

通过计算方法预测甜菊糖苷的甜味和苦味

李 伟^{1,2}, 王海军², 夏咏梅^{*1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 通过计算模拟软件,对一系列甜菊糖苷与人体味觉受体间的相互作用进行了研究。建立了人体甜味受体(hT1R2,hT1R3)和苦味受体(hT2R4)的同源模型,通过 Ramachandran 图和其他质量参数来验证模型的可靠性。将味觉受体模型与天然甜菊糖苷分子进行对接,分析了对接过程中的能量变化和相互作用,发现对接结果与甜菊糖苷的甜味与苦味明显相关,可通过该计算方法来预测甜菊糖苷的风味。此外,味觉受体的空间位阻是导致甜菊糖苷 C-13 和 C-19 位上的葡萄糖基数量改变对其风味造成不同影响的主要原因。预测了数种改性甜菊糖苷的风味并挑选出可能的优质甜味剂。

关键词: 甜菊糖苷;甜味受体;苦味受体;同源建模;受体-配体相互作用

中图分类号:TP 302.7 文章编号:1673-1689(2020)04-0024-09 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.04.004

Prediction of Sweetness and Bitterness of the Steviol Glycosides by Computational Approach

LI Wei^{1,2}, WANG Haijun², XIA Yongmei^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This study investigated the interaction between a series of steviol glycosides (SG) and human taste receptors with computational simulation. Firstly, the homology models of human sweet taste receptors hT1R2/hT1R3 and bitter taste receptor hT2R4 were built. Ramachandran plot and several quality factors were used to check the model quality. Then molecule docking studies between taste receptors and a group of natural SG were performed. The interaction energy and patterns of the docking procession were analyzed. It was found that the docking results of SG were obviously correlated with their sweetness and bitterness. So the probable flavor of other SG could be predicted by the computational approach. In addition, the sweetness and bitterness of SG showed different trends with the change in amount of glucose residues at the C-13 and C-19 positions, which appeared to be caused by the unique structure of the taste receptors. Finally, the study predicted the flavor of several modified SG and subsequently suggested possible potent sweeteners.

Keywords: steviol glycosides, sweet taste receptor, bitter taste receptor, homology modeling, receptor-ligand interaction

收稿日期: 2018-10-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772017;31371837);食品科学与技术国家重点实验室自由探索项目(SKLF-ZZB-201808)。

* 通信作者: 夏咏梅(1965—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事化学工程与技术研究。E-mail: ymxia@jiangnan.edu.cn

甜菊糖苷(steviol glycoside),是甜叶菊的叶子中所含的二萜糖苷类物质。该类物质具有相同的骨架和不同的位于 C-13 和 C-19 位上的糖基,结构如图 1 所示。与传统的蔗糖和人造甜味剂不同,甜菊糖苷对人体更加安全,对人体健康的副作用更小^[1]。甜菊叶中含有质量分数 6%~10% 的斯替夫苷(Stevioside),2%~4% 的莱鲍迪苷 A (Rebaudioside A)和 1%~2% 的其他次要糖苷,它们具有各自独特的结构和风味,一些主要的天然甜菊糖苷的结构和甜度如表 1 所示。其中,Rebaudioside A 的甜度约为蔗糖的 350 倍,味感也最相适于蔗糖,有较高的应用价值。Stevioside 在 C-13 位置上比 Rebaudioside A 少一个葡萄糖残基,甜度为蔗糖的约 250 倍,虽然含量更高,但更强的后苦味降低了它的应用价值^[2]。Rebaudioside D 在 C-19 位上比 Rebaudioside A 多一个葡萄糖残基,甜度虽降至约 250 倍蔗糖,但后苦味也更弱,因此综合味感更好。由此可见甜菊糖苷上的糖基对其风味的重要影响^[3]。目前已发现 64 种甜菊糖苷,但大部分由于含量较低,缺乏相关甜味数据。此外为了改善甜菊糖苷的风味,研究人员

使用了许多生物或化学方法来修饰其结构^[4-7],但产品中多种物质混杂,难以彻底分离以验证不同组分的甜度^[8]。因此,如果能够建立一种准确且省时省力的方法来预测甜菊糖苷的甜味和苦味,那么将有助于指导新型甜菊糖苷的设计和改性,从而获得更优质的甜味剂。

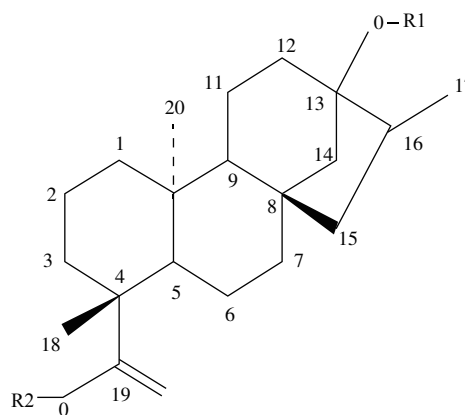


图 1 甜菊糖苷分子结构式

Fig. 1 Molecule structure of steviol glycosides

表 1 几种天然甜菊糖苷的结构及甜度

Table 1 Structure and sweetness of several natural steviol glycosides

甜菊糖苷	甜度 ^[9-10]	R1	R2
Rebaudioside A	350	Glc(β1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-	Glc(β1-
Dulcoside A	300	Rha(α1-2)Glc(β1-	Glc(β1-
Stevioside	250	Glc(β1-2)Glc(β1-	Glc(β1-
Rebaudioside D	250	Glc(β1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-	Glc(β1-2)Glc(β1-
Rebaudioside M	200	Glc(β1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-	Glc(β1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-
Rubusoside	200	Glc(β1-	Glc(β1-
Rebaudioside C	150	Rha(α1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-	Glc(β1-

