

牦牛骨胶原蛋白肽对酪氨酸酶的抑制作用

谢莎¹, 卢海立¹, 黄琪¹, 黄梅桂¹, 毕秀芳¹, 蔡寅川², 郝刚^{1*}

(1. 西南民族大学食品科学与技术学院, 四川成都 610041)(2. 四川阿坝州工业经济研究所, 四川汶川 623000)

摘要: 为探究牦牛骨胶原蛋白多肽组分 YBCP-2-2 对酪氨酸酶的抑制方式, 对其进行了抗氧化活性、Cu²⁺ 螯合能力、肽对酪氨酸单酚酶和二酚酶抑制动力学及酪氨酸酶荧光光谱影响等方面的分析。结果表明 YBCP-2-2 具有显著抗氧化能力, DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基的清除 IC₅₀ 分别为 6.02 mg/mL 和 0.81 mg/mL, 总还原力在 8.00 mg/mL 时吸光值达 0.57, 铜离子螯合能力也较为出色, IC₅₀ 为 3.22 mg/mL。YBCP-2-2 对酪氨酸单酚酶具有明显迟滞效应并呈质量浓度依赖性, 当抑制物质量浓度达到 20.00 mg/mL 时, 反应初速度从 0.012 /min 下降至 0.003 9 /min; 对酪氨酸二酚酶的抑制类型为混合竞争性抑制, $V_{\max}$ 和 K_m 均随胶原蛋白肽质量浓度的变化而改变, 抑制常数 KI 为 0.58 mg/mL。YBCP-2-2 能与酪氨酸酶发生相互作用导致酶蛋白荧光猝灭且引起荧光光谱从 340.20 nm 红移至 351.60 nm。结果证明了胶原蛋白多肽具有较强的酪氨酸酶抑制活性, 为完善肽类对酪氨酸酶抑制作用的理论研究提供了理论依据。

关键词: 胶原蛋白肽; 酪氨酸酶; 抑制作用

文章编号: 1673-9078(2025)10-187-195

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.10.1068

Inhibition of Tyrosinase by Yak Collagen Peptides

XIE Sha¹, LU Haili¹, HUANG Qi¹, HUANG Meigui¹, BI Xiufang¹, CAI Yinchuan², HAO Gang^{1*}

(1. College of Food Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

(2. Sichuan Aba Institute of Industrial Economics, Wenchuan 623000, China)

Abstract: To investigate the inhibition mode of the yak bone collagen peptide fraction, YBCP-2-2, its antioxidant activity, Cu²⁺ chelating capacity, inhibition kinetics against tyrosine mono- and di-phenolase, and interaction with tyrosinase were analyzed using fluorescence spectroscopy. The results demonstrated that YBCP-2-2 exhibited notable antioxidant capacity, with IC₅₀ values of 6.02 mg/mL and 0.81 mg/mL for scavenging DPPH and ABTS free radicals, respectively. YBCP-2-2 also exhibited a total reducing power absorbance value of 0.57 at 8.00 mg/mL, along with superior Cu²⁺ chelating capacity, with an IC₅₀ of 3.22 mg/mL. Furthermore, YBCP-2-2 substantially inhibited tyrosine monophenolase in a mass concentration-dependent manner. At an inhibitor mass concentration of 20.00 mg/mL, the initial velocity of the reaction decreased from 0.012 /min to 0.003 9 /min. The inhibition type on tyrosine diphenolase was identified as mixed competitive inhibition, with both $V_{\max}$ and K_m undergoing changes in response to variations in the collagen peptide mass concentration; the inhibition constant KI was determined as 0.58 mg/mL. The interaction between YBCP-2-2 and tyrosinase induced fluorescence quenching of the enzyme, accompanied by a red-shift in the fluorescence emission spectrum from 340.20 nm to 351.60 nm. These findings conclusively demonstrate the potent tyrosinase inhibitory activity of collagen peptides, thereby providing a theoretical foundation for further investigations into peptide-based tyrosinase inhibition.

Key words: collagen peptide; tyrosinase; inhibition

引文格式:

谢莎, 卢海立, 黄琪, 等. 牦牛骨胶原蛋白肽对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2025, 41(10): 187-195.

XIE Sha, LU Haili, HUANG Qi, et al. Inhibition of tyrosinase by yak collagen peptides [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(10): 187-195.

收稿日期: 2024-07-23; 修回日期: 2024-09-14; 接受日期: 2024-09-26

作者简介: 谢莎 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 1903694743@qq.com

通讯作者: 郝刚 (1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 蛋白质化学研究, E-mail: indianahg@hotmail.com

酪氨酸酶是黑色素合成过程中的关键限速酶。该酶是一种双功能氧化酶,能表现出两种催化机制:1、能羟基化单酚为邻二酚体现酪氨酸单酚酶活性,2、能氧化邻二酚为邻苯醌体现二酚酶活性;这两种酶活性都是由氧与酶活性中心的铜离子 Cu_A 和 Cu_B 结合而产生的^[1]。哺乳动物的皮肤、毛发和眼睛颜色主要由体内酪氨酸酶调节的黑色素决定,而酪氨酸酶由人体的黑色素细胞调节。正常情况下,适量的黑色素能保护皮肤和 DNA 免受紫外线辐射等各种有害物质侵害,但黑色素异常积累时可能会导致黄褐斑生成、诱发黑色素瘤等皮肤病、还与神经退行性疾病如帕金森症和阿尔兹海默病等有关^[2]。因此抑制酪氨酸酶活性是解决色素过度沉积的最有效途径之一。

