

大米谷蛋白模拟酶解释放生物活性肽的研究

周湘人¹, 李 杨¹, 付湘晋^{1,2,3,4*}

(1. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 长沙 410004; 2. 林产食品加工与安全品质控制湖南省重点实验室, 长沙 410004; 3. 湖南省营养健康品工程技术研究中心, 长沙 410004; 4. 湖南省调味料绿色制造工程技术研究中心, 长沙 410004)

摘要: 目的 通过对大米谷蛋白的模拟酶解及生物信息学分析, 评价大米谷蛋白作为生物活性肽前体的潜在价值。**方法** 首先, 利用计算机在 UniProt 蛋白质数据库中查找大米谷蛋白的序列, 使用 BIOPEP 活性肽数据库对所选的 3 条序列进行模拟酶解, 并同时酶解产生的肽片段数量、分子量及其氨基酸组成进行统计分析。然后, 将模拟酶解产生的肽片段序列与 BIOPEP 数据库中已有记载的生物活性肽序列进行对比, 筛选出具有生物活性的肽片段。最后, 对模拟酶解产生的生物活性肽进行致敏性和毒性预测。**结果** 胃蛋白酶和木瓜蛋白酶是最适合水解大米谷蛋白的两种酶。大米谷蛋白酶解可产生许多生物活性肽, 其中出现频率最高的是二肽基肽酶IV (dipeptidyl peptidase-IV, DPP-IV)抑制肽和血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)抑制肽。大米谷蛋白本身无潜在致敏性, 且其经过计算机模拟酶解得到的 DPP-IV 抑制肽和 ACE 抑制肽均无细胞毒性。**结论** 大米谷蛋白可作为酶解释放 DPP-IV 抑制肽和 ACE 抑制肽的良好前体, 本研究为大米谷蛋白酶解生产生物活性肽提供了理论指导。

关键词: 大米谷蛋白; 二肽基肽酶IV抑制肽; 血管紧张素转换酶抑制肽; 生物信息学分析

Study on release of bioactive peptides from rice glutelin by in silico enzymatic hydrolysis

ZHOU Xiang-Ren¹, LI Yang¹, FU Xiang-Jin^{1,2,3,4*}

(1. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory of Forest Food Processing and Safety Quality Control, Changsha 410004, China; 3. Hunan Province Nutrition and Health Products Engineering Technology Research Center, Changsha 410004, China; 4. Hunan Province Seasonings Green Manufacturing Engineering Technology Research Center, Changsha 410004, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the potential value of rice glutelin as bioactive peptide precursor, through silico enzymatic hydrolysis and bioinformatics analysis of rice glutelin. **Methods** First, the rice glutenin sequences were searched in the UniProt protein database by computer, and the 3 selected sequences were subjected to silico enzymatic hydrolysis by using the BIOPEP active peptide database, and the number, molecular weight and amino acid composition of peptide fragments generated by enzymatic hydrolysis were statistically analyzed. Then, the peptide fragments sequence generated from in silico enzymatic hydrolysis was compared with the bioactive peptide

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2019JJ40538)、湖南省教育厅重点项目(18A155)、长沙市重大专项项目(kh2003013)

Fund: Supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2019JJ40538), the Key Project of Education Department of Hunan Province (18A155), and the Changsha Major Special Project (kh2003013)

*通信作者: 付湘晋, 博士, 教授, 主要研究方向为食品加工与食品代谢组学。E-mail: drxjfu@163.com

*Corresponding author: FU Xiang-Jin, Ph.D, Professor, College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China. E-mail: drxjfu@163.com

sequence recorded in the BIOPEP database to screen out the peptide fragment with biological activity. Finally, the allergenicity and toxicity of the bioactive peptides generated from in silico enzymatic hydrolysis were predicted.

Results Pepsin and papain were the 2 most suitable enzymes for the hydrolysis of rice glutelin. Rice glutelin hydrolysis could produce many bioactive peptides, and the dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitory peptides and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides showed the highest frequency. The rice glutenin itself had no potential sensitization, and neither the DPP-IV inhibitory peptide nor the ACE inhibitory peptide obtained from in silico enzymatic hydrolysis had cytotoxicity. **Conclusion** Rice glutelin can be used as a good precursor for enzymatic hydrolysis of DPP-IV inhibitory peptides and ACE inhibitory peptides. This study provides theoretical guidance for enzymatic hydrolysis of rice glutelin to produce bioactive peptides.

