

紫菜酶解产物锌螯合- α -葡萄糖苷酶抑制剂活性肽的研究

胡春芹, 龙婧, 周楠迪, 田亚平*

(1. 江南大学, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究紫菜酶解 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽与锌螯合反应的条件, 并对锌-螯合-糖苷酶抑制剂活性肽的胃肠消化稳定性进行评价。对条斑紫菜在一定条件下进行内切与外切蛋白酶的复合酶解获得具备 α -葡萄糖苷酶高抑制活性的多肽, 采用超滤纳滤双膜组合分离后旋转蒸发浓缩冻干, 获得的多肽质量浓度为1 mg/mL时对0.5 mg/mL的 α -葡萄糖苷酶抑制率达68%;利用 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽与锌溶液反应进行螯合条件优化, 螯合的最佳条件为: 时间1.5 h, pH 4.5, 温度37 °C, 质量浓度6 mg/mL, 得到的锌-螯合-糖苷酶抑制剂活性肽溶液螯合度为25.6%, 螯合后对 α -葡萄糖苷酶抑制活性提高到79.8%;建立体外胃肠消化模型, 以 α -葡萄糖苷酶抑制活性为指标, 评价制备的锌-螯合-糖苷酶抑制剂活性肽的胃肠消化耐受性, 结果表明: 经过不同酶与底物比、时间胃消化后 α -葡萄糖苷酶抑制活性下降均在7%左右, 十二指肠消化后, 抑制活性下降均在5%以内, 具有良好的胃肠消化稳定活性。

关键词: 紫菜酶解肽; α -葡萄糖苷酶抑制剂; 螯合锌; 稳定性

中图分类号: TS 21.1 文章编号: 1673-1689(2019)04-0143-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.04.021

Research of α -Glucosidase Inhibitor From Proteolytic Product of *Porphyra yezoensis* Chelated With Zinc

HU Chunqin, LONG Jing, ZHOU Nandi, TIAN Yaping*

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to study the conditions of chelating Zinc with α -glucosidase inhibitory active peptides from *Porphyra yezoensis* enzymatic hydrolysis and evaluate the stability of gastrointestinal digestion The polypeptide, inhibiting the α -glucosidase activity highly, would be gained by the compound enzymolysis technics with using protease of ex- and in- under various treatment factors. Thereafter, the hydrolysate was separated by filtering membrane technique combined ultrafiltration with nanofiltration firstly, and then concentration through rotary evaporator, which the inhibition ratio of α -glucosidase (0.5 mg/mL) could be reached 68% at 1 mg/mL of concentrated polypeptide

收稿日期: 2016-10-08

基金项目: 产学研前瞻性联合研究项目(BY2014023-22)。

* 通信作者: 田亚平(1964—), 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物活性物质方面的研究。E-mail: yapingtian@hotmail.com

引用本文: 胡春芹, 龙婧, 周楠迪, 等. 紫菜酶解产物锌螯合- α -葡萄糖苷酶抑制剂活性肽的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(04): 143-149.

solution; The optimization factors of chelating reaction involved polypeptide and zinc solution were 1.5 h of reaction time, 37 °C of temperature, 6 mg/ml of polypeptide and pH 4.5 respectively, which the chelating degree of polypeptide and zinc had reached 25.6%, and the inhibition for α -glucosidase had increased to 79.8% after chelation; In addition, the model of gastrointestinal digestion in vitro would be built to evaluate the toleration of the chelate for gastrointestinal digestion by assessing their capacity to inhibit the α -glucosidase activity. The results indicated that the decrease of α -glucosidase activity only had 7% after gastrointestinal digestion under various reaction time and enzyme-substrate ratio; and then reaching 5% approximately after duodenal digestion. Therefore, the chelate of polypeptide and zinc solution was shown better stability of gastrointestinal digestion in this study.

