

大球盖菇酶解液中鲜味肽的分离鉴定及其协同增鲜效果分析

陈荣荣^{1,2}, 李文¹, 吴迪¹, 张忠¹, 鲍大鹏¹, 陈万超^{1,3,*}, 张劲松¹, 杨焱^{1,*}
(1.上海市农业科学院食用菌研究所, 农业农村部南方食用菌资源利用重点实验室, 国家食用菌工程技术研究中心, 上海 201403; 2.上海海洋大学食品学院, 上海 201200; 3.上海百信生物科技有限公司, 上海 201403)

摘要: 利用超滤、凝胶过滤色谱结合感官评价和电子舌分析技术, 分离大球盖菇酶解液中鲜味肽组分, 对鲜味最强组分F3中的鲜味肽进行反向高效液相色谱-串联质谱鉴定, 并将鉴定得到的鲜味肽合成后进一步探讨其呈味特性。结果表明, 大球盖菇酶解液F3组分中鉴定得到8条鲜味肽段, 分别为ELWR、RLVDR、KPDNR、AHLRF、LDWDR、LAEWR、DDWWR和EGHKGW, 它们均具有鲜味特征和鲜味增强作用, 阈值分别为0.30~1.33 mmol/L和0.53~2.43 mmol/L; 除LDWDR外, 7条多肽对味精溶液均有不同程度的鲜味提升, 提升幅度0.18%~61.12%, ELWR、RLVDR、KPDNR、AHLRF和EGHKGW 5条多肽在低浓度时表现出良好的鲜味提升效果。RLVDR和KPDNR协同增鲜的鲜味峰值质量浓度为5 mg/mL, LDWDR、LAEWR、DDWWR和EGHKGW在4 mg/mL时达到鲜味峰值。鲜味肽的氨基酸组成和空间结构会影响其味觉属性。本研究结果为大球盖菇鲜味肽的开发利用提供了理论依据。

关键词: 大球盖菇酶解液; 鲜味肽; 分离鉴定; 协同增鲜效果

Separation and Identification of Umami Peptides from the Enzymatic Hydrolysate of *Stropharia rugosoannulata* and Their Synergistic Umami-Enhancing Effect

CHEN Rongrong^{1,2}, LI Wen¹, WU Di¹, ZHANG Zhong¹, BAO Dapeng¹, CHEN Wanchao^{1,3,*}, ZHANG Jingsong¹, YANG Yan^{1,*}
(1. Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; 2. College of Food Sciences & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201200, China; 3. Shanghai Baixin Biotechnology Co. Ltd., Shanghai 201403, China)

Abstract: Umami peptides from the enzymatic hydrolysate of *Stropharia rugosoannulata* were separated by ultrafiltration (UF) and gel filtration chromatography (GFC) combined with sensory evaluation and electronic tongue analysis. Fraction F3, with the strongest umami intensity, were identified by reversed-phase high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS/MS). The identified peptides were synthesized and evaluated for their taste characteristics. The results showed that eight umami peptides were identified in fraction F3, namely ELWR, RLVDR, KPDNR, AHLRF, LDWDR, LAEWR, DDWWR and EGHKGW, and all of them possessed umami characteristics and umami-enhancing effects with thresholds ranging from 0.30 to 1.33 mmol/L and from 0.53 to 2.43 mmol/L, respectively. All peptides except LDWDR showed different degrees of umami improvement in monosodium glutamate (MSG) solution, ranging from 0.18% to 61.12%. ELWR, RLVDR, KPDNR, AHLRF and EGHKGW showed good umami-enhancing effects at low concentrations. The peak concentration of RLVDR and KPDNR for synergistic umami-enhancing effect was 5 mg/mL. LDWDR, LAEWR, DDWWR and EGHKGW reached the umami peak at 4 mg/mL. The amino acid composition and the

收稿日期: 2023-02-22

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(2020-02-08-00-12-F01484); 上海市青年科技启明星计划项目(20QB1400900)

第一作者简介: 陈荣荣(1997—)(ORCID: 0000-0003-2572-9546), 女, 硕士研究生, 研究方向为食用菌风味成分分析及产生机制。E-mail: 2573092923@qq.com

*通信作者简介: 陈万超(1987—)(ORCID: 0000-0002-2490-8860), 男, 助理研究员, 博士, 研究方向为食用菌加工与产品开发。E-mail: chenwanchao@saas.sh.cn

杨焱(1971—)(ORCID: 0000-0003-1421-8003), 女, 研究员, 博士, 研究方向为食用菌功能营养与精深加工。E-mail: yangyan@saas.sh.cn

spatial structure of umami peptides could affect their taste properties. The results of this study provide a theoretical basis for the development and utilization of umami peptides from *S. rugosoannulata*.

Keywords: enzymatic hydrolysate of *Stropharia rugosoannulata*; umami peptide; isolation and identification; synergistic umami-enhancing effect

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230222-203

中图分类号: TS255.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 01-0065-10

引文格式:

陈荣荣, 李文, 吴迪, 等. 大球盖菇酶解液中鲜味肽的分离鉴定及其协同增鲜效果分析[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 65-74.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230222-203. <http://www.spkx.net.cn>

CHEN Rongrong, LI Wen, WU Di, et al. Separation and identification of umami peptides from the enzymatic hydrolysate of *Stropharia rugosoannulata* and their synergistic umami-enhancing effect[J]. Food Science, 2024, 45(1): 65-74. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230222-203. <http://www.spkx.net.cn>

鲜味是继酸、甜、苦、咸之后的第5种基本味道, 因其口感丰富和愉悦被认为是一种重要的食品风味^[1-2]。研究发现, 许多物质如氨基酸、核苷酸、有机酸、无机盐、多肽等均具有鲜味^[3], 而天然来源的鲜味肽因其愉悦的口感和生理活性也引起越来越多学者关注。1978年, Yamasaki等^[4]用木瓜蛋白酶处理牛肉肉汁, 通过凝胶过滤、离子交换树脂层析和纸电泳, 从中分离出一种八肽(H-Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala-OH)并命名为鲜味肽。随后, 研究者逐渐在许多动物^[5]、植物^[6]、水产品^[7-9]以及菌物^[10-12]等食品中分离鉴定了上百种鲜味肽。鲜味肽作为新型鲜味物质, 不仅可以通过协同作用或美拉德反应补充或增强食品原有风味^[13-15], 还能带来愉悦的味觉感受; 同时, 鲜味肽能提供肽及氨基酸类的营养成分, 更符合“天然、营养、安全”的食品发展理念^[16], 在食品领域中具有极大的开发应用前景。

鲜味肽广泛存在于各类食品中, 而动植物、水产品等主要鲜味来源的原材料制备鲜味肽的成本相对较高, 寻找更多的鲜味食物资源对未来天然鲜味肽基料的发展尤为重要。我国是食用菌生产大国, 食用菌蛋白含量高、味道鲜美, 是制备鲜味肽的理想原料^[17]。Chang Jincui等^[12]对真姬菇中的鲜味肽研究发现, 酶解后的样品通过超滤、凝胶过滤色谱、反向高效液相色谱和超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱分离鉴定得到鲜味肽EGTAG, 经感官评价发现EGTAG在水和鸡汤中的鲜味阈值分别为8.26 mmol/L和10.04 mmol/L, 具有良好的鲜味特性。李雪^[18]从蟹味菇中提取得到一个呈味肽, 其序列为Glu-Gly-Thr-Ala-Gly, 具有呈鲜特性, 且能引起鸡汤的浓厚感。Song Shiqing等^[10]采用水提、酶解提取和高压蒸煮法分别从美味牛肝菌中获得421、713条和616条肽段, 其中DGF、HHYE和KCGQ表现出与味精(monosodium glutamate, MSG)的鲜味协同效应。

