

固定化 ACE 及其应用于分离和富集 食源性 ACE 抑制肽的研究进展

张婧婧¹ 刘智禹^{2,3,4}

(1. 漳州科技职业学院, 福建 漳州 363202; 2. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361013; 3. 国家海水鱼类加工技术研发分中心(厦门), 福建 厦门 361013; 4. 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013)

摘要:血管紧张素转换酶(angiotensin I-converting enzyme, ACE)在血压调节中起关键作用, 抑制 ACE 活性可控制血压升高, 食源性 ACE 抑制肽(angiotensin- I converting enzyme inhibitory peptide, ACEIP)因其降压作用温和专一与高安全性近些年受到广泛关注与研究。通过 ACE 的固定化可以克服传统游离 ACE 的不足并显著提高其稳定性, 并赋予较好的重复使用性。文章对 ACE 的固定化与固定化 ACE 用作选择性富集食源性 ACEIP 组分的亲和分离介质等方面的相关研究进行了综述, 并展望了其工业化应用前景。

关键词:固定化 ACE; 食源性 ACE 抑制肽; 亲和型分离介质; 选择性富集

Research progress on ACE immobilization and immobilized ACE used for affinity separation and enrichment of food-derived antihypertensive peptides

ZHANG Jingjing¹ LIU Zhiyu^{2,3,4}

(1. Zhangzhou College of Science and Technology, Zhangzhou, Fujian 363202, China; 2. Fishries Research Institute of Fujian, Xiamen, Fujian 361013, China; 3. National Research and Development Center for Marine Fish Processing (Xiamen), Xiamen, Fujian 361013, China; 4. Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Xiamen, Fujian 361013, China)

Abstract: Food-derived ACE inhibitory peptides can regulate blood pressure mildly and specifically by inhibiting the activity of ACE, which has attracted widespread attention and extensive research. Immobilization of ACE can overcome the shortcomings of traditional free ACE, significantly improve its stability, and give better reusability. This review summarized the immobilization of ACE and its use as an affinity separation medium for selective enrichment of food-borne ACEIP components, and prospects for its industrial application.

Keywords: ACE immobilization; food-derived ACE inhibitory peptides; affinity medium; selective enrichment

相较于降压用合成药物, 食源性 ACE 抑制肽(angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide, ACEIP)具备独特的降血压特性, 如源自可食性蛋白, 其易于人体消化吸收, 对人体无副作用, 正常人使用无不良反应, 降压效果温和专一^[1-3]。新近研究^[4-6]证实 ACEIP 还具备抗氧化活性与免疫调节作用。食源性 ACEIP 于 1965 年由 Ferreira^[7]发现, 并于 1979 年由 Oshima 等^[8]利用细菌胶原酶水解食物蛋白——明胶酶解制备。迄今为止, 已从陆

地动植物、海洋鱼类、虾类、贝类和藻类等众多生物中成功获取了 ACEIP^[9-11]。酶促水解和分离纯化是制备高活性食源性 ACEIP 的两个关键过程, 由于反应可控温和、产物安全, 蛋白酶水解法已成为获取 ACEIP 的主要方法^[12-13]。从组成复杂的酶解物中筛选出较高纯度的 ACEIP 必须经由繁琐且耗时的分离纯化过程, 如基于相对分子质量大小实现分离的凝胶过滤、超滤、透析等, 或是基于带电性质实现分离的离子交换色谱等^[14-16]。

基金项目:福建省科技厅星火项目(编号:2021S0051);漳州市自然基金项目(编号:ZZ2023J22)

通信作者:张婧婧(1986—), 女, 漳州科技职业学院副教授, 硕士。E-mail:360095693@qq.com

收稿日期:2023-09-26 **改回日期:**2024-02-29

近年基于ACE同食源性ACEIP组分之间存在较强亲和作用而实现分离富集的方法得到较快发展,其分离富集过程相对简单且高效^[17]。ACE(EC 3.4.15.1)本质上是一种酶分子,其在使用和贮存过程中较易变性失活,故游离ACE的稳定性较差,且基本无法循环使用;而高纯ACE目前主要从动物组织中提取纯化,其工艺繁琐耗时,致使游离ACE的重复使用性和使用经济性较差^[18]。ACE的固定化则可以增强ACE的稳定性,赋予其较好的重复使用性。酶的固定化的实现方法和技术手段多样,经典的包埋法、共价结合法、交联法等均可用于ACE的固定化^[19]。基于ACE固定化的过程是否使用载体,可将固定化分为有载体的ACE固定化和无载体的ACE固定化。载体的引入对固定化ACE主要产生两方面的影响,一方面,载体本身的固有特性通过固定化过程可移植并赋予固定化ACE,如适用于固相分离的固相性和磁性分离的磁响应性;另一方面,引入的载体会改变ACE的微环境进而影响酶活性构象的暴露程度以及“稀释”单位质量载体的酶活力^[20]。因此,利用保有酶活力和相对稳定的固定化ACE作为亲和性介质或配基,基于其同食源性ACEIP之间形成的亲和作用,可实现从成分复杂的蛋白酶解产物体系中高效筛选分离富集高活性ACEIP组分。

