

食品源性降血压活性肽的研究进展

沈 亮^{1,2}

(1. 生物技术与生物资源利用山东省高校重点实验室, 生命科学学院, 德州学院, 山东德州 253023;
2. 山东省功能大分子重点实验室, 德州学院, 山东德州 253023)

摘要: 食源性生物活性肽具有提升人体的健康状况以及治疗多种疾病的功能, 尤其是调节血压的能力已经得到了证实。研究表明这些多肽的药理作用和其本身的结构相关, 还取决于目标组织对它们的吸收和利用的效率。文章总结了一些重要的抗高血压多肽和功能性食品的降压效果, 降压的分子机制, 影响因素, 多肽的制备分离等内容。结果表明, 未来的研究将集中在生物活性肽在受试患者体内降血压作用的评价、生物利用度和药代动力学方面。

关键词: 降血压活性肽, 功能性食品, 高血压, 降压分子机制

Research progress in food protein-derived antihypertensive peptides

SHEN Liang^{1,2}

(1. Key Laboratory of Biotechnology and Biological Resource Utilization in Universities of Shandong,
College of Life Science, Dezhou University, Dezhou 253023, China;

2. Key Laboratory of Functional Macromolecular Biophysics of Shandong, Dezhou University, Dezhou 253023, China)

Abstract: Bioactive peptides (BAPs), derived through enzymatic hydrolysis of food proteins, have demonstrated potential for application as health-promoting agents against numerous human health and disease conditions, especially regulation of blood pressure (BP). The feasibility of pharmacological application of these peptides depends on absorption and bioavailability in intact forms in target tissues, which in turn depends on structure of the peptides. In this article, the literature on antihypertensive peptides and functional food were reviewed, with emphasis on BP-lowering activity, molecular mechanisms of BP-lowering, influencing factors, and the methods of production and purification, etc. The future research efforts on BAPs should be directed toward evaluation of health-promoting effects *in vivo*, bioavailability and pharmacokinetics in human subjects.

Key words: antihypertensive peptides; functional food; hypertension; molecular mechanisms of BP-lowering

中图分类号: TS201

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)14-390-05

生物活性肽是指超越正常合理的营养功能并具有明显药理活性的食物蛋白衍生肽。研究表明, 来源于食物蛋白酶解的多肽中有许多具有显著的降血压活性功能。在预防或是控制人体疾病的过程中, 人们已经开始使用含有这些生物活性肽的功能性和保健性食品作为化学治疗的辅助手段。高血压是困扰全球的一种心血管疾病, 同时也是诱发冠心病、肾衰竭的因素之一。《2012年世界卫生统计》报告, 全球1/3的成年人患有高血压, 这种病症的死亡人数约等于中风和心脏病所导致的总死亡人数的一半。中国卫生部2012年4月出版的《中国心血管病报告2011》显示, 心血管病早就远超癌症, 达到中国总死亡构成的41%。目前, 治疗高血压主要以化学合成的降压药物为主, 但服药后易引起低血压、心动过缓、呕吐等副作用。通常情况下, 生物活性肽的治疗效果要低于合

成的药物, 但它具有很多优点, 如: 天然、安全、健康、低成本等。另外, 它们既可以作为肽的来源, 同时本身也具有很高的营养价值, 能提供多种人体必需氨基酸。所以这方面的研究发展非常迅速, 逐渐成为现代食品工业研究的焦点领域之一。目前的文献中涉及多肽的范围很广, 主要的来源是动植物性蛋白, 包含了从低分子量双肽、三肽、寡肽到大分子量的多聚肽^[1]。添加了生物活性肽用来提高机体健康的功能食品已经被开发出来, 而且有些已经开始了商业化的生产销售^[2-4]。下面我们将对具有降血压功能的生物活性肽的研究和利用情况作一个简单回顾。

1 血压的生理性调节

血压的生理性调节是通过肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 和缓激肽-一氧化氮系统 (kinin-nitric oxide (NO) system) 的作用。RAS系统原理是通过肾素的蛋白水解作用将血管紧张素原转变为血管紧张素-I (angiotensin-I, AT-I)。这是RAS途径的第一个反应, 也是限速步骤。然后, 在血管紧张素I型转化酶 (angiotensin I-converting enzyme, ACE) 的作用下, AT-I的C末端组氨酸残基被切下, AT-I转化为AT-II。AT-II具有很强的血管收缩功能,

