

复合酶法提取仿栗籽蛋白的工艺优化

麻成金^{1,2}, 黄伟², 黄群^{2,3}, 冯磊², 吴丽雅^{2,3}, 苏超²

(1.吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室, 湖南张家界 427000; 2.吉首大学食品科学研究所, 湖南吉首 416000;

3.吉首大学植物保护与利用湖南省高校重点实验室, 湖南吉首 416000)

摘要:以仿栗籽为原料,选择多种酶对其蛋白质进行提取,筛选出纤维素酶与木瓜蛋白酶进行复合酶解试验。以蛋白提取率为指标,在单因素试验的基础上,采用二次通用旋转组合设计对复合酶提取仿栗籽蛋白工艺进行优化。结果表明:复合酶提取仿栗籽蛋白优化工艺条件为料液比1:25、总加酶量370U/g、以纤维素酶与木瓜蛋白酶的加酶量配比6:4同时加入、酶解温度57℃、酶解时间80min、酶解pH7.6。在此优化条件下,仿栗籽蛋白提取率为74.91%。

关键词:仿栗籽蛋白;提取;复合酶解;二次通用旋转组合设计

Optimization of Dual-Enzymatic Hydrolysis for Protein Extraction from *Sloanea hemsleyana* Seeds

MA Cheng-jin^{1,2}, HUANG Wei², HUANG Qun^{2,3}, FENG Lei², WU Li-ya^{2,3}, SU Chao²

(1. Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University,

Zhangjiajie 427000, China; 2. Institute of Food Science, Jishou University, Jishou 416000, China;

3. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Utilization of Hunan Province, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstract: Dual-enzymatic hydrolysis of *Sloanea hemsleyana* seeds with cellulase and papain was the best way for protein extraction as demonstrated by a comparison of the hydrolysis efficiencies of 6 different enzymes on *Sloanea hemsleyana* seeds. The effects of simultaneous or stepwise hydrolysis, cellulase/papain ratio, solid/solvent ratio, total enzyme dosage, temperature, hydrolysis time and pH on protein yield were investigated using one-factor-at-a-time design. Further, total enzyme dosage, temperature, hydrolysis time and pH were optimized using quadratic regression universal rotary combination design. The optimal hydrolysis conditions for protein extraction from *Sloanea hemsleyana* seeds were determined as follows: *Sloanea hemsleyana* seed meal was suspended in deionized water at a solid/liquid ratio of 1:25, and added simultaneously with cellulase and papain at a ratio of 6:4 until a total enzyme dose of 370 U/g for hydrolysis at pH 7.6, 57 °C for 80 min. Under these conditions, the extraction yield of protein from *Sloanea hemsleyana* seeds was 74.91%.

Key words: *Sloanea hemsleyana* seed protein; extraction; dual-enzymatic hydrolysis; quadratic regression universal rotary combination design

中图分类号: TS201.2; TS229

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)20-0027-06

仿栗(*Sloanea hemsleyana* (Ito) Rehd. et Wils)系杜英科猴欢喜属常绿乔木,主要分布在我国西南地区,仿栗果实产量较高,其种籽含油率最高可达58%,是一种具有开发前景的木本油料植物^[1]。仿栗籽不仅可以用来制备高级食用植物油和作为生物柴油原料油,而且脱脂后籽粕含有丰富的蛋白质(约为20%~25%),开发利用价值较高^[2-3]。

目前,植物蛋白提取方法主要有碱法和酶法。碱法虽然操作简单、生产成本低,但在提取率、卫生安全、营养特性等方面存在缺陷;酶法是利用酶对细胞壁或蛋

白的降解,促使植物蛋白溶出,具有反应条件温和等优点,是一种高效、环保的植物蛋白提取技术^[4-6]。目前,国内外已有利用酶法提取大豆、花生、大米等植物蛋白的研究报道^[4-9],但尚未见关于仿栗籽蛋白酶法提取工艺的研究文献。本实验以仿栗籽为原料,蛋白提取率为指标,从几种常用的商品酶中筛选提取效果较好的酶制剂进行复合酶解试验,并在单因素试验的基础上,通过二次通用旋转组合设计对复合酶提取仿栗籽蛋白工艺条件进行优化,旨在为仿栗籽综合利用提供科学的依据。

收稿日期: 2012-07-09

基金项目: 林产化工工程湖南省重点实验室开放项目(JDZ201101); 湖南省高校创新平台开放基金项目(09K089)

作者简介: 麻成金(1963—),男,教授,硕士,研究方向为食物资源开发与利用。E-mail: machengjin368@126.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

