

一种筛选血管紧张素转换酶抑制肽的方法

金 清¹, 吴建平², 张贵川³, 邓亚飞⁴, 袁吕江^{1,*}

(1. 西南大学 发光与实时分析教育部重点实验室, 重庆 400715;

2. Department of Human Ecology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba R3T 2N2, Canada;

3. 西南大学食品科学学院, 重庆 400716; 4. 西南大学药学院, 重庆 400716)

摘 要: 实验建立一种从蛋白水解物中快速高效鉴别血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)的方法: 先对蛋白按照酶解位点进行序列搜寻, 建立一个样品肽库; 在量效结构关系(QSAR)研究的基础上对样品库中的肽的 ACE 抑制活性进行预测, 然后化学合成目标肽及测定活性; 必要时用现代分析技术确证蛋白水解物中目标肽的存在。用此方法对油菜、大米、小麦蛋白水解物中三肽 ACE 抑制活性进行研究, 发现 IC₅₀ 在 10 μmol/L 以下的三肽多达 34 条, 选择了 11 条活性较高的肽合成验证, 最后发现潜藏在油菜 Cruciferin BNC1 (P33523) 蛋白序列 347~349 的 LRL 活性最高, IC₅₀ 达到 3.42 μmol/L, 且具有较好的稳定性。抑制动力学研究表明, LRL 属于竞争性抑制剂; 油菜蛋白胃蛋白酶水解物进行分子质量分段, 取分子质量小于 1000D 部分进行高效液相色谱(HPLC)分析发现有 LRL。

关键词: 血管紧张素转换酶抑制剂; QSAR; 活性预测; 油菜籽蛋白; 大米蛋白; 小麦蛋白

A Method for Screening Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides

JIN Qing¹, WU Jian-ping², ZHANG Gui-chuan³, DENG Ya-fei⁴, YUAN Lü-jiang^{1,*}

(1. Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis, Ministry of Education, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Department of Human Ecology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba R3T 2N2, Canada;

3. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China;

4. College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: A rapid and highly efficient method for identifying angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from protein hydrolysates was established based on quantitative structure activity relationship (QSAR) and protein sequence. First, a small peptide library was constructed by protein sequence searching according to the hydrolysis sites of a specific enzyme. Then, the activities of peptides in the library were predicted using QSAR model. Target peptides were synthesized and their IC₅₀ values were measured. Finally, a real protein hydrolysate was prepared and HPLC was employed to analyze the target peptides in the hydrolysates. Totally 34 tripeptides with an IC₅₀ of less than 10 μmol/L were predicted from rapeseed protein, wheat protein and rice protein and 11 of them with higher activity were synthesized. LRL with the lowest IC₅₀ of 3.42 μmol/L located in rapeseed cruciferin BNC1 (P33523) sequence 347—349 was characterized from the synthesized peptides.

Key words: ACE inhibitor; quantitative structure activity relationship(QSAR); activity prediction; rapeseed protein; wheat protein; rice protein

中图分类号: TS22

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)19-0120-05

血管紧张素转化酶(angiotensin converting-I enzyme, ACE)是一种膜固定的金属蛋白酶,能够催化水解血管紧张素 I 转化成高血压因子-血管紧张素 II,因此,抑制 ACE 活性成为目前调控血压的重要手段^[1]。1977 年, Ondetti 等^[2]根据竞争性抑制机理和已获得的 ACE 抑制肽的结构特点,建立了 ACE 活性部位的假设模型,并依此设计出第一个口服有效的降血压药物卡托普利

(Captopril)。大多数 ACE 抑制剂(ACEI)是化学合成的产物,临床上都或多或少的表现有一定的副作用^[3],如卡托普利作为降压的一线药物在临床上应用,但其仍有着很强的皮肤系统的不良反应^[4],据此人们认为存在于天然食物蛋白中的 ACEI 尽管活性稍低,但可能有更高的安全性。

