

乙醇对多肽AKRA呈酸味的影响及其机制

丛湘芸^{1,2}, 吴继红^{1,2*}, 孙颖^{1,2}, 黄明泉^{1,3}, 赵东瑞^{1,3}, 郑福平^{1,3}

(1. 中国轻工业酿酒分子工程重点实验室, 食品质量与安全北京实验室, 北京 100048)

(2. 北京工商大学轻工科学与工程学院, 北京 100048) (3. 北京工商大学食品与健康学院, 北京 100048)

摘要: Ala-Lys-Arg-Ala (AKRA) 是白酒中的一种非挥发性组分, 其呈味特性未有报道。该研究旨在探究 AKRA 在乙醇体系下的滋味特性及其受乙醇浓度影响的机制。结合人工感官评价和定量描述性分析 (QDA) 评估 AKRA 的滋味, 利用滋味稀释分析 (TDA) 测定其味觉阈值, 并运用密度泛函理论、分子对接与分子动力学模拟等方法探究 AKRA 的活性位点以及与酸味受体 PKD2L1 的相互作用。结果表明, AKRA 在水和不同体积分数乙醇水溶液 (38%、46%、54%) 中均表现酸味, 且味觉阈值随乙醇浓度升高而增加, 分别为 0.28、3.91、7.73、16.42 mg·mL⁻¹; PKD2L1 与 AKRA 的相互作用依赖于氢键、静电作用力, 关键作用位点有 SER264、SER30、SER257 等氨基酸残基; 尽管乙醇浓度的增加在理论上导致 PKD2L1 与 AKRA 结合自由能增加, 其绝对值从 25.620 kJ·mol⁻¹ 增加至 50.604 kJ·mol⁻¹, 但乙醇含量上升依然能够减弱实际情况下人们对 AKRA 酸味的感知。因此得出结论, AKRA 的酸味感知受到乙醇浓度的显著影响, 其与 PKD2L1 的相互作用机制涉及氢键和静电作用力, 乙醇浓度的上升减弱了人们对 AKRA 酸味的感知灵敏度。本研究将为酒类饮品的风味研究与调控提供新的视角。

关键词: 多肽; 乙醇; 酸味受体; 分子对接; 分子动力学模拟

文章编号: 1673-9078(2026)3-282-289

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.3.1941

Effect and Mechanism of Ethanol on the Sour Taste of AKRA, A Peptide Reported in Baijiu

CONG Xiangyun^{1,2}, WU Jihong^{1,2*}, SUN Ying^{1,2}, HUANG Mingquan^{1,3}, ZHAO Dongrui^{1,3}, ZHENG Fuping^{1,3}

(1.Key Laboratory of Brewing Molecular Engineering of China Light Industry, Beijing Laboratory of Food Quality and Safety, Beijing 100048, China)(2.School of Light Industry Science and Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)(3.School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Ala-Lys-Arg-Ala (AKRA) is a non-volatile component in Chinese Baijiu, however, its taste characteristics have not been previously reported. This study aimed to investigate the taste properties of AKRA in ethanol-water systems and how they are affected by ethanol concentrations. The taste of AKRA was assessed using a combination of sensory evaluation and quantitative descriptive analysis, and its taste thresholds determined via taste dilution analysis. Then, the active sites of AKRA and its interaction with the sour taste receptor, PKD2L1, were explored through density functional theory, molecular docking, and molecular dynamics simulations. Results indicated that AKRA exhibited a sour taste both in water and ethanol solutions of varying concentrations (38%, 46%, and 54%), with taste thresholds increasing as the ethanol concentration increased, which were 0.28, 3.91, 7.73, and 16.42 mg·mL⁻¹,

引文格式:

丛湘芸,吴继红,孙颖,等.乙醇对多肽AKRA呈酸味的影响及其机制[J].现代食品科技,2026,42(3):282-289.

CONG Xiangyun, WU Jihong, SUN Ying, et al. Effect and mechanism of ethanol on the sour taste of AKRA, a peptide reported in Baijiu [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(3):282-289.

收稿日期: 2024-12-27; 修回日期: 2025-02-21; 接受日期: 2025-02-27

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD2101205)

作者简介: 丛湘芸 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 白酒风味化学, E-mail: congxiangyun2022@163.com

通讯作者: 吴继红 (1988-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 酒类风味化学、酿酒副产物高值利用, E-mail: wujihong12@126.com

respectively. The interaction between PKD2L1 and AKRA was dependent on hydrogen bonding and electrostatic forces, in which the key interaction sites included specific amino acid residues, such as SER264, SER30, and SER257. Although the increase in ethanol concentration theoretically led to an increase in the binding free energy between PKD2L1 and AKRA, with the absolute value rising from $-25.620 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ to $-50.604 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, the actual perception of the sour taste of AKRA decreased. Therefore, perception of the sour taste from AKRA was significantly affected by ethanol concentrations. Overall, the mechanism by which AKRA interacts with PKD2L1 involves hydrogen bonding and electrostatic forces, and an increase in ethanol concentration diminishes perception sensitivity to AKRA. This study provides a novel perspective for the study and modulation of flavor in alcoholic beverages.

