

# 乳清蛋白水解制备功能性多肽的研究概况

李晓东<sup>1,2,3\*</sup>, 蒋琛<sup>2</sup>, 宋惠敏<sup>1,3</sup>

(1. 东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 食品学院, 哈尔滨 150030;

2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 3. 东北农业大学食品营养与安全协同创新中心, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 乳清是生产干酪及干酪素过程中获得的大量液态副产物, 含有丰富的营养成分, 其主要成分乳清蛋白的营养价值极高。随着近年来小肽生物活性功能研究的开展, 对于乳清蛋白水解物中功能性多肽的研究成为主要方向。近年来的研究中发现乳清蛋白中含有多种生物活性肽, 包括 ACE 抑制肽、抑菌肽、抗病毒肽、抗氧化活性肽及其它活性肽。目前, 国内外有关 ACE 抑制肽的研究较多, 而对降胆固醇肽的研究多是以大豆蛋白为原料, 而更具有研究价值的乳清蛋白源降胆固醇肽研究较少。本人以乳清蛋白为原料, 对其酶解产物的降胆固醇活性肽进行分离制备, 既充分利用了干酪的副产物, 减少了资源浪费和环境污染, 又能提供一种新型降胆固醇功能产品, 为商业化开发乳清蛋白降胆固醇功能产品提供理论依据。本文结合本人对降胆固醇肽的研究, 综述了乳清蛋白源功能性多肽的制备、分离纯化技术及其活性多肽的研究概况。

**关键词:** 乳清蛋白; 功能性多肽; 生物学功能

## Research progress on preparing functional polypeptide from whey protein hydrolysis

LI Xiao-Dong<sup>1,2,3\*</sup>, JIANG Chen<sup>2</sup>, SONG Hui-Min<sup>1,3</sup>

(1. Key Laboratory of Dairy Science of Ministry of Education, College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 3. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**ABSTRACT:** With the development of research on biological activity of small peptides in recent years, research on functions of whey protein hydrolysate peptides become hot. Whey is a liquid by-product obtained in the process of cheese and casein. Whey is rich in nutrients, and its main component is whey protein which has a high nutritional value. Recent studies have found that whey protein contains a variety of bioactive peptides, including antihypertensive peptides, antimicrobial peptides, antiviral peptide, antioxidant activity peptides and other bioactive peptides, and has been a hot research. At present, there are many studies on the antihypertensive peptides at home and abroad, and there are fewer studies on hypocholesterolemic peptides. Most of studies about hypocholesterolemic peptides are about soy protein. However, whey protein hypocholesterolemic peptides have more research value, in fact. In this experiment, whey protein was as raw material, hypocholesterolemic peptides were separated and prepared from its hydrolysates. In this subject, by-product of cheese was full used, it not only reduced waste of resources and environmental pollution, but also provided a theoretical basis

基金项目: 国家“十二五”科技支撑项目(2011BAD09B01)

**Fund:** Supported by the National "Twelfth Five-Year" Plan for Science and Technology Support Program (2011BAD09B01)

\*通讯作者: 李晓东, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为乳品科学与技术。E-mail:hrblxd@163.com

\*Corresponding author: LI Xiao-Dong, Professor, Key Laboratory of Dairy Science of Ministry of Education, College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China. E-mail:hrblxd@163.com

for the commercial development of hypocholesterolemic functional products. This paper reviews the whey protein source of functional polypeptides preparation, separation and purification technology and research status of active peptides.

**KEY WORDS:** whey protein; bioactive peptides; bioactivity

### 1 引言

随着人们生活水平的日益提高,使得人们更加注意自己的身体健康,想在不食用药物治疗的条件下,通过食用无毒、无副作用的非药物制品达到良好的保健效果。因此,寻找副作用小且易吸收的天然物质,探索其调节身体机能的作用及分子机制,是目前研究防治高血压、动脉粥样硬化、神经系统、胃肠道系统等疾病发生发展的热点和目标<sup>[1]</sup>。相对于药物治疗,食品源功能性多肽类产品具有更好的安全性<sup>[2]</sup>。随着近年来小肽生物活性功能研究的开展,已经证明许多小肽分子不仅能提供人体生长、发育所需的营养物质与能量,更为重要的是其还具有潜在的降血压、抑菌、促进生长、增强机体免疫能力、镇静、降低胆固醇、改善物质代谢等功能<sup>[3]</sup>。生物活性肽作为一个具有很大潜力的功能性因子,成为医药、食品及动物营养等领域研究的一个热点,引起越来越多的注意和重视。乳清是工

