

地龙 α -葡萄糖苷酶抑制肽的制备、筛选及活性分析

李丹¹, 李秀怀¹, 吴筱寒¹, 赖富饶¹, 闵甜¹, 周飞燕², 陈孟璋², 吴晖^{1*}, 贺萍^{3*}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 广州白云山维一实业股份有限公司, 广东广州 511458) (3. 广东海洋大学食品科学与工程学院, 广东阳江 529500)

摘要:为促进地龙蛋白中潜在 α -葡萄糖苷酶抑制肽的释放并筛选鉴定其活性肽序列, 以地龙为原料, 通过自溶-外源酶复合酶解制备地龙蛋白肽, 结合超滤分离、多肽组学及生物信息学方法筛选潜在活性肽, 通过体外实验和分子对接分析其活性及作用机制。结果表明, 经 2 h 自溶酶解后加入风味蛋白酶进行二级酶解, 在加酶量 $6\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 、酶解时间 4 h、温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 值 9.5 条件下制得的地龙蛋白酶解物的 α -葡萄糖苷酶抑制率为 66.59%。超滤结果显示, $<3\text{ kDa}$ 组分具有最强抑制活性 ($\text{IC}_{50}=0.84\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。通过 LC-MS/MS 结合生物信息学筛选获得 6 条潜在活性肽, 其中 RGF 和 FLP 经过体外验证, 展现出较强的抑制活性, IC_{50} 值分别为 1.56 mM 和 3.57 mM。分子对接结果表明, RGF 和 FLP 均可与 α -葡萄糖苷酶关键残基形成氢键、疏水作用等多种非共价相互作用, 表明多肽可能通过与酶活性口袋结合发挥抑制作用。综上, 本研究确定了地龙源 α -葡萄糖苷酶抑制肽的制备工艺, 筛选获得具有降糖潜力的活性肽序列, 为阐明地龙蛋白肽抑制 α -葡萄糖苷酶的构效关系提供了理论基础, 为地龙功能食品的开发提供了新方向。

关键词: 地龙蛋白; 自溶酶解; 工艺优化; 分子对接; α -葡萄糖苷酶抑制肽

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.7.0399

Preparation, Identification, and Mechanism Analysis of α -Glucosidase Inhibitory Peptides from Earthworm

LI Dan¹, LI Xiuhuai¹, WU Xiaohan¹, LAI Furao¹, MIN Tian¹, ZHOU Feiyan², CHEN Mengzhang², WU Hui^{1*}, HE Ping^{3*}

(1.College of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.Guangzhou BaiyunshanWeiyi Industrial Co. Ltd., Guangzhou 511458, China)

(3.College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Yangjiang 529500, China)

Abstract: To promote the release of potential α -glucosidase inhibitory peptides from earthworm protein, earthworm protein hydrolysates were prepared using a combined autolysis-exogenous protease hydrolysis strategy. Potential inhibitory peptides were screened by ultrafiltration, peptidomics, and bioinformatics analysis, followed by in vitro activity evaluation and molecular docking analysis. After 2 h autolysis followed by flavourzyme hydrolysis, the obtained hydrolysate showed an α -glucosidase inhibition rate of 66.59% under optimized conditions of $6\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ enzyme dosage, 4 h hydrolysis time, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, and pH 9.5. The $<3\text{ kDa}$ fraction exhibited the strongest inhibitory activity, with an IC_{50} value of $0.84\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Six potential α -glucosidase inhibitory peptides were identified by LC-MS/MS combined with bioinformatics analysis. Among them, RGF and FLP showed relatively strong in vitro α -glucosidase inhibitory activities, with IC_{50} values of 1.56 and 3.57 mM, respectively. Molecular docking analysis revealed that RGF and FLP could interact with key residues of α -glucosidase through hydrogen bonding and hydrophobic interactions, suggesting that their inhibitory activities may be related to binding within the enzyme active pocket. Overall, this study established a preparation process for earthworm-derived α -glucosidase inhibitory peptides and identified bioactive peptide sequences with potential hypoglycemic activity, providing insights into the structure-activity relationships of earthworm-derived peptides and supporting their potential application in functional foods.

Key words: earthworm protein; autolysis hydrolysis; process optimization; molecular docking; α -glucosidase inhibitory peptide

收稿日期: 2026-03-16; 修回日期: 2026-07-12; 接受日期: 2026-07-13

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2022B0202020003)

作者简介: 李丹 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: danli2025@163.com

通讯作者: 吴晖 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: fehwi@scut.edu.cn; 共同通讯作者: 贺萍 (1994-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: hepingscut@163.com

糖尿病是一类以高血糖为主要特征的代谢性疾病,其发病率在全球范围内持续上升,已对人类健康和社会经济发展造成严重负担。国际糖尿病联盟数据显示,预计到2045年中国患者数量将超过1.74亿^[1],其中2型糖尿病(Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM)占病例总数的90%^[2]。T2DM的核心病理特征为胰岛素代谢紊乱与餐后血糖异常,其并发症(如心血管疾病、肾衰竭等)严重威胁患者生存质量^[3,4]。当前临床干预策略主要通过提高胰岛细胞活力或抑制碳水化合物消化。相较于前者间接调控血糖,后者通过直接延缓肠道葡萄糖吸收,规避了胰岛 β 细胞的代谢压力,成为T2DM管理重要策略之一^[5]。 α -葡萄糖苷酶是存在于小肠上皮细胞刷状缘的一类关键消化酶,能够催化寡糖和双糖中的 α -葡萄糖苷键水解并释放葡萄糖,使其被肠道吸收进入血液,进而引起餐后血糖水平升高^[6]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂可以通过抑制该酶的催化活性,减缓碳水化合物向葡萄糖的转化和吸收过程,发挥调控血糖水平的作用^[7]。与传统药物(阿卡波糖、麦格列醇等)常伴随肠胃不适、肝毒性等副作用相比,食源性生物活性肽具有安全性高、免疫原性低等优势,被认为是潜在天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂,并逐渐成为研究热点^[8]。

地龙(Earthworm, *Eisenia fetida*)是一种重要的药食同源原料,其中地龙蛋白(Earthworm Protein, EP)约占地龙干重的60%~70%,可作为制备生物活性肽的重要蛋白质来源。研究表明,地龙蛋白酶解物(Earthworm Protein Hydrolysate, EPH)具有抗血栓^[9]、抗氧化^[10]、免疫调节^[11]、ACE抑制活性等^[12]活性。此外,地龙蛋白酶解物在体外也表现出一定的 α -葡萄糖苷酶抑制能力^[13],但现阶段相关研究主要集中于蛋白酶解物的生物活性评价,而对于具体活性肽序列的鉴定及其作用机制仍缺乏系统研究。鉴定地龙来源的 α -葡萄糖苷酶抑制肽并阐明其作用机制,对于揭示其结构功能关系及其与酶分子的相互作用具有重要意义。

基于此,本研究以地龙为原料,通过复合酶解策略优化酶解工艺,以提高地龙蛋白的水解程度并促进 α -葡萄糖苷酶抑制肽的释放。随后采用超滤分离酶解物,并结合LC-MS/MS质谱分析和生物信息学方法对潜在活性肽进行筛选与鉴定。进一步通过体外实验验证其 α -葡萄糖苷酶抑制活性,并利用分子对接技术分析其作用机制。研究结果不仅为地龙来源降血糖活性肽的发现与利用提供了理论依据,也为地龙功能食品的开发及产业化应用提供了新方向。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜地龙(太平二号),由鼎龙生物科技有限公司提供。 α -葡萄糖苷酶、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)、L-亮氨酸、2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)试剂,上海源叶生物科技有限公司;风味蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶及菠萝蛋白酶,购自沧州夏盛酶制剂有限公司;复合蛋白酶和木瓜蛋白酶,购自南京庞博生物工程有限公司。

1.2 主要仪器设备

FA2104型电子天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;DF-0191S型集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司;Victor3型多功能酶标仪,美国PerkinElmer公司;Nano-300微量分光光度计,杭州奥盛仪器有限公司;H1750R高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;FD-1A-50冷冻干燥机,上海维谱电子科技有限公司;Waters2695高效液相色谱仪,美国Waters公司;Vanquish Neo/Orbitrap Fusion Lumos液相色谱-质谱联用仪,美国Thermo Fisher Scientific公司;MSC300杯式超滤器,上海摩速科学器材有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 地龙蛋白酶解物制备工艺研究

1.3.1.1 地龙自溶酶解物的制备

根据周飞燕等^[14]报道的方法,将地龙原浆与超纯水按质量比1:2混合制备地龙浆(50%, m/m),在40℃条件下通过磁力搅拌自溶水解2 h,随后沸水浴10 min,以终止酶解反应。冷却至外源酶水解温度后,进行下一步酶解。

