

缫丝蚕蛹蛋白酶法水解条件优化

钟雨坤¹, 罗金凤¹, 黄先智^{2,*}, 丁晓雯¹

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆市农产品加工及贮藏重点实验室, 重庆 400715;

2. 西南大学蚕学与系统生物学研究所, 重庆 400715)

摘要:目的: 利用酶水解缫丝蚕蛹蛋白, 拟为其深度开发利用提供参考。方法: 利用蛋白酶水解缫丝蚕蛹蛋白, 并用分光光度法测定各指标。结果表明: 单酶水解时, 实验所用的 8 种酶中以蚕蛹蛋白水解专用酶的水解度最高, 最佳水解条件是底物浓度 7%, 温度 53℃, pH7.2, 加酶量 3%, 水解度达到 21.44%。

关键词: 缫丝蚕蛹, 酶水解, 条件优化

Optimization of protease hydrolysis conditions on silkworm pupa protein

ZHONG Yu-shen¹, LUO Jin-feng¹, HUANG Xian-zhi^{2,*}, DING Xiao-wen¹

(1. College of Food Science of Southwest University, Key Laboratory of Processing and Storage of Agricultural Products of Chongqing, Chongqing 400715, China;

2. IKTS of Bombycology and Biology of Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Purpose: Enzyme hydrolysis of silkworm pupa protein was studied in order to provide references to deeply exploit silkworm pupa protein. Methods: Protease was used to hydrolyze silkworm pupa protein and spectrophotometry was used to detect indicators. Results: When hydrolyzed by single protease, dedicated protease for silkworm pupa protein showed the highest hydrolysis degree out of 8 proteases used in the experiment, the best hydrolysis conditions were: the substrate concentration was 7%, 53℃, pH7.2, the additive amount of protease was 3%, and the hydrolysis degree turned out to be 21.44%.

Key words: silkworm pupa protein; enzyme hydrolysis; optimization of conditions

中图分类号: TS218

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)17-0232-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.17.042

我国是世界最大的蚕茧生产国, 年产鲜茧 60 余万吨^[1]。蚕蛹是蚕茧缫丝后的主要副产物, 蛋白质含量占干蚕蛹质量的 45%~55%^[2]。蚕蛹蛋白含有 18 种氨基酸, 其中 8 种人体必需氨基酸的含量占氨基酸总量的 40% 以上, 高于 WHO/FAO 提出的参考蛋白模式, 且比例适当, 被证实为一种优质、丰富的蛋白源^[3-4]。在缫丝过程中, 干蛹产量与茧丝量之比约为 0.8:1, 即我国每年要产出 12 万吨以上的缫丝蚕蛹^[5]。由于缫丝蚕蛹一般经过了高温和强碱等理化因素的作用, 其感官、理化性质发生了劣变, 目前主要用作动物饲料, 在一定程度上降低了蚕蛹资源的附加值, 也间接暴露出我国蚕桑产业的产品结构单一等问题。因此, 如何更好地开发利用缫丝蚕蛹, 提高其附加值成为了推动我国蚕桑产业发展的关键环节之一。

随着生物技术的发展, 发现一些分子质量介于蛋白质和氨基酸的多肽具有极强的生物活性, 如抗菌、增强免疫、抗氧化、降血压、降胆固醇、矿物结合、

抗血栓、促生长、抑制肿瘤转移等作用^[6-7]。这些生理功能是原蛋白所不具备或不可比拟的。通过酶解是制备生物活性肽的重要手段, 同时酶解能够改善缫丝蚕蛹劣变的感官品质, 这为缫丝蚕蛹蛋白的开发利用提供了新途径。

本文以缫丝蚕蛹蛋白为原料, 通过多种酶单独或组合对其进行水解, 研究获得最大水解度的酶解条件, 以期对缫丝蚕蛹蛋白的深度开发与利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

缫丝蚕蛹 由重庆合川太和丝厂提供; 缫丝蚕蛹蛋白 自制, 蛋白质含量 77.31%; 胃蛋白酶(酶活 20 万 U/g)、胰蛋白酶(酶活 20 万 U/g) Solarbio 公司; 中性蛋白酶(酶活 10 万 U/g)、碱性蛋白酶(酶活 20 万 U/g)、蚕蛹蛋白水解专用酶(酶活 30 万 U/g)

