

可食动物血蛋白肽的研究进展

卢文静 韩涛*

(北京农学院食品科学系 北京 102206)

摘要:生物体内存在多种具有生理功能的多肽物质,其组成和结构各具不同。目前已从包括人、植物、动物在内的各种生物体中分离出不同种类的活性多肽,且对其性质、制备方法、纯化方法、鉴定技术、功能活性及应用等方面进行了大量的研究。介绍了近年来可食动物血蛋白肽在功能和制备方面的研究进展,为其进一步开发利用提供线索和思路。

关键词:动物血肽 功能活性

Research progress on polypeptides from blood of edible animals

LU Wen-jing HAN Tao*

(Department of Food Science, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: There are a lot of bioactive polypeptides in bio-organisms with different structures and functional activities. Some of functional polypeptides were discovered in plants and animals, and their characters, preparation process, separation and purification methods, determination techniques, functional activities and application were studied extensively. Research progress on the preparation process and functional activities of polypeptides from blood of edible animals were reviewed.

Key words: blood; polypeptide; functional activity

中图分类号:TS201.2⁺1

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2011)11-0499-04

肽是由氨基酸通过肽键连接而成的化合物,它是机体组织细胞的基本组成成分。生物活性肽(Biological active peptide)是一类分子量较小、在结构上较松散、能够调节生物机体的生命活动和具有生理活性作用的一类肽的总称。动物对蛋白质的利用,长期以来一直认为是蛋白质水解成游离氨基酸后才被吸收。但有研究表明,动物在肠道对蛋白质的利用并不局限于游离氨基酸的形式,部分是以寡肽形式吸收的,且具有吸收快的特点,这与游离氨基酸的吸收机理和吸收过程完全不同,避免了氨基酸之间的吸收竞争,同时,肽被吸收后,被水解的氨基酸的种类和数量也影响着蛋白质的代谢水平。有些肽不仅能提供动物生长、发育所需的营养物质,而且还具有防病治病、调节机体生理机能的功效^[1]。以可食动物血为蛋白源的生物活性肽是通过现代生物技术将血中的球蛋白转化为小分子肽。小分子血肽不仅有很好的溶解性、低粘度、抗凝胶形成性,而且在

体内消化吸收快,适合作为不能消化和吸收完整蛋白质的病人、患胃病和肝病病人膳食中的蛋白质主要来源;适用于易过敏病人,避免完整蛋白质引起的免疫调节过敏反应;有利于矿物质元素的吸收和利用;某些小肽还具有免疫增强活性作用等。在发达国家,猪血的利用率已达50%以上,主要是开发肽类试剂、肽类药物以及功能食品和食品添加剂。在我国,利用血红蛋白酶解成具有生物活性的肽类物质,用于食品工业和制药工业,将极大满足人们日益增长的对功能性食品的需要,有助于解决屠宰时动物血对环境的污染,提高蛋白质资源的利用率^[2]。目前,我国每年屠宰产生的动物鲜血量达200多万t,仅猪血就约有150万t,是最大的动物性蛋白资源之一。但我国利用血资源开发的产品还比较单调,除了一小部分被加工成血粉或发酵血粉作为饲料添加剂及用于生化制药业生产血红素、超氧化物歧化酶、蛋白胨外,相当大的一部分都作为废弃物排出,既污染了环境,又浪费了宝贵的蛋白资源。

1 可食动物血蛋白肽功能的研究进展

1.1 抗氧化作用

抗氧化机理包括通过给抗氧化酶提供氢、缓冲

收稿日期:2010-10-11 * 通讯联系人

作者简介:卢文静(1987-),女,研究生,研究方向:农产品加工及贮藏工程。

基金项目“农产品加工及贮藏工程”北京市重点建设学科。

生理 pH、螯合金属离子和捕捉自由基等途径。自由基可引起人体组织蛋白质损伤、脂质过氧化、核酸损伤等,进而诱发各种疾病。而具有抗氧化作用的活性多肽具有清除自由基、防止脂质过氧化等作用。如将其添加到功能性保健食品中,具有预防多种疾病的作用。抗氧化活性多肽还能作为天然抗氧化剂防止油脂氧化,并可用于化妆品中起到延缓组织衰老的作用^[3]。