酪氨酸酶抑制剂能对酪氨酸酶产生显著抑制效果的方式,可归结为以下四大途径:1、抑制剂通过抗氧化基质达到抑制目的。2、抑制剂和底物有相对类似的结构,作为底物的结构类似物进入酪氨酸酶的活性空腔并覆盖催化位点,同底物竞争酶活性中心,从而降低黑色素生成的反应速率。3、抑制剂能同酪氨酸酶活性中心的 Cu^{2+} 螯合,降低酪氨酸酶活性^[3]。4、抑制剂与酪氨酸酶疏水腔入口或催化活性中心位点的氨基酸残基结合,通过改变酶的构象或者形成空间位阻效应从而钝化酶^[4]。但大多数酪氨酸酶抑制剂方式并非通过单一途径对酪氨酸酶活性进行抑制,如丁小梅等^[5]发现了螺旋藻多糖可以通过非共价键与酪氨酸酶结合来降低其活性,且这个结合是可逆的,同时螺旋藻多糖还表现出较为出色的抗氧化性。Deng 等^[6]发现分离纯化得到的木瓜籽蛋白酪氨酸酶抑制肽 Arg-His-Ala-Lys-Phe 不仅拥有很强的抗氧化性和铜离子螯合能力,而且还与酪氨酸酶之间存在很多对接位点,可以通过改变配体-蛋白复合物的构象来影响酪氨酸酶的活性。

酪氨酸酶抑制剂来源非常广泛,近年来,从各种生物资源中寻找酪氨酸酶抑制剂成为生命科学研究的一大热点。本实验室在前期研究中从牦牛骨胶原蛋白的水解物中分离纯化出一个酪氨酸酶抑制率较高的多肽组分 YBCP-2-2,本文以该组分为研究对象,测定其 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率、总还原力和铜离子螯合率,通过 YBCP-2-2 对酪氨酸单酚酶和二酚酶的催化反应的酶动力学研究和酶蛋白的荧光光谱分析了解多肽组分与酪氨酸酶之间的相互作用,探讨肽类抑制剂对酪氨酸酶的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

五水硫酸铜、氯化铁、铁氰化钾,成都市科隆化

学品有限公司;冰醋酸,成都金山化学试剂有限公司;过硫酸钾、L-多巴、还原型谷胱甘肽,上海麦克林生化科技有限公司;L-酪氨酸、蘑菇多酚氧化酶(500 U/mL)、碱性蛋白酶(200 U/mg),源叶有限公司;ABTS,索莱宝科技(北京)有限公司;醋酸钠,成都市科龙化工试剂厂。

1.2 仪器与设备

F-4700 荧光分光光度计,日立公司;UV-1900 紫外可见光光谱仪,AOELAB 公司;318C+ 酶标仪,上海沛欧分析仪器公司;高效液相色谱:Waters 600(2487 紫外检测器和 M32 工作站),色谱柱:TSK ge-l 2000 SWXL 300×7.8 mm,美国 Waters 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 胶原蛋白酪氨酸酶抑制肽的制备

用碱性蛋白酶对牦牛骨胶原蛋白进行酶解,底物质量分数为 2.00%,酶底比为 8 000 U/g、pH 值为 9.00、50 ℃ 酶解 7 h,水解结束后沸水灭酶 10 min,待冷却后,调节 pH 值至 7.00 后离心(6 000 r/min, 10 min),取上清液用旋蒸仪浓缩,采用截留分子量为 3 kDa 的超滤管离心,收集分子量 3 kDa 以下的组分,再用葡聚糖凝胶 SephadexG-50 串联 SephadexG-15 对其进行分离纯化,得到高酪氨酸酶抑制活性多肽组分 YBCP-2-2(86.65 g/100 g),用于接下来的试验。

1.3.2 基本成分测定

蛋白质含量:参考 GB5009.5-2016 中的凯氏定氮法;水分:参考 GB 5009.4-2010 中的高温灼烧法;灰分:直接干燥法。

1.3.3 氨基酸组成测定

使用氨基酸自动分析仪检测氨基酸组成和含量。

1.3.4 多肽疏水值的计算

参考 Zhang 等^[7]的方法计算。

$$\Delta Q = \frac{\sum \frac{AA_i}{M_i}}{\sum \frac{AA_i}{M_i}} \times \Delta f_{ti}$$
$$Q = \sum \Delta Q_i \quad (1)$$

式中:

AA_i ——100 g 蛋白质中氨基酸含量, g;

M_i ——氨基酸摩尔质量, g/mol;

$\sum AA_i/M_i$ ——氨基酸总摩尔数, mol;

f_{ti} ——氨基酸侧链疏水性值, kJ/mol;

Q ——蛋白质疏水性值, kJ/mol。

1.3.5 相对分子质量测定

参考 GB31645-2018 胶原蛋白肽的测定, 利用高效液相排阻色谱法 (HPSEC) 对分离纯化得到的 YBCP-2-2 进行分子量分析。

检测波长: 220 nm; 相对分子质量标准品: 杆菌酶 (MW 1450)、细胞色素 C (MW 12500)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (MW 451) 及乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (MW 189); 流动相: $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}:V_{\text{三氟乙酸}}=450:550:1$; 流量: 0.5 mL/min; 柱温: 30 °C。

1.3.6 抗氧化活性测定

1.3.6.1 DPPH·清除能力测定

参考 Morales 等^[8]方法稍作改进, 取 1.00 mL 不同质量浓度 (1.00、2.00、4.00、6.00、8.00 mg/mL) 的胶原蛋白肽液与同体积 0.10 mol/L 的 DPPH 乙醇溶液混合均匀、在暗处室温放置 30 min 后测定 517.00 nm 处吸光度, 空白组为无水乙醇, 对照组为样液与无水乙醇混合液, 阳性对照为 GSH。计算公式如下:

$$D = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D ——DPPH 自由基清除率, %;

A_1 ——样液与 DPPH 乙醇溶液的 OD 值;

A_2 ——样液与无水乙醇的 OD 值;

A_0 ——无水乙醇与 DPPH 乙醇溶液的 OD 值。

1.3.6.2 ABTS⁺自由基清除能力测定

参考商文慧^[9]的方法稍作改进。将 7.00 mol/L 的 ABTS⁺ 溶液与 2.45 mol/L 的过硫酸钾溶液混匀, 避光静置 12 h, 用无水乙醇稀释混合液 40~50 倍, 直至其在 734.00 nm 下吸光值于 0.70±0.02 范围内。向 2.00 mL 的 ABTS⁺ 溶液中分别加入 0.50 mL 不同质量浓度多肽溶液, 静置 10 min 后测定。空白对照为无水乙醇, 阳性对照为 GSH。计算公式如下:

$$F = (1 - \frac{B_1 - B_2}{B_0}) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

F ——ABTS⁺ 自由基清除率, %;

B_0 ——0.5 mL 蒸馏水与 2 mL ABTS 混合液的 OD 值;

