



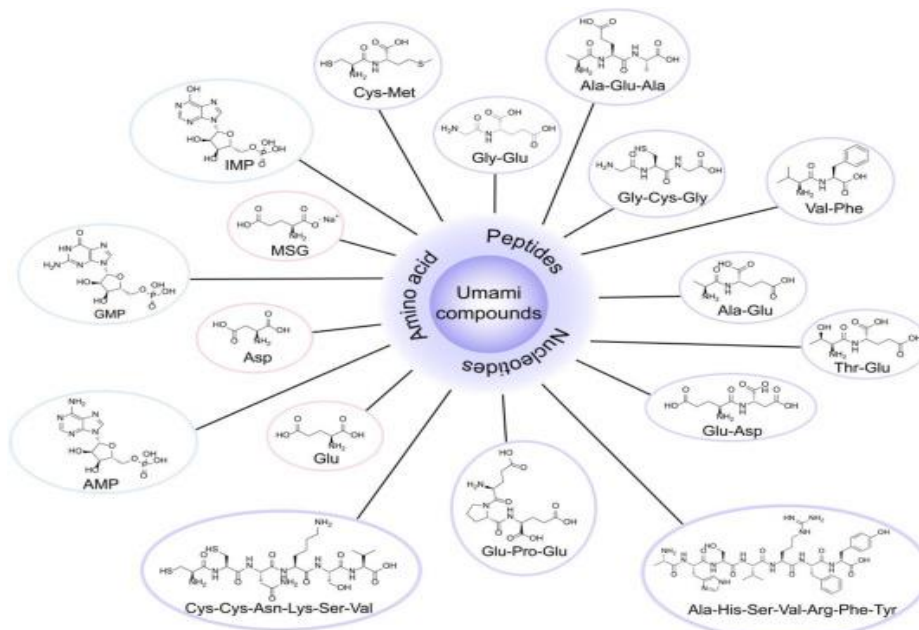
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Π.Μ.Σ. «ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ & ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Αναζήτηση νέων ενώσεων ενεργοποιητών της umami γεύσης με χρήση υπολογιστικών τεχνικών»



ΑΘΗΝΑ 2024

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
Π.Μ.Σ. «ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ & ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Αναζήτηση νέων ενώσεων ενεργοποιητών της umami γεύσης με χρήση
υπολογιστικών τεχνικών»**

ΚΟΥΝΟΥΠΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗ Α.Μ.: 22007

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΚΡΙΤΣΗ ΕΥΤΥΧΙΑ

ΜΕΛΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: ΒΑΣΙΛΕΙΑ ΣΙΝΑΝΟΓΛΟΥ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2024

Επιτροπή Αξιολόγησης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «**Αναζήτηση νέων ενώσεων ενεργοποιητών της *umami* γεύσης με χρήση υπολογιστικών τεχνικών**» που παρουσιάστηκε από την Αγγελική Κούνουπα, υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

A/a	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	ΕΥΤΥΧΙΑ ΚΡΙΤΣΗ	Επίκουρη Καθηγήτρια / Επιβλέπουσα	
2	ΒΑΣΙΛΕΙΑ ΣΙΝΑΝΟΓΛΟΥ	Καθηγήτρια / Μέλος	
3	ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ	Καθηγητής / Μέλος	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη **Αγγελική Κούνουπα** του **Ανδρέα**, με αριθμό μητρώου **22007** φοιτήτρια του του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Π.Μ.Σ.) «ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ» του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Επιστημών Τροφίμων, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής Μηχανικών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα



Αγγελική Κούνουπα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Ευτυχία Κρίτση, Επίκουρη Καθηγήτρια ΠΑΔΑ, για την ανάθεση του θέματος καθώς και για την στήριξη και απόλυτη καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Ακόμα, ευχαριστώ θερμά την κα. Βασιλεία Σινάνογλου, Καθηγήτρια ΠΑΔΑ και τον κ. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη, Καθηγητή ΠΑΔΑ για τη συμμετοχή τους ως μέλη της Τριμελούς επιτροπής της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αλέξανδρο Τιμόθεο Λουκά, Χημικό Μηχανικό Msc και υποψήφιο διδάκτορα στο τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής για την συνεργασία του στη διεξαγωγή των πειραμάτων μοριακής δυναμικής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την συνεχή στήριξη και υπομονή που δείχνουν σε όλο το ταξίδι των ακαδημαϊκών μου χρόνων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανθρώπινη γεύση μπορεί να αναλυθεί στις 5 βασικές γευστικές ιδιότητες: γλυκιά (sweet), όξινη (sour), πικρή (bitter), αλμυρή (salty) και umami. Η umami γεύση έλαβε ευρεία αποδοχή ως βασική γεύση έπειτα από την ανακάλυψη ότι ετεροδιμερείς υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνες G, T1R1/T1R3 μεσολαβούν στην αντίχνευσή της. Ο ετεροδιμερής υποδοχέας T1R1/T1R3 είναι εξειδικευμένος στην αντίχνευση ερεθισμάτων με γεύση umami (L-αμινοξέα), καθώς *in vitro* δεν ανταποκρίνεται σε γλυκά ερεθίσματα αλλά ανταποκρίνεται αποκλειστικά σε ερεθίσματα umami (MSG και L-γλουταμινικό). Την τελευταία πενταετία, πολυάριθμες έρευνες έχουν στραφεί στην ανακάλυψη ενώσεων, και ιδιαίτερα πεπτιδίων που προκαλούν την umami γεύση και προέρχονται από τα τρόφιμα.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πιθανότητα πεπτιδίων, τα οποία περιέχονται στο γιαούρτι, να ενεργοποιούν την umami γεύση μέσω εφαρμογής υπολογιστικών τεχνικών. Αρχικά, τα πεπτίδια που περιέχονται στο γιαούρτι χρησιμοποιήθηκαν ως ο εξεταζόμενος δειγματοχώρος και η αμινοξική τους αλληλουχία καταγράφηκε με χρήση της διαδικτυακής βάσης δεδομένων ελεύθερης πρόσβασης Fermented Food Database (FermFOODb). Δεδομένης της απουσίας κρυσταλλικής δομής του ανθρώπινου ετεροδιμερούς T1R1/T1R3 δημιουργήθηκε ομόλογο μοντέλο του υποδοχέα χρησιμοποιώντας τη βάση πρωτεϊνικών δομών AlphaFold καθώς και τον επίσης ελεύθερης πρόσβασης διακομιστή ομόλογης μοντελοποίησης SWISS-MODEL. Στη συνέχεια, τα πεπτίδια υποβλήθηκαν σε πειράματα μοριακής πρόσδεσης (Molecular Docking), στοχεύοντας στην εύρεση των πεπτιδίων με εν δυνάμει ικανότητα ενεργοποίησης της umami γεύσης. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε "Τυφλή μοριακή πρόσδεση – Blind Docking" και στη συνέχεια "Στοχευμένη" μοριακή πρόσδεση, μέσω εφαρμογής των διαδικτυακών εργαλείων DockThor και Webina. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων βασίστηκε στην ενέργεια πρόσδεσης (docking score) των εξεταζόμενων πεπτιδίων στον T1R1/T1R3 υποδοχέα και στη σύγκριση των αλληλεπιδράσεων των εξεταζόμενων πεπτιδίων με τις αλληλεπιδράσεις πεπτιδίων γνωστών από τη βιβλιογραφία με umami γεύση.

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων επιλέχθηκαν δέκα πεπτίδια (FLL, YP, QQQTED, TVQVT, YAKPA, FAQ, YQEPVL, YQQPVL, IPIQY, KFQSEE), στα οποία εφαρμόστηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Molecular Dynamics). Από τα

αποτελέσματα προέκυψε ότι τα πεπτίδια QQQTED και YQQPVL παρουσίασαν σταθερότητα εντός του υποδοχέα γεγονός που καταδεικνύει την εν δυνάμει ενεργοποίηση της umami γεύσης.

Λέξεις – Κλειδιά: umami γεύση, T1R1/T1R3 υποδοχείς, ζυμώμενα τρόφιμα, υπολογιστικές τεχνικές, μοριακή πρόσδεση, μοριακή δυναμική

ABSTRACT

Human taste can be categorized into the 5 basic taste qualities: sweet, sour, bitter, salty and umami. Umami taste gained recognition as a fundamental taste the discovery that heterodimeric receptors coupled to G, T1R1/T1R3 proteins are responsible for its detection. The T1R1/T1R3 heterodimeric receptor is specialized in identifying umami-flavoured stimuli (L-amino acids), and in vitro studies show it exclusively responds to umami stimuli (MSG and L-glutamate) rather than sweet stimuli. Recent research, particularly over the past five years, has focused on identifying compounds, notably peptides derived from food, that elicit the umami taste.

In the present study, the possibility of peptides, which are present in yoghurt, to activate umami taste was studied by applying computational techniques. Initially, the peptides contained in yoghurt were used as the investigated sample space and their amino acid sequence was recorded using the online open access Fermented Food Database (FermFOODb). Given the absence of a crystal structure of the human T1R1/T1R3 heterodimer, a homologous model of the receptor was generated using the AlphaFold protein structure base as well as the also open access homologous modeling server SWISS-MODEL. The peptides were then subjected to molecular docking experiments, aiming to find peptides with potential umami flavor activation capacity. For this purpose, "Blind Molecular Docking" and then "Targeted" molecular docking was performed by applying the online tools DockThor and Webina. The evaluation of the results was based on the docking energy (docking score) of the tested peptides at the T1R1/T1R3 receptor and the comparison of the interactions of the tested peptides with the interactions of peptides known from the literature with umami flavor.

Ten peptides (FLL, YP, QQQTED, TVQVT, YAKPA, FAQ, YQEPVL, YQQPVL, IPIQY, KFQSEE) were selected from the evaluation of the results and molecular dynamics simulations were applied to them. The results showed that QQQTED and YQQPVL peptides showed stability within the receptor indicating the potential activation of umami taste.

Key words: umami taste, T1R1/T1R3 receptors, fermented foods, computational techniques, molecular docking, molecular dynamics

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Βιολογία και ανθρώπινη γεύση	13
1.1 Ταξινόμηση/Ορισμός της γεύσης	13
1.2 Αντίληψη της γεύσης	14
1.3 Ανατομία και φυσιολογία της γεύσης	15
1.4 Κυτταρικοί τύποι γεύσης	17
Κεφάλαιο 2: Η umami γεύση	20
2.1 Ορισμός	20
2.2 Οι υποδοχείς της umami γεύσης	22
2.3 Παραδοσιακές προσεγγίσεις για την ανακάλυψη ενεργοποιητών της umami γεύσης .23	
2.3.1 Ο ρόλος του γλουταμινικού οξέος και των νουκλεοτιδίων	23
2.3.2 Umami πεπτίδια και άλλες ενώσεις	24
Κεφάλαιο 3: Βάσεις δεδομένων πεπτιδίων και εφαρμογή Υπολογιστικών Τεχνικών	27
3.1. Βάσεις δεδομένων πεπτιδίων	27
3.2. Μοριακή πρόσδεση	28
3.2.1. Διάγραμμα ροής Μοριακής Πρόσδεσης	28
3.2.2. Ομόλογη μοντελοποίηση	29
3.2.3. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής	31
Σκοπός	32
Κεφάλαιο 4: Επιλογή και προετοιμασία πεπτιδίων	33
4.1 Χρησιμοποιούμενες βάσεις δεδομένων & επιλογή πεπτιδίων	33
4.2 Σχεδιασμός πεπτιδίων σε 2D και 3D δομή	43
Κεφάλαιο 5: Πειράματα μοριακής πρόσδεσης σε ομόλογο μοντέλο του ανθρώπινου T1R1/T1R3 υποδοχέα	69
5.1 Δημιουργία και προετοιμασία ομόλογου μοντέλου του ανθρώπινου T1R1/T1R3 υποδοχέα	69
5.2 Διεξαγωγή πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης	71
5.3. Αξιολόγηση αποτελεσμάτων μοριακής πρόσδεσης	76
Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι	88

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Ανατομία της ανθρώπινης γλώσσας με θηλές και γευστικούς κάλυκες. Οι περιφερειακές, μυκητοειδείς και φυλλώδεις θηλές είναι οι δομές που στεγάζουν τους γευστικούς κάλυκες. Οι γευστικοί κάλυκες είναι μια συλλογή διαφοροποιημένων επιθηλιακών κυττάρων που ανταποκρίνονται στις 5 βασικές γεύσεις και μεταδίδουν τις πληροφορίες αυτές στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Οι νηματοειδείς θηλές μεταδίδουν την αφή, τη θερμοκρασία και την αλγαισθησία (Gravina et al. 2013b).....	16
Εικόνα 2. Κυτταρικοί τύποι γευστικού κάλυκα (Gravina et al.2013b).....	17
Εικόνα 3: Απεικόνιση γευστικού κάλυκα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Witt, 2019).....	19
Εικόνα 4: Η χημική δομή της 5'-μονοφωσφορικής ινοσίνης (Inosine 5'-monophosphate – IMP).....	20
Εικόνα 5: Η χημική δομή της 5' μονοφωσφορικής γουανοσίνης (Guanosine 5' monophosphate - GMP).....	21
Εικόνα 6. Διάγραμμα ροής των τεσσάρων βασικών βημάτων των πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης (Eweas, 2014).....	29
Εικόνα 7: Διαδικασία Ομόλογης μοντελοποίησης (Vyas et al., 2012).	30
Εικόνα 8: Ομόλογο μοντέλο του ανθρώπινου T1R1/T1R3 υποδοχέα με βάση το πρότυπο 1EWK.	70
Εικόνα 9. Τριδιάστατη απεικόνιση του ανθρώπινου T1R1/T1R3 υποδοχέα με τη θέση πρόσδεσης του L-γλουταμικού οξέος (πράσινο χρώμα).	76
Εικόνα 10: Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου FLL και του ανθρώπινου υποδοχέα T1R1/T1R3.....	80
Εικόνα 11. Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου YP με τον υποδοχέα T1R1/T1R3.....	81
Εικόνα 12. Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου QQQTED με τον υποδοχέα T1R1/TR3.	81
Εικόνα 13. Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου TVQVT με τον υποδοχέα T1R1/TR3.....	82
Εικόνα 14. Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου YAKPA με τον υποδοχέα T1R1/TR3.....	82
Εικόνα 15. Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου FAQ με τον υποδοχέα T1R1/TR3.....	83
Εικόνα 16. Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου YQEPVL με τον υποδοχέα T1R1/T1R3.	83
Εικόνα 17. Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου YQQPVL με τον υποδοχέα T1R1/T1R3.....	84
Εικόνα 18. Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου KFQSEE με τον υποδοχέα T1R1/T1R3.....	84
Εικόνα 20. Διακύμανση RMSD του συμπλόκου πεπτιδίου YQQPVL – T1R1/T1R31 κατά τη διάρκεια μοριακής προσομοίωσης.	86
Εικόνα 19. Διακύμανση RMSD του συμπλόκου πεπτιδίου QQQTED – T1R1/T1R31 κατά τη διάρκεια μοριακής προσομοίωσης.	86

Εικόνα 21. Διακύμανση RMSD του συμπλόκου πεπτιδίου YP – T1R1/T1R31 κατά τη διάρκεια μοριακής προσομοίωσης.87

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Πεπτίδια που προκαλούν την umami γεύση και οι πηγές τροφίμων που εξήχθησαν.	24
Πίνακας 2. Μελετούμενα πεπτίδια γιαουρτιού από τη βάση δεδομένων πεπτιδίων Food Matrix Of FermFooDb.....	33
Πίνακας 3. Δομές πεπτιδίων γιαουρτιού σε 3D μορφή.....	43
Πίνακας 4. Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης με εφαρμογή του λογισμικού DockThor για τα εξεταζόμενα πεπτίδια που περιέχονται στο γιαούρτι.....	71
Πίνακας 5. Μοτίβο δημιουργούμενων αλληλεπιδράσεων, έπειτα από την εφαρμογή μοριακής πρόσδεσης με το λογισμικό DockThor σε γνωστά umami πεπτίδια που προέκυψαν από αναζήτηση της βιβλιογραφίας.....	74
Πίνακας 6. Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης Webina 1.0.5 για τα εξεταζόμενα πεπτίδια που περιέχονται στο γιαούρτι.	77
Πίνακας 7. Πεπτίδια που επιλέχθηκαν για αξιολόγηση μοριακής δυναμικής	79
Πίνακας 8. Οι μέσες τιμές του RMSD και της τυπικής απόκλισης κάθε συμπλόκου πεπτιδίου-υποδοχέα που υπολογίστηκαν για 100 ns.....	85

Κεφάλαιο 1: Βιολογία και ανθρώπινη γεύση

1.1 Ταξινόμηση/Ορισμός της γεύσης

Η γεύση είναι μια αισθητηριακή λειτουργία που περιλαμβάνει την από του στόματος αντίληψη χημικών ουσιών που προέρχονται από τα τρόφιμα και τη διέγερση των κύτταρων των υποδοχέων που βρίσκονται στους γευστικούς κάλυκες. Η γεύση εξυπηρετεί κυρίως δύο λειτουργίες: επιτρέπει την αξιολόγηση των τροφίμων ως προς την τοξικότητα και τα θρεπτικά συστατικά, ενώ προετοιμάζει το σώμα για τον μεταβολισμό των τροφίμων μετά την κατανάλωσή τους. Η αντίληψη της γεύσης προκαλείται από μόρια που διεγείρουν τους γευστικούς κάλυκες στα επιθήλια της στοματικής κοιλότητας και του φάρυγγα (πίσω μέρος του λαιμού) (Breslin and Spector, 2008). Επιπλέον, συνδυάζεται με την όσφρηση και τις οπτικές αισθήσεις και έτσι επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση και η αναγνώριση των τροφίμων κατατάσσοντάς τα ως οικεία ή νέα. Εάν η γεύση που αντανακλάται από την κατανάλωση τροφής είναι οικεία, είναι εφικτή η πρόβλεψη των μεταβολικών συνεπειών της κατάποσης της τροφής. Από την άλλη, εάν είναι νέα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτά τα αισθητηριακά στοιχεία για τον προσδιορισμό των φυσιολογικών αποτελεσμάτων κατάποσης. Στην περίπτωση που το αποτέλεσμα είναι θετικό, η γεύση σηματοδοτεί ευχαρίστηση, τόσο άμεσα από την ευχάριστη ποιότητα της ίδιας της γεύσης, όσο και από τις σχετικές μεταβολικές συνέπειες. Επιπλέον, η γεύση θα μπορούσε να χαρακτηριστεί και κοινωνική αίσθηση ιδιαίτερα στα ασπόνδυλα. Για παράδειγμα, τα αρσενικά της *Drosophila* χρησιμοποιούν τη γεύση προκειμένου να διακρίνουν τα θηλυκά από τα αρσενικά αλλά και για να αναγνωρίσουν σε ποια φάση ζευγαρώματος βρίσκεται το εκάστοτε θηλυκό (Wang et al., 2011).

Η ανθρώπινη γεύση μπορεί να αναλυθεί στις 5 βασικές γευστικές ιδιότητες: γλυκιά (sweet), όξινη (sour), πικρή (bitter), αλμυρή (salty) και umami (Gravina et al., 2013a). Παρόλο που η αίσθηση της γεύσης έχει χαρακτηριστεί ως μηχανισμός ποιοτικού ελέγχου της τροφής, το αποτέλεσμα που αντιλαμβάνεται ο άνθρωπος απορρέει από την αλληλεπίδραση και των 5 αισθήσεων. Ακόμα και πριν την κατανάλωση τροφής, οι εικόνες, οι ήχοι και τα αρώματα αυξάνουν τα επίπεδα ορμονών και την παραγωγή σιέλου, ώστε το άτομο να αντιληφθεί την ανάγκη πρόσληψης τροφής (Gravina et al., 2013a). Στη συνέχεια, καθώς η τροφή εισέρχεται στη στοματική κοιλότητα, οι υποδοχείς της γεύσης, διεγείρουν την παραγωγή απαραίτητης ποσότητας σιέλου για την προετοιμασία της μάσησης και της

κατάποσης ή στην περίπτωση μη εύγευστων ή τοξικών υλικών της απόχρεμψης ή του εμετού. Οι γεύσεις που διεγείρουν την όρεξη, όπως η γλυκιά γεύση, η γεύση umami και οι τροφές με χαμηλά επίπεδα νατρίου, περιγράφουν τη θρεπτική αξία της τροφής, ενώ η πικρή, η όξινη και η αλμυρή γεύση, συχνά, υποδηλώνουν την παρουσία τοξινών ή υψηλή περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα, αντίστοιχα. Οι τροφές που γίνονται αντιληπτές ως στυφές ή δυσάρεστες δηλώνουν την παρουσία δυνητικά επιβλαβών συστατικών του πεπτικού συστήματος, ενώ τροφές με κρεμώδη αίσθηση δηλώνουν την ασφάλεια και την παρουσία επιθυμητών λιπαρών (Gravina et al., 2013a).

1.2 Αντίληψη της γεύσης

Η αντίληψη της γεύσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προτίμηση των τροφίμων και καθορίζει την πρόσληψη τροφίμων με ευχάριστη γεύση, ενώ αποφεύγει εκείνα που είναι δυσάρεστα. Η αντίληψη της γεύσης πραγματοποιείται κατά την πρόσδεση των συστατικών της τροφής στους ειδικούς γευστικούς υποδοχείς και η διαδικασία αυτή μεταβάλλεται από μόρια που διακόπτουν την αλληλεπίδρασή τους. Η επεξεργασία των γευστικών πληροφοριών είναι ζωτικής σημασίας προκειμένου να διευκρινιστούν οι γευστικές προτιμήσεις και να δημιουργηθούν οι εκάστοτε διατροφικές συνήθειες (Kral and Rauh, 2010). Οι γευστικές ιδιότητες, όπως το umami και το γλυκό, χαρακτηρίζουν τροφές πλούσιες σε πρωτεΐνες και ενέργεια, αντίστοιχα. Οι όξινες και πικρές γεύσεις, συχνά, χαρακτηρίζουν τρόφιμα αλλοιωμένα ή τοξικά (Breslin and Spector, 2008). Η αλμυρή γεύση εξασφαλίζει την κατάλληλη ισορροπία των ηλεκτρολυτών της διατροφής. Επιπλέον, πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα καταδεικνύουν ότι τα λιπίδια μπορούν να γίνουν αντιληπτά από συγκεκριμένους υποδοχείς στα κύτταρα γεύσης και ως εκ τούτου η λιπαρή γεύση αποκτά σταδιακά την ιδιότητα μιας έκτης γεύσης (Deerankumar et al., 2019).

Η συνειδητή κατανόηση της "γεύσης" προέρχεται από τις καθημερινές εμπειρίες που αποκτώνται με τα τρόφιμα και τις γευστικές τους ενώσεις. Οι γεύσεις είναι αισθήσεις πολλαπλών χαρακτηριστικών. Συγκεκριμένα, η αντίληψη της γεύσης δεν αποτελεί μόνο κριτήριο ποιότητας, αλλά μέσω αυτής δίνεται η δυνατότητα μέτρησης της έντασης της γεύσης με την πάροδο του χρόνου. Για παράδειγμα, η αίσθηση του πικρού παραμένει για παρατεταμένο χρονικό διάστημα και προσδιορίζεται κυρίως στο πίσω μέρος του στόματος (Nakamura et al., 2012).

