DOI:10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90252 [文章编号] 1003-5788(2023)03-0153-08

鲣鱼背腹肉降尿酸肽制备工艺优化及体外活性研究

Optimization of preparation and in-vitro activity of uricate-lowering peptide from dorsal belly meat of skipjack

楚玉柔[1,2] 孙继鹏[2] 朱秋语[1] 姚 玮[2] 宋 茹[1] 王家星[2]

CHU Yu-rou[1,2] *SUN Ji-peng*[2] *ZHU Qiu-yu*[1] *YAO Wei*[2] *SONG Ru*[1] *WANG Jia-xing*[2]

(1. 浙江海洋大学,浙江 舟山 316022;2. 浙江省海洋开发研究院,浙江 舟山 316021)

(1. *Zhejiang Ocean University*, *Zhoushan*, *Zhejiang* 316022, *China*;
2. *Zhejiang Marine Development Research Institute*, *Zhoushan*, *Zhejiang* 316021, *China*)

摘要:目的:提高鲣鱼加工副产物利用率,开发具有降尿酸活性的食品基料。**方法:**通过响应面分析酶解过程中酶的种类及添加量、pH 值、酶解温度和酶解时间对抑制肽固含量和黄嘌呤氧化酶(XOD)抑制率的影响。**结果:**胰蛋白酶为最佳水解鲣鱼背腹肉的蛋白酶,最佳酶解工艺条件为酶添加量 4%,pH 8.0,酶解温度 55 ℃,酶解时间 5 h,料液比 1∶3 (g/mL)。该条件下制备的 XOD 抑制肽固含量为7.96%,XOD 抑制率为 43.941%,具有很强的抗氧化能力,清除羟自由基和 DPPH 自由基的 ED_{50} 分别为 6.0,10.0 mg/mL。**结论:**鲣鱼背腹肉有潜力用于制备 XOD 抑制肽,在抗氧化应激以及预防高尿酸血症方面可作为膳食功能因子切入。

关键词:鲣鱼背腹肉;黄嘌呤氧化酶抑制肽;抑制率;体外活性

Abstract: Objective: This study aimed to develop an auric-lowering peptide of skipjack byproducts (SPBp) with Xanthine oxidase (XOD) inhibition activity and improve the utilization rate of byproducts of skipjack. **Methods:** Based on the response surface methodology, several parameters affecting this process were investigated, including protease types and enzymatic dosages, pH, temperature, time and their interactions on the content of amino-nitrogen, solid content and XOD inhibition activity. **Results:** The results showed that trypsin was the best protease. The optimal process parameters were as follows: the dosage of the enzyme was 4%, pH 8.0, temperature 55 ℃, time 5 h, solid-liquid ratio 1∶3 (g/mL). Under the control of the optimal conditions, the solid content was 4.12%; XOD inhibition activity was 43.941%, which were all in good agreement with the predicted values. SPBp-XOIP showed strong radical scavenging activity against hydroxyl and DPPH radicals with ED50 values of 6.0 mg/mL and 10.0 mg/mL, respectively. **Conclusion:** The meat of Skipjack has the potential to prepare XOD inhibitory peptides, which can be used as dietary function factors in antioxidant stress and prevention of hyperuricemia.

Keywords: skipjack dorsal belly; xanthine oxidase inhibitory peptides; inhibition ratio; *in vitro* activity

黄嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase, XOD)是人体内尿酸代谢的关键酶[1],可转化次黄嘌呤为黄嘌呤,再进一步生成尿酸[2],因此过高的 XOD 蛋白活性会促进上述反应,使人体内血尿酸浓度不断上升,最终导致高尿酸血症。研究[3-5]表明,高尿酸血症与肾炎、高血压、2 型糖尿病等慢性病症紧密相关。Massey 等[6]发现 XOD 特异性低,在催化过程中可生成过氧化物。此外,尿酸生成过程中的副产物超氧阴离子(O_2^-)和过氧化氢(H_2O_2),易引发炎症从而加重病情[7]。

目前,通常以饮食干预或者药物来治疗高尿酸血症病人。药物治疗效率高且效果好,但同时伴随诸多毒副作用,并以药物过敏最为常见[8-9]。因此开发天然无毒的降尿酸药物具有重要的临床意义。有研究[10-12]发现,植物源的黄酮类、酚酸类以及生物碱类物质均具有较好的降尿酸作用。动物蛋白来源的小分子降尿酸肽具有原料来源广泛、安全指数高、易吸收等特点,为当下痛风及

基金项目:舟山市科技计划项目(编号:2021C41006,2021C12003)

作者简介:楚玉柔,女,浙江海洋大学在读硕士研究生。

通信作者:王家星(1994—),女,浙江省海洋开发研究院中级工程师,硕士。E-mail:18868005756@163.com

收稿日期:2022-03-04 **改回日期:**2022-10-10

高尿酸血症研究领域的热门话题之一[13]。

鲣鱼(*Katsuwonus pelamis*)属鲈形总目金枪鱼亚目金枪鱼科鲣属[14],具有很高的营养价值,蛋白含量高且低脂。鲣鱼的捕捞量占金枪鱼产量的 70%以上[15],但是与目前常用作生鱼片加工使用的蓝鳍金枪鱼、马苏金枪鱼等相比,其属于低值金枪鱼,因其在加工生产过程中会产生诸如内脏、红肉、鱼皮和鱼骨等加工副产物且占比较高,约为鱼体重量的 50%～70%,此外,鲣鱼还含有多种生物活性物质。舟山及宁波地区鲣鱼年加工量在全国位于前列,鲣鱼加工副产物多达 50 t/d,这些副产物通常被加工成廉价的饲料,利用价值低,造成了大量宝贵营养和功能成分的浪费。近年来,已有不少关于鲣鱼在降尿酸及干预高尿酸血症等方面的报道[16],但对其加工副产物中提取制备活性物质的研究尚未见报道。研究拟采用酶解法制备鲣鱼加工副产品黄嘌呤氧化酶抑制肽(SPBp-XOIP),以 XOD 抑制率、抑制肽固含量作为筛选指标,筛选出酶解鲣鱼加工副产物的最佳活性蛋白酶,通过响应面法优化酶解工艺,同时测定 SPBp-XOIP 的抗氧化能力,并利用 SPSS 回归拟合分析 XOD 抑制率与体外抗氧化关键自由基(DPPH·、·OH)清除率之间的相关性,旨在为开发具有降尿酸活性的食品基料提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

