

猪血红蛋白ACE抑制肽的分离和理化性质研究

邓惠玲^{1,2}, 刘 嘉^{1,2}, 陈光镜^{1,2}, 阚建全^{1,2,*}

(1.西南大学食品科学学院, 重庆 400715;

2.农业部农产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(重庆), 重庆 400715)

摘 要:以猪血红蛋白的胃蛋白酶水解液为原料,依次通过大孔吸附树脂DA201-C、葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20进行纯化,最终得到了3个降血压组分;并收集ACE抑制活性最高的组分 α -II,对其进行理化性质的研究。结果表明,酶解液经过大孔树脂DA201-C脱盐后,IC₅₀为0.87mg/mL;继续经过葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20分离得到的猪血红蛋白ACE抑制肽(α -II)的IC₅₀为0.21mg/mL。分离后的猪血红蛋白ACE抑制肽(α -II)在pH为7时,溶解度最低,为50.37%;胃蛋白酶对其活性影响不显著。温度在25~55℃之间以及中性和偏酸性的条件下时, α -II具有较好的热稳定性;当NaCl浓度大于0.6mol/L时,其活性急剧下降。

关键词:猪血红蛋白,ACE抑制肽,分离,理化性质

Study on separation and physicochemical properties of ACE inhibitory peptides from porcine hemoglobin

DENG Hui-ling^{1,2}, LIU Jia^{1,2}, CHEN Gang-jing^{1,2}, KAN Jian-quan^{1,2,*}

(1.College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2.Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-products on Storage and Preservation (Chongqing), Ministry of Agriculture, Chongqing 400715, China)

Abstract:The pepsin hydrolysate of porcine hemoglobin as raw material was used for adsorption and desorption through using macroporous resin DA201-C and Sephadex LH-20 chromatogram, then three antihypertensive components were obtained; and to collect and to study on physicochemical properties of ACE inhibitory peptide α -II that possessing the largest ACE inhibitory activity. The results showed that, ACE inhibitory peptide of porcine hemoglobin was separated by macroporous resin DA201-C and the IC₅₀ was 0.87mg/mL; next separated by Sephadex LH-20 and IC₅₀ was 0.21mg/mL. The lowest solubility of ACE inhibitory peptides of porcine hemoglobin(α -II) was 50.37% at pH 7; and this fraction(α -II) demonstrated high stability against gastrointestinal proteases, temperature 25~55℃ and pH<7. But ACE inhibitory activity could reduce rapidly when the NaCl concentration exceeded 0.6mol/L.

Key words:porcine hemoglobin; ACE-inhibitory peptide; separation; physicochemical properties

中图分类号:TS251.93

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2013)06-0281-05

血管紧张素转化酶(The angiotensin I-converting enzyme, ACE)是一种二肽基肽酶,在血压调节系统中起关键作用。ACE一方面通过水解作用,使不具有催化活性的血管紧张素 I 成为具有促进血管收缩作用的血管紧张素II;另一方面通过降解作用,使具有舒张血管紧张作用的舒缓肌肽失活^[1]。ACE酶活性过高会导致高血压病的产生,因此需要服用ACE抑制剂。一些合成的ACE抑制剂,如卡托普利、赖诺普利、卡托普利等被用来治疗高血压和心血管疾病,降压

效果显著。但是研究发现,长期使用这些合成抑制剂会导致近44%的病人出现诸如咳嗽、皮疹、味觉失调等副作用^[2]。Ferreira^[3]首次在美国矛头蝮的毒液中发现ACE抑制肽,此后,食源性ACE抑制肽受到众多学者的关注,被认为是最有希望取代合成ACE抑制剂的天然活性物质^[4]。近年来,从各种食物蛋白质中分离纯化出许多ACE抑制肽,如Anne等^[5]从牛奶中分离纯化出了 α -1a f105-110, β -lg f9-14, f15-20, as1-cn f142-147, f157-164, f194-199, β -cn f108-113, f177-183和193-1989多肽。Hiroyuki等^[6]从鲑鱼肉中分离纯化出Leu-Lys-Pro-Asn-Met五肽。Daodong等^[7]从脱脂牛奶中分离纯化出Val-Pro-Pro三肽。Zhao等^[8]从海参中分离纯化出Glu-Asp-Pro-Gly-Ala五肽。Wang等^[9]从牡蛎中分离纯化出Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-

