

鱼皮生物活性肽的提取及功能活性研究进展

游子娟¹ 陈汉林² 邓辅财²

(1. 广东石油化工学院化学学院, 茂名 525000; 2. 广东石油化工学院环境科学与工程学院, 茂名 525000)

摘要: 对水产加工过程中的鱼皮废弃物进行深加工处理, 对其高附加值利用可以变废为宝, 减少环境污染; 鱼皮来源生物活性肽具有抗氧化、抗高血压、抗菌等功效。对鱼皮废弃物中生物活性肽的提取、分离鉴定方法及其功能活性进行深入探讨, 可为食品、保健品、化妆品、医药品和化工产品等相关产品的开发提供理论基础。本文综述了酶法、化学法及发酵法提取鱼皮来源生物活性肽的优缺点, 酶法相对于化学法应用广泛, 获得的生物活性肽活性高, 发酵法成本低, 适用于批量生产。归纳总结了超滤、纳滤、凝胶过滤、离子交换和高效液相色谱及质谱联用等鱼皮生物活性肽的分离纯化和鉴定方法, 多种分离、鉴定方法相结合来获取具有特定功能活性的鱼皮生物活性肽是首选, 但获得高纯度及高活性的目标产物仍是当前亟待突破的难点。此外, 分析了鱼皮生物活性肽在抗氧化性、血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 抑制活性、抗菌性及其他生物活性的研究现状, 归纳了功能活性与肽的分子量大小、肽序列结构及位置的构效关系。最后展望了生物活性肽在功能活性研发方面的不足之处及进一步研究的方向, 以期可为鱼类加工业打造高值化利用功能性产品提供参考。

关键词: 鱼皮; 生物活性肽; 提取; 分离鉴定; 功能活性; 抗氧化性; ACE 抑制活性; 抗菌性

DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2022-1265

Research Progress in the Extraction and Functional Activities of Bioactive Peptides from Fish Skin

YOU Zi-juan¹ CHEN Han-lin² DENG Fu-cai²

(1. College of Chemistry, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming 525000; 2. College of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming 525000)

Abstract: Deep processing of fish skin waste in aquatic products processing can turn waste into treasure in high-value-added way and reduce environmental pollution, and the bioactive peptides from fish skin possess antioxidant, antihypertensive and antibacterial effects, etc. The methods of extraction, separation and identification of bioactive peptides from fish skin waste and their functional activities were discussed in depth, which may provide theoretical basis for the development of food, health products, cosmetics, pharmaceuticals and chemical products. In this paper, the advantages and disadvantages of enzyme, chemical and fermentation methods for the extraction of bioactive peptides from fish skin are reviewed. Compared with chemical methods, enzyme method is widely used, by which the bioactive peptides have higher activity; the cost of fermentation method is low, and it is suitable for mass production. The separation, purification and identification methods of fish skin bioactive peptides, such as ultrafiltration, nanofiltration, gel filtration, ion exchange, high performance liquid chromatography and mass spectrometry are summarized. The combination of multiple separation and identification methods to obtain fish skin bioactive peptides with specific functional activities is the first choice, but to obtain high purity and high activity of the target products is still a difficult breakthrough. In addition, the functional activities of fish skin bioactive peptides, such as antioxidant properties, inhibitory activities of angiotensin converting enzyme (ACE), antibacterial properties, and other bioactivities are analyzed, and the structure-activity relationship between functional activities and molecular weight, sequence structure and location of the peptides is summarized. Finally, the deficiencies of functional activity research, the development

收稿日期: 2022-10-12

基金项目: 茂名市科技计划项目 (2022045, 2021KJZXZJGSPDX002), 广东石油化工学院人才引进项目 (2020rc015)

作者简介: 游子娟, 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 天然产物化学; E-mail: youzijuan@163.com

通讯作者: 邓辅财, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物化学; E-mail: dferndferm@163.com

of bioactive peptides, and the direction of further research are prospected, aiming to provide reference for the fish processing industry in making high-value functional products.

Key words: fish skin; bioactive peptide; extraction; isolation and identification; functional activity; antioxidant activity; ACE inhibitory activity; antibacterial activity

我国是水产养殖大国, 每年水产加工产生的鱼皮、鱼鳞和鱼骨等下脚料高达 250 万吨, 其中, 鱼皮价格低廉, 在水产品加工副产物中占主导, 约占鱼类加工总量的 7%–8%。目前, 仅加工成鱼饲料等低值化产品或者掩埋丢弃的方式处理鱼皮等加工副产物, 不仅造成资源浪费, 甚至可直接导致环境污染^[1]。与陆生动物性副产物资源相比, 鱼皮来源广泛、易于加工、生物安全性高^[2]。鱼皮中蛋白质含量丰富, 可通过蛋白酶水解法、化学法或微生物发酵法等生产功能性生物活性肽^[3]。由于肽的生物活性与其氨基酸组成及序列密切相关, 不同的提取方法得到的产物功能活性不一^[4]。鱼皮生物活性肽丰富的疏水性氨基酸, 使其具有一定的抗氧化性^[5]、ACE 抑制活性^[6–7]。此外, 鱼皮生物活性肽还具有抗菌^[8]、免疫调节^[9]、抗癌^[10]等功效。鱼皮生物活性肽一般含有 2–20 个氨基酸残基, 相对分子质量低于 6 000 Da, 属于小分子肽。由于小分子肽更能抵抗内源性消化酶的水解, 与氨基酸和蛋白质相比具有更高的生物可利用性^[11]。因此, 对水产加工产生的鱼皮废弃物中生物活性肽的提取、分离鉴定方法及其功能活性进行深入探讨, 不仅有助于以之为基础的新功能食品、保健品、化妆品、医药品和化工产品等的开发, 提高其附加值, 而且能将其变废为宝, 减少环境的污染, 为鱼类水产加工业的发展提供更加广阔的前景。

基于此, 本文对近年来国内外鱼皮来源生物活性肽的提取、分离纯化、结构鉴定及其功能活性等方面的研究进展进行全面介绍, 重点介绍生物活性肽在抗氧化性、ACE 抑制活性、抗菌性、免疫调节性、神经保护活性与肽结构的构效关系, 以期为我国水产鱼皮废弃物高值化功能性产品的深入打造提供理论指导和有力借鉴。

1 鱼皮生物活性肽的提取

鱼皮生物活性肽的常规提取方法主要有酶法、化学法及发酵法(表 1)。酶法水解条件温和、安全、

产物结构稳定, 但生产成本较高; 化学法操作简便、成本低廉, 但反应过程会引入有毒物质, 安全性低, 且部分氨基酸被破坏, 应用范围受限; 发酵法则具有增加产物风味、去腥、操作简便、成本低廉、可批量生产的优点, 其不足包括产率低、产物纯化难、部分产酶菌存在一定的毒性。因此, 可根据实际需求及所需产物的特性选择不同提取方法。

1.1 酶法

酶法是指蛋白质在一定条件(温度、pH、酶浓度等)下水解生成肽的方法。酶法生产条件温和、安全、过程容易, 反应过程可以控制, 且不会破坏蛋白质中的氨基酸, 目前在胶原蛋白肽制备中得到广泛应用^[12–13]。酶法步骤包括材料前处理、蛋白酶的选择、水解度的测定、均质和加热灭活蛋白酶等^[16]。常用的商业化蛋白酶主要有碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶和复合蛋白酶等^[17–18]。