鲣鱼背腹肉:浙江省兴业集团;

胃蛋白酶(3 000 NF)、菠萝蛋白酶(30 万 U/g)、木瓜蛋白酶(10 万 U/g):南宁庞博生物工程有限公司;

中性蛋白酶(3 万 U/g)、碱性蛋白酶(20 万 U/g):河南仰韶生化工程有限公司;

风味蛋白酶:20 万 U/g,浙江一诺生物科技有限公司;

动物蛋白复合酶(15 万 U/g)、海产品水解专用复配蛋白酶(18.5 万 U/g,统一称为水产蛋白复合酶)、胰蛋白酶(15.6 万 U/g):南宁东恒华道生物公司;

别嘌醇片:广东彼迪药业有限公司;

黄嘌呤氧化酶(5 U)、抑肽酶(6 512 Da)、杆菌肽(1 423 Da)、谷胱甘肽(612.63 Da)、乙氨酸—乙氨酸—乙氨酸(189 Da)、甘氨酸(75 Da):上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

其他试剂:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2　仪器与设备

凯氏定氮仪:KDN816 型,上海纤检仪器有限公司;

高效离心机:Avanti J-E 型,美国 Beckman Coulter 公司;

电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9076A 型,上海一恒科学仪器有限公司;

冷冻干燥机:710401040 型,美国 Labconco 公司;

卷式膜多功能小试设备:RNF0460 型,厦门世达膜科技有限公司;

高效液相色谱系统:HPLC 1260 型,美国 Agilent 科技有限公司;

双层玻璃反应釜:YSF-20L 型,巩义市予华仪器有限公司。

1.3　试验方法

1.3.1　常规营养成分测定

(1) 水分:常压热风干燥法。

(2) 蛋白质含量:半微量凯氏定氮法。

(3) 脂肪含量:索氏抽提法。

(4) 灰分:灰化法。

(5) 总糖含量:斐林氏容量法。

1.3.2　氨基酸组成分析　根据文献[17]^{27}。

1.3.3　SPBp-XOIP 的制备　根据文献[17]$^{17-18}$。

1.3.4　最佳蛋白水解酶的筛选　设定加酶量为 2 g/100 g 蛋白、固液比 1∶3 (g/mL)、酶解 4 h,按表 1 对鲣鱼背腹肉进行酶解,评价指标为水解度、抑制肽固含量以及 XOD 抑制率。

表 1　不同蛋白酶的反应条件

Table 1　Enzymatic hydrolysis conditions of different proteases

酶种类	温度/℃	pH	酶种类	温度/℃	pH
木瓜蛋白酶	55	6.5	菠萝蛋白酶	55	6.8
风味蛋白酶	55	7.5	碱性蛋白酶	55	8.5
胰蛋白酶	55	8.0	胃蛋白酶	55	2.5
中性蛋白酶	55	6.5	水产蛋白复合酶	55	6.5
动物蛋白复合酶	55	8.0			

1.3.5　响应面优化试验　通过 Box-Behnken 设计,以抑制肽固含量和 XOD 抑制率为响应值,设置 3 个变量进行响应面优化试验。

1.3.6　水解度测定　根据文献[18]。

1.3.7　抑制肽固含量测定　根据文献[19－20],采取直接干燥法测量抑制肽的总固形物质量分数,按式(1)计算抑制肽固含量。

$$c=\frac{M_2-M_1}{20}\times 100\%, \tag{1}$$

式中:

c——固含量,%;

M_1——平板质量,g;

M_2——平板和干燥后样品总质量,g。

1.3.8　黄嘌呤氧化酶(XOD)抑制活性测定　根据文献[21]修改如下:称取 4.56 g 磷酸氢二钾及 2.71 g 磷酸二氢钾,分别定容至 100 mL,使用时以体积比 4∶1 混匀。

称取 0.022 8 g 黄嘌呤粉末,用微量 4 mol/L NaOH 溶解后,用缓冲液定容至 100 mL,备用。取 400 μL XOD 原液用缓冲液定容至 50 mL,备用。按式(2)计算 XOD 抑制率。

$$I_{XOD}=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_3-A_4}\right)\times 100\%, \quad (2)$$

式中:

I_{XOD}——黄嘌呤氧化酶抑制率,%;

A_1——试验组吸光值;

A_2——试验对照组吸光值;

A_3——空白组吸光值;

A_4——空白对照组吸光值。

1.3.9　·OH 清除活性测定　根据文献[22][34]。

1.3.10　DPPH·清除活性测定　根据文献[22][33]。

1.3.11　分子量测定　根据 QB/T 2879—2007。TSKgel 2500 色谱柱;紫外检测波长 220 nm;洗脱时间 30 min;流速 0.5 mL/min。

