

酪蛋白磷酸肽副产物中 ACEI 肽的分离鉴定及稳定性研究

赵力超¹, 宁德山², 龙梓祺¹, 刘飞³, 陈飞龙¹, 曹庸¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510623)

(3. 广州绿萃生物科技有限公司, 广东广州 510663)

摘要: 酪蛋白磷酸肽副产物中仍含有丰富的功能性多肽, 从中回收具有降压活性的血管紧张素 I 转化酶抑制肽具有废物利用和环境保护的意义。本文在前期研究富集活性肽工艺的基础上, 从粗富集产物中进一步分离纯化出具有降压活性的多肽单体, 并对单体的分子量、一级序列及其稳定性进行了研究。研究表明, 以粗富集产物为原料, 仅通过阴离子交换树脂及液相制备两步就可获得活性较高的转化酶抑制肽单体 P16 和 P18。P16 分子量 742.6, 序列为 GPFPIIV, 属首次发现; P18 分子量 1385.8, 序列为 FFVAPFPEVFGK。二者均具有较高的耐酸碱性和热稳定性, 经体外模拟胃肠消化过程后, 发生不同程度的分解, 但 P16 的活性在分解后反而升高 12.8%, P18 则降低 37.5%。推测活性的升高或降低均与活性中心暴露或破坏有关。

关键词: 酪蛋白磷酸肽副产物; 血管紧张素 I 转化酶抑制肽; 废物利用; 降血压; 结构分析; 稳定性

文章编号: 1673-9078(2014)10-52-57

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.010

Purification, Identification and Evaluation of the Stability of Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from By-products of Casein Phosphopeptides

ZHAO Li-chao¹, NING De-shan², LONG Zi-qi¹, LIU Fei³, CHEN Fei-long¹, CAO Yong¹

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China) (2. Infinitus Co., Ltd, Guangzhou, Guangdong 510623, China) (3. Greencream Biotech Co., Ltd, Guangzhou, Guangdong 510663, China)

Abstract: By-products of casein phosphopeptide contain abundant functional peptides, from which angiotensin I-converting enzyme (ACE-I) inhibitory peptides with antihypertensive activity can be recycled. This is of significance for utilizing waste and protecting the environment. Based on previous research on technology that accumulates bioactive peptides, the peptide monomers with antihypertensive activity were isolated and purified from crude-enriched products, and the molecular weights of peptide monomers, their primary sequences, and stabilities were studied. The results showed that, using the crude products as raw materials, ACE-I inhibitory peptide monomers with high activity, P16 and P18, could be obtained in just two steps, including anion-exchange chromatography and HPLC. The molecular weight of P16 was 742.6 and its primary sequence was GPFPIIV, which was discovered for the first time. The molecular weight of P18 was 1385.8 and its primary sequence was FFVAPFPEVFGK. Both P16 and P18 possessed high acid-base resistance and thermal stability. Various degrees of decomposition occurred in both peptides in the *in vitro* gastrointestinal digestion test. Nevertheless, the activity of P16 increased by 12.8%, while that of P18 decreased by 37.5%. Thus, the rise and decline were related to the exposure or destruction of the active centers.

Key words: casein phosphopeptides by-products; angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides; waste utilization; antihypertension; structure analysis; stability

越来越多的资料表明, 水解食物源蛋白获得的多

收稿日期: 2014-05-05

基金项目: 广东省科技计划项目(2012B020312004)

作者简介: 赵力超(1979-), 男, 博士, 副教授, 主要从事功能食品的高新加工技术

通讯作者: 曹庸(1966-), 男, 博士, 教授

肽片段具有生理功效。其中, 针对当今世界最常见的心血管疾病之一高血压开发的血管紧张素 I 转化酶抑制肽(Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides, ACEI 肽)受到广泛关注。血管紧张素转化酶(Angiotensin-converting enzyme, ACE, EC 3.4.15.1)是一种重要的血压控制酶, ACEI 肽对其抑制可有效

