

响应面法优化苦瓜籽蛋白质提取工艺

张治强,成兰英*

(西南科技大学材料科学与工程学院,四川绵阳 621010)

摘要:以苦瓜籽为原料,采用紫外光谱和响应面法研究盐溶法提取苦瓜籽蛋白质的最佳工艺。以苦瓜籽蛋白质的提取率为指标,考察 NaCl 浓度、pH、提取时间对苦瓜籽蛋白质提取率的影响。在单因素实验的基础上,通过 Box-Benhnken 中心组合设计和响应面分析法,确定苦瓜籽蛋白质的最佳提取工艺。结果表明:在料液比为 1:6,提取温度为 4℃下,NaCl 浓度 1.3mol/L,pH8.8,提取时间 3.6h,苦瓜籽蛋白质的提取率为 23.80%,较优化前提高了 3.24 倍,同时建立了盐提蛋白质的二次多项数学模型,对苦瓜籽蛋白质的提取具有很好的预测作用。此外,通过凯氏定氮法确定苦瓜籽中蛋白质含量为 32.13%。

关键词:苦瓜籽,蛋白质含量,紫外光谱,响应曲面法,提取工艺

Optimization of protein extraction from defatted bitter melon seed using response surface methodology

ZHANG Zhi-qiang, CHENG Lan-ying*

(School of Material Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

Abstract: The optimum extracting conditions of protein from bitter melon seeds by the salt solvent method were studied. The effects of concentration of NaCl, pH and extraction time on the yield of protein were studied based on the extraction rate. According to the single factor experiments, the optimum extract process for bitter melon seed protein was determined through Box-Benhnken central composite design and response surface methodology. The results showed that the optimized extract process for bitter gourd seed protein was that the material/liquid ratio was 1:6 and the temperature was at 4℃, the concentration of NaCl was 1.3mol/L and pH8.8, at a extract time of 3.6h, the extraction rate of bitter gourd seed protein was 23.80%, 3.24 times higher than that before the optimization. In addition, a quadratic equation model for protein extraction was set up and it played an important role in predicting the extraction of protein. Furthermore, the protein content of bitter melon seeds was 32.13% determined by Kjeldahl method.

Key words: bitter melon seed; protein content; ultraviolet spectrum; response surface method; extraction technology

中图分类号:TS255.36

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2013)01-0268-05

苦瓜(*Momordica charantia* L.)是葫芦科苦瓜属植物,具有消暑涤热,明目解毒之功效^[1]。苦瓜种子中含有丰富的蛋白质。目前,人们已经从中提取纯化出多种活性蛋白质^[2-5],并对其氨基酸组成和药理活性进行检测^[6-9]。苦瓜籽中的蛋白质具有多种活性,如苦瓜凝集素对鼻咽癌细胞有抑制作用^[10],核糖体失活蛋白具有抗 HIV 和抑制多种肿瘤细胞生长的作用^[11-13]。此外,人们发现多种具有 N-糖苷酶活性的蛋白质如苦瓜凝集素(MCL)^[14]、胰蛋白酶抑制剂(MCTI-I、II、III)^[15-17]、核糖体失活蛋白(RIP)^[18]和多肽-P^[19]等。近来发现,苦瓜籽蛋白质还具有一定的抗菌活性^[5]。由于苦瓜蛋白质中大部分为清蛋白(49.3%)、球蛋白(29.3%)和谷蛋白(3.1%)^[20],采用

蛋白质常用盐溶提取法,NaCl 浓度、盐溶液 pH 对苦瓜籽蛋白质的提取率具有较大影响。本研究采用紫外光谱法和微量凯氏定氮法测定蛋白质含量,在单因素实验基础上利用 Box-Benhnken 响应面设计,研究 NaCl 盐溶液浓度、溶液 pH 和提取时间对苦瓜籽蛋白质提取率的影响,确定三种因素的主次关系、交互影响和最佳组合,旨在提高苦瓜籽蛋白质的提取产率,为苦瓜籽蛋白质的综合开发和生产利用提供指导和帮助。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苦瓜籽 购自四川省绵阳市华灵高科良种繁育研究中心;NaCl、HCl、NaOH、无水乙醇、考马斯亮蓝 G-250 成都科龙化工试剂厂;牛血清蛋白(BSA)上海伯奥生物科技有限公司;所用试剂均为分析纯。

