

# 响应面法优化胃蛋白酶酶解瘤背石磺肌肉蛋白工艺参数

刁亚, 沈和定\*, 程知庆, 姚理想, 吴欣, 杜文俊

(上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 为了优化胃蛋白酶酶解瘤背石磺肌肉工艺参数, 以温度、pH、时间和液固比为试验因子, 以水解度为响应值, 在单因素试验的基础上, 根据 Box-Behnken 中心组合设计试验原理, 采用 4 因素 3 水平的响应面设计确定最佳工艺条件。结果表明, 最佳酶解工艺参数为温度 35℃, pH 1.5, 时间 2 h, 液固比 93 mL·g<sup>-1</sup>。经过验证, 实际水解度为 11.38%, 与理论值的 RSD 为 0.26%。

**关键词:** 瘤背石磺; 胃蛋白酶; 酶解; 响应面

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)03-0391-07

## Optimizing conditions for enzymolysis of *Onchidium struma* mantle protein using pepsin by response surface methodology

DIAO Ya, SHEN Hedding, CHENG Zhiqing, YAO Lixiang, WU Xin, DU Wenjun

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract:** To optimize the enzymolysis conditions of *Onchidium struma* mantle protein using pepsin, the effects of enzymolysis temperature, pH value, enzymolysis time and liquid-solid ratio on the hydrolysis rate were determined using the response surface methodology (RSM). The enzymolysis conditions were investigated based on a 4-variable, 3-level Box-Behnken central composite design on the basis of single factor. Results showed that the optimum technological conditions were: enzymolysis for 2 h at 35℃ and pH1.5 with the liquid-solid rate of 93 mL·g<sup>-1</sup>. The actual hydrolysis rate was 11.38%, which was 0.26% of the theoretical value of RSD.

**Key words:** *Onchidium struma*; peptin; enzymolysis; response surface methodology

瘤背石磺 (*Onchidium struma*)<sup>[1]</sup>, 又名海癞子、土鲍、土鸡等, 隶属软体动物门、腹足纲、肺螺亚纲、石磺科, 广泛的分布在江苏、上海、福建、广东、海南等地咸淡水交汇处的高潮带滩涂, 被认为是一种介于海洋与陆地之间的进化的贝类<sup>[2]</sup>。近年来国内外专家开始研究瘤背石磺的营养价值, 管菊<sup>[3]</sup>等发现瘤背石磺的蛋白质含量高于牡蛎, 黄金田<sup>[4]</sup>等发现瘤背石磺富含多种氨基酸和微量元素, 具有很高的营养价值, 与一般的植物蛋白相比更容易消化、吸收和利用, 营养价值也相对较高。当前国内外对于瘤背石磺的研究大多集中在生态习性, 繁殖和神经生理学, 而对于瘤背石磺的营养成分尤其是蛋白的研究还较少。

研究表明动物蛋白具有抗氧化<sup>[5-8]</sup>、抗肿瘤<sup>[9]</sup>、降血压<sup>[10-12]</sup>及调节免疫<sup>[13]</sup>等功能, 近年来研究人员开始采用酸法、碱法和酶法提取动物蛋白, 其中酶解法具有过程条件易控制、条件温和、成本低、效率高等优点, 已经广泛的应用在生产和科学研究中, 酶解法关键在于选择合适的酶, 通常所用酶有胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶等。其中胃蛋白酶是一种消化性蛋白酶, 作用的主要部位是芳香族氨基酸或酸性氨基酸的氨基所组成的肽键, 已经广泛的用于黄鲫<sup>[14]</sup>、草鱼<sup>[15]</sup>、大鲵<sup>[16]</sup>和鳕鱼<sup>[17]</sup>等海洋生物蛋白的水解。

本试验以采于上海崇明的瘤背石磺为材料, 采用胃蛋白酶酶解瘤背石磺肌肉蛋白, 考察温度、pH、

收稿日期: 2015-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41276157) 和上海高校水产学一流学科建设项目共同资助。

作者简介: 刁亚, 硕士研究生。E-mail: 1017970882@qq.com

\* 通信作者: 沈和定, 博士, 教授。E-mail: hdshen@shou.edu.cn

时间和液固比对水解度的影响,利用响应面试验优化工艺参数,以期获得最优酶解条件,旨在为瘤背石磺蛋白酶解液中活性物质进一步分离纯化和鉴定提供参考,为瘤背石磺资源深度加工提供理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

