

食品中 kokumi 物质的研究进展

冯涛¹, 张治文¹, 庄海宁², 周进杰³, 徐志民^{1,4}, 孙敏¹

(1. 上海应用技术学院香料香精技术与工程学院, 上海 201418) (2. 国家食用菌工程技术研究中心, 上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201403) (3. 上海牡丹香精香料有限公司, 上海 201210) (4. 路易斯安那州立大学农业中心食品科学学院, 美国 70803)

摘要: 随着食品工业的发展和人们生活水平的提高, 单一的味觉特性不再能满足人们的需求。食物的有些风味特性无法用苦、酸、咸、鲜和甜来描述, 比如食物的浓厚感、持久性和复杂感, 以及由此引起的一系列的增强食物整体的圆润平衡的感觉, 我们将具有以上特性的物质称为 kokumi。Kokumi 物质本身没有味道或者味道很淡, 但添加少量的 kokumi 物质到基本溶液中便可以引起滋味品尝方面的改变。本文综述了 kokumi 物质的类别、检测方法和分离鉴定方法, 分析了肽类和非肽类 kokumi 物质的物质组成和特点; 比较了感官评价法和钙感受受体法 (CaSR) 在对 kokumi 物质进行初步检测方面的优势和不足; 阐述了分离鉴定 kokumi 物质常用的方法如超滤、凝胶过滤色谱和反相高效液相色谱 (RP-HPLC)、飞行质谱 (TOF-MS)。本文综述了国内外关于 kokumi 物质的研究, 为 kokumi 物质的研究和开发提供一定的理论基础。

关键词: 钙感受受体法; 分离; 鉴定

文章编号: 1673-9078(2016)12-374-380

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.056

Developments of Kokumi Substances in Food

FENG Tao¹, ZHANG Zhi-wen¹, ZHUANG Hai-ning², ZHOU Jin-jie³, XU Zhi-min^{1,4}, SUN Min¹

(1. School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China) (2. Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Shanghai 201403, China) (3. Shanghai peony perfume Flavor Co., Ltd., Shanghai 201210, China) (4. Department of food Science, Louisiana State University Agricultural Center, Louisiana 70803, United States)

Abstract: With the development of the food industry and the improvement of living standards, single-taste characteristics in food can no longer meet demands. Some flavors in food cannot be described as bitter, sour, salty, umami, or sweet; such thick, lingering, complex flavors, as well as a series of strong, overall well-rounded, and balanced sensations are known as “kokumi”. Kokumi substances have no inherent flavor, or have only a faint taste, but the addition of small amounts of kokumi substances to basic solutions can change their taste. This paper summarizes the classification, measurement methods, and isolation and identification methods of kokumi substances, and the composition and characteristics of peptide and non-peptide kokumi substances. Preliminary determination of the advantages and disadvantages of kokumi substances was conducted by comparing the results of sensory evaluation and calcium-sensing receptor (CaSR) assays. This paper also introduces methods for the isolation and identification of kokumi substances, such as ultra-filtration, gel permeation chromatography, preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography, and time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS). Domestic and international research on kokumi substances is summarized, and a theoretical basis for research on kokumi substances is provided.

Key words: calcium-sensing receptor assay; isolation; identification

随着时代的发展, 人们对食品的要求也不只是局限在饱腹的层面上, 人们开始注重食物的风味和营养特性。食物在满足人们基本需求的同时, 也会给人们带来心理上愉悦的享受。食物的特性在品尝的过程中

收稿日期: 2015-12-17

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2013)第6-10号]

作者简介: 冯涛(1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品风味化学

通讯作者: 庄海宁(1980-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 食用菌深加工

通过口腔内的接收器而被感知。滋味和触觉是评判食物特性的两个重要方面, 口腔里不同的触觉接收器可以感知食物的尺寸和形状等^[1]。滋味是由食物中的水溶性小分子与舌头中味觉感受器的味蕾相结合, 产生的酸甜苦辣咸鲜等味觉。

酸甜苦辣是人们传统认知的四种基本味觉。鲜味物质最早是在1908年由 Ikeda 在海带中发现的谷氨酸钠, 因其美好令人愉悦的滋味将其命名为 umami^[2], 随后发现了一些核苷酸也有鲜味特点, 比如 5'-核苷

