

虾壳源蛋白水解物降糖降脂活性评价及肽序分析

Study on hypoglycemic and lipid-lowering activity of shrimp shell-derived enzymatic hydrolysate and peptide sequence analysis

韩鹏薇^{1,2} 易彤¹ 李虹辉² 吴昊¹ 李彦¹ 褚武英²

HAN Pengwei^{1,2} YI Tong¹ LI Honghui² WU Hao¹ LI Yan¹ CHU Wuying²

(1. 长沙理工大学食品与生物工程学院, 湖南 长沙 410114; 2. 长沙学院生物与化学工程学院, 湖南 长沙 410022)

(1. School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha, Hunan 410114, China; 2. College of Biology and Chemical Engineering, Changsha University, Changsha, Hunan 410022, China)

摘要:目的: 采用酶解法制备克氏原螯虾壳蛋白水解物 (*Procambarus clarkii* shell protein hydrolysates, PCSPHs), 并分析其体外降糖降脂活性及肽序。方法: 分别采用胃蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶水解制备不同虾壳蛋白水解物, 分析其体外降糖降脂活性和肽序列; 运用 Peptide Ranker 及 BIOPEP-UWM 网站在线分析, 再以核受体 PPAR γ 配体结合区域的晶体结构作为靶点, 使用 Autodock vina 进行分子对接模拟, 获得具有潜在降糖降脂活性的虾壳肽。结果: 胃蛋白酶水解物 (PEP-PCSPHs) 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性具有较强的抑制作用, IC₅₀ 值分别为 (5.42 $\pm$ 0.05), (7.11 $\pm$ 1.01) mg/mL; 胰蛋白酶水解物 (TRY-PCSPHs) 对胰脂肪酶活性具有最强的抑制能力, IC₅₀ 值为 (4.71 $\pm$ 1.12) mg/mL, 且对甘氨酸钠表现出最好的体外结合效果。此外, 经质谱鉴定 PEP-PCSPHs 和 TRY-PCSPHs 中分别得到 3 391, 2 086 条肽序; 通过在线网站预测和分子对接筛选出多条均能与 PPAR γ 结合的降糖降脂虾壳活性肽 (PCSAPs)。结论: 酶解克氏原螯虾壳制备的虾壳蛋白水解物具有潜在的降糖降脂活性, 可以改善糖脂代谢紊乱。

关键词: 克氏原螯虾壳; 蛋白水解物; PPAR γ ; 分子对接; 降糖降脂活性

基金项目: 湖南省教育厅科学研究优秀青年项目 (编号: 22B0327); 湖南省教育厅重点科学研究项目 (编号: 22A0237); 国家自然科学基金青年项目 (编号: 32102816); 湖南省科技创新计划资助 (编号: 2023RC3137)

作者简介: 韩鹏薇, 女, 长沙理工大学在读硕士研究生。

通信作者: 吴昊 (1990—), 男, 长沙理工大学副教授, 博士。

E-mail: haowu@csust.edu.cn

收稿日期: 2024-01-11 **改回日期:** 2024-03-19

Abstract: Objective: The PCSPHs were prepared by enzymatic hydrolysis of *Procambarus clarkii* shells, and their hypoglycemic and lipid-lowering activities in vitro were evaluated and peptide sequence were analyzed. **Methods:** Different crayfish shell proteolysates were prepared by hydrolysis of pepsin, alcalase, trypsin, flavor protease and papain, and their in vitro hypoglycemic and lipid-lowering activities were evaluated and peptide sequences were determined. The peptides sequence of *Procambarus clarkii* shells was identified by LC-MS/MS. Taking the crystal structure of the nuclear receptor PPAR γ ligand binding region as the target, Autodock vina was used to simulate molecular docking to obtain crayfish shell peptides with potential hypoglycemic/lipid-lowering activities. **Results:** The PEP-PCSPHs had significant inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase activity, with IC₅₀ values of (5.42 $\pm$ 0.05) mg/mL and (7.11 $\pm$ 1.01) mg/mL, respectively. The TRY-PCSPHs had the strongest inhibitory effect on pancreatic lipase activity, with an IC₅₀ of (4.71 $\pm$ 1.12) mg/mL, and exhibited the best in vitro binding effects on sodium glycinolate. In addition, 3 391 peptide sequences were identified in pepsin hydrolysates and 2 086 peptide sequences were identified in trypsin hydrolysates, and multiple hypoglycemic/lipid-lowering crayfish shell active peptides that could bind to PPAR γ were screened through online website prediction and molecular docking. **Conclusion:** The shrimp shell peptides prepared by enzymatic hydrolysis of crayfish shells have potential hypoglycemic and lipid-lowering activities, which may play a role in improving glucose and lipid metabolism disorders.

Keywords: *Procambarus clarkii* shells; protein hydrolysate; PPAR γ ; molecular docking; hypoglycemic and lipid-lowering activity

糖类和脂质是细胞和机体重要的能量和物质来源。脂质代谢稳态平衡对维持机体的正常生理功能至关重要, 发生紊乱后会导致多种重大疾病, 如糖尿病、肥胖、非酒精性脂肪肝、高血压、高脂血症、心脑血管等^[1]。过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) 是一类配体激活核转录因子, 属于核受体超家族成员。目前, 已知的 PPARs 家族存在 PPAR α 、PPAR β/δ 和 PPAR γ 3 种亚型。其中研究较深入的为 PPAR γ , 其具有多种生物效应, 在脂肪组织、巨噬细胞、单核细胞、肠细胞、骨骼肌和内皮细胞中表达丰富。PPAR γ 被激活后可调控与胰岛素效应有关的多种基因的转录, 在调节胰岛素敏感性、脂质代谢、脂肪生成和葡萄糖的体内平衡中发挥重要作用^[2-3]。曾被广泛应用于临床的合成药物噻唑烷二酮类 (TZDs, PPAR γ 的高效配体), 通过持续强激活 PPAR γ , 可显著改善胰岛素抵抗, 降低高血糖、高胰岛素血症及相关的代谢紊乱, 但伴有水肿、体重增加、肝功能异常和心力衰竭等副作用。然而, 在众多具有降糖/脂活性的天然产物中, 生物活性肽因活性好、结构简单、稳定性高、吸收好、免疫原性低、副作用少等备受关注。

生物活性肽 (bioactive peptides, BP) 是一类具有特殊生理活性的肽, 具有多种人体代谢和生理调节功能, 通常由 2~10 个氨基酸组成, 相对分子质量低于 10 000, 来源广泛。按照生理功能, 可将 BP 分为抑菌肽、抗氧化肽、降糖肽、降血压肽、降脂肽等^[4-5]。利用合适的蛋白酶水解可以释放具有生物活性的肽片段, 如大豆蛋白肽通过细胞试验发现其具有明显的降脂效果^[6]。Ben Henda 等^[7]发现来源于鱼副产品以及裙带菜等其他海洋资源中的生物活性肽可以通过调节白色脂肪组织从而达到调节能量代谢紊乱的作用。此外, Ji 等^[8]发现南极磷虾酶解物可显著降低糖尿病斑马鱼的葡萄糖、甘油三酯和胆固醇水平; 来自奶酪的 LPQNIPPL 肽能降低健康大鼠的餐后血糖^[9], 以及从鱼皮明胶中分离的 GPVGPAGNPGANGLN 肽能够增强链脲佐菌素诱导 (STZ) 糖尿病小鼠的胰岛素分泌^[10], 利用野生型秀丽隐杆线虫和人肝癌细胞为模型, 可证明乳清肽和牡蛎肽的降糖活性^[11]。