KEY WORDS: rice glutelin; dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides; angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides; bioinformatics analysis

0 引言

大米蛋白具有高生物效价、低致敏性等特点,其水解后的多肽具有降血压、降低胆固醇等活性,是一种优质的植物蛋白^[1]。大米蛋白按其溶解特性可分为 4 类^[2]:水溶性清蛋白(albumin)、盐溶性球蛋白(globulin)、碱溶性谷蛋白(glutelin)、醇溶蛋白(gliadin),其中谷蛋白是大米的主要蛋白成分。大米谷蛋白经酶解后也会产生具有不同生理功能的活性肽,这是稻米资源开发利用的一条重要途径。

1995 年, SCHLIMME 等^[3]将生物活性肽定义为:一类由 20 种氨基酸组成,长度在 2~30 个氨基酸之间的对人体生命活动有益或具有生理作用的肽类化合物。生物活性肽可调节多种身体功能,例如降低血压[血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)抑制肽]、降低血糖水平[二肽基肽酶 IV (dipeptidyl peptidase-IV, DPP-IV)抑制肽]^[4]及抗氧化、免疫调节、抗血栓形成等作用^[5]。

目前对大米蛋白的研究较多,但是对于大米蛋白活性肽的研究远远不及大豆、玉米等其他植物蛋白^[6]。URAIPOONG 等^[7]研究发现,米糠蛋白尤其是白蛋白和谷蛋白消化液中的 ACE 和 α -葡萄糖苷酶抑制活性特别强,对人体健康具有实质性的益处。YANG 等^[8]研究发现多模式 S 型超声预处理是从大米蛋白中制备 ACE 抑制肽的有效方法。SELAMASSAKUL 等^[9]研究发现糙米蛋白经菠萝蛋白酶水解后,可产生低分子量的肽段,其 N 端为疏水或芳香族残基,可向缺电子自由基和铜离子提供电子,从而具有抗氧化活性。LIU 等^[10]报道了从富硒糙米中提取的水溶性蛋白质经碱性蛋白酶水解后可得到抗氧化肽,其蛋白水解物可作为天然食品抗氧化剂。

近期研究发现天然食物蛋白质中包含有抑制二肽基肽酶 IV 和血管紧张素转换酶的活性肽序列,利用各种蛋白资源开发 DPP-IV 抑制肽和 ACE 抑制肽引起了很多研究者的兴趣。NEVES 等^[11]研究发现大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)中具有抑制 ACE 和 DPP-IV 酶活性和抗氧化活性的

生物活性肽。ASHOK 等^[12]从水牛初乳脂肪球蛋白中分离出新的具有 DPP-IV 和 ACE 抑制作用的生物活性肽。ZHAO 等^[13]报道了从鸡蛋蛋白中提取的 ACE 和 DPP-IV 抑制肽可作为控制高血压和糖尿病的功能性食品成分。上述研究为进一步探索大米谷蛋白中的生物活性肽提供了良好的蛋白质组学信息。

分析食品蛋白质活性肽常涉及到 3 个方面:生物信息学研究、体外研究、离体/体内研究^[14]。后两种可被概括为研究生物活性肽的经典策略,而生物信息学则涉及了计算机技术的应用,如生物活性肽数据库的开发、应用计算机工具和程序研究蛋白质作为活性肽来源的潜力、预测生物活性肽发挥作用的机制、预测肽结构-功能关系^[15]。由于传统的生物活性肽分离鉴定技术存在步骤烦琐、花费成本高等缺点,采用生物信息学技术对食品级蛋白进行模拟酶解,并预测所产肽片段的活性可以大大缩短研究时间和降低费用^[16]。GANGOPADHYAY 等^[17]使用生物信息学方法和活性肽数据库作为预测大麦蛋白释放 ACE 抑制肽的工具,评估了利用木瓜蛋白酶模拟酶解大麦蛋白生产 ACE 抑制肽的潜力,证实了生物信息学技术的低成本和高效性。LAFARGA 等^[18]利用已知的计算机方法、肽数据库和软件评估了牛和猪肉类蛋白作为释放 ACE 抑制肽和 DPP-IV 抑制肽的潜力,发现木瓜蛋白酶和胃蛋白酶是水解肉类蛋白质生产两种生物活性肽的最佳酶类,也证明了计算机模拟酶解在简化生物活性肽的鉴定和产生方面的有效性。POOJA 等^[19]采用生物信息学技术评估了米糠球蛋白作为释放 DPP-IV 抑制肽前体的潜力,并研究了所释放 DPP-IV 抑制肽的一级结构、物理化学特征和致敏性。目前,基于生物信息学技术的活性肽研究方法已打破了传统研究方法的局限性,大大缩短了研究费用和时间。然而,这种方法仍存在一些局限性,如一些预测因子没有考虑蛋白质分子特定区域内的重叠序列,因此可能高估了特定蛋白质分子的生物活性,此外,在使用活性肽预测工具 PeptideCutter 预测特定蛋白分子的释放方面也有局限性^[20]。

