

## 浓厚味 $\gamma$ -谷氨酰胺研究进展、机遇与挑战

付余, 张宇昊\*

(西南大学食品科学学院 川渝共建特色食品重庆市重点实验室 重庆 400715)

**摘要** 高盐摄入给全民健康带来潜在风险。目前食品工业使用钠盐的替代物易导致食品感官品质降低。如何在保障食品品质的前提下科学降低加工食品中钠盐含量,是亟待突破的瓶颈问题。 $\gamma$ -谷氨酰胺能赋予食物浓厚味,可与钠盐协同发挥增咸提鲜的作用,为“减盐不减味”的实施提供了解决途径。然而,目前尚缺乏 $\gamma$ -谷氨酰胺的高效制备方法,其浓厚味呈味机制和构效关系尚不明确,同时浓厚味评价的标准化方法还有待进一步完善。本文综述 $\gamma$ -谷氨酰胺的制备方法、味觉传导机制、呈味影响因素以及评价方法,旨在探讨 $\gamma$ -谷氨酰胺研究的进展、机遇和挑战,为食品工业高效利用浓厚味 $\gamma$ -谷氨酰胺,实现“减盐不减味”提供新的思路与策略。

**关键词**  $\gamma$ -谷氨酰胺; 浓厚味; 酶法制备; 味觉传导机制; 构效关系; 评价方法

**文章编号** 1009-7848(2022)04-0014-11 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2022.04.002

流行病学研究表明,长期高钠盐饮食不仅会引发心血管疾病,还会引发肾结石、骨质疏松症、糖尿病等疾病<sup>[1]</sup>。目前,全球人均食盐摄入量远高于世界卫生组织(WHO)的人均推荐量(5 g/d),如美国人均每日食盐摄入量超过 10 g,欧洲国家人均每日食盐摄入量为 8~13 g<sup>[2]</sup>,而我国人均每日食盐摄入量约为 12 g,超出推荐量近 1 倍。由此可见,减少膳食中钠盐的摄入,有助于降低全民潜在健康风险。食品工业上目前使用氯化钾、氯化钙等非钠盐部分替代氯化钠,易导致食品感官品质降低,而“减盐不减味”是减少膳食钠盐摄入的关键。一些食源性肽具有咸味增强作用,其本身没有咸味,当其与氯化钠共同摄入时能够增强味蕾对咸味的感知。有学者对一些咸味增强物质进行分离鉴定,发现 $\gamma$ -谷氨酰胺是其中关键组分之一。 $\gamma$ -谷氨酰胺是含有 $\gamma$ -谷氨酰残基的一类小分子肽<sup>[3]</sup>,可用于增强食物的浓厚味(Kokumi)和持续性<sup>[4]</sup>,并与食盐协同起到增咸、提鲜的效果<sup>[5]</sup>,有望为食品工业减盐的实施提供全新的思路与策略。

虽然 $\gamma$ -谷氨酰胺因突出的呈味效果逐渐受到关注,但是在研究与应用过程中仍存在许多问题与挑战。在产物制备方面, $\gamma$ -谷氨酰胺在自然界中分布广泛,在动物、植物、微生物中均有检出,然而,其含量或产率较低,且分布差异较大,如何经济、有效地富集或制备 $\gamma$ -谷氨酰胺,尚缺乏成熟方案。目前常采用一些蛋白酶,如 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶、谷氨酰胺酶等催化制备 $\gamma$ -谷氨酰胺<sup>[6]</sup>,然而,此方法受限于缺乏高特异性和高活性的食品级蛋白酶,生产效率较低,难以真正用于规模化的食品工业生产中。在呈味构效方面, $\gamma$ -谷氨酰胺的浓度、阈值、C 端氨基酸残基与浓厚味的强、弱及呈味特性密切相关,而浓厚味与 $\gamma$ -谷氨酰胺的构效关系尚不明确<sup>[7]</sup>,造成环境因素对 $\gamma$ -谷氨酰胺呈味的影响规律研究难以深入。在呈味机制方面,目前已证实 $\gamma$ -谷氨酰胺是钙感受体(CaSR)的变构激动剂,而 $\gamma$ -谷氨酰胺激活 CaSR 过程中是否与咸味、鲜味受体之间存在一定的联系,且诱发浓厚味特性与细胞内外钙离子浓度的关系也尚不明确。在评价方法方面,当前浓厚味的的评价方法主要包括感官评价法和 CaSR 活性检测法等<sup>[8]</sup>,仍缺少较为系统、客观的评价方法。例如,感官评价法主观性较强,单独使用难以实现浓厚味和增味效果的准确评估;CaSR 法主要利用 $\gamma$ -谷氨酰胺激活 CaSR,而一些细胞表达 CaSR 受体的能力有限,限制了该法的应用。

**收稿日期**: 2022-03-20

**基金项目**: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32101980);“十四五”国家重点研发计划项目(2021YFD2100105);重庆市技术创新与应用发展专项重点项目(cstc2021jsx-cylhX0014)

**作者简介**: 付余(1987—),男,博士,教授

**通信作者**: 张宇昊 E-mail: zhy1203@163.com

基于此,本文针对  $\gamma$ -谷氨酰胺的制备方法、呈味特性与钙感受体的结合机制、 $\gamma$ -谷氨酰胺的呈味影响因素以及浓厚味评价方法等方面进行综述,分析当前的机遇和挑战,并对未来的研究方向进行展望,旨在为食品工业中应用  $\gamma$ -谷氨酰胺进行减盐、增味提供理论参考。

## 1 $\gamma$ -谷氨酰胺的制备

天然的  $\gamma$ -谷氨酰胺广泛存在于细菌、动植物及发酵食品中,而天然食物中的  $\gamma$ -谷氨酰胺含量较低,且分布差异较大。据报道,意大利鱼酱中  $\gamma$ -谷氨酰胺( $\gamma$ -Glu-Val-Gly)的含量范围为 0.4~12.6 mg/L, 酱油中  $\gamma$ -谷氨酰胺的含量范围为 1.5~6.1 mg/L, 蓝纹奶酪中所有  $\gamma$ -谷氨酰胺的总量仅为 3.59 mmol/kg<sup>[4]</sup>。由此可见,天然  $\gamma$ -谷氨酰胺因含量或产率低,无法满足工业化的需要,故定向合成方法成为制备浓厚味  $\gamma$ -谷氨酰胺的主要发展方向。目前, $\gamma$ -谷氨酰胺的合成方法主要有生物合成法(如酶法、微生物发酵法等)和化学合成法。

### 1.1 酶法

酶法合成是利用酶的催化作用合成  $\gamma$ -谷氨酰胺。目前文献报道的具有合成  $\gamma$ -谷氨酰胺能力的蛋白酶主要包括谷氨酰胺转氨酶(GGT, EC 2.3.2.2)、谷氨酰胺酶(EC 3.5.1.2)和谷氨酰胺半胱氨酸合成酶(E.C. 6.3.2.2)。

