

大黄鱼蛋白源 ACE 抑制三肽的虚拟筛选、 体外活性验证及分子机制

纪慧卓, 陈嘉钰, 李欣, 马汝平, 于志鹏*, 赵文竹, 励建荣*

(渤海大学食品科学与工程学院, 生鲜农产品贮藏加工
及安全控制技术国家地方联合工程研究中心, 辽宁锦州 121013)

摘要: 本文利用在线数据库对大黄鱼膜蛋白虚拟酶解, 对所得三肽的生物活性、亲水性、吸收、分布、代谢、排泄、毒性等性质进行预测, 通过分子对接预测三肽与血管紧张素转化酶(angiotensin-I converting enzyme, ACE)对接能量, 同时对其体外 ACE 抑制活性测定, 并阐明与 ACE 活性位点的分子作用机制。结果表明, 获得四种源自大黄鱼的 ACE 抑制三肽 CMK, GWR, WAK 和 WQK, 其 IC_{50} 值分别为 0.19、2.40、0.40 和 1.10 mmol/L。分子作用机制表明三肽 CMK, GWR, WAK 和 WQK 与 ACE 的 S_1 口袋关键氨基酸 Ala354, Glu384 和 S_2 口袋关键氨基酸 His353 产生相互作用, 而且氢键促进三肽与 ACE 活性口袋的结合。本研究表明来自大黄鱼蛋白的三肽可以被用于开发预防高血压的功能性食品组分。

关键词: 大黄鱼膜蛋白, 虚拟筛选, ACE 抑制肽, 分子机制

Screening, *in Vitro* Activity and Molecular Mechanism of ACE Inhibitory Tripeptides from *Larimichthys crocea* Protein

Ji Huizhuo, CHEN Jiayu, LI Xin, MA Ruping, YU Zhipeng*, ZHAO Wenzhu, LI Jianrong*

(College of Food Science and Engineering, Bohai University, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, China)

Abstract: The moesin of *Larimichthys crocea* was *in silico* digested by gastrointestinal proteases (pepsin and trypsin) of online databases ExPASy PeptideCutter, and the potential bioactive, solubility, absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity of screened tripeptides were predicted and validated in this study. Furthermore, the interaction mechanism of tripeptides and angiotensin-I converting enzyme (ACE) was elucidated by molecular docking and the CDOCKER-Energy was calculated. The ACE inhibitory activity of potential tripeptides *in vitro* was determined by RP-HPLC and the interaction site of tripeptides in ACE was also clarified. In this paper, four ACE inhibitory tripeptides CMK, GWR, WAK and WQK were successfully identified from the moesin of *Larimichthys crocea*, with IC_{50} values of 0.19, 2.40, 0.40, and 1.10 mmol/L respectively. The results of molecular interaction between tripeptides and ACE suggested that tripeptides CMK, GWR, WAK and WQK interacted with key residues Ala354, Glu384 in S_1 pocket of ACE and key residue His353 in S_2 pocket of ACE. Meanwhile, hydrogen bond may attribute to the molecular interaction of tripeptide and the active pocket of ACE. The current study indicated that tripeptides from *Larimichthys crocea* moesin could be used to develop functional food to prevent hypertension in the future.

Key words: *Larimichthys crocea* moesin; virtual screening; ACE inhibitory peptides; molecular mechanism

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)06-0125-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060287

引文格式: 纪慧卓, 陈嘉钰, 李欣, 等. 大黄鱼蛋白源 ACE 抑制三肽的虚拟筛选、体外活性验证及分子机制[J]. 食品工业科技, 2021, 42(6): 125-129, 143.

Ji Huizhuo, CHEN Jiayu, LI Xin, et al. Screening, *in Vitro* Activity and Molecular Mechanism of ACE Inhibitory Tripeptides from *Larimichthys crocea* Protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(6): 125-129, 143. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

血管紧张素转化酶(angiotensin-I converting enzyme, ACE)是一种含锌的金属肽酶, 可催化血管紧

收稿日期: 2020-06-24

作者简介: 纪慧卓(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白质及活性肽的功能研究与产品开发, E-mail: jihuzhuo155623@163.com。

* 通信作者: 于志鹏(1984-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 蛋白质及活性肽的功能研究与产品开发, E-mail: yuzhipeng20086@sina.com。