B_1 ——0.5 mL 样品与 2 mL ABTS 混合液的 OD 值;

B_2 ——0.5 mL 样品与 2 mL 无水乙醇混合液的 OD 值。

1.3.6.3 总还原力测定

参照冯磊^[10]的方法稍作改进, 取 1.00 mL 不同质量浓度 (1.00、2.00、4.00、6.00、8.00 mg/mL) 的 YBCP-2-2 溶液于试管中, 加入 2 倍体积的 PBS 溶液 (0.20 mol/L, pH 值为 6.60) 和 $K_3Fe(CN)_6$ 溶液

(1.00%, m/V), 混匀后在 50 °C 条件下反应 20 min。反应结束后, 向试管中加入与 PBS 溶液同体积的 10 wt.% TCA 溶液, 迅速混匀后离心 (3 000 r/min, 10 min), 取 2.00 mL 上清液于新试管中, 加入同体积的超纯水、0.40 mL 的 0.10 wt.% $FeCl_3$ 溶液。静止 10 min 后在紫外 700.00 nm 处测定反应液的吸光值, 参比为超纯水, 阳性对照为 GSH。

1.3.7 多肽对酪氨酸酶的动力学研究

1.3.7.1 对酪氨酸单酚酶活性抑制

采用 Chen 等^[11]方法稍作修改, 在体系中加入 20.00 μ L 的 L-酪氨酸 (0.30 mg/mL), 40.00 μ L 不同质量浓度的 YBCP-2-2 溶液 (0、2.50、5.00、10.00、15.00、20.00 mg/mL), 40.00 μ L 的酪氨酸酶溶液 (500 U/mL), 100.00 μ L 的 0.05 mol/L PBS 溶液 (pH 值为 6.80), 总体积为 200.00 μ L 溶液, 用酶标仪于 475.00 nm 处测定 20 min 内反应吸光值变化, 每 30 s 扫描一次。用初速度 dp/dt (产物随时间的变化量) 表示。

1.3.7.2 对酪氨酸二酚酶活性抑制

固定反应体系中酪氨酸酶质量浓度 (500 U/mL), 将 YBCP-2-2 质量浓度设为 0、2.50、5.00、10.00、15.00 mg/mL, 同时将底物 L-多巴质量浓度设为 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 mg/mL。通过酶标仪测定 475.00 nm 处 10 min 内反应的吸光值变化, 测出反应初速度 V_0 并绘制双倒数曲线图, 以 L-DOPA 质量浓度的倒数为 X 轴, V_0 的倒数为 Y 轴, 利用 Lineweaver-Burk 双倒数方程获得 K_m 和 V_{max} , 确定抑制类型。以双倒数曲线中各直线的斜率为 Y 轴, YBCP-2-2 的质量浓度为 X 轴进行作图, 得出抑制常数 KI。

1.3.8 Cu^{2+} 螯合能力测定

参考 Supatcha 等^[12]方法稍作修改, 将 100.00 μ L 不同质量浓度 (2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 mg/mL) 的 YBCP-2-2 与 2.80 mL 的 0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 值为 6.00)、0.10 mL 的 1.00 mg/mL $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 混匀后与 0.06 mL 的 4.00 mmol/L 邻苯二酚紫混匀, 在 632.00 nm 处测定吸光度。空白对照为超纯水, 阳性对照为 EDTA。按公式计算铜离子螯合率:

$$T = (1 - \frac{C_0 - C_1}{C_0}) \times 100\% \quad (4)$$

式中:

T ——铜离子螯合率, %;

C_0 ——空白吸光度;

C_1 ——样品组吸光度。

1.3.9 荧光猝灭试验

参照 Yu 等^[13]的方法测定肽对酪氨酸酶的荧光猝

灭，取 2.00 mL 不同质量浓度 YBCP-2-2 溶液（2.50、5.00、7.50、10.00 mg/mL）与同体积 500 U/mL 酪氨酸酶液混合，扫描混合液的荧光光谱；激发波长：280.00 nm，扫描发射光谱范围为 300.00~500.00 nm。

1.3.10 数据统计与分析

所有试验均重复 3 次，数据处理分析采用 Excel 和 Origin 软件进行，用 Excel 2019 软件做数据统计与计算；并用平均数和标准差表示。

2 结果与分析

2.1 基本成分

由表 1 可知原料牛骨胶原蛋白的基本组成，水分含量和灰分含量均占比不大，分别为 11.33% 和 0.21%。而蛋白质含量较高，达到 85.10% 以上，说明此原料可作为提取胶原蛋白肽的优质原料。

表 1 牦牛骨胶原蛋白基本成分（%）

Table 1 Basic components of yak bone collagen (%)

组成成分	蛋白质	水分	灰分
含量	85.10±0.46	11.33±0.11	0.21±0.23

2.2 氨基酸组成分析

由表 2 数据可知，YBCP-2-2 中的疏水性、芳香族、极性、抗氧化性的氨基酸种类含量分别占总体氨基酸的 42.32%、10.04%、28.43% 和 63.45%。而多肽链中是否有疏水性氨基酸的存在，对功能活性肽的酪氨酸酶抑制能力来说非常关键。如 Schurink 等^[14]研究表明，若生物活性肽的酪氨酸酶抑制（TI）能力较强，那氨基酸组成通常会出现一个或多个精氨酸残基或者苯丙氨酸残基。如果天冬氨酸、丝氨酸、半胱氨酸等不带电荷的极性氨基酸存在于多肽中，那这些氨基酸可能与酪氨酸酶催化多巴形成的多巴醌形成共轭从而抑制黑色素形成^[15]。精氨酸可以增强细胞渗透性，促进多肽与酪氨酸酶之间的相互作用；芳香族氨基酸如苯丙氨酸、酪氨酸等不仅可以作为底物结构类似物和酪氨酸酶形成竞争性抑制作用从而起到抑制其酶活的作用^[16]，也可以提供质子直接猝灭或者抑制自由基，发挥抗氧化功能；丝氨酸和苏氨酸可以与酪氨酸酶酶促反应中的中间产物多巴醌结合产生复合物，抑制其进一步转化为黑色素从而达到抑制酪氨酸酶活性的效果^[17]。因此，YBCP-2-2 多肽中含有十分丰富的有利于抑制酪氨酸酶活性的氨基酸，这些具有明显 TI 活性的氨基酸占蛋白总量的 44.40%，这解释了该组分具有较强的酪氨酸酶抑制活性（TIA）。

