

臧薇, 曹荣, 孙国辉, 等. 蛋白核小球藻黄嘌呤氧化酶抑制肽的酶法制备及活性分析 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(9): 248–257. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050032

ZANG Wei, CAO Rong, SUN Guohui, et al. Enzymatic Preparation and Activity Analysis of Xanthine Oxidase Inhibitory Peptide from *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(9): 248–257. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050032

· 工艺技术 ·

蛋白核小球藻黄嘌呤氧化酶抑制肽的酶法制备及活性分析

臧薇^{1,2}, 曹荣², 孙国辉², 赵玲², 王珊珊^{2,*}, 薛勇^{1,*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东青岛 266071)

摘要: 挖掘蛋白核小球藻肽对黄嘌呤氧化酶 (Xanthine oxidase, XOD) 的抑制活性, 能够为高尿酸血症的预防和治疗策略提供科学依据, 并有助于促进微藻资源的综合利用。本研究选取蛋白核小球藻为原料提取蛋白, 以黄嘌呤氧化酶抑制率和水解度 (Degree of hydrolysis, DH) 为评估指标, 通过单因素和响应面实验优化最佳酶解工艺条件, 并对 XOD 抑制肽进行深入分析。结果显示, 木瓜蛋白酶为最适蛋白酶, 最佳酶解条件为 pH7.0, 酶解温度 48.0 °C, 酶解时间 4.0 h, 加酶量 2000 U/g, 底物浓度 10 mg/mL。此时理论抑制率为 73.78%, 实际抑制率达 71.56%±0.51%。蛋白核小球藻 XOD 抑制肽在氨基酸组成上模式合理, 必需氨基酸、疏水性氨基酸及碱性氨基酸的含量分别为 43.17%、45.07% 和 14.15%。该肽表现出较好的胃肠道消化稳定性, 但在高温和强酸、强碱性条件下抑制能力下降, 对 Fe²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺ 和 Mg²⁺ 等金属离子较为敏感。该肽相对分子质量主要集中于 1 kDa 以下, 超滤得到的 <3 kDa 组分 XOD 抑制活性最高, 其 IC₅₀ 为 (5.23±0.68) mg/mL。本研究食源性降尿酸肽的开发利用提供理论参考。

关键词: 蛋白核小球藻, 酶解工艺, 黄嘌呤氧化酶抑制肽, 氨基酸组成, 分子量

中图分类号: TS254.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2026)09-0248-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050032



本文网刊:

Enzymatic Preparation and Activity Analysis of Xanthine Oxidase Inhibitory Peptide from *Chlorella pyrenoidosa*

ZANG Wei^{1,2}, CAO Rong², SUN Guohui², ZHAO Ling², WANG Shanshan^{2,*}, XUE Yong^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Exploring the xanthine oxidase (XOD) inhibitory peptide from *Chlorella pyrenoidosa* could provide a scientific basis for hyperuricemia prevention and treatment strategies, and promote the comprehensive utilization of microalgal protein resources. In this study, *Chlorella pyrenoidosa* was used as the raw material to extract proteins. With the XOD inhibition rate and the degree of hydrolysis (DH) as evaluation indicators, the optimal enzymatic hydrolysis conditions were optimized through single-factor and response surface experiments. Based on this, further analysis of XOD inhibitory peptide was conducted. The results showed that papain was the most suitable protease, and the optimal enzymatic hydrolysis conditions were pH7.0, hydrolysis temperature 48.0 °C, hydrolysis time 4.0 h, enzyme dosage 2000 U/g, and substrate concentration 10 mg/mL. Under these conditions, the theoretical inhibition rate was 73.78%, and the actual inhibition rate reached 71.56%±0.51%. The amino acid composition of *Chlorella pyrenoidosa* XOD inhibitory peptide was

收稿日期: 2025-05-08

基金项目: 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费资助 (20603022024010); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助 (2023TD72)。

作者简介: 臧薇 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工, E-mail: zangwei2023@163.com。

* 通信作者: 王珊珊 (1984-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 水产品精深加工, E-mail: wangss@ysfri.ac.cn。

薛勇 (1976-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品加工, E-mail: xueyong@ouc.edu.cn。

reasonable, with essential amino acids, hydrophobic amino acids, and basic amino acids accounting for 43.17%, 45.07%, and 14.15% of the total, respectively. Additionally, they exhibited moderate stability under gastrointestinal digestion conditions, but their inhibitory activity decreased significantly under high temperature or strong acid/alkaline conditions. They were also relatively sensitive to metal ions such as Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} and Mg^{2+} . The relative molecular mass mainly concentrated below 1 kDa, and the ultrafiltered fraction with a molecular weight <3 kDa showed the highest XOD inhibitory activity, with an IC_{50} of (5.23 ± 0.68) mg/mL. This study provides a theoretical reference for the development and utilization of food-derived uric acid-lowering peptides.

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*; enzymatic hydrolysis process; xanthine oxidase inhibitory peptide; amino acid composition; molecular mass

微藻是一种形态微小、结构简单的光合自养单细胞微生物, 普遍分布于海洋及淡水湖泊^[1]。其生长繁殖速率快; 培养方式灵活, 且不占用耕地资源; 含有丰富营养素及大量生物活性物质, 例如蛋白质、多糖、多不饱和脂肪酸、 β -胡萝卜素及虾青素等^[2]。当今世界人口激增, 资源匮乏现象尤为严重, 基于食品健康及可持续性发展的需求, 微藻成为最有发展潜力的粮食替代物之一^[3]。蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)属于绿藻门小球藻属, 富含大量优质蛋白, 约占其干重的 50%~65%, 是一种优良的可持续性未来食品蛋白质来源^[4-5]。2012 年, 国家卫计委批准其为新资源食品^[6]。同时, 研究发现蛋白核小球藻酶解肽具有多种生物功效, 是制备生物活性肽的优质原料, 如: 林雯等^[7]从蛋白核小球藻酶解肽中筛选出具有降脂效果的多肽, 并在秀丽隐杆线虫中验证该肽段能够抑制高糖饮食线虫体内 22.5% 的脂肪沉积; Suo 等^[8]利用胰蛋白酶制备蛋白核小球藻酶解产物, 经分离纯化, 获得具有降血压活性的肽段 LVAKA, 其体外 ACE 抑制活性 IC_{50} 达 $26.66 \mu\text{mol/L}$ 。目前国内外对蛋白核小球藻精深加工的研究仍十分有限, 对其生物活性肽进一步开发利用亟需研究。

高尿酸血症(Hyperuricemia, HUA)是一种由嘌呤代谢紊乱导致尿酸生成过多的慢性疾病, 其典型病症包括痛风和尿酸性肾结石, 长期 HUA 还可能引起心血管疾病等一系列代谢综合征^[9]。近几十年来, 我国 HUA 患病率呈逐年上升趋势(大陆高达 16.4%), 发病年龄趋于年轻化^[10]。黄嘌呤氧化酶是人体内尿酸生成过程中的关键酶, 主要作用是以黄嘌呤为中间体, 催化次黄嘌呤羟基化生成尿酸^[11]。因此, 可通过抑制 XOD 活性来降低血清中尿酸水平, 以达到缓解或治疗 HUA 的目的。目前已开发出别嘌呤醇和非布他司等基于 XOD 活性调节的降尿酸药物。但此类药物使用剂量过大或时间过长时可能产生不良反应, 例如引起肝肾损伤、胃肠道不适、过敏和心血管损害等^[12-13]。近年来, 已有大量研究发现具有降尿酸功效的天然产物能够与 XOD 相互作用、改变其空间结构, 从而使酶活性降低或使酶失活^[14]。其中, 食源性降尿酸肽因其活性高、稳定性好、特异性强等优点而受到研究者的广泛关注^[11]。Zhu 等^[15]发现水稻肽和胶原蛋白肽能够通过抑制 XOD 活性, 有效降低高

