

鲣鱼降尿酸肽酶解物的制备、分析及稳定性研究

姜 涵¹, 张 武², 何璐瑶¹, 曹少谦¹, 杨 华¹, 戚向阳^{1*}

(¹浙江万里学院生物与环境学院 浙江宁波 315100

²上海海洋大学食品学院 上海 201306)

摘要 探讨鲣鱼降尿酸肽的制备工艺及其特性。以黄嘌呤氧化酶(XO)抑制活性、水解度为指标,在优化降尿酸肽酶解工艺的基础上,对酶解物的分子质量、氨基酸组成及稳定性等特性进行分析。结果表明,中性蛋白酶为制备鲣鱼降尿酸肽的最适蛋白酶,经单因素和响应面优化试验,确定了最优工艺条件为温度 40℃,酶解 pH 7.1,酶添加量 10 400 U/g,酶解时间 4 h,料液比 1:5(g/mL)。在此条件下,制备的酶解物其 XO 抑制率和水解度分别为(83.91±0.16)%, (38.67±0.39)%,得率为(18.24±1.02)%。分子质量分布及氨基酸分析表明,制备的降尿酸酶解物以小分子肽为主,分子质量小于 1 ku 的组分占比 91.9%,且疏水氨基酸占比较高,达 49.61%。所制备的降尿酸酶解物对热、酸碱以及 Ca²⁺、Mg²⁺、Al³⁺、K⁺、Na⁺、NH⁴⁺等离子具有较好的稳定性,添加 Zn²⁺、Cu²⁺可显著增加酶解物 XO 抑制活性,而 Fe²⁺、Fe³⁺的存在显著降低其抑制活性。此外,酶解物在胃肠模拟消化环境下比较稳定,经体外肠模拟消化后,其 XO 抑制活性显著增强。本研究为鲣鱼资源的高附加值利用提供一定的理论基础。

关键词 鲣鱼; 降尿酸肽; 酶解物; 制备; 特性

文章编号 1009-7848(2024)10-0258-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.10.024

高尿酸血症(Hyperuricemia, HUA)分为原发性和继发性两大类^[1]。HUA 并发症较多,其中以痛风较为常见,过多的尿酸易在关节处析出,形成尿酸盐结晶,白细胞攻击堆积的结晶形成炎症,从而引发痛风^[2]。尿酸是嘌呤代谢的最终产物,其产生过程需腺苷脱氨酶(Adenosine deaminase, ADA)、黄嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase, XO)两种关键酶参与^[3]。若能抑制 ADA 或 XO 两种关键酶活性,则可限制尿酸产生。目前,常用别嘌醇(Allopurinol)与非布司他(Febuxostat)等药物抑制 XO 活性,治疗效果较为显著,然而,治疗初期存在诱发痛风的风险,且存在一定毒副作用^[4]。

多种天然产物被证明具有降尿酸活性,如黄酮类、酚酸类、多糖类、生物活性肽等^[5]。其中,生物活性肽因制备成本低,样品成本低,易吸收,安全性高等特点而备受关注。降尿酸肽按作用方式大体可分为抑制 XO 等关键酶活性的多肽及促进尿

酸排泄的多肽两类^[6]。目前,研究多集中在关键酶设计及制备降尿酸肽方面,而针对尿酸排泄方面的研究较为薄弱。生物活性肽的制备方式有酶解^[7]、溶剂提取^[8]、微生物发酵^[9]以及化学合成^[7]等,其中,酶解法条件温和、可控安全、成本低等优势^[10]受到人们青睐。鲣鱼(*Katsuwonus pelamis*)产量占全球金枪鱼总产量的 48%^[11],具有低脂、高蛋白等特性,且富含 DHA、EPA^[12]。目前针对鲣鱼资源的开发利用主要以传统加工为主,产品较单一,主要有鱼罐头^[13]、干制品及鱼粉^[14]等,在精深加工方面较为薄弱。近期研究发现,鲣鱼蛋白肽具有抗疲劳^[15]、保护肝脏^[16]、降尿酸等诸多功能。如:He 等^[17]利用碱性蛋白酶酶解鲣鱼,筛选多个具有降尿酸活性的蛋白肽,其中二肽-FH 最优,体外 XO 抑制活性 IC₅₀ 为 25.7 mmol/L。邹琳^[18]利用中性蛋白酶酶解鲣鱼背肉,经分离、纯化、鉴定获得具有降尿酸活性的蛋白肽-ACECD,其体外 XO 抑制活性 IC₅₀ 为 7.23 mg/mL。为了进一步筛选高活性功能肽,以 XO 抑制率及水解度为指标,探讨鲣鱼降尿酸酶解物的制备工艺及其特性,为提升海洋资源综合利用率以及筛选安全且有效的降尿酸功能物质提供理论依据。

收稿日期: 2023-10-12

基金项目: 浙江省重点研发项目(2019C02071);浙江省一流学科“生物工程”学生创新项目(CX2022010)

第一作者: 姜涵,男,硕士生

通信作者: 戚向阳 E-mail: qixiangyang85@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要材料及试剂 鳕鱼, 宁波今日食品有限公司, 去头、尾、骨、皮、内脏及深色肉, 将鱼肉搅碎后分装至自封袋, 置于-20℃条件冷冻。细胞色素 C (MW12400)、杆菌酶 (MW1450)、Gly-Gly-Tyr-Arg (MW451)、Gly-Gly-Gly (MW189), 上海源叶生物科技有限公司; 氢氧化钠、氯化钠、三氟乙酸、茚三酮等均为分析纯级, 上海国药集团化学试剂有限公司; 中性蛋白酶(5×10⁴ U/g)、酸性蛋白酶(5×10⁴ U/g)、碱性蛋白酶(2×10⁵ U/g)、风味蛋白酶(5×10⁴ U/g)、木瓜蛋白酶(8×10⁵ U/g), 北京 Solar-bio 公司; 黄嘌呤氧化酶(50 U/mg)、辣根过氧化物酶(200 U/mg)、黄嘌呤(分析纯级)、4-氨基安替比林(分析纯级), 上海麦克林生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器与设备 ICP-MS 7900 电感耦合等离子体质谱仪, 美国安捷伦公司; Multiskan FC 酶标仪, 美国 ThermoFisher 公司; KDN-812 凯氏定氮仪, 上海纤检公司; L-8900 全自动氨基酸分析仪, 日本日立公司; Waters 600 HPLC, 美国 Waters 公司; 5804R 高速离心机, 德国 Eppendorf 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 双酶偶联法测定 XO 抑制率 尿酸特征峰在波长 290 nm 左右^[19], 然而酶解液中可能含有如 Trp 残基等在紫外波段存在吸收峰的氨基酸, 产生干扰, 为排除干扰, 利用显色液性质将测定波长调整到 508 nm 处测定^[20]。参考杨柳等^[21]方法, 并稍作修改。取 0.2061 g 4-氨基安替比林, 0.018 g 辣根过氧化物酶, 0.5594 g 苯酚, 用 Tris-HCl 缓冲液定容至 1 L 制备为显色液。在 96 孔板中每孔加入 50 μL 黄嘌呤氧化酶(0.52 U/mL)溶液与 50 μL 待测样品, 振荡 30 s 后, 置于 37℃环境孵育 10 min。孵育后加入 100 μL 黄嘌呤溶液(2.0 mmol/L)与 100 μL 显色液混合记为 A₁, 缓冲液替换黄嘌呤溶液记为 A₀, 缓冲液替换样品记为 A₂, 然后再次将 96 孔板置于 37℃条件反应 15 min, 加入 30 μL NaOH(1.0 mol/L)终止反应, 测定波长 508 nm 处吸光值。按公式(1)计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_2 - (A_1 - A_0)}{A_2} \times 100 \quad (1)$$

