

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

叶灏铎^{1,2}, 管晓盛³, 马凤², 毛远辉², 孙世利¹, 曹庸², 苗建银^{2*}

(1. 广东省茶树资源创新利用重点实验室, 广东省农业科学院茶叶研究所, 广东广州 510640)

(2. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642)

(3. 梅州市梅县区市场监督管理局安全保障中心, 广东梅州 514000)

摘要: 以英红九号红茶渣为原料, 通过碱提酸沉提取茶叶蛋白, 以黄嘌呤氧化酶抑制率为指标, 采用单因素和响应面实验优化酶解制备降尿酸肽, 对其氨基酸组成进行分析, 并对最优酶解物进行超滤分离和活性评价。结果表明, 在底物浓度 2% (m/V)、加酶量 0.3% (m/V)、温度 39 °C、pH 值 7.5 和酶解时间 3.4 h 条件下, 得到的降尿酸肽的黄嘌呤氧化酶抑制率为 85.42%。氨基酸分析表明, 降尿酸肽中必需氨基酸含量丰富 (38.49%), 高比例的疏水性氨基酸 (48.00%) 和碱性氨基酸 (13.67%) 对黄嘌呤氧化酶抑制活性有重要作用。酶解物经过超滤分离后, 与原酶解物的活性 (IC₅₀ 0.72 mg/mL) 比较, <3 ku 组分的黄嘌呤氧化酶抑制活性显著提升 (IC₅₀ 0.41 mg/mL)。该研究可为茶叶蛋白的高值化利用提供参考, 为茶叶源新型降尿酸健康食品的开发提供了理论依据。

关键词: 英红九号茶蛋白; 酶解; 降尿酸肽; 黄嘌呤氧化酶抑制活性; 响应面优化; 超滤; 氨基酸组成

文章编号: 1673-9078(2023)03-147-155

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0401

Enzymatic Preparation of Uric Acid-lowering Peptides from Yinghong NO.9 Tea Protein and Activity Comparison of the Components with Different Molecular Weights

YE Haoduo^{1,2}, GUAN Xiaosheng³, MA Feng², MAO Yuanhui², SUN Shili¹, CAO Yong², MIAO Jianyin^{2*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Tea Plant Resources Innovation and Utilization, Tea Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China) (2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangzhou 510642, China) (3. Meizhou Meixian Administration for Market Regulation, Meizhou 514000, China)

Abstract: Taking Yinghong NO.9 black tea dregs as the raw material, the tea protein was extracted by alkali extraction and acid precipitation. Taking the inhibition rate of xanthine oxidase as the index, uric acid-lowering peptides were prepared *via* enzymolysis after optimization through single factor experiments and response surface test. The amino acid composition was analyzed, and the optimal enzymatic hydrolysate were subjected to separation *via* ultrafiltration and activity evaluation. The results showed that under the conditions of 2% substrate concentration, 0.3% enzyme amount, temperature 39 °C, pH 7.5 and enzymolysis time 3.4 h, the obtained uric acid-lowering peptides exhibited a xanthine oxidase inhibitory rate of 85.42%. Amino acid analysis showed that the uric acid-lowering peptides were rich in essential amino acids

引文格式:

叶灏铎, 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.

YE Haoduo, GUAN Xiaosheng, MA Feng, et al. Enzymatic preparation of uric acid-lowering peptides from Yinghong NO.9 tea protein and activity comparison of the components with different molecular weights [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 147-155.

收稿日期: 2022-04-07

基金项目: 广东省茶树资源创新利用重点实验室开放课题 (2020KF01)

作者简介: 叶灏铎 (1998-), 男, 在读研究生, 研究方向: 食品新原料与功能性食品, Email: yehaoduo@163.com; 共同第一作者: 管晓盛 (1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品生产安全监督管理, Email: guanxiaosheng@gmail.com

通讯作者: 苗建银 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学, Email: miaojy8181@scau.edu.cn

(38.49%), and had high proportions of hydrophobic amino acids (48.00%) and basic amino acids (13.67%), which were important for its xanthine oxidase inhibitory activity. After the separation of the enzymatic hydrolysate *via* ultrafiltration, the xanthine oxidase inhibitory activity (IC_{50} : 0.41 mg/mL) of the fraction with a molecular weight <3 ku increased significantly compared to the activity of the initial enzymatic hydrolysate (IC_{50} : 0.72 mg/mL). This study provides a reference for the high-value utilization of tea protein, and a theoretical basis for the development of a novel tea-derived uric acid-lowering health food.

Key words: Yinghong No. 9 tea protein; enzymatic hydrolysis; uric acid-lowering peptide; xanthine oxidase inhibitory activity; response surface optimization; ultrafiltration; amino acid composition

高尿酸血症已经成为第四种高风险的慢性疾病,其风险程度仅次于高血脂症、高血压症和高血糖症^[1]。高尿酸血症是一种代谢性疾病,其诱发原因主要是嘌呤摄入过量、人体内尿酸增多或排泄减少,主要体现为血清尿酸浓度超过正常限值(男性为 ≥ 420 mol/L,女性为 ≥ 360 mol/L)^[2]。尿酸浓度过高对机体具有多种不良影响,其中最直接的危害是造成晶体堆积导致痛风及肾结石^[3]。目前,国内外对于高尿酸的防治主要集中于黄嘌呤氧化酶抑制剂的开发研究^[4],黄嘌呤氧化酶参与人体内嘌呤代谢的关键步骤,其主要作用是催化次黄嘌呤氧化为黄嘌呤,黄嘌呤再接着被氧化为尿酸、嘧啶和嘌呤等代谢物质^[5]。基于此原理,目前已开发出基于黄嘌呤氧化酶活性调节的降尿酸药物,如别嘌呤醇和非布司他等,均可用于高尿酸血症的临床治疗。但此类药物长期服用将带有一定的副作用,比如引起胃肠道不适、过敏和肾毒性等^[6]。近年来,从天然产物中开发出安全有效的,具有黄嘌呤氧化酶抑制活性的生物活性肽已经成为研究的热点^[7],如圆鳞鱼蛋白降尿酸肽^[1]、金枪鱼蛋白降尿酸肽^[8]和菜豆降尿酸肽^[7]等。

