

富硒螺旋藻蛋白水解多肽的制备及其对 ACE 活性的抑制作用

王韵, 蔡智辉, 张逸波, 戚红军, 凌钦婕, 黄峙
(暨南大学生命科学技术学院, 广东广州 510632)

摘要: 从富硒螺旋藻 (SeSP) 中提取含硒总蛋白 (SeSP-TP), 建立蛋白酶水解制备含硒多肽 (SeSP-PP) 的最佳条件, 体外检测 SeSP-PP 对血管紧张素转化酶 (ACE) 活性的抑制作用, 采用 ICP 法快速测定藻粉及总蛋白中的硒含量。结果发现, 5 种常见蛋白酶对 SeSP-TP 的水解度趋势为: 胃蛋白酶-胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶联合酶 > 碱性蛋白酶 > 木瓜蛋白酶 > 胰凝乳蛋白酶 > 胰蛋白酶 > 胃蛋白酶。利用胃蛋白酶-胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶联合酶水解, 可显著提高蛋白水解度, 达到 87.94%, 且联合水解的多肽对 ACE 抑制效率最高 (89.47%)。碱性蛋白酶水解得到的多肽对 ACE 的抑制率也较高。当荧光检测出的含硒多肽高于 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对 NO 的合成有明显的促进效应, 而含硒蛋白效果不明显。水溶性和非水溶性组分中测定的硒含量之和占总硒的 95.47%, 可能在提取制备 SeSP-TP 过程中, 部分含硒蛋白质和含硒小分子会在沉淀、复溶和透析等步骤中丢失。

关键词: 血管紧张素转化酶 (ACE); 螺旋藻; 制备; 硒; 多肽

文章编号: 1673-9078(2013)7-1574-1579

Preparation of Polypeptides by Hydrolysis of Selenium-enriched *Spirulina* Protein and their Inhibitory Activity for Angiotensin-converting Enzyme

WANG Yun, CAI Zhi-hui, ZHANG Yi-bo, QI Hong-jun, LING Qin-jie, HUANG Zhi
(College of Life Sciences and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The water soluble total protein (TP) of selenium-enriched *Spirulina platensis* (SeSP), named as SeSP-TP, was extracted by phosphate buffer and then hydrolyzed by 5 different proteases to produce SeSP peptides (SeSP-Ps). The angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of SeSP-Ps was measured in vitro and ICP method was used to rapidly determinate of selenium in algae powder and total protein content. The results showed that treatments with different proteases caused different degree of hydrolysis (DH) of SeSP-TP, and the combination digestion by pepsin, trypsin and chymotrypsin led to the highest DH value. The SeSP-Ps obtained via hydrolysis by the combination digestion of pepsin, trypsin and chymotrypsin showed the highest ACE-inhibitory activity (89.47%). The ACE inhibition efficiency of polypeptides prepared by alkaline protease is higher. Fluorescence detection showed that, when the content of selenium peptides was above 50 $\mu\text{g/mL}$, the synthesis of NO was obviously promoted. However, selenium protein showed little effect on the reaction. Selenium contents in both water-soluble and water-insoluble components accounted for 95.47% of total selenium, probably due to that in extraction and preparation of SeSP-TP, some selenium protein and small molecules containing selenium missed in precipitation, dissolution and dialysis steps.

Key words: angiotensin convert enzyme; *Spirulina platensis*; sample preparation; selenium; peptide

螺旋藻 (*Spirulina platensis*, SP) 是一种营养丰富均衡的健康食品^[1]。近 20 年来的研究发现, 螺旋藻具有独特的营养价值与医药保健功效, 并被联合国粮农组织 (FAO) 和世界卫生组织 (WHO) 分别誉为“最

收稿日期: 2013-03-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20975045)

