

苦味肽的苦味机制及脱苦策略研究进展

蒲明慧¹, 吴昊¹, 文李¹, 陈茂龙¹, 程云辉^{1,2,*}

(1.长沙理工大学食品与生物工程学院, 湖南 长沙 410114; 2.齐鲁工业大学食品科学与工程学院, 山东 济南 250353)

摘要: 蛋白质水解过程中形成的苦味肽会导致食品出现苦味, 苦味肽从口感角度往往被认为是不受欢迎的成分。然而, 有研究表明其中一些苦味肽显示出对人类健康有益的生物活性及有助于缓解慢性疾病的特性。因此, 阐明苦味肽的苦味机制对于改善食品口味和生物活性开发利用具有重要意义。前期研究报道提出了 Q 值、苦味氨基酸、苦味指示基序和空间结构等肽苦味影响因素, 但普适的机制尚未得到阐明。酶法或非酶法去苦味策略已在实验室及工业化规模中实施应用, 其中酶法因高效、安全而广受关注, 具有脱苦能力或潜力的和来源于动物、植物与微生物的酶被研究者不断鉴定并报道。本文较全面地总结苦味肽的研究进展, 内容包括苦味肽的来源、生物活性、鉴定方法、苦味机制及酶法/非酶法脱苦方法等, 同时归纳总结不同来源的具有脱苦能力或潜力的酶的共有特性, 并展望苦味肽未来研究方向。

关键词: 苦味肽; 生物活性; 苦味机制; 脱苦; 微生物酶

Research Progress in the Bitterness Mechanism and Debittering Strategies of Bitter Peptides

PU Minghui¹, WU Hao¹, WEN Li¹, CHEN Maolong¹, CHENG Yunhui^{1,2,*}

(1. School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha 410114, China; 2. School of Food Science and Engineering, Qilu University of Technology, Jinan 250353, China)

Abstract: Bitter peptides derived from the hydrolysis of proteins can cause food to taste bitter and are generally deemed undesirable from the perspective of taste. However, studies have shown some bitter peptides to have bioactivities that are beneficial to human health and helpful for alleviating chronic diseases. Hence, elucidating the bitter mechanism of bitter peptides is important for improving the taste and bioactivity utilization of food. Previous studies have pointed out the factors affecting the bitterness of peptides, such as Q value, bitter amino acids, bitterness indicator motifs and spatial structure, but the universal mechanism is still unclear. Enzymatic and non-enzymatic debittering treatments have been developed for laboratory and industrial applications, among which, enzymatic debittering treatments have attracted more attention due to the high efficiency and biosafety, and animal/plant/microorganism-derived enzymes with debittering capacity or potential have been identified and reported continuously. This review comprehensively summarizes recent progress in bitter peptides, including their sources, bioactivities, identification methods, bitterness mechanism and enzymatic/non-enzymatic debittering treatments, and the common characteristics of enzymes from different sources with debittering capacity or potential. Finally, it gives an outlook on future research directions.

Keywords: bitter peptides; bioactivity; bitterness mechanism; debittering; microbial enzymes

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240306-041

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 21-0344-13

引文格式:

蒲明慧, 吴昊, 文李, 等. 苦味肽的苦味机制及脱苦策略研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(21): 344-356. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240306-041. <http://www.spkx.net.cn>

PU Minghui, WU Hao, WEN Li, et al. Research progress in the bitterness mechanism and debittering strategies of bitter peptides[J]. Food Science, 2024, 45(21): 344-356. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240306-041. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2024-03-06

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目 (2022JJ30587);

山东省“泰山产业领军人才”工程项目 (LJNY202004; TSCY20190103); 湖南省科技创新计划资助项目 (2023RC3137)

第一作者简介: 蒲明慧 (1996—) (ORCID: 0009-0009-3009-8022), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。

E-mail: 17373157925@163.com

*通信作者简介: 程云辉 (1964—) (ORCID: 0000-0003-0903-1893), 女, 教授, 博士, 研究方向为功能性食品研究与开发。

E-mail: cyh@csust.edu.cn

苦味是食品的基本属性之一,是影响其受欢迎和流行程度的重要因素^[1],并逐渐成为影响食品工业可持续发展的关键因素^[2]。在乳制品特别是奶酪等食品行业,苦味通常被认为是一种令人不快和不受欢迎的味道,但苦瓜和咖啡等特殊食品除外,因为一些对苦味接受程度较高的特殊人群对它们有特别偏好;同时,一些苦味肽具有对人类有益的生物活性,如血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)抑制活性^[3]、免疫调节活性^[4]和抗氧化活性^[5]等。通常蛋白质水解过程中产生的苦味肽是导致蛋白水解类产品出现苦味的主要原因^[6],乳蛋白^[7]、玉米醇溶蛋白^[8]、大豆蛋白^[9]和鱼蛋白^[4]是苦味肽的主要来源,研究苦味肽的苦味机制可以为食品制造业提供指导与参考。

阐明肽和苦味之间的关系是苦味肽研究的一个重要方向。Ney等^[10]提出了苦味和平均疏水性相关性的假设,该假设通过 Q 值(定义为肽的所有单个氨基酸残基的转移自由能相加并除以肽中氨基酸残基的总数,即平均疏水性)的计算结果预判分子质量低于6 000 Da的肽是否会呈现苦味,此假设已被一些研究者应用于苦味肽的预测^[11-13]。其他研究者则认为苦味可能与苦味氨基酸^[14]、苦味指示基序^[15]或空间结构^[16-18]有关。定量结构-活性关系(quantitative structure-activity relationship, QSAR)模型也被应用于苦味机理探究, Kim^[19]和Xu Biyang^[20]等建立了不同的QSAR模型,以期明确影响肽苦味的各种因素。然而至今为止,普适的肽苦味机制仍有待深入探讨。

当苦味肽的浓度达到或超过阈值时,受试者就会感觉到苦味的存在^[21]。研究者发现了一些可用于肽的脱苦方法,如通过添加磷酸盐^[22]和 $\alpha\beta$ -环糊精^[23-24]掩蔽苦味、添加苦味抑制肽^[25]阻止苦味肽与苦味受体(taste receptor family 2 member, T2R)结合,此外酶水解^[26]、Plastein反应^[27]和美拉德反应^[28]亦可通过改变苦味肽的构象或释放氨基酸来减少苦味,而活性炭、树脂^[29]和色谱技术则可通过对苦味肽的分离而去除苦味^[30]。其中,非酶法分离苦味肽往往会损失一部分氨基酸残基^[31],同时使用添加剂掩蔽苦味可能会引入其他味道。酶法脱苦因具有更温和和反应条件、更低杂质分离难度、良好生物安全性及可与蛋白水解结合到同一步骤中而倍受关注^[32]。目前研究重点集中在筛选具有降解苦味肽能力的酶,包括来自动物、植物及微生物的酶。但酶法处理苦味肽也可能因为肽结构被修饰而对其生物活性产生不良影响,因此研究者在选择脱苦方法时应综合考虑多种因素。本文系统地介绍苦味肽来源及其生物活性、基于疏水性的苦味机制的研究进展,总结非酶法和酶法脱苦的特点,重点探讨具有潜在苦味肽降解能力的生物酶筛选,并展望苦味肽未来的研究方向。

1 苦味肽概述

1.1 苦味肽的来源

肽作为蛋白质水解的产物,通常由2~20个氨基酸构成,理论上所有蛋白质降解不完全时都会产生肽。近年来肽的许多功能特性和生物活性已经被研究者发现^[33-35],苦味肽的研究情况也与此类似。

苦味肽在人类日常食物中并不少见。奶酪是西方家庭餐桌上常见的食物,作为一种发酵乳制品,被赋予了不同的、复杂的感官特性,其中也包括苦味,因此它可以作为苦味肽的分离来源。宋雪梅等^[13]从牦牛乳硬质干酪分离出了14种苦味肽, Toelstede等^[36]也从高达奶酪中鉴定出了14种苦味肽,其中有4种肽序相似程度较高的苦味肽被列于表1中。此外, Zhang Xin等^[37]也从蒙古奶酪中分离出了1种苦味二肽。

在我国具有几千年食用习惯的大豆也是苦味肽的丰富来源^[38]。Kim等^[39]通过反相高效液相色谱(reverse phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC)法从大豆11S球蛋白中分离并鉴定出了6种苦味肽, Tong Xiaohong等^[9]从大豆蛋白水解物中发现的新肽中包含了22种肽链相对较长的潜在苦味肽,它们的氨基酸残基数量为10~21个不等(一部分从大豆蛋白水解物中发现的潜在苦味肽列于表1)。有趣的是,在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中合成的大豆球蛋白前体亚基在水解后也产生了7种苦味肽^[40]。

大多数的苦味肽都是从酪蛋白的酶解物中分离出来的^[41]。如Richter等^[42]从酪蛋白中鉴定出3种苦味肽; Sebalb等^[43]从酪蛋白的不同亚基中鉴定了15种关键的苦味肽,其中有4种苦味肽来自 α_{s1} -casein、8种来自 β -casein、3种来自 κ -casein; Forler等^[44]在新鲜奶酪发酵过程中再次分离出相同的肽,并且发现来源于 β -酪蛋白的肽MAPKHKEMPFPKYPVEPF和来源于 κ -酪蛋白的肽ARHPHPLSFM是浓缩牛奶制成的新鲜奶酪中苦味的主要贡献者。

表1列出了一些已报道的苦味肽及其相关信息。研究表明,从牛肉中也能分离出苦味肽, Zhao Di等^[12]体外模拟消化牛肉后发现了3种苦味肽。另外,鱼类中含有丰富的蛋白质, Hu Yun等^[45]对7种商业鱼类的6类蛋白质进行分析后认为它们的胶原蛋白可成为良好的苦味肽前体,而Gan Ruiqing等^[46]从罗非鱼副产品中发现了10种长链苦味肽。Sun Xiaorui^[47]和Liu Boye^[14]等分别从小麦面筋蛋白质发现了43、101种苦味肽(其中分别有2、3种列于表1中),说明麦麸也是苦味肽的一个重要来源。除此之外,来自血红蛋白^[48-49]、鸡肉^[50]、蚕豆^[51]、花生^[52]、豌豆^[53]、乳清蛋白^[54]、米酒^[55]、婴儿配方奶粉^[56]和玉米^[8]的苦味肽也均有报道。

表 1 部分已报道苦味肽的来源、序列、分子质量、Q值及鉴定/预测方法
Table 1 Sources, sequences, molecular masses, Q values, and identification/prediction methods of some reported bitter peptides