收稿日期:2012-11-19 * 通讯联系人

作者简介:邓惠玲(1987-),女,硕士研究生,研究方向:食品化学与营养学。

基金项目:西南大学基本科研业务费专项资金资助项目(XDJK2009C055)。

Gln-Arg-Phe九肽。Hee等^[10]从阿拉斯加州鲑鱼皮中分离纯化出Gly-Pro-Leu三肽。ACE抑制肽的降血压活性与其纯度密切相关,目前肽类的分离纯化方式主要包括大孔树脂^[11]、凝胶色谱^[12]、离子交换色谱^[13]、疏水相互作用色谱^[14]、高效液相色谱^[15]等。本研究以猪血血红蛋白的胃蛋白酶水解液为原料,使用大孔吸附树脂DA201-C和葡聚糖凝胶Sephadex LH-20对其进行初步分离,并对初步分离后具有较高ACE抑制活性的组分进行理化性质研究,旨在为猪血红蛋白ACE抑制肽的工业开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

猪血血红蛋白粉 实验室自制;血管紧张素转化酶(ACE)(纯度2~6U/mg)、马尿酸-组胺酰-亮氨酸(HHL) Sigma公司;Pepsin胃蛋白酶(酶活20万U/g)

Sigma公司;胰蛋白酶(酶活1万U/g)、胰凝乳蛋白酶(酶活1万U/g) 南宁东恒华道生物科技有限公司;Sephadex LH-20 美国GE公司;DA201-C大孔树脂(孔径0.315~1.25) 沧州宝恩化工有限公司。

ALPAAI-4LSC型真空冷冻干燥机 德国Chris公司;1-15PK型冷冻离心机 SIGMA公司;LC-20AD型高效液相色谱仪 日本岛津公司;DBS-100型电脑全自动部分收集器 上海沪西分析仪器厂;HL-2型恒流泵 上海沪西分析仪器厂;UV-2450PC型紫外可见分光光度计 SHIMADZU。

1.2 实验方法

1.2.1 猪血红蛋白酶解液的制备^[16] 取25g猪血红蛋白粉,加入蒸馏水(502mL),配制成4.98%(m/v)底物,以HCl(1mol/L)调节底物pH至1.98,再按照胃蛋白酶:猪血血红蛋白粉为3:100(w/w)的比例加入胃蛋白酶进行水解,37.6℃酶解,以HCl维持反应体系的pH恒定。水解4h后,100℃水浴10min灭酶,流水冷却至37℃,以10000r/min,5℃离心10min,收集上清液,真空冷冻干燥后备用。

1.2.2 猪血红蛋白ACE抑制肽的纯化实验

1.2.2.1 大孔树脂DA201-C的分离实验^[17] 在室温下,将大孔树脂浸泡于95%乙醇中24h,使其充分溶胀;然后用无水乙醇淋洗至220nm处无吸收峰;再用蒸馏水洗至无乙醇味。接着浸泡于5倍体积的5% NaOH中8h,用蒸馏水洗至pH为7;最后浸泡于5倍体积的5% HCl中8h,用蒸馏水洗至pH为7,备用。在层析柱中装满预处理好的大孔吸附树脂DA201-C(2.6cm×50cm),湿法上柱;将浓度为45mg/mL的猪血红蛋白多肽溶液30mL以0.5mL/min的流速流经层析柱,用紫外检测器检测流出液在280nm处的吸光度(A_{280nm}),以 $A_{280nm} \geq 0.05$ 时停止上样。将500mL的75%(v/v)的乙醇以1.0mL/min的流速流经层析柱,以 $A_{280nm} \geq 0.05$ 时停止上样。收集洗脱液进行旋转蒸发浓缩后真空冷冻干燥,备用。并进行ACE抑制活性的测定和脱盐率^[18]测定。

$$\text{脱盐率}(\%) = 1 - \frac{A_2}{A_1} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中, A_1 为脱盐前样品中的灰分; A_2 为脱盐后样

