

# ACD/MS Workbook Suite を用いた LC-MS 分析による 発芽玄米酒粕のアンジオテンシン変換酵素阻害活性ペプチドの同定 Identification of the angiotensin-converting enzyme inhibitory activity peptide of the germinated brown rice sake-lees by LC-MS analysis using ACD/MS Workbook Suite

小木曾加奈<sup>1</sup> 古田 一匡<sup>2</sup> 岡崎 光雄<sup>3</sup>

Kana KOGISO, Kazumasa FURUTA, Mitsuo OKAZAKI

## 要旨：

Until now, we have made low-salt bread using the germinated brown rice sake-lees. We would like to utilize the germinated brown rice sake-lees for making bread, which is in future.

Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) inhibitory activities were measured in germinated brown rice sake-lees, germinated brown rice liquor, and refined sake in vitro.

As a result, the ACE inhibitory activities (germinated brown rice sake-lees, germinated brown rice liquor and refined sake) were 0.15 mg/ml, 1.15 mg/ml and 1.55 mg/ml with an IC<sub>50</sub> level, respectively.

Since ACE inhibitory activity of the germinated brown rice liquor was higher than that of the refined sake, the germinated brown rice-derived ingredients was suggested to have some ACE inhibitory activity. In addition, the ACE inhibitory activity of the germinated brown rice sake-lees was higher than that of the germinated brown rice liquor. Taken together, the germinated brown rice sake-lees were expected to remain more inhibitory activity than the liquor.

As a method to easily search and identify the functional ingredients of the food, we conducted an examination to develop a method for identification of the functional-dipeptide from germinated brown rice sake-lees extract. From the LC-MS analysis results, we searched dipeptide with the ACE inhibitory activity using the software ACD/MS Workbook Suite (Advanced Chemistry Development, Inc., Canada)

with IntelliTarget function and MS Match function. Comparing the two functions, MS Match function showed that dipeptide Val-Pro with the hypotensive effect was present in germinated brown rice sake-lees. The effective dipeptide was identified easily by using MS Match function from LC-MS results

キーワード：ACE 阻害, 発芽玄米酒粕, 簡易同定方法, ACD

## I、はじめに

発芽玄米とは玄米を約1~2日程度、摂氏32度前後の状態に水分を含ませ、1mmほどの芽が出た状態にしたものである<sup>1)</sup>。これまでの研究で、ビタミンやミネラルが白米よりも豊富<sup>2)</sup>というだけでなく、フェルラ酸やフィチン酸などのポリフェノール<sup>2-5)</sup>やγ-アミノ酪酸 (GABA)<sup>2,6)</sup>も多く含まれていることが明らかにされている。GABAは血圧上昇抑制作用<sup>7)</sup>や血糖値の低減作用<sup>8)</sup>を示すことが報告され

ており、その機能が注目されている。また近年ではコメアレルギーの原因となるアレルゲンが、白米や玄米に比べ発芽玄米中では低減化されていることも報告<sup>9)</sup>されており、発芽玄米の健康効果が期待されている。

ところで発芽玄米清酒ならびにその酒粕は、発芽玄米を原料とする清酒とその残さである。これは一般的な清酒醸造過程で、玄米から精米を経る際に取り除かれてしまう「ぬか」や「胚芽」の成分が清酒や酒粕にそのまま残ると考えられ、食品の機能性に富むことが予想される (図1)。筆者らは食品産業

1)長野県短期大学 生活科学科 健康栄養専攻 Nagano Prefectural College, 8-49-7 Miwa, Nagano 380-8525, Japan