1.2.2 氨基氮含量测定 采用《食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定》(GB 5009.235-2016)的酸度计法测定。

1.2.3 水解度的测定 参考李美娜等^[22]的方法, 以样液氨基氮与原料中总氮的比值表示, 按公式(2)计算:

$$\text{水解度}(\%) = \frac{\text{酶解液氨基氮含量}}{\text{原料总氮}} \times 100 \quad (2)$$

1.2.4 鳕鱼降尿酸肽酶解工艺的优化

1.2.4.1 最优酶筛选 选用表 1 中蛋白酶进行酶解, 固定酶添加量(6 000 U/g)、时间(4 h)和料液比(1:5), 在各自最适 pH 与温度条件下进行酶解。酶解至 4 h 后置于 100℃灭酶 15 min, 冷却至室温, 于 10 200 r/min, 4℃离心 10 min, 取上清液, 以 XO 酶抑制率和水解度为指标, 比较各蛋白酶的酶解效果。

表 1 不同蛋白酶的最优酶解条件
Table 1 Optimal enzymatic conditions for different proteases

酶的种类	酶活 力/(U/ g)	温度/ ℃	时间/h	pH 值	料液 比/(g/ mL)
酸性蛋白酶	6 000	35	4	3.0	1:5
中性蛋白酶	6 000	45	4	7.0	1:5
碱性蛋白酶	6 000	40	4	10.0	1:5
木瓜蛋白酶	6 000	45	4	7.5	1:5
风味蛋白酶	6 000	50	4	7.5	1:5

1.2.4.2 单因素实验 以 XO 活性抑制率为主要指标, 水解度为参考, 分别固定样品料液比 1:5(g/mL), 酶解时间 4 h, pH 7 或酶添加量 8 000 U/g 进行单因素实验。分别探究不同温度(35, 40, 45, 50, 55℃), 不同酶加量(5 000, 7 000, 8 000, 9 000, 10 000, 12 000 U/g), 不同料液比(1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:10), 不同 pH 值(5, 6, 7, 8, 9)以及不同酶解时间(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h)对鳕鱼酶解效果的影响。

1.2.4.3 响应面优化酶解试验 根据单因素实验结果, 确定酶解温度(A)、酶解 pH 值(B)、酶添加量(C)自变量水平, 以 XO 活性抑制率(Y₁)、水解度(Y₂)为响应值, 采用 Box-Behnken 模型进行响应面优化试验^[23]。赋予两项响应值相同权重, 预测

最优鲮鱼酶解液工艺制备条件，响应面因素水平设计如表 2 所示。

表 2 响应面试验因素水平设计表
Table 2 Factor level of response surface analysis

水平	因素		
	A(酶解温度)/℃	B(pH 值)	C(酶添加量)/(U/g)
-1	35	6	9 000
0	40	7	10 000
1	45	8	11 000

1.2.5 鲮鱼与酶解物主要理化指标及重金属含量测定 脂肪含量、水分含量、粗蛋白含量、灰分均以 GB 5009-2016 食品安全国家标准方法测定。参考国家标准《食品安全国家标准 食品中多元素的测定》(GB 5009.268-2016) 中第一法电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定鲮鱼鱼肉(湿基)与酶解物冻干粉中汞、铬、镉、铅金属含量(mg/kg),并参考国家标准《食品安全国家标准 食品中污染物限量》(GB 2762-2017)分析样品中重金属含量是否超标。

1.2.6 分子质量分布 参考《海洋鱼低聚肽粉》(GB/T 22729-2008)中高效凝胶过滤色谱法,将质量浓度为 10 mg/mL 酶解样品过膜,测定酶解产物的分子质量。

1.2.7 氨基酸组成分析 参考王乐等^[24]的方法,称取适量样品加入 6 mol/L 盐酸 10 mL,氮吹封口,110 ℃静置水解 24 h,定容过滤,10 000 r/min 离心,取 0.2 mL 上清液氮吹,加入 0.02 mol/L 盐酸 2 mL 溶解,0.22 μm 滤膜过滤,进样测定样品各氨基酸含量。测定条件:磺酸型阳离子分析柱(4.6 mm×60 mm);柱温 57 ℃;梯度洗脱;双通道波长为 440 nm 和 570 nm;反应器温度 135 ℃;茆三酮流速 0.35 mL/min;进样量 20 μL,每个样品平行进样 3 次。

1.2.8 稳定性研究

1.2.8.1 不同 pH 值、温度、金属离子环境对酶解产物稳定性的影响 将酶解物冻干粉配制成质量浓度为 15 mg/mL 的溶液,探讨酶解物在不同 pH 值(3,4,5,6,7,8,9,10)、不同温度(4,30,40,50,60,70,100 ℃)以及不同金属离子环境下(K⁺、Na⁺、

Mg²⁺、Ca²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、NH⁺、Al³⁺、Zn²⁺、Cu²⁺,浓度均为 15 mmol/mL)对 XO 酶的抑制效果。

1.2.8.2 胃肠模拟消化对酶解产物 XO 抑制活性的影响 参考马天新^[25]的方法,并稍作修改。人工胃液配制:取 0.2 g NaCl,加入超纯水 70 mL 与 730 μL 盐酸,用盐酸调 pH 值为 1.2 后,定容 100 mL,备用。取 40 mL 胃液,加入样品与胃蛋白酶(质量比为 50:1)后待用。人工肠液配制:称取 0.7 g 磷酸二氢钾溶于 25 mL 超纯水中振荡,加入 19 mL NaOH(0.2 mol/L)和 40 mL 超纯水,用 NaOH 调 pH 值为 7.5,定容至 100 mL,现配现用。用人工胃液配制质量浓度为 15 mg/mL 的样品溶液,37 ℃水浴消化,每 20 min 取 5 mL 消化液置于沸水灭酶,然后于 4 ℃保存,共计消化 1 h,然后用 1 mol/L 碳酸氢钠将剩余 25 mL 消化液的 pH 值调至 6.5。随后将 pH 6.5 胃液加入到 25 mL 人工肠液中,模拟十二指肠消化。加入胰蛋白酶(质量比为 25:1)于 37 ℃消化,每 30 min 取 10 mL 消化液于沸水中灭酶,消化 2 h,随后测定经胃液、肠液消化后酶解产物的 XO 抑制率,确定模拟消化对酶解产物的影响。

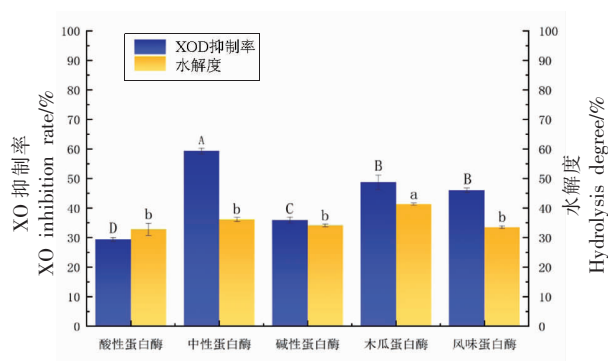
1.2.9 数据统计与分析 所有试验均重复 3 次。采用 Origin 2018 软件作图,SPSS 26.0 进行方差分析,以 P<0.05 表示数据具有统计学意义上的显著性差异。