目前,已有研究报道大米谷蛋白经体外模拟消化释

放 ACE 抑制肽和抗氧化肽^[21-23], 但基于生物信息学技术模拟酶解大米谷蛋白释放生物活性肽的研究还未常见。本研究旨在确定大米谷蛋白的物理化学性质, 并全面分析谷蛋白中 DPP-IV 抑制肽和 ACE 抑制肽的释放规律和生化特性, 以期为大米谷蛋白作为制备 DPP-IV 抑制肽和 ACE 抑制肽的原料, 应用于食品工业提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 大米谷蛋白的来源

大米谷蛋白由 3 种亚基组成, α -谷蛋白、 β -谷蛋白和 γ -谷蛋白。从蛋白质数据库 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 中查找 3 种谷蛋白亚基所对应的氨基酸序列。 β -谷蛋白由 466 个氨基酸片段组成, 属于一种可能的巯基蛋白酶。 α -谷蛋白由 458 个氨基酸片段组成, 而 γ -谷蛋白由 362 个氨基酸片段组成。3 种谷蛋白亚基都源于粳稻品种, 在序列上也存在着相似之处。

1.2 大米谷蛋白的理化性质及致敏性预测

使用蛋白质数据库 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 的 ProtParam 工具对 3 种大米谷蛋白亚基的理化性质进行预测, 包括总平均亲水性、分子量、等电点 (isoelectric point, pI)、不稳定指数、脂溶性指数。同时使用 AllergenFP (<http://ddg-pharmfac.net/AllergenFP/>) 预测大米谷蛋白的潜在致敏性。

1.3 计算机模拟酶解

使用活性肽数据库 BIOPEP (http://www.uwm.edu.pl/biochemia/biopep/start_biopep.php) 的“酶作用 (enzyme action)”功能对 3 条大米谷蛋白亚基进行酶解。在 BIOPEP 数据库中提供的 44 种蛋白水解酶中, 选取了 9 种具有代表性的蛋白酶, 分别是消化蛋白酶: 胰蛋白酶 (E.C.3.4.21.4)、胃蛋白酶 (E.C.3.4.23.1)、胰凝乳蛋白酶 (E.C.3.4.21.1); 植物蛋白酶: 木瓜蛋白酶 (E.C.3.4.22.2)、菠萝蛋白酶 (E.C.3.4.22.32)、无花果蛋白酶 (E.C.3.4.22.3) 和微生物蛋白酶: 嗜热菌蛋白酶 (E.C.3.4.24.27)、枯草杆菌蛋白酶 (E.C.3.4.21.62)、蛋白酶 P1 (E.C.3.4.21.96)。

1.4 筛选具有生物活性的肽段

使用 PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) 筛选具有生物活性潜力的肽段。将大米谷蛋白模拟酶解产生的肽段氨基酸序列输入网址即可得到一个介于 0~1 之间的评分, 筛选得分高于 0.5 的肽段作为潜在生物活性肽, 然后与 BIOPEP 数据库中已记载的生物活性肽进行对比, 鉴定肽片段的生物活性。统计分析大米谷蛋白在不同酶作用下的生物活性肽总数和水解度, 筛选出理论上最适合水解大米谷蛋白的 2 种酶, 并找出大米谷蛋白模拟酶解产生频率最高的两种潜在生物活性肽。

1.5 活性肽的潜在毒性及水溶性预测

使用毒性预测工具 ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html>) 预测大米谷蛋白酶解后释放 ACE 抑制肽和 DPP-IV 抑制肽的潜在毒性。使用在线工具 Innovagen (<http://www.innovagen.com/proteomics-tools>) 预测筛选到的潜在生物活性肽的水溶性。

1.6 数据统计分析

采用 Excel 软件进行统计分析, 采用 Origin 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 大米谷蛋白理化特性

从表 1 可以看出, 大米谷蛋白中有 α -谷蛋白、 β -谷蛋白和 γ -谷蛋白 3 个亚基, 其分子量分别约为 50.13、49.80、39.11 kDa。其中 α 和 β 链谷蛋白的等电点小于 6.5, 属于酸性蛋白质, 而 γ -谷蛋白的 pI 为 6.71, 属于中性蛋白质 ($6.5 < pI < 7.5$)^[24]。而且这 3 条谷蛋白亚基的总平均亲水性均显示负值 (-0.169~-0.46), 这表明谷蛋白 3 条亚基均具有较好的亲水性。3 条谷蛋白亚基的不稳定指数均小于 40, 可视为较稳定。脂肪族氨基酸指数被定义为蛋白质脂肪侧链占蛋白质的相对含量, 由蛋白质中丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸的含量所决定, 被认为代表了蛋白质的热稳定性。然而该值在 ExPASy 的 ProtParam 功能模块中虽然有明确定义, 但并未提及该数值达到多少, 可视为蛋白质具有热稳定性。