2)富士通株式会社 テクニカルコンピューティング・ソリューション事業本部 科学システムソリューション統括部

Fujitsu Co., Ltd., 1-9-3 Nakase, Mihama-ku, Chiba 261-8588, Japan

3)岡崎酒造株式会社 Okazaki Brewer Co. Ltd., 4-7-33 Tyuo, Ueda, 386-0012, Japan

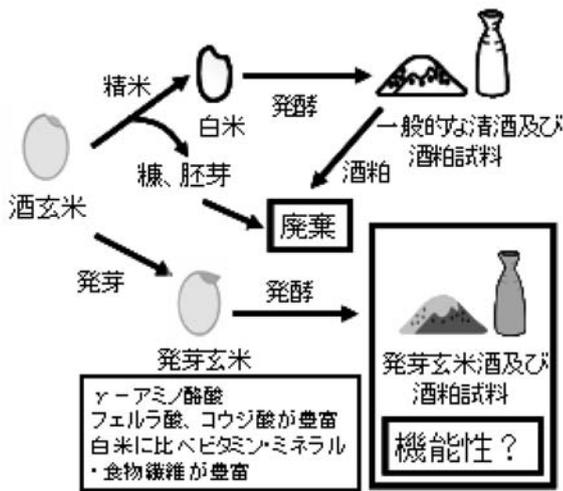


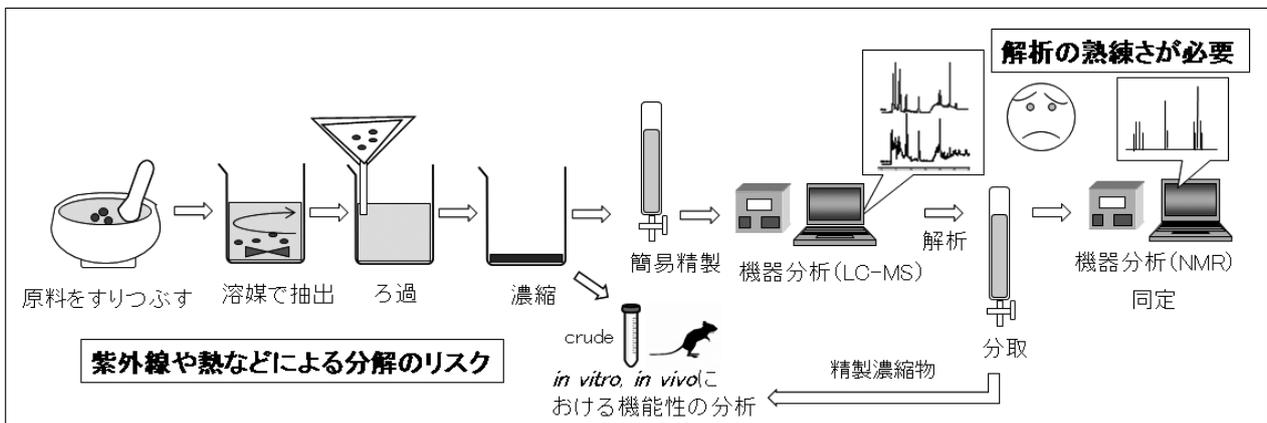
図 1. 発芽玄米酒粕の作成方法と機能性

廃棄物の再利用の面から、ぬかや精米粕の出ない、環境に優しい発芽玄米清酒や、産業廃棄物として処理されがちな酒粕を製パン時に添加することの有効性を検討しており、これまでにその製パン性について知見を得てきた。すなわちパンの膨化<sup>10)</sup>や「コク味」と「塩味」が強くなる傾向<sup>11)</sup>、さらにパンの香気性の向上<sup>12)</sup>がなされることを見いだした。塩味が増強する理由は発芽玄米酒粕中の有機酸が原因であったが<sup>11)</sup>、小麦粉を発芽玄米酒粕に10%代替する

ことでパンを最大24%程度減塩することができた<sup>13)</sup>。今回は将来的に減塩でかつ血压降下作用を有するパンを作製するために、発芽玄米酒粕の血压降下作用を考慮し、Angiotensin-Converting Enzyme (以下 ACE と略記) の阻害活性を測定した。ACE はアンジオテンシン I というポリペプチドを、昇圧作用のあるアンジオテンシン II に変換する酵素であり、それを阻害することによって血压を下げる作用を示す。ACE 阻害については発芽玄米酒粕だけでなく、発芽玄米酒、発芽玄米ではない清酒についても測定を行った。発芽玄米酒粕における ACE 阻害活性を比較することで、その機能性について検討した。

一方で、食品は様々な成分の複合体であり、これまでの分析方法には時間と費用の面でコスト面の課題があった。具体的には、本研究で扱った血压降下作用を持つ成分を検討するためには酒粕中の成分を分析に必要な量を取得するため、ある程度抽出・濃縮後に(簡易)精製する必要がある。このような精製過程には、光や熱による分解の恐れがあり、化合物の同定には困難さが伴う。精製後の、LC-MS や NMR などによる解析には熟練を要する。例えば、今回は LC-MS 分析でポジティブイオンモードを使用しているが、分子量の付近に分子イオンとして