KDN-102C 型凯氏定氮仪 上海纤检仪器有限公司;pHS-3C pH 酸度计 成都世纪方舟科技有限公司;UV-2102 型紫外分光光度计 尼科上海仪器

收稿日期:2012-07-23 *通讯联系人

作者简介:张治强(1987-),男,硕士研究生,主要从事天然产物分离分析研究。

基金项目:四川省教育厅重点项目(07Zd1117);博士研究基金(07ZX0108);横向技术开发项目(12zh0051)。

有限公司;AL104 型电子分析天平 梅特勒-托利多仪器上海有限公司;GL-20LX-B 型高速冷冻离心机 湖南星科科学仪器有限公司;LHS-250SC 型恒温恒湿箱 上海一恒科技有限公司;EYELA water bath SB-2000 型旋转蒸发仪 上海爱朗仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原料的预处理 将苦瓜籽用高速组织捣碎机粉碎,用石油醚(固液比 1:3, g/mL)浸泡一周脱脂,减压蒸馏回收石油醚。将脱脂苦瓜籽粉末置于通风厨中以挥发溶剂,冰箱中低温保存备用。

1.2.2 苦瓜籽蛋白质的提取方法 参照 Lee-Huang 等^[18]方法,取 2g 脱脂苦瓜籽粉末,用 12mL 0.15mol/L 的 NaCl 溶液抽提 5min,再用 1mol/L 的 HCl 调 pH 至 3.6,4℃ 下缓慢搅拌 15min,用纱布过滤残渣,滤液于 10000r/min 下离心 15min,即得蛋白质溶液。

1.2.3 苦瓜籽蛋白质含量的测定 苦瓜籽蛋白质总含量的测定采用微量凯氏定氮法,参照 GB 5009.5-2010。

苦瓜籽提取液蛋白质的含量测定采用考马斯亮蓝法。标准曲线的制作:分别取 1mg/mL 牛血清蛋白 50、100、150、200、250、300μL 于试管中,加入 5mL 考马斯亮蓝溶液,再用蒸馏水补足至 6mL,5min 后测其吸光度值,建立回归方程为 $Y = 0.0023X + 0.58573$, Y 为吸光度值, X 为蛋白质含量(μg),结果显示,吸光度值在 0.701~1.271 之间具有良好的线性关系($R^2 = 0.99947$),单因素实验和响应面实验所得吸光度值均在此区间内。提取液中蛋白质含量测定方法:取 1mL 不同实验条件下的苦瓜籽蛋白质溶液定容至 50mL,按照标准曲线的操作,在 595nm 处测定吸光度值,计算蛋白质的含量,以蛋白质提取率高低评价提取效果。苦瓜籽蛋白质提取率公式:

苦瓜籽蛋白质的提取率(%) = 提取液中蛋白质含量/原料中蛋白质总含量 × 100

1.2.4 苦瓜籽蛋白质的单因素实验 选定 NaCl 浓度、pH、提取时间三个因素作单因素实验,考察各因素对蛋白质提取效果的影响。

1.2.5 苦瓜籽蛋白质提取的响应面设计 在单因素的基础上,采用 SAS 9.1.3 中的 Box-Behnken 中心组合实验设计响应面实验,每个组合重复实验三次,实验因素与水平设计如表 1 所示。转换公式 $X_1 = (x_1 - 1.0)/0.2$, $X_2 = x_2 - 8$, $X_3 = x_3 - 4$ 。

表 1 实验因素水平与编码

Table 1 Code and level of factors chosen for the trials			
因素	水平		
	-1	0	1
x_1 NaCl 浓度(mol/L)	0.8	1.0	1.2
x_2 pH	7	8	9
x_3 提取时间(h)	3	4	5

2 结果与讨论

2.1 凯氏定氮法测定苦瓜籽蛋白质总含量

3 次测定结果表明苦瓜籽中蛋白质平均含量为 32.13%。

2.2 苦瓜籽蛋白质提取的单因素实验结果

2.2.1 NaCl 浓度对提取效果的影响 取 2g 苦瓜籽,分别加入 12mL 浓度分别为 0.4、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8mol/L 的 NaCl 溶液进行提取,溶液 pH7,4℃ 下提取 12h,结果如图 1。