作者简介: 王韵 (1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事富硒螺旋藻蓝蛋白活性研究,

通讯作者: 黄峙 (1968-), 男, 博士, 教授, 主要从事硒、硒等元素的活性形态及其作用机制研究

理想的食品”和“人类最佳保健品”。螺旋藻成为全球开发规模最大、应用领域最广的经济微藻, 我国已将其列入中药保护品种^[2]。螺旋藻富含优质蛋白质, 蛋白质含量高达其干重的 50~71%^[3]。硒 (Selenium, Se) 是人和动物的必需微量元素之一。硒参与构成人体内已知的 25 种硒酶 (Selenoenzyme) 和硒蛋白 (Selenoprotein), 它们在调节机体氧化还原平衡、物质代谢、发育与生殖及免疫功能方面均起重要作用^[4]。无机硒可经生物转化生成不同活性的生物有机硒, 如硒蛋白、硒多糖、硒脂等。螺旋藻具有生长速度快、

培养简便、对无机硒有较强耐性等优点,是硒生物有机化的理想载体。研究发现,富硒螺旋藻(Se enriched *Spirulina platensis*, SeSP)中含硒蛋白质是主要的活性硒形态,从 SeSP 中分离纯化的含硒藻蓝蛋白(Se containing phycocyanin, Se-PC)和含硒别藻蓝蛋白(Se containing allophycocyanin, Se-APC)具有很强的抗氧化、抗肝损伤和纤维化及抑制肿瘤细胞生长活性。

血管紧张素转化酶(Angiotensin-converting enzyme, ACE)是调节血压和血管功能的重要因子^[5]。ACE 切除血管紧张素 I C 末端的 His-Leu,生成活性更强的血管紧张素 II,引起小动脉血管平滑肌强烈收缩,导致血压迅速上升^[6]。抑制 ACE 的活性,可以有效阻止血管紧张素 II 的生成,从而达到防治高血压的目的。为寻求安全高效、副作用少的 ACE 抑制剂,近年来国内外学者关注天然食品对 ACE 活性的影响,发现在大豆、花生、沙丁鱼等食品蛋白质的酶水解产物中,可获得具有 ACE 抑制作用的多肽成分,已发现不同来源的 ACE 抑制多肽有 250 余种^[7-9]。研究表明,螺旋藻蛋白中也含有抑制 ACE 活性的多肽^[10]。本文从 SeSP 中提取总蛋白(SeSP-TP),通过研究 5 种常用蛋白酶对 SeSP-TP 的水解效率,建立多种蛋白酶联合水解 SeSP-TP 的方法,高效制备 SeSP-TP 水解多肽(SeSP-PP),并检测了 SeSP-PP 在体外对 ACE 活性的抑制作用,为应用 SeSP 功能食品防治高血压及心脑血管疾病提供科学实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

胃蛋白酶(Pepsin, 2500 U/mg)、胰蛋白酶(Trypsin, 10000 U/mg)、木瓜蛋白酶(Papain, 200 U/mg)、胰凝乳蛋白酶(Chymotrypsin, 1500 U/mg)、碱性蛋白酶(Alcalase, 200 U/mg)、马尿酸-组胺酰-亮氨酸(N-Hippuryl-His-Leu hydrate, HHL)、血管紧张素转化酶(10 U/mg)等试剂购自 Sigma 公司;BCA 法蛋白质定量试剂盒、HEPES 和 PBS 缓冲液购自鼎国生物技术公司;丙酮、乙酸乙酯等试剂均为 AR 级。实验全部采用 Milli Q 水。主要仪器有:RT-6100 酶标仪、JY92-IIID 型超声细胞破碎仪、TGL-16G 型冷冻高速离心机、S54 型紫外-可见分光光度计。

