

球磨辅助酶解制备南瓜籽 ACE 抑制肽

杨晨¹, 孔凡¹, 雷芬芬^{1,2,3}, 何东平^{1,2,3}, 罗质^{1,2,3}

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 国家粮食局粮油资源综合开发工程技术研究中心, 武汉 430023; 3. 大宗粮油精深加工教育部重点实验室, 武汉 430023)

摘要:以南瓜籽蛋白为原料, 通过球磨预处理辅助酶解法制备血管紧张素转换酶(ACE)抑制肽。以 ACE 抑制率和水解度为评价指标, 对蛋白酶进行筛选。采用单因素试验研究球磨时间、酶解时间、底物质量浓度、pH 和酶解温度对酶解产物 ACE 抑制率和水解度的影响, 在此基础上, 以 ACE 抑制率为考察指标, 采用响应面法对球磨辅助酶解工艺条件进行优化。结果表明: 球磨预处理可显著提高南瓜籽蛋白的酶解效率; 最佳球磨辅助酶解工艺条件为选用碱性蛋白酶、球磨时间 6 min、酶解时间 10 h、底物质量浓度 0.08 g/mL、pH 8.5、酶解温度 55 °C, 在此条件下所得 ACE 抑制肽的 ACE 抑制率可达(86.65 ± 0.55)%。

关键词:南瓜籽; ACE 抑制肽; 球磨; 酶解

中图分类号: TS229; Q816

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2021)09-0022-06

Preparation of ACE inhibitory peptides from pumpkin seed using ball – milling assisted enzymolysis method

YANG Chen¹, KONG Fan¹, LEI Fenfen^{1,2,3}, HE Dongping^{1,2,3}, LUO Zhi^{1,2,3}

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 2. Grain and Oil Resources Comprehensive Exploitation and Engineering Technology Research Center of State Administration of Grain, Wuhan 430023, China; 3. Key Laboratory of Deep Processing of Major Grain and Oil, Ministry of Education, Wuhan 430023, China)

Abstract: Angiotensin – I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides were prepared from pumpkin seed protein using ball – milling assisted enzymolysis method. With ACE inhibition rate and degree of hydrolysis as indicators, the protease was screened and the effects of ball – milling time, enzymolysis time, substrate mass concentration, pH and enzymolysis temperature were studied by single factor experiment. Then the ball – milling assisted enzymolysis conditions were optimized by response surface methodology with ACE inhibition rate as indicator. The results showed that the enzymolysis efficiency of pumpkin seed protein could be improved significantly by ball – milling pretreatment. The optimal ball – milling assisted enzymolysis conditions were obtained as follows: using alkaline protease, ball – milling time 6 min, enzymolysis time 10 h, substrate mass concentration 0.08 g/mL, pH 8.5 and enzymolysis temperature 55 °C. Under these conditions, the ACE inhibition rate of ACE inhibitory peptides could reach (86.65 ± 0.55)%.

Key words: pumpkin seed; ACE inhibitory peptides; ball – milling; enzymolysis

收稿日期: 2020-10-30; 修回日期: 2021-05-19

基金项目: 湖北省技术创新专项重大项目(2019ABA117)

作者简介: 杨晨(1996), 女, 在读硕士, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白(E-mail)2547243071@qq.com。

通信作者: 雷芬芬, 讲师, 博士(E-mail)fiona_lei@126.com。

高血压是临床上一种常见病、多发病, 是冠心病、脑卒中等其他心脑血管疾病的最主要危险因素, 是严重危害人类身心健康的慢性疾病^[1-2]。目前, 治疗高血压主要以化学合成降压药物为主, 但服药后易出现副作用, 如引发干咳、皮疹、血管性水肿、蛋

白尿、白细胞减少和停药综合征等。生物活性肽的治疗效果虽然低于合成药物,但副作用小,具有天然、安全、营养、成本低等优点^[3]。血管紧张素转换酶(ACE)是一种多功能酶,其在体内肾素-血管紧张素系统和激肽释放酶-激肽系统中对血压的调节起着重要作用^[4]。所以,开发ACE抑制肽成为近年来的研究热点。

