

罗非鱼皮胶原肽的酪氨酸酶抑制活性与铜离子结合活性研究

宋玉琼^{1,2}, 胡 晓^{2,3}, 相 欢^{2,3}, 陈胜军^{2,3}, 李来好^{2,3}, 杨贤庆^{2,3}, 吴燕燕^{2,3}, 马海霞^{2,3}

1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所/农业农村部水产品加工重点实验室, 广东 广州 510300

3. 大连工业大学/海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁 大连 116034

摘要: 为探明罗非鱼 (*Oreochromis*) 鱼皮胶原蛋白肽能否有效抑制黑色素的生成, 采用酶解法制备出罗非鱼皮酪氨酸酶抑制肽 (Tilapia skin tyrosinase inhibitory peptides, TSTIP), 并开展其酪氨酸酶 (Tyrosinase, TYR) 抑制活性与铜离子 (Cu^{2+}) 结合活性的相关性研究。结果显示, 罗非鱼皮经碱性蛋白酶酶解 4 h 后的产物具有最高的 TYR 抑制活性和 Cu^{2+} 结合活性, 且两者呈极显著正相关 ($R=0.856$)。荧光光谱分析显示, TSTIP 与 TYR 或 Cu^{2+} 结合后其内源荧光吸收强度的下降趋势一致, 同时紫外吸收增强, 且最大吸收波长发生红移。傅里叶变换红外光谱分析显示, TYR 与 Cu^{2+} 主要通过羰基及氨基与 TSTIP 结合。圆二色谱分析显示, 两种结合物中 β -转角及无规则卷曲含量相对减少, β -折叠含量相对增多, 该现象在 TSTIP- Cu^{2+} 结合物中更加明显。结果表明, TSTIP 结合 TYR 产生的结构变化与结合 Cu^{2+} 相似, TSTIP 可通过整合 TYR 的活性中心 Cu^{2+} 来抑制其活性。

关键词: 罗非鱼皮; 胶原蛋白肽; 酪氨酸酶; 肽- Cu^{2+} 结合物; 结构特征

中图分类号: TS 254.1

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Study on tyrosinase inhibitory activity and Cu^{2+} binding activity of tilapia skin peptides

SONG Yuqiong^{1,2}, HU Xiao^{2,3}, XIANG Huan^{2,3}, CHEN Shengjun^{2,3}, LI Laihao^{2,3}, YANG Xianqing^{2,3}, WU Yanyan^{2,3}, MA Haixia^{2,3}

1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300, China

3. Dalian Polytechnic University/Collaborative Innovation Center of Provincial and Ministerial Co-Construction for Marine Food Deep Processing, Dalian 116034, China

Abstract: To find out whether the tilapia (*Oreochromis*) skin collagen peptides can effectively inhibit melanin production, we used enzymatic method to prepare the tilapia skin tyrosinase (TYR) inhibitory peptides (TSTIP) and studied the relevance between TYR inhibitory activity and Cu^{2+} binding activity. The results show that the product of tilapia skin hydrolyzed by alcalase for 4 h exhibited both the highest TYR inhibitory activity and Cu^{2+} binding activity, which were significantly positively cor-

收稿日期: 2022-04-07; 修回日期: 2022-06-06

基金项目: 广东省重点领域研发计划资助项目 (2020B020226005); 国家特色淡水鱼产业技术体系 (CARS-46); 广东省基础与应用基础研究基金 (2019A151011588); 茂名市引进创新创业团队项目 (200201095834980); 广东省企业科技特派员专项 (GDKTP2021035300); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2020TD69); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2021SD06)

作者简介: 宋玉琼 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工与质量安全、食品生物技术。E-mail: SYQ1010730529@163.com

通信作者: 胡 晓 (1981—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为水产品加工与质量安全、食品生物技术。E-mail: hnhuxiao@163.com

related ($R=0.856$). When TSTIP was bound to Cu^{2+} or tyrosinase, the intrinsic fluorescence absorption had a consistent decreasing trend, but the UV absorption increased and the maximum absorption wavelength had a red shift. For FTIR results, TYR and Cu^{2+} bound to TSTIP mainly by carbonyl and amino groups. Circular dichroism shows that the β -turn and random curl contents of the two conjugates decreased relatively, while the β -fold content increased relatively, which was more obvious for TSTIP- Cu^{2+} conjugate. In conclusion, the structural change of TSTIP-TYR is similar with that of TSTIP- Cu^{2+} conjugate, which indicates that TSTIP can inhibit TYR's activity by binding to its Cu^{2+} active site.

Keywords: Tilapia skin; Collagen peptides; Tyrosinase; Peptide- Cu^{2+} conjugates; Structural characteristics

罗非鱼 (*Oreochromis*), 隶属于硬骨鱼纲、鲈形目、丽鱼科, 因具有食性杂、生长快、易繁殖的特点已成为全球主要养殖鱼类^[1]。罗非鱼富含蛋白质, 氨基酸组成较均衡, 大部分氨基酸评分均大于1, 属于高蛋白优质鱼类^[2]。2020年我国罗非鱼加工总量为 54.95×10^4 t, 位淡水产品之首^[3]。罗非鱼加工以冷冻鱼片为主, 加工过程中产生的大量副产物如鱼皮、鱼骨等主要用于生产低值饲料鱼粉, 存在蛋白利用率低及环境污染等问题^[4-5]。研究表明, 鱼皮中的胶原蛋白约占总蛋白含量的25%, 且含有人体必需的8种氨基酸, 具有较高的利用价值, 可用来提取功能活性成分^[6-8]。近年来, 随着对水产胶原蛋白活性肽研究的逐步深入, 罗非鱼皮作为廉价易得的优质原料, 具有广阔的研发前景。

黑色素是决定人体肤色的关键因子, 可将有害的紫外线转化成热能以保护皮肤^[9]。酪氨酸酶 (Tyrosinase, TYR) 是黑色素合成的限速酶, 可被活性氧激活, 活性过高则可引起黑色素非正常沉积进而引发痤疮、黄褐斑、黑素病、脂溢性角化病等皮肤疾病^[10]。大量研究表明, 抑制 TYR 活性可有效减少黑色素生成^[11-13]。此外, TYR 在黑色素合成过程中催化产生的高活性多巴醌参与体内氧化应激, 而氧化应激被认为与神经退行性疾病帕金森症的激活有关^[14]。TYR 的活性中心是以2个铜离子 (Cu^{2+}) 为催化位点的疏水空腔, 每个 Cu^{2+} 分别与3个组氨酸形成氢键^[15], 且 Cu^{2+} 之间以氧桥连接, TYR 的活性取决于 Cu^{2+} 多种氧化形式的相互转化。若 Cu^{2+} 被结合而无法进行氧原子的转移, 导致其无法发挥催化作用, TYR 的活性将被抑制。因此, 活性肽有可能作为底物类似物进入 TYR 的疏水口袋, 占据底物结合位点, 并通过与 Cu^{2+} 形成相互作用力, 降低 Cu^{2+} 催化活性, 进而抑制 TYR 的活性^[16]。