目前, 常见的生物活性肽分离鉴定方法仍存在耗时耗力等缺陷, 生物信息学技术被迅速用于生物活性肽构效关系的研究, 其结果有助于活性肽的快速高通量筛选。Peptide Ranker 为一种基于 N-to-1 新型神经网络预测生物活性肽的服务器, 通过向 Peptide Ranker 提交多肽信息即可预测多肽具有某种功能活性的概率, 并按照每种肽的预测生物活性概率大小进行排序, 是一种有效的肽序功能预测筛选方法^[12]。BIOPEP-UWM (Biopep) 数据库^[13]主要包括序列数据库 (多肽、蛋白质等) 及蛋白质评估工具库, 目前已收录 4 700 多种生物活性肽, 是最全面

的生物活性肽数据库。多肽的价值可以通过对多肽潜在生物活性的概况进行估计, 包括多肽中生物活性片段的出现频率以及多肽的潜在生物活性。这些生物信息分析手段操作简便, 可处理海量数据, 已成为生物活性肽研究的重要方法。

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) (俗称“小龙虾”) 是目前全球分布最广、产量最高的淡水螯虾之一, 而中国又是世界上最大的克氏原螯虾生产和消费国, 在其加工和消费过程中会产生大量虾壳副产物, 这些副产物富含大量蛋白质, 但却未得到充分利用。有研究表明, 日粮添加虾壳粉可有效改善脂质代谢能力, 且虾壳蛋白水解物富含各种必需氨基酸^[14-15], 具有抗氧化^[16]、降血压^[17-18]等潜在生物活性。研究拟采用酶解法制备虾壳活性肽, 测定其体外降糖、降脂活性, 并对活性较好的蛋白水解物进行序列鉴定, 利用 Peptide Ranker 和 BIOPEP-UWM 数据库对虾壳多肽序列进行高通量筛选, 旨在借助生物信息学手段快速高效筛选出大量具有潜在降糖降脂活性的虾壳肽, 为天然降糖/脂活性成分的虚拟筛选提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

克氏原螯虾壳粉: 湖南省水产科学研究所;
石油醚: 沸程 60~90 °C, 国药集团化学试剂有限公司;
碱性蛋白酶、阿卡波糖: 北京索莱宝科技有限公司;
风味蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、猪胰脂肪酶、 α -淀粉酶: 上海西格玛奥德里奇有限公司;
木瓜蛋白酶: 北京百灵威有限公司;
 α -葡萄糖苷酶、考来烯胺: 上海源叶生物科技有限公司;
碘、月桂酸 4-硝基苯脂、甘氨酸酸钠、牛磺胆酸钠: 上海麦克林生化科技股份有限公司;
对硝基苯- α -D-葡萄糖苷 (PNPG): 上海易恩化学技术有限公司;
奥利司他: 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

电子分析天平: FA2004N 型, 上海精密科学仪器有限公司;
数显恒温水浴锅: HH-6B 型, 国华 (常州) 仪器制造有限公司;
pH 计: FiveEsayPlusTM 型, 梅特勒—托利多仪器 (上海) 有限公司;
离心机: TDL-36C 型, 上海安亭科学仪器厂;
酶标仪: ReadMax 1900 型, 上海闪谱生物科技有限公司;
冷冻干燥机: LGJ-18C 型, 北京四环起航科技有限

公司;

磁力搅拌器:8S-1 型,常州国宇仪器制造有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 虾壳蛋白水解物制备流程

脱脂虾壳粉→加水→室温溶解 3 h→水浴加热→调节 pH→加酶→酶解(保持体系 pH 稳定)→灭酶(95 ℃, 15 min)→冷却(室温后调至 pH 7)→离心(3 600 r/min, 15 min)→取上清液→酶解液→加 4% 活性炭→50 ℃ 循环水浴搅拌 1 h→抽滤→冷冻干燥→虾壳蛋白水解物

1.3.2 α -淀粉酶活性抑制能力测定 参照文献[19]并修改。96 孔板中加入 45 μ L 不同质量浓度的虾壳活性肽(2, 4, 6, 8, 10 mg/mL)和 15 μ L 质量浓度为 0.02 mg/mL 的 α -淀粉酶溶液, 37 ℃ 反应 10 min, 加入 60 μ L 浓度为 0.08% 的淀粉溶液, 37 ℃ 反应 15 min, 加入 60 μ L 浓度为 1.0 mol/L 的盐酸溶液终止反应, 加入 20 μ L 浓度为 0.01 mol/L 碘溶液显色, 用 15 μ L 磷酸盐缓冲液替代 α -淀粉酶溶液作为空白, 测定 630 nm 下吸光度。按式(1)计算 α -淀粉酶抑制率。

$$R = [1 - (A_3 - A_4) / (A_1 - A_2)] \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R —— α -淀粉酶抑制率, %;

A_1 ——阴性空白吸光度;

A_2 ——阴性对照吸光度;

A_3 ——样品空白吸光度;

A_4 ——样品对照吸光度。

1.3.3 α -葡萄糖苷酶活性抑制能力测定 参照文献[20]并修改。用 0.2 mol/L, pH 6.8 的磷酸钠缓冲液将 α -葡萄糖苷酶和对硝基苯- α -D-葡萄糖苷(PNPG)分别配制成 0.2 U/mL 和 1 mg/mL 的溶液。分别移取 50 μ L 磷酸缓冲液、PNPG 及虾壳活性肽溶液于 96 孔板中, 37 ℃ 孵育 5 min, 充分混合, 加入 10 μ L α -葡萄糖苷酶溶液启动反应, 37 ℃ 反应 30 min, 加入 80 μ L 浓度为 1 mol/L 的碳酸钠终止反应, 酶标仪测定 405 nm 下反应体系生成物 4-硝基苯酚(PNP)含量, 并按式(2)计算 α -葡萄糖苷酶抑制率。

$$Y = [(A_A - A_S) / (A_A - A_B)] \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

Y —— α -葡萄糖苷酶抑制率, %;

A_B ——空白组吸光度;

A_A ——对照组吸光度;

A_S ——样品组吸光度。

1.3.4 胰脂肪酶活性抑制能力测定 用 5 mmol/L 的乙酸钠溶液(含 1% Triton X-100)配制质量浓度为 0.8 mg/mL 的月桂酸-4-硝基苯脂溶液, 向 96 孔板中加入 60 μ L 胰脂肪酶溶液(10 mg/mL), 60 μ L PBS 缓冲液、20 μ L 各质量浓度的虾壳活性肽溶液和 80 μ L 月桂酸-4-

硝基苯脂, 37 ℃ 反应 30 min, 测定 405 nm 处吸光值。对照组用 PBS 缓冲液代替胰脂肪酶, 按式(3)计算胰脂肪酶抑制率。

$$X_1 = (1 - A/A_0) \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

X_1 ——胰脂肪酶抑制率, %;

A ——样品组吸光度;

A_0 ——对照组吸光度。

1.3.5 体外降脂试验

(1) 胆酸盐标准曲线的绘制: 采用 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液(pH 6.3)将牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠母液(1 mmol/L)稀释成不同浓度梯度。分别取 2.5 mL 胆酸盐标准溶液于 15 mL 厚壁耐压瓶中, 加入 7.5 mL 浓度为 60% 的 H_2SO_4 , 70 ℃ 水浴 25 min, 冰浴冷却, 取 200 μ L 加至 96 孔板中, 测定 387 nm 处吸光值。以各胆酸盐物质的量浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制标准曲线。

