

醒酒玉米低聚肽的分离制备及其氨基酸序列分析

Preparation, separation and amino acid sequence analysis of corn oligopeptides with antialcoholism activity

马伟^{1,2} 戴军² 陈尚卫² 朱松²

MA Wei^{1,2} DAI Jun² CHEN Shang-wei² ZHU Song²

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

(1. The School of Food Science and Technology of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:以脱淀粉玉米蛋白粉为原料,用 Alcalase 2.4L 在优化酶解条件下制得玉米低聚肽产品 COP。通过体外醒酒活性及动物试验表明:COP 具有较高体内外醒酒活性,同时发现 COP 的剂量与小鼠血醇含量的降低呈明显的剂量—效应关系。经凝胶过滤色谱和反相色谱分离分级及醒酒活性筛选,得到醒酒活性较强的玉米低聚肽级分 COP III-17。该级分通过超高效液相色谱—四级杆—飞行时间串联质谱联用分析,得到其氨基酸序列为:P-Y-L-P-L-L-P-S。

关键词:玉米;低聚肽;醒酒活性;色谱分离;四级杆—飞行时间串联质谱

Abstract: Corn oligopeptides (COP) were prepared via enzymatic hydrolysis of destarched corn proteins by Alcalase 2.4L. By investigated COP antialcoholism activity in vitro and in vivo, it is found that COP has highly antialcoholism activity. Meanwhile, the scavenging rate of blood alcohol concentration is positively correlated with the dose of COP. COP were separated by Sephadex G-15 gel chromatogram and RP-HPLC step by step, then fraction COP III-17 was separated with highly antialcoholism activity. UPLC-Q-TOF-MS analysis showed that its amino acid sequence: P-Y-L-P-L-L-P-S.

Keywords: corn; oligopeptides; antialcoholism activity; chromatographic separation; Q-TOF-MS

玉米低聚肽是以玉米蛋白为主要原料,用酶解法(蛋白酶)生产的相对分子量小于 1 000、主要成分为肽的粉末状物质^[1],2010 年经中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会批准作为新资源食品开始使用。玉米低聚肽中富含丙氨酸、亮氨酸、谷氨酸和脯氨酸等^[2],其特殊的氨基酸组成和连

接方式赋予玉米肽多种生物活性,如促进酒精代谢^[3]、保护酒精性/化学性肝损伤^[4,5]、抗疲劳^[6]、抗肿瘤^[7]、抑制血管紧张素转换酶活性^[8]等。

Yamaguchi 等^[1,3]首先用碱性蛋白酶水解玉米蛋白,得到了有生物活性的玉米肽,并发现其具有促进酒精代谢作用,并对其醒酒机理进行了初步研究。结果表明:玉米肽的醒酒作用源于它可以显著性提高血清中丙氨酸、亮氨酸的浓度,从而产生稳定的辅酶(NAD⁺),进而加速血液中乙醇在肝脏中的代谢。

目前,关于具有醒酒活性玉米低聚肽的报道多集中于玉米蛋白粉的酶解条件的优化,而关于其醒酒活性肽的氨基酸序列报道较少,仅 Ma Zhi-li 等^[9]给出了一种醒酒活性肽的氨基酸序列为 Q-L-L-P-F。为进一步研究醒酒活性肽的构效关系,进而为开发高醒酒活性玉米低聚肽产品提供理论依据,本研究将自制的玉米低聚肽产品经凝胶过滤色谱和反相色谱分离分级,以及醒酒活性筛选,获得醒酒活性较强的级分;该级分再经超高效液相色谱—四级杆—飞行时间串联质谱联用分析,以获得其氨基酸序列。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 试验原料

玉米蛋白粉(corn gluten meal, CGM):粗蛋白含量为 62.87%,中食都庆(山东)生物技术有限公司。

1.1.2 试验动物

昆明种健康小白鼠,体重(25±2)g,雄性,苏州中医院研究所。

1.1.3 主要试剂

中温 α 淀粉酶 BAN 480L:480 KNU/g,丹麦 Novo 公司;

作者简介:马伟(1985—),男,江南大学在读硕士研究生。

E-mail: 649196775@qq.com

通讯作者:戴军

收稿日期:2015-06-09

Alcalase 2.4 L:2.4 AU/g,丹麦 Novo 公司;

