

- Regul, 1999, 27: 105 ~ 111.
- 36 Sisler E. C, Serek M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent development. *Physiol Plant*, 1997, 100: 577 ~ 582.
  - 37 Sisler E. C, Yang S. F. Anti - ethylene effects of cis - 2 - butene and cyclic olefins. *Phytochem*, 1984, 23: 2765 ~ 2768.
  - 38 Sisler E. C. Ethylene binding components in plants. In Mattoo KA, Suttle JC (eds). *The Plant Hormone Ethylene*. CRC, Boca Roton, 1991, 81 ~ 95.
  - 39 Smith T. A. Polyamines. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 1985, 36, 117 ~ 143.
  - 40 Srivastava M. K, Dwivedi U. N. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant Science*, 2000, 158, 87 ~ 96.
  - 41 Suttle J. C. Effects of polyamines on ethylene production. *Phytochemistry*, 1981, 20(7): 1477 ~ 1480.
  - 42 Veen H. Effect of silver on ethylene synthesis and action in cut carnations. *Planta*, 1979, 145: 467 ~ 470.
  - 43 Veen H. Silver thiosulphate: an experimental tool in plant science. *Sci Hort*, 1983, 20: 211 ~ 224.
  - 44 Wang H, Woodson W. R. Reversible inhibition of ethylene action and interruption of petal senescence in carnation flowers by norbornadiene. *Plant Physiol*, 1989, 89: 434 ~ 438.
  - 45 Wang Z, Dille D. R. Aminoethoxyvinylglycine, combined with ethephon, can enhance red color development without overripening apples. *HortScience*. 2001, 36(2): 328 ~ 331.
  - 46 Wilkinson J. Q, Lannan M. B, Yen H. C, Giovannoni J. J, Klee H. An ethylene inducible component of signal transduction encoded by Never - ripe. *Science*, 1995, 270, 1807 ~ 1809.
  - 47 Wilkinson J. Q, Lanahan M. B, Clark D. G, et al. A dominant mutant receptor from *Arabidopsis* confers ethylene insensitivity in heterologous plants[J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15: 444 ~ 447.
  - 48 Yang S. F, Hoffman N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev. Plant Physiol*, 1984, 35: 155 ~ 189.
  - 49 Zagory, D. Ethylene - removing packaging in: Rooney, M. L. (Ed. ). *Active Food Packaging*. London, Blackie Academic & Professional, 1995, 38 ~ 54.

## 免疫活性肽的研究进展与展望

王秋韞 庞广昌 陈庆森 天津商学院生物技术与蛋白资源研究室 天津

7320  
300400 A

**摘 要** 近年来,乳蛋白来源的生物活性肽方面的研究进展迅速,日益引起人们的重视并日趋成为乳品领域研究的焦点。到目前为止,已经发现了几十种具有不同生理功能的生物活性肽,免疫活性肽就是其中研究较多的一类生物活性肽,它能够增强人体的免疫功能,对人体特别是对新生儿正常生理功能发挥着不可替代的功能,它的开发利用和进一步深入研究具有重要意义。

**关键词** 乳蛋白 免疫活性肽 展望

**Abstract** In recent years, great progress have been made on the studies of milk derived peptides. These peptides were of great physical importance, and more and more attentions were attached to these peptides. Up to now, tens of these active peptides kinds have been found. Immuno peptide was are one of these kinds of physical peptides. They could improve the immune defensive function of human, especially of neonates. The further studies and the exploitation would be of great importance.

**Key words** Milk - protein Immuno peptides Prospective

乳是新生哺乳动物的主要食物来源,也是成年人饮食的一个重要组成部分。长期以来,乳蛋白仅仅被人们视为一种营养蛋白,为新生哺乳动物提供充足的能量和各种氨基酸。然而,近年来的研究结果表明,乳蛋白除其营养价值外,还是生物活性肽的重要来源。这些生物活性肽,均以无活性的状态存在于乳蛋白前体物中,只有用适当的酶水解后,它们的活性才被释放出来,从而发挥其生理功能。免疫活性肽就是利用蛋白酶水解乳蛋白并从中获得的一种具有免疫增强作用的短肽,

它具有多种生理功能和广阔的开发应用前景。

### 1 免疫活性肽的研究进展

乳蛋白生物活性肽的研究始于1979年,德国的 Brantl 等人通过酶解牛乳酪蛋白得到了一些多肽产物,并证明它们具有类吗啡活性<sup>[1]</sup>,从此,人们展开了生物活性肽方面的研究。经过20多年的逐步探索,到目前为止,人们已经发现了多种生物活性肽,如:类吗啡活性肽(Opioid peptides),是研究最早的一类生

