

高F值活性肽的生物活性、制备技术及吸收评价技术的研究进展

张 婵^{1,2}, 侯 威¹, 王成涛^{1,2*}, 赵 磊¹, 孙宝国^{1,2}, 李树标³

(1. 北京工商大学 北京市食品添加剂工程技术研究中心, 北京 100048; 2. 北京市食品风味化学重点实验室, 北京 100048; 3. 阜丰集团有限公司发展中心, 莒南 276600)

摘 要: 高F值活性肽(HFRP)是指一类由2~9个氨基酸残基所组成的小肽, 一般F值大于20。HFRP是一种重要活性肽, 具有抗疲劳, 补充人体必需氨基酸, 促进酒精代谢, 保肝护肝, 促进氮储留和蛋白质合成, 抑制蛋白质分解, 改善手术后和卧床病人的蛋白营养状况等多种生理功能, 因此具有良好开发应用前景。本文综述了高F值活性肽的生理功能及用途、原料及制备技术、耐消化性及肠吸收评价技术的研究进展, 为新型活性肽保健食品的研究开发提供理论依据和技术支持。

关键词: 高F值活性肽; 生物活性; 制备技术; 耐消化性; 吸收评价技术

Biological activity, preparation technology and intestinal absorption of high Fischer ratio peptide

ZHANG Chan^{1,2}, HOU Wei¹, WANG Cheng-Tao^{1,2*}, ZHAO Lei¹, SUN Bao-Guo^{1,2}, LI Shu-Biao³

(1. Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 3. Development Center, Fufeng Group Company Limited, Junan 276600, China)

ABSTRACT: High Fischer ratio peptide (HFRP) is a kind of active peptides with 2~9 amino acid residues, and the F value of HFRP requirements generally greater than 20. HFRP are active peptides having many important physiological functions, such as anti-fatigue, adding essential amino acids of human body, promoting the metabolism of alcohol, protecting liver, promoting nitrogen retention and protein synthesis, inhibiting protein decomposition, improving patient nutrition after surgery. Therefore, HFRP have a good development prospect. The research progress was reviewed on physiological functions, applications, raw materials, preparation technologies, digestion resistant and evaluation methods of intestinal absorption of HFRP, which provided a theoretical and technical reference for study of the active peptide.

KEY WORDS: high Fischer ratio peptide (HFRP); biological activity; preparation technology; resistant digestion; intestinal absorption evaluation technology

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(211101)、北京市教委面上项目(KM201110011001)、北京市教委——教师队伍建设--食品科学创新团队(2013113)

Fund: Supported by the Key Project of Chinese Ministry of Education (211101), the Scientific Research Project of Beijing Education Commission (KM201110011001) and the Food Science Innovation Teams of the Beijing Education Commission (2013113)

*通讯作者: 王成涛, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术, E-mail: wangchengtao@th.btbu.edu.cn

*Corresponding author: WANG Cheng-Tao, Ph.D., Professor, Research Direction: Food Biotechnology, No.33, Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100048, China, E-mail: wangchengtao@th.btbu.edu.cn

生物活性肽(bioactive peptide, 简称活性肽)是指对生物机体的生命活动有益或促进生理功能的肽类化合物。目前生物活性肽的种类较多, 已报道的主要具有抗氧化、抗菌、降血压、免疫调节、保护或减轻肝损伤、降胆固醇等多种活性肽^[1-6]。

高F值活性肽(high Fischer ratio peptide, HFRP)是一类由2~9个氨基酸残基所组成的复合小肽(或称寡肽、短肽, HFRP), 其显著特征是高F值, 一般应大于20^[5-6]。F值(Fischer ratio)是指支链氨基酸BCAA(branch chain amino acid)与芳香族氨基酸AAA(aromatic amino acids)含量的摩尔数比值(BCAA/AAA)。BCAA主要包括: 缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile); AAA主要包括: 色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)。正常人血液的F值为3.0~3.5, 但患有肝脏疾病病人的血液中F值只有1.0或更低, 需要及时补充、调整。

1 HFRP的生物活性

HFRP是一种重要活性肽, 其生理功能及用途已有一些研究成果。

1.1 HFRP可直接提供能量, 具有抗疲劳作用

研究发现^[4], 支链氨基酸(BCAA)代谢与运动性疲劳有密切关系。支链氨基酸主要在肌肉组织进行代谢, 起到节氮供能的作用, 补充外源性BCAA可减少肌肉蛋白质的分解作用, 降低运动过程中大脑5-羟色胺的积累, 防止中枢神经疲劳。动物试验也表明, 饮用富含BCAA饮料的小鼠体重明显增加, 运动能力、耐热、抗疲劳和耐缺氧能力显著提高。HFRP进入机体可逐渐分解为支链氨基酸, 因此HFRP或BCAA可作为运动营养补充剂、抗缺氧剂, 可应用于制造增强运动能力的固体或液体运动饮料, 用于制造耐缺氧的保健营养片剂, 提高在高海拔地区的机体适应能力。