励建荣(1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品加工, E-mail: jrli6491@163.com。

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2019YFD0901702)。

张素 I 水解为血管紧张素 II,在血压调节中起重要作用,因而受到广泛关注^[1]。ACE 抑制剂已被用于治疗高血压等心血管疾病,但这些抑制剂会产生许多不良反应,如干咳、血管性水肿、肾功能损伤等,尤其是生物利用度低而引起的多剂量给药问题^[2]。因此,急需寻找天然且安全的 ACE 抑制剂。

蛋白质经蛋白酶消化降解释放大量生物活性肽,其中小肽可以被人体完整吸收利用^[3]。水产源活性肽具有多种健康促进益处,如抗氧化、降低血压等,被用在保健功能食品配方中作为营养补充剂^[4]。大黄鱼是我国出口养殖水产品中八大优势品种之一,2018 年大黄鱼海水养殖产量达 19.8 万吨,但大黄鱼深加工技术落后,导致其附加值低,甚至产生供过于求等问题。大黄鱼蛋白质含量丰富,是优质蛋白质资源^[5]。在前期研究中发现,大黄鱼蛋白酶解物具有 ACE 抑制活性,因此大黄鱼可作为 ACE 抑制肽制备的蛋白原料^[6]。虚拟筛选鉴定 ACE 抑制肽,克服传统筛选方法的时间长、成本高等不足^[7]。

因此,本研究以大黄鱼膜突蛋白为原料,利用虚拟筛选方法获得具有潜在 ACE 抑制活性三肽,并对体外活性进行确证,阐明了 ACE 抑制三肽与靶点相互作用的分子机制。本文为食源性 ACE 抑制肽开发提供了新途径,并有望提高大黄鱼的附加值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

血管紧张素转化酶(ACE)(从兔肺提取)、马尿酸、马尿酸酰-组氨酸-亮氨酸(HHL) 美国 Sigma-Aldrich 公司;活性肽(纯度 80%) 上海淘普生物科技有限公司。

Discovery Studio 2017 R2 Client 美国 Accelrys 公司;HPLC-2010 高效液相色谱仪(分析型) 日本 SHIMADZ 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 虚拟酶解及新肽筛选 在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得大黄鱼膜突蛋白序列 (accession No: KKF16686)。利用 ExPASy Peptide Cutter^[8] 程序 (http://web.expasy.org/peptide_cutter), 选取胃蛋白酶和胰蛋白酶进行酶解,从酶解后所得大量多肽中筛选三肽序列,并利用在线数据库 AHTPDB^[9] (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>) 和 BIOPEP-UWN^[10] (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) 与已知肽对比,筛选尚未报道过的三肽。

1.2.2 生物活性、水溶性、ADMET 性质预测 利用 PeptideRanker 程序^[11] (<http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/>) 预测所得三肽生物活性,筛选具有良好生物活性的三肽。用 Innovagen^[12] (<http://www.innovagen.com/>) 程序对三肽水溶性预测,利用 admetSAR^[13] (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1/>) 预测所筛选三肽的吸收、分布、代谢、排泄及毒性性质 (Absorption, Distribution, Metabolism,

Excretion, and Toxicity, ADMET), 本次筛选指标主要为血脑屏障渗透性 (BBB, blood-brain barrier penetration)、胃肠道吸收性 (HIA, human intestinal absorption)、CYP450 (细胞色素 P450) 和急性口服毒性。将最终筛选所得三肽用于后续研究。

1.2.3 活性三肽与 ACE 分子对接 从 Protein Data Bank (PDB) 数据库获取 ACE 的 3D 结构 (PDB ID: 1O86), 删除水分子,加氢原子修饰,并作为靶点。用 Discovery Studio (DS) 2017 R2 Client 软件绘制活性肽 3D 结构,在其 Small Molecules 模块选择 CHARMM 力场,使用 Minimize Ligands 和 Prepare Ligands 对活性肽优化,能量最小化后作为小分子配体。利用 DS 的 CDOCKER 模块进行对接,对接位点坐标为 x : 40.497490, y : 34.882980 和 z : 44.381489。根据对接 “-CDOCKER_ENERGY” 值判断活性肽与 ACE 的结合能力。