方俊^[2]利用铁氰化钾-磷酸盐缓冲系统初步验证了猪血多肽的还原能力,再利用化学发光法系统检测其在体外对超氧阴离子自由基、羟自由基和过氧化氢的清除能力,证实了其体外抗氧化活性;随后以溴代苯致小鼠肝中毒,引起肝脂质过氧化,再给小鼠灌胃不同剂量的猪血多肽,检测小鼠肝脏和血清超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性以及丙二醛(MDA)含量,进一步证实了其体内抗氧化能力。

不同水解条件影响产物的抗氧化能力。任建东^[4]采用 Alcalase 碱性蛋白酶、酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶和中性蛋白酶水解鹿茸血,研究不同酶水解产物对 DPPH·(二苯代苦味肼基自由基)、·OH 的清除作用,结果表明:对于 DPPH·,酸性蛋白酶水解产物的清除率明显高于其他 3 种酶,分别是木瓜蛋白酶的 2 倍、Alcalase 碱性蛋白酶的 1.6 倍;对于 ·OH,不同酶水解产物在不同时间对 ·OH 的清除率不同,其中,Alcalase 碱性蛋白酶水解产物在 0.5h 达到 81.80%,随着水解的进行而缓慢升高并始终处于较高水平,5h 时获得最大清除率(96.30%),为 4 种酶中活性最高;且蛋白质水解物的抗氧化活性与其水解度存在正相关性。尹晓平^[5]将马鹿茸血用木瓜蛋白酶水解,选取 3 个不同水解度的水解产物以及原鹿茸血和鹿茸粉,以 150mg/kg·d 灌胃小鼠 15d,结果表明:肽 1 组(水解度为 19.8% 的水解产物)较对照组显著增强小鼠血清、肝组织的总抗氧化能力和 GSH-Px 的活力,减少 MDA 的含量,具有明显的抗氧化活性;与鹿茸粉和原鹿茸血粉相比,肽 1 组的抗氧化性明显增强。

1.2 降血压作用

血管紧张素转换酶(Angiotensin I-Converting Enzyme, ACE)主要参与肾素血管紧张素醛固酮系统的调节。ACE 催化血管紧张素 I(Angiotensin I)转变为具强效升高血压作用的物质血管紧张素 II(Angiotensin II);同时,ACE 将具降压作用的物质舒张激肽(Bradynkinin)降解,使之失去降压作用。故 ACE 对血压的调节发挥重要作用。目前用于降血压的药物,其降压原理主要是抑制 ACE 的活性。血管紧张素转化酶抑制剂(Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor, ACEI)的研究开发,常常通过抑制剂降压效果体外检测,即测试其对 ACE 活性的抑制作用。

庞伟^[6]以猪血多肽粉作为血管紧张素转化酶抑制剂,通过高效液相色谱法(HPLC)验证了其对抗血管紧张素转换酶(Angiotensin I-Converting Enzyme,

ACE)的抑制作用,且发现不同分子量段的多肽对 ACE 抑制率均随浓度增加呈增长趋势。任建东^[4]研究了鹿茸血经 Alcalase 碱性蛋白酶、酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶和中性蛋白酶水解后,其水解产物与 ACE 抑制率的关系,观察到未水解时(0h),鹿茸血并不显示出 ACE 抑制活性,随着各蛋白酶的作用,水解产物表现出或强或弱的 ACE 抑制活性;Alcalase 蛋白酶作用 3h 得到的水解产物具有最高的 ACE 抑制率,为 90.63%;仅中性酶的酶解物对 ACE 抑制率与其水解度显著相关,其余酶解物对 ACE 抑制率并未随水解度的升高而呈现明显的规律性变化,表明对于 ACE 抑制活性来说,鹿茸血存在一个最佳水解度。Kazuo Mito^[7]等酶解以猪血为原料制备的珠蛋白,得到了 4 个具有抑制 ACE 活性、降血压的活性肽,分别是 Phe-Gln-Lys-Val-Val-Ala, Phe-Gln-Lys-Val-Val-Ala-Gly, Phe-Gln-Lys-Val-Val-Ala-Lys 和 Gly-Lys-Lys-Val-Val-Leu-Gln,它们对 ACE 活性的抑制率(IC₅₀)分别为 5.8、7.4、2.1、1.9 μmol,自发性高血压小鼠在口服 Phe-Gln-Lys-Val-Val-Ala、Gly-Lys-Lys-Val-Val-Leu-Gln 半个小时后,血压从(172 ± 5) mmHg 降至(150 ± 6) mmHg。