大球盖菇(*Stropharia rugosoannulata*)又名赤松茸, 属于伞菌目、球盖菇科、球盖菇属^[19], 色泽鲜艳、

肉质细嫩, 具有“素中之荤”的美誉^[20], 且营养丰富, 烹饪时有肉香味, 富含必需氨基酸、维生素、蛋白质、多糖等营养成分^[21], 其子实体干品中粗蛋白质量分数高达30%, 是制备鲜味肽的优质原料。目前, 关于大球盖菇的研究主要集中在栽培方面, 对于其呈味特性研究进展缓慢。Li Wen等^[22]对超声制备的大球盖菇多肽的结构与抑制血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)之间的机制进行研究, 发现超声处理后的肽主要为八肽、九肽和十肽, 多肽中氨基酸主要是疏水氨基酸, 活性肽与ACE的对接结果表明, 氢键相互作用是ACE与多肽相互作用的主要方式。Chen Wanchao等^[23]对大球盖菇水提物中的鲜味肽进行鉴定发现5条肽, 分别为EPLCNQ、SGCVNEL、PHEMQ、SEPSHF和ESCAPQL, 鲜味阈值在0.167~0.390 mmol/L范围内。Li Wen等^[24]通过虚拟筛选、电子舌验证和分子对接技术, 对超声辅助定向酶解法制备的47种大球盖菇鲜味肽的结构与味觉活性关系进行了分析, 发现鲜味肽能与鲜味受体T1R1/T1R3形成氢键相互作用和静电相互作用, 多肽N-端和C-端氨基酸残基在与受体结合形成中起着重要作用。已有的报道主要聚焦于大球盖菇超声辅助酶解及水提的多肽活性及风味评价, 实验前期利用内外切酶对大球盖菇进行分步酶解, 获得肽含量及呈鲜效果显著提升的鲜味肽基料, 但其鲜味肽的结构及呈鲜特性尚需进一步研究。

本研究以大球盖菇子实体为原料, 利用中性蛋白酶和风味蛋白酶对子实体进行内外切酶分步酶解, 采用超滤、凝胶过滤色谱(gel filtration chromatography, GFC)和反向高效液相色谱-串联质谱(reversed-phase high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, RP-HPLC-MS/MS)技术结合感官评价和电子舌分析, 从大球盖菇酶解液中分离纯化并鉴定出8条鲜味肽, 并对其合成及呈味特性分析, 同时评价其与MSG的协同增鲜效果, 并比较鲜味肽与其组成氨基酸

混合物的呈味差异, 以期为大球盖菇鲜味肽产品的开发和应用提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

大球盖菇 上海菇林源菌业专业合作社。MSG、蔗糖、食盐 市购。

氢氧化钠、浓盐酸 国药集团化学试剂有限公司; 中性蛋白酶 (6×10^4 U/g)、风味蛋白酶 (3×10^4 U/g) 北京索莱宝科技有限公司; Sephadex G-15葡聚糖凝胶瑞典Cytiva公司; 柠檬酸(食品级) 北京萃锋科技有限公司; 异亮氨酸(食品级) 北京爱普锐晟科技有限公司; 乙腈、三氟乙酸和甲酸(色谱级) 美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 仪器与设备

QE-400粉碎机 浙江屹立工贸有限公司; MA100水分测定仪 德国Sartorius公司; Allegra 25R Centrifuge离心机 美国Beckman公司; SA-402B味觉分析系统日本INSENT公司; RP-HPLC-MS/MS仪(Thermo Easy NLC液相色谱仪, Thermo Scientific Q-Exacte Orbitrap质谱仪) 美国Thermo Fisher Scientific公司; ZWY恒温培养振荡器 上海智城分析仪器制造有限公司; DGG-9240B电热恒温鼓风干燥箱 上海森信实验仪器有限公司; pH计 北京莱万生物技术有限公司; 超滤膜分离装置 美国Millipore公司; AKTA™ flux 6超滤设备、AKTA pure蛋白纯化系统、Superdex™ 30 Increase 10/300 GL凝胶色谱柱 美国通用电气医疗公司。

1.3 方法

1.3.1 大球盖菇酶解液的制备

新鲜大球盖菇子实体简单清洗后, 烘干至水分质量分数低于10%, 将烘干后的大球盖菇粉碎后过100目筛备用。根据实验前期已优化的高肽含量和风味良好的分步酶解条件, 选取中性蛋白酶和风味蛋白酶对大球盖菇粉进行分步酶解, 酶解温度为50℃, 料液比为1:30(g/mL), 先加入1 175 U/g中性蛋白酶酶解76 min(pH 7.5), 再添加490 U/g风味蛋白酶继续酶解20 min(pH 7.0), 反应结束后100℃沸水浴10 min, 冷却至室温后, 8 000 r/min离心15 min收集上清液备用。

1.3.2 酶解液的超滤分离

鲜味肽的分子质量主要集中在3 000 Da以下^[25], 上述方法制备的酶解上清液经0.45 μm水系滤膜过滤, 选取3 000 Da的超滤管进行截留(25℃、 $\Delta P=0.60$ bar、400 r/min), 获得U1(>3 000 Da)和U2(<3 000 Da)两个组分, 冷冻干燥后储存于-80℃备用。

1.3.3 GFC分离

参考Chen Wanchao等^[23]的方法略微修改, 冻干后的U2组分用超纯水配制成100 mg/mL的溶液, 经0.22 μm水系滤膜过滤后, 加载到层析柱中。具体参数设置如下: 样品上样量2 mL, 洗脱液为超纯水, 流速0.75 mL/min, 紫外检测波长220 nm, 经自动收集器收集不同组分, 冷冻干燥后进行感官和电子舌评价。

1.3.4 RP-HPLC-MS/MS鉴定多肽序列

样品处理: 参考Li Wen等^[22]的方法稍作修改。对凝胶分离出的鲜味最佳组分用ZipTip C₁₈除盐处理, 样品用0.1%三氟乙酸溶液溶解, 17 000×g离心10 min, 取上清液备用。经多次润洗后, 取10 μL 60%乙腈-0.1%三氟乙酸溶液将样品洗脱至离心管并真空干燥备用。

色谱条件: nanoViper C₁₈分析柱(75 μm×150 mm, Acclaim PepMap RSLC C₁₈, 2 μm, 100 Å), 流动相A为0.1%甲酸溶液, 流动相B为0.1%甲酸和80%乙腈溶液; 梯度洗脱时间60 min; 洗脱条件: 0~8 min, 95%~92% A、5%~8% B; 8~39 min, 92%~72% A、8%~28% B; 39~50 min, 72%~60% A、28%~40% B; 50~51 min, 60%~5% A、40%~95% B; 51~55 min, 5% A、95% B; 55~56 min, 5%~95% A、95%~5% B; 55~60 min, 95% A、5% B; 流速600 nL/min; 进样体积8 μL。