收稿日期: 2013-02-19

作者简介: 沈亮(1975-), 男, 硕士研究生, 副教授, 研究方向: 微生物发酵工程, 天然药物。

基金项目: 山东省星火计划(2011XH13005); 山东省科技攻关计划项目(2011YD10008); 德州市科技发展计划项目(2011B04)。

可以通过与遍布全身组织的受体结合,引起生理级联反应,导致血管收缩,从而维持正常的血压。然而在病理状态下,过多的AT-II会导致血管过度收缩,并且限制了血管的放松,从而生产高血压。

kinin-NO system中,缓激肽通过引发一系列的反应来达到降压的作用。缓激肽提高细胞内Ca²⁺浓度导致一氧化氮合酶(nitric oxide synthases, NOS)被激活,其产生的NO具有很强的血管扩张作用,导致血压降低。ACE能够降解缓激肽,所以,ACE的浓度增加会导致双重作用来提高血压,即阻止血管舒张和激活血管收缩。因此,在高血压的治疗中已经开始采用ACE的抑制剂^[9]。此外,由于AT-I在一些组织中可以通过同ACE无关的替代途径转化为AT-II,所以通过直接抑制肾素来阻止AT-I的合成,可能会比使用ACE抑制剂降血压的效果更好^[6]。

2 食源性生物活性肽降压机制的研究

2.1 降压活性肽的ACE抑制机制

具有RAS调节功能的食源多肽主要是通过抑制ACE活性起作用。首创性的工作是对矛头腹蛇毒液中自然产生的ACE抑制型抗高血压多肽的研究^[7-8]。这项工作开启了后续对食物蛋白源性抗高血压衍生肽的研究序幕。到今天为止,通过文献报道的食物源性ACE抑制多肽的来源涵盖了很多动植物性食物蛋白,尤其是牛奶、鱼、蛋,还有大豆蛋白^[9-11]。

食源性抗高血压多肽产品的生产技术,也已经有了相关的研究报道^[12]。其中一些多肽的氨基酸序列和相关的生物学活性已经得到了研究和鉴定。据报道,α1-酪蛋白来源的Val-Ala-Pro(f25~27),β-酪蛋白来源的Ile-Pro-Pro(f74~76)和Val-Pro-Pro(f84~86)使ACE活性降低50%(IC₅₀)的最低浓度分别是2、5、9μmol/L^[9,13]。Sato等^[14]通过研究得到了食源性多肽ACE抑制活性的竞争性抑制生理机制,一些食源性多肽能够结合到ACE的催化位点,同AT-I形成竞争,从而造成ACE的活性下降;此外,还有一些多肽则是通过非竞争(比如,Leu-Trp和Ile-Tyr)或反竞争(比如,Ile-Trp和Phe-Tyr)模式抑制ACE活性。非竞争模式是多肽结合到ACE的非催化位点,导致酶的构象发生改变,反竞争模式是抑制剂与底物和酶生成中间复合物结合,而引起的抑制作用,从而降低了酶的活性。这说明即便是仅有一个氨基酸的不同,甚至是同分异构体,也可以极大地影响肽和ACE之间的相互作用。

食源性生物活性肽的特殊活性主要是依赖于它们的氨基酸残基性质,包括:链长、疏水性、分子电荷和侧链蓬松度等^[4]。随着对活性肽生理功能结构基础的了解,更多具有明显降压生理活性的多肽被发现。对多肽抑制ACE的分子机制的进一步研究表明,多肽的疏水氨基酸残基是其功能的重要结构要点。Wu等^[15-16]利用偏最小二乘投影(PLS)法对多肽潜在结构的定量构效关系进行分析表明,C-末端庞大的疏水性氨基酸(例如Pro、Trp、Phe和Tyr)和N-末端脂肪族氨基酸(例如Leu、Ile和Val)是二肽和三肽ACE抑制活性的必要结构,并且C-末端(分别包含4~

10个氨基酸)的最后4个疏水性氨基酸残基是ACE抑制活性的关键结构。此外,多肽的C-末端氨基酸残基ε-氨基上带正电荷(例如,Arg和Lys),也会表现出ACE的抑制活性,原因可能是它们能够和ACE上非活性中心的阴离子位点结合,从而引起ACE结构的变化^[17]。

