

## • 天然产物生物合成 •

**邢新会** 清华大学教授、博士生导师、化学工程系生物化工研究所所长，清华大学深圳国际研究生院生物医药与健康工程研究院副院长。发表学术论文 290 余篇，合作著书 8 本，编写英文专著 1 部，译著教材 2 部，申请发明专利 100 余项，授权发明专利 80 余项。担任 *Biochemical Engineering Journal* 副主编及《生物工程学报》等多个国内外学术期刊编委。近 5 年获得的荣誉和奖励有第 45 届日内瓦国际发明展金奖 (2017 年)，日本东京大学工学院会士 (Fellow) 荣誉称号 (2018 年)，国际生物过程学会 (IBA) 会士奖及东京工业大学会士 (Fellow) (2019 年)，中国轻工业联合会技术发明一等奖 (2019 年)，中国发酵产业协会“协同创新精英奖” (2020 年) 等。



# 天然活性多肽的发掘策略和生产技术

王彦珺<sup>1</sup>, 李姝承<sup>1</sup>, 关长阁<sup>1</sup>, 何东<sup>2</sup>, 廖锡豪<sup>1</sup>, 王怡<sup>1</sup>, 陈海红<sup>1</sup>, 张翀<sup>1,3</sup>, 邢新会<sup>1,3,4,5</sup>

1 清华大学 化学工程系生物化工研究所 工业生物催化教育部重点实验室, 北京 100084

2 广东工业大学 轻工与化工学院, 广东 广州 510006

3 清华大学 合成与系统生物学中心, 北京 100084

4 清华大学 深圳国际研究生院 生物医药与健康工程研究院, 广东 深圳 518055

5 深圳湾实验室医药健康技术与工程研究所, 广东 深圳 518055

王彦珺, 李姝承, 关长阁, 等. 天然活性多肽的发掘策略和生产技术. 生物工程学报, 2021, 37(6): 2166-2180.

Wang YJ, Li SC, Guan CG, et al. Functional discovery and production technology for natural bioactive peptides. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 2166-2180.

**摘要:** 活性多肽可以参与生命机体的多种生理活动, 对促进人体健康发挥着重要的作用, 如降血压、降血糖、降血脂和抗癌等, 其创制技术也逐渐成为重要的研究和应用转化方向。本综述旨在总结天然活性多肽的发掘策略和生产技术的研究进展。目前, 天然活性多肽的发掘与生产技术主要包括自上而下和自下而上两种方法, 其中自上而下方法在多肽发掘方面主要为直接提取鉴定法, 在生产技术方面主要包括直接提取法、酶解法和微生物发酵法; 自下而上方法在多肽发掘方面包括天然活性多肽改造和数据库发掘方法, 在生产技术方面主要方法包括化学合成法、酶合成法、基因重组表达法和无细胞合成法。自上而下的天然多肽制备与功能验证方法存在步骤烦琐、耗费时间长、功能不确定性大、实验与生产成本高以及质量控制难度大等问题; 而自下而上的活性多肽合成与功能验证方法适合多肽药物的开发, 而难以用于功能食品。随着测序和质谱技术的发展, 人们更容易从分子水平获

Received: January 16, 2021; Accepted: April 6, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program (No. 2016YFD0400203-4).

Corresponding author: Xin-Hui Xing. Tel: +86-10-62794771; E-mail: xhxing@tsinghua.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2016YFD0400203-4) 资助。

网络出版时间: 2021-04-14

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210414.1103.003.html>

取物种蛋白组信息。以此蛋白组信息为根据,将自上而下和自下而上两种方法结合,可以克服单独使用这两种方法存在的问题,从而为快速开发和生产天然活性多肽提供新的策略。

关键词:天然活性多肽,发掘策略,生产技术,自上而下,自下而上

## Functional discovery and production technology for natural bioactive peptides

Yanjun Wang<sup>1</sup>, Shucheng Li<sup>1</sup>, Changge Guan<sup>1</sup>, Dong He<sup>2</sup>, Xihao Liao<sup>1</sup>, Yi Wang<sup>1</sup>,  
Haihong Chen<sup>1</sup>, Chong Zhang<sup>1,3</sup>, and Xin-Hui Xing<sup>1,3,4,5</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemical Engineering, Key Laboratory for Industrial Biocatalysis of the Ministry of Education, Tsinghua University, Beijing 100084, China

<sup>2</sup> School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China

<sup>3</sup> Center for Synthetic and Systems Biology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

<sup>4</sup> Institute of Biomedicine and Health Engineering, Shenzhen International Graduate School, Tsinghua University, Shenzhen 518055, Guangdong, China

<sup>5</sup> Shenzhen Bay Laboratory Medical Health Technology and Engineering Institute, Shenzhen 518055, Guangdong, China

**Abstract:** Bioactive peptides play important roles in promoting human health, such as lowering blood pressure, blood sugar and blood lipid, anti-obesity, and anti-cancer. Thus, exploring functional bioactive peptides and developing efficient production technologies are of crucial importance. Herein, we review the development of function discovery and production technology for natural bioactive peptides. Presently, the top-down and bottom-up approaches are mainly used for the function discovery and production of natural active peptides. The top-down approach includes the direct extraction and identification for functional discovery, and the direct extraction, enzymatic hydrolysis and microbial fermentation for production. The bottom-up approach includes the polypeptide modification and database mining for functional discovery, and the chemical synthesis, enzyme synthesis, recombinant expression and cell-free synthesis for production. The top-down approach is usually associated with complicated process, lower efficiency, higher cost, harder quality control, and uncertain functionality, while the bottom-up approach is more suitable for the development of peptide drugs but difficult to be used for functional foods. With the technology development of sequencing and mass spectrometry, it is easier to obtain the proteomic information of various organisms at the molecular level. Based on the proteomic information, the top-down and bottom-up approaches can be combined to overcome the disadvantages of using these two approaches alone, thus providing a new strategy for the rapid development and production of natural active peptides.

**Keywords:** natural bioactive peptides, functional mining strategy, production technology, top-down, bottom-up

随着社会生产力的发展,人们的生活水平不断提升,健康意识不断增强,对健康产品的需求也在不断增长。目前,全球各类疾病患者占总人口数量的20%,亚健康人群占人口总数的75%以上,而健康人群总量不足5%的现状导致社会医疗支出负担持续加重,并成为日益严重的社会性问题<sup>[1]</sup>。因此,如何改善亚健康状态,并使健康状态得到持续维持,成为国家和社会关注的重点。而相较于传统的疾病治疗观念,预防疾病的发生即“治未病”,不失为一种更好的健康

维持手段。因此学者们提出了“大健康”这一理念。在“大健康”理念下,健康产业呈现多元化发展态势<sup>[2]</sup>。

我国是农业大国,源于农业资源的天然蛋白质种类丰富,总量巨大。但目前天然蛋白质资源多用于生产动物饲料和食品蛋白质补充剂等附加值较低的产品,在蛋白质的精细加工与高值化综合利用方面还有很大的发展空间。天然生物活性多肽(Natural bioactive peptides)是一类源自天然蛋白质的生物资源,组成多肽的氨基酸数量一般

在 2-50 个之间<sup>[3]</sup>。生物活性多肽在生命机体中可发挥重要的生理调节作用,如抗菌抑菌、降血糖、降血压、降胆固醇、抗氧化、抗肥胖、抗癌、免疫调节、与矿物元素结合等生理功能<sup>[4]</sup>。活性多肽分子量较小,种类丰富,在人体内以微量存在,具有细胞转运容易、吸收利用度高、半衰期短、毒性和免疫原性低、生物活性多样等特点,因此成为 21 世纪人类健康保健品的新宠儿。目前,天然活性多肽的研发技术和产业化应用发展迅速。根据 Biopep 数据库<sup>[5]</sup>中的数据,活性多肽数量已达 4 000 余种。然而目前,挖掘具有保健功能的活性多肽的技术仍然比较落后<sup>[6]</sup>,难以满足健康产业发展的需求。若能够发展高效的天然活性多肽创制技术,将大大提高蛋白质的高值化利用能力,极大地促进天然蛋白质资源精深加工的技术进步及产业链延伸。