目前, 国内外关于活性肽对 TYR 的抑制机制已有较多报道, 主要围绕肽链氨基酸组成对 TYR

抑制活性的影响, 而探讨活性肽与 TYR 中 Cu^{2+} 活性中心结合的研究鲜见报道, 尚无有关罗非鱼蛋白来源 TYR 抑制肽的研究^[17-18]。因此, 本研究以罗非鱼皮为原料制备酪氨酸酶抑制肽 (Tilapia skin tyrosinase inhibitory peptides, TSTIP), 并通过结合体系验证 TSTIP 与 TYR 中 Cu^{2+} 活性中心的相互作用, 以期对酪氨酸酶抑制剂在美容、食品、医学等领域的研究以及提高罗非鱼产业的经济效益提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

罗非鱼皮购于广东百维生物科技有限公司; 碱性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶 (合肥博美生物科技有限公司); 还原型谷胱甘肽 (Mw 307.3)、杆菌肽 (相对分子质量 MW 6511.44) (广州市齐云生物技术有限公司); 细胞色素 C (MW 12 400)、抑肽酶 (MW 1 422.69)、L-酪氨酸、磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (上海麦克林生化科技有限公司); 氧化型谷胱甘肽 (Mw 612.63)、L-多巴、蘑菇酪氨酸酶 (T3824) (美国 Sigma 公司); 硫酸铜 (CuSO_4) (天津市百世化工有限公司); 乙腈 (CH_3CN)、三氟乙酸 ($\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$) (国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

凯氏定氮仪 (Kjeltec™ 2300, 丹麦 FOSS 公司); 吸光酶标仪 (Sunrise-basic Tacan, 瑞士 TECAN 公司); 荧光分光光度计 (Cary Eclipse, 美国 VARIAN 公司); 紫外可见分光光度计 (UV 2550)、红外光谱仪 (IRAffinity-1)、高效液相色谱仪 (LC-20AD, 日本 SHIMADZU 公司); 圆二色谱仪 (Chirascan, 英国 Applied Photophysics 公司); 电感耦合等离子质谱 (Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS, Agilent 7900, 美国 Agilent 公司)。

1.3 方法

1.3.1 罗非鱼皮胶原蛋白水解物的制备

参照本课题组前期研究方法^[19]并稍作修改。罗非鱼皮解冻洗净,按 1:10 ($m:V$) 加入氢氧化钠 (NaOH) 溶液 ($0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 搅拌 30 min 后流水洗至中性; 再按 1:10 ($m:V$) 加入氯化氢 (HCl) 溶液 ($0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 浸泡 10 min 后流水洗至中性, 沥干打浆, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴加热 5 h, $10\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后取上清液, 利用凯氏定氮法 (GB 5009.5—2016) 测定胶液中的蛋白含量。

取约 100 g 的罗非鱼皮胶液, 加入质量分数为 2% (按胶液蛋白含量为基底) 的蛋白酶, 在各自最优的酶解条件 (表 1) 下分别酶解 1~8 h, 期间每隔 1 h 调节 pH, 酶解完成后沸水浴加热 15 min 灭酶, 冷却后抽滤, $10\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液冷冻干燥即为罗非鱼皮蛋白肽。

表 1 不同蛋白酶的酶解条件
Table 1 Enzymatic conditions for different proteases

蛋白酶 Protease	酶解条件 Hydrolysis condition				
	酶活力 Enzymatic activity/ ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	pH	温度 Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	加酶量 Enzyme content/%	酶解时间 Hydrolysis time/h
碱性蛋白酶 Alcalase	200	9.0	50	2	1、2、4、 6、8
木瓜蛋白酶 Papain	1 500	6.5	50	2	1、2、4、 6、8
胰蛋白酶 Trypsin	250	8.0	37	2	1、2、4、 6、8

1.3.2 氨基酸测定

氨基酸测定参考 GB 5009.124—2016《食品安全国家标准食品中氨基酸的测定》。

1.3.3 分子量分布测定

参照 Guo 等^[20]的方法并略作修改, 采用高效体积排阻色谱 (High-performance size-exclusion chromatography, HPSEC) 法测定肽的分子量分布。流动相为 A (水, 含体积分数为 0.1% 三氟乙酸): B (乙腈, 含体积分数为 0.1% 三氟乙酸) = 80:20 ($V:V$), 进样体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$ ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 流速为 $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长为 214 nm 。不同相对质量标准品 (细胞色素 C, 氧化型谷胱甘肽, 还原型谷胱甘肽, 抑肽酶, 杆菌肽) 用流动相配制成 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合液, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后进样, 利用混合标准品制作标准曲线, 根据样品的保留时间计算其分子量分布。

1.3.4 TYR 抑制率测定

按照 Yu 等^[21]的方法略作修改。反应在 96 孔板中进行, 反应体系为 $200\text{ }\mu\text{L}$ 。以 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 L-多巴或 L-酪氨酸为底物, 以 pH 6.8, 浓度为 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 为缓冲液。先加入 $80\text{ }\mu\text{L}$ 的底物溶液, 再加入同等体积的酶解物 (质量浓度 $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 孵育 5 min 后测定 475 nm 处吸光值。最后加入 $40\text{ }\mu\text{L}$ TYR 溶液 ($500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 再次测定 475 nm 的吸光值。对照组以 PBS 溶液替代酶解物。TYR 抑制率按式 (1) 计算。

$$R_{\text{TYR}} = \left(1 - \frac{A_2' - A_2}{A_1' - A_1}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中: R_{TYR} 为 TYR 抑制率 (%); A_1 和 A_2 分别为不加酶解物组与加酶解物组预培养 5 min 的吸光值; A_1' 和 A_2' 分别为两组培养 15 min 后的吸光值。

1.3.5 Cu^{2+} 结合活性的测定

使用 ICP-MS 对酶解物的铜结合活性进行测定^[22]。将酶解物与 CuSO_4 溶液按 1:1 ($V:V$) 混合后 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡 90 min 使其结合。取 20 mL 结合液透析 24 h, 每 4 h 换一次水。记录透析后溶液的总膨胀体积。取 1 mL 透析液于消化管, 加入 5 mL 硝酸进行微波消解后定容至 50 mL , 采用 ICP-MS 测定溶液中的 Cu^{2+} 质量浓度。 Cu^{2+} 结合率公式如下:

$$R_c = \frac{c \times V \times n}{m} \times 100\% \quad (2)$$

式中: R_c 为 Cu^{2+} 结合率 (%); c 为透析后 Cu^{2+} 的质量浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); V 为总膨胀体积 (mL); m 为加入金属的总质量 (mg); n 为稀释倍数。

1.3.6 荧光光谱扫描

将碱性蛋白酶对罗非鱼皮胶原水解 4 h 后得到的酶解液进行离心, 离心所得上清液的冻干品作为 TSTIP。分别将 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 、 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ TSTIP、TSTIP- Cu^{2+} (Cu^{2+} 质量浓度 $0.002\sim 0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、TSTIP-TYR (TYR 溶液质量浓度 $500\sim 1\,000 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行荧光光谱扫描, 激发波长 300 nm , 发射光谱扫描范围 $290\sim 310 \text{ nm}$, 间距 0.2 nm 。

