

米酒糟ACE抑制肽的提取、分离纯化及结构鉴定

翁哲希¹, 何泽琪¹, 崔鹏举², 代晋², 彭新安¹, 温林凤¹, 林倩如¹, 戴伟杰³, 徐兆珍², 曹庸^{1*}
(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 阳西美味鲜食品有限公司, 广东阳江 529800)
(3. 广东惠尔泰生物科技有限公司, 广东广州 510642)

摘要: 酒糟是酿酒过程中的副产物之一, 富含多种天然活性物质。该研究以米酒糟为原料, 通过水提得到粗提物的ACE抑制率为42.93%, 与同次测得市售降压肽ACE抑制率64.52%相差21.25%。随后在乙醇体积分数90%处理, 上清经陶瓷膜和纳滤膜过滤后用石油醚萃取, 萃取后的样品再先后通过3、0.2 μm和5 000 u超滤膜分离。最终5 000 u透过液的ACE抑制率46.00%高于同次测得市售降压肽39.57%, 超出了6.43%。最后通过LTQ Orbitrap Velos Pro对可能存在的活性肽段进行解析, 辅以Compound Discovery软件鉴定出Val-Val-Val、Ile-Ser-Val、Val-Pro-Leu、Leu-Ser-Glu、Phe-Tyr、Val-Arg等11条活性短肽, 不少肽段具有Val、Phe、Tyr等已被证实与ACE抑制机制有关的疏水氨基酸或芳香族氨基酸。实验表明上述分离手段能提高多肽混合物的ACE抑制效果。从米酒糟中分离出具有高ACE抑制活性的多肽混合物为酒糟的加工利用提供了理论依据。

关键词: 酒糟; ACE抑制肽; 降血压; 分离纯化

文章编号: 1673-9078(2025)01-97-104

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.1.1455

Extraction, Separation, Purification and Structural Identification of ACE Inhibitory Peptide from Rice Distiller's Grains

WENG Zhexi¹, HE Zeqi¹, CUI Pengju², DAI Jin², PENG Xinan¹, WEN Linfeng¹, LIN Qianru¹, DAI Weijie³,
XU Zhaozhen², CAO Yong^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Yangxi Meiweixian Foods Co. Ltd., Yangjiang 529800, China)

(3. Guangdong Huiertai Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Distiller's grains are one of the by-products of the winemaking process, and rich in a variety of natural active substances. In this research, the ACE inhibition rate of the crude extract obtained by water extraction from the rice distiller's grains was 42.93%, which was 21.25% lower than that (64.52%) of the commercially available antihypertensive peptide (measured at the same time). Subsequently, the crude extracted was treated with the ethanol (90% volume fraction). Then, the resulting supernatant was filtered by ceramic membrane and nanofiltration membrane, then extracted with petroleum ether. The extracted samples were separated by 3, 0.2 μm and 5 000 u ultrafiltration membranes. The ACE inhibition rate of the 5 000 u

引文格式:

翁哲希, 何泽琪, 崔鹏举, 等. 米酒糟ACE抑制肽的提取、分离纯化及结构鉴定[J]. 现代食品科技, 2025, 41(1): 97-104.

WENG Zhexi, HE Zeqi, CUI Pengju, et al. Extraction, separation, purification and structural identification of ace inhibitory peptide from rice distiller's grains [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(1): 97-104.

