

石金钱龟低聚肽制备工艺优化及其抑制新冠病毒的潜能

苏可盈^{1,2}, 杨贵卓¹, 戴庞聪¹, 李莉¹, 徐晓飞^{2,3}, 张学武^{1,2*}

(1. 广州工商学院工学院, 广东广州 510850) (2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510642)

(3. 东莞华发生物科技有限公司, 广东东莞 523000)

摘要: 为了探究石金钱龟低聚肽作为新冠肺炎病毒(SARS-CoV-2)药物开发原料的可能性, 该研究用“风味蛋白酶+木瓜蛋白酶”组合对龟肉进行酶解, 通过不同酶配比、加酶量、pH和酶解时间的单因素实验和正交实验确定最优工艺条件, 制备出石金钱龟低聚肽。再通过HPLC-MS分离、Peak Studio解析、Peptide Ranker活性预测逐步筛选出活性较高的低聚肽, 最后进行各低聚肽序列与SARS-CoV-2棘突蛋白(S蛋白)的分子对接。结果显示, 最佳工艺参数为风味蛋白酶:木瓜蛋白酶=7:3、加酶量7%、pH 5.5、酶解时间4h, 此时的水解度为42.56%; Peak Studio解析出可信度(ALC) > 90%的肽共510条, 经Peptide Ranker生物活性评估后筛选出6条低聚肽与S蛋白分子对接, 低聚肽序列分别为: LDFFK、LDFFKAL、FRVL、AFRVL、AGGKPFQ、SPFRVT, 其Docking Score在-138.50~169.68之间, 其中LDFFKAL的Docking Score最低, 为-169.68, 说明该低聚肽抑制新冠肺炎病毒的潜能最强。总的来说, 经工艺优化后石金钱龟肉的水解度大大增加, 且制得的石金钱龟低聚肽有较强的抑制新冠肺炎病毒的潜能。

关键词: 石金钱龟; 低聚肽; SARS-CoV-2; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2022)08-80-88

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.8.1176

Optimization of Preparation Techniques for Oligopeptides from *Mauremys mutica* and Its Potential to Inhibit SARS-CoV-2

SU Keying^{1,2}, YANG Guizhuo¹, DAI Pangcong¹, LI Li¹, XU Xiaofei^{2,3}, ZHANG Xuewu^{1,2*}

(1. School of Engineering of Guangzhou College of Technology and Business, Guangzhou 510850, China)

(2. Food Science and Engineering College of South China University of Technology, Guangzhou 510642, China)

(3. Huafa Biotechnology Company of Dongguan, Dongguan 523000, China)

Abstract: This study aimed to explore the possibility of using *Mauremys mutica* oligopeptides as raw materials to develop a drug targeting the SARS-CoV-2 virus. *M. mutica* oligopeptides were prepared through the combined enzymatic hydrolysis of *M. mutica* meat using flavoenzyme and papain, and the optimal enzyme ratios, enzyme dosage, pH, and enzymatic hydrolysis time were determined using single-factor and orthogonal experiments. After separating the oligopeptide fractions via high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS), Peak Studio and Peptide Ranker were used for peptide sequence analysis and peptide activity prediction, respectively, to screen for oligopeptides with high bioactivity. Finally, the binding ability of oligopeptides with high predicted activity against the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain (RBD) was evaluated using molecular docking. The results show that the highest degree of hydrolysis (DH; 42.56%) was obtained when *M. mutica* meat was treated with a flavoenzyme: papain ratio of 7:3 and an enzyme dosage of 7% at pH 5.5 for 4 h. According to Peak Studio analysis, 510 peptides with an average local confidence (ALC) of > 90% were discovered. Six

引文格式:

苏可盈, 杨贵卓, 戴庞聪, 等. 石金钱龟低聚肽制备工艺优化及其抑制新冠病毒的潜能[J]. 现代食品科技, 2022, 38(8): 80-88

SU Keying, YANG Guizhuo, DAI Pangcong, et al. Optimization of preparation techniques for oligopeptides from *Mauremys mutica* and its potential to inhibit SARS-CoV-2 [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(8): 80-88

收稿日期: 2021-10-20

基金项目: 广东省教育厅普通高校青年创新人才项目(2020KQNCX108); 广州工商学院校级科研项目(KA202036; KA202037)

作者简介: 苏可盈(1993-), 女, 硕士, 助教, 研究方向: 食品营养物质提取, E-mail: 294598870@qq.com

通讯作者: 张学武(1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物研究, E-mail: xuewu@scut.edu.cn

oligopeptides with high Peptide Ranker scores (LDFFK, LDFFKAL, FRVL, AFRVL, AGGKPFQ, and SPFRVT) were screened to dock with S protein. Their docking scores ranged from -138.50 to -169.68, and the lowest docking score (-169.68) was exhibited by LDFFKAL. Therefore, a high DH of *M. mutica* meat could be attained after process optimization, and a high inhibitory potential for SARS-CoV-2 was observed in the resulting *M. mutica* oligopeptides.

Key words: *Mauremys mutica*; oligopeptides; SARS-CoV-2; molecular docking

新型冠状病毒 SARS-COV-2 是于 2019 年底开始流行的一种急性呼吸道感染病毒。科学家们分离出导致该疾病的病原体, 并指出它是一种新的冠状病毒, 属于 2003 年流行的非典型肺炎病毒 SARS-COV 的同一病毒家族^[1]。目前, 药物治疗的研究主要在于寻找 SARS-COV-2 蛋白酶 (M^{Pro}) 的抑制剂^[2,3] 和 SARS-COV-2 棘突蛋白 (S 蛋白) 的抑制剂^[4]。其中, SARS-COV-2 棘突蛋白是一种糖蛋白, 它能在冠状病毒表面上形成类似于冠状样外观^[5], 它是冠状病毒 SARS-COV-2 识别宿主细胞的主要驱动力, 负责与宿主细胞上的 ACE2 受体结合, 并介导宿主细胞膜和病毒膜的融合从而感染宿主细胞^[6]。本研究旨在应用分子对接技术筛选出 SARS-COV-2 棘突蛋白的抑制剂。分子对接是药物筛选常用的方法, 该方法能模拟某些配体物质与特定的受体蛋白结合模式, 再根据计算物化参数来预测其结合势能, 两者的结合势能越低, 说明配合体越稳定, 配体对蛋白质活性的抑制越强^[7,8], 目前, 分子对接已被广泛用于低聚肽药物的筛选, 学者们已应用分子对接技术从虾夷扇贝^[9]、发酵大豆制品^[10]、吞拿鱼^[11]中成功筛选出了抑制 SARS-CoV-2 活性的低聚肽。