的降低血压^[1]。

从食物蛋白中获得 ACEI 肽, 虽然比人工合成的降压药物效果弱, 但具有以下优势^[2-3]: 只对高血压患者起作用, 对血压正常者不会产生降血压过度的问题; 食品来源, 安全性极高; 活性多样性, 除降血压功能外, 往往还具有免疫促进、抗凝血、易消化吸收、抗肿瘤等功能; 具有较好的酸、热稳定性、水溶性好等加工优点, 易于作为功能因子添加到各类食品中。1979 年, Oshima 首次从食物蛋白质分离到食源性 ACEI 肽后, 多种不同食物来源的 ACEI 肽相继被发现^[4]。国外已有多种商业化的食物源 ACE 抑制肽制品面市, 而我国 ACEI 肽的商品化尚处于起步阶段^[5-6]。究其原因, 高活性的 ACEI 肽产品要求对蛋白质酶解产物进行反复的分离提取, 目前的产业化分离纯化工艺成本较高。此外, 较贵的蛋白来源也限制了多肽的利用。所以如何利用蛋白产品的副产物, 通过简单工艺分离富集 ACEI 肽是今后发展的重点。

酪蛋白磷酸肽 (Casein phosphopeptides, CPPs) 是酪蛋白生物活性肽中被研究和开发最早的一种, 具有结合矿物质的作用, 也是酪蛋白生物活性肽中研究最多的一种^[7]。CPPs 生产企业生产过程中, 有近 80% 的蛋白质副产物 (Casein phosphopeptides by-product, CPPBP) 未被合理利用, 作为饲料或废物弃去, 造成资源浪费和环境污染。因此, 最大程度地开发 CPPBP 中的活性肽具有很大的经济效益和社会效益。本课题组前期已确认 CPPBP 的降压效果, 并对有活性的多肽组分进行了工业化程度的粗分离富集^[8], 为本文的研究提供了支持。本文在前期研究基础上分离、纯化 CPPBP 中的 ACEI 肽, 对主要活性肽进行氨基酸序列测定, 以及对 pH、温度和模拟胃肠消化系统的影响进行研究。该结果能为 ACEI 肽的理论研究提供基础数据, 并为商业化开发利用 CPPBP 提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

工厂生产 CPPs 后的杂多肽饱和水溶液 (CPPBP), 广州绿萃生物科技有限公司; ACEI 肽粗分离富集产品, 无限极 (中国) 有限公司; 血管紧张素转化酶 (Angiotensin I-converting enzyme, ACE), 活力单位 0.1 U/mL, 美国 sigma 公司; 马尿酸组氨酰亮氨酸 (IV-hippuryl-His-Leu tetrahydrate, HHL), 分析纯, 美国 sigma 公司; 胃蛋白酶, 活力单位 3000 U/mg, 分析纯, 广州市齐云生物技术有限公司; 胰蛋白酶, 活力单位 250 U/mg, 分析纯, 广州市齐云生物技术有限公司;

乙腈, 色谱纯, 德国 Fisher 公司; 三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, TFA)、马尿酸 (Hippuric acid), 色谱纯, 美国 sigma 公司; 其他试剂均为分析纯。

Diamonsil C18 色谱柱, 200 mm×4.6 mm, 5 μm, 中国迪马科技有限公司; LC-10A 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; LC-8A 制备高效液相色谱仪, 日本岛津公司; SPD-10A 紫外检测器, 日本岛津公司; Agilent1100 高效液相-质谱联用仪, 美国 Agilent 公司; PSQ-33A 全自动蛋白质多肽测序仪, 日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 ACEI 肽的分离纯化

利用高效液相色谱分析检测 CPPBP 原料和 ACEI 肽粗分离富集产品 (标记为 P_I) 的多肽组成。检测条件为: 色谱柱: Diamonsil C18 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 泵超纯水 (含 0.1% (V/V) TFA), B 泵乙腈 (含 0.1% (V/V) TFA), B 泵初始浓度为 10%; 洗脱方式: 二元梯度洗脱; 0.01 min~40 min, 10%~70%; 40.01 min~45 min, 90%; 流速: 1 mL/min; 检测波长 214 nm; 进样量 20 μL。

采用分析型高效液相色谱 (HPLC) 对 P_I 中的多肽进行制备, 得到单体, 并对分离到的单峰物质进行 ACEI 活性检测。制备条件为: 色谱柱: Diamonsil C18 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 泵超纯水 (含 0.1% (V/V) TFA), B 泵乙腈 (含 0.1% (V/V) TFA), B 泵初始浓度为 10%; 洗脱方式: 二元梯度洗脱; 0.01 min~5 min, 5%~20%; 5 min~50 min, 20%~45%; 50.01 min~55 min, 90%~90%; 流速: 1 mL/min; 检测波长 214 nm; 进样量 20 μL。