氧化型辅酶 I(NAD⁺):上海国药集团;

乙醇脱氢酶 ADH:310 U/mg,美国 Sigma 公司;

SephadesG-15:葡聚糖凝胶,美国 GE 公司;

乙腈:色谱纯,美国 Fisher 公司;

甲酸:色谱纯,美国 ROE 公司;

乙醇、正丁醇:优级纯,国药集团化学试剂有限公司;

NaOH、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、KH₂PO₄、明胶、焦磷酸钠、盐酸、三氟乙酸、无水乙醇等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.4 主要仪器设备

高速冷冻离心机:Avanti J-E 型,美国 Beckman 公司;

双光紫外可见分光光度计:TU-1900 型,北京普析通用仪器有限公司;

气相色谱仪:GC-2010 型,日本岛津公司;

恒流泵:HL-2 型,上海沪西分析仪器有限公司;

电脑全自动部分收集器:BSZ-100 型,上海沪西分析仪器有限公司;

紫外检测器:HD-3 型,上海沪西分析仪器有限公司;

色谱工作站:SEPU3000 型,杭州普惠科学仪器有限公司;

冷冻干燥机:SCIENTZ-10N 型,宁波新芝生物科技有限公司;

高效液相色谱仪:Waters 2545 型,美国沃特公司;

超高效液相色谱—飞行时间质谱联用仪:Wates Acquity UPLC-Waters MALDI Synapt Q-TOF 型,美国沃特公司。

1.2 方法

1.2.1 玉米低聚肽的制备 因原料中蛋白质含量不高,故先用中温淀粉酶对原料脱淀粉,然后以脱淀粉玉米蛋白粉为原料进行酶水解得到玉米粗肽液,再经过除杂和脱盐,最后进行低温喷雾干燥得到玉米低聚肽成品(COP)。玉米低聚肽的制备工艺流程:

玉米蛋白粉→α-淀粉酶水解(pH 5.5,温度 60 °C,酶底比 2.5%,料液比 1:11(m:V),酶解时间 3 h)
 脱淀粉玉米蛋白粉→碱性蛋白酶水解(pH 8.5,温度 55 °C,酶底比 1.5%,料液比 1:15(m:V),酶解时间 3 h)
 玉米粗肽液→冷冻离心(8 000 r/min,10 °C,20 min)→上清液
 微滤(分别用 0.80,0.45,0.22 μm 的微孔滤膜抽滤)→超滤(3 kDa)→纳滤(160 Da)→低温喷雾干燥→玉米低聚肽

1.2.2 玉米低聚肽的理化指标 按 QB/T 4707—2014 执行。

1.2.3 体外醒酒活性——乙醇脱氢酶(ADH)活力的测定

参照文献[10]修改如下:取 5 mL 小管,加入 pH 8.8 的焦磷酸钠缓冲液 1.5 mL,27 mmol/L 氧化型辅酶 I(NAD⁺) 1.0 mL,体积分数为 11.5% 的乙醇溶液 0.5 mL,试样(0.1 mg/mL COP 溶液或超纯水)0.1 mL,混匀后置于 25 °C 水浴锅中温浴 5 min,之后向管中加入 25 °C 温浴的 ADH

(0.25 U/mL)0.1 mL。混匀后立即测定其吸光度(A_{340 nm})值,每隔 10 s 读数一次,直至每分钟吸光度的增大值达到稳定为止。取最初线性部分计算每分钟还原型辅酶 I(NADH)的生成量,ADH 的活力(U)以每分钟生成 1 μmol NADH 时所需的酶量表示。ADH 酶活按式(1)计算:

$$E_{ADH} = \frac{\Delta A \times 3.2}{W \times 6.2} \quad (1)$$

式中:

E_{ADH}——ADH 酶活,U;

ΔA——340 nm 处每分钟吸光度的增加值;

3.2——反应液总体积,mL;

W——酶液中含酶量,mg/mL;