在人体感知味觉的过程中,味觉受体起着关键作用。人体甜味受体(human sweet taste receptor, hSTR)是由两个亚基 hT1R2 和 hT1R3 组成的异二聚体蛋白,属于 C 类 G 蛋白偶联受体(C-GPCR)家族^[11]。hT1R2 和 hT1R3 结构包括氨基末端结构域(ATD)、半胱氨酸富集结构域(CRD)和 7 个跨膜螺旋结构域(TMD)^[12],其 ATD 部分由两片以大间隙分隔的叶片构成,是与甜味剂发生结合的主要活性部位^[13]。如糖(葡萄糖,蔗糖等)、二肽甜味剂(阿斯巴甜,阿力甜等)、甜蛋白(Thaumatococcus, Monellin 等)等物质都可以在该部分与甜味受体发生结合^[14-15]。而人体苦味受体(human bitter taste receptor, hBTR)同

样属于 G 蛋白偶联受体,人体中苦味的感知主要依赖 hTAS2R 家族中的 25 种受体^[16],其中 hTAS2R4 (hT2R4)被发现在甜菊糖苷的苦味感知中起主要作用^[17]。这些味觉受体通过不同的结合方式,与外来分子结合并被激活,引起一系列信号传导反应,如 G 蛋白的激活,细胞内钙释放,细胞去极化和激活突触等。最终产生特征性的味觉信号传递至大脑并引起人体对味觉的感知^[18]。

作者通过计算方法,模拟味觉受体与甜菊糖苷之间的结合,从而预测甜菊糖苷的风味。目前,味觉受体的晶体结构尚未被解析,因此我们首先通过同源建模,建立了有高可信度的甜味受体 hT1R2,

hT1R3 和苦味受体 hT2R4 的三维结构模型。接下来将天然甜菊糖苷作为配体,与味觉受体间进行分子对接,寻找计算结果与其甜味和苦味之间的关系,建立起用于预测甜菊糖苷风味的计算方法,并分析了甜菊糖苷结构的变化对其风味的影响。最后,通过这种方法,根据改性甜菊糖苷的结构预测其甜味和苦味,并挑选出可能的优质甜味剂。本研究有助于人们理解甜菊糖苷的结构与其风味之间的关系,明确设计或改性新型甜菊糖苷的思路,从而事半功倍地获取新型甜味剂,扩展甜菊糖苷在食品药物等领域中的应用。

1 材料与方法

1.1 使用软件

Discovery Studio 2.5: 美国 BIOVIA 公司产品; Chemdraw 15: 美国 CambridgeSoft 公司产品。

1.2 计算与实验方法

1.2.1 配体的准备 通过 Chemdraw 15 绘制一系列甜菊糖苷的分子结构(见表 1 和表 4),并导入至 Discovery Studio 2.5 软件中,通过 Prepare Ligands 工具进行对配体的预处理,改变离子化状态,优化其构型。产生配体的 3D 模型,用于后续分子对接计算。

1.2.2 甜味受体的同源建模 在 NCBI 数据库中检索目标甜味受体 hT1R2 和 hT1R3 的氨基酸序列(ID:NP_689418.2, NP_689414.1)^[19]。并对其进行 BLAST 搜索,在 PDB 蛋白质数据库中搜索对目标序列有较高一致性的模板蛋白。在 Discovery Studio 2.5 中导入目标和模板序列,生成目标-模板序列比对结果。随后使用 Build Homology Model 工具,根据比对结果构建 hT1R2 和 hT1R3 的同源模型。通过 Prepare Protein 工具对受体模型进行优化,施加 CHARMM 力场并使其能量最小化。使用 Ramachandran 图和 Verify 3D 分数评估模型的可靠性。

1.2.3 苦味受体的同源建模 对苦味受体 hT2R4 同样进行上文中的检索,结果发现与 hT2R4 间序列一致性最高的模板也仅有 14% 的序列一致性,这不足以生成有高可靠性的同源模型。作者使用 I-TASSER 在线建模服务器^[20]来进行建模工作。在提交 hT2R4 的氨基酸序列(Q9NYW5.1)后,I-TASSER 从 PDB 数据库中搜索具有一定相似性的模板,并从中切割出有较高相似性的片段,然后通过蒙特卡洛

模拟对这些片段进行结构预测并组装成完整蛋白模型。之后通过将模型调整到低自由能状态,消除空间碰撞,优化氢键网络等处理,确定最终生成的同源模型^[21]。通过 I-TASSER 的 TM-score,以及 Ramachandran 图对模型的可靠性进行了检测。

1.2.4 分子对接 使用 Discovery Studio 2.5 中的 Define and Edit Binding Site 工具对受体模型进行处理,筛选出可能存在的结合位点,并生成活性域以定义可能发生分子对接的区域。选择 CDOCKER 半柔性对接方法对甜菊糖苷配体与味觉受体间进行分子对接计算,这种对接方法将大分子受体模型固定,而允许小分子配体模型的构象在合理范围内发生改变,在保证计算准确性的同时减少了计算量^[22]。CDOCKER 方法计算了配体-受体间相互作用能,根据能量筛选结合位置以确定最终的对接构象,对接过程中相互作用能的值越高,受体和配体之间的结合越稳定^[23]。