中国是世界上最大的茶叶生产国,茶叶深加工技术的进步和茶叶深加工产品的增加,大量废弃茶渣也随之产生。据不完全统计,我国茶叶深加工行业湿茶渣年产量在 $2 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8$ kg,废弃茶渣大多被用于生产饲料、土壤肥料等低附加值产品,而茶渣中存留的优质植物蛋白并未得到充分利用^[9-11]。茶渣中粗蛋白含量为18%~20%,其蛋白中有丰富的氨基酸和活性肽,营养、健康价值极高,具有巨大的开发利用潜力和市场应用前景^[12,13]。英红九号是广东省特有的优良茶树品种,目前已大面积推广种植。英红九号茶树品种优质高产,但目前对英红九号茶叶成分的研究主要集中在多酚和黄酮类等^[14],而对茶叶或茶渣中存留的优质蛋白研究较少。若能将其中的蛋白进行深度开发探究,将为茶叶资源的高值化利用提供新思路,并将创造出巨大的市场价值。

本研究以英红九号红茶渣为原料,通过碱提酸沉获得茶叶蛋白,以黄嘌呤氧化酶抑制率为指标,酶解

法制备茶蛋白降尿酸肽,对其进行黄嘌呤氧化酶抑制活性检测和氨基酸组成分析,并对超滤组分进行黄嘌呤氧化酶抑制活性分析。本研究为茶叶蛋白资源的高值化利用提供理论基础,为功能性健康食品开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

英红九号红茶,广东省农业科学院茶叶研究所提供;胰蛋白酶(2.5×10^5 U/g)、木瓜蛋白酶(2×10^5 U/g)、中性蛋白酶(1×10^5 U/g)、胃蛋白酶(3×10^6 U/mg),南宁庞博生物工程有限公司;黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶(50 U/mg)、别嘌呤醇,上海麦克林生化有限公司;其他化学品和试剂均为分析纯。

AL104 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;PHS-3D 台式 pH 计,上海三信仪表厂;HH-4 数显恒温水浴锅,金坛市华城海龙实验仪器厂;L530 台式低速自动平衡离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;Alpha 2-4 LDplus 冷冻干燥机,Christ 公司;2300 多功能酶标仪,PerkinElmer 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 英红九号茶蛋白的提取

英红九号红茶叶经过水煮后,过滤取茶渣烘干,粉碎后过 20 目筛备用。基于碱提酸沉的原理和参考叶灏铎等^[15]的方法进行茶叶蛋白的提取,并略作修改。称取一定量粉碎的茶叶,以固液比 1:40 (g:mL) 的比例加入 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液,45 °C 下浸提 4 h 后,过滤并于 4 000 r/min 下离心 20 min,收集上清液并用 1 mol/L 盐酸调节 pH 值至等电点 3.5,静置 20 min 后,离心。弃上清,收集蛋白沉淀,用 pH 值 3.5 的盐酸溶液清洗蛋白沉淀三遍,冷冻干燥后即得英红九号红茶蛋白粗提物。

1.2.2 英红九号茶蛋白肽的制备

参考叶灏铎等^[15]的方法略带修改制备茶渣蛋白肽,将一定量的英红九号茶蛋白粗提物加入适量蒸馏

水配成溶液, 调节 pH 值后加入一定量的酶, 于适当温度恒温水浴酶解 3 h, 沸水中灭酶 10 min, 冷却至室温, 4 000 r/min 下离心 20 min, 上清液收集即为含英红九号茶蛋白肽的酶解液。

1.2.3 单因素实验

1.2.3.1 蛋白酶的筛选

选取实验室酶解常用的 4 种蛋白酶, 在酶最适合条件下对英红九号茶蛋白进行酶解, 各种蛋白酶的最适条件如表 1 所示。在底物浓度为 3%, 加酶量为 0.3% 条件下, 酶解 3 h, 灭酶活后离心, 取上清酶解液测定黄嘌呤氧化酶抑制率, 选择最优的蛋白酶。

表 1 各种蛋白酶的最适酶解条件

Table 1 Optimum enzymatic hydrolysis conditions for various proteases

蛋白酶	最适条件	
	温度/℃	pH 值
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	45	7.0

1.2.3.2 酶解时间对活性的影响

在底物浓度为 3%, 酶添加量为 0.3%, 酶最适 pH 值的条件下, 设置不同酶解时间 (1、2、3、4、5 h), 酶解完成后离心取上清酶解液, 分别测定黄嘌呤氧化酶抑制率, 确定酶解时间。

1.2.3.3 酶解温度对活性的影响

在底物浓度为 3%, 酶添加量为 0.3%, 酶最适 pH 值的条件下, 设置不同酶解温度 (35、40、45、50、55 ℃), 酶解 3 h 后离心取上清酶解液, 分别测定黄嘌呤氧化酶抑制率, 确定酶解温度。

1.2.3.4 加酶量对酶解活性的影响

在底物浓度 3%、温度 45 ℃、酶最适 pH 值等条件下, 添加不同浓度的蛋白酶 (0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%), 酶解 3 h 后离心取上清酶解液, 分别测定黄嘌呤氧化酶抑制率, 确定加酶量。