6.2——NADH 在 340 nm 处的摩尔吸光系数。

1.2.4 玉米低聚肽醒酒动物试验 醒酒动物试验及量效关系试验参照文献[11]。将昆明种雄性小鼠,饲养 1 周后随分为 5 组,每组 10 只。5 组分别为空白组(阴性对照)、模型组(阳性对照)、COP 低剂量组(0.2 mg/g·BW)、COP 中剂量组(0.4 mg/g·BW)、COP 高剂量组(0.8 mg/g·BW)。采用灌胃的方式给予 COP,灌胃前禁食 12 h,空白组和模型组分别给予等体积的生理盐水。30 min 后除空白组外,其余 4 组均灌胃 50%(V/V)乙醇 0.012 mL/g·BW,空白组则灌胃等体积的生理盐水,两次灌胃总体积不超过 0.03 mL/g·BW。1 h 后眼眶取血,将所取血样于 37 °C 水浴恒温 30 min,立即以 4 000 r/min 离心 5 min 取血清,在血清中加入等体积的 10% TCA 和 4 μL/mL 的正丁醇(内标物),再以 4 000 r/min 离心 5 min,取上清液供测定血清中乙醇浓度用。

将上述处理好的血清样品用气相色谱法测定乙醇的浓度,色谱条件:检测器:FID,温度 250 °C;DB-23 毛细管色谱柱:60 m×320 mm×25 μm,柱温 70 °C;流量:氢气 47 mL/min,空气 400 mL/min,氮气 1.5 mL/min。

1.2.5 凝胶过滤色谱分离 COP 色谱分离柱自装,填料为 Sephadex G-15,柱尺寸:60 cm×2.6 cm;洗脱液:超纯水;洗脱流速:1.0 mL/min;上样量:COP 15 mL(30 mg/mL);检测波长:220 nm。结合 SEPU3000 色谱工作站给出的色谱图,每 6 min 收集 1 管,按照分子量大小分为不同级分,将各级分经冷冻干燥后得到固形物,然后分别测定其体外醒酒活性,活性最强的级分用于后续进一步分离纯化。

1.2.6 制备型反相高效液相色谱分离纯化 将经冷冻干燥制得的 1.2.5 中活性最强的级分,用 Waters 2545 制备型高效液相色谱(RP-HPLC)进一步分离纯化。色谱柱为 Waters xBridge™ Prep C₁₈(250 mm×19 mm,5 μm);柱温为室温(20 °C 左右),进样量 500 μL,样品浓度 50 mg/mL,流动相流速 10 mL/min,紫外检测波长 220 nm;流动相:A 为乙腈(0.05% TFA),B 为超纯水(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。将集分经冷冻干燥后得到固形物,分别测定其 ADH 激活率。ADH 激活率按式(2)计算:

$$R = \frac{E_{\text{加肽}} - E_{\text{空白}}}{E_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

R——ADH 激活率, %;

$E_{\text{加肽}}$ ——玉米低聚肽组 ADH 酶活, U;

$E_{\text{空白}}$ ——空白组 ADH 酶活, U。

1.2.7 UPLC—Q—TOF—MS 分离分析 将 1.2.6 中体外醒酒活性最强的冻干组分, 经 UPLC—Q—TOF—MS 进一步分离分析。

(1) 液相条件: Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱仪, 色谱柱为 Waters xBridge™ BEH 130 C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 45 °C, 进样量 1 μL, 进样浓度 0.1 mg/mL, 流动相流速 0.3 mL/min, PDA 检测器, 流动相: A 为乙腈, B 为超纯水 (0.1% 甲酸); 洗脱条件: 0~1 min, 2% A; 1~23 min, 2% A~40% A; 23~25 min, 40% A~80% A; 25~26 min, 80% A; 26~30 min, 80% A~2% A。

(2) 质谱条件: Waters MALDI Synapt Q—TOF, 离子化方式 ESI⁺; 毛细管电压 3.0 kV; 取样锥孔电压 30 V; 离子源温度 100 °C; 脱溶剂温度 400 °C; 脱溶剂气流 500 L/h; 锥孔气流 50 L/h; 碰撞能量 6/25 V; 倍增器电压 1 800 V。

1.2.8 统计学处理 采用 SPSS 软件, 所有数据以平均值 (3 次重复) 或者以平均值 ± 标准差表示, 组间经 *t* 检和方差分析对试验结果进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 玉米低聚肽的理化指标

