

文章编号: 1000-0615(2007)04-0512-06

鱼降压肽的酶法制备工艺及其理化性质

陈季旺¹, 夏文水^{1,2}, 黄爱妮¹, 汪芳安¹

(1. 武汉工业学院食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023;

2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:采用高效液相色谱测定降压肽的血管紧张素转化酶抑制活性,对碱性蛋白酶水解草鱼蛋白制备鱼降压肽进行研究。结果表明,碱性蛋白酶水解草鱼蛋白制备鱼降压肽的较佳工艺条件为:pH 9.0、温度 50 ℃、酶与底物比 48 AU·kg⁻¹、水解度 34.52%。鱼降压肽成分分析结果显示,鱼降压肽中可溶性氮含量为 81.26%,肽含量为 72.81%,脂肪含量为 0.12%,水分含量为 3.54%,灰分含量为 9.47%。体积排阻色谱测定鱼降压肽的相对分子质量在 124~10581 之间,主要集中在 124~1062 之间;溶解度高效液相测定结果表明,在 pH 3.0~11.0 时鱼降压肽溶解度为 96.0%左右,可广泛应用于食品中。

关键词:草鱼; 降压肽; 碱性蛋白酶; 高效液相色谱; 相对分子质量; 体积排阻高效液相色谱

中图分类号: Q 814; S986.2 **文献标识码:** A

Preparation and the physical and chemical characterization of antihypertensive peptides from fish protein by enzymatic hydrolysis

CHEN Ji-wang¹, XIA Wen-shui^{1,2}, HUANG Ai-ni¹, WANG Fang-an¹

(1. School of Food Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. School of Food Science, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: China is the rich country of fishery of fresh water, and the yearly output of fresh water fish is 19.188 million tons, approximately accounting for 40% of the total fish output. The main kinds of fish are the silver carp, variegated carp and grass carp. The processing proportion reaches above 75% in developed country, and there are only 30% in our country at present. The fresh water fish are sold primarily fresh with the low price, which has seriously affected the sustainable development of fresh water fishery. Not only have antihypertensive peptides from protein of fresh water fish the advantage of protein, but also they have the character of acid and heat stability as well as the better solubility and unique antihypertensive function. It is easier to digest and absorb than the protein and its amino acid. So it will be the future for deeply processing fresh water fish so that fish protein can be utilized to prepare for antihypertensive peptides by biological technology. In the paper grass carp protein was hydrolyzed by alcalase and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities were assayed by high performance liquid chromatography for preparing fish antihypertensive peptides. The results indicated that

收稿日期: 2006-10-13

资助项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA501A-25)

作者简介: 陈季旺(1971-),男,湖北崇阳人,副教授,博士,主要从事食品生物技术研究。Tel: 13971309046, E-mail: jiwangchen@yahoo.com.cn

appropriate hydrolysis conditions for alcalase were pH 9.0, 50 °C, ratio of alcalase to grass carp protein with 48 AU·kg⁻¹, DH 34.52%. The results of analyzing components showed that fish antihypertensive peptides made under the same hydrolysis conditions contained 81.26% of soluble N, 72.81% of peptides, 0.12% of fat, 3.54% of water and 9.47% of ash. Its relative molecular weight assayed by size exclusion high performance liquid chromatography distributed from 124 to 10581, and mainly from 124 to 1062. Solubility of antihypertensive peptides from grass carp protein was analyzed during pH 3 and pH 11, and the result showed that its solubility of around 96.0% was steady, and fish antihypertensive peptides could be extensively used in food.

Key words: grass carp; antihypertensive peptides; alcalase; high-performance liquid chromatography; molecular weight; size exclusion high performance liquid chromatography

目前,我国高血压患病率已上升到 11.88%,患病人数估计已近 1 亿,每年死于心血管疾病的人数达 200 万。因此,高血压病已成为一个十分严重的社会公共卫生问题。我国临床常用的抗高血压药主要包括利尿药、肾上腺素受体阻断药等。虽然这些药具有很好的降压效果,但都具有一定的副作用或不良反应。由于来源于食品中的降压肽具有降血压效果明显且对正常血压无影响、无副作用等优点,已成为目前研究的热点^[1-4]。

