

瘤背石磺肌肉酶解工艺优化

Optimization on enzymolysis processing for muscle of *Onchidium struma*

刁亚 沈和定 程知庆 姚理想

DIAO Ya SHEN He-ding CHENG Zhi-qing YAO Li-xiang

(上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

(College of Aquaculture and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

摘要:为了研究胰蛋白酶酶解瘤背石磺肌肉的最佳工艺,在单因素试验的基础上,通过响应面试验法和正交试验法比较最佳条件和蛋白提取率。结果表明:响应面试验法的最佳工艺条件为酶解温度 44 °C,酶解时间 2.3 h, pH 9.0, 液固比 92:1(V:m);而正交试验法的最佳工艺条件为酶解温度 45 °C,酶解时间 2 h, pH 9.0, 液固比 90:1(V:m), 两种方法所得到的蛋白提取率分别为 8.74% 和 8.51%。

关键词:瘤背石磺;蛋白;酶解;响应面法;正交试验法

Abstract: The optimal enzymolysis processing for *Onchidium struma* muscle protein extraction by trypsin was investigated by response surface methodology and orthogonal design on the basis of single factor. The results showed that the optimum enzymolysis processing conditions via response surface methodology were as followed: enzymolysis temperature 45 °C, enzymolysis time 2.3 h, pH value 9.0 and liquid-solid rate 92:1(V:m). And by the Orthogonal design, were enzymolysis temperature 45 °C, enzymolysis time 2 h, pH value 9.0 and liquid-solid rate 90:1(V:m). The extraction protein rates by these of two methods were 8.74% and 8.52% respectively.

Keywords: *Onchidium struma*; protein; enzymolysis; response surface methodology; orthogonal design

瘤背石磺(*Onchidium struma*)是一种具有重要经济价值和营养价值的贝类,它属于软体动物门、腹足纲、肺螺亚纲、缩眼目。常生活在咸淡水交汇处的高潮带滩涂,俗称海癞子、土鸡、土海参等^[1]。瘤背石磺的出肉率很高,肌肉中富含蛋白质。管菊等^[2]发现瘤背石磺肌肉中粗蛋白含量高达 55% 以上,是极好的蛋白质来源。当前国内外对于瘤背石磺的研究主要集中在神经、繁殖等领域^[3],对于其体内活性物

质如蛋白质、多肽等研究仍较少。近些年的研究发现动物蛋白具有抗衰老、抗肿瘤、调节免疫等生理功能^[4-6]。Khodabandeh 等^[7]从石磺的卵细胞中分离得到的一种对乳腺癌细胞有一定抗癌活性的蛋白质。目前动物蛋白提取的方法主要有酸法、碱法和酶法^[3],其中酶法提取因反应条件温和、无不良反应且进程易控制,已成为当今研究的热点^[8-10]。

为了提高蛋白的提取率,需要对其提取工艺条件进行优化,而响应面法或正交试验是常用的试验优化设计方法^[11],如鲁宁等^[12]利用响应面法对鸡胸软骨胶原蛋白水解工艺进行了优化;曹文红等^[13]利用正交试验优化青鳞鱼酶解工艺参数等。在工艺优化过程中,正交试验能够较全面考察多因素多水平,它的优点在于方法简便,试验次数较少,实施较为简单,但无法确定整个区域上因素的最优条件与响应值,与实际情况可能存在偏差^[14]。而响应面法的优点在于建模快速,试验精确度高,预测性更好。但是响应面法也有一定的局限性,如果试验点选取不当,也无法找到最优条件^[15]。

为了避免工艺优化试验的盲目性和随意性,本试验拟采用响应面法^[16,17]和正交试验法^[18,19]对瘤背石磺肌肉蛋白酶解提取工艺优化进行比较研究,探讨两种方法对瘤背石磺肌肉蛋白提取工艺的差别,旨在节约蛋白资源以及瘤背石磺的综合开发利用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