1.2.4 ACE 抑制肽的合成 用标准 Fmoc 固相化学合成法合成所得三肽序列^[14]。

1.2.5 ACE 抑制活性测定 利用 RP-HPLC 法进行体外 ACE 抑制活性测定^[15]。RP-HPLC 色谱条件为:检测波长 228 nm,柱温 25 °C,流速 0.5 mL/min,流动相为乙腈/水(25/75)等度洗脱。

1.4 数据分析

实验数据表示为均值 ± 标准差,采用 Spss Statistics 25 软件对数据进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 三肽生物活性、水溶性预测

大黄鱼膜突蛋白经 ExPASy PeptideCutter 程序中胃蛋白酶和胰蛋白酶虚拟酶解,共释放 55 个三肽。三肽更易与 ACE 活性位点有效结合^[1],同时,低分子量的肽更容易穿过细胞膜和小肠屏障^[16]。因此本文选取三肽进行后续研究。与在线数据库 AHTPDB 和 BIOPEP-UWN 中已收录的三肽进行对比得到 45 个未被报道的三肽。PeptideRanker 是一种多肽生物活性预测程序,可预测 ACE 抑制活性、抗病毒、抗氧化等生物活性,基于新型 N-to-1 神经网络 (novel N-to-1 neural network) 预测多肽具有生物活性的可能性^[11]。生物活性预测活性评分大于等于 0.5 的三肽具有潜在的生物活性,本次筛选共 11 个三肽 MAF、GWR、IGF、GML、SCL、CMK、WAK、WQK、AGR、VNF、ALG,评分值分别为 0.97、0.97、0.95、0.91、0.71、0.70、0.65、0.57、0.55、0.51、0.51,表明具有潜在生物活性。Innovagen 程序基于多肽的等电点、带电荷残基数量和长度预测潜在水溶性,结果呈现为水溶性好或水溶性差。预测潜在的生物活性三肽的水溶性,结果表明三肽 CMK、GWR、WAK、WQK 和 AGR 的水溶性好。

2.2 ADMET 性质预测

预测活性肽吸收、分布、代谢、排泄及毒性等性质 (ADMET) 对早期发现 ACE 抑制肽的不良性质和避免给人体带来安全性问题具有重要意义。admetSAR 是开放源可读式数据库,能够根据肽的结构来预测并分析肽的 ADMET 性质。本文预测的指

表1 大黄鱼膜突蛋白源三肽的 ADMET 性质预测结果
Table 1 ADMET prediction results of tripeptide from moesin in *Larimichthys crocea*

三肽	CMK	GWR	WAK	WQK	AGR
HIA	HIA + 0.5058	HIA + 0.8291	HIA + 0.9441	HIA + 0.8852	HIA- 0.7528
BBB	BBB + 0.5871	BBB + 0.5895	BBB + 0.6041	BBB + 0.7917	BBB + 0.6205
CYP450 2C9 Substrate	0.8182	0.8496	0.8371	0.8854	0.8034
CYP450 2D6 Substrate	0.7678	0.7447	0.7825	0.7906	0.7833
CYP450 3A4 Substrate	0.7086	0.6941	0.6631	0.6805	0.7097
CYP450 1A2 Inhibitor	0.8611	0.8554	0.6908	0.8415	0.9151
CYP450 2C9 Inhibitor	0.8856	0.8896	0.9237	0.9303	0.8333
CPY450 2D6 Inhibitor	0.9375	0.9113	0.9676	0.9554	0.9095
CYP450 2C19 Inhibitor	0.8760	0.8118	0.8715	0.9038	0.84374
CYP450 3A4 Inhibitor	0.9849	0.8704	0.9644	0.9748	0.8472
CYP Inhibitory Promiscuity	0.9950	0.9850	0.9628	0.9752	0.9942

标为 CYP450 和急性口服毒性、血脑屏障渗透性 (BBB)、胃肠道吸收性 (HIA), 结果见表 1。

2.2.1 CYP450 和急性口服毒性 CYP450 存在于人体小肠和肝脏中, 是体内参与内、外源物质代谢的主要酶, 可为毒性研究提供重要信息, 其中参与物质代谢的主要有 CYP450 2C9、CYP450 2D6、CYP450 3A4、CYP450 1A2、CYP450 2C19 等。可通过预测三肽与 CYP450 的相互作用, 研究三肽是否可作为其底物或抑制剂, 进而判断三肽的毒性^[17-18]。研究结果表明这些三肽并不是 CYP450 2C9、CYP450 2D6、CYP450 3A4、CYP450 1A2、CYP450 2C19 的底物也非他们的抑制剂, 表明这五个三肽 CMK、GWR、WAK、WQK 和 AGR 均对人体无毒性或低毒性。