1.3.12　SPSS 相关性分析　采用 SPSS 回归拟合分析鲣鱼背腹肉酶解上清液的 XOD 抑制率,抑制肽固含量,·OH 和 DPPH·清除率之间的相关性。使用数值积分分析和曲线拟合来分析指数,阐述抗氧化性与 XOD 抑制活性的潜在关系。

1.4　数据统计分析

采用 Excel、SPSS 20.0 软件进行统计分析,以 Origin 8.0 和 Adobe illustrator 绘图。

2　结果与分析

2.1　鲣鱼加工副产物营养成分及氨基酸组成分析

由表 2 可知,鲣鱼加工副产物中水分含量最高达 66.72%,其次为粗蛋白质(25.41%),蛋白含量较为丰富。脂肪含量也相对较高达 9.17%,灰分及总糖含量分别为 1.51%和 0.82%。

表 2　鲣鱼加工副产物常规营养成分分析

Table 2　Nutritional constituent analysis of skipjack byproducts　%

水分	蛋白质	粗脂肪	灰分	总糖
66.72	25.41	9.17	1.51	0.82

由表 3 可知,鲣鱼加工副产物共检出 16 种氨基酸,其中 7 种为必需氨基酸(EAA)。谷氨酸(2.37%)和天冬氨酸(1.89%)含量最高,赖氨酸(1.75%)次之,蛋氨酸(0.56%)含量最低。鲣鱼加工副产物的氨基酸总量(TAA)为样品质量的 19.5%。其中 EAA/TAA 比值为 0.43,高于 FAO/WHO 标准建议值 0.40[23],说明鲣鱼加工副产物是一种优质蛋白,且蛋白含量高,以该蛋白质为基物,通过酶解法制备的黄嘌呤氧化酶抑制酶解液营养均衡并具有生产可行性。

表 3　鲣鱼加工副产物氨基酸组成†

Table 3　Amino acid composition of skipjack byproducts　g/100 g

氨基酸组成	含量	氨基酸组成	含量
天冬氨酸	1.89	酪氨酸	0.71
苏氨酸*	0.98	苯丙氨酸*	1.00
丝氨酸	0.67	赖氨酸*	1.75
谷氨酸	2.37	组氨酸	1.13
脯氨酸	0.85	精氨酸	1.18
甘氨酸	1.01	必需氨基酸	8.56
丙氨酸	1.40	总氨基酸	19.50
缬氨酸*	1.05	非必需氨基酸	11.21
蛋氨酸*	0.56	必需氨基酸/总氨基酸	0.43
异亮氨酸*	1.04	必需氨基酸/非必需氨基酸	0.76
亮氨酸*	1.88		

† 色氨酸在强酸下被破坏,所以不包括色氨酸;* 表示必需氨基酸。

2.2　蛋白酶的筛选

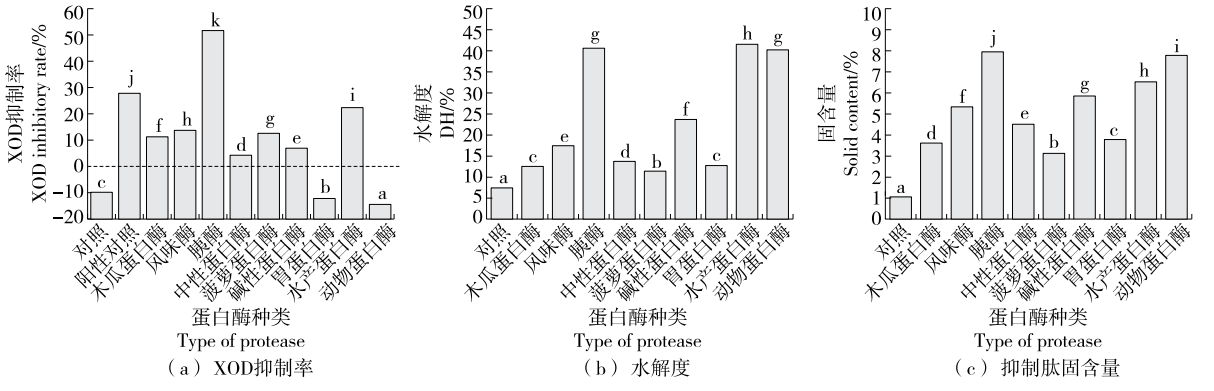
由图 1 可知,鲣鱼加工副产物经不同蛋白酶水解后所得产物的 XOD 抑制活性存在差异,阳性对照组别嘌呤醇的 XOD 抑制率为 27.664%,胰蛋白酶水解液对 XOD 的抑制率最强,达 51.636%,其次为水产蛋白复合酶。动物蛋白酶酶解得到的产物水解度为 40%,抑制肽固含量为 7.5%,但 XOD 抑制率<0,未检出活性,说明鲣鱼背腹肉经水产蛋白复合酶酶解后的产物不具有 XOD 抑制能力。胰蛋白酶只断裂精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)羧基参与形成的肽键,其中富含 Arg 的肽特有的阳离子和氢键特性有利于与 XOD 晶体结构(1FIQ)的 6 个结合位点中的黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)结合,形成非竞争性、不可逆抑制作用[24-25]。Nongonierma 等[26]水解牛乳蛋白得到的二肽中仅包含色氨酸(Trp),其表现出的 XOD 抑制活性属于非竞争性抑制。因此 XOD 的抑制机制中,抑制分子首先要结合到 XOD 的主要位点上形成竞争性或非竞争性不可逆抑制,而后实现抑制作用。不同酶解液的水解度与抑制肽固含量之间呈现出相同的上升或下降趋势,故后续试验主要以 XOD 抑制率及抑制肽固含量为优化指标。