我国是淡水渔业最发达国家,淡水鱼年产量为 1918.8 万 t,约占鱼类产量 40%。我国淡水鱼仍以鲜活上市销售为主,在气温较高的秋冬季节,受鱼货集中上市的冲击较大,不仅鱼价低,而且运销不畅、销售滞缓造成巨大损失,渔民增产不增收,严重影响了淡水渔业的可持续发展。因此,积极开展淡水鱼,特别是低值淡水鱼的深加工势在必行^[5-6]。以低值淡水鱼为原料生产得到的鱼降压肽不仅具有鱼蛋白的优点,同时还具有良好的酸、热稳定性、溶解性以及独特的降血压功能,比鱼蛋白和它的氨基酸更易消化吸收^[1]。

本文通过对酶法制备鱼降压肽的工艺及其特性进行研究,拟确定鱼降压肽酶法制备的较佳工艺条件。对在此条件下制备的鱼降压肽理化性质进行分析,为鱼降压肽的进一步开发奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 原料与试剂

草鱼从武汉常青花园菜市场购买;碱性蛋白酶购于广西南宁庞博生物工程有限公司;血管紧张素转化酶(ACE)、马尿酸组氨酰亮氨酸(HHL)购于 Sigma 化学公司,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

SHB-Ⅲ型循环水式多用真空泵,郑州长城科

工贸公司;超级恒温水浴槽,巩义市英峪予华仪器厂;LXJ-Ⅱ型离心机,上海医用分析仪器厂;RE52CS 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;DELTA 320 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;JJ-2 组织捣碎匀浆机,常州国华电器有限公司;LG-3 型冷冻干燥机,宁波市生化仪器厂。

1.3 方 法

蛋白质含量的测定 半微量凯氏定氮法。将鱼蛋白的含氮量转换成蛋白质含量时的转换系数 F 为 6.25(GB5511-85)。

肽含量的测定 QB/T2653-2004。

脂肪含量的测定 索氏抽提法(GB5497-85)。

水分含量的测定 105 °C 恒重法(GB5512-85)。

灰分含量的测定 550 °C 灼烧法(GB5505-85)。

碱性蛋白酶水解鱼蛋白的影响因素 采用碱性蛋白酶水解鱼蛋白 180 min,鱼蛋白以 30% 浓度溶解在 200 mL 去离子水中,选择 pH 值为 7.5、8.0、8.5、9.0 和 9.5;温度为 45、50、55、60 和 65 °C;酶与底物比为 96、48、24 和 12 AU·kg⁻¹进行水解。水解结束后立即把酶解液放入 95 °C 以上热水中 15 min 终止反应,灭酶后的水解液冷却至室温,用 2 mol·L⁻¹氢氧化钠调 pH 7.0,10 000 r·min⁻¹冷冻离心 20 min,上清液经浓缩后冷冻干燥备用。

酶解蛋白质水解度(DH)的测定 参照文献[7-8]。在中性及碱性条件下采用 pH-stat 法,水解度的计算公式:

$$DH(\%) = B \times Nb \times 1/\alpha \times 1/MP \times 1/H_{\text{tot}} \times 100$$

式中, B: 碱液体积(mL); Nb: 碱液的摩尔浓度

($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); α : α -氨基的解离度(根据具体情况而定); MP : 底物中蛋白质的含量(g); H_{tot} : 底物蛋白质中的肽键总数($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$); 试验采用鱼肉为原料, 取 $H_{\text{tot}} = 8.40 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

鱼降压肽的制备工艺 草鱼→清洗(去头、去内脏、去骨)→绞碎→匀浆→配成溶液→调 pH 值→酶解→灭酶($95 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 min)→离心($10\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 20 min)→上清液→浓缩→冷冻干燥→鱼降压肽。

血管紧张素转化酶(ACE)抑制活性的测定 参照文献[9]。高效液相色谱(HPLC)系统: WATERS 2690; 检测器: Waters996; 色谱柱: ZORBAX ODS $4.6 \times 150 \text{ mm}$; 洗脱液: 30% 甲醇: 70% 水(含 1% 醋酸); 流速: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 228 nm ; 上样量: $10 \text{ } \mu\text{L}$ 。

将样品溶于超纯水中, 离心($10\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 20 min), 取上清液进行 ACE 抑制活性测定。

