

# 鳕鱼源金属螯合肽体外模拟胃肠消化稳定性研究

杜芬<sup>1</sup>, 侯虎<sup>1</sup>, 赵玉然<sup>2</sup>, 赵雪<sup>1</sup>, 张朝辉<sup>1</sup>, 李八方<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003) (2. 山东出入境检验检疫局, 山东青岛 266003)

**摘要:** 为了评价鳕鱼皮胶原蛋白源金属螯合肽, Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Arg(多肽 M), 的胃肠消化耐受性, 建立体外模拟胃肠消化模型(SGID), 该模型包括模拟人体中胃消化环境和肠消化环境两个阶段。多肽 M 的钙螯合率为  $0.88 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{mg}$ , 铁螯合率为 33.67%。胃消化产物 S, 钙螯合率为  $0.87 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{mg}$ , 与纯肽相比钙螯合率下降 1.14%; 铁螯合率为 33.72%, 与纯肽相比反而上升 0.05%。肠消化产物 D, 钙螯合率为  $0.85 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$ , 与纯肽相比下降 3.40%; 铁螯合率为 34.13%, 与纯肽相比上升 0.46%。利用反相高效液相色谱、质谱和圆二色谱技术, 发现经过两个阶段多肽 M 分子量未发生变化, 肽键未发生断裂, 构象发生变化, 其中无规卷曲减少,  $\beta$  折叠和  $\beta$  转角构象增加。因此, 多肽 M 在体外模拟胃肠消化过程中其多肽链氨基酸组成不变, 空间构象发生改变, 钙铁离子螯合能力变化不大, 体外模拟胃肠消化耐受性高。

**关键词:** 鳕鱼; 金属螯合肽; 体外模拟胃肠消化; 稳定性

文章编号: 1673-9078(2016)07-33-38

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.006

## Stability of Alaska Pollock-derived Metal Chelating Peptide during *In Vitro* Gastrointestinal Digestion

DU Fen<sup>1</sup>, HOU Hu<sup>1</sup>, ZHAO Yu-ran<sup>2</sup>, ZHAO Xue<sup>1</sup>, ZHANG Zhao-hui<sup>1</sup>, LI Ba-fang<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

(2. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** In order to evaluate the gastrointestinal tolerance of a new Alaska pollock skin collagen-derived metal chelating peptide (Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Arg, peptide M), an *in vitro* simulated gastrointestinal digestion (SGID) model was established, and this model included two stages: simulated human gastric digestion and simulated human intestinal digestion. The calcium-chelating activity of peptide M was  $0.88 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{mg}$ , and its iron-chelating activity was 33.67%. The calcium-chelating activity of gastric digestion product S was  $0.87 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{mg}$ , a 1.14% decrease compared to the pure peptide. The iron-chelating activity of S was 33.72%, an increase of 0.05% compared to the pure peptide. The calcium-chelating activity of intestinal digestion product D was  $0.85 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$ , a 3.40% decrease compared to the pure peptide. And the iron-chelating activity of D was 34.13%, an increase of 0.46% compared to the pure peptide. Reversed-phase high-performance liquid chromatography, full scan mass spectrometry, and circular dichroism showed that after two-stage SGID, M molecule did not show a change in molecular mass or cleavage of peptide bonds, but there were changes in the conformation, including a decrease in the proportion of random coils and increases in the proportions of  $\beta$ -sheets and  $\beta$ -turns. Therefore, during the SGID, the amino acid composition in the peptide was not changed, and the spatial conformation was changed. The calcium- and iron-chelating capabilities were not significantly changed. Peptide M showed a high gastrointestinal tolerance in SGID.