瘤背石磺:采于上海崇明堡镇菜市场;
胰蛋白酶:4×10³ U/g,国药集团化学试剂有限公司;
石油醚、无水乙醇、盐酸等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 试验仪器

全自动凯氏定氮仪:K12A 型,上海晟声分析仪器有限公司;

电子分析天平:AL104 型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

pH 计:UB-7 型,上海精密科学仪器有限公司;

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:41276157)

作者简介:刁亚(1990—),男,上海海洋大学在读硕士研究生。

E-mail:1017970882@qq.com

通讯作者:沈和定

收稿日期:2015-05-01

紫外可见分光光度计:UV-7502PC型,上海精密仪器有限公司;

低速台式离心机:TDZ6B-WS型,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;

双列六孔恒温水浴锅:HWS-26型,上海慧泰仪器制造有限公司;

电热恒温干燥箱:DHG-9077A型,上海精宏试验设备有限公司;

组织切碎机:QJSJ-D162型,广东小熊电器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 预处理 将采集于崇明的瘤背石磺致死,解剖去除内脏,用4℃蒸馏水洗净后放入烧瓶中,加入适量石油醚去脂12h,过滤后加入适量无水乙醇处理6h去除石油醚,洗净后放入烘箱烘焙12h得到瘤背石磺粉。

1.3.2 提取率测定 采用凯氏定氮法(GB/T 5009.5—2003)测定样品中的粗蛋白含量,考马斯亮蓝法^[20]测定水溶性蛋白含量。瘤背石磺肌肉蛋白提取率按式(1)计算:

$$R = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R ——瘤背石磺肌肉蛋白的提取率, %;

m_1 ——水解液中水溶性蛋白的含量, g;

m_2 ——样品粗蛋白的含量, g。

1.3.3 瘤背石磺肌肉蛋白的酶解工艺 称取1.0g粉碎的瘤背石磺粉,按照酶解条件(温度、pH、时间、液固比和加酶量)进行酶解试验,得到酶解液。反应结束后,在95℃高温下灭活15min,待溶液冷却后,放入高速冷冻离心机中离心(4000 r/min)10min,取上清液测试提取率。

1.3.4 单因素试验

(1) 酶解温度:在酶解时间2h, pH 8.0, 液固比80:1 ($V:m$), 加酶量10%的条件下, 考察酶解温度30, 35, 40, 45, 50, 55, 60℃对蛋白提取率的影响。

(2) pH:在酶解温度35℃, 酶解时间2h, 液固比80:1 ($V:m$), 加酶量10%的条件下, 考察pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0对蛋白提取率的影响。

(3) 酶解时间:在酶解温度35℃, pH 8.0, 液固比80:1 ($V:m$), 加酶量10%的条件下, 考察酶解时间1, 2, 3, 4, 5, 6, 7h对蛋白提取率的影响。

(4) 液固比:在酶解时间2h, pH 8.0, 酶解时间2h, 加酶量10%的条件下, 考察液固比40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1 ($V:m$)对蛋白提取率的影响。

(5) 加酶量:在酶解时间2h, pH 8.0, 酶解时间2h, 液固比80:1 ($V:m$)的条件下, 考察加酶量4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%对蛋白提取率的影响。

1.3.5 正交试验及响应面设计 根据单因素试验结果, 选择对酶解效果影响显著的因素, 以蛋白提取率为评价指标, 设计正交试验或响应面设计, 以优化其酶解工艺。

1.4 数据分析软件

采用正交设计助手 II 专业版及 Design-expert 8.0.6。

2 结果与分析

2.1 酶解前瘤背石磺肌肉粗蛋白测定的结果

采用凯氏定氮法测定瘤背石磺肌肉粗蛋白含量, 经过3次重复试验, 得出蛋白质含量为59.87%, 证明瘤背石磺肌肉的蛋白质含量相当高, 具有很大的研究价值。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 酶解温度对蛋白提取率的影响 由图1可知, 随着酶解温度的提高, 提取率表现为先上升后下降的趋势, 当温度在30~45℃时, 温度不断升高, 分子的动能也在不断增加, 底物与酶之间的接触几率也在增加^[21], 因此蛋白提取率逐渐上升; 温度达到45℃时, 提取率最大, 为7.02%; 但超过45℃后, 酶的活力开始下降, 甚至失活, 因此控制最适酶解温度为45℃左右。