Key words: peptides; ethanol; sour taste receptor; molecular docking; molecular dynamics simulation

多肽是白酒中一类微量且重要的非挥发性成分,目前,对白酒中多肽的研究主要集中于揭示其生物活性及其对白酒风味的影响等方面^[1,2]。呈味肽可通过与其它风味成分形成复合味感以赋予食品特殊的风味,能够增进、改善或掩盖食品感官特性^[3]。酸味是氨基酸残基电离出的氢离子与味觉细胞相互作用形成刺激,而呈现出的一种味觉感受^[4]。PKD2L1 和 PKD1L3 是酸味受体,存在于感知酸味物质的味觉受体细胞中^[5]。迄今为止,关于食品中酸味肽的报道不多,白酒中酸味肽的研究更少。

乙醇是白酒中的主要成分之一,其含量通常在 32% 至 70% 之间^[6]。乙醇对酒的风味乃至滋味都有至关重要的影响。有研究表明,乙醇能够通过与其它成分的相互作用而产生苦味^[7];较高的乙醇浓度会增加苦味以及甜味的感知,而减少酸味的感知^[8,9]。此外,乙醇浓度越高,人类对粘度和密度感知就会越强,热、灼烧、刺痛以及类似“天鹅绒质感”的口腔包裹感也会越明显^[9]。然而,多肽对白酒口感的影响鲜有研究,乙醇如何调控白酒中多肽的味觉特性及其潜在机制更是未见报道。

本研究致力于剖析 AKRA 的呈味特征,并探究乙醇在这一滋味展现过程中的影响及机制。首先,借助人工感官评估手段,探究 AKRA 在水溶液和含有不同浓度乙醇的水溶液中的滋味阈值;进而,基于密度泛函理论,探究 AKRA 的活性中心,通过分子对接技术直观展示 AKRA 与酸味受体(PKD2L1)之间的相互作用模式及其结合位点;最后,借助分子动力学模拟技术,探讨在不同乙醇含量的水溶液条件下,复合物间的相互作用力的稳定性及结合能的变化。这一系列研究成果将为探索酒精性饮料的风味、滋味提供新的视角,为未来酒类质量调控与创新的深入研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与耗材

多肽 AKRA 标准品(分子量: 444.52 Da、纯度: 96.78%),食品级,由上海科肽生物科技有限公司合成;

无水柠檬酸,食品级,购于莲花健康产业集团有限公司;蔗糖,食品级,购于南京甘汁园股份有限公司;奎宁,食品级,购于陕西海益斯生物科技有限公司。氯化钠,食品级,购于中盐上海市盐业有限公司;谷氨酸钠,食品级,购于莲花健康产业集团有限公司;无水乙醇,食品级,购于河南汉永酒精有限公司。

试饮杯,购于厦门钰得沣塑胶有限公司;Eppendorf Research®plus 2 mL 一次性塑料吸管及移液枪,德国艾本德股份公司;MX-S 赛洛捷克旋涡混合器,购于北京凯诺春天生物科技有限公司;LAL1T 酒精浓度计,购于广州市速为电子科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 AKRA的溶解度和毒性预测

使用 innovagen [<http://www.innovagen.com/>](2024 年 6 月 26 日访问)] 网站预测 AKRA 的溶解度,用 ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html> (2024 年 6 月 26 日访问)) 预测其毒性。

1.2.2 溶液配制及感官评价

该研究相关的培训与后续感官评价实验均已通过北京工商大学科学研究伦理委员会的审批(伦审 2024 年第 242 号)。感官评价成员来自北京工商大学酿酒工程团队,由 15 人组成,其中男性 7 人、女性 8 人,年龄 22~30 岁,身体素质良好,实验前 3 个月内无吸烟等影响感官评价的行为。

配制如表 1 所示的标准味觉化合物的水溶液^[10]作为参比溶液,参考 GB/T 6291.1-2012 中的方法,对小组成员进行五个基本味道(酸味、甜味、苦味、咸味和鲜味)的感官培训,最终筛选出前 10 名培训效果较好的人员作为本实验的感官评价小组成员。

配制质量浓度为 $1.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 AKRA 水溶液作为待评定的样品溶液,取该溶液 2~3 mL 置于口中 10 s 进行品尝,吐出后用纯净水漱口,之后立即取参比液 2~3 mL 置于口中 10 s 进行品尝。之后,对 AKRA 水溶液的滋味以及强度进行打分。

表 1 参比溶液的滋味评价标准		
Table 1 Taste evaluation criteria for reference solution		
滋味描述	参比标准物质	不同质量浓度 (g·L ⁻¹) 对应的 不同评分标准 (由高到低分别为 9、5、1 分)
酸味	无水柠檬酸	8.00、4.50、1.00
甜味	蔗糖	6.00、3.75、1.50
苦味	奎宁	1.40 × 10 ⁻² 、7.70 × 10 ⁻³ 、1.40 × 10 ⁻³
咸味	氯化钠	10.00、5.50、1.00
鲜味	谷氨酸钠	20.00、10.00、0.20

1.2.3 采用滋味稀释分析法 (TDA) 测定 AKRA 的味觉阈值

根据相关报道,采用 TDA 法对 AKRA 在不同乙醇水溶液体系下的滋味阈值进行测定^[11]。将经固相合成的 AKRA 标准品分别溶解于超纯水 (使其最终质量浓度为 1.00 mg·mL⁻¹) 与不同体积分数的乙醇水溶液 (38%、46%、54%, V/V) 中 (使其最终质量浓度为 32.00 mg·mL⁻¹)。再用水溶液或不同浓度的乙醇水溶液以 1:1 的比例逐步稀释上述标准品母液以制备不同质量浓度的 AKRA 待测样品,并进行随机编号。感官评价小组成员采用三杯法 (3-AFC) 从每组随机编号的样品中 (包含 1 个含 AKRA 的样品和 2 个空白对照样品) 选出滋味不同的一杯,并记录其编号。

1.2.4 密度泛函理论确定 AKRA 的潜在活性位点

使用 GaussView 5.0 可视化肽的 3D 结构,使用 Gaussian 09 程序进行计算活性位点。分别在 B3LYP/6-311G (d,p), scrf=(solvent=water) 和 B3LYP/6-311G (d,p), scrf=(solvent=ethanol) 条件下对 AKRA 进行优化^[12,13],计算了最高占用分子轨道 (HOMO) 和最低未占用分子轨道 (LUMO)^[14],并用 Multiwfn 和 VMD 可视化最终结果。

