

# 基于分子模拟的鸡肉增鲜肽增鲜机制

张敬铖<sup>1,2,3</sup>, 何 玮<sup>1,2,3</sup>, 梁 莉<sup>1,2,3</sup>, 张玉玉<sup>1,2,3,\*</sup>

(1.北京工商大学 老年营养与健康教育部重点实验室, 北京 100048; 2.北京工商大学 中国商业联合会味科学重点实验室, 北京 100048; 3.北京工商大学 中原食品实验室, 北京 100048)

**摘要:** 为了研究增鲜肽的增鲜机制, 通过分子模拟技术结合感官评价分析3条鸡肉源肽LPLQD、DGGRYY和DEAGPSIVH的增鲜作用、增鲜肽-谷氨酸-味觉受体互作分子机制及其动态结合过程。增鲜肽的特性分析结果表明, 3条增鲜肽水溶性较好且无毒性。感官分析结果显示, 3条增鲜肽均对质量分数0.35%谷氨酸钠溶液具有鲜味感知加成作用。分子对接结果表明, 增鲜肽的存在显著增加了配体体系与味觉受体亚型1 (taste receptor type 1, T1R1) 间的相互作用, 包括静电相互作用、疏水相互作用和氢键相互作用, 从而增强了配体体系与T1R1之间的结合稳定性。在分子动力学模拟过程中, 鲜味受体T1R1胞外捕蝇草结构域相对稳定, 而富半胱氨酸结构域存在较大的空间波动。氢键数量统计结果显示, 增鲜肽加入配体体系能够增加配体与受体间氢键相互作用, 从而增强配体与受体的结合强度。通过前沿分子轨道计算确定了Ser、Tyr、Gln、Arg和His等氨基酸残基为增鲜肽与T1R1结合的主要活性位点。以上研究结果可为理解增鲜肽的增鲜机制以及新型增鲜剂的开发提供理论支持。

**关键词:** 增鲜肽; 分子对接; 分子动力学; 前沿分子轨道

## Elucidating the Mechanism of Action of Umami-Enhancing Peptides Derived from Chicken Based on Molecular Simulation

ZHANG Jingcheng<sup>1,2,3</sup>, HE Wei<sup>1,2,3</sup>, LIANG Li<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Yuyu<sup>1,2,3,\*</sup>

(1. Key Laboratory of Geriatric Nutrition and Health (Beijing Technology and Business University), Ministry of Education, Beijing 100048, China; 2. Key Laboratory of Flavor Science of China General Chamber of Commerce, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 3. Food Laboratory of Zhongyuan, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

**Abstract:** To investigate the mechanism of action of umami-enhancing peptides, molecular simulation and sensory evaluation were employed to analyze the umami-enhancing effects of three peptides derived from chicken: LPLQD, DGGRYY, and DEAGPSIVH, the molecular mechanism of umami-enhancing peptide-glutamic acid-taste receptor interaction and the dynamic binding process. The results indicated that all three umami-enhancing peptides exhibited good water solubility and non-toxicity and had an additive effect on the umami taste of 0.35% glutamic acid solution. Molecular docking results revealed that the presence of umami-enhancing peptides greatly enhanced the interactions between the ligand system and the taste receptor type 1 (T1R1) including electrostatic interaction, hydrophobic interaction, and hydrogen bonding interaction, thereby leading to enhanced binding stability. Furthermore, molecular dynamic simulations disclosed that the venus flytrap (VFT) domain in the T1R1 receptors was relatively stable, while the cysteine-rich domain exhibited significant spatial fluctuations. Statistics of hydrogen bonds indicated that the addition of umami-enhancing peptides to the ligand system enhanced the hydrogen bonding interaction and consequently binding intensity between ligands and receptors. By analyzing the frontier molecular orbitals, serine, tyrosine, glutamine, arginine, and histidine residues were identified as active sites in the peptides that contributed to the binding with T1R1. The above results provide theoretical support for understanding the umami-enhancing mechanism of peptides and for the development of new umami enhancers.

**Keywords:** umami-enhancing peptide; molecular docking; molecular dynamics; frontier molecular orbital

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20231222-193

中图分类号: TS202.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 24-0001-08

收稿日期: 2023-12-22

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年科学基金项目 (32122069); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32102118); 北京高校卓越青年科学家计划项目 (BJJWZYJH01201910011025)

第一作者简介: 张敬铖 (1995—) (ORCID: 0000-0001-5499-7166), 男, 博士研究生, 研究方向为食品风味化学。

E-mail: 984785361@qq.com

\*通信作者简介: 张玉玉 (1982—) (ORCID: 0000-0003-3095-3083), 女, 教授, 博士, 研究方向为天然香料与食品风味化学。

E-mail: zhangyuyu@btbu.edu.cn

引文格式:

张敬铖, 何玮, 梁莉, 等. 基于分子模拟的鸡肉增鲜肽增鲜机制[J]. 食品科学, 2024, 45(24): 1-8. DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20231222-193. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Jingcheng, HE Wei, LIANG Li, et al. Elucidating the mechanism of action of umami-enhancing peptides derived from chicken based on molecular simulation[J]. Food Science, 2024, 45(24): 1-8. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20231222-193. <http://www.spkx.net.cn>

鲜味作为5种基本滋味之一,在食品风味中发挥重要的作用<sup>[1]</sup>。鲜味化合物主要包括游离氨基酸、核苷酸、有机酸、鲜味肽和肽的衍生物<sup>[2-3]</sup>,能够赋予食品令人愉悦的滋味并提高食物的整体感官质量<sup>[4]</sup>。随着消费者对食品风味和营养健康需求的不断提高,使新型鲜味化合物及其呈味分子机制在食品科学领域具有良好的研究前景<sup>[5-6]</sup>。鲜味肽被认为是一种理想的天然鲜味物质,存在于多种动、植物和微生物原料中<sup>[7]</sup>,具有较好的安全性。鲜味肽不仅能够增强食品的鲜味和食品整体风味,还富含营养且易于被人体吸收<sup>[8]</sup>。除鲜味肽外,还存在一些具有增鲜特性的小分子肽,其被称为增鲜肽。增鲜肽本身不一定具有鲜味,但能够与其他鲜味物质共同作用增强其鲜味感知强度<sup>[9]</sup>。目前的研究主要侧重于鲜味肽的呈味效应,对于小分子肽的增鲜作用机制研究较少。

