

沙棘籽乙醇脱氢酶激活肽的激活机理及稳定性

黄琪¹, 罕璐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 610000) (2. 四川阿坝州工业经济研究所, 四川汶川 623000)

摘要: 该研究通过测定不同质量浓度沙棘籽乙醇脱氢酶 (Alcohol Dehydrogenase, ADH) 激活肽的 ADH 激活率、抗氧化性、稳定 ADH 作用、内源荧光光谱、氨基酸组成, 探索其作用机理及不同条件下的稳定性。结果表明, 沙棘籽 ADH 激活肽的 ADH 激活活性呈浓度依赖性, 质量浓度为 10 mg/mL 时 ADH 激活率为 48.92%。沙棘籽 ADH 激活肽具有较强自由基清除力, 1 mg/mL 该肽的 DPPH 自由基清除率达 87.17%、ABTS 自由基清除率达 99.76%, ·OH 清除率则在 4 mg/mL 时达 87.98%, 这使得 ADH 免受自由基攻击。沙棘籽 ADH 激活肽能与 ADH 相互作用, 在 5 mg/mL 及 10 mg/mL 下使 ADH 结构伸展, 这种结构调整更利于 ADH 与底物结合, 这也是 ADH 活性及稳定性提高的原因。该肽的氨基酸构成较为均衡, 亮氨酸、丙氨酸等促酒精代谢氨基酸含量较为丰富。沙棘籽 ADH 激活肽在热、酸碱处理、部分金属离子 (Na⁺, Ca²⁺, K⁺) 处理和胃消化中稳定, Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 对其活性有抑制作用且呈浓度依赖性, 经肠道消化后仍可保持 50.70% 左右的 ADH 激活活性。综上, 沙棘籽 ADH 激活肽具较强的 ADH 激活作用, 能为 ADH 创造稳定有利环境, 且具有较好稳定性。

关键词: 沙棘籽蛋白; ADH 激活肽; 作用机理; 稳定性

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.11.1083

Activation Mechanism and Stability of Alcohol Dehydrogenase Activating Peptide from Sea Buckthorn Seed

HUANG Qi¹, HAN Lu¹, HUANG Meigui¹, BI Xiufang¹, CAI Yinchuan², HAO Gang^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Southwest Minzu University, Chengdu 610000, China)

(2. The Research Institute of Industrial Economy of Aba, Wenchuan 623000, China)

Abstract: In this study, the activation rate of alcohol dehydrogenase (ADH), antioxidant properties, stabilizing effects on ADH, endogenous fluorescence spectra, and amino acid composition of ADH-activating peptides from sea buckthorn seeds at various concentrations were assessed in order to investigate their mechanism of action and stability in diverse conditions. It was demonstrated by the results that the ADH activation activity of sea buckthorn seed peptides is concentration-dependent, with an activation rate of 48.92% observed at a concentration of 10 mg/mL. Strong free radical scavenging capabilities were exhibited by the peptides, with a DPPH free radical scavenging rate of 87.17% and an ABTS free radical scavenging rate of 99.76% achieved at a concentration of 1 mg/mL, while an ·OH scavenging rate of 87.98% was reached at 4 mg/mL. ADH is protected from free radical attacks by this activity. The sea buckthorn seed ADH activating peptide can be interacted with by ADH, resulting in structural extension of ADH at concentrations of 5 mg/mL and 10 mg/mL. This structural adjustment facilitates the binding of ADH to the substrate, which is also the reason for the increased activity and stability of ADH. The amino acid composition of the peptide is considered relatively balanced, with a rich content of alcohol-metabolizing amino acids such as leucine and alanine. The sea buckthorn seed ADH activating peptide is stable under heat, acidic and alkaline treatments, exposure to certain metal ions (Na⁺, Ca²⁺, K⁺), and gastric digestion. An inhibitory effect is exerted on its activity by Fe²⁺ and Fe³⁺ in a concentration-dependent manner, and approximately 50.70% of its ADH activating activity can still be maintained after intestinal digestion. In summary, a strong ADH activating effect is possessed by the sea buckthorn seed ADH activating peptide, a stable and favorable environment for ADH is created, and good stability is demonstrated.

Key words: Sea buckthorn seed protein; ADH activating peptides; Mechanism of action; stability

收稿日期: 2024-07-25; 修回日期: 2024-09-29; 接受日期: 2024-10-09

基金项目: 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金 (ZYN2025116)

作者简介: 黄琪 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白质化学研究, E-mail: 1012962812@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

研究表明,多种疾病与长期过量饮酒有关,其中酒精性肝损伤就是最典型的例子,因此解酒护肝课题成为当今研究的热点。当乙醇在机体内吸收速率大于其氧化代谢速率,就会导致机体内乙醇浓度急剧上升,造成全身性的神经功能损伤,引发呼吸抑制、昏迷和心跳骤停等危急症状^[1],严重的可能造成生命危险。乙醇摄入后在机体内首先通过口腔,后由胃的“首过效应”、肠以及胰腺等组织吸收一小部分,最后约有90%~98%的乙醇被肝脏代谢,还有小部分通过呼吸,尿液和汗液排出^[2]。高浓度酒精及其代谢中间产物是引起酒精性肝损伤最直接的原因。加快酒精代谢、降低血液中毒性因子浓度是缓解肝脏损伤的一个途径。乙醇在人体中的氧化代谢途径有三条:乙醇脱氢酶(Alcohol Dehydrogenase, ADH)、过氧化氢酶(Catalase From *Micrococcus Lysodeikticus*, CAT)、微粒体乙醇氧化体系(Microsomal Ethanol Oxidizing System, MEOS)。在健康人体中,吸收的大多数乙醇通过肝脏中ADH途径进行代谢^[3]。

