

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20220183

大豆低聚肽的分离纯化及呈鲜序列鉴定

穆伟豪, 石可歆, 胡海玥, 杨晨, 汪建明
(天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 为了分析大豆低聚肽中鲜味肽成分, 本文通过纳滤分离结合感官评价对大豆低聚肽进行了初步分离得到鲜味最佳组分 Pb-3, 通过凝胶过滤层析从 Pb-3 中分离出鲜味和增鲜效果最强的 Fb-2, 进一步采用反相高效液相色谱分离出鲜味效果最佳的 Kb-2, 采用超高效液相色谱-串联质谱法从 Kb-2 中鉴定出鲜味肽。结果显示: 与对照组相比, 相对分子质量为 300~500 的大豆低聚肽 Kb-2 具有较强的鲜味和增鲜效果; 鉴定出 3 种鲜味肽, 分别为 2 个四肽 Val-Thr-Val-Glu (VTVE)、Leu-Glu-Lys-Asp (LEKD) 和 1 个三肽 Trp-Glu-Arg (WER)。本研究为大豆低聚肽生产复合调味品提供了理论支持。

关键词: 大豆低聚肽; 纳滤分离; 凝胶过滤层析; 反相高效液相色谱; 鲜味肽

中图分类号: TS201.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2023)03-0009-07

Optimization of Separation and Purification Process of Soybean Oligopeptide and Fresh Sequence Research

MU Weihao, SHI Kexin, HU Haiyue, YANG Chen, WANG Jianming

(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In order to analyze umami peptides in soybean oligopeptides, fractionation guided by sensory evaluation of the extract was performed through nanofiltration and obtained the best umami component Pb-3. Fraction Fb-2, which was found to make the greatest contribution to the strongest umami and umami enhancement, was further fractionated by gel filtration chromatography. A Kb-2 with the best umami effect was further isolated by reversed-phase high performance liquid chromatography. In addition, the umami peptides from Kb-2 were identified by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The results showed that, compared with the control group, the soybean oligopeptide Kb-2 at relative molecular mass 300-500 had stronger umami and fresh-increasing effects. Three umami peptides were identified, including two tetrapeptides Val-Thr-Val-Glu (VTVE), Leu-Glu-Lys-Asp (LEKD) and one tripeptide Trp-Glu-Arg (WER). This study has provided theoretical support for soybean oligopeptide production of complex flavoring.

Key words: soybean oligopeptides; nanofiltration separation; gel filtration chromatography; reversed phase high performance liquid chromatography; umami peptide

大豆富含蛋白质、脂肪、碳水化合物等营养素及钙、磷、铁等矿物质, 是自然界中蛋白质含量最高的植物^[1]。大豆低聚肽是大豆蛋白通过酶解而获得的小分子水解产物^[2], 具有抗氧化、抗疲劳、降血糖、提高免疫力、调节肠道功能等多种生理功能^[3]。大豆低聚肽不仅具有大豆蛋白质所不具备的良好的溶解性及吸水性^[4], 而且其含有的鲜味肽序列对于食品的鲜味

具有非常重要的贡献^[5]。大豆的鲜味也被证实与其他味道存在相互作用, 其中一个显著特点就是抑制苦味^[6]。Kim 等^[7]从大豆中提取了 5 种鲜味肽, 其中 Glu-Glu 鲜味肽序列可以通过与苦味受体结合抑制苦味。因此, 探究大豆低聚肽的分离纯化以及鲜味肽的序列对大豆低聚肽的开发应用非常必要。

目前低聚肽的分离纯化方法主要有大孔树脂层

收稿日期: 2022-07-21; 修回日期: 2022-10-18

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2020KC029)

作者简介: 穆伟豪(1998—), 男, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 汪建明, 教授, wangjianming@tust.edu.cn