收稿日期: 2023-12-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972078); 广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队建设项目(2023KJ117); 阳江市“揭榜挂帅”项目(SDZX2023002)

作者简介: 翁哲希(2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品化学, E-mail: wengzhexi@stu.scau.edu.cn

通讯作者: 曹庸(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性产物及功能性食品, E-mail: caoyong2181@scau.edu.cn

permeate was 46.00%, which was higher than that (39.57%) of the commercially available antihypertensive peptide (difference: 6.43%). Finally, LTQ Orbitrap Velos Pro was used, with the aid of Compound Discovery software, to analyze the possible bioactive peptides. Eleven active short peptides were identified, including Val-Val-Val, Ile-Ser-Val, Val-Pro-Leu, Leu-Ser-Glu, Ph-Tyr, and Val-Arg. These peptides contained hydrophobic or aromatic amino acids that have been shown to be involved in ACE inhibition mechanism, such as Val, Phe and Tyr. The experimental results showed that the above separation methods could improve the ACE inhibition effect of the polypeptide mixture. The separation of polypeptide mixtures with high ACE inhibition activities from distiller' grains provides a theoretical basis for the processing and utilization of distiller's grains.

Key words: distiller'grains; ACE inhibitor peptide; hypotensive; separation and purification

高血压的疾病特征为动脉压升高, 世界卫生组织建议的是正常成年人的血压标准应为收缩压 ≤ 140 mmHg, 舒张压 ≤ 90 mmHg。成年人高血压的诊断依据为收缩压 ≥ 160 mmHg, 舒张压 ≥ 95 mmHg。高血压是全球范围内心血管疾病和非正常死亡的主要原因之一, 也是中风、心力衰竭、心肌梗死、心房颤动和外周动脉疾病最常见的危险因素^[1], 预计到 2025 年患高血压人数将达到 15 亿^[2,3]。目前已经证实的是肾素-血管紧张素系统 (Renin-angiotensin System, RAS) 是治疗高血压的关键靶点, 血管紧张素抑制酶 (Angiotensin-I-converting Enzyme, ACE) 抑制剂可降低高血压患者的死亡率, 如卡托普利和赖诺普利等化学合成药物, 在临床上可用于高血压的治疗, 但也伴有一些副作用^[4], 如咳嗽、皮疹、血管性水肿等^[5]。相比之下, 自然界的生物活性肽更环保、更安全, 因此成为了近年来研究的热点。除了日常健康饮食, 增加果蔬和优质蛋白的摄入量可降低血压外^[6], 蛋白中含有的活性肽片段也对人体健康有很大帮助。

大米是世界上最重要的农作物之一, 曾有报告显示, 预计全球大米产量到 2029 年将达到 5.82 亿吨^[7]。大米蛋白的氨基酸组成比例与 FAO/WHO 的建议模式接近, 它的营养价值可以与鸡蛋、鱼、虾及牛肉蛋白等动物蛋白媲美^[8]。但中国在大米资源的开发和综合利用方面水平较低, 导致其经济价值不能得到体现。米酒则是大米加工利用的途径之一, 生产过程中会产生大量的发酵基料, 也可称为米酒糟。目前仅有少数工厂将其烘干作为饲料出售, 大部分厂家均以低廉的价格售卖, 还有些厂家则直接以废弃物排放, 这造成了蛋白质资源的浪费^[9,10], 也对环境造成了污染。所以米酒糟的综合利用是一个新的可开发领域, 一旦被开发成产品, 则可大幅度提高米酒糟的经济和利用价值, 同时减少环境污染。根据文献报道, 以大米蛋白为原料来制备大米肽,

尤其是制备高纯度的活性肽, 是目前深加工大米蛋白的主要方向^[11], 大量的文献资料已验证了具有 ACE 抑制活性的食源性生物活性肽具有显著的降压作用^[12-17], 此外已被证实的生理功效有抗氧化、抗衰老、降血压、降血脂、免疫调节和风味肽等^[18], 还具有抗癌和抗菌等功能, 用途颇广。大米肽的保健功效使得提取和开发大米蛋白成为热点^[19], 以食品为原料分离纯化制备降血压肽, 已在食品研究领域得到了重视。

本文利用米酒糟为实验原料, 利用水提, 醇沉, 膜过滤, 石油醚除杂等手段得到的混合物具有一定的降血压效果, 最终得到的组分的 ACE 抑制率高于市售降血压肽。米酒糟是大米蛋白的重要来源, 具有原料安全、无毒副作用、营养价值较高的优点。本文为米酒糟的合理加工利用以及具有降血压作用的大米肽提供进一步的应用参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器设备

