

利用自建的活性肽数据库搜寻食物 蛋白质中潜在的生物活性肽*

黎观红 乐国伟 施用晖 乐小良

(江南大学食品学院, 无锡, 214036)

摘要 利用 Microsoft Office 2000 中的 Access 数据库软件建立了一个生物活性肽数据库, 该数据库系统由生物活性肽序列及其相关信息子库、常见食物蛋白质序列子库和蛋白水解酶信息子库构成。同时数据库中引入了序列比对和酶解位点预测等 2 个自编程序, 利用该程序可分别用来寻找蛋白质中存在的生物活性肽片段或可能含有具有某种功能的生物活性肽的蛋白质及寻找把蛋白质中潜在的生物活性肽从该蛋白质中释放出来的适宜的酶。该数据库还具有数据的输入、修改删除、查询检索等功能。

关键词 数据库, 生物活性肽, 食物蛋白质

现代营养学研究发现: 人类摄食蛋白质经消化道的酶作用后, 大多是以小肽形式消化吸收, 以游离氨基酸形式吸收的比例很小, 进一步的试验又揭示了小肽的吸收比游离氨基酸的吸收更为迅速^[1]。肽营养作用的另一新认识是, 蛋白质在酶解过程中可以产生一些具有特殊生理调节功能的生物活性肽。这些生物活性肽本身以非活性状态存在于蛋白质氨基酸序列之中, 当用适当的蛋白酶进行体外水解, 或在胃肠道消化过程中, 以及食品加工过程中, 它们就被释放出来并发挥生理调节作用^[2]。食物蛋白源生物活性肽是现代营养学及食品学研究的热点和极具发展前景的功能因子, 近年来受到广泛重视。目前已从各种食物蛋白的不同酶解产物中分离鉴定出阿片肽、血管紧张素转化酶抑制肽(降压肽)、免疫调节肽、抗菌肽、抗血栓肽、矿物元素吸收促进肽、降胆固醇肽等^[3,4]。在这些活性肽中有许多活性肽的组成氨基酸并不一定是必需氨基酸, 这就为人类更充分利用蛋白质资源尤其是那些原本认为生物价不高的蛋白质资源, 成为能更好满足人类保健需要的基料。

人们获取生物活性肽的方法有: 分离提取

存在于生物体内的各种天然活性肽, 通过化学法和酶法降解蛋白质生产活性肽; 化学合成生物活性肽; 利用 DNA 重组技术制取生物活性肽。其中, 酶解蛋白质生产活性肽安全性很高, 生产条件温和, 能在一定的条件下进行定位水解分裂产生特定的目的肽, 且水解过程容易控制, 因而能较好地满足活性肽生产的需要。在酶法降解蛋白质生产活性肽过程中, 蛋白质原料的选择是生产相应功能活性肽的基础, 而酶的选择是生产活性肽的关键^[5]。但由于事先不知道原料蛋白的一级结构(即组成蛋白质的氨基酸序列)以及酶的专一性, 当前的研究者往往需从大量的蛋白质和水解酶中进行筛选, 因而酶法生产活性肽往往存在一定的盲目性。然而, 随着生物信息学的发展及生物活性肽研究的深入, 越来越多的蛋白质一级结构及活性肽的氨基酸序列(与其是生物活性短肽)得到阐明, 这为从原料蛋白中寻找已知序列的生物活性肽提供了氨基酸序列基础。因此, 若能知道蛋白质序列中存在的活性肽片段及种类, 能够在理论上根据活性肽片段两端及其相连的氨基酸组成选择专一性的酶来定点水解获取目的肽。本研究的目的即在于回答食物蛋白质中含

第一作者: 博士研究生。

* 中央级科研院所科技基础性工作专项基金重点项目资助(No. 2001DEA20022)

