

条斑紫菜蛋白酶解产物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂纯化及特性

周 锋, 刘冬冬, 周楠迪, 田亚平*

江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

摘要:以 α -葡萄糖苷酶抑制活性为指标, 优选出 1398 中性蛋白酶、碱性蛋白酶和氨基酶在一定条件下复配酶解条斑紫菜蛋白制备 α -葡萄糖苷酶抑制剂。酶解液加入乙醇至终浓度为 60% 以沉淀去除多糖, 上清液为 α -葡萄糖苷酶抑制剂粗品。该粗品利用 SP Sepharose High Performance 阳离子交换层析、Sephadex G-10 凝胶层析和 Mono Q 阴离子交换层析进行分离纯化, 获得一种肽类 α -葡萄糖苷酶抑制剂(LGI)。LGI 经反向高效液相层析测定纯度为 62.4%, 基本特性分析显示其具较好的温度和 pH 稳定性, 对 α -葡萄糖苷酶半抑制浓度 IC_{50} 值为 97.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 属于一种非竞争性抑制剂。

关键词:条斑紫菜; 蛋白酶水解; α -葡萄糖苷酶抑制剂; 纯化; 基本特性

中图分类号: Q946.1; TS254.9

文献标识码: A

Purification and Characterization of α -Glucosidase Inhibitor from Proteolytic Product of *Porphyra Yezoensis*

ZHOU Feng, LIU Dong-dong, ZHOU Nan-di, TIAN Ya-ping*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: In this study, combined proteolysis of *Porphyra yezoensis* by 1398 neutral protease, alkaline protease and aminopeptidase was optimized using the α -glucosidase inhibitor activity as index. The α -glucosidase inhibitor from hydrolysate was initially extracted by adding 60% ethanol to precipitate and remove polysaccharides. The supernatant was further purified through SP Sepharose High Performance cation-exchange chromatography, Sephadex G-10 gel filtration chromatography and Mono Q anion exchange chromatography. The purity of the obtained peptide-type α -glucosidase inhibitor (LGI) was up to 62.4%, according to the result of reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The basic characteristics of LGI indicated that it had high thermo-stability and pH stability. The IC_{50} value of LGI was 97.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against α -glucosidase, and it belonged to non-competitive inhibitors.

Key words: *Porphyra yezoensis*; protease hydrolysis; α -glucosidase inhibitor; purification; basic characteristics

α -葡萄糖苷酶(简称, EC 3.2.1.20)为一种低聚糖水解酶,在细胞外主要作用于多糖末端的非还原性 α -葡萄糖苷键,产生 α -D-葡萄糖,是人类在体内水解淀粉等糖类物质的关键酶。医学上 α -葡萄糖苷酶可作为治疗糖尿病的重要靶,上个世纪末就开始将 α -葡萄糖苷酶抑制剂作为一类治疗糖尿病的新型降血糖药物,其主要作用机制是通过抑制小肠上段细胞表面的 α -葡萄糖苷酶活性,减缓碳水化合物的分解吸收,从而增强对胰岛素刺激的敏感性并减少对胰腺刺激的作用,达到降低餐后血糖和治疗糖尿病的目的^[1]。天然的 α -葡萄糖苷酶抑制

剂具有较强的抑制活性和很高的安全性,酶解法制备 α -葡萄糖苷酶抑制剂条件可控,反应过程温和,成为近年来人们关注的热点。如 Lee HJ 等^[2]从蚕茧水解液中提取出抑制 α -葡萄糖苷酶活力较强的抑制剂 GEY 和 GYG; Matsui 等采用碱性蛋白酶水解沙丁鱼肉,经过分离纯化后从水解产物中分离得到具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的活性多肽(Tyr-Tyr-Pro-Leu)。杜昱光等学者采用胃蛋白酶酶解牡蛎可溶性蛋白得到 α -葡萄糖苷酶抑制。这些都可以证明酶解天然产物制备 α -葡萄糖苷酶抑制剂具有很好的发展潜力。

