

牦牛乳干酪苦味肽 ACE 抑制活性表征的分子机制

杨保军, 梁琪*, 宋雪梅

(甘肃农业大学食品科学与工程学院 甘肃省功能乳品工程实验室 兰州 730070)

摘要 用生物信息学方法计算并分析牦牛乳硬质干酪中鉴定出的 3 种苦味肽 RK7、VN10 和 SN12 的理化特性, 对肽结构做能量最小化处理, 从 PDB 数据库获取血管紧张素转化酶(ACE)蛋白晶体的 X 射线衍射三维结构, 通过分子对接和数据库比对评估和表征苦味肽的 ACE 抑制活性及其与 ACE 的作用机理。通过计算得出 RK7、VN10 和 SN12 的不稳定性指数分别为 19.84、49.44 和 42.87, 疏水性分别为 42.86%、70.00% 和 66.67%。分子对接结果表明: ACE 分子中的 Ala356、His387、Phe391、Pro407、His410、Glu411、Ser517、Val518、Pro519 残基为其与 RK7 和 VN10 结合的重要活性位点, RK7、VN10 和 SN12 分别与 ACE 活性位点的氨基酸形成 3、2 个和 0 个氢键; RK7、VN10 和 SN12 与 ACE 的结合表现出相似的分子机制, 均结合于 ACE 的活性空腔内($X:35.46, Y:43.15, Z:55.47, R:9 \text{ \AA}$); RK7、VN10 和 SN12 与 BIOPEP 数据库中已知 ACE 抑制肽的最高相似度分别为 57.14%、90.00% 和 75.00%。综合 RK7、VN10 和 SN12 与 ACE 活性位点氨基酸残基相互作用的情况和 BIOPEP 数据库比对结果预测出 3 种肽段的 ACE 抑制活性: VN10 > RK7 > SN12。本试验为理论层面和分子水平研究干酪苦味肽的 ACE 抑制活性提供参考。

关键词 牦牛乳硬质干酪; 苦味肽; 理化分析; ACE 抑制活性; 分子对接

文章编号 1009-7848(2022)05-0008-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.05.002

干酪成熟过程中酪蛋白降解程度的增加或降解过程中形成的中间产物没有被充分降解时, 将会产生苦味肽^[1], 从干酪中鉴定出的苦味肽主要源自 α_{s1} -酪蛋白(α_{s1} -Casein, α_{s1} -CN)和 β -酪蛋白(β -Casein, β -CN)的降解^[2]。肽序列中含有的疏水性氨基酸如精氨酸、亮氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸和脯氨酸等是肽的苦味来源, 也是苦味受体的结合位点^[3]。干酪中苦味肽分子质量在 100~6 000 u。Topcu 等^[4]分离出分子质量 500~4 000 u 和 200~700 u 的苦味肽(分别来源于 Turkish White 干酪和 Kasar 干酪), Turkish White 干酪中的疏水性片段是苦味最强的部分, 色氨酸和苯丙氨酸是 Kasar 干酪苦味肽的共有氨基酸。Toelstede 等^[5-6]从 Gouda 干酪水溶性提取物中鉴定出 16 种苦味肽, 其中 12 个肽具有较强的苦味。

肽是一类由氨基酸通过肽键连接而成的化合物, 具有溶解性高、黏度低、易消化、易吸收等优点^[7]。蛋白质降解肽具有一定的生理功能活性, 如 ACE 抑制活性和抗氧化、抗菌及降胆固醇活性

等^[8-9]。本课题组前期研究不同成熟温度(5, 10 °C 和 15 °C)、成熟时间(0~6 个月)牦牛乳硬质干酪中醇溶性粗提苦味肽的 ACE 抑制活性, 结果发现 5 °C 成熟 6 个月牦牛乳硬质干酪中醇溶性粗提苦味肽的 ACE 最大抑制活性达(72.33±2.32)%。本实验室宋雪梅等^[1]使用葡聚糖凝胶(Sephadex G-25)色谱和液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)从牦牛乳硬质干酪中鉴定出 14 种苦味肽, 主要为氨基酸残基数目 7~17、分子质量小于 2 000 u 的肽, 苦味肽序列中存在的疏水性氨基酸主要有脯氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和异亮氨酸。Pripp 等^[10]和 Upadhyaya 等^[11]的研究表明食源性二肽或三肽可以竞争性抑制 ACE, 从而具有降血压的作用。肽的结构特征, 如肽链长度、氨基酸组成、肽的物化特征(如氨基酸残基的疏水性、分子电荷和侧链)等都会影响其生物活性^[12]。BIOPEP 数据库是目前最全面的生物活性肽数据库^[13], 分子对接是基于受体结构, 受体和配体分子之间的静电匹配, 化学环境互补和空间互补等原则模拟并寻找两者的最佳结合模式, 评价其结合构象稳定程度的技术, 被用于寻找能与靶蛋白相互作用的多肽并说明其生物学机制^[14-15]。管晓等^[16]研究二肽(GF、GY、VF 和 IY)与 ACE 的相互作用模式与分子机制, 结果表明氢

收稿日期: 2021-12-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660468)

作者简介: 杨保军(1995—), 男, 硕士生

通信作者: 梁琪 E-mail: Liangqi@gsau.edu.cn

键、疏水、静电等作用力对二肽与 ACE 的结合有影响,且氢键作用为主要影响因素,ACE 分子中 Arg522、Glu384 和 Ala354 为二肽与 ACE 结合的重要活性位点,ACE 抑制二肽中 N 端氨基的作用对其抑制活性影响显著^[17]。