收稿时间: 2003-10-15, 改回时间: 2003-12-09

有哪些潜在的活性肽片断,这些活性肽通过哪些酶可以定点水解出来。

1 建库目标

首先收集已知功能的生物活性肽序列和蛋白质序列数据,建成数据库,然后编写序列比对程序,通过与已知蛋白质或肽进行序列比对,来寻找蛋白质中存在的生物活性肽片段或可能含有具有某种功能生物活性肽的蛋白质。同时,在数据库中也收集蛋白水解酶数据,通过编写的程序,来寻找把蛋白质中潜在的生物活性肽从该蛋白质中释放出来的适宜的酶。

2 材料与方法

2.1 硬件与软件配备

硬件: Pentium 3 及以上兼容机,内存 64M 以上,硬盘 10G 以上,EGA 或 VGA 显示器。

软件: Windows98 操作系统、数据库平台系统采用 Microsoft Office 中的 Access 2000 数据库软件,开发软件采用 Visual Basic 6.0。

2.2 数据的收集与处理

2.2.1 数据的收集

生物活性肽序列、功能及其相关信息收集:从已公开发表的文献资料中收集主要活性肽的氨基酸序列、功能、活性数值、来源、主要的理化性质(等电点、分子量)参考文献等。活性肽的分子量及理论等电点通过相应的计算工具得到^[6]。在本数据库中,活性肽序列长度均在 12 肽以下,组成的氨基酸均为常见的 20 种 L 型氨基酸,而且氨基酸侧链不带任何修饰。本数据库中的生物活性肽包括血管紧张素转化酶抑制肽 325 种、免疫调节肽 147 种、阿片肽 76 种、抗血栓肽 35 种、抗氧化肽 31 种、脯氨酰内肽酶(EC 3.4.21.26)抑制肽(抗健忘因子)20 种、降胆固醇肽 11 种、抗炎肽 8 种、抗肿瘤肽 5 种、抗病毒肽 3 种。

蛋白质序列及其相关信息的收集:在互连网上从常用的蛋白质序列数据库 PIR 和 SWISS-PROT 中收集常见的植物蛋白和动物蛋白氨基酸序列及其相关信息,包括蛋白质及

其亚基名称、氨基酸序列、来源物种、参考文献等^[7,8]。

酶学数据的收集:在互连网上从常用的酶学数据库中收集主要的蛋白水解酶的相关信息,包括名称、来源、酶切位点、作用条件及其他相关信息等^[9]。

2.2.2 数据的处理

收集的原始数据信息杂乱、格式不规范,不能直接收入到数据库中。因此,在把数据输入到数据库之前,对其进行了规范化处理,根据系统的需要,把数据进行分类、统一格式,然后收集到 Access 数据库中。

2.3 数据库应用程序的开发

根据研究的要求,需要编写序列比对程序和寻找释放目的肽的酶的程序。对于这些应用程序的开发,采用 Visual Basic 6.0。对程序要求进行算法分析后,编写出可行可靠的程序段,然后进行调试、编译、数据库联接,最后开发出应用程序。

同时,也采用 Visual Basic 6.0 开发数据库管理系统,包括数据库信息的输入、浏览、检索以及相关辅助系统,从而开发出一个完整的数据库系统。

3 数据库的结构与功能

3.1 数据库系统结构

数据库含有 3 个核心子库(1)生物活性肽序列、功能及其他相关信息子库(2)蛋白质序列及相关信息子库(3)酶学数据子库。

系统使用关系式数据结构设计,使各个子信息库之间联系紧密。

3.2 数据库的功能及使用

通过本数据库,只要输入任一给定的蛋白质序列,就可通过数据库中的程序自动扫描数据库中所有的活性肽,并进行蛋白质序列与活性肽序列的比对,从而给出该蛋白质所包含的所有活性肽片断,给出活性肽片断在该蛋白质中的位置以及相应活性肽的信息如功能、氨基酸序列、分子量、等电点、参考文献等,然后根据活性肽两端及其相连的氨基酸组成从酶学数

据子库中找出能够水解释放相应活性肽的蛋白酶。数据库还具备数据库的最基本的功能——检索。通过该数据库,能够检索到生物活性肽和蛋白质的相关信息,为生物活性肽的进一步研究奠定了信息基础。同时数据库还具有数据的输入、修改、删除等功能。

