

干腌火腿抗氧化肽的研究进展

谢锐鸿¹, 肖珊^{1,2*}, 王波², 王际辉^{1,2}

(1. 大连工业大学生物工程学院, 大连 116034; 2. 东莞理工学院生命健康与技术学院, 东莞 523808)

摘要: 自由基过量累积会导致人体许多慢性疾病的产生, 如衰老、慢性炎症、心血管疾病等, 目前常规的解决方法是使用抗氧化剂。然而人工合成的抗氧化剂对人体有潜在危害, 因此无毒副作用的抗氧化肽成为了当今研究的热点。作为发酵肉制品之一的干腌火腿, 因其蛋白质含量丰富, 且在发酵过程中受到内源酶和微生物的影响, 会对蛋白质进行分解, 从而产生具有抗氧化活性的小肽。大量的研究表明, 来源于干腌火腿的肽具有极强的抗氧化活性。因此, 干腌火腿作为天然抗氧化肽的潜在来源, 备受研究人员的关注。本文综述了干腌火腿中抗氧化肽研究的最新进展, 主要包括抗氧化肽的形成、制备、纯化鉴定及抗氧化机制 4 个方面, 其中特别指出外源微生物对抗氧化肽形成的影响, 以期为干腌火腿抗氧化肽的进一步研究提供理论基础。

关键词: 干腌火腿; 抗氧化肽; 抗氧化性; 内源酶; 微生物

Research progress on the antioxidant peptides in dry-cured ham

XIE Rui-Hong¹, XIAO Shan^{1,2*}, WANG Bo², WANG Ji-Hui^{1,2}

(1. College of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; 2. College of Life Health and Technology, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, China)

ABSTRACT: Excessive accumulation of by radicals can lead to the development of many chronic diseases in the body, such as aging, chronic inflammation, cardiovascular disease, etc.. The conventional solution is the use of antioxidants. However, synthetic antioxidants are potentially harmful to the human body, so antioxidant peptides without toxic side effects have become a hot topic in today's research. Dry-cured ham, one of the fermented meat products, is rich in proteins and underwent the influence of endogenous enzymes and microorganisms during the fermentation process. This process breaks down the proteins to produce small peptides with antioxidant activity. Numerous studies show that peptides derive from dry-cured ham had extremely potent antioxidant activity. Therefore, dry-cured ham attract much attention from researchers as a potential source of natural antioxidant peptides. This article reviewed the latest progress in the study of antioxidant peptides in dry-cured ham, mainly including the formation, preparation, purification and identification of antioxidant peptides, and antioxidant mechanisms. It specifically pointed out the influence of exogenous microorganisms on the formation of antioxidant peptides, in order to provide a theoretical basis for further research on antioxidant peptides in dry-cured ham.

KEY WORDS: dry-cured ham; antioxidative peptide; antioxidation activity; endogenous enzyme; microorganism

基金项目: 东莞理工学院高层次人才科研启动项目(GC300501-139)

Fund: Supported by the Dongguan University of Technology High-level Talent Research Initiation Project (GC300501-139)

*通信作者: 肖珊, 博士, 副教授, 主要研究方向为肉品科学。E-mail: xiaoshan@dgut.edu.cn

*Corresponding author: XIAO Shan, Ph.D, Associate Professor, College of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; College of Life Health and Technology Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, China. E-mail: xiaoshan@dgut.edu.cn

0 引言

长期以来,干腌火腿一直被认为是一种具有丰富营养价值的滋补食品。古籍《藏药秘诀》中记录了干腌火腿的多种功效,包括生津、壮阳、开胃、安神等。这些功能可能与干腌火腿中含有的生物活性肽有关,因此干腌火腿在发酵过程中生成的多种生物活性肽已成为研究的热点^[1]。

近年来,生物活性肽已广泛应用于人们的日常生活。这些生物活性肽根据其不同功能可以分为多个类别,如抗氧化肽、抗菌肽、降血糖肽等。目前,抗氧化肽是生物活性肽领域的研究热点之一。研究已经明确,自由基是一类具有高度氧化活性的分子或原子,它们与多种慢性疾病之间存在密切的关联^[2-3]。如 HARRAAN^[4]研究发现自由基的产生会对细胞和组织造成损伤,从而引起机体衰老; KOHEN 等^[5]总结了氧化应激和自由基与慢性炎症的关系,并着重介绍了氧化应激的机制以及氧化剂在减轻炎症过程中的作用。抗氧化肽作为一种具有抗氧化活性的物质,且对人体没有明显的毒副作用,因此引起了广泛的关注。

目前,对于干腌火腿中抗氧化肽的研究主要集中在抗氧化肽的形成机制、分离纯化方法以及其作用机制方面。本文阐述了近年来关于干腌火腿来源抗氧化肽的研究进展,重点总结了外源微生物对抗氧化肽形成的影响,并指出了其问题和不足,旨在为动物源抗氧化肽,尤其是干腌火腿来源抗氧化肽的进一步发展提供理论基础。

1 干腌火腿抗氧化肽的形成

1.1 抗氧化肽

自从 LEWIS^[6]于 1916 年首次提出自由基的概念以来,随着科研人员的进一步研究,人们已经认识到自由基的产生与人体许多慢性疾病息息相关。天然的抗氧化肽具有卓越的抗氧化活性,它们能够通过多种方式发挥作用,包括螯合金属离子以去除多余的重金属,清除自由基以减缓自动氧化反应的速率,还可以促进过氧化氢的分解,从而减

少过氧化氢的含量^[7]。这些机制使得抗氧化肽在保护生物体免受氧化应激和氧化损伤方面具有重要作用。目前,抗氧化肽的主要来源包括动物蛋白^[8]、植物蛋白^[9]、微生物蛋白^[10]等。其中,作为传统的发酵肉制品,干腌火腿富含丰富的蛋白质,是天然抗氧化肽重要来源。目前,已有研究人员从干腌火腿中分离得到抗氧化肽^[11-16],如表 1 所示。XING 等^[10]研究团队发现,从宣威火腿中提取的抗氧化肽 DLEE 在对 Caco-2 细胞的氧化应激中展现出显著的保护效果。这一发现揭示了该肽在药物应用方面的潜在价值,为未来设计用于维护肠道健康的药物提供了新的思路。此外,祝超智^[7]的研究发现,添加金华火腿粗肽液能够有效延长广式腊肠的货架期,其效果甚至优于化学抗氧化剂 BHT。这提示火腿来源的粗肽在食品中可作为高效抗氧化剂使用。这些研究成果为开发健康食品和药物提供了实质性的支持和指导,同时表明了抗氧化肽在医药、食品科学,食品营养学等交叉学科中的巨大潜力。

1.2 抗氧化肽形成机制

在制备干腌火腿的过程中,肌肉内的内源酶直接参与抗氧化肽的形成。火腿生物活性肽的生成涉及多种酶,包括组织蛋白酶 B、D、H、L,钙激活蛋白酶,以及氨肽酶和二肽酶。这些酶在火腿的制备过程中扮演着关键角色,促使蛋白质水解,生成具有抗氧化活性的生物活性肽^[19]。此外,外源微生物也与干腌火腿中抗氧化肽的形成密切相关。目前有许多研究人员表明,从干腌火腿中分离得到的一些微生物菌株具有高产蛋白酶的特性^[20-22]。以下两部分内容将对内源酶及微生物对肽的形成影响进行综合阐述。