南瓜籽富含蛋白质、油脂、维生素、膳食纤维、矿物质和果胶等多种营养成分^[5-7]。近年来,我国对南瓜籽的开发利用多集中在南瓜籽油上^[8],作为南瓜籽制油后的副产物,南瓜籽粕中蛋白质含量丰富,但未得到有效的综合利用,造成了资源的浪费。

超微粉碎技术是利用机械或流体动力的方式克服固体内部凝聚力使之破碎,使物料的粒径达到10~25 μm的超微米水平,具有粉碎速度快、原料利用率高、污染小、粉体粒径小且均匀等特点^[9-10]。目前,超微粉碎技术可分为机械粉碎和化学合成粉碎两大类,机械粉碎又可分为干法粉碎和湿法粉碎,球磨粉碎既可用于干法粉碎又可用于湿法粉碎^[11-12]。研究发现,超微粉碎处理对鸡蛋蛋白质结构和功能特性有很大的影响,对于提高蛋白质资源的利用率有重要的应用价值^[13]。周志峰等^[14]研究表明,磨球超微粉碎,可改善蚕蛹蛋白功能特性。谭文等^[15]研究了球磨处理对鸡蛋清蛋白结构、性质及起泡性的影响,结果表明,适度球磨处理可以改变蛋清蛋白分子结构,提升其泡沫稳定性。Wang等^[16]研究了球磨对牡蛎蛋白粒径、构象、理化性质和体外蛋白消化率的影响,为球磨处理在牡蛎蛋白利用中的应用提供了理论依据。Liu等^[17]研究表明,适当的球磨处理可以改变大豆分离蛋白的理化性质,提高大豆分离蛋白的胶凝性能。但球磨处理南瓜籽蛋白的研究未见报道。

本文采用球磨辅助酶解法制备南瓜籽ACE抑制肽,并以ACE抑制率和水解度为指标对制备工艺进行优化,以期对南瓜籽蛋白的高效利用以及大规模生产提供基础数据及研究思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

南瓜籽粕,宝得瑞(湖北)健康产业有限公司提供;碱性蛋白酶(酶活力 2×10^5 U/g)、木瓜蛋白酶(酶活力 8×10^5 U/g)、中性蛋白酶(酶活力 2×10^5 U/g)、风味蛋白酶(酶活力 1.5×10^4 U/g),江苏锐阳生物科技有限公司;氨肽酶1(酶活力500 LAPU/g)、氨肽酶2(酶活力500 LAPU/g),天野酶

制剂(江苏)有限公司;N-[3-(2-咪唑基)丙烯酰]-L-苯丙氨酰-甘氨酸-甘氨酸(FAPGG)、血管紧张素转换酶(ACE),美国Sigma公司;其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

P-7 PL 微型行星式球磨机,德国飞驰(FRITSCH)仪器公司;LB941 酶标仪,德国 Berthold 公司;TDZ5-WS 台式离心机;HH-6 型数显恒温水浴锅;分析天平。

1.2 试验方法

1.2.1 南瓜籽蛋白的制备

取南瓜籽粕按照料液比1:5加水混合,调节pH为9.5,50℃水浴处理2h,冷却至室温后,2810×g离心10min,取上清液,调节上清液pH为4.5,50℃水浴处理2h,冷却至室温后,2810×g离心10min,取沉淀,用蒸馏水水洗沉淀至中性后,真空冷冻干燥即为南瓜籽蛋白,经测定蛋白质含量达98%左右。

1.2.2 南瓜籽ACE抑制肽的制备

将南瓜籽蛋白球磨处理一定时间。称取一定量的球磨处理后的南瓜籽蛋白,用蒸馏水溶解,调节底物质量浓度,滴加1 mol/L的NaOH溶液调节pH,加入一定量的酶(酶添加量为南瓜籽蛋白质量的2%)后在一定温度水浴锅中酶解一定时间。酶解结束后,沸水浴灭酶15min。冷却后2810×g离心15min,取上清液冷藏备用。