Ο συνδυασμός αντιπροσωπευτικών ερεθισμάτων πολλαπλών γευστικών ιδιοτήτων σε ένα μείγμα που περιέχει σακχαρόζη, γλουταμινικό μονονάτριο, χλωριούχο νάτριο, κιτρικό οξύ και θειϊκή κινίνη, θα προσφέρει στον δοκιμαστή την αντίληψη ότι το μείγμα είναι ταυτόχρονα γλυκό, αλμυρό, όξινο και πικρό (Breslin, 2013). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι το γευστικό σύστημα είναι σε θέση να αναλύει τα επιμέρους συστατικά ενός σύνθετου μείγματος. Αυτό, ωστόσο, δεν αποκλείει ότι τα συστατικά ενός γευστικού μείγματος αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για να μεταβάλλουν την αντίληψη. Ορισμένοι συνδυασμοί ερεθισμάτων αλληλεπιδρούν στους γευστικούς κάλυκες και στα κύτταρα υποδοχείς, όπως τα άλατα και οι τοξίνες (Breslin, 2013) και πολλοί συνδυασμοί ισχυρών ερεθισμάτων αλληλεπιδρούν για να καταστείλουν ή να ενισχύσουν το ένα το άλλο (Breslin, 2013).

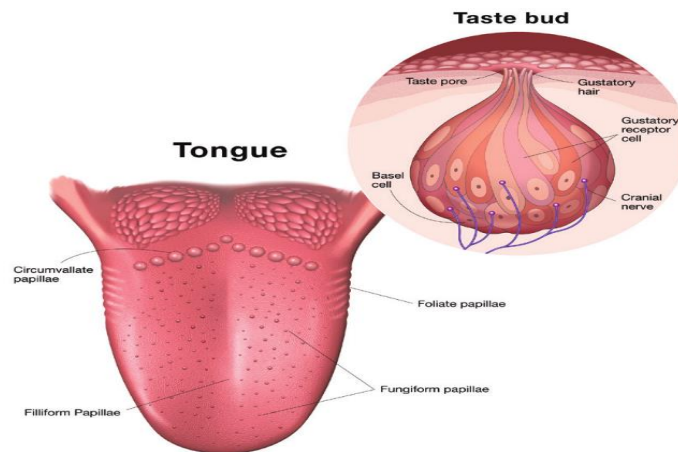
Εν κατακλείδι, το γευστικό σύστημα του ανθρώπου διαδραματίζει πολλαπλούς ρόλους στην εξασφάλιση της επιβίωσης. Η γεύση βοηθά στον εντοπισμό ασφαλών και θρεπτικών τροφών σε ένα πολύπλοκο περιβάλλον. Οι διαφορετικές γεύσεις των τροφίμων αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, καθώς και με άλλα αισθητηριακά ερεθίσματα, όπως η όραση, η όσφρηση και η αφή, ώστε να διαμορφωθεί ένα συνολικό προφίλ της τροφής το οποίο θα την καταστήσει κατάλληλη ή όχι προς κατανάλωση (Breslin, 2013).

1.3 Ανατομία και φυσιολογία της γεύσης

Το γευστικό σύστημα αποτελείται από τα γευστικά αισθητήρια όργανα, που ονομάζονται γευστικοί κάλυκες, τους νευρώνες τους και τις θηλές στις οποίες βρίσκονται κυρίως. Η αρχιτεκτονική και το προφίλ του κεντρικού δικτύου των γευστικών προσαγωγών νευρώνων ομοιάζει περισσότερο με τις σωματο-αισθητηριακές οδούς και τις οδούς του πόνου παρά με εκείνες του χημειο-αισθητηριακού συστήματος όσφρησης. Παρ' όλα αυτά, τα αισθητήρια κύτταρα τόσο της όσφρησης όσο και της γεύσης διαθέτουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, και τα δύο παρουσιάζουν συνεχή εναλλαγή αισθητηριακών και υποστηρικτικών κυττάρων και τα δύο διαθέτουν παρόμοιους μηχανισμούς μεταγωγής (Witt, 2019a). Ωστόσο, οι οσφρητικοί αισθητηριακοί νευρώνες εκφράζονται απευθείας στον εγκέφαλο χωρίς σύνδεση μέσω συστοιχιών νευρικών ινών, των οσφρητικών ινών, ενώ οι αισθητηριακοί νευρώνες της γεύσης πρώτα προσδένονται με κύτταρα υποδοχέων του γευστικού κάλυκα, πριν την έκφραση στον εγκέφαλο (Witt, 2019a). Ανάλογα με τη θέση τους, οι νευρώνες που τροφοδοτούν τους γευστικούς κάλυκες

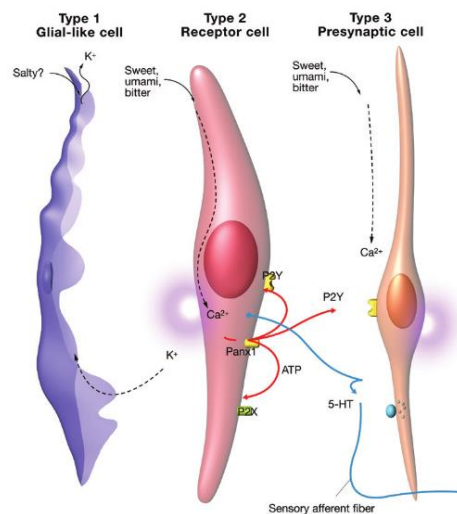
προέρχονται από τουλάχιστον τρία διαφορετικά νεύρα, τα οποία εισέρχονται όλα από την περιφέρεια στον πυρήνα της μονήρους οδού του εγκεφαλικού στελέχους. Στην περίπτωση της γεύσης, ο θάλαμος αποτελεί σημαντικό σταθμό μετάδοσης των σημάτων πριν φθάσουν στον φλοιό, ενώ στην περίπτωση της όσφρησης, ο θάλαμος παρακάμπτεται σχεδόν πλήρως από τις κεντρικές οδούς του (Witt, 2019a). Η ενσωμάτωση των πληροφοριών και των δύο αισθητηριακών συστημάτων, καθώς και των πληροφοριών από την όραση και τη μηχανική αίσθηση, πραγματοποιείται τελικά σε ανώτερες φλοιώδεις περιοχές, όπως η πρόσθια νησίδα και ο τροχιομετωπιαίος φλοιός (Witt, 2019a).

Οι άνθρωποι έχουν 4 τύπους θηλών: οι μυκητοειδείς, οι φυλλόμορφες και οι περιφερικές θηλές, ενώ οι νηματοειδείς θηλές μεταδίδουν την αφή, τη θερμοκρασία και την αλγαισθησία (nociception) (**Εικόνα 1**). Οι μυκητοειδείς θηλές είναι δομές σε σχήμα μανιταριού που προεξέχουν από την επιφάνεια της γλώσσας. Ο άνθρωπος διαθέτει κατά μέσο όρο 195 μυκητοειδείς θηλές, το 87% των οποίων βρίσκεται στα πρόσθια 2 εκατοστά της γλώσσας. Οι φυλλοειδείς θηλές είναι πλευρικές πτυχές της γλώσσας που περιέχουν περισσότερους από 100 γευστικούς κάλυκες. Οι περιφερικές θηλές σχηματίζουν ένα ανεστραμμένο V στο οπίσθιο τμήμα της γλώσσας. Αυτές οι θηλές είναι ενσωματωμένες στη γλώσσα και έχουν μια τάφρο γύρω τους. Οι άνθρωποι έχουν πάνω από 100 γευστικούς κάλυκες στις περιφερικές θηλές (Gravina et al., 2013a).



Εικόνα 1. Ανατομία της ανθρώπινης γλώσσας με θηλές και γευστικούς κάλυκες. Οι περιφερειακές, μυκητοειδείς και φυλλώδεις θηλές είναι οι δομές που στεγάζουν τους γευστικούς κάλυκες. Οι γευστικοί κάλυκες είναι μια συλλογή διαφοροποιημένων επιθηλιακών κυττάρων που ανταποκρίνονται στις 5 βασικές γεύσεις και μεταδίδουν τις πληροφορίες αυτές στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Οι νηματοειδείς θηλές μεταδίδουν την αφή, τη θερμοκρασία και την αλγαισθησία (Gravina et al. 2013b).

Οι γευστικοί κάλυκες είναι η πρωταρχική αισθητήρια μονάδα του γευστικού συστήματος και βρίσκονται ενσωματωμένοι κάτω από την κερατινώδη στιβάδα των θηλών με έναν γευστικό πόρο εκτεθειμένο στο εξωτερικό περιβάλλον (Gravina et al., 2013b). Στην **Εικόνα 1** απεικονίζονται οι γευστικοί κάλυκες που αποτελούνται από 150 έως 300 άμεσα συνδεδεμένα κυλινδρικά κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης. Τουλάχιστον, 5 τύποι κυττάρων αποτελούν έναν γευστικό κάλυκα: κύτταρα τύπου 1, 2, 3, βασικά κύτταρα και νευρικές διεργασίες (**Εικόνα 2**). Οι διάφοροι τύποι γευστικών κυττάρων χαρακτηρίζονταν ανέκαθεν από την παρουσία ή την απουσία πυκνών κόκκων (Gravina et al., 2013b). Κάθε γευστική ιδιότητα εκφράζεται αποκλειστικά από ένα υποσύνολο μεμονωμένων γευστικών κυττάρων ή 1 γευστική ιδιότητα για 1 κυτταρικό τύπο της γεύσης. Για παράδειγμα, ένα ευαίσθητο στη γλυκιά γεύση κύτταρο τύπου 2 εκφράζει υποδοχείς γλυκού, αλλά δεν εκφράζει υποδοχείς πικρού ή umami και αντίστροφα (Gravina et al., 2013b).



Εικόνα 2. Κυτταρικοί τύποι γευστικού κάλυκα (Gravina et al.2013b)

1.4 Κυτταρικοί τύποι γεύσης

Τα κύτταρα γεύσης κατηγοριοποιούνται σε κυτταρικούς τύπους με βάση φυσιολογικές και ανοσοϊστοχημικές ιδιότητες, καθώς δεν είναι σαφές εάν οι γευστικές ιδιότητες μεταφέρονται μέσω δικών τους ξεχωριστών νευρικών ινών ή εάν τα μεμονωμένα κύτταρα γεύσης εξειδικεύονται για περισσότερες από μία γευστικές ιδιότητες. Η βάση για την τρέχουσα ονοματολογία των κυττάρων των γευστικών καλύκων καθιερώθηκε από τον

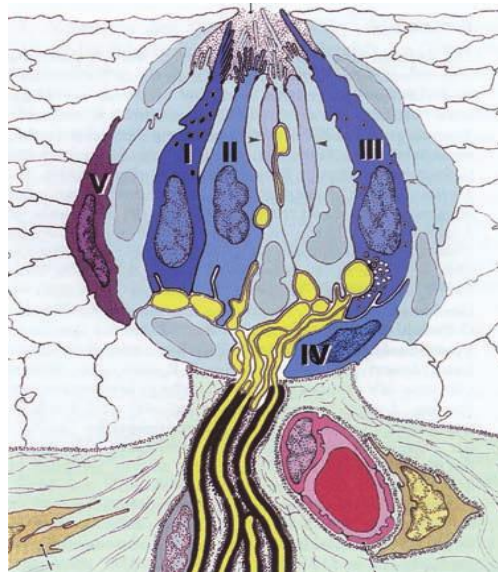
Murray και τους συνεργάτες του στις φυλλώδεις θηλές κουνελιών (Witt, 2019b). Ταξινόμησαν τα κύτταρα των γευστικών καλύκων σε τύπου I, II και III. Οι περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη χημειοαντίληψη των γευστικών ερεθισμάτων και τη μεταφορά πληροφοριών στους πρωτογενείς προσαγωγούς άξονες προέρχονται από μελέτες σε ποντίκια (Dando and Roper, 2009- Huang et al., 2009). Ωστόσο, η έννοια των ευρέως συντονισμένων κυτταρικών υποδοχέων γεύσης έχει αντικαταχθεί πιο πρόσφατα από αναφορές που περιγράφουν μια λογική κωδικοποίησης "ένα κύτταρο μία γεύση", η οποία αναφέρεται σε εξειδικευμένα κύτταρα υποδοχέων γεύσης που προβάλλουν συγκεκριμένες ιδιότητες σε αντίστοιχα πεδία του κεντρικού νευρικού φλοιού (Yarmolinsky et al., 2009), (Chen et al., 2011).

Τα κύτταρα τύπου I, περίπου το 50% του συνολικού πληθυσμού, έχουν σχήμα ατράκτου και μια βασική απόφυση που περιβάλλει τους άξονες με τρόπο που ομοιάζει με κύτταρο Schwann. Τα κύτταρα τύπου I προεξέχουν με μακριές μικροβελόνες που ομοιάζουν με βούρτσα (1-2 mm) μέσα στον γευστικό λάκκο και τυλίγουν τα κύτταρα τύπου II και III με κυτταρικές προεξοχές (Witt, 2019b). Τα κύτταρα αυτά έχουν εκκριτική (υποστηρικτικά κύτταρα) και πιθανώς φαγοκυτταρική λειτουργία και, πιθανώς, παράγουν το άμορφο υλικό του γευστικού λάκκου. Επιπλέον, συμμετέχουν στην ανακατανομή ιόντων και στην κάθαρση νευροδιαβιβαστών, παρόμοια με τη λειτουργία των κυττάρων της γλοίας στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Περιέχουν τον γλοιακό μεταφορέα γλουταμινικού/ασπαρτικού (GLAST) (Witt, 2019b), καθώς και ένζυμα που αποικοδομούν το εξωκυττάριο ATP (Witt, 2019b). Ορισμένα κύτταρα τύπου I διαθέτουν τον διάυλο K^+ ROMK που μπορεί να αποβάλλει τα συσσωρευμένα εξωκυττάρια ιόντα καλίου διατηρώντας τη διεγερσιμότητα των κυττάρων τύπου II και III (Dvoryanchikov et al., 2009). Έχει προταθεί ότι ένας υποπληθυσμός των κυττάρων τύπου I εμπλέκεται στην πρόσληψη της γεύσης του αλατιού (Vandenbeuch et al., 2008).

Παρά τις σημαντικές διαφορές μεταξύ των ειδών, η τρέχουσα πρόταση είναι ότι τα γευστικά ερεθίσματα λαμβάνονται από τα κύτταρα-υποδοχείς τύπου II (Chaudhari and Roper, 2010), ενώ τα γευστικά κύτταρα τύπου III (προσυναπτικά) είναι τα μόνα που περιέχουν συναπτικές πρωτεΐνες και σχηματίζουν συνδέσεις με τις νευρικές ίνες (Witt, 2019b). Η μεταφορά πληροφορίας από τα κύτταρα τύπου II (υποδοχείς) στα κύτταρα τύπου III (προσυναπτικά) μεσολαβεί μέσω του ATP και (Chaudhari and Roper, 2010) ή

απευθείας από τα κύτταρα τύπου II στις νευρικές ίνες, καθώς οι γευστικές προσαγωγές περιέχουν επίσης πουρινεργικούς υποδοχείς P2X2 και P2X3 για την αλληλεπίδραση με το ATP (Witt, 2019b). Οι στρατηγικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων τύπου II και τύπου III αντικατοπτρίζονται επίσης από αναλύσεις μεταγραφώματος, που καταδεικνύουν ότι τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τα ερεθίσματα ρυθμίζονται ανοδικά στα κύτταρα τύπου II, ενώ εκείνα που είναι υπεύθυνα για τις νευρικές οδούς ρυθμίζονται ανοδικά στα κύτταρα τύπου III (Sukumaran et al., 2017).

Τέλος, αναγνωρίζεται και μια τέταρτη κατηγορία κυττάρων, τα κύτταρα τύπου IV, τα οποία ονομάζονται βασικά κύτταρα ή πρόδρομα κύτταρα γεύσης. Είναι σχετικά μικρά κύτταρα που βρίσκονται στη βάση του γευστικού κάλυκα. Τα κύτταρα τύπου IV θεωρούνται πρόδρομα κύτταρα των κυττάρων του κάλυκα (Chaudhari and Roper, 2010). Στους εμβρυϊκούς και ενήλικους βαλβιδικούς γευστικούς κάλυκες των ποντικών, τα βασικά κύτταρα εκφράζουν επίσης τη σηματοδοτική πρωτεΐνη sonic hedgehog (Shh) (Miura et al., 2014) και τους μεταγραφικούς παράγοντες Hes6 και Mash-1, όπου ο τελευταίος πιθανόν να εμπλέκεται στην εξειδίκευση της γενεαλογικής γραμμής τύπου III (Seta et al., 2011). Η θέση των παραπάνω κυτταρικών τύπων στον γευστικό κάλυκα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3**.

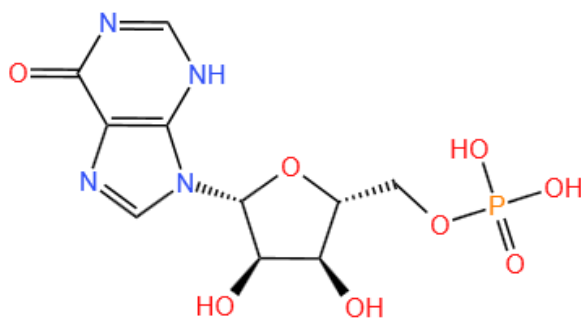


Εικόνα 3: Απεικόνιση γευστικού κάλυκα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Witt, 2019)

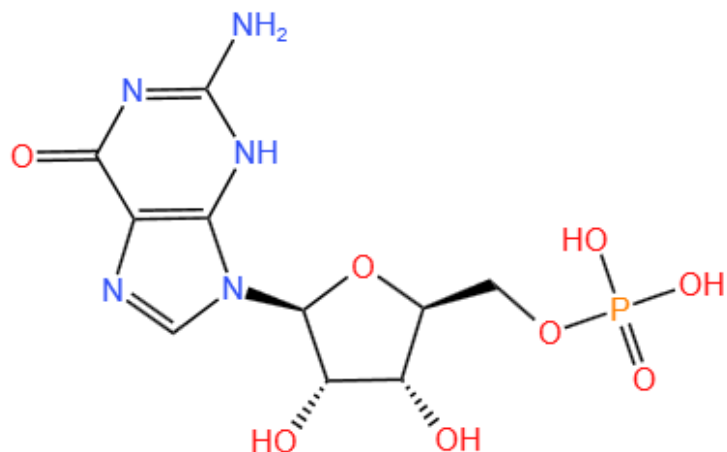
Κεφάλαιο 2: Η umami γεύση

2.1 Ορισμός

Η umami γεύση πρωτοαναφέρθηκε από τον Ikeda, ο οποίος απομόνωσε το γλουταμινικό οξύ από ένα είδος φύκους, το kombu, διαπιστώνοντας ότι τα άλατα του γλουταμινικού οξέος, ιδίως το άλας νατρίου, το γλουταμινικό μονονάτριο (Monosodium glutamate - MSG), προσέφεραν στα φύκη την ιδιαίτερη γεύση τους (Isabella E Hartley et al., 2019). Έτσι, το φυσικό L-γλουταμινικό οξύ αποτελεί τον κυριότερο εκπρόσωπο της umami γεύσης και το MSG τον κυριότερο εκπρόσωπο που μπορεί να προστεθεί τεχνητά. Αργότερα, ανακαλύφθηκε ότι η γεύση του L-γλουταμινικού οξέος μπορεί να αυξηθεί συνεργιστικά μέσω της προσθήκης νουκλεοτιδίων και συγκεκριμένα της 5'-μονοφωσφορικής ινοσίνης (Inosine 5'-monophosphate - IMP και της 5' μονοφωσφορικής γουανοσίνης Guanosine 5' monophosphate - GMP) (Isabella E Hartley et al., 2019). Όταν η IMP δοκιμάζεται μεμονωμένα, προκαλεί μια ελάχιστη έως αδύναμη γεύση umami, η οποία θεωρείται ότι οφείλεται στην αλληλεπίδραση της IMP με συγκεντρώσεις L-γλουταμινικού οξέος του ανθρώπινου σιέλου, αποδεικνύοντας ότι η IMP και η GMP απαιτούν L-γλουταμινικό οξύ για την αντίληψη της umami γεύσης (Isabella E Hartley et al., 2019). Στις **Εικόνες 4** και **5** παρουσιάζονται οι χημικές δομές της 5'-μονοφωσφορικής ινοσίνης και της 5' μονοφωσφορικής γουανοσίνης, αντίστοιχα.



Εικόνα 4: Η χημική δομή της 5'-μονοφωσφορικής ινοσίνης (Inosine 5'-monophosphate – IMP)



Εικόνα 5: Η χημική δομή της 5' μονοφωσφορικής γουανοσίνης (Guanosine 5' monophosphate - GMP)

Στο παρελθόν έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η umami γεύση σηματοδοτεί την παρουσία αμινοξέων και πρωτεϊνών, προωθώντας την κατανάλωση ορισμένων τροφίμων που περιέχουν πρωτεΐνες. Αντίθετα, πολλά τρόφιμα με φυσικά υψηλή περιεκτικότητα σε φυσικό L-γλουταμινικό οξύ δεν είναι συνήθως πλούσια σε πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα τα πιτζίλια, το καλαμπόκι, τα κόκκινα σταφύλια και οι τομάτες (Kurihara, 2015). Στην ίδια κατεύθυνση, τα τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, όπως το βόειο κρέας, το χοιρινό κρέας και το κοτόπουλο, δεν περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις L-γλουταμινικού οξέος (Isabella E Hartley et al., 2019). Η πρωτεόλυση των πρωτεϊνών των τροφίμων που πραγματοποιείται κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, της ωρίμανσης ή της θερμικής επεξεργασίας απελευθερώνει αμινοξέα και πεπτίδια που μπορούν να διεγείρουν γευστικές ιδιότητες. Έτσι, η αντίληψη της umami γεύσης μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία αμινοξέων που έχουν απελευθερωθεί κατά την πρωτεόλυση που πραγματοποιείται στα τρόφιμα μέσω διαφόρων διαδικασιών μαγειρέματος (Breslin, 2013). Κατά τη διάρκεια της πρωτεόλυσης είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη ότι τα αμινοξέα που απελευθερώνονται δεν είναι μόνο αμινοξέα με γεύση umami (L-γλουταμινικό οξύ), ή με πικρή γεύση (π.χ. L-λευκίνη, -φαινυλαλανίνη, -τρυπτοφάνη) και γλυκιά γεύση (π.χ. L-γλυκίνη, -αλανίνη, -προλίνη) αλλά διαφοροποιούνται ανάλογα με το είδος του τροφίμου (Isabella E Hartley et al., 2019).