南宁东恒华道生物科技有限公司; 木瓜蛋白酶(酶活 80 万 U/g)、风味酶(酶活 3 万 U/g)、胰酶(酶活 4000 U/g) 广西南宁庞博生物工程有限公司; 其他常用试剂 均为分析纯。

pHs-3C 酸度计 上海三信仪表厂; 5810 型台式高速离心机 Eppendorf 中国有限公司; UV-2405 分

收稿日期: 2014-01-10 * 通讯联系人

作者简介: 钟雨坤(1991-), 男, 硕士, 研究方向: 食品安全与质量控制。

基金项目: 国家蚕桑产业技术体系蚕茧综合利用项目(CARS-22-ZJ0503); 公益性行业(农业)科研专项项目(201303053)。

光光度计 日本岛津(中国)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 缂丝蚕蛹蛋白酶解用酶的筛选 以水解度为指标来确定酶解缂丝蚕蛹蛋白的较佳酶。

将脱脂缂丝蚕蛹蛋白粉过 60 目筛,用 8 种蛋白酶水解,探讨不同水解时间对水解度的影响。水解条件是生产厂商提供的各酶的最适水解条件,在恒温水浴中维持温度恒定,以 1mol/L 的 HCl 或 NaOH 维持 pH 恒定,水解条件如表 1 所示。

表 1 单酶水解缂丝蚕蛹蛋白的水解条件

Table 1 Hydrolysis conditions on silkworm pupa protein by single enzyme

编号	蛋白酶名称	底物浓度 (%)	加酶量 (%)	pH	温度 (℃)
E1	胃蛋白酶	5	2	2.0	37
E2	中性蛋白酶			7.0	50
E3	碱性蛋白酶			10.0	50
E4	胰蛋白酶			7.5	50
E5	木瓜蛋白酶			7.0	50
E6	风味蛋白酶			7.0	50
E7	蚕蛹蛋白水解专用酶			7.5	55
E8	胰酶			8.0	50

分别酶解 6h,然后于沸水浴中加热 10min 使酶灭活,流动水冷却酶解液,用纯水补足水解过程中蒸发的水分,4000r/min 离心 15min,收集上清液测定水解度。水解度计算公式^[8]如下:

水解度(%) = $\frac{\text{氨基酸总量}}{\text{总氮量}} \times 100$

采用凯氏定氮法测定酶解液的总氮量^[8],双指示剂甲醛滴定法测定氨基酸态氮含量^[9]。

1.2.2 缂丝蚕蛹蛋白酶解条件的优化

1.2.2.1 单因素实验优化酶解条件 在研究一项实验条件时,固定其他实验条件不变,考察待研究因素变化对水解度的影响。

pH 对水解度的影响:底物浓度 5%,温度 55℃,加酶量 2%,采用 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 调节水解体系的 pH,设定 pH 分别为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0,酶解 4h 后灭酶离心,测酶解液总氮和氨基酸态氮含量,计算水解度。

底物浓度对水解度的影响:加酶量 2%,温度为 55℃,pH8.0,底物浓度分别为 1%、3%、5%、10%、15%、20%、25%,并按上述方法计算水解度。

加酶量对水解度的影响:底物浓度 5%,pH8.0,温度 55℃,加酶量分别为 0.5%、1.0%、2.0%、4.0%、6.0%、8.0%,并按上述方法计算水解度。

温度对水解度的影响:底物浓度 5%,加酶量 2%,pH8.0,设温度分别为 45、50、55、60、65℃,并按上述方法计算水解度。

1.2.2.2 响应曲面法优化酶解条件的实验 在单因素实验最佳水平左右的小范围内,以水解度为响应值(Y),用响应面法进一步优化酶解条件。根据中心组合实验设计原理,采用四因素五水平的响应面分析方法设计实验,分析因素与设计见表 2。

表 2 响应面分析因素与水平

Table 2 Variables and levels in central composite design

编码	因素			
	X ₁ pH	X ₂ 底物浓度 (%)	X ₃ 加酶量 (%)	X ₄ 温度 (℃)
+1.682	10	9	4	65
+1	9	7	3	60
0	8	5	2	55
-1	7	3	1	50
-1.682	6	1	0	45