#### 1.1.1 $\gamma$ -谷氨酰胺转氨酶 $\gamma$ -谷氨酰胺转氨酶 ( $\gamma$ -

Glutamyl transpeptidase, GGT)广泛存在于生物体内,是谷胱甘肽(GSH)代谢的关键酶之一,可催化 3 种类型的反应:水解反应、转氨反应和自转氨反应(图 1)。具体机制为:1)当亲核试剂为水分子时会发生水解反应,同时释放出游离的谷氨酸;2)如果受体为氨基酸或肽分子时,将发生转氨反应,生成  $\gamma$ -谷氨酰胺;3)当受体分子同时作为反应中的供体和受体时,将会发生自转氨反应。其中,转氨反应和自转氨反应都被证明可在体外高浓度的供体(游离谷氨酰胺)基质中发生,生成  $\gamma$ -谷氨酰胺<sup>[9]</sup>。

目前研究证实,GGT 可用于催化生成多种  $\gamma$ -谷氨酰胺<sup>[10]</sup>。杨娟<sup>[11]</sup>研究表明,GGT 的转氨反应最优条件为 37 °C、pH 10.0、反应时间 3 h,最高产率 88%。Lin 等<sup>[12]</sup>对 GGT 的固定化进行研究,通过将地衣芽孢杆菌 GGT 固定在石墨烯氧化物纳米片上合成  $\gamma$ -Glu-Phe 和  $\gamma$ -Glu-Leu,与未固定的谷氨酰胺转氨酶相比,固定化酶表现出明显更高的活性,并且产物的产率高于 31%。由于谷氨酰胺转氨酶属于转移酶而不是合成酶,不消耗 ATP 等能量化合物,具有较高的酶活性,因此该方法在食品工业中具有大规模生产  $\gamma$ -谷氨酰胺的应用前景。然而,目前食品工业仍缺乏食品级的高特异性、高活性的  $\gamma$ -谷氨酰胺转氨酶,利用合成生物学手段高效表达安全的 GGT,是食品级  $\gamma$ -谷氨酰胺制备的发展方向之一。

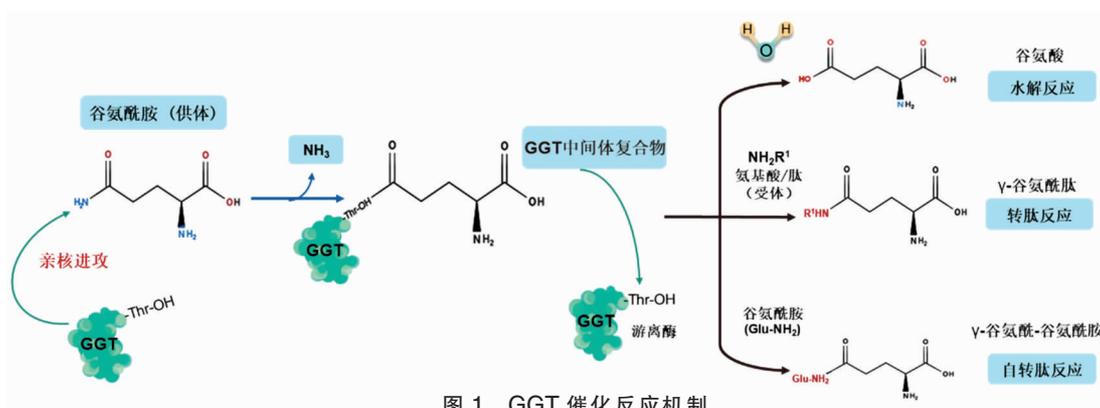


图 1 GGT 催化反应机制

Fig.1 The catalytic reaction mechanism of GGT

1.1.2 谷氨酰胺酶 谷氨酰胺酶(Glutaminase)是一种能够合成  $\gamma$ -谷氨酰胺的重要酶制剂。与谷氨酰胺转氨酶不同的是谷氨酰胺酶是一种水解酶,

它广泛分布于细菌、酵母菌和真菌等微生物中。除水解作用外,谷氨酰胺酶也具有一定的  $\gamma$ -谷氨酰胺基转移酶活性<sup>[13]</sup>。早在 20 世纪 70 年代,铜绿假单

胞菌(*P. Aeruginosa*)<sup>[14]</sup>和大肠杆菌属(*Escherichia coli*)<sup>[15]</sup>来源的谷氨酰胺酶便被报道可催化 $\gamma$ -谷氨酰基供体与其它小分子物质结合生成 $\gamma$ -谷氨酰物质;硝基还原假单胞菌(*P. nitroreducens*)来源的谷氨酰胺酶也具有 $\gamma$ -谷氨酰基转移反应活性,在谷氨酰胺和羟胺的反应体系中,它能够催化形成 $\gamma$ -谷氨酰基异羟肟酸<sup>[16]</sup>。Tomita等<sup>[17]</sup>研究表明米曲霉源谷氨酰胺酶的 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶活性,并证实谷氨酰胺酶可以催化合成多种 $\gamma$ -谷氨酰肽,例如: $\gamma$ -Glu-Gln、 $\gamma$ -Glu-Glu、 $\gamma$ -Glu-Ala、 $\gamma$ -Glu-Ser、 $\gamma$ -Glu-Phe、 $\gamma$ -Glu-Val、 $\gamma$ -Glu-Ile和 $\gamma$ -Glu-Gly。近年来,也有不少学者通过研究更多微生物源谷氨酰胺酶合成多种 $\gamma$ -谷氨酰肽<sup>[18]</sup>。Yang等<sup>[19-20]</sup>利用从淀粉芽孢杆菌和米曲霉获得的谷氨酰胺酶合成了 $\gamma$ -[Glu]<sub>(1≤n≤5)</sub>-Phe,并指出其最佳反应温度37℃,最佳pH值为10,以及最佳反应时间3h;研究还发现,从解淀粉芽孢杆菌中提取的一种谷氨酰胺酶也能催化转肽反应,它具有合成 $\gamma$ -[Glu]<sub>(n=2,3,4)</sub>-Val或 $\gamma$ -[Glu]<sub>(n=2,3,4)</sub>-Met的转肽酶活性。本研究团队利用谷氨酰胺酶分别催化秀珍菇蛋白肽和鸡骨蛋白肽合成 $\gamma$ -谷氨酰肽,研究发现通过优化反应条件来提升产率空间仍非常有限,最终产率仍较低(最高仅为39.38%),说明谷氨酰胺酶虽可用于生成 $\gamma$ -谷氨酰肽,但其底物特异性差且 $\gamma$ -谷氨酰基转移活性有限,很难真正用于规模化生产食品级 $\gamma$ -谷氨酰肽。

**1.1.3  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶**  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶( $\gamma$ -Glutamyl cysteine synthetase)可催化合成一些 $\gamma$ -谷氨酰肽。Nakayama等<sup>[21]</sup>报道从奇异变形杆菌中纯化的 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶在30℃时可以合成含半胱氨酸的 $\gamma$ -谷氨酰肽,其中包括 $\gamma$ -Glu-Cys、 $\gamma$ -Glu-Abu、 $\gamma$ -Glu-Ser和 $\gamma$ -Glu-Hse。然而,此合成酶在催化反应过程中需要消耗ATP,且产量受到ADP和终产物的反馈抑制的影响<sup>[11]</sup>,因此在 $\gamma$ -谷氨酰肽的制备中使用率不高。