1.2.1 内源酶对肽的形成影响研究

组织蛋白酶是指位于细胞内溶酶体中的多种小尺寸蛋白酶的总称。当动物体死去无生命体征时,组织蛋白酶会随着溶酶体裂解而游离出,发挥其蛋白质降解的能力,从而形成抗氧化肽等生物活性肽^[23]。研究表明,不同的组织蛋白酶对蛋白质降解起到不同的效果^[19,23-26]。组织蛋白酶 B 和 L 在降解肌原纤维蛋白方面表现出较强的降解能力,

表 1 不同火腿来源的抗氧化肽及氨基酸序列

Table 1 Antioxidant peptides and amino acid sequences from different sources of ham

火腿品种	纯化方式	氨基酸序列	参考文献
金华火腿	凝胶层析色谱法、凝胶层析色谱法	DHDGPDHW、FPPDVG D、PFGDTH、VRPPASKSL、LPGGGHGDL、FLKMN、GKFNV、LPGGGT、KEER、HA	[7,12]
诺邓火腿	凝胶层析色谱法	QVTSLSGQcHHHDEK、VHQYFNVGLIQPGSVK、QNLLSQSHAHQQFLR、GcFKPIVAGDQNV EYK、AIQISYNPEDLSKPDR、NLHPELGTADAKEHWK、IRELESQISELQELQEDLESER、IHVSDQELQSANASVDDSRLEELK	[13]
宣威火腿	凝胶层析色谱法、离子交换色谱法、高效液相色谱法、反相高效液相色谱法、凝胶层析法	DLEE、NPPKFD、GHYTEGAELVDSVL DVVRK、TDEFQLHTNVNDGTEFGGSIYQK	[11,14-15]
西班牙干腌火腿	凝胶层析色谱法、反相色谱法、凝胶层析色谱法、凝胶层析色谱法	SAGNPN、GLAGA、SNAAC、AEEETPDL	[16-18]

它们能够进行多位点降解,从而进行有效分解。而组织蛋白酶 H 在降解肌肉蛋白方面的作用相对有限,但它具有较高的稳定性,这在一些特定的环境下可能具有优势。相对而言,组织蛋白酶 D 的稳定性较差,其选择性受到所处环境的 pH 影响较大。在 pH 为 3.0 的环境下,组织蛋白酶 D 会降解肌球蛋白重链、 α -肌动蛋白、原肌球蛋白以及肌钙蛋白的 T 亚基和 I 亚基。而当环境的 pH 为 5.5 时,组织蛋白酶 D 则会对肌联蛋白、伴肌动蛋白、M 蛋白和 C 蛋白进行降解。XING 等^[27]进行了多肽组学分析,对从金华火腿中提取的抗氧化肽进行研究,结果发现,这些抗氧化肽中有大约 32%来自肌球蛋白,其余的主要来源于原肌球蛋白、肌钙蛋白和肌动蛋白等,这项研究从组学的角度证实了火腿抗氧化肽的来源与肌肉内源酶的存在密切相关。GALLEGO 等^[28]的研究也证实,组织蛋白酶 B、H、L 对干腌火腿中抗氧化肽的形成息息相关。

钙激活蛋白酶是一种半胱氨酸类内肽酶,这种蛋白酶通常需要一定浓度的钙离子才能被激活。研究表明钙激活蛋白酶在低盐环境下可增强其活性,而高盐环境下则导致活性丧失^[29-30]。因此,钙组织蛋白酶主要在火腿加工初期发挥作用,并随着加工过程逐渐丧失活性。目前,研究人员已确定了 14 种不同类型的钙激活蛋白酶,并发现 μ -钙激活蛋白酶和 m-钙激活蛋白酶与肉类的宰后成熟过程密切相关^[31]。这两种蛋白酶都具有强大的蛋白质降解能力,对肉类中的蛋白质水解起到重要作用,影响着肉类的口感和品质。MORA 等^[32]从塞拉诺火腿中提取得到 14 个来源于肌原纤维蛋白的多肽片段,并推测钙激活蛋白酶在其中起到关键作用。BARON 等^[33]发现 μ -钙激活蛋白酶和 m-钙激活蛋白酶会先酶解肌原纤维蛋白产生大量多肽,其后其他组织蛋白酶进一步酶解,将大量多肽降解成小肽。综上所述,钙激活蛋白酶虽然作用范围有限,但对干腌火腿中活性肽的形成起到关键作用,主要体现在腌制初期促进肌原纤维蛋白的初步降解。

氨肽酶和二肽酶分别存在于细胞质和溶酶体中,它们在火腿发酵后期的蛋白质水解方面起着重要作用^[30,34]。在火腿加工过程中,蛋白酶会水解并破坏火腿的蛋白质网状结构,从而影响火腿的质地。随后,在氨肽酶和肽酶的作用下会产生游离氨基酸和寡肽等物质。研究表明,肽酶具有较高的活性,类似于组织蛋白酶 D。在火腿加工过程中,肽酶的活性逐渐减弱,但在末期仍可观察到^[35]。火腿中常见的肽酶包括二肽酶和三肽酶,它们能够分别水解蛋白质片段和多肽的 N 端,生成二肽和三肽^[36]。据报道,二肽酶能够从 N 端水解 Ala-Gln、Arg-Gly、Asn-Pro、Ile-Leu、Ala-Gly、Ser-Gly、Ser-Gln 等二肽,而三肽酶能够水解位于 N 端的 Ile-Ile-Pro、Arg-Gly-Ala、Gly-Ala-Gly、Gly-Pro-Gly 等三肽^[37]。氨肽酶在谷氨酸、丙氨酸、亮氨酸、赖氨酸等氨基酸的生成过程中发挥着关键作用^[38],在干腌

火腿的整个加工过程中均检测到氨肽酶的活性^[39],这表明其在火腿中的整个加工过程中都参与了活性肽的形成。

在发酵过程中,影响干腌火腿蛋白质水解的因素包括原料品质差异、加工条件和时间等。这些因素的不同均会导致内源酶类型和活性的差异,进而影响蛋白质水解。此外,随着火腿发酵时间的延长,温度和盐含量逐渐上升,水分活度逐渐降低,也会导致内源酶的活性降低^[23,36]。总之,内源酶在蛋白质水解中起到关键作用,是干腌火腿中活性肽形成的关键因素之一。

1.2.2 微生物对肽的形成影响研究

在火腿的发酵过程中,外源微生物会产生蛋白酶,降解原料肉中的蛋白质,从而生成肽和氨基酸^[39]。这一过程不仅产生了大量的风味物质,还提高了火腿的营养价值。外源微生物在干腌火腿的制备中起到了重要作用,促进了抗氧化肽和火腿风味的产生^[40]。研究人员对干腌火腿的微生物菌群结构进行了分析,发现在发酵过程中,葡萄菌属和曲霉菌属作为优势菌群发挥着重要作用,同时还检测到具有蛋白质降解能力的芽孢杆菌属^[20]。这一发现表明,在火腿的发酵过程中,外源微生物通过降解蛋白质的作用,促使抗氧化肽的形成。这些微生物在形成干腌火腿特殊风味、滋味中起着非常重要的作用,并有助于促进抗氧化肽的生成,提高火腿的营养价值。董杰等^[21]从如皋火腿、金华火腿和宣威火腿中筛选出了能够产生高活性蛋白酶的葡萄球菌。潘明^[22]从如皋火腿的表面霉菌中筛选出了能产生高活性蛋白酶和脂肪酶的黄青霉。这些研究结果表明,不同类型的微生物在发酵肉制品中均可以产生多种蛋白酶,有助于抗氧化肽的形成。值得注意的是,干腌火腿的加工环境和加工工艺也会显著影响其微生物多样性。然而,目前国内外的研究中,对干腌火腿外源微生物与活性肽形成之间的关系研究相对较少,而且对于外源微生物、内源酶和蛋白质之间的相互作用机制也缺乏深入的研究。因此,未来研究中,微生物对干腌火腿活性肽形成的影响将成为一个重要的研究方向,有助于更全面地理解干腌火腿制备过程中微生物、酶和蛋白质之间的复杂相互作用关系,同时有助于进一步提高火腿的品质和营养价值。