石金钱龟 (学名: *Mauremys mutica*), 又称石龟、黄喉拟水龟, 在分类上隶属龟鳖目、潮龟科、拟水龟属, 在我国华东、华南等地分布较广, 也常见于越南、日本等国家。龟肉在我国作为食疗和药用有着悠久的历史, 龟肉营养丰富, 可滋阴养颜, 增补保健, 延年益寿, 入药可治疗痛风、糖尿病、肺结核。龟肉中粗蛋白含量约为 16.46%, 其中必需氨基酸占 40%, 其氨基酸模式基本能满足 FAO/WHO 所推荐的人体所需的氨基酸模式^[12]。且多项研究表明, 龟肉多肽有抗氧化^[13]、抗肿瘤^[14]等生理功能。

由此可见, 从传统应用角度和现代研究视角均能体现龟肉具有提高抵抗力的相关功能, 所以龟肉蛋白对新冠肺炎病毒的作用值得探究。而现存对于龟肉酶解的研究中, 龟肉蛋白的水解度较低 (仅为 15% 左右)^[14,15], 且所得肽类分子较大, 这在一定程度上抑制了龟肉肽类生物活性的发挥。本研究用复合酶酶解龟肉, 通过工艺优化最大程度获得分子量较小的低聚肽, 并通过分子对接技术模拟龟肉低聚肽与新冠肺炎病毒 S

蛋白的结合, 以探究龟肉低聚肽抑制新冠肺炎病毒的潜能。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

石金钱龟由广东省东莞市华南协同创新研究院提供; 氢氧化钠、盐酸, 均为分析纯, 天津鼎盛鑫公司; 木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶, 均为食品级, 北京鸿润宝顺科技有限公司; 硼砂、十二烷基硫酸钠、邻苯二甲醛 OPA, 均为分析纯, 天津福晨公司; 1,4-二巯基苏糖醇 DTT、丝氨酸标准品, 均为色谱纯, 恒远博泰生物科技有限公司。

RT-6100 全自动酶标仪, 杜雷公司; AB104 电子天平, 瑞士梅特勒公司; 数显 PH 计, 上海雷磁; KD-10N 真空冷冻干燥机, 郑州科达; UV-1000 紫外可见光光度计, 上海仪电; HH-S21-4 数显恒温水浴锅, 上海博讯; TD5 台式高速离心机, 德国纳赫特; JJ-2 高速组织捣碎机, 常州亿通; SPX-250B-Z 生化培养箱, 上海双旭; THZ-100 恒温振荡培养器, 上海赫田。

1.2 实验方法

1.2.1 龟肉水解液的制备

龟肉蛋白的酶解工艺流程如下:

取肉→搅碎→调节料液比 (1:6)→调节 pH 值→加酶→恒温密封酶解→沸水浴灭酶→低温高速离心→取上清液

将冷冻于 -4 °C 的石金钱龟室温解冻, 剔骨去皮, 保留龟肉, 准确称量龟肉, 按料液比 (1:6) 加入蒸馏水, 置于高速组织捣碎机搅拌至无相连龟肉纤维, 制得龟肉原浆。取 50 mL 龟肉原浆于 100 mL 锥形瓶, 用 1 mol/L NaOH 溶液和 1 mol/L HCl 溶液调节原液 pH 值, 添加相应的蛋白酶, 用保鲜膜封口后于 55 °C 恒温振荡培养器保温酶解, 期间保持 pH 恒定。酶解结束后于沸水浴中保温 6 min, 冷却至室温后于低温高速离心机 8000 r/min 15 min, 取上清液冷冻保存, 以备后续水解度的测定。

1.2.2 龟肉蛋白液水解度的测定

本文采用邻苯二甲醛法 (OPA 法) 进行龟肉蛋白液水解度的测定, 并作了适当调整。OPA 法测定步骤:

标准溶液测定 ($OD_{control}$): 将 400 μL 丝氨酸标准溶液加入到一个装有 3 mL OPA 试剂的测试管中混合均匀 (5 s) 后精确静置 2 min 后立即读取 340 nm 的吸光值; 空白试验 (OD_{blank}): 吸取 400 μL 去离子水参照标准溶液测定进行; 样品测定 (OD_{sample}): 吸取 400 μL 样品溶液参照标准溶液测定进行。得出结果按公式 (1) (2) (3) 计算水解度。

$$SerineNH_2 = \frac{OD_{sample} - OD_{blank}}{OD_{control} - OD_{blank}} \times \frac{0.9516meqv}{L} \times \frac{C \times V \times 10^{-3}}{A \times P \times V} \quad (1)$$

$$h = \frac{SerineNH_2 - \beta}{\alpha} \quad (2)$$

$$DH / \% = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

C——稀释倍数;

A——料液比 0.167;

P——蛋白含量;

β ——查表得 0.40;

α ——查表得 1.00;

h_{tot} ——查表得 7.6。

1.2.3 酶组合的筛选

在参考现有研究^[14,15]的基础上, 选择了动物蛋白酶解常用的风味蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶进行探究, 且该三种酶的最适 pH 值和最适温度相近, 便于酶解条件的控制。利用风味蛋白酶:木瓜蛋白酶=1:1、风味蛋白酶:中性蛋白酶=1:1、木瓜蛋白酶:中性蛋白酶=1:1 三种酶组合进行酶解, 酶解条件为: 加酶量 5% (m/V , 两酶总质量/龟肉原浆)、pH 7、55 $^{\circ}\text{C}$ 、酶比例为 1:1 (酶解开始时同时加入)、酶解时间 5 h, 测定水解度, 确定最适的酶组合。