## 1.2 微生物发酵法

微生物发酵法是在特定环境下,利用某些微生物代谢途径产生的蛋白酶来催化合成 $\gamma$ -谷氨酰肽的一种方法。Hasegawa等<sup>[22]</sup>研究发现谷氨酸棒状杆菌发酵产生谷氨酸的过程中,在 $\gamma$ -谷氨酸

转肽酶的催化作用下可以合成多种 $\gamma$ -谷氨酰肽。Sofyanovich等<sup>[23]</sup>研究发现酿酒酵母除了可以产生GSH外,还可以催化生成 $\gamma$ -Glu-Val和 $\gamma$ -Glu-Val-Gly,其中 $\gamma$ -Glu-Val-Gly是酵母多个重要生理代谢途径的共有产物,因此它能天然存在于酵母细胞中。Yan等<sup>[24]</sup>探究了 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸连接酶(GCL)在罗伊氏乳杆菌LTH5448合成 $\gamma$ -谷氨酰二肽中的作用,发现罗伊氏乳杆菌中存在3个编码GCL的基因,其中罗伊氏乳杆菌中的2个基因能介导合成 $\gamma$ -Glu-Ile和 $\gamma$ -Glu-Cys,并利用其合成具有浓厚味 $\gamma$ -谷氨酰肽的发酵剂培养物,从而改善发酵食品的风味。Yang等<sup>[25]</sup>研究发现,在一些发酵食品中也存在罗伊氏乳杆菌中的GCL,可以催化合成具有独特浓厚味的 $\gamma$ -谷氨酰二肽( $\gamma$ -Glu-Ile和 $\gamma$ -Glu-Cys)。对于发酵类调味品,可以通过引入特定微生物菌种参与发酵,靶向提升产品中 $\gamma$ -谷氨酰肽含量,进而有助于开发富含 $\gamma$ -谷氨酰肽的低盐增味调味品。然而,从 $\gamma$ -谷氨酰肽制备的角度,尚缺乏以 $\gamma$ -谷氨酰肽制备为目的的发酵菌种及其发酵条件优化研究。目前主要使用诱变育种和基因工程手段提高GSH的产率,虽然发酵效率有所提高,但是其产率最高也不超过20%。通过菌种改造获得 $\gamma$ -谷氨酰肽高产菌株,可能成为未来研究需要攻克的难题。

## 1.3 化学合成法

化学合成法是以氨基酸为原料,通过对活性基团进行保护或者屏蔽来实现目标产物的 $\gamma$ -谷氨酰基化,常用于合成高纯度的 $\gamma$ -谷氨酰肽。Amino等<sup>[26]</sup>通过 $\gamma$ -谷氨酰基的N- $\alpha$ -苯氧羰基保护,以Glu、Val和Gly残基为主链依次缩合制备 $\gamma$ -Glu-Val-Gly,然而,该方法存在操作复杂,产物易产生消旋体,分离难度大,产率低,成本高等缺点,而且在制备过程中需要使用过量的偶联剂和酰化试剂,容易导致环境污染。这种方法不适用于食品级 $\gamma$ -谷氨酰肽工业化水平的大规模生产,然而,其可用于 $\gamma$ -谷氨酰肽的构效研究,为进一步阐明 $\gamma$ -谷氨酰肽呈味机理提供支撑。

## 2 $\gamma$ -谷氨酰肽的呈味分子机制

$\gamma$ -谷氨酰肽可以提高基本呈味物质的呈味强度,在食物中加入此类肽会增加食物的鲜咸味及

浓厚味<sup>[27]</sup>,然而,当  $\gamma$ -谷氨酰胺的添加量过高时又会引起浓厚味强度的减退<sup>[5]</sup>。随着对  $\gamma$ -谷氨酰胺呈味特性研究的深入,现已证实  $\gamma$ -谷氨酰胺的浓厚味受体为钙感受受体 (Calcium sensing receptor, CaSR), 且浓厚味的味觉强度与其激活 CaSR 的能力呈正相关<sup>[28]</sup>,因此从  $\gamma$ -谷氨酰胺与 CaSR 结合的角度,深入挖掘浓厚味的呈味机理,可为  $\gamma$ -谷氨酰胺的呈味分子机制研究提供理论参考。

## 2.1 $\gamma$ -谷氨酰胺与 CaSR 的结合机制

CaSR 是 C 家族 G 蛋白偶联受体 (G-protein-coupled receptor, GPCR) 的一种,属于细胞外氨基酸传感器家族。类似于其它 C 类 G 蛋白偶联受体, CaSR 识别配体的关键位点存在于一个大的 N 末端 Venus Flytrap 结构域 (VFT), 此结构域由 2 个区域 (LB1 和 LB2) 组成。此外, CaSR 还包含一个富含半胱氨酸的结构域 (Cysteine-rich, CR), 它将 VFT 模块连接到跨膜区域, 是受体激活所必需的途径<sup>[29]</sup>。L 型氨基酸以及  $\gamma$ -谷氨酰胺也都是通过与 VFT 结合区域结合激活 CaSR, 并通过 T145A/S170T 双突变体的共同机制发挥作用, 可能占据受体 VFT 结构域的重叠结合位点<sup>[30]</sup>。

## 2.2 信号传导机制

味觉受体细胞 (Taste receptor cell, TRC) 是味蕾的组成成分, 主要分为 4 种类型: I、II、III 和 IV 型 (IV 型细胞数量不足 2%)。其中, II 型细胞中含有 G 蛋白偶联受体 T1Rs 和 T2Rs, 甜味、苦味和鲜味是由 GPCRs 介导的, 异二聚体受体 T1Rs

负责鲜味 (T1R1/T1R3) 和甜味 (T1R2/T1R3), 而 T2Rs 是苦味味觉受体; CaSR 在 II、III 型 2 种细胞中都有表达, 且主要在 III 型细胞中表达<sup>[31]</sup>。如图 2 所示, CaSR 主要在 II 型细胞中与腔膜上的 T2Rs 共同表达, 并对苦味 (例如  $\text{Ca}^{2+}$  或苯甲地那铵) 和浓厚味 (*L*-氨基酸或  $\gamma$ -谷氨酰胺) 的转导发挥作用。具体而言, 激活 CaSR 同源二聚体或 CaSR/T2R 异源二聚体, 会促使通过磷脂酶 (PLC) 依赖性途径增加细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度, 最终促进细胞释放神经递质 ATP 至细胞外<sup>[28]</sup>, 而 CaSR 激动剂可直接激活表达在味觉受体细胞表面的 CaSR, 进而通过中枢神经系统 (Central nervous system, CNS) 反馈到大脑<sup>[27]</sup>。

鲜味物质谷氨酸钠和浓厚味物质 GSH 可分别与 II 型细胞膜上的 T1Rs 和 CaSR 结合, 通过相似途径增强  $\text{Ca}^{2+}$  的释放, 提高细胞动作电位并促进 ATP 的释放, 以实现增强鲜味的效果。在 III 型细胞中 (图 2),  $\gamma$ -谷氨酰胺激活顶端的 CaSR 后, 通过 PLC 依赖的信号通路诱导细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的增加, 同时 III 型细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的增加与 5-羟色胺 (5-HT) 的释放有关, 而 5-HT 会抑制 II 型细胞中 ATP 的释放, 它们所产生的味觉信号互有影响。表达 CaSR 的味觉受体细胞可以作为浓厚味的评价模型, 在鲜味物质存在的情况下,  $\gamma$ -谷氨酰胺的鲜味增强作用是否依赖于 CaSR 的激活而发生, 目前尚不清楚, 有待进一步研究<sup>[32]</sup>。

