

## 血管紧张素转化酶抑制肽 Leu-Lys-Pro(LKP)抑制机理的研究

徐晓晴<sup>1</sup>, 周倩<sup>1</sup>, 孙建华<sup>1</sup>, 孙丽霞<sup>1</sup>, 冯学珍<sup>1,2</sup>, 徐永芳<sup>1</sup>, 童张法<sup>1</sup>, 廖丹葵<sup>1\*</sup>

1. 广西石油资源加工及过程强化技术重点实验室, 广西大学化学化工学院, 广西南宁 530000

2. 广西科技大学医学部, 广西柳州 545006

**摘要** 血管紧张素转化酶(ACE)是一种含锌离子的羧二肽酶,通过肾素-血管紧张素系统和激肽释放酶-激肽系统进行血压调节。食源性血管紧张素转化酶抑制肽(ACEIP)可抑制ACE的活性对高血压控制有利。以鳀鱼蛋白分离出的ACE抑制肽Leu-Lys-Pro(LKP)为原料,采用荧光光谱法、紫外-可见光谱法、圆二色谱法、等温滴定量热法(ITC)以及分子对接技术研究了LKP对ACE的抑制机理。荧光光谱结果表明,LKP能够有效猝灭ACE的内源荧光,猝灭机制为静态猝灭,两者结合可形成较稳定的复合物,ACE中色氨酸和酪氨酸残基所处的微环境疏水性减小,导致极性增强。紫外、圆二色谱结果表明,LKP与ACE结合会导致ACE构象发生改变,ACE与LKP结合后二级结构比未结合时松散,为紧密-松散-稍紧密的变化过程。ITC测得LKP与ACE结合的焓变( $\Delta H$ )、熵变( $\Delta S$ )、化学计量比( $n$ )以及结合常数( $K_a$ )等热力学参数,结果表明两者结合反应是由熵驱动的自发吸热过程,结合力主要为疏水作用,确定LKP与ACE相互作用的结合位点数约为1,且随温度升高而增加。LKP与ACE的结合常数 $K_a$ 分别为 $2.2 \times 10^3$ ,  $0.9 \times 10^3$ 和 $5.3 \times 10^3$ ,说明两者亲和力较小。分子对接结果表明,ACE活性中心的S<sub>1</sub>口袋的氨基酸残基Gln281, Lys511与LKP形成氢键相互作用,His353, His513与LKP具有疏水作用,LKP主要通过疏水作用与ACE结合,氢键稳定蛋白空间结构。该研究对了解ACE抑制肽与ACE的作用机制提供了一定的帮助,为开发新的治疗高血压药物建立一定的理论基础。

**关键词** 血管紧张素转化酶;抑制肽;光谱法;等温滴定量热;分子对接

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2022)07-2107-06

### 引言

高血压作为最常见的慢性病,对人类健康产生严重威胁,已成为全球重要的公共卫生问题<sup>[1]</sup>。血管紧张素转化酶活性过高会使血压升高,通过抑制血管紧张素转化酶(angiotensin-I converting enzyme, ACE)的活性降低血压已证明是治疗高血压的有效方法之一,ACE抑制剂类药物如卡托普利等具有较好的降压效果,但会引起咳嗽、皮疹等副作用<sup>[2]</sup>。近年来,从食源性蛋白中分离出多种ACE抑制肽,与化学合成的降血压药物相比,具有副作用小、吸收好等优点<sup>[3]</sup>,可在一定范围内有效改善调节血压。

以往研究多集中在ACE抑制肽的提取与鉴定,关于ACE与抑制肽在分子水平上相互作用的研究还处于起步阶段,而两者的作用机制研究是研发新药的基础。Yan等<sup>[4]</sup>通

过3D-QSRA、分子对接和分子动力学研究了C-末端为色氨酸的ACE抑制肽VKW与GTW和ACE相互作用,结果表明ACE-VKW复合物比ACE-GTW复合物更稳定,因此VKW与ACE具有更高的亲和力和活性。Lan等<sup>[5]</sup>利用光谱法、等温滴定量热及分子对接模拟研究了GF-6与ACE的相互作用机制,发现GF-6主要通过氢键作用结合在ACE非活性部位。迄今为止,仍有大量ACE抑制肽与ACE的作用机制缺乏研究。