**Key words:** Alaska pollock; metal chelating peptide; *in vitro* gastrointestinal digestion; stability

铁和钙是人体重要的矿物质元素之一, 具有重要的生理功能。矿物质摄入量不足易引发矿物质缺乏症, 如钙吸收量过低会导致骨钙溶出, 从而增大骨质疏松

收稿日期: 2015-08-27

基金项目: 国家自然科学基金(31401476, 31471606); 教育部博士点基金(20130132120024); 山东省海洋经济创新发展区域示范项目; 中国博士后基金特别资助(2015T80751)

作者简介: 杜芬(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋活性物质

通讯作者: 李八方(1953-), 男, 博士, 教授, 研究方向为海洋活性物质

发生的可能性。低铁吸收会导致缺铁性贫血, 降低体力及脑力劳动能力等<sup>[1]</sup>。摄入量不足及生物利用度低是造成铁和钙缺乏的主要原因。近年来随着人们生活水平的提高, 食源性营养补充剂越来越为人们所接受, 因此在补铁、补钙方面食源性金属螯合肽逐渐成为研究热点之一。继酪蛋白磷酸肽之后, 新的金属螯合肽不断被发现, 如乳清蛋白源钙螯合肽 Phe-Asp<sup>[2]</sup>, 乳清蛋白源铁螯合肽<sup>[3]</sup>, 凤尾鱼源铁螯合肽<sup>[4]</sup>, 螺旋藻源铁螯合肽等<sup>[5]</sup>。鳕鱼作为中国产量丰富的商业鱼种, 其

鱼皮常常作为副产物未被充分利用。鱼皮中含有丰富的胶原蛋白, 胶原蛋白因具有较好的生物相容性、生物可降解性和弱抗原性在食品、药品及化妆品等行业应用广泛<sup>[6]</sup>。鱼类胶原蛋白具有广泛的生物活性, 如抗氧化、抑菌、降脂活性并对创伤愈合、皮肤、骨及关节有益<sup>[7]</sup>。因此, 加强对鳕鱼胶原蛋白的利用意义深远。在对鳕鱼皮胶原蛋白水解分离的基础上, 利用离子交换色谱、高压液相色谱及液质联用等技术分离纯化出一条新的钙铁离子螯合肽, 即 Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Arg (多肽 M)<sup>[8]</sup>。

多肽经口腔、胃进入肠道, 整个过程经历多种酶解环境, 酶种类多环境复杂。其中对多肽具有酶解作用的酶主要是胃蛋白酶和胰蛋白酶, 多肽在两种酶的作用下酶解成分子量更小的肽以及氨基酸<sup>[9]</sup>, 其中多肽经口腔进入胃部 pH 值降为 2 左右, 变化剧烈。很多金属螯合肽经过胃肠消化其氨基酸组成发生变化, 活性降低或消失。因此, 找到胃肠消化耐受性高的金属螯合肽对于促进钙铁吸收, 缓解因钙铁缺乏导致的缺乏症意义深远。体外模拟胃肠消化主要通过考察胃蛋白酶和胰液素耐受性, 来模拟人体中胃消化环境和肠消化环境。本文利用体外模拟胃肠消化模型研究鳕鱼源金属螯合肽在胃肠消化环境中的稳定性, 利用反相高效液相色谱及质谱等技术对酶解产物进行分析, 不仅为金属螯合肽的高胃肠消化耐受性提供理论基础, 还可以为研究金属螯合肽促金属离子转运吸收提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

多肽 Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Arg (多肽 M)由吉尔生化(上海)有限公司合成, 纯度约为 98%; 胃蛋白酶(pepsin)、胰液素(pancreasin)均购自 Sigma 公司(Sigma Chemical Co., USA); 菲啰嗪(ferrozine)购自 Aladdin-阿拉丁试剂(上海)有限公司; 超纯水由 Aqualix™ 5(Millipore, Taiwan)制备; 色谱级乙腈及酪蛋白水解肽购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 其他检测试剂均为国产分析纯。

### 1.2 主要仪器设备

高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; 反相色谱柱 Poroshell 120 EC C-18 (4.6×150 mm, 2.7 μm); 酶标仪, 美国佛蒙特州宝特仪器有限公司; 离子阱静电场轨道阱质谱仪 LTQ Orbitrap XL, 美国菲尼根质谱公司; AA6800 原子吸收分光光度计, 岛津香港有限公司;