Keywords: Porphyra peptides, α -glucosidase inhibitor, chelated zinc, stability

糖尿病是一种由多因素作用引发的高血糖代谢疾病,其基本发病机制主要为胰岛素抵抗、氧化应激作用、 β 细胞功能受损、细胞因子炎症。糖尿病治疗的作用机制主要是平衡胰岛素的分泌与抵抗作用,维持胰岛 β 细胞含量稳定;糖分解过程中的关键酶控制也是一种有效途径^[1]。 α -葡萄糖苷酶主要分布于小肠上皮黏膜上,属于消化酶,在人体消化食物过程中,可降解乳糖、麦芽糖等一系列低聚糖,主要断裂低聚糖非还原端 α -1,4 糖苷键,产生 α -葡萄糖。因此,可以通过具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的物质竞争性减缓葡萄糖苷水解酶的催化,使小肠上皮细胞表面的 α -葡萄糖苷酶作用降低,进而降低碳水类化合物的吸收利用,有效缓解餐后血糖浓度,从而促进糖尿病的治疗。通过酶解法制备的自然界生物中的 α -葡萄糖苷酶抑制剂既遵守安全绿色原则,又避免对人体形成二次伤害,且具有较强的抑制性,因此受到人们的密切关注^[2-3]。

此外,锌作为人体必需的矿物金属之一,对机体非常重要。锌的生物功能繁多,包括参与葡萄糖和脂质代谢、细胞增殖、免疫神经系统和胰岛素的合成等。 Zn^{2+} 还被用作 α -葡萄糖苷酶抑制剂研究,作为临床代替治疗 II 型糖尿病的物质^[4]。多肽-锌复合物作为一种有机锌化合物,更接近于机体内锌的作用形式,能够达到更好的营养补充效果。而且,多肽-锌以多肽形式被人体所利用,减少与氨基酸吸收之间的竞争力,增强锌的利用,发挥更多的生理作用^[5-7]。杨杰等^[8]研究发现,从鱼蛋白中提取的小肽与螯合锌后具有抗氧化和补锌双重效果。梅丽萍等^[9]在研究临床上检测微量元素对肾病及糖尿病治疗的意义时发现,血糖浓度与锌的含量成反比。

PAULE 等^[10]研究发现向糖尿病小鼠体内注入 2 种特殊的肽 (GHTD 氨基化合物和类似物 ISF402)与锌配合物,降血糖能力比单独使用胰岛素强。

本研究旨在开发一种新型天然原料酶解活性肽,具备靶酶的抑制活性的同时螯合微量锌,以利于快速吸收的形式为补充锌和治疗糖尿病提供一种更为稳定、安全高效的新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

条斑紫菜,购自南通千鹤食品有限公司;中性蛋白酶,购自苏柯汉生物有限公司;碱性蛋白酶,购自广西庞博有限公司;氨肽酶,为实验室自制; α -葡萄糖苷酶,购自源叶生物科技有限公司;4-硝基苯基-D-吡喃葡萄糖苷(PNPG),购自阿拉丁试剂;氯化锌、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等,购自国药化学试剂有限公司。

722 型紫外可见分光光度计、原子吸收分光光度计,购自普析通用仪器有限责任公司;实验室用水均为超纯水。

1.2 试验方法

1.2.1 紫菜蛋白制备 α -葡萄糖苷酶抑制多肽工艺流程 参考周锋等^[2]和高素蕴等^[11]的方法并在其基础上改动。将条斑紫菜烘干、粉碎,取 33 g 溶于 1 L 0.02 mmol/L、pH 8.5 的缓冲液中,沸水浴 15 min。加入中性蛋白酶($E/S=8 \times 10^4$ U/g)、碱性蛋白酶($E/S=8 \times 10^4$ U/g)、氨肽酶($E/S=28$ U/g),50 °C 下酶解 6 h,煮沸 15 min 灭酶,9 000 r/min 离心 15 min 去沉淀,稀释 1.6 倍通过 10×10^3 的超滤膜,收集透过液,再通过 1×10^3 纳滤膜,收集透过液,旋转蒸发仪浓缩、