尿酸血症小鼠血清中的尿酸水平; Wei 等^[16]研究表明高浓度鳀鱼肽可降低高尿酸血症小鼠的血清尿酸水平、血清肌酐水平、血尿素氮水平和肝黄嘌呤氧化酶活性; 芸豆水解物中鉴定出具有较强 XOD 抑制活性的六肽 DWYDIK, 其抑制率达 $68.63\% \pm 5.07\%$, 可通过疏水通道与 XOD 关键氨基酸形成氢键^[17]。

虽然陆地和海洋生物来源的降尿酸肽已被大量研究, 但微藻来源的降尿酸肽研究仍鲜有报道。本研究拟采用蛋白核小球藻干粉为原料提取粗蛋白, 以 XOD 抑制率和水解度为指标, 根据单因素和响应面试验优化出蛋白核小球藻 XOD 抑制肽的最佳酶解条件, 并对其氨基酸组成、稳定性、分子量分布和不同超滤组分 XOD 抑制活性进行分析。本研究可为蛋白核小球藻的高质化利用提供理论依据, 同时也为食源性降尿酸肽的开发提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蛋白核小球藻藻粉 上海光语生物科技有限公司; 硫酸钾、硫酸铜、盐酸 均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 浓硫酸 分析纯, 烟台远东精细化工公司; 木瓜蛋白酶(8×10^5 U/g)、中性蛋白酶(5×10^4 U/g)、胃蛋白酶(3000 U/g)、风味蛋白酶(3×10^4 U/g)、胰蛋白酶(2.5×10^5 U/g)、黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶(8.16 U/mL) 北京索莱宝科技有限公司; 碱性蛋白酶(2×10^5 U/g) 上海源叶生物科技有限公司; 3 kDa 离心超滤管 美国 Millipore 公司; BeyoGold™ 96 孔透明平地 UV 板、BCA 蛋白试剂盒 上海碧云天生物技术股份有限公司。

SH220F 石墨消解仪、K9840 自动凯氏定氮仪 海能未来技术集团股份有限公司; LX1211 箱式高温电阻炉 天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司; HWCJ-6S 恒温磁力搅拌水浴锅 常州市春秋电子仪器有限公司; SHA-B 水浴恒温振荡器 常州国宇仪器制造有限公司; FE20 实验室 pH 计 上海梅特勒-托利多(Mettler Toledo)公司; Christ 冷冻干燥机 德国 Marin Christ 公司; UV-5100 紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司; H1850 离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; Multi Go15010 酶标仪 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白核小球藻基本组分测定 蛋白质、脂肪、灰分、水分、多糖和粗纤维含量测定分别依据 GB 5009.5-2016《食品安全国家标准 凯氏定氮法》^[18]、GB 5009.6-2016《食品安全国家标准 索氏提取法》^[19]、GB 5009.4-2016《食品安全国家标准 灼烧称量法》^[20]、GB 5009.3-2016《食品安全国家标准 直接干燥法》^[21]、SN/T 4260-2015《出口植物源食品中粗多糖的测定 苯酚-硫酸法》^[22]和 GB/T 5009.10-2003《植物类食品中粗纤维的测定》^[23]。

1.2.2 蛋白核小球藻蛋白的提取 参考黄素艳等^[24]的方法并略作修改。取适量的蛋白核小球藻干粉与蒸馏水以料液比 1:15(g/mL)混匀, 4 ℃溶胀 24 h。后置于-50 ℃冰箱冻结 6 h, 此操作反复 4 次以上。再用 2 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 9.0, 搅拌浸提 4 h 后 4000 r/min 离心 20 min。取上清液用 2 mol/L HCl 溶液调 pH 至最佳沉淀点 4.0, 静置至无沉淀生成, 离心收集蛋白沉淀并透析 72 h, 冻干得粗蛋白粉。

$$\text{粗蛋白得率}(\%) = \frac{A}{B} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中, A 为粗蛋白粉质量, g; B 为原料总质量, g。

1.2.3 蛋白核小球藻蛋白肽的酶解制备 参考 Hou 等^[25]的方法, 称取一定量的粗蛋白粉, 按适当底物浓度溶解于蒸馏水中, 调节 pH 后加入蛋白酶, 在适宜温度下进行酶解, 对反应液进行沸水浴灭酶 15 min。冷却至室温后, 经离心(8000 r/min, 20 min)收集上清液得酶解液, 冻干后冷藏备用。

1.2.3.1 蛋白酶的筛选 选取木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胃蛋白酶和风味蛋白酶 5 种商品蛋白酶, 在底物浓度 10 mg/mL, 加酶量 2000 U/g, 酶解时间 4 h, 在各种酶的最适温度(均为 50 ℃)和 pH(分别为 7.0、7.0、8.5、2.0 和 7.5)下进行酶解。以 XOD 抑制率和水解度为指标, 筛选出最优蛋白酶进行工艺优化。

1.2.3.2 单因素实验 选择最适蛋白酶, 固定条件为底物浓度 10 mg/mL、酶解 pH 7.0、酶解温度 48.00 ℃、酶解时间 4.0 h 和加酶量 2000 U/g, 分别考察底物浓度(4、6、8、10、12 mg/mL)、酶解时间(2、3、4、5、6 h)、酶解温度(40、45、50、55、60、65 ℃)、酶解 pH(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)和加酶量(500、1000、1500、2000、2500、3000 U/g)对 XOD 抑制率的影响。

1.2.3.3 响应面优化试验 基于单因素实验的结果, 选定 XOD 抑制率作为响应指标, 运用 Design-Expert

13.0 软件中的 Box-Behnken 方法, 设计涉及酶解温度(℃)、酶解时间(h)以及酶解 pH 的三因素三水平响应面试验(表 1)。

1.2.4 XOD 抑制率的测定 参考邹琳^[26]的方法并稍作调整。首先, 在 96 孔板中加入 100 μL 待测样品(10 mg/mL)和 50 μL XOD 溶液(0.02 U/mL), 振荡 30 s 以确保混合均匀, 25 ℃下保温 5 min。加入 50 μL 黄嘌呤溶液(0.48 mmol/L), 再次振荡 30 s 混合, 继续在 25 ℃下保温 25 min。最后, 在 290 nm 波长下测定吸光度。XOD 抑制率的计算公式如下:

$$\text{XOD抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4}\right) \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中, A_1 代表加入酶后的样品溶液的吸光度; A_2 代表未加入酶的样品溶液的吸光度; A_3 代表以缓冲液替代样品溶液作为空白对照时的吸光度; A_4 则代表该空白对照中未加入酶的吸光度。

1.2.5 水解度的测定 茚三酮比色法^[27]可以有效测定蛋白质水解溶液中氨基酸生成量, 凯氏定氮法测定原料中总氮含量, 最终可以准确地计算出样品的水解度。公式如下:

$$\text{DH}(\%) = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中, DH 指蛋白质分子中由于酶法水解而断裂的肽键占蛋白质分子中总肽键数的比例; h 代表水解后每 g 蛋白质被裂解的肽键数, mmol/g; h_{tot} 代表每 g 原料蛋白质中的肽键数, mmol/g。

1.2.6 多肽蛋白纯度的测定 参考张钧橙等^[28]的方法, 采用 BCA 蛋白试剂盒对最佳酶解条件下所制备的多肽浓度进行检测。

1.2.7 氨基酸组成分析 参考 GB 5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》和 GB 5009.294-2023《食品安全国家标准 食品中色氨酸的测定》对酶解物氨基酸组成进行分析^[29]。