条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)为属红藻门、原红藻纲、红毛菜科、紫菜属,具有很高的食用和药用价值,可以治疗甲状腺肿大,降低胆固醇和预防动脉粥样硬化^[3]。我国的海洋地区紫菜原料来源广泛丰

富,目前大多仅仅用于制成海苔等休闲食品,对其深度加工的研究开发利用较少。紫菜原料中蛋白含量高达 37% 左右,此外还含有多糖、纤维、VC、各种矿物质等,因此开展对紫菜蛋白深度酶解产生活性物质的研究将对今后海洋资源的充分开发和利用有较好的推动作用。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

低值紫菜,南通千鹤食品有限公司; α -葡萄糖苷酶、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG),Sigma 公司;酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶,广西南宁庞博生物工程有限公司;1398 中性蛋白酶,苏柯汉生物生物工程科技有限公司;胃蛋白酶,上海生物工程技术有限公司;氨肽酶,实验室自产;其他试剂均为国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器

高速冷冻离心机 Himac CR22G (HITACHI 集团);AKTA 蛋白质分析仪(美国电气医疗集团);HH-4 型恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司);旋转蒸发仪(郑州市亚荣仪器有限公司);高速冷冻离心机、真空冷冻干燥机(日本日立公司);酶标仪 Plus(美国分子仪器公司);Water 600 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);HP1100 型高效液相色谱仪(美国 Aglient 公司)。

2 实验方法

2.1 单酶水解低值紫菜

根据胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶等 6 种内切酶分别在表 1 条件下,进行酶解低值紫菜^[4]。

表 1 不同蛋白酶对紫菜的水解作用条件

Table 1 Conditions for the hydrolysis of *P. yezoensis*

水解条件 Hydrolysis conditions	胃蛋白酶 Pepsin	酸性蛋白酶 Acid protease	木瓜蛋白酶 Papain	中性蛋白酶 Neutrase	胰蛋白酶 Trypsin	碱性蛋白酶 Alcalase
温度 Temperature (°C)	50	50	50	50	50	50
时间 Time (h)	5	5	5	5	5	5
底物浓度 Substrate concentration (%)	3	3	3	3	3	3
加酶量 Enzyme to substrate ratio (U/g)	1200	4000	8000	4000	160	4000
pH	1.8	3.0	6.8	7.0	8.0	9.0

将条斑紫菜粉末烘干至恒重,按照底物浓度(3%)溶于缓冲液中,沸水浴 15 min,冷却后放在 50 °C 水浴锅中并按照上述加酶量加入蛋白酶,维持 pH 恒定。酶解 5 h 后沸水浴 15 min 灭酶,冷却后加入乙醇至终浓度为 60%。室温静置过夜,8000 rpm 离心 10 min 去除沉淀,以对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性作为指标,筛选出抑制效果较好的水解用酶。

2.2 复配酶解紫菜制备 α -葡萄糖苷酶抑制剂

在上述实验的基础上优化酶解条件,选择内切酶(中性蛋白酶、碱性蛋白酶)和外切酶(氨肽酶)复配酶解紫菜,生成 α -葡萄糖苷酶的抑制剂,测定其对 α -葡萄糖苷酶的活性。采用烘干粉碎条斑紫菜粉末为底物,以 pH 7.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液为介质,底物与缓冲液的比例为 1:33,沸水浴 15 min。加入中性蛋白酶($E/S = 8 \times 10^4$ U/g),50 °C 水解 7 h,沸水浴灭酶 15 min,调节 pH 8.5,加入固体氨肽酶($E/S = 28$ U/g)和碱性蛋白酶($E/S = 8 \times 10^4$ U/

g),50 °C 水解 3 h,沸水浴灭酶 15 min,加入乙醇至终浓度为 60%。室温静置过夜,8000 rpm 离心 10 min,得到的上清液为含 LGI 的混合物。