PDB 数据库、BIOPEP 数据库等有效缩短了肽结构和功能表征的研究周期,分子对接等生物信息学技术为分子水平解释 ACE 抑制肽和 ACE 相互作用提供了理论依据。此外,本试验用 3 种苦味肽都不在 BIOPEP 的 ACE 抑制肽数据库中。本试验对牦牛乳硬质干酪中鉴定出的 3 种苦味肽进行理化分析,借助分子对接工具和 BIOPEP 数据库评估和表征苦味肽的 ACE 抑制活性及其与 ACE

相互作用的分子机制。为从理论水平分析和分子水平解释干酪苦味肽的 ACE 抑制活性提供了数据支撑,对进一步完善肽数据库奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验工具和材料

1.1.1 试验工具 Discovery Studio Client v16.1.0(DS),蛋白结构分析软件,用于蛋白质结构功能研究和药物设计^[18]。

1.1.2 试验材料 以苦味肽 RPKHPIK (RK7)、VYFPFGPIPN (VN10) 和 SLVYFPFGPIPN (SN12) 为研究对象,这 3 种肽均来源于牦牛乳硬质干酪,由项目组前期工作所得,基本信息见表 1。

表 1 3 种牦牛乳硬质干酪苦味肽的基本信息

Table 1 Basic information on three yak milk hard cheese bitter peptides

肽段序列	分子质量/u	酸性氨基酸/个	碱性氨基酸/个	蛋白来源	疏水值/J·mol ⁻¹
RPKHPIK (RK7)	875.09	0	3	α_1 -CN	7 415.18
VYFPFGPIPN (VN10)	1 100.28	0	0	β -CN	8 227.45
SLVYFPFGPIPN (SN12)	1 130.52	0	0	β -CN	7 588.94

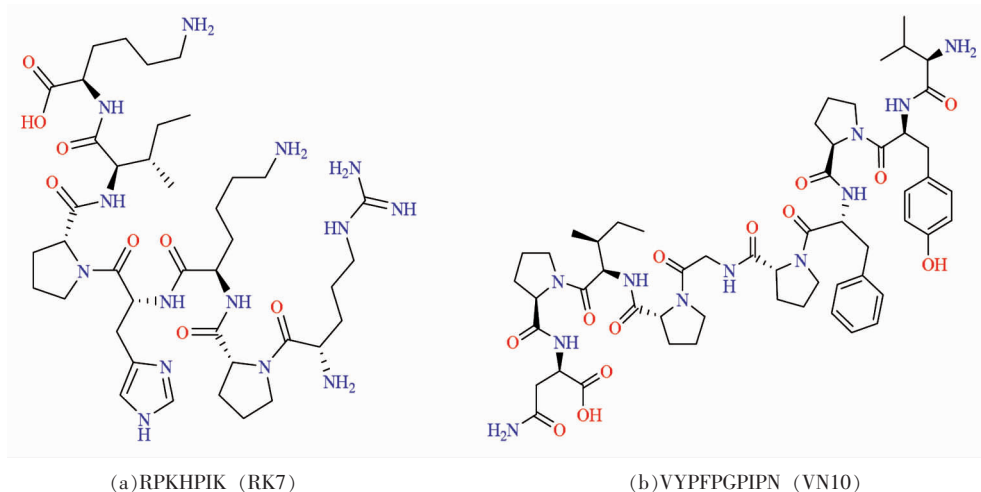
注:R. 精氨酸(Arg);P. 脯氨酸(Pro);K. 赖氨酸(Lys);H. 组氨酸(His);I. 异亮氨酸(Ile);V. 缬氨酸(Val);Y. 酪氨酸(Tyr);F. 苯丙氨酸(Phe);G. 甘氨酸(Gly);N. 天冬酰胺(Asn);S. 丝氨酸(Ser);L. 亮氨酸(Leu);肽段疏水值和肽段苦味成正比。

1.2 试验方法

1.2.1 苦味肽理化特性计算和预测 参考 Soleymanzadeh 等^[19]的方法使用生物信息学网址和数据库提供的软件计算和预测 3 种苦味肽的理化特性。肽特性计算器(<https://pepcalc.com/>)用于确定肽的分子质量、等电点(pI)和净电荷;ExPASy ProtParam 工具 (<https://web.expasy.org/cgi-bin/>

protparam /protparam) 用于预测肽的不稳定性指数;使用 <https://www.peptide2.com> 确定肽的疏水性氨基酸比例^[12]。

1.2.2 肽结构优化 RK7、VN10 和 SN12 的分子结构式如图 1 所示,具体结构优化过程参考文献[20]1.2.2 节所述。



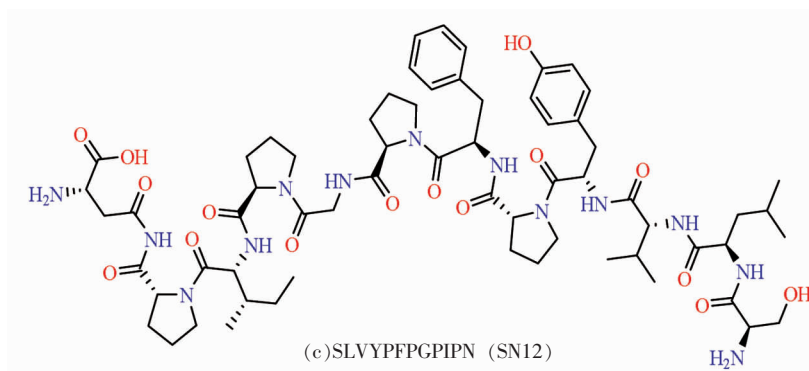


图1 具有ACE抑制活性的苦味肽的分子结构

Fig.1 Molecular structure of bitter peptide with ACE inhibitory activity

1.2.3 准备受体蛋白 参考 Natesh 等^[21]的方法,从 Protein Data Bank 数据库(www.rcsb.org)中下载 ACE(PDB ID:1O86)蛋白晶体的 X 射线衍射三维结构,并用 DS 软件处理该蛋白质,具体处理方法参考文献[16]1.2.3 节所述。

