

黑豆黄嘌呤氧化酶抑制肽的制备及体外降尿酸活性

孙菁茹¹, 孙铭爽², 吕文庆¹, 曹荣安¹, 刁静静^{3,4,*}, 王长远^{1,3,*}

(1.黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319; 2.黑龙江欧能达乳业有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150025; 3.国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319; 4.黑龙江省杂粮加工及质量安全工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:以黑豆蛋白为原料,以黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)抑制率和水解度为指标筛选最佳蛋白酶和酶解工艺参数,在此基础上采用膜分离技术对黑豆蛋白酶解产物进行分离,获得不同分级的酶解产物,根据XOD抑制活性确定黑豆蛋白酶解产物的分子质量范围,并对其氨基酸组成、分子质量分布、肽序列以及活性稳定性进行分析。结果表明,黑豆XOD抑制肽的最佳酶解工艺为:碱性蛋白酶加酶量1.5%、酶解时间4 h、酶解温度50 ℃、pH 9.0、底物质量分数3%,此条件下黑豆蛋白酶解物的XOD抑制率和水解度分别为73.61%和21.29%。超滤产物中F3组分的XOD抑制活性最高(半抑制浓度为8.76 mg/mL),分子质量≤1 500 Da,该组分的疏水性氨基酸和碱性氨基酸占氨基酸总量的56.66%和20.16%;该组分在高温热处理、胃、胰蛋白酶消化作用下均具有良好的稳定性。液相色谱-串联质谱法鉴定出F3组分中有18条肽段,平均分子质量主要集中在500~1 400 Da。该系列肽段N-端和C-端疏水性氨基酸分别占44.86%和33.14%,碱性氨基酸分别占33.57%和39.29%。该研究结果可为黑豆蛋白的高值化利用提供一定的基础理论依据。

关键词:黑豆蛋白;酶解工艺;黄嘌呤氧化酶抑制肽;氨基酸组成;肽序列

Preparation of Xanthine Oxidase Inhibitory Peptide from Black Bean Protein by Enzymatic Hydrolysis and Its Uric Acid-Lowering Activity *in Vitro*

SUN Jingru¹, SUN Mingshuang², LÜ Wenqing¹, CAO Rong'an¹, DIAO Jingjing^{3,4,*}, WANG Changyuan^{1,3,*}

(1. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; 2. Heilongjiang Ounengda Dairy Co. Ltd., Harbin 150025, China; 3. National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing 163319, China; 4. Heilongjiang Coarse Grain Processing and Quality Safety Engineering Technology Research Center, Daqing 163319, China)

Abstract: In this study, black soybean protein was enzymatically hydrolyzed to prepare xanthine oxidase (XOD) inhibitory peptide. Based on XOD inhibitory activity and degree of hydrolysis (DH), various proteases were screened, and the hydrolysis parameters were optimized. Furthermore, the protein hydrolysate was fractionated by membrane separation into several fractions. The molecular mass ranges of the resulting fractions were determined based on XOD inhibitory activity, and their amino acid composition, molecular mass distribution, peptide sequences, activity and stability were analyzed. The results showed that the optimum enzymatic hydrolysis conditions were as follows: alkaline protease dosage of 1.5%, hydrolysis time of 4 h, temperature of 50 ℃, pH 9.0, and substrate concentration of 3%. Under the optimized conditions, the XOD inhibition rate and DH of the protein hydrolysate were 73.61% and 21.29%, respectively. The XOD inhibitory activity of F3, obtained from ultrafiltration of the hydrolysate, was the highest (with a half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 8.76 mg/mL), with the molecular mass ≤ 1 500 Da. In F3, hydrophobic and basic amino acids accounted for 56.66% and 20.16% of the total amino acids, respectively. This fraction had good stability under high-temperature treatment, simulated gastric and trypsin digestion. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) identified 18 peptides in F3,

收稿日期: 2024-05-09

基金项目: 黑龙江省重点研发计划项目(2022ZX02B18); 黑龙江八一农垦大学研究生创新基金项目(YJSCX2023-ZX19)

第一作者简介: 孙菁茹(2000—)(ORCID: 0000-0007-1254-0695),女,硕士,研究方向为食品科学。E-mail: 269489825@qq.com

*通信作者简介: 刁静静(1981—)(ORCID: 0000-0002-4309-8808),女,研究员,博士,研究方向为粮食油脂及植物蛋白质工程。E-mail: diaojing62@163.com

王长远(1976—)(ORCID: 0000-0001-7692-286X),男,教授,博士,研究方向为粮食油脂及植物蛋白质工程。E-mail: byndwcy@163.com

with an average molecular mass of approximately 500–1 400 Da. In these peptides, hydrophobic amino acids at the N-terminus and C-terminus accounted for 44.86% and 33.14%, respectively, and basic amino acids accounted for 33.57% and 39.29% of the total amino acid residues, respectively. The results of this study provide a theoretical basis for the high value utilization of black bean protein.

Keywords: black soybean protein; enzymatic hydrolysis process; xanthine oxidase inhibitory peptides; amino acid composition; peptide sequence

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240509-052

中图分类号: TS214.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 23-0072-09

引文格式:

孙菁茹, 孙铭爽, 吕文庆, 等. 黑豆黄嘌呤氧化酶抑制肽的制备及体外降尿酸活性[J]. 食品科学, 2024, 45(23): 72-80.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240509-052. <http://www.spkx.net.cn>

SUN Jingru, SUN Mingshuang, LÜ Wenqing, et al. Preparation of xanthine oxidase inhibitory peptide from black bean protein by enzymatic hydrolysis and its uric acid-lowering activity *in vitro*[J]. Food Science, 2024, 45(23): 72-80. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240509-052. <http://www.spkx.net.cn>