1.2 总蛋白的提取

取 SeSP 藻粉 10 g,加 100 mL 缓冲液(pH 8.3,含 0.1 M Tris-HCl, 20~25% Glycerol, 2% Polyvinylpyrrolidone, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.07% β -Mercaptoethanol),冰浴搅拌 6 h,超声破碎 5 min(5 s 破碎,5 s 间隔;功率 600 W),10%硫酸铵沉淀 4

h, 12000 g 离心 30 min 去掉细胞碎片,80%硫酸铵沉淀过夜,12000 g 离心 10 min 收集沉淀蛋白,加入 50 mL Milli Q 水复溶。4 °C 双蒸水透析过夜(3 次),采用 BCA 法测定蛋白质浓度^[11]。

1.3 水解多肽的制备

参照文献,取 SeSP-TP 与蛋白酶进行酶解。用五种单一酶水解,并模拟人体胃肠道,由胃蛋白酶-胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶联合水解共六种。水解结束,沸水浴 10min 终止反应,用截留分子量为 10KD 的超滤管超滤所有酶解样品,冷冻干燥^[6],得 SeSP-PP。

1.4 指标检测

1.4.1 蛋白质水解度的测定

用水解后多肽的量与水解前蛋白质的量之间的比值作为蛋白水解度(Degree of hydrolysis, DH)。蛋白质和多肽浓度均采用 BCA 方法测定。

1.4.2 硒含量检测

参照文献方法^[7],将 100 mg 或 100 μ L 的样品与 2 mL 消化液(浓硝酸:高氯酸为 3:1, V/V),180 °C 消化 2h,待溶液完全澄清后,12000 \times g 离心去沉淀,Milli Q 水稀释到 25 mL,用 ICP-AES 测定 Se 含量。

1.4.3 ACE 抑制率测定

ACE 活性测定方法参见文献^[7]。取 20 μ L SeSP-PP 和 20 μ L 50 mM HEPES-NaCl 缓冲液(pH8.3,含 300mM NaCl)混合,加入 0.3 mU ACE,37 °C 反应 15 min,加入 20 μ L 6.5 mM HHL,37 °C 反应 1 h,用 1M 的 HCl 终止反应。加入 200 μ L 乙酸乙酯萃取反应产物马尿酸(Hip),取上层 150 μ L,减压离心(40 °C、真空度 0.090 MPa)去除乙酸乙酯,固体用 500 μ L MilliQ 水溶解,测 228 nm 处光吸收值(产物马尿酸在 228 nm 处有特征吸收峰)。SeSP-PP 对 ACE 的抑制率按以下公式计算:

ACE 抑制率=(对照组 ACE 活力-测定组 ACE 活力)/对照组 ACE 活力 \times 100%

1.5 制备等电点聚焦

将 500 mg SeSP-TP 溶于 20 mL 的上样缓冲液(含 5M 尿素,2% CHAPs,10 mM DTT,2% IPG),充分溶解后 12000 g 离心 30 min,取上清 18 mL 注入到 Rotofor Cell 中。200 V 运行 1 h,100 V 升压 3 h,1500 V 维持 4 h,按等电点 3.5 到 10 收集 10 个组分各 1 mL,3 kD 超滤去除两性电解质和尿素,10 倍体积冷丙酮沉淀过夜,12000 g 离心 20 min 取沉淀,复溶于 0.5 mL Milli Q 水中,按上述胃蛋白酶-胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶联合水解制备 SeSP-PP。

1.6 荧光检测 NO 的合成

在 96 孔板中先加好 20 μ L 样品。多肽和蛋白各加 200、100、50、25、12.5、6.25 μ g/mL 这六个浓度,每

个浓度各加三个孔，测出荧光值求平均数和算偏差，留几个孔只加 PBS 对照。将细胞瓶中的细胞消化下来，数细胞。DAF-FMDA 稀释液稀释 DAF-FM DA，使终浓度为 5 μM。用稀释好的 DAF-FMDA 重悬细胞，细胞浓度为 10⁶ cells/mL。37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min。每隔 3~5 min 颠倒混匀一下，使探针和细胞充分接触。离心去除上清 PBS 重悬。每个孔加入 180 μL 细胞。495 nm 激发波长，515 nm 发射波长检测开始反应后 5、10、20、40、60、90、120 min 的荧光值。