1.2.3.5 酶解 pH 值对活性的影响

在底物浓度 3%、酶添加量 0.3%、温度 45 ℃等条件下, 设置不同 pH 值 (6.0、6.5、7.0、7.5、8.0), 酶解 3 h 后离心取上清酶解液, 分别测定黄嘌呤氧化酶抑制率, 确定酶解 pH 值。

1.2.3.6 底物浓度对酶解活性的影响

在酶添加量 0.3%、温度 45 ℃、酶最适 pH 值等条件下, 设置不同底物浓度 (1%、2%、3%、4%、5%), 酶解 3 h 后离心取上清酶解液, 分别测定黄嘌呤氧化酶抑制率, 确定底物浓度。

1.2.4 响应面优化实验

以单因素实验为基础, 选择对酶解产物黄嘌呤氧化酶抑制活性影响较显著的三个因素进行响应面优化, 设置时间、温度和加酶量为自变量, 基于此以单因素指标活性最高点为中心左右取值, 设置三水平, 以黄嘌呤氧化酶抑制率为响应值, 设计三因素三水平的响应面试验, 设计如表 2 所示。

表 2 响应面因素与水平设计

Table 2 Factors and levels of responsesurface experiment

因素	水平		
	-1	0	1
A 时间/h	2	3	4
B 温度/℃	35	40	45
C 加酶量/%	0.2	0.3	0.4

1.2.5 黄嘌呤氧化酶抑制率的测定

参考邹琳等^[4]的方法检测黄嘌呤氧化酶抑制率, 并略有修改。将 50 μL 待测样品及 50 μL 浓度为 0.02 U/mL 的黄嘌呤氧化酶溶液加入 96 孔板中, 室温条件下混合均匀, 再加入 50 μL 0.48 mmol/L 的黄嘌呤溶液, 振荡混匀 30 min 后, 在 290 nm 处测定吸光值。使用下式计算黄嘌呤氧化酶抑制率:

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

式中:

D——黄嘌呤氧化酶抑制率, %;

A₁——添加样品溶液的吸光值;

A₂——不加酶样品溶液的吸光值;

A₃——用缓冲液代替样品溶液的吸光值;

A₄——用缓冲液代替酶和样品溶液的吸光值。

1.2.6 氨基酸组成测定

参考陈冰冰等^[16]的方法测定最优酶解物中的氨基酸组成。

1.2.7 英红九号茶蛋白肽超滤分离

最优工艺条件得到的酶解液, 通过截留量为 3 ku 的超滤膜进行超滤分离, 得到 >3 ku 组分和 <3 ku 组分。冷冻干燥后, 补充溶剂, 将冻干的酶解物和各超滤组分配制成不同浓度溶液, 分别测定其黄嘌呤氧化酶抑制率, 以别嘌呤醇作为阳性对照, 通过 SPSS 软件计算 IC₅₀ 值。

1.3 数据处理

本研究中的实验都进行了至少三次重复, 使用 Design Expert 8.0.6.1 软件、SPSS 21.0 软件和 Microsoft Office 2019 软件进行实验设计和数据分析, 最终数据结果以平均值±标准差 (SD) 表示。

2 结果与讨论

2.1 英红九号茶蛋白的提取

基于碱提酸沉原理,从英红九号茶渣中提取出了粗蛋白,其得率为20.04%。茶叶前期经过水煮处理去除了部分多酚和可溶性多糖,所得茶渣用碱液浸提后,用盐酸调节溶液pH值至茶蛋白等电点3.5形成沉淀,经离心处理得到茶蛋白粗提物,在这一过程大部分在上清液中的多酚和多糖类物质基本被去除,可认为所得粗蛋白中已不含游离多酚或多糖。然而,近年研究发现,部分茶蛋白中存在配糖体,而此类糖蛋白可能具有较好的功能活性^[17,18],本研所得粗蛋白中糖蛋白的含量、结构特点和活性作用,有待深入研究。

2.2 单因素实验

2.2.1 蛋白酶的筛选

不同种类的蛋白酶由于特异性,其发挥作用的位点不同,酶解得到的多肽片段也不相同,因此酶解应充分考虑酶的选择和酶解条件^[16]。本研究采用了实验室较为常用的四种蛋白酶,用于英红九号茶蛋白水解物的制备,得到四种蛋白酶酶解物并检测其黄嘌呤氧化酶抑制活性,结果如图1所示。相较于其他三种蛋白酶酶解物,中性蛋白酶酶解物的黄嘌呤氧化酶抑制活性最高,抑制率为81.93%。说明英红九号茶蛋白采用中性蛋白酶酶解,能释放出更多高活性肽段。李桂芬等人制备抗痛风肽也用到了中性蛋白酶^[19],可见中性蛋白酶适合用于酶解出具有潜在的降尿酸作用的肽段。因此,后续实验将采用中性蛋白酶进行蛋白酶解物的制备。