取样品 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 和 ACE(0.25 U 溶于 2.5 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼酸盐缓冲液、pH 8.3、含 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠) $5 \text{ } \mu\text{L}$ 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中保温 6 min , 加入 $50 \text{ } \mu\text{L}$ $6.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 底物(HHL 溶于相同的缓冲液中), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下反应 30 min , 加入 $25 \text{ } \mu\text{L}$ $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液中止反应, 至室温取 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 反应产物进样, 通过 HPLC 洗脱图谱定量马尿酸生成量, 以生成马尿酸的量来判断样品的 ACE 抑制活性。

鱼降压肽相对分子质量的测定 参照文献[10]。高效液相色谱仪: Waters 600/2487; 色谱柱: Tskgel G2000 SW \times L 相对分子质量分级范围 $100 \sim 10\ 000$; 流动相: 乙腈/水/TFA 为 $45/55/0.1$; 检测波长: 220 nm ; 柱温: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 流速: $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 相对分子质量标准品: 细胞色素 C ($M_w 12500$)、抑肽酶 ($M_w 6500$)、杆菌酶 ($M_w 1450$)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 ($M_w 451$) 和乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 ($M_w 189$)。

鱼降压肽溶解度的测定 将 2 g 鱼降压肽加入 100 mL 水中, 用 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸和 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调节 pH $2.0 \sim 10.0$, 室温下 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌 1 h , $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min , 测上清液中肽含量, 公式如下:

$$\text{溶解度}(\%) = \frac{\text{上清液肽}(\text{g})}{\text{肽样品}(\text{g})} \times 100$$

2 结果

2.1 碱性蛋白酶水解草鱼蛋白的影响因素

pH 值对碱性蛋白酶水解草鱼蛋白的影响

由图 1 可以看出, pH 值对碱性蛋白酶水解草鱼蛋白有显著影响。随着 pH 值的升高, 草鱼蛋白的水解度逐渐增大。在 pH 7.5 时, 水解度最低, 而当 pH 9.0 时, 草鱼蛋白的水解度最高。从图中还可以看出, 在 pH 7.5~9.0 范围内, 随着 pH 值的增加, 鱼蛋白的水解度明显增加; 当 pH 9.5 时, 其水解度增加不明显, 跟 pH 9.0 时差别不大。考虑到 pH 值增加时, 碱的用量加大, 因此, 确定碱性蛋白酶的最适 pH 值为 9.0。

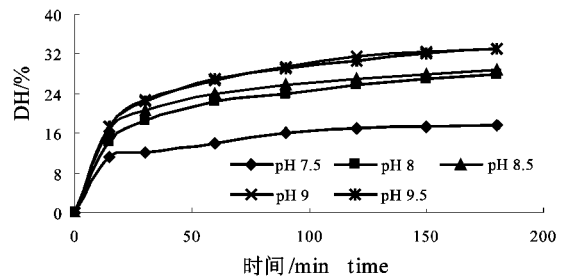


图 1 碱性蛋白酶在不同 pH 值下的水解进程曲线

Fig.1 Hydrolysis curves for grass carp protein with alcalase at varying pH

温度对碱性蛋白酶水解草鱼蛋白的影响 由图 2 可知, 温度对碱性蛋白酶水解草鱼蛋白的影响也很大。45 $^\circ\text{C}$ 时水解度最低, 随着温度的增加, 水解度增加明显; 在温度为 50、55 和 60 $^\circ\text{C}$ 时, 草鱼蛋白的水解度的差异不是很大; 在 65 $^\circ\text{C}$ 时, 虽然在 30 min 内水解度跟 50、55 和 60 $^\circ\text{C}$ 差别不大, 但 30 min 后, 随着时间的延长, 水解度明显降低。考虑工业化生产时的成本, 50 $^\circ\text{C}$ 更为理想。因此, 选择 50 $^\circ\text{C}$ 作为鱼蛋白水解的最适温度。

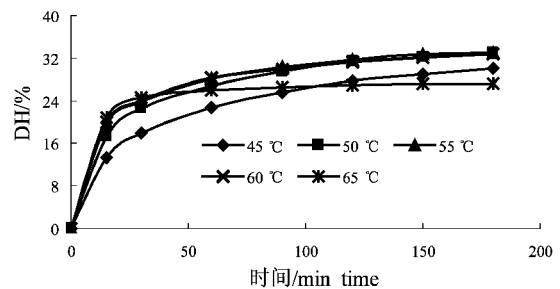


图 2 碱性蛋白酶在不同温度下的水解进程曲线

Fig.2 Hydrolysis curves for grass carp protein with alcalase at varying temperature