2.2.2 血脑屏障渗透性 (BBB) 血脑屏障是维持脑内环境稳定的重要结构, 在生理状态下, 一方面能够允许脑组织所需的营养物质及某些大分子通过, 另一方面能阻挡有害物质的进入, 同时将有物质和代谢废物排出。但是, BBB 的存在, 导致许多活性物质到达脑内浓度低, 不能发挥作用^[19]。因此本研究预测了三肽的血脑屏障渗透性, 血脑屏障渗透性好的会被标记为 BBB⁺, 反之被标记为 BBB⁻^[20]。结果表明三肽 CMK、GWR、WAK、WQK 和 AGR 的 BBB 值分别为 0.5871、0.5895、0.6041 和 0.7917, 且均被标记为 BBB⁺, 表明这五种三肽均具有良好的血脑屏障渗透效果。

2.2.3 胃肠道吸收性 (HIA) 活性肽的肠道吸收率直接影响其生物利用度, 在预测中, 胃肠道吸收率小于 30% 的三肽被标记为 HIA⁻, 反之标记为 HIA⁺, HIA 值越高说明该三肽越容易被小肠吸收^[20]。结果显示三肽 CMK、GWR、WAK 和 WQK 均表现出良好的肠道吸收性, 肠道吸收值分别为 0.5058、0.8291、0.9441 和 0.8852。

2.3 三肽与 ACE 的分子对接及体外活性

分子对接指两个或多个分子通过结构互补或能量匹配相互识别, 是虚拟筛选和研究受体配体复合物相互作用的重要工具。为预测三肽与 ACE 的相互

作用, 本文利用 DS 软件将 ACE 与三肽 CMK、GWR、WAK 和 WQK 对接。“-CDOCKER_ENERGY” 值代表三肽与 ACE 的结合亲和力, 该值越高表明结合越紧密。三肽 CMK、GWR、WAK 和 WQK 与 ACE 相互作用的对接评分分别为 95.7441、84.9125、100.2910 和 104.3250 kcal/mol, 表明均可与 ACE 发生不同程度的结合, 可能具有潜在 ACE 抑制活性。体外 ACE 抑制活性测定结果显示三肽 CMK、GWR、WAK 和 WQK 的 IC₅₀ 值分别为 0.19、2.40、0.40 和 1.10 mmol/L。与之前报道的三肽 ACE 抑制活性结果相似如: PYK、GEP 和 DMG^[21-23] (IC₅₀ 值分别为 2.4、3.2 和 3.95 mmol/L), 高于肽 FNATAG^[24] (IC₅₀ 值 8.84 mmol/L) 的 ACE 抑制活性。因此, 这些三肽可作为未来 ACE 抑制剂的候选功能因子。

2.4 三肽与 ACE 的分子作用机制

ACE 包含三个活性口袋, S1, S2 和 S1'。S1 口袋包含残基 Ala354, Glu384 和 Tyr523; S2 口袋包含残基 Gln281, His353, Lys511, His513 和 Tyr520; S1' 口袋包含残基 Glu162。同时, 位于 ACE 活性位点的 Zn(II) 能够与 ACE 残基 His383, His387 和 Glu411 结合, 对 ACE 活性也起着关键作用^[25-26]。

三肽 CMK 与 ACE 的对接结果见图 1, CMK 与 S1 口袋残基 Ala354, Glu384; S2 口袋残基 His353, Lys511, His513, Tyr520 以及残基 Glu376, Asp453 发生相互作用。ACE 残基 Ala354, His353, His513, Tyr520, Asp453 与 CMK 发生氢键相互作用, 共形成 7 个氢键。同时, 残基 Ala354 通过烷基相互作用与肽结合, His353 通过 π -烷基相互作用与肽结合。此外, 三肽 CMK 通过吸引电荷相互作用与残基 Glu384, Glu376, Asp453, Lys511 结合, 与 Lys511 形成盐桥。