2.2 Οι υποδοχείς της umami γεύσης

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι γευστικοί υποδοχείς στη γλώσσα ανιχνεύουν διαλύτες του σιέλου, μη πτητικές χημικές ουσίες από τα τρόφιμα που βρίσκονται στη στοματική κοιλότητα. Από τις βασικές γεύσεις, η γλυκιά, η πικρή και η umami γεύση προκύπτουν μέσω νεργοποίησης υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες, T1Rs και T2Rs, που βρίσκονται στα κύτταρα των γευστικών υποδοχέων τύπου II (Isabella E. Hartley et al., 2019). Οι ουσίες που προκαλούν την πικρή γεύση ανιχνεύονται από τους υποδοχείς T2R, για τους οποίους υπάρχουν σήμερα πάνω από 25 γονίδια που τους κωδικοποιούν (Isabella E. Hartley et al., 2019). Από την άλλη, η αλμυρή και η όξινη γεύση προτείνεται ότι ρυθμίζονται από εξειδικευμένους διαλύτες ιόντων. Για την αλμυρή γεύση έχει προταθεί ότι εμπλέκεται ο επιλεκτικός επιθηλιακός δίαυλος νατρίου (ENaC), ενώ οι πιθανοί υποδοχείς της όξινης γεύσης περιλαμβάνουν ιόντα H^+ που διαπερνούν τα κύτταρα τύπου III (Isabella E. Hartley et al., 2019).

Η umami γεύση έγινε ευρέως αποδεκτή ως βασική γεύση έπειτα από την ανακάλυψη ότι ετεροδιμερείς υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνες G, T1R1/T1R3 μεσολαβούν στην ανίχνευσή (Isabella E. Hartley et al., 2019). Το ετεροδιμερές σύμπλοκο της umami γεύσης, T1R1/T1R3, μοιράζεται μια κοινή υπομονάδα υποδοχέα (T1R3) με τη γλυκιά γεύση, η οποία ανιχνεύεται από τους ετεροδιμερείς υποδοχείς, T1R2/T1R3 (Isabella E. Hartley et al., 2019). Ο ετεροδιμερής υποδοχέας T1R1/T1R3 είναι εξειδικευμένος στην ανίχνευση ερεθισμάτων με γεύση umami (L-αμινοξέα), καθώς *in vitro* δεν ανταποκρίνεται σε γλυκά ερεθίσματα αλλά ανταποκρίνεται αποκλειστικά σε ερεθίσματα umami (MSG και L-γλουταμινικό) (Isabella E. Hartley et al., 2019). Ο υποδοχέας T1R1/T1R3 επιβεβαιώθηκε ότι ανταποκρίνεται σε ερεθίσματα umami γεύσης έπειτα από την ανακάλυψη ότι οι υποδοχείς T1R1, T1R3 και T1R1/T1R3 knockout ποντικών στερούνται ή έχουν εξασθενημένες γευστικές αποκρίσεις σε ερεθίσματα umami (MSG) ενώ οι ανθρώπινοι υποδοχείς T1R1/T1R3 ανταποκρίνονται σε *in vitro* πειράματα κατά την εφαρμογή L-γλουταμινικό οξέος (Isabella E. Hartley et al., 2019).

2.3 Παραδοσιακές προσεγγίσεις για την ανακάλυψη ενεργοποιητών της umami γεύσης

2.3.1 Ο ρόλος του γλουταμινικού οξέος και των νουκλεοτιδίων

Ακολουθώντας της ανακάλυψης του umami, ο Ikeda και ο Saburosuke Suzuki ανέπτυξαν το 1909 ένα νέο καρύκευμα, το γλουταμινικό μονονάτριο (MSG), για να προσθέσουν την umami γεύση, τη βασική γευστική ένωση του dashi, σε μια μεγάλη ποικιλία ιαπωνικών σπιτικών πιάτων. Το L-γλουταμινικό μονονάτριο (MSG) χρησιμοποιείται περισσότερο από έναν αιώνα ως καρύκευμα που προσδίδει umami γεύση, με πιθανή επίδραση όχι μόνο στη γεύση αλλά και στην όρεξη του ανθρώπου (Kouzuki *et al.*, 2019). Το MSG αυξάνει την έκκριση σιέλου από τους παρωτιδικούς αδένες και μεταδίδοντας σήματα γεύσης στον εγκέφαλο μέσω στοματικών ή γαστρικών υποδοχέων, προάγοντας έτσι την πέψη (Kouzuki *et al.*, 2019). Ως εκ τούτου, η πρόσληψη MSG μπορεί να αυξήσει την απορρόφηση του ψευδαργύρου από το έντερο και να ενισχύσει τη γεύση των γευμάτων. Επιπλέον, η πρόσδεση του γλουταμινικού οξέος στους υποδοχείς της γλώσσας μπορεί να υποστεί επεξεργασία στον πρωτογενή φλοιό (cortex) της γεύσης - αναφορές έχουν χρησιμοποιήσει λειτουργική MRI για να καταδείξουν ότι τα ερεθίσματα της γεύσης umami ενεργοποιούν τις περιοχές του φλοιού της γεύσης (Kouzuki *et al.*, 2019).

Η umami γεύση, ως βασική γεύση, παρουσιάζει πολυδιάστατο χαρακτήρα. Οι ουσίες umami μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και επίσης μπορούν να αλληλεπιδρούν με άλλες γευστικές ουσίες προσφέροντας συνεργιστική επίδραση ή κατασταλτική επίδραση στη συνολική αντίληψη της γεύσης. Η πιο εμφανής συνεργιστική επίδραση είναι η ενίσχυση του umami στην απόκριση του L-γλουταμινικού οξέος από τα 5-ριβονουκλεοτίδια. Μια μελέτη έδειξε ότι το μείγμα γλουταμινικού οξέος και IMP (1:1) παρήγαγε 7 φορές μεγαλύτερη ένταση umami σε σύγκριση με την ένταση του γλουταμινικού οξέος (Wang *et al.*, 2020). Ο μοριακός μηχανισμός της συνέργειας μπορεί να αποσαφηνιστεί με χρήση μοντέλου που περιλαμβάνει την περιοχή Venus flytrap του T1R1 (Wang *et al.*, 2020). Χρησιμοποιώντας ανθρώπινη αισθητηριακή αξιολόγηση μελετήθηκε η συνεργιστική επίδραση της L-θεανίνης και της IMP αναλογικά με το ερέθισμα της umami γεύσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συνεργιστική δράση των δύο ουσιών προκαλούσε αύξηση της έντασης της umami γεύσης κατά 57% σε σχέση με το ερέθισμα που προκαλούσε η ουσία της L-θεανίνης (Wang *et al.*, 2020).

2.3.2 Umami πεπτίδια και άλλες ενώσεις

Σήμερα, τα umami πεπτίδια αποτελούν ένα δημοφιλές ερευνητικό θέμα αναφορικά με την umami γεύση στα τρόφιμα, λόγω των φυσικών, θρεπτικών και ασφαλών χαρακτηριστικών τους και της ευχάριστης αισθητηριακής τους αντίληψης. Τα umami πεπτίδια ενισχύουν άμεσα τη γεύση των τροφίμων και αλληλεπιδρούν με το αλάτι και το γλουταμινικό μονονάτριο (MSG) βελτιώνοντας τη νόστιμη και απαλή γεύση των τροφίμων (Yang et al., 2021). Την τελευταία πενταετία, πολλές έρευνες έχουν στραφεί στην ανακάλυψη πεπτιδίων που προκαλούν την umami γεύση και προέρχονται από τα τρόφιμα. Για παράδειγμα, οι Liu, Zhu κ.ά. (2020) απομόνωσαν επτά νέα πεπτίδια umami από το *Takifugu rubripes* και επαλήθευσαν ότι αυτά τα πεπτίδια διαθέτουν χαρακτηριστικά umami γεύσης. Τέσσερα πεπτίδια (VPY, TAY, AAPY και GFP) απομονώθηκαν από διάλυμα ενζυμοποίησης κουκουλιών μεταξοσκώληκα και το αποτέλεσμα έδειξε ότι τα πεπτίδια έχουν υψηλή umami γεύση και επίδραση ενίσχυσης του umami (Yu et al., 2018). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά πεπτίδια τροφίμων που προκαλούν την umami γεύση.

Πίνακας 1. Πεπτίδια που προκαλούν την umami γεύση και οι πηγές τροφίμων που εξήχθησαν.

Πεπτίδια UMAMI	Πηγή	Βιβλιογραφία
VYFPGPL	<i>Hypsizygyus marmoreus</i>	(Dong et al., 2023)
YIGGS	<i>Hypsizygyus marmoreus</i>	(Dong et al., 2023)
SGSLGGGSG	<i>Hypsizygyus marmoreus</i>	(Dong et al., 2023)
VEAGP	<i>Hypsizygyus marmoreus</i>	(Dong et al., 2023)
SGLAEGSG	<i>Hypsizygyus marmoreus</i>	(Dong et al., 2023)
PPQEAAQF	Chicken soup	(J. Zhang et al., 2023)
AEEHVEAVN	Chicken soup	(J. Zhang et al., 2023)
NEFGYSNR	Chicken soup	(J. Zhang et al., 2023)
FSGLDGAK	Porcine bone soup	(Liang et al., 2022)
FAGDAPR	Porcine bone soup	(Liang et al., 2022)
FSGLDSK	Porcine bone soup	(Liang et al., 2022)
EEAK	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	(Zhao et al., 2019)

EMQK	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	(Zhao et al., 2019)
STELFK	<i>Oreochromis niloticus</i>	(Shiyan et al., 2021)
FVGLQER	<i>Oreochromis niloticus</i>	(Shiyan et al., 2021)
VADLMR	<i>Oreochromis niloticus</i>	(Shiyan et al., 2021)
DALKKK	<i>Oreochromis niloticus</i>	(Shiyan et al., 2021)
DK	<i>Ruditapes philippinarum</i> & <i>Macra veneriformis</i>	(Wang et al., 2024)
EEK	<i>Ruditapes philippinarum</i> & <i>Macra veneriformis</i>	(Wang et al., 2024)
EDQK	<i>Ruditapes philippinarum</i> & <i>Macra veneriformis</i>	(Wang et al., 2024)
SEGGR	<i>Ruditapes philippinarum</i> & <i>Macra veneriformis</i>	(Wang et al., 2024)
QDSIGS	<i>Ruditapes philippinarum</i> & <i>Macra veneriformis</i>	(Wang et al., 2024)
CCNKS	Jinhua hams	(Dang et al., 2015)
AHSVRFY	Parma hams	(Dang et al., 2015)
HLQLAIR	<i>Takifugu rubripes</i>	(Liu et al., 2020)
DPLRGGYY	<i>Takifugu rubripes</i>	(Liu et al., 2020)
AGLQFPVGR	<i>Takifugu rubripes</i>	(Liu et al., 2020)
LLPGELAK	<i>Takifugu rubripes</i>	(Liu et al., 2020)
AGFAGDDAPR	<i>Takifugu rubripes</i>	(Liu et al., 2020)
GYSFTTTAER	<i>Takifugu rubripes</i>	(Liu et al., 2020)
DAGVIAGLNVLR	<i>Takifugu rubripes</i>	(Liu et al., 2020)
HGEDKEGE	Sanhuang chicken	(Chen et al., 2021)
IPIPATKT	Sanhuang chicken	(Chen et al., 2021)
SEASNK	Sanhuang chicken	(Chen et al., 2021)
IGPGLGR	Sanhuang chicken	(Chen et al., 2021)
AGDDAPR	Sanhuang chicken	(Chen et al., 2021)
FAGDDAPR	Sanhuang chicken	(Chen et al., 2021)

ADGLWL	Sanhuang chicken	(Chen et al., 2021)
KDGGGGK	Sanhuang chicken	(Chen et al., 2021)
PGPAGPAGP	Sanhuang chicken	(Chen et al., 2021)
GFLGPQ	Sanhuang chicken	(Chen et al., 2021)
KLNDAQAPK	Wild edible Termitomyces mushrooms	(L. Zhang et al., 2023)
DSTDEKFLR	Wild edible Termitomyces mushrooms	(L. Zhang et al., 2023)
VGKGAHLSGEH	Wild edible Termitomyces mushrooms	(L. Zhang et al., 2023)
MLKKKKLA	Wild edible Termitomyces mushrooms	(L. Zhang et al., 2023)
SLGFGGPPGY	Wild edible Termitomyces mushrooms	(L. Zhang et al., 2023)
TVATFSSSTKPDD	Wild edible Termitomyces mushrooms	(L. Zhang et al., 2023)
AMDDDEADLLLLAM	Wild edible Termitomyces mushrooms	(L. Zhang et al., 2023)
VEDEDEKPKEK	Wild edible Termitomyces mushrooms	(L. Zhang et al., 2023)
SPEEKKEEET	Wild edible Termitomyces mushrooms	(L. Zhang et al., 2023)
PEGADKPNK	Wild edible Termitomyces mushrooms	(L. Zhang et al., 2023)
SSRNEQSR	Peanut hydrolysate	(Su et al., 2012)
EGSEAPDGSSR	Peanut hydrolysate	(Su et al., 2012)

Κεφάλαιο 3: Βάσεις δεδομένων πεπτιδίων και εφαρμογή Υπολογιστικών Τεχνικών

3.1. Βάσεις δεδομένων πεπτιδίων

Ο αναδυόμενος τομέας της πεπτιδομικής τροφίμων ορίζεται ως το σύνολο των πεπτιδίων που υπάρχουν στα τρόφιμα ή παράγονται κατά την επεξεργασία, αποθήκευση ή πέψη των τροφίμων. Σήμερα, τα βιοδραστικά πεπτίδια αποτελούν τα σημαντικότερα συστατικά των λεγόμενων λειτουργικών τροφίμων (Martini et al., 2021). Εκτός από τα εργαστηριακά πειράματα που εφαρμόζονται στην πεπτιδομική τροφίμων, οι μέθοδοι βιοπληροφορικής χρησιμοποιούνται εκτενώς για την έρευνα των βιοδραστικών πεπτιδίων που προέρχονται από τρόφιμα (Du et al., 2023). Οι μέθοδοι βιοπληροφορικής περιλαμβάνουν την αποθήκευση και τον σχολιασμό των πεπτιδίων σε βάσεις δεδομένων και την πρόβλεψη της βιοδραστικότητας των πεπτιδίων με τη χρήση υπολογιστικών τεχνικών, όπως η Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking) ή τα Ποσοτικά Μοντέλα Σχέσης Δομής-Δράσης (Quantitative Structure Activity Relationship - QSAR). Επιπλέον, περιλαμβάνονται ο σχεδιασμός προγραμμάτων πρόβλεψης της βιοδραστικότητας ή άλλων χαρακτηριστικών αυτών των ενώσεων, καθώς και προγραμμάτων προσομοίωσης της πρωτεόλυσης (Iwaniak et al., 2024).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δύο βάσεις δεδομένων πεπτιδίων τροφίμων η BIOPEP-UWM: Sensory peptides and amino acids (https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep/start_biopep.php) και η Fermented Food Database - FERMFoodb (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/fermfoodb/>).

Η βάση δεδομένων BIOPEP-UWM αποτελεί ένα τυπικό εργαλείο υποστήριξης της πεπτιδομικής τροφίμων. Ο ιστότοπος BIOPEP-UWM παρέχει πρόσβαση στις βάσεις δεδομένων που αναφέρονται στις ακόλουθες ομάδες ενώσεων: πρωτεΐνες, βιοδραστικά πεπτίδια, αλλεργιογόνες πρωτεΐνες και τους επιτόπους τους, αισθητηριακά πεπτίδια και αμινοξέα, πεπτίδια με εν δυνάμει βιοδραστικότητα (*in silico*), καθώς και τροποποιημένα αμινοξέα (Iwaniak et al., 2024). Η βάση δεδομένων επιτρέπει, για παράδειγμα, την εύρεση βιοδραστικών ενώσεων ή τμημάτων σε αλληλουχίες πρωτεϊνών ή πεπτιδίων που σχετίζονται με τη γεύση, τον υπολογισμό ποσοτικών παραμέτρων που περιγράφουν τις πρωτεΐνες ως πρόδρομες ουσίες βιοδραστικών πεπτιδίων και την προσομοίωση της πρωτεόλυσης (Iwaniak et al., 2024). Χρησιμοποιείται σε εργασίες που αξιολογούν τη

βιοπληροφορική ή ενσωματώνουν *in silico* προβλέψεις και υπολογισμούς με εργαστηριακά πειράματα. (Iwaniak et al., 2024)

Η βάση δεδομένων ζυμωμένων γαλακτοκομικών τροφίμων (FermFoodDb) είναι φιλική προς τον χρήστη και περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό παραδοσιακών γαλακτοκομικών τροφίμων που διανέμονται παγκοσμίως, τα οποία έχουν ελεγχθεί ως προς την περιεκτικότητά τους σε μικροβιακές ταξινομικές ομάδες (σε επίπεδο φύλου και είδους), καθώς και ορισμένα συναφή δεδομένα που περιλαμβάνουν ετικέτα γεωγραφικής ένδειξης, χώρα/περιοχή προέλευσης, καθώς και τεχνολογικές πτυχές (πηγή γάλακτος, επεξεργασία γάλακτος, ωρίμανση) (Zinno et al., 2022). Επιπλέον, μπορούν να αντληθούν βάσης δεδομένων πεπτιδίων που σχετίζονται με τη γεύση κάθε είδους ζημούμενου τροφίμου (Zinno et al., 2022).

3.2. Μοριακή πρόσδεση

Η μοριακή πρόσδεση είναι η υπολογιστική τεχνική που μπορεί να προβλέψει τις θέσεις πρόσδεσης και να διευκρινίσει τον μηχανισμό μοριακής δράσης προσομοιώνοντας την αυθόρμητη διαδικασία πρόσδεσης ενώσεων στους υποδοχείς (Brooijmans and Kuntz, 2003). Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται συνήθως σε μελέτες σχεδιασμού φαρμάκων (Ferreira et al., 2015). Επιπλέον, μπορεί να αποτελέσει σημείο αναφοράς για τον χαρακτηρισμό των θερμοδυναμικών και δυναμικών μεταβολών των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, το οποίο όχι μόνο επαληθεύει τα πειραματικά αποτελέσματα σε μοριακό επίπεδο αλλά και καθοδηγεί το πραγματικό πείραμα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι μήτρες τροφίμων είναι συνήθως πολύπλοκες και οι αντιδράσεις ποικίλες, η μοριακή πρόσδεση παρουσιάζει μεγάλες δυνατότητες στην πρόβλεψη του τρόπου δράσης και στη διευκόλυνση της μείωσης του κόστους των πειραμάτων, γεγονός που δικαιολογεί την εκτεταμένη εφαρμογή αυτής της μεθόδου στην επιστήμη των τροφίμων (Tao et al., 2020).

3.2.1. Διάγραμμα ροής Μοριακής Πρόσδεσης

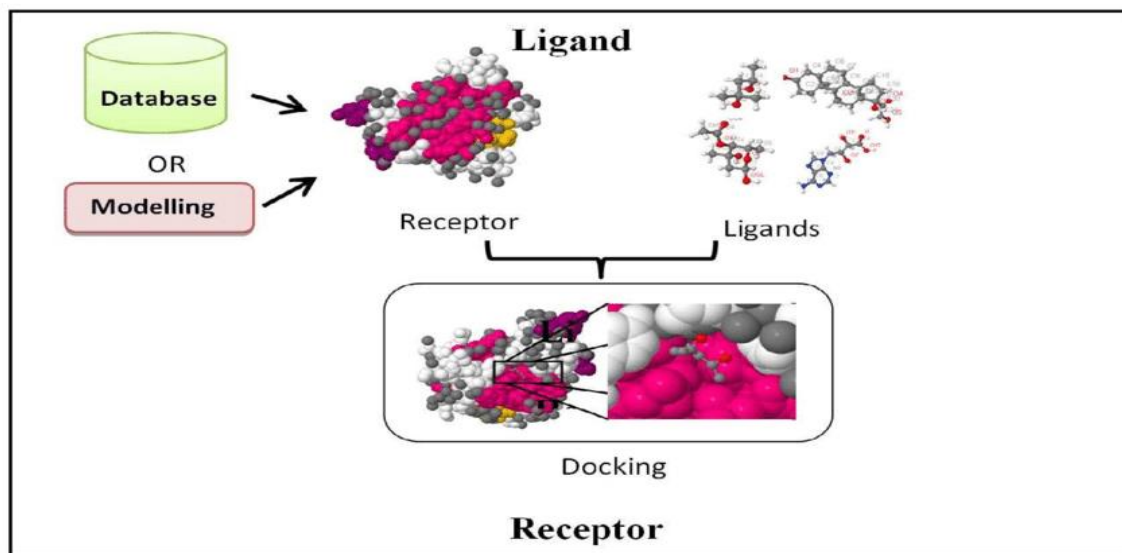
Η μοριακή πρόσδεση είναι μια μέθοδος πρόβλεψης της θέσης και της συγγένειας ενός προσδέτη (μικρό μόριο) σε μια θέση πρόσδεσης υποδοχέα (μακρομόριο) (Roche et al., 2015). Στην **Εικόνα 6** παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής της μοριακής πρόσδεσης.

Οι περισσότερες μελέτες μοριακής πρόσδεσης περιλαμβάνουν τρία στάδια (Eweas, 2014):

- Στο πρώτο στάδιο, επιλέγεται ένα μοντέλο που περιγράφει τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις στο σύστημα. Τα δύο πιο συνηθισμένα μοντέλα που χρησιμοποιούνται στη μοριακή πρόσδεση είναι η κβαντομηχανική και η μοριακή μηχανική. Αυτά τα μοντέλα επιτρέπουν τον υπολογισμό της ενέργειας οποιασδήποτε διάταξης ατόμων και μορίων του συστήματος και τον τρόπο μεταβολής της ενέργειας του συστήματος καθώς αλλάζουν οι θέσεις των ατόμων και των μορίων.

- Το δεύτερο στάδιο μιας μελέτης μοριακής πρόσδεσης είναι ο ίδιος ο υπολογισμός, όπως μια ελαχιστοποίηση της ενέργειας, μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής ή Monte Carlo ή μια αναζήτηση διαμόρφωσης.

- Τέλος, ο υπολογισμός πρέπει να αναλυθεί, όχι μόνο για να υπολογιστούν οι ιδιότητες αλλά και για να ελεγχθεί ότι έχει πραγματοποιηθεί σωστά.