1.3.1.2 外源水解酶种类筛选

将地龙自溶酶解液调节至适合的pH值,按4000 U·g⁻¹蛋白质量加入不同蛋白酶,于各自温度水解3 h。酶解反应结束后,将样品置于100℃沸水浴中处理10 min以灭酶,随后以4000 r·min⁻¹离心20 min,收集上清液用于

蛋白回收率的测定,其余样品冻干后测定 α -葡萄糖苷酶抑制活性和水解度,通过综合比较筛选出更能促进 α -葡萄糖苷酶抑制肽释放的外源酶。

表 1 6 种蛋白酶解条件

Table 1 Hydrolysis Conditions of Six Proteases

酶种类	温度/℃	pH
菠萝蛋白酶	55	7
复合蛋白酶	45	7
碱性蛋白酶	55	9
中性蛋白酶	45	7
风味蛋白酶	50	8.5
木瓜蛋白酶	55	6.5

1.3.1.3 单因素法优化地龙蛋白外源酶酶解工艺

以地龙自溶酶解物为底物,通过单因素实验考察酶添加量、酶解时间、酶解温度及 pH 对 α -葡萄糖苷酶活性、水解度和蛋白回收率的影响。首先设置不同酶添加量(3 000、4 000、5 000、6 000、7 000 U·g⁻¹),在 pH 值 8.5、50 ℃条件下酶解 3 h,以筛选适宜的酶添加量。在确定最适加酶量条件下,进一步考察不同酶解时间(2、3、4、5、6 h)对酶解效果的影响。随后在最适加酶量和酶解时间条件下,设置不同酶解温度(40、45、50、55、60 ℃)进行酶解。最后在最适加酶量、酶解时间和温度条件下,将体系 pH 值分别调节至 6.5、7.5、8.5、9.5、10.5,以筛选适宜的酶解 pH 值。各反应结束后均于 100 ℃沸水浴中加热 10 min 灭酶,4 000 r·min⁻¹离心 20 min,收集上清液并冷冻干燥,-40 ℃备用。

1.3.2 α -葡萄糖苷酶抑制率的测定

参照 Zhou 等^[15]的方法,略作修改。将待测样品配制成质量浓度为 2 mg·mL⁻¹的样品溶液。准确吸取 50 μ L α -葡萄糖苷酶溶液(0.2 U·mL⁻¹)与 50 μ L 样品溶液混匀,并在 37 ℃孵育 10 min。然后向混合物中加入 50 μ L 对硝基苯基吡喃葡萄糖苷(pNPG, 5 mM),在 37 ℃孵育 30 min 后,测定 405 nm 处的吸光度。根据下式计算样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制率。

$$I(\%) = [1 - \frac{(S-S_0)}{(C-C_0)}] \times 100 \quad (1)$$

式中:

I —— α -葡萄糖苷酶抑制率; %

S ——样品组吸光值;

S_0 ——样品空白组吸光值;

C ——对照组吸光值;

C_0 ——对照空白组吸光值。

1.3.3 水解度的测定

参照潘蕾蔓^[16]的方法,采用 TNBS 法测定水解度。以 L-亮氨酸为标准品建立标准曲线测定游离氨基酸含量,在 340 nm 处测定吸光度,并根据游离氨基酸含量及总氨基酸含量计算水解度。

水解度的测定公式如下:

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\% = \frac{a_h - a_0}{a_t - a_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

DH ——水解度, %;

h ——水解的肽键数, mmol·L⁻¹;

h_{tot} ——总肽键数, mmol·L⁻¹;

a_0 ——样品未水解前的游离氨基酸含量, mmol·L⁻¹;

a_h ——样品水解后的游离氨基酸含量, mmol·L⁻¹;

a_t ——样品完全水解的游离氨基酸含量, mmol·L⁻¹。

1.3.4 蛋白回收率测定

参照刘洋^[17]的方法,略作修改,采用 GB 5009.5-2025 标准中凯氏定氮法测定酶解液中的蛋白质含量,并据此计算酶解物的蛋白回收率。

$$w(\%) = \frac{m_1 \times w_1}{m_2 \times w_2} \times 100 \quad (3)$$

式中:

w ——酶解物蛋白回收率, %;

m_1 ——地龙酶解液质量, g;

w_1 ——地龙酶解液中蛋白质质量浓度, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;

m_2 ——地龙浆质量, g;

w_2 ——地龙浆中蛋白质质量浓度, $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1.3.5 分子量分布测定

采用高效尺寸排阻色谱对酶解产物的分子量分布进行分析。样品溶解于流动相并定容至 10 mL,经超声处理 5 min 后离心,取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后进行检测。色谱系统为 Waters2695 高效液相色谱仪,色谱柱为 TSK-GEL G2000SWXL (7.8 mm $\times$ 300 mm)。流动相为 40% 体积分数乙腈溶液(含 0.1% TFA),流速 0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 220 nm,进样量 20 μL 。

1.3.6 氨基酸组成测定

氨基酸组成采用 L-8080 全自动氨基酸分析仪(Hitachi)进行分析,采用 Na 型阳离子交换色谱柱(4.6 mm $\times$ 60 mm, 3 μm),以柠檬酸缓冲液体系作为流动相,流速为 0.4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 55 $^{\circ}\text{C}$,反应温度 135 $^{\circ}\text{C}$ 。通过茚三酮进行柱后衍生化检测,其中脯氨酸在 440 nm 波长下检测,其余氨基酸在 570 nm 波长下检测,并采用外标法计算各氨基酸的含量。

1.3.7 地龙酶解物的超滤分离

将地龙蛋白酶解物配制成 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进行超滤分级。在 0.2 MPa 氮气压力和 240 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 磁力搅拌条件下,样品依次通过截留分子量为 10 kDa 和 3 kDa 的超滤膜进行分级分离,分别获得分子量大于 10 kDa、3~10 kDa 以及小于 3 kDa 的三个组分,冷冻干燥后,于 -40 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.8 LC-MS/MS 鉴定多肽序列

利用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)对 α -葡萄糖苷酶抑制活性较高的 EPHU3 组分进行分析。样品浓度在 205 nm 处使用 NanoDrop 微量分光光度计测定,经还原、烷基化及脱盐纯化处理后,以 0.1% 体积分数甲酸复溶。色谱分离采用纳升级反相液相色谱系统,预柱为 PepMap Neo C18 (300 $\mu\text{m} \times 5$ mm),分析柱为 Reprosil-Pur 120 C18-AQ (150 $\mu\text{m} \times 170$ mm, 1.9 μm),采用梯度洗脱进行分离。质谱分析在 Orbitrap Fusion Lumos 上以正离子模式进行,一级质谱分辨率 120 000,扫描范围 100~1 500 m/z ;二级质谱碰撞能量 30,分辨率 15 000。采用数据依赖采集模式(DDA)获取 MS/MS 谱图用于多肽鉴定。质谱原始数据采用 PEAKS Studio 软件进行分析,并检索目标蛋白数据库(uniprotkb_taxonomy_id_6396_2025_07_03.fasta)进行多肽序列鉴定。检索参数设置如下:固定修饰为 Carbamidomethyl (C),可变修饰为 Oxidation (M) 和 Acetyl (Protein N-term),酶切方式为 Non-specific,一级质谱质量误差为 20 ppm,二级质谱质量误差为 0.02 Da,假发现率(FDR)控制在 1% 以内。

1.3.9 虚拟筛选高活性地龙多肽

利用 PeptideRanker 预测肽段的潜在生物活性,ToxinPred 3.0 预测肽段毒性,ExPASy ProtParam 计算肽段等电点等理化性质。

1.3.10 分子对接分析

使用 ChemDraw 22.0.0 和 Chem3D 22.0.0 构建候选多肽结构并进行能量最小化处理。利用 AutoDock Vina 1.1.2 模拟分子相互作用。从 PDB (Protein Data Bank) 数据库选取异麦芽糖酶晶体结构(PDB: 3AJ7, 分辨率 1.30 $\text{\AA}$) 作为分子对接受体,该结构与酿酒酵母来源的 α -葡萄糖苷酶具有 72% 的序列同源性,已被广泛用于 α -葡萄糖苷酶抑制剂的分子对接研究^[18],以 (19, -2.9, 22) 为中心设置网格盒进行分子对接^[19]。对接结果使用 PyMOL 1.7.2.1 进行三维结构可视化,并利用 Discovery Studio 2019 分析多肽与 α -葡萄糖苷酶之间的氢键相互作用。

1.3.11 多肽固相合成

FEWP、WFFGHP、PGEFPW、RGF、FLP 和 SPGEFPW 六条肽由南京杰肽生物科技有限公司采用 Fmoc 固相合成技术制备^[20], 检测纯度均在 95%以上, 满足后续实验需要。

1.3.12 数据分析及处理

使用 SPSS 26.0 软件进行统计处理, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 结合 Duncan 多重比较法进行显著性检验, 以 $P<0.05$ 作为差异显著的判定标准。实验结果图由 GraphPad Prism 9.5 软件绘制。