一般的なこれまでの分析法



今回の方法

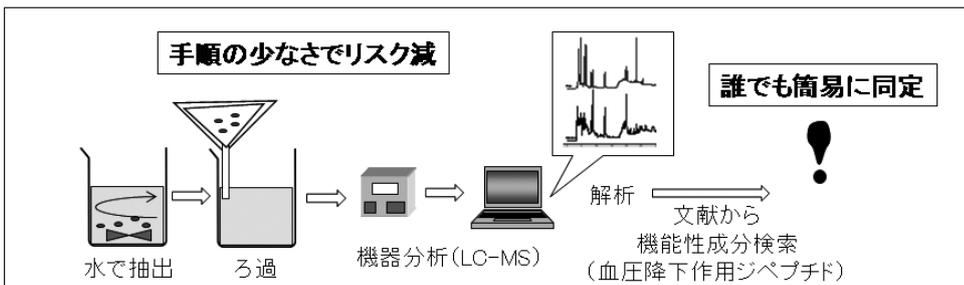


図 2. これまでの分析手法と今回の手法の違い

M<sup>+</sup>、プロトン化分子である [M+H]<sup>+</sup>、ナトリウムイオン付加分子である [M+Na]<sup>+</sup>、脱水分子である [M-H]<sup>+</sup>、多価プロトン化分子である [M+nH]<sub>n</sub><sup>+</sup>などが検出される。この他に同位体の存在、フラグメントイオン（フラグメントイオンは分子イオンが分解したもので、試料分子の構造情報を示している）の存在、空気、カラムの液相、カラムのマトリクスなどのバックグラウンドピークの存在によりクロマトグラムは複雑となる。さらに、機能性解析のため目的物をさらなる分離・精製に供し、生物学的な機能解析の実施という流れになる。このような熟練さや時間、費用などの課題を解決するため、著者らはできるだけ簡易に、かつお金がかからない方法を検討することとした（図2）。複雑な生データを解析するために用いられるソフトはいくつかあるが、今回は ACD/MS Workbook Suite を用いることにした。

これまで特殊な製法で作製された発芽玄米酒粕については、ACE 阻害活性や、その阻害活性成分が何かを検討されたことはない。そこで今回は研究の前半で *in vivo* による発芽玄米酒粕や発芽玄米酒、吟醸酒における ACE 阻害活性を測定した。また後半では ACE 阻害活性を有するペプチド群の中からジペプチドを選択し、発芽玄米酒粕中に存在するかどうかの簡易同定方法の検討を行った。すなわち、発芽玄米酒粕の LC-MS データを用いて既知の血圧降下作用のある ACE 阻害ジペプチドが存在するかを検討し、発芽玄米酒粕由来の機能性ペプチドを還元同定できることを実証することを目的とした。

## II、実験方法

まず、実験では発芽玄米酒粕やその他酒の ACE 阻害活性を測定した。その後、発芽玄米酒粕の LC-MS 測定を行った。発芽玄米酒粕中に当該ジペプチドが存在するかどうかを判別する方法として、LC-MS 分析結果を用いて ACD/MS Workbook Suite (ACD 社、カナダ) というソフトウェアの① IntelliTarget 機能（以後、ITA と略記）や② MS Match 機能（以後、MM と略記）で ACE 阻害活性を有するジペプチドを検索した。

### 1. ACE 阻害活性測定方法

発芽玄米酒粕のほか、発芽胚芽米酒、同様の製法を行っている吟醸酒について試料とし、それぞれ測定を行った。ACE 阻害活性は Dojindo ACE Kit-WST (株式会社 同仁化学研究所、熊本) を用い

て *in vitro* における阻害活性を測定した。それぞれの酒は Kit に示されている方法で 5 倍、5<sup>2</sup> 倍、5<sup>3</sup> 倍、5<sup>4</sup> 倍、5<sup>5</sup> 倍、5<sup>6</sup> 倍に希釈し使用した。発芽玄米酒粕は遠心分離後の上澄み液を同様に希釈し使用した。キットに書かれている手順通りに作業を行い、37℃ で 60 分間インキュベート後、各ウェルに Indicator working solution を 200 μl ずつ加え、室温で 10 分間インキュベートした。プレートリーダー（コロナ電気株式会社製吸光グレーティングマイクロプレートリーダ SH-1200Lab）で 450 nm の吸光度を測定した後、ACE 阻害活性値（阻害率%）を下記の計算式により求めた。

ACE 阻害活性値（阻害率%）= [(A blank 1 - A sample)/(A blank 1 - A blank 2)] × 100

なお、それぞれの試料について測定は三連で行い、これらの平均値から 50% 阻害濃度を算出、IC<sub>50</sub> 値とした。

### 2. LC-MS 測定方法

LC-MS は Waters 社製 Xevo QT of MS を用いた。カラムは GL Science 製 Intersil ODS-3 (4.6\*250mm) を用いた。分析条件は以下の通りである。流速 0.5 ml/min で A : 0.1% V/V ギ酸水溶液、B : 0.1% V/V ギ酸アセトニトリル溶液とした。グラジエント条件は A : B 90 : 10 とし、B は 5 分ごとに 10% ずつ濃度を上げ、最終的に 60% まで濃度を上げた。カラムの温度条件は 40℃ とした。今回はポジティブイオンモードを使用した。

発芽玄米酒粕試料は蒸留水に 5 倍容となるよう懸濁し、フィルターをかけ、サンプルとした。

### 3. 発芽玄米酒粕中に存在する ACE 阻害ジペプチド検出に至るための ACD/MS Workbook Suite の ITA 機能及び MM 機能の検討

ACD/MS Workbook Suite とは MS フラグメント解析と LC-MS 成分探索を同時にサポートする ACD 社のマススペクトル解析ソフトである。

複雑な生データを解析するために用いられるソフトはいくつかあるが、今回は ACD/MS Workbook Suite を用いることにした。その Suite の中で ITA 機能はターゲット化合物の解析支援をするための機能である。特徴としては、混合物中の成分検索を目的とし、既知の精密質量や組成式を化合物リストに入力することにより該当する目的成分の抽出を可能にしている。すなわち、まず先に述べたようなノイズの多い生の LC-MS データからノイズ低減を経て、各マスキロマトグラムを判別する。この判別された