1.2.3 数据处理方式 每项实验重复 3 次以上,实验结果取平均值,采用 Excel 2007、SPSS17.0 进行数据分析,Excel 2007 软件做图。

2 结果与分析

2.1 缂丝蚕蛹蛋白酶解用酶的筛选

酶解蛋白质所得多肽的生理活性与蛋白酶的种类和水解度^[10]有密切关系。以水解度为指标,对实验用的 8 种蛋白酶是否适于缂丝蚕蛹蛋白的水解进行探讨,结果如图 1 所示。

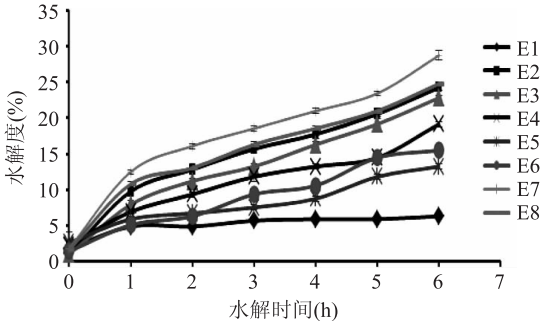


图 1 缂丝蚕蛹蛋白酶解后水解度的比较

Fig.1 Comparison of the silkworm pupa protein hydrolysis degree

由图 1 可见,缂丝蚕蛹蛋白的酶解从开始至 4h 内,水解度的增加相对较快且达到较高的水平,并且还需综合考虑蛋白质品质和投入产出比的因素,因而后面的实验选用 4h 作为酶解时间。

不同蛋白酶水解缂丝蚕蛹蛋白 4h 时所得水解度的结果如图 2 所示。

对图 2 进行显著性分析的结果表明,在加酶量、底物浓度、酶解时间一定时,E7(蚕蛹蛋白水解专用酶)对缂丝蚕蛹蛋白的水解较其他蛋白酶具有显著优势。因此,以下将通过单因素实验和响应面法对 E7 水解缂丝蚕蛹蛋白的条件进行优化。

2.2 单因素实验对 E7 酶解缂丝蚕蛹蛋白条件的优化

2.2.1 pH 对缂丝蚕蛹蛋白水解度的影响 酶的活性部位由结合部位和催化部位组成,结合部位和催化部位的基团对反应体系的 pH 变化比较敏感^[11-13]。用蚕蛹蛋白水解专用酶水解缂丝蚕蛹蛋白,pH 对水解度的影响如图 3 所示。

由图 3 可知,当 pH8.0 时,底物浓度 5%,加酶量 2%,温度 55℃时,E7 对缂丝蚕蛹蛋白的水解度达到最大,为 21.15%。这说明酶催化体系中作为底物的

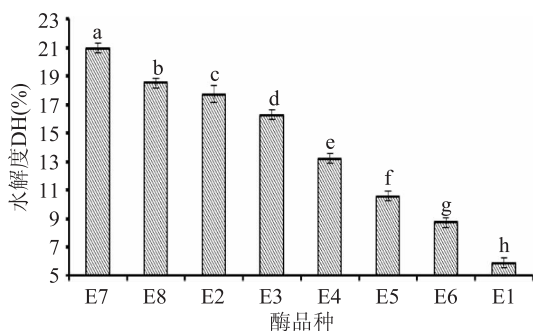


图2 缂丝蚕蛹蛋白酶解4h时水解度的比较

Fig.2 Comparison of the silkworm pupa protein hydrolysis degree after 4 hours of enzymolysis
注:上标为水解度的显著性分析,不同字母表示水解缂丝蚕蛹蛋白的水解度之间具有显著性差异 ($p < 0.05$),图3~图6同。

