

大豆多肽中 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制剂的虚拟筛选及体外活性验证

薛森, 吴敬凡, 曹淑芳, 白森, 朱丹实, 刘贺, 杨立娜*

(渤海大学食品科学与工程学院 辽宁锦州 121000)

摘要 目的:通过抑制碳水化合物消化酶的活性延缓碳水化合物的消化,来预防和控制糖尿病的作用已经成为多领域的研究热点。 β -伴大豆球蛋白是大豆蛋白中含量最高的功能性蛋白,但其胃肠道消化后产生的多肽是否具有抑制碳水化合物消化酶的活性还不得而知。方法:将 β -伴大豆球蛋白进行胃肠道模拟消化,通过虚拟筛选和 ADMET 预测选出 α -葡萄糖苷酶抑制肽和 α -淀粉酶抑制肽,检测多肽对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制作用。结果:通过胃酶、胰酶和糜蛋白酶将 β -伴大豆球蛋白虚拟酶解成 95 个小分子多肽;筛选出 8 个 α -葡萄糖苷酶抑制肽和 α -淀粉酶抑制肽;发现氢键和静电相互作用在多肽与 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶结合中起重要作用;体外验证发现四肽 EASY 具有较强 α -葡萄糖苷酶抑制效果,其 IC_{50} 值为 208.6 $\mu\text{g/mL}$,未发现明显 α -淀粉酶抑制效果。结论: α -葡萄糖苷酶抑制肽 EASY 具有抑制碳水化合物消化酶的活性,可能成为控制糖尿病的潜在抑制剂。

关键词 大豆多肽; α -葡萄糖苷酶; α -淀粉酶; 虚拟筛选; 抑制活性

文章编号 1009-7848(2024)06-0044-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.06.005

2021 年国际糖尿病联合会的数据显示:近几年,由于人们的饮食和生活作息的改变,糖尿病在全球范围内的发病率持续急剧上升,预计在未来的 30 年内,糖尿病患者总数将临近 10 亿人。肥胖、久坐不动和过量地摄入糖都会导致糖尿病发生^[1-3]。其中,过量摄入糖会使人体长期处于高血糖的情况下,人体内的组织与器官都会发生病变,机能衰退,严重时可能引发一系列并发症,甚至会威胁生命^[4]。可以通过抑制碳水化合物消化酶的活性来延缓碳水化合物的消化,进而起到预防和控制糖尿病的作用。 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶作为碳水化合物的主要消化酶,通过水解 α -(1,4)或 α -(1,6)糖苷键释放游离的葡萄糖分子。碳水化合物消化酶抑制剂阿卡波糖是经过认证的抗糖尿病药物,然而,其存在着一定的不良反应,如:腹胀、腹泻、腹痛和肝损伤^[5]。寻找天然的抑制剂对于预防控制糖尿病和降低不良反应有着重要的意义。

食源性多肽较氨基酸和蛋白质具有诸多优势,如易吸收、无毒、特异性高和生物活性多样

等^[6],在功能性食品、保健品及食品辅料的开发中具有广阔的前景^[7-10]。相对分子量较小的多肽更容易穿透肠道屏障^[11]。目前一些具有碳水化合物消化酶抑制活性的食源性多肽被报道,如核桃中的 LPLLR^[12],谷子中的 EQGFLPGPEESGR^[13],小麦胚芽中的 LDLQR、AGGFR、LDNFR^[14],火麻仁多肽^[15],燕麦蛋白中的 GDVVALPA 和 DVVALPAG^[16]等对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶有抑制作用。大豆也是一类蛋白质含量较高的植物原料,不仅富含色氨酸、苏氨酸等必需氨基酸,而且氨基酸的构成也符合联合国粮农组织和世界卫生组织所建议的基本食品氨基酸构成模式^[17]。大豆蛋白主要由 β -伴大豆球蛋白、大豆球蛋白等组成,其中 β -伴大豆球蛋白是大豆蛋白中最具功能性的蛋白。目前关于 β -伴大豆球蛋白消化后的多肽研究较少。大豆粕等副产物制作大豆肽的工艺主要以生物发酵、酶解法和酸解法为主,这些工艺流程简单,设备常见且便宜,效率高,成本低。探究大豆蛋白消化后的多肽对碳水化合物消化酶的抑制作用以及相互作用关系,可以为大豆活性肽应用于食品及医药领域提供参考,同时也有助于提高大豆粕等副产物的附加值。

收稿日期: 2023-06-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31901680)

第一作者: 薛森,男,硕士生

通信作者: 杨立娜 E-mail: yangln16@bhu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

α -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.20, 来源于酿酒酵母, 700 000 unit/mL) 和对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG), 购自上海源叶生物科技有限公司; 猪胰腺 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.1, 50 unit/g), 购自北京博奥拓达科技有限公司; 可溶性淀粉, 购自天津致远化学试剂有限公司; 其余所用化学试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆蛋白模拟胃肠道消化 本研究选择了胃酶 (EC 3.4.23.1)、胰酶 (EC 3.4.21.4) 和糜蛋白酶 (EC 3.4.21.1) 三种典型的胃肠道酶进行模拟消化。使用 ExPASy PeptideCutter (https://web.expasy.org/peptide_cutter/)^[18] 对 β -伴大豆球蛋白 α 亚基 (UniProtKB: P0D016)、 β -伴大豆球蛋白 α' 亚基 (UniProtKB: P11827) 和 β -伴大豆球蛋白 β 亚基 (UniProtKB: P25974) 进行模拟消化。模拟消化完成后, 选择三肽、四肽、五肽和六肽进行后续试验。

1.2.2 分子对接 从 RCSB 蛋白质数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载 α -葡萄糖苷酶的 3D 结构 (PDB: 3L4Y 和 3LPO) 和 α -淀粉酶的 3D 结构 (PDB: 5U3A), 将蛋白受体结果导入 Discovery Studio (DS) 2017 R2 Client 软件, 在分子对接前进行去除水分子, 补充非完整的氨基酸残基, 加氢原子, 设置受体结合位点。将 1.2.1 节筛选得到的多肽在 DS2017 软件中进行 3D 建模, 并将其作为配体进行能量最小化。采用 Dock Ligands 中半柔性对接程序 LibDock 进行分子对接, 设置参数为刚性优化、快速筛选, 其余设置为默认值进行分子对接, 并分析多肽与氨基酸残基间的氢键作用。按打分将筛选出的多肽进行下一步操作。

1.2.3 药物代谢动力学预测 DS 2017 R2 进行药物代谢动力学 (ADMET) 预测, 进一步筛选多肽。将 1.2.2 节筛选得到的多肽导入 DS 2017 R2 软件, 在工具栏中打开 ADMET Descriptors, 选择所有多肽, 再选择需要预测的 ADMET 性质 (溶解性和肝毒性), 记录并分析预测结果。

1.2.4 α -葡萄糖苷酶抑制效果验证 α -葡萄糖苷酶抑制活性试验根据 Liu 等^[19]的方法进行, 稍作修改。200 μ L 的 α -葡萄糖苷酶溶液 (7 unit/mL) 与