表 1. ITA 機能と MM 機能の違い

機能名	目的	動向
ITA	混合物中の成分検索	実際のLC-MSデータのノイズを減じると同時にマスクロマトグラフィを判別、当該化合物の質量数から、このピークがそれに当たると指示
MM	簡易なピーク判別支援機能	当該構造式から計算される同位体パターンとインポートしたLC-MSデータを比較し、構造式がデータ中に存在する可能性を判断

クロマトグラムは測定時の範囲における全て（今回は  $m/z=1000$  まで）の質量数について抽出されている。ITA 機能では抽出されたマスクロマトグラムをさらに時間軸方向で比較し、分子イオンと保持時間を判別する。その該当するマススペクトルの位置に目的化合物の分子イオン、同位体パターンが存在するかを検討する。その後、ターゲットの成分の化学構造式あるいは組成式情報を入力することで、それを基に質量数を算出し、合致するピークに紐付けする。

一方、MM 機能は簡易なピーク判別支援機能である。特徴としては計算される同位体パターンとインポートした LC-MS データを比較し、貼り付けた構造式がデータ中に存在する可能性を判断することができる。すなわちターゲットの化学構造式から質量数を判別し、その分子イオンピークが検出できているかを判別する機能である。具体的にはソフト中に当該構造式を書き込むことにより、全マスクロマトグラムのピーク中から構造式の質量数に合致するマスクロマトグラムを探索する。探索後、該当するマスクロマトグラムのピークがあれば、そのピークが正しいかどうかを検討する。その該当するピーク位置のマススペクトルに目的化合物の分子イオン、同位体パターンが存在するかを検討し、決定する機能である。それぞれの特徴を表 1 に示す。

上記の説明のとおり、発芽玄米酒粕サンプルの LC-MS データの中にジペプチドのシグナルが観測されているか ITA 機能及び MM 機能を使用し検討を行った。

まず、ACD 社製 ACD Percepta/Structure Designer によって各標準アミノ酸 20 種類をコンピュータ上に作成し、ジペプチドとして 400 個 ( $20 \times 20 = 400$  個) を自動作成した。

ITA 機能での検討を以下のように行った。LC-MS データ中に、400 個のジペプチドデータを用いてピーク判別を行った。さらに血圧降下作用を

有すると報告されているジペプチド<sup>14-27)</sup>を文献から 43 種類選別し、判別されたジペプチドから該当するものを選別した。

同時に MM 機能での検討を以下のように行った。MM 機能により構造式から計算された質量数を元に、LC-MS データ中のピークから血圧降下作用を有すると報告されているジペプチド 43 種類のシグナルが一致するものを推定帰属先ピークとして表示させた。その中からいくつかをジペプチドの候補とした。

以上の 2 点の機能を正しく評価するため、新たに標品の LC-MS を測定し、これを標準としてこれらの判別結果を比較検討した。

#### 4. 標品の LC-MS 測定方法

ジペプチド候補の中から標品 1 種類を選んで LC-MS で同定を行った。標品である Val-Pro は Boc-Val-Pro (渡辺化学工業株式会社、広島) 10 mg/ml に 4N 塩酸-酢酸エチル溶液で Boc 基を脱保護したのち精製し、Val-Pro として使用した。これを 25% エタノール水溶液に溶解し標品サンプルとした。分析条件は 2. の測定方法と同じである。

### III、実験結果

#### 1. ACE 阻害活性測定結果

ACE 阻害活性試験の結果から発芽玄米酒粕、発芽胚芽米酒、清酒の ACE 阻害活性は  $IC_{50}$  値でそれぞれ 0.15 mg/ml、1.15 mg/ml、1.55 mg/ml であった。

#### 2. 発芽玄米酒粕の LC-MS 結果

発芽玄米酒粕の LC-MS スペクトルを示す (図 3)。精製工程がないため、多くの成分が検出された。

### 3. ACE 阻害活性を有するジペプチド判別結果と実際の標品との比較結果

ITA 機能での解析の結果、LC-MS 中に 400 個のジペプチドに相当する質量数を持つ 57 ピークが判別された。それらのうち ACE 阻害活性を有すると考えられるジペプチドは 8 ピーク (Val-Pro, Ala-Phe, Ile-Phe, Leu-Phe, Tyr-Pro など) が判別された。さらに ITA から示される Formula Fit Quality index 値について検討を行った。この Formula Fit Quality index 値は 0-1 までの数値である。数字が 1 に近ければ近いほどノイズでなく、成分が検出さ