冻干。

1.2.2 糖苷酶抑制剂活性肽-Zn 整合方法 紫菜酶解产物 α -葡萄糖苷酶活性多肽、0.5 mmol/L 的氯化锌溶液调节 pH、温度、时间、质量比,振荡整合,无水乙醇沉降,离心去上清液,烘干^[12]。

1.2.3 不同酶与底物比、不同时间条件下体外模拟胃肠稳定性 体外模拟胃肠消化过程中 α -葡萄糖苷酶抑制稳定性的方法参考杜芬等^[13]和 Cruz-Huerta 等^[14]的方法并在其基础上略有改动。胃肠消化过程共分为 2 个阶段:胃消化和十二指肠消化。定量配制 1 mg/mL 的整合多肽溶液,并将 pH 调到 2.0(1 mol/L HCl)。37 °C 恒温孵育 15 min,加入不同质量的胃蛋白酶,37 °C 恒温振荡一定时间,将 pH 调至 7.0(5 mol/L NaOH),终止胃蛋白酶反应。十二指肠消化阶段:将经过胃消化阶段的整合多肽溶液置于 37 °C 恒温孵育 15 min,按照 Zn-整合肽与酶不同质量比加入胰蛋白酶,继续 37 °C 恒温振荡一定时间。置于 85 °C 恒温保温 20 min,终止十二指肠消化反应。分别测定胃消化阶段和十二指肠消化阶段 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

1.3 分析方法

1.3.1 整合率的测定^[15] 采用火焰法原子吸收分光光度计测定整合前后 Zn 的总量分别为 A_1 、 A_2 , 计算公式为:

$$\text{整合度} = A_2/A_1 \quad (1)$$

1.3.2 糖苷酶抑制率的测定 采用 4-硝基苯基-D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)法。取 3 支试管,取一份待测样品加入试管 A 中,一份 0.5 mg/mL α -葡萄糖苷酶混合均匀,37 °C 水浴保温 10 min,再加入一份 10 mmol/L PNPG 反应 1 h 后加入一份 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应,在 405 nm 处测定吸光度 A_i ; 试管 B 中用氯化锌溶液替换 PNPG 溶液,吸光值为 A_j ; C 管中取一份氯化锌溶液替换待测样品加入离心管中,操作同 A 试管,吸光值为 A_0 , α -葡萄糖苷酶活性抑制率的测定公式为:

$$\text{抑制率} = (1 - (A_i - A_j)/A_0) \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 α -葡萄糖苷酶抑制多肽的制备

紫菜蛋白经酶解、超滤、纳滤等深加工后得到的 α -葡萄糖苷酶抑制剂为小分子多肽类,主要集中在 130~1 000 之间。所制备的多肽其质量浓度在

1 mg/mL 时对 0.5 mg/mL 的 α -葡萄糖苷酶 (2×10^4 U/g) 的抑制率可以达到 68%。张立新等^[16]也曾研究报道刺参、海筒螅等海洋无脊椎动物的提取物在 1 mg/mL 时对 α -葡萄糖苷酶抑制率达到 68.5% 和 60.5%, 可作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂提取的原料。

2.2 Zn^{2+} 对 α -葡萄糖苷酶抑制性

参照杨杨^[17]研究高剂量补锌对海马锌含量、BDNF 和记忆力的影响时提出, 人体补锌量为 15 mg/d, 低剂量补锌约 10 ppm, 高剂量补锌约 40 ppm, 应合适地补锌, 避免过量, 本实验选择 Zn^{2+} 的浓度为 0.5 mmol/L。测定单独 Zn^{2+} 溶液对于 α -葡萄糖苷酶的影响, 如下图 1。