1.3 免疫活性增强作用

方俊^[2]从非特异性免疫和细胞免疫方面观察了猪血多肽对环磷酰胺所致免疫低下小鼠和正常小鼠免疫功能的影响。结果表明,不同剂量的猪血多肽均能恢复环磷酰胺造成的免疫低下小鼠脾脏指数和胸腺指数,免疫器官胸腺和脾脏指数随着猪血多肽浓度的增大而增加,并呈量效关系;通过小鼠碳粒廓清实验和腹腔巨噬细胞(PM)吞噬鸡红细胞实验,发现不同剂量猪血多肽对正常小鼠单核巨噬细胞吞噬功能和腹腔巨噬细胞吞噬功能均有增强作用。李艳伟^[8]等利用 T 淋巴细胞转化实验、E 花环形成实验及 NK 细胞杀伤毒性实验等体外免疫学实验方法,证实猪血被胰蛋白酶水解后的肽产物具有免疫增强活性,当给药剂量为 0.25mg/mL 时, T 淋巴细胞转化高出对照 64%, E 花环结环率高出对照 103%;但随着给药剂量的增加,对免疫活性的增强作用不断下降,甚至对机体产生一定的免疫抑制作用;以不同的给药方式和给药剂量对小鼠进行体内药理学实验,证实了体外的免疫活性增强作用。

1.4 降血脂和降胆固醇作用

有研究分析,多肽能刺激甲状腺激素分泌增加,促进胆固醇的胆汁酸化,使粪便排泄胆固醇增加,从而起到降低血液胆固醇的作用^[3]。猪血多肽高剂量、中剂量均可使高血脂大鼠模型血清胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)显著性下降(P < 0.05),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)升高,表明猪血多肽可促进血脂代谢,有一定的降血脂作用及对高血脂的形成具有预防作用,降低动脉硬化的风险^[2]。

1.5 抗疲劳作用

现代营养学研究发现,抗疲劳肽具有明显提高

人体工作能力,增强肌肉含量和力量,维持或提高机体的运动能力,且快速消除疲劳,迅速恢复和增强体力等功效,有助于维持人体健康。因此,抗疲劳肽成为从事体力、脑力、体育运动等人群的一种重要的功能性食品基料。马鹿茸血经木瓜蛋白酶水解,得到3个不同水解度的水解产物,以150mg/kg·d灌胃小鼠15d,并进行小鼠负重游泳实验,结果表明:水解度(DH)为19.8%的水解产物(命名为肽1)使小鼠的游泳时间明显延长;在相同的游泳时间内,肽1组肌乳酸含量比对照组减少44.9%,肝糖元的消耗量减少38.4%,血液中尿素氮含量减少31.4%,明显增强抗疲劳性^[5]。

2 可食用血蛋白肽的制备

血红蛋白经水解后,降解成不同链长的小分子肽类化合物,这些小分子再经过分离纯化即得到血红蛋白多肽。

2.1 水解方法的选择

2.1.1 化学法水解 化学水解有酸水解和碱水解两种。化学水解方法简单,价格便宜,水解效率高,但存在着诸多缺陷:a.卫生安全问题:许多化学试剂不可能在食品生产上大量应用;b.营养成分的损失:降低了蛋白质的生物化学价值;c.水解程度不易控制:不能按规定的水解度进行水解,反应条件剧烈,副反应较多;d.化学水解的产品具有焦糊味道,将严重影响产品的风味。因此,对于血红蛋白多肽的生产,一般很少应用化学水解法^[9]。

