

# 丝蛋白肽醒酒活性组分分离纯化及其构效关系研究

## Isolation, purification and structure-activity relationship of silk fibroin peptides with anti-alcoholism activity

袁亮<sup>1,2</sup> 戴军<sup>1</sup> 陈尚卫<sup>1</sup> 朱松<sup>1</sup> 张学军<sup>3</sup> 张平<sup>3</sup>

YUAN Liang<sup>1,2</sup> DAI Jun<sup>1</sup> CHEN Shang-wei<sup>1</sup> ZHU Song<sup>1</sup> ZHANG Xue-jun<sup>3</sup> ZHANG Ping<sup>3</sup>

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122;

3. 山东天九生物技术有限公司, 山东 菏泽 274108)

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

3. Shandong Tianjiu Biotechnology Co., Ltd., Heze, Shandong 274108, China)

**摘要:**以废蚕丝为原料,采用 40% CaCl<sub>2</sub> 溶液将其溶解、透析后得蚕丝蛋白,优化其酶解工艺条件,并将制得的丝蛋白肽经凝胶过滤色谱 (HPGFC) 和反相液相色谱 (RP-HPLC) 分离纯化,利用瓦勒-霍赫法考察了不同浓度和组分丝蛋白肽的体外醒酒活性。结果表明,最佳蚕丝蛋白酶解工艺条件为时间 240 min、加酶量([E]/[S])2.0%、pH 8.5、温度 60 °C、底物浓度 5%,该工艺下可获得水解度为 23.22% 的丝蛋白肽;体外醒酒活性试验表明有较高 ADH 激活率的丝蛋白肽浓度为 2 mg/mL;经 HPGFC 和 RP-HPLC 分离纯化,可分别得到 3 个和 17 个组分,其中 SFP-II-8 组分的体外醒酒活性最高,其 ADH 激活率可达 44.51%;将 SFP-II-8 组分通过液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱联用分析(UPLC-Q-TOF-MS)后得出其氨基酸序列为 L-G-G-V-G-A。

**关键词:**丝蛋白;肽;水解度;ADH 激活率;色谱分离

**Abstract:** Waste silk as raw material was dissolved with 40% CaCl<sub>2</sub> solution at first, and silk fibroin was extracted after dialysis; Then the enzymolysis conditions of silk fibroin was optimized. Besides, silk fibroin peptides was fractionated by using HPGFC and separated ultimately by RP-HPLC, then their anti-alcoholism activity in vitro was detected by Valle&Hoch's method. The experiment results showed that the optimal enzymatic hydrolysis conditions of silk fibroin were as followed: time of 240 min, enzyme dosage of 2%, substrate concentration of 5%, pH 8.5 and temperature of 60 °C, and the optimal degree of hydrolysis (DH) was 23.22%. In addition, the better alcohol dehydrogenase (ADH) activation rate of SFP-II-8 obtained by HPGFC and RP-HPLC was measured under the concentration of

2 mg/mL, and it can up to 44.51%. UPLC-Q-TOF-MS analysis showed that its amino acid sequence was L-G-G-V-G-A.

**Keywords:** silk fibroin peptides; degree of hydrolysis; ADH activation rate; chromatographic separation

蚕丝蛋白作为从蚕丝中提取出来的一种天然高分子化合物,具备良好的人体亲和性、无毒副作用、无过敏反应等特点<sup>[1]</sup>,已经广泛应用于食品、化妆品、生物制药、临床诊断治疗及医用材料等诸多领域<sup>[2-3]</sup>。