荧光光谱、紫外-可见吸收光谱可以分析蛋白质大分子与小分子作用类型,分析蛋白质构象的改变,是研究分子间相互作用的重要方法<sup>[6]</sup>。圆二色谱可以表征蛋白质分子与小分子结合前后二级结构的改变。等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)可根据焓变与熵变的不同推测结合驱动力等信息,更加深入了解大分子与小分子结合的作用机制。分子对接可以有效分析蛋白质大分子与小分子的相互

收稿日期: 2021-06-23, 修订日期: 2021-12-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(51372043), 广西自然科学基金项目(2017GXNSFDA198052)资助

作者简介: 徐晓晴,女,1995年生,广西大学化学化工学院硕士研究生 e-mail: 892817910@qq.com

\* 通讯作者 e-mail: liaodankuigx@163.com

作用<sup>[7]</sup>。本工作采用多光谱法、等温滴定量热以及分子对接研究分析 ACE 与 LKP 相互作用机理,为 ACE 抑制肽的应用提供基础数据。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

试剂:猪肺 ACE 由本实验室自提( $1.23 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ),用 pH 7.0 HEPES 缓冲溶液(含  $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ )配制成  $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的储备液, LKP(纯度  $>98\%$ , 经实验验证  $\text{IC}_{50} 0.32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  由上海拜尔迪公司合成), 用上述缓冲液配制成  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的储备液。HEPES(上海麦克林公司), NaCl(四川成都科隆有限公司)。

仪器: Nano 等温滴定量热仪(美国 TA 公司); UV-2501PC 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); MOS-450 圆二色谱仪(法国 Biologi 公司); SF QY-9000 荧光分光光度计(北京卓立汉光仪器公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 荧光及紫外光谱分析

ACE 的浓度为  $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 加入不同浓度的 LKP, 以相应浓度的 LKP 溶液为参比, 设置激发波长为 280 nm, 激发与发射狭缝均为 5 nm, 在不同温度(288, 293 和 298 K)下, 扫描反应体系 300~500 nm 的发射光谱, 研究 LKP 对 ACE 的猝灭机制。

以相应浓度的 LKP 溶液为参比, 扫描 200~350 nm 的紫外吸收光谱, 研究在不同温度(288, 293 和 298 K)下, ACE-LKP 体系光谱变化规律。

#### 1.2.2 圆二色谱

ACE 的浓度为  $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 用 HEPES 缓冲液进行背景测试, 用 0.1 cm 比色皿测定 190~260 nm 的 CD 谱。研究 LKP 对 ACE 二级结构的影响。

#### 1.2.3 等温滴定量热

将 250  $\mu\text{L}$  ACE( $0.4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )溶液注入样品池, LKP( $2.8 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )装入注射器, 待温度(288, 293 和 298 K)稳定后, 开始向样品池中连续滴加 20 滴 LKP 溶液, 每滴 2.5  $\mu\text{L}$ , 研究 ACE 与 LKP 的相互作用。

#### 1.2.4 分子对接

使用软件 Auto Dock Vina 进行分子对接模拟。LKP 的结构使用 Chemdraw 生成并优化。ACE 的晶体结构在 Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>)下载。对接运行后获得具有最低结合能的构象。对接结果及相互作用力分析使用 PyMOL(De Lano Scientific LLC, USA)软件, 研究 LKP 与 ACE 结合机制。