AllergenFP 是一个预测蛋白质潜在致敏性的在线平台, 通过 Tanimoto 相似度搜索, 可查询已知蛋白质的致敏性^[25]。人们普遍认为大米蛋白具有低敏特性, 然而近年来也出现过食用大米过敏的病例报道, 研究发现食用大米引起人体过敏主要是由免疫球蛋白 E (IgE) 介导, 且发现过敏是由清蛋白和球蛋白中存在的过敏蛋白引起的^[26]。本研究的预测结果表明, 大米谷蛋白属于可能的非过敏原。

2.2 大米谷蛋白模拟酶解释放活性肽

本研究共计采用 9 种蛋白酶实现了对大米谷蛋白 3 条亚基的计算机模拟酶解, 统计了释放的生物活性肽数量 (DPP-IV 抑制肽、DPP-III 抑制肽、ACE 抑制肽、抗氧化肽、 α -葡萄糖苷酶抑制肽) 以及水解度, 如表 2 所示。从酶的种类上看, 植物蛋白酶释放的活性肽总数和蛋白水解度均要高于消化酶和微生物酶, 这可能是由于植物酶比消化酶或微生物酶具有更多的识别位点。然而只考虑单酶水解作用, 胃蛋白酶 (pH>2) 释放活性肽的总数 (249) 及 3 条亚基的平均水解度 (54.27%) 都是最高的, 其次是木瓜蛋白酶 (活性肽总数 188, 平均水解度 31.2%) 和菠萝蛋白酶 (活性肽总数 182, 平均水解度 43.5%)。

表 1 大米谷蛋白的理化特性
Table 1 Physical and chemical properties of rice glutelin

序号	UniProt ID	蛋白质类型	总平均亲水性	分子量/kDa	等电点	不稳定指数	脂肪族氨基酸指数	过敏性预测
1	P25777	β 链	-0.346	49.80	5.21	32.05	64.98	可能的非过敏原
2	P25776	α 链	-0.460	50.13	5.14	33.16	68.03	可能的非过敏原
3	P25778	γ 链	-0.169	39.11	6.71	30.84	76.08	可能的非过敏原

表 2 大米谷蛋白 β 链、 α 链和 γ 链在不同酶作用下的生物活性肽总数和水解度
Table 2 Total number of bioactive peptides and degree of hydrolysis for β -chain, α -chain and γ -chain of rice glutelin under different enzyme action

酶来源	酶种类	β 链		α 链		γ 链	
		活性肽总数	理论水解度/%	活性肽总数	理论水解度/%	活性肽总数	理论水解度/%
消化	胃蛋白酶(pH>2)	95	54.93	82	55.08	72	52.8
	胰蛋白酶	5	7.82	5	8.78	6	7.66
	胰凝乳蛋白酶	32	18.54	42	19.62	27	19.67
植物	木瓜蛋白酶	73	31.12	60	29.78	55	32.71
	菠萝蛋白酶	57	44.05	73	40.79	52	45.76
	无花果蛋白酶	45	32.99	46	34.94	45	34.16
	枯草杆菌蛋白酶	36	20.75	31	22.72	45	23.4
微生物	嗜热菌蛋白酶	51	26.53	39	27.71	47	29.61
	蛋白酶 P1	28	29.76	18	28.4	29	28.57

将模拟酶解释放的肽片段序列输入到 PeptideRanker 网站的文本框中, 预测肽具有生物活性的可能性, 并与 BIOPEP 数据库中已经存在的生物活性肽进行对比, 筛选具有特定活性的肽片段。图 1 展示了不同酶水解大米谷蛋白产生的 5 种不同类型的生物活性肽的数量。大米谷蛋白经胃蛋白酶、木瓜蛋白酶模拟酶解释放的 DPP-IV 抑制肽数量分别为 129 和 92, 经胃蛋白酶、木瓜蛋白酶模拟酶解释放的 ACE 抑制肽数量分别为 86 和 67。而这与 LAFARGA 等^[18]的研究结果相似, 因此选择胃蛋白酶和木瓜蛋白酶作为合适的水解酶进一步分析 DPP-IV 抑制肽和 ACE 抑制肽的分子量分布和氨基酸组成。理论上而言, 大米谷蛋白可作为制备 DPP-IV 抑制肽和 ACE 抑制肽的潜力蛋白质来源。同时, 由于胃中的低酸环境及胃蛋白酶、胰蛋白酶和其他肽酶的作用, 活性肽会发生降解而失活^[27]。而本研究发现胃蛋白酶和木瓜蛋白酶是水解大米谷蛋白效果较好的两种酶, 所以这也是大米谷蛋白作为制备生物活性肽前体的优势之一。