蚕丝蛋白肽中富含甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸等多种氨基酸,因氨基酸组成和排列的差异而表现出多种功能性,诸如醒酒护肝<sup>[4]</sup>、降血糖<sup>[5-6]</sup>、降血压<sup>[7]</sup>、抗辐射抗肿瘤<sup>[8-9]</sup>、止血与抗菌抗炎<sup>[10-12]</sup>、降胆固醇与降血脂<sup>[13-14]</sup>等。近年来对天然醒酒生物活性物质的研究日趋重视<sup>[15-17]</sup>,当人体摄入乙醇后,90%~98%的乙醇是以肝内氧化的形式在体内发生代谢反应;其他则通过发汗、排尿及呼气等方式排泄到体外,而且在该反应中,起重要作用的是乙醇脱氢酶(ADH)氧化体系。而该体系的反应需要氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)的参与,在乙醇被氧化为乙醛的同时,NAD 则被还原为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)。由于该还原产物在 340 nm 处有吸收峰,因此可以根据 NADH 在单位时间内引起的吸光度变化率来计算 ADH 活性的变化<sup>[18]</sup>。

国内外不乏蚕丝蛋白水解物醒酒活性的研究报道,平林洁等<sup>[19]</sup>研究发现蚕丝蛋白水解物的醒酒作用明显强于单一的丙氨酸和甘氨酸;周凤娟等<sup>[20]</sup>研究进一步证明丝素肽具有显著醒酒和防醉效果;祝永强等<sup>[21]</sup>研究不仅表明丝素水解物在抗醉酒方面有一定效果,而且发现将其与 V<sub>C</sub> 和中药提取物混合后的效果尤为显著。然而,关于醒酒丝蛋白肽活性组分分离纯化及其构效关系的研究尚未见报道。本研究拟以醒酒活性为考察指标,将实验室酶解制备的丝蛋白肽,

作者简介:袁亮,男,江南大学在读硕士研究生。

通信作者:戴军(1957—),男,江南大学研究员,博士。

E-mail: daihplc@163.com

收稿日期:2018-06-23

先用凝胶过滤色谱 (HPGFC) 进行粗分离, 再用反相色谱 (RP-HPLC) 进一步分离, 最终获得活性最强组分, 经液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱联用分析, 以获得其氨基酸序列, 以期为开发新的肽类醒酒产品提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

蚕丝 (silk): 粗蛋白氮含量为 14.53%, 江苏省东台市民生生物科技有限公司;

乙醇脱氢酶 (ADH): 310 U/mg, 美国 Sigma 公司;

氧化型辅酶 I (NAD<sup>+</sup>): 98%, 上海国药集团;

Sephades G-15: 葡聚糖凝胶, 美国 GE 公司;

Alcalase 2.4 L 碱性蛋白酶: 2.4 AU/g, 丹麦 Novo 公司;

乙腈: 色谱纯, 美国 Fisher 公司;

无水乙醇、三氟乙酸、CaCl<sub>2</sub> 等: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器设备

旋转蒸发器: RE-52A 型, 上海亚荣生化仪器厂;

紫外分光光度计: TU-1900 型, 北京普析通用仪器有限公司;

超高效液相色谱仪: Waters Acquity UPLC 型, 美国 Waters 公司;

超滤杯: YL-300 型, 上海羽令过滤器材有限公司;

质谱仪: Waters MALDI SYNAPT Q-TOF MS 型, 美国 Waters 公司;

恒流泵: HL-2S 型, 上海沪西分析仪器有限公司;

高效液相色谱仪: Waters 2545 型, 美国 Waters 公司;

高速冷冻离心机: Avanti J-E 型, 美国 Beckman 公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 蚕丝蛋白粉制备 称取适量蚕丝, 剪碎后置于烧杯中备用; 加入 40% CaCl<sub>2</sub> 溶液煮沸 60 min, 8 层纱布过滤后离心 (10 000 r/min, 10 min), 装入 7 000 Da 透析袋中流动水透析 12 h 后, 再用蒸馏水透析 12 h (每 1.5 h 换一次水); 超滤浓缩后, 冻干得蚕丝蛋白粉。

1.2.2 蚕丝蛋白粉酶解单因素试验 以蚕丝蛋白粉的水解度为评价指标, 选温度、pH 值、底物浓度、加酶量 (酶与底物比) 以及时间进行单因素试验, 确定各因素对评价指标的影响。

