

大鳞副泥鳅蛋白 ACE 抑制肽的分离纯化与鉴定

Isolation, purification and identification of ACE inhibitory peptide from *Paramisgurnus dabryanus* protein

董婧琪¹ 何泽贺² 田桂芳² 邵娟娟¹ 吴小禾³

DONG Jing-qi¹ HE Ze-he² TIAN Gui-fang² SHAO Juan-juan¹ WU Xiao-he³

(1. 河北农业大学理工学院, 河北 沧州 061000; 2. 河北农业大学食品科技学院,

河北 保定 071000; 3. 中山火炬职业技术学院, 广东 中山 528436)

(1. College of Technology, Agricultural University of Hebei, Cangzhou, Hebei 061000, China;

2. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China;

3. Zhongshan Torch Vocational and Technical College, Zhongshan, Guangdong 528436, China)

摘要:目的:开发大鳞副泥鳅的 ACE 抑制肽。方法:采用超滤、葡聚糖凝胶(Sephadex G-15)和半制备型高效液相色谱等多种技术,从大鳞副泥鳅蛋白酶解产物中分离纯化制备了高活性的 ACE 抑制肽,并利用高效液相色谱质谱—串联质谱对其结构进行解析;利用抑制动力学分析纯化后 ACE 抑制肽的抑制模式。结果:高活性 ACE 抑制肽的氨基酸序列为 Glu-Gly-His, 相对分子质量 345.2 Da, IC₅₀ 值为 (17.89 ± 3.28) μg/mL, 纯化倍数为 27.47。结论:大鳞副泥鳅抑制肽是一种竞争性的 ACE 抑制肽。

关键词:大鳞副泥鳅; ACE 抑制肽; 分离纯化; 结构鉴定; 抑制作用

Abstract: Objective: This study aimed to develop ACE inhibitory peptide of *Paramisgurnus dabryanus*. **Methods:** Ultrafiltration, Sephadex G-15 and RP-HPLC were used to isolate and purify ACE inhibitory peptides from the proteolysis products of *P. dabryanus*, and their structures were analyzed by HPLC-MS/MS. The inhibitory mode of purified ACE inhibitory peptide was analyzed by inhibition kinetics. **Results:** The amino acid sequence of ACE inhibitory peptide was Glu-Gly-HIS, the relative molecular weight was 341.2 Da, the IC₅₀ value was (17.89 ± 3.28) μg/mL, and the purification ratio was 27.47. **Conclusion:**

基金项目:河北省重点研发计划项目(编号:21327107D);河北省现代农业产业技术体系淡水养殖创新团队建设项目(编号:HBCT2018180206);河北农业大学渤海校区协同创新项目(编号:2021-BHXT-06)

作者简介:董婧琪,女,河北农业大学在读本科生。

通信作者:吴小禾(1977—),男,中山火炬职业技术学院副教授,博士。E-mail:7931990@qq.com

收稿日期:2021-09-30 **改回日期:**2022-09-20

The inhibitory peptide of *P. dabryanus* is a competitive ACE inhibitory peptide.

Keywords: *Paramisgurnus dabryanus*; ACE inhibitory peptide; isolation and purification; structure identification; inhibition

高血压是脑血管病的重要表现特征之一,也是治疗脑血管病的重要指标^[1]。血管紧张素转化酶(ACE)因破坏肾素—血管紧张素系统与激肽释放酶—激肽系统之间的平衡而直接引起机体的高损伤^[2],在血压的调控中起到重要作用^[3]。降低 ACE 活性可以有效降低血压,但是现阶段的降压药物大多是合成类的 ACE 抑制剂,如卡托普利、阿克拉普利和依那普利等抑制剂。而使用合成类降压药后可能出现咳嗽、皮疹和头痛等不良反应,所以目前合成类降血压药物的使用受到限制^[4]。此外,已证实从食物中获得的抗高血压肽对高血压病人具有降压效果,而且没有毒副作用^[5]。