由表 1 可知, 通过比较可以发现自制玉米低聚肽的各项值均优于 QB/T 4707—2014 中的要求。

表 1 玉米低聚肽理化指标

Table 1 Physical and chemical indicators of corn oligopeptides %

来源	蛋白质 (干基)	低聚肽 (干基)	蛋白质水解物所占比例 (λ=220 nm) *	水分	灰分
测定值	85.09	74.07	95.62	4.10	2.61
QB/T 4707—2014 限值	80.00	70.00	85.00	7.00	8.00

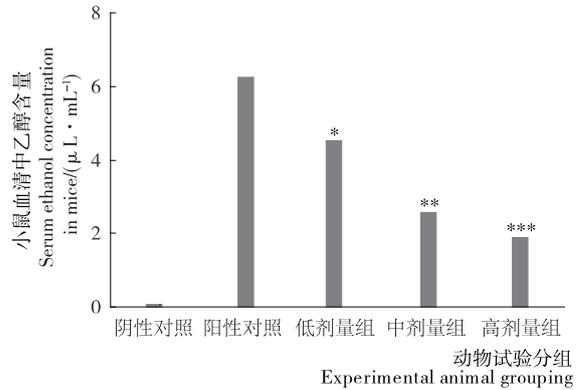
* 相对分子质量小于 1 000。

2.2 体外醒酒试验

经 ADH 活力测定, 自制玉米低聚肽 COP 的体外醒酒活性——ADH 激活率为 (41.73 ± 1.9)%, 优于市售某玉米低聚肽的 ADH 激活率 (35.69 ± 1.4)%, 说明自制的玉米低聚肽 COP 具有高效的体外醒酒活性。

2.3 玉米低聚肽醒酒动物试验

由图 1 可知, 与阳性对照组比较, 随着灌胃 COP 剂量的增加, 小鼠血清中乙醇含量不断降低, 当 COP 的剂量为 0.2 mg/g · BW 时, 小鼠血清中乙醇含量显著降低 (P < 0.05), 当 COP 的剂量为 0.4 mg/g · BW 时, 小鼠血清中乙醇含量极



*. 与阳性对照组比较差异显著 (P < 0.05) ** . 与阳性对照组比较差异极显著 (P < 0.01) *** . 与阳性对照组比较差异极显著 (P < 0.001)

图 1 不同剂量玉米低聚肽对小鼠血清中乙醇含量的影响

Figure 1 Effect of corn peptides on serum ethanol concentration in mice

显著降低 (P < 0.01), 当 COP 的剂量为 0.8 mg/g · BW 时, 乙醇含量降低达到极显著水平 (P < 0.001), 乙醇含量降低率达到 70.02%。通过动物试验表明, COP 在小鼠体内有高醒酒活性, 同时不难发现玉米低聚肽的剂量与小鼠血清中乙醇含量的降低呈现明显的量效关系。

2.4 凝胶过滤色谱分离分级

凝胶过滤色谱 (Sephadex G-15) 分离 COP 的洗脱曲线见图 2。按照分子量大小分为 5 个级分, 分别定义为 COP I、COP II、COP III、COP IV、COP V。5 个级分中 COP III 的体外醒酒活性最强, 其 ADH 激活率为 (37.82 ± 1.7) %。多次收集 COP III, 经旋转蒸发浓缩及冷冻干燥后得到固形物用于后续分离纯化。

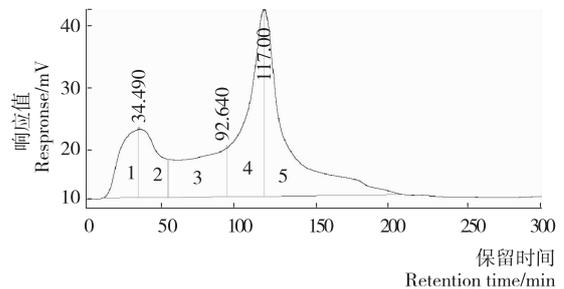


图 2 Sephadex G-15 分离 COP

Figure 2 Separation of COP by Sephadex G-15

2.5 制备型 RP—HPLC 分离分级

将经凝胶过滤色谱 (Sephadex G-15) 分离得到的活性较强级分 COP III 进一步进行反相色谱分离, 可分成如图 3 所示的 21 个级分。分别收集这 21 个级分, 经旋转蒸发浓缩及冷冻干燥后测定其体外醒酒活性, 结果见图 4。