2 结果与讨论

2.1 酶种类对地龙自溶酶解物酶解效率影响及 α -葡萄糖苷酶活性的影响

不同蛋白酶具有不同的底物特异性和酶切位点, 因此对蛋白质水解能力及产物组成存在显著差异。已有研究表明, 不同蛋白酶在酶切位点和催化特性方面具有一定互补性, 通过复合酶解可提高蛋白质水解效率并促进小分子活性肽的释放^[21]。课题组前期研究发现地龙体内存在具有蛋白水解能力的自源酶, 在自溶过程中可促进蛋白质降解并释放多种生物活性肽^[11]。因此, 本研究选取六种食品级蛋白酶对地龙自溶酶解物进行二次酶解, 并以蛋白回收率、水解度和 α -葡萄糖苷酶抑制活性为指标评价其酶解效果。

如图 1A 所示, 与未酶解组相比, 自溶处理显著提高了地龙蛋白的蛋白回收率和水解度 ($P<0.05$)。进一步添加外源蛋白酶后, 各处理组酶解效率存在明显差异。其中风味蛋白酶处理组蛋白回收率最高 (64.03%), 与碱性蛋白酶 (59.39%) 和中性蛋白酶 (57.83%) 差异不显著 ($P>0.05$), 但均显著高于其他处理组 ($P<0.05$)。在水解度方面, 碱性蛋白酶组最高 (38.29%), 但与风味蛋白酶 (36.93%) 和中性蛋白酶 (34.49%) 差异不显著 ($P>0.05$), 表明三者均具有较好的酶解能力。研究表明地龙蛋白主要属于碱性蛋白, 在偏碱性条件下更易暴露酶切位点^[22], 其中碱性蛋白酶和中性蛋白酶多为内切酶, 而风味蛋白酶兼具内切酶和外切酶活性, 能够在促进蛋白降解的同时释放更多小分子肽。

如图 1B 所示, 进一步比较不同酶解产物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性发现, 各处理组抑制率大小规律为: 风味蛋白酶解液 (51.44%) > 碱性蛋白酶解液 (44.21%) > 中性蛋白酶解液 (36.72%) > 菠萝蛋白酶解液 (35.67%) > 木瓜蛋白酶解液 (31.35%) > 复合蛋白酶解液 (27.86%) > 自溶酶解液 (18.26%) > 未酶解蛋白液 (10.84%)。其中风味蛋白酶组抑制率最高 (51.44%), 显著高于其他酶解组 ($P<0.05$)。综合酶解效率和抑制活性结果, 较高的水解度和蛋白回收率有利于促进蛋白质充分降解, 从而释放更多潜在活性肽段并提高 α -葡萄糖苷酶抑制活性。风味蛋白酶处理组在蛋白回收率和水解度方面均处于较高水平, 因此选择其作为后续酶解实验的最适外源蛋白酶。

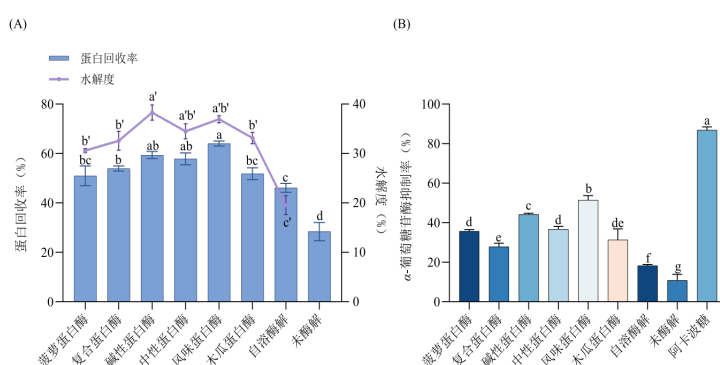


图 1 不同蛋白酶制备的地龙蛋白酶解物蛋白回收率、水解度 (A) 及 α -葡萄糖苷酶抑制活性 (B) 的影响

Fig.1 Effects of different proteases on protein recovery, degree of hydrolysis (A), and α -glucosidase inhibitory activity (B) of earthworm protein hydrolysates

注: 图中不同字母表示各组之间差异显著 ($P<0.05$)。

2.2 单因素法优化酶解工艺结果分析

2.2.1 加酶量对酶解效率影响及 α -葡萄糖苷酶活性影响

在底物浓度一定条件下, 加酶量会影响酶与底物的接触概率, 从而影响酶解效率。如图 2A 所示, 随着加酶

量由 $3\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加至 $7\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, 蛋白回收率和水解度均呈现先升高后下降趋势, 在 $6\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 时分别达到 72.34% 和 41.96% 。同时, α -葡萄糖苷酶抑制活性的变化趋势与之基本一致, 在 $6\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 时达到最高值 (47.49%)。结果表明, 适宜的加酶量有利于促进蛋白质水解并释放活性肽, 而当加酶量过高时, 体系中酶分子相对过剩, 在底物浓度有限的条件下可能导致部分酶处于非有效结合状态, 同时已生成的活性肽进一步被降解为短肽或游离氨基酸, 从而使抑制活性由升高转为下降^[23]。因此, 选取 $6\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 作为后续实验的最适加酶量。

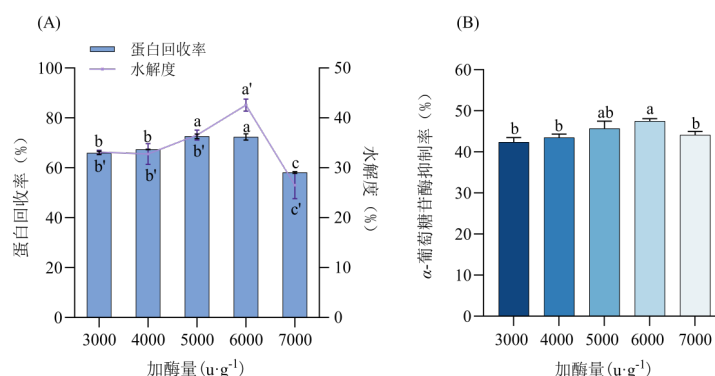


图2 加酶量对地龙自溶酶解物蛋白回收率、水解度 (A) 和 α -葡萄糖苷酶活性 (B) 的影响

Fig.2 Effects of enzyme dosage on protein recovery, degree of hydrolysis (A), and α -glucosidase inhibitory activity (B) of earthworm protein hydrolysates

注: 图中不同字母表示各组之间差异显著 ($P<0.05$)。

2.2.2 酶解时间对酶解效率影响及 α -葡萄糖苷酶活性影响

图3结果表明, 随着酶解时间由2 h延长至6 h, 蛋白回收率和水解度整体呈现升高后下降的趋势, 在5 h时分别达到 75.81% 和 44.54% , 而 α -葡萄糖苷酶抑制活性则在4 h时达到最高值 62.14% 后下降, 适当延长酶解时间有利于蛋白质逐步降解并释放具有活性的中短肽; 而随着反应时间进一步延长, 底物逐渐减少, 同时已生成的活性肽可能被进一步水解为更短肽段或游离氨基酸, 导致抑制活性下降。此外, 长时间酶解还可能引发产物反馈抑制或改变体系中肽段组成比例, 从而影响酶抑制活性。综合蛋白回收率、水解度及抑制活性结果, 4 h时活性达到峰值且水解程度适中, 而延长至5 h虽可进一步提高水解度, 但抑制活性下降, 表明过度水解不利于活性肽的形成。因此, 确定4 h为最优酶解时间。

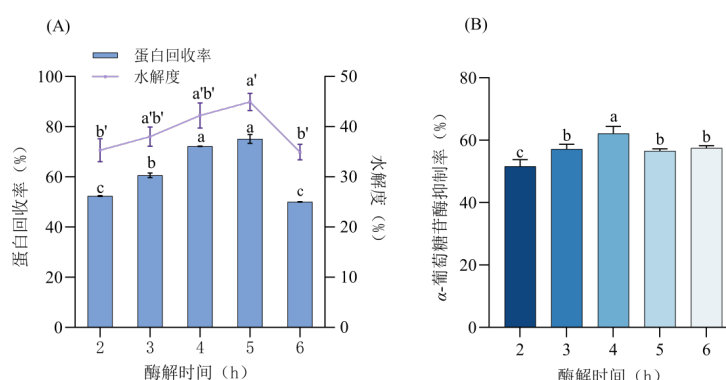


图3 酶解时间对地龙自溶酶解物蛋白回收率、水解度 (A) 和 α -葡萄糖苷酶活性 (B) 的影响

Fig.3 Effects of hydrolysis time on protein recovery, degree of hydrolysis (A), and α -glucosidase inhibitory activity (B) of earthworm protein hydrolysates