质谱条件: 一级质谱参数为分辨率为120 000, 自动增益控制为 4×10^5 , 离子最大注入时间为50 ms, 质量扫描范围为 m/z 350~1 550; 二级质谱参数为分辨率为50 000, 自动增益控制为 1×10^5 , 离子最大注入时间100 ms, 从一级质谱中选择进行二级碎裂离子数为20, 二级碎裂能量模式碰撞能量32 eV。利用Peaks studio软件及Uniprot蛋白质数据库对多肽进行序列分析, 对采集到的二级质谱数据进行手动*de novo*解析, 获得多肽序列的分子质量误差为±0.03 Da。

1.3.5 目标肽的合成

经质谱鉴定的多肽序列, 委托上海吉尔生化有限公司采用固相合成法合成并进行脱盐处理, 获得纯度大于98%的8条多肽用于呈味特性的研究。

1.3.6 感官评价

参考Chen Wanchao等^[23]的方法稍作修改。感官评定小组由11名实验室成员组成, 5名男性和6名女性, 年龄在20~30岁, 无味觉和嗅觉障碍。对感官评价员进行基本的味觉培训, 酸味、甜味、苦味、咸味和鲜味的标准品分别为0.08%柠檬酸、1%蔗糖、1%异亮氨酸、0.35%氯化钠和0.35%MSG溶液, 感官评价实验在(25±1)℃的感官分析室中进行, 待测样品配制好后, 用NaOH(1.0 mol/L)或HCl(1.0 mol/L)调节pH值至6.5盛放于30 mL品尝杯中, 用3位数字随机编号, 评价员随机选取

样品, 品尝量不低于5 mL, 用舌头搅拌样品10 s, 随后吐出, 为了避免疲劳效应和遗留影响, 感官评价员在两次品尝间需用超纯水漱口, 并休息2 min。

1.3.6.1 超滤组分和凝胶组分的感官分析和滋味稀释分析

将超滤和凝胶冻干样品充分溶解于超纯水中, 配制质量浓度为5 mg/mL的溶液并调节pH值至6.5, 小组成员采用十点评分法对样品进行评分, 5种标准品的感官评分设定为5分, 0分表示无, 10分表示最强, 对样品的酸味、甜味、苦味、咸味和鲜味进行打分, 并用雷达图展示评价结果。

滋味稀释分析实验: 将样品配制成5 mg/mL的溶液, 采用超纯水1:1 (V/V) 逐级稀释, 配制一系列质量浓度梯度的溶液, 并按照浓度依次增大的顺序进行品尝, 采用三角实验评估稀释水平, 当感官评价员刚好将其与两个空白对照组(超纯水)区分出时, 此时的稀释倍数为样品的滋味稀释因子(taste dilution factor, TD), 每个样品测试3次, 所有感官评价结果的平均值计为最终结果。

1.3.6.2 合成肽及其氨基酸混合物的感官评定

将合成肽用超纯水配制成1 mg/mL的溶液, 对应的氨基酸混合物配制成相同质量浓度的溶液, 调节pH值至6.5, 并参照1.3.6.1节的方法进行评价和打分。

1.3.6.3 合成肽的鲜味阈值和增鲜阈值测定

参考Xu Xiaodong等^[26]的实验方法稍作修改。合成肽的初质量浓度为1 mg/mL, 用超纯水对其进行体积比1:1逐步稀释, 当刚好品尝出溶液中的鲜味值时, 记录此时的质量浓度为合成肽的鲜味阈值。合成肽的增鲜阈值测定以0.5 mg/mL MSG为对照组, 并在其中添加合成肽, 等比例提高溶液中合成肽的质量浓度, 当感官评价员品尝出溶液的鲜味值增加时, 此时的质量浓度为合成肽的增鲜阈值。

1.3.6.4 合成肽的剂量-反应实验

参照李晓明等^[16]的方法稍作修改, 将合成肽配制成6种不同质量浓度, 分别为1、2、3、4、5、6 mg/mL, 并分别添加0.5 mg/mL MSG作为母液, 0.35%的MSG溶液为鲜味标准品, 设定为5分, 0.5 mg/mL的MSG母液设定为1分, 采用10分制对添加MSG的合成肽鲜味值进行打分, 最终得到合成肽的剂量-反应曲线。

1.3.7 电子舌分析

1.3.7.1 超滤和凝胶组分的电子舌分析

将超滤和凝胶组分配制成5 mg/mL的溶液, 采用SA-402B味觉分析系统中的6个传感器, 分别为CAO(酸味)、GL1(甜味)、COO(苦味)、CTO(咸味)、

AAE(鲜味)和AE1(涩味)进行测定, 将样品倒入特定量杯置于样品槽中进行测定, 每个样品测试4次, 样品测试时间为120 s, 取后3次数据进行分析。

1.3.7.2 合成肽协同增鲜实验

增鲜实验将0.2 mg/mL合成肽添加到2 mg/mL MSG溶液中进行电子舌测定, 并与0.5、1、2 mg/mL和3.5 mg/mL的MSG溶液进行对照, 对其协同增鲜效果进行分析。

1.4 数据分析

利用Excel 2019、IBM SPSS Statistics 25和Origin 2018对数据进行统计学分析及绘图, 采用Tukey HSD检验进行差异显著性分析。所有实验均为3次平行实验的结果, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 超滤和凝胶色谱分离纯化鲜味肽组分结果

大球盖菇经分步酶解获得酶解物, 其可溶性肽含量达到245.45 mg/g, 表现出明显的鲜味和菇味, TD值为32(表1)。对酶解物进行超滤分离得到两个组分, 其中U2组分(<3 000 Da)鲜味值较高, TD值为32(表1), 电子舌和感官评价结果表现出与酶解物相似的味觉属性(表2和图1), 且研究表明鲜味肽的分子质量均小于3 000 Da^[26-27], 进一步对U2组分进行GFC分离。其利用分子质量大的样品在色谱柱中保留时间短先被洗脱, 分子质量小的样品后被洗脱进而对样品达到分离的效果^[28]。经GFC共得到4个组分(图2), 其中F4组分占比少且得率低, 选取F1、F2和F3进一步分析。感官评定结果显示, GFC分离的3个组分均表现出鲜味特征, 并伴有轻微涩味和甜味, 且F2和F3鲜味明显, TD值达到64(表1)。结合电子舌分析结果可知, F3组分鲜味更突出, 鲜味值为20.66±0.13, 与F2差异显著($P<0.05$), 且F3中的可溶性肽含量达到389.42 mg/g, 进一步表明其中的鲜味肽可能发挥了极大的作用。因此, 本研究选择F3组分做进一步鲜味肽鉴定。

表1 酶解物、超滤和GFC组分的可溶性肽含量及感官分析
Table 1 Soluble peptide contents and sensory analysis of the enzymatic hydrolysate and its fractions separated by UF and GFC