2.3 DPP-IV 抑制肽和 ACE 抑制肽的分子量分布

2.3.1 DPP-IV 抑制肽的分子量分布

图 2 展示了大米谷蛋白经胃蛋白酶和木瓜蛋白酶模拟酶解释放 DPP-IV 抑制肽的分子量分布情况, 可以看出

经胃蛋白酶水解释放的 DPP-IV 抑制肽分子量范围为 170~490 Da, 平均值为 241.9 Da。经木瓜蛋白酶水解释放的 DPP-IV 抑制肽分子量范围为 145~345 Da, 平均值为 222.4 Da。其中, 分子量范围为 245~270 Da 的 DPP-IV 抑制肽出现频率最高。

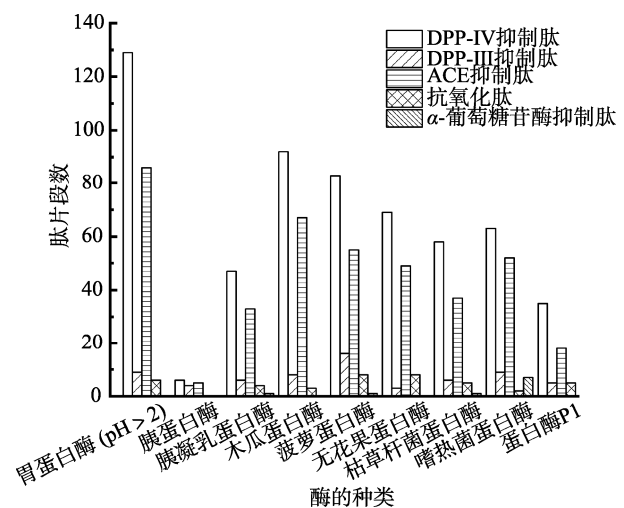


图 1 大米谷蛋白在不同酶作用下释放生物活性肽片段数
Fig.1 Number of bioactive peptide fragments released by rice glutelin under the action of different enzymes

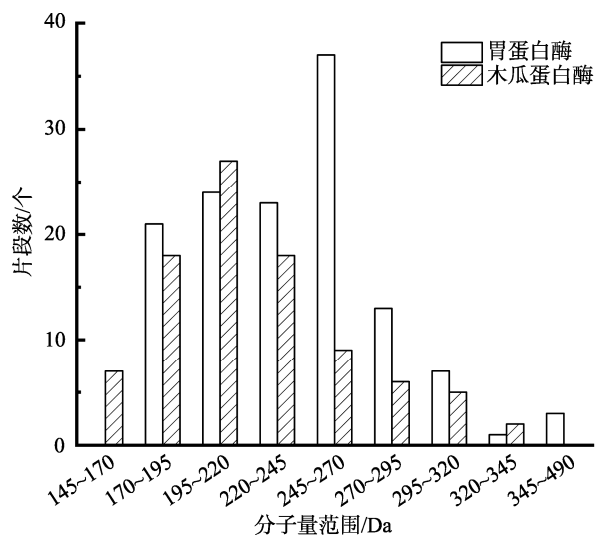


图 2 大米谷蛋白在胃蛋白酶和木瓜蛋白酶作用下 DPP-IV 抑制肽分子量分布

Fig.2 Molecular weight distribution of DPP-IV inhibitory peptides under the action of pepsin and papain in rice glutelin

2.3.2 ACE 抑制肽的分子量分布

图 3 展示了大米谷蛋白经胃蛋白酶和木瓜蛋白酶模拟水解释放 ACE 抑制肽的分子量分布情况, 可以看出经胃蛋白酶水解释放 ACE 抑制肽的分子量范围在 145~370 Da, 平均值为 266 Da; 经木瓜蛋白酶水解释放 ACE 抑制肽分子量范围为 145~320 Da, 平均为 231.5 Da。其中, 分子量范围为 245~270 Da 的 ACE 抑制肽出现频率最高。综上可以发现大米谷蛋白模拟酶解释放的都是小分子多肽(50 Da<分子量<1000 Da), 且均由 2~3 个氨基酸组成。出现频率最高的 DPP-IV 抑制肽和 ACE 抑制肽分子量范围均为 245~270 Da。由于蛋白质酶解可产生多条分子量相近的肽段, 难以实现多肽的分离纯化以及后续的鉴定工作。通过计算机模拟酶解并统计分析活性肽的分子量分布有利于减少成本、提高新的活性肽开发效率。