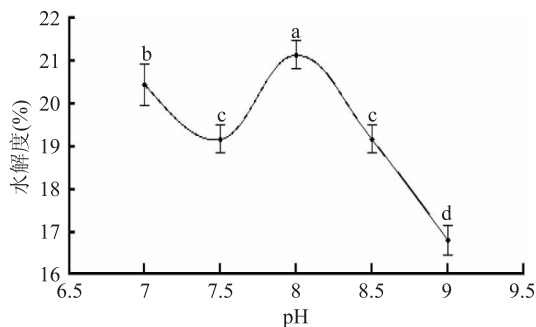


图3 pH对缂丝蚕蛹蛋白水解度的影响

Fig.3 The effect of pH on

silkworm pupa protein hydrolysis degree

蚕蛹蛋白在 pH8.0 时表现出较好的解离状态。因此,选取 pH8.0 作为其较佳的酶解 pH。

2.2.2 底物浓度对缂丝蚕蛹蛋白水解度的影响 适当的底物浓度有利于反应向生成物方向进行。用蚕蛹蛋白水解专用酶水解缂丝蚕蛹蛋白,底物浓度对水解度的影响如图4所示。

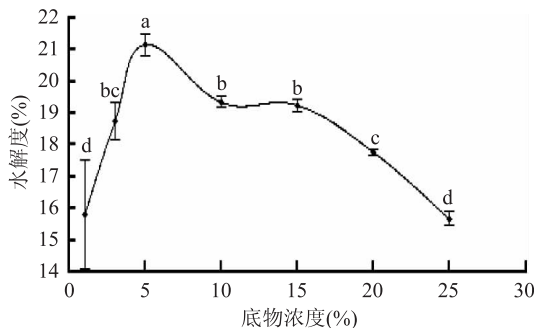


图4 底物浓度对蚕蛹蛋白水解度的影响

Fig.4 The effect of substrate concentration on silkworm pupa protein hydrolysis degree

由图4可知,当底物浓度为5%,pH8.0,加酶量2%,温度55℃时其水解度达到最大值,为21.15%。这说明当底物浓度低于5%时,氨基酸得率少,水解效率低;当底物浓度高于5%时,酶的稳定性下降,且酶活力也受到抑制。因此,选取5%作为较佳的底物浓度。

2.2.3 加酶量对缂丝蚕蛹蛋白水解度的影响 在底物浓度一定时,底物的转化率取决于酶浓度,酶浓度越大,酶与蛋白质接触的几率增加,底物转化的能力也就相应增加^[14]。酶解缂丝蚕蛹蛋白的酶用量对水解度的影响如图5所示。

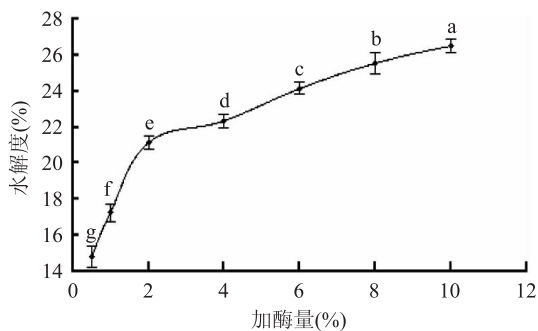


图5 加酶量对缂丝蚕蛹蛋白水解度的影响

Fig.5 The effect of additive amount of protease on silkworm pupa protein hydrolysis degree

由图5可见,在 pH8.0,底物浓度5%,温度55℃时,在实验的加酶量范围内,当加酶量在2%以内时,水解度的增加很快;当加酶量超过2%后,水解度的增加趋缓。同时还需综合考虑酶的成本和目标水解度的要求,因此选取2%作为较适宜的加酶量。

2.2.4 温度对缂丝蚕蛹蛋白水解度的影响 酶催化反应存在着最适温度。在最适温度以下,随着温度的升高,反应速度越快。如果超过酶的最适温度,将导致酶变性,使酶活性减弱甚至丧失^[15]。缂丝蚕蛹蛋白酶解温度对水解度的影响如图6所示。

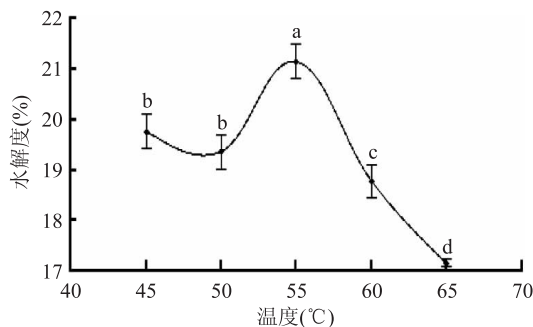


图6 温度对缂丝蚕蛹蛋白水解度的影响

Fig.6 The effect of temperature on silkworm pupa protein hydrolysis degree

由图6可知,在 pH8.0,底物浓度5%,加酶量2%,当温度达到55℃时,水解度达到最大值,为21.15%。这说明55℃为酶的最适温度,当超过55℃时,维持酶分子结构的次级键解体,使得酶活性减弱甚至丧失。因此,选取55℃作为酶解的适宜温度。

