基于感官评价和分子对接的 Pro、Glu 二肽与鲜味受体构效关系

赵孟斌[1]，顾华蓉[1]，穆洪涛[2]，高向阳[1*]

（1.华南农业大学食品学院，广东省功能食品活性物重点实验室，岭南现代农业科学与技术广东省实验室，广东广州 510642）（2.广东第二师范学院生物与食品工程学院，广东广州 510303）

摘要：为探究脯氨酸（Proline，Pro）、谷氨酸（Glutamic Acid，Glu）二肽与鲜味受体分子相互作用，该研究合成了 12 个 Pro、Glu 二肽，以感官评价为基础，利用同源建模、分子对接技术研究 Pro、Glu 二肽与味觉受体第一家族亚型 1（Taste Receptor Type 1 Member 1，T1R1）、味觉受体第一家族亚型 3（Taste Receptor Type 1 Member 3，T1R3）和钙敏感受体（Calcium Sensitive Receptor，CaSR）的构效关系。结果表明：除脯氨酸-丝氨酸（Proline-serine，Pro-Ser）、缬氨酸-脯氨酸（Valine-proline，Val-Pro）和亮氨酸-谷氨酸（Leucine-glutamic Acid，Leu-Glu）不呈鲜，其余二肽的呈鲜阈值均低于谷氨酸钠阈值（0.3 mg/mL），其中 γ-谷氨酸-蛋氨酸（γ-Glutamic Acid-methionine，γ-Glu-Met）和甘氨酸-谷氨酸（Glycine-glutamic Acid，Gly-Glu）的呈鲜阈值最低，为 0.07 mg/mL。二肽与 T1R1 的关键结合位点为 Asp147、Thr149、Ser172 和 Arg277，T1R1 是 Glu 二肽呈鲜的重要受体；与 T1R3 的关键结合位点为 Glu45、Ser147、Val277 和 His278，Ser147 是 N-γ-Glu 二肽与 T1R3 受体的关键结合位点；与 CaSR 的关键结合位点为 Leu173、Asn176、Gln179、Arg220、Ser244 和 Asp275，Glu 二肽比 Pro 二肽更易与 CaSR 受体结合。二肽与受体主要通过氢键与疏水相互作用结合，呈味较强的二肽在对接时多嵌于受体结合口袋深处；呈味较弱的二肽有的位于结合口袋较浅的位置，有的其疏水区或亲水区暴露于受体表面。该研究有助于阐明鲜味肽与鲜味受体相互作用机制，为深入研究鲜味肽呈鲜机理奠定基础。

关键词：Pro、Glu 二肽；鲜味受体；构效关系；分子对接

文章编号：1673-9078(2023)09-123-136 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.9.0996

The Structure-activity Relationship between Pro-Glu Dipeptides and Umami Receptor Based on Sensory Evaluation and Molecular Docking

ZHAO Mengbin[1], GU Huarong[1], MU Hongtao[2], GAO Xiangyang[1*]

(1.Functional Food Active Substance Key Laboratory of Guangdong Province, Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2.College of Biology and Food Engineering, Guangdong University of Education, Guangzhou 510303, China)

Abstract: Twelve proline (Pro)/glutamic acid (Glu) dipeptides were synthesized to explore the molecular interaction mechanism between Pro/Glu dipeptides and umami receptors. Based on sensory evaluation, the homology modeling and molecular docking technique were used to assess the structure-activity relationship between Pro/Glu dipeptides and umami receptors, including taste receptor type 1 member 1 (T1R1), taste receptor type 3 member 3 (T1R3) and calcium-sensitive receptor (CaSR). Our results indicated that except for proline-serine (Pro-Ser), valine-proline (Val-Pro), and leucine-glutamic acid (Leu-Glu), the umami threshold of other dipeptides was lower than that of sodium glutamate (0.3 mg/mL). The umami threshold of γ-glutamic acid-methionine (γ-Glu-Met) and glycine-glutamic acid (Gly-Glu) was the lowest

引文格式：

赵孟斌,顾华蓉,穆洪涛,等.基于感官评价和分子对接的 Pro、Glu 二肽与鲜味受体构效关系[J].现代食品科技,2023,39(9):123-136

ZHAO Mengbin, GU Huarong, MU Hongtao, et al. The structure-activity relationship between pro-glu dipeptides and umami receptor based on sensory evaluation and molecular docking [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(9): 123-136

收稿日期：2022-08-10

基金项目：国家自然科学基金面上项目（31771939）

作者简介：赵孟斌（1997-），男，硕士研究生，研究方向：食品科学，E-mail：1344368105@qq.com

通讯作者：高向阳（1966-），女，博士，教授，研究方向：功能与发酵食品化学，E-mail：gaoxiangyang@scau.edu.cn

(0.07 mg/mL). Notably, Asp147, Thr149, Ser172, and Arg277 were the key binding sites of Pro-Glu dipeptides to T1R1, the key umami receptor of Glu dipeptides. Similarly, Glu45, Ser147, Val277, and His278 were the key binding sites to T1R3, whereas Ser147 was the key binding site between N-γ-Glu dipeptides and the T1R3 receptor. Leu173, Asn176, Gln179, Arg220, Ser244, and Asp275 were the key binding sites to CaSR, with Glu dipeptides had a higher affinity for binding to the CaSR receptor compared to Pro dipeptides. Binding of Pro/Glu dipeptides to receptors was mainly achieved through hydrogen bonds and hydrophobic interaction. During molecular docking, dipeptides with strong umami interactions were predominantly embedded in the depth of the receptor binding pocket, whereas dipeptides with weak umami interactions were located in the shallow position of the binding pocket, with some of their hydrophobic or hydrophilic regions being exposed to the surface of the receptors. This study aided in clarifying the interaction mechanism between Pro-Glu dipeptides and umami receptors, establishing a foundation for further study on the mechanism of action of umami peptides.

Key words: Pro-Glu dipeptide; umami receptor; structure-activity relationship; molecular docking

鲜味，是继酸、甜、苦、咸味后，第五个被确定的基本味觉，具有增加食物口感丰富性和令人舒服愉快的特点[1]。引起鲜味的物质根据化学成分可分为氨基酸类、核苷酸类、有机酸类、有机碱类和鲜味肽[2]，其中鲜味肽是一种分子量约为 150~3 000 u 的小分子肽，具有增鲜、增香及增强食品整体味感作用，并且有良好的加工特性、热稳定性和营养价值。鲜味肽不仅具有鲜味，而且可以掩盖和减弱苦味以改善食品风味[3]，与其他物质协同增鲜还可减少食盐和谷氨酸钠的摄入[4]。1978 年，Yamasaki 等[5]首次从木瓜蛋白酶水解的牛肉水解液中分离纯化得到氨基酸序列为 Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala 的鲜味肽，目前已经发现鲜味肽在鱼类[6]、鸡汤[7]、火腿[8]和菌类[9]等许多食品中广泛存在，是食品中重要的呈味物质。现阶段对鲜味肽的研究主要集中在分离鉴定等方面，具体的呈鲜机理与构效关系尚不明确。鲜味在人体的感知主要依靠异源二聚体味觉受体第一家族亚型 1/3（Taste Receptor Type 1/3，T1R1/T1R3）[10]、味型代谢性谷氨酸受体 4（Metabotropic Glutamate Receptor 4，mGluR4）[11]、胞外钙敏感受体（Calcium-sensing Receptor，CaSR）[12]和 G 蛋白偶联受体 C 家族 6 组 A 亚型（G Protein-coupled Receptor Family C Group 6 Member A Receptor，GPRC6A）[13]，均属于 G 蛋白偶联受体家族的 C 亚族，可广泛感知多种鲜味物质，将鲜味信号传递至大脑[14]，但人类鲜味受体的晶体结果尚未被完全解析[15]，因此有必要通过蛋白质结构预测来获得其三维结构，利用计算机辅助受体-配体结合的分子对接技术，从小分子（配体）及蛋白大分子（受体）各自的三维结构入手，检验两者结合能力，预测其结合模式及关键结合位点，分析鲜味肽与受体间的相互作用，有助于阐明鲜味肽呈鲜机制。

本研究以鱼露中鉴定得到的脯氨酸二肽和谷氨酸二肽[16]为研究对象，通过分子对接技术表征二肽与 T1R1、T1R3 及 CaSR 鲜味受体的结合模式，寻找二肽与鲜味受体结合的关键位点，同时结合二肽的呈鲜强度与阈值来探究其呈鲜机理与构效关系。