来源	序列	分子质量/Da	疏水氨基酸相对含量/%	Q值/(cal/mol)	鉴定/预测方法	参考文献
大豆	IYPGCP	760	66.67	2 216.0 ^C	TSE	[40]
	IYPGCPST	962	50.00	1 651.4 ^C	TSE	
牛肉	LIDHFLDKPVSPL	1 640.92 ^C	64.29	1 741	Q值	[12]
	QLIDHFLDKPVSPLLL	1 963.28 ^C	58.82	1 714	Q值	
鱼	DLPGPIGIPIN	1 089.26 ^C	63.64	1 760.9 ^C	苦味指示基序	[46]
	LDLPGPIGIPIN	1 202.42 ^C	66.67	1 815.8 ^C	苦味指示基序	
玉米	LQL	372.46 ^C	66.67	1 580.0 ^C	TSE	[57]
	LGL	301.38 ^C	66.67	1 613.3 ^C	TSE	
	LVL	343.46 ^C	100.00	2 176.7 ^C	TSE	
血红蛋白	VVYPWTQRF	1 195.37 ^C	66.67	1 732.2 ^C	TSE	[48]
	VVYPW	662.78 ^C	100.00	2 374.0 ^C	TSE	[49]
酪蛋白	YQEPVLGPVRGPFPIIV	1 881.24 ^C	70.59	1 800.6 ^C	TSE	[42]
	RGPFPIIV	898.10 ^C	75.00	2 031.3 ^C	TSE	
	LHLPLP	688.86 ^C	83.33	2 166.7 ^C	TSE	
β-酪蛋白	LHLPLPLL	915.17 ^C	87.50	2 230.0 ^C	TSE	[43-44]
	HLPLPLLQ	930.14 ^C	75.00	1 915.0 ^C	TSE	
	YFPFGPIHN	1 041.16 ^C	66.67	1 871.1 ^C	TSE	
奶酪	YFPFGPIP	1 001.13 ^C	77.78	2 106.7 ^C	TSE	[36]
	YFPFGPIHNS	1 128.2 ^C	60.00	1 688.0 ^C	TSE	
	YFPFGPIPNS	1 088.21 ^C	70.00	1 900.0 ^C	TSE	
	RIINPEGQQ	1 053.56 ^C	33.33	1 070.0 ^C	TSE	
蚕豆	GGLRIINPEG	1 024.57 ^C	40.00	1 225.0 ^C	TSE	[51]
	GGLRIINPEGQQ	1 280.68 ^C	33.33	1 004.2 ^C	TSE	
	FEEIR	693.36	40.00	1 490.0 ^C	TSE	[47]
麦麸	FEEIRNL	920.48	42.86	1 408.6 ^C	TSE	
	HIPGL	535.65 ^C	60.00	1 702.0 ^C	苦味氨基酸	[14]
	HIPGLER	820.95 ^C	42.86	1 398.6 ^C	苦味氨基酸	
豌豆	HIPGLERPS	1 005.15 ^C	44.44	1 383.3 ^C	苦味氨基酸	[53]
	LY	293.11	50	2 645	Q值	
	LV	231.17	100	2 055	Q值	
花生	IK	260.20	50	2 235	Q值	[52]
	FL	279.17	100	2 535	Q值	

注：C表示该值并非直接从文献中得到而是通过其他工具计算得到，肽的分子质量在<https://www.cusabio.cn/technology-93.html>中计算，Q值则是在<http://www.cqudfbp.net/bitterPrediction/tools/DataInput.jsp>^[58]中计算得到；肽序中加粗的部分表示几个不同苦味肽（一般是来源相同）中相同的、连续的氨基酸残基；TSE:传统感官评价（traditional sensory evaluation）。

1.2 苦味肽的生物活性

不少文献报道了苦味肽的生物活性。李梦瑶等^[59]发现牦牛乳干酪苦味肽RPKHPIK和KVLPVPQ的α-淀粉酶抑制活性半数抑制浓度（median inhibition concentration, IC₅₀）值分别为0.45 mg/mL和0.86 mg/mL，而Kheeree等^[60]从去脂柠檬罗勒种子中分离出了两种无毒的苦味肽（LGRNLPPI和GPAGPAGL），二者的ACE抑制活性IC₅₀值分别为（0.124±0.02）mmol/L和（0.013±0.001）mmol/L。Luo Cheng等^[41]报道了中等剂量的酶水解鲢鱼（*Michthys miiuy*）蛋白产生的苦味肽显示出免疫调节活性，可提高大黄鱼（*Larimichthys crocea*）体外淋巴细胞和溶菌酶活性，之后Deng Shanggui等^[61]研究发现鲢鱼苦味肽具有浓度

依赖效应的1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH）自由基清除活性、还原力和金属螯合活性，这揭示了开发具有多种生物活性苦味肽的可能性。

来源于BIOPEP-UWM数据库的苦味活性肽的序列、半数效应浓度（median effective concentration, EC₅₀）、分子质量及Q值如表2所示。BIOPEP-UWM数据库中收录的一些肽同时表现出苦味和生物活性。据该数据库提供的参考资料，苦味肽具有ACE抑制、抗氧化、抗炎、抗癌和免疫调节等活性。表2中列举的苦味ACE抑制肽的EC₅₀值在1~190 μmol/L之间，表明其生物活性相对较强。

表 2 苦味活性肽的序列、EC₅₀、分子质量及Q值
Table 2 Sequences, EC₅₀ values, molecular masses and Q values of bioactive bitter peptides

活性	序列	EC ₅₀ /(μmol/L)	分子质量/Da	疏水氨基酸相对含量/%	Q值/(cal/mol)
ACE抑制活性	AF	190.00	236.28	100.00	1 690.0
	AYFYPEL	6.58	902.02	85.71	2 101.4
	DG	12.30	190.16	0.00	270.0
	DY	100.00	296.28	50.00	1 705.0
	EY	2.68	310.31	50.00	1 710.0
	FALPQYLK	4.30	979.19	75.00	1 888.8
	FFVAPFPEVFGK	18.00	1 384.65	75.00	1 833.3
	FY	25.00	328.37	100.00	2 760.0
	LGRNLPPI	124	879.07	62.50	1 721.3
	GGY	1.30	295.30	33.33	956.7
	GLY	8.91	351.41	66.67	1 763.3
	GPAGPAGL	13.00	638.73	62.50	1 140.0
	GRP	19.90	328.38	33.33	1 116.7
	IA	153.00	202.26	100.00	1 850.0
	IE	0.00	260.29	50.00	1 760.0
	IL	54.95	244.34	100.00	2 695.0
	IP	130.00	228.30	100.00	2 795.0
	IW	4.70	317.39	100.00	2 985.0
	KF	28.30	293.37	50.00	2 075.0
	KP	22.00	243.31	50.00	2 060.0
	LLF	79.80	391.52	100.00	2 496.7
	LRP	1.00	384.48	66.67	1 923.3
	LW	50.00	317.39	100.00	2 710.0
	LY	18.00	294.36	100.00	2 645.0
抗氧化活性	PR	4.10	271.32	50.00	1 675.0
	RF	93.00	321.38	50.00	1 690.0
	RPKHPIKHQ	13.00	1 140.36	33.33	1 426.7
	VF	9.20	264.33	100.00	2 170.0
	VVYPWTQRF	34.30	1 195.39	66.67	1 732.2
	VY	7.10	280.33	100.00	2 280.0
	WL	41.40	317.39	100.00	2 710.0
	YL	122.00	294.36	100.00	2 645.0
	ALEPDHR	未报道	836.91	42.86	1 155.7
	AYFYPEL	未报道	902.02	85.71	2 101.4
	EL	未报道	260.29	50.00	1 485.0
	GGY	未报道	401.42	66.67	1 913.3
抗氧化活性	KP	未报道	243.31	50.00	2 060.0
	LQL	未报道	372.47	66.67	1 580.0
	LW	未报道	317.39	100.00	2 710.0

续表2

活性	序列	EC ₅₀ / (μmol/L)	分子质量/Da	疏水氨基酸相对含量/%	Q值/ (cal/mol)
	LY	未报道	294.36	100.00	2 645.0
	VY	未报道	280.33	100.00	2 280.0
	YGLF	未报道	498.58	60.00	1 985.0
	YGY	未报道	401.42	66.67	1 913.3
	YFPFGPI	未报道	789.93	85.71	2 335.7
	YYG	未报道	401.42	66.67	1 913.3
	YYY	未报道	507.55	100.00	2 870.0
	PY	未报道	278.31	100.00	2 745.0
抗炎活性	FFVAPFPEVFGK	未报道	1 384.65	75.00	1 833.3
	VVV	未报道	315.42	100.00	1 690.0
	YFPFGPI	未报道	789.93	85.71	2 335.7
抗癌活性	YG	未报道	238.25	50.00	1 435.0
	YGG	未报道	295.30	33.33	956.7
	YFPFGPI	未报道	789.93	85.71	2 335.7
	YQQPVLGPVRGPFPIIV	未报道	1 880.27	70.59	1 762.4

注：所有数据均来自BIOPEP-UWM数据库^[62-63]，包括苦味、活性、序列及EC₅₀值，对应的参考文献亦可从数据库中得到，因此不再一一列出；分子质量在<https://www.cusabio.cn/technology-93.html>中计算得到（结果保留两位小数），Q值则是在<http://www.cqudfbp.net/bitterPrediction/tools/DataInput.jsp>^[58]中计算所得。

1.3 苦味肽/酶解物的苦味评鉴方法

苦味程度的评鉴主要是对目标物质的苦味程度进行相对度量^[64]，方法一般可分为传统感官评定和非传统感官评定，它们的区别主要在于前者的受试者是专业感官评定人员，而后者则是借助模拟生物体味觉功能的设备完成感官评定。

用于确定某些蛋白水解物或肽中是否存在苦味及苦味水平的传统感官评定方法，是基于受过训练的感官小组成员通过比较样品和参考溶液而得出的判断。Yan Zhengfei等^[65]招募了10名感官评定小组成员，以奎宁作为参考评估由新型双酶系统产生的大米蛋白水解物中的苦味水平。此外，罗非鱼副产品的6种不同酶解物的苦味程度评判^[46]、合成血红蛋白肽VVYPWTQRF^[48]和奶酪苦味肽^[36,43]的苦味验证都是采用传统感官评价方法。传统的感官评定方法经典而科学，但感官评定结果依赖于感官评定小组人员的专业水平，有时会因个体感官差异及味觉疲劳而影响结果。

相比之下，非传统感官评定倾向于使用与人类味觉器官功能相等或相似的传感器进行苦味评价，如电子舌。Qin Qin等^[66]使用市售的味觉系统对大米小肽进行苦味分析，以确定一种细菌衍生酶的去苦味功能；田霄艳等^[67]使用电子舌分析大豆蛋白水解物的苦味程度，并借此构建了一个可以替代常规感官评价分析方法的预测模型。非传统的感官评定方法不会因受试者的专业水平差异或连续工作引起的味觉疲劳而影响评定结果，但电子舌等传感器还有待于提高灵敏度和降低使用成本。