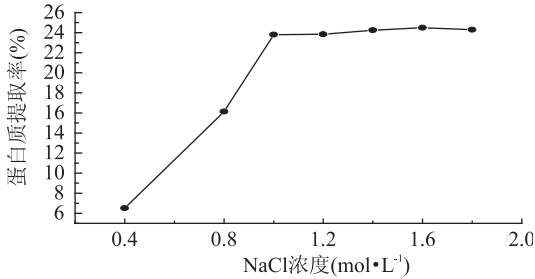


图 1 NaCl 浓度对苦瓜籽蛋白提取的影响
Fig.1 Effect of concentration of NaCl on the extraction of bitter melon protein

当 NaCl 溶液浓度由 0.4~1.0mol/L 增加时,蛋白质提取率呈上升趋势,但浓度达到 1.0mol/L 后,提取率变化不大,趋于稳定。由于低浓度的盐溶液能够增加蛋白质分子表面的电荷,增加其水中溶解度,而高浓度的盐溶液反而会破坏蛋白质表面的水化膜和电荷,出于保护蛋白质活性的需要,本实验选择 1.0mol/L。

2.2.2 溶液 pH 对提取效果的影响 取 2g 苦瓜籽,加入 12mL 浓度为 1.0mol/L、pH 分别为 6、7、8、9、10、11 的 NaCl 溶液进行提取,4℃ 下提取 12h,结果如图 2。

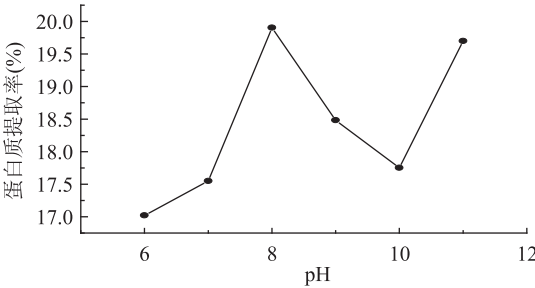


图 2 pH 对苦瓜籽蛋白提取的影响
Fig.2 Effect of pH on the extraction of bitter melon protein

当溶液 pH 为 8 时,蛋白质提取率最大,因为碱性条件下蛋白质发生酸式解离,使其本身带相同的负电荷而相互排斥,增加其在水溶液中的分散性,同时对蛋白质的次级键氢键有一定的破坏作用,对蛋白质有一定的增溶作用。当溶液 pH 为 10 时,溶液的 pH 与蛋白质的等电点相等,蛋白质分子的静电荷为零,相邻蛋白质分子之间没有静电排斥力而聚集沉淀,蛋白质的溶解度最低,当溶液 pH 大于 10 后,蛋白质分子携带同种电荷而相互排斥,阻止了单分子的聚集^[21],因此溶解度增大,浓度增加,提取率升高,但是过碱环境破坏蛋白质结构和构象,使部分埋藏在蛋白质内部的羧基、酚羟基和巯基离子化^[22],影响其生物活性,所以选择 pH 为 8。

2.2.3 提取时间对提取效果的影响 取 2g 苦瓜籽,

表3 回归模型的方差和显著性分析结果

Table 3 Coefficient and significance of regression model

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	p 值	显著性
X_1	1	3.40605	3.40605	91.86093	0.000209	**
X_2	1	3.341113	3.341113	90.10957	0.000219	**
X_3	1	0.082012	0.082012	2.211871	0.197108	
X_1^2	1	6.449733	6.449733	173.9488	0.0001	**
X_1X_2	1	0.297025	0.297025	8.010743	0.036661	*
X_1X_3	1	0.002025	0.002025	0.054614	0.824487	
X_2^2	1	0.120741	0.120741	3.256377	0.130989	
X_2X_3	1	2.1316	2.1316	57.4891	0.000633	**
X_3^2	1	2.757356	2.757356	74.36571	0.000346	**
模型	9	18.29297	2.032552	54.81778	0.000183	**
误差	5	0.185392	0.037078			
失拟项	3	0.152325	0.050775	3.071069	0.255231	
总和	14	18.47836				
模型的绝对系数			0.9900			
模型的调整绝对系数			0.9719			