(2) 胆酸盐结合能力测定: 依次取 1 mL 样品液(10 mg/mL)、HCl 溶液(0.01 mol/L)、胃蛋白酶(10 mg/mL)加至 15 mL 具塞试管中, 37 ℃、120 r/min 振荡 1 h 模拟胃部消化。用 NaOH(0.1 mol/L)溶液调节 pH 值至 6.3, 加入 4 mL 胰蛋白酶(10 mg/mL)振荡 1 h 模拟肠道消化。向每个具塞试管中加入 4 mL 胆酸盐(1 mmol/L), 37 ℃ 振荡 1 h, 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液至厚壁耐压瓶中。按胆酸盐溶液标准曲线绘制步骤测定胆酸盐含量, 重复试验 3 次, 按式(4)计算胆酸盐结合能力。

$$X_2 = C_1 - C_2, \quad (4)$$

式中:

X_2 ——胆酸盐结合量, μ mol/mg;

C_1 ——原始胆酸盐物质的量浓度, μ mol/mg;

C_2 ——残留的胆酸盐物质的量浓度, μ mol/mg。

1.3.6 肽序列鉴定 将体外降糖降脂活性较好的蛋白水解物样品寄送至深圳市微纳菲生物技术有限公司进行鉴定, 采用 LC-MS/MS 分析, 质谱采集到的原始 raw 图谱文件, 采用 PEAKS Studio 8.5 软件进行数据加工处理和检索分析, 数据库为 NCBI 下载的 *Procambarus clarkii* 物种蛋白数据库, 检索参数设置: 一级质谱质量容差为 10 μ g/mL, 二级质谱为 0.05 Da。

1.3.7 数据库预测 采用 PeptideRanker 筛选鉴定所得到的肽序, 将肽序单独排列后以 FASTA 格式提交至 PeptideRanker 进行打分, 分值为 0~1, 越接近 1 则生物活性越好。选择 Ranker 值 ≥ 0.5 的肽序提交至 BIOPEP-UWM 中, 提交的肽段与数据库中现有的具有降糖降脂活性的肽段进行比对, 选择含有数据库现有活性片段的肽序进行后续对接。

1.3.8 虾壳活性肽的三维模型构建 使用 ChemDraw 软件对上述筛选出的潜在降糖/脂虾壳活性肽进行二维结

构绘制,选定 View 下拉菜单中的工具栏 show HELM Monomer Toolbar,选定该工具栏中的 AA,输入活性肽的氨基酸,得到肽的分子结构式,将二维结构保存为 *.cdxml 格式。将二维结构导入 ChemDraw 3D 中生成三维球棍模型,进一步采用 Chem3D 中的 MM2 模块进行优化,通过计算最小化能量得到最恰当的化合物空间构象并进行保存,保存类型为 *.pdb 格式。用 PyMol 打开后缀为 *.pdb 格式的虾壳活性肽文件,对其进行加氢并保存。使用 AutoDock Tools 将虾壳活性肽的 *.pdb 格式转换为 *.pdbqt 格式并设置为配体。

1.3.9 PPAR γ 的三维模型构建 以 PPAR γ 作为分子对接的受体蛋白,从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中获取 PPAR γ 蛋白(PDB ID:6MD4)的三维结构。使用 PyMol 去除受体中的原始配体并进行去水加氢后保存为 *.pdb 格式。导入 AutoDock Tools 将 PPAR γ 蛋白的 *.pdb 格式转换为 *.pdbqt 格式并设置为受体,用于后续分子对接分析。

1.3.10 PPAR γ 与虾壳活性肽对接 用 AutoDock Vina 分子模拟软件将虾壳活性肽与 PPAR γ 蛋白进行半柔性对接,以 PPAR γ 与罗格列酮结合位点作为对接盒子包裹的范围,输出一个 Config.txt 文件,运行 Vina。根据 AutoDock Vina 输出的分数排名,选择结合能最优的复合物用于后续研究。使用 PyMol 作为结构可视化以及配体与受体互作分析软件,使用 Ligplot 软件分析配体与受体之间的二维蛋白相互作用。

1.3.11 数据处理 使用 Origin 2018 软件对酶的抑制曲线进行非线性拟合,并计算 IC₅₀ 值。通过 SPSS Statistics 26 软件进行统计分析,数据采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 代表具有显著性差异。所有数据均表示为平均值 $\pm$ 标准差。

2 结果与分析

2.1 虾壳活性肽体外降糖能力分析

根据文献[19-20],虾壳蛋白水解物对酶的活性抑制能力均符合拟合方程:

$$Y = A_2 + (A_1 - A_2) / [1 + (X/X_0)^P], \quad (5)$$

式中:

A_1 —— X 趋近于无穷大或无穷小时, Y 的最大值;

A_2 —— X 趋近于无穷大或无穷小时, Y 的最小值;

X ——曲线拐点;

P ——与拐点处斜率相关。

2.1.1 α -淀粉酶活性抑制能力 由图 1 和表 1 可知,各虾壳蛋白水解物对 α -淀粉酶活性抑制能力随质量浓度的增大逐渐提升,其中抑制能力最强的为胃蛋白酶水解物,其 IC₅₀ 值为 (5.418 ± 0.052) mg/mL,显著低于其他 4 种虾壳蛋白水解物,为阳性对照组的 8~9 倍。Admassu 等^[21]使用胃蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶和中性蛋白酶水解紫菜蛋白,其中胃蛋白酶水解物对 α -淀粉酶的抑制率最高,中性蛋白酶水解物的最低,抑制率分别为 50.00% 和 18.27%。Zhou 等^[22]从藜麦胃蛋白酶水解物中分离出的 MMFP 肽具有显著的 α -淀粉酶活性抑制能力。Xiong

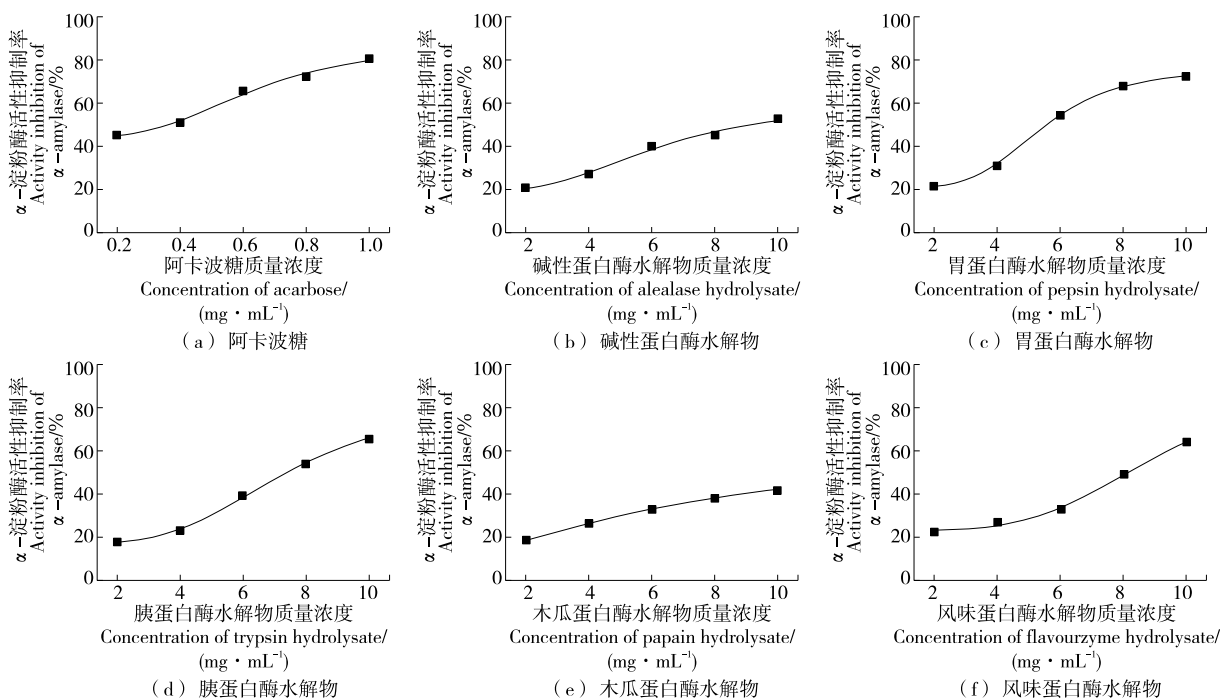


图 1 虾壳蛋白水解物的 α -淀粉酶活性抑制能力

Figure 1 Inhibition of α -amylase activity of crayfish shell protease hydrolysates