早在 1979 年, Oshima 等^[5]就从明胶的酶解液中发

收稿日期: 2010-12-08

基金项目: 重庆自然科学基金项目(2007BB0345)

作者简介: 金清(1988—),女,硕士研究生,主要从事生物资源活性成分的分离研究。E-mail: jinqing7777@126.com

* 通信作者: 袁吕江(1963—),男,教授,博士,主要从事天然产物化学研究。E-mail: yuanlujiang@hotmail.com

现了ACE抑制肽,接着在奶类、豆类、鱼、发酵食品中相继发现有ACE抑制活性较高的肽而倍受关注^[6],随后,大量的ACE抑制肽从不同食物蛋白质水解物中被分离鉴定出,并且以往的研究如玉米,主要集中在植物的二肽上^[7],而作为我国主要油料作物之一的油菜、主要粮食作物如大米和小麦等在三肽方面的研究却少有报道。在过去的30年中,人们在研究天然蛋白中的ACEI时尝试了各种不同的方法如选择原料、酶制剂和使用先进的分离纯化技术,但鉴别蛋白水解物中ACEI所采取的实验路线基本上遵循蛋白质提取→酶解→反复分离纯化→活性测定这一路线,没有实质性的变化。尽管一些先进的分离技术及快速准确的酶活性检测技术:LC-MS在线筛选在其中得到运用^[8];采取体外模仿部分胃肠道消化酶解的方法^[9],用定向酶解的方法获得ACE抑制肽^[10];都存在着不仅消耗大量人力物力且效率低下,往往造成活性丢失的弊端,为此,我们发展了一种从蛋白水解物中高效快速鉴别ACEI的方法:先对食物蛋白进行虚拟水解-即按照酶解位点对蛋白进行序列搜寻建立一个样品肽库,然后在QSAR研究的基础上对库中肽的ACE抑制活性进行预测,目标肽的合成及抑制活性测定,必要时用现代分析技术在蛋白水解物中找到目标肽。QSAR研究的部分结果已经发表^[11],本实验用此方法对目前研究相对较少的油菜、大米、小麦蛋白水解物中三肽ACE抑制活性进行了快速鉴别。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

油菜种子蛋白:Cruciferin BNC1(P33523)、Cruciferin BNC2(P33524)、Cruciferin CRU1(P33525)、Cruciferin CRU4(P33522)、Cruciferin(P11090)、Cruciferin subunit(Q9AXL9)、*B. napus* Cruciferin(Q39324)、Napin 2(P01090)、Napin(Q42469)、*Brassica napus* napB napin(Q39344)、Napin BNIII(P80208)、Napin-1A(P24565)、Napin embryo-specific(P09893)、Napin-B(P27740)、Napin(P17333);大米蛋白:(Globulin 2(O65043)、Glutelin type-A 1(P07728)、Glutelin type-B 2(Q02897)、Glutelin type-B1(P14323)、Glutelin type-B4(P14614)、Globulin 1(O65042)、19 kD Globulin(P29835)、Prolamin PPROL 14E(Q0DJ45)、Prolamin PPROL 17D(P20698)、Glutelin(Q40689)、Glutelin type-A 3(Q09151)、Glutelin(Q9ZWJ8)、Seed allergenic protein RAG2(Q01882);小麦蛋白:alpha/beta-Gliadin(P02863)、alpha/beta-Gliadin storage protein(Q41546)、alpha-Gliadin storage protein(Q41530)、alpha-Gliadin(Q41509)、gamma-Gliadin(P21292)、alpha/beta-Gliadin A-V(P04725)、alpha/beta-Gliadin A-IV(P04724)、alpha/beta-Gliadin A-III(P04723)、