1.2.8 稳定性研究

1.2.8.1 不同温度、pH 以及金属离子环境对稳定性的影响 配制浓度为 10 mg/mL 的样品溶液, 分别将样品溶液在不同温度(4、25、37、50、80 和 100 ℃)、不同 pH(4.0、6.0、7.0、8.0、10.0 和 12.0)以及不同金属离子环境下(K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} , 离子浓度均为 500 μg/mL)放置 2 h, 评估其在不同条件下的稳定性。

1.2.8.2 模拟胃肠道消化对稳定性的影响 参考孙菁茹等^[30]的方法并略作修改。将 10 mg/mL 样品溶液用 1 mol/L HCl 溶液调 pH 至 2.0, 加入底物质量分数 2% 的胃蛋白酶, 37 ℃水浴反应 2 h, 取 10 mL 消化液水浴灭酶, 冷却至室温后离心取上清液, 随后 4 ℃保存; 剩余胃消化溶液用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.5, 加入底物质量分数 2% 胰蛋白酶溶液, 37 ℃水浴反应 2 h, 水浴灭酶, 冷却至室温后离心取

表 1 响应面因素和水平设计

Table 1 Response surface factors and horizontal design

水平	A酶解温度(℃)	B酶解时间(h)	C酶解pH
-1	45	3	6.5
0	50	4	7.0
1	55	5	7.5

上清液,分别测定经胃液和肠液消化后样品溶液的 XOD 抑制率。

1.2.9 肽分子量分布 依照 GB/T 22729-2008《海洋鱼低聚肽粉》^[31]中的高效液相色谱法,配制浓度为 2 mg/mL 的样品溶液并过膜,对其进行分子量分布的测定。

1.2.10 超滤分离 配制浓度为 10 mg/mL 样品溶液并过膜,采用 3 kDa 超滤膜进行超滤,分别收集不同组分,冷冻干燥后测定其 XOD 抑制率。通过软件 Origin 2024,使用非线性回归分析拟合曲线并计算各组分的 IC₅₀ 值。

1.3 数据处理

所有实验均独立重复 3 次,采用软件 IBM SPSS Statistics 27.0.1 对实验数据进行 ANOVA 单因素方差分析、显著性差异分析($P < 0.05$ 差异显著, $P < 0.01$ 差异极显著);借助 Origin 2024 软件,对实验数据进行可视化处理并作图,数据结果均以(平均值±标准差)表示。

2 结果与分析

2.1 蛋白核小球藻蛋白的提取

基本组分分析结果表明,蛋白核小球藻藻粉中蛋白含量最高,为 59.81%±0.29%,高于莱茵衣藻(48%)和微拟球藻蛋白含量(47%)^[32],其粗脂肪、多糖、水分、灰分和粗纤维含量均较低,分别为 3.48%±0.00%、12.99%±0.46%、6.30%±0.00%、5.54%±0.00% 和 9.90%±1.71%,表明蛋白核小球藻是提取微藻蛋白的良好原料。采用浸提溶胀、循环冻融和碱提酸沉联合提取方法,经冷冻干燥得到粗蛋白,其得率为 25.78%。粗蛋白冻干粉经凯氏定氮法测得蛋白含量为 65.05%,提取结果表明大部分蛋白质已被有效分离,能够满足后续酶解实验的需求。

2.2 蛋白核小球藻蛋白的酶解工艺优化

2.2.1 蛋白酶的筛选 以 XOD 抑制率和 DH 为指

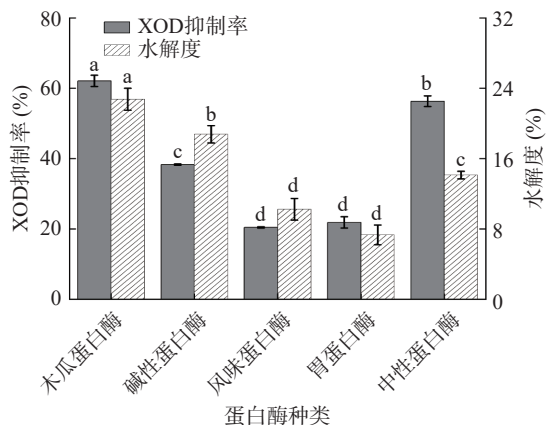


图 1 蛋白酶种类对 XOD 抑制率和水解度的影响

Fig.1 Effect of protease types on the XOD inhibitory rate and DH

注:不同字母表示同一指标间差异显著($P < 0.05$),图 2、图 4、图 5 同。

标,分别在五种酶的最适温度和 pH 下进行酶解。由图 1 可知,XOD 抑制率和 DH 的变化趋势大体一致,与其他 4 种酶相比,木瓜蛋白酶的 XOD 抑制率和 DH 最高,分别可达 62.12%±1.62% 和 22.75%±1.25%,中性蛋白酶的 XOD 抑制率次之。这可能是由于蛋白酶对底物结构的选择有特异性,木瓜蛋白酶主要作用于羧基端含有精氨酸、甘氨酸、赖氨酸等氨基酸残基的肽键,其切割释放的肽段对 XOD 具有较好的抑制活性作用^[33]。因此,选用木瓜蛋白酶制备酶解液。

2.2.2 单因素实验

2.2.2.1 底物浓度 由图 2(a)可知,随着底物浓度的增加,XOD 抑制率先迅速上升后缓慢下降,当底物浓度为 10 mg/mL 时,XOD 抑制率达到最大值 65.08%±1.48%,当底物浓度升至 12 mg/mL 时,XOD 抑制率显著下降($P < 0.05$)。随着底物浓度的增大,酶的活性位点与底物的接触几率增大,酶解后产生的高活性肽段随之增加;底物浓度过高时,底物分子扩散受阻,催化位点被占据,导致酶促反应受到限制^[34]。因此,选取 10 mg/mL 为最佳底物浓度。

2.2.2.2 酶解时间 图 2(b)显示,XOD 抑制率随酶解时间延长呈现先上升后下降的趋势。当酶解 4 h 时,其抑制率最高达 65.06%±2.80%,显著高于其他时间($P < 0.05$),在酶解 5 h 后抑制效果趋于平缓。这可能是由于反应时间过长,过度酶解可能导致原有的高活性肽段被破坏,酶解液失去抑制活性^[35]。因此,选取酶解时间 3、4、5 h 进行后续酶解优化试验。

2.2.2.3 酶解温度 由图 2(c)可知,酶解温度过高或过低均会导致酶解产物 XOD 抑制活性下降。当酶解温度为 50 °C 时,XOD 抑制效果最明显,抑制率为 65.16%±1.6%。木瓜蛋白酶的最适温度为 50 °C,低于最适温度时分子扩散速率较慢,酶与底物作用不充分,高温则导致酶部分失活^[36]。因此,选取酶解温度 45、50、55 °C 进行后续酶解优化试验。

2.2.2.4 酶解 pH 由图 2(d)可知,随着酶解 pH 的增大,XOD 抑制率表现出先增加后减小的趋势。当酶解体系 pH 为 7.0 时,抑制效果最佳。pH 偏高或者偏低可能会影响酶的构象变化,造成催化性能降低^[37]。因此,选取 pH 6.5、7.0、7.5 进行后续酶解优化试验。

2.2.2.5 加酶量 随着加酶量增加,XOD 抑制效果先缓慢增加,在加酶量为 2000 U/g 时 XOD 抑制率最大;当加酶量继续增高时,XOD 抑制率迅速显著降低($P < 0.05$)(图 2(e))。加酶量不足时,底物分子无法与酶的活性位点充分接触;当加酶量过高时,活性肽分子被过度水解,造成酶与底物的物料浪费^[38];另外,与其他单因素条件相比,不同加酶量条件下,XOD 抑制率变化幅度较小,因此,结合实际确定加酶量为 2000 U/g。