1.7 统计分析

所有试验重复 3 次。结果以平均值±标准差表示，统计分析采用 SPSS 13.0 处理，差异显著性用 P<0.05 (*) 或 P<0.01 (**)*表示。

2 结果与讨论

2.1 多肽制备条件的优化

经大量预实验建立不同蛋白酶的最适水解条件(表 1)，并进一步优化 SeSP-TP 浓度和水解时间。胃蛋白酶-胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶联合水解时，模拟胃肠道消化过程，先用胃蛋白酶在 37 °C 和 pH 1.5 条件下水解 6 h，用 0.1 M NaOH 调节 pH 7.5 后，再用胰蛋白酶：胰凝乳蛋白酶 (10:1, U/U) 在 37 °C 水解 6 h^[3]。

2.2 SeSP-TP 及其硒含量

经试验批量培养生产 SeSP 藻粉，并从中提取 SeSP-TP，其中蛋白质含量、硒含量如表 1 所示。数据显示，SeSP 藻粉中总蛋白含量高达 661.30 mg/g，Se

含量为 613.60 μg/g，说明培养生产的 SeSP 品质优良，富含硒元素。SeSP-TP 中以水溶性蛋白为主，占总蛋白的 69.08%，相应地，SeSP 中的 Se 也主要分布在水溶性蛋白中，占总硒的 67.24%，因此采用水溶性蛋白组分作为 SeSP-TP 进行蛋白酶水解实验研究是合理的。在 SeSP 非水溶性组分中，蛋白质含量为 452.70 mg/g，占总蛋白的 25.40%，其中 Se 含量达 466.69 μg/g，占总硒的 28.22%。而且水溶性和非水溶性组分中测定的蛋白质量之和占总蛋白的 94.48%，测定的硒含量之和占总硒的 95.46%，提示其中有部分生物转化的有机硒可能结合在其它生物分子中，有待进一步研究证实。在提取制备 SeSP-TP 过程中，部分含硒蛋白质和含硒小分子也可能在沉淀、复溶和透析等步骤中丢失。

表 1 不同蛋白酶水解 SeSP-TP 的最适条件^[3]

Table 1 The optimal condition for SeSP-TP hydrolysis by different proteases

蛋白酶	酶量 /U	SeSP-TP 量/mg	pH	温度 /°C	反应 时间/h	终体 积/mL
碱性蛋白酶	50	100	7.8	60	6	5
胰蛋白酶	50	100	7.5	37	6	5
胰凝乳蛋白酶	50	100	7.5	40	6	5
木瓜蛋白酶	50	100	5.7	55	6	5
胃蛋白酶	50	100	1.5	37	6	5
胃蛋白酶-胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶	50:50:5	100	1.5→7.5	37	6+6	5

表 2 SeSP 总蛋白含量及含硒量

Table 2 Protein concentration and Se content in SeSP

样品	样品 总计	总蛋白			硒		
		mg/g or mg/mL	mg	%	μg/g or μg/mL	μg	%
干粉	10.43 g	661.30±42.63	6897.36±444.23	100	613.60±39.84	6399.85±414.72	100
非水溶性组分	3.87 g	452.70±26.91	1751.95±103.89	25.40±3.78	466.69±28.82	1806.09±111.41	28.22±4.56
水溶性组分	50.0 mL	95.29±10.23	4764.50±509.04	69.08±7.21	86.07±7.46	4303.50±370.30	67.24±7.71

2.3 不同蛋白酶水解度的比较

从图 1 中可以看出，在 5 mL 体积的水解体系中，50 U 蛋白酶水解 10 h，随着 SeSP-TP 底物浓度升高，水解度有所下降。

从图 2 中可以看出，在 5 mL 体积的水解体系中，SeSP-TP 底物浓度为 5~10 mg/mL，50 U 蛋白酶水解，随着时间增加，水解度亦增加，6 h 即达到很高水平，10 h 后虽然有所增加，但不明显，且浪费时间。