注: * 为显著($p < 0.05$), ** 为极显著($p < 0.01$)。

加入 12mL 1.0mol/L、pH7 的 NaCl 溶液,4℃ 下分别提取 0.5、1、2、4、6、8、12h,结果如图 3。

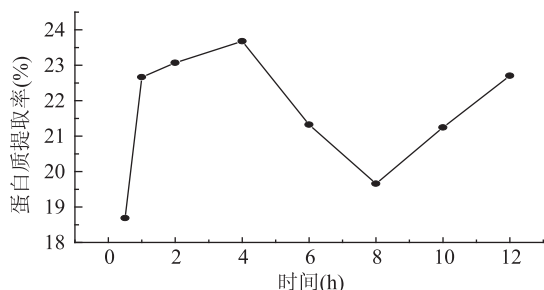


图3 提取时间对苦瓜籽蛋白提取的影响

Fig.3 Effect of time on the extraction of bitter melon protein

在 0.5~4h 内,提取率随提取时间的增加而变大,当提取时间为 4h 时,蛋白质具有最大的溶出率,提取效果最好,4h 后提取效果下降,浓度降低,说明蛋白质已经开始部分水解。由于蛋白质水解产生的精氨酸与芳香族氨基酸能够进一步与考马斯亮蓝结合^[23],使得 8h 后溶液颜色加深,吸光度值增加,导致提取率升高,因此为了防止蛋白质水解,保持其原有活性,提取时间选择 4h。

2.3 盐溶法提取蛋白质工艺的优化

2.3.1 实验设计及实验结果 以单因素实验结果为基础,根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理,以 NaCl 浓度、pH、提取时间为自变量,蛋白质提取率 Y 为响应值,设计三因素三水平共 15 个实验点的响应面实验,其中 1~12 为析因实验,13~15 为中心点实验,实验设计和实验结果见表 2。

2.3.2 模型的建立及其显著性检验 使用统计分析软件 SAS 9.1.3,以 NaCl 浓度、pH、提取时间为响应变量,以苦瓜籽蛋白质提取率为响应值对表 2 的数据进行处理,得到回归方程方差分析表 3。

采用 SAS 软件对响应值和各因素进行回归拟合,得方程:

$$Y = 23.69333 + 0.6525X_1 - 0.64625X_2 - 0.10125X_3 - 1.321667X_1^2 + 0.2725X_1X_2 - 0.0225X_1X_3 + 0.180833X_2^2 - 0.73X_2X_3 - 0.864167X_3^2$$

表2 实验设计和实验结果

Table 2 Experimental designs and results

实验号	x_1	x_2	x_3	Y 蛋白质提取率(%)
1	-1	-1	0	22.95
2	-1	1	0	20.84
3	1	-1	0	23.72
4	1	1	0	22.70
5	0	-1	-1	22.87
6	0	-1	1	24.17
7	0	1	-1	23.31
8	0	1	1	21.69
9	-1	0	-1	20.96
10	1	0	-1	22.30
11	-1	0	1	20.76
12	1	0	1	22.01
13	0	0	0	23.84
14	0	0	0	23.64
15	0	0	0	23.60

由表 3 可以看出,模型的 $p = 0.000183 < 0.01$,模型达到极显著。在各因素交互作用中, X_1 和 X_3 交互影响不显著, X_1 和 X_2 之间交互作用显著, X_2 和 X_3 之间极显著,说明它们各自两因素之间不是简单的线性关系,还存在二次关系。

模型失拟项 $p > 0.05$,不显著,表示模型预测值与实际值误差较小,可以用此模型预测真实值。模型的绝对系数 $R^2 = 0.9900$,说明该模型能解释 99.00% 的响应值变化,即吸光度的变化 99.00% 来自 NaCl 浓度、pH 和提取时间,因此该模型拟合程度较好,实验误差小,与实际情况较吻合,可以用此模型对盐溶法提取蛋白的效果进行分析和预测。

