

咖啡豆多肽的制备及其生物活性表征

林琳^{1*}, 王珍珍^{1,2}, 徐思伟¹, 陈丽¹, 王蕊蕊¹

(1. 上海科黛生物科技有限公司, 上海, 201703;

2. 南京玻得理生物科技有限公司, 江苏南京, 210031)

DOI:10.61369/CDCST.2026020014

摘 要: 通本研究以咖啡豆为原料, 采用酶解技术制备咖啡豆多肽, 表征了结构并探究其对皮肤成纤维细胞 (HDF- α) 氧化损伤的保护作用及胶原代谢调控机制。采用 GPC 测定相对分子质量分布, LC-MS/MS 鉴定氨基酸序列, 建立 H_2O_2 联合 IL-1 β 诱导的 HDF- α 细胞氧化损伤模型, 并通过 RT-qPCR 检测 COL-I、COL-III、MMP-1、MMP-3 中 mRNA 相关基因的表达。结果表明, 所制备咖啡豆多肽重均相对分子质量 (Mw) 为 4751 Da, 多分散系数 1.391, 相对分子质量分布集中; 其主要多肽序列富含疏水性及碱性氨基酸, 三肽占比为 60%。细胞实验表明, 在 12.5~50 mg/kg 浓度范围内, 咖啡豆多肽显著促进 HDF- α 细胞增殖 ($P < 0.001$), 并对氧化损伤具显著保护作用 ($P < 0.05-0.01$)。机制研究发现, 咖啡豆多肽可显著上调 COL-I/III 的 mRNA 表达 ($P < 0.01$), 同时显著抑制 MMP-1/3 的 mRNA 表达 ($P < 0.01$), 有效调控胶原代谢平衡。该咖啡豆多肽具有抗氧化和抗光老化活性, 可作为功能性原料应用于化妆品领域。



林琳

关键词: 咖啡豆多肽; 抗氧化; 抗光老化; 人皮肤成纤维细胞; 胶原代谢; 基质金属蛋白酶

作者简介: 林琳, 上海科黛 (毕生之研) 生物科技有限公司研发总监, 主要从事日用化学品研发工作。E-mail: lin.lin@corday.tech。

咖啡豆中蛋白质含量丰富, 约占生豆干重的 11% ~ 15%。这些蛋白质在咖啡加工过程中大量残留在咖啡渣中, 使得咖啡渣成为获取植物蛋白的潜在来源^[1]。将咖啡渣中的蛋白质转化为生物活性多肽, 不仅可实现废弃物资源化利用, 还能为功能性食品、化妆品等领域提供新型天然原料, 符合循环经济和绿色发展的理念^[2]。生物活性肽是指蕴藏在蛋白质序列中、经酶解释放后具有生理调节功能的肽段, 因其相对分子质量小、易吸收、活性多样而备受关注^[3]。其中, 抗氧化活性是多肽最重要的生物功能之一, 外源性抗氧化肽可通过清除自由基、螯合金属离子、激活内源性抗氧化酶等途径发挥保护作用^[4-5]。研究表明, 富含疏水性氨基酸 (如 Pro、Leu、Val) 和芳香族氨基酸 (如 Tyr、Trp、Phe) 的肽段通常具有较强的自由基清除能力^[6]。咖啡蛋白作为生物活性肽前体的潜力已初步被认识。Dai 等从绿咖啡豆蛋白酶解物中成功分离出 IIPNEVY 和 ITPPVMLPP 两条 ACE 抑制肽, IC₅₀ 值分别为 57.54 μ M 和 40.37 μ M^[7]。然而, 目前关于咖啡豆多肽的研究主要集中于降血压和降血糖活性, 关于皮肤保护功能的研究较少。考虑到咖啡蛋白的氨基酸富含疏水性氨基酸和芳香族氨基酸, 这恰好是抗氧化肽和具有皮肤保护活性肽的共同结构基础, 因此推测咖啡豆多肽可能具有抵抗氧化应激、调控 MMPs 和胶原蛋白表达的潜力^[8-9]。目前关于咖啡豆多肽的研究主要集中于降血压和降血糖活性, 其在皮肤保护方面的功能尚未见系统报道。基于此, 本研究首次系统