1.1.1 原料与试剂

酒糟: 由阳西美味鲜公司提供。

盐酸 (HCL), 广州化学试剂厂; 三氟乙酸 (Trifluoroacetic Acid, TFA), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; ACE 酶, 美国 sigma 公司; 马尿酸-组氨酸-亮氨酸 (Hippuryl-L-His-L-Leu, HHL), 美国 sigma 公司; 硼酸-硼砂缓冲液, 北京雷根生物技术有限公司; 无水乙醇, 广州化学试剂厂; 石油醚, 广州化学试剂厂; 乙腈, 色谱纯, 瑞典 Oceanpak 公司; 甲酸, 色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 未标注试剂均为分析纯。

PTH-氨基酸混合标品、PTH-氨基酸洗脱液、球蛋白 (马) 标品、体积分数 5% 的 PITC 正庚烷溶液、12% 的三甲胺溶液、三氟乙酸、体积分数

25%的三氟乙酸溶液、乙酸乙酯、1-氯丁烷、体积分数37%的乙腈溶液、聚凝胺试剂,色谱纯,均由日本和光纯药工业株式会社提供。

1.1.2 主要仪器设备

AL104 万分之一电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;TDL-5离心机,上海安亭仪器有限公司;R204B3旋转蒸发仪,上海申科技有限公司;XMTD-8222恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;PR02559超纯水发生器,美国Milipore公司;KQ500-B超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;VM-300S涡旋混合器,群安实验仪器有限公司;MSC300超滤杯,上海摩速科学器材有限公司;LC-10ATvp plus分析型高效液相,日本岛津公司;LTQ Orbitrap Velos Pro质谱仪,美国Thermo公司;AKN-0.8-330新型固液分离膜过滤设备,哈尔滨奥科诺生物制品有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 提取

料液比为1:5,温度50℃,提取时间1h,提取次数2次。用400目滤布粗分离,除去滤渣并收集滤液,在4000 r/min,15 min离心,收集上清液。将上清液在55℃下旋转蒸发浓缩,保留粗提液。取少量粗提液浓缩冻干与市售降压肽比对ACE抑制活性。

1.2.2 醇沉

分别配制无水乙醇和体积分数为90%乙醇,其中体积分数为90%乙醇用一级水进行稀释。将粗提液取少量用体积分数90%乙醇和无水乙醇分别进行醇沉,除去沉淀后保留上清液,浓缩冻干后与粗提液及市售降压肽比对ACE抑制活性。将ACE抑制活性最好的条件用于后续的大量样品醇沉分离。

1.2.3 一次膜过滤

将醇沉后的上清样品先通过孔径为0.45 μm的卷式陶瓷膜,得到截留液和透过液,再将透过液经孔径为150 u的卷式纳滤膜过滤,收集截留液。将以上样品冻干后与市售降压肽和未经膜处理的样品进行ACE抑制活性比对。另外还将各组分样品通过分析型高效液相色谱对其成分活性位置进行分析,分析条件如下:色谱柱为ECOSIL C18(260 mm×4.6 mm,5 μm);流动相的A泵为超纯水,B泵为乙腈;流速为1 mL/min;进样量为20 μL;检

测波长为214 nm。洗脱程序如下:0~30 min,5%~35% B;30~50 min,35%~45% B;50~50.1 min,45%~70% B;50.1~60 min,90% B(均为体积分数)。

1.2.4 石油醚处理

将膜过滤各组分中ACE抑制活性最好的组分加入石油醚(沸程30~60℃),待沉淀产生后,4000 r/min,15 min离心弃去沉淀,收集上清液。冻干后与市售降压肽比对ACE抑制活性。