采用 717 阴离子交换树脂对 P_I 进一步分离, 用水进行洗脱, 洗脱液真空浓缩, 冷冻干燥, 标记为 P_{II}; 采用高效液相制备色谱法对 P_{II} 中的 ACEI 肽进行富集, 收集相应的单体组分, 冷冻干燥备用。

ACE 抑制活性检测时每个样品的浓度设定为 500 μg/mL。

1.2.2 ACE 抑制活性测定

参考 Cushman^[9]的方法并加以改进, ACE 浓度为 0.25 U/mL, 流动相与色谱条件根据实验条件更改为: 乙腈:超纯水=25:75 (含 0.1% (V/V) TFA)。ACE 抑制率结果计算如式 (1):

$$R = \frac{A - B - A_0}{A - A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: R: ACEI 样品对 ACE 的抑制率 (%), A: 对照管中马尿酸的峰面积, B: 样品管中马尿酸的峰面积, A₀: 空白管中马尿酸的峰面积。

1.2.3 ACEI 肽一级结构分析

肽的分子量采用高效液相色谱法和质谱联用 (HPLC-MS/ESI) 测定^[10], 肽的一级结构采用 N 端氨基酸序列分析方法 (Edman 降解法^[11]) 测定。

1.2.4 pH、温度对 ACE 抑制肽的影响

取一定量的活性肽单体粉末, 分别配制 pH 为 2、4、6、7、8、10 的溶液, 在 37 °C 下保温 30、60、120 min 后, HPLC 法检测 ACEI 肽的含量变化; 取一定量的活性肽单体粉末, 配成 pH 7 溶液, 分别在 0、20、40、60、80、100 °C 下保温 30、60、120 min 后, HPLC 法检测 ACEI 肽的含量变化。

抑制肽保留率% = (反应一段时间后抑制肽含量 / 初始抑制肽含量) × 100%

1.2.5 体外模拟消化实验

体外模拟胃肠消化道消化实验参照顾欣^[12]的方法进行, 0~90 min 为模拟胃消化过程, 90~330 min 为模拟肠消化时间, 分别在 30、60、90、120、150、180、210、270、330 min 取样检测模拟消化液中 ACEI 肽的含量和活性。含量变化用 HPLC 法检测, 抑制肽保留率% = (反应一段时间后抑制肽含量 / 初始抑制肽含量) × 100%。活性测定时样品浓度设定为 200 μg/mL。

1.2.6 数据处理

以上所有试验数据平行测定 3 次, 结果用平均值 ± 标准偏差表示, 采用 Statistica 6.0 软件对数据进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 ACEI 肽分离纯化

CPPBP 原料、ACEI 肽粗分离富集产品 (标记为 P_I) 和经过阴离子交换树脂分离组分 (标记为 P_{II}) 的多肽组成分别如图 1、2、3 所示。

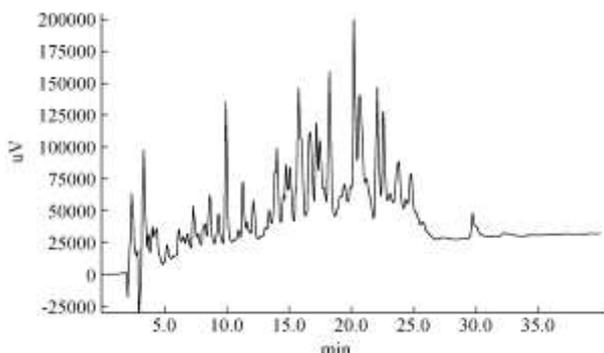


图 1 CPPBP 的 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of CPPBP

由图 1 可知, CPPBP 的多肽组成较为复杂, 但经过我们二段量化富集工艺制备后, 多肽得到了一定程

度的纯化, 在图 2 中按出峰时间顺序对多肽进行编号为 P₁、P₂……。课题组前期对其中含量较高的多肽进行了活性测定发现, P₁₆ 和 P₁₈ 的 ACE 活性抑制率最高^[8]。为能进一步纯化 P₁₆ 和 P₁₈, 课题组经反复尝试最终选用阴离子交换树脂法, 结果如图 3。阴离子交换树脂能使 P_I 中 P₁₆ 和 P₁₈ 活性单体前面的杂质最大限度的去除, 且只需用去离子水为洗涤剂, 能充分保护多肽的序列结构, 保证其活性不受破坏。最后, 通过制备色谱法, 对 P₁₆ 和 P₁₈ 进行了富集。