1.2 HFRP富含支链氨基酸, 可提供3种人体必需氨基酸

HFRP富含缬氨酸(Val)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)等支链氨基酸, 它们是人体八种必需氨基酸之三种。其中缬氨酸对于维持机体正常神经系统功能、刺激骨骼前T淋巴细胞分化成熟、增强免疫功能等发挥作用; 异亮氨酸可用于治疗精神障碍, 增进食欲,

抗贫血; 亮氨酸可降低血糖, 缓解或辅助治疗头晕, 促进皮肤伤口及骨伤愈合等作用。上述3种必需氨基酸在机体内发挥重要生理功能^[4,5]。

1.3 HFRP的保肝护肝, 辅助治疗肝性脑病作用

肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE), 是肝功能衰竭时出现的特征性神经症状, 是严重肝病时机体复杂代谢紊乱的情况下, 多种因素综合作用的结果。临床表现是行为异常、意识障碍, 甚至昏迷, 也可表现为用智力测验或电生理检测方法检测到的轻微异常。通过静脉注射或口服富含支链氨基酸的混合液, 补充机体内支链氨基酸, 可纠正氨基酸代谢的不平衡, 抑制大脑中假神经递质的形成, 可预防肝性脑病发生或减缓其症状, 改善病人营养状况^[4-6]。

动物试验表明, HFRP能有效保护肝细胞, 减轻由酒精或CCl₄导致的肝损伤, 改善肝、肾、肠胃疾病患者营养的功能; HFRP还可促进酒精代谢, 具有解酒的功能, 用于醒酒食品、解酒饮料及片剂。

1.4 HFRP可改善手术后和卧床病人的蛋白营养状况

HFRP可改善手术后和卧床病人的蛋白营养状况, 尤其对烧伤和外科手术病人、严重消化障碍病人, 如果摄入正常膳食蛋白往往会出现血氨增高, 血液及脑中氨基酸模式发生改变, 频频发生昏迷现象。BCAA具有促进氮储留和蛋白质合成, 抑制蛋白质分解等作用。有研究报道BCAA作为烧伤、外科手术、脓毒血症和长期卧床鼻饲等病人的营养补充剂, 并取得了令人满意效果。国外已有一些用于预防、治疗肝硬化和慢性肝病病人的静脉注射或口服HFRP制剂、富含BCAA的饮料^[4-6]。

2 HFRP的原料和制备技术

2.1 HFRP制备的原料选择

目前, 活性肽制备所使用的主要是蛋白质类原料^[7-11], 如玉米黄粉、大豆蛋白粉、大米谷朊粉、酪蛋白粉等。玉米黄粉是玉米淀粉厂湿法制取玉米淀粉后的副产物, 其蛋白质含量35%~65%^[6]。由于玉米黄粉具有特殊气味和色泽, 水溶性差, 口感粗糙, 且其氨基酸组成中缺乏赖氨酸、色氨酸等必需性氨基酸, 一般认为其营养价值较低, 限制其利用, 主要作为畜禽廉价饲料, 附加值低。研究发现^[7]玉米黄粉中主要

含醇溶蛋白(约占 70%)、谷蛋白(约占 28%), 其中醇溶蛋白富含缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)等支链氨基酸(疏水性氨基酸)。我国每年产玉米黄粉约 60 万吨, 资源丰富, 因此, 玉米黄粉是生产高 F 值活性肽的良好原料, 为玉米资源深度加工开发提供了重要方向。

