

蚯蚓谷胱甘肽还原酶分离提取的研究

原琳,李娇,王有志,荣永海,荣龙

北京航空航天大学生物与医学工程学院,北京 100191

摘要:本研究利用闪式提取与超声提取相结合的方法从蚯蚓中提取纯化谷胱甘肽还原酶(GR),利用正交试验对提取条件进行了优化,并对GR的酶学性质进行了研究。结果表明,GR的最佳提取条件为:pH值7.5,料液比1:5,闪提时间45 s,超声时间15 min。提取的GR比活力达到655.9 U/mg pr.,纯化了32.3倍,回收率为58.4%。利用SDS-PAGE电泳测得蚯蚓GR的分子量为110 kDa。GR的最适pH值和温度分别为8.0和50℃。

关键词:蚯蚓;谷胱甘肽还原酶;闪提;纯化

中图分类号:Q814.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.10.016

Extraction and Purification of Glutathione Reductase from Earthworm *Eisenia fetida*

YUAN Lin, LI Jiao, WANG You-zhi, RONG Yong-hai, RONG Long*

Beihang University, School of Biological Science and Medical Engineering, Beijing 100191, China

Abstract: Glutathione reductase (GR) is an enzyme that plays important physiological role and widely distributes throughout organisms. GR catalyzes reaction to turn the oxidized glutathione (GSSG) into the reduced glutathione (GSH). In this study, GR was purified to electrophoretically homogeneous state from earthworm *Eisenia fetida*. The purification process involved flash extraction, ultrasonic extraction, acetone precipitation, ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. The results showed that the optimal extraction conditions determined by orthogonal experiments were: pH of 7.5, solid/liquid ratio of 1:5, extraction time of 45 s, and ultrasonic treatment time of 15 min. Under these conditions, GR was purified 32.3-fold to a specific activity of 655.9 U/mg pr., and was obtained with a yield of 58.4%. The molecular weight of the purified enzyme was estimated 110 kDa by SDS-PAGE. The optimal pH and temperature were 8.0 and 50 °C for GR.

Key words: earthworms; glutathione reductase; flash extraction; purification

蚯蚓(*Eisenia fetida*)属环节动物门寡毛纲类单向蚓目,具有水解碳水化合物和蛋白质的能力,可消化土壤中的落叶、褐藻、真菌等^[1]。目前,对蚯蚓的研究主要集中在其与土壤的相互作用方面^[2-4],而蚯蚓体内所含有的多种抗氧化酶未被充分开发利用。本实验室已完成了蚯蚓过氧化氢酶、超氧化物歧化酶以及谷胱甘肽过氧化物酶的分离提取研究^[5,6],此外,蚯蚓中还含有大量的谷胱甘肽还原酶。

谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase GR: EC 1.6.4.2)是一种重要的黄素蛋白酶,广泛存在于动、植物以及微生物中。GR的分子量为60~65 kDa,等电点(isoelectric point, pI)为4.5。GR为谷胱甘肽氧化还原系统的重要组成部分,可利用还原

型辅酶II(NADPH)将氧化型谷胱甘肽(GSSG)转变为还原型谷胱甘肽(GSH),以补充GSH在氧化应激状态下的不断消耗,使细胞内GSH与GSSG的比值维持在一个固定水平(GSH/GSSG=100/1)。同时,GR还可与超氧化物歧化酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶以及过氧化氢酶共同作用,清除体内的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)^[7],共同构成机体的抗氧化系统。当植物受到环境胁迫时(包括空气污染、强光、干旱、 γ -射线、冷胁迫、热胁迫、高压氧胁迫以及重金属等),体内会产生活性氧,GR酶活性就会相应升高,以抵抗氧化损伤。

闪式提取是一种新型的提取方法,其利用机械剪切力和超动分子渗透作用,可在极短时间内使目标提取物从细胞中释放出来,是一种高效节能的提取方法。此外,由于闪式提取在常温下操作,不会使生物活性物质受热破坏,因此,适合用于酶类的分离