通过单因素实验,得到蚕蛹蛋白水解专用酶酶解缂丝蚕蛹蛋白的最优条件是 pH8.0,底物浓度5%,加酶量2%,温度55℃。

由于单因素优化方法是在其他因素不变的条件下,每次优化一个因素而得到的,忽略各因素间的交互作用。为了得到最优的酶解条件,在单因素实验的基础上,应用响应面法优化蚕蛹蛋白水解专用酶酶解缂丝蚕蛹蛋白的条件。

2.3 响应面法优化 E7 水解缬丝蚕蛹蛋白的条件

E7 酶解条件的中心组合设计得到的实验结果见表 3。

表 3 响应面分析方案及实验结果

Table 3 Scheme and results of response surface analysis					
实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	水解度 (%)
1	0	0	0	-1	19.18
2	-1	-1	+1	-1	19.44
3	+1.682	0	0	0	13.05
4	-1	-1	+1	+1	20.76
5	+1	+1	-1	+1	13.27
6	+1	-1	+1	+1	14.50
7	-1	+1	-1	+1	16.52
8	0	0	0	0	17.79
9	+1	+1	+1	+1	15.67
10	0	+1.682	0	0	19.33
11	0	0	0	+1.682	15.42
12	0	0	0	0	17.99
13	0	0	0	0	18.98
14	-1	-1	-1	+1	16.47
15	0	-1.682	0	0	17.79
16	+1	-1	+1	-1	17.46
17	-1	+1	-1	-1	13.98
18	-1	+1	+1	-1	21.18
19	0	0	0	0	19.77
20	-1	-1	-1	-1	14.83
21	+1	-1	-1	-1	13.18
22	-1	+1	+1	+1	20.33
23	+1	+1	-1	-1	5.65
24	0	0	0	-1.682	19.77
25	+1	-1	-1	+1	12.19
26	+1	+1	+1	-1	17.37
27	0	0	+1.682	0	22.54
28	-1.682	0	0	0	16.01
29	0	0	-1.682	0	6.52
30	0	0	0	0	20.99

利用 Design Expert 7.0 软件对实验结果进行响应面分析,得出回归模型参数的方差分析见表 4。

对响应值与各因素进行回归拟合后,得到的回归方程如下:

$$Y = 42.08 - 0.019X_1 + 0.047X_2 + 0.13X_3 + 0.029X_4 + 0.038X_1X_2 - 0.022X_1X_3 - 0.19X_1X_4 + 0.065X_2X_3 - 0.23X_2X_4 + 0.055X_3X_4 - 0.25X_1^2 - 0.39X_2^2 - 0.71X_3^2 - 0.41X_4^2$$

回归方程中各变量对响应值影响的显著性由 F 值来判断,概率 $p(F > Fa)$ 值越小,则相应变量的显著程度越高。模型 p 值小于 0.01,表示模型高度显著,失拟项 $p = 0.0631 (> 0.05)$,影响不显著,说明未知因素对实验结果干扰小。 $R^2 = 0.9907$,说明模型拟合程度良好,实验误差小。因此,回归方程可以较好的描述各因素与响应值之间的真实关系。

