

# 醋制对黑豆蛋白含量及多肽 ACE 抑制活性的影响

张月圆<sup>1,2</sup>, 陈佩瑶<sup>1,2</sup>, 刘 露<sup>1,2</sup>, 冀会方<sup>1,2</sup>, 李玲玲<sup>1,2</sup>, 王灵芝<sup>1</sup>

(1. 北京中医药大学 生命科学院, 北京 100102; 2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

**摘 要:**为考察醋制对黑豆蛋白含量及多肽 ACE 抑制活性的影响, 为对黑豆醋浸过程中蛋白组分及含量变化进行分析, 并对相应 ACE 抑制肽活性进行测定。黑豆经醋浸不同时间后, 采用顺序抽提法提取清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白, 并采用凯氏定氮法及 SDS-PAGE 电泳进行定量和定性分析; 各蛋白组分经胃蛋白酶水解, 经超滤(截留分子量 3 kD)后收集滤液, 获得多肽组分, RP-HPLC 法进行 ACE 抑制活性评价。结果表明: 经醋浸 14 d 后, 黑豆总蛋白含量变化幅度小于  $\pm 0.5\%$ ; 清蛋白含量由 55.13% (0 d) 降低至 9.61% (14 d); 球蛋白由 7.04% (0 d) 增加到 20.34% (14 d); 醇溶蛋白由 0.81% (0 d) 增加到 1.72% (14 d); 谷蛋白由 21.11% (0 d) 增加到 59.45% (14 d), 含量最高。醋浸处理降低了清蛋白源多肽的 ACE 抑制活性, 但提高了球蛋白、醇溶蛋白及谷蛋白多肽的 ACE 抑制活性, 其中, 谷蛋白多肽抑制率由 18.18% (0 d) 增加至 37.58% (14 d), 抑制活性升高。醋浸可改变黑豆各蛋白组分的含量和对应多肽的 ACE 抑制活性, 其中, 谷蛋白含量及其多肽 ACE 抑制活性均有增加。研究结果表明可进一步采用分离纯化技术从谷蛋白多肽中获得高活性降压肽。

**关键词:** 黑豆; 醋浸; 蛋白质; 多肽; ACE 抑制活性  
**中图分类号:** S565.1      **文献标识码:** A      **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2017.06.0932

## Effect of Vinegar Soaking on Black Soybean Protein Fractions Content and Their Corresponding Peptides' ACE Inhibitory Activity

ZHANG Yue-yuan<sup>1,2</sup>, CHEN Pei-yao<sup>1,2</sup>, LIU Lu<sup>1,2</sup>, JI Hui-fang<sup>1,2</sup>, LI Ling-ling<sup>1,2</sup>, WANG Ling-zhi<sup>1</sup>

(1. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2 School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**Abstract:** To analyze the variation total protein content and four protein fractions of black soybean and their corresponding peptides' ACE inhibitory activity after soaking in vinegar, four protein fractions of albumin, globulin, prolamin and glutelin were sequentially extracted and then protein contents and molecular weight distribution were measured by Kjeldah method and Tris-Glycine SDS-PAGE, respectively. These four protein fractions were hydrolyzed by pepsin and the hydrolysate was passed through an ultrafiltration membrane (cutting off molecular weight of 3 kD) to collect the ultrafiltrate. The angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of the peptides was evaluated by RP-HPLC. The results showed that: The total protein content of black soybean changed less than  $\pm 0.5\%$  after soaking in vinegar for 14 d, while the content of albumin reduced from 55.13% (0 d) to 9.61% (14 d), globulin, prolamin and glutelin contents increased from 7.04% (0 d) to 20.34% (14 d), 0.81% (0 d) to 1.72% (14 d) and 21.11% (0 d) to 59.45% (14 d), respectively. Vinegar soaking made the ACE inhibitory activity of albumin peptides decreased, while those from globulin, prolamin and glutelin increased. Among them, glutelin peptides manifested highest increased inhibitory activity from 18.18% (0 d) to 37.58% (14 d). The protein fraction contents of black soybean and ACE inhibitory activity of corresponding peptides significantly changed after vinegar soaking, among them, glutelin content and its peptide ACE inhibitory activity were increased, suggested that the antihypertensive peptides could be further generated from glutelin peptide by using the technology of separation and purification.