ADH是一种锌依赖性酶,每个亚基的两个锌原子在酶中发挥不同的功能:一个锌原子位于ADH的活性位点,负责与底物结合,第二个锌原子通过稳定酶的三级结构来发挥突出的构象作用,多肽可能通过诱导ADH三级和四级结构变化从而促进乙醇与ADH的活性部位结合^[4]。同时乙醇的代谢可诱导氧化应激^[5],代谢过程中产生的自由基会抑制ADH的活性。有研究表明ADH激活率与羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除率基本上呈正相关关系,这说明ADH激活效果与抗氧化性有着密不可分的关系,而小分子肽有着抗氧化、清除体内自由基、增强肝组织的解毒功能排泄毒物的作用,因此利用生物活性肽制备新型解酒护肝产品具有重大意义^[6]。

沙棘籽蛋白质含量丰富,可达到25%,是制备生物活性肽的优质植物蛋白原料^[7]。沙棘籽多肽具有天然健康、营养丰富、生物活性多样等优点,是一种极具潜力的天然生物活性物质。但目前沙棘籽经过榨取油脂后大多被当作饲料或废料进行处理,深加工产品较少,关于沙棘籽多肽制备的研究报道也相对较少,对沙棘籽蛋白资源的深度开发利用仍处于探索的初期阶段。沙棘籽蛋白作为一种优质的植物蛋白来源,其开发利用不仅可以提升沙棘加工产业的附加值、促进地方经济发展,更能满足现代人对健康食品日益增长的需求。在本实验室前期研究中,从沙棘籽蛋白的酶解物中分离纯化出高ADH激活率的组分S-1,在本研究中,通过测定沙棘籽ADH激活肽对DPPH、ABTS自由基以及 $\cdot\text{OH}$ 的清除率,结合对ADH稳定性的考量以及氨基酸分析,从多个角度揭示了沙棘籽ADH激活肽的作用机理,并对沙棘籽ADH激活肽的稳定性进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

沙棘籽,松潘县夏旭冬日天然沙棘食品公司;2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、乙醇脱氢酶(ADH)(268 U/mg)、氧化型辅酶I(NAD^+)、胃蛋白酶(1:30 000)、胰蛋白酶(1:250),上海源叶生物科技有限公司;过硫酸钾($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)、 FeSO_4 、 H_2O_2 、水杨酸,科隆化学品(成都)有限公司;其余试剂均为常规分析纯及色谱纯。

1.2 仪器与设备

UV1810S紫外可见分光光度计,佑科仪器仪表有限公司;A 300全自动氨基酸分析仪,德国MembraPure公司;荧光分光光度计(F-4700),日本日立公司;PSH-3CpH计,上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 沙棘籽ADH激活肽的制备

本实验以提取的沙棘籽蛋白为底物,质量浓度5%,pH值6.5,温度55℃,先添加风味蛋白酶酶解2h,[E]/[S]为4 000 U/g,灭酶后再加入木瓜蛋白酶水解2h,pH值7,温度50℃,[E]/[S]为3 000 U/g。酶解液用DA201-C大孔吸附树脂纯化,质量浓度55%的乙醇溶液作为解吸剂,流速1.5 mL/min,收集高活性组分后用3 000 Da超滤离心管离心,收集小于3 000的组分,最后用葡聚糖凝胶Sephadex G-15对该组分进一步分离纯化,获得三个组分,其中组分S-1的相对分子质量主要分布在180-500 Da,这部分主要是小分子量的肽(2~4肽),此外4~8肽S-1的占比也最高,组分S-1的ADH激活率较处理前也显著提升,为45.5%,选择该组分为沙棘籽ADH激活肽。

1.3.2 ADH 激活率测定

称取适量沙棘籽 ADH 激活肽，配置为不同质量浓度的溶液（0.1, 1, 2, 10 mg/mL），ADH 激活率用瓦勒-霍赫法进行测定，在试管中依次加入焦磷酸钠缓冲液（pH 值=8.8）1.5 mL，0.027 mol/L 氧化型辅酶 I（NAD⁺）

1.0 mL，11.5%（V/V）的乙醇溶液 0.5 mL，以及 0.1 mL 样品溶液，混合均匀后，放入 37 °C 的水浴锅中保温 5 min，保温结束后的试管立即加入 ADH 溶液（0.05~0.25 U/mL）0.1 mL，混匀后立即用紫外分光光度计测定其在 340 nm 处的吸光值，每隔 10 s 记录一次，连续记录 5 min，取反应最初呈线性关系的吸光值作图，以 0.1 mL 超纯水代替

肽溶液为对照，根据式（1）计算 ADH 酶活力，进而根据式（2）计算出 ADH 激活率^[8,9]。

$$E = \frac{\Delta A_{340} \times 3.2}{E_w \times 6.2} \quad (1)$$

式中：

E —ADH 酶活力，U；

ΔA_{340} —线性反应初期 10 s 增加的吸光值；

3.2—反应液的总体积，ml；

E_w —反应液中的酶含量，mg/mL；

6.2—NADH 的克分子吸光值系数。

$$A = (E_S - E_C) / E_C \quad (2)$$

式中：

A —ADH 激活率，%；

E_S —样品组的酶活力，U；

E_C —对照组的酶活力，U。

1.3.3 ·OH 清除率测定

参照章萍萍^[10]的方法稍作修改：准确吸取不同质量浓度（0.1, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL）沙棘籽 ADH 激活肽溶液 1 mL，加入 1.0 mL 3 mmol/L FeSO₄ 溶液和 1.0 mL 3 mmol/L H₂O₂ 溶液，室温静置反应 10 min 后加入 1.0 mL 3 mmol/L 水杨酸溶液在 37 °C 恒温水浴锅中反应 30 min，以蒸馏水为参比，在 510 nm 下测定吸光度值。空白组以蒸馏水代替样品溶液，本底组以蒸馏水代替 FeSO₄ 溶液 H₂O₂ 溶液和水杨酸溶液，其余操作相同。按式（3）计算·OH 清除率。