2.3　SPBp-XOIP 相对分子量分布

由图 2 可知,酶解液中 65%为 200～600 Da 的肽段,25%左右为 600～1 000 Da 的肽段,酶解产物 90%以上的组分分子质量<1 000 Da,为小分子肽。

2.4　酶解条件单因素试验

由图 3 可知,随着酶添加量的递增,抑制肽固含量和 XOD 抑制率呈先增加后减小的趋势,当酶添加量为4%



（a）XOD抑制率　（b）水解度　（c）抑制肽固含量

字母不同表示差异显著（$P<0.05$）

图 1　蛋白酶种类对 SPBp-XOIP 酶解效果的影响

Figure 1　Effects of protease types on the enzymatic hydrolysis of SPBP-XOIP

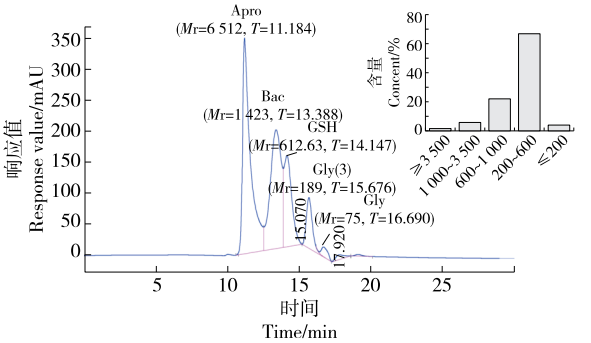
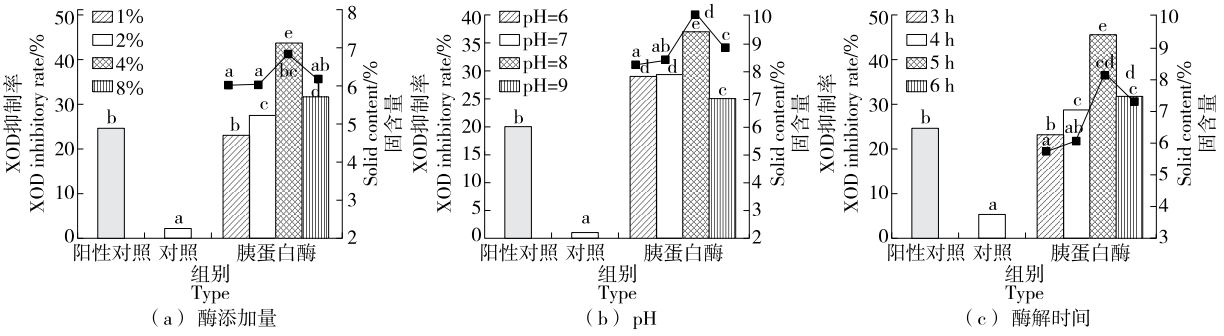


图 2　SPBp-XOIP 分子量分布图

Figure 2　Molecular mass distribution of hydrolysates of skipjack Tuna byproducts

时，XOD 抑制率达到最大值 43.740%；pH 同时影响酶的活性中心和 XOD 的分离状态，可改变其空间结构和表面特征，并对酶和化学物质的特殊组合产生作用[27]。当 pH 为 8 时，XOD 抑制活性[(37.137±0.376)%]最强；当 pH 为 9.0 时，XOD 抑制率和抑制肽固含量显著下降（$P<0.05$）。抑制肽固含量随着酶解时间的增长先平稳上升后缓慢减小，当酶解时间为 5 h 时，抑制肽固含量达最大[(7.62±0.74)%]而后降低，这是因为随着酶水解的持续发生，蛋白酶可切位点逐渐减少，产生酶水解的肽与鱼类蛋白竞争成为底物，从而降低酶水解的效率[28]。因此，综合考虑抑制肽固含量和 XOD 抑制活性，选择最佳酶添加量为 4%，pH 为 8.0，酶解时间为 5 h。



（a）酶添加量　（b）pH　（c）酶解时间

字母不同表示差异显著（$P<0.05$）

图 3　酶添加量、pH、酶解时间对鲣鱼加工副产物胰蛋白酶酶解液 XOD 抑制率的影响

Figure 3　Effects of enzymatic dosages, pH, time on inhibition rate of skipjack Tuna byproducts hydrolysate derived from trypsin digestion ($n=3$)

2.5　响应面优化试验

2.5.1　响应面优化模型的建立与方差分析　在单因素试验基础上，选择酶添加量、pH 值和酶解时间为试验因素，以抑制肽固含量和 XOD 抑制率为响应值进行响应面试验，各因素水平见表 4，试验设计及结果见表 5。

采用 Design-Expert 8.0.6.1 进行分析，得到二次响应面回归方程为：

表 4　鲣鱼加工副产物酶解工艺的响应面因素水平表

Table 4　Response surface factors and levels of enzymatic hydrolysis of skipjack byproducts

水平	A 酶添加量/%	B pH 值	C 酶解时间/h
−1	2	7.0	4
0	4	8.0	6
1	8	9.0	8

表 5　响应面试验设计及结果

Table 5　Observed and estimated values for different levels of experimental design

试验号	A	B	C	Y_1抑制肽固含量/%	Y_2XOD抑制率/%
1	−1	0	−1	6.49	31.15
2	1	0	−1	6.49	32.51
3	1	1	0	6.79	34.10
4	0	0	0	7.45	42.16
5	0	0	0	7.46	43.12
6	−1	0	1	6.89	32.15
7	0	1	1	6.68	33.54
8	−1	−1	0	6.65	34.19
9	0	0	0	7.45	42.89
10	0	−1	−1	6.20	33.98
11	−1	1	0	6.85	32.74
12	1	−1	0	6.65	35.56
13	0	1	−1	6.34	32.53
14	0	0	0	7.44	42.00
15	0	−1	1	6.54	34.99
16	1	0	1	6.83	33.52
17	0	0	0	7.47	43.58

$$Y_1=7.45-0.015A+0.078B+0.18C-0.015AB-0.015AC-0.24A^2-0.48B^2-0.54C^2,\quad(3)$$

$$Y_2=42.75+0.68A-0.73B+0.5C-0.000\ 5AB+0.000\ 25AC-0.001BC-5.01A^2-3.59B^2-5.40C^2。\quad(4)$$