1.2.5 二次膜过滤

将石油醚处理后的上清液旋蒸除去有机试剂后,先用3 μm、0.2 μm的微孔滤膜抽滤过膜,再用5000 u的超滤片式膜处理。超滤步骤用超滤杯进行,全程在常温下进行,固定好超滤杯后加入100 mL样品,密封后通入氮气,保持压力为0.1~0.22 MPa,并收集5000 u膜透过液。将透过液冻干后与市售降压肽进行ACE抑制活性比对。

1.2.6 结构解析鉴定

为了进一步明确ACE抑制肽的作用结构,选取了活性最好的组分5000 u超滤膜透过液,使用UPLC-LTQ-Orbitrap-Velos Pro质谱分析仪对其进行定性分析,结合质谱软件Compound Discovery(CD)软件来解析鉴定。其中,HPLC条件如下:检测波长A280,流动相A:体积分数0.1%的三氟乙酸水溶液,流动相B:体积分数0.1%的三氟乙酸乙腈溶液;分离条件:泵B体积分数梯度0~20 min,5%~30%;20~40 min,45%~70%;40~50 min,90%;MS条件如下:流动相A:体积分数0.1%的甲酸水溶液,流动相B:体积分数0.1%的甲酸乙腈溶液;分离条件:泵B体积分数梯度0~8 min,5%~50%,8~10 min,50%~90%,10~12 min,90%;流量300 μL/min;进样体积10 μL。选用负离子模式,离子源设置:毛细管温度380℃,源加热器温度350℃,鞘气流速50 arb,辅助气流2 MPa,碰撞模式:CID,扫描范围50~1000 m/z。

质谱分析涉及的条件参数如下:参数设置参照CD 3.1 Metabolomics中文教程中的默认参数,搜索数据库,以及所有Metabolika代谢通路。

1.2.7 ACE抑制率测定

参照Cushman等^[20]的方法,略有修改。首先分别向空白组、对照组和样品组加入10 μL ACE溶液(0.25 U/mL),然后样品组加入10 μL血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI),对照组加入10 μL缓冲液,

空白组加入 10 μL 缓冲液和 80 μL 1.0 mol/L HCl, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 5 min 后所有组别均加入 30 μL HHL 溶液 (6.5 mmol/mL, HHL 溶于 pH 值为 8.3 的 0.1 mol/L 硼酸缓冲液, 含 0.3 mol/L 氯化钠 NaCl), 再置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温反应 1 h, 反应结束后对对照组和样品组分别加入 80 μL 1.0 mol/L HCl 中止反应。

液相色谱条件: 色谱柱为 C18 (260 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为超纯水: 乙腈 =75:25 (含体积分数 0.1% TFA); 检测波长为 228 nm; 柱温箱温度为 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速为 1 mL/min; 进样体积为 20 μL 。

结果计算:

原理: 在 ACE 酶的催化下, HHL 会迅速分解, 并产生二肽 (His-Leu, HL) 和马尿酸 (Hip), 马尿酸在 228 nm 处有最大的吸收峰。一旦添加 ACEI, ACE 酶的活性会被抑制, Hip 的生成量随之减少, 所以可以利用液相色谱来测定 Hip 的生成量, 从而来计算 ACEI 对 ACE 酶活的抑制效果。ACE 抑制率的计算如下:

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

式中:

R —ACEI 对 ACE 的抑制率, %;

A —对照组中马尿酸的峰面积;

B —添加 ACEI 组中马尿酸的峰面积;

A_0 —空白组中马尿酸的峰面积。

1.2.8 数据处理

以上所有试验数据平行测定 3 次, 采用 Excel 2019 软件完成数据统计, 采用 GraphPad Prism 8.0.2 对试验数据进行处理。

2 结果与讨论

2.1 米酒糟的提取

将上清液冻干后与市售降压肽配成统一质量浓度 (1 mg/mL) 比对发现水提酒糟粗提物中具有一定的 ACE 抑制活性, 在同一次对比中市售降压肽和水提酒糟的抑制率分别为 64.52% 和 43.27%, 两者相差 21.25%。如图 1 所示, 已有大量文献资料证明植物来源的 ACE 抑制肽主要有米糠、大豆、花生、绿豆、菜籽等, 如王申等^[21]通过超声结合微波酶解预处理的大米肽 ACE 抑制率可达 80% 以上, 封张萍等^[7]在最佳酶解条件下得到大米蛋白水解液的 ACE 抑制率为 75.17%。水提法是从原料中直接