高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)是一种以血清尿酸浓度超过溶解度极限(生理pH值时血清尿酸水平 $>6.8\text{ mg/dL}$)为特征的代谢性疾病^[1],高嘌呤饮食、过度饮酒、高果糖摄入等生活方式因素都可能导致机体尿酸水平升高^[2],慢性HUA会导致尿酸钠晶体在关节和其他软组织中积聚,从而增加痛风的风险。近年来,HUA与痛风患者逐渐年轻化,减少HUA等并发症的发生已引起全世界各国的重视^[3]。黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)是嘌呤代谢中的关键酶,可将次黄嘌呤和黄嘌呤转化为尿酸,是治疗HUA的重要靶点^[4]。国内外目前针对HUA的预防和治疗多以别嘌呤醇和非布索坦类等XOD抑制剂为主,但临床试验中易引起严重的过敏反应、胃肠疾病、肾毒性及肝毒性等不良反应^[5]。因此,研发高效、低副作用的XOD天然抑制剂是目前治疗HUA的研究热点。现有研究已发现天然产物中的多酚、黄酮及多糖类物质具有较好的XOD抑制效果,如李子多酚^[6]、清飘苓茶黄酮^[7]、玉米须多糖^[8]等。近年来有研究表明,生物活性肽能改变XOD的空间结构,阻止黄嘌呤与其结合,对HUA有显著的调节效果,尤其是动物蛋白酶解产物,如蓝鳍金枪鱼肽^[9]、乳清蛋白肽^[10]等。Murota等^[11]发现小分子肽的XOD抑制活性更好。叶灏铎等^[12]发现肽段的氨基酸组成及残基位置会影响其XOD抑制活性,疏水氨基酸、N-端和C-端为芳香族氨基酸的多肽抑制能力更强。

黑豆又被称作乌豆,在我国的大豆资源中仅次于黄豆,位居第二^[13]。与其他大豆品种相比,黑豆的蛋白质含量最高,有“植物蛋白之王”的美誉^[14]。黑豆蛋白包含18种氨基酸,其组成与动物氨基酸十分类似,含量丰富且配比合理,对人体代谢调节等方面具有重要作用^[15]。大量研究已证实黑豆蛋白酶解物有较高的生物活性,如抗氧化性、血管紧张素转换酶抑制活性、抗肿瘤、调节血糖血脂等^[16]。最新研究发现大豆肽、芸豆肽

有抑制XOD活性的能力^[17],但大豆中嘌呤含量较高,食用过多会导致尿酸堆积进而引发痛风等疾病。目前,Mao Zhenjie等^[18]研究发现,多肽中色氨酸(Trp)的含量可能与XOD抑制肽的活性密切相关,但大豆中的色氨酸含量较低^[19],因黑豆与大豆同源,其色氨酸含量也相对较低,并且黑豆自古以来就有益肾、解毒、利水的功效^[20],多吃黑豆可促进尿酸排出,一定程度上降低人体内尿酸水平。因此,本研究以黑豆蛋白为原料,以XOD抑制率、水解度(hydrolysis degree, DH)为指标,筛选最佳酶解条件及参数;在此基础上对黑豆酶解产物进行超滤分离获得最优XOD抑制活性组分,并对其进行分子质量分布、氨基酸组成和稳定性分析,通过液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)解析鉴定该组分黑豆XOD抑制肽的结构特征,以为黑豆资源的合理利用及功能性食品的开发提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑豆蛋白粉(80%) 兰州沃特莱斯生物科技有限公司;中性蛋白酶($5\times 10^4\text{ U/g}$) 北京索莱宝科技有限公司;木瓜蛋白酶($2\times 10^5\text{ U/g}$) 上海麦克林生化有限公司;胰蛋白酶($2.5\times 10^5\text{ U/g}$)、胃蛋白酶($3\times 10^4\text{ U/g}$)、碱性蛋白酶($2\times 10^5\text{ U/g}$)、风味蛋白酶($2\times 10^4\text{ U/g}$)、XOD(50 U/mg)、别嘌呤醇、黄嘌呤上海源叶生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

RE-3000B旋转蒸发器 郑州市亚荣科技有限公司;MSM-4010实验用膜分离装置 上海摩速科学器材有限公司;L-420型低速台式离心机 湖南湘仪

实验室仪器开发有限公司; FD-100S真空冷冻干燥机
北京惠城佳仪科技有限公司; 2300多功能酶标仪 美国
PerkinElmer公司; GPC-20A凝聚渗透色谱仪、LC-20AD
高效液相色谱仪、C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)
日本岛津仪器有限公司; GMPWXL水相凝胶色谱柱
日本东曹株式会社; Easy nLC 1200色谱系统、Q-Exactive
HF质谱仪、C₁₈色谱柱(100 μm×20 mm, 5 μm)、C₁₈
色谱分析柱(75 μm×150 mm, 3 μm) 美国Thermo
Fisher Scientific公司。

1.3 方法

1.3.1 黑豆XOD抑制肽的制备

称取一定量的黑豆蛋白粉配制质量分数3%的溶液, 根据所添加酶加入1 mol/L NaOH或1 mol/L HCl溶液调节混合溶液至相应的pH值, 在酶最适温度下水浴进行酶解反应, 水解一定时间后对酶解液进行灭酶, 静置冷却, 以8 000 r/min离心20 min后收集酶解上清液, 冷冻干燥储存在-20℃冰箱里用于后续实验。

1.3.2 蛋白酶的筛选

选取6种蛋白酶, 在酶最适合条件下分别对黑豆蛋白进行酶解, 各种蛋白酶的最适条件如表1所示。在底物质量分数3%、加酶量1.5% (以蛋白粉质量计) 条件下酶解4 h, 灭酶活后离心, 取上清酶解液测定XOD抑制率和DH, 选择最优的蛋白酶。

表1 各种蛋白酶的最适酶解条件

Table 1 Optimal enzymatic hydrolysis conditions for various proteases

蛋白酶	最适条件	
	温度/℃	pH
胰蛋白酶	37	8.0
木瓜蛋白酶	55	6.5
胃蛋白酶	37	1.5
中性蛋白酶	50	7.0
碱性蛋白酶	50	9.0
风味蛋白酶	50	7.0

1.3.3 单因素试验

选择最优蛋白酶, 考察不同因素对XOD抑制率和DH的影响, 优化条件为: 底物质量分数(1%、2%、3%、4%、5%)、酶解时间(1、2、3、4、5 h)、加酶量(1%、1.5%、2%、2.5%、3%)。除考察因素外, 初始条件不变: 底物质量分数3%、加酶量1.5%、pH 9.0、酶解温度50℃、时间4 h。

1.3.4 XOD抑制率的测定

参考邹琳等^[21]的方法检测XOD抑制率, 并略作修改。将50 μL待测样品及25 μL浓度为0.02 U/mL的XOD溶液加入96孔板中, 振荡30 s, 25℃保温5 min, 再加入150 μL 0.48 mmol/L的黄嘌呤溶液, 振荡30 s后, 25℃保

温25 min, 测定290 nm处的吸光度。XOD抑制率计算公式如下:

$$\text{XOD抑制率}/\% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4}\right) \times 100 \quad (1)$$