1.3.7 紫外可见光谱扫描 (UV)

分别将 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ TSTIP、TSTIP- Cu^{2+} (Cu^{2+} 浓度 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、TSTIP-TYR (TYR 溶液质量浓度 $500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行紫外光谱扫描, 扫描范围为 $200\sim 500 \text{ nm}$ 。

1.3.8 傅里叶变换红外光谱扫描 (FTIR)^[23]

分别制备 TSTIP、TSTIP- Cu^{2+} 及 TSTIP-TYR 的

冻干样。制备 TSTIP-Cu²⁺ 的冻干样时, 将 TS-TIP 与 CuSO₄ 溶液按 1:1 (V:V) 混合后 37 °C 恒温振荡 90 min, 结合反应结束后透析 24 h, 将透析液冻干。制备 TSTIP-TYR 的冻干样时, 将 TS-TIP 与 TYR 溶液按 2:1 (V:V) 混合静置 90 min 后冻干。检测时将 1 mg 冻干样品与 100 mg 干 KBr 混合为透明的液体, 而后置于红外光谱仪上。FTIR 光谱使用红外分光光度计在 4 000~400 cm⁻¹ 范围内记录, 分辨率为 4 cm⁻¹。

1.3.9 圆二色谱 (Circular dichroism, CD) 扫描

采用 Chirascan 圆二色谱仪分别对 TSTIP、TS-TIP-Cu²⁺ 与 TSTIP-TYR 进行圆二色谱扫描, 扫描范围为 190~260 nm。采用 CDNN 软件预测样品二级结构的含量。

1.4 数据统计与分析

实验数据使用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 结果以“平均值±标准误 ($\bar{X} \pm SE$)”表示, 结果的差异性采用单因素方法分析 (One-way ANOVA), 随后进行 Duncan's 多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著; 采用双变量 Pearson 系数进行相关性分析; 采用 Origin 8.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同酶解物的 TYR 抑制率、Cu²⁺ 结合率及相关性分析

选取 3 种蛋白酶对罗非鱼皮胶原进行酶解, 分别得到碱性蛋白酶酶解物 (Alcalase hydrolysate, AH)、木瓜蛋白酶酶解物 (Papain hydrolysate, PH) 及胰蛋白酶酶解物 (Trypsin hydrolysate, TH), 测得酶解物的 TYR 抑制率见图 1-a 和 1-b。在 TYR 的作用过程中, TYR 将酪氨酸羟基化为 L-多巴, 在此反应中具有单酚酶活性; 然后 TYR 将 L-多巴氧化为多巴醌, 在此反应中具有二酚酶活性。结果显示, 3 种酶解物测得的 TYR 抑制率 (包括单酚酶与二酚酶抑制活性) 随着酶解时间的延长呈现先升高后降低的趋势; 其单酚酶抑制率在第 6 小时达到最高, 二酚酶抑制率在第 4 小时达到最高, 且二酚酶抑制率均高于单酚酶抑制率。三者的 TYR 抑制率大小为 AH > PH > TH。酶解 4、6 和 8 h 所得的 AH 其 TYR 抑制率无显著性差异。考虑时间成本, 最终认为酶解 4 h 得到的碱性蛋白酶酶解物 AH 具有最佳的 TYR 抑制活性。

TYR 是一种金属氧化酶, 结构中心的双核 Cu²⁺ 具有催化活性。已有研究证明小分子肽可与 TYR 中的双核 Cu²⁺ 及周围氨基酸产生相互作用力, 从而抑制 TYR 的催化作用^[24]。3 种蛋白酶酶解物的 Cu²⁺ 结合率测定结果见图 1-c。可以看出, 碱性蛋白酶酶解物 AH 和胰蛋白酶酶解物 TH 的 Cu²⁺ 结合率高于木瓜蛋白酶酶解物 PH。当酶解时间低于 4 h 时, TH 的 Cu²⁺ 结合率高于 AH; 第 4 小时两者结合效果相同; 4 h 后 TH 的 Cu²⁺ 结合率低于 AH, 且随着酶解时间延长 AH 的 Cu²⁺ 结合率显著提高, 可能是酶解得到的小分子肽段增多, 且小分子肽段更易与 Cu²⁺ 结合。对酶解 4 h 的 AH 进行二酚酶抑制率与 Cu²⁺ 结合率的相关性分析, 得到两者具有较高的正相关性, 相关系数为 0.856 ($P=0.01$) (图 1-d)。Chen 等^[25] 研究表明肽的 Cu²⁺ 结合率越高, TYR 抑制效果越好。类似结果也出现在 Deng 等^[26] 的研究中。由此猜测 AH 可能通过结合 TYR 中的 Cu²⁺ 活性中心来抑制 TYR 的活性。故采用碱性蛋白酶酶解 4 h 的产物 (TSTIP) 进行分子量与氨基酸含量分析, 并将其分别与 TYR 及 Cu²⁺ 结合, 对结合物进行结构验证。

2.2 TSTIP 的分子量分布

由图 2 可知, 随着碱性蛋白酶酶解时间的延长, 罗非鱼皮胶原蛋白中大分子量肽段 (>10 000 D) 逐渐减少, 而小分子量肽段 (<3 000 D) 逐渐增加。酶解 4 h 后 <1 000 D 的肽段显著增加, 其中 <500 D 组分占 40% 以上。TSTIP 中 >10 000 D 的组分占 27.56%, 5 000~10 000 D 的组分占 3.78%, 3 000~5 000 D 的组分占 3.18%, 1 000~3 000 D 的组分占 17.34%, 500~1 000 D 的组分占 19.72%, 小于 500 D 的组分占 28.43%, 说明 TSTIP 中同时具有 TYR 抑制活性与 Cu²⁺ 结合活性的肽分子量在 1 000 D 以下。酶解过程会产生分子量不同的片段, 大量研究表明 TYR 抑制活性较强的肽其分子量集中在 2 000 D 以下。Deng 等^[26] 水解柑橘 (*Citrus reticulata* Blanco) 籽发现分子量 <1 000 D 组分的 TYR 抑制活性高于其他组分。另一方面, 肽的分子量是影响金属结合活性的重要因素之一^[27]。Guo 等^[20] 将阿拉斯加狭鳕 (*Gadus chalcogrammus*) 鱼皮酶解物进行固定化 Cu²⁺ 亲和层析, 得到分子量在 500~2 000 D 的组分具有更好的 Cu²⁺ 结合活性。Carasco-Castilla 等^[18] 在纯化菜豆蛋白酶解物时也发现