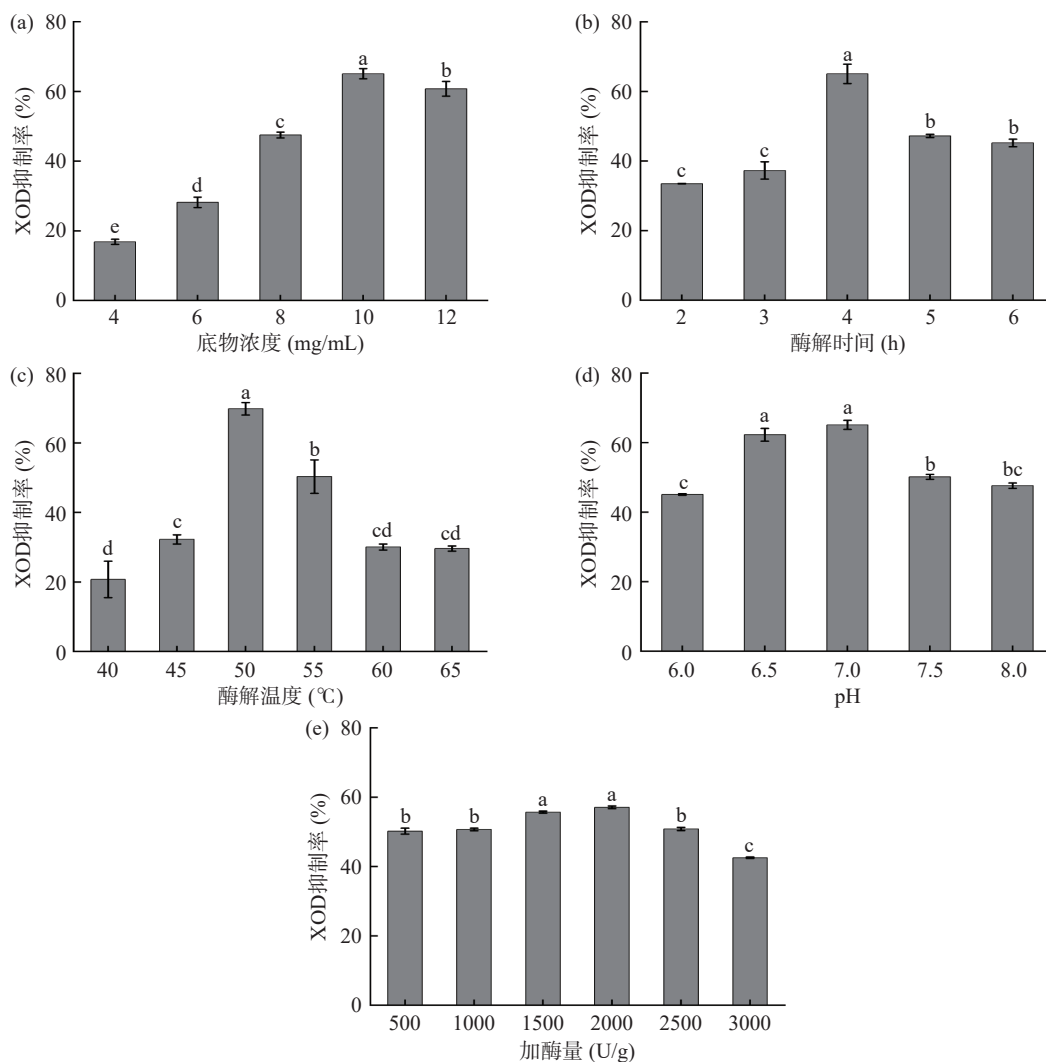


图2 不同酶解条件对蛋白核小球藻酶解效果的影响

Fig.2 Effects of different enzymatic conditions on the enzymatic hydrolysis efficiency of *Chlorella pyrenoidosa*

2.2.3 响应面试验

2.2.3.1 响应面设计及其结果 根据单因素的实验结果,选择酶解温度、酶解时间和酶解 pH。以 XOD 抑制率为响应值进行三因素三水平响应面优化试验,试验结果见表 2。

2.2.3.2 响应面回归模型的建立及方差分析 利用 Design-Expert 13 对响应面设计所得数据进行多元回归拟合分析,得到 XOD 抑制效果对 A(酶解温度)、B(酶解时间)和 C(酶解 pH)的二次回归

方程:

$$Y=72.89-1.77A+0.9475B+4.36C+3.33AB-0.1925AC-0.0450BC-2.95A^2-2.59B^2-7.95C^2$$

从表 3 可知,回归模型(P=0.0002)极显著,失拟项(P=0.4373)不显著,R²=0.9669,R²_{adj}=0.9244,说明该模型可以较为准确地预测酶解工艺参数。因素的 F 值越大,表明该因素对 XOD 抑制率影响程度越大,因此,三因素对 XOD 抑制率影响大小为:C(酶解 pH)>A(酶解温度)>B(酶解时间)。

表 2 响应面设计及其结果

Table 2 Design and results of response surface experimental

试验号	A酶解温度	B酶解时间	C酶解pH	Y XOD抑制率(%)	试验号	A酶解温度	B酶解时间	C酶解pH	Y XOD抑制率(%)
1	-1	-1	0	72.82	10	0	0	0	73.74
2	-1	0	-1	58.87	11	0	0	0	70.32
3	-1	0	1	68.10	12	0	0	0	73.11
4	-1	1	7	66.00	13	0	0	0	74.73
5	0	-1	-1	56.02	14	1	-1	0	62.06
6	0	-1	1	64.72	15	1	0	-1	56.28
7	0	1	-1	60.07	16	1	0	1	64.74
8	0	1	1	68.59	17	1	1	0	68.54
9	0	0	0	72.57					

表 3 回归模型方差分析
Table 3 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	586.28	9	65.14	22.73	0.0002	**
A(酶解温度)	25.10	1	25.10	8.76	0.0211	*
B(酶解时间)	7.18	1	7.18	2.51	0.1575	
C(酶解pH)	152.34	1	152.34	53.15	0.0002	**
AB	44.22	1	44.22	15.43	0.0057	**
AC	0.1482	1	0.1482	0.0517	0.8266	
BC	0.0081	1	0.0081	0.0028	0.9591	
A ²	36.54	1	36.54	12.75	0.0091	**
B ²	28.32	1	28.32	9.88	0.0163	*
C ²	266.17	1	266.17	92.86	<0.0001	**
残差	20.06	7	2.87			
失拟项	9.20	3	3.07	1.13	0.4373	不显著
纯误差	10.86	4	2.72			
总和	606.35	16				

注: *表示显著差异(P<0.05), **表示极显著差异(P<0.01)。

2.2.3.3 响应面交互作用分析 如图 3 所示, AB 的等高线趋于椭圆形且密集程度高, 说明酶解时间和酶解温度交互作用强, 两因素交互对 XOD 抑制率的影响更显著; BC 和 AC 的等高线稀疏且不趋于椭圆, 说明酶解时间与酶解 pH、酶解温度和酶解 pH 的两两交互作用较弱且不显著。由 3D 响应面图可知, 坡度最陡峭的因素是酶解 pH, 可见其对 XOD 抑制活性影响最为显著; 其次是酶解温度, 酶解时间的坡度最平缓, 说明其对 XOD 抑制率影响较小。响应面交互作用结果与方差结果保持一致。

2.2.3.4 最优条件及工艺验证 利用 Design-Expert

13 预测的酶解液最佳酶解工艺为 pH7.139, 酶解温度 48.369 °C, 酶解时间 3.972 h, 理论 XOD 抑制率为 73.78%。结合实际生产应用, 将酶解工艺适当调整为 pH7.0, 酶解温度 48.00 °C, 酶解时间 4.0 h, 并同时加酶量 2000 U/g, 底物浓度 10 mg/mL 的条件下进行验证实验, 测定 XOD 抑制率达 71.56%±0.51%, 表明该模型对酶解工艺的预测有较高的准确度, 具有一定的可行性。