2.2 降压活性多的肽肾素抑制机制

研究表明除了对ACE的抑制,某些食源性多肽还可以抑制肾素的活性。这种新的具有降血压活性的食源性多肽有可能为高血压患者提供更好的治疗方法。最早的工作是,Udenigwe等^[18]用不同的蛋白酶水解亚麻籽蛋白质,然后超滤得到低分子量(<1ku)的多肽片段,这些片段表现出温和的肾素抑制活性(IC₅₀为1.22~2.81mg/mL)。在低浓度下,这些肽的组分在试管混合抑制模型中表现出肾素抑制活性,同时也检测出明显的ACE抑制活性。因此,它们对ACE和肾素具有双重抑制的功能,这样的结果预示着它们可能具有更好的降压效果。在其他的研究中,麻仁和豌豆蛋白的酶解液中也分离到了肾素抑制剂。Girgih等^[19]通过体外模拟胃肠消化麻仁蛋白的过程,证明了其水解物具有抑制肾素(IC₅₀为0.81mg/mL)和ACE(IC₅₀为0.67mg/mL)的活性。其中粗蛋白水解产物比未水解的麻仁蛋白,或是相同分子量的多肽组分,具有更强的肾素抑制活性。2010年Li和Aluko^[20]从碱性蛋白酶制备的豌豆蛋白水解产物中分离到3个二肽(Ile-Arg、Lys-Phe和Glu-Phe)表现出,较弱的温和的肾素抑制活性(IC₅₀分别是9.2、17.8、22.6mmol/L)。另外,这些二肽的肾素抑制活性比粗肽低,这个事实表明活性肽间可能存在着协同作用。豌豆蛋白水解产物中具有肾素和ACE抑制活性的二肽序列已经被分离和分析^[15,20-21]。利用这些数据,通过偏最小二乘(PLS)化学计量计算,并结合实验研究得到了具有肾素抑制活性的二肽所必须的结构特征。Udenigwe等^[21]的研究表明,多肽N-末端疏水的低分子量氨基酸(例如Ile、Leu、Ala、Val)和C-末端庞大的芳香族氨基酸(例如Trp、Phe、Tyr)的存在是抑制肾素活性的必需结构。因此,尽管ACE和肾素抑制作用没有什么直接关系,但是具有ACE抑制功能的二肽和肾素抑制二肽在结构特征上却是相似的。Sato等^[14]通过PLS计算证明,抗高血压二肽(Ile-Trp)是最有效的肾素抑制,同时也是有效的ACE抑制剂。在此基础上推测,双效的RAS酶调节活性可能就是源于食源性多肽中所含的Ile-Trp的降血压活性。

3 食源性多肽在体内的降血压研究

在活体实验中,食源性生物活性肽同样表现出了降压活性。Girgih等^[19]用大麻籽蛋白水解物(含ACE,肾素抑制肽),按200mg/kg体重对自发性高血压大鼠进行灌胃实验,8h后大鼠收缩压(systolic BP, SBP)明显下降30mmHg。乳源三肽Ile-Pro-Pro和Val-Pro-Pro,是发酵乳降压产品可尔必思(Calpis日本)和埃沃露丝(Evolus芬兰)主要的活性成分。Nakamura等^[13]的研究发现,这两种三肽分别导致原发性高血压大鼠血压降低28.3、32.1mmHg。Hata等^[22]的研究发

现,患轻度高血压受试者,按95mL/d食用Calpis乳酸产品8周后,SBP降低14.1mmHg和舒张压(diastolic BP, DBP)降低6.9mmHg。此外,一项由70名白种人一级高血压受试者参与的实验表明,每天食用Ile-Pro-Pro 7.5mg,4周以后SBP和DBP分别降低3.8mmHg和2.3mmHg^[23]。水解乳清蛋白(BioZate)具有降压作用,患高血压的志愿者按20g/d的食用量,6周后,SBP和DBP分别降低11mmHg和7mmHg^[24]。在近期的研究中也有一些和以上实验结果不一致的结论。Van Mierlo等^[25],Usinger等^[26]研究发现,一些含乳源三肽的降压产品在轻度高血压患者中的使用效果并不明显,使用这些产品的高血压患者的24h动态血压监测(ambulatory BP monitoring, ABPM)数据(相对于单点的临床/实验室测量,ABPM血压测量方法可以提供更精确的数据)证明这些产品缺乏显著的降血压活性。Van Mierlo等^[25]研究发现,乳源三肽的降压产品对白种人ABPM数据变化基本没有影响,但对亚洲人降压作用明显。