1 材料与方法

1.1 材料与数据库

谷氨酸钠、蔗糖、柠檬酸、氯化钠均为食品级，购自广州利成实业有限公司。奎宁：色谱纯，购自广州丛源仪器有限公司。

根据前期实验分离鉴定得到的鱼露寡肽序列[17]，从中选取 12 个二肽：丝氨酸-脯氨酸（Serine-proline，Ser-Pro）、脯氨酸-丝氨酸（Proline-serine，Pro-Ser）、丙氨酸-脯氨酸（Alanine-proline，Ala-Pro）、脯氨酸-丙氨酸（Proline-alanine，Pro-Ala）、缬氨酸-脯氨酸（Valine-proline，Val-Pro）、脯氨酸-缬氨酸（Proline-valine，Pro-Val）、γ-谷氨酸-蛋氨酸（γ-Glutamic Acid-methionine，γ-Glu-Met）、蛋氨酸-谷氨酸（Methionine-glutamic Acid，Met-Glu）、γ-谷氨酸-甘氨酸（γ-Glutamic Acid-glycine，γ-Glu-Gly）、甘氨酸-谷氨酸（Glycine-glutamic Acid，Gly-Glu）、γ-谷氨酸-亮氨酸（γ-Glutamic Acid-leucine，γ-Glu-Leu）和亮氨酸-谷氨酸（Leucine-glutamic Acid，Leu-Glu），采用固相合成法合成以上二肽，并进行脱盐处理，使纯度≥98%，委托生工生物工程（上海）股份有限公司完成。

鲜味受体蛋白均来自 Uniprot 蛋白数据库（https://www.uniprot.org）：T1R1、T1R3 和 CaSR 的检索号分别为 Q7RTX1、Q7RTX0、P41180。模板蛋白来自 PDB 数据库（https://www.rcsb.org）。

序列对比、同源建模及模型评估涉及的平台：SWISS-MODEL（https://swissmodel.expasy.org）、NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov）、SAVES v6.0（https://saves.mbi.ucla.edu/）。

1.2 实验方法

1.2.1 感官评价

感官评价小组由 20 名味觉正常人员组成（10 女 10 男，20~25 岁），并依据 GB/T 16291.1-2012[18]接受了感官培训以辨别五种基本味觉（酸、甜、苦、咸、鲜）。参考丛艳君等[19]分别以柠檬酸（0.8 mg/mL）、蔗糖（10 mg/mL）、奎宁（0.8 mg/mL）、氯化钠（3.5 mg/mL）和谷氨酸钠（3.5 mg/mL）作为酸、甜、苦、咸、鲜的评价标准，配制 2 mg/mL 合成肽供评价小组进行感官描述。采用三角试验法[20]确定二肽的呈鲜阈值，样品用超纯水溶解，将起始质量浓度为 2 mg/mL 的合成肽溶液逐级稀释，至评价小组无法品尝出溶液中的鲜味，则该合成肽的呈鲜阈值即为倒数第 2 个合成肽溶液的质量浓度值。采用各感官评价员评定结果的平均值，且每个评定员之间的误差应不超过 2 个稀释水平。感官评价在恒定温度（24±1）℃下进行。

1.2.2 鲜味受体同源建模与能量优化

获取目标蛋白序列后，于 NCBI 网站进行 protein blast 比对，以序列覆盖率较高、E 值小于 10^{-5} 以及序列相似性大于 30%为标准[21]，选取打分较高的蛋白作为备选模板。利用 SYBYL-X 2.0 将模板与目标蛋白进行序列比对，选取序列一致性最高且 RMSD 值最小的模板，利用 SWISS-MODEL 进行建模。利用 SYBYL-X 2.0 软件中的 Powell 法对模型进行能量最小化（Minimize）处理。

1.2.3 模型评估

利用拉氏图与 Verify 3D 对优化后的模型进行结构评估。

1.2.4 Pro、Glu 二肽与鲜味受体的分子对接

1.2.4.1 小分子配体的准备

通过 SYBYL-X 2.0 中的 sketch 模块与蛋白质自动生成模块建立目标二肽结构，采用 tripos 力场对二肽分子进行能量最小化处理。

1.2.4.2 分子对接

采用 Docking suite 模块准备模块蛋白与二肽分子。对模块蛋白进行末端残基修复与加氢处理后，Automatic 模式生成活性口袋，Surflex for searching 模式对二肽分子进行准备处理，最后利用 Surflex-Dock Screen 模式进行分子对接，计算受体与配体的对接分值并预测结合位点，综合考虑打分函数的一致性，选择对接总评分最高的构象以进行后续分析研究。

1.2.4.3 配体-受体相互作用研究

利用 SYBYL-X 2.0 中的 Merge 功能将配体的最优对接构象与受体进行合并，得到配体-受体复合物，再利用 Proteins Plus 中的 PoseView 2D interaction diagrams 模块做出配体与受体的相互作用模式图。利用 SYBYL-X 2.0 中的 MOLCAD 模块创建分子表面。

1.2.5 数据分析

分子对接所用软件为 SYBYL-X 2.0。二肽与鲜味受体结合的 2D 模式图利用在线服务器 Proteins Plus（https:proteins.plus/）得出。

2 结果与讨论

2.1 Pro、Glu 二肽的感官评价

表 1 二肽的感官评价结果

Table 1 The sensory evaluation of dipeptides

合成肽	感官描述	呈鲜阈值/(mg/mL)	合成肽	感官描述	呈鲜阈值/(mg/mL)
Ser-Pro	较鲜，酸味	0.10±0.03	γ-Glu-Met	较鲜，持续性，微酸	0.07±0.02
Pro-Ser	微酸	-	Met-Glu	微鲜，持续性	0.15±0.05
Ala-Pro	较鲜，持续性	0.08±0.03	γ-Glu-Gly	微鲜，微酸	0.11±0.03
Pro-Ala	较鲜，微酸	0.21±0.06	Gly-Glu	较鲜，微酸	0.07±0.03
Pro-Val	较鲜，微酸，回甜	0.09±0.03	γ-Glu-Leu	酸味，微鲜	0.11±0.03
Val-Pro	微酸	-	Leu-Glu	酸味	-

对合成 Pro、Glu 二肽进行感官评价，结果见表 1。除 Pro-Ser、Val-Pro 和 Leu-Glu 不呈鲜，其余二肽的呈鲜阈值均低于谷氨酸钠阈值（0.3 mg/mL）。其中 γ-Glu-Met 和 Gly-Glu 的呈鲜阈值最低，为 0.07 mg/mL，说明其鲜味强度最高，Pro-Ala 的呈鲜阈值最高，为 0.21 mg/mL，说明其鲜味强度最低。呈鲜阈值较低的肽如 γ-Glu-Met、Gly-Glu、Ser-Pro、Ala-Pro、Pro-Ala 和 Pro-Val 等具有较强的鲜味。所有二肽均未表现出苦味，表明含有疏水性氨基酸的二肽不一定呈现苦味，可能是由于部分疏水性基团对呈鲜起辅助作用[22]。呈鲜味的二肽都伴随着一定的酸味和甜味，Zhang 等[23]也发现鲜味肽除了呈鲜味，也呈酸味、苦味和甜味，证明鲜味肽并不是呈单一鲜味，而是具有以鲜味为主的多种呈味效果，对鲜味肽呈鲜起重要作用。具有相同氨基酸但排列顺序不同的二肽呈鲜阈值有差异，当 Pro 位于肽链 C 端时，二肽呈鲜阈值相对较低，表明

鲜味肽的鲜味与其氨基酸排列顺序及肽链的构效有关。γ-Glu-Met 和 Gly-Glu 均比其相反氨基酸序列二肽的呈鲜阈值低，可能是由于相反序列导致二肽空间构效差异，改变肽与受体的相互作用，影响肽与受体的结合位置，使其产生不同的呈鲜效果。

2.2 鲜味受体同源建模

T1R1、T1R3 及 CaSR 受体同源模板结果如表 2~4 所示，T1R1 和 T1R3 模板序列覆盖率均≥54.00%，E 值均接近于 0。E 值越低则打分结果越可靠[21]。序列相似性大于 30%表明模型可靠[21]，CaSR 模板序列一致性≥64.00%，同源性较高。RMSD 表示模板蛋白与目标蛋白的结构一致性，该值越小则蛋白的结构一致性越强。因此 T1R1、T1R3 建模模板为 5x2m，CaSR 建模模板为 5fbh，其他学者也采用了 5x2m[21]和 5fbh[24]作为建模模板。

表 2 T1R1 同源模板序列比对结果

Table 2 Sequence alignment results of T1R1 homologous template

PDB ID	Query Cover	E value	%Identity	RMSD
5k5t	64.00%	$2e^{-90}$	32.80%	94.71
5k5s	64.00%	$2e^{-90}$	28.20%	206.09
5x2m	55.00%	$4e^{-80}$	35.70%	0.00
5fbh	54.00%	$8e^{-69}$	26.70%	109.24