由图 4 可知, 17 号级分的体外醒酒活性最高, 其 ADH 激活率为 (45.73 ± 2.3) %, 组分 14, 15, 16, 19, 20, 21 的 ADH 激活率均超过 25% ~ 40%。17 号级分用于下一步 UPLC—Q—TOF—MS 分析, 以期得到其氨基酸序列。

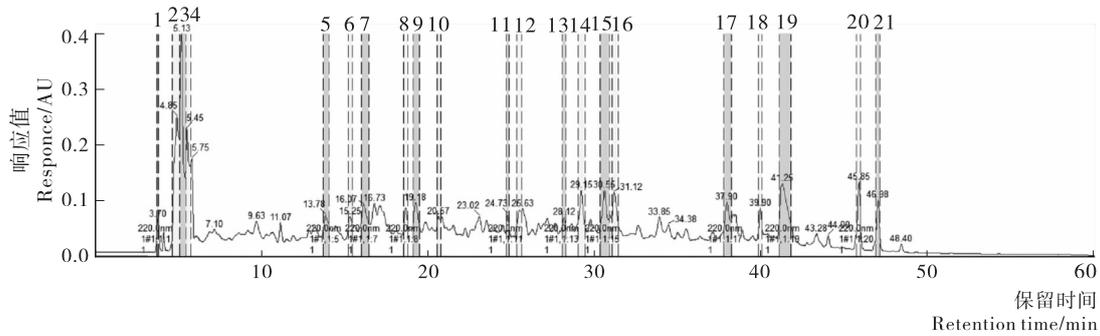


图3 制备反相高效液相分离 COP III 色谱图

Figure 3 The chromatogram of COP III separated by Preparative RP-HPLC

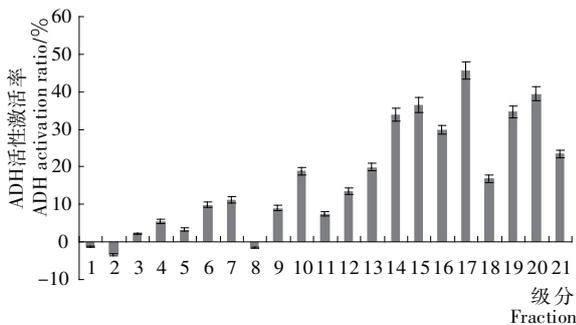


图4 反相高效液相分离组分的体外醒酒活性

Figure 4 The antialcoholism activity in vitro of the fractions separated by RP-HPLC

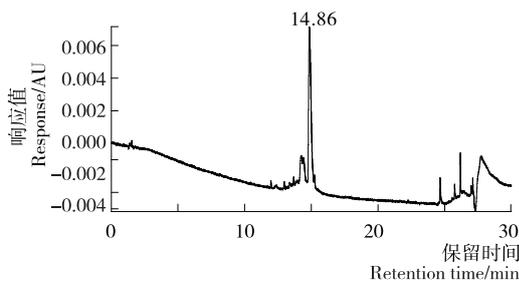


图5 COP III-17 级分的反相超高效液相色谱图

Figure 5 The RP-UPLC profile of COP III-17

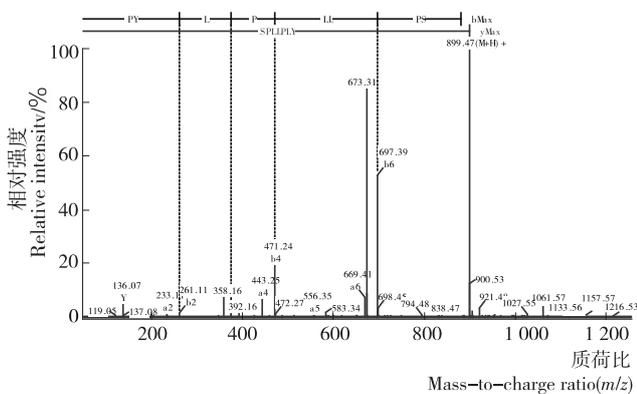


图6 COP III-17 主峰(RT=14.86)的 Q-TOF 二级质谱图 (m/z=899.5)