2 结果与分析

2.1 鲮鱼降尿酸肽酶解工艺的优化

2.1.1 不同蛋白酶对鲮鱼酶解效果的影响 由图 1 可知,5 种蛋白酶在各自最适条件下,以中性蛋白酶水解鲮鱼蛋白所得酶解液的 XO 活性抑制率最高,达 59.71%;而水解度以木瓜蛋白酶最佳(41.30%),其次为中性蛋白酶(36.16%),综合考虑,选用中性蛋白酶进行后续酶解试验。

2.1.2 单因素酶解实验 由图 2a 可知,在其它条件相同情况下,随酶解温度升高,酶解液的 XO 抑制率和水解度均呈先上升后下降的趋势,XO 抑制率和水解度分别在 40 ℃和 50 ℃时最佳;由图 2b 可知,随酶添加量增加,水解度持续上升,而酶解液 XO 抑制率则在 10 000 U/g 时最大,这可能是由于随酶添加量和水解度的增加,生成的鲮鱼蛋



注:不同字母代表样品间的显著差异($P < 0.05$),下同。

图1 不同蛋白酶对鲮鱼酶解效果的影响

Fig.1 Effect of different proteases on the enzymatic effect of *Katsuwonus pelamis*

白肽进一步水解为氨基酸,从而导致酶解液 XO 抑制活性减弱或丧失^[18];由图 2c 及 2d 可知,酶解液 XO 抑制率和水解度均随料液比和 pH 值增加呈先上升后下降的趋势,以料液比 1:5 及 pH 7

时最佳;由图 2e 可知,XO 抑制率和水解度随水解时间的延长而增加,然而当水解时间增至 4 h 时,再增加水解时间,XO 抑制率变化趋于缓慢且有所降低,以 4 h 较佳。

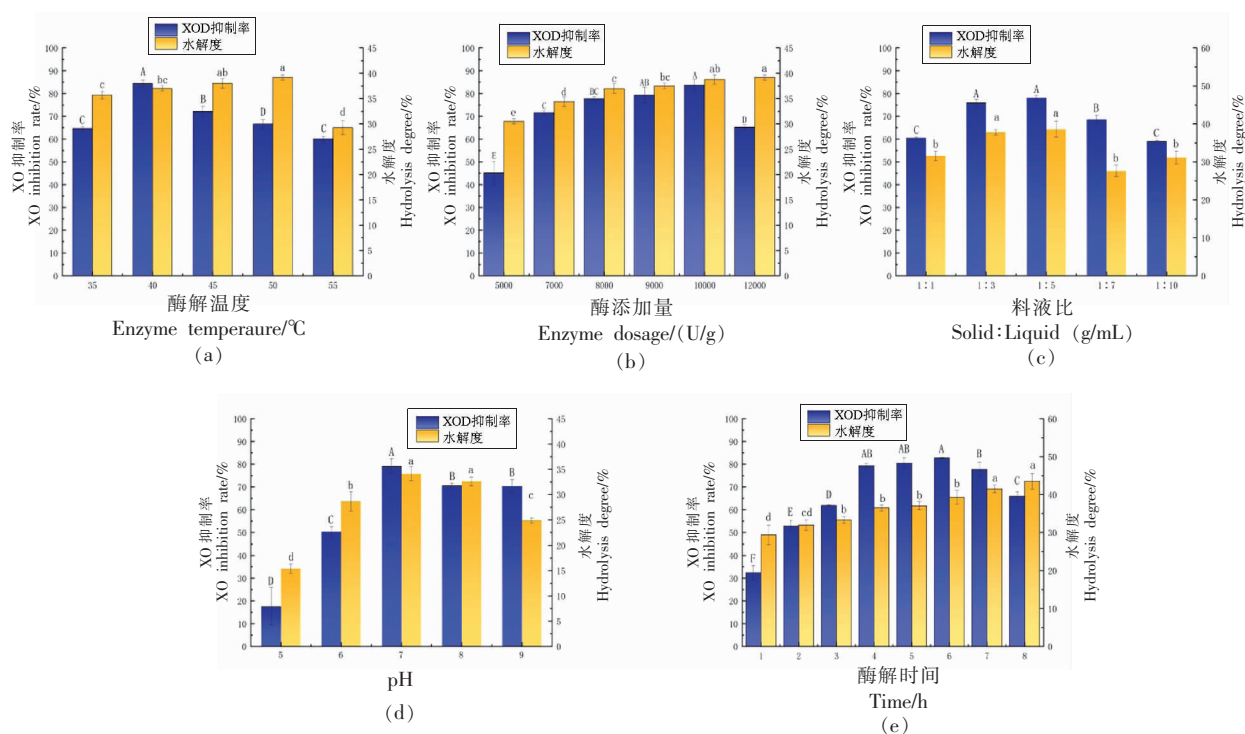


图2 不同酶解条件对鲮鱼酶解效果的影响

Fig.2 Effect of different enzymatic conditions on the enzymatic effects of *Katsuwonus pelamis*

2.1.3 响应面试验 根据单因素实验,选取对酶解效果影响较大的酶解温度、酶解 pH 值和酶添加量 3 个因素进行响应面优化试验,结果见表 3。

2.1.3.1 以 XO 活性抑制率为响应值的回归模型

及方差分析 利用 Design-Expert 10.0.7 对试验结果进行多元回归拟合,得到 XO 酶抑制活性关于 A(酶解温度)、B(酶解 pH 值)、C(酶添加量)的二次回归方程为: $Y_1 = 81.89 + 0.31A + 1.20B + 1.82C +$

$0.85AB+1.18AC-0.17BC-8.35A^2-3.37B^2-8.23C^2$, 回归方程的方差分析见表4, 回归模型为极显著 ($P<0.01$), 失拟值不显著 ($P=0.3965>0.05$), $R^2=0.9859$, $R_{adj}^2=0.9677$, 说明该模型可以较准确地预测鲢鱼降尿酸肽酶解工艺优化参数;同时,该模型中 B, C, A^2, B^2, C^2 为显著影响因素; $F(C)>F(B)>F(A)$, 即各因素对 XO 酶抑制率的影响大小分别为酶添加量>酶解 pH 值>酶解温度。

表 3 Box-Behnken 试验设计结果
Table 3 Box-Behnken test design results

试验号	A(酶解温度)/℃	B(酶解 pH 值)	C(酶添加量)/(U/g)	XO 抑制率(Y_1)/%	水解度(Y_2)/%
1	40	7	10 000	83.80 ± 0.71	38.04 ± 0.09
2	45	7	9 000	63.39 ± 0.57	34.04 ± 0.17
3	35	7	11 000	66.04 ± 0.34	36.93 ± 0.16
4	40	8	11 000	72.81 ± 0.39	37.95 ± 0.27
5	40	7	10 000	84.06 ± 0.46	38.48 ± 0.18
6	40	6	11 000	72.93 ± 0.61	36.30 ± 0.71
7	40	7	10 000	83.73 ± 0.34	38.51 ± 0.11
8	45	7	11 000	68.71 ± 0.25	39.26 ± 0.24
9	40	8	9 000	69.32 ± 0.19	35.00 ± 0.14
10	40	6	9 000	68.07 ± 0.22	33.52 ± 0.26
11	35	8	10 000	70.97 ± 0.66	34.54 ± 0.13
12	40	7	10 000	82.97 ± 0.36	38.83 ± 0.33
13	40	7	10 000	83.76 ± 0.13	38.87 ± 0.38
14	45	8	10 000	72.85 ± 0.47	35.72 ± 0.26
15	35	6	10 000	68.30 ± 0.75	34.02 ± 0.04
16	35	7	9 000	64.42 ± 0.47	33.84 ± 0.31
17	45	6	10 000	67.86 ± 0.31	35.08 ± 0.22