酸、鸟苷酸和肌苷酸^[3]。随着人们生活质量的改善,单一的味觉不再能满足人们的需求。有些物质的特点无法用单一的味感来描述,比如浓厚感、持久感、复杂以及圆润平衡的感觉,日本科学家将能引起此类感觉的物质命名为“kokumi”^[4]。在人们的认识中可能对鲜味和 kokumi 味准确的定义有点混淆,Chris 等认为鲜味是指“美好的味道”,kokumi 物质则偏重于“浓厚味、增强味感”以及一种满口感。Kokumi 感更强调带给食物的复杂口感和持久性。他还指出鲜味因为有具体的接收器是一种基础味感,而 kokumi 物质则兼有基本味感和一些物理学特性比如粘度等特性^[5]。

Kokumi 物质在日本的研究较为广泛而深入,近年来我国 kokumi 物质风味的研究也逐渐增多。食品中的 kokumi 物质大致可以分为肽类和非肽类两大类。本文在前人研究的基础上进行总结归纳,主要包括 kokumi 物质的种类、检测和分离鉴定方法以及国内外的研究进展。本文旨在使更多人了解 kokumi 物质,为 kokumi 风味物质的研究和开发提供参考。

1 kokumi 物质的特点

Kokumi 呈味特性的物质大致可以分为非肽类(表 1)和肽类(表 2)两种。目前发现的 kokumi 呈味物

质以肽类较为常见,如 γ -谷胱甘肽、 γ -谷氨酰胺类以及一些低分子肽类等^[6-8]。然而 Kokumi 物质最早是在大蒜的水提物中发现的,经过鉴定发现赋予 kokumi 风味特性的主要是一些含硫化合物如大蒜碱、S-甲基-L-半胱氨酸亚砷和 γ -L-谷酰基-S-烯丙基-L-半胱氨酸^[4]。随后在洋葱中也发现了含硫的 kokumi 感物质,像 γ -谷酰基-S-丙基-L-半胱氨酸亚砷和反-S-丙基-L-半胱氨酸亚砷^[9]。Kokumi 物质并不像酸甜苦咸这些基本味一样有具体的接收器和传导途径,事实上不同的食物中的 kokumi 成分的传导也是不一样的。即使是在日本,Kokumi 物质也没有一个十分确定的定义^[10]。Ueda 通过研究发现谷胱甘肽(GSH)具有明显 kokumi 风味特点:当添加 0.02%的 GSH 到鲜味溶液和牛肉汤基中后,显著增加了溶液的满口性、持久感和醇厚感。添加谷胱甘肽到牛肉汤中会有这些风味特点,但对酸甜苦咸这些基本味却没有影响。kokumi 风味特性的物质单独溶于水中基本上是没有味道的或者味道很淡,但添加少量的 kokumi 物质可以显著降低鲜味物质如谷氨酸钠、IMP 的阈值^[6]。因此 kokumi 物质可以大致认为是能够使食物具有味觉方面的浓厚感、持久感、复杂感以及由此引起的一种圆润平衡味觉感受的一类物质。

表 1 非肽类 kokumi 感物质

Table 1 Non-peptide kokumi substances

原料	预处理	分离纯化的方法	鉴定方法	Kokumi 感物质	参考文献
大蒜	热水浸提、均质、离心	反渗透、离子交换色谱	核磁共振、质谱	大蒜碱、S-甲基-L-半胱氨酸亚砷、 γ -L-谷酰基-S-烯丙基-L-半胱氨酸	4
洋葱	酒精提取、沸水提取	离子交换色谱	质谱、核磁共振	γ -谷酰基-S-丙基-L-半胱氨酸亚砷和反-S-丙基-L-半胱氨酸亚砷	9
洋葱	高温提取(160℃)	离心得沉淀物	气象色谱-质谱联用	植物甾醇类	11
青鱼片	去脂后用去离子水提取	透析、凝胶过滤色谱、高效液相色谱	质谱、核磁共振	肌氨酸、肌酸酐	12
鳄梨	热水处理,戊烷提取	反相高效液相色谱	二级质谱,核磁共振	10种炔烃和烯烃类物质	13
面筋	复合蛋白酶和风味蛋白酶酶解	--	--	小麦面筋酶解液	14