2.3 酶解低值紫菜产物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂粗品的分离纯化

活性炭脱色^[5]:活性炭对有机大分子色素具有较强的吸附能力,是蛋白质水解液常用的脱色剂,本实验中未经脱色处理的紫菜水解液的颜色较深,影响后续实验,故采用活性炭脱色。取 100 mL 紫菜酶解液调解 pH 为 4.0,加入活性炭 1 g,在 60 °C 水浴锅中保温 40 min,8000 rpm 离心 10 min 去除沉淀,收集上清液冷冻干燥备用。

SP Sepharose High Performance 阳离子交换层析:取冷冻干燥的样品溶解于磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 A (10 mmol/mL, pH 3.0),洗脱液 B 为含 2 mol/L NaCl 的冲液 A。在流速为 1 mL/min 条件下用缓冲液 A 平衡 SP Sepharose High Performance 阳

离子交换层析柱 8 个柱体积, 上样量为 2 mL, 用平衡液 A 洗脱 3 个柱体积, 随后进行 0 ~ 30% 洗脱缓冲液 B 线性梯度洗脱 12 个柱体积; 检测波长: 220 nm, 收集各峰组分, 每管收集 0.5 mL, 并对各峰组分的抑制剂活性进行比较, 取活性最高的峰组分冷冻干燥备用。

Sephadex G-10 凝胶层析: 取离子交换层析分离的样品溶解在超纯水中, 用 0.22 μm 的针头过滤器过滤备用。用超纯水平衡 Sephadex G-10 凝胶层析柱后, 进样量 1 mL, 用超纯水进行洗脱。检测波长为 220 nm, 洗脱液流速为 0.5 mL/min, 收集各峰组分, 并对各峰组分的抑制剂活性进行比较, 取活性最高的峰组分冷冻干燥备用。

Mono Q 阴离子交换层析: 将 Sephadex G-10 凝胶层析分离活性成分溶解于 Tris-HCl 缓冲液 A (10 mmol/L, pH 8.5) 中, 配制浓度为 1 mg/mL。利用 Mono Q 阴离子交换层析进一步分离纯化。采用阶段洗脱方式: 流动相 B 为含 0.04 ~ 0.9 mol/L NaCl 的缓冲液 A, 上样量为 2 mL, 流速 0.5 mL/min, 检测波长为 220 nm, 收集各峰组分, 并对各峰组分的抑制剂活性进行比较, 取活性最高的峰组分冷冻干燥备用。

2.4 反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 测定纯度

取上述分离活性最高的冻干粉溶解于超纯水中后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤备用。色谱条件: SB Aq 柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A, 0.1% 三氯乙酸 20% 乙腈水溶液 (V/V); B, 0.1% 三氯乙酸 70% 乙腈水溶液 (V/V)。洗脱程序: 0 ~ 5 min 100% A, 5 ~ 20 min 100% ~ 0% A。流速为 1 mL/min; 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 5 μL ; 检测波长为 220 nm^[6]。

2.5 α -葡萄糖苷酶活性、抑制剂对 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

酶活力单位定义: 在 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 6.8 条件下, 1 min 内水解 PNPG 释放 1 μmol 对硝基酚 (PNP) 所需的酶量为一个活力单位 (U)。

α -葡萄糖苷酶活性测定: 根据 Apostolidis E 等的方法并略有修改, 以 PNPG 为底物, 测定 α -葡萄糖苷酶活性。反应体系为: 140 μL 的磷酸钾缓冲液 (20 mmol/L, pH 6.8), 70 μL 的 6 mg/mL 的 α -葡萄糖苷酶, 混合均匀后于水浴锅 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 20 min, 再加入 70 μL 的 10 mmol/L 的 PNPG 继续反应 1 h, 然后加入 70 μL 的 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应。用

酶标仪在 405 nm 处测定吸光度。

抑制剂活力单位定义: 在相同条件下降低 1 个酶活力单位所需的抑制剂的量, 抑制率 = (抑制前酶活 - 抑制后酶活) / 抑制前酶活 \times 100%, 规定在上述条件下, 对 α -葡萄糖苷酶抑制率达 5% 的抑制活性为一个抑制单位 (IU)。