2 抗氧化肽的制备方法

制备生物活性肽的方法有很多,主要分为溶剂提取法、降解法和合成法^[41-42]。溶剂提取法一般选用盐酸或磷酸盐缓冲溶液进行提取。降解法可以进一步分为发酵法和酶解法。发酵法涉及微生物发酵,产生具有生物活性的肽。酶解法则使用特定酶来降解蛋白质,产生生物活性肽。合成法可以分为化学合成法和合成生物法。化学合成法通常使用固相合成法,通过逐步添加氨基酸来构建目标肽。合成生物法涉及基因工程技术,通过构建基因工程菌,合成生物活性肽。目前,常用于制备干腌火腿活性肽的方法为

溶剂提取法和酶解法。

2.1 溶剂提取法

溶剂提取法是一种选择合适溶剂将目标化合物从样品中提取出来的方法,这种方法具有操作简单、高效快速以及相对低成本等优势。然而,溶剂提取法也存在一些劣势,如原料肽含量要求高、非特异性提取等。因此,在使用溶剂提取法时,需要仔细考虑样品的特性和目标化合物的性质,以确保获得高质量的提取物。

ESCUADERO 等^[16]使用了 0.01 mol/L 盐酸溶液从西班牙火腿中提取分离了生物活性肽,并发现其具有抗高血压和抗氧化活性。祝超智^[7]也选择了盐酸作为提取液,从金华火腿中获取得到抗氧化肽,并发现强酸条件会影响抗氧化肽的活性。此外,有研究人员选择使用磷酸缓冲液提取干腌火腿中的活性肽。吴宝森^[13]使用了磷酸缓冲液提取诺邓火腿的粗肽,体外抗氧化实验表明诺邓火腿的粗肽具有一定的抗氧化活性;WANG 等^[43]使用磷酸缓冲液提取宣威火腿、金华火腿和羊肉火腿的粗肽,并进行了体外抗氧化实验。研究结果显示,不同火腿样品中的肽具有不同的抗氧化性能,其中,羊肉火腿肽对 Fe^{2+} 的螯合能力最强,金华火腿肽对 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt, ABTS)] 和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基的清除能力最强。这种差异可能是因为不同加工方法导致火腿品质存在较大差异,因此相同的提取液对不同火腿中抗氧化肽的提取效果会有显著差异。

不同提取液也可能对火腿的粗肽提取率及抗氧化活性产生影响。席丽琴等^[44]研究发现,磷酸法提取得到的西式发酵火腿粗肽质量及含量均要高于盐酸法提取得到的粗肽。此外,结合体外抗氧化能力的测定,可以得出磷酸法提取得到的粗肽抗氧化能力更强。胡亚亚等^[45]的研究也证明了相较于盐酸提取法,磷酸盐提取法可以从金华火腿中提取更多的抗氧化肽。因此,选择合适的提取液以及了解原料的特性对于有效提取和应用抗氧化肽非常重要。

2.2 酶解法

酶解法是一种利用特定蛋白酶催化,使特定蛋白质或多肽中的肽键断裂的方法。这种方法具有特异性强、反应条件温和等优点。目前,用于生产抗氧化肽的酶有多种,常见的包括胃蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶等。不同的酶具有不同的酶切位点,所产生的肽段的抗氧化活性也不同。因此,在生产抗氧化肽时,可以选择适当的酶来实现特定的酶解效果,以获得具有期望功能的肽段。

目前对于火腿酶解的研究主要集中在由此产生的风味物质,而运用酶解法制备火腿抗氧化肽的研究相当有

限。陈黎洪等^[46]通过中性蛋白酶和风味蛋白酶对金华火腿进行了酶解,获得了具有抗氧化活性的多肽;HU 等^[15]使用胃蛋白酶和胰蛋白酶对宣威火腿进行酶解,获得了具有抗氧化活性的多肽。因此,酶解法可能会成为一种生产抗氧化肽的新手段。此外,利用酶解法还能够将火腿废弃物加工成活性肽,以提高其应用潜力及经济价值。

然而,该方法也面临一些挑战,如酶解反应对于环境要求较高、抗氧化肽的活性与酶解条件的关系复杂等。因此,对于以酶解法制备抗氧化肽的研究仍需进一步深入。

2.3 新兴技术在生物活性肽制备中的应用

除了传统的溶剂提取法和酶解法之外,近年来出现了一些新技术,如高静水压(high hydrostatic pressure, HHP)和脉冲电场(pulsed electric fields, PEF),用于生物活性肽的制备。HHP 是一种非热技术,它通过快速施加等静压(通常为 100~1000 MPa)到液体或部分液体产品上。有研究建议使用 HHP 技术从多种食品副产品中生成生物活性肽^[47]。例如,ALVAREZ 等^[48]利用 HHP 技术成功将 82%的血红蛋白分解为平均大小为 3.2 kDa 的抗氧化肽。PEF 是一种非热程序,已广泛用于灭活液体和半液体食品中的微生物和酶,同时也可用于提高食品和营养品行业的提取效率。通过这种方式,PEF 技术可以提高蛋白质对酶水解的敏感性。实际上,经过 PEF 处理的 β -乳球蛋白通过改善活性位点的诱导亲核酶作用,从而改善了生物肽的生成^[49]。

3 抗氧化肽的分离纯化与鉴定

分离纯化与鉴定对于抗氧化肽的研究十分重要,只有明确肽的组成,对抗氧化肽的结构及作用机制的研究才有意义。从火腿中分离得到的抗氧化肽含有大量肽段,其结构与组成十分复杂,且其中存在很多相对分子量相近的肽段,给肽的分离纯化造成很大的困难。随着研究领域的不断扩展和科技的不断进步,出现了越来越多的分离纯化技术和鉴定方法,这些方法为多肽研究提供了新的工具和途径。由于多肽的性质受到提取方法和原材料差异的影响,因此多肽的性质在不同实验应用中呈现出多样性。在这种情况下,研究人员需要根据多肽的特定理化性质,如相对分子质量、亲水性和疏水性等,来选择适当的分离和纯化策略。此外,高科技手段如质谱分析等也逐渐被引入到多肽研究中,以更准确地鉴定和表征多肽的结构和性质^[50]。这些进展有望加速多肽研究的进程,并促进其在不同领域的应用。目前,常用的多肽分离纯化法主要有超滤法、凝胶层析谱法、离子交换色谱法、反相高效液相色谱法、双水相萃取法等,不同方法的优缺点如表 2 所示。常见的结构鉴定法有质谱法、圆二色谱法和核磁共振法等。不同结构鉴定方法的侧重点有所不同,在实际应用中,应根据需要采取合适的鉴定手段。

表 2 不同分离纯化活性肽方法的优缺点

Table 2 Advantages and disadvantages of different methods for isolation and purification of active peptides