2.2 活性肽的制备技术

活性肽制备技术近年来有一些研究报道, 主要包括蛋白质酶解、活性肽分离纯化等 2 个方面。

2.2.1 蛋白质酶解技术

将蛋白质酶解为适当分子量的肽, 多种蛋白酶都可应用^[9-12], 如人或动物来源的胃蛋白酶、胰蛋白酶(trypsin)、胰凝乳蛋白酶(α -Chymotrypsin)、弹性蛋白酶(elastase)、羧肽酶(carboxypeptidase), 植物来源的木瓜蛋白酶(papain)、菠萝蛋白酶(bromelain), 微生物来源的枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)、曲霉菌蛋白酶(*Aspergillus protease*)等。不同蛋白酶的主要作用位点不同^[10-13], 如胃蛋白酶优先作用于芳香族氨基酸(Phe, Trp, Tyr)和 Leu 的肽键; 胰蛋白酶可选择性水解精氨酸(Arg)或赖氨酸(Lys)的羧基所构成的肽键; 胰凝乳蛋白酶主要作用于蛋白质的酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)和苯丙氨酸(Phe)等芳香族氨基酸的羧基肽键; 弹性蛋白酶特异的肽键切除位点为羧基端的疏水性氨基酸残基, 如甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)和缬氨酸(Val); 羧肽酶 A 主要能够水解小分子肽 C-端的具有芳香族或脂肪族侧链氨基酸基团; 羧肽酶 B 则优先作用于羧基端的碱性氨基酸基团, 如精氨酸(Arg)和赖氨酸(Lys)等。因此, HFRP 的制备需要在了解原料蛋白的氨基酸序列及酶切位点的基础上进行分析判断, 并试验研究优化制备工艺条件。

2.2.2 活性肽的分离纯化技术

利用分子排阻效应(size exclusion)、电荷性、疏水性等, 可制备不同分子量、电荷性的肽组分^[10-14]。Sephadex G25、G15 凝胶过滤层析可分别分离分子量 1.0~5.0 kDa 和<1.5 kDa 的活性肽; 离子交换凝胶层析通过相反电荷基团的静电吸引、洗脱纯化, 制备不同电荷性的活性肽。Ma 等^[5]采用 RP-HPLC、YMC ODS C-18 等, 通过疏水性层析分离制备不同疏水性的活性肽; Rajapakse 等^[14]采用 SP Sephadex C-25 阳离子交换色谱分离制备抗氧化肽组分。

3 活性肽的耐消化性及吸收评价技术

活性肽的功能发挥需要依赖于肽结构的完整性, 如何保持活性肽完整性及高效吸收是功效的基础和关键技术。活性肽口服途径的摄入、进入机体、发挥生理功能, 需要面临胃肠道的物理屏障和生化屏障双重作用, 前者主要包括由消化道粘膜层、细胞分泌系统、上皮细胞间的紧密连接等构成的物理屏障, 后者是指胃内低 pH 值、胃肠内多种消化酶等消化降解。目前对于活性肽耐消化性、吸收、转运、体内功效评价等已有一些研究^[13-15]。

3.1 活性肽的耐消化性

活性肽降解除了受消化道生理条件影响外, 其本身的结构性质, 如肽链长短、氨基酸组成、电荷性、疏水性等都会对其酶解反应产生重要影响^[16]; 胃肠存在的蛋白酶对于蛋白质及多肽的氨基酸序列有特异的识别位点或敏感位点, 从而使不同蛋白质及多肽具有不同的耐消化性能。Hur 等^[17]对酪蛋白的体外模拟消化研究表明, 胰酶可能优先切断 Leu、Lys、Arg、Phe、Tyr 等碱性、部分亲水性氨基酸形成肽键, 而 Glu、Thr、Ser、Asp 等酸性氨基酸更倾向于留在未消化的大分子肽段中。Vermeirssen 等^[18]研究了 3 种源于 β -乳球蛋白的抗高血压肽的胃肠稳定性, 结果显示, 其降解程度受生物活性肽链长、序列特异性双重影响。降血压肽的活性与其 C-端和 N-端氨基酸的疏水性 N-端氨基酸的电荷性高度相关。因此, 活性肽的结构性质既决定其生物活性, 又与其耐消化性密切相关。

3.2 活性肽的吸收评价技术

主要通过体内、体外 2 种方式评价活性肽的吸收效率。

3.2.1 在体动物模型(*in situ* animal model)吸收评价技术

通常采用大鼠构建动物模型, 主要是将活性肽通过肠道单向灌流法(unidirectional perfusion)、肠道循环灌流法(circulatory perfusion)、肝肠血管灌流(vascularly perfused intestine-liver preparation)等, 评价其在不同胃肠段的吸收效率及途径^[19-21]。通常是将麻醉的大鼠开腹, 对待考察肠部位的两端插管结扎, 用生理盐水冲洗干净肠道内容物, 建立相关平衡、构建不同的回路、加样、取样和检测等操作。肝肠血管

灌流常用于研究活性肽及其代谢产物的肝肠循环、评价吸收和首过效应,具有良好应用潜力。离体肠外翻囊技术对于评价活性肽的跨膜吸收、被动吸收和主动转运过程的机制研究的具有一定的价值^[22,23]。