1.2.5 分子对接技术探究 AKRA 与酸味受体之间的交互作用

利用 Discovery Studio (DS) 2019 软件,将 AKRA 与酸味受体 (PKD2L1, 其对应的模板为 UniPort ID: Q9P0L9) 进行分子对接。首先,利用 ChemDraw 20.0 软件画出多肽的二维结构,利用 Discovery Studio 软件的 Prepare Ligands 对 AKRA 的二维结构进行进一步的处理,并获得 AKRA 的三维结构。其次,导入酸味受体,对受体进行去水、去配体以及加氢等的处理,并利用软件中的 From Receptor Cavities 寻找活性口袋。最后,使用 Dock Ligands (LibDock) 进行 AKRA 和酸味受体的分子对接,并对对接结果进行打分^[15,16]。

1.2.6 分子动力学模拟酸味受体与 AKRA 复合物的稳定性

利用分子动力学模拟对 AKRA 与酸味受体复合物在水、38%、46% 及 54% (V/V) 乙醇水溶液中的稳定性进行了进一步的研究。首先,将通过分子对接得到的 AKRA-Q9P0L9 复合物进行前处理,通过 PyMOL 软件,将受体与配体分开并分别保存为 pdb 格式和 mol2 格式。之后,用虚拟机处理小分子肽的 mol2 格式文件,并获得 .itp 格式和 .gro 格式文件。最后,利用 Gromacs 软件在恒温常压和周期性边界条件下进行动力学模拟。

该模拟系统采用了 AMBER99SB-ILDN 力场和 TIP3P 水模型,建立拓扑文件,构建了立方盒。如果为乙醇水体系,则需在立方盒中添加一定数量的乙醇分子。为了保持模拟体系的电荷平衡,在模拟盒中加入 NaCl,通过 Na⁺ 和 Cl⁻ 离子维持模拟体系的电荷平衡。在进行动力学模拟之前,对模拟系统进行能量最小化,以消除原子间过于紧密的接触。采用了最速下降法 (速度快但不收敛的方法) 进行 50 000 步长的计算来实现能量最小化。能量最小化后,进行 NVT 控温 (300 K, 2 fs) 和 NPT 控压 (0.1 MPa, 2 fs) 100 ps 的平衡模拟。最后,进行复合物 50 000 ps 的分子动力学模拟 (300 K, 2 fs; 0.1 MPa, 2 fs)^[17]。

1.2.7 酸味受体与 AKRA 复合物的结合自由能的计算

分子力学 / 泊松 - 波尔兹曼 (广义波恩) 表面积 (MM-PBSA) 是一种两点式自由结合能计算的方法,该方法对体系结合前的和结合后的构象进行采样而无需对过渡状态进行采样,因此,该方法简单、可靠、省时,是计算相互作用能最广泛的方法之一^[18]。熵对结合能的贡献和构象的波动也体现在 MM-PBSA 方法中,受体与配体的结合自由能 ΔG_{bind} 的计算公式如 (1) 所示^[19,20]。

$$\Delta G_{bind} = E_{MM} + \Delta G_{sol} - T\Delta S$$
 (1)

式中:

E_{MM} ——真空中的平均分子机械势能;

ΔG_{sol} ——溶剂化的自由能;

$T\Delta S$ ——指真空中自由能的熵贡献。

可用公式 (2), 并根据 MM 力场参数进行 ΔG_{gas} 的计算^[19,20]。

$$E_{MM} = E_{bonded} + E_{nonbonded} = E_{bonded} + (E_{elec} + E_{vdw})$$
 (2)

式中:

E_{bonded} ——键合相互作用;

$E_{nonbonded}$ ——非键合相互作用 (非键合相互作用主要包括了静电相互作用和范德华力);

E_{elec} ——静电相互作用;
 E_{vdw} ——范德华力。

溶剂化自由能是将溶质从真空转移到溶剂的能量,可以通过密度泛函法^[21]和积分方程理论进行计算。在MM-PBSA方法中,可根据如下公式(3)进行溶剂化自由能的计算。

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{PB} + \Delta G_{nP}$$

式中:

ΔG_{PB} ——极性溶剂化能;

ΔG_{nP} ——非极性溶剂化能。

1.3 数据分析

本研究所使用的预测活性位点软件为 Gaussian 09 (Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA), 分子对接软件为 Discovery Studio 2019 (Dassault Systèmes Biovia, San Diego, CA, USA), 分子动力学模拟软件为 Gromacs 2019.6 (Department of Biophysical Chemistry, University of Groningen, Groningen, The Netherlands)。所有数据和分析都是对3次平行实验进行的,实验数据采用 SPSS 25 (Inc., Chicago, IL, USA) 进行单因素方差分析 (ANONA), 数据表示为3次的平均值 ± 标准差。数据由 Origin 2021 (Origin Lab Corp., Northampton, MA, USA) 处理及绘制。 $P < 0.05$ 确定为具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 AKRA的滋味特性及强度打分

根据感官评价小组成员的细致品评结果,绘制了AKRA的滋味轮廓雷达图,如图1所示,可以得知,AKRA具有明显的酸味特征,打分为8.8;相比酸味而言,其它几种滋味属性打分值较低,例如甜味、苦味、咸味、鲜味等的平均分分别为3.2、2.6、1.5、1.0。因此,可以判定AKRA的主导滋味是酸味,即AKRA是一种酸味肽。