1.2.3 ACE抑制率的测定

参照罗鹏^[18]的方法,略有改动,借助酶标仪测定南瓜籽ACE抑制肽的ACE抑制率。配制0.1 mol/L的硼酸缓冲液(pH 8.3,含0.3 mol/L NaCl),利用缓冲液分别配制0.1 mol/L的FAPGG溶液和0.1 U/mL的ACE溶液。在96孔板样品孔中添加ACE溶液20 μL、FAPGG溶液100 μL和样品溶液40 μL(酶解液稀释50倍),空白孔中添加ACE溶液20 μL、FAPGG溶液100 μL和硼酸缓冲液40 μL。在340 nm波长处测定样品孔和空白孔的吸光度,分别为 A_1 和 B_1 ,37℃恒温反应30min后再次测定样品孔和空白孔的吸光度,分别为 A_2 和 B_2 。按式(1)计算ACE抑制率(Y)。

$$Y = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{B_1 - B_2}\right) \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 水解度(DH)的测定

南瓜籽蛋白的水解度(DH)为氨态氮占总氮的比例。

氨态氮含量的测定采用甲醛滴定法^[19]。取南

瓜籽蛋白酶解液 5 mL 于小烧杯中,加入 25 mL 蒸馏水,磁力搅拌并用精密 pH 计测量 pH。先用 0.05 mol/L NaOH 溶液调节 pH 为 8.2,加入中性甲醛溶液 10 mL,再用 0.05 mol/L NaOH 溶液调节 pH 为 9.2,记录溶液从 pH 8.2 至 pH 9.2 消耗的 NaOH 溶液体积。以 30 mL 蒸馏水作空白并按式(2)计算酶解液中氨态氮含量。

$$X = \frac{C \times (V_1 - V_2) \times 14}{V_3} \quad (2)$$

式中: X 为样品中氨态氮的含量,mg/mL; C 为 NaOH 溶液的浓度,mol/L; V_1 为样品加入甲醛后消耗 NaOH 溶液的体积,mL; V_2 为试剂空白加入甲醛后消耗 NaOH 溶液的体积,mL; V_3 为样品稀释液取用量,mL;14 为氮的摩尔质量,g/mol。

总氮含量的测定采用 GB 5009.5—2016 凯氏定氮法。

1.2.5 数据处理

运用 SPSS 17.0 统计软件做方差分析(ANOVA),用 Duncan 多重比较法进行显著性检验。应用 Origin8.5 进行数据整理、作图,响应面实验数据采用 Design Expert 8.0 软件分析。

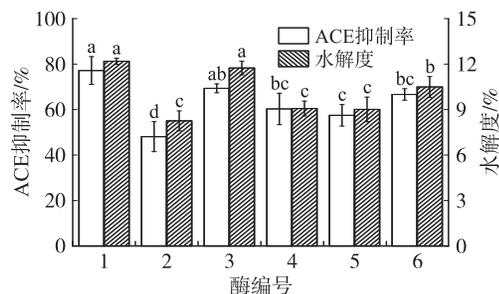
2 结果与分析

2.1 酶的筛选

以南瓜籽蛋白为原料,选取 6 种酶并分别在其最适条件下进行酶解,分别为碱性蛋白酶(pH 8.5, 55 °C)、木瓜蛋白酶(pH 7.0, 55 °C)、中性蛋白酶(pH 7.0, 50 °C)、碱性蛋白酶+风味蛋白酶(添加比例 1:1, pH 8.5, 55 °C)、碱性蛋白酶+氨肽酶 1(添加比例 1:1, pH 8.5, 55 °C)、碱性蛋白酶+氨肽酶 2(添加比例 1:1, pH 8.5, 55 °C)。在酶添加量 2%、酶解时间 8 h、底物质量浓度 0.08 g/mL 条件下,以 ACE 抑制率和水解度为评价指标,筛选南瓜籽蛋白制备 ACE 抑制肽的最佳酶,结果见图 1。