式中: A_1 表示样品溶液加酶的吸光度; A_2 表示样品溶液不加酶的吸光度; A_3 表示缓冲液代替样品溶液(空白组)加酶的吸光度; A_4 表示空白组不加酶的吸光度。

1.3.5 DH的测定

碱性和中性蛋白酶DH的测定采用pH-stat法^[22], 按照下式计算:

$$\text{DH}/\% = \frac{B \times N_b}{M_p} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{\text{tot}}} \times 100 \quad (2)$$

式中: B 为消耗的NaOH溶液的体积/mL; N_b 为NaOH溶液的浓度/(mol/L); M_p 为底物蛋白质的总量/g; α 为 α -氨基酸的解离度(胰蛋白酶的 $1/\alpha$ 为1.30, 木瓜蛋白酶的 $1/\alpha$ 为4.25, 中性蛋白酶和风味蛋白酶的 $1/\alpha$ 为2.27, 碱性蛋白酶的 $1/\alpha$ 为1.01); h_{tot} 为每克蛋白质中肽键的物质(7.80 mmol/g)。

酸性蛋白酶DH的测定采用茚三酮比色法^[23]。称取0.20 g干燥过后的甘氨酸, 溶解并定容至100 mL, 再从中取2 mL定容至100 mL, 将甘氨酸分别配制浓度为0、4、8、12、16、24、32、40 mol/L的标准溶液; 加入1 mL显色剂水浴加热15 min, 冷却后加入5 mL乙醇, 静置15 min, 于570 nm处测吸光度。取灭酶后的水解液1 mL, 调至pH 6.0, 定容至100 mL。取2 mL稀释液于试管中, 剩余步骤同标准曲线测定, 水作参比。另取相同浓度未水解蛋白溶液1 mL, 按上述方法测光密度, 以二者光密度之差从标准曲线计算得到的蛋白质量浓度, DH按下式计算:

$$\text{DH}/\% = \frac{A}{1\,000 \times W} \times V_1 \times \frac{100}{V_2} \times 100 \quad (3)$$

式中: A 为通过标准曲线所计算得到的蛋白质量/mg; W 为样品质量/g; V_1 为水解液的总体积/mL; V_2 为显色时所用稀释液的体积/mL。

1.3.6 超滤分离

采用膜分离装置对黑豆XOD抑制粗肽进行不同分子质量截留, 依次通过截留分子质量为3 000、1 500 Da的超滤膜进行超滤分离, 分别收集3个部分(>3 000 Da、3 000~1 500 Da、<1 500 Da), 并命名为F1、F2、F3。冷冻干燥后, 分别测定不同级分酶解产物的XOD抑制率, 以别嘌呤醇作为阳性对照, 通过SPSS软件分别将F1、F2、F3组分的不同浓度梯度与所对应的XOD抑制率数据输入表中, 使用非线性回归分析拟合曲线并计算各组分的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)值。

1.3.7 稳定性分析

1.3.7.1 温度对黑豆酶解产物XOD抑制活性的影响

将F3配制成10 mg/mL的溶液, 调节至pH 7.0, 分别置于70、80、90、100 °C的水浴中加热1 h, 冷却至室温后, 按照1.3.4节的方法测定XOD抑制率, 以未处理的10 mg/mL肽溶液作对照组。

1.3.7.2 体外模拟胃肠道消化对黑豆酶解产物XOD抑制活性的影响

将F3配制成10 mg/mL的溶液, 用1 mol/L盐酸溶液调至pH 2.0, 加入底物质量2.5%的胃蛋白酶, 置于37 °C水浴振荡消化反应2 h, 消化完成后分成2个部分, 一部分沸水浴加热10 min终止反应, 为胃消化样品; 剩余部分继续反应, 用1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH 7.5, 加入底物质量1%的胰蛋白酶, 置于37 °C水浴振荡消化反应3 h, 反应完成后沸水浴加热10 min终止反应, 为胃肠消化样品; 分别测定胃消化、胃肠消化样品的XOD抑制率, 以未处理的10 mg/mL肽溶液作对照组。

1.3.8 分子质量分布测定

采用凝胶渗透色谱法对最佳XOD抑制率的组分分子质量分布进行分析。样品过0.45 μm微孔滤膜, 选择GMPWXL水相凝胶色谱柱(300 mm×7.8 mm, 13 μm)进行测定, 流动相为水(含0.1 mol/L NaNO₃+0.05% NaN₃), 样品体积100 μL, 柱温平衡在35 °C, 流速0.6 mL/min, 在220 nm波长处检测流出物。以窄分布聚乙二醇为标准品构建校准曲线, 通过比较样品中不同组分的保留时间计算样品的分子质量分布。

1.3.9 氨基酸组成分析

准确称取1.00 g F3样品, 移取3.0 mL 6 mol/L盐酸溶液(含0.1%苯酚)至样品瓶中, 超声溶解, 将溶液转移至安培瓶中, 连续5次, 充氮, 熔封, 烘箱110 °C水解24 h后, 精密移取上述样品1.0 mL, N₂吹干盐酸, 加1.0 mL水复溶, 待分析。

色谱条件: 色谱柱: C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温: 40 °C; 流速: 1.0 mL/min; 波长: 254 nm; 进样量: 10 μL; 流动相A为0.1 mol/L醋酸钠溶液(pH 6.5): 乙腈=93:7, 流动相B为水: 乙腈=20:80。

1.3.10 LC-MS/MS鉴定肽序列

取适量F3样品使用纳升流速Easy nLC 1200色谱系统进行色谱分离。肽段分离后用Q-Exactive HF质谱仪进行数据依赖采集质谱分析。

1.3.10.1 LC条件

色谱条件: C₁₈色谱柱(100 μm×20 mm, 5 μm)、C₁₈色谱分析柱(75 μm×150 mm, 3 μm); 流速: 300 nL/min; 波长: 254 nm; 进样量: 10 μL; 流动相: A为0.1%甲酸溶液, B为80%乙腈(含0.1%甲酸)溶液; 洗脱梯度: 0~2 min, 98%~95% A、2%~5% B;

2~44 min, 95%~72% A、5%~28% B; 44~51 min, 72%~60% A、28%~40% B; 51~53 min, 60%~0% A、40%~100% B; 53~60 min, 0% A、100% B。

1.3.10.2 MS条件

分析时长: 60 min; 一级质谱分辨率: 120 000 (*m/z* 200), AGC target: 3×10^6 , 一级最大进样时间: 50 ms; 二级质谱分辨率: 在*m/z*为200时的分辨率为15 000, AGC target: 1×10^5 , 二级最大进样时间: 50 ms; MS²激活类型: HCD; 隔离窗口: *m/z* 1.6; 归一化碰撞能量: 28。