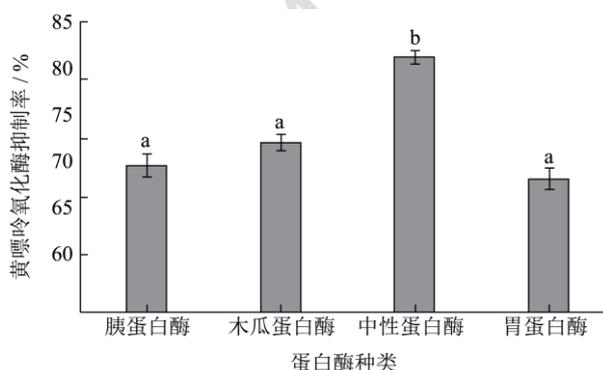


图1 蛋白酶种类对酶解物黄嘌呤氧化酶抑制率的影响

Fig.1 Effect of protease types on inhibition rate of xanthine oxidase

注:图中小写字母显著性差异 $P < 0.05$ 。下图同。

2.2.2 酶解时间对酶解物活性的影响

如图2所示,英红九号茶蛋白水解物对黄嘌呤氧

化酶的抑制率随着酶解时间的延长呈现出先上升后下降趋势,酶解3 h得到的酶解液活性最强,黄嘌呤氧化酶抑制率为82.79%。推测原因,1 h~3 h,随着酶解时间的增加,酶与底物的反应充分,产生大量活性肽;但酶解时间过长,会造成底物被水解过度,产生的活性肽被进一步降解成低活性的氨基酸,导致酶解液活性下降,且酶解时间过长也会增加能耗^[20]。因此确定最佳酶解时间为3 h。

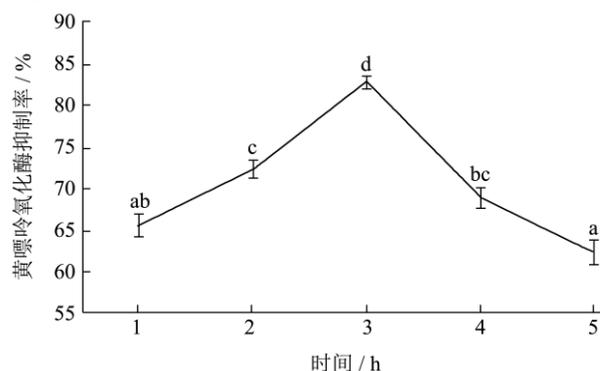


图2 酶解时间对酶解物黄嘌呤氧化酶抑制率的影响

Fig.2 Effect of enzymatic hydrolysis time on inhibition rate of xanthine oxidase

2.2.3 酶解温度对酶解物活性的影响

如图3所示,温度40℃时,酶解物抑制黄嘌呤氧化酶的活性达到最大值82.88%,而后随着温度升高,活性逐渐下降。这可能与酶的活力有关,中性蛋白酶在30~55℃范围内酶活力最好。温度升高可以加快分子热运动,促进酶与底物充分反应,产出高活性的酶解物,温度过高则会降低酶活力,不利于酶解反应的正向进行^[21]。因此,确定最佳酶解温度为40℃。

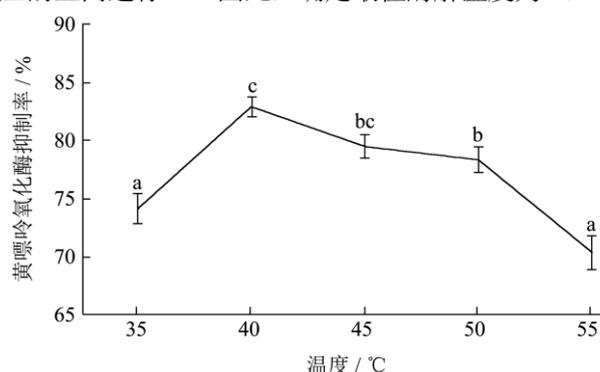


图3 酶解温度对酶解物黄嘌呤氧化酶抑制率的影响

Fig.3 Effect of enzymatic hydrolysis temperature on inhibition rate of xanthine oxidase

2.2.4 加酶量对酶解物活性的影响

如图4所示,酶解物黄嘌呤氧化酶抑制活性随着加酶量的增大而逐渐增强,而后随之下降。在加酶量0.3% (mV)时,酶解物活性最好,黄嘌呤氧化酶抑制率达到81.15%。酶的添加量较少时,酶与底物不能

充分反应, 结合能力较差, 而过量的酶比例又会使酶与蛋白质的结合达到过饱和状态, 蛋白过度水解, 过量的酶将具有活性的肽分解, 导致功能活性发生变化, 生成活性较差的酶解物, 且过量的酶也会造成资源浪费^[22,23]。因此, 确定适宜的加酶量为 0.3%。

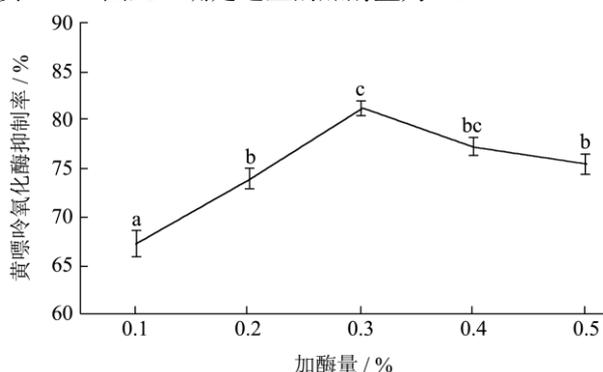


图 4 加酶量对酶解物黄嘌呤氧化酶抑制率的影响

Fig.4 Effect of enzyme dosage on inhibition rate of xanthine oxidase

2.2.5 pH 值对酶解物活性的影响

如图 5 所示, 酶解物的黄嘌呤氧化酶抑制活性, 在 pH 值 6.0~8.0 之间, 呈现先增大后减小趋势, 在 pH 值 7.5 时酶解产物活性最高, 黄嘌呤氧化酶抑制率达到 81.97%。pH 值也是影响蛋白酶活力的重要因素之一, 过酸过碱都会影响酶活力^[24], 适当增加 pH 值, 可以促进增加可溶性蛋白的含量, 有助于酶促反应的进行; 但 pH 值过大, 会破坏酶活性, 从而降低酶解效果^[25]。因此, 确定最佳 pH 值为 7.5。