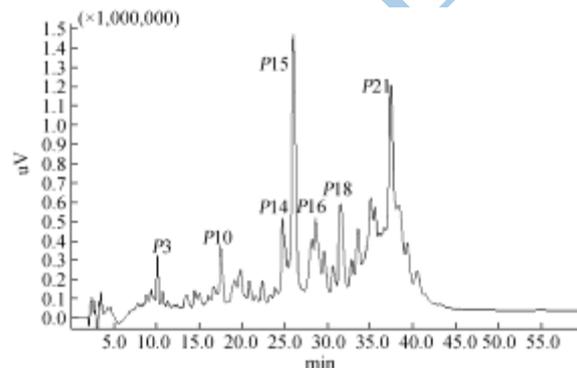


图 2 P_I 的 HPLC 图谱

Fig.2 HPLC chromatogram of P_I

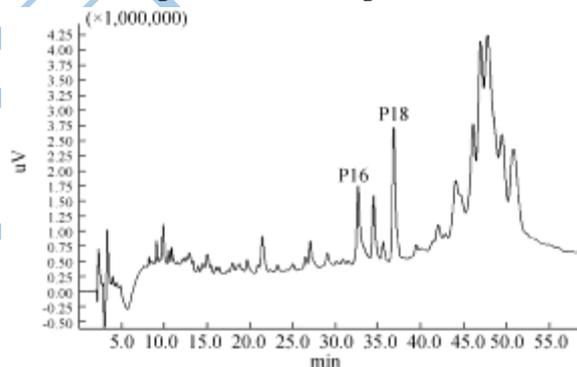


图 3 P_{II} 的 HPLC 图谱

Fig.3 HPLC chromatogram of P_{II}

表 1 ACE 活性抑制肽纯化步骤及结果

Table 1 The purification stages and results of ACE inhibitory peptides

样品	纯化步骤	ACE 抑制率/%	纯化倍数	
			P ₁₆	P ₁₈
CPPBP	-	20.19 ± 1.08	1	1
P _I	二段量化富集工艺	46.29 ± 3.16	8.4	10.8
P _{II}	阴离子交换树脂水洗	63.34 ± 4.91	15.0	19.4
P ₁₆	高效液相制备色谱分离	89.84	83.7	
P ₁₈	高效液相制备色谱分离	92.15		86.9

注: 样品浓度 500 μg/mL。

不同纯化步骤制得样品的 ACE 抑制率和 P₁₆、P₁₈ 纯化倍数如表 1 所示。随着纯化步骤的进行, 样品 ACE 抑制率不断提高, ACEI 肽的纯化倍数也不断

提高。

2.2 ACEI 肽一级结构分析

通过 HPLC-MS/ESI 测得 *P16*、*P18* 的分子量分别为 742.6、1385.8，推测 *P16* 由 6~7 个氨基酸组成，而 *P18* 由 11~12 个氨基酸组成。因此，Edman 反应测两个活性肽的氨基酸序列时分别做 7 和 12 个循环。结果显示，*P16* 的序列为 GPFPIIV，属于 β 酪蛋白 203-209 的片段 (β -CN f(203-209))；*P18* 的序列为 FFVAPFP EVFGK，属于 α_{S1} 酪蛋白 23-34 的片段 (α_{S1} -CN f(23-34))。该结果通过液相色谱-质谱/质谱 (LC-MS/MS) 联用法，比对数据库，得到进一步验证。