探究咖啡豆多肽对皮肤成纤维细胞氧化损伤的保护作用, 并阐明其对胶原代谢 (COL-I / III 与 MMP-1/3) 的调控机制。

基于上述背景, 本研究以咖啡豆为原料, 采用酶解技术制备咖啡豆多肽, 系统测定其相对分子质量分布和氨基酸序列等结构特征, 评价其体外抗氧化活性, 并进一步建立 H_2O_2 联合 IL-1 β 诱导的人皮肤成纤维细胞 (HDF- α) 氧化损伤模型, 探究咖啡豆多肽对细胞活力的保护作用, 以及对 COL-I、COL-III、MMP-1、MMP-3 表达水平的调控作用^[10-11]。通过分析多肽结构特征与细胞水平抗光老化活性之间的构效关系, 旨在揭示咖啡豆多肽作为多功能抗衰老原料的潜力, 为咖啡副产物的高值化利用开辟新途径, 并为开发兼具抗氧化与抗光老化功效的天然功能性原料奠定科学基础。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

试剂: 小果咖啡 (*Coffea arabica*) 生豆, 产自中国云南; 水为符合 GB/T 6682 规定的一级水, 自制; 碱性蛋白酶 (Alcalase 37071, 酶活力 20 万 U/g), 酶制剂生物技术公司; 木瓜蛋白酶 (酶活力 80 万 U/g), 南宁市庞博生物工程有限公司; 脯氨酸内切蛋白酶, Sigma-Aldrich; 乙腈、甲酸 (质谱纯), Thermo Fisher Scientific; Trizol 试

剂, 上海超研生物科技有限公司; FastStart SYBR Green 预混剂, Sigma-Aldrich; HDF- α 细胞 (人皮肤成纤维细胞), ATCC; 其余试剂均为国产分析纯。

仪器: ME204E型电子天平, 瑞士 Mettler Toledo; FiveEasy Plus型 pH 计, 瑞士 Mettler Toledo; Research Plus 型移液器 (100~1000 μ L), 德国 Eppendorf; 超滤系统 (Ultracel® 再生纤维素超滤膜, 3 kDa NMWL), Merck (Sigma-Aldrich); 真空浓缩仪 (Bionoon VAC-P1 型), 上海般诺生物科技有限公司; 喷雾干燥机 (YPG 型), 江苏太阳臣干燥科技有限公司; 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪 (配有电喷雾离子源), Waters; 色谱柱 (Atlantis T3 C18 Column, 15 cm $\times$ 2.1 mm, 5 μ m), Waters; 实时荧光定量 PCR 仪 (QuantStudio5), Thermo Fisher Scientific; 核酸定量仪 (JP-Keebio10000), 上海嘉鹏。

1.2 实验方法

1.2.1 咖啡豆多肽的制备

选用小果咖啡 (*Coffea arabica*) 生豆为原料, 经精选去除杂质及霉变颗粒后, 采用低温压榨工艺脱除油脂, 获得脱脂咖啡豆粕。将脱脂咖啡豆粕粉碎过筛, 与一定比例的磷酸盐缓冲液 (0.1 mol/L, pH 8.0) 混合均匀, 配制成蛋白质浆料。酶解反应采用碱性蛋白酶 (Alcalase) 与胰氨酸内切蛋白酶组成的复合酶体系 (酶活力比 2:1), 按酶与底物质量比 (E/S) 为 3% 加入蛋白质浆料中。酶解条件控制为: 温度 50 ~ 55 $^{\circ}$ C, pH 8.0 ~ 9.0, 反应时间 4 ~ 6 h。反应结束后, 迅速升温至 95 $^{\circ}$ C 并保温 10 min 使蛋白酶失活, 终止水解反应, 防止过度水解。酶解液经离心 (10 000 $\times$ g, 20 min, 4 $^{\circ}$ C) 或板框过滤去除不溶性残渣, 收集上清液。依次进行活性炭脱色 (1% w/v, 50 $^{\circ}$ C, 30 min)、离子交换脱盐及纳滤浓缩 (截留相对分子质量 200 Da), 得到初步浓缩液。经离子交换脱盐后, 电导率降至 50 μ S/cm 以下, 确保盐分去除充分, 避免对后续细胞实验产生干扰。随后采用不同截留相对分子质量 (MWCO: 1 kDa、3 kDa、5 kDa、10 kDa) 的超滤膜对浓缩液进行分级分离, 富集目标相对分子质量范围的肽段。将收集的特定组分肽溶液经喷雾干燥 (进风温度 160 ~ 180 $^{\circ}$ C, 出风温度 80 ~ 90 $^{\circ}$ C), 即得咖啡豆多肽粉末, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 相对相对分子质量分布测定