表 3 T1R3 同源模板序列比对结果

Table 3 Sequence alignment results of T1R3 homologous template

PDB ID	Query Cover	E value	%Identity	RMSD
5x2m	55.00%	$1e^{-100}$	39.50%	0.00
5k5t	64.00%	$1e^{-84}$	28.20%	94.76
5k5s	64.00%	$3e^{-84}$	29.30%	212.71
5fbh	55.00%	$1e^{-64}$	27.80%	113.99

表 4 CaSR 同源模板序列比对结果

Table 4 Sequence alignment results of CaSR homologous template

PDB ID	Query Cover	E value	%Identity	RMSD
5k5t	56.00%	0.00	64.10%	111.04
5k5s	56.00%	0.00	64.00%	256.98
5fbh	48.00%	0.00	64.40%	0.00

2.3 模型评估

T1R1、T1R3 和 CaSR 受体的模型图、拉氏图与 Verify 3D 打分结果如图 1、图 2 所示，图 1 中 a、c 为受体蛋白模型图，b、d 为拉氏图，e、f 和图 2c 为 Verify 3D 评分图。

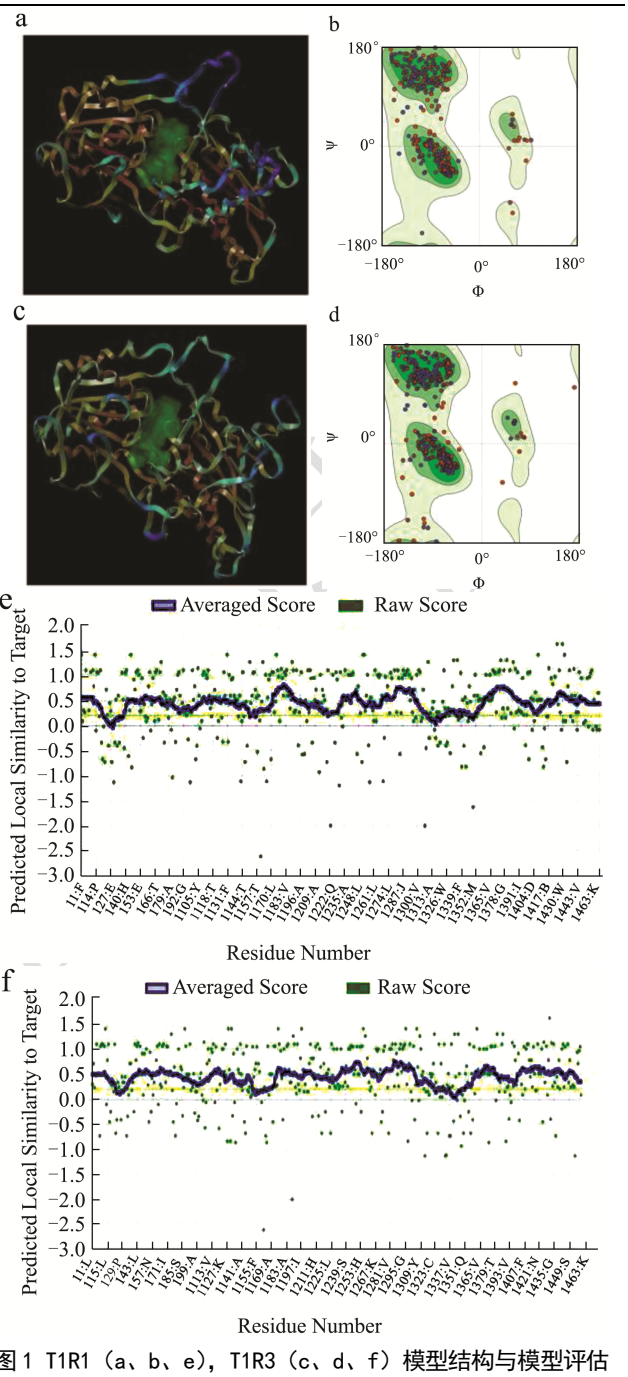


图 1 T1R1（a、b、e），T1R3（c、d、f）模型结构与模型评估

Fig.1 T1R1 (a, b, e), T1R3 (c, d, f) model structure and model evaluation

拉氏图中的圆点代表蛋白的氨基酸残基，绿色越深则氨基酸残基构象越合理，白色区域为不可接受区[25]。结果显示，T1R1 模型中 99.13%的氨基酸处于合理区，其中 94.14%处于最适区，4.99%处于可接受区；T1R3 模型中 98.07%的氨基酸处于合理区，其中 92.70%处于最适区，5.37%处于可接受区；CaSR 模型中 99.12%的氨基酸处于合理区，其中 95.71%处于最适区，3.41%处于可接受区。当不低于 90%的 ψ，φ 二面角分布在可接受区则表明模型合理[26]，因此 3 个模型均合理。Verify 3D 打分显示模型均具有超过 90%的

氨基酸残基 3D/1D 值大于 0.2，表明模型质量合格。三个受体蛋白的配体结合口袋如受体模型图中绿色区域所示，均位于受体中心的空腔区域，位置与前人研究结果基本一致[24,27,28]。

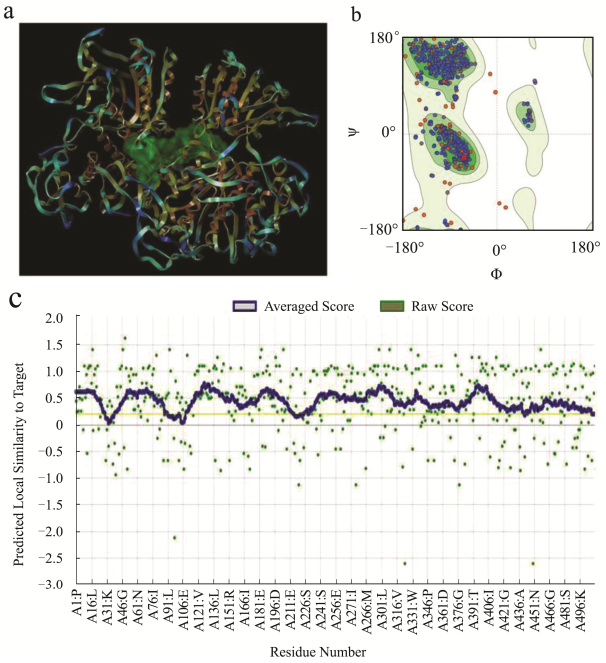


图 2 CaSR 模型结构与模型评估

Fig.2 CaSR model structure and model evaluation

2.4 二肽与鲜味受体的分子对接

2.4.1 对接评分

选择感官评价结果中呈鲜的 4 个 Pro 二肽和 5 个 Glu 二肽及鲜味基准物谷氨酸钠（MSG）与 T1R1、T1R3 及 CaSR 受体进行分子对接评分，考虑了分子极性、疏水性、焓和溶剂化等因素，对配体与受体的结合亲和程度，一般认为评分≥7 表示受体与配体结合能力强，小于 4 则结合能力弱[29]。

Pro 二肽与 T1R1 对接评分均高于与 T1R3 和 CaSR 的评分，与 T1R1 结合较为紧密，顾华蓉等[30]在 Pro 二肽呈鲜特性中也发现 T1R1 可能是 Pro 二肽呈鲜的重要受体。

Glu 二肽与受体的对接评分均大于 6.90，同时也均大于 MSG 的相应对接评分，大多数超过 8 分，肽与受体的亲和程度较高。除 Gly-Glu 和 γ-Glu-Leu，其余 Glu 二肽与 T1R1 和 CaSR 的对接评分高于 T1R3，提示 Glu 二肽主要与 T1R1 和 CaSR 结合呈鲜，可能与 T1R3 受体特殊的结合构象有关[31]。与 T1R1 和 CaSR 的对接评分显示，N-γ-Glu 二肽的评分均高于相同氨基酸组成的 C-Glu 二肽，与 T1R1 和 CaSR 结合更为紧密，进一步说明鲜味肽呈鲜效果与氨基酸排列顺序有关，Masahiro 等[32]发现二肽氨基酸顺序排列相反时，Lys-Glu 不具有鲜味，Glu-Lys 具有鲜味，与本研究结果类似。

表 5 二肽与 T1R1、T1R3 及 CaSR 受体的分子对接评分

Table 5 Molecular docking score of dipeptides with T1R1, T1R3 and CaSR receptors

	T1R1	T1R3	CaSR
Ser-Pro	5.61	5.50	5.52
Ala-Pro	5.19	4.29	4.96
Pro-Ala	5.33	4.55	5.22
Pro-Val	6.71	5.75	5.84
γ-Glu-Met	9.44	7.42	10.40
Met-Glu	8.39	7.82	8.80
γ-Glu-Gly	8.16	7.86	8.57
Gly-Glu	6.94	7.72	7.09
γ-Glu-Leu	9.70	8.25	8.15
MSG	6.19	4.85	5.04