PHS-3C 型 pH 计, 上海精密科学仪器有限公司; Christ RLPHR 1-4 LD Plus 真空冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; WH-2 型旋涡振荡器(旋涡混合器), 常州华奥仪器制造有限公司; MOS450/AF-CD 圆二色谱仪, 法国 Bio-Logic(比奥罗杰)公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 钙螯合活性的测定

钙测定方法根据参考文献<sup>[10]</sup>并进行相应改动, 方法如下: 在 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液中加入 CaCl<sub>2</sub>, 调节其浓度为 5 mmol/L, 加入多肽 M 调整其浓度为 0.5 mg/ml。37 °C 水浴 30 min, 并用 6 mol/L 的 HCl 或同浓度的 NaOH 调节溶液 pH 至 7.5。反应结束后将混合液离心 20 min, 转速为 5000 r/min。取少量上清液稀释至适宜浓度, 用原子吸收法测定溶液中钙含量。实验中设置多肽 M 空白对照组, 每个样品重复测定三次。多肽的加入会阻止磷酸钙沉淀的形成, 因此多肽组上清液中钙含量会高于空白组, 所以多肽螯合钙离子的量可以通过以下公式进行计算:

$$M-Ca=R-B$$

注: M-Ca: 螯合钙离子的量, R: 样品组上清液中溶解钙的量, B: 空白组上清液钙的量。

#### 1.3.2 铁螯合活性的测定

铁螯合活性测定采用菲啰嗪比色法<sup>[11]</sup>, 多肽 M 按 1 mg/mL 溶解在 0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液中, 并调至 pH 5.0, 溶剂选用超纯水。取上述溶液 250 μL 加入 96 孔板中, 于酶标仪中 37 °C 预热。5 min 后取出, 加入 20 μL 浓度为 0.25 mmol/L 的 FeSO<sub>4</sub>, 震荡混匀后开始计时。30 min 后, 加入 15 μL 浓度为 2.5 mmol/L 的菲啰嗪溶液终止反应。10 min 后, 设置酶标仪检测波长为 562 nm 并测定吸光度值。分别选用超纯水与酪蛋白水解肽作为对照组, 每个样品三个平行。铁螯合率计算公式如下:

$$\text{铁螯合率}(\%)=(\text{Abs}_{\text{空白}}-\text{Abs}_{\text{样品}})/\text{Abs}_{\text{空白}}\times 100\%$$

#### 1.3.3 体外模拟胃肠消化

体外模拟胃肠消化方法参照 Cruz-Huerta<sup>[12]</sup>和郭<sup>[6]</sup>等人的方法并加以改动。体外模拟消化分为胃消化和十二指肠消化两个阶段。将多肽 M 按照 1 mg/mL 溶解在超纯水中, 用 0.5 mol/L 的 HCl 调至 pH 2.0。37 °C 水浴 20 min, 按酶与底物 1:40 的比例加入胃蛋白酶, 37 °C 水浴搅拌 120 min 后胃消化阶段结束。用 0.5 mol/L 的 NaOH 调节溶液 pH 7.5 终止胃蛋白酶反应, 并取出部分溶液冻干后以备后续试验使用。十二指肠消化阶段: 将胃消化阶段剩余液体 37 °C 预热 15 min, 酶与底物按照 1:25 的比例加入胰液素, 继续 37 °C 条

件下反应 120 min。反应结束后,将样品加热到 85 °C 持续 20 min 终止酶反应,冻干后-20 °C 贮存备用。

### 1.3.4 反相高效液相色谱分析

将胃酶解阶段产物 S、十二指肠酶解阶段产物 D 及多肽 M 按照 1 mg/ml 浓度溶解于超纯水中,用 0.22 μm 孔径的针头滤器过滤。液相条件如下:流动相 A 为超纯水含 0.1%三氟乙酸(V/V),流动相 B 为乙腈含 0.1%三氟乙酸(V/V);使用反相色谱柱 Poroshell 120 EC C-18,流速为 0.3 mL/min,检测波长 214 nm;洗脱方式采用梯度洗脱,流动相 B 采用 10~60%洗脱 40 min。根据多肽 M 吸光度值调节胃酶解阶段产物 S、十二指肠酶解阶段产物 D 的浓度至适宜吸光度值。