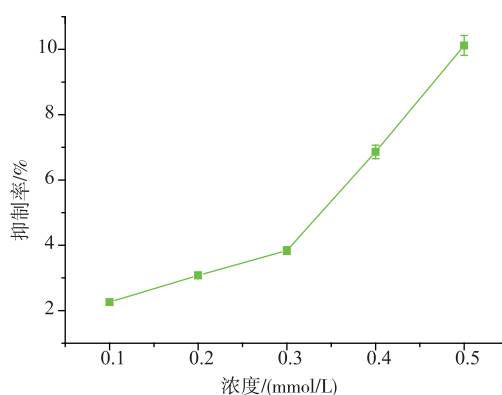


图 1 Zn 浓度对糖苷酶抑制率的影响

Fig. 1 Influence of zn concentration on inhibition activity

单独的 Zn^{2+} 对 α -葡萄糖苷酶有一定的抑制作用, 且随着浓度的变化有一定的变化。在此浓度范围内, Zn^{2+} 对酶有一定的抑制作用, 说明 Zn 可以作为治疗糖尿病的有效物质。

2.3 糖苷酶抑制多肽-Zn 整合工艺制备

糖苷酶抑制剂活性肽-Zn 整合单因素实验: 以 1 mg/mL 整合多肽对 α -葡萄糖苷酶的抑制率和整合度为指标, 确定底物质量浓度、pH、时间、温度对整合的影响。

2.3.1 多肽质量浓度对整合反应和抑制率的影响 配置多肽质量浓度为 2、4、6、8、10 mg/mL, 溶于 0.5 mmol/L, pH 4.5 的 ZnCl_2 溶液, 37 °C, 水浴整合 30 min, 结果见图 2。

整合率在一定质量浓度(4 mg/mL)之前呈现平稳趋势, 随后呈现一定的下降。说明质量浓度影响整合反应的进行, 质量浓度较低时, Zn^{2+} 质量浓度充足, 可以最大程度地与多肽溶液整合, 多肽质量浓度达到一定时, Zn^{2+} 的量不足以满足整合的进行, 整

合度有所降低。螯合多肽质量浓度在 1 mg/mL 时对 0.5 mg/mL 的 α -葡萄糖苷酶抑制率在 4 mg/mL 前随着多肽质量浓度的升高呈现相应的升高,之后也呈现很大幅度降低。说明在一定质量浓度范围内多肽-Zn 作为一种有机锌形式可以促进糖苷酶抑制活性。随着螯合度的降低,其抑制活性也相应降低。综合考虑,选择最适的多肽质量浓度为 4 mg/mL。

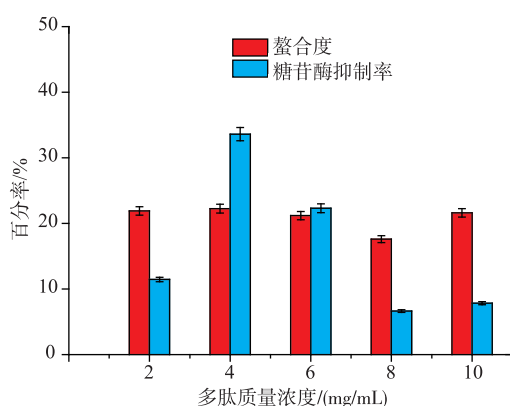


图 2 多肽质量浓度对螯合度和抑制活性的影响

Fig. 2 Influence of peptides concentration on chelation and inhibition activity

2.3.2 pH 对螯合反应和抑制率的影响 配置多肽质量浓度为 10 mg/mL, pH 分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6, 37 °C, 水浴螯合 30 min, 结果见图 3。