从表 1 可以看出大蒜和洋葱中的 kokumi 感物质都有含硫氨基酸半胱氨酸,此氨基酸可能是引起浓厚感的关键物质。其原因可能是因为半胱氨酸侧链集团上含有的巯基,在舌头上产生的轻微的收敛感而增加了味觉的浓厚感^[8]。将加热的洋葱浓缩沉淀物放入汤基中时,使得汤的香气味感更为持久,这是由于洋葱沉淀物中含有 kokumi 风味的植物甾醇类物质^[10]。我们还可以看出肌酸酐、肌氨酸以及炔类也是 kokumi 感物质。

从表 2 可以发现,赋予食品中 kokumi 感的肽类多含有 Gly、Glu、Arg 和 Ala 这些氨基酸,还有的含有 Cys。除了我们常见的谷胱甘肽, γ -glu-val-gly 的 kokumi 特性更强,kuroda 等将 γ -glu-val-gly 加入到鸡汤或者低脂奶油中后可显著增强它们的浓厚感、持久性和满口性^[23]。肽在食品中的呈味作用因其肽链的长度、氨基酸的组成、种类以及排列方式不同而迥异^[24]。肽因含有氨基和羧基两亲性基团,故在中性 pH 附近有较强的缓冲能力,而肽的浓厚感以及赋予食品的细节

腻微妙的感受都与肽的缓冲作用相关。研究发现 Arg、Leu、Gly、Phe 和 Pro 这些疏水性氨基酸是苦味受体的结合位点^[25]。一般情况下,肽中的疏水性氨基酸暴露在外越多越易于味蕾接触,使得苦味越强^[26]。表 2

中的多个 kokumi 肽的末端连接疏水氨基酸,但这些肽并没有苦味,反而呈现出浓厚感、持久性及绵延感等 kokumi 风味特性。这表明肽的呈味作用受其单个氨基酸的影响,但并不能决定肽的总体呈味效果。

表 2 肽类 kokumi 物质

Table 2 Peptide kokumi substances

原料	预处理	分离纯化的方法	鉴定方法	肽序列	参考文献
牛肉	热水浸提	凝胶过滤色谱、离子交换色谱和电泳	爱德曼降解、羧肽酶解技术	Lys-Gly-As-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala	15
菜豆	水煮	凝胶过滤色谱、亲水液相色谱	液相色谱串联质谱、核磁共振	γ -L-glu-L-leu、 γ -L-glu-L-val、 γ -L-glu-L-cys- β -ala	7
高达奶酪	水提	凝胶过滤色谱	液相色谱串联质谱	10 种 γ -L-glutamyl dipeptides	8
酵母抽提物	温水提取、离心	超滤、凝胶过滤色谱、反相高效液相色谱	飞行时间串联质谱	γ -glu-(leu/val/tyr)、ala-leu、GSH、leu-lys (gln/ala/glu/thr)	16
虾酱	水提/加酸溶解	衍生化	高效液相色谱串联质谱	γ -glu-val-gly	17
乳蛋白	酶解	凝胶过滤色谱、反相高效液相色谱	基质辅助激光解析飞行时间质谱	得到 11 个 8-9 个氨基酸残基组成肽链	18
扇贝	水提	衍生化	高效液相色谱串联质谱	γ -glu-val-gly	10
咸水鸭	水提	超滤、凝胶过滤色谱	液相色谱串联质谱	Gly-Pro-Asp-Pro-leu-Arg Tyr-Met、Asp-Pro-Leu-Arg-Tyr-Met、 Val-Val-Thr-Asn-Pro-Ser-Arg-Pro-Trp	19
暗纹东方鲀	水提	超滤、凝胶过滤色谱、反相高效液相色谱	基质辅助激光解析飞行时间质谱	Pro-A-Ala-B-Met-Cys-Arg	20
酱油	过滤离心、稀释	衍生化	高效液相色谱串联质谱	γ -glu-val-gly	21
含酒精的饮料	过滤离心得上清液	衍生化	高效液相色谱串联质谱	γ -glu-val-gly	22

2 kokumi 物质的检测方法

由于 kokumi 物质本身并没有或仅有极微的 kokumi 滋味,少量的 kokumi 物质存在便可以显著增强食物的风味,因此我们无法使用一种纯的化学物质作为标准来测量它的 kokumi 强度^[27]。目前关于 kokumi 物质的检测方法主要有基于细胞外钙离子浓度改变的钙敏感受体法和基于酸甜苦咸鲜的感官评价方法。

