

酶解燕麦蛋白制备 ACE 抑制肽的研究

张晓平¹, 赵世锋², 蒋 琼¹, 董银卯¹, 刘永国¹, 任 清^{1,*}

(1. 北京工商大学 植物资源研究开发北京市重点实验室, 北京 100037; 2. 张家口市农业科学院, 河北 张家口 075000)

摘 要: 本研究以燕麦蛋白为原料, 分别选用 Alcalase、Neutrase 和 Protamex 进行单独或联合水解, 经活性炭 YD-303 脱色、大孔吸附树脂 DA-201C II 脱盐及分级纯化、Sephadex G-25 凝胶色谱柱进一步分离, 以获得高纯度、高活性的血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制肽。结果表明: 单酶反应时, Alcalase 水解 2h 所获得的产物对 ACE 的抑制率可达 85.40%; YD-303 处理燕麦蛋白酶解液脱色最优工艺为添加量 1.5%(W/V)、pH3.5、温度 40℃、脱色时间 75min。利用 75% 乙醇洗脱大孔吸附树脂 DA-201C II 所获得的组分 ACE 抑制活性最高, 其经 Sephadex G-25 进一步分离纯化, 得到四个分离组分, 第四组分的 ACE 抑制活性最高, 抑制率为 95.6%。

关键词: 燕麦蛋白; 酶解; ACE 抑制肽; 脱色; 脱盐

Study on Preparation of Angiotensin I-converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptide from Oat Protein by Enzymatic Hydrolysis

ZHANG Xiao-ping¹, ZHAO Shi-feng², JIANG Qiong¹, DONG Yin-mao¹, LIU Yong-guo¹, REN Qing^{1,*}

(1. Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing Technology and Business University, Beijing 100037, China; 2. Zhangjiakou Academy of Agricultural Sciences, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: Oat protein was hydrolyzed by Alcalase, Neutrase, and Protamex individually or jointly and the obtained hydrolysates were further subjected to decolorization with activated carbon YD-303 and purification with macroporous adsorption resin DA201-C II for desalination and Sephadex G-25 column for fractionation. The results showed that the hydrolysates of oat protein by individual Alcalase had the highest ACE inhibitory activity of 85.40%. The optimum decolorization conditions with YD-303 contained quantity of activated carbon 1.5%, pH 3.5, 40 °C, and adsorption time 75 min. Fractions eluted with 75% ethanol from macroporous adsorption resin displayed the highest inhibitory activity and were further separated by Sephadex G-25 into 4 subfractions. The fourth subfraction presented the most effective elution and its inhibitory activity was 95.6%.

Key words: oats protein; enzymatic hydrolysis; ACE inhibitory peptide; decolorization; desalination

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)11-0189-05

随着人们生活水平的不断提高、平均寿命的不断延长, 社会逐步进入老龄化, 高血压的患病率也逐步上升。高血压病是引起冠心病、心肌梗塞、脑卒中和肾功能衰竭等并发症的主要原因, 被喻为人类健康的“第一杀手”。因此, 治疗和防治高血压病是当今社会研究的一个热门课题^[1-3]。

在高血压发病机制中, 肾素 - 血管紧张素系统(rennin-angiotensin system, RAS)是调节血压的重要内分泌系统, 激肽 - 激肽生成酶系统(kallikrein-kinin system, KKS)是人体内的一种降血压系统。RAS 与 KKS 的平衡失调是引起高血压的重要原因之一。而 ACE 在

RAS 和 KKS 系统中对血压调节起重要作用, 因此, 通过抑制 ACE 活性治疗高血压病是一种行之有效的途径^[4]。

虽然合成的 ACE 抑制剂降压效果显著, 但由于其高活性和特异性, 应用过程中也出现了严重的负效应^[5]。这就促使人们去寻找更有效的 ACE 抑制剂。国内外研究表明, 食物蛋白质酶解产物中的一些短肽具有广泛的生理调节功能, 如免疫调节肽、激素肽、酶抑制剂肽、抗生素肽、抗病毒肽、降血压肽、降胆固醇肽等^[6], 特别是具有降血压活性的 ACE 抑制肽受到广泛的关注。