酶与底物比对碱性蛋白酶水解草鱼蛋白的影响 从图 3 中可以看到,随着酶添加量的增加,碱性蛋白酶水解草鱼蛋白的速度加快,草鱼蛋白被水解的程度提高,但水解度的增加并不与加酶量同倍数增加。考虑到碱性蛋白酶价格较贵,因此,选用酶与底物比为 $48 \text{ AU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

根据以上研究,确定碱性蛋白酶水解鱼蛋白的较佳条件为:pH 9.0、温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、酶与底物比 $48 \text{ AU}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

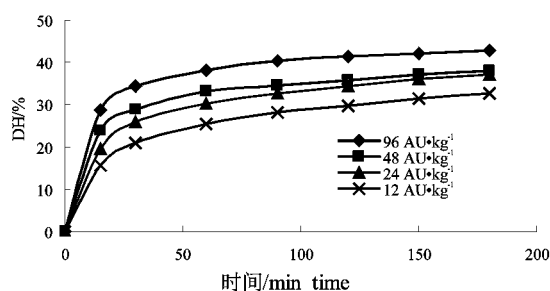


图 3 碱性蛋白酶在不同酶与底物比时的水解进程曲线

Fig.3 Hydrolysis curves for grass carp protein with alcalase at varying $[E]/[S]$

2.2 不同水解度鱼蛋白酶解物的血管紧张素转化酶(ACE)抑制活性

在上述碱性蛋白酶较佳工艺条件下进行草鱼蛋白的水解,测定不同水解度草鱼蛋白酶解物的 ACE 抑制活性(表 1)。

表 1 不同水解度草鱼蛋白酶解物的 ACE 抑制活性

Tab.1 ACE inhibitory activities of enzymatic hydrolyzates from grass carp at different DH

水解度(%) degree of hydrolysis	ACE 活性抑制率(%) ratio of ACE inhibitory activities
24.95	35.64
32.53	64.22
34.52	76.85
38.72	70.35
43.43	66.24
43.94	63.82

从表 1 中可知,草鱼蛋白的碱性蛋白酶水解物具有明显的 ACE 抑制活性,但不同水解度酶解物的 ACE 抑制活性也存在较大差异。随着碱性蛋白酶作用草鱼蛋白水解度的增加,其酶解物的 ACE 抑制活性增加,至水解度为 34.52% 时,酶解物的 ACE 抑制活性最高,继续增加水解度,酶解物的 ACE 抑制活性反而下降,因此,确定碱性蛋

白酶水解草鱼蛋白生产鱼降压肽的水解终点为水解度 34.52%。

2.3 鱼降压肽成分与理化性质分析

鱼降压肽成分分析 对鱼降压肽成分进行分析,结果见表 2。从表中可以看出,鱼降压肽中可溶性氮含量较高,达到了 81.26%,肽含量为 72.81%。灰分和水分含量分别为 9.47% 和 3.54%,脂肪含量较低,为 0.12%。由于鱼降压肽中灰分较高,限制了其在食品中的应用。

表 2 鱼降压肽成分分析

Tab.2 Content of compositions in grass carp antihypertensive peptides

成份 component	含量(%) content
可溶性氮 soluble N	81.26
肽 peptides	72.81
脂肪 fat	0.12
水分 water	3.54
灰分 ash	9.47

鱼降压肽的相对分子质量 根据图 4 和表 3 可知,鱼降压肽相对分子质量分布范围较窄,主要分布在 124 ~ 10581 之间。相对分子质量在 10581 ~ 1062 之间的组分含量较低,为 8.16%;其次为相对分子质量在 1062 ~ 465 之间的组分,含量为 40.96%;相对分子质量在 465 ~ 124 之间的组分含量最高,为 51.88%。