瘤背石磺采于上海崇明,平均体重为(17.81±3.29)g。解剖取内脏后,于4℃蒸馏水洗净,高速组织切碎机切碎,石油醚去脂8h后放入40℃恒温干燥箱中干燥12h备用。

胃蛋白酶(酶活力为 $1.2 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ):国药集团化学试剂有限公司;氢氧化钠、盐酸、无水乙醇、福林酚、甲醛等其他试剂均为国产分析纯;超纯水。

全自动定氮仪:K12A,上海晟声自动化分析仪器有限公司;双列六孔恒温水浴锅:HWS-26,上海慧泰仪器制造有限公司;电子分析天平:AL104,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;pH计:UB-7,上海皖宁精密科学仪器有限公司;组织切碎机:QSJ-D162,广东小熊电器有限公司;低速台式离心机:TDZ6B-WS,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;紫外可见分光光度计:UV-7502PC,上海精密仪器有限公司。

### 1.2 方 法

**1.2.1 制备工艺** 准确称取瘤背石磺样品1g,置于三角烧瓶中,按一定的液固比(水与固体的比例,下同)加入蒸馏水,调整pH和温度,同时加入胃蛋白酶酶解(酶解过程中不断加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NaOH和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的HCl调整溶液pH),反应结束后100℃灭活10min,离心取上清液( $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,

15min)测定水解度。

**1.2.2 酶活力的测定** 用Folin-酚法测定蛋白酶活力<sup>[18]</sup>。

**1.2.3 水解度的计算** 总氮含量测定采用微量凯氏定氮法(GB/T5009.5-2010)<sup>[19]</sup>,氨基酸态氮含量采用甲醛电位滴定法测定<sup>[20]</sup>,水解度的计算:

$$DH = \frac{M_1}{M_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:DH—水解度,%; $M_1$ —水解液中氨基态氮的含量,g; $M_2$ —样品总氮的含量,g。

**1.2.4 单因素试验** 在pH为2.0、时间2h、液固比 $100 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 不变的条件下,控制水解温度分别为25、30、35、40、45和50℃,进行单因素试验,考察温度对水解度的影响。

在温度35℃、时间2h、液固比 $100 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 不变的条件下,控制水解pH值分别为1.0、1.5、2.0、2.5、3.0和3.5,进行单因素试验,考察pH对水解度的影响。

在温度35℃、pH为2.0、液固比 $100 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 不变的条件下,控制水解时间分别为1、2、3、4、5和6h,进行单因素试验,考察时间对水解度的影响。

在温度35℃、pH为2.0、时间2h不变的条件下,控制液固比分别为70:1、80:1、90:1、100:1、110:1和120:1 $\text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ ,进行单因素试验,考察液固比对水解度的影响。

**1.2.5 响应面试验设计** 在单因素试验基础上,根据Box-Behnken Design设计原理,选取温度A、pH B、时间C和液固比D4个因素,以水解度为响应值,设计4因素3水平的中心组合试验。试验因素与水平设计见表1。

表1 Box-Behnken中心组合设计水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken central composite design

水平 Level	因素 Factor			
	A: 温度/℃ Temperature	B: pH pH value	C: 时间/h Enzymolysis time	D: 液固比/ $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ Liquid-solid rate
-1	30	1.0	1	80
0	35	1.5	2	90
1	40	2.0	3	100

**1.2.6 数据分析** 每个试验点平行3次,用Excel数据处理软件求出平均值和标准误差。用SPSS分析软件进行单因素方差分析和显著性检验,利用Design expert 8.0.5.0软件进行响应面数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素结果分析

**2.1.1 温度的确定** 由图1可以看出,温度在25~

35℃时,水解度随着温度的上升而逐渐增加;当温度达到35℃时,水解度达到最大值8.18%;温度继续上升,水解度开始下降;温度的升高可以提高酶的活性,但是超过一定的温度,可能开始影响酶的结构和活性<sup>[21]</sup>,造成水解度的下降,因此选择35℃作为酶解的合适温度。

**2.1.2 pH的确定** 由图2可以看出,当pH在1~1.5时,蛋白水解度的增高趋势随pH的升高迅速增

加, 显然, 这是因为胃蛋白酶对酸性条件有较强的适应能力<sup>[22]</sup>, 但是随着 pH 继续升高, 水解度开始下降, 由于此时 pH 逐渐超过了胃蛋白酶最适范围, 酶活受到损失, 水解度故而下降。