1.4 数据处理与分析

实验均重复3次, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用Origin2021进行分析作图, SPSS 20软件单因素方差对数据进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白酶对黑豆蛋白酶解产物XOD抑制率的影响

由表2可知, 在同一酶解时间, 碱性蛋白酶解物的XOD抑制活性和DH显著高于其他5种酶解产物($P < 0.05$), 分别为73.61%和21.29%。这是由于蛋白酶的底物特异性会导致其作用位点的差异性, 酶解后会得到不同分子质量及氨基酸序列的多肽片段^[23]。碱性蛋白酶酶切位点相对比较广泛, 可作用于疏水性或芳香族氨基酸的肽键^[24], 生成的小肽和氨基酸可能更易于与XOD的活性位点发生作用, 从而增强其对XOD的抑制效果。马雪琪^[17]研究结果与本研究一致, 均发现碱性蛋白酶作用于蛋白后释放出的肽段具有潜在的降尿酸作用。因此, 选取碱性蛋白酶为最适酶。

表2 蛋白酶种类对酶解物XOD抑制率和DH的影响

Table 2 Effects of protease type on the XOD inhibitory activity and DH of hydrolysates

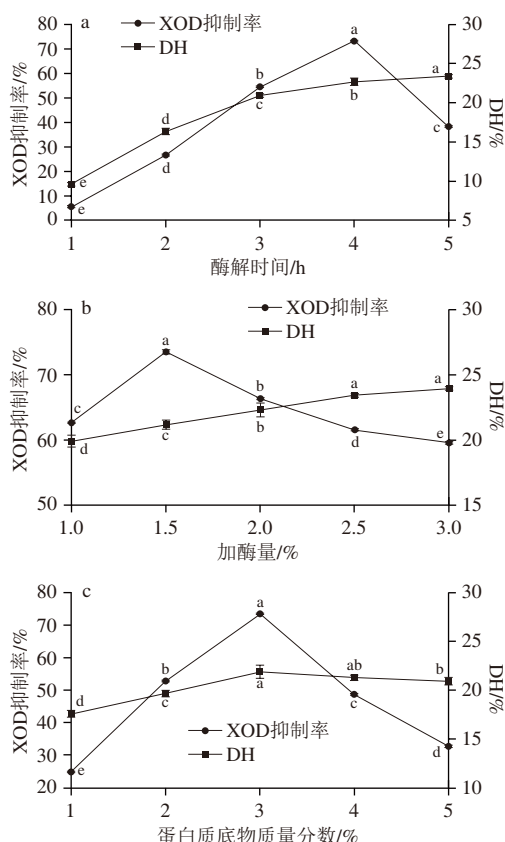
蛋白酶	XOD抑制率/%	DH/%
碱性蛋白酶	73.61±0.22 ^a	21.29±0.45 ^a
风味蛋白酶	15.33±0.29 ^f	12.93±0.61 ^b
中性蛋白酶	28.42±0.08 ^d	11.03±0.31 ^c
胰蛋白酶	29.61±0.26 ^c	8.67±0.06 ^d
胃蛋白酶	40.49±0.27 ^b	6.13±0.15 ^e
木瓜蛋白酶	24.64±0.24 ^e	2.77±0.58 ^f

注: 同列小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

2.2 不同酶解参数对黑豆蛋白酶解产物XOD抑制率的影响

由图1a所示, 黑豆蛋白酶解产物的DH随着酶解时间的延长而持续增加。当酶解时间>4 h, DH变化速率降低, 这说明在1~4 h, 随着酶解时间的延长, 蛋白质持续被酶解, 产生了大量蛋白残基, 当酶解时间>4 h, 酶

解体系中蛋白质已逐渐被酶解完全,蛋白酶的作用位点趋于饱和,DH增加减缓。此时,黑豆蛋白酶解物的XOD抑制率随着酶解时间的延长呈先上升后下降的趋势,4 h时活性最强,这表明黑豆蛋白酶解物的XOD抑制率可能与黑豆蛋白酶解物的分子质量大小有关,适当水解,形成的肽段与XOD的结合能力可能更强,继续水解后,分子质量进一步降低,可能会导致其与XOD的结合能力减弱,从而降低其活性^[12]。



同一指标小写字母不同表示差异显著, $P < 0.05$, 下同。

图1 酶解时间(a)、加酶量(b)及蛋白质底物质量分数(c)对DH和XOD抑制活性的影响

Fig. 1 Effects of enzymatic hydrolysis time (a), enzyme dosage (b) and protein substrate concentration (c) on the XOD inhibitory activity and DH of hydrolysates

图1b是酶添加量对黑豆蛋白XOD抑制活性和DH的影响,随着加酶量逐渐增加,DH一直呈上升趋势,XOD抑制率呈先上升后下降的趋势,酶添加量 $< 2\%$ 时,其XOD抑制活性均显著高于2.5%和3%处理组。在加酶量为1.5%时,XOD抑制活性显著高于其他处理组($P < 0.05$),这进一步说明黑豆酶解产物XOD抑制活性与其分子质量紧密相关。在同一酶解时间下,不同酶添加量得到酶解产物的酶解速率不同,DH不同,其产物也不同,因此其结合XOD的能力也显著不同。酶添加量过高,黑豆蛋白在同一酶解时间会被降解成分子质量更小的肽段残基,使

其XOD抑制能力降低,酶添加量低时,酶解速率低,酶解产物的得率较小,且从经济方面考虑,对黑豆蛋白的利用率较低。

由图1c可知,XOD抑制率随着底物质量分数的增加呈先上升后下降的趋势,当底物质量分数为3%时,XOD抑制活性最强,DH变化趋势与其相同,说明酶和底物之间的结合强度与底物质量分数有关,当底物质量分数偏低时,足量的酶不能与底物充分接触,产生的高活性肽段数量少;当底物质量分数过大会导致分子扩散受阻,流动性变差使酶解速率降低,最终导致XOD抑制率下降^[25]。综上,最佳酶解参数为:酶解时间4 h、加酶量1.5%、底物质量分数3%。