2.4 大米谷蛋白释放 DPP-IV 抑制肽和 ACE 抑制肽的潜在毒性及水溶性预测

本研究是为了发现具有抑制 DPP-IV 和 ACE 酶活性的潜在生物活性肽, 因此有必要对它们进行毒性预测。采用毒性预测工具 ToxinPred^[28]对大米谷蛋白释放的所有肽进行潜在毒性评价, 它使用基于二肽组成和基序扫描的混合模型来预测肽的毒性或识别蛋白质中的毒性区域。表 3、4 表明, 从大米谷蛋白中释放的 DPP-IV 抑制肽和 ACE 抑制肽都没有潜在的毒性。这表明它们可用于食品和医药产品的进一步开发与利用。

水溶性预测结果表明大米谷蛋白模拟酶解释放的 DPP-IV 抑制肽中水溶性较好的片段数有 16 个, ACE 抑制肽中水溶性较好的片段数有 12 个, 大米肽的水溶性分布

较为平衡, 这意味着它们可以在多种系统(水溶性、脂溶性)中发挥作用。

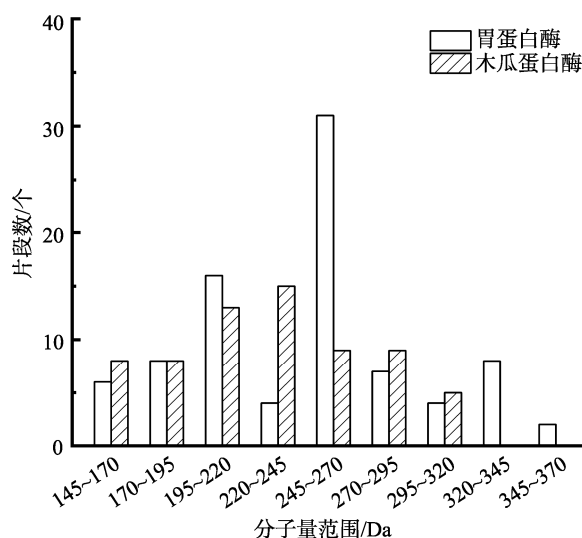


图 3 大米谷蛋白在胃蛋白酶和木瓜蛋白酶作用下 ACE 抑制肽分子量分布

Fig.3 Molecular weight distribution of ACE inhibitory peptides under the action of pepsin and papain in rice glutelin

表 3 大米谷蛋白释放 DPP-IV 抑制肽的序列、毒性和水溶性预测
Table 3 Sequence, toxicity and water solubility prediction of DPP-IV inhibitory peptide released from rice glutelin in silico

肽片段	数量	支持向量机评分	毒性预测	水溶性预测
VV	1	-0.8	无毒性	较差
AL	11	-0.8	无毒性	较差
SL	4	-0.8	无毒性	较差
WL	1	-0.8	无毒性	较差
AE	1	-0.8	无毒性	较好
AF	10	-0.8	无毒性	较差
AG	7	-0.8	无毒性	较差
AH	1	-0.8	无毒性	较差
AT	9	-0.8	无毒性	较差
AV	6	-0.8	无毒性	较差
KF	1	-0.8	无毒性	较好
KR	3	-0.8	无毒性	较好
NG	2	-0.8	无毒性	较好
NL	1	-0.8	无毒性	较差
NT	1	-0.8	无毒性	较好
PT	2	-0.8	无毒性	较差
QG	4	-0.8	无毒性	较好
QL	4	-0.8	无毒性	较差
VD	1	-0.8	无毒性	较好
VF	2	-0.8	无毒性	较差
YG	4	-0.8	无毒性	较差

表 3(续)

肽片段	数量	支持向量机评分	毒性预测	水溶性预测
YR	1	-0.8	无毒性	较好
AD	1	-0.8	无毒性	较好
AT	1	-0.8	无毒性	较差
EG	1	-0.8	无毒性	较好
IN	1	-0.8	无毒性	较差
KG	1	-0.8	无毒性	较好
NR	2	-0.8	无毒性	较好
SF	1	-0.8	无毒性	较差
YL	1	-0.8	无毒性	较差
VR	2	-0.8	无毒性	较好
AS	1	-0.8	无毒性	较好
MR	1	-0.8	无毒性	较好
PS	1	-0.8	无毒性	较好
VI	1	-0.8	无毒性	较差
YF	1	-0.8	无毒性	较差