200 μ L 多肽溶液 (0.1, 1, 10, 100 μ g/mL) 进行混合, 37.0 $^{\circ}$ C 反应 20 min 后, 加入 200 μ L 2.5 mmol/L 对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷溶液, 反应混合物在 37.0 $^{\circ}$ C 下反应 20 min。酶标仪在 405 nm 波长处测定对硝基苯酚的释放量。使用公式 (1) 计算抑制活性。

$$\text{活性抑制}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}}}{A_{\text{空白对照}} - A_{\text{空白}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

1.2.5 α -淀粉酶抑制效果验证 α -淀粉酶抑制活性试验根据 Waqas 等^[19]的方法进行, 稍做修改。100 μ L 猪胰腺 α -淀粉酶溶液 (2 unit/mL) 与 200 μ L 多肽溶液 (1, 3, 10, 30, 100 μ g/mL) 进行混合, 在 37.0 $^{\circ}$ C 反应 10 min 后, 加入 100 μ L 1% 可溶性淀粉溶液, 反应混合物在 37.0 $^{\circ}$ C 下反应 20 min, 再加入 200 μ L DNS 溶液, 在沸水中水浴 10 min。酶标仪在 565 nm 波长处测定反应混合物吸光度值。使用公式 (2) 计算抑制活性。

$$\text{活性抑制}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}}}{A_{\text{空白对照}} - A_{\text{空白}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

1.2.6 多肽样品制备 多肽由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成分离, 纯度 > 95%。在室温下溶解度良好, 试验过程中也未出现析出现象。

1.2.7 统计分析 试验数据用平均值 \pm 标准差表示, 每组样品最少重复 3 次。使用 Origin 2022 和 GraphPad Prism 9 进行绘图, GraphPad Prism 9 进行 IC₅₀ 值计算。所有试验和分析至少重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 β -伴大豆球蛋白模拟胃肠道消化结果

将 β -伴大豆球蛋白 α 亚基、 α' 亚基和 β 亚基分别使用胃蛋白酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶进行模拟胃肠道消化, 由于肽链过长的多肽不容易与活性位点结合, 因此选择 3~6 个氨基酸的肽链作为研究对象。如表 1 所示, 胃肠道模拟消化后共得到 95 个三肽、四肽、五肽和六肽, 其中 41 个三肽, 23 个四肽, 19 个五肽, 12 个六肽。

2.2 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制肽的虚拟筛选

α -葡萄糖苷酶主要包含麦芽糖酶-葡糖淀粉酶 (Maltase-Glucoamylase, MGAM) 和蔗糖酶-异麦芽糖酶 (Sucrase-Isomaltase, SI) 两种酶, 所以选择

表1 体外胃肠道消化模拟结果

Table 1 Simulation results of gastrointestinal digestion *in vitro*

三肽			四肽		五肽		六肽
AEL	GEK	QEK	ADAD	GIAY	ADADY	PGSAK	ASV CVS
AIL	GGK	Q GK	AGEK	G S NR	DNVVR	Q E E E H	EDENNP
CNL	GPL	Q IR	AGSK	NEGA	EEG NK	Q E E E P	EHP R PH
DSY	GTV	Q NL	AIVI	NPIY	EEG SK	Q NP SH	EITPEK
DTK	G V V	Q PH	AIVV	NPQL	EEINK	Q SG DA	ENQNGR
EEH	I IK	Q QH	DIEN	Q IER	EEINR	SEDDV	GPFPSI
EEK	I VI	SEF	DPIY	QVQE	EQQQK	SEQDI	NSKPNT
EER	I V Q	S GR	EASY	SPQL	EQQQR	SIVDM	SCNSEK
EPR	N IL	S NK	EEEEK	SSNS	NGTAI	SVVDM	SQSESY
EQK	N PF	S NN	ENPK	SSSR	NQACH		VDAQPK
EQR	N QR	S QQ	EQIR	VGIK			VNND DR
ESY	N QY	S SI	EVQR				VNPHDH
ETS	N SK	V EK					
EVR	P NH						

MGAM(PDB:3L4Y)和SI(PDB:3LPO)作为 α -葡萄糖苷酶抑制肽的受体蛋白。选择人胰腺 α 淀粉酶(Human Pancreatic Alpha Amylase,AMY2A,PDB:5U3A)作为 α -淀粉酶抑制肽的受体蛋白。使用DS 2017 R2软件中的LibDock程序将95个多肽分别对接到MGAM、SI和AMY2A上。如表

2~表4所示,根据多肽与MGAM、SI和AMY2A分子对接的打分结果分别选择4种多肽打分最高的10条多肽。综合筛选出可以与3个结合位点良好结合的多肽共21种,并对这21种多肽进行了ADMET预测,如表5所示。

表2 大豆多肽与MGAM对接结果(前10名)

Table 2 Docking results of soybean peptides with MGAM (Top 10)

	三肽	对接分数	四肽	对接分数	五肽	对接分数	六肽	对接分数
1	EQR	184.713	EEEEK	191.35	QSGDA	201.732	ENQNGR	222.169
2	EER	179.203	EVQR	183.253	QEEEP	199.752	VNPHDH	196.907
3	EEK	174.536	EASY	179.649	QNPSH	190.554	EDENNP	196.584
4	NQR	169.078	SSSR	179.63	EQQQK	184.848	EITPEK	187.747
5	NQY	168.357	ENPK	173.288	EQQQR	179.602	VDAQPK	185.639
6	Q GK	166.42	NPQL	172.211	EEINR	179.306	EHP R PH	168.762
7	DTK	163.615	QVQE	170.101	EEG NK	178.3	SCNSEK	167.842
8	EPR	162.557	G S NR	169.799	SEDDV	177.14	GPFPSI	163.947
9	Q IR	161.983	DPIY	167.197	PGSAK	174.397	NSKPNT	163.006
10	EEH	161.311	DIEN	166.677	NGTAI	172.045	SQSESY	156.751

表3 大豆多肽与SI对接结果(前10名)

Table 3 Docking results of soybean peptides with SI (Top 10)

	三肽	对接分数	四肽	对接分数	五肽	对接分数	六肽	对接分数
1	EQR	177.999	EEEEK	186.681	EEINK	198.362	EDENNP	191.934
2	EEH	171.494	Q IER	180.752	EEG SK	193.197	ENQNGR	187.568
3	EER	169.28	QVQE	180.659	QSGDA	186.432	VNPHDH	177.382

(续表 3)

	三肽	对接分数	四肽	对接分数	五肽	对接分数	六肽	对接分数
4	NQY	167.595	EASY	172.681	QEEEP	184.45	VNDDDR	176.625
5	ESY	156.48	ENPK	171.778	EQQQR	181.878	EITPEK	175.57
6	QEK	155.221	EVQR	169.582	QNPSH	177.199	EHRPH	172.991
7	QQH	154.752	NPIY	167.628	EEINR	174.38	SQSESY	162.831
8	NQR	154.486	EQIR	166.504	SEQDI	173.856	VDAQPK	162.031
9	QIR	151.187	SSSR	165.015	EEGNK	171.712	GPFPSI	160.218
10	EQK	147.214	DPIY	158.863	QEEEH	168.27	ASVCVS	159.134

表 4 大豆多肽与 AMY2A 对接结果(前 10 名)

Table 4 Docking results of soybean peptides with AMY2A (Top 10)