2 结果与讨论

2.1 甜味受体的同源建模

通过 BLAST 搜索来寻找与甜味受体 hT1R2 和 hT1R3 间有较高相似性的模板。该方法基于模板与目标序列间的序列一致性和 E 值来进行选择,序列一致性越高且 E 值越低,模板与目标序列间相似性越高,更适合用于同源建模^[19]。搜索结果显示青鳉鱼味觉受体 T1R2-T1R3 配体结合域晶体结构的 B 链(PDB ID:5X2M_B)与 hT1R2 和 hT1R3 受体间最为相似。与此前研究者们用于甜味受体同源建模的模板 3LMK_A^[19]、2E4U_A^[24]、1EWK_A^[25] 相比,它与 hT1R2 和 hT1R3 间有最高的序列一致性和最低的 E 值,如表 2 所示。因此,选用 5X2M_B 作为构建甜味受体同源模型的理想模板。

表 2 用于甜味受体同源建模的不同模板的比较

Table 2 Comparison of different templates used for homology modeling of sweet taste receptors

模板	对 hT1R2 的相似性		对 hT1R3 的相似性	
	序列一致性/%	E 值	序列一致性/%	E 值
5X2M_B	34	$7e^{-75}$	37	$9e^{-101}$
3LMK_A	25	$3e^{-28}$	28	$2e^{-22}$
2E4U_A	26	$1e^{-41}$	26	$4e^{-43}$
1EWK_A	25	$6e^{-23}$	25	$3e^{-24}$

使用 Discovery Studio 2.5 的 Build Homology Model 工具构建同源模型(图 2(a))。可见所建模型对应于甜味受体的 ATD 部分,主要由两个大叶片构成,中间存在较大空隙(图中亮绿色部分),这里也是甜味受体与配体间主要发生结合的位点所在^[26]。Ramachandran 图(图 2(a))表明,对 hT1R2 而言,96.5%的氨基酸残基处于合理区域(蓝线范围内绿点),2.0%处于允许区域(蓝线到粉线范围绿点),1.5%处于异常区域(粉线外红点)。而对 hT1R3 而言,这个比例则是 94.5%、3.3%、2.2%。在此前的研

究中,所构建的甜味受体同源模型中最多也只有 90%的氨基酸残基处于合理区域^[19,24]。Verify 3D 分数对模型结构的可靠性进行了打分(图 2(b)),蓝色部分为高分区,可靠性高;红色部分为低分区,可靠性低),对 hT1R2 为 0.65,对 hT1R3 为 0.95,该值越接近 1,模型质量越好。在此前的研究中,甜味受体的 Verify 3D 分数处于 0.4 至 0.8 的范围内^[27]。以上分析证明,hT1R2 和 hT1R3 甜味受体模型的绝大部分氨基酸残基都处于合理构象,模型的评价结果较好,可靠性较高,可用于后续分子对接计算。

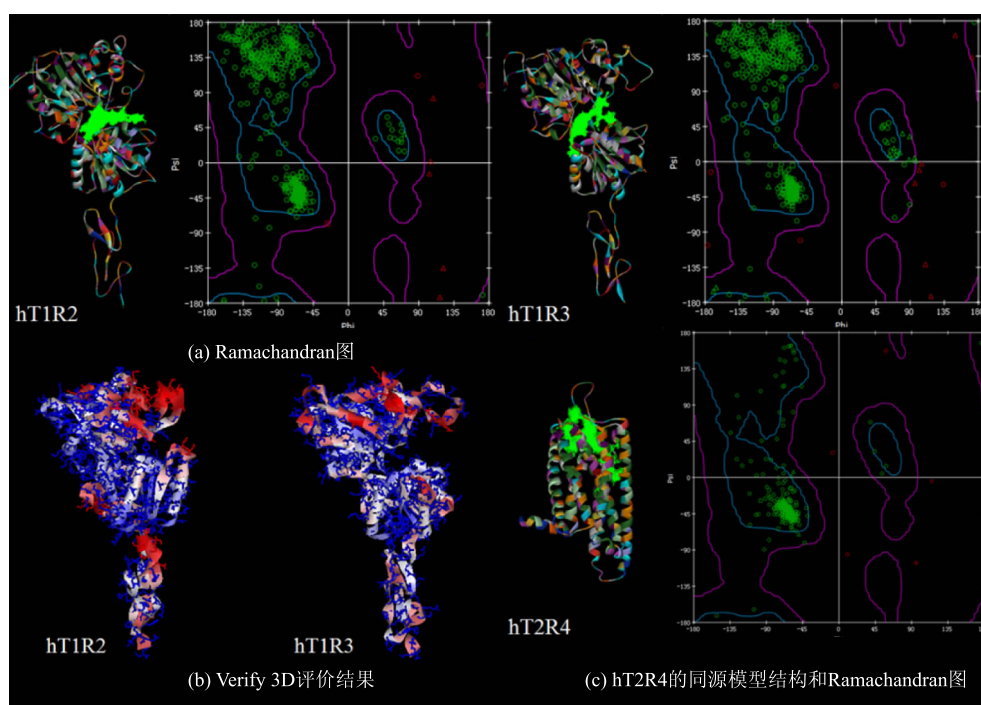


图 2 同源模型结构

Fig. 2 Homology models

2.2 苦味受体的同源建模

对于苦味受体 hT2R4, I-TASSER 建模服务器共选择了 8 个模板(4GRV, 5TJV, 4N6H, 5ZBH, 5G1H, 4DJH, 4BUO 和 5HAS), 它们与目标序列的一致性在 9%~13%之间。虽然这些模板的整体相似性较低, 但 I-TASSER 切割出模板中与目标序列有较高相似性的片段并对其进行结构预测, 然后组装成完整的苦味受体模型, 从而保证模型整体的可靠性^[21]。