## 2 结果与讨论

### 2.1 LKP 对 ACE 的荧光猝灭机制研究

ACE 的荧光主要是由色氨酸、酪氨酸以及苯丙氨酸残基发出, 在不同温度下, 不同浓度 LKP 与 ACE 作用的荧光光谱如图 1(a-c)所示。

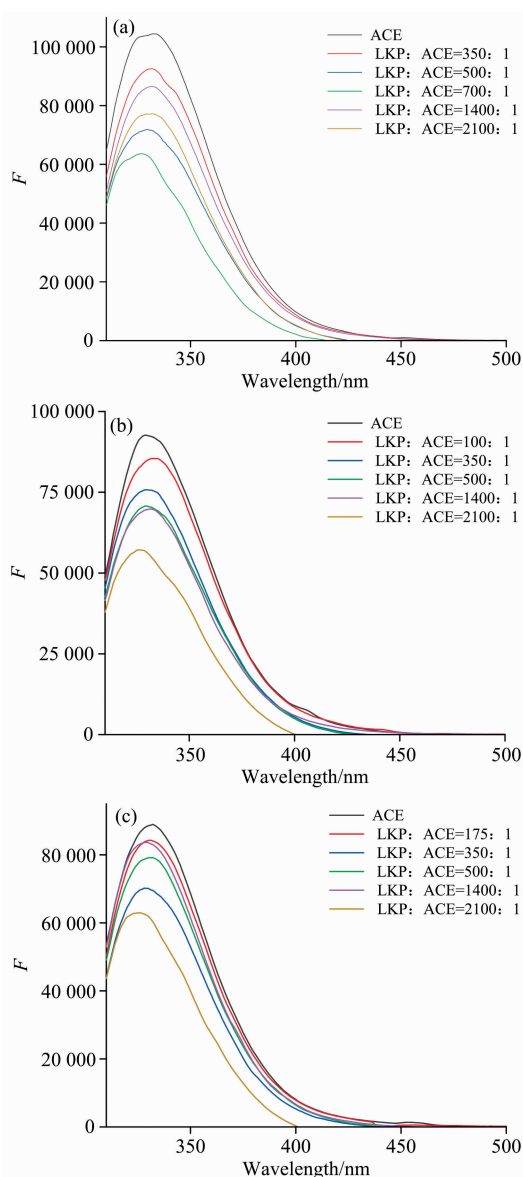


图 1 不同温度下 ACE 与 LKP 结合的荧光发射光谱  
(a)~(c): 288, 293, 298 K,  $c(\text{ACE}) = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 1 Fluorescence emission spectra of ACE with LKP at different temperatures

(a)~(c): 288, 293, 298 K,  $c(\text{ACE}) = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

由图 1 结果可知, 随着 LKP 浓度的增加, ACE 的荧光强度不断降低, 表明 LKP 能引起 ACE 的荧光猝灭, 荧光猝灭过程分为静态猝灭与动态猝灭<sup>[8]</sup>。做不同温度下  $F_0/F$  对  $[Q]$  的 Stern-Volmer 曲线<sup>[9]</sup> ( $F_0$ : 未加猝灭剂;  $F$ : 加猝灭剂荧光强度), 结果如图 2。

由表 1 可知, 随温度升高猝灭常数  $K_{sv}$  减小, 且  $K_q$  均远大于  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  ( $K_q$ : 猝灭过程速率常数)由此判断 LKP 对 ACE 的猝灭机制为静态猝灭。此外, 随 LKP 浓度的增加, ACE 最大发射峰位置先红移后蓝移, 说明 ACE 荧光生色基团所处的微环境发生改变。为进一步研究 LKP 对 ACE 蛋白空间构象的影响, 采用紫外-可见吸收光谱

和圆二色谱进行分析。

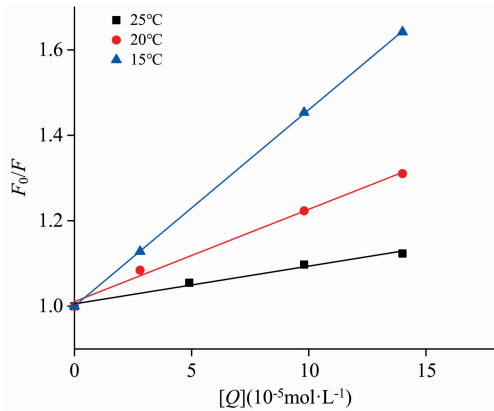


图 2 ACE 与 LKP 结合的 Stern-Volmer 图  
Fig. 2 The Stern-Volmer plots of ACE with LKP

表 1 不同温度下 ACE 与 LKP 结合的猝灭常数

Table 1 Quenching constants of ACE with LKP at different temperatures

T/ K	$K_{sv}/$ ( $10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	$K_q/$ ( $10^{12} \text{ L} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	$R^2$
288	4.6	4.6	1
293	2.1	2.1	0.994 8
298	0.8	0.8	0.984 8

## 2.2 LKP 对 ACE 结构的影响

### 2.2.1 紫外可见吸收光谱

不同温度下，ACE 与 LKP 结合的紫外可见吸收光谱如图 3(a-c)所示。

由图 3 可知，ACE 的吸收光谱具有两个吸收峰，221 nm 处的强吸收峰为肽主链的特征峰，280 nm 处的弱吸收峰为芳香族氨基酸的特征峰<sup>[10]</sup>。随着 LKP 浓度的升高，ACE 的吸收光谱发生减色效应，221 nm 吸收峰红移，温度越高移动越明显，分析认为 LKP 的  $\pi^*$  空轨道与 ACE 分子上氨基酸残基的  $\pi$  电子轨道之间发生偶合，导致能级下降<sup>[11]</sup>，以及芳香族氨基酸残基所处的微环境发生改变<sup>[12]</sup>。由此说明 ACE 与 LKP 结合生成复合物，使 ACE 的构象改变。