大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)为重要的淡水型鱼类之一^[6],属高蛋白低脂肪食品。大鳞副泥鳅蛋白有多种生物活性,ACE 抑制活性是其主要活性之一。目前 ACE 抑制肽的制取方法主要是酶法,而单一的酶类通常具有一定的局限性。何泽贺等^[7]对于复合酶法提取泥鳅中 ACE 抑制肽进行了研究,但未进一步进行分离纯化与鉴定的研究。研究拟采用胰氨酸蛋白酶和碱性蛋白酶的复合酶解法制取大鳞副泥鳅制备 ACE 抑制肽,并对其进一步的分离纯化与鉴定,旨在为大鳞副泥鳅的 ACE 抑制肽开发利用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

大鳞副泥鳅:单只重量约 35~45 g,河北农业大学

市场;

碱性蛋白酶:1 万 U/g,美国 Sigma 公司;

脯氨酸蛋白酶:25 U/g,夏盛(北京)生物科技开发有限公司;

血管紧张素转化酶:1 000 U/g,美国 Sigma 公司;

三羟甲基氨基甲烷(纯度 $\geq 99.8\%$)、三(羟甲基)甲基甘氨酸(纯度 $\geq 99.0\%$):分析纯,美国 Sigma 公司;

氢氧化钠(纯度 $\geq 96.0\%$)、盐酸(36.0%~38.0%)、氯化钠(纯度 $\geq 99.5\%$):分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

绞肉机:JYL-C020E 型,九阳股份有限公司;

冷冻干燥机:Beta1-8 LD plus 型,德国 Marin Christ 公司;

水浴恒温振荡器:SHA-B 型,江苏正基仪器有限公司;

冷冻离心机:5418 R 型,德国艾本德公司;

涡旋混匀仪:MIX1000 型,广东佛衡仪器有限公司;

紫外可见分光光度计:UV752N 型,上海元析仪器有限公司;

超滤:80EL005 型,密理博(中国)有限公司;

恒流泵:HL-2 型,上海青浦沪西仪器厂;

反向高效液相色谱仪:1260 型,安捷伦科技有限公司;

质谱仪:Orbitrap Elite 型,赛默飞世尔科技公司。

1.3 试验方法

1.3.1 大鳞副泥鳅蛋白酶解液的制备 大鳞副泥鳅清洗后,热烫约 30 s 去除黏液,经处理后得泥鳅肉糜,-20 °C 冷冻贮藏。将常温解冻的肉糜与磷酸缓冲溶液(pH 7.0, 0.1 mol/L)制备成质量分数 10% 的匀浆^[8],并使用均质机均质。然后用碱性蛋白酶(1 000 U/g)与脯氨酸蛋白酶(5 U/g)在 40 °C 条件下^[9],同步酶解大鳞副泥鳅蛋白 3 h,沸水浴 10 min,10 000 r/min 离心 20 min,取上清即得到大鳞副泥鳅的酶解物(PDH)。然后对 PDH 进行冻干(冷阱温度-55 °C,抽气速率 5 L/s)处理,在干燥器中贮藏备用。

1.3.2 超滤 将冻干的 PDH 溶解在蒸馏水中,并使用超滤进行分级分离,该系统的截留分子量膜范围为 10,5,3,1 kDa。首先使用 10 kDa 超滤膜对 PDH 进行超滤,以生成截留液(PDH-I)和渗透液。将 10 kDa 的渗透液在 5 kDa 的超滤膜上进一步分离,获得 5 kDa 截留液(PDH-II)和渗透液。然后将 5 kDa 渗透液在 3 kDa 超滤膜上分离得到截留液(PDH-III)和渗透液,将 3 kDa 渗透液在 1 kDa 的超滤膜上分离,获得 1 kDa 的截留液(PDH-IV)

和渗透液(PDH-V)。分别收集所得的 PDH-I (>10 kDa)、PDH-II (10~5 kDa)、PDH-III (5~3 kDa)、PDH-IV (3~1 kDa)和 PDH-V (<1 kDa)组分并冻干,备用。

1.3.3 葡聚糖凝胶过滤层析 利用 Sephadex G-15 层析柱(1.6 cm×80 cm)对所获得的 PDH-I、PDH-II、PDH-III、PDH-IV 和 PDH-V 组分中 ACE 抑制活性最高的组分进行纯化。上样液质量浓度为 30 mg/mL,以 0.5 mL/min 流量用蒸馏水洗脱,收集洗脱液(3 mL/管),并利用在 280 nm 处测量的吸光度进行监测。收集各级分,使用旋转蒸发器对各级分进行浓缩,并冷冻干燥,备用。

