江依建, 吴庆智, 张建, 等. 核桃源 DPP-IV 抑制肽的制备、分离纯化、鉴定及机制研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(12): 235−245. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050159
JIANG Yijian, WU Qingzhi, ZHANG Jian, et al. Preparation, Isolation and Purification, Characterization and Mechanism of DPP-IV Inhibitory Peptide of Walnut Origin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(12): 235−245. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050159

· 工艺技术 ·

核桃源 DPP-IV 抑制肽的制备、分离纯化、鉴定及机制研究

江依建[1,2,3], 吴庆智[1], 张　建[1,2,3], 毛晓英[1,2,3,*]
（1.石河子大学食品学院, 新疆石河子 832003;
2.特色农产品加工与质量控制重点实验室（部省共建）, 新疆石河子 832003;
3.新疆生产建设兵团食品营养与安全控制重点实验室, 新疆石河子 832003）

摘　要: 本文以核桃蛋白为原料制备对二肽基肽酶（Dipeptidyl peptidase-IV，DPP-IV）具有抑制作用的生物活性肽。采用碱性蛋白酶进行酶解，通过单因素及响应面优化试验确定最佳酶解条件：底物浓度 2.23%（w/v）、酶添加量 9100 U/g、酶解时间 180 min，该条件下水解度 DH 为 25.47%，DPP-IV 抑制率为 77.85%。进一步对核桃蛋白酶解液进行分离纯化、鉴定、分子机制及二级结构等分析。结果表明，分子量<3 kDa 的 U1 组分表现出最高 DPP-IV 抑制活性（IC_{50}=2.81 mg/mL）。通过 Sephadex C-25 柱层析分离 U1 后获得两个组分（F1 和 F2），其中 F2 组分活性较高，检测到 6557 个肽段，经计算机模拟方法筛选出 5 个潜在降血糖肽。KFPF 表现出最高的 DPP-IV 抑制活性（IC_{50}=0.26 mg/mL）。分子对接表明，KFPF 与 DPP-IV 形成 6 个氢键和 10 个疏水相互作用。体外活性验证表明，KFPF 表现出竞争性抑制特性。此外，红外光谱结果显示，KFPF 二级结构中 β-转角（82.03%）和 α-螺旋（15.18%）的含量较高。表明肽段的 DPP-IV 抑制活性可能与其 β-转角和 α-螺旋的含量有关。这些结果表明，KFPF 具有作为潜在辅助降低血糖的功能活性。

关键词: 核桃蛋白, 酶解, DPP-IV 抑制肽, 分子对接, 二级结构
中图分类号: TS255.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2026)12−0235−11
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050159
本文网刊:

Preparation, Isolation and Purification, Characterization and Mechanism of DPP-IV Inhibitory Peptide of Walnut Origin

JIANG Yijian[1,2,3], WU Qingzhi[1], ZHANG Jian[1,2,3], MAO Xiaoying[1,2,3,*]
（1.School of Food Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China;
2.Key Laboratory of Agricultural Product Processing and Quality Control of Specialty (Co-construction by Ministry and Province), Shihezi 832003, China;
3.Key Laboratory for Food Nutrition and Safety Control of Xinjiang Production and Construction Corps, Shihezi 832003, China）

Abstract: This study isolated and characterized bioactive peptides with dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitory activity from walnut protein hydrolysates. The hydrolysis process was optimized using response surface methodology with alkaline protease, yielding optimal conditions as follows: Substrate concentration 2.23% (w/v), enzyme dose 9100 U/g, and hydrolysis time 180 min. Under these conditions, the degree of hydrolysis reached 25.47%, and the DPP-IV inhibition rate

收稿日期: 2025−05−19
基金项目: 2025 年兵团重点领域科技攻关计划项目（2025AB015）; 国家自然基金（地区科学基金）（31560433）; 兵团重点领域科技攻关计划项目（2018AB015）; 2022 年度新疆自治区重大科技专项（2022A02004）。
作者简介: 江依建（2000−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 核桃蛋白生物活性肽, E-mail: jiangyijian0123@163.com。
*** 通信作者:** 毛晓英（1976−）（ORCID: 0000−0001−8773−2172）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 蛋白质氧化, 活性肽的功能性, 特色谷物副产物高值化, E-mail: maoxiaoying99@163.com。

was 77.85%. The hydrolysate was further separated, purified, and characterized. The fraction with molecular weight <3 kDa (U1) demonstrated the strongest DPP-IV inhibitory activity (IC_{50}=2.81 mg/mL). Subsequent purification of U1 by Sephadex C-25 column chromatography yielded two sub-fractions (F1 and F2), with F2 exhibiting superior activity. A total of 6557 peptides were identified, and five potential hypoglycemic peptides were screened via *in silico* approaches. Among these, the peptide KFPF showed the highest DPP-IV inhibitory activity (IC_{50}=0.26 mg/mL). Molecular docking simulations revealed that KFPF binds to DPP-IV via six hydrogen bonds and ten hydrophobic interactions. *In vitro* assays indicated that KFPF acts as a competitive inhibitor. Furthermore, secondary structure analysis by infrared spectroscopy suggested a high content of β-turn (82.03%) and α-helix (15.18%), implying a possible correlation between these structural features and DPP-IV inhibition. These findings demonstrated that KFPF derived from walnut protein has potential as a functional dietary component for blood glucose management.

Key words: walnut protein; enzymatic digestion; DPP-IV inhibitory peptide; molecular docking; secondary structure

目前, 糖尿病(Diabetes mellitus, DM)已成为世界上最严重、最常见的代谢疾病之一, 也是导致死亡的主要原因[1]。根据有关报道, 2045 年全球 20~79 岁糖尿病人群的患病率估计将上升至 7.832 亿人[2]。其中, 二型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2DM)占总糖尿病的 90% 以上[3]。二肽基肽酶 IV(DPP-IV)是一种普遍存在的蛋白酶, 参与胰高血糖素样肽 1(GLP-1)和葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)的降解[4]。因此, DPP-IV 是治疗 DM 的重要靶点。通过抑制 DPP-IV 的活性可以防止肠促胰岛素的降解, 从而更好地实现血糖调节。目前, DPP-IV 抑制剂包括西格列汀、维格列汀和沙格列汀等。然而, 这些化学合成药物往往会产生许多副作用, 例如, 头痛、鼻咽炎、上呼吸道感染和严重的过敏反应[5]。因此, 寻找 DPP-IV 抑制剂的潜在天然替代品势在必行。

近年来, 由于食物来源的生物活性肽(BPs)的低毒性、零毒性、潜在的抗高血压、抗氧化、抗肿瘤和抗糖尿病作用, 使人们对 BPs 的研究兴趣日益增加[6]。并且许多食品成分已被发现表现出出色的 DPP-IV 抑制能力, 例如大豆、苦荞、蛋壳膜和牦牛血液等, 都是 DPP-IV 抑制肽的潜在来源, 它们几乎没有不良反应, 并且显示出帮助控制血糖水平的潜力[7]。ZHAO 等[8] 发现, 通过细胞分析, 市售大豆蛋白水解物具有 DPP-IV 抑制活性。WU 等[9] 从苦荞蛋白模拟胃肠消化产物中鉴定出两种新型 DPP-IV 抑制肽, 并发现它们显示出较好的降血糖应用潜力。ZHU 等[10] 从蛋壳膜水解物中鉴定出 3 种高丰度的新型 DPP-IV 抑制肽(YPEPPPQ、HDGADVS 和 VTDGQPH)。ZHANG 等[11] 也首次从牦牛血红蛋白中筛选并鉴定出 2 种 DPP-IV 抑制肽。

核桃(*Juglans regia* L.)具有很高的药用价值, 在传统医学和功能食品中都得到了认可, 是中国最有发展前景的绿色营养保健品之一[12]。核桃蛋白含 18 种氨基酸, 其组成非常均衡, 是优质蛋白质的重要来源[13]。核桃蛋白(Walnut protein, WP)具有极高的利用价值, 由核桃蛋白衍生出的核桃肽具有抗氧化, 降血糖, 抗高血压及降尿酸等多种生物活性。CHEN 等[14] 从核桃蛋白水解物(WPHs)中分离出 3 种新型抗氧化肽, 并且这三种肽在细胞水平上表现出优异的抗氧化活性。KONG 等[15] 首次从 WPHs 中分离并表征了 DPP-IV 抑制肽, 发现分子量较低、碱性氨基酸残基较高的肽段具有较强的 DPP-IV 抑制活性。LIU 等[16] 发现核桃蛋白水解物可通过抑制组织中血管紧张素 I-转换酶(ACE)活性来达到降压作用。ZHONG 等[17] 发现核桃衍生肽可能与嘌呤形成非共价复合物以减少其吸收, 从而降低血清尿酸水平。尽管如此, 关于核桃肽的 DPP-IV 抑制作用的研究仍然相对有限。