2.1 钙敏感受体法

细胞外的钙敏感受体 (CaSR) 是典型的具有 7 个跨膜片段的 G 蛋白偶联受体,属于该类受体 C 家族第二组的成员,由 1078 个氨基酸残基组成^[28]。CaSR 对维持人体内的钙稳态起到非常重要的作用,它可以感知血液中的钙离子浓度的变化。血液中钙的水平通过 CaSR 被感知,CaSR 又反过来可以抑制甲状旁腺的分泌,刺激分泌降钙素,并诱导尿液中钙的排泄以减少

血液中的钙维持血钙的正常水平。CaSR 不仅存在于甲状旁腺和肾脏中^[29], 而且还在其他一些组织中表达, 如肝、心脏、肺、胃肠道、胰腺和中枢神经系统, 这表明 CaSR 参与了人体的一些生物学功能^[30]。

通过研究发现具有浓厚感、复杂感和持久感的 kokumi 特性物质可以激发人体的钙敏感受体并可能修饰酸甜苦咸鲜基本味^[31]。最近的研究表明: 像谷胱甘肽这种 kokumi 感物质就是通过人体内的钙敏接收器被感知的, 目前各种各样的 kokumi 活性物质, 比如 γ -谷氨酰胺、 γ -谷缬甘肽, 也被证明可以刺激细胞外的钙敏接收器^[32]。之前的研究发现, CaSR 在小鼠的味觉细胞的亚群中存在^[33], Ninomiya 和他的同事也报道称小鼠有一组味觉传入神经纤维可感应到 Ca 离子和 Mg 离子^[34]。McCaughy 等通过研究发现钙对味觉有影响, 钙离子的摄入是维持食欲和内稳态平衡的基础, 还发现钙的减少会增加适口性^[35]。以上这些研究表明钙的传导机制存在于味觉细胞中。近日, Bystrova 等也发现 CaSR 在味觉细胞的子集中表达, 并且激动剂 NPS 的 R-568 和几个氨基酸可以引起味觉细胞的响应^[36]。Ohsu 等人报告称各种各样的钙敏激动剂包括 γ -谷氨酰胺二肽和三肽物质有 kokumi 滋味, 这些钙敏激动剂的活性和 kokumi 味觉强度之间有极高的相关性。此外, 许多 γ -谷氨酰胺是 CaSR 的激动剂, 这些物质具有醇厚感滋味特性, 并且发现 γ -谷缬甘肽是最有潜力的 kokumi 物质^[30]。

为了阐述 kokumi 物质的接收细胞和生理学特性, Maruyama 和他的同事将 Calcium Green-1 加载到小鼠舌组织切片的味觉细胞中, 利用共聚焦扫描显微镜观察发现, 应用于味觉细胞局部部位的 kokumi 物质可引起了细胞内钙离子浓度的增加。当用 CaSR 的抑制剂 NPS1234 预处理过的细胞时, 这种现象就被抑制。这些发现表明 CaSR 表达的味觉细胞是 kokumi 物质初步的检测器, 它们和酸甜苦咸鲜这些基本味的接收细胞都不一样, 而是一个独立的群体^[37]。

2.2 感官评价法

食品感官分析是在食品理化分析的基础上, 集心理学、生理学和统计学的知识发展起来的一门学科。食品的感官评价方法实质上是指借助人的感觉器官(视觉、嗅觉、触觉、听觉和味觉), 通过语言、文字或数据来鉴定食品的外观、滋味和特性等, 最后通过统计学对所得数据进行分析^[38]。

Ueda 首次将感官评定法应用于 kokumi 风味物质的鉴定^[4]。食品中 kokumi 物质的感官评价方法大致是这样的: 选取 10 名(18~25 周岁, 男女各半)感官评

价员, 使用一定浓度的蔗糖、咖啡因、乳酸、氯化钠和谷氨酸钠对甜、苦、酸、咸和鲜这些基本味进行训练, 使用空白鸡汤添加一定浓度的谷胱甘肽来训练满口感、复杂感和持久感这些 kokumi 特性, 使他们能辨别这些基本味并能用语言准确描述出各种滋味特性。然后将实验中得到的各组分加入到空白鸡汤中或基础溶液中, 配置成不同浓度的待评定溶液, 通过与空白溶液比较, 对以上组分进行打分, 一般采用 9 分法(0~9 分, 0 分表示没有某种滋味特性; 9 分代表某种滋味特性最强)味道从无到有, 从弱到强。为了保证鉴评人员安全高效的鉴评需采用啜食技术, 即待鉴评的溶液在口中旋转鉴评而不要咽下, 每个样品鉴评之间都采用清水漱口^[7]。