分子模拟技术可在计算机中对分子结构、分子特性和相互作用机制等进行模拟计算,相关技术已在鲜味肽的呈味机制研究中得到应用<sup>[10]</sup>。Gu Yuxiang等<sup>[11]</sup>采用虚拟筛选、感官评价以及分子对接等方法高效地筛选出猪I型胶原蛋白中的6种新型鲜味肽。Dang Yali等<sup>[12]</sup>通过分子对接和分子动力学模拟探究了鲜味肽、谷氨酸钠(monosodium glutamate, MSG)和鲜味受体之间的相互作用关系及关键结合位点。分子对接和分子动力学模拟技术也逐渐被应用于增鲜和增甜分子机制研究。在 $\gamma$ -谷氨酰胺的增味分子作用机制研究中,分子对接及动力学模拟结果显示 $\gamma$ -谷氨酰胺对味觉受体亚型1(taste receptor type 1, T1R1)和味觉受体亚型2(taste receptor type 2, T1R2)均表现出较好的亲和力,其中疏水相互作用和氢键为主要相互作用力<sup>[13]</sup>。因此,分子模拟技术广泛适用于配体与受体相互作用分析,可以对增鲜肽与鲜味受体的互作分子机制及动态变化过程进行探索。

本实验室前期从鸡胸肉汤中筛选出20条潜在的鲜味肽,并发现其中3条具有较好的增鲜作用。本实验拟对鸡胸肉汤来源的3条增鲜肽(LPLQD、DGGRYY和DEAGPSIVH)的增鲜分子机制进行研究。通过感官评价实验测定增鲜肽与MSG在二元溶液体系中的相互作用规律;对增鲜肽分子的溶解性和毒性等基础特性方面进行计算,深入了解增鲜肽的分子特性;通过分子对接技术分析小分子肽增强鲜味感知的潜在机制,揭示其与鲜味受体的相互作用;并运用分子动力学模拟计算增鲜肽与

T1R1的动态相互作用;另外,通过对这3种增鲜肽进行前沿分子轨道(frontier molecular orbital, FMO)计算,确定其结构中的活性位点,旨在深入探究小分子肽增强鲜味感知的机制,为增鲜肽在食品中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鸡肉源肽LPLQD、DGGRYY和DEAGPSIVH由上海鸿肽生物技术有限公司合成,纯度>98%。屈臣氏饮用水(蒸馏水)、雪井食盐(未加碘,NaCl含量≥99.1%)均购自永辉超市。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 增鲜肽-MSG二元溶液体系中的相互作用

为探究增鲜肽在质量分数0.35% MSG溶液中的增鲜效果,参照Zhu Jiancai<sup>[14]</sup>和牛云蔚<sup>[15]</sup>等方法,利用S型曲线对肽-MSG二元溶液体系中二者的相互作用进行分析。将增鲜肽与MSG按1:3.5的质量比混合,用蒸馏水配制成4.5 g/L的二元混合溶液。随后用纯净水对混合溶液进行梯度稀释(1:1, V/V),并以蒸馏水为参照,按照溶液浓度由高到低的顺序参考GB/T 12311—2012《感官分析方法 三点检验》进行三点检测感官评价。对感官评价小组成员无法正确区分的样品溶液和蒸馏水的最终浓度进行记录。利用偶然因素对检测概率( $P$ )进行修正,如式(1)所示:

$$P = \frac{3p-1}{2} \quad (1)$$

式中: $P$ 为正确检测概率的修正值; $p$ 为实际测得的正确检测概率值。

假设混合物的对数浓度与正确检测概率值关系呈S型曲线,利用Origin2021b软件进行拟合,二者的拟合关系如式(2)所示:

$$y = \frac{1}{1 + e^{-\lambda x}} \quad (2)$$

式中: $x$ 为混合物的对数浓度; $y$ 为正确检测概率值; $e$ 为自然常数; $\lambda$ 为曲线拟合参数。

混合物的理论正确检测概率按式(3)计算:

$$p(AB) = p(A) + p(B) - p(A)p(B) \quad (3)$$

式中： $p(AB)$ 为混合物的理论正确检测概率； $p(A)$ 和 $p(B)$ 分别为正确检测到MSG和合成肽的概率。将混合实验得出的最终正确检测概率与理论正确检测概率 $p(AB)$ 进行比较<sup>[16]</sup>。

### 1.2.2 肽性质计算

在线计算工具的综合应用有助于更全面地了解增鲜肽的特性。毒性计算使用ToxinPred网站 (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred>)。对于肽的基础特性则分别使用PEPTIDE 2.0 (<https://www.peptide2.com>)、NovoPro (<https://www.novopro.cn>)和PepCalc (<https://pepcalc.com>)网站进行计算。

### 1.2.3 鲜味受体及增鲜肽的三维结构建立

为研究增鲜肽与鲜味受体的相互作用，参考Liang Li等<sup>[17]</sup>的同源建模方法构建味觉受体第一家亚型1 (T1R1)的三维结构并优化。选择代谢性谷氨酸受体5 (PDB ID: 6N51)作为模板，具有33.1%的相似度以及90.8%的模板覆盖率，并通过Modeller 10.1软件进行模型构建，经拉氏图评估表明，T1R1受体模型中99%的氨基酸残基位于合理区域，1%的氨基酸残基在不合理区域。使用PyMOL软件建立增鲜肽的三维结构并进行能量最小化，解决空间结构中不合理的原子间接触<sup>[18]</sup>，确保构建的肽结构在后续分子对接过程中更为合理和稳定。