表 4 XO 抑制活性的回归方程方差分析

Table 4 Variance analysis of regression equation of XO inhibition activity

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
回归模型	794.48	9	88.28	54.31	< 0.0001	**
A	1.19	1	1.19	0.73	0.4213	
B	9.66	1	9.66	5.94	0.0449	*
C	29.25	1	29.25	18.00	0.0038	**
AB	1.34	1	1.34	0.82	0.3945	
AC	3.42	1	3.42	2.11	0.1901	
BC	0.46	1	0.46	0.28	0.6109	
A^2	337.76	1	337.76	207.79	< 0.0001	**
B^2	61.31	1	61.31	37.72	0.0005	*
C^2	280.92	1	280.92	172.82	< 0.0001	**
失拟值	5.56	3	1.85	1.27	0.3965	
纯误差	5.82	4	1.45	—	—	
总和	805.86	16	—	—	—	

注:*. 表示显著差异($P<0.05$);**. 表示差异极显著($P<0.01$)。 $R^2=0.9859$, $R_{adj}^2=0.9677$ 。

2.1.3.2 以水解度为响应值的回归模型及方差分析 利用 Design-Expert 10.0.7 对试验结果进行多元回归拟合,得到水解度关于 A(酶解温度)、B(酶解 pH 值)、C(酶添加量)的二次回归方程为:

$Y_2=38.55+0.60A+0.54B+1.76C+0.029AB+0.53AC+0.043BC-1.69A^2-2.02B^2-0.84C^2$ ，方差分析见表 5。回归模型极显著($P<0.01$)， $R^2=0.9741$ ， $R_{adj}^2=0.9409$ ，失拟值不显著($P=0.1117>0.05$)。说

明该模型可以较准确预测鲮鱼降尿酸肽的酶解工艺优化参数；其中 $B、C$ 为显著影响因素； $F(C)>F(A)>F(B)$ ，即各因素影响的大小依次为：酶添加量>酶解温度>酶解 pH 值。

表 5 水解度的回归方程方差分析

Table 5 Analysis of variance of regression equation of hydrolysis degree						
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
回归模型	66.31	9	7.37	29.28	< 0.0001	**
A	2.85	1	2.85	11.34	0.0120	
B	2.30	1	2.30	9.14	0.0193	*
C	24.64	1	24.64	97.95	< 0.0001	**
AB	3.318×10^{-3}	1	3.318×10^{-3}	0.013	0.9118	
AC	1.14	1	1.14	4.53	0.0709	
BC	7.430×10^{-3}	1	7.430×10^{-3}	0.030	0.8684	
A ²	12.04	1	12.04	47.84	0.0002	**
B ²	17.12	1	17.12	68.05	< 0.0001	*
C ²	2.95	1	2.95	11.72	0.0111	**
失拟值	1.31	3	0.44	3.88	0.1117	
纯误差	0.45	4	0.11	—	—	
总和	68.07	16	—	—	—	

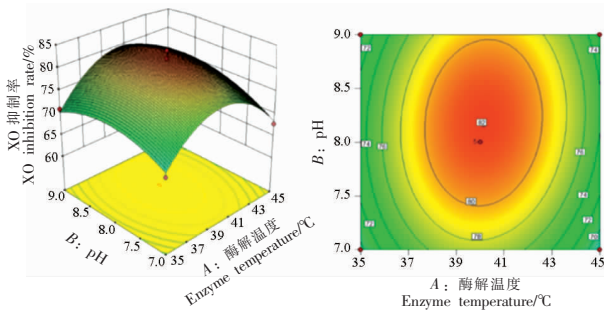
注：*表示显著差异($P<0.05$)；**表示差异极显著($P<0.01$)。 $R^2=0.9741$ ， $R_{adj}^2=0.9409$ 。

2.1.3.3 响应面等高线分析 酶解温度、酶添加量、酶解 pH 值三因素间的交互作用见图 3。等高线的形状可反映各因素间的交互作用显著与否，椭圆形表示交互作用显著，圆形表示交互作用不显著，根据三维立体图的陡峭程度可反映各因素对响应值的影响。

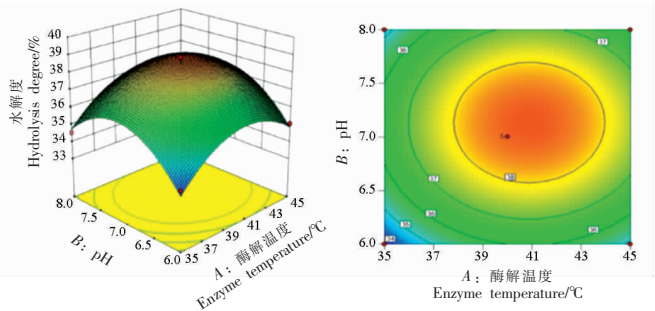
以 XO 活性抑制率为响应值(Y_1)的响应面分析见图 3a~3c，发现温度及酶添加量均与 pH 值交互显著，在合适交互下，当温度、pH 及酶添加量的范围在 37~43 ℃，pH 7.5~8.0 及 9 500~10 500 U/g

时，酶解液对 XO 活性抑制率最佳；以水解度为响应值(Y_2)的响应面分析见图 3d~3f，温度、pH 值及酶添加量之间交互作用显著。当温度、pH 值及酶添加量的范围分别为 39~41 ℃，pH 6.75~7.5，10 000~10 250 U/g 时，酶解液水解度有极大值。

2.1.4 最优条件与模型验证试验 利用 Design-Expert 10.0.7 软件，赋予 XO 抑制率、水解度相同权重进行预测，最佳条件为温度 40.598 ℃，酶解 pH 7.138，酶添加量 10 368.835 U/g，响应值 XO 抑制率及水解度的预测值分别为 83.97%和 39.19%。