如图 2(c)所示, hT2R4 同源模型由多根氨基酸螺旋构成, 结合位点位于螺旋中央的空隙处。I-TASSER 使用 TM-Score 来评价建模质量, TM-

Score>0.5 则代表模型与天然蛋白质结构较为相似^[20]。最终得到的 hT2R4 同源模型的 TM-Score 为 0.70 ± 0.12 , 处于较高水平, 证明建模结果具有较高的可信度。此外, hT2R4 的 Ramachandran 图(图 2(c))显示, 有 93.0%的氨基酸残基处于合理区域, 5.3%处于允许区域, 1.7%处于异常区域, 这也与过去研究的结果相似^[28], 证明大部分氨基酸残基都处于合理构象, 模型可靠性较高。

2.3 天然甜菊糖苷分子对接计算结果

将上述同源模型用于与天然甜菊糖苷之间的分子对接计算, 以探究计算结果与甜菊糖苷的甜味和苦味之间的关系。在此前的研究中, 人们发现甜

菊糖苷与甜味受体 hT1R2 和 hT1R3 之间的相互作用能 (Interaction Energy, IE) 与其甜度密切相关^[29], hT1R2 和 hT1R3 能够分别触发彼此独立的甜味信号,由两个亚基的累积效应引起甜味感知,因此可以通过将 hT1R2 和 hT1R3 与某种甜菊糖苷间的相互作用能 (IE_{hT1R2}, IE_{hT1R3}) 相加,以得到该甜菊糖苷与甜味受体间的总相互作用能 (IE_s)^[9];同时用 hT2R4 与甜菊糖苷间的相互作用能 (IE_{hT2R4}) 来代表甜菊糖苷与苦味受体间的总相互作用能 (IE_b)^[28]。计算结果如表 3 所示,发现甜菊糖苷的 IE_s 与其甜度之间存在明显的正相关趋势,两者的大小排序大

致相同,高甜度的甜菊糖苷通常具有较高的 IE_s。对苦味受体也有同样的结论, Rubusoside 和 Stevioside 等具有较强苦味的甜菊糖苷,其 IE_b 都超过了 45 kJ/mol。而苦味较弱的甜菊糖苷 (Rebaudioside A、D、M) 的 IE_b 都低于 40 kJ/mol。

结果表明,甜菊糖苷与味觉受体间的相互作用能可以在一定程度上反映其引发的相应味觉的强弱。因此,可通过计算找到与甜味受体间相互作用能 (IE_s) 较高而与苦味受体间相互作用能 (IE_b) 较低的甜菊糖苷,其最有可能使人感受到更强的甜味和更弱的苦味,从而产生较好的风味。

表 3 天然甜菊糖苷与 hT1R2, hT1R3 和 hT2R4 间的相互作用能和产生相互作用的氨基酸残基

Table 3 Interaction energy (IE) and residues involved in protein – ligand interactions of hT1R2, hT1R3 and hT2R4 with natural steviol glycosides

甜菊糖苷	甜度	IE _{hT1R2} / (kJ/mol)	IE _{hT1R3} / (kJ/mol)	IE _s / (kJ/mol)	氨基酸残基 hT1R2	氨基酸残基 hT1R3	IE _b / (kJ/mol)	氨基酸残基 hT2R4
Rebaudioside A	350	54.85	76.14	130.99	Ser27, Tyr90, Asp129, Asn130, Ser131, Glu289, Ser290	His128, Gly151, Glu284, Thr288, Gln309	37.00	Asn165, Met259, Ser263
Dulcoside A	300	61.11	63.81	124.92	Tyr90, Asp200, Thr229, Ser290	Ser153, Asp290, Asn369	44.60	Tyr250, Ser263
Stevioside	250	60.86	58.78	119.64	Lys52, Asp129, Asn130, Ser152, Arg365	Glu131, Asp290	45.45	Asn165
Rebaudioside D	250	45.71	76.56	122.27	Tyr49, Asp129, Ser152, Ser290, Asp294	His128, Glu131, Ser289, Asp290, Asn369, His371	32.70	Val85, Thr246
Rebaudioside M	200	44.75	74.53	119.28	Lys47, Asn130, Ser198, Thr229, Asp265, Leu266, Thr267, Asn299	Glu200, Val260, His261, Glu284, Ala285	20.46	Thr66, Phe168, Ser263
Rubusoside	200	67.16	50.80	117.96	Ser131, Ser152, Ser290	Val260, Glu284, Gln309	47.32	Met89, Thr246
Rebaudioside C	150	60.58	54.63	115.21	Tyr90, Asp129, Asn130, Asp200, Glu289, Ser290	Glu28, Gly151, Gln309, Gln372	48.38	Thr166, Thr246