2.2 AKRA在不同溶剂体系下的味觉阈值

根据感官评价结果,通过统计学分析和曲线拟合的方式确定了不同体系下AKRA的味觉阈值。如图2所示,X轴表示AKRA质量浓度的以10为底的对数值($\lg \rho$),而Y轴表示品评小组成员能够正确识别异常样品的概率(p),当 $Y=66.67\%$ 时,计算得到的质量浓度值即为相应的味觉阈值^[22]。

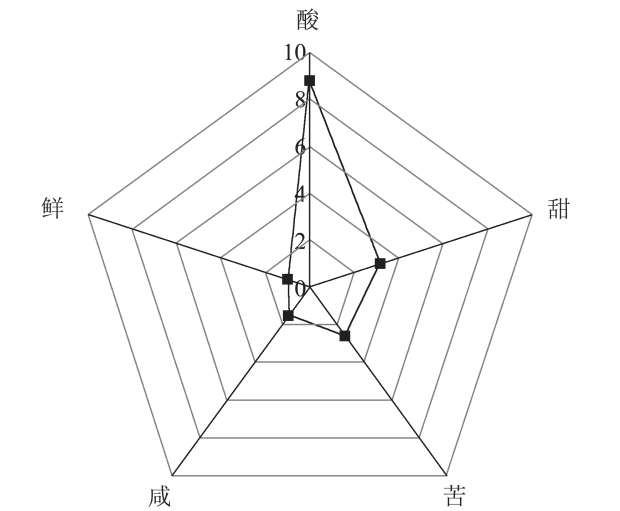
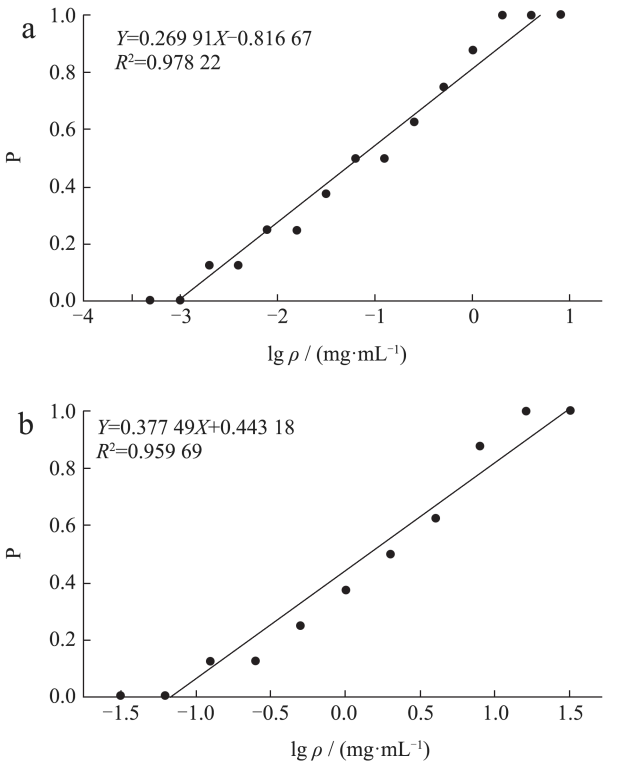


图 1 AKRA 的滋味雷达图

Fig.1 The taste radar chart of AKRA

AKRA 味觉阈值测定的曲线拟合图如图 2 所示,经计算,AKRA 在水以及 38%、46%、54% (V/V) 乙醇水溶液中的阈值分别为 0.28、3.91、7.73 及 16.42 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。随着乙醇含量的增加,人们对 AKRA 的感知变弱,阈值明显增高,推测可能是较高浓度的乙醇对 AKRA 与受体之间的结合作用产生了不利影响,亦或是高浓度乙醇干扰了人们的味觉灵敏度,具体原因值得后续深入探究。