仿栗籽: 10月上旬采摘, 取出籽干燥后密封保存。

碱性蛋白酶(20万U/g)、酸性蛋白酶(5万U/g) 北京奥博星生物技术有限公司; 中性蛋白酶(10万U/g)、木瓜蛋白酶(100万U/g)、纤维素酶(140万U/g)、果胶酶(100万U/g) 湖州米纯生物科技有限公司; 盐酸、氢氧化钾、硫酸钾等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

JA5103电子天平 上海民桥精密科学仪器有限公司; 722型可见分光光度计 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; THZ-82A水浴恒温振荡器 金坛市顺华仪器有限公司; PHS-25数字式pH计 上海伟业仪器厂; LXJ-II B离心机 上海安亭科学仪器厂; FD5-2.5冻干机 美国SIM公司。

1.3 方法

1.3.1 工艺流程

仿栗籽→粉碎→脱脂→抽滤→干燥→过筛→仿栗籽粕→加酶浸提→灭酶→离心分离→上清液→酸沉→离心分离→冷冻干燥→仿栗籽粗蛋白

1.3.2 蛋白提取率的测定与计算

原料中蛋白含量测定: 采用半微量凯氏定氮法, 参照GB 5009.5—2003《蛋白质的测定》; 仿栗籽提取蛋白含量通过测定酶解上层清液中蛋白含量来获得, 酶解上层清液中蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法^[10]。计算仿栗籽蛋白提取率公式如下:

$$\text{蛋白提取率}/\% = \frac{\text{提取蛋白的质量}}{\text{原料中蛋白含量}} \times 100$$

1.3.3 试验设计

1.3.3.1 酶制剂的筛选

按照酶作用位点的不同, 选取几种常用商品酶(纤维素酶、果胶酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶)进行酶解试验。确定适宜的酶制剂, 并根据生产厂家提供的酶作用最适条件及预试验结果来设定酶制剂的反应条件^[11-12]。

1.3.3.2 复合酶加酶方式的确定

选取酶解效果较好的两种酶制剂进行复合酶解试验, 分同时加入及分步加入两种方式考察加酶方式对蛋白提取率的影响。其中酶分步加入时需灭活第1种酶、调节pH值后再加入第2种酶^[12]。

1.3.3.3 复合酶加酶量配比的确定

在确定酶制剂种类及加酶方式基础上, 固定总加酶量为400U/g, 研究两种酶制剂间不同加酶量对比对蛋白提取率的影响。

1.3.3.4 单因素试验

在确定酶制剂种类、加酶方式及加酶量配比基础上, 分别对料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40)、总加酶量(200、250、300、350、400、450、500U/g)、酶解温度(40、45、50、55、60、65、70℃)、酶解时间(20、40、60、80、100、120、140min)和酶解pH值(6.0、6.4、6.8、7.2、7.6、8.0、8.4)进行单因素试验, 考察各因素对蛋白提取率的影响。

1.3.3.5 二次通用旋转组合设计优化试验

在单因素试验的基础上, 选取总加酶量、酶解温度、酶解pH值和酶解时间4个主要因素进行二次通用旋转组合试验设计, 以蛋白提取率为评价指标, 采用DPS 7.05软件进行数据分析, 对复合酶提取仿栗籽蛋白工艺条件进行优化。

2 结果与分析

2.1 仿栗籽粕蛋白含量的测定

采用半微量凯氏定氮法测定仿栗籽粕蛋白含量, 进行3次平行实验取平均值, 得出本实验所用仿栗籽粕蛋白含量为21.27%。

2.2 酶制剂的筛选

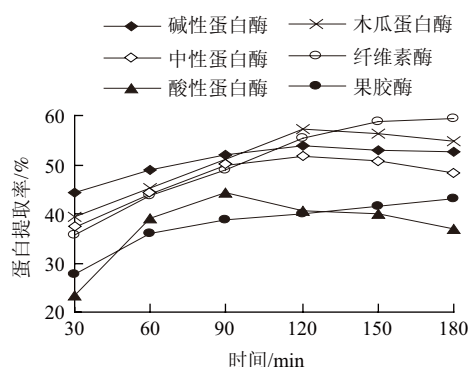


图1 不同酶制剂对蛋白提取率的影响
Fig.1 Effect of enzyme type on the extraction yield of protein

由图1可知, 纤维素酶的提取效果最好, 木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶次之, 其他酶制剂较差。这可能是由于酶作用位点的不同以及蛋白质在不同pH值环境中溶解性不同导致的。由图1可知, 当酶解时间超过120min以后, 纤维素酶与木瓜蛋白酶的提取效果明显优于其他酶制剂, 选取纤维素酶与木瓜蛋白酶进行复配。