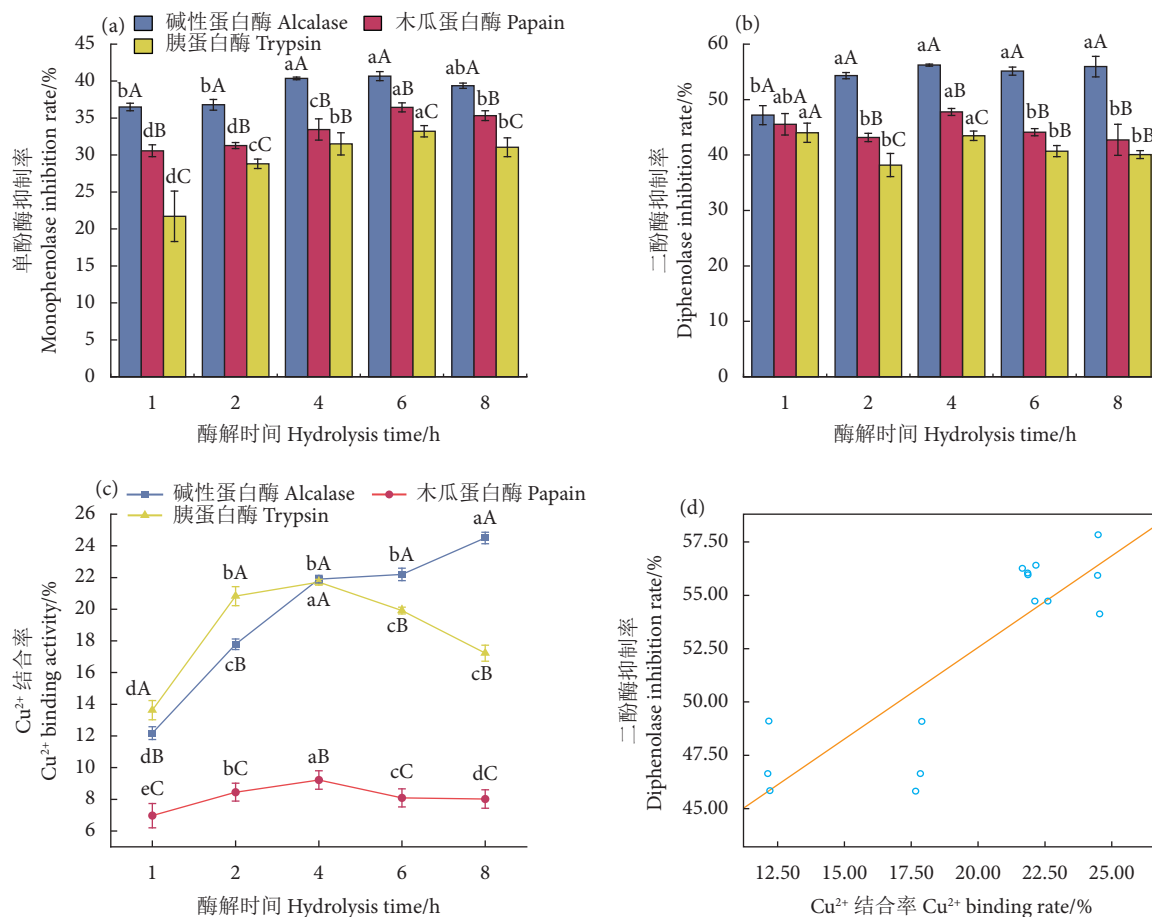


图1 不同酶解物的TYR抑制率与Cu²⁺结合率和相关性分析

注: a. 酶解物的单酚酶抑制活性; b. 酶解物的二酚酶抑制活性; c. 酶解物的 Cu²⁺结合率; d. TSTIP 二酚酶抑制活性与 Cu²⁺结合率和相关性分析; 不同小写字母表示同种蛋白酶在不同酶解时间所得酶解物的抑制率差异显著 ($P < 0.05$); 不同大写字母表示不同蛋白酶在同一酶解时间所得酶解物的抑制率差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 1 Tyrosinase inhibition rate and Cu²⁺ binding rate of different hydrolysates and correlation analysis

Note: a. Monophenolase inhibitory activity of hydrolysates; b. Diphenolase inhibitory activity of hydrolysates; c. Cu²⁺ binding rate of hydrolysates; d. Correlation analysis between tyrosinase inhibitory activity and Cu²⁺ binding rate. Different lowercase letters indicate that the same protease at different hydrolysis time had significant difference ($P < 0.05$), while different uppercase letters indicate that different proteases at the same hydrolysis time had significant difference ($P < 0.05$).

分子量 $<1\ 000\ D$ 组分的 Cu²⁺结合活性远高于大分子量组分。结合 2.1 的结果, 酶解 4 h 后的产物其 TYR 抑制活性无显著性差异, 而 Cu²⁺结合活性差别较大; 且酶解 4 h 后的产物中分子量低于 1 000 D 的占比更大, 后续研究将进一步确定对这两种活性具有更大贡献的分子量组分。

2.3 TSTIP 氨基酸含量分析

由表 2 可知, 酶解后脯氨酸、丙氨酸、谷氨酸和精氨酸含量比例未显著降低, 甘氨酸及胱氨酸含量比例有所提高, 其他氨基酸中蛋氨酸、色氨酸含量比例显著提高。谷氨酸与精氨酸在 TYR 活性及 Cu²⁺结合活性中起重要作用, 此外甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、胱氨酸、蛋氨酸与色氨酸对这两种活性有一定贡献。

大量研究表明, 疏水性氨基酸 (如脯氨酸、丙氨酸、蛋氨酸等) 及芳香族氨基酸 (如色氨酸) 较其他种类氨基酸对 TYR 活性有显著影响^[28-29]。有研究报道 TYR 抑制肽能够直接与酶中的双核 Cu²⁺形成氢键, 这主要与肽序列中的胱氨酸有关^[16]。甘氨酸、脯氨酸与丙氨酸 3 种氨基酸是胶原蛋白的特征性氨基酸, 在胶原蛋白中的含量最为丰富。此外谷氨酸、精氨酸在罗非鱼皮中含量较高, 其结合金属离子的能力较其他氨基酸强。含精氨酸的多肽表现出良好的 TYR 结合特征, 其胍基具有结合 Cu²⁺的活性^[26,30]。Megías 等^[31]将鹰嘴豆 (*Cicer arietinum* Linn.) 蛋白水解物纯化得到 Cu²⁺结合肽, 发现结合肽较水解物增加了精氨酸含量。此外, 与金属离子结合的肽可能与谷氨酸的羧基有

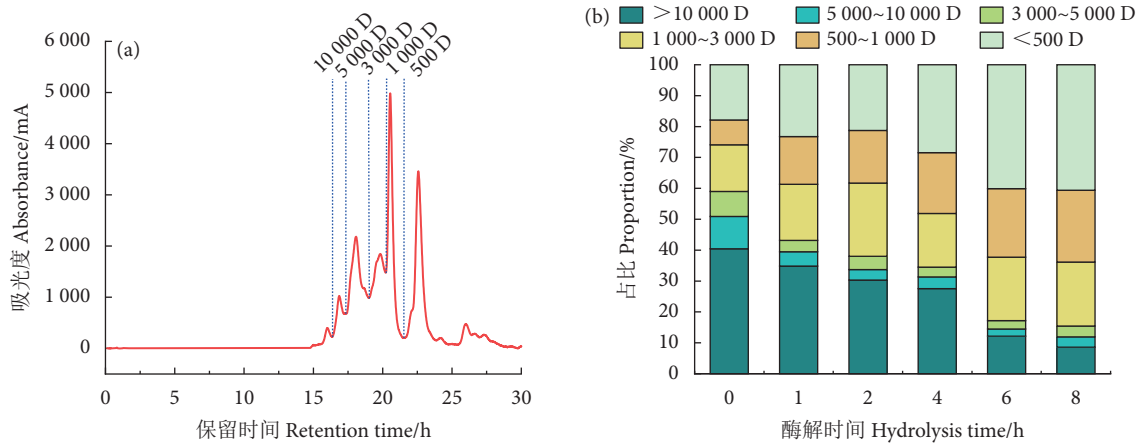


图2 碱性蛋白酶酶解物分子量分布及其占比

注: a. 酪氨酸酶抑制肽的分子量分布; b. 碱性蛋白酶酶解物不同组分的占比。

Fig. 2 Molecular weight distribution and proportion of alcalase hydrolysate

Note: a. Molecular weight distribution of TSTIP; b. Proportion of alcalase hydrolysate with different components.

