张正海, 李柏阳, 田媛, 等. 汉麻蛋白源胰脂肪酶抑制肽的制备、结构表征及活性筛选 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(15): 77−86. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060326

ZHANG Zhenghai, LI Baiyang, TIAN Yuan, et al. Preparation, Structural Characterization, and Activity Screening of Pancreatic Lipase Inhibitory Peptides from Hemp Protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(15): 77−86. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060326

· 研究与探讨 ·

汉麻蛋白源胰脂肪酶抑制肽的制备、结构表征及活性筛选

张正海, 李柏阳, 田　媛, 李国巍, 吕文庆, 潘　静, 高　媛, 石　杰*

（黑龙江省科学院大庆分院, 黑龙江大庆 163319）

摘　要: 本研究旨在利用生物酶解技术提升汉麻蛋白资源的利用率及产品附加值，制备具有胰脂肪酶（pancreatic lipase，PL）抑制活性的功能肽。基于对比不同蛋白酶的水解效果筛选最优酶，采用 Box-Behnken 响应面法优化酶解工艺；综合运用分子量分布测定、扫描电镜观察、紫外光谱、傅里叶变换红外光谱、圆二色光谱及氨基酸组成分析，解析酶解前后蛋白的结构特征变化；利用 LC-MS/MS 鉴定多肽序列，并结合分子对接技术筛选潜在的活性肽。结果表明，最优酶解条件为：木瓜蛋白酶与底物比（E/S，w/w）4.3%、温度 62 ℃、pH6.1。此条件下，酶解物的 PL 抑制率达 57.06%±1.64%，IC_{50} 值为 5.12±0.31 mg/mL。水解产物呈现不规则无定形微观结构，平均分子量降低且 1~3 kDa 多肽占比升高；酶解过程导致蛋白的 β-折叠比例显著降低，α-螺旋、β-转角比例显著增加，甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸及精氨酸等氨基酸的含量也发生显著变化；经鉴定，酶解产物中共有 1195 条多肽，从中筛选出相对含量大于 1% 且 PeptideRanker 得分≥0.6 的候选多肽 15 条（序列：FEW、LLFSP、LAF、LLF、FYL、LSF、VLF、LLSF、LFL、LFY、LVF、LFR、LFF、LLLF、FLF），其累计相对含量达 28.79%；分子对接显示，上述多肽与 PL 的对接结合能介于−7.4~−10.0 kcal/mol，显示出较强的 PL 抑制潜力。综上，本研究证实木瓜蛋白酶可高效制备汉麻蛋白源 PL 抑制肽，同时酶解过程能显著改变蛋白结构。优化的酶解条件及鉴定出的 15 种潜在活性肽，为汉麻蛋白在肥胖干预功能食品中的高值化开发及工业化应用提供了理论与技术依据。

关键词: 汉麻蛋白, 酶解肽, 结构表征, 胰脂肪酶抑制, 分子对接

中图分类号: TS254.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)15−0077−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060326

本文网刊:

Preparation, Structural Characterization, and Activity Screening of Pancreatic Lipase Inhibitory Peptides from Hemp Protein

ZHANG Zhenghai, LI Baiyang, TIAN Yuan, LI Guowei, LÜ Wenqing, PAN Jing, GAO Yuan, SHI Jie*

（Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing 163319, China）

Abstract: This study investigated the enzymatic production of bioactive peptides from hemp (*Cannabis sativa* L.) protein with potent pancreatic lipase (PL) inhibitory activity. Through a comparative evaluation of proteases, papain yielded a hydrolysate with the highest PL inhibitory activity and was consequently selected for process optimization using Box-Behnken response surface methodology. The optimal conditions were determined as follows: enzyme-to-substrate ratio, 4.3%; hydrolysis temperature, 62 ℃, and pH6.1, resulting in 57.06%±1.64% PL inhibition with an IC_{50} value of 5.12±0.31 mg/mL. The hydrolysate exhibited an irregular amorphous microstructure, accompanied by a reduced average molecular weight and an increased proportion of 1~3 kDa peptides. After enzymatic hydrolysis, the β-sheet proportion of the protein decreased significantly, while the α-helix and β-turn proportions increased remarkably. Additionally, the levels of

收稿日期: 2025−06−26

基金项目: 黑龙江省科学院大庆分院院所能力提升项目（YSTS2025DQ01-5）; 黑龙江省大庆市庆雁人才支持计划项目（DQXY202409）; 黑龙江省科学院青年创新基金（CXMS2024DQ01）。

作者简介: 张正海（1988−）, 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 功能食品与生物技术, E-mail: 95513801@qq.com。

*** 通信作者:** 石杰（1984−）, 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 农产品加工, E-mail: shijie0456@163.com。

amino acids such as glycine, alanine, proline, serine, and arginine underwent significant changes. A total of 1195 peptides were identified by LC-MS/MS, from which 15 candidate peptides (with sequences FEW, LLFSP, LAF, LLF, FYL, LSF, VLF, LLSF, LFL, LFY, LVF, LFR, LFF, LLLF, and FLF) were screened based on two criteria: relative content >1% and PeptideRanker score ≥0.6. The cumulative relative content of these 15 candidate peptides reached 28.79%. Molecular docking results indicated that the binding energies between these peptides and PL ranged from −7.4 to −10.0 kcal/mol, suggesting their potential as PL inhibitors. In conclusion, papain can efficiently generate PL-inhibitory peptides from hemp protein. Additionally, the enzymatic hydrolysis process significantly alters the structural characteristics of hemp protein. The optimized hydrolysis conditions established here, along with the identification of 15 potential bioactive peptides, provide a solid foundation for the high-value development of hemp protein and its industrial application in functional foods for the intervention of obesity.

Key words: hemp protein; enzymatic hydrolysate peptides; structural characterization; pancreatic lipase inhibition; molecular docking

肥胖是由遗传、饮食、生活方式及环境等多因素相互作用引发的慢性代谢性疾病，特征为机体脂肪过度积累。体重指数大于或等于 25 kg/m^2 为超重，大于或等于 30 kg/m^2 则被判定为肥胖。2022 年全球肥胖人口已突破 10 亿，中国肥胖人群规模超 2.2 亿，且呈现年轻化趋势[1]。肥胖不仅是Ⅱ型糖尿病、非酒精性脂肪肝等代谢综合征的重要诱因，更导致每年超过 400 万人死亡[2]。现有药物如奥利司他存在胃肠道副作用和肝损伤风险，而 GLP-1 受体激动剂等新药面临停药反弹及用药成本高昂的挑战。因此，开发安全有效的新型肥胖干预策略已成为亟待解决的关键问题[3]。

膳食甘油三酯是人体脂肪摄入的主要形式，其消化吸收依赖于胰脂肪酶（pancreatic lipase, PL）的催化作用。该酶负责水解人体 50%~70% 的膳食脂肪，是调控脂肪吸收的关键限速酶[4]。特异性抑制 PL 活性可有效减少肠道对游离脂肪酸的摄取，阻断其经血液循环参与的脂肪重合成，从而实现对肥胖的干预。研究证实，由 2~20 个氨基酸组成的特定短肽序列，可通过竞争性结合 PL 活性位点或改变其空间构象等机制，高效抑制 PL 活性[5]。这类肽通常可通过酶解技术从蛋白中释放出来。目前，已从黑芝麻饼、奇亚籽、亚麻籽、黑豆、榛子等多种植物蛋白水解物中鉴定出具有 PL 抑制活性的肽段[6]。相较于化学合成药物，植物源生物活性肽具有毒性低、原料成本低等优势，在肥胖干预功能食品开发中具有广阔应用前景。