析法^[8]、膜分离法^[9]、凝胶过滤层析(gel filtration chromatography, GFC)法^[10]、反相高效液相色谱(reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)法^[11]、离子交换色谱法^[12]等. 随着生物技术的发展,使用单一的分离纯化技术很难将低聚肽从样品中准确分离,必须结合多种方法从而达到最好的分离和纯化效果. Rhyu 等^[3]使用膜分离技术对韩国豆酱中的低聚肽进行分离纯化,结果表明一种相对分子质量在 500~1 000 的低聚肽具有较高的鲜味强度. Kim 等^[13]通过离子交换色谱法结合高效液相色谱法对鳕鱼皮水解物中的抗氧化肽进行分离纯化,结果表明抗氧化肽 C 端存在 Gly-Pro-Hyp 的重复序列. Zhuang 等^[14]结合感觉引导分离法、大孔树脂层析法、中压液相色谱法和反相高效液相色谱法,从酱油中分离出 5 种鲜味肽,并通过超高效液相色谱-串联质谱鉴定肽序列为 ALPEEV、LPEEV、AQALQAQA、EQQQQ 和 EAGIQ. Deng 等^[15]采用连续超滤、凝胶过滤层析和反相高效液相色谱对虾肉进行分离纯化,使用纳米高效液相色谱-质谱联用技术鉴定了 5 条肽段,氨基酸序列分别为 APAP、ASEFFR、AEASALR、LGDVLR、WDDMEK. 邓静^[16]通过超滤、凝胶过滤层析、反相高效液相色谱法对雅鱼鲜味肽进行分离纯化,得到组分 F4 的鲜味值和鲜味提升值最高.

前期研究^[5, 7]表明,大豆低聚肽的不同氨基酸序列在一定程度上影响了食物的鲜味,而通过多种方法结合进行分离纯化得到的低聚肽可以使鲜味肽的呈鲜序列更加准确. 该方法优化大豆低聚肽的生产工艺,指导大豆低聚肽作为鲜味剂的开发应用. 本研究将纳滤分离法、凝胶过滤层析、反相高效液相色谱 3 种方法进行结合,依次对大豆低聚肽进行分离纯化,缩小鲜味肽的相对分子质量,并结合鲜味、增鲜效果等感官评价对其呈味特性进行分析,得到呈鲜效果最好的组分;利用超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)^[17]从中鉴定出鲜味肽的氨基酸序列,对纳滤分离后的鲜味肽进行抑苦作用的研究. 本研究旨在为大豆低聚肽调味品的开发应用提供一定的理论依据,为改善食品风味的研究提供新的选择.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料与试剂

大豆低聚肽(Pb)购自山东天博食品配料有限

公司.

葡聚糖凝胶 Sephadex G-15,分析纯,上海源叶生物技术有限公司;乙腈、甲酸,色谱纯,天津市津科精细化工研究所;三氟乙酸(TFA),色谱纯,上海麦克林生化科技有限公司.

1.1.2 仪器与设备

FD-1A-50 型冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;U120Pro 型紫外-可见分光光度计,翱艺仪器(上海)有限公司;BS-100A 型凝胶柱层析系统,上海青浦沪西仪器厂;半制备反相高效液相色谱仪,德国安捷伦公司;U3000 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;U3000 型超高效液相色谱-串联质谱仪,美国布鲁克公司.

1.2 方法

1.2.1 大豆低聚肽相对分子质量分布测定

根据 GB/T 22492—2008《大豆肽粉》,在 220 nm 的紫外吸收波长下,使用高效凝胶过滤法进行测定,得到大豆低聚肽的相对分子质量及其分布范围.

1.2.2 纳滤分离法分离大豆低聚肽

纳滤分离法具有操作便捷、条件温和等优点,随着膜技术以及制造工艺的发展,纳滤分离法已经应用于食品、医学等各个领域^[18]. 将质量分数为 2% 的 Pb 溶液依次透过截留相对分子质量为 1 000、500、300 的纳滤膜进行分离,得 4 个组分,分别为 Pb-1($M_r > 1 000$), Pb-2($500 < M_r \leq 1 000$), Pb-3($300 \leq M_r \leq 500$), Pb-4($M_r < 300$),各组分浓缩、冷冻干燥后(质量为 m),放于干燥器中保存待用. 按照式(1)计算各组分的得率(R),即各个组分在 Pb 溶液(Pb 的质量为 m_0)中的占比.

$$R = \frac{m}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 凝胶过滤层析(GFC)分离呈味肽

根据 Kong 等^[19]、梁佳明^[20]的方法加以改进. 凝胶层析柱(1.6 cm × 70 cm)填料为葡聚糖凝胶 Sephadex G-15,超纯水平衡 3 h. Pb 组分用超纯水配制成质量浓度为 20 mg/mL 的溶液,进样量 2 mL,超纯水洗脱流量为 2 mL/min,在 214 nm 波长下检测紫外吸收峰,混合收集同一峰下的组分,以 Fb 命名,经浓缩、冷冻干燥后,放于干燥器中备用.