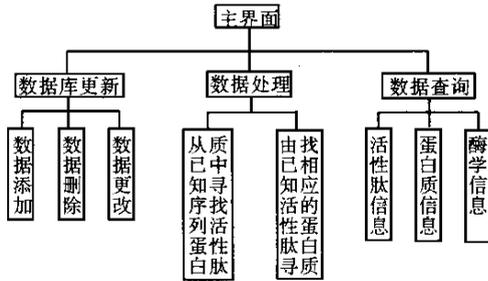


图1 数据库功能模块图

3.3 数据库系统的维护及扩充

数据库在以后的使用中会涉及到数据的改变和更新,所以,应该经常对数据库进行维护,以使数据库能够正常使用。数据库的数据还需充实,当数据达到一定的数量级时,就需要对数据库进行升迁和功能的完善,以便能够正常管理数据和使用。

4 讨论

生物活性肽的生产通常采用以下的方式:首先是利用蛋白水解酶对蛋白质进行水解;其次对产品进行分离;而后对分离的产品进行活性鉴定;最后是对有活性的产品进行结构解析,从而确定活性肽的氨基酸组成和序列。一般来讲还需通过人工合成相应的肽进行活性测定,以进一步确证上一步所分离鉴定出来的活性肽。通过本数据库,只要输入任一给定的蛋白质序列,就可通过数据库中的程序自动扫描数据库中所有的活性肽,并进行蛋白质序列与活性肽序列的比对,从而给出该蛋白质所包含的活性肽片段,给出活性肽片段在该蛋白质中的位置,然后根据活性肽两端及其相连的氨基酸组成从酶学数据子库中找出能够水解释放相应活性肽的蛋白酶。因此,本数据库对生物活性肽的生产具有一定的指导意义。

然而,由于蛋白质结构及蛋白质酶解过程

的复杂性,理论预测的结果与实际试验结果可能并不完全一致。例如,牛 β -乳球蛋白包含许多理论上能被胃蛋白酶水解的肽键,然而,该蛋白质能够抵抗胃蛋白酶的水解,这是因为 β -乳球蛋白形成致密的天然球状结构,由疏水性氨基酸形成的易被胃蛋白酶水解的肽键深埋在分子内部而不易与酶接触^[10]。另外,酶解作用的pH值、水解时间、温度以及其他条件均会影响目的活性肽的获得。因此,目的活性肽的酶解释放仍需通过试验进行评价,而且从蛋白质中释放出某些已知序列的活性肽常需要多种酶的联合作用,例如从小麦谷蛋白中释放出外啡肽(Gly-Tyr-Tyr-Pro-Thr)就是其中一例^[11]。

本数据库所收集的活性肽种类和数量比较有限,仅仅包含以前通过不同实验所获得的已知功能和序列的活性肽。本数据库只能预知蛋白质序列中隐含的已知功能和序列的活性肽片段。因此,蛋白质序列中很有可能包含本数据库未曾提到的其他新的活性肽片段,但新的活性肽只能通过试验才能得到。由此可知,所收集的活性肽种类和数量是影响本数据库质量的一个重要因素,必须不断地添加日后发现的活性肽到本数据库中,这样才能比较完整地预知蛋白质序列中所包含的活性肽的种类和数量。

参 考 文 献

- 1 Webb K E. Recent Developments in Gastrointestinal Absorption and Tissue Utilization of Peptides: A Review[J]. J Dairy Sci, 1993, 76: 351~361
- 2 Gobetti M, Stepaniak L, Angelis M D et al. Latent Bioactive Peptides in Milk Proteins: Proteolytic Activation and Significance in Dairy Processing[J]. Crit Rev Food Sci Nutri, 2002, 42: 223~239
- 3 Yoshikawa M, Fujita H, Matoba N et al. Bioactive Peptides Derived from Food Proteins Preventing Lifestyle-Related Diseases[J]. Biofactors, 2000, 12: 143~146
- 4 Dziuba J, Minkiewicz P, Nalecz D. Biologically Active Peptides Derived from Plant and Animal Proteins[J]. Pol Food Nutri Sci, 1999, 8: 3~16
- 5 程云辉,文新华. 生物活性肽制备的研究进展[J].