三肽 GWR 与 ACE 的对接结果见图 2, GWR 同时与 S1 口袋的三个残基发生相互作用, 与 S2 口袋 His353, S1' 口袋 Glu162, 锌离子结合残基 Glu411, His387 及残基 Ala356, Val380, Val379 相互作用。ACE 残基 Ala354, Tyr523, His353, His387, Ala356

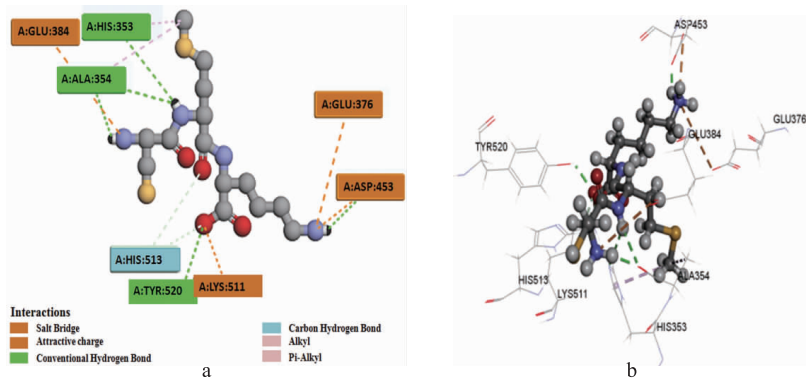


图1 CMK-ACE 分子相互作用

Fig.1 Molecular interaction of CMK and ACE

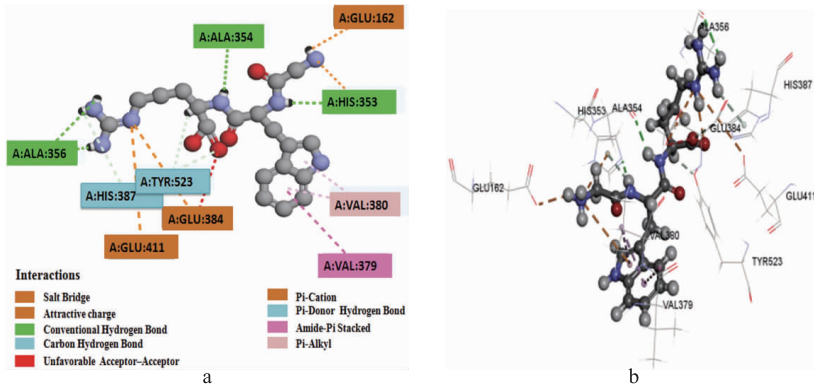


图2 GWR-ACE 分子相互作用

Fig.2 Molecular interaction of GWR and ACE

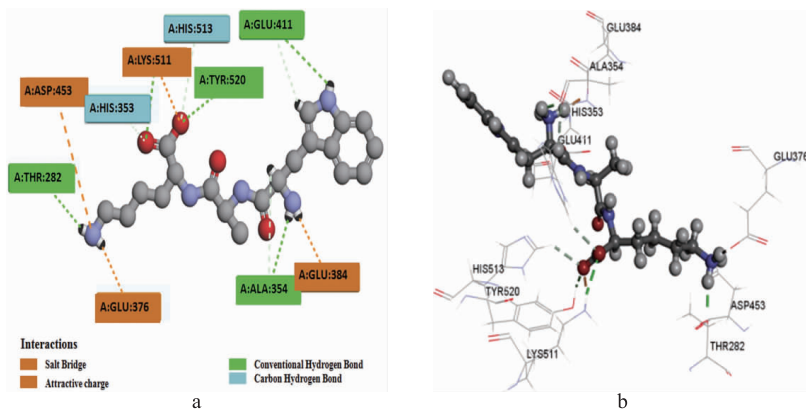


图3 WAK-ACE 分子相互作用

Fig.3 Molecular interaction of WAK and ACE

与 GWR 发生氢键相互作用,共形成 8 个氢键。同时,ACE 残基 His353 通过 π -阳离子相互作用与肽结合。三肽 GWR 与 ACE 的 Glu162 形成盐桥和吸引电荷相互作用,与 Glu411 形成吸引电荷相互作用。残基 Val380 与 GWR 通过 2 个 π -烷基相互作用。