品中的灰分。

1.2.2.2 葡聚糖凝胶Sephadex LH-20的分离实验^[19]

在室温下将葡聚糖凝胶LH-20浸泡于55%乙醇中24h后,使其充分溶胀;然后用去离子水洗至无乙醇味,溶胀24h。0.2mol/L的HCl中浸泡12h,用去离子水洗至中性,备用。

在层析柱中装满预处理好的葡聚糖凝胶Sephadex LH-20(1.6cm×100cm),湿法上柱;取0.5g 1.2.2.1中的洗脱组分作为纯化样品溶于10mL超纯水中配成50mg/mL的上样浓度;以去离子水为洗脱剂,流速为0.2mL/min在280nm处检测吸光度,收集不同组分真空冷冻干燥,备用。

1.2.3 ACE抑制活性的测定^[20] 在试管中依次加入1000μL硼酸盐缓冲溶液(pH 8.3,0.2mol/L)、200μL酶解液以及10μL ACE,把以上混合液放入37℃恒温水浴中保温5min,再加入50μL 5mmol/L HHL(pH8.3,0.3mol/L NaCl)于37℃中恒温30min,加入100μL 1mol/L HCl终止反应,至室温,取5μL反应产物过0.45μm水相膜处理后进样,通过反相高效液相色谱洗脱图谱定量马尿酸的生成量,从而计算ACE抑制肽的抑制率,ACE抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中, A_1 为不存在ACE抑制肽时的峰面积; A_2 为存在ACE抑制肽时的峰面积。

色谱条件:高压液相色谱系统:SHIMADZU LC-20AD;检测器:SPD-M20A;色谱柱:SHIMADZU VP-ODS 4.6mm×150mm;洗脱液为乙腈:超纯水(24:76,v/v);洗脱液流速:0.4mL/min;检测波长:228nm,进样量:5μL。

半数抑制浓度(IC_{50}):指当抑制率为50%时,所需抑制剂的质量浓度(mg/mL)计算方法:检测多个质量浓度梯度下ACE抑制肽的抑制率,通过SPSS软件的概率系统(Probit)分析获得 IC_{50} 值。

1.2.4 猪血红蛋白ACE抑制肽的理化性质实验

1.2.4.1 猪血红蛋白ACE抑制肽(α -II)的溶解性实验^[21] 取0.5g经Sephadex LH-20分离得到的组分 α -II,加入30mL去离子水中,以1mol/L HCl和1mol/L NaOH调节pH2.0~10.0,室温下50r/min搅拌1h;9000r/min离心20min,取上清液测定其中的蛋白质含量^[22],公式如下:

$$\text{溶解性}(\%) = \frac{M_2}{M_1} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中, M_1 为样品的质量; M_2 为上清液中的肽含量。

1.2.4.2 猪血红蛋白ACE抑制肽(α -II)的模拟消化道环境稳定性实验^[23] 取0.1g经Sephadex LH-20分离得到的组分 α -II用去离子水配成1mg/mL的溶液(样品溶于0.1mol/L的KCl-HCl缓冲液,pH2.0)中,以1mol/L HCl调节pH到2.0,加入胃蛋白酶:ACE抑制肽(α -II)为1:100(w/w)的比例加入胃蛋白酶于37℃下水解4h。反应结束后将其置于100℃水浴10min灭酶;并以1mol/L NaOH调节pH至7.0,取50mL水解液在

5000r/min下离心15min,测定上清液的ACE抑制活性。在剩余的50mL水解液中再加入胰蛋白酶:胰凝乳蛋白酶:ACE抑制肽(α -II)为1:1:100(w/w/w)的比例加入胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶于37℃下水解4h。反应结束后将其置于100℃水浴10min灭酶。再取适量水解液于5000r/min离心15min,测定上清液的ACE抑制活性。