将酶解产物冻干处理, 获得肽粉后, 将其溶解并配制成浓度为 0.5 mg/mL 的溶液。由 BCA 蛋白试剂盒测得蛋白核小球藻多肽的蛋白纯度较高为 84.29%±0.38%, 与响应面法优化制备的小麦抗氧化活性肽蛋白纯度 85%±0.16% 相近^[28], 能够有效避免某些杂质对后续实验造成干扰。

2.3 氨基酸组成分析

由表 4 可知, 氨基酸组成中必需氨基酸占比为 43.17%, 高于联合国粮食及农业组织/世界卫生组织倡议的理想蛋白规定(40%), 表明其具有较高的营养价值。疏水性氨基酸占比为 45.07%, 高于藜麦多肽(34.11%)^[39], 与羊骨多肽含量接近(43.20%)^[40]。据报道, XOD 是一种含钼(Mo)酶, 其中 Mo 结构域是关键活性位点, 底物黄嘌呤可通过一个狭窄的疏水通道进入 Mo 结构域。富含疏水性氨基酸的活性肽段更容易通过疏水作用与 XOD 中特定的氨基酸残基或 Mo 活性位点相互作用, 进而发挥抑制作用^[41-42]。此外, 研究表明芳香族氨基酸与碱性氨基酸对活性肽段的 XOD 抑制活性也有较大贡献, 芳香族氨基酸与

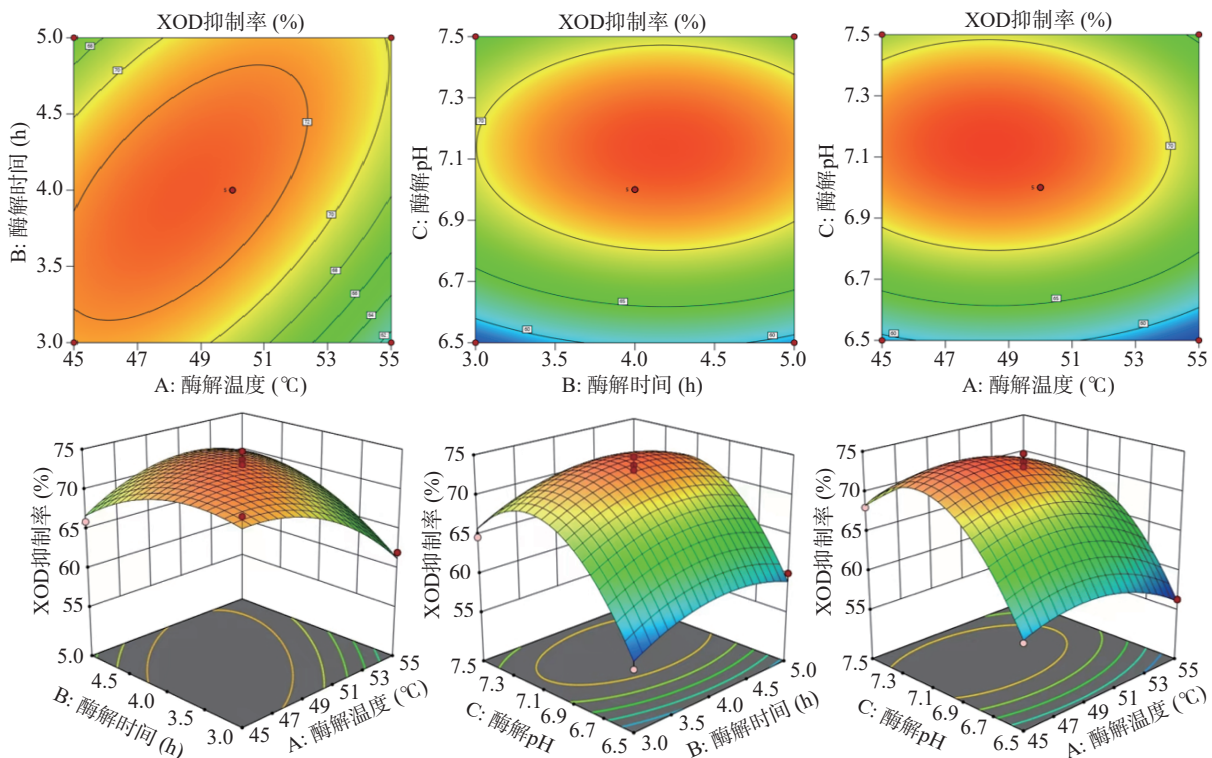


图 3 各因素交互作用对 XOD 抑制率的影响

Fig.3 Effects of interaction of various factors on the XOD inhibition rate

表4 蛋白核小球藻 XOD 抑制肽氨基酸组成
Table 4 Amino acid composition of *Chlorella pyrenoidosa* XOD inhibitory peptide

项目	相对百分含量(%)
天冬氨酸(Asp)	10.57±0.22
苏氨酸(Thr)	5.38±0.25
丝氨酸(Ser)	3.23±0.34
谷氨酸(Glu)	11.56±0.10
甘氨酸(Gly)	5.64±0.15
丙氨酸(Ala)	8.53±0.33
胱氨酸(Cys)	0.56±0.00
缬氨酸(Val)	7.80±0.04
蛋氨酸(Met)	2.13±0.67
异亮氨酸(Ile)	5.40±0.01
亮氨酸(Leu)	9.88±0.06
酪氨酸(Tyr)	3.83±0.08
苯丙氨酸(Phe)	5.47±0.07
赖氨酸(Lys)	5.92±0.11
组氨酸(His)	1.79±0.04
精氨酸(Arg)	6.44±0.01
脯氨酸(Pro)	4.67±0.24
色氨酸(Trp)	1.18±0.31
必需氨基酸(EAA)	43.17±3.62
疏水性氨基酸(HAA)	45.07±0.78
碱性氨基酸(BAA)	14.15±0.05
芳香族氨基酸(AAA)	10.49±0.15

注: 必需氨基酸: Lys、Phe、Met、Thr、Ile、Leu、Val和Trp; 疏水性氨基酸: Trp、Phe、Val、Ile、Leu、Ala、Pro和Met; 碱性氨基酸: Lys、His和Arg; 芳香族氨基酸: Tyr、Phe和Trp。

XOD 活性中心通过 π - π 堆叠相互作用, 从而竞争性抑制其与底物结合^[43]。碱性氨基酸能够在含有芳香

族氨基酸的 XOD 抑制肽中起关键作用。蛋白核小球藻酶解物中芳香族氨基酸占比 10.49%, 碱性氨基酸占比 14.15%, 这有助于提升其对 XOD 活性的抑制效果, 但其特定的多肽序列仍需要进一步分析^[44]。

2.4 稳定性研究

2.4.1 不同温度、pH 以及金属离子环境对稳定性的影响 如图 4(a)所示, 当温度在 4~50 °C 时, 样品溶液的 XOD 抑制活性均能维持在 68% 以上($P>0.05$), 说明此温度范围内 XOD 抑制肽对温度变化敏感性较弱; 当温度升至 80 °C 保持一段时间后, 其抑制活性显著下降($P<0.05$)。这可能是高温影响了肽段中活性氨基酸残基, 破坏了中心结构的稳定性^[45]。

由图 4(b)可知, 样品溶液在中性条件下 XOD 抑制活性显著高于酸性和碱性条件下($P<0.05$); 在 pH 分别为 4.0 和 12.0 时, 其 XOD 抑制活性分别下降了 41.29% 和 14.68%。酸性条件下, 分子间相互作用减弱, 多肽颗粒聚集沉淀, 溶解度降低, 导致活性削弱^[46]; 碱性条件下肽分子易发生外消旋或引发脱酰胺水解反应, 进而影响活性与稳定性^[45]。可见, 过酸和过碱均会影响肽段稳定性。