2.4.2 二肽与鲜味受体结合的关键氨基酸残基分析

表 6 二肽与鲜味受体的对接能量（kcal/mol）

Table 6 The docking energies of dipeptides with umami receptors

二肽	T1R1		T1R3		CaSR	
	对接总能量	对接相互作用能量	对接总能量	对接相互作用能量	对接总能量	对接相互作用能量
Ser-Pro	-38.34	-47.58	-34.31	-44.25	-18.97	-27.97
Ala-Pro	-33.11	-43.72	-33.68	-40.43	-17.68	-27.44
Pro-Ala	-21.01	-34.39	-29.14	-42.13	-12.35	-28.33
Pro-Val	-32.81	-26.11	-30.95	-45.01	-15.92	-32.38
γ-Glu-Met	-48.81	-48.01	-59.63	-41.24	-56.40	-47.31
Met-Glu	-35.67	-15.07	-54.62	-55.23	-36.27	-29.99
γ-Glu-Gly	-36.02	-15.33	-54.75	-37.23	-53.18	-35.16
Gly-Glu	-58.28	-46.88	-57.94	-50.89	-53.89	-33.13
γ-Glu-Leu	-37.92	-20.03	-54.98	-33.98	-52.19	-37.95

表 7 二肽与 T1R1 受体的结合位点

Table 7 Binding sites of dipeptides to T1R1 receptor

结合位点	Ser-Pro	Ala-Pro	Pro-Ala	Pro-Val	γ-Glu-Met	Met-Glu	γ-Glu-Gly	Gly-Glu	γ-Glu-Leu	MSG
His71									+	
Ser107	+	+	+			++				
Asp147		++	++	+		++		+	++	
Ser148	+									
Thr149					+	+	+	+		+
Asn150							+			+
Ala170					+					
Ser172					+	+	++	+		
Asp218	+						+			+
Tyr220							+			+
Arg277	+			++	++	++		++	++	
Gln278	+			+	+					
Ser385									++	
Asn388									+	

注：“+”表示二肽与受体在该氨基酸残基形成氢键，“+”的数量表示氢键的数量。图 8、9 同。

表 8 二肽与 T1R3 受体的结合位点

Table 8 Binding sites of dipeptides to T1R3 receptor

结合位点	Ser-Pro	Ala-Pro	Pro-Ala	Pro-Val	γ-Glu-Met	Met-Glu	γ-Glu-Gly	Gly-Glu	γ-Glu-Leu	MSG
Glu45		++	+++	++			++			
Ser66		+	+							
Ser104			+		+					
His145										+
Ser146	+									
Ser147					+		+	+	++	+
Glu148	+						+		+	
Gly168					+	+			+	
Ser170					+			+		+
Asp216	++									
Ser276							+			
Val277	+	++		++			+	+		
His278		++	+	+			++			
Glu301						++			+	
Ala302								+		
Gln326						+				
His388						+				
Gln389						+				

表 6 为二肽与鲜味受体的对接能量。Glu 二肽的对接能量整体大于 Pro 二肽，对接能量越低，肽与受体结合的亲和力越强，说明 Glu 二肽更易与受体结合。其中 γ-Glu-Met 和 Gly-Glu 进入 T1R1、T1R3 和 CaSR 结合腔所需能量最低，结合的亲和力最强，可能是由于能更嵌入到受体的结合口袋部位，最终导致 γ-Glu-Met 和 Gly-Glu 的呈鲜阈值低。

表 7 中结合位点 Asp147 和 Arg277 出现频率和成键数量均较多，可能是二肽与 T1R1 的关键结合位点。Thr149 和 Ser172 出现 4 次，与 T1R1 形成氢键的均为 Glu 二肽，同时 Thr149 是 MSG 与 T1R1 的结合位点，Thr149 和 Ser172 可能是 Glu 二肽与 T1R1 结合的关键

位点，与其他学者的研究结果一致[26,33]，T1R1 是 Glu 二肽呈鲜的重要受体。Liu 等[28]和 Zhang 等[33]鉴定出 T1R1 的关键氨基酸残基有 D147、S148、T149、S172、Y220、R277、Q278、A302，S385，除 Ala302 外，其余残基也在本研究中 Pro、Glu 二肽与 T1R1 的对接位点，进一步证明其具有呈鲜特性。

表 8 中 Glu45、Ser147、Val277 和 His278 出现频率和成键数量较多，Ser147 同时是 MSG 与 T1R3 的结合位点，这些残基可能是二肽与 T1R3 的关键结合位点。与 Ser147 结合的均为 N-γ-Glu 二肽，而谷氨酸位于 C 端的二肽，除 Gly-Glu 外其余均不能与 Ser147 结合，Ser147 可能是 N-γ-Glu 二肽与 T1R3 的关键结合位点。Pro、Glu 二肽均能在 His145、Ser147、Ser170 和 Gly168 结合 T1R3，Cascales 等[34]发现这些位点是 T1R3 上的关键氨基酸残基，进一步表明二肽可通过 T1R3 受体呈鲜。

表 9 二肽与 CaSR 受体的结合位点

Table 9 Binding sites of dipeptides to CaSR receptor

结合位点	Ser-Pro	Ala-Pro	Pro-Ala	Pro-Val	γ-Glu-Met	Met-Glu	γ-Glu-Gly	Gly-Glu	γ-Glu-Leu	MSG
Asn102				+					+	
Val104				+						
Gly148						+			++	
Val149									++	
Leu173		+			+		+	+		+
Asn176		+			+++	+	+++	++		+
Asn178					+		+			
Gln179	+			+		++		+	++	
Asp216	+								+	
Asp217	+					+				+
Arg220					++	++	++	+		++
Ser244					+	+	+	+		
Ser272			+							
Asp275	++++		+++	+						

表 9 显示 Leu173、Asn176、Gln179、Arg220 和 Ser244 是 Pro、Glu 二肽与 CaSR 结合较多的位点，其中在 Asn176、Gln179 残基处对接的肽有 5 个，成键数也较多，这些位点可能是二肽与 CaSR 的关键结合位点。Pro 二肽中的 Pro-Ala 与 Ser-Pro 分别在 Asp275 处与受体形成 3 或 4 个氢键，主要原因是其引起鲜味受体细胞产生强烈信号[30]，产生较多的氢键结合；除 Gln179 和 Asp275 位点外，其余 4 个位点主要结合 Glu 二肽，氢键数也较多，说明相比于 Pro 二肽，Glu 二肽更易与 CaSR 结合。Asn102、Asp216、Ser272、Asp275 是 CaSR 激活剂与 CaSR 的相互作用位点[24]，部分二肽可在这些位点与 CaSR 形成氢键，进一步验证 Pro、Glu 二肽也能通过与上述残基结合激活 CaSR 受体。

2.4.3 Pro、Glu 二肽的呈鲜构效关系

Pro、Glu 二肽与 T1R1、T1R3 和 CaSR 不同的结合能力影响鲜味阈值和呈鲜强度，主要与二肽与受体间的构效关系有关，因此分析了 Pro、Glu 二肽及其潜在鲜味受体的构效关系，同时分别将未呈鲜二肽 Pro-Ser、Val-Pro 和 Leu-Glu 的受体-配体结合情况与鲜味较强的 Ser-Pro、Pro-Val 和 Glu-Leu 进行对比，探究导致其呈鲜效果差异的原因。

图 3 显示 Ser-Pro 与 T1R1 受体上的 Ser107、Ser148、Asp218、Arg277 及 Gln278 残基形成氢键，与 Gln278 存在疏水相互作用。图 4 中 Pro-Ser 的对接位点为 Thr149、Asn150、Ser216 及 Ser276，比 Ser-Pro 少结合一个残基且不存在疏水接触。疏水相互作用是受体-配体结合的驱动力[35,36]，当配体与受体的疏水区发生相互作用时，其间的水分子从疏水区排出，增加配体与受体的结合亲和力，Ser-Pro 与 T1R1 的疏水接触使结合更加稳定；Ser-Pro 中丝氨酸位于 N 端有一个游离的氨基与受体形成氢键，而 Pro-Ser 中 N 端脯氨酸的亚氨基未能与受体形成氢键，因此 Pro-Ser 与 T1R1 的结合力相较于 Ser-Pro 更弱，Ser-Pro 呈鲜阈值低，呈现较强鲜味，Pro-Ser 不能呈鲜。

如图 5 和图 6 所示，Ala-Pro 及 Pro-Ala 与 T1R1 均在 Ser107 与 Asp147 处对接，但 Pro-Ala 与 Ala302 残基间存在疏水接触，与 T1R1 的结合相对紧密。Ala-Pro 及 Pro-Ala 与 CaSR 的结合位点完全不同，但均能形成氢键，丙氨酸是分子量仅大于甘氨酸的氨基酸，仅含有一个甲基，Ala-Pro 与 Pro-Ala 由于分子量