食源性的 ACE 抑制肽降血压效果温和、专一、持久、安全性高, 而且对正常血压无影响, 无副作用^[7]。

收稿日期: 2008-10-19

作者简介: 张晓平(1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事生物活性大分子的分离提取研究。E-mail: xiaoping830419@163.com

* 通讯作者: 任清(1969-), 男, 讲师, 博士, 主要从事生物活性成分分离提取及功能研究。E-mail: renqing1349@sina.com

因此,从食物资源中分离出的 ACE 抑制肽显示出了良好的应用前景。自 1979 年, Oshima 等^[8]首次从明胶酶解液中分离出降血压肽以来,人们又从乳制品蛋白^[9-10]、玉米和荞麦等植物蛋白^[11-13]、鱼贝类和藻类等水产蛋白^[14-15],以及猪、牛等动物蛋白^[16-17]的酶解物中提取出降血压肽,并开发多种相应的产品。

本实验以燕麦麸为原料,利用碱提酸沉原理提取燕麦蛋白。燕麦蛋白经不同蛋白酶水解后,经活性炭 YD-303 脱色,大孔吸附树脂 DA-201C II 脱盐及分级纯化, Sephadex G-25 凝胶色谱柱进一步分离,以研究不同组分的 ACE 抑制活性,旨在为 ACE 抑制肽的分离纯化及进一步研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

燕麦麸皮(蛋白质含量 17.8%) 河北省康保县翔龙食品有限公司; ACE 和 马尿酸 - 组氨酸 - 亮氨酸(HHL) Sigma 公司; Alcalase、Neutrase、Protamex Novozymes 公司; Folin- 酚试剂 Sigma 公司; 牛血清白蛋白、VB₁₂、氧化性谷胱甘肽 北京拜尔迪生物公司; YD-303 活性炭 远大活性炭公司; 大孔吸附树脂层析柱系统(2.5cm × 60cm): 自制; DA201-C II 江阴市有机化工厂; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

DSHZ-300 多用途水浴恒温振荡器 江苏太仓市实验设备厂; Beckman coulter 高速离心机 Beckman 公司; 凝胶层析系统(包括: 层析柱 1.5cm × 60cm、DHL-A 电脑恒流泵、DBS-100 电脑全自动部分收集器和 IHID-2 核酸蛋白检测仪记录仪) 上海沪西分析仪器厂有限公司; 其他均为实验室常用仪器。

1.3 方法

1.3.1 燕麦蛋白的提取

称取一定量的燕麦麸,以料液比为 1:28 加入去离子水,调 pH 值为 10.5,置于超声波生化仪(频率 28Hz,强度 0.8A),保温于 65℃,浸提 75min,离心(10000 r/min, 10min),取上清液调 pH 值至燕麦蛋白等电点处(pI = 4.0),室温静置 60min,在 4000r/min 条件下离心 15min,即得燕麦蛋白沉淀;用去离子水漂洗燕麦蛋白沉淀三次后,加入一定量去离子水溶解,配成 5% 的蛋白溶液,备用。

1.3.2 ACE 抑制肽的制备

1.3.2.1 单酶水解

取一定量的燕麦蛋白溶液,置于恒温酶反应器中,调至酶的最适条件对其酶解,选用的蛋白酶及各自酶解条件,见表 1。在酶最适条件下连续酶解 3h,酶解过

程中保持 pH 值稳定。每隔 1h 取酶解液 20ml,置于 90℃ 水浴中 15min,灭酶,迅速冷却到 40℃,调节溶液 pH 值至燕麦蛋白的等电点,冷却,在 4℃, 10000r/min 条件下离心 20min,取上清液,调节 pH 7.0,测定水解液中多肽含量。根据不同时间段下多肽的含量,将其配成相同浓度的多肽溶液(本研究测定 ACE 抑制率所用多肽浓度为 2mg/ml),然后测定其各自的 ACE 抑制活性。