采用高效凝胶渗透色谱法 (gel permeation chromatography, GPC) 测定咖啡豆多肽的相对相对分子质量分布, 所用仪器为 Waters 1515 高效液相色谱系统 (配 2414 示差折光检测

器) 及 Empower 3 软件, 色谱柱采用适用于水相体系的凝胶色谱柱, 柱温箱温度控制在 35 ~ 40 $^{\circ}$ C, 以超纯水 (或 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液) 为流动相, 流速设定为 0.5 ~ 1.0 mL/min。测定时, 精确称取一系列已知相对分子质量的聚乙二醇标准品 (相对分子质量范围覆盖 1×10^2 至 5×10^5 Da) 配制成标准溶液, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后进样分析, 以保留时间对相对分子质量对数进行线性回归绘制标准曲线。将咖啡豆多肽样品用流动相配制成 1.0 mg/mL 溶液, 同法过滤后, 在相同色谱条件下进样 20 μ L 分析。根据样品保留时间, 参照标准曲线由软件自动计算得到样品的数均相对分子质量 (M_n)、重均相对分子质量 (M_w) 及不同相对分子质量区间的相对百分含量, 所有样品重复测定 3 次取平均值。

1.2.3 氨基酸序列鉴定

采用液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 技术对咖啡豆多肽的氨基酸序列进行鉴定。取 1 mg 多肽干粉, 加入 100 μ L 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液, 超声匀浆后于 14 000 g 离心 10 min, 取上清液经 10 kDa 超滤管 (PALL, OD010C35) 于 13 500 g 离心 10 min 超滤, 滤液采用 C18 固相萃取柱 (Sigma, 66871) 脱盐处理, 具体步骤为依次使用乙腈和 0.1% TFA 平衡萃取柱, 上样后以 70% 乙腈溶液洗脱肽段。脱盐后的多肽样品经纳升流速 HPLC 系统 (Easy nLC, Thermo Scientific) 进行色谱分离, 使用 C18 色谱柱 (75 μ m $\times$ 10 cm, 3 μ m), 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为含 0.1% 甲酸的 84% 乙腈水溶液, 以 250 nL/min 流速在 60 min 内进行梯度洗脱 (0~50 min, B 液从 0% 线性升至 35%)。分离后的样品直接进入 Q-Exactive HF-X 质谱仪 (Thermo Fisher) 进行质谱分析, 采用正离子检测模式, 一级质谱扫描范围为 300~1800 m/z, 分辨率为 70 000 (at m/z 200), 每次全扫描后采集 10 个二级碎片图谱, HCD 碎裂能量为 30 eV。原始质谱数据采用 MaxQuant 1.5.5.1 软件进行数据库检索, 数据库选用 UniProtKB 数据库中咖啡 (*Coffea arabica*) 蛋白质组数据库 (uniprotkb_Coffea arabica_65769_2025_11_30), 设置肽段质量容差为 20 mg/kg, 二级碎片质量容差为 0.1 Da, 肽段假阳性率 (FDR) 控制在 ≤ 0.01 , 最终获得多肽的氨基酸序列鉴定结果^[12]。

1.2.4 人皮肤成纤维细胞实验

1.2.4.1 细胞活力测定

采用 CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 法考察咖啡豆多肽对人皮肤成纤维细胞 (Human Dermal Fibroblasts - adult,

HDF-α)活力的影响。将HDF-α细胞接种于96孔板中,培养24小时后,分别加入不同浓度的咖啡豆多肽样品处理细胞,继续培养24小时,每孔加入CCK-8溶液孵育2~4小时,于450 nm波长处测定吸光度值,计算细胞存活率,实验重复三次^[13]。