1.3.4 制备型高效液相色谱分离纯化 使用安捷伦 XSelect® peptide CSHTMC₁₈ 色谱柱(19 mm×150 mm)进行纯化。A 相:体积分数 0.1% TFA 纯乙腈;B 相:体积分数 0.1% TFA 水溶液。洗脱条件:A,0~10%,持续 20 min,上样量 800 μ L,柱温 30 °C,流量 17 mL/min,检测波长 280 nm。多次上样并收集不同级分,进行浓缩处理,通过冷冻干燥后保存,并测定其 ACE 抑制活性。使用与上述相同的条件对活性最高的组分进行第二次 RP-HPLC 纯化。所得纯化的肽用于质谱分析。

1.3.5 ACE 抑制肽一级结构的质谱测定 将 1.3.4 制得的样品利用 Orbitrap Elite 质谱仪(Thermo Scientific)进行检测,色谱柱为 Thermo Scientific 的 C₁₈ 散装材料填充柱(100 μ m×2 cm)和 C₁₈ 分离毛细管柱(75 μ m×15 cm)。将肽重悬于缓冲液 A(体积分数 0.1% 甲酸的水溶液)中,装到预柱上,用分离柱分离,线性梯度为 7%~35% 缓冲液 B(含有体积分数 0.1% 甲酸的乙腈),然后进行 LC-MS/MS 分析。离子化方式:ESI;电压 2 200 V;以数据依赖模式进行采集,在 FT 模式下以 120 000 的分辨率进行全面 MS 扫描(m/z 300~1 700),然后对 15 个最丰富的离子进行碰撞诱导解离(CID)MS/MS 扫描。自动增益控制(AGC)目标对于 Orbitrap 扫描为 1e6 离子,对于 MS/MS 扫描为 5e4 离子。动态排除参数:隔离窗口, m/z 2,重复计数 1,重复持续时间 25 s,排除时间 25 s。

1.3.6 ACE 抑制模式鉴定 分别将 0.000,0.025,0.050,0.075 mg/mL 的 ACE 抑制肽添加到 0.5,1.0,2.0 mg/mL 的 FAPGG 底物的反应混合物中与 ACE 反应,然后测定 ACE 的抑制活性。通过 Lineweaver-Burk 图研究抑制剂存在下的 ACE 抑制模式, Lineweaver-Burk 图基于反应速率(1/V)和底物浓度(1/S)关系的倒数图。

1.3.7 肽得率的测定 按体积比 1:1 将 5% 的三氯乙酸与蛋白酶水解液混匀,6 000 r/min 离心 10 min,采用考马斯亮蓝法,对上清液中可溶性蛋白含量进行测定,按式(1)计算短肽得率^[10]。

$$N_{\text{sl.TCA}} = \frac{N_1}{N_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

$N_{\text{sl.TCA}}$ ——三氯乙酸可溶性氮得率, %;

N_1 ——在 5% TCA 中的可溶性蛋白质质量, mg;

N_2 ——PDH 中的可溶性蛋白质质量, mg。

1.3.8 ACE 抑制率测定 向微孔板的微孔中分别加入 10 μL 的 ACE 溶液和 10 μL 蛋白水解液, 再添加 150 μL 底物(1.0 mmol/L FAPGG 与 50 mmol/L 的 Tris-HCl 混匀, NaCl 浓度为 0.3 mol/L), 然后立刻将微孔板放入预热到 37 $^{\circ}\text{C}$ 的酶标仪中, 在 340 nm 下测定 20 次吸光值, 每次间隔 1 min。作为空白对照, 以吸光值($A_{340\text{nm}}$)为横坐标, 时间为纵坐标作曲线, 计算斜率, 通常取 10 ~ 20 min 的斜率来计算。按式(2)计算 ACE 抑制率。

$$A_{\text{CE},1} = \left(1 - \frac{\Delta A_1}{\Delta A_B}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

$A_{\text{CE},1}$ ——ACE 抑制率, %;