注: 图中不同字母表示各组之间差异显著 ($P<0.05$)。

2.2.3 酶解温度对酶解效率影响及 α -葡萄糖苷酶活性影响

由图4可见, 酶解温度在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内时, 蛋白回收率和水解度在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时达到最高值, 分别为 75.09% 和 44.95% 。 α -葡萄糖苷酶抑制活性则在 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时达到最高值 64.34% , 但与 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下的抑制活性差异不显著 ($P>0.05$)。适宜温度能够增强酶催化效率并促进活性肽生成, 而过高温可能导致酶结构不稳定或活性降低。综

合考虑酶解效率与抑制活性, 确定 50 °C 为较适宜的酶解温度。

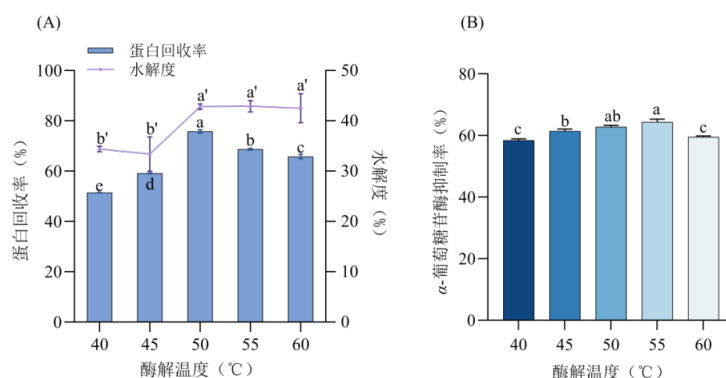


图 4 酶解温度对地龙自溶酶解物蛋白回收率、水解度 (A) 和 α -葡萄糖苷酶活性 (B) 的影响

Fig.4 Effects of hydrolysis temperature on protein recovery rate, degree of hydrolysis (A), and α -glucosidase inhibitory activity (B) of earthworm autolytic hydrolysate

注: 图中不同字母表示各组之间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2.4 pH 值对酶解效率影响及 α -葡萄糖苷酶活性影响

图 5 结果表明, 随着体系 pH 值由 6.5 升高至 10.5, 蛋白回收率和水解度在 pH 值 9.5 时达到较高水平, 分别为 73.99% 和 42.64%。在 pH 值 9.5 条件下, α -葡萄糖苷酶抑制率为 66.59%, 且与更高 pH 值条件相比差异不显著 ($P > 0.05$)。pH 值对酶活性及底物结构具有重要影响: 适宜的碱性环境有助于酶活性中心的离子化状态维持, 从而提高催化效率并促进活性肽释放; 而过高 pH 值可能破坏酶的空间结构或改变底物构象, 导致酶活性下降, 同时也可能影响肽段的稳定性。因此, 在 pH 值为 9.5 时, 酶解产物抑制活性较高, 且与更高 pH 条件相比差异不显著 ($P > 0.05$), 综合考虑酶解效率及体系稳定性, 选取 pH 值为 9.5 作为较适宜的酶解条件。

综上所述, 单因素实验结果表明, 较优酶解条件为: 加酶量 $6\ 000\ \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 、酶解时间 4 h、温度 50 °C、pH 值 9.5, 获得的酶解物 EPH 的蛋白含量为 85.05%, 该工艺条件不仅能够实现较高的酶解效率, 同时有助于增强酶解产物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。

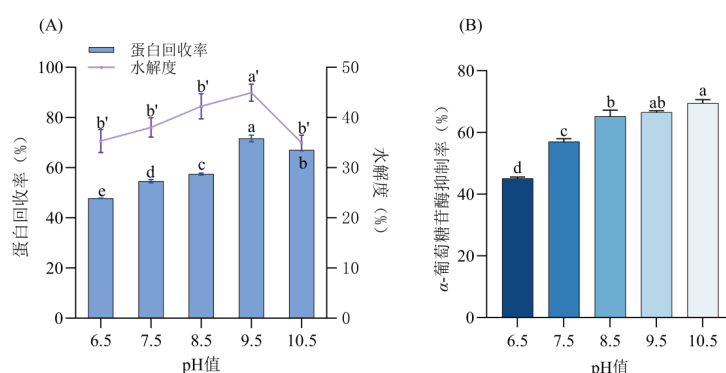


图 5 pH 值对地龙自溶酶解物蛋白回收率、水解度 (A) 和 α -葡萄糖苷酶活性 (B) 的影响

Fig.5 Effects of pH on protein recovery rate, degree of hydrolysis (A), and α -glucosidase inhibitory activity (B) of earthworm autolytic hydrolysate

注: 图中不同字母表示各组之间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 地龙酶解物氨基酸组成分析

对地龙蛋白和地龙蛋白酶解物进行氨基酸组成分析。由表 2 可知, 总体来看, EP 与 EPH 均含有丰富的酸性氨基酸和疏水性氨基酸, 其中含量较高的氨基酸主要包括谷氨酸 (Glu)、天冬氨酸 (Asp)、亮氨酸 (Leu) 和脯氨酸 (Pro) 等。EP 中含量较高的氨基酸依次为 Glu (12.91%)、Asp (10.60%)、Leu (8.81%)、Pro (6.92%) 和 Ser (6.79%); 而 EPH 中含量较高的氨基酸依次为 Glu (13.71%)、Asp (12.66%)、Leu (8.53%)、Phe (5.70%)

和 Lys (5.48%)。与 EP 相比, EPH 中 Asp、Glu、Lys 和 Phe 等氨基酸含量有所增加, 而 Pro 和 Ser 的比例明显下降, 表明复合酶解过程改变了蛋白质的氨基酸组成特征。

进一步分析氨基酸类型分布发现, 与 EP (40.43%) 相比, EPH 中带电氨基酸 (Asp、Glu、Lys、Arg、His) 比例提高至 48.17%。带电氨基酸的增加有利于肽与 α -葡萄糖苷酶之间形成氢键或静电相互作用, 从而增强结合稳定性。研究表明, 在 α -葡萄糖苷酶抑制肽中, 含有带电或极性侧链的氨基酸 (如 Lys、Arg、Ser、Thr 和 Tyr) 能够参与氢键或极性相互作用, 是影响其抑制活性的重要结构特征之一^[6]。此外, 两种样品中疏水性氨基酸含量均较高, 在 EP 和 EPH 中分别为 47.35%和 42.96%。研究表明, 疏水性氨基酸 (如 Leu、Ala 和 Pro) 能够增强肽与 α -葡萄糖苷酶活性口袋之间的疏水相互作用, 从而提高抑制活性。因此, 地龙蛋白及其酶解物中较高比例的带电和疏水性氨基酸, 可能为其 α -葡萄糖苷酶抑制活性提供重要的结构基础^[24]。

表 2 地龙蛋白 (EP) 及地龙蛋白酶解物 (EPH) 的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of earthworm protein (EP) and earthworm protein hydrolysate (EPH)				
氨基酸种类	EP/(mg·g ⁻¹)	EP/%	EPH/(mg·g ⁻¹)	EPH/%
天冬氨酸 Asp	73.07	10.60	113.78	12.66
苏氨酸 Thr	41.61	6.04	48.51	5.40
丝氨酸 Ser	46.78	6.79	47.38	5.27
谷氨酸 Glu	89.00	12.91	123.12	13.71
脯氨酸 Pro	47.70	6.92	23.03	2.56
甘氨酸 Gly	35.57	5.16	44.72	4.98
丙氨酸 Ala	40.47	5.87	49.09	5.46
半胱氨酸 Cys	9.89	1.43	4.06	0.45
缬氨酸 Val	36.89	5.35	47.61	5.30
蛋氨酸 Met	12.12	1.76	19.30	2.15
异亮氨酸 Ile	31.68	4.60	42.05	4.68
亮氨酸 Leu	60.71	8.81	76.67	8.53
酪氨酸 Tyr	26.04	3.78	35.77	3.98
苯丙氨酸 Phe	40.24	5.84	51.25	5.70
赖氨酸 Lys	37.56	5.45	49.21	5.48
组氨酸 His	17.27	2.51	25.00	2.78
精氨酸 Arg	42.51	6.17	37.94	4.22
氨基酸总含量	689.10	100.00	898.39	100.00
必需氨基酸	278.08	40.35	359.59	40.03
非极性脂肪族氨基酸	265.14	38.48	302.47	33.67
极性氨基酸	88.39	12.82	95.89	10.67
芳香族氨基酸	73.73	10.70	58.80	6.55
酸性氨基酸	162.07	23.52	236.90	26.38
碱性氨基酸	127.90	18.56	187.99	20.92