表 4 大米谷蛋白释放 ACE 抑制肽的序列、毒性和水溶性预测

Table 4 Sequence, toxicity and water solubility prediction of ACE inhibitory peptide released from rice glutelin in silico

肽片段	数量	支持向量机评分	毒性预测	水溶性预测
VF	2	-0.8	无毒性	较差
YG	4	-0.8	无毒性	较差
AF	10	-0.8	无毒性	较差
KR	3	-0.8	无毒性	较好
AG	7	-0.8	无毒性	较差
QG	4	-0.8	无毒性	较好
SG	1	-0.8	无毒性	较好
NG	2	-0.8	无毒性	较好
QK	2	-0.8	无毒性	较好
KF	1	-0.8	无毒性	较好
AR	6	-0.8	无毒性	较好
PT	2	-0.8	无毒性	较差
AH	1	-0.8	无毒性	较差
AV	6	-0.8	无毒性	较差
DF	2	-0.8	无毒性	较好
WL	1	-0.8	无毒性	较差
ST	3	-0.8	无毒性	较好
IF	1	-0.8	无毒性	较差
KG	1	-0.8	无毒性	较好
EG	1	-0.8	无毒性	较好
SF	1	-0.8	无毒性	较差
IF	1	-0.8	无毒性	较差
HG	1	-0.8	无毒性	较差
VR	2	-0.8	无毒性	较好
AVL	1	-0.8	无毒性	较差

3 结论与讨论

本研究探讨了大米谷蛋白作为生物活性肽前体的潜力。通过 BIOPEP 数据库分析, 大米谷蛋白的等电点值较低, 亲水性及稳定性较好, 无潜在的致敏性。大米谷蛋白可作为多种生物活性肽的前体, 特别是 DPP-IV 抑制肽和 ACE 抑制肽。对 DPP-IV 抑制肽和 ACE 抑制肽的分子量分布和氨基酸组成进行进一步分析, 结果发现, 胃蛋白酶比木瓜蛋白酶具有更高的释放这两种肽的潜力。此外, 使用在线肽毒性预测工具 ToxinPred, 通过计算机模拟蛋白质水解获得的 DPP-IV 抑制肽和 ACE 抑制肽没有显示出细胞毒性。使用在线工具 Innovagen 预测两种肽的水溶性也发现, 均存在水溶性较好的活性肽片段。综上所述, 这些结果表明大米谷蛋白是生产各种生物活性肽的良好前体, 生物信息学分析可为蛋白质实际水解生产生物活性肽提供指导。

参考文献

- [1] 徐兴凤. 酶解大米谷蛋白性质以及多糖对其影响的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
XU XF. Study on the properties of limited enzymatic hydrolysis rice glutelin and the effects of polysaccharides on its properties [D]. Nanchang: Nanchang University, 2016.
- [2] 王章存, 姚惠源. 大米蛋白质研究现状[C]. 中国粮油学会第三届学术年会, 2004.
WANG ZC, YAO HY. Research status of rice protein [C]. The Third Annual Conference of China Cereals and Oils Association, 2004.
- [3] SCHLIMME E, MEISEL H. Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects [J]. *Nahrung*, 1995, 39(1): 1–20.
- [4] IWANIAK A, DAREWICZ M, MINKIEWICZ P. Peptides derived from foods as supportive diet components in the prevention of metabolic syndrome [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2018, 17(1): 63–81.
- [5] LI SS, BU TT, ZHENG JX, *et al.* Preparation, bioavailability, and mechanism of emerging activities of Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2019, 18(4): 1097–1110.
- [6] 李晓东. 功能性大豆食品[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
LI XD. Functional Soybean Food [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006.
- [7] URAIPONG C, ZHAO J. Rice bran protein hydrolysates exhibit strong *in vitro* α -amylase, β -glucosidase and ACE-inhibition activities [J]. *J Sci Food Agric*, 2016, 96(4): 1101–1110.
- [8] YANG X, WANG LL, ZHANG FY, *et al.* Effects of multi-mode S-type ultrasound pretreatment on the preparation of ACE inhibitory peptide from rice protein [J]. *Food Chem*, 2020, 331. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127216
- [9] SELAMASSAKUL O, LAOHAKUNJIT N, KERDCHOECHUEN O, *et al.* Isolation and characterisation of antioxidative peptides from bromelain-hydrolysed brown rice protein by proteomic technique [J]. *Process Biochem*, 2018, 70: 179–187.
- [10] LIU K, ZHAO Y, CHEN F, *et al.* Purification and identification of Se-containing antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of