酶法提取鱼皮生物活性肽既可采用单一蛋白酶进行, 也可采用复合蛋白酶或分步酶解法配合进行。酶的最适反应浓度、pH 值和温度均因酶的种类不同而有所差异, 酶浓度(0.001%–0.005%, W/W)、pH 值(1.5–11)和温度(35℃–60℃)是常用的制备条件^[19]。秦倩倩等^[20]以 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH·)清除率为指标, 从 5 种蛋白酶中筛选出碱性蛋白酶为草鱼皮胶原蛋白的最佳水解酶; 通过 Plackett-Burman 试验设计、最陡爬坡试验和 Box-Behnken 中心组合试验优化, 得出最优酶解条件为酶解时间 3.0 h, 酶解温度 46.5℃, 用酶量 7 025.2 U/g; 在此条件下, 酶解产物对 DPPH·清除率达 78.3%。此外, Himaya 等^[21]采用分步酶解法水解太平洋鲑鱼(*Gadus macrocephalus*)皮, 采用胃蛋白酶水解鱼皮, 再采用胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶双酶法酶解, 最终得到相对分子量为 1 301 Da 的寡肽, 该酶解产物具有较强的 ACE 抑制活性。

表 1 鱼皮生物活性肽提取方法比较

Table 1	Comparison of different extraction methods of bioactive peptides from fish skin		
常规提取方 Conventional extraction method	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	文献来源 Reference
酶法 Enzymatic method	水解条件温和、反应安全可控，产物结构稳定，不破坏氨基酸，功能活性高，利于人体吸收 The hydrolysis conditions are mild, reactions are safe and controllable, the structure of the product is stable and it does not destroy amino acids, functional activity is high, and the hydrolysates are conducive to human absorption	酶活性较弱，反应速度慢，水解不彻底，价格昂贵、生产成本低 The activity of enzyme is weak, reaction speed is slow, the hydrolysis is not complete, the price of enzyme is expensive, and has high production cost	[12-13]
化学法 Chemical method	操作简便、成本低 Easy control, and low cost	引入有毒物质，安全性低，部分氨基酸被破坏，水解产物成分复杂，应用受限 It introduces toxic substances, safety is low, partial amino acids are destroyed, the hydrolysate composition is complex, and the application scope is limited	[4, 14]
发酵法 Fermentation	增加产物风味、去腥，操作简便，可批量生产，成本低 Increase product flavor, reduce fishy, easy to operate, and can be mass production at low cost	产率低，纯化困难，部分产酶菌有毒 of producing enzyme is toxic	Low [15]

为了提高酶解产率，需优化蛋白酶的水解条件，如蛋白酶用量、水解 pH 值和温度等^[22]。靳书杰^[23]以日本黄姑鱼（*Nibea japonicus*）鱼皮为原料，分别采用中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶和胃蛋白酶对其进行酶解，以 DPPH·清除率为评价指标，结果显示中性蛋白酶酶解产物 DPPH·清除能力最大，而后选取中性蛋白酶为最优酶，再进行单因素实验，优化得到其最优水解条件为酶解时间 5 h、加酶量 1 500 U/g、料液比 1：6、酶解温度 45℃和 pH 7.0。

综上所述，为了提高酶解生物活性肽的提取效率，首先应选择合适的蛋白酶或者复合蛋白酶水解鱼皮，并对蛋白酶的水解条件进行优化，提高蛋白酶的水解效率。

1.2 化学法

化学法包括酸法、碱法提取或者酸碱法混合提取，是通过强酸或者强碱水解蛋白质使肽键断裂的方法。鱼皮被碱水解后，特定的氨基酸，如色氨酸、丝氨酸和苏氨酸会被强碱破坏，因此在水解的过程必须严格控制反应 pH 和温度^[4]。生物活性肽通过酸法、碱法提取的一般步骤包括：用碱液（一般为 NaOH）对鱼皮进行前处理，并在一定的温度下搅拌一定的时间。重复 3 遍碱处理除去非蛋白物

质和色素等杂质后，反复用酸液（一般为 HCl，也可以是醋酸）处理。在酸、碱处理后，用蒸馏水将鱼皮洗涤至中性，溶解于蒸馏水中 65℃保持 4 h。有些研究提取步骤还包括脱脂，如 Jongjareonrak 等^[24]采用正丁醇脱脂处理 24–48 h，每 8 h 换液一次，上清液用醋酸溶解并温和搅拌 24 h，通过脱脂处理可以提高活性肽的纯度。上述步骤得到蛋白质水解物后，采用强酸、强碱使蛋白质水解为生物活性肽。提取条件为 6–12 mol/L HCl 或者 4 mol/L H₂SO₄、100–200℃，水解 12–24 h；或者 6 mol/L 的 NaOH 或 2 mol/L 的 Ba（OH）₂、水解 6 h，然后经活性炭脱色，再通过 701 型树脂除去酸和盐^[25]。Cole 等^[26]从比目鱼（*Pleuronectes americanus*）表皮和黏液提取物中得到抗菌肽，从皮肤上刮取黏液，加入 50 mL 0.2 mol/L Na₂Ac，0.2% Triton X-100，1 mmol/L 苯基甲基磺酰氟，均质，匀浆，再以 20 000 × g 离心 20 min，将上清液进一步纯化，得到含有 25 个氨基酸残基的抗菌肽，其氨基酸序列为：GWGSFFKKAHVGVGHVGVKAAALTHY。

化学法具有操作简便、成本低廉等优点，但是相比于酶法提取，该法存在一定的不足：反应过程难以控制，会引入有毒化学物质，还会破坏特定的氨基酸结构，如色氨酸、丝氨酸和苏氨酸^[27]；同时，

由于化学试剂裂解多肽化学键不具有特异性,导致化学法制备生物活性肽难以复制;水解产物成分复杂,应用范围受限等。因此酶法比化学法应用更广泛。

1.3 发酵法

发酵法是利用微生物菌种在生长繁殖代谢过程中产生的蛋白酶来水解蛋白质底物制备生物活性肽的方法。该法可有效回收或将食品转化为酶、有机酸等高价值产品^[28]。在发酵的过程中,生物活性肽在微生物和内源性蛋白酶水解的过程中被释放出来。

目前,用于发酵法制备生物活性肽的菌种主要有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、曲霉菌(*Aspergillus*)以及乳酸菌(*Lactic acid bacteria*)等^[29]。Jemil等^[30]通过一种蛋白水解菌枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) A26发酵几种鱼类蛋白质,生产蛋白质水解物。在发酵过程中,鱼皮蛋白质释放出的一些生物肽和氨基酸在蛋白质水解酶的作用下,可被菌株用作碳氮基质增长。吴海滨^[31]利用米曲霉(*Aspergillus oryzae*)发酵鳕鱼皮制备生物活性肽,对米曲霉的发酵条件进行优化,选择最优条件进行活性肽发酵,分离得到较强抗氧化性和ACE抑制活性的肽。邢瀚文等^[32]以罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)鱼皮为原料,利用枯草芽孢杆菌固态发酵(solid-state fermentation, SSF)制备胶原蛋白肽,发酵活性肽中含有7种必需氨基酸,分子量小于5 000 Da的肽段抗氧化性最强,清除羟基自由基(hydroxyl free radical, $\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)和DPPH $\cdot$ 的 IC_{50} 值分别为3.83、4.19和2.37 mg/mL,且具有较好的还原力。