已有研究者将传统与非传统感官评定方法结合起来对目标物进行分析，Liu Boye等^[68]采用带有味觉系统

TS-5000Z电子舌进行小麦麸皮水解物的苦味判断，并应用传统感官评定的方法进一步研究其苦味影响因素。

2 肽苦味形成机制的研究

2.1 疏水性（Q值）

Q值是一个反映疏水性和肽苦味之间关系的参数，由Ney^[10]在1979年提出，它被定义为肽的平均疏水性，这个特征参数是由肽的所有单个氨基酸残基的转移自由能相加并除以肽中氨基酸残基的总数而得到，其计算公式如下：

$$Q\text{值}/(\text{cal/mol}) = \frac{\sum \Delta f}{n}$$

式中：Δf代表转移自由能；n代表肽的总氨基酸残基数。

Ney^[10]认为对于分子质量约为6 000 Da的肽，如果其Q值高于1 400 cal/mol，则是苦味肽；如果低于1 300 cal/mol，则是非苦味肽。但这个假设不能用于判断Q值介于1 300 cal/mol和1 400 cal/mol之间或分子质量明显高于6 000 Da的肽的苦味程度。

这一假设已在风味肽研究领域得到了部分应用和证明。血红蛋白苦味肽^[48]VVYPWTQRF的计算Q值为1 732.2 cal/mol，小麦麸皮苦味肽^[47]FEEIRNL和FEEIR的Q值分别显示为1 408.6 cal/mol和1 490.0 cal/mol；宋雪梅等^[13]根据Q值推定了14种来源于牦牛乳硬质干酪的苦味肽。

表1中的大多数苦味肽符合Q值假说，但也有例外。如合成的蚕豆酱苦味肽^[51]RIINPEGQQ、GGLRIINPEG和GGLRIINPEGQQ皆可检测到不同程度的苦味，但其Q值分别只有1 070.0、1 225.0 cal/mol和1 004.2 cal/mol；而疏水性低于1 400 cal/mol的肽NALPE^[16]（实际为1 262.0 cal/mol，计算结果从<http://www.cqudfbp.net/bitterPrediction/tools/DataInput.jsp>^[58]得到）则被小组评价为“非常苦”。以上研究表明肽的苦味不仅受平均疏水性的影响，可能还受到Q值假设之外的一些其他因素的影响。

2.2 苦味氨基酸

肽的一级结构对肽的特性也有影响，由碱性蛋白酶制备的大西洋鲑鱼（*Salmo salar*）副产品的蛋白水解物显示出比酸性蛋白酶和中性蛋白酶的水解物更强烈的苦味^[1]；类似的结果也出现在对6种商业酶制备的3种罗非鱼副产品（鱼头、鱼骨和鱼皮）蛋白水解物^[46]的感官特性比较以及无水解羽扇豆蛋白分离物^[6]（*Lupinus angustifolius* L. protein isolates, LPI）和9种LPI水解物的感官特征分析上。这些研究表明，蛋白质受酶特异性水解形成的苦味肽具有不同的一级结构，从而影响了肽的苦味或强度。

芳香族、碱性和支链氨基酸都是已知的苦味氨基酸^[69], 包括组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、缬氨酸(Val)、苯丙氨酸(Phe)和异亮氨酸(Ile)^[70], 同时, 它们也都是疏水氨基酸。

苦味氨基酸可能是肽呈现苦味的原因之一。Takahashi等^[71]采用Glu残基取代Arg和Phe, 可将牛 β -酪蛋白的C端八肽(RGPFPIIV)从苦味转换成甜味, 其甜度比蔗糖高667倍, 这表明苦味氨基酸在特定肽的味道形成中起重要作用。因此, 一些研究人员也根据苦味氨基酸的比例来判断苦味肽, 如Liu Boye等^[14]将苦味氨基酸比例超过50%的小麦麸皮肽标记为苦味肽。

然而, Kim等^[16]合成了强苦味肽NALPE及其5个类似物N-A-L-P-R/W/P/L/S, 虽然它们都表现出不同程度的苦味, 但其苦味氨基酸相对含量最高为40%, 最低为20%, 由此可推断非苦味氨基酸可能也会影响肽的苦味。同时, Zhao Jianhua等^[51]发现合成肽比相应氨基酸的混合物显示出更低的苦味, 这也证明了苦味不仅仅受氨基酸组成的影响, 还与氨基酸所处的位置有关, 当疏水氨基酸位于有限酶解^[72]制备的长链肽、中链肽以及深度酶解^[31]制备的短链肽的肽链中心或末端时, 肽会呈现不同的苦味强度。

2.3 苦味指示基序

另一种评估肽苦味的方法是基于苦味指示基序的存在。根据Liu ZhiPing等^[73]的定义, 基序为可重复的、在蛋白质或肽中具有特定的生物功能的模式序列。在这种假设下, 当一个被鉴定的肽序含有与苦味有关的基序时就表明它具有潜在的苦味。Iwaniak等^[15]通过确认PK、VI、VL等20余种基序的存在标记了10条苦味肽, 而Hu Yun等^[45]借助BIOPEP-UWM数据库(<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>)的苦味计算工具完成了对鱼类蛋白质苦味前体的预测, 该工具主要通过比较蛋白质所含的味觉活性片段的数量来确定苦味潜力。

2.4 空间结构

空间结构是肽的属性之一, 相似的结构可能表明其感官性质相似。Kim等^[16]将强苦肽NAPLE的类似物根据苦味程度分为无苦味、微苦味和强苦味的3组, 通过比较肽的计算机模拟的空间结构, 发现组内的肽具有相似的结构, 而组间则存在结构上的差异, 他们提出肽苦味决定因素可能包括疏水区的组成、极性基团和疏水区的空间方向以及同一平面内面临的极性基团和疏水区之间的接近程度^[16]。然而, De Carvalho等^[74]在通过转谷氨酰胺酶交联改变乳清蛋白肽的构象后, 发现与苦味有关的刺激强度或持续时间并没有减少, 这表明可能只有一些特殊的空间结构变化才会对苦味起决定性的作用。

Ishibashi等^[18,75]认为苦味肽中存在两个参与苦味形成机制的决定位点, 分别为至少由3-碳骨架构成的庞大疏水基团的结合单元(binding unit, BU)(与苦味受体结合), 以及包括 α -氨基或疏水基团的庞大的碱性基团的

刺激单元(stimulating unit, SU)。当苦味肽中的BU与SU的平均空间距离约为4.1 Å^[18]时, T2Rs(结合口袋尺寸约为15 Å^[76])就可通过位于结合口袋壁上的疏水识别区^[77]感知它的疏水性, 进而触发神经信号级联^[78]。这一假设可能可以解释一些肽的 Q 值大于1 400 cal/mol却并不呈现苦味的现象。此外, 疏水识别区中存在的疏水基团数量可能会影响苦味的强弱, 如2/3/4-亮氨酸肽的苦味分别是亮氨酸单体的8、15、30倍^[17]。

2.5 QSAR模型

随着计算科学的发展, 基于机器学习方法的QSAR模型也被用于识别和预测肽的苦味。2006年, Kim等^[19]基于由224个二至四肽和5个氨基酸组成的数据库进行了QSAR建模分析, 结果表明, C末端的大量疏水氨基酸和N末端的大量碱性氨基酸与苦味高度相关。Xu Biyang等^[20]建立了3个QSAR模型, 认为对于苦味二肽、三肽和四肽来说, 占主导地位的是C端氨基酸的疏水性、第二位氨基酸的电子特性和N端存在的大量疏水性氨基酸。Hryniewicz等^[79]报道认为理想的苦味ACE抑制肽其C端、N端通常分别由P、Y、F和G、V、I、L组成。

综上所述, 在决定肽的苦味的诸多因素中, 疏水性占主导地位, 包括单个氨基酸的疏水性、疏水区域、疏水基团的数量及肽表面的疏水性; 其次则是特定位置上氨基酸的类型, 改变特定苦味肽的某一个氨基酸会使肽的味道发生剧烈变化, 理想苦味肽N端和C端的氨基酸具有偏好性; 最后则是空间结构, 肽的BU和SU(最优值为4.1 Å)可能参与苦味形成机制, 二者的平均距离会影响T2Rs对肽苦味的识别。然而, 要揭示具有普适性的苦味机制还需更深入的探索, 这也是苦味肽未来的一个重要研究方向。

3 苦味酶解物/肽的脱苦方法

3.1 非酶法脱苦

3.1.1 添加剂的掩蔽和抑制作用

目前对于苦味的脱苦方法可以分为非酶法脱苦和酶法脱苦, 它们的原理、优势及不足如表3所示。

最近, 味精溶液对苦味肽的掩蔽作用受到关注^[51], 这可能是由于鲜味物质对苦味肽的非竞争型抑制^[80]。Tamura等^[81]报道添加脱脂牛奶、大豆酪蛋白、酸性氨基酸和糊化淀粉皆可有效掩盖苦味, 他们还发现对苦味氨基酸进行乙酰化或将酸性氨基酸连接到疏水性氨基酸上也具有脱苦效应。Lemieux等^[82]总结了一些可以掩盖低水平苦味的物质, 包括谷氨酸、天冬氨酸(酸味将被引入)、聚磷酸盐、明胶、环糊精和淀粉; Saha等^[83]也认为谷氨酰低聚肽、谷氨酰谷氨酸光学异构体、磷脂和溶血磷脂也有掩盖苦味的作用。此外, Xu Qingbiao等^[84]报道氯化钠可通过降低肽的表面疏水性而发挥苦味掩蔽作用。

表3 脱苦方法的原理与比较

Table 3 Principles, advantages and disadvantages of different debittering treatments

分类	处理方法	原理	优势	不足
非酶法 脱苦	添加可以掩盖苦味的物质	添加剂带来更强的味道以掩盖苦味，将苦味物质带入其网状结构	不影响苦味肽的活性与营养价值	可能引入添加剂的味道
	添加苦味抑制、拮抗或阻断剂或对苦味肽进行封装	阻止苦味肽和T2Rs结合；降低苦味肽的表面疏水性以抑制苦味等	不影响苦味肽的活性与营养价值	可能引入抑制剂的的味道
	使用材料、有机溶剂、色谱技术、等电点沉淀去除苦味肽	材料吸附、溶剂提取、分配系数差异、肽在等电点溶解度最低等	理论上可以完全去除苦味	损失一部分氨基酸与营养价值
	美拉德反应	糖基化使苦味肽的疏水性急剧降低，改变了肽的结构	可溶性增加，产物可能有新的活性	可能使肽原本的活性发生不确定的变化
酶法 脱苦	通过酶催化的脱酰胺、Plastein反应、水解作用处理苦味肽	改变苦味肽的构象或从中释放氨基酸	高效、具有特异性、固定化酶可以重复使用	苦味肽可能随着构象或序列的改变而失活