(1) 时间: 固定温度 60 °C, pH 值 8.5, 底物浓度 5%, 加酶量 2.0%, 考察时间 (30, 60, 90, 150, 240, 300 min) 对蚕丝蛋白粉水解度的影响。

(2) 加酶量: 固定温度 60 °C, pH 值 8.5, 底物浓度 5%, 时间 240 min, 考察加酶量 (0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%) 对蚕丝蛋白粉水解度的影响。

(3) pH 值: 固定温度 60 °C, 底物浓度 5%, 加酶量 2.0%, 时间 240 min, 考察 pH 值 (7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5) 对蚕丝蛋白粉水解度的影响。

(4) 温度: 固定 pH 值 8.5, 底物浓度 5%, 加酶量 2.0%, 时间 240 min, 考察温度 (45, 50, 55, 60, 65 °C) 对蚕丝蛋白粉

水解度的影响。

(5) 底物浓度: 固定温度 60 °C, pH 值 8.5, 加酶量 2.0%, 时间 240 min, 考察底物浓度 (2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 10%) 对蚕丝蛋白粉水解度的影响。

根据单因素试验结果, 选取主要因素进行正交试验优化工艺条件。

1.2.3 HPGFC 分离丝蛋白肽 HPGFC 所用填料为 Sephadex G-15, 凝胶柱尺寸: 60 cm × 2.6 cm; 紫外检测器波长: 220 nm; 洗脱液: 超纯水; 丝蛋白肽上样量: 15 mL; 上样浓度: 30 mg/mL; 流速: 1.0 mL/min。根据色谱图收集各组分, 经旋转蒸发器浓缩后, 用冷冻干燥机冻干成粉, 再根据体外醒酒活性高低进行筛选, 将活性最强的组分继续分离。

1.2.4 RP-HPLC 分离纯化 将初分后 ADH 激活率最强的组分, 用 RP-HPLC 进一步分离。色谱条件: 色谱柱: Waters xBridge™ Prep C<sub>18</sub> (250 mm × 19 mm, 5 μm); 柱温: 室温; 流动相: A 纯乙腈, B 超纯水 (0.05% TFA); 梯度洗脱条件: 0~30 min, 5% A~20% A; 30~50 min, 20% A~50% A; 50~53 min, 50% A; 53~55 min, 50% A~5% A; 55~60 min, 5% A; 检测波长: 220 nm; 流速: 10 mL/min; 样品浓度: 50 mg/mL; 进样量: 500 μL。将分离后得到的组分浓缩冻干后测定 ADH 激活率。

1.2.5 水解度测定 采用 pH-stat 法<sup>[22]</sup>, 水解度按式 (1) 计算:

$$DH = \frac{B \times N_b}{a \times m \times h_{\text{tot}}} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

DH——水解度, %;

B——消耗的 NaOH 量, mL;

N<sub>b</sub>——NaOH 摩尔浓度, mol/mL;

a——氨基平均解离度,  $a = 10^{\text{pH}-\text{pK}} / (1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}})$ , 其中 pK 为氨基酸的平均 pK, 按 7.0 算 (平均解离常数), pH 为反应起始 pH 值;

m——蚕丝蛋白质质量, g;

h<sub>tot</sub>——底物中肽键总数, 丝素 h<sub>tot</sub> = 12.4 mmol/g。

1.2.6 体外醒酒活性——乙醇脱氢酶 (ADH) 活力的测定

采用瓦勒-霍赫 (Valle & Hoch)<sup>[23-24]</sup> 法, 并以 0.5 mL 蒸馏水代替乙醇溶液作参比调零; 以 0.1 mL 蒸馏水代替 0.1 mL 丝蛋白肽作对照组。ADH 的活力值 (U) 按式 (2) 计算:

$$E_{\text{ADH}} = \frac{\Delta A \times 3.2}{w \times 6.2}, \quad (2)$$

式中:

E<sub>ADH</sub>——酶活, U;