2.1.2 酶法水解 相对而言,酶法水解的反应条件温和,副反应少,不破坏氨基酸。酶法水解要求设备简单,操作安全,无溶剂污染,投资少;同时,酶水解的水解程度可以控制,特别是利用不同酶的特异性,得到不同水解物和各种多肽产品。

用于水解蛋白质的酶按来源分主要有三种类型:a.动物性蛋白酶,如胃蛋白酶、胰蛋白酶等;b.植物性蛋白酶,如木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶等;c.微生物蛋白酶,如来源于枯草杆菌、枯草芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌、黑曲霉、毛霉、青霉产生的酶。动植物蛋白酶虽有一定优势,但来源少,价格昂贵,一般仅限于实验室研究工作,不适于工业化生产。随着生物技术的进步,微生物产酶技术日趋成熟,加之微生物蛋白酶价格便宜,来源广泛,是一种比较理想的酶来源^[9]。

Man-Jin In等人依次用外肽酶 Flavourzyme 和内肽酶 Esperase 水解猪血红蛋白,得到富含亚铁血红素的低分子量的小肽,再用截流分子量12~14ku的膜时,血红素和肽的比率达到25.4%之多^[9]。张华山^[10]分别用AS1.398中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶对猪血蛋白进行水解,结果表明AS1.398中性蛋白酶在pH为7.5,温度为40℃,酶量(E/S)为8000U/g,底物温度(S)为8%,水解时间为7h的条件下对猪血蛋白的水解能力最强。于美娟^[11]等比较了单一酶和复合酶水解鲜猪血的酶解效果,

并确定了最适水解工艺条件:pH为7.5,温度为50~55℃,酶底物浓度比(E/S)8000U/g,水解8h。结果表明,复合酶解鲜猪血水解效果最好。姜红等^[12]选用木瓜蛋白酶对天山马鹿茸血进行水解制备免疫活性肽,在52℃,pH7.2,酶用量8U/g,底物浓度10%时,水解度达到最大18.1%。周娟娟等^[13]选用碱性蛋白酶对鸭血进行单酶水解,在温度50℃、酶用量8000U/g底物、底物浓度7%、pH10,酶水解2h时水解度达到最大,但仍小于16%。刘成梅等^[14]选用中性蛋白酶和风味蛋白酶对鸭血进行同步酶解,得出最佳工艺条件为:pH7.1,反应温度50.5℃,酶解时间4.8h;在此条件下酶解所得小分子肽无异味,苦味轻,平均粒径为798.5nm,比表面为0.82634m²/g,Zeta电位为-8.63mV,吸水性为0.4388g/g,吸油性为8.323mL/g。陈文辉等^[15]通过比较木瓜蛋白酶、AS1398中性蛋白酶和胰蛋白酶水解猪血红蛋白生产小肽的研究,得出选用木瓜蛋白酶,在底物浓度为8%,酶浓度为4000U/g,水解时间为7h的条件下是制备小肽的最佳条件。

2.2 血红蛋白多肽的分离纯化

血红蛋白水解成多肽后,还需要进一步的分离纯化。目前,多肽分离纯化方法有盐析法、超滤法、层析法和电泳法等。而在实际应用中,常常采用上述几种方法的组合对特定多肽类物质进行分离纯化。

李艳伟^[8]等利用Sephadex G-25凝胶层析、阳离子交换层析、超滤除盐及高压液相色谱等方法分离纯化猪血胰蛋白酶水解液,得到的目标产物是一种在高压液相色谱水平上的纯品,分子量大约为3000的小肽。方俊^[2]等选用优良菌株A32发酵新鲜猪血制得猪血多肽,再将发酵液用0.05μm的陶瓷膜微滤和Mr1000超滤膜超滤、喷雾干燥分离获得血红蛋白多肽,并测得多肽的相对分子质量分布为Mr850~5000。