文章拟从ACE的固定化及其用作选择性富集食源性

ACEIP组分的亲和分离介质等方面进行综述,以期高效且稳定地获取高活性食源性ACEIP提供参考。

1 ACEIP的降血压作用机理

人体血压受到多个相互作用的系统共同调节^[21-22],包括肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)^[23-24]、激肽释放酶-激肽系统(kallikrein-kinin system, KKS)^[25]、利钠肽系统NPS^[25]、内皮素系统ES^[25],而血压升高同人体中负责血压调节的RAS和KKS关联紧密^[26-27]。如图1~图2所示,ACE参与血压调节的作用机制是:在RAS系统中,ACE作为I型跨膜蛋白酶,能将RAS中由肾素分解释放出的无活性十肽-血管紧张素-I的C末端的二肽(His-Leu),切除生成具有使血管收缩功能的血管紧张素-II,致使血管平滑肌收缩,从而引起血压升高^[28-31]。相对地,ACE在KKS系统中作为最主要的缓激肽代谢酶,具有酶解缓激肽的能力,即ACE能够切除KKS中缓激肽C末端的二肽(Phe-Arg),使其失活从而使该系统处于抑制状态,导致血压升高。因此,通过抑制ACE的活性,就能有效地降低血压。

食源性ACEIP具备ACE抑制活性且源于自然,可作为合成药物的替代品,其副作用更小且降血压温和,利用食源性活性肽抑制ACE的活性是目前调节人体血压的重要手段^[32-34]。

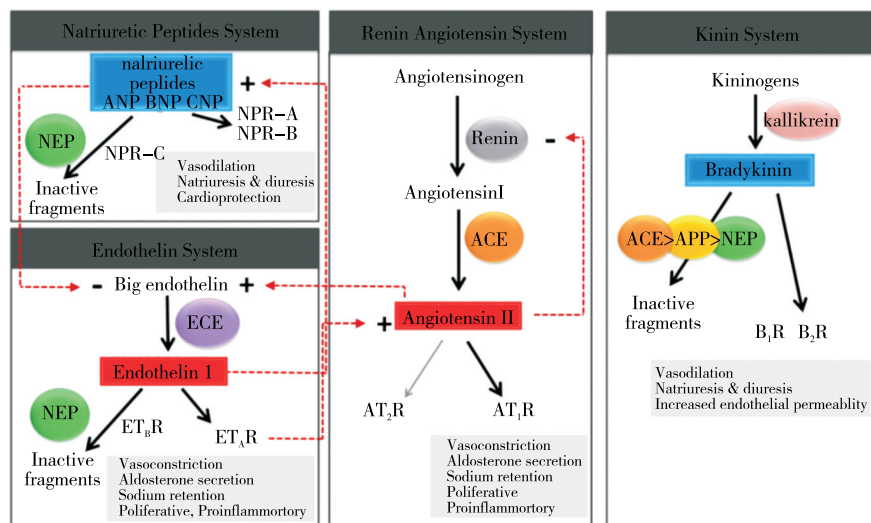


图1 人体血压调节的多个系统及其ACE在RAS或KKS中的作用^[22]

Figure 1 Multiple systems of human blood pressure regulation and the role of ACE in RAS or KKS

2 ACE的固定化及其用于ACE抑制肽的分离富集

依据ACE固定化过程是否使用载体,将固定化分为有、无载体的ACE固定化。载体的引入对固定化ACE产生两方面的影响,其一,载体本身的固有特性(如适用于固相分离的固相性和磁性分离的磁响应性)可赋予固定

化ACE;其二,引入的载体会影响ACE的微环境和单位质量载体的酶活力^[20]。视载体的性质及载体是否耦合磁性分离,固定化进一步细分为基于天然聚合物的ACE固定化、基于合成化合物的ACE固定化和耦合磁性分离特性的ACE固定化。文中所述四类ACE固定化的主要特点如图3所示;所制备固定化ACE用于亲和性分离富集食源性ACEIP的分离过程及特征如图4所示。

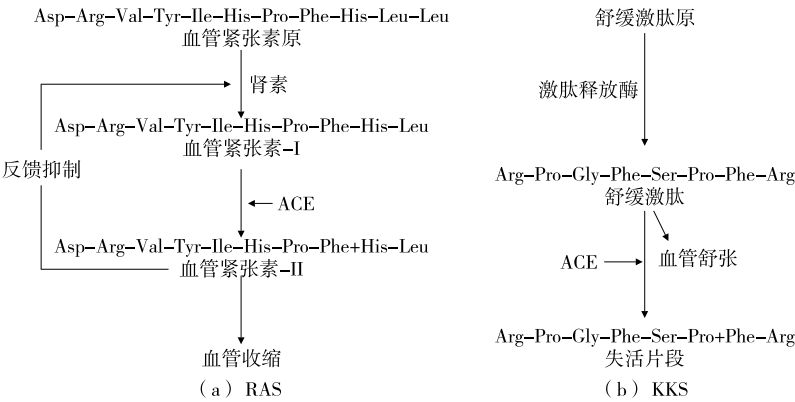


图 2 ACE 在 RAS 和 KKS 中的调节^[28]

Figure 2 Regulatory function of ACE in the RAS and KKS

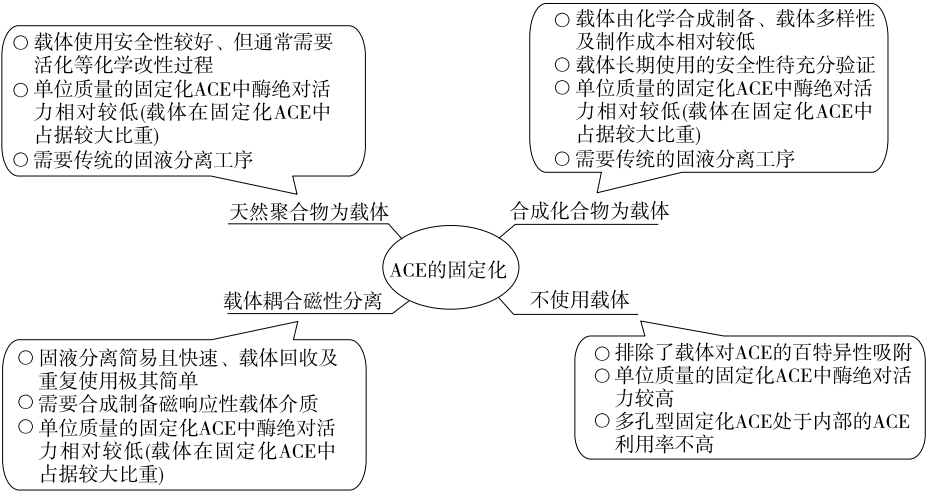


图 3 ACE 的固定化(有/无载体)