$$R = (A_0 - A_1 + A_2) / A_0 \times 100\% \quad (3)$$

式中：

R —·OH 清除率，%；

A_0 —空白组的吸光度；

A_1 —样品组的吸光度；

A_2 —本底组的吸光度。

1.3.4 DPPH 自由基清除率测定

参照赵强忠等^[11]的方法稍作修改：准确吸取不同质量浓度（0.1, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL）的沙棘籽 ADH 激活肽样品溶液 2 mL，与等量浓度为 0.1 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液均匀混合，于室温下暗处静置 30 min，在 517 nm 下测定其吸光度。空白组为等量乙醇溶液与 DPPH 溶液，对照组为等量乙醇溶液和肽溶液，其余操作相同。按式（4）计算 DPPH 自由基清除率。

$$R_D = [1 - (A_S - A_C) / A_B] \times 100 \quad (4)$$

式中：

R_D —DPPH 自由基清除率，%；

A_B ——空白组的吸光度;

A_S ——样品组的吸光度;

A_C ——对照组的吸光度。

1.3.5 ABTS 自由基清除率测定

参照马思彤等^[12]的方法稍作修改: 取 10 mg ABTS 溶于 2.6 mL 超纯水中配制为 7 mmol/L 的 ABTS 溶液, 取 3.45 mg 过硫酸钾溶于 2.6 mL 蒸馏水中配制成 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液, 将两者按体积比 1:1 混合配制为 ABTS 储备液, 使用前在 37 °C 下避光静置 12 h 后用 0.2 mol/L pH 值 7.4 的 PBS 稀释 ABTS 储备液 (20~30 倍), 使其在 734 nm 波长处的吸光度为 0.70 ± 0.02 , 便为 ABTS 工作液, 现用现配。取 1.8 mL ABTS 工作液和 0.2 mL 不同质量浓度 (0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mg/mL) 的样品溶液, 振荡 10 s 混匀后在 37 °C 下静置反应 5 min, 在 734 nm 波长处测定反应体系的吸光度, 对照组为 1.8 mL ABTS 工作液和 0.2 mL PBS 溶液, 其余操作相同。参比液为 PBS 溶液。按式 (5) 计算 ABTS 自由基清除率。

$$R_A = (A_C - A_S) / A_C \quad (5)$$

式中:

RA——ABTS 自由基清除率, %;

AS——样品组的吸光度;

AC——对照组的吸光度。

1.3.6 ADH 稳定性测定

参考肖楚乔^[8]的方法稍作修改: 将 0.1 mL 不同质量浓度样品溶液 (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/mL) 与同体积的 ADH (0.25 U/mL) 混合, 置于 37 °C 下保温一定时间 (0, 15, 30, 60, 90, 120 min) 后, 加入 3 mL 反应试剂开始检测 ADH 酶活力。反应试剂中包含焦磷酸钠缓冲液 (pH 值 8.8)、11.5% 乙醇和 0.027 mol/L NAD⁺ 溶液。测定 ADH 酶活力, 并记录该反应停止时的时间。保温 0 min 时的 ADH 相对酶活力记录为 V_0 , 按式 (6) 计算经保温后的相对 ADH 酶活力。

$$R = \frac{V_s}{V_0} \quad (6)$$

式中:

R——ADH 相对酶活力, U;

V_s ——保温结束后的 ADH 活力, U;

V_0 ——保温 0 min 时的 ADH 酶活力, U。

1.3.7 内源荧光光谱的测定

参照 Wan 等^[13]的方法稍作修改: 将 ADH 溶于 PBS 缓冲液 (10 mmol/L, pH 值 7.0), 质量浓度为 0.2 mg/mL, 取 1 mL ADH 溶液与等量不同质量浓度 (0.01, 0.1, 1, 2, 5, 10 mg/mL) 的沙棘籽 ADH 激活肽溶液混合后测定其荧光光谱, 参比为对应质量浓度的肽溶液。激发波长设定 280 nm, 发射波长扫描 300~500 nm, 测定温度为 37 °C。

1.3.8 氨基酸组成分析

样品前处理: 准确称取 1.00 g 样品, 加入质量浓度 5% 的三氯乙酸溶液定容至 25 mL, 4 °C 下静置 30 min, 4 °C 下 1 000 r/min 离心 5 min, 进样全自动氨基酸分析仪进行测定。分析仪条件: C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温 40 °C; 流速为 0.4 mL/min; 流动相 A 为 10 mmol/L Na₂HPO₄ 和 Na₂B₄O₇ (1:1, V/V, pH 值 8.2), 流动相 B 为乙腈: 甲醇: 水 (45:45:10, V/V/V)。

1.3.9 沙棘籽 ADH 激活肽的稳定性

1.3.9.1 热稳定性

将沙棘籽 ADH 激活肽溶液 (10 mg/mL×10 mL) 置于水浴锅或高压蒸汽灭菌锅中设定温度为 25、37、50、80、100、121 °C 保温 1 h, 稀释其质量浓度为 5 mg/mL, 测定其 ADH 激活率, 以 25 °C 温度处理的组别为对照组 (100%), 测定并计算其余 ADH 激活保留率。