组分	可溶性肽含量/(mg/g)	TD值	味觉描述
酶解物	245.45±6.96 ^e	32	明显鲜味, 轻微苦涩, 微甜菇味明显
U1	235.05±6.50 ^e	16	较鲜, 轻微苦涩, 微甜
U2	241.76±4.80 ^f	32	明显鲜味, 微甜, 轻微苦涩
F1	440.81±4.32 ^a	16	明显酸味, 轻微鲜味, 微甜
F2	173.70±0.43 ^d	64	明显鲜味, 轻微咸味, 微甜, 轻微苦涩
F3	389.42±7.74 ^b	64	苦涩味, 明显鲜味, 微甜, 菇味明显

注: 同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

表 2 酶解物、超滤和GFC组分的电子舌呈味特性

Table 2 Taste characteristics of the enzymatic hydrolysate and its fractions separated by UF and GFC

组分	酸味强度	苦味强度	鲜味强度	咸味强度	甜味强度
原液	-56.53±0.84 ^c	8.29±0.35 ^{cd}	18.02±0.35 ^e	0.27±0.14 ^a	7.32±0.58 ^a
U1>3 000 Da	-52.10±0.58 ^b	7.91±0.38 ^d	16.80±0.26 ^d	0.29±0.15 ^a	7.25±0.49 ^a
U2<3 000 Da	-55.83±0.65 ^c	8.80±0.37 ^{bc}	18.08±0.22 ^e	0.27±0.15 ^a	7.19±0.42 ^{ab}
F1	-32.60±0.24 ^a	6.91±0.33 ^e	11.51±0.10 ^f	0.35±0.27 ^a	6.43±0.26 ^c
F2	-61.20±0.39 ^d	9.55±0.53 ^b	19.59±0.20 ^b	0.25±0.15 ^a	7.20±0.22 ^{ab}
F3	-60.47±0.98 ^d	11.69±0.28 ^a	20.66±0.13 ^a	0.23±0.16 ^a	7.75±0.20 ^a

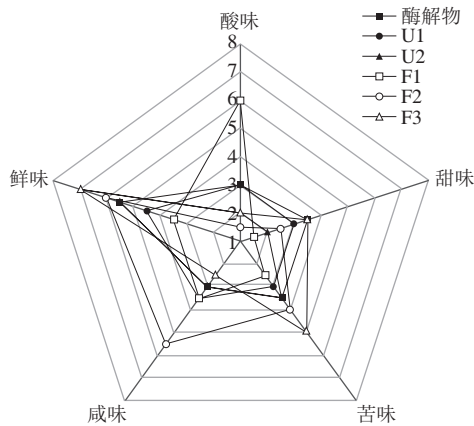


图 1 酶解物、超滤和GFC组分的感官雷达图

Fig. 1 Radar map of sensory evaluation of the enzymatic hydrolysate and its fractions separated by UF and GFC

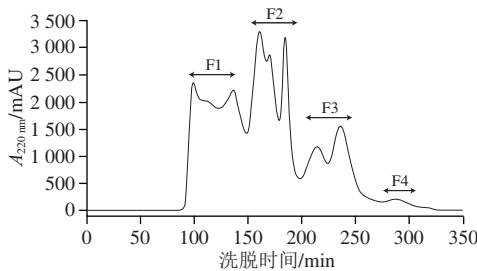
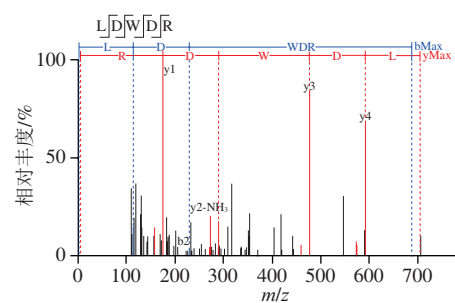
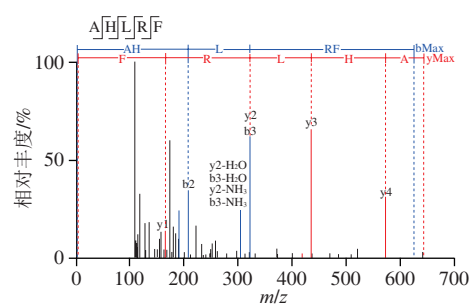
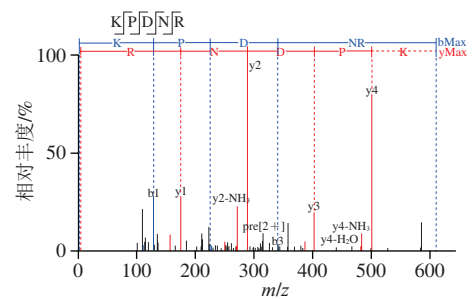
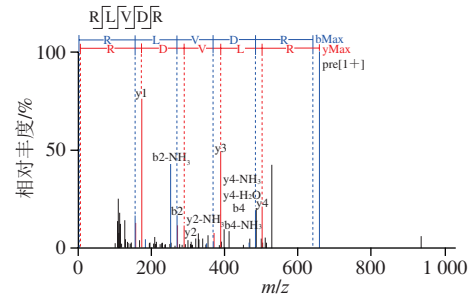
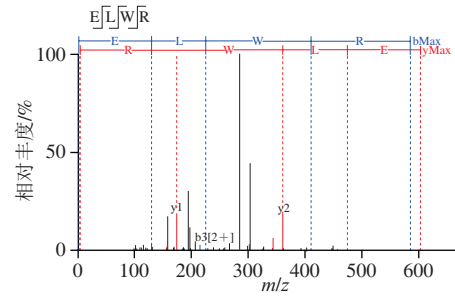


图 2 U2组分的GFC图

Fig. 2 Gel filtration chromatograms of fraction U2

2.2 RP-HPLC-MS/MS鉴定大球盖菇鲜味肽结果

利用RP-HPLC-MS/MS对F3组分中鲜味肽进行鉴定, 获得8条多肽(ALC>95%) (图3和表3), 分别为Glu-Leu-Trp-Arg (ELWR)、Arg-Leu-Val-Asp-Arg (RLVDR)、Lys-Pro-Asp-Asn-Arg (KPDNR)、Ala-His-Leu-Arg-Phe (AHLRF)、Leu-Asp-Trp-Asp-Arg (LDWDR)、Leu-Ala-Glu-Trp-Arg (LAEWR)、Asp-Asp-Trp-Trp-Arg (DDWWR)、Glu-Gly-His-Lys-Gly-Trp (EGHKGW), 肽链长度4~6, 且以五肽为主, 分子量在602.317 6~776.324 2 Da之间。