汉麻（*Cannabis sativa* L.）籽作为我国特色油料作物，其加工副产物汉麻仁粕的蛋白质含量高达 40%~50%，但当前利用率极低，造成严重的资源浪费。近年来，越来越多的研究发现，酶解制备的汉麻多肽具有抗氧化、免疫调节和抗疲劳的作用，并在预防和治疗糖尿病、高血压、血栓、高胆固醇血症及肥胖等慢性疾病中展现出巨大潜力[7−9]。特别是在肥胖干预方面，研究发现，汉麻蛋白酶解物可显著降低高脂饮食诱导的肥胖大鼠体重及血清总胆固醇水平[10]。尹浩等[11] 通过超滤、肽组学与虚拟筛选技术联用，从汉麻籽蛋白中成功鉴定出 APAM、RLPA 两条靶向 PL 的抑制肽。本课题组前期研究[12] 从木瓜蛋白酶水解的汉麻籽蛋白中分离出 3 种新型 PL 抑制肽，其中 YNLPILRF 的抑制活性最强，IC_{50} 为 0.377±0.041 mmol/L。然而，此类单一高活性肽的分离纯化成本高昂，难以实现规模化应用。相对而言，开发一种以富含多种活性肽的功能性肽混合物为目标的高效、低成本制备工艺，对于推动汉麻肽的实际应用更具价值[13]。

因此，本研究通过筛选最优蛋白酶、优化酶解工艺参数，建立汉麻蛋白源 PL 抑制肽的高效制备方法；结合多学科技术手段解析酶解前后蛋白的结构变化；通过 LC-MS/MS 与分子对接技术筛选潜在活性肽序列，旨在推动汉麻加工副产物在功能性食品或膳食补充剂领域的实际应用转化。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

汉麻仁分离蛋白（hemp protein isolate, HPI）辽宁俏牌生物科技有限公司；木瓜蛋白酶（≥6000 U/mg）、菠萝蛋白酶（300 U/mg）、中性蛋白酶（50 U/mg）、风味酶（20 U/mg）、对硝基苯丁酸酯（p-NPB）上海麦克林生化科技有限公司；猪胰腺Ⅱ型胰脂肪酶（3~90 U/mg） 美国 Sigma-Aldrich 公司；邻苯二醛（OPA）、BCA 蛋白浓度检测试剂盒 安徽白鲨生物有限公司。

M104E 型电子天平、FE20 型实验室 pH 计 瑞士梅特勒-托利多公司；VFD4500 型真空冷冻干燥机 北京博医康有限公司；L8900 全自动氨基酸分析仪 日本日立公司；TSKgel G2000 SWXL 色谱柱 日本 TOSOH 公司；Molecular Devices 酶标仪 上海美谷分子有限公司；U-T1810S 紫外可见分光光度计 上海屹谱仪器制造有限公司；Chirascan V100 圆二色光谱仪 Applied Photophysics 公司；FTIR-650 傅里叶变换红外光谱仪 天津港东科技发展有限公司；GeminiSEM 360 场发射扫描电子显微镜（分辨率 1.0 nm @ 15 kV，加速电压 0.1~30 kV，配备 EDAX Octane Elect Plus 能谱仪） 德国蔡司公司；EasynLC

1200 系统　美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　汉麻蛋白酶解物的制备与蛋白酶筛选　以 PL 抑制率为评价指标，分别采用中性蛋白酶（40 ℃，pH7.5）、风味蛋白酶（50 ℃，pH8.0）、菠萝蛋白酶（50 ℃，pH7.0）和木瓜蛋白酶（65 ℃，pH6.0）在各自最适 pH 与温度条件下对 HPI 进行酶解处理。底物蛋白浓度为 50 g/L，酶与底物比统一为 4%（w/w），酶解时间为 5 h。检测酶解物对 PL 抑制率的大小，筛选酶解效果最优的蛋白酶。

1.2.2　汉麻蛋白酶解工艺优化　通过单因素实验分别探讨酶浓度、酶解 pH 和酶解温度对 PL 抑制率的影响，料液比为 1∶20 g/mL，酶解时间为 5 h。采用单因素实验，固定项参数为：酶浓度 4%，酶解 pH6.0，酶解温度 60 ℃；变动项参数为酶浓度（1%、2%、4%、6%、8%）、酶解 pH（5.0、5.5、6.0、6.5、7.0）以及酶解温度（50、55、60、65、70 ℃）。样品水解结束后，于 95 ℃ 条件下灭酶 10 min，调整 pH 至 7.0，8000 r/min 离心 20 min，测定上清液对 PL 的抑制作用。在单因素实验结果的基础上，利用 Design-Expert 软件进行 Box-Behnken Design 试验设计，见表 1。最终，通过对回归方程的分析确定汉麻多肽的最佳酶解工艺参数。

表 1　Box-Behnken 试验设计因素与水平

Table 1　Factors and levels of the Box-Behnken experimental design

水平	X_1：酶浓度（%）	X_2：酶解温度（℃）	X_3：酶解pH
−1	3	60	5.5
0	4	65	6.0
+1	5	70	6.5

1.2.3　脂肪酶抑制活性测定　以 p-NPB 为底物进行 PL 抑制试验[12]。在 96 孔板中依次加入 50 μL 样品溶液与 25 μL 胰脂肪酶溶液（1.25 mg/mL，溶解于 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液，pH7.4，含有 100 mmol/L NaCl），并在 37 ℃ 条件下预孵育 15 min。随后加入 25 μL p-NPB 溶液（5 mmol/L）启动反应，补充磷酸钠缓冲液至终体积为 150 μL。继续孵育 15 min 后，使用酶标仪测定 405 nm 处的 OD 值。PL 抑制率按如下公式计算：

$$\text{PL抑制率}(\%)=\left(1-\frac{C-D}{A-B}\right)\times 100$$

式中：A 为含酶无样品组的 OD 值；B 为无酶无样品组的 OD 值；C 为含酶含样品组的 OD 值；D 为含样品无酶组的 OD 值。

在最佳酶解条件下，采用 GraphPad Prism（v10.1.2）软件通过非线性回归分析测定样品抑制 PL 的 IC_{50} 值，同时以奥利司他作为阳性对照。

1.2.4　水解度的测定　采用 OPA 法测定酶解产物的水解度[13]。取 20 μL L-丝氨酸或样品溶液与 150 μL 的 OPA 试剂混合，孵育 2 min 后，使用酶标仪测定 340 nm 处的 OD 值。根据 L-丝氨酸标准曲线（浓度范围 0~100 μg/mL）计算游离氨基含量。将 50 mg HPI 样品，加入 6 mol/L HCl 溶液中，于 115 ℃ 条件下水解 22 h，测定总氨基酸含量。水解度计算按照如下公式：

$$\text{水解度}(\%)=\frac{OD_{样品}-OD_{空白}}{OD_{总}-OD_{空白}}\times 100$$

式中：$OD_{样品}$为样品水解后的 OD 值；$OD_{空白}$为样品水解前的 OD 值；$OD_{总}$为样品完全水解后的 OD 值。

1.2.5　分子量分布检测　将酶解物以 10000 r/min 离心 10 min，收集上清液。使用配备有 220 nm 波长的 UV 检测器的高效液相色谱系统测定分子量分布[14]。取 10 μL 样品进样至 TSKgel G2000 SWXL 色谱柱（300×7.8 mm，0.5 μm）。以含 45%（v/v）乙腈与 0.1%（v/v）三氟乙酸的超纯水为洗脱液，采用等度洗脱方式，流速设定为 0.5 mL/min，检测波长 220 nm。以牛血清白蛋白、细胞色素 C、抑肽酶、杆菌肽以及甘氨酰-甘氨酰-酪氨酰-精氨酸四肽为标准品，标准品保留时间为横坐标（x），其分子量对数为纵坐标（y），拟合得到标准曲线方程为 y=−0.231427x+6.91037，R^2=0.9896。