尽管活性多肽具有较高的医药健康功效和经济价值,但其现有的发掘和生产技术方法均存在一些问题,如多肽发掘方法周期长、研发成本高;而多肽生产方法如天然活性多肽提取和发酵制备方法受限于原料或菌群组成的不稳定性,造成产品的质控难度大。然而,目前尚缺乏系统总结天然活性多肽发掘和生产技术的综述性文章。因此,本文将从自上而下和自下而上两个角度,详细总结活性多肽的发掘和生产方法,分析两种方法的特点及不足,并提出将自上而下和自下而上两种方法结合的思路,为多肽发掘与生产提供了新策略,进而推动新型活性多肽的创制进程。

## 1 天然活性多肽的发掘

活性多肽的功能是依靠其特定的序列和特殊的结构来实现的。因此,如何从复杂天然生物体系中筛选出具有特定生物学活性的多肽,是天然活性多肽创制和应用的关键技术。目前,活性多肽发现的方法主要包括直接从天然产物中提取鉴定、天然活性多肽改造以及多肽数据库与人工智

能挖掘等。

### 1.1 天然活性多肽的功能序列发现

#### 1.1.1 天然产物中直接鉴定活性多肽

最直接的活性多肽挖掘方法是使用物理手段从天然生物资源及其酶解产物或发酵物中分离提取,然后进一步挖掘其所具有的生理活性功能;或从天然资源中筛选、分离具有特定功能的生物活性多肽。Ferreira 等<sup>[7]</sup>于 1965 年从美洲矛头蝮 *Bothrops jararaca* 蛇毒中分离到了具有降血压作用的替普罗肽 (pyroGlu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro),而 Danielle<sup>[8]</sup>等也于 2004 年采用两步液相色谱法及电喷雾串联质谱法从蛇毒中鉴定了 5 种新的缓激肽增强肽。DiBianco<sup>[9]</sup>发现替普罗肽末端 7-9 位的 Ile-Pro-Pro 序列能够抑制血管紧张素转化酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)的活性,减少血管紧张素 II 的生成,避免过多的血管收缩从而达到降血压的效果。Takano<sup>[10-11]</sup>团队也根据此序列信息,从酸奶中分离到了有 ACE 抑制活性和体内降血压活性的 Ile-Pro-Pro 和 Val-Pro-Pro 两种三肽序列,并解析了其作用机制。而饮料公司 Calpis 也将包含 Ile-Pro-Pro 和 Val-Pro-Pro 两种三肽的乳酸菌饮品和保健品推向了市场,在受高血压困扰的中老年人中收获了广泛好评。

#### 1.1.2 天然活性多肽改造

对目前已知序列及功能的多肽进行改造,可获得功效更好的新型活性多肽。例如,人体中的胰高血糖素样肽 (GLP-1)<sup>[12]</sup>具有促进胰岛素生成和分泌、延迟胃排空、降低食欲以及减少胰高血糖素分泌等作用,是控制血糖和治疗 II 型糖尿病的重要生物活性肽。但这种多肽易被内源酶二肽基肽酶-4 (DPP-IV)<sup>[13]</sup>快速降解,在血液内的半衰期仅为 10 min。研究者们通过对 GLP-1 的部分氨基酸替换,获得了半衰期更长的多肽产品,如艾塞那肽 (Exenatide)<sup>[14]</sup>、利西拉肽 (Lixisenatide)<sup>[15]</sup>和索马鲁肽 (Semaglutid)<sup>[16]</sup>等,其中索马鲁肽的

作用周期(半衰期)可达1周,成为II型糖尿病治疗的重要多肽药物。

### 1.1.3 多肽数据库与人工智能挖掘活性多肽

基于已有的活性多肽序列与功能数据库,利用自然语言处理(Nature language processing, NLP)和人工智能方法,生成有功能的未被识别到的多肽也是近年来发展起来的一种活性多肽挖掘新方法。在多肽的自然语言处理模型中,20种天然氨基酸残基就像26个英文字母,而每一条由不同氨基酸组成的多肽序列就是一个“单词”,其对某个疾病和特定受体的功能就是“词义”。Giguère等<sup>[17]</sup>使用机器学习方法,通过对Joo等<sup>[18]</sup>实验得到的抑菌多肽结构功能库中的序列生成NLP模型进行语义分析,得到了数条自然界未被识别的且具有较高活性的抑菌多肽。Fang等<sup>[19]</sup>同样基于NLP模型,使用深度学习算法,从Agrawal<sup>[20]</sup>的数据库中选取训练集,最终筛选出了具有抗真菌功能的活性多肽。这些研究结果显示人工智能在活性多肽挖掘中的应用潜力,但该领域的研究仍处于初步发展阶段。

### 1.2 活性多肽功能评价方法

活性多肽功能主要是通过体内和体外实验进行评价的。任美娟<sup>[21]</sup>通过体外的抗氧化表征实验发现杏鲍菇多肽口服液具有抗氧化功能。孙金沅等<sup>[22]</sup>通过体外表征发现白酒酒醅中两种多肽具有抗氧化和降血压功能。李继海<sup>[23]</sup>通过小鼠实验模型发现梅花鹿茸来源的活性多肽能够提高机体的细胞免疫和机体免疫功能。戴媛<sup>[24]</sup>通过大鼠实验发现大豆多肽TTYT使抗氧化酶活性和GSH含量升高,且处理剂量不同改变的效果不同,400 mg TTYT/kg体重的处理剂量效果最佳,说明TTYT减轻了脂质和蛋白质的氧化损伤,提高了抗氧化酶活性和抗氧化物质含量,增强了大鼠机体的抗氧化能力。然而,多肽的功能评价通常是活性多肽研发的决速环节,其周期

长、成本高、通量低,且细胞和动物模型结果难以用于预测对于人体的作用,未来需要发展更高效和更具有针对性的功能评价方法。比如Xing等<sup>[25]</sup>综述了微流控人源类器官系统能够更好地模拟人体真实器官功能,作为新型高通量筛选和表征模型可以提高活性多肽功能挖掘的效率和可靠性。

### 1.3 活性多肽的构效关系

活性多肽与其靶蛋白的构效关系研究对于挖掘更多的活性多肽以及理解活性多肽结构与功能之间的关系具有重要意义。Nongonierma和FitzGerald<sup>[26]</sup>开发了一种结合蛋白质覆盖率和效能指数的计算方法,并应用了肽段比对策略来研究序列与功能之间的关系。此外,分子对接<sup>[27]</sup>模拟方法也已被用于阐明实验或预测的多肽序列与生物活性靶标蛋白质的相互作用。Nongonierma等<sup>[28]</sup>还发现,对接三肽分子与DPP-IV活性位点获得的Vina分数(预测的亲合力)与其体外DPP-IV抑制特性之间并没有直接相关性,因此建议研究者应建立结构-功能关系的多维度模型,而不是直接使用对接的亲合力高低来选择目标活性多肽。Zhou等<sup>[29]</sup>使用定量构效关系(Quantitative structure-activity relationship, QSAR)分析方法,并结合量子力学/分子力学分析方法,解析了多肽与ACE酶的复合物所涉及的结构基础和高能谱,以及模型化ACE与多肽之间的相互作用谱。Acharya等<sup>[30]</sup>指出,活性多肽与其靶蛋白结合过程中的动态构象变化对对接计算结果也有影响,并提倡建立记录这些变化的4D结构数据库,以更好地反映多肽的构效关系。张贵川<sup>[31]</sup>利用经典的z-scales氨基酸描述子,对140种抑制ACE的三肽进行了描述,得到关于IC<sub>50</sub>的回归方程从而建立了所有三肽序列对于ACE抑制活性的模型。表1列举了部分慢性病相关蛋白与活性多肽序列的构效关系,并针对这些蛋白总结出活性多肽的序列规律。