分离纯化法	优点	缺点
超滤法	时间短、产量高、回收率高	产生浓差极化现象
凝胶层析谱法	洗脱条件温和、不影响分离物质的性质	产率低、时间成本高
离子交换色谱法	能够分离阳离子或阴离子肽	选择性低、柱效低、易膨胀
反相高效液相色谱法	分离短肽方面展现出巨大的潜力	溶剂浪费严重、成本高
双水相萃取法	快速、廉价、低毒性和生物相容性高	含有大量聚合物和盐、易乳化
双水相浮选法	高选择性、规模化、低毒性、高效率	含有大量聚合物和盐

3.1 抗氧化肽的分离纯化

3.1.1 超滤法

超滤法是一种常用于分离小分子物质的膜分离技术。这种技术利用超滤膜,通过施加压力差,使溶质和溶剂通过膜,从而实现对不同分子量物质的分离,具有操作简单、能较好地保持抗氧化肽的性能及活性等优势。柯虹乔^[51]采用超滤法,从金枪鱼水解液中分离得到了分子量分别为 1、3、5 和 8 kDa 的多肽组分,这些分离得到的多肽组分在抗氧化活性方面均表现出显著强于水解液的特性。这说明超滤法能够有效提高抗氧化肽的活性。然而,超滤法还存在选择性受限、无法分离相似分子量抗氧化肽的劣势,因此未来超滤技术的研究应集中在对新型膜材料和新型超滤技术的研发。

3.1.2 凝胶层析色谱法

凝胶层析色谱法是一种基于分子在凝胶中的渗透能力和排除作用,从而实现混合物中不同分子量大小分离的技术。XING 等^[27]运用 Sephadex G-25 凝胶色谱柱对宣威火腿的抗氧化肽进行分离并进行活性的测定,发现第 3 组分具有显著高于谷胱甘肽的抗氧化能力。ESCUDERO 等^[16]用 Sephadex G-25 凝胶色谱柱分离西班牙干腌火腿的肽提取物,分离得到 3 个组分。结果表明,这 3 个组分均具有抗高血压活性和抗氧化活性,且不同组分的抗氧化肽活性存在一定差异。

3.1.3 离子交换色谱法

离子交换色谱法是一种通过离子交换作用实现溶液中离子分离的层析技术。该技术利用具有离子交换功能的固定相,通过与样品中的离子相互作用,实现分子的分离。在 WANG 等^[52]研究中,采用 DEAE-52 纤维素阴离子交换柱对 1 kDa 以下的斑蝥肌肉水解肽进行了分离,最终获得了 5 个不同的组分。其中,第 4 个组分对 DPPH 自由基的清除能力最强。

3.1.4 反相高效液相色谱法

反相高效液相色谱法是一种常用于多肽分离和分析的方法,其基本原理是利用多肽分子的极性差异在反相柱上进行分离。通常,非极性或弱极性的多肽分子会与 C₁₈ 柱上的填料相互作用,从而导致它们在柱上停留时间较长,

而极性的多肽分子则会停留时间较短,从而实现多肽的分离和纯化^[53]。反相高效液相色谱法一般用于分离纯化后期的抗氧化肽进一步提纯,为后续的组分鉴定提供有力的支持。姜海洋等^[54]用凝胶层析法分离从牦牛骨提取的抗氧化肽,将抗氧化活性最强的组分通过反相高效液相色谱法进一步纯化得到单一组分。BOUHALLAB 等^[55]用反相高效液相色谱法分离酪蛋白水解肽,得到了 4 种具有活性的小肽,其分子量分布在 500~800 Da 范围内。尽管这 4 种肽的性质接近,但反相高效液相色谱法可以很好地分离不同的小肽。

3.1.5 双水相萃取法

双水相萃取是一种液-液分馏技术,作为一种温和和快速的分离提纯法被广泛应用在各种生物大分子的提取分离中。它是由两种化学性质不同的水溶性聚合物(通常是聚乙二醇)和盐溶液(硫酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐等)组合而成,形成两个不相溶的富水相并利用待分离物质在两相间分配系数的差异进行物质分离与纯化的技术^[56]。与其他分离提纯的方法相比,双水相萃取法具有选择性强、操作便利、低毒性和生物相容性高的特点^[57]。JIANG 等^[58]利用聚乙二醇-丙二醇-单丁醚/磷酸盐组成的双水相体系从乳清蛋白的酶解产物中得到抗氧化肽。JIANG 等^[57]利用 2-丙醇/磷酸二氢钠组成双水相体系实现从乳清蛋白的水解液中获得抗氧化肽,还基于该双水相体系首次开发双水相浮选法,用于提取抗氧化肽,且来源于双水相浮选法的抗氧化肽活性优于双水相萃取所提取的抗氧化肽。

3.1.6 纯化技术的创新发展

为了在工业生产中实现更高的产量和更低的成本,人们开发了新技术来分离和纯化生物活性肽,其中包括亚临界萃取。亚临界水水解是一种创新的生物活性肽提取方法。该方法利用亚临界状态下水的温度和压力接近临界点,使水的介电常数降低,类似于有机溶剂。ALVAREZ 等^[48]使用这种方法成功分离并获得了具有抗氧化活性的猪血蛋白肽。

3.2 抗氧化肽的结构鉴定

3.2.1 质谱法

质谱法是一种高度精密的分析技术,通过将多肽分子转化为离子并进行质谱分析,可以提供详细的分子结构

和相对丰度信息^[59]。该方法具有许多优势, 包括高分辨率、准确的质量测定和能够获得多肽的氨基酸序列和一级结构信息。然而, 它也有一些限制, 对数据库的依赖性强。质谱法通常需要将实验结果与已知的蛋白质数据库进行比对, 以确定多肽的序列^[56]。尽管如此, 质谱法仍然是多肽分析的重要工具, 特别是在研究抗氧化肽的序列和结构时, 它可以提供有关多肽的重要信息, 有助于深入理解它们的生物活性和应用潜力。杨天志等^[12]以金华火腿为研究对象, 借助 Q-Exactive Plus 质谱仪对从液相色谱分离出的多肽组分进行分析。在此研究中, 确定了 3 条具有抗氧化活性的多肽序列。吴宝森^[13]利用凝胶层析柱对诺邓火腿粗肽液进行纯化分离, 通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法对抗氧化活性最强的组分进行深入分析, 最终获得了 8 条抗氧化肽序列。

3.2.2 圆二色谱法

圆二色谱法是目前应用最广泛的测定多肽二级结构的方法, 对进一步了解多肽构象与活性之间的关系具有重要作用。JIA 等^[60]采用圆二色谱法对从文蛤里分离出来的 3 种抗氧化肽(Mmp4、Mmp11 和 Mmp19)进行结构鉴定, 结果表明, Mmp4 主要为 β -折叠, Mmp11 和 Mmp19 为无规则卷曲。JIANG 等^[61]采用圆二色谱法对从玉米蛋白水解物中纯化出来的抗氧化肽 AGLPM 和 HALGA 进行结构鉴定, 结果表明这两条多肽主要为无规则卷曲和低程度的 α -螺旋。

3.2.3 核磁共振法

核磁共振法是一种基于原子核的物理现象的谱学技术, 广泛用于研究分子的结构、动态行为和相互作用, 它能够提供有关分子内部构建和相互关系的详细信息。WANG 等^[62]的研究采用核磁共振技术对核桃抗氧化肽的组成及其抗氧化活性进行分析。研究结果表明, 核桃抗氧化肽中的色氨酸残基是唯一在 ABTS 阳离子自由基处理后发生明显变化的残基。这一发现与核桃抗氧化肽的潜在抗氧化性能有关, 说明色氨酸残基在核桃抗氧化肽的抗氧化过程中扮演了重要角色, 揭示了核磁共振表征的结构和氧化反应产物可以用来探索食物来源肽的抗氧化机制。