1.2.6　扫描电镜（scanning electron microscope，SEM）　采用扫描电镜观察各样品的表面微观形貌。将冻干的样品涂在样品托盘的导电胶上，喷涂金后 10.0 kV 加速电压下使用高分辨率场发射扫描电镜成像。

1.2.7　多光谱分析　圆二色谱（circular dichroism，CD）：在氮气的保护下对 0.5 mg/mL 的样品在 190~260 nm 扫描，并使用 CDNN 2.1-simple Spectra 程序分析二级结构[14]。傅里叶变换红外光谱（fourier transform infrared spectroscopy，FTIR）：将样品与干燥的溴化钾（1∶100，w/w）混合后粉碎，置于真空压片机中加压至 20 MPa，持续 2 min。扫描波数 400~4000 cm^{-1}，分辨率为 4 cm^{-1}，累积 64 次扫描。紫外光谱：取 0.5 mg/mL 的样品，在 190~400 nm 波长范围内记录光谱数据。

1.2.8　氨基酸组成分析　采用 L8900 全自动氨基酸分析仪进行分析[15]。将 50 mg 样品置于 10 mL 6 mol/L HCl 中，于 110 ℃ 水解 24 h 后进行检测。蛋白质效率比的计算按照如下公式[16]：

$$\text{蛋白质效率比}=-0.468+0.454\times\text{Leu}-0.105\times\text{Tyr}$$

式中：Leu 和 Tyr 分别代表 100 g 样品中亮氨酸和酪氨酸的质量，g。

1.2.9　LC-MS/MS 鉴定　样品采用 0.15×150 mm Acclaim PepMap RP-C_{18} 色谱柱和 EasynLC 1200 系统分离。样品体积为 3 μL，经 95% 流动相 A（0.1%

甲酸)平衡后上样。流动相 B 由 84% 乙腈和 0.1% 甲酸组成。洗脱速度为 300 nL/min, 梯度为: 0~50 min, 4%~50%B; 50~54 min, 50%~100%B; 54~60 min, 保持 100%B, 分离肽在 Q-Exactive HF-X 上使用数据依赖的 Top 20 方法分析。在 ESI 正离子模式下, MS 数据在 350~1500 m/z 范围内采集。一级质谱分辨率配置为 60000, 二级质谱分辨率设置为 15000。结合 uniprotkb_Cannabis_sativa_30192_2025_03_03 数据库, 使用 MaxQuant(v1.5.5.1)对数据进行鉴定。最后, 对相对含量大于 1% 的肽段进行生物活性预测和分子对接分析。

1.2.10 生物活性预测和分子对接分析 采用 PeptideRanker 对生物活性进行评分, 筛选出得分≥0.6 的肽。以胰脂肪酶 1ETH 作为受体蛋白。候选多肽作为配体, 经 Chem 3D 20.0 软件 MMFF94 力场进行能量最小化优化, 采用在线平台 CB-Dock2(CB-Dock2: An accurate protein-ligand blind docking tool)进行半柔性分子对接。对接过程中, 对配体结合口袋进行全蛋白表面盲对接, 其余参数保持默认设置。最后, 应用 PyMOL 2.6.0 和 BIOVIA_DS2024Client 软件对肽与受体的结合模式进行可视化分析。

1.3 数据处理

所有结果均为 3 个重复, 并以平均值±标准差表示。采用 SPSS29.0 软件进行单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan's Multiple Range 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。Origin Pro 2024 软件绘图。通过 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 计算预测变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)。为验证 OPLS-DA 模型的有效性并排除过拟合风险, 采用置换检验(permutation test, n=200)对模型进行验证。

2 结果与分析

2.1 最佳水解酶的筛选结果

不同蛋白酶水解产物的 PL 抑制率和水解度如图 1 所示。木瓜蛋白酶水解产物的 PL 抑制活性显著高于其他蛋白酶($P<0.05$), 抑制率达到 49.77%±0.10%; 其次为菠萝蛋白酶的 38.89%±1.11% 和风味蛋白酶的 29.65%±1.05%, 而中性蛋白酶水解物抑制率仅为 20.45%±1.87%。木瓜蛋白酶属于半胱氨酸蛋白酶, 其催化特性表现为优先水解 Arg 和 Lys 羧基端的肽键[17]。Mudgil 等[18] 的研究指出, 酪蛋白的木瓜蛋白酶水解物也表现出更高的 PL 抑制活性。此外, 木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、风味蛋白酶和中性蛋白酶所得水解物的水解度分别为 12.85%±0.64%、11.88%±0.45%、6.04%±0.17% 和 4.68%±0.13%。相比之下, 在木瓜蛋白酶水解 HPI 的研究中, Malomo 等[19] 采用 PH-stat 方法测得的水解度为 17.99%±0.11%。本研究与文献报道的水解度有差异, 可能归因于所使用的汉麻蛋白原料、水解度检测方法及酶解工艺条件的不同。因此, 选择木瓜蛋白酶进行 HPI 的酶解, 并进一步优化酶解工艺参数, 旨在获得 PL 抑制活性更高的 HPI 酶解产物。

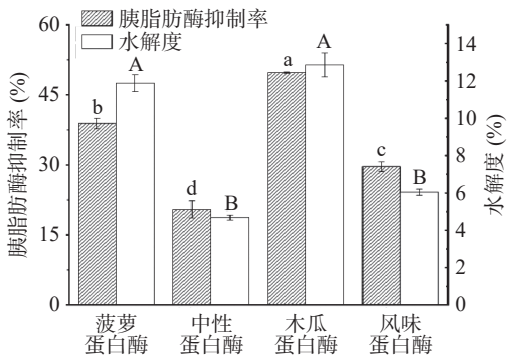


图 1 不同酶解产物的胰脂肪酶抑制率与水解度

Fig.1 PL inhibition rates and degree of different enzymatic hydrolysates

注: 不同大、小字母表示差异显著($P<0.05$), 图 2 同。

2.2 单因素实验结果

如图 2 所示, HPI 酶水解物对 PL 的抑制率随酶浓度、反应温度和 pH 的增加均呈现先上升后下降的趋势。在酶浓度为 4%、酶解温度为 65 ℃、pH6.0 的条件下, PL 抑制率最高。当酶浓度超过最适水平时, 底物蛋白上的结合位点趋于饱和, 可能引起酶分子间的聚集, 从而影响其催化效率[20]。而过高的 pH 和温度则会降低蛋白酶自身活性, 并可能引起多肽空间构象改变, 影响其活性基团的暴露[21]。例如, 枯草芽孢杆菌蛋白酶在 pH10.0 时显示出最大活性, 但超出此范围活性会下降, 这是因为极端 pH 可能导致酶蛋白变性, 从而降低催化能力[22]。因此, 本研究选择酶浓度 4%、酶解温度 65 ℃、pH6.0 作为中心点, 进行响应面优化。

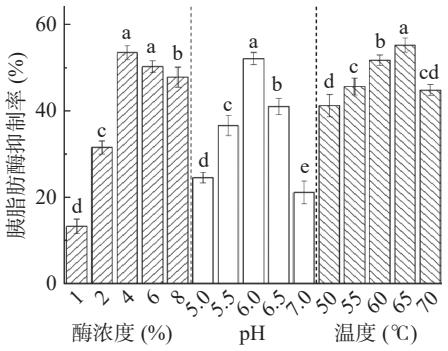


图 2 单因素实验结果

Fig.2 Results of a single-factor experiment

2.3 响应面试验设计方案及结果

以酶浓度(X_1)、酶解温度(X_2)和酶解 pH(X_3)为自变量, 各因素水平分别编码为−1、0 和+1(分别代表低、中、高水平)。试验设计与结果见表 2。以 PL 抑制率(Y)为响应值, 利用 Design-Expert 软件对响应值与各因素的编码值进行回归拟合后, 得到二