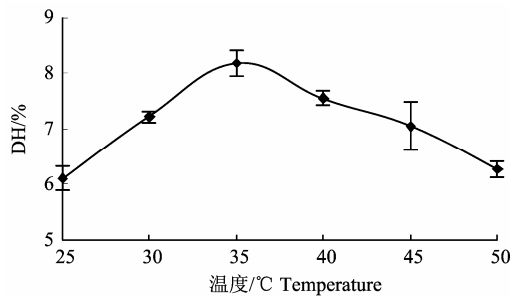


图 1 温度对水解度的影响

Figure 1 Effect of temperature on the hydrolysis rate

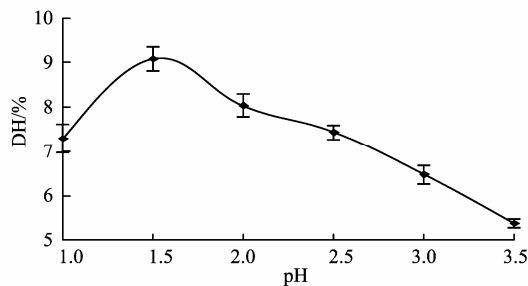


图 2 pH 对水解度的影响

Figure 2 Effect of pH value on the hydrolysis rate

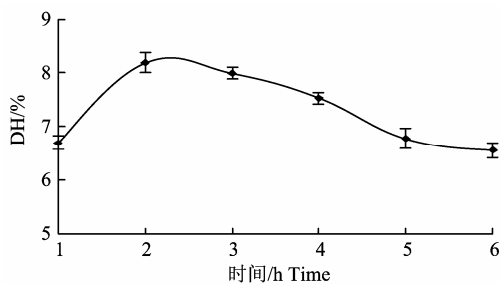


图 3 时间对水解度的影响

Figure 3 Effect of time on the hydrolysis rate

**2.1.3 时间的确定** 由图 3 可以看出, 水解度会随着时间的延长而增大, 水解曲线呈快速上升后缓慢下降的趋势, 当时间达到 2 h 时, 酶与蛋白质基本反应结束, 达到了动态平衡, 继续延长时间, 酶的活性开始逐渐下降, 产物抑制作用增强, 导致水解度下降<sup>[18]</sup>。因此最适时间为 2 h。

**2.1.4 液固比的确定** 由图 4 可看出, 随着液固比的增加, 水解度不断提高。当液固比为 90 mL·g<sup>-1</sup> 时, 水解度到一个较大值; 而随着液固比的继续增大, 可能由于底物浓度下降, 酶与底物接触的几率

减小, 水解度开始下降<sup>[18]</sup>。因此为了考虑生产需要, 选择液固比为 90 mL·g<sup>-1</sup> 较为适宜。

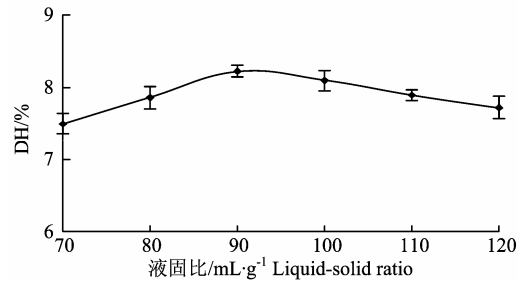


图 4 液固比对水解度的影响

Figure 4 Effect of liquid-solid ratio on the hydrolysis rate

## 2.2 响应面结果分析

**2.2.1 响应面试验结果** 根据表 1 方案进行试验, 方案及结果见表 2, 利用 Design Expert 软件对所得数据进行分析, 对各因素回归拟合后, 得到回归方程为:

$$DH/\% = -142.81183 + 5.24497A + 12.17700B + 2.57900C + 1.04897D + 0.03200AB + 0.02000AC + 4.45000 \times 10^{-3}AD + 0.04000BC - 0.05850BD + 0.04700CD - 0.08089A^2 - 2.52900B^2 - 1.78850C^2 - 6.56000 \times 10^{-3}D^2$$