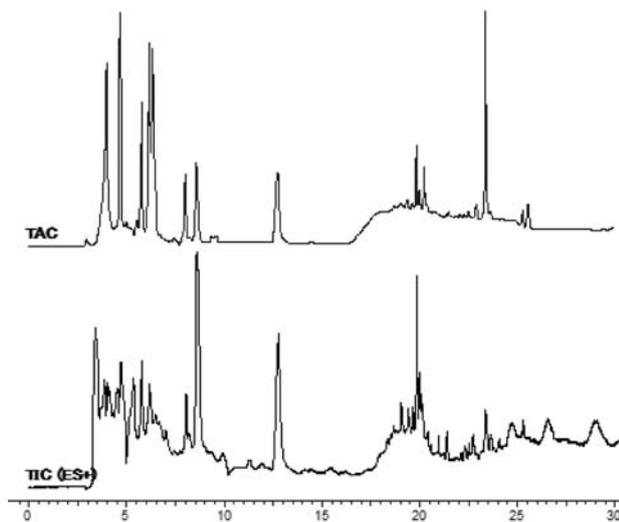


図 3. 発芽玄米酒粕の LC-MS スペクトル (上部: LC スペクトル、下部: MS 陽イオン)

れているとみなす。すなわち 0.9 以上であれば、ノイズではなく成分が検出されていると判断できるとされている。今回はより厳密にするため 0.99 以上のものをピックアップした。今回ピックアップされたピークは 16 ピークであった。ACE 阻害活性を有すると考えられる者は 4 ピーク (Gly-Val, Val-Pro, Ala-Phe, Glu-Glu など) であった (表 2. 参照)。

MM 機能での解析では、ITA の結果から抽出された 4 ピークに対し、判別されたジペプチドの構造式を LC-MS に貼り付けて推定帰属先ピークを確認した。

以上の 2 点の機能を正しく評価するため、標品 Val-Pro のポジティブイオンモード  $M^+$  ( $m/z = 215$ ) の LC-MS 測定を行い、上記結果との比較を行った (図 4、図 5 参照)。標品では 5.3min と 19.9min に酒粕では 3.3min、5.3min、19.9min に  $m/z=215$  の成分を含むピークを確認した (図 6-8 参照)。

ITA 機能の場合、3.3 分のピークを Val-Pro であると判別していた。

一方、MM 機能の場合、5.3 分、19.9 分の 2 つを Val-Pro であると判別していた。実際には標品では 5.3 分が Val-Pro であった。

### IV. 考察

これまで特殊な製法で作製された発芽玄米酒粕については ACE 阻害活性や、その阻害活性成分が何かを検討されたことはなかった。今回、本研究の前

表 2. ITA 機能における酒粕 LC-MS 中に見いだされた ACE 阻害活性ジペプチドと推定されるピーク (灰色の部分)

$m/z$	tR (min)	Height (counts)	Label	Notation	FFQ	Mass Error (Da)
175.108	3.556	3136	Gly-Val, Val-Gly	[M+H] <sup>+</sup>	0.998	0.014
215.139	3.372	7345	Pro-Val, Val-Pro	[M+H] <sup>+</sup>	0.997	-0.216
231.098	5.389	495	Asp-Pro, Ile-Val, Leu-Val, Pro-Asp, Val-Ile, Val-Leu	[M+H] <sup>+</sup>	0.921	-0.12
237.123	9.745	294	Ala-Phe, Asp-Cys, Cys-Asp, Met-Ser, Phe-Ala, Ser-Met	[M+H] <sup>+</sup>	0.994	0.038
247.111	4.766	994	Asn-Asn, Asp-Ile, Asp-Leu, Glu-Val, Ile-Asp, Leu-Asp, Met-Pro, Pro-Met, Val-Glu	[M+H] <sup>+</sup>	0.801	0.006
277.103	4.458	13695	Glu-Glu	[M+H] <sup>+</sup>	1	0.042
279.17	19.007	190	Glu-Met, Ile-Phe, Leu-Phe, Met-Glu, Phe-Ile, Phe-Leu, Pro-Tyr, Tyr-Pro	[M+H] <sup>+</sup>	0.868	0.044
304.182	21.669	529	Arg-Glu, Glu-Arg, Trp-Val, Val-Trp	[M+H] <sup>+</sup>	0.973	0.11

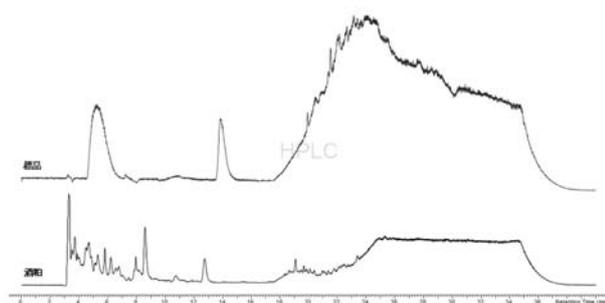


図4. 標品 (Val-Pro) と発芽玄米酒粕抽出物の Total Ion Chromatogram

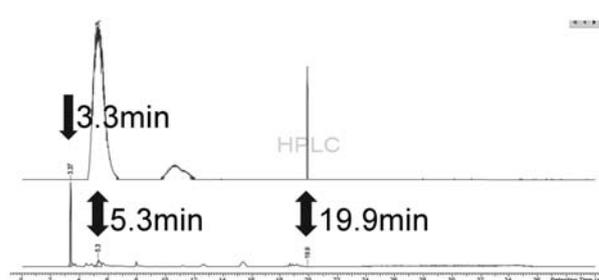


図5.  $m/z=215$  (Val-Pro) の Ion Chromatogram (上部: 標品、下部: 酒粕)