业化生产干酪及干酪素的副产品。工业化生产 1 吨干酪就会排放 9 吨乳清,因此乳清的资源十分丰富<sup>[4]</sup>。从乳清中分离所得的乳清蛋白广泛用于乳产品加工中。近年来,随着乳源性活性肽研究与产品开发的兴起,除酪蛋白外,乳清蛋白已被证实含有很多潜在的生物活性肽段(见图 1),成为近几年来国外的研究热点<sup>[5]</sup>。这为进一步提升乳清蛋白产品的营养功能,提高乳清蛋白产品的利用价值及附加产值提供了新的思路和方法。人们对乳清蛋白的功能特性的认识正逐步向其水解产生的多肽生物学性质研究方面转移,但相对于食品蛋白源生物活性肽,目前国际乳清蛋白源生物活性肽单体纯化分离的研究较少<sup>[6]</sup>。国家发展改革委、工业和信息化部组织制定的《食品工业“十二五”发展规划》指出要大力开发乳蛋白、乳清制品等相关产品,延长乳制品加工产业链<sup>[7]</sup>。因此,本文将结合本人的部分研究,对国、内外乳清蛋白水解制备功能性多肽的研究现状做一综述。

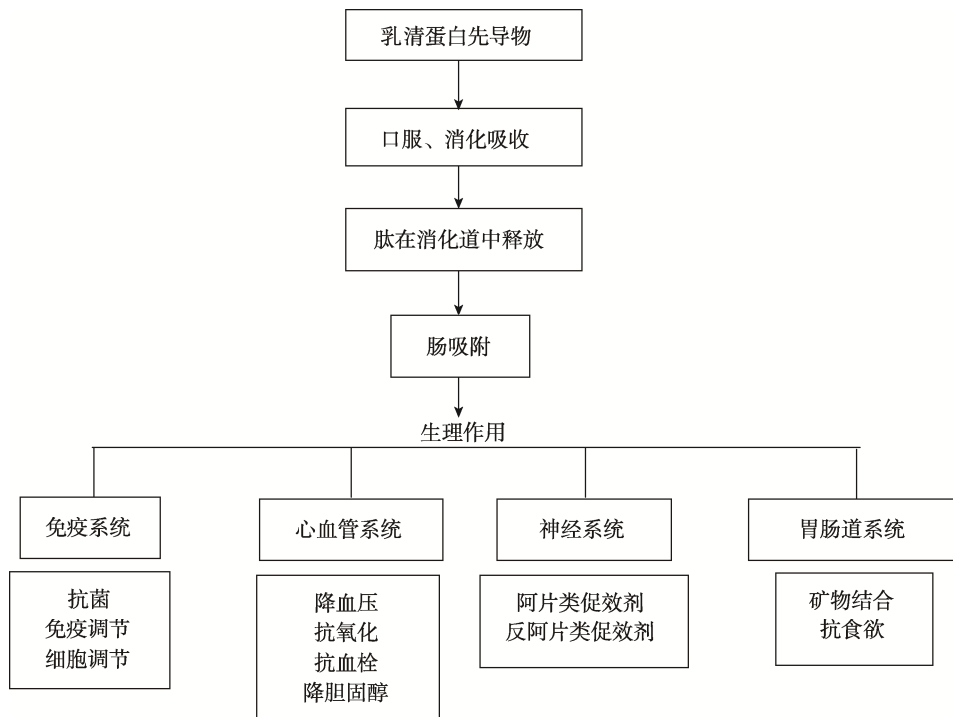


图 1 乳清蛋白源功能性多肽的生物活性框架

Fig. 1 Physiological framework of bioactivity of whey peptides.

## 2 乳清蛋白生物活性肽的研究进展

目前得到的乳清蛋白生物活性肽的作用主要有: 抑菌、抗病毒、免疫调节、神经调节、ACE 抑制、降胆固醇、降血糖等功能<sup>[8-15]</sup>, 见表 1。

表 1 乳清蛋白水解产生的生物活性肽的功能及其可能机制  
Table 1 The function and possible mechanism of Bioactive peptides from whey protein hydrolysis

肽的名称/序列	生物学功能	可能的机制
f(142-148)	ACE 抑制	抑制血管内皮素(ET-1)的释放
$\alpha$ -Lactorphin f(50-53)	ACE 抑制	一氧化氮敏感的机制(体内)
$\beta$ -Lactorphin f(10-105)	ACE 抑制	神经降压素受体介导的 NT2
$\beta$ -Lactotensin f(146-149)	ACE 抑制	神经降压素受体介导的 NT2
$\alpha$ -Lactorphin; $\beta$ -Lactorphin; serorphin	类鸦片活性肽	通过阻断阿片受体拮抗剂纳洛酮降低血压
Albutensin	类鸦片活性肽	通过补充 C3a 和 C5a 受体
糖巨肽	镇痛 调节食物摄入量 调节食物摄入量	通过神经降压素和多巴胺拮抗剂受体介导的 NT2 和 D1 通过补充受体介导的 C3a 缩胆囊素的释放

### 2.1 乳清蛋白肽抑菌、抗病毒、抗肿瘤活性的研究现状

乳清蛋白中的乳铁蛋白具有抑制细菌生长和病毒繁殖的作用。乳铁蛋白能够清除体内部分致病菌生长所需要的铁离子, 其消化产物乳铁转运蛋白也可抑制多种致病菌的生长繁殖。2007 年, Miralles 等<sup>[16]</sup>研究证实糖基化的  $\beta$ -乳球蛋白对大肠杆菌具有杀菌作用。乳铁蛋白还可预防多种病毒的安装; 2004 年, Leonie 等<sup>[17]</sup>通过实验证明乳铁蛋白能够抑制病毒侵入细胞。