ΔA——吸光度每分钟的增加值;

3.2——反应体系的总体积, mL;

w——加酶浓度, mg/mL;

6.2——NADH 在 340 nm 处的摩尔吸光系数。

ADH 激活率按式 (3) 计算:

$$R = \frac{E_{\text{实验}} - E_{\text{对照}}}{E_{\text{对照}}} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

$R$ ——ADH 激活率, %;

$E_{\text{试验}}$ ——丝蛋白肽试验组 ADH 酶活, U;

$E_{\text{对照}}$ ——空白对照组 ADH 酶活, U。

## 2 结果与分析

### 2.1 蚕丝蛋白酶解工艺条件研究

2.1.1 酶解蚕丝蛋白单因素试验 由图 1 可知:

(1) 随着酶解时间的延长,水解度不断提高,但 150 min 后增幅明显回落,240 min 后渐趋平缓。因此,为制备含量较高的丝蛋白肽产品,综合考虑制备效率,最终选择 240 min 为酶解最适时间。

(2) 加酶量超过 2.0% 后,酶解过程的影响幅度较小,基本达到平衡状态,考虑制备成本,本试验最终选择 2% 加酶量作为碱性蛋白酶水解蚕丝蛋白的最适加酶量。

(3) 随着 pH 值由 7.5 提高到 9.5,水解度变化幅度较大;当 pH 从 7.5 提高到 8.5 时,水解程度逐渐增大;pH 从 8.5 提高到 9.5 时,水解程度逐渐降低;在 pH 为 8.5 时,水解程度最大,因此,最终确定反应最适 pH 为 8.5。

(4) 当温度从 45 °C 提高到 70 °C 时,蛋白水解度呈先增大后降低的趋势;60 °C 时达到最大值(23.22%),但温度继续上升反而不利于酶解,这是因为 Alcalase 酶在高温下可能部分变性而导致酶活减弱。

(5) 随着底物浓度提高,水解度先不断增大、之后开始下降,底物浓度为 5% 时水解度达到最大值,因此,确定最适底物浓度为 5%。

2.1.2 酶解蚕丝蛋白正交试验 根据单因素试验结果,本研究选取对蚕丝蛋白水解度影响较大的 3 个因素即加酶量、pH 值及底物浓度,每个因素分别设计 3 个水平(见表 1)进行正交试验,试验结果见表 2。正交试验表明,3 个因素对酶解反应的影响顺序依次是底物浓度 > 加酶量 > pH 值,最优组合为  $C_2A_2B_2$ ,即底物浓度 5%,pH 值 8.5,加酶量 2.0%,在此条件下水解度达到最大值(23.22%)。

### 2.2 丝蛋白肽浓度对体外醒酒活性的影响

根据瓦勒-霍赫(Valle&Hoch)的方法,将丝肽浓度设定 5 组梯度分别为 1, 2, 4, 6, 8 mg/mL,每组浓度梯度设置 3 个平行试验,分别测定各组丝肽溶液的体外醒酒活性,结果见图 2。从图 2 可以看出,ADH 激活率随着丝蛋白肽浓度的增加表现出先上升后下降的趋势,当浓度为 2 mg/mL 时,ADH 激活率达到最大值[(24.44 ± 0.70)%]。