2.4 甜菊糖苷结构的改变对其风味的影响

分析上述对接结果可以发现,在甜菊糖苷的 C-13 和 C-19 位上仅有葡萄糖基的情况下,其与味觉受体间的相互作用能和其葡萄糖基数量间存在着一定的变化规律。当 C-19 位上糖基保持不变时,随着 C-13 位上葡萄糖基数量的增加 (Rubusoside < Stevioside < Rebaudioside A),甜菊糖苷与甜味受体间相互作用能 (IE_s) 升高,与苦味受体间相互作用能 (IE_b) 下降。而当 C-13 位上糖基不变时,随着 C-19 位上葡萄糖基数量增加 (Rebaudioside A < Rebaudioside D < Rebaudioside M),甜菊糖苷的 IE_s

和 IE_b 都在降低。即 C-13 位上葡萄糖基数量的增加导致甜菊糖苷的甜味增强,苦味减弱, C-19 位上葡萄糖基数量的增加导致甜味和苦味都减弱。

通过分析甜菊糖苷与味觉受体之间的相互作用模式可以解释上述现象。甜菊糖苷 (图 3,以 Rebaudioside A 为例) 与味觉受体间的主要相互作用为受体的氨基酸残基与甜菊糖苷葡萄糖基上羟基之间的氢键作用。而 C-13 和 C-19 位上葡萄糖基数量的改变对甜菊糖苷风味造成的不同影响,可能是由于甜味和苦味受体的结合位点的空间差异所引起的。一方面,甜味受体的结合位点 (图 2(a)),亮

绿色部分)位于氨基末端结构域的两个叶片之间的大间隙中,具有较大的空间,配体进入结合位点时所受空间限制较小。另一方面,苦味受体的结合位点(图 2(c),亮绿色部分)位于数根氨基酸螺旋之间的空隙中,空间较小,配体进入结合位点时所受空间限制较大。因此甜菊糖苷从体积较大的 C-13 糖基一侧进入甜味受体位点,从体积较小的 C-19 糖基一侧进入苦味受体位点。Rubusoside、Rebaudioside A、Rebaudioside M 与味觉受体间的对接构象(图 4)也证明了这一点。

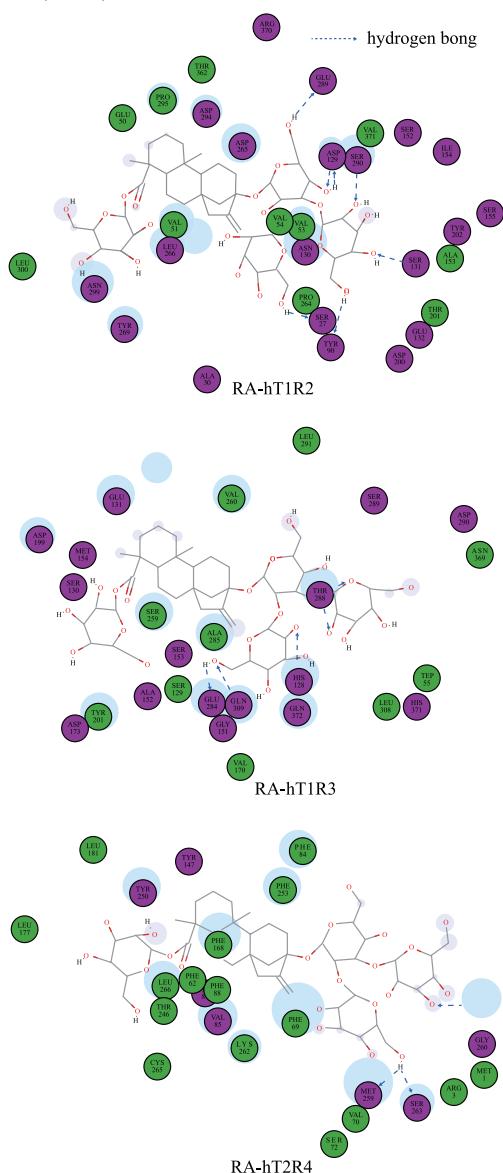


图 3 Rebaudioside A (RA) 与 hT1R2, hT1R3 和 hT2R4 间相互作用模式图

Fig. 3 Interaction patterns of Rebaudioside A (RA) with hT1R2, hT1R3 and hT2R4

所以当 C-13 位上葡萄糖基数量增加时(图 4, 从 Rubusoside 到 Rebaudioside A),甜菊糖苷依然可以从该侧较轻松地进入空间较大的甜味受体的结合位点中。更多的糖基有利于与氨基酸残基间产生更强的相互作用和更高的 IEs,从而激发更强烈的甜味信号。而在与苦味受体结合时,由于位点的空间较小,只有 C-19 位上的糖基能够进入位点, C-13 位上较大的糖基不但由于距离较远难以与氨基酸残基间产生相互作用,并且会影响苦味受体与甜菊糖苷间结合构象的稳定性,使其 IEb 下降,导致苦味减弱。而当 C-19 位上葡萄糖基数量增加时(图 4, 从 Rebaudioside A 到 Rebaudioside M),甜菊糖苷仍旧从 C-13 位方向与甜味受体结合, C-19 位上的糖基在另一侧难以进入位点,仅会影响结合构象的稳定性。在与苦味受体结合时, C-19 位上的糖基由于体积增大,也无法深入空间较小的结合位点,使得甜菊糖苷与苦味受体间的结合稳定性变差,因此导致 IEs 与 IEb 都降低,表现出甜味与苦味都在减弱。