物活性肽,具有类吗啡受体配体活性,能与机体内的类吗啡受体结合,具有止痛<sup>[2]</sup>、止泻<sup>[3]</sup>、抑制胃肠蠕动、增强机体对氨基酸和其它营养物质的吸收的功能<sup>[4]</sup>;免疫活性肽(Immunopeptides),能够增强机体免疫力,刺激机体淋巴细胞的增殖,增强巨嗜细胞的吞噬功能,提高机体抵御外界病原体感染的能力,降低机体发病率,并具有抗肿瘤功能<sup>[5]</sup>;抗血栓活性肽(Antithrombotic peptides),能抑制血纤维蛋白原与血小板表面的特异性受体结合,具有抗凝血、抑制血栓形成的生理功能;酪蛋白磷酸肽(Caseinophosphopeptides,简称CPP),能与多种矿物质元素结合形成可溶性的有机磷酸盐,充当许多矿物质元素特别是钙离子在体内运输的载体,促进小肠对钙离子和其他矿物质元素的吸收;抗菌肽(Antimicrobial peptides),是近年来发现并开始研究的一类生物活性肽,体外条件下能抑制细菌的生长,在体内具有类似抗生素的活性,能抑制小鼠感染致病金黄色葡萄球菌<sup>[6]</sup>;抗血栓转化酶抑制剂(Inhibitors of angiotensin-converting enzyme,简称CEI),是一种多功能肽,具有调节血压、免疫防御和调节神经系统功能的活性<sup>[7]</sup>。此外,近几年还有抗高血压肽(Antihypertensive peptides)、抗遗忘肽(Antiamnesic peptides)等生物活性肽的报道。

免疫活性肽是继类吗啡活性肽发现后首次从乳中获得并证明其生理活性的一类生物活性肽,免疫活性肽的研究始于1981年,Jolles等首次报道,用胰蛋白酶水解人乳蛋白,从水解物中分离得到一种具有免疫活性的肽段,它的氨基酸序列是Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr,相当于人乳 $\beta$ -酪蛋白54-59的氨基酸残基序列<sup>[8]</sup>,这个短肽,在体外试验中能增强小鼠腹腔巨噬细胞对绵羊红细胞的吞噬作用,静脉注射,则能增强小鼠抵抗肺炎克氏杆菌(*Klebsiella. Pneumoniae*)感染的能力。此后,科学家进行了大量免疫活性肽方面的研究。但是,自免疫活性肽被发现和得到系统研究以来,由于其活性检测方法比较麻烦,需要做大量的动物试验才能得出结论,而做动物试验的首要条件是要获得足够量的纯品,而到目前为止,免疫活性肽的研究仍处于实验水平,还没有一套较为有效的制备方法。所以,二十年来,免疫活性肽方面的研究进展比较缓慢。就目前我们所掌握的资料来看,德国以Hans Meisel为首的联邦乳品研究中心(Federal Dairy Research Center)物化研究所(Institute for Chem-

istry and Physics)在这方面做了大量工作,发现了多种免疫活性肽并对其部分生物活性做了一定的检测,目前,正在进行深入研究;国内有关免疫活性肽的研究还未见报道。

## 2 免疫活性肽的种类

目前,据文献报道,从牛乳、人乳及植物蛋白中获得的不同序列的免疫活性肽共有39种<sup>[9]</sup>,其中,牛乳蛋白来源的免疫活性肽有9种,其序列及来源如下:

上述是狭义上的免疫活性肽。从广义上讲,免疫活性肽不仅指免疫活性肽(Immunopeptides),还应该包括具有免疫活性的其他类生物活性肽,例如类吗啡肽,它是一种多功能肽,除了具有类吗啡活性外,它还具有免疫刺激性,能够刺激机体淋巴细胞的增殖,增强机体免疫功能。此外,抗菌肽、乳转铁蛋白B、抗血栓转化酶抑制剂等生物活性肽也具有较强烈的免疫活性。随着研究的进一步深入,相信会有更多种类的免疫活性肽被人们发现并开发应用。