以上研究表明,在体内环境中,多肽应该具有一定的降压效果,但会受到人体内各种复杂因素的影响。除了受到多肽本身具备的降压活性影响外,还可能和食用剂量、实验持续时间、输送系统、人种及个体遗传特征、患者高血级别,甚至饮食结构等多种因素相关。另外,同传统的降压药物相比,多肽的降压过程更加温和平稳,需要一段时间才能表现出来,有利于人体对血压的变化的适应。

食源蛋白衍生肽抑制ACE或肾素的生理活动,最终导致AT-II循环量减少,同时缓激肽水平升高血管扩张,从而引起血压的降低^[27-28]。Kawasaki等^[29]的实验中,轻度高血压的受试者,口服100mL(含有3mg Val-Tyr)饮料,每天2次,连续4周,导致血浆中的AT-II和醛固酮减少,AT-I增加,同时SBP相应减少9.3mmHg。这说明Val-Tyr在体内可以抑制ACE,从而起到降压的作用。然而,在Boelsma等^[23]的研究中,轻度高血压患者服用了含乳源三肽(Ile-Pro-Pro)的药物后,尽管检测到了血压的下降,但血浆中AT-I, AT-II,和肾素活性并没有出现显著变化。这表明生物活性肽在机体内的降压作用,可能存在其他的替代路线。Barba de la Rosa等^[30]的研究的一项研究表明,菟属谷蛋白的胰蛋白酶消化产物(含ACE抑制多肽)可以诱导血管内皮细胞产生NOS,激活NO合成,合成的NO同步诱导离体大鼠主动脉平滑肌松弛。内皮细胞NOS上的Ser117残基是这些多肽的特定的作用位点,活性多肽可使Ser117残基磷酸化从而表现出显著的降压活性。这也证明了食源性多肽的降压活性可以通过调节RAS酶活性以外的其他途径介导。因此,在体内复杂环境下多肽的降价机制还有待进一步的研究。

4 Meta-分析

许多食源多肽降血压的研究中使用了Meta-分析。Meta-分析是指用统计学方法对收集的多个研究资料进行分析和概括,以提供量化的平均效果来回答研究的问题。其优点是增大样本含量来增加

结论的可信度,解决研究结果的不一致性。常被用来对同一课题的多项独立研究的结果进行系统的、定量的综合分析。

Prupp^[31]报道了17例使用不同食物来源(牛奶和鱼)的多肽和蛋白水解产物降血压的临床效果的Meta-分析结果,其中SBP和DBP分别下降了5.3mmHg和2.4mmHg。在另一项Meta-分析的12项随机对照实验中,Xu等^[32]在623名高血压和初期患者的两种乳源三肽(Val-Pro-Pro和Ile-Pro-Pro)降压实验中,得到了近似的降压效果(-4.8mmHg SBP, -2.2mmHg DBP);其中,高血压患者的降压效果更加明显。这项研究中普遍存在的限制因素是实验对象的非均一性,因为很难得到情况完全相同的高血压患者,这直接造成实验结果缺乏可对比性。

同种族个体之间的均一性应该高于随机抽取的研究对象,因此将不同种族人群的研究结果进行对比应该具有较高的研究价值。Cicero等^[33]对18个实验结果的Meta-分析表明乳源三肽使SBP和DBP略有降低(分别是3.73mmHg和1.97mmHg),并且发现降压效果受种族因素的影响。研究人员发现,同白种人相比乳源三肽在亚裔患者中引起的的血压降低更为明显,并且这种影响和年龄、连续使用时间、使用剂量及血压基线等因素无关,并且同合成药物相比,多肽导致的血压降低的过程比较温和。

综上Meta-分析的结论,能较好解释Van Mierlo等^[25],在对亚裔和白种人研究中得到的不同结果,从统计学的角度来看人种的不同和个体遗传因素对降压多肽治疗效果的影响较为明显。