关, 因为羧基可与 Cu^{2+} 产生静电和离子作用力而对 Cu^{2+} 具有很强的亲和性^[20]。肽段中的氨基酸不

表2 罗非鱼皮和酪氨酸酶抑制肽中氨基酸成分和质量分数

Table 2 Amino acids composition and mass fraction of tilapia skin and TSTIP %

氨基酸 Amino acids	罗非鱼皮 Tilapia skin	罗非鱼皮酪氨酸酶抑制肽 TSTIP
天冬氨酸 Asp	6.20±0.23 ^f	6.00±0.28 ^f
谷氨酸 Glu	10.78±0.14 ^d	10.65±0.21 ^d
赖氨酸 Lys	3.69±0.23 ^g	3.62±0.26 ^g
组氨酸 His	0.90±0.10 ^{jk}	0.87±0.25 ^{kl}
精氨酸 Arg	9.45±0.18 ^e	9.20±0.23 ^e
色氨酸 Trp	0.15±0.20 ^l	1.80±0.22 ⁱ
酪氨酸 Tyr	0.65±0.23 ^k	0.61±0.18 ^l
苯丙氨酸 Phe	2.21±0.25 ⁱ	2.11±0.15 ⁱ
甘氨酸 Gly	26.28±0.21 ^a	27.70±0.21 ^a
丙氨酸 Ala	11.22±0.17 ^c	11.16±0.23 ^c
缬氨酸 Val	2.21±0.21 ⁱ	2.19±0.26 ⁱ
蛋氨酸 Met	1.18±0.17 ^k	1.47±0.34 ^{ij}
异亮氨酸 Ile	1.17±0.24 ^j	1.10±0.40 ^{jk}
脯氨酸 Pro	14.32±0.15 ^b	13.68±0.23 ^b
亮氨酸 Leu	2.95±0.09 ^h	2.92±0.22 ^h
苏氨酸 Thr	2.95±0.04 ^h	2.94±0.17 ^h
丝氨酸 Ser	3.84±0.14 ^g	3.72±0.32 ^g
胱氨酸 Cys	0.01±0.12 ^l	0.04±0.13 ^m

注: 不同小写字母表示同种原料在不同氨基酸种类的相对质量分数差异显著 ($P<0.05$)。

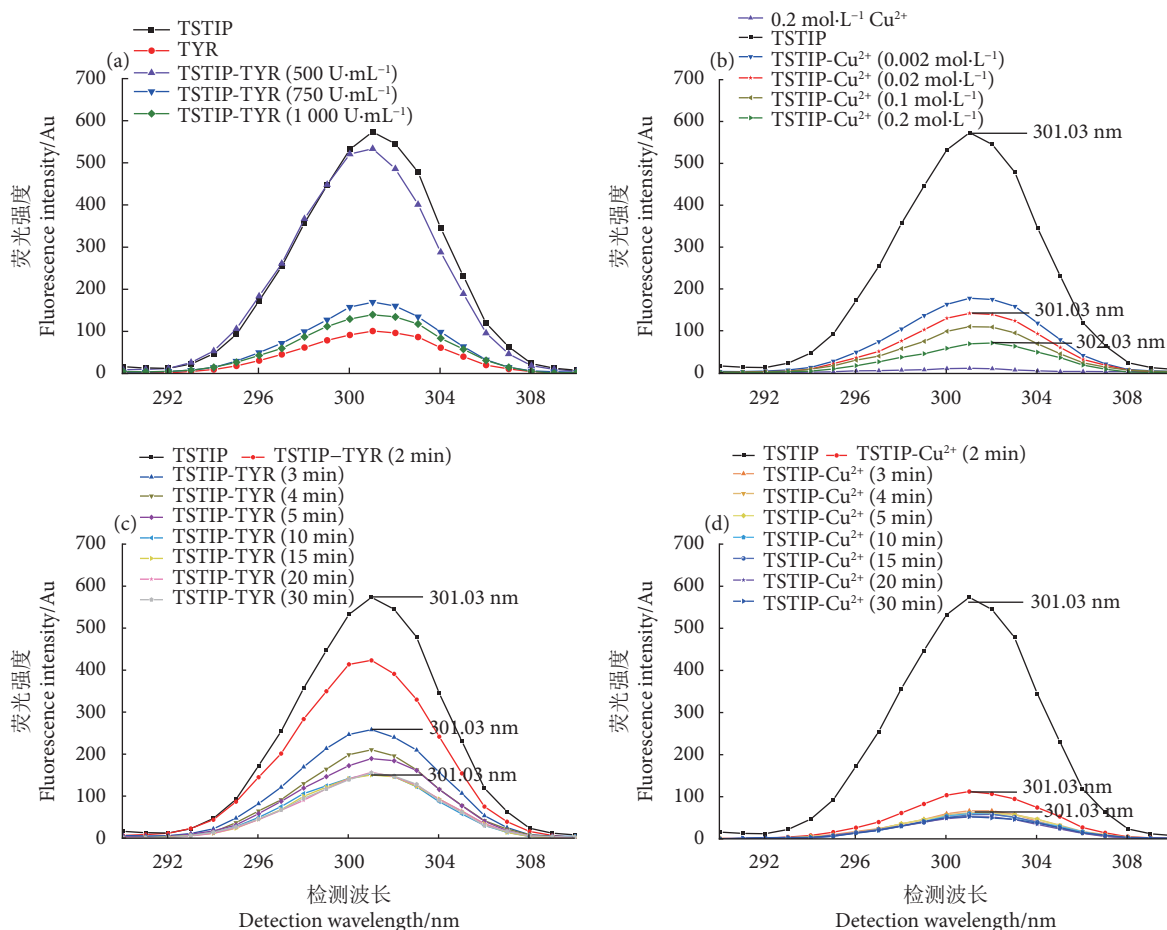
Note: Different lowercase letters indicate that there are significant differences in the relative mass fraction of the same material in different amino acids ($P<0.05$).