表 1 靶标蛋白与高活性多肽的构效关系

Table 1 Structure and function relationship between target protein and bioactive peptides

Chronic disease	Target protein	Bioactive peptides	IC <sub>50</sub> /(μmol/L)	Patterns
Hypertension	ACE1	VPP <sup>[10-11]</sup>	9.00	If the volume of the third amino acid at C-terminal is small, it will have strong hydrophobicity and high activity
		LRL <sup>[31]</sup>	3.42	
Hyperglycemia/Diabetes	DPP-IV	IPI <sup>[32]</sup>	3.00	For tripeptides, the polypeptide with proline as the second amino acid have higher activity <sup>[34]</sup>
		VPI <sup>[33]</sup>	20.20	
Hypeluricemia/Gout	XOD	WV <sup>[35]</sup>	1 300.00	For dipeptides or tripeptides, the peptides containing phenylalanine and tryptophan have higher activity <sup>[37]</sup>
		WDQW <sup>[36]</sup>	950.00	

#### 1.4 天然活性多肽的应用及市场情况

随着天然活性多肽被大量发掘,已有很多功效与作用机理明确的活性多肽被推入市场。根据日本健康营养协会<sup>[38]</sup>的统计,日本健康食品的总市值已达到 80 亿美元。其中多肽类的来源、主要功能序列、制备方法、功能活性以及市场情况如表 2 所示。

## 2 活性多肽的生产方法

现有的活性多肽的生产方法可以分为自上而下与自下而上两大类。自上而下指从动植物蛋白原料出发进行加工、分离、纯化进而得到活性多肽的过程,主要包括直接提取法、酶解法、微生物发酵法等;自下而上指从小分子的氨基酸出发合成特定多肽序列的过程,主要包括化学合成法、化学-酶耦合法、基因工程表达和无细胞合

成等。活性多肽的生产方法、筛选和实际应用的关系如图 1 所示。

### 2.1 自上而下的活性多肽生产方法

#### 2.1.1 活性多肽直接提取法

直接提取法可基于肽的分子量、电学性质等物理特性,实现从生物质中分离目标活性多肽的目的。例如曹伯良<sup>[39]</sup>开发了利用超滤、纳滤等方式从养殖水中直接提取生物活性多肽的装置;Preecharram 等<sup>[40]</sup>利用阴离子交换、凝胶过滤和反相高效液相色谱法处理得到了暹罗鳄鱼血清中的 6 种抗菌肽 (Hp14、Hp15、Hp17、Hp31、Hp36 和 Hp51)。直接提取法分离过程取决于天然原料的多肽种类和含量,影响因素多,技术经济性不高。因此,从天然资源直接提取活性多肽的方法适于新功能的发现,但一般难以用于工业化生产。

表 2 商业化的天然活性多肽产品一览

Table 2 An overview of commercially available bioactive peptides

Origin	Sequence	Method	Function	Market situation
Milk	VPP, IPP <sup>[41]</sup>	Fermentation	Antihypertensive, ACE inhibitors	Listed by Calpis, a Japanese beverage company
Milk	NIPPLTQTPVVV <sup>[42]</sup> , PPFLQPE	Fermentation	Improve amnesia, increase the memory of the elderly	Listed by Calpis, a Japanese beverage company
Rice	SEEGYYGEQQQPG MTR <sup>[43]</sup>	Enzymatic hydrolysis	Gain muscle after a workout and reduce muscle damage	Developed by BASF Chemical
Pea	HGPVEMPYLLYPS SK <sup>[44]</sup>	Enzymatic hydrolysis	Protect skin and slow down skin aging	Developed by artificial intelligence peptide technology company Nuritas

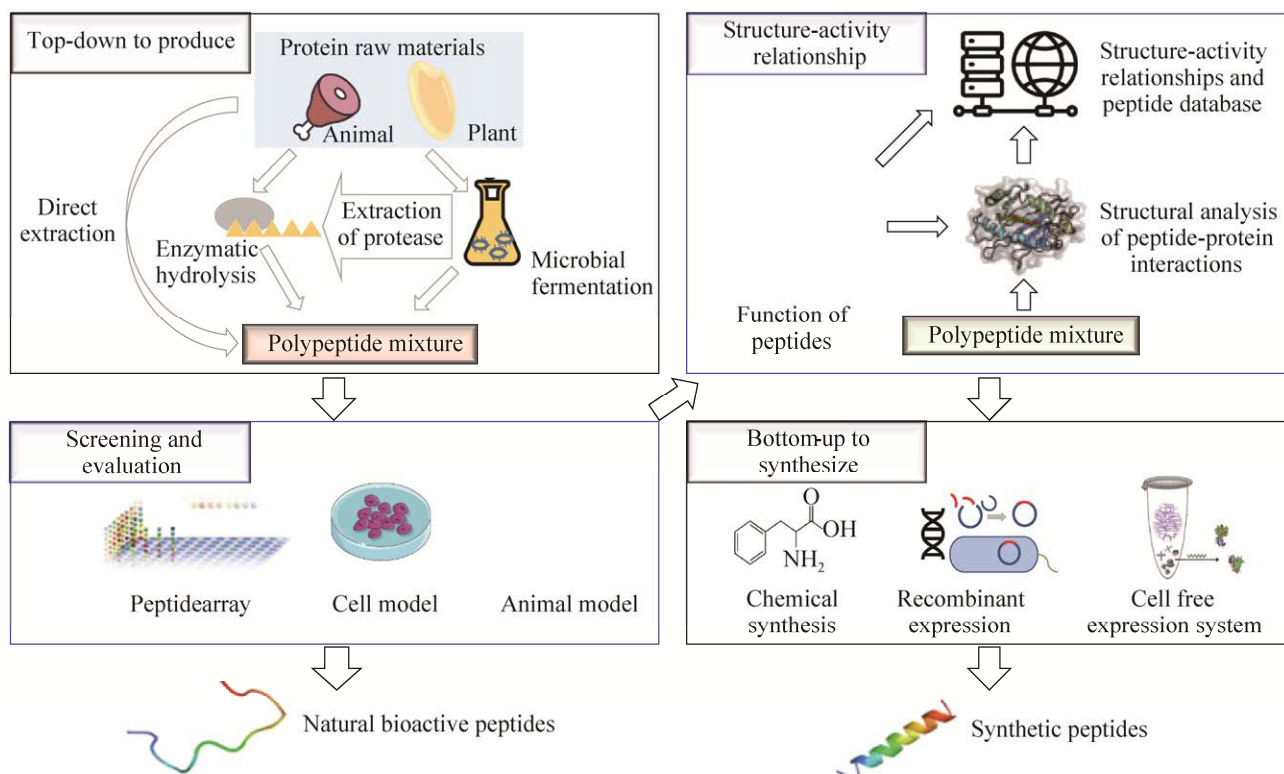


图 1 活性多肽的发掘和生产方法

Fig. 1 Scheme of functional discovery and production technology for bioactive peptides.