1.2.4 单因素实验

取三份 150 mL 石金钱龟肉原浆, 将酶配比设置为风味蛋白酶:木瓜蛋白酶=1:1、1:2、2:1, 加酶量为 3%、pH 7、55 $^{\circ}\text{C}$ 、酶解 5 h, 操作步骤按“1.2.1”, 测定样品水解度, 确定水解度最高的酶配比。取四份 150 mL 石金钱龟肉原浆, 将加酶量设置为 1%、3%、5%、7%, 采用最适的酶配比, 其他反应条件同上, 进行水解反应, 操作步骤按“1.2.1”, 测定样品水解度, 确定最适的加酶量。取四份 150 mL 石金钱龟肉原浆, pH 设置为 5、6、7、8, 采用最适的酶配比和加酶量, 其他反应条件同上, 进行水解反应, 操作步骤按“1.2.1”, 测定样品水解度, 确定最适 pH 值。取七份 150 mL 石金钱龟肉原浆, 酶解时间设置为 2、3、4、5、6、7, 采用最适的酶配比、加酶量和 pH 值进行水解反应, 操作步骤按“1.2.1”, 测定样品水解度,

确定最适水解时间。

1.2.5 正交实验设计

表 1 因素水平表

Table 1 Factor and level for orthogonal experiment

水平	因素			
	A 风味蛋白酶 占比/%	B 加酶量/%	C PH 值	D 时间/h
1	50%	7%	5.5	4
2	60%	8%	6	5
3	70%	9%	6.5	6

在单因素实验探究所得的最优酶解条件的基础上, 对风味蛋白酶占比、加酶量、pH、时间四个因素设置更细致的梯度条件, 以水解度为指标, 进行 $L_9(3^4)$ 正交实验探究。试验因素与水平见表 1。

1.2.6 UPLC-MS 法分离龟肉低聚肽

利用高效液相色谱质谱联用法分离龟肉低聚肽并鉴定低聚肽结构。所用超高效液相色谱仪为 Thermo Fisher Scientific TMQ Exactive, 色谱柱为 Aquity UPLC BEH C18 色谱柱, 粒径 1.7 μm , 质谱仪为组合型四级杆 Orbitrap 质谱仪。A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为 0.1% 甲酸乙腈溶液, 进样量 20 μL , 流速 0.3 mL/min, 进样盘温度 10 $^{\circ}\text{C}$ 。洗脱参数设置为 0 min: 95% A 相、5% B 相; 30 min: 60% A 相、40% B 相; 30.1 min: 95% A 相、5% B 相; 35 min: 95% A 相、5% B 相。检测波长: 220 nm。质谱参数设置: 正离子模式; Sheath gas flow rate: 45 L/min; Aux gas flow rate: 15 L/min; Sweep gas flow rate: 2 L/min; 雾化电压: 3.50 kV; 毛细管温度: 320 $^{\circ}\text{C}$; S-lens RF level: 55.0; Aux gas heater temp: 350 $^{\circ}\text{C}$; 扫描范围是 200~3000 m/z 。获得样品的一级、二级质谱图。

1.2.7 Peaks Studio 解析低聚肽序列

使用 Peaks Studio X 软件的 DB search 和 de novo 模块对质谱数据进行解析。DB search 蛋白数据库来源为 UniProt 蛋白数据库 (<https://www.uniprot.org/>) Plukenetia volubilis 物种, DB search 解析参数设置为: Parent Mass Error Tolerance 20.0×10^{-6} , Fragment Mass Error Tolerance 0.1 u, Max Missed Cleavages 100。De novo 解析参数设置为 Parent Mass; Error Tolerance 20.0×10^{-6} , Fragment Mass Error Tolerance 0.1 u。筛选出可信用度大于 95% 的低聚肽序列进行后续分析。

1.2.8 Peptide Ranker 生物活性评价

Peptide Ranker 是一种基于新型神经网络的生物活性肽预测服务器, 用于预测低聚肽具有生物活性的概率^[16]。低聚肽的生物活性用“Score”表示, 数值越高, 表示低聚肽的预测活性越高, 选择“Score>0.5”的低聚

肽进行后续的分子对接。

1.2.9 石金钱龟低聚肽与 SARS-Cov-2 S 蛋白活性结构域的分子对接

本研究用 HPEPDOCK 进行分子对接。HPEPDOCK 是一种新颖的 Web 服务器,可通过分层算法将蛋白质-肽对接。HPEPDOCK 并未进行冗长的模拟来精炼肽构象,而是通过 MODPEP 程序生成的肽构象的整体来考虑肽的灵活性^[17],HPEPDOCK Web 服务器可从 <http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hpepdock/> 获得。先从 PDB (<https://www.rcsb.org/>) 中找出 SARS-Cov-2 病毒 S 蛋白的活性结构,其编号为 7DWZ,EMDData 来源为 EMD-30890。

1.2.10 数据处理

每次试验设 3 组平行,数据采用 $\bar{x} \pm SD$ 表示,用 Excel、SPSS 9.0 软件进行数据处理和图表制作。

2 结果与分析

2.1 酶组合的筛选

复合酶水解结果如图 1 所示,“风味蛋白酶+木瓜蛋白酶”组石金钱龟肉的水解度最高,为 24.12%,高于“中性蛋白酶+风味蛋白酶”组合(21.92%)和“木瓜蛋白酶+中性蛋白酶”组合(16.61%)。“木瓜蛋白酶+风味蛋白酶”组合的水解度最高的原因可能是木瓜蛋白酶是内切的巯基蛋白酶,且酶切位点具有非特异性^[18],使其酶切作用具备更多的可能性,从而能产生更丰富的短肽链。而风味蛋白酶同时具有外切和内切特性,酶切位点多样,有利于短肽的生成,且已有研究表明其对水产品的酶解效果较好^[18]。因此选择“风味蛋白酶+木瓜蛋白酶”组合进行后续研究。