### 1.3.5 质谱鉴定

分别取适量胃消化阶段产物 S、十二指肠消化阶段产物 D 及多肽 M 溶解在超纯水中并稀释至适宜浓度,漩涡震荡器混匀,用 0.22 μm 孔径的针头滤器过滤后进行质谱鉴定。质谱参数如下:样品流速 5 μL/min,喷雾电压为 3.60 kV,氮气流速 10 μL/min,毛细管温度 320 °C,正电荷条件下扫描范围为 100-1000 m/z。

### 1.3.6 圆二色谱分析

25 °C 条件下,将多肽 M、胃消化产物 S、肠消化产物 D 用超纯水配制浓度为 0.2 mg/ml,用 0.22 μm 的针头滤器过滤。在 1 mm 光径样品池中,于 300-180 nm 扫描波长范围内进行扫描。其中,响应时间 1s,扫描速度 100 nm/min,重复测量 4 次。

### 1.3.7 数据分析

实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,数据处理采用 SPSS Statistics 和 Excel 软件。

## 2 结果与讨论

### 2.1 钙螯合活性

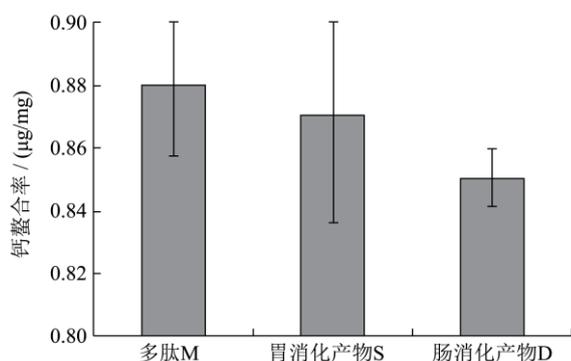


图 1 多肽及其产物钙螯合率

Fig.1 Calcium chelating activity of peptide M and its simulated gastrointestinal digestion products

体外模拟胃肠消化模型被用来模拟人体胃肠消化的过程,该方法简单快速,在一定程度上可以反映人体对样品的消化吸收情况,因此在研究和评价活性肽方面被广泛应用。该模型主要通过考察样品对胃蛋白酶和胰液素的耐受性,反映样品在胃消化阶段和十二指肠消化阶段的情况。活性肽在体外模拟胃肠消化过程中其活性会部分降低或丧失,如蛋清蛋白肽的 ACE 抑制活性经过胃消化阶段下降 11.46%,经过肠消化阶段下降 39.94%<sup>[13]</sup>。因此,活性肽在模拟胃肠消化过程中活性稳定性对其发挥正常的生物活性至关重要。

体外模拟消化前后多肽 M 钙螯合率如图 1 所示,多肽 M 钙螯合率为 0.88 ± 0.02 μg/mg。经胃消化阶段后产物 S 钙螯合率为 0.87 ± 0.03 μg/mg,约为纯肽的 98.86%,与纯肽相比钙螯合能力稍有下降。继续酶解到肠消化阶段结束,肠消化产物 D 钙螯合率为 0.85 ± 0.01 μg/mg,下降至纯肽的 96.60%,钙螯合能力下降率达到 3.40%。由图 1 可知体外模拟胃肠消化的不同阶段均会对多肽 M 钙螯合能力产生影响,但在钙螯合能力方面两个阶段变化不大,说明体外模拟胃肠消化过程对多肽 M 钙螯合能力影响较小。