1.2.4 反相高效液相色谱法分离呈味肽

根据 Kong 等^[19]、Zhuang 等^[14]的方法加以改进. 对经凝胶过滤层析得到的感官评分最高的 Fb 组分用半制备反相高效液相色谱法进行分离纯化. 用超纯水配制成质量浓度 20 mg/mL 的溶液,使用色谱

柱为 Shim-pack GIST C18 (10 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为 0.05% TFA-乙腈溶液(A)和 0.05% TFA-水溶液(B), 流量 5 mL/min, 进样量 100 μL. 洗脱梯度: 0 ~ < 10 min, 20% A; 10 ~ 20 min, 20% ~ 50% A, 洗脱液在紫外检测器 214 nm 波长下检测, 混合收集同一峰下的组分, 以 Kb 命名, 经浓缩、冷冻干燥后, 在 -20 °C 条件下保存备用.

1.2.5 感官评价

20 名专业的感官评价人员 (10 名男士, 10 名女士, 年龄 25 ~ 35 岁) 在温度为 (23 ± 2) °C 的感官评价室内采用定量分析法对分离纯化的 Pb 组分进行感官评价^[21], 比较分离后各组分与标准组分的味道, 感官评价人员对分离后的各组分进行 0 ~ 20 分的味觉评分, 并以标准组分的味道评分为 10 分进行比较. 大豆低聚肽的感官评价标准见表 1.

表 1 大豆低聚肽的感官评价标准

Tab. 1 Sensory evaluation of soybean oligopeptide

感官评价	得分/分
味道可有可无	0 ~ 2
味道较弱	3 ~ 4
味道中等	5 ~ 7
味道较强	8 ~ 10
味道强烈	11 ~ 20

在纳滤分离实验中, 以质量分数为 1% 的 Pb 溶液为标准品, 以酸味、甜味、苦味、咸味、鲜味及增鲜作用为标准指标, 进行感官评价. 在凝胶过滤层析分离纯化中, 以质量分数 1% 的感官评价最好的纳滤分离组分为标准品, 以鲜味及增鲜作用为标准指标进行感官评分, 对凝胶过滤层析分离各组分的滋味特性与标准品的对应滋味进行比较. 在半制备反相高效液相色谱分离纯化过程中, 分别以质量分数为 1% 的鲜味和增鲜作用最好的组分为标准品, 对其鲜味及增鲜效果进行感官评分, 其 RP-HPLC 分离各组分的滋味特性与标准品的对应滋味进行比较.

1.2.6 超高效液相色谱-串联质谱法鉴定鲜味肽结构

根据 Liu 等^[22]的方法加以改进. 经过纳滤分离、凝胶过滤层析、反相高效液相色谱三步分离所得的鲜味和增鲜效果评分最高的组分 Kb 进行 UPLC-MS/MS 鉴定. 色谱条件: 进样质量浓度为 2 mg/mL, 色谱柱为 RP-C18 (0.15 mm × 150 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.1% 甲酸-水溶液(A)和 0.1% 甲酸-乙腈溶液(B), 柱温 30 °C, 进样量 5 μL, 洗脱流量 0.2 mL/min, 检测波长 220 nm. 洗脱梯度: 0 ~ < 50 min, 4% ~ 50% B; 50 ~ < 54 min, 50% ~ 100% B; 54 ~ 60 min,

100% B. 质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI) 正离子模式扫描, 雾化气压力 150 kPa, 干燥气温度 180 °C, 干燥气流量 8.0 L/min, 质荷比 (*m/z*) 扫描范围 50 ~ 2 000, 并根据一级质谱信号强度选取前 10 个母离子进行碰撞诱导裂解 (CID) 获得二级质谱.