2.4 地龙蛋白酶解物分子量分布

对地龙蛋白酶解前 (EP) 和酶解产物 (EPH) 的分子量分布进行分析。如图 6 (A) 所示, 与地龙蛋白原料相比, 酶解产物的色谱峰整体向后移动, 表明其主要组分分子量明显降低。分子量分布结果显示, EPH 中 >10 000 Da 组分由 13.78%降低至 0.42%, 而 180~1 000 Da 组分占比由 47.26%提高至 88.97%, 同时氨基酸比例显著增加。已有研究表明, 低分子量肽通常具有更好的稳定性和更高的生物利用度, 因此更易发挥生物活性^[25]。上述结果表明, 复合酶解工艺能够有效降低地龙蛋白的分子量, 促进小分子肽和氨基酸的生成, 从而赋予其更好的吸收特性和应用潜力。

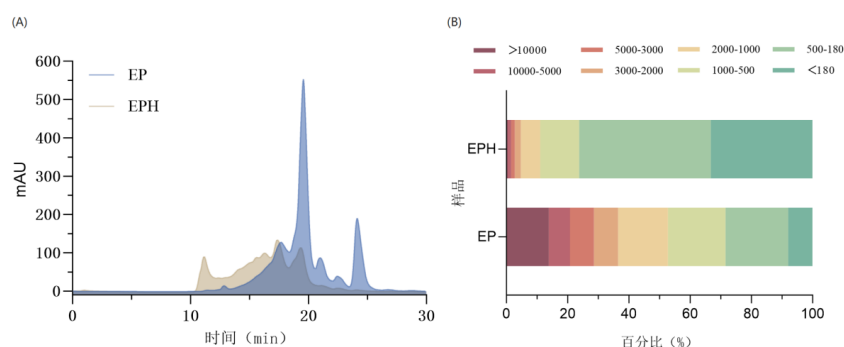


图6 EP和EPH的HP-SEC色谱图(A)与分子量分布(B)

Fig.6 HP-SEC chromatograms (A) and molecular weight distribution (B) of earthworm protein (EP) and its hydrolysate (EPH)

2.5 超滤法分级组分的 α -葡萄糖苷酶活性

蛋白质酶解物的分子量分布在生物活性肽的生成过程中具有重要作用。超滤技术是一种常用于分离不同分子量肽段的方法,通过使用不同截留分子量(MWCO)的膜可以将蛋白酶解物分离为不同分子量组分。该方法易于放大,在功能肽的工业化制备中具有良好的应用前景^[26]。地龙蛋白酶解物 EPH 经超滤分级后得到>10 kDa、3~10 kDa 和<3 kDa 三个组分,分别记为 EPHU1、EPHU2 和 EPHU3,分子量分布分析结果表明,各组分均表现出明显的目标分子量富集特征,其中 EPHU1 中>10 kDa 组分占比为 91.20%,EPHU2 中 3~10 kDa 组分总占比为 87.21%,EPHU3 中<3 kDa 组分总占比为 98.66%,说明超滤分级具有较好的分离效果。不同分子量组分的 α -葡萄糖苷酶抑制活性如图 7 所示,其中 EPHU3 组分的 IC_{50} 为 $0.84 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,显著低于 EPHU2 ($1.99 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和 EPHU1 ($2.34 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)组分 ($P<0.05$),说明 α -葡萄糖苷酶抑制活性主要来源于低分子量肽组分。类似结果在其他蛋白来源中也有报道,如 Zhou 等^[27]在花生蛋白酶解物中发现 3 kDa~500 Da 组分具有最强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。Deng 等^[28]从桑叶中分离得到的<3 kDa 组分也表现出最强的抑制活性,其 IC_{50} 为 $5.27 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。这些研究结果均表明,低分子量肽是 α -葡萄糖苷酶抑制活性的主要来源,其原因可能在于小分子肽更容易进入酶活性口袋,并与关键氨基酸残基形成稳定相互作用,从而发挥更强的抑制作用。

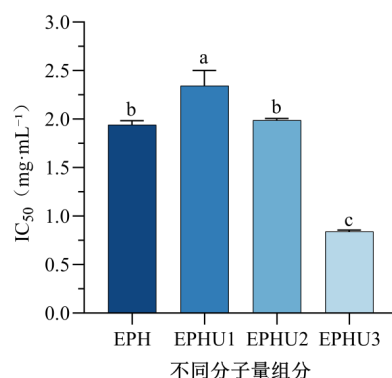


图7 超滤分级组分的 α -葡萄糖苷酶抑制活性 (IC_{50})

Fig.7 α -Glucosidase inhibitory activities (IC_{50}) of ultrafiltration fractions from earthworm protein hydrolysate

注: 图中不同字母表示各组之间差异显著 ($P<0.05$)。

2.6 EPHU3 组分多肽序列鉴定及特征分析

通过 LC-MS/MS 鉴定 EPHU3 中的多肽序列,共鉴定出 10 353 条多肽序列。如图 8A 所示,对这 10 353 条多肽氨基酸组成进行统计分析发现,与整体酶解物相比,低分子量组分的优势氨基酸类型发生明显变化,其中 Gly (9.66%)、Ser (8.59%)、Ala (7.79%)、Thr (7.49%) 和 Leu (7.02%) 含量相对较高,Asp (6.77%) 和 Pro (6.64%) 等氨基酸也占有一定比例。总体来看,该组分富含 Gly、Ser、Thr 等柔性或亲水性氨基酸以及 Leu、Ala、Pro 等

疏水性氨基酸。柔性或亲水性氨基酸有利于提高多肽构象灵活性和水溶性，而疏水性氨基酸则能够增强多肽与 α -葡萄糖苷酶活性口袋之间的疏水相互作用。此外，如图 8B 所示，端位氨基酸分析显示 N 端以 Ser、Gly 等亲水性残基为主，而 C 端相对富集 His 和 Pro 等结构性氨基酸，C 端的 Pro 结构有助于维持多肽稳定构象并增强其与酶的结合能力^[24]，从而可能赋予 EPHU3 组分较强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

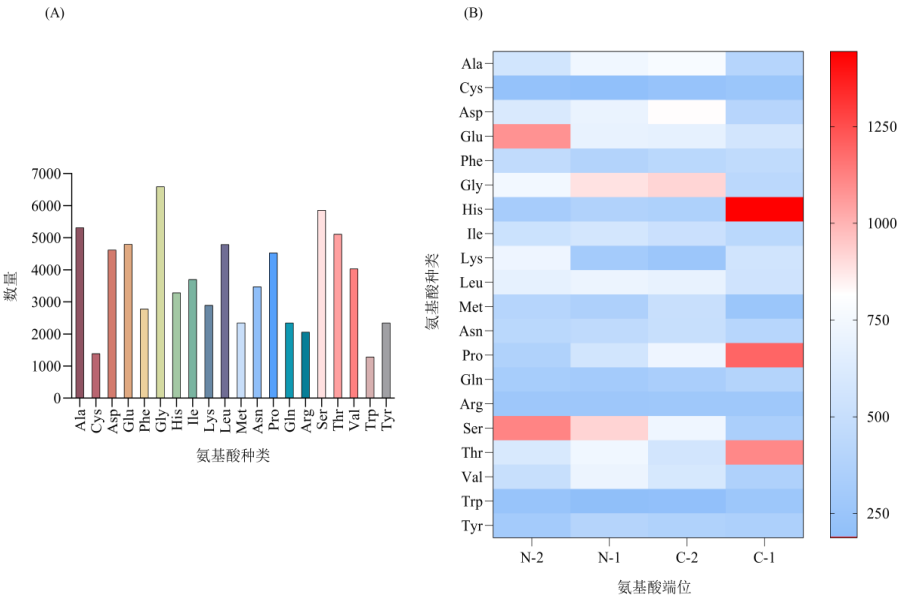


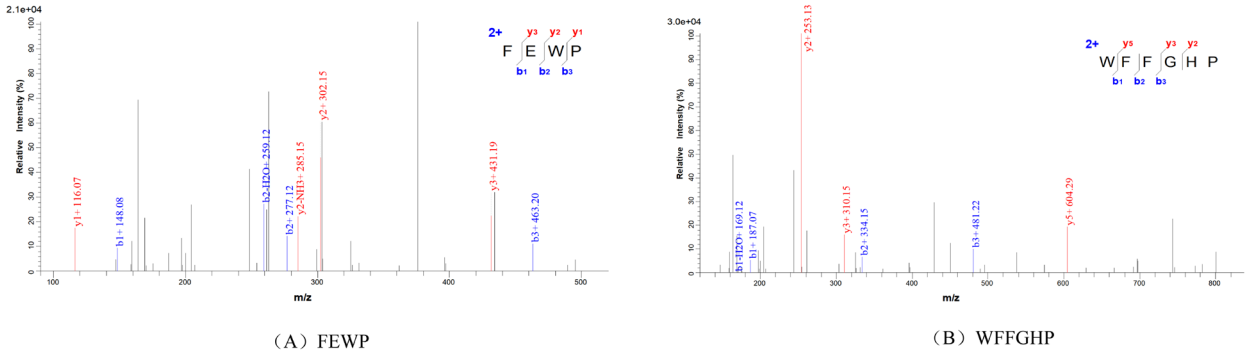
图 8 EPHU3 组分鉴定多肽的氨基酸组成 (A) 和端位氨基酸分布 heatmap (B)