仅能够结合 TYR 中的 Cu^{2+} , 还可与 Cu^{2+} 周围的关键氨基酸如 Val283、Met280、Phe264、His85、Glu256、His263 和 Asn260 等建立相互作用力, 覆盖底物与 Cu^{2+} 的结合部位从而抑制 TYR 活性。由此推测 TSTIP 能够进入 TYR 的活性中心并结合 Cu^{2+} 及周围氨基酸, 因此同时具有 TYR 抑制活性与 Cu^{2+} 结合活性。

2.4 TSTIP-TYR 及 TSTIP- Cu^{2+} 的荧光光谱分析

图 3 为当激发波长为 305 nm 时, TSTIP 分别与 TYR 及 Cu^{2+} 结合后荧光发射光谱的变化 (290~310 nm)。荧光强度的降低说明 TSTIP 结合了 TYR^[21]。随着 TYR 浓度的增加, TSTIP 的内源性荧光强度逐渐降低。当 TYR 质量浓度为 500~750 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 荧光强度下降幅度明显 (图 3-a)。随着 Cu^{2+} 浓度的增加, TSTIP 的内源荧光强度逐渐降低。与 0.002 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 结合时, TSTIP 的荧光强度下降幅度显著增加; 随着 Cu^{2+} 浓度继续增大, 荧光强度下降减缓, 荧光光谱发生微弱红移 (由 301.03 nm 移至 302.03 nm, 图 3-b)。荧光强度降低是 TSTIP 中的芳香族氨基酸与 Cu^{2+} 发生结合的典型特征^[32]。 Cu^{2+} 引起的荧光猝灭伴随着红移, 表示 TSTIP 与 Cu^{2+} 结合后其构象发生改变, 形成更稳定的结合物, 这可能因为荧光基团转移至更加亲水的环境^[21]。TYR 构象变化会影响其活性, 说明 TSTIP 具有较好的 TYR 抑制能力。图 3-a 与图 3-b 表明 TYR 与 Cu^{2+} 均能与 TSTIP 结合。

由图 3-c 与图 3-d 可看出, TYR 结合 TSTIP 的速率比 Cu^{2+} 与 TSTIP 的结合速率慢, 且需要更长

图3 TSTIP-TYR及TSTIP-Cu²⁺的荧光光谱

注: a、b 分别为 TSTIP 与不同浓度的 TYR 或 Cu²⁺ 结合后的荧光强度变化; c、d 分别为 TSTIP 与 TYR 或 Cu²⁺ 结合后荧光强度随时间的变化。

Fig. 3 Fluorescence intensity of TSTIP-TYR and TSTIP-Cu²⁺

Note: The a and b represent the changes in fluorescence intensity of TSTIP combining with TYR or Cu²⁺ at different concentrations, respectively; the c and d represent the changes in fluorescence intensity of TSTIP combining with TYR or Cu²⁺ at different time, respectively.

时间达到稳定。原因可能是 TYR 中的 Cu²⁺ 被包裹在疏水的酶中心, 肽到达 Cu²⁺ 活性中心需要一定时间^[33]。此外, TSTIP 可以快速结合 Cu²⁺, 因此具有很好的 Cu²⁺ 结合活性。2 种结合物稳定之后的荧光强度相似, 推测 TSTIP 能够结合 TYR 中的 Cu²⁺ 活性中心。

2.5 TSTIP-TYR 及 TSTIP-Cu²⁺ 的紫外与红外光谱分析

图 4-a 表明 TSTIP 在 250~285 nm 出现了芳香族氨基酸的特征吸收带。与 TYR 结合后, TSTIP 的紫外吸收强度增强, 且最大吸收波长向长波方向移动 (由 275 nm 移至 283 nm), 这与 Cu²⁺ 结合 TSTIP 的紫外光谱相似。七肽 Ile-Gln-Ser-Pro-His-Phe-Phe 与 TYR 及 Cu²⁺ 结合的紫外光谱也出现了相同的趋势^[29]。这说明 TYR 及 Cu²⁺ 均能与 TSTIP 形成新的结合物, TSTIP 能够结合 TYR 的 Cu²⁺

活性中心。

红外光谱中氨基 (-NH)、酰胺 I 带 (C=O)、羧基 (-COOH) 的特征性吸收峰分别为 3 500~3 250 cm⁻¹、1 700~1 600 cm⁻¹ 和 1 500~1 400 cm⁻¹^[34]。TSTIP 在 3 361.92 cm⁻¹ 出现特征吸收峰是由于胶原肽中 -NH 的伸缩振动^[23]。与 Cu²⁺ 结合后, 该吸收峰移至 3 363.85 cm⁻¹, 而与 TYR 结合后该峰移至 3 379.28 cm⁻¹, 可能是 -NH 与 TYR 中的 Cu²⁺ 距离更远。TSTIP 与 TYR 及 Cu²⁺ 结合后, 其酰胺 I 带 (C=O) 吸收峰由原来的 1 639.49 cm⁻¹ 分别红移至 1 654.93 cm⁻¹ 及 1 647.20 cm⁻¹, 表明 C=O 参与了 TYR 中 Cu²⁺ 的共价键合反应^[23]; 羧基 (-COOH) 反对称伸缩振动吸收峰由 1 544.98 cm⁻¹ 分别蓝移至 1 543.05 cm⁻¹ 及 1 541.12 cm⁻¹, 说明 -COOH 与 Cu²⁺ 发生了不稳定结合。据报道, 肽的结合能力与肽中羧基及氨基的总数有关^[20]。综上, TYR 与 Cu²⁺ 主要通过氨基及

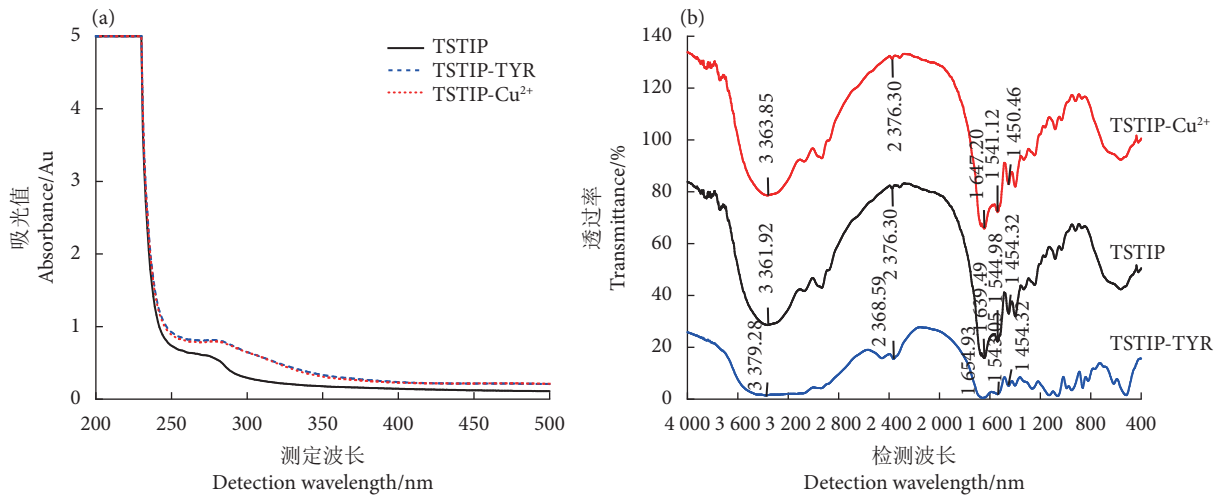


图4 TSTIP-TYR和TSTIP-Cu²⁺的紫外与红外光谱分析

注: a. TSTIP-TYR 及 TSTIP-Cu²⁺的紫外吸收光谱; b. TSTIP-TYR 及 TSTIP-Cu²⁺的红外吸收光谱。

Fig. 4 UV and FTIR spectrum of TSTIP-TYR and TSTIP-Cu²⁺

Note: a. UV spectrums of TSTIP-TYR and TSTIP-Cu²⁺; b. FTIR spectrums of TSTIP-TYR and TSTIP-Cu²⁺.