1.2.4 分子对接 基于结构的药物设计工具 Lib-Dock 能快速、精确、虚拟筛选大规模数据库^[18],本试验使用 DS 软件中的 LibDock 程序确定苦味肽在 ACE 活性部位的最佳对接位姿和相互作用关系,详细步骤参考文献[20]1.2.4 节所述。

1.2.5 肽数据库比对 BIOPEP 数据库包含多种功能活性已知的肽序列^[22],将理化分析和虚拟筛选(分子对接)后能与 ACE 形成稳定肽-ACE 复合物构象的苦味肽与 BIOPEP 数据库中已知的 ACE 抑制肽序列相似性比对,根据比对结果表征苦味肽的 ACE 抑制活性。

2 结果与分析

2.1 苦味肽理化性质分析

通过生物信息学网址和数据库提供的软件计算和预测 3 种苦味肽的理化特性,结果见表 2。不稳定性指数用于预测肽的不稳定性,RK7 所带净电荷为 3.1,不稳定性指数为 19.84,不稳定性指数小于 40,说明 RK7 是稳定的且较高净电荷不影响其稳定性,VN10 和 SN12 的不稳定性指数分别为 49.44 和 42.87,不稳定性指数大于 40,说明 VN10 和 SN12 可能是不稳定的。RK7、VN10 和 SN12 分别含有 3,7 和 8 个疏水性氨基酸,疏水性分别为 42.86%,70.00%和 66.67%,显示出适度的疏水性,由于肽与 ACE 活性位点的结合与疏水性氨基酸有着本质关系^[23],所以初步推测 RK7、VN10 和 SN12 具有 ACE 抑制活性。

表 2 苦味肽理化参数表

Table 2 Physical and chemical parameters of bitter peptides

序列	理论分子质量/u	等电点	净电荷	不稳定性指数	亲水性平均值	疏水性氨基酸比例/%
RK7	875.07	11.57	3.1	19.84	-2.029	42.86
VN10	1 100.26	3.63	0	49.44	-0.010	70.00
SN12	1 300.50	3.43	0	42.87	0.242	66.67

2.2 分子对接

2.2.1 寻找受体结合区 借助 DS 软件中的 Define and Edit Binding Site 工具寻找受体(ACE)中的空腔,以此来寻找受体中可能的结合部位,结果如图 2 所示,经过处理后系统视图中自动添加 10 个结合位点(Site 1~10),即找到了 10 个可能的结合区域。

2.2.2 RK7 与 ACE 的相互作用分析 RK7 与 ACE 对接后得到 52 个对接构象,其中 Site 1 区域包含 50 个对接构象,Site 3 区域包含 2 个对接构象,最佳对接构象位于 Site 1 区域($X:35.46, Y:43.15, Z:55.47, R:9 \text{ \AA}$),对接得分为 240.04,结合能为 28 413.71 kJ/mol,最佳对接构象如图 2 所示。

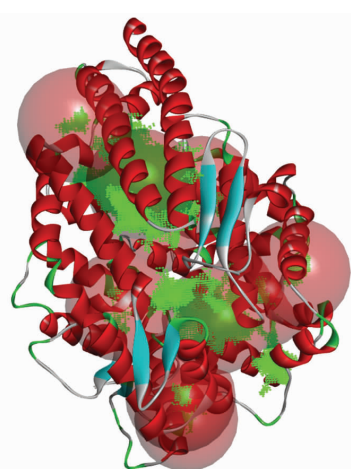
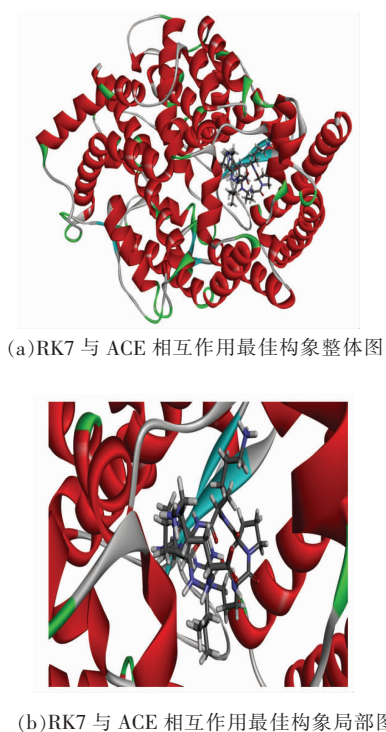


图 2 受体中可能的结合部位

Fig.2 Possible binding sites in the receptor

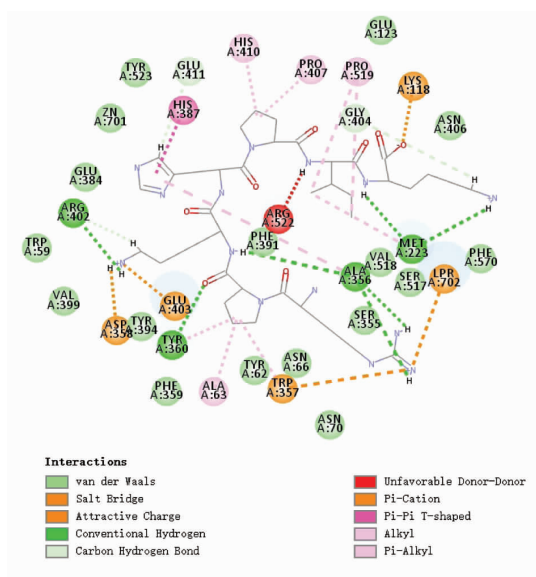
由图 3 可知, RK7 中 Arg 的胍基与 ACE 的 Ala356 残基形成两个氢键, 键长分别为 4.44 Å 和 3.50 Å; Pro 的羧基与 ACE 的 Tyr360 和 Ala356 残基各形成一个氢键, 键长分别为 6.03 Å 和 5.00 Å; Lys 的 ϵ 位氨基与 ACE 的 Arg402 残基形成一个氢键, 键长为 3.12 Å; RK7 尾部 Lys 的 α 位和 ϵ 位氨基与 ACE 的 Met223 残基各形成一个氢键, 键