**2.2.2 方差分析** 经整理, 该拟合的二次回归模型及各项方差分析结果如下表 3 所示。此模型的决定系数  $R^2$  为 0.9888, 线性关系显著; 模型的调整确定系数  $R^2_{Adj}$  为 0.9776, 能较好地解释模型的变化。一次项中 A、B、C、D 的回归系数极显著, 说明温度、pH、时间和液固比对蛋白水解度有极显著影响; 交互项 BD、CD 的偏回归系数极显著, 说明 pH 和液固比、时间和液固比的交互项对蛋白水解度有极显著影响; 交互项 AD 的偏回归系数显著, 即温度和液固比的交互项对蛋白水解度有显著影响。4 个二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  的偏回归系数达到极显著水平。回归方差分析显著性检验结果表明, 该模型回归极显著, 且失拟项不显著 ( $P = 0.1728 > 0.05$ ), 说明该方程对试验拟合较好, 说明试验误差小, 可以用此模型对胃蛋白酶酶解瘤背石磺肌肉蛋白进行分析和预测。

**2.2.3 回归模型优化** 由于交互项中 AB、AC 和 BC 对水解度的影响并不显著, 因此采用手动优化方法对回归模型再一次进行优化, 优化结果见表 4。

经过手动优化后的回归模型方程为:

$$DH/\% = -146.01183 + 5.33297A + 13.37700B + 3.33900D + 1.04897D + 4.45000 \times 10^{-3}AD - 0.05850BD + 0.04700CD - 0.08089A^2 - 2.52900B^2 - 1.78850C^2 -$$

$6.56000 \times 10^{-3} D^2$

由表 4 可知, 优化后的模型  $P$  值为  $<0.0001$   $<0.01$ , 说明模型极显著, 同时失拟项不显著 ( $P=0.2058 > 0.05$ ), 优化后该模型的确定系数  $R^2$  为

0.9874, 模型的调整确定系数  $R^2_{Adj}$  为 0.9792, 说明该模型与实验拟合较好, 自变量与响应值之间线性关系显著, 可用于该反应的理论推测。

表 2 试验方案与结果

Table 2 Testing program and the results

试验编号 No.	温度/ $^{\circ}\text{C}$	pH	时间/h	液固比/ $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$	水解度/% Degree of hydrolysis
	Temperature A	pH value B	Time C	Liquid-solid ratio D	
1	-1	-1	0	0	8.02
2	1	-1	0	0	8.45
3	-1	1	0	0	8.66
4	1	1	0	0	9.41
5	0	0	-1	-1	8.30
6	0	0	1	-1	8.44
7	0	0	-1	1	8.31
8	0	0	1	1	10.33
9	-1	0	0	-1	8.21
10	1	0	0	-1	8.55
11	-1	0	0	1	8.24
12	1	0	0	1	9.47
13	0	-1	-1	0	8.41
14	0	1	-1	0	8.61
15	0	-1	1	0	9.10
16	0	1	1	0	9.38
17	-1	0	-1	0	6.89
18	1	0	-1	0	7.45
19	-1	0	1	0	7.37
20	1	0	1	0	8.33
21	0	-1	0	-1	9.28
22	0	1	0	-1	10.40
23	0	-1	0	1	10.25
24	0	1	0	1	10.20
25	0	0	0	0	11.10
26	0	0	0	0	11.36
27	0	0	0	0	11.27
28	0	0	0	0	11.33
29	0	0	0	0	11.45

方差分析中各因素的  $F$  值可以反映各因素对于实验指标的影响大小,  $F$  越大, 影响效果越大。从方差分析表可知,  $F_c(58.73) > F_a(43.18) > F_d(31.03) > F_b(23.5)$ , 因此各因素对于瘤背石磺肌肉蛋白水解度的影响大小顺序依次是: 时间 (C)  $>$  温度 (A)  $>$  液固比 (D)  $>$  pH (B)。

**2.2.4 响应面曲面分析** 根据回归方程做出响应面, 考察拟合响应曲面的形状, 通过模型方程所作的响应曲面图, 可直观地描述各因素对水解度的影

响和各个因素间的交互作用。结果见图 5、图 6 和图 7。等高线形状可以反映考察因素交互作用的强弱, 若为圆形则表示其交互效应不显著, 椭圆形则表示显著<sup>[23]</sup>。从图 5、图 6 和图 7 的响应面和等高线可以看出温度和液固比的交互作用, pH 与液固比的交互作用、时间与液固比的交互作用等高线图均为椭圆形, 因此温度和液固比的交互作用, pH 与液固比的交互作用、时间与液固比的交互作用均显著。