**Keywords:** Black soybean; Soaking in vinegar; Protein; Peptides; ACE inhibitory activity

黑豆亦称乌豆, 是豆科植物大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 的黑色种子, 其味甘性平, 归脾、肾经, 具有益精明目、养血祛风、利水、解毒之功效, 可用于治疗阴虚烦渴、头晕目昏、水肿尿少等。青仁黑豆是黑豆之上品, 中医称之为药黑豆或雄黑豆, 其营养价值和食疗作用远高于黄仁黑豆和黄豆<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 2017-05-29  
基金项目: 北京中医药大学基本科研业务费自助选题项目 (2015-JYB-JSM S026); 北京中医药大学校级发展基金。  
第一作者简介: 张月圆 (1992 -), 女, 硕士, 主要从事中药活性蛋白及多肽的功能研究。E-mail: 13521311896@163.com。  
通讯作者: 王灵芝 (1973 -), 女, 博士, 副研究员, 主要从事中药活性蛋白及多肽的功能研究。E-mail: wanglz@bucm.edu.cn。

醋豆是以整粒大豆为原料,经食醋浸渍而成。它不仅集合了大豆和食醋的营养和保健作用,且经过浸制过程,大豆中原有的一些有害物质如胰蛋白酶阻碍因子、凝血素等失活,使得醋豆的功效更加突出<sup>[2]</sup>。研究表明,醋豆制品可降低受试者的血压、胆固醇和甘油三酯<sup>[3-5]</sup>,但其药效物质基础尚不明确。醋豆的制备可选用黑豆亦可选用黄豆,但选用药食同源的黑豆制备得到的醋豆可能具有其独特的优势。黑豆蛋白质含量高达 36%~40%,居豆类首位。故本文着重于考察醋浸对黑豆蛋白质组含量及对应多肽的 ACE 抑制活性的影响,从蛋白质角度初步解释醋制黑豆的降血压作用。

血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)作为抗高血压一线药物,通过减少血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)的生成和减弱缓激肽的降解来发挥降压效果,且不影响植物神经、中枢神经和性功能。目前 ACEI 药物可分为 3 类,即含巯基或硫基类(卡托普利等)、含羧基类(赖诺普利等)及含次磷酸基类(西罗普利等)<sup>[6]</sup>。尽管这些药物的疗效显著,但同时存在不同程度的副作用,如咳嗽、味觉功能紊乱、皮疹及白细胞减少等<sup>[7]</sup>。因此,寻找新型 ACEI 是近年来的科研热点之一。与化学合成的 ACE 抑制剂相比,食源性 ACE 抑制肽具有效果温和、作用持久和安全性高且对正常人群血压无影响的特点而备受关注<sup>[8-9]</sup>。大量的 ACE 抑制肽已从不同动植物蛋白中获得,如酪蛋白<sup>[10]</sup>、小麦<sup>[11]</sup>、玉米<sup>[12]</sup>、大豆<sup>[13]</sup>、薏苡仁<sup>[14]</sup>、蜈蚣<sup>[15]</sup>。

目前,已从大豆中分离到多种 ACE 抑制肽,如 HHL<sup>[13]</sup>、DLP、DG、LAIPVNKP、LPHF、SPYP、WL、SW 和 FS<sup>[16-20]</sup>。本实验室前期工作研究表明,黑豆蛋白经胃蛋白酶水解后可得到具有较高 ACE 抑制活性的多肽。本文拟研究醋浸过程中黑豆蛋白质含量、分子量分布及相应多肽 ACE 抑制活性的变化。ACE 抑制肽构效关系研究表明,疏水性氨基酸残基占 60% 以上,且 C 末端的氨基酸是芳香族氨基酸或疏水性氨基酸残基,则其 ACE 抑制活性强<sup>[21]</sup>。胃蛋白酶倾向于水解氨基端或羧基端为芳香族氨基酸(Phe、Tyr、Trp)或 Leu 之间肽键<sup>[22]</sup>,故本研究采用胃蛋白酶作为水解酶以制备 ACE 抑制肽;由于 ACE 抑制肽具有较低的相对分子质量,一般由 2~10 个氨基酸组成<sup>[23]</sup>,故本文选取小分子量组分进行 ACE 活性评价,期望从中获得具有较高 ACE 抑制活性的多肽组分。以为醋制黑豆在防治高血压