提取。本研究创新性地将其应用于 GR 的提取分离。

目前,GR 的提取分离研究主要集中于植物,而蚯蚓中 GR 的研究还未见报道。本研究利用闪式提取与超声提取相结合的方法对蚯蚓中的谷胱甘肽还原酶进行了提取纯化,并对其性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜冻蚯蚓购自北京大环顺鑫有机肥料厂;DEAE Sepharose Fast Flow 琼脂糖凝胶层析柱由 GE Healthcare 生产;氧化型谷胱甘肽(L-Glutathione oxidized, GSSG)购自北京拜尔迪生物技术有限公司;还原型辅酶 II 四钠(NADPH Na₄)由德国 Roche 公司生产;考马斯亮蓝 G-250 由美国 Amresco 公司生产;SDS 聚丙烯酰胺电泳试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

1.2 仪器与设备

电子天平,意大利 BEL Engineering srl 公司;JH-BE-50 型闪式提取器,河南金鼎科技发展有限公司;

SY-1000E 型多用途恒温超声提取机,北京弘祥隆生物技术开发有限公司;900 型低温冰箱,Thermo Scientific 公司;HH-4 型数显恒温水浴锅,江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;Aranti™ J-25 型低温离心机,美国 Beckman Coulter 公司;3000 型分光光度计,美国 BIO-RAD 公司;DYY-7C 型电泳仪,北京市六一仪器厂;211 型 pH 计,意大利 HANNA 公司。

1.3 谷胱甘肽还原酶活性的检测

谷胱甘肽还原酶的活性利用其催化氧化型谷胱甘肽(GSSG)及还原型辅酶 II(NADPH)的性质来测定,采用杨伟宗等^[8]的方法。酶活性单位定义为每分钟消耗 1 μmol NADPH 的 GR 酶量。

1.4 蛋白质浓度的测定

蛋白质浓度由 Bradford 法测定,使用牛血清白蛋白作为蛋白标准品绘制标准曲线。标准曲线为 $A = 0.0082 + 0.0061C, R^2 = 0.9992$ 。

1.5 蚯蚓谷胱甘肽还原酶提取纯化的工艺

蚯蚓谷胱甘肽还原酶的提取与纯化工艺见图 1。

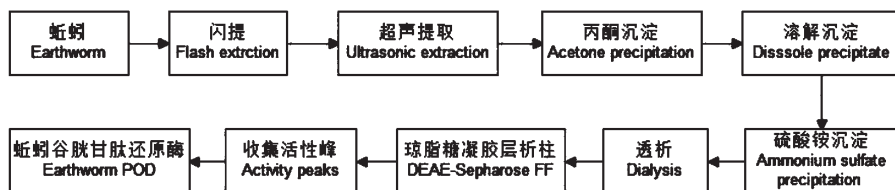


图 1 蚯蚓谷胱甘肽还原酶提取纯化工艺流程

Fig. 1 Extraction and purification process of earthworm GR

1.6 粗酶液的制备

称取 100 g 新鲜冻蚯蚓,剪碎。加入 4 倍体积缓冲液 A(pH 8.0,含 5 mmol/L EDTA 的 5 mmol/L PBS 缓冲液),以 3500 r/s 闪提 60 s,再以 800 W 功率超声提取 30 min。后在 -70 °C 冷冻 12 h,融化后以 11000 r/s 离心 40 min,弃去沉淀,上清液即为蚯蚓 GR 粗酶液。