1.3 数据处理

采用 Origin 2018、SPSS 26.0 软件进行数据统计分析. 每组实验平行 3 次, 测定结果以平均值表示.

2 结果与分析

2.1 大豆低聚肽的纳滤分离

低聚肽往往采用超滤或纳滤等膜分离技术进行初次分离^[23]. 本研究采用截留相对分子质量 ≤ 1 000 的不同纳滤膜依次对 Pb 溶液进行分离, 按照 1.2.2 节的方法, 将 20 mg/mL 的 Pb 溶液依次通过截留相对分子质量为 1 000、500、300 的纳滤膜, 得到 Pb-1 ($M_r > 1 000$)、Pb-2 ($500 < M_r \leq 1 000$)、Pb-3 ($300 \leq M_r \leq 500$)、Pb-4 ($M_r < 300$). 大豆低聚肽纳滤分离各组分得率如图 1 所示.

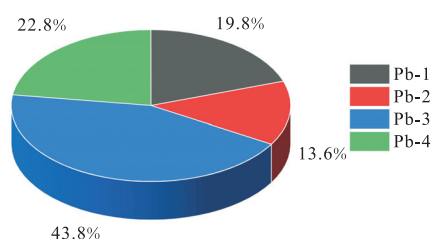


图 1 大豆低聚肽纳滤分离各组分得率

Fig. 1 Separation rates of each component in Pb nanofiltration separations

由图 1 可知, Pb-3 ($300 \leq M_r \leq 500$) 为 Pb 中占比最多的组分. 纳滤分离法是一种依靠压力推动的机械过滤过程, 分离过程比较粗糙, 受氨基酸的极性、纳滤分离过程中的肽聚集、肽分子本身具有的吸附性、溶液中盐离子带有的正负电荷、纳滤膜孔隙形状等多种因素的影响, 在这种过程中很难分离出相对分子质量精确的多肽, 所以进一步采用凝胶过滤层析进行纯化, 以获得更精确的组分^[24].

按照 1.2.4 节的方法对经过纳滤分离后的大豆低聚肽组分 Pb-1、Pb-2、Pb-3、Pb-4 进行感官评价, 结果如图 2 所示.

经纳滤分离得到的 4 个组分感官评价的酸味、苦味、咸味、鲜味强度和增鲜效果都随着相对分子质量的增大呈先增强后减弱的趋势, Pb-2 的苦味最强,

Pb-3 的咸味、鲜味和增鲜效果则显著高于其他 3 个组分, Pb-4 的各种滋味评分均为所有组分中的最低值. 不同的呈味效果与低聚肽的相对分子质量密切相关, 而 Pb-4 组分的相对分子质量过小, 溶液中几乎不含有其他类呈味物质, 呈味效果并不明显. 类似的有, Feng 等^[25]对双孢蘑菇中呈鲜低聚肽成分进行了分离优化, 结果表明, 通过超滤分离的小分子肽 U- II ($300 \leq M_r \leq 3\ 000$) 具有较强的鲜味, U- I ($M_r > 3\ 000$) 具有微弱的鲜味和苦味, U- III ($M_r < 300$) 几乎不具有呈鲜作用; Liu 等^[6]对不同相对分子质量组分 A₁ ($M_r \leq 3\ 000$)、A₂ ($M_r > 3\ 000$) 进行了感官评价, 发现与 A₂ 相比, A₁ 的鲜味更强, 苦味强度相对较弱, 结果表明低相对分子质量组分 A₁ 是影响鲜味的关键活性组分. 因此说明, 不同相对分子质量的低聚肽对于组分的感官评价起着重要的作用, 可以通过膜分离技术得到具有不同风味的低聚肽.