发酵法的酶水解由微生物蛋白酶进行,生物活性肽无需进一步水解就可直接分离获得。相比其他方法,发酵法操作较为简便,成本较低,适合批量生产,并且可以增加产物风味、去腥。但是相比于酶法,发酵法的效率低,产物纯化比较困难,部分产酶菌株可能会对机体产生一定的毒害作用、安全性低等限制了发酵法的广泛应用^[15],因而安全高效的发酵菌株的获得及选择显得至关重要。

2 鱼皮生物活性肽的分离鉴定

生物活性肽的生物活性是由其性质决定的,比如分子量、电荷和疏水性等。因此,生物活性肽的

分离纯化是其活性与结构鉴定的基础,通常根据多肽的分子量、极性和等电点等性质的不同来选择适当的分离纯化方法^[33]。基于分子量大小的多肽分离方法有超滤法(ultrafiltration, UF)^[34]、纳米超滤法(nano ultrafiltration, NF)和凝胶过滤法^[35]。离子交换色谱基于多肽的电荷进行分离,反向高效液相色谱(reverse high performance liquid chromatography, RP-HPLC)则根据生物活性肽的疏水性和亲水性进行分离^[36]。从RP-HPLC分离出具有最高活性的生物活性肽组分,进一步采用高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(HPLC-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, HPLC-Q-TOF-MS)^[6]、电喷雾离子质量(electrospray ion mass, ESI)^[37]、基质辅助激光解吸/电离质谱(matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI-MS)等进行肽序列分析鉴定。此外,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)^[38]、傅立叶红外光谱(Fourier transform infrared, FTIR)^[39]、Edman降解法、圆二色谱法及核磁共振法等也常用于生物活性肽结构的鉴定。

为了获得高纯度和高活性的生物活性肽,通常采用多种方法相结合的方式分离纯化及鉴定,超滤膜过滤、凝胶渗透层析及高效液相色谱等进行分离纯化后,结合质谱进行肽序列鉴定。超滤一般用于活性肽组分的粗分离,常与其他方法联合起来对粗组分进行进一步分离^[40]。Azizah等^[41]采用2%碱性蛋白酶从鱼皮中提取胶原蛋白肽,利用超滤法分离>30 kD、10–30 kD、3–10 kD和<3 kD的肽段,不同分子量的肽段总抗氧化活性分别为 $(45.07 \pm 0.12) \mu\text{mol TE/g}$ 、 $(45.85 \pm 0.04) \mu\text{mol TE/g}$ 、 $(45.93 \pm 0.04) \mu\text{mol TE/g}$ 和 $(45.98 \pm 0.04) \mu\text{mol TE/g}$ 。牛瑞等^[42]将鳕鱼多肽依次通过超滤、凝胶过滤层析、阴离子交换层析(anion exchange chromatography, Q-FF)和RP-HPLC进行分离纯化,最终获得具有较强抗氧化性的生物活性肽。Senphan等^[43]采用超滤和Sephadex™ G-15凝胶柱层析技术结合对石斑鱼皮(*Lates calcarifer*)蛋白酶解产物进行处理,得到分子量为364 Da的抗氧化肽,其2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵

盐 (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), ABTS) 自由基清除能力最强。

虽然当前已有大量的生物活性肽分离鉴定方法, 但探索可获得高纯度及高活性的目标产物仍是当前迫切需要突破的难点。目前我国鱼皮生物活性肽的研究发展非常迅猛, 开发出高效且精准的鱼皮生物活性肽分离鉴定技术, 可推动鱼皮生物活性肽的健康有序发展^[44]。

3 鱼皮生物活性肽的功能活性

3.1 抗氧化活性

活性氧 (ROS) 和活性氮 (RNS) 分别为氧和氮代谢的常见产物。人体在新陈代谢的过程中会不断产生 $\cdot O_2^-$ 、 $\cdot OH$ 和 DPPH $\cdot$ 等 ROS, 过量的 ROS 由于具有一定氧化性而会对人体细胞中的大分子如蛋白质、脂类和 DNA 造成损伤, 而肽类则由于结构特性可以抵抗这些 ROS 的氧化损伤。而且, 肽类由于具有更佳稳定性而被认为是比游离氨基酸更有效的抗氧化剂^[45]。据报道, 肽的抗氧化性能大小与肽的种类、结构位置和疏水性氨基酸密切相关^[46]。鱼皮中胶原蛋白含量丰富, 而胶原蛋白中含有大量甘氨酸 (Gly)、缬氨酸 (Val)、丙氨酸 (Ala)、脯氨酸 (Pro) 和羟脯氨酸 (Hyp), 含有这些氨基酸的肽往往具有较强抑制脂质过氧化活性^[47]。常见抗氧化活性研究方法包括 DPPH $\cdot$ 清除能力、氧自由基 (ORAC) 清除能力、 $\cdot OH$ 清除能力和铁原子还原抗氧化剂能力 (FRAP) 分析等^[48-50]。低分子量肽往往具有更高的 ORAC 值和金属螯合作用, 而高分子量肽则常被报道具有较高的 FRAP 和 DPPH $\cdot$ 清除能力^[51]。

抗氧化活性肽往往大量存在于巴沙鱼 (*Pangasius bocourti*)、金枪鱼 (*Thunnus albacares*)、石斑鱼 (*Lates calcarifer*) 等鱼皮中^[41, 52-54] (表 2)。Sae-Leaw 等^[54] 从石斑鱼皮中提取抗氧化肽, 通过交联葡聚糖 G-25 和 RP-HPLC 分离得到 4 个包含 5-12 个氨基酸的肽段, Gly-Leu-Phe-Gly-Pro-Arg (646.367 1 Da)、Gly-Ala-Thr-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Arg (1 107.590 5 Da)、Val-Leu-Gly-Pro-Phe (532.313 0 Da) 和 Gln-Leu-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Val (780.461 4 Da)。其中 Gly-Leu-Phe-Gly-Pro-Arg (646.367 1 Da)

具有最高的抗氧化性 $[(81.41 \pm 0.34) \text{ mmol TE}/\mu\text{mol 肽}]$ 。Zhang 等^[55] 从罗非鱼皮水解产物提取抗氧化肽, 分离出具有较强抗氧化性的肽段, 分别是 Glu-Gly-Leu (317.33 Da) 和 Tyr-Gly-Asp-Glu-Tyr (645.21 Da), 研究了 $\cdot O_2^-$ 、 $\cdot OH$ 和 DPPH $\cdot$ 清除能力, 结果发现, Glu-Gly-Leu (317.33 Da) 的羟基自由基清除能力 (IC_{50} , 4.61 g/mL) 较 Tyr-Gly-Asp-Glu-Tyr (645.21 Da) (IC_{50} , 6.45 g/mL) 高。蔡金秀等^[56] 进行了马面鱼 (*Thamnaconus septentrionalis*) 皮胶原抗氧化肽的分离制备及稳定性研究, 探讨了马面鱼皮的最佳酶解工艺, 得到抗氧化活性较高的 A 组分, 其清除 DPPH $\cdot$ 的 IC_{50} 值为 1.80 mg/mL。根据 UPLC-MS 分析推测 A 组分的氨基酸序列可能是 Gly-Glu-Gly-Ala-Cys-Asn 或 Asn-Glu-Gly-Ala-Cys-Gly。