	三肽	对接分数	四肽	对接分数	五肽	对接分数	六肽	对接分数
1	NQR	129.671	ENPK	141.534	QEEEP	151.7	SQSESY	157.015
2	EER	128.789	EQIR	137.904	EQQQR	148.461	VNPHDH	156.642
3	NQY	128.673	QIER	134.612	EQQK	145.335	EDENNP	149.545
4	EQR	128.008	SPQL	132.343	QEEEH	144.257	EITPEK	145.259
5	EPR	122.784	NPQL	131.84	DNVVR	141.958	ENQNGR	143.884
6	QIR	120.974	SSSR	131.465	EEGNK	141.507	VDAQPK	142.553
7	DSY	120.806	QVQE	131.073	NQACH	141.122	SCNSEK	139.839
8	EEH	119.853	NPIY	128.094	EEINK	137.499	VNDDDR	139.212
9	EVR	119.469	GSR	128.03	QSGDA	137.062	EHRPH	138.591
10	ESY	119.05	EASY	127.565	SEQDI	136.54	ASVCVS	125.264

表 5 大豆多肽的对接评分、溶解度和毒性预测

Table 5 Docking score, solubility, and toxicity prediction of soybean peptides

多肽	溶解性	肝毒性	对接分数		
			MGAM	SI	AMY2A
EER	好	无毒	179.203	169.280	128.789
NQR	好	无毒	169.078	154.486	129.671
NQY	好	无毒	168.357	167.595	128.673
QIR	好	无毒	161.983	151.187	120.974
EASY	好	无毒	179.649	172.681	127.565
SSSR	好	无毒	179.630	165.015	131.465
QSGDA	好	无毒	201.732	186.432	137.062
SQSESY	好	无毒	156.751	162.831	157.015
EEH	好	有毒	-	-	-
EQR	好	有毒	-	-	-
ENPK	好	有毒	-	-	-
QVQE	好	有毒	-	-	-
EEGNK	好	有毒	-	-	-
EQQQR	好	有毒	-	-	-
QEEEP	好	有毒	-	-	-
EDENNP	好	有毒	-	-	-
EHRPH	好	有毒	-	-	-
EITPEK	好	有毒	-	-	-
ENQNGR	好	有毒	-	-	-
VDAQPK	好	有毒	-	-	-
VNPHDH	好	有毒	-	-	-

ADMET 是对药物的吸收、分布、代谢、排泄和毒性全面的研究^[20], ADMET 性质研究主要以人源性或人源化组织功能性蛋白质为“药靶”, 将体外研究技术与计算机模拟等方法相结合, 研究药物与体内生物物理和生物化学屏障因素间的相互作用, 为体外筛选抑制剂提供了良好的基础^[21]。如表 5 所示, 21 个多肽具有良好的水溶性, 8 个多肽无肝毒性, 表明这 8 个多肽对人体有害的可能性比较小^[22]。水溶性对生物活性多肽的吸收有重要影

响, 而溶解能力是生物活性多肽发挥生理功能的限制因素^[23]。

综合对接 3 种受体蛋白的打分分数和多肽的 ADMET 预测结果, 分别从三肽、四肽、五肽和六肽中选取较为合适的多肽, 分别为三肽: EER、四肽: EASY、五肽: QSGDA 和六肽: SQSESY (图 1), 作为 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制肽, 并进行后续的体外验证试验。

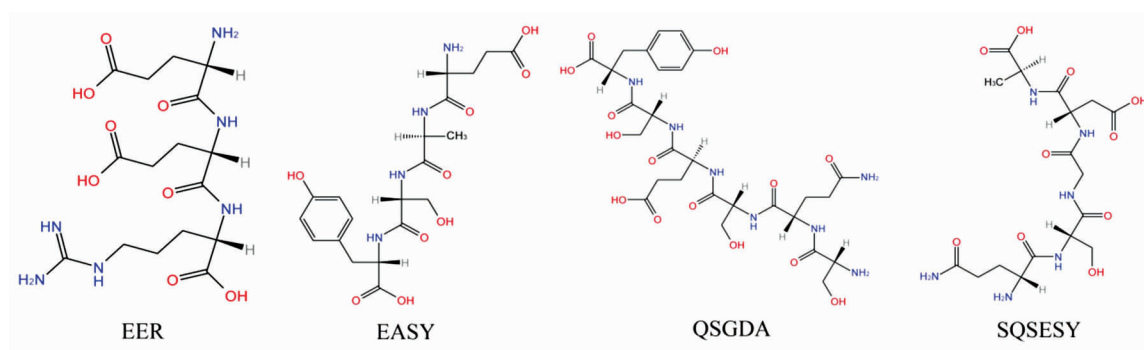


图 1 分子对接筛选的 4 种大豆多肽化学结构

Fig.1 Chemical structures of four soybean peptides screened by molecular docking

2.3 大豆多肽与 α -葡萄糖苷酶的分子对接

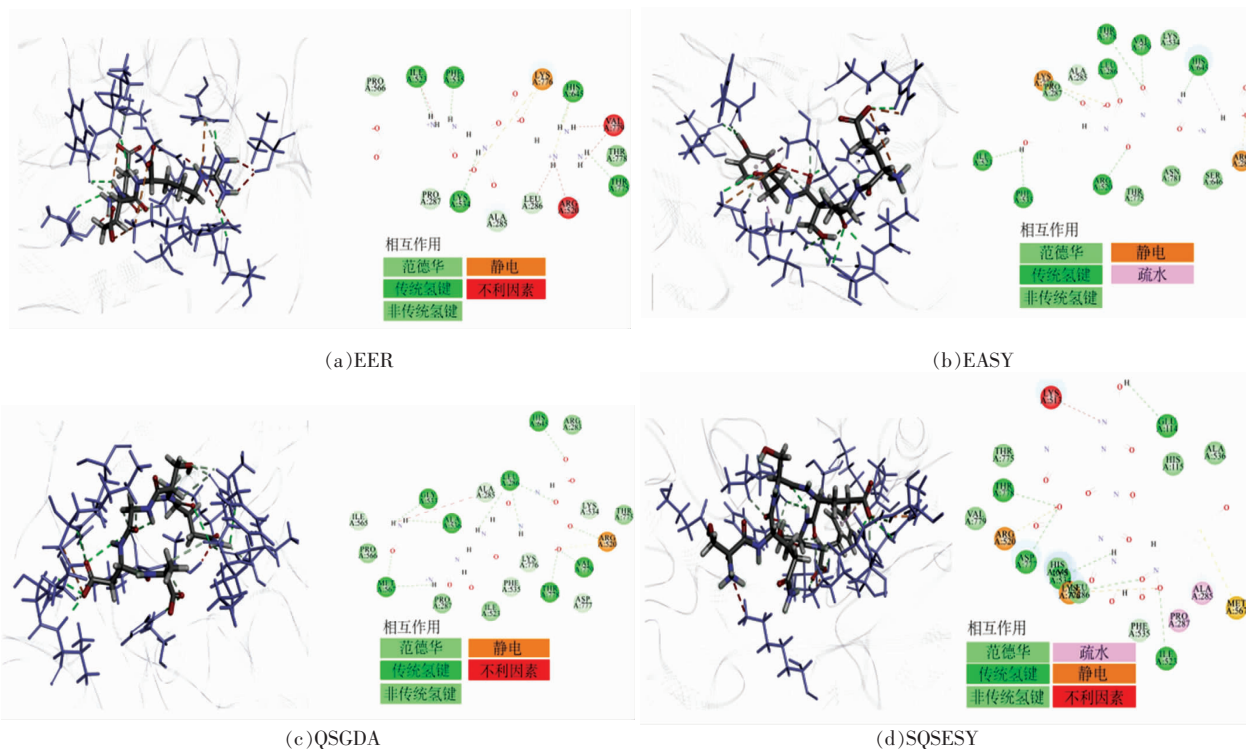
4 种多肽与 MGAM 结合的对接结果如图 2 所示。三肽 EER 可以与对接位点中多个氨基酸残基形成氢键相互作用, 如 PRO566、PHE535、LEU286、ILE523、HIS645、THR775、LYS534、ALA285 和 PRO287, 与 LYS776 形成静电相互作用, 会与 VAL779、LEU286、ILE523 和 ARG520 形成排斥相互作用(图 2a)。