乳清蛋白的抗癌活性也被广泛的研究。膳食摄入乳清蛋白可促进组织内谷胱甘肽的合成量升高, 引起负反馈抑制肿瘤细胞内谷胱甘肽的合成, 而产生抗肿瘤的效果。

### 2.2 乳清蛋白肽免疫调节作用的研究现状

乳清蛋白富含半胱氨酸和谷氨酸, 维持谷氨酰胺水平, 增强免疫细胞功能, 以及刺激机体淋巴细胞的增殖。2008 年, Gauthier 等<sup>[18]</sup>通过细胞实验和酶联免疫试验研究表明乳清分离蛋白能够刺激小鼠脾脏细胞的增殖, 并且其酶解产物还可明显增加  $\gamma$ -干扰素的分泌。

### 2.3 乳清蛋白抗氧化肽的研究进展

研究发现, 酶解乳清蛋白并分离纯化后得到的多肽混合物具有较强的清除体内自由基和抗氧化的活性。2007 年, Cheison 等<sup>[19]</sup>用蛋白酶 Protease N Amano 水解乳清分离蛋白, 其 DPPH 自由基清除能力得到明显提高; 2009 年, Kong 等<sup>[20]</sup>通过纯化乳清蛋白得到不同分子量范围的乳清蛋白肽, 发现分子量在 100~2800 Da 的乳清蛋白多肽自由基清除能力最强。

### 2.4 乳清蛋白 ACE 抑制肽的研究进展

国外较早就开始从动植物中分离提取 ACE 抑制肽, 并早在 1982 年 Maruyama 就陆续的进行了 ACE 抑制肽的研究。Mullally 等人<sup>[21]</sup>研究了胰蛋白酶水解  $\beta$ -乳球蛋白所得水解液的 ACE 抑制活性。  $\beta$ -乳球蛋白本身不具有 ACE 抑制的活性, 而将其用胰蛋白酶水解得到的水解液产生的 ACE 抑制率达到 83.4%。Pihlanto-Leppala<sup>[22]</sup>等人研究利用胰蛋白单一酶水解或利用几种复合酶水解乳清蛋白, 所得的水解液具有较强的 ACE 抑制活性, 并通过色谱进行分离纯化得到几种具有 ACE 抑制活性的肽段, IC<sub>50</sub> 浓度为 77~1062  $\mu$ m。Lee 等<sup>[23]</sup>用蛋白酶 K 水解乳清蛋白, 并层析分离得到 6 种 ACE 抑制肽片段, 具有明显的降血压活性; Ferreira 等<sup>[24]</sup>人对胰蛋白酶水解的乳清蛋白水解物的 ACE 抑制肽的特性进行了研究, 并用高效液相色谱对其分离纯化, 得到的结构序列 Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) 具有抑制 ACE 的活性。Elizabete 等<sup>[25]</sup>人研究了酶和温度对乳清蛋白水解物的 ACE 抑制活性的影响, 乳清分离蛋白是在 65  $^{\circ}$ C 和 95  $^{\circ}$ C 预先变性, 用碱性蛋白酶和胰凝乳蛋白酶进行水解, 结果表明用碱性蛋白酶在 65  $^{\circ}$ C 具有最高的 ACE 抑制活性。Guo 等<sup>[26]</sup>人研究了用响应面法求 L. Helveticus 水解乳清蛋白产生乳清蛋白水解肽的最佳条件, 最终确定了在 E/S 为 0.60, pH 为 9.18, 温度为 38.9  $^{\circ}$ C 时 ACE 抑制活性最高达到了 82.2%, 此时的水解度为 18.8%。Lee 等<sup>[27]</sup>人用嗜热菌蛋白酶水解  $\beta$ -酪蛋白和  $\alpha$ -乳白蛋白得到的 ACE 抑制肽进行鉴定和分离。嗜热菌蛋白酶水解  $\beta$ -酪蛋白和  $\alpha$ -乳白蛋白, 分离通过凝胶过滤色谱和反相高效液相色谱,  $\alpha$ -乳白蛋白被分离出五种 ACE 抑制肽, 包括 C-末端序列。  $\alpha$ -乳白蛋白相对应的氨基酸残基序列是 24-26。IC<sub>50</sub> 是 1~5  $\mu$ m。  $\beta$ -酪蛋白水解分离出两种 ACE 抑制活性比较强的 f58-76 和 f59-76。Tânia 等<sup>[28]</sup>首次对乳清蛋白降血压肽在模拟胃肠道环境下稳定性进行了研究, 研究发现十几种乳清蛋白 ACE 抑制肽经胃肠道酶消化作用后表现出不同的结果, 有的被分解成更小的肽, 活性下降了; 有的保持稳定, 活