表 3 回归方程方差分析

Table 3 Analysis results of regression and variance

方差来源 Variance source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F	P 值 Pr>F	显著性 Significance
模型 Model	46.84	14	3.35	88.2	< 0.0001	**
A	1.52	1	1.52	40.06	< 0.0001	**
B	0.83	1	0.83	21.8	0.0004	**
C	2.07	1	2.07	54.49	< 0.0001	**
D	1.09	1	1.09	28.79	< 0.0001	**
AB	0.026	1	0.026	0.67	0.4251	
AC	0.04	1	0.04	1.05	0.3219	
AD	0.2	1	0.2	5.22	0.0384	*
BC	1.60×10 <sup>-3</sup>	1	1.60×10 <sup>-3</sup>	0.042	0.8402	
BD	0.34	1	0.34	9.02	0.0095	**
CD	0.88	1	0.88	23.29	0.0003	**
A <sup>2</sup>	26.53	1	26.53	699.33	< 0.0001	**
B <sup>2</sup>	2.59	1	2.59	68.36	< 0.0001	**
C <sup>2</sup>	20.75	1	20.75	547	< 0.0001	**
D <sup>2</sup>	2.79	1	2.79	73.59	< 0.0001	**
残差 Residual	0.53	14	0.038			
失拟项 Lack of fit	0.46	10	0.046	2.73	0.1728	
纯误差 Pure error	0.068	4	0.017			
总误差 Overall error	47.37	28				

模型的确定系数  $R^2=0.9888$ , 模型的调整确定系数  $R^2Adj=0.9776$

Determining coefficient of the model ; Adjusted determining coefficient of the model

注: “\*”为显著 ( $P<0.05$ ), “\*\*”为极显著 ( $P<0.01$ )。下同。

Note: “\*”means the difference is significant at the 0.05 level, “\*\*”means the difference is significant at the 0.01 level. The same below.

表 4 去掉交互项 AB、AC 和 BC 后的优化结果

Table 4 The optimization results of excluding AB,AC and BC

方差来源 Variance source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F	P 值 Pr>F	显著性 Significance
模型 Model	46.77	11	4.25	120.83	< 0.0001	**
A	1.52	1	1.52	43.18	< 0.0001	**
B	0.83	1	0.83	23.5	0.0002	**
C	2.07	1	2.07	58.73	< 0.0001	**
D	1.09	1	1.09	31.03	< 0.0001	**
AD	0.2	1	0.2	5.63	0.0298	*
BD	0.34	1	0.34	9.72	0.0063	**
CD	8.80×10 <sup>-1</sup>	1	8.80×10 <sup>-1</sup>	25.11	0.0001	**
A <sup>2</sup>	26.53	1	26.53	753.8	< 0.0001	**
B <sup>2</sup>	2.59	1	2.59	73.68	< 0.0001	**
C <sup>2</sup>	20.75	1	20.75	589.61	< 0.0001	**
D <sup>2</sup>	2.79	1	2.79	79.32	< 0.0001	**
残差 Residual	0.6	17	0.035			
失拟项 Lack of fit	0.53	13	0.041	2.4	0.2058	
纯误差 Pure error	0.068	4	0.017			
总误差 Overall error	47.37	28				

模型的确定系数  $R^2=0.9874$ , 模型的调整确定系数  $R^2Adj=0.9792$

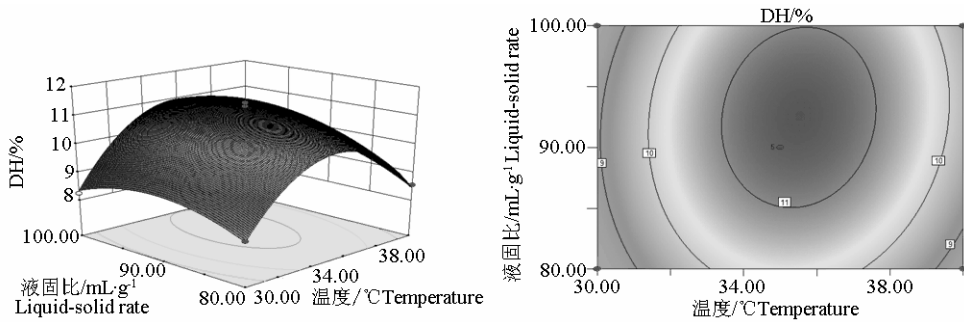


图 5 温度和液固比及其交互作用对蛋白水解度影响的响应曲面和等高线

Figure 5 Responsive surfaces and contour showing the effects of temperature and liquid-solid ratio and their interaction to the degree of hydrolysis