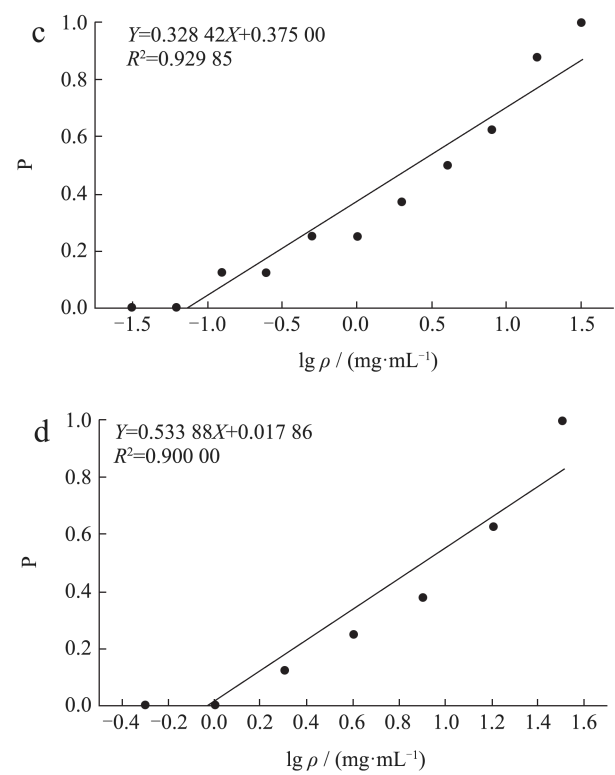


图 2 AKRA 味觉阈值测定的曲线拟合图

Fig.2 The curve fitting (CF) of taste detection thresholds of AKRA

注：a~d 分别为水、38%、46%、54% (V/V) 乙醇水溶液中的 CF 曲线。

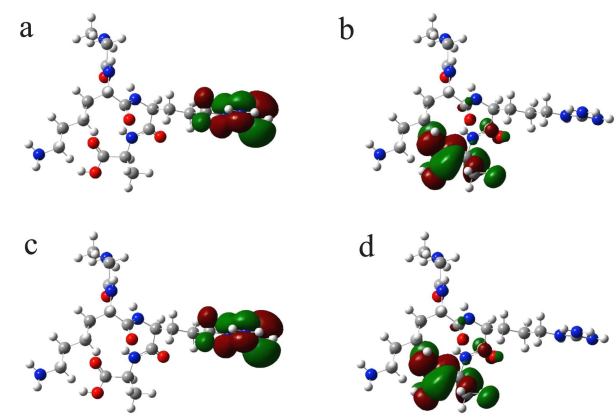


图 3 AKRA 的活性位点

Fig.3 The active sites of AKRA

注：活性位点为红色，轨道波函数的正负相分别以酒红色和墨绿色表示。a、b 分别为 AKRA 在水中的 HOMO、LUMO 轨道，c、d 分别为 AKRA 在乙醇中的 HOMO、LUMO 轨道。

2.3 密度泛函理论探究AKRA的潜在活性位点

由图 3 可知，乙醇并不会改变 AKRA 的活性位点及前线轨道的分布。最高占据分子轨道（HOMO）和最低未占据分子轨道（LUMO）分别指的是倾向于提供和接受电子的区域^[23]。由此可知，AKRA 中精氨酸

（Arg）是主要作用位点之一，其位于最高占据分子轨道（HOMO），电子很容易溢出。AKRA 中连接 Arg 的丙氨酸（Ala）也是主要作用位点之一，其位于最低未占据分子轨道（LUMO）。

2.4 酸味受体与AKRA之间的模拟对接

本研究选用的酸味受体为 PKD2L1，其对应的模板为 Q9P0L9。该模板于 UniPort [https://www.uniprot.org/(2024 年 6 月 26 日访问)] 网站获得，并用拉氏图对模型进行质量评估，如图 4 所示。由图 4 可看出模型中落在允许区和最大允许区的氨基酸残基占整个蛋白质的比例约为 98.5%。因此，该模型的构象具有合理性，构象符合立体化学规则，可用作分子对接及后续研究。

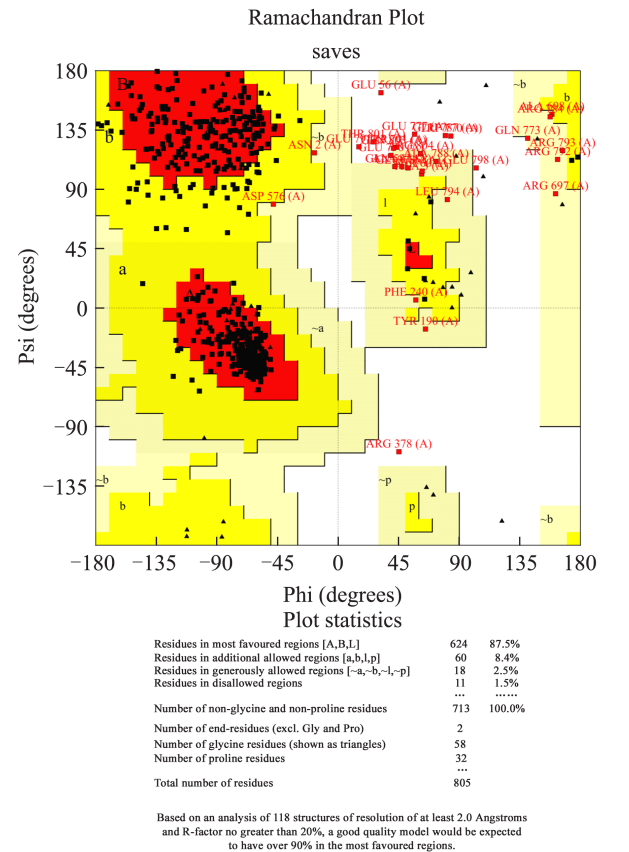


图 4 酸味受体 PKD2L1 同源建模模型 Q9P0L9 的拉氏图

Fig.4 The Ramachandran plot of the homology modeling for the sour taste receptor Q9P0L9

图 5a 和 5b 分别为 AKRA 与酸味受体 PKD2L1 结合的二维和三维图，由图可知，二者之间的相互作用主要包括：氢键和静电相互作用。作用位点主要包括：SER264、SER30、SER257、GLN335、GLY33、GLU429、ARG319、ARG337。其中，AKRA 中的 Arg 为主要的活性位点。

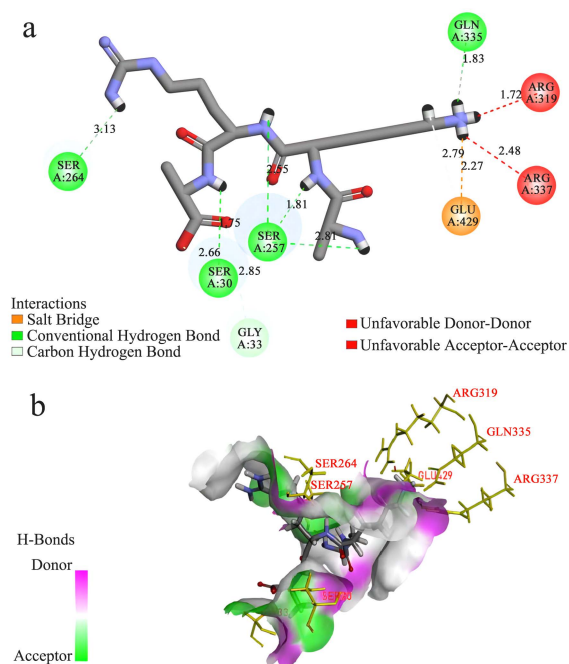


图5 酸味受体与 AKRA 结合的二维 (a)、三维 (b) 示意图

Fig.5 2D (a) and 3D (b) diagrams illustrating the molecular docking interactions between AKRA and the sour taste receptor