三肽 WAK 与 ACE 的对接结果见图 3。三肽 WAK 与 S1 口袋 Ala354, Glu384, 与 S2 口袋 His353, Lys511, His513, Tyr520, 锌离子结合残基 Glu411 及残基 Asp453, Glu376, Thr282 发生相互作用。ACE 残基 Ala354, His353, Lys511, His513, Tyr520, Glu411, Thr282 与三肽 WAK 通过氢键发生相互作用,共形成 9 个氢键。ACE 残基 Lys511 与三肽形成盐桥和吸引

电荷相互作用。三肽 WAK 与 ACE 的 Asp453 通过吸引电荷相互作用结合,残基 Glu384 和 Glu376 均通过盐桥和吸引电荷相互作用与 WAK 结合。

三肽 WAK 与 ACE 的对接结果见图 4。三肽 WQK 同时与 S1 口袋的三个残基发生相互作用,与 S2 口袋 Gln281, His353, Lys511, His513 和 Tyr520, 锌离子结合残基 His387, 残基 Thr282, Ala356, Glu376 及 Zn701 相互作用。ACE 残基 Ala354, Glu384, Tyr523, Gln281, His353, His513, Tyr520, Thr282, Ala356 与三肽 WQK 发生氢键相互作用,共形成 12 个氢键。同时,ACE 的 Ala356 也通过 π -烷基相互作用与三肽结合。三肽与 ACE 的 Lys511, Glu376 均形成盐桥和吸引电荷相互作用结合。His387 与三肽

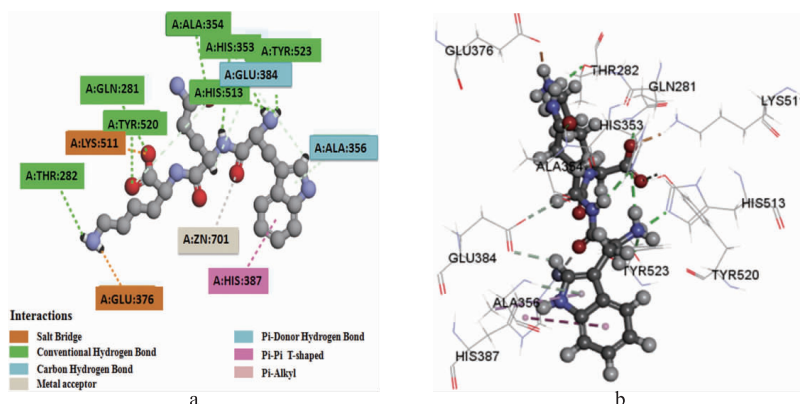


图4 WQK-ACE 分子相互作用

Fig.4 Molecular interaction of WQK and ACE

之间形成 π - π 相互作用。此外,Zn701 与三肽 WQK 中的氧原子形成金属受体相互作用。

3 讨论与结论

本论文利用虚拟筛选结合体外活性验证方法获得大黄鱼蛋白源 ACE 抑制三肽 CMK、GWR、WAK 和 WQK,体外实验证明三肽 CMK、GWR、WAK 和 WQK 均具有 ACE 抑制活性,其 IC_{50} 值分别为 0.19、2.40、0.40 和 1.10 mmol/L。结果表明三肽 CMK、GWR、WAK 和 WQK 均与 ACE 的 S1 和 S2 口袋相互作用,而且均与 ACE 的残基 His353, Ala354 和 Glu384 发生相互作用,表明这些氨基酸可能在 ACE 结合中起到重要作用。已有研究证明肽具有更高 ACE 抑制活性可能由于其与 ACE 活性位点形成更多氢键^[27]。本研究中,三肽 WQK 与 ACE 形成的氢键数目最多,且与活性位点的氨基酸相互作用数量最大,可能是 WQK 与 ACE 的对接评分最高的原因。ACE 抑制肽与锌离子结合残基相互作用,促进其 ACE 抑制活性^[28]。本试验中三肽 GWR、WAK 和 WQK 均与锌离子结合残基发生了相互作用,表明三肽 CMK、GWR、WAK 和 WQK 均具有潜在 ACE 抑制活性,与体外实验结果一致。