从图 3 可看出，SeSP-TP 底物浓度为 5 mg/mL，50 U 蛋白酶水解 6 h，蛋白质水解度可维持在最大值。5 种蛋白酶对 SeSP-TP 的水解度依次为：碱性蛋白酶>木瓜蛋白酶>胰凝乳蛋白酶>胰蛋白酶>胃蛋白酶。

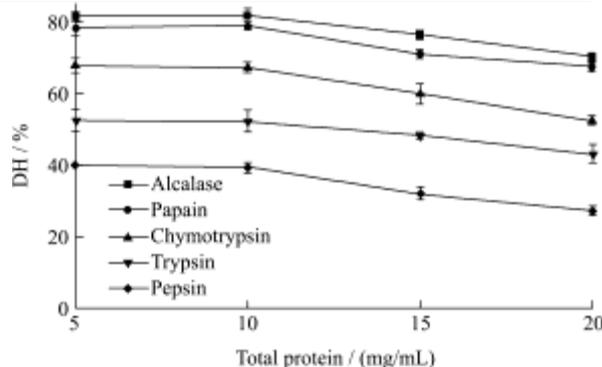


图 1 总蛋白浓度对蛋白酶水解效果的影响

Fig.1 Effects of protein concentration on DH of SeSP-TP digested by 5 proteases

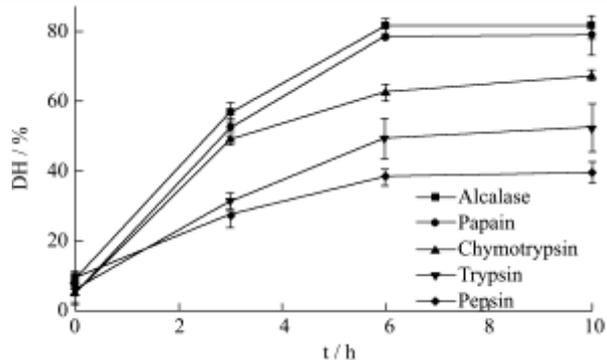


图 2 水解时间对蛋白酶水解效果的影响。

Fig.2 Effects of time on DH of SeSP-TP digested by 5 proteases

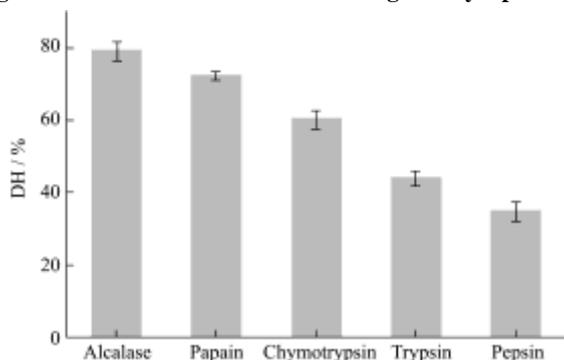


图 3 不同酶处理的影响

Fig.3 The influence of different enzyme treatment on DH of SeSP-TP digested by 5 proteases

注：底物浓度为 5 mg/mL，50U 蛋白酶水解 6h。

2.4 胃蛋白酶-胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶联合水解制备 SeSP-PP

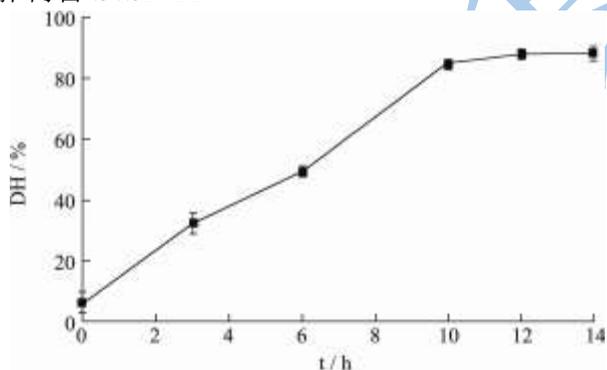


图 4 胃蛋白酶-胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶联用对 SeSP-TP 水解度的影响