2.3 黑豆蛋白酶解物超滤组分XOD抑制活性分析

酶解液经超滤分离得到F1、F2、F3 3个组分。酶解产物可以通过N-端或C-端的形式嵌入XOD活性中心,阻止底物与XOD结合^[26],阳性药物别嘌呤为嘌呤类似物,其化学结构与黑豆XOD抑制肽不同,但作用机制与其相同。由图2可知,F3组分活性(IC_{50} : 8.76 mg/mL)相较于原酶解液(IC_{50} : 15.92 mg/mL),活性显著提升。F2组分活性(IC_{50} : 25.8 mg/mL)虽高于F1组分(IC_{50} : 42.7 mg/mL),但明显弱于酶解液。这表明,较高活性的黑豆XOD抑制肽主要存在于小分子肽段中,与詹苏泓^[27]的研究结果吻合。图中阳性药物别嘌呤(IC_{50} : 0.08 mg/mL)比F3组分具有更强的XOD抑制活性,可能是因为小分子质量的别嘌呤可以很好地嵌入XOD的活性口袋中。然而,肽作为比药物别嘌呤更安全的物质,更适合长期治疗^[28]。综上,F3组分的黑豆蛋白酶解产物表现出显著的XOD抑制效果。

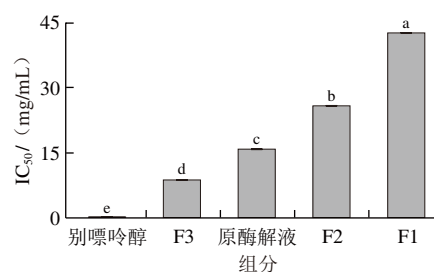


图2 不同组分XOD抑制活性的 IC_{50} 值

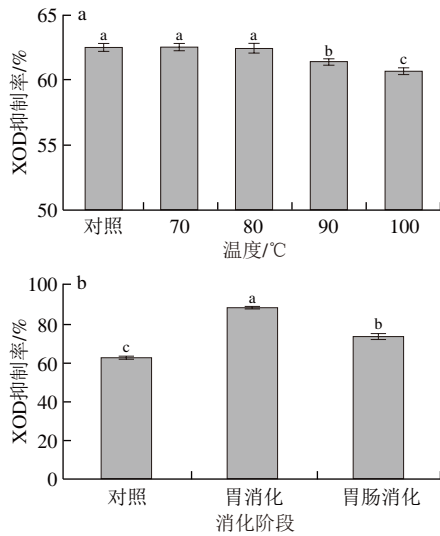
Fig. 2 IC_{50} values for XOD inhibitory activity of different ultrafiltration fractions

2.4 稳定性分析

由图3a可知,温度 $\leq 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,F3组分XOD抑制率差异不显著($P > 0.05$),当温度 $\geq 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,XOD抑制活性有略微下降趋势,100 $^{\circ}\text{C}$ 时活性仅仅降低了约2%,推测这与高温环境使活性多肽的结构发生局部变化有关^[29],但其抑制率仍能达到原有活性的95.24%以上。结合表3结果,F3中肽分子质量大多小于1 500 Da,Bui等^[30]发现肽

的分子质量与热稳定性之间成反比,分子质量较大的肽易成簇堆叠,会阻止它们与酶的活性位点结合,小分子质量的肽在高温下能更稳定地聚集,这可能是F3组分具有良好稳定性的原因。

图3b是使用胃、肠阶段体外消化模型来评价胃肠道消化对F3组分的XOD抑制活性的影响。体外模拟消化后酶解产物的生物活性是其在人体内生物利用度的良好指标^[31]。本研究中,经胃消化实验,其XOD抑制活性与对照组相比提升了29.8%,进一步胰酶消化后,其活性虽有所降低,但仍高于对照组16%。这可能是因为肽的活性序列不会被消化酶降解,并且一部分活性肽可以抵抗胃肠道肽酶,特别是短链肽和含Pro的肽^[32]。胃蛋白酶主要作用于芳香族氨基酸或酸性氨基酸组成的肽键,这可能在C-端产生甲硫氨酸(M)、苯丙氨酸(F)或亮氨酸(L),以及在N-端产生酪氨酸(Y)、苯丙氨酸(F)或亮氨酸(L)。胰蛋白酶则特异性地切割位于精氨酸(R)或赖氨酸(K)组成的肽键^[33]。多肽经胃、胰蛋白酶进一步酶解,连接构象发生改变,从而暴露出原本被遮蔽的活性基团,这一过程可能会产生分子质量更小、具有更高XOD抑制活性的短肽^[34]。综上所述,F3组分表现出较高的热稳定性和胃肠消化稳定性,有利于作为功能食品基料进行应用。



a.温度对F3 XOD抑制率的影响;b.体外模拟胃肠消化对F3 XOD抑制率的影响。

图3 F3组分活性稳定性研究结果

Fig. 3 Results of research on the activity stability of F3

2.5 分子质量分布

分子质量分布是衡量多肽分子质量集中程度的关键参数,对评价酶解过程和纯化效果具有重要意义。从表3可知,F3分子质量<1 500 Da的组分占88.34%,其中1 500~500 Da(31.88%)和500~180 Da(39.32%)为高占比组分,说明高XOD抑制活性肽段分子质量多集中于1 500~180 Da。而分子质量>1 500 Da的组分占比

较低,可能是因为肽的分子大部分呈线性结构,超滤过程中的滤膜附近自身的可变形范围较大,同时压力的驱动作用导致部分大分子质量的肽进入透过液,因此超滤膜实际有效截留分子质量大于理论截留分子质量^[35]。综上,F3组分分子质量≤1 500 Da。

表3 F3组分的分子质量分布
Table 3 Molecular mass distribution of F3

分子质量/Da	>1 500	1 500~500	500~180	<180
峰面积百分比/%	11.66	31.88	39.32	17.14

2.6 氨基酸组成分析

由表4可知,F3组分中必需氨基酸占总氨基酸的58.26%,和黑豆蛋白相比增加了16.33%,且明显高于世界卫生组织与联合国粮食及农业组织倡议的参考蛋白模式中约40%的必需氨基酸值,其占比越高,黑豆蛋白的营养价值越高^[36]。F3组分中的疏水氨基酸相对含量(56.66%)和碱性氨基酸相对含量(20.16%)也均高于黑豆蛋白,Bu Ying等^[9]发现XOD活性中心的Mo-pt附近有一个疏水口袋,能形成通往活性位点的路径,疏水氨基酸较多的肽段更容易进入其活性中心发挥抑制作用。Hou Mengfan等^[37]研究发现,在卵形鲳鲹肽中,XOD抑制活性的增强与疏水性氨基酸的含量呈正相关,特别是亮氨酸(Leu)的含量最为突出。这一发现与F3氨基酸组成分析结果一致,其中亮氨酸的含量占据了25.17%。Li Yujuan等^[38]研究成果表明,在对鲢鱼水解物进行分离纯化之后,相较于酸性肽,弱碱性肽展现出了更为显著的XOD抑制效能。这可能是F3组分中赖氨酸(7.61%)和精氨酸(10.59%)占比高的原因。实验结果表明,F3组分展现出较强的XOD抑制活性,含量丰富的疏水性氨基酸和碱性氨基酸可能发挥了关键作用。