从以上结果可以看出, 鱼皮来源抗氧化肽分子量大部分小于 1 000 Da, 且大部分含有疏水性氨基酸, 如丙氨酸 (Ala)、亮氨酸 (Leu)、脯氨酸 (Pro)、酪氨酸 (Tyr)、苯丙氨酸 (Phe) 和赖氨酸 (Lys)。鱼皮胶原蛋白中含有丰富的抗氧化活性肽, 是理想的抗氧化活性肽的来源之一, 有望应用在药品、化妆品和食品中。不过, 未来的研究方向应该是鱼皮生物活性肽在体内的实际应用效果。

3.2 ACE抑制活性

血管紧张素转化酶 ACE (EC 3.4.15.1) 是一种金属二肽酶, 它在血压的调整上具有必不可少的作用。ACE 是肾素-血管紧张素系统 (RAS) 的一部分, 可以将血管紧张素 I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) 从 C 末端切除 His-Leu, 转化成血管紧张素 II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), 而血管紧张素 II 可以使小动脉收缩和加速心脏搏动导致血压升高。另一方面, ACE 也是激肽释放酶-激肽系统 (KKS) 的重要组成部分, 它可以催化缓解激肽成为失活片段, 从而加速机体血压升高。因此, ACE 抑制剂可以起到降低血压的作用^[57]。由于传统的抗高血压药物会引起一定的副作用, 因此, 寻找天然安全的具有抗血压活性的生物活性肽成为研究的热点。

ACE 抑制活性与结构的关系尚未确定, 但有研究报道, 大部分 ACE 抑制肽包含脯氨酸、赖氨酸或芳香族氨基酸, 且受肽链 C 端的氨基酸序列影

表 2 鱼皮生物活性肽抗氧化性

Table 2 Anti-oxidative activities of bio-active peptides from fish skin

来源 Species	提取方法 Extraction method	分离、鉴定方法 Separation and identification methods	水解度 Degree of hydrolysis, DH/%	产率 Yield/%	自由基清除率 Free radical scavenging rate				氨基酸序列 Amino acid sequences	文献来源 Reference
					1,1-二苯基-2-三硝基苯胍自由基	羟自由基 Hydroxyl free radical,	2,2'-联氮-二(3-乙基-噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基 2,2'-Azinobis-•OH (IC ₅₀) (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate acid), ABTS	—		
巴沙鱼皮 <i>Pangasius bocourti</i> skin	碱性蛋白酶水解 Alcalase hydrolysis	超滤膜过滤、SDS-PAGE Ultrafiltration membrane filtration, SDS-PAGE	48.06 ± 1.97	—	—	—	(45.98 ± 0.04) μmol TE/g	—	—	[41]
黄鳍金枪鱼皮 Yellowfin Tuna (<i>Thunnus albacares</i>) skin	碱性蛋白酶水解 Alcalase hydrolysis	超滤膜过滤、SDS-PAGE Ultrafiltration membrane filtration, SDS-PAGE	—	52.7	—	—	—	—	—	[52]
石斑鱼皮 Seabass (<i>Lates calcarifer</i>) skin	碱性蛋白酶水解 Alcalase hydrolysis	交联葡聚糖 G-25 和超高效液相色谱 - 电喷雾离子质谱 - 质谱 / 质谱 Sephadex G-25 column, UPLC-ESI-MS/MS	—	59.7	—	—	(2.59 ± 0.04) mmol TE/μmol	Val-Leu-Gly-Pro-Phe (532.313 0 Da)	—	[54]
罗非鱼皮 <i>Tilapia (Oreochromis niloticus)</i> skin	蛋白酶 E、中性蛋白酶 Protease E and multifect neutral	超滤、葡聚糖凝胶柱层析 G-25、反向高效液相色谱、Q-TOF MS/ESI Ultrafiltration, Sephadex G-25 gel filtration column, RP-HPLC and Q-TOF MS/ESI	22.11 ± 0.19	—	—	—	(81.41 ± 0.34) mmol TE/μmol	Gly-Leu-Phe-Gly-Pro-Arg (646.367 1 Da)	—	—
					—	—	(10.47 ± 0.35) mmol TE/μmol	Gly-Ala-Thr-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Arg (1 107.590 5 Da)	—	—
					—	—	(0.5 ± 0.02) mmol TE/μmol	Gln-Leu-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Val (780.461 4 Da)	—	—
					4.61 μg/mL	—	—	Glu-Gly-Leu (317.33 Da)	—	[55]
马面鱼皮 <i>Navodon Septentrio nalis (Thamnamo nus septentrionalis)</i> skin	酸性蛋白酶和 'Amano' 2G Acid Protease and 'Amano' 2G	超滤和凝胶柱层析法, 超高效液相色谱 - 质谱 Ultrafiltration, gel filtration chromatography, and UPLC-MS	—	1.80 mg/mL	—	6.45 μg/mL	—	Tyr-Gly-Asp-Glu-Tyr (645.21 Da)	Asn-Glu-Gly-Ala-Cys-Gly-Gly-Glu-Gly-Ala-Cys-Asn	[56]

注：“—” 为文献未报道。下同

Note: “—” means not reported in literature. The same below

响,尤其是当肽链C端为脯氨酸等疏水性氨基酸时,ACE抑制活性更强^[58]。ACE抑制活性的检测方法主要有分光光度法、RP-HPLC法^[59]、荧光法^[60]和毛细血管电泳法(CE)。其中,分光光度法和毛细血管电泳法主要原理都是ACE通过水解底物马尿酸-组氨酰-亮氨酸(N-hippuryl-His-Leu hydrate, HHL)产生马尿酸(HA)的量来确定ACE抑制率,抑制率大小一般通过半抑制浓度(IC₅₀)表示。RP-HPLC法采用C₁₈柱检测HA的成分,虽然省去了萃取HA的步骤,但需要消耗大量的流动相,对样品量多的情况不适用。

研究报道,鱼皮来源的多肽的ACE抑制活性较强,其活性大小与肽的序列组成密切相关(表3)。Ngo等^[61]从太平洋鲑鱼皮中分离纯化了ACE抑制肽,通过多种蛋白酶的水解比较,发现以胰蛋白酶(trypsin)水解得到肽的ACE抑制活性最高,采用超滤膜分离不同分子量(<1 kD, 1–5 kD, 5–10 kD和>10 kD)的多肽,ACE抑制活性最高是分子量小于1 kD的多肽,进一步分离可得到GASSGMPG(662 Da)和LAYA(436 Da)两个ACE抑制肽,IC₅₀分别是6.9 μmol/L和14.5 μmol/L。Yang等^[6]通过酶解法从阿拉斯加鲑鱼皮中得到具有较高ACE抑制性的生物活性肽,其肽序列为GPLGVP,IC₅₀为108.5 μmol/L。Lee等^[36]通过比较6种蛋白酶水解鳕鱼(*Rajiformes*)皮得到的ACE抑制肽发现,a-胰凝乳蛋白酶水解肽的活性最高,进而经过分离纯化得到两个具有较高ACE抑制活性的肽段,分别是PGPLGLTGP(975.38 Da)和QLGFLGPR(874.45 Da),相应的IC₅₀分别为95 μmol/L和148 μmol/L,表明ACE抑制活性与蛋白酶选择有关,因为不同蛋白酶水解位点不同,从而得到序列不同的肽段,而肽的结构序列及分子量大小决定ACE的抑制活性大小。Ngo等^[62]从鳕科(*Okamejei kenojei*)鱼皮中分离纯化得到两个具有ACE抑制活性的肽,分别是LGPLGHQ(720 Da)和MVGSA PGVL(829 Da),其IC₅₀分别为4.22 μmol/L和3.09 μmol/L;计算机模拟结构位点分析显示,ACE分子对纯化肽几乎暴露出与卡托普利类似的ACE分子结合位点,ACE分子与纯化肽的结合位点有很多残基,包括Trp67、Asn68、Thr71、Asn72和Arg348,表明ACE分子上的纯化