### 2.3 丝蛋白肽分离纯化

2.3.1 HPGFC 分离纯化 丝蛋白肽经 HPGFC 分离色谱图如图 3 所示,根据保留时间不同,本研究分别收集了图 3 中 1、2、3(SFP-I、SFP-II、SFP-III) 3 个组分,经浓缩、冻干后分

表 1 正交试验设计表

Table 1 Design of the orthogonal test

水平	A 加酶量([E]/[S])/%	B pH 值	C 底物浓度/%
1	1.5	8.0	4
2	2.0	8.5	5
3	2.5	9.0	6

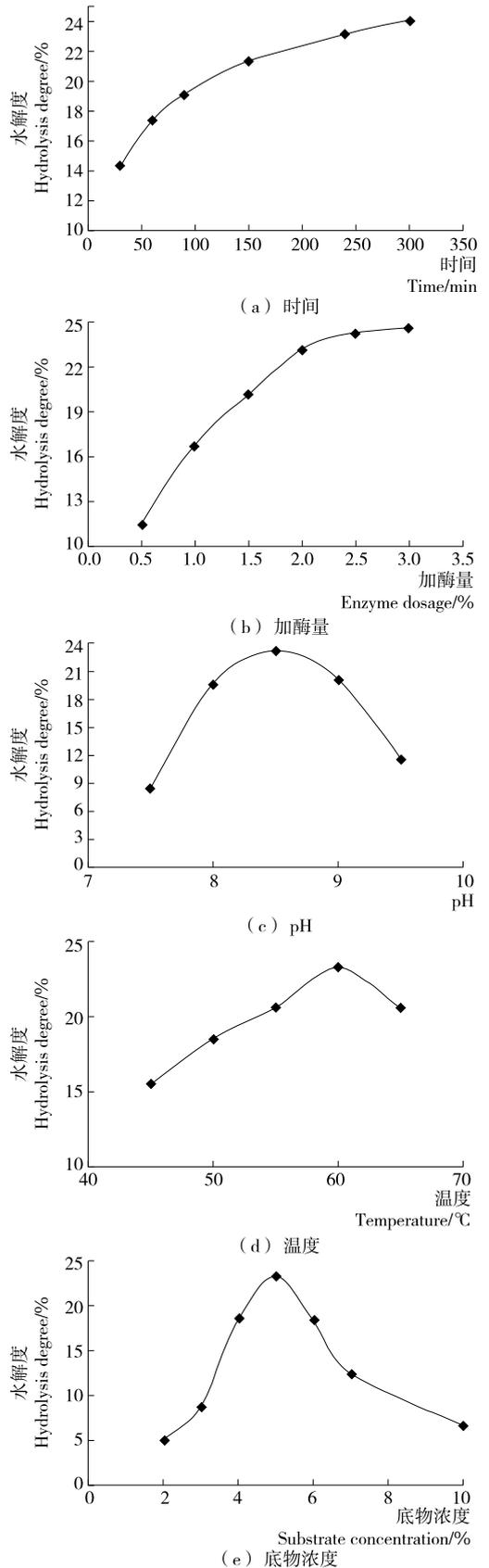


图 1 时间、加酶量、pH、温度及底物浓度对蚕丝蛋白水解度的影响

Figure 1 Effect of time, enzyme dosage, pH, temperature and substrate concentration on degree of hydrolysis of silk fibroin

表 2  $L_9(3^3)$  正交试验设计及结果

组别	A	B	C	水解度 $DH/\%$
1	1	1	1	10.48
2	1	2	2	20.25
3	1	3	3	12.12
4	2	1	2	19.02
5	1	2	3	17.63
6	1	3	1	16.39
7	3	1	3	16.58
8	3	2	1	18.51
9	3	3	2	17.56
-----				
$K_1$	42.85	46.07	45.38	
$K_2$	53.04	56.39	56.83	
$K_3$	52.65	46.07	46.32	
R	10.19	10.32	11.45	
-----				
因素主→次	CBA			
最优组合条件	$C_2A_2B_2$			

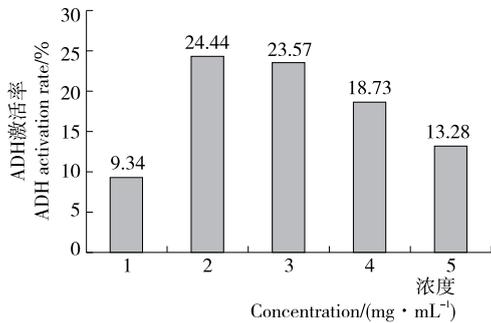


图 2 不同浓度的丝蛋白肽对体外醒酒活性的影响  
Figure 2 Effect of concentration on ADH activation rate of silk fibroin peptide