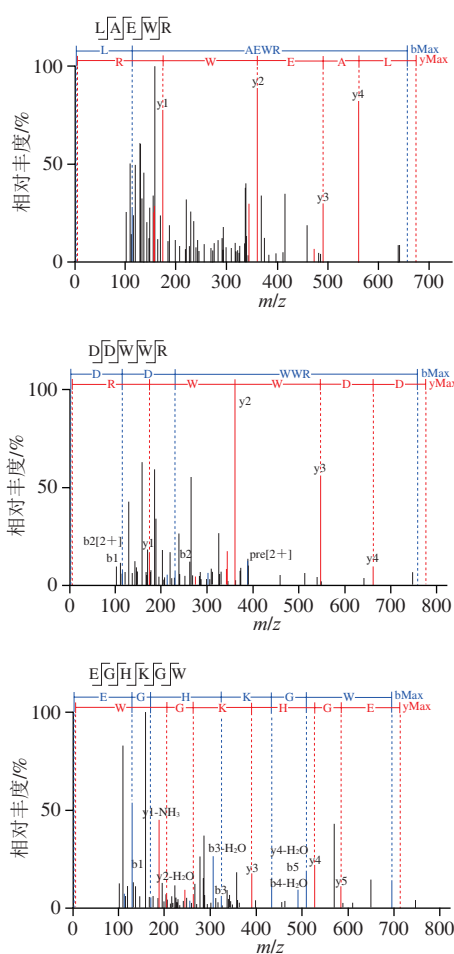


图3 8条多肽的质谱图

Fig. 3 Mass spectra of eight peptides

表3 F3组分中鉴定的特征肽段

多肽序列	长度	m/z	分子质量/Da	峰强度
ELWR	4	302.166 9	602.317 6	8.73×10^5
RLVDNR	5	329.705 7	657.392 2	1.05×10^6
KPDNR	5	315.171 0	628.329 2	4.94×10^6
AHLRF	5	322.188 5	642.360 2	1.24×10^6
LDWDR	5	352.673 8	703.328 9	1.87×10^6
LAEWR	5	337.687 3	673.354 7	3.31×10^5
DDWWR	5	389.173 6	776.324 2	2.16×10^6
EGHKGW	6	357.174 5	712.329 3	2.04×10^5

2.3 大球盖菇合成肽的呈味特性分析

2.3.1 合成肽的感官特性、鲜味阈值和增鲜阈值

多肽由于其化学性质和构象的多样性,导致其表现出多种味觉特征^[1]。利用固相合成法合成了鉴定得到的8条多肽,并进行了感官评定和电子舌分析(图4)。感官评定结果显示合成肽表现出的滋味轮廓相似,鲜甜味突出,同时咸味和苦味明显,酸味较弱。其中,酸味的产生可能由于合成过程中的试剂残留^[29],亦或由于肽链中的羧基解离强度强于氨基,表现出酸味^[28]。电子舌分析可知ELWR鲜味值最高,达到8.39;RLVDNR、

KPDNR、AHLRF和EGHKGW 4条多肽的鲜味值均大于7,且RLVDNR、AHLRF和EGHKGW表现出更愉悦的滋味特征,鲜甜味及咸味更突出,酸苦味弱;而LDWDR、LAEWR和DDWWR 3条多肽与其余5条多肽滋味特征区别明显,表现出鲜咸味值低、苦味值高的特征。当鲜味肽含有谷氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺和天冬酰胺残基,且鲜味氨基酸占比较大时,对于鲜味的贡献更大^[30-31]。而鲜甜味氨基酸位于肽链两端时,更利于与鲜味受体结合,更容易产生鲜味^[32]。除AHLRF外,8条多肽均含有鲜味氨基酸,且除AHLRF和EGHKGW外,C-末端均为精氨酸(碱性氨基酸)。多肽中含有碱性氨基酸且末端含有精氨酸的肽段会呈现苦味^[28,33],苯丙氨酸作为苦味氨基酸也会增强多肽的苦味特征^[34],这可能是多肽表现出苦味的原因。LDWDR、LAEWR和DDWWR更苦可能是由于苦味氨基酸占比较大(60%),或因疏水性氨基酸暴露导致其产生苦味^[35]。

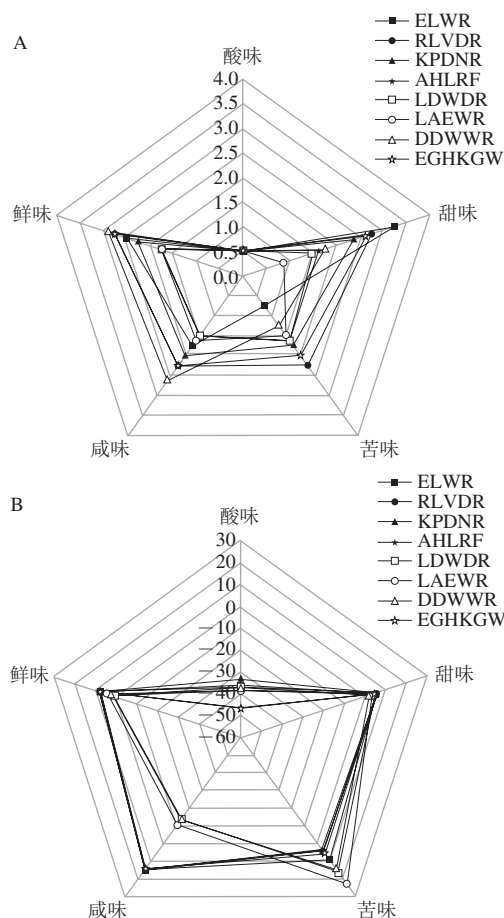


图4 合成肽感官评分(A)和电子舌(B)雷达图

Fig. 4 Results of sensory evaluation (A) and electronic tongue analysis (B) of synthetic peptides

由表4可知,8条肽段均表现出鲜味特征并对鲜味有提升作用,鲜味阈值在0.30~1.33 mmol/L之间,增鲜阈值在0.53~2.43 mmol/L之间。其中LDWDR、LAEWR和

DDWWR有苦涩感但鲜味提升效果明显, 增鲜阈值与其余5条多肽之间差异显著且小于1 mmol/L ($P<0.05$); 鲜味阈值分别为1.33、0.56 mmol/L和1.13 mmol/L, LDWDR和DDWWR的鲜味阈值显著高于其他多肽 ($P<0.05$), 鲜味强度弱; 其次是ELWR、RLVDR、KPDNR和EGHKGW表现出甜味和咸味的味觉特征, 并且有较强的鲜味提升作用, 增鲜阈值均大于1 mmol/L, 鲜味阈值分别为0.52、0.86、0.30 mmol/L和0.44 mmol/L; 而AHLRF并未品尝出甜味, 鲜味提升效果较弱, 增鲜阈值为2.43 mmol/L, 鲜味阈值为0.49 mmol/L, 增鲜效果最差。8条多肽中KPDNR鲜味阈值最低为0.30 mmol/L, 但雷达图并未显示出其鲜味最强, 可能由于其他味觉属性如甜味的协同作用增强了鲜味值, 导致感官的鲜味阈值偏低^[27]。增鲜效果最好的多肽是LDWDR, 其增鲜阈值为0.53 mmol/L, 虽然其鲜味阈值最高, 鲜味值低, 但是在添加0.5 mg/mL的MSG溶液后, 展现出更强的鲜味提升效果, 可能是由于MSG与合成肽产生了味觉协同作用, 导致合成肽味觉属性变化, 致使鲜味增强^[29,36]。

表4 合成肽的味觉描述、鲜味阈值及增鲜阈值
Table 4 Taste description, umami thresholds and umami-enhancing thresholds of synthetic peptides