## 3 免疫活性肽的生理功能

与其他生物活性肽一样,动物乳蛋白经胃肠道蛋白酶水解后释放的免疫活性肽,对于新生儿的生长发育和正常生理功发挥着非常重要的作用。刚出生的婴儿,其免疫器官尚未发育完全,免疫系统的功能也不健全,T细胞和B细胞仍处于非活性状态<sup>[10]</sup>,所以,它还不能有效地抵御外界各种病原微生物的入侵,免疫能力低下。而乳蛋白作为新生儿的主要食物来源,无论从进化意义还是从个体发育的意义上讲,都责无旁贷地负担起弥补这一缺陷的责任。乳中除含有免疫球蛋白和各种细胞因子外,乳蛋白经胃肠道的蛋白酶水解后能释放出多种生物活性肽,其中的免疫活性肽也在很大程度弥补了新生儿的免疫功能缺陷。免疫活性肽不仅能够调节大肠菌群、增强肠道免疫力、刺激淋巴细胞增殖、提高巨噬细胞吞噬外来异物的能力,而且具有抗肿瘤的功能。1991年,Hadden等人用Tyr-Gly和Tyr-Gly-Gly注射93位艾滋病综合症患者,惊喜地发现,二肽或三肽能显著地增强艾滋病患者的抗感染能力,降低艾滋病患者的死亡率<sup>[11]</sup>。这一发现的意义非同小可,它为人们攻克艾滋病这一顽症提供了一种新途径,也给艾滋病患者带来了希望和光

氨基酸序列	来源及所在位置	参考文献
Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn	$\beta$ -CNf63-68	[10]
Gly-Leu-Phe	$\alpha$ -LAf51-53	[11]
Leu-Leu-Tyr	$\beta$ -CNf191-193	[10]
Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp	$\alpha$ -s1-CNf194-199	[10]
Tyr-Gln-Gln-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg	$\beta$ -CNf193-202	[12]
Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile	$\beta$ -CNf60-66	[13]
Tyr-Gly	$\alpha$ -Lactorphin	[14]
Tyr-Gly-Gly	$\kappa$ -CN 氮末端	[14]
Tyr-Gln-Gln-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val	$\beta$ -CNf194-209	[15]

明。免疫活性肽发挥其生理功能的浓度极低,例如,二肽 Tyr-Gly,在  $10 \sim 11 \text{ mol/L}$  的浓度下,就能显著增强小鼠腹腔巨噬细胞对绵羊红细胞的吞噬作用,刺激淋巴细胞的增殖,提高小鼠抵抗肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的感染能力; Tyr-Gly-Gly 作用的浓度更低,仅为  $10 \sim 12 \text{ mol/L}$  [18]。

#### 4 免疫活性肽的开发前景展望

研究表明,酪蛋白中包含有多种生物活性序列,其中包括多种免疫活性肽,这些生物活性肽,均以无活性的形式存在于酪蛋白前体物中,只有用适当的蛋白酶水解并从酪蛋白中释放出来后,才成为具有生理活性的肽段。因此,在体外条件下,只要调节适当的 pH 值、温度和水解时间,用适当的蛋白酶或不同蛋白酶的组合作用水解,就能够产生出免疫活性肽并具有与体内条件下释放的免疫活性肽相同的生理活性;而且,近年来的研究结果表明,短肽类物质可以以完整肽段的形式被机体吸收,进入循环系统与靶位点结合,从而发挥其生理功能,而不必分解为单个氨基酸 [19]。这就为免疫活性肽的研究和开发应用提供了分子生物学方面的依据。免疫分子生物学研究指出,能够引起机体免疫排斥反应的物质的分子量通常在  $1,0000$  道尔顿以上 [20],分子量小的小分子,不具备免疫原性,进入机体后不被机体识别,一般不能诱发免疫排斥反应。目前所发现的免疫活性肽中,最小的分子仅有两个氨基酸残基组成 (Tyr-Gly),分子量为  $328$  道尔顿;最大的分子也只有  $17$  个氨基酸残基 (Tyr-Gln-Gln-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val),分子量为  $1870$  道尔顿左右,它们都不具免疫原性,却能以完整肽的形式通过小肠壁进入循环系统,这些小分子肽,不仅能够刺激机体自身淋巴细胞的增殖、促进细胞因子的释放、增强机体巨噬细胞的吞噬能力,而且不会引起机体的免疫排斥反应。这也正是免疫活性肽与用于提高机体免疫能力的大分子药物如免疫球蛋白相比最明显的优势,而且,注射免疫球蛋白只能被动地增强机体免疫力而不能调动机体自身免疫系统的防御作用,属于被动免疫。一旦停止用药,机体的免疫能力又会有所下降。免疫活性肽则不同,它充分调动了机体自身免疫系统的主动性,促进机体自身免疫能力的提高,故而不会使机体产生对药物的依赖性。所以,免疫活性肽作为一类小分子物质,以其分子量低、活性强、用量少的独特优势,已越来越多地引起人们的重视,其工业化生产也成为当前食品和医药行业发展的大趋势。