表 2 各组分的氨基酸成分分析

Table 2 Amino acid composition analysis of each component

氨基酸/(g/100 g)	相对分子质量	疏水性值/(kJ/mol)	YBCP-2-2
天冬氨酸（Asp）	133.1	2.25	2.08
谷氨酸（Glu）	147.1	2.3	8.46
丝氨酸（Ser）	105.1	0.17	2.61
组氨酸（His）	155.2	2.09	0.3
甘氨酸（Gly）	75.1	0	25.2
苏氨酸（Thr）	119.1	1.87	1.58
精氨酸（Arg）	174.2	3.05	6.86
丙氨酸（Ala）	89.1	3.05	10.36
酪氨酸（Tyr）	181.2	12	0.59
半胱氨酸（Cys）	121.2	0	0.11
缬氨酸（Val）	117.1	7.06	2.43
蛋氨酸（Met）	149.2	5.43	0.19
苯丙氨酸（Phe）	165.2	11.08	8.06
异亮氨酸（Ile）	131.2	12.41	1.47
亮氨酸（Leu）	131.2	10.12	5.17
赖氨酸（Lys）	146.2	6.27	3.16
脯氨酸（Pro）	115.1	10.87	8.76
疏水性 Q 值（kJ/mol）			3.515
疏水性氨基酸比例			42.32%
极性氨基酸比例			28.43%
必需氨基酸比例			24.14%
芳香族氨基比例			10.04%
抗氧化性氨基酸比例			63.45%
TI 活性氨基酸比例			44.40%

注：疏水性氨基酸：Leu、Ala、Val、Met、Phe、Pro、Trp 和 Ile；极性氨基酸：Ser、Thr、Tyr、Cys、Lys、Arg、His、Asp 和 Glu；必需氨基酸：仅测 Phe、Leu、Lys、Val、Ile、Thr 和 Met；芳香族氨基酸：Tyr、Phe 和 Trp；抗氧化性氨基酸：Val、Ala、Glu、Leu、Phe、Pro、Tyr、Ile、Arg、His、Cys、Met 和 Lys；TI 活性氨基酸：Asp、Glu、Ser、His、Thr、Arg、Tyr、Cys、Val、Leu 和 Phe。

2.3 相对分子质量分析

对分离纯化前的胶原蛋白肽（YBCP）和分离纯化得到的 YBCP-2-2 进行分子量分析对比，结果如图 1 和表 3 所示。将 YBCP-2-2 按分子量大小可以分为 5 个部分，且均在 3 000 Da（28 肽）以下，小于 1 000 Da（8 肽）的部分达到了 96.56%，其中 *M_w* 为 259-608 的肽段较为集中，含量约为 90.73%，还有 5.83% 的组分为游离氨基酸。

有研究表明随着组分分子量的减小，其 TIA 越来越大，分子量分布在 1 000 Da 以下的组分抑制酪

氨酸酶活性最高^[18]。另外，小分子的多肽比分子量更大的胶原蛋白肽及其多肽更易被人体吸收，因此能更好的发挥其生物活性作用。YBCP-2-2 的相对分子质量则主要分布在 1 000 Da（2~8 肽）以下，尤其是 500 Da 以下的相对分子含量远远高于分离纯化前的含量，这部分主要由 2~4 肽和游离氨基酸组成，且 YBCP 和 YBCP-2-2 在这部分小肽的峰面积分别占总面积的 49.04% 和 75.54%，酪氨酸酶抑制活性最高的 YBCP-2-2<500 Da（2~4 肽）的部分比 YBCP 高 26.53%，这进一步表明胶原蛋白肽的酪氨酸酶抑制活性与多肽的相对分子量分布密切相关，分子量越小，酪氨酸酶抑制能力越高。

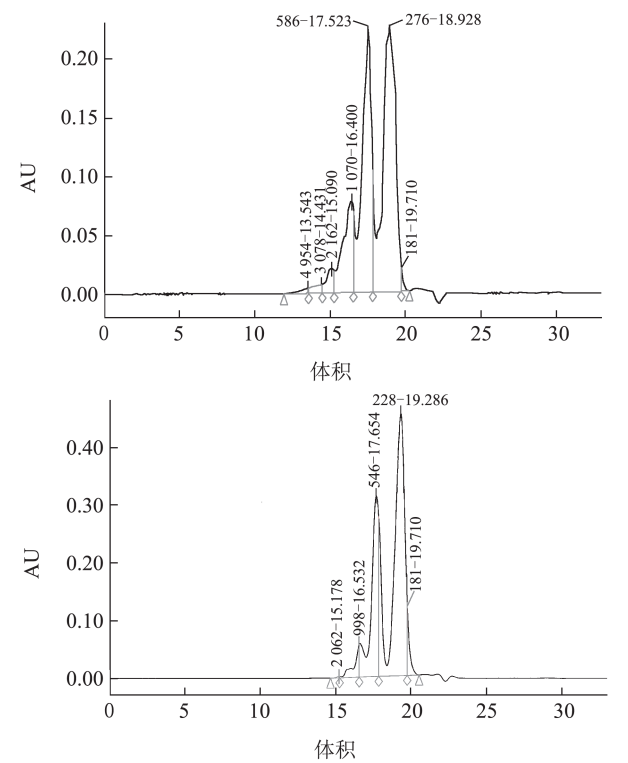


图 1 YBCP2-2 分子量分布峰图

Fig.1 Peak distribution of YBCP-2-2 component

注：a 为 YB；b 为 YBCP-2-2。

表 3 YBCP-2-2的分子量分析			
Table 3 Molecular weight analysis of YBCP-2-2 component			
分子量/Da	肽分布	峰面积百分比/%	
		YBCP	YBCP-2-2
>5 000	>39 肽	0.53	/
3 000~5 000	23~39 肽	1.18	/
2 000~3 000	16~23 肽	2.32	0.04
1 000~2 000	8~16 肽	12.93	3.4
500~1 000	4~8 肽	34	20.99
180~500	2~4 肽	48.44	69.74
<180	游离氨基酸	0.6	5.83