Kokumi 物质单独溶于水中是没有味道的或者味道很淡, 但当与其他物质共同存在时可以引起滋味品尝方面的浓厚感、复杂感和持久感等。Miyaki 等通过感官评价方法添加微量的 γ -Glu-Val-Gly 到鸡汤中, 发现在 99% 的置信水平上可以显著增加鸡汤的鲜味和满口感, 而且在 95% 的置信水平上较没有添加 γ -Glu-Val-Gly 的对照组有较强的饱满口感^[39]。Miyamura 通过感官评价发现添加 γ -Glu-Val-Gly 到低脂花生酱中也可以增强它的浓厚感、余味和润滑口感^[40]。

除了 kokumi 物质作为 CaSR 的激动剂, CaSR 还可以通过这些物质被激活, 例如: 阳离子类、氨基酸药剂类、多胺类和碱性肽类如活化鱼精蛋白和聚赖氨酸^[41-43]。由此可以发现 Kokumi 物质是一种钙敏激动剂, 它可以引起细胞内钙离子浓度的增加, 但一些氨基酸、阴离子等也是钙敏激动剂, 因此 CaSR 方法仅可以对 kokumi 物质进行初步筛选, 我们还要通过感官评价方法对 kokumi 物质进行再次筛选。由于感官评价方法也受到一些主观因素的影响比如感官评价员的身体状况、精神状态、周边环境等, 因此将钙敏感受体法和感官评价相结合来检测浓厚感物质是今后筛选浓厚感物质的趋势。

3 kokumi 物质的分离和结构鉴定

Kokumi 物质多以肽类为主, Kokumi 物质一般采用的分离手段有超滤、离子交换色谱、凝胶过滤色谱和反相高效液相色谱等, 对 kokumi 物质进行鉴定的方法有质谱法和核磁共振等。分离鉴定 kokumi 物质的一般流程如图 1。

3.1 超滤

超滤是利用超滤膜组件两侧的浓度和压力等作为

推动力,通过膜组件的膜孔径将原料液分为透过液和浓缩液两部分,从而达到将原料液分离纯化的目的。超滤是一种快速、有效获得并浓缩目标分子量的方法^[44]。Masashi Ogasawara 对大豆水解蛋白液超滤得到 1000~5000 u 的大豆酶解液,该截留液和木糖发生美拉德反应,然后对该美拉德反应产物进行超滤得到分子量为 1000~5000 u 的“美拉德反应肽”。该反应得到的美拉德反应肽加入鲜味溶液或大骨汤中后,可引起滋味品尝方面的持久性和醇厚感^[45]。

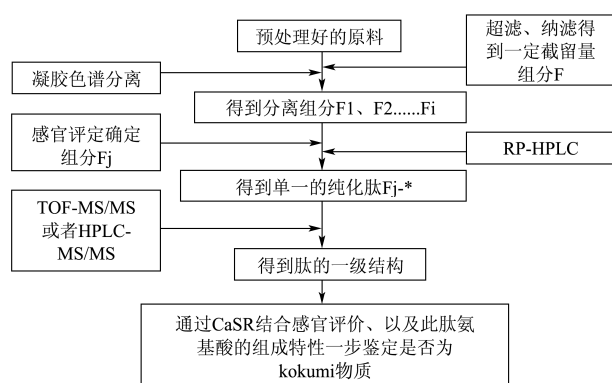


图1 kokumi 物质的分离鉴定方法流程图

Fig.1 Flow chart for the identification of kokumi substances

3.2 凝胶过滤色谱

凝胶过滤色谱是利用凝胶内部的网状结构将样品进行分离的方法。由于被分离物的分子量不同在凝胶色谱柱内的路径各异,最终以不同的时间段被洗脱下来而达到分离的目的。常用的葡聚糖凝胶有 G-15、G-25 和 G-75 等。刘建彬等通过使用 TSK G2000 凝胶柱将酶解后的鸡肉肽进行分离为五个组分(即<200 u, 200~500 u, 500~1000 u, 1000~3000 u 和>3000 u)和木糖发生美拉德反应,结果发现低分子肽类(<500 u)是吡嗪类和 2-糠基吡咯等风味物质形成的主要贡献物^[46]。