1.2.4.3 猪血红蛋白ACE抑制肽(α -II)的热稳定性实验^[24] 取0.1g经Sephadex LH-20分离得到的组分 α -II用去离子水配成1mg/mL的溶液,以1mol/L HCl和1mol/L NaOH调节pH7.0,分别置于温度为25、35、45、55、65、75、85、95℃下水浴2h,再测定其ACE抑制活性。

1.2.4.4 猪血红蛋白ACE抑制肽(α -II)的pH实验^[25] 取0.1g经Sephadex LH-20分离得到的组分 α -II用去离子水配成1mg/mL的溶液,调节HAc-NaAc缓冲溶液的pH为2、3、4、5、6、7、8、9、10,室温放置2h,再测定其ACE抑制活性。

1.2.4.5 猪血红蛋白ACE抑制肽(α -II)的盐稳定性实验^[26] 取0.1g经Sephadex LH-20分离得到的组分 α -II分别溶于0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2mol/L的NaCl溶液中,浓度为1mg/mL,室温放置2h,再测定其ACE抑制活性。

1.2.5 数据处理方法 实验数据均是经过3次平行实验得到的平均值,并计算其误差,SPSS18.0分析数据之间的相关性,Simaplot10软件作图。

2 结果与分析

2.1 猪血红蛋白ACE抑制肽的分离实验结果

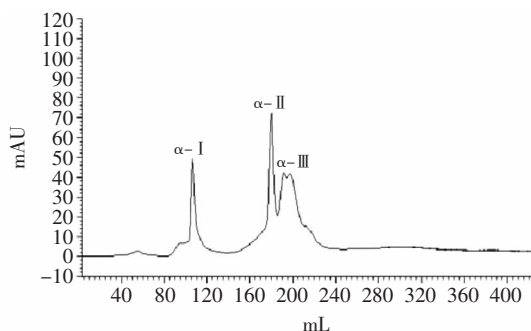


图1 Sephadex LH-20分离猪血红蛋白ACE抑制肽的HPLC图谱
Fig.1 HPLC chromatograms of ACE inhibitory peptides from porcine hemoglobin separated after Sephadex LH-20

表1 不同分离方法得到的分离组分的ACE活性抑制比较
Table 1 Comparison of inhibition of ACE activity of fractions prepared by different separation methods

组分	IC ₅₀ (mg/mL)
酶解原液	1.53±0.03
大孔树脂DA201-C分离组分	0.87±0.02
葡聚糖凝胶Sephadex LH-20分离组分 α -I	0.64±0.01
葡聚糖凝胶Sephadex LH-20分离组分 α -II	0.21±0.03
葡聚糖凝胶Sephadex LH-20分离组分 α -III	0.49±0.01

从表1和图1可知,与酶解原液相比,分离后的组

分IC₅₀差异极显著($p<0.01$)。经过大孔树脂DA201-C分离的组分ACE抑制活性明显提高,其IC₅₀为0.87,脱盐率为94.52%;再经过葡聚糖凝胶Sephadex LH-20的分离,洗脱出3个组分,各个组分的ACE抑制活性与经过大孔树脂DA201-C分离的组分相比也均有提高;其中组分 α -II的抑制活性最强,IC₅₀为0.21。根据凝胶过滤色谱的分离原理,分子量大的组分先出峰,分离量小的分子后出峰,由此可知,其分子量大小顺序为: α -I < α -II < α -III。

2.2 猪血红蛋白ACE抑制肽(α -II)的溶解性实验结果

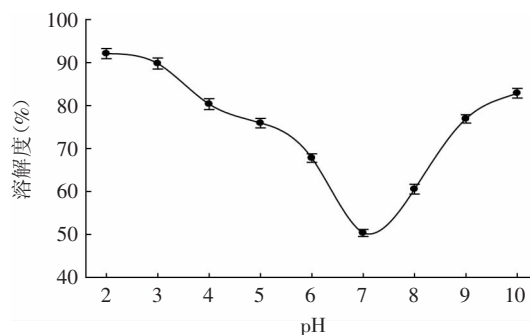


图2 猪血红蛋白ACE抑制肽(α -II)的溶解性
Fig.2 Solubility of ACE inhibitory peptides from porcine hemoglobin(α -II)