总体而言, 抗氧化肽的结构与其活性息息相关。然而, 目前众多鉴定多肽结构的方法均很难准确地鉴定出多肽的具体构象, 因此鉴定多肽的结构仍旧是未来多肽研究的关键。

4 抗氧化肽的作用机制

抗氧化肽具有多种途径来保护细胞和生物分子免受氧化应激的损害。这些途径包括捕捉自由基、清除氧化物质、抑制氧化反应等。抗氧化肽的活性与其分子量、氨基酸序列和氨基酸种类密切相关。此外, 研究表明抗氧化肽可以通过调控多个信号通路来维持细胞内的氧化平衡, 而在一定程度上保护机体免受氧化应激的损害。

4.1 抗氧化肽的特征

4.1.1 分子量

目前, 大多数已知的抗氧化肽通常含有 2~20 个氨基酸残基的分子且分子量小于 6000 Da^[63]。MORA 等^[64]采用尺寸排阻色谱法从西班牙干腌火腿中分离得到 93 条抗氧化肽, 主要是由 5~20 个氨基酸组成, 且分子量在 400~2500 Da 之间。研究表明分子量较小的抗氧化肽活性更高。LI 等^[65]发现, 与分子量高于 1500 Da 的肽相比, 分子量为 500~1500 Da 的玉米麸质水解产物衍生的肽具有更高的抗氧化活性。这些研究均表明, 分子量较小的肽通常具有更高的抗氧化活性。这可能是由于分子量大小影响了抗氧化肽转移到靶点的途径。一般而言, 分子量较小的抗氧化肽更容易穿越胃肠屏障, 进入血液循环, 以促进其在组织水平的生物利用度^[66]。此外, 研究表明相较于蛋白质和单一氨基酸, 含有 2~6 个氨基酸的肽更容易被吸收^[67]。

4.1.2 氨基酸的组成和序列

部分游离氨基酸表现出一定抗氧化活性, 其活性从大到小的顺序为色氨酸、酪氨酸、蛋氨酸、半胱氨酸、组氨酸、苯丙氨酸, 其余氨基酸没有抗氧化活性^[68]。尽管它们表现出一定的抗氧化活性, 目前尚未发现它们在食品和生物系统中可以作为有效的抗氧化剂。此外值得指出的是, 抗氧化肽中一些本身具有较低抗氧化活性或甚至没有抗氧化活性的氨基酸, 在肽链的组合中可能呈现更显著的抗氧化效果^[69]。因此, 抗氧化肽的活性与氨基酸序列及组成息息相关。

研究表明, 含有芳香族氨基酸的肽具有较强的抗氧化能力, 这可能是因为 R 基团中的咪唑环具有供氢能力、脂质过氧自由基捕集能力和螯合金属离子能力^[70]。RAJAPAKSE 等^[71]研究发现, 组氨酸的含量能够影响抗氧化肽螯合金属的能力, 且当组氨酸位于 N 端时, 其螯合能力最强。为了进一步了解组氨酸对肽抗氧化活性的影响, CHEN 等^[72]从大豆蛋白水解产物中分离的五肽 LLPHH 为基础, 设计合成 28 个抗氧化肽。结果表明, Pro-His-His 表现出更高的抗氧化能力, 为肽的特定氨基酸序列对其性质的影响提供了依据。此外, 在 C-末端具有 Trp 和 Tyr 残基的肽可以发挥强大的自由基清除活性^[73]。

一般而言, 含有疏水性氨基酸的肽具有潜在的抗氧化活性, 这可能是因为疏水性氨基酸与脂质分子相互作用时, 捕获脂质自由基, 从而降低氧化反应的速率。如 OHATA 等^[74]对含有两个连续疏水性氨基酸的抗氧化肽 GYP 进行研究, 发现这种肽在 100 mmol/L 的浓度下, 羟自由基清除率高达 97.6%。而 GLAGA^[16]、IEAEGE^[73]、DLEE^[11], 这些来源于动物蛋白的抗氧化肽, 均含有超过一半的疏水性氨基酸。然而, 仅凭借这一点来判断肽是否具有潜在的抗氧化活性并不可靠。有研究发现, Ala-His 二肽并没有抗氧化活性^[75]。

4.2 抗氧化肽与氧化应激通路

随着研究的深入,人们发现当活性氧在机体内大量堆积时,会引发细胞凋亡和损伤,导致人体许多慢性疾病的产生。而抗氧化肽能够有效地清除自由基,减少活性氧对细胞的损伤。大量研究表明,抗氧化肽可以通过多个细胞通路来抑制氧化应激,从而有效地保护机体^[76]。目前,主要与氧化应激相关的细胞通路有 Nrf2-Keap1 信号通路、MAPK 信号通路。

4.2.1 Nrf2-Keap1 信号通路

Nrf2-Keap1 通路是一种重要的细胞信号传导途径,其功能是调节细胞对氧化应激的反应,以维持细胞内的氧化平衡,主要组成有 Nrf2(核因子-2 类 NF-E2 相关因子)、Keap1(抗氧化应激调控蛋白 1)和 ARE(抗氧化应激元素)^[77]。Nrf2 被认为是一种转录因子,主要存在于细胞质中,负责调控一系列抗氧化基因的表达。与其结合的 Keap1,除了充当负调控蛋白,还是感知氧化状态的感应器。在正常的生理条件下,Nrf2 与 Keap1 通过相互作用,将 Nrf2 导向泛素化降解途径,阻止其进入细胞核,从而维持 Nrf2 的稳定性。然而,当细胞面临氧化应激时,Keap1 的构象发生改变,导致其无法有效地抑制 Nrf2。这使得 Nrf2 能够逃脱 Keap1 的抑制,进入细胞核。一旦 Nrf2 进入细胞核,它会与 ARE 结合,激活与 ARE 关联的抗氧化基因的转录。这些基因编码的蛋白质包括谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物

歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等抗氧化酶,这些酶能够清除细胞内的自由基,减轻氧化应激,维持细胞内的氧化平衡。图 1 展示了在抗氧化肽作用下 Nrf2-Keap1 的信号调节途径。

研究表明,抗氧化肽能够通过促进 Nrf2 的活性上调,有效地缓解氧化应激引起的细胞或生物体损伤,进而对多种疾病的发生产生正面影响。WANG 等^[78]发现从甲鱼蛋白中获取的抗氧化肽 EDYGA 可以与 Keap1 蛋白中的 Kelch 结构域特异性结合,从而引发了细胞内抗氧化基因的表达上调,有助于降低机体内的氧化应激损害程度。王婷婷^[79]采用酶解海参获得两条抗氧化肽 WWGP 和 APGY,均可与 Keap1 直接结合,从而使得 Nrf2 进入细胞质,改善氧化应激造成的细胞损伤。

4.2.2 MAPK 信号通路

MAPK 信号通路是一种重要的细胞信号传导途径,广泛参与调控细胞的生理过程。MAPK 信号通路主要有 3 个分支:ERK、JNK、和 p38 激酶,其中 ERK 信号通路可以通过激活转录因子,如 AP-1,来调节抗氧化基因的表达^[80]。此外,ERK 也能影响 Nrf2 的活性,从而提高细胞的抗氧化能力。WANG 等^[81]研究发现抗氧化肽 DHNNPQIR-NH₂ 能够通过抑制 MAPK 通路来预防和治疗肺纤维化。ZHANG 等^[82]研究发现抗氧化肽 YWDHNNPQIR 能够抑制 MAPK 信号通路,从而缓解糖尿病肾病小鼠的氧化应激。