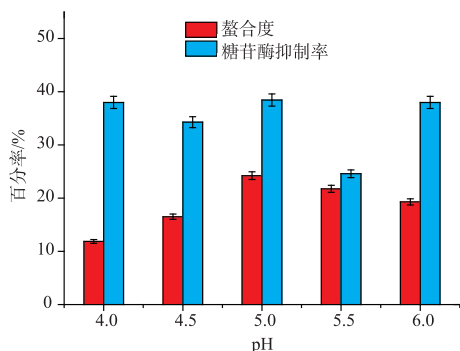


图 3 pH 对螯合度和抑制活性的影响

Fig. 3 Influence of pH value on chelation and inhibition activity

pH 值在 4~5 时螯合率快速升高, 螯合多肽对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性相对稳定, pH 值 5~6 时螯合率逐渐下降, 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性也略降低。说明 H^+ 的浓度影响多肽与锌的螯合反应, 对于糖苷酶抑制活性的影响在一定 pH 范围内影响不大。 H^+ 大量存在时可能会竞争 Zn 的供电基团, 影响螯合反应的进行。pH 到达 5 时螯合度最大。pH 继续

增加时螯合率降低, 可能是由于体系中 OH^- 离子增加, 竞争性结合 Zn^{2+} , 形成 $Zn(OH)_2$ 沉淀。故选择 pH 5.0 作为螯合的 pH。

2.3.3 时间对螯合反应和抑制活性的影响 配置 10 mg/mL 的多肽溶液, pH 4.5, 37 °C 水浴螯合 0.5、1、1.5、2.0、2.5 h, 结果见图 4。

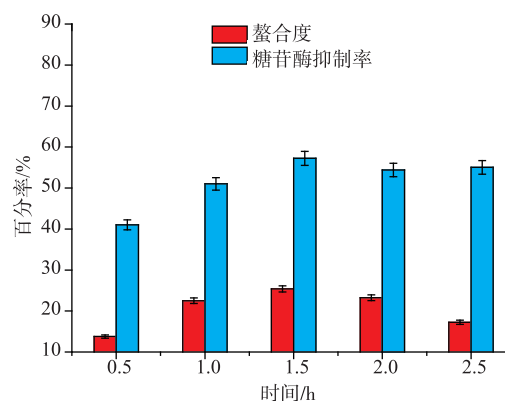


图 4 时间对螯合度和抑制活性的影响

Fig. 4 Influence of Time on chelation and inhibition activity

0.5~1.5 h, 螯合率和 α -葡萄糖苷酶抑制活性逐渐上升, 且在 1.5 h 时达到最高, 1.5 h 之后, 螯合率和抑制活性均有所降低。说明螯合实验中供电基团和离子是动态运动, 并不停反应的, 一定时间之后, 离子或者供电基团饱和, 螯合度不再增加, 时间过长, 影响螯合溶液中离子或者供电基团的运动, 螯合度降低, 进而影响 α -糖苷酶抑制活性。因此选择时间 1.5 h 进行螯合。

2.3.4 温度对螯合反应和抑制活性的影响 配置多肽质量浓度 10 mg/mL, pH 4.5, 分别置于 30、37、40、50、60 °C 中水浴螯合 30 min, 结果见图 5。

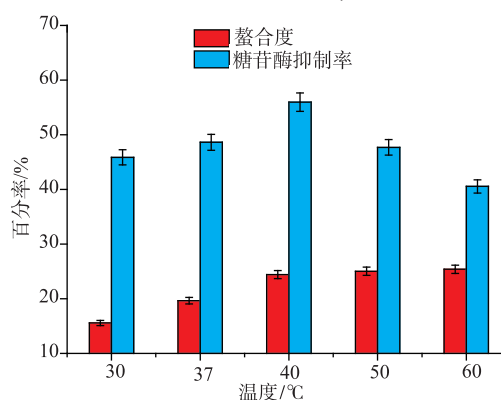


图 5 温度对螯合度和抑制活性的影响

Fig. 5 Influence of Temperature on chelation and inhibition activity

温度在低于 40 ℃时整合度逐渐上升,40 ℃之后,整合度基本稳定,可能是因为整合是一个动态过程,温度升高有利于分子运动,促进整合反应的进行。温度大于 40 ℃时,分子间运动较快,整合反应不受分子间力的变化而变化;温度低于 40 ℃时 α -糖苷酶抑制活性逐渐上升。40 ℃时抑制活性达到最大,40 ℃之后, α -糖苷酶抑制活性缓慢降低,说明低温影响 α -糖苷酶抑制率活性,温度升高不但可以激活多肽,还能促进整合进行,发挥更好的抑制活性。温度高于 40 ℃时,影响多肽整合物的稳定性,进而影响抑制活性。因此,优选温度 40 ℃进行整合反应。