表 2　响应面分析试验结果

Table 2　Results of response surface methodology experiment

试验号	酶浓度(X_1)	酶解温度(X_2)	酶解pH(X_3)	胰脂肪酶抑制率(%)
13	0	0	0	54.11±1.05^{a}
12	0	+1	+1	40.71±1.27^{d}
10	0	+1	−1	19.35±0.82^{h}
5	−1	0	−1	15.49±1.33^{i}
15	0	0	0	52.29±1.05^{a}
3	−1	+1	0	31.19±0.34^{f}
8	+1	0	+1	46.64±1.73^{c}
4	+1	+1	0	49.17±1.05^{b}
11	0	−1	+1	46.15±1.52^{c}
14	0	0	0	54.08±1.05^{a}
6	+1	0	−1	25.10±0.78^{g}
9	0	−1	−1	26.52±0.64^{g}
2	+1	−1	0	53.25±1.38^{a}
1	−1	−1	0	49.34±0.50^{b}
7	−1	0	+1	34.11±0.73^{e}

注：同列数据后不同字母代表差异显著(P<0.05)。

次多项回归方程：$Y=53.5+5.5X_1-4.36X_2+10.14X_3+3.52X_1X_2+0.73X_1X_3+0.437X_2X_3-5.3X_1^2-2.46X_2^2-17.86X_3^2$。方差分析结果如表 3 所示，模型整体极显著($P$<0.01)，失拟项不显著($P$>0.05)，且决定系数 R^2=0.9954，校正决定系数 R^2adj=0.9870。表明模型高度显著，能够充分解释自变量与响应值之间的关系，且与实际数据拟合良好。根据回归方程中一次项系数绝对值的大小判断，各因素对 HPI 酶解产物 PL 抑制率的影响程度排序为：酶解 pH(X_3)>酶浓度(X_1)>酶解温度(X_2)。方差分析显示，一次项中 X_1、X_2、X_3 对抑制率的影响均达到极显著水平(P<0.01)。在交互项中 X_1X_2 对抑制率的影响极显著(P<0.01)。

表 3　响应面试验方差分析

Table 3　Analysis of variance of response surface methodology experiment

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	2506.39	9	278.49	100.66	< 0.0001**
X_1	242.17	1	242.17	87.53	0.0002**
X_2	151.85	1	151.85	54.88	0.0007**
X_3	823.02	1	823.02	297.47	< 0.0001**
X_1X_2	49.51	1	49.51	17.89	0.0082**
X_1X_3	2.12	1	2.12	0.7657	0.4216
X_2X_3	0.7430	1	0.7430	0.2686	0.6264
X_1^2	103.82	1	103.82	37.52	0.0017**
X_2^2	22.27	1	22.27	8.05	0.0364*
X_3^2	1177.25	1	1177.25	425.50	< 0.0001**
残差	13.83	5	2.77		
失拟项	11.66	3	3.89	3.57	0.2264
纯误差	2.18	2	1.09		
总差	2520.22	14			
R^2=0.9954	R^2_{adj}=0.9870				

注：*代表差异显著(P<0.05)，**代表差异极显著(P<0.01)。

如图 3 所示，酶浓度(X_1)与酶解温度(X_2)的交互作用曲面陡峭。在较低温度下，PL 抑制率对酶浓

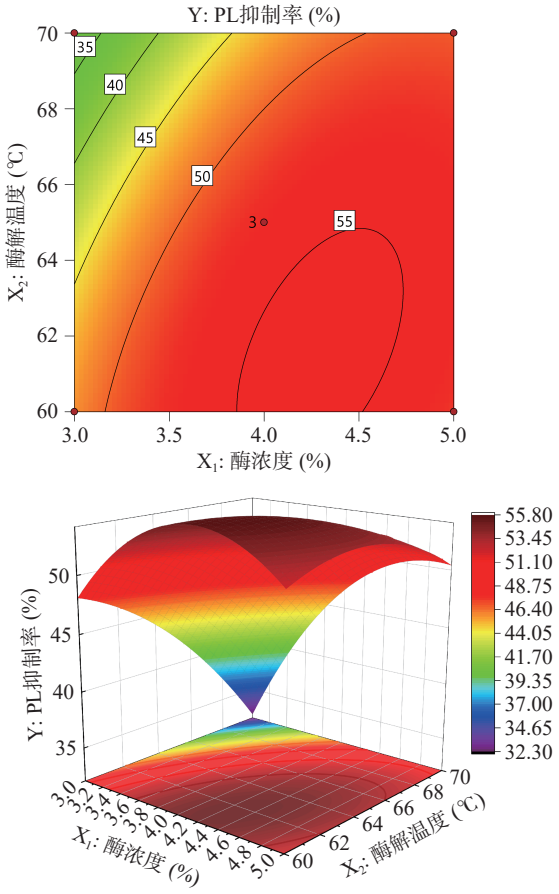


图 3　响应面 3D 图与等高线图

Fig.3　Response surface 3D graph and contour graph

度的变化更为敏感。因此，在实际生产中，建议在固定最佳 pH 的前提下，优先精确控制酶解温度，再匹配相应的酶浓度，以稳定获得高活性的多肽产物。基于 Design-Expert 软件的分析与计算，得出最佳酶解工艺参数的编码值为：酶浓度 4.32%、酶解温度 61.88 ℃、酶解 pH6.14。该条件下理论预测的 PL 抑制率可达 57.20%。考虑到实际操作的可行性与便利性，将优化参数调整为酶浓度 4.3%、温度 62 ℃ 和 pH6.1 并进行验证实验。重复三次，实际测得酶解物的 PL 抑制率为 57.06%±1.64%，与理论预测值高度吻合，证明模型可靠。

本研究得到的木瓜蛋白酶水解产物(papain hydrolysate, PH)，其 IC_{50} 值为 5.12±0.31 mg/mL，相应水解度为 12.33%±0.38%。该活性与通过优化酶解工艺制备的螺旋藻蛋白酶解物(IC_{50} 值为 4.52 mg/mL)活性相近[23]。尽管它们的 IC_{50} 值均显著高于奥利司他(~0.01 mg/mL)，但这主要是由于蛋白酶解物为多肽混合物，而非单一高活性成分。然而，作为天然来源的产物，PH 在安全性方面潜力更大，作为功能性食品原料具有独特的应用价值。

2.4　分子量分布结果

分子量是影响多肽抑制 PL 活性的关键因素之一。由表 4 可知，未水解的 HPI 分子量主要分布在< 1 kDa 和 1~3 kDa 区间，分别占 66.55%±0.82% 和

表 4 HPI 与 PH 的分子量分布

Table 4 Molecular weight distribution of HPI and PH

样品	平均分子量(Da)	>10 kDa(%)	5~10 kDa(%)	3~5 kDa(%)	1~3 kDa(%)	<1 kDa(%)
HPI	1560.12±8.12	3.39±0.31	1.16±0.11	2.84±0.34	26.06±0.35	66.55±0.82
PH	1247.51±5.67*	0.80±0.02*	2.02±0.09*	4.64±0.18*	29.24±0.74*	63.20±0.55*