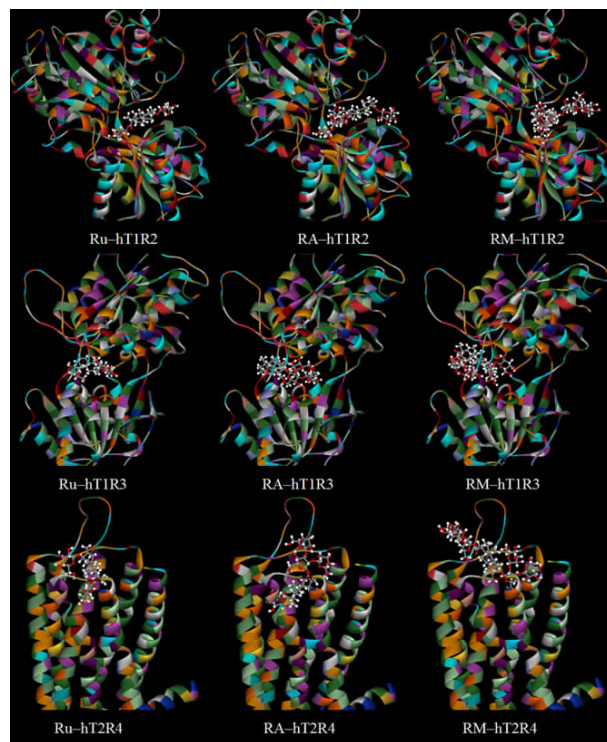


图 4 Rubusoside (Ru), Rebaudioside A (RA), Rebaudioside M (RM) 与 hT1R2, hT1R3, hT2R4 间的对接构象

Fig. 4 Docking poses of Rubusoside (Ru), Rebaudioside A (RA) and Rebaudioside M (RM) docked on hT1R2, hT1R3 and hT2R4

2.5 预测改性甜菊糖苷的风味

根据以上的分析,作者预测在 C-13 位上有较多葡萄糖基的甜菊糖苷可能具有较强的甜味和较弱的苦味,能够成为优质甜味剂。在此前的研究中,许多研究者通过生物或化学改性方法,对甜菊中含量最高的 Stevioside 或 Rebaudioside A 进行改性,在 C-13 位上增加葡萄糖基从而得到新型甜菊糖苷。但是由于产品组分混杂,分离困难,难以验证其风味。因此我们在此选择了 8 种改性甜菊糖苷,其结构如表 4 所示^[30-33]。通过计算方法来预测其风味,计算结果如表 5 所示。

分析以上计算结果可以发现,相比 C-13 位上有 3 个葡萄糖基(编号 1、2、3、4),有 4 个葡萄糖基

(编号 5、6、7、8) 的改性甜菊糖苷通常具有更高的 IEs 和更低的 IEb,即甜味更强且苦味更弱,这与之前分析天然甜菊糖苷计算结果得出的结论相符。相比天然甜菊糖苷中有最高甜度与应用价值的 Rebaudioside A,在这 8 种改性甜菊糖苷中,编号 5、6、8 预测有更强的甜味和更弱的苦味,其中 6 号被预测为甜味最强而苦味最弱,可能有作为优质甜味剂投入应用的潜力。

不同的甜菊糖苷与味觉受体结合时,都有各自独特的相互作用模式,能够与味觉受体的不同组合氨基酸残基间产生相互作用。分析表 3 和表 5 可知,分别有 24、21 和 17 个氨基酸残基参与了甜菊糖苷与 hT1R2、hT1R3 和 hT2R4 间产生氢键的相互

表 4 改性甜菊糖苷的结构

Table 4 Structures of modified steviol glycosides

改性甜菊糖苷编号	C-13 位上的糖基结构	改性甜菊糖苷编号	C-13 位上的糖基结构
1	Glc(α1-4)Glc(β1-2)Glc(β1-	5	Glc(α1-4)Glc(β1-3)[Glc(β1-2)]Glc(β1-
2	Glc(α1-6)Glc(β1-2)Glc(β1-	6	Glc(β1-2)Glc(β1-3)[Glc(β1-2)]Glc(β1-
3	Glc(β1-2)[Glc(α1-6)]Glc(β1-	7	Glc(α1-4)Glc(α1-4)Glc(β1-2)Glc(β1-
4	Glc(β1-3)Glc(β1-2)Glc(β1-	8	Glc(α1-6)Glc(β1-2)[Glc(α1-6)]Glc(β1-

注:上述改性甜菊糖苷在 C-19 位上的糖基皆为 Glc(β1-。

表 5 改性甜菊糖苷与 hT1R2、hT1R3 和 hT2R4 间的相互作用能和产生相互作用的氨基酸残基

Table 5 Interaction energy (IE) and residues involved in protein - ligand interactions of hT1R2,hT1R3 and hT2R4 with modified steviol glycosides