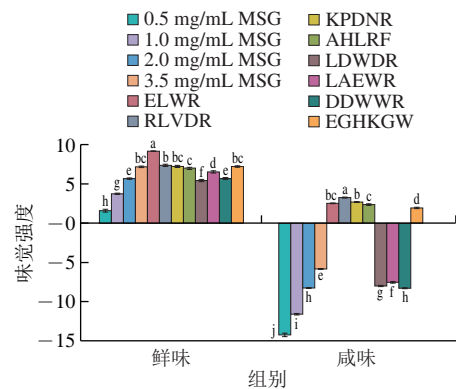
合成肽	味觉描述	鲜味阈值/(mmol/L)	鲜味提升效果	增鲜阈值/(mmol/L)
ELWR	微苦, 鲜味, 咸味, 甜味	0.52±0.10 ^{ab}	较强鲜味提升	1.56±0.10 ^f
RLVDR	鲜味, 咸味, 微甜	0.86±0.10 ^c	较强鲜味提升	1.33±0.19 ^{bc}
KPDNR	鲜味, 咸味, 甜味	0.30±0.10 ^a	较强鲜味提升	1.39±0.20 ^{bc}
AHLRF	鲜味, 咸味	0.49±0.10 ^b	微弱鲜味提升	2.43±0.10 ^d
LDWDR	微苦, 微涩, 微鲜	1.33±0.09 ^d	明显鲜味提升	0.53±0.18 ^e
LAEWR	苦味, 涩味, 余味, 较鲜	0.56±0.19 ^b	明显鲜味提升	0.65±0.09 ^e
DDWWR	微苦, 微鲜	1.13±0.16 ^c	明显鲜味提升	0.56±0.08 ^e
EGHKGW	鲜味, 咸味, 微甜	0.44±0.09 ^b	较强鲜味提升	1.23±0.18 ^e

2.3.2 合成肽与MSG的协同增鲜效应分析

为进一步探究多肽的协同增鲜效果, 将0.2 mg/mL鲜味合成肽添加到2 mg/mL MSG溶液中进行电子舌测定, 与0.5~3.5 mg/mL MSG溶液的鲜味值比较。图5显示, 添加合成肽后, 除LDWDR外, 其余7条多肽对MSG溶液均有不同程度的鲜味提升效果, 相比2 mg/mL MSG溶液的鲜味值分别提升了61.12%、29.25%、26.62%、22.94%、14.54%、0.18%、26.44%, 添加ELWR、RLVDR、KPDNR和EGHKGW这4条多肽溶液的鲜味值甚至超出3.5 mg/mL MSG溶液的鲜味值, 分别超出了27.78%、2.50%、0.42%和0.28%, 且4条多肽在较低浓度下就表现出极强的鲜味增强效果。从不同质量浓度MSG溶液的咸味值可以看出, 添加0.2 mg/mL合成肽溶液的咸味值相比2 mg/mL MSG溶液提升效果显著 (除DDWWR外) ($P<0.05$), 咸味值分别提升了130.83%、139.56%、132.89%、129.00%、2.55%、8.25%和123.67%, 添加

ELWR、RLVDR、KPDNR、AHLRF和EGHKGW后, 溶液的咸味值超出了3.5 mg/mL MSG溶液的咸味值。

合成肽与MSG的协同增鲜实验表明, 鲜味肽加入后对MSG产生了协同作用, 从而增强了MSG溶液的鲜味值和咸味值, 这也与Goto等^[37]的研究结果一致。Deng Xiaofei等^[36]研究卵形鲳鲹水解物中的合成肽时发现, 在2 mg/mL MSG溶液中添加1 mg/mL合成肽后, 溶液鲜味提升, 且表现出更丰富更柔和的味觉属性。本研究中, 除LDWDR外, 合成肽质量浓度在0.2 mg/mL时均能提升溶液鲜味, ELWR、RLVDR、KPDNR、AHLRF和EGHKGW在低质量浓度时也表现出对MSG溶液良好的鲜味和咸味提升效果。



同一指标不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

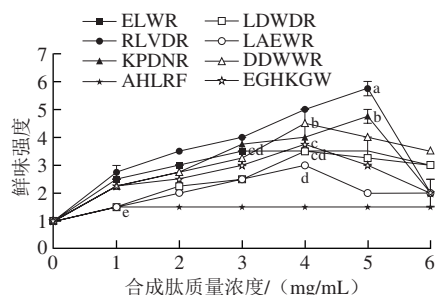
图5 合成肽与MSG的协同增鲜效应

Fig. 5 Synergistic umami-enhancing effect of synthetic peptides and MSG

2.3.3 合成肽在MSG溶液中的剂量-反应关系

剂量-反应实验可以反映在MSG溶液中, 合成肽浓度增加对MSG呈味特性的影响^[29], 结果如图6所示, 随着合成肽质量浓度的提高, 8条多肽均表现出不同程度的鲜味提升效果, 鲜味增强曲线呈现先升高后降低的趋势 (除AHLRF外), 而AHLRF仅在1 mg/mL时对溶液的鲜味具有增强作用, 随着浓度提升, 鲜味并未增强。LDWDR、LAEWR、DDWWR和EGHKGW 4条多肽在1~4 mg/mL范围内, 使得MSG溶液的鲜味强度急剧增加, 当添加的合成肽质量浓度超过4 mg/mL后, 高质量浓度合成肽的酸味和苦涩味掩盖或者抑制了鲜味, 导致溶液的鲜味强度降低^[16,38], 可见并非质量浓度越高对MSG溶液的鲜味增强效果越好, 而这与An Feiyu等^[31]的研究结果一致。ELWR、RLVDR和KPDNR也表现出与LDWDR、LAEWR、DDWWR和EGHKGW相似的增鲜趋势, 不同的是, ELWR、RLVDR和KPDNR增鲜强度呈现下降的质量浓度分别为3、5 mg/mL和5 mg/mL。此外, RLVDR和KPDNR在达到最高鲜味强度后, 随着质量浓度提高, 溶液的鲜味强度骤降; 而ELWR、LDWDR、

LAEWR、DDWWR和EGHKGW这5条多肽在达到鲜味峰值后,随着质量浓度提升,溶液的鲜味强度则表现出缓慢下降的趋势。总之,多肽在低质量浓度时可能对MSG溶液不具备鲜味提升作用,且随着质量浓度增加鲜味亦不会提升甚至会下降,可见多肽与MSG溶液协同增鲜,质量浓度至关重要。