表 4 回归方程系数方差分析

Table 4 The variance analysis of regression equation

来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	388.05	14	0.34	106.16	0.0005	极显著
X ₁	67.17	1	67.17	15.30	0.0014	极显著
X ₂	0.013	1	0.013	0.030	0.8652	不显著
X ₃	219.89	1	219.89	50.08	<0.0001	极显著
X ₄	0.18	1	0.18	0.040	0.8435	不显著
X ₁ X ₂	2.16	1	2.16	0.49	0.4934	不显著
X ₁ X ₃	0.040	1	0.040	9114E-003	0.9252	不显著
X ₁ X ₄	0.45	1	0.45	0.10	0.7533	不显著
X ₂ X ₃	5.82	1	5.82	1.33	0.2677	不显著
X ₂ X ₄	4.64	1	4.64	1.06	0.3204	不显著
X ₃ X ₄	14.09	1	14.09	3.21	0.0934	不显著
X ₁ ²	41.42	1	41.42	9.43	0.0078	极显著
X ₂ ²	1.34	1	1.34	0.31	0.5885	不显著
X ₃ ²	41.42	1	41.42	9.43	0.0078	极显著
X ₄ ²	5.87	1	5.87	1.34	0.2655	不显著
残差	65.86	15	4.39			
失拟项	58.86	10	5.89	4.21	0.0631	不显著
误差	6.99	5	1.40			
总和	453.91	29				

pH 和加酶量的 p 值均小于 0.01,说明其对水解度的影响极显著;底物浓度和温度的 p 值大于 0.05,说明其对水解度影响不显著;各交互项的 p 值均大于 0.05,说明各因素间的交互作用对水解度的影响不显著,因此后面没有列出各因素的交互作用图;pH 和加酶量的二次项对水解度的影响也是极显著的,而底物浓度和温度的二次项不显著。

由响应面优化结果可知,在水解时间为 4h 时,蚕蛹蛋白水解专用酶水解缬丝蚕蛹蛋白的最佳条件为:底物浓度为 7%,温度 53.09℃,pH7.2,加酶量 3%,水解度预测值为 22.09%。为了便于对实验条件进行控制,验证实验时将温度设为 53℃,底物浓度为 7%,pH7.2,加酶量为 3%,得到的实际水解度为 21.44%,与预测值无显著差异($p < 0.05$)。证明实验设计与分析方法是准确可靠的。

验证实验得到的最优水解度与单因素实验的结果(水解度 21.15%)无显著差异($p < 0.05$),这是由于在实验的范围内底物浓度和温度对水解度的影响不显著,各因素交互作用的对水解度的影响也不显著,说明单因素实验已得到了较好结果。在 pH7.2~8.0,底物浓度 5%~7%,加酶量 2%~3%,温度 53~55℃的范围内均可得到较高的水解度。

3 结论

单酶水解时,8 种蛋白酶中蚕蛹蛋白水解专用酶对缬丝蚕蛹蛋白的水解度最高,达到 20.98%。因而蚕蛹蛋白水解专用酶最适于水解缬丝蚕蛹蛋白。

在水解时间为 4h 的条件下,通过单因素实验和响应面法优化后确定其最佳酶解参数为:pH7.2,底

(下转第 240 页)

次,在此条件下,去皮绿豆中多糖的得率可以达到4.32%,经 Sevag 法脱蛋白后,多糖纯度可以达到50.35%,其中蛋白质含量为31.26%。

通过响应面分析法可以确定各因素及其交互作用在工艺过程中对响应值的影响,精确表达因素和响应值之间的关系,并为寻求最优实验条件并降低开发的时间和成本。利用响应面分析法优化从去皮绿豆中提取可溶性绿豆多糖的工艺条件,可以有效地降低工艺条件组合的繁杂性,为绿豆的综合利用提供一些理论指导。

参考文献

- [1] 李敏.绿豆化学成分及药理作用的研究概况[J].上海中医药杂志,2001,35(5):47-48.
- [2] Mubarak A E. Nutritional composition and anti-nutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes [J]. Food Chemistry, 2005, 89: 489-495.
- [3] Wu Q, Tan Z P, Liu H D, et al. Chemical characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its pharmacological effect on heart antioxidant enzyme activities and left ventricular function in aged mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46: 284-288.
- [4] 李一莉,林晓红.绿豆胰蛋白酶抑制剂片段及其类似物的合成[J].中国科学:B辑,1994,24(1):42-47.
- [5] 赖富饶.超声波辅助提取芸豆种皮水溶性多糖的优化工艺研究[J].食品工业科技,2010,31(2):203-207.
- [6] 达娃,戴岑,席美丽.绿豆多糖的提取工艺研究[J].陕西农业科学,2010(1):23-25.
- [7] 闵甜,吴晖,赖富饶,等.超声辅助提取绿豆皮水溶性多糖工艺优化[J].食品科学,2012,33(14):6-10.