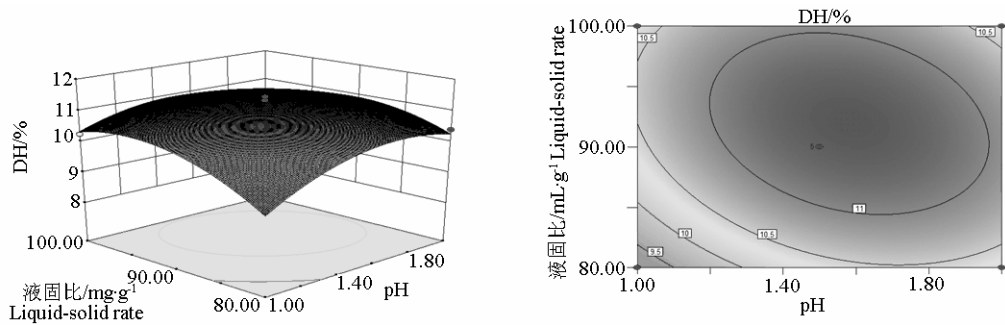


图 6 pH 和液固比及其交互作用对蛋白水解度影响的响应曲面和等高线

Figure 6 Responsive surfaces and contour showing the effects of pH value and liquid-solid rate and their interaction to the degree of hydrolysis

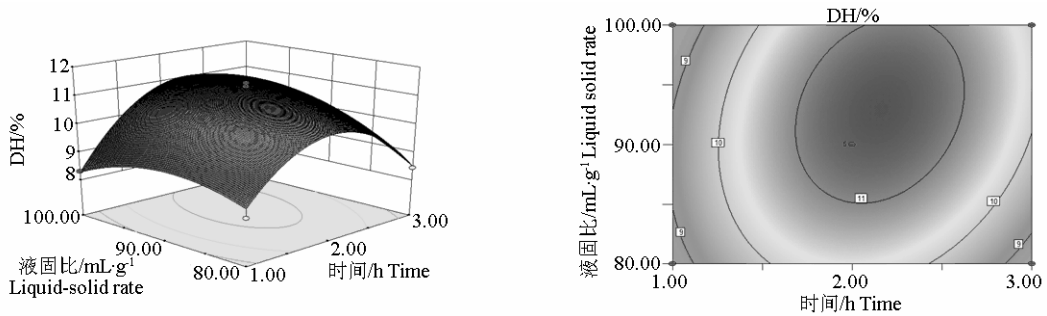


图 7 时间和液固比及其交互作用对蛋白水解度影响的响应曲面和等高线

Figure 7 Responsive surfaces and contour showing the effects of time and liquid-solid ratio and their interaction to the degree of hydrolysis

从图 5 曲面图的形状可知, 随着液固比和温度的增加, 水解度先升高, 达到最高点后, 又逐渐降低, 说明液固比和温度过高或过低都不能使水解度达到最大值, 只有取某个中间值时, 才可使水解度达到最大; 从图 6 可知, 当 pH 处于较低水平时, 随着液固比的提高, 水解度先快速上升后下降, 上升幅度较大, 当 pH 处于较高水平时, 水解度上升后下降, 上升幅度较小; 而液固比一定时, 水解度随着 pH 的提高先升高后降低; 从图 7 可知, 随着时间和液固比的增加, 水解度先迅速增加然后开始下降, 这也就说明所要寻找的最适时间和最适液固比都在设定的试验范围内。

**2.2.5 验证试验** 对试验模型进行分析可得胃蛋白酶酶解瘤背石磺肌肉蛋白的最佳理论工艺条件为: 温度 35.51℃, pH 1.57, 时间 2.15 h, 液固比 92.69 mL·g<sup>-1</sup>, 此条件下蛋白水解度为 11.41%。考虑到实际经济操作的可行性, 对所得工艺条件修正为: 温度 35℃, pH 1.5, 时间 2 h, 液固比 93 mL·g<sup>-1</sup>。采用此工艺条件进行验证实验, 实际测得蛋白水解度为 11.38%, 与理论值 RSD 为 0.26%, 说明采用响应面法得到的工艺参数可靠, 具有一定的实用价值。