1.3.9.2 pH 稳定性

分别将沙棘籽 ADH 激活肽溶液 (10 mg/mL×10 mL) 用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 分别调节 pH 值为 3、5、7、9、11、12 在室温下维持 1 h, 再调节 pH 值为 7 并稀释其质量浓度为 5 mg/mL, 以 pH 值为 7 处理的组别为对照组 (100%), 测定并计算其余 ADH 激活保留率。

1.3.9.3 金属离子稳定性

分别将沙棘籽 ADH 激活肽溶液 (10 mg/mL×10 mL) 与 0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L 的 NaCl, CaCl₂, FeCl₂, FeCl₃, KCl 溶液混合, 在室温下维持 1 h 并稀释其质量浓度为 5 mg/mL, 以未添加金属离子的组别为对照组(100%), 测定并计算其余 ADH 激活保留率。

1.3.10 胃肠道模拟消化

参照 Alting 等^[14]的方法并稍作修改。第 1 组: 将沙棘籽 ADH 激活肽溶液 (10 mg/mL×10 mL) 按 1:50 (m/m) 加入胃蛋白酶, 在 pH 值=2, 37 °C 条件下酶解 2 h, 90 °C 水浴 10 min 灭酶, 冷却至室温; 第 2 组: 在上述条件下先加入胃蛋白酶酶解 2 h, 再加入 1:50 (m/m) 胰蛋白酶在 pH 值=8, 37 °C 条件下反应 2 h, 灭酶后冷却至室温。第 3 组: 不加胃蛋白酶和胰蛋白酶, 自然 pH 值, 其余处理流程相同。反应结束后均稀释样品质量浓度为 5 mg/mL 后以第 3 组为对照组 (100%), 测定并计算 ADH 激活保留率。

1.4 数据处理与分析

实验数据均重复 3 次取平均值, 使用 Excel 进行数据统计, 使用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行 Duncan 法多重比较, ANOVA 方差分析。

2 结果与分析

2.1 沙棘籽 ADH 激活肽的 ADH 激活率

不同质量浓度沙棘籽 ADH 激活肽的 ADH 激活率如图 1 所示, ADH 激活率随着肽的质量浓度的升高而增加, 呈现一定的量效关系, 但当肽的质量浓度达到 5 mg/mL 之后 ADH 激活率增长率变得平缓, 10 mg/mL 时 ADH 激活率为 48.92%, 这可能是因为肽浓度升高后整体颜色加深, 对吸光值的测量有一定影响。多肽对 ADH 的影响, 一般可通过改变 ADH 内关键氨基酸残基例如 Tyr、Phe 以及 Ser 的微环境, 并促使 ADH 结构发生扩展, 以此增强底物接近活性位点的能力, 从而强化其催化效能。

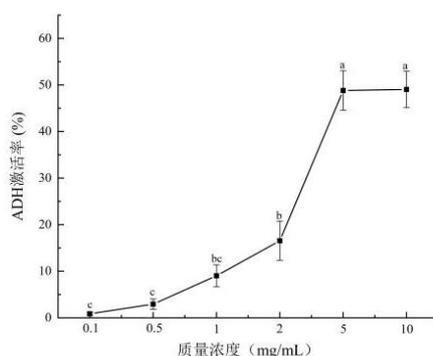


图 1 不同质量浓度沙棘籽肽的 ADH 激活率

Fig.1 ADH activation by different mass concentrations of sea buckthorn seed peptides

注: 不同字母表示差异显著, $P < 0.05$, 下同。

2.2 沙棘籽 ADH 激活肽抗氧化活性测定结果

自由基的产生是乙醇代谢过程中引起肝细胞损伤的重要诱因之一。乙醇在肝脏微粒体和体内能够转化为自由基代谢物——1-羟乙基自由基, 后者在化学反应中进一步产生·OH, 脉冲辐解研究表明·OH 占乙醇在体内产生的自由基总量的 80%^[15]。ADH 激活率与·OH 自由基清除率基本上呈正相关关系, 因此测量沙棘籽 ADH 激活肽的抗氧化活性可从另一角度揭示沙棘籽 ADH 激活肽的激活机理^[7]。沙棘籽 ADH 激活肽的清除自由基能力如图 2 所示。

由图 2A 可知,在肽的质量浓度较低时,抗氧化能力与浓度呈正相关,自由基清除率随肽的质量浓度增大而上升。DPPH 自由基清除率在肽的质量浓度为 1 mg/mL 时达到峰值(87.17%), $\cdot\text{OH}$ 清除率则在肽的质量浓度为 4 mg/mL 时最高(87.98%);由图 2B 可知,在 0.01 mg/mL 时沙棘籽 ADH 激活肽已经表现出 ABTS 自由基清除率,在 0.5 mg/mL 时已经达到 94.32%,而后均保持在 99%以上,该结果表明,沙棘籽 ADH 激活肽在特定的实验条件下,展现出了优越的自由基清除能力。沙棘籽 ADH 激活肽的抗氧化氨基酸的含量达到了 25.61% (见表 1),它们可以直接与自由基发生反应从而减少自由基数量,赋予沙棘籽 ADH 激活肽抗氧化能力。逢治飞^[16]使用风味蛋白酶和中性蛋白酶复合酶解制备沙棘籽粕肽,其 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力随质量浓度的增大而增强,当肽的质量浓度达到 1.0 mg/mL 时, $\cdot\text{OH}$ 清除率为 60%左右,DPPH 自由基清除率在 65%以上,ABTS 自由基清除能力达到 99%,这与本研究结果相似。由于自由基的清除能力与 ADH 活性之间的关联性,可推测在过量饮酒后,由于自由基的攻击,ADH 的活性受到抑制,而当这些自由基被有效清除后,为 ADH 的稳定活力的发挥提供了良好环境,这也许是其激活机制中的一环^[17]。

