

畜禽内脏源生物活性肽的制备、活性分析及构效关系的研究进展

张昱婷¹, 牛占占¹, 黄玉清¹, 宁亚维¹, 苑博华^{2*}, 王志新^{1*}

(1. 河北科技大学食品与生物学院, 河北石家庄 050018)

(2. 河北工程大学生命科学与食品工程学院, 河北邯郸 056038)

摘要: 畜禽内脏富含蛋白质、脂肪、维生素和矿物质, 具有优良的抗氧化、抗炎以及抗衰老等作用, 受到国内外研究人员的关注, 但我国畜禽内脏资源利用率很低, 造成了资源的极大浪费。利用畜禽副产物生产高附加值产品, 可减少废弃物处理不当造成的环境污染, 提高副产物综合利用价值, 有助于畜禽资源的可持续利用。生物活性肽主要来源于植物、动物和微生物, 具有降血压、抗氧化、抗菌、抗炎等多种功效, 在食品、医药以及保健品等领域有着广阔的应用前景。目前国内外有关生物活性肽的报道主要源于乳制品、植物蛋白等, 以畜禽类内脏为原料的研究报道较少, 部分研究者对构效关系进行了较为深入的研究。该文归纳总结了畜禽类内脏制备生物活性肽的方法, 讨论了畜禽内脏来源的降血压肽、抗氧化肽、抗炎肽、抗菌肽的活性及其构效关系, 为未来更深层次的研究提供新的思路与方法, 并对现存的技术问题以及今后的研究方向做出了展望。

关键词: 畜禽内脏; 生物活性肽; 制备纯化; 结构鉴定; 活性分析; 构效关系

文章编号: 1673-9078(2024)07-343-352

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.7.0749

Research Progress on Preparation, Activity Analysis, and Structure-activity Relationship of Visceral Bioactive Peptides from Livestock and Poultry

ZHANG Yuting¹, NIU Zhanzhan¹, HUANG Yuqing¹, NING Yawei¹, YUAN Bohua^{2*}, WANG Zhixin^{1*}

(1. College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

(2. School of Life Sciences and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China)

Abstract: Livestock viscera is rich in protein, fat, vitamins, and minerals, and it has excellent antioxidant, anti-inflammatory, and anti-aging effects. Moreover, it has attracted the attention of many researchers around the world, although the utilization rate of livestock viscera resources is extremely low in China, which has caused a great waste of resources. Using livestock by-products to produce high-value-added products can reduce environmental pollution caused by improper waste disposal. Bioactive peptides mainly come from plants, animals, and microorganisms, and have various effects such as lowering blood pressure, antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory. They have a wide application prospect in food, medicine, and health products. At present, most reports on bioactive peptides are derived from dairy products and plant proteins, and few reports are based on livestock viscera. Some researchers have conducted in-depth research on the structure-activity relationship. This article summarizes the methods for preparing bioactive peptides from livestock viscera, discusses the activity and structure-activity relationship of bioactive peptides derived from livestock viscera, such as antihypertensive, antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial peptides, and provides new ideas and methods for future research, and makes an outlook for existing technical problems and future research directions.

张昱婷, 牛占占, 黄玉清, 等. 畜禽内脏源生物活性肽的制备、活性分析及构效关系的研究进展[J]. 现代食品科技, 2024, 40(7): 343-352.

ZHANG Yuting, NIU Zhanzhan, HUANG Yuqing, et al. Research progress on preparation, activity analysis, and structure-activity relationship of visceral bioactive peptides from livestock and poultry [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(7): 343-352.

收稿日期: 2023-06-19

基金项目: 河北省省级科技计划资助项目 (22327107D; 21327122D)

作者简介: 张昱婷 (1999-), 女, 研究生, 研究方向: 生物工程, E-mail: 1832499892@qq.com

通讯作者: 苑博华 (1980-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 发酵工程, E-mail: 10568487@qq.com; 共同通讯作者: 王志新 (1980-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 生物工程, E-mail: zhxwang0311@163.com

disposal of waste and improve the comprehensive utilization value of by-products, which is beneficial to the sustainable utilization of livestock and poultry resources in China. Bioactive peptides are mainly derived from plants, animals, and microbiology, and they have many functions, such as lowering blood pressure and enhancing immunity, with antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory properties. Bioactive peptides have broad application prospects in food, medicine, and health products. Currently, bioactive peptides are mainly obtained from dairy products and plant proteins; however, there are few reports on the study of poultry viscera as the raw material for bioactive peptide preparation, although a few researchers have studied the structure-activity relationship. In this paper, the methods of preparing bioactive peptides from livestock viscera are summarized. The activities and structure-activity relationships of antihypertensive peptides, antioxidant peptides, anti-inflammatory peptides, and antimicrobial peptides from livestock viscera were discussed. This study provides new ideas and methods for further research of bioactive peptides from livestock viscera, looks forward to existing technical problems, and showcases future research directions.

Key words: livestock viscera; bioactive peptides; preparation and purification; structure identification; activity analysis; structure-activity relationship

我国是最大的畜禽生产国之一, 据国家统计局统计显示, 我国肉类产量约占全球肉类总产量的四分之一, 2022年中国肉类产量达9 328.44万t, 且呈现持续增长趋势, 其中猪牛羊禽肉产量共计9 227万t, 猪肉产量为5 541万t, 占比59%, 禽肉产量2 443万t, 占比26%。禽畜内脏是一种营养丰富的食品, 富含蛋白质、脂肪、维生素和矿物质, 不仅是一种优质的蛋白资源, 同时还含有大量的超氧化物歧化酶, 具有优良的抗氧化、抗炎以及抗衰老等作用, 是制备生物活性肽的优良原料。虽然我国畜禽内脏资源丰富, 但其利用率很低, 小部分被制成初加工食品售出, 绝大部分作为动物饲料使用, 造成了资源的极大浪费。因此, 使用禽畜副产物制备具有高附加值的产品, 不仅可以减少因废物处理不当造成的环境污染, 还可以提高副产品的综合利用价值, 为我国经济的可持续发展作出贡献。