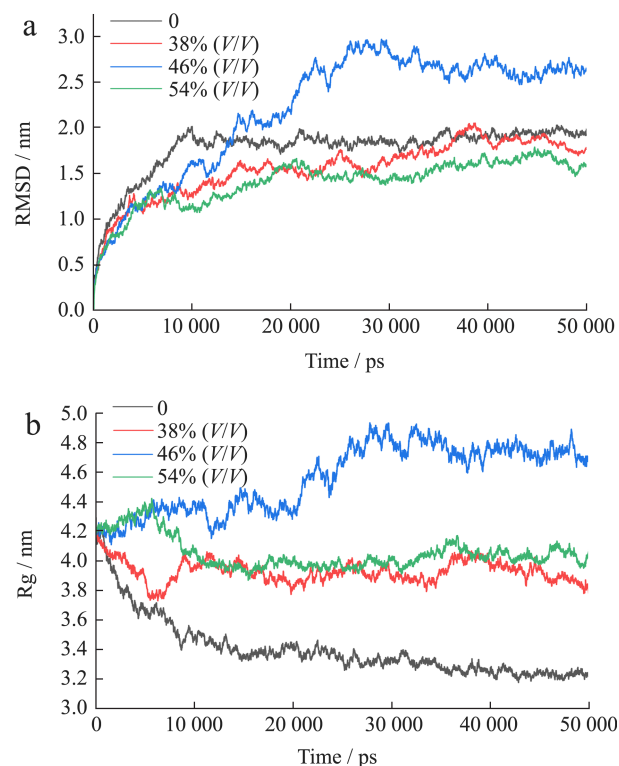
2.5 分子动力学模拟

分子动力学模拟 (MD) 是一种用于模拟蛋白质构象动力学以及研究扩展时间尺度和更复杂现象的强大方法。Wang 等^[18]用该方法探究了 Sotolone 对映异构体激活人类嗅觉受体 OR8D1 的分子机制,并得出 (S)-sotolone 与 OR8D1 可以形成更稳定的构型。同样,本研究以均方根偏差 (RMSD)、回旋半径 (Rg)、均方根波动 (RMSF) 等指标,从不同角度解释了在不同梯度乙醇水溶液中酸味受体的稳定性。研究表明,在 38% 和 54% (V/V) 乙醇水体系中酸味受体的稳定性均较高,而在 46% (V/V) 乙醇水体系中受体的稳定性差。具体分析如下:

均方根偏差 (RMSD) 分析可以揭示蛋白质在模拟过程中的构象与初始构象之间的位置变化, RMSD 值越大,表明目标分子偏离参考分子的程度越大、越不稳定^[24]。由图 6a 可知,在乙醇存在的情况下,酸味受体的稳定性大小顺序为: 54% > 38% > 46% (V/V), 该受体在 54% (V/V) 的最稳定,在 46% (V/V) 最不稳定。回旋半径 (Rg) 可以表征蛋白质结构的紧实度,同样也可以依靠回旋半径来表征模拟过程中蛋白质的肽链松散程度的变化,在整个分子动力学模拟的过程中,波动程度越低且越一致,系统的刚度和紧凑性就越高,蛋白质的结构越稳定^[25]。由图 6b 可知,酸味受体蛋白在 38% 和 54% (V/V) 乙醇水体系中稳定后,从开始到结束的过程中 Rg 值并没有明显的波动, Rg

值分别在 3.8~4.1 nm 和 3.9~4.1 nm 范围内,而在 46% (V/V) 乙醇水中复合物的 Rg 值出现了明显的波动 (4.2~5.0 nm),说明受体蛋白的结构稳定性差。此外,受体中的单个氨基酸残基对复合物的稳定性起着至关重要的作用,氨基酸残基的波动可以通过均方根波动 (RMSF) 参数来判断,该参数解释了每个氨基酸随时间平均偏离参考位置的情况, RMSF 值较小通常表明分子体系结构较为稳定,而 RMSF 值较大则表示分子体系结构波动性较大^[26]。由图 6c 可知,在 38% 和 54% (V/V) 乙醇水体系中氨基酸的 RMSF 值较在 46% (V/V) 乙醇水体系中的波动较小。此外,从残基 ARG600 到 GLY700, RMSF 在不同体系下的差异尤为显著。

受体的稳定性是评估受体-配体复合物的一个重要方面,但它并不直接等同于受体和配体之间的结合力。在分子对接模拟的过程中,配体会与蛋白质形成一定数量的氢键,即 AKRA 可与酸味受体之间形成氢键。本研究利用 GROMACS 判断体系中的氢键数量^[27]。由图 6d 可知,在 38% 和 46% (V/V) 乙醇水体系中的平均氢键数量分别为 0.668、0.524,而在 54% (V/V) 乙醇水体系中氢键数量少,几乎很难检测到。氢键数量多,复合物之间的结合力往往较强,反之则弱,高的结合力意味着受体与配体之间的结合更为紧密,这通常会导致更强的信号传导和更明显的气味感知。因此, AKRA 在 54% (V/V) 乙醇水体系中阈值最高、感知最弱,这也与人工感官评价的结果相符。