由表 6 可知,Y_1和 Y_2的回归模型系数 $R^2>0.9$,说明抑制肽固含量和 XOD 抑制率的实际值与预测值拟合较好;模型极显著($P<0.01$),失拟项不显著,说明模型能够较好地揭示各因素与抑制肽固含量和 XOD 抑制率之间的关系。

B 和 C 因子对抑制肽固含量均有极显著影响($P<0.01$),A 次之($0.01<P<0.05$)。二次项中,A^2、B^2、C^2均为极显著($P<0.01$),而各因素间交叉项对抑制肽固含量的影响不显著($P>0.05$)。

由表 7 可知,A 和 B 对 XOD 抑制率均有极显著影响($P<0.01$),C 的影响较弱于两者($0.01<P<0.05$)。同时,A^2、B^2、C^2对 XOD 抑制率影响均极显著($P<0.01$),交叉项影响不显著($P>0.05$)。

2.5.2　响应面分析　通过 Design-Expert 软件绘制各交互因素对 XOD 抑制率及抑制肽固含量影响的 3D 图。图 4 中的响应面图坡度陡峭,说明酶解时间、酶添加量和 pH 单因素对鲤鱼背腹肉酶解液的固含量和 XOD 抑制率的影响显著;等高线基本呈椭圆形,说明各因素对鲤鱼背腹肉酶解液的抑制肽固含量和 XOD 抑制率存在交互作用,但并不显著。

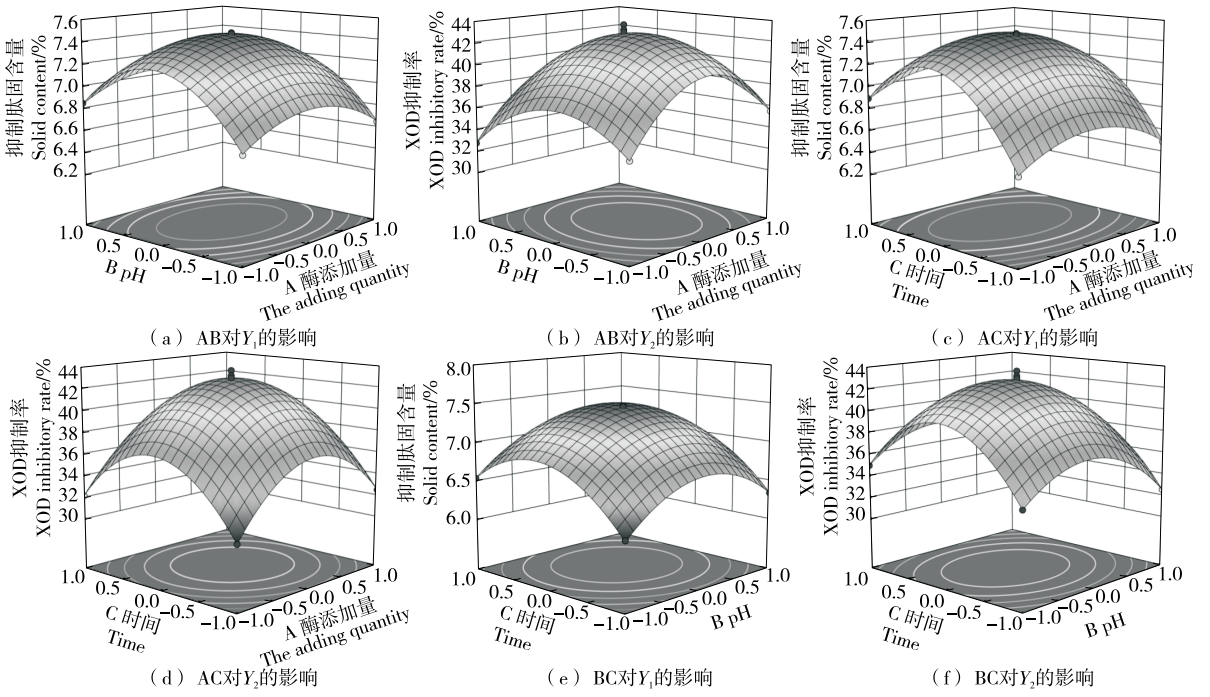
2.5.3　最优工艺条件的确定与验证　由回归方程预测的最佳酶解条件为酶添加量 3.72%,酶解时间 4.77 h,pH 7.89,此时预测抑制肽固含量为 7.454%,XOD 抑制率为 42.75%。考虑到试验操作条件,将工艺条件调整为酶添加量 4%,酶解时间 5 h,pH 8.0 进行验证实验,测得抑