四肽 EASY 可以与多个氨基酸残基形成氢键相互作用, 如 ILE523、PHE535、ALA285、LEU286、THR778、VAL779、HIS645、ARG520 和 LYS776, 与 LYS776 和 ARG283 形成静电相互作用, 与 ALA285、ARG520 和 HIS645 形成疏水相互作用(如图 2b)。

五肽 QSGDA 可与 ILE565、MET567、GLY533、ALA536、ALA285、LEU286、HIS645、LYS534、ARG520、VAL779、ASP777、THR778、LYS776 和 PHE535 形成氢键相互作用, 与 ARG520 形成静电相互作用, 与 ALA285 形成排斥相互作用(图 2c)。

六肽 SQSESY 可与 GLU114、THR778、ASP777、LYS534、LYS776、PHE535 和 ILE523 形成氢键相互作用, 与 ARG520、LYS776 和 MET567 形成静电相互作用, 与 ALA285 和 PRO287 形成疏水相互作用, 与 LYS513 形成排斥相互作用(图 2d)。

LEU286 和 EER 之间的氢键数为 20, ARG520 和 EER 之间的氢键数为 29, LYS534、THR778 和 EER 之间的氢键数为 11, LYS534 和 EER 之间的氢键数为 14。LEU286 和 EASY 之间的氢键数为 14, ARG520 和 EASY 之间的氢键数为 10, LYS776 与 EASY 之间的氢键数为 17, ASP777 与 EASY 之间的氢键数为 11。ALA285、LYS776 与 QSGDA 之间氢键数为 16, LEU286 与 QSGDA 之间氢键数为 15, PHE535、ASP777 与 QSGDA 之间氢键数为 14。LYS534 与 SQSESY 之间氢键数为 9, LYS776、ASP777 与 SQSESY 之间氢键数为 6(图 3)。我们观察到 MGAM 氨基酸残基 ALA285、LEU286、ARG520、HIS645、LYS776、ASP777 在多肽结合中起到重要作用。此外, EER、EASY 和 QSGDA 与 MGAM 之间的氢键数量高于



(a)EER

(b)EASY

(c)QSGDA

(d)SQSESY

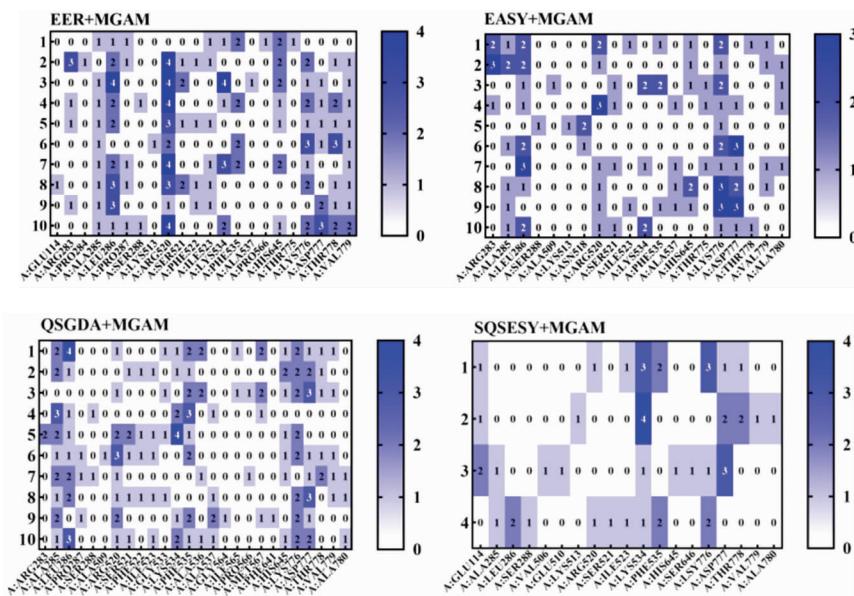
图 2 大豆多肽与 MGAM 对接

Fig.2 Docking of soybean peptides with MGAM

SQSESY。

已知的 α -葡萄糖苷酶抑制剂阿卡波糖与 α -葡萄糖苷酶的结合位点为 ASP203、ARG526、THR205、ASP542、HIS600 和 ASP327 这些氨基酸残基所形成的活性口袋,4 个多肽与 MGAM 相结

合的对接位点和相互作用模式与已知的 α -葡萄糖苷酶抑制剂阿卡波糖的结合位点和相互作用模式相似,所以它们可能是一种潜在的 α -葡萄糖苷酶抑制剂^[24]。



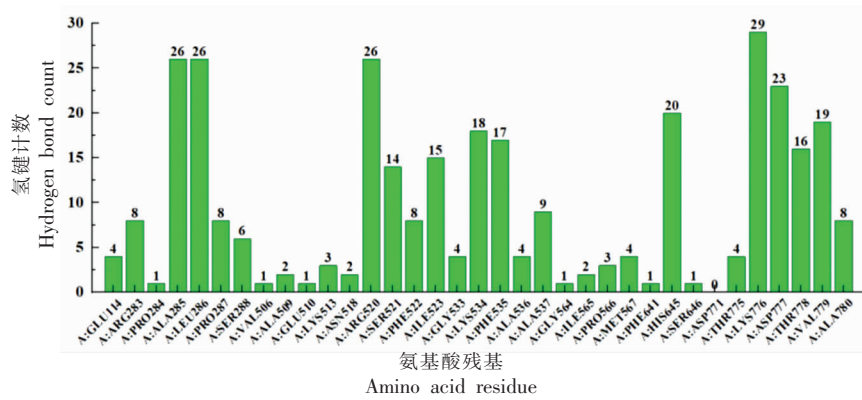


图3 大豆多肽与MGAM对接的氢键热图及氨基酸残基氢键数

Fig.3 Hydrogen bond heatmap and amino acid residue hydrogen bond number of soybean peptides docked with MGAM

4种多肽与SI结合的对接结果如图4所示。三肽EER可以与GLU47、PRO50、THR51、GLU52、TRP62、PRO496、TYR494和PRO495形成氢键相互作用,与GLU47形成静电相互作用,与THR498和GLY53形成排斥相互作用(图4a)。