领域中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

雄黑豆购自北京同仁堂药店,批号 141225003,产地辽宁,经北京中医药大学刘春生教授鉴定为豆科植物大豆的黑色种子。

胃蛋白酶(批号 01535535)、马尿酸-组氨酸-亮氨酸(HHL,批号 1001510772)、血管紧张素转化酶(ACE,批号 1001926470)购自美国 Sigma 公司;碱性蛋白酶(批号 20160401)购于 Biotopped 公司;卡托普利(批号 100318-200602)购自中国药品生物制品检定所。山西陈醋购于山西紫林醋业股份有限公司。其它试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 醋豆的制备 将黑豆置于广口瓶内,加入 3 倍体积陈醋(m/V),封口后,于 4℃ 冰箱浸泡。7 和 14 d 后取出,去除种皮,去离子水冲洗数次,真空干燥。

1.2.2 蛋白组分的提取 将原料黑豆、醋浸 7 和 14 d 黑豆分别粉碎后过 40 目筛子,石油醚脱脂,采用顺序抽提法<sup>[24]</sup>依次使用双蒸水、0.5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl、70% 乙醇(5% β-巯基乙醇,0.5% NaAc)、0.0125 mol·L<sup>-1</sup> 硼酸钠缓冲液(1% SDS,2% β-巯基乙醇)提取其清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白及谷蛋白,各蛋白提取液于 4℃ 透析 24 h,期间换水数次,蛋白液冷冻干燥备用。

1.2.3 蛋白质含量测定 采用微量凯氏定氮法<sup>[25]</sup>测定黑豆粉末、各蛋白组分提取液和残渣中的含氮量,通过含氮量计算蛋白质含量。黑豆粉末总蛋白含量按式(1)计算;提取液及残渣蛋白含量按式(2)计算。公式如下:

$$\text{固体样品中蛋白质含量}\% = (V_2 - V_1) \times 0.01 \times 14 \times 6.25 \times N / (C \times 1000) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{液体样品中蛋白质含量}(\text{mg}) = (V_2 - V_1) \times 0.01 \times 14 \times 6.25 \times N \quad (2)$$

$V_2$  为滴定样品用去的盐酸的平均体积(mL), $V_1$  为滴定空白用去的盐酸平均体积(mL),0.01 为盐酸的摩尔浓度,14 为氮的原子量,6.25 为系数, $N$  为样品稀释的倍数, $C$  为粉末样品重量(g)。

1.2.4 SDS-PAGE 法分析蛋白质分子量分布 采用垂直板不连续体系<sup>[26]</sup>:分离胶浓度为 15%,浓缩胶浓度为 3%。将各蛋白溶液与上样缓冲液混合后,100℃ 变性 5 min,取适量蛋白上样。将电流调至

10 mA,待样品进入分离胶后调至 30 mA,当染料前沿距胶底 1.5 cm 时,停止电泳。考马斯亮蓝 R-250 过夜染色,甲醇:水:冰乙酸=5:4:1 脱色。

1.2.5 ACE 抑制肽的制备 采用胃蛋白酶作为水解酶以制备 ACE 抑制肽。将从原料黑豆、醋浸 7 和 14 d 黑豆提取得到的 4 种蛋白组分用胃蛋白酶酶解,底物浓度 2%,酶与底物浓度比 1:10, pH2.0, 37℃ 水解 48 h, 95℃ 水浴 5 min 以终止反应,冰浴 10 min, 8 000 r·min<sup>-1</sup>、4℃ 离心 10 min, 取上清液备用<sup>[14]</sup>。