各因素的影响程度分析,模型中的因素 X_1 、 X_2 、 X_1^2 、 X_2X_3 和 X_3^2 达到极显著水平($p < 0.01$), X_3 (提取时间)影响不显著。由 F 检验得到各因子贡献率为 $X_1 > X_2 > X_3$,即 NaCl 浓度 > pH > 提取时间。

2.3.3 盐溶法提取蛋白工艺的响应面分析 根据回归方程,做出响应面图,如图4~图6。

由图4可知,随着因素 X_1 的取值不断增大,响应值不断增大,在中心点过后小幅度下降,波动不大。在 X_1 的作用下,随着因素 X_2 编码值的增大,响应面的值不断减小。由图5可以看出,随着 X_1 和 X_3 的数值的增大,响应面的值都是先增大后减小,在 X_1 和 X_2 的中心点附近吸光度有最大值,此时蛋白质具有较大的溶出率。由图6可知,固定NaCl浓度,当提取时间和pH都在中心点附近时,蛋白质提取率较高,有利于蛋白质的溶出。由以上响应面图分析可知,在各因素中心点附近,溶液的环境对蛋白质结构影响较小,此时蛋白质具有较高的溶出率,回归方程具有最优水平。

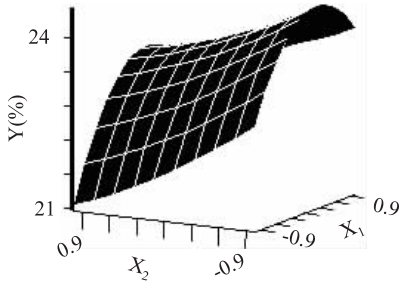


图4 蛋白质提取率与NaCl浓度、pH的响应面图
Fig.4 Response surface contour plots showing effects of concentration of NaCl and pH on the protein extraction rate

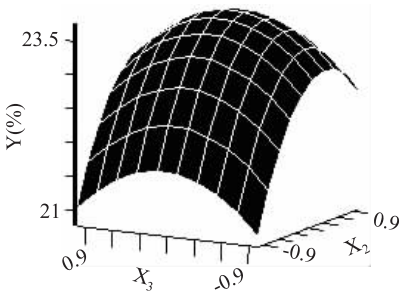


图5 蛋白质提取率与NaCl浓度、提取时间的响应面图
Fig.5 Response surface contour plots showing effects of concentration of NaCl and extraction time on the protein extraction rate

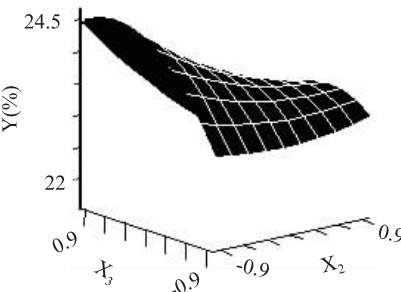


图6 蛋白质提取率与pH、提取时间的响应面图
Fig.6 Response surface contour plots showing effects of pH and extraction time on the protein extraction rate

2.3.4 最佳提取条件的确定及验证 将回归方程对 X_1 、 X_2 、 X_3 分别取一阶偏导数等于零,解方程组带入转化公式,得最优提取条件为NaCl浓度1.33mol/L、

pH为8.76、提取时间为3.62h,理论提取率为23.57%。根据实际情况调整为NaCl浓度1.3mol/L、pH为8.8、提取时间为3.6h,在此最优条件下进行3次平行实验,吸光度平均值为1.172,提取率为23.80%,误差为0.98%,响应值的实验值与回归方程预测值吻合良好,因此响应面法对苦瓜籽蛋白质提取条件的优化是可行的,模型方程适合。将优化前后的提取工艺和结果进行整理分析得表4。

表4 优化前后提取工艺的比较
Table 4 Comparison of abstraction process before and after optimization

提取条件	优化前	优化后
NaCl 浓度 (mol/L)	0.15	1.3
pH	3.6	8.8
提取时间 (h)	0.25	3.6
吸光度	0.724	1.172
提取率 (%)	5.61	23.80