提取 ACE 抑制肽的主要方法之一^[22], 经常会结合一些高新手段如高压、超声等方法联合使用, 这些新技术用于辅助提取生物活性肽, 可加快多肽的释放且快速进到溶剂里, 在一定条件下不会破坏多肽结构且操作方便, 可以节约时间、提高效率^[23]。结果表明本试验得到的水提粗提液具有进一步分离纯化得到高 ACE 抑制活性组分的可行性。

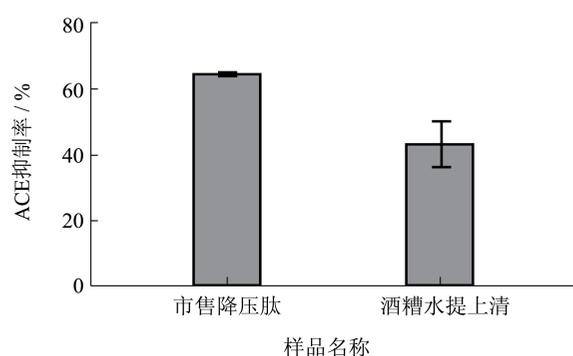


图 1 水提粗提物与市售降压肽的 ACE 抑制率

Fig.1 ACE inhibition rate of water extract and commercial antihypertensive peptide

2.2 乙醇醇沉分离纯化

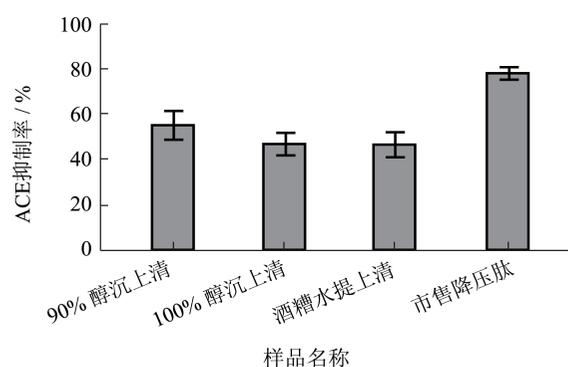


图 2 不同浓度醇沉后上清与粗提液、市售降压肽的 ACE 的抑制率

Fig.2 ACE inhibition rate of supernatant, crude extract and commercial antihypertensive peptide after alcohol precipitation with different concentrations

乙醇可通过与多肽特异性结合, 改变多肽的结构和相互作用性质, 且不同体积分数的乙醇溶液与多肽的相互作用有差异, 从而能将具有不同结构特性的多肽进行分离, 有研究通过在富含氨基酸的原淀粉酶、橡胶籽蛋白水解物和草汁中加入不同体积分数 (0~95%) 的乙醇后发现, 不同氨基酸的醇沉浓度存在差异, 因此可以通过调节乙醇体积分数来富集目标组分, 提高样品纯度^[24]。将冻干后的水提酒

糟分别加入体积分数 90% 乙醇和无水乙醇, 搅拌混匀后 4 °C 过夜存放, 在 4 000 r/min, 15 min 下离心弃去沉淀, 保留上清。冻干后与未经乙醇处理的样品及市售降压肽配成统一质量浓度 (1 mg/mL) 进行活性比对, 结果如图 2 所示, 发现在该次同条件比对比下用体积分数 90% 乙醇醇沉后的上清 ACE 抑制率为 55.68%, 高于未经处理料液的 47.69%, 但与市售仍存在较大活性差距。