将上步所得上清液转入截留分子量 3 kD 的超滤管,收集滤液冷冻干燥,以制备小分子量多肽组分。

1.2.6 ACE 抑制肽活性的测定 使用 Lowry 法<sup>[27]</sup>测定多肽浓度。200 μL 样品溶液(以牛血清白蛋白为标准蛋白)加 1 mL 碱性铜溶液混合后 25℃ 放置 10 min,快速加入酚试剂 100 mL 摇匀,30℃ 温育 30 min, 650 nm 测定样品光吸收。根据标准曲线算出样品蛋白浓度(μg·mL<sup>-1</sup>)。

采用高效液相色谱(RP-HPLC)法<sup>[14]</sup>测定小分子量多肽组分的 ACE 抑制活性。样品用硼酸缓冲液(0.1 mol·L<sup>-1</sup>硼酸,0.3 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, pH8.3)配制成 0.05 mg·mL<sup>-1</sup>的溶液。反应体系为:10 μL 样品溶液、20 μL ACE(2 mU)和 20 μL HHL(2 mM)。样品溶液与 ACE 混合于 37℃ 温育 10 min,后加入 HHL,继续温育 80 min 后加入 100 μL 乙腈终止反应。以卡托普利(4×10<sup>-10</sup> mol·L<sup>-1</sup>)为阳性对照,硼酸缓冲液为空白对照。

样品经 C<sub>18</sub> 色谱柱(250×4.6 mm, 5 μm, TIAN-HE)分析,流动相 A 为 100% 乙腈,B 为 H<sub>2</sub>O(含 0.05% TFA, V/V),洗脱条件 A:B=25:75,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30℃,上样量 10 μL,228 nm 下进行检测,根据 HA 峰面积计算 ACE 抑制率:

ACE 抑制率(%)=(A - B) / A × 100

A 为空白对照组所产生的 HA 峰面积,B 为样品组所产生的 HA 峰面积。

1.3 数据分析

所有试验数据以平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SAS 9.3 软件对试验数据进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 醋浸过程黑豆蛋白组分的含量变化

经醋浸 14 d 后,黑豆总蛋白含量变化幅度小于

± 0.5% (0 d 为 46.73%, 7 d 为 47.22%, 14 d 为 46.41%)。各蛋白组分占总蛋白的比例发生了较大变化,结果如表 1 所示。醋浸 7 和 14 d,各蛋白质含量差异不大。其中,清蛋白含量由 55.13% (0 d) 降低至 9.61% (14 d);球蛋白由 7.04% (0 d) 增加到 20.34% (14 d);醇溶蛋白由 0.81% (0 d) 增加到 1.72% (14 d);谷蛋白由 21.11% (0 d) 增加到 59.45% (14 d),醋浸前清蛋白含量最高,醋浸 14 d 后谷蛋白含量最高。因此醋制使得各蛋白组分的比例发生了不同程度的变化。

表 1 4 种蛋白组分占总蛋白的比例

Table 1 Ration of 4 kinds of protein components to total protein (%)

醋浸时间 Vinegar soaking time /d	清蛋白 Albumin	球蛋白 Globulin	醇溶蛋白 Prolamin	谷蛋白 Glutelin
0	55.13	7.04	0.81	21.11
7	9.59	18.15	1.93	58.37
14	9.61	20.34	1.72	59.45