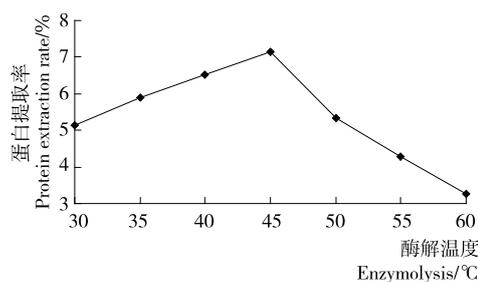


图1 酶解温度对蛋白提取率的影响

Figure 1 Influence of enzymolysis temperature on protein extraction rate

2.2.2 酶解时间对蛋白提取率的影响 由图2可知, 当酶解时间为2h时, 提取率最大, 超过2h后, 提取率开始下降。这可能是因为酶在反应过程中逐渐失活, 而且还会分解溶液中溶出的蛋白质^[22], 导致蛋白提取率逐渐降低, 因此控制酶解时间在2h左右。

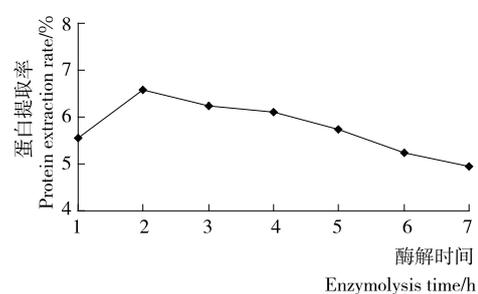


图2 酶解时间对蛋白提取率的影响

Figure 2 Influence of enzymolysis time on protein extraction rate

2.2.3 pH对蛋白提取率的影响 pH会改变酶中心的构象, 使酶活性中心的催化基团和结合基团受到影响^[23]。由图3可知, pH为9.0时, 提取率为最大值, 达到7.12%。但pH继续上升, 提取率反而下降, 这可能是因为pH过高导致酶活性降低甚至失活^[24]。因此最适pH为9.0。

2.2.4 液固比对蛋白提取率的影响 由图4可知, 液固比在90:1 ($V:m$)以下时, 提取率持续上升, 当液固比为90:1

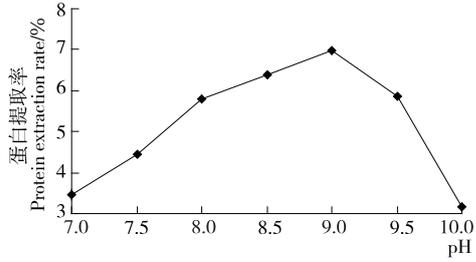


图 3 pH 对蛋白提取率的影响

Figure 3 Influence of pH value on protein extraction rate

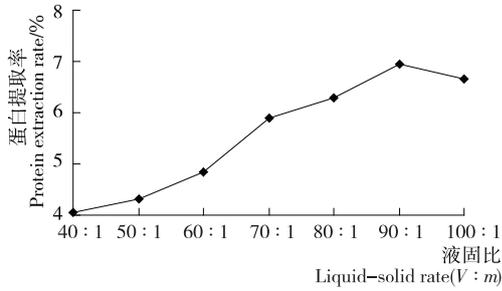


图 4 液固比对蛋白提取率的影响

Figure 4 Influence of liquid-solid rate on protein extraction rate

($V:m$)时,提取率达到最大值,继续提升液固比,提取率开始下降,因此选取 90:1($V:m$)左右作为试验条件。

2.2.5 加酶量对蛋白提取率的影响 由图 5 可知,在加酶量为 4%~10%时,对蛋白提取率的影响并不显著,加酶量在 9%时,提取率最大,考虑到生产成本问题,选取 9%作为试验条件。