任建东^[10]等采用活性炭色谱法分离鹿茸血肽,选用pH4,流速为0.5BV/h,上样浓度为10mg/mL的条件下分离效果较好,对无水乙醇与5%乙酸混合溶液的洗脱组分进行进一步分离,得到的洗脱组分的抗氧化活性和ACE抑制活性均较高,其中对DPPH·的清除率非常高,远高于大孔树脂洗脱组分的活性;采用半制备RP-HPLC分离无水乙醇与5%乙酸混合溶液洗脱组分,得到从R-1到R-11共11个组分,其中R-9对·OH的清除率最高,R-11具有最高的DPPH·清除率和较高的ACE抑制率。液质联用分析组分R-9和R-11得到三条序列:分别为Ash-Ser-Ala-Trp(NSAW)、Tyr-Asp-Gin-Trp(YDQW)、Tyr-Asp-Ala-Trp(YDAW)。

3 结束语

可食动物血蛋白肽是由新鲜的动物血经过抗凝、冷藏保鲜、离心分离取血球液、经酶解、活性鉴定、分离纯化得到的有生物活性的一类物质。可食动物血蛋白肽不仅具有良好的营养特性,能够提供极易吸收的多肽化合物,而且具有极佳的生理功能,

是一种非常有前途的功能性食品原料。其具有适口性好、消化吸收快、附加值高、溶解性好、低粘度、抗凝胶形成性等特点,可用作食品添加剂原料、化妆品中的活性成分等。国外已经将从猪血中分离纯化得到的多肽用于面包、饮料、特殊人群的饮食等。将从可食动物血中得到的蛋白肽用于饲料中,可以减少单体氨基酸的添加,既保证了配方营养水平,又降低了成本,其价值远远高于玉米蛋白粉,同时避免大量使用植物蛋白饲料造成的有机微量元素如硒和锌的缺乏,提高肌体免疫力,减少部分体表疾病和损伤造成的继发疾病和死亡。

因此,利用现代高新技术对可食动物血中的血红蛋白多肽进行制备、分离和纯化,并对其功能和生理活性进行系统化的研究,使血红蛋白多肽成为新一代的蛋白营养和多功能的生理活性物质,并以此为突破口,加强对血资源深加工的研究,开发新产品,提高血资源的附加值,对可食动物血的利用走上工业化开发道路和保护生态环境有着重要的意义^[9]。