2.3 一次过膜法分离纯化

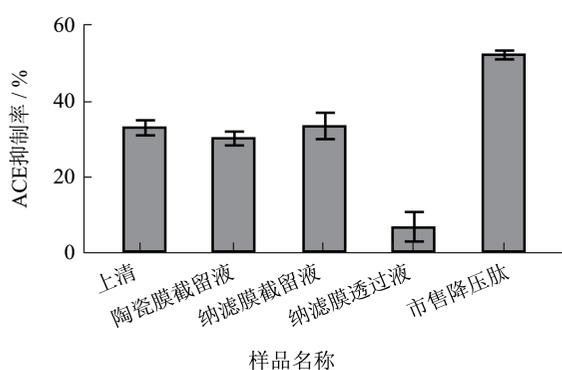


图 3 各过膜截留与透过组分与未过膜样品、市售降压肽的 ACE 抑制率

Fig.3 ACE inhibition rate of transmembrane entrapped and transmembrane components, non-transmembrane samples and commercially available antihypertensive peptides

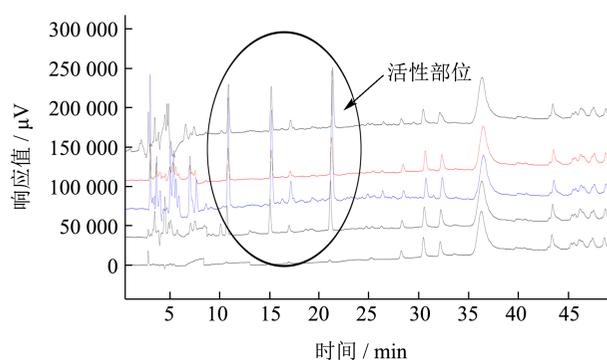


图 4 各过膜截留与透过组分的液相图谱

Fig.4 Liquid phase spectra of each transmembrane entrapment and permeation components

注: 从上到下依次为陶瓷膜截留液、陶瓷膜透过液、纳滤膜截留液、纳滤膜透过液、CK。

膜过滤是分离纯化不同分子质量植物来源功能活性多肽的主要技术, 膜分离效果通常与膜的孔径相关^[25], 而膜的孔径又通常与制膜过程中原料的选择及浓度、制膜条件如添加剂的选择和浓度等有关^[26]。将体积分数 90% 乙醇醇沉处理后的上清液先

用新型固液分离膜过滤设备在 0.45 μm 卷式陶瓷膜中过滤, 得到陶瓷膜截留液和透过液。透过液进一步通过 150 u 分子量的卷式纳滤膜过滤, 此步骤主要为除去上清液中的水分和小分子物质, 收集纳滤膜截留液和纳滤膜透过液。将上述得到的 3 种过膜样品与未经过膜处理的样品, 及市售降压肽配成统一质量浓度 (1 mg/mL) 进行 ACE 抑制活性比对。结果如图 3 所示发现纳滤膜截留液的 ACE 抑制活性为 33.74%, 与市售的 ACE 抑制率 53.03% 的差距缩小为 19.29%, 在所有分离样品的同次活性比对比中较高。Yu 等^[27]和 Aleman 等^[28]均在鱼胶原蛋白中发现分子量最小的组分 ACE 抑制活性最高, 抑制率可达到 40%~50%, 表明小分子量肽段相较于大分子量肽段能表现出更优的 ACE 抑制效果的结论, 这与本试验结果类似。同时将所有组分通过分析型高效液相色谱对成分进行分析, 通过图 4 可初步判断其活性部位主要出峰时间为 10~20 min, 此时间段主峰越高, 样品活性越强, 为后续寡肽的分离纯化提供判断。