性不变;有的经过消化活性反而上升了。国内学者潘道东 2012 年从乳清蛋白水解产物中分离纯化出一种新的 ACE 抑制肽并对其分子机制进行了研究<sup>[29]</sup>。

以上就是近几年国内、外学者对于 ACE 抑制肽的研究,一般都是在筛选水解酶类,以及酶解条件优化上面下功夫,ACE 抑制肽的纯度没有大幅度的提高<sup>[30]</sup>,这是我们需要亟待解决的问题。

## 2.5 乳清蛋白降胆固醇肽的研究进展

由于高胆固醇对人类健康危害极大,医药业人工合成的降胆固醇药物又不可避免的会给人体带来副作用,因此很多研究学者把目标指向了天然的降胆固醇活性因子。研究发现,许多食物蛋白源生物活性肽都具有降低血液胆固醇水平的功能,继而掀起了研究开发降胆固醇活性肽的热潮<sup>[31]</sup>。关于食物蛋白源生物活性肽降低胆固醇作用的研究多集中于大豆蛋白。目前已知的大豆球蛋白五肽 LPYPR 和八肽 IAVPGEVA 都可以抑制羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)的活性<sup>[32]</sup>。实际上,乳清蛋白的降低血清胆固醇水平的作用早在 2001 年就得到了证实。

日本学者 Nagaoka 连续多年对降胆固醇肽进行研究。1991 年和 1992 年 Nagaoka<sup>[33]</sup>的研究结果表明,牛乳清蛋白源活性肽的降胆固醇活性比大豆蛋白和酪蛋白强。经过近些年的研究,我们明确的降血压生物活性肽单体很多,而针对降胆固醇的一些具有生物活性的单体研究的并不是很多。随后 1999 年 Nagaoka<sup>[34]</sup>通过试验证明,与干酪水解肽和未水解的蛋白相比,乳糜微粒中胆固醇在乳清蛋白水解的多肽中降低的很显著。主要原因是乳糜微粒中胆固醇的溶解度一旦降低会导致人体对外来的一些胆固醇的吸收量减少,这样一来胆固醇含量降低,从而达到了降胆固醇的效果。接着在 2001 年 Nagaoka<sup>[35]</sup>用胰蛋白酶水解牛乳  $\beta$ -乳球蛋白( $\beta$ -lactoglobulin),并从中分离纯化得到一种含有 5 个氨基酸残基的小肽段(Ile-Ile-Ala-Glu-Lys),进行质谱鉴定其位置为 f 71-75,通过 Caco-2 细胞及活体动物实验证明了这种 5 肽不但能降低乳糜微粒中胆固醇的溶解性,使其吸收减少,而且还能使牛黄胆酸很牢固的进行结合。与降胆固醇的甾醇类药物相比较,它对降低血清胆固醇水平有明显的作。

在我国,2006 年高学飞等<sup>[36]</sup>利用二次旋转回归实验设计深入探讨了不同水解条件对胰蛋白酶水解乳清蛋白的影响,得到了分子量范围介于 2000~12000 Da 之间的活性肽具有 HMG-CoA 还原酶抑制羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)的活性。日本学者 Kensei 于 2007 年的研究发现一种  $\alpha$ -乳球蛋白分离所得到的降胆固醇

肽——Lactostatin 可增加小鼠肝脏中 CYP7A1 的水平和 mRNA 表达<sup>[37]</sup>。此项研究为降胆固醇肽降胆固醇分子机制的研究奠定了理论基础,本人从乳清蛋白水解物中分离得到了具有降胆固醇功效的活性肽,目前正进行单体肽的分离研究,利用乳清蛋白降低胆固醇水平的产品及其方法现已申请了专利。

## 2.6 乳清蛋白降血糖肽的研究进展

乳清蛋白及其多肽的降低血糖的功效已经早有报道。2007 年,Blouet 等<sup>[38]</sup>研究表明用富含  $\alpha$ -La 营养液喂食雄性 Wistar 大鼠,在餐后 2 h 内其血糖水平明显低于其他蛋白饮食组大鼠的血糖。2011 年薛长勇等<sup>[39]</sup>采用碱性蛋白酶水解乳清蛋白,分离纯化后的多肽进行动物实验,结果显示分子量分布在 900~1900 Da 的多肽,能降低灌胃后 KKAY 糖尿病小鼠血糖、显著升高灌胃后 0.5 h 血清胰岛素水平。

## 2.7 乳清蛋白肽的其他功能性研究现状

2009 年, Xu 等<sup>[40]</sup>利用离子交换色谱从乳清蛋白的胰蛋白酶水解物中分离出一种分子量在 1.4~3.4 kDa 之间的小分子螯合钙的肽,这种肽能够促进钙的吸收,抑制磷酸钙的形成,预防骨疾病。2010 年,潘道东等<sup>[41]</sup>利用胰蛋白酶水解乳清蛋白制备促钙吸收肽,研究乳清蛋白肽对生长期小鼠骨密度的影响,通过体外检测法来测定肽的持钙活性,制备出了氨基氮含量较高和活性较强的矿物元素结合肽,此肽具有较强的体外持钙活性。2011 年, Malcata 等<sup>[42]</sup>用来自于朝鲜蓟中的胰酶类水解乳清蛋白得到抗溃疡活性肽,乳清蛋白在朝鲜蓟花朵的水浸液中水解得到的这种肽具有预防由药物或无水乙醇引起的胃粘液溃疡性损害。此外,乳清蛋白活性肽还具有抑制食欲、增强记忆等特殊功能。