分子对接可以用于预测小分子与蛋白之间的相互作用, 可以为了解生物活性分子的物理和化学性质提供有价值的见解[18]。目前对 DPP-IV 抑制肽的研究多集中在其活性方面, 而对其抑制机制及构效关系的研究较少。因此, 本研究的目的是通过酶解技术和计算机辅助筛选, 从核桃蛋白中制备 DPP-IV 抑制肽, 评价其生物活性, 并通过分子对接、抑制模式和二级结构来探讨 DPP-IV 抑制肽的作用机制和构效关系。本研究旨在揭示 DPP-IV 抑制肽的构效关系和降血糖分子机制, 并提供一种体外和计算机联合筛选 DPP-IV 抑制肽的方法, 为 WP 在工业生产中的高值化利用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新疆薄皮核桃　新疆石河子农贸市场; 碱性蛋白酶(200000 U/g)、Gly-Pro-pNA　上海源叶生物公司; DPP-IV 酶　Sigma Aldrich(上海)公司; 合成肽段 KFPF、IFR、KGFL、KIPF、KLF　纯度>98%, 上海淘普生物科技有限公司; 三羟甲基氨基甲烷　分析纯, 上海碧云天生物技术股份有限公司; 浓盐酸、氢氧化钠、氯化钠、冰乙酸　分析纯, 天津市鑫铂特化工有限公司; 葡聚糖凝胶 C-25　北京普西唐生物科技有限公司。

K3 Plus 酶标仪　广东丹利科技有限公司; LE204E 电子分析天平　上海精密仪器仪表有限公司; 多 Wks900B/3S 频超声设备　江苏五棵松生物科技有限公司; VERTEX 70v 傅立叶变换红外光谱仪　德国布鲁克公司; 雷磁 pHS-3C pH 计　上海仪电科学仪器股份有限公司; Stratos 高速冷冻离心机

赛默飞世尔科技(中国)有限公司；HH-S2 恒温磁力搅拌水浴锅　江苏金怡仪器科技有限公司；DHP-9082 电热恒温培养箱　上海一恒科学仪器有限公司；Q Exactive 质谱仪　美国 Thermo Fisher Scientific；Easy-nLC 1200 液相色谱仪　赛默飞世尔科技有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　WP 的制备、酶解及其条件优化

1.2.1.1　WP 的制备　参考毛晓英等[19]的方法，略作修改。核桃去壳，置于 45 ℃ 左右烘干后将核桃仁去皮，使用破碎机破碎去皮核桃仁，用正己烷以 1∶6 的比例对核桃脱脂 2 h，然后抽滤，反复操作至正己烷澄清，收集残渣于通风处挥干，过 80 目筛即可得到脱脂核桃粉，将其与去离子水以 1∶20(w/v)进行混合，使用 NaOH 溶液将混合液的 pH 调节到 10.5，在室温下搅拌 1 h，以 7500 r/min 转速离心 15 min 得到上清液；再用 HCl 溶液将上清液的 pH 调节到 4.5，室温下搅拌 1 h，以 7500 r/min 的转速离心 15 min 得到沉淀。将沉淀物的 pH 调节至 7.0，冷冻干燥后即为 WP，−20 ℃ 保存。

1.2.1.2　WP 的酶解　根据我们前期的实验结果，采用三频超声对核桃蛋白进行预处理，预处理时间为 25 min，功率为 300 W，碱性蛋白酶为水解用酶。首先，将冻干后的 WP 溶于蒸馏水(1∶25，w/v)中混匀，进行超声预处理，然后，在核桃蛋白溶液中加入碱性蛋白酶(pH9.0，55 ℃)水解 180 min。酶解结束后，在沸水浴中灭酶 10 min，随后冰水浴冷却，8000 r/min 离心 20 min，得到上清液，将其冷冻干燥即可得到核桃蛋白水解物(WPHs)，−20 ℃ 下保存备用。

1.2.1.3　单因素实验　使用碱性蛋白酶(pH9.0，55 ℃)进行酶解，选取酶解时间、底物浓度和加酶量为考察因素，以 DH% 和 DPP-IV 抑制率为指标设计试验。首先，在底物浓度为 2%、加酶量为 8000 U/g 的条件下，研究不同酶解时间(60、90、120、150、180 min)对核桃蛋白酶解物 DH% 和 DPP-IV 抑制率的影响。接着，在酶解时间为 120 min、加酶量为 8000 U/g 的条件下，研究不同底物浓度(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%和 2.5%)对核桃蛋白酶解物 DH% 和 DPP-IV 抑制率的影响。最后，在酶解时间为 120 min、底物浓度为 2% 的条件下，研究不同加酶量(6000、7000、8000、9000、10000 U/g)对核桃蛋白酶解物 DH% 和DPP-IV 抑制率的影响。单因素实验设计因素与水平见表 1。

表 1　单因素实验因素水平表

Table 1　Single-factor test factor level table

水平	因素		
	酶解时间(min)	底物浓度(%)	加酶量(U/g)
1	60	0.5	6000
2	90	1.0	7000
3	120	1.5	8000
4	150	2.0	9000
5	180	2.5	10000

1.2.1.4　响应面优化试验　在单因素实验的基础上，固定超声辅助酶解条件：超声功率 300 W，超声时间 25 min，以酶解时间(A)、底物浓度(B)和加酶量(C)为自变量，以水解度 DH(Y_1)和 DPP-IV 抑制率(Y_2)为响应值，使用 Design-Expert 8.0.6 软件进行三因素三水平的 Box-Behnken 试验设计，优化酶解工艺，确定制备 DPP-IV 抑制肽的最佳酶解工艺条件。因素水平设计见表 2。

表 2　三因素三水平响应面试验设计表

Table 2　Three factor and three level response surface experimental design table

因素	水平		
	−1	0	1
A酶解时间(min)	120	150	180
B底物浓度(%)	1.5	2	2.5
C加酶量(U/g)	8000	9000	10000

1.2.2　水解度的测定

根据 DONG 等[20]所描述的 pH-stat 法，略作修改，在酶解前，调节溶液的 pH 至酶的最适 pH，并且在水解过程中不断滴加 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液，以保持溶液的 pH 稳定，反应结束后记录所用的碱液量。计算公式如下：

$$DH(\%) = \frac{c \times V \times 100}{\alpha \times m \times h_{tot}} \qquad 式（1）$$

式中：c 为 NaOH 的浓度(mol/L)；V 是 NaOH 的消耗量(mL)；α 指 α-NH_2 的解离度，$1/\alpha$ 为校准因子，其中碱性蛋白酶为 1.01；中性蛋白酶为 2.27；复合蛋白酶为 1.40；胰蛋白酶为 3.60；风味蛋白酶为 1.52。m 是核桃蛋白质量(g)；h_{tot} 为核桃蛋白的肽键数(mmol/g)，7.35 mmol/g。

1.2.3　DPP-IV 抑制活性、IC_{50} 值及抑制模式的测定

根据 KOJIMA 等[21]的方法，略作修改。将样品溶解在 Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L，pH8.0)中作为样品溶液，使终浓度为 2 mg/mL。50 μL DPP-IV(15 U/L)和 25 μL 样品在 96 孔板 37 ℃ 孵育 10 min。随后加入 25 μL Gly-Pro-pNA(1.6 mmol/L)底物溶液，并在 37 ℃ 孵育 60 min，随后加入 100 μL 乙酸钠缓冲液(1 mol/L，pH4.0)终止反应，用 96 孔酶标板在 405 nm 处测量吸光度。DPP-IV 抑制率计算公式如下式：

$$\text{DPP-IV抑制率}(\%) = \frac{F_{control} - (F_{sample} - F_{blank})}{F_{control}} \times 100 \qquad 式（2）$$

式中：$F_{control}$ 指对照组在 405 nm 处的吸光值；F_{sample} 指样品组在 405 nm 处的吸光值；F_{blank} 指空白组在 405 nm 处的吸光值。

在不同的样品浓度下，分别测定纯化步骤中不同分子量的部分和纯肽的抑制活性，并使用 GraphPad Prism10.4.1 从水解产物或肽浓度(mg/mL)与抑

制活性(%)的 s 形剂量反应图中计算 IC_{50} 值。

抑制模式的测定参考 LI 等[22] 的方法,略作修改。采用 Lineweaver-Buck 方法分析 KFPF 的抑制类型。样品浓度为 0、0.26 和 0.52 mg/mL,底物浓度为 1~5 μmol/L。将样品与 Gly-Pro-pNA 在 37 ℃ 下孵育 30 min,使用酶标仪测定 405 nm 处的吸光值。

1.2.4 核桃 DPP-IV 抑制肽的分离纯化及鉴定

1.2.4.1 超滤 根据张丽娜[23] 的方法,略作修改。将得到的核桃蛋白酶解液(WPHs)冷却至室温后依次加入 10 kDa、5 kDa 和 3 kDa 的超滤管,在 4 ℃、8000×g、20 min 条件下进行超滤,收集得到 U1(<3 kDa)、U2(3~5 kDa)、U3(5~10 kDa)和 U4(>10 kDa)四个组分,冷冻干燥后保存在−20 ℃ 用于后续实验。