2.4 YBCP-2-2多肽的抗氧化活性

2.4.1 DPPH自由基清除能力

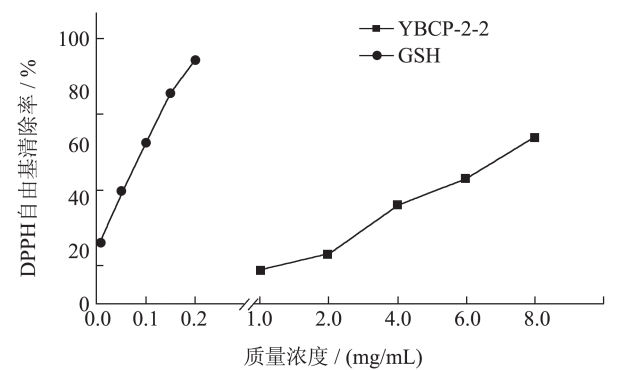


图 2 YBCP-2-2 对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.2 Effect of YBCP-2-2 on DPPH free radical scavenging

DPPH· 是一个非常稳定的自由基，采用 DPPH 法来探究样品的抗氧化能力，反应原理是紫色的 DPPH· 能被加入到体系中的抗氧化物质还原从而转变为黄色^[19]。反应过程中，体系的吸光值随着被还原的 DPPH· 的增大而减小，以此来评价样品样品的抗氧化能力。如图 2 所示，随着多肽组分和 GSH 的浓度升高，两者的 DPPH 自由基清除率逐渐增强；其中 GSH 的 DPPH 自由基清除能力十分突出，IC₅₀ 为 0.054 mg/mL，能使紫色溶液在短时间内变为黄色；YBCP-2-2 的 DPPH 自由基清除能力相对较弱，质量浓度为 8.00 mg/mL 时清除率为 62.87%，IC₅₀ 为 6.02 mg/mL。可能是 YBCP-2-2 组分中含硫氨基酸 Cys 和 Met 的含量极低；蛋氨酸和半胱氨酸残基几乎对所有的活性氧都十分敏感，Met 能通过氧化还原循环清除氢过氧化物、单线态氧等有害物质；Cys 能提供电子发挥抗氧化作用^[20]。同时 Cys 和 Met 都是合成 GSH 的前体物质，合成过程中主要被 Cys 和 γ 谷氨酰半胱氨酸合成酶含量影响，而 GSH 又在清除自由基、维持抗氧化系统方面起着十分重要的作用^[21]。

2.4.2 ABTS⁺自由基清除能力

图 3 可以看出，YBCP-2-2 和 GHS 对 ABTS⁺ 自由基清除能力随着质量浓度增加呈上升的趋势。GSH 具有非常不错的 ABTS⁺ 自由基清除能力，浓度在 0.15 mg/mL 时就能达到 99.20% 的清除率，IC₅₀ 为 0.018 mg/mL；YBCP-2-2 比 GSH 稍显逊色，但浓度为 6.00 mg/mL 时清除率高达 99.42% 接近百分之百，IC₅₀ 为 0.81 mg/mL。可能是因为 YBCP-2-2 含有较高的疏水性氨基酸与芳香族氨基酸；Gly、Val 和 Ala 等疏水氨基酸能通过侧链的脂肪烃让多肽和自由基间的结合变得更为紧密^[22]。Phe 等芳香族氨基酸能通过提

供质子来增强生物活性肽的抗氧化作用^[23]。

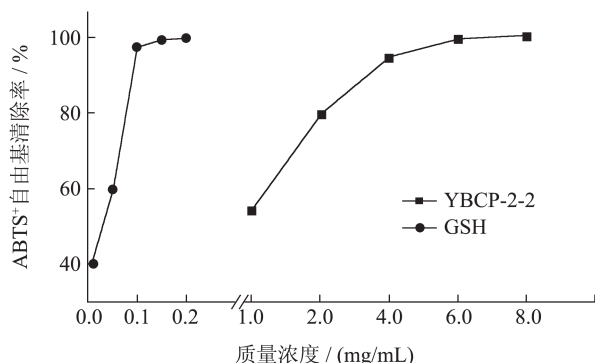


图3 YBCP-2-2对ABTS⁺自由基清除率的影响

Fig.3 Effect of YBCP-2-2 on ABTS⁺ free radical scavenging

2.4.3 总还原力

具有还原能力的样品能将 $K_3Fe(CN)_6$ 还原成为 $K_4Fe(CN)_6$ ， $K_4Fe(CN)_6$ 通过与 Fe^{3+} 反应生成普鲁士蓝，通常用紫外检测仪在700 nm的吸光度代表生成量，且生成量与吸光度成正比^[24]，所以吸光度越大、样品的还原能力越强。由图4可知，GSH的总还原力与其质量浓度成正比，具有较强的总还原力，仅0.25 mg/mL溶液吸光度就高达0.787；YBCP-2-2的总还原力也呈正比，当质量浓度为8.00 mg/mL时吸光度达0.547。但GSH总还原力要强于多肽组分，GSH质量浓度仅为0.15 mg/mL时就与多肽组分在6.00 mg/mL质量浓度时的总还原力相似。

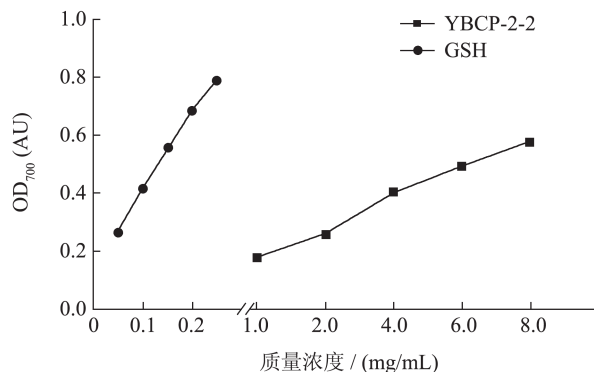


图4 YBCP-2-2的总还原力

Fig.4 Total reducing power of YBCP-2-2

2.5 YBCP-2-2对酪氨酸酶抑制酶动力学研究

2.5.1 YBCP-2-2对酪氨酸单酚酶的抑制作用

由图5可知，不同质量浓度的YBCP-2-2对酪氨酸酶单酚酶的作用进程曲线，曲线的斜率代表反应的速度。未加入YBCP-2-2时，在反应前3 min曲线斜率较小，说明反应速度较慢；在3~15 min内曲线斜率越来越大、反应速率快速上升直至最大，反应产物的