表 1 实验中选用的酶及水解条件
Table 1 Selected enzymes and their optimal conditions

酶	pH	温度(℃)	E/S(%)
Alcalase	7.5	60	5
Neutrase	7	50	5
Protamex	7	50	5

1.3.2.2 联酶水解

在最佳蛋白酶的最适条件下,进行单酶水解,水解一定时间后,置于 90℃ 水浴中 15min,灭酶,冷却至另一酶的最适水解温度后,调节 pH 值,加入酶再次进行水解;连续酶解 3h,每隔 1h 取酶解液 20ml,其它同单酶水解实验。

1.3.3 酶解液脱色工艺的优化

燕麦蛋白酶解液 → 调 pH 值 → 加活性炭 → 恒温水浴(转速为 100r/min) → 脱色 → 抽滤 → 多肽溶液

1.3.4 酶解产物的脱盐及分级纯化

将经过预处理的 DA201-C II 树脂用无水乙醇充分膨胀,加入去离子水进行洗涤,直至树脂中无乙醇残留,装满 2.5cm × 60cm 层析柱;将脱色后的燕麦蛋白酶解液进行浓缩,直至多肽浓度为 40mg/ml,调 pH 值 4.0;室温条件下,将酶解液以 1BV/h 的流速流经层析柱;上样结束后,用去离子水以 1BV/h 的流速洗涤层析柱,以 15ml/管收集水洗脱液,以去离子水为对照,在波长 220nm 处测定其电导率及吸光度,直至洗脱液的电导率与去离子水相当、吸光度小于 1 为止;依次用 15%、35%、55%、75% 和 95% 的乙醇以 1.5ml/min 的流速流经层析柱,对 DA201-C II 树脂吸附的燕麦肽进行分步洗脱,分别收集各组分并配制为相同浓度的多肽液,测定各组分的 ACE 抑制活性。

1.3.5 凝胶分离纯化洗脱组分

利用 Sephadex G-25 对 75% 乙醇洗脱的组分进行分离纯化,进一步研究不同组分的 ACE 抑制活性,从而获得具有高 ACE 抑制活性的多肽。具体参数如下:凝胶柱规格: 1.5 × 60cm; 流速: 0.6ml/min; 检测波长: 280nm; 上样量: 5ml; 洗脱液: 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液, pH = 6.8。

1.3.6 ACE 抑制率的测定^[18]

首先, 取 5 mmol/L HHL 溶液 100 μ l 与 40 μ l ACE 抑制肽混合, 置于 37℃ 水浴中, 预热 5min, 加入 0.1U/ml ACE 溶液 10 μ l, 于 37℃ 恒温水浴中反应 60min; 其次, 向反应体系中加入 1mol/L HCl 溶液 150 μ l 以终止反应, 再加入 1.5ml 乙酸乙酯(萃取反应体系中的马尿酸), 混合均匀, 4℃、4000r/min 条件下离心 10min; 最后, 从反应体系中取出 1ml 酯层溶液转入另一试管中, 置于 80℃ 恒温干燥箱中烘干后, 重新溶于 3ml 超纯水中, 于 228nm 处测定吸光度(表 2)。

表 2 ACE 抑制率的测定

Table 2 Determination procedure of ACE inhibiting activity

试剂	实验过程		
	a	b	c
0.1U/ml ACE(μ l)	0	0	10
1mol/L HCl(μ l)	0	0	150
5mmol/L HHL(μ l)	100	100	100
ACE 抑制剂(μ l)	40	0	40
硼酸盐缓冲液(μ l)	0	40	0
37℃ 水浴 5min			
0.1U/ml ACE(μ l)	10	10	0
37℃ 水浴 60min			
1mol/L HCl(μ l)	150	150	0
ACE 抑制剂(μ l)	0	40	0
硼酸盐缓冲液(μ l)	40	0	40
乙酸乙酯(ml)	1.5	1.5	1.5
均匀混合, 离心(4000r/min, 10min), 取 1ml 的乙酸乙酯层, 80℃ 下烘干。			
超纯水(ml)	3	3	3
超声 10min, 使目标产物充分溶解 228nm 检测吸光度			