抑制剂对 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定: 采用 PNPG 法。首先取 70 μL 待测样品加入 1.5 mL 的离心管中, 接着加入 70 μL 的 6 mg/mL 的 α -葡萄糖苷酶, 混合均匀后于水浴锅 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 20 min, 再加入 70 μL 的 10 mmol/L 的 PNPG 继续反应 1 h, 然后加入 70 μL 的 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应。用酶标仪在 405 nm 处测定吸光度 A_i ; 另取 70 μL 待测样品加入 1.5 mL 的离心管中, 接着加入 70 μL 的 6 mg/mL 的 α -葡萄糖苷酶, 混合均匀后于水浴锅 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 20 min, 加入 70 μL 的磷酸钾缓冲液 (20 mmol/L, pH 6.8) 反应 1 h, 操作同上, 吸光值为 A_j ; 取 70 μL 缓冲液加入 1.5 mL 的离心管中, 操作同上, 吸光值为 A_o , 样品对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率的公式:

$$\text{清除率} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_o}\right) \times 100$$

式中: A_i 为加入抑制剂的吸光值; A_j 为背景颜色对照的吸光值; A_o 为不加抑制剂的吸光值。

2.6 蛋白浓度测定

双缩脲法。

2.7 水解度 (DH) 的测定

甲醛滴定法。

2.8 抑制剂 LGI 的基本性质研究

抑制剂 LGI 温度的稳定性: 紫菜酶解液中 α -葡萄糖苷酶抑制剂分别在 30 ~ 80 $^{\circ}\text{C}$ 范围内, 分别保温 7 h, 每间隔 1 h, 在标准条件下测定抑制活性, 以 50 $^{\circ}\text{C}$ 测定的抑制活性为 100%, 计算相对抑制活性。

抑制剂 (LGI) 的 pH 稳定性: 紫菜酶解液中 α -葡萄糖苷酶抑制剂分别用 pH 3 ~ 12 不同酸碱溶液 50 $^{\circ}\text{C}$ 处理 2 h, 在标准条件下测定抑制活性, 以抑制活性最高为 100%, 计算相对抑制活性。

IC50 值定义: 在最适条件下, 对一定量 α -葡萄糖苷酶活性抑制率达 50% 时的抑制剂添加量。

抑制剂抑制动力学分析: 在反应体系中控制 α -葡萄糖苷酶和抑制剂浓度不变, 配制 10 mmol/mL PNPG, 并分别稀释 2、4、8、16、32、64 等一系列倍数后作为底物, 测定反应初速度。Lineweaver-Burk 做双倒数曲线, 测定抑制剂抑制类型^[7]。

3 结果与分析

3.1 蛋白酶种类的确

本实验选用胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶等六种内切酶分别单独对低值紫菜进行水解,和中性蛋白酶、碱性蛋白酶与氨肽酶复配酶解紫菜,以酶解产物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性为指标,结果见图1。

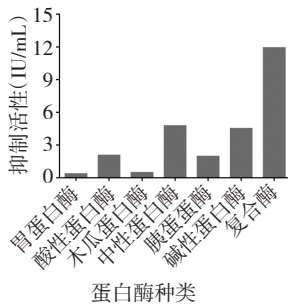


图1 不同酶水解产物对 α -葡萄糖糖苷酶的抑制活性

Fig. 1 α -Glucosidase Inhibitory activity of different protease hydrolysates

条斑紫菜分别经六种内切蛋白酶单独水解和中性蛋白酶、碱性蛋白酶与氨肽酶分步复合水解后,将水解产物配制成质量浓度为10 mg/mL的溶液(pH 6.8),测其对 α -葡萄糖糖苷酶的抑制活性,从图1可以看出发现六种的水解产物均有一定的抑制活性,其中中性蛋白酶对 α -葡萄糖糖苷酶抑制活性较高,其次为碱性蛋白酶,因此选择中性蛋白酶和碱性蛋白酶两种内切酶与外切酶氨肽酶复配进行多酶水解。