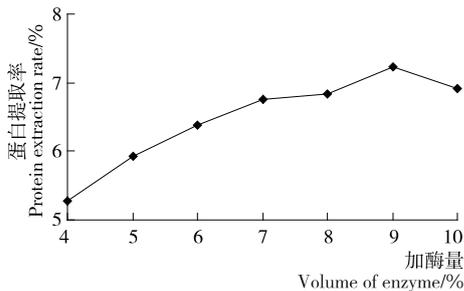


图 5 加酶量对蛋白提取率的影响

Figure 5 Influence of volume of enzyme on protein extraction rate

综上所述,酶解温度、酶解时间、pH 和液固比对酶解效果影响较显著,而加酶量对酶解效果的影响不太显著。因此固定加酶量为 9%,以酶解温度、酶解时间、pH 和液固比进行后续的正交试验及响应面试验。

2.3 正交试验结果

按 $L_{16}(4^5)$ 正交设计进行胰蛋白酶水解瘤背石磺肌肉蛋白的正交试验,各因素水平设计见表 1。

由表 2 可知,各因素影响顺序为:酶解温度>酶解时间>液固比>pH;最优工艺为 $A_3B_2C_3D_3$ 。

由表 3 可知,4 种因素对于蛋白提取率的影响都极显著。

表 1 正交试验因素及水平表

Table 1 Levels of experiment factor of orthogonal design

编码	A 酶解温度/ $^{\circ}C$	B 酶解时间/h	C pH	D 液固比 ($V:m$)
1	35	1	8.0	70:1
2	40	2	8.5	80:1
3	45	3	9.0	90:1
4	50	4	9.5	100:1

表 2 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计及结果

Table 2 Experiment and results of $L_{16}(4^5)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D	E(空白)	蛋白提取率/%
1	1	1	1	1	1	4.84
2	1	2	2	2	2	5.76
3	1	3	3	3	3	5.92
4	1	4	4	4	4	5.04
5	2	1	2	3	4	6.15
6	2	2	1	4	3	6.78
7	2	3	4	1	2	5.39
8	2	4	3	2	1	6.37
9	3	1	3	4	2	7.91
10	3	2	4	3	1	8.42
11	3	3	1	2	4	6.73
12	3	4	2	1	3	6.46
13	4	1	4	2	3	5.18
14	4	2	3	1	4	6.33
15	4	3	2	4	1	5.04
16	4	4	1	3	2	5.66
<hr/>						
K_1	5.390	6.020	6.003	5.755	6.168	
K_2	6.173	6.822	5.853	6.010	6.180	
K_3	7.380	5.770	6.633	6.538	6.085	
K_4	5.553	5.883	6.008	6.192	6.063	
R	1.990	1.052	0.780	0.783	0.117	

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
酶解温度	9.781	3	238.561	**
酶解时间	2.729	3	66.561	**
pH	1.442	3	35.171	**
液固比	1.299	3	31.683	**
误差	0.041	3		

† $F_{0.05}(3,3)=9.280, F_{0.01}(3,3)=29.500$ 。

2.4 响应面试验结果

采用中心组合试验对胰蛋白酶酶解工艺条件进行分析和优化,因素编码及水平见表 4。

表 4 响应面因素与水平

Table 4 The response surface of level and factor

水平	A 酶解温度/°C	B 酶解时间/h	C pH	D 液固比(V:m)
-1	40	1	8.5	80:1
0	50	2	9.0	90:1
1	60	3	9.5	100:1

通过软件对表 5 数据进行分析,得到酶解温度、pH、酶解时间和液固比与蛋白提取率之间的模拟方程见式(2):

$$Y = -282.95525 + 7.69313A + 1.78367B + 18.33900C + 0.78848D + 0.01450AB - 0.06000AC - 0.00330AD + 0.01500BC + 0.02325BD + 0.02750CD - 0.078337A^2 - 1.03842B^2 - 1.00867C^2 - 0.00551D^2 \quad (2)$$