由图 1 可知,南瓜籽蛋白的酶解产物对 ACE 均有抑制效果,不同酶解产物的 ACE 抑制率和水解度存在一定的差异,其中碱性蛋白酶酶解产物的 ACE 抑制率和水解度均最高,分别为 77.17% 和 12.19%,其次为中性蛋白酶,分别为 69.36% 和 11.74%。且碱性蛋白酶和中性蛋白酶酶解产物的 ACE 抑制率显著高于其他酶的酶解产物($p < 0.05$)。而碱性蛋白酶与风味蛋白酶、氨肽酶 1、氨肽酶 2 复合酶酶解产物的 ACE 抑制率较低,这可能是因为复合酶在酶解南瓜籽蛋白过程中使具有 ACE 抑制活性的肽段降解成更小的肽段或氨基酸

从而导致 ACE 抑制活性降低^[20]。因此,选择碱性蛋白酶进行后续南瓜籽蛋白酶解条件的优化。



注:1. 碱性蛋白酶;2. 木瓜蛋白酶;3. 中性蛋白酶;4. 碱性蛋白酶+风味蛋白酶;5. 碱性蛋白酶+氨肽酶 1;6. 碱性蛋白酶+氨肽酶 2;同一指标不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。下同

图 1 不同酶对南瓜籽蛋白酶解产物 ACE 抑制率和水解度的影响

2.2 单因素试验

2.2.1 球磨时间对南瓜籽蛋白酶解产物 ACE 抑制率及水解度的影响

采用碱性蛋白酶,在酶解温度 55 °C、pH 8.0、酶解时间 8 h、底物质量浓度 0.08 g/mL 条件下,考察球磨时间对酶解产物 ACE 抑制率及水解度的影响,结果见图 2。

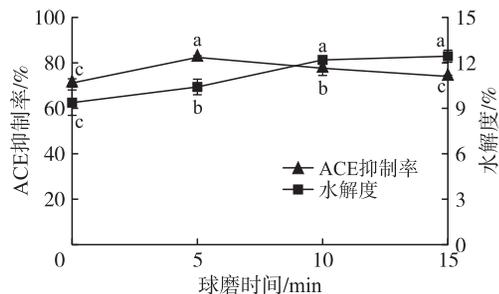


图 2 球磨时间对酶解产物 ACE 抑制率和水解度的影响

由图 2 可知,与未球磨预处理(0 min)相比,南瓜籽蛋白进行球磨处理 5 min 后酶解液的 ACE 抑制率和水解度都显著增大($p < 0.05$)。酶解产物的 ACE 抑制率在 5 min 时达到最大值(82.42%),比未经球磨预处理提高了 11.13 个百分点,此时水解度也提高了 1.03 个百分点,这可能是因为球磨处理时的压力和摩擦作用使南瓜籽蛋白的结构发生了变化,有利于碱性蛋白酶的水解,得到了更多碳末端为脯氨酸或芳香氨基酸的多肽,而氮末端是疏水性氨基酸的多肽具有 ACE 抑制活性^[21]。当球磨时间超过 5 min 后,酶解产物的 ACE 抑制率开始下降,表明过长的球磨时间并不利于 ACE 抑制肽的生成。谭文等^[15]的研究结果表明,鸡蛋蛋清蛋白在受到球磨作用后,其二级结构发生改变,但当球磨时间过长

后, α -螺旋含量开始增加, 可能是因为过度球磨处理使蛋白质分子发生聚集。因此, 选择最佳球磨时间为 5 min。

2.2.2 酶解时间对南瓜籽蛋白酶解产物 ACE 抑制率和水解度的影响

采用碱性蛋白酶, 在球磨时间 10 min、酶解温度 55 °C、pH 8.0、底物质量浓度 0.08 g/mL 条件下, 考察酶解时间对酶解产物 ACE 抑制率及水解度的影响, 结果见图 3。