1.2.4.2 离子交换分离 根据 KONG 等[15] 的方法,略作修改。采用去离子水对 Sephadex C-25 阳离子交换树脂平衡,之后将相对分子质量<3 kDa 的肽溶液上样。收集的组分记为 F1、F2,将两个组分分别浓缩、冷冻干燥并保存在−20 ℃ 下备用。

1.2.4.3 肽序列鉴定 将样品溶于 50 mmol/L 的 NH_4HCO_3,向溶液中添加二硫苏糖醇(DTT)溶液,使其最终浓度达到 10 mmol/L,然后将溶液在 56 ℃ 的条件下水浴 1 h。接着,加入碘乙酰胺(IAM)溶液,让其最终浓度为 55 mmol/L,并在避光的条件下进行 40 min 的反应。对反应后所得到的产物实施脱盐处理,之后将产物放置在 45 ℃ 的真空离心浓缩仪中,使溶剂在真空环境下挥发至干。

用 Easy-nLC 1200 液相色谱仪分析样品多肽序列,将 5 μL 样品上样至 RPLC C_{18}(Acclaim PepMap, 150 μm×180 mm, 3 μm)中。0.1% 甲酸水溶液和 20% 甲酸水溶液-80% 乙腈作为溶剂 B。流速 600 nL/min,4%~8% B 0~2 min,8%~28% B 2~45 min,28%~40% B 45~55 min,40%~95% B 55~56 min,95% B 56~66 min。水解物经高效液相色谱分离后通过 Q Exactive 质谱仪进行质谱分析,喷雾电压:2.2 kV,毛细管温度:270 ℃,MS 参数:分辨率:70000,400 m/z,扫描范围:100.0~1500.0 m/z。MS/MS 的参数:分辨率 17500,400 m/z,TopN:20,NCE/steppedNCE:28。对质谱原始文件使用 Byonic 根据固定修饰(Fixed modifications):Carbamidomethyl(C),可变修饰(Variable modifications):Oxidation(M),Acetyl(N-term)等条件检索目标蛋白数据库。

1.2.5 DPP-IV 抑制肽的筛选 根据 WEI 等[24] 的方法,略作修改。对纯化并鉴定后的活性肽进行有关毒性和生物利用度的计算机筛选。首先,使用分子对接进行结合能计算,确定所鉴定的肽的可能存在的 DPP-IV 抑制活性。然后将获得的多肽序列与 BIOPEP 数据库和文献中报道过的多肽序列相比较、去除。使用 PeptideRanker 对肽进行分析,计算肽的潜在生物活性,使用 PepDraw 预测肽的疏水性、等电点和净电荷,使用 Proteomics 工具预测肽的水溶性,使用 ToxinPred 和 admetSAR@LMMD(https://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar1)预测肽的毒性。此外,在 SwissADME 平台(http://www.swissadme.ch/)和 iDrug(https://drug.ai.tecent.com/console/cn/admet)上进行了多肽的药代动力学测试。其中,在 admetSAR@LMMD 网站上,当 Druglikeness 中的 Lipinski 显示为“Yes”时,即可以保留作为 DPP-IV 抑制肽的潜在活性多肽。

1.2.6 多肽合成 采用固相法对筛选所得肽段进行人工合成(纯度>98%),通过 LC-MS 和 HPLC 法确定肽段分子量和纯度(委托上海淘普生物科技有限公司完成)。首先将树脂溶胀,然后接第一个氨基酸,经过脱保护、检测、洗、缩合等步骤后,从树脂上切割多肽、吹干洗涤,并用 HPLC 纯化多肽,最后将纯化后的溶液冷冻干燥,得到粉末状多肽,密封包装,于−20 ℃ 保存备用。

1.2.7 分子对接 根据 HUO 等[25] 的方法,略作修改。以 DPP-IV(PDB ID: 5J3J)作为分子对接的受体蛋白,以 KFPF、IFR、KGFL、KIPF、KLF、IPI 作为分子对接的配体分子。在蛋白晶体结构数据库(PDB)寻找对应的标准基因名,查询对应的受体蛋白,物种选择为“homo sapiens”,下载受体蛋白的 pdb 格式文件,用 pymol 软件对其进行去水、删除配体及离子处理;借助 PubChem 数据库,通过查询配体分子 IPI 的 3D 模型图,下载为 SDF 格式文件,同时对所有 SDF 格式文件的配体分子导入到 Chem3D 软件中进行能量最小化处理(mm2)并转变为 pdb 格式文件,将受体蛋白和配体分子的 pdb 格式文件导入 AutoDockVina 中进行分子对接前处理(转化为 pdbqt),之后开展半柔性(分子构象可以扭转、蛋白保持不变)分子对接,根据共结晶配体的位置定义对接网格:网格盒尺寸为 x=90.0,尺寸 y=80.0,尺寸 z=126.0,网格盒中心为 x=28.879,y=−2.763,z=72.412。将分子对接的结果数据保存,并在 PyMOL 软件(3D 绘图)与 Ligplus 软件(2D 绘图)中进行可视化处理。

1.2.8 傅里叶变换红外光谱(FTIR) 根据 ZHAO 等[26]的方法,略作修改。将冻干后的多肽样品与溴化钾压制成 1~2 mm 厚的薄片后进行扫描,FTIR 光谱记录范围为 400~4000 cm^{-1},分辨率为 4 cm^{-1}。使用 PeakFit 4.12 和 Omnic 软件进行分析。

1.3 数据处理

使用 SPSS 27.0.1 软件在 $P<0.05$ 的显著性水平下对数据做单因素方差分析(ANOVA),使用 GraphPad Prism 10.4.1 进行 IC_{50} 值分析。所有试验均重复三次,数据显示为标准差±平均值。

2 结果与分析

2.1 核桃蛋白水解物的制备

2.1.1 单因素实验结果 酶解可以很好的将蛋白质

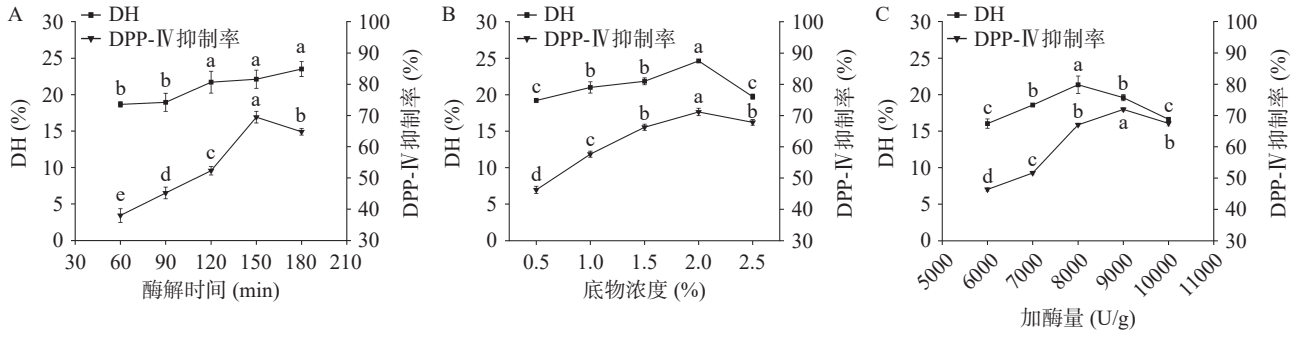


图 1　酶解单因素实验结果

Fig.1　Results of the one-factor test for enzymatic digestion

注：A. 酶解时间；B. 底物浓度；C. 加酶量；不同小写字母代表组间差异显著（P<0.05）。

中的 DPP-IV 抑制肽释放[27]。酶解时间对 WP 水解度 DH 和 DPP-IV 抑制活性的影响结果如图 1A 所示，水解度随着酶解时间的增加表现出逐渐增加的趋势，而 DPP-IV 抑制率随着酶解时间的增加表现出先增加后减少的趋势，并在 150 min 的时候达到最大值 69.46%。酶解程度随着酶解时间的增加而加大，因此水解度 DH 和 DPP-IV 抑制率逐渐增加。然而，随着酶解时间的延长，核桃蛋白的酶切位点逐渐减少，产生的具有 DPP-IV 抑制活性的多肽也相应减少，因此 DPP-IV 抑制率有所降低。综合考虑酶解时间对 WPHs 的 DPP-IV 抑制活性的影响，选择 120~180 min 的酶解时间进一步试验。

图 1B 为底物浓度对 WP 水解度 DH 和 DPP-IV 抑制率的影响。结果表明，过低的底物浓度会使酶和底物结合不充分从而导致水解反应速度降低，而底物浓度过高时，酶的活性位点基本已和底物结合，酶解反应趋于极限[28–29]。如图 1B 所示，总体上水解度 DH 和 DPP-IV 抑制率随底物浓度的增大而上升，当底物浓度为 2% 时，DPP-IV 抑制率达到最大值 71.17%，此时水解度也达到最大值 24.64%。然而当继续增加底物浓度时，水解度 DH 和 DPP-IV 抑制率则都有所下降。综合考虑底物浓度对 WPHs 的 DPP-IV 抑制率的影响，选择 1.5%~2.5% 的底物浓度进一步试验。