(a)酶解温度和酶解 pH 值对 XO 抑制率的影响



(d)酶解温度和酶解 pH 值对水解度的影响

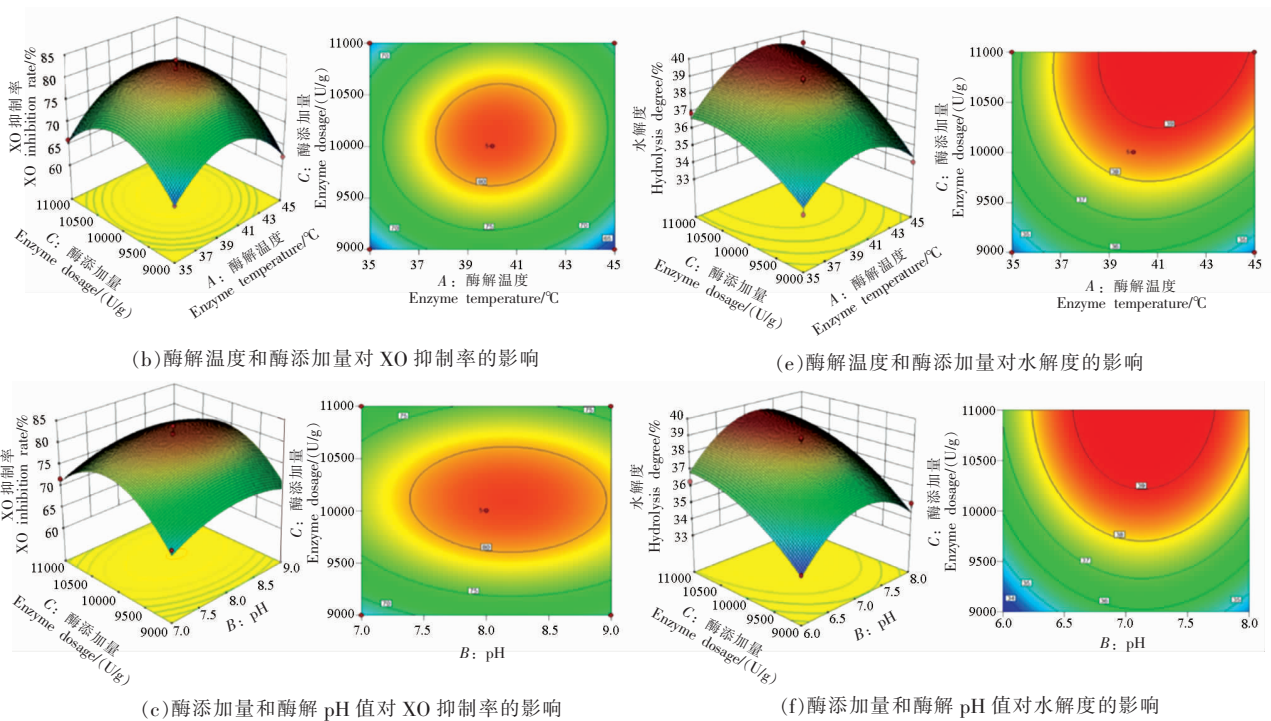


图 3 各因素交互作用对 XO 活性抑制率及水解度的影响

Fig.3 Effect of interaction of various factors on the XO activity inhibition rate and hydrolysis degree

为操作方便,将试验条件调整为温度 40 ℃,酶解 pH 7.1,酶加量 10 400 U/g,此条件 XO 抑制率及水解度分别为(83.91±0.16)%,(38.67±0.39)%,酶解物得率为(18.24±1.02)%。可见该模型可以较好预测鲢鱼的酶解效果。

2.2 酶解物的分子质量分布

由图 4、表 6 可知,鲢鱼酶解物中蛋白肽的分子质量主要分布在 1 ku 以下,占比 91.9%;酶解后分子质量大于 3 ku 的肽段仅占 0.88%,推测分子质量小于 1 ku 的肽段是酶解物中发挥 XO 抑制活性的主要组分。

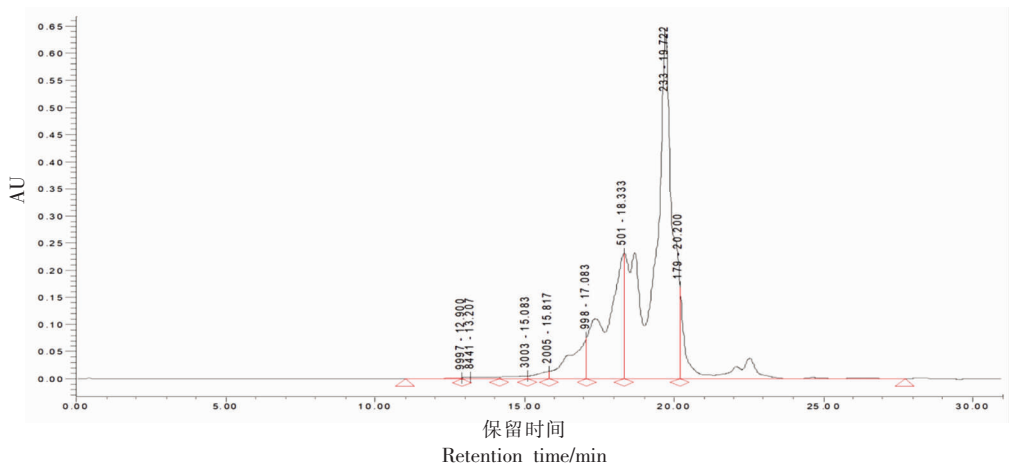


图 4 鲢鱼酶解物分子质量分布色谱图

Fig.4 Chromatogram of molecular weight distribution of the enzymatic hydrolysate

表 6 鳀鱼酶解物分子质量分布

Table 6 The relative molecular mass distribution of enzymatic hydrolysate

分子质量范围/u	峰面积/%	数均分子质量/u	重均分子质量/u
>10 000	0.09	12 606	13 252
10 000~5 000	0.34	6 946	7 238
5 000~3 000	0.45	3 739	3 822
3 000~2 000	0.84	2 348	2 379
2 000~1 000	6.36	1 270	1 314
1 000~500	20.83	652	681
500~180	62.86	267	291
<180	8.21	—	—

2.3 酶解物的氨基酸组成分析

鳀鱼酶解物氨基酸组成分析见表 7。17 种氨基酸中疏水氨基酸、芳香族氨基酸、碱性氨基酸和酸性氨基酸的含量分别为 49.61%、17.04%、

18.56%、16.37%，以亮氨酸含量最高，组氨酸次之。推断酶解产物中疏水氨基酸是影响其降尿酸活性主要氨基酸。

表 7 鳀鱼酶解物的氨基酸分析

Table 7 Amino acid analysis of the enzymatic hydrolysate

氨基酸种类	含量/(g/100g)	氨基酸种类	含量/(g/100g)
天冬氨酸(Asp)****	6.59 ± 0.47	酪氨酸(Tyr)**	2.76 ± 0.68
苏氨酸(Thr)	5.14 ± 0.29	苯丙氨酸(Phe)*/**	4.50 ± 0.32
丝氨酸(Ser)	3.71 ± 0.34	赖氨酸(Lys)***	5.81 ± 0.33
谷氨酸(Glu)****	8.53 ± 0.71	组氨酸(His)**/**	9.77 ± 1.08
甘氨酸(Gly)	7.85 ± 0.64	精氨酸(Arg)***	2.97 ± 0.24
丙氨酸(Ala)*	9.58 ± 1.17	羟脯氨酸(Pro)*	4.21 ± 0.31
半胱氨酸(Cys)	0.31 ± 0.09	疏水氨基酸(HAA)	49.61
缬氨酸(Val)*	7.90 ± 0.41	芳香氨基酸(AAA)	17.04
蛋氨酸(Met)*	3.10 ± 0.91	碱性氨基酸(PCAA)	18.56
异亮氨酸(Ile)*	6.37 ± 0.42	酸性氨基酸(NCAA)	16.37
亮氨酸(Leu)*	10.87 ± 1.34	必需氨基酸(EAA)	43.69

注：*表示疏水氨基酸；**表示芳香族氨基酸；***表示碱性氨基酸；****表示酸性氨基酸。

2.4 酶解物的基本成分分析

由表 8 可知，鳀鱼鱼肉中水分含量最高，为(72.67±0.70)%，蛋白含量次之(21.87±0.77)%，脂肪与灰分含量较低，分别为(6.01±0.12)%和(1.40±0.07)%，表明鳀鱼蛋白质含量丰富，是制备蛋白肽的优良原料。酶解后，产物的粗蛋白及灰分含量较鱼肉干基有所提高，表明通过酶解富集了蛋白质，同时，由于酶解过程 pH 调节导致灰分含量有所提升。重金属分析表明，鳀鱼鱼肉与酶解物中重金属含量均未超标，若以干基计算，与鱼肉相比(折算后 Pb、Cd、Hg、Cr 含量分别为 0.0073、0.0695、