四肽EASY与PHE49、GLN48、THR51、LEU105、GLY53、GLU52和TRP62形成氢键相互作用,与LYS504形成静电相互作用,与TYR94形成孤对电子,与THR498和GLU47形成排斥相互作用(图4b)。

五肽QSGDA可以与THR498、ARG58、GLU47、GLN48、PHE497、PHE49、PRO495、TYR494、PRO496和LYS491形成氢键相互作用,与GLU47形成静电相互作用,与GLU52形成排斥相互作用(图4c)。

六肽SQSESY可以与PRO495、TYR494、LYS491、VAL489、GLY53、GLU52、ASN108和ASN547形成氢键相互作用,与GLU52和LYS493形成静电相互作用,与GLU52和GLY53形成排斥相互作用(图4d)。

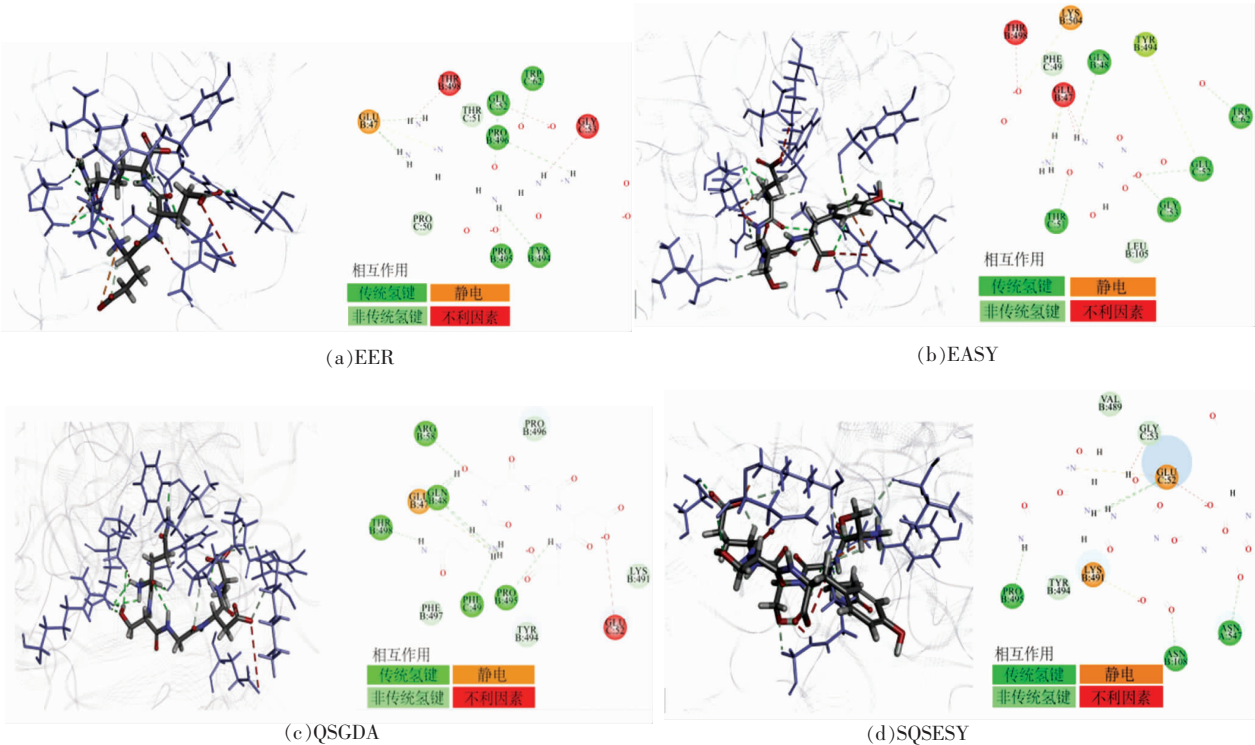


图4 大豆多肽与SI对接结果

Fig.4 Docking results of soybean peptides with SI

GLU47、GLU52 和 EER 之间氢键数为 13, TYR94 和 EER 之间氢键数为 11, PRO496 和 EER 之间氢键数为 16。TYR494 和 EASY 之间氢键数为 13, THR51 和 EASY 之间氢键数为 10, GLU52 和 EASY 之间氢键数为 24。ARG58 和 QSGDA 之间氢键数为 11, GLU52 和 QSGDA 之间氢键数为

14, GLY53 和 QSGDA 之间氢键数为 10。GLU52 和 SQSESY 之间氢键数为 20, GLY53 和 SQSESY 之间氢键数为 12(图 5)。我们观察到 SI 氨基酸残基 TYR494、THR51、GLU52 和 GLY53 在多肽结合中起到重要作用。

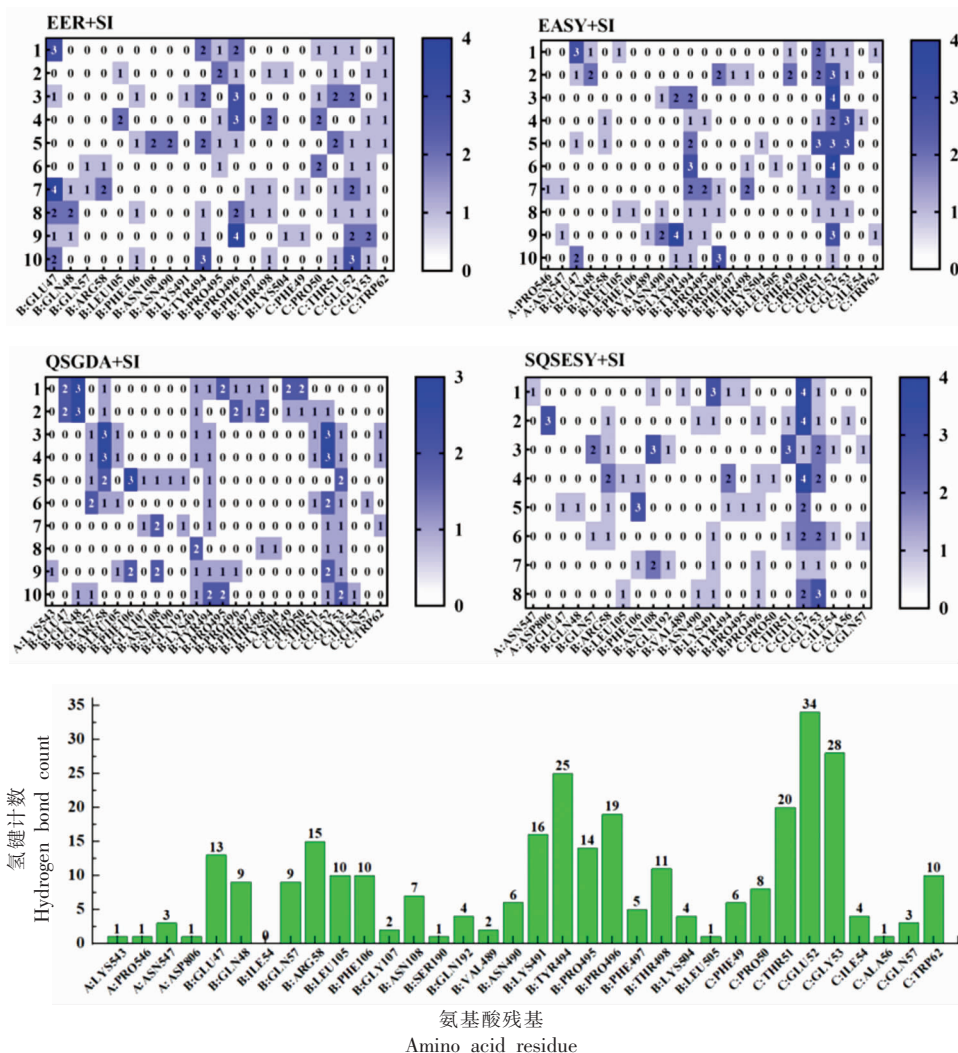


图 5 大豆多肽与 SI 对接的氢键热图及氨基酸残基氢键数

Fig.5 Hydrogen bond heatmap and amino acid residue hydrogen bond number of soybean peptides docked with SI