小、体积小更易与鲜味受体结合，Ala-Pro 中的丙氨酸残基比 Pro-Ala 更接近受体活性口袋，因此 Ala-Pro 表现出较低的呈鲜阈值和较强鲜味，Dang 等[37]报道在鲜味肽与鲜味受体研究中也发现小分子量的二肽或三肽更易与受体结合。

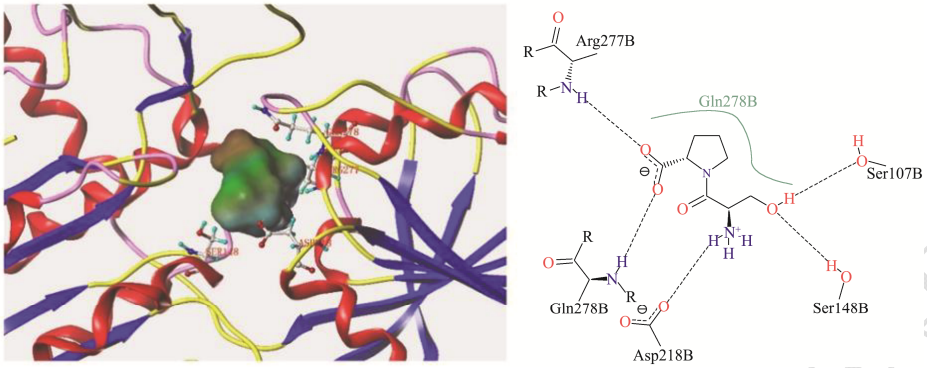


图 3 Ser-Pro 与 T1R1 受体结合模式图

Fig.3 Binding pattern of Ser-Pro to T1R1 receptor

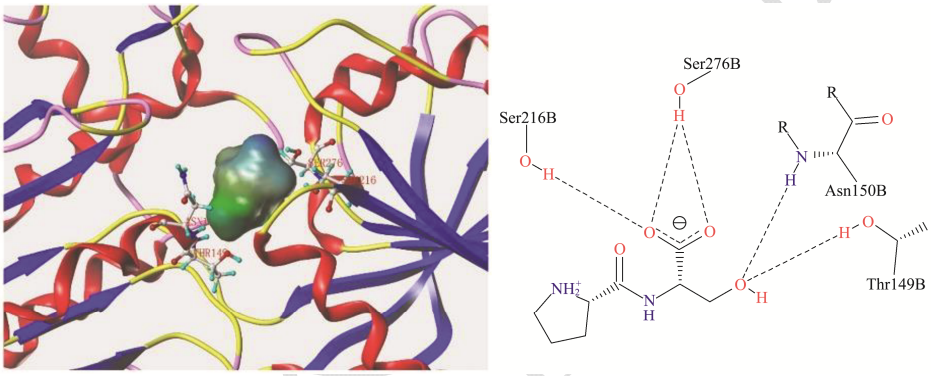


图 4 Pro-Ser 与 T1R1 受体结合模式图

Fig.4 Binding pattern of Pro-Ser to T1R1 receptor

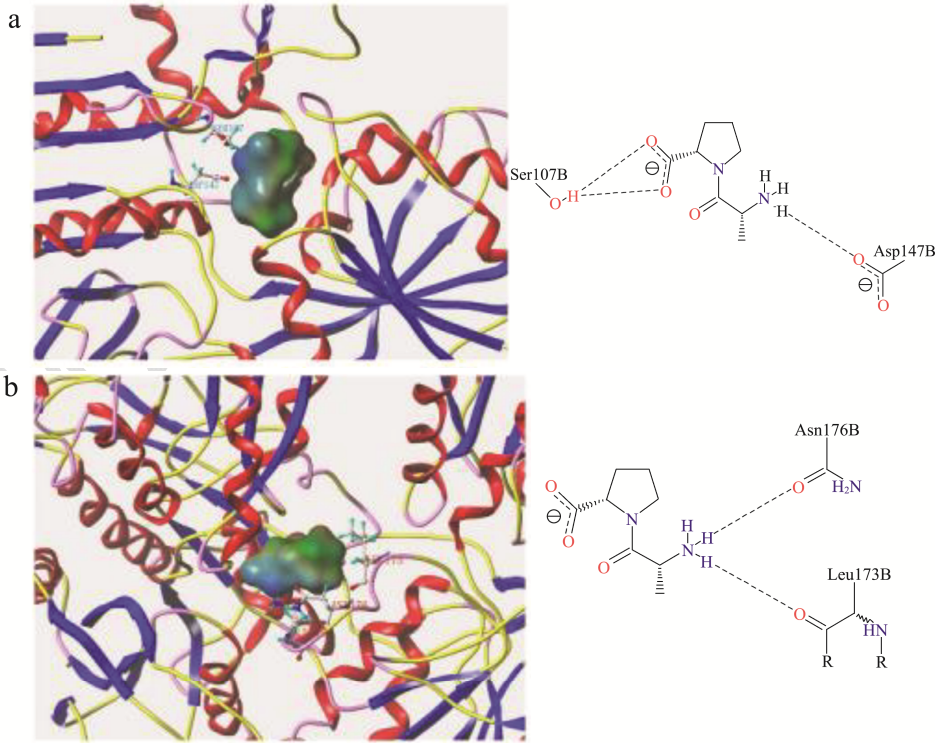


图 5 Ala-Pro 与 T1R1 (a)、CaSR (b) 受体结合模式图

Fig.5 Binding pattern of Ala-Pro to T1R1 (a), CaSR (b) receptor

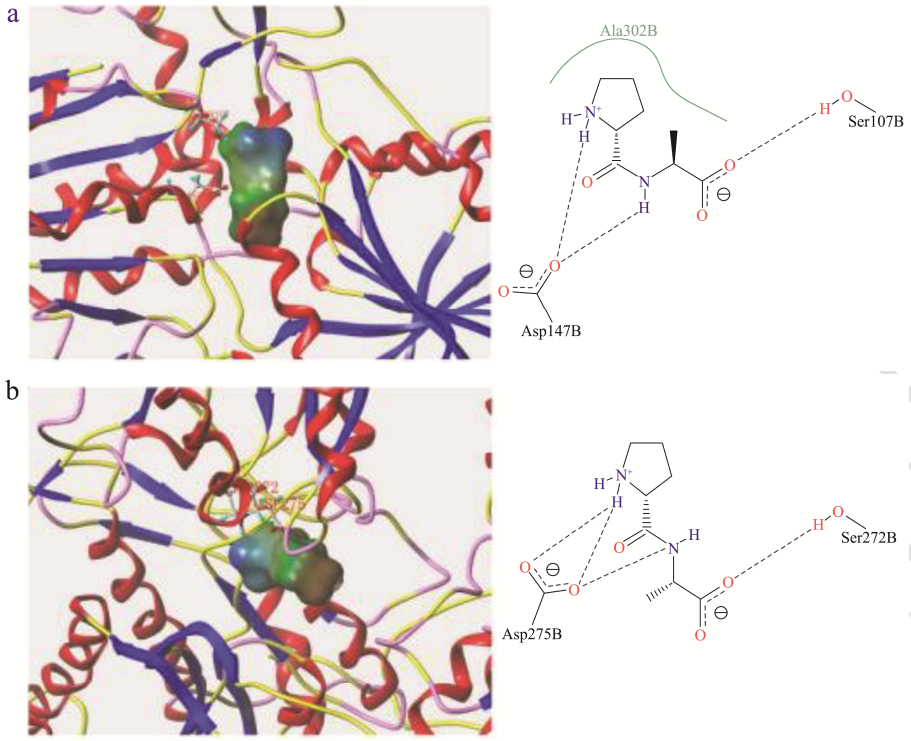


图 6 Pro-Ala 与 T1R1 (a)、CaSR (b) 受体结合模式图

Fig.6 Binding pattern of Pro-Ala to T1R1 (a), CaSR (b) receptor

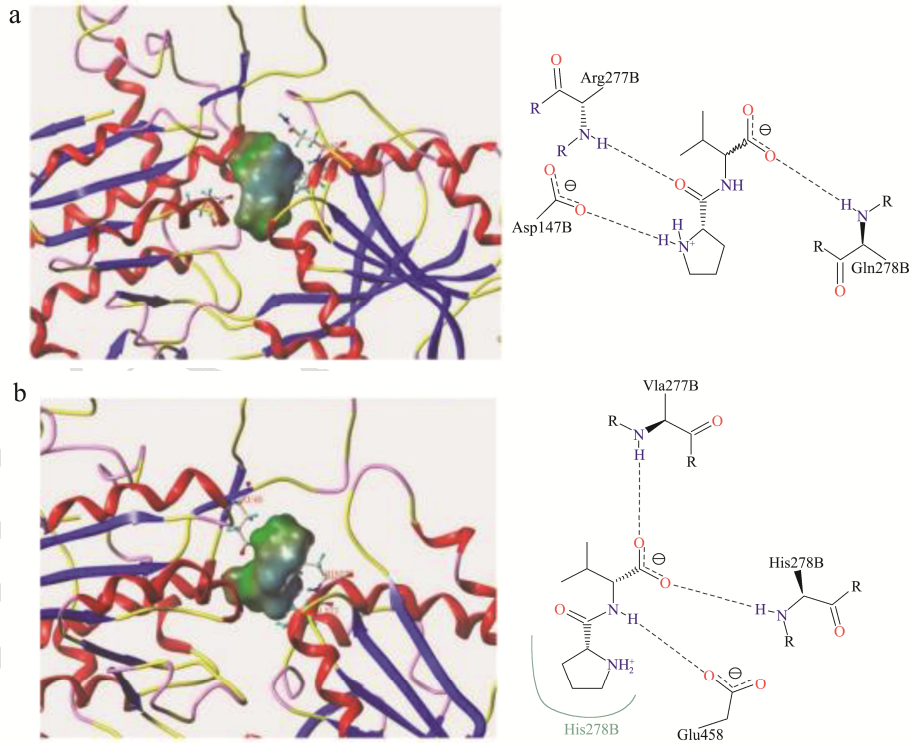


图 7 Pro-Val 与 T1R1 (a)、T1R3 (b) 受体结合模式图

Fig.7 Binding pattern of Pro-Val to T1R1 (a), T1R3 (b) receptor

由图 7 可知，Pro-Val 和 Val-Pro 与 T1R1 均有 3 个对接位点，其中 Pro-Val 与 Arg277 结合形成两个氢键，Arg277 是报道的关键氨基酸残基[26]；Val-Pro 与 Ser276 形成氢键，与 Ser148 及 Ser276 存在疏水相互作用，3D 图显示 Val-Pro 的亲水区域暴露于受体外，未能与受体产生相互作用，可能与溶剂水结合，导致与 T1R1 的结合亲和力减弱。

Pro-Val 和 Val-Pro 与 T1R3 之间均形成多个氢键且存在疏水接触，其中 Pro-Val 与 Glu45 及 Val277 均形成两个氢键，其疏水区被包裹在受体空腔内部，配

体-受体复合物更加稳定；Val-Pro 与图 8 中结合口袋左侧部分仅与 His145 的 1 个氢键连接，对接位置相比于 Pro-Val 更浅，疏水区域更接近结合口袋表面，导致 Val-Pro 与受体结合稳定性差，未能呈鲜。鲜味肽与 T1R3 的结合归因于 C 端氨基酸与受体关键氨基酸残基之间的静电相互作用、氢键等[38]，不同的 C 端氨基酸残基使其产生有差异的结合力，导致 Pro-Val 和 Val-Pro 相反的呈味效果。