Figure 3 Immobilization of ACE (with/without matrix)

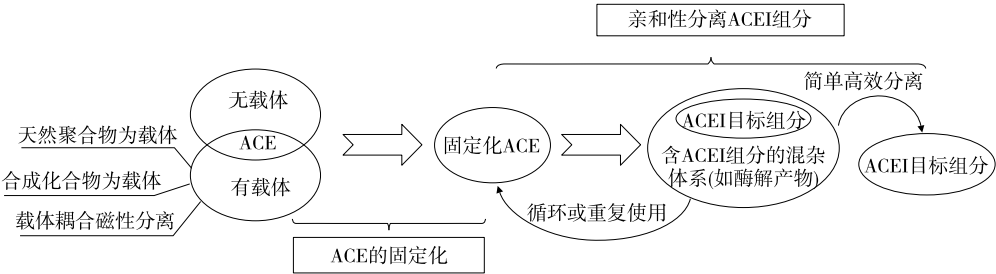


图 4 ACE 的固定化及固定化 ACE 用于亲和分离 ACEIP

Figure 4 Immobilization of ACE and immobilized ACE for affinity separation and enrichment of ACEIP

2.1 有载体的 ACE 固定化及其分离富集食源性 ACEIP

2.1.1 天然聚合物用作 ACE 的固定化载体及其分离富集食源性 ACEIP 固定化的载体来源及材质方面,琼脂糖、壳聚糖等天然聚合物用作固定化载体,不仅其安全性已得到较为充分的验证,且有关的改性、修饰等手段也较为成熟^[35]。将这类天然高聚物载体及其改性衍生物用作 ACE 的固定化载体已有不少的研究。刘宏等^[36-37]对 ACE

固相化的相关研究显示,对于 ACE 的固定化,化学结合法的效果要优于物理包埋法,作者进一步以琼脂作为基础载体,经由苯甲磺酰氯活化后再偶联 ACE 制备了固定化 ACE。固定化 ACE 的相关酶学特性研究表明,该固定化方法对 ACE 的固定效率可达 66%,固定化后酶活力为未固定化前的 82%,ACE 固定化过程对酶的破坏相对较轻。此外,固定化 ACE 的最适 pH 范围有所加宽,固定化 ACE

的耐温性也有所增强,如处于 64 °C 环境时,固定化 ACE 仍可保有 78% 的酶活力,相应环境下游离 ACE 的酶活力则大幅降至 13%;贮存稳定性方面,固定化 ACE 显示了较好的相对稳定性,如在 4 °C 保存 3 个月仍保有 80% 的酶活力。固定化载体的引入与存在,使得 ACE 构象调整的自由度下降,增强了温度场下的构象稳定性;同时 ACE 同载体形成某种程度结合,较大程度抑制了 ACE 之间的相互作用与可能存在的自降解。Megías 等^[38-39]对基础载体琼脂糖进行乙二醛酰化活化后再用于固定化 ACE,作者确认了该固定化 ACE 可用于从葵花籽、油菜籽等蛋白水解液中简单亲和分离 ACEIP。其研究对比了动物肺组织新提取 ACE 及商用高纯度 ACE 的固定化效果,组织新提取 ACE 制备的固定化 ACE 亲和吸附 ACEIP 后需要专一性洗脱,而商用高纯度 ACE 制备的固定化 ACE 亲和吸附后则无需专一性洗脱,但是后者所采用的非专一性洗脱可能会一定程度造成已吸附的非 ACEIP 组分的洗脱释放。孙凤祥等^[40]利用甲壳糖作为固定化载体,通过 EDC 的交联作用,实现了载体与 ACE 的偶联固定化,所制备固定化 ACE 的酶活力为 110 U/g 湿重,其固定化率为 22%;相较于游离 ACE,该固定化 ACE 具备较好的耐热性,在 50~80 °C 范围内更为稳定。此外,该固定化 ACE 可洗涤再生重复使用,反复使用 5 次其酶活力无明显下降,即便该固定化酶在 4 °C 存放 5 个月后,酶活力仍无明显下降。黄燕等^[41-42]利用自制 CTS 微珠为载体,经由戊二醛交联后再对 ACE 进行固定化,制备了可对 ACE 抑制组分(angiotensin-I converting enzyme inhibitor, ACEI)形成特异性结合的亲和介质,同时结合高效色谱-质谱实现了复杂体系中 ACE 抑制组分的快速筛选。其相应酶学特性研究表明,所制备固定化 ACE 拥有良好的稳定性,4 °C 湿态保存 30 d 其残余酶活力仍超 80%;同时 ACE 固定化后其适用 pH 范围加宽,在 pH 7~9 其活性较优且相差不大。作者利用已上市 ACE 抑制合成药物,对该亲和筛选方法进行了验证,确认了该方法的高度选择性,最后通过该固定化 ACE 成功地对中药地龙及山楂中的 ACE 抑制组分进行了筛选。