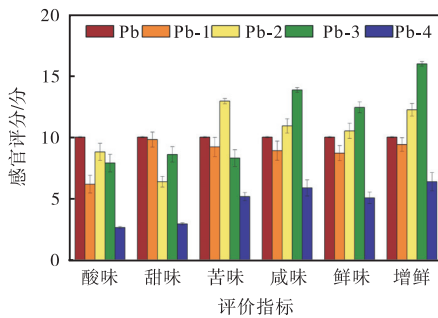


图 2 大豆低聚肽纳滤分离各组分感官评价结果

Fig. 2 Sensory evaluation results of each component in Pb nanofiltration separation

上述结果表明, Pb-3 具有最高的鲜味强度和鲜味增强作用, 由此可以推断 $300 \leq M_r \leq 500$ 的低聚肽对样品的鲜味起到重要作用, 因此收集组分 Pb-3 进行下一步的分离纯化.

2.2 大豆低聚肽的凝胶过滤层析分离

将 Pb 经纳滤分离后鲜味强度最高、增鲜效果最好的组分 Pb-3 通过 Sephadex G-15 凝胶过滤层析分离纯化. 如图 3 所示, Pb-3 经凝胶过滤层析后, 在保留时间 10~60 min 内被洗脱出 3 个峰, 分别标记为 Fb-1、Fb-2、Fb-3. 分别收集多次凝胶过滤层析分离后同一吸收峰下的组分进行感官评价分析.

组分 Pb-3 凝胶过滤层析分离纯化各组分的鲜味及鲜味增强特性如图 4 所示. 将 Pb-3 组分与凝胶分离组分进行分析对比, 以 Pb-3 组分为 10 分标准, 通过凝胶色谱分离得到的 Fb-2 的鲜味得分为 10.5 分, 增鲜得分为 14.9 分, 是组分中最高的且均大于 Pb-3

组分, 说明 Fb-2 具有较高的鲜味强度和较强的鲜味增强效果. 与前期研究结果^[26]保持一致, 即低相对分子质量的组分是食品中的主要味觉活性化合物. 凝胶过滤层析分离是利用凝胶的网状结构, 相对分子质量大的组分在介质中渗透路径越短, 在色谱柱中的保留时间就越短, 从而达到分离的目的^[27], 其对低聚肽的分离效果受到过滤介质、过滤柱高度、流速等不同因素的影响^[28]. 选取鲜味和增鲜效果都较好的组分 Fb-2 继续进行下一步的分离纯化.

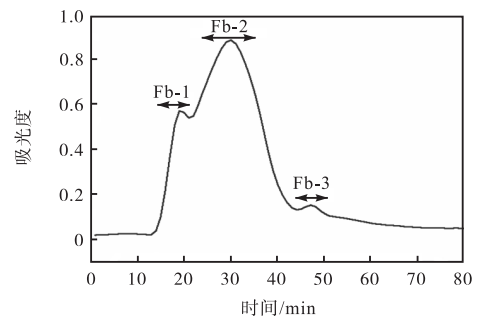


图 3 凝胶过滤层析分离纯化组分 Pb-3 色谱图

Fig. 3 Separation and purification of component Pb-3 by Gel filtration chromatography

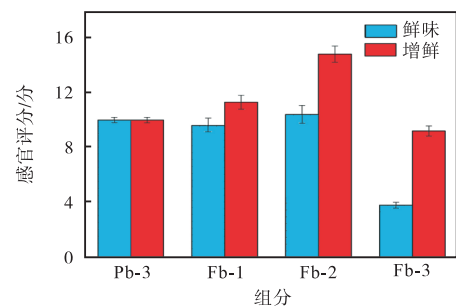


图 4 组分 Pb-3 凝胶过滤层析分离纯化各组分的鲜味及鲜味增强特性

Fig. 4 Umami flavor and umami enhancement characteristics of component Pb-3 and Pb-3 separated by gel filtration chromatography

2.3 大豆低聚肽的反相高效液相色谱分离

反相高效液相色谱分离是通过分子疏水性的强弱对物质进行分离纯化, 具有安全、高效等优点. 李晓明^[29]通过 RP-HPLC 对白玉菇中的鲜味肽进行分离纯化, 得到组分 P1、P2、P3、P4, 其中 P1 的出峰时间最短, 其疏水作用较弱, 具有最佳的鲜味和鲜味增强效果. 庄明珠^[30]对酱油中的鲜味肽进行分离纯化后得到组分 HPLC-1、HPLC-2、HPLC-3、HPLC-4, 结果表明分离的 HPLC-3 组分的鲜味比其他组分的好. 将本研究的凝胶过滤层析分离所得的最优组分 Fb-2 进一步通过反相高效液相色谱法进行分离纯化, 共得