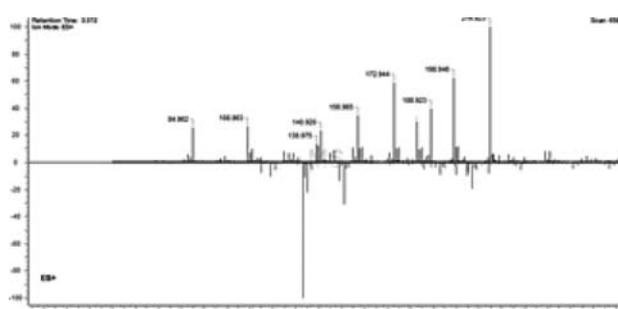


図6. 3.3分のピーク (上部: 酒粕 下部: 標品)

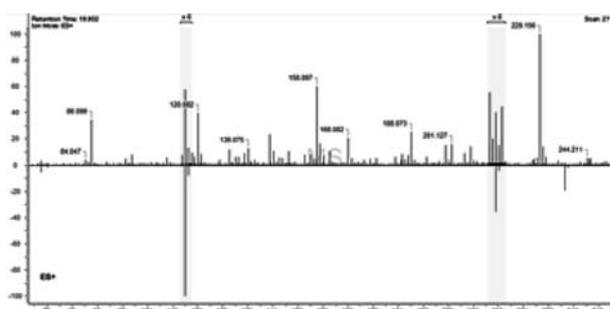


図7. 5.3分のピーク (上部: 酒粕 下部: 標品)

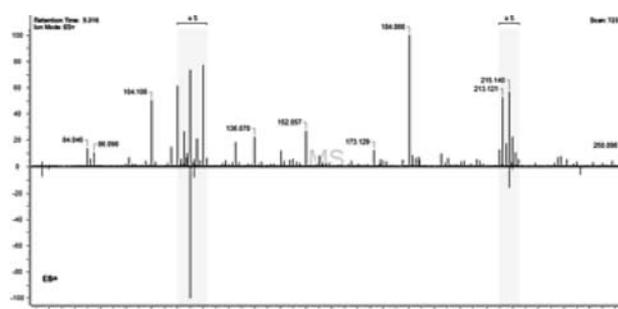


図8. 19.9分のピーク (上部: 酒粕 下部: 標品)

半に行った *in vivo* における ACE 阻害活性試験の結果、発芽玄米酒粕、発芽胚芽米酒、清酒の ACE 阻害活性は  $IC_{50}$  値でそれぞれ 0.15 mg/ml、1.15 mg/ml、1.55 mg/ml であった。清酒より発芽胚芽米酒が ACE 阻害活性は高かったことから、発芽玄米由来成分に ACE 阻害活性があることがわかった。また、発芽胚芽米酒よりも発芽玄米酒粕の方が ACE 阻害活性は高かったことから、酒中よりもしぼった残渣である酒粕中に阻害活性成分が残ることが示された。このことから発芽玄米酒粕の中には ACE 阻害活性を示す成分を酒類よりも多く含んでいることが示された。

本研究の後半では、これまで報告のある ACE 阻害活性を有するジペプチドを発芽玄米酒粕中に含有するかどうかの探索について検討した。発芽玄米酒粕の LC-MS 解析結果を元に ITA の結果から

3.3min で  $m/z=215$  のピークが確認された (表2)。しかし、標品で 5.3min の成分が Val-Pro と確認されたため、3.3min のピークが Val-Pro である可能性は排除された。これは、ITA では酒粕のスペクトルに Val-Pro のシグナルは確認できたが強度は小さく、別の成分が支配的であったため、ITA では別の成分と認識されていたためであった。一方、MM 機能による方法では、構造式のクロマトグラムピークへの帰属機能を有するため 5.3min、19.9min とともに帰属の可能性が示された (図9)。実際には標品から 5.3min の成分が Val-Pro と同定されたため、MM 機能によって Val-Pro の存在が確認できた。今回の結果では、ITA 機能を用いた場合、同定したいジペプチドとは異なる、別の大きなピークが多く含まれていた。これはサンプルの精製過程を経ずに LC-MS の分析を行ったためであろうと考えられる。すなわち雑多な成分が多く含まれていることで、LC-MS スペクトル上で確認したいジペプチドが認識しにくくなり、当該成分の抽出がうまく行われていないと考えられる。一方、MM 機能はノイズ成分の影響を受けず、ジペプチドの存在を検知できたと考えられる。しかし、ITA 機能のうち、ピークノイズを除去すること、そこから目的の質量数を持つものを簡易に抽出することは可能であった。ITA 機能でピークノイズを除去後、MM 機能を使用することでより正確に同定できることが示された。