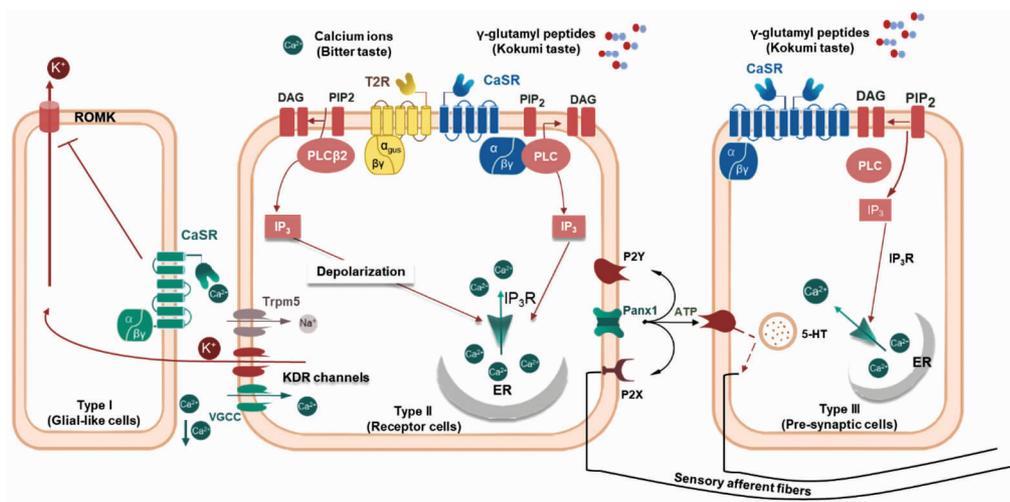


图 2 CaSR 在味觉细胞中的作用途径<sup>[28]</sup>

Fig.2 The role of CaSR in taste cells<sup>[28]</sup>

### 3 浓厚味 $\gamma$ -谷氨酰胺的呈味影响因素

$\gamma$ -谷氨酰胺的浓厚味特性其实在很大程度上受不同因素的影响,如N端氨基酸残基的差异会使 $\gamma$ -谷氨酰胺呈现出不同的浓厚味特性,浓度和pH值等环境因素也会影响呈味效果。因此,原料来源、应用的食物体系以及 $\gamma$ -谷氨酰胺浓度阈值不同,均会造成浓厚味产生较大差异。本节针对影响 $\gamma$ -谷氨酰胺浓厚味的因素进行综述,为 $\gamma$ -谷氨酰胺在不同食物体系中的科学应用提供理论参考。

#### 3.1 呈味构效

$\gamma$ -谷氨酰胺的结构与其对CaSR的激活能力密切相关,而 $\gamma$ -谷氨酰胺激活CaSR的能力与浓厚味强度呈正相关<sup>[33]</sup>。明确 $\gamma$ -谷氨酰胺的呈味构效关系有助于厘清不同 $\gamma$ -谷氨酰胺的浓厚味呈味特点,进而筛选适合在不同食物体系中应用 $\gamma$ -谷氨酰胺。Amino等<sup>[34]</sup>报道,具有以下结构特点的 $\gamma$ -谷氨酰胺能够有效激活CaSR:1)在N末端存在1个 $\gamma$ -L-谷氨酰胺残基;2)当第2个残基为中等分子量,含有1~3个C或者含有2个C和1个O或S原子的脂肪族中性取代基(如Val、Leu等),并且为L构型;3)第3个残基的存在,特别是存在C

末端的羧酸且没有侧链的残基(如Gly),将会呈现出较强CaSR的激活能力,许多研究结果也证明了以上构效规律。Ohsu等<sup>[27]</sup>研究表明, $\gamma$ -Glu-Val-Gly、 $\gamma$ -Glu-Cys和GSH( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly)均具有激活CaSR的能力。此外,Amino等<sup>[34]</sup>研究发现多种含硫氨基酸的 $\gamma$ -谷氨酰胺也具有激活CaSR的能力,且具有较强的浓厚味。如表1所示, $\gamma$ -L-谷氨酰胺-S-甲基-L-半胱氨酰胺甘氨酸的CaSR激活能力,而该结构也满足上述对于表现强效的CaSR激活能力的结构要求。相反, $\gamma$ -L-谷氨酰胺-L-蛋氨酸、 $\gamma$ -L-谷氨酰胺-S-(正丙基)-L-半胱氨酸、 $\gamma$ -L-谷氨酰胺-S-(2-丙烯基)-L-半胱氨酸和 $\gamma$ -L-谷氨酰胺-S-(2-丙烯基)-L-半胱氨酸亚砷拥有分子量更大的侧链基团,然而,在CaSR活性评价中未展现其活性。由此可以推测 $\gamma$ -谷氨酰胺和CaSR相互结合以表达活性时,对于 $\gamma$ -谷氨酰胺的空间结构要求十分严格。Amino等<sup>[35]</sup>还发现若将硫化物转化为极性官能团,如亚砷基团,会阻碍 $\gamma$ -谷氨酰胺和CaSR的相互作用,并且发现 $\alpha$ -L-谷氨酰胺不能激活CaSR受体,进一步佐证了 $\gamma$ -L-谷氨酰胺残基对于呈现强效CaSR激活能力的结构依赖性。

表1 含硫氨基酸的 $\gamma$ -谷氨酰胺的CaSR激活能力<sup>[35]</sup>

Table 1 CaSR activity of sulfur amino acid-containing  $\gamma$ -glutamyl peptides<sup>[35]</sup>

$\gamma$ -谷氨酰胺	钙敏受体激活能力(EC <sub>50</sub> )/mmol·L <sup>-1</sup>
$\gamma$ -L-谷氨酰胺-L-半胱氨酰胺甘氨酸(GSH)	0.70
$\gamma$ -L-谷氨酰胺-L-半胱氨酸	0.46
$\gamma$ -L-谷氨酰胺-S-(2-丙烯基)-L-半胱氨酸	不活跃
$\gamma$ -L-谷氨酰胺-S-(2-丙烯基)-L-半胱氨酸亚砷	不活跃
$\gamma$ -L-谷氨酰胺-S-甲基-L-半胱氨酸	1.47
$\gamma$ -L-谷氨酰胺-S-甲基-L-半胱氨酸亚砷	不活跃
$\gamma$ -L-谷氨酰胺-S-(正丙基)-L-半胱氨酸	不活跃
$\gamma$ -L-谷氨酰胺-L-蛋氨酸	不活跃
$\gamma$ -L-谷氨酰胺-L-蛋氨酸亚砷	>100
$\gamma$ -L-谷氨酰胺-S-(2-丙烯基)-L-半胱氨酰胺甘氨酸	不活跃
$\gamma$ -L-谷氨酰胺-S-(2-丙烯基)-L-半胱氨酰胺甘氨酸亚砷	182
$\gamma$ -L-谷氨酰胺-S-甲基-L-半胱氨酰胺甘氨酸	0.32
$\gamma$ -L-谷氨酰胺-S-甲基-L-半胱氨酰胺甘氨酸亚砷	43.6
$\alpha$ -L-谷氨酰胺-S-(2-丙烯基)-L-半胱氨酸	不活跃