生物活性肽是指对生物体的正常生命活动具有良好生理作用的肽类化合物, 其结构复杂程度不一, 是介于氨基酸与蛋白质之间的小分子聚合物, 一般由2~20个氨基酸构成。在过去的几十年里, 科学家们更加关注从动植物中分离获得比合成化合物更安全的生物活性肽。据统计, 现已获得的生物活性肽超4 000余种, 其生理功能涉及降血压、抗氧化、抗炎、抗菌以及免疫调节等^[1], 生物活性肽已成为国际上热门的研究课题。目前国内外有关生物活性肽的报道主要源于乳制品、植物蛋白等, 以畜、禽类内脏为原料的研究报道较少, 部分研究者对构效关系进行了较为深入的研究。本文归纳总结了畜、禽类内脏源生物活性肽的制备、纯化以及鉴定方法,

并对其结构与功能的关系进行了深入探究, 重点分析了禽畜内脏源活性肽的生物活性与肽链中氨基酸的种类、数量、在碳链中所处的位置、肽链的空间结构以及特定氨基酸修饰的关系, 为未来更深层次的研究提供新的思路与方法。

1 生物活性肽的制备

1.1 预处理

禽畜内脏源生物活性肽存在于复杂的动物内脏组织之中, 首先需要对禽畜内脏进行机械破碎、匀浆处理以及有机溶剂脱脂等处理, 去除血管、胆管等结缔组织及脂肪, 使被提取物充分释放出来。

活性肽是氨基酸通过肽键相连而成, 并通过氢键、二硫键、范德华力等方式形成复杂空间构象的长链聚合物, 大部分非极性侧链隐藏于分子内部, 而大量研究表明, 生物活性肽的功能基团多为疏水性氨基酸。因此, 匀浆脱脂处理后, 还需要通过加热、超声波、微波及高压等方法辅助蛋白的溶出和作用位点的暴露, 提高水解效率和资源利用。这些预处理方式对后续制备的生物活性肽的理化性质及功能特性也会产生一定的影响。

1.2 制备方法

根据已有报道, 大多数动物蛋白质来源的生物活性肽通常采用酶解法^[2]、微生物发酵法^[3]、水提法^[4]、有机溶剂提取法^[5]、酸碱提取法^[6]或化学合成法^[7]获得。

1.2.1 酶解法制备生物活性肽

酶解法是利用蛋白酶水解蛋白质产生特定多肽

片段的方法, 广泛应用于生物活性肽的制备工艺中, 被认为是生产活性肽最有效的方法^[8]。酶解法具有高度专一性、作用条件温和、酶解效果好且获得的产品安全性高等优点^[9]。目前常用的酶制剂有碱性蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶等。

酶解分为单一酶水解法和复合酶水解法。单一酶水解法是利用一种酶对蛋白质进行水解, 该方法的酶解条件易于控制, 可以得到大量相同且稳定的多肽段。唐素婷等^[10]以鸭心为原料, 中性蛋白酶为水解酶, 通过单因素和响应面实验得到最佳酶解条件, 在最优条件下, 酶解液的水解度可达 17.49%, DPPH 自由基清除率达 58.96%。Nichol 等^[11]使用木瓜蛋白酶水解猪肝获取“粗”肝肽混合物, 经过高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 分离和液相色谱与串联质谱联用 (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) 鉴定后, 得到 FWG、MFLG 和 SDPPLVFG 三种具有抗氧化活性的新肽。

复合酶水解法是指使用两种或两种以上的酶对蛋白质进行水解, 其含有多个酶切位点, 克服了单一酶水解产生的多肽末端氨基酸单一的缺点, 增加了多肽的多样性。郭德斌等^[12]使用复合蛋白酶和碱性蛋白酶对鸭心、鸭肠、鸭胗进行二步酶解, 结果表明, 3 种鸭内脏酶解产物均具有良好的 ABTS 自由基清除能力和 Fe^{2+} 螯合能力。张来弟等^[13]使用碱性蛋白酶和风味蛋白酶对鸭肝进行同步水解, 分离纯化后得到 10 种新肽, 其中, LVYFPGPPI 和 VIESPPEI 质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对炎症细胞中 NO 的抑制率分别为 48.24% 和 56.32%。

1.2.2 发酵法制备生物活性肽

微生物发酵法是利用微生物生长过程中合成分泌的蛋白酶降解底物蛋白质, 产生特定小分子生物活性肽的过程。微生物发酵法利用的酶系丰富、安全性高且利于大规模制备, 但同时也存在发酵工艺周期长、酶活力不稳定、酶特异性不强等缺点^[14]。诸多微生物, 如嗜热链球菌、双歧杆菌、乳杆菌、乳酸菌、枯草芽孢杆菌等都是常见的生物活性肽发酵菌株^[15]。

如今, 国内外使用微生物发酵法制备生物活性肽的技术已经非常成熟, 欧美地区多从乳制品中发酵生产生物活性多肽, 亚非地区则更多的使用豆类作为发酵原料。目前有研究者通过动物肝脏发酵生

产生物活性肽并取得了良好的效果。Chakka 等^[16]采用发酵法制备鸡肝水解物来减轻小鼠模型中由于贫血造成的不良反应, 结果表明, 鸡肝水解物不仅恢复了小鼠的血红蛋白含量, 还显著改善了血清的抗氧化状态。Kumar 等^[17]采用乳酸菌 NCIM5368 制备鸡肝水解物, 结果显示, 鸡肝水解物的水解度为 14.30%, 对 DPPH 自由基和超氧化物阴离子自由基的清除活性高达 96.14% 和 95.02%。