表4 黑豆蛋白与F3组分氨基酸组成
Table 4 Amino acid composition of black bean protein and F3

氨基酸种类	相对含量/%	
	黑豆蛋白	F3组分
谷氨酸(Glu)	25.11	7.24
丝氨酸(Ser)	7.33	4.13
甘氨酸(Gly)	4.78	1.91
组氨酸(His)	1.06	1.96
精氨酸(Arg)	9.96	10.59
苏氨酸(Thr)	4.26	4.82
丙氨酸(Ala)	4.72	7.74
脯氨酸(Pro)	6.43	1.05
酪氨酸(Tyr)	3.73	5.07
缬氨酸(Val)	4.62	9.89
异亮氨酸(Ile)	4.52	8.08
亮氨酸(Leu)	11.45	25.17
苯丙氨酸(Phe)	4.45	4.73
赖氨酸(Lys)	7.58	7.61
必需氨基酸	41.93	58.26
疏水性氨基酸	36.19	56.66
碱性氨基酸	18.60	20.16

注:必需氨基酸包括Thr、Val、Met、Ile、Leu、Phe、Lys、His;疏水性氨基酸包括Ile、Ala、Pro、Phe、Val、Leu、Trp、Met;碱性氨基酸包括His、Lys、Arg。

2.7 F3组分的肽序列结果

为了深入了解黑豆XOD抑制肽的氨基酸序列和分子质量等信息,探索XOD抑制能力与其之间的相互关系,对F3组分采用LC-MS/MS进行序列测定,经数据库搜索和比对,肽段序列解析,共检测出18种肽序列,如图4所示。表5和图5为肽序列含量排在前8位的肽序列及其相关信息,可以看出F3组分中主要肽段的分子质量范围集中在500~1 400 Da,均<1 500 Da,这与表3相对分子质量检测结果一致,该组分肽段均是含有5~12个氨基酸分子的短肽链,Craik等^[39]研究发现含有5~10个氨基酸残基的肽段,更易被机体吸收,发挥特殊的生物活性,F3组分表现出较高的XOD抑制活性进一步印证了上述发现。通过对现已报道的XOD抑制肽序列分析,发现XOD抑制肽活性的高低不仅与疏水性氨基酸、芳香族氨基酸及其残基含量有关,也受碱性氨基酸的影响^[40]。F3组分所测肽段中疏水性氨基酸、芳香族氨基酸和碱性氨基酸的相对含量分别为18.24%、6.92%和13.21%,鉴于芳香族氨基酸的相对含量较低,可以推断在抑制XOD活性方面,疏水性氨基酸与碱性氨基酸可能发挥了更为显著的作用。表5肽序列中N-端和C-端的疏水性氨基酸占比高达44.86%和33.14%,碱性氨基酸占比高达33.57%和39.29%,且肽序列N-端Lys、Arg、Leu 3种氨基酸含量最高。肽序列C-端Lys、Val、Phe、Arg 4种含量最高,均为疏水氨基酸或碱性氨基酸,其中Lys的占比最高,肽序列含量第一的肽段为Lys-Glu-Gly-Gly-Val-Leu-Pro-Gly-Ile-Lys(图5a),推测黑豆XOD抑制肽起到关键降尿酸作用的可能为碱性氨基酸,具体的作用机制还有待进一步研究。