#### 3.2 其它因素

$\gamma$ -谷氨酰胺的结构决定其浓厚味的效果,不同食物体系下呈味物质组成、pH值等因素会影响 $\gamma$ -谷氨酰胺对CaSR的激活效果等,造成 $\gamma$ -谷氨

酰胺在实际食物应用中呈现出的浓厚味不同。对于浓厚味 $\gamma$ -谷氨酰胺的产生,一些呈味物质具有协同作用,将 $\gamma$ -谷氨酰胺添加到如氯化钠、谷氨酸钠或鸡汤等风味基质中, $\gamma$ -谷氨酰胺的浓厚味

检测阈值显著降低,并且显著增强了风味基质的复杂口感、满口感和持续口感。Dunkel 等<sup>[36]</sup>通过感官评价法发现在鸡汤溶液中, $\gamma$ -Glu-Leu、 $\gamma$ -Glu-Val、 $\gamma$ -Glu-Cys- $\beta$ -Ala、 $\gamma$ -Glu-Cys-Gly 的浓厚味(复杂口感、满口感、延绵感)阈值分别为 0.8,0.4,0.2,0.2 mmol/L,并发现  $\gamma$ -Glu-Cys- $\beta$ -Ala 加入谷氨酸和氯化钠的混合溶液后,阈值下降约 32 倍,在加入低脂花生酱、低脂奶油冻中也会产生类似的效果<sup>[37]</sup>。此外, $\gamma$ -谷氨酰胺加入基质的 pH 值也会影响浓厚味的强度。Simone 等<sup>[38]</sup>利用感官评价法鉴定  $\gamma$ -谷氨酰胺在 pH 值分别为 4.7,5.7,6.7,7.7 时的浓厚味强度;当 pH 值为 6.7 时, $\gamma$ -谷氨酰胺的浓厚味强度最强,当 pH 值为 5.7 时强度次之,然而,在较低 pH 值(4.7)和较高的 pH 值(7.7)下均未观察到明显的浓厚味,这表明  $\gamma$ -谷氨酰胺呈现的浓厚味强度强烈依赖于 pH 值。由于  $\gamma$ -谷氨酰胺本身不具有基本味,只有在含有呈味

物质的体系中才能体现出呈味效果,因此  $\gamma$ -谷氨酰胺呈现浓厚味的能力不仅受自身结构和浓度的影响,还与其应用的食物体系环境有关,环境因素对  $\gamma$ -谷氨酰胺呈味特性的影响规律有待进一步研究。

#### 4 $\gamma$ -谷氨酰胺浓厚味的评价方法

由于  $\gamma$ -谷氨酰胺不仅赋予食物醇厚、持续的味觉感受特性,还增强基本呈味物质的呈味强度,因此判断和评价浓厚味强度是研究  $\gamma$ -谷氨酰胺的必要前提。目前,评价  $\gamma$ -谷氨酰胺及其增味效果的方法主要有感官评价法、CaSR 法和电子舌法,如表 2 所示。加强对  $\gamma$ -谷氨酰胺的浓厚味的评价研究并制定科学有效的评价方法,对于  $\gamma$ -谷氨酰胺的高效制备及食品工业化生产具有重要意义。

表 2 浓厚味  $\gamma$ -谷氨酰胺及其增味效果的评价方法

Table 2 Methods for assessing kokumi  $\gamma$ -glutamyl peptides and their taste-enhancing effects

方法	步骤	特点	参考文献
感官评价法	1) 感官鉴评训练; 2) 鉴评试验, 将待评定的物质加入基础溶液或食品体系中, 经鉴评人员品尝后打分; 3) 对不同鉴评人员品尝相同溶液得到的数据采用统计方法分析	优点: 方便、快捷, 具有系统性、科学性, 方法成熟、完善 缺点: 检测浓度较高、误差大, 主观性较强	[36],[47],[48]
CaSR 法	1) 将 CaSR 的 cDNA 转染至卵母细胞, 加入待测样品的培养基进行培养; 2) 利用激活卵母细胞内的钙离子而产生的电流进行测定	优点: 缩小人工筛选范围, 降低成本 缺点: 复杂繁琐且具有一定的不准确性	[34]
电子舌法	1) 测量前对电子舌进行自检、激活、校准和诊断; 2) 配制好的溶液直接倒入电子舌专用杯中, 室温下测量	优点: 客观灵敏, 方便快捷, 可用于多样本分析 缺点: 无法直接测定浓厚味强度	[42],[49]

#### 4.1 感官评价法

感官评价是通过视觉、嗅觉、触觉、味觉和听觉感知来测定和分析待测样品的分析方法<sup>[39]</sup>, 是一种常见的评定  $\gamma$ -谷氨酰胺赋予食物浓厚味的方法。早在 1997 年, Ueda 等<sup>[40]</sup>首次提出  $\gamma$ -谷氨酰胺——GSH 的感官评价方法, 他们测定了水和鲜味溶液中 GSH 的阈值及其对基本味觉(酸、甜、苦、咸、鲜)的调节能力。随后, 该法又经研究学者的补充和完善, 被广泛应用于浓厚味物质的评价

中。

评价过程如下<sup>[41]</sup>: 1) 感官鉴评训练, 通过让感官鉴评人员品尝一系列代表酸、甜、苦、咸、鲜和浓厚味的基础溶液, 使他们对这些味觉具有准确的认识, 并用描述性语言进行表达。2) 鉴评试验, 将不同浓度的待测物质溶解于含有 2 种以上的呈味物质体系中(可采用空白鸡汤或肉汤), 让鉴评人员品尝并通过评分法(0~10 分依次表示味觉强度从无到非常强烈), 从酸、甜、苦、咸、鲜和浓厚味等

方面对待测样品进行打分。3)汇总品尝相同溶液鉴评人员的结果并采用统计学方法进行分析,给出描述性感官评价结果。

探究  $\gamma$ -谷氨酰胺的阈值浓度也可采用感官评价法。味觉阈值浓度主要通过味觉浓度或稀释分析的三角形试验来确定<sup>[10]</sup>。感官评鉴小组需在其它 2 个空白样品之外正确识别出待测样品,并以评鉴人员能够区分该差异的最小浓度作为待测物质的味觉阈值。例如,Liu 等<sup>[42]</sup>利用该法测定  $\gamma$ -Glu-Val-Gly 的味觉识别阈值浓度为 1.55  $\mu\text{mol/L}$ 。此外,一些研究学者也通过感官评价法来评价  $\gamma$ -谷氨酰胺基础味的调节能力,即在基础味溶液中考察额外添加的浓厚味肽改变基础味的强度(例如氯化钠溶液中的咸味)<sup>[43]</sup>。