肽可能有助于抑制ACE活性从而预防高血压。

由于人体内肠道与体外的环境条件不同,因此要想知道ACE抑制肽在人体内的实际效果,需首先建立一套模拟体内消化系统的研究方法。一方面,未来的主流研究方向可能是基于电子计算机信息系统辅助建立肠胃消化酶系统模拟研究模型;另一方面,未来ACE抑制肽研究应重点在其对肠胃消化酶的抑制活性以及细胞的可行性等方面^[57]。

3.3 抗菌性

鱼类生活环境一般都有大量致病微生物,它们经常会直接接触潜在的病原体。鱼皮可直接为鱼提供天然的物理屏障保护,也可通过天然免疫因子如抗菌肽(AMPs)作为化学保护屏障来间接保护自己^[63]。AMPs的生物活性在很大程度上与其电荷、螺旋度、疏水性及序列等物理化学结构有关^[64]。

表4列举了分离获得的黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)和鲭鱼(*Katsuwonus pelamis*)皮来源的抗菌肽^[65–66]。据报道,两个甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)相关的抗菌肽(YFGAP和SJGAP)具有同时对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的广谱性,对两种细菌的MECs值分别达到1.2–17.0 μg/mL和3.1–12.0 μg/mL。此外,该活性肽的抗菌活性还包括嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)和副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)3种鱼类病原体。Cole等^[26]从比目鱼中分离鉴定得到了具有较强抗菌性的活性肽,其结构包含25个氨基酸残基,氨基酸序列为GWGSFFKKAHVGVGHVGAALTHY。Ennaas等^[67]纯化和鉴定了4种来自马鲛鱼(*Scomberomorus niphonius*)下脚料水解物的抗菌肽,通过RP-HPLC对4种抗菌肽的序列进行鉴定,分别是SIFIQRFTT(P4)、RKSGDPLGR(P8.1)、AKPGDGAGSGPR(P8.2)和GLPGPLGPAGPK(P11)。在浓度为200 μg/mL时,P8.1、P8.2和P11只显示部分抑菌性,而P4则可同时抗革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。Ennaas^[68]及其团队发现,合成的鱼皮胶原蛋白肽在1.88 mmol/L浓度时,可以抑制金黄色葡萄球菌的生长,原因可能是由于这些肽的C端含有带有正电荷的赖氨酸(Lys)的缘故。

表 3 鱼皮生物活性肽 ACE 抑制性

Table 3 ACE inhibitory activities of bioactive peptides from fish skin							
来源 Species	提取方法 Extraction method	分离、鉴定方法 Separation and identification methods	水解度 Degree of hydrolysis, DH/%	产率 Yield/%	半抑制浓度 IC ₅₀ / (μmol·L ⁻¹)	氨基酸序列 Amino acid sequences	文献来源 Reference
太平洋鲑鱼皮 Pacific cord fish (<i>Gadus macrocephalus</i>) skin	酶法 Enzyme method	超滤、阴离子交换层析、 反向高效液相色谱、质谱 Ultrafiltration, anion exchange chromatography, RP-HPLC and MS	—	—	6.9	GASSGMPG (662 Da)	[61]
阿拉斯加鲑鱼 皮 Alaska pollack skins	酶法 Enzyme method	Sephadex G-25 凝胶柱层析、 反向高效液相色谱和高效液 相色谱 - 四极杆飞行时间质 谱 Sephadex G-25 gel filtration chromatography, RP-HPLC and HPLC-Q-TOF-MS	—	—	14.5 108.5	LAYA (436 Da) GPLGVP (538.31 Da)	[6]
鳕鱼皮 Skate (<i>Rajiformes</i>) skin	酶法 Enzyme method	Sephadex G-25 凝胶柱层析、 反向高效液相色谱、Q-TOF MS/ESI Sephadex G-25 gel filtration chromatography, RP- HPLC and Q-TOF MS/ESI	—	—	95	PGPLGLTGP (975.38 Da)	[36]
鳕科鱼皮 <i>Okamejei kenojei</i> skin	碱性蛋白酶水解 Alcalase hydrolysis	超滤膜过滤、Superdex™ Peptide 10/300 GL 凝胶柱层 析 Ultrafiltration, Superdex™ Peptide 10/300 GL gel filtration chromatography	—	—	148 4.22	QLGFLGPR (874.45 Da) LGPLGHQ (720 Da) [62]	
					3.09	MVGSAPGVL (829 Da)	

综上可知，部分鱼皮来源的多肽具有一定的抗菌性，其抗菌性强弱与肽的序列、结构、大小密切相关，将来有望应用在食品保藏和化妆品生产等领域。

3.4 其他生物活性

鱼皮来源生物活性肽还具有抗癌性^[69]、抗高血糖性^[70]、免疫调节性^[71]、神经保护活性^[72]等其他功能活性（表 5）。在各种胶原蛋白水解物中发现，鲑鱼（*Oncorhynchus keta*）皮胶原蛋白肽（MCPs）对室息围产期（PA）雌鼠具有神经保护作用。行为测试显示，MCPs 通过减少 PA 雌鼠大脑中氧化损伤和抑制乙酰胆碱酯酶（acetylcholinesterase, AChE）活性，增加海马磷酸化 c-AMP 反应元件结合蛋白（p-CREB）

和脑源性神经营养因子（brain derived neurotrophic factor, BDNF）表达,促进幼鼠的长期学习和记忆^[73]。Sasaoka 等^[74]报道了鲟鱼（*Acipenser sinensis*）皮胶原蛋白水解物存在降血糖作用，通过交联葡聚糖 G-25、RP-HPLC 分离鉴定及肽序列分析得知，每一个降血糖肽序列均为 Gly-X-Y 结构（X、Y 为可选择氨基酸残基）。Sae-Leaw 等^[75]发现石斑鱼皮水解物具有免疫调节作用，表现为脂多糖刺激 RAW 264.7 巨噬细胞中产生的白细胞介素 -6（IL-6）和 IL-1β 显著降低。Lu 等^[76]从鳕鱼（*Gadus Macrocephalus*）皮中酶解得到的鱼皮胶原蛋白肽具有抗光老化作用，通过分离纯化得到两种具有较强基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMP-1）抑制活性的肽段，

表 4 鱼皮生物活性肽抗菌性

Table 4 Antimicrobial activities of bioactive peptides from fish skin									
来源 Species	提取方法 Extraction method	分离、鉴定方法 Separation and identification methods	水解度 Degree of hydrolysis, DH/%	产率 Yield/%	MECs/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	MIC/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	微生物 Microorganism	氨基酸序列 Amino acid sequences	文献来源 Reference
黄鳍金枪鱼 Yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>) skin	酶法 Enzyme method	反向高效液相色谱、激光去电离飞行时间质谱法 RP-HPLC, MALDI-TOF	—	—	1.2	—	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	YFGAP	[65]
					—	—	白念珠菌 <i>C. albicans</i>		
					3	—	大肠杆菌 <i>E. coli</i>		
鲣鱼鱼皮 Skipjack tuna (<i>Katsuwonus pelamis</i>) skin	酶法 Enzyme method	反向高效液相色谱、激光去电离飞行时间质谱分 RP-HPLC, MALDI-TOF	—	—	3	—	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	SJGAP	[66]
					16	—	白念珠菌 <i>C. albicans</i>		
					2.7	—	大肠杆菌 <i>E. coli</i>		
冬季比目鱼 Winter flounder (<i>Pleuronectes americanus</i>) skin	酸法 Acid-extraction method	G-50 分子排阻色谱、高效液相色谱 G-50 gel filtration chromatography and HPLC	—	—	—	1.1–2.2*	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	GWGSFFKKAHH VGKHVGKAALTHY	[26]
					—	—	白念珠菌 <i>C. albicans</i>		
					—	2.2–3.3*	大肠杆菌 <i>E. coli</i>		