2.3 复合酶加酶方式的确定

选取纤维素酶与木瓜蛋白酶两种酶制剂, 固定总加酶量固定400U/g、加酶量配比1:1分同时加入与分步加入进行加酶方式研究, 复合酶提取仿栗籽蛋白的不同酶解方案、参数及试验结果见表1。由表1可知, 纤维素酶与木瓜蛋白酶同时加入的提取效果较好, 这可

能是因为分步加入时两次灭酶处理导致蛋白变性的结果^[13]。故选择纤维素酶与木瓜蛋白酶同时加入进行后续试验。

表1 复合酶提取仿果籽蛋白的酶解方案及结果

Table 1 Effect of simultaneous or stepwise hydrolysis with cellulase and papain on the extraction yield of protein

酶解方案	温度/℃	pH	时间/min	蛋白提取率/%
同时加入纤维素酶、木瓜蛋白酶	50	7.0	100	64.75±0.21
先加入纤维素酶，后加入木瓜蛋白酶	55→50	7.2→6.5	50→50	54.85±0.17
先加入木瓜蛋白酶，后加入纤维素酶	50→55	6.5→7.2	50→50	61.14±0.23

2.4 复合酶加酶量配比的确

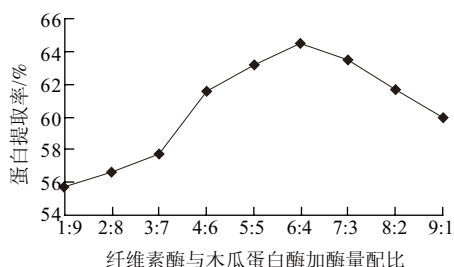


图2 加酶量比对蛋白提取率的影响

Fig.2 Effect of cellulase/papain ratio on the extraction yield of protein

由图2可知，纤维素酶与木瓜蛋白酶加酶量配比为6:4时蛋白提取率最高，达到(64.47±0.25)%。因此后续试验均采用以纤维素酶:木瓜蛋白酶=6:4配比同时加入的酶解方式进行。

2.5 单因素试验

2.5.1 料液比对蛋白提取率的影响

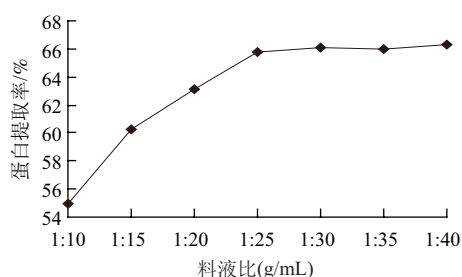


图3 料液比对蛋白提取率的影响

Fig.3 Effect of solid/solvent ratio on the extraction yield of protein

在总加酶量400U/g、复合酶加酶量配比6:4、酶解温度50℃、酶解时间70min、酶解pH7.0的条件下，进行料液比对蛋白提取率影响试验，结果见图3。由图3可知，随着料液比的增大，蛋白提取率逐渐增加，当料液比达到1:25后，蛋白提取率增加平缓。这是因为料液比虽有利于酶和底物的相互作用，但此时体系黏度大且蛋白

质不能充分浸润，影响传质过程；增大料液比可降低溶液黏度，加快传质过程，但也降低了酶与底物接触的几率^[14]，因此，当料液比达到一定值后，蛋白提取率变化并不明显。故选择料液比为1:25为宜。

2.5.2 总加酶量对蛋白提取率的影响

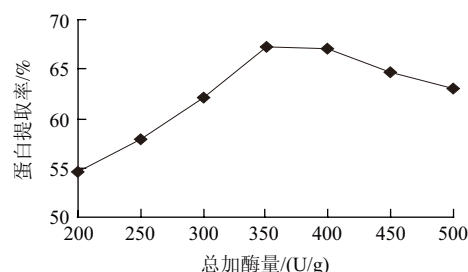


图4 总加酶量对蛋白提取率的影响

Fig.4 Effect of total enzyme dose on the extraction yield of protein

在复合酶加酶量配比6:4、料液比1:20、酶解温度50℃、酶解时间70min、酶解pH7.0条件下，进行总加酶量对蛋白提取率影响试验，结果见图4。由图4可知，蛋白提取率随着加酶量的增加而不断增加，在350U/g时提取率最高，当加酶量超过350U/g提取率开始下降。这是因为加入酶制剂后，纤维素酶降解了植物细胞壁的纤维素骨架，使蛋白质更易从细胞内释出，从而提高了蛋白质的提取率；但随着总加酶量的继续增加，过多的酶作用于已经溶出的蛋白质使其水解^[15]，因此降低了蛋白提取率。故总加酶量选择350U/g为宜。