2.4 石油醚萃取分离

石油醚是常用的萃取剂之一。在纳滤膜截留液中按照少量多次原则加入石油醚, 直至产生沉淀后离心, 弃去沉淀后将上清液与未经石油醚处理的样品冻干, 配成统一质量浓度 (1 mg/mL) 与市售降压肽比较 ACE 抑制活性, 结果如图 5 所示, 发现经石油醚除杂后的上清液抑制率与处理前相比有所提高, 达 54.78%, 此时与市售降压肽的 ACE 抑制率差距缩小为 12.60%。

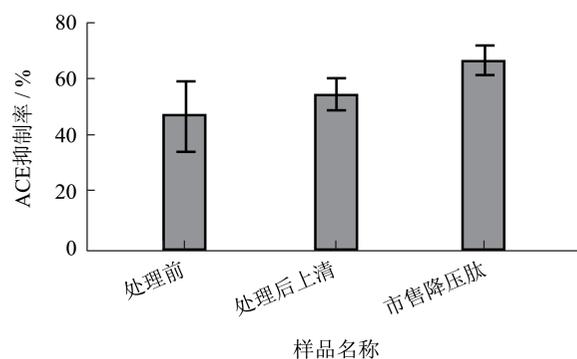


图 5 石油醚除杂后上清液、未处理样品、市售降压肽的 ACE 抑制率

Fig.5 ACE inhibition rate of petroleum ether supernatant, untreated sample and commercial antihypertensive peptide after impurity removal

有较好的降压效果, ACE 抑制率高于市售降压肽的多肽混合物。但具体起关键作用的寡肽有待进一步分离纯化及解析鉴定。

参考文献

- [1] YIN R, YIN L, LI L, et al. Hypertension in China: burdens, guidelines and policy responses: a state-of-the-art review [J]. *Journal of Human Hypertension*, 2022, 36(2): 126-134.
- [2] KINGUE S, NGOE C N, MENANGA A P, et al. Prevalence and risk factors of hypertension in urban areas of Cameroon: a nationwide population-based cross-sectional study [J]. *The Journal of Clinical Hypertension*, 2015, 17(10): 819-824.
- [3] MOHAMMED N A, MOHAMMAD Z, JETLY K, et al. The prevalence and risk factors of hypertension among the urban population in southeast Asian countries: a systematic review and meta-analysis [J]. *International Journal of Hypertension*, 2021:6657003.
- [4] HEEL R C, BROGDEN R N, SPEIGHT T M, et al. Captopril: a preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy [J]. *Drugs*, 1980, 20: 409-452.
- [5] 卢洋.核桃蛋白源ACE抑制肽的纯化、结构鉴定及性质研究[D].西安:陕西科技大学,2015.
- [6] TYSON C C, DAVENPOET C A, LIN P, et al. DASH diet and blood pressure among black Americans with and without CKD: the Jackson heart study [J]. *American Journal of Hypertension*, 2019, 32(10): 975-982.
- [7] 封张萍,岳阳,刘东红,等.大米ACE抑制肽制备工艺优化和生物活性研究[J].*食品科技*,2021,46(2):210-217.
- [8] NISOV A, ERCILI-CURA D, NORDLUND E. Limited hydrolysis of rice endosperm protein for improved techno-functional properties [J]. *Food Chemistry*, 2020, 302: 125274.
- [9] 张鹏,周春霞,洪鹏志,等.大蒜生物活性成分降血压机制研究进展[J].*食品研究与开发*,2015,36(17):189-193.
- [10] 许伟瀚,双全,吴楠.降血压肽研究进展[J].*食品研究与开发*,2017,38(5):216-220.
- [11] 严静,查园园,钱家美,等.大米蛋白资源开发利用现状[J].*中国食品添加剂*,2020,31(5):124-129.
- [12] ZHANG L, MIAO J, GUO J, et al. Two novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from rice (*Oryza sativa* L.) bran protein [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(9): 4153-4162.
- [13] DONG J, WANG S, YIN X, et al. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effects of rice peptides [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(6): 1539-1543.
- [14] BRAVO F I, MAS-CAPDEVILA A, LÓPEZ-FERNÁNDEZ-SOBRINO R, et al. Identification of novel antihypertensive peptides from wine lees hydrolysate [J]. *Food Chemistry*, 2022, 366: 130690.
- [15] KAPRASOB R, KHONGDETH J, LAOHAKUNJIT N, et al. Isolation and characterization, antioxidant, and antihypertensive activity of novel bioactive peptides derived from hydrolysis of King Boletus mushroom [J]. *LWT*, 2022, 160: 113287.
- [16] SONKLIN C, ALASHI M A, LAOHAKUNJIT N, et al. Identification of antihypertensive peptides from mung bean protein hydrolysate and their effects in spontaneously hypertensive rats [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 64: 103635.
- [17] AMORIM F G, COITINHO L B, DIAS A T, et al. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: bioprospection of antihypertensive molecules [J]. *Food Chemistry*, 2019, 282: 109-119.
- [18] 蔡俊.大米抗氧化肽的复合酶法制备及理化性质研究[D].武汉:武汉轻工大学,2016.
- [19] LIU Y Q, STRAPPE P, SHANG W T, et al. Functional peptides derived from rice bran proteins [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(2): 349-356.
- [20] 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.
- [21] 王申,周佳,徐晶,等.超声、微波联合预处理大米蛋白制备ACE抑制肽工艺优化[J].*食品与机械*,2014,30(3):159-162.
- [22] 许新月,崔文玉,柏雨岑,等.食用菌ACE抑制肽制备及其功能活性研究进展[J].*山东农业科学*,2019,51(11):157-160,167.
- [23] 董彩军,李锋.食源性ACE抑制肽的研究进展[J].*上海轻工业*,2023,6:162-164.
- [24] WIDYARANI, BOWDEN N A, KOLFSCHOTEN R C, et al. Fractional precipitation of amino acids from agro-industrial residues using ethanol [J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2016, 55(27): 7462-7472.
- [25] TAN P, JIANG Y, QI S, et al. Ce-doped smart adsorbents with photoresponsive molecular switches for selective adsorption and efficient desorption [J]. *Engineering*, 2020, 6(5): 569-576.