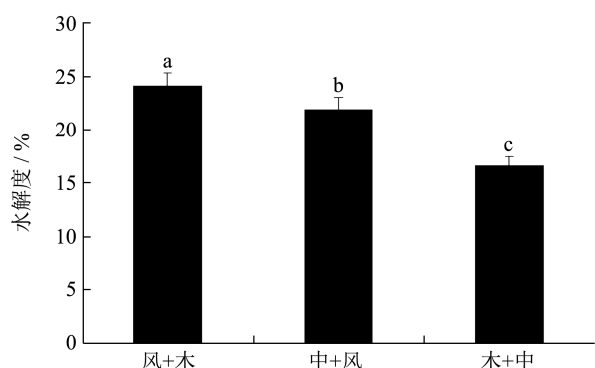


图 1 复合蛋白酶对石金钱龟肉水解度的影响

Fig.1 Effect of combination of enzyme on degree of hydrolysis

注:不同字母表示不同数据间差异显著($p < 0.05$)。图 2~5 同。

2.2 单因素实验分析

2.2.1 酶比对水解度的影响

风味蛋白酶与木瓜蛋白酶的不同酶比对水解度影响如图 2 所示。由图 2 可知,风味蛋白酶:木瓜蛋白酶=1:1 时水解度最高,为 25.43%,与风味蛋白酶:木瓜蛋白酶=2:1 时的水解度(24.81%)相近,但风味蛋白酶:木瓜蛋白酶=1:2 时水解度明显下降。所以,选取风味蛋白酶:木瓜蛋白酶=1:1 进行后续研究。

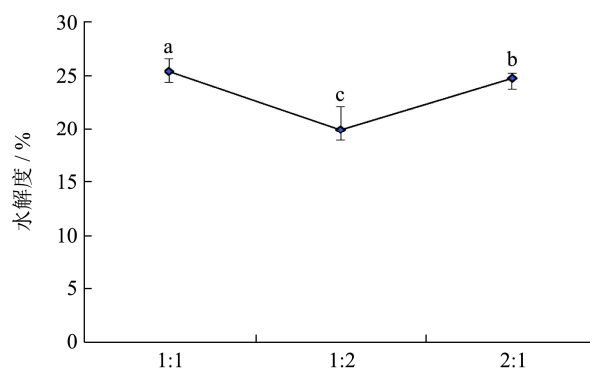


图 2 复合酶的酶比对水解度的影响

Fig.2 Effect of proportion of composite enzyme on degree of hydrolysis

2.2.2 pH 值对水解度的影响分析

pH 值对水解度影响如图 3 所示。随 pH 升高,酶解液的水解度呈先升高后下降的趋势,当 pH=6 时,水解度最高,为 23.16%,当 pH>6 时水解度持续下降,可能是碱性环境破坏了酶的空间结构,亦可能是碱性环境抑制了酶活性,造成酶活性降低,从而影响水解过程^[18]。

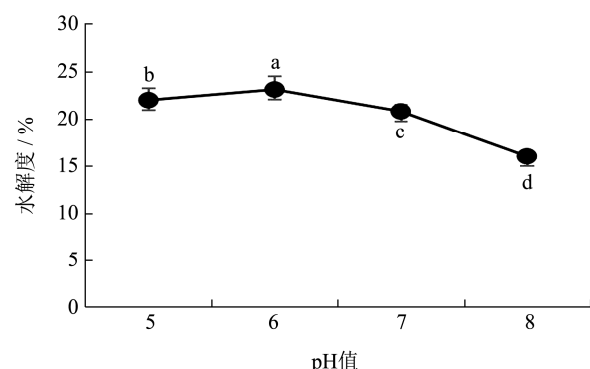


图 3 pH 对水解度的影响

Fig.3 Effect of pH on degree of hydrolysis

2.2.3 酶解时间对水解度的影响分析

本试验酶解时间对水解度的影响如图 4 所示,结果显示,龟肉酶解 2 h~5 h 的水解度逐渐增大,酶解时间为 6 h 时水解度最高,为 24.82%,此阶段酶的作用位点较多,且活性中心并未饱和,6 h 后,水解度轻微下降至 20%左右,从而选择酶解时间 6 h 作后续研究。