从图2可知,猪血红蛋白ACE抑制肽 α -II的溶解性在pH7附近最低,溶解度仅为50.37%。而升高或降低pH,其溶解度均有所提高。这可能是由于血红蛋白ACE抑制肽 α -II是由不同氨基酸组成的短肽,该短肽的等电点位于pH7附近。因此,在这个范围内,分子间没有作用力,容易聚集,导致溶解度降低;加入酸或碱以后,氨基酸与酸或碱结合,分子间电荷互相排斥,不易聚集,继而溶解度变大。

2.3 猪血红蛋白ACE抑制肽(α -II)的模拟消化道环境稳定性实验结果

表2 消化酶对猪血红蛋白ACE抑制肽(α -II)活性的影响

Table 2 Effect of digestive enzyme on the activity of ACE inhibitory peptide(α -II) from porcine hemoglobin

消化酶	胃蛋白酶	胰蛋白酶+胰凝乳蛋白酶	空白对照
IC ₅₀ (mg/mL)	0.20±0.02	0.29±0.01	0.21±0.01

从表2可知,猪血红蛋白ACE抑制肽(α -II)经消化酶水解后ACE活性变化不大。跟空白组比较,胃蛋白酶水解后组分的IC₅₀变化不明显,差异不显著($p>0.05$),这说明胃蛋白酶对猪血红蛋白ACE抑制肽(α -II)的活性影响非常小;经胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶水解后的组分的IC₅₀增加了4%,这可能是因为胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶水解了少部分多肽,打断了某些具有活性的肽段,从而降低了猪血红蛋白ACE抑制肽(α -II)的活性。

2.4 猪血红蛋白ACE抑制肽(α -II)的热稳定性实验结果

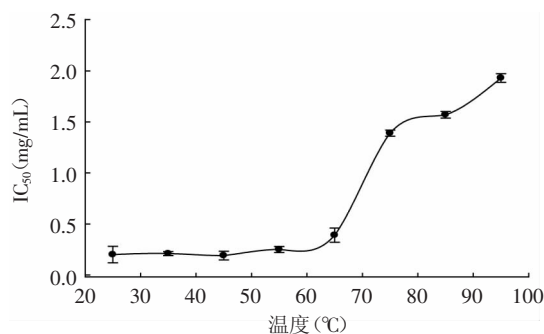


图3 温度对猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)活性的影响

Fig.3 Effect of temperature on the activity of ACE inhibitory peptide (α-Ⅱ) from porcine hemoglobin

由图3可知,猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)在不同温度下水浴2h后,其ACE抑制活性差异显著($p < 0.05$)有一定的变化。随着温度的升高,猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)的 IC_{50} 也逐渐增大。当温度在25~55℃时,猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)的活性无显著变化(IC_{50} : 0.20~0.25);继续升高温度,猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)的 IC_{50} 也迅速增大,当温度达到95℃时,其 IC_{50} 增大到1.93mg/mL。由此可知,高温对猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)的活性影响较大。

2.5 猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)的pH实验结果

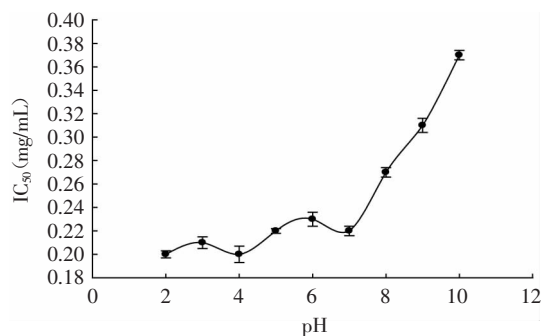


图4 pH对猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)的ACE抑制活性的影响

Fig.4 Effect of pH value on the activity of ACE inhibitory peptide (α-Ⅱ) from porcine hemoglobin

从图4可知,当pH在2~7之间时,猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)的活性变化幅度很小,猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)的 IC_{50} 维持在0.21mg/mL附近。当pH大于7时,其 IC_{50} 值迅速增大;当pH为10时,其 IC_{50} 增大为0.37mg/mL。由此可知,猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)在中性和偏酸性的条件下比较稳定。