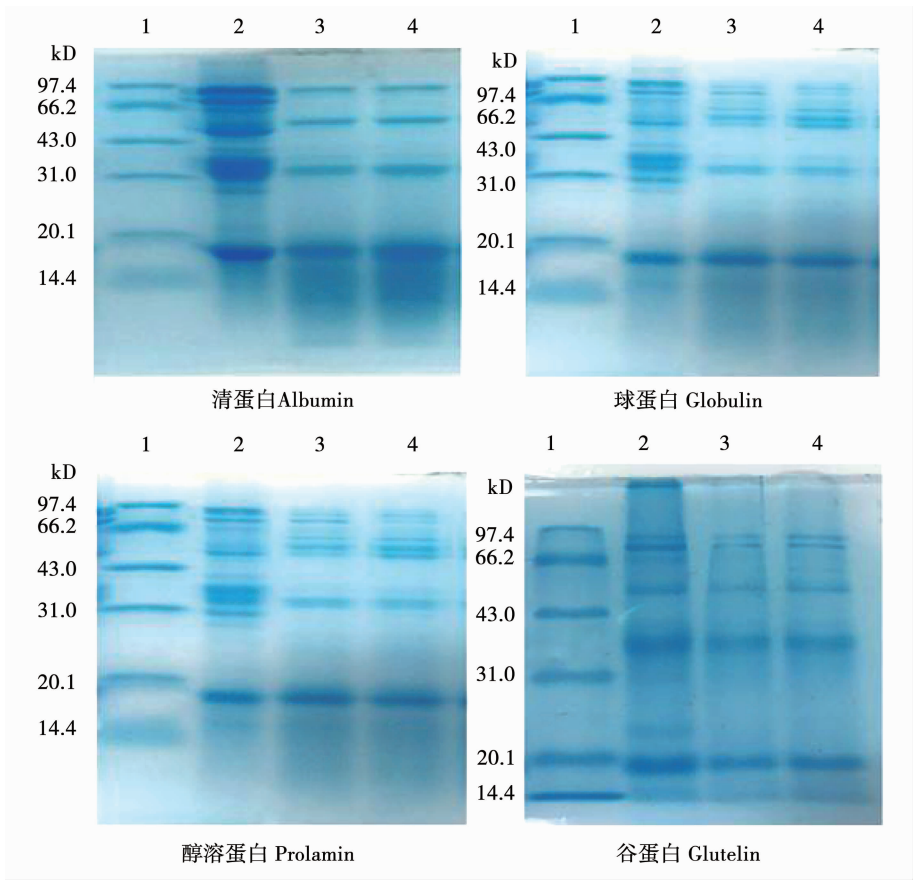
2.2 醋浸对黑豆蛋白质分子量分布的影响

采用 SDS-PAGE 对醋浸前后黑豆 4 类蛋白的分子量分布情况进行分析,电泳图谱如图 1 所示。与醋浸前相比,清蛋白经醋浸后 70、50 和 37 kD 附近的条带消失;球蛋白经醋浸后 37 和 30 kD 附近的条带被降解;醇溶蛋白在 10~97.4 kD 范围内均有分布且条带数较少;谷蛋白在 23 和 66.2 kD 附近的两条带均已降解。可见,醋浸在一定程度上影响着黑豆各蛋白组分的分子量分布,部分蛋白降解,但醋浸 7 和 14 d 之间差异不大。

2.3 醋浸对黑豆 ACE 抑制肽活性的影响

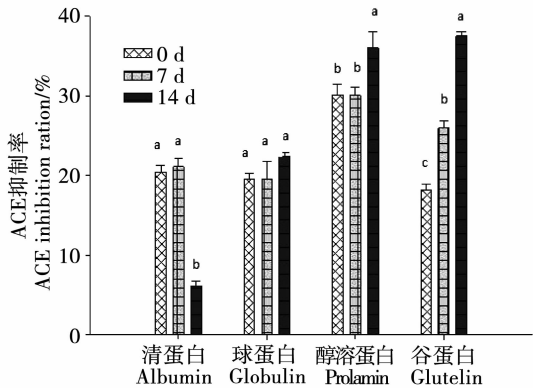
使用胃蛋白酶对醋浸 7 和 14 d 后黑豆所得各蛋白组分进行水解,其小分子多肽组分 ACE 抑制活性的变化如图 2 所示。对于清蛋白,未醋浸材料来源的小分子肽其 ACE 抑制率为 20.42%,醋浸 7 d 后活性没有明显改变,但醋浸 14 d 后,ACE 抑制率显著下降至 6.11% ( $P < 0.05$ );醋浸对球蛋白多肽 ACE 抑制活性无显著影响 ( $P > 0.05$ );醋浸 7 d 后醇溶蛋白多肽的 ACE 抑制活性无显著改变 ( $P > 0.05$ ) (0 d 为 30.47%, 7 d 为 30.05%),但醋浸 14 d 后则显著增加 (35.85%,  $P < 0.05$ );谷蛋白多肽