表 1 虾壳蛋白水解物对 α-淀粉酶活性的抑制参数[†]

Table 1 Fitting curve and parameters of α-amylase activity inhibition of crayfish shell protease hydrolysates

样品	A ₁	A ₂	X ₀	P	R ²	IC ₅₀ 值/ (mg · mL ⁻¹)
阿卡波糖	0.439 67±0.035 22	0.873 17±0.116 23	0.626 35±0.113 09	3.302 76±1.584 08	0.993 2	0.626±0.113 ^f
碱性蛋白酶水解物	0.192 66±0.039 62	0.599 06±0.133 53	6.226 45±1.439 88	2.976 73±1.671 29	0.992 3	6.226±1.440 ^d
胃蛋白酶水解物	0.208 85±0.004 57	0.759 02±0.007 14	5.418 05±0.051 90	4.470 28±0.174 28	0.999 6	5.418±0.052 ^e
胰蛋白酶水解物	0.170 22±0.009 00	0.815 52±0.052 14	7.287 01±0.363 96	3.569 81±0.387 12	0.998 7	7.287±0.364 ^b
木瓜蛋白酶水解物	0.130 85±0.003 47	0.577 82±0.011 59	6.820 30±0.171 25	1.614 85±0.056 23	0.999 8	6.820±0.171 ^c
风味蛋白酶水解物	0.231 30±0.017 73	0.902 69±0.291 98	8.985 49±1.945 05	4.192 08±1.463 07	0.997 3	8.985±1.945 ^a

[†] 字母不同表示差异显著(P<0.05)。

等^[23]从谷蛋白的胃蛋白酶水解物中发现,相对分子质量超过 10 000 的肽由于其与 α-淀粉酶的强结合亲和力,对小麦淀粉的体外酶水解具有很强的抑制作用。Ramírez 等^[24]从燕麦蛋白酶解物中分离出的 GDVVALPA 肽和 DVVALPAG 肽除了能有效抑制 α-淀粉酶外,还具有较强的 α-葡萄糖苷酶抑制活性。

2.1.2 α-葡萄糖苷酶活性抑制能力 由图 2 和表 2 可知,胃蛋白酶水解物的 α-葡萄糖苷酶活性抑制能力最好,其 IC₅₀ 值为(7.107±1.010) mg/mL,但相较阳性对照阿卡波糖还有一定差距,后续可通过筛选纯化进一步提高其降糖能力。

肽的抑制作用可能是由于具有活性的肽段与葡萄糖苷酶催化位点上的氨基酸通过氢键、极性和疏水性作用

结合,阻碍了碳水化合物底物与酶的结合,从而抑制了酶原有的能够催化促进多糖分解的生物活性。此外,相对分子质量、氨基酸组成和疏水性^[25-26]也被认为是影响降糖肽活性的键结构特征。

2.2 虾壳活性肽体外降脂能力分析

2.2.1 胰脂肪酶活性抑制能力 胰脂肪酶可以将脂肪水解成游离脂肪酸和单酰甘油酯,促进机体对脂肪的吸收,通过抑制其活性达到降脂目的^[27]。由图 3 和表 3 可知,阳性对照药物奥利司他对胰脂肪酶活性的 IC₅₀ 值为(0.657±0.075) mg/mL。相较之下,虾壳蛋白水解物的 IC₅₀ 值约为其 7~11 倍。其中,虾壳胰蛋白酶水解物对胰脂肪酶的活性抑制效果最好。胰蛋白酶水解物对胰脂肪酶的活性抑制呈剂量依赖效应,在一定质量浓度范围内,

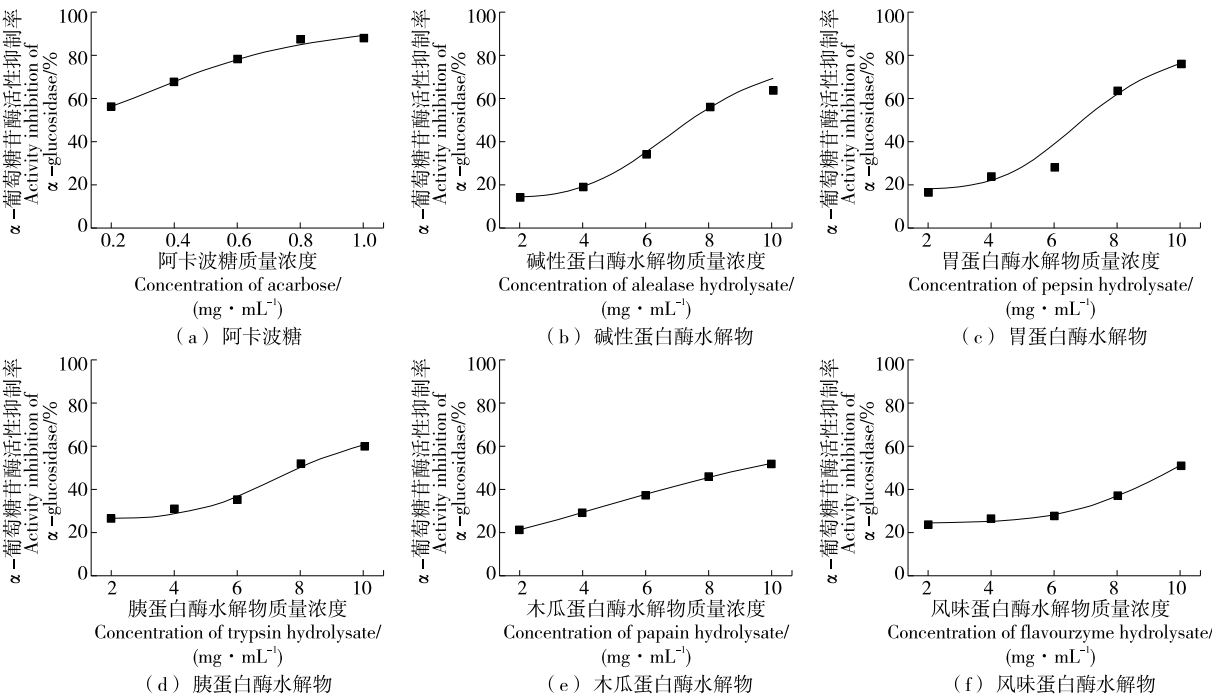


图 2 虾壳蛋白水解物的 α-葡萄糖苷酶活性抑制能力

Figure 2 Inhibition of α-glucosidase activity of crayfish shell protease hydrolysates

随着质量浓度的增加,抑制效果越好。经 Logistic 模型拟合后,其 IC_{50} 值为 $(4.710\ 3\pm1.120\ 13)\text{ mg/mL}$,表明虾壳胰蛋白酶水解物具有良好的降脂潜力,或可在延缓三酰基甘油酯的水解中发挥重要作用。