表 6　试验结果方差分析†

Table 6　Analysis of variance of regression equation of solid content

来源	平方和		自由度	均方		F 值		P 值	
	Y_1	Y_2		Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2
模型	2.970 0	324.73	9	0.330 0	36.08	1 628.26	144.06	<0.000 1**	<0.000 1**
A	0.001 8	3.72	1	0.001 8	3.72	8.87	14.85	0.020 5*	0.006 3**
B	0.048 0	4.21	1	0.048 0	4.21	236.87	16.82	<0.000 1**	0.004 6**
C	0.250 0	2.02	1	0.250 0	2.02	1 242.50	8.08	<0.000 1**	0.025 0*
AB	0.000 9	1.00×10^{-6}	1	0.000 9	1.00×10^{-6}	4.44	3.99×10^{-6}	0.073 2	0.998 5
AC	0.000 9	2.50×10^{-7}	1	0.000 9	2.50×10^{-7}	4.44	9.98×10^{-7}	0.073 2	0.999 2
BC	0.000 0	4.00×10^{-6}	1	0.000 0	4.00×10^{-6}	0.00	1.60×10^{-6}	1.000 0	0.996 9
A^2	0.250 0	105.79	1	0.250 0	105.79	1 215.56	422.38	<0.000 1**	<0.000 1**
B^2	0.960 0	54.18	1	0.960 0	54.18	4 722.62	216.33	<0.000 1**	<0.000 1**
C^2	1.210 0	122.82	1	1.210 0	122.82	5 985.42	490.39	<0.000 1**	<0.000 1**
残差	0.001 4	1.75	7	0.000 2	0.25				
失拟性	0.000 9	7.75×10^{-6}	3	0.000 3	2.58×10^{-6}	2.31	5.89×10^{-6}	0.218 3	1.000 0
纯误差	0.000 5	1.75	4	0.001 1	0.44				
总差	2.970 0	326.49	16						

† “**”表示差异极显著($P<0.01$);“*”表示差异显著($P<0.05$)。



（a）AB对Y_1的影响　（b）AB对Y_2的影响　（c）AC对Y_1的影响

（d）AC对Y_2的影响　（e）BC对Y_1的影响　（f）BC对Y_2的影响

图 4　各因素对 XOD 抑制率及抑制肽固含量的交互影响

Figure 4　Interaction of various factors on the degree of hydrolysis

制肽固含量为 7.96%，XOD 抑制率为 43.941%，基本符合预测理论值。因此通过响应面方法优化得到的酶解条件合理可行。

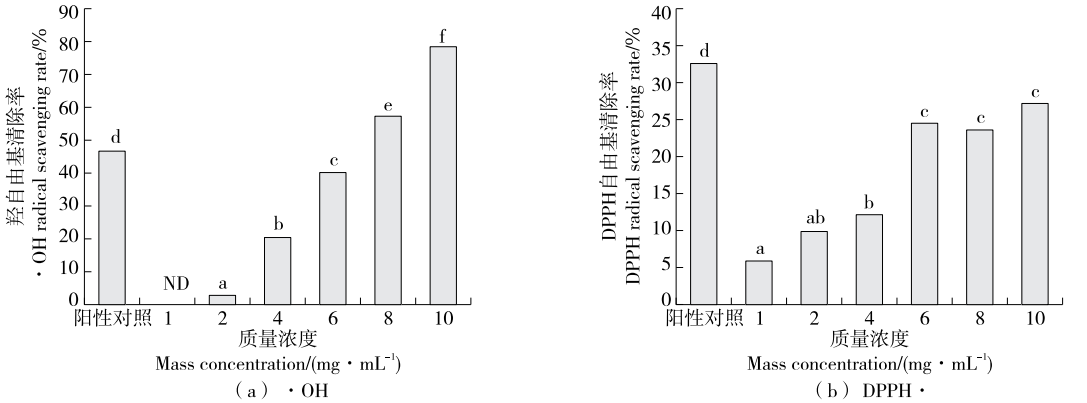
2.6　SPBp-XOIP 体外抗氧化能力

由图 5(a)可知，SPBp-XOIP 的 · OH 清除能力最强，6 mg/mL 的 SPBp-XOIP 与 0.022 g/mL 维生素 C 阳性对照对 · OH 清除能力相当，说明 SPBp-XOIP 具有良好的 · OH 清除活性，可能是因为酶解产物能与 Fe^{2+} 结合，抑制了自由基的产生。

由图 5(b)可知，SPBp-XOIP 清除 DPPH · 能力呈浓度依赖性，经计算，SPBp-XOIP 对 DPPH · 清除能力的半抑制质量浓度(ED_{50})为 10.0 mg/mL，对照组维生素 C 的 ED_{50} 为 0.027 mg/mL。通常认为，DPPH · 能够接受 H · 或电子形成稳定的反磁性分子[29]，SPBp-XOIP 对 DPPH · 的清除作用可能是由于鳕鱼蛋白经过酶解后暴露出更多的疏水性氨基酸侧链，更易接近 DPPH · ，作为氢供体与之反应，从而猝灭自由基，形成更稳定的结构。

2.7　SPSS 相关性分析

由图 6 可知，SPBp-XOIP 的抑制率与 DPPH · 清除率呈极显著正相关($r=0.974$，$P<0.01$)，表明 SPBp-XOIP 在对 XOD 产生抑制的同时对 DPPH · 具有清除能力，蛋白质水解物的抗氧化特性与其氨基酸组成有关，其



（a）· OH　（b）DPPH ·

字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 5　SPBp-XOIP 对 · OH 和 DPPH · 的清除能力

Figure 5　Scavenging ability of SPBP-XOIP at different concentrations on · OH and DPPH · radicals