生成量也随时间的增加迅速上升；在15 min后的反应速率略微开始下降。由于在酪氨酸单酚酶催化L-酪氨酸反应过程中的一个典型特征是存在迟滞效应，也就是说其能减缓催化反应而出现迟滞时间，迟滞时间能被反应液中的酶和底物浓度影响^[25]；由图6可知，加入YBCP-2-2的质量浓度增加，反应的初速度显著减小，当抑制物质质量浓度达到20.00 mg/mL时，反应初速度 dp/dt 从0.012/min下降至0.0039/min，说明随胶原蛋白肽浓度的增加，单酚酶的迟滞效应明显增强。总的来说，加入不同质量浓度的YBCP-2-2后，整体反应速度从缓慢上升到快速上升最后趋于平缓；不同质量浓度的胶原蛋白肽不仅降低酪氨酸单酚酶的活性还延长了酶反应的迟滞时间，且随质量浓度增加其延迟情况越来越明显，曲线斜率减小。在相同反应时间下，胶原蛋白肽质量浓度越高反应液的吸光值就越低，代表产物生成量越少，说明组分YBCP-2-2对酪氨酸酶的单酚酶有较好的抑制作用。

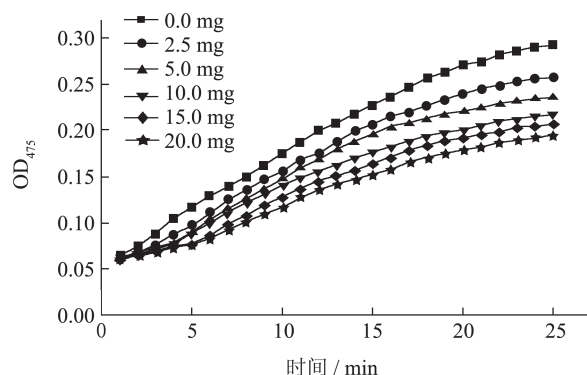


图5 YBCP-2-2对酪氨酸酶单酚酶抑制作用进程曲线

Fig.5 Progress curve of YBCP-2-2 inhibition of tyrosinase
monophenolase

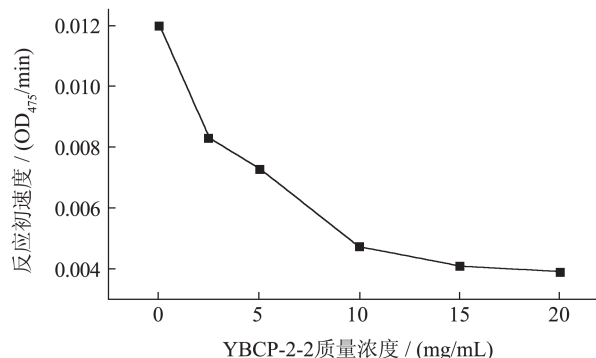


图6 YBCP-2-2对酪氨酸单酚酶反应初速度的影响

Fig.6 Effect of YBCP-2-2 on initial reaction rate of
tyrosine monophenolase

2.5.2 YBCP-2-2对酪氨酸二酚酶的抑制作用

由图7a可知，未添加YBCP-2-2时，酪氨酸

二酚酶与底物 L-多巴的 $V_{\max}$ 为 0.193/min, K_m 值为 1.195 mg/mL。随 L-多巴质量浓度的增加, 反应初速度 V_0 不断增长, 直线斜率随 YBCP-2-2 质量浓度的增大而增大, 所有直线均同时在第二象限的同一点相交, 这代表酶促反应的 $V_{\max}$ 和 K_m 均受到组分 YBCP-2-2 的影响; 随着 YBCP-2-2 质量浓度的升高, 则 $V_{\max}$ 会减小、 K_m 会增大, 说明肽能通过混合型作用抑制二酚酶, 同时还能发生竞争性和非竞争性抑制作用。YBCP-2-2 既能在反应过程中与游离酶结合, 通过竞争酶活性中心将底物 L-多巴排斥在活性中心外; 又能在酶促反应过程中与游离酶及酶-底物复合物结合。由图 7b 可知斜率与对应的 YBCP-2-2 质量浓度关系曲线, 确定 YBCP-2-2 的抑制常数 K_I 为 0.58 mg/mL。

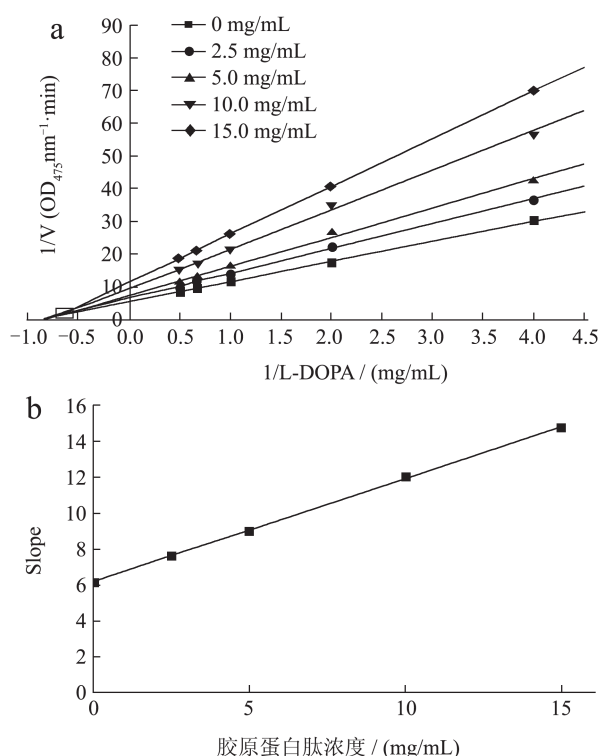


图 7 YBCP-2-2 对酪氨酸二酚酶的抑制类型 (a) 和抑制常数 (b) 的测定

Fig.7 Determination of the type(a) and inhibition constant(b) of YBCP-2-2

2.6 YBCP-2-2 铜离子螯合能力

酪氨酸酶的活性中心含有两个具有催化活性的 Cu^{2+} , 已研究表明小分子肽能以螯合酪氨酸酶内双铜离子的方式来降低酪氨酸酶活性^[26]。结果如图 8 所示, EDTA 仅需要 1.00 mg/mL 时铜离子螯合率就能高达 94.42%, 具有很强的铜离子螯合能力, IC_{50} 为 0.26 mg/mL; 当 YBCP-2-2 质量浓度在 2.00~6.00 mg/mL 范围内时, 对 Cu^{2+} 螯合能力上升较快, 但超过这个范围后螯合率增加的速率减慢; 当 YBCP-2-2 质量浓度为