Fig.4 Effect of combination digestion of pepsin, trypsin and chymotrypsin on DH of SeSP-TP

从图 4 中可看出，在整个水解过程中，随着水解度的升高，水解速率逐渐减低，符合蛋白酶水解过程中由于底物被分解而造成的反应平衡变化的规律。

虽然胰蛋白酶和胃蛋白酶对 SeSP-TP 的水解度较低，分别为 37.13% 和 36.46%，但是，当胃蛋白酶-胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶联合使用时对 SeSP-TP 的水解度

最高(图 2)，可以达到 87.94%。即先用胃蛋白酶水解 6 h，再加入胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶水解 6 h，其水解度可高达 90%，水解程度明显优于其他体外蛋白酶单独作用。胃蛋白酶-胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶联合使用很好地模拟了人体消化道酶系统，提示，SeSP-TP 可被人体高效消化利用。

2.5 SeSP-PP 对 ACE 的抑制率

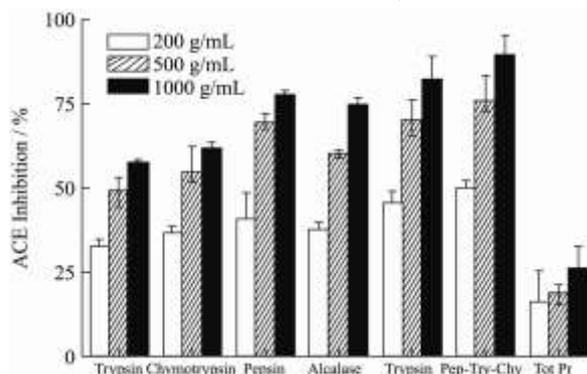


图 5 不同蛋白酶水解 SeSP-PP 对 ACE 的抑制率

Fig.5 ACE inhibition of SeSP-PP hydrolyzed by different proteases

如图 5 所示，5 种蛋白酶水解多肽对 ACE 抑制率结果依次为：木瓜蛋白酶>胃蛋白酶>碱性蛋白酶>胰凝乳蛋白酶>胰蛋白酶，但是，当胃蛋白酶-胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶联合水解的 SeSP-PPs 对 ACE 抑制效率最高 (89.47%)。胃蛋白酶-胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶联合水解，较好地模拟了人体消化道酶系统，提示 SeSP-TP 经人体消化利用后，可产生对 ACE 具有较强抑制作用的活性多肽。因此，该海藻作为防治高血压和心脑血管疾病的保健食品拥有广阔的应用前景。

2.6 ACE 抑制率与多肽等电点的关系

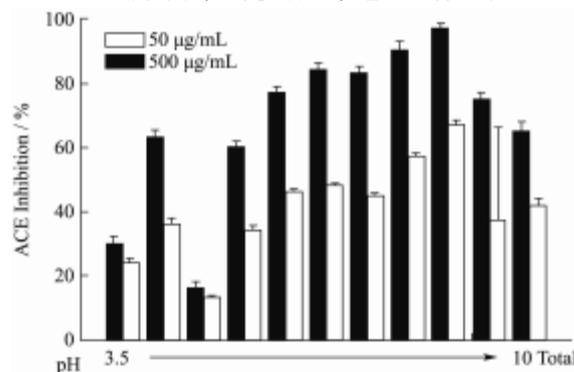


图 6 水解多肽抑制 ACE 效率与等电点的关系

Fig.6 Relationship between ACE-inhibitory activity of the peptide and protein isoelectric point

从图 6 可见，不同等电点的含硒藻蛋白通过胃蛋白酶-胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶联合水解 10 h，且总蛋白量比酶量为 10 mg/50 U 产生的含硒多肽对 ACE 的抑制在不同 pH 值时显示出不同的效果，且主要是 pH>6.5