1.2.3 其他方法

大量研究显示, 水提法、酸碱提取法、有机溶剂沉淀法等都可以从动物内脏中提取生物活性肽。De 等^[4]通过水提法从猪肝中提取具有抗炎效果的生物活性肽。任美凤等^[18]使用丙酮分级沉淀法从新鲜鸡心中提取锰超氧化物歧化酶, 经测定酶的比活为 1 633 U/mg, 纯化倍数为 139.16, 能够专一的清除生物体内的超氧自由基。

2 生物活性肽的分离纯化及结构鉴定

2.1 生物活性肽的分离纯化

分离纯化是分析多肽结构和功能之间关系的重要步骤。制备得到生物活性肽酶解液或发酵液后, 需要对其进行分离纯化。初步水解物中不同分子量的活性肽理化性质和生物活性均有所不同, 选择合适的分离技术能够更加准确地富集有效的活性片段, 有助于指导人们开发更高价值的产品。目前, 畜禽内脏源生物活性肽普遍运用的分离纯化方法有膜分离技术、层析技术以及色谱技术。

单一的分离方法往往具有较大的局限性, 通过联合色谱分离技术可以有效地富集和纯化生物活性肽。Fan 等^[19]使用 Sephadex G-15 凝胶色谱和反相高效液相色谱对发酵鸭肝提取物进行分离纯化, 得到总抗氧化活性最高组分的 DPPH 自由基清除活性、羟基自由基清除活性和 ABTS⁺ 自由基清除活性分别为 58.26%、34.26% 和 93.43%。Sun 等^[20]使用凝胶过滤色谱从鸭肝水解物中分离获得四个亚级组分, 其中第二个组分同时表现出最高的 DPPH 自由基清除活性、ABTS⁺ 自由基清除活性以及羟基自由基清除活性。

2.2 生物活性肽的结构鉴定

生物活性肽经过分离纯化处理后, 需要对活性肽进行氨基酸序列及结构特征分析。目前随着质谱

分析技术在生物领域的不断发展,快原子轰击质谱法、电喷雾电离质谱法、液相色谱串联质谱法等都应用于多肽类物质的分析检测之中。Polisel等^[21]使用 LC-MS/MS 技术从猪肝水解产物中鉴定出 14 个短肽,它们与乳清蛋白水解产物具有相似的生物学活性,具有良好的降血糖和降血压能力。舒沿沿等^[5]利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱鉴定得到具有高抗氧化活性的鹅肝肽。但目前的方法也存在步骤繁琐、耗时和成本高等问题^[22]。因此,

需要创建更加快速便捷的结构鉴定方法。

畜禽内脏源生物活性肽来源广、种类多、安全性高。在工艺生产方面,畜禽内脏源生物活性肽的乳化性、起泡性优良,具有良好的稳定性和加工性能。目前,国内对生物活性肽的分离纯化等技术较为成熟,对其机制的研究主要集中在抗氧化、降血压、抗炎、抗菌等方面。下面对畜禽内脏源生物活性肽的制备、分离纯化、结构鉴定及功能评价方法的研究现状进行了汇总,结果见表 1。

表 1 畜禽内脏来源生物活性肽的制备、纯化、鉴定以及功能评价

Table 1 Preparation, purification, identification and functional evaluation of visceral bioactive peptides from livestock and poultry visceral

畜禽内脏来源	制备方法	分离纯化方法	结构鉴定方法	功能评价方法	生物活性肽功能	参考文献
鸡肝	胃蛋白酶水解	膜分离技术	氨基酸分析仪、电泳技术	小鼠分组给药试验,生化分析仪检测小鼠的生化指标	降血脂肽	[23]
鸡肝	胃蛋白酶水解	膜分离技术	氨基酸序列分析	增加脂质代谢、减少氧化应激的能力	降血脂肽、抗氧化肽	[24]
鸡源内脏	鸡肝 胃蛋白酶水解	高效液相色谱技术	SDS-PAGE	DPPH 自由基清除活性、亚铁离子螯合能力	抗氧化肽	[25]
鸡肝	胃蛋白酶水解	膜分离技术	氨基酸序列分析	小鼠体内试验,测定肝脏甘油三酯含量、硫代巴比妥酸值和促炎细胞因子	抗炎、抗氧化、调节脂质稳态	[26]
鸡肠	超声辅助乙酸浸提	葡聚糖凝胶过滤层析、超滤	SDS-PAGE	对指示菌的抑制活性	抗菌肽	[27]
鸭肝	PCR 扩增重组蛋白	高效液相色谱技术	SDS-PAGE、蛋白质印迹分析	对单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌的抑制活性	抗菌肽	[28]
鸭源内脏	鸭肝 风味蛋白酶和碱性蛋白酶水解	凝胶过滤色谱与反相高效液相色谱结合	液相色谱-质谱联用技术	对 NO 的抑制率、对白介素-6 肿瘤坏死因子- α 释放的抑制率	抗炎肽	[13]
鸭肝	碱性蛋白酶水解	Sephadex G-15、反相高效液相色谱技术	液相色谱-串联质谱技术	DPPH、ABTS ⁺ 自由基清除能力	抗氧化肽	[20]
鸭心、鸭肠、鸭胗	碱性蛋白酶和复合蛋白酶水解	高效液相色谱技术	氨基酸序列分析	ABTS ⁺ 自由基清除能力、Fe ²⁺ 螯合能力	抗氧化肽	[12]
鹅肝	胃蛋白酶水解	膜分离技术	—	小鼠分组给药试验,测定小鼠生化指标、炎症因子及肠道微生物	降血脂、抗炎、改善肠道菌群失调	[29]
鹅源内脏	鹅肝 微生物发酵法	凝胶过滤层析技术	氨基酸序列分析	羟自由基清除能力、Fe ²⁺ 螯合能力	抗氧化肽	[5]
鹅肝	胃蛋白酶水解法	离子交换色谱、反相液相色谱	液相色谱-质谱联用技术	羟基自由基清除活性、DPPH 自由基清除活性、Fe ²⁺ 螯合能力、体外细胞实验	抗氧化肽	[30]