2.5.3 酶解温度对蛋白提取率的影响

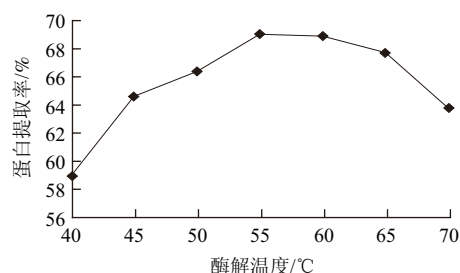


图5 酶解温度对蛋白提取率的影响

Fig.5 Effect of enzymolysis temperature on the extraction yield of protein

在总加酶量400U/g、复合酶加酶量配比6:4、料液比1:20、酶解时间70min、酶解pH7.0的条件下，进行酶解温度对蛋白提取率影响试验，结果见图5。由图5可知，蛋白提取率随着温度的升高不断增加，55℃时达到最大，继续升高温度反而下降。这是因为在一定温度范围内，随着温度升高，酶活力增大、酶与底物结合程度提高，有利于蛋白质提取；但温度过高会导致蛋白质变性，不仅降低了酶活力，而且会引起蛋白质的聚集和沉淀作用，使其溶解度下降，从而降低了蛋白提取率^[16]。因此可选择55℃为酶解温度。

2.5.4 酶解时间对蛋白提取率的影响

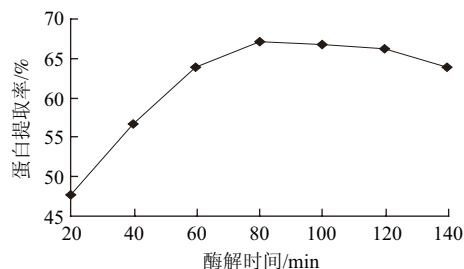


图6 酶解时间对蛋白提取率的影响

Fig.6 Effect of enzymolysis time on the extraction yield of protein

在总加酶量400U/g、复合酶加酶量配比6:4、料液比1:20、酶解温度50℃、酶解pH7.0的条件下,进行酶解时间对蛋白提取率影响试验,结果见图6。由图6可知,在反应初期,随着酶解时间的延长,蛋白提取率增加较快,到80min左右时提取率最高,继续延长时间提取率略有降低。这是因为反应前期底物浓度、酶活性较高,提取率上升较快;但随着酶解时间延长,反应产物的积累抑制了酶的活力,同时部分溶出蛋白质被水解,导致蛋白提取率下降^[16]。故酶解时间控制在80min左右为宜。

2.5.5 酶解pH值对蛋白提取率的影响

在总加酶量400U/g、复合酶加酶量配比6:4、料液比1:20、酶解温度50℃、酶解时间70min的条件下,进行酶解pH值对蛋白提取率影响试验,结果见图7。由图7可知,pH值对蛋白提取率影响较大,随着pH值的升高,蛋白提取率先升高,在pH值为7.2左右时提取效果最好,然后随pH值的进一步提高而下降。这是因为pH值会影响底物和酶的构象,从而影响酶的活力及其与底物的结合,导致蛋白提取率较低^[17]。故选择酶解pH7.2较适宜。

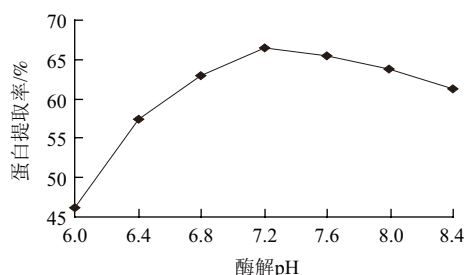


图7 酶解pH值对蛋白提取率的影响

Fig.7 Effect of enzymolysis pH on the extraction yield of protein

2.6 二次通用旋转组合设计优化试验

2.6.1 数学模型的建立与显著性检验

在单因素试验的基础上,选取总加酶量(X_1)、酶解温度(X_2)、酶解时间(X_3)和酶解pH值(X_4) 4个因素,以蛋白提取率(Y)为指标,采用二次通用旋转组合设计优化复合酶提取仿栗籽蛋白工艺条件。试验因素水平见表2,试验设计方案及结果见表3。