Fig.8 Amino acid composition (A) and terminal amino acid distribution heatmap (B) of peptides identified in the EPHU3 ultrafiltration fraction

2.7 EPHU3 组分中潜在 α -葡萄糖苷酶抑制肽筛选

分子对接是计算机辅助药物设计的重要手段，能够快速筛选生物活性化合物、识别治疗靶点以及阐明分子机制^[29]。对 EPHU3 组分中的 10 353 条多肽序列进行筛选。首先设定阈值-10 lg P>20 以减少假阳性，应用 Peptide Ranker 进行生物活性预测，选取评分超过 0.9 的肽段。根据报道，长度为 3~7 肽的 α -葡萄糖苷酶抑制肽具有较好的抑制活性^[24]，因此选取肽链长度为 3~7 的肽序列，根据上述条件筛选得到符合条件的 54 条多肽序列。

将候选活性肽与 α -葡萄糖苷酶 (3AJ7) 通过 AutoDock Vina 软件进行分子对接，并计算结合能 (Vina Score)。对接结果显示，54 条候选多肽与 α -葡萄糖苷酶的结合能范围为-10.40~-6.60 kcal·mol⁻¹ 之间。根据分子相互作用理论，结合能数值越低，表明配体与受体蛋白所形成的复合物构象越稳定，结合强度越高。根据对接评分结果，选取结合能排名前六的多肽 FEWP、WFFGHP、PGEFPW、RGF、FLP 和 SPGEFPW 作为潜在活性肽进行进一步分析，其二级质谱图及对接评分见图 9 及表 3。



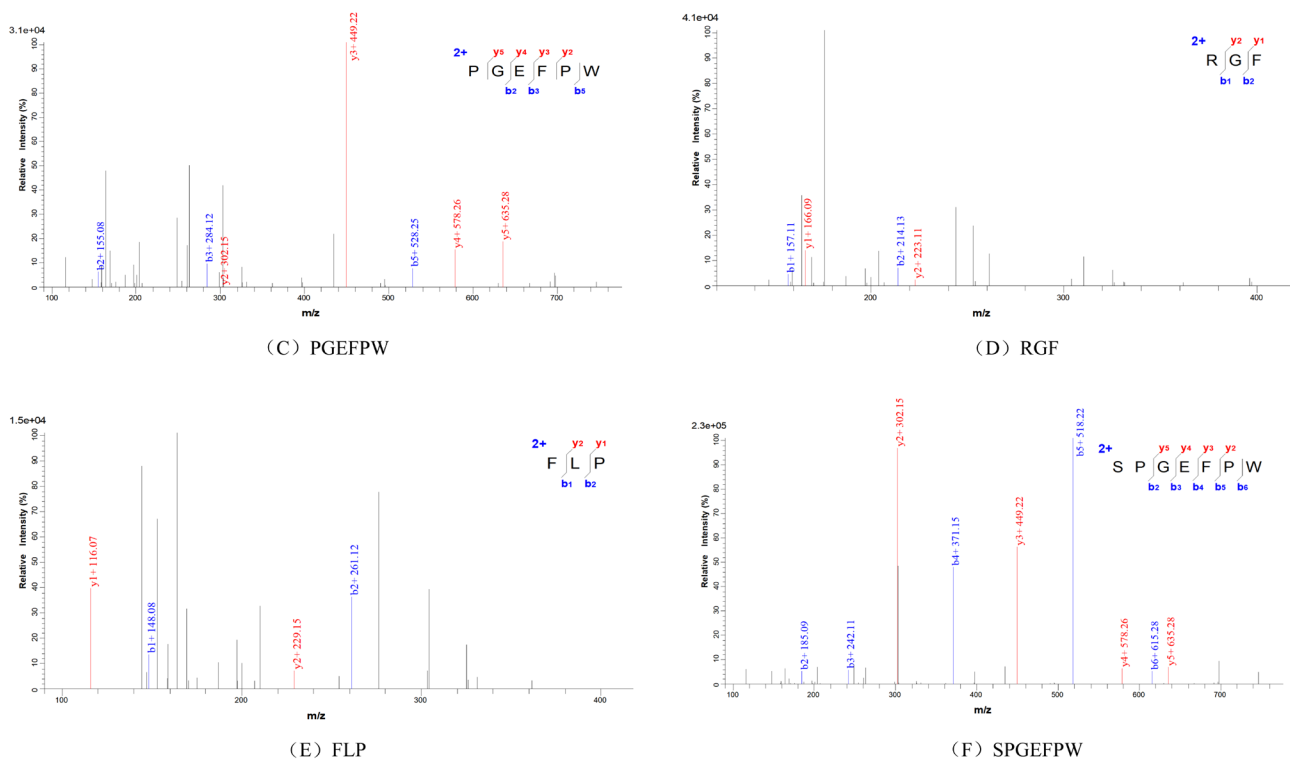


图9 候选 α -葡萄糖苷酶抑制肽的 MS/MS 谱图

Fig.9 MS/MS spectra of candidate α -glucosidase inhibitory peptides

表 3 候选 α -葡萄糖苷酶抑制肽的分子对接结果及理化性质

Table 3 Molecular Docking Scores and Physicochemical Properties of Selected α -Glucosidase Inhibitory Peptides							
Peptide	Vina score/(kcal·mol ⁻¹)	Peptide ranker	链长	等电点	GRAVY	相对丰度/%	
1 FEWP	-10.40	0.94	4	1.10	-0.8	0.012	
2 WFFGHP	-9.90	0.98	6	7.69	-0.083	0.001	
3 PGEFPW	-9.40	0.93	6	0.88	-0.867	-	
4 RGF	-8.90	0.96	3	10.55	-0.7	0.011	
5 FLP	-8.90	0.97	3	3.57	1.667	0.013	
6 SPGEFPW	-8.90	0.93	7	0.88	-0.857	0.032	
7 阿卡波糖	-8.80						

注：GRAVY=疏水性的算术平均值，负值代表亲水，越小越亲水。

2.8 合成多肽 α -葡萄糖苷酶抑制活性

通过 Fmoc 固相合成法对上述 6 种 α -葡萄糖苷酶抑制肽进行合成，如图 10A 所示，在 1 mg·mL⁻¹ 质量浓度条件下，各合成多肽对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性存在明显差异，部分多肽表现出较强抑制活性，而部分多肽抑制作用较弱或不明显。其中，RGF 表现出最强的抑制效能，抑制率为 70.53%，显著高于其他多肽处理组 ($P<0.05$)；FLP 次之，抑制率为 30.59%；SPGEFPW、PGEFPW、FEWP 抑制率皆低于 15%，而 WFFGHP 在该浓度下几乎未检测出明显抑制活性。因此，选择 RGF 和 FLP 两条多肽进一步研究。以不同浓度梯度评价 RGF 和 FLP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性，并计算对应的 IC₅₀ 值。结果如图 10B~C 所示，RGF 和 FLP 对 α -葡萄糖苷酶均表现出较好的抑制活性，其 IC₅₀ 分别为 1.56 mM 和 3.57 mM。与已报道的黑豆来源肽 NNNPFKF (IC₅₀=4.96 mM)、RADLPGVK (IC₅₀=3.36 mM)、FLKEAFGV (IC₅₀=1.52 mM)^[30]及奶疙瘩来源肽 EMPF (IC₅₀=6.02 mM)^[31]相比，本研究获得的 RGF 和 FLP 表现出较强的 α -葡萄糖苷酶抑制能力。此外，与米曲霉来源三肽 PFP (IC₅₀=9.59 mM)^[32]以及蚕茧蛋白水解物来源三肽 GEY (IC₅₀=7.36 mM) 和 GYG (IC₅₀=5.08 mM)^[33]相比，RGF 和 FLP 同样表现出较好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性，说明地龙来源短肽具有一定的 α -葡萄糖苷酶抑制潜力。

为进一步探讨两条活性肽抑制 α -葡萄糖苷酶活性的潜在原因, 结合其氨基酸组成及理化性质, 对 RGF 和 FLP 的构效关系进行了分析。从分子量看, RGF 和 FLP 均为短链三肽, 相较于长链多肽, 短链肽具有分子量小、空间位阻较低等特点, 可能更易进入 α -葡萄糖苷酶活性口袋并与关键残基发生相互作用, 从而表现出较好的抑制活性。从氨基酸组成和理化性质来看, 二者存在明显差异。RGF 由 Arg、Gly 和 Phe 组成, 其中 Arg 为碱性带正电氨基酸, 可能通过氢键或静电相互作用与 α -葡萄糖苷酶中的酸性残基结合; Phe 为芳香族疏水性氨基酸, 可参与疏水作用或 π - π 相互作用, 从而增强肽段与酶活性口袋的结合稳定性。FLP 由 Phe、Leu 和 Pro 组成, 三者均属于疏水性或非极性氨基酸, 总疏水性较高。其中 Phe 和 Leu 有利于增强与酶疏水区域的相互作用, Pro 的环状结构可限制肽链构象, 提高其空间稳定性, 并可能促进其与酶活性口袋的适配^[24]。与 RGF 相比, FLP 缺少带电残基, 主要依赖疏水作用及氢键等非共价相互作用与酶结合, 这可能是其抑制活性弱于 RGF 的原因之一。