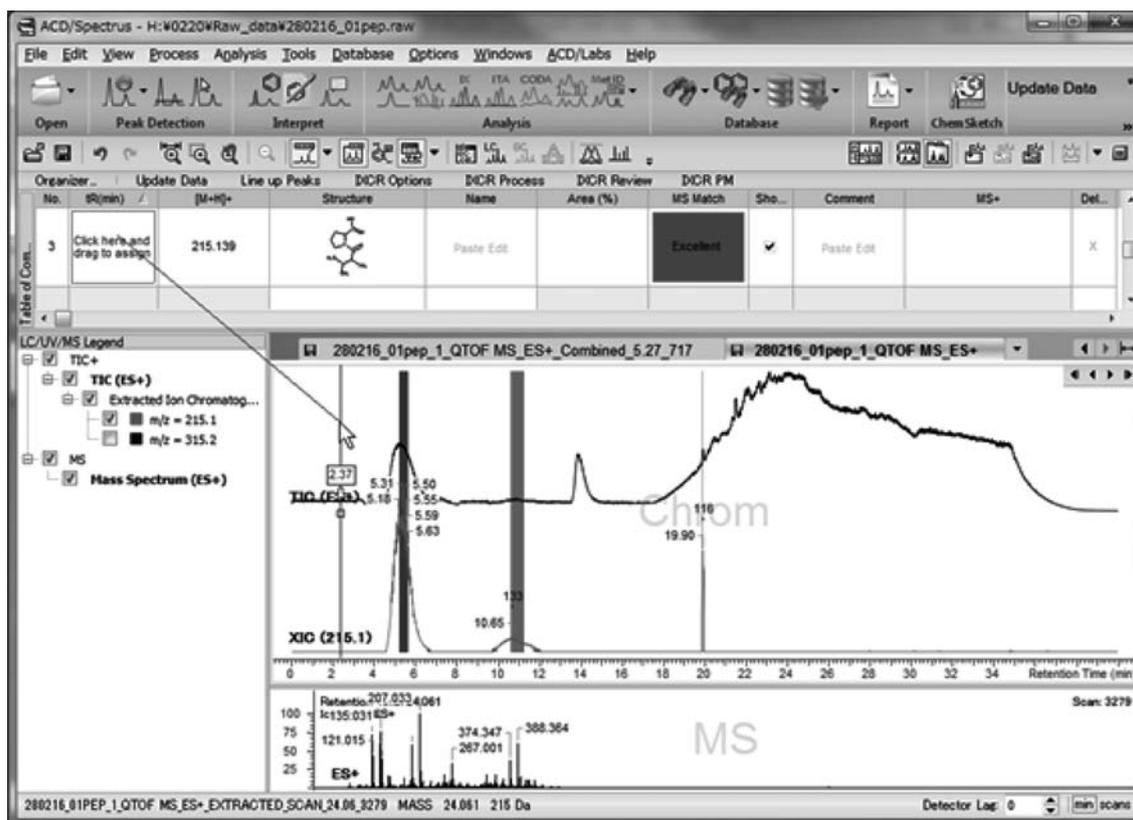


図9. MM 機能による MS Workbook の構造式のマスクロマトグラムピークへの帰属機能

今回、発芽玄米酒粕において他の酒類よりも ACE 阻害能があることが示された。また使用した標品である Val-Pro は ACE 阻害活性として IC<sub>50</sub> 値が 420 μmol/l という報告がある<sup>14)</sup>。今回の抽出・分析方法は crude の状態であるが、その阻害の一部は ACE 阻害能を有する Val-Pro のようなジペプチドが存在するためであろうことが示唆された。このようなジペプチドは小腸上皮細胞から吸収されることが知られており<sup>28,29)</sup>、食品として摂取した際にも体内に吸収され、健康効果（血圧降下作用）を発揮すると期待できる。

今回のケースでは ITA 機能のうち、ノイズを除去し、目的の質量数を持つものを簡易に抽出後、MM 機能で同定を行う方法により、興味ある成分の存在を簡便に推定し、更に詳細な解析、研究へ進めるための指標を得られることが示された。

## VI、謝辞

本研究の一部は科研費 26750033 の助成を受けたものである。

## VI、参考文献

- 1) FANCL Pre-germinated brown rice. Patent. 2005. No. 3738025, JP Nov 4.
- 2) Patil S B , Khalid M K, Germinated brown rice as a value added rice product: A review, J Food Sci Technol. 48 (6) pp661-667 (2011)
- 3) Ito, S, Ishikawa, Y. Marketing of value-added rice products in Japan: germinated brown rice and rice bread., FAO Rice Conference 04/CRS.7. (2004).
- 4) Su Tian, Nakamura K., Kayahara H., Analysis of phenolic components in white rice, brown rice and germinated brown rice., J.Agric. Food Chem., 52, pp4808-4813 (2004).
- 5) Su Tian, Nakamura K., Tong Cui, Kayahara H., High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. J. Chromatography A, 1063, pp121-128 (2005).
- 6) Nakamura K., Kayahara K., Su Tian, Germinated brown rice and its function from GABA to Phenols. Food Research, 592, pp12-16 (2004).
- 7) 大森正司, 矢野とし子, 岡本順子, 津志田藤二郎, 村井敏信, 樋口満, 嫌気処理緑茶（ギャバロン茶）による高血圧自然発症ラットの血圧上昇抑制作用, 日本農芸化学会誌, 61 (11), pp1449-1451 (1987)