ACE 抑制率计算公式如下:

$$\text{ACE 抑制率(\%)} = \frac{A_b - A_a}{A_b - A_c} \times 100$$

1.3.7 脱色率的测定

燕麦蛋白酶解液经高速离心后, 经紫外-可见分光光度计扫描, 发现酶解液在 450nm 处有最大吸收峰, 并且以某一批次酶解液的色素浓度为 100%, 配置不同色素浓度的样品溶液, 验证不同色素浓度与其在 450nm 波长下吸光度的线性关系, 经验证在 450nm 波长下色素浓度与吸光度具有良好的线性关系, 两者方程为 $y = 0.0065x - 0.0038$, $R^2 = 0.9997$, 故选取 450nm 作为检测燕麦蛋白酶解液中色素浓度的最佳吸收波长。

在 450nm 波长条件下, 分别测定脱色前后燕麦蛋白酶解液的吸光度, 计算燕麦蛋白酶解液的脱色率, 计算公式如下:

$$\text{脱色率(\%)} = \frac{\text{脱色前吸光度} - \text{脱色后吸光度}}{\text{脱色前吸光度}} \times 100$$

1.3.8 多肽回收率计算

$$\text{多肽回收率(\%)} = \frac{\text{脱色后多肽浓度}}{\text{脱色前多肽浓度}} \times 100$$

1.3.9 综和评分计算

正交试验数据处理采用加权评分法计算综合评分, 即综合评分 = (脱色率 / 最大脱色率) $\times$ 100 $\times$ 0.5 + (回收率 / 最大回收率) $\times$ 100 $\times$ 0.5。

2 结果与分析

2.1 燕麦蛋白单酶水解产物的 ACE 抑制活性

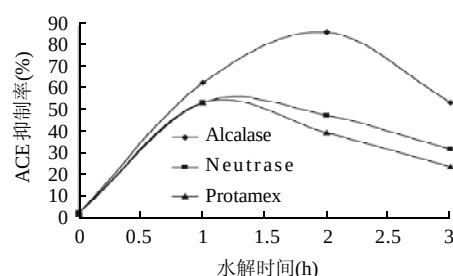


图 1 酶解时间与 ACE 抑制活性关系

Fig.1 Relationships between hydrolysis time and ACE inhibitory activity for 3 kinds of enzyme

由图 1 中可知, 未酶解的燕麦蛋白几乎没有 ACE 抑制活性, 但所有的酶解产物均表现出抑制作用, 因此, ACE 抑制活性是由酶解后所产生的肽类物质所引起的。酶解产物 ACE 抑制活性与水解时间明显相关, 并非简单的有或无, 这可能是由于酶解产物组成的复杂性和 ACE 较宽的底物特异性所决定的。

根据酶解产物 ACE 抑制活性的高低, 从整体上而言, Alcalase 要比 Neutrase 和 Protamex 作用于燕麦蛋白的酶解产物具有更强的 ACE 抑制作用, 可能是由酶的活性、作用位点的不同导致对同一底物的作用效果有明显的差异。同时, 随着酶解时间的延长, 酶解产物 ACE 抑制活性反而下降, 可能是由于随着反应的进行, 具有 ACE 抑制活性的多肽被再次酶解, 甚至被水解为氨基酸。因此, 选用 Alcalase 作为制备燕麦蛋白 ACE 抑制肽的最适用酶, 水解时间为 2h, 对 ACE 抑制率为 85.4%。

2.2 燕麦蛋白联酶水解产物的 ACE 抑制活性

由图 2 可知, 在联酶水解的初始阶段, 酶解产物 ACE 抑制率均呈不同程度的下降。这可能是由于 Alcalase 酶解产生的具有 ACE 抑制活性的多肽被再次加入的酶作用, 导致酶解产物的 ACE 抑制活性下降。但是组合 Alcalase+Neutrase 和 Alcalase+Protamex 随着酶解反应的进行, 酶解产物 ACE 抑制活性又有不同程度的提高。吴建平^[19]和蒋菁莉等^[20]分别在大豆降压肽和牦牛

乳酪蛋白降血压肽的研究中, 均出现同样的现象。

结果显示, 联酶与单酶水解相比, 联酶水解燕麦蛋白所获得的产物 ACE 抑制活性并没有得到明显的提高。因此, 从简化工艺的角度考虑, 选择 Alcalase 单酶水解燕麦蛋白制备 ACE 抑制肽更具实际意义。