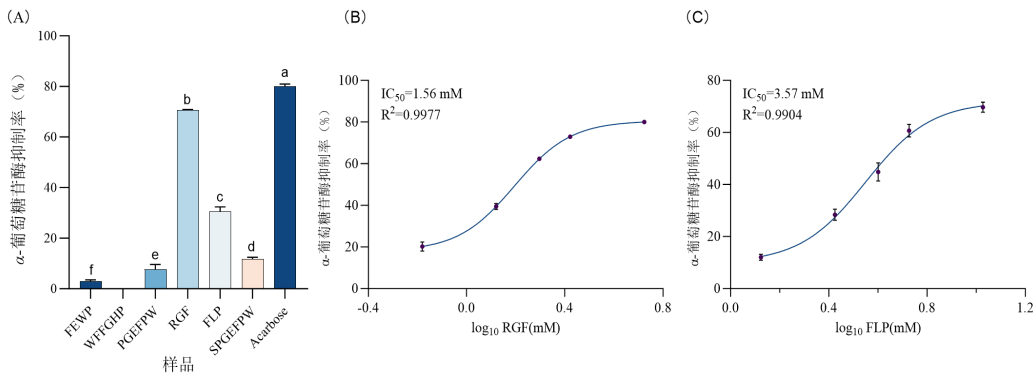


图 10 合成多肽 α -葡萄糖苷酶抑制活性 (A)、RGF (B) 和 FLP (C) 的 α -葡萄糖苷酶活性抑制曲线

Fig.10 α -Glucosidase inhibitory activities of synthetic peptides (A) and concentration–response curves of RGF (B) and FLP (C)

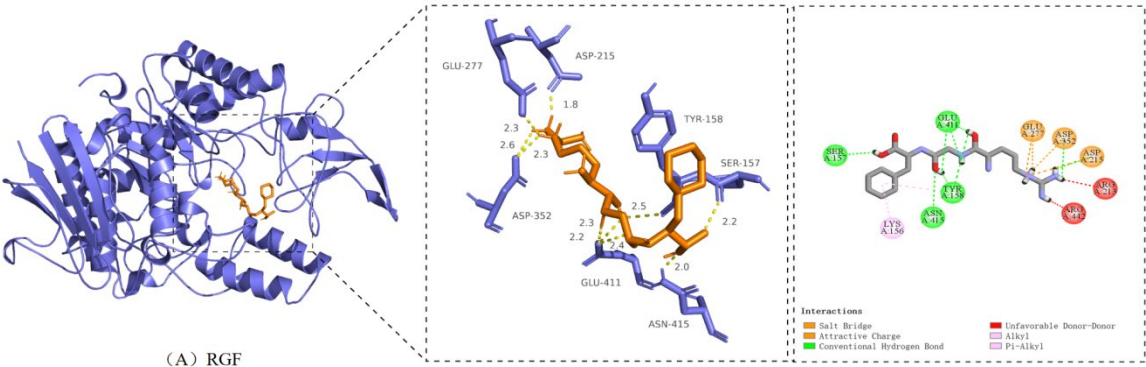
注: 图中不同字母表示各组之间差异显著 ($P<0.05$)。

2.9 分子对接分析

表 4 肽 RGF、FLP 和阿卡波糖与 3AJ7 的分子对接结果

Table 4 Molecular docking results of peptides RGF, FLP, and acarbose with 3AJ7

序列	肽与 α -葡萄糖苷酶的结合位点	氢键数
RGF	TYR-158 (2.5Å)、SER-157 (2.2Å)、ASP-215 (1.8Å)、GLU-277 (2.3Å)、ASP-352 (2.6Å、2.3Å)、GLU-411 (2.2Å、2.3Å、2.4Å)、ASN-415 (2.0Å)	10
FLP	TYR-158 (2.5Å)、ASP-352 (2.5Å)、GLU-411 (2.1Å)、ASN-415 (2.5Å)	4
阿卡波糖	GLU-271 (2.7Å)、ILE-272 (2.5Å、2.3Å)、ARG-270 (2.3Å)、VAL-266 (2.9Å)、ASN-264 (2.3Å、2.0Å)、HIS-295 (1.9Å)、ARG-263 (2.7Å)	8



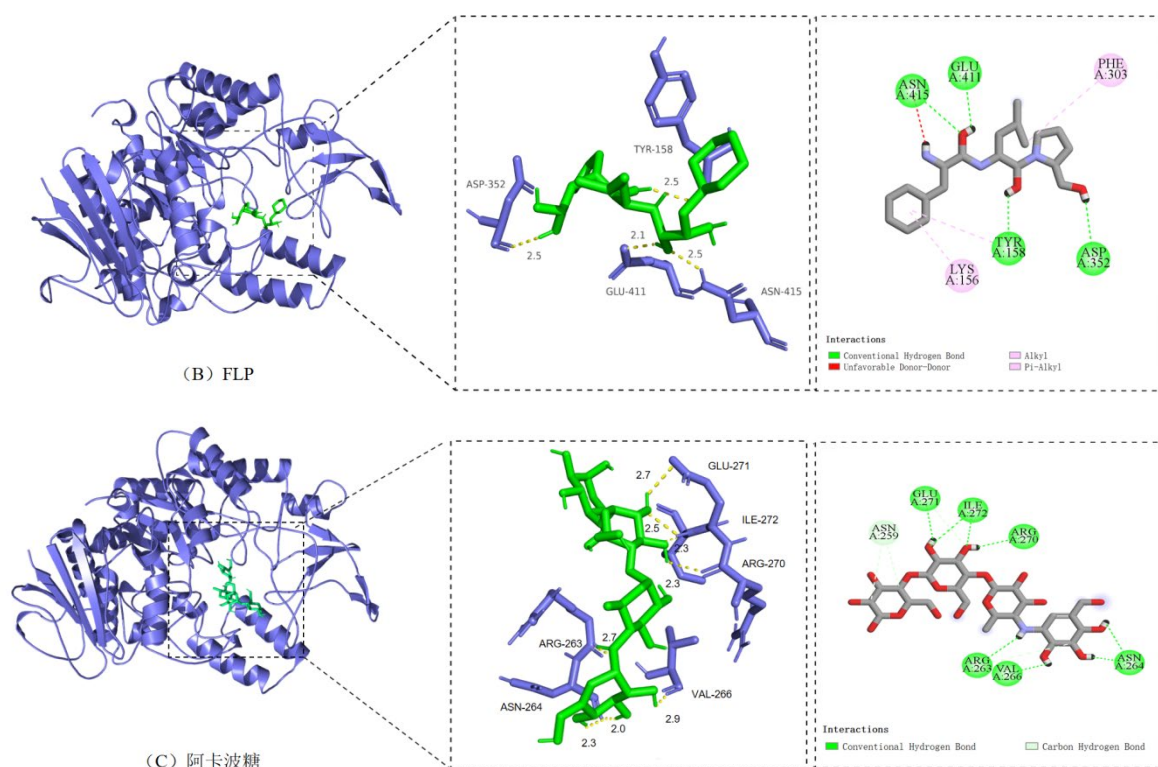


图 11 肽 RGF (A)、FLP (B) 和阿卡波糖 (C) 在 3AJ7 内预测结合构象的对接模型

Fig.11 Molecular docking models of predicted binding conformations for peptides RGF, FLP, and acarbose within 3AJ7