3.3 反相-高效液相色谱

超滤、凝胶过滤色谱是根据分子量大小来对原料液中的物质进行初步筛选,通过超滤和凝胶过滤色谱还不能得到单一纯化的肽,还需要通过液相色谱对所得组分进一步分离纯化。党亚丽使用超滤和凝胶过滤色谱方法对金华火腿和巴马火腿中水溶性的鲜味肽进行分离,通过半制备 RP-HPLC 对凝胶过滤色谱得到的火腿中呈味肽组分进一步进行分离纯化,最后通过 MALDI-TOF-MS 进行鉴定,分别从金华火腿中得到 Cys-Cys-Asn-Lys-Ser-Val (CCNKS V)呈味肽,从巴马火腿中得到 Ala-His-Ser-Val-Arg-Phe-Tyr (AHSVRFY)呈

味肽^[47]。

3.4 质谱法

质谱法是利用电场和磁场的作用将运动的离子按质荷比不同而进行分离后对物质进行鉴定的方法。随着质谱技术的发展,质谱分析也由简单的二级串联质谱(MS/MS)发展到四级杆串联时间飞行质谱(Q-TOF-MS/MS)和辅助激光解析电离质谱(MALDI-MS/MS)等。韩复亮对黄酒中的肽类物质进行分析鉴定,首先采用超滤的方法得到分子量小于 3000 u 的低分子肽类,然后通过离子交换色谱和凝胶过滤色谱进一步分离纯化,最后利用超高压液相色谱飞行时间质谱(UPLC-ESI-MS/MS)对凝胶过滤色谱得到的各个组分进行鉴定,最后它们从黄酒中分离出大量的肽类包括 43 种生物活性肽和 3 种呈味肽^[48]。

从复杂的食品中提取单一的物质是几代科学家共同努力的目标。由于原料不同所采取的分离鉴定方法也有差异,应当就具体研究对象选取合适的方法,将各种方法联合使用取长补短,最终方能达到理想的分离效果。

4 展望

随着人们生活水平的提高和饮食习惯的改变,人们对食物的风味和质量要求不断提高,渴望体验更美味的食物。人们饮食中摄入高糖、高盐或高脂的食物来平衡味觉可能是造成亚健康的根源。添加少量的 Kokumi 物质就可以增加食物的整体味感,以达到减少食盐、糖等调味料的使用量。因此 kokumi 物质的深入研究,将从原料中分离纯化得到的 kokumi 风味特性强的组分工业化及在调味品中开发应用是一个很好的方向。或者是采用原材料发酵来得到较为自然的 kokumi 风味物质^[49]。另外 kokumi 物质的味觉形成机制及在味觉细胞中的信号传导仍需进一步明确。

参考文献

- [1] Kohyama K. Oral sensing of food properties [J]. Journal of Texture Studies, 2015, 46: 138-151
- [2] Ikeda K. New seasonings [J]. Chemical Senses, 2002, 27(9): 847-849
- [3] Yamaguchi S, Ninomiya K. Umami and food palatability [M]. Springer US: Flavor Chemistry, 1999
- [4] Ueda Y, Sakaguchi M, Hirayama K, et al. Characteristic flavor constituents in water extract of garlic [J]. Agricultural & Biological Chemistry, 1990, 54(1): 163-169
- [5] Winkel C, De Klerk A J, De Rijke E, et al. New