表2 复合酶提取仿栗籽蛋白工艺优化二次通用旋转组合设计试验因素水平表

Table 2 Variables and levels used in quadratic regression universal rotary combination design

编码值	因素			
	X_1 总加酶量/(U/g)	X_2 酶解温度/℃	X_3 酶解时间/min	X_4 酶解pH值
-2	250	45	40	6.4
-1	300	50	60	6.8
0	350	55	80	7.2
1	400	60	100	7.6
2	450	65	120	8.0

表3 复合酶提取仿栗籽蛋白工艺优化二次通用旋转组合设计试验结果

Table 3 Quadratic regression universal rotary combination design arrangement and corresponding results

编号	X_1	X_2	X_3	X_4	Y/%
1	1	1	1	1	71.68
2	1	1	1	-1	62.97
3	1	1	-1	1	70.85
4	1	1	-1	-1	62.31
5	1	-1	1	1	68.61
6	1	-1	1	-1	59.99
7	1	-1	-1	1	67.87
8	1	-1	-1	-1	59.3
9	-1	1	1	1	68.11
10	-1	1	1	-1	59.45
11	-1	1	-1	1	67.34
12	-1	1	-1	-1	58.71
13	-1	-1	1	1	65.07
14	-1	-1	1	-1	56.43
15	-1	-1	-1	1	64.24
16	-1	-1	-1	-1	55.61
17	-2	0	0	0	60.11
18	2	0	0	0	67.07
19	0	-2	0	0	64.99
20	0	2	0	0	71.03
21	0	0	-2	0	63.04
22	0	0	2	0	64.66
23	0	0	0	-2	56.17
24	0	0	0	2	73.41
25	0	0	0	0	73.05
26	0	0	0	0	72.76
27	0	0	0	0	73.04
28	0	0	0	0	72.58
29	0	0	0	0	69.98
30	0	0	0	0	72.97
31	0	0	0	0	73.01

利用DPS 7.05统计软件对表3的试验结果进行拟合分析,可得到回归模型:

$$Y = 72.48429 + 1.7725X_1 + 1.51583X_2 + 0.38833X_3 + 4.47833X_4 - 2.49878X_1^2 - 1.39378X_2^2 - 2.43378X_3^2 - 1.94878X_4^2 - 0.01375X_1X_2 - 0.015X_1X_3 - 0.0075X_1X_4 -$$

$$0.005X_2X_3 - 0.005X_2X_4 - 0.005X_3X_4$$

为说明数学模型的有效性及各因素对提取率的影响程度,对该模型进行方差分析,结果见表4。

表4 二次通用旋转组合设计试验方差分析表
Table 4 Analysis of variance for the experimental results of quadratic regression universal rotary combination design

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
X_1	75.4022	1	75.4022	51.5952	<0.0001	**
X_2	55.1460	1	55.1460	37.7346	<0.0001	**
X_3	3.6193	1	3.6193	2.4765	0.1351	
X_4	481.3313	1	481.3313	329.3588	<0.0001	**
X_1^2	178.5490	1	178.5490	122.1751	<0.0001	**
X_2^2	55.5507	1	55.5507	38.0115	<0.0001	**
X_3^2	169.3807	1	169.3807	115.9015	<0.0001	**
X_4^2	108.5993	1	108.5993	74.3108	<0.0001	**
X_1X_2	0.0030	1	0.0030	0.0021	0.9643	
X_1X_3	0.0036	1	0.0036	0.0025	0.9610	
X_1X_4	0.0009	1	0.0009	0.0006	0.9805	
X_2X_3	0.0004	1	0.0004	0.0003	0.9870	
X_2X_4	0.0004	1	0.0004	0.0003	0.9870	
X_3X_4	0.0042	1	0.0042	0.0029	0.9578	
回归	1011.8364	14	72.2740	$F_2=49.45469$	<0.0001	**
剩余	23.3827	16	1.4614			
失拟	15.8849	10	1.5885	$F_1=1.27117$	0.3226	不显著
误差	7.4978	6	1.2496			
总和	1035.2191	30				