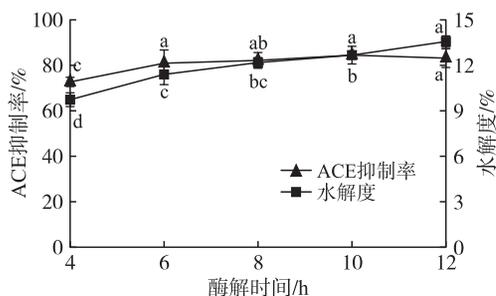


图3 酶解时间对酶解产物 ACE 抑制率和水解度的影响

由图 3 可知, 随着酶解时间的延长, 南瓜籽蛋白酶解产物的 ACE 抑制率先升高后趋于稳定, 在酶解时间为 10 h 时达到最大, 水解度则随着酶解时间的延长不断升高 ($p < 0.05$)。由于在酶解时间为 6 h 和 10 h 时, 酶解产物的 ACE 抑制率变化不显著 ($p > 0.05$), 因此为节约时间成本, 选择最佳酶解时间为 6 h。

2.2.3 底物质量浓度对南瓜籽蛋白酶解产物 ACE 抑制率和水解度的影响

采用碱性蛋白酶, 在球磨时间 10 min、酶解温度 55 °C、pH 8.0、酶解时间 8 h 条件下, 考察底物质量浓度对酶解产物 ACE 抑制率及水解度的影响, 结果见图 4。

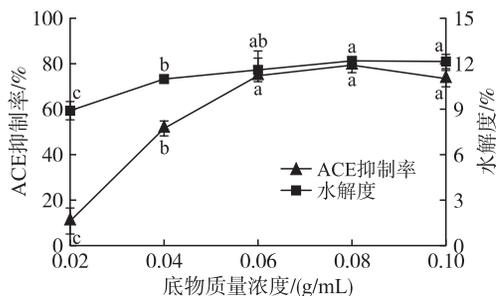


图4 底物质量浓度对酶解产物 ACE 抑制率和水解度的影响

由图 4 可知, 在底物质量浓度从 0.02 g/mL 增加到 0.08 g/mL 时, 南瓜籽蛋白酶解产物的 ACE 抑制率和水解度逐渐增加, 且变化显著 ($p < 0.05$)。当底物质量浓度为 0.08 g/mL 时, ACE 抑制率和水

解度均最高; 之后随着底物质量浓度的增加, ACE 抑制率开始下降但变化不显著 ($p > 0.05$), 水解度无明显变化。当底物质量浓度较小时, 增加底物质量浓度可以使酶与底物更加充分地结合, 从而提高总体水解速率, 水解生成更多 ACE 抑制肽, 使水解产物的 ACE 抑制率和水解度增大^[22]; 但当底物质量浓度过高时, 会使酶解体系黏度增大, 影响了酶与底物的结合从而影响了酶解反应的进行, 导致 ACE 抑制率下降。因此, 选择最佳底物质量浓度为 0.08 g/mL。

2.2.4 pH 对南瓜籽蛋白酶解产物 ACE 抑制率和水解度的影响

采用碱性蛋白酶, 在球磨时间 10 min、酶解温度 55 °C、酶解时间 8 h、底物质量浓度 0.08 g/mL 条件下, 考察 pH 对酶解产物 ACE 抑制率及水解度的影响, 结果见图 5。

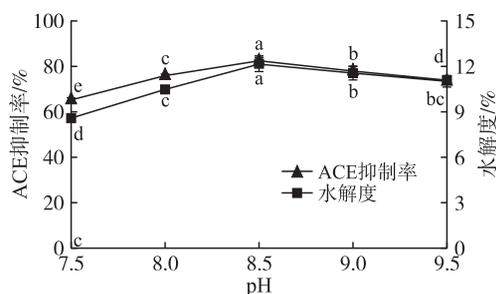


图5 pH 对酶解产物 ACE 抑制率和水解度的影响

由图 5 可知, 随着酶解体系 pH 的升高, 南瓜籽蛋白酶解产物的 ACE 抑制率和水解度也逐渐升高, 且变化显著 ($p < 0.05$), 在 pH 8.5 时达到最高值, 继续增大 pH, ACE 抑制率和水解度反而下降。这可能是因为 pH 过低或过高都会影响碱性蛋白酶的活力, 不利于酶解, 从而影响了其作用效果^[23]。因此, 选择最佳 pH 为 8.5。