1.2.4.2 氧化损伤保护实验

紫外线诱导的皮肤光老化涉及氧化应激与炎症反应的协同作用。为更贴近这一病理特征,本研究建立H₂O₂(200 μM)联合IL-1β(10 ng/mL)诱导的HDF-α细胞损伤模型。其中,H₂O₂模拟氧化应激,IL-1β模拟炎症微环境,二者联合可协同模拟光老化过程中的多重损伤机制^[14]。经预实验设置H₂O₂浓度梯度(100、200、400 μM)及IL-1β浓度梯度(5、10、20 ng/mL)进行正交筛选,以细胞活力降至50%~60%作为模型构建标准,最终确定联合诱导浓度为200 μM H₂O₂与10 ng/mL IL-1β。该浓度组合下细胞活力降至47.41%($P<0.001$),模型构建成功。细胞接种培养后,设置空白对照组、模型组以及不同浓度咖啡豆多肽样品处理组(在共刺激同时加入样品),培养24小时后采用CCK-8法测定细胞活力。采用 t 检验比较空白组与模型组差异,采用单因素方差分析比较样品组与模型组差异。

1.2.4.3 相关基因表达分析

采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测咖啡豆多肽对HDF-α细胞中COL-I、COL-Ⅲ、MMP-1、MMP-3 mRNA表达水平的调控作用。细胞分组及处理同上,培养24小时后收集细胞,Trizol法提取总RNA,核酸定量仪测定RNA浓度和纯度,反转录合成cDNA,采用FastStart SYBR Green预混剂在QuantStudio 5实时荧光定量PCR仪上进行扩增。以GAPDH为内参基因,采用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因的相对表达量^[15]。所用引物序列见表1,实验重复三次,采用 t 检验比较空白组与模型组差异,采用单因素方差分析比较样品组与模型组差异。

表1 引物序列

	引物	引物序列
COL-I	COL-I-H-F	GTGCGATGACGTGATCTGTGA
	COL-I-H-R	CGGTGGTTTCTTGGTCGGT
COL-Ⅲ	COL-Ⅲ-H-F	TTGAAGGAGGATGTTCCCATCT
	COL-Ⅲ-H-R	ACAGACACATATTGGCATGGTT
MMP-1	MMP-1-H-F	AAAATTACACGCCAGATTTGCC
	MMP-1-H-R	GGTGTGACATTACTCCAGAGTTG
MMP-3	MMP-3-H-F	CGGTTCCGCCTGTCTCAAG
	MMP-3-H-R	CGCCAAAAGTGCCTGTCTT
GAPDH	GAPDH-F	GTCGGAGTCAACGGATTTGG
	GAPDH-R	ATCTCGCTCCTGGAAGATGG

1.2.7 统计学方法

数据分析用GraphPad Prism8.0进行统计,结果用平均值Mean±标准差SD表示。各组间比较用配对样本 t -test和one-way anova进行统计分析,统计分析均为双尾。当 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 和 $P<0.001$ 时认为有显著差异,在图像中分别用“*”/“#”、“**”/“##”和“***”/“###”表示;当 $P\geq 0.05$ 时,无显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 相对相对分子质量分布特征

采用凝胶渗透色谱法对咖啡豆多肽的相对相对分子质量分布进行测定,结果如图1和表2所示。咖啡豆多肽样品的数均相对分子质量 M_n 为3415 Da,重均相对分子质量 M_w 为4751 Da, MP 为4590 Da,多分散系数 M_w/M_n 为1.391。多分散系数为1.391,表明样品相对分子质量分布相对集中,均一性良好。GPC图谱(图1)显示,样品在约4.6 kDa处呈现明显主峰,同时在1 kDa以下区域存在拖尾峰,提示样品中除主要的高相对分子质量肽段外,还含有一定比例的低相对分子质量肽段。这种“主峰集中、低相对分子质量拖尾”的分布特征,有利于兼顾透皮吸收性与生物活性。需要指出的是,GPC测定的重均相对分子质量(4751 Da)因对大相对分子质量组分赋予更高权重而偏高,而数均相对分子质量(3415 Da)更能反映样品中肽段分子的数量平均分布。此外,LC-MS/MS鉴定结果(表3)显示,三肽(相对分子质量275~415 Da)在鉴定到的肽段序列中占比60%,进一步证实样品中富含低相对分子质量活性肽段。