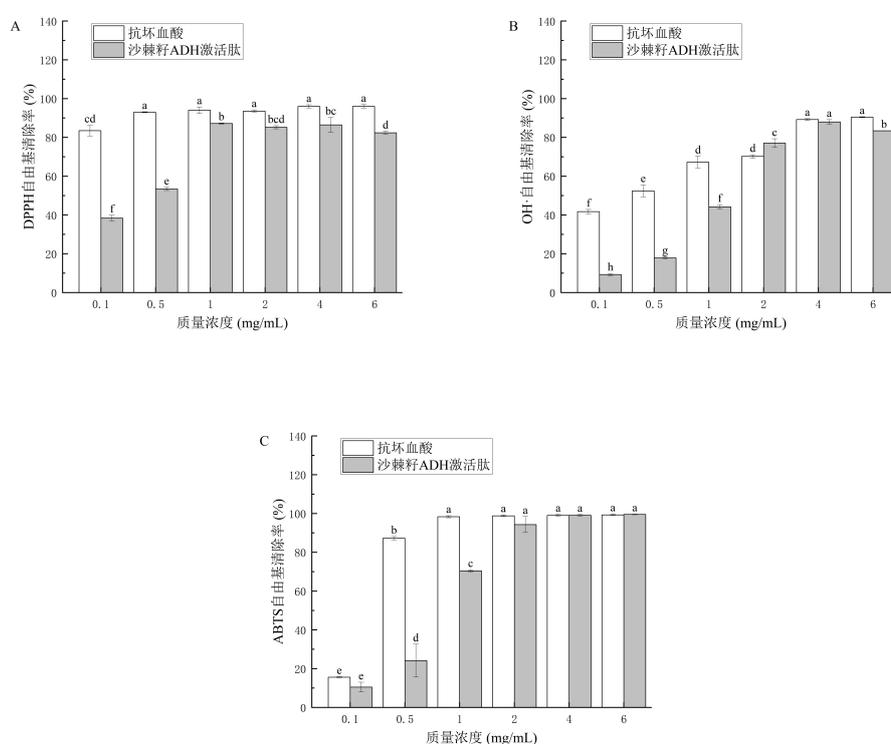


图 2 沙棘籽肽的抗氧化活性

Fig.2 Antioxidant activity of sea buckthorn seed peptides

2.3 沙棘籽 ADH 激活肽对 ADH 稳定性的测定结果

在 37 °C 保温后沙棘籽 ADH 激活肽对 ADH 稳定性的影响如图 3 所示。由图可知,随着保温时间的增加,ADH 的酶活性显著降低,当保温时间为 60 min 时,ADH 的活性下降到其初始活性的 16.67%,而保温时间达到 120 min 后,活性仅为初始活性的 10.45%,几乎完全丧失。加入 0.1 mg 的沙棘籽 ADH 激活肽对 ADH 酶相对活力略有提升但并不明显。当加入 1 mg/mL 以及更高质量浓度的沙棘籽 ADH 激活肽与 ADH 共同保温,ADH 能够保持更高的活性。当 ADH 激活肽的质量浓度达到 5 mg/mL 以上时,保温 15 min 后 ADH 活力不降反增,即使保温 120 min,ADH 的活性也没有明显下降。这些观察结果表明,ADH 激活肽能够显著提高 ADH 的稳定性,并维持其酶活性。提高酶稳定性的方法多种多样,其中包括运用添加剂、酶分子的化学修饰,以及酶固定化等手段^[18]。例如 Uygun 等^[19]将 ADH 固定到金属螯合冷冻凝胶 (HEMA-GMA) 上,发现固定后 ADH 的稳定性高于游离酶。以上结果表明,沙棘籽 ADH 激活肽的存在可提高 ADH 的稳定性,此时沙棘籽 ADH 激活肽充当了 ADH 稳定剂的角色。

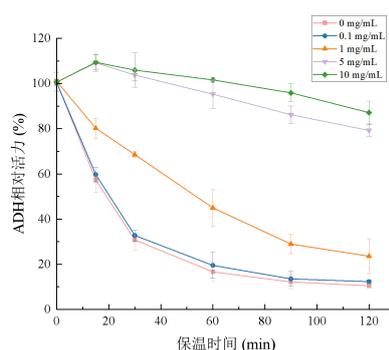


图3 沙棘籽 ADH 激活肽对 ADH 稳定性的影响

Fig.3 Effect on ADH activating peptides from sea buckthorn seed on ADH stability

2.4 沙棘籽 ADH 激活肽对 ADH 内源荧光光谱的影响

芳香族氨基酸 Trp 具有荧光活性, 当其侧链基团与小分子物质发生相互作用时, 蛋白的内源荧光可能会发生猝灭, 这种荧光猝灭现象可以从分子层面反映出蛋白质与小分子之间的结合模式^[8]。沙棘籽 ADH 激活肽对 ADH 内源荧光的影响如图 4 所示。由图可知, 沙棘籽 ADH 激活肽的质量浓度低于 1 mg/mL 时, ADH 的荧光强度并未发生明显变化, 然而当沙棘籽 ADH 激活肽的质量浓度提升至 2 mg/mL 时, 随着浓度的增加, 荧光强度出现了明显的猝灭现象, 这是因为配体与蛋白质荧光团之间相互作用, 导致了荧光量子产率的降低, 提示肽与 ADH 之间存在相互作用^[20]。 λ_{\max} 与 Trp 所处微环境有关, 当 Trp 残基由极性环境转移到疏水环境时, 其荧光光谱会蓝移, 反之荧光光谱会红移, 值得注意的是, ADH 的荧光发射峰位于约 325 nm 处, 当沙棘籽 ADH 激活肽的质量浓度达到 5 mg/mL 时, 观察到内源荧光发生了明显的红移, 表明沙棘籽 ADH 激活肽的加入改变了 ADH 构象, 结构舒展, Trp 从酶蛋白分子内部逐渐外露。蛋白质与配体或辅助因子的结合可能改变其构象, 使得原本被包埋的 Trp 残基暴露出来^[21]。结合图 1 和图 3 分析可知, 在沙棘籽 ADH 激活肽质量浓度为 5 mg/mL 的条件下, ADH 的激活率及稳定性均明显提高, 此时观察到 λ_{\max} 明显红移, ADH 结构发生了伸展, 说明 ADH 这种相对较伸展与敞开的结构或许更利于与底物结合, 推测 ADH 空间结构的展开是其活性提高的潜在原因。