到 3 个组分, 分别为 Kb-1、Kb-2、Kb-3, 其色谱图如图 5 所示。

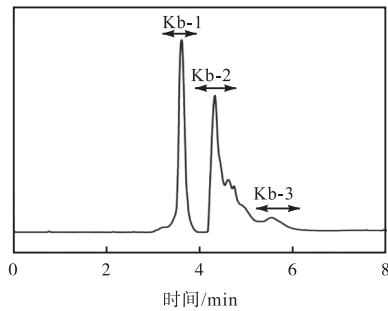


图 5 反相高效液相色谱法分离纯化组分 Fb-2 色谱图
Fig. 5 Separation and purification of component Fb-2 by RP-HPLC

分别收集多次分离后的各个组分进行鲜味及增鲜效果感官评价分析, RP-HPLC 分离纯化组分 Fb-2 各组分的鲜味及鲜味增强特性结果如图 6 所示, 3 个组分中 Kb-2 的鲜味和增鲜效果最佳, 其次为 Kb-1, 而 Kb-3 的鲜味评分低于未经过 RP-HPLC 分离的组分 Fb-2, 表明呈鲜效果较差。选取组分 Kb-2 采用 UPLC-MS/MS 进一步鉴定其氨基酸序列。

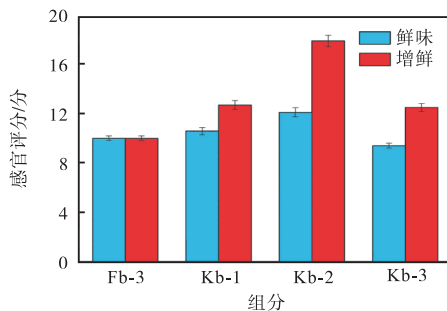
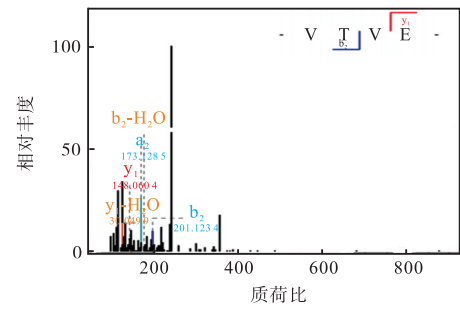


图 6 RP-HPLC 分离纯化组分 Fb-2 各组分的鲜味及鲜味增强特性

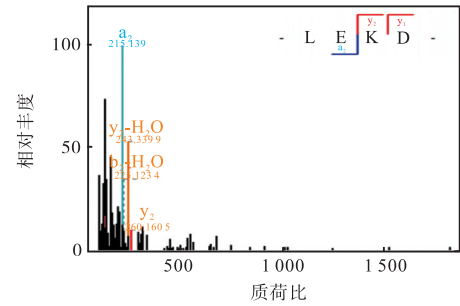
Fig. 6 Umami flavor and umami enhancement characteristics of component Fb-2 separated by RP-HPLC

2.4 UPLC-MS/MS 对鲜味肽的鉴定

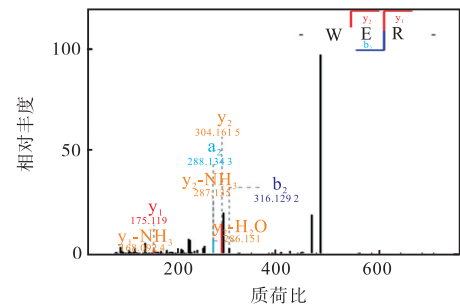
组分 Kb-2 经 UPLC-MS/MS 鉴定出的肽序列结构图如图 7 所示。通过 UPLC-MS/MS 对经过纳滤分离、GFC 分离、RP-HPLC 分离纯化得到的鲜味和增鲜效果最佳的 Kb-2 组分进行鉴定, 得到了 2 个相对分子质量分别为 446.24、503.26 的四肽 Val-Thr-Val-Glu (VTVE)、Leu-Glu-Lys-Asp (LEKD) 和 1 个相对分子质量为 489.23 的三肽 Trp-Glu-Arg (WER)。3 种大豆低聚肽的相对分子质量集中在 440~510 之间, 表明大豆低聚肽具有良好的呈鲜效果。