食品与机械, 2001, (4): 4~7

6 <http://www.expasy.org/tools/pi-tool.html>

7 <http://www.nbrf.georgetown.edu/pir/>

8 <http://www.expasy.org/sprot/>

9 <http://merops.sanger.ac.uk/>

10 Papiz M Z, Sawyer L, Eliopoulos E E et al. The Structure of Beta - lactoglobulin and Its Similarity to Plasma Retinol - binding Protein[J]. Nature , 1986 , 324 : 383 ~ 385

11 Fukudome S, Jinsmaa Y, Matsukawa T et al. Release of Opioid Peptides , Gluten Exorphins by the Action of Pancreatic Elastase. FEBS Lett[J], 1997 , 412 : 475 - 479

Searching for Latent Bioactive Peptides Encrypted in Food Proteins with Self-Constructed Database of Biologically Active Peptides

Li Guanhong Le Guowei Shi Yonghui Le Xiaoliang

(School of Food Science and Technology , Southern Yangtze University , Wuxi , 214036)

ABSTRACT By using Microsoft Access 2000 database software , a bioactive peptides database which was constructed which comprised three sub-database , ordinary food protein sequences sub-database and proteolytic enzyme information sub-database. Two self-developed programs provide flexibility in searching fragments of selected peptide or protein with the sequences of peptides from the database. Also it allows for searching enzyme that could hydrolysis the selected peptides. The daabase has functions for data input , data modification and deletion , query and search.

Key words database , bioactive peptides , food proteins

市场动态

国产食品添加剂出口竞争力增强

近年来 ,我国食品添加剂行业积极采用新技术 ,加强管理 ,提高产品质量 ,降低产品成本 ,同时 ,企业注重加强国际交流 ,改善形象 ,扩大国际销售渠道 ,使我国食品添加剂产品的国际市场竞争力逐渐增强。

在市场经济的浪潮中 ,食品添加剂行业经过优胜劣汰 ,很多企业停产。但留下来的企业采用高新技术 ,提高产品质量 ,赶超国际水平 ,从而提高了产品的国际市场竞争力。我国有很多食品添加剂品种在国际市场上占有优势 ,让国外企业刮目相看。

国家统计局公布的信息显示 ,食品添加剂行业若以最经常出口的 14 种产品为统计对象 ,1999 年出口额为 5.88 亿美元 ,比 1998 年的 4.97 亿美元增长 18.4% ,显示出其强劲的增长势头。我国食品添加剂产品除了传统出口的天然香精香料和中国特有的品种以外 ,一些新品种也显示出优良的出口竞争力。

1999 年我国年产柠檬酸 27 万 t ,出口 20 万 t ,产量和欧美相当 ,但出口量居世界第 1 位。在美国市场 ,ADM 公司生产的柠檬酸每磅售价 75 美分 ,而我国的同类产品售价仅 55 美分 ,有相当强的竞争力。

世界每年木糖、木糖醇的消费量为 2 万 t ,主要用于防龋齿食品的生产。我国年产木糖、木糖醇 1 万多 (能力为 3 万 t) ,出口约 1 万 t ,占世界贸易量的 50% ,是世界第一生产和出口大国。有些国家则从我国进口原料 ,再加工出口。

防腐剂山梨酸钾过去是我国进口的品种 ,现在我国能批量出口。美国是苯甲酸钠的消费大国。美国年消费苯甲酸钠 1 万 t ,我国年产 4 万 t 以上 ,出口 1 万多 t。

我国 1998 年产糖精 2.5 万 t 左右 ,出口 1 万多 t ,约占世界贸易量的 50%。

1999 年 ,我国 8 个骨干厂的乙基麦芽酚产量为 1 500t ,出口高达 1 200t ,占国际贸易量的 80%。

从以上几个食品添加剂品种的产量和出口量的数据可以看出 ,我国食品添加剂产品在国际市场上居于重要地位。