长分别为 5.07 Å 和 4.68 Å。RK7 与 ACE 的 Arg402 (5.10 Å)、Gly404 (3.64 Å)、Glu411 (5.39 Å) 残基形成范德华力或碳氢键, 与 ACE 的 Lys118 (5.42 Å)、Trp357 (4.44 Å)、Asp358 (4.25 Å)、Glu403 (5.98 Å) 和 Lpr702 (7.65 Å) 残基形成盐桥、静电或 Pi-Cation 相互作用, 与 ACE 的 His387 (5.78 Å) 残基形成 Pi-Pi T-shaped 相互作用, 与 ACE 的 Ala63 (3.36 Å)、Met223 (6.43 Å)、Ala356 (5.66 Å)、Trp357 (4.86 Å)、Tyr360 (5.36 Å)、Pro407 (3.61 Å)、His410 (4.52 Å)、Pro519 (4.8 Å/5.40 Å) 残基形成 Alkyl 或 Pi-Alkyl 相互作用。从以上信息可知, RK7 与 Ala356 和 Arg402 形成 2 个相对较强的氢键, 与 Tyr360 和 Met223 形成 2 个相对较弱的氢键。Ala356 与 ACE 形成了 3 个氢键, 因此 RK7 和 ACE 的相互作用受 Ala356 的影响较大。其它相互作用力包括盐桥、碳氢键和静电相互作用等也参与了肽与 ACE 的相互作用, 详细信息如图 3c 所示, 氢键属于分子间较强相互作用力, 使得肽与 ACE 以较高亲和力结合, 从而使构象得以稳定。