加酶量对 WP 水解度 DH 和 DPP-IV 抑制率的影响结果见图 1C。水解度 DH 和 DPP-IV 抑制率随加酶量的增加均表现出先增加后减少的趋势，并分别在 8000 U/g（21.36%）和 9000 U/g（71.95%）的时候达到最大值。加酶量增加导致核桃蛋白和酶的接触机率增大，具有 DPP-IV 抑制活性的多肽也随之增加[30]。然而继续增加加酶量会导致多肽过度酶解为分子量更小的活性减少或无活性的肽段甚至是游离氨基酸，DPP-IV 抑制率就会有所降低[31]。综合考虑加酶量对 WPHs 的 DPP-IV 抑制活性的影响，选择 8000~10000 U/g 的加酶量进一步试验。

2.1.2　响应面分析

2.1.2.1　双响应面试验设计与结果　在单因素实验的基础上，以水解度 DH 和 DPP-IV 抑制率为双响应值，运用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面试验，试验结果见表 3，方差分析见表 4、表 5。

将表 3 试验结果通过 Design-Expert 8.0.6 软件经多元回归拟合及方差分析，得到实验因素对 Y_1（水

表 3　响应面试验设计与结果

Table 3　Design and results of response surface methodology

实验号	A酶解时间（min）	B底物浓度（%）	C加酶量（U/g）	水解度 Y_1(%)	DPP-IV抑制率 Y_2(%)
1	120	1.5	9000	21.14	73.89
2	180	1.5	9000	25.48	75.77
3	120	2.5	9000	23.42	74.71
4	180	2.5	9000	28.03	77.2
5	120	2	8000	20.27	71.93
6	180	2	8000	25.22	75.09
7	120	2	10000	21.23	74.31
8	180	2	10000	25.67	75.25
9	150	1.5	8000	19.06	75.43
10	150	2.5	8000	20.76	76.09
11	150	1.5	10000	20.85	74.57
12	150	2.5	10000	22.47	77.71
13	150	2	9000	23.64	80.65
14	150	2	9000	22.58	80.51
15	150	2	9000	21.85	81.37
16	150	2	9000	22.33	80.63
17	150	2	9000	23.57	80.73

表 4　基于水解度 DH 的方差分析表

Table 4　ANOVA table based on hydrolysis degree DH

来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	81.84	9	9.09	19.14	0.0004	**
A酶解时间	42.04	1	42.04	88.51	<0.0001	**
B底物浓度	8.30	1	8.30	17.48	0.0041	**
C加酶量	3.01	1	3.01	6.34	0.0399	*
AB	0.0182	1	0.0182	0.0384	0.8503	
AC	0.0650	1	0.0650	0.1369	0.7223	
BC	0.0016	1	0.0016	0.0034	0.9553	
A^2	17.15	1	17.15	36.09	0.0005	**
B^2	0.3652	1	0.3652	0.7687	0.4097	
C^2	12.38	1	12.38	26.05	0.0014	**
残差	3.33	7	0.4750			
失拟项	0.8552	3	0.2851	0.4616	0.7242	
纯误差	2.47	4	0.6175			
总和	85.17	16				

R^2=0.9610　R^2_{Adj}=0.9108　C.V.%=3.02

注：P<0.01表示极显著，以**表示，P<0.05表示显著，以*表示；表5同。

表 5 基于 DPP-IV 抑制率的方差分析表

Table 5 ANOVA table based on DPP-IV inhibition rate

来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	135.90	9	15.10	90.47	<0.0001	**
A-酶解时间	8.97	1	8.97	53.73	0.0002	**
B-底物浓度	4.58	1	4.58	27.41	0.0012	**
C-加酶量	1.36	1	1.36	8.16	0.0245	*
AB	0.0930	1	0.0930	0.5573	0.4797	
AC	1.23	1	1.23	7.38	0.0299	*
BC	1.54	1	1.54	9.21	0.0190	*
A^2	54.42	1	54.42	326.08	<0.0001	**
B^2	13.49	1	13.49	80.85	<0.0001	**
C^2	38.85	1	38.85	232.79	<0.0001	**
残差	1.17	7	0.1669			
失拟项	0.7055	3	0.2352	2.03	0.2520	
纯误差	0.4629	4	0.1157			
总和	137.06	16				

R^2=0.9915 R^2_{Adj}=0.9805 C.V.%=0.5319

解度 DH)和 Y_2(DPP-IV 抑制率)的拟合方程分别为:

$$Y_1=-96.51-0.57A+6.44B+0.03C+0.45\times10^{-2}AB-4.25\times10^{-6}AC-0.04\times10^{-3}BC+0.22\times10^{-2}A^2-1.18B^2-1.72\times10^{-6}C^2$$

$$Y_2=-295.44+1.38A+17.47B+0.06C+0.01AB+0.18\times10^{-4}AC+0.12\times10^{-2}BC-0.40\times10^{-2}A^2-7.16B^2-3.04\times10^{-6}C^2$$

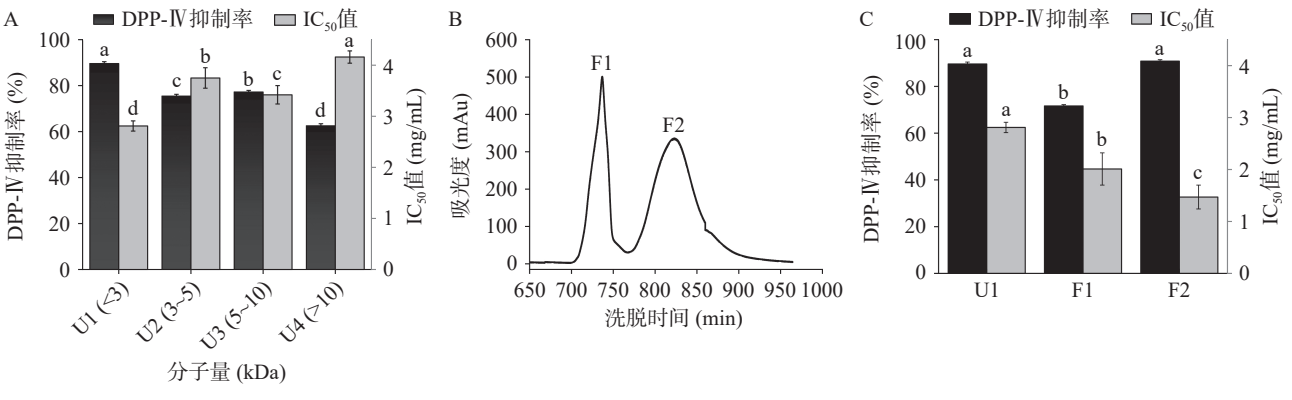
2.1.2.2 方差分析 以 A(酶解时间)、B(底物浓度)、C(加酶量)为自变量,以 DH 和 DPP-IV 抑制率为响应值,利用 Design-Expert 8.0.6 软件进行方差分析,结果见表 4 和表 5。两个模型的 P 值均小于 0.05,说明两个模型均显著,两个模型失拟项 P 值均不显著,表示回归模型预测值与实测值的拟合水平较高,可靠性强[32]。由表 4 和表 5 可知,两个模型的相关系数 R^2 均>0.95,说明相关度好。因此,该模型可用于预测和分析 WP 酶解工艺。各因素对 DH 的响应:A、B、A^2、C^2 达到极显著(P<0.01),C 为显著(P<0.05),表明酶解时间、底物浓度和加酶量对 WPHs 的 DH 影响显著;对 DPP-IV 抑制率的响应:A、B、A^2、B^2、C^2 达到极显著(P<0.01),C、AC、BC 为显著(P<0.05),表明酶解时间、底物浓度、加酶量、酶解时间和加酶量的交互作用以及底物浓度和加酶量的交互作用对 WPHs 的 DPP-IV 抑制活性影响显著[33]。F 值可以反映出各因素对试验指标的重要性,F 越大表明此因素对试验指标的影响越大[34]。由 F 值可以看出,各因素对 DH 响应值影响的顺序为:酶解时间>底物浓度>加酶量,对 DPP-IV 响应值影响的顺序为:酶解时间>底物浓度>加酶量。

2.1.2.3 模型验证 由方差分析可知,各因素对 WPHs 的 DH 与 DPP-IV 抑制率的影响效果一致,而本文主要是制备 DPP-IV 抑制肽,因此以 DPP-IV 抑制率为主要指标得到最优酶解条件,利用软件对响应面结果分析,我们得到酶解的最佳理论条件为:底物浓度 2.23%(w/v),加酶量 9100 U/g,酶解时间 180 min,其理论 DPP-IV 抑制率为 78.93%,该条件下的理论水解度 DH 为 26.84%。对 WP 酶解最佳工艺参数进行验证实验,测得水解度 DH 为 25.47%,DPP-IV 抑制率为 77.85%,与理论值差异不显著,说明有较好的拟合性。