注: *表示与HPI组相比差异显著, $P<0.05$, 表5~表6同。

26.06%±0.35%。经木瓜蛋白酶水解后, 产物 PH 的平均分子量为 1247.51±5.67 Da, 显著低于 HPI 的 1560.12±8.12 Da($P<0.05$)。尽管平均分子量下降, PH 中<1 kDa 组分的总占比却较 HPI 有所降低($P<0.05$)。该现象可能由两方面原因导致: 一方面, 部分低分子量肽段可能被进一步水解为游离氨基酸, 致使该区间占比减少; 另一方面, 木瓜蛋白酶同时对高、低分子量肽段进行切割, 促使分子量在 3~5 kDa 区间出现集中趋势, 引发各区间比例重新分配。具体表现为, 3~5 kDa 区间的占比从 2.84%±0.34% 上升至 4.64%±0.18%($P<0.05$), 而>10 kDa 与<1 kDa 组分占比则显著下降($P<0.05$)。类似现象在鹰嘴豆蛋白水解过程中亦有报道, 即随着水解度增加, 平均分子量下降, 但不同区段肽段占比呈动态变化[24]。此外, 低分子量多肽因体积小、空间位阻低, 通常更易进入 PL 的活性口袋并实现高效结合, 这被认为是其发挥 PL 抑制作用的重要原因之一[25]。例如, 牦牛奶奶酪酶解物的小分子组分[26] 和胶原蛋白的低分子量多肽[27] 均表现出更强的 PL 抑制活性。

2.5 SEM 分析结果

HPI 与 PH 的扫描电镜结果如图 4 所示。未经过水解的 HPI 样品呈现出粗糙、多孔的蜂窝状结构, 这与以往研究结果一致[28]。相比之下, 经木瓜蛋白酶水解后的产物 PH 则表现为相对光滑、无定形的致密块状或片状结构。在酶处理得到的绿豆蛋白酶解物表面同样呈现不均匀、光滑的结构[29]。其结构转变很可能与水解处理促使包埋在蛋白质内部的疏水基团及巯基得以暴露相关。例如, 核桃蛋白经木瓜蛋白酶水解后, 随着水解度的增加, 其分子量降低, 疏水基团和暴露巯基含量增加[30]。这些暴露的基团在冻干过程中, 相互作用增强, 进而形成较大的聚集体[31−32]。

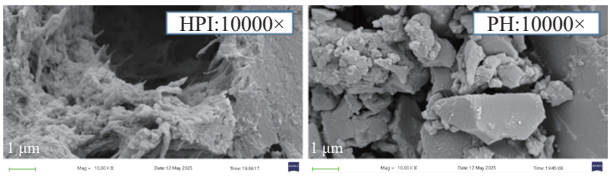


图 4 HPI 和 PH 的 SEM 图

Fig.4 SEM images of HPI and PH

2.6 光谱分析结果

远紫外 CD 光谱(190~260 nm)能够反映肽键发色团的构象信息。如图 5A、图 5B 所示, CDNN 软件分析表明, HPI 主要由 β-折叠(43.87%±0.53%)和无规则卷曲(32.31%±1.23%)组成, 这与先前关于

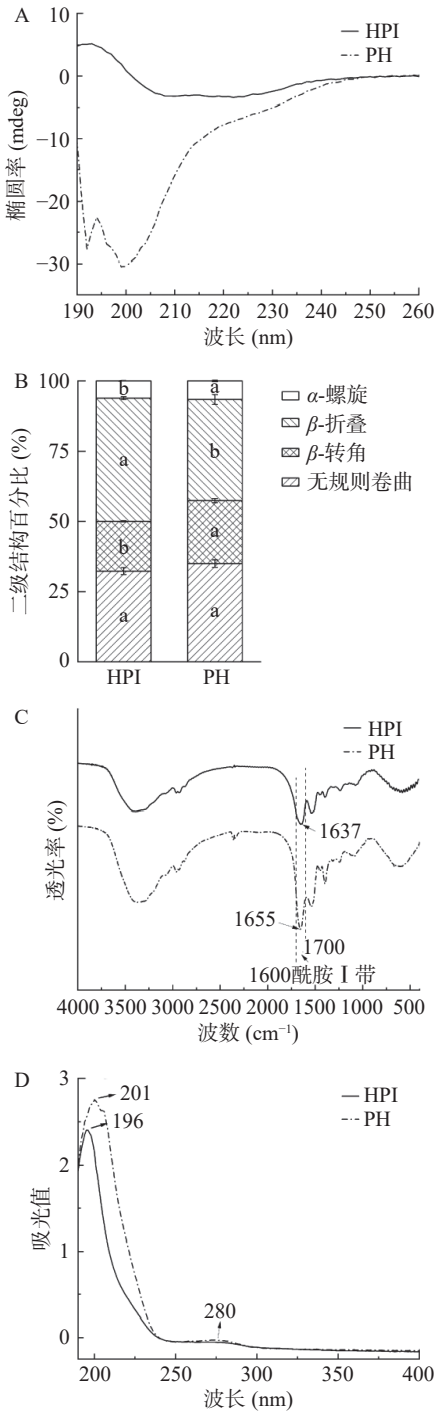


图 5 HPI 和 PH 的圆二色谱(A)、二级结构分布(B)、傅里叶变换红外光谱(C)和紫外吸收光谱(D)

Fig.5 CD spectra (A), protein secondary structure distribution diagrams (B), FTIR spectra (C), and ultraviolet (UV) spectra (D) of HPI and PH

注: 同一二级结构(α-螺旋、β-折叠、β-转角、无规则卷曲)中, 不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

HPI 二级结构以 β-折叠为主的报道相符[33]。酶解后，α-螺旋、β-转角比例显著增加(P<0.05)，而 β-折叠比例则显著减少(P<0.05)。β-转角比例的增加与 PL 抑制活性的提升呈现出一致性，提示二者之间存在潜在关联，其内在机制有待进一步阐明。此外，水解可能释放原本被 β-折叠结构包埋的活性区域，或形成新的结合位点，促进多肽与 PL 的结合。

FTIR 光谱中，酰胺Ⅰ带(1600~1700 cm^{-1})的峰位与蛋白质构象直接相关。如图 5C 所示，水解导致 HPI 的酰胺Ⅰ带特征峰从代表 β-折叠的 1637 cm^{-1} 迁移至对应 α-螺旋的 1655 cm^{-1}，表明 β-折叠比例降低而 α-螺旋比例升高[34]。采用高斯分峰法拟合，通过分峰积分计算二级结构占比，结果显示 PH 的 β-折叠比例显著降低(P<0.05)，α-螺旋、β-转角比例升高(P<0.05)，与 CD 光谱结果一致(表 5)。

表 5　HPI 与 PH 的 FTIR 的二级结构

Table 5　Secondary structure of HPI and PH obtained from FTIR

样品	α-螺旋(%)	β-折叠(%)	β-转角(%)	无规则卷曲(%)
HPI	20.49±0.95	39.47±2.22	18.26±0.87	21.78±0.31
PH	27.59±1.57*	27.14±2.05*	21.66±1.43*	23.61±1.05

由图 5D 可见，PH 的整体紫外吸收强度显著高于未水解的 HPI，直观反映出水解对蛋白空间构象的影响。紫外光谱中 190~230 nm 区域的吸收信号源于肽键的 $n\rightarrow\pi^*$电子跃迁，其峰位和强度与肽链的构象及疏水环境直接相关。PH 在 196 nm 处的吸收显著增强，且最大吸收波长出现红移，提示肽链构象可能趋于伸展，推测其原因可能与水解后疏水基团暴露引起的微环境变化有关。通常情况下，非极性氨基酸通常位于蛋白质内部的疏水核，而极性氨基酸则分布于表面[35]。Wang 等[36] 的研究证实，水解可提高 HPI 的表面疏水性。同时，在 280 nm 附近吸收增强表明芳香族氨基酸残基的溶剂暴露程度增加[37]。