- developments in umami (enhancing) molecules [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2008, 5(6): 1195-1203
- [6] Ueda Y, Yonemitsu M, Tsubuku T, et al. Flavor characteristics of glutathione in raw and cooked foodstuffs [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 1997, 61(12): 1977-1980
- [7] Andreas, Dunkel, Jessica, et al. Molecular and sensory characterization of gamma-glutamyl peptides as key contributors to the kokumi taste of edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. *Agricultural and Food Chemistry food Chem.*, 2007, 55(16): 6712-6719
- [8] Simone T, Andreas D, Thomas H. A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured Gouda cheese [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2009, 57(4): 1440-1448
- [9] Ueda Y, Tsubuku T, Miyajima R. Composition of sulfur-containing components in onion and their flavor characters [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 1994, 58(1): 108-110
- [10] Motonaka, Kuroda, Yumiko, et al. Determination of γ -glutamyl-valyl-glycine in raw scallop and processed scallop products using high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(3): 1640-1644
- [11] Nishimura T, Ai S E, Nagao A, et al. Phytosterols in onion contribute to a sensation of lingering of aroma, a koku attribute [J]. *Food Chemistry*, 2016, 192: 724-728
- [12] Shah A K M A, Ogasawara M, Egi M, et al. Identification and sensory evaluation of flavour enhancers in Japanese traditional dried herring (*Clupea pallasii*) fillet [J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(1): 249-253
- [13] Andreas Georg D, Thomas H. Bitter-tasting and kokumi-enhancing molecules in thermally processed avocado (*Persea americana Mill*) [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2010, 58(24): 12906-12915
- [14] Koo S H, Bae I Y, Lee S, et al. Evaluation of wheat gluten hydrolysates as taste-active compounds with antioxidant activity [J]. *Journal of Food Science & Technology*, 2014, 51(3): 535-542
- [15] Yamasaki Y, Maekawa K. A Peptide with delicious taste [J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 1978, 42(9): 1761-1765
- [16] 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 & Agriculture*, 2014, 95
- [17] Miyamura N, Kuroda M, Kato Y, et al. Determination and quantification of a Kokumi peptide, γ -glutamyl-valyl-glycine, in fermented shrimp paste condiments [J]. *Food Science & Technology Research*, 2014, 20: 699-703
- [18] 王蓓,许时婴.乳蛋白酶解产物呈味肽序列的研究[J].*食品科学*, 2010, 31(7):140-145
- WANG Bei, XU Shi-ying. Identification of Kokumi taste in Hydrolyzed milk protein [J]. *Food Science*, 2010, 31(7): 140-145
- [19] 陶正清,刘登勇,戴琛,等.盐水鸭呈味肽的分离纯化及结构鉴定[J].*南京农业大学学报*,2014,37(5):135-142
- TAO Zheng-qing, LIU Deng-yong, DAI Chen, et al. Isolation and identification of flavour peptide from nanjing cooked duck [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2014, 37(5): 135-142
- [20] 刘源,仇春泱,王锡昌,等.养殖暗纹东方鲀肌肉中呈味肽的分离鉴定[J].*现代食品科技*,2014,8:38-42
- LIU Yuan, QIU Chun-yang, WANG Xi-chang, et al. Isolation and identification of flavour peptide from cultured puffer fish [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 8: 38-42
- [21] Kuroda M, Kato Y, Yamazaki J, et al. Determination and quantification of the kokumi peptide, γ -glutamyl-valyl-glycine, in commercial soy sauces [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(2): 823-828
- [22] Naohiro Miyamura, Yuko Iida, Motonaka Kuroda, et al. Determination and quantification of kokumi peptide, γ -glutamyl-valyl-glycine, in brewed alcoholic beverages [J]. *Journal of Bioscience and bioengineering*, 2015, 120(3): 311-314
- [23] Motonaka Kuroda, Naohiro Miyamura. Mechanism of the perception of "kokumi" substances and the sensory characteristics of the "kokumi" peptide, γ -Glu-Val-Gly [J]. *Flavour*, 2015, 4(1): 1-3
- [24] 周雪松,赵谋明.肽的呈味功能研究[J].*中国调味品*, 2005,6: 38-42
- ZHOU Xue-song, ZHAO Mou-ming. Study on the seasoning effect of peptides [J]. *China Condiment*, 2005, 6: 38-42
- [25] Matoba T, Hata T. Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures [J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 2008, 36(8): 1423-1431
- [26] Pripp A H, Ardö Y. Modelling relationship between angiotensin-(I)-converting enzyme inhibition and the bitter taste of peptides [J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(3): 880-888
- [27] Thao Van Ho, Hideyuki Suzuki. Increase of 'Umami' and 'Kokumi' compounds in Miso, fermented soybeans, by the addition of bacterial γ -glutamyltranspeptidase [J].