续表 1

畜禽内脏来源	制备方法	分离纯化方法	结构鉴定方法	功能评价方法	生物活性肽功能	参考文献	
猪肝	风味蛋白酶水解	膜分离技术、高效液相色谱技术	多荧光检测、反相色谱技术	对 ABTS ⁺ 、DPPH 自由基清除率 / 对热死环丝菌生长的抑制作用	抗氧化肽 / 抗菌肽	[31]	
猪肝	风味蛋白酶水解	高效液相色谱技术	液相色谱-质谱联用技术	自由基清除率	抗氧化肽	[11]	
猪肝	木瓜蛋白酶、胰蛋白酶, 碱性蛋白酶水解	超滤技术	—	ABTS ⁺ 、DPPH 自由基清除率, 对大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌等指示菌的抑制活性	抗氧化肽 / 抗菌肽	[32]	
猪源内脏	猪肝	超声辅助碱性蛋白酶水解	膜分离技术	基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱技术	Fe ²⁺ 螯合活性、DPPH 自由基清除活性和亚油酸氧化抑制活性	抗氧化肽	[33]
猪肝	胶原酶水解	—	—	对脂多糖诱导的白介素-8 产生的抑制能力	抗炎肽	[34]	
猪肝	碱性蛋白酶水解	膜分离技术	基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱技术	水解度、DPPH 自由基清除活性、亚铁离子螯合能力和还原力	抗氧化肽	[35]	
猪肝	水提法	膜分离技术	—	膜生物反应器测定肝细胞消除环氧化酶-2 的能力	抗炎肽	[4]	
羊源内脏	羊肝	碱性蛋白酶水解	响应面优化最佳酶解条件	—	羟自由基、超氧阴离子和 DPPH 自由基的清除能力	抗氧化肽	[36]

3 生物活性肽的活性及构效关系

生物活性肽主要来自动物和植物, 具有多种生物活性。研究表明, 生物活性肽具有降血压、抗氧化、抗菌、抗炎、降血脂和增强免疫力的作用。活性肽的生物活性与肽链中氨基酸的组成、数量、在碳链中所处的位置以及肽链的空间结构有关^[37]。Maestri 等^[38]检测了来自动物源性食物的 807 种生物活性肽的氨基酸序列, 结果表明, 氨基酸的构效关系很大程度上决定了生物活性肽的功能, 其中, N 末端和 C 端倒数第二个位置的氨基酸残基对肽活性的影响最大。目前, 国内对生物活性肽的研究大多停留在纯化鉴定不同来源的多肽, 对其结构与功能的关系的研究较少, 本文对生物活性肽现有构效关系的研究结果进行了总结概述。

3.1 降血压肽

3.1.1 降血压活性

高血压是最常见的心血管疾病之一, 高血压的发生、发展与血管紧张素转换酶 (Angiotensin Converting Enzyme, ACE) 密切相关。现在市面上流通的降压药存在诸多不良作用, 因此, 人们致力

于寻找天然安全的 ACE 抑制剂来预防和治疗高血压, 其中食物来源的 ACE 抑制肽是研究最多的生物活性肽^[39]。

禽畜内脏源生物活性肽大多具有较好的 ACE 抑制活性。María 等^[40]研究发现猪肝水解产物具有良好的 ACE 抑制活性, 在水解 pH 值为 4.8 和 7.5 时制备的多肽具有较高的抑制率, 分别为 65.3% 和 64.8%。Jessika 等^[41]研究发现鸡内脏浓缩蛋白的水解产物具有很强的抑制 ACE 的能力, 其抑制率高达 83.72%。

3.1.2 降血压肽的构效关系

ACE 抑制肽 (即降血压肽) 的活性与肽链的末端氨基酸有关, ACE 抑制肽的 N- 末端多为疏水性氨基酸^[42], 而 ACE 抑制肽的作用主要取决于 C 端的氨基酸, C- 末端三肽残基在与 ACE 活性位点的结合中起主要作用。当 C 端氨基酸为芳香族氨基酸 (Tyr、Phe、Trp) 或含亚氨基的 Pro 时抑制活性较高, 当 C 端 Lys 的 ϵ - 氨基和 Arg 侧链胍基带正电荷时, 可显著提高 ACE 抑制肽的活性^[43]。

ACE 抑制肽的作用也与肽的分子量密切相关, Natesh 等^[44]通过结晶学研究证明, ACE 抑制肽的活性位点不能容纳大的肽分子, 一般含有 2~12 个氨

氨基酸的较短序列; Zhou 等^[45]研究发现, 长达 4 个氨基酸的肽足以与 ACE 有效结合, 更多的残基不会显著增强降血压能力。因此, 可以认为三肽和四肽是降血压高活性候选物的最佳选择。

综合来看, ACE 抑制肽 N 末端多为疏水性氨基酸, C 末端多为芳香族和环状残基。大量研究表明, 肽长度的增加会阻碍其进入 ACE 活性位点, 长度超过 3 个氨基酸的肽, 其 ACE 抑制活性可能会降低, 因此高活性的 ACE 抑制肽多为三肽和四肽。

3.2 抗氧化肽

3.2.1 抗氧化肽活性

机体的氧化平衡是一种重要而微妙的状态^[46], 生物体在病理或极端环境条件下产生的过量活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 会导致蛋白质、脂质等重要细胞生物聚合物的氧化损伤, 引起关节炎、动脉粥样硬化、癌症等各种疾病。抗氧化肽作为一种天然抗氧化剂, 其结构相对简单、易吸收、稳定性好, 具有清除自由基、抑制脂质氧化的能力, 对人体健康具有重要的作用^[47]。