## 4.2 CaSR 法

目前,常用卵母细胞或人胚肾细胞 HEK-293 作为 CaSR 受体细胞模型来评估  $\gamma$ -谷氨酰胺的受体激活情况。Amino 等<sup>[34]</sup>采用卵母细胞进行评价的方法如下:从非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)卵巢中制备卵母细胞,然后将人源 CaSR 的互补 RNA(cRNA)转导至卵母细胞中。当卵母细胞中表达的 CaSR 被激活时,会导致细胞间  $\text{Ca}^{2+}$  增加,激活内源性钙离子依赖性  $\text{Na}^+$  通道并产生电流。在含有 CaSR 激活剂的缓冲液中培养卵母细胞时,可通过细胞两极的电流来表征激活剂的激活效果,记录的电流峰值与 CaSR 被激活的强度相关<sup>[34]</sup>。HEK-293 细胞法则将人源 CaSR 的 cDNA 构建于表达载体 pcDNA3.1 上,并迅速转染到 HEK-293 细胞中,在含有待测物质的培养基中培养后,用钙离子指示剂或钙离子染料染色。当 HEK-293 细胞中表达的 CaSR 被激活后,细胞间  $\text{Ca}^{2+}$  浓度会增加,此时,钙离子染料会与游离的  $\text{Ca}^{2+}$  结合,从而导致染料荧光强度增加,因此可通过检测荧光强度评估各种待测样品的 CaSR 激活能力及其浓度依赖性<sup>[27]</sup>。Broadhead 等<sup>[30]</sup>在表达 CaSR 的 HEK-293 细胞中评价了  $\gamma$ -谷氨酰胺对钙离子依赖的细胞内的钙调动的的影响,研究发现 S-甲基谷胱甘肽、谷胱甘肽( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly)、 $\gamma$ -L-谷酰基-L-丙氨酸( $\gamma$ -Glu-Ala)和  $\gamma$ -L-谷酰基-L-半胱氨酸( $\gamma$ -Glu-Cys)都是非常有效的 CaSR 正变构调节剂,可以显著促进钙离子依赖的钙调动,它们的  $\text{EC}_{50}$  值分别

为 1.7,3.9,4.7,4.8  $\mu\text{mol/L}$ ,且促进钙激活的能力排序为 S-甲基谷胱甘肽> $\gamma$ -Glu-Cys-Gly> $\gamma$ -Glu-Ala> $\gamma$ -Glu-Cys。该结果再次表明  $\gamma$ -谷氨酰胺的结构、肽序列及肽链长度对 CaSR 的激活能力以及浓厚味强度都有影响,然而,其确切的构效关系有待进一步阐明。

与感官评定法相比,CaSR 法的时间和人力消耗少,由于 CaSR 法基于细胞实验,此方法不需要对检测样本设定严格的食品级原料要求,因此比较适用于大规模检测。然而,CaSR 法的结果需进一步通过感官评定法验证。由于许多 CaSR 激活剂并不是浓厚味物质<sup>[32]</sup>,并且细胞有限的表达能力和复杂的细胞培养环境都对 CaSR 法的大规模应用形成限制<sup>[7]</sup>,因此,目前 CaSR 法一般用于对待测物质的初步筛选<sup>[41]</sup>。

## 4.3 电子舌

电子舌(Electronic tongue)是通过模仿人体味觉机理制成的新型分析仪器,目前被广泛应用于食品、调味品、中药及中成药等领域。与人工的感官评价相比,电子舌更客观、灵敏、不易疲劳,可同时用于多种样本的测定。然而,对于浓厚味这种特征性味道,其复杂的呈味特性超出了电子舌检测的能力。目前,主要使用电子舌结合人工感官方法评价厚味肽对于基础溶液的增咸、增鲜效果。Yan 等<sup>[44]</sup>对具有浓厚味的豌豆蛋白肽进行电子舌及感官分析,发现在 0.5%NaCl 溶液中加入肽产物后,咸度及鲜味响应值均显著增加,说明这些小肽不仅具有浓厚感特征的醇厚、圆润的感觉,还可能对咸味和鲜味起到增强作用。Zhang 等<sup>[45]</sup>也利用电子舌、人工感官等方法对河豚中的关键味觉活性成分通过味觉重构、遗漏和添加试验确定其中的关键物质,发现两种味觉活性肽 Pro-Val-Ala-Arg-Met-CysArg(PR-7)和 Tyr-Gly-Gly-Thr-Pro-Pro-Phe-Val(YV-8)是引起典型浓厚味的关键化合物,并在接近中性 pH(6.5~8.0)时,具有显著鲜味增强作用<sup>[46]</sup>。除此之外,有学者通过感官分析和电子舌技术验证了典型的浓厚味  $\gamma$ -谷氨酰胺的鲜味增强作用<sup>[47-48]</sup>。综上所述,感官评价法、CaSR 法和电子舌可为浓厚味的特征和定量测定提供一定评价依据,然而,每种方法单独用于浓厚味评价都不足以获得有说服力的结论,尚需采用几种方法

联合评价,方能得到相对客观的结果。

## 5 挑战与展望

目前,高钠盐摄入是我国居民膳食方面潜在风险之一。 $\gamma$ -谷氨酰胺不仅能够增强食品的呈味强度,具有潜在的生理调节功能,而且在工业化食品减盐领域具有广阔的应用前景。然而,目前  $\gamma$ -谷氨酰胺的研究还存在如下挑战:

1) 目前酶法制备  $\gamma$ -谷氨酰胺的生物酶制剂主要有谷氨酰胺酶和谷氨酰转肽酶,然而,由于谷氨酰胺酶受体的转移活性较低,难以用于  $\gamma$ -谷氨酰胺的工业化生产;谷氨酰转肽酶催化合成  $\gamma$ -谷氨酰胺还处于实验室水平,具有高产量的优良菌株还有待开发。可以结合酶工程修饰与改造技术建立高效表达的酶制剂,并结合固定化酶技术,增强其特有的催化作用及回收率,筛选出高活性的谷氨酰转肽酶,为实现食品领域中  $\gamma$ -谷氨酰胺低成本、高产量的工业化生产提供前期基础。

2) 除  $\gamma$ -谷氨酰胺外,CaSR 还有其它已知的激动剂,例如:乳酸钙、鱼精蛋白、聚赖氨酸和 L-组氨酸,也可赋予食品浓厚味。然而,目前几乎未见  $\gamma$ -谷氨酰胺与其它 CaSR 激动剂之间协同作用的研究。未来研究可以探究不同 CaSR 激动剂结合所产生的协同作用,为浓厚味食品更高效、高质的生产提供新思路。

3)  $\gamma$ -谷氨酰胺不仅赋予食物浓厚味,还增强基本呈味物质的鲜、咸味强度。 $\gamma$ -谷氨酰胺与钙敏感受体相互作用产生浓厚味的同时,与 II、III 型 TRC 产生的味觉信号互有影响,这些细胞间的信号交流是否影响鲜味与咸味,目前尚不清楚。通过  $\gamma$ -谷氨酰胺的计算机模拟分析,根据同源性建模、分子动力学等策略,可从分子层面阐明呈味机制及其与呈味物质的相互作用。