由表 6 可知,模型极显著(P<0.01),失拟项不显著(P>0.05),确定系数 R² 为 0.9899,调整确定系数 R²_{adj} 为 0.9798,说明此模型与实际情况相符,误差较小。

方差分析结果还表明各因素之间存在一定的交互作用,其中 A、B、C、D、A²、B²、C²、D² 影响均极显著(P<0.01),BD 影响显著(P<0.05),而 AB、AC、AD、BC、CD 均不显著。

表 5 响应面试验结果

Table 5 The results of response surface

编号	A	B	C	D	蛋白提取率/%
1	0	0	1	-1	7.74
2	0	1	-1	0	6.88
3	1	0	1	0	5.96
4	0	1	0	-1	7.08
5	0	1	1	0	7.96
6	-1	0	0	-1	6.18
7	0	0	0	0	8.36
8	0	0	1	1	8.35
9	0	-1	0	-1	6.35
10	1	1	0	0	5.49
11	0	0	-1	-1	7.02
12	0	0	-1	1	7.08
13	0	0	0	0	8.55
14	0	-1	1	0	7.31
15	-1	0	1	0	7.46
16	0	0	0	0	8.45
17	-1	0	0	1	6.74
18	1	0	-1	0	5.33
19	1	0	0	-1	5.41
20	1	-1	0	0	4.16
21	-1	-1	0	0	5.28
22	0	0	0	0	8.22
23	0	-1	0	1	6.27
24	0	1	0	1	7.93
25	-1	1	0	0	6.32
26	-1	0	-1	0	6.23
27	1	0	0	1	5.37
28	0	-1	-1	0	6.26
29	0	0	0	0	8.35

表 6 响应面方差分析

Table 6 The variance analysis of response surface

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	14	38.59	2.76	97.79	<0.0001	***
A	1	3.51	3.51	124.52	<0.0001	***
B	1	3.03	3.03	107.50	<0.0001	***
C	1	2.98	2.98	105.72	<0.0001	***
D	1	0.32	0.32	11.36	0.0046	**
AB	1	0.021	0.021	0.75	0.4023	
AC	1	0.09	0.09	3.19	0.0956	
AD	1	0.09	0.09	3.19	0.0956	
BC	1	2.25×10 ⁻⁴	2.25×10 ⁻⁴	7.98×10 ⁻³	0.9301	
BD	1	0.22	0.22	7.67	0.0151	*
CD	1	0.076	0.076	2.68	0.1237	
A ²	1	24.88	24.88	882.59	<0.0001	***
B ²	1	6.99	6.99	248.14	<0.0001	***
C ²	1	0.41	0.41	14.63	0.0019	**
D ²	1	1.68	1.68	59.78	<0.0001	***
残差	14	0.39	0.028			
失拟项	10	0.33	0.033	2.21	0.2314	不显著
纯误差	4	0.061	0.015			
总误差	28	38.98				

† * 表示显著(P<0.05); ** 表示极显著(P<0.01); R² = 0.9899, R²_{adj} = 0.9798。

2.5 回归模型优化

由于交互项中 AB、AC、AD、BC 和 CD 对蛋白提取率的影响并不显著,因此采用手动优化的方法对回归模型再一次进行优化,结果见表 7。

表 7 去掉交互项 AB、AC、AD、BC 和 CD 后的优化结果

Table 7 The optimization results of excluding AB, AC, AD, BC and CD

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	9	38.31	4.26	120.45	<0.0001	***
A	1	3.51	3.51	99.31	<0.0001	***
B	1	3.03	3.03	85.74	<0.0001	***
C	1	2.98	2.98	84.32	<0.0001	***
D	1	0.32	0.32	9.06	0.0072	**
BD	1	0.22	0.22	6.12	0.0230	*
A ²	1	24.88	24.88	703.92	<0.0001	***
B ²	1	6.99	6.99	197.91	<0.0001	***
C ²	1	0.41	0.41	11.67	0.0029	**
D ²	1	1.68	1.68	47.67	<0.0001	***
残差	19	0.67	0.035			
失拟项	15	0.61	0.041	2.69	0.1747	不显著
纯误差	4	0.061	0.015			
总误差	28	38.98				