与植物源肽、鱼胶原蛋白肽等生物活性肽相似, 禽畜内脏源活性肽也具有较好的抗氧化活性。Du 等^[30]从鹅肝水解物中分离得到氨基酸序列为 Leu-Pro-Leu-Pro-Phe-Pro 的抗氧化肽, 其具有改善肝细胞醇介导的氧化应激损伤的靶向作用, 并且在模拟胃肠道消化中具有较高的活性及稳定性。Sun 等^[20]采用反相高效液相色谱法等方法分离纯化得到两种新型鸭肝蛋白肽: DTYIRQPW 和 WDDMEKIWHH, 并确定这两种肽具有保护 HepG2 细胞免受氧化损伤的能力。

3.2.2 抗氧化肽的构效关系

研究表明, 决定抗氧化肽生物活性的主要因素是其氨基酸组成。疏水性氨基酸 (Ala、Leu、Pro 等) 以及芳香族氨基酸 (Trp、Phe、Tyr 和 His) 具有很强的电子转移能力, 因而具有自由基清除活性, 其中, 末端为 His 和 Leu 时, 其咪唑环和硫醇基可以提供氢离子来延缓脂质氧化^[48]。郭德斌^[12]采用复合酶法对鸭心、鸭肠、鸭胗进行酶解制备抗氧化肽, 结果显示, 3 种酶解产物的氨基酸组成中疏水性氨基酸序列占比分别为 31.07%、29.19% 和 29.62%。母应春等^[49]采用胃蛋白酶提取羊肝抗氧化肽, 得到的酶解产物对羟自由基的清除率高达 84.50%, 酶解产物中疏水性氨基酸含量为 41.46%, 远远超过其他

氨基酸的含量。上述研究结果均表明疏水性氨基酸的含量直接影响到酶解产物的抗氧化活性。

同时, 肽链中特定氨基酸的位置对其抗氧化特性也至关重要。抗氧化多肽的 N 端多为疏水性氨基酸, 而 C 端多为亲水性的氨基酸。其中, 位于 N 端的氨基酸更为重要, 这是由于 N 端的疏水性氨基酸具有脂肪烃侧链, 可以帮助抗氧化多肽从细胞膜移位至 ROS 部位进行清除反应, 从而有效地抑制脂质过氧化^[50]。而 C 端具有亲水性基团的抗氧化肽可以提高其溶解度, 从而提高生物利用度^[51]。一些研究表明, 特定的氨基酸修饰也可以增强抗氧化性能, Xiong 等^[52]研究发现木糖修饰的鸡肝蛋白肽对 DPPH 和羟自由基的清除能力以及还原性均显著增强。另外, 抗氧化多肽的生物活性也受分子质量的影响, 低分子质量的多肽更容易通过机体肠道等屏障, 因而表现出更高的抗氧化活性。María 等^[51]使用蛋白水解酶处理猪肝, 得到 44 种抗氧化肽, 对他们进行抗氧化能力测定发现由 3~6 个氨基酸 (分子量低于 1 ku) 组成的短肽具有更好的自由基清除能力。

3.3 抗炎肽

3.3.1 抗炎活性

炎症是机体对局部损伤或感染的反应, 过度的炎症反应通常会引发动脉粥样硬化和癌症等慢性病^[53,54]。目前使用的抗炎药物具有依赖性、过敏性、代谢紊乱等副作用, 因此, 研究开发安全高效的天然抗炎肽是如今的焦点。

抗炎肽可以通过抑制白介素 -1 β 、白介素 -6、白介素 -12、肿瘤坏死因子 - α 等促炎因子的合成, 提高白介素 -10、转化生长因子等抑炎因子的表达来减轻炎症反应。一些体外研究表明禽畜内脏源活性肽具有一定的抗炎活性。张来弟等^[13]从鸭肝中筛选得到 3 种具有抗炎功效的新肽, 其中, 肽段 VIESPPEI 在质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对肿瘤坏死因子 - α 释放的抑制率达 42.48%; 而 IDVSPDSDHY 抑制白介素 -6 释放能力最强, 在质量浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 抑制率达到 27.04%。

3.3.2 抗炎肽的构效关系

近年来, 动物源抗炎肽的数量不断增加, 但对其构效关系研究十分有限, 其特异性的分子机制在很大程度上仍是未知的^[55]。研究表明, 抗炎肽的特异性基团富含疏水性氨基酸, 其中亮氨酸、丝氨酸、

酪氨酸和精氨酸残基占主导地位^[56]。此外, 抗炎肽在肠道消化吸收和转运的机制也需要详尽阐明。Hasegawa 等^[57]研究发现, 甘氨酸、组氨酸和半胱氨酸可以抑制内皮细胞中核因子 κ B 的活化、核因子抑制蛋白的降解、E-选择素的表达和白介素-6的产生, 表明这些氨基酸可能在内皮炎症过程中表现出抗炎作用。

现阶段研究者对抗炎肽的研究较为薄弱, 对其构效关系的研究多为简单的理论推理和预测, 缺乏充足、系统的实验依据。随着对抗炎肽的不断深入研究, 我们应该将多肽的抗炎活性与其空间结构联系起来, 为研究其作用机制提供理论基础, 也可定向合成、改造、开发抗炎活性更佳的多肽类产品提供依据。

3.4 抗菌肽

3.4.1 抗菌活性

抗菌肽是机体抵抗外来致病菌侵袭的重要屏障, 不同来源的抗菌肽可能呈现不同的作用机制^[58]。天然来源的抗菌肽具有稳定性好、安全性高、广谱抗菌性等优点, 逐渐成为医药、食品、畜牧业的研究热点^[59]。相关研究表明, 禽畜内脏来源活性肽具有一定的抑菌作用, 高彦华^[60]研究发现从猪小肠组织中分离纯化得到的猪抗菌肽 PR-39, 其对常见病原微生物具有广谱抗菌活性, 同时具有抑制炎症、促进损伤修复等免疫功能。