3.1.2 阻止苦味肽与苦味受体结合

苦味由各种T2Rs介导，人类可通过25种已知的T2Rs感知不同类型肽的苦味^[85]。Xu Qingbiao等^[25]从鸡蛋白水解物馏分F5%-1中发现的具有最强的苦味抑制活性的16种肽被认为是苦味受体T2R4/7/14拮抗剂候选物，可用于抑制药物和食品工业中的苦味。Kim等^[86]发现来自韩国酱油的分子质量小于500 Da的F05馏分物质可拮抗人类苦味受体（human type 2 bitter taste receptor, hTAS2R）43和46。赤霉酸被发现是苦味受体T2R4的阻断剂，在与奎宁的竞争实验中显示出的IC₅₀值为（34.4±1.1）μmol/L^[87]。Kim等^[80]报道鲜味肽可通过与苦味受体结合来抑制水杨苷的苦味，这一机制也可能适用于苦味肽。

封装是非酶法改善肽感官质量的新方向。Krunić等^[88]建立了由浓缩乳清蛋白和胰蛋白酶水解物组成的封装系统，通过将有苦味的肽封装在基质内，使其不能对产品味道产生影响，达到了中和苦味的目的。Gao Yi等^[89-90]分别通过油包水高内相乳剂和水包油包水的封装策略，降低了相同苦味肽的苦味，证明了苦味肽封装策略的多样性。

3.1.3 美拉德反应的修饰作用

美拉德反应是指羰基和氨基化合物通过加成、缩合、重排和聚合生成一系列类黑素和挥发性物质的复杂化学反应^[91]，在水解物去苦味应用中也有相关报道。Zhou Xue等^[92]发现，与酶法水解物相比，所有来自不同还原糖特别是葡萄糖与果糖和豌豆蛋白水解物的美拉德反应中间体都显示出了较低苦味。Zhang Ninglong等^[93]发现与空白对照组相比，暗纹东方鲀（*Takifugu obscurus*）副产品水解物在与木糖进行美拉德反应后，其苦味明显降低。Zhang Chunlei等^[94]认为糖基化反应降低苦味可能是由于肽的表面疏水性急剧降低和溶解度增加。

3.1.4 分离

Tamura等^[81]报道了通过分离使肽苦味消除的研究，包括乙醇提取以及树脂吸附，这些都依赖于对“不需要的”分子的清除，Saha等^[83]报道了活性炭的脱苦效果。此外，Imai等^[95]制备了一种未经化学修饰的新型硅胶，在

中性条件下对疏水或带正电的肽有较高的吸附能力，借此实现了对苦味肽的选择性消除；同时，疏水性肽在等电点的pH值附近溶解度非常低，可通过等电点沉淀被去除^[96]。

色谱分离法也是一种可行的脱苦方法。Roland等^[97]将疏水色谱法应用在酪蛋白和大豆蛋白水解物的脱苦中，因为酚醛树脂与含有芳香/杂环侧链的肽氨基酸残基形成的疏水相互作用延迟了苦味成分的出峰，因而可选择性地制备无苦味肽水解物。Lin Shibin等^[98]发现C₁₈柱在RP-HPLC中是比C₈和酚醛树脂更有效的去苦味材料，而Kim等^[99]借助RP-HPLC法采用C₁₈柱从大豆11S球蛋白的胰蛋白酶水解物中分离和鉴定出了苦味肽。

由于苦味成分被去除，经过分离操作后理论上可获得没有任何苦味的产品，但不可忽视的是分离过程中会损失一定比例的氨基酸，这将导致蛋白水解物营养价值的降低。

3.2 酶法脱苦

3.2.1 Plastein反应

肽或酶解物的苦味可通过酶催化的Plastein反应的修饰作用来减少。在Plastein反应中，弹性的、胶状的和不溶于水的产物会在酶的催化下形成^[99]，反应过程可能涉及肽的缩合、转肽或肽聚集^[27]，该反应的降苦效应可能是源于反应后酶水解物的疏水氨基酸残基被包藏而导致不能与味觉感受器接触^[32]。如由碱性酶诱导的牛红细胞水解物和谷氨酸制备的Plastein产物，与相应的水解物相比仅有50%的苦味^[100]。Sharma等^[101]研究发现所有鲑鱼骨架蛋白水解物的Plastein产物都比对照组显示出更低的苦味，其中在40℃条件下借助1%的Alcalase 2.4 L形成的Plastein产物苦味最小（4.45±0.52）。

3.2.2 脱酰胺处理

游离氨基酸、肽和蛋白质的氨基可通过酶的脱酰胺作用去除，通过将肽序中谷氨酰胺残基转换为谷氨酸可抑制苦味物质与苦味受体的结合^[86]。谷氨酰胺酶^[102]、肽谷氨酰胺酶^[103]、转谷氨酰胺酶^[104]和糜蛋白酶^[105]已被用于基于脱酰胺反应的肽类脱苦效应研究。与单一水解或脱酰胺的小麦面筋相比，谷氨酰胺酶脱酰胺后的酸性水解物具有较弱的苦味和鲜味^[106]。Liu Boye等^[107]发现谷氨

酰胺酶处理180 min的小麦麸水解物的苦味评分可从1.33降低至0.65, 因此认为脱酰胺处理对小麦麸水解物的苦味具有掩蔽作用。

3.2.3 动物酶的水解作用

如图1所示, 具有脱苦作用的水解酶来源广泛, 研究者在动物、植物及微生物中均有发现。其中, 动物通常拥有复杂的酶系统, 已报道的具有脱苦能力的动物酶对于一些苦味或疏水氨基酸具有特异性。来自乌贼 (*Illex illecebrosus*) 肝胰腺的羧基肽酶对C端与Ala相邻的Phe或Leu的底物具有偏好, 可减少蛋白水解物的苦味^[108]。Ge Shijun等^[109]制备的固定化猪胰腺外肽酶能有效释放肽中的氨基酸, 尤其是Arg、Lys、His、Tyr、Phe、Leu和Glu, 进而去除胰蛋白酶/胰凝乳蛋白酶酪蛋白水解物的苦味。来自鸡 (*Gallus gallus*) 的一种具有广泛底物特异性的氨基肽酶N, 对于亮氨酸- β -萘酰胺具有最高的底物特异性, 有可能可与其他内切酶结合制备脱苦蛋白水解物^[110]。上述报道中的酶都对苦味或疏水氨基酸有偏好, 因此, 对苦味或疏水氨基酸具有特异性的动物酶可考虑作为脱苦候选酶。

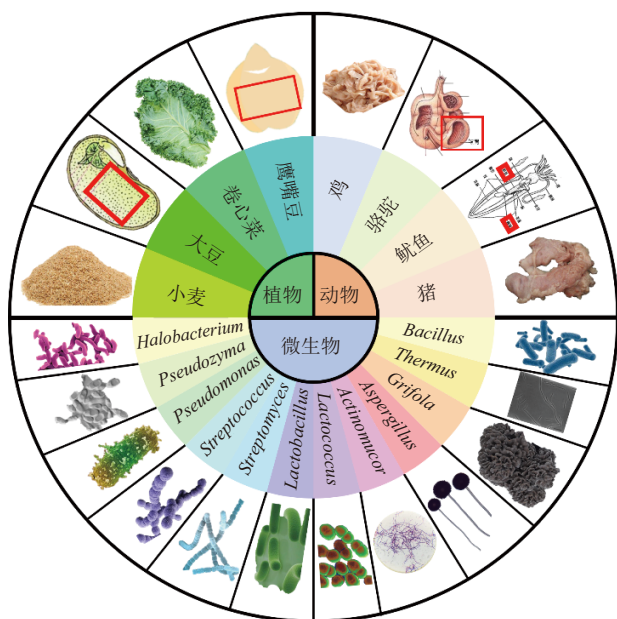


图1 部分脱苦水解酶的来源

Fig. 1 Sources of some debittering enzymes

3.2.4 植物酶的水解作用

目前, 一些商业化的蛋白水解物和纯化的生物活性肽大多是植物来源的蛋白质, 从植物中寻找酶来减少或缓解苦味成为热点研究方向。Zhang Mengmeng等^[111]报道, 大豆幼苗部分纯化的蛋白酶 (partially purified soybean protease, PSP) 可在3 h内将碱性酶制备的大豆蛋白分离水解物 (soybean protein isolate hydrolysate, SPIH) 的苦味评分从 3.45 ± 0.51 降至0, 说明PSP可完全

去除碱性蛋白酶制备的SPIH的苦味, 这可能预示着来源于小麦、水稻、玉米和花生等植物种子的蛋白水解物的苦味可被其发芽种子中的蛋白酶有效去除。大豆蛋白酶D3^[112]、来自白菜叶 (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) 的氨基肽酶与脯氨酸氨基肽酶和来自鹰嘴豆子叶 (*Cicer arietinum* L.) 的氨基肽酶^[113]也显示出了脱苦效果, 进一步证明了植物酶的脱苦潜力。

Umetsu等^[114]研究发现小麦羧基肽酶处理的酪蛋白水解物苦味肽, 其 $\Delta f > 1\ 600$ cal/mol的疏水氨基酸占释放的总游离氨基酸的32%~76%, 表明小麦羧基肽酶可从苦味肽中释放疏水氨基酸以达到去苦味效果; 结合Q值假设, 可认为植物脱苦酶可能也是通过释放疏水氨基酸来减轻或去除肽的苦味。

3.2.5 真菌酶的水解作用

一些具有悠久安全使用历史的丝状真菌被广泛用于制备食品级工业酶。如来自米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的同时具有外切蛋白酶活性和内切肽酶活性的商业风味蛋白酶被认为可用于脱苦^[115]; Edens等^[116]报道来自 *A. niger* 的胞外脯氨酸内切蛋白酶可完全脱除酪蛋白水解物苦味; 从黑曲霉 (*A. sojae*) GIM3.30中克隆的亮氨酸氨基肽酶Lap1既可降低酪蛋白和大豆蛋白水解物的苦味, 也能提高其水解程度^[117]。

此外, 将真菌中性蛋白酶Protease A 2SD和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 衍生的Protex 6L应用于两步酶辅助水提取, 发现由两种酶混合水解产生的大豆蛋白水解物具有比单一Protex 6L水解物更低的苦味, 其原因可能是Protease A 2SD倾向于裂解苦味肽N端的Leu和Arg残基^[9]。因此, 可考虑结合使用真菌酶与细菌酶对蛋白水解物脱苦。

在其他真菌中发现的一些氨基肽酶也具有去苦味的能力或潜力。经来自食用担子菌 *Grifola frondosa* 的氨基肽酶处理后, 大豆蛋白和酪蛋白水解物的苦味肽中的疏水氨基酸被选择性地释放出来, 并且苦味随之减少^[118]。另一种从 *G. frondosa* 中分离出来的氨基肽酶, 也可通过水解N端疏水性氨基酸残基而达到去蛋白水解物苦味的目的^[119]。

3.2.6 细菌的水解作用

自然界中不同属、种, 甚至同一物种的细菌皆含有特殊的酶系统, 且由于细菌生命周期较短、繁殖速度较快, 其进化的可能性也较高。来自 *P. hubeiensis* 31-B的亮氨酸氨基肽酶AP31-B能从吞噬细胞增强激素 (T-K-P-R) 中释放苏氨酸、从三肽L-A-P中释放亮氨酸和从L-L-A中释放亮氨酸与丙氨酸, 这使得酪蛋白水解物的苦味在AP31-B处理3 h后即可降至相当于0.2%咖啡因苦味的水平, 表明该氨基肽酶可作为食用酶制剂用于乳制品加工^[120]。Murai等^[121]发现源自 *Aneurinibacillus* sp. AM-1菌