2.2 核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽的分离纯化及鉴定

2.2.1 核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽的分离纯化 将 2.1.2.3 中碱性蛋白酶水解 180 min 得到的 WPHs 进行超滤,得到 U1(<3 kDa)、U2(3~5 kDa)、U3(5~10 kDa)、U4(>10 kDa)四个组分,图 2A 显示了各组分的 DPP-IV 抑制率及 IC_{50} 值。超滤结果显示,U1 组分的 DPP-IV 抑制活性显著优于其他各组(IC_{50}=2.81±0.1 mg/mL)。说明相对分子量较低的 DPP-IV 抑制肽的生物活性较高[35]。ZHANG 等[36] 也报道了相同的结果。图 2B 为离子交换分离洗脱图。用 Sephadex C-25 分离 U1 后,共得到两个组分:F1 和 F2,其 DPP-IV 抑制率与 IC_{50} 值见图 2C。F2 组分(IC_{50}=1.47±0.23 mg/mL)明显优于 F1 组分(IC_{50}=2.01±0.31 mg/mL),也明显优于 U1 组分,说明离子交换分离的效果较好[37]。因此,我们选择 F2 组分进行肽序列鉴定。

2.2.2 核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽的鉴定 从 F2 组分中检测到 6557 个肽序列,图 2D 为 F2 组分的总离子流图。图 2E 显示 F2 中肽段的分子量主要集中在小于 1 kDa 的部分(88.80%)。WANG 等[38] 和 LIU 等[39] 也得出了同样的结论,他们发现分子量<1 kDa 的 DPP-IV 抑制肽具有相对较好的生物活性。图 2F 显示了 F2 中的多肽的长度主要集中在



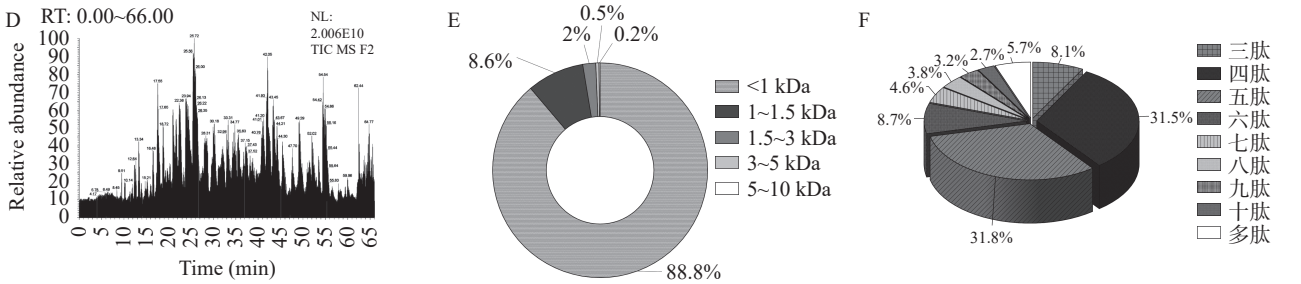


图 2　核桃蛋白酶解物的分离纯化及鉴定结果

Fig.2　Results of separation, purification and identification of walnut protease hydrolysates

注：A. 不同超滤组分的二肽基肽酶 IV(DPP-IV)抑制率及 IC_{50} 值；B. 经 Sephadex C-25 凝胶纯化的 U1(<3 kDa)组分色谱图；C. U1(<3 kDa)、F1、F2 组分的二肽基肽酶 IV(DPP-IV)抑制率及 IC_{50} 值；D. F2 组分总离子流色谱图；E. F2 组分中所鉴定肽段的分子量范围分布；F. F2 组分中所鉴定肽段的长度分布；不同字母表示统计学显著差异(P<0.05)。

3~6 肽[40]。这与 CHEN 等[41] 和 GUAN 等[42] 的报道一致，他们发现降血糖肽的结构通常由 2~25 个蛋白残基组成。

肽的筛选流程如图 3 所示。首先，将分离纯化、鉴定后的多肽序列，使用分子对接进行结合能计算，以确定可能存在的 DPP-IV 抑制活性的多肽，筛选出 1401 条可能具有极高 DPP-IV 抑制活性的多肽[43]。再利用 BIO-UWM 数据库和相关文献，从 1401 个肽中鉴定出 1379 个新的、未报道的肽，用于后续筛选[44]。随后，利用 PeptideRanker 和 PepDraw 网站预测 1379 个多肽的生物活性和疏水性。已知的最高生物活性评分为 1.0，水溶性高的多肽更容易被吸收[45]。筛选出 539 个生物活性大于 0.8 的多肽，然后对这些多肽的水溶性进行预测，得到 78 个具有良好的水溶性和显著生物活性的多肽。当预测其肽毒性时，将具有毒性的肽剔除[18]。在比较剩余肽的人体肠道吸收(HIA)、口服生物利用度(HOB)、Caco-2 细胞通透性、血浆蛋白结合(PPB)和血脑屏障通透性(BBBP)水平后[12]，最终选择了 5 条具有潜在的良好生物活性的肽。表 6 显示了与肽相对应的具体信息。

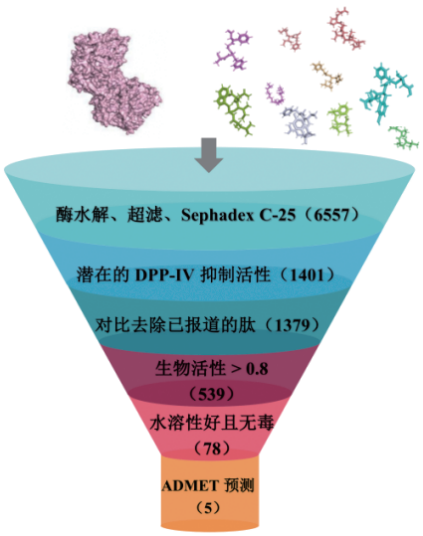


图 3　筛选流程图

Fig.3　Screening flowchart

表 6　核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽的理化性质、消化阻力、运输、吸收和毒性

Table 6　Physicochemical properties, digestive resistance, transport, absorption and toxicity of walnut protein DPP-IV inhibitory peptide

项目	IPI	KFPF	IFR	KGFL	KIPF	KLF
分子量(Da)	341.45	537.66	434.54	463.58	503.64	406.53
生物活性得分	0.47	0.98	0.9	0.86	0.85	0.81
溶解性	良好	良好	良好	良好	良好	良好
毒性	无毒	无毒	无毒	无毒	无毒	无毒
Caco-2 渗透性($\times10^{-6}$)	3.15	0.55	0.54	0.42	0.8	0.54
CYP 2D6 抑制	无	无	无	无	无	无
CYP 3A4 抑制	无	无	无	无	无	无
HIA	1	0.95	1	1	0.99	1
HOB(%)	47	11	13	16	14	22
PPB(%)	33	70	43	61	50	67
BBBP	0.18	0.08	0.11	0.18	0.07	0.18

注：IPI指经典的DPP-IV抑制剂二肽素A(Ile-Pro-Ile)。

筛选得到的 5 个 DPP-IV 抑制肽具有良好的水溶性，说明容易被肠道快速吸收。这 5 种 DPP-IV 抑制肽的序列长度均在 3~5 个氨基酸范围内。这与 GUAN 等[42] 的研究结果一致，他们发现短链肽在体内更稳定，更容易被吸收，且可能会有更好的 DPP-IV 抑制活性。此外，所有化合物都显示出对人体肠道有益。它们均显示出良好的药代动力学，这预示着筛选出来的五个肽可能在药物开发和利用中有更好的应用潜力。

2.3　DPP-IV 抑制肽的抑制机制

采用分子对接方法分析 DPP-IV 抑制肽与 DPP-IV 的作用机制，同时也可以验证肽筛选的结果是否可靠。分子对接可视化见图 4，其中，最左侧图中，二肽基肽酶 IV(DPP-IV)的三维蛋白结构以粉色显示，多肽的小分子结构以绿色呈现。中间的图代表 DPP-IV 通过黄线连接的氨基酸残基和蓝线表示的氢键与多肽结合。最右侧图表示多肽通过氢键和疏水作用与 DPP-IV 结合的氨基酸残基位点名称，绿色虚线及绿色氨基酸残基位点名称代表氢键，红色睫毛图及其黑色氨基酸残基位点名称代表疏水相互作用。MENG 等[46] 的研究结果表明，氢键相互作用对肽