4)  $\gamma$ -谷氨酰胺的浓厚味强度随肽链长度的增加而降低,浓厚味  $\gamma$ -谷氨酰胺大多是由 2~5 个氨基酸组成的小肽,而 C 端氨基酸残基不同的  $\gamma$ -谷氨酰胺,其呈味特性和浓厚味味觉阈值也存在差异。目前  $\gamma$ -谷氨酰胺的构效关系尚不明确,进一步加强  $\gamma$ -谷氨酰胺构效方面的研究,可为新型  $\gamma$ -谷氨酰胺的设计、制备提供思路。

5) 目前检测浓厚感的方法复杂繁琐,且客观

性和准确性不足,很难做到对浓厚感强度的精准定量评价。利用感官评价法、分子对接技术及 CaSR 活性检测法 3 种方法联合评价  $\gamma$ -谷氨酰胺与 CaSR 受体的相互作用,有望实现  $\gamma$ -谷氨酰胺的准确评价和筛选。

## 6 结论

作为一种新型的呈味肽, $\gamma$ -谷氨酰胺逐渐受到关注。 $\gamma$ -谷氨酰胺赋予食物浓厚味并增强基本呈味物质的呈味强度,尤其是在减少食盐用量的情况下起到增咸、提鲜的效果,有望作为食品工业减盐的全新材料。目前人工制备  $\gamma$ -谷氨酰胺主要通过谷氨酰转肽酶和谷氨酰胺酶进行酶法催化合成。检测  $\gamma$ -谷氨酰胺的浓厚味主要使用感官评价法和 CaSR 活性检测法,其呈味能力与其呈味阈值、样品中的浓度和  $\gamma$ -谷氨酰胺的空间结构有较大关系。至今,我国对  $\gamma$ -谷氨酰胺的研究开发仍处于初步阶段,还需加强对  $\gamma$ -谷氨酰胺的制备方法、呈味机制、构效关系及呈味评价等方面的研究。

### 致谢:

感谢安琪酵母股份有限公司刘政芳对本文的帮助和建议。

## 参 考 文 献

- [1] GRILLO A, SALVI L, CORUZZI P, et al. Sodium intake and hypertension[J]. *Nutrients*, 2019, 11(9): 1970.
- [2] RYSOVA J, SMIDOVA Z. Effect of salt content reduction on food processing technology[J]. *Foods*, 2021, 10(9): 2237.
- [3] YANG J, SUN-WATERHOUSE D, CUI C, et al. Gamma-glutamyl peptides: Favorable catalytic actions of glutaminase[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 96: 315-321.
- [4] YANG J, BAI W, ZENG X, et al. Gamma glutamyl peptides: The food source, enzymatic synthesis, kokumi-active and the potential functional properties - A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 91: 339-346.

- [5] TAKAKURA Y, ARAI S, KANAORI K, et al. Development of enzymatic synthesis of gamma-glutamylcarnosine and its effects on taste[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(2): 592-597.
- [6] SUZUKI H. Bacterial gamma-glutamyltranspeptidase: Food and medicinal applications [J]. Scienceasia, 2019, 45(6): 503-508.
- [7] LU Y, WANG J, SOLADOYE O P, et al. Preparation, receptors, bioactivity and bioavailability of gamma-glutamyl peptides: A comprehensive review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 113: 301-314.
- [8] FUKAO T, SUZUKI H. Enzymatic synthesis of gamma-glutamylvalylglycine using bacterial gamma-glutamyltranspeptidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(27): 7675-7679.
- [9] SPERANZA G, MORELLI C F. Gamma-glutamyl transpeptidase-catalyzed synthesis of naturally occurring flavor enhancers[J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2012, 84: 65-71.
- [10] SUZUKI H. Gamma-glutamyltranspeptidase essential for the metabolism of gamma-glutamyl compounds in bacteria and its application[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2021, 85(6): 1295-1313.
- [11] 杨娟.  $\gamma$ -谷氨酰胺的酶法合成及其应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- YANG J. The enzymatic synthesis and application of  $\gamma$ -glutamyl peptides[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [12] LIN L L, CHI M C, LAN Y J, et al. Facile immobilization of *Bacillus licheniformis* gamma-glutamyltranspeptidase onto graphene oxide nanosheets and its application to the biocatalytic synthesis of gamma-L-glutamyl peptides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 117: 1326-1333.
- [13] SUZUKI H, NAKAFUJI Y, TAMURA T. New method to produce kokumi seasoning from protein hydrolysates using bacterial enzymes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2017, 65(48): 10514-10519.
- [14] PRUSINER S, STADTMAN E R. Regulation of glutaminase B in *Escherichia coli*. III. Control by nucleotides and divalent cations[J]. Journal of Biological Chemistry, 1976, 251(11): 3463-3469.
- [15] SODA K, YAMAMOTO T, OHSHIMA M. Purification and properties of isoenzymes of glutaminase from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1972, 46(3): 1278-1284.
- [16] TACHIKI T, YAMADA T, UEDA M, et al. Purification and some properties of glutaminase from *Pseudomonas nitroreducens* IFO 12694[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1996, 60(7): 1160-1164.
- [17] TOMITA K, YANO T, KITAGATA T, et al. Formation of gamma-glutamyl-transferase peptides by glutaminase of *Aspergillus oryzae*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53(7): 1995-1996.
- [18] YANG J, HUANG Y R, DONG H, et al. The application of L-glutaminase for the synthesis of the immunomodulatory gamma-D-glutamyl-L-tryptophan and the kokumi-imparting gamma-D-glutamyl peptides[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(11): 5841-5849.
- [19] YANG J, SUN-WATERHOUSE D, CUI C, et al. Synthesis and sensory characteristics of kokumi gamma-[glu](n)-phe in the presence of glutamine and phenylalanine: Glutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens* or *Aspergillus oryzae* as the catalyst[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(39): 8696-8703.
- [20] YANG J, SUN-WATERHOUSE D, XIE J, et al. Comparison of kokumi gamma-[Glu](n>1)-Val and gamma-[Glu](n>1)-Met synthesized through transpeptidation catalyzed by glutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Food Chemistry, 2018, 247: 89-97.
- [21] NAKAYAMA R, KUMAGAI H, MARUYAMA T, et al. Synthesis of gamma-glutamylpeptides by gamma-glutamylcysteine synthetase from *Proteus mirabilis*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1981, 45(12): 2839-2845.
- [22] HASEGAWA M, MATSUBARA I. Studies on gamma-glutamylpeptides in L-glutamic acid fermentation broths. 3. The mechanism of formation of gamma-glutamylpeptides during L-glutamic acid fermentation contributed solely by gamma-glutamyltranspeptidase [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1978, 42(2): 383-391.
- [23] SOFYANOVICH O A, NISHIUCHI H, YAMAGISHI