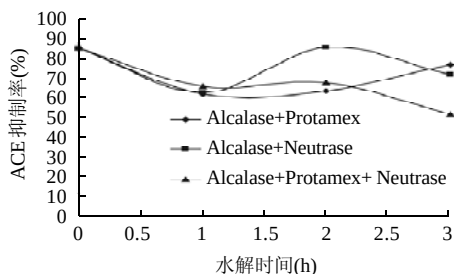


图2 酶解时间与 ACE 抑制活性关系

Fig.2 Relationships between hydrolysis time and ACE inhibitory activity for 3 enzyme combinations

2.3 燕麦蛋白酶解液脱色工艺的确定

表3 因素-水平设计表

Table 3 Factors and levels of orthogonal test on decolorization conditions of oat protein hydrolysate

水平	因素			
	pH	添加量(% , W/V)	温度(°C)	时间(min)
1	2.5	0.5	35	45
2	3	1	40	60
3	3.5	1.5	45	75

燕麦蛋白在经蛋白酶水解的过程中, 常伴随大量色素物质的形成^[21], 使酶解液呈现出褐色或黑色。这些色素的存在, 不仅使其在食品、药品工业中的应用受到限制, 而且不利于有效成分的进一步分离纯化和结果分析。因此, 在利用 Alcalase 酶解燕麦蛋白制备 ACE 抑制肽的过程中, 必须将色素除去。活性炭对有机大分子色素具有较强的吸附能力, 为蛋白质酶解液常用的脱色剂。以脱色率和多肽回收率为评价指标, 筛选出 YD-303 活性炭作为燕麦蛋白酶解液的脱色剂, 设计出 YD-303 处理燕麦蛋白酶解液脱色工艺正交试验的因素-水平表(表3), 正交试验结果见表4。

以综合评分为考察指标, 由表4可知, 各因素对 YD-303 处理燕麦蛋白酶解液处理效果的影响, 主次顺序为添加量>时间>温度>pH 值, 即添加量影响最大。由图3可知, YD-303 处理燕麦蛋白酶解液脱色最优工艺为添加量 1.5%(% , W/V), pH3.5, 温度 40℃, 脱色时间 75min。经过验证实验, 在此条件下经 YD-303 处理的燕麦蛋白酶解液的脱色率和蛋白回收率分别可达 85.36% 和 83.79%。

2.4 DA201-C II 树脂对脱色产物的脱盐及分级纯化

在燕麦蛋白酶解过程中, 需要不断滴加碱液来维持

反应体系的 pH 值, 导致样品中残留大量的无机盐。这些盐分的存在不仅影响最终产品的口味, 而且影响其生物活性的发挥。因此, 必须对燕麦蛋白酶解液进行脱盐。

表4 YD-303 处理燕麦蛋白酶解液的脱色工艺正交试验结果

Table 4 Results and range analysis of orthogonal test on decolorization conditions of oat protein hydrolysate

试验号	pH	添加量 (% , W/V)	温度 (°C)	时间 (min)	脱色率 (%)	多肽回收率 (%)	综合 评分
1	2.5	0.5	35	45	10.57	88.31	53.53
2	2.5	1	40	60	68.92	85.86	88.08
3	2.5	1.5	45	75	81.23	74.60	92.45
4	3	0.5	40	75	41.87	93.91	75.77
5	3	1	45	45	47.21	86.07	74.88
6	3	1.5	35	60	61.28	85.55	83.28
7	3.5	0.5	45	60	44.28	90.67	75.52
8	3.5	1	35	75	62.40	91.72	87.21
9	3.5	1.5	40	45	72.66	78.85	86.75
均值 1	78.020	68.273	74.673	71.720			
均值 2	77.977	83.390	83.533	82.293			
均值 3	83.160	87.493	80.950	85.143			
极差	5.183	19.220	8.860	13.423			