株的具有脯氨酸特异性的氨基肽酶有望降解乳制品中的苦味肽。因此,可考虑采用细菌酶进行脱苦处理。

乳酸菌(*Lactis acid bacteria*, LAB)常被用作食品发酵菌种,其中*L. lactis*是一种模式LAB^[122],Tchorbanov等^[123]报道*Lactobacillus* LBL-4显示出对蛋白质酶解物的脱苦潜力,*L. lactis* KLDS4. 0325的完整基因组测序显示其也有降解苦味肽的潜力^[124],这说明*L. latis*中可能含有脱苦酶。Sridhar等^[125]报道来自*L. helveticus* CNRZ32的两种内肽酶(PepE2、PepO3)对酪蛋白的两种模式苦味肽(β -酪蛋白f193-209和 α_{s1} -酪蛋白f1-9)皆具有水解特异性;Hu Keke等^[126]报道*L. lactis* prolidase可优先水解Xaa-Pro二肽,其中Xaa是疏水性氨基酸,这使其有望成为工业脱苦应用的潜在候选酶。嗜热链球菌(*S. thermophilus*)是一种嗜热的LAB,Fernandez-Espla等^[122]从*S. thermophilus*中发现的一种氨基肽酶PepS对N端含有精氨酸或芳香族氨基酸的肽具有优先降解性,可水解富含疏水氨基酸的苦味肽;Motoshima等^[121]也报道了来自*S. thermophilus* YRC001的赖氨酸酶对胰蛋白酶消化物的脱苦效果。以上报道说明从LAB中发掘脱苦酶具有可行性。

链霉菌(*Streptomyces*)的氨基肽酶具有更高的稳定性、酶活性和广泛的底物特异性,在制备脱苦蛋白水解物方面显示出良好的应用价值^[127]。Hatanaka等^[26]报道来自*Streptomyces* sp. TH-4的氨基肽酶对N端疏水氨基酸有偏好且对Arg残基有较高水解倾向,它对合成的苦味肽KKK、LL和FFF具有相对活性;Wan Kun等^[128]报道*Streptomyces*氨基肽酶XPO DUET可通过裂解N端的Phe、Val和Pro,降解一种来源于胰酶消化酪蛋白的过敏性苦味肽FFVAPFPEVFGK。

其他来自不同细菌的酶的脱苦能力或潜力也相继被研究人员报道。来自荧光假单胞菌(*P. fluorescens*) RO98的纯化蛋白酶可水解 α_{s1} -casein f1-9和 β -casein f193-209两种苦味肽^[129],来自*T. aquaticus* YT-1的氨基肽酶T可降低由3种蛋白酶(枯草蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶)水解的酪蛋白水解物的苦味^[130];来自巨型芽孢杆菌(*B. megaterium*)的M32羧肽酶(CPM32)^[131]、*A. elegans*的羧肽酶^[132]和外肽酶^[133]都具有降低大豆蛋白水解物苦味的效果。Capiralla等^[134]认为一种来自*H. halobium* S9、具有疏水性氨基酸的特异性胞外内肽酶可作为奶酪和蛋白水解物去苦味的候选酶。

已报道的具有脱苦能力的酶大多是通过降解苦味肽或改变苦味肽氨基酸序列、结构或构象实现,主要包括转氨酶类的脱酰胺作用、Plastein反应及酶解反应,大部分报道都提及脱苦水解酶对苦味肽中的苦味或疏水氨基酸具有特异性(表4),因此可利用此特性预测或鉴别酶

对苦味肽的脱苦能力。来源于动物或植物的酶在应用时具有相对更高的安全性,但提取不易、产量不可控,而直接从微生物中提取酶也受限于靶向分离技术,且难以获得高纯度目标酶。随着基因工程技术的发展,研究者可通过鉴定酶序列并构建表达载体,进而在成熟的原核或真核生物表达体系中进行基因表达,高效获得较高纯度的目标酶。

表4 具有脱苦能力/潜力的微生物酶的来源、登录号及氨基酸偏好
Table 4 Sources, accession numbers and amino acid preferences of microbial enzymes with debittering capacity or potential

酶	登录号	来源	对Xaa-pNA ^a 的偏好	参考文献
ScAP	MZ542353 (GenBank)	<i>S. canis</i> T20	Leu, Met, Phe	[65-66]
脯氨酸特异性氨基肽酶	未报道	<i>Aneurinibacillus</i> sp. strain AM-1	Leu, Pro	[121]
蛋白酶A 2SD	未报道	<i>A. oryzae</i>	未报道	[9]
AP31-B	未报道	<i>P. hubeiensis</i> 31-B	Leu, Arg, Met	[120]
TH-4AP	AB237499 (DDBJ database)	<i>Streptomyces</i> sp. TH-4	Lys, Arg, Lys(Boc) ^b	[26]
XPO DUET	AB284164 (DDBJ database)	<i>S. costaricanus</i> TH-4	Met, Met/Phe/Gly/Ala-Pro	[128]
LAP	未报道	<i>S. gedanensis</i>	Leu, Met, Phe	[127]
GFAP	未报道	<i>G. frondosa</i>	未报道	[118]
AP	未报道	<i>Lactobacillus</i> LBL-4	未报道	[123]
PepN	未报道	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> Wg2	未报道	[135]
氨基肽P	未报道	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	未报道	[136]
脯氨酸肽酶	EU216565 (GenBank)	<i>L. lactis</i> NRRL B-1821	未报道	[137]
PepO2	AF321529 (GenBank)	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	未报道	[138]
PepE2	AY365130 (GenBank)	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	未报道	[125]
PepO3	AY355128 (GenBank)	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	未报道	[125]
Flavourzyme (500L)	未报道	<i>A. oryzae</i>	未报道	[115,139]
脯氨酸特异性内蛋白酶	未报道	<i>A. niger</i>	Ala-Ala-Pro, Z ^c -Ala-Ala-Ala-Pro	[116]
Lap1	AF419160.1 (GenBank)	<i>A. sojae</i> GIM3.30	Leu, Arg, Met, Lys	[117]
PepS	AF102860 (GenBank)	<i>S. thermophilu</i>	Arg	[122]
赖氨酸氨基肽酶	D38040 (GenBank)	<i>S. thermophilu</i> YRC001	未报道	[21]
<i>Halobacterium</i> 内肽酶	未报道	<i>H. halobium</i> S9	Suc ^d -Ala-Ala-Pro-Phe, Suc ^d -Ala-Leu-Pro-Phe, Suc ^d -Ala-Phe-Ala-Phe	[134]
蛋白酶	未报道	<i>P. fluorescens</i> RO98	未报道	[129]
氨基肽T	未报道	<i>T. aquaticus</i> YT-1	未报道	[130]
CPM32	未报道	<i>B. megaterium</i>	未报道	[131]
羧肽酶	未报道	<i>A. elegans</i>	未报道	[132]
外肽酶	未报道	<i>A. elegans</i>	未报道	[133]

注: Xaa-pNA^a.由氨基酸的羧基与对硝基苯胺的氨基缩合而成的底物; Boc^b.叔丁氧羰基,肽合成中用于保护氨基酸中的氨基; Z^c-.苄氧羰基(benzyloxycarbonyl-),肽合成中用于保护氨基的保护基; Suc^d-.N-琥珀酰基-(N-succinyl-);“/”前后为同一个位置的不同氨基酸;加粗字体的氨基酸均为苦味氨基酸,也是疏水氨基酸; GenBank. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; DDBJ database. <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>。

4 结 语

苦味通常被认为是食品的缺陷味道,蛋白质在酶解过程中形成的苦味肽是导致苦味产生的原因之一,它们通常具有高疏水氨基酸比例。目前应用于苦味肽特征或苦味预测的指标包括Q值、苦味指示基序和空间结构。

同时,一些苦味肽还具有抗氧化、抑制ACE和免疫调节活性等生物活性,但应用时也会受到苦味的负面影响。研究者发现可通过非酶法和酶法处理来掩盖、缓解、减少和去除肽的苦味,其中酶法去苦味处理拥有高效、反应温和等独特优势,并且可以一步法实现水解与脱苦。此外,还鉴定了多种来自动物、植物、真菌和细菌的降苦/去苦酶,它们大部分都对疏水氨基酸具有特异性,可考虑将其作为鉴别及筛选脱苦酶的参考依据。

综合目前关于苦味肽苦味机制的研究而言,疏水性可能是肽苦味产生的先决条件,包括单个氨基酸的疏水性、疏水区域、疏水基团的数量及肽表面的疏水性在内的有关因素在肽苦味的产生与强度上占主导地位。空间结构方面,苦味肽的苦味决定位点可能参与苦味形成,BU与SU之间的平均距离是T2Rs识别苦味的关键,但更普适的苦味机制仍有待深入揭示, Q 值假设与苦味决定位点假设存在互补的可能,因此以特定技术改变苦味肽的空间结构,尤其是BU与SU的平均距离,并结合QSAR定量比较前后苦味差异,可能是一个前景较好的揭示肽苦味机制的研究方向。

选择脱苦方法处理苦味肽时,如果需要保留其营养价值或特殊活性,可选择采用合适的添加剂或封装策略;在以苦味肽或含苦味肽的水解物为原料制备产品时,可通过美拉德反应、Plastein反应或酶水解等策略达到降苦或脱苦的目的;但当苦味肽不具备保留价值,成为了体系中“不需要的物质”时,则可选择乙醇与异丙醇等有机溶剂、活性炭与树脂等吸附材料或使用色谱技术将其完全分离以去除苦味。同时,为了使苦味活性肽在功能性食品和生物医药领域实现更好的商业应用,还需结合苦味机制的研究进展,继续探索高效、特异和对产品质量负面影响最小的脱苦策略。

参考文献:

- [1] ASPEVIK T, TOTLAND C, LEA P, et al. Sensory and surface-active properties of protein hydrolysates based on Atlantic salmon (*Salmo salar*) by-products[J]. Process Biochemistry, 2016, 51(8): 1006-1014. DOI:10.1016/j.procbio.2016.04.015.
- [2] 王浩, 李加兴, 郑建仙. 阿魏酸苯环取代衍生物改良支链氨基酸苦味味觉的研究[J]. 食品与机械, 2023, 39(8): 6-11. DOI:10.13652/j.spjx.1003.5788.2023.80299.
- [3] MINE Y, SHAHIDI F. Nutraceuical proteins and peptides in health and disease[M]. Boca Raton: CRC Press, 2005. DOI:10.1201/9781420028836.
- [4] LUO C, GWEKWE B, CHOTO P, et al. Bitter peptides from enzymatically hydrolyzed protein increase the number of leucocytes and lysozyme activity of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 81: 130-134. DOI:10.1016/j.fsi.2018.07.013.
- [5] YOKOMIZO A, TAKENAKA Y, TAKENAKA T. Antioxidative activity of peptides prepared from okara protein[J]. Food Science and Technology Research, 2002, 8(4): 357-359. DOI:10.3136/fstr.8.357.
- [6] SCHLEGEL K, SONTHEIMER K, HICKISCH A, et al. Enzymatic hydrolysis of lupin protein isolates-changes in the molecular weight distribution, technofunctional characteristics, and sensory attributes[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(8): 2747-2759. DOI:10.1002/fsn3.1139.
- [7] IWANIAK A, MINKIEWICZ P, HRYNKIEWICZ M, et al. Hybrid approach in the analysis of bovine milk protein hydrolysates as a source of peptides containing di- and tripeptide bitterness indicators[J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2020, 70(2): 139-150. DOI:10.31883/pjfn/113532.
- [8] KOMAI T, KAWABATA C, TOJO H, et al. Purification of serine carboxypeptidase from the hepatopancreas of Japanese common squid *Todarodes pacificus* and its application for elimination of bitterness from bitter peptides[J]. Fisheries Science, 2007, 73(2): 404-411. DOI:10.1111/j.1444-2906.2007.01348.x.
- [9] TONG X H, LIAN Z T, MIAO L M, et al. An innovative two-step enzyme-assisted aqueous extraction for the production of reduced bitterness soybean protein hydrolysates with high nutritional value[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 134: 110151. DOI:10.1016/j.lwt.2020.110151.
- [10] NEY K H. Bitterness of peptides: amino acid composition and chain length[J]. ACS Symposium Series, 1979, 115: 149-173. DOI:10.1021/bk-1979-0115.ch006.
- [11] RAUH V M, JOHANSEN L B, IPSEN R, et al. Plasmin activity in UHT milk: relationship between proteolysis, age gelation, and bitterness[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(28): 6852-6860. DOI:10.1021/jf502088u.
- [12] ZHAO D, XU Y J, GU T Y, et al. Peptidomic investigation of the interplay between enzymatic tenderization and the digestibility of beef semimembranosus proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(4): 1136-1146. DOI:10.1021/acs.jafc.9b06618.
- [13] 宋雪梅, 张炎, 杨敏, 等. 牦牛乳硬干酪苦味肽的分离与特征鉴定[J]. 食品科学, 2016, 37(15): 160-164. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201615027.
- [14] LIU B Y, ZHU K X, GUO X N, et al. Changes in the enzyme-induced release of bitter peptides from wheat gluten hydrolysates[J]. RSC Advances, 2016, 6(104): 102249-102257. DOI:10.1039/C6RA22155F.
- [15] IWANIAK A, HRYNKIEWICZ M, MINKIEWICZ P, et al. Soybean (*Glycine max*) protein hydrolysates as sources of peptide bitter-tasting indicators: an analysis based on hybrid and fragmentomic approaches[J]. Applied Sciences, 2020, 10(7): 2514. DOI:10.3390/app10072514.
- [16] KIM M R, YUKIO K, KIM K M, et al. Tastes and structures of bitter peptide, asparagine-alanine-leucine-proline-glutamate, and its synthetic analogues[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(14): 5852-5858. DOI:10.1021/jf7036664.
- [17] ISHIBASHI N, ARITA Y, KANEHISA H, et al. Bitterness of leucine-containing peptides[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1987, 51(9): 2389-2394. DOI:10.1080/00021369.1987.10868411.
- [18] ISHIBASHI N, KOUGE K, SHINODA I, et al. A mechanism for bitter taste sensibility in peptides[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1988, 52(3): 819-827. DOI:10.1080/00021369.1988.10868743.
- [19] KIM H O, LI-CHAN E C Y. Quantitative structure-activity relationship study of bitter peptides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(26): 10102-10111. DOI:10.1021/jf062422j.
- [20] XU B Y, CHUNG H Y. Quantitative structure-activity relationship study of bitter di-, tri- and tetrapeptides using integrated descriptors[J]. Molecules, 2019, 24(15): 2846. DOI:10.3390/molecules24152846.

- [21] MOTOSHIMA H, SHIRAISHI T, TSUKASAKI F, et al. Purification, characterization, and gene cloning of lysyl aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* YRC001[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67(4): 772-782. DOI:10.1271/bbb.67.772.
- [22] TOELSTEDE S, HOFMANN T. Quantitative studies and taste re-engineering experiments toward the decoding of the nonvolatile sensometabolome of Gouda cheese[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(13): 5299-5307. DOI:10.1021/jf800552n.
- [23] MONGE NETO A Á, STRÖHER R, ASSENHA H B R, et al. Interaction of peptides obtained from the enzymatic hydrolysis of soybean meal with cyclodextrins: an evaluation of bitterness reduction[J]. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2017, 89(1): 59-69. DOI:10.1007/s10847-017-0731-7.
- [24] RUDOLPH S, RIEDEL E, HENLE T. Studies on the interaction of the aromatic amino acids tryptophan, tyrosine and phenylalanine as well as tryptophan-containing dipeptides with cyclodextrins[J]. European Food Research and Technology, 2018, 244(9): 1511-1519. DOI:10.1007/s00217-018-3065-9.
- [25] XU Q B, SINGH N, HONG H, et al. Hen protein-derived peptides as the blockers of human bitter taste receptors T2R4, T2R7 and T2R14[J]. Food Chemistry, 2019, 283: 621-627. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.01.059.
- [26] HATANAKA T, ARIMA J, URAJI M, et al. Characterization, cloning, sequencing, and expression of an aminopeptidase N from *Streptomyces* sp. TH-4[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(2): 347-356. DOI:10.1007/s00253-006-0669-y.
- [27] GONG M, MOHAN A, GIBSON A, et al. Mechanisms of plastein formation, and prospective food and nutraceutical applications of the peptide aggregates[J]. Biotechnology Reports, 2015, 5: 63-69. DOI:10.1016/j.btre.2014.12.003.
- [28] HONG P K, NDAGIJIMANA M, BETTI M. Glucosamine-induced glycation of hydrolysed meat proteins in the presence or absence of transglutaminase: chemical modifications and taste-enhancing activity[J]. Food Chemistry, 2016, 197: 1143-1152. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.11.096.
- [29] TOSSAVAINEN O, OUTINEN M, HARJU M, et al. Removal of β -lactoglobulin residues from an enzymatic whey protein hydrolysate[J]. Milchwissenschaft, 1996, 51(11): 628-632.
- [30] ZHU X P, SUN-WATERHOUSE D, CHEN J H, et al. Bitter-tasting hydrophobic peptides prepared from soy sauce using aqueous ethanol solutions influence taste sensation[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2020, 55(1): 146-156. DOI:10.1111/ijfs.14271.
- [31] FITZGERALD R J, O'CUINN G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates[J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(2): 234-237. DOI:10.1016/j.biotechadv.2005.11.002.
- [32] LIU B Y, LI N N, CHEN F S, et al. Review on the release mechanism and debittering technology of bitter peptides from protein hydrolysates[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(6): 5153-5170. DOI:10.1111/1541-4337.13050.
- [33] 董静茹, 莫君明, 王升. 鹰嘴豆多肽抗疲劳活性[J]. 食品与机械, 2023, 39(3): 142-146.
- [34] 沈金鹏, 王珂雯, 黄潘钿, 等. 珍珠贝水解肽的制备、氨基酸组成及抗炎活性[J]. 食品与机械, 2023, 39(2): 132-139; 206.
- [35] 厉荣玉, 厉红, 郑鹏, 等. 酪蛋白GYLEQ抗氧化肽: 钙螯合物的制备、表征及功能特性[J]. 食品与机械, 2023, 39(2): 37-44.
- [36] TOELSTEDE S, HOFMANN T. Sensomics mapping and identification of the key bitter metabolites in Gouda cheese[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(8): 2795-2804. DOI:10.1021/jf7036533.
- [37] ZHANG X, ZHENG Y R, ZHOU R, et al. Comprehensive identification of molecular profiles related to sensory and nutritional changes in Mongolian cheese during storage by untargeted metabolomics coupled with quantification of free amino acids[J]. Food Chemistry, 2022, 386: 132740. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.132740.
- [38] CHATTERJEE C, GLEDDIE S, XIAO C W. Soybean bioactive peptides and their functional properties[J]. Nutrients, 2018, 10(9): 1211. DOI:10.3390/nu10091211.
- [39] KIM I M R, KAWAMURA Y, LEE C H. Isolation and identification of bitter peptides of tryptic hydrolysate of soybean 11S glycinin by reverse-phase high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Food Science, 2003, 68(8): 2416-2422. DOI:10.1111/j.1365-2621.2003.tb07039.x.
- [40] KIM M R, CHOI S Y, KIM C S, et al. Amino acid sequence analysis of bitter peptides from a soybean proglycinin subunit synthesized in *Escherichia coli*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1999, 63(12): 2069-2074. DOI:10.1271/bbb.63.2069.
- [41] 赵铭琪, 张秀秀, 李晓东, 等. 乳杆菌产X-脯氨酰-二肽酰基-氨肽酶活性对契达干酪抗氧化活性及品质的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(16): 117-125. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190703-037.
- [42] RICHTER P, SEBALD K, FISCHER K, et al. Bitter peptides YFYPEL, VAPPEVF, and YQEPVLGPVRGPFPIIV, released during gastric digestion of casein, stimulate mechanisms of gastric acid secretion via bitter taste receptors TAS2R16 and TAS2R38[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(37): 11591-11602. DOI:10.1021/acs.jafc.2c05228.
- [43] SEBALD K, DUNKEL A, SCHÄFER J, et al. Sensoproteomics: a new approach for the identification of taste-active peptides in fermented foods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(42): 11092-11104. DOI:10.1021/acs.jafc.8b04479.
- [44] FORLER B, HORSTMANN G, SCHÄFER J, et al. Effects of protein, calcium, and pH on gene transcription, cell-envelope peptidase activity of *Lactococcus lactis* strains, and the formation of bitter peptides[J]. Foods, 2021, 10(7): 1588. DOI:10.3390/foods10071588.
- [45] HU Y, XIAO N Y, YE Y T, et al. Fish proteins as potential precursors of taste-active compounds: an *in silico* study[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(14): 6404-6413. DOI:10.1002/jsfa.12006.
- [46] GAN R Q, HE Y F, LI Y C. Structural characteristics of taste active peptides in protein hydrolysates from tilapia by-products[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2022, 16(2): 1674-1687. DOI:10.1007/s11694-022-01302-8.
- [47] SUN X R, ZHENG J Y, LIU B Y, et al. Characteristics of the enzyme-induced release of bitter peptides from wheat gluten hydrolysates[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1022257. DOI:10.3389/fnut.2022.1022257.
- [48] AUBES-DAFAU I, CAPDEVIELLE J, SERIS J L, et al. Bitter peptide from hemoglobin hydrolysate: isolation and characterization[J]. FEBS Letters, 1995, 364(2): 115-119. DOI:10.1016/0014-5793(95)00361-C.
- [49] AUBES-DAFAU I, COMBES D. Effect of different proteases on bitterness of hemoglobin hydrolysates[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1997, 67(1/2): 127-138. DOI:10.1007/BF02787847.
- [50] MAHASHI K, MATSUZAKI M, YAMAMOTO Y, et al. Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysate of food proteins and characterization of their taste properties[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1999, 63(3): 555-559. DOI:10.1271/bbb.63.555.
- [51] ZHAO J H, LIAO S Q, BI X P, et al. Isolation, identification and characterization of taste peptides from fermented broad bean paste[J]. Food & Function, 2022, 13(16): 8730-8740. DOI:10.1039/d2fo01389d.