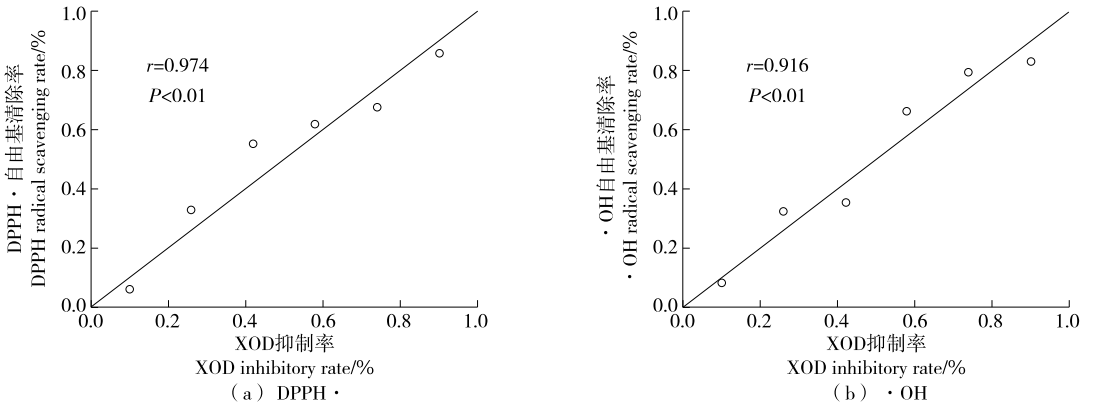


图 6　SPBp-XOIP 的 XOD 抑制率与 DPPH·、·OH 清除率的相关性

Figure 6　Correlations among inhibition rate of XOD after SPBp-XOIP, and racidial screening of DPPH· and ·OH after SPBp-XOIP

中缬氨酸、亮氨酸[30]、组氨酸和精氨酸[31]自身就表现出一定的抗氧化作用。SPBp-XOIP 的抑制率与·OH 清除率呈极显著正相关($r=0.916$, $P<0.01$)。在生理条件下,一般以黄嘌呤脱氢酶(FAD)存在,在辅酶 I(NAD)存在时,FAD 比分子氧具有更强的亲和力,是一种电子受体。但在病理条件下,腺苷三磷酸(ATP)会降解为腺嘌呤和黄嘌呤,同时将大量的 FAD 转化为 XOD,使得分子氧代替 NAD 作为受体,在生成尿酸的同时产生大量的自由基,从而对机体造成损伤[32]。故 SPBp-XOIP 在本身具有抗氧化能力的同时,能够对 XOD 产生抑制,以此来降低尿酸,对肾脏起到保护作用,显示了其在高尿酸血症上的潜在前景。

3　结论

以鲤鱼加工副产物为研究对象,确定了黄嘌呤氧化酶抑制肽的蛋白酶为胰蛋白酶,最优制备条件为酶添加量 4%,酶解时间 5 h,料液比 1∶3 (g/mL),酶解温度 55 ℃,pH 8.0。此条件下,与阳性对照别嘌呤醇相比,黄嘌呤氧化酶抑制率为 43.941%。黄嘌呤氧化酶抑制肽可能对高尿酸血症、痛风具有一定的干预作用;同时,黄嘌呤氧化酶抑制肽具有很强的抗氧化能力,清除羟自由基和 DPPH 自由基的半抑制质量浓度分别为 6.0,10.0 mg/mL。但鲤鱼肽的抗氧化能力以及黄嘌呤氧化酶抑制能力在体内是否能保持尚不清楚,下一步将会展开相应的动物试验。

参考文献

[1] 周洁, 孙超, 李飞, 等. 中药活性成分降尿酸作用机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(1): 19-22.
ZHOU J, SUN C, LI F, et al. Research progress on the mechanism of active components of traditional Chinese medicine to reduce uric acid[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2018, 34(1): 19-22.

[2] WANG Y, ZHANG G, PAN J, et al. Novel insights into the inhibitory mechanism of kaempferol on xanthine oxidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(2): 526-534.

[3] EKUNDAYO O J, DELL'ITALIA L J, SANDERS P W, et al. Association between hyperuricemia and incident heart failure among older adults: A propensity-matched study[J]. International Journal of Cardiology, 2010, 142(3): 279-287.

[4] PUDDU P, PUDDU G M, CRAVERO E, et al. Relationships among hyperuricemia, endothelial dysfunction and cardiovascular disease: Molecular mechanisms and clinical implications[J]. Journal of Cardiology, 2012, 59(3): 235-242.

[5] 任昊, 刘宏发, 刘郑荣. 高尿酸血症和肾脏[J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(1): 152-154.
REN H, LIU H F, LIU Z R. Kidney and hyperuricemia[J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2008, 17(1): 152-154.

[6] MASSEY V, BRUMBY P E, KOMAI H, et al. Studies on milk xanthine oxidase some spectral and kinetic properties[J]. Journal of Biological Chemistry, 1969, 244(7): 1 682.

[7] MASUO K, KU B. Characterization of the xanthine oxidase inhibitory activity of alk(en)yl phenols and related compounds[J]. Phyto Chemistry, 2018, 155: 100-106.

[8] FRANCES R, MICHELLE H, MICHAEL D. Optimizing current treatment of gout[J]. Nature Reviews Rheumatology, 2014, 10(5): 271-283.

[9] BURNS C M, WORTMANN R L. Gout therapeutics: New drugs for an old disease[J]. The Lancet, 2011, 377(9 760): 165-177.

[10] NILE S H, NILE A S, KEUM Y S, et al. Utilization of quercetin and quercetin glycosides from onion (*Allium cepa* L.) solid waste as an antioxidant, urease and xanthine oxidase inhibitors[J]. Food Chemistry, 2017, 235: 119-126.

[11] LEE C T, CHANG L C, LIU C W, et al. Negative correlation between serum uric acid and kidney URAT1 mRNA expression caused by resveratrol in rats[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017, 61(10): 1-9.

[12] SANG M M, DU G Y, HAO J, et al. Modeling and optimizing inhibitory activities of *Nelumbinis folium* extract on xanthine oxidase using response surface methodology [J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2017, 139: 37-43.