### 2.2.2 圆二色谱

不同的二级结构产生的圆二色谱 CD 谱带的位置以及吸收强弱都是不同的<sup>[13]</sup>。为进一步了解 LKP 对 ACE 蛋白构象的影响，测量 LKP 与 ACE 结合的 CD 光谱，结果如图 4 所示。

采用 CDpro 软件对 CD 数据进行分析，ACE 的二级结构含量由大到小依次是：无规则卷曲， $\beta$ -折叠， $\beta$ -转角， $\alpha$ -螺旋。其中  $\alpha$ -螺旋含量由 10.8% 降至 0.1% 后上升至 10.2%； $\beta$ -折叠由 22.9% 升至 38.8% 后降到 34.8%； $\beta$ -转角由 13.8% 降至 9.5% 后升到 11%；无规则卷曲由 49.4% 升至 50.8% 后降至 41.5%。说明当 LKP 含量较少时，ACE 的二级结构是由  $\alpha$ -螺旋逐渐向  $\beta$ -折叠与无规则卷曲结构转变，说明 ACE 肽链结构逐渐舒展，结构变得松散；LKP 逐渐增加后，肽链结构又进行了折叠收缩，结构变得紧密，最终 ACE 的空间结

构比未加入 LKP 时松散，表明 LKP 能够使 ACE 的二级结构发生显著变化，原因可能为 LKP 与 ACE 结合使蛋白质原有的氢键网络结构发生改变，引起肽链的重排，从而导致空间构象的改变。

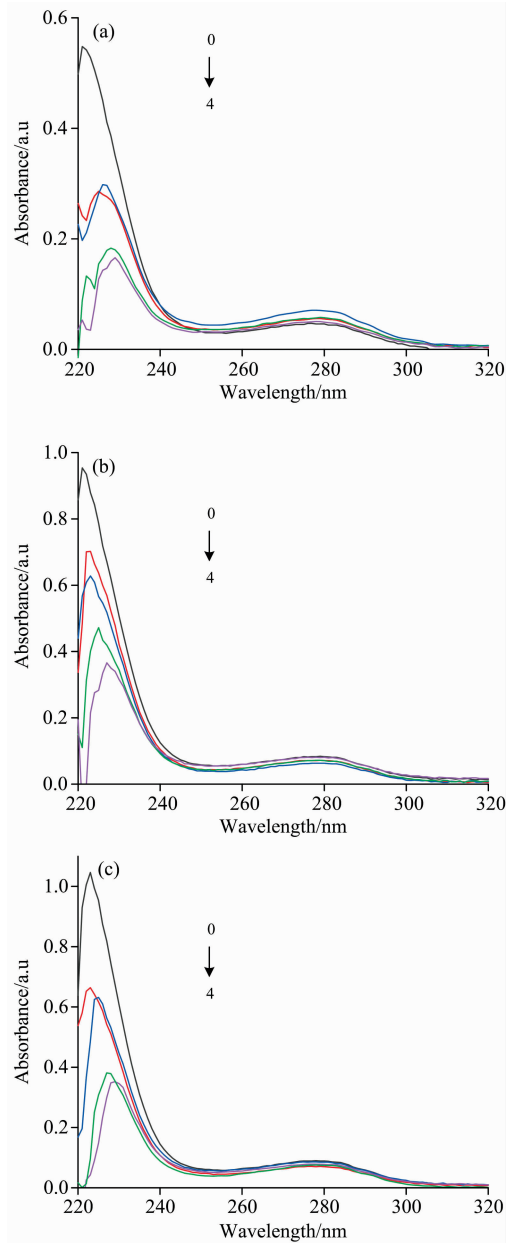


图 3 不同温度下 ACE 与 LKP 结合的紫外吸收光谱

(a)–(c): 288, 293, 298 K,

$c(\text{ACE}) = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,

$c(\text{LKP})(0-4)$ : 0, 0.28, 1.4, 2.8,  $4.2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 3 UV absorption spectra of ACE with LKP at different temperatures