在固定化 ACE 活性及稳定性的进一步改善方面,Tian 等^[43]在制备 CTS 微球载体并结合 GA 交联固定 ACE 之后,利用烷基胺进行固定化 ACE 的再修饰。其研究显示固定化 ACE 后的再修饰实现清除载体上多余醛基的同时,明显提升了其活性及稳定性,即新制备固定化 ACE 进行再修饰后,再修饰的固定化 ACE 在 4 °C 贮存 120 d,其活性可达未进行再修饰的固定化 ACE 的 109.2%。此外,再修饰的固定化 ACE 在 pH 8.3~11.3 范围内可保持超 110% 的较为稳定的相对酶活,而未再修饰的固定化 ACE 在

pH>8.3 环境时其相对酶活即显著下降,如在 pH 11.3 时已保持不到 80% 的相对酶活。

将天然聚合物作为 ACE 的固定化载体并用于 ACEIP 的亲性和分离具备以下特点:① 所用载体安全性较高,载体制备技术相对较为成熟;② 由于载体的存在,单位质量的固定化 ACE 总酶活力相对较低;③ 需要考虑载体存在可能导致非特异性吸附的影响;④ 这类固定化 ACE 用于分离酶解液中 ACEIP 时需要固液分离环节。

2.1.2 合成化合物用作 ACE 的固定化载体及其分离富集食源性 ACEIP 合成高聚物用作固定化 ACE 的载体方面,孙凤祥等^[44]利用丙烯酰胺原位聚合的凝胶包埋策略,将 ACE 包埋于聚合的丙烯酰胺凝胶内,制备了针对 ACE 抑制组分的亲和分离纯化介质,实现了对猪骨胶原蛋白酶解物中 ACEI 组分的相对简单、高效的分离纯化。经由该凝胶包埋固定 ACE 实施的亲和分离,所制备的 ACEI 的比抑制活力达 1 450 U/mg,是酶解后未处理的粗提液的 906 倍,但活力回收率仅超 12%。合成的介孔类载体近来也被用作固定 ACE 的载体。Sun 等^[45]通过制备分子筛 SBA-15 基础载体,在基础载体吸附锌离子后再用作固定化 ACE 的载体,ACE 固定化后形成的固定化酶对温度和 pH 的耐受到提升。

多孔整体柱的制备相对简单,可用于快速、高效地分离,尤其可用于大规模样品的分离纯化^[46]。多孔整体柱用作固定化 ACE 的载体方面,陈盈盈^[47]基于卵蛋白/壳聚糖并利用 GA 交联自制了兼具弹性和通透性的海绵状冻凝胶整体柱,并将其直接用于 ACE 的固定化,制备了固定化 ACE 整体柱。该研究显示,固定化 ACE 同底物的亲和力增加(表观米氏常数 K_m 变小),即整体柱中的固定化 ACE 对底物分子拥有更具亲和性的构象,且渗透性良好、传质阻力较小。该整体柱固定化 ACE 联用色谱可对复杂体系中的 ACE 抑制组分实现快速筛选。

将合成化合物作为 ACE 的固定化载体并用于 ACEIP 的亲性和分离具备以下特点:① 备选载体类型多样且易于改性与后续修饰;② 由于载体的存在,单位质量的固定化 ACE 总酶活力相对较低;③ 需要考虑载体存在可能导致非特异性吸附的影响;④ 这类固定化 ACE 用于分离酶解液中 ACEIP 时需要固液分离环节。

2.1.3 耦合磁性分离特性的 ACE 的固定化及其分离富集食源性 ACEIP 随着科学技术的不断发展和学科间的交叉渗透,ACE 的固定化手段也不断发展和出新^[48-50]。近年来在各类分离介质中植入或耦合具备磁响应的磁性分离特性,因其可实现简单高效且实时分离等特性得到较为广泛的研究^[52-53]。在耦合磁性分离特性的固定化 ACE 的相关研究方面,兰雄雕等^[54]采用反相悬浮包埋法制备

磁性琼脂糖微球,再经由环氧氯丙烷活化后用于 ACE 的固定化。研究结果表明,相较于游离 ACE,固定化 ACE 对 pH 的耐受性有较大程度提升,在 pH 6.3~8.3 范围其酶活基本保持不变,均接近于 100%;即便 pH 调至 9.3,其酶活仍超 70%。同时,固定化 ACE 的热稳定性增强,固定化 ACE 在 60 °C 环境中的酶活力仍超 50%,其在 -20 °C 贮藏 30 d 后的残余酶活力保持不低于 90%(同样贮藏环境游离 ACE 的酶活力已不足 44%)。该研究中所制备固定化 ACE 的酶活为 0.128 U/g,而相对酶活力回收率不到 15%,且该固定化 ACE 的相对酶活力仅为游离 ACE 的 40%,显见 ACE 固定化过程对酶活力产生了一定程度的不利影响。但是通过该固定化策略,可以赋予 ACE 重复再用能力,且可一定程度提升 ACE 的稳定性,显著增强其抗失活能力。此外,该固定化 ACE 在施加磁场时可实现快速分离回收,在连续使用 10 次后酶活力仍保持在 50% 以上^[54]。De Almeida 等^[55]利用 GA 对自制的端氨基磁性颗粒进行表面交联反应后再用于 ACE 的固定化,制备了带磁响应性的亲和吸附介质 ACE-MB。该固定化 ACE(即 ACE-MB)不仅可有效识别不同的底物,且表现出米氏动力学特性;利用该固定化 ACE 可从牛血白蛋白的胰蛋白酶水解物中有效分离出 ACEIP,相应的试验证实了其具备重复使用性,同时该固定化 ACE 可作为有效的亲和吸附介质用于鉴别具备 ACE 配基特性的活性肽。Lan 等^[56]利用反相微乳法制备磁性琼脂糖基础微球,并对微球表面进行环氧活化后即用作固定化 ACE 的载体,制备了固定 ACE 的磁性亲和介质 MAM-ACE。该亲和介质 MAM-ACE 可用于经超滤的长蛇鲻蛋白水解物中 ACEIP 组分的亲和吸附分离,且被吸附的 ACEIP 可利用 1 mol/L NaCl 释放,同时洗脱释放组分可再利用反相 HPLC 进一步纯化。相较于传统离子交换色谱、凝胶渗透色谱等费时且繁杂的分离纯化手段,该研究中的磁性亲和介质 MAM-ACE 同样可实现从混合物中对微量食源性活性肽的快速有效分离。同时将磁性亲和分离同反相色谱结合,不仅可有效实现食源性 ACEIP 的分离和鉴定,且大幅缩短了纯化工序^[56]。Feng 等^[57]利用一锅法合成磁响应性的纳米颗粒,无需进一步地改性或活化即用作猪肺 ACE 的固定化载体,制备了相应的固定化 ACE。该固定化 ACE 展现了较优的稳定性和重复使用性,在 -80 °C 环境放置 30 d,该固定化 ACE 仍保有 84.09% 的酶活力,而游离 ACE 的残留酶活力已不足 46%;同时该固定化 ACE 即便连续使用 6 个循环后,仍保有超 54% 的残留酶活力。利用该固定化 ACE 可实现对裙带菜蛋白水解物中 ACEIP 组分的亲和吸附分离,且吸附完成后可实现 10 s 内从溶液中磁响应分离。