注：* 表示 U/ μL
Note: * indicates U/ μL

GEIGPSGGRGKPGKDG DAGPK 和 GFSGLDGAKGD, 其 MMP-1 抑制率分别为 16% 和 15%。此外, 由于每种水解物都是由不同的多肽混合组成, 某些生物活性肽会表现出多种生物活性, 而非仅仅具有一种功能活性^[77]。

4 总结与展望

通过酶法、化学法及发酵法等进行提取, 进而利用超滤、HPLC、质谱等对提取物进行分离纯化及鉴定, 可以获得广泛功能的鱼皮来源生物活性肽, 如抗氧化性、抗血压性、抗菌性和免疫调节性等。目前, 围绕鱼皮来源生物活性肽功能活性的研究主

要包括以下 3 个方面:(1) 对不同种类鱼皮来源活性肽进行工艺提取研究, 并优化提取效率和产物质量;(2) 分离鉴定方法的创新;(3) 活性肽的结构与功能活性如抗氧化性、ACE 抑制性及抗菌性等作用的关联机制研究。

然而, 目前鱼皮生物活性肽提取方法单一, 提取效率和分离纯化效率较低, 获得的产物成分仍然较为复杂, 导致其生物活性较低。在功能活性研究方面, 其受试对象主要仅集中在人体外及动物体内, 大部分活性功能在人体内的真实生物活性未得到充分验证, 如抗血压活性急需验证体外 ACE 抑制活性

表 5 鱼皮生物活性肽的其他活性

Table 5 Other activities of peptides from fish skin

功能活性 Functional activity	来源 Species	提取方法 Extraction method	分离、鉴定方法 Separation and identification methods	水解度 Degree of hydrolysis, DH/%	产率 Yield/%	氨基酸序列 Amino acid sequences	文献来源 Reference
神经保护 Neuroprotective activity	鲑鱼皮 Chum Salmon (<i>Oncorhynchus keta</i>) skin	酶法 Enzyme method	—	—	—	—	[73]
抗高血糖 Antihyperglycemic	鲟鱼皮等 Sturgeon (<i>Acipenser sinensis</i>) skin, etc	酶法 Enzyme method	交联葡聚糖 G-25、反向高效液相色谱 Gel filtration chromatography G-25, RP-HPLC	—	11.9	Gly-X-Y (X、Y 为可选的氨基酸残基) Gly-X-Y (X、Y is an optional amino acid residue)	[74]
免疫调节性 Immunomodulation activity	石斑鱼皮 Seabass (<i>Lates calcarifer</i>) skin	酶法 Enzyme method	—	—	—	—	[75]
基质金属蛋白酶抑制活性 Matrix metalloproteinases, MMP-1 inhibitory activity	鳕鱼皮 Pacific cod (<i>Gadus Macrocephalus</i>) skin	酶法 Enzyme method	阴离子交换层析、反向高效液相色谱、高效液相色谱-电喷雾串联质谱法 Anion exchange chromatography, RP-HPLC, HPLC-LC-ESI-MS/MS	—	—	EIGPSCGRGKPGKDG DAG- PK, GFSLDGA KGD	[76]

与人体内实际抗血压效果；功能类型方面多集中在抗氧化性、抗血压性和抗菌性等，对其他方面的功能如免疫调节性、神经保护作用、抗癌性等研究较少。

综上所述，今后鱼皮生物活性肽研究应着重在如下方面：探索高效安全的提取方法，提高提取效率；开发安全高效的发酵菌株；利用现代化信息技术，开发高效、精准的分离、纯化及鉴定技术，提高活性肽的活性和利用率；开展功能活性人体内实验，探明活性肽的结构与活性关联机制；抗氧化肽的潜在免疫调节活性，即抗炎、抗过敏和调节细胞的信号通路等值得进一步关注。另外，当前关注较少的生物活性如免疫调节性、神经保护作用、抗癌性等方面值得进一步细致全面地探索，如对阿尔茨海默症中观察到的β相关神经毒素性疾病的神经保护作用等。

参 考 文 献

[1] Zhang YQ, Tu D, Shen Q, et al. Fish scale valorization by hydrothermal pretreatment followed by enzymatic hydrolysis for gelatin hydro-

lysate production [J] . *Molecules*, 2019, 24 (16) : 2998.

[2] 杨敏, 吴兆明, 李晶晶, 等. 鱼皮胶原蛋白寡肽的生物活性及应用研究进展 [J] . *食品科学*, 2018, 39 (5) : 304-310.

Yang M, Wu ZM, Li JJ, et al. Advances in biological activity and application of fish skin collagen-derived oligopeptides [J] . *Food Sci*, 2018, 39 (5) : 304-310.

[3] Nirmal NP, Santivarangkna C, Rajput MS, et al. Valorization of fish byproducts: sources to end-product applications of bioactive protein hydrolysate [J] . *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2022, 21 (2) : 1803-1842.

[4] Abuine R, Rathnayake AU, Byun HG. Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates [J] . *Fish Aquatic Sci*, 2019, 22 (1) : 10.

[5] Razali A, Amin AM, Sarbon NM. Antioxidant activity and functional properties of fractionated cobia skin gelatin hydrolysate at different molecular weight [J] . *Int Food Res J*, 2015, 22: 651-660.

[6] Yang GL, Qin S, Li WJ. Purification and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide derived from Alaska pollack skins [J] . *J Food Sci*, 2021, 86 (6) : 2457-2467.