2.7　氨基酸组成结果及多元统计分析

本研究对 HPI 及其水解产物 PH 的氨基酸组成进行了比较分析，结果详见表 6。二者均富含谷氨酸、精氨酸和天冬氨酸，而半胱氨酸含量相对较低。已有研究报道，富含精氨酸的多肽具有显著的脂肪酶抑制活性[38]。如图 6A 的 PCA 分析显示，PC1 和 PC2 的累积贡献率达 98.4%，表明该模型能有效区分 HPI 和 PH 的氨基酸指纹特征。此外，OPLS-DA(图 6B)的验证参数 R^2X、R^2Y 和 Q^2 值均大于 0.5，证实模型具有良好的拟合度和预测能力。为验证模型是否存在过拟合，进一步进行了 200 次置换检验，结果如图 6C 所示，Q^2 回归线与 Y 轴的截距为 −1.42(小于 0)，表明模型未出现过拟合现象，结果可靠。在 OPLS-DA 模型中，VIP 值>1 的特征性差异氨基酸包括甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、精氨酸(图 6E)。水解后，丙氨酸和甘氨酸的含量分别由原来的 2.47%±0.09% 和 2.59%±0.06% 升高至 4.49%±0.01% 和 5.40%±0.03%，显著增加 81.78% 和 108.11%(P<0.05)。这类侧链较小的氨基酸更易形成 α-螺旋结构。已有研究报道，在 C57BL/6J 小鼠中补充丙氨酸可缓解高脂饮食引起的体重增加[39]。这提示，PH 中富含的丙氨酸可能与其整体抗肥胖效应具有协同作用。PH 中的甲硫氨酸含量显著低于 HPI(P<0.05)。有研究指出，限制甲硫氨酸摄入具有抗肥胖效应[40]，因此该特征也可能为 PH 的整体功效做出贡献。如图 6D 所示，在特定氨基酸类别方面，PH 中必需氨基酸、芳香族氨基酸及带正电荷的氨基酸的含量低于 HPI，而疏水性氨基酸与支链型氨基酸含量则高于 HPI。支链氨基酸在肥胖与糖尿病相关代谢紊乱中的作用尚存争议，有研究认为其升高可能与胰岛素抵抗有关[41]，但膳食摄入评估研究显示，较高的支链氨基酸摄入量与较低的肥胖风险相关[42]。本研究观察到 PH 中支链氨基酸含量升高，其生物学效应有待后续体内实验验证。此外，PH 的蛋白质效率比为 1.63，高于 1.5 的标准，具备良好的营养品质。总之，木瓜蛋白酶的水解过程显著改变了 HPI 的氨基酸组成。所得水解产物 PH 富含与抗肥胖相关的精氨酸、丙氨酸，具有较高的疏水性与支链氨基酸含量，以及优越的 PER 值。

表 6　HPI 与 PH 的氨基酸组成比较(g/100 g)

Table 6　Comparison of amino acid compositions between HPI and PH (g/100 g)

氨基酸	HPI	PH
天冬氨酸	7.17±0.02	7.71±0.02*
苏氨酸	2.17±0.07	2.37±0.04*
丝氨酸	3.16±0.04	4.35±0.03*
谷氨酸	14.06±0.02	13.34±0.03*
甘氨酸	2.59±0.06	5.40±0.03*
丙氨酸	2.47±0.09	4.49±0.01*
缬氨酸	3.19±0.03	3.71±0.03*
半胱氨酸	0.23±0.04	0.23±0.01
甲硫氨酸	0.77±0.07	0.23±0.03*
异亮氨酸	2.29±0.09	2.40±0.06*
亮氨酸	4.93±0.04	5.01±0.03*
酪氨酸	2.17±0.04	1.70±0.04*
苯丙氨酸	3.15±0.02	2.61±0.04*
赖氨酸	2.16±0.02	1.89±0.07*
组氨酸	1.58±0.02	1.53±0.02*
精氨酸	8.67±0.06	7.49±0.02*
脯氨酸	2.72±0.07	4.25±0.08*

注：因酸水解破坏色氨酸，因此未检测到色氨酸。

2.8　PL 抑制肽的筛选和分子对接

通过 LC-MS/MS 分析，从 PH 中共鉴定出 1195 条多肽，其氨基酸序列数量为 3~24 个，其中相对含量大于 1% 的有 21 条。如表 7 所示，在这 21 条多肽中，有 15 条(包括 FEW、LLFSP、LAF、LLF、FYL、LSF、VLF、LLSF、LFL、LFY、LVF、LFR、LFF、

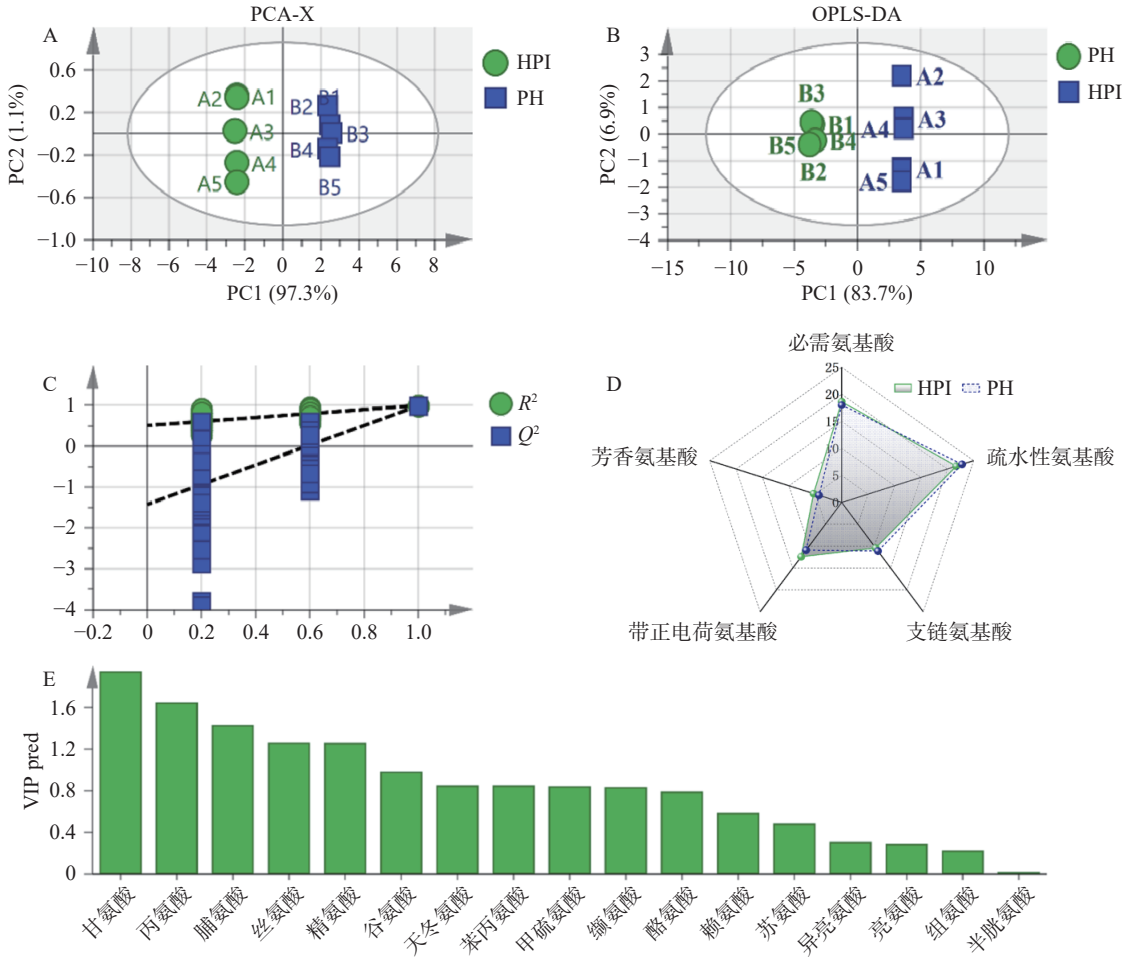


图 6 HPI 和 PH 的 PCA 分析散点图(A)、OPLS-DA 分析散点图(B)、OPLS-DA 模型置换检验图(C)、不同类型氨基酸含量(g/100 g)(D)和 VIP 得分图(E)