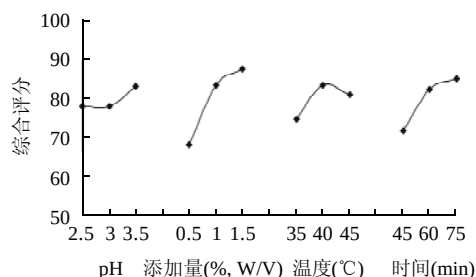


图3 效应曲线图

Fig.3 Visual diagram for range analysis of orthogonal test results

本研究证明, 大孔吸附树脂对燕麦蛋白酶解液进行吸附后, 酶解液的电导率变化不明显。而燕麦蛋白酶解液中对电导率有贡献的组分主要是无机盐和带电荷的氨基酸^[22], 说明大孔吸附树脂对盐几乎没有吸收, 而只对酶解液中多肽有吸附, 因此采用大孔吸附树脂对燕麦蛋白酶解液脱盐是一个行之有效的方法。

Cheung 等^[23]研究认为, 多肽的 ACE 抑制活性与疏水性氨基酸有关, 疏水性氨基酸残基占 60% 以上的 ACE 抑制肽具有更强的降压活性。由于不同浓度乙醇的极性不同, 它们与不同疏水性的肽段亲和力也就不同, 因此, 通过不同浓度的乙醇进行梯度洗脱, 就有可能得到具有不同降血压活性的燕麦肽, 在脱盐的同时实现 ACE 抑制肽的初步分离。不同浓度乙醇对大孔吸附树脂吸附的燕麦肽进行分步洗脱, 不同洗脱组分的 ACE 抑制活性, 结果见表5。

从表5可知, 75% 乙醇的洗脱组分对 ACE 抑制活性最高, 抑制率为 90.45%。

表5 不同乙醇浓度洗脱组分的ACE抑制活性

Table 5 ACE inhibitory activities of elution fractions of Alcalase hydrolystates on resin DA201-CII by different concentrations of ethanol

乙酸浓度(%)	15	35	55	75
ACE抑制率(%)	28.55	37.83	66.12	90.45

2.5 凝胶分离纯化高抑制活性的组分

利用 Sephadex G-25 对 75% 乙醇的洗脱组分进行分离纯化, 所获得的凝胶过滤图谱, 结果见图 4。

经 Sephadex G-25 分离后各组分的 ACE 抑制活性, 结果见表 6。

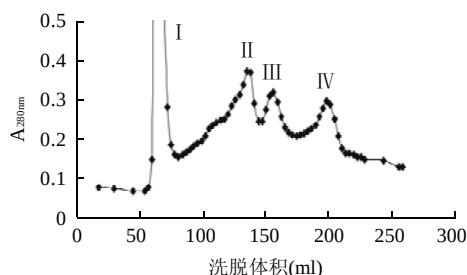


图4 Sephadex G-25 凝胶过滤图谱

Fig.4 Elution curve of 75% ethanol elution Sephadex G-25 column

表6 Sephadex G-25 层析分离组分的ACE抑制活性

Table 6 ACE inhibitory activities of 4 subfractions of 75% ethanol elution fraction

组分	I	II	III	IV
ACE抑制率(%)	8.7	45.15	70.2	95.6

由图 4 及表 6 可知, 75% 乙醇洗脱的组分中含有四个组分, III 号和 IV 号组分的抑制率较其他两个组分要高。同时, 根据凝胶排阻色谱原理, III 号和 IV 号组分的分子量也较小。Ganapathy 等^[24]研究证明, 小肽在体内能够保持较好的稳定性, 能够以较完整的形式被吸收, 因此, 应采用 III 号和 IV 号组分进行下一步研究。

3 结 论

3.1 通过对单酶和联酶水解实验对比研究, 选择 Alcalase 单酶水解燕麦蛋白制备 ACE 抑制肽更具实际意义。在最适条件下, 利用 Alcalase 酶解燕麦蛋白 2h, 获得的酶解产物 ACE 抑制率可达 85.4%。

3.2 YD-303 处理燕麦蛋白酶解液脱色的最优工艺为添加量 1.5%(W/V)、pH3.5、温度 40℃、脱色时间 75min。经过验证实验, 在此条件下经过 YD-303 处理的燕麦蛋白酶解液的脱色率和蛋白回收率分别可达 85.36% 和 83.79%。