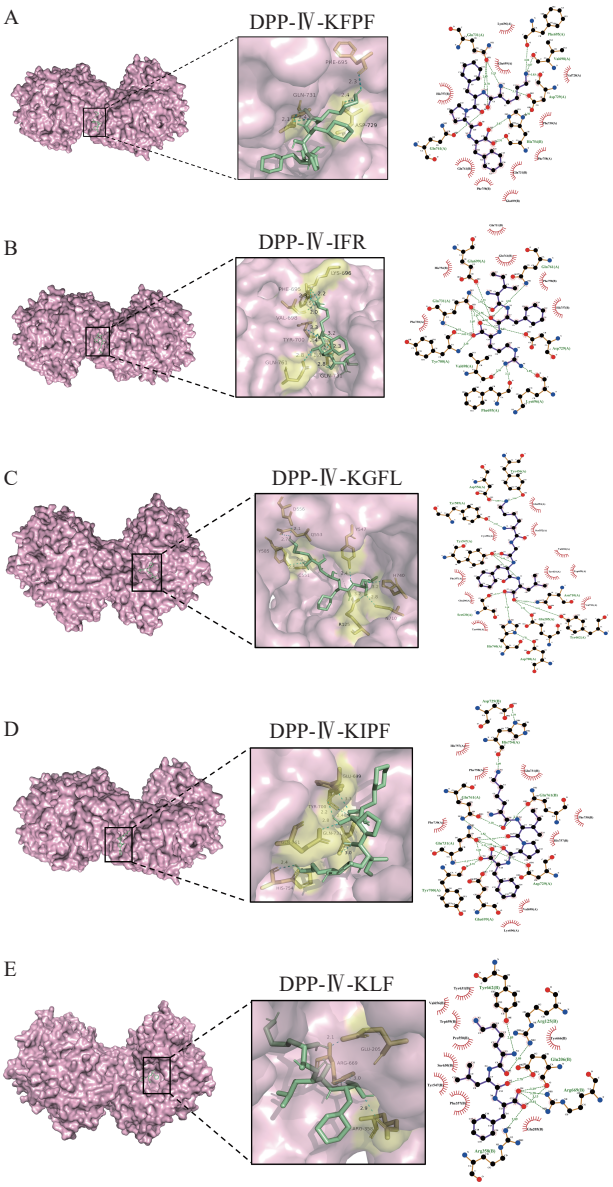


图 4　五种 DPP-IV 抑制肽与 DPP-IV 结合的分子对接结果

Fig.4　Molecular docking results of five DPP-IV inhibitory peptides bound to DPP-IV

的 DPP-IV 抑制活性有重要贡献，键数量越多，表明 DPP-IV 与肽的结合越有效，抑制作用也就越显著。YANG 等[47] 也得到了相同的结果，他们发现具有较多氢键的 DPP-IV 抑制肽具有更高的抑制活性。如图 4A 所示，KFPF 与 DPP-IV 的氨基酸残基 Phe695（键长：2.3 Å）、Asp729（键长：2.4 Å）和 Gln731（键长：2.1 Å、2.4 Å）形成了 6 个氢键。通过 Glu699、His757 和 Gln761 等 10 个氨基酸残基与 DPP-IV 形成疏水相互作用。

IFR（图 4B）与 DPP-IV 的氨基酸残基 Gln761（键长：2.8 Å）、Lys696（键长：2.2 Å、2.3 Å）和 Phe695（键长：2.0 Å、2.5 Å）结合，形成 8 个氢键和 6 个疏水作用。KGFL（图 4C）与 DPP-IV 的氨基酸残基 His740（键长 3.2 Å）、Tyr547（键长 2.4 Å）、Asn710（键长 2.8 Å）和 Arg125（键长：3.2 Å）结合，形成 10 个氢键和 10 个疏水作用。KIPF（图 4D）与 DPP-IV 的氨基酸残基 His754（键长：2.4 Å）、Gln761（键长：2.8 Å）和 Gln731（键长：3.0 Å）结合，形成 8 个氢键和 8 个疏水作用。KLF（图 4E）与 DPP-IV 的氨基酸残基 Glu205（键长：2.1 Å）、Arg669（键长：3.0 Å、3.3 Å）和 Arg358（键长：2.9 Å）结合，形成 5 个氢键和 9 个疏水作用。对接结果见表 7。一般情况下，结合能＜−4 kcal/mol 则表明其结合的较好[48]。如表所示，5 个肽的结合能均为负值（−6.6~−7.3 kcal/mol），表明它们均能与 DPP-IV 紧密的结合[49]。其中 KFPF、IFR、KGFL、KIPF 与 DPP-IV 对接后的结合能均≤−7 kcal/mol，表明对接强烈，其活性较好，且构象稳定[18]。这些结果表明，计算机筛选出来的 5 个肽具有较好的潜在 DPP-IV 抑制活性，但其实际抑制能力需要通过实验验证。

表 7　分子对接结果

Table 7　Molecular docking results

多肽序列	结合能（kcal/mol）	氢键数量	氢键键长（Å）	疏水氨基酸残基
KFPF	−7.0	6	2.1、2.3、2.4、2.4	10
IFR	−7.3	8	1.8、2.0、2.2、2.3、2.3、2.4、2.5、2.8、2.8、3.2、3.3	6
KGFL	−7.3	10	2.1、2.3、2.4、2.5、2.7、2.8、3.2、3.2	10
KIPF	−7.1	8	2.2、2.4、2.4、2.8、3.0、3.3	8
KLF	−6.6	5	2.1、2.9、3.0、3.3	9

2.4　DPP-IV 抑制肽的体外活性

体外活性实验（表 8）显示，KFPF 的抑制活性最高，IC_{50} 值为 0.26 mg/mL，并且显著优于 ZHENG 等[50] 从牛奶中鉴定出的 DPP-IV 抑制肽 GPFPIIV（IC_{50}=0.30 mg/mL）和 DAI 等[51] 从高粱中获得的 DPP-IV 抑制肽（IC_{50}=0.48 mg/mL）。其次是 KIPF（IC_{50}=0.49 mg/mL）、KGFL（IC_{50}=1.46 mg/mL）、IFR（IC_{50}=4.74 mg/mL）、KLF（IC_{50}=9.35 mg/mL）。这与基于分子对接结合能评分的预测结果不一致。出现这种现象的原因可能是该软件对抑制肽的空间构型进行了自动优化。ASHOK 等[52] 同样发现来自牛乳蛋白的 DPP-IV 抑制肽的分子对接评分与多肽实际的活性之间没有相关性。DHAOUAFI 等[53] 揭示了 DPP-IV 的大多数肽抑制序列中存在一种或多种疏水氨基酸。这是因为疏水氨基酸在结合时能够更紧密地与 DPP-IV 的相关活性口袋结合，从而表现出更

表 8　多肽的体外活性和 IC_{50} 值

Table 8　*In vitro* activity and IC_{50} values of peptides

多肽序列	DPP-IV（%）（2 mg/mL）	IC_{50}值（mg/mL）
KFPF	96.91±2.09^{a}	0.26±0.03^{d}
IFR	54.37±3.32^{d}	4.74±0.51^{b}
KGFL	70.51±2.85^{c}	1.46±0.18^{c}
KIPF	89.08±1.78^{b}	0.49±0.05^{d}
KLF	38.67±0.42^{e}	9.35±0.36^{a}

注：表中字母表示同一列之间的差异显著性（P<0.05）。

好地抑制活性。并且 ZHANG 等[11] 发现，肽段序列中带有 Pro 或 Ala 残基的肽可以作为强 DPP-IV 抑制剂。所筛选出的 5 条肽段中，KFPF 和 KIPF 均含有 3 个疏水氨基酸，且均含有脯氨酸，这可能是 KFPF 和 KIPF 抑制活性较高的原因。

2.5　DPP-IV 抑制肽的二级结构分析

肽的生理活性与其结构有着密不可分的关系。FTIR 光谱法适用于所有氨基酸残基，是研究肽的二级结构的有力手段[22]。酰胺 I 波段（1600~1700 cm^{-1}）主要是 C=O 的伸缩振动，对研究肽的二级结构具有重要意义。如表 9 所示，通过对酰胺 I 带的分析发现，DPP-IV 抑制活性最高的 KFPF 由 β-转角（82.03%±0.36%）、α-螺旋（15.18%±0.49%）和 β-折叠（2.38%±0.02%）组成。其中，β-转角和 α-螺旋结构的总含量 KFPF 与 KIPF 较高。这表明 β-转角和 α-螺旋结构可能与 DPP-IV 抑制活性相关。KGFL 的 β-转角含量低于 KFPF 和 KIPF，其 DPP-IV 抑制活性也低于 KFPF 和 KIPF。IFR 中主要由 β-转角（92.39%±0.70%）构成，未检出 α-螺旋，其 DPP-IV 抑制活性明显低于 KFPF 和 KIPF。KLF 中的 α-螺旋与 β-转角的总含量最低（6.25%±0.34%），其 DPP-IV 抑制活性也最低。ZHANG 等[54] 发现从薏苡仁蛋白中分离的 DPP-IV 抑制肽的活性与其 β-转角结构直接相关。HE 等[55] 研究了牛皮肤胶原 DPP-IV 抑制肽的二级结构，也得到了相同的发现。本研究通过合成 5 种 DPP-IV 抑制肽的二级结构，发现 β-转角和 α-螺旋结构是核桃蛋白中 DPP-IV 抑制肽的重要组成部分。

表 9　五种 DPP-IV 抑制肽的二级结构

Table 9　Secondary structures of five DPP-IV inhibitory peptides

二级结构	KFPF	IFR	KGFL	KIPF	KLF
β-折叠（%）	2.38±0.02^{c}	7.77±0.15^{b}	59.54±0.08^{a}	–	93.64±0.49^{a}
随机线圈（%）	–	–	–	–	–
α-螺旋（%）	15.18±0.49^{a}	–	–	12.48±0.09^{b}	6.25±0.34^{c}
β-转角（%）	82.03±0.36^{c}	92.39±0.70^{a}	40.38±0.79^{d}	87.40±0.85^{b}	–