- [52] TU J C, GUO J, DONG H, et al. Novel umami-, salty-, and kokumi-enhancing γ -glutamyl tripeptides synthesized with the bitter dipeptides from defatted peanut meal protein hydrolysate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(20): 7812-7819. DOI:10.1021/acs.jafc.3c01467.
- [53] YANG J, GUO S Q, ZENG X F, et al. Synthesis of taste active γ -glutamyl peptides with pea protein hydrolysate and their taste mechanism via *in silico* study[J]. Food Chemistry, 2024, 430: 136988. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.136988.
- [54] LIU X W, JIANG D S, PETERSON D G. Identification of bitter peptides in whey protein hydrolysate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(25): 5719-5725. DOI:10.1021/jf4019728.
- [55] YU H Y, WANG X Y, XIE J R, et al. Isolation and identification of bitter-tasting peptides in Shaoxing rice wine using ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry combined with taste orientation strategy[J]. Journal of Chromatography A, 2022, 1676: 463193. DOI:10.1016/j.chroma.2022.463193.
- [56] ALIM A, SONG H L, RAZA A, et al. Identification of bitter constituents in milk-based infant formula with hydrolysed milk protein through a sensory-guided technique[J]. International Dairy Journal, 2020, 110: 104803. DOI:10.1016/j.idairyj.2020.104803.
- [57] WIESER H, BELITZ H D. Bittere peptide aus dem maisprotein zein durch hydrolyse mit pepsin[J]. Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 1975, 159(6): 329-336. DOI:10.1007/BF01461373.
- [58] QIN D Y, BO W C, ZHENG X, et al. DFBP: a comprehensive database of food-derived bioactive peptides for peptidomics research[J]. Bioinformatics, 2022, 38(12): 3275-3280. DOI:10.1093/bioinformatics/btac323.
- [59] 李梦瑶, 梁琪, 宋雪梅. 结合分子对接技术研究牦牛乳干酪苦味肽 RK7和KQ7的 α -淀粉酶抑制活性[J]. 食品科学, 2023, 44(2): 132-138. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220120-197.
- [60] KHEEREE N, SANGTANOO P, SRIMONGKOL P, et al. ACE inhibitory peptides derived from de-fatted lemon basil seeds: optimization, purification, identification, structure-activity relationship and molecular docking analysis[J]. Food & Function, 2020, 11(9): 8161-8178. DOI:10.1039/d0fo01240h.
- [61] DENG S G, CHOTO LUTEMA P, GWEKWE B, et al. Bitter peptides increase engulf of phagocytes *in vitro* and inhibit oxidation of myofibrillar protein in peeled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during chilled storage[J]. Aquaculture Reports, 2019, 15: 100234. DOI:10.1016/j.aqrep.2019.100234.
- [62] IWANIAK A, MINKIEWICZ P, DAREWICZ M, et al. BIOPEP database of sensory peptides and amino acids[J]. Food Research International, 2016, 85: 155-161. DOI:10.1016/j.foodres.2016.04.031.
- [63] MINKIEWICZ P, IWANIAK A, DAREWICZ M. BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: current opportunities[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(23): 5978. DOI:10.3390/ijms20235978.
- [64] 史芳芳, 王娜娜, 范学辉, 等. 脱苦过程中苦杏仁苷含量的变化及其与苦味的关系[J]. 食品与机械, 2018, 34(7): 211-214. DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2018.07.043.
- [65] YAN Z F, YUAN S, QIN Q, et al. Enhancement of rice protein hydrolysate quality using a novel dual enzyme system[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 158: 113110. DOI:10.1016/j.lwt.2022.113110.
- [66] QIN Q, TANG C Y, WU J, et al. A dual-functional aminopeptidase from *Streptomyces canis* T20 and its application in the preparation of small rice peptides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 167: 214-222. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.175.
- [67] 田霄艳, 郑斐庭, 冯涛, 等. 大豆蛋白水解物苦味评价方法[J]. 食品科学, 2022, 43(3): 25-32. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210309-120.
- [68] LIU B Y, ZHU K X, PENG W, et al. Effect of sequential hydrolysis with *endo*- and *exo*-peptidase on bitterness properties of wheat gluten hydrolysates[J]. RSC Advances, 2016, 6(33): 27659-27668. DOI:10.1039/C5RA28171G.
- [69] SUZUKI H, KAJIMOTO Y, KUMAGAI H. Improvement of the bitter taste of amino acids through the transpeptidation reaction of bacterial gamma-glutamyltranspeptidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(2): 313-318. DOI:10.1021/jf010726u.
- [70] LIANG Z C, LIN X Z, HE Z G, et al. Amino acid and microbial community dynamics during the fermentation of Hong Qu glutinous rice wine[J]. Food Microbiology, 2020, 90: 103467. DOI:10.1016/j.fm.2020.103467.
- [71] TAKAHASHI M, NAKATA T, NAKATANI M, et al. Conversion of bitterness of C-terminal octapeptide of bovine-casein (Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val) into sweetness[C]. Osaka: Protein Research Foundation, 1995: 281-284.
- [72] CHO M J. Characterization of bitter peptides from soy protein hydrolysates[D]. Columbia: University of Missouri, 2000.
- [73] LIU Z P, WU L Y, WANG Y, et al. Bridging protein local structures and protein functions[J]. Amino Acids, 2008, 35(3): 627-650. DOI:10.1007/s00726-008-0088-8.
- [74] DE CARVALHO N C, PESSATO T B, NEGRÃO F, et al. Physicochemical changes and bitterness of whey protein hydrolysates after transglutaminase cross-linking[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 113: 108291. DOI:10.1016/j.lwt.2019.108291.
- [75] ISHIBASHI N, KUBO T, CHINO M, et al. Taste of proline-containing peptides[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1988, 52(1): 95-98. DOI:10.1080/00021369.1988.10868632.
- [76] MAEHASHI K, HUANG L. Bitter peptides and bitter taste receptors[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009, 66(10): 1661-1671. DOI:10.1007/s00018-009-8755-9.
- [77] MATOBA T, HATA T D. Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1972, 36(8): 1423-1431. DOI:10.1080/00021369.1972.10860410.
- [78] CHANDRASHEKAR J, MUELLER K L, HOON M A, et al. T2Rs function as bitter taste receptors[J]. Cell, 2000, 100(6): 703-711. DOI:10.1016/S0092-8674(00)80706-0.
- [79] HRYNKIEWICZ M, IWANIAK A, BUCHOLSKA J, et al. Structure-activity prediction of ACE inhibitory/bitter dipeptides: a chemometric approach based on stepwise regression[J]. Molecules, 2019, 24(5): 950. DOI:10.3390/molecules24050950.
- [80] 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. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.11.114.
- [81] TAMURA M, MORI N, MIYOSHI T, et al. Practical debittering using model peptides and related compounds[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1990, 54(1): 41-51.
- [82] LEMIEUX L, SIMARD R E. Bitter flavour in dairy products. II. a review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition[J]. Le Lait, 1992, 72(4): 335-385. DOI:10.1051/lait:1992426.
- [83] SAHA B C, HAYASHI K. Debittering of protein hydrolyzates[J]. Biotechnology Advances, 2001, 19(5): 355-370. DOI:10.1016/s0734-9750(01)00070-2.
- [84] XU Q B, HONG H, YU W L, et al. Sodium chloride suppresses the bitterness of protein hydrolysates by decreasing hydrophobic