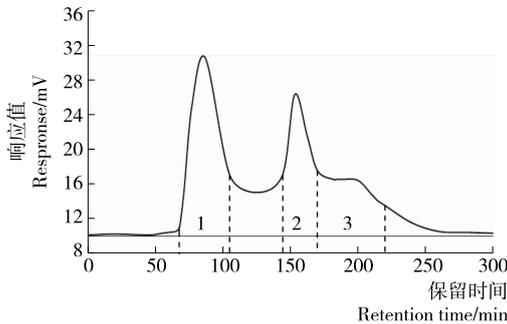


图 3 HPGFC 分离丝蛋白肽

Figure 3 Separation of silk fibroin peptide by HPGFC

别测定其体外醒酒活性。HPGFC 分离组分体外醒酒效果如图 4 所示,组分 2(SFP-II)的 ADH 激活率最高,为  $(31.69 \pm 1.9)\%$ 。多次收集组分 2 浓缩、冻干后进一步采用 RP-HPLC 进行分离纯化。

2.3.2 RP-HPLC 分离纯化 采用 RP-HPLC 对 HPGFC 初分筛选出的体外醒酒活性较强组分 SFP-II 进行分离纯化,可得到 17 个不同组分,结果见图 5。反复收集经超滤浓缩、冻干后的 17 个组分,分别测定其体外醒酒活性,结果见图 6。从图 6 可知,RP-HPLC 分离获得的 8 号组分(SFP-II-8)体外醒酒活性最高,可达 44.51%。

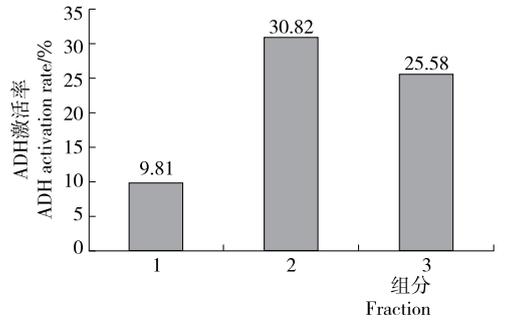


图 4 HPGFC 分离组分的体外醒酒效果

Figure 4 Effect of fractions separated by HPGFC on anti-alcoholism in vitro

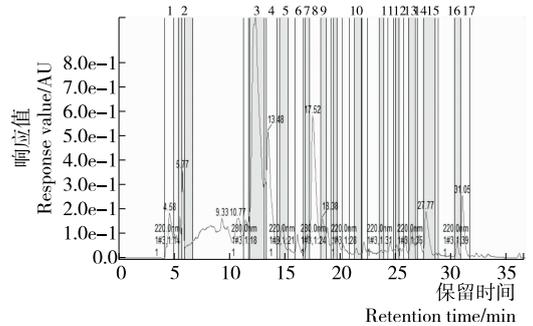


图 5 RP-HPLC 分离 SFP-II

Figure 5 Separation of SFP-II by RP-HPLC

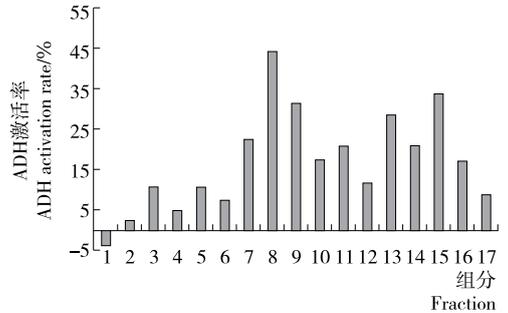


图 6 RP-HPLC 分离组分的体外醒酒效果

Figure 6 Effect of fractions separated by RP-HPLC on anti-alcoholism in vitro

#### 2.4 SFP-II-8 活性组分氨基酸序列分析

将 SFP-II-8 号组分经 LC-MS/MS 分离分析,可得到其 Q-TOF 二级质谱图,结果见图 7。采用 Biolynx 软件对该组分的碎片离子进行解析,可得到其氨基酸序列解析图,结果见图 8。从图 8 可知,SFP-II-8 相对分子质量为 473.4,其氨基酸序列为 L-G-G-V-G-A。