### 2.2 铁螯合活性

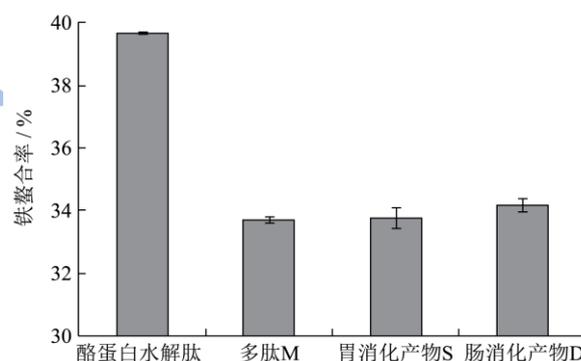


图 2 铁螯合活性

Fig.2 Iron chelating activity

铁螯合活性的测定选择菲罗嗪比色法,在该实验中选择酪蛋白水解肽做对比测定多肽 M 经过不同消化阶段后的铁螯合能力。由图 2 可以看出酪蛋白水解肽与样品相比具有较高的铁螯合能力,螯合率达到 39.59 ± 0.04%。多肽 M 铁螯合率为 33.67%,胃消化产物 S 铁螯合率为 33.72%,所以经过胃消化阶段多肽的铁螯合能力变化不大。经过肠消化阶段后,肠消化产物 D 铁螯合率达到 34.13%,多肽 M 经过肠消化阶段后铁螯合能力反而有所增加。因此,整个体外模拟胃肠消化过程对多肽 M 螯合铁离子是有利的,原因可能是酶解过程引起多肽 M 空间结构改变或溶液存在状

态改变使其更容易螯合铁离子。

### 2.3 反相高效液相色谱分析

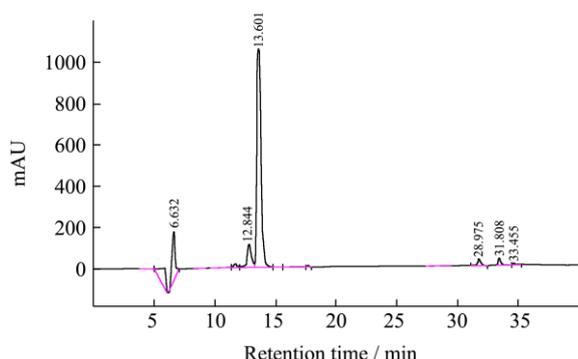


图3 多肽 M 反相高效液相色谱

Fig.3 Reversed-phase HPLC (RP-HPLC) chromatogram of

peptide M

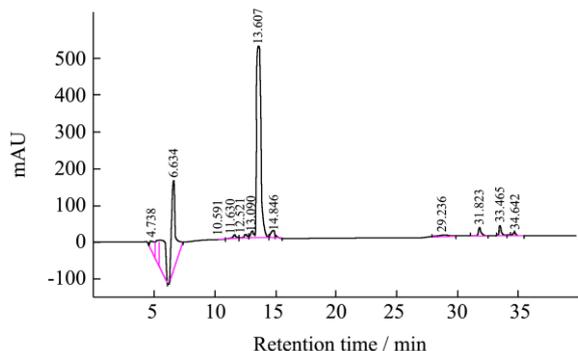


图4 产物 S 反相高效液相色谱

Fig.4 Reversed-phase HPLC (RP-HPLC) chromatogram of

product S

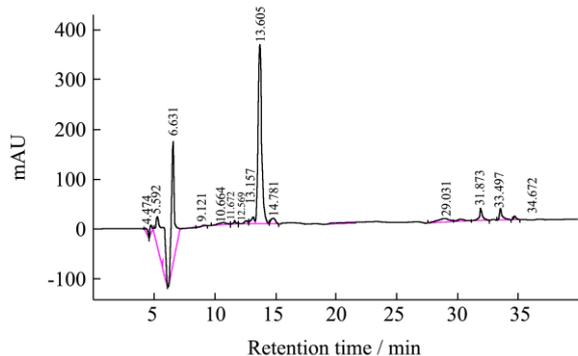


图5 产物 D 反相高效液相色谱

Fig.5 Reversed-phase HPLC (RP-HPLC) chromatogram of

product D

图3可以看出多肽 M 纯度非常高,除多肽峰外只有溶剂峰吸光度值较高。在反相色谱图3中可以看出,水峰出现在 6.63 min 左右,多肽 M 在 13.601 min 左右出峰,其中在 30~35 min 出现溶剂杂峰。多肽 M 测定时样品浓度为 1 mg/mL,由图3可知其峰值较高,产物 D 及产物 S 预实验反相高效液相谱图显示与图3峰