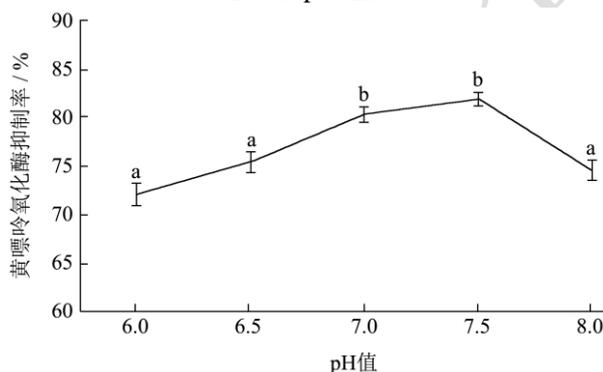


图 5 pH 值对酶解物黄嘌呤氧化酶抑制率的影响

Fig.5 Effect of pH on inhibition rate of xanthine oxidase

2.2.6 底物浓度对酶解物活性的影响

由图 6 所示, 随着底物浓度的增加, 酶解物抑制黄嘌呤氧化酶的活性, 逐步增大并趋于平缓后逐渐降低, 在底物浓度为 2% (m/V) 时, 酶解物的活性达到最高值, 其黄嘌呤氧化酶抑制率为 82.98%, 持续增大底物浓度, 酶解物的活性趋于平缓后下降, 这可能是由于酶与反应底物的结合程度和底物浓度相关。较低的底物浓度, 会使底物与酶结合的位点变少, 影响反

应速率, 过高的底物浓度又会超出酶与底物的结合范围, 同样影响酶解效果, 导致酶解物活性下降^[26,27]。因此, 确定适宜的底物浓度为 2% (m/V)。

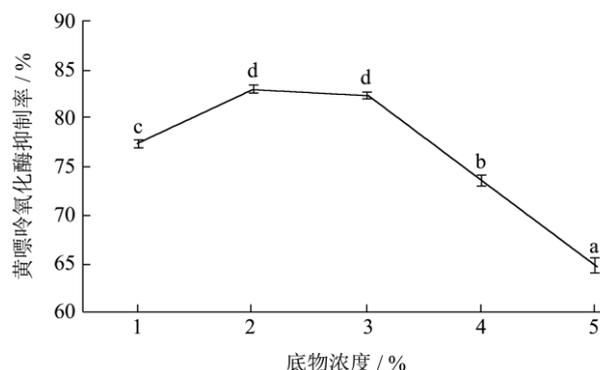


图 6 底物浓度对酶解物黄嘌呤氧化酶抑制率的影响

Fig.6 Effect of substrate concentration on inhibition rate of xanthine oxidase

2.3 响应面优化实验

基于单因素实验, 以时间 (A)、温度 (B) 和加酶量 (C) 三个因素为自变量, 以黄嘌呤氧化酶抑制率为活性指标, 设计并进行三因素三水平试验。响应面实验结果如表 3 所示。

表 3 响应面设计方案及结果

Table 3 The design and results of the response surface experimental

序号	因素			黄嘌呤氧化酶抑制率/%
	A 时间/h	B 温度/°C	C 加酶量/%	
1	1	0	1	81.79
2	0	1	-1	76.47
3	1	1	0	77.37
4	0	-1	1	78.15
5	-1	1	0	73.95
6	0	0	0	82.73
7	0	0	0	83.19
8	0	0	0	81.51
9	-1	0	1	77.31
10	-1	-1	0	76.47
11	1	-1	0	80.67
12	0	1	1	75.07
13	0	-1	-1	78.99
14	1	0	-1	78.15
15	0	0	0	82.77
16	0	0	0	83.18
17	-1	0	-1	75.63

表 4 回归模型显著性检验

Table 4 Analysis of variance for response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值 (Prob>F)	显著性
模型	142.99	9	15.89	12.24	0.001 6	**
A-时间	26.72	1	26.72	20.58	0.002 7	**
B-温度	16.30	1	16.30	12.56	0.009 4	**
C-加酶量	1.19	1	1.19	0.91	0.371 1	
AB	0.15	1	0.15	0.12	0.742 2	
AC	0.96	1	0.96	0.74	0.418 2	
BC	0.078	1	0.078	0.060	0.812 9	
A ²	21.42	1	21.42	16.50	0.004 8	**
B ²	46.01	1	46.01	35.44	0.000 6	**
C ²	20.39	1	20.39	15.70	0.005 4	**
残差	9.09	7	1.30			
失拟项	7.20	3	2.40	5.08	0.075 2	不显著
纯误差	1.89	4	0.47			
总和	152.08	16				

注: $P < 0.05$, 显著, 显著性标为*; $P < 0.01$, 极显著, 显著性标为**; $P > 0.05$, 不显著。

应用 Design Expert 8.0.6.1 软件对响应面数据进行回归拟合分析, 得到影响因素时间 (A)、温度 (B) 和加酶量 (C), 与响应值黄嘌呤氧化酶抑制率 (Y) 之间的二次多项回归方程:

$$Y = 82.68 + 1.83 \times A - 1.43 \times B + 0.39 \times C - 0.20 \times A \times B + 0.49 \times A \times C - 0.14 \times B \times C - 2.26 \times A^2 - 3.31 \times B^2 - 2.20 \times C^2$$