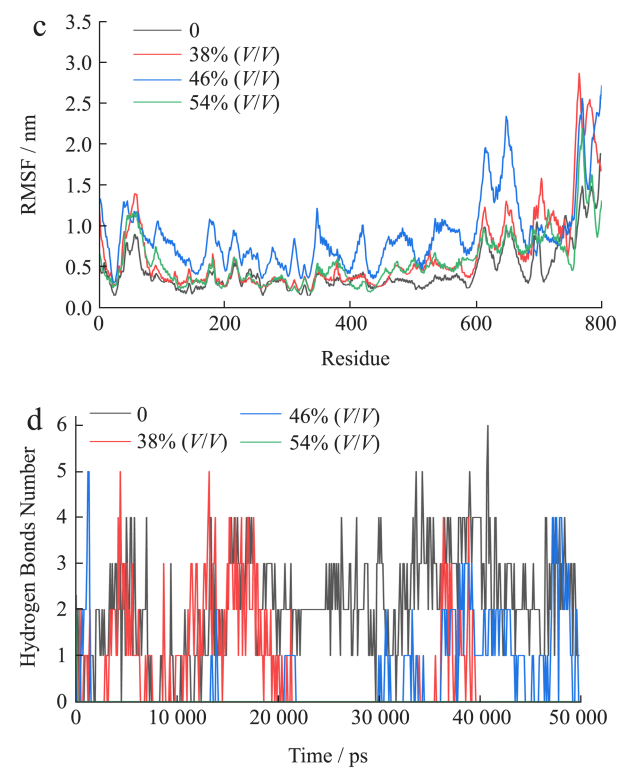


图 6 酸味受体与 AKRA 分子动力学模拟结果

Fig.6 Molecular dynamic simulation results between the sour taste receptor and AKRA

注: (a) RMSD; (b) Rg; (c) RMSF; (d) 氢键数量。

2.6 酸味受体与AKRA的结合自由能计算结果

结合自由能 (ΔG_{bind}) 是描述受体与配体结合过程的热力学量, 它直接反映了结合过程的自发性和结合强度, ΔG_{bind} 的值为负, 说明该结合是自发的, 数值越负, 表示结合越稳定, 亲和力越强^[28,29]。为了进一步分析在不同乙醇水体系下酸味受体 PKD2L1 与 AKRA 的相互作用强度, 采用 MM-PBSA 的方法计算了它们在不同体系下的 ΔG_{bind} 。

由表 2 可知, 在不同体系下, 酸味受体 PKD2L1 与 AKRA 结合的 ΔG_{bind} 的数值均为负数, ΔG_{bind} 在水溶液中的绝对值最大 (为 66.584 kJ·mol⁻¹), 说明在水溶液中 PKD2L1 与 AKRA 的结合自由能最大, 最容易被感知, 因此阈值最低。而在 38%、46%、54% (V/V) 乙醇水溶液体系中 ΔG_{bind} 的绝对值逐渐增加, 从 25.620 kJ·mol⁻¹ 增加至 50.604 kJ·mol⁻¹, 说明 PKD2L1 与 AKRA 的结合自由能随着乙醇浓度的增加而增强, 即乙醇浓度的增加有利于人们对 AKRA 的酸味感知, 但是这与前述的感官评价实验的结果相悖。推测导致这一现象的原因可能是: (1) 分子动力学模拟实验在预测时存在一些需要解决或者优化的情况, 如评估和

校准力场参数、调整模拟条件以更接近实验环境、延长模拟时间尺度以捕捉更多动态过程, 以及改进溶剂化模型和结合亲和力预测方法等, 此外, 还应结合多种模型的优势, 通过集成学习方法来提高预测的准确性; (2) 较高浓度的乙醇会降低人们对酸味的感知^[8], 但是, 引起该现象的具体原因还有待进一步探索。

表 2 不同体系下AKRA与酸味受体的结合自由能

Table 2 Binding energy of AKRA and the sour taste receptors under different systems

指标 *	水 ^a	38% (V/V) 乙醇水 ^a	46% (V/V) 乙醇水 ^a	54% (V/V) 乙醇水 ^a
E_{elec}	-2.415	-15.473	-1.590	-28.921
E_{vdw}	-97.349	-43.924	-70.218	-80.423
ΔG_{PB}	50.488	43.972	57.076	75.581
ΔG_{nP}	-17.307	-10.194	-15.439	-16.841
E_{MM}	-99.765	-59.398	-71.809	-109.344
ΔG_{sol}	33.181	33.778	41.637	58.740
ΔG_{bind}	-66.584	-25.620	-30.171	-50.604

注: * 该列中 E_{elec} 是静电相互作用, E_{vdw} 是范德华力, ΔG_{PB} 为极性溶剂化能, ΔG_{nP} 为非极性溶剂化能, E_{MM} 为真空中的平均分子机械势能, ΔG_{sol} 是溶剂化的自由能, ΔG_{bind} 为受体与配体的结合自由能; a 表示该列中数值的单位为 kJ·mol⁻¹。

3 结论

本研究运用人工感官评价及定量描述性分析 (QDA) 确认 AKRA 的主导滋味为酸味, 并通过滋味稀释分析 (TDA) 测定了 AKRA 在水溶液以及不同浓度的乙醇水溶液中的味觉感知阈值, 分别是: 在纯水中为 0.28 mg·mL⁻¹, 在 38%、46%、54% (V/V) 乙醇水溶液中分别为 3.91、7.73、16.42 mg·mL⁻¹, 由此可见, 乙醇含量上升减弱了人们对 AKRA 酸味的感知灵敏度。

进一步地, 本研究还深入探讨了 AKRA 的活性位点及其与酸味受体 PKD2L1 之间的相互作用及机制, 发现主要相互作用主要包括氢键、静电作用力; 关键作用位点有 SER264、SER30、SER257、GLN335、GLY33、GLU429、ARG319、ARG337; AKRA 中的 Arg 为主要的活性位点; AKRA 与 PKD2L1 二者之间的结合自由能在理论计算上随着乙醇的增加而增强, ΔG_{bind} 的绝对值 25.620 kJ·mol⁻¹ 增加至 50.604 kJ·mol⁻¹, 而这一结果与感官评价结果相悖, 推测可能是由于较高浓度的乙醇在实际中减弱了人们对于酸味的感知, 亦或是分子动力学模拟实验无法完全模拟真实的人工感官体验而导致, 因此, 引起该现象的具体原因还有待进一步探索。