(a) VTVE



(b) LEKD



(c) WER

图 7 组分 Kb-2 经 UPLC-MS/MS 鉴定出的肽序列结构图

Fig. 7 Peptide sequence structure of component Kb-2 identified by UPLC-MS/MS

梁佳明^[20]使用纳升级超高效液相色谱-串联质谱对牛肝菌中的鲜味肽序列进行分析, 共鉴定出 2 条多肽分别为 LEFKQIAGSF、TVIDAPGHRD, 其中含有较高的鲜味氨基酸, 其水溶液有明显的鲜味。温志鹏^[31]通过 UPLC-MS/MS 对海带鲜味组分进行分析鉴定, 发现 3 种海带鲜味肽, 其氨基酸序列分别为 TDIRPY、KMGYWDA、ESGVIPIY。已有研究^[14]表明 VE、LE、EK、KD、ER 这些氨基酸组成结构都具有强烈的鲜味作用, 而在 Kb-2 组分中鉴定出的 VTVE、LEKD、WER 这 3 条肽链中含有上述氨基酸序列, 因此, 这 3 条肽链对鲜味有重要的贡献。从氨基酸组成来看, 鲜味氨基酸以天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)为主, 组氨酸(H)和缬氨酸(V)可能引起多肽的鲜味。此外, 谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、丙氨酸(A)、甘氨酸

(G)和苏氨酸(T)被认为是甜氨基酸,它们也能引起鲜味^[32-33]。精氨酸(R)或赖氨酸(K)作为C端氨基酸有助于多肽和鲜味受体的相互作用,导致多肽的鲜味强度更高^[31]。

3 结 语

使用纳滤分离、凝胶过滤层析、RP-HPLC依次对大豆低聚肽进行三步分离纯化,结合感官评价结果,得到了鲜味和增鲜效果最强的组分Kb-2,显示大豆低聚肽具有较强的鲜味和增鲜效果,且相对分子质量集中在300~500。对比单一的分步纯化方法,对大豆低聚肽进行逐步分离纯化,更加准确地分离出大豆低聚肽呈鲜部分序列,用UPLC-MS/MS对大豆低聚肽进一步鉴定,得出2个四肽Val-Thr-Val-Glu(VTVE)、Leu-Glu-Lys-Asp(LEKD)和1个三肽Trp-Glu-Arg(WER)。