0.1284、0.0040 mg/kg)，发现酶解物中 Pb、Cr 含量有所增加，而 Cd 与 Hg 含量则下降。

2.5 酶解物的稳定性研究

2.5.1 不同 pH、温度及金属离子对酶解物稳定性的影响 由图 5a~5c 可知，酶解物对酸、碱及热具有较好的稳定性。不同金属离子对酶解物稳定性的影响不同（见图 5c），其中 Ca²⁺、Mg²⁺、Al³⁺、K⁺、Na⁺、NH⁺离子对酶解物的稳定性影响不显著，添加 Zn²⁺、Cu²⁺可显著增加酶解物 XO 抑制活性，而 Fe²⁺、Fe³⁺的存在则显著降低了酶解物 XO 抑制活性，因此，在加工过程中应尽量避免接触 Fe²⁺、Fe³⁺

表 8 鳀鱼酶解物的营养成分与重金属含量分析

Table 8 The nutritional composition and heavy metal contents of enzymatic hydrolysate

样品	营养成分/%				重金属含量/(mg/kg)			
	水分含量	粗蛋白质含量	粗脂肪含量	灰分含量	铅(Pb)	镉(Cd)	汞(Hg)	铬(Cr)
鳀鱼鱼肉	72.67 ± 0.70	21.87 ± 0.77	6.01 ± 0.12	1.40 ± 0.07	0.0020	0.0190	0.0351	0.0010
酶解产物	2.06 ± 0.39	92.98 ± 0.17	—	5.58 ± 0.03	0.0296	0.0530	0.0810	0.5150

注:国家标准 GB 2762-2017 中水产品(肉食性)及其制品的重金属污染物限量;Pb 为 0.5 mg/kg(鲜、冻水产动物),1.0 mg/kg(水产制品);Cd 为 0.1 mg/kg;Hg 为 1 mg/kg;Cr 为 2 mg/kg。— 未检出。

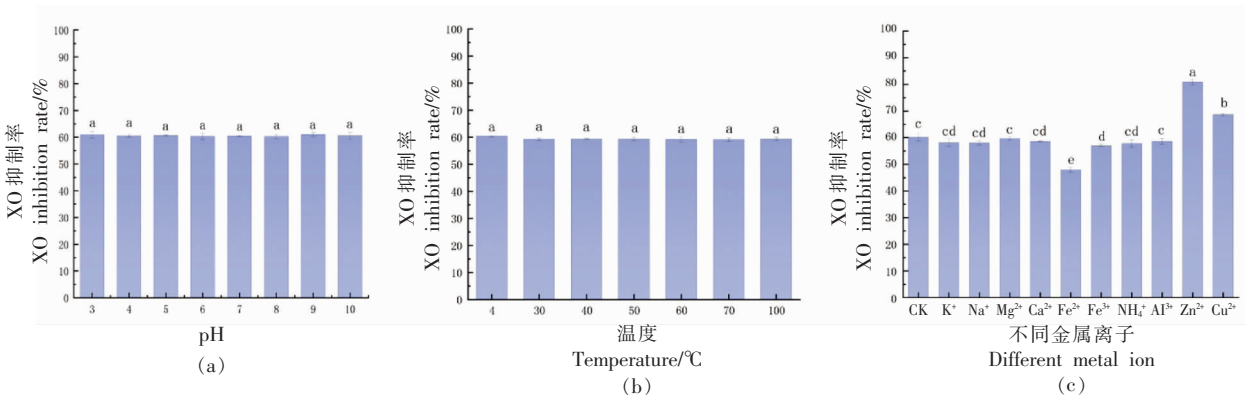


图 5 不同 pH 值、温度及金属离子对酶解物稳定性的影响

Fig.5 Effect of different pH, temperature and metal ions on the stability of enzymatic hydrolysate

离子。

2.5.2 胃肠模拟消化对鳀鱼酶解物稳定性的影响

由图 6 可知,酶解物在胃液中抑制 XO 的活性较稳定,胃液消化 60 min 后,其对 XO 的抑制效果无显著变化;在随后的肠液中,经肠液消化,酶解液对 XO 的抑制活性显著提高,然而其抑制活性随消化时间延长无显著差异。

3 讨论

酶解法优势明显,是目前制备活性肽的常用方法之一,而不同蛋白酶制备的酶解物其 XO 抑制率与水解度存在显著差异。本文研究了不同蛋白酶制备的鳀鱼酶解物对 XO 的抑制活性,发现中性蛋白酶优于其它 4 种蛋白酶。赵谋明等^[26]研究发现,中性蛋白酶与胰酶复配水解秋刀鱼肉,酶解物的氮回收率与 XO 抑制活性最优。黎青勇^[27]利用 Autodock Vina 高通量筛选预测了核桃源降尿酸肽的 XO 抑制活性,发现芳香族氨基酸残基在 N 端位置有利于降尿酸肽的 XO 抑制活性。中性蛋白酶酶切位点较多,且一般作用于芳香族氨基酸^[28],推测酶解产物中降尿酸肽含有较多 N 端芳

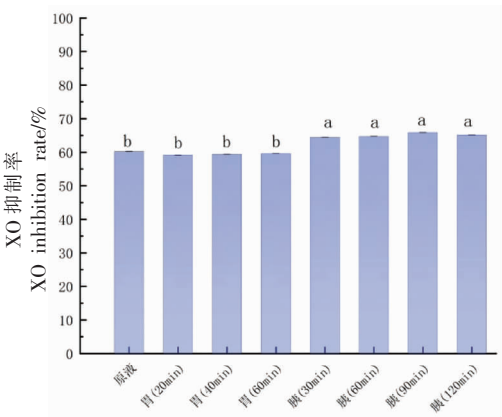


图 6 胃肠模拟消化对鳀鱼酶解物稳定性的影响

Fig.6 Effects of simulated gastrointestinal digestion on the stability of enzymatic hydrolysates

香族氨基酸残基。有研究表明降尿酸肽多以短肽为主,一般小于 1 ku^[18-19,27,29-30]。何伟炜^[19]从鳀鱼酶解产物中分离、纯化 13 种短肽,其中 FH 具有较好的 XO 抑制活性。盛周煌^[31]从罗非鱼酶解产物分离、纯化出降尿酸肽 TSPW。本文的分析也显示所制备的酶解物其分子质量小于 1 ku 的肽占比高达 91.9%,进一步表明抑制 XO 肽主要为小分子

肽。生物活性肽的功能特性受其独特结构的影响,降尿酸肽作为一种生物活性肽也有其独特的结构。XO 存在空腔 Mo-pt,分子质量较小且具有独特结构的降尿酸肽若能进入此结构域便能对 XO 结构造成一定程度的影响。He 等^[17]发现含有 Trp、Phe 的降尿酸肽具有显著的 XO 抑制活性,并推测疏水氨基酸因更易进入 XO 活性中心的疏水空间而具有显著的 XO 抑制活性。研究结果表明,所制备酶解物其疏水性氨基酸占比最高,达到 49.61%。此外,酶解物中还含有一定的酸性氨基酸与碱性氨基酸。在配体-受体相互作用中,含有酸性、碱性氨基酸的配体因含有羧基、氨基等特殊官能团,使配体与受体蛋白残基间容易形成静电相互作用,而静电相互作用具有键能较高,距离依赖较小等特点,显著优于其它非共价键相互作用类型,推测除疏水氨基酸外,能够提供离子条件的酸性、碱性氨基酸也有助于降尿酸肽抑制 XO 酶活性。Liu 等^[32]以水稻为原料,提取活性肽并利用 Sephadex G-50 凝胶柱分离、纯化,得到降尿酸肽 AAAAGAKAR,利用分子对接技术分析其与 XO 结构间的相互作用^[33],发现除去常规的范德华力、氢键等,AAAAGAKAR 的相互作用方式还存在配体与蛋白间的电荷吸引,表明静电作用对降尿酸肽的活性也具有一定作用。