耦合磁性分离特性的 ACE 固定化载体用于 ACEIP 的亲性和分离具备以下特点:① 可实现简单高效的实时分离效果,极大程度利于过程的可控性、简便性与重复使用性;② 由于载体的存在,单位质量的固定化 ACE 总酶活力相对较低;③ 耦合或植入磁性分离特性的载体制备通常相对复杂;④ 需要考虑载体存在可能导致的非特异性吸附影响。

2.2 无载体的 ACE 固定化及其分离富集食源性 ACEIP

ACE 的固定化通常借助固定化载体完成,引入的载体在赋予其相应特性如磁响应性的同时,也一定程度上影响了固定化 ACE 的微环境。从相对质量占比来看,使用载体的固定化 ACE 中超过 90% 被固定化载体占据,相当于 ACE 被载体“稀释”,使得其单位质量固定化 ACE 中有效的酶活力不高^[58]。因此,无载体的固定化 ACE 可显著提升单位质量固定酶中 ACE 的比重,理论上可增加相应的总的酶活力。无载体的固定化 ACE 通常采用交联酶聚集体技术制备,一般包含沉淀和交联的两步制备过程,即先加入沉淀剂使 ACE 形成物理聚集体,再加入交联剂对已沉淀的 ACE 进行化学交联^[58]。利用交联酶聚集体技术制备无载体固定化 ACE 排除了载体引起的不利影响,制备工艺相对简单,制作成本也较低。曾伟秀^[59]从猪肺中提取 ACE 粗酶,利用硫酸铵溶液、戊二醛分别作为沉淀剂和交联剂,通过酶交联聚集体技术制备了多孔性的无定形 ACE 交联聚集体(ACE-CLEAs)。该 ACE 交联聚集体的酶活可达 3.31 U/g,是已报道的壳聚糖固定化 ACE 相应酶活的 26.6 倍,可见 ACE 交联聚集体单位质量内的总酶活显著增强。相应的酶学特性研究显示,同游离 ACE 相比,该 ACE 交联聚集体始终可保持略好的比活力,同时其热稳性、对 pH 耐受性均得到显著提升,如在 pH 5.3~11.3 范围内可保持不低于 60% 的比活力。曾伟秀等^[60]通过酶聚集体技术制备 ACE 交联聚集体后,利用卡托普利作为模型验证了基于 ACE 交联聚集体亲和吸附筛选 ACE 抑制组分方法的有效性。随后利用该方法对不同中药煎煮液进行了亲和吸附差异谱图测定,并进一步测定了对存有吸附差异性的抑制组分的 ACE 抑制活性,建立了 ACE 抑制活性同亲和吸附差异性的关联,实现了从中药组分中快速筛选天然的 ACEIP 组分。

不同于传统的使用载体的固定化 ACE,无载体的固定化 ACE 的制备及其用于 ACEIP 的亲性和分离具备以下特点:① 单位质量的固定化 ACE 中含非 ACE 组分很低,保证了固定化 ACE 拥有较高的总酶活力;② 不涉及载体的制备及使用,固定化 ACE 的制备更为环保、更为简便且相对低成本;③ 排除了载体可能导致的非特异性吸附、利于混杂体系中 ACE 抑制组分的亲和吸附分离及后续的解

吸附过程;④ 制备过程仍以合成化合物为交联剂,需要开发更安全的环保型交联剂;⑤ 无载体固定化ACE以多孔型为主,需要开发可调整较宽范围孔径及孔类型的制备技术,以适应较为多样的ACEI组分的亲和吸附过程;

⑥ 从进一步提升分离过程的简便性与高效性,可开发耦合磁性分离特性的无载体固定化ACE。

文中所述有载体或无载体固定化ACE的制备及固定化ACE亲和分离抑制肽的效果见表1。

表1 固定化ACE用于亲和分离ACEIP
Table 1 The immobilized ACE for affinity separation and enrichment of ACEIP