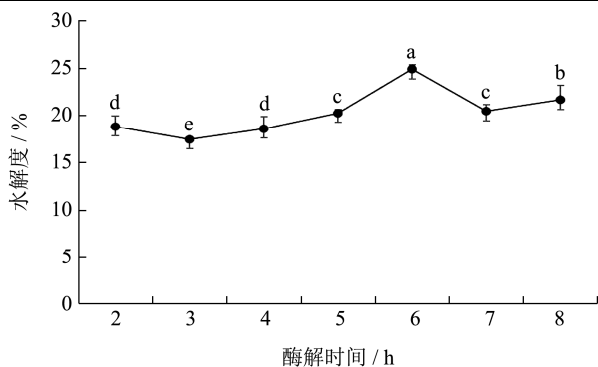


图4 酶解时间对水解度的影响

Fig.4 Effect of hydrolysis time on degree of hydrolysis

2.2.4 加酶量对水解度的影响分析

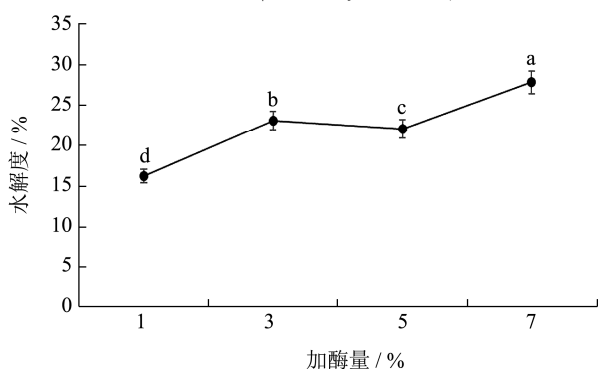


图5 加酶量对水解度的影响

Fig.5 Effect of hydrolysis time on degree of hydrolysis

加酶量对水解度影响如图5所示,加酶量在7%以下时,水解度随加酶量的增加而呈上升趋势,说明酶解开始时,增加酶用量会增加酶与底物的接触率,

促进水解反应。当加酶量为7%时,水解度最高,为27.78%,所以选择加酶量7%作后续研究。

2.3 正交实验结果分析

风味蛋白酶和木瓜蛋白酶的正交实验结果见表2。在单因素实验结果的基础上,本研究对四个因素设置了更细致的水平梯度,对酶解条件进行了进一步的优化。由表1和表2可知,各因素对水解度影响大小顺序为:风味蛋白酶占比>pH值>酶解时间>加酶量。在本实验中,最优方案为A3B1C1D1。则确定复合蛋白酶酶解石金钱龟肉的最佳工艺参数为:风味蛋白酶:木瓜蛋白酶=7:3、加酶量为7%、pH为5.5、酶解时间为4h,通过验证实验得知此条件下的水解度为42.56%。该酶解效果大大优于现有研究中单一酶的水解效果,如张永进等^[19]分别探究了复合蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶对中华草龟肉和龟血的酶解反应,所得水解度约为20%;徐杰等^[18]使用风味蛋白酶对珍珠龙胆石斑鱼肉酶解,5h后其水解度仅为9.99%;陶美洁等^[20]用风味蛋白酶、木瓜蛋白酶等4种酶分别酶解贻贝蒸液,所得的水解度最大为13.98%。可见,用单一酶对肉类蛋白进行水解时,水解度较低,且时间较长。而李军等^[21]用碱性蛋白酶和风味蛋白酶等多种酶复配而成的复合蛋白酶对鲢鱼骨胶原蛋白进行水解,得到水解度高达49%,与本研究水解度测定的结果有一定相似性。

表2 正交实验结果

Table 2 Result of orthogonal experiment

实验序号	因素				水解度 DH/%
	A 风味蛋白酶占比	B 加酶量	C pH 值	D 时间/h	
1	1	1	1	1	33.37
2	1	2	2	2	21.73
3	1	3	3	3	21.52
4	2	1	2	3	28.91
5	2	2	3	1	34.97
6	2	3	1	2	27.07
7	3	1	3	2	42.48
8	3	2	1	3	41.09
9	3	3	2	1	39.87
K1	25.54	34.92	38.84	36.07	
K2	30.32	32.60	30.17	30.43	
K3	41.15	29.49	32.99	30.51	
R	15.61%	5.43%	8.67%	5.64%	

2.4 HPLC-MS 分离与 de novo 肽序列测定

利用高效液相色谱-质谱联用法对优化后的酶解低聚肽进行分离,可得质谱图(如图6所示)。把质谱数

据导入 Peak Studio 8.5 软件进行 de novo 分析,可测得可信度 (ALC) 在 50% 以上的低聚肽序列共 510 条,肽链长度介于“四肽”至“十六肽”之间,低聚肽占比为 89.7%。其中“ALC>95%”的低聚肽序列共 20 条,肽链长度介于“四肽”至“七肽”之间,低聚肽占比为 100%。低聚肽是指由 2~9 个氨基酸脱水缩合而成的短肽,分子量一般在 1000 u 以下,与多肽相比,低聚肽有溶解性好,性能稳定,安全性高,更易吸收的特点。如二肽和三肽可以通过肠道内的 PepT1 和 PepT2 肽类转运系统直接吸收^[22],四肽和五肽可以通过细胞旁路紧密连接途径运输^[23],这样的吸收方式消耗能量更小。

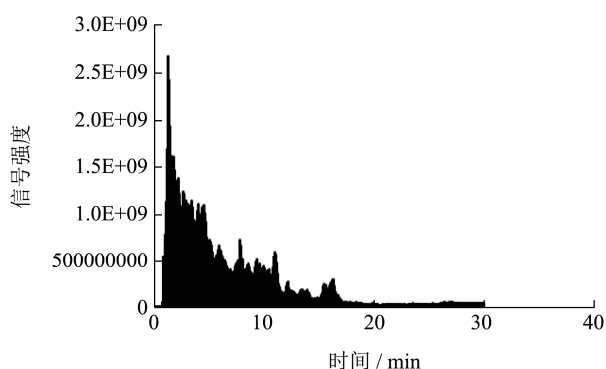


图 6 石金钱龟样品的高效液相色谱-质谱图

Fig.6 HPLC-MS diagram of *Mauremys mutica* peptide

表 3 De novo 肽测序解析结果

Table 3 Peptide sequences determined by De novo

NO.	Peptide	ALC/%	m/z	Mass	×10 ⁻⁶
1	AFRVL	98	303.19	604.36	4
2	YLLLK	98	325.21	648.42	1.1
3	QVTPVK	98	336.20	670.40	4.3
4	LEYVAK	98	361.70	721.40	3.8
5	ALVLK	98	272.19	542.37	2.1
6	SSLLAK	98	309.69	617.37	1.5
7	GPLVK	97	257.17	512.33	2.7
8	EAFRVL	97	367.71	733.41	6
9	AVTPVK	97	307.69	613.37	1.6
10	AGGKPFQ	97	352.69	703.36	1.7
11	TGKLVE	97	323.69	645.36	1.9
12	TTLHEFT	97	424.71	847.40	2.6
13	SPFRVT	97	353.69	705.38	2.6
14	LTGYK	97	291.16	580.32	1.5
15	YPYLAK	96	377.71	753.40	2
16	KVYPYQAK	96	498.78	995.54	1.9
17	LDFFKAL	95	427.24	852.47	2.4
18	FRVL	95	267.67	533.33	2.9
19	LDFFK	95	335.18	668.35	2.8
20	VEPFK	95	310.17	618.33	2.1