### 3 结论

本试验在单因素的基础上, 采用响应面法优化

了胃蛋白酶酶解瘤背石磺肌肉蛋白的工艺参数, 根据优化条件进行了验证试验, 在温度 35℃, pH 1.5, 时间 2 h, 液固比 93 mL·g<sup>-1</sup>。在此条件下重复试验 3 次得到的平均水解度为 11.38%, 试验值与理论值较接近, RSD 为 0.26%。说明用响应面法优化胃蛋白酶酶解瘤背石磺肌肉蛋白工艺试验设计可靠, 对瘤背石磺的研究具有理论指导意义和实用价值。

### 参考文献:

- [1] 孙变娜, 沈和定, 吴洪喜, 等. 崇明岛瘤背石磺的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014(7): 987-989; 1050.
- [2] 孙变娜, 沈和定. 浅议瘤背石磺酶解多肽开发前景[J]. 生物技术世界, 2013(8): 2.
- [3] 管菊, 沈和定, 钱静, 等. 四种石磺营养成分分析及价值评价[J]. 食品工业科技, 2013(17): 349-353; 364.
- [4] 黄金田, 王爱民. 瘤背石磺营养成分分析及品质评价[J]. 海洋科学, 2008, 32(11): 29-35.
- [5] 周成, 邬应龙, 夏晓杰, 等. 响应面法优化齐口裂腹鱼肉蛋白酶解工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2014(2): 192-196.
- [6] 黄艳青, 赵建明, 龚洋洋, 等. 鲑鱼头蛋白酶水解物的抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(2): 121-126.
- [7] 王帅, 钟立成, 尹冬冬, 等. 鹿血清蛋白抗氧化肽体外抗氧化性及其机理研究[J]. 经济动物学报, 2014(2): 96-99; 103.
- [8] 郑慧, 逯良忠, 孙小红, 等. 鱼蛋白资源综合利用研究现状[J]. 粮食与食品工业, 2014(4): 70-74; 78.
- [9] 徐跃, 岳继萍, 杨仙玉. 无尾两栖类抗肿瘤肽的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2014(5): 587-592.
- [10] 杜磊, 方明, 吴洪喜, 等. 酶解星虫水溶性蛋白制备降血压肽的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2013(8): 187-191.
- [11] 刘小红, 李诚, 付刚, 等. 猪股骨头胶原蛋白降血压肽的分离纯化[J]. 食品科学, 2014, 35(6): 50-54.
- [12] 陈胜军, 李来好, 曾名勇, 等. 罗非鱼鱼皮胶原蛋白降血压酶解液的制备与活性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 229-233.
- [13] 郭淼, 崔犁, 翟梦新, 等. 林蛙油蛋白中性蛋白酶水解物促进脾细胞和巨噬细胞功能[J]. 食品工业科技, 2014(1): 345-348.
- [14] 宋茹, 汪东风, 谢超, 等. 黄鲫胃蛋白酶酶解液体外抗氧化、抑菌作用研究[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 127-131.
- [15] 申锋, 杨莉莉, 熊善柏, 等. 胃蛋白酶水解草鱼鱼鳞制备胶原肽的工艺优化[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(3): 387-391.
- [16] 顾赛麒, 李莉, 王锡昌, 等. 人工养殖大鲵皮胶原蛋白的性质研究[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 74-79.
- [17] 王希, 钟耀广, 市川寿. 响应面优化超声波快速提取鳕鱼皮中胶原蛋白的工艺研究[J]. 东北农业大学学报, 2014(7): 117-123.
- [18] 周成, 邬应龙, 夏晓杰, 等. 响应面法优化齐口裂腹鱼肉蛋白酶解工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2014(2): 192-196.
- [19] 汤务霞, 冯程, 韩艳. 响应面法优化碱性蛋白酶提取菜籽饼中可溶性蛋白质的研究[J]. 食品工业科技, 2012(11): 179-182; 186.
- [20] 中华人民共和国卫生部 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.39-2003, 酱油卫生标准的分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [21] 姚笛, 马萍, 王颖, 等. 响应面法优化玉米芯中木聚糖的提取工艺[J]. 食品科学, 2011, 23(8): 111-115.
- [22] 胡耀辉. 食品生物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [23] Kiran B, Kaushik A, Kaushik C P. Response surface methodological approach for optimizing removal of Cr (VI) from aqueous solution using immobilized cyanobacterium[J]. Chemical Engineering Journal, 2007, 126(23): 147-153.