表 2 虾壳蛋白水解物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制参数[†]

Table 2 Fitting curve and parameters of α -glucosidase activity inhibition of crayfish shell protease hydrolysates

样品	A_1	A_2	X_0	P	R^2	IC_{50} 值/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
阿卡波糖	$0.512\ 05\pm0.027\ 04$	$0.985\ 93\pm0.114\ 55$	$0.535\ 92\pm0.099\ 02$	$2.194\ 33\pm0.634\ 82$	$0.999\ 3$	0.536 ± 0.099^f
碱性蛋白酶水解物	$0.139\ 66\pm0.010\ 76$	$0.844\ 89\pm0.189\ 49$	$7.321\ 60\pm1.038\ 11$	$4.173\ 00\pm0.682\ 61$	$0.999\ 4$	7.322 ± 1.038^d
胃蛋白酶水解物	$0.181\ 44\pm0.060\ 61$	$0.869\ 50\pm0.178\ 00$	$7.106\ 50\pm1.010\ 47$	$4.887\ 15\pm3.202\ 54$	$0.995\ 6$	7.107 ± 1.010^e
胰蛋白酶水解物	$0.264\ 24\pm0.006\ 46$	$0.716\ 58\pm0.246\ 60$	$7.819\ 18\pm2.335\ 05$	$4.515\ 21\pm2.845\ 23$	$0.992\ 1$	7.819 ± 2.335^e
木瓜蛋白酶水解物	$0.992\ 06\pm0.038\ 40$	$1.002\ 16\pm0.572\ 06$	$12.096\ 08\pm9.416\ 18$	$1.520\ 34\pm0.578\ 88$	$0.999\ 1$	12.096 ± 9.426^a
风味蛋白酶水解物	$0.243\ 31\pm0.015\ 51$	$0.966\ 32\pm1.000\ 72$	$11.269\ 30\pm5.993\ 66$	$4.549\ 76\pm2.411\ 23$	$0.996\ 2$	11.269 ± 5.994^b

[†] 字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

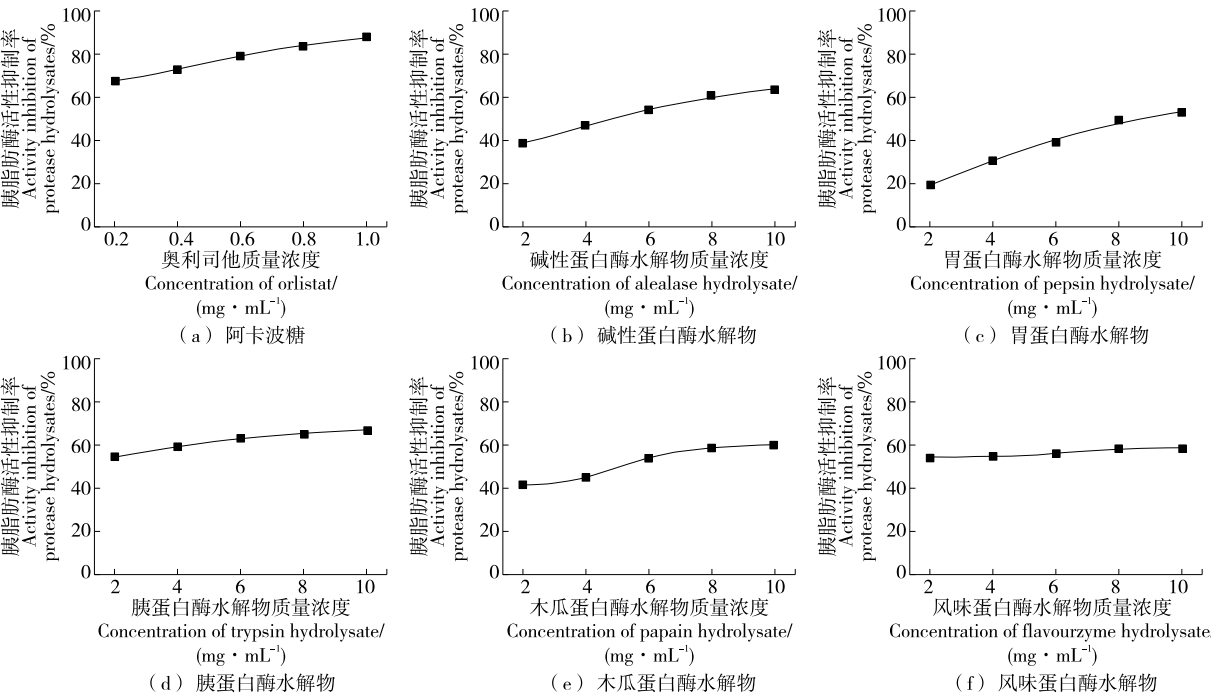


图 3 虾壳蛋白水解物的胰脂肪酶活性抑制能力

Figure 3 Inhibition of pancreatic lipase activity of crayfish shell protease hydrolysates

表 3 虾壳蛋白水解物对胰脂肪酶活性的抑制参数[†]

Table 3 Fitting curve and parameters of pancreatic lipase activity inhibition of crayfish shell protease hydrolysates

样品	A_1	A_2	X_0	P	R^2	IC_{50} / ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
奥利司他	$0.659\ 50\pm0.005\ 99$	$0.961\ 17\pm0.041\ 79$	$0.657\ 48\pm0.074\ 61$	$2.270\ 21\pm0.336\ 23$	$0.999\ 8$	0.657 ± 0.075^f
碱性蛋白酶水解物	$0.353\ 56\pm0.039\ 53$	$0.746\ 13\pm0.079\ 60$	$6.049\ 72\pm0.921\ 80$	$2.053\ 43\pm0.752\ 46$	$0.998\ 8$	6.050 ± 0.922^e
胃蛋白酶水解物	$0.187\ 87\pm0.012\ 64$	$0.766\ 83\pm0.462\ 56$	$7.145\ 19\pm3.020\ 22$	$3.974\ 33\pm3.107\ 37$	$0.998\ 7$	7.145 ± 3.020^a
胰蛋白酶水解物	$0.513\ 13\pm0.064\ 52$	$0.706\ 66\pm0.034\ 06$	$4.710\ 30\pm1.120\ 13$	$1.956\ 56\pm1.055\ 88$	$0.997\ 1$	4.710 ± 1.120^e
木瓜蛋白酶水解物	$0.436\ 40\pm0.019\ 35$	$0.646\ 94\pm0.035\ 47$	$6.385\ 03\pm0.549\ 48$	$5.130\ 40\pm2.323\ 36$	$0.994\ 1$	6.385 ± 0.549^b
风味蛋白酶水解物	$0.438\ 45\pm0.002\ 85$	$0.581\ 33\pm0.002\ 60$	$5.079\ 36\pm0.063\ 57$	$7.029\ 73\pm0.349\ 24$	$0.999\ 8$	5.079 ± 0.064^d

[†] 字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

2.2.2 体外降脂能力 胆汁酸是肝内胆固醇衍生物,经分泌进入动态平衡的胆汁酸池,再经肠肝循环回到肝脏,在脂肪的消化和吸收过程中起重要作用,可以乳化疏水的甘油三酯和胆固醇脂促进脂类消化,且与共脂肪酶作用激活脂肪酶,使甘油三酯水解为游离脂肪酸和甘油 2-单酯。胆汁酸的减少一方面可以直接抑制脂肪的消化和吸收,另一方面将促进肝脏内胆固醇的转化以维持胆汁酸池的动态平衡,间接降低体内胆固醇水平,达到降脂目的。而胆汁酸在体内以胆酸盐的形式存在,因此,是具有一定胆酸盐结合能力的物质,可能具有潜在的降脂活性。由表 4 可知,虾壳胰蛋白酶水解物对甘氨酸胆酸钠表现出最好的体外结合效果。风味蛋白酶水解物对牛磺胆酸钠表现出最好的体外结合效果,胃蛋白酶水解物和胰蛋白酶水解物的次之。