羰基与 TSTIP 结合, 结合引起 TSTIP 发生相似的结构变化, 进一步验证 TSTIP 能够结合 TYR 的 Cu²⁺ 活性中心, 从而抑制 TYR 活性。

2.6 TSTIP-TYR 及 TSTIP-Cu²⁺的圆二色谱分析

圆二色谱可观测到远紫外区光谱区域 (190~260 nm) 蛋白质或肽主链构象的变化, 可用于检测本研究中 TSTIP 分别与游离 Cu²⁺和固定 Cu²⁺ (TYR) 结合后其二级结构发生的变化。TYR 的二级结构以 β -折叠为主; TSTIP 中 β -转角与无规则卷

曲含量最高, 两者含量占总比的 70% 以上 (图 5)。结合 TYR 或 Cu²⁺后, TSTIP 在 170 nm 处的单负峰出现上移 (图 5-a), 说明 β -折叠含量增加。 β -折叠的出现被认为是金属离子与肽链发生结合的特征^[35]。TSTIP-Cu²⁺的 β -折叠含量显著高于 TSTIP (图 5-b), 表明 Cu²⁺与 TSTIP 的结合诱导了 TSTIP 的折叠并形成更紧密的结构^[31]。TYR 与 TSTIP 结合后其 β -折叠含量显著减少, 说明 TYR 的结构打开, 构象变化有利于 TSTIP 与 TYR 中 Cu²⁺活性中心的结

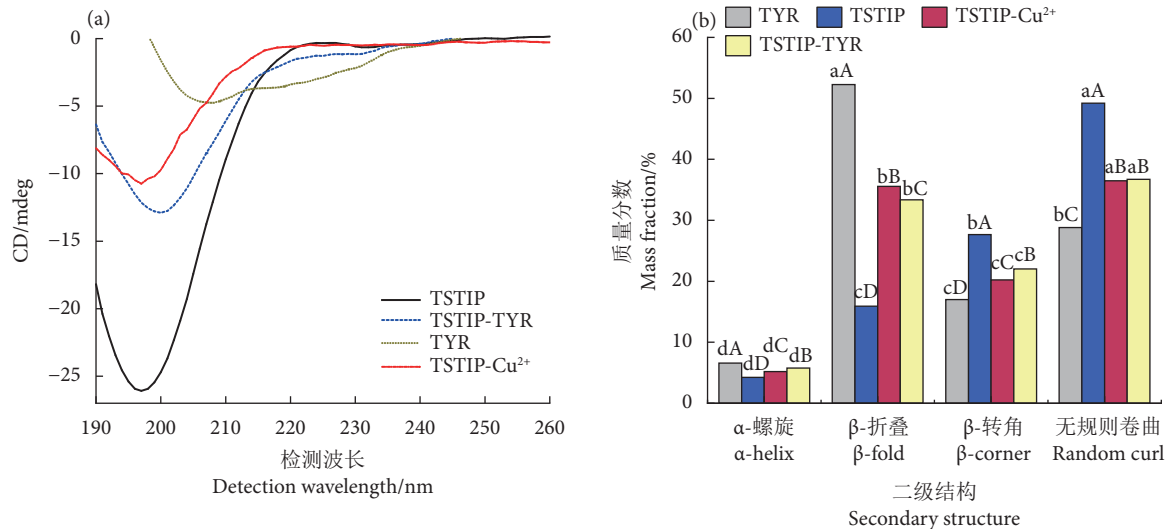


图5 TSTIP-TYR及TSTIP-Cu²⁺的圆二色谱

注: a. TSTIP-TYR 和 TSTIP-Cu²⁺的圆二色谱图; b. TSTIP-TYR 和 TSTIP-Cu²⁺的二级结构; 不同小写字母表示同一样品在不同二级结构的质量比例有显著性差异 ($P < 0.05$); 不同大写字母表示不同样品在同种二级结构的质量比例有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 CD analysis of TSTIP-TYR and TSTIP-Cu²⁺

Note: a. Circular dichroism spectrum of TSTIP-TYR and TSTIP-Cu²⁺; b. Proportions of secondary structures of TSTIP-TYR and TSTIP-Cu²⁺. Different lowercase letters indicate that the mass proportion of the same sample in different secondary structures had significant difference ($P < 0.05$). Different uppercase letters indicate that the mass proportion of different samples in the same secondary structure had significant difference ($P < 0.05$).

合; TSTIP-Cu²⁺中 β -折叠含量高于 TSTIP-TYR, 说明 TSTIP 与 Cu²⁺结合比 TYR 更加紧密, 主要与 TYR 中的 Cu²⁺被包裹在结构中心有关^[36]。总之, Cu²⁺及 TYR 的加入引起 TSTIP 的二级结构产生相似变化, 说明 TSTIP 可结合 TYR 中的 Cu²⁺活性中心来抑制 TYR 的催化活性。

3 结论

本文以罗非鱼皮为原料, 进行了 TSTIP 的制备以及 TSTIP-TYR 与 TSTIP-Cu²⁺结构特征的研究。结果表明, 通过碱性蛋白酶酶解 4 h 制得的 TSTIP 较其他蛋白酶解物具有更好的 TYR 抑制活性和 Cu²⁺结合活性, 且这 2 种活性存在极显著的正相关性 ($P=0.01$); 此外, 发现 TSTIP 中分子量在 1 000 D 以下的组分含量占 48.15%, 小分子肽段显示出更强的 TYR 抑制活性与 Cu²⁺结合活性。肽链中的甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、胱氨酸、蛋氨酸、色氨酸、谷氨酸与精氨酸对这 2 种活性的增强均具有贡献, 说明了 TYR 抑制活性与 Cu²⁺结合活性具有正相关性; 对 TSTIP 抑制 TYR 的作用机制进行探究, 发现 TSTIP 与 Cu²⁺及 TYR 结合后, 荧光、紫外、红外光谱及二级结构均发生了相似的变化, TYR 活性空腔打开, TSTIP 进入活性中心并结合 Cu²⁺及周围关键氨基酸, 从而抑制了 TYR 的催化活性。TSTIP 是含有不同分子量肽段的混合物, 未来将对 TSTIP 进一步分离纯化和鉴定序列, 以获得混合组分中具有最高 TYR 抑制活性的具体肽段。

参考文献:

- [1] 胡俊康. 罗非鱼养殖现状与健康管理——访中国水产科学研究院珠江水产研究所王广军研究员 [J]. 广东饲料, 2021, 30(3): 8-10.
- [2] 李敏雄. 罗非鱼皮胶原蛋白肽的制备及活性研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2018: 1-2.
- [3] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2021 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2021: 78.
- [4] 陈胜军, 李来好, 杨贤庆, 等. 罗非鱼综合加工利用与质量安全控制技术研究进展 [J]. 南方水产科学, 2011, 7(4): 85-90.
- [5] 梁小明, 韦倩妮, 吴军, 等. 罗非鱼加工废弃物的综合利用探讨 [J]. 现代食品, 2020(17): 29-31.
- [6] ZHANG X G, NOISA P, YONGSAWATDIGUL J. Identification and characterization of tilapia antioxidant peptides that protect AAPH-induced HepG2 cell oxidative stress[J]. J Funct Foods, 2021, 86: 104662.