金属离子是食品配方中常见成分, 因此有必要测定其对 XOD 抑制活性的影响。如图 4(c)所示, 添加 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Na^+ 对 XOD 抑制率并无显著影响($P>0.05$), 其数值均高于 67%; 金属离子 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Mg^{2+} 使得 XOD 抑制率显著下降($P<0.05$), Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的影响最为明显, 与不加金属离子的样品溶液相比分别降低了 20.21% 和 16.56%, 这与姜涵等^[47] 研

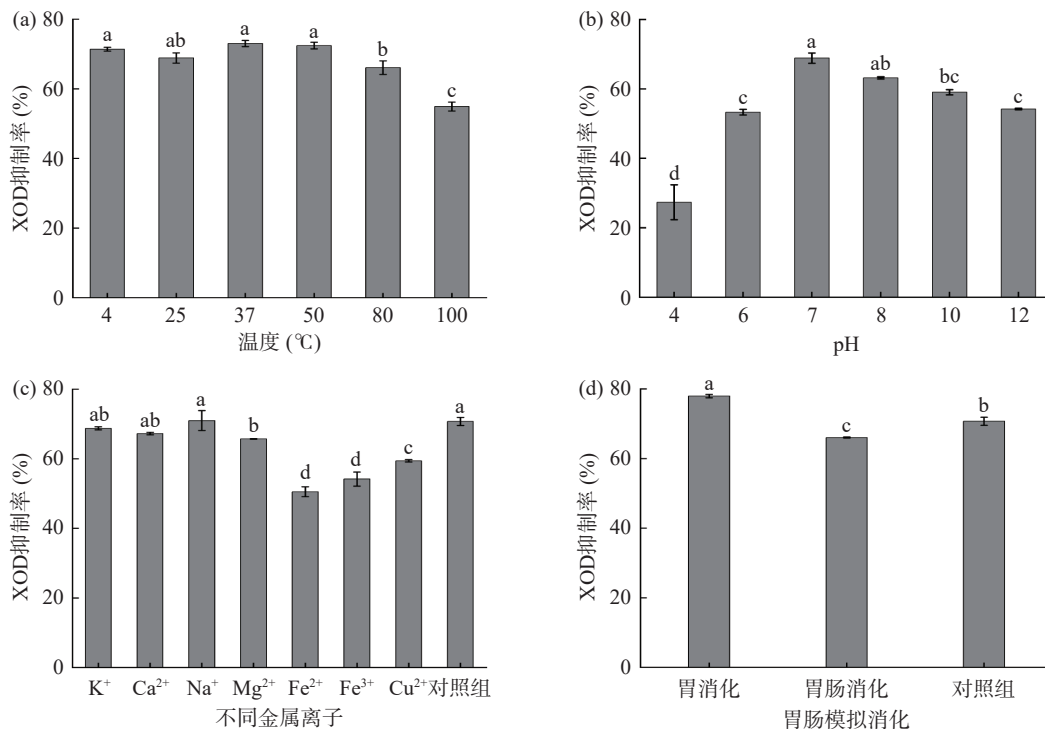


图4 不同温度、pH、金属离子以及胃肠模拟消化对蛋白核小球藻 XOD 抑制肽稳定性的影响

Fig.4 Effects of different temperature, pH, mental ions, and simulated gastrointestinal digestion on the stability of *Chlorella pyrenoidosa* XOD inhibitory peptide

究结果一致。这可能是由于金属离子破坏多肽之间化学作用力的平衡,从而削弱 XOD 抑制活性^[48]。此外,不同金属离子对 XOD 抑制肽活性的影响程度存在差异,可能是由于肽段对不同金属离子的络合能力及形成的络合物空间结构不同。因此,在加工、运输和贮藏过程中应尽量避免接触金属离子。

2.4.2 模拟胃肠道消化对稳定性的影响 如图 4(d)所示,与对照组相比,经胃消化后样品溶液 XOD 抑制率显著上升了 7.25% ($P < 0.05$),这可能因为胃蛋白酶的主要作用部位为芳香族氨基酸或酸性氨基酸的氨基所组成的肽键,使得苯丙氨酸、酪氨酸和亮氨酸等疏水性氨基酸暴露,活性进一步提高^[30];再经肠道消化,样品溶液的 XOD 抑制率显著下降 ($P < 0.05$),可能是在胰蛋白酶的消化下,小分子肽段进一步酶解为分子质量更小的短肽和游离氨基酸,使得原有的 XOD 抑制活性减弱^[49]。

2.5 分子量分布

如表 5 所示,肽的分子量主要分布在 1 kDa 以下,占比为 70.95%,其中分子量 <500 Da 的肽段占比 46.15%,说明蛋白核小球藻 XOD 抑制肽主要以小分子肽段为主。研究发现,小分子肽 (<1 kDa) 具有更强的 XOD 抑制效果,且分子量较小的多肽穿透性较强,更易穿透小肠黏膜被机体消化吸收^[40]。Qi 等^[50]比较了乳清蛋白肽不同超滤组 U1、U2 和 U3 的 XOD 抑制活性,结果显示 U3 组中分子量 <1 kDa 的肽段占比最大且表现出最高的 XOD 抑制活性。李晓彤等^[40]采用双酶分步法水解羊骨蛋白 240 min 时,低于 1 kDa 多肽占 94.48%,能够有效降低高尿酸小鼠的血清尿酸水平。

表 5 蛋白核小球藻 XOD 抑制肽分子量分布

Table 5 Relative molecular weight distribution of *Chlorella pyrenoidosa* XOD inhibitory peptide

分子量分布范围 (Da)	峰面积百分比 (%)	数均分子量 (Mn)	重均分子量 (Mw)
>5000	2.87	6883	7554
5000~3000	4.65	3742	3822
3000~2000	5.66	2407	2440
2000~1000	15.89	1342	1395
1000~500	24.78	688	714
500~189	38.03	300	318
<189	8.12	/	/

注:“/”表示无有效测定结果。

2.6 超滤组分 XOD 抑制活性分析

经超滤分离得到两个组分,即分子量 <3 kDa 和 >3 kDa。如图 5 所示,分子量 <3 kDa 组分 IC_{50} 为 $(5.23 \pm 0.68) \text{ mg/mL}$,显著低于 ($P < 0.05$)粗 XOD 抑制肽 ($IC_{50} = 7.18 \pm 0.67 \text{ mg/mL}$)和分子量 >3 kDa 组分 ($IC_{50} = 7.63 \pm 0.30 \text{ mg/mL}$),阳性药物别嘌呤醇 ($IC_{50} = 0.19 \pm 0.10 \text{ mg/mL}$)具有更强的抑制能力,这可能是由于其分子量小,更易于嵌入 XOD 活性位点^[30]。考虑到肽类抑制剂能够摆脱药物有副作用的

缺点,具有制备成本低、安全性高、易吸收等特点,因此更适合长期治疗高尿酸血症^[51]。此外,该超滤组分的 XOD 抑制效果优于藜麦降尿酸肽 ($IC_{50} = 5.97 \text{ mg/mL}$)^[39]和小黄鱼肽 ($IC_{50} = 25.87 \pm 0.16 \text{ mg/mL}$)^[48]。这表明,高活性 XOD 抑制肽的分子量相对更低,这是因为较小的空间位阻能够使其顺利嵌入 XOD 活性中心,从而有效阻断底物与 XOD 的结合^[30]。