值及峰面积基本相同,因此在测定模拟胃肠消化产物时进行适度稀释后测定。

经过模拟胃消化阶段后,胃消化产物 S 在 13.607 min 左右出峰,与多肽 M 出峰时间一致,说明经过胃消化阶段多肽 M 分子量未发生改变。但与图3相比,12.844 min 的峰消失,被分解为附近的许多更小的峰。肠消化产物 D 出峰时间为 13.605 min,如图5所示,说明多肽 M 经过胃消化阶段的进一步消化其分子量并未发生变化。图5中在 4.5 min 左右出现杂峰,杂峰可能因为酶中含有缓冲盐。从反相高效液相色谱结果来看,体外模拟胃肠消化对多肽 M 影响较小,多肽 M 对体外模拟胃肠消化耐受性高。

### 2.4 质谱测定

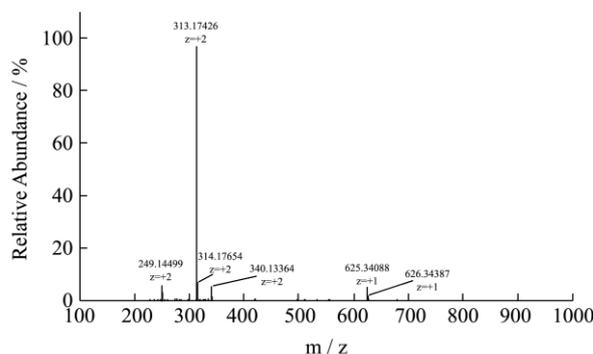


图6 多肽 M 质谱图

Fig.6 Product ion spectrum of peptide M

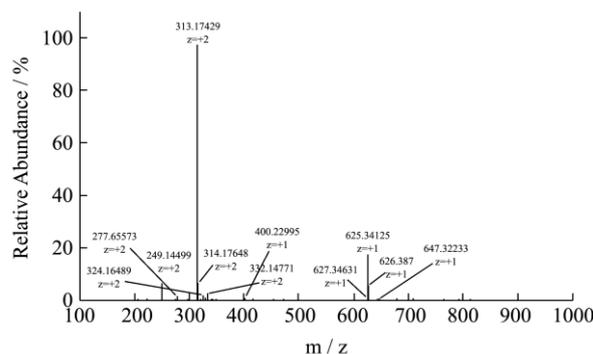


图7 产物 S 质谱图

Fig.7 Product ion spectrum of product S

如图6所示,多肽 M 溶液中主峰精确分子量为 624.33 u,与多肽合成鉴定报告相符。质谱测定灵敏度非常高,随着酶的加入不同消化阶段会出现不同程度的杂峰,由于其中酶含量非常少所以由其产生的杂峰相对丰度会非常低,因此可以认为主峰外的其余峰主要是由消化产物产生的。在图7、图8中可以看到样品溶液中主要物质分子量与多肽 M 相同,其中杂峰数量较多主要由少量分解物造成。由质谱结果可以得出,多肽 M 经过体外模拟胃肠消化过程中分子量未发生

改变, 所以其多肽氨基酸组成未发生改变, 说明在胃蛋白酶和胰液素的作用下肽键未发生断裂。

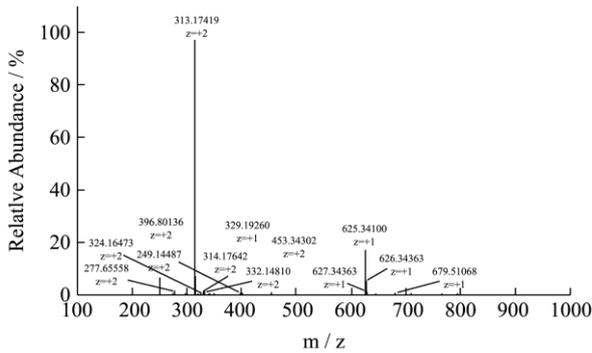


图8 产物D质谱图

Fig.8 Product ion spectrum of product D

但经过整个消化过程, 多肽 M 钙螯合能力有所下降, 经过两个阶段钙螯合能力下降 3.40%, 铁螯合能力反而稍有上升, 上升 0.46%。说明整个消化过程虽然没有改变多肽 M 的氨基酸组成, 但对多肽 M 的空间构型或溶液存在状态产生一定影响, 使其与原构型相比不利于螯合钙离子, 更有利于螯合铁离子, 但整体影响不大, 因此多肽 M 体外模拟胃肠消化耐受性非常好, 是一条非常稳定的钙铁螯合肽。