固定化ACE		亲和分离ACEIP		参考文献
所用载体	耦合磁性分离	蛋白原料	亲和分离效果	
琼脂	无	未涉及	未涉及	[36—37]
琼脂糖	无	葵花籽、油菜籽	IC ₅₀ 分别降至不到蛋白初始水解物的1/50,1/150	[38—39]
甲壳糖	无	未涉及	未涉及	[40]
壳聚糖	无	中药地龙及山楂	不引入酶底物、亲和筛选选择性好且简单	[41—42]
壳聚糖	无	未涉及	未涉及	[43]
丙烯酰胺凝胶	无	猪骨胶原蛋白	亲和分离组分的比抑制活力达1 450 U/mg,是粗提液的906倍	[44]
分子筛SBA-15	无	皮氏蛾螺	可亲和吸附分离蛋白酶水解物中具ACE抑制活性的组分	[45]
卵蛋白—壳聚糖多孔整体柱	无	未涉及	未涉及	[47]
琼脂糖	有	未涉及	未涉及	[54]
改性磁性颗粒	有	牛血白蛋白	可从蛋白水解物中有效分离出ACEIP,且具备重复使用性	[55]
琼脂糖	有	长蛇鲭蛋白	实现从混合物中对微量食源性活性肽的快速有效分离	[56]
纳米颗粒	有	裙带菜蛋白	可亲和吸附分离蛋白水解物中ACEIP组分,且实现10 s内从溶液中磁响应分离	[57]
无载体	无	中药煎煮液	实现中药组分中ACEIP的快速筛选	[59—60]

3 结论与展望

ACE拥有较大的相对分子质量且其空间结构相对复杂,在固定化后由于空间自由度受到一定的限制,多数情况下会造成固定化ACE相对酶活力某种程度的降低,但其稳定性大幅增强、并显示了较好的重复使用性。同时固定化ACE保留了同食源性ACEIP之间较好的亲和作用,故将固定化ACE用作亲和性吸附富集ACEIP组分的分离纯化介质与手段,尤其是结合了磁性分离特性的固定化ACE亲和型介质,其可实现从复杂酶解物体系中高效筛选食源性ACEIP组分。不过,固定化ACE及其相应的亲和分离纯化策略目前仍局限于实验室使用,未来要实现大规模的工业化应用仍需着力于以下方面的研究与开发:① 开发更优的固定化载体,使固定化ACE具备更优的相对酶活力和操作稳定性,可保证不低于20次的重复使用次数。② 开发改善非特异性吸附的屏蔽或钝化处理技术手段和方法,以确保筛选结果的有效性和准确性,如固定化ACE的再修饰技术。③ 无载体固定化ACE的相关技术开发。④ 基于固定化ACE亲和分离纯

化策略的高通量或高处理量技术开发,如固定化ACE同整体柱技术的偶联,或是固定化ACE同酶膜反应器的偶联。

参考文献

[1] RAJAK D, SAHU D, JAIN A, et al. Review on toxicity of antihypertensive drugs[J]. Asian Journal of Dental and Health Sciences, 2022, 2(4): 64-68.

[2] BALGIR P P, SHARMA M. Biopharmaceutical potential of ACE-inhibitory peptides[J]. Journal of Proteomics & Bioinformatics, 2017, 10(7): 171-177.

[3] SARBON N M, HOWELL N K, WAN-AHMAD W A N. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from chicken skin gelatin hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats[J]. International Food Research Journal, 2019, 26(3): 903-911.

[4] XIE D W, SHEN Y L, SU E Z, et al. The effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide VGINYW and the hydrolysate of α -lactalbumin on blood pressure control, oxidative stress and gut microbiota of spontaneously hypertensive rats[J].

- Food & Function, 2022, 13(5): 2 743-2 755.
- [5] SETAYESH-MEHR Z, GHASEMI L V, ASOODEH A. Evaluation of the in vivo antihypertensive effect and antioxidant activity of HL-7 and HL-10 peptide in mice[J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48: 5 571-5 578.
- [6] 张芷萌, 倪策, 欧晓晖, 等. 食源性生物活性肽的免疫功能研究进展[J]. 食品与机械, 2023, 39(5): 193-202.
- ZHANG Z M, NI C, OU X H, et al. Research progress on immune function of food-derived bioactive peptides[J]. Food & Machinery, 2023, 39(5): 193-202.
- [7] FERREIRA S H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*[J]. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy, 1965, 24(1): 163-169.
- [8] OSHIMA G, SHIMABUKURO H, NAGASAWA K. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digest of gelatin by bacterial collagenase[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology, 1979, 566(1): 128-137.
- [9] 董婧琪, 何泽贺, 田桂芳, 等. 大鳞副泥鳅蛋白 ACE 抑制肽的分离纯化与鉴定[J]. 食品与机械, 2022, 38(12): 145-150.
- DONG J Q, HE Z H, TIAN G F, et al. Isolation, purification and identification of ACE inhibitory peptide from *Paramisgurnus dabryanus* protein[J]. Food & Machinery, 2022, 38(12): 145-150.
- [10] CIURKO D, CZYŻNIKOWSKA Z, KANCELISTA A, et al. Sustainable production of biosurfactant from agro-industrial oil wastes by *Bacillus subtilis* and its potential application as antioxidant and ace inhibitor[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(18): 10824.
- [11] SU Y C, CHEN S C, SHEN J S, et al. Screening and molecular mechanisms of novel ACE- inhibitory peptides from *gracilariopsis lemaneiformis*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(23): 14850.
- [12] 张玲瑜, 苗建银, 曹愚, 等. 米糠蛋白源 ACE 抑制肽的酶解制备及活性研究[J]. 食品与机械, 2022, 38(3): 160-166.
- ZHANG L Y, MIAO J Y, CAO Y, et al. Enzymatic preparation and activity study of rice bran protein-derived ACE inhibitory peptides[J]. Food & Machinery, 2022, 38(3): 160-166.
- [13] 陈胜军, 蔡苗苗, 杨贤庆, 等. 海洋藻类来源 ACE IPs 的酶法制备及评价模型的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(20): 298-303.
- CHEN S J, CAI M M, YANG X Q, et al. Enzymatic preparation and evaluation model of marine algae-derived angiotensin converting enzyme inhibitory peptides: a review [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(20): 298-303.
- [14] ZHOU J, HAN Q Y, KOYAMA T, et al. Preparation, purification and characterization of antibacterial and ACE inhibitory peptides from head protein hydrolysate of Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*[J]. Molecules, 2023, 28(2): 894.
- [15] CAO D Q, LU X J, XU X T, et al. Purification and identification of a novel ACE inhibitory peptide from marine alga *Gracilariopsis lemaneiformis* protein hydrolysate[J]. European Food Research and Technology, 2017, 243(10): 1 829-1 837.
- [16] JOSHI I, JANAGARAJ K, PEER M N, et al. 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(7): 101770.
- [17] LU Y, WU Y J, HOU X H, et al. Separation and identification of ACE inhibitory peptides from lizard fish proteins hydrolysates by metal affinity-immobilized magnetic liposome [J]. Protein Expression and Purification, 2021, 191: 106027.
- [18] EISELE T, STRESSLER T, KRANZ B, et al. Automated multi-step purification protocol for angiotensin-I-converting-enzyme (ACE) [J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences, 2012, 911: 64-70.
- [19] MAGHRABY Y R, EL-SHABASY R M, IBRAHIM A H, et al. Enzyme immobilization technologies and industrial applications[J]. ACS Omega, 2023, 8(6): 5 184-5 196.
- [20] MOHAMMADI M, SHAHEDI M, AHRARI F, et al. Isocyanide-based multi-component reactions for carrier-free and carrier-bound covalent immobilization of enzymes[J]. Nature Protocols, 2023, 18(5): 1 641-1 657.
- [21] UDENIGWE C, MOHAN A. Mechanisms of food protein-derived antihypertensive peptides other than ACE inhibition [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 8: 45-62.
- [22] ASOODEH A, YAZDI M M, CHAMANI J. Purification and characterisation of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from lysozyme hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2012, 131(1): 291-295.
- [23] JAO C L, HUANG S L, HSU K C. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: Inhibition mode, bioavailability, and antihypertensive effects[J]. BioMedicine, 2012, 2(4): 130-136.
- [24] ARENDSE L B, JAN-DANSER A H, POGLITSCH M, et al. Novel therapeutic approaches targeting the renin-angiotensin system and associated peptides in hypertension and heart failure[J]. Pharmacological Reviews, 2019, 71(4): 539-570.
- [25] 刘畅. 食源性生物活性肽对 ACE N 和 C 结构域的抑制作用机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021: 1-5.
- LIU C. Study on the inhibitory mechanism of food-derived bioactive peptides on ACE N and C domains[D]. Changchun: Jilin University, 2021: 1-5.
- [26] BEMNSTEIN K E, ONG F S, BLACKWELL W L B, et al. A

- modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme[J]. *Pharmacological Reviews*, 2013, 65(1): 1-46.
- [27] RIORDAN J F. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives[J]. *Genome Biology*, 2003, 4(8): 1-5.
- [28] 林凯, 韩雪, 张兰威, 等. ACE抑制肽构效关系及其酶法制备的研究进展[J]. *食品科学*, 2017, 38(3): 261-270.
- LIN K, HAN X, ZHANG L W, et al. Progress in structure-activity relationship and enzymatic preparation of ACE inhibitory peptides[J]. *Food Science*, 2017, 38(3): 261-270.
- [29] GUY J L, LAMBERT D W, WARNER F J, et al. Membrane-associated zinc peptidase families: comparing ACE and ACE2[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Proteins and Proteomics*, 2005, 1751(1): 2-8.
- [30] IWATA M, GREENBERG B. Ectodomain shedding of ACE and ACE2 as regulators of their protein functions[J]. *Current Enzyme Inhibition*, 2011, 7(1): 42-55.
- [31] FRYER R M, SEGRETÍ J A, BANFOR P N, et al. Effect of bradykinin metabolism inhibitors on evoked hypotension in rats: rank efficacy of enzymes associated with bradykinin-mediated angioedema[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2008, 153(5): 947-955.
- [32] SHARMA S, PRADHAN R, MANICKAVASAGAN A, et al. Corn distillers solubles as a novel bioresource of bioactive peptides with ACE and DPPIV inhibition activity: characterization, in silico evaluation, and molecular docking[J]. *Food & Function*, 2022, 13(15): 8179-8203.
- [33] MARTÍNEZ S M, GABALDÓN J A, GARCÍA S M. Unravelling the molecular mechanisms associated with the role of food-derived bioactive peptides in promoting cardiovascular health[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 64(5): 103645.
- [34] MA F F, WANG H, WEI C K, et al. Three novel ACE inhibitory peptides isolated from ginkgo biloba seeds: purification, inhibitory kinetic and mechanism[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 9: 1579.
- [35] DWEVEDI A. *Polymeric supports for enzyme immobilization* [M]. London: Academic Press, 2021: 1-25.
- [36] 刘宏, 陈兰英. 血管紧张素转换酶的固相化与性质[J]. *中国医学科学院学报*, 2000, 22(6): 558-561.
- LIU H, LIU L Y. Immobilization and properties of angiotensin converting enzyme[J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2000, 22(6): 558-561.
- [37] 刘宏, 陈兰英. 血管紧张素转换酶固相化方法的选择[J]. *基础医学与临床*, 2001(3): 278-281.
- LIU H, LIU L Y. Immobilization methods of angiotensin converting enzyme[J]. *Basic Medical Sciences and Clinics*, 2001(3): 278-281.
- [38] MEGÍAS C, PEDROCHE J, YUST M D M, et al. Immobilization of angiotensin-converting enzyme on glyoxyl-agarose[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(13): 6414-6415.
- [39] MEGÍAS C, PEDROCHE J, YUST M D M, et al. Affinity purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides using immobilized ACE[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(19): 7120-7124.
- [40] 孙凤祥, 刘长江, 王守训, 等. 甲壳糖固定血管紧张素转换酶的制备及其性质[J]. *潍坊医学院学报*, 2004, 26(3): 169-170.
- SUN F X, LIU C J, WANG S X, et al. Production and characterization of immobilized angiotensin converting enzyme (ACE) by chitosan[J]. *Acta Academiae Medicinae Weifang*, 2004, 26(3): 169-170.
- [41] 黄燕, 田清清, 李谭瑶, 等. 亲和色谱法筛选中药中血管紧张素转化酶抑制剂[J]. *中国科学B辑*, 2009, 39(8): 760-766.
- HUANG Y, TIAN Q Q, LI T Y, et al. Screening of angiotensin converting enzyme inhibitors from traditional Chinese medicines by affinity chromatography[J]. *Science in China (Series B)*, 2009, 39(8): 760-766.
- [42] 洪韞嘉, 李谭瑶, 陈波, 等. 壳聚糖固定化血管紧张素转化酶及其性质[J]. *高等学校化学学报*, 2009, 30(2): 328-331.
- HONG Y J, LI T Y, CHEN P, et al. Immobilization of angiotensin converting-enzyme on chitosan microspheres[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2009, 30(2): 328-331.
- [43] TIAN Q Q, ZHOU N Y, ZENG W X, et al. Effect of alkylamine on activity and stability of immobilized angiotensin converting enzyme[J]. *Catalysis Communications*, 2012, 24: 16-19.
- [44] 孙凤祥, 王守训, 任维栋, 等. 亲和色谱法从猪骨胶原蛋白酶解物中分离纯化血管紧张素转换酶抑制剂[J]. *中国生化药物杂志*, 2004, 25(6): 347-349.
- SUN F X, WANG S X, REN W D, et al. Isolation and purification of angiotensin converting enzyme inhibitor from pig bone collagenase hydrolysate using affinity chromatography[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmacology*, 2004, 25(6): 347-349.
- [45] SUN M L, ZHANG Q, MA Q, et al. Affinity purification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from volutharpa ampullacea perryi protein hydrolysate using Zn-SBA-15 immobilized ACE[J]. *European Food Research and Technology*, 2018, 244(3): 457-468.
- [46] 陈佩佩, 龚林军, 吕永琴. 多孔整体柱固定化酶研究进展[J]. *生物加工过程*, 2019, 17(1): 36-43.
- CHEN P P, GONG L J, LU Y Q. New development and