alpha/beta-Gliadin A-II(P04722)、alpha/beta-Gliadin A-I(P04721)、omega Gliadin storage protein(Q9FUW7)、omega Gliadin(Q6PNA3)、gamma Gliadin(Q6EEW8)、Glutenin high molecular weight subunit DY10(P10387)、Glutenin high molecular weight subunit Ax2*(Q41553)、Glutenin high molecular weight(Q41516)、Glutenin high molecular weight subunit 1Ax1(Q03872)、Glutenin low molecular weight storage protein(P93793)、Glutenin low molecular weight storage protein(P93790)、Glutenin low molecular weight subunit PTUDUCD1(P16315)、Glutenin low molecular weight subunit 1D1(P10386)、Glutenin low molecular weight subunit(P10385)、Glutenin high molecular weight subunit DX5(P10388)、Glutenin high molecular weight subunit PW212(P08489)、Glutenin high molecular weight subunit 12(P08488)。

胃蛋白酶、胰蛋白酶、肠黏膜肽酶 美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 三肽 QSAR 模型建立

从发表的文献[11]中收集整理出ACE抑制活性的三肽140条作为样本。为确保样品的代表性,收集的肽全部来源于食品蛋白,且活性(IC₅₀)都小于2mmol/L。运用经典的z-scales描述子^[12]来描述三肽的结构性质(方法见表1)。以生物活性lgIC₅₀为Y-矩阵和表达化学结构的多元数据组为X-矩阵,用软件SIMCA-P version 10(Umetrics Inc., Kinnelon, NJ)中偏最小二乘回归分析建立回归方程。对模型用“留一法(leave-one-out)”^[13]分别作交叉检验(cross validation, CV),即每次从140个样本中抽出一个肽,用其余的139个肽建模并对抽出的肽进行活性预测,得到140个肽的活性预测值,计算交叉验证相关系数R²_{cv}。

$$R^2_{cv}=1-\frac{\sum (y_{\text{exp}}-y_{\text{pre}})^2}{\sum (y_{\text{exp}}-y_{\text{ave}})^2}$$

式中: y_{exp} 表示实际测得的活性值; y_{pre} 表示交叉验证的活性预测值; y_{ave} 表示所有肽的平均活性值。以IKP(Ile-Lys-Pro)抑制三肽序列为例,将IKP氨基酸转化为多元数据的步骤^[14]。

表1 三肽IKP的Z-scales的描述
Table 1 Description of tripeptide Z-scales

氨基酸代码	I	K	P
氨基酸	Ile	Lys	Pro
序列位置	1	2	3
序列对应的氨基酸描述子	Z ₁₁ 、Z ₁₂ 、Z ₁₃	Z ₂₁ 、Z ₂₂ 、Z ₂₃	Z ₃₁ 、Z ₃₂ 、Z ₃₃
描述子对应得到的数值	-4.44、-1.68、-1.03	2.84、1.41、3.14	-1.22、0.88、2.33

1.2.2 蛋白的水解及样品三肽活性预测

蛋白的水解利用网络资源在网上完成(http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/peptidecutter_instructions.html#peptides)。水解完成后,收集整理所有三肽。由于肽的数量巨大,舍去不含疏水氨基酸的肽来缩小肽的数量。用 QSAR 模型计算三肽的 ACE 抑制活性。

1.2.3 肽的合成及 ACE 抑制活性测定

肽的合成委托西安华辰生物技术有限公司完成,合成的肽经液相色谱-质谱联用(LC-MS)确证。ACE 抑制活性的测定是用高效液相色谱法^[15]。

1.2.4 水解物中高活性肽的 HPLC 鉴别

按照蛋白序列搜寻时的条件水解油菜蛋白,水解物用截留分子质量为 5000D 和 1000D 的超滤膜分为 3 个组分,测定各组分 ACE 抑制活性。因为三肽的分子质量都比 1000D 小,以合成的三肽为参考物质,将此段水解物用 HPLC 检测。检测条件:柱子 C₁₈ 柱,以乙腈、水、三氟乙酸(体积比 45:55:0.1)为流动相,检测波长为 228nm。比较样品和参考三肽的色谱图,以此来判断目标肽在样品中是否存在。