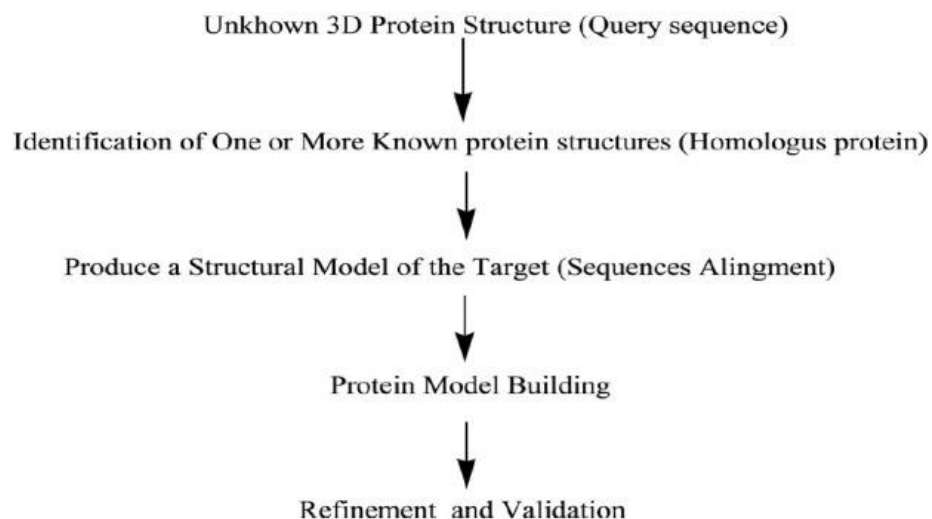
Εικόνα 6. Διάγραμμα ροής των τεσσάρων βασικών βημάτων των πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης (Eweas, 2014).

3.2.2. Ομόλογη μοντελοποίηση

Στην πιο στοιχειώδη μορφή της, η ομόλογη μοντελοποίηση περιλαμβάνει τον υπολογισμό της δομής μιας πρωτεΐνης για την οποία είναι γνωστή μόνο η αλληλουχία, χρησιμοποιώντας τη στοίχισή της με μια ομόλογη πρωτεΐνη για την οποία είναι γνωστή η δομή. (Venselaar et al., 2010)

Η ομόλογη μοντελοποίηση είναι η μόνη μέθοδος επιλογής για τη δημιουργία ενός αξιόπιστου τριδιάστατου μοντέλου μιας πρωτεΐνης από την αλληλουχία αμινοξέων της.

Χρησιμοποιείται για την αναζήτηση της διαμόρφωσης που έχει υποστεί την ελάχιστη διαφοροποίηση, δηλαδή των δομών που έχουν επιλυθεί πειραματικά. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι η δομική διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης είναι περισσότερο συντηρημένη από την αμινοξική της αλληλουχία και ότι μικρές αλλαγές στην αλληλουχία συνήθως οδηγούν σε μικρή μεταβολή της τριδιάστατης δομής (Vyas et al., 2012). Η διαδικασία ομόλογης μοντελοποίησης αποτελείται από τα διάφορα βήματα που απεικονίζονται στην **Εικόνα 7** (Vyas et al., 2012). Η ομόλογη μοντελοποίηση ξεκινά με το πρόγραμμα ομόλογης μοντελοποίησης το οποίο συγκρίνει την αλληλουχία της πρωτεΐνης αγνώστου δομής με μια γνωστή από την πρωτεϊνική βάση δεδομένων Protein Data Bank (PDB - <https://www.rcsb.org/>). Έπειτα, ακολουθεί η δημιουργία του ομόλογου μοντέλου, η βελτιστοποίηση και η αξιολόγησή του. Τα βήματα αυτά μπορούν να επαναλαμβάνονται έως ότου δημιουργηθούν κατάλληλα μοντέλα. Η ομόλογη μοντελοποίηση είναι χρήσιμη στη μοριακή βιολογία και συγκεκριμένα σχετίζεται με τον σχεδιασμό φαρμάκων, τη θέση πρόσδεσης, την εκλεκτικότητα υποστρώματος κ.α (Vyas et al., 2012). Μπορεί επίσης να παρέχει μοντέλα εκκίνησης για την επίλυση δομών από την κρυσταλλογραφία ακτινών X, το NMR και την ηλεκτρονική μικροσκοπία. Η σταθερότητα διαμόρφωσης των ομόλογων μοντέλων μπορεί να αξιολογηθεί με επακόλουθες προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (molecular dynamics simulations) (Vyas et al., 2012).



Εικόνα 7: Διαδικασία Ομόλογης μοντελοποίησης (Vyas et al., 2012).

3.2.3. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής

Η Μοριακή Δυναμική (Molecular Dynamics - MD) είναι μια τεχνική προσομοίωσης κατά την οποία τα άτομα ενός μοριακού συστήματος αλληλεπιδρούν για ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα με βάση τους νόμους της φυσικής, αποδίδοντας έτσι την κίνηση των σωματιδίων (Frenkel and Smit, 2023). Πιο συγκεκριμένα, μέσω της μοριακής δυναμικής είναι εφικτή η παρακολούθηση της φυσικής χρονικής εξέλιξης ενός συστήματος, όπως ακριβώς γίνεται και σε μια πειραματική διαδικασία. Χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη γεωμετρία και την ενέργεια του εξεταζόμενου συστήματος. Η τελική διαμόρφωση του εξεταζόμενου συστήματος στο χώρο, όπως αυτή προκύπτει από τη μέθοδο της μοριακής δυναμικής, είναι αυτή της ελάχιστης ολικής εσωτερικής ενέργειας (Frenkel and Smit, 2023).

Τα βασικά στάδια που ακολουθούνται σε μια προσομοίωση Μοριακής δυναμικής ενός μοριακού συστήματος είναι τα ακόλουθα: Α) Προετοιμασία, Β) Ελαχιστοποίηση της ενέργειας, Γ) Θέρμανση και εξισορρόπηση, Δ) Παραγωγική φάση. Αρχικά, καθορίζονται οι συντεταγμένες του μακρομόριου, οι οποίες αντλούνται από κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ ή από φασματοσκοπία NMR, ενώ αν δεν είναι διαθέσιμα τέτοιου είδους πειραματικά δεδομένα χρησιμοποιούνται άλλες τεχνικές, όπως η ομόλογη μοντελοποίηση (Frenkel and Smit, 2023). Έπειτα, πραγματοποιείται ελαχιστοποίηση της ενέργειας του συστήματος σύμφωνα με το πεδίο δυνάμεων για τις αρχικές συντεταγμένες, ώστε η προσομοίωση να είναι σταθερή. Το σύστημα θερμαίνεται σταδιακά μέχρι τη θερμοκρασία στην οποία θα πραγματοποιηθεί η προσομοίωση και στη συνέχεια εξισορροπείται (Frenkel and Smit, 2023). Τέλος, κατά την παραγωγική φάση, πραγματοποιούνται οι κυρίως προσομοιώσεις του συστήματος για το επιθυμητό χρονικό διάστημα που μπορεί να κυμαίνεται από αρκετές εκατοντάδες ps έως ns ή και περισσότερο. Στη διάρκεια της φάσης αυτής υπολογίζονται οι θερμοδυναμικές παράμετροι που θα χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή συμπερασμάτων. Μετά το τέλος της προσομοίωσης, είναι εφικτή η καταγραφή των ατομικών θέσεων και ταχυτήτων και η αναπαράστασή τους γραφικά σε συνάρτηση με το χρόνο (Frenkel and Smit, 2023).

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εύρεση πεπτιδίων που εν δυνάμει ενεργοποιούν την umami γεύση με χρήση υπολογιστικών εργαλείων. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν μέσω εφαρμογής μοριακής πρόσδεσης οι αλληλεπιδράσεις των πεπτιδίων που περιέχονται στο γιαούρτι με τον ανθρώπινο υποδοχέα T1R1/T1R3. Η διαδικτυακή βάση δεδομένων ελεύθερης πρόσβασης FermFooDb χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή των επιλεγόμενων προς μελέτη πεπτιδίων.

Δεδομένου ότι η θέση πρόσδεσης των πεπτιδίων στον ανθρώπινο T1R1/T1R3 υποδοχέα δεν έχει προσδιοριστεί, αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής πρόσδεσης των εξεταζόμενων πεπτιδίων στο σύνολο του υποδοχέα "Τυφλή μοριακή πρόσδεση" με χρήση του λογισμικού DockThor. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής πρόσδεσης σε πεπτίδια που αντλήθηκαν από την βιβλιογραφία και παρουσιάζουν umami γεύση, σε μια προσπάθεια επικύρωσης των αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής πρόσδεσης, με χρήση του λογισμικού Webina, σε καθορισμένο πλέγμα που περιελάμβανε τη θέση πρόσδεσης του L-γλουταμινικού οξέος, ως ένα επιπλέον φίλτρο επιλογής.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή των λογισμικών συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας και, εν τέλη, επιλέχθηκαν 10 πεπτίδια τα οποία έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό ικανοποιητική ενέργεια πρόσδεσης (docking score) αλλά και κοινό μοτίβο αλληλεπιδράσεων με τα γνωστά από τη βιβλιογραφία umami πεπτίδια. Για την τελική των πεπτιδίων με εν δυνάμει umami γεύση χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

Κεφάλαιο 4: Επιλογή και προετοιμασία πεπτιδίων

4.1 Χρησιμοποιούμενες βάσεις δεδομένων & επιλογή πεπτιδίων

Στην παρούσα εργασία ο εξεταζόμενος δειγματοχώρος αποτελείται από πεπτίδια που αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων πεπτιδίων Fermented Food Database (FermFoodDb - <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/fermfoodb/index.php>). Η συγκεκριμένη βάση δεδομένων έχει ελεύθερη πρόσβαση, είναι φιλική προς τον χρήστη και περιλαμβάνει πληροφορίες για τη γεύση πεπτιδίων τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση. Τα ζυμώμενα τρόφιμα επιλέχθηκαν διότι η πρωτεόλυση που πραγματοποιείται κατά τη ζύμωση των τροφίμων παράγει αμινοξέα και πεπτίδια που ενισχύουν ιδιαίτερα την umami γεύση (π.χ. α-γλουταμυλικά πεπτίδια). (Zhao et al., 2016)

Από τη βάση δεδομένων FermFoodDb επιλέχθηκαν προς μελέτη τα πεπτίδια που περιέχονται στο γιαούρτι, οι αλληλουχίες των οποίων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2**. Συνολικά, μελετήθηκαν 85 πεπτίδια, τα οποία αποτελούνται από 2 έως 24 αμινοξέα.

Πίνακας 2. Μελετούμενα πεπτίδια γιαουρτιού από τη βάση δεδομένων πεπτιδίων Food Matrix Of FermFoodDb

Πεπτιδική Αλληλουχία	Μέγεθος πεπτιδίου	Τρόφιμο	Πρωτεΐνη	Παραπομπή
IPP	3	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Kajimoto et al., 2000)
IPP	3	Γιαούρτι	κ-καζεΐνη	(Kajimoto et al., 2000)
VPP	3	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Kajimoto et al., 2000)
QQQTED	6	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Kajimoto et al., 2000)
NSKKTVD	7	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	αS2-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)

YP	2	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
YAKPA	5	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	κ-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
TVQVT	5	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	κ-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
TVQVTST	7	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	κ-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
VPYPQ	5	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
PIGSENS	7	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	αS1- καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
KAVPYPQ	7	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β- καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
TVQVTSTAV	9	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	κ-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
IESPPEIN	8	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	κ-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
NVPGEIVE	8	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)

VIESPPEIN	9	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	κ-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
KVLPVPE	7	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
GVRGPFPII	9	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
DKIHPF	6	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
IPIQY	5	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
VFGKEKVNEL	10	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	αS1- καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
ELQDKIHPF	9	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
YFPGPIP	9	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
QQPVLGPVRGPF	13	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
HKEMPFKYPVQPF	14	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)

ΜΑΡΚΗΚΕΜΡΡΚΥΡ QPF	18	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
LVYRFPGPIPN	11	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
SLVYRFPGPIPN	12	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
MRPKYRVQPF	11	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
TQTRVVPPFLQPE	14	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
YQRPVLGPVRGPFPII	16	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
RDMPIQAFLL	10	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
QRPVLGPVRGPFPIV	16	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
YQRPVLGPVRGPFPII V	17	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
ΜΑΡΚΗΕΜΡΡΚΥΡ	13	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)

SLPQNIPPLTQTPVVV PFLQPEVM	24	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
NIPPLTQTPVVVPFLQ PEVM	20	Γιαούρτι εμπλουτισμένο με ιχθυέλαιο	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
FAQ	3	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
KFQSEE	6	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
QQQTEDELQ	9	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
KAVPYPQ	7	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
SPPEIN	6	Γιαούρτι	κ-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
LIHPFAQ	7	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)

DKIHPFAQTQ	10	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
KAVPYPQRDMPIQ	13	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
SQSKVLPVPQ	10	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
AVPYPQRDMPI	11	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
DKIHPF	6	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
SVLSLSQ	7	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
SVLSLS	6	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
YQEPVL	6	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and

				Brückner, 2000)
LTLTDVE	7	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
DMPIQAF	7	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
SLTLTDVE	8	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
LNVPGEIVQ	9	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
FVAPFPE	7	Γιαούρτι	αS1- καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
FLL	3	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
SLVYFPFGPIHN	12	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)

DMPIQAFL	8	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
SLVYFPFGPIHNSLPQ	16	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
VAPFPEVF	8	Γιαούρτι	αS1-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
GPVRGPF	7	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
FVAPFPEVFG	10	Γιαούρτι	αS1-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
YYEQPVLGPVRGPFPI IV	18	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
LYQEPVLGPVRGPF	14	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
LLYQEPVLGPVRGPF	15	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and

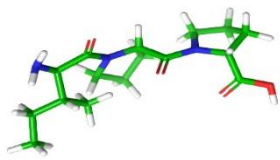
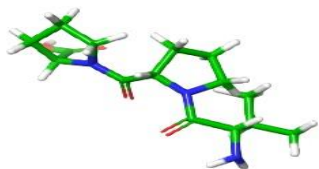

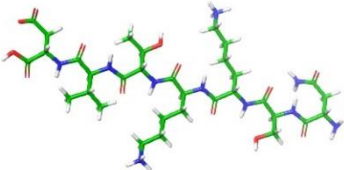
				Brückner, 2000)
NLHLPLPLLLQ	12	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
YP	2	Γιαούρτι	β-καζεΐνη	(Farvin et al., 2010)
DKIHPFAQ	8	Γιαούρτι από πρόβειο γάλα	β-καζεΐνη	(Papadimitrio u et al., 2007)
TQTPVVVP	8	Γιαούρτι από πρόβειο γάλα	β-καζεΐνη	(Papadimitrio u et al., 2007)
RPKHPIKH	8	Γιαούρτι από πρόβειο γάλα	αS1- καζεΐνη	(Papadimitrio u et al., 2007)
SQPK YQEP	9	Γιαούρτι από πρόβειο γάλα	β-καζεΐνη	(Papadimitrio u et al., 2007)
NQFLPYPY	8	Γιαούρτι από πρόβειο γάλα	κ-καζεΐνη	(Papadimitrio u et al., 2007)
TQTPVVVP	8	Γιαούρτι από πρόβειο γάλα	β-καζεΐνη	(Papadimitrio u et al., 2007)
YPVEPFTE	8	Γιαούρτι από πρόβειο γάλα	β-καζεΐνη	(Papadimitrio u et al., 2007)
TYKEE	5	Γιαούρτι από άπαχο γάλα	αS2- καζεΐνη	(Schieber and

				Brückner, 2000)
IPP	3	Γιαούρτι από άπαχο γάλα	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
IPP	3	Γιαούρτι από άπαχο γάλα	κ-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
YQQPVL	6	Γιαούρτι από άπαχο γάλα	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
RINKK	5	Γιαούρτι από άπαχο γάλα	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
SLPQN	5	Γιαούρτι από άπαχο γάλα	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
VPP	3	Γιαούρτι από άπαχο γάλα	β-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)
ARHPH	5	Γιαούρτι από άπαχο γάλα	κ-καζεΐνη	(Schieber and Brückner, 2000)

4.2 Σχεδιασμός πεπτιδίων σε 2D και 3D δομή

Ο σχεδιασμός των πεπτιδίων σε 2D μορφή και η μετατροπή σε 3D μορφή πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος MAESTRO της εταιρείας Schrödinger. Στον **Πίνακα 3** απεικονίζονται οι δομές των μελετούμενων πεπτιδίων σε 3D μορφή.

Πίνακας 3. Δομές πεπτιδίων γιαουρτιού σε 3D μορφή

Πεπτιδική Αλληλουχία	3D Δομή Πεπτιδίου
IPP	
VPP	
QQQTED	
NSKKTVD	

YP



YAKPA

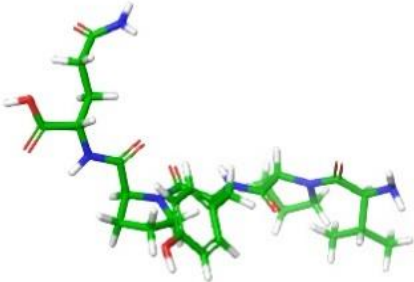
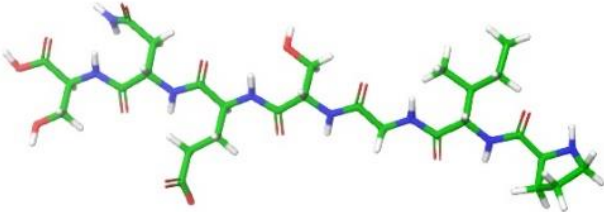
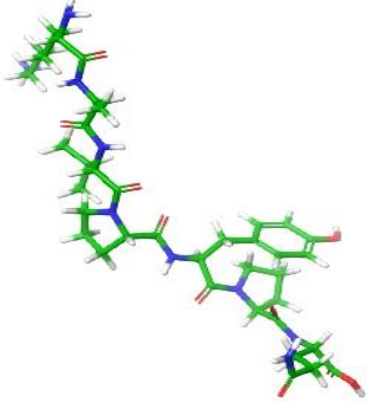


TVQVT

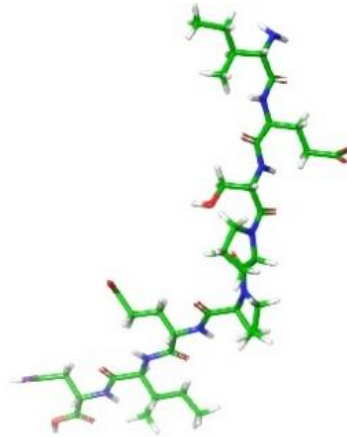


TVQVTST

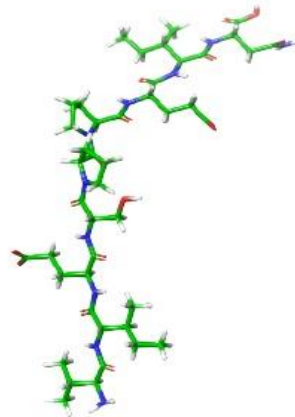




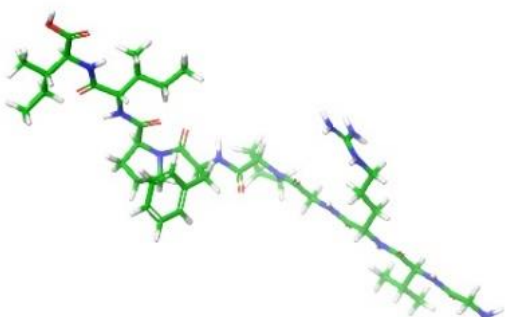
<p>VPYPQ</p>	
<p>PIGSENS</p>	
<p>KAVPYPQ</p>	

IESPPEIN



NVPGEIVE



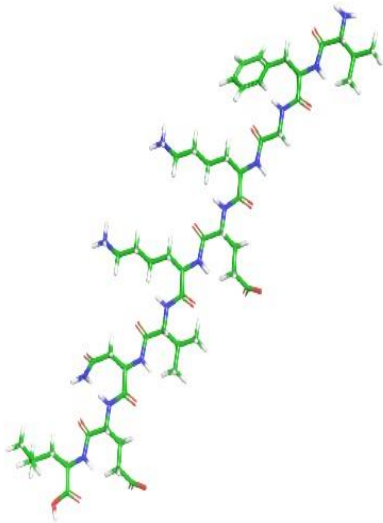
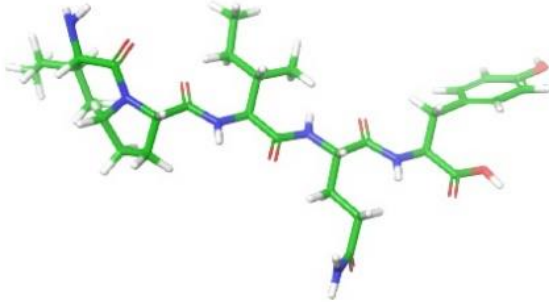
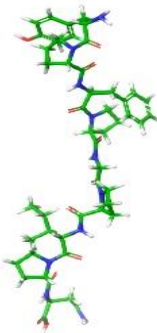
<p>VIESPPEIN</p>	
<p>KVLPVPE</p>	
<p>GVRGPFPII</p>	

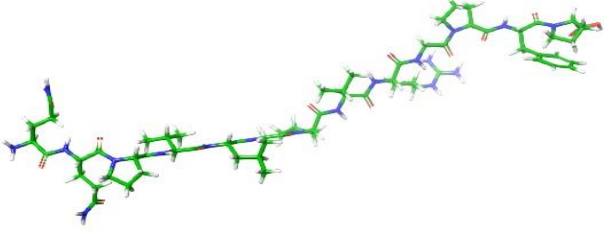
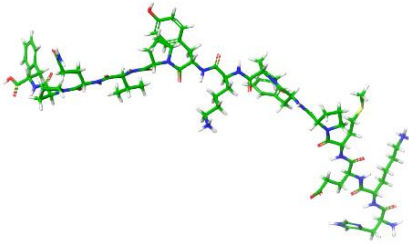
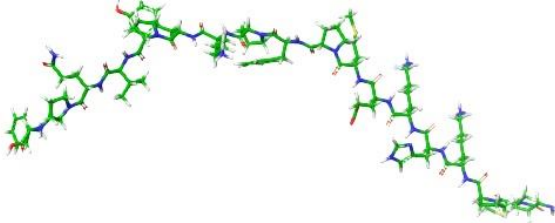
DKIHPF

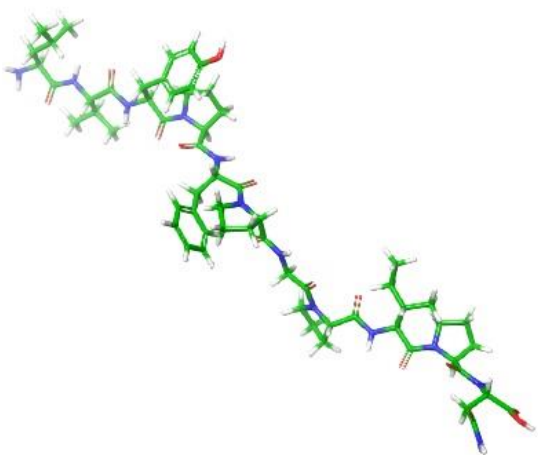
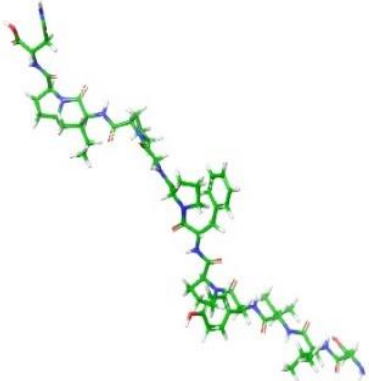
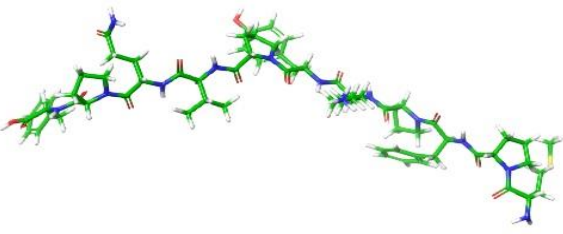