2.4 整合反应的正交实验分析

为了进一步优化整合工艺,选择温度、时间、pH、多肽浓度 4 个因素进行四因素三水平正交实验,见表 1。实验以 1 mg/mL 整合肽对 α -糖苷酶活性抑制率为指标,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,结果见表 2。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels of chelation technology

因素水平	时间/h	温度/℃	pH	底物质量浓度/(mg/mL)
1	1	37	4.5	2
2	1.5	40	5	4
3	2	43	5.5	6

表 2 整合反应正交分析结果

Table 2 Chelate reaction results of orthogonal experiment

因素 实验号	A	B	C	D	抑制率/ %
1	1	1	1	1	47.44
2	1	2	2	2	69.18
3	1	3	3	3	72.24
4	2	1	2	3	73.58
5	2	2	3	1	42.85
6	2	3	1	2	73.40
7	3	1	3	2	71.49
8	3	2	1	3	73.19
9	3	3	2	1	43.55
K_{1j}	62.95	64.17	64.68	44.61	
K_{2j}	63.28	61.74	62.10	71.36	
K_{3j}	62.74	63.06	62.19	73.03	
R	0.54	2.43	2.58	28.42	

根据表 2,对 α -葡萄糖苷酶抑制活性影响的显

著次序为: $D \rightarrow C \rightarrow B \rightarrow A$,即底物浓度>pH>温度>时间。 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽整合锌的最佳条件为: $A_2B_1C_1D_3$ 。用最优实验组合再次实验,获得整合多肽的整合度为 25.6%,1 mg/mL 的整合活性肽对 α -葡萄糖苷酶抑制率为 79.8%,因此整合的最佳条件为:1.5 h,pH 4.5,37 ℃,6 mg/mL。

2.5 体外模拟胃肠稳定性

胃肠消化模型主要是针对食品在消化过程中活性变化建立的,反映样品在人体内的消化吸收情况。本实验主要考察样品对胃蛋白酶和胰蛋白酶的耐受性,反映 Zn-糖苷酶抑制整合活性肽在胃消化阶段和十二指肠消化阶段的抑制活性稳定情况。由图 6 模拟胃液消化过程可知,随着时间和胃蛋白酶量的增加,抑制活性在一定范围内保持稳定,当时间达到 1.5 h,胃蛋白酶质量:活性肽质量达到 16 时,抑制活性开始降低,但降低的幅度较小,说明糖苷酶抑制-Zn 整合肽在胃消化阶段,具有较强的活性稳定性。刘珊珊等^[18]研究酪蛋白抗氧化肽的胃肠消化稳定性发现经过胃蛋白酶消化后,抗氧化活性出现显著降低。CHEN 等^[19]研究发现蛋清蛋白肽在经过胃肠消化阶段后 ACE 抑制活性降低。糖苷酶抑制-Zn 整合肽经过肠道消化阶段稳定性见图 7。

十二指肠消化阶段,活性多肽的抑制率基本保持稳定,抑制活性不随时间和胰蛋白酶的质量增加而降低,说明其对胰蛋白酶的耐受性也较好, α -葡萄糖苷酶抑制-Zn 整合活性肽在模拟胃肠消化过程中都能够很好地保持 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,发挥正常的生物活性,并且可以作为功能成分提高矿物质的吸收。