Fig.6 PCA scatterplot (A), OPLS-DA scatterplot (B), permutation test plot of the OPLS-DA model (C), content of different types of amino acids (g/100 g) (D), and VIP scores plot (E) of HPI and PH

表 7 PH 中多肽的 LC-MS/MS 鉴定和与 1ETH 的分子对接结果

Table 7 Identification of peptides in PH by LC-MS/MS and results of molecular docking with 1ETH

多肽序列	相对含量(%)	PeptideRanker得分	对接结合能(kcal/mol)
FEW	3.53	0.944	−10.0
LLFSP	3.23	0.681	−7.8
LAF	3.02	0.870	−8.8
LLF	2.49	0.939	−8.3
FYL	2.48	0.951	−9.6
LSF	2.06	0.829	−8.2
VLF	1.99	0.729	−7.9
LLSF	1.60	0.773	−7.5
LFL	1.54	0.945	−8.7
LFY	1.44	0.926	−8.6
LVF	1.29	0.647	−9.3
LFR	1.04	0.940	−8.5
LFF	1.04	0.994	−8.9
LLLF	1.02	0.884	−7.4
FLF	1.02	0.995	−9.3

LLLF 和 FLF)的 PeptideRanker 得分不低于 0.6, 其相对含量累计为 28.79%。已有研究证实, 结合自由能越低, 肽与受体蛋白的相互作用越稳定。当对接结合能低于−7.0 kcal/mol 时, 通常意味着配体与受体之间具有极强的结合亲和力[12]。上述多肽与胰脂肪酶 1ETH 的结合自由能介于−7.4~−10.0 kcal/mol 之间, 表明它们与 PL 活性口袋具有较高的亲和力。组成分析显示, 它们中疏水性氨基酸占比为 60%~100%, 芳香族氨基酸占比为 20%~67%。图 7 为对接结合能最低的 4 条多肽(FEW、FYL、LVF、FLF)与 1ETH

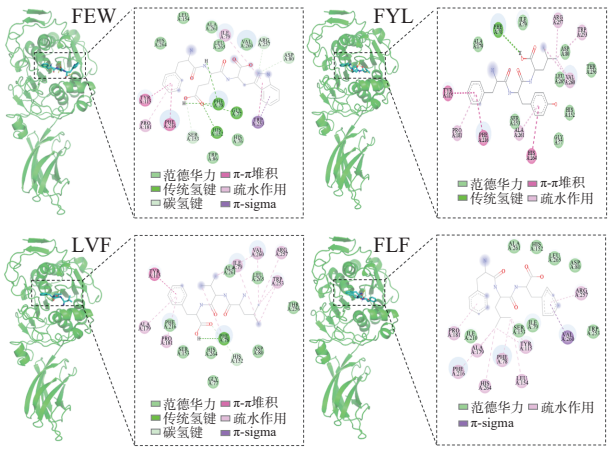


图 7 多肽 FEW、FYL、LVF、FLF 与 1ETH 的结合模式图

Fig.7 Binding modes of peptides FEW, FYL, LVF, and FLF with 1ETH

的分子对接结合模式图。结果表明，缬氨酸（V）和亮氨酸（L）等疏水残基易于与胰脂肪酶的疏水活性口袋结合。例如，在 LVF 中，缬氨酸与 Ile_{79} 形成疏水相互作用；在 FYL 中，亮氨酸则与 Val_{260} 和 Trp_{253} 形成相互作用。此外，FYL 中的苯丙氨酸（F）通过其芳香侧链与酶活性中心残基 Tyr_{115} 形成 π–π 堆积作用，而该肽段中的酪氨酸（Y）通过酚羟基与 Phe_{78} 的主链羰基氧原子之间形成氢键相互作用。

3　结论

本研究筛选出木瓜蛋白酶为制备汉麻蛋白源 PL 抑制肽的最优酶，优化后工艺（E/S 4.3%、62 ℃、pH6.1）可使 PH 的 PL 抑制率达 57.06%（IC_{50}=5.12 mg/mL）。结构分析证实，酶解引起蛋白质 β-折叠比例降低，α-螺旋与 β-转角比例增加。进一步通过 LC-MS/MS 与分子对接筛选出 15 条潜在活性肽，其累计相对含量为 28.79%。这些肽的共同特征为富含疏水性氨基酸和芳香族氨基酸，与 PL 的结合能介于 −7.4~−10.0 kcal/mol 之间。上述结果为汉麻源 PL 抑制肽的工业化制备提供了关键工艺参数，并明确了其产物的结构特征与候选活性肽序列，为未来建立基于特征氨基酸与特定肽段的质量控制方法奠定了理论基础。

需指出，本研究结果基于体外实验，其主要局限在于未考虑胃肠道环境中胃酸、消化酶及胆汁酸等干扰因素，因此难以全面模拟体内的真实生理环境。此外，多肽在加工与消化过程中的稳定性亦有待探究。后续可采用高脂饮食诱导的 C57BL/6J 小鼠模型，检测多肽对小鼠体重、脂肪系数及血清甘油三酯的影响，并系统评估其在功能性食品体系中的活性保留率。

© 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] NG M, GAKIDOU E, LO J, et al. Global, regional, and national prevalence of adult overweight and obesity, 1990–2021, with forecasts to 2050: A forecasting study for the Global Burden of Disease Study 2021[J]. The Lancet, 2025, 405(10481): 813−838.

[2] Collaborators The GBD Obesity. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years[J]. New England Journal of Medicine, 2017, 377(1): 13−27.

[3] YANOVSKI S Z, YANOVSKI J A. Long-term drug treatment for obesity: A systematic and clinical review[J]. JAMA, 2014, 311(1): 74−86.

[4] SUBRAMANIYAN V, HANIM Y U. Role of pancreatic lipase inhibition in obesity treatment: Mechanisms and challenges towards current insights and future directions[J]. International Journal of Obesity, 2025, 49(3): 492−506.

[5] CHIA T Y, GAN C Y, SHAFIE M H, et al. A comprehensive review on the pancreatic lipase inhibitory peptides: A future anti-obesity strategy[J]. Electronic Journal of General Medicine, 2023, 20(3): em470.

[6] HAJFATHALIAN M, GHELICHI S, JACOBSEN C. Anti-obesity peptides from food: Production, evaluation, sources, and commercialization[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2025, 24(2): e70158.

[7] AGUCHEM R N, OKAGU I U, OKAGU O D, et al. A review on the techno-functional, biological, and health-promoting properties of hempseed-derived proteins and peptides[J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(7): e14127.

[8] SHI Jie, GE Jingyi, ZHANG Zhenghai, et al. Anti-thrombotic effect of hemp seed peptides in zebrafish by dual regulation of vegfr1 signaling and caspase-3-mediated apoptosis[J]. Food Science & Nutrition, 2025, 13(8): e70756.

[9] 葛婧仪, 张正海, 魏连会, 等. 汉麻活性肽对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(8): 90−96. [GE Jingyi, ZHANG Zhenghai, WEI Lianhui, et al. Immunomodulatory effect of bioactive peptides from hemp seeds on RAW264.7 macrophages[J]. Food Research and Development, 2025, 46(8): 90−96.]

[10] MAJEWSKI M, JURGOŃSKI A. The effect of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds and hemp seed oil on vascular dysfunction in obese male zucker rats[J]. Nutrients, 2021, 13(8): 2575.