表 4 虾壳蛋白水解物对甘氨酸胆酸钠和牛磺胆酸钠的结合量[†]
Table 4 Sodium glycinocholate binding of crayfish shell protease hydrolysates

样品	甘氨酸胆酸钠结合量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$)	牛磺胆酸钠结合量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$)
考来烯胺	0.947 4 $\pm$ 0.015 01 ^a	0.896 4 $\pm$ 0.000 71 ^a
碱性蛋白酶水解物	0.555 4 $\pm$ 0.001 93 ^c	0.448 8 $\pm$ 0.003 65 ^f
胃蛋白酶水解物	0.545 8 $\pm$ 0.007 01 ^d	0.504 2 $\pm$ 0.003 68 ^c
胰蛋白酶水解物	0.581 5 $\pm$ 0.004 27 ^b	0.496 9 $\pm$ 0.001 98 ^d
木瓜蛋白酶水解物	0.475 1 $\pm$ 0.002 56 ^e	0.483 3 $\pm$ 0.001 04 ^e
风味蛋白酶水解物	0.419 9 $\pm$ 0.002 53 ^f	0.592 8 $\pm$ 0.003 68 ^b

[†] 字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

与考来烯胺结合甘氨酸胆酸钠和牛磺胆酸钠的量为 100%相比,效果最好的胰蛋白酶水解物结合甘氨酸胆酸钠的相对值约为 61.38%,风味蛋白酶水解物结合牛磺胆酸钠的相对值约为 66.13%,胃蛋白酶水解物和胰蛋白酶水解物结合牛磺胆酸钠的相对值分别为 56.25%和55.43%。综合来看,虾壳胰蛋白酶水解物的降脂活性较好。朱晓连等^[28]以卵形鲳鲹鱼肉为原材料,以酶解产物与胆酸盐的体外结合率为指标,发现 5 种常用食品用蛋白酶中最优蛋白酶为胰蛋白酶。江锟等^[29]以海洋鲈鱼为原料,采用胰蛋白酶制备的酶解液具有降血脂活性,其效果与降脂药物考来烯胺相当。

2.3 LC-MS/MS 测序及数据库预测

使用液相色谱—串联质谱(LC-MS/MS)测定降糖活性较好的虾壳胃蛋白酶水解物和降脂活性较好的胰蛋白酶水解物氨基酸序列,结果发现胃蛋白酶水解物中含有 3 391 条肽序,胰蛋白酶水解物中含有 2 086 条肽序。通过 Peptide Ranker 数据库对鉴定得到的肽序列进行生物

活性预测,Ranker 值 >0.5 的虾壳胃蛋白酶水解物中有 812 条肽序,胰蛋白酶水解物中有 114 条肽序。为进一步提高虾壳肽潜在降糖降脂活性的概率,选择 Ranker 值 >0.5 的肽序导入 BIOPEP-UWM 数据库中进行匹配,从而进一步筛选获得具有相应活性片段的肽序。其中多条肽序均含有相应的降糖/脂活性片段,部分肽序结果见表 5。

2.4 PPAR γ 蛋白与 PCSAPs 的分子对接

选出 BIOPEP 数据库中能匹配到降糖/降脂活性片段且 Ranker 值较高的肽序进行分子对接,通过 AutoDock Vina 软件分析 PPAR γ 和 PCSAPs 的结合作用,根据软件打分评价肽与 PPAR γ 结合的强弱,结合能 $<-29\ 302\ \text{J/mol}$ 的对接结果均为有效结合。对接效果最优的 5 条肽序如图 4 所示,EFALF 与 PPAR γ 分子上氨基酸残基 Ser342、Ser289、Tyr327 和 His449 产生氢键;EFIPIF 与 PPAR γ 分子上氨基酸残基 Lys263、Glu291 和 Ser342 产生氢键;FDTFEF 与 PPAR γ 分子上氨基酸残基 Glu343 和 Ser342 产生氢键;HWFSLF 与 PPAR γ 分子上氨基酸残基 Glu343 和 Tyr327 产生氢键;LPLWPY 与 PPAR γ 分子上氨基酸残基 Ser289 产生氢键。其中,FDTFEF 的结合能最低,为 $-41\ 022.8\ \text{J/mol}$ 。

近年来,多肽类药物已被广泛用于治疗糖尿病、肥胖症、心血管综合征及免疫紊乱等多种疾病。相较于常规低分子化学药物来说,多肽由于相对分子质量小、结构简单、无免疫原性等独特优势备受关注。从食品蛋白中发现和制备能够改善糖脂代谢紊乱的多肽对于辅助治疗糖尿病等代谢类疾病具有很大的应用潜力^[30]。前期试验发现,虾壳蛋白水解物的相对分子质量主要分布在 3 000 以下,具有较好的生物活性潜力。而酶解是将具有降糖降脂活性的多肽从前体蛋白中释放出来的常用方法,不同的蛋白酶具有不同的限制性切割位点,因而会产生不同的活性效果^[31]。

目前,降糖降脂肽的体外效应主要通过消化酶的生化分析来评价,还有少数采用细胞模型来探究具有降糖降脂活性的多肽对不同类型细胞的影响,也可以用生物信息学来预测多肽。Wang 等^[32]使用 ExPASy Peptide Cutter 中胃蛋白酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶对芝麻蛋白进行计算机模拟水解,通过 Peptide Ranker、Swiss ADME 和 Auto Dock 筛选出 6 种肽(TF、EW、QWM、NIF、AGY 和 PIF),并进一步合成了 6 种肽,验证了其在体外的胰脂肪酶抑制作用,且 TF、EW、QWM、NIF 和 AGY 对胰脂肪酶表现出抑制活性。而多肽或水解物的有些生物学效应不能很好地通过体外试验反映出来,比如降糖肽对动物糖耐量和胰腺细胞的影响,降脂肽对动物体内胆固醇、甘油三酯、脂蛋白的作用等,亟需在体外试验的基础上进一步进行体内试验。降糖降脂肽的体内效应常在小鼠模