## 3 乳清蛋白降胆固醇活性肽的制备及初步纯化的研究

### 3.1 乳清蛋白降胆固醇活性肽分离纯化研究现状

目前,利用乳清蛋白源制备生物活性肽通常有两种途径即肽的释放和肽的合成<sup>[43-46]</sup>(如图 2):

将生物活性肽从乳清蛋白中释放出来后,为得到纯度较高生理功能作用较强的活性肽就需要对蛋白肽混合物进行分离纯化。由于提取物成分复杂,生物活性肽的分离纯化成为制约其研究的难点。肽的分离纯化往往是将若干分离纯化技术联合使用而实现的。目前已经建立起来并且广泛得到应用的分离纯化方法有以下几种<sup>[46-50]</sup>,如表 2。

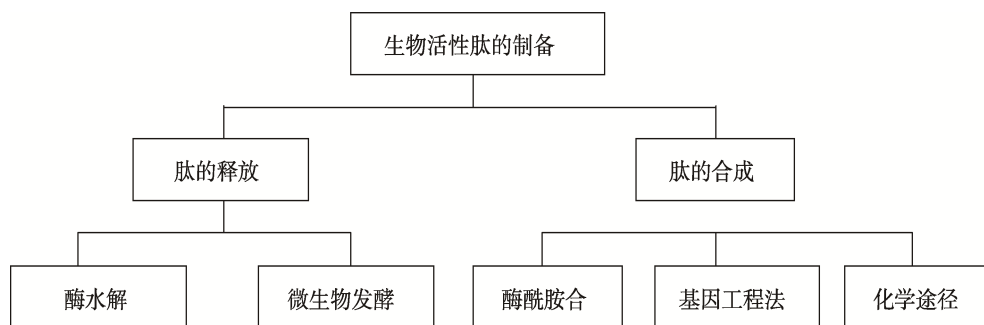


图 2 乳清蛋白源功能性多肽的制备

Fig. 2 The preparation of functional peptide from Whey protein

表 2 乳清蛋白降胆固醇活性肽的分离纯化方法

Table 2 The methods of separation and purification of whey protein hypocholesterolemic peptides

方法	原理	特点
超滤法	以压力差为驱动力的膜分离技术, 是按照膜的截留分子量大小对物料进行分离	时间短、处理量大、蛋白回收率高及滤膜可重复利用
凝胶过滤色谱法	一种根据分子大小和形状差异, 利用凝胶网状结构进行分离的方法	分离条件温和, 分离面宽, 产品得率高, 常用来分离分子量在 1 kDa~15 kDa 的活性肽
离子交换色谱法	该法是以离子交换树脂为固定相, 与流动相中的组分进行可逆的交换, 根据它们之间的结合力大小差异而使流动相中的组分得到分离	树脂还具有脱盐效果, 常用来脱除水解肽成分中多余的盐分
反相高效液相色谱法	根据流动相中被分离溶质疏水性的不同, 在固定相和流动相中产生不同的分配系数而得到分离纯化	此法对分子量在 1 kDa 以下的小分子活性肽的分离纯化尤为重要
电泳法	在电场的作用下, 利用待分离样品中各分子带电性质, 及分子本身大小、形状等性质的差异, 使带电分子产生不同的迁移速度, 从而对样品进行分离鉴定或提纯的技术	聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)是用于分离蛋白质的一种常用电泳方法

### 3.2 酶法制备乳清蛋白降胆固醇活性肽及初步纯化的研究

本人以浓缩乳清蛋白 WPC80 为原料, 利用生物酶技术、超滤、离子交换色谱以及凝胶过滤色谱分离纯化技术来制备乳清蛋白降胆固醇活性肽, 研究其生物活性、分子量分布及在体外模拟胃肠道环境的稳定性。主要研究内容和结果如下:

(1)降胆固醇活性肽的酶法制备工艺优化: 分别以五种不同的工具酶对乳清蛋白原料进行水解, 最终选取胰蛋白酶作为最佳水解工具酶。以水解度和胆固醇胶束溶解度抑制率为指标, 对水解过程中的五个因素进行单因素及响应面优化实验。得出优化的酶解参数为: 时间 8.5 h、温度 55 °C、pH8.0、加酶量 4.7%、底物浓度 5.8%, 此时水解物的胆固醇胶束溶解度抑制率为 17.26%。