1.2.5 体外目标肽抗消化实验^[16]

取 1.5mL 的离心管 5 支,分别取 100 μ L 1mg/mL 的目标肽溶液(合成的)于离心管中,编号 A、B、C、D、E 管, A 管中加入适量的胃蛋白酶处理; B 管中加入适量的胰蛋白酶处理; C 管中加入适量的肠黏膜肽酶处理; D 管依次用 3 种酶进行处理; E 管不加任何酶,加缓冲液。消化后取出,置于沸水浴中 15min,使酶失活。在 10000r/min 微量高速离心机上离心 10min 后,取上清液参照 ACE 抑制活性方法测定经过酶反应之后的肽的 ACE 抑制效应,并计算其抑制率。

2 结果与分析

2.1 QSAR 模型及预测能力

以三肽 N 端第一位氨基酸残基的亲水性指数 $Z_{11}(x_1)$ 、立体性状大小指数 $Z_{12}(x_2)$ 和电性参数 $Z_{13}(x_3)$, 第二位氨基酸残基的亲水性指数 $Z_{21}(x_4)$ 、立体性状大小指数 $Z_{22}(x_5)$ 和电性参数 $Z_{23}(x_6)$, 第三位氨基酸残基的亲水性指数 $Z_{31}(x_7)$ 、立体性状大小指数 $Z_{32}(x_8)$ 和电性参数 $Z_{33}(x_9)$ 为自变量,三肽的 ACE 抑制活性 $\lg(\text{IC}_{50})$ 为因变量,用软件 SIMCA-P version 10 (Umetrics Inc., Kinnelon, NJ) 建立的回归方程为:

$$y = 1.727584 + 0.060348x_1 + 0.055900x_2 + 0.106603x_3 - 0.041317x_4 - 0.060064x_5 + 0.151157x_6 + 0.070841x_7 - 0.145287x_8 - 0.071214x_9 \quad (2)$$

回归方程(2)可知,ACE 抑制肽(三肽)N 端起第三位氨基酸残基的立体性状大小指数 $Z_{32}(x_8)$ 、电性参数 $Z_{33}(x_9)$, 第二位氨基酸的亲水性指数 $Z_{21}(x_4)$ 和立体性状指数与 $\lg(\text{IC}_{50})$ 的值呈负相关;而第三位氨基酸的亲水性指数 $Z_{31}(x_7)$ 、第二位氨基酸的电性参数 $Z_{23}(x_6)$ 、第一位氨基酸的 3 个参数与 $\lg(\text{IC}_{50})$ 的值成正相关。对于较高活性的肽即 $\lg(\text{IC}_{50})$ 值小的肽, N 端第三位氨基酸需具备低亲水性指数值、较高的立体性状和电性参数值,满足这些条件的氨基酸有 Pro、Phe、Tyr、Trp; N 端第二位氨基酸需具备较高的亲水指数值和立体性状指数值、较低的电性参数值,满足这些参数的氨基酸有 Lys、Arg、Glu、Glu; N 端第一位氨基酸要求 Z-scales 的三个参数值都小,满足这个条件的氨基酸有 Val、Leu、Ile、Met、Thr、Ala。

“留一法”交互检验得到 R^2_{cv} 为 0.5471637。通常 $R^2_{cv} > 0.5$ 表明相应变量建立的模型具有较好的预测能力,说明模型(1)具有较强的预测能力。将模型(1)所得的三肽 ACE 抑制活性的预测值与相应的观测值作图线性关系良好, $r=0.7397$ (图 1)。