ACE 抑制率随醋浸时间延长呈增加趋势,由原来的 18.18% (0 d) 分别显著增加到 25.96% (7 d) 和 37.58% (14 d)。由此可知,醋浸 14 d 黑豆谷蛋白多肽具有较高的 ACE 抑制活性。



1: 标准蛋白;2: 未醋浸;3: 7 d 醋豆;4: 14 d 醋豆。  
1: Standard protein; 2: Without vinegar soaking; 3: Vinegar soaking for 7 d; 4: Vinegar soaking for 14 d.

图 1 黑豆蛋白质 SDS-PAGE 图谱  
Fig. 1 SDS-PAGE profile of black soybean proteins



不同字母表示各组间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。  
Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

图 2 醋浸对黑豆多肽 ACE 抑制活性的影响  
Fig. 2 The effect of vinegar soaking on ACE inhibitory activity of black soybean peptides

3 结论与讨论

黑豆是极具开发潜力的植物蛋白资源,其蛋白质含量高达 36% ~ 40%,居豆类首位,氨基酸组成优于黄豆。黑豆多肽具有多种生理活性,如抗氧化<sup>[28-29]</sup>、降低胆固醇<sup>[30]</sup>、抗肿瘤<sup>[31-32]</sup>及体外醒酒活性<sup>[33]</sup>等。醋制法是一种重要的传统中药炮制方法。中医认为醋性味酸苦、微温,具有收敛、解毒、散瘀止痛、消积聚之功效。以醋制药材可降低其毒性、缓和副作用及增强疗效的作用<sup>[2]</sup>。经醋浸后大豆的蛋白质、脂肪酸及总黄酮含量等的变化从营养学或生理学的角度更符合人体需求<sup>[34-35]</sup>。近年来,成品醋豆经临床试验,连食 40 d 后,高血压、胆固醇、甘油三酯症状明显改善,还能软化血管,防止动脉硬化,对脑血栓、糖尿病、肥胖症、心脏病有辅助

疗效<sup>[3]</sup>。

本研究表明,醋浸 14 d 后黑豆总蛋白含量变化幅度小于  $\pm 0.5\%$ ,而陈芬等<sup>[35]</sup>的研究结果表明将东北大豆(黄豆)醋浸 28 d 后豆中蛋白质含量显著降低,本研究得到与其不同的结果。推测这与大豆种类及醋浸时间有关,醋浸时间较长可使豆中的蛋白质充分水解并溶出,从而含量降低。此外,经醋浸 14 d 后,各蛋白组分的胃蛋白酶水解肽 ACE 抑制活性发生了明显改变,其中谷蛋白多肽的活性随着醋浸时间的延长而增加。研究结果表明有望通过采用分离纯化技术从醋制黑豆谷蛋白多肽中获得高活性降压肽,为醋制黑豆及醋豆在防治高血压领域中的应用提供理论依据。