3.2 酶解条斑紫菜产物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂粗品的分离纯化

3.2.1 SP Sepharose High Performance 阳离子交换层析

条斑紫菜酶解产物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂粗

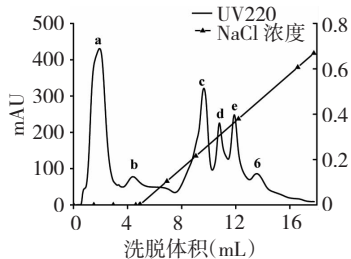


图2 紫菜酶解液的 SP Sepharose High Performance 阳离子交换色谱图

Fig. 2 SP Sepharose High Performance cation-exchange chromatogram of protease hydrolysates

品经0.22 μ m 针头微孔过滤后用 SP Sepharose High Performance 阳离子交换层析柱进行分离纯化,结果见图2。

由图2可以看出,抑制剂粗品经 SP Sepharose High Performance 阳离子交换层析柱进行分离纯化后主要得到 a、b、c、d、e、f 6 个峰组分,其中峰组分 c 抑制活性最高达 9.938 IU/mL。将组分 c 浓缩后冷冻干燥备用。

3.2.2 Sephadex G-10 凝胶层析

将上述所得组分经 Sephadex G-10 凝胶层析色谱进行分离,结果见图3。

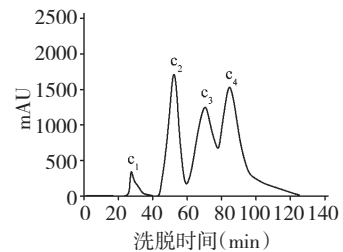


图3 组分 c 的 Sephadex G-10 凝胶层析色谱图

Fig. 3 Sephadex G-10 gel chromatogram of component c

从图3可以看出,通过凝胶柱纯化后,主要得到4个组分。其中峰组分 c_2 有抑制活性。收集峰组分 c_2 ,冷冻干燥,待进一步纯化。

3.2.3 Mono Q 阴离子交换层析

采用 Mono Q 阴离子交换层析进一步分离上述步骤所得组分 c_2 ,纯化结果如图4。

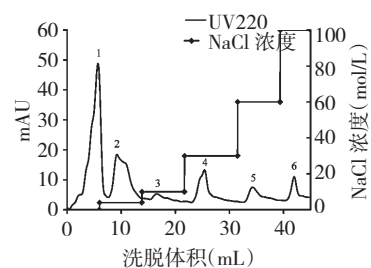


图4 组分 c_2 的 Mono Q 阴离子交换色谱图

Fig. 4 Mono Q anion exchange chromatogram of the component c_2

图4结果表明组分 c_2 经过 Mono Q 阴离子交换色谱纯化后,可获得6个峰组分,其中峰组分4抑制活性最高,可达17.6 IU/mL,将其冷冻干燥,得到纯化后的 α -葡萄糖苷酶抑制剂,命名为LGI。