编号	IEhT1R2 / (kJ/mol)	IEhT1R3 / (kJ/mol)	IEs / (kJ/mol)	氨基酸残基 hT1R2	氨基酸残基 hT1R3	IEb / (kJ/mol)	氨基酸残基 hT2R4
1	64.33	64.95	129.28	Lys52, Asn130, Ser290	Asn51, Asp199, Thr288, Ser289, His371	33.59	Met89, Asp92, Tyr147, Ser185
2	49.60	73.57	123.17	Tyr90, Ser290, Val296, Asn299	His128, Glu131, Gly151, Glu200, Gln309,Gln372	41.56	Asn165, Thr166
3	56.27	68.56	124.83	Lys52, Asn130, Thr229, Glu289, Ser290, Asp294	Ser129, Glu131, Ser153, Thr288	40.66	Met1, Thr166
4	45.59	78.69	124.28	Lys52, Asn130, Ser290, Asp294, Arg370	Ser130, Glu131, Gly151, Asp199, Thr288, His371,Gln372	42.95	Asp92, Ser185
5	63.81	78.73	142.54	Ser27, Asp129, Asn130, Glu132	Glu131, Gly151, Glu284, Gln309	31.58	Ala9, Glu158, Met259, Ser263
6	66.79	82.76	149.55	Ser27, Asn130, Ser152, Asp265, Glu289, Ser290	Asn51, Glu284, Ala285, Asp290	18.06	Phe69, Met89, Ser263
7	61.31	80.88	142.19	Ala30, Tyr90, Asn130, Asp294, Arg370	His128, Ser130, Ser153, His261, Glu284, Ala285, Thr288	40.05	Met89, Tyr147, Thr246, Met259
8	56.92	75.41	132.33	Lys52, Asp129, Asp200, Thr229, Glu289, Ser290, Arg370	Asn51, Glu131, Glu284, Gln309, His371, Gln372	25.71	Asp92, Tyr147, Asn165, Ser185, Ser263

作用中。其中, Ser290 (hT1R2), Glu131, Glu284 (hT1R3) 和 Ser263 (hT2R4) 可分别与 11, 7, 6 种甜菊糖苷间产生氢键, 是与甜菊糖苷间产生氢键最频繁的氨基酸残基, 在甜味和苦味的感知过程中起到重要作用。与其他甜菊糖苷相比, 每种甜菊糖苷都具有各自独特的风味, 这是由于甜菊糖苷的 C-13 和 C-19 位上具有不同结构的糖基。这些糖基与味觉受体中的众多氨基酸残基以不同组合的方式发生相互作用, 并激发有各自特征性的味觉信号, 信号传递到大脑最终使人感受到不同的风味。

3 结 语

通过合适的模板, 构建起具有高可靠性的甜味 (hT1R2, hT1R3) 和苦味 (hT2R4) 受体的同源模型, 并与一系列甜菊糖苷之间进行分子对接研究。发现计算得到的受体-配体间相互作用能与甜菊糖苷的风味高度相关, 与甜味受体间有高相互作用能且与

苦味受体间有低相互作用能的甜菊糖苷最有可能具有较强的甜味和较弱的苦味。通过该方法, 还预测了改性甜菊糖苷的风味并筛选出可能的优质甜味剂。通过分析计算结果和相互作用模式, 我们发现 C-13 位上葡萄糖基的增多会导致甜菊糖苷的甜味增强而苦味减弱, C-19 位上葡萄糖基的增多会导致甜味和苦味都减弱。这些不同的变化趋势是由甜味和苦味受体间的结构不同所引起的。甜菊糖苷通过 C-13 和 C-19 位上的糖基, 与味觉受体中不同组合的氨基酸残基间发生相互作用, 从而激发特征性的味觉信号并使人感知到不同的风味。通过这种计算方法, 可以更好的理解甜菊糖苷的结构与其风味之间的联系, 预测具有新设计结构的甜菊糖苷的风味, 从而判断它是否是合适的甜味剂。这为进一步通过生物或化学改性方法改善甜菊糖苷的风味指明了方向, 为新型甜味剂的预测和设计提供了新的途径。

参考文献:

- [1] CEUNEN S, GEUNS J M C. Steviol glycosides: Chemical diversity, metabolism, and function[J]. **Journal of Natural Products**, 2013, 76(6): 1201-1228.
- [2] GALLO M, VITULANO M, ANDOLFI A, et al. Rapid solid-liquid dynamic extraction (RSLDE): A new rapid and greener method for extracting two steviol glycosides (stevioside and rebaudioside A) from stevia leaves [J]. **Plant Foods for Human Nutrition**, 2017, 72(2): 141-148.
- [3] PURKAYASTHA S, MARKOSYAN A, PRAKASH I, et al. Steviol glycosides in purified stevia leaf extract sharing the same metabolic fate[J]. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2016, 77: 125-133.
- [4] GERWIG G J, TE POELE E M, DIJKHUIZEN L, et al. Structural analysis of rebaudioside A derivatives obtained by *Lactobacillus reuteri* 180 glucanucrase-catalyzed trans- α -glucosylation[J]. **Carbohydrate Research**, 2017, 440-441: 51-62.
- [5] WAN Huida. Microwave-assisted enzymatic transglycosylation and hydrolysis of stevioside [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(12): 1338-1343. (in Chinese)
- [6] LI S, LI W, XIAO Q Y, et al. Transglycosylation of stevioside to improve the edulcorant quality by lower substitution using cornstarch hydrolyzate and CGTase[J]. **Food Chemistry**, 2013, 138(2-3): 2064-2069.
- [7] LU T, XIA Y M. Transglycosylation specificity of glycosyl donors in transglycosylation of stevioside catalysed by cyclodextrin glucanotransferase[J]. **Food Chemistry**, 2014, 159(11): 151-156.
- [8] DE OLIVEIRA B H, PACKER J F, CHIMELLI M, et al. Enzymatic modification of stevioside by cell-free extract of *Gibberella fujikuroi*[J]. **Journal of Biotechnology**, 2007, 131(1): 92-96.
- [9] PRAKASH I, MARKOSYAN A, BUNDERS C. Development of next generation stevia sweetener: rebaudioside M [J]. **Foods**, 2014, 3(1): 162-175.
- [10] XU Z W, LI Y Q, WANG Y H, et al. Production of β -fructofuranosidase by *Arthrobacter* sp. and its application in the modification of stevioside and rebaudioside A[J]. **Food Technology and Biotechnology**, 2009, 47(2): 137-143.
- [11] LI X, STASZEWSKI L, XU H, et al. Human receptors for sweet and umami taste [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2002, 99(7): 4692-4696.
- [12] CHRON J B, GOLEBIEWSKI J, ANTONCZAK S, et al. The anatomy of mammalian sweet taste receptors [J]. **Proteins -**