(a) RK7 与 ACE 相互作用最佳构象整体图

(b) RK7 与 ACE 相互作用最佳构象局部图



(c) RK7 与 ACE 相互作用最佳构象二维平面图

图 3 RK7 与 ACE 的对接构象图

Fig.3 Docking conformation between RK7 and ACE

2.2.3 VN10 与 ACE 的相互作用分析 VN10 与 ACE 对接后得到 1 个较好的对接构象, 该构象位于 Site 1 区域 ($X:35.46, Y:43.15, Z:55.47, R:9$

Å), 对接得分为 222.34, 结合能为 604.71 kJ/mol, 最佳对接构象如图 4 所示。

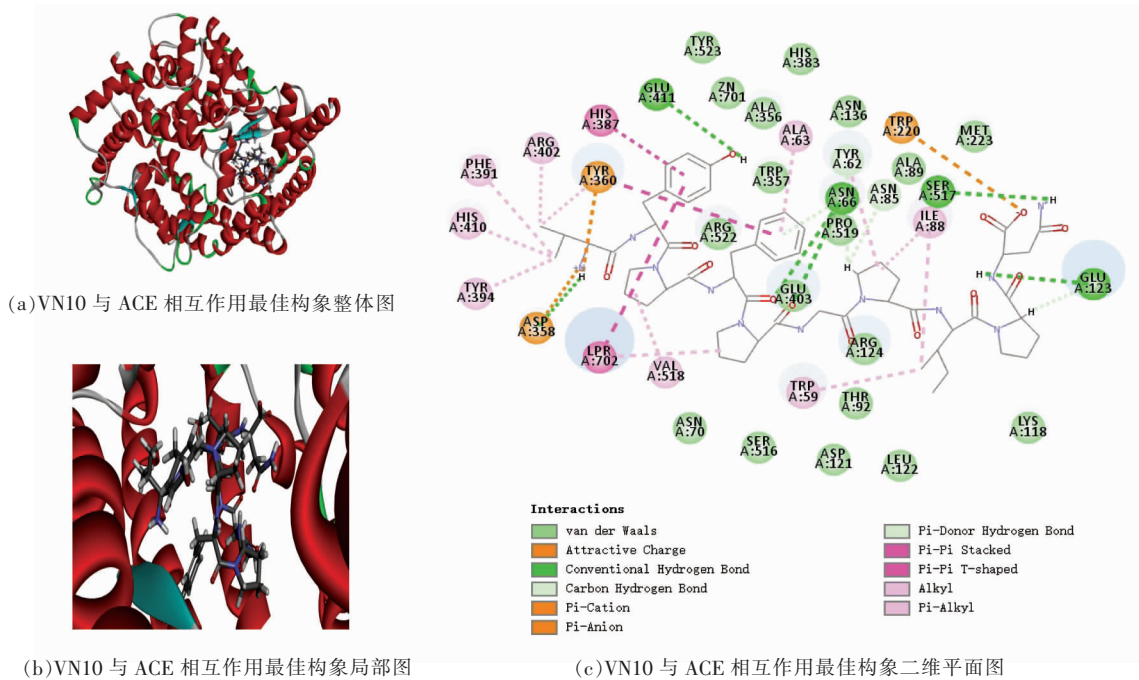


图 4 VN10 与 ACE 的对接构象图

Fig.4 Docking conformation between VN10 and ACE

由图 4 可知, VN10 中 Val 的氨基与 ACE 的 Asp358 残基形成一个强氢键, 键长为 2.80 Å, Tyr 的羟基与 ACE 的 Glu411 残基形成一个氢键, 键长为 4.88 Å, Phe 和 Pro 的羧基各与 ACE 的 Asn66 残基形成一个氢键, 键长分别为 5.32 Å 和 5.21 Å, Asn 的氨基和胍基分别与 ACE 的 Glu123 和 Ser517 残基形成一个氢键, 键长为 5.20 Å 和 4.32 Å; VN10 与 ACE 的 Tyr62 (6.07 Å)、Asn66 (6.24 Å)、Asn85 (4.00 Å)、Glu123 (5.41 Å) 残基形成范德华力或碳氢键, 与 ACE 的 Trp220 (5.26 Å)、Asp358 (2.97 Å)、Tyr360 (3.39 Å) 残基形成静电相互作用, 与 ACE 的 Tyr360 (6.88 Å)、His387 (5.47 Å)、Lpr702 (9.41 Å) 残基形成 Pi-Pi Stacked 或 Pi-Pi T-shaped 相互作用, 与 ACE 的 Trp59 (5.00 Å)、Tyr62 (5.48 Å)、Ala63 (5.71 Å)、Ile88 (5.09 Å/5.46 Å)、Tyr360 (4.46 Å)、Phe391 (5.11 Å)、Tyr394 (6.55 Å)、Arg402 (5.13 Å)、His410 (6.81 Å)、Val518 (6.57 Å)、Lpr702 (11.99 Å) 残基形成 Alkyl 或 Pi-Alkyl

相互作用。VN10 与 ACE 间相互作用的详细信息如图 4c 所示, 这些相互作用使 VN10 和 ACE 形成稳定的复合物构象。

2.2.4 SN12 与 ACE 的相互作用分析 SN12 与 ACE 对接后得到 9 个对接构象, 这些构象均位于 Site 1 区域 ($X:35.46, Y:43.15, Z:55.47, R:9$ Å), 其中最佳对接构象的对接得分为 -6.32, 结合能为 2 554.88 kJ/mol, 最佳对接构象如图 5 所示。

由图 5 可知, SN12 中 Ser 的羧基与 Tyr360 形成一个氢键, 键长为 5.78 Å, Tyr 的羟基与 Asn66 形成一个氢键, 键长为 3.74 Å, Pro 的羧基与 Arg124 形成一个氢键, 键长为 5.12 Å, Asn 的胍基与 Lys118 和 Glu123 各形成一个氢键, 键长为 4.50 Å 和 5.45 Å; SN12 与 ACE 的 Asn66 (5.89 Å)、Tyr394 (5.76 Å)、Arg402 (5.10 Å) 残基形成范德华力、碳氢键或 Pi-Donor hydrogen Bond 相互作用, 与 ACE 的 Lys118 (6.08 Å) 残基形成静电相互作用, 与 ACE 的 Tyr62 (5.87 Å)、Trp357 (3.24 Å/

4.16 Å)、Lpr702(9.53 Å)残基形成 Pi-Alkyl 相互作用。SN12 与 ACE 间相互作用的详细信息如图

5c 所示,造成 SN12 和 ACE 对接得分低的主要原因是对接过程中存在不支持两者结合的氨基酸残基。

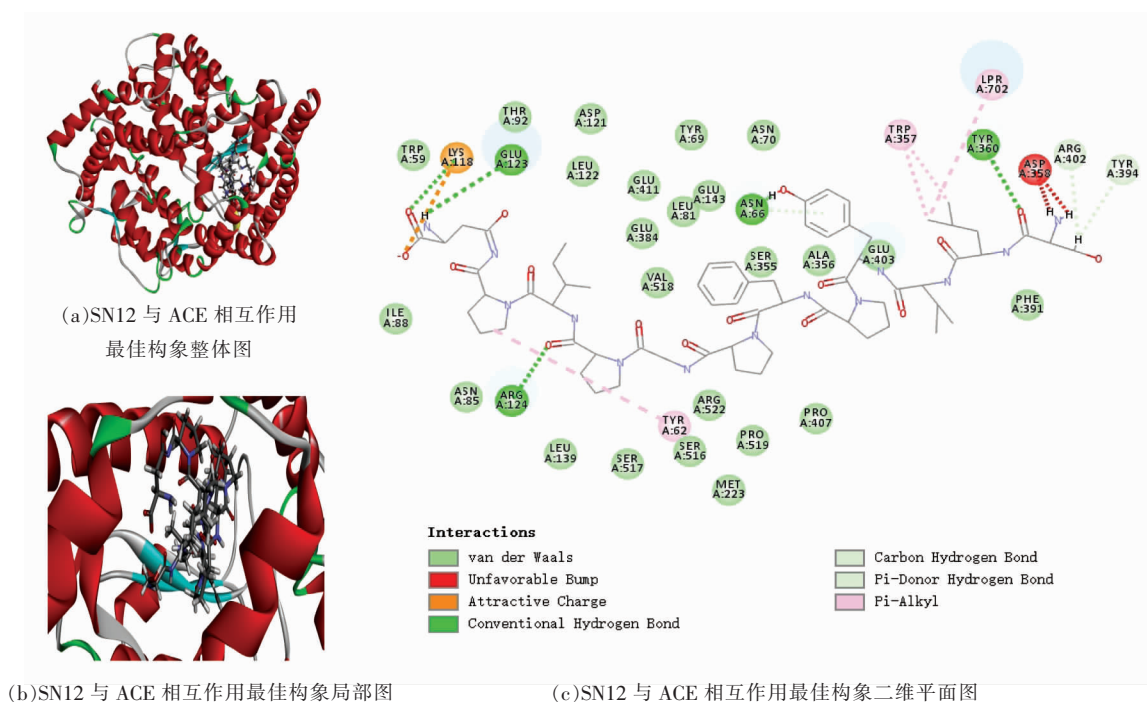


图 5 SN12 与 ACE 的对接构象图

Fig.5 Docking conformation between SN12 and ACE

2.3 苦味肽功能活性表征

截止 2020 年 12 月, BIOPEP 数据库的 4 132 种功能活性已知肽段当中包含 1 012 种 ACE 抑制肽, 将 RK7、VN10 和 SN12 与 BIOPEP 数据库中的 ACE 抑制肽比对后发现 RK7、VN10 和 SN12 的最高相似度分别为 57.14%、90.00% 和 75.00%, 当然