按照原方法^[18]提取的蛋白质溶液吸光度为0.724,提取率为5.61%,优化后蛋白质提取率为23.80%,较之前提高了3.24倍。说明优化后各因素能够更明显利于蛋白质的溶解,大大提高蛋白质的提取率。

3 结论

本研究利用SAS软件,通过响应面法确定盐溶法提取苦瓜籽蛋白质的最佳提取工艺为:NaCl浓度1.3mol/L、pH为8.8、提取时间为3.6h,产率为23.80%。通过方差分析得知,三个因素对苦瓜籽蛋白质提取的影响大小为:NaCl浓度>pH>提取时间。通过凯氏定氮法确定苦瓜籽中蛋白质含量为32.13%。

参考文献

[1] 江苏新医学院.中药大辞典(上册)[M].上海:上海科技出版社,1986:1281.
[2] Xiong S D, Yu K, Liu X H, et al. Ribosome - inactivating proteins isolated from dietary bitter melon induce apoptosis and inhibit histone deacetylase - 1 selectively in premalignant and malignant prostate cancer cells [J]. International Journal of Cancer, International Journal of Cancer, 2009, 125(4): 774-782.
[3] Huang L, Adachi T, Shimizu Y, et al. Characterization of lectin isolated from Momordica charantia seed as a B cell activator[J]. Immunology letters, 2008, 121(2): 148-156.
[4] Parkash A, Ng TB, Tso WW. Purification and characterization of charantin, a napin - like ribosome - inactivating peptide from bitter gourd (Momordica charantia) seeds [J]. The Journal of Peptide Research; Official Journal of the American Peptide Society, 2002, 59(5): 197-202.
[5] 蔡马, 于群, 朱新产. 苦瓜籽蛋白的 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相分离及抑菌作用的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(4): 612-619.
[6] R Horax, N Hettiarachchy, A Kannan, et al. Proximate composition and amino acid and mineral contents of Mormordica charantia L. pericarp and seeds at different maturity stages [J]. Food Chemistry, 2010, 122(4): 1111-1115.

- [7] Fang EF, Zhang CZ, Wong JH, et al. The MAP30 protein from bitter gourd (*Momordica charantia*) seeds promotes apoptosis in liver cancer cells in vitro and in vivo[J]. *Cancer letters*, 2012, 324(1): 66-74.
- [8] Fang E F, Zhang C Z, Zhang L, et al. In vitro and in vivo anticarcinogenic effects of RNase MC2, a ribonuclease isolated from dietary bitter gourd, toward human liver cancer cells[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012, 44(8): 1351-1360.
- [9] 郎海滨, 糜漫天, 程天民, 等. 苦瓜核糖体失活蛋白的纯化及其诱导 HL-60 细胞凋亡的研究[J]. *营养学报*, 2004, 26(2): 139-143.
- [10] Fang E F, Zhang C Z, Ng T B, et al. Momordica Charantia lectin, a type II ribosome inactivating protein, exhibits antitumor activity toward human nasopharyngeal carcinoma cells In Vitro and In Vivo[J]. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 2012, 5(1): 109-121.
- [11] Jiratchariyakul W, Wiwat C, Vongsakul M, et al. HIV Inhibitor from Thai bitter gourd[J]. *Planta Medica*, 2001, 67(4): 350-353.
- [12] 樊剑鸣, 马建新, 高德富, 等. 苦瓜蛋白 MAP30 对大肠癌细胞株 LoVo 细胞生长及凋亡的影响[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2009, 44(5): 983-985.
- [13] Li M, Chen Y, Liu Z, et al. Anti-tumor activity and immunological modification of ribosome-inactivating protein (RIP) from *Momordica Charantia* by covalent attachment of polyethylene glycol[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2009, 41(9): 792-799.
- [14] Ng T B, Wong C M, Li W W, et al. Isolation and characterization of a galactose binding lectin with insulinomimetic activities. From the seeds of the bitter gourd *Momordica charantia* (Family Cucurbitaceae)[J]. *International Journal of Peptide and*

Protein Research, 1986, 28(2): 163-172.