### 1.2.4 分子对接

采用Auto Dock Vina软件进行分子对接。在对接过程中，采用半柔性对接，增鲜肽与谷氨酸作为整体配体体系，视为柔性分子，而受体的结构为刚性。最终，根据对接能量选择最低能量的结合构象作为最合适的结合模型。为了更全面地分析受体与配体的相互作用，使用Discovery Studio 2016软件生成对接构象的二维 (2 dimension, 2D)图，并进行相互作用力及关键结合位点分析。

### 1.2.5 分子动力学分析

分子对接能够揭示配体体系与T1R1之间的瞬时静态相互作用。为了进一步研究配体体系与受体的动态结合过程，采用分子动力学模拟进行计算分析。参考Chen Daoyou等的方法<sup>[19]</sup>，使用GROMACS 2020软件在CHARMM27力场下进行模拟。首先创建分子拓扑文件，以受体蛋白为中心构建形状为立方体的盒子，并向盒子中填充TIP3P水模型。通过向盒子中添加钠离子 ( $\text{Na}^+$ )及氯离子 ( $\text{Cl}^-$ )，以保证整体系统具有中性电荷状态，维持整体系统的稳定性。

整个系统的能量最小化采用最陡下降方法，对系统进行了两步预平衡，分别在等温等容系综 (NVT系综，系统在模拟过程中的粒子数、体积和温度保持恒定)和等温等压系综 (NPT系综，系统在模拟过程中的粒子数、压力和温度保持恒定)下进行预平衡。预平衡完成

后，在适当的温度和压力下进行10 ns的模拟，分析配体体系与T1R1之间的相互作用的动态变化。

### 1.2.6 FMO分析

通过计算增鲜肽的FMO，能够从增鲜肽的分子结构角度揭示增鲜肽的活性位点。参考Wang Wenli等<sup>[20]</sup>的方法，使用GaussView 6.0可视化工具对增鲜肽的三维结构进行可视化呈现，然后用Gaussian 09程序在B3LYP/6-311G条件下对多肽进行密度泛函理论优化，以获得最稳定的肽分子结构。使用Multiwfn工具描述最高占据分子轨道 (highest occupied molecular orbital, HOMO)和最低未占据分子轨道 (lowest unoccupied molecular orbital, LUMO)<sup>[21]</sup>，以观察到配体周围的最佳电位电子分布。FMO分析能够提供有价值的化学信息，并确定肽分子内潜在的活性位点<sup>[20,22]</sup>。

### 1.3 数据处理

所有数据采用SPSS 17.0统计软件包进行单因素方差分析，并进行Duncan多水平检验。显著性检验标准 $P < 0.05$ 。图表由Origin 2021b、PyMOL和Discovery Studio 2016软件绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 肽的性质分析结果

本研究对3条增鲜肽的溶解性和毒理学进行了预测，如表1所示，LPLQD、DGGRYY和DEAGPSIVH的氨基酸残基数量分别为5、6和9，其理论摩尔质量分别为584.66、729.74 g/mol和923.97 g/mol，理论等电点分别为3.12、6.57和3.92。根据计算和预测结果，3条增鲜肽序列都具有良好的水溶性，并且毒理性预测结果均为无毒。以上结果为感官评价实验提供了安全的保障。

表1 增鲜肽的理化性质预测分析

Table 1 Predicted physicochemical properties of umami-enhancing peptides

| 肽序列       | 残基数 | 摩尔质量/<br>(g/mol) | 等电点  | 溶解性   | 毒理性 | 酸碱性 |
|-----------|-----|------------------|------|-------|-----|-----|
| LPLQD     | 5   | 584.66           | 3.12 | 良好水溶性 | 无毒  | 酸性  |
| DGGRYY    | 6   | 729.74           | 6.57 | 良好水溶性 | 无毒  | 中性  |
| DEAGPSIVH | 9   | 923.97           | 3.92 | 良好水溶性 | 无毒  | 酸性  |

3条增鲜肽的酸碱性质存在差异，其中LPLQD和DEAGPSIVH被预测为呈酸性，而DGGRYY被预测为呈中性。这一差异可能与它们的氨基酸残基组成有关。因此，对3条增鲜肽序列中的氨基酸残基属性及分布进行了分析，结果如图1所示。LPLQD序列中仅含有1个酸性残基，即天冬氨酸，占全部序列20.0%，其他残基均为疏水非带电残基或中性残基。而在DEAGPSIVH肽中，序列包含了天冬氨酸和谷氨酸两个酸性残基，占全



部序列22.2%，而碱性残基仅有组氨酸1个，占全部序列11.1%。LPLQD和DEAGPSIVH的酸性氨基酸数量多于碱性氨基酸，因此被预测为呈酸性。而在DGGRYY中，序列包含1个酸性残基，即天冬氨酸，占全部序列16.7%，以及1个碱性残基，即精氨酸，占全部序列16.7%，这两种氨基酸的数量相等，因此DGGRYY被预测为中性肽序列。3条肽序列中酸性和碱性残基的分布差异可能与其理化特性和呈味特征有关。本研究中3条增鲜肽的序列中都包含天冬氨酸残基、在鲜味肽序列中出现的天冬氨酸及谷氨酸等酸性残基，此肽可能拥有更好的鲜味感官表现<sup>[5,10]</sup>，同时研究表明天冬氨酸残基在肽的鲜味特性中起重要的作用<sup>[23]</sup>。