3.4.2 抗菌肽的构效关系

不同的抗菌肽虽然在二级和三级结构上存在差异, 但抗菌肽通常由一个疏水表面和一个亲水表面组成。这种独特的两亲性特征使得抗菌肽可以与菌体细胞膜相互作用, 在抗菌作用机制中起作用^[61]。

抗菌肽的氨基酸组成和分子量大小决定了其抗菌能力。研究发现, 抗菌肽主要由疏水性氨基酸组成, 脂肪族和芳香族氨基酸也起到了一定作用。Borrajó 等^[31]研究发现, 猪肝水解物中富含脂肪族和芳香族氨基酸的短肽, 其抗菌性较高。大多数抗菌肽均带正电荷^[62], 在一定范围内, 其阳离子浓度与抗菌能力呈正相关^[63], 较高数量的碱性氨基酸会有效提升其抗菌能力。多肽的抗菌能力也与肽序列的三维拓扑结构有关, 研究表明, α -螺旋构象丰富的抗菌肽具有较高的两亲性, 与菌体具有较强的结合能力, 而 β -折叠构象较为复杂, 其作用机制尚未完全阐明^[64]。Ma 等^[65]设计了四种具有 α -螺旋的杂交

肽, 这些肽通过增加膜通透性和破坏膜完整性来杀死微生物细胞。

3.5 其他生物活性肽

研究证明, 畜、禽源内脏蛋白水解物还具有降血糖、降血脂、抗衰老、抗癌、增强免疫力^[66]等其他生物活性。Wu 等^[23]研究发现, 从鸡肝中提取的生物活性肽可以缓解高脂血症小鼠的糖代谢障碍, 降低空腹血糖并增加糖耐量, 同时增加葡萄糖转运蛋白的表达, 进而促进肝、骨骼肌和肾周脂肪组织对葡萄糖的吸收利用。Yang 等^[67]将鸡肝水解物添加到仓鼠饮食中, 结果显示, 鸡肝水解物可以有效改善脂质稳态和抗氧化能力。赵金等^[29]将鹅肝酶解物添加到大鼠饲料中进行喂养, 并实时测定试验组大鼠的各项生理指标, 结果表明, 鹅肝酶解物显著降低了大鼠血清中的尿素氮、胆固醇、甘油三酯及炎症水平, 并且改善了大鼠肠道微生物紊乱的现象。

4 展望

综上所述, 禽畜内脏源生物活性肽具有巨大的研究潜力, 在降血压、抗氧化、抗炎、抗菌以及增强免疫力等方面均有优良的表现, 开发多功能性禽畜内脏源活性肽刻不容缓。但我国对禽畜内脏的精深加工和高值化起步晚, 还存在一些待解决的问题。目前研究者大多根据活性肽的纯度以及与底物的亲和力和进行筛选, 忽视了其在体内的吸收代谢机制及效果, 因此我们应建立结构-功能关系的多维度模型, 深入研究禽畜类活性肽的定量构效关系及其在体内的代谢机制。同时, 为了促进人类健康, 活性肽的生物利用度、体内持久性和特异性需要进一步研究。此外, 有研究发现, 高血压, 慢性炎症在代谢综合发病机制中具有很强的相互作用, 因此, 挖掘更多的禽畜内脏源活性肽以及探究活性肽功能之间的协同作用具有重要意义。所以, 我们要寻找更加高效、快速的活性肽分离纯化方法, 尽可能多的从禽畜内脏中提取功能性生物活性肽。同时, 借鉴其他领域的新方法、新机理、新思路, 深层次的了解活性肽的构效关系及作用机制, 计算机等工具的使用以及涵盖更广泛生物活性的强大生化分析, 将成为发现及改进生物活性肽的方法。现研究均表明肽链 N 末端的疏水性氨基酸以及 C 末端的芳香族氨基酸以及环状残基在一定程度上都会提升其功能特性, 并且特定的氨基酸修饰也可以增强其活性, 所

以,随着生物信息学、量子化学、基因编辑等技术的进步,可以使用定点诱变等其他分子生物学技术来提高生物活性肽的表达。同时,在未来的研究中,还应关注添加活性肽食品的感官评价、理化性质、营养价值等问题,开发更有效的工艺技术来获得具有生物活性且消费者可接受的多肽产品。