## 参考文献

- [1] 徐尔雅. 淡豆豉的原料应使用黑大豆[J]. 中药材, 1994, 17(4): 44-46. (Xu E Y. Raw materials of fermented soybean should use black soybean[J]. Traditional Chinese Medicine, 1994, 17(4): 44-46. )
- [2] 吴卫东. 醋制中药初探[J]. 天津中医学院学报, 2001, 20(1): 44, 53. (Wu W D. Preliminary study of vinegar-traditional Chinese medicine[J]. Journal of Tianjin Institute of Traditional Chinese Medicine, 2001, 20(1): 44-53. )
- [3] 韩涛, 李丽萍, 张玉白, 等. 醋豆加工过程物质含量的变化及醋豆产品的感官评价[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(6): 39-44. (Han T, Li L P, Zhang Y B, et al. Changes of total acid and free amino acid contents during pickling of soybean in vinegar and a sensory evaluation of vinegar-pickled soybean[J]. Food and Fermentation Industries, 2001, 27(6): 39-44. )
- [4] 林健, 林升清. 醋豆红曲胶囊调节血脂作用的实验研究[J]. 大豆加工, 2002(2): 24-25. (Lin J, Lin S Q. Experimental study on effect of red koji vinegar-bean capsule on adjusting blood lipid[J]. Soybean Processing, 2002(2): 24-25. )
- [5] 颜士灿. 醋豆降脂胶囊研制及降血脂作用的实验[J]. 福建中医药, 1999, 30(1): 36-37. (Yan S C. Development of vinegar-bean lipid-lowering capsule and its effect study[J]. Fujian Chinese medicine, 1999, 30(1): 36-37. )
- [6] 黄梅. 血管紧张素转化酶抑制剂药代动力学特征预测模型的研究[D]. 天津: 天津大学, 2013. (Huang M. Study on pharmacokinetic prediction model of angiotensin-converting enzyme inhibitor[D]. Tianjin: Tianjin University, 2013. )
- [7] 黄燕, 姚守拙. 亲和色谱法筛选中药中血管紧张素转化酶抑制剂[J]. 中国科学 B: 化学, 2009, 39(8): 760-766. (Huang Y, Yao S Z. Screening of angiotensin converting enzyme inhibitors from traditional Chinese medicines by affinity chromatography[J]. Chinese Science B: Chemical, 2009, 39(8): 760-766. )
- [8] Ni H, Li L, Guo S S. Isolation and identification of an angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from yeast[J]. Current Analytical Chemistry, 2012, 8(1): 180-185.
- [9] Chen C, Chi Y J, Wei X, et al. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate[J]. Food Science and Biotechnology, 2012, 21(1): 27-34.
- [10] Kohmura M, Nio N, Kubo K, et al. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human  $\beta$ -casein[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53: 2107-2114.
- [11] Matsui T, Li C H, Tanaka T, et al. Depressor effect of wheat germ hydrolysate and its novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, Ile-Val-Tyr, and the metabolism in rat and human plasma[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2000, 23: 427-431.
- [12] Suh H J, Whang J H. A peptide from corn gluten hydrolysate that is inhibitory toward angiotensin I-Converting enzyme[J]. Biotechnology Letters, 1999, 21: 1055-1058.
- [13] Shin Z I, Yu R, Park S A, et al. His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity *in vivo*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49: 3004-3009.
- [14] Yuan J, Liang Y, Cui S, et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity of adlay (Coix lacryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf) glutelin hydrolysate[J]. Journal of Food Science 2014, 26: 282-288.
- [15] 谢柳倩, 赵灵灵, 袁建娜, 等. 蜈蚣蛋白水解产物 ACE 抑制活性的初步研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(10): 2214-2218. (Xie L Q, Zhao L L, Yuan J N, et al. Primary Study on hydrolysis of centipedes protein and evaluation of Its ACE inhibitory activity[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica - World Science and Technology, 2014, 16(10): 2214-2218. )
- [16] Wu J P, Ding X L. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats [J]. Agriculture Food Chemistry, 2001(49): 501-506.
- [17] Wu J P, Ding X L. Characterization of inhibition and stability of soy protein derived angiotensin I-Converting enzyme inhibitory peptides[J]. Food Research International, 2002(35): 367-375.
- [18] Kuba M, Tana C, Tawata S, et al. Production of angiotensin I-Converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase [J]. Process Biochemistry, 2005(40): 2191-2196.
- [19] 刘佳. 大豆蛋白 ACE 抑制肽的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008. (Liu J. ACE inhibitory peptides derived from soybean protein[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008. )
- [20] 常伟. 定向酶解大豆蛋白及其 ACE 抑制肽研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008. (Chang W. Hydrolysis on soybean protein with directed hydrolyzing method and the study on ACE inhibitory peptides[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008. )
- [21] Cheung H S, Wang F L, Ondetti M A, et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme[J]. The

Journal of Biological Chemistry, 1980, 255: 401-407.