3.2.2 体外吸收评价技术

由于体内试验通常成本高、取样困难,且试样与食物直接相互作用非常复杂,试验结果重复性差、规律性不强等。目前,活性肽的体外吸收评价主要采用模拟胃肠消化模型和单层细胞模型为基础的吸收评价技术。

3.2.2.1 模拟胃肠消化模型的评价技术

目前,研究者^[13]优先采用模拟胃肠消化模型,研究其胃和小肠两个阶段的消化过程,通过制备模拟胃液和模拟肠液,按照消化生理条件将待测物进行先胃消化,再肠消化的处理过程,用以评价生物活性物质的胃肠道内稳定性。然而,研究者关注较多的是前两段消化作用(第一段胃阶段消化、第二段是肠阶段消化),忽视第三段的消化作用(小肠吸收界面肽酶作用),或者只开展小肠吸收界面的转运研究,未考虑胃肠消化作用^[14]。采用完整的三段式消化模型,评价高F值活性肽的肠吸收效率,有助于提高其可靠性。

3.2.2.2 单层细胞模型评价技术

小肠上皮细胞是一种生物膜,活性肽的吸收过程是一种跨膜转运的过程,因此构建体外模拟生物膜是目前优先采用的方法^[24,25],其中Caco-2单层细胞评价体系是目前国内外应用最广泛的活性物质肠吸收的评价方法^[22-27]。

Caco-2细胞系来源于人结直肠癌,该细胞能够在有孔的多聚碳酸酯膜上自发分化成肠上皮细胞单层,具有与体内小肠上皮细胞相似的细胞极性、紧密连接和转运系统以及酶系统,尤其是该细胞模型含有与人体微绒毛上类似的肽酶种类和相对含量^[26,27];Caco-2细胞的肠腔内上皮细胞侧为AP侧,腔外一测为BL侧,在正常的生理条件下,待测物质从AP转运到BL侧,才能进入血液循环系统。因此可以很好地模拟体内小肠上皮细胞的物理屏障和化学屏障,在活性肽、药物的胃肠吸收及其评价方面得到广泛应用。

4 小结与展望

高F值活性肽由于其独特氨基酸组成,具有改

善精神状况、抗疲劳、改善醉酒、保肝护肝、辅助治疗肝硬化和肝性脑病、纠正血浆及脑中氨基酸病态模式、降低血氨和平衡蛋白质营养等生理功能,是一种具有重要开发价值的功能成分。

目前已发现一些寡肽,如抗氧化肽、胰岛素等有特殊的吸收载体,可通过氢离子和钙离子浓度电导的消耗能量的主动转运系统、具pH依赖性的非耗能性钠离子和氢离子交换系统和谷胱甘肽(GSH)等多种转运系统^[28-30],但目前对于高F值活性肽的肠吸收模式及其机制未见报道。加强高F值活性肽制备技术、吸收动力学、结构特征与胃肠耐消化性的关系规律、吸收机制等方面的研究,提高活性肽的肠吸收效率及生物利用度,为新型活性肽保健食品的研究开发提供理论依据和技术支持,对于提高农副产品的附加值,推动生物活性肽产业的发展,具有重要的经济效益和社会效益。

参考文献

- [1] Cavazos A, Mejia EG. Identification of Bioactive Peptides from Cereal Storage Proteins and Their Potential Role in Prevention of Chronic Diseases [J]. *Comp Rev Food Sci Food Safety*, 2013, DOI: 10.1111/1541-4337.12017
- [2] Danquah MK, Agyei D. Pharmaceutical applications of bioactive peptides [J]. *OA Biotechnol*, 2012, 1(2):5.
- [3] Kim SK, Ngo DH, Vo TS. Marine fish-derived bioactive peptides as potential antihypertensive agents [J]. *Adv Food Nutr Res*, 2012, 65: 249-60.
- [4] Adachi S, Yamanaka T, Hayashi S, et al. Preparation of peptide mixture with high Fischer ratio from protein hydrolysate by adsorption on activated carbon [J]. *Bioseparation*, 1993, 3(4): 227-232.
- [5] Ma Y, Lin L, Sun DW. Preparation of high Fischer ratio oligo-peptide by proteolysis of corn gluten meal [J]. *Czech J Food Sci*, 2008, 26(1): 38-47.
- [6] 董清平, 方俊, 田云, 等. 高F值寡肽研究进展. 现代生物医学进展[J]. 2009, 9(2): 368-378.
Dong QP, Fang J, Tian Y, et al. Research progress on high fischer ratio oligo-peptide [J]. *Prog Mod Biomed*, 2009, 9(2): 368-378.
- [7] 郑明洋, 王元秀, 张桂香, 等. 响应面法优化玉米黄粉蛋白的酶解工艺[J]. *食品科学*, 2012, 33(4): 71-76.
Zheng MY, Wang YX, Zhang GX, et al. Optimization of hydrolysis process for corn gluten meal by response surface methodology [J]. *Food Sci*, 2012, 33(4): 71-76.
- [8] Hasan I, A Gani R, Akbar N, et al. Correlation between branched