2.2.5 酶解温度对南瓜籽蛋白酶解产物 ACE 抑制率和水解度的影响

采用碱性蛋白酶, 在球磨时间 10 min、pH 8.0、酶解时间 8 h、底物质量浓度 0.08 g/mL 条件下, 考察酶解温度对酶解产物 ACE 抑制率及水解度的影响, 结果见图 6。

由图 6 可知, 随着酶解温度的升高, 南瓜籽蛋白酶解产物 ACE 抑制率和水解度都呈现出先升高后降低的趋势, 在酶解温度为 55 °C 时, ACE 抑制率和水解度均最大, 这可能是因为在一一定的温度范围内随着温度的升高有利于酶解反应的进行, 但温度过高后, 酶在高温下发生了不可逆变性, 活性减弱, 从而降低了酶的催化效率。此外, 在较高的温度下, 热

失活速率的增加导致活性催化剂分子数量减少得更快,使得酶解产物的 ACE 抑制率和水解度下降^[24]。因此,选择最佳酶解温度为 55℃。

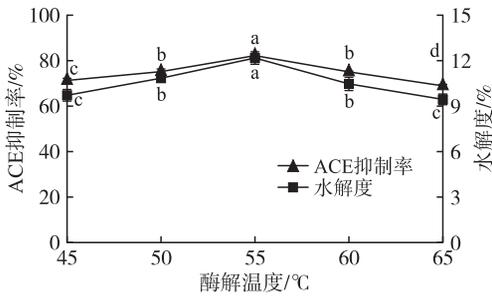


图6 酶解温度对酶解产物 ACE 抑制率和水解度的影响

2.3 响应面优化试验

2.3.1 响应面回归模型的建立与分析

在单因素试验的基础上,采用碱性蛋白酶对样品进行酶解。固定酶解温度 55℃、pH 8.5, 根据 Box - Behnken 试验设计原理,选取对 ACE 抑制率影响较大的 3 个考察因素底物质量浓度(X_1)、酶解时间(X_2)和球磨时间(X_3)为自变量,以 ACE 抑制率(Y)为响应值,采用三因素三水平的响应面分析法进行试验设计,响应面因素水平见表 1,响应面因素设计及其结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 响应面因素水平

水平	X_1 底物质量浓度 / (g/mL)	X_2 酶解时间 / h	X_3 球磨时间 / min
-1	0.06	6	0
0	0.08	8	5
1	0.10	10	10

表 2 响应面因素设计及其结果

试验号	X_1	X_2	X_3	Y / %
1	0	-1	1	80.36
2	0	1	1	84.25
3	1	0	-1	75.42
4	-1	-1	0	81.56
5	0	0	0	85.99
6	0	-1	-1	77.49
7	-1	0	1	80.67
8	1	1	0	81.56
9	0	0	0	85.34
10	1	0	1	74.21
11	-1	0	-1	74.35
12	1	-1	0	78.18
13	0	0	0	85.64
14	0	1	-1	79.01
15	0	0	0	85.20
16	0	0	0	84.95
17	-1	1	0	82.98

表 3 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	257.97	9	28.66	107.64	<0.000 1**
X_1	12.98	1	12.98	48.74	0.000 2**
X_2	13.03	1	13.03	48.94	0.000 2**
X_3	21.85	1	21.85	82.04	<0.000 1**
X_1X_2	0.96	1	0.96	3.61	0.099 3
X_1X_3	14.18	1	14.18	53.23	0.000 2**
X_2X_3	1.40	1	1.40	5.27	0.055 3
X_1^2	75.50	1	75.50	283.53	<0.000 1**
X_2^2	0.06	1	0.06	0.23	0.649 1
X_3^2	106.40	1	106.40	399.59	<0.000 1**
残差	1.86	7	0.27		
失拟项	1.22	3	0.41	2.50	0.198 9
误差	0.65	4	0.16		
总和	259.83	16			

注: * 表示差异显著($p < 0.05$); ** 表示差异极显著($p < 0.01$)。

通过表 2 进行响应面分析,得到相应的 ACE 抑制率的回归方程为: $Y = 11.75 + 1.626.24X_1 - 0.16X_2 + 3.37X_3 + 12.25X_1X_2 - 18.83X_1X_3 + 0.06X_2X_3 - 10.586.25X_1^2 - 0.03X_2^2 - 0.20X_3^2$ 。