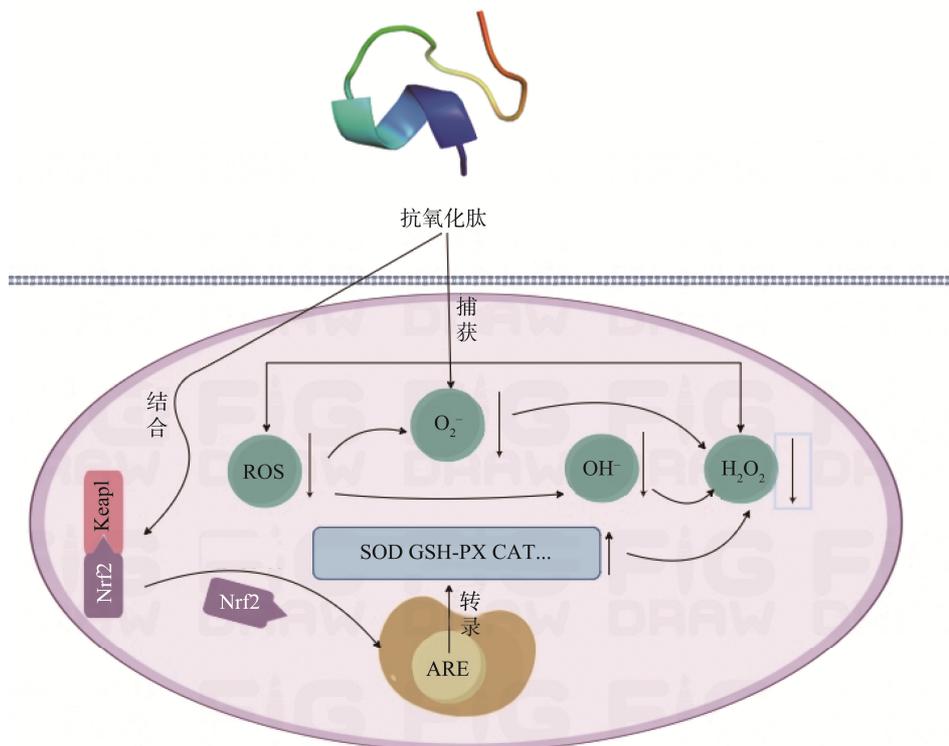


图 1 抗氧化肽作用下 Nrf2-Keap1 的信号调节途径

Fig.1 Signaling regulation pathway of Nrf2-Keap1 under the action of antioxidant peptides

5 结束语

综上所述,干腌火腿抗氧化肽的形成、提取纯化、鉴定方法及作用机制方面均有大量的研究成果。但此领域的研究仍然存在一些问题有待解决,同时这些亟待解决的问题也是抗氧化肽未来的研究趋势:(1)微生物对活性肽形成的作用机制尚不明确,干腌火腿中的微生物对抗氧化肽形成的影响鲜有文献报道。(2)提取纯化干腌火腿的抗氧化肽仍面临困难,常用的色谱分离法存在成本高、效率慢等劣势。对此,开发低成本、高效率的提取纯化法对抗氧化肽的生产应用显得尤为重要。(3)对抗氧化肽的结构研究不足,目前大部分文献仅阐述肽的一级结构对抗氧化活性的影响,尚未清楚的揭示抗氧化肽的二级、三级结构对活性的影响。这些结构与活性之间的关系会成为未来研究抗氧化肽的重点和难点。(4)针对抗氧化肽之间的协同作用尚未明确。因此,有必要采用蛋白组学技术,研究同源抗氧化肽的相互作用。

参考文献

- [1] 王伟强,许为民,郑宇,等.干腌火腿生物活性肽的形成、制备及功能研究进展[J].食品科技,2023,48(2):106-112.
WANG WQ, XU WM, ZHENG Y, *et al.* Research progress on formation, preparation and function of bioactive peptides in dry-cured ham [J]. Food Sci Tech-Brazil, 2023, 48(2): 106-112.
- [2] ALKADI H. A review on free radicals and antioxidants [J]. Infect Disord Drug Target, 2020, 20(1): 16-26.
- [3] 陈晶晶,张留记,屠万倩,等.菊花清除自由基动力学特性及对羟基自由基介导的2-脱氧核糖裂解的抑制作用[J].食品安全质量检测学报,2023,14(23):206-213.
CHEN JJ, ZHANG LJ, TU WQ, *et al.* Dynamic characteristics of free radical scavenging of chrysanthemum morifolium and its inhibitory effects on hydroxyl radical-mediated 2-deoxyribose degradation [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(23): 206-213.
- [4] HARRAAN D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry [J]. Sci Ag Know Environ, 2002, 37(2002): cp14.
- [5] KOHEN R, NYSKA A. Invited review: Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification [J]. Toxicol Pathol, 2002, 30(6): 620-650.
- [6] LEWIS GN. The atom and the molecule [J]. J Am Chem Soc, 1916, 38(4): 762-785.
- [7] 祝超智.金华火腿抗氧化肽的活性研究及组分鉴定[D].南京:南京农业大学,2017.
ZHU CZ. Study of identification and antioxidant activity of peptides from Jinhua ham [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017
- [8] ZHU CZ, ZHANG WG, KANG ZL, *et al.* Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua ham [J]. Meat Sci, 2014, 96(2): 783-789.
- [9] CHATTERJEE C, GLEDDIE S, XIAO CW. Soybean bioactive peptides and their functional properties [J]. Nutrients, 2018, 10(9): 1211.
- [10] XING L, HU Y, HU H, *et al.* Purification and identification of antioxidative peptides from dry-cured Xuanwei ham [J]. Food Chem, 2016, 194: 951-958.
- [11] WAN C, FAN X, LOU Z, *et al.* Iturin: Cyclic lipopeptide with multifunction biological potential [J]. Crit Rev Food Sci, 2022, 62(29): 7976-7988.
- [12] 杨天志,张迎阳,邹平,等.干腌火腿活性肽的抗氧化性能研究与鉴定[J/OL].食品与发酵工业:1-10.[2023-11-10].<https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.035254>
YANG TZ, ZHANG YY, ZOU P, *et al.* Study and identification of antioxidant properties of dry-cured ham active peptides [J/OL]. Food Ferment Ind: 1-10. [2023-11-10]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.035254>
- [13] 吴宝森.诺邓火腿抗氧化肽分离纯化及其特性研究[D].昆明:云南农业大学,2018.
WU BS. Study on separation, purification and characteristics of antioxidative peptides from Nuodeng ham [D]. Kunming: Yunnan Agricultural University, 2018.
- [14] NIE W, ZHOU K, WANG Y, *et al.* Isolation and identification of bioactive peptides from Xuanwei ham that rescue oxidative stress damage induced by alcohol in HHL-5 hepatocytes [J]. Food Funct, 2020, 11(11): 9710-9720.
- [15] HU YY, XIAO S, WANG B, *et al.* Transepithelial transport and cytoprotection of novel antioxidant peptides isolated from simulated gastrointestinal digestion of Xuanwei ham [J]. Food Funct, 2023, 14(8): 3552-3563.
- [16] ESCUDERO E, MORA L, FRASER PD, *et al.* Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham [J]. Food Chem, 2013, 138(2-3): 1282-1288.
- [17] GALLEGO M, MORA L, TOLDRA F. Characterisation of the antioxidant peptide AEEYPPDL and its quantification in Spanish dry-cured ham [J]. Food Chem, 2018, 258: 8-15.
- [18] GALLEGO M, MORA L, REIG M, *et al.* Stability of the potent antioxidant peptide SNAAC identified from Spanish dry-cured ham [J]. Food Res Int, 2018, 105: 873-879.
- [19] ZHOU CY, WU JQ, TANG CB, *et al.* Comparing the proteomic profile of proteins and the sensory characteristics in Jinhua ham with different processing procedures [J]. Food Control, 2019, 106: 106694.
- [20] 邢巍,刘贯勇,牛保坤,等.微生物对肉制品发酵的影响研究进展[J].肉类研究,2023,37(4):61-68.
XING W, LIU HY, NIU BK, *et al.* Research progress on the effects of Microorganisms on the fermentation of meat products [J]. Meat Res, 2023, 37(4): 61-68.
- [21] 董杰,蒋云升.肉源产蛋白酶葡萄球菌发酵剂的筛选研究[J].食品科学,2009,30(19):194-196.
DONG J, JIANG YS. Screening of high-yield protease-producing staphylococcus from traditional fermented meat products [J]. Food Sci, 2009, 30(19): 194-196.
- [22] 潘明.如皋火腿发酵菌群与火腿品质关系研究[D].扬州:扬州大学,2007.
PAN M. Study on the relationship between fermentation flora of Rugao ham and ham quality [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2007.
- [23] 李平,张志,周辉,等.干腌火腿中肽的形成机理研究进展[J].食品与发酵工业,2022,48(4):294-300.
LI P, ZHANG Z, ZHOU H, *et al.* The mechanism of peptides formation in dry-cured ham: A review [J]. Food Ferment Ind, 2022, 48(4): 294-300.
- [24] BARRETT AJ, KIRSCHKE H. [41] Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L [J]. Method Enzymol, 1981, 80: 535-561.
- [25] NODA T, ISOGAI K, KATUNUMA N, *et al.* Effects on cathepsin B, H, and D in pectoral muscle of dystrophic chickens (line 413) of *in vivo*