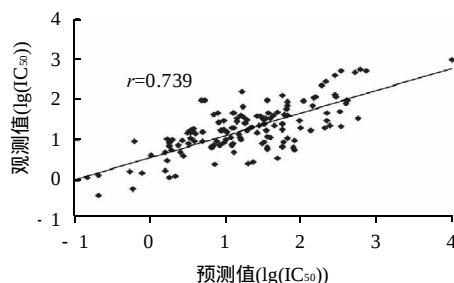


图 1 140 个 ACE 抑制肽 $\lg(\text{IC}_{50})$ 观测值与预测值的相关性
Fig.1 Correlation between observed and predicted IC_{50} values of ACE inhibitory peptides

2.2 不同来源三肽 ACE 抑制活性的预测值及实际测定值

用 QSAR 模型计算了来源于油菜蛋白的三肽 104 条、来源于大米蛋白的三肽 132 条、小麦蛋白的三肽 96 条的 ACE 抑制活性,其中 IC_{50} 在 10 μ mol/L 以下的三肽多达 34 条,除去文献已有报道的三肽和预测活性大于 6 μ mol/L 的肽,取 11 条化学合成并测定 ACE 抑制活性。这 11 条肽的活性预测值与实际测定值见表 2。

由表 2 可知, VRY 的预测值和测定值误差最大(1.026),即浓度相差为 10 倍多; LRL 的预测值和测定值误差最小(0.088),即浓度很接近。误差值接近 1 的有 5 个,误差在 0.3~0.6 的有 4 个,即多数肽的预测浓度值和测定浓度值的差达到 10 倍,说明预测的准确性还有待改进。

表 2 部分三肽 ACE 抑制活性的预测值、测定值及在蛋白序列中的位置

Table 2 Comparison of predicted and measured ACE inhibitory activities of tripeptides and their protein sequence locations

肽	源蛋白 / 位点	水解酶	预测值(lg(IC ₅₀))	测定值(lg(IC ₅₀))	误差
LRL	Cruciferin BNC1/347(油菜)	Pepsin (pH1.3)	0.446	0.534	0.088
VRY	Cruciferin BNC1/71(油菜)	Pepsin (pH1.3)	0.061	1.086	1.026
AQW	Cruciferin BNC1/187(油菜)	Thermolysin(pH8)	0.423	1.322	0.899
FRW	Cruciferin BNC1/421(油菜)	Thermolysin(pH8)	- 0.167	0.699	0.866
FEW	Cruciferin CRU1/420(油菜)	Thermolysin(pH8)	0.462	1.041	0.579
IRL	Cruciferin CRU1/346(油菜)	Pepsin (pH1.3)	0.387	1.307	0.920
IIF	19 kD Globulin/5(大米)	Pepsin (pH1.3)	0.815	1.322	0.507
SRF	Glutelin type-B 2/9(大米)	Pepsin (pH1.3)	0.456	0.845	0.389
VVF	19 kD Globulin/77(大米)	Pepsin (pH1.3)	0.785	1.157	0.373
IAP	alpha/beta-Gliadin/279(小麦)	Thermolysin(pH8)	0.997	1.505	0.848
ERP	Glutenin/32(小麦)	Pepsin (pH1.3)	0.764	0.954	0.93

在活性预测中还发现, 来源于油菜的 IC₅₀ 小于 10 μmol/L 的三肽比较多, 而大米和小麦中比较少, 然而对油菜籽蛋白的研究确实较少。因此在合成肽的时候, 来源于油菜的选了 6 条, 来源于大米和小麦的分别选了 3 条和 2 条, 结果来源于油菜的 LRL 活性最高。

QSAR 模型的预测能力取决于建模数据样本的准确性和可靠性。所选用的 ACE 抑制肽活性数据来自文献, 不同作者和不同实验室所测定的结果有一定差异, 这可能是造成多数肽的预测值和测定值误差大的主要原因。尽管如此, 用此方法还是找到了一个新的活性比较高的三肽 LRL, 其 IC₅₀ 为 3.42 μmol/L, 说明该方法比传统方法更高效。