5 降血压生物活性肽安全性的研究

由于食物蛋白在体内会很自然的降解为多肽,并且在工业生产中使用的是食品级的降解酶,执行的是严格的食品生产标准,所以到目前为止很少有人关注这些食物源性生物活性肽的安全问题^[34]。大量的研究已经证明这些生物活性肽对细胞培养没有毒性。Phelan等^[35]对乳源性生物活性肽的安全问题研究进行了总结。Anadón等^[36]的研究表明,大鼠使用单剂量(2000mg/kg),或是每日重复剂量(1000mg/kg连续使用4周)含降血压肽(α s1-casein f90-94和f143-149)的酪蛋白水解产物,不会对血液生化指标、血项、主要器官重量比、组织结构病理等参数和死亡率产生任何不良影响。并且实验中使用多肽的剂量要远远高于药理活性检测规定中的要求。进一步的实验表明,高血压和初期患者对含丰富乳源三肽(Ile-Pro-Pro)牛奶蛋白水解物具有良好的耐受性,同使用安慰剂的受试者相比,其血清和尿液生化参数没有任何明显的不同^[23,37]。因此,食源性生物活性肽总体上是安全的,但应注意避免生产中的各种处理技术对多肽产品的质量和安全性带来潜在的负面影响。

6 降血压生物活性肽的制备

自然状态下,食品中降压多肽含量很低,直接利用食物蛋白来生产含有降压多肽功能性食品基本不具备可行性。因此,必须要选择合适方法来处理这些

食物蛋白,促使其释放出大量可供提取的活性多肽。目前,主要的方法是化学降解法和酶解法。化学降解法利用酸、碱水解蛋白,反应条件剧烈,降解条件很难控制。与之相比,酶解法具有催化效率高、专一性强、反应条件温和及可调控等特点,因此酶解法是最常用的方法。

降压肽的相对分子量一般在1500u以下,食物蛋白经特异性酶解,先除去较大的杂质,再选用合适的膜超滤或是凝胶过滤层析将分子量在特定范围内的多肽进行浓缩,得到降压肽的粗制产品。另外,使用吸附剂材料也可以富集食品中的肽。如,用活性炭柱可以分离得到蛋白水解产物中富含支链氨基酸的多肽片段^[38]。

进一步的分析提纯处理需要根据目标多肽的特性(相对分子量,净电荷,疏水性等)选择合适的方法将它们分离出来。反相高效液相色谱在研究多肽的结构和功能特性的时候非常有效,它可以将具有不同疏水性的肽分离出来^[39]。使用离子交换层析色谱可以分离得到带有特定静电荷的多肽片段^[40]。分子大小相同但携带电荷不同的肽可以通过电渗析-超滤分离技术(electrodialysis-ultrafiltration, EDUF)被分离,已经证明这种方法在选择性分离带有静电荷的低分子生物活性肽方面具有很高的效率^[41]。此外,毛细管电泳和毛细管电泳色谱技术(capillary Electrophoresis, CE; capillary electrochromatography, CEC)在多肽的分离、纯化、生物化学特性研究方面也有一些实际应用^[42]。

总的说来,食源性蛋白经酶解后的目标多肽粗提品的浓缩制备比较简单,在此基础上需要选择合适的色谱技术对产品进行提纯。另外,EDUF、CE、CEC等技术在抗血压生物活性肽的分离提纯中也有不错的表现。

7 结论与展望

生物活性肽主要的来源是动植物性蛋白,蛋白先通过酶水解得到一些多聚肽的片段,然后这些混合多聚肽再经过后水解,分离得到具有生物活性的多肽^[10,34]。这些多肽不同于自然产生的生物活性肽,它们是通过蛋白酶水解食物蛋白而获得的。目前,多数的研究主要集中在牛乳蛋白、乳酪蛋白、乳清蛋白,另外,鸡蛋和肌肉蛋白也可以产生生物活性肽。海产品中的蛋白也可以作为生物活性肽很好的来源,比如:鱼、马哈鱼、牡蛎、大型海藻、乌贼、海胆、小虾、蟹、海马等。而大豆和各种豆类,大米、玉米、花生、燕麦、小麦、油菜籽和亚麻籽都是典型的用于生物活性肽生产的植物蛋白来源。