参考文献

- [1] WEI J, MA R T. Cross-modal interactions caused by nonvolatile compounds derived from fermentation, distillation and aging to harmonize flavor [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024, 64(19): 6686-6713.
- [2] LI Y, YUAN S Q, YONG X H, et al. Research progress on small peptides in Chinese Baijiu [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 72(9): 104081.
- [3] 刘希,侯莎.呈味肽的分类及呈味效果定量评价方法综述[J].*食品安全导刊*,2022,31:141-145.
- [4] 姜莉莉,李杏元.呈味肽应用于食品的研究进展[J].*中国调味品*,2019,44(11):187-189.
- [5] 朱晓利,谭支良.哺乳动物消化道味觉受体和味觉感应研究进展[J].*动物营养学报*,2016,28(12):3721-3728.
- [6] LIU H L, SUN B G. Effect of fermentation processing on the flavor of Baijiu [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(22): 5425-5432.
- [7] BLANDINE N C, DENIS D, AXEL M. Influence of ethanol content on sweetness and bitterness perception in dry wines [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 87: 61-66.
- [8] MARIA C Z, MARIA C G, MARA V G. Sourness-sweetness interactions in different media: white wine, ethanol and water [J]. *Journal of Sensory Studies*, 2006, 21(6): 601-611.
- [9] VASILISA D, GOERAN H. Oral sensation of ethanol in a primate model III: responses in the lingual branch of the trigeminal nerve of *Macaca mulatta* [J]. *Alcohol*, 2002, 26(1): 3-16.
- [10] SHAN Y M, PU D D, ZHANG J C, et al. Decoding of the saltiness enhancement taste peptides from the yeast extract and molecular docking to the taste receptor T1R1/T1R3 [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(47): 14898-14906.
- [11] 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*,2007,12:117-121.
- [12] 黄张君,张文华,曾运航,等.白酒贮存过程中主要成分间氢键相互作用的量子化学计算[J].*食品科学*,2021,42(12):45-51.
- [13] JIA W, DU A, FAN Z B, et al. Effects of short-chain peptides on the flavor profile of Baijiu by the density functional theory: peptidomics, sensomics, flavor reconstitution, and sensory evaluation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(30): 9547-9556.
- [14] CHANG R, ZHOU Z L, DONG Y, et al. Sensory-guided isolation, identification, and active site calculation of novel umami peptides from ethanol precipitation fractions of fermented grain wine (Huangjiu) [J]. *Foods*, 2023, 12(18): 14.
- [15] 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.
- [16] 曾巧辉,郭槟勇,高立芳,等.计算机模拟拟豆源多肽与DPP-IV和SARS-CoV-2 Mpro的相互作用[J].*现代食品科技*,2023,39(6): 142-153.
- [17] JAMES A M, CARMENZA M, KOUSHIK K, et al. ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB [J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2015, 11(8): 3696-3713.
- [18] WANG J, WANG D Q, HUANG M Q, et al. Decoding molecular mechanism underlying human olfactory receptor OR8D1 activation by sotolone enantiomers [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(10): 5403-5415.
- [19] RASHMI K, RAJENDRA K, ANDREW L. G_mmpbsa-A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations [J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2014, 54(7): 1951-1962.
- [20] MARIO S V-T, MARIO E V-T, PEDRO A V, et al. Gmx_MMPBSA: a new tool to perform end-state free energy calculations with GROMACS [J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2021, 17(10): 6281-6291.
- [21] KRESTEN L-L, STEFANO P, KIM P, et al. Improved side-chain torsion potentials for the amber ff99SB protein force field [J]. *Proteins-structure Function and Bioinformatics*, 2010, 78(8): 1950-1958.
- [22] WU J H, ZHENG Y, SUN B G, et al. The occurrence of propyl lactate in Chinese Baijiu (Chinese Liquors) detected by direct injection coupled with gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2015, 20(10): 19002-19013.
- [23] DEBDUTTA C, PRATIM C K. Conceptual density functional theory based electronic structure principles [J]. *Chemical Science*, 2021, 12(18): 6264-6279.
- [24] JIA R, YANG Y, LIAO G Z, et al. Flavor characteristics of umami peptides from wuding chicken revealed by molecular dynamics simulation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(7): 3673-3682.
- [25] YU H X, ZHAO S, YI J J, et al. Identification of novel umami peptides in *termitomyces albuminosus* (Berk) heim soup by in silico analyses combined with sensory evaluation: discovering potential mechanism of umami taste formation with molecular perspective [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(45): 17243-17252.
- [26] BARRY H, ANTHONY N. Classical electrostatics in biology and chemistry [J]. *Science (New York, N.Y.)*, 1995, 268(5214): 1144-1149.
- [27] CHEN X, DUAN D H, ZHU S Y, et al. Molecular dynamics simulation of temperature induced unfolding of animal prion protein [J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2013, 19(10): 4433-4441.
- [28] ISMAHENE B K, MOHAMED B, NESRINE M, et al. Statistical physics modeling and interpretation of the adsorption of enantiomeric terpenes onto the human olfactory receptor OR1A1 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 171: 428-434.
- [29] 陈胤熹,黎菁菁,罗佳伟,等.利用同源建模、分子模拟和分子对接技术分析家蚕中碳酸酐酶的结构和催化机制[J].*现代食品科技*,2022,38(1):159-164.