† * 表示显著(P<0.05); ** 表示极显著(P<0.01); R² = 0.9828, R²_{adj} = 0.9746。

经过手动优化后的模拟方程见式(3):

$$Y = -270.45275 + 6.94213A + 2.56367B + 18.14400C + 0.88723D + 0.02325BD - 0.078337A^2 - 1.03842B^2 - 1.00867C^2 - 5.09667 \times 10^{-3}D^2 \quad (3)$$

由表 7 可知,优化后的模型极显著(P<0.01),同时失拟

项不显著($P>0.05$), R^2 为 0.982 8, R_{Adj}^2 为 0.974 6, 说明此模型是可靠的。从 F 值的大小可以得到各单因素的影响顺序为 $A>B>C>D$, 即酶解温度 $>$ 酶解时间 $>$ pH $>$ 液固比。

2.6 响应面曲面分析及优化

图 6 给出了交互项 BD 的等高线图和响应面图, 随着酶解时间和液固比的增加, 蛋白提取率都是先增加后减小; 说明只有取某个适中值时, 才可以使蛋白提取率达到最大。由图 6 还可以看出, 酶解时间与液固比的交互作用对蛋白提取率的影响较显著, 这与表 7 中的结果一致。

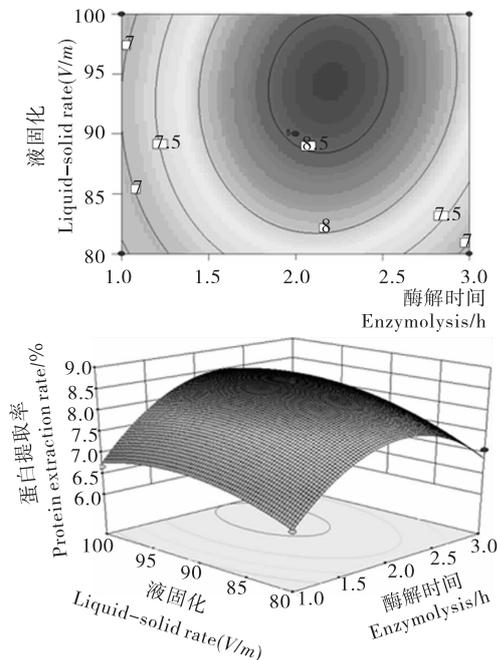


图 6 $Y=f(B,D)$ 的等高线图和响应面图

Figure 6 The contour map and response surface graph of BD

2.7 响应面法与正交试验法比较

对上述两种方法得到的最优工艺结果进行验证实验, 结果表明, 正交试验法优化得到的最佳工艺条件为: 酶解温度 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 酶解时间 2 h, pH 9.0, 液固比 90:1(V:m); 而响应面法优化得到的最佳工艺条件为: 酶解温度 $44.31\text{ }^{\circ}\text{C}$, 酶解时间 2.27 h, pH 9.00, 液固比 92.21:1(V:m), 为了便于生产, 经调整后得到的工艺条件为酶解温度 $44\text{ }^{\circ}\text{C}$, 酶解时间 2.3 h, pH 9.0, 液固比 93:1(V:m), 两种方法通过 3 次验证实验得到的蛋白提取率平均值分别为 8.51% 和 8.74%。

3 结论

(1) 通过比较响应面法和正交试验对酶解瘤背石磺肌肉蛋白条件的优化结果, 发现两种试验设计方法在分析各因素对水解度的影响上得出的结果基本一致, 但响应面法对数据的统计分析优于正交试验法; 两种方法得到的最优工艺验证结果表明, 响应面法得到的最优工艺获得的平均蛋白提取率比正交试验法高出 2.70%。