1.7 谷胱甘肽还原酶提取条件的优化

1.7.1 闪式提取单因素试验

取 700 g 蚯蚓平均分成 7 份,分别加入 4 倍体积 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0,含 5 mmol/L EDTA 的 5 mmol/L PBS 缓冲液,以 3500 r/s 闪提 60 s,再以 800 W 功率超声提取 30 min。之后在 -70 °C 冷冻 12 h,融化后以 11000 r/s 离心 40 min,弃去沉淀,分别测上清液中的 GR 酶活,以考察闪提

pH 值(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)对蚯蚓 GR 提取总酶活的影响。

取 600 g 蚯蚓平均分成 6 份,分别按料液比 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7 加入不同体积的缓冲液 A,以 3500 r/s 闪提 60 s,再以 800 W 功率超声提取 30 min。后在 -70 °C 冷冻 12 h,融化后以 11000 r/s 离心 40 min,弃去沉淀,分别测上清液中的 GR 酶活,考察闪提料液比(1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7)对蚯蚓 GR 提取总酶活的影响。

取 500 g 蚯蚓平均分成 5 份,各加入 4 倍体积缓冲液 A,分别以 3500 r/s 闪提 30、45、60、75、90 s,再以 800 W 功率超声提取 30 min。后在 -70 °C 冷冻 12 h,融化后以 11000 r/s 离心 40 min,弃去沉淀,分别测上清液中的 GR 酶活,考察闪提时间(30、45、60、75、90 s)对蚯蚓 GR 提取总酶活的影响。

1.7.2 超声提取单因素试验

取 600 g 蚯蚓平均分成 6 份, 各加入 4 倍体积缓冲液 A, 以 3500 r/s 闪提 60 s, 再以 800 W 功率分别超声提取 0、15、30、45、60、75 min。后在 -70 °C 冷冻 12 h, 融化后以 11000 r/s 离心 40 min, 弃去沉淀, 分别测上清液中的 GR 酶活, 考察超声时间 (0、15、30、45、60、75 min) 对蚯蚓 GR 提取总酶活的影响。

1.7.3 正交试验

选取单因素试验中对蚯蚓 GR 总酶活影响较大的因素设计正交试验, 以进一步优化蚯蚓 GR 的提取条件。

1.8 谷胱甘肽还原酶的纯化

向粗酶液中缓慢加入 3 倍体积丙酮 (-20 °C 预冷), 在 -20 °C 下静置 1 h。以 11000 r/s 离心 40 min, 收集上清留待回收丙酮, 用适量缓冲液 A 溶解沉淀。向溶液中缓慢加入硫酸铵至饱和度达到 30%, 在 4 °C 下静置 2 h。以 11000 r/s 离心 40 min, 取上清, 在 4 °C 下对缓冲液 A 透析 2 h。将透析后的酶液过预先用缓冲液 A 平衡的琼脂糖凝胶层析柱 (2.5 cm × 30 cm)。用含 0.5 mol/L NaCl 的缓冲液 A 洗脱, 收集洗脱液, 即为纯化的 GR 酶液。

1.9 谷胱甘肽还原酶分子量的测定

谷胱甘肽还原酶的分子量由 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定。蛋白质条带用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.10 pH 值和温度对酶活性的影响

分别在不同的 pH 值下测定 GR 的活性, 其余条件同标准测定方法, 以研究 GR 的最适 pH 值。采用一系列缓冲液配制不同 pH 值的检测体系以测定最适 pH 值, 包括氯化钾-盐酸缓冲液 (pH 值 2.0)、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 值 3.0 ~ 5.0)、PBS 缓冲液 (pH 值 6.0 ~ 8.0)、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 值 9.0 ~ 10.0) 及碳酸钠-氢氧化钠缓冲液 (pH 值 11.0), 缓冲液浓度均为 0.1 mol/L。将纯化的 GR 酶液分别调至上述 pH 值, 在 37 °C 下水浴 2 h, 之后用标准检测方法测定其剩余活性, 以研究 GR 的酸碱稳定性。

GR 的最适温度利用标准方法分别在 20 ~ 80 °C 下测定。将纯化后的 GR 酶液分别在 20 ~ 80 °C 下水浴 2 h, 再以标准测定方法测该酶剩余活性, 以研究 GR 的热稳定性。