- administration of E-64-c (N-[N-(L-3-transcarboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-3-methyl-butylamine) [J]. *J Biochem*, 1981, 90(3): 893–896.
- [26] 穆雪, 韩剑众. 骨骼肌中组织蛋白酶[J]. *肉类研究*, 2010, (5): 13–17.
MU X, HANG JZ. On cathepsin in skeletal muscle [J]. *Meat Res*, 2010, (5):13–17.
- [27] XING L, LIU R, GAO X, *et al.* The proteomics homology of antioxidant peptides extracted from dry-cured Xuanwei and Jinhua ham [J]. *Food Chem*, 2018, 266: 420–426.
- [28] GALLEGO M, MORA L, ARISTOY MC, *et al.* Evidence of peptide oxidation from major myofibrillar proteins in dry-cured ham [J]. *Food Chem*, 2015, 187: 230–235.
- [29] GOLL DE, THOMPSON VF, LI H, *et al.* The calpain system [J]. *Physiol Rev*, 2003. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2002>
- [30] 赵改名. 肌肉蛋白水解酶在金华火腿加工过程中作用的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
ZHAO GM. Studies on the effects of muscles proteolytic enzymes in the processing of Jinhua ham [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005.
- [31] 曾珍. 钙调蛋白酶 2、20S 蛋白酶体和组织蛋白酶 B+L 对宰后猪肉保水性的影响[D]. 成都: 四川农业大学, 2020.
ZENG Z. The effect of calpain 2, 20S proteasome and cathepsin B+L on postmortem pork water-holding capacity [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2020.
- [32] MORA L, SENTANDREU MA, KOISTINEN KM, *et al.* Naturally generated small peptides derived from myofibrillar proteins in serrano dry-cured ham [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(8): 3228–3234.
- [33] BARON CP, JACOBSEN S, PURSLOW PP. Cleavage of desmin by cysteine proteases: Calpains and cathepsin B [J]. *Meat Sci*, 2004, 68(3): 447–456.
- [34] POLJANEC I, RADOVČIĆ NM, PETRIČEVIĆ S, *et al.* Proteolysis and protein oxidation throughout the smoked dry-cured ham process [J]. *Food Chem*, 2021, 362: 130207.
- [35] SENTANDREU M, TOLDRÁ F. Dipeptidyl peptidase activities along the processing of Serrano dry-cured ham [J]. *Eur Food Res Technol*, 2001, 213: 83–87.
- [36] TOLDRÁ F, ARISTOY MC, PART C, *et al.* Muscle and adipose tissue aminopeptidase activities in raw and dry-cured ham [J]. *J Food Sci*, 1992, 57(4): 816–818.
- [37] GALLEGO M, MORA L, FIDEL T. Potential cardioprotective peptides generated in Spanish dry-cured ham [J]. *J Food Bioact*, 2019. <https://doi.org/10.31665/JFB.2019.5190>.
- [38] OLMO AD, CALZADA J, GAYA P, *et al.* Proteolysis and flavor characteristics of serrano ham processed under different ripening temperature conditions [J]. *J Food Sci*, 2015, 80(10–12): C2404.
- [39] JIMENEZ CF, VENTANAS J, TOLDRA F. Nutritional composition of dry-cured ham and its role in a healthy diet [J]. *Meat Sci*, 2010, 84(4): 585–593.
- [40] LUCKE FK. Fermented meat products [J]. *Food Res Int*, 1994, 27(3): 299–307.
- [41] WANG W, LIU Z, LIU Y, *et al.* Plant polypeptides: A review on extraction, isolation, bioactivities and prospects [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 207: 169–178.
- [42] ZHU Y, GUO Y, YANG F, *et al.* Combined application of high-throughput sequencing and UHPLC-Q/TOF-MS-based metabolomics in the evaluation of microorganisms and metabolites of dry-cured ham of different origins [J]. *Int J Food Microbiol*, 2021, 359: 109422.
- [43] WANG J, GUO M, WANG Q, *et al.* Antioxidant activities of peptides derived from mutton ham, Xuanwei ham and Jinhua ham [J]. *Food Res Int*, 2021, 142: 110195.
- [44] 席丽琴, 杨君娜, 许随根, 等. 西式发酵火腿粗肽的制备及抗氧化活性和氨基酸组成分析[J]. *肉类研究*, 2022, 36(1): 1–6.
XI LQ, YANG JN, XU SG, *et al.* Preparation, antioxidant activity and amino acids composition analysis of crude peptides from western-style fermented ham [J]. *Meat Res*, 2022, 36(1): 1–6.
- [45] 胡亚亚, 邢路娟, 周光宏, 等. 不同提取方法对金华火腿粗肽液抗氧化活性的影响[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(14): 115–118, 122.
HU YY, XING LJ, ZHOU GH, *et al.* Effect of extraction methods on the antioxidant activity of crude peptides from Jinhua ham [J]. *Sci Technol Food Indu*, 2015, 36(14): 115–118, 122.
- [46] 陈黎洪, 唐宏刚, 肖朝耿, 等. 金华火腿副产品蛋白酶解物的功能特性与抗氧化活性研究[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(3): 43–49.
CHEN LH, TANG HG, XIAO CG, *et al.* Studies on functional properties and antioxidant activities of the protein hydrolysates derived from Jinhua ham byproducts [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2011, 11(3): 43–49.
- [47] MARCINIAK A, SUWAL S, NADERI N, *et al.* Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology [J]. *Trend Food Sci Technol*, 2018, 80: 187–198.
- [48] ALVAREZ C, RENDUELES M, DIAZ M. Production of porcine hemoglobin peptides at moderate temperature and medium pressure under a nitrogen stream. Functional and antioxidant properties [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(22): 5636–5643.
- [49] MIKHAYLIN S, BOUSSETTA N, VOROBIEV E, *et al.* High voltage electrical treatments to improve the protein susceptibility to enzymatic hydrolysis [J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2017, 5(12): 11706–11714.
- [50] 朱梦媛, 李冲伟. 植物源功能肽的制备、生理活性与应用研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(17): 363–369.
ZHU MY, LI CW. A review of the preparation, physiological activities and application of plant-derived functional peptides [J]. *Food Sci*, 2021, 42(17): 363–369.
- [51] 柯虹乔. 酶解金枪鱼头蛋白制备抗氧化活性肽的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012.
KE HQ. Preparation of antioxidant peptides from tuna head by enzymatic hydrolysis [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012.
- [52] WANG B, LI ZR, CHI CF, *et al.* Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle [J]. *Peptides*, 2012, 36(2): 240–250.
- [53] LE MS, NONGONIERMA AB, FITZGERALD RJ. Improved short peptide identification using HILIC-MS/MS: Retention time prediction model based on the impact of amino acid position in the peptide sequence [J]. *Food Chem*, 2015, 173: 847–854.