对实验模型及方程进行显著性检验分析, 由表 4 可知, 该模型的 F 值为 12.24, $P = 0.001 6 < 0.01$, 表明建立的模型是极显著的, 失拟项 F 值为 5.08, $P = 0.075 2 > 0.05$, 模型失拟不显著, 说明由实验误差主要是随机误差, 其它偶然因素对试验结果的影响较小^[28]。模型的决定系数 $R^2 = 0.940 2$, 调整系数 $R^2_{adj} = 0.860 2$, 信噪比 Adeq Precision = 9.865 > 4, 说明该模型的拟合度和可信度较好^[29], 变异系数 CV 值表示实验的准确度, CV 值越小, 实验越可靠, 本实验的 CV 值为 1.44%, 说明实验结果可靠性高^[30]。综上, 本次实验结果可靠, 建立的回归模型拟合度高, 可用于观测英红九号茶蛋白肽生物活性随实验条件变化的规律, 分析和预测制备降尿酸的最优工艺条件。

单因素变量的显著性可通过 F 值和 P 值反映, 由表 4 可以看出, 时间和温度变量都具有极显著性 ($P < 0.01$), 通过比较 F 值可以反映出各个因素对酶解物黄嘌呤氧化酶抑制活性的影响程度, F 值越大, 则影响程度越大^[31], 因此可以推断出三个因素变量对活性的影响程度大小为: 时间 > 温度 > 加酶量。

响应面图的曲面陡峭程度, 与各因素间的交互作用程度成正比。由图 7 可以看出, 三个因素之间形成

的图形, 开口向下呈凸形, 均存在均值, 且等高线图也趋于椭圆形, 说明其两两因素之间均存在较明显的相互作用^[30,32]。通过图形的比较同样得出三个因素对酶解物活性的影响程度与方差分析中的结果一致, 进一步说明了实验模型的可靠性。

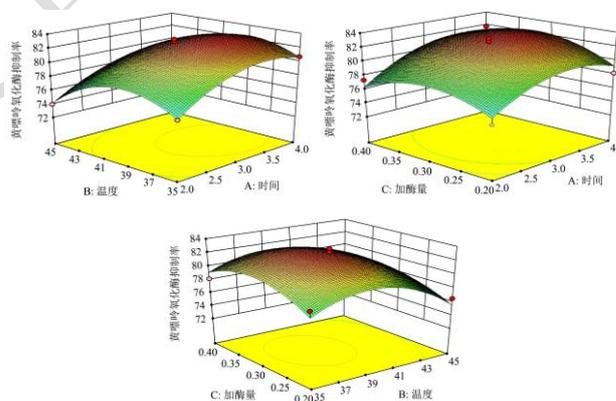


图 7 时间、温度、加酶量交互作用对黄嘌呤氧化酶抑制率的影响

Fig.7 Effects of interaction of time, temperature and enzyme dosage on inhibition rate of xanthine oxidase

通过模型优化和软件预测, 得出中性蛋白酶酶解英红九号茶蛋白制备降尿酸肽的最优条件: 时间 3.4 h、温度 39.08 °C、加酶量 0.31% (mV)。此条件下预测得到的黄嘌呤氧化酶抑制率为 83.25%。对此预测条件进行实验验证, 为了便于操作, 将实验条件修正为: 底物浓度 2% (mV)、加酶量 0.3% (mV)、温度 39 °C、pH 值 7.5、酶解时间 3.4 h, 得到的酶解产物黄嘌呤氧化酶抑制率为 85.42%, 与预测值的相对误差为 2.61%, 说明此响应面优化模型准确性和可信度较高。

2.4 英红九号茶蛋白酶解物的黄嘌呤氧化酶抑制活性分析

如图 8 所示, 英红九号茶蛋白酶解物与黄嘌呤氧化酶抑制活性存在明显的量效关系, 抑制率随着肽浓度升高而增大。肽浓度为 4 mg/mL 时, 黄嘌呤氧化酶抑制率达到了 70.89%, 计算得到此条件下英红九号茶蛋白肽黄嘌呤氧化酶抑制活性的 IC₅₀ 为 0.72 mg/mL, 活性优于鲑鱼蛋白肽^[33] (IC₅₀: 7.23 mg/mL) 和核桃蛋白肽^[34] (IC₅₀: 19.01 mg/mL)。

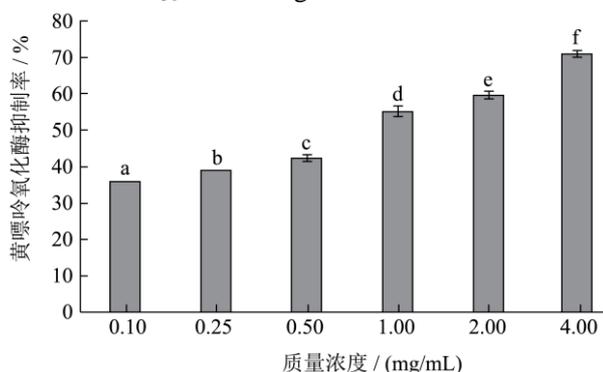


图 8 不同浓度酶解物的黄嘌呤氧化酶抑制率

Fig.8 inhibition rate of xanthine oxidase in different concentration of hydrolysates

2.5 氨基酸组成分析

如表 5 所示, 英红九号茶蛋白肽的氨基酸组成中, 必需氨基酸相对含量为 38.49%, 疏水性氨基酸的相对比例高达 48.00%, 碱性氨基酸相对含量为 13.67%。有研究表明, 含疏水性氨基酸的肽具有较强的黄嘌呤氧化酶抑制活性, 黄嘌呤氧化酶的活性中心由一个疏水囊组成, 含有较多疏水氨基酸的肽段可能更容易进入其活性中心, 从而发挥抑制作用^[35]。还有研究指出, 中性或弱碱性的肽比较容易成为有效的黄嘌呤氧化酶抑制剂^[36]。本研究中英红九号茶蛋白肽展现出了较强的黄嘌呤氧化酶抑制活性, 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。