### 3 结论

(1) 酶解条件优化试验结果显示,蚕丝蛋白制备丝蛋白肽的最佳工艺为:酶解时间 240 min、加酶量  $[E]/[S]$  2.0%、pH 8.5、温度 60 °C、底物浓度 5%,该工艺条件下蚕丝蛋白水解度为 23.22%。瓦勒-霍赫法测定的体外活性试验结果表明,蚕丝蛋白水解液具有一定的醒酒活性,且不同浓度的丝蛋白肽的 ADH 激活率有所差异,浓度为 2 mg/mL 时醒酒活性较高。将丝蛋白肽经过 HPGFC 和 RP-HPLC 分离

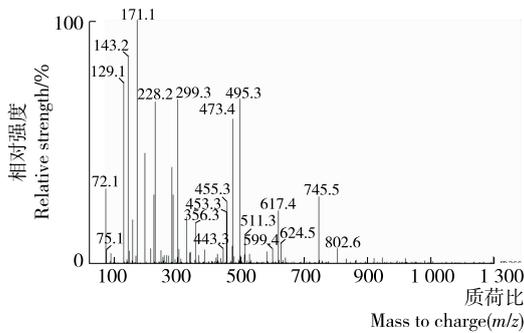


图 7 SFP-II-8 主峰的 Q-TOF 二级质谱图

Figure 7 MS/MS spectrum of the major component of SFP-II-8

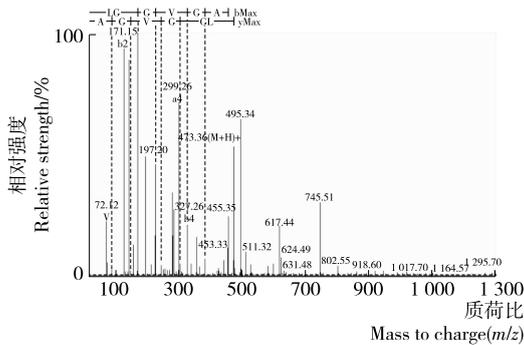
图 8 SFP-II-8 的氨基酸序列解析图 ( $m/z=473.4$ )

Figure 8 Amino acid sequence analysis diagram of SFP-II-8

纯化,可分别得到 3、17 个组分,其中 SFP-II-8 级分 ADH 激活率最高,可达 44.51%;SFP-II-8 经 UPLC-Q-TOF-MS 分析得到其氨基酸序列为 L-G-G-V-G-A。本研究为进一步开发、优化蚕丝蛋白资源和研究丝蛋白肽的醒酒活性提供了新的依据。

(2) 本研究对丝蛋白肽的醒酒活性仅做了体外试验,有待后续进一步通过动物试验验证其生物活性。此外,分离分析得到的具有较高醒酒活性的丝蛋白肽组分的氨基酸序列还有待于通过化学合成该序列肽及其色谱-质谱分析和活性试验进行验证。

### 参考文献

- [1] 胡梅,彭巍,李海军. 蚕丝蛋白及其衍生物在化妆品中的应用[J]. 日用化学品科学, 2011(6): 34-36, 39.
- [2] 侯春春,张胡静,李圣春,等. 蚕丝蛋白生物医学材料的研究现状[J]. 丝绸, 2010(7): 18-22.
- [3] 李德远,文德卿,苏喜生,等. 蚕丝蛋白食品的研究开发[J]. 食品科学, 1994(4): 36-39.
- [4] MAGOICHI Yamaguchi, FUMI Nishikiori, MICHIKO Ito, et al. The effects of corn peptide ingestion on facilitating alcohol metabolism in healthy men[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1997, 61(9): 28-29.
- [5] 高建梅,白锦,满青青,等. 蚕丝水解物对实验性糖尿病大鼠血糖调节作用的机制研究[J]. 卫生研究, 2000, 29(6): 379-382.
- [6] BOK Kyung Han, HYUN Jung Lee, HYUN Sun Lee, et al. Hypoglycemic effects of functional tripeptides from silk in differentiated ad-

ipocytes and streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2014, 96(1): 116-121.