此研究领域不断发展壮大,现在已经得到关于各种具有降血压功能的食源性生物活性肽的很多信息,数学的方法已经被引入这一研究领域。通过研究,多肽在体内降血压的分子机制逐渐被揭示出来。食源性降血压多肽的产品已经得到了开发,除了具有类似抗高血压等功能的生物活性肽治疗药剂之外,还有一些超出最基本的营养目的的动植物源性的食品,即功能性食品或保健食品。这些产品的开发

和生产可以促进农业产品加工的多样化,提高农业产品的附加值。因此,具有降血压功能等生理活性的食源性生物活性肽,以及和其相关的产品越来越受到消费者的青睐。

今后的研究工作应指向生物活性肽在受试患者体内降血压作用的评价、生物利用度和药代动力学。需要进一步明确多肽降血压的分子机制,预测和规范它们作为降血压促进剂在食品体系中的用途。此外,在商品化之前这些多肽产品的安全性也应进行必要的评估,特别是过度的食品加工的过程可能会影响多肽自然结构的完整性,从而影响到产品的质量安全性。

参考文献

- [1] Hernández-Ledesma B, Hsieh C-C, de Lumen BO. Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention[J]. *Peptides*, 2009, 30:426-430.
- [2] Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: production and functionality[J]. *Int Dairy J*, 2006, 16:945-960.
- [3] Fitzgerald C, Gallagher E, Tasdemir D, et al. Heart health peptides from macroalgae and their potential use in functional foods[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59:6829-6836.
- [4] Pripp AH, Isaksson T, Stepaniak L, et al. Quantitative structure-activity relationship modelling peptides and proteins as a tool in food science[J]. *Trends Food Sci Technol*, 2005, 16:484-494.
- [5] Ibrahim MM. RAS inhibition in hypertension[J]. *J Hum Hypertens*, 2006, 20:101-108.
- [6] Segall L, Covic A, Goldsmith DJA. Direct renin inhibitors: the dawn of a new era, or just a variation on a theme[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2007, 22:2435-2439.
- [7] Ferreira SH, Bartelt DC, Greene LJ. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom[J]. *Biochemistry*, 1970, 9:2583-2593.
- [8] Ondetti MA, Williams NJ, Sabo EF, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*: isolation, elucidation of structure and synthesis[J]. *Biochemistry*, 1971, 10:4033-4039.
- [9] FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ. Hypotensive peptides from milk proteins[J]. *J Nutr*, 2004, 134:980-988.
- [10] Aluko RE. Determination of nutritional and bioactive properties of peptides in enzymatic pea, chickpea, and mung bean protein hydrolysates[J]. *J AOAC Int*, 2008, 91:947-956.
- [11] Aluko RE. Antihypertensive properties of plant-derived inhibitors of angiotensin I converting enzyme activity[J]. *Recent Progress in Medicinal Plants-Phytopharmacology and Therapeutic*, 2008, 22(4):541-561.
- [12] Aluko RE. Technology for the production and utilization of food protein-derived antihypertensive peptides: A review[J]. *Recent Pat Biotechnol*, 2007, 1:260-267.
- [13] Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, et al. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from a sour milk[J]. *J Dairy Sci*, 1995, 78:777-783.