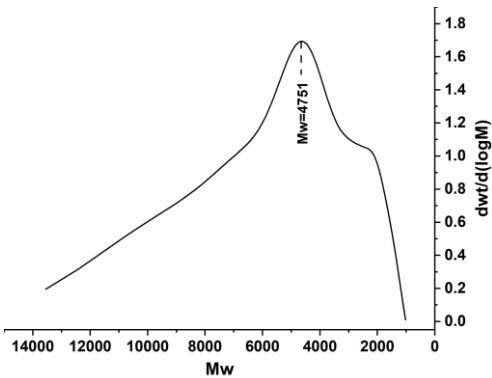


图1 咖啡豆多肽的相对相对分子质量分布图

表2 咖啡豆多肽的相对相对分子质量分布参数

M_n	M_w	MP	M_z	M_z+1	多分散性	保留时间/min
3415	4751	4590	6391	8038	1.391001	10.092

2.2 多肽序列鉴定与结构分析

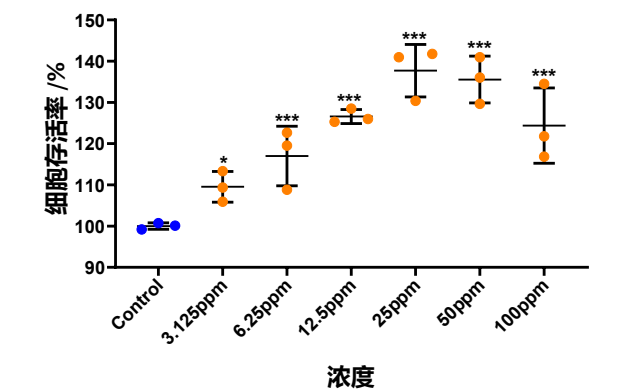
采用 LC-MS/MS 技术对咖啡豆多肽的氨基酸序列进行鉴定，以峰强度排序前 20 的多肽序列如表 3 所示。由表 3 可知，鉴定到的多肽序列长度主要分布在 3-10 个氨基酸之间，其中以三肽（长度为 3）为主，共鉴定到 12 条，占比 60%；八肽次之，共鉴定到 6 条，占比 30%；十肽鉴定到 2 条，占比 10%。多肽相对分子质量范围分布在 275.15 Da 至 1019.51 Da 之间，电荷数主要为 +1 或 +2，符合小分子肽段的典型质谱行为特征。从氨基酸组成分析，鉴定到的多肽富含亮氨酸（L）、精氨酸（R）、赖氨酸（K）、脯氨酸（P）等疏水性氨基酸和碱性氨基酸，如 LLG、LRL、LLR、PGR、PDK 等序列。研究表明，富含疏水性氨基酸的多肽更容易通过疏水相互作用与细胞膜或酶活性中心结合，从而发挥生物活性；而富含精氨酸和赖氨酸的阳离子多肽则更易于与带负电的细胞膜相互作用，促进细胞摄取。此外，部分多肽序列如 AGFAGDDAPR、FAGDDAPR 等含有多个酸性氨基酸残基（天冬氨酸 D、谷氨酸 E），可能赋予其金属离子螯合能力，进一步协同发挥抗氧化活性。具体而言，序列 LLG、LRL、LLR 富含亮氨酸（L），疏水性强，有利于自由基清除；PGR、PDK 含脯氨酸（P），可增强肽链刚性及酶解稳定性；AGFAGDDAPR、FAGDDAPR 含天冬氨酸（D），可能赋予金属离子螯合能力。上述结构特征与文献报道的典型抗氧化肽（如 VY、GPL）具有相似性，为咖啡豆多肽的抗氧化及抗光老化活性提供了分子基础。

表 3 峰强度前 20 的多肽序列

多肽序列	长度（氨基酸个数）	相对分子质量 Mw	电荷数 / 个
TEAPLNPK	8	868.46543	2
LLG	3	301.20016	1
AGFAGDDAPR	10	975.44101	2
LGR	3	344.2172	1
LRL	3	400.2798	1
LLR	3	400.2798	1;2
SGL	3	275.14812	1
PSIVGRPR	8	880.52428	2
PDK	3	358.18523	1
FAGDDAPR	8	847.38243	2
LHL	3	381.2376	1;2
PGR	3	328.1859	1
SDKLSLGAET	10	1019.5135	2
FSG	3	309.13247	1
EEL	3	389.17981	1
LLQ	3	372.23727	1
LQR	3	415.25432	1;2
LLK	3	372.27366	1;2
FSGILQKD	8	906.48108	2
LKEEAEAK	8	916.48656	2