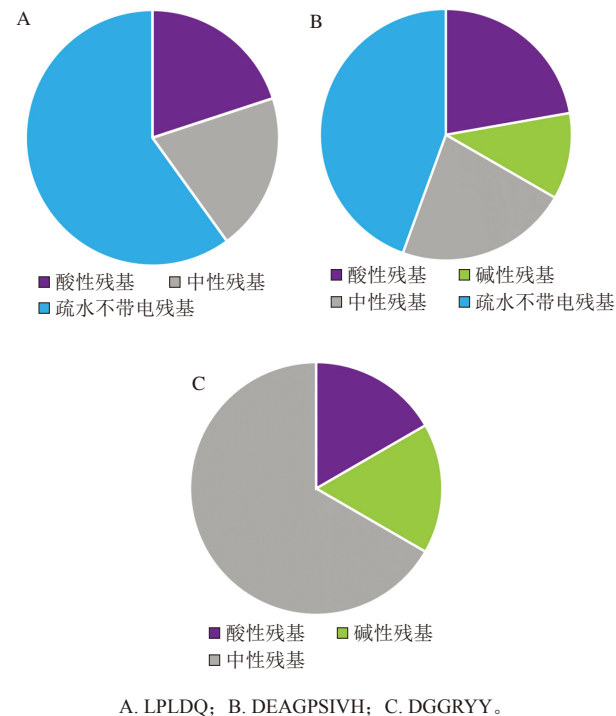
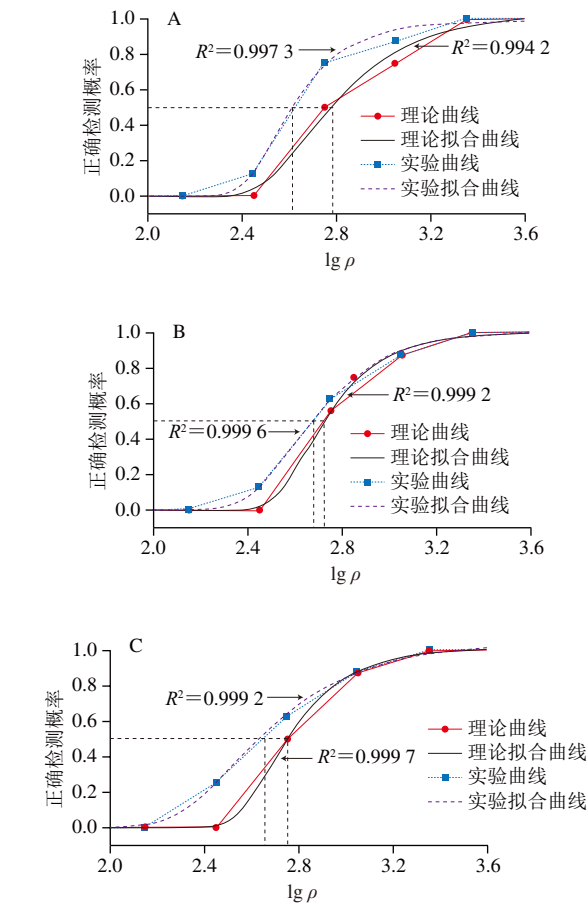


Fig. 1 Distribution of different types of amino acids in peptide sequences

2.2 增鲜肽-MSG二元溶液体系中的相互作用分析结果

前期研究发现，LPLQD、DGGRYY和DEAGPSIVH在质量分数0.35%的MSG溶液中具有显著增鲜效果<sup>[24]</sup>。为探究增鲜肽和MSG在溶液体系中的相互作用，利用S型曲线进行拟合。通过评价小组对混合物正确检测的实验概率和理论概率之比( $r$ )进行肽和MSG相互作用的判别，如掩盖作用( $r>1$ )、无相互作用( $r=1$ )、加成作用( $0.5<r<1$ )、协同作用( $r\leq 0.5$ )<sup>[25]</sup>。增鲜肽与质量分数0.35% MSG混合物的拟合结果如图2所示。在增鲜肽-MSG的二元混合体系中，LPLQD-MSG、DGGRYY-MSG和DEAGPSIVH-MSG的实验阈值分别为411.24、477.83 mg/L和453.87 mg/L，均低于理论阈值(表2)。

$r$ 值分别为0.67、0.90和0.80，都处于0.5~1范围内。表明这3条增鲜肽对质量分数0.35% MSG溶液的鲜味感知具有加成作用。



A. LPLQD; B. DGGRYY; C. DEAGPSIVH.  $\rho$ .质量浓度/(mg/L)。

图2 肽-MSG混合物相互作用的S型曲线  
Fig. 2 S-curve analysis of the interaction of peptide-MSG mixture

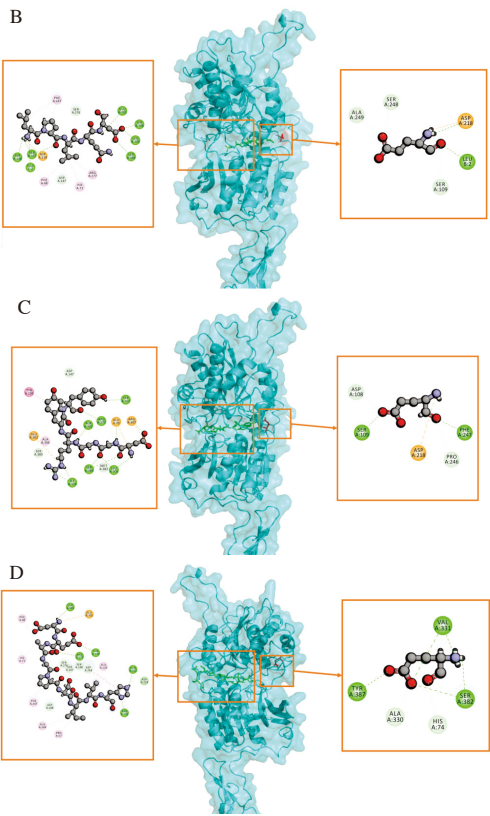
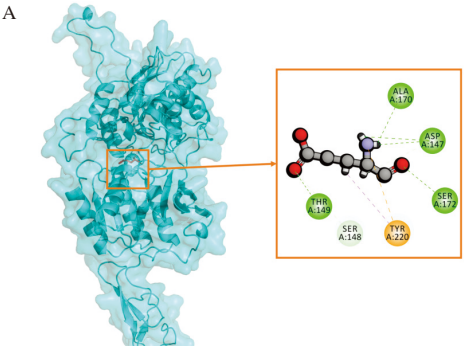
表2 肽-MSG混合物相互作用的S型曲线数据

| 混合物组分         | 阈值/(mg/L) |        | 实验阈值与理论阈值之比( $r$ ) | 相互作用 |
|---------------|-----------|--------|--------------------|------|
|               | 实验        | 理论     |                    |      |
| LPLQD-MSG     | 411.24    | 611.45 | 0.67               | 加成作用 |
| DGGRYY-MSG    | 477.83    | 531.03 | 0.90               | 加成作用 |
| DEAGPSIVH-MSG | 453.87    | 569.15 | 0.80               | 加成作用 |