(2)降胆固醇活性肽的初步纯化工艺研究: 选用截留分子量为 10 kDa 的超滤膜对乳清蛋白水解肽进行初步分离浓缩, 并对其超滤技术参数进行优化, 得出最佳工艺参数: 温度为 40 °C, 压力为 0.15 MPa, 水解肽浓度为 6 mg/mL, 在此条件下得到的超滤透过液的胆固醇胶束溶解度抑制率达到 28.63%, 与超滤前相比有显著提高。分别采用阴阳离子交换树脂和大孔吸附树脂对超滤浓缩后的活性肽进行脱盐纯化处理, 筛选工艺参数并比较二者脱盐和纯化效果, 结果得出大孔吸附树脂处理后脱盐和纯化效果较好, 脱盐率达 93.14%, 肽回收率达 85.13%, 处理后活性肽的抑制率从 28.63%提高到 47.53%。采用 Sephadex G-50 和 Sephadex G-25 凝胶过滤色谱逐级分离纯化降胆固醇活性肽, 结果得出 Sephadex G-50 凝胶色谱纯化的两个组分中 F2 的活性较高为 60.52%, 利用 Sephadex G-25 凝胶过滤色谱对其进一步纯化得到降胆固醇活性最高为 81.12%的 FB

组分。

(3)肽分子量鉴定: 利用 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定上述纯化的降胆固醇活性肽的分子量, 得出蛋白谱带的相对迁移率与标准蛋白质分子量的对数值之间的回归方程为  $Y = -1.314X + 4.6261 (R^2 = 0.9831)$ , 经计算降胆固醇活性肽的分子量分布在 1.9~3.3 kDa 之间。

(4)提纯后活性肽的成分测定: 对降胆固醇活性肽的多肽总量、水分及灰分含量进行测定, 得出其多肽混合物中的多肽总量为 90.18%, 水分含量为 5.37%, 灰分含量为 0.85%。

(5)体外稳定性的研究: 体外模拟人体胃肠道环境两个阶段的消化过程, 分别利用模拟胃液和模拟肠液处理乳清蛋白降胆固醇活性肽, 结果表明经模拟胃肠液消化后其活性从 81.12% 下降到 76.85%, 稳定性较好。

### 3.3 下一步研究计划

在前期研究的基础上, 拟采用分子生物学、生物化学、免疫学等相关学科的方法及手段, 在从乳清蛋白水解物中分离纯化出具有较高稳定性和较高活性的降胆固醇肽单体后, 研究其对胆固醇代谢的调节作用和小鼠粪便中性固醇和胆汁酸排泄的促进作用, 以及对小鼠肝脏内源性胆固醇合成途径和小鼠胆汁酸合成途径中关键酶: 胆固醇 12 $\alpha$ -羟化酶、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶还原酶和胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶(CYP7A1)表达, 以及对肝脏胆汁酸合成关键酶上游的调控分子-肝同源受体(LXR)和法尼酯受体(FXR)两个核受体的检测和分析, 探讨乳清蛋白降胆固醇肽的具体作用靶点和调控信号通路, 最终目的为确定乳清蛋白水解肽在降胆血清中胆固醇的分子作用机制。

## 4 结 语

目前, 我国对于乳清蛋白多肽的研究开发正处在起步阶段, 基础和应用研究都不够完善, 近年来的研究多活跃在对降血压肽的研究上, 对其他具有特定生理功能肽的生理活性和分离纯化研究较少, 更没有商业化开发乳清蛋白功能产品。因此在分离纯化出降胆固醇肽单体的基础上, 拟对以下三方面进行更为深入的研究: (1)对体外 Caco-2 细胞中胆固醇吸收的影响来判定其稳定性; (2)与降胆固醇类药物生物学功效的比较来判定其降胆固醇效果; (3)明确降胆固醇肽的具体作用靶点和调控信号通路, 进一步确定乳清蛋白水解肽在降胆血清中胆固醇的分子作用机制。此研究理论可加大国际上对乳清蛋白源的降胆固醇肽的分

子机制的认识深度, 并提高乳清作为干酪生产副产物的应用价值。

### 参考文献

- [1] 徐庆. 中链脂肪酸对小鼠胆固醇代谢的调节及其机制研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2013.  
Xu Q. Effects of medium-chain fatty acids on cholesterol metabolism and their mechanisms in mice [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2013.
- [2] Salter AM. Dietary fatty acids and cardiovascular disease. *Animal: an international journal of animal* [J]. Biosci, 2013, 7(Suppl 1): 163-171.
- [3] 顾瑞霞. 乳与乳制品的生理功能特性[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.  
Gu RX. Physiological features of milk and dairy products [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2001.
- [4] Ryan KN, Vardhanabhuti B, *et al.* Stability and mechanism of whey protein soluble aggregates thermally treated with salts [J]. *Food Hyd*, 2012, 27, 411-420.
- [5] Yuma T, Masaya S, *et al.* L-Cysteine-induced up-regulation of the low-density lipoprotein receptor is mediated via a transforming growth factor- $\alpha$  signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Communications*. Available online, 2014.
- [6] Jacobson TA, Glickstein SB, *et al.* Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on low-density lipoprotein cholesterol and other lipids: a review [J]. *J Clinical Lipidol*, 2012, 6(1): 5-18.
- [7] 《食品工业“十二五”发展规划》解读 [EB/OL]. <http://www.miit.gov.cn/n11293472/n11293832/n11293907/n11368223/14560608.html>, 2012-04.  
The interpretation of food industry “12th Five-Year” plan [EB/OL]. <http://www.miit.gov.cn/n11293472/n11293832/n11293907/n11368223/14560608.html>, 2012-04.
- [8] Maes W, Camp JV, *et al.* Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells [J]. *Regul Pept*, 2004, 118: 105-109.
- [9] Sipola M, Finckenberg P, *et al.* Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats [J]. *J Dairy Res*, 2002, 69: 103-111.
- [10] Yamauchi R, Usui H, *et al.* Characterization of  $\beta$ -lactotensin a bioactive peptide derived from bovine  $\beta$ -lactoglobulin as a neurotensin agonist [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(1): 940-943.
- [11] Nurminen ML, Sipola M, Kaarto H, *et al.*  $\alpha$ -Lactorphin lowers

- blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and in spontaneously hypertensive rats [J]. *Life Sci*, 2000, 66(1): 1535–1543.
- [12] Ijas H, Collin M, Finckenberg P, *et al.* Antihypertensive opioid-like milk peptide  $\alpha$ -lactorphin: Lack of effect on behavioural tests in mice [J]. *Int Dairy J*, 2004, 14(1): 201–205
- [13] Takahashi, Moriguchi MSM, *et al.* Albutensin A an ileum-contracting peptide derived from serum albumin acts through both receptors for complements C3a and C5a [J]. *Lett Pept Sci*, 1998, 5(1): 29–35.
- [14] Yoshikawa. Albutensin A and complement C3a decrease food intake in mice [J]. *Peptide*, 2002, 23(1): 127–133.
- [15] Beucher M, Levenez F, Yvon Y, *et al.* Effect of caseinomacropptide (CMP) of cholecystokinin (CCK) release in rats [J]. *Reprod Nutr Dev*, 1994, 34(2): 613–614.
- [16] Miralles T, Santiago M, Toshiko M, *et al.* Albutensin A an ileum-contracting peptide derived from serum albumin acts through both receptors for complements C3a and C5a [J]. *Food Chem*, 2007, 5(1): 1071–1075.
- [17] Beljaara L, Van der Strate BWA, Bakker HI, *et al.* Inhibition of cytomegalovirus infection by lactoferrin in vitro and in vivo [J]. *Antiviral Res*, 2004, 63(3): 197–208.
- [18] Gauthier SF, Boutin Y, Montoni A, *et al.* Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions [J]. *Int Dairy J*, 2008, 18(3): 260–270.
- [19] Cheison SC, Wang Z, *et al.* Preparation of whey protein hydrolysates using a single-and two-stage enzymatic membrane reactor and their immunological and antioxidant properties: characterization by multivariate data analysis [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(10): 3896–3904.
- [20] Peng XY, Xiong YL, *et al.* Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance [J]. *Food Chem*, 2009, 113(1): 196–201
- [21] Mullally MM, Meisel H, *et al.* Identification of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment bovine  $\beta$ -lactoglobulin [J]. *FEBS Lett*, 1997, 402(2-3): 99–101.
- [22] Pihlanto-Leppala A, Koskinen P, Piilola K, *et al.* Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides [J]. *J Dairy Res*, 2000, 67(1): 53–64.
- [23] Ferreira O, Pinho M, Mota V, *et al.* Preparation of ingredients containing an ACE-inhibitory tryptic hydrolysis of whey protein concentrates [J]. *Int Dairy J*, 2007, 17(2): 481–487.
- [24] Elizabete LC, Jose ARG, *et al.* Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates [J]. *Int Dairy J*, 2007, (17): 632–640.
- [25] Yu X, Guo, Pan DD, *et al.* Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology [J]. *Food Chem*, 2009, (114): 328–333.
- [26] Jeanette O, Samah M, Shalaby, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis [J]. *Int Dairy J*, 2007, 17(7): 488–503.
- [27] Lee NY, Cheng JT, Enomoto T, *et al.* Essential of proline and valine residues in the peptide derived from lactoferrin for angiotensin converting enzyme inhibition [J]. *J Chin Chem Society*, 2006, 53(3): 515–518.
- [28] Tânia T, Maria DMC, Isidra R, *et al.* Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes [J]. *Peptides*, 2011, 32: 1013–1019.
- [29] Pan DD, Cao JX, Guo HQ, *et al.* Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate [J]. *Food Chem*, 2012, 1(1): 121–126
- [30] 张金凤. 酶法制备乳清蛋白降血压肽和降胆固醇肽的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
- Zhang JF. Preparation of antihypertensive peptides and cholesterol peptides of whey protein enzymatic method [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013.
- [31] 顾浩峰, 张富新, 等. 乳制品中生物活性肽的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(2): 370–375.
- Gu HF, Zhang FX, *et al.* Research progress of bioactive peptides in dairy products [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2013, 34(2): 370–375.
- [32] 樊永华, 许辉. 大豆活性肽的分离纯化和生理活性[J]. *吉林农业*, 2013, 301(4): 280–281.
- Fan YH, Xu H. Isolation and purification of soybean and physiologically active peptides [J]. *Jilin Agric*, 2013, 301(4): 280–281.
- [33] Nagaoka S, Kanamaru, *et al.* Comparative studies on the serum cholesterol lowering action of whey protein and soybean protein in rats [J]. *Biosci Biotech Biochem*. 1992, 56(5): 1484–1485.
- [34] Nagaoka S, Miwa K, *et al.* Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and caco-2 cells [J]. *J Nutr*, 1999, 129(1): 1725–1730.
- [35] Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, *et al.* Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk  $\beta$ -lactoglobulin [J]. *Biochem Biophys Res Communications*, 2001, 281(1): 11–7.
- [36] 高学飞. 乳清蛋白降胆固醇活性肽的制备及其生物学功能的