3.2.4 LGI 的分析鉴定

从图5所示,在保留时间为1.579 min处,得到

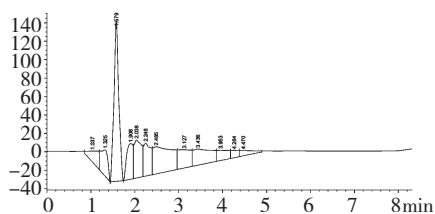


图5 LGI的RP-HPLC色谱图谱

Fig. 5 RP-HPLC chromatogram of LGI

一个峰面积比为 62.4% 的洗脱峰;在用 RP-HPLC 测定 LGI 纯度之前,对此样品用安捷伦 1100 液相色谱分析氨基酸组成(图略),发现其主要含有 ala 及极少量的 asp、glu、gly、thr 等氨基酸;通过 Sephadex G-10 凝胶层析分子筛判定 LGI 的分子量范围在 190 ~ 260 Da 之间,参考 Tao J 和 liu JY 等^[8] 学者研究紫菜蛋白质的一级结构序列,推测 LGI 可能是由 ala 组成的三肽。LGI 对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值为 97.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与许芹永等学者^[9] 在肉桂中提取的 α -葡萄糖苷酶抑制剂的 IC_{50} 值 350.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相比, LGI 是一种抑制作用较强的抑制剂。天然的 LGI 分子量小,和已经报道的药品(阿卡波糖片、米格列醇片)相比,具有易吸收的特点,对消化道无副作用的优势。

3.3 LGI 的基本性质研究

3.3.1 LGI 的温度稳定性

抑制剂 LGI 分别在 30 ~ 80 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,分别保温 7 h,每间隔 1 h,在标准条件下测定抑制活性,以 50 $^{\circ}\text{C}$ 测定的抑制活性为 100%,计算相对抑制活性,结果如图 5。

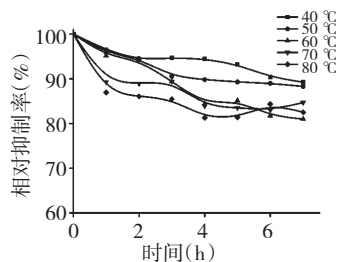


图6 LGI 的温度稳定性

Fig. 6 Thermal stability of LGI

从图 6 可以看出 LGI 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 保温 7 h,抑制活性仍然保持在 80% 以上,说明这种小肽的热稳定性较好,这点对加工、保存皆有较大益处。

3.3.2 LGI 的 pH 稳定性

图 7 结果表明 LGI 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性在酸性环境中基本不变化,在碱性环境中随着 pH

值的增高抑制活性仅有所降低。说明 LGI 的 pH 稳定性也比较好。

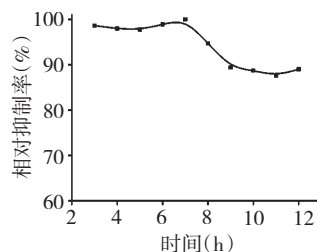
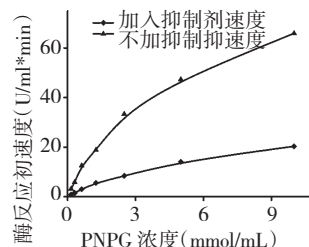
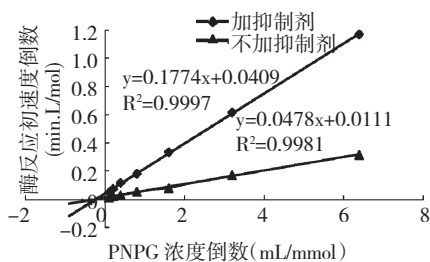


图7 LGI 的 pH 稳定性

Fig. 7 pH stability of LGI

3.3.3 LGI 对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学研究

图 8、9 的结果表明,加入抑制剂前后, α -葡萄糖苷酶对 PNPG 的 K_m 不变, V_{max} 变小,说明 LGI 对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型属于一种非竞争性的抑制作用。许芹永等人^[9] 在肉桂中提取的 α -葡萄糖苷酶抑制剂也是此种类型。Westey AM 等人^[10] 在开放系统中研究酶抑制剂作用时发现非竞争性抑制剂在生物体内不会随着底物浓度的累加而丢失,是一种理想的治疗药物。LGI 与 α -葡萄糖苷酶分子之间相互作用的具体机制有待进一步的深入研究,可为其今后的应用提供更好的理论依据。

图8 LGI 对 α -葡萄糖苷酶的 V-S 图Fig. 8 V-S diagram of LGI against α -glucosidase图9 LGI 对 α -葡萄糖苷酶的双倒数曲线Fig. 9 Double reciprocal plot of LGI against α -glucosidase