2.3 分子对接分析结果

T1R1属于G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)家族，以异二聚体形式存在。其基本结构由胞外捕蝇草(venus flytrap, VFT)结构域、富半胱氨酸结构域和七次跨膜(7 transmembrane, 7TM)结构域组成<sup>[22,26]</sup>。研究表明，T1R1的VFT结构域可作为鲜味分子的主要结合位点，用于特异性识别配体，是受体感知鲜味信号的关键区域。分析T1R1对增鲜肽的结合位点有助于探索增鲜感知的分子机制<sup>[27-28]</sup>。

根据前述的感官实验结果, 3条增鲜肽均在MSG溶液中具有增鲜效果。考虑到MSG在溶液中的电离, 因此, 在分子模拟过程中使用谷氨酸代替MSG, 与增鲜肽共同作为配体和T1R1进行分子对接, 分析增鲜肽协同增鲜过程中与T1R1相互识别的结合位点。对MSG与T1R1的复合物(ComE)、MSG存在时增鲜肽LPLQD与T1R1的复合物(ComLPL)、MSG存在时增鲜肽DGGRYY与T1R1的复合物(ComDGG)以及MSG存在时增鲜肽DEAGPSIVH与T1R1的复合物(ComDEA)进行了分子对接, 结合构象如图3所示, 结合位点如表3所示。分子对接的结果显示, 谷氨酸能够进入T1R1的VFT结构域, 并与结合口袋中的Ser172、Ala170、Asp147、Ser148、Thr149以及Tyr220残基产生相互作用。如图3A所示, 氢键和静电相互作用为谷氨酸与T1R1的主要相互作用力, 但谷氨酸与T1R1间的相互作用较少, 可能与谷氨酸分子较小, 很难与受体结构域产生紧密的接触有关, 这一结果与An Feiyu等<sup>[29]</sup>在鲜味肽与T1R1/T1R3的分子对接研究中的结果一致, 具有较长氨基酸序列的鲜味肽相较于短氨基酸序列的鲜味肽容易拥有良好的分子对接能量并与受体产生更紧密的结合。此外, 从图3B~D还可以观察到, 随着增鲜肽的引入, T1R1不仅与谷氨酸发生相互作用还能与增鲜肽结合, 导致与配体体系整体的相互作用增强。如表3所示, 当增鲜肽与谷氨酸作为配体体系同时存在时, T1R1与配体的结合位点增多, 其中Ser107、Asp147、Ser148、Asp218、Phe247和Glu301残基成为主要的配体结合位点。这些位点在已有研究中被证实存在鲜味肽与T1R1结合中发挥重要作用<sup>[17-18,23]</sup>。增鲜肽的存在引入了大量新的氢键相互作用、疏水相互作用和静电相互作用, 激活了T1R1结合口袋中的结合位点, 增加了相互作用数量。这可能是增鲜肽增强鲜味感知的一个重要原因。此外, 在ComLPL的分子对接结果中还发现谷氨酸与LPLQD分子中的Leu残基发生氢键相互作用。谷氨酸分子与肽分子间的相互作用使二者在受体的VFT结构域中更加稳定, 这也是肽分子增强鲜味感知的潜在原因之一。



A. ComE; B. ComLPL; C. ComDGG; D. ComDEA; 图5同。绿色为氢键相互作用; 粉色为疏水相互作用; 黄色为静电相互作用。

图3 4种配体体系的分子对接结果

Fig. 3 Molecular docking results of four ligand systems

表3 4种配体体系与T1R1的结合位点

Table 3 Binding sites of four ligand systems with T1R1

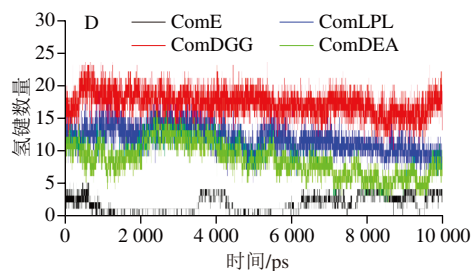
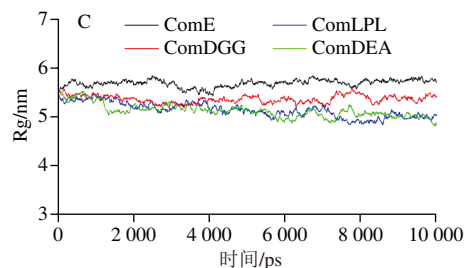
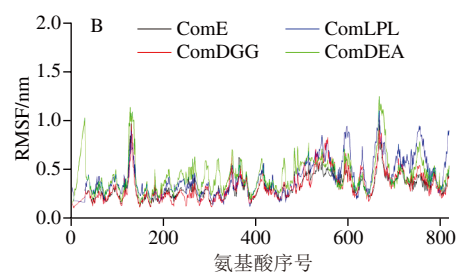
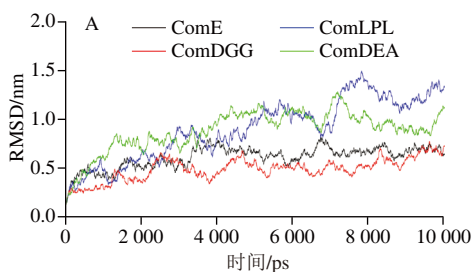
| 结合位点   | ComE | ComLPL | ComDGG | ComDEA |
|--------|------|--------|--------|--------|
| His74  |      |        |        | +      |
| Ala330 |      |        |        | +      |
| Val331 |      |        |        | ++     |
| Ser382 |      |        |        | ++     |
| Tyr387 |      |        |        | +      |
| Ser172 | +    |        |        |        |
| Ala170 | +    |        |        |        |
| Ser109 |      | +      | +      |        |
| Ser248 |      | +      |        |        |
| Phe68  |      | *      |        | *      |
| Asp147 | ++   | *      | *      |        |
| His71  |      | *      |        | ***    |
| Arg277 |      | *      | *      |        |
| Ser384 |      | *      | **     |        |
| Leu305 |      | *      | **     |        |
| Glu301 |      | *      | *      | *      |
| Ser276 |      | *      |        | **     |
| Phe247 |      | **     | +      | *      |
| Ser148 | +    | **     |        | *      |
| Ser107 |      | ***    | *      | ***    |
| Asp218 |      | **++   | +      | *      |
| Ser385 |      |        | *      | *      |
| Tyr220 | ++   |        | *      |        |
| Asp108 |      |        | +      | *      |
| Ala249 |      | +      |        | *      |
| Pro246 |      |        | +      |        |
| Thr149 | +    |        |        | *      |