### 2.5 圆二色谱分析

如图 9 所示, 图 a、b 和 c 分别对应多肽 M, 胃消化产物 S 和肠消化产物 D 的圆二色谱检测结果。如 a 所示, 多肽 M 在水溶液中以无规卷曲(65.5%)为主, 存在β折叠(20.2%)和β转角(14.2%)。经过胃消化阶段, 胃产物 S 与多肽 M 相比无规卷曲(64.1%)减少, β折叠(21.2%)和 β转角(14.7%)减少。肠消化产物 D 与多肽 M 相比变化较大, 其无规卷曲(62.9%)减少, β折叠(20.2%)所占比例不变, β转角(16.9%)增加 19.01%。因此, 经过体外模拟胃肠消化多肽 M 构象发生改变, 无规卷曲减少, β折叠和β转角构象增加。

### 3 结论

多肽 M 的钙螯合率为  $0.88 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{mg}$ , 铁螯合率为 33.67%。经过体外模拟胃肠消化第一阶段得到胃消化产物 S, 其钙螯合率为  $0.87 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{mg}$ , 铁螯合率为 33.72%。胃消化产物 S 与多肽 M 相比, 钙螯合率下降 1.14%, 铁螯合率上升 0.05%。经过体外模拟消化第二阶段得到肠消化产物 D, 其钙螯合率为  $0.85 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$ , 铁螯合率为 34.13%。肠消化产物 D 与多肽 M 相比, 钙螯合率下降 3.40%, 铁螯合率上升 0.46%。因此, 多肽 M 经过体外模拟胃肠消化两个阶段, 钙螯合能力与铁螯合能力整体变化不大, 体外模

拟胃肠消化耐受性高。利用反相高效液相色谱、质谱手段对胃消化阶段和十二指肠消化阶段产物进行分析, 发现多肽 M 经过整个消化过程其分子质量未发生改变, 肽键未发生断裂。圆二色谱分析可知, 多肽 M 经过体外模拟胃肠消化构象发生变化, 无规卷曲减少, β折叠和β转角构象增加。因此, 多肽 M 在体外模拟胃肠消化过程中其多肽链氨基酸组成不变, 空间构象发生改变, 钙铁离子螯合能力变化不大, 体外模拟胃肠消化耐受性高。