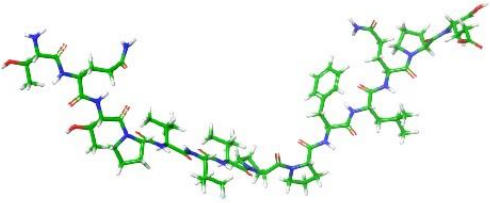

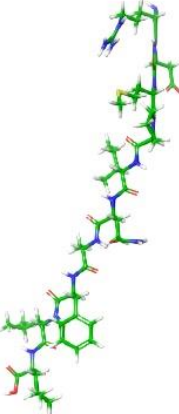
IPIQY

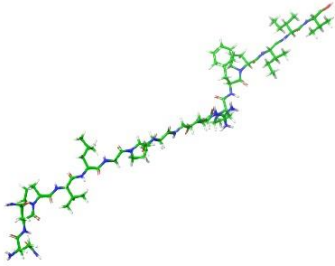

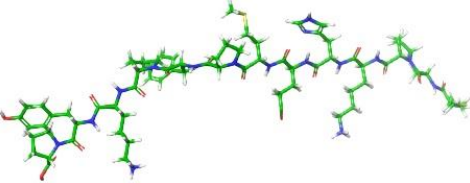


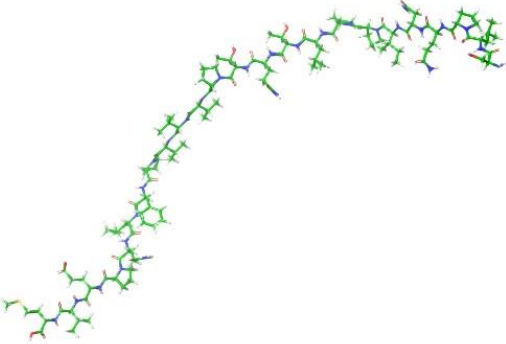
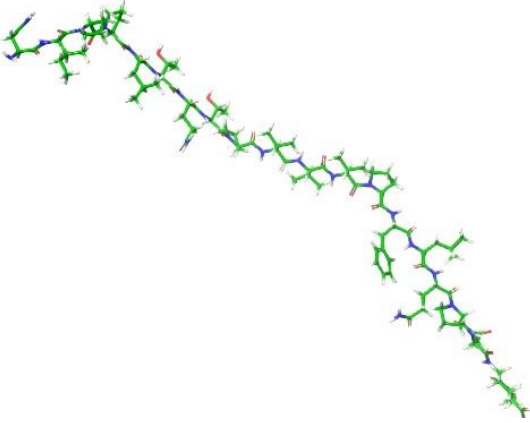
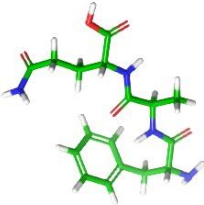
<p>VFGKEKVNEL</p>	
<p>ELQDKIHPF</p>	
<p>YFPFGPIP</p>	

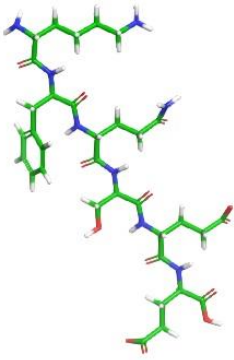
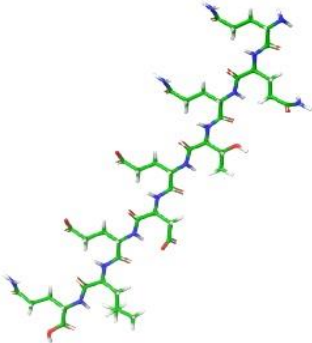
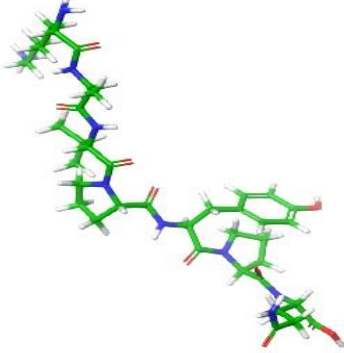
<p>QQPVLGPVVRGPF</p>	
<p>HKEMPFPKYPVQPF</p>	
<p>MAPKHKEMPFPKYPVQPF</p>	

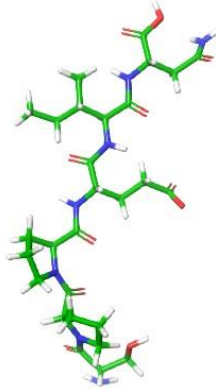
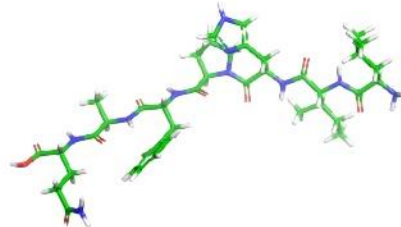

<p>LVYFPFGPIP</p>	
<p>SLVYFPFGPIP</p>	
<p>MPFPKYPVQPF</p>	

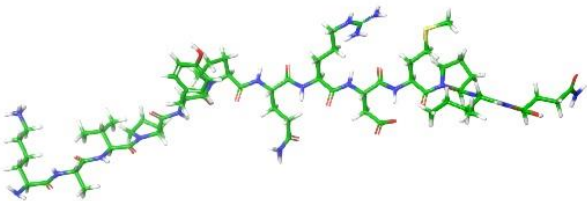
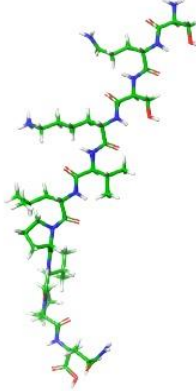
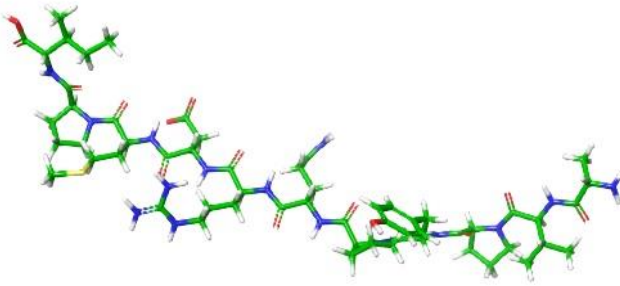
<p>TQTPVVVPPFLQPE</p>	
<p>YQQPVLGPVVRGPFPII</p>	
<p>RDMPIQAFLI</p>	

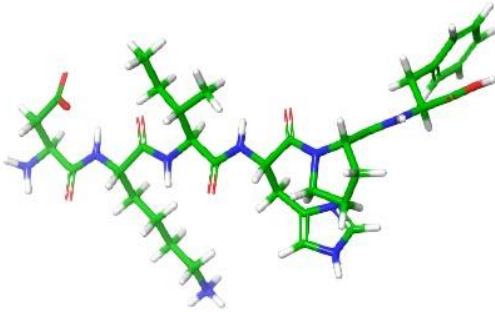
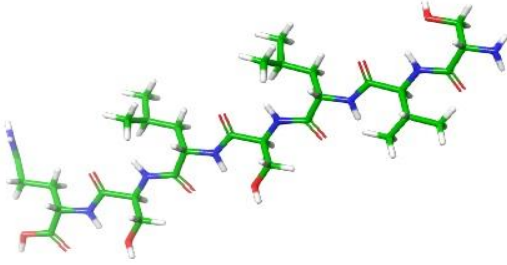
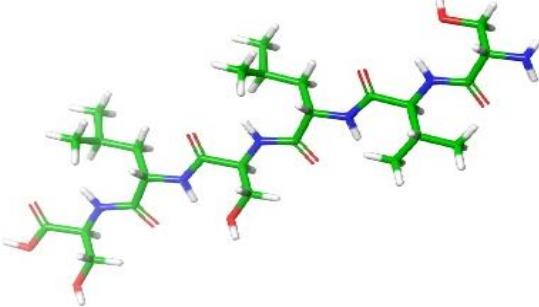
<p>QQPVLGPVVRGPFPIIV</p>	
<p>YQQPVLGPVVRGPFPIIV</p>	
<p>MAPKHEMPFPKYP</p>	

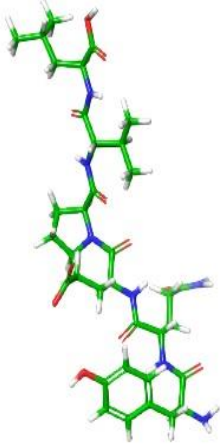
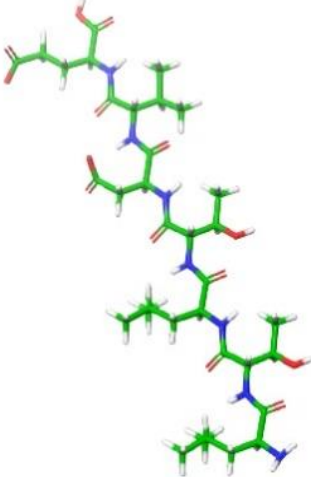
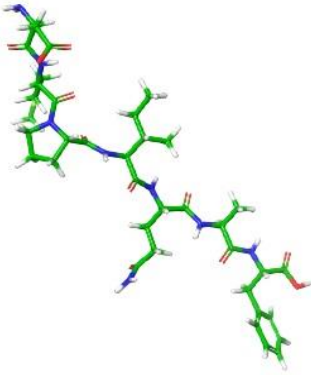
<p>SLPQNIPLTQTPVVVPFL QPEVM</p>	
<p>NIPPLTQTPVVVPFLQPEV M</p>	
<p>FAQ</p>	

<p>KFQSEE</p>	
<p>QQQTEDELQ</p>	
<p>KAVPYPQ</p>	

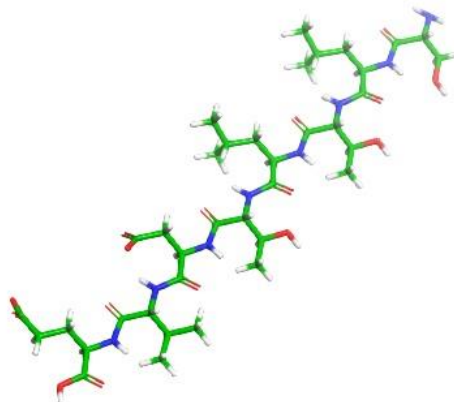
<p>SPPEIN</p>	
<p>LIHPFAQ</p>	
<p>DKIHPFAQTQ</p>	

<p>KAVPYPQRDMPIQ</p>	
<p>SQSKVLPVPQ</p>	
<p>AVPYPQRDMPI</p>	

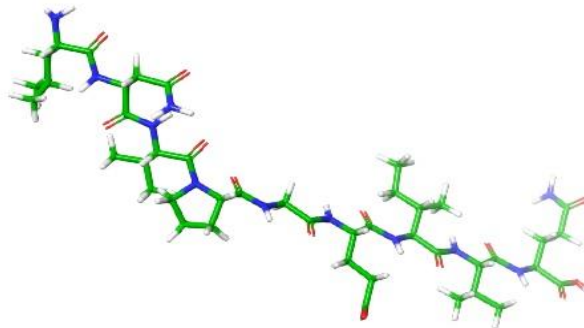
<p>DKIHPF</p>	
<p>SVLSLSQ</p>	
<p>SVLSLS</p>	

<p>YQEPVL</p>	
<p>LTLTDVE</p>	
<p>DMPIQAF</p>	

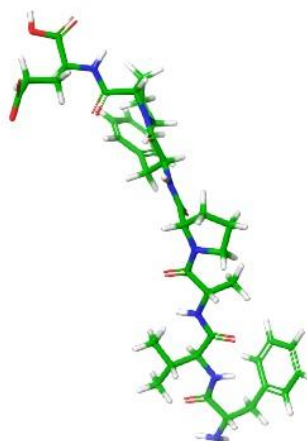
SLTLTDVE

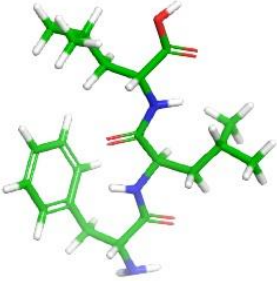
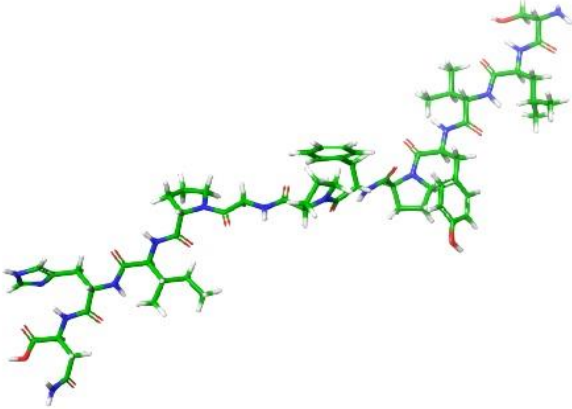
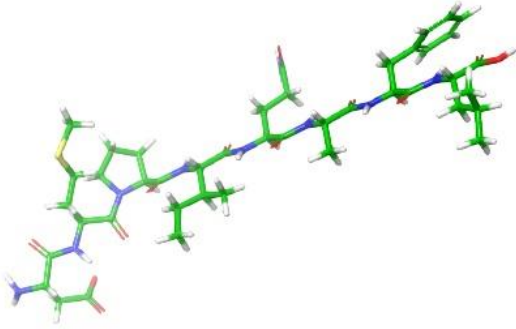


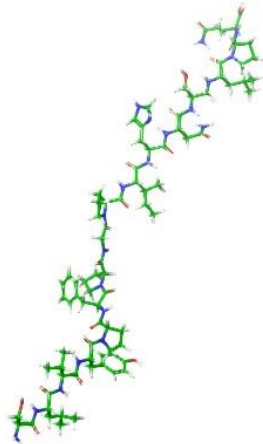
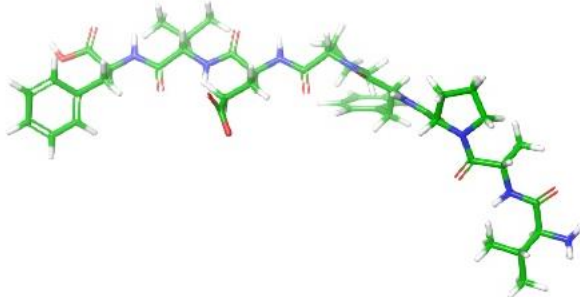
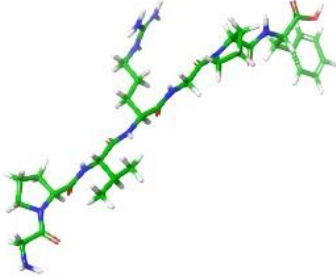
LNVPGEIVQ



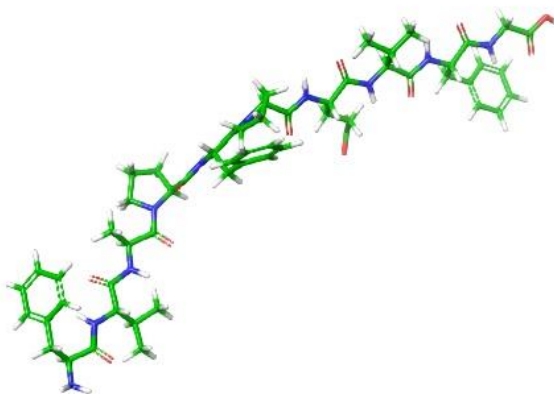
FVAPFPE



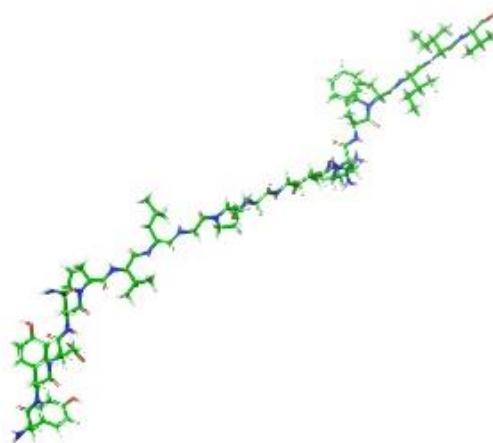
<p>FLL</p>	 <p>A 3D ball-and-stick model of the peptide FLL. The backbone is shown in green, with blue nitrogen atoms and red oxygen atoms. The side chains are shown in white and green. The peptide is in a compact, folded conformation.</p>
<p>SLVYFPFGPIHN</p>	 <p>A 3D ball-and-stick model of the peptide SLVYFPFGPIHN. The backbone is shown in green, with blue nitrogen atoms and red oxygen atoms. The side chains are shown in white and green. The peptide is in a long, extended conformation.</p>
<p>DMPIQAFL</p>	 <p>A 3D ball-and-stick model of the peptide DMPIQAFL. The backbone is shown in green, with blue nitrogen atoms and red oxygen atoms. The side chains are shown in white and green. The peptide is in a long, extended conformation.</p>

<p>SLVYPFPGPIHNSLPQ</p>	
<p>VAPFPEVF</p>	
<p>GPVRGPF</p>	

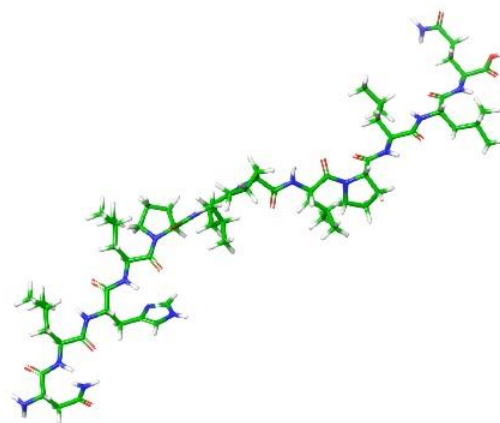
FVAPFPEVFG



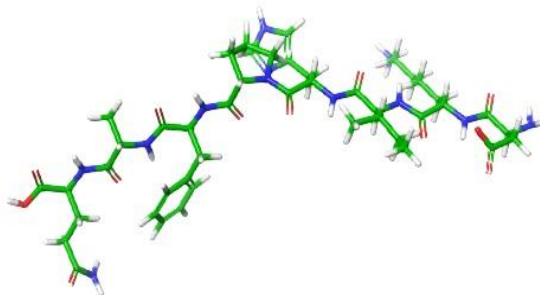
YYEQPVLGPVRGPFPIIV



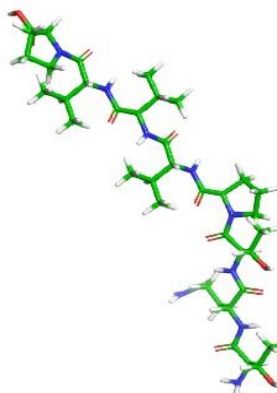
NLHLPLPLLLQ



DKIHPFAQ

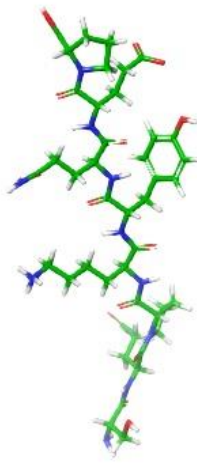
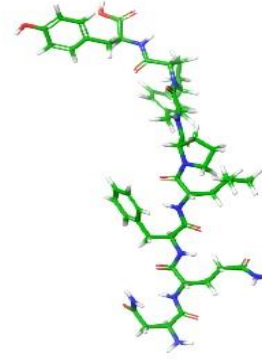
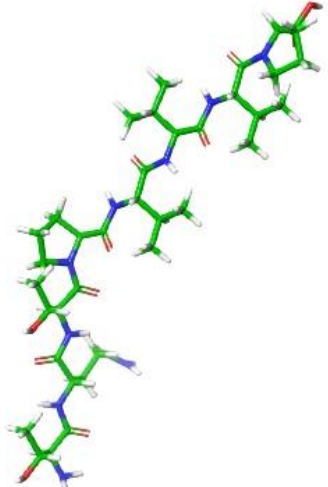


TQTPVVVP

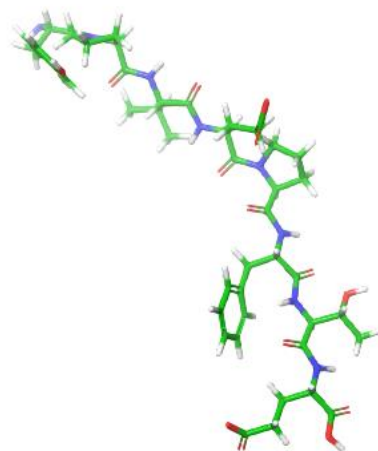


RPKHPIKH

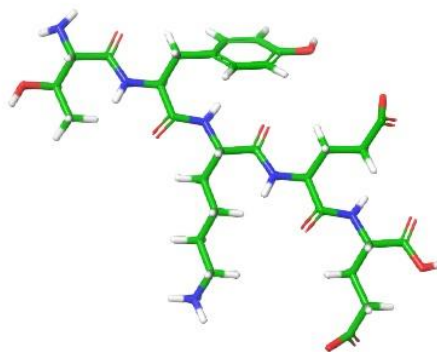


<p>SQPKYQEP</p>	
<p>NQFLPYPY</p>	
<p>TQTPVVVP</p>	

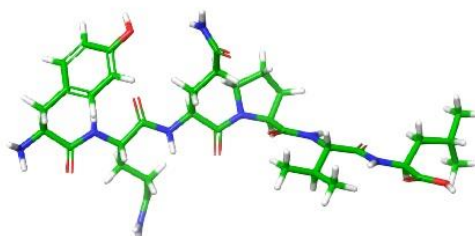
YPVEPFTE



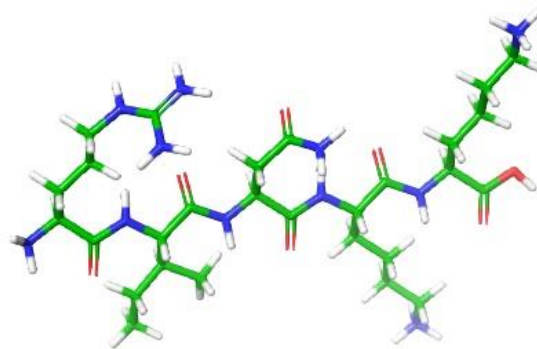
TYKEE



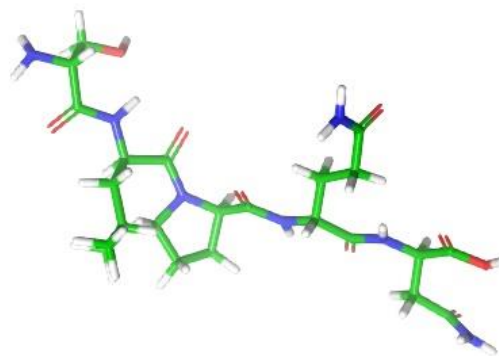
YQQPVL



RINKK



SLPQN



Κεφάλαιο 5: Πειράματα μοριακής πρόσδεσης σε ομόλογο μοντέλο του ανθρώπινου T1R1/T1R3 υποδοχέα