2.3 咖啡豆多肽对 HDF-α 细胞氧化损伤的保护作用

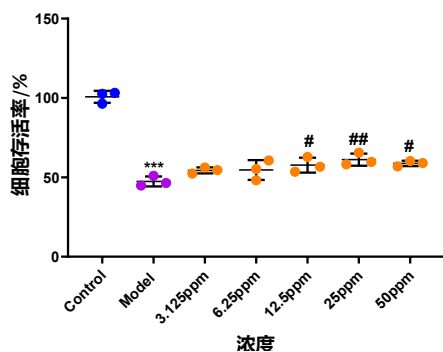
采用 CCK-8 法考察咖啡豆多肽对人皮肤成纤维细胞（HDF-α）的细胞毒性及增殖促进作用。结果如图 2 所示，与对照组相比，在 3.125~100 mg/kg 浓度范围内，咖啡豆多肽处理 24 h 后均未表现出细胞毒性，细胞存活率均高于 99%。特别是在 12.5~50 mg/kg 浓度范围内，细胞存活率显著升高至 125%~142%（ $P < 0.001$ ），表明咖啡豆多肽在该浓度区间内具有促进 HDF-α 细胞增殖的活性，其中 25 mg/kg 时细胞存活率最高，达到 140.98%。这一结果提示咖啡豆多肽不仅具有良好的生物安全性，还可能通过促进成纤维细胞增殖从而发挥皮肤修复功能。



注：数据以均值 ± 标准差表示， $n=3$ 。与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

图 2 咖啡豆多肽对 HDF-α 细胞活力的影响。

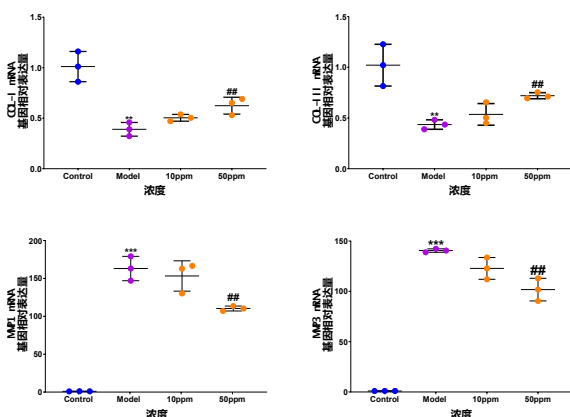
建立 H_2O_2 （200 μM ）联合 IL-1 β （10 ng/mL）诱导的 HDF-α 细胞氧化损伤模型，考察咖啡豆多肽的保护作用。结果显示（图 3），与对照组相比，模型组细胞存活率显著降低至 47.41%（ $P < 0.001$ ），表明氧化损伤模型构建成功。与模型组相比，经咖啡豆多肽处理后，细胞存活率呈剂量依赖性升高，其中 12.5 mg/kg、25 mg/kg 和 50 mg/kg 处理组细胞存活率分别升高至 57.68%、61.13% 和 58.73%，差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ）。结果表明，咖啡豆多肽对 H_2O_2 联合 IL-1 β 诱导的 HDF-α 细胞氧化损伤具有显著保护作用。保护效应在 12.5~25mg/kg 范围内呈浓度依赖性增强（25 mg/kg 时细胞存活率达 61.13%），50 mg/kg 时略有回落（58.73%）。该“钟形”剂量效应常见于多肽及植物提取物，可能与高浓度下轻微诱导细胞周期阻滞或自噬有关，亦可能受多肽聚集状态影响其细胞摄取效率。



注：数据以均值 ± 标准差表示， $n=3$ 。与对照组比较，*** $P < 0.001$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图3 咖啡豆多肽对 $H_2O_2+IL-1\beta$ 诱导的 HDF- α 细胞活力的影响

