精的制备与风味分析[D].上海:上海应用技术大学,2021.
- [57] 李文婷.鸡肉增味肽的分离鉴定及鸡肉香精的制备[D].天津:天津科技大学,2020.
- [58] 李婉秋,李瑞,赵晓熠,等.葵花籽肽ALEPIER呈鲜机制及其鲜味稳定性[J].中国油脂,2023,48(4):33-38.
- [59] 杨动听,王晔洋,杨选,等.食品呈味肽的呈味机制及计算机辅助分析研究进展[J].食品工业科技,2024,45(13):378-388.
- [60] REN H, ZHOU J, FU H, et al. Identification and virtual screening of novel salty peptides from hydrolysate of tilapia by-product by batch molecular docking [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2024, 10: 1343209.
- [61] 向芳.食品减盐策略研究进展[J].食品与发酵工业,2024, 50(6):350-358.
- [62] TANG J, ZHANG Y Y, WU H Z, et al. Recent progress on volatile flavor compounds of traditional Chinese cured meat products [J]. *Food Science*, 2014, 35(15): 283-288.
- [63] 甄宗圆,陈旭,万双菊,等.肉制品低钠盐工艺研究进展[J].肉类研究,2020,34(4):100-106.
- [64] 蔡茜茜,汪少芸,高婷婷,等.一种鱼源咸味肽及其制备方法和应用:中国, CN202311518701[P].2024-03-01.
- [65] 赵曦.咸味香精调味料创新提速[N].消费日报,2021-08-23(A03).
- [66] 郑家伦,李晨,陆利霞,等.美拉德反应制备咸味香精研究进展[J].中国调味品,2016,41(12):129-133.
- [67] 聂鑫,陈泓帆,向露,等.低盐肉制品加工技术研究进展[J].中国调味品,2023,48(6):216-220.
- [68] 张修正.贝类鲜味肽的制备、分离纯化及生物活性研究 [D].烟台:鲁东大学,2023.