5.1 Δημιουργία και προετοιμασία ομόλογου μοντέλου του ανθρώπινου T1R1/T1R3 υποδοχέα

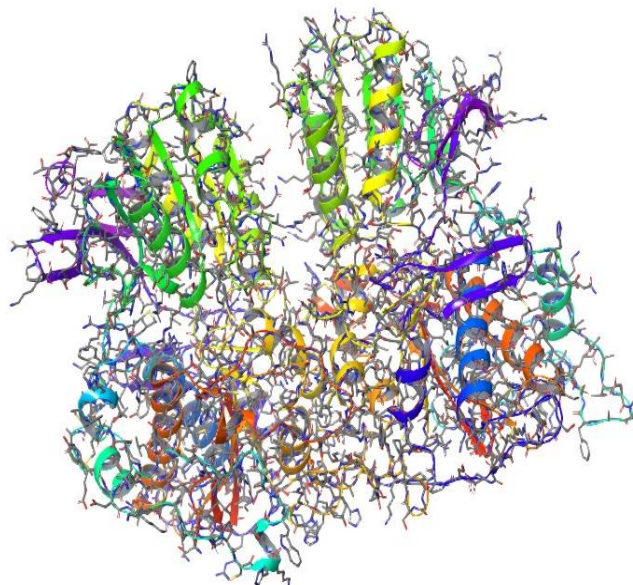
Δεδομένης της απουσίας κρυσταλλικής δομής του ανθρώπινου ετεροδιμερούς T1R1/T1R3 υποδοχέα κρίθηκε απαραίτητη η δημιουργία ομόλογου μοντέλου (Shrivastav and Srivastava, 2013). Το ετεροδιμερές T1R1/T1R3, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ανήκει στην οικογένεια των συζευγμένων με G πρωτεΐνες (GPCR) υποδοχέων, η δομή των οποίων αποτελείται από μια εξωκυτταρική N-τελική περιοχή, που ονομάζεται Venus flytrap domain, VFT, μια εξωκυτταρική περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη (CRD), μια 7-trans-μεμβρανική περιοχή (7-TMD) και μια ενδοκυτταρική C-τελική περιοχή (Zhang et al., 2022). Ο ανθρώπινος T1R1/T1R3 είναι ένας υποδοχέας umami γεύσης ευρέος φάσματος και διαθέτει πολλαπλές περιοχές πρόσδεσης. Ειδικότερα, η περιοχή VFT της υπομονάδας T1R1 δρα ως ορθοστερική περιοχή πρόσδεσης, ενώ το μονομερές T1R3 παίζει βοηθητικό ρόλο στην πρόσδεση (Toda et al., 2013). Οι γνωστές ουσίες umami, όπως το γλουταμινικό μονονάτριο (MSG) και τα 5'-νουκλεοτίδια, δρουν κυρίως μέσω της ταυτόχρονης αλληλεπίδρασης με την T1R1-VFT.

Για τη δημιουργία του ομόλογου μοντέλου ακολουθήθηκαν τα ακόλουθα βήματα:

1. Αρχικά, η αλληλουχία αμινοξέων του ανθρώπινου T1R1/T1R3 υποδοχέα ελήφθη χρησιμοποιώντας την ελεύθερης πρόσβασης βάση πρωτεϊνικών δεδομένων AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). Συγκεκριμένα, ελήφθησαν τα μονομερή T1R1 και T1R3 με κωδικούς UniProt (<https://www.uniprot.org/>) Q7RTX1 και Q7RTX0, αντίστοιχα.
2. Στη συνέχεια, για τη δημιουργία του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ομόλογης μοντελοποίησης, ελεύθερης πρόσβασης, SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>).

Στην καρτέλα "Target Sequence(s)", προστέθηκαν οι αμινοξικές αλληλουχίες των δύο μονομερών και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε "Αναζήτηση Πρότυπης Δομής". Από τα αποτελέσματα προέκυψαν συνολικά 20 πρότυπα από τα οποία επιλέχθηκε ως πρότυπο ο μεταβοτροπικός υποδοχέας γλουταμινικού (mGluRs) του *Rattus norvegicus*, με κωδικό PDB: 1EWK για τη δημιουργία του ομόλογου

μοντέλου (**Εικόνα 8**) (Chang et al., 2023). Το συγκεκριμένο πρότυπο παρουσιάζει ομοιότητα με τον ανθρώπινο T1R1/T1R3 υποδοχέα σε ποσοστό 40%. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο και σε άλλες μελέτες και βρίσκεται σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα (Hutasingh et al., 2023).



Εικόνα 8: Ομόλογο μοντέλο του ανθρώπινου T1R1/T1R3 υποδοχέα με βάση το πρότυπο 1EWK.

5.2 Διεξαγωγή πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης

Τη δημιουργία του ομόλογου μοντέλου του ανθρώπινου ετεροδιμερούς T1R1/T1R3 υποδοχέα ακολούθησε η διεξαγωγή πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης με σκοπό τη μελέτη του τρόπου πρόσδεσης των πεπτιδίων του δειγματοχώρου. Από πρόσφατες έρευνες είναι γνωστό ότι η κύρια περιοχή πρόσδεσης των umami πεπτιδίων είναι η περιοχή VFT (Venus Flytrap Domain), χωρίς όμως να υπάρχει καθορισμένο σημείο πρόσδεσης (Liang et al., 2022), (Wang et al., 2020). Για τον λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε "τυφλή μοριακή πρόσδεση" (blind docking) μεταξύ του ομόλογου μοντέλου του ετεροδιμερούς T1R1/T1R3 και των εξεταζόμενων πεπτιδίων με χρήση του λογισμικού ελεύθερης πρόσβασης DOCKTHOR (<https://dockthor.lncc.br/v2/>).

Επιπλέον, για σκοπούς επικύρωσης και σύγκρισης των αποτελεσμάτων "τυφλή μοριακή πρόσδεση" εφαρμόστηκε και σε μια σειρά πεπτιδίων, τα οποία είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι παρουσιάζουν umami γεύση (Dong et al., 2023), (Dang et al., 2015).

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ελήφθησαν υπόψη οι ενεργειακές τιμές docking score και οι δημιουργούμενες αλληλεπιδράσεις των πεπτιδίων στην VFT περιοχή του ομόλογου μοντέλου (Πίνακας 4). Αξίζει να αναφερθεί ότι πεπτίδια των οποίων η αμινοξική αλληλουχία αποτελείται από περισσότερα από 12 αμινοξέα δεν ήταν δυνατόν να προσδεθούν στον εξεταζόμενο υποδοχέα. Επομένως από τα 85 πεπτίδια που συμπεριλαμβάνονταν στις αναφορές πεπτιδίων γιαουρτιού, εξετάστηκαν στην "τυφλή μοριακή πρόσδεση" τα 52.

Πίνακας 4. Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης με εφαρμογή του λογισμικού Dockthor για τα εξεταζόμενα πεπτίδια που περιέχονται στο γιαούρτι

Πεπτίδια	Docking score (kcal·mol ⁻¹)	Αλληλεπιδράσεις
DKIHPF	-8,155	Δεσμός Υδρογόνου Glu172
IESPPEIN	-7,807	Δεσμοί Υδρογόνου Ser217, Cys106, Arg177
IPIQY	-8,148	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Glu178
IPP	-7,613	Δεσμοί Υδρογόνου Arg247, Arg180
KAVPYPQ	-8,555	Δεσμός Υδρογόνου Glu172
KVLPVPE	-8,531	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Arg191

NSKKTVD	-7,086	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Glu178, Ser175, Leu173
NVPGEIVE	-7,086	Δεσμοί Υδρογόνου Lys242, Asp243, Arg191
QQQTED	-6,574	Δεσμός Υδρογόνου Arg177
TVQVT	-7.636	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172,Ser175,Arg191
TVQVTST	-7,841	Δεσμοί Υδρογόνου Glu178,Glu172,Arg191
TVQVTSTAV	-8,646	Δεσμοί Υδρογόνου Ser175, Glu172, Ser217
VIESPPEIN	-9,331	Δεσμοί Υδρογόνου Gln278, Glu178
VPP	-7,441	Δεσμοί Υδρογόνου Arg247, Arg180, Asp215
VPYPQ	-6.889	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Arg177, Ser217
YAKPA	-7,891	Δεσμοί Υδρογόνου Asp219, Glu172, Ser217, Arg191
LVYFPFGPIPN	-9,904	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Ser224
QQQTEDELQ	-9,001	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Glu178, Asp147
KFQSEE	-7,470	Δεσμοί Υδρογόνου Glu178, Arg191, Arg177
FAQ	-7,322	Δεσμοί Υδρογόνου Asp147
SPPEIN	-6,766	Δεσμοί Υδρογόνου Arg191, Glu172, Arg177, Glu173
SLVYFPFGPIPN	-9,542	Δεσμοί Υδρογόνου Ser217, Asp218, Glu172
MPFPKYPVQPF	-10,051	Δεσμοί Υδρογόνου Arg191, Glu172, Asn150
RDMPIQAFL	-8,383	Δεσμοί Υδρογόνου Glu178, Glu172,Ile225
LIHPFAQ	-8,851	Δεσμοί Υδρογόνου Glu178, Arg177
DKIHPFAQTQ	-7,996	Δεσμοί Υδρογόνου Leu173, Glu178, Glu172
SQSKVLPVPQ	-8,483	Δεσμοί Υδρογόνου Glu178, Arg91, Glu172
AVPYPQRDMPI	-9.499	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Asp218, Ser217, Arg171
SVLSLSQ	-6,87	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172,Glu178
YQEPVL	-8,065	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172,Arg171

LTLTDVE	-7,973	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Ser175, Arg191, Arg177
DMPIQAF	-8,985	Δεσμοί Υδρογόνου Ser175, Glu178, Ser217
SLTLTDVE	-7,458	Δεσμοί Υδρογόνου Arg177, Arg191, Glu172
LNVPGEIVQ	-8,966	Δεσμοί Υδρογόνου Gln221, Ser224, Glu172
FVAPFPE	-9,27	Δεσμοί Υδρογόνου Arg177, Glu172, Arg191
SLVYFPFGPIHN	-9,542	Δεσμοί Υδρογόνου Cys106, Ser217, Glu172
DMPIQAFL	-8,985	Δεσμοί Υδρογόνου Ser175, Ser217, Glu178, Arg191
FLL	-7,773	Δεσμός Υδρογόνου Asp147
DKIHPEAQ	-8,419	Δεσμοί Υδρογόνου Ser175, Ser217, Arg191, Glu178
VAPFPEVF	-8,022	Δεσμοί Υδρογόνου Arg177, Asp243
GPVRGPF	-7,694	Δεσμοί Υδρογόνου Ser217, Asp219, Glu178, Arg177
FVAPFPEVFG	-8,419	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Arg177, Arg191
TQTPVVVP	-8,071	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Glu178
RPKHPIKH	-8,617	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Arg191, Asp445, Glu178
SQPKYQEP	-8,366	Δεσμοί Υδρογόνου Glu178, Glu172, Arg191, Ile225, Asp243
NQFLPYPY	-8,761	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Ser446, Arg177
YPVEPFTE	-8,861	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Arg191
TYKEE	-7,141	Δεσμός Υδρογόνου Ser217
YQQPVL	-8,042	Δεσμοί Υδρογόνου Arg177, Gln221, Ser224
NLHLPLPLLLQ	-11,381	Δεσμοί Υδρογόνου Ser224, Asp243, Gln221, Arg177
YP	-7,261	Δεσμοί Υδρογόνου Asp147, Ser48

DMPIQAFL	-8.985	Δεσμοί Υδρογόνου Ser217, Ser175, Glu178, Arg191
-----------------	--------	---

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, φαίνεται ότι τα πεπτίδια του γιαουρτιού παρουσιάζουν τιμές πρόσδεσης που κυμαίνονται από -6,57 έως -11,3 kcal·mol⁻¹ σχηματίζοντας πλήθος αλληλεπιδράσεων με τον εξεταζόμενο υποδοχέα. Το πεπτίδιο με τη βέλτιστη ενέργεια πρόσδεσης (docking score) είναι το NLHLPLPLLLQ. Οι πιο συχνά δημιουργούμενες αλληλεπιδράσεις που εμφανίζονται είναι με τα πεπτίδια Glu172, Glu178, Arg177, Arg191, Ser217.

Στον **Πίνακα 5** παρουσιάζεται το μοτίβο αλληλεπιδράσεων των γνωστών από τη βιβλιογραφία πεπτιδίων με umami γεύση, όπως προέκυψε έπειτα από την εφαρμογή του λογισμικού DockThor.

Πίνακας 5. Μοτίβο δημιουργούμενων αλληλεπιδράσεων, έπειτα από την εφαρμογή μοριακής πρόσδεσης με το λογισμικό DockThor σε γνωστά umami πεπτίδια που προέκυψαν από αναζήτηση της βιβλιογραφίας.

Πεπτίδια	Docking score (kcal·mol⁻¹)	Αλληλεπιδράσεις	Βιβλιογραφία
VYFPGPL	-9,12	Δεσμός Υδρογόνου Asp243	(Dong et al., 2023)
YIHGGS	-7,375	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Asp243, Asp445	(Dong et al., 2023)
SGSLGGGSG	-7,736	Δεσμός Υδρογόνου Asp243	(Dong et al., 2023)
VEAGP	-6,585	Δεσμοί Υδρογόνου Arg191, Asp 445, Arg177	(Dong et al., 2023)
PPQEAAQF	-7,557	Δεσμοί Υδρογόνου Glu178, Arg177	(Zhang et al., 2022)
AEEHVEAVN	-7,509	Δεσμοί Υδρογόνου Arg177, Glu178, Glu172, Lys242, Glu 240	(Zhang et al., 2022)

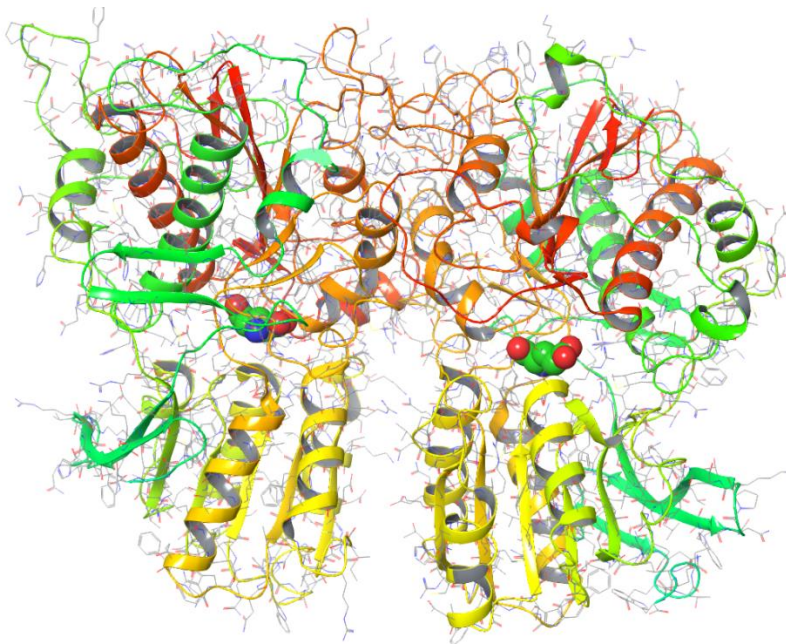
NEFGYSNR	-8,333	Δεσμοί Υδρογόνου Arg191, Ser175, Asp445, Glu172, Asp243 Ser217	(Zhang et al., 2022)
FSGLDGAK	-7,509	Δεσμοί Υδρογόνου Glu178, Arg177, Glu172	(Liang et al., 2022)
FAGDAPR	-8,093	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Glu178	(Liang et al., 2022)
FSGLDSK	-8,061	Δεσμοί Υδρογόνου Ser217, Glu178, Asp147	(Liang et al., 2022)
EANK	-6,26	Δεσμοί Υδρογόνου Arg177, Ser446	(Zhao et al., 2023)
EEAK	-6,643	Δεσμοί Υδρογόνου Arg 177, Glu178	(Zhao et al., 2023)
DALKKK	-7,095	Δεσμοί Υδρογόνου Glu178, Glu 172, Asp445, Ser446, Arg191, Asp219	(Shiyan et al., 2021)
STELFK	-7,661	Δεσμοί Υδρογόνου Glu178, Arg 177, Glu 172, Gln221	(Shiyan et al., 2021)
FVGLQER	-8,268	Δεσμοί Υδρογόνου Glu178, Thr179, Gln221, Glu172, Cys106	(Shiyan et al., 2021)
VADLMR	-7,404	Δεσμοί Υδρογόνου Glu172, Asp445, Arg191, Glu178	(Shiyan et al., 2021)
EMQK	-6,878	Δεσμοί Υδρογόνου Arg177, Glu172, Glu178	(Zhao et al., 2023)

Τα πειράματα "Τυφλής μοριακής πρόσδεσης" για τα πεπτίδια που προέκυψαν από βιβλιογραφική αναζήτηση παρουσίασαν τιμές docking score που κυμαίνονται από -6,26 kcal·mol⁻¹, για το πεπτίδιο EANK, και -9,12 kcal·mol⁻¹, για το πεπτίδιο VYPFGPL. Επομένως, παρατηρείται ότι τα πεπτίδια του γιαουρτιού εμφάνισαν και υψηλότερα

docking score από αυτά της βιβλιογραφίας. Αναφορικά με τις αλληλεπιδράσεις, τα εξεταζόμενα πεπτίδια παρουσίασαν παρόμοιο μοτίβο συγκρινόμενα με τα πεπτίδια που προέκυψαν από την αναζήτηση της βιβλιογραφίας, με κυριότερα τα αμινοξέα Glu172, Glu178, Arg177 και Arg191 του ανθρώπινου T1R1/T1R3 υποδοχέα.

5.3. Αξιολόγηση αποτελεσμάτων μοριακής πρόσδεσης

Στη συνέχεια, τα εξεταζόμενα πεπτίδια υποβλήθηκαν εκ νέου σε πειράματα "Στοχευμένης μοριακής πρόσδεσης" στη θέση πρόσδεσης του L-γλουταμικού οξέος, με χρήση του λογισμικού ελεύθερης πρόσβασης Webina 1.0.5 (<https://durrantlab.pitt.edu/webina/>). Για τον προσδιορισμό της θέσης πρόσδεσης του L-γλουταμικού οξέος πραγματοποιήθηκε υπέρθεση του δημιουργούμενου ομόλογου μοντέλου και του προτύπου (μεταβοτροπικός υποδοχέας γλουταμικού (mGluRs) του *Rattus norvegicus*, με κωδικό PDB: 1EWK). Από την υπέρθεση προέκυψε η θέση πρόσδεσης του L-γλουταμικού οξέος (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Τριδιάστατη απεικόνιση του ανθρώπινου T1R1/T1R3 υποδοχέα με τη θέση πρόσδεσης του L-γλουταμικού οξέος (πράσινο χρώμα).

Ακολούθως, δημιουργήθηκε πλέγμα (Grid box) με τη χρήση του προγράμματος Autodock Vina (Μέγεθος: $x=28 \text{ \AA}$, $y=30 \text{ \AA}$, $z=24 \text{ \AA}$, Κέντρο: $x=33,306 \text{ \AA}$, $y=-3,806 \text{ \AA}$, $z=33,526 \text{ \AA}$) και η ικανότητα πρόσδεσης των πεπτιδίων αξιολογήθηκε σε κάθε μονομερές

ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης που περιλαμβάνουν την ενέργεια πρόσδεσης καθώς και τις δημιουργούμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πεπτιδίων και των μονομερών T1R1 και T1R3 παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**. Επισημαίνεται ότι, τα πεπτίδια των οποίων η αμινοξική αλληλουχία αποτελείται από περισσότερα από 8 αμινοξέα δεν ήταν δυνατόν να προσδέσουν στον εξεταζόμενο υποδοχέα, άρα εξετάστηκαν συνολικά 33 πεπτίδια.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης Webina 1.0.5 για τα εξεταζόμενα πεπτίδια που περιέχονται στο γιαιούρι.