### 2.1.2 蛋白原料的蛋白酶解法

酶解法是利用蛋白酶水解蛋白原料得到目标活性多肽的方法。蛋白酶作为天然生物催化剂，不仅能够水解氨基酸之间的肽键，还可以催化其他类型的反应，如外消旋醇和羧酸拆分中的酯化和酯交换反应，以及中、前手性二醇的立体选择性酰化反应。蛋白酶能够特异地降解蛋白底物，从而生成活性多肽<sup>[45]</sup>。

目前报道的应用于多肽制备的食品工业用蛋白酶包括碱性蛋白酶 (Alcalase)、中性蛋白酶 (Neutrase)、木瓜蛋白酶 (Papain)、糜蛋白酶 (Chymotrypsin)、风味蛋白酶 (Flavourzyme)、复合蛋白酶 (Protamex)、胃蛋白酶 (Flavourzyme)、胰蛋白酶 (Trypsin)、枯草芽孢杆菌分离蛋白酶 (*Bacillus subtilis* isolated enzymes)、嗜热菌蛋白酶 (Thermolysin) 等<sup>[46-55]</sup>。目前，用于食品或功能食品的活性多肽制备必须使用这些

食品级蛋白酶。

Arrutia 等<sup>[56]</sup>使用胰蛋白酶水解牛血清白蛋白 (BSA) 产生的多肽产物混合物具有 ACE 抑制作用、DPP-IV (二肽基肽酶-4) 抑制作用和抗氧化作用。Chang<sup>[57]</sup>等在胃蛋白酶-胰酶酶解油棕榈仁得到的水解液 (Oil palm kernel hydrolysate, OPKH) 中提取多肽，通过超滤、反相 HPLC、半制备 HPLC 等方法纯化 OPKH，再采用液相色谱-电喷雾电离/多级质谱 (LC-ESI-Q-TOF-MS/MS) 和从头测序相结合的方法鉴定出 3 个抗氧化肽 VVGGGDV、VPVTST 和 LTTL DSE。Lajmi 等<sup>[58]</sup>采用胰蛋白酶对星鲨属鱼类 *Mustelus mustelus* 的胶原蛋白进行水解，得到具有血管紧张素转换酶 (ACE) 或脯氨酰内肽酶 (PEP) 抑制活性的蛋白水解物，且用海藻酸钠-乳清蛋白分离微球包裹水解产物可提高 ACE 抑制活性 ( $IC_{50}=0.24$  mg/mL)。Mudgil 等<sup>[59]</sup>和 Nongonierma

等<sup>[60-61]</sup>以骆驼奶为原料,通过碱性蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶得到同时具有 $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -amylase)、胰脂肪酶(pancreatic lipase)和DPP-IV抑制作用的降食欲蛋白水解物,并从中筛选出VPV、VPF、LPVPQ和YPI等抗模拟消化(Simulated gastric and intestinal digestion, SGID)的活性多肽。

蛋白酶解法生产活性多肽具有高效性、环境友好等优点,然而这一方法最大的挑战是蛋白酶的选择。同种原料选择不同的酶进行酶解得到肽谱以及多肽相对含量差别很大。同时由于食品级蛋白酶的纯度以及分子特性等产品信息有限,用于天然活性多肽的制备与生产常需要反复试错,耗物耗时耗力,对原料质量要求高,质控难度大。而基于数据库中的蛋白序列,引入生物信息学方法或者软件应用等工具对蛋白酶切位点进行预测能够辅助酶的选择,对于未来特异性蛋白酶的分子设计具有重要参考价值。例如,Yu等<sup>[62]</sup>以虾夷盘扇贝 *Mizuhopecten yessoensis* 提取出的肌球蛋白(Myosin)为原料,通过PeptideCutter<sup>[63]</sup>对水解多肽组成进行了预测,并筛选出了其中具有抑制ACE活性的7种三肽。

### 2.1.3 微生物发酵法

微生物发酵法是生产食品级蛋白水解物和活性多肽的有效途径之一<sup>[4]</sup>。常见天然原料主要有牛奶蛋白、奶酪、蛋清、鱼类、藻类、豆类(黄豆、绿豆)、谷类(小麦、大米、燕麦)等<sup>[64-66]</sup>,此外,藜麦、鹰嘴豆、葡萄等<sup>[67-68]</sup>也曾被使用。目前,欧美地区从乳制品中发酵生产生物活性多肽的方法与工艺最为成熟,亚非地区则更多使用豆类作为发酵原料。在发酵过程中常用的微生物主要有乳酸菌 *Lactococcus*、乳杆菌 *Lactobacillus*、嗜热链球菌 *Streptococcus thermophilus*、酵母菌 *Saccharomyces*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*<sup>[69-71]</sup>等。Daliri等<sup>[72]</sup>利用戊糖小球菌 *Pediococcus pentosaceus* SDL1409 在 37 °C 条件下将大豆发酵

48 h, 发酵液对 ACE 的半抑制浓度  $IC_{50}$  值为  $(0.123\pm 0.02)$  mg/mL。采用液相色谱-电喷雾飞行时间质谱法对小分子多肽进行鉴定,依据丰度和结构特征,筛选出4个高效抑制ACE的活性多肽(EDEVSFSP、SRPFNL、RSPFNL、ENPFNL)。Moslehisad等<sup>[73]</sup>利用鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* PTCC1637 从骆驼乳中提取的3-5 kDa 肽段对ACE半抑制浓度  $IC_{50}$  值为  $(1.45\pm 0.02)$  mg/mL。Rizzello等<sup>[70]</sup>利用植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* T0A10 发酵藜麦面团,并利用反相高效液相色谱法分离水/盐溶性提取物(WSE)中的蛋白,并体外测定分离获得的32个组分对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)和2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate], ABTS)自由基的抑制作用及抑制亚油酸自氧化的能力。通过纳米液相色谱-电喷雾电离-质谱连用鉴定出5个抗氧化功效较强的由5-9个氨基酸残基组成的多肽(IVLVQEG、TLFRPEN、VGFGI、FTLIIN和LENSGDKKY)。Takano团队<sup>[74-75]</sup>发现酸奶能够降低自发性高血压大鼠的血压,根据替普罗肽末端7-9位的Ile-Pro-Pro序列能够抑制ACE的活性,从瑞士乳杆菌 *Lactobacillus helveticus* 或德氏乳杆菌亚种 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. 发酵的酸奶中分离得到了具有ACE抑制活性和体内降压活性的Ile-Pro-Pro和Val-Pro-Pro两种三肽序列。He等<sup>[76]</sup>利用葡聚糖硫酸钠盐(DSS)造模的溃疡性结肠炎小鼠模型,利用4种食品级乳酸菌 *Lactobacillus* sp.混合发酵小麦胚芽和苹果,并从其发酵液的醇溶组分中发现了可有效预防溃疡性结肠炎的活性多肽组分。

对于工业生产规模,利用微生物发酵生产天然活性多肽在技术经济性上具有竞争优势,但微生物分泌的其他蛋白和多糖等生物大分子会影响产品纯度,后续分离纯化过程相对复杂。此外,如何利用非转基因技术选育高活性发酵微生物也

是提高活性多肽生产效率的重要环节。因此,在实际生产中需要不断地选育安全性高、转化能力强的菌株。

## 2.2 自下而上的活性多肽生产方法

多肽合成方法一般是以氨基酸为原料,通过化学合成或生物合成方法将氨基酸按照特定序列组合成为目标活性多肽。但这种活性多肽生产方法的前提是需要根据多肽结构与功能关系的数据库,获得活性多肽序列。