前期文献表明，Maruyama 曾从 α_{S1} -酪蛋白的胰蛋白酶水解物中分离得到 *P18*，并首次报道其具有 ACE 抑制活性^[13]。该片段的 IC_{50} 约为 $18 \mu M$ ^[14] 或 $77 \mu M$ ^[15]，活性中心可能为 VAP (α_{S1} -CN f(25-27)， $IC_{50}=2.0 \mu M$)^[16]，模型小鼠口服具有良好的降压效果，且腹腔注射给药效果更明显。该片段已被应用于商品化的降压产品 Peptide C12[®] 中。2002 年 Nimmagudda 在某次会议上的发言宣称，连续 4 周口服 C12[®] 的临床试验显示，该产品能有效降低患者的心脏收缩压和舒张压^[17]。但该产品的主要问题在于成本较高，以纯酪蛋白为来源酶解制备 *P18* 会造成较大的浪费。*P16* 为本课题组首次发现，该序列为 Yamamoto^[18]、Miguel^[19] 发现的具有 ACE 抑制活性肽片段 (YQEPVLGPVRGPFPIIV，VRGPFPIIV) 中更为短小的一个部分。这两个多肽片段来源于乳酸链球菌或瑞士乳杆菌发酵过的乳制品。目前尚未见到这两个多肽片段的商业化应用，究其原因，发酵制品中多肽组分非常复杂，有降压活性的多肽在其中含量较少，并且分离难度较大。而单纯吃发酵制品又往往达不到有效活性剂量。所以，以 CPPBP 为原料富集 *P16*、*P18* 具有商业化开发前景。

大量 ACEI 肽构效关系的文献都表明，肽链长度为 2~15 的多肽抑制活性较为明显^[20]，*P16*、*P18* 肽链长度印证该点。从一级结构来看，ACE 抑制肽的活性很大程度上是由其 C-端的三肽序列决定，ACE 的活性中心 S1 和 S2 位点倾向于与 C-端的三个氨基酸残基均为疏水性氨基酸的抑制肽反应，尤其 C-端氨基酸含有芳香族氨基酸，如 Try、Trp、Phe 和 Pro 时，抑制作用最强。推测可能是因为 C 端的疏水性氨基酸残基，利于多肽接近 ACE^[15]，高亲水性无法使肽接近 ACE 活性部位而导致活性弱或无活性。*P18* 的序列及其活性中心证明了该点，而且，*P18* 在动物体内经过进一步的胃肠道消化后，活力会进一步上升，说明其活性位点的进一步暴露。还有资料表明，ACE 对底物或抑

制肽的 C 末端第三个氨基酸具有很高的立体专一性，该位的氨基酸必须是 L 构型，但对第四位氨基酸的立体专一性不严格^[21]，如 D-VAP 的活性很低，其 IC_{50} 为 $550 \mu M$ ，但 VAP 和 D-PVAP 的 IC_{50} 分别为 $2.0 \mu M$ 和 $17 \mu M$ ^[16]。这点在某种程度上限制了人工合成降压肽的发展。而 *P16* 则证明了支链氨基酸氨基酸如 Ile 和 Val 对多肽的 ACE 抑制活性也有显著影响，*P16* 和 Yamamoto^[18]、Miguel^[19] 发现的活性肽片段具有相同的 C-端三肽 IIV，推测 IIV 可能是其活性中心。