10.00 mg/mL 时铜离子螯合率高达 79.10%, IC_{50} 为 3.22 mg/mL; 由此可见 YBCP-2-2 在高质量浓度下具有显著的铜离子螯合能力。

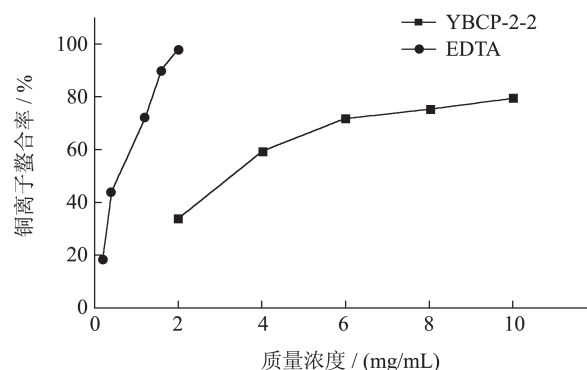


图 8 胶原蛋白肽的铜离子螯合能力

Fig.8 Copper ion chelating capacity of collagen peptides

YBCP-2-2 中有 62.98% 以上的能螯合金属的氨基酸, 尤其是 Glu、Phe 和 Arg 含量相对较多; 研究表明, 具有良好金属螯合能力的多肽中通常有 Asp、Glu、His、Cys、Arg 等氨基酸^[27], Jung 等^[28] 也发现疏水性氨基酸在肽链的起始和末端存在与酪氨酸酶中心的铜离子活性位点形成额外的相互作用。多肽对酪氨酸酶的抑制活性在一定程度上受到了铜离子的螯合能力影响, 宋玉琼等^[29] 证明多肽尤其是小分子是肽段的铜离子结合率越高, 酪氨酸酶抑制能力越强, 这两种活性存在极显著的正相关性。也有研究表明, 酪氨酸酶抑制剂可以分为破坏型和非破坏型, 破坏型又分为几个种类, 而研究最广泛的就是抑制剂可以直接通过破坏酪氨酸酶的双核铜离子活性中心以使酪氨酸酶失活^[30]。

综上所述, YBCP-2-2 因为具有一定 Cu^{2+} 螯合能力, 所以可以通过阻断酪氨酸酶的催化氧化来达到减少黑色素生成目的。

2.7 荧光猝灭

280.00 nm 或 290.00 nm 的激发光能够激发 Tyr、Trp 和 Phe 残基产生荧光, 若蛋白质中同时存在 Trp 和 Tyr 残基, Tyr 残基内分子的能量会转移到 Trp 残基里, 从而导致 Trp 残基的荧光增加和 Tyr 残基的荧光猝灭^[31]。酪氨酸酶的 Trp 残基可以在激发波长为 280.00 nm 处有较强的荧光, 发射波长为 337.00 nm 左右^[32], 因此通过 Trp 荧光光谱的变化来确定 YBCP-2-2 与酪氨酸酶之间的相互作用。YBCP-2-2、酪氨酸酶和 YBCP-2-2 与酪氨酸酶结合后的荧光光谱变化 (290.00~500.00 nm) 如图 9 所示。YBCP-2-2 和酪氨酸酶有明显不同的特征吸收峰, 酪氨酸酶在 340.20 nm 处有荧光发射峰, 随着添加的 YBCP-2-2 质量浓度增

加,酪氨酸酶的内源性荧光强度明显降低,表现出一定的剂量依赖性,且荧光光谱发生红移(从 340.20 nm 移至 351.60 nm),这表示 YBCP-2-2 与酪氨酸酶结合导致酪氨酸酶分子中 Trp 所处的微环境从疏水性内部逐渐转移到外部的水相环境中,即酪氨酸酶的空间结构伸展打开,这种构象上的改变影响了酪氨酸酶的活性^[33]。

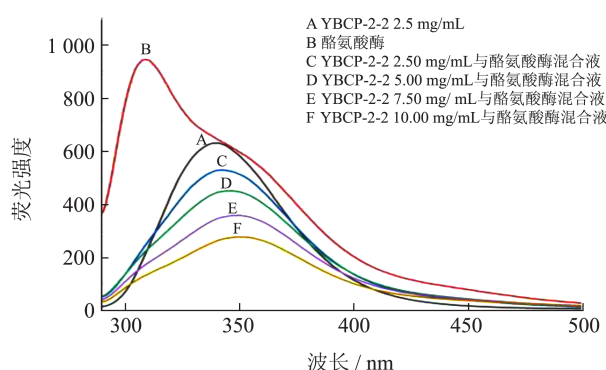


图9 不同质量浓度 YBCP-2-2 对酪氨酸酶荧光光谱的影响

Fig.9 Effect of different mass concentrations of YBCP-2-2 on the fluorescence spectrum of tyrosinase