4 结论

条斑紫菜经本实验室自产的氨肽酶与两种商品

中性蛋白酶和碱性蛋白酶在一定条件下复配可控酶解后,得到的水解产物对 α -葡萄糖苷酶抑制活力较强;通过阳离子交换层析、凝胶层析、阴离子交换层析三步组合的色谱分离步骤,从紫菜酶解后的混合物中分离出达到一定纯度对 α -葡萄糖苷酶抑制活力较高的抑制剂 LGI,它属于一种非竞争性抑制剂,为分子量在 190 ~ 260 Da 范围的小肽。LGI 属于天然产物、易于获得、分子量小、温度和 pH 稳定性高,符合具有药用潜力 α -葡萄糖苷酶抑制剂的各种特点。紫菜酶解产生肽类 α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究为海洋原料的开发提供了新思路。

参考文献

- LI HM (李洪梅). The clinical application of α -glycosidase inhibitor. *Chin Med* (中国医刊), 2007, 42(10): 19-21.
- Lee HJ, Lee HS, Choi JW, et al. Novel tripeptides with α -glucosidase inhibitory activity isolated from silk cocoon hydrolysate. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 11522-11525.
- Niwa K, Yamamoto T, Furuita H, et al. Mutation breeding in the marine crop *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta): cultivation experiment of the artificial red mutant isolated by heavy-ion beam mutagenesis. *Aquaculture*, 2011, 314: 182-187.
- Zhang QP (张秋萍), Tian YP (田亚平). Study on preparation of antioxidant peptides from *Pisum sativum* L. by dual-enzymatic method. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 519-524.
- Yang N (杨娜), Yang DL (杨栋梁), Liu JJ (刘佳佳). Effect of decoloration by particulate active carbon on active components of water extraction of fermented garlic. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2007, 28(5): 75-80.
- Lee SH, Qian ZJ, Kim SK. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem*, 2010, 118: 96-102.
- Shobana S, Sreerama YN, Malleshi NG. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet *Eleusine coracana* seed coat phenolics; Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chem*, 2009, 115: 1268-1273.
- Jang T, Zhang J, Chang W, et al. Crystal structure of R-phycoyanin and possible energy transfer pathways in the phycobilisome. *Bioph J*, 2001, 81: 1171-1179.
- Xu QY (许芹永), Zhu JB (朱靖博), Wang ZZ (王振中), et al. The research of α -glucosidase inhibitors from cortex cinnamomi. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 1246-1249.
- Westley AM, Westley J. Enzyme inhibition in open systems Superiority of uncompetitive agents. *J Biol Chem*, 1996, 271: 5347-5352.
- Lin XY (林祥云). *Fragrance and Flavor Materials Dictionary* (香料香精辞典). Beijing: Chemical Industry Press, 2007. 30-90.
- Bauer K, Garbe D, Surburg H. *Common Fragrance and Flavor Materials*. Weinheim (Germany), 2001. 119-160.
- Patroselinum-Parsley [EB/OL]. <http://www.henriettesherbal.com/eclectic/kings/petroselinum.html>, 2013.
- Lin XY (林祥云). *Fragrance and Flavor Materials Dictionary* (香料香精辞典). Beijing: Chemical Industry Press, 2007. 166.
- Bauer K, Garbe D, Surburg H. *Common Fragrance and Flavor Materials*. Weinheim (Germany), 2001. 104-111.
- Lin XY (林祥云). *Fragrance and Flavor Materials Dictionary* (香料香精辞典). Beijing: Chemical Industry Press, 2007. 368.
- Lin XY (林祥云). *Technology of Artificial Flavor Production* (调香术). Beijing: Chemical Industry Press, 2011. 80.
- Song BG (孙宝国). *Technology of Edible Flavor Production* (食用调香术). Beijing: Chemical Industry Press, 2010. 380-381.
- Hashidoko Y. The phytochemistry of *Rosa Rugosa*. *Phytochemistry*, 1996, 43: 535-549.

(上接第 1445 页)