- [7] CHEN J D, SUN S S, LI Y S, et al. Proteolysis of tilapia skin collagen: identification and release behavior of ACE-inhibitory peptides[J]. Food Sci Technol, 2021, 139: 110502.
- [8] JIN L, ZHENG D X, YANG G Y, et al. Tilapia skin peptides ameliorate diabetic nephropathy in stz-induced diabetic rats and HG-induced GMCs by improving mitochondrial dysfunction[J]. Mar Drugs, 2020, 18(7): 363-378.
- [9] 王堡焯. 灰星鲨鱼皮肤的提取及生物活性的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2019: 12-60.
- [10] 李娜. 玉米源单体肽 TPM 对酪氨酸酶活性的影响 [D]. 长春: 吉林大学, 2018: 1-25.
- [11] TENG H, FAN X Y, LV Q Y, et al. *Folium nelumbinis* (lotus leaf) volatile-rich fraction and its mechanisms of action against melanogenesis in B16 cells[J]. Food Chem, 2020, 330(15): 127030.
- [12] PENG Z Y, WANG G C, ZENG Q H, et al. Synthesis, antioxidant and anti-tyrosinase activity of 1, 2, 4-triazole hydrazones as anti-browning agents[J]. Food Chem, 2021, 341(2): 128265.
- [13] KUBGLOMSONG S, THEERAKULKAIT C, REED R L, et al. Isolation and identification of tyrosinase-inhibitory and copper-chelating peptides from hydrolyzed rice-bran-derived albumin[J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(31): 8346-8354.
- [14] ISABELLA T, MARCO B, FRANCESCO V, et al. The reaction of alpha-synuclein with tyrosinase: possible implications for Parkinson disease[J]. J Biol chem, 2008, 283(24): 16808-16817.
- [15] SAMANEH Z, ASIEH B, MAHMUD T H K, et al. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors[J]. J Enzym Inhib Med Chem, 2019, 34(1): 279-309.
- [16] JOOMPANG A, JANGPROMMA N, CHOOWONGKOMON K, et al. Evaluation of tyrosinase inhibitory activity and mechanism of Leucrocine I and its modified peptides[J]. J Biosci Bioeng, 2020, 130(3): 239-246.
- [17] AGUILAR-TOAL'A J E, HERNÁNDEZ-MENDOZA A, GONZÁLEZ-CORDOVA A F, et al. Potential role of natural bioactive peptides for development of cosmeceutical skin products[J]. Peptides, 2019, 122: 170170.
- [18] CARRASCO-CASTILLA J, HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ A J, JIMÉNEZ-MARTÍNEZIMÉNEZ C, et al. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates[J]. Food Chem, 2012, 135(3): 1789-1795.
- [19] 林善婷, 胡晓, 李来好, 等. 罗非鱼皮蛋白肽-Fe²⁺结合物的制备及性质分析 [J]. 食品科学, 2021, 42(8): 157-164.
- [20] GUO L D, HARNEDY P A, O'KEEFFE M B, et al. Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides[J]. Food Chem, 2015, 173(15): 536-542.
- [21] YU Q, LI J W, FAN L P. Effect of drying methods on the microstructure, bioactivity substances, and antityrosinase activity of asparagus stems[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(5): 1537-1545.
- [22] 张金杨. 罗非鱼促钙吸收肽的制备分离及生物活性研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2018: 13-14.
- [23] WU W M, HE L C, LIANG Y H, et al. Preparation process optimi-

- zation of pig bone collagen peptide-calcium chelate using response surface methodology and its structural characterization and stability analysis[J]. *Food Chem*, 2019, 284(30): 80-89.
- [24] SHEN Z W, WANG Y J, GUO Z, et al. Novel tyrosinase inhibitory peptide with free radical scavenging ability[J]. *J Enzym Inhib Med Chem*, 2019, 34(1): 1633-1640.
- [25] CHEN M J, LIU J R, SHEU J F, et al. Study on skin care properties of milk kefir whey[J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2006, 19(6): 905-908.
- [26] DENG Y J, HUANG L X, ZHANG C H, et al. Skin-care functions of peptides prepared from Chinese quince seed protein: sequences analysis, tyrosinase inhibition and molecular docking study[J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 148: 112331.
- [27] XIE N, HUANG J, LI B, et al. Affinity purification and characterization of zinc chelating peptides from rapeseed protein hydrolysates: possible contribution of characteristic amino acid residues[J]. *Food Chem*, 2015, 173(15): 210-217.
- [28] 冯兰. 黑色素生成抑制肽的设计、筛选及作用机制探究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2018: 15-22.
- [29] NIE H L, LIU L, YANG H Q, et al. A novel heptapeptide with tyrosinase inhibitory activity identified from a phage display library[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2017, 181(1): 219-232.
- [30] TORRES-FUENTES C, ALAIZ M, VIOQUE J. Chickpea chelating peptides inhibit copper-mediated lipid peroxidation[J]. *J Sci Food Agric*, 2014, 94(15): 3181-3188.
- [31] MEGÍAS C, PEDROCHE J, YUST M, et al. Affinity purification of copper chelating peptides from chickpea protein hydrolysates[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(10): 3949-3954.
- [32] DAS D, MITRA S, KUMAR R, et al. Copper-induced spectroscopic and structural changes in short peptides derived from azurin[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 687(15): 108388.
- [33] SCHURINK M, van BERKEL W J H, WICHERS H J, et al. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity[J]. *Peptides*, 2007, 28(3): 485-495.
- [34] ARICHAYA M, PORNLERT A, SUWIMON K. Chicken foot broth byproduct: a new source for highly effective peptide-calcium chelate[J]. *Food Chem*, 2021, 345(30): 128713.
- [35] MA Q F, HU J, WU W H, et al. Characterization of copper binding to the peptide amyloid- β (1-16) associated with Alzheimer's disease[J]. *Biopolymers*, 2006, 83(1): 20-31.
- [36] OOKUBO N, MICHIE H, KITAMATSU M, et al. The transdermal inhibition of melanogenesis by a cell-membrane-permeable peptide delivery system based on poly-arginine[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(15): 4508-4516.