Πεπτίδια	Docking score (T1R1) (kcal·mol ⁻¹)	Docking score (T1R3) (kcal·mol ⁻¹)	Δημιουργούμενες Αλληλεπιδράσεις στο T1R1 μονομερές
DKIHPF	3,022	-8,095	Δεσμοί Υδρογόνου Lys377, Arg281, Arg277, His71
IESPPEIN	3,778	-7,035	Δεσμοί Υδρογόνου Arg277, Lys377, Arg281, His308, Asn150, Ser148
IPIQY	-2,593	-9,129	Δεσμοί Υδρογόνου Ser148, Glu701, Arg277
IPP	-8,071	-7,264	Δεσμοί Υδρογόνου Ser276, Asp218, Ser48
KAVPYPQ	-0,06956	-9.,197	Δεσμοί Υδρογόνου Ala302, Arg277, Glu701, Tyr220, Asp147, Ser276, His71
KVLPVPE	4,349	-7,823	Δεσμοί Υδρογόνου Asp147, Ala302, Glu701, Lys377, His308, Arg307
NSKKTVD	-1,588	-8,282	Δεσμοί Υδρογόνου Asp147, Arg277, Ser276, Gln278, Ala302, Glu301, Glu701, Ser306
NVPGEIVE	6,794	-8,346	Δεσμοί Υδρογόνου Ala302, Arg277, Arg281, Lys377
QQQTED	-7,421	-8,126	Δεσμοί Υδρογόνου Ala302, Glu301, Gln278, Thr149, Tyr220,
TVQT	-4,592	-7,452	Δεσμός Υδρογόνου Pro45
TVQVTST	-0,979	-8,293	Δεσμοί Υδρογόνου Thr149, His71, Lys379
VIESPPEIN	7,443	-	Δεσμοί Υδρογόνου Lys379, Ser306, Ser148, Leu279, Thr149, Ser148, Arg277

VPP	-6,719	-7,140	Δεσμός Υδρογόνου Pro45
VPYPQ	-1,349	-8,597	Δεσμός Υδρογόνου Ser148
YAKPA	-6,623	-8,985	Δεσμοί Υδρογόνου His71, Ala302, Tyr220, Asn150, Glu701, Ser276
KFQSEE	-0,5897	-7,720	Δεσμοί Υδρογόνου Glu701, Asp147, Asp218, Asp219, Ser306, Thr149, His308, Ile309, Arg277
FAQ	-7,617	-6,213	Δεσμοί Υδρογόνου Tyr220, Thr149, Pro45, Ser148
SPPEIN	0,008	-8,584	Δεσμοί Υδρογόνου Thr149, Arg151, His71, Asp218, Ser148, Asn150
LIHPFAQ	-0,7986	-8,985	Δεσμοί Υδρογόνου Ser48, Ser148, Ser276
SVLSLSQ	-5,467	-8,872	Δεσμοί Υδρογόνου His308, Ser148
YQEPVL	0,015	-8,857	Δεσμοί Υδρογόνου His71, Tyr220, Thr149
LTLTDVE	-2,625	-7,886	Δεσμοί Υδρογόνου Lys379, Gln278, Arg151, Ala302
DMPIQAF	2,414	-8,000	Δεσμοί Υδρογόνου Ser216, His71, Ser172, Gln195, Asp218, Lys379, His2178, Asn68, Glu702, Glu45, Ser145, Glu47
SLTLTDVE	2,894	-7,415	Δεσμοί Υδρογόνου Asp218, Ser148, His71
FVAPFPE	4,406	-8,552	Δεσμοί Υδρογόνου Arg307, His308, Lys377, His71, Gln278, Asp218, Thr149, Glu701
FLL	-6,865	-7,680	Δεσμός Υδρογόνου His71
DKIHPFAQ	8,537	-8,278	Δεσμοί Υδρογόνου His71, Asn69, Leu46
VAPFPEVF	-11,724	-8,692	Δεσμοί Υδρογόνου His71, Gln78, Lys155, Asp108, Asp150, Asp219, Asp218
GPVRGPF	2,818	-8,376	Δεσμοί Υδρογόνου His71, Gln278, Arg277, Ser276
TYKEE	-4,486	-8,441	Δεσμοί Υδρογόνου Asp218, Asp147, Glu701, Lys377, Arg307
YQQPVL	-0,812	-9,150	Δεσμοί Υδρογόνου His71, Ala302, Tyr220

YP	-6,538	-9.15	Δεσμοί Υδρογόνου Tyr220, His71
-----------	--------	-------	--------------------------------

Το Webina προσέφερε στοιχεία για την ενέργεια πρόσδεσης και στα δύο μονομερή του ετεροδιμερούς T1R1/T1R3, ενώ παράλληλα λήφθηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πεπτιδίων και των αμινοξέων του υποδοχέα. Τη χαμηλότερη ενέργεια στο μονομερές T1R1 παρουσίασε το πεπτίδιο DKIHHPFAQ με ενέργεια ίση με $8,537 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ενώ τη μεγαλύτερη ενέργεια διαθέτει το πεπτίδιο VAPFPEVF με $-11,724 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Στην περίπτωση εξέτασης του ανθρώπινου T1R3 μονομερούς, το πεπτίδιο FAQ παρουσίασε τη χαμηλότερη ενέργεια $-6,213 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ και το πεπτίδιο KAVPYRQ τη μεγαλύτερη $-9,197 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.

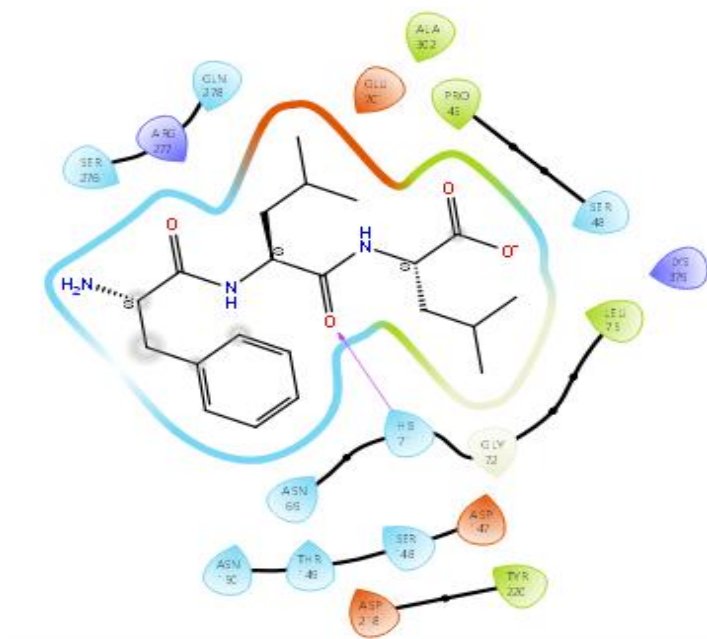
Την αξιολόγηση των παραπάνω αποτελεσμάτων ακολούθησε η επιλογή πεπτιδίων για τη διεξαγωγή προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής. Η επιλογή αυτή στηρίχθηκε στο πλήθος των αλληλεπιδράσεων που ήταν κοινές με αυτές της βιβλιογραφίας ανά πεπτίδιο αλλά και στην ύπαρξη ικανοποιητικής ενέργειας πρόσδεσης και στα δύο μονομερή του ετεροδιμερούς ανθρώπινου υποδοχέα T1R1/T1R3. Παράλληλα, λήφθηκαν υπόψιν οι ενέργειες που λήφθηκαν από τα πειράματα Τυφλής μοριακής πρόσδεσης μέσω DOCKTHOR. Έτσι, επιλέχθηκαν τα παρακάτω 10 πεπτίδια που αναγράφονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Πεπτίδια που επιλέχθηκαν για αξιολόγηση μοριακής δυναμικής

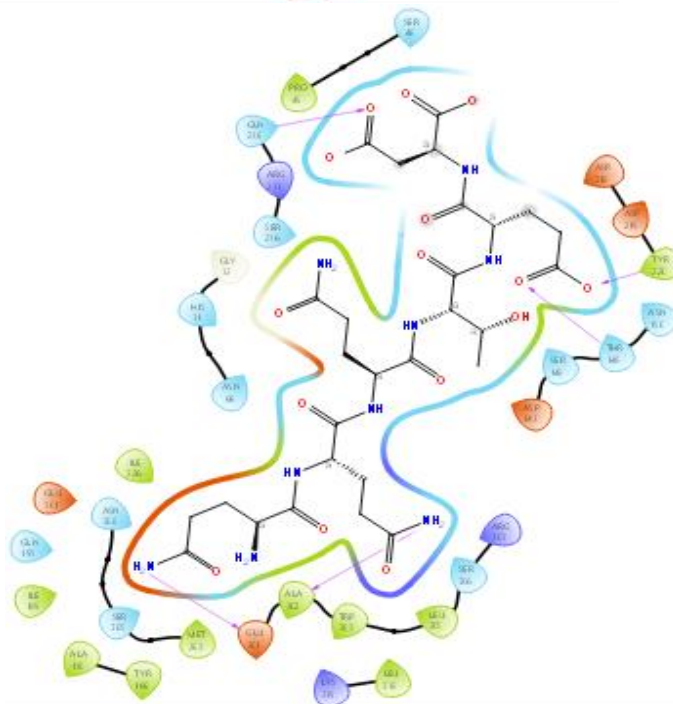
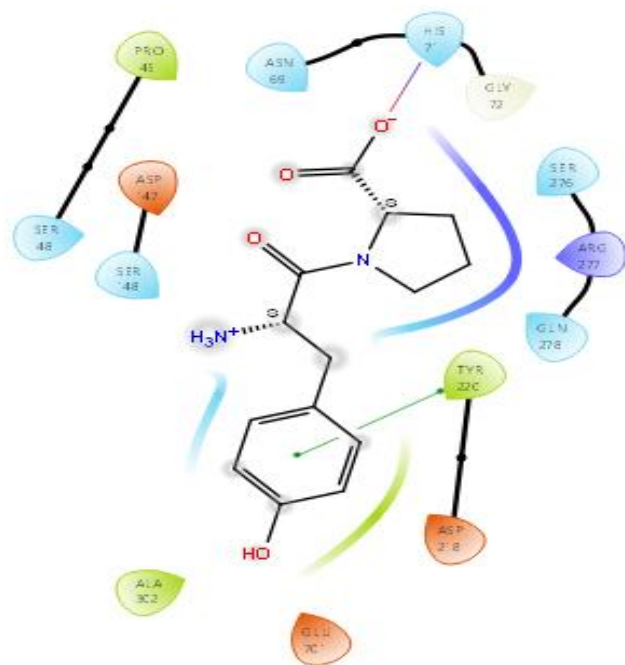
Πεπτίδια	Docking score WEBINA (T1R1) ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Docking score WEBINA (T1R3) ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Docking score DOCKTHOR ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Αλληλεπιδράσεις
FLL	-6,865	-7,680	-7,773	Δεσμός Υδρογόνου His71
YP	-6,538	-9,150	-7,261	Δεσμοί Υδρογόνου Tyr220, His71
QQQTED	-7,421	-8,126	-6,574	Δεσμοί Υδρογόνου Ala302, Glu301, Gln278, Thr149, Tyr220

TVQVT	-4,592	-7,452	-7,636	Δεσμός Υδρογόνου Pro45
YAKPA	-6,623	-8,985	-7,891	Δεσμοί Υδρογόνου His71, Ala302, Tyr220, Asn150, Glu701, Ser276
FAQ	-7,617	-6.213	-8,062	Δεσμοί Υδρογόνου Tyr220, Thr149, Pro45, Ser148
YQEPVL	0,015	-8,857	-8,065	Δεσμοί Υδρογόνου His71, Tyr220, Thr149
YQQPVL	-0,812	-9,150	-8,042	Δεσμοί Υδρογόνου His71, Ala302, Tyr220
IPIQY	-2,593	-9,129	-8,148	Δεσμοί Υδρογόνου Ser148, Glu701, Arg277
KFQSEE	-0,5897	-7,720	-6,248	Δεσμοί Υδρογόνου Glu701, Asp147, Asp218, Asp219, Ser306, Thr149, His308, Ile309, Arg277

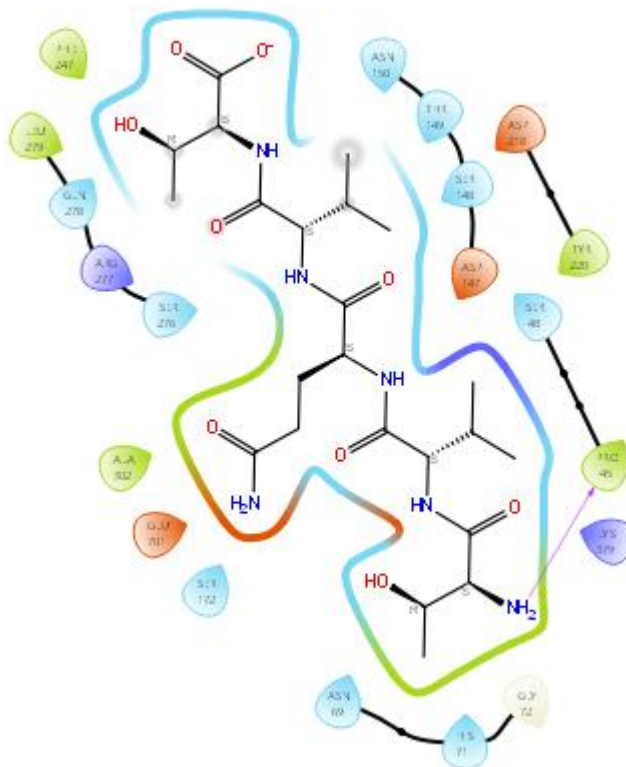
Στις ακόλουθες Εικόνες (**Εικόνες 10-18**) παρουσιάζεται σε διδιάστατη απεικόνιση ο τρόπος πρόσδεσης των πεπτιδίων που προκρίθηκαν στον ανθρώπινο T1R1/T1R3 υποδοχέα.



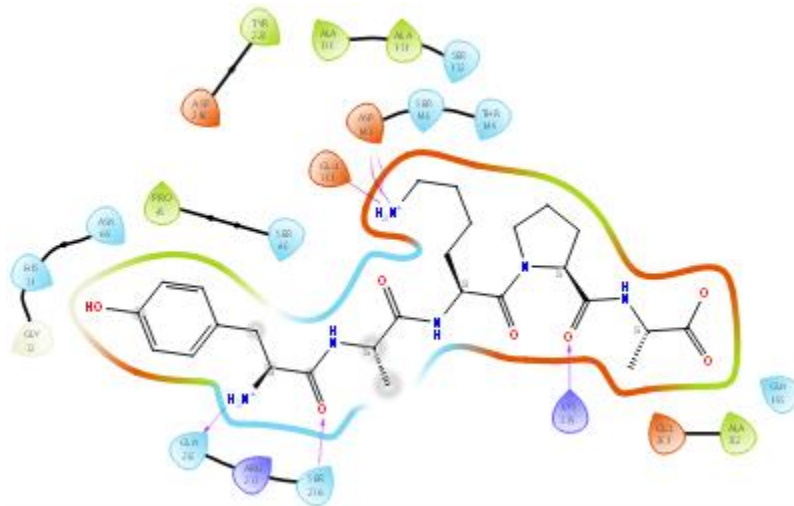
Εικόνα 10: Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου FLL με τον ανθρώπινο υποδοχέα T1R1/T1R3.



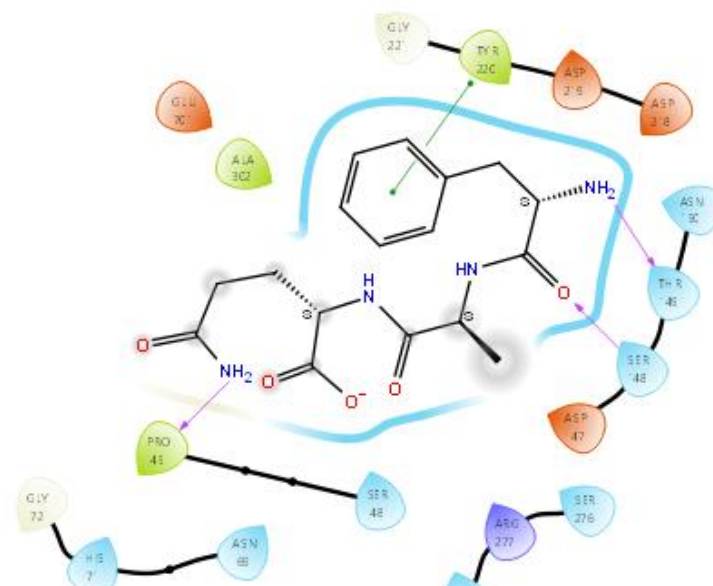
Εικόνα 12. Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου QQQTED με τον ανθρώπινο υποδοχέα T1R1/TR3.



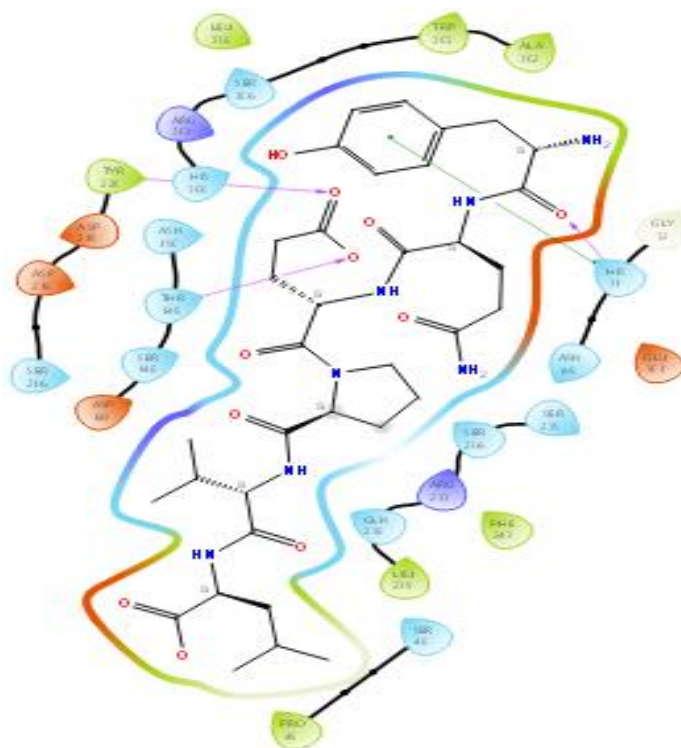
Εικόνα 13. Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου TVQVT με τον ανθρώπινο υποδοχέα T1R1/TR3.



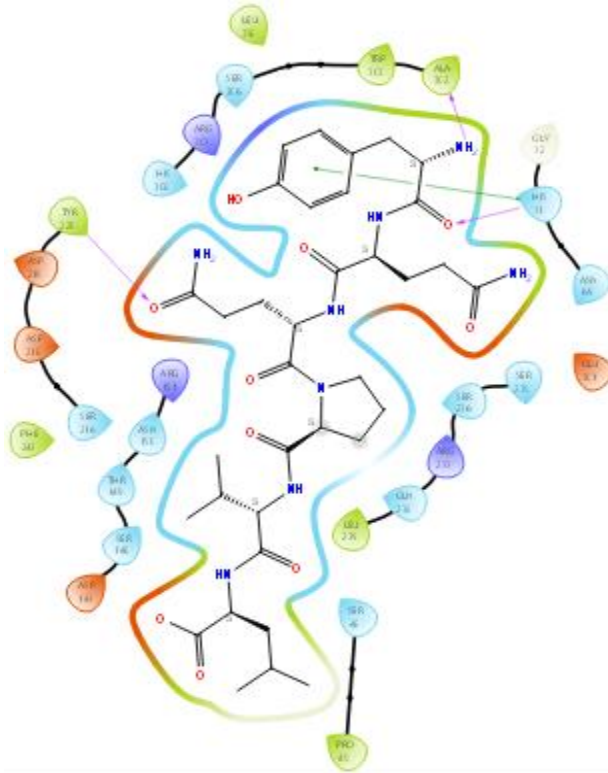
Εικόνα 14. Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου YAKPA με τον ανθρώπινο υποδοχέα T1R1/TR3.



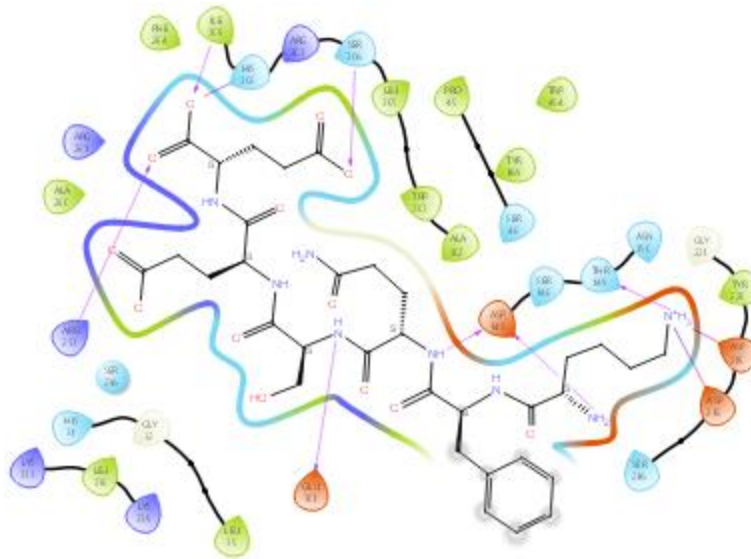
Εικόνα 15. Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου FAQ με τον ανθρώπινο υποδοχέα T1R1/TR3.



Εικόνα 16. Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου YQEPVL με τον ανθρώπινο υποδοχέα T1R1/TR3.



Εικόνα 17. Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου YQQPVL με τον ανθρώπινο υποδοχέα T1R1/T1R3.



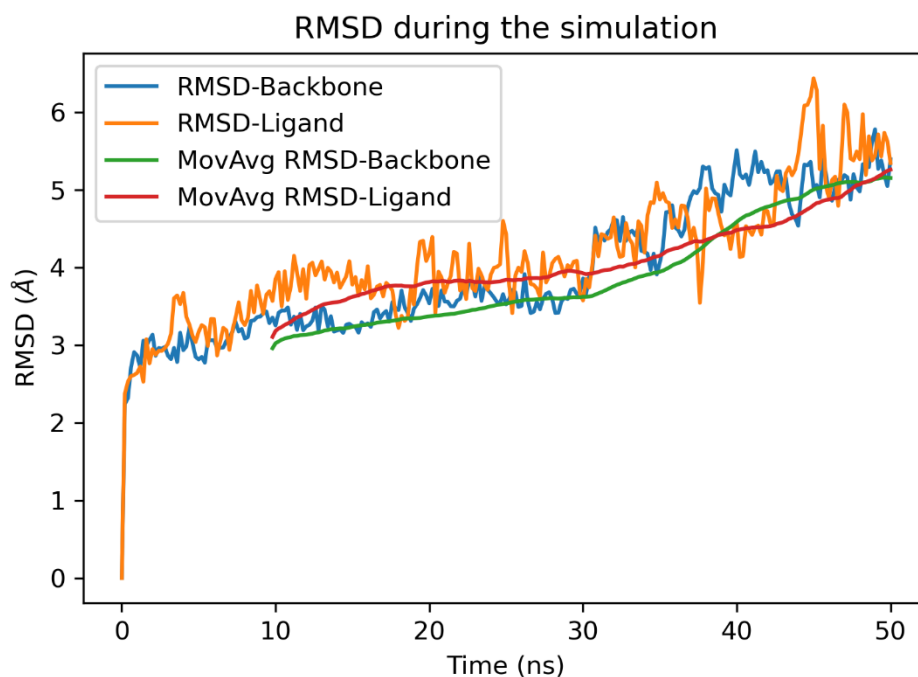
Εικόνα 18. Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου KFQSEE με τον ανθρώπινο υποδοχέα T1R1/T1R3

Για να αξιολογηθεί η πρόσδεση των επιλεγμένων πεπτιδίων στον υποδοχέα T1R1/T1R3, πραγματοποιήθηκαν επιπρόσθετα προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής με χρόνο προσομοίωσης 100 ns στα σύμπλοκα πεπτιδίου-υποδοχέα χρησιμοποιώντας το λογισμικό Gromacs 2021 (Loukas et al., 2024). Από τα πεπτίδια που επιλέχθηκαν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μοριακής δυναμικής των πεπτιδίων YP, QQQTED και YQQPVL, καθώς τα πειράματα MD των υπολοίπων πεπτιδίων βρίσκονται σε εξέλιξη.