[22] 李斌, 李玲玲, 冀会方, 等. 薏苡仁谷蛋白源降压肽稳定性研究[J]. 中医药学报, 2015, 43(6): 53-57. (Li B, Li L L, Ji H F, et al. Stability of antihypertensive peptides derived from adlay glutelin[J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2015, 43(6): 53-57. )

[23] 蔡高峰, 黄纪念, 孙强, 等. 大豆降压肽的制备、纯化及活性分析方法研究进展[J]. 中国食物与营养, 2009(10): 25-27. (Cai G F, Huang J N, Sun Q, et al. Research progress of preparation, purification and activity analysis method of soybean antihypertensive peptides[J]. Chinese Food and Nutrition, 2009(10): 25-27. )

[24] Siong H T, Rodney J M, Christopher L B, et al. Extraction and characterization of protein fractions from Australian canola meals [J]. Food Research International, 2011, 44: 1075-1082.

[25] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 食品药品监督总局, 2015. (National pharmacopoeia committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[S]. Food and Drug Administration, 2015. )

[26] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社, 2004; 216-223. (Li J W. Principle and method of biochemistry experiment[M]. Beijing: Peking University Press, 2004, 216-223. )

[27] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951, 193:265-275.

[28] 刘恩岐, 李华, 巫永华, 等. 黑豆肽的抗氧化活性与缓解体力疲劳作用[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 273-277. (Liu E Q, Li H, Wu Y H, et al. Antioxidant capacity and fatigue-relieving function of black soybean peptides[J]. Food Science, 2013, 34(11): 273-277. )

[29] 王璇. 黑豆肽的制备及抗氧化活性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2012. (Wang X. Study on the preparation and antioxidant activity of black-soybean peptides[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2012. )

[30] 刘恩岐, 李华, 巫永华. 降胆固醇黑豆肽的分离纯化与结构鉴定[J]. 食品科学, 2013(19): 128-132. (Liu E Q, Li H, Wu Y H, et al. Isolation and identification of hypocholesterolemic peptide derived from black soybean protein[J]. Food Science, 2013(19): 128-132. )

[31] 王菲, 王常青, 樊迎, 等. 不同处理条件小黑豆乳清蛋白的抗肿瘤作用[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 267-270. (Wang F, Wang C Q, Fan Y, et al. Anti-tumor activity of whey protein from small black soybean subjected to treatment at different temperatures[J]. Food Science, 2013, 34(3): 267-270. )

[32] Hong Y X, Cai X X, Shao B, et al. Isolation of a thermostable trypsin inhibitor with exploitable potential[J]. European Food Research and Technology, 2013(237): 457-465.

[33] 田田. 黑豆多肽的制备及体外醒酒活性的研究[D]. 长春: 长春工业大学, 2014. (Tian T. Preparation and anti-alcoholism activity in vitro of black bean polypeptide [D]. Changchun: Changchun University of Technology, 2014. )

[34] 陈芬, 李莉, 陈鸣丽, 等. 醋豆与大豆脂肪酸含量的比较及营养学意义[J]. 生物技术, 2008, 18(1): 73-75. (Chen F, Li L, Chen M L, et al. Comparison of fatty acids(FA) in soybean after treating with vinegar and it's signification[J]. Biotechnology, 2008, 18(1): 73-75. )

[35] 陈芬, 徐国海, 万国华, 等. 大豆醋浸后蛋白质和氨基酸含量的变化[J]. 孝感学院学报, 2004, 24(3): 47-50. (Chen F, Xu G H, Wan G H, et al. Changing of contents of protein and amino acids of soybean after soaking with vinegar[J]. Journal of Xiaogan University, 2004, 24(3): 47-50. )