- Se-enriched brown rice protein [J]. *Food Chem*, 2015, 187(15): 424–430.
- [11] NEVES AC, HARNEDY PA, O'KEEFFE MB, *et al.* Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities [J]. *Food Chem*, 2017, 218: 396–405.
- [12] ASHOK A, BRIJESHA N, APARNA HS. Discovery, synthesis, and *in vitro* evaluation of a novel bioactive peptide for ACE and DPP-IV inhibitory activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 180: 99–110.
- [13] ZHAO WZ, ZHANG D, YU ZP, *et al.* Novel membrane peptidase inhibitory peptides with activity against angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV identified from hen eggs [J]. *J Funct Foods*, 2019, 64. DOI: 10.1016/j.jff.2019.103649
- [14] UDENIGWE CC. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2014, 36(2): 137–143.
- [15] IWANIAK A, DAREWICZ M, MOGUT D, *et al.* Elucidation of the role of *in silico* methodologies in approaches to studying bioactive peptides derived from foods [J]. *J Funct Foods*, 2019, 61: 103486.
- [16] 周亭屹, 高新昌, 党亚丽, 等. 基于生物信息学技术的生物活性肽研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(12): 335–340.
- ZHOU TY, GAO XC, DANG YL, *et al.* Research development of the bioactive peptides based on bioinformatics [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2019, 40(12): 335–340.
- [17] GANGOPADHYAY N, WYNNE K, O'CONNOR P, *et al.* *In silico* and *in vitro* analyses of the angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates generated from crude barley (*Hordeum vulgare*) protein concentrates [J]. *Food Chem*, 2016, 203: 367–374.
- [18] LAFARGA T, O'CONNOR P, HAYES M. Identification of novel dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from meat proteins using *in silico* analysis [J]. *Peptides*, 2014, 59: 53–62.
- [19] POOJA K, RANI S, KANWATE B, *et al.* Physico-chemical, sensory and toxicity characteristics of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from rice bran-derived globulin using computational approaches [J]. *Int J Pept Res Ther*, 2017, 23(4): 519–529.
- [20] NONGONIERMA AB, FITZGERALD RJ. Strategies for the discovery and identification of food protein-derived biologically active peptides [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2017, 69: 289–305.
- [21] 石嘉铎, 张太, 梁富强. 体外模拟消化对大米谷蛋白结构及水解产物生物活性的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(1): 59–66.
- SHI JY, ZHANG T, LIANG FQ. Effect of *in vitro* simulated digestion on the structure of rice glutelin and the biological activity of hydrolysates [J]. *Food Sci*, 2021, 42(1): 59–66.
- [22] 陈倩倩, 佟立涛, 钟葵, 等. 大米蛋白酶解物的 ACE 抑制活性研究[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(3): 91–96.
- CHEN QQ, TONG LT, ZHONG K, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition by rice protein hydrolysate [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2015, 31(3): 91–96.
- [23] 金清, 吴建平, 张贵川, 等. 一种筛选血管紧张素转换酶抑制肽的方法[J]. *食品科学*, 2011, 32(19): 120–124.
- JIN Q, WU JP, ZHANG GC, *et al.* A Method for screening angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides [J]. *Food Sci*, 2011, 32(19): 120–124.
- [24] JI D, UDENIGWE CC, AGYEI D. Antioxidant peptides encrypted in flaxseed proteome: An *in silico* assessment [J]. *Food Sci Hum Well*, 2019, 8(3): 306–314.
- [25] IVAN D, LYUDMILA N, IRINI D, *et al.* Allergen FP: Allergenicity prediction by descriptor fingerprints [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(6): 846–851.
- [26] 潘菁, 汪何雅, 钱和. 大米过敏蛋白的研究进展[J]. *食品科技*, 2012, 37(5): 126–128.
- PAN J, WANG HY, QIAN H. Advances of rice allergen proteins [J]. *Food Sci Technol*, 2012, 37(5): 126–128.
- [27] TEIXEIRA B, PIRES C, NUNES ML, *et al.* Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from cape hake by-products [J]. *Int J Food Sci Tech*, 2016, 51(12): 2528–2536.
- [28] SUDHEER G, PALLAVI K, KUMARDEEP C, *et al.* *In silico* approach for predicting toxicity of peptides and proteins [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73957.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



周湘人, 硕士研究生, 主要研究方向为食品工程。

E-mail: 501578682@qq.com



付湘晋, 博士, 教授, 主要研究方向为食品加工与食品代谢组学。

E-mail: drxfjfu@163.com