2 结果与讨论

2.1 GR 提取条件的优化结果

2.1.1 闪式提取单因素试验结果

闪提 pH 值对蚯蚓 GR 提取率的影响见图 2。pH 值由 6.0 逐渐增大时, 所提取的蚯蚓 GR 总酶活也随之逐渐增加, pH 增大到 7.5 时, GR 的总酶活达到最大。随着 pH 值继续增大, GR 的总酶活逐渐降低。因此, 选择 pH 7.5 作为闪提最佳 pH 值。

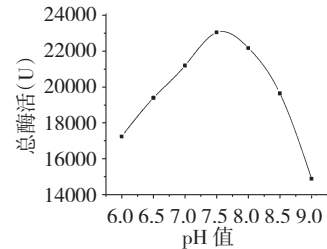


图 2 闪提 pH 值对谷胱甘肽还原酶总酶活的影响

Fig. 2 Effect of pH on the total activity of GR

闪提料液比对蚯蚓 GR 提取率的影响见图 3。加水倍数由 2 倍开始增加, 提取剂比例的增大使蚯蚓细胞内的物质释放更加充分, 所提取的蚯蚓 GR 总酶活也随之增加, 当料液比达到 1:5 时, 蚯蚓 GR 的总酶活达到最大值。之后, 随着加水比例的增大, GR 的总酶活反而呈下降趋势, 可能是原料被提取剂过度稀释后, 闪提的机械剪切机会减少, 使得提取效率降低。另外, 加水过多, 使提取出的 GR 被稀释, 提取液的离子强度降低, 导致 GR 失活。综上, 选择 1:5 作为闪提最佳料液比。

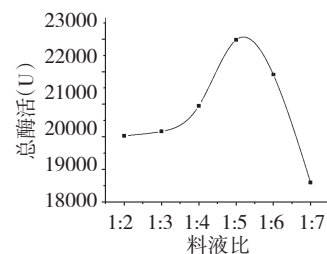


图 3 闪提料液比对谷胱甘肽还原酶总酶活的影响

Fig. 3 Effect of solid/liquid ratio on the total activity of GR

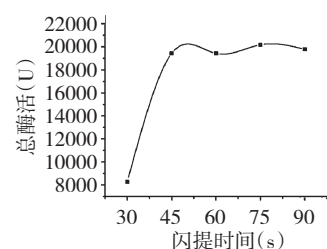


图 4 闪提时间对谷胱甘肽还原酶总酶活的影响

Fig. 4 Effect of extraction time on the total activity of GR

闪提时间对蚯蚓 GR 提取率的影响见图 4。闪提时间由 30 s 增加到 45 s 时, 蚯蚓 GR 总酶活显著增大, 但闪提时间继续增加, GR 总酶活基本保持不变。因此, 选择 45 s 作为最佳闪提时间。

2.1.2 超声提取单因素试验结果

超声时间对蚯蚓 GR 提取率的影响见图 5。超声波可将细胞破碎, 随着超声时间的增加, 蚯蚓 GR 总酶活也随着增加, 在 15 s 时, GR 总酶活达到最大值。但是, 超声时间超过 30 s 后, GR 总酶活反而随超声时间的增加而下降, 这可能是由于超声波的辐射及热能作用于酶蛋白, 会使其结构发生改变, 导致酶失活。综上, 选择 15 s 作为最优超声时间。

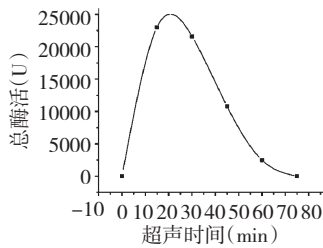


图 5 超声时间对谷胱甘肽还原酶总酶活的影响

Fig. 5 Effect of ultrasonic treatment time on the total activity of GR

2.1.3 正交试验结果

根据单因素实验的结果, 选择 pH 值、料液比及超声时间这个对提取率影响较大的因素设计正交试

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	A	B	C
	pH 值 pH value	料液比 Solid/liquid ratio	超声时间 Ultrasonic treatment time (min)
1	7.0	1:4	15
2	7.5	1:5	20
3	8.0	1:6	25