采用 RT-qPCR 技术进一步考察咖啡豆多肽对 HDF- α 细胞中 I 型胶原 (COL- I)、III 型胶原 (COL- III) 及基质金属蛋白酶 MMP-1、MMP-3 mRNA 表达水平的影响。结果显示 (图4)，与对照组相比，模型组 COL- I 和 COL- III mRNA 表达水平显著降低至 0.39 倍和 0.44 倍 ($P < 0.01$)，而 MMP-1 和 MMP-3 mRNA 表达水平分别升高至 163.09 倍和 140.57 倍 ($P < 0.001$)。这一放大效应与 H_2O_2 联合 $IL-1\beta$ 协同激活 NF- κ B 及 AP-1 通路有关，已有研究表明此类联合刺激可显著放大基质金属蛋白酶的转录响应^[14, 16]。与模型组相比，经咖啡豆多肽处理后，COL- I 和 COL- III mRNA 表达水平均显著回升，其中 50 mg/kg 处理组 COL- I 和 COL- III 分别回升至 0.62 倍和 0.72 倍 ($P < 0.01$)；同时，MMP-1 和 MMP-3 mRNA 表达水平显著下调，50 mg/kg 处理组 MMP-1 和 MMP-3 分别降至 110.33 倍和 101.75 倍 ($P < 0.01$)。结果表明，咖啡豆多肽能够通过上调 COL- I 和 COL- III 的基因表达，并抑制 MMP-1 和 MMP-3 的基因表达，从而多靶点调控胶原代谢平衡，发挥抗光老化作用。



注：数据以均值 ± 标准差表示， $n=3$ 。与对照组比较，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ 。

图4 咖啡豆多肽对 $H_2O_2+IL-1\beta$ 诱导的 HDF- α 细胞中胶原代谢相关基因 (COL-I, COL-III, MMP-1, MMP-3) 表达的影响

3 结论

本研究以咖啡豆为原料，采用酶解技术成功制备了具有生物活性的咖啡豆多肽，其重均相对分子质量为 4751 Da，多分散系数 1.391，相对分子质量分布集中且均一性良好；LC-MS/MS 鉴定出 20 条主要多肽序列，以三肽为主 (占比 60%)，富含亮氨酸、精氨酸、脯氨酸等疏水性及碱性氨基酸，其中 LL-二肽结构多次出现，为多肽的生物活性提供了结构基础。细胞实验表明，咖啡豆多肽在 12.5~50 mg/kg 浓度范围内显著促进 HDF- α 细胞增殖 ($P < 0.001$)，并对 H_2O_2 联合 $IL-1\beta$ 诱导的氧化损伤具有显著保护作用 ($P < 0.01$)；机制研究发现，咖啡豆多肽可通过上调 COL- I 和 COL- III 基因表达 ($P < 0.01$) 并抑制 MMP-1 和 MMP-3 基因表达 ($P < 0.01$)，多靶点调控胶原代谢平衡，从而发挥抗光老化作用。该咖啡豆多肽通过调控胶原代谢发挥抗光老化作用，为咖啡副产物的高值化利用提供了新途径，也为开发兼具抗氧化与抗光老化功效的天然化妆品原料奠定了科学基础。

参考文献

- [1]陈云兰, 李积华, 陈文进, 等. 云南 4 个产区咖啡豆的主要风味成分及感官品质分析 [J]. 热带作物学报, 2024, 45(7):1445-1454.
- [2]LEE JONG WON, LEE SANGYOON, LEE MI-YEON, et al. Sub-critical water mediated conversion of spent coffee grounds into physiologically active biomaterials for utilization in food industry[J]. LWT, 2025, 218117476.
- [3]ALI ATIF, BUKHSH KIRAN KAREEM, RAZA MUHAMMAD MOHSIN, et al. Exploring the structure-activity relationships and molecular mechanisms of food-derived antioxidative peptides in mitigating oxidative stress: A comprehensive review[J]. Journal of Functional Foods, 2025, 127106751.
- [4]ZHANG WEI, HU SHENGBING, TANG HAIYAN, et al. Food-derived antioxidant peptides mediated multifunctional bioactivities and bioavailability-enhancing delivery strategies via the Nrf2/Keap1 signaling pathway[J]. Food Chemistry, 2026, 501147604.
- [5]ZHAO CHANGHUI, WANG YANLI and ASHAOLU TOLULOPE JOSHUA. Antioxidative and mineral-binding food-derived peptides: Production, functions, metal complexation conditions, and digestive fate[J]. Food Research International, 2025, 200115471.
- [6]ALI M., RAWEL H. and HELLWIG M. Limited enzymatic hydrolysis of green coffee protein as a technique for preparing new functional food components[J]. J Food Sci Technol, 2023, 60(2):609-620.
- [7]DAI H., HE M., HU G., et al. Discovery of ACE Inhibitory Peptides

Derived from Green Coffee Using In Silico and In Vitro Methods[J]. Foods, 2023, 12(18):14.