研究表明,大豆低聚肽中特定的氨基酸序列具有较高的风味活性,可以作为一种新型鲜味剂使用。同时,在鲜味肽分离纯化过程中,区别于目前应用广泛的超滤,采用截留相对分子质量 ≤ 1000 的纳滤膜进行低聚肽的第一次分离纯化,使分离效果更精准。对鲜味肽的鉴定只通过UPLC-MS/MS法进行分析,因此需要进一步通过不同的分离鉴定方法对其肽序列进行鉴定。文章重点研究了不同相对分子质量低聚肽的不同呈味效果,对于分离后的低聚肽的纯度并没有研究,接下来需进一步研究不同分离方法对大豆低聚肽分离纯度的影响,为大豆低聚肽的进一步开发利用提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] XIA K, PITTELLI S, CHURCH J, et al. Kinetic stability of proteins in beans and peas: implications for protein digestibility, seed germination, and plant adaptation[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2016, 64(40): 7649-7657.
- [2] 刘文颖, 谷瑞增, 鲁军, 等. 大豆低聚肽中抗氧化肽的分离纯化及结构鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(2): 44-48.
- [3] 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.
- [4] 戴媛, 冷进松. 大豆多肽的功能性质及应用前景[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2019, 40(2): 132-139.
- [5] DING Y, LI X, KAN J. Isolation and identification of flavor peptides from douchi (traditional Chinese soybean food) [J]. *International journal of food properties*, 2017, 20: 1982-1994.
- [6] LIU Z, ZHU Y, WANG W, et al. Seven novel umami peptides from *Takifugu rubripes* and their taste characteristics[J]. *Food chemistry*, 2020, 330: 127204.
- [7] 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]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2015, 456(2): 586-590.
- [8] 张晓梅. 降血压和降胆固醇大豆肽的分离纯化[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [9] ZHANG Y, JIAO J, LIU C, et al. Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macro porous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography[J]. *Food chemistry*, 2008, 107(3): 1326-1336.
- [10] 赵春燕, 康素花, 荣向华, 等. 凝胶层析分离纯化乳酸菌菌体蛋白条件的优化[J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(22): 47-50.
- [11] 舒一梅, 李诚, 李凌希, 等. 制备型反相高效液相色谱分离猪股骨降血压肽的研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(4): 265-268.
- [12] 程云辉, 毛田米, 黄璐, 等. 大米肽中压离子交换色谱分离及其免疫活性评价[J]. *食品与机械*, 2018, 34(3): 151-155.
- [13] KIM S K, KIM Y T, BYUN H G, et al. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2001, 49(4): 1984-1989.
- [14] 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.
- [15] DENG X, LIN H, AHMED I, et al. Isolation and identification of the umami peptides from *Trachinotus ovatus* hydrolysate by consecutive chromatography and Nano-HPLC-MS/MS[J]. *LWT*, 2021, 141: 110887.
- [16] 邓静. 雅鱼鲜味肽的制备、分离及滋味特性研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2020.
- [17] 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,2018.
- [18] 周丽珍,李艳,孙海燕,等. 膜技术分离纯化花生蛋白酶解液制备活性短肽[J]. 中国油脂,2014,39(10):24-29.
- [19] KONG Y, ZHANG L, ZHAO J, et al. Isolation and identification of the umami peptides from shiitake mushroom by consecutive chromatography and LC-Q-TOF-MS[J]. Food research international, 2019, 121: 463-470.
- [20] 梁佳明. 牛肝菌鲜味肽及呈味特性研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2021.
- [21] ZHANG J, XU J, LIU L, et al. Physicochemical and sensory characteristics of soya protein isolate hydrolysates with added substrate-like amino acids[J]. International journal of food science & technology, 2015, 51(1): 69-77.
- [22] LIU J, SONG H, LIU Y, et al. Discovery of kokumi peptide from yeast extract by LC-Q-TOF-MS/MS and sensomics approach[J]. Journal of the science of food and agriculture, 2015, 95(15): 3183-3194.
- [23] 李学鹏,谢晓霞,朱文慧,等. 食品中鲜味物质及鲜味肽的研究进展[J]. 食品工业科技,2018,39(22):319-327.
- [24] JANG A, LEE M. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates[J]. Meat science, 2005, 69(4): 653-661.
- [25] 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): 43-54.
- [26] KIM Y, KIM E Y, SON H J, et al. Identification of a key umami-active fraction in modernized Korean soy sauce and the impact thereof on bitter-masking[J]. Food chemistry, 2017, 233: 256-262.
- [27] 吕娟,周刚,李振莲,等. 凝胶过滤色谱法测定蛋白胨中多肽的相对分子质量分布[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(15):5131-5136.
- [28] 蒋腾川,宋新波,张丽娟. 凝胶过滤色谱法测定3种不同来源多肽的相对分子质量分布[J]. 食品科学,2014,35(24):312-315.
- [29] 李晓明. 白玉菇中鲜味肽的分离纯化及呈味特性研究[D]. 南昌:江西农业大学,2021.
- [30] 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.
- [31] 温志鹏. 海带鲜味肽的分离纯化、鉴定及性质研究[D]. 广州:华南理工大学,2019.
- [32] 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.
- [33] ZHANG J, SUN-WATERHOUSE D, SU G, et al. New insight into umami receptor, umami/umami-enhancing peptides and their derivatives: a review[J]. Trends in food science & technology, 2019, 88: 429-438.

责任编辑:郎婧