验, 各因素水平见表 1。

正交试验的结果见表 2。由结果可知, 各因素的最优组合为 $A_2B_2C_3$, 即最优条件为: pH 值 7.5, 料液比 1:5, 超声时间 25 min。由极差分析可知, 各因素对蚯蚓 GR 总酶活的影响大小顺序依次为 $B > A > C$ 。

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of $L_9(3^4)$ experimental design for the extraction of GR

试验号 No.	A pH 值 A pH value	B 料液比 B Solid/liquid ratio	C 超声时间 (min) C Ultrasonic treatment time	总酶活 (U) Total activity
1	1	1	1	16091
2	1	2	2	21543
3	1	3	3	18084
4	2	1	2	16098
5	2	2	3	23665
6	2	3	1	19006
7	3	1	3	15783
8	3	2	1	20532
9	3	3	2	14096
k_{ij}	18573	15991	18534	
k_{2j}	19590	21913	17246	
k_{3j}	16804	17062	19177	
R_j	2786	5922	1931	

正交试验的方差分析结果见表 3。由离差平方和可知, 对 GR 总酶活影响大小依次为 $B > A > C$, 与正交试验的结论一致。其中, 闪提料液比对蚯蚓 GR 提取率的影响显著 ($P < 0.05$), 其次为闪提 pH 值 ($P < 0.10$), 而超声时间对 GR 提取率的影响不显著, 因此, 为节约能源, 选择最低水平 15 min 作为最优超声时间。

综合以上分析, 确定蚯蚓 GR 提取的最优工艺条件为: pH 值 7.5, 料液比 1:5, 超声时间 15 min。

表 3 方差分析

Table 3 ANOVA of the GR extraction

方差来源 Source of variance	离差平方和 Square sum of deviations	自由度 df	均方 Mean Square	F
A pH 值 A pH value	11925446.00	2	5962723.00	11.28 *
B 料液比 B Solid/liquid ratio	59761170.66	2	29880585.33	56.55 **
C 超声时间 C Ultrasonic treatment time	5816788.67	2	2908394.33	5.50
误差 Error	1056818.67	2	528409.33	

注: * $P < 0.10$; ** $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.10$; ** $P < 0.05$.

2.2 谷胱甘肽还原酶的纯化结果

利用上述最优条件得到的蚯蚓 GR 提取纯化结果见表 4。最终,从蚯蚓中提取的谷胱甘肽还原酶纯化了 32.3 倍,回收率达到 58.4%。其他来源的 GR 与蚯蚓 GR 的比较情况见表 5。经比较可知,从

蚯蚓中提取纯化的 GR 具有更高的比活力,且用本研究所确定的提取方法能够保证相对较高的回收率,同时蚯蚓生物量极大,更易获得。因此,蚯蚓 GR 更适合于工业化生产。

表 4 蚯蚓谷胱甘肽还原酶纯化结果

Table 4 Purification results of GR

步骤 Step	总活性 Total activity (U)	比活 Specific activity (U/mg pr.)	纯化倍数 Purification (fold)	回收率 Recovery (%)
粗酶液 Crude extract	24482.6	20.3	1.0	100.0
丙酮沉淀 Acetone precipitation	20124.7	40.9	2.0	82.2
硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate precipitation	16990.9	100.0	4.9	69.4
琼脂糖凝胶层析柱 DEAE-Sepharose	14297.8	655.9	32.3	58.4