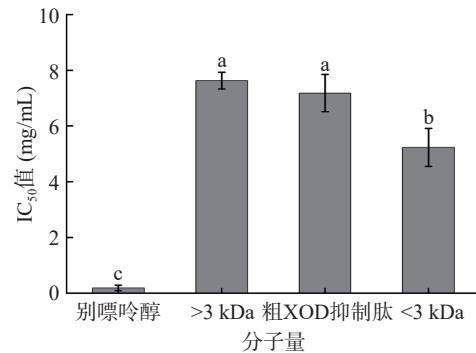


图 5 不同超滤组分活性

Fig.5 Activity of different ultrafiltration components

3 结论

本研究以蛋白核小球藻为原料,采用浸提溶胀、循环冻融和碱提酸沉法联合提取蛋白,以 XOD 抑制率和 DH 为指标,通过单因素和响应面试验优化制备 XOD 抑制肽的最佳酶解参数:木瓜蛋白酶为最适蛋白酶,酶解 pH7.0,酶解温度 48.0 °C,酶解时间 4.0 h,加酶量 2000 U/g,底物浓度 10 mg/mL,此条件下所制备 XOD 抑制肽抑制率达 $71.56\% \pm 0.51\%$ 。氨基酸组成分析表明该肽中含有较高比例的必需氨基酸和疏水性氨基酸。稳定性分析揭示了 XOD 抑制肽具有一定的胃肠道消化稳定性,但在高温和强酸、强碱性条件下其活性显著降低,对 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Mg^{2+} 等金属离子较为敏感。分子量分布和超滤显示小分子肽在 XOD 抑制活性中起关键作用。本研究为微藻蛋白资源的高质化利用和 XOD 抑制肽的开发提供一定的理论参考,未来可进一步解析其构效关系及体内降尿酸机制,定向开发功能制品,探索其在不同食品系统中的应用效果,深化微藻资源的多元化应用。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] TOUNSI L, HENTATI F, BEN H H, et al. Microalgae as feedstock for bioactive polysaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 221: 1238–1250.
- [2] LI J, CHISTI Y, MENG C X, et al. Editorial: Microalgae as sustainable food resources: Prospects, novel species, bioactive compounds, cultivation process and food processing[J]. Frontiers in Nutrition, 2025, 11: 1543087.
- [3] OLSEN M L, OLSEN K, JENSEN P E. Consumer acceptance

- of microalgae as a novel food-Where are we now? And how to get further[J]. *Physiologia Plantarum*, 2024, 176(3): e14337.
- [4] KANAGA K, PANDEY A, KUMAR S, et al. Multi-objective optimization of media nutrients for enhanced production of algae biomass and fatty acid biosynthesis from *Chlorella pyrenoidosa* NCIM 2738[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 200: 940-950.
- [5] BITO T, OKUMURA E, FUJISHIMA M, et al. Potential of *Chlorella* as a dietary supplement to promote human health[J]. *Nutrients*, 2020, 12(9): 2524.
- [6] 卫生部. 关于批准蛋白核小球藻等4种新资源食品的公告(2012年第19号)[EB/OL]. [Ministry of Health. Announcement on approving 4 new resource foods including *Chlorella pyrenoidosa* (No. 19, 2012) [EB/OL].]
- [7] 林奕, 柳雯郡, 黄俊媛, 等. 蛋白核小球藻胰脂肪酶抑制肽的分离纯化、鉴定及其降脂活性[J]. *食品科学*, 2023, 44(24): 155-163. [LIN Luan, LIU Wenjun, HUANG Junyuan, et al. Isolation, purification, identification and hypolipidemic activity of lipase inhibitory peptide from *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Food Science*, 2023, 44(24): 155-163.]
- [8] SUO Qishan, WANG Jing, WU Ning, et al. Discovery of a novel nanomolar angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide with unusual binding mechanisms derived from *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 280: 135873.
- [9] LIU Rui, HAN Cheng, WU Di, et al. Prevalence of hyperuricemia and gout in Mainland China from 2000 to 2014: A systematic review and meta-analysis[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015(1): 762820.
- [10] 李鸿钰, 田建广, 胡滨, 等. 高尿酸血症的流行病学特征及其与心血管疾病的研究进展[J]. *华南预防医学*, 2025, 51(2): 127-130, 136. [LI Hongyu, TIAN Jianguang, HU Bin, et al. Epidemiological characteristics of hyperuricemia and advances in research with cardiovascular disease[J]. *South China Journal of Preventive Medicine*, 2025, 51(2): 127-130, 136.]
- [11] WANG Yanxin, MA Mingxia, HUANG Yumeng, et al. Food-derived bio-functional peptides for the management of hyperuricemia and associated mechanism[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2024, 13(4): 1767-1786.
- [12] CAI Ruida, LI Fei, LI Yin hao, et al. Mechanism and use strategy of uric acid-lowering drugs on coronary heart disease[J]. *IJC Heart & Vasculature*, 2024, 53: 101434.
- [13] CICERO A F G, FOGACCI F, KUWABARA M, et al. Therapeutic strategies for the treatment of chronic hyperuricemia: An evidence-based update[J]. *Medicina*, 2021, 57(1): 58.
- [14] 张志蛟, 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]. *药科学报*, 2022, 57(6): 1679-1688. [ZHANG Zhijiao, LIANG Ruipeng, ZHAO Tong, et al. Research progress of natural products for the treatment of hyperuricemia and gout[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2022, 57(6): 1679-1688.]
- [15] ZHU Yan, ZHANG Ruixue, WEI Ying, et al. Rice peptide and collagen peptide prevented potassium oxonate-induced hyperuricemia and renal damage[J]. *Food Bioscience*, 2021, 42: 101147.
- [16] WEI Wei, ZHOU Lijian, WANG Shue, et al. *Katsuwonus pelamis* peptide and its complexes protect zebrafish and mice from hyperuricemia through promoting kidney excretion of uric acid and inhibiting liver xanthine oxidase activity[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2022, 10: 924371.
- [17] 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.
- [18] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定 GB 5009.5-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. National food safety standard Determination of protein in food: GB 5009.5-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.]
- [19] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定 GB 5009.6-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. National food safety standard Determination of fat in food GB 5009.6-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.]
- [20] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中灰分的测定 GB 5009.4-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [The National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Determination of ash content in food according to the national food safety standard GB 5009.4-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.]
- [21] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中水分的测定 GB 5009.3-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [The National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard Determination of moisture in food GB 5009.3-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.]
- [22] 国家质量监督检验检疫总局. 出口植物源食品中粗多糖的测定 苯酚-硫酸法 SN/T 4260-2015[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015. [General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Determination of crude polysaccharides in exported plant-based foods: Phenol-sulfuric acid method SN/T 4260-2015[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.]
- [23] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. 植物类食品中粗纤维的测定 GB/T 5009.10-2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004. [Ministry of Health of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of crude fiber in vegetable foods GB/T 5009.10-2003[S]. Beijing: Standards Press of China, 2004.]
- [24] 黄素艳, 曹荣, 刘楠, 等. 提取方式对微拟球藻蛋白理化性质和功能特性的影响[J]. *食品工业科技*, 2025, 46(1): 87-96. [HUANG Suyan, CAO Rong, LIU Nan, et al. Effect of extraction methods on physicochemical and functional properties of *Nannochloropsis* proteins[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2025, 46(1): 87-96.]
- [25] HOU Mengfan, XIANG Huan, HU Xiao, et al. Novel potential XOD inhibitory peptides derived from *Trachinotus ovatus*: Isolation, identification and structure-function analysis[J]. *Food Bioscience*, 2022, 47: 101639.
- [26] 邹琳. 鳀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 Lin. Enzymatic preparation and functional evaluation of xanthine oxidase inhibitory peptides from skipjack tuna[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.]
- [27] 刘长蛟, 杨越越, 王妮, 等. 茛三酮比色法测定黄秋葵氨基酸含量的不确定度评定[J]. *粮食与油脂*, 2019, 32(9): 92-95. [LIU Changjiao, YANG Yueyue, WANG Ni, et al. Uncertainty evaluation for determining amino acids' content in okra by ninhydrin colorimetric method[J]. *Cereals & Oils*, 2019, 32(9): 92-95.]
- [28] 张钧橙, 王崇崇, 廖彦超, 等. 小麦活性肽的酶法制备及其抗氧化特性分析[J]. *食品工业科技*, 2025, 46(24): 231-238. [ZHANG Juncheng, WANG Chongchong, LIAO Yanchao, et al. Enzymatic preparation of wheat bioactive peptides and their antioxidant properties[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2025,