的碱性蛋白质通过联合酶水解所得到的多肽具有更强的抑制效率。ACE作用的位点是末端的 His-Lue, 其中 His 的等电点为 7.6。这可能是由于 ACE 抑制肽是通过与底物竞争位点起作用, 因此, 对 ACE 高效抑制的多肽可能富含 His-Lue, 使得其底物蛋白等电点偏向碱性。提示, 联合水解的含硒多肽可能富含 His-Leu, 从而具有对 ACE 的高抑制活性。

2.7 含硒多肽与含硒蛋白对 NO 的合成影响

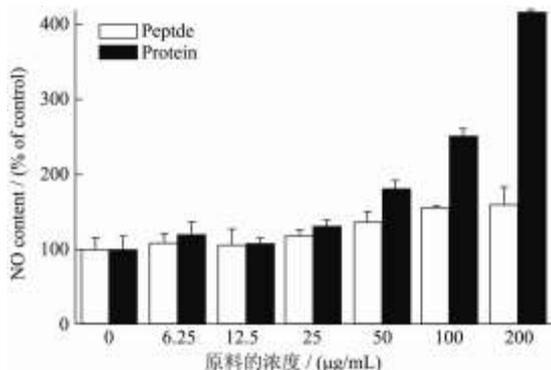


图7 反应后 120min 时, 含硒多肽和含硒蛋白对 NO 生成的影响关系(以所测得的荧光值表示)

Fig.7 Influence of selenium peptides and selenium protein on NO after a 120-min reaction

用荧光法所得的荧光值正比反映 NO 的浓度, 即荧光值的高低直接体现出 NO 的量, 从图 7 中可以看出, 在浓度为 50 μg/mL 以上的水解多肽对 NO 合成的促进作用远比水解蛋白质的促进作用高, 当浓度为 50 μg/mL 以下时, 差异不显著, 当高于 50 μg/mL 时, 差异极其显著 ($p < 0.01$), 这也说明当含硒多肽的浓度很低时, 对 NO 的合成起不到明显的作用。另外, 随着浓度的增加, 含硒蛋白对 NO 合成的影响变化不大, 而含硒多肽从 50 μg/mL 开始变化非常大, 相同条件对比下, 这表明了 NO 合成的影响关键因素是含硒多肽而不是含硒蛋白。

3 结论

3.1 螺旋藻细胞壁极薄, 易被人体消化系统消化吸收, 藻蓝蛋白 (Phycocyanin) 是藻类中一种具有重要生理活性的色素蛋白, 常用于药物和食品领域以及免疫学、细胞学等方面的研究^[11-13]。含硒蛋白质是 SeSP 中的主要活性组分^[11, 14]。近年来, 对天然 ACE 抑制肽的研究表明, 一些来源于蛋白酶解产生的活性肽可以对 ACE 起到有效的抑制作用^[15]。因此, 可以通过水解富硒螺旋藻得到高 ACE 抑制活性的多肽, 从而开发具有防止心脑血管疾病的天然活性药物。

3.2 通过实验总结, 从螺旋藻中提取含硒总蛋白 (SeSp-Tp), 用不同蛋白酶水解制备含硒多肽

(SeSp-Ps), 选取最佳水解条件, 即当总蛋白量比酶量为 10 mg/50 U, 采用联合酶水解方式水解 10 h 时具有最高水解率, 并且模拟了人体模拟人体内消化道消化方式, 其得到的多肽, 对 ACE 具有较强抑制活性可达 90%。多肽浓度为 50 μg/mL 以上的水解多肽对 NO 合成的促进作用远比水解蛋白质的促进作用高。所以, 对含硒多肽的研究, 寻找并鉴定水解藻多肽中能有效防治高血压的组分, 为应用海洋功能食品防治高血压及心脑血管疾病提供科学实验依据。