- [7] YUAN Wei, WANG Jie-hua, ZHOU Feng-juan. In vivo hypotensive and physiological effects of a silk fibroin hydrolysate on spontaneously hypertensive rats[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2012, 76(10): 54-55.
- [8] KIM J K, LEE J H, SUNG N Y, et al. Radioprotective effects of silk peptide on RAW264.7 macrophage cells[J]. Italian Journal of Food Science, 2012, 24(4): 188-191.
- [9] 黄慧明. 蚕丝蛋白肽抗肿瘤与抗氧化作用研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012: 65-66.
- [10] LORENZ Meinel, SANDRA Hofmann, VASSILIS Karageorgiou, et al. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo[J]. Biomaterials, 2005, 26(2): 147-155.
- [11] YASUHIRA Ikegawa, SO Sato, GARBEEN Lim, et al. Amelioration of the progression of an atopic dermatitis-like skin lesion by silk peptide and identification of functional peptides[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2012, 76(3): 473-477.
- [12] IKEGAWA Y, SATO S, LIM G, et al. Amelioration of an atopic dermatitis-like skin lesion by silk peptide and identification of functional peptides [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2012, 76(3): 473-477.
- [13] SEO C W, UM I C, RICO C W, et al. Antihyperlipidemic and body fat-lowering effects of silk proteins with different fibroin/sericin compositions in mice fed with high fat diet[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(8): 4 192-4 197.
- [14] 蓝建京. 废蚕丝中主要成份提纯及丝素降胆固醇肽的酶法制备研究[D]. 南宁: 广西大学, 2013: 45.
- [15] 隋玉杰,何慧,石燕玲,等. 玉米肽的醒酒活性体外试验及其醒酒机理研究[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(5): 54-58.
- [16] 李萍,钟赣生. 葛花对酒后血中乙醇浓度和肝中乙醇脱氢酶活性的影响[J]. 科技导报, 2009, 27(23): 82-85.
- [17] 周勇,陈焯,王权,等. 大豆肽的解酒作用及其机制研究[J]. 中药材, 2014(6): 1 033-1 036.
- [18] MA Zhi-li, HOU Tao, SHI Wen, et al. Purification and identification of corn peptides that facilitate alcohol metabolism by semi, reparative high, erformance liquid chromatography and nano liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Journal of Separation Science, 2016, 39(21): 4 234-4 236.
- [19] 潔平林. 絹を食べる-機能性食品に变身(こんな面白い研究がある)[J]. Chemistry, 1992, 47: 24.
- [20] 周凤娟,许时婴,杨瑞金,等. 丝素活性肽对小鼠急性酒精中毒的防治作用研究[J]. 营养学报, 2007, 29(5): 473-475.
- [21] 祝永强,魏克民,朱良均. 丝素水解物及不同组方抗醉酒的动物比较研究[J]. 蚕桑通报, 2008(3): 16-18.
- [22] MAN D. Enzymic hydrolysis of food proteins: By Jens Adler-Nissen, Elsevier Applied Science Publishers, London, 1986, xxii + 404 pp. ISBN 0 85334 386 1. Price: £57.00[J]. Journal of Food Engineering, 1989, 9(2): 165-166.
- [23] 施特马赫. 酶的测定方法[M]. 钱嘉渊,译. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 128.
- [24] 马伟,戴军,陈尚卫,等. 醒酒玉米低聚肽的分离制备及其氨基酸序列分析[J]. 食品与机械, 2015, 31(5): 197-200, 221.