2.4 大豆多肽与 α -淀粉酶的分子对接

4 种多肽与 AMY2A 结合的对接结果如图 6 所示。三肽 EER 可以与 GLY309、GLY308、GLY304、ASN352、HIS305、ASP353、ILE312 和 ASP317 形成氢键相互作用,与 ASP317 和 HIS305 形成静电相互作用,与 ARG346 形成排斥相互作用(图 6a)。

四肽 EASY 可与 ASN350、ASN352、GLY351、HIS305、GLY304、ARG346、TRP316、ALA310、ASN301 和 ILE312 形成氢键相互作用,与 ARG346 形成静电相互作用,与 ARG346 和 ARG267 形成排斥相互作用(图 6b)。

五肽 QSGDA 可与 ASP317、ASN301、ILE312、ARG346、GLN302、ASP353、ASN352、GLY351

和 ALA310 形成氢键相互作用,与 ASP317 形成静电相互作用,与 ARG267 形成排斥相互作用(图 6c)。

六肽 SQSESY 可与 GLY304、GLY306、GLY309、

ASN352、GLY351、HIS305、THR314 和 ARG346 形成氢键相互作用,与 ARG267 和 ARG346 形成静电相互作用,与 ARG346 形成疏水相互作用(图 6d)。

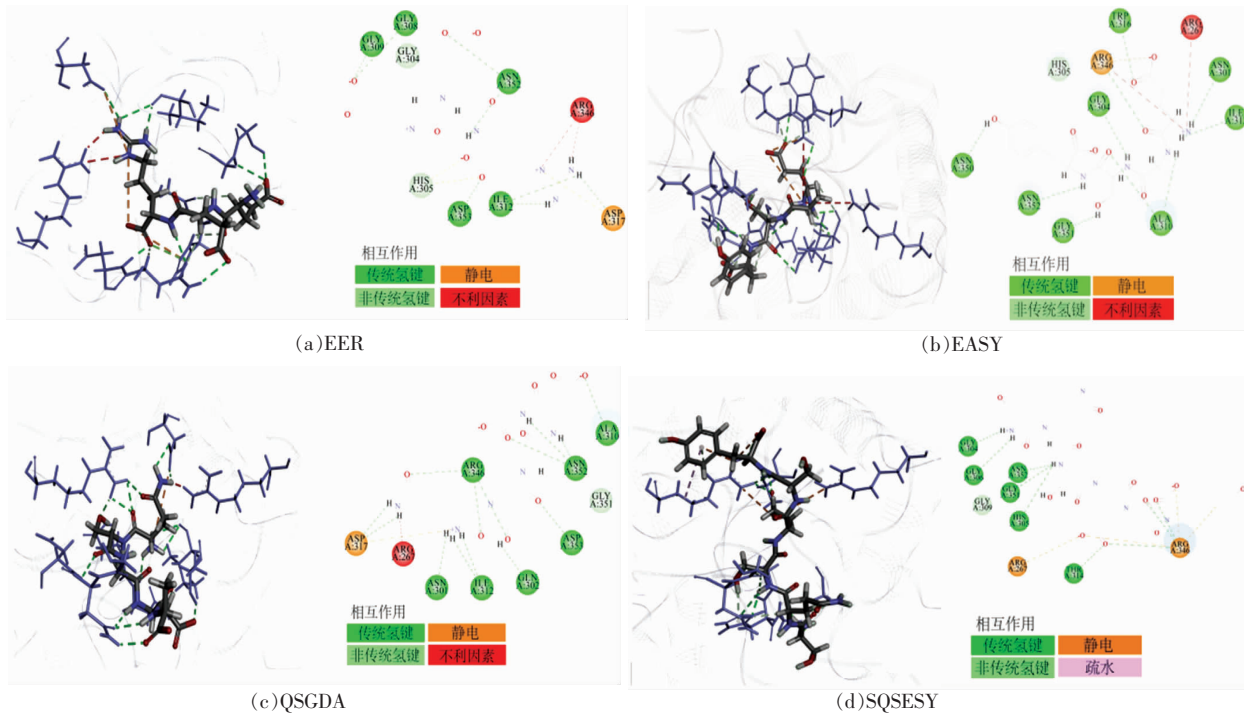
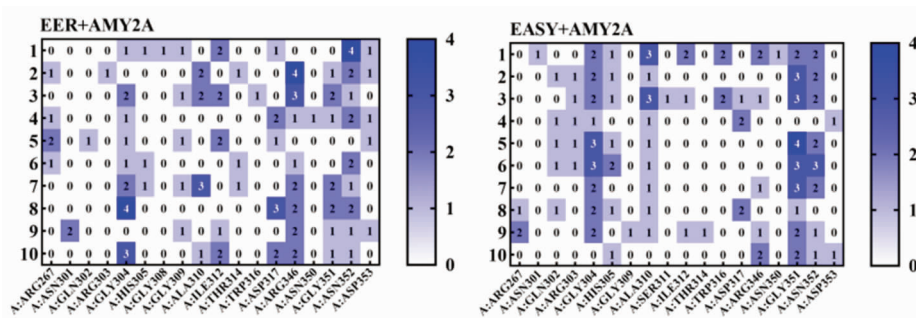


图 6 大豆多肽与 AMY2A 对接结果

Fig.6 Docking results of soybean peptides with AMY2A

GLY304 与 EER 之间的氢键数为 15, ARG346 与 EER 之间的氢键数为 17, GLY351 与 EER 之间的氢键数为 10, ASN352 与 EER 之间的氢键数为 16。GLY304 与 EASY 之间氢键数为 19, ALA310 与 EASY 之间氢键数为 13, GLY351 与 EASY 之间氢键数为 23, ASN352 与 EASY 之间氢键数为 15。ARG267 与 QSGDA 之间氢键数为 11, GLY304 与 QSGDA 之间氢键数为 14, ARG346 与

QSGDA 之间氢键数为 19, GLY351 与 QSGDA 之间氢键数为 12。HIS305 与 SQSESY 之间氢键数为 13, ARG345 与 SQSESY 之间氢键数为 30, GLY351 与 SQSESY 之间氢键数为 17, ASN352 与 SQSESY 之间氢键数为 14 (图 7)。我们观察到 AMY2A 氨基酸残基 GLY304、HIS305、ALA310、ARG346、GLY351 和 ASN352 在多肽结合中起到重要作用。