- [7] Mahmoodani F, Ghassem M, Babji AS, et al. ACE inhibitory activity of *Pangasius catfish* (*Pangasius sutchi*) skin and bone gelatin hydrolysate [J]. J Food Sci Technol, 2014, 51 (9): 1847-1856.
- [8] 缪文华. 一种马面鲷鱼皮抑菌肽的制备方法: CN108315377A [P]. 2018-07-24.
- Miao WH. Preparation method of *thamnaconus multiradiatus* fish skin bacterium-inhibiting peptide: CN108315377A [P]. 2018-07-24.
- [9] 余方苗, 董晓泽, 何康, 等. 一种罗非鱼鱼皮免疫调节肽的制备方法: CN109439713B [P]. 2021-06-18.
- Yu FM, Dong XZ, He K, et al. Method for preparing tilapia mossambica skin immunomodulating peptide: CN109439713B [P]. 2021-06-18.
- [10] Baehaki A, Suhartono M, Sukarno, et al. Collagen peptides from fish skin with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitor and cancer antiproliferative activity [J]. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2016, 7 (1): 1994-2000.
- [11] Hajirostamloo B. Bioactive component in milk and dairy product [J]. World Acad Sci Eng Technol, 2010, 72: 162-166.
- [12] 李敏雄, 郭斌, 刘飞, 等. 罗非鱼皮胶原蛋白肽制备的工艺优化 [J]. 现代食品科技, 2018, 34 (7): 205-212.
- Li MX, Guo B, Liu F, et al. Study on the preparation of collagen peptide from *Tilapia* skin [J]. Mod Food Sci Technol, 2018, 34 (7): 205-212.
- [13] 吕婷. 酶法提取鱼皮胶原蛋白活性短肽的研究 [D]. 大连: 大连工业大学, 2009.
- Lyu T. Study on enzymatic extraction of cod collagen for active peptide [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2009.
- [14] 刘培勇. 鲟鱼皮胶原蛋白肽的制备、纯化工艺及理化性质研究 [D]. 武汉: 武汉工业学院, 2012.
- Liu PY. Research on process of preparation, purification and physicochemical properties for collagen peptides of sturgeon skin [D]. Wuhan: Wuhan Institute of Technology, 2012.
- [15] 余楠楠, 陈琛. 生物活性肽功能及制备技术研究进展 [J]. 中国酿造, 2018, 37 (9): 17-21.
- Yu NN, Chen C. Research progress of bioactive peptide function and preparation technology [J]. China Brew, 2018, 37 (9): 17-21.
- [16] Martosuyono P, Fawzya YN, Patantis G, et al. Enzymatic production of fish protein hydrolysates in A pilot plant scale [J]. Squalen Bull Marine Fisheries Postharvest Biotech, 2019, 14 (2): 85-92.
- [17] Ketnawa S, Benjakul S, Martínez-Alvarez O, et al. Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: Bioactivity and stability [J]. Food Chem, 2017, 215: 383-390.
- [18] Cai LY, Wu XS, Zhang YH, et al. Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin [J]. J Funct Foods, 2015, 16: 234-242.
- [19] Halim NRA, Yusof HM, Sarbon NM. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: a comprehensive review [J]. Trends Food Sci Technol, 2016, 51: 24-33.
- [20] 秦倩倩, 吴琼英, 贾俊强. 酶法制备草鱼皮胶原蛋白抗氧化肽的工艺优化 [J]. 江苏科技大学学报: 自然科学版, 2020, 34 (1): 90-97.
- Qin QQ, Wu QY, Jia JQ. Optimization of technology for preparation of antioxidant peptides from collagen of grass carp skin by enzymatic hydrolysis [J]. J Jiangsu Univ Sci Technol Nat Sci Ed, 2020, 34 (1): 90-97.
- [21] Himaya SWA, Ngo DH, Ryu B, et al. An active peptide purified from gastrointestinal enzyme hydrolysate of Pacific cod skin gelatin attenuates angiotensin-I converting enzyme (ACE) activity and cellular oxidative stress [J]. Food Chem, 2012, 132 (4): 1872-1882.
- [22] Roslan J. Optimization and enzymatic hydrolysis of Tilapia by-product and fractionation of protein hydrolysate using membrane ultrafiltration [D]. Malaysia: Universiti Putra Malaysia, 2016.
- [23] 靳书杰. 日本黄姑鱼皮胶原蛋白理化特性及其胶原蛋白肽活性研究 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019.
- Jin SJ. Study on the physicochemical properties of collagen and biological activity of collagen peptides from giant croaker (*Nibea japonica*) [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019.
- [24] Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*) [J]. Food Chem, 2005, 93 (3): 475-484.
- [25] 张琦. 生物活性肽制备的研究 [J]. 畜牧兽医杂志, 2003, 22 (3): 20-21.
- Zhang Q. Study on preparation of bioactive peptides [J]. J Animal Sci Vet Med, 2003, 22 (3): 20-21.

- [26] Cole AM, Weis P, Diamond G. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272 (18): 12008-12013.
- [27] Tavano OL. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology [J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2013, 90: 1-11.
- [28] Chai KF, Voo AYH, Chen WN. Bioactive peptides from food fermentation: a comprehensive review of their sources, bioactivities, applications, and future development [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2020, 19 (6): 3825-3885.
- [29] 范吉钊, 柯义强, 刘红海, 等. 发酵法制备生物活性肽的研究进展 [J]. *安徽农学通报*, 2020, 26 (23): 19-23.
- Fan JY, Ke YQ, Liu HH, et al. Research progress in the preparation of bioactive peptides by fermentation [J]. *Anhui Agric Sci Bull*, 2020, 26 (23): 19-23.
- [30] Jemil I, Jridi M, Nasri R, et al. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26 [J]. *Process Biochem*, 2014, 49 (6): 963-972.
- [31] 吴海滨. 利用米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 发酵鳕鱼皮制备生物活性肽的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- Wu HB. Studies on the production of active peptides from cod fish skin fermentation by *Aspergillus oryzae* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.
- [32] 邢瀚文, 韩玮, 施文正, 等. 固态发酵法制备罗非鱼皮胶原蛋白肽及其抗氧化活性研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46 (19): 104-110.
- Xing HW, Han W, Shi WZ, et al. *Tilapia* skin collagen peptides prepared by solid-state fermentation and its antioxidant activity [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46 (19): 104-110.
- [33] 谢博, 傅红, 杨方. 生物活性肽的制备、分离纯化、鉴定以及构效关系研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2021, 42 (5): 383-391.
- Xie B, Fu H, Yang F. Research progress on preparation, purification, identification and structure-activity relationship of bioactive peptides [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42 (5): 383-391.
- [34] Blanco M, Vázquez JA, Pérez-Martín RI, et al. Hydrolysates of fish skin collagen: an opportunity for valorizing fish industry byproducts [J]. *Mar Drugs*, 2017, 15 (5): 131.
- [35] Sabeena Farvin KH, Andersen LL, Otte J, et al. Antioxidant activity of cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: Fractionation and characterisation of peptide fractions [J]. *Food Chem*, 2016, 204: 409-419.
- [36] Lee JK, Jeon JK, Byun HG. Effect of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide purified from skate skin hydrolysate [J]. *Food Chem*, 2011, 125 (2): 495-499.
- [37] Sampath Kumar NS, Nazeer RA, Jaiganesh R. Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*) [J]. *Amino Acids*, 2012, 42 (5): 1641-1649.
- [38] Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*) [J]. *Food Chem*, 2004, 85 (1): 81-89.
- [39] Bai CJ, Wei QF, Ren XL. Selective extraction of collagen peptides with high purity from cod skins by deep eutectic solvents [J]. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2017, 5 (8): 7220-7227.
- [40] 李璇, 杜梦霞, 王富龙, 等. 生物活性肽的制备及分离纯化方法研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38 (20): 336-340, 346.
- Li X, Du MX, Wang FL, et al. Research progress in preparation and purification of bioactive peptides [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2017, 38 (20): 336-340, 346.
- [41] Azizah N, Ochiai Y, Nurilmala M. Collagen peptides from *Pangasius* fish skin as antioxidants [J]. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*, 2020, 404 (1): 012055.
- [42] 牛瑞, 于建生. 鳕鱼多肽的抗氧化活性及其分离纯化 [J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29 (4): 562-566.
- Niu R, Yu JS. Antioxidant activity and purification of pollock peptides [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2010, 29 (4): 562-566.
- [43] Senphan T, Benjakul S. Antioxidative activities of hydrolysates from seabass skin prepared using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp [J]. *J Funct Foods*, 2014, 6: 147-156.
- [44] 李晓杰, 李富强, 朱丽萍, 等. 生物活性肽的制备与鉴定进展 [J]. *齐鲁工业大学学报*, 2021, 35 (1): 23-28.
- Li XJ, Li FQ, Zhu LP, et al. Progress of preparation and identification of bioactive peptides [J]. *J Qilu Univ Technol*, 2021, 35 (1): 23-28.
- [45] Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. Antioxidant activity of proteins