- interactions[J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(1): 86-91. DOI:10.1111/1750-3841.14419.
- [85] FU Y, CHEN J R, BAK K H, et al. Valorisation of protein hydrolysates from animal by-products: perspectives on bitter taste and debittering methods: a review[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2019, 54(4): 978-986. DOI:10.1111/ijfs.14037.
- [86] 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. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.04.123.
- [87] PYDI S P, JAGGUPILLI A, NELSON K M, et al. Absciscic acid acts as a blocker of the bitter taste G protein-coupled receptor T2R4[J]. *Biochemistry*, 2015, 54(16): 2622-2631. DOI:10.1021/acs.biochem.5b00265.
- [88] KRUNIĆ T Ž, RAKIN M B. Enriching alginate matrix used for probiotic encapsulation with whey protein concentrate or its trypsin-derived hydrolysate: impact on antioxidant capacity and stability of fermented whey-based beverages[J]. *Food Chemistry*, 2022, 370: 130931. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.130931.
- [89] GAO Y, WU X L, MCCLEMENTS D J, et al. Encapsulation of bitter peptides in water-in-oil high internal phase emulsions reduces their bitterness and improves gastrointestinal stability[J]. *Food Chemistry*, 2022, 386: 132787. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.132787.
- [90] GAO Y, LI X Q, XIE Y F, et al. Encapsulation of bitter peptides in diphasic gel double emulsions: bitterness masking, sustained release and digestion stability[J]. *Food Research International*, 2022, 162: 112205. DOI:10.1016/j.foodres.2022.112205.
- [91] ZHAO J, WANG T Z, XIE J C, et al. Meat flavor generation from different composition patterns of initial Maillard stage intermediates formed in heated cysteine-xylose-glycine reaction systems[J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 79-88. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.08.096.
- [92] ZHOU X, CUI H P, ZHANG Q, et al. Taste improvement of Maillard reaction intermediates derived from enzymatic hydrolysates of pea protein[J]. *Food Research International*, 2021, 140: 109985. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109985.
- [93] ZHANG N L, YANG Y F, WANG W L, et al. A potential flavor seasoning from aquaculture by-products: an example of *Takifugu obscurus*[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 151: 112160. DOI:10.1016/j.lwt.2021.112160.
- [94] ZHANG C L, ALASHI A M, SINGH N, et al. Glycated beef protein hydrolysates as sources of bitter taste modifiers[J]. *Nutrients*, 2019, 11(9): 2166. DOI:10.3390/nu11092166.
- [95] IMAI K, IKEDA A, SHIMIZU K, et al. Selective elimination of bitter peptides by adsorption to heat-treated porous silica gel[J]. *Food Science and Technology Research*, 2019, 25(2): 179-186. DOI:10.3136/fstr.25.179.
- [96] ADLER-NISSEN J, POULSEN G, ANDERSEN P E. Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food[J]. *Annales de La Nutrition et de l'alimentation*, 1978, 32(2/3): 205-216. <https://www.jstor.org/stable/45123441>.
- [97] ROLAND J F, MATTIS D L, KIANG S, et al. Hydrophobic chromatography: debittering protein hydrolysates[J]. *Journal of Food Science*, 1978, 43(5): 1491-1493. DOI:10.1111/j.1365-2621.1978.tb02526.x.
- [98] LIN S B, NELLES L P, CORDLE C T, et al. Debittering casein hydrolysates with octadecyl-siloxane (C₁₈) columns[J]. *Journal of Food Science*, 1997, 62(4): 665-670. DOI:10.1111/j.1365-2621.1997.tb15431.x.
- [99] SUN X H, ACQUAH C, GAZME B, et al. Mechanisms of plastein formation influence the IgE-binding activity of egg white protein hydrolysates after simulated static digestion[J]. *Food Chemistry*, 2021, 345: 128783. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128783.
- [100] SYNOWIECKI J, JAGIETKA R, SHAHIDI F. Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction[J]. *Food Chemistry*, 1996, 57(3): 435-439. DOI:10.1016/S0308-8146(96)00005-2.
- [101] SHARMA K, NILSUWAN K, ZHANG B, et al. Protein hydrolysate from salmon frame debittered by plastein reaction: amino acid composition, characteristics and antioxidant activities[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2023, 58(1): 154-166. DOI:10.1111/ijfs.16183.
- [102] JIANG Y Q, WANG Z J, HE Z Y, et al. Effect of heat-induced aggregation of soy protein isolate on protein-glutaminase deamidation and the emulsifying properties of deamidated products[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 154: 112328. DOI:10.1016/j.lwt.2021.112328.
- [103] ITO K, MATSUSHIMA K, KOYAMA Y. Gene cloning, purification, and characterization of a novel peptidoglutaminase-asparaginase from *Aspergillus sojae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(15): 5182-5188. DOI:10.1128/AEM.00765-12.
- [104] ZHANG Q Z, CHENG Z Z, WANG Y, et al. Combining Alcalase hydrolysis and transglutaminase-cross-linking improved bitterness and techno-functional properties of hypoallergenic soybean protein hydrolysates through structural modifications[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 151: 112096. DOI:10.1016/j.lwt.2021.112096.
- [105] KRONDAHL E, VON EULER-CHELPIN H, ORZECOWSKI A, et al. Investigations of the *in-vitro* metabolism of three opioid tetrapeptides by pancreatic and intestinal enzymes[J]. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2000, 52(7): 785-795. DOI:10.1211/0022357001774642.
- [106] SCHLICHTERLE-CERNY H, AMADÒ R. Analysis of taste-active compounds in an enzymatic hydrolysate of deamidated wheat gluten[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(6): 1515-1522. DOI:10.1021/jf010989o.
- [107] LIU B Y, ZHU K X, GUO X N, et al. Effect of deamidation-induced modification on umami and bitter taste of wheat gluten hydrolysates[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(10): 3181-3188. DOI:10.1002/jsfa.8162.
- [108] RAKSAKULTHAI R, HAARD N F. Purification and characterization of a carboxypeptidase from squid hepatopancreas (*Illex illecebrosus*)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(10): 5019-5030. DOI:10.1021/jf010320h.
- [109] GE S J, ZHANG L X. The immobilized porcine pancreatic exopeptidases and its application in casein hydrolysates debittering[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1996, 59(2): 159-165. DOI:10.1007/BF02787817.
- [110] MANE S, DAMLE M, HARIKUMAR P, et al. Purification and characterization of aminopeptidase N from chicken intestine with potential application in debittering[J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(6): 1011-1016. DOI:10.1016/j.procbio.2010.02.020.
- [111] ZHANG M M, XIN X, WU H, et al. Debittering effect of partially purified proteases from soybean seedlings on soybean protein isolate hydrolysate produced by alcalase[J]. *Food Chemistry*, 2021, 362: 130190. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.130190.
- [112] KODERA T, ASANO M, NIO N. Characteristic property of low bitterness in protein hydrolysates by a novel soybean protease D3[J]. *Journal of Food Science*, 2006, 71(9): S609-S614. DOI:10.1111/j.1750-3841.2006.00179.x.

- [113] REAL HERNANDEZ L M, GONZALEZ DE MEJIA E. Enzymatic production, bioactivity, and bitterness of chickpea (*Cicer arietinum*) peptides[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(6): 1913-1946. DOI:10.1111/1541-4337.12504.
- [114] UMETSU H, MATSUOKA H, ICHISHIMA E. Debittering mechanism of bitter peptides from milk casein by wheat carboxypeptidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1983, 31(1): 50-53. DOI:10.1021/jf00115a013.
- [115] NAMPOOTHIRI K M, NAGY V, KOVACS K, et al. L-Leucine aminopeptidase production by filamentous *Aspergillus* fungi[J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 41(6): 498-504. DOI:10.1111/j.1472-765X.2005.01789.x.
- [116] EDENS L, DEKKER P, VAN DER HOEVEN R, et al. Extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(20): 7950-7957. DOI:10.1021/jf050652c.
- [117] HUANG W Q, ZHONG L F, MENG Z Z, et al. The structure and enzyme characteristics of a recombinant leucine aminopeptidase rLap1 from *Aspergillus sojae* and its application in debittering[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 177(1): 190-206. DOI:10.1007/s12010-015-1737-5.
- [118] NISHIWAKI T, YOSHIMIZU S, FURUTA M, et al. Debittering of enzymatic hydrolysates using an aminopeptidase from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 93(1): 60-63. DOI:10.1016/S1389-1723(02)80055-X.
- [119] NISHIWAKI T, HAYASHI K. Purification and characterization of an aminopeptidase from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, 65(2): 424-427. DOI:10.1271/bbb.65.424.
- [120] ISSHIKI S, SHITASUE S, MASE T, et al. Characterization of an aminopeptidase from *Pseudozyma hubeiensis* 31-B and potential applications[J]. Mycoscience, 2017, 58(1): 60-67. DOI:10.1016/j.myc.2016.10.001.
- [121] MURAI A, TSUJIMOTO Y, MATSUI H, et al. An *Aneurinibacillus* sp. strain AM-1 produces a proline-specific aminopeptidase useful for collagen degradation[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(4): 810-818. DOI:10.1111/j.1365-2672.2004.02210.x.
- [122] FERNANDEZ-ESPLA M D, RUL F. PepS from *Streptococcus thermophilus*, a new member of the aminopeptidase T family of thermophilic bacteria[J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 263(2): 502-510. DOI:10.1046/j.1432-1327.1999.00528.x.
- [123] TCHORBANOV B, MARINOVA M, GROZEVA L. Debittering of protein hydrolysates by *Lactobacillus* LBL-4 aminopeptidase[J]. Enzyme Research, 2011, 2011: 538676. DOI:10.4061/2011/538676.
- [124] YANG X C, WANG Y T, ZHOU Y, et al. Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KLD4.0325, a bacterium newly isolated from Koumiss in Xinjiang, China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(12): 1406-1418.
- [125] SRIDHAR V R, HUGHES J E, WELKER D L, et al. Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(6): 3025-3032. DOI:10.1128/AEM.71.6.3025-3032.2005.
- [126] HU K K, TANAKA T. S1 site residues of *Lactococcus lactis* prolidase affect substrate specificity and allosteric behaviour[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2009, 1794(12): 1715-1724. DOI:10.1016/j.bbapap.2009.08.005.
- [127] RAHULAN R, DHAR K S, NAMPOOTHIRI K M, et al. Characterization of leucine amino peptidase from *Streptomyces gedanensis* and its applications for protein hydrolysis[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(2): 234-242. DOI:10.1016/j.procbio.2011.10.038.
- [128] WAN K, URAJI M, YANG L L, et al. Novel activity of *Streptomyces* aminopeptidase P[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2020, 7(1): 20. DOI:10.1186/s40643-020-00309-7.
- [129] KOKA R, WEIMER B C. Investigation of the ability of a purified protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98 to hydrolyze bitter peptides from cheese[J]. International Dairy Journal, 2000, 10(1/2): 75-79. DOI:10.1016/S0958-6946(00)00023-6.
- [130] MINAGAWA E, KAMINOGAWA S, TSUKASAKI F, et al. Debittering mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by aminopeptidase T[J]. Journal of Food Science, 1989, 54(5): 1225-1229. DOI:10.1111/j.1365-2621.1989.tb05960.x.
- [131] DING S L, MAO B J, LU X Y, et al. Efficient production and biochemical characterization of a thermostable carboxypeptidase from *Bacillus megaterium* and its application on flavor improvement of soy isolate protein hydrolysates[J]. European Food Research and Technology, 2022, 248(8): 2135-2143. DOI:10.1007/s00217-022-04036-5.
- [132] FU J, LI L, YANG X Q. Specificity of carboxypeptidases from *Actinomucor elegans* and their debittering effect on soybean protein hydrolysates[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 165(5/6): 1201-1210. DOI:10.1007/s12010-011-9338-4.
- [133] LI L, YANG Z Y, YANG X Q, et al. Debittering effect of *Actinomucor elegans* peptidases on soybean protein hydrolysates[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(1): 41-47. DOI:10.1007/s10295-007-0264-y.
- [134] CAPIRALLA H, HIROI T, HIROKAWA T, et al. Purification and characterization of a hydrophobic amino acid-specific endopeptidase from *Halobacterium halobium* S9 with potential application in debittering of protein hydrolysates[J]. Process Biochemistry, 2002, 38(4): 571-579. DOI:10.1016/S0032-9592(02)00180-2.
- [135] TAN P S, VAN KESSEL T A, VAN DE VEERDONK F L, et al. Degradation and debittering of a tryptic digest from beta-casein by aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(5): 1430-1436. DOI:10.1128/aem.59.5.1430-1436.1993.
- [136] DONNELL M M, FITZGERALD R, FHAOLÁIN I N, et al. Purification and characterization of aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*[J]. The Journal of Dairy Research, 1997, 64(3): 399-407. DOI:10.1017/s0022029997002318.
- [137] YANG S I, TANAKA T. Characterization of recombinant prolidase from *Lactococcus lactis*- changes in substrate specificity by metal cations, and allosteric behavior of the peptidase[J]. The FEBS Journal, 2008, 275(2): 271-280. DOI:10.1111/j.1742-4658.2007.06197.x.
- [138] CHEN Y S, CHRISTENSEN J E, BROADBENT J R, et al. Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, an endopeptidase with post-proline specificity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 1276-1282. DOI:10.1128/AEM.69.2.1276-1282.2003.
- [139] SINTHUSAMRAN S, IDOWU A T, BENJAKUL S, et al. Effect of proteases and alcohols used for debittering on characteristics and antioxidative activity of protein hydrolysate from salmon frames[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(2): 473-483. DOI:10.1007/s13197-019-04075-z.