### 2.2.1 活性多肽的化学合成和酶催化合成

1901年 Fischer 等<sup>[77]</sup>通过将 2,5-二酮哌嗪(甘氨酸酐)与盐酸一起煮沸,成功制备了双甘肽(Gly-Gly, Glycylglycine),这也是最早被人类合成出的多肽。此外, Fischer 等还创造性研究出在液相中合成多肽的方法被称为液相合成法,这种方法在合成片段较短且量大的目标多肽时更有优势,且纯度较高。

1963年, Merrifield<sup>[78]</sup>首先提出并建立了固相合成的方法,高效地合成了四肽(Leu-Ala-Gly-Val)。其基本原理是,将氨基酸的 C 端固定在树脂上,之后依次缩合氨基酸延长肽链。这一方法大大提高了合成长链多肽的效率,相比液相方法,固相合成在分离目标多肽和副产物上更简便。1966年 Kung 等<sup>[79]</sup>成功实现结晶牛胰岛素合成也是基于固相合成方法。固相合成技术目前已经广泛应用于各种长度的多肽生产中,当需要合成中长肽或较小分子量蛋白时,一般优先选择该方法。

在发明多肽的固相合成法之后,为了提高合成的效率, Kullman<sup>[80]</sup>又提出了使用蛋白酶合成活性多肽的新思路,并于 1979 年率先使用木瓜蛋白酶(Papain)和嗜热菌蛋白酶(Thermolysin)等提纯酶的催化合成技术,成功合成了亮脑啡肽(Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)和甲硫脑啡肽(Tyr-Gly-Gly-Phe-Met)。相比于完全使用化学合成法,酶法合成多肽最突出的优点是用酶催化反应时对氨基酸选择的特异性<sup>[45]</sup>,同时也因此降低

了化学合成法对氨基酸残基侧链保护的要求。但是高纯度高活性的特异性蛋白酶提纯过程较为烦琐,价格也较为昂贵。因此目前使用酶合成方法还未成为多肽合成的主流方法。

### 2.2.2 活性多肽的基因工程表达

随着重组蛋白表达技术和基因工程技术的不断发展,越来越多的研究开始利用重组表达技术,以原核和真核宿主细胞来生产目标活性多肽<sup>[81]</sup>。然而,如果目标产物为短肽,则很容易被微生物胞内的蛋白酶降解,从而降低重组表达生产多肽的效率<sup>[82]</sup>。

以原核表达体系为例,在大肠杆菌中,可以使用两种方法解决目标多肽降解问题:1)使用蛋白酶缺陷菌株;2)以不溶性包涵体或串联体形式表达多肽。Prak 等<sup>[83]</sup>在使用大肠杆菌体系表达降胆固醇水平的五肽 IIAEK 时,利用了大豆球蛋白原的序列并串联多个目标 IIAEK 序列,最终成功生成了纯净的外泌包涵体蛋白。该包涵体可以在胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的作用下分解形成目标五肽序列。

在真核表达体系中,常用酵母体系进行多肽的表达。Guo 等<sup>[84]</sup>将抗菌多肽天蚕素 D 基因整合到毕赤酵母 *Pichia pastoris* 基因组上,通过 Tricine-SDS-PAGE 技术证明天蚕素 D 被表达和分泌,并且分泌的天蚕素 D 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都具有良好的抗菌效果。Meng 等<sup>[85]</sup>利用 *Pichia pastoris* 成功表达了多肽 Mytichitin-A,且产量达到了 45.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,该多肽可以高效地抑制革兰氏阳性菌而不能抑制革兰氏阴性菌的生长。Zhang 等<sup>[86]</sup>利用 *Pichia pastoris* 表达了凝集素多肽,产量达到了 748.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,且表达的凝集素对革兰氏阳性菌有很高的抑制效果。吕星星等<sup>[87]</sup>利用 *Pichia pastoris* 表达了鳕鱼  $\beta$ -防御素,抑菌实验表明表达的鳕鱼  $\beta$ -防御素对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和副溶血性弧菌的抑制率分别为 94.34%、86.97% 和 85.92%。



使用基因重组技术表达活性多肽, 相比化学合成多肽而言目标产物的产率比较低, 因此表达体系的选择和设计尤其重要<sup>[82]</sup>。在多肽的重组表达过程中, 还会因为表达体系自身的缺陷产生缺失或无效的多肽片段<sup>[88]</sup>, 甚至宿主细胞自身代谢分泌的多肽时常也会出现, 导致分离纯化过程复杂。而使用无生长代谢影响的无细胞表达体系, 则能够克服上述缺点<sup>[89]</sup>。

### 2.2.3 活性多肽的无细胞系统表达

无细胞系统 (Cell-free system) 是指利用有完整蛋白合成能力的细胞提取物, 而非活体细胞来表达蛋白质的系统。这样的表达系统相比于活细胞而言, 蛋白产物纯度更高、更易于分离, 且能够合成对细胞有毒性的多肽, 还可以采用非天然氨基酸合成非天然活性多肽<sup>[90]</sup>。此外, 因反应体系为溶液体系, 更容易控制。

萤火虫抗菌肽 (Pyrrhocoricin)<sup>[91]</sup>是从萤火虫体内提取的长度为 20 个氨基酸的抑菌肽, 其功能是高效地杀伤革兰氏阴性菌, 大肠杆菌作为革兰氏阴性菌无法表达该多肽。而 Taniguchi 等<sup>[92]</sup>利用大肠杆菌的无细胞表达体系表达了该多肽。该研究发现, 生成的重组抗菌肽并不随反应时间增长而使无细胞表达体系的活性下降, 同时还与自然界提取的天然萤火虫抗菌肽有相同构象, 完全等效地抑制革兰氏阴性菌的生长。

综上所述, 无细胞系统表达对于具有细胞毒性或是本身易被分解的目标多肽生产是一个极具潜力的多肽表达系统。

### 2.3 两类活性多肽挖掘和生产方法存在的问题

以天然的生物质资源为原料, 通过直接提取、酶解和微生物发酵制备多肽的自上而下方法是从自然界发现新的功能性多肽的重要途径, 对于丰富和发展活性多肽库发挥了巨大作用, 至今仍然被广泛采用。但其缺点在于蛋白酶的选择或发酵的菌种均需要反复试错, 活性多肽分离纯化、功能发现和评价过程复杂, 不确定性大且成

本较高。并且, 对于没有参考基因组和蛋白组的大量物种, 发现和制备功能性多肽的研发过程具有更大的不确定性。

另一方面, 自下而上的多肽合成方法能够精确地合成具有特定功能的多肽。但其前提是要预先明确多肽序列和功能活性之间的关系。而目前已知结构的多肽库种类仍然有限, 所以可供选择合成的多肽种类也很有限。另外, 人工合成多肽一般适合于多肽药物开发, 难以直接用于功能食品和保健食品。

## 3 小结与展望

天然活性多肽成为生物医药与健康产业发展的重要物质体系, 具有巨大的发展潜力。目前, 已经报道的具有功能活性的多肽仅有 4 000 种左右, 但远低于自然界存在的蛋白资源可能发掘的种类, 因此利用自然界大量未被利用的物种蛋白资源发掘和生产新的天然活性多肽仍然是推动多肽技术发展有效的途径。自上而下发掘和生产活性多肽方法是活性多肽新功能发现和功能食品产业发展的重要路径, 但如上所述, 研发过程复杂、不确定性大、成本较高, 且对于没有参考基因组和蛋白组的大量物种, 发现和制备功能性多肽的研发过程具有更大的不确定性。而自下而上合成多肽方法的优势是基于已知的多肽构效关系, 可以对目标多肽进行精准设计和人工合成, 但其合成的多肽难以用于食品工业: 液相或固相合成中引入了二甲基甲酰胺 (DMF) 和二氯甲烷 (DCM) 等有机溶剂和萃取剂, 即使低于检测限仍然无法保证最终产品经服用后对人体无毒无害; 而发酵生产用的菌种或无细胞体系同样因为代谢毒素的种类繁杂难以分离, 暂时未被食品工业认可和接受。因此, 今后需要利用天然资源发展快速发掘和生产活性多肽的系统工程技术, 即食品和健康行业生产的活性多肽产品在很长一段时期内都要以自上而下的合成为主。