- chain amino acids to tyrosine ratio and child pugh score in liver cirrhosis patients [J]. Indonesian Gastroentero Hepatol, Digest Endosc, 2005, 6(1): 1–3.
- [9] Hamman, Josias H, Gill M. Oral delivery of peptide drugs: Barriers and developments [J]. Biodrugs, 2005, 19: 165–177.
- [10] Florence D, Blanco PM. Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs [J]. Molecules, 2005, 10: 65–80.
- [11] Min C, Li B. The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion [J]. Innov Food Sci Emerg Technol, 2012, 16: 341–348.
- [12] Cheison A, Chelulei S, Schmitt M, , *et al.* Influence of temperature and degree of hydrolysis on the peptide composition of trypsin hydrolysates of 3-lactoglobulin: Analysis by LC-ESI-TOF/MS [J]. Food Chem, 2010, 121: 457–467.
- [13] Ma YY, Li YL, Zhai JJ, *et al.* Fractionation and evaluation of radical scavenging peptides from *in vitro* digests of buckwheat protein [J]. Food Chem, 2010, 118: 582–588.
- [14] Rajapakse N, Mendis E, Byun HG, *et al.* Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems [J]. J Nutr Biochem, 2005, 16(9): 562–569.
- [15] Daniel EV, Johnson SR, Cheng HY, *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates [J]. J Med Chem, 2002, 45(12): 2615–2623.
- [16] Agudelo RA, Gauthie SF, Pouliot Y, *et al.* Kinetics of peptide fraction release during *in vitro* digestion of casein [J]. J Sci Food Agr, 2004, 84(4): 325–332.
- [17] Hur, SJ, Lim BO, Eric A. *In vitro* human digestion models for food applications [J]. Food Chem, 2011, 125: 1–12.
- [18] Vermeirssen V, Deplancke B, Tappenden KA. Intestinal transport of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile- -Arg through a Caco-2 cell monolayer [J]. J Pept Sci, 2002, 8(3): 95–100.
- [19] Ekmekcioglu C. A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems [J]. Food Chem, 2002, 76: 225–230.
- [20] Gupta V, Doshi N, Mitragotr S. Permeation of insulin, calcitonin and exenatide across Caco-2 monolayers: measurement using a rapid, 3-day system [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57136.
- [21] Sam M, Brayden DJ, Feighery L, *et al.* Cracking the junction: update on the progress of gastrointestinal absorption enhancement in the delivery of poorly absorbed drugs [J]. Crit Rev Ther Drug, 2008, 25: 117–168.
- [22] Trisha LP, 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.
- [23] Ana Q, Contreras MM, Ramos M, *et al.* Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of [beta]-casein-peptides with antihypertensive properties [J]. Peptides, 2009, 30: 1848–1853.
- [24] Edward HK, Li D, Petusky S, *et al.* Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery [J]. J Pharm Sci, 2004, 93: 1440–1453.
- [25] Marta M, Dávalos A, María A. Transepithelial transport a cross Caco-2 cell monolayers of antihypertensive egg-derived peptides. PepTI-mediated flux of Tyr-Pro-Ile [J]. Mol Nutr Food Res, 2008, 52: 1507–1513.
- [26] Cristina M, Pedroche J, Mar YM, *et al.* Stability of sunflower protein hydrolysates in simulated gastric and intestinal fluids and Caco-2 cell extracts [J]. LWT-Food Sci Tech, 2009, 42: 1496–1500.
- [27] Sambuy Y, Angelis ID, Ranaldi G, *et al.* The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors On Caco-2 cell functional characteristics [J]. Cell Biol Toxicol, 2005, 21: 1–26.
- [28] Chae, Young S, Jang MK, *et al.* Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans [J]. J Contr Release, 2005, 102: 383–394.
- [29] Aria Quirós, Ramos M, Muguera B. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis* [J]. Int Dairy J, 2007, 17: 33–41.
- [30] Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical intervention s[J]. J Amino Acids, 2012, doi:10.1155/2012/736837.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



张婵, 博士, 研究方向: 食品生物技术。
E-mail: zhangchan@th.btbu.edu.cn



王成涛, 博士、教授, 主要研究方向
为食品生物技术。
E-mail: wangchengtao@th.btbu.edu.cn