参考文献

- [1]陈春刚,韩芬霞.生物活性肽的生理功能及其制备[J].安徽农业科学,2006,34(7):1300-1303.
- [2]方俊.猪血多肽的制备及其生物活性的研究[D].湖南农业大学,2006.
- [3]孔令明,李芳,陶永霞,等.多肽的功能活性与研究进展[J].中国食品添加剂,2009(2):71-73.
- [4]任建东.酶解鹿茸血疏水性肽的分离及活性研究[D].江南大学,2008.
- [5]尹晓平.马鹿茸血酶解制备抗疲劳活性肽的研究[D].江南大学,2008.
- [6]庞伟.猪血多肽的发酵法制备及其ACE抑制活性研究[D].合肥工业大学,2009.
- [7] Kazue Mito, Mikio Fujii, Masayoshi Kuwahara, et al. Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from hemoglobin[J].European Journal of Pharmacology, 1996, 304: 93-98.
- [8]李艳伟,江波,佟祥山.酶解猪血蛋白中活性肽的纯化和功能研究[J].高等学校化学学报,2005,26:61-63.
- [9]郑炯,汪学荣.猪血中血红蛋白多肽的研究进展[J].肉类研究,2007(4):38-40.
- [10]张华山.酶法水解猪血蛋白的研究[J].粮食与饲料工业,1999(8):33-34.
- [11]于娟娟,马美湖,单杨,等.采用两酶复合水解猪血红蛋白(Hb)制备水解蛋白的研究[J].食品科学,2007,28(1):196-200.
- [12]姜红,施用晖,乐国伟,等.木瓜蛋白酶水解马鹿茸血制备免疫活性肽的研究[J].氨基酸和生物资源,2008,30(1):72-76.
- [13]周娟娟,王海滨,柯雪梅.碱性蛋白酶水解鸭血工艺条件的研究[J].粮食与饲料工业,2007(3):42-44.
- [14]刘成梅,吴享,钟业俊,等.鸭血小分子肽同步酶解工艺的优化[J].食品科学,2010,31(10):151-154.
- [15]陈文辉,杨万根,马美湖.不同种类蛋白酶水解猪血红蛋白生产小肽的比较研究[C].第五届中国肉类科技大会论文集,2005:333-337.
- [1]陈春刚,韩芬霞.生物活性肽的生理功能及其制备[J].安徽农业科学,2006,34(7):1300-1303.
- [2]中华人民共和国上海进出口商品检验局.SN/T 0394-95 出口淀粉检验规则[S].北京:中华人民共和国国家进出口商品检验局,1995.
- [3]辽宁省淀粉协会,辽宁省彰武淀粉厂,沈阳市食品发酵研究所,等.GB/T 12309-90 工业玉米淀粉[S].北京:中华人民共和国轻工业部,1990.
- [4]刘亚伟主编.农产品现代加工技术丛书-玉米淀粉生产及转化技术[M].北京:化学工业出版社,2004:32-36.
- [5]北京市卫生防疫站.GB/T 5009.53-2003 淀粉类制品卫生标准的分析方法[S].北京:中华人民共和国卫生部,2003.
- [6]国家乳制品质量监督检验中心.GB/T 5413.28-1997 乳粉滴定酸度的测定[S].北京:中国轻工总会,1997.
- [7]国内贸易部成都粮食储藏科学研究所.GB/T 15684-1995 谷物研磨制品-脂肪酸值的测定[S].北京:中华人民共和国国内贸易部科技司,1995.
- [8]刘文生.啤酒用玉米米工艺检测指标的研究[J].西部粮油科技,2003,28(6):63-65.
- [9]王平,徐明亮,苏宏元,等.对改进稻谷脂肪酸值终点判定条件的探讨[J].粮食科技与经济,2006(4):41-43.
- [10]顾国贤.酿造酒工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1996:18-19.
- [11]上海淀粉技术研究所.GB/T 12096-89 淀粉细度测定方法[S].北京:中华人民共和国商业部,1989.
- [12]蔡定域.酿酒工业分析手册[M].北京:轻工业出版社,1988:93-94.

(上接第498页)

会,2008.

[2]中华人民共和国上海进出口商品检验局.SN/T 0394-95 出口淀粉检验规则[S].北京:中华人民共和国国家进出口商品检验局,1995.

[3]辽宁省淀粉协会,辽宁省彰武淀粉厂,沈阳市食品发酵研究所,等.GB/T 12309-90 工业玉米淀粉[S].北京:中华人民共和国轻工业部,1990.

[4]刘亚伟主编.农产品现代加工技术丛书-玉米淀粉生产及转化技术[M].北京:化学工业出版社,2004:32-36.

[5]北京市卫生防疫站.GB/T 5009.53-2003 淀粉类制品卫生标准的分析方法[S].北京:中华人民共和国卫生部,2003.

[6]国家乳制品质量监督检验中心.GB/T 5413.28-1997 乳粉滴定酸度的测定[S].北京:中国轻工总会,1997.

[7]国内贸易部成都粮食储藏科学研究所.GB/T 15684-1995 谷物研磨制品-脂肪酸值的测定[S].北京:中华人民共和国国内贸易部科技司,1995.

[8]刘文生.啤酒用玉米米工艺检测指标的研究[J].西部粮油科技,2003,28(6):63-65.

[9]王平,徐明亮,苏宏元,等.对改进稻谷脂肪酸值终点判定条件的探讨[J].粮食科技与经济,2006(4):41-43.

[10]顾国贤.酿造酒工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1996:18-19.

[11]上海淀粉技术研究所.GB/T 12096-89 淀粉细度测定方法[S].北京:中华人民共和国商业部,1989.

[12]蔡定域.酿酒工业分析手册[M].北京:轻工业出版社,1988:93-94.

全国中文核心期刊
轻工行业优秀期刊