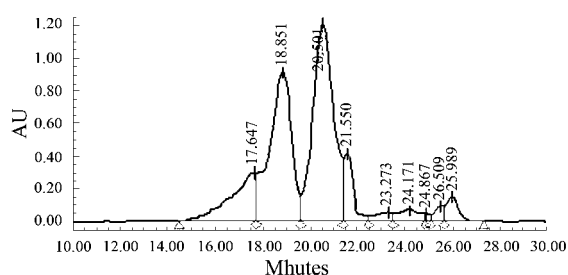


图 4 鱼降压肽的体积排阻高效液相色谱图

Fig.4 SE-HPLC of antihypertensive peptides from grass carp protein

相对分子质量标准曲线:

$$\lg Mw = 7.24 - 0.242T, R = 0.9950$$

鱼降压肽的溶解性 对鱼降压肽在 pH 2.0 ~ 10.0 范围内的溶解度进行了测定,结果如图 5 中所示。鱼降压肽在不同的 pH 值范围内,其溶解度基本上没有变化,在 pH 2.0 ~ 10.0 时溶解度

均大于 96%。说明鱼降压肽的溶解性没有受到 pH 值的影响,其具有良好的溶解性。

表 3 鱼降压肽的相对分子质量

Tab.3 Relative molecular weight of antihypertensive peptides from grass carp protein

各峰值的保留时间(min) reserve time of peak	相对分子质量 relative molecular weight	峰面积所占比例(%) ratio of peak area
14.562 ~ 17.647	10581 ~ 1062	8.16
17.647 ~ 19.512	1062 ~ 465	40.96
19.512 ~ 21.567	465 ~ 124	51.88

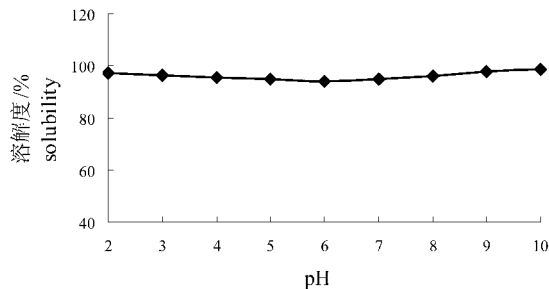


图 5 鱼降压肽的溶解性

Fig.5 Solubility of fish antihypertensive peptides

3 讨论

国外有关海鱼(沙丁鱼、鲑鱼和金枪鱼等)、大豆蛋白、玉米蛋白、花生蛋白和酪蛋白等蛋白质酶解液以及酸奶中降压肽的研究报道较多^[11-15]。国内吴建平^[16]研究了大豆蛋白中的降压肽;倪莉等^[17]研究了丝素蛋白中的降压肽;赵利等^[18]研究了酪蛋白中的降压肽;黎观红等^[19]研究了花生蛋白中的降压肽等。利用低值淡水鱼—草鱼制备鱼降压肽目前国内外还未见报道。

3.1 体外降压活性的测定

传统上采用紫外分光光谱法测定 ACE 抑制活性^[20],即用乙酸乙酯反复抽提反应产物中的马尿酸,然后于 228 nm 下比色,定量马尿酸的生成量。该方法的缺点是实验步骤较为烦琐,且易使定量结果偏低。倪莉等^[21]曾采用高效凝胶过滤色谱测定马尿酸的生成量,应用于腐乳中肽的 ACE 抑制活性测定,但定量结果不稳定,重复性较差。吴建平^[9]采用高效液相色谱测定了大豆肽的 ACE 抑制活性,据报道测定稳定高效,重复性

好,定量马尿酸结果精确。因此,采用高效液相色谱法测定鱼降压肽的 ACE 抑制活性。

3.2 鱼降压肽制备的较佳工艺条件

从目前所报道的肽结构和 ACE 抑制活性关系的研究结果发现,肽链 C 末端是脯氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸或序列中含有疏水性氨基酸是维持高 ACE 抑制活性所必需^[11-12]。碱性蛋白酶作用范围广,对疏水性氨基酸 - COOH 具有底物特异性^[22],因此,采用碱性蛋白酶水解草鱼蛋白来制备降压肽。

pH 值、温度对酶催化反应的影响主要包括两个方面:一是影响酶的稳定性;二是影响酶与底物的结合以及酶催化底物转变成产物。在低 pH 值时,酶由于自动消化而引起酶活力的丧失,而在高 pH 值时,酶由于不可逆变性而失活很快,因此,酶催化反应有一个最适的 pH 值。碱性蛋白酶是一种蛋白质,温度过高,蛋白质易发生变性而影响其活性^[22-23]。

酶与底物比能在一定值上下自由变动。在此值以下,有些酶将出现特异性变窄现象,即在很低的酶与底物比时,即使反应在适当的水解度终止,但酶的水解作用并不完全;在此值以上,酶与底物比越高反应速度越快,但酶用量增大引起成本增加,应控制酶与底物比在可以接受的时间内完成反应^[22-23]。