由于本方法是基于 QSAR 的研究结果对肽的活性进行预测, 4 肽及以上的肽样本少, 建立 QSAR 模型的可信度差, 因此本文没有报道。此外, 活性肽是潜藏在蛋白序列中的, 如果蛋白的序列没有完成就不能使用本方法。

2.3 油菜蛋白水解液中 LRL 的鉴别

以上研究表明 LRL 潜藏在油菜 Cruciferin BNC1 (P33523) 蛋白的序列 347 ~ 349 中, 这是理论研究的结果, 实际水解液中有无 LRL 需实验来证明。为此, 将油菜蛋白用胃蛋白酶水解, 水解液用截留分子质量为 1000D 和 5000D 的超滤膜超滤得不同分子质量范围的组分 3 个, ACE 抑制活性表明分子质量小于 1000D 的活性最高(表 3), 故将此段水解物用反相 HPLC 分析, 与合成的 LRL 对比, 结果在样品图谱中有与 LRL 出峰时间相同的峰(图 2), 初步可以确定样品中有 LRL 的存在。且 LRL 属于竞争性抑制剂(图 3)。

表 3 油菜蛋白水解物不同分子质量段的 ACE 抑制率

Table 3 ACE inhibitory rates of rapeseed protein hydrolysates with different molecular masses

分子质量段	> 5000D	1000 ~ 5000D	< 1000D
抑制率/%	21.6	68.8	96.5

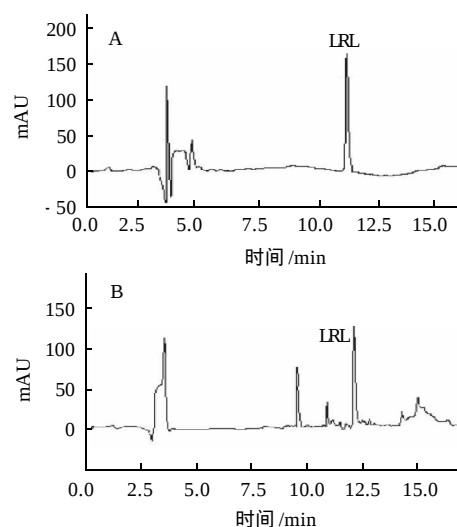


图 2 合成 LRL (A) 与分子质量小于 1000D 油菜蛋白水解物(B) HPLC 图谱

Fig.2 HPLC profiles of synthesized LRL and rapeseed hydrolysates with molecular mass of less than 1000 D

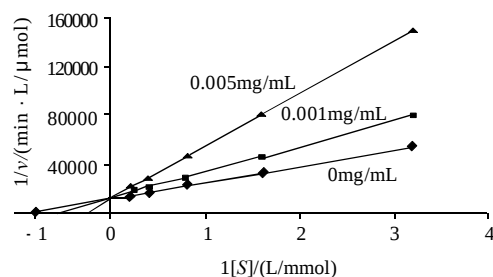


图 3 LRL 三肽 ACE 抑制的 Lineweaver-Burk 模型

Fig.3 Lineweaver-Burk model of ACE inhibition of LRL tripeptide

2.4 体外高活性肽抗消化实验结果

ACE 抑制肽口服后要在人体内发挥作用, 前提是 ACE 抑制肽能够抵抗消化酶水解, 也即是经过消化系统中各种酶的消化后, 其活性不发生变化的肽才有可能在体内发挥作用。前面结果表明, 11 种合成肽中, LRL