注: \*配体体系中肽和结合位点之间相互作用; +配体体系中谷氨酸和结合位点之间相互作用。数量表示配体与受体之间形成相互作用力的数量。

## 2.4 分子动力学分析结果

为了进一步研究增鲜肽与受体的动态结合过程,进行了分子动力学模拟计算,结果如图4所示。均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)可作为评价配体和鲜味受体结合稳定性的标准<sup>[29]</sup>,如图4A所示,经过10 ns的分子动力学模拟后,整个系统的RMSD仍然显示出一些波动。通过对比0、5 ns和10 ns的构象,发现VFT结构域相对稳定,而富半胱氨酸结构域产生了一些较大的波动。这种波动可能与C类GPCR结构的天然不稳定性有关<sup>[30-31]</sup>,导致RMSD经过一段时间模拟后仍存在波动。均方根波动(root mean square fluctuation, RMSF)可以衡量出每个原子相对于其平均位置的波动,可以反映蛋白质每个区域的柔韧性大小<sup>[32]</sup>。如图4B所示,4种复合物的RMSF相对较低,受体蛋白上大多数序列的RMSF低于0.3 nm。根据RMSF可以观察到T1R1中前480个氨基酸残基的波动相对较小,而在第481位之后的残基波动较大。前480个氨基酸主要位于T1R1的VFT结构域,VFT结构域与配体的结合可能在一定程度上增强了该区域氨基酸残基的稳定性。而481位以后的氨基酸序列主要位于富半胱氨酸结构域和7TM结构域,富半胱氨酸结构域随着模拟时间的推移出现了部分的波动,导致第481位残基之后的RMSF较大。

回转半径(radius of gyration, Rg)是用来评估动力学模拟过程中整体结构紧凑性的参数<sup>[33]</sup>。如图4C所示,ComE、ComLPL、ComDGG与ComDEA的平均Rg分别为5.67、5.14、5.36、5.12 nm。结果表明,在分子动力学模拟的过程中,配体与T1R1之间形成了高度致密和稳定的相互作用。这表明配体体系与T1R1的相互作用在模拟过程中能够维持结构的紧凑性和稳定性。为了进一步探究4种不同配体体系与受体蛋白质复合物的相互作用,使用Gromacs程序中的氢键数量统计程序计算了配体体系与T1R1间的潜在氢键数量<sup>[19]</sup>。图4D所示为复合物中存在的氢键总数,ComE、ComLPL、ComDGG和ComDEA中配体体系与T1R1的平均氢键数分别为1.79、11.67、17.12和8.62。相较于ComE,加入增鲜肽的配体体系与T1R1之间产生更多的氢键相互作用。这些额外的氢键相互作用增加了配体与T1R1的VFT结构域的结合稳定性<sup>[25,34]</sup>,氢键在增鲜肽与T1R1的相互作用中发挥着关键作用,促进了复合物的稳定形成,与上述分子对接结果基本一致。

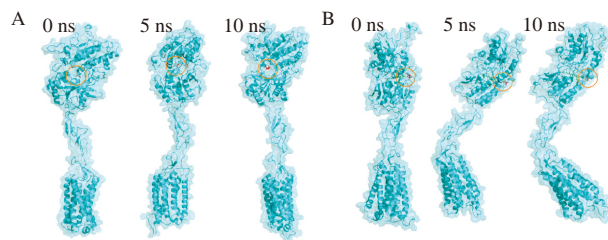


A. RMSD; B. RMSF; C. Rg; D. 氢键数量。

图4 分子动力学模拟分析图

Fig. 4 Results of molecular dynamic simulation analysis

最后,对比了0、5 ns与10 ns时4种不同配体体系的构象变化。如图5所示,在不同模拟时间4种不同的配体体系都表现出T1R1的VFT结构域相对稳定,但富半胱氨酸结构域存在较大的空间波动,这与之前的RMSD和RMSF数据分析结果相吻合。但相比添加了增鲜肽的3种复合物,仅以谷氨酸为配体的ComE随着模拟时间推移,配体具有向外逃逸的趋势。而增鲜肽存在的体系中,尽管也出现配体体系中谷氨酸向外逃逸的现象,但由于增鲜肽的存在,仍然能够保持配体体系与VFT结构域的相互作用,这也可能是增鲜肽增强鲜味感知的机制之一。