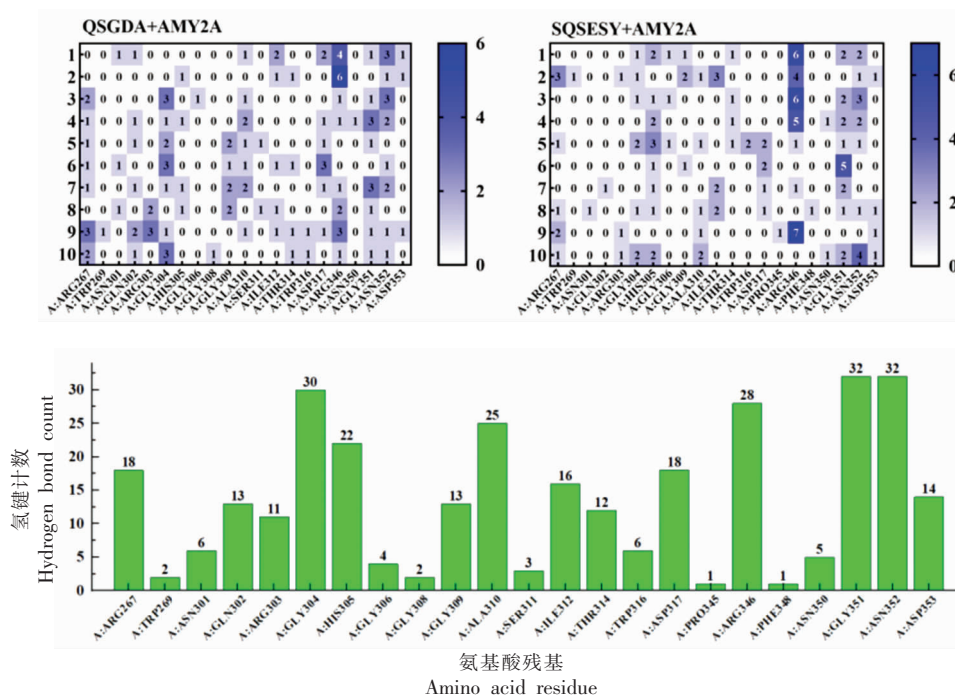


图 7 大豆多肽与 AMY2A 对接的氢键热图及氨基酸残基氢键数

Fig.7 Hydrogen bond heatmap and amino acid residue hydrogen bond number of soybean peptides docked with AMY2A

2.5 α -葡萄糖苷酶活性验证结果

为了验证虚拟筛选的准确性,进行了4个多肽的 α -葡萄糖苷酶抑制活性试验。如图8所示,EASY的 IC_{50} 值为208.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而EER、QSGDA和SQSESY抑制效果在30%左右。EASY比其它3个多肽抑制效果好,从分子对接结果看,可能是因为其它3个多肽与结合位点中氨基酸残基结合时,与VAL779、LEU286、ILE523、ALA285、LYS513和ARG520等氨基酸残基产生了排斥作用,这种多肽与氨基酸残基相互排斥的相互作用,不利于多肽与活性口袋相互结合,从而导致抑制效果不如EASY。同时,根据氢键热图,4种多肽结合氨基酸残基位点与已知 α -葡萄糖苷酶抑制剂阿卡波糖与 α -葡萄糖苷酶的结合位点ASP203、ARG526、THR205、ASP542、HIS600和ASP327位置重合,但是所结合的氨基酸残基并未重合^[24]。三肽、五肽和六肽与氨基酸残基结合后,可能使 α -葡萄糖苷酶形变量较小,稍微阻止 α -葡萄糖苷酶与糖苷键的结合,所以抑制效果在30%左右,而四肽与氨基酸残基结合后,可能使 α -葡萄糖苷酶形变量较大或阻碍使 α -葡萄糖苷酶与糖苷键的结合,所以抑制效果好。

2.6 α -淀粉酶活性验证结果

为了验证虚拟筛选的准确性,进行了4个多肽的 α -淀粉酶抑制活性试验。如图9所示,SQSESY未产生明显的抑制效果,EER和QSGDA抑制效果不佳,EASY抑制效果在质量浓度高于30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后出现增长。可能是因为与结合位点中氨基酸残基结合时,与ARG346和ARG267等氨基酸残基产生了排斥作用,这种多肽与氨基酸残基相互排斥的相互作用,不利于多肽与活性口袋相互结合。同时,根据氢键热图,4种多肽结合氨基酸残基位点与已知 α -淀粉酶主要氨基酸残基Asp197、Glu233和Asp300位置相近,但是所结合的氨基酸残基并未重合^[25]。4种多肽与氨基酸残基结合后,由于位点位置未与 α -淀粉酶主要氨基酸残基相重合,所以可能使 α -淀粉酶形变量较少或者未阻止 α -淀粉酶与糖苷键的结合,所以4种多肽都未展现明显的 α -淀粉酶抑制效果。

3 结论

从 β -伴大豆球蛋白中筛选出4种可能的 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制多肽。根据体外试验,四肽EASY具有较强的 α -葡萄糖苷酶抑制活

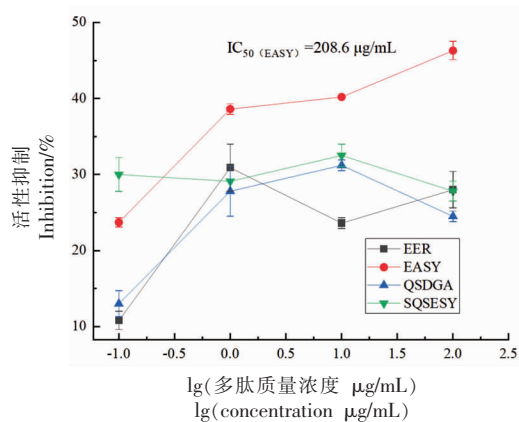


图8 α-葡萄糖苷酶抑制作用

Fig.8 α-glucosidase inhibition effect of peptide

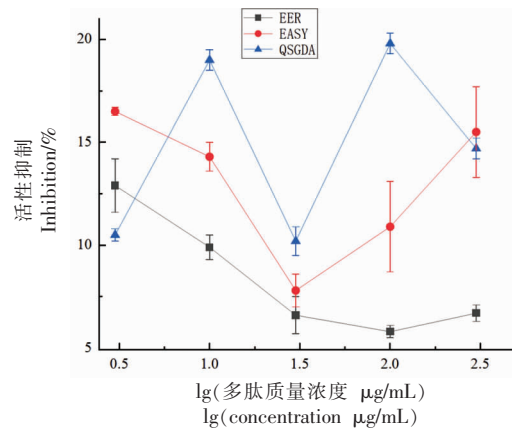


图9 α-淀粉酶抑制作用

Fig.9 α-amylase inhibition effect of peptide

性,其 IC_{50} 值为 $208.6 \mu\text{g/mL}$ 。分子对接表明,氢键相互作用、静电相互作用和盐桥在EASY与 α -葡萄糖苷酶的相互作用中起着重要的作用。4种多肽都未表现出明显的 α -淀粉酶抑制作用。四肽EASY作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂,可用于控制碳水化合物的消化过程,是一种有前景的天然多肽。在模拟消化和虚拟筛选中,筛选天然的抑制剂对于预防控制糖尿病和降低不良反应是一种可行的方法。然而,还需要进行更多的体外和体内实验来进一步研究。