表 5 其他来源的谷胱甘肽还原酶与蚯蚓谷胱甘肽还原酶提取分离情况比较

Table 5 Comparison of purification of GR from earthworm with GR from other sources

来源 Sources	比活 Specific activity (U/mg pr.)	纯化倍数 Purification (fold)	回收率 Recovery (%)
蚯蚓 Earthworm	655.9	32.3	58.4
火鸡肝脏 Liver of turkey	606.67	2476	10.8
绵羊肝脏 Liver of sheep	47.27	1477	14.1
紫花苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	281	1222	-
红豆 <i>Adenanthera pavonina</i>	273	1948	-
鱼腥藻 <i>Anabeana</i>	249	-	-

2.3 SDS-PAGE 测定分子量结果

各步骤酶液的 SDS-PAGE 电泳结果见图 6。粗酶液中的大部分杂蛋白经丙酮沉淀及硫酸铵沉淀去除,而经过 DEAE-Sepharose 柱后,蚯蚓 GR 被纯化至单一条带。与 Marker 进行对照,可知蚯蚓 GR 的分子量大约为 110 kDa。

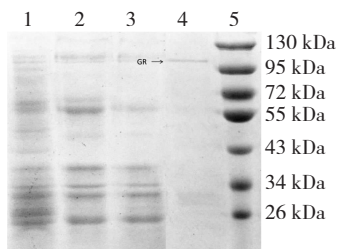


图 6 蚯蚓谷胱甘肽还原酶的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 6 SDS-PAGE pattern of the purified GR

注:1:粗酶液;2:丙酮沉淀溶解后;3:硫酸铵沉淀上清透析后;4:琼脂糖凝胶层析柱洗脱液;5:蛋白质标准

Note:1:Crude extract;2:Acetone precipitation;3:Ammonium sulfate precipitation;4:Purified GR;5:Protein marker

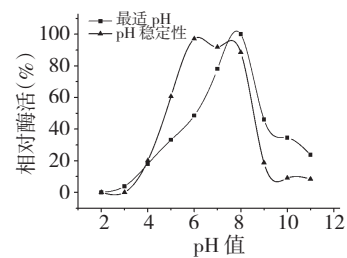


图 7 蚯蚓谷胱甘肽还原酶的最适 pH 值及酸碱稳定性

Fig. 7 Effects of pH on the activity and stability of earthworm GR

2.4 谷胱甘肽还原酶的最适 pH 值及酸碱稳定性结果

pH 值对蚯蚓 GR 活性的影响如图 7 所示。GR 在 pH 8.0 时相对酶活具有最大值,此与绵羊肝脏 GR 的最适 pH 相一致。在不同 pH 值下水浴 2 h 后,GR 酶活在 pH 6.0~8.0 之间可保持最大活性的 85% 以上,而在 pH 3.0 以下,GR 完全失活。

2.5 谷胱甘肽还原酶的最适温度及热稳定性

温度对蚯蚓 GR 活性的影响如图 8 所示。温度在 50 ℃ 时, 蚯蚓 GR 具有最大酶活性。这与孙虎山等^[9]对栉孔扇贝血液中 GR 的研究结果相同。温度在 40 ℃ 以下时, 水浴 2 h 后蚯蚓 GR 活性基本可保持稳定。50 ℃ 以上, GR 稳定性迅速下降, 2 h 后仅剩 50%。60 ℃ 以上水浴 2 h 后, GR 活性完全丧失。