RK7、VN10 和 SN12 当中也含有其它一些具有 ACE 抑制活性的小肽片段, 它们均处于 RK7、VN10 和 SN12 的不同位置, 这为后续研究 RK7、VN10 和 SN12 经消化酶酶切后继续发挥 ACE 抑制活性提供了可能, 但前提是要充分考虑消化酶的酶切位点。

表 3 RK7、VN10 和 SN12 与 BIOPEP 数据库中 ACE 抑制肽的相似性比对

Table 3 Similarity comparison of RK7, VN10 and SN12 with ACE inhibitor peptides in the BIOPEP database

肽序列	编号	来源	活性	数量	位置
PKHP	9567	暂无记录	ACE 抑制剂	1	[2~5]
RPKHPIK	当前研究肽段	α_1 -CN	当前研究肽段	1	[1~5]
YPFPGPIP	7486	β -CN(60~68)	ACE 抑制剂	1	[2~10]
VYFPGPIP	当前研究肽段	β -CN	当前研究肽段	1	[1~10]
YPFPGPIP	7486	β -CN(60~68)	ACE 抑制剂	1	[4~12]
SLVYFPGPIP	当前研究肽段	β -CN	当前研究肽段	1	[1~12]

注: 位置表示 BIOPEP 数据库中 ACE 抑制活性已知肽段在当前研究肽段中所处的位置。

3 讨论

由于亲水性氨基酸残基会干扰肽进入 ACE 的活性位点, 因此肽序列中亲水性和疏水性氨基

酸比例会影响肽的 ACE 抑制活性^[24-25]。当 ACE 抑制肽 C 端含有 3 个疏水性氨基酸时, 该肽具有较高的 ACE 抑制活性^[26-27]。另外, 当 ACE 抑制肽 C 端

为疏水性氨基酸(如 Trp、Tyr、Pro 和 Phe)或芳香族氨基酸、中间为带正电荷的氨基酸、N 端为疏水性氨基酸(Val 和 Leu)时,其 ACE 抑制能力较强^[28-29]。此外,还有研究表明只要 ACE 抑制肽的 C 端含有一个疏水性氨基酸,或者 C 端含 Arg 其侧链胍基和 Lys 的 ϵ -氨基上带有正电荷,均可提高肽的 ACE 抑制活性^[24,30]。本试验选取的 3 个肽段 RK7、VN10 和 SN12,其 C 端均含有 Pro 和 Ile,N 端则含有不同的疏水性氨基酸(如 Pro、Val 和 Leu),将其与 BIOPEP 数据库比对后发现 3 个肽段均含有不同数量具有 ACE 抑制活性的小肽片段,这是 RK7、VN10 和 SN12 具有 ACE 抑制活性的基础。

分子对接是研究配体与靶向受体之间相互作用模式、亲和性及相互作用位点的技术^[31],涉及的主要作用力有范德华力、静电相互作用和氢键相互作用等。Pan 等^[32]从乳清蛋白中纯化出具有 ACE 抑制活性的 2 肽 LL 并将其与 ACE 进行分子对接,结果表明 LL 与 ACE 分子中的 His353、Ala354、Ser355、Glu384、Arg522 和 Tyr523 通过氢键形成稳定复合物。Tu 等^[33]鉴定了来自酪蛋白的新型混合型高效 ACE 抑制肽,该肽与 ACE 的氨基酸残基形成 15 个氢键,多个氢键的相互作用显著地增加了 ACE 和肽复合物的稳定性。ACE 活性位点的氨基酸是 ACE 与具有 ACE 抑制活性的肽相互作用的关键氨基酸,通过已经解析的 ACE 晶体结构(PDB ID: 1O86)可知,ACE 活性位点的氨基酸残基包括:Tyr523、Arg522、Tyr520、Pro519、Val518、Ser517、Ser516、His513、Phe512、Lys511、Glu411、His410、Pro407、Phe391、His387、Glu384、His383、Val380、Ala356、Ser355、Ala354、His353、Gln281、Alu162^[16,34-35]。分析 RK7、VN10 和 SN12 与 ACE 的对接结果可知,Ala356、His387、Phe391、Pro407、His410、Glu411、Ser517、Val518、Pro519 是 RK7 和 VN10 与 ACE 结合的重要活性位点,ACE 与 RK7 和 VN10 的分子机制相似,均在 ACE 的活性空腔内结合,多为 N 端氨基和 C 端羧基参与肽段中氢键的形成。本试验 RK7 与 ACE 形成 7 个氢键(与 ACE 活性位点形成 3 个氢键),VN10 与 ACE 形成 6 个氢键(与 ACE 活性位点形成 2 个氢键),SN12 与 ACE 形成 5 个氢键(与 ACE 活性位

点不存在氢键),氢键是分子间的较强作用力,是肽与 ACE 形成稳定复合物构象并产生高 ACE 抑制活性的内在因素。

4 结论

本试验运用生物信息学方法对牦牛乳硬质干酪中 3 种苦味肽 RK7、VN10 和 SN12 进行理化计算和分析,将这 3 种肽分别与 ACE 做分子对接,结果表明 ACE 分子中 Ala356、His387、Phe391、Pro407、His410、Glu411、Ser517、Val518、Pro519 残基是 ACE 与 RK7 和 VN10 结合时起重要作用的残基,肽分子中参与氢键形成的多为 N 端氨基和 C 端羧基。RK7、VN10 和 SN12 与 ACE 的结合表现出相似的作用机制,均结合于 ACE 的活性空腔内,结合区域为 X:35.46,Y:43.15,Z:55.47,R:9 Å。RK7、VN10 和 SN12 与 BIOPEP 数据库中的 ACE 抑制肽比对后发现其最高相似度分别为 57.14%、90.00% 和 75.00%。综合 RK7、VN10 和 SN12 与 ACE 活性位点氨基酸残基相互作用的情况和 BIOPEP 数据库比对结果预测出这 3 种肽段的 ACE 抑制活性:VN10 > RK7 > SN12。3 种肽段单体的 ACE 抑制活性有待通过体外试验做进一步验证,并通过模拟酶切研究酶切片段的 ACE 抑制活性。本研究有效揭示了牦牛乳硬质干酪中具有 ACE 抑制活性的苦味肽与 ACE 间相互作用的分子机制,目前 RK7、VN10 和 SN12 并不在具有 ACE 抑制活性的 BIOPEP 数据库中,有可能作为 ACE 抑制肽数据库的扩充序列。