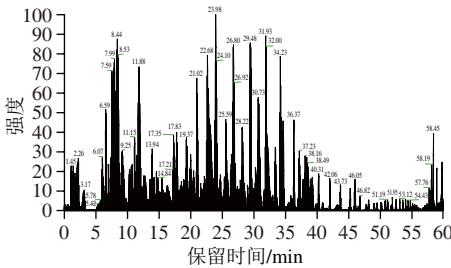


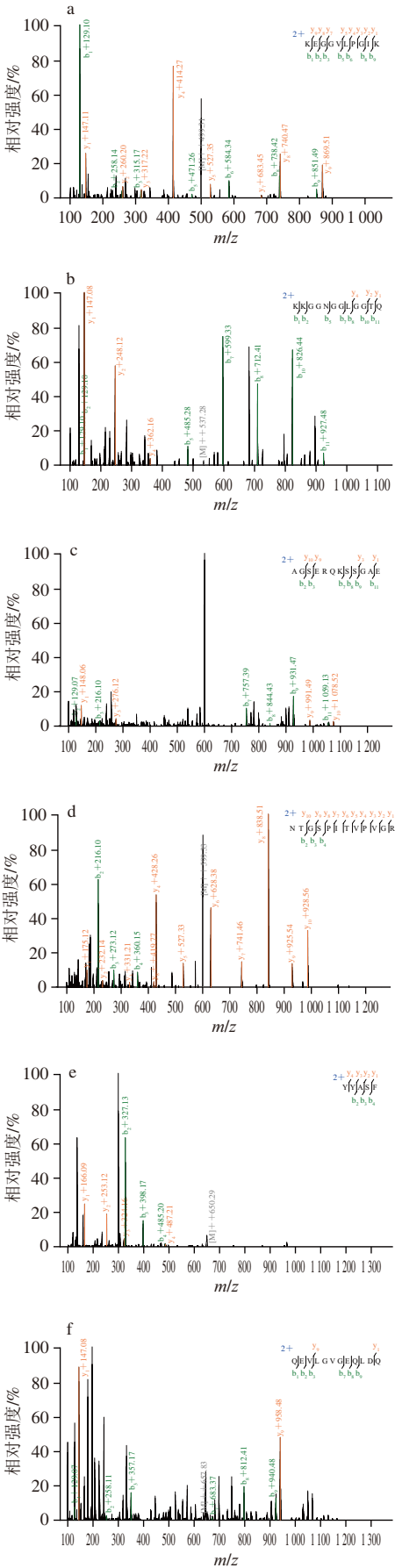
图4 F3组分基峰图

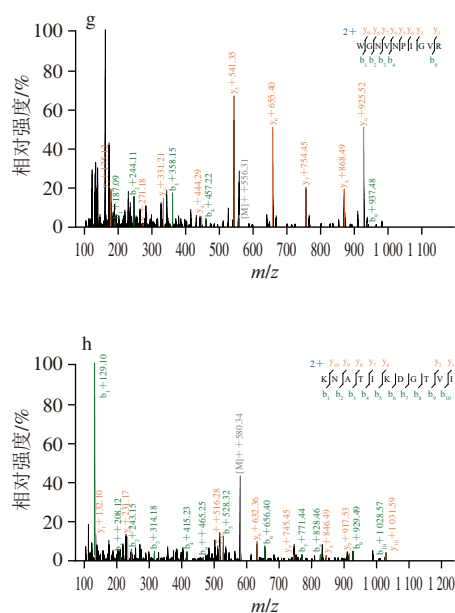
Fig. 4 Base peak chromatogram of F3

表5 F3组分中含量前8的肽序列分析

Table 5 Sequence analysis of eight major peptides in F3

序列	长度	分子质量/Da	强度
KEGGVLPGIK	10	996.596 78	921 560 000
KKGGNGGLGGTQ	12	1 072.562 5	439 210 000
AGSERQKSSGAE	12	1 205.563 6	252 540 000
NTGSPITVPVGR	12	1 196.651 3	149 120 000
YYASF	5	649.274 78	135 480 000
QEVLVGGEQLDQ	12	1 313.646 3	104 640 000
WGNVNPIGVR	10	1 110.593 4	92 135 000
KNATIKDGTVI	11	1 158.660 8	58 473 000





a. KEGGVLPGIK; b. KKGNGGLGGTQ;
c. AGSERQKSSGAE; d. NTGSPITVPVGR; e. YYASF;
f. QEVLGVGEQLDQ; g. WGNVNPIGVR; h. KNATIKDGTVI.

图5 F3组分中含量前8的肽序列二级质谱图

Fig. 5 Secondary mass spectra showing the sequences major peptides in F3

3 结论

本研究以黑豆蛋白为原料,以XOD抑制率和DH指标优化出黑豆XOD抑制肽最优工艺参数:碱性蛋白酶加酶量1.5%、酶解时间4 h、酶解温度50℃、pH 9.0、底物质量分数3%,此条件下获得的XOD抑制率和DH分别为73.61%和21.29%。在此基础上,黑豆酶解物经超滤分离和XOD抑制能力分析得出,小分子肽在XOD抑制活性中起关键作用,XOD抑制活性最高组分F3(IC₅₀: 8.76 mg/mL),其分子质量≤1 500 Da,该组分含有高比例的疏水性氨基酸和碱性氨基酸,LC-MS/MS结果显示,黑豆XOD抑制肽N-、C-端多以疏水性氨基酸和碱性氨基酸为主。活性稳定性结果发现F3组分还具有良好的热稳定性和体外消化稳定性。本研究结果可为黑豆蛋白资源的开发利用提供新思路,为XOD肽类抑制剂的研究提供一定的理论参考。

参考文献:

[1] ZHANG Y L, CHEN S M, YUAN M, et al. Gout and diet: a comprehensive review of mechanisms and management[J]. *Nutrients*, 2022, 14(17): 3525. DOI:10.3390/nu14173525.
[2] CHEN X L, GUAN W L, LI Y J, et al. Xanthine oxidase inhibitory peptides from *Larimichthys polyactis*: characterization and *in vitro* silico evidence[J]. *Foods*, 2023, 12(5): 982. DOI:10.3390/foods12050982.

[3] QI X F, CHEN H R, GUAN K F, et al. Novel xanthine oxidase inhibitory peptides derived from whey protein: identification, *in vitro* inhibition mechanism and *in vivo* activity validation[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2022, 128: 106097. DOI:10.1016/j.bioorg.2022.106097.
[4] ZHONG H, ABDULLAH, ZHANG Y P, et al. Exploring the potential of novel xanthine oxidase inhibitory peptide (ACECD) derived from Skipjack tuna hydrolysates using affinity-ultrafiltration coupled with HPLC-MALDI-TOF/TOF-MS[J]. *Food Chemistry*, 2021, 347: 129068. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129068.
[5] MEHMOOD A, ZHAO L, WANG C T, et al. Management of hyperuricemia through dietary polyphenols as a natural medicament: a comprehensive review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(9): 1433-1455. DOI:10.1080/10408398.2017.1412939.
[6] LI Y B, LAI P F, CHEN J C, et al. Extraction optimization of polyphenols, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities from *Prunus salicina* Lindl[J]. *Food Science and Technology*, 2016, 36(3): 520-525. DOI:10.1590/1678-457x.0022.
[7] 于紫薇, 肖扬, 双全, 等. 清飘茶中黄酮提取工艺优化及功能特性的检测[J]. *食品科技*, 2019, 44(10): 235-240. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2019.10.040.
[8] WANG X Z, YUAN L Y, BAO Z J, et al. Screening of uric acid-lowering active components of corn silk polysaccharide and its targeted improvement on renal excretory dysfunction in hyperuricemia mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 86: 104698. DOI:10.1016/j.jff.2021.104698.
[9] BU Y, WANG F, ZHU W H, et al. Combining bioinformatic prediction and assay experiment to identify novel xanthine oxidase inhibitory peptides from Pacific bluefin tuna (*Thunnus Orientalis*)[C]. *E3S Web of Conferences*, 2020, 185: 04062. DOI:10.1051/e3sconf/202018504062.
[10] XU Y R, GONG H, ZOU Y, et al. Antihyperuricemic activity and inhibition mechanism of xanthine oxidase inhibitory peptides derived from whey protein by virtual screening[J]. *Journal of Dairy Science*, 2024, 107(4): 1877-1886. DOI:10.3168/jds.2023-24028.
[11] MUROTA I, TAGUCHI S, SATO N, et al. Identification of antihyperuricemic peptides in the proteolytic digest of shark cartilage water extract using *in vivo* activity-guided fractionation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(11): 2392-2397. DOI:10.1021/jf405504u.
[12] 叶灏峰, 管晓盛, 马凤, 等. 英红九号茶蛋白降尿酸肽的酶解制备及不同分子量组分的活性对比[J]. *现代食品科技*, 2023, 39(3): 147-155. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0401.
[13] 周凯琳, 陶莎, 薛文通. 黑豆蛋白及其抗氧化肽研究进展[J]. *食品工业*, 2015, 36(5): 204-207.
[14] MOJICA L, DE MEJÍA E G. Optimization of enzymatic production of anti-diabetic peptides from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins, their characterization and biological potential[J]. *Food & Function*, 2016, 7(2): 713-727. DOI:10.1039/c5fo01204j.
[15] XIONG S L, YAO X L, LI A L. Antioxidant properties of peptide from cowpea seed[J]. *International Journal of Food Properties*, 2013, 16(6): 1245-1256. DOI:10.1080/10942912.2011.582976.
[16] DONG Y F, SUN N, GE Q, et al. Antioxidant soy peptide can inhibit xanthine oxidase activity and improve LO2 cell damage[J]. *Food Bioscience*, 2023, 52: 102455. DOI:10.1016/j.fbio.2023.102455.
[17] 马雪琪. 芸豆源抑制黄嘌呤氧化酶活性物质提取及膳食补充剂开发制备[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022. DOI:10.27158/d.cnki.ghznu.2022.001720.
[18] MAO Z J, JIANG H, SUN J N, et al. Virtual screening and structure optimization of xanthine oxidase inhibitory peptides from