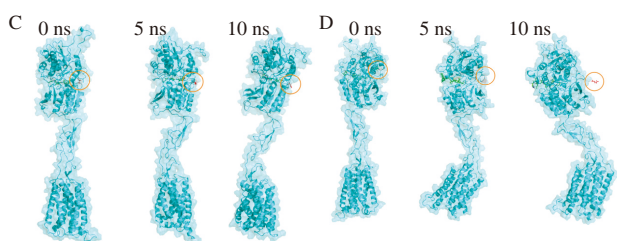
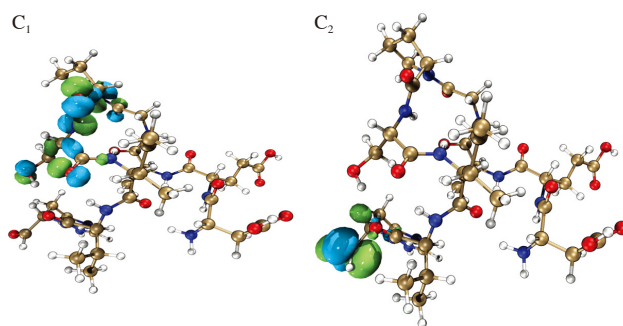
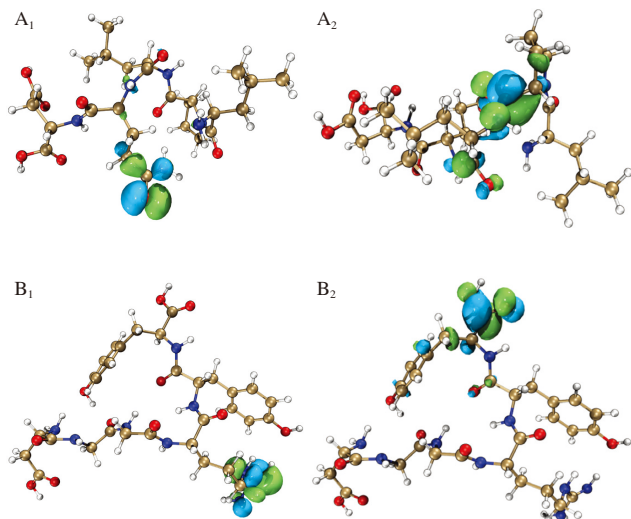


图5 分子动力学模拟轨迹分析图

Fig. 5 Trajectory analysis diagram of molecular dynamic simulation

## 2.5 FMO计算分析

FMO在化合物分子的活性位点分析中扮演着至关重要的角色,对于分子性质的研究具有关键意义。通过对FMO进行计算,可得到HOMO和LUMO,分别反映了分子结构中给出和吸收电子的能力,可依此寻找增鲜肽分子结构中的活跃位点。从配体分子结构角度,分析3条增鲜肽的潜在增鲜机制。对增鲜肽的三维结构进行优化,并计算其活性位点(LPLQD、DGGRYY和DEAGPSIVH),结果如图6所示。增鲜肽的活性位点与其分子结构密切相关,但与T1R1的相互作用位点略有不同<sup>[20]</sup>。对HOMO/LUMO进行分析发现,LPLQD的活性位点主要分布在Pro和Gln残基上;DGGRYY的活性位点位于Arg和Tyr残基;DEAGPSIVH的活性位点则主要存在于Pro、Ser和His残基上,对比分子对接结果发现,这些残基与T1R1产生了多个氢键及疏水相互作用力。此前关于鲜味肽的研究表明,Ser、Tyr、Gln、Arg和His在肽序列中的出现,会对增强鲜味强度具有贡献<sup>[12,22]</sup>,3条增鲜肽中的活性位点包含上述残基,推测这些活性位点的出现可以使增鲜肽更好地与T1R1结合,从而增强鲜味感知<sup>[35-36]</sup>。



A. LPLQD; B. DGGRYY; C. DEAGPSIVH。下标1.HOMO; 下标2.LUMO。

图6 HOMO/LUMO分析

Fig. 6 Analysis of HOMO/LUMO

## 3 结论

本实验通过多种分子模拟手段研究了增鲜肽潜在的增鲜机制。结果显示,增鲜肽-谷氨酸配体体系与T1R1间的相互作用显著增加且结合稳定性增强,其中T1R1的Ser107、Asp147、Ser148、Asp218、Phe247和Glu301残基为主要的配体结合位点。分子动力学模拟中,发现配体-受体复合物的VFT结构域稳定而富半胱氨酸结构域存在空间波动,并且配体体系中增鲜肽的存在能够增加与鲜味受体T1R1相互作用中的氢键数量。实验结果可为肽增鲜分子机制的研究提供新思路,有助于解析增鲜肽、MSG和鲜味受体之间的相互作用,随着分子模拟实验的完善,后续应尝试进行受体-配体分子互作实验进行验证,进一步为增鲜肽在食品中的应用提供理论支撑。

## 参考文献:

- [1] HARTLEY I E, LIEM D G, KEAST R. Umami as an 'alimentary' taste. A new perspective on taste classification[J]. *Nutrients*, 2019, 11(1): 182. DOI:10.3390/nu11010182.
- [2] ZHU Y W, ZHOU X R, CHEN Y P, et al. Exploring the relationships between perceived umami intensity, umami components and electronic tongue responses in food matrices[J]. *Food Chemistry*, 2022, 368: 130849. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.130849.
- [3] MOURITSEN O G. Umami flavour as a means of regulating food intake and improving nutrition and health[J]. *Nutrition and Health*, 2012, 21(1): 56-75. DOI:10.1177/0260106012445537.
- [4] YAMAGUCHI S. Basic properties of umami and its effects on food flavor[J]. *Food Reviews International*, 1998, 14(2/3): 139-176. DOI:10.1080/87559129809541156.
- [5] ZHANG J C, YAN W J, ZHANG Q C, et al. Umami-BERT: an interpretable BERT-based model for umami peptides prediction[J]. *Food Research International*, 2023, 172: 113142. DOI:10.1016/j.foodres.2023.113142.
- [6] ZHANG L L, PU D D, ZHANG J C, et al. Identification of novel umami peptides in chicken breast soup through a sensory-guided approach and molecular docking to the T1R1/T1R3 taste receptor[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(20): 7803-7811. DOI:10.1021/acs.jafc.3c01251.