在活性肽与大分子结合过程中, 氢键、范德华力、疏水作用及静电相互作用等多种非共价作用力共同参与复合物的形成与稳定。其中, 氢键作用被认为是维持复合物稳定性的重要驱动力之一^[6]。研究表明, 3AJ7 的关键功能位点主要包括催化核心残基 Asp215、Glu277 和 Asp352, 以及位于活性口袋入口的 Tyr158、His280 和 310~315 loop^[34]。其中, Glu277 作为一般酸碱催化残基, Asp215 与底物葡萄糖残基形成氢键并参与底物定位, Asp352 参与稳定底物催化网络, Tyr158、His280 及 310~315 loop 则共同限制底物进入活性腔。分子对接结果如表 4 和图 11 所示, RGF 可与 Tyr158、Asp215、Glu277、Asp352、Glu411、Asn415 和 Ser157 等关键残基形成 10 个氢键相互作用。其中, Asp215、Glu277 和 Asp352 均属于 α -葡萄糖苷酶催化核心残基, 说明 RGF 不仅能够占据活性口袋入口区域, 还可进一步延伸至催化中心并与关键催化位点发生作用。同时, RGF 中的 Arg 残基可与 Asp215 和 Asp352 形成静电作用及盐桥相互作用, 从而进一步增强复合物稳定性; 其 Phe 残基则能够与 Tyr158 和 Lys156 形成疏水作用及 π -烷基相互作用, 有助于提高其与酶活性口袋的结合稳定性。因此, RGF 可能通过阻碍底物进入活性腔并干扰催化过程共同发挥 α -葡萄糖苷酶抑制作用。相比之下, FLP 主要与 Tyr158、Asp352、Glu411 和 Asn415 等残基形成 4 个氢键相互作用, 说明 FLP 同样可能具有一定的活性口袋入口占位作用, 并可对催化区域产生一定干扰。同时, 其中的 Phe 和 Leu 残基还可与 Phe303、Lys156 等形成疏水作用, 从而进一步增强复合物稳定性。然而, 与 RGF 相比, FLP 与催化核心残基的相互作用数量相对较少, 且结合位置更偏向酶活性口袋外围区域, 这可能是其抑制活性弱于 RGF 的重要原因之一。

3 结论

本研究以地龙为原料, 构建了自溶酶-外源蛋白酶复合酶解体系, 筛选并确定自溶-风味蛋白酶为最佳酶解组合, 经单因素优化获得最佳酶解工艺: 加酶量 $6\ 000\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ 、酶解时间 4 h、温度 $50\ ^\circ\text{C}$ 、pH 9.5, 在该条件下获得的酶解产物中, 180~1 000 Da 的小分子肽占比为 88.97%。超滤分级结果显示, <3 kDa 组分具有较强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性 ($\text{IC}_{50}=0.84\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 表明其活性主要来源于低分子量肽段。通过 LC-MS/MS 结合生物信息学方法筛选获得 6 条潜在活性肽, 其中 RGF 和 FLP 在体外实验验证中表现出较好的抑制活性 (IC_{50} 分别为 1.56 mM 和 3.57 mM)。分子对接分析表明, 两者可能通过氢键等非共价相互作用与 α -葡萄糖苷酶关键位点结合, 从而影响其酶活性。需要指出的是, 本研究主要基于体外实验及分子对接结果, 相关结论仍需进一步验证, 后续研究可

结合动物模型或临床前实验,系统评价其降血糖效果及体内生物利用度,并进一步解析其作用机制。同时,可进一步采用响应面等方法优化酶解工艺参数,并对分离纯化流程进行优化,以提高目标活性肽的制备效率,为其进一步开发及潜在规模化应用提供参考。

参考文献

- [1] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, et al. IDF diabetes atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2022, 183: 109119.
- [2] BLASCHKE F, CAGLAYAN E, HSUEH W A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists: Their role as vasoprotective agents in diabetes [J]. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 2006, 35(3): 561-574.
- [3] SANDHOLM N, GROOP P H. Genetic basis of diabetic kidney disease and other diabetic complications [J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2018, 50: 17-24.
- [4] MISRA S, KHUNTI K, GOYAL A, et al. Managing early-onset type 2 diabetes in the individual and at the population level [J]. Lancet, 2025, 405(10497): 2341-2354.
- [5] GLOSTER T M, DAVIES G J. Glycosidase inhibition: Assessing mimicry of the transition state [J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2010, 8(2): 305-320.
- [6] IBRAHIM M A, BESTER M J, NEITZ A W H, et al. Structural properties of bioactive peptides with α -glucosidase inhibitory activity [J]. Chemical Biology & Drug Design, 2018, 91(2): 370-379.
- [7] HA T J, BO SONG S, KO J, et al. Isolation and identification of α -glucosidase inhibitory constituents from the seeds of *vigna nakashimae*: Enzyme kinetic study with active phytochemical [J]. Food Chemistry, 2018, 266: 483-489.
- [8] DI STEFANO E, OLIVIERO T, UDENIGWE C C. Functional significance and structure-activity relationship of food-derived α -glucosidase inhibitors [J]. Current Opinion in Food Science, 2018, 20: 7-12.
- [9] 魏玮.地龙蛋白肽的分离纯化、结构鉴定及抗血栓活性研究[D].镇江:江苏大学,2023.
- [10] YAN Q, LI N, LI Y, et al. Preparation and identification of novel antioxidant peptides from collagen hydrolysate of sheep hoof assisted by ultrasound [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 281: 136415.
- [11] 张艺哲.地龙蛋白水解物的制备及免疫调节活性肽的纯化鉴定与构效关系[D].广州:华南理工大学,2025.
- [12] LIN Z, WU H, ZHANG M. Isolation, identification, and structure-activity relationship of novel ACE inhibitory peptides from earthworm protein *in vitro* gastrointestinal digestion product [J]. Food Bioscience, 2023, 55: 103010.
- [13] BUI P T, PHAM K T, VO T D L. Earthworm (*perionyx excavatus*) protein hydrolysate: Hypoglycemic activity and its stability for the hydrolysate and its peptide fractions [J]. Processes, 2023, 11(8): 2490.
- [14] 周飞燕,张丽娜,郑淑彦,等.地龙胰脂肪酶抑制肽的制备、结构鉴定及活性分析[J].现代食品科技,2026,42(1):110-120.
- [15] ZHOU M, REN G, ZHANG B, et al. Screening and identification of a novel antidiabetic peptide from collagen hydrolysates of Chinese giant salamander skin: Network pharmacology, inhibition kinetics and protection of IR-HepG2 cells [J]. Food & Function, 2022, 13(6): 3329-3342.
- [16] 潘蕾蔓.玛咖蛋白肽的制备、鉴定及免疫调节活性的研究[D].广州:华南理工大学,2024.
- [17] 刘洋.弹性蛋白肽的抗皮肤光老化功效及其作用机制研究[D].广州:华南理工大学,2019.
- [18] YUE L M, LEE J, ZHENG L, et al. Computational prediction integrating the inhibition kinetics of gallotannin on α -glucosidase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 103: 829-838.
- [19] WANG L, ZHANG F, SUO B, et al. α -glucosidase inhibitory peptides from the enzymolysis of semen *ziziphi spinosae* protein using an ultrasound-assisted protease: Preparation and inhibitory mechanism [J]. Food Research International, 2025, 208: 116282.
- [20] FIELDS G B, NOBLE R L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids [J]. International Journal of Peptide and Protein Research, 1990, 35(3):161-214.
- [21] KRISTINSSON H G, RASCO B A. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2000, 40(1): 43-81.
- [22] 张玮.地龙蛋白的抗氧化肽的制备、鉴定和构效关系[D].广州:华南理工大学,2024.
- [23] 武安琪.基于苦杏仁醇溶蛋白的降血糖肽饮料制备工艺研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2022.

- [24] 李志明,张舒,孟维洪,等.食源性 α -葡萄糖苷酶抑制肽: 构效关系、安全性及生物利用度研究进展[J].食品科学,2023,44(15):298-320.
- [25] HONG H, FAN H, CHALAMAIAH M, et al. Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives [J]. Food Chemistry, 2019, 301: 125222.
- [26] REN Y, LIANG K, JIN Y, et al. Identification and characterization of two novel α -glucosidase inhibitory oligopeptides from hemp (*cannabis sativa* L.) seed protein [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 26: 439-450.
- [27] ZHOU S, ZHANG Z, LI S, et al. Characterization and efficacy of α -glucosidase inhibitory peptides from enzymatically hydrolyzed peanut meal [J]. Food Research International, 2025, 218: 116864.
- [28] DENG F, LIANG Y, LEI Y, et al. Development and identification of novel α -glucosidase inhibitory peptides from mulberry leaves [J]. Foods, 2023, 12(21): 3917.
- [29] JIN Z, WEI Z. Molecular simulation for food protein-ligand interactions: A comprehensive review on principles, current applications, and emerging trends [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2024, 23(1): e13280.
- [30] 李元程.黑豆 α -葡萄糖苷酶抑制肽的制备研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2025.
- [31] 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.
- [32] KANG M G, YI S H, LEE J S. Production and characterization of a new α -glucosidase inhibitory peptide from aspergillus oryzae N159-1 [J]. Mycobiology, 2013, 41(3): 149-154.
- [33] LEE H J, LEE H S, CHOI J W, et al. Novel tripeptides with α -glucosidase inhibitory activity isolated from silk cocoon hydrolysate [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(21): 11522-11525.
- [34] YAMAMOTO K, MIYAKE H, KUSUNOKI M, et al. Crystal structures of isomaltase from saccharomyces cerevisiae and in complex with its competitive inhibitor maltose [J]. The FEBS journal, 2010, 277(20): 4205-4214.