2.5 Peptide Ranker 生物活性评价

利用 Peptide Ranker 平台对“ALC>95%”的 20 条低聚肽进行生物活性预测,按分数由高至低排列如下,Score>0.5 的低聚肽共 6 条,占总数的 30%,筛选出 Score>0.5 的低聚肽进行后续研究,肽序列分别为:LDFFK、LDFFKAL、FRVL、AFRVL、AGGKPFQ、SPFRVT。

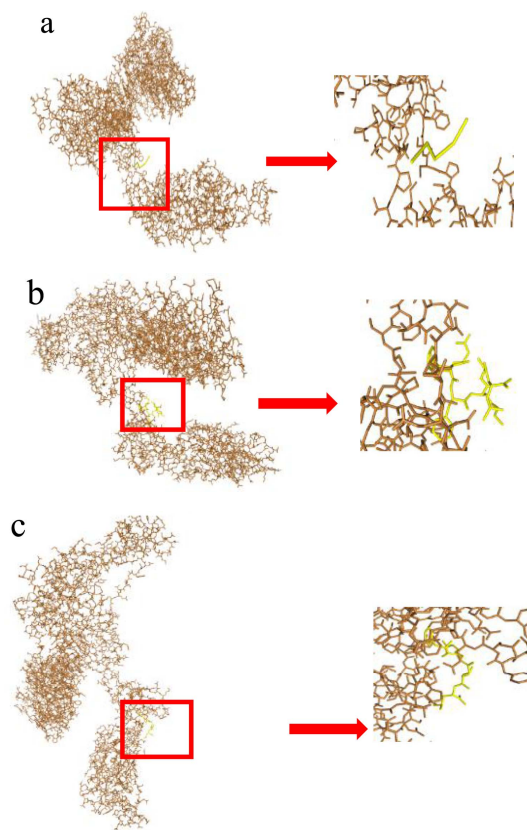
表 4 肽序列的 Peptide Ranker 评分结果

Table 4 Peptide Ranker score of peptide sequences

NO.	Score	Peptide	NO.	Score	Peptide
1	0.85	LDFFK	11	0.29	GPLVK
2	0.76	LDFFKAL	12	0.25	SSLLAK
3	0.69	FRVL	13	0.22	KVYPYQAK
4	0.66	AFRVL	14	0.16	LTGYK
5	0.65	AGGKPFQ	15	0.14	ALVLK
6	0.56	SPFRVT	16	0.10	AVTPVK
7	0.43	YPYLAK	17	0.08	TTLHEFT
8	0.36	YLLLK	18	0.07	QVTPVK
9	0.33	EAFRVL	19	0.06	LEYVAK
10	0.30	VEPFK	20	0.05	TGKLVE

2.6 龟肉低聚肽与 S 蛋白活性结构域分子对接

对接



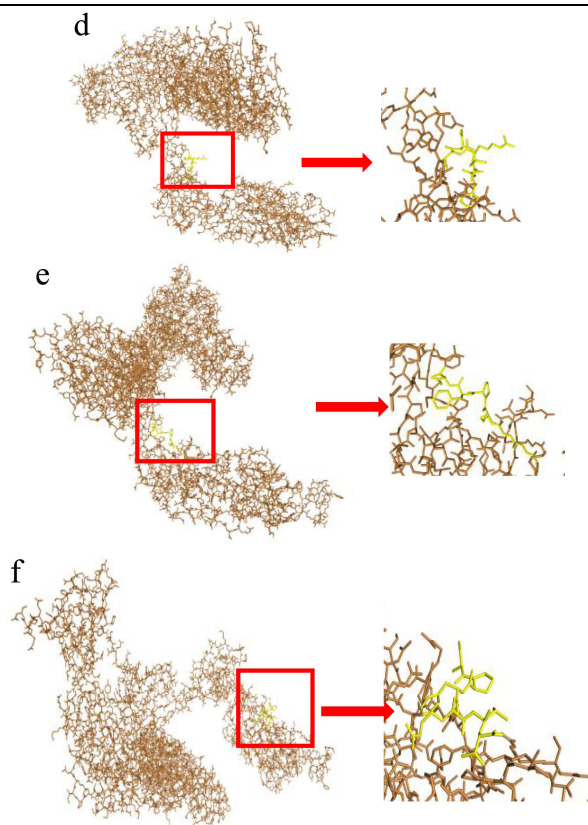


图7 肽序列与 S 蛋白分子对接构象

Fig.7 Docking image of peptides and S protein

注: (a) LDFFK 与 S 蛋白分子对接构象; (b) LDFFKAL 与 S 蛋白分子对接构象; (c) FRVL 与 S 蛋白分子对接构象; (d) AFRVL 与 S 蛋白分子对接构象; (e) AGGKPFQ 与 S 蛋白分子对接构象; (f) SPFRVT 与 S 蛋白分子对接构象。

S 蛋白是存在于 SARS-CoV-2 病毒表面的蛋白结构域, S 蛋白利用血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 作为细胞受体,在感染期间介导病毒和宿主细胞膜的融合,从而感染人体细胞^[24]。由 PDB (<https://www.rcsb.org/>) 可知 S 蛋白的编号为 7DWZ。该蛋白结构域由 A、B、C 三条低聚肽链组成,肽序列总长度为 1283。利用 HPEPDOCK 服务器对“Peptide Ranker Score>0.5”的低聚肽进行分子对接,每个低聚肽的最佳对接模型如图 7 所示。

龟肉低聚肽与 S 蛋白的分子对接能模拟龟肉低聚肽对 S 蛋白的结合方式, Docking Score 是指该复合体的结合能, Docking Score 越小,说明复合体越稳定,则该龟肉低聚肽对 SARS-CoV-2 S 蛋白的潜在抑制能力越强。6 条低聚肽的 Docking Score 如表 5 所示,由表可知,6 条低聚肽与 S 蛋白均有高亲和力 (Docking Score<-100),其中 LDFFK、LDFFKAL、FRVL、AGGKPFQ、SPFRVT 与 S 蛋白具有极高亲和力 (Docking Score<-140)。本团队前期以玉米、小麦、大豆、燕麦等 7 种植物为研究对象^[25],仅发现与