参考文献

- [1] 包显颖,陈丽,倪姮佳,等.抗氧化多肽研究及其应用前景[J].生命科学,2016,28(9):998-1005.
- [2] VERMA A K, CHATLI M K, KUMAR P, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of porcine liver hydrolysate in meat emulsion and their influence on physico-chemical and color deterioration during refrigeration storage [J]. Journal of Food Science, 2019, 84(7): 1844-1853.
- [3] 刘铭,刘玉环,王允圃,等.制备、纯化和鉴定生物活性肽的研究进展及应用[J].食品与发酵工业,2016,42(4):244-251.
- [4] DE B L, SALERNO S, GIORNO L, et al. Membrane bioreactor using pig hepatocytes for *in vitro* evaluation of anti-inflammatory drugs [J]. Catalysis Today, 2005, 118(1): 172-180.
- [5] 舒沿沿,胡冰雪,潘道东,等.发酵鹅肝肽的分离纯化及其抗氧化特性研究[J].食品工业科技,2016,37(24):105-110.
- [6] 王立,邹焯,张坤,等.响应面试验优化超声辅助碱提鸭肝蛋白工艺及其抗氧化性能[J].食品科学,2017,38(18):222-228.
- [7] 谢博,傅红,杨方.生物活性肽的制备、分离纯化、鉴定以及构效关系研究进展[J].食品工业科技,2021,42(5):383-391.
- [8] PEIGHAMBARDOUST SH, KARAMI Z, PATEIRO M, et al. A review on health-promoting, biological, and functional aspects of bioactive peptides in food applications [J]. Biomolecules, 2021, 11(5): 631.
- [9] 裴小平,唐道邦,肖更生,等.抗氧化肽制备的应用现状及趋势[J].食品工业科技,2009,2:319-322.
- [10] 唐素婷,母应春,赵泽伟,等.鸭心蛋白酶解条件优化及其抗氧化活性研究[J].食品科技,2015,40(12):100-106.
- [11] PEARMAN N A, RONANDER E, SMITH A M, et al. The identification and characterisation of novel bioactive peptides derived from porcine liver [J]. Current Research in Food Science, 2020, 3: 314-321.
- [12] 郭德斌,邱丽聰,李军,等.3种鸭内脏基本成分及其酶解液体外抗氧化活性对比分析[J].食品安全质量检测学报, 2022,13(10):3141-3147.
- [13] 张来弟,孙杨赢,周昌瑜,等.鸭肝蛋白酶解产物中抗炎肽的分离鉴定及活性分析[J].食品科学,2023,44(12):150-156.
- [14] 陈月华,程云辉,许宙,等.食源性生物活性肽免疫调节功能研究进展[J].食品与机械,2016,32(5):209-213.
- [15] CHAKRABARTI S, GUHA S, MAJUMDER K. Food-derived bioactive peptides in human health: challenges and opportunities [J]. Nutrients, 2018, 10(11): 1738.
- [16] CHAKKA A K, RAMANATIKARA J, ZITUJI S P, et al. *In-vivo* anti-anaemic effects of bioactive compounds prepared from chicken liver using biotechnological tools [J]. Waste and Biomass Valorization, 2021, 12(12): 6699-6708.
- [17] CHAKKA A K, ELIAS M, JINI R, et al. *In-vitro* antioxidant and antibacterial properties of fermentatively and enzymatically prepared chicken liver protein hydrolysates [J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(12): 8059-8067.
- [18] 任美凤,胡瑞斌,孙芳,等.鸡心SOD的分离纯化及部分性质研究[J].西南大学学报(自然科学版),2013,35(2):35-40.
- [19] FAN X, HAN Y, SUN Y, et al. Preparation and characterization of duck liver-derived antioxidant peptides based on LC-MS/MS, molecular docking, and machine learning [J]. LWT, 2023, 175: 114479.
- [20] SUN J, ZHOU C, CAO J, et al. Purification and characterization of novel antioxidative peptides from duck liver protein hydrolysate as well as their cytoprotection against oxidative stress in HepG2 cells [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 848289.
- [21] POLISELI C B, TONIN A P P, MARTINEZ F C, et al. Tri- and dipeptides identification in whey protein and porcine liver protein hydrolysates by fast LC-MS/MS neutral loss screening and de novo sequencing [J]. Journal of Mass Spectrometry 2021, 56(2): e4701.
- [22] DALLAS D C, GUERRERO A, PARKER E A, et al. Current peptidomics: applications, purification, identification, quantification, and functional analysis [J]. Proteomics, 2015, 15(5-6): 1026-1038.
- [23] WU Y H S, LIN Y L, HUANG C, et al. Cardiac protection of functional chicken-liver hydrolysates on the high-fat diet induced cardio-renal damages via sustaining autophagy homeostasis [J]. Journal of The Science of Food and Agriculture, 2020, 100(6): 2443-2452.
- [24] YANG G T, LIN C, LIU C W, et al. Effects of chicken-liver hydrolysates on lipid metabolism in a high-fat diet [J]. Food Chemistry, 2014, 160: 148-156.
- [25] CHOU C H, WANG S Y, LIN Y T, et al. Antioxidant activities of chicken liver hydrolysates by pepsin treatment [J]. International Journal of Food Science, 2014, 49(7): 1654-1662.
- [26] LIN Y L, TAI S Y, CHEN J W, et al. Ameliorative effects of pepsin-digested chicken liver hydrolysates on development of alcoholic fatty livers in mice. [J]. Food & Function, 2017, 8(5): 1763-1774.
- [27] 谭淑樱,王海英,祁克宗,等.鸡肠道抗菌肽的提取及活性研究[J].家禽科学,2009,7:3-6.