Figure 6 MS/MS spectrum of the major component of COP III-17

2.6 活性级分的氨基酸序列分析

将 17 号级分经 UPLC-Q-TOF-MS 分离分析,得到 UPLC-UV 图谱和其主成分 (RT=14.86 min) 的 Q-TOF 二级质谱图,见图 5、6。采用 Biolynx 软件对该主成分的碎片离子进行解析,得到其氨基酸序列为 P-Y-L-P-L-L-P-S,断裂模式见图 6。

3 结论

经体外 ADH 活性试验及动物试验表明,在本研究给出的水解条件下制得的玉米低聚肽产品 COP 具有较高的体内醒酒活性,COP 的剂量与小鼠血醇含量的降低呈现明显的剂量-效应关系。经 UPLC-Q-TOF-MS 分析,初步得到最强活性组分的分子量为 899.5,其氨基酸序列为:P-Y-L-P-L-L-P-S。本研究为进一步开发玉米蛋白资源及高醒酒活性玉米低聚肽产品提供了新的依据。

参考文献

- 1 Yamaguchi M, Takada M, Nozaki O, et al. Preparation of corn-peptide from corn gluten meal and its administration effect on alcohol metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 1996, 42 (3): 219~231.
- 2 Yamaguchi M, Takeuchi M, Ebihara K. Inhibitory effect of peptide prepared from corn gluten meal on 7,12-dimethylbenz[a] anthracene-induced mammary tumor progression in rats[J]. Nutrition Research, 1997, 17(7): 1 121~1 130.
- 3 Yamaguchi M, Nishikiori F, Ito M, et al. The effects of corn peptide ingestion on facilitating alcohol metabolism in healthy men[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1997, 61 (9): 1 474~1 481.
- 4 Zhang Feng, Zhang Jia-li, Li Yong. Corn oligopeptides protect against early alcoholic liver injury in rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(6): 2 149~2 154.
- 5 Yu Guo-cai, Lv Jie, He Hui, et al. Hepatoprotective effects of corn peptides against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice[J]. Journal of Food Biochemistry, 2012, 36(4): 458~464.
- 6 李晶. 玉米肽抗疲劳作用的实验研究[J]. 食品与机械, 2004, 20 (1): 11~12.

(下转第 221 页)

3 结论

本试验对 Alcalase 碱性蛋白酶酶解大豆蛋白过程进行优化,以水解度为指标,确定大豆多肽酶解的最佳工艺参数为:反应体系 pH 值 9.0,反应温度 55 °C,反应时间 3 h,大豆脱脂豆粕添加量 5%(m/V),Alcalase 碱性蛋白酶的添加量 2 000 U/g,该条件下水解度为 13.53%。本试验使得大豆蛋白水解度得到了较大提高,下一步将对大豆蛋白水解产物的生理功能与水解度之间的关系进行更深入的研究。