2.6 猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)的盐稳定性实验结果

在胃蛋白酶水解猪血红蛋白的过程中,需要不断地加入HCl和NaOH维持体系的pH恒定不变。酶解液在经过DA201-C大孔树脂脱盐后,其ACE抑制活性有了明显提高。从图5可知,当NaCl浓度为0.2~0.6mol/L时,猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)的 IC_{50} 均在0.20~0.21mg/mL的范围内小幅波动;当NaCl浓度超过0.6mol/L时,其 IC_{50} 迅速增大;当NaCl浓度为1.2mol/L

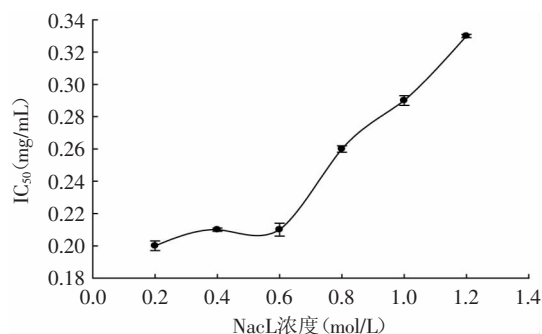


图5 NaCl浓度对猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)的ACE抑制活性的影响

Fig.5 Effect of NaCl concentration on the activity of ACE inhibitory peptide (α-Ⅱ) from porcine hemoglobin

时, IC_{50} 为0.33mg/mL。由此可知,在浓度低于0.6mol/L的NaCl溶液中猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)的活性变化小,但当其浓度较高于0.6mol/L时,就会显著降低猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)的活性。由此可以进一步证明使用DA201-C大孔树脂对其脱盐作用是很明显的。

3 结论

3.1 猪血红蛋白的胃蛋白酶水解液经大孔树脂DA201-C和葡聚糖凝胶Sephadex LH-20的初步分离后,其ACE抑制活性具有明显提高,与酶解原液相比,其 IC_{50} 最大下降了86%。

3.2 猪血红蛋白ACE抑制肽(α-Ⅱ)在pH7时溶解度最小,为50.37%;经消化酶水解后ACE抑制活性变化不大;在温度为25~55℃时,ACE抑制活性波动不明显;在中性和偏酸性的条件下比较稳定,在NaCl浓度小于0.6mol/L时,ACE抑制活性较稳定。

参考文献

- [1] MURRAY B A, FITZGERALD R J. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production[J]. Current Pharmaceutical Design, 2007, 13(8): 773-791.
- [2] CHEUNG I W, NAKAYAMA S, MONICA N K, 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(19): 9234-9242.
- [3] FERREIRA S H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*[J]. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy, 1965, 24(1): 163-169.
- [4] JIMSHEENA V K, GOWDA R L. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from arachin by simulated gastric digestion[J]. Food Chemistry, 2011, 125(2): 561-569.
- [5] PIHLANTOLEPPALA A, ROKKA T, KORHONEN H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins[J]. International Dairy Journal, 1998, 8(4): 325-331.

(下转第303页)

Instytutow i Laboratoriow Badawczych Przemysłu Spożywczego, 2009, 64: 66–76.

[10] 牛丽影, 胡小松, 赵镭, 等. 橙汁主要矿质元素含量的特征分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29: 259–262.

[11] Chang S, Kang D H. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2004, 30: 55–74.

[12] Yamazaki K, Kawai Y, Inoue N, et al. Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores[J]. Letters in Applied Microbiology, 1997, 25: 153–156.

[13] Silva F M, Gibbs P, Viera C, et al. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature,

soluble solids and pH conditions for design of fruit processes[J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 51: 95–103.

[14] Edyta Chmal-Fudali, Agnieszka Papiewska. The possibility of thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit and vegetable juices[J]. Biotechnology and Food Science, 2011, 75: 87–96.