(a)–(c): 288, 293, 298 K,

$c(\text{ACE}) = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,

$c(\text{LKP})(0-4)$ : 0, 0.28, 1.4, 2.8,  $4.2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

## 2.3 LKP 与 ACE 的热力学参数及作用力类型

LKP 与 ACE 作用的等温滴定热曲线图如图 5(a-c)，

采用 NanoAnalyze 软件分析得到的热力学参数列于表 2。

由公式  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  可知, 吉布斯自由能的变化  $\Delta G$  包括两个部分, 即焓变项( $\Delta H$ )和熵变项( $-T\Delta S$ )。由表 2 结果可知,  $\Delta G < 0$  证明反应具有自发性,  $\Delta H > 0$  说明 LKP 与 ACE 的结合过程是吸热的。 $\Delta S$  值大说明有较大的疏水作用, 因此结合力主要表现为疏水作用力。三个温度下,  $|-T\Delta S| > |\Delta H|$ , 说明 LKP 与 ACE 的结合主要以熵驱动为主,  $\Delta C_p$  为较大的负值, 说明 LKP 与 ACE 结合属于非刚性结合, 结合过程中 ACE 表面的疏水基团被亲水基团包埋, 蛋白质产生的空间构象变化使得表面的结合位点不能再和抑制肽结合。288 K 时, LKP 与 ACE 的结合位点数为 0.131, 与另外两个温度的结果差异较大是因为温度较低导致 ACE 失活严重, 因此与 LKP 的结合位点数较小。随着温度的升高, 结合位点数逐渐增大, 温度升高会使 ACE 的空间构象发生变化, ACE 的肽链伸展, 使氨基酸残基暴露出来, 更有利于与 LKP 的结合。

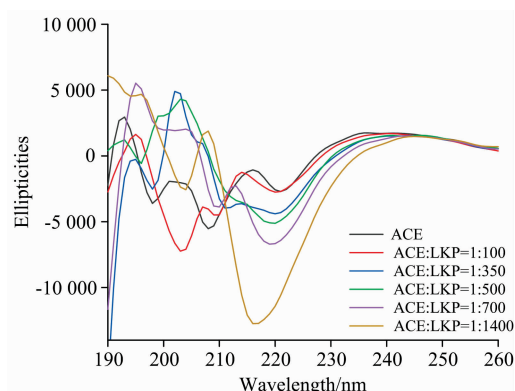


图 4 ACE 与 LKP 结合的圆二色谱图

298 K,  $c(\text{ACE}) = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 4 CD spectra of ACE with LKP

298 K,  $c(\text{ACE}) = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

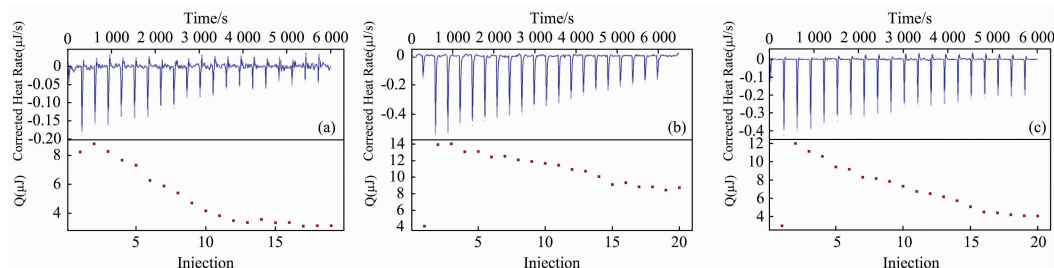


图 5 不同温度下 LKP 滴定 ACE 的热流曲线图

(a)–(c): 288, 293, 298 K,  $c(\text{ACE}) = 0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $c(\text{LKP}) = 2.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 5 The heat flow of binding LKP to ACE

(a)–(c): 288, 293, 298 K,  $c(\text{ACE}) = 0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $c(\text{LKP}) = 2.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

表 2 LKP 与 ACE 结合的热力学参数

Table 2 Thermodynamics parameter of binding of LKP and ACE

T/ K	n	$K_a$ / ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	$\Delta H$ / ( $\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	$\Delta C_p$ / ( $\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )	$\Delta G$ / ( $\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	$-T\Delta S$ / ( $\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )
288	0.131	$2.2 \times 10^3$	1 890		-18.425 9	-1 908.43
293	1.323	$0.9 \times 10^3$	1 118	-99.4	-16.571	-1 134.57
298	1.727	$5.3 \times 10^3$	895.8		-21.260 3	-917.06