- [15] Hara S, Makino J, Ikenaka T. Amino acid sequences and disulfide bridges of serine Proteinase inhibitors from bitter gourd (*Momordica charantia* Linn) seeds[J]. *Journal of Biochemistry*, 1989, 105(1): 88-92.
- [16] Hamato N, Koshiha T, Pham TN, et al. Trypsin and elastase inhibitors from bitter gourd (*Momordica charantia* Linn) seeds: purification, amino acid sequences, and inhibitory activities of four new inhibitors[J]. *Journal of Biochemistry*, 1995, 117(2): 432-437.
- [17] Huang B, Ng TB, Fong WP, et al. Isolation of a trypsin inhibitor with deletion of N-terminal pentapeptide from the seeds of *Momordica cochinchinensis*, the Chinese drug mubiezhi[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1999, 31(6): 707-715.
- [18] Lee-Huang S, Huang PL, Nara PL, et al. MAP30: a new inhibitor of HIV-1 infection replication[J]. *FEBS Letters*, 1990, 272(1-2): 12-18.
- [19] Khanna P, Jain SC, Panagariya A, et al. Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source[J]. *Journal of Natural Products*, 1981, 44(6): 648-655.
- [20] Horax R, Hettiarachchy N, Over K, et al. Extraction, Fractionation and Characterization of Bitter Melon Seed Proteins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(3): 1892-1897.
- [21] 王镜岩. 生物化学(上册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 305.
- [22] 周瑞宝. 植物蛋白功能原理与工艺[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 30.
- [23] 张建社. 蛋白质分离与纯化技术[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2009: 93.

(上接第 267 页)

- [3] 向阳, 张彤. 高效液相色谱法测定葡萄皮和葡萄籽中白藜芦醇的含量[J]. *卫生研究*, 2005, 32(5): 490-494.
- [4] 杨夫臣, 吴江. 葡萄果皮花色素的提取及其理化性质[J]. *果树报*, 2007, 24(3): 287-292.
- [5] 田丽婷, 马龙. 超临界二氧化碳萃取葡萄皮渣中三萜类总组分[J]. *中国现代应用药学杂志*, 2004, 21(1): 6-8.
- [6] 孙艳, 房玉林, 张昂, 等. 葡萄皮渣中可溶性膳食纤维提取工艺研究[J]. *西北农林科技大学学报*, 2010, 38(10): 147-151.
- [7] 王战勇, 苏婷婷. 葡萄皮中粗蛋白提取条件的研究[J]. *氨基酸和生物资源*, 2004, 26(2): 6-7.
- [8] 马春宏, 朱红, 王良, 等. 双水相萃取技术的应用研究进展[J]. *光谱实验室*, 2010, 27(5): 1906-1913.
- [9] 刘叶青. 生物分离工程实验[M]. 北京: 高等教育出版, 2007: 81-82.
- [10] 周红航, 王维香. 聚乙二醇/硫酸铵双水相体系萃取猪胰蛋白酶[J]. *化工进展*, 2009, 28(2): 305-308.
- [11] Jiang L F. Optimization of fermentation conditions for

pullulan production by *Aureobasidium pullulans* using response surface methodology[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79: 414-417.

- [12] 袁晶, 宋达峰, 胡炜力, 等. 响应面法优化植物乳杆菌素的双水相萃取条件[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(3): 90-96.
- [13] 郑楠, 刘杰. 双水相萃取技术分离纯化蛋白质的研究[J]. *化学与生物工程*, 2006, 23(10): 7-9.
- [14] 曹对喜, 杜征, 韩玉婷, 等. 双水相萃取法提取木瓜蛋白酶的研究[J]. *农产品加工*, 2010(10): 66-69.
- [15] 张兰威, 陈一, 韩雪, 等. 双水相萃取法从风干香肠中分离提取蛋白酶[J]. *分析化学*, 2008, 36(7): 901-904.
- [16] 张喜峰, 李彩霞, 崔玮, 等. 反胶团萃取分离葡萄酒下脚料中葡萄皮蛋白质[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(2): 212-218.
- [17] 赵晓红. 双水相萃取/浮选分离-富集环境中持久性污染物的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2011.
- [18] 孟宪军, 王冠群, 宋德群, 等. 响应面法优化蓝莓花色苷提取工艺的研究[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(7): 226-229.