ΔA_1 ——添加抑制剂时的斜率;

ΔA_B ——空白对照的斜率。

IC_{50} 为抑制 50% ACE 活性时所需酶解样品的质量浓度。 IC_{50} 定义为 ACE 抑制率达 50% 时的多肽质量浓度 (mg/mL), 用 SPSS 13.0 统计软件的概率单位法 (probit) 计算。

1.4 数据处理与分析

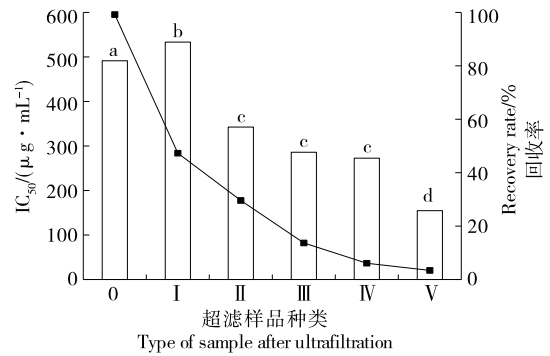
采用 Means \pm SD 表示试验数据, 通过 SPSS 13.0 统计分析软件做方差分析 (ANOVA), 并进行 Duncan 的新多范围测试, 以确定其显著差异。

2 结果与分析

2.1 PDH 的超滤分离

在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下, 用碱性蛋白酶和脯氨酸蛋白酶同步酶解大鳞副泥鳅蛋白 3 h 后, 所得酶解产物具有最高 ACE 抑制活性。大鳞副泥鳅蛋白酶解产物 (PDH) IC_{50} 为 (491.45 \pm 15.11) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。而 IC_{50} 值越低, ACE 抑制活性越高。

采用 10, 5, 3, 1 kDa 的超滤膜对 PDH 进行分离, 如图 1 所示, 5 种组分中, 分子量 < 1 kDa 的 PDH-V 表现出最高的 ACE 抑制活性, IC_{50} 值为 (154.70 \pm 7.35) $\mu\text{g}/\text{mL}$; 而分子量 > 10 kDa 的 PDH-I 的活性最低, IC_{50} 值为 (533.45 \pm 12.89) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 与 Li 等^[1] 研究结果相符合。分析目前国内外对于食源性 ACE 的研究, 大部分 ACE 抑制肽的氨基酸个数低于 10, 分子量小, 这是分子量 < 1 kDa 的超滤膜分离所得的 ACE 抑制肽活性最高的原因之一。此外, 还有可能由于酶解过程中引入大分子杂质, 从而影响 ACE 抑制肽与 ACE 的结合, 在使用较大分子



小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 1 大鳞副泥鳅蛋白酶解产物的不同超滤组分的血管紧张素转化酶抑制活性值和回收率

Figure 1 Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity and recovery rates of different ultrafiltration components of *P. dabryanus* protein

量超滤膜时不能充分将其滤去, 造成所得组分表现的 ACE 抑制活性有所降低。

由此可得, PDH 的 ACE 抑制活性主要取决于其分子量, 其 ACE 抑制活性随 PDH 分子量的降低而增加。而超滤是去除大分子、实现含有 < 1 kDa 分子量肽分级及提高 ACE 抑制活性的有效手段。此外, 肽得率随分子量的减小而减小, PDH-V 的肽得率为 3.4%, 所以大鳞副泥鳅蛋白并未酶解完全, 仍然存在大部分大分子蛋白。因此, 后续将继续对 PDH-V 进行纯化。

2.2 凝胶过滤层析进行纯化

将冻干的 PDH-V 组分用蒸馏水溶解, 使用 Sephadex G-15 (1.6 cm \times 80 cm) 上通过凝胶过滤层析进行纯化。凝胶过滤是一种可以分离具有不同分子尺寸的物质, 并且已被用于从低分子量物质中脱盐蛋白质溶液, 分离蛋白质和其他胶体。由图 2 所知, 纯化得到 3 个组分 F1、F2 和 F3, 这 3 个组分的 IC_{50} 值分别为 (148.45 \pm 7.83), (98.52 \pm 5.67), (172.87 \pm 9.78) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