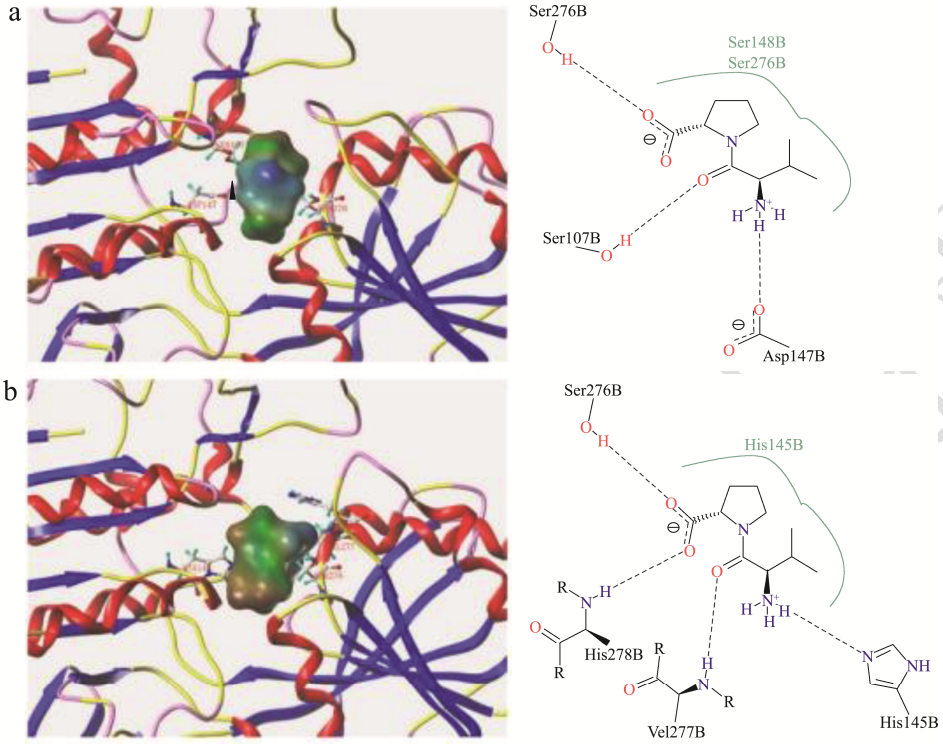


图 8 Val-Pro 与 T1R1 (a)、T1R3 (b) 受体结合模式图

Fig.8 Binding pattern of Val-Pro to T1R1 (a), T1R3 (b) receptor

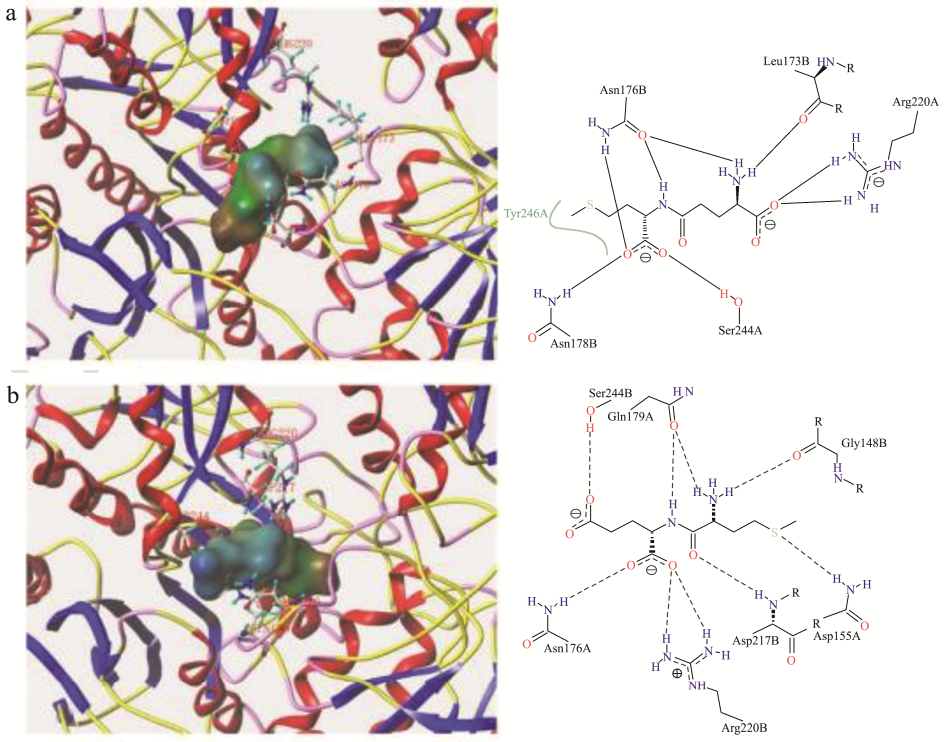


图 9 γ-Glu-Met (a)、Met-Glu (b) 与 CaSR 受体结合模式图

Fig.9 Binding pattern of γ-Glu-Met (a), Met-Glu (b) to CaSR receptor

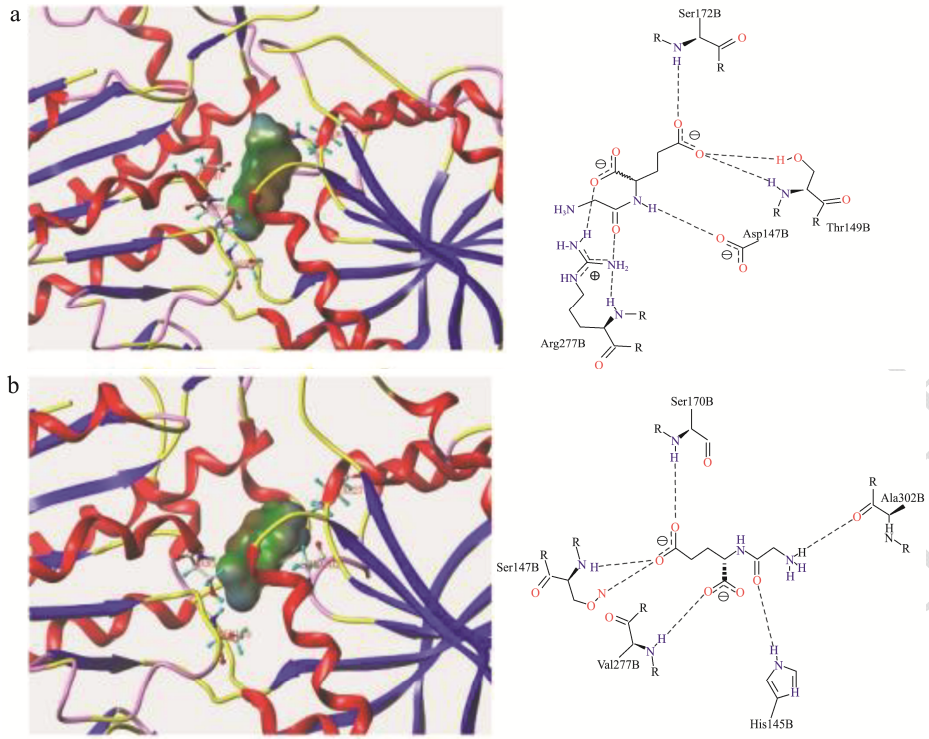


图 10 Gly-Glu 与 T1R1 (a)、T1R3 (b) 受体结合模式图

Fig.10 Binding pattern of Gly-Glu to T1R1 (a), T1R3 (b) receptor

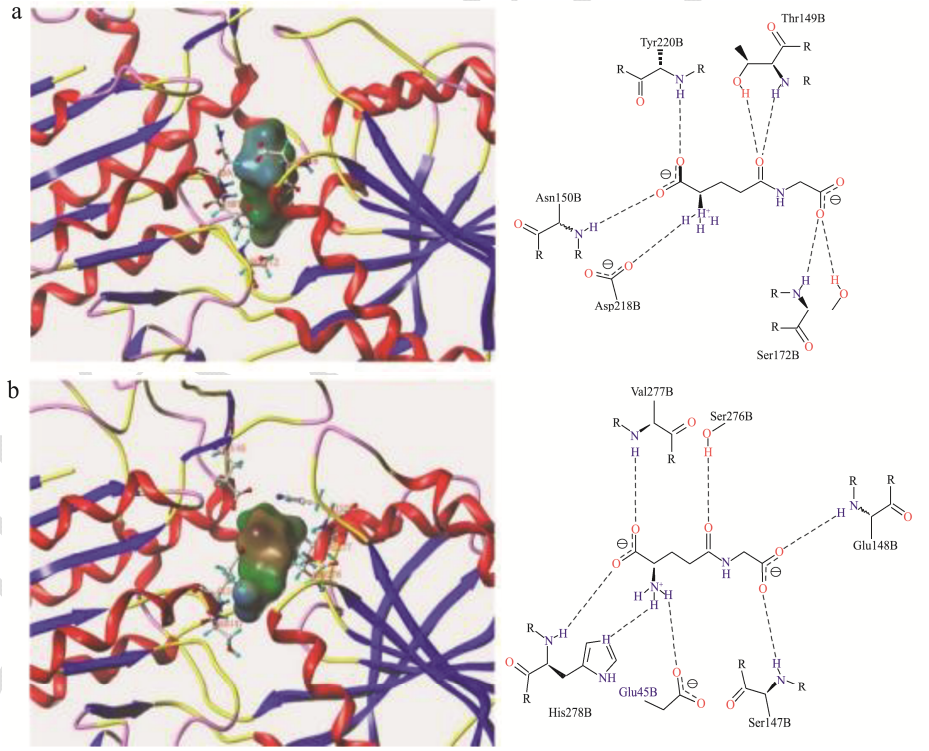


图 11 γ-Glu-Gly 与 T1R1 (a)、T1R3 (b) 受体结合模式图

Fig.11 Binding pattern of γ-Glu-Gly to T1R1 (a), T1R3 (b) receptor

图 9 所示，γ-Glu-Met 与 CaSR 有 5 个对接位点，形成 8 个氢键，其中与 Asn176 形成 3 个氢键，与 Tyr246 存在疏水接触。γ-Glu-Met 分子各部分均可与 CaSR 形成相互作用，Glu 残基嵌入受体深处，与受体结合更紧密，呈鲜阈值低至 0.07 mg/mL。庄金达[39]研究发现鲜味肽与受体形成的疏水相互作用可增强二者的亲和力，与本研究结果一致。Met-Glu 与 CaSR 有 5 个对接位点，形成 9 个氢键，从 3D 图可见 Met-Glu 的亲水区 Glu 残基朝向受体表面，易与溶剂水结合导致与受体亲和力减弱，与 CaSR 的对接评分（8.80）小于