注：不同字母表示同一行数据之间的差异显著性（P<0.05）；“–”表示无数据。

2.6　KFPF 抑制模式

通过 Lineweaver-Buck 图谱法测定了 KFPF 的抑制模式。如图 5 所示，随着 KFPF 的质量浓度增加，斜率逐渐增大，但与纵轴的交点位置保持不变，这表明抑制剂浓度升高、K_m 值增大而 V_{max} 保持恒定，属于典型竞争性抑制类型。该现象表明 KFPF 通过与 DPP-IV 活性位点相互作用，抑制了 DPP-IV 与底物的反应。ZHAO 等[8] 从豌豆蛋白中分离的多肽 YPR 也通过竞争性抑制作用表现出较高的 DPP-IV 抑制活性。DU 等[56] 也在从羊奶乳清蛋白中发现的高活性 DPP-IV 抑制肽 SPPEFLR 对 DPP-IV 表现出竞争性抑制。

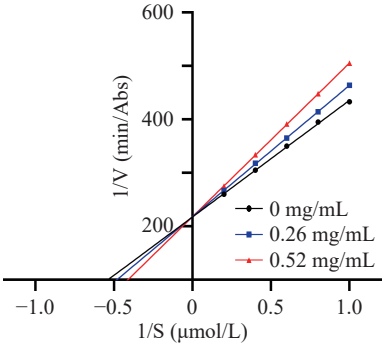


图 5　KFPF 的抑制模式

Fig.5　Inhibition pattern of KFPF

3　结论

本研究以核桃蛋白为对象，结合酶解条件优化、分离纯化、筛选以及活性验证鉴定出 5 条 DPP-IV 抑制肽：KFPF、IFR、KGFL、KIPF 和 KLF。通过单因素结合响应面优化试验，得到碱性蛋白酶水解核桃蛋白的最优条件：底物浓度 2.23%（w/v）、酶添加量 9100 U/g、酶解时间 180 min，该条件下水解度 DH 为 25.47%，DPP-IV 抑制率为 77.85%。分子对接分析表明，这些肽段主要通过氢键和疏水相互作用与 DPP-IV 结合，产生 DPP-IV 抑制作用。随后通过红外光谱分析，探讨了多肽二级结构与 DPP-IV 抑制活性的关系。分析发现 β-转角和 α-螺旋结构与其 DPP-IV 抑制活性紧密相关。此外，还发现 KFPF 通过与底物竞争结合 DPP-IV，具有最好的 DPP-IV 抑制活性，其 IC_{50} 值为 0.26 mg/mL。这些结果将为核桃蛋白 DPP-IV 抑制肽作为功能性食品成分预防和辅助治疗 2 型糖尿病提供一些见解，但本研究仍存在一些不足，KFPF 的生物稳定性和体内降血糖效果有待进一步研究。

© 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] 周高兴. 新疆薄皮核桃种仁种皮褐变差异分析及温度和氧气对其影响的研究[D]. 阿拉尔：塔里木大学, 2024. [ZHOU Gaoxing. Differential analysis of seed coat browning of thin-skinned walnut seed kernels in Xinjiang and the effects of temperature and oxygen on it[D]. Aral: Tarim University, 2024.]

[2] 李佳琪, 白丽. 中国核桃生产分布的变迁及发展建议[J]. 北

方果树, 2025(3): 1−6. [LI Jiaqi, BAI Li. Changes in the distribution of walnut production in China and suggestions for development[J]. Northern Fruit Tree, 2025(3): 1−6.]
[3] MORA-MELGEM J A, ARÁMBURO-GÁLVEZ J G, CÁRDENAS-TORRES F I, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from chickpea proteins (*Cicer arietinum* L.): Pharmacokinetics, molecular interactions, and multi-bioactivities[J]. Pharmaceuticals, 2023, 16(8): 1109.
[4] CHEN Xiya, ZHANG Wenhao, PAN Yuexin, et al. Preparation, identification, and molecular mechanism of novel DPP-IV inhibitory peptides from pumpkin seed: *In silico* screening and experimental validation[J]. Food Chemistry, 2025, 486: 144530.
[5] BOLLATI C, XU Ruoxian, BOSCHIN G, et al. Integrated evaluation of the multifunctional DPP-IV and ACE inhibitory effect of soybean and pea protein hydrolysates[J]. Nutrients, 2022, 14(12): 2379.
[6] LI Ping, CAO Tianli, LI Zongshuo, et al. Identification and antidiabetic activity of peptides in protein *Morus alba* leaf proteolytic hydrolysates: A novel functional food ingredient for ameliorating type 2 diabetes mellitus[J]. Food Bioscience, 2025, 66: 106139.
[7] KUPTAWACH K, SANGTANOO P, NUTHO B, et al. Multitarget mechanisms of diabetic inhibitory peptides derived from Longan seed protein hydrolysate[J]. Food Bioscience, 2025, 68: 106652.
[8] ZHAO Mengyao, LEI Jia, YAN Qiaojuan, et al. Discovery of pea protein-derived DPP-IV inhibitory peptides: Transport across Caco-2 cell monolayers and molecular mechanisms[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 307: 141897.
[9] WU Weijing, QIU Ju, WANG Libo, et al. Identification and characterization of two novel dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from the simulated gastrointestinal digestion of Tartary buckwheat proteins[J]. Food Chemistry, 2025, 473: 143067.
[10] ZHU Lingjiao, LI Zuyue, MA Meihu, et al. Exploration of novel DPP-IV inhibitory peptides from discarded eggshell membrane: An integrated *in silico* and *in vitro* study[J]. Food Bioscience, 2024, 59: 104036.
[11] ZHANG Jin, WU Yulong, TANG Honggang, et al. Identification, characterization, and insights into the mechanism of novel dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from yak hemoglobin by *in silico* exploration, molecular docking, and *in vitro* assessment[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 259: 129191.
[12] HONG Zishan, SHI Chongying, HU Xia, et al. Walnut protein peptides ameliorate DSS-induced ulcerative colitis damage in mice: An *in silico* analysis and *in vivo* investigation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(42): 15604−15619.
[13] SHENG Xinyuan, SUN Mingkai, ZHANG Yaoxin, et al. Effect of ultra-high pressure combined with heat-assisted treatment on the characterization, moisture absorption, and antioxidant activity properties of walnut peptide[J]. Food Chemistry, 2025, 476: 143473.
[14] CHEN Peihang, HUANG Pantian, LIANG Yingyan, et al. The antioxidant peptides from walnut protein hydrolysates and their protective activity against alcoholic injury[J]. Food & Function, 2024, 15(10): 5315−5328.
[15] KONG Xiangzhen, ZHANG Lina, SONG Weiguang, et al. Separation, identification and molecular binding mechanism of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides derived from walnut (*Juglans regia* L.) protein[J]. Food Chemistry, 2021, 347: 129062.
[16] LIU Dandan, GUO Yiting, ZHU Junsong, et al. The necessity of enzymatically hydrolyzing walnut protein to exert antihypertensive activity based on *in vitro* simulated digestion and *in vivo* verification[J]. Food & Function, 2021, 12(8): 3647−3656.
[17] ZHONG Jun, XU Yongzhao, XIAO Ganhong, et al. Walnut peptide reduce uric acid production by non-covalent binding to hypoxanthine *in vitro*[J]. Food Bioscience, 2025, 71: 107072.
[18] DANG Kuo, LAN Jing, WANG Yanli, et al. Screening and evaluation of novel DPP-IV inhibitory peptides in goat milk based on molecular docking and molecular dynamics simulation[J]. Food Chemistry: X, 2025, 25: 102217.
[19] 毛晓英, 朱新荣, 万银松, 等. 核桃蛋白的组成分析及分离提取工艺的优化[J]. 中国食品学报, 2019(3): 195−205. [MAO Xiaoying, ZHU Xinrong, WAN Yinsong, et al. Composition analysis and optimization of separation and extraction process of walnut protein[J]. Chinese Journal of Food Science, 2019(3): 195−205.]
[20] DONG Xinhong, LI Jing, JIANG Guoxiang, et al. Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on physicochemical and antioxidant properties of peanut proteins[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(4): 1417−1425.
[21] KOJIMA K, HAMA T, KATO T, et al. Rapid chromatogrpahic purification of dipeptidyl peptidase IV in human submaxillary gland[J]. Journal of Chromatography A, 1980, 189(2): 233−240.
[22] LI Jialu, WEI Yabo, LEI Yongdong, et al. Screening, identification, and mechanistic exploration of DPP-IV inhibitory peptides from collagen in *Esox lucius* skin[J]. Food Bioscience, 2025, 63: 105698.
[23] 张丽娜. 核桃蛋白水解物的抗氧化性及其二肽基肽酶 IV 抑制活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023. [ZHANG Lina. Antioxidant activity of walnut protein hydrolysate and its inhibitory activity of dipeptidyl peptidase IV[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.]
[24] WEI Yabo, GUO Xin, FAN Xuemei, et al. Screening and mechanism of six angiotensin I-converting eneyme inhibitory peptides from protein hydrolysate of *Coregonus peled* visceral: A combined in computer and *in vitro* study[J]. Lwt, 2023, 188: 115426.
[25] HUO Jiaying, CUI Zhaowei, ZHANG Ruru, et al. Study on the effect and mechanism of ultrasonic-assisted enzymolysis on antioxidant peptide activity in walnuts[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2025, 112: 107159.
[26] ZHAO Yindi, WU Qingzhi, ZHANG Qihong, et al. Ultrasound and high-speed shear pretreatments of walnut meal protein: Structural and functional characterization and mechanistic investigation[J]. Lwt, 2024, 210: 116820.
[27] MA Xiaotong, WANG Wenxing, SHI Hongmei, et al. Identification of novel antifreeze peptides from yak skin gelatin ultrasound-assisted enzymatic hydrolysate[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2024, 111: 107102.
[28] HAO Yuejing, XING Lujuan, WANG Zixu, et al. Study on the anti-inflammatory activity of the porcine bone collagen peptides prepared by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 101: 106697.
[29] GE Shuangmei, HE Chunyan, DUAN Yichen, et al. Characteristics of enzymolysis of silkworm *Pupa* protein after tri-frequency ultrasonic pretreatment: Kinetics, thermodynamics, structure and antioxidant changes[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1170676.
[30] QUAN Zhengze, WANG Zonghan, WANG Zixu, et al. Study on the antioxidant and antiosteoporotic activities of the oyster peptides prepared by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2025, 112: 107211.
[31] CHEN Wen, YANG Fan, XU Haining, et al. Hexagonal plate ultrasound pretreatment on the correlation between soy protein isolate structure and cholesterol-lowering activity of peptides, and protein's enzymolysis kinetics, thermodynamics[J]. International Jour-