- structure Function and Bioinformatics**, 2017, 85(2):332-341.
- [13] GLASER D,HELLEKANT G,BROUWER J N,et al. Effects of gymnemic acid on sweet taste perception in primates [J]. **Chemical Senses**, 2017, 8(4):367-374.
- [14] NIE Y, VIGUES S, HOBBS J R, et al. Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli[J]. **Current Biology**, 2005, 15(21):1948-1952.
- [15] FERNSTROM J D, MUNGER S D, SCLAFANI A, et al. Mechanisms for sweetness [J]. **Journal of Nutrition**, 2012, 142(6):1134S-1141S.
- [16] SINGH N, PYDI S P, UPADHYAYA J, et al. Structural basis of activation of bitter taste receptor T2R1 and comparison with class A G-protein-coupled receptors (GPCRs) [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2011, 286(41):36032-36041.
- [17] HELLFRITSCH C, BROCKHOFF A, STHLER F, et al. Human psychometric and taste receptor responses to steviol glycosides [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2012, 60(27):6782-6793.
- [18] LAFFITTE A, NEIERS F, BRIAND L. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues [J]. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, 2014, 17(4):379-385.
- [19] MAYANK, JAITAK V. Interaction model of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) with sweet taste receptors; A computational approach[J]. **Phytochemistry**, 2015, 116(1):12-20.
- [20] ROY A, KUCUKURAL A, ZHANG Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction[J]. **Nature Protocols**, 2010, 5(4):725-738.
- [21] ZHANG Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction[J]. **Bmc Bioinformatics**, 2008, 9:40-47.
- [22] TAN S, WANG D, CHI Z, et al. Study on the interaction between typical phthalic acid esters (PAEs) and human haemoglobin (hHb) by molecular docking[J]. **Environ Toxicol Pharmacol**, 2017, 53:206-211.
- [23] PANDEY R K, KUMBHAR B V, SUNDAR S, et al. Structure-based virtual screening, molecular docking, ADMET and molecular simulations to develop benzoxaborole analogs as potential inhibitor against *Leishmania donovani* trypanothione reductase[J]. **Journal of Receptor Research**, 2017, 37(1):60-70.
- [24] ACEVEDO W, RAM REZSARMIENTO C A, AGOSIN E. Identifying the interactions between natural, non-caloric sweeteners and the human sweet receptor by molecular docking[J]. **Food Chemistry**, 2018, 264:164-171.
- [25] LIU B, HA M, MENG X Y, et al. Molecular mechanism of species-dependent sweet taste toward artificial sweeteners[J]. **Journal of Neuroscience**, 2011, 31(30):11070-11076.
- [26] LEE A A, OWYANG C. Sugars, sweet taste receptors, and brain responses[J]. **Nutrients**, 2017, 9(7):653-665.
- [27] MAILLET E L, CUI M, JIANG P, et al. Characterization of the binding site of aspartame in the human sweet taste receptor[J]. **Chemical Senses**, 2015, 40(8):577-587.
- [28] SINGLA R, JAITAK V. Synthesis of rebaudioside A from stevioside and their interaction model with hTAS2R4 bitter taste receptor[J]. **Phytochemistry**, 2016, 125:106-111.
- [29] HAN P, RSJ K, ROURA E. Salivary leptin and TAS1R2/TAS1R3 polymorphisms are related to sweet taste sensitivity and carbohydrate intake from a buffet meal in healthy young adults[J]. **British Journal of Nutrition**, 2017, 118(10):763-770.
- [30] LOBOV S V, KASAI R, OHTANI K, et al. Enzymic production of sweet stevioside derivatives; transglucosylation by glucosidases[J]. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, 1991, 55(12):2959-2965.
- [31] CHATURVEDULA V S P, UPRETI M, PRAKASH I. Structures of the novel α -glucosyl linked diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*[J]. **Carbohydrate Research**, 2011, 346(13):2034-2038.
- [32] YAMAMOTO K, YOSHIKAWA K, OKADA S. Effective production of glycosyl-steviosides by α -1,6 transglucosylation of dextrin dextranase[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 1994, 58(9):1657-1661.
- [33] KUSAMA S, KUSAKABE I, NAKAMURA Y, et al. Transglucosylation into stevioside by the enzyme system from *Streptomyces* sp[J]. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, 2014, 50(10):2445-2451.