- [26] 杨雅梦,胥健萍,刘婉月,等.植物多肽分离技术及功能研究进展[J].食品科技,2021,46(6):194-200.
- [27] YU Z, WU S, ZHAO W, et al. Identification of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from collagen hydrolysates and its molecular inhibitory mechanism [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2020, 55(9): 3145-3152.
- [28] ALEMÁN A, GÓMEZ-GUILLÉN M C, Montero P. Identification of ace-inhibitory peptides from squid skin collagen after *in vitro* gastrointestinal digestion [J]. Food Research International, 2013, 54(1): 790-795.
- [29] 王晓丹,薛璐,胡志和,等.ACE抑制肽构效关系研究进展[J].食品科学,2017,38(5):305-310.
- [30] HIDALGO J M, MARGALEF M, BRAVO F I, et al. Virgin olive oil (unfiltered) extract contains peptides and possesses ACE inhibitory and antihypertensive activity [J]. Clinical Nutrition, 2020, 39(4): 1242-1249.
- [31] SONKLIN C, ALASHI M A, LAOHAKUNJIT N, et al. Identification of antihypertensive peptides from mung bean protein hydrolysate and their effects in spontaneously hypertensive rats [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103635.
- [32] 邢路娟,郝月静,左庆翔,等.金华火腿中生物活性肽的血管紧张素转化酶调节功能及其分离纯化[J].中国食品学报,2023,23(5):78-86.
- [33] LOPEZ-FERNANDEZ-SOBRINO R, SOLIZ-RUEDAJ R, MARGALEF M, et al. ACE inhibitory and antihypertensive activities of wine lees and relationship among bioactivity and phenolic profile [J]. Nutrients, 2021, 13(2): 679.