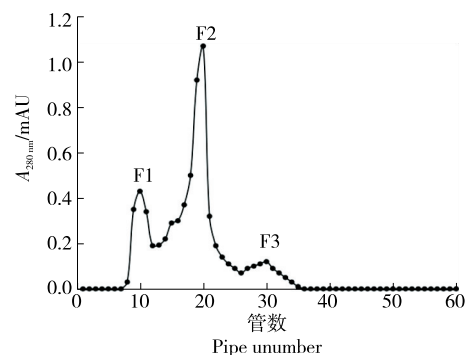


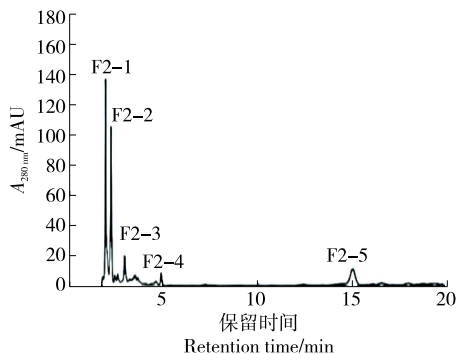
图 2 样品 V 的 Sephadex G-15 凝胶渗透色谱

Figure 2 Gel permeation chromatography of Sephadex G-15 for sample V

通过研究测定表明 F2 具有最强的 ACE 抑制活性,与 PDH 相比,活性提高了 4.99 倍(表 1)。收集 F2 合并冻干以待进一步纯化。

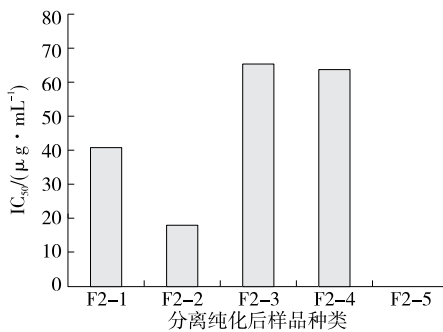
2.3 RP-HPLC 分离纯化

将来自凝胶色谱的组分通过半制备型 RP-HPLC 进一步分离纯化。如图 3(a)所示,收集到的 5 个组分中,保



(a) F2 组分的反相高效液相色谱图

留时间为 2.07 min 的 F2-2 表现出最强的 ACE 抑制活性,其 IC₅₀ 值为(17.89 ± 3.28) μg/mL。此外经色谱柱分离后所得的色谱图中出现一些小分子肽的混合物,根据石杰等^[12]的研究进行分析可得,可能是由于在进行洗脱的过程中,F2 中所含的亲水性盐类对分离造成影响,从而导致部分小分子肽的出现。



(b) 各组分的血管紧张素转化酶抑制活性值

图 3 F2 组分的反相高效液相色谱图及各组分的血管紧张素转化酶抑制活性值

Figure 3 Reversed phase high-performance liquid chromatography chromatogram of F2 component and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of each component

使用反相高效液相色谱仪进行二次分离以获得纯度更高的 F2-2 组分。由图 4 可知,组分 F2-2 呈现明显的单一峰,可得肽段较纯从而可以用于肽表征。但在特征峰后仍存在含量较低的肽段,为提高 F2-2 组分纯度通过重复注射在相同的保留时间收集 F2-2 级分并冻干。将级分重新溶解,用于 HPLC-MS/MS 分析与肽的一级结构的氨基酸序列测定。

2.4 ACE 抑制肽的分离纯化

纯化获得组分的 IC₅₀ 值和纯化倍数见表 1。使用超滤、Sephadex G-15 过滤层析、RP-HPLC 纯化程序从 PDH 纯化 ACE 抑制肽,纯化倍数达到 27.47 倍,得到的目的肽段 IC₅₀ 为(17.89 ± 3.28) μg/mL。

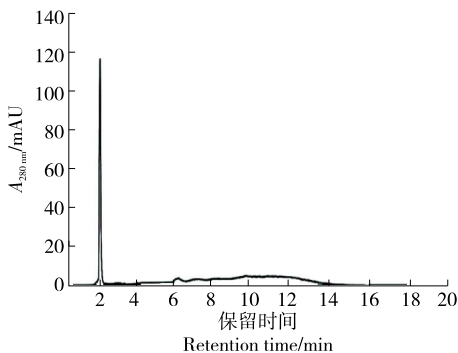


图 4 F2-2 组分的反相高效液相色谱图

Figure 4 Reversed phase high-performance liquid chromatography chromatograms of F2-2 components