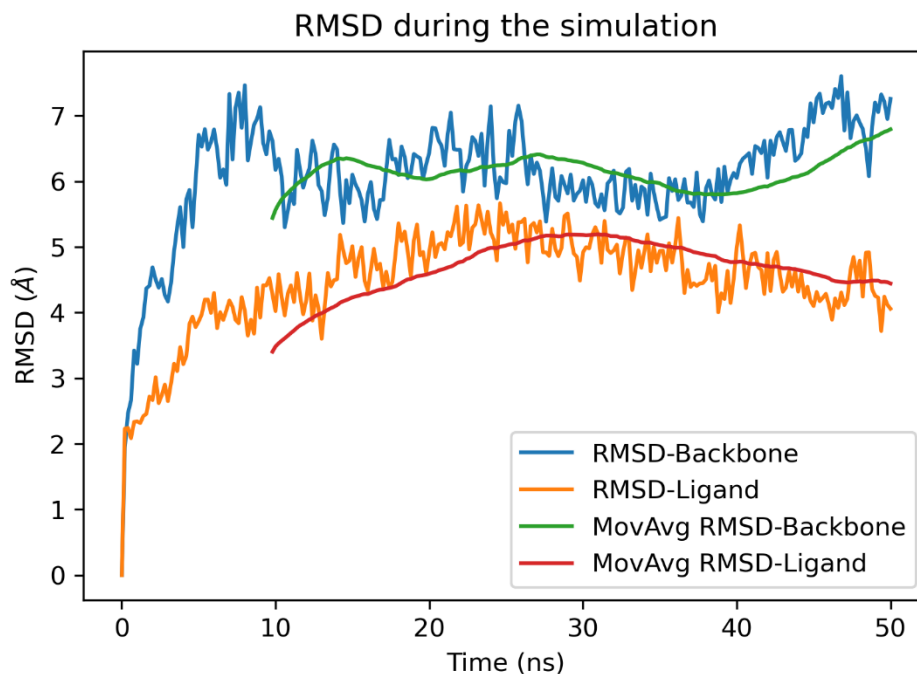
Η θέση πρόσδεσης με την "καλύτερη ενέργεια πρόσδεσης" κάθε συμπλόκου πεπτιδίου-υποδοχέα χρησιμοποιήθηκε ως εναρκτήρια δομή. Ο υπολογισμός της ρίζας μέσης τετραγωνικής απόκλισης (RMSD) των συμπλόκων έδειξε ότι το πεπτίδιο QQQTED και το YQQPVL παρέμειναν σταθερά εντός του ανθρώπινου T1R1/T1R3. Από την άλλη πλευρά, το πεπτίδιο YP επέδειξε αξιοσημείωτα μεγάλη τιμή RMSD. Οι τιμές RMSD για κάθε σύμπλοκο πεπτιδίου-υποδοχέα παρατίθενται στον **Πίνακα 8**. Επιπλέον, στις **Εικόνες 19-21** φαίνεται η διακύμανση του κάθε συμπλόκου στη διάρκεια της μοριακής προσομοίωσης.

Πίνακας 8. Οι μέσες τιμές του RMSD και της τυπικής απόκλισης κάθε συμπλόκου πεπτιδίου-υποδοχέα που υπολογίστηκαν για 100 ns

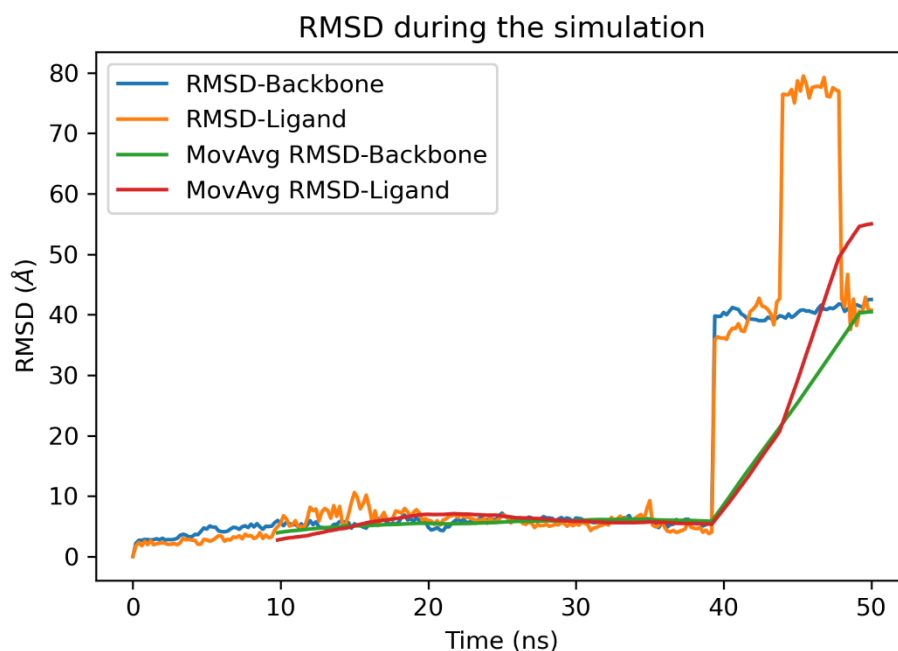
ΠΕΠΤΙΔΙΟ	RMSD
YP	15,62 +/- 21,72
QQQTED	4,12 +/- 0,83
YQQPVL	4,47 +/- 0,77



Εικόνα 20. Διακύμανση RMSD του συμπλόκου πεπτιδίου QQQTED – T1R1/T1R31 κατά τη διάρκεια μοριακής προσομοίωσης.



Εικόνα 19. Διακύμανση RMSD του συμπλόκου πεπτιδίου YQQPVL – T1R1/T1R31 κατά τη διάρκεια μοριακής προσομοίωσης.



Εικόνα 21. Διακύμανση RMSD του συμπλόκου πεπτιδίου YP – T1R1/T1R31 κατά τη διάρκεια μοριακής προσομοίωσης.

Σύμφωνα με τα διαγράμματα, φαίνεται ότι τα πεπτίδια QQQTED και YQQPVL προσδένουν εντός του καθορισμένου πλέγματος ενώ το YP δεν προσδένει με την ίδια ευκολία. Αυτό, πιθανότατα συμβαίνει λόγω του μικρού του μεγέθους το οποίο του προσφέρει ιδιαίτερη ευελιξία και επομένως τη δυνατότητα να προσδεθεί με τα αμινοξέα στο συγκεκριμένο πλέγμα.

Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη για την πιθανότητα τα πεπτίδια, που περιέχονται στο γιαούρτι, να ενεργοποιούν την umami γεύση με τη χρήση υπολογιστικών τεχνικών. Αρχικά, ο εξεταζόμενος δειγματοχώρος των πεπτιδίων γιαουρτιού αντλήθηκε από την διαδικτυακή βάση δεδομένων ελεύθερης πρόσβασης Fermented Food Database (FermFOODb). Γνωρίζοντας ότι ο ανθρώπινος υποδοχέας T1R1/T1R3 δεν έχει κρυσταλλική δομή, δημιουργήθηκε το ομόλογο μοντέλο του χρησιμοποιώντας τη βάση πρωτεϊνικών δομών AlphaFold καθώς και τον επίσης ελεύθερης πρόσβασης διακομιστή ομόλογης μοντελοποίησης SWISS-MODEL. Στη συνέχεια, διεξάχθηκαν πειράματα μοριακής πρόσδεσης για τα πεπτίδια του γιαουρτιού (Molecular Docking), στοχεύοντας στην εύρεση των πεπτιδίων με εν δυνάμει ικανότητα ενεργοποίησης της umami γεύσης. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε "Τυφλή μοριακή πρόσδεση – Blind Docking" και στη συνέχεια "Στοχευμένη" μοριακή πρόσδεση, μέσω εφαρμογής των διαδικτυακών εργαλείων DockThor και Webina. Κύριο κριτήριο αξιολόγησης αποτέλεσε η ενέργεια πρόσδεσης (docking score) των εξεταζόμενων πεπτιδίων στον T1R1/T1R3 υποδοχέα και στη σύγκριση των αλληλεπιδράσεων των εξεταζόμενων πεπτιδίων με τις αλληλεπιδράσεις πεπτιδίων γνωστών από τη βιβλιογραφία με umami γεύση.

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων επιλέχθηκαν δέκα πεπτίδια (FLL, YP, QQQTED, TVQVT, YAKPA, FAQ, YQEPVL, YQQPVL, IPIQY, KFQSEE), στα οποία εφαρμόζονται προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Molecular Dynamics). Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα πεπτίδια QQQTED και YQQPVL παρουσίασαν σταθερότητα εντός του υποδοχέα γεγονός που καταδεικνύει την εν δυνάμει ενεργοποίηση της umami γεύσης. Από την άλλη το πεπτίδιο YP δεν παρουσιάζει ενεργειακή σταθερότητα στον υποδοχέα στο συγκεκριμένο πλέγμα.

Μελλοντικός στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ολοκλήρωση των πειραμάτων μοριακής δυναμικής για τα υπόλοιπα πεπτίδια του γιαουρτιού που έχουν επιλεγεί. Έπειτα τα πεπτίδια που θα προκριθούν θα συντεθούν εργαστηριακά ή θα αγοραστούν και θα πραγματοποιηθεί αξιολόγηση της γεύσης τους είτε με τη χρήση μηχανικής γλώσσας είτε μέσω οργανοληπτικού ελέγχου από εξειδικευμένο πάνελ. Με την εκπλήρωση των πειραμάτων αυτών ανοίγει ο δρόμος έρευνας των πεπτιδίων αυτών για τη χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων. Ο κύριος στόχος χρήσης τους είναι ο εμπλουτισμός τροφίμων για

την ενίσχυση της γεύσης τροφίμων και τη μείωση της προσθήκης του επιτραπέζιου αλατιού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Breslin, P.A.S., 2013. An Evolutionary Perspective on Food and Human Taste. *Current Biology* 23, R409–R418. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.010>
- Breslin, P.A.S., Spector, A.C., 2008. Mammalian taste perception. *Curr Biol* 18, R148-155. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.017>
- Brooijmans, N., Kuntz, I., 2003. Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 32, 335–73. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532>
- Chang, J., Li, X., Liang, Y., Feng, T., Sun, M., Song, S., Yao, L., Wang, H., Hou, F., 2023. Novel umami peptide from *Hypsizygus marmoreus* hydrolysate and molecular docking to the taste receptor T1R1/T1R3. *Food Chemistry* 401, 134163. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134163>
- Chaudhari, N., Roper, S.D., 2010. The cell biology of taste. *Journal of Cell Biology* 190, 285–296. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003144>
- Chen, M., Gao, X., Pan, D., Xu, S., Zhang, H., Sun, Y., He, J., Dang, Y., 2021. Taste characteristics and umami mechanism of novel umami peptides and umami-enhancing peptides isolated from the hydrolysates of Sanhuang Chicken. *Eur Food Res Technol* 247, 1633–1644. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03734-w>
- Chen, X., Gabitto, M., Peng, Y., Ryba, N.J.P., Zuker, C.S., 2011. A Gustotopic Map of Taste Qualities in the Mammalian Brain. *Science* 333, 1262–1266. <https://doi.org/10.1126/science.1204076>
- Dang, Y., Gao, X., Ma, F., Wu, X., 2015. Comparison of umami taste peptides in water-soluble extractions of Jinhua and Parma hams. *LWT - Food Science and Technology* 60, 1179–1186. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.014>
- Deepankumar, S., Karthi, M., Vasanth, K., Selvakumar, S., 2019. Insights on modulators in perception of taste modalities: a review. *Nutrition Research Reviews* 32, 231–246. <https://doi.org/10.1017/S0954422419000118>
- Dong, X., Wan, C., Huang, A., Xu, H., Lei, H., 2023. Novel Umami Peptides from *Hypsizygus marmoreus* and Interaction with Umami Receptor T1R1/T1R3. *Foods* 12, 703. <https://doi.org/10.3390/foods12040703>

- Du, Z., Comer, J., Li, Y., 2023. Bioinformatics approaches to discovering food-derived bioactive peptides: Reviews and perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 162, 117051. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117051>
- Dvoryanchikov, G., Sinclair, M.S., Perea-Martinez, I., Wang, T., Chaudhari, N., 2009. Inward rectifier channel, ROMK, is localized to the apical tips of glial-like cells in mouse taste buds. *Journal of Comparative Neurology* 517, 1–14. <https://doi.org/10.1002/cne.22152>
- Eweas, A., 2014. Advances in molecular modeling and docking as a tool for modern drug discovery. *Der Pharma Chemica* 6, 211–228.
- Ferreira, L.G., Dos Santos, R.N., Oliva, G., Andricopulo, A.D., 2015. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* 20, 13384–13421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>
- Frenkel, D., Smit, B., 2023. Chapter 4 - Molecular Dynamics simulations, in: Frenkel, D., Smit, B. (Eds.), *Understanding Molecular Simulation (Third Edition)*. Academic Press, pp. 97–124. <https://doi.org/10.1016/B978-0-32-390292-2.00012-X>
- Gravina, S.A., Yep, G.L., Khan, M., 2013a. Human Biology of Taste. *Annals of Saudi Medicine* 33, 217–222. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2013.217>
- Gravina, S.A., Yep, G.L., Khan, M., 2013b. Human Biology of Taste. *Annals of Saudi Medicine* 33, 217–222. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2013.217>
- Hartley, Isabella E., Liem, D.G., Keast, R., 2019. Umami as an ‘Alimentary’ Taste. A New Perspective on Taste Classification. *Nutrients* 11, 182. <https://doi.org/10.3390/nu11010182>
- Hartley, Isabella E., Liem, D.G., Keast, R., 2019. Umami as an ‘Alimentary’ Taste. A New Perspective on Taste Classification. *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/nu11010182>
- Hutasingh, N., Chuntakaruk, H., Tubtimrattana, A., Ketngamkum, Y., Pewlong, P., Phaonakrop, N., Roytrakul, S., Rungrotmongkol, T., Paemane, A., Tansrisawad, N., Siripatrawan, U., Sirikantaramas, S., 2023. Metabolite profiling and identification of novel umami compounds in the chaya leaves of two species using multiplatform metabolomics. *Food Chemistry* 404, 134564. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134564>

- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., Darewicz, M., 2024. BIOPEP-UWM database — present and future. *Current Opinion in Food Science* 55, 101108. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.101108>
- Kouzuki, M., Taniguchi, M., Suzuki, T., Nagano, M., Nakamura, S., Katsumata, Y., Matsumoto, H., Urakami, K., 2019. Effect of monosodium L-glutamate (umami substance) on cognitive function in people with dementia. *Eur J Clin Nutr* 73, 266–275. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0349-x>
- Kral, T.V.E., Rauh, E.M., 2010. Eating behaviors of children in the context of their family environment. *Physiol Behav* 100, 567–573. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.031>
- Kurihara, K., 2015. Umami the Fifth Basic Taste: History of Studies on Receptor Mechanisms and Role as a Food Flavor. *BioMed research international* 2015, 189402. <https://doi.org/10.1155/2015/189402>
- Liang, L., Zhou, C., Zhang, J., Huang, Y., Zhao, J., Sun, B., Zhang, Y., 2022. Characteristics of umami peptides identified from porcine bone soup and molecular docking to the taste receptor T1R1/T1R3. *Food Chemistry* 387, 132870. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132870>
- Liu, Z., Zhu, Y., Wang, W., Zhou, X., Chen, G., Liu, Y., 2020. Seven novel umami peptides from *Takifugu rubripes* and their taste characteristics. *Food Chemistry* 330, 127204. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127204>
- Loukas, A.-T., Papadourakis, M., Panagiotopoulos, V., Zarnpala, A., Chontzopoulou, E., Christodoulou, S., Katsila, T., Zoumpoulakis, P., Matsoukas, M.-T., 2024. Natural Compounds for Bone Remodeling: A Computational and Experimental Approach Targeting Bone Metabolism-Related Proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 25, 5047. <https://doi.org/10.3390/ijms25095047>
- Martini, S., Solieri, L., Tagliazucchi, D., 2021. Peptidomics: new trends in food science. *Current Opinion in Food Science* 39, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.016>
- Miura, H., Scott, J.K., Harada, S., Barlow, L.A., 2014. Sonic hedgehog-expressing basal cells are general post-mitotic precursors of functional taste receptor cells. *Developmental Dynamics* 243, 1286–1297. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24121>

- Nakamura, Yuko, Goto, T.K., Tokumori, K., Yoshiura, T., Kobayashi, K., Nakamura, Yasuhiko, Honda, H., Ninomiya, Y., Yoshiura, K., 2012. The temporal change in the cortical activations due to salty and sweet tastes in humans: fMRI and time-intensity sensory evaluation. *NeuroReport* 23, 400. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32835271b7>
- Papadimitriou, C.G., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Silva, S.V., Gomes, A.-M., Malcata, F.X., Alichanidis, E., 2007. Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chemistry* 105, 647–656. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.028>
- Roche, D., Brackenridge, D., McGuffin, L., 2015. Proteins and Their Interacting Partners: An Introduction to Protein-Ligand Binding Site Prediction Methods. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 29829–29842. <https://doi.org/10.3390/ijms161226202>
- Schieber, A., Brückner, H., 2000. Characterization of oligo- and polypeptides isolated from yoghurt. *Eur Food Res Technol* 210, 310–313. <https://doi.org/10.1007/s002170050555>
- Seta, Y., Oda, M., Kataoka, S., Toyono, T., Toyoshima, K., 2011. Mash1 is required for the differentiation of AADC-positive type III cells in mouse taste buds. *Developmental Dynamics* 240, 775–784. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22576>
- Shiyan, R., Liping, S., Xiaodong, S., Jinlun, H., Yongliang, Z., 2021. Novel umami peptides from tilapia lower jaw and molecular docking to the taste receptor T1R1/T1R3. *Food Chemistry* 362, 130249. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130249>
- Shrivastav, A., Srivastava, S., 2013. Human sweet taste receptor: Complete structure prediction and evaluation. *International Journal of Chemical and Analytical Science* 4, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijcas.2013.03.002>
- Su, G., Cui, C., Zheng, L., Yang, B., Ren, J., Zhao, M., 2012. Isolation and identification of two novel umami and umami-enhancing peptides from peanut hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS. *Food Chemistry* 135, 479–485. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.130>

- Sukumaran, S.K., Lewandowski, B.C., Qin, Y., Kotha, R., Bachmanov, A.A., Margolskee, R.F., 2017. Whole transcriptome profiling of taste bud cells. *Sci Rep* 7, 7595. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07746-z>
- Sun, X., Zhong, K., Zhang, D., Shi, B., Wang, H., Shi, J., Battino, M., Wang, G., Xiaobo, Z., Zhao, L., 2022. The enhancement of the perception of saltiness by umami sensation elicited by flavor enhancers in salt solutions. *Food Research International* 157, 111287. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111287>
- Tao, X., Huang, Y., Wang, C., Chen, F., Yang, L., Ling, L., Che, Z., Chen, X., 2020. Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review. *International Journal of Food Science & Technology* 55, 33–45. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14325>
- Toda, Y., Nakagita, T., Hayakawa, T., Okada, S., Narukawa, M., Imai, H., Ishimaru, Y., Misaka, T., 2013. Two distinct determinants of ligand specificity in T1R1/T1R3 (the umami taste receptor). *J Biol Chem* 288, 36863–36877. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.494443>
- Vandenbeuch, A., Clapp, T.R., Kinnamon, S.C., 2008. Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci* 9, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-1>
- Venselaar, H., Joosten, R.P., Vroiling, B., Baakman, C.A.B., Hekkelman, M.L., Krieger, E., Vriend, G., 2010. Homology modelling and spectroscopy, a never-ending love story. *Eur Biophys J* 39, 551–563. <https://doi.org/10.1007/s00249-009-0531-0>
- Vyas, V.K., Ukawala, R.D., Ghate, M., Chintha, C., 2012. Homology Modeling a Fast Tool for Drug Discovery: Current Perspectives. *Indian J Pharm Sci* 74, 1–17. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.102537>
- Wang, L., Han, X., Mehren, J., Hiroi, M., Billeter, J.-C., Miyamoto, T., Amrein, H., Levine, J.D., Anderson, D.J., 2011. Hierarchical chemosensory regulation of male-male social interactions in *Drosophila*. *Nat Neurosci* 14, 757–762. <https://doi.org/10.1038/nn.2800>
- Wang, P., Ye, X., Liu, J., Xiao, Y., Tan, M., Deng, Y., Yuan, M., Luo, X., Zhang, D., Xie, X., Han, X., 2024. Recent advancements in the taste transduction mechanism,

- identification, and characterization of taste components. *Food Chemistry* 433, 137282. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137282>
- Wang, W., Zhou, X., Liu, Y., 2020. Characterization and evaluation of umami taste: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 127, 115876. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115876>
- Witt, M., 2019a. Chapter 10 - Anatomy and development of the human taste system, in: Doty, R.L. (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology, Smell and Taste*. Elsevier, pp. 147–171. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63855-7.00010-1>
- Witt, M., 2019b. Anatomy and development of the human taste system. *Handb Clin Neurol* 164, 147–171. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63855-7.00010-1>
- Yang, J., Huang, Y., Cui, C., Dong, H., Zeng, X., Bai, W., 2021. Umami-enhancing effect of typical kokumi-active γ -glutamyl peptides evaluated via sensory analysis and molecular modeling approaches. *Food Chem* 338, 128018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128018>
- Yarmolinsky, D.A., Zuker, C.S., Ryba, N.J.P., 2009. Common Sense about Taste: From Mammals to Insects. *Cell* 139, 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.001>
- Yu, Z., Jiang, H., Guo, R., Yang, B., You, G., Zhao, M., Liu, X., 2018. Taste, umami-enhance effect and amino acid sequence of peptides separated from silkworm pupa hydrolysate. *Food Research International* 108, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.047>
- Zhang, J., Zhang, Jincheng, Liang, L., Sun, B., Zhang, Y., 2023. Identification and virtual screening of novel umami peptides from chicken soup by molecular docking. *Food Chemistry* 404, 134414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134414>
- Zhang, L., Zhang, Li, Perez, J., Lu, B., Fengming, Z., Yu 于富强, F.-Q., 2023. Novel umami peptides from two *Termitomyces* mushrooms and molecular docking to the taste receptor T1R1/T1R3. *Food Science and Human Wellness* 13, 1–16. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250091>
- Zhang, N., Cui, Z., Li, M., Fan, Y., Liu, J., Wang, W., Zhang, Y., Liu, Y., 2022. Typical Umami Ligand-Induced Binding Interaction and Conformational Change of T1R1-VFT. *J. Agric. Food Chem.* 70, 11652–11666. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c05559>

- Zhao, C.J., Schieber, A., Gänzle, M.G., 2016. Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations – A review. *Food Research International* 89, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.042>
- Zhao, W., Su, L., Huo, S., Yu, Z., Li, J., Liu, J., 2023. Virtual screening, molecular docking and identification of umami peptides derived from *Oncorhynchus mykiss*. *Food Science and Human Wellness* 12, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.07.026>
- Zhao, Y., Zhang, M., Devahastin, S., Liu, Y., 2019. Progresses on processing methods of umami substances: A review. *Trends in Food Science & Technology* 93. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.012>
- Zinno, P., Calabrese, F.M., Schifano, E., Sorino, P., Di Cagno, R., Gobbetti, M., Parente, E., De Angelis, M., Devirgiliis, C., 2022. FDF-DB: A Database of Traditional Fermented Dairy Foods and Their Associated Microbiota. *Nutrients* 14, 4581. <https://doi.org/10.3390/nu14214581>