- application of porous monoliths as solid supports for immobilization of enzymes[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2019, 17(1): 36-43.
- [47] 陈盈盈. 冻凝胶整体柱的制备及固定化血管紧张素转化酶的研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2012: 20-43.
- CHEN Y Y. Study on the preparation of monolithic materials via cryogelation for the immobilization of ACE[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2012: 20-43.
- [48] HARIRI P, JAFARI-NODOUSHAN H, MOJTABAVI S, et al. Magnetic casein aggregates as an innovative support platform for laccase immobilization and bioremoval of crystal violet[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 202: 150-160.
- [49] ZHANG L, WANG W H, YANG Y Q, et al. Site-specific, covalent immobilization of PNGase F on magnetic particles mediated by microbial transglutaminase[J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1 250: 340972.
- [50] AZIZI V, MOHAMMADI M, MOKARRAM R R, et al. Immobilization of α -amylase on modified magnetic zeolite (MAZE) coated with carboxymethyl cellulose (CMC) composite and its properties[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 144(4): 111214.
- [51] MANOUCHEHRI M, SEIDI S, ABDULLAH F O. Application of magnetic nanomaterials in magnetic-chromatography: a review[J]. Talanta, 2021, 229: 122273.
- [52] XIMENES I A T, DE OLIVEIRA P C O, WEGERMANN C A, et al. Magnetic particles for enzyme immobilization: a versatile support for ligand screening[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2021, 204: 114286.
- [53] WANG M X, YOU X Y. Critical review of magnetic polysaccharide-based adsorbents for water treatment: synthesis, application and regeneration[J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 323(3): 129118.
- [54] 兰雄雕, 陈锡鸿, 廖丹葵, 等. 磁性琼脂糖微球固定化血管紧张素转化酶的制备及性质[J]. 精细化工, 2014, 31(12): 1 461-1 465, 1 470.
- LAN X D, CHEN X H, LIAO D K, et al. Preparation and properties of magnetic agarose microsphere immobilized angiotensin converting enzyme[J]. Fine Chemicals, 2014, 31(12): 1 461-1 465, 1 470.
- [55] DE ALMEIDA F G, VANZOLINI K L, CASS Q B. Angiotensin converting enzyme immobilized on magnetic beads as a tool for ligand fishing[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, 132: 159-164.
- [56] LAN X D, LIAO D, WU S G, et al. Rapid purification and characterization of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from lizard fish protein hydrolysates with magnetic affinity separation[J]. Food Chemistry, 2015, 182: 136-142.
- [57] FENG X Z, LIAO D K, SUN L X, et al. Affinity purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from Wakame (*Undaria pinnatifida*) using immobilized ACE on magnetic metal organic frameworks[J]. Marine Drugs, 2021, 19(3): 177.
- [58] CHAUHAN V, KAUSHAL D, DHIMAN V K, et al. An insight in developing carrier-free immobilized enzymes[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 794411.
- [59] 曾伟秀. 交联血管紧张素转化酶聚集体的制备及应用[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2013: 12-20.
- ZENG W X. Preparation and application of cross-linked angiotensin converting enzyme aggregates[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2013: 12-20.
- [60] 曾伟秀, 田青青, 赵昕, 等. 交联血管紧张素转化酶聚集体的制备及性质[J]. 应用化学, 2013, 30(7): 815-820.
- ZENG W X, TIAN Q Q, ZHAO X, et al. Preparation and properties of cross-linked angiotensin converting enzyme aggregates[J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2013, 30(7): 815-820.