表 1 大鳞副泥鳅蛋白血管紧张素转化酶抑制肽的纯化[†]

Table 1 Purification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide of *P. dabryanus* protein

样品名称	纯化方式	IC ₅₀ / (μg · mL ⁻¹)	纯化倍数
PDH	PDH	491.45 ± 15.11	1.00
PDH-V	超滤	154.70 ± 7.35	3.18
F2	Sephadex G-15	98.52 ± 5.67	4.99
F2-2	RP-HPLC	17.89 ± 3.28	27.47

[†] 纯化倍数表示经纯化处理后,与大鳞副泥鳅蛋白酶解产物相比,大鳞副泥鳅蛋白中 ACE 抑制肽的 IC₅₀ 值纯化倍数,即纯化后 ACE 活性抑制倍数^[13]。

2.5 采用质谱法测定 ACE 抑制肽的一级结构

利用质谱仪对组分 F2-2 进行一级质谱(MS)与二级质谱(MS/MS)交替处理,而各组分的结构利用分析软件预测。其过程为选择一级质谱所产生的肽段中的母离子(质子化分子),使其进入二级质谱,并使其发生碰撞诱导解离(CID)反应分解形成一定量的碎裂离子。由于各个肽段的质量数不同,而肽序列可利用其间存在的差值进行推定,并利用仪器中所含软件对肽序列进行解析。

如图 5 所示,丰度值最高的母离子为 m/z 345.208,即可得出该目标肽段的分子量为 321.208 Da。再用 m/z 345.208 的母离子在二级质谱(MS/MS)中进行分析处理。由于氨基酸残基通过肽键连接形成肽与蛋白质,而沿肽骨架断裂所获得的是主要的碎裂峰组。在发生电

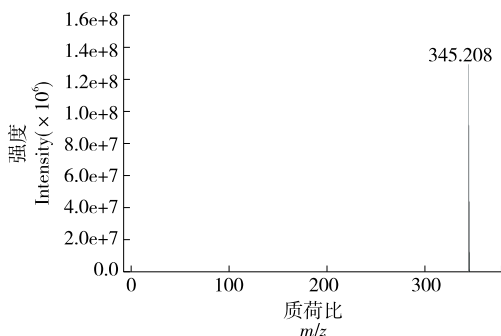


图 5 组分 F2-2 的质谱图

Figure 5 Mass spectrometer diagram of component F2-2

离反应与飞行进程中,待测分子产生亚稳离子,由于相邻同组类型峰的质量存在差值,而肽的序列测定正是通过分析质量差,进而识别相应氨基酸残基。

肽段在质谱分析中的碎裂具有一定规律,碎片离子主要分为两类:从 N 端开始以 a、b、c 表示,从 C 端开始以 x、y、z 表示,在肽链中与其他键相比,酰胺键较易断裂,因此 b 和 y 系列离子具有相对较大的出现概率。母离子(345.208)进入二级质谱,在谱图中其相应碎片具有标注,利用肽的 b 离子和 y 离子互补的方法推断组分的序列为 Glu-Gly-His,分子量为 345.2 Da。从大鳞副泥鳅蛋白中分离所得 ACE 抑制肽的氨基酸序列中甘氨酸属于疏水性氨基酸,石杰等^[12]研究表明疏水性氨基酸的存在促进 ACE 抑制肽的抑制活性。组氨酸属于正电荷氨基酸,Wu 等^[14]研究发现正电荷氨基酸可使 ACE 抑制肽表现出更强的抑制活性,由此可得此肽段具有较高的 ACE 抑制活性。