- 8) Imam MU, Musa SN, Azmi NH, Ismail M., Effects of white rice, brown rice and germinated brown rice on antioxidant status of type 2 diabetic rats., *Int J Mol Sci.*, 13 (10), pp12952-69 (2012)
- 9) Yamada C, Izumi H, Hirano J, Mizukuchi A, Kise M, Matsuda T, Kato Y., Degradation of Soluble Proteins Including Some Allergens in Brown Rice Grains by Endogenous Proteolytic Activity during Germination and Heat-Processing., *Biosci Biotechnol Biochem.* 69 (10) pp1877-83 (2005)
- 10) 牛越静子, 小木曾加奈, 発芽玄米酒粕の食品利用方法についての検討, 長野県短期大学紀要, 第 65 号, pp13-18 (2010)
- 11) 小木曾加奈, 中澤弥子, 吉岡由美, 佐藤晶子, 岡崎光雄, 発芽玄米酒粕製パンの呈味性, 日本味と匂学会誌, 18 (3), pp387-390 (2011)
- 12) 小木曾加奈, 中澤弥子, 岡崎光雄, 発芽玄米酒粕の嗜好特性, 日本家政学会誌 66 (3) pp113-119 (2015)
- 13) 小木曾加奈, 岡崎光雄, 発芽玄米酒粕の加工特性と減塩効果, 日本味と匂学会誌 21 (3) pp339-342 (2014)
- 14) Cheung HS, Wang FL, Ondetti MA, Sabo EF, Cushman DW., Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence., *J Biol Chem.*, 255 (2) pp401-407 (1980)
- 15) Miyoshi S, Ishikawa H, Kaneko T, Fukui F, Tanaka H, Maruyama S., Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an alpha-zein hydrolysate., *Agric Biol Chem.*, 55 (5) 1313-1318 (1991)
- 16) 斉藤 義幸, 中村 圭子, 川戸 章嗣, 今安 聰, 清酒および副産物中アンジオテンシン変換酵素阻害物質, 日本農芸化学会誌, 66 (7) pp1081-1087 (1992)
- 17) Matsumura N, Fujii M, Takeda Y, Shimizu T., Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 57 (10) pp1743-1744 (1993)
- 18) Mullally MM, Meisel H, FitzGerald RJ., Synthetic peptides corresponding to alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity., *Biol Chem Hoppe Seyler.*, 377 (4) pp259-260 (1996)
- 19) Matsufuji H, Matsui T, Seki E, Osajima K, Nakashima M, Osajima Y., Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle., *Biosci Biotechnol Biochem.* 58 (12) pp2244-2245 (1994)
- 20) Abubakar A, Saito T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T., Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J Dairy Sci.*, 81 (12) pp3131-3138 (1998)
- 21) 日本合成化学工業株式会社, Patent. 1991. No. 264536, JP Nov 25.
- 22) Yokoyama K, Chiba H, Yoshikawa M., Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito., *Biosci Biotechnol Biochem.*, 56 (10) pp 1541-1545 (1992)
- 23) 松田秀喜, 長岡俊徳, 森田日出男, 箴島克裕, 箴島豊, 食品工業用蛋白質分解酵素によってイワシ筋肉から得られたアンジオテンシンI変換酵素阻害ジペプチド, 日本食品工業学会誌, 39 (8) pp678-683 (1992)
- 24) Matsui T, Li CH, Osajima Y., Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ., *J Pept Sci.*, 5 (7) : 289-297 (1999)
- 25) Ohta T, Iwashita A, Sasaki S, Kawamura Y., Antihypertensive Action of the Orally Administered Protease Hydrolysates of Chum Salmon Head and Their Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides., *Food Science and Technology International*, 3 (4), 339-343 (1997)
- 26) Matsui T, Yukiyoishi A, Doi S, Sugimoto H, Yamada H, Matsumoto K., Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR., *J Nutr Biochem.* 13 (2) pp80-86 (2002)
- 27) Chun-Hui Li, Matsui T, Matsumoto K, Yamasaki R, Kawasaki T., Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein., *Journal of Peptide Science.*, 8 (6) pp267-274 (2002)
- 28) Newey H, Smyth DH., Intracellular hydrolysis of dipeptides during intestinal absorption., *J Physiol.* 152 pp367-80 (1960)
- 29) Matthews DM., Intestinal absorption of peptides., *Physiol Rev.* 55 (4) pp537-608 (1975)

(平成 29 年 9 月 25 日受付、平成 29 年 12 月 8 日受理)