参 考 文 献

- [1] MAMUN-OR-RASHID A N M, HOSSAIN M S, HASSAN N, et al. A review on medicinal plants with antidiabetic activity[J]. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2014, 3(4): 149-159.
- [2] ASMAT U, ABAD K, ISMAIL K. Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review[J]. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2016, 24(5): 547-553.
- [3] VLACHOS D, MALISOVA S, LINDBERG F A, et al. Glycemic index (GI) or glycemic load (GL) and dietary interventions for optimizing postprandial hyperglycemia in patients with T2 diabetes; A review[J]. *Nutrients*, 2020, 12(6): 1561.
- [4] 周珊. 早发2型糖尿病临床特征及大血管病变相关因素分析[D]. 大连: 大连医科大学, 2012.
ZHOU S. Clinical characteristics and risk factors of macro vascular complications in early onset type 2 diabetes[D]. Dalian: Dalian Medical University, 2012.
- [5] DALSGAARD N B, GASBJERG L S, HANSEN L S, et al. The role of GLP-1 in the postprandial effects of acarbose in type 2 diabetes[J]. *European Journal of Endocrinology*, 2021, 184(3): 383-394.
- [6] GUPTA S, KAPOOR P, CHAUDHARY K, et al. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73957.
- [7] 戴媛, 冷进松. 大豆多肽的功能性质及应用前景[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2019, 40(2): 132-139.
DAI Y, LENG J S. Functional properties and application prospect of soybean polypeptide[J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2019, 40(2): 132-139.
- [8] GONZÁLEZ-MONTOYA M, HERNÁNDEZ-LEDESMAN B, SILVÁN J M, et al. Peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation[J]. *Food Chemistry*, 2018, 242: 75-82.
- [9] MARCELA G M, EVA R G, DEL CARMEN R R M, et al. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative effects of three peptide fractions of germinated soybeans on breast and cervical cancer cell lines[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2016, 71: 368-374.
- [10] GONZÁLEZ-MONTOYA M, HERNÁNDEZ-LEDESMAN B, MORA-ESCOBEDO R, et al. Bioactive peptides from germinated soybean with anti-diabetic

- potential by inhibition of dipeptidyl peptidase-IV, α -amylase, and α -glucosidase enzymes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(10): 2883.
- [11] HU F Y, CHI C F, WANG B, et al. Two novel antioxidant nonapeptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) muscle[J]. Marine Drugs, 2015, 13(4): 1993–2009.
- [12] WANG J, WU T, FANG L, et al. Anti-diabetic effect by walnut (*Juglans mandshurica* Maxim.)-derived peptide LPLLR through inhibiting α -glucosidase and α -amylase, and alleviating insulin resistance of hepatic HepG2 cells[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 69: 103944.
- [13] KARAS M, JAKUBCZYK A, SZYMANOWSKA U, et al. Different temperature treatments of millet grains affect the biological activity of protein hydrolyzates and peptide fractions[J]. Nutrients, 2019, 11(3): 550.
- [14] LIU W, LI H, WEN Y, et al. Molecular mechanism for the α -glucosidase inhibitory effect of wheat germ peptides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(50): 15231–15239.
- [15] 徐梅, 王常青, 赵大洲. 大麻仁多肽的制备及减肥功能研究[J]. 粮食流通技术, 2022(7): 28.
- XU M, WANG C Q, ZHAO D Z. Study on preparation and anti-obesity effect of *Cannabis sativa* L. polypeptide[J]. Grain Distribution Technology, 2022(7): 28.
- [16] FUENTES L R, RICHARD C, CHEN L. Sequential alcalase and flavourzyme treatment for preparation of α -amylase, α -glucosidase, and dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitory peptides from oat protein[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 87: 104829.
- [17] 徐丽萍, 邢超, 王鑫, 等. 酶解法制备大豆低聚肽工艺的研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2012, 28(2): 143–146.
- XU L P, XING C, WANG X, et al. Study on preparation of soybean peptide by enzyme hydrolysis[J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition), 2012, 28(2): 143–146.
- [18] ZHAO Y, CHEN Z, LI J, et al. Formation mechanism of ovalbumin gel induced by alkali[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 61: 390–398.
- [19] BABA W N, MUDGIL P, KAMAL H, et al. Identification and characterization of novel α -amylase and α -glucosidase inhibitory peptides from camel whey proteins[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(2): 1364–1377.
- [20] JIA C Y, LI J Y, HAO G F, et al. A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery[J]. Drug Discovery Today, 2020, 25(1): 248–258.
- [21] LIN X, SHI H, ZHANG W, et al. A new approach of mitigating CYP3A4 induction led to the discovery of potent hepatitis B virus (HBV) capsid inhibitor with optimal ADMET profiles[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2019, 62(22): 10352–10361.
- [22] WU Z, LEI T, SHEN C, et al. ADMET evaluation in drug discovery. 19. Reliable prediction of human cytochrome P450 inhibition using artificial intelligence approaches[J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2019, 59(11): 4587–4601.
- [23] LEE J S, KIM E S, LEE H G. Improving the water solubility and antimicrobial activity of silymarin by nanoencapsulation[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2017, 154: 171–177.
- [24] SIM L, QUEZADA-CALVILLO R, STERCHI E E, et al. Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 375(3): 782–792.
- [25] ZHOU H, SAFDAR B, LI H, et al. Identification of a novel α -amylase inhibitory activity peptide from quinoa protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134434.

Virtual Screening of α -glucosidase and α -amylase Inhibitors from Soybean Peptides and Its Activity Validation *in Vitro*

Xue Sen, Wu Jingfan, Cao Shufang, Bai Miao, Zhu Danshi, Liu He, Yang Lina*
(College of Food Science and Technology, Bohai University, Jinzhou 121000, Liaoning)

Abstract The objective: To delay the digestion of carbohydrates by inhibiting the activity of carbohydrate digestive en-

zymes, thereby preventing and controlling the effects of diabetes has become a research hotspot across multiple fields. β -Conglycinin is the most abundant functional protein in soy protein, but it is unknown whether the peptides produced after gastrointestinal digestion possess the activity to inhibit carbohydrate digestive enzymes. Method: β -Conglycinin was subjected to simulated gastrointestinal digestion, and α -glucosidase inhibitory peptides and α -amylase inhibitory peptides were selected through virtual screening and ADMET prediction, and the inhibitory effects of the peptides on α -glucosidase and α -amylase were tested. Results: β -Conglycinin was virtually digested into 95 small molecular peptides by pepsin, trypsin, and chymotrypsin; eight α -glucosidase inhibitory peptides and α -amylase inhibitory peptides were selected; it was found that hydrogen bonds and electrostatic interactions play an important role in the binding of peptides with α -glucosidase and α -amylase; *in vitro* verification found that the tetrapeptide EASY has a strong inhibitory effect on α -glucosidase, with an IC_{50} value of 208.6 $\mu\text{g/mL}$, and no obvious inhibitory effect on α -amylase was observed. Conclusion: The α -glucosidase inhibitory peptide EASY possesses the activity to inhibit carbohydrate digestive enzymes and may become a potential inhibitor for controlling diabetes.

Keywords soybean peptides; α -glucosidase; α -amylase; virtual screening; inhibitory activity