- [7] ZHANG Y, VENKITASAMY C, PAN Z L, et al. Novel umami ingredients: umami peptides and their taste[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(1): 16-23. DOI:10.1111/1750-3841.13576.
- [8] 宁梦华, 王文利, 陈高乐, 等. 养殖暗纹东方鲀中7种醇提鲜味肽的鉴定及其呈鲜特性[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 16-23.
- [9] 刘源, 朱忆雯, 李明阳, 等. 食品鲜味研究热点: 争议与功能[J]. 食品科学, 2022, 43(19): 8-16. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220517-234.
- [10] ZHAO S, MA S, ZHANG Y Y, et al. Combining molecular docking and molecular dynamics simulation to discover four novel umami peptides from tuna skeletal myosin with sensory evaluation validation[J]. Food Chemistry, 2024, 433: 137331. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.137331.
- [11] GU Y X, ZHANG J C, NIU Y J, et al. Virtual screening and characteristics of novel umami peptides from porcine type I collagen[J]. Food Chemistry, 2024, 434: 137386. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.137386.
- [12] DANG Y L, HAO L, CAO J X, et al. Molecular docking and simulation of the synergistic effect between umami peptides, monosodium glutamate and taste receptor T1R1/T1R3[J]. Food Chemistry, 2019, 271: 697-706. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.08.001.
- [13] YANG J, GUO J, MAI R J, et al. Comparing the difference in enhancement of kokumi-tasting  $\gamma$ -glutamyl peptides on basic taste via molecular modeling approaches and sensory evaluation[J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(6): 1573-1579. DOI:10.1016/j.fshw.2022.06.015.
- [14] ZHU J C, CAO X Y, NIU Y W, et al. Investigation of lactone chiral enantiomers and their contribution to the aroma of Longjing tea by odor activity value and S-curve[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(17): 6691-6698. DOI:10.1021/acs.jafc.3c00860.
- [15] 牛云蔚, 朱全, 肖作兵. 茅台酒香气组成及关键香气成分间的协同作用[J]. 中国食品学报, 2021, 21(10): 215-226. DOI:10.16429/j.1009-7848.2021.10.024.
- [16] LYTRA G, TEMPERE S, LE FLOCH A, et al. Study of sensory interactions among red wine fruity esters in a model solution[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(36): 8504-8513. DOI:10.1021/jf4018405.
- [17] LIANG L, DUAN W, ZHANG J C, et al. Characterization and molecular docking study of taste peptides from chicken soup by sensory analysis combined with nano-LC-Q-TOF-MS/MS[J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132455. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.132455.
- [18] LIANG L, ZHOU C C, ZHANG J C, et al. Characteristics of umami peptides identified from porcine bone soup and molecular docking to the taste receptor T1R1/T1R3[J]. Food Chemistry, 2022, 387: 132870. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.132870.
- [19] CHEN D Y, CHEN W C, WU D, et al. Saltiness enhancing peptides isolated from enzymolysis extract of *Lentinula edodes* and their taste enhancing action mechanisms[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 188: 115430. DOI:10.1016/j.lwt.2023.115430.
- [20] WANG W L, YANG L, NING M H, et al. A rational tool for the umami evaluation of peptides based on multi-techniques[J]. Food Chemistry, 2022, 371: 131105. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131105.
- [21] LU T, CHEN F W. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer[J]. Journal of Computational Chemistry, 2012, 33(5): 580-592. DOI:10.1002/jcc.22885.
- [22] WANG W L, CUI Z Y, NING M H, et al. *In-silico* investigation of umami peptides with receptor T1R1/T1R3 for the discovering potential targets: a combined modeling approach[J]. Biomaterials, 2022, 281: 121338. DOI:10.1016/j.biomaterials.2021.121338.
- [23] ZHANG J N, SUN-WATERHOUSE D, SU G W, et al. New insight into umami receptor, umami/umami-enhancing peptides and their derivatives: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 88: 429-438. DOI:10.1016/j.tifs.2019.04.008.
- [24] ZHANG J C, ZHANG J C, LIANG L, et al. Identification and virtual screening of novel umami peptides from chicken soup by molecular docking[J]. Food Chemistry, 2023, 404: 134414. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.134414.
- [25] 肖作兵, 朱建才, 牛云蔚, 等. 香气成分的协同作用研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2018, 36(4): 1-7. DOI:10.3969/j.issn.2095-6002.2018.04.001.
- [26] LI X D. T1R receptors mediate mammalian sweet and umami taste[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2009, 90(3): 733S-737S. DOI:10.3945/ajcn.2009.27462G.
- [27] DAMAK S, RONG M Q, YASUMATSU K, et al. Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1R3[J]. Science, 2003, 301(5634): 850-853. DOI:10.1126/science.1087155.
- [28] YU X Q, ZHANG L J, MIAO X D, et al. The structure features of umami hexapeptides for the T1R1/T1R3 receptor[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 599-605. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.11.133.
- [29] AN F Y, CAO K X, JI S Q, et al. Identification, taste characterization, and molecular docking study of a novel microbiota-derived umami peptide[J]. Food Chemistry, 2023, 404: 134583. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.134583.
- [30] FENG Z W, MA S F, HU G X, et al. Allosteric binding site and activation mechanism of class C G-protein coupled receptors: Metabotropic glutamate receptor family[J]. The AAPS Journal, 2015, 17(3): 737-753. DOI:10.1208/s12248-015-9742-8.
- [31] DODEVSKI I, PLÜCKTHUN A. Evolution of three human GPCRs for higher expression and stability[J]. Journal of Molecular Biology, 2011, 408(4): 599-615. DOI:10.1016/j.jmb.2011.02.051.
- [32] SONG S Q, ZHUANG J D, MA C Z, et al. Identification of novel umami peptides from *Boletus edulis* and its mechanism via sensory analysis and molecular simulation approaches[J]. Food Chemistry, 2023, 398: 133835. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.133835.
- [33] ZHAO W Z, ZHANG Q, SU L J, et al. Taste characteristics and umami mechanism of novel umami peptides from hen egg proteins[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 181: 114778. DOI:10.1016/j.lwt.2023.114778.
- [34] XIONG Y Z, GAO X C, PAN D D, et al. A strategy for screening novel umami dipeptides based on common feature pharmacophore and molecular docking[J]. Biomaterials, 2022, 288: 121697. DOI:10.1016/j.biomaterials.2022.121697.
- [35] YU Z P, KANG L X, ZHAO W Z, et al. Identification of novel umami peptides from myosin via homology modeling and molecular docking[J]. Food Chemistry, 2021, 344: 128728. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128728.
- [36] LIU Z Y, ZHU Y W, WANG W L, et al. Seven novel umami peptides from *Takifugu rubripes* and their taste characteristics[J]. Food Chemistry, 2020, 330: 127204. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127204.