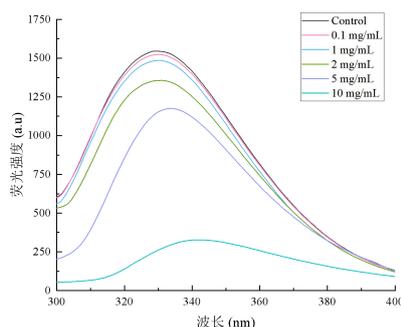


图4 沙棘籽肽对 ADH 内源荧光的影响

Fig.4 Effect of ADH activating peptides from sea buckthorn seed in the intrinsic fluorescence of ADH

2.5 沙棘籽 ADH 激活肽氨基酸组成分析

沙棘籽 ADH 激活肽的氨基酸组成如表 1 所示, 肽的氨基酸构成较为均衡。其中, 必需氨基酸的含量为 26.68%, 支链氨基酸的比例占 12.69%, 有研究表明, 支链氨基酸的摄入是一种有效地缓解肝损伤的方法^[22]; 抗氧化氨基酸的含量达到了 25.61%, 这些氨基酸对于提高活性肽的自由基清除能力起到了关键作用。沙棘籽 ADH 激活肽的 ADH 激活机制可能在于其高效清除自由基的能力, 通过减少自由基对 ADH 的攻击, 结合 ADH 改变其空间构象来增强酶的稳定性。这一点与先前进行的抗氧化性试验以及 ADH 稳定性试验结果相互印证。沙棘籽 ADH 激活肽

中的 Leu、Ala 含量达到了 9.75%，除了清除自由基的能力以外，还能提高血液中 Leu、Ala 的含量。提高血液内 Leu、Ala 浓度可产生稳定的 NAD⁺，即 ADH 的辅酶，从而增强 ADH 活性，Ala 会参与肝脏中糖异生反应，促使 NADH 氧化成 NAD⁺，从而保持 NAD⁺ 稳定存在，协助羧酸循环正常进行，促进乙醇分解与代谢的发生^[23]。此外，His、Pro、Gly 几种氨基酸的含量也较为丰富，上述氨基酸可在一定程度上加速酒精代谢并缓解酒精性肝损伤^[24,25]。沙棘籽 ADH 激活肽的多种氨基酸共同赋予了其独特的生物活性和保健功能，这些氨基酸的协同作用使得沙棘籽 ADH 激活肽在营养学和医学领域具有广阔的应用前景。

表 1 沙棘籽 ADH 激活肽的氨基酸组成 (g/100 g)

Table 1 Amino acid composition of ADH activating peptides from sea buckthorn seed (g/100 g)

氨基酸种类	含量
Asp	9.88
Glu	10.62
Ser	3.97
His	2.68
Gly	3.64
Thr	2.27
Arg	2.93
Ala	3.21
Tyr	4.86
Cys-s	2.47
Val	3.66
Met	1.21
Phe	3.27
Ile	1.53
Leu	3.37
Lys	2.69
Pro	5.23
总量	67.47
疏水性氨基酸比例/%	31.84%
抗氧化性氨基酸比例/%	25.61%
支链氨基酸比例/%	12.69%
芳香族氨基酸比例/%	12.05%
促酒精代谢氨基酸比例/%	9.75%
必需氨基酸比例/%	26.68%

注：疏水性氨基酸指 Ala、Met、Phe、Leu、Ile、Val、Trp 和 Pro；抗氧化性氨基酸指 His、Tyr、Leu、Trp、Lys、Met 和 Cys；支链氨基酸指 Leu、Val 和 Ile；芳香族氨基酸指 Tyr、Phe 和 Trp；必需氨基酸指 Leu、Lys、Ile、Thr、Phe、Val、Trp 和 Met；促酒精代谢氨基酸指 Leu、Ala。

2.6 沙棘籽 ADH 激活肽的稳定性

热加工与 pH 值变化在食品加工中都较为常见，pH 值可通过诱导肽的构象变化，或是引起肽的电荷波动从而影响其活性^[26]。如图 5A、B 所示，在本实验选取的温度、pH 值范围内，实验组与对照组相比均没有出现显著差异，表明沙棘籽 ADH 激活肽有着良好的热稳定性以及酸碱稳定性。该肽在制备过程中经过了高温灭酶，若存在因温度上升而引发的肽不稳定问题，该问题在灭酶过程中便已发生，因此后续的再次加热不会对肽活性产生影响。

响^[27]。本实验选取的 pH 值 2~10 的范围已经满足绝大部分食品加工的条件, 表明沙棘籽 ADH 激活肽具有较大的产品开发潜力。

金属材料是食品包装里十分重要的材料之一, 本实验探究了 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} 对沙棘籽 ADH 激活肽活性的影响, 结果如图 5C 所示。由图可知 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 对肽影响较小, 即使在组中最高浓度 1 mmol/L 时也无显著抑制作用 ($P < 0.05$); Fe^{2+} 与 Fe^{3+} 对稳定性的影响较大, 在离子浓度为 1 mmol/L 时 ADH 相对激活率分别降低到 22.76% 和 39.15%, 可能是因为 Fe^{2+} 一类的金属离子介导的氨基酸残基氧化会引起蛋白质氧化损伤, 影响其生物活性^[28]。在食品包装时应尽量避免铁质材料。