2.6 ACE 抑制肽的抑制动力学研究

ACE 抑制肽以竞争性、非竞争性和混合型方式抑制 ACE 的活性^[15],其中多为竞争性抑制,而竞争性抑制剂一般与底物结构较为相似,竞争性抑制剂可与活性位点

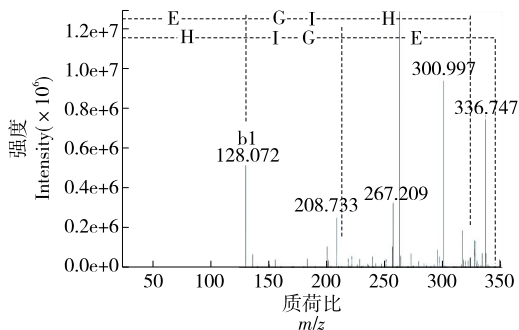


图 6 主成分质子数与电荷数比为 345.208 的串联质谱图
Figure 6 Tandem mass spectrometry with principal component proton number to charge ratio 345.208

结合,阻断底物和酶之间的相互作用或改变酶的构象,从而使底物无法接近活性位点^[16-18]。其中底物浓度、抑制剂浓度、底物以及抑制剂与酶的亲和能力是影响竞争性抑制的主要因素^[19]。

使用 Lineweaver-Burk 作图研究来自 PDH 肽的 ACE 抑制模式,测定了存在和不存在抑制剂的酶的动力学常数^[20]。图 7 结果表明, V_{max} 不会随大鳞副泥鳅 ACE 抑制肽浓度的变化而发生明显差异,但 K_m (反应速度为 $1/2V_{max}$ 时底物浓度的数值)随肽浓度的增加而有所提高,表明这种肽是 ACE 的竞争性抑制剂,可以结合到肽的活性位点,导致底物无法与活性位点结合,从而起到抑制性作用。综上,PDH 水解肽为竞争性抑制肽,具有显著的 ACE 抑制活性,作为功能性食品成分或天然降高血压剂具有良好的市场前景。

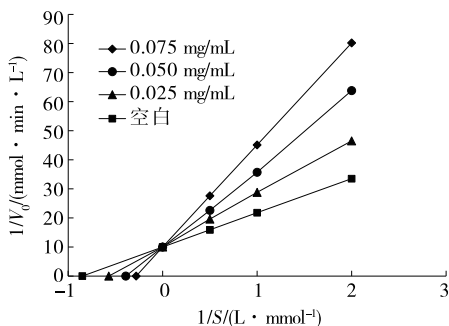


图 7 大鳞副泥鳅血管紧张素转化酶抑制肽对血管紧张素转化酶的抑制 Lineweaver-Burk 模型

Figure 7 Inhibition of angiotensin-converting enzyme by angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide in *P. dabryanus* by Lineweaver-Burk model

3 结论

研究采用超滤、凝胶过滤层析和半制备 RP-HPLC 多级分离技术构建了一种活性高、纯度高的大鳞副泥鳅蛋白 ACE 抑制肽的提取纯化方法。所得目标肽段的 IC_{50} 值为 $(17.89 \pm 3.28) \mu\text{g/mL}$,与大鳞副泥鳅的初始酶解物相比,ACE 抑制活性显著提高,纯化倍数 27.47,其氨基酸序列为 Glu-Gly-His,分子量 345.2 Da。ACE 抑制动力学研究分析表明大鳞副泥鳅抑制肽对于底物 ACE 是一种竞争性抑制。由此可得,研究所得的大鳞副泥鳅蛋白 ACE 抑制肽具有明显的降压效果,且原料价格低廉,来源广泛,可作为良好的食源性 ACE 抑制肽来源。但大鳞副泥鳅蛋白 ACE 抑制肽的体外试验无法确定其在体内的降压效果,仍需进行进一步的动物性试验来验证。