表 5 虾壳活性肽的虚拟筛选结果

Table 5 Virtual screening results of crayfish shell active peptides

Peptide Ranker	肽序	来源	活性片段	活性
0.995 282	FFMPGF	胃蛋白酶水解物	MP;GF;PG;FF	DPP-IV 抑制
0.994 705	DFPFW	胃蛋白酶水解物	FP;PF	DPP-IV 抑制
0.994 678	SFGWF	胃蛋白酶水解物	WF;GW;SF	DPP-IV 抑制
0.993 507	FMPGF	胃蛋白酶水解物	MP;GF;PG	DPP-IV 抑制
0.992 566	FYLFF	胃蛋白酶水解物	YL;FF	DPP-IV 抑制
0.992 227	MDFPFW	胃蛋白酶水解物	FP;PF	DPP-IV 抑制
0.991 042	FDFGF	胃蛋白酶水解物	GF	DPP-IV 抑制
0.989 891	HFFMPGF	胃蛋白酶水解物	MP;GF;HF;PG;FF	DPP-IV 抑制
0.986 204	LSFGWF	胃蛋白酶水解物	WF;GW;SF	DPP-IV 抑制
0.985 990	GGYFF	胃蛋白酶水解物	GG;GY;YF;FF	DPP-IV 抑制
0.985 899	HMDPFW	胃蛋白酶水解物	FP;PF	DPP-IV 抑制
0.985 382	PFWWDG	胃蛋白酶水解物	WW;PF;WD	DPP-IV 抑制
0.984 862	FPGAF	胃蛋白酶水解物	FP;GA;AF;PG	DPP-IV 抑制
0.984 662	FAPLF	胃蛋白酶水解物	FA;AP;PL	DPP-IV 抑制
0.980 922	WGPQF	胃蛋白酶水解物	GP;WG;PQ;QF	DPP-IV 抑制
0.980 791	GFLLF	胃蛋白酶水解物	LL;FL;GF	DPP-IV 抑制
0.979 720	VPFRLHFFMPGF	胃蛋白酶水解物	MP;VP;FP;GF;HF;LH;PF;PG;RL;FF	DPP-IV 抑制
0.979 515	AASWWF	胃蛋白酶水解物	AA;WW;WF;AS;SW	DPP-IV 抑制
0.979 476	FKPWL	胃蛋白酶水解物	KP;WL;PW	DPP-IV 抑制
0.978 870	HWFSLF	胰蛋白酶水解物	SL;WF;HW	DPP-IV 抑制

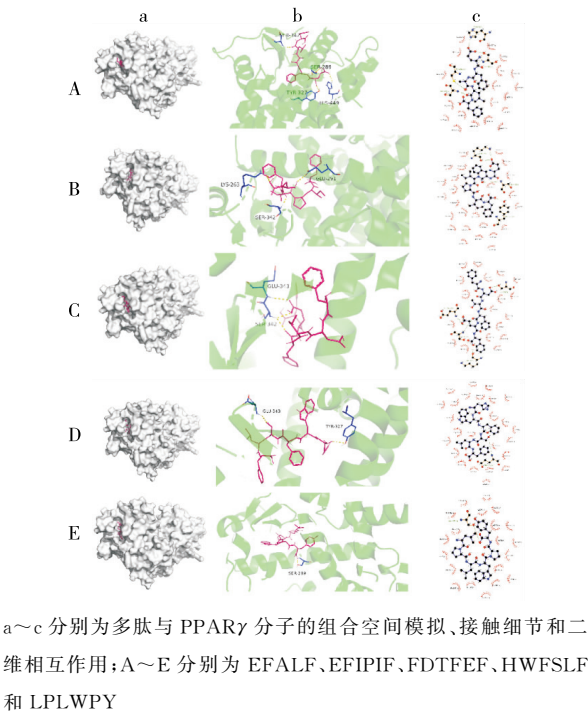


图 4 PPAR γ 分子与 5 条虾壳肽的模拟对接

Figure 4 Simulated docking of PPAR γ molecule with five PCSAPs

型^[33]上进行,包括单基因肥胖小鼠和多基因肥胖小鼠等自发性模型,以及高脂饮食诱导、化学(链脲佐菌素,四氧嘧啶)诱导等诱导型模型和遗传修饰小鼠模型。此外,斑马鱼作为一种新型模式生物,因其基因与人类相似度极高,体积小,试验周期短且具备其他动物模型所不具有的诸多优势而显示出较大潜力,非常适合进行人类疾病建模及机制研究^[34-36]。

3 结论

利用酶解法制备了克氏原螯虾壳活性肽,其在体外表现出潜在的降糖活性,对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶均有一定的活性抑制作用。此外,通过胰脂肪酶活性抑制试验和胆酸盐结合试验发现,虾壳活性肽或可在改善脂质代谢中发挥作用。后续的序列鉴定及计算机预测筛选出大量的活性片段,多肽与 PPAR γ 分子的有效结合,也都表明了这种可能性。研究筛选出了与 PPAR γ 结合效果最优的肽序,后续可采用分子对接所筛选出的潜在活性最好的虾壳肽在斑马鱼体内进行验证探究,以揭示虾壳活性肽改善糖脂代谢紊乱的分子机制。

参考文献

[1] CHEN L, CHEN X W, HUANG X, et al. Regulation of glucose and

- lipid metabolism in health and disease [J]. Science China Life Sciences, 2019, 62(11): 1 420-1 458.
- [2] OH J H, KARADENIZ F, LEE J I, et al. Artemisia princeps inhibits adipogenic differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes via downregulation of PPAR γ and MAPK pathways [J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2019, 24(3): 299-307.
- [3] CHO Y M, KIM D H, LEE K H, et al. The IRE1 α -XBP1s pathway promotes insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes by increasing PPAR γ activity[J]. Experimental & Molecular Medicine, 2018, 50(8): 1-15.
- [4] ZAKY A A, SIMAL-GANDARA J, EUN J B, et al. Bioactivities, applications, safety, and health benefits of bioactive peptides from food and by-products: A review [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 8: 815640.
- [5] 王耀冉, 陈明杰, 李治平, 等. 生物活性肽制备、鉴定及其生物活性研究进展[J]. 食品工业, 2021, 42(12): 349-354.
- WANG Y R, CHEN M J, LI Z P, et al. Research progress on preparation, identification and biological activity of bioactive peptides[J]. The Food Industry, 2021, 42(12): 349-354.
- [6] 肖聪丽, 李理, 陈敏. 大豆多肽的分离纯化及其体外降血脂功能研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(7): 30-35.
- XIAO C L, LI L, CHEN M. Separation and purification of soybean peptides and its hypolipidemic function invitro[J]. China Brewing, 2020, 39(7): 30-35.
- [7] BEN HENDA Y, LAAMARI M, LANNELUC I, et al. Di and tripeptides from marine sources can target adipogenic process and contribute to decrease adipocyte number and functions[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 17: 1-10.
- [8] JI W, ZHANG C, JI H. Two novel bioactive peptides from antarctic krill with dual angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activities[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(7): 1 742-1 749.
- [9] UENISHI H, KABUKI T, SETO Y, et al. Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats[J]. International Dairy Journal, 2012, 22(1): 24-30.
- [10] WANG T Y, HSIEH C H, HUNG CC, et al. Fish skin gelatin hydrolysates as dipeptidyl peptidase IV inhibitors and glucagon-like peptide-1 stimulators improve glycaemic control in diabetic rats: A comparison between warm- and cold-water fish[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 19: 330-340.
- [11] 韩迪. 短肽抑制高糖诱导氧化应激反应与机制研究[D]. 烟台: 烟台大学, 2023: 8-9.
- HAN D. Study on the inhibition and mechanism of short peptides on high glucose induced oxidative stress response [D]. Yantai: Yantai University, 2023: 8-9.
- [12] 田文慧, 孙丽平, 张翠, 等. 白啤中二肽基肽酶-IV 抑制肽的虚拟筛选及活性分析[J]. 食品科学, 2022, 43(10): 81-87.
- TIAN W H, SUN L P, ZHANG C, et al. Virtual screening of activity evaluation of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides in white beer[J]. Food Science, 2022, 43(10): 81-87.
- [13] MINKIEWICZ P, IWANIAK A, DAREWICZ M. BIOPEP-UWM virtual: A novel database of food-derived peptides with in silico-predicted biological activity[J]. Applied Sciences, 2022, 12(14): 7 204.
- [14] LI H, ISAAC N, HE S, et al. Dietary supplementation with proteinhydrolysates from the shell of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) affects growth, muscle antioxidant capacity and circadian clock genes expression of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Aquaculture Reports, 2022, 27: 101390.
- [15] 程小飞, 宋锐, 洪波, 等. 虾壳粉氨基酸和脂肪酸营养成分分析[J]. 中国饲料, 2020(23): 66-70.
- CHENG X F, SONG R, HONG B, et al. Analysis of nutritional components of amino acids and fatty acids in *Procrustus clarkii* crawfish shell meal[J]. China Feed, 2020(23): 66-70.
- [16] 贺舒雯, 朱豪杰, 韩鹏薇, 等. 虾壳活性肽对斑马鱼氧化应激损伤的保护作用[J]. 食品与机械, 2023, 39(9): 140-147.
- HE S W, ZHU H J, HAN P W, et al. Protective effects of *Procambarus clarkii* shell bioactive peptides on oxidative stress injury of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Food & Machinery, 2023, 39(9): 140-147.
- [17] 王晋, 张风, 周爱梅, 等. 虾头、虾壳抗氧化肽的分离纯化及其对秀丽隐杆线虫的抗氧化作用[J]. 食品科学, 2019, 40(3): 56-63.
- WANG J, ZHANG F, ZHOU A M, et al. Purification of antioxidant peptides derived from enzymatic hydrolysates of shrimp heads and shells and their antioxidant protection in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Science, 2019, 40(3): 56-63.
- [18] 施旭丹, 罗自生, 那地拉·阿合买提江, 等. 酶解虾壳蛋白制备 ACE 抑制剂的工艺优化 [J]. 食品科学, 2012, 33(11): 131-136.
- SHI X D, LUO Z S, Nadila, et al. Enzymatic preparation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from shrimp shell[J]. Food Science, 2012, 33(11): 131-136.
- [19] 王倩, 袁雪涛, 王宁丽, 等. 海地瓜多肽体外降糖活性评价[J]. 食品科技, 2018, 43(8): 245-248.
- WANG Q, YI X T, WANG N L, et al. Evaluation of hypoglycemic activity in vitro for polypeptides from *Acaudina molpadioides*[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(8): 245-248.
- [20] LIM J, KIM D K, SHIN H, et al. Different inhibition properties of catechins on the individual subunits of mucosal α -glucosidases as measured by partially-purified rat intestinal extract [J]. Food & Function, 2019, 10(7): 4 407-4 413.
- [21] ADMASSU TESSEMA H, GASMALLA M A A, YANG R, et al. Evaluation of the in vitro α -amylase enzyme inhibition potential of commercial dried laver (*Porphyra species*) seaweed protein