SARS-CoV-2 病毒亲和力高的低聚肽 (Docking Score<-140) 14 条,且亲和力最高的低聚肽 VQVVN Docking Score 仅为-152.4,其值高于本研究中的低聚肽 LDFFKAL (Docking Score=-169.68),说明本研究的石金钱龟低聚肽抑制 SARS-CoV-2 病毒活性的潜能更大。

此前,很多学者也发现了能抑制某些病毒的低聚肽序列。如: SainZ 等^[24]对抑制肽的研究中指出,有 Wimley-White 界面疏水性的低聚肽可以防止非典型肺炎病毒 (SARS-CoV) 融合宿主细胞膜的糖蛋白融合; Struck 等^[26]明确指出,六肽“YKYRYL”可以抑制 SARS-CoV 病毒与 ACE2 受体结合,从而防止细胞被感染; Zhao 等^[27]发现多肽“NGAICWGPCPTA FRQIGNCGHFKVRCCKIR”有较好的对抗 SARS-CoV 病毒和 MERSCoV 病毒的活性。

表 5 肽序列的 Docking Score 结果

Table 5 Docking Score of peptide sequences

NO.	Peptide	Peptide Ranker Score	Docking Score
1	LDFFK	0.85	-149.89
2	LDFFKAL	0.76	-169.68
3	FRVL	0.69	-152.05
4	AFRVL	0.66	-138.50
5	AGGKPFQ	0.65	-152.33
6	SPFRVT	0.56	-143.71

3 结论

本研究首先通过单因素实验和正交实验摸索了石金钱龟肉蛋白的最佳酶解条件制备出了石金钱龟低聚肽,其最佳酶解条件为:风味蛋白酶:木瓜蛋白酶=7:3、加酶量为 7%、pH 为 5.5、酶解时间为 4 h,此时的水解度为 42.56%,此水解度高于绝大多数同期的肉类水解的相关研究。然后,把石金钱龟低聚肽用 HPLC-MS 分离,结果导入 Peaks Studio 进行解析,可信度 (ALC>95%) 较高的低聚肽共 20 条,均为低聚肽。经过 Peptide Ranker 筛选得到 6 条低聚肽与 SARS-COV-2 棘突蛋白 (S 蛋白) 进行分子对接,低聚肽序列分别是 LDFFK、LDFFKAL、FRVL、AFRVL、AGGKPFQ、SPFRVT,其与 S 蛋白均表现出高亲和力 (Docking Score<-100), Docking Score 在 -138.50~-169.68 之间。其中, LDFFKAL 与 S 蛋白亲和力最高, Docking Score=-169.68。总的来说,经工艺优化后,本研究制得了水解度较高的石金钱龟肉酶解物,且从中筛选出的石金钱龟低聚肽与 S 蛋白的亲和力较高,有较强的抑制 SARS-COV-2 病毒作用的潜能,可作为 SARS-COV-2 病毒药物筛选的重点研究对象。

参考文献

- [1] Chen Yun, Guo Yao, Pan Yihang, et al. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 525(1): 135-145
- [2] Andrianov Alexander M, Kornoushenko Yuri V, Karpenko Anna D, et al. Computational discovery of small drug-like compounds as potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease [J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2021, 39(15): 235-237
- [3] Adeoye Akinwunmi O, Oso Babatunde Joseph, Olaoye Ige Francis, et al. Repurposing of chloroquine and some clinically approved antiviral drugs as effective therapeutics to prevent cellular entry and replication of coronavirus [J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2021, 39(10): 124-136
- [4] Faria Sergio, Teleschi João. Computational search for drug repurposing to identify potential inhibitors against SARS-COV-2 using molecular docking, QTAIM and IQA methods in viral spike protein - human ACE2 interface [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2021, 1232: 130076
- [5] Bernardi Austen, Huang Yihan, Harris Bradley, et al. Development and simulation of fully glycosylated molecular models of ACE2-Fc fusion proteins and their interaction with the SARS-CoV-2 spike protein binding domain [J]. *PloS One*, 2020, 15(8): 125-132
- [6] Walls Alexandra C, Park Young-Jun, Tortorici M Alejandra, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein [J]. *Cell*, 2020, 183(6): 153-164
- [7] Yuriev E, Holien J, Ramsland P A. Improvements, trends, and new ideas in molecular docking: 2012-2013 in review [J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2015, 28(10): 156-170
- [8] Hirayama N. Docking Simulations between drugs and HLA molecules associated with idiosyncratic drug toxicity [J]. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2016, 32(1): 31-39
- [9] 步营,何玮,王飞,等.基于分子对接技术从虾夷扇贝中筛选抗 SARS-CoV-2 活性肽研究[J].*食品科学技术学报*,2020, 38(4):54-62
- BU Ying, HE Wei, WANG Fei, et al. Screening research of anti-SARS-CoV-2 peptides from *Mizuhopecten yessoensis* base on molecular docking [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 38(4): 54-62
- [10] Padhi Srichandan, Sanjukta Samurailatpam, Chourasia Rounak, et al. A multifunctional peptide from bacillus fermented soybean for effective inhibition of SARS-CoV-2 S1 receptor binding domain and modulation of toll like receptor 4: a molecular docking study [J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021
- [11] YU Zhipeng, KAN Ruotong, JI Huizhuo, et al. Identification of tuna protein-derived peptides as potent SARS-CoV-2 inhibitors via molecular docking and molecular dynamic simulation [J]. *Food Chemistry*, 2021, 342: 1024-1036
- [12] 徐莹莹,赖年悦,石扬,等.中华草龟肉的营养成分分析及品质评价[J].*肉类工业*,2017,5:27-35
- XU Yingying, LAI Nianyue, SHI Yang, et al. Nutritional components analysis and quality evaluation of *Chinemys reevesii* tortoise meat [J]. *Meat Industry*, 2017, 5: 27-35
- [13] 王艳梅,万全,赖年悦,等.黄缘盒龟肉的酶解工艺优化及其体外抗氧化活性研究[J].*水产学报*,2013,4:623-629
- WANG Yanmei, WAN Quan, LAI Nianyue, et al. Optimization of enzymatic technology of yellow-margined box turtle muscle and antioxidant abilities of its hydrolysates *in vitro* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 4: 623-629
- [14] 何胜洁,毛新亮,张学武.金钱龟酶解低聚肽的分离、纯化及抗肿瘤活性研究[J].*现代食品科技*,2015,31(10):86-90
- HE Shengjie, MAO Xinliang, ZHANG Xuewu, et al. Study of the separation, purification, and anti-tumor activities of peptides prepared from enzymolyzed *Cuora trifasciata* meat [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(10): 86-90
- [15] Ahmet G, Esra G, Fatih Mehmet Y. Bioactive peptides derived from plant origin by-products: Biological activities and techno-functional utilizations in food developments - a review [J]. *Food Research International*, 2020, 136: 109-114
- [16] Catherine M, Haslam N J, Gianluca P, et al. Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity [J]. *Plos One*, 2012, 7(10): e45012
- [17] Pei Zhou, Bowen Jin, Hao Li. HPEPDOCK: a web server for blind peptide-protein docking based on a hierarchical algorithm [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46: W443-W452
- [18] 徐杰,林泽安,李子青,等.响应面法优化珍珠龙胆石斑鱼肉肽的酶法制备工艺及酶解产物的抗氧化活性[J].*食品工业科技*,2020,41(19):205-211
- XU Jie, LIN Zean, LI Ziqing. Optimization of enzymatic preparation process of peptides from pearl gentian grouper by response surface methodology and the antioxidant activity of