- K, et al. Multiple pathways for the formation of the gamma-glutamyl peptides gamma-glutamyl-valine and gamma-glutamyl-valyl-glycine in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Plos One, 2019, 14(5): e0216622.
- [24] YAN B W, CHEN Y Y, WANG W L, et al. Gamma-glutamyl cysteine ligase of *Lactobacillus reuteri* synthesizes gamma-glutamyl dipeptides in sourdough[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(46): 12368-12375.
- [25] YANG J, SUN-WATERHOUSE D, CUI C, et al. Gamma-glu-met synthesised using a bacterial glutaminase as a potential inhibitor of dipeptidyl peptidase IV[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2018, 53(5): 1166-1175.
- [26] AMINO Y, NAKAZAWA M, KANEKO M, et al. Structure-CASR-activity relation of kokumi gamma-glutamyl peptides[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2016, 64(8): 1181-1189.
- [27] OHSU T, AMINO Y, NAGASAKI H, et al. Involvement of the calcium-sensing receptor in human taste perception[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(2): 1016-1022.
- [28] BRENNAN S C, DAVIES T S, SCHEPELMANN M, et al. Emerging roles of the extracellular calcium-sensing receptor in nutrient sensing: Control of taste modulation and intestinal hormone secretion[J]. British Journal of Nutrition, 2014, 111(S1): S16-S22.
- [29] GENG Y, MOSYAK L, KURINOV I, et al. Structural mechanism of ligand activation in human calcium-sensing receptor[J]. Elife, 2016, 5: e13662.
- [30] BROADHEAD G K, MUN H C, AVLANI V A, et al. Allosteric modulation of the calcium-sensing receptor by gamma-glutamyl peptides inhibition of pth secretion, suppression of intracellular camp levels, and a common mechanism of action with l-amino acids[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(11): 8786-8797.
- [31] 伍伦杰, 伍圆明, 孙伟峰, 等. Kokumi 肽及其受体的研究进展[J]. 中国调味品, 2019, 44(3): 189-197.
- WU L J, WU Y M, SUN W F, et al. Research progress of Kokumi peptides and Kokumi receptors [J]. China Condiment, 2019, 44(3): 189-197.
- [32] MARUYAMA Y, YASUDA R, KURODA M, et al. Kokumi substances, enhancers of basic tastes, induce responses in calcium-sensing receptor expressing taste cells[J]. Plos One, 2012, 7(4): e34489.
- [33] MIYAMURA N, KURODA M, MIZUKOSHI T, et al. Distribution of a kokumi peptide,  $\gamma$ -Glu-Val-Gly, in various fermented foods and the possibility of its contribution to the sensory quality of fermented foods[J]. Fermentation Technology, 2015, 4(2): 1000121.
- [34] AMINO Y, NAKAZAWA M, KANEKO M, et al. Structure-CaSR-activity relation of kokumi gamma-glutamyl peptides [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2016, 64(8): 1181-1189.
- [35] AMINO Y, WAKABAYASHI H, AKASHI S, et al. Structural analysis and taste evaluation of -glutamyl peptides comprising sulfur-containing amino acids[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2018, 82(3): 383-394.
- [36] DUNKEL A, KOESTER J, HOFMANN T. Molecular and sensory characterization of gamma-glutamyl peptides as key contributors to the kokumi taste of edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(16): 6712-6719.
- [37] MIYAMURA N, JO S, KURODA M, et al. Flavour improvement of reduced-fat peanut butter by addition of a kokumi peptide,  $\gamma$ -glutamyl-valyl-glycine [J]. Flavour, 2015, 4(1): 1-4.
- [38] SIMONE T, ANDREAS D, THOMAS H. A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured Gouda cheese[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(4): 1440-1448.
- [39] YANG J, LEE J. Application of sensory descriptive analysis and consumer studies to investigate traditional and authentic foods: A review[J]. Foods, 2019, 8(2): 54.
- [40] UEDA Y, YONEMITSU M, TSUBUKU T, et al. Flavor characteristics of glutathione in raw and cooked foodstuffs [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1997, 61(12): 1977-1980.
- [41] 曾贞, 江洪. 浓厚感物质的研究进展 [J]. 食品科学, 2015, 36(19): 297-301.
- ZENG Z, JIANG H. Recent advances in kokumi substances[J]. Food Science, 2015, 36(19): 297-301.
- [42] LIU J, SONG H, LIU Y, et al. Discovery of kokumi peptide from yeast extract by LC-Q-TOF-MS/MS

- and sensomics approach[J]. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(15): 3183–3194.
- [43] HILLMANN H, HOFMANN T. Quantitation of key tastants and re-engineering the taste of parmesan cheese[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(8): 1794–1805.
- [44] YAN F, CUI H, ZHANG Q, et al. Small peptides hydrolyzed from pea protein and their maillard reaction products as taste modifiers: Saltiness, umami, and kokumi enhancement[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2021, 14(6): 1132–1141.
- [45] ZHANG N L, AYED C, WANG W L, et al. Sensory-guided analysis of key taste-active compounds in pufferfish (*Takifugu obscurus*)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(50): 13809–13816.
- [46] ZHANG N L, LIU H, ZHOU X R, et al. Taste and stability characteristics of two key umami peptides from pufferfish (*Takifugu obscurus*) [J]. *Food Chemistry*, 2022, 371: 131124.
- [47] YANG J, HUANG Y R, CUI C, et al. Umami-enhancing effect of typical kokumi-active gamma-glutamyl peptides evaluated via sensory analysis and molecular modeling approaches[J]. *Food Chemistry*, 2021, 338: 128018.
- [48] 郭晶, 麦锐杰, 董浩, 等. “厚味” $\gamma$ -谷氨酰-缬氨酸增味作用差异性机制研究[J]. *食品科学*, 2022, 43(3): 33–39.
- GUO J, MAI R J, DONG H, et al. Comparison the difference of kokumi-tasting  $\gamma$ -glutamyl peptides on the basic taste-enhancing effects via molecular modeling approaches and sensory evaluation[J]. *Food Science*, 2022, 43(3): 33–39.
- [49] WANG W, ZHOU X, LIU Y. Characterization and evaluation of umami taste: A review[J]. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 2020, 127: 115876.

### Research Progress, Opportunities and Challenges in the Research of Kokumi $\gamma$ -Glutamyl Peptides

Fu Yu, Zhang Yuhao\*

(College of Food Science, Southwest University, Chongqing Key Laboratory of Speciality Food Co-Built by Sichuan and Chongqing, Chongqing, 400715)

**Abstract** High salt intake poses potential health risks for the whole people. The sodium salt substitutes commonly used in the food industry can easily lead to the reduced sensory quality in food. How to scientifically reduce sodium content in processed food under the premise of quality assurance is the bottleneck issue to be addressed urgently.  $\gamma$ -Glutamyl peptides can endow food with a kokumi taste, and play a synergistic role with sodium salt to increase saltiness and improve umami, which can provide a solution for "salt reduction without flavor reduction". Currently, there is still a lack of efficient preparation method for  $\gamma$ -glutamyl peptides, and the mechanism of taste transduction and structure-activity relationship are currently unclear, while the standardization method of kokumi taste evaluation needs to be further developed. The preparation method, taste conduction mechanism, influencing factors and evaluation method of  $\gamma$ -glutamyl peptides were systematically reviewed in this review to discuss the progress, opportunities and challenges in the research of  $\gamma$ -glutamyl peptides, which can provide new ideas and strategies for the food industry to efficiently utilize  $\gamma$ -glutamyl peptides to achieve "salt reduction without flavor reduction".

**Keywords**  $\gamma$ -glutamyl peptides; kokumi; enzymatic preparation; mechanism of taste transduction; structure-function relationship; evaluation methods