- [14] Sato M, Hosokawa T, Yamaguchi T, *et al.* Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 6245-6252.
- [15] Wu J, Aluko RE, Nakai S. Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure-activity relationship study of di- and tripeptides[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 732-738.
- [16] Wu J, Aluko RE, Nakai S. Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure-activity relationship modelling of peptides containing 4-10 amino acid residues[J]. *QSAR Comb Sci*, 2006, 25: 873-880.
- [17] Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides[J]. *Brit J Nutr*, 2004, 92: 357-366.
- [18] Udenigwe CC, Lin Y-S, Hou W-C, *et al.* Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions[J]. *J Funct Foods*, 2009(1): 199-207.
- [19] Girgih AT, Udenigwe CC, Li H, *et al.* Kinetics of enzyme inhibition and antihypertensive effects of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates[J]. *J Am Oil Chem Assoc*, 2011, 88(11): 1767-1774.
- [20] Li H, Aluko RE. Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein hydrolysate[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 11471-11476.
- [21] Udenigwe CC, Li H, Aluko RE. Quantitative structure-activity relationship modelling of renin-inhibiting dipeptides[J]. *Amino Acids*, 2012, 42(4): 1379-1386.
- [22] Hata Y, Yamamoto M, Ohni M, *et al.* A placebocontrolled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects[J]. *Am J Clin Nutr*, 1996, 64: 767-771.
- [23] Boelsma E, Kloek J. IPP-rich milk protein hydrolysate lowers blood pressure in subjects with stage 1 hypertension, a randomized controlled trial[J]. *Nutr J*, 2010(9): 52.
- [24] Pins JJ, Keenan JM. The antihypertensive effects of a hydrolysed whey protein isolate supplement (BioZate® 1)[J]. *Cardiovas Drugs Ther*, 2002, 16(1): 68.
- [25] Van Mierlo LAJ, Koning MMG, Van Zander KD, *et al.* Lactotripeptides do not lower ambulatory blood pressure in untreated whites: results from 2 controlled multicenter crossover studies[J]. *Am J Clin Nutr*, 2009, 89: 617-623.
- [26] Usinger L, Jensen LT, Flambard B, *et al.* The antihypertensive effect of fermented milk in individuals with prehypertension or borderline hypertension[J]. *J Hum Hypertens*, 2010, 24: 678-683.
- [27] Sipola M, Finckenberg P, Santisteban J, *et al.* Longterm intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2001, 52: 745-754.
- [28] Ruiz-Giménez P, Ibáñez A, Salom JB, *et al.* Antihypertensive properties of lactoferricin B-derived peptides[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 6721-6727.
- [29] Kawasaki T, Seki E, Osajima K, *et al.* Antihypertensive effect of valyl-tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects[J]. *J Hum Hypertens*, 2000, 14: 519-523.
- [30] Barba de la Rosa AP, Barba Montoya A, Martínez-Cuevas, *et al.* Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: Antihypertensive role of amaranth peptides[J]. *Nitric Oxide*, 2010, 23: 106-111.
- [31] Pripp AH. Effect of peptides derived from food proteins on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Food Nutr Res*, 2008, 52: 1-9.
- [32] Xu J-Y, Qin L-Q, Wang P-Y, *et al.* Effect of milk tripeptides on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Nutrition*, 2008, 24: 933-940.
- [33] Cicero AFG, Gerocami B, Laghi L, *et al.* Blood pressure lowering effect of lactotripeptides assumed as functional foods: a meta-analysis of current available clinical trials[J]. *J Hum Hypertens*, 2011, 25: 425-436.
- [34] Wang W, Gonzalez de Mejia E. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases[J]. *Compr Rev Food Sci Food Safety*, 2005(4): 63-78.
- [35] Phelan M, Ahernea A, FitzGerald RJ, *et al.* Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status[J]. *Int Dairy J*, 2009, 19: 643-654.
- [36] Alemán A, Pérez-Santín E, Bordenave-Juchereau S, *et al.* Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity[J]. *Food Res Int*, 2011, 44: 1044-1051.
- [37] Germino FW, Neutel J, Nonaka M, *et al.* The impact of lactotripeptides on blood pressure response in stage 1 and stage 2 hypertensives[J]. *J Clin Hypertens*, 2010, 12: 153-159.
- [38] Udenigwe CC, Aluko RE. Antioxidant and angiotensin converting enzyme-inhibitory properties of a flaxseed protein-derived high Fischer ratio peptide mixture[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 4762-4768.
- [39] Pownall TL, Udenigwe CC, Aluko RE. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 4712-4718.
- [40] Pownall TL, Udenigwe CC, Aluko RE. Effects of cationic property on the in vitro antioxidant activities of pea protein hydrolysate fractions[J]. *Food Res Int*, 2011, 44: 1069-1074.
- [41] Doyen A, Beaulieu L, Saucier L. Demonstration of in vitro anticancer properties of peptide fractions from a snow crab by-products hydrolysate after separation by electro dialysis with ultrafiltration membranes[J]. *Sep Purif Technol*, 2011, 78: 321-329.
- [42] Kašička V. Recent developments in CE and CEC of peptides (2009-2011)[J]. *Electrophoresis*, 2012, 33: 48-73.