(上接第235页)

物浓度7%,加酶量3%,温度53℃,其水解度达到21.44%。

参考文献

- [1] 封槐松.我国蚕桑业历史辉煌未来需要我们去努力开创[R].杭州:农业部种植业管理司经作处,2012.
- [2] 董烨平,吴琼英.蚕蛹蛋白开发与利用现状[J].农产品加工(学刊),2010(6):17-20.
- [3] 吕汶骏,赵钟兴,廖丹葵,等.蚕蛹蛋白及其水解产物中氨基酸组成分析[J].食品科学,2012(12):228-232.
- [4] 王彦平,刘洁,吴予明,等.蚕蛹的营养成分分析[J].郑州大学学报:医学版,2009(3):638-641.
- [5] 汪涛,吴大洋,刘伦杰,等.蚕蛹综合利用产品研发现状及原料前处理工艺探讨[J].蚕业科学,2009,35(3):692-695.
- [6] ARIHARA K. Strategies for designing novel functional meat products[J]. Meat Science, 2006(1): 219-229.
- [7] 李勇.生物活性肽研究现状和进展[J].食品与发酵工业,2007(1):3-9.

- [8] 钟葵,曾志红,林伟静,等.绿豆多糖的制备及其抗氧化特性研究[J].中国粮油学报,2013,28(2):93-95.
- [9] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956;28:350-356.
- [10] Lai F R, Wen Q B, Li L, Wu H, et al. Antioxidant activities of water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (*Vigna radiata* L.) hull with ultrasonic assisted treatment [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81: 323-329.
- [11] Staub A M. Removal of protein-Sevag method [M]. Methods in Carbohydrate Chemistry, 1965, 5: 5-6.
- [12] Zhu C P, Liu X L. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from Pomegranate peel by response surface methodology [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92: 1197-1202.
- [13] Sun Y X, Liu J C, Kennedy J F. Application of response surface methodology for optimization of polysaccharides production parameters from the roots of *Codonopsis pilosula* by a central composite design [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80: 949-953.
- [14] 杨宇博,夏红梅,袁恒翼.植物多糖及其提取方法[J].中国甜菜糖业,2008(2):34-37.
- [15] 董英,徐斌,陆琪,等.水提苦瓜多糖的分离纯化及组成性质研究[J].食品科学,2005,26(11):115-119.
- [16] Sun Y X, Liu J C, Kennedy J F. Application of response surface methodology for optimization of polysaccharides production parameters from the roots of *Codonopsis pilosula* by a central composite design [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80: 949-953.
- [17] 胡成旭,候欣彤,冯永宁,等.响应面法优化云芝多糖提取条件的研究[J].食品工业科技,2007(7):124-127.
- [18] Box G E, Hunter W G. Statistics for experiments: an introduction to design, data analysis and model building [M]. New York: Wiley 1978.

- [8] 吕顺,林琳,向蔚,等.鲢鱼皮明胶的水解工艺[J].食品科学,2013,34(5):156-160.
- [9] 北京市卫生防疫站,邯郸市卫生防疫站,唐山市卫生防疫站. GB/T 500939-2003. 酱油卫生标准的分析方法[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会,2003, 317-323.
- [10] 杨梅琳.蚕蛹蛋白的酶法水解及其产物的抗氧化性研究[D].无锡:江南大学,2006.
- [11] 蔡丽华,马美湖.4种常用蛋白酶对牛骨蛋白的酶解动力学研究[J].食品科学,2010(5):150-154.
- [12] 李积华,郑为完,苏冰霞,等. Alcalase 2.4 L FG 酶解米渣蛋白动力学特性研究[J].食品科学,2007(5):190-194.
- [13] 吴晖,罗美琪,唐语谦,等.酶解丝素蛋白制备ACE抑制肽的研究[J].现代食品科技,2011(12):1461-1465.
- [14] 林高堂,蒋立文,颜新培.单酶水解蚕蛹蛋白工艺条件研究[J].广东蚕业,2008,22(4):25-31.
- [15] 白小佳,宋庆明,肖萍,等.碱性蛋白酶水解蚕豆蛋白的条件优化[J].食品研究与开发,2010(4):126-129.