2.6 超滤组分黄嘌呤氧化酶抑制活性分析

酶解物、超滤组分和阳性对照别嘌呤醇的黄嘌呤氧化酶抑制活性比较如图 9 所示, 经过超滤分离得到的 <3 ku 组分活性 (IC₅₀: 0.41 mg/mL), 虽不及阳性药物别嘌呤醇 (IC₅₀: 0.03 mg/mL), 但相较于酶解物 (IC₅₀: 0.72 mg/mL), 活性有显著提升, 而 >3 ku 组分的活性 (IC₅₀: 1.79 mg/mL) 明显弱于酶解物, 可以推断英红九号茶蛋白肽的高活性组分, 主要集中于

小分子肽段, 邹琳等^[4]和 Li 等^[34]的研究中都有类似报道。综上, 英红九号茶蛋白肽具有显著的黄嘌呤氧化酶抑制活性, 且小分子肽段活性更强, 其具体纯化鉴定和作用机制有待进一步深入研究。

表 5 英红九号茶蛋白肽的氨基酸组成

Table 5 Amino acid composition of peptides from Yinghong NO.9

氨基酸	相对百分含量/%
天冬氨酸(Asp)	11.61
苏氨酸(Thr)*	5.64
丝氨酸(Ser)	5.64
谷氨酸(Glu)	11.78
甘氨酸(Gly) [#]	11.36
丙氨酸(Ala) [#]	6.35
缬氨酸(Val)* [#]	6.02
蛋氨酸(Met)* [#]	1.26
异亮氨酸(Ile)* [#]	4.67
亮氨酸(Leu)* [#]	7.45
酪氨酸(Tyr)	3.66
苯丙氨酸(Phe) [#]	4.42
组氨酸(His)*	5.51
赖氨酸(Lys)*	3.53
精氨酸(Arg)	4.63
脯氨酸(Pro) [#]	6.48
必需氨基酸(EAA)	38.49
疏水性氨基酸(HAA)	48.00
碱性氨基酸(BAA)	13.67

注: 必需氨基酸 (*EAA): Thr、Val、Met、Ile、Leu、Phe、Lys、His; 疏水性氨基酸 (#HAA): Ala、Val、Ile、Leu、Gly、Phe、Pro、Met; 碱性氨基酸 (BAA): His、Lys、Arg。

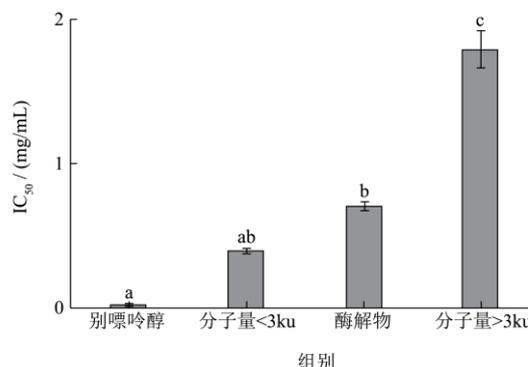


图 9 不同组分黄嘌呤氧化酶抑制活性的 IC₅₀ 值

Fig.9 The IC₅₀ values of different components of xanthine oxidase inhibitory activity

3 结论

本研究以英红九号茶渣为原料, 碱提酸沉法提取

茶叶蛋白,以黄嘌呤氧化酶抑制率为主要指标,通过单因素和响应面实验,获得酶解英红九号茶蛋白制备降尿酸肽的最佳工艺条件。对最优条件得到的酶解物进行超滤分离,比较了超滤组分、酶解物及阳性对照别嘌呤醇的黄嘌呤氧化酶抑制活性。经过超滤分离,英红九号茶蛋白肽中高活性组分得到富集,即小分子肽($<3\text{ ku}$)在黄嘌呤氧化酶抑制活性中起到了关键作用。氨基酸分析表明,英红九号茶蛋白肽中高比例的必需氨基酸、疏水性氨基酸和碱性氨基酸,对活性也有重要影响。综合前人报道和本研究结果,可以推断小分子、疏水性和碱性的多肽可能具有较高的黄嘌呤氧化酶抑制活性,具体构效关系及活性机制仍需进一步深入研究。本研究为茶叶蛋白资源的开发利用提供了新思路,为黄嘌呤氧化酶肽类抑制剂的研究提供了理论参考。