[13] 黎青勇. 核桃源降尿酸肽靶向抑制黄嘌呤氧化酶活性的构效机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018: 9-12.
LI Q Y. Study on the structure-activity mechanism of targeting inhibition of xanthine oxidase by uricacid-lowering peptides derived from walnut[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018: 9-12.

[14] MAJKOWSKI J. Global fishery resources of tuna and tuna-like species[M]. 483 ed. Rome: FAO Fisheries Technical Paper, 2007: 11-38.

[15] 陈洋洋, 陈新军. 中西太平洋鲣鱼渔业研究进展[J]. 广东海洋大学学报, 2017, 37(5): 34-43.
CHEN Y Y, CHEN X J. Research progress of Skipjack bonito fishery in central and Western Pacific[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2017, 37(5): 34-43.

[16] FUJITA H, YAMAGAMI T, OHSHIMA K. Effects of an ace-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects 1[J]. Nutrition Research, 2001, 21(8): 1 149-1 158.

[17] 宋茹. 黄鲫(Setipinna Taty)蛋白抗菌肽的制备及抗菌功能等生物活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
SONG R. Preparation of antimicrobial peptides from Carassius auratus carassius (Setipinna Taty) protein and their biological activities[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.

[18] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学:上册[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 173-174.
WANG J Y, ZHU S G, XU C F. Biochemistry: Volume 1[M]. Beijing: Higher Education Press, 2002: 173-174.

[19] 叶丽珠, 陈慧斌, 刘智禹. 花蛤蒸煮液喷雾干燥法制蛤粉工艺优化研究[J]. 渔业研究, 2017, 39(6): 469-475.
YE L Z, CHEN H B, LIU Z Y.Study on the process optimization of clam powder by spray drying of cockle cooking liquid[J]. Fishery Research, 2017, 39(6): 469-475.

[20] 陈君琛, 周学划, 赖谱富, 等. 大球盖菇漂烫液喷雾干燥制营养精粉工艺优化[J]. 农业工程学报, 2012, 28(21): 272-279.
CHEN J C, ZHOU X H, LAI P F, et al. Optimization of processing nutrient powder from blanching liquid of stropharia rugoso-annulata with spray drying technology[J]. Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2012, 28(21): 272-279.

[21] 邹琳. 鲣鱼黄嘌呤氧化酶抑制肽的酶解制备及功能活性评价[D]. 杭州: 浙江大学, 2019: 56.
ZOU L. Enzymatic hydrolysis preparation and functional activity evaluation of xanthine oxidase inhibitory peptide of Bonito[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019: 56.

[22] 陈文超. 苹果渣低聚糖的提取纯化及抗氧化性研究[D]. 太原: 山西大学, 2017.
CHEN W C. Study on extraction, purification and antioxidant activity of oligosaccharides from apple residue[D].Taiyuan: Shanxi University, 2017.

[23] FAO/WHO. Protein quality evaluation [M]. Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1991: 51.

[24] 赵贵琴, 李婷婷, 宋敏杰, 等. 分子对接技术筛选鲈鱼肌球蛋白中黄嘌呤氧化酶抑制肽[J]. 中国食品学报, 2021, 21(6): 81-91.
ZHAO G Q, LI TT, SONG M J, et al. Screening of xanthine oxidase inhibitory peptide in myosin from Perch by molecular docking technique[J]. Chinese Journal of Food Science, 2021, 21(6): 81-91.

[25] SKIBO E B. Noncompetitive and irreversible inhibition of xanthine oxidase by benzimidazole analogues acting at the functional flavin adenine dinucleotide cofactor[J]. Biochemistry, 1986, 25(15): 89-94.

[26] NONGONIERMA A B, MAUX S L, HAMAYON J, et al. Strategies for the release of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides in an enzymatic hydrolyzate of α-lactalbumin [J]. Food & Function, 2016, 7(8): 3 437-3 443.

[27] 田旭静, 段鹏慧, 范三红, 等. 响应面法优化酶解藜麦糠蛋白制备抗氧化肽工艺[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 158-164.
TIAN X J, DUAN P H, FAN S H, et al. Response surface methodology for optimization of hydrolysis conditions for preparing antioxidant peptides from quinoabran protein[J]. Food Science. 2018, 39(10): 158-164.

[28] 钟机. 蓝圆鲹鱼肉蛋白酶解液的制备及其 Maillard 反应生香工艺研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2017: 15-17.
ZHONG J. Study on the preparation of enzymatichy drolysate of decapterus maruadsi proteins and Maillard reaction[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2017: 15-17.

[29] SOARES J R, DINS T C P, CUNHA A P, et al. Antioxidant activities of some extracts of Thymus zygis[J]. Free Radical Res, 1997, 26: 469-478.

[30] 曹振海, 乐彩虹, 陶宁萍, 等. 体外模拟消化对暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白肽结构特征及抗氧化活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(23): 61-69.
CAO Z H, LE C H, TAO N P, et al. Effects of simulated digestion in vitro on collagen peptide structure and antioxidant activity of Takifugu Rubripes[J]. Food and Fermentation Industry, 2021, 47(23): 61-69.

[31] 刘乐, 李艳, 连加达, 等. 藜麦醇溶蛋白的氨基酸组成、抗氧化性与乳化性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(13): 181-187.
LIU L, LI Y, LIAN J D, et al. Quinoa gliadin of amino acid composition, oxidation resistance and emulsification study[J]. Journal of Food and Fermentation Industry, 2022(13): 181-187.

[32] SINGH D, CHANDER V, CHOPRA K. The effect of quercetin, a bioflavonoid on ischemia/reperfusion induced renal injury in rats [J]. Arch Med Res, 2004, 35: 484-494.