- 46(24): 231-238.]
- [29] 李巧琪,李洪燕,卢桂锋,等. 测定食品中 16 种氨基酸国家标准方法的改进[J]. 理化检验-化学分册, 2022, 58(1): 77-83. [LI Qiaoqi, LI Hongyan, LU Guifeng, et al. Improvement of national standard method for determination of 16 kinds of amino acids in food[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B (Chemical Analysis), 2022, 58(1): 77-83.]
- [30] 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. [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.]
- [31] 国家市场监督管理总局,中国国家标准化管理委员会. 海洋鱼低聚肽粉 GB/T 22729-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009. [General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Oligopeptides powder of marine fish GB/T 22729-2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009.]
- [32] 陈峰,杨帅伶,刘宾. 微藻蛋白质及其在食品中的应用研究进展[J]. 中国食品学报, 2022, 22(6): 21-32. [CHEN Feng, YANG Shuailing, LIU Bin. Microalgal protein and research progress on application in foods[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(6): 21-32.]
- [33] 朱秀清,王源,朱颖,等. 蛋白酶水解汉麻分离蛋白产物结构及功能特性比较[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(24): 111-117. [ZHU Xiuqing, WANG Yuan, ZHU Ying, et al. Structural and functional properties of hemp protein isolate hydrolysates obtained with different proteases[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(24): 111-117.]
- [34] 彭宇航,孙立,杨果果,等. 辣木籽醒酒肽的酶解制备工艺优化[J]. 中国油脂, 2024, 49(6): 42-46,75. [PENG Yuhang, SUN Li, YANG Guoguo, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis preparation process of Moringa oleifera seed sobering peptide[J]. China Oils and Fats, 2024, 49(6): 42-46,75.]
- [35] SEIBERT E, TRACY T S. Fundamentals of enzyme kinetics[M]. Enzyme Kinetics in Drug Metabolism. Totowa, NJ: Humana Press, 2014: 9-22.
- [36] 王海东,张涵,周泓妍,等. 响应面法优化五味子蛋白肽的制备工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2024, 45(19): 166-176. [WANG Haidong, ZHANG Han, ZHOU Hongyan, et al. Optimization of preparation technology and antioxidant activity of schisandrae chinensis protein peptides *in vitro* by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(19): 166-176.]
- [37] BEN TAHER I, FICKERS P, CHNITI S, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis and fermentation conditions for improved bioethanol production from potato peel residues[J]. Biotechnology Progress, 2017, 33(2): 397-406.
- [38] 胡博,高盼,毛妮妮,等. 酶法辅助提取、纯化米糠蛋白工艺优化[J]. 中国油脂, 2023, 48(8): 115-120,136. [HU Bo, GAO Pan, MAO Yanni, et al. Optimization of enzyme assisted extraction and purification of rice bran protein[J]. China Oils and Fats, 2023, 48(8): 115-120,136.]
- [39] 钟婉滢,苗建银,叶灏铎,等. 藜麦蛋白肽的酶解制备及体外降血脂与降尿酸活性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(23): 156-166. [ZHONG Wanying, MIAO Jianyin, YE Haoduo, et al. Enzymatic preparation of quinoa protein peptides and its lipid-lowering and uric acid-lowering activity *in vitro* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(23): 156-166.]
- [40] 李晓彤,胡冠华,王诗琪,等. 羊骨生物活性肽体内外降尿酸活性及作用机制[J]. 食品科学, 2025, 46(8): 143-150. [LI Xiaotong, HU Guanhua, WANG Shiqi, et al. Uric acid-lowering activity *in vitro* and *in vivo* and mechanism of sheep bone bioactive peptides[J]. Food Science, 2025, 46(8): 143-150.]
- [41] MEHMOOD A, IFTIKHAR A, CHEN X M. Food-derived bioactive peptides with anti-hyperuricemic activity: A comprehensive review[J]. Food Chemistry, 2024, 451: 139444.
- [42] MAO Zhenjie, JIANG Hong, SUN Jianan, 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.
- [43] 常畅,陈哲漪,张泓,等. 裙带菜蛋白黄嘌呤氧化酶抑制肽的酶法制备及作用机制[J]. 食品科学技术学报, 2025, 43(1): 55-62, 73. [CHANG Chang, CHEN Zheyi, ZHANG Hong, et al. Enzymatic preparation and inhibitory mechanism of xanthine oxidase inhibitory peptides from *Undaria pinnatifida* proteins[J]. Journal of Food Science and Technology, 2025, 43(1): 55-62,73.]
- [44] LIU Xiaoyu, ZHANG Lei, LAI Boyin, et al. Harnessing protein hydrolysates and peptides for hyperuricemia management: Insights into sources, mechanisms, techniques, and future directions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(34): 18758-18773.
- [45] 徐紫琪,王玉珠,魏光强,等. 奶疙瘩抗氧化肽、 α -葡萄糖苷酶抑制肽的鉴定及其稳定性分析[J]. 食品工业科技, 2025, 46(14): 1-12. [XU Ziqi, WANG Yuzhu, WEI Guangqiang, et al. Identification of antioxidant peptides and α -glucosidase inhibitory peptides from milk pimples and their stability analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(14): 1-12.]
- [46] 李爽,刘小芳,冷凯良,等. 大西洋鳕鱼骨胶原蛋白肽的抗氧化活性及稳定性研究[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(16): 50-56. [LI Shuang, LIU Xiaofang, LENG Kailiang, et al. Antioxidant activity and stability of collagen peptides from Atlantic cod (*Gadus morhua*) bone[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(16): 50-56.]
- [47] 姜涵,张武,何璐瑶,等. 鲑鱼降尿酸肽酶解物的制备、分析及稳定性研究[J]. 中国食品学报, 2024, 24(10): 258-270. [JIANG Han, ZHANG Wu, HE Luyao, et al. Preparation, analysis and the stability of the enzymatic hydrolysate of hypouricemic peptide from *Katsuwonus pelamis* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(10): 258-270.]
- [48] 王子俊,徐鹏飞,朱天晴,等. 牦牛骨胶原蛋白肽的抗氧化活性验证、稳定性评估及机制分析[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(19): 126-134. [WANG Zijun, XU Pengfei, ZHU Tianqing, et al. Verification of antioxidant activity, stability evaluation, and mechanism analysis of yak bone collagen peptide[J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(19): 126-134.]
- [49] 陶强,李姣,曹皖雪,等. 肽 Tyr-Pro-Ile-Trp(YPIW)对 α -葡萄糖苷酶的抑制机理及其稳定性[J]. 食品科学, 2025, 46(7): 43-50. [TAO Qiang, LI Jiao, CAO Wanxue, et al. Mechanism for the inhibition of α -glucosidase by peptide Tyr-pro-ile-trp (YPIW) and its stability[J]. Food Science, 2025, 46(7): 43-50.]
- [50] QI Xiaofen, CHEN Haoran, GUAN Kaifang, 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.
- [51] CHEN Ying, LI Hongyan, CAI Yunfei, et al. Anti-hyperuricemia bioactive peptides: A review on obtaining, activity, and mechanism of action[J]. Food & Function, 2024, 15(11): 5714-5736.