3 结论

本文发现 YBCP-2-2 能清除 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基,且总还原力在 8.00 mg/mL 时吸光值达 0.57;说明该肽具有一定抗氧化能力。同时铜离子螯合能力测定发现 YBCP-2-2 能螯合金属离子,而铜离子是酪氨酸酶的辅助因子,YBCP-2-2 对铜离子的螯合为酪氨酸酶的抑制做出一定的贡献。另外,荧光淬灭实验也揭示,YBCP-2-2 能与酪氨酸酶结合并使酶蛋白空间结构展开。未添加 YBCP-2-2 时,酪氨酸二酚酶与底物 L-多巴的 $V_{\max}$ 为 0.193/min, K_m 值为 1.195 mg/mL;随着添加 YBCP-2-2 质量浓度的升高, $V_{\max}$ 减小、 K_m 增大,抑制常数 KI 为 0.58 mg/mL;这与报道关于混合型酪氨酸酶抑制剂的 Lineweaver-Burk 方程的实验结果是相似的,因此初步总结出 YBCP-2-2 的抑制类型为混合竞争性抑制,但后续还需要更多的实验结果来证明。本文探讨了肽类抑制剂对酪氨酸酶的抑制作用机制,这对完善酪氨酸酶抑制理论具有重要意义。

参考文献

- [1] HALDYS K, LATAJKA R. Thiosemicarbazones with tyrosinase inhibitory activity [J]. RSC Medicinal Chemistry, 2019, 10(3): 378-389.
- [2] YAMAGUCHI Y, HEARING V J. Physiological factors that regulate skin pigmentation [J]. Biofactors, 2009, 35(2): 193-199.
- [3] BAGHERZADEH K, SHIRGAHI TALARI F, SHARIFIA,

- et al. A new insight into mushroom tyrosinase inhibitors: docking, pharmacophore-based virtual screening, and molecular modeling studies [J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2015, 33(3): 487-501.
- [4] DERI B, KANTEEV M, GOLDFEDER M, et al. The unravelling of the complex pattern of tyrosinase inhibition [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 34993.
- [5] 丁小梅,何善生,王力,等.螺旋藻多糖对酪氨酸酶的抑制作用及抗氧化性能[J].中国食品学报,2019,19(10):86-92.
- [6] DENG Y, HUANG L, ZHANG C, et al. Skin-care functions of peptides prepared from Chinese quince seed protein: sequences analysis, tyrosinase inhibition and molecular docking study [J]. Industrial Crops and Products, 2020, 148: 112331.
- [7] ZHANG X, LIU C, NEPAL S, et al. A hybrid approach for scalable sub-tree anonymization over big data using MapReduce on cloud [J]. Journal of Computer and System Sciences, 2014, 80(5): 1008-1020.
- [8] MORALES-MEDINA R, TAMM F, GUADIX A M, et al. Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying [J]. Food Chemistry, 2016, 194: 1208-1216.
- [9] 商文慧.海胆卵黄蛋白及其酶解物的功能特性研究[D].大连:大连工业大学,2020.
- [10] 冯磊.茶叶籽蛋白提取及其酶解物抗氧化作用研究[D].吉首:吉首大学,2014.
- [11] CHEN M J, HUNG C C, CHEN Y R, et al. Novel synthetic kojic acid-methimazole derivatives inhibit mushroom tyrosinase and melanogenesis [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 122(6): 666-672.
- [12] 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]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(31): 8346-8354.
- [13] YU Z Y, XU K, WANG X, et al. Punicalagin as a novel tyrosinase and melanin inhibitor: inhibitory activity and mechanism [J]. LWT, 2022, 161: 113318.
- [14] 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.
- [15] WU J J, LIN J C, WANG C H, et al. Extraction of antioxidative compounds from wine lees using supercritical fluids and associated anti-tyrosinase activity [J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2009, 50(1): 33-41.
- [16] ISHIKAWA M, KAWASE I, ISHII F. Combination of amino acids reduces pigmentation in B16F0 melanoma cells [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2007, 30(4): 677-681.
- [17] HU Z Z, SHA X M, ZHANG L, et al. From fish scale gelatin to tyrosinase inhibitor: a novel peptides screening approach application [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 853442.
- [18] 宋永相,孙谧,王跃军,等.海洋活性胶原肽的抗氧化性及对酪氨酸

酶的抑制作用与初步分离研究[J].中国食品学报,2009,9(5):7-13.

[19] 韦献雅,殷丽琴,钟成,等.DPPH法评价抗氧化活性研究进展[J].食品科学,2014,35(9):317-322.

[20] QIAN Z J, JUNG W K, KIM S K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(6): 1690-1698.

[21] 霍湘,王安利,杨建梅.含硫氨基酸的抗氧化作用[J].生物学通报,2006,4:3-4.

[22] 张晖,唐文婷,王立,等.抗氧化肽的构效关系研究进展[J].食品与生物技术学报,2013,32(7):673-679.

[23] ZHANG J, LI M, ZHANG G N, et al. Identification of novel antioxidant peptides from snakehead (*Channa argus*) soup generated during gastrointestinal digestion and insights into the anti-oxidation mechanisms [J]. Food Chemistry, 2021, 337: 127921.

[24] 王会,郭立,谢文磊.抗氧化剂抗氧化活性的测定方法(一)[J].食品与发酵工业,2006,3:92-98.

[25] 肖飞,赵曙辉.鹰嘴豆异黄酮对酪氨酸酶的抑制动力学[J].日用化学工业,2010,40(6):439-443.

[26] SHEN Z, WANG Y, GUO Z, et al. Novel tyrosinase inhibitory peptide with free radical scavenging ability [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2019, 34(1): 1633-1640.

[27] 李雪芬,杜斌,丁轲,等.金属螯合肽分离纯化及其抗氧化活性的研究进展[J].中国食物与营养,2016,22(3):35-39.

[28] JUNG S, KIM D H, SON J H, et al. The functional property of egg yolk phosvitin as a melanogenesis inhibitor [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 993-998.

[29] 宋玉琼,胡晓,相欢,等.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[J].南方水产科学,2023,19(1):155-164.

[30] 穆燕.千日红酪氨酸酶抑制剂的分离纯化及其抑制机理研究[D].广州:华南理工大学,2012.

[31] 王守业,徐小龙,刘清亮,等.荧光光谱在蛋白质分子构象研究中的应用[J].化学进展,2001,4:257-260.

[32] ANAND U, JASH C, BODDEPALLI R K, et al. Exploring the mechanism of fluorescence quenching in proteins induced by tetracycline [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2011, 115(19): 6312-6320.

[33] 肖厚荣,盛良全,施春华,等.水杨酸与牛血清蛋白相互作用的荧光光谱研究[J].光谱学与光谱分析,2004,1:78-81.