参考文献

- [1] 张博超, 张学武. 螺旋藻抗肿瘤肽的分离及壳聚糖纳米粒子复合物的制备[D]. 广州: 华南理工大学, 2012
Zhang Bachao, Zhang Xuewu. Separation of anticancer peptide from Spirulina and preparation of Chitosan Nanoparticles [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012
- [2] 黄峙, 向军俭, 郑文杰等. 钝顶螺旋藻富集转化硒及硒在藻体中的分布[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(1): 12-14
Huang Zhi, Xiang Junjian, Zheng Wen-jie. The Accumulation and Distribution of Selenium in Spirulina platensis. plant physiology communications [J]. 2001, 37(1): 12-14
- [3] 高冬芳, 张逸波, 凌钦婕, 等. 富硒螺旋藻多肽对血管紧张素转化酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2011, 32(7): 7-10
Gao Dong-fang, Zhang Yi-bo, Ling Qin-jie, et al. Angiotensin Convert Enzyme Inhibition of Peptides Derived from Water Soluble Total Protein of Selenium-enriched Spirulina platensis [J]. Food Chemistry, 2011, 32(7): 7-10
- [4] Suetsuna K, Chen J R. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microSeSP, Chlorella vulgaris and Spirulina platensis [J]. MARINE BIOTECHNOLOGY, 2001, 3(4): 305-309
- [5] WU Hui, LUO Mei-qi, TANG Yu-qian, et al. Enzymatic Hydrolysis of Silk Fibroin for Production of ACE Inhibitors [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 27: 1461-1465
- [6] Megias C, Pedroche J, Yust M, et al. Purification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from sunflower protein hydrolysates by reverse-phase chromatography following affinity purification [J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(1): 228-232
- [7] Cheung IWY, Nakayama S, Hsu MNK, et al. Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Activity of Hydrolysates from Oat (Avena sativa) Proteins by In Silico and In Vitro Analyses [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57: 9234-9242

- [8] Guang C, Phillips RD. Purification, Activity and Sequence of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Alcalase Hydrolysate of Peanut Flour [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009,57: 10102-10106
- [9] Sheih IC, Fang TJ, Wu TK. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the SeSP protein waste [J]. Food Chemistry. 2009;115: 279-284
- [10] Lu J, Ren DF, Xue YL, Sawano Y, Miyakawa T, Tanokura M. Isolation of an Antihypertensive Peptide from Alcalase Digest of *Spirulina platensis* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(12): 7166-7171
- [11] Huang Z, Yang F, Zheng WJ, Guo BJ. Purification and preparation of active subunits of C-phycoyanin by a protocol of liquid-phase isoelectric focusing [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2006, 27 (6): 1051-1054
- [12] 乔晓玲, 闫祝炜, 张原飞, 等. 食品真空冷冻干燥技术研究进展 [J]. 食品科学, 2008, 29(5): 469-474
- QIAO Xiao-ling, YAN Zhu-wei, Zhang Yuan-fei. Research Progress on Food Freeze-drying [J]. FOOD CHEMISTRY, 2008, 29(5): 469-474
- [13] 张厚森, 尹利端, 赵厚民, 等. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的提取及分子量研究 [J]. 江西农业学报, 2012, 24(10): 102-103
- ZHANG Hou shen, YIN Li dua, ZHAO Hou min, et al. Study on Extraction of Phycocyanin from *Spirulina platensis* and Its Molecular Weight [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2012, 24(10): 102-103
- [14] Wu Wei-liang, Wu Guo-jie, Liang Dao-shuang, et al. The Physiological Function and Research Progress of Angiotensin-I-converting Enzyme Inhibitory Peptides [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 3: 251-254
- [15] 何海伦, 陈秀兰, 孙彩云, 等. 血管紧张素转化酶抑制肽的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(9): 7-11
- HE Hailun, CHEN Xiu lan, SUN Caiyun, et al. Research Progress in Inhibitory Peptides of Angiotensin Converting Enzyme [J]. China Biotechnology, 2004, 24(9): 7-11