2.3 ACE 抑制肽酸碱及热稳定性

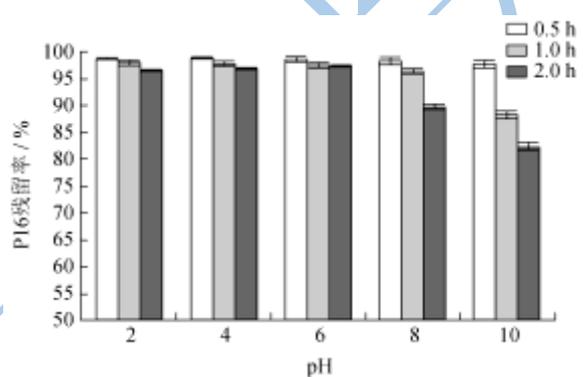


图 4 pH 对 *P16* 的影响

Fig.4 Effect of pH on *P16* activity

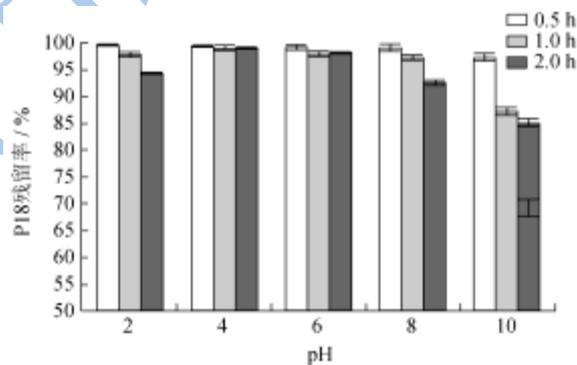


图 5 pH 对 *P18* 的影响

Fig.5 Effect of pH on *P18* activity

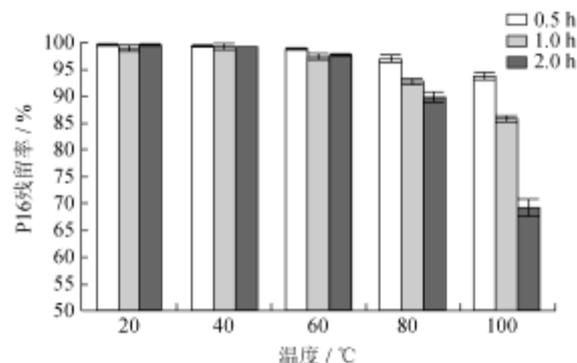


图 6 温度对 *P16* 的影响

Fig.6 Effect of temperature on *P16* activity

做为具有降压效果的功能性食品添加剂，ACE 抑

制肽须具有一定的加工稳定性。ACE 抑制肽 P16、P18 的酸碱稳定性如图 4、图 5 所示，热稳定性如图 6、图 7 所示。

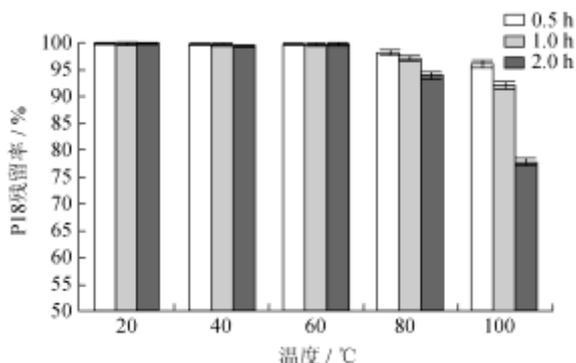


图 7 温度对 P18 的影响

Fig.7 Effect of temperature on P18 activity

由图 4、图 5 可知，P16、P18 的耐酸碱性都很好，0.5 h 内不同酸碱环境下损失率均不超过 5%。随着时间的延长，在 pH≤2 和 ≥8 的环境下，肽发生了部分分解，且碱性环境下分解速度更快，但 2 h 内，多肽仍有 80% 以上的残留。由图 6、图 7 可知，P16、P18 耐热性也很好，低温短时加热对多肽几乎没有什么影响，温度升高到 100 °C 加热 0.5 h 仍有 90% 以上的保留率。但随着加热时间的延长，多肽含量会进一步下降，2 h 后，P16 损失 30% 左右，P18 损失约 25%。前期对活性的监测发现，多肽含量和其降压活性呈量效关系，我们测定了碱性环境和高温环境下 2 h 后两种多肽的活性，发现活性确实随含量的下降呈下降趋势，且趋势相同。由实验结果可知，课题组分离得到的 ACE 抑制肽 P16、P18 能满足一般食品加工生产的要求。

2.4 ACE 抑制肽体外模拟消化稳定性

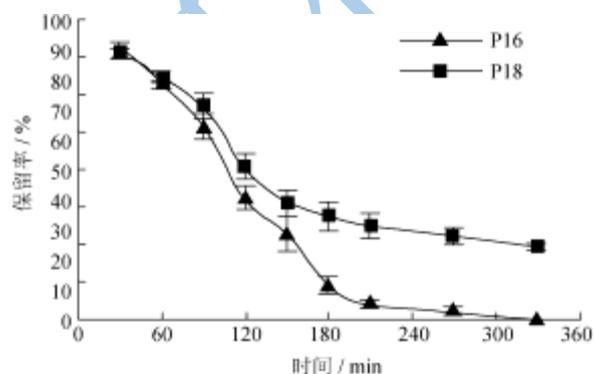


图 8 体外模拟胃肠消化过程中 ACE 抑制肽含量的变化

Fig.8 Variation in the content of ACE inhibitory peptides during *in vitro* gastrointestinal digestion