γ-Glu-Met，呈鲜阈值也高于 γ-Glu-Met 两倍多，故 Met-Glu 鲜味程度小于 γ-Glu-Met，从受体与分子的角度表明 γ-Glu-Met 可通过结合 CaSR 受体呈现较强鲜味。

图 10 和 11 可知，Gly-Glu 与多个氨基酸残基形成氢键，均完全嵌于两个受体结合口袋内部，可能与分子大小有关[37]，Gly-Glu 中甘氨酸的 R 基仅为一个氢原子，Gly-Glu 分子更易进入受体的结合口袋。γ-Glu-Gly 与 T1R1、T1R3 分别有 5 个或 6 个对接位点，氢键数较多，但呈味强度弱于 Gly-Glu，可能与二肽与受体的结合位置有关：与 T1R1 的结合图可知，γ-Glu-Gly 的亲水区趋向受体外表面，易与水分子亲和而减弱二肽与受体的结合力；在与 T1R3 结合时，γ-Glu-Gly 分子整体位于结合口袋的浅表处，疏水区域暴露于受体表面，水溶液中的配体与受体结合不稳定，阮仕艳[40]发现鲜味肽与 T1R3 受体氢键数越多，距离越短，越能结合受体口袋，本研究中位于结合口袋浅表处的 γ-Glu-Gly 可能由于与受体口袋中心距离较远，使 γ-Glu-Gly 呈味强度弱于 Gly-Glu。

图 12 显示 γ-Glu-Leu、Leu-Glu 与 T1R1 均存在多个对接位点且形成 7 个氢键，但 Leu-Glu 的对接评分（7.60）远低于 γ-Glu-Leu（9.70），感官评价显示 Leu-Glu 未呈鲜，上述结果表明 Leu-Glu 与 T1R1 的结合效果不理想，与二肽分子的对接位置有关。从 3D 图可见，γ-Glu-Leu 以水平向的状态被包裹于受体结合口袋内部较深的位置，而 Leu-Glu 是以竖直向状态嵌于受体结合口袋，位置较浅，疏水区域暴露于受体表面，因此 Leu-Glu 与 T1R1 的结合稳定性弱于 γ-Glu-Leu，导致呈鲜能力弱。