- [28] HONG Y, TRUONG A D, LEE J, et al. Identification of duck liver-expressed antimicrobial peptide 2 and characterization of its bactericidal activity [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2019, 32(7): 1052.
- [29] 赵金,潘道东,孙杨赢,等.鹅肝酶解物对酒精性脂肪肝的改善作用[J].*核农学报*,2019,33(7):1393-1398.
- [30] DU Y, CHEN Z, WEI H, et al. Isolation and identification of antioxidative peptide from goose liver hydrolysate to ameliorate alcohol-mediated oxidative stress damage in HHL-5 hepatocytes [J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7151.
- [31] BORRAJO P, LÓPEZ-PEDROUSO M, FRANCO D, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of porcine liver hydrolysates using flavourzyme [J]. *Applied Sciences*, 2020, 10(11): 3950.
- [32] VERMA A K, CHATLI M K, KUMAR P, et al. *In-vitro* assessment of antioxidant and antimicrobial activity of whole porcine-liver hydrolysates and its fractions [J]. *Animal Production Science*, 2019, 59(4): 641-646.
- [33] YU H C, TAN F J. Effect of ultrasonic pretreatment on the antioxidant properties of porcine liver protein hydrolysates [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2017, 52(6): 1392-1399.
- [34] MÁTIS G, KULCSÁR A, PETRILLA J, et al. Porcine hepatocyte-Kupffer cell co-culture as an *in vitro* model for testing the efficacy of anti-inflammatory substances. [J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2017, 101(2): 201-207.
- [35] YU H C, TAN F J. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis conditions for the production of antioxidant hydrolysates from porcine liver by using response surface methodology [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2017, 30(11): 1612.
- [36] 文飞,母应春,李静雯,等.羊肝蛋白酶解条件优化及酶解产物抗氧化活性研究[J].*中国酿造*,2017,36(1):157-163
- [37] NASRI M. Protein hydrolysates and biopeptides: production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A review. [J]. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2017, 81: 109-159.
- [38] MAESTRI E, PAVLICEVIC M, MONTORSI M, et al. Meta-analysis for correlating structure of bioactive peptides in foods of animal origin with regard to effect and stability [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(1): 3-30.
- [39] MORA L, REIG M, TOLDRÁ F. Bioactive peptides generated from meat industry by-products [J]. *Food Research International*, 2014, 65: 344-349.
- [40] LÓPEZ-PEDROUSO M, LORENZO J M, BOU R, et al. Valorisation of pork by-products to obtain antioxidant and antihypertensive peptides [J]. *Food Chemistry*, 2023, 423: 136351.
- [41] DOS SANTOS AGUILAR J G, DE SOUZA A K S, DE CASTRO R J S. Enzymatic hydrolysis of chicken viscera to obtain added-value protein hydrolysates with antioxidant and antihypertensive properties [J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2019, 26: 717-725.
- [42] HERNÁNDEZ-LEDESMA B, DEL MAR CONTRERAS M, RECIO I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods [J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2010, 165(1): 23-25.
- [43] GIRGIH A T, HE R, MALOMO S, et al. Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides [J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 6: 384-394.
- [44] NATESH R, SCHWAGER S L U, STURROCK E D, et al. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex [J]. *Nature*, 2003, 421(6922): 551-554.
- [45] ZHOU P, YANG C, REN Y, et al. What are the ideal properties for functional food peptides with antihypertensive effect? A computational peptidology approach [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 2967-2973.
- [46] LORENZO J M, MUNEKATA P E S, GÓMEZ B, et al. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review [J]. *Trends in Food Science*, 2018, 79: 136-147.
- [47] 闫昌誉,丁肇俊,李晓敏,等.鸡源性活性肽的研究进展[J].*今日药学*,2022,32(1):4-16.
- [48] PARK E Y, NAKAMURA Y, SATO K, et al. Effects of amino acids and peptide on lipid oxidation in emulsion systems [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2012, 89: 477-484.
- [49] 母应春,苏伟,文飞,等.基于Plackett-Burman设计和响应面法优化羊肝抗氧化肽的制备工艺[J].*中国酿造*,2017, 36(7):161-166.
- [50] NWACHUKWU I D, ALUKO R E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(1): e12761.
- [51] LÓPEZ-PEDROUSO M, LORENZO J M, BORRAJO P, et al. In search of antioxidant peptides from porcine liver hydrolysates using analytical and peptidomic approach [J]. *Antioxidants*, 2021, 11(1): 27.
- [52] XIONG G.Y, CHEN X, ZHANG X X, et al. Process optimization and the relationship between the reaction degree and the antioxidant activity of Maillard reaction products of chicken liver protein hydrolysates [J]. *Poultry Science*, 2020, 99(7): 3733-3741.
- [53] TABAS I, GLASS C K. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities [J]. *Science*, 2013, 339(6116): 166-172.
- [54] CHAKRABARTI S, JAJANDIDEH F, WU J. Food-derived

- bioactive peptides on inflammation and oxidative stress [J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 608979.
- [55] KHATUN M, HASAN M M, KURATA H. PreAIP: Computational prediction of anti-inflammatory peptides by integrating multiple complementary features [J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 129.
- [56] GUPTA S, SHARAM A K, SHASTRI V, et al. Prediction of anti-inflammatory proteins/peptides: an insilico approach. [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2017, 15(1): 1-11.
- [57] HASEGAWA S, ICHIYAMA T, SONAKA I, et al. Cysteine, histidine and glycine exhibit anti-inflammatory effects in human coronary arterial endothelial cells [J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2012, 167(2): 269-274.
- [58] CORRÊA J A F, EVANGELISTA A G, DE MELO NAZARETH T, et al. Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides [J]. *Materialia*, 2019, 8: 10094.
- [59] 贾英民,刘杨柳,陈洲.抗菌肽研究现状及其在食品安全中的应用前景[J].*食品科学技术学报*,2017,35(6):1-9.
- [60] 高彦华.猪抗菌肽PR-39的表达特性和调控及免疫调节机制研究[D].杭州:浙江大学,2014.
- [61] DASHPER S G, LIU S W, REYNOLDS E C. Antimicrobial peptides and their potential as oral therapeutic agents [J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2007, 13(4): 505-516.
- [62] PATIL-SEN Y, DENNISON S R, SNAPE T J. Functional foldamers that target bacterial membranes: The effect of charge, amphiphilicity and conformation [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2016, 24(18): 4241-4245.
- [63] RONČEVIĆ T, KRCE L, GERDOL M, et al. Membrane-active antimicrobial peptide identified in *Rana arvalis* by targeted DNA sequencing [J]. *BBA-Biomembranes*, 2018, 1861(3): 651-659.
- [64] SHI Y, WAN M, FU L, et al. Peptide-lipid interaction sites affect vesicles' responses to antimicrobial peptides [J]. *Biophysical Journal*, 2018, 115(8): 1518-1529.
- [65] MA Z, WEI D, YAN P, et al. Characterization of cell selectivity, physiological stability and endotoxin neutralization capabilities of α -helix-based peptide amphiphiles [J]. *Biomaterials*, 2015, 52: 517-530.
- [66] 程媛,曹慧,徐斐,等.食源性蛋白中免疫活性肽的研究进展[J].*食品科学*,2015,36(17):296-299.
- [67] YANG K T, LIN C, LIU C W, et al. Effects of chicken-liver hydrolysates on lipid metabolism in a high-fat diet [J]. *Food Chemistry*, 2014, 160: 148-156.