绝大多数功能性食品均通过口服摄入, 沙棘籽 ADH 激活肽体外模拟胃肠道消化试验结果如图 5D 所示。由图可知, 经胃蛋白酶作用后沙棘籽 ADH 激活肽活性略微下降但与对照组无显著性区别 ($P > 0.05$), 再经胰蛋白酶水解后, ADH 激活率显著下降, 但较对照组仍保持了 50.7% 的活性。这可能是由于沙棘籽 ADH 激活肽酸碱稳定性良好, 可抵抗极端 pH 值以及未被胃蛋白酶切断活性肽段, 而胰蛋白酶对羧基端为 Lys 和 Arg 的肽键有特异性, 会降低水解产物的整体疏水性, 引起 ADH 激活活性下降^[29], 这也进一步说明了这些肽上还存在胰蛋白酶的酶切位点。

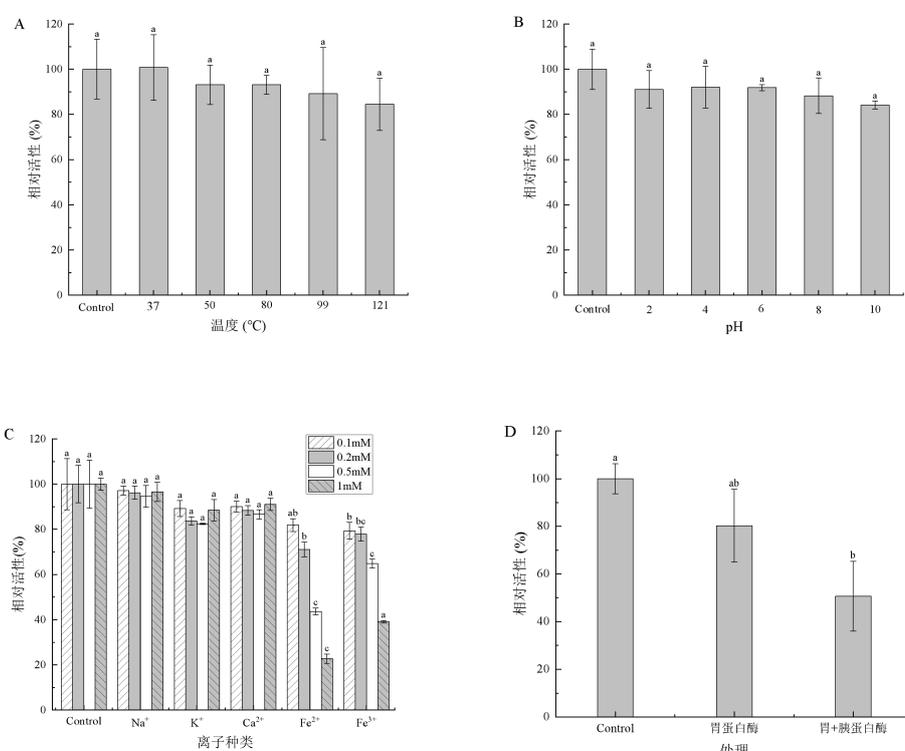


图 5 沙棘籽 ADH 激活肽的稳定性

Fig.5 Stability of ADH activating peptides from sea buckthorn seeds

3 结论

本研究围绕沙棘籽 ADH 激活肽的 ADH 激活机理展开研究。实验表明, ADH 激活率与沙棘籽 ADH 激活肽浓度呈现一定的量效关系, 肽的质量浓度达到 5 mg/mL 之后 ADH 激活率增长率变得平缓, 10 mg/mL 时 ADH 激活率为 48.92%; 沙棘籽 ADH 激活肽表现出良好的自由基清除能力, 当肽的质量浓度为 1 mg/mL 时, DPPH 自由基清除率最高, 达到了 87.17%, $\cdot\text{OH}$ 清除率则在 4 mg/mL 时最高 (87.98%), ABTS 自由基清除率在 1 mg/mL 以上均保持在 99% 左右; 从氨基酸构成来看, 沙棘籽 ADH 激活肽的氨基酸构成较为均衡, 抗氧化氨基酸的含量达到了 25.61%, Leu、Ala 等促酒精代谢氨基酸的含量也较为丰富, 为 9.75%, 综合分析发现沙棘籽 ADH 激活肽的高抗氧化性氨基酸含量使其具有较强自由基清除力, 保护 ADH 免受自由基侵害, 为 ADH 的稳定活性创造有利环境; 沙棘籽 ADH 激活肽具有良好的抵抗温度、pH 值和部分金属离子 (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) 的能力, Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对其活性有抑制作用且呈浓度依赖性, 胃蛋白酶对肽活性无明显抑制作用, 胰蛋白酶可使肽的 ADH 激活率降低, 但

相对对照组仍然保持了 50.7% 的激活率;此外,沙棘籽 ADH 激活肽能够有效防止 ADH 在保温过程中活性的丧失,当肽的质量浓度为 5 mg/mL 以上时,保温 120 min 后 ADH 的活性也没有明显下降;进一步研究沙棘籽 ADH 激活肽对 ADH 内源荧光的影响,结果显示沙棘籽 ADH 激活肽与 ADH 之间相互作用,特别是在高质量浓度下(5, 10 mg/mL)观察到 λ_{\max} 明显红移,表明 ADH 结构发生了伸展,此时 ADH 相对较伸展与敞开的结构或许更利于与底物结合,推测 ADH 空间结构的展开是其活性提高的潜在原因,ADH 稳定性试验的结果也支持了这一点。