如图 2 所示, 人们可以将自上而下和自下而上的两种合成方法有机结合起来, 加速活性多肽的发掘和生产研发进程。从自下而上的角度, 对于许多没有明确其基因组和蛋白组的物种及其蛋白资源, 可以利用蛋白测序和蛋白组学技术, 获取天然蛋白序列, 结合多肽构效关系数据库, 利用机器学习等方法预测可能具有活性的多肽序列, 直接通过合成方法进行制备, 经活性检测确认后获得目标活性多肽; 再从自上而下的角度, 确定目标活性多肽在其源蛋白序列上切割下来所需的酶切位点, 进而利用生物信息学方法选择相应的酶对该酶切位点进行切割, 实现目标活性多肽的酶解制备。理论上, 酶解制备的活性多肽与合成制备的活性多肽在活性上应无明显差别。相比于单一使用自下而上的方法, 上下结合法更适用于合成肽无法直接应用的场景, 例如功能食品

的开发; 相比于自上而下的方法, 上下结合法免除了传统活性多肽筛选的分离纯化、活性检验等操作重复进行的巨大工作量, 在确定了目标活性多肽序列的先验条件下进行蛋白序列的精准切割, 因而大大缩短了筛选时间, 达到了快速制备与验证目标活性多肽的效果。

尽管目前已经有许多研究多肽构效关系的方法, 但多肽的发掘及其作用机理阐释的难点仍在于构效关系难以明确, 限制了活性多肽的发展。随着计算机分子图形学、分子动力学、量子化学、医学等学科的进步, 针对多种信号通路及较为复杂的多肽-靶蛋白结合构效关系开展研究也逐渐成为可能。未来, 这些构效关系研究方法和装备的创新将为图 2 所示的功能性多肽创制技术发展提供重要的支撑。

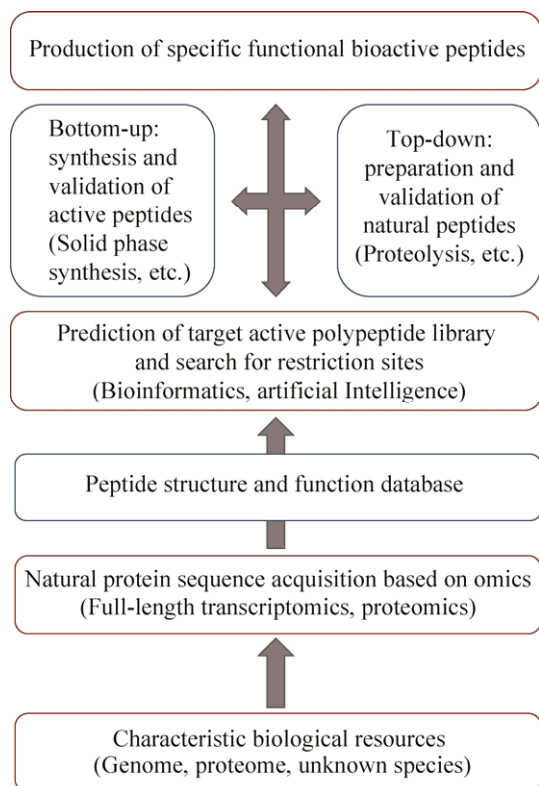


图 2 功能性多肽的系统创制技术  
Fig. 2 Creation technology of functional peptides.

## REFERENCES

- [1] Vos T, Barber RM, Bell B, et al. Global burden of disease study 2013 collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the global burden of disease study 2013. *Lancet*, 2015, 386(9995):743-800.
- [2] 欧阳雪梅, 中国大健康产业如何塑造未来医养模式. *人民论坛*, 2020(28): 71-73.  
Ouyang XM. How does China's great health industry shape the future medical care model, *Peoples Tribune*, 2020(28): 71-73(in Chinese).
- [3] Miranda LP, Alewood PF. Accelerated chemical synthesis of peptides and small proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(4): 1181-1186.
- [4] Singh BP, Vij S, Hati S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 2014, 54: 171-179.
- [5] Minkiewicz, Iwaniak, Darewicz. BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: current opportunities. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 5978.

- [6] 施安辉, 单宝龙, 贾朋辉, 等. 国内蛋白质饲料资源开发利用的现状与前景. 饲料博览, 2006(6): 40-43.  
Shi AH, Shan BL, Jia PH, et al. Current situation and prospect of development and utilization of protein feed resources in China. Feed Rev, 2006(6): 40-43 (in Chinese).
- [7] Ferreira SH. A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of *Bothrops jararaca*. Br J Pharmacol Chemother, 1965, 24(1): 163-169.
- [8] Ianzer D, Konno K, Marques-Porto R, et al. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. Peptides, 2004, 25(7): 1085-1092.
- [9] DiBianco R. Adverse reactions with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. Med Toxicol, 1986, 1(2): 122-141.
- [10] Masuda O, Nakamura Y, Takano T. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. J Nutr, 1996, 126(12): 3063-3068.
- [11] Yamamoto N, Akino A, Takano T. Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. Biosci Biotechnol Biochem, 1994, 58(4): 776-778.
- [12] Marathe CS, Rayner CK, Jones KL, et al. Glucagon-like peptides 1 and 2 in health and disease: a review. Peptides, 2013, 44: 75-86.
- [13] Reinhold D, Kähne T, Steinbrecher A, et al. The role of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) enzymatic activity in T cell activation and autoimmunity. Biol Chem, 2002, 383(7/8): 1133-1138.
- [14] Raufman JP. Bioactive peptides from lizard venoms. Regul Pept, 1996, 61(1): 1-18.
- [15] Christensen M, Knop FK, Holst JJ, et al. Lixisenatide, a novel GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes mellitus. IDrugs, 2009, 12(8): 503-513.
- [16] Nauck MA, Petrie JR, Sesti G, et al. The once-weekly human GLP-1 analogue semaglutide provides significant reductions in HbA1c and body weight in patients with type 2 diabetes. Abstracts of the 48th EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Diabetologia, 2012, 55(S1): 1-538.
- [17] Giguère S, Laviolette F, Marchand M, et al. Machine learning assisted design of highly active peptides for drug discovery. PLoS Comput Biol, 2015, 11(4): e1004074.
- [18] Joo SH, Pei DH. Synthesis and screening of support-bound combinatorial peptide libraries with free C-termini: determination of the sequence specificity of PDZ domains. Biochemistry, 2008, 47(9): 3061-3072.
- [19] Fang C, Moriwaki Y, Li CH, et al. Prediction of antifungal peptides by deep learning with character embedding. IPSJ Trans Bioinform, 2019, 12: 21-29.
- [20] Agrawal P, Bhalla S, Chaudhary K, et al. *In silico* approach for prediction of antifungal peptides. Front Microbiol, 2018, 9: 323.
- [21] 任美娟. 杏鲍菇多肽口服液研制及抗氧化功能评价. 太谷: 山西农业大学, 2018.  
Ren MJ. Preparation of *Pleurotus eryngii* polypeptide oral liquid and evaluation of its antioxidant activity. Taigu, China: Shanxi Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [22] 孙金沅, 姜云松, 刘国英, 等. 白酒酒醅中两种多肽的鉴定及其抗氧化和降血压功能评价. 食品与发酵工业, 2019, 45(18): 1-8.  
Sun JY, Jiang YS, Liu GY, et al. *In vitro* antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of two oligopeptides in Jiupai of Baijiu. Food Ferment Ind, 2019, 45(18): 1-8 (in Chinese).
- [23] 李继海. 梅花鹿茸活性成分提取分离、功能评价及功能食品研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.  
Li JH. Study on extraction, purification and function evaluation of active composition in pilose antler and function food development[D]. Beijing: China Agricultural University, 2005 (in Chinese).
- [24] 戴媛. 大豆多肽 TTYT 的抗氧化功能及其代谢组学研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017.