稳定性研究表明,温度、pH 值对酶解物的活性影响较小。分子质量较低的多肽一般不具有三级、四级结构,同时,降尿酸肽多为 2~10 肽,其二级结构较为稳定。推测较小分子质量提供的稳定结构是降尿酸肽受外界影响较小的原因之一。然而,酶解物受 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 金属离子的影响较大,可能是酶解物中降尿酸肽参与了部分金属离子的络合。肽段中某些氨基酸因具有咪唑基、羧基、氨基等基团,能够与 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 等金属离子形成络合物^[34],而络合产物可能增强或破坏 XO 抑制活性。组氨酸二肽具有 XO 抑制活性,肌肽作为一种组氨酸二肽具有络合部分金属离子的功能,如螯合 Zn^{2+} 治疗放射性食管炎^[35];螯合 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 以减少体内脂肪氧化反应^[36]。因此,推测金属离子对酶解物 XO 抑制活性影响和酶解物中降尿酸肽络合反应有关。酶解物经胃模拟消化 60 min 后,其 XO 抑制活性无显著变化,然而经肠模

拟消化后,其 XO 抑制率显著上升,这可能是因为酶解物在酸性条件下比较稳定,且胃蛋白酶的酶切位点一般作用于芳香族^[28],与制备降尿酸肽所用的中性蛋白酶分解类型相似;而肠模拟消化的胰蛋白酶作用位点广泛,不受氨基酸类型限制^[28],酶解物经肠模拟消化后,可能将酶解物中分子质量大于 1 ku(占比 8.1%)的肽进一步降解为小分子肽,从而使其 XO 抑制活性增加。

4 结论

本文通过单因素实验及响应面优化试验优化了鲮鱼降尿酸肽酶解工艺。结果表明,中性蛋白酶为最优蛋白酶,且在温度 40℃,酶解 pH 7.1,酶添加量 10 400 U/g,酶解时间 4 h,料液比 1:5 条件下,制备的酶解物有最佳的 XO 抑制率与水解度,分别为 $(83.91 \pm 0.16)\%$ 与 $(38.67 \pm 0.39)\%$,酶解物得率为 $(18.24 \pm 1.02)\%$ 。分子质量分布及氨基酸分析表明,酶解物中蛋白肽的分子质量一般小于 1 000 u,其氨基酸以疏水氨基酸为主。不同 pH、温度、胃模拟消化及 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 、 NH_4^{+} 离子对酶解物 XO 抑制率的影响较小,添加 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 离子可显著增加其活性,而 Fe^{2+} 及 Fe^{3+} 的存在则显著降低酶解物 XO 抑制活性。此外,经肠模拟消化后,酶解物的 XO 抑制活性显著增加。表明所制备的酶解物具有较好的 XO 抑制活性,且稳定性较好,该研究为提升鲮鱼资源精深加工水平及其活性肽制备提供一定的理论依据。

参 考 文 献

- [1] 李鑫德,李长贵.原发性痛风和高尿酸血症的精准分型及治疗研究进展[J].精准医学杂志,2018,33(6):550-554.
LI X D, LI C G. Advances in the precise typing and treatment of primary gout and hyperuricemia[J]. Journal of Precision Medicine, 2018, 33(6): 550-554.
- [2] HOWARD S S, DONNA B, JOSHUA M S. Gout: Current insights and future perspectives[J]. Journal of Pain, 2011, 12(11): 1113-1129.
- [3] YAMADA Y, YAMADA K, NOMURA N, et al. Molecular analysis of two enzyme genes, HPRT1 and PRPS1, causing X-linked inborn errors of

- purine metabolism [J]. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2010, 29(4): 291–294.
- [4] 谷光宇, 胡海龙, 郭剑超. 高尿酸血症药物治疗的研究进展[J]. *医学综述*, 2020, 26(14): 2829–2833.
GU G Y, HU H L, GUO J C. Research progress of drug therapy for hyperuricemia[J]. *Medical Recapitulate*, 2020, 26(14): 2829–2833.
- [5] 史传超. 天然植物功能因子对尿酸代谢酶调控作用机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
SHI C C. Study on regulation mechanism of natural substances on urate metabolism enzymes[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [6] 张志姣, 梁瑞鹏, 赵彤, 等. 具有降尿酸或抗痛风活性的天然产物研究进展[J]. *药学学报*, 2022, 57(6): 1679–1688.
ZHANG Z J, LIANG R P, ZHAO T, et al. Research progress of natural products for the treatment of hyperuricemia and gout [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2022, 57(6): 1679–1688.
- [7] 谢博, 傅红, 杨方. 生物活性肽的制备、分离纯化、鉴定以及构效关系研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(5): 383–391.
XIE B, FU H, YANG F. Research progress on preparation, purification, identification and structure–activity relationship of bioactive peptides[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(5): 383–391.
- [8] ILA J, JANAGARAJ K, PEER M N K, et al. Isolation and characterization of angiotensin I–converting enzyme (ACE–I) inhibition and antioxidant peptide from by–catch shrimp (*Oratosquilla woodsoni*) waste[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 29: 101770.
- [9] PETLADA K, NAPHATSAWAN P, SITTIK R, et al. Effects of fermentation periods on antioxidant and angiotensin I–converting enzyme inhibitory activities of peptides from fish sauce by–products [J]. *LWT*, 2021, 135: 110122.
- [10] 李建杰, 叶磊, 荣瑞芬. 生物活性肽的酶法制备及分离鉴定研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(2): 195–199.
LI J J, YE L, RONG R F. Research advances on enzymatic preparation and separation identification of bioactive peptides[J]. *Food Research and Development*, 2012, 33(2): 195–199.
- [11] 苗振清, 黄锡昌. 世界金枪鱼渔业现状分析[J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2002(4): 307–313.
MIAO Z Q, HUANG X C. Present situation and development of worldwide tuna fisheries[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University*, 2002(4): 307–313.
- [12] MOURENTE G, TOCHER D R. Tuna nutrition and feeds: Current status and future perspectives[J]. *Reviews in Fisheries Science*, 2009, 17(3): 373–390.
- [13] 李天翔. 鲣鱼罐头预处理工艺对鱼肉蛋白及组胺变化的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
LI T X. Effect of pretreatment processes on muscle proteins and histamine variation of canned skipjack [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.
- [14] 全晶晶. 鲣鱼高值化加工的关键技术研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2013.
QUAN J J. Research on key technology of skipjack high–value process[D]. Ningbo: Ningbo University, 2013.
- [15] 李守江, 孔祥佳, 刘智禹, 等. 响应面试验优化酶解法制备鲣鱼活性肽及其对小鼠抗疲劳的影响[J]. *康复学报*, 2022, 32(5): 407–418.
LI S J, GUI X J, LIU Z Y, et al. Optimization of preparation of bioactive peptide by enzymatic hydrolysis in *Katsuwonus pelamis* using response surface methodology and its anti–fatigue effect on mice [J]. *Rehabilitation Medicine*, 2022, 32(5): 407–418.
- [16] 易冲. 鲣鱼(*Katsuwonus pelamis*)寡肽 SEP–3 对睡眠剥夺小鼠肝脏损伤的修复作用及机制探究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2022.
YI C. Repair effect and mechanism of skipjack(*Katsuwonus pelamis*) oligopeptides on liver injury in sleep deprived mice[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2022.
- [17] HE W W, SU G W, SUN–WATERHOUSE D X, et al. *In vivo* anti–hyperuricemic and xanthine oxidase inhibitory properties of tuna protein hydrolysates and its isolated fractions[J]. *Food Chemistry*, 2018, 272: 453–461.
- [18] 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.
ZOU L. Enzymatic preparation and functional evaluation of xanthine oxidase inhibitory peptides from skipjack tuna [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [19] 何伟炜. 金枪鱼黄嘌呤氧化酶抑制肽的分离鉴定及其作用机制初探[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.