目前,短肽类物质的生产主要有三种方法:一、基因工程方法,二、化学合成方法,三、酶解法。由于用基因工程方法和化学合成方法生产免疫活性肽需要较昂贵的仪器设备,投资大,成本高,且其安全性还需进一步检测,其应用受到很大的局限;而用酶解法生产免疫活性肽则具有较多的优势,酶解法生产免疫活性肽的原料来源主要是酪蛋白,酪蛋白的来源广泛,在人乳、牛乳、羊乳中的含量高,且制备简单,生产成本低。所以,用酪蛋白生产免疫活性肽,具有原料廉价,成本低,安全性高的优点。有鉴于此,目前,免疫活性肽的研究和制备主要采用酶解的方法获得。

同时我们应当看到,虽然免疫活性肽的研究已经有二十多年的历史了,但其发挥其免疫活性的生理机制目前还不清楚,这就为免疫活性肽的进一步深入研究带来了一定的困难,同时,用蛋白酶酶解酪蛋白生产免疫活性肽,由于酶解液中蛋白片段的种类多且粘度大,免疫活性肽的分离纯化比较困难,很难用一种方法达到纯化的目的,目前常用的纯化方法是反相高压液相色谱 (RPHPLC),但此方法仅限于实验室水平的研究,距工业化生产还有很大的距离。所以,免疫活性肽的研究还有待于进一步深入研究。近几年来,本实验室一直在从事此方面的研究,试图从工业化生产的角度制备并分离纯化免疫活性肽,并取得了一定的成绩,积累了一些成功经验和失败的教训。

随着研究手段和研究方法的不断提高,免疫活性肽的研究必将不断深入,由于免疫活性肽是短肽,稳定性强,所以,它不仅可以制成制剂,作为治疗免疫能力低下的药物,而且,可以作为有效成分添加到奶粉、饮料、功能性食品和保健药品中,增强人体的免疫能力,为提高人民身体素质和祖国的社会主义现代化建设作出巨大贡献。

#### 参考文献

- 1 Brantl. V. H, Teschemacher, A. Hemschem and F. Lottspeich. Novel opioid peptides derived from casein  $\beta$  - casomorphins. I. Isolation from bovine casein peptone. Hoppe - Seyler's Z. Phys - iol. Chem, 1979, 360: 1211 ~ 1216.
- 2 Chang. K. J. et al. Analgesic activity of intracerebroventricular administration of morphiceptin and  $\beta$  - casomorphins: Correlation with the morphin ( $\mu$ ) receptor binding affinity. Life Science, 1982, 30: 1547 ~ 1551.
- 3 Daniel. H et al. Effect of casein and  $\beta$  - casomorphins on gastroin - testinal motility in rats. Journal of Nutrition, 1990, 3: 252 ~ 257.
- 4 Meisel. H and Frister H. Journal of Dairy Research, Chemical characterization of bioactive peptides from in vivo digests of ca - sein, 1989, 56: 343 ~ 349.
- 5 Meisel. H Overview on milk protein - derived peptides, Int. Dairy Journal, 1989, 8: 363 ~ 373.
- 6 E. LAHOV and W. REGELSON Antibacterial and Immunostimu - lating Casein - derived Substance from Milk: Casocidin, Isracidin Peptides Fd Chem. Toxic, 1996, 34(9): 1131 ~ 145.
- 7 Meisel. H, Casokinins as inhibitors of Angiotensin - Converting - Enzyme In New Perspective in infant Nutrition. eds G. Sawatzki and B. Renner Thieme, Stuttgart, New York, 1993, 153 ~ 159.
- 8 Jolles. P, Parker. F., Migliore. D, Alliel. P, Zeria. A and Werner. G. H, Immunostimulating substances from human casein. Journal of Immunopharmacology, 1981, 3: 363.
- 9 Dziuba. J, Minkiewicz. P., Nalecz. D and Lwaniak. A Database of biologically active peptide sequences, Nahrung 1999, 43: 190 ~ 195.
- 10 Miglior - Samour. D et al Biologically active casein peptides im - plicates immunomodulation, Journal of Dairy Research, 1989, 56: 357 ~ 362.