- International Journal of Food Studies, 2013, 2(1): 39-47
- [28] Brown E M, Gamba G, Riccardi D, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid [J]. *Nature*, 1993, 366(6455): 575-580
- [29] Chattopadhyay N, Vassilev P M, Brown E M. Calcium-sensing receptor: roles in and beyond systemic calcium homeostasis [J]. *Biological Chemistry*, 1997, 378(8):759-768
- [30] Brown E M, Macleod R J. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling [J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81(1): 239-297
- [31] Dunkel A, Hofmann T F. Kokumi flavour compounds and use: US, US 8147892 B2 [P]. 2012
- [32] Takeaki O, Yusuke A, Hiroaki N, et al. Involvement of the calcium-sensing receptor in human taste perception [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(2): 1016-1022
- [33] Gabriel A S, Uneyama H, Maekawa T, et al. The calcium-sensing receptor in taste tissue [J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2009, 378(3): 414-418
- [34] Ninomiya Y, Tonosaki K, Funakoshi M. Gustatory neural response in the mouse [J]. *Brain Research*, 1982, 244(2): 370-373
- [35] Mccaughy S A, Forestell CATordoff M G. Calcium deprivation increases the palatability of calcium solutions in rats [J]. *Physiology & Behavior*, 2005, 84(2): 335-342
- [36] Bystrova M F, Romanov R A, Rogachevskaja O A, et al. Functional expression of the extracellular- Ca^{2+} -sensing receptor in mouse taste cells [J]. *Journal of Cell Science*, 2010, 123(Pt 6): 972-982
- [37] Yutaka M, Reiko Y, Motonaka K, et al. Kokumi substances, enhancers of basic tastes, induce responses in calcium-sensing receptor expressing taste cells [J]. *Plos One*, 2012, 7(4): e34489
- [38] 冯涛,田怀香,陈福玉.食品风味化学[M].北京:中国质检出版社,2013
FENG Tao, TIAN Huai-xiang, CHEN Fu-yu. Food flavor chemistry [M]. Beijing: China Quality Press, 2013
- [39] Miyaki T, Kawasaki H, Kuroda M, et al. Effect of a kokumi peptide, γ -glutamyl-valyl-glycine, on the sensory characteristics of chicken consommé [J]. *Flavour*, 2015, 4(1): 1-8
- [40] Miyamura N, Jo S, Kuroda M, et al. Flavour improvement of reduced-fat peanut butter by addition of a kokumi peptide, γ -glutamyl-valyl-glycine [J]. *Flavour*, 2015, 4(1): 1-4
- [41] Hee-Chang M, Franks A H, Culverston E L, et al. The venus fly trap domain of the extracellular Ca^{2+} -sensing receptor is required for L-amino acid sensing [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(50): 51739-51744
- [42] Young S H, Rey O, Sinnett-Smith J, et al. Intracellular Ca^{2+} oscillations generated via the Ca^{2+} -sensing receptor are mediated by negative feedback by PKC α at Thr888 [J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2014, 306(3): C298-306
- [43] Quinn S J, Ye C P, Diaz R, et al. The Ca^{2+} -sensing receptor: a target for polyamines [J]. *American Journal of Physiology*, 1997, 273(4): C1315-23
- [44] Kapel R, Klingenberg F, Framboisier X, et al. An original use of size exclusion-HPLC for predicting the performances of batch ultra filtration implemented to enrich a complex protein hydrolysate in a targeted bioactive peptide [J]. *Journal of Membrane Science*, 2011, 383(1): 26-34
- [45] Ogasawara M, Katsumata T, Egi M. Taste properties of Maillard-reaction products prepared from 1000 to 5000 Da peptide [J]. *Food Chemistry*, 2006, 99(3): 600-604
- [46] Liu J, Liu M, He C, et al. Effect of thermal treatment on the flavor generation from Maillard reaction of xylose and chicken peptide [J]. *Food Science and Technology*, 2015, 64(1): 316-325
- [47] Dang Y, Gao X, Ma F, et al. Comparison of umami taste peptides in water-soluble extractions of Jinhua and Parma hams [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 60(2): 1179-1186
- [48] Fu Liang Han, Yan Xu. Identification of low molecular weight peptides in Chinese rice wine (Huang Jiu) by UPLC-ESI-MS/MS [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2011, 117(2): 238-250
- [49] Lee S H, Eom S Y, Park J S, et al. Method for preparing natural Kokumi flavor: US, 20150296848 [P] 2015-10-22