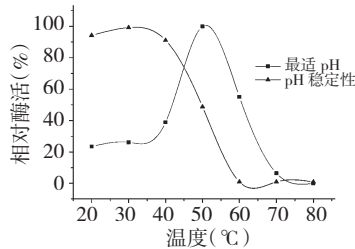


图 8 蚯蚓谷胱甘肽还原酶的最适温度及热稳定性

Fig. 8 Effects of temperature on the activity and stability of earthworm GR

3 结论

本研究实现了利用闪式提取与超声提取相结合的方法从蚯蚓中提取纯化 GR, 并对 GR 的性质进行了研究。纯化得到的 GR 分子量为 110 kDa。蚯蚓 GR 的最适 pH 及温度分别为 8.0, 50 ℃。利用蚯蚓提取纯化的 GR 比活力及收率与其他来源的 GR 相比均较高, 且蚯蚓较其他原料更易获取, 因此, 蚯蚓是生产 GR 的一种较好来源。本研究确立了一种高效的 GR 提取分离方法, 为未来 GR 的产业化生产创造了条件。

参考文献

- Ma JJ (马静静), Zhang W (张伟), Zheng B (郑彬), et al. Multiple-time addition of benzo[α]pyrene in soil declined its toxic effects on *Eisenia foetida* coelomocytes. *J Nanjing Agric Univ* (南京大学学报), 2014, 37: 77-82.
- He YS, Xu XY, Gao XL, et al. Response of SOD activity of earthworm to soil plumbum pollution. *Agric Sci Technol*, 2014, 02: 212-214.
- Dong WH (董炜华), Han DF (韩德复), Wu XW (吴祥文), et al. The growth and reproduction of earthworm in the different polluted soil. *J Changchun Normal Univ* (长春师范学院学报), 2013, 12: 92-95.
- Wang DD (王丹丹), Wu LJ (巫丽俊), Dai Y (戴莹), et al. Effects of earthworm on soil nutrients and Zn chemical forms in Zn contaminated soil. *Soil* (土壤), 2013, 06: 1048-1054.
- Liao Y (廖怡), Rong YH (荣永海), Rong L (荣龙). Combined extraction of superoxide dismutase and catalase from earthworm *Eisenia fetida*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 11: 1538-1544.
- Shang GN (商桂娜), Rong YH (荣永海), Rong L (荣龙). Extraction and purification of GSH-Px from earthworm. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 01: 76-82.
- Lin YX (林源秀), Gu XX (顾欣昕), Tang HR (汤浩茹). Characteristics and biological functions of glutathione reductase in plants. *Chin J Biochem Molecul Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2013, 06: 534-542.
- Yang WZ (杨伟宗), Yin YJ (殷怡静), Shen FN (沈斐纳), et al. Determination of activity of glutathione reductase from erythrocyte. *Chin J Clin Lab Sci* (临床检验杂志), 1988, 01: 11-12.
- Sun HS (孙虎山), Wang HN (王海娜), Wang YY (王宜艳). Study on activities of glutathione reductase in the haemolymph of *Chlamys farreri*. *Mar Sci Bull* (海洋通报), 2007, 06: 108-112.
- Bumsang K, Peppas NA. *In vitro* release behavior and stability of insulin in complexation hydrogels as oral drug delivery carriers. *Int J Pharm*, 2003, 266: 29-37.
- Berez B, et al. Stability of sunflower 2S albumins and LTP to physiologically relevant *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chem*, 2013, 138: 2374-2381.
- Fu YS (傅钰生), et al. Design and analysis of experiments (实验设计与分析). Beijing: Posts & Telecom Press, 2008: 152.
- Graff J, et al. Gastrointestinal mean transit times in young and middle-aged healthy subjects. *Clin Physiol*, 2001, 21: 253-259.
- Shi XJ (施祥杰), Zhou JP (周建平). Current advances in gastro-retentive drug delivery system. *Progr Pharm Sci* (药学进展), 2010, 34(2): 55-60.

(上接第 1841 页)

- Bumsang K, Peppas NA. *In vitro* release behavior and stability of insulin in complexation hydrogels as oral drug delivery carriers. *Int J Pharm*, 2003, 266: 29-37.
- Berez B, et al. Stability of sunflower 2S albumins and LTP to physiologically relevant *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chem*, 2013, 138: 2374-2381.
- Fu YS (傅钰生), et al. Design and analysis of experiments