nal of Biological Macromolecules, 2024, 258: 128897.
[32] 颜阿娜, 洪燕婷, 王琳, 等. 鲭鱼酶解工艺双响应面法优化及抗氧化活性研究[N]. 通化师范学院学报, 2023-09-04(4). [YAN Ana, HONG Yanting, WANG Lin, et al. Optimization and antioxidant activity of mackerel enzyme digestion process by dual response surface method[N]. Journal of Tonghua Normal College, 2023-09-04(4).]
[33] 翁淑燚. 绿茶萃取液酶解工艺双响应面法优化研究[J]. 中国茶叶, 2022, 44(8): 40−47. [WENG S Y. Optimization of enzymatic hydrolysis process of green tea extract by dual response surface method[J]. Chinese Tea, 2022, 44(8): 40−47.]
[34] 陶莉, 王俊彤, 李冠龙, 等. 玉米蛋白源 DPP-IV 抑制肽的酶法制备及其性质研究[J]. 食品工业科技, 2026, 47(1): 289−299. [TAO Li, WANG Juntong, LI Guanlong, et al. Enzymatic preparation and characterization of DPP-IV inhibitory peptide from corn protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(1): 289−299.]
[35] LIU Mingchen, LI Yicheng, LI Wentao, et al. Hemp seed protein exerts its hypoglycemic and hypolipidemic effects through degradation into short peptides[J]. Food Chemistry, 2025, 484: 144406.
[36] ZHANG L, BAI Y Y, HONG Z S, et al. Isolation, identification, activity evaluation, and mechanism of action of neuroprotective peptides from walnuts: A review[J]. Nutrients, 2023, 15(18): 4085−4108.
[37] ZHONG Hui, LI Baokun, FAN Zhexin, et al. Isolation, purification, characterization, and analysis of the antioxidant activity of antioxidant peptides from walnut milk fermented with *Lactobacillus paracasei* SMN-LBK[J]. Food Bioscience, 2024, 61: 104547.
[38] WANG Xinyi, AI Xin, ZHU Zehui, et al. Pancreatic lipase inhibitory effects of peptides derived from sesame proteins: *In silico* and *in vitro* analyses[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 222: 1531−1537.
[39] LIU Xiaoting, SUN Shuo, LIU Jiale, et al. Isolation, virtual screening, and evaluation of hazelnut-derived immunoactive peptides for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(20): 11561−11576.
[40] COURNOYER A, BERNIER M È, ABOUBACAR H, et al. Machine learning-driven discovery of bioactive peptides from duckweed (*Lemnaceae*) protein hydrolysates: Identification and experimental validation of 20 novel antihypertensive, antidiabetic, and/or antioxidant peptides[J]. Food Chemistry, 2025, 482: 144029.
[41] CHEN Haihong, LI Wei, WANG Yi, et al. Mining and validation of novel hemp seed-derived DPP-IV-inhibiting peptides using a combination of multi-omics and molecular docking[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(23): 9164−9174.
[42] GUAN Changge, LUO Jiawei, LI Shucheng, et al. Exploration of DPP-IV inhibitory peptide design rules assisted by the deep learning pipeline that identifies the restriction enzyme cutting site [J]. ACS Omega, 2023, 8(42): 39662−39672.
[43] 谢玉霞, 葛武鹏, 李国薇, 等. 驼乳乳铁蛋白 DPP-IV 抑制肽的筛选验证及其防治糖尿病潜在作用机制探究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(6): 384−395. [XIE Yuxia, GE Wupeng, LI Guowei, et al. Screening and validation of lactoferrin DPP-IV inhibitory peptide from camel's milk and its potential mechanism of diabetes prevention[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(6): 384−395.]
[44] ZHENG Xinyu, MA Jun, ZHANG Anyu, et al. Bioactive peptides from millet bran glutelin-2: Identification, virtual screening, inhibitory mechanism towards angiotensin-I-Converting enzyme, stability, antihypertension, and ferrous-transmembrane absorption [J]. Food Bioscience, 2025, 63: 105595.
[45] XU Qiongyao, ZHENG Lin, HUANG Mingtao, et al. Collagen derived Gly-Pro-type DPP-IV inhibitory peptides: Structure-activity relationship, inhibition kinetics and inhibition mechanism[J]. Food Chemistry, 2024, 441: 138370.
[46] MENG Pengfei, WANG Yanxin, HUANG Yumeng, et al. A strategy to boost xanthine oxidase and angiotensin converting enzyme inhibitory activities of peptides via molecular docking and module substitution[J]. Food Chemistry, 2024, 442: 138401.
[47] YANG Zhizhi, XU Hui, WANG Changrong, et al. Discovery and mechanism of novel anticoagulant peptides from *Larimichthys crocea* based on *in silico*, molecular docking, molecular dynamics, and *in vitro* analysis[J]. Food Research International, 2025, 213: 116566.
[48] 张楚涵, 陈寅格, 马婷, 等. 珍珠蚌肉 DPP-IV 抑制肽的制备与分离[J]. 食品科学, 2024, 45(17): 63−70. [ZHANG Chuhan, CHEN Yinge, MA Ting, et al. Preparation and isolation of DPP-IV inhibitory peptide from pearl mussel[J]. Food Science, 2024, 45(17): 63−70.]
[49] HU Haohan, LI Jianfei, CHEN Feng, et al. Isolation and characterization of DPP-IV inhibitory peptide from rabbit meat hydrolysate: Mechanism, gastrointestinal resistance, and hypoglycemic effects of Leucyl-Leucine (LL)[J]. Food Bioscience, 2024, 61: 104592.
[50] ZHENG Qianqian, LUO Xin, PAN Daodong, et al. Rapid screening and identification of novel dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from buffalo milk[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2025, 105(7): 3942−3950.
[51] DAI Lingyan, KONG Lingxin, CAI Xiao, et al. Analysis of the structure and activity of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory oligopeptides from sorghum kafirin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(6): 2010−2017.
[52] ASHOK A, APARNA H S. Identification of DPP-IV inhibitory peptides derived from buffalo colostrum: Mining through bioinformatics, *in silico* and *in vitro* approaches[J]. Journal of Molecular Recognition, 2024, 37(4): e3090.
[53] DHAOUAFI J, ROMDHANI M, DERACINOIS B, et al. Fractionation and identification of bioactive peptides from red macroalgae protein hydrolysates: *In silico* analysis and *in vitro* bioactivities[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2024, 58: 103211.
[54] ZHANG Shu, LI Zhiming, FENG Yuchao, et al. DPP-IV inhibitory peptides from *Coix seed* prolamins: Release, identification, and analysis of the interaction between key residues and enzyme domains[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(40): 14575−14592.
[55] HE Long, WANG Xinyue, WANG Yanru, et al. Production and identification of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from discarded cowhide collagen[J]. Food Chemistry, 2023, 405: 134793.
[56] DU Xiaojing, JIANG Chengyu, WANG Shan, et al. Preparation, identification, and inhibitory mechanism of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from goat milk whey protein[J]. Journal of Food Science, 2023, 88(8): 3577−3593.