参考文献

- [1] HU Xiao, ZHOU Ya, Zhou Shaobo, et al. Purification and identification of novel xanthine oxidase inhibitory peptides derived from round scad (*Decapterus maruadsi*) protein hydrolysates [J]. Marine Drugs, 2021, 19(10): 538-538.
- [2] Pascart Tristan, Liot é Fr éric. Gout: state of the art after a decade of developments [J]. Rheumatology (Oxford, England), 2019, 58(1): 27-44.
- [3] TIAN Yuchen, LIN Lianzhu, ZHAO Mouming, et al. Xanthine oxidase inhibitory activity and antihyperuricemic effect of *Moringa oleifera* Lam. leaf hydrolysate rich in phenolics and peptides [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 270.
- [4] 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.
- [5] 袁祺,程述震,吴迪,等. 黄嘌呤氧化酶肽类抑制剂的研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(11): 355-363.
- [6] ZHANG Yingyu, LI Qi, WANG Fengzhong, et al. A zebrafish (*Danio rerio*) model for high-throughput screening food and drugs with uric acid-lowering activity [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 508(2): 494-498.
- [7] WU Yuqun, HE Hui, HOU Tao. Purification, identification, and computational analysis of xanthine oxidase inhibitory peptides from kidney bean [J]. Journal of Food Science, 2021, 86(3): 1081-1088.
- [8] YU Zhipeng, KAN Ruotong, WU Sijia, et al. Xanthine oxidase inhibitory peptides derived from tuna protein: Virtual screening, inhibitory activity, and molecular mechanisms [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 101(4): 1349-1354.
- [9] LAI Xingfei, PAN Shunshun, ZHANG Wenji, et al. Properties of ACE inhibitory peptide prepared from protein in green tea residue and evaluation of its anti-hypertensive activity [J]. Process Biochemistry, 2020, 92: 277-287.
- [10] Kellogg Joshua J, Graf Tyler N, Paine Mary F, et al. Comparison of metabolomics approaches for evaluating the variability of complex botanical preparations: green tea (*Camellia sinensis*) as a case study [J]. Journal of Natural Products, 2017, 80(5): 1457-1466.
- [11] Bedrood Zeinab, Rameshrad Maryam, Hosseinzadeh Hossein. Toxicological effects of *Camellia sinensis* (green tea): A review [J]. Phytotherapy Research, 2018, 32(7): 1163-1180.
- [12] 靳伟刚,张洋,罗黎琳,等. 茶渣资源的开发与利用-茶渣中茶叶蛋白的酶法提取和酶法水解[J]. 中国食品添加剂, 2011, 4: 54-58.
- [13] ZHOU Jihong, YU Yueer, DING Lejia, et al. Matcha green tea alleviates non-alcoholic fatty liver disease in high-fat diet-induced obese mice by regulating lipid metabolism and inflammatory responses [J]. Nutrients, 2021, 13(6): 1950-1958.
- [14] 孙世利,郭芸彤,陈海强,等. 英红九号六大茶类生化成分分析及体外活性评价[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(9): 159-165.
- [15] 叶灏铎,苗建银,李龙星,等. 勐库大叶茶蛋白降血脂肽的酶解制备及活性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 212-221.
- [16] 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.
- [17] ZHAO Wenzhu, CHEN Yuejiao, YU Hanjie, et al. The enrichment and characterization of ginger-derived glycoprotein using magnetic particles [J]. Food Chemistry, 2018, 244: 164-168.
- [18] HUANG Danfei, NIE Shaoping, HAN Cheng, et al. Regulation of maturation and function of dendritic cells by tea glycoprotein [J]. European Food Research and Technology, 2012, 235(6): 1023-1032.
- [19] 李桂芬,何定芬,郑霖波,等. 响应面法优化金枪鱼蛋白抗痛风活性肽制备工艺[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2020, 39(1): 41-50.
- [20] 栾俊家,张尚悦,李昂达,等. 响应面法优化秋刀鱼酶解制备抗氧化活性肽的工艺[J]. 食品工业科技, 2022, 43(5): 172-181.
- [21] 赵晨雨,李慧敏,王新媛,等. 响应面法优化刺五加酶解工艺的研究[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(9): 23-30.
- [22] Eric Karangwa, ZHANG Xiaoming, Nicole Murekatete, et al.

- Effect of substrate type on sensory characteristics and antioxidant capacity of sunflower Maillard reaction products [J]. *European Food Research and Technology*, 2015, 240(5): 939-960.
- [23] 谭力铭,曹妍,裴海生,等.酸枣仁 ACE 抑制肽酶解工艺优化[J]. *食品工业科技*,2022,43(2):182-194.
- [24] 黄文,余可楠,廖婉雯,等.响应面法优化罗非鱼鳞钙结合肽酶解工艺及其特性表征[J]. *食品工业科技*,2021,42(21):190-196.
- [25] 王岩,王建宇,于璐,等.中性蛋白酶酶解玉米粉工艺研究[J]. *食品科技*,2021,46(7):180-184.
- [26] 刘东伟,袁玮琼,柳梅,等.核桃粕蛋白抑菌肽的制备工艺及纯化[J]. *食品工业科技*,2021,42(2):185-191 .
- [27] 林童,张旭,周灯银,等.小麦胚芽肽的制备及抗氧化活性分析[J]. *食品工业*,2021,42(8):47-52.
- [28] 杨娜,赵雨晴,张帅,等.响应面法优化提取白附子美白成分的工艺研究[J]. *哈尔滨商业大学学报(自然科学版)*,2019, 35(4):392-395.
- [29] 张婉迎,杨俊杰,杨松,等.响应面优化桑葚果粉喷雾干燥研究[J]. *食品工业*,2018,39(7):182-185.
- [30] 杨豪,刘晓雪,苏海冉,等.响应面法优化辣木叶蛋白提取工艺及凝集活性研究[J]. *食品工业科技*,2022,43(6):150-157.
- [31] 赵丛枝,寇天舒,张子德.发酵型无花果果酒加工工艺的研究[J]. *食品研究与开发*,2014,35(13):79-82.
- [32] 冯结铎,娄华,钟先锋,等.响应面分析法优化亚麻籽粕水解工艺研究[J]. *中国调味品*,2019,44(8):99-104.
- [33] Zhong Hao, Abdullah, Zhang Yipeng, 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.
- [34] LI Qingyong, KANG Xiaoyan, SHI Chuanchao, 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.
- [35] HE Weiwei, SU Guowan, Dongxiao Sun-Waterhouse, 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.
- [36] LI Yujuan, KANG Xiaoyan, LI Qingyong, 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.