- Dai Y. Studies on antioxidant function and its metabonomics of soybean polypeptide TTYT[D]. Changchun: Jilin University, 2017 (in Chinese).
- [25] Xing YF, Liu JY, Guo XJ, et al. Engineering organoid microfluidic system for biomedical and health engineering: a review. *Chin J Chem Eng*, 2020(30): 244-254.
- [26] Nongonierma AB, FitzGerald RJ, An *in silico* model to predict the potential of dietary proteins as sources of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides. *Food Chemistry*, 2014. 165: 489-498.
- [27] Sánchez-Rivera L, Martínez-Maqueda D, Cruz-Huerta E, et al. Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. *Food Res Int*, 2014, 63: 170-181.
- [28] Nongonierma AB, Mooney C, Shields DC, et al. In silico approaches to predict the potential of milk protein-derived peptides as dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitors. *Peptides*, 2014, 57: 43-51.
- [29] Zhou P, Yang C, Ren Y, et al. What are the ideal properties for functional food peptides with antihypertensive effect? A computational peptidology approach. *Food Chem*, 2013, 141(3): 2967-2973.
- [30] Acharya C, Kufareva I, Ilatovskiy AV, et al. PeptiSite: a structural database of peptide binding sites in 4D. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 445(4): 717-723.
- [31] 张贵川. 食源三肽ACE抑制活性构效关系研究[D]. 重庆: 西南大学, 2009.  
Zhang GC. Studies of QSAR on angiotensin-converting enzyme tri-peptides inhibitors derived from food proteins[D]. Chongqing: Southwest University, 2009 (in Chinese).
- [32] Umezawa H, Aoyagi T, Ogawa K, et al. Diprotins A and B, inhibitors of dipeptidyl aminopeptidase IV, produced by bacteria. *J Antibiot*, 1984, 37(4): 422-425.
- [33] Guan CG, Iwatani S, Xing XH, et al. Strategic preparations of DPP-IV inhibitory peptides from val-pro-xaa and ile-pro-xaa peptide mixtures. *Int J Pept Res Ther*, 2021, 27(1): 735-743.
- [34] Nongonierma AB, Dellafiora L, Paoletta S, et al. *In silico* approaches applied to the study of peptide analogs of ile-pro-ile in relation to their dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties. *Front Endocrinol*, 2018, 9: 329.
- [35] Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Tryptophan-containing milk protein-derived dipeptides inhibit xanthine oxidase. *Peptides*, 2012, 37(2): 263-272.
- [36] 黎青勇. 核桃源降尿酸肽靶向抑制黄嘌呤氧化酶活性的构效机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.  
Li QY. Study on the structure-activity mechanism of targeting inhibition of xanthine oxidase by uric acid-lowering peptides derived from walnut[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018 (in Chinese).
- [37] 何伟炜. 金枪鱼黄嘌呤氧化酶抑制肽的分离鉴定及其作用机制初探[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.  
He WW. Study on identification and mechanism of xanthine oxidase inhibitory peptides from tuna protein[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [38] Iwatani S, Yamamoto N. Functional food products in Japan: a review. *Food Sci Hum Wellness*, 2019, 8(2): 96-101.
- [39] 曹伯良. 一种从养殖水中直接提取生物活性肽的方法和装置: CN111034669A. 2019-12-15.  
Cao BL. A method and a device for directly extracting bioactive peptide from aquaculture water: CN111034669A. 2019-12-15(in Chinese).
- [40] Preecharram S, Daduang S, Bunyaratratchata W, et al. Antibacterial activity from *Siamese crocodile (Crocodylus siamensis)* serum, *AFR J Biotechnol*, 2008,94(7):131-138.
- [41] Boelsma E, Kloek J. Lactotripeptides and antihypertensive effects: a critical review. *Br J Nutr*, 2009, 101(6): 776-786.
- [42] Ohsawa K, Nakamura F, Uchida N, et al. *Lactobacillus helveticus*-fermented milk containing lactononadecapeptide (NIPPLTQTPVVVPPFLQPE) improves cognitive function in healthy middle-aged adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled

- trial. *Int J Food Sci Nutr*, 2018, 69(3): 369-376.
- [43] Rein D, Ternes P, Demin R, et al. Artificial intelligence identified peptides modulate inflammation in healthy adults. *Food Funct*, 2019, 10(9): 6030-6041.
- [44] Kennedy K, Cal R, Casey R, et al. The anti-ageing effects of a natural peptide discovered by artificial intelligence. *Int J Cosmet Sci*, 2020, 42(4): 388-398.
- [45] Guzman F, Barberis S, Illanes A. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electron J Biotechnol*, 2007, 10(2): 279-314.
- [46] Gallego M, Mora L, Hayes M, et al. Effect of cooking and *in vitro* digestion on the antioxidant activity of dry-cured ham by-products. *Food Res Int*, 2017, 97: 296-306.
- [47] Homayouni-Tabrizi M, Asoodeh A, Soltani M. Cytotoxic and antioxidant capacity of camel milk peptides: effects of isolated peptide on superoxide dismutase and catalase gene expression. *J Food Drug Anal*, 2017, 25(3): 567-575.
- [48] Lassoued I, Mora L, Barkia A, et al. Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Proteom*, 2015, 128: 8-17.
- [49] Lassoued I, Mora L, Nasri R, et al. Characterization and comparative assessment of antioxidant and ACE inhibitory activities of thornback ray gelatin hydrolysates. *J Funct Foods*, 2015, 13: 225-238.
- [50] Abdelhedi O, Jridi M, Jemil I, et al. Combined biocatalytic conversion of smooth hound viscera: protein hydrolysates elaboration and assessment of their antioxidant, anti-ACE and antibacterial activities. *Food Res Int*, 2016, 86: 9-23.
- [51] Wang Y, Chen H, Wang X, et al. Isolation and identification of a novel peptide from zein with antioxidant and antihypertensive activities. *Food Funct*, 2015, 6(12): 3799-3806.
- [52] Mirzapour M, Rezaei K, Sentandreu MA, et al. *In vitro* antioxidant activities of hydrolysates obtained from Iranian wild almond (*Amygdalus scoparia*) protein by several enzymes. *Int J Food Sci Technol*, 2016, 51(3): 609-616.
- [53] Nongonierma AB, Le Maux S, Dubrulle C, et al. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein hydrolysates with *in vitro* dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory and antioxidant properties. *J Cereal Sci*, 2015, 65: 112-118.
- [54] Cheng FY, Lai IC, Lin LC, et al. The *in vitro* antioxidant properties of alcalase hydrolysate prepared from silkie fowl (*Gallus gallus*) blood protein. *Anim Sci J*, 2016, 87(7): 921-928.
- [55] Karamać M, Kosińska-Cagnazzo A, Kulczyk A. Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1027.
- [56] Arrutia F, Puente Á, Riera FA, et al. Influence of heat pre-treatment on BSA tryptic hydrolysis and peptide release. *Food Chem*, 2016, 202: 40-48.
- [57] Chang SK, Ismail A, Yanagita T, et al. Antioxidant peptides purified and identified from the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) kernel protein hydrolysate. *J Funct Foods*, 2015, 14: 63-75.
- [58] Lajmi K, Gómez-Estaca J, Hammami M, et al. Upgrading collagenous smooth hound by-products: effect of hydrolysis conditions, *in vitro* gastrointestinal digestion and encapsulation on bioactive properties. *Food Biosci*, 2019, 28: 99-108.
- [59] Mudgil P, Kamal H, Yuen GC, et al. Characterization and identification of novel antidiabetic and anti-obesity peptides from camel milk protein hydrolysates. *Food Chem*, 2018, 259: 46-54.
- [60] Nongonierma AB, Paoletta S, Mudgil P, et al. Identification of novel dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides in camel milk protein hydrolysates. *Food Chem*, 2018, 244: 340-348.
- [61] Nongonierma AB, Cadamuro C, Le Gouic A, et al. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory properties of a camel whey protein enriched hydrolysate preparation. *Food Chem*, 2019, 279: 70-79.
- [62] Yu Z, Wu S, Zhao W, et al. Identification and the molecular mechanism of a novel myosin-derived ACE inhibitory peptide. *Food Funct*, 2018, 9(1): 364-370.