参考文献

- [1] MIRIJELLO A, SESTITO L, ANTONELLI M, et al. Identification and management of acute alcohol intoxication [J]. *European Journal of Internal Medicine*, 2023, 108: 1-8.
- [2] 陈奕璇,郭佳琦,关文强,等.沙棘综合开发利用研究进展[J].*食品研究与开发*,2023,44(19):201-207.
- [3] CONTRERAS-ZENTELLA M L, VILLALOBOS-GARCÍA D, HERNÁNDEZ-MUÑOZ R. Ethanol metabolism in the liver, the induction of oxidant stress, and the antioxidant defense system [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(7): 1258.
- [4] TVRDÝ V, HRUBŠA M, JIRKOVSKÝ E, et al. Silymarin dehydroflavonolignans chelate zinc and partially inhibit alcohol dehydrogenase [J]. *Nutrients*, 2021, 13(12): 4238.
- [5] 赵锦鹏,马翼飞,马清涌,等.长期饮酒人群发生急性胰腺炎的风险因素分析:一项基于 UK Biobank 的自然人群研究[J].*西安交通大学学报(医学版)*,2024,45(2):192-199.
- [6] 隋玉杰.玉米肽的制备条件及其醒酒护肝机理研究[D].武汉:华中农业大学,2006.
- [7] 王迪,李文霞,姚瑜,等.沙棘蛋白和多肽的提取及功能活性研究进展[J].*食品工业科技*,2022,43(3):447-455.
- [8] 肖楚乔.鸡肉蛋白源 ADH 激活肽的制备及对小鼠酒精性肝损伤的保护机制研究[D].广州:华南理工大学,2020.
- [9] 陈彤.用沙棘籽渣制备功能性多肽的研究[D].太原:山西大学,2016.
- [10] 章萍萍.紫薯花青素的提取、纯化及其抗氧化和益生元活性研究[D].合肥:合肥工业大学,2017.
- [11] 赵强忠,刘丹.秋刀鱼抗氧化肽制备及其抗氧化活性的研究[J].*现代食品科技*,2014,30(10):165-171.
- [12] 马思彤,刘静波,张婷,等.体外模拟胃肠消化及碱性蛋白酶处理后蛋清肽抗氧化活性差异及肽序列解析[J].*食品科学*,2020,41(21):113-120.
- [13] WAN Z L, WANG L Y, WANG J M, et al. Synergistic foaming and surface properties of a weakly interacting mixture of soy glycinin and biosurfactant stevioside [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2014, 62(28): 6834-6843.
- [14] ALTIING A C, MEIJER R J, VAN BERESTELJN E C. Incomplete elimination of the ABBOS epitope of bovine serum albumin under simulated gastrointestinal conditions of infants [J]. *Diabetes Care*, 1997, 20(5): 875-880.
- [15] BADGER T M, RONIS M J, SEITZ H K, et al. Alcohol metabolism: role in toxicity and carcinogenesis [J]. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2003, 27(2): 336-347.
- [16] 逢治飞.沙棘籽粗抗氧化肽制备及其活性研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2018.
- [17] 刘鹏.低分子量促乙醇代谢玉米肽制备与蛋白成分对活性贡献关系研究[D].广州:华南理工大学,2015.
- [18] PADMA I, ANANTHANARAYAN L. Enzyme stability and stabilization – Aqueous and non-aqueous environment [J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(10): 1019-1032.
- [19] UYGUN D A, AKDUMAN B, UYGUN M, et al. Immobilization of alcohol dehydrogenase onto metal-chelated cryogels [J]. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2015, 26(7): 446-457.
- [20] SHEN L, TANG C. Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate [J]. *Food Research International*, 2012, 48(1): 108-118.
- [21] 吴彤,刘丽莉,杨协力,等.NaCl 和茶多酚对碱诱导鸡蛋卵白蛋白凝胶特性的影响[J].*核农学报*,2024,38(1):93-100.
- [22] LO E K K, FELICIANNA, XU J H, et al. The emerging role of branched-chain amino acids in liver diseases [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(6): 1444.
- [23] 李荣华,郑旗.部分植物蛋白肽在抗疲劳功能食品中的研究进展[J].*食品安全质量检测学报*,2022,13(2):529-535.
- [24] XIAO C, TOLDRÁ F, ZHOU F, et al. Chicken-derived tripeptide KPC (Lys-Pro-Cys) stabilizes alcohol dehydrogenase (ADH) through peptide-enzyme interaction [J]. *LWT*, 2022, 161: 113376.
- [25] NIE W, DU YY, XU F R, et al. Oligopeptides from Jinhua ham prevent alcohol-induced liver damage by regulating intestinal homeostasis

- and oxidative stress in mice [J]. *Food & Function*, 2021, 12(20): 10053-10070.
- [26] LUNKAD R, MURMILIUK A, TOŠNER Z, et al. Role of p KA in Charge Regulation and Conformation of Various Peptide Sequences [J]. *Polymers*, 2021, 13(2): 214.
- [27] XIAO C, TOLDRÁ F, ZHOU F, et al. Effect of cooking and in vitro digestion on the peptide profile of chicken breast muscle and antioxidant and alcohol dehydrogenase stabilization activity [J]. *Food Research International*, 2020, 136: 109459.
- [28] 文镜,张春华,董雨,等.蛋白质羰基含量与蛋白质氧化损伤[J].*食品科学*,2003,10:153-157.
- [29] TAVANO O L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology [J]. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2013, 90: 1-11.