- the enzymatic hydrolysis products [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(19): 205-211
- [19] 张永进.中华草龟生物活性肽的制备及其体内外抗肿瘤作用研究[D].合肥:合肥工业大学,2015
ZHANG Yongjin. Preparation of bioactive peptides from Chinese pond turtle and their antitumor activity *in vitro* and *in vivo* [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2015
- [20] 陶美洁,孟粉,董焯,等.贻贝蒸煮液酶解工艺的优化[J].中国食品学报,2020,20(12):209-220
TAO Meijie, MENG Fen, DONG Ye, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions of mussel cooking liquor [J]. Chinese Journal of Food Science, 2020, 20(12): 209-220
- [21] 李军,罗娟,涂宗财,等.鲢鱼骨胶原低聚肽的制备及其抗氧化活性研究[J].食品与发酵工业,2020,46(2):222-230
LI Jun, LUO Juan, TU Zongcai, et al. Preparation of silver carp bone collagen polypeptide and its antioxidant activity [J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(2): 222-230
- [22] Vanessa Vermeirssen, John Van Camp, Willy Verstraete. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides [J]. British Journal of Nutrition, 2004, 92(3): 357-366
- [23] Hong Seong-Min, Tanaka Mitsuru, Koyanagi Riho, et al. Structural design of oligopeptides for intestinal transport model [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(10): 2072-2079
- [24] Sainz Bruno, Mossel Eric C, Gallaher William R, et al. Inhibition of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) infectivity by peptides analogous to the viral spike protein [J]. Virus Research, 2006, 120(1-2): 135-144
- [25] Zhen Luo, Keying Su, Xuewu Zhang. Potential of plant proteins digested *in silico* by gastrointestinal enzymes as nutritional supplement for COVID-19 patients [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2020, 75(4): 583-591
- [26] Anna-Winona Struck, Marco Axmann, Susanne Pfefferle, et al. A hexapeptide of the receptor-binding domain of SARS corona virus spike protein blocks viral entry into host cells via the human receptor ACE2 [J]. Antiviral Research, 2012, 94(3): 288-296
- [27] ZHAO Hanjun, ZHOU Jie, ZHANG Ke, et al. A novel peptide with potent and broad-spectrum antiviral activities against multiple respiratory viruses [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 22008

(上接第 152 页)

- [8] GB 5009.181-2016,食品安全国家标准食品中丙二醛的测定[S]
GB 5009.181-2016, National Food Safety Standard - Determination of Malondialdehyde in Food [S]
- [9] Krasulya O, Smirnova A, Bogush V, et al. Estimation of the stability of skeletal muscle myoglobin of chilled pork treated with brine activated by low-frequency high-intensity ultrasound [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 71: 105363
- [10] GB/T 22210-2008,肉与肉制品感官评定规范[S]
GB 4789.2-2016, Criterion for Sensory Evaluation of Meat and Meat Products [S]
- [11] 杨新磊.紫外处理与两种天然保鲜剂对冷却猪肉品质的影响研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2013
YANG Xinlei. Study on quality of chilled pork meat with UV-C treatment and two kind of natural preservative [D]. Xianyang: Northwest A & F University, 2013
- [12] NY/T 632-2002,冷却猪肉[S]
NY/T 632-2002, Chilled Pork [S]
- [13] Iulia Movileanu, Máryuri T Núñez de González, Brian Hafley, et al. Comparison of dried plum puree, rosemary extract, and BHA/BHT as antioxidants in irradiated ground beef patties [J]. International Journal of Food Science, 2013, 2013: 1-7
- [14] 赵莉君,赵改名,李苗云,等.冷藏调理川香鸡柳生产用抗氧化剂的筛选[J].现代食品科技,2020,36(8):160-165
ZHAO Lijun, ZHAO Gaiming, LI Miaoyun, et al. Comparison of different antioxidants on quality of pre-processed Sichuan-style chicken breast strips during refrigeration [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 160-165
- [15] 魏心如,李伟明,闫海鹏,等.冷却鸡肉肉色色差计评定方法标准化[J].食品科学,2014,35(24):189-193
WEI Xinru, LI Weiming, YAN Haipeng, et al. Standardization of color measurement of chilled chicken using colorimeter [J]. Food Science, 2014, 35(24): 189-193