- [54] 姜海洋, 张周莉, 孙敏, 等. 牦牛骨抗氧化肽的分离纯化及鉴定[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(8): 3479–3485.
JIANG HY, ZHANG ZL, SUN M, *et al.* Isolation, purification and identification antioxidant peptides from yak bone [J]. *Genom Appl Biol*, 2019, 38(8): 3479–3485.
- [55] BOUHALLAB S, HENRY G, BOSCHETTI E. Separation of small cationic bioactive peptides by strong ion-exchange chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 724(1–2): 137–145.
- [56] 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.
- XIE B, FU H, YANG F. Research progress on preparation, purification, identification and structure-activity relationship of bioactive peptides [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(5): 383–391.
- [57] JIANG B, NA J, WANG L, *et al.* Separation and enrichment of antioxidant peptides from whey protein isolate hydrolysate by aqueous two-phase extraction and aqueous two-phase flotation [J]. *Foods*, 2019, 8(1): 34.
- [58] JIANG B, ZHANG X, YUAN Y, *et al.* Separation of antioxidant peptides from pepsin hydrolysate of whey protein isolate by ATPS of EOPO co-polymer (UCON)/phosphate [J]. *Sci Rep-UK*, 2017, 7(1): 13320.
- [59] HOU TY, CHIANG NC, TENG SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology [J]. *J Food Drug Anal*, 2019, 27(2): 404–414.
- [60] JIA W, PENG Q, SU L, *et al.* Novel bioactive peptides from *Meretrix meretrix* protect *Caenorhabditis elegans* against free radical-induced oxidative stress through the stress response factor DAF-16/FOXO [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(11): 444.
- [61] JIANG Y, ZHANG M, LIN S, *et al.* Contribution of specific amino acid and secondary structure to the antioxidant property of corn gluten proteins [J]. *Food Res Int*, 2018, 105: 836–844.
- [62] WANG M, SUN X, LUO W, *et al.* Characterization and analysis of antioxidant activity of walnut-derived pentapeptide PW5 via nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Food Chem*, 2021, 339: 128047.
- [63] SUN J, HE H, XIE BJ. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(21): 6646–6652.
- [64] MORA L, ESCUDERO E, FRASER PD, *et al.* Proteomic identification of antioxidant peptides from 400 to 2500 Da generated in Spanish dry-cured ham contained in a size-exclusion chromatography fraction [J]. *Food Res Int*, 2014, 56: 68–76.
- [65] LI X, HAN L, CHEN L. *In vitro* antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal [J]. *J Sci Food Agric*, 2008, 88(9): 1660–1666.
- [66] PENG H, WANG J, CHEN J, *et al.* Challenges and opportunities in delivering oral peptides and proteins [J]. *Expert Opin Drug Del*, 2023: 1–21.
- [67] PRICE D, JACKSON KG, LOVEGROVE JA, *et al.* The effects of whey proteins, their peptides and amino acids on vascular function [J]. *Nutr Bullet*, 2022, 47(1): 9–26.
- [68] DAVALOS A, MIGUEL M, BARTOLOME B, *et al.* Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis [J]. *J Food Protect*, 2004, 67(9): 1939–1944.
- [69] KAWASHIMA K, ITOH H, MIYOSHI M, *et al.* Antioxidant properties of branched-chain amino acid derivatives [J]. *Chem Pharm Bullet*, 1979, 27(8): 1912–1916.
- [70] CHAN KM, DECKER EA, FEUSTMAN C. Endogenous skeletal muscle antioxidants [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1994, 34(4): 403–426.
- [71] RAJAPAKSE N, MENDIS E, JUNG WK, *et al.* Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties [J]. *Food Res Int*, 2005, 38(2): 175–182.
- [72] CHEN HM, URAMOTO K, YAMAUCHI F, *et al.* Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein [J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44(9): 2619–2623.
- [73] SAIGA AI, TANABE S, NISHIMURA T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(12): 3661–3667.
- [74] OHATA M, UCHIDA S, ZHOU L, *et al.* Antioxidant activity of fermented meat sauce and isolation of an associated antioxidant peptide [J]. *Food Chem*, 2016, 194: 1034–1039.
- [75] LIU R, XING L, FU Q, *et al.* A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products [J]. *Antioxidants*, 2016, 5(3): 32.
- [76] ANGULO P, KAUSHIK G, SUBRAMANIAM D, *et al.* Natural compounds targeting major cell signaling pathways: A novel paradigm for osteosarcoma therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 1–13.
- [77] BAIRD L, YAMAMOTO M. The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40(13): e00099-20.
- [78] WANG N, WANG W, SADIQ FA, *et al.* Involvement of Nrf2 and Keap1 in the activation of antioxidant responsive element (ARE) by chemopreventive agent peptides from soft-shelled turtle [J]. *Process Biochem*, 2020, 92: 174–181.
- [79] 王婷婷. 海参肽对II型糖尿病大鼠血糖活性调节作用及其机制研究[D]. 南宁: 广西大学, 2022.
- WANG TT. Hypoglycemic effects of peptides from sea cucumber (*Holothuria nobilis*) on type II diabetic rats and the related mechanisms [D]. Nanning: Guangxi University, 2022.
- [80] HUTTON SR, OTIS JM, KIM EM, *et al.* ERK/MAPK signaling is required for pathway-specific striatal motor functions [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(34): 8102–8115.
- [81] WANG D, YAN Z, BU L, *et al.* Protective effect of peptide DR8 on bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating the TGF- β /MAPK signaling pathway and oxidative stress [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2019, 382: 114703.
- [82] ZHANG M, YAN Z, BU L, *et al.* Rapeseed protein-derived antioxidant peptide RAP alleviates renal fibrosis through MAPK/NF- κ B signaling pathways in diabetic nephropathy [J]. *Drug Design Dev Therapy*, 2018. DOI: 10.2147/DDDT.S162288

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介

谢锐鸿, 硕士研究生, 主要研究方向为天然产物化学。
E-mail: 13229185458@163.com

肖珊, 博士, 副教授, 主要研究方向为肉品科学。
E-mail: xiaoshan@dgut.edu.cn