除生产加工稳定性外，作为蛋白质片段，ACE 抑制肽能否在人体消化吸收过程仍保持较高 ACE 抑制

活性是降压产品有效与否的关键问题。在开发初期，体外消化试验相对易行，且结果可指导进一步的体内实验。在体外模拟胃肠消化过程中，P16、P18 保留率随时间变化情况如图 8 所示，活性变化情况如图 9 所示。

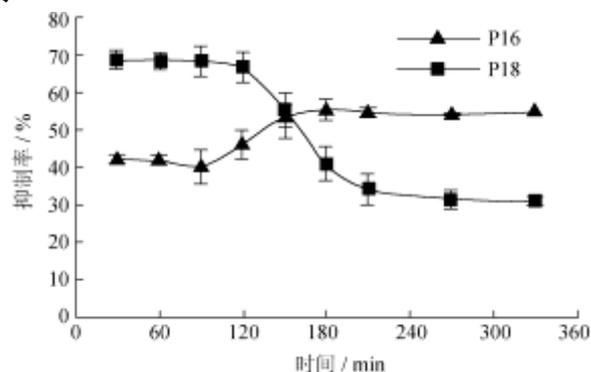


图 9 体外模拟胃肠消化过程中 ACE 抑制肽活性的变化

Fig.9 Variation in the activity of ACE inhibitory peptides during *in vitro* gastrointestinal digestion

从图 8 可知，胃肠道酶对 P16、P18 都有比较明显的分解作用。前 90 分钟主要为胃蛋白酶作用阶段，P16、P18 的含量在该阶段呈现直线下降趋势，降低幅度为 30%~40% 之间。90~330 min 主要为胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶作用阶段。P16 含量在该阶段继续快速下降，180 min 后下降趋于缓和，330 min 后已经检测不到 P16 的存在。P18 在该阶段也呈快速下降趋势，但保留率一直高于 P16，180 min 后保留率仍有 40% 左右，此后下降趋势缓和，330 min 停止反应时，保留率约为 24%。

结合图 9 可知，在胃蛋白酶作用阶段，虽然 P16、P18 的含量快速下降，但二者酶解液 ACE 抑制活性的变化不大，推测 P16、P18 的活性中心并没有遭到破坏。而在肠道酶作用阶段，二者酶解液的活性均发生变化，且变化趋势出现分化。P16 酶解液活性在 90 min 后出现上升，180 min 后达到一定值不再变化，抑制率比初始提高 12.8%。P18 酶解液活性则在 90 min 后急速下降，180 min 下降趋缓，330 min 后比初始降低 37.5%。推测在肠道酶作用下，P16 的活性中心在一定程度上被暴露出来，有可能是胰凝乳蛋白酶断裂 P16 序列中的两处芳香族疏水性氨基酸 Phe 结合位点，使得 IIV 得以释放。同理推测 P18 酶解液活性的降低和其中心 VAP 遭到破坏有关。该推论同结构分析部分的结论相一致。

此外，我们在液相跟踪 P16、P18 含量变化过程中观察到，随着时间的推移，P16 会分解为 3 个小片段，随后其中两个小片段逐渐消失，最后只剩一个。而 P18 分解的相对缓慢，在分解过程中产生 1 新片段，

最后新片段和 P18 共存。究竟生成了什么新片段, 是否和文章推测一致, 仍有待于进一步研究。

3 结论

3.1 在前期研究的基础上, 以二段量化富集工艺富集的 CPPBP 多肽样品为原料, 通过阴离子交换树脂及液相制备纯化 ACEI 肽, 最终的到有较高活性的 ACEI 肽单体 P16 和 P18。经测定, P16 的分子量为 742.6, 序列为 GPFPIIV, 属于 β 酪蛋白 203~209 的片段(β -CNf(203-209)); P18 的分子量为 1385.8, 序列为 FFVAPFP EVFGK, 属于 α_{S1} 酪蛋白 23~34 的片段(α_{S1} -CNf(23-34))。P16 为首次发现。

3.2 P16 和 P18 具有较高的耐酸碱性和热稳定性, 可以满足一般水平的食品加工工艺。二者经过体外模拟胃肠消化过程后, 均发生不同程度的分解, P18 最后能保留 24%, 而 P16 分解殆尽。但从 ACE 抑制活性上看, P16 的活性在分解后反而升高 12.8%, P18 则降低 37.5%。推测 P16 活性的升高和活性中心 IIV 的释放有关, 而 P18 活性的降低和活性中心 VAP 的破坏有关。具体细节有待于进一步证实。