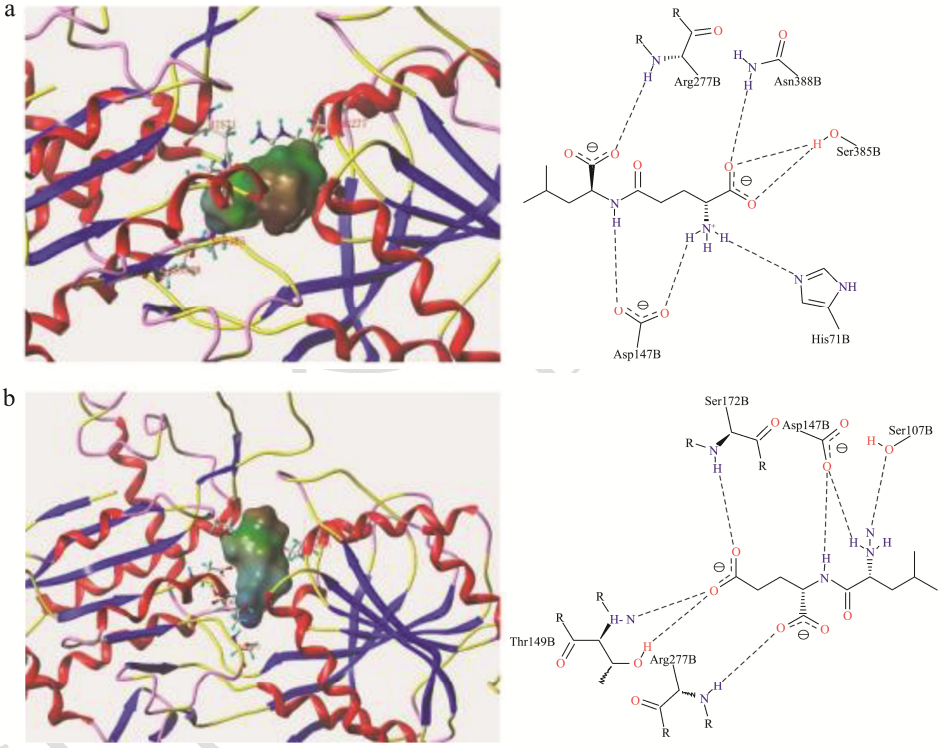


图 12 γ-Glu-Leu(a)、Leu-Glu(b)与 T1R1 受体结合模式图

Fig.12 Binding pattern of γ-Glu-Leu (a), Leu-Glu (b) to T1R1 receptor

3 结论

本研究以感官评价为基础，利用同源建模、分子对接技术研究 Pro、Glu 二肽与鲜味受体 T1R1、T1R3 和 CaSR 的构效关系。结果表明：除 Pro-Ser、Val-Pro 和 Leu-Glu 不呈鲜，其余二肽的呈鲜阈值均低于谷氨酸钠阈值，γ-Glu-Met、Gly-Glu、Ser-Pro、Ala-Pro、Pro-Ala 和 Pro-Val 等具有较强鲜味。二肽与 T1R1 的关键结合位点为 Asp147、Thr149、Ser172 和 Arg277，T1R1 是 Glu 二肽呈鲜的重要受体；与 T1R3 的关键结合位点为 Glu45、Ser147、Val277 和 His278，Ser147 是 N-γ-Glu 二肽与 T1R3 受体的关键结合位点；与 CaSR 的关键结合位点为 Leu173、Asn176、Gln179、Arg220、Ser244 和 Asp275，Glu 二肽比 Pro 二肽更易与 CaSR 受体结合。二肽与受体之间主要通过氢键与疏水相互作用结合，呈味较强的二肽在对接时多嵌于受体结合口袋的深处，或与受体间形成多个氢键及疏水接触；呈味较弱的二肽有的位于结合口袋较浅的位置，有的肽疏水区或亲水区暴露于受体表面，配体与受体结合不稳定或易与溶剂水发生相互作用影响结合稳定性。本研究明晰了 Pro、Glu 二肽呈鲜的构效关系，有助于阐明二肽与 T1R1、T1R3 和 CaSR 鲜味受体分

子相互作用机制，为鲜味肽呈鲜机理的研究提供了理论依据。

参考文献

[1] Wang W, Zhou X, Liu Y. Characterization and evaluation of umami taste: A review [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2020, 127: 115876.

[2] 郇思琪,刘登勇,王笑丹,等.食品中呈鲜味物质研究进展[J].食品工业科技,2020,41(21):333-339.

[3] Kim M, Son H, 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.

[4] 韩富亮,郭安鹊,王华,等.食源性鲜味肽和浓厚感肽的研究进展[J].食品科学,2015,36(23):314-320.

[5] Yamasaki Y, Maekawa K. A peptide with delicious taste [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1978, 42(9): 1761-1765.

[6] 莫加利,陈季旺,刘静泊,等.风干武昌鱼中鲜味肽的分离纯化及二级结构分析[J].食品科学,2019,40(14):23-28.

[7] 丁奇.鸡汤及鸡肉酶解液中鲜味成分的测定与对比分析[D].北京:北京工商大学,2017.

[8] 李平,张志,周辉,等.干腌火腿中肽的形成机理研究进展[J].食品与发酵工业,2022,48(4):294-300.

[9] 李晓明,黄占旺,徐明生,等.白玉菇中鲜味肽的分离鉴定及呈味特性分析[J].食品科学,2021,42(24):252-260.

[10] Nelson G, Chandrashekar J, Hoon M A, et al. An amino-acid taste receptor [J]. Nature, 2002, 416(6877): 199-202.

[11] Choudhuri S P, Delay R J, Delay E R. Metabotropic glutamate receptors are involved in the detection of IMP and L-amino acids by mouse taste sensory cells [J]. Neuroscience, 2016, 316: 94-108.

[12] 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.

[13] Wellendorph P, Bräuner-osborne H. Molecular cloning, expression, and sequence analysis of GPRC6A, a novel family C G-protein-coupled receptor [J]. Gene, 2004, 335: 37-46.

[14] 赵孟斌,张琦梦,宋明月,等.味觉感知的人体肠-脑轴信号传导机制研究进展[J].食品科学,2022,43(11):197-203.

[15] Yu Z, Kang L, Zhao W, et al. Identification of novel umami peptides from myosin via homology modeling and molecular docking [J]. Food Chemistry, 2021, 344: 128728.

[16] 古汶玉.鱼露鲜味肽呈味评价体系的构建研究[D].广州:华南农业大学,2019.

[17] 孙金玲.鱼露风味成分分析及其小肽的分离鉴定[D].广州:华南农业大学,2017.

[18] GB/T 16291.1-2012,感官分析选拔、培训与管理评价员一般导则第 1 部分:优选评价员[S].

[19] 丛艳君,易红,郑福平.基于电子舌技术不同超声处理时间的奶酪滋味区分[J].食品科学,2015,36(6):114-118.

[20] 王春叶,童华荣.滋味稀释分析及其在食品滋味活性成分分析中的应用[J].食品与发酵工业,2007,33(12):117-121.

[21] 李伟.小分子甜味剂与甜/苦味受体的相互作用以及甜度构效关系预测[D].无锡:江南大学,2019.

[22] Yoshio Y, Kazuyuki M. Synthesis of a peptide with delicious taste [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 2014, 44(1): 93-97.

[23] Zhang J, Zhao M, Su G, et al. Identification and taste characteristics of novel umami and umami-enhancing peptides separated from peanut protein isolate hydrolysate by consecutive chromatography and UPLC-ESI-QTOF-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2019, 278: 674-682.

[24] Guo D, He H, Hou T. Purification and characterization of positive allosteric regulatory peptides of calcium sensing receptor (CaSR) from desalted duck egg white [J]. Food Chemistry, 2020, 325: 126919.

[25] 祁麟.基于分子模拟技术的抗 CD47 抗体结构预测与人源化改造[D].北京:北京协和医学院,2020.

[26] 余霞琴.鲜味受体 T1R1/T1R3 的结构模拟及其与鲜味六肽作用研究[D].上海:上海海洋大学,2017.

[27] Dang Y, Gao X, Xie A, et al. Interaction between umami peptide and taste receptor T1R1/T1R3 [J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2014, 70(3): 1841-1848.

[28] Liu H, Da L T, Liu Y. Understanding the molecular mechanism of umami recognition by T1R1-T1R3 using molecular dynamics simulations [J]. BiochemBiophys Res Commun, 2019, 514(3): 967-973.

[29] Jiang X, Li S, Zhang H, et al. Discovery of potentially biased agonists of mu-opioid receptor (MOR) through molecular docking, pharmacophore modeling, and MD simulation [J]. Computational Biology and Chemistry, 2021, 90: 107405.

[30] 顾华蓉,张琦梦,穆洪涛,等.基于 STC-1 细胞味觉感知模型对鱼露脯氨酸二肽呈鲜特性的研究[J].食品工业科技,2021,42(24):1-7.

[31] Li X, Xie X, Wang J, et al. Identification, taste characteristics and molecular docking study of novel umami peptides derived from the aqueous extract of the clam *Meretrix*

meretrix Linnaeus [J]. Food Chemistry, 2020, 312: 126053.

[32] Masahiro, Tamura, Tohru, et al. The relationship between taste and primary structure of "delicious peptide" (Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala) from beef soup [J]. Agricultural & Biological Chemistry, 2014, 53(2): 319-325.

[33] Zhang F, Klebansky B, Fine R M, et al. Molecular mechanism for the umami taste synergism [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(52): 20930-20934.

[34] López Cascales J J, Oliveira Costa S D, De Groot B L, et al. Binding of glutamate to the umami receptor [J]. Biophysical Chemistry, 2010, 152(1-3): 139-144.

[35] Kaiser A, Müller P, Zellmann T, et al. Hydrophobic contacts specifically contribute to peptide binding at the neuropeptide Y2 receptor [J]. Neuropeptides, 2016, 55: 16.

[36] Wang Y, LiU M, Gao J. Enhanced receptor binding of SARS-CoV-2 through networks of hydrogen-bonding and hydrophobic interactions [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020, 117(25): 13967-13974.

[37] Dang Y, Hao L, Cao J, 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.

[38] Bu Y, Liu Y, Luan H, et al. Characterization and structure-activity relationship of novel umami peptides isolated from Thai fish sauce [J].Food & Function, 2021, 11(12): 5027-5037.

[39] 庄金达.四种牛肝菌特征风味物质和鲜味肽鉴定及其呈味机制研究[D].上海:上海应用技术大学,2021.

[40] 阮仕艳.罗非鱼下颌水提鲜味肽的呈味特性及其作用机制研究[D].昆明:昆明理工大学,2021.

现代食品科技