3.3 利用不同浓度的乙醇分级洗脱大孔吸附树脂吸附的多肽, 75% 乙醇的洗脱组分对 ACE 抑制活性最高, 抑制率可达 90.45%, 其经 Sephadex G-25 进一步分离纯化,

得到四个分离组分, 第四组分不仅分子量最小, 而且 ACE 抑制活性最高, 抑制率为 95.6%。

参考文献:

- [1] 吴建平, 丁霄霖. 食品蛋白质降血压肽的研究进展[J]. 中国粮油学报, 1998(5): 13-16.
- [2] 辛志宏, 马海乐, 吴守一. 食品蛋白质中降血压肽的功能与应用[J]. 食品与发酵工业, 2003(8): 29-31.
- [3] 肖红, 段玉峰, 刘平, 等. 食品蛋白降血压肽及其研究进展[J]. 食品研究与开发, 2004(5): 10-13.
- [4] 吴炜亮, 吴国杰, 梁道双, 等. ACE抑制肽的生理功能和研究进展[J]. 现代食品科技, 2006, 22(3): 251-254.
- [5] MESSERLI F H. Combinations in the treatment of hypertension: ACE inhibitors and calcium antagonists[J]. Am J Hypertension Aug, 1999, 12: 86-90.
- [6] 赵海珍, 陆兆新, 刘战民. 天然食品来源的血管紧张素转换酶抑制肽的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(5): 315-317.
- [7] 梁汉紫, 刘成梅, 刘伟. 食源性 ACE 抑制肽的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2007(8): 156-158.
- [8] OSHIMA H, SHIMABUKURO K. Peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1979, 566: 128-137.
- [9] MAENO M, YAMAMOTO N, TAKANO T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790[J]. J Dairy Sci, 1996, 79: 1316-1321.
- [10] ABUBAKAR A, SAITO T, KITAZAWA H, et al. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion[J]. J Dairy Sci, 1998, 81: 3131-3138.
- [11] MIYOSHI S, ISHIKAWA H, KANKEO T, et al. Structure and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an α -zein hydrolysate[J]. Agric Biol Chem, 1991, 55: 1313-1318.
- [12] LI C H, MATSUI T, MATSUNOTO K, et al. Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein[J]. J Peptide Sci, 2002(8): 267-274.
- [13] YUST M M, PEODROCHE J, GIRONGLE J, et al. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with Alcalase[J]. Food Chem, 2003, 81: 363-369.
- [14] MATSUI T, MATSUFUJI H, SEKI E, et al. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle[J]. Biosci Biotech Biochem, 1993, 57: 922-925.
- [15] FUJITA H, YOSHIKAWA M. LKPNM: a pro-drug type ace inhibitory peptide derived from fish protein[J]. Immunopharmacology, 1999, 44: 123-127.
- [16] ARIAH K, NAKASHIMA Y, MUKAI T, et al. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins[J]. Meat Sci, 2001, 57: 319-324.
- [17] JANG A, LEE M. Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates[J]. Meat Sci, 2005, 69: 653-661.
- [18] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochem Pharmacol, 1971, 20: 1637-1648.
- [19] 吴建平, 丁霄霖. 大豆降压肽的研制(I)-生产高活性 ACEI 肽酶系的筛选[J]. 中国油脂, 1998, 23(2): 49-51.
- [20] 蒋菁莉, 任发政. 酶法制备牦牛乳酪蛋白源血管紧张素转换酶抑制肽[J]. 食品科学, 2006, 27(6): 35-38.
- [21] 刘惠宾, 赖其法, 金承涛. 活性炭对鱼蛋白水解液脱色效果的研究[J]. 食品科学, 1998, 19(7): 18-20.
- [22] 宫霞, 赵骏. 大孔吸附树脂对酪蛋白酶解液的脱盐作用研究[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 301-303.
- [23] CHEUNG H S, WANG F L, ONDETTI M A, et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin converting enzyme[J]. J Bio Chem, 1980, 255: 401-407.
- [24] GANAPATHY V, BRANDSCH M, LEIBACH F H. Intestinal transport of amino acids and peptides[M]. JOHNSON L R. Physiology of the gastrointestinal tract, New York: Raven Press, 1994.