- HE W W. Study on identification and mechanism of xanthine oxidase inhibitory peptides from tuna protein[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.
- [20] LI Z Q, WANG W. Spectrophotometric assay of xanthine oxidase activity in cell extracts applying horseradish peroxidase[J]. Chemistry & Bioengineering, 2008, 11: 75–78.
- [21] 杨柳, 康小燕, 梁明, 等. 筛选降尿酸肽的体外测定方法的建立与优化[J]. 现代食品科技, 2018, 34(4): 249–257.
- YANG L, KANG X Y, LIANG M, et al. Establishment and optimization of an *in-vitro* method for screening anti-hyperuricemic peptides[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(4): 249–257.
- [22] 李美娜, 黎德佳, 谢景, 等. 鲮鱼鱼鳞蛋白的酶解制备工艺及其抗氧化活性[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(19): 86–89.
- LI M N, LI D J, XIE J, et al. Study on enzymatic hydrolysis preparation and antioxidant activity of protein from carp scales[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(19): 86–89.
- [23] 邹琳, 杭妙佳, 李阳, 等. 鲮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.
- ZOU L, HANG M J, LI Y, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process for preparing xanthine oxidase inhibitory peptides from skipjack tuna[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2019, 45(5): 550–562.
- [24] 王乐, 李享, 刘文营, 等. 清酱肉体外模拟消化后粗肽的抗氧化活性和氨基酸分析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(2): 319–326.
- WANG L, LI X, LIU W Y, et al. Antioxidant activities and amino acid composition of crude peptides extracted from pickled sauced meat after *in vitro* simulated gastrointestinal digestion[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(2): 319–326.
- [25] 马天新. 黑鱼鱼肉 ACE 抑制肽的制备及快速筛选[D]. 南昌: 江西师范大学, 2021.
- MA T X. Preparation and rapid screening of ACE inhibitor peptides from *channa striatus*[D]. Nanchang: Jiangxi Normal University, 2021.
- [26] 赵谋明, 徐巨才, 刘洋, 等. 秋刀鱼制备黄嘌呤氧化酶抑制肽的工艺优化[J]. 农业工程学报, 2015, 31(14): 291–297.
- ZHAO M M, XU J C, LIU Y, et al. Technology optimization on preparation of XOD inhibition peptide from saury[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2015, 31(14): 291–297.
- [27] 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.
- LI Q Y. Study on the structure-activity mechanism of targeting inhibition of xanthine oxidase by uric acid-lowering peptides derived from walnut[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [28] 步婷婷. 低苯丙氨酸乳清蛋白水解物制备及其调控骨合成作用的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- BU T T. Studies on the preparation of low-phenylalanine whey hydrolysate and its regulation on bone formation[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.
- [29] 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 anti-hyperuricemic peptides[J]. Food & Function, 2018, 9(1): 107–116.
- [30] NONGONIERMA A B, FITZGERALD R J. Tryptophan-containing milk protein-derived dipeptides inhibit xanthine oxidase[J]. Peptides, 2012, 37(2): 263–272.
- [31] 盛周煌. 罗非鱼皮胶原蛋白降尿酸活性肽的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- SHENG Z H. Study on uric acid-reducing peptide of tilapia skin collagen[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [32] LIU N X, WANG Y, YANG M F, et al. A new rice-derived short peptide potentially alleviated hyperuricemia induced by potassium oxonate in rats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 67(1): 220–228.
- [33] 袁祺, 程述震, 吴迪, 等. 黄嘌呤氧化酶肽类抑制剂的进展[J]. 食品科学, 2022, 43(11): 355–363.
- YUAN Z, CHENG S Z, WU D, et al. Advances in research on xanthine oxidase inhibitory peptides[J]. Food Science, 2022, 43(11): 355–363.
- [34] NAZIM H, RIAZ M. Mitigation of Cu(II)-induced damage in human blood cells by carnosine: An *in vitro* study[J]. Toxicology in Vitro, 2020, 68: 104956.

- [35] YANASE K, FUNAGUCHI N, IIHARA H, et al. Prevention of radiation esophagitis by polaprezinc (zinc *L*-carnosine) in patients with non-small cell lung cancer who received chemoradiotherapy [J]. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015, 8(9): 16215.
- [36] 王西汐, 李雯晖, 张健, 等. 组氨酸二肽及其功能

性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(7): 213–218.

WANG X X, LI W H, ZHANG J, et al. Progress in investigations of histidine dipeptide and its functions[J]. Food Research and Development, 2022, 43(7): 213–218.

Preparation, Analysis and the Stability of the Enzymatic Hydrolysate of Hypouricemic Peptide from *Katsuwonos pelamis*

Jiang Han¹, Zhang Wu², He Luyao¹, Cao Shaoqian¹, Yang Hua¹, Qi Xiangyang^{1*}

(¹College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang

²College of Food Sciences & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract In this paper, the preparation technology, analysis and stability of hypouricemic peptide from *Katsuwonos pelamis* were discussed. Taking the inhibitory activity of xanthine oxidase (XO) and the hydrolysis degree as indicators, enzymatic hydrolysis process of hypouricemic peptide was optimized, and the molecular weight, amino acid composition and stability of the hydrolysate were also analyzed. The results showed that the neutral protease was the most suitable protease for preparing the hypouricemic peptide of *Katsuwonos pelamis*, through single factor and response surface optimization tests, the optimal process conditions were determined of 40 °C temperature, pH 7.1, 10 400 U/g enzyme addition, enzymolysis time 4 h and material to liquid ratio 1:5 (g/mL). Under these conditions, the XO inhibition rate and hydrolysis degree of the prepared enzymatic hydrolysate were (83.91±0.16)% and (38.67±0.39)% respectively, and its yield was (18.24±1.02)%. Molecular weight distribution and amino acid analysis showed that the prepared hypouricemic hydrolysate was mainly composed of small molecular peptides, whose molecular weight less than 1 ku and hydrophobic amino acids accounted for 91.9% and 49.61% respectively. The prepared hypouricemic hydrolysate had good stability to heat, acid and alkali as well as metal ions such as Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺, K⁺, Na⁺ and NH⁺. Adding Zn²⁺ and Cu²⁺ could significantly increase the XO inhibitory activity of hydrolysate, whereas the presence of Fe²⁺ and Fe³⁺ significantly reduced the XO inhibitory activity. In addition, the enzymatic hydrolysate was relatively stable in the gastrointestinal simulated digestion environment, and its XO inhibitory activity was significantly enhanced after *in vitro* intestinal simulated digestion. This study provides a theoretical basis for the deep and high value-added utilization of *Katsuwonos pelamis* resources.

Keywords *Katsuwonos pelamis*; hypouricemic peptide; enzymatic hydrolysate; preparation; characteristic