因此,确定碱性蛋白酶水解草鱼蛋白的较佳工艺条件为 pH 9.0、温度 50 ℃、酶与底物比 48 AU·kg⁻¹。

3.3 鱼降压肽的理化性质

相对分子质量 鱼降压肽相对分子质量分布范围较窄,主要分布在 124 ~ 10 581 之间,且在 124 ~ 1062 之间的组分达到了 90% 以上。说明鱼降压肽也是由一些低相对分子质量的肽组成,这与一些报道相一致^[16,18-19]。

溶解性 与鱼蛋白比较,在 pH 3.0 ~ 11.0 时,鱼肽的溶解度高而稳定,可能是当鱼蛋白被碱性蛋白酶水解后,蛋白质多聚体解离为小分子的肽,分子由卷曲状态成为较伸展的状态,增加了分子表面电荷,加强了分子与分子之间,分子与水溶液之间的静电作用^[23]。因此,鱼降压肽的溶解性不会受到 pH 值影响,有利于其在食品中的应用。

参考文献:

- [1] 辛志宏,马海乐,吴守一. 食品蛋白质中降血压肽的功能与应用[J]. 食品与发酵工业,2003,(8):84-87.
- [2] Kawamura Y. Food proteins and antihypertensive peptides[J]. Farming Japan,1997,31(1):14-19.
- [3] Fujita H, Yokoyama K, Yoshikawa M. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins[J]. J Food Sci,2000, 65(4):564-569.
- [4] 彭师奇. 多肽药物化学[M]. 北京:科学出版社,1997:233-300.
- [5] 朱碧英,毛秀珍. 鲢鱼蛋白酶解肽分子组成及其降血脂作用的初步研究[J]. 营养学报,2005,27(5):422-424.
- [6] 王长云,薛长湖,陈修白. 低酶水解法提取无苦味鲤鱼水解蛋白[J]. 水产学报,1995,(4):350-353.
- [7] Jens Adler-Nissen. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid[J]. J Agric Food Chem, 1979, 27 (6):1256-1262.
- [8] Jens Adler-Nissen. Enzymatic hydrolysis of food protein [M]. Essex, Elsevier Applied Science Publishers LTD, 1986:122-144.
- [9] Wu J P, Aluko R E, Muri A D. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin I-converting enzyme-catalyzed reactions [J]. J Chromatography A, 2002,950:125-130.
- [10] 李建武,肖能赓,余瑞元,等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社,1994.
- [11] Yamamoto N. Antihypertensive peptides derived from food proteins[J]. Biopolymers, 1997,43:129-135.
- [12] Yamamoto N, Takano T. Antihypertensive peptides derived from milk proteins[J]. Nahrung, 1999,3:159-164.
- [13] Maruyama S, Miyoshi S, Kaneko T, *et al.* Angiotensin I-converting enzyme inhibitory actives of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein[J]. Agric Biol Chem, 1989, 53: 1077-1081.
- [14] Fujita H, Yoshikawa M. LKAPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptides derived from fish protein[J]. Immunopharmacology, 1999, 44: 123-127.
- [15] Nakamura Y, Yamamoto N. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk[J]. J Dairy Sci, 1995, 78: 777-783.
- [16] 吴建平,丁宵霖. 大豆降压肽的研究[J]. 中国油脂,1998,23(5):22-25.
- [17] 倪莉,王璋,许时婴. 功能性食品配料—丝素的性质和应用[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2002,30:744-747.
- [18] 赵利,王璋,许时婴. Alcalase水解酪蛋白的研究[J]. 中国乳品工业,2005,33(4):15-19.
- [19] Li G H, Shi Y H, Le G W, *et al.* Alcalase hydrolysates peanut protein isolates inhibit angiotensin I-converting enzyme activity [J]. Shiping Kexue, 2005, 26(6):55-60.
- [20] Cushman D W, Cheung H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochem Pharmacol, 1971, 20:1637-1657.
- [21] 倪莉,饶平凡,王璋. 腐乳中生理活性多肽的分离和表征[J]. 浙江农业大学学报,1997,23(8):93-97.
- [22] 王璋. 食品酶学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2005.
- [23] 沈同. 生物化学[M]. 北京:科学出版社,2004.