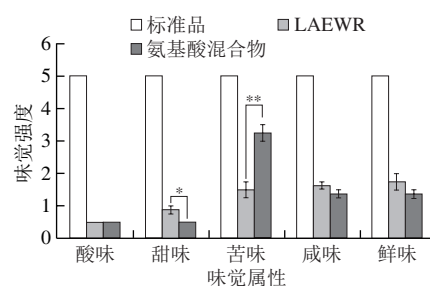
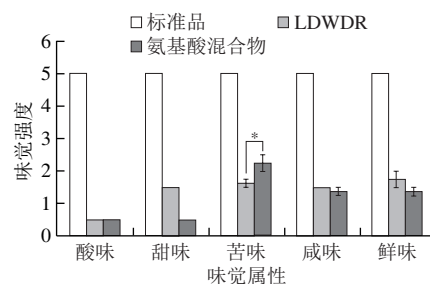
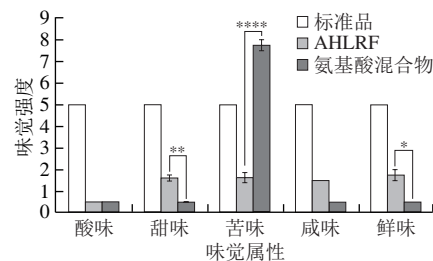
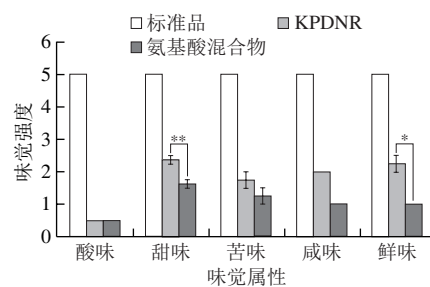
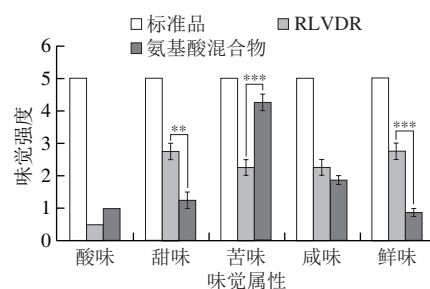
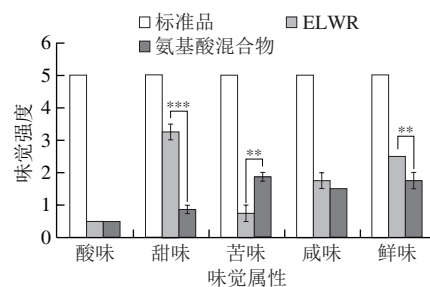
鲜味峰值时的显著性分析,小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

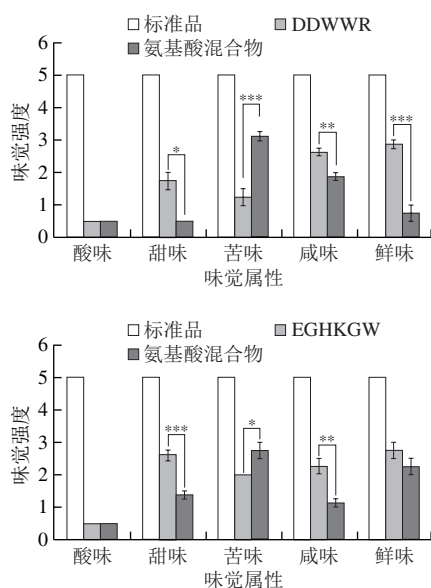
图6 合成肽在MSG溶液中的剂量-反应曲线

Fig. 6 Dose-response curves of umami taste for synthetic peptides in MSG solution

2.3.4 合成肽与其组成氨基酸混合物的呈味效应比较

为进一步说明多肽的味觉属性并非相应氨基酸味道的叠加,对组成合成肽的氨基酸混合物在水溶液中的滋味特征进行了感官评价(图7),发现8条多肽与其等质量配比的氨基酸混合液的呈味差异显著。ELWR和RLVDR的组成氨基酸混合液溶液苦味突出,而多肽溶液以甜鲜味为主,主要是由于苦味氨基酸占比高,分别为75%和80%,而多肽由于氨基酸脱水缩合形成肽键及空间结构,可能改变了其呈味特性,从而产生明显的味觉差异;LDWDR、LAEWR和DDWWR的苦味氨基酸占比60%,鲜甜味氨基酸占比40%,合成肽溶液分别突出在鲜味或鲜咸味,而等质量配比的氨基酸混合液则苦味突出,可见鲜味不仅与氨基酸组成和排列顺序有关,肽链构象也会影响鲜味的呈现^[16]。KPDNR和EGHKGW溶液鲜甜味突出,其鲜甜味氨基酸占比突出,组成氨基酸混合液却分别表现出甜味和苦味的特征,表明多肽中鲜甜味氨基酸占比大时,有助于多肽的鲜味呈现,这也与林萌萌等^[39]的发现一致。AHLRF溶液表现出鲜咸味突出的特征,苦味氨基酸占比达到80%,氨基酸混合液苦味突出,甜味、鲜味和咸味不明显,其苦味值是合成肽苦味值的近3倍,合成肽的甜味和鲜味值显著高于混合液,而合成肽突出的苦味可能与苦味氨基酸占比较大,以及C-末端为疏水氨基酸苯丙氨酸有关。总之,氨基酸混合物的味觉特征表现出单个氨基酸口味叠加的特点,而多肽丰富的滋味特征与其氨基酸组成和特定空间结构相关,这也与Feng Tao等^[40]的研究结果一致。





显著性: *. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$, ***. $P < 0.001$, ****. $P < 0.0001$.

图7 合成肽与等质量配比的氨基酸混合物的感官评价分析对比图
Fig. 7 Taste intensity of 1:1 mixtures of amino acids and synthetic peptides

3 结论

通过对大球盖菇酶解液进行超滤和凝胶过滤色谱分离,结合感官评价和电子舌分析,得到鲜味最强组分F3,通过RP-HPLC-MS/MS鉴定得到8条多肽,分别为ELWR、RLVDR、KPDNR、AHLRF、LDWDR、LAEWR、DDWWR和EGHKGW,以五肽为主,分子量在602.3176~776.3242 Da之间。8条多肽呈味特性丰富,且兼具鲜味及其增强特性,鲜味阈值在0.30~1.33 mmol/L之间,增鲜阈值在0.53~2.43 mmol/L之间。它们与MSG的协同增鲜实验表明,除LDWDR外,其余7条多肽对MSG溶液均有不同程度的鲜味提升作用,提升幅度为0.18%~61.12%;除DDWWR外,其余7条多肽对MSG溶液的咸味提升了2.55%~139.56%;ELWR、RLVDR、KPDNR、AHLRF和EGHKGW 5条多肽在低浓度时也表现出良好的鲜味和咸味提升效果。除AHLRF外,其余7条合成肽的剂量-反应曲线均呈现先升高后降低的趋势,RLVDR和KPDNR的鲜味峰值质量浓度达到5 mg/mL;协同增鲜效应研究发现,合成肽质量浓度对于协同增鲜具有重要作用。此外,通过比较合成肽和其组成氨基酸混合物的呈味特性发现,氨基酸的组成、种类和空间结构均会对合成肽的味觉属性产生影响,且合成肽的呈味并不是氨基酸味觉属性的简单叠加,而是各方面因素综合影响的结果。综上所述,本研究为大球盖菇鲜味肽的开发利用及天然鲜味调味品在食品中的应用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] TEMUSSI P A. The good taste of peptides[J]. Journal of Peptide Science, 2011, 18(2): 73-82. DOI:10.1002/psc.1428.
- [2] NINOMIYA K. Umami: a universal taste[J]. Food Reviews International, 2002, 18(1): 23-38. DOI:10.1081/fri-120003415.
- [3] HAJEB P, JINAP S. Umami taste components and their sources in Asian foods[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2014, 55(6): 778-791. DOI:10.1080/10408398.2012.678422.
- [4] YAMASAKI Y, MAEKAWA K. A peptide with delicious taste[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1978, 42(9): 1761-1765. DOI: 10.1080/00021369.1978.10863242.
- [5] LI L, ZHOU C C, ZHANG J C, et al. Characteristics of umami peptides identified from porcine bone soup and molecular docking to the taste receptor T1R1/T1R3[J]. Food Chemistry, 2022, 387(1): 132870. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.132870.
- [6] 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 Chemistry, 2012, 135(2): 479-485. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.04.130.
- [7] 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, 2019, 312(15): 126053. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.126053.
- [8] DENG X F, 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-Food Science and Technology, 2021, 4(1): 141-150. DOI:10.1016/j.lwt.2021.110887.
- [9] LIU Z Y, ZHU Y W, WANG W L, et al. Seven novel umami peptides from *Takifugu rubripes* and their taste characteristics[J]. Food Chemistry, 2020, 330(15): 127204. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127204.
- [10] SONG S Q, ZHUANG J D, MA C Z, et al. Identification of novel umami peptides from *Boletus edulis* and its mechanism via sensory analysis and molecular simulation approaches[J]. Food Chemistry, 2022, 398(1): 133835. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.133835.
- [11] SHEN Q L, SUN L P, HE Z D, et al. Isolation, taste characterization and molecular docking study of novel umami peptides from *Lactarius volemus* (Fr.) [J]. Food Chemistry, 2022, 401(1): 134137. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.134137.
- [12] CHANG J C, LI X, LIANG Y, et al. Novel umami peptide from *Hypsizygus marmoreus* hydrolysate and molecular docking to the taste receptor T1R1/T1R3[J]. Food Chemistry, 2023, 401(1): 134163. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.134163.
- [13] KERTH C R, MILLER R K. Beef flavor: a review from chemistry to consumer[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95(14): 2783-2798. DOI:10.1002/jsfa.7204.
- [14] DRAKE S L, WHETSTINE M E C, DRAKE M A, et al. Sources of umami taste in Cheddar and Swiss cheeses[J]. Journal of Food Science, 2007, 72(6): 360-366. DOI:10.1111/j.1750-3841.2007.00402.x.
- [15] CHAUDHARU N, PEREIRA E, ROPER S D. Taste receptors for umami: the case for multiple receptors[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2009, 90(3): 738-742. DOI:10.3945/ajcn.2009.27462H.
- [16] 李晓明, 黄占旺, 徐明生, 等. 白玉菇中鲜味肽的分离鉴定及呈味特性分析[J]. 食品科学, 2021, 42(24): 252-260. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20201210-115.