参考文献

[1] CHRISTINA G K, DIMITRIOS P B, LAZAROS I S. Inflammation

- and cardiovascular disease [J]. *World Journal of Translational Medicine*, 2019, 8(1): 1-8.
- [2] KAHSU G A, MASRESHA A B, MEHARI A T, et al. Targeting renin-angiotensin system against alzheimer's disease[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 440-456.
- [3] CLAYTON D, HANCHAPOLA I, THOMAS W G, et al. Structural determinants for binding to angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) and angiotensin receptors 1 and 2 [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2015, 6: 5-13.
- [4] XUE L, WANG X D, HU Z H, et al. Identification and characterization of an angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide derived from bovine casein[J]. *Peptides*, 2018, 99: 161-168.
- [5] ILA J, JANAGARAJ K, PEER M. Isolation and characterization of angiotensin I - converting enzyme (ACE-I) inhibition and antioxidant peptide from by-catch shrimp (*Oratosquilla woodmasoni*) waste [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 29: 101770.
- [6] 姚金明, 陈秀梅, 刘明哲, 等. 饲料中添加虾青素对大鳞副泥鳅生长和体色的影响[J]. *饲料工业*, 2019, 40(8): 46-51.
- YAO J M, CHEN X M, LIU M Z, et al. Effects of Astaxanthin on the growth and body color of juvenile *Paramisgurnus dabryanus*[J]. *Feed Industry*, 2019, 40(8): 46-51.
- [7] 何泽贺, 肖宇, 刘建朝, 等. 大鳞副泥鳅蛋白制备 ACE 抑制肽的酶解方式研究[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(7): 134-140.
- HE Z H, XIAO Y, LIU J C, et al. Study on enzymatic hydrolysis of ACE inhibitory peptide prepared from *Paragurnus dhamgurnus* protein[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(7): 134-140.
- [8] HUANG Y O, RUAN G H, QIN Z J, et al. Antioxidant activity measurement and potential antioxidant peptides exploration from hydrolysates of novel continuous microwave-assisted enzymolysis of the *Scomberomorus niphonius* protein[J]. *Food Chemistry*, 2017, 223: 89-95.
- [9] THEODRI P J, TICKEL S, IDIENS R. Proline specific protease from *Penicillium Chrysogenum*: 200980120102.4[P]. 2011-05-04.
- [10] JANG A, LEE M. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates[J]. *Meat Science*, 2005, 69(4): 653-661.
- [11] LI M Y, FAN W L, XU Y. Identification of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory and antioxidant peptides derived from Pixian broad bean paste[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 151: 112221.
- [12] 石杰, 宿瑞奇, 张文婷, 等. 三斑海马蛋白 ACE 抑制肽的制备及其二级结构的研究[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(9): 38-44.
- SHI J, SU Q Q, ZHANG W T, et al. Preparation and secondary structure of angiotensin i-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide of Seahorse protein[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(9): 38-44.
- [13] 李锐, 邹茜, 孙玉林, 等. 克氏原螯虾虾头模拟胃肠道消化产物中 ACE 抑制肽的分离纯化与鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(6): 139-146.
- LI R, ZOU Q, SUN Y L, et al. Isolation and identification of ACE inhibitory peptide from simulated gastrointestinal digestive products of *Procambarus clarkii* head[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(6): 139-146.
- [14] WU J, ALUKO R E, NAKAI S. Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship study of di- and tripeptides[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(3): 732-738.
- [15] LI Y, ZHOU J Z, HUANG K H, et al. Purification of a novel angiotensin- I -converting enzyme (ACE) inhibitory peptide with an antihypertensive effect from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(5): 1 320-1 325.
- [16] LEE S H, QIAN Z J, KIM S K, et al. A novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats[J]. *Food Chemistry*, 2010, 118(1): 96-102.
- [17] FORGHANI B, ZAREI M, EBRAHIMPOUR A, et al. Purification and characterization of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides derived from *Stichopus horrens*: Stability study against the ACE and inhibition kinetics[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 20: 276-290.
- [18] HENDAY B, LABIDI A, ARNAUDIN I, et al. Measuring angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by micro plate assays: Comparison using marine cryptides and tentative threshold determinations with captopril and losartan [J]. *Food Chemistry*, 2013, 61: 10 685-10 690.
- [19] RUIZ R J, DAVILA O G, CHEL G L, et al. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook bean enzymatic hydrolysates[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2013, 37(1): 26-35.
- [20] 卢洋. 核桃蛋白源 ACE 抑制肽的纯化、结构鉴定及性质研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2015: 80.
- LU Y. Purification, identification and characterization of angiotensin i-converting enzyme inhibitory peptide derived from Walnut protein [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2015: 80.