- 研究[J]. 中国乳业, 2005,(5): 41-42.
- Gao XF. Preparation and biological functions of cholesterol-lowering activity of whey protein peptides [J]. Chin Dairy Ind, 2005, (5): 41-42.
- [37] Kensei M, Itsuo K, Yoshihiro K, *et al.* A novel regulatory pathway for cholesterol degradation via lactostatin [J]. Biochem Biophysical Res Communications, 2007, 352(3): 697-702.
- [38] Bloueta C, Mariottia F, MikogamiT, *et al.* Meal cysteine improves postprandial glucose control in rats fed a high-sucrose meal [J]. J Nutr Biochem, 2007, 18(3): 519-524
- [39] 薛长勇, 徐庆, 刘英华, 等. 乳清蛋白水解法及其多肽对 KKAY 小鼠血糖的影响[J]. 卫生研究, 2011,40(5): 624.
- Xue CY, Xu Q, Liu YH, *et al.* Hydrolysis of whey protein and polypeptide effect on KKAY mice blood glucose [J]. Health Res, 2011, 40(5): 624.
- [40] Xu Ri. Calcium binding of peptides derived from enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate [J]. Int J Dairy Technol, 2009, 62(2): 170-173.
- [41] 潘道东, 陆皓茜. 乳清蛋白肽对骨密度和骨钙含量的影响[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2010, 32(4): 350-353.
- Pan DD, Lu HQ. Whey protein peptide influence on bone mineral density and calcium content [J]. Acta Nutr Sinica, 2010, 32 (4): 350-353.
- [42] Malcata FX, Tavares TG, Monteiro KM. Antiulcerogenic activity of peptide concentrates obtained from hydrolysis of whey proteins by proteases from *Cynara cardunculus* [J]. Int Dairy J, 2011, 21(12): 934-939.
- [43] 张建华. 干酪乳清脱盐技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2012.
- Zhang JH. Cheese whey desalination technology research [D]. Beijing: The Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, master degree thesis, 2012.
- [44] 赵紫薇, 潘道东, 等. 发酵乳清橘汁饮料的研制[J]. 食品工业科技, 2013, 34(13): 223-227.
- Zhao ZW, Pan DD, *et al.* Orange juice beverage fermented whey [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(13): 223-227.
- [45] 余丹丹, 张昊, 等. 乳清蛋白的特性及其在食品工业中的应用[J]. 中国乳业, 2013, 6: 58-60.
- Yu DD, Zhang H, *et al.* The properties of whey protein and its application in food industry [J]. Chin Dairy, 2013, 138, 58-60.
- [46] 陈静廷. 乳清蛋白及其加工利用的研究进展[J]. 中国奶牛, 2013, 2: 74-77.
- Chen JT. Advances in the use of whey protein and its processing [J]. China Cows, 2013, 2: 74-77.
- [47] 于志鹏, 赵文竹, 等. 蛋清蛋白质降压肽纯化及分子量测定[J]. 食品工业科技, 2010, 31(7): 230-232.
- Yu ZP, Zhao WZ, *et al.* Determination and molecular antihypertensive peptides derived from egg white protein purification capacity [J]. Food Ind Technol, 2010, 31(7): 230-232.
- [48] 张玉奎, 张维冰. 分析化学手册-液相色谱分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- Zhang YK, Zhang WB. The Handbook of chemistry analysis by high performance liquid chromatography [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000.
- [49] 樊永华, 许辉. 大豆活性肽的分离纯化和生理活性[J]. 吉林农业, 2013, 301(4): 280-281
- Fan YH, Xu H. Isolation and purification of soybean and physiologically active peptides [J]. Jilin Agric, 2013, 301(4): 280-281.
- [50] Tânia GT, Manuela A, David G, *et al.* Manufacture of bioactive peptide-rich concentrates from Whey: Characterization of pilot process [J]. J Food Eng, 2012, 110(4): 547-552.

(责任编辑: 邓伟)

## 作者简介



李晓东, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为乳品科学与技术。  
E-mail: hrbldx@163.com.