- 11 Chiba. H and Yoshikawa. M Opioid antagonist peptides derived from  $\kappa$  - casein, Journal of Dairy Research, 1989, 56: 363 ~ 366.
- 12 Meisel. M and E. Schlimme (1994) Inhibitors of angiotensin I - converting enzyme derived from bovine casein (casokinins), in  $\beta$  - casomorphins and Related Peptides: Recent Developments eds. V. Brantl and H. Teschemacher, VCH, Weinheim, Germany, 1994, 27 ~ 33.
- 13 Brantl. V., Teschemacher. H, Blsig. J et al Opioid activities of  $\beta$  - casomorphins, Life Science, 1981, 28: 1903 ~ 1909.
- 14 Caste. M et al Identification of C - terminal peptides of bovine  $\beta$  - casein that enhance proliferation of rat lymphocytes, Immunol. Lett, 1996, 3: 41 ~ 46.
- 15 Mullally. M, M. Meisel, R. J. Fitz Gerald Synthetic peptides corresponding to  $\alpha$  - lactalbumin and  $\beta$  - lactoglobulin sequence with angiotensin - I - converting enzyme inhibitors activity, Biological Chemistry Hoppe - Seyler, 1996, 377: 259 ~ 260.
- 16 Kayser. H and Meisel. H Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk, FEBS Letters, 1996, 383: 18 ~ 20.
- 17 F. L. Schanbacher et al Biology and origin of bioactive peptides in milk, Livestock Production Science, 1997, 50: 105 ~ 123.
- 18 Hadden, J. W Immunotherapy of human immunodeficiency virus infection, Trends in Pharmaceutical Science, 1991, 12: 107 ~ 111.
- 19 Gander, M. L. G Intestinal assimilation of intact peptides and proteins from the diet - a neglected field? Biol. Rev. 1984, 59: 289 ~ 331.
- 20 武汉大学. 复旦大学生物学教研室. 微生物学. 北京: 高等教育出版社, 221.

## 红曲霉产桔霉素的研究动态

赖卫华 南昌大学生命科学与食品工程学院 南昌 330047

许杨 中德联合研究院 南昌 330047

T626 A

**摘 要** 红曲霉在食物中的应用已有千年的历史。近年来,由于它能够生成多种生理活性物质而备受各国的关注。然而,目前发现多种长期应用于工业生产的红曲霉在产生色素和生理活性物质的同时,还能分泌一种真菌毒素—桔霉素。桔霉素主要作用的靶器官是肾脏,它不仅可以致畸、导致肿瘤的发生,而且可以诱发突变。本文综述了近年来有关红曲霉产桔霉素的研究动态,其中包括桔霉素的理化性质、毒性、检测方法、桔霉素在红曲霉培养过程中的动力学研究以及抑制其生成的对策。

**关键词** 红曲霉 桔霉素 动态

**Abstract** Monascus has been used to prepare red mold rice as a natural food pigments and also as a food disinfectant for a thousand years. The physiologically active substance produced by monascus has been researched widely. At present, however, most of monascus, widely used in industry, were proved to produce citrinin, which is a mycotoxin, accompanying with pigments and physiologically active substance. Kidney is the target organ of citrinin, resulting in not only teratogenicity and carcinogenicity but also mutagenicity. This review set forth the recent tendency of study about citrinin, including the physical and chemical properties, the toxicological characteristics, the detection methods and the kinetic analysis of red pigment and citrinin production by monascus. Hence the method was suggested to inhibit the excretion of citrinin.

**Key words** Monascus Citrinin Tendency

红曲不仅被用于酿造黄酒,而且在腐乳、食醋、食品色素、中药等制造方面也有广泛应用<sup>[1]</sup>。

近年来,在回归自然思潮的影响下,红曲产品在西方世界已引起了注意,特别是可以用天然红曲色素部分代替西方的肉制品工业中的发色剂—亚硝酸盐,由此可能带来巨大的应用前景为世人所关注<sup>[2]</sup>。同时,经研究证实,红曲霉发酵过程中产生的多种次级代谢产物具有重要的生理活性<sup>[3]</sup>; Monacolin 类化合物是胆固醇合成关键酶 HMG - CoA 还原酶的抑制剂,对该酶有

较强的竞争抑制作用,从而降低胆固醇的合成。Eva 等从物质结构的角度出发,进行了深入的研究,阐明了其作用机理<sup>[4]</sup>;  $\gamma$  - 氨基丁酸和乙酰胆碱具有控制血压的功效<sup>[5]</sup>; 麦角固醇经紫外线照射后逐步转化为 VD<sub>2</sub>, 而 VD<sub>2</sub> 是一种重要药品,可防治幼儿的佝偻病,对促进孕妇和老年人的钙磷的吸收有明显作用<sup>[6]</sup>; 他汀类化合物具有抗骨质疏松的功效,而且是目前唯一发现的,通过增强骨细胞中骨形成蛋白基因的表达来增加骨骼密度的一类物质<sup>[7]</sup>,可以逆转骨质疏松这一进程<sup>[8,9]</sup>。这对老年人、特别