- whole protein sequences of Pacific white shrimp via molecular docking[J]. Food Chemistry, 2023, 429: 136837. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.136837.
- [19] WU Y Q, HE H, HOU T. Purification, identification, and computational analysis of xanthine oxidase inhibitory peptides from kidney bean[J]. Journal of Food Science, 2021, 86(3): 1081-1088. DOI:10.1111/1750-3841.15603.
- [20] 刘秀玉, 王利丽, 左瑞庭, 等. 药用黑豆的研究进展[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(20): 82-85. DOI:10.11954/ytctty.201720027.
- [21] 邹琳, 杭妙佳, 李阳, 等. 鳕鱼黄嘌呤氧化酶抑制肽酶法制备工艺优化[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2019, 45(5): 550-562. DOI:10.3785/j.issn.1008-9209.2019.01.101.
- [22] 李雪, 左锋, 王长远. 复合酶法制备紫花芸豆抗氧化肽[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(3): 349-356. DOI:10.13200/j.cnki.cjb.002796.
- [23] 韩雪兰, 于景华, 姜中航, 等. 酶水解条件对乳清蛋白水解度和 β -Ig致敏性的影响[J]. 中国乳品工业, 2017, 45(12): 19-23. DOI:10.3969/j.issn.1001-2230.2017.12.004.
- [24] 陈冰冰, 欧颖仪, 叶灏铎, 等. 富硒辣木叶蛋白ACE抑制肽的酶解工艺优化及活性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 1-9. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2021060268.
- [25] HE W W, SU G W, SUN-WATERHOUSE D, et al. *In vivo* anti-hyperuricemic and xanthine oxidase inhibitory properties of tuna protein hydrolysates and its isolated fractions[J]. Food Chemistry, 2019, 272: 453-461. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.08.057.
- [26] 张笑莹, 钟婉滢, 马凤, 等. 苦荞蛋白降血脂肽的酶解制备、氨基酸组成及活性研究[J]. 食品工业科技, 2024: 45(21): 129-139. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2023110029.
- [27] 詹苏泓. 远东拟沙丁鱼XOD抑制肽的制备及其降尿酸功效研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2022. DOI:10.27788/d.cnki.ggdhy.2022.000298.
- [28] LI Q Y, KANG X Y, SHI C C, et al. Moderation of hyperuricemia in rats via consuming walnut protein hydrolysate diet and identification of new antihyperuricemic peptides[J]. Food & Function, 2018, 9(1): 107-116. DOI:10.1039/c7fo01174a.
- [29] ZHU C Z, ZHANG W G, KANG Z L, et al. Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua ham[J]. Meat Science, 2014, 96(2): 783-789. DOI:10.1016/j.meatsci.2013.09.004.
- [30] BUI P T, PHAM K T, VO T D L. Earthworm (*Perionyx excavatus*) protein hydrolysate: hypoglycemic activity and its stability for the hydrolysate and its peptide fractions[J]. Processes, 2023, 11(8): 2490. DOI:10.3390/pr11082490.
- [31] HARNEDY P A, PARTHSARATHY V, MCLAUGHLIN C M, et al. Blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle protein hydrolysate with *in vitro* and *in vivo* antidiabetic properties[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 40: 137-145. DOI:10.1016/j.jff.2017.10.045.
- [32] ZHANG X D, DAI Z Y, ZHANG Y Q, et al. Structural characteristics and stability of salmon skin protein hydrolysates obtained with different proteases[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 153: 112460. DOI:10.1016/j.lwt.2021.112460.
- [33] WEN S Y, ZHOU G H, SONG S X, et al. Discrimination of *in vitro* and *in vivo* digestion products of meat proteins from pork, beef, chicken, and fish[J]. Proteomics, 2015, 15(21): 3688-3698. DOI:10.1002/pmic.201500179.
- [34] 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.
- [35] 温青玉, 张雨, 李天齐, 等. 面筋蛋白咸味肽的分离纯化及结构鉴定[J]. 食品科学, 2023, 44(4): 194-199. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220624-278.
- [36] 吴杰, 于立梅, 冯卫华. 两种豆类植物蛋白的特征氨基酸组成和消化特性[J]. 广州化工, 2013, 41(15): 59-61; 98. DOI:10.3969/j.issn.1001-9677.2013.15.023.
- [37] HOU M F, XIANG H, HU X, et al. Novel potential XOD inhibitory peptides derived from *Trachinotus ovatus*: isolation, identification and structure-function analysis[J]. Food Bioscience, 2022, 47: 101639. DOI:10.1016/j.fbio.2022.101639.
- [38] LI Y J, KANG X Y, LI Q Y, et al. Anti-hyperuricemic peptides derived from bonito hydrolysates based on *in vivo* hyperuricemic model and *in vitro* xanthine oxidase inhibitory activity[J]. Peptides, 2018, 107: 45-53. DOI:10.1016/j.peptides.2018.08.001.
- [39] CRAIK D J, FAIRLIE D P, LIRAS S, et al. The future of peptide-based drugs[J]. Chemical Biology & Drug Design, 2013, 81(1): 136-147. DOI:10.1111/cbdd.12055.
- [40] PEI X D, LI F, ZHANG Y M, et al. Preparation, purification, and identification of novel feather keratin-derived peptides with antioxidative and xanthine oxidase inhibitory activities[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(21): 8061-8070. DOI:10.1021/acs.jafc.3c01131.