参考文献

- [1] Rodríguez-Figueroa J C, Reyes-Díaz R, González-Córdova A F, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial lactococcus lactis strains [J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(11): 5032-5038
- [2] Hernández-Ledesma B, Del Mar Contreras M, Recio I. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods [J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2011, 165(1): 23-35
- [3] Miguel M, Contreras M M, Recio I, et al. ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate [J]. Food Chemistry, 2009, 112(1): 211-214
- [4] 管晓, 彭剑秋, 金周筠, 等. 食源性血管紧张素转化酶抑制肽的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(7): 135-141
GUAN Xiao, PENG Jian-qiu, JIN Zhou-jun, et al. Studies on ACE inhibitory peptide derived from food protein [J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(7): 135-141
- [5] Korhonen H. Milk-derived bioactive peptides: from science to applications [J]. Journal of Functional Foods, 2009, 1(2): 177-187
- [6] 刘丽娜, 王文亮, 徐同成, 等. 降血压肽研究现状及其前景分析 [J]. 中国食物与营养, 2011, 17(6): 64-67
LIU Li-na, WANG Wen-liang, XU Tong-cheng, et al. Research progress and prospect of antihypertensive peptides

- [J]. Food and Nutrition in China, 2011, 17(6): 64-67
- [7] Zhao W, Xu G, Yang R, et al. Preparation of casein phosphopeptides using a novel continuous process of combining an enzymatic membrane reactor with anion-exchange chromatography [J]. Journal of Food Engineering, 2013, 117(1): 105-112
- [8] 赵力超, 宁德山, 李双祁, 等. 酪蛋白磷酸肽副产物中 ACEI 肽的富集工艺研究 [J]. 食品工业科技, 2014, (已接收)
ZHAO Li-chao, NING De-shan, LI Shuang-qi, et al. Enrichment process of angiotensin i-converting enzyme inhibitory peptides from casein peptide phosphate byproducts [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014 (accepted)
- [9] Cushman D W, Cheung H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung [J]. Biochemical Pharmacology, 1971, 20(7): 1637-1648
- [10] Otte J, Shalaby S M A, Zakora M, et al. Fractionation and Identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis [J]. International Dairy Journal, 2007, 17(12): 1460-1472
- [11] Grant G A, Crankshaw M W, Gorka J. Edman sequencing as tool for characterization of synthetic peptides [M]//Gregg B. Fields. Methods in Enzymology. Academic Press, 1997: 395-419
- [12] 顾欣, 李迪, 侯雅坤, 等. 核桃蛋白源血管紧张素转化酶抑制剂的分离纯化 [J]. 食品科学, 2013, 34(9): 52-55
GU Xin, LI Di, HOU Ya-kun, et al. Separation and purification of angiotensin converting enzyme inhibitor from walnut protein [J]. Food Science, 2013, 34(9): 52-55
- [13] Maruyama S, Suzuki H. A peptide inhibitor of angiotensin i-converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1982, 46(5): 1393-1394
- [14] Tauzin J, Miclo L, Gaillard J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α_{S2} -casein [J]. Febs Letters, 2002, 531(2): 369-374
- [15] Hideaki K, Kunio D, Shigeru S, et al. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 1990, 96(2): 367-371
- [16] Maruyama S, Mitachi H, Tanaka H, et al. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1987, 51(6): 1581-1586

- [17] Nimmagudda R. New bioactive peptides for the nutritional industry [J]. Oral Presentation at: Supplside West Trade Show and Conference, Lasvegas, Nv, December 4Th to 6Th., 2002
- [18] Yamamoto N, Akino A, Takano T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790 [J]. *Journal of Dairy Science*, 1994, 77(4): 917-922
- [19] Miguel M, Recio I, Ramos M, et al. Antihypertensive effect of peptides obtained from *enterococcus faecalis*-fermented milk in rats [J]. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(9): 3352-3359
- [20] Ryan J T, Ross R P, Bolton D, et al. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish [J]. *Nutrients*, 2011, 3(9): 765-791
- [21] Oshima G, Nagasawa K. Stereospecificity of peptidyl dipeptide hydrolase (angiotensin i-converting enzyme) [J]. *Journal of Biochemistry*, 1979, 86(6): 1719-1724

现代食品科技