[15] Hippchen A, Röhl K, Poralla K. Occurrence in soil of thermo-acidophilic bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and hopanoids[J]. Archives of Microbiology, 1981, 129: 53–55.

[16] Jay J M, Loessner M J, Golden D A. Food protection with high temperatures, and characteristics of thermophilic microorganisms [J]. Modern Food Microbiology, Food Science Text Series, 2005, 5: 415–441.

(上接第284页)

[6] FUJITA H, YOSHIKAWA M. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein [J]. Immunopharmacology, 1999, 44(1/2): 123–127.

[7] Pan Dao-dong, Luo Yong-kang, TANOKURA M. Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004 [J]. Food Chemistry, 2005, 91(1): 123–129.

[8] Zhao Yuan-hui, Li Ba-fang, Liu Zun-ying, et al. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(12): 1586–1591.

[9] Wang Jia-pei, Hu Jia-nen, Cui Jin-zhe, et al. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the anti hypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats[J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 302–308.

[10] BYUN H G, KIM S K. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin [J]. Process Biochemistry, 2011, 36(12): 1155–1162.

[11] Han Hua, Yi Yang-hua, Li Ling, et al. A new triterpene glycoside from sea cucumber *Holothuria leucospilota* [J]. Chinese Chemical Letters, 2007, 18(2): 161–164.

[12] KIM M R, KAWAMURA Y, LEE C H. Isolation and identification of bitter peptides of tryptic hydrolysate of soybean 11S glycinin by reverse-phase high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Food Science, 2003, 68(8): 2416–2422.

[13] Wu Jiang-ping, Ding Xiao-lin. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides [J]. Food Research International, 2002, 35(4): 367–375.

[14] TAKUO N, LECH O. Purification of glycomacropeptide from nondialyzable fraction of sweet whey by hydrophobic interaction chromatography on phenyl-agarose [J]. Biotechnology Letters, 2000, 22(5): 413–416.

[15] ALEMAN A, GIMENEZ B, PEREZ-SANTIN E, et al. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-

inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate [J]. Food Chemistry, 2011, 125(2): 334–341.

[16] Zhao Qiu-yu, SANNIER F, PIOT J M. Kinetics of appearance of four hemorphins from bovine hemoglobin peptic hydrolysates by HPLC coupled with photodiode array detection [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology, 1996, 1295(1): 73–80.

[17] Wan J B, Zhang Q W, Ye W C, et al. Quantification and separation of protopanaxatriol and protopanaxadiol type saponins from *Panax notoginseng* with macroporous resins [J]. Separation and Purification Technology, 2008, 60(2): 198–205.

[18] 刘佳. 大豆蛋白ACE抑制肽的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.

[19] RIIHINEN K R, GODECKE T, PAULI G F, et al. Purification of berry flavonol glycosides by long-bed gel permeation chromatography [J]. Journal of chromatography A, 2012, 1244(29): 20–27.

[20] Wu J, ALUKO R, MUIR A. Improved Method for Direct High-performance Liquid Chromatography Assay of Angiotensin-converting Enzyme-catalyzed Reaction [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 950: 125–131.

[21] 盛彩虹, 刘晔, 刘大川, 等. 紫苏分离蛋白功能性研究 [J]. 食品科学, 2011, 32(17): 137–139.

[22] 陈季旺, 孙勤, 夏文水. 鱼降压肽的大孔树脂分离及其活性稳定性 [J]. 食品科学, 2009, 30(18): 25–28.

[23] LIESELOT V, GUY S, TOSHIRO M, et al. C (ACE) inhibitory peptide from the gastrointestinal hydrolysate of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* [J]. Process Biochemistry, 2008, 43(8): 900–904.

[24] 廖丹葵. 鸡蛋蛋黄蛋白质制备降血压肽的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2006.

[25] 杨锋, 马千里, 黄永春. 醋蛋中ACE抑制肽的分离及稳定性研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(24): 78–79.

[26] Jiang Jiang, Chen Jie, Xiong You-ling. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(16): 7576–7583.

[27] 潘道东, 林璐. DA201-C大孔吸附树脂静态吸附ACE抑制肽的研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(5): 20–23.