由表 3 可知:回归模型 $p < 0.000 1$,表明该模型极显著;失拟项 p 为 0.198 9,大于 0.05,差异不显著,表明该模型拟合度良好,可以用于优化南瓜籽蛋白酶解制备 ACE 抑制肽的工艺;该模型的确定系数(R^2)为 0.992 8,校正系数(R_{adj}^2)为 0.983 6,说明不确定因素对试验结果的干扰较小,ACE 抑制率的变化有 99.28% 来源于所选变量,模型与实际试验拟合较好;变异系数为 0.64%,说明模型的置信度高,因此可以用此模型分析和预测南瓜籽蛋白酶解制备 ACE 抑制肽的情况。根据 F 值得出各因素对南瓜籽蛋白酶解产物 ACE 抑制率的影响从大到小依次为球磨时间(X_3) > 酶解时间(X_2) > 底物质量浓度(X_1)。模型中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1X_3 、 X_1^2 、 X_3^2 对 ACE 抑制率的影响极显著($p < 0.01$), X_1X_2 、 X_2X_3 、 X_2^2 对 ACE 抑制率的影响不显著($p > 0.05$),表明各个因素之间存在一定的交互作用,不是简单的线性关系。

通过模型优化得出南瓜籽蛋白酶解制备 ACE 抑制肽的最优条件为:底物质量浓度 0.08 g/mL,酶解时间 10 h,球磨时间 6.25 min。在最优条件下,ACE 抑制率理论值为 86.92%。

2.3.2 验证试验

为检验响应面模型的准确性,根据上述优化的酶解条件进行验证试验,考虑到方便实际操作,将参数修正为底物质量浓度 0.08 g/mL、酶解时间 10 h、

球磨时间 6 min、酶解温度 55 °C、pH 8.5, 经过 3 次平行试验, ACE 抑制率的平均值为 (86.65 ± 0.55)%, 与模型的理论值相对误差为 0.31%, 说明该模型优化得到的南瓜籽蛋白酶解制备 ACE 抑制肽的工艺参数是准确可靠的。

3 结论

本研究以南瓜籽蛋白为原料, 将球磨技术应用到南瓜籽 ACE 抑制肽的制备中, 通过比较不同酶酶解产物的 ACE 抑制率和水解度, 选用碱性蛋白酶进行后续酶解工艺的优化试验。在单因素试验的基础上, 以 ACE 抑制率为考察指标, 通过响应面法优化得到南瓜籽蛋白制备 ACE 抑制肽最优工艺条件为球磨时间 6 min、酶解时间 10 h、底物质量浓度 0.08 g/mL、pH 8.5、酶解温度 55 °C, 在此条件下 ACE 抑制率为 (86.65 ± 0.55)%。本试验结果表明球磨辅助处理后南瓜籽蛋白酶解产物的 ACE 抑制率显著高于未经处理的酶解产物, 证明了球磨处理在辅助酶解南瓜籽蛋白制备 ACE 抑制肽的研究中能有效提高酶解效率, 为球磨辅助酶法制备南瓜籽 ACE 抑制肽提供了理论依据, 对南瓜籽蛋白的进一步开发利用具有重要参考价值。

参考文献:

- [1] 胡建功, 何朝, 赵莹颖, 等. 不同年龄段高血压患者服药依从性调查及影响因素[J]. 公共卫生与预防医学, 2019, 30(5): 133 - 137.
- [2] 吴敏云, 姚慧珍, 杨庆业, 等. 产次对衢州市柯城地区农村妇女高血压患病影响的调查研究[J]. 中国预防医学杂志, 2019, 20(9): 850 - 852.
- [3] 贾婵媛, 陈彬合. 大豆降压肽的研究进展[J]. 食品与药品, 2017, 19(1): 62 - 66.
- [4] 任锦, 曹刚, 张瑞洁, 等. ACE 抑制肽的合成及其活性研究[J]. 药学学报, 2011, 46(1): 58 - 63.
- [5] 贾晓军, 王和平, 岳青, 等. 鲜食南瓜组合农艺性状与产量的相关性分析[J]. 北方园艺, 2019(3): 22 - 28.
- [6] 王丽波, 程龙, 徐雅琴, 等. 南瓜籽多糖热水提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 农业工程学报, 2016, 32(9): 284 - 290.
- [7] SADEGHI A, EBRAHIMI M, RAEISI M, et al. Improving the antioxidant capacity of bread rolls by controlled fermentation of rice bran and addition of pumpkin (*Cucurbita pepo*) puree[J]. J Food Meas Charact, 2019, 13(4): 2837 - 2845.
- [8] 唐蔚, 宁奇, 孙培冬. 南瓜籽抗氧化肽的制备及分离纯化[J]. 中国油脂, 2016, 41(2): 20 - 24.
- [9] 郭妍婷, 黄雪, 陈曼, 等. 超微粉碎技术的应用研究进展[J]. 广东化工, 2016, 43(16): 276 - 277.
- [10] ZHU K X, HUANG S, PENG W, et al. Effect of ultrafine grinding on hydration and antioxidant properties of wheat bran dietary fiber[J]. Food Res Int, 2010, 43(4): 943 - 948.
- [11] 郭武汉, 关二旗, 卞科. 超微粉碎技术应用研究进展[J]. 粮食与饲料工业, 2015(5): 38 - 40.
- [12] 杨春瑜, 柳双双, 梁佳钰, 等. 超微粉碎对食品理化性质影响的研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(1): 220 - 224.
- [13] 于翠平, 查越, 吴凡, 等. 超微粉碎技术对蛋白质理化及功能性质影响的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(2): 360 - 365.
- [14] 周志峰, 任子旭, 贾俊强, 等. 磨球超微粉碎改性蚕蛹蛋白的工艺优化及功能特性[J]. 江苏大学学报(自然科学版), 2015, 36(6): 679 - 685.
- [15] 谭文, 张钦俊, 万鹏宇, 等. 球磨处理对鸡蛋蛋白结构、性质及起泡性的影响[J/OL]. 食品科学[2020 - 10 - 30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200924.1333.002.html>.
- [16] WANG Z Y, CHANG S J, LI Y J, et al. Effects of ball milling treatment on physicochemical properties and digestibility of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) protein powder[J/OL]. Food Sci Nutr, 2018, 6(6)[2020 - 10 - 30]. <https://doi.org/10.1002/fsn3.705>.
- [17] LIU B H, WANG H, HU T, et al. Ball - milling changed the physicochemical properties of SPI and its cold - set gels[J]. J Food Eng, 2017, 195: 158 - 165.
- [18] 罗鹏. 葵花籽 ACE 抑制肽的分离纯化、结构分析与稳态化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [19] 刘东伟, 袁玮琼, 柳梅, 等. 核桃粕蛋白抑菌肽的制备工艺及纯化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 185 - 191.
- [20] 吴红洋, 姜太玲, 胡惠茗, 等. 响应面法优化酶解花椒籽蛋白制备降压肽工艺[J]. 食品科学, 2014, 35(21): 180 - 185.
- [21] 刘佳, 王兴国, 杨严俊. 酶法制备大豆蛋白降压肽的研究[J]. 中国油脂, 2008, 33(9): 6 - 9.
- [22] LI M Q, XIA S W, ZHANG Y J, et al. Optimization of ACE inhibitory peptides from black soybean by microwave - assisted enzymatic method and study on its stability[J]. LWT - Food Sci Technol, 2018, 98: 358 - 365.
- [23] 卢娣, 吴庆智, 毛晓英, 等. 响应面法优化核桃降压肽的酶解工艺研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(11): 233 - 238.
- [24] WANG X Q, YU H H, XING R G, et al. Optimization of oyster (*Crassostrea talienwhanensis*) protein hydrolysates using response surface methodology[J/OL]. Molecules, 2020, 25(12): 2844[2020 - 10 - 30]. <https://doi.org/10.3390/molecules22122.844>.