- [17] 陈艳芳, 鲍大鹏, 陈洪雨, 等. 蛋白质品质评价方法及其在食用菌中的应用进展[J]. 食用菌学报, 2020, 27(3): 92-104. DOI:10.16488/j.cnki.1005-9873.2020.03.013.
- [18] 李雪. 蟹味菇风味物质研究及其呈味肽的提取鉴定[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2020. DOI:10.27801/d.cnki.gshyy.2020.000174.
- [19] 黄年来. 大球盖菇的分类地位和特征特性[J]. 食用菌, 1995, 17(6): 1-11.
- [20] 陈君琛, 周学划, 赖谱富, 等. 大球盖菇漂烫液喷雾干燥制营养精粉工艺优化[J]. 农业工程学报, 2012, 28(21): 272-279. DOI:10.3969/j.issn.1002-6819.2012.21.038.
- [21] 黄美仙, 岑燕霞, 孙朋, 等. 大球盖菇研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2021(12): 124-129. DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2021.12.0124.
- [22] LI W, CHEN W C, MA H L, et al. Structural characterization and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory mechanism of *Stropharia rugosoannulata* mushroom peptides prepared by ultrasound[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 88: 106074. DOI:10.1016/j.ultsonch.2022.106074.
- [23] CHEN W C, LI W, WU D, et al. Characterization of novel umami-active peptides from *Stropharia rugosoannulata* mushroom and in silico study on action mechanism[J]. Journal of Food Composition and Analysis. 2022, 110: 104530. DOI:10.1016/j.jfca.2022.104530.
- [24] LI W, CHEN W C, MA H L, et al. Study on the relationship between structure and taste activity of the umami peptide of *Stropharia rugosoannulata* prepared by ultrasound[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 90: 106206. DOI:10.1016/j.ultsonch.2022.106206.
- [25] KONG Y, ZHANG L 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. DOI:10.1016/j.foodres.2018.11.060.
- [26] XU X D, XU R, SONG Z, et al. Identification of umami-tasting peptides from *Volvariella volvacea* using ultra performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry and sensory-guided separation techniques[J]. Journal of Chromatography A. 2019, 1596: 96-103. DOI:10.1016/j.chroma.2019.03.003.
- [27] 宁梦华, 王文利, 刘高乐, 等. 养殖暗纹东方鲀中7种醇提鲜味肽的鉴定及其呈味特性[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 16-23. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200917-231.
- [28] 蒋希希, 裴斐, 赵立艳, 等. 草菇鲜味肽的分离鉴定及呈味特性分析[J]. 食品科学, 2022, 43(12): 235-242. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20211110-124.
- [29] ZHUANG M Z, LIN L Z, ZHAO M M, et al. Sequence, taste and umami-enhancing effect of the peptides separated from soy sauce[J]. Food Chemistry, 2016, 206: 174-181. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.03.058.
- [30] 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. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.01.128.
- [31] AN F Y, CAO K X, JI S Q, et al. Identification, taste characterization, and molecular docking study of a novel microbiota-derived umami peptide[J]. Food Chemistry, 2023, 404: 134583. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.134583.
- [32] WANG W L, ZHOU X R, LIU Y. Characterization and evaluation of umami taste: a review[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2020, 127: 115876. DOI:10.1016/j.trac.2020.115876.
- [33] SHINODAI, OKAI H, FUKUI S. Bitter Taste of H-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-OH corresponding to the partial sequence (positions 82-88) of bovine β -casein, and related peptides[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1986, 50(5): 1255-1260. DOI:10.1080/00021369.1986.10867554.
- [34] ISHIBASHI N, SADAMORI K, YAMAMOTO O, et al. Bitterness of phenylalanine- and tyrosine-containing peptides[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1987, 51(12): 3309-3313. DOI:10.1080/00021369.1987.10868574.
- [35] ZHANG J N, SU D X, SU G W, et al. New insight into umami receptor, umami/umami-enhancing peptides and their derivatives: a review[J]. Trends in Food Science and Technology, 2019, 88: 429-438. DOI:10.1016/j.tifs.2019.04.008.
- [36] DENG X F, 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-Food Science and Technology, 2021, 141: 110887. DOI:10.1016/j.lwt.2021.110887.
- [37] GOTO T K, YEUNG A W K, TANABE H C, et al. Enhancement of combined umami and salty taste by glutathione in the human tongue and brain[J]. Chemical Senses, 2016, 41(7): 623-630. DOI:10.1093/chemse/bjw066.
- [38] DING Y B, LI X Y, KAN J Q. Isolation and identification of flavor peptides from douchi (traditional Chinese soybean food)[J]. International Journal of Food Properties, 2017, 20(2): 1982-1994. DOI:10.1080/10942912.2017.1360906.
- [39] 林萌莉, 王洁, 廖永红, 等. 炖煮鸡汤中多肽与鲜味构效关系[J]. 食品科学, 2016, 37(3): 12-16. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201603003.
- [40] FENG T, WU Y, ZHANG Z W, et al. Purification, identification, and sensory evaluation of kokumi peptides from *Agaricus bisporus* mushroom[J]. Foods, 2019, 8(2): 43. DOI:10.3390/foods8020043.