参 考 文 献

- [1] 宋雪梅,张炎,杨敏,等. 牦牛乳硬质干酪苦味肽的分离与特征鉴定[J]. 食品科学, 2016, 37(15): 160-164.
SONG X M, ZHANG Y, YANG M, et al. Separation and characterization of bitter peptides from hard cheese made from yak milk[J]. Food Science, 2016, 37(15): 160-164.
- [2] SINGH T K, DRAKE M A, CADWALLADER K R. Flavor of cheddar cheese: A chemical and sensory perspective[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2003, 2(4): 166-189.

- [3] GOMEZ M J, GARDE S, GAYA P, et al. Relationship between level of hydrophobic peptides and bitterness in cheese made from pasteurized and raw milk[J]. *Journal of Dairy Research*, 1997, 64(2): 289–297.
- [4] TOPCU A, SALDAMLI I. Determination of peptides caused bitterness in turkish white cheese and kasar cheese[J]. *Journal of Food Technology*, 2007, 5(2): 131–134.
- [5] TOELSTEDE S, HOFMANN T. Sensomics mapping and identification of the key bitter metabolites in Gouda cheese[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(8): 2795–2804.
- [6] TOELSTEDE S, HOFMANN T. Quantitative studies and taste re-engineering experiments toward the decoding of the nonvolatile sensometabolome of Gouda cheese[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(13): 5299–5307.
- [7] 褚宁宁, 陈雨豪, 陈娟娟, 等. 基于 nanoUPLC-MS/MS 的螺旋藻游离肽组成分析[J]. *核农学报*, 2020, 34(4): 735–744.
- CHU N N, CHEN Y H, CHEN J J, et al. Peptide profiling of *Spirulina platensis* based on nanoUPLC-MS/MS[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2020, 34(4): 735–744.
- [8] YOSHIKAWA M, FUJITA H, MATOBA N, et al. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases[J]. *BioFactors (Oxford, England)*, 2000, 12(1/2/3/4): 143–146.
- [9] SILVA S V, MALCATA F X. Caseins as source of bioactive peptides [J]. *International Dairy Journal*, 2005, 15(1): 1–15.
- [10] PRIPP A H, ARDO Y. Modelling relationship between angiotensin-(I)-converting enzyme inhibition and the bitter taste of peptides[J]. *Food Chemistry*, 2006, 102(3): 880–888.
- [11] UPADHYAYA J, PYDI S P, SINGH N, et al. Bitter taste receptor T2R1 is activated by dipeptides and tripeptides[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 398(2): 331–335.
- [12] 杨保军, 梁琪. 干酪源生物活性肽的构效关系研究进展[J]. *食品与发酵工业*, (2021-01-27)[2021-05-31]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1802.TS.20210126.1736.001.html>.
- YANG B J, LIANG Q. Advances on the structure-activity relationship of bioactive peptides in cheese [J]. *Food and Fermentation Industries*, (2021-01-27)[2021-05-31]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1802.TS.20210126.1736.001.html>.
- [13] FU Y, YOUNG J F, L2KKE M M, et al. Revalorisation of bovine collagen as a potential precursor of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides based on *in silico* and *in vitro* protein digestions[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 24: 196–206.
- [14] 李海粟, 李任植, 李俭, 等. 模拟设计抗药突变型 ALS 抑制物结构的研究进展[J]. *核农学报*, 2017, 31(7): 1443–1451.
- LI H S, LI R Z, LI J, et al. Advances in molecular structure of mutated ALS-inhibitor with simulated design [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2017, 31(7): 1443–1451.
- [15] SÁNCHEZ-RIVERA L, MARTÍNEZ-MAQUEDA D, CRUZ-HUERTA E, et al. Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides[J]. *Food Research International*, 2014, 63: 170–181.
- [16] 管骁, 刘静, 苏浙娜, 等. 血管紧张素转化酶抑制二肽抑制 ACE 作用的柔性分子对接[J]. *食品科学*, 2015, 36(5): 1–6.
- GUAN X, LIU J, SU X N, et al. Flexible molecular docking of interaction between angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory dipeptides and ACE[J]. *Food Science*, 2015, 36(5): 1–6.
- [17] 王晓丹, 薛璐, 胡志和, 等. ACE 抑制肽构效关系研究进展[J]. *食品科学*, 2016, 38(5): 305–310.
- WANG X D, XUE L, HU Z H, et al. Progress in research on structure-activity relationship of ACE inhibitory peptides[J]. *Food Science*, 2016, 38(5): 305–310.
- [18] 黄勇, 陈晨, 张志毅, 等. Autodock Vina 与 Discovery Studio 在虚拟筛选耐药蛋白抑制剂中的比较 [J]. *生物信息学*, 2012, 10(4): 248–253.
- HUANG Y, CHEN C, ZHANG Z Y, et al. Comparison of Autodock Vina and Discovery Studio in virtual screening for antibiotic resistance protein inhibitors [J]. *China Journal of Bioinformatics*, 2012, 10(4): 248–253.
- [19] SOLEYMANZADEH N, MIRDAMADI S, MIRZAEI M, et al. Novel β -casein derived antioxidant and ACE-inhibitory active peptide from camel milk fermented by *Leuconostoc lactis* PTCC1899; Identifica-