实验结果表明, LKP 与 ACE 的结合位点数约为 1, 与 ACE 的抑制剂卡托普利、依那普利等的结合位点数相近, 但 LKP 与 ACE 的结合常数都远小于卡托普利、依那普利等抑制剂与 ACE 的结合常数<sup>[14]</sup>。卡托普利、依那普利等药物的分子结构中的官能团能够和锌离子结合形成稳定的多面体结构, 这个作用过程对亲和力的影响非常大<sup>[15]</sup>。说明 LKP 是与活性中心的结合口袋发生作用, 没有和锌离子结合。综上所述, LKP 与 ACE 的活性中心结合作用, 反应为自发进行的吸热过程, 主要驱动力为熵驱动, 结合作用力为疏水作用力。

#### 2.4 分子对接

选择 tACE 作为蛋白质大分子, 以锌离子为中心设置结合口袋中心, 调整结合口袋体积, 对接盒子范围为 ( $40 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA}$ )。LKP 与 ACE 的对接结果如图 6(a,b)所示, 结

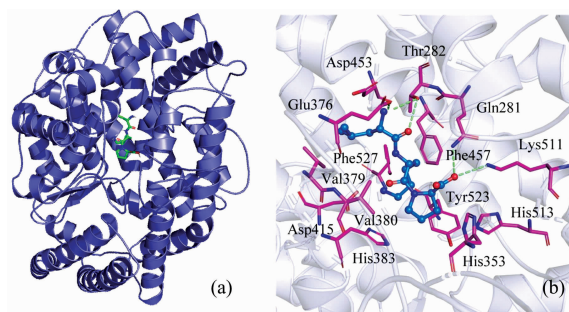


图 6 LKP 与 ACE 的分子对接

(a): LKP 与 ACE 的对接模型;

(b): LKP 与 ACE 分子上氨基酸残基的相互作用

Fig. 6 The docking simulation of LKP binding to ACE

(a): The docking simulation of LKP binding to ACE;

(b): The interaction between LKP and the residues of ACE is shown

构能量为 $-7.5 \text{ kcal} \cdot \text{m}^{-1}$ 。

ACE主要的活性位点由3个口袋组成,  $S_1$  (Gln281, Lys511, His353, His513)、 $S_2$  (Glu 384, Ala 354, Tyr 523)和 $S'_1$  (Glu 162), 由图6(b)可知, 氨基酸残基 Thr282, Glu376, Gln281, Lys511与LKP分子形成氢键相互作用, 氨基酸残基 Asp453, Phe457, Tyr523, His513, His353, His383, Val380, Asp415, Val379, Phe527与LKP小分子形成疏水相互作用, 其中 $S_1$ 口袋中的四个氨基酸残基均和LKP分子有作用, 氨基酸残基 Gln281, Lys511与LKP形成氢键相互作用, His353, His513与LKP具有疏水作用, 从结果可以看出LKP与ACE的氨基酸残基主要是通过疏水作用结合, 氢键的形成有利于稳定蛋白质的空间构象, 与ITC的实验结果相符。

### 3 结 论

通过多光谱法结合等温滴定量热实验、分子对接等方法研究LKP与ACE相互作用。荧光光谱表明LKP通过静态猝灭机制有效猝灭ACE的内源荧光。紫外可见吸收光谱、圆二色谱实验表明, 在抑制肽LKP的作用下, ACE二级结构比未加入LKP时疏松, LKP对ACE的空间构象具有显著影响。ITC实验结果表明, LKP与ACE为非刚性结合, 是由熵驱动的发吸热反应, 主要作用力为疏水作用。分子对接模拟表明LKP通过疏水作用与ACE在活性中心 $S_1$ 口袋进行结合。本研究有助于了解ACE与其抑制肽相互作用机理, 为开发新的治疗高血压药物提供基础数据。