(2) 酶解瘤背石磺肌肉蛋白最优工艺的确定以响应面法为准, 最终确定为酶解温度 $44\text{ }^{\circ}\text{C}$, 酶解时间 2.3 h, pH 9.0, 液固比 93:1(V:m)。在此条件下, 提取率达到 8.74%。有理论研究^[25]表明, 动物蛋白中含有大量生物活

性肽, 而通过酶解反应可以释放出这些具有特殊生物学功能的活性肽, 因此本研究可为后续瘤背石磺肌肉蛋白的利用和开发, 以及瘤背石磺肌肉蛋白中的活性肽分离纯化和活性研究提供理论依据。

参考文献

- 1 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.
- 2 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.
- 3 刁亚, 沈和定, 程知庆, 等. 响应面法优化胃蛋白酶酶解瘤背石磺肌肉蛋白工艺参数[J]. 安徽农业大学学报, 2015(3):391~397.
- 4 孙变娜, 沈和定, 吴洪喜, 等. 石磺营养价值、活性物质的研究现状及开发前景[J]. 江苏农业科学, 2013(8):14~17.
- 5 张媛溶. 上海沿海蛤蟆石磺的初步研究[C]//贝类学会论文集第二辑. 北京:北京科学出版社, 1986:153.
- 6 李八方. 海洋生物活性物质[M]. 青岛:中国海洋大学出版社, 2007.
- 7 Khodabandeh S, Maleki D, Abdolzadeh M. Isolation of a 320 kDa protein from the eggs of *Onchidium* (sea slug) that exhibits anticancer activity against breast cancer cell line (T47D) [J]. The Breast, 2011(20):18~19.
- 8 范东斌, 莫弦丰, 陈玉竹, 等. 响应曲面法优化油茶饼粕蛋白的超声辅助提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2014(3):199~202.
- 9 郭显荣, 黄卫文, 龚吉军, 等. 不同提油方法的油茶粕蛋白制备工艺研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(6):147~149, 175.
- 10 马秀婷, 肖志刚, 孙旭, 等. 超声波辅助提取豆渣蛋白工艺优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(1):108~112.
- 11 黄菊, 翟淑敏. 正交设计和响应面法优化荞麦中芦丁提取工艺的比较[J]. 粮食与油脂, 2014(9):45~48.
- 12 鲁宁. 鸡胸软骨胶原蛋白制备工艺研究[D]. 合肥:安徽农业大学, 2013.
- 13 曹文红, 冯思涛, 莫敏婷, 等. 青鳞鱼酶解工艺正交优化及其产物分子量分布的研究[J]. 食品科技, 2013(4):130~135.
- 14 王永菲, 王成国. 响应面法的理论与应用[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2005(3):236~240.
- 15 张艳, 李永哲. 响应面法及其在药学领域中的应用[J]. 吉林化工学院学报, 2012(7):20~26.
- 16 Myers R H, Khuri A I. Response surface methodology: 1966~1988[J]. Technometrics, 1966, 31(2):137~157.
- 17 徐向英, 王岸娜, 林伟静, 等. 响应面法优化燕麦全粉中蛋白质提取工艺[J]. 食品与机械, 2011, 27(5):96~99.
- 18 李加兴, 房惠芳, 陈选, 等. 牡丹籽粕蛋白提取工艺优化及其等电点分析[J]. 食品与机械, 2014, 30(3):147~150.
- 19 刘立新. 猪骨蛋白水提工艺的优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(5):220~222.
- 20 王镜岩. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社, 2007.
- 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(8):111~115.
- 22 邹华蓉. 棉籽水酶法制备油脂和蛋白质的工艺研究[D]. 武汉:湖北工业大学, 2014.
- 23 胡耀辉. 食品生物化学[M]. 北京:化学工业出版社, 2009.
- 24 何士敏, 方平, 郭利佳. 鱼腥草抗氧化成份的研究[J]. 西南农业学报, 2009(3):625~631.
- 25 孙雪萍, 杨家林, 徐艳, 等. 方格星虫蛋白酶解工艺优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(2):238~242.