[8]CHOU P. H., WANG S. T., YEN M. H., et al. Fluid-induced, shear stress-regulated extracellular matrix and matrix metalloproteinase genes expression on human annulus fibrosus cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 734.

[9]HE L., LIU R., CHEN L., et al. Anti-photoaging activity of cod peptides: structural characterisation and clinical validation[J]. Food Funct, 2025, 16(20):7972–7989.

[10]CAMILLO L., GROSSINI E., FARRUGGIO S., et al. Alpha-Tocopherol Protects Human Dermal Fibroblasts by Modulating Nitric Oxide Release, Mitochondrial Function, Redox Status, and Inflammation[J]. Skin Pharmacol Physiol, 2022, 35(1):1–12.

[11]LUO L., ZHU D., ZHANG Z., et al. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 amplifies inflammation in LPS-induced THP-1 cells[J]. Iran J Basic Med Sci, 2023, 26(3):374–379.

[12]WANG SHUNXI, TIAN LEI, LIU HAIJUN, et al. Large-Scale Discovery of Non-conventional Peptides in Maize and Arabidopsis

through an Integrated Peptidogenomic Pipeline[J]. Molecular Plant, 2020, 13(7):1078–1093.

[13]FAN J., SCHIEMER T., VASKA A., et al. Cell via Cell Viability Assay Changes Cellular Metabolic Characteristics by Intervening with Glycolysis and Pentose Phosphate Pathway[J]. Chem Res Toxicol, 2024, 37(2):208–211.

[14]ENESA KARINE, ITO KAZUHIRO, LUONG LE A., et al. Hydrogen Peroxide Prolongs Nuclear Localization of NF- κ B in Activated Cells by Suppressing Negative Regulatory Mechanisms[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(27):18582–18590.

[15]LIVAK K. J. and SCHMITTGEN T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4):402–8.

[16]MARTIN G., ANDRIAMANALJAONA R., MATHY-HARTERT M., et al. Comparative effects of IL-1 β and hydrogen peroxide (H₂O₂) on catabolic and anabolic gene expression in juvenile bovine chondrocytes[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13(10):915–24.

Preparation and Biological Activity Characterization of Coffee Bean Peptides

Lin Lin^{1*}, Wang Zhen-zhen², Xu Si-wei¹, Chen Li¹, Wang Rui-rui¹

(1. Shanghai Corday Biotechnology Co., LTD, Shanghai 201703, China;

2. Nanjing Baudry Biotechnology Co., LTD, Nanjing 210031, China)

Abstract : Coffee bean peptides were prepared via enzymatic hydrolysis and characterized for molecular weight distribution and amino acid sequences. Their protective effects against oxidative damage in human dermal fibroblasts (HDF- α) and regulatory mechanism on collagen metabolism were investigated. Molecular weight distribution was determined by GPC, and amino acid sequences were identified by LC-MS/MS. An H₂O₂+IL-1 β -induced oxidative damage model in HDF- α cells was established. Additionally, cell viability was assessed by CCK-8 assay, and mRNA expression levels of COL-I, COL-III, MMP-1, and MMP-3 were detected by RT-qPCR. In the results, the prepared peptides represented a weight-average molecular weight of 4751 Da with a polydispersity index of 1.391. Twenty major peptide sequences were identified, rich in hydrophobic and basic amino acids, with tripeptides accounting for 60%. At concentrations of 12.5-50 mg/kg, coffee bean peptides significantly promoted HDF- α cell proliferation ($P < 0.001$) and exhibited significant protective effects against oxidative damage ($P < 0.05-0.01$). Mechanistic studies revealed that coffee bean peptides significantly upregulated COL-I/III mRNA expression ($P < 0.01$) while significantly downregulating MMP-1/3 mRNA expression ($P < 0.01$), effectively regulating collagen metabolic balance. In conclusion, coffee bean peptides possess significant antioxidant and anti-photoaging activities and probably be developed as functional ingredients for cosmetic applications.

Keywords : coffee bean peptides; antioxidant; anti-photoaging; human dermal fibroblasts; collagen metabolism; matrix metalloproteinases