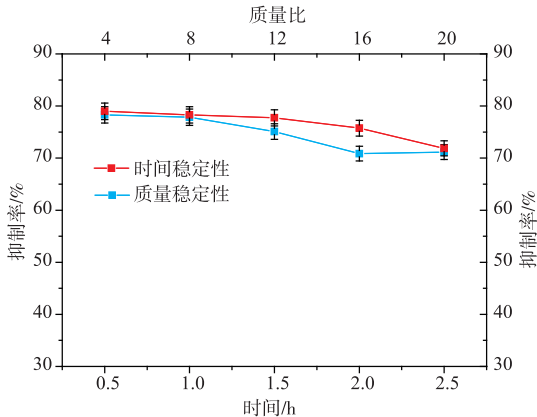


图 6 糖苷酶抑制-Zn 整合肽在模拟肠消化阶段的稳定性
Fig. 6 Stability of the chelate complex of Zn-peptide in the simulated gastric phase

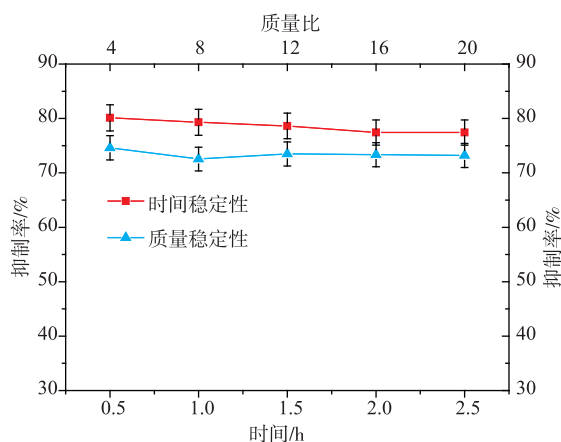


图 7 糖苷酶抑制-Zn 螯合肽在模拟肠消化阶段的稳定性

Fig. 7 Stability of the chelate complex of Zn-peptide in the simulated intestinal phase

这些特性表征和其为一系列分子量比较低,且有特定氨基酸序列的小肽组成有密切关系。

3 结 语

本实验以紫菜为原料酶解制备的 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽与锌螯合的最佳螯合条件为: 时间 1.5 h, pH 4.5, 温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 质量浓度 6 mg/mL, 螯合度为 25.6%。得到的锌螯合肽对 0.5 mg/mL 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性达到约 79.8%, 比未螯合的多肽 α -葡萄糖苷酶抑制活性提高了 17.35% 倍, 且模拟体外胃肠消化时抑制活性稳定性较好, 说明锌螯合肽可以作为一种潜在的预防和治疗糖尿病的保健食品。

参考文献:

- [1] YU Caiyun, GAO Zhaolan, CHEN Tianzi, et al. Advancement in research of α -glucosidase inhibitors of natural products[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2015, 36(22). (in Chinese)
- [2] ZHOU Feng, LIU Dongdong, ZHOU Nandi, et al. Purification and characterization of α -glucosidase inhibitor from proteolytic product of *porphyra yezoensis*[J]. **Natural Products Research and Development**, 2014, 26(9): 1463-1468. (in Chinese)
- [3] WANG Liming, XIA Wenshui. Research on the mechanism of tea polysaccharide reducing blood glucose in vitro[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(3): 354-358. (in Chinese)
- [4] 尹尚军, 斯越秀, 钱国英. 锌离子作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂的应用及其测定方法: 中国, 201210376435.7[P]. 2013-01-09.
- [5] BUGLYO P, NAGY E M, FARKAS E, et al. New insights into the metal ion-peptide hydroxamate interactions: Metal complexes of primary hydroxamic acid derivatives of common dipeptides in aqueous solution[J]. **Polyhedron**, 2007, 26(8): 1625-1633.
- [6] TORREGGIANI A, FINI G, BOTTURA G. Effect of transition metal binding on the tautomeric equilibrium of the carnosine imidazolic ring[J]. **Journal of Molecular Structure**, 2001, s 565-566(2): 341-346.
- [7] LIU Wen, LOU Qiaoming, YANG Wenge. Research progress of peptide-metal element chelate[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2014, 40(4): 142-146. (in Chinese)
- [8] YANG Jie, ZHAO Honglei, XU Shufen, et al. Antioxidant and zinc supplementation effect of zinc chelating small peptides from fish protein in mice[J]. **Journal of Huazhong Agricultural University**, 2011, 30(4): 516-520. (in Chinese)
- [9] MEI Liping, SUN Xinda, QI Juanrei, et al. The significance of the trace elements in patients with diabetes and diabetic nephropathy[J]. **Chinese Journal of Healthy Laboratory Technology**, 2011, 21(5): 1198-1200. (in Chinese)
- [10] PAULE S G, NIKOLOVSKI B, LUDEMAN J, et al. Ability of GHTD-amide and analogs to enhance insulin activity through zinc chelation and dispersal of insulin oligomers[J]. **Peptides**, 2009, 30(6): 1088-1097.
- [11] GAO Suyun, PAN Sizhi, GUO Kangquan. The synthesis and preparation of Soybean hydrolysate separation protein chelating Zn (II)-peptide[J]. **Food Science**, 2003, 24(10): 117-120. (in Chinese)
- [12] XU Qingling, ZENG Qingzhu, YAN Lei, et al. Preparation and biological activities of Zn(II)-tilapia peptide complexes[J]. **Food Science**, 2003, 24(10): 117-120. (in Chinese)
- [13] DU Fen, Hou Hu, ZHAO Yuran, et al. Digestibility of alaska pollock-derived metal chelating peptide in vitro gastrointestinal digestion[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2016(7). (in Chinese)
- [14] CRUZ-HUERTA E, GARCIA-NEBOT M J, MIRALLES B, et al. Caseinophosphopeptides released after tryptic hydrolysis versus simulated gastrointestinal digestion of a casein-derived by-product[J]. **Food Chemistry**, 2015, 168: 648-655.

- [15] LIU Wenhan, WU Xiaoqiong, CHEN Dan, et al. Indirect study of zinc-cystine complex reaction by FAAS[J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, 2008, 28(1): 209-213. (in Chinese)
- [16] ZHANG Lixin, XUE Feng, GAI Ruiying. Screening for α -glucosidase inhibitors from marine invertebrates extracts[J]. **Chinese Journal of Marine Drugs**, 2008, 27(5): 11-14. (in Chinese)
- [17] 杨杨. 高剂量补锌导致海马锌含量减少, BDNF 缺失和学习记忆障碍[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [18] LIU Shanshan, AO Jing, XIE Ningning, et al. Study on the stability of casein antioxidant peptides during simulated gastrointestinal digestion[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2014, 14(2): 47-54. (in Chinese)
- [19] CHEN Chen, CHI Yujie, ZHAO Mingyang, et al. The inhibitory effect of egg white-derived peptides on the activity of angiotensin converting enzyme and their stability during simulated gastrointestinal digestion in vitro[J]. **Acta Nutrimenta Sinica**, 2012, 34(3): 274-277. (in Chinese)

科技信息

欧盟不再批准使用活性物质灭线磷

据欧盟官方公报消息, 2019 年 2 月 28 日, 欧盟委员会发布委员会实施条例(EU)2019/344, 根据欧洲议会和理事会关于将植物保护产品投放市场的条例(EC) No 1107/2009, 不再批准使用活性物质灭线磷(ethoprophos)并修订欧盟委员会实施细则(EU)第 540/2011 号。具体修改如下:

1. 委员会实施细则(EU)第 540/2011 号附件 A 部分, 删除第 155 行关于灭线磷的内容。
 2. 成员国最迟应于 2019 年 9 月 21 日前撤销对含有灭线磷植物保护产品的授权。
 3. 根据(EC)第 1107 / 2009 号条例第 46 条给予的任何宽限期应尽可能缩短, 最迟于 2020 年 3 月 21 日到期。
- 此条例自其在欧盟官方公报上发布之日起第 20 生效。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟不再批准使用活性物质灭线磷[EB/OL]. (2019-3-1). <http://news.foodmate.net/2019/03/508337.html>