- and peptides [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2008, 48 (5): 430-441.
- [46] Udenigwe CC, Aluko RE. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits [J]. J Food Sci, 2012, 77 (1): R11-R24.
- [47] Hayes M, Flower D. Bioactive peptides from marine processing byproducts [M] //Bioactive Compounds from Marine Foods. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2013: 57-71.
- [48] 郭洪辉, 张怡评, 洪专, 等. 河豚鱼皮胶原寡肽螯合锌的体内体外抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42 (5): 66-71.
- Guo HH, Zhang YP, Hong Z, et al. Study on *in vivo* and *in vitro* antioxidant activity of collagen oligopeptide chelated zinc from puffer skin [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42 (5): 66-71.
- [49] Chen XL, Peng M, Li J, et al. Preparation and functional evaluation of collagen oligopeptide-rich hydrolysate from fish skin with the serine collagenolytic protease from *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 15716.
- [50] Nam PV, Van Hoa N, Anh TTL, et al. Towards zero-waste recovery of bioactive compounds from catfish (*Pangasius hypophthalmus*) by-products using an enzymatic method [J]. Waste Biomass Valor, 2020, 11 (8): 4195-4206.
- [51] Theodore AE, Raghavan S, Kristinsson HG. Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56 (16): 7459-7466.
- [52] Nurilmala M, Hizbullah HH, Karnia E, et al. Characterization and antioxidant activity of collagen, gelatin, and the derived peptides from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin [J]. Mar Drugs, 2020, 18 (2): 98.
- [53] Nurilmala M, Fauzi S, Mayasari D, et al. Collagen extraction from yellowfin tuna (*thunnus albacares*) skin and its antioxidant activity [J]. J Teknologi, 2019, 81 (2): 141-149.
- [54] Sae-Leaw T, Karnjanapratum S, O' Callaghan YC, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from gelatin hydrolysate of seabass skin [J]. J Food Biochem, 2017, 41 (3): e12350.
- [55] Zhang YF, Duan X, Zhuang YL. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin [J]. Peptides, 2012, 38 (1): 13-21.
- [56] 蔡金秀, 夏姗姗, 马佳雯, 等. 马面鱼皮胶原抗氧化肽的分离制备及稳定性研究 [J]. 核农学报, 2021, 35 (11): 2569-2577.
- Cai JX, Xia SS, Ma JW, et al. Isolation, preparation and stability of collagen antioxidant peptides from the skin of navodon septentrionalis [J]. J Nucl Agric Sci, 2021, 35 (11): 2569-2577.
- [57] 游子娟. 重组米曲霉中性蛋白酶 (rNpI) 在蛋白质水解中的应用研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2015.
- You ZJ. Research on the application of asperigillus oryzae recombinant neutral protease (rNpI) in protein hydrolysis [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015.
- [58] Ghassem M, Arihara K, Babji AS, et al. Purification and identification of ACE inhibitory peptides from Haruan (*Channa striatus*) myofibrillar protein hydrolysate using HPLC-ESI-TOF MS/MS [J]. Food Chem, 2011, 129 (4): 1770-1777.
- [59] Yuan L, Sun LP, Zhuang YL. Preparation and identification of novel inhibitory angiotensin-I-converting enzyme peptides from tilapia skin gelatin hydrolysates: inhibition kinetics and molecular docking [J]. Food Funct, 2018, 9 (10): 5251-5259.
- [60] Guo LD, Harnedy PA, Zhang L, et al. *In vitro* assessment of the multifunctional bioactive potential of Alaska pollock skin collagen following simulated gastrointestinal digestion [J]. J Sci Food Agric, 2015, 95 (7): 1514-1520.
- [61] Ngo DH, Vo TS, Ryu B, et al. Angiotensin- I- converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Pacific cod skin gelatin using ultrafiltration membranes [J]. Process Biochem, 2016, 51 (10): 1622-1628.
- [62] Ngo DH, Kang KH, Ryu B, et al. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from antihypertensive skate (*Okamejei kenojei*) skin gelatin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats [J]. Food Chem, 2015, 174: 37-43.
- [63] Rydlo T, Miltz J, Mor A. Eukaryotic antimicrobial peptides: promises and premises in food safety [J]. J Food Sci, 2006, 71 (9): R125-R135.
- [64] Ahmed TAE, Hammami R. Recent insights into structure-function relationships of antimicrobial peptides [J]. J Food Biochem, 2019, 43 (1): e12546.
- [65] Seo JK, Lee MJ, Go HJ, et al. Purification and characterization of YFGAP, a GAPDH-related novel antimicrobial peptide, from the

- skin of yellowfin tuna, *Thunnus albacares* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 33 (4): 743-752.
- [66] Seo JK, Lee MJ, Go HJ, et al. Antimicrobial function of the GAPDH-related antimicrobial peptide in the skin of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 36 (2): 571-581.
- [67] Ennaas N, Hammami R, Beaulieu L, et al. Purification and characterization of four antibacterial peptides from protamex hydrolysate of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) by-products [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 462 (3): 195-200.
- [68] Ennaas N, Hammami R, Gomaa A, et al. Collagencin, an antibacterial peptide from fish collagen: activity, structure and interaction dynamics with membrane [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473 (2): 642-647.
- [69] Alemán A, Pérez-Santín E, Bordenave-Juchereau S, et al. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity [J]. *Food Res Int*, 2011, 44 (4): 1044-1051.
- [70] Wang TY, Hsieh CH, Hung CC, et al. Fish skin gelatin hydrolysates as dipeptidyl peptidase IV inhibitors and glucagon-like peptide-1 stimulators improve glycaemic control in diabetic rats: a comparison between warm- and cold-water fish [J]. *J Funct Foods*, 2015, 19: 330-340.
- [71] Duarte J, Vinderola G, Ritz B, et al. Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation [J]. *Immunobiology*, 2006, 211 (5): 341-350.
- [72] Pei XR, Yang RY, Zhang ZF, et al. Marine collagen peptide isolated from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) skin facilitates learning and memory in aged C57BL/6J mice [J]. *Food Chem*, 2010, 118 (2): 333-340.
- [73] Xu LL, Dong WH, Zhao J, et al. Effect of marine collagen peptides on physiological and neurobehavioral development of male rats with perinatal asphyxia [J]. *Mar Drugs*, 2015, 13 (6): 3653-3671.
- [74] Sasaoka Y, Kishimura H, Adachi S, et al. Collagen peptides derived from the triple helical region of sturgeon collagen improve glucose tolerance in normal mice [J]. *J Food Biochem*, 2018, 42 (2): e12478.
- [75] Sae-leaw T, O'Callaghan YC, Benjakul S, et al. Antioxidant, immunomodulatory and antiproliferative effects of gelatin hydrolysates from seabass (*Lates calcarifer*) skins [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2016, 51 (7): 1545-1551.
- [76] Lu JH, Hou H, Fan Y, et al. Identification of MMP-1 inhibitory peptides from cod skin gelatin hydrolysates and the inhibition mechanism by MAPK signaling pathway [J]. *J Funct Foods*, 2017, 33: 251-260.
- [77] Nasri M. Protein hydrolysates and biopeptides: production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A review [J]. *Adv Food Nutr Res*, 2017, 81: 109-159.

(责任编辑 高洁)