- [63] Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*, 1999, 112: 531-552.
- [64] Admassu H, Gasmalla MAA, Yang R, et al. Bioactive peptides derived from seaweed protein and their health benefits: antihypertensive, antioxidant, and antidiabetic properties. *J Food Sci*, 2018, 83(1): 6-16.
- [65] 阮晓慧, 韩军岐, 张润光, 等. 食源性生物活性肽制备工艺、功能特性及应用研究进展. *食品与发酵工业*, 2016, 42(6): 248-253.
- Ruan XH, Han JQ, Zhang RG, et al. Progress in the preparation, functional properties and applications of food-derived bioactive peptides. *Food Ferment Ind*, 2016, 42(6): 248-253 (in Chinese).
- [66] 王竹清, 李八方. 生物活性肽及其研究进展. *中国海洋药物*, 2010, 29(2): 60-68.
- Wang ZQ, Li BF. Research progress of bioactive peptides. *Chin J Mar Drugs*, 2010, 29(2): 60-68 (in Chinese).
- [67] Montemurro M, Pontonio E, Gobetti M, et al. Investigation of the nutritional, functional and technological effects of the sourdough fermentation of sprouted flours. *Int J Food Microbiol*, 2019, 302: 47-58.
- [68] Aredes Fernández PA, Stivala MG, Rodríguez Vaquero MJ, et al. Increase in antioxidant and antihypertensive activity by *Oenococcus oeni* in a yeast autolysis wine model. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(2): 359-364.
- [69] Obaroakpo JU, Liu L, Zhang SW, et al. A glucosidase and ACE dual inhibitory protein hydrolysates and peptide fractions of sprouted quinoa yoghurt beverages inoculated with *Lactobacillus casei*. *Food Chem*, 2019, 299: 124985.
- [70] Rizzello CG, Lorusso A, Russo V, et al. Improving the antioxidant properties of quinoa flour through fermentation with selected autochthonous lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 2017, 241: 252-261.
- [71] Chakrabarti S, Guha S, Majumder K. Food-derived bioactive peptides in human health: challenges and opportunities. *Nutrients*, 2018, 10(11): 1738.
- [72] Daliri EB-M, Lee BH, Park MH, et al. Novel angiotensin I -converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein isolates fermented by *Pediococcus pentosaceus* SDL1409. *LWT*, 2018, 93: 88-93.
- [73] Moslehishad M, Ehsani MR, Salami M, et al. The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. *Int Dairy J*, 2013, 29(2): 82-87.
- [74] Masuda O, Nakamura Y, Takano T. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J Nutr*, 1996, 126(12): 3063-3068.
- [75] DiBianco R. Adverse reactions with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Med Toxicol*, 1986, 1(2): 122-141.
- [76] Nakamura Y, Masuda O, Takano T. Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60(3): 488-489.
- He D, Wang Y, Lin J, et al. Identification and characterization of alcohol-soluble components from wheat germ-apple fermented by *Lactobacillus* sp. capable of preventing ulcerative colitis of dextran sodium sulfate-induced mice. *J Funct Foods*, 2020, 64: 103642.
- [77] Fischer E, Fourneau E. Ueber einige Derivate des Glykocolls. *Ber Dtsch Chem Ges*, 1901, 34(2): 2868-2877.
- [78] Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. the synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc*, 1963, 85(14): 2149-2154.
- [79] Kung YT, Du YC, Huang WT, et al. Total synthesis of crystalline bovine insulin. *Sci Sin*, 1965, 14(11): 1710-1716.
- [80] Kullmann W. Enzymatic synthesis of Leu- and Met-enkephalin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979, 91(2): 693-698.
- [81] 徐珂, 张丽萍, 张园园, 等. 微生物源抗菌肽表达系统研究进展及改造策略. *河北科技大学学报*,

- 2019, 40(5): 454-460.
- Xu K, Zhang LP, Zhang YY, et al. Advances in microbial antimicrobial peptides expression system and transformation strategy. *J Hebei Univ Sci Technol*, 2019, 40(5): 454-460 (in Chinese).
- [82] Deng T, Ge H, He H, et al. The heterologous expression strategies of antimicrobial peptides in microbial systems. *Protein Expr Purif*, 2017, 140: 52-59.
- [83] Prak K, Utsumi S. Production of a bioactive peptide (IIAEK) in *Escherichia coli* using soybean proglycinin A1aB1b as a carrier. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(9): 3792-3799.
- [84] Guo C, Huang Y, Zheng H, et al. Secretion and activity of antimicrobial peptide cecropin D expressed in *Pichia pastoris*. *Exp Ther Med*, 2012, 4(6): 1063-1068.
- [85] Meng DM, Dai HX, Gao XF, et al. Expression, purification and initial characterization of a novel recombinant antimicrobial peptide mytichitin-A in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2016, 127: 35-43.
- [86] Zhang J, Yang Y, Teng D, et al. Expression of plectasin in *Pichia pastoris* and its characterization as a new antimicrobial peptide against *Staphylococcus* and *Streptococcus*. *Protein Expr Purif*, 2011, 78(2): 189-196.
- [87] 吕星星, 王莎莎, 赵震, 等. 基于重组毕赤酵母的鳕鱼  $\beta$ -防御素生物合成及其抑菌活性. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(4): 568-577.
- Lü XX, Wang SS, Zhao Z, et al. Biosynthesis of *Siniperca chuatsi*  $\beta$ -defensin based on recombinant *Pichia pastoris* and its antibacterial activity. *J Shanghai Ocean Univ*, 2020, 29(4): 568-577 (in Chinese).
- [88] Koos JD, Link AJ. Heterologous and *in vitro* reconstitution of fuscanodin, a lasso peptide from *Thermobifida fusca*. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(2): 928-935.
- [89] Liu SJ, Li YM, Xu ZW, et al. Immune responses elicited in mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing F4 fimbrial adhesin FaeG by oral immunization. *Vet Res Commun*, 2010, 34(6): 491-502.
- [90] Murray CJ, Baliga R. Cell-free translation of peptides and proteins: from high throughput screening to clinical production. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17(3): 420-426.
- [91] Kragol G, Lovas S, Varadi G, et al. The antibacterial peptide pyrrohocorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*, 2001, 40(10): 3016-3026.
- [92] Taniguchi M, Ochiai A, Kondo H, et al. Pyrrohocorin, a proline-rich antimicrobial peptide derived from insect, inhibits the translation process in the cell-free *Escherichia coli* protein synthesis system. *J Biosci Bioeng*, 2016, 121(5): 591-598.

(本文责编 陈宏宇)