- tion and molecular docking[J]. *International Dairy Journal*, 2019, 97: 201–208.
- [20] 杨保军, 梁琪, 宋雪梅. 基于计算机虚拟技术研究牦牛乳硬质干酪苦味肽的抑菌活性差异[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(12): 75–87.
- YANG B J, LIANG Q, SONG X M. Study on difference of antibacterial activity of bitter peptide from yak milk hard cheese based on computer virtual technology[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2021, 40(12): 75–87.
- [21] NATESH R, SCHWAGER S L U, STURROCK E D, et al. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex[J]. *Nature*, 2003, 421(6922): 551–554.
- [22] MINKIEWICZ P, IWANIAK A, DAREWICZ M. BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: Current opportunities[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(23): 5978.
- [23] 苏娜, 吉日本图, 伊丽. 驼乳肽生物功能特性的研究进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(21): 321–329.
- SU N, JI R M T, YI L. Recent progress in biological functions of camel milk peptides[J]. *Food Science*, 2020, 41(21): 321–329.
- [24] LI G H, LE G W, SHI Y H, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects[J]. *Nutrition Research*, 2004, 24(7): 469–486.
- [25] ASOODEH A, HOMAYOUNI-TABRIZI M, SHAB-ESTARIAN H, et al. Biochemical characterization of a novel antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Struthio camelus* egg white protein hydrolysis[J]. *Journal of Food & Drug Analysis*, 2016, 24(2): 332–342.
- [26] WILSON J, HAYES M, CARNEY B. Angiotensin-I-converting enzyme and prolyl endopeptidase inhibitory peptides from natural sources with a focus on marine processing by-products[J]. *Food Chemistry*, 2011, 129(2): 235–244.
- [27] 张江涛, 秦修远, 贾福怀, 等. 卵白蛋白低聚肽的体外抗氧化及 ACE 抑制作用[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(12): 67–74.
- ZHANG J T, QIN X Y, JIA F H, et al. *In vitro* antioxidant and ACE inhibition effects of ovalbumin oligopeptides[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(12): 67–74.
- [28] FITZGERALD R J, MURRAY B A. Bioactive peptides and lactic fermentations[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2006, 59(2): 118–125.
- [29] HE R, MALOMO S A, ALASHI A, et al. Purification and hypotensive activity of rapeseed protein-derived renin and angiotensin converting enzyme inhibitory peptides[J]. *Journal of Functional Foods*, 2013, 5(2): 781–789.
- [30] LOPEZ-FANDINO R, OTTE J, VAN CAMP J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity[J]. *International Dairy Journal*, 2007, 16(11): 1277–1293.
- [31] GUEDES I A, DE MAGALH C S, DARDENNE L E. Receptor-ligand molecular docking[J]. *Biophysical Reviews*, 2014, 6(1): 75–87.
- [32] PAN D D, CAO J X, GUO H Q, et al. Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate[J]. *Food Chemistry*, 2012, 130(1): 121–126.
- [33] TU M L, LIU H X, ZHANG R Y, et al. Analysis and evaluation of the inhibitory mechanism of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide derived from casein hydrolysate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(16): 4139–4144.
- [34] RAWENDRA R D S, AISHA, CHANG C I, et al. A novel angiotensin converting enzyme inhibitory peptide derived from proteolytic digest of Chinese soft-shelled turtle egg white proteins[J]. *Journal of Proteomics*, 2013, 94(6): 359–369.
- [35] PAN D D, GUO H Q, ZHAO B, et al. The molecular mechanisms of interactions between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011, 21(13): 3898–3904.

Molecular Mechanism of ACE Inhibitory Activity Characterization of Yak Milk Cheese Bitter Peptide

Yang Baojun, Liang Qi*, Song Xuemei

(*Functional Dairy Product Engineering Laboratory of Gansu, College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070*)

Abstract The aim of the experiment was to calculate and analyze the physicochemical properties of three bitter peptides RK7, VN10 and SN12 identified in yak milk hard cheese using bioinformatics methods, and minimize the energy of the peptide structure. Obtained the X-ray diffraction three-dimensional structure of ACE protein crystals from the PDB database, and evaluated and characterized the ACE inhibitory activity of bitter peptides and the mechanism of action with ACE through molecular docking and database comparison. The instability indexes of RK7, VN10 and SN12 were 19.84, 49.44 and 42.87, respectively, and the hydrophobicities were 42.86%, 70.00% and 66.67%, respectively. These three peptides were molecularly docked with ACE, the results of the study showed that the Ala356, His387, Phe391, Pro407, His410, Glu411, Ser517, Val518, and Pro519 residues in the ACE molecule were important active sites for binding to RK7 and VN10, RK7, VN10 and SN12, respectively formed 3, 2 and 0 hydrogen bonds with the amino acids in the active site of ACE. The binding of RK7, VN10 and SN12 to ACE showed similar molecular mechanisms, all of which were bound in the active cavity of ACE ($X: 35.46, Y: 43.15, Z: 55.47, R: 9 \text{ \AA}$). The highest similarities between RK7, VN10 and SN12 and the known ACE inhibitor peptides in the BIOPEP database were 57.14%, 90.00% and 75.00%, respectively. Integrating the interaction of RK7, VN10 and SN12 with the amino acid residues of the active site of ACE and the BIOPEP database comparison results predicted the ACE inhibitory activity of the three peptides: VN10 > RK7 > SN12. Therefore, this experiment provided the reference for studying the ACE inhibitory activity of cheese bitter peptides at the theoretical and molecular levels.

Keywords yak milk hard cheese; bitter peptide; physicochemical analysis; ACE inhibitory activity; molecular docking