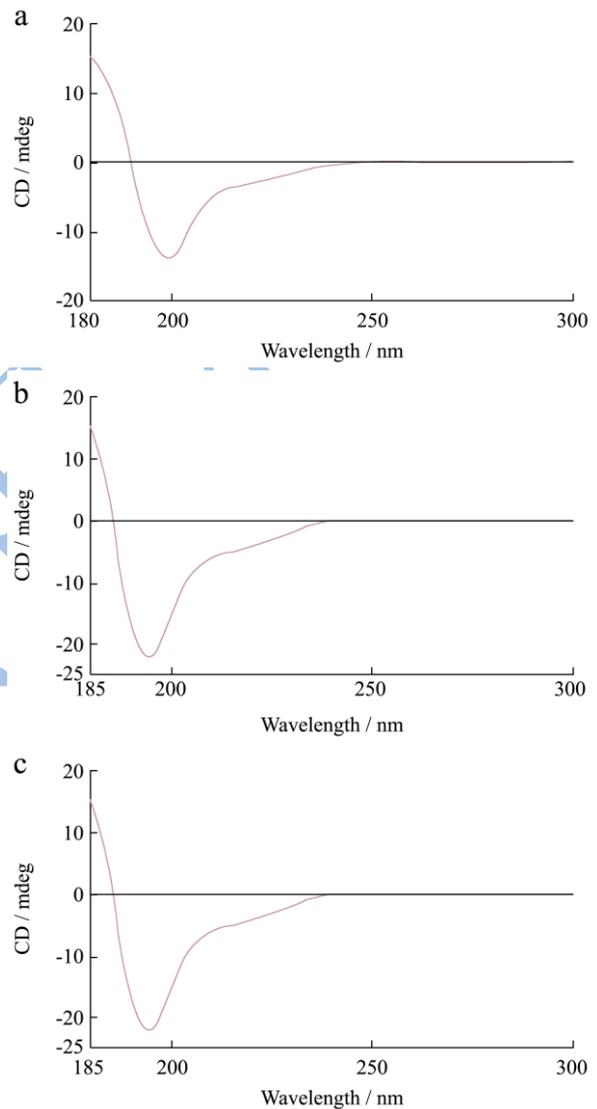


图9 多肽 M、产物 S、产物 D 圆二色谱图

Fig.9 Near-UV CD spectra of peptide M, product S and product D

### 参考文献

- [1] Lee S H, Song K B. Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein [J]. Process Biochemistry, 2009, 44(3): 378-381
- [2] Zhao L, Huang S, Cai X, et al. A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein

- hydrolysate [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 10: 46-53
- [3] Caetano-Silva M E, Bertoldo-Pacheco M T, Paes-Leme A F, et al. Iron-binding peptides from whey protein hydrolysates: Evaluation, isolation and sequencing by LC-MS/MS [J]. Food Research International, 2015, 71: 132-139
- [4] Wu H, Liu Z, Zhao Y, et al. Enzymatic preparation and characterization of iron-chelating peptides from anchovy (*Engraulis japonicus*) muscle protein [J]. Food Research International, 2012, 48(2): 435-441
- [5] Kim N H, Jung S H, Kim J, et al. Purification of an iron-chelating peptide from spirulina protein hydrolysates [J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2014, 57(1): 91-95
- [6] Shoulders M D, Raines R T. Collagen structure and stability [J]. Annual Review of Biochemistry, 2009, 78: 929
- [7] Han Y, Xie J, Gao H, et al. Hepatoprotective effect of collagen peptides from cod skin against liver oxidative damage *in vitro* and *in vivo* [J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2015, 71(2): 1089-1095
- [8] Guo L, Harnedy P A, O'Keeffe M B, et al. Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides [J]. Food Chemistry, 2015, 173: 536-542
- [9] 赵力超, 宁德山, 龙梓祺, 等. 酪蛋白磷酸肽副产物中 ACEI 肽的分离鉴定及稳定性研究 [J]. 现代食品科技, 2014, 30(10): 52-57  
ZHAO Li-chao, NING De-shan, LONG Zi-qi, et al. Purification, identification and evaluation of the stability of angiotensin i-converting enzyme inhibitory peptides derived from by-products of casein phosphopeptides [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(10): 52-57
- [10] Charoenphun N, Cheirsilp B, Sirinupong N, et al. Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate [J]. European Food Research and Technology, 2013, 236(1): 57-63
- [11] Guo L, Harnedy P A, Zhang L, et al. *In vitro* assessment of the multifunctional bioactive potential of Alaska pollock skin collagen following simulated gastrointestinal digestion [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95(7): 1514-1520
- [12] Cruz-Huerta E, Garc ía-Nebot M J, Miralles B, et al. Caseinophosphopeptides released after tryptic hydrolysis versus simulated gastrointestinal digestion of a casein-derived by-product [J]. Food chemistry, 2015, 168: 648-655
- [13] 陈晨, 迟玉杰, 赵明阳, 等. 蛋清蛋白肽体外血管紧张素转化酶抑制活性及其消化稳定性 [J]. 营养学报, 2012, 34(3): 274-277  
CHEN Chen, CHI Yu-jie, ZHAO Ming-yang, et al. The inhibitory effect of egg white-derived peptides on the activity of angiotensin-converting enzyme and their stability during simulated gastrointestinal digestion *in vitro* [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2012, 34(3): 274-277