活性最高。因此,对 LRL 做了体外消化酶水解实验,结果见图 4。

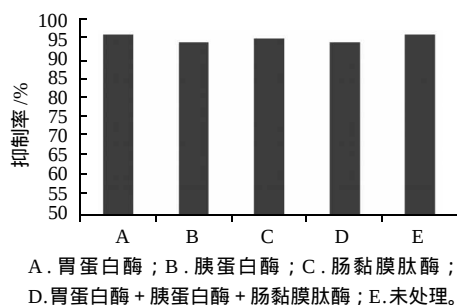


图 4 LRL 三肽 ACE 抑制活性稳定性分析

Fig.4 Stability analysis of LRL tripeptide in terms of ACE inhibitory activity

由图 4 可知, LRL 经过胃肠道消化酶处理后仍然保持活性,表明此合成的三肽 LRL 如果运用于动物实验,是能够保证其抑制活性的。

3 结 论

以三肽为例,建立一种从蛋白水解液中快速鉴别 ACE 抑制肽的方法。用此方法对大米、油菜籽、小麦蛋白水解物中 ACEI 三肽进行了鉴别,从油菜 Cruciferin BNC1 (P33523)蛋白的序列347~349中找到了活性比较高的 LRL,其 IC_{50} 为 $3.42 \mu\text{mol/L}$,且有较好的稳定性。与传统方法相比,此方法高效快速准确。由于此方法主要是基于 QSAR 研究结果及蛋白序列搜寻,故可以运用于其他天然活性肽的研究。

参 考 文 献 :

- [1] ZAMAN M A, OPARIL S, CALHOUN D A. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system[J]. Nature Rev Drug Discov, 2002, 1 (8): 621-636.
- [2] ONDETTI M A, RUBIN B, CUSHMAN D W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents[J]. Science, 1977, 196: 441-444.
- [3] STIRLING C, HOUSTON J, ROBERTSON S, et al. Diarrhoea, vomiting and ACE inhibitors: an important cause of acute renal failure[J]. J of Human Hypertension, 2003, 17(3): 419-423.
- [4] 李仁宏, 刘伟, 张青青. 卡托普利皮肤系统的不良反应[J]. 中国误诊学杂志, 2007, 13(7): 3173-3174.
- [5] OSHIMA G, SHIMABUKURO H, NAGASAWA K. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology, 1979, 566(1): 128-137.
- [6] LI G H, LE GW, SHI Y H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects[J]. Nutr Res, 2004, 24(7): 469-486.
- [7] 刘焕. 大米 ACE 抑制肽的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [8] PLATERINK C J V, JANSSEN H G M, HAVERKAMP J. Development of an at-line method for the identification of angiotensin-I inhibiting peptides in protein hydrolysates[J]. Journal of Chromatography B, 2007, 846(9): 147-154.
- [9] 刘志伟, 刘秀梅, 郑梦云, 等. 大豆蛋白体外酶解物种血管紧张素转化酶抑制剂活性肽研究[J]. 营养学报, 2007, 29(1): 69-73.
- [10] 常玮. 定向酶解大豆蛋白及其 ACE 抑制肽研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [11] WU Jianping, ALUKO R E, NAKAI S. Structural requirements of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure-activity relationship study of di- and tripeptides[J]. Journal of Agriculture Food Chemistry, 2006, 54(3): 732-738.
- [12] SANDBERG M, ERIKSSON L, JONSSON J, et al. New chemical descriptors relevant for the design of biologically active peptides. a multivariate characterization of 87 amino acids[J]. J Med Chem, 1998, 41(14): 2481-2491.
- [13] HELLBERG S, SJOSTROM M, SKAGERBERG B, et al. Peptide quantitative structure-activity relationship, a multivariate approach[J]. J Med Chem, 1987, 30(7): 1126-1135.
- [14] ARE H P, TOMAS L, LESZEK S, et al. Quantitative structure activity relationship modeling of peptides and proteins as a tool in food science [J]. Trends in Food Science and Technology, 2005, 16(11): 484-494.
- [15] WU Jianping, ALUKO R E, MUIR A D. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 950(1): 125-130.
- [16] VERCROYSE L, CAMP V J, MOREL N, et al. Ala-Val-Phe and Val-Phe: ACE inhibitory peptides derived from insect protein with antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats[J]. Peptides, 2010, 31(3): 482-488.