### References

- [1] Bundy J D, He J. *Annals of Global Health*, 2016, 82(2): 227.
- [2] Qiao W J, Zhang X Y, Kan B, et al. *Open Medicine*, 2021, 16(1): 149.
- [3] Zheng Y J, Wang X, Zhuang Y L, et al. *Journal of Food Science*, 2020, 85(4): 1328.
- [4] Yan W, Lin G, Zhang R, et al. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 304: 112702.
- [5] Lan X, Sun L, Muhammad Y, et al. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 2018, 66(51): 13414.
- [6] Li X, Jiang H, Pu Y, et al. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 2019, 67(51): 14066.
- [7] Pinzi L, Rastelli G. *International Journal Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4331.
- [8] TUO Xun, SONG Ji-min, FU Hao, et al(庾 浔, 宋继敏, 付 豪, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2021, 41(5): 1487.
- [9] Fu Y, Alashi A M, Young J F, et al. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 101: 207.
- [10] Khatun S, Riyazuddeen, Qais F A. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 299: 112124.
- [11] Wang L, Dong J, Li R, et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 230: 118044.
- [12] Zhang L, Liu Y, Wang Y. *Food Chemistry*, 2019, 301: 125294.
- [13] Qi X, Xu D, Zhu J, et al. *Food Hydrocolloids*, 2021, 113: 106513.
- [14] Liao P Y, Lan X D, Liao D K, et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(27): 7015.
- [15] Bhat Z F, Kumar S, Bhat H F. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(3): 566.

# Study on the Inhibition Mechanism of Angiotensin Conversion Enzyme Inhibitor Peptide Leu-Lys-Pro (LKP)

XU Xiao-qing<sup>1</sup>, ZHOU Qian<sup>1</sup>, SUN Jian-hua<sup>1</sup>, SUN Li-xia<sup>1</sup>, FENG Xue-zhen<sup>1,2</sup>, XU Yong-fang<sup>1</sup>, TONG Zhang-fa<sup>1</sup>, LIAO Dan-kui<sup>1\*</sup>

1. Guangxi Key Laboratory of Petrochemical Resource Processing and Process Intensification Technology, School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530000, China

2. Department of Medicine, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China

**Abstract** Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) is a zinc-containing carboxydipeptidase that regulates blood pressure through renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems. The ACE inhibitory peptide (ACEIP) derived from food protein could inhibit the activity of ACE, which is beneficial to antihypertension. In this paper, the inhibition mechanism of the inhibitory peptide LKP from bonito fish on ACE was studied by using fluorescence spectra, ultraviolet absorption spectra, circular dichroism (CD), and isothermal titration calorimetry (ITC) and molecular docking. The fluorescence spectra showed that LKP could effectively quench the endogenous fluorescence of ACE, and the quenching mechanism was static quenching by the formation of a relatively stable complex LKP-ACE. The microenvironment around the tryptophan and tyrosine residues in ACE was localized, decreased the hydrophobicity, and enhanced the polarity. The results of UV and CD showed that the combination of LKP and ACE would lead to the conformation change of ACE. After the addition of LKP, the secondary structure of ACE became looser, and the structural changes of a tightness, loosening and slightly tighter have taken place during the interaction process. The thermodynamic parameters such as enthalpy change ( $\Delta H$ ), entropy change ( $\Delta S$ ), stoichiometric ratio ( $n$ ) and binding constant ( $K_a$ ) of the interaction between LKP and ACE were obtained by the ITC method. The results showed that the binding reaction of LKP and ACE was a spontaneous endothermic process driven by entropy, and the binding force was mainly hydrophobic. The stoichiometric ratio ( $n$ ) value was determined to be about 1, which was enhanced with increasing temperature. At 288, 293 and 299 K, the binding constants  $K_a$  of LKP and ACE were  $2.2 \times 10^3$ ,  $0.9 \times 10^3$  and  $5.3 \times 10^3$ , respectively, indicating the affinity of LKP and ACE was relatively low. The results of molecular docking showed that the amino acid residues Gln281 and Lys511 in the  $S_1$  pocket of the ACE active center could form two hydrogen bonds with LKP, and hydrophobic interaction could have occurred between His353 and His513 and LKP, LKP bond to ACE mainly through hydrophobicity, and hydrogen bonds stabilized the spatial structure of the protein. This study provides certain help for exploring the interaction between ACE inhibitory peptide and ACE and offers some theoretical basis for the development of new hypertension drugs.

**Keywords** Angiotensin I-converting enzyme (ACE); Inhibitory Peptides; Spectroscopic method; Isothermal titration calorimetry; Molecular docking

(Received Jun. 23, 2021; accepted Dec. 9, 2021)

\* Corresponding author