- hydrolysate[J]. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2018, 18(4): 547-556.
- [22] ZHOU H, SAFDAR B, LI H, et al. Identification of a novel α -amylase inhibitory activity peptide from quinoa protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134434.
- [23] XIONG Y, GU C, YU J, et al. Inhibition of in vitro amylolysis of wheat starch by gluten peptides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(19): 7 514-7 520.
- [24] RAMÍREZ FUENTES L, RICHARD C, CHEN L. Sequential alcalase and flavourzyme treatment for preparation of α -amylase, α -glucosidase, and dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitory peptides from oat protein[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 87: 104829.
- [25] KIELA P R, GHISHAN F K. Physiology of intestinal absorption and secretion [J]. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2016, 30(2): 145-159.
- [26] DING L, WANG L, ZHANG T, et al. Hydrolysis and transepithelial transport of two corn gluten derived bioactive peptides in human Caco-2 cell monolayers[J]. Food Research International, 2018, 106: 475-480.
- [27] HOU X D, SONG L L, CAO Y F, et al. Pancreatic lipase inhibitory constituents from Fructus psoraleae[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2020, 18(5): 369-378.
- [28] 朱晓连, 陈华, 蔡冰娜, 等. 具有结合胆酸盐作用卵形鲳鲹蛋白酶解物的制备和分子量分布研究[J]. 南方水产科学, 2017, 13(2): 101-108.
- ZHU X L, CHEN H, CAI B N, et al. Production of bile acid salts binding hydrolysate from *Trachinotus ovatus* and its molecular weight distribution[J]. South China Fisheries Science, 2017, 13(2): 101-108.
- [29] 江钨, 徐志宏, 魏振承, 等. 鲈鱼活性肽的制备工艺及其体外降血脂活性研究[J]. 广东农业科学, 2013, 40(9): 99-102.
- JIANG K, XU Z H, WEI Z C, et al. Preparation of active peptides from marine bass and their hypolipidemic activity in vitro [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2013, 40(9): 99-102.
- [30] 张晓艺, 王晗, 裴栋, 等. 食品蛋白来源的降血糖肽的研究进展[J]. 生物技术, 2022, 32(4): 528-535, 505.
- ZHANG X Y, WANG H, PEI D, et al. Research progress of hypoglycemic peptides derived from food protein [J]. Biotechnology, 2022, 32(4): 528-535, 505.
- [31] 张廷新, 李富强, 张楠, 等. 降糖肽的制备、生物学效应及其构效关系研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(8): 433-442.
- ZHANG T X, LI F Q, ZHANG N, et al. Advances in preparation, biological effect and structure-activity relationship of hypoglycemic peptides [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(8): 433-442.
- [32] WANG X, AI X, ZHU Z, 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: 1 531-1 537.
- [33] 王雪, 呼永河. 糖尿病小鼠模型的常见种类及其构建要素分析[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 415-421.
- WANG X, HU Y H. Analysis of common types and construction elements of diabetic mouse models[J]. Laboratory Animal and Comparative Medicine, 2023, 43(4): 415-421.
- [34] 刘露, 杨志康, 杨晓彤, 等. 斑马鱼肥胖模型的构建及在降脂物质中应用进展[J]. 现代预防医学, 2021, 48(14): 2 622-2 625, 2 630.
- LIU L, YANG Z K, YANG X T, et al. Construction of zebrafish obesity model and its application in lipidlowering substances[J]. Modern Preventive Medicine, 2021, 48(14): 2 622-2 625, 2 630.
- [35] 江霞, 钱豪杰, 魏迅, 等. 斑马鱼糖尿病模型的构建及应用进展[J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(6): 547-552.
- JIANG X, QIAN H J, WEI X, et al. Research progress in construction and application of diabetes model in zebrafish[J]. Laboratory Animal and Comparative Medicine, 2020, 40(6): 547-552.
- [36] KRISHNAN J, ROHNER N. Sweet fish: Fish models for the study of hyperglycemia and diabetes[J]. Journal of Diabetes, 2019, 11(3): 193-203.
- YANG H. The fusion of traditional cultural elements and packaging art design[J]. Food & Machinery, 2023, 39(11): 250.
- [12] 初春. 文旅融合背景下地方文化融入食品包装设计研究[J]. 食品与机械, 2023, 39(8): 98-102.
- CHU C. Research on the integration of regional culture into food packaging design under the background of cultural and tourism integration[J]. Food & Machinery, 2023, 39(8): 98-102.
- [13] 叶德辉, 穆荣兵. 论工业设计中产品的科技感[J]. 包装工程, 2008(4): 109-111.
- YE D H, MU R B. On the sense of science and technology of products in industrial design[J]. Packaging Engineering, 2008(4): 109-111.

(上接第 111 页)

- [9] 赵颖涛. 包装设计定位基本要素及价值分析[J]. 西部皮革, 2020, 42(17): 57-58.
- ZHAO Y T. Basic elements and value analysis of packaging design positioning[J]. Western Leather, 2020, 42(17): 57-58.
- [10] 赵娟姝. 美术绘画色彩在食品包装设计中的应用[J]. 食品与机械, 2024, 40(1): 248.
- ZHAO Q S. The application of artistic painting colors in food packaging design[J]. Food & Machinery, 2024, 40(1): 248.
- [11] 杨欢. 传统文化元素与包装艺术设计的交融性[J]. 食品与机械, 2023, 39(11): 250.