[11] 尹浩, 朱将雄, 钟宇, 等. 汉麻籽中靶向抑制胰脂肪酶/胆固醇酯酶多肽的快速鉴定筛选及活性探究[J]. 食品工业科技, 2025, 46(9): 114−123. [YIN Hao, ZHU Jiangxiong, ZHONG Yu, et al. Insights into rapid identification, screening and activity investigation of novel hemp seed pancreatic lipase/cholesterol esterase inhibitory peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(9): 114−123.]

[12] ZHANG Zhenghai, GE Jingyi, WEI Lianhui, et al. Isolation and identification of novel hemp seed protein-derived pancreatic lipase inhibitory peptides[J]. Food Bioscience, 2025, 63: 105834.

[13] CHEN Haihong, XU Bing, WANG Yi, et al. Emerging natural hemp seed proteins and their functions for nutraceutical applications[J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(4): 929−941.

[14] BAO Xin, ZHANG Yiyun, WANG Liyang, et al. Machine learning discovery of novel antihypertensive peptides from highland barley protein inhibiting angiotensin I-converting enzyme (ACE)[J]. Food Research International, 2025, 202: 115689.

[15] ZHANG Ying, GUI Meng, FAN Wei, et al. Response surface methodology optimization on extraction and antioxidant activity evaluation of antioxidant peptide from enzymatic hydrolysates of sturgeon bone[J]. LWT, 2024, 198: 116042.

[16] GHAREHBEGLOU P, SARABANDI K, AKBARBAGLU Z. Insights into enzymatic hydrolysis: Exploring effects on antioxidant and functional properties of bioactive peptides from *Chlorella* proteins[J]. Journal of Agriculture and Food Research, 2024, 16: 101129.

[17] TACIAS-PASCACIO V G, CASTAÑEDA-VALBUENA D, MORELLON-STERLING R, et al. Bioactive peptides from fisheries residues: A review of use of papain in proteolysis reactions[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 184: 415−428.

[18] MUDGIL P, BABA W N, KAMAL H, et al. A comparative investigation into novel cholesterol esterase and pancreatic lipase inhibitory peptides from cow and camel casein hydrolysates generated upon enzymatic hydrolysis and *in-vitro* digestion[J]. Food Chemistry, 2022, 367: 130661.

[19] MALOMO S A, ALUKO R E. *In vitro* acetylcholinesterase-

inhibitory properties of enzymatic hemp seed protein hydrolysates [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2016, 93(3): 411−420.

[20] MAITI A, NIVIDHA, DEY K K. Preserving enzyme conformation and catalytic efficiency in crowded and active environments [J]. Nanoscale Advances, 2025, 7(19): 6265−6272.

[21] BISIRRI E A, KAAR J L, SCHWARTZ D K. High-throughput screening identifies anionic polymer supports that improve enzyme activity at low pH and high temperature[J]. Langmuir, 2025, 41(8): 5335−5346.

[22] BEZAWADA J, YAN S, JOHN R P, et al. Recovery of *Bacillus licheniformis* alkaline protease from supernatant of fermented wastewater sludge using ultrafiltration and its characterization [J]. Biotechnology Research International, 2011, 2011(1): 238549.

[23] LIN Miaoluan, ZENG Qiaohui, YANG Jiaxin, et al. *Spirulina* derived peptides: Inhibition mechanism on pancreatic lipase and impact on lipid-lowering effects of *Caenorhabditis elegans*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 319: 145403.

[24] WANG Chao, RAO Junhui, LI Xueyin, et al. Chickpea protein hydrolysate as a novel plant-based cryoprotectant in frozen surimi: Insights into protein structure integrity and gelling behaviors[J]. Food Research International, 2023, 169: 112871.

[25] YU Kai, JIANG Wenjing, CHENG Ningning, et al. Molecular mechanisms of naringin's high lipid-lowering activity: Pancreatic lipase inhibition and fat accumulation reduction[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2025, 105(11): 6229−6242.

[26] WANG Peng, SONG Xuemei, LIANG Qi. Molecular docking studies and *in vitro* activity of pancreatic lipase inhibitors from yak milk cheese[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26(2): 756.

[27] GONZÁLEZ-NORIEGA J A, VALENZUELA-MELENDRES M, HERNÁNDEZ-MENDOZA A, et al. Hydrolysates and peptide fractions from pork and chicken skin collagen as pancreatic lipase inhibitors[J]. Food Chemistry, 2022, 13: 100247.

[28] MONTSERRAT-DELa PAZ S, RIVERO-PINO F, VILLANUEVA A, et al. Nutritional composition, ultrastructural characterization, and peptidome profile of antioxidant hemp protein hydrolysates[J]. Food Bioscience, 2023, 53: 102561.

[29] 胡锦瑞. 绿豆抗氧化肽的制备及其对高脂诱导小鼠肠道代谢产物的影响[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2024. [HU Jinrui. Preparation of antioxidant peptides from mung beans and their effects on intestinal metabolites in mice with high lipid induction [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2024.]

[30] FENG Li, WU Yingmin, HAN Yuting, et al. Structural characteristics, functional properties and nutritional value of walnut protein by limited enzymatic hydrolysis[J]. LWT, 2024, 197: 115923.

[31] CHAI Jiale, ZHAO Xue, XU Yujuan, et al. An unfolding/aggregation kinetic instructed rational design towards improving graft degree of glycation for myofibrillar protein[J]. Food Chemistry, 2024, 446: 138876.

[32] WEI X R, MONAHAN F, ZHANG C J, et al. Exposure of hydrophobic groups affected the thermal aggregation of myosin based on experimental and molecular dynamics simulation[J]. LWT, 2023, 187: 115315.

[33] SHEN Peiyi, GAO Zili, XU Minwei, et al. The impact of hempseed dehulling on chemical composition, structure properties and aromatic profile of hemp protein isolate[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 106: 105889.

[34] WEI Wei, HU Wei, ZHANG Xianyi, et al. Analysis of protein structure changes and quality regulation of surimi during gelation based on infrared spectroscopy and microscopic imaging[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 5566.

[35] PIRESTANI S, NASIRPOUR A, KERAMAT J, et al. Preparation of chemically modified canola protein isolate with gum Arabic by means of Maillard reaction under wet-heating conditions[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 155: 201−207.

[36] WANG Q L, JIN Y, XIONG Y L. Heating-aided pH shifting modifies hemp seed protein structure, cross-linking, and emulsifying properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(41): 10827−10834.

[37] CHEN Hui, DONG Xiting, ZHAO Yongqiang, et al. Oyster-derived peptides as pancreatic lipase inhibitors: Kinetics, molecular interactions, and gastrointestinal stability[J]. Food Bioscience, 2025, 63: 105637.

[38] STEFANUCCI A, LUISI G, ZENGIN G, et al. Discovery of arginine-containing tripeptides as a new class of pancreatic lipase inhibitors[J]. Future Medicinal Chemistry, 2019, 11(1): 5−19.

[39] FREUDENBERG A, PETZKE K J, KLAUS S. Dietary L-leucine and L-alanine supplementation have similar acute effects in the prevention of high-fat diet-induced obesity[J]. Amino Acids, 2013, 44(2): 519−528.

[40] LUO Tingyu, YANG Yuhui, XU Yuncong, et al. Dietary methionine restriction improves glucose metabolism in the skeletal muscle of obese mice[J]. Food & Function, 2019, 10(5): 2676−2690.

[41] WHITE P J, NEWGARD C B. Branched-chain amino acids in disease[J]. Science, 2019, 363(6427): 582−583.

[42] OKEKUNLE A P, WU X Y, FENG R N, et al. Higher intakes of energy-adjusted dietary amino acids are inversely associated with obesity risk[J]. Amino Acids, 2019, 51(3): 373−382.