参考文献

[1] Chamata Y, Watson K A, Jauregi P. Whey-derived peptides interactions with ACE by molecular docking as a potential predictive tool of natural ACE inhibitors[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3): 864.
 [2] Mirzaei M, Mirdamadi S, Safavi M. Structural analysis of ACE-inhibitory peptide (VL-9) derived from Kluyveromyces marxianus protein hydrolysate[J]. Journal of Molecular Structure, 2020, 1213: 128199.
 [3] Shen W L, Matsui T. Current knowledge of intestinal absorption of bioactive peptides[J]. Food & Function, 2017, 8(12): 4306-4314.
 [4] Lassoued I, Mora L, Barkia A, et al. Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. Journal of Proteomics, 2015, 128: 8-17.
 [5] 吴靖娜, 许永安, 刘智禹. 养殖大黄鱼鱼肉营养成分的分析及评价[J]. 营养学报, 2013, 35(6): 610-612.

[6] 樊玥. 基于分子对接的海水鱼 ACE 抑制三肽鉴定及作用机制研究[D]. 锦州: 渤海大学, 2019.

[7] Yu Z P, Chen Y, Zhao W Z, et al. Identification and molecular docking study of novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from *Salmo salar* using in silico methods[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(10): 3907-3914.
 [8] Wiederschain G Y. The proteomics protocols handbook [J]. Biochemistry, 2006, 71(6): 696.
 [9] Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, et al. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73957.
 [10] Iwaniak A, Minkiewicz P, Darewicz M, et al. BIOPEP database of sensory peptides and amino acids[J]. Food Research International, 2016, 85: 155-161.
 [11] Mooney C, Haslam N J, Pollastri G, 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.
 [12] Lafarga T, O'Connor P, Hayes M. In silico methods to identify meat-derived prolyl endopeptidase inhibitors[J]. Food Chemistry, 2015, 175: 337-343.
 [13] Cheng F X, Li W H, Zhou Y, et al. admetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties [J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2012, 52(11): 3099-3105.
 [14] Zhao W Z, Zhang D, Yu Z P, et al. Novel membrane peptidase inhibitory peptides with activity against angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV identified from hen eggs[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103649.
 [15] Liu J B, Yu Z P, Zhao W Z, et al. Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2010, 122(4): 1159-1163.
 [16] Hu F Y, Chi C F, Wang B, et al. Two novel antioxidant nonapeptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) muscle[J]. Marine Drugs, 2015, 13(4): 1993-2009.
 [17] Cheng F X, Yu Y, Shen J, et al. Classification of cytochrome P450 inhibitors and noninhibitors using combined classifiers[J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2011, 51(5): (下转第 143 页)

present in underutilised legumes[J].Journal of Food Science and Technology-Mysore,2019,56(1):281-289.

[10]Kasar S S, Giri A P, Pawar P K, et al. A protein - amylase inhibitor from *Withania Somnifera* and its role in overall quality and nutritional value improvement of potato chips during processing[J]. Food and Bioprocess Technology, 2019, 12(4):636-644.

[11]周丹,王天鸿,郑少文,等.有机肥和化肥配施对菜豆生长和产量的影响[J].山西农业科学,2020,48(5):739-744.

[12]王强,张亚芝,魏淑红,等.黑龙江省芸豆生产现状与产业化发展[J].中国种业,2008,(4):11-12.

[13]胡燕秋,冯国军,杨晓旭,等.菜豆种质资源的植物凝集素含量测定及变化分析[J].中国农学通报,2020,36(5):18-25.

[14]冯国军,刘大军.菜豆的营养价值评价与分析[J].北方园艺,2016,(24):200-208.

[15]Ganesan K, Xu B J. Polyphenol - rich dry common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their health benefits[J].International Journal of Molecular Sciences,2017,18(11):1-26.

[16]Yao Y, Hu Y, Zhu Y, et al. Comparisons of Phaseolin type and α -amylase inhibitor in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in China[J].The Crop Journal,2016,4(1):68-72.

[17]Ma Y, Rang Y, Yang R, et al. Effect of white kidney bean extracts on estimated glycemic index of different kinds of porridge[J].LWT-Food Science and Technology,2018,96(8):576-582.

[18]陈一昆,李钦,赵璠,等.芸豆提取物 α -淀粉酶抑制剂对SD大鼠的减肥效果研究[J].食品科技,2012,37(10):207-210.