参考文献

- Naoki Izawa, Tomoko Hanamizu, Toshiro Sone. Effects of fermentation conditions and soybean peptide supplementation on hyaluronic acid production by *Streptococcus thermophilus* strain YIT 2084 in milk[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 10(4): 356~360.
- Huang Mei-gui, Zhang Xiao-ming, K Eric, et al. Inhibiting the color formation by gradient temperature-elevating Maillard reaction of soybean peptide-xylose system based on interaction of l-cysteine and Amadori compounds[J]. *Journal of Peptide Science*, 2012, 18(5): 342~349.
- Tokudome Yoshihiro. Effects of soybean peptide and collagen peptide on collagen synthesis in normal human dermal fibroblasts [J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2012, 63(6): 689~695.
- 兰欣怡, 张彬. 大豆多肽的研究进展[J]. *动物营养*, 2008(10): 19~22.
- 陶红丽, 朱志伟, 江津津. 大豆多肽生理活性研究进展[J]. *食品与机械*, 2007, 23(6): 133~136.
- Kamal Jangra, Sandeep Grover, Aman Aggarwal. Simultaneous optimization of material removal rate and surface roughness for WEDM of WC-Co composite using grey relational analysis along with Taguchi method[J]. *International Journal of Industrial Engineering Computations*, 2011, 2(3): 479~490.
- 王莉娟, 陶文沂. 脱脂豆粕制备高水解度大豆肽酶解条件的优化[J]. *食品与机械*, 2008, 24(1): 20~24.
- 张毅, 华欲飞, 孔祥珍, 等. Alcalase 酶解制备大豆肽工艺条件的优化[J]. *粮食与食品工业*, 2009, 16(6): 40~44.
- 邓聚龙. 灰色理论基础[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2002: 1~10.
- 周秀文. 灰色关联度的研究与应用[D]. 吉林: 吉林大学, 2011.
- 宋春宁, 杨瑞标. 蔗糖澄清工段糖浆色值影响因素的灰色关联分析[J]. *食品与机械*, 2013, 29(2): 28~31.
- Adeel H Suhail. Surface roughness identification using the grey relational analysis with multiple performance characteristics in turning operations[J]. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 2012, 37(4): 1 111~1 117.
- 王轩, 毕金峰, 刘璇, 等. 不同产地苹果脆片品质的灰色关联度分析[J]. *食品与机械*, 2012, 28(5): 51~54.
- 孙玉刚. 灰色关联分析及其应用的研究[D]. 南京: 南京航空航

- 天大学, 2007.
- 黄雅燕, 王文平, 肖美添. 碱性蛋白酶水解豆粕制备大豆多肽[J]. *华侨大学学报(自然科学版)*, 2013, 34(6): 674~677.
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 23527—2009 蛋白酶制剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- Angeles Saavedra, Elena Arce, Jose Luis Miguez, et al. Potential effect of uncertainty on the GRG interpretation[J]. *Grey Systems: Theory and Application*, 2013, 3(2): 121~128.
- 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.5—2010 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- 徐勤, 葛向阳, 刘建峰. 甲醛法测大豆蛋白水解度的改进[J]. *饲料工业*, 2008, 29(5): 46~47.
- 胥彩云, 童军茂, 周晓宏. 酶水解法提高大豆蛋白水解度的研究[J]. *食品与机械*, 2010, 26(1): 9~11.
- 陈敏. 双酶复合法提取大豆蛋白的工艺研究[D]. 西安: 西安科技大学, 2009.
- 赵庆政. 用酶法从脱脂豆粕中提取蛋白的探讨[J]. *食品工业科技*, 1982(4): 53~56.
- 张玲华, 唐小俊, 张宝玲. 大豆多肽制备工艺的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2001(3): 37~39.
- 陈新, 陈庆森, 庞广昌. 不同变性方式对 Alcalase AF2. 4L 酶解玉米蛋白水解度的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2005(2): 42~44.
- 马歌丽, 彭新榜, 卫军. 反应条件对酪蛋白水解度的影响[J]. *食品研究与开发*, 2007(1): 8~11.
- 张巧娥, 吴学荣, 马水鱼, 等. 奶牛产奶量与乳成分的多元回归分析[J]. *江西农业大学学报*, 2011, 33(1): 112~116.

(上接第 200 页)

- Li Jiang-tao, Zhang Jiu-liang, He Hui, et al. Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by corn peptides and its anti-tumor efficacy in H22 tumor bearing mice[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013(51): 297~305.
- Yang Yan-jun, Tao Guan-jun, Liu Ping, et al. Peptide with angiotensin I-Converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(19): 7 891~7 895.
- Ma Zhi-li, Zhang Wen-jun, Yu Guo-cai, et al. The primary structure identification of a corn peptide facilitating alcohol metabolism by HPLC—MS/MS [J]. *Peptides*, 2012, 37(1): 138~143.
- Madhusudhan M C, Raghavarao K S M S, Sanjay Nene. Integrated process for extraction and purification of alcohol dehydrogenase from Baker's yeast involving precipitation and aqueous two phase extraction [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 38(3): 414~420.
- 隋玉杰. 玉米肽的制备条件及其醒酒护肝机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.