[19]Shi Z, Zhu Y, Teng C, et al. Anti - obesity effects of α -amylase inhibitor enriched - extract from white common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) associated with the modulation of gut microbiota composition in high-fat diet-induced obese rats[J]. Food & Function,2020,11:1624-1634.

[20]Wang S, Chen L, Yang H, et al. Regular intake of white kidney beans extract (*Phaseolus vulgaris* L.) induces weight loss

compared to placebo in obese human subjects[J].Food Science & Nutrition,2020,8:1-10.

[21]廖祥兵,陈晓明,肖伟,等.DNS法定量测定还原糖的波长选择[J].中国农学通报,2017,33(15):144-149.

[22]Sagu S T, Huschek G, Bonick J, et al. A new approach of extraction of alpha - amylase/trypsin inhibitors from wheat (*Triticum aestivum* L.), based on optimization using plackett - burman and box - behnken designs [J] . Molecules, 2019, 24(19):3589.

[23]Fakhoury A M, Woloshuk C P. Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and fungal α -amylases by a lectin-like protein from *Lablab purpureus*[J].Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001,14(8):955-961.

[24]Bao Y, Shao L, Xing G, et al. Cobalt, nickel and iron embedded chitosan microparticles as efficient and reusable catalysts for Heck cross - coupling reactions [J] . International Journal of Biological Macromolecules,2019,130:203-212.

[25]Chen X, He X, Zhang B, et al. Wheat gluten protein inhibits alpha- amylase activity more strongly than a soy protein isolate based on kinetic analysis [J] . International Journal of Biological Macromolecules,2019,129:433-441.

[26]Ribic R, Stojkovic R, Milkovic L, et al. Design, synthesis and biological evaluation of immunostimulating mannosylated desmuramyl peptides[J].Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2019,15:1805-1814.

[27]Cao Y, Sun Y, Zou S W, et al. Orally administered Baker's Yeast beta-glucan promotes glucose and lipid homeostasis in the livers of obesity and diabetes model mice [J] . Journal of Agricultural and Food Chemistry,2017,65(44):9665-9674.

[28]Senthil S L, Chandrasekaran R, Arjun H A, et al. *In vitro* and in silico inhibition properties of fucoidan against α -amylase and α -D-glucosidase with relevance to type 2 diabetes mellitus [J] . Carbohydrate Polymers,2019,209:350-355.

(上接第129页)

996-1011.

[18]李晓宇,刘皋林.CYP450酶特性及其应用研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2008,13(8):942-946.

[19]吕旭满,孙明江,孙凤志.冰片促进药物透过血脑屏障的研究进展[J].中国中药杂志,2012,37(7):878-881.

[20]Shen J, Cheng F X, Xu Y, et al. Estimation of ADME properties with substructure pattern recognition [J] . Journal of Chemical Information and Modeling,2010,50(6):1034-1041.

[21]Terashima M, Oe M, Ogura K, et al. Inhibition strength of short peptides derived from an ACE inhibitory peptide [J] . Journal of Agricultural and Food Chemistry,2011,59(20):11234-11237.

[22]García M C, Puchalska P, Esteve C, et al. Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities [J] . Talanta, 2013,106:328-349.

[23]Zhao W Z, Xue S Y, Yu Z P, et al. Novel ACE inhibitors derived from soybean proteins using in silico and *in vitro* studies [J] . Journal of Food Biochemistry,2019,43(9):e12975.

[24]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.

[25]Lin K, Zhang L W, Han X, et al. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protease hydrolysates of Qula casein: Quantitative structure - activity relationship modeling and molecular docking study [J] . Journal of Functional Foods,2017,32:266-277.

[26]Pan D D, Cao J X, Guo H Q, et al. Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate [J] . Food Chemistry, 2012, 130(1):121-126.

[27]Yu Z P, Wu S J, Zhao W Z, et al. Identification and the molecular mechanism of a novel myosin-derived ACE inhibitory peptide [J] . Food & Function,2018,9(1):364-370.

[28]Abdelhedi O, Nasri R, Mora L, et al. In silico analysis and molecular docking study of angiotensin I - converting enzyme inhibitory peptides from smooth - hound viscera protein hydrolysates fractionated by ultrafiltration [J] . Food Chemistry, 2018,239:453-463.