注: **, 影响极显著, $P<0.01$; *, 影响显著, $0.01<P<0.05$ 。

从表4可知, 回归方程的显著性检验极显著, 失拟性检验不显著, 说明回归方程对试验点拟合较好, 回归方程的预测值与试验值非常吻合, 故该模型可用于仿栗籽蛋白复合酶提取的理论预测, 从F值可知, 各因素对蛋白提取率影响大小顺序为: 酶解pH值>总加酶量>酶解温度>酶解时间。由表4还可知, 除 X_3 以外, 线性项和平方项均达到了显著水平, 交互项均未达到显著水平。剔除回归方程中 $\alpha=0.1$ 水平上的不显著项, 可得到简化后的回归方程:

$$Y = 72.48429 + 1.7725X_1 + 1.51583X_2 + 4.47833X_4 - 2.49878X_1^2 - 1.39378X_2^2 - 2.43378X_3^2 - 1.94878X_4^2$$

2.6.2 单因素效应分析

为进一步分析试验中各因素对蛋白提取率的影响, 对回归模型进行降维处理。固定任意3个因素于零水平, 依次得到各个单因素与蛋白提取率的效应方程, 根据方程可得到单因素效应曲线, 如图8所示。

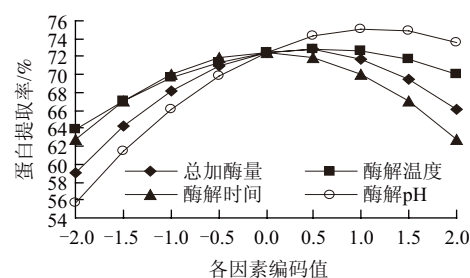


图8 单因素效应分析图

Fig.8 Analysis of the one-factor effect of four main hydrolysis parameters on the extraction yield of protein

由图8可知, 各因素对蛋白提取率的影响均呈先增大后减小的趋势, 其中酶解pH值变化幅度最大, 说明酶解pH值对蛋白提取率影响最大。图8中各曲线的变化趋势与前面单因素试验结果基本吻合, 也说明所建立的数学模型合适。

2.6.3 提取工艺的优化与验证

通过DPS 7.05软件分析, 采用频率分析法寻优, 其中提取率高于66.08%的方案有101个, 对数学回归模型进行分析, 结果见表5。从表5可知, 在95%的置信区间内提取率大于66.08%的优化提取方案为: 总加酶量359.03~376.35U/g、酶解温度56.4~58.45℃、酶解时间77~83min、酶解pH7.56~7.68。为便于指导实际生产, 将最优组合方案定为: 总加酶量370U/g、酶解温度57℃、酶解时间80min、酶解pH7.6。按此工艺条件进行验证实验, 重复3次, 结果取平均值, 实际测得提取率为74.91%, 与理论预测值75.88%接近, 进一步验证了数学回归模型合理。

表5 各变量取值的频率分布

Table 5 Frequency distribution of variable value in the optimization scheme

水平	X_1		X_2		X_3		X_4	
	次数	频率/%	次数	频率/%	次数	频率/%	次数	频率/%
-2	0	0	1	0.99	0	0	0	0
-1	18	17.82	20	19.8	30	29.7	1	0.99
0	38	37.62	29	28.71	41	40.59	27	26.73
1	36	35.64	31	30.69	30	29.7	39	38.61
2	9	8.91	20	1.98	0	0	34	33.66
加权均数	0.356		0.485		0		1.05	
标准误	0.087		0.104		0.104		0.08	
95%置信区间	0.186~0.527		0.280~0.690		-0.150~0.150		0.893~1.206	
提取条件	总加酶量359.03~376.35U/g		酶解温度56.4~58.45℃		酶解时间77~83min		酶解pH7.5572~7.6824	

3 结 论

从几种商品酶中筛选出纤维素酶、木瓜蛋白酶进行复合酶解试验,在单因素试验的基础上,选取总加酶量(X_1)、酶解温度(X_2)、酶解时间(X_3)和酶解pH值(X_4)进行二次通用旋转组合试验,建立了仿栗籽蛋白提取率(Y)的优化数学模型: $Y=72.48429+1.7725X_1+1.51583X_2+4.47833X_4-2.49878X_1^2-1.39378X_2^2-2.43378X_3^2-1.94878X_4^2$,该模型在本试验范围内能较好地预测仿栗籽蛋白提取率,采用频率分析法得到的复合酶提取仿栗籽蛋白的最佳工艺条件为料液比1:25(g/mL)、总加酶量370U/g、以纤维素酶与木瓜蛋白酶的加酶量配比6:4同时加入、酶解温度57℃、酶解时间80min、酶解pH7.6,在此工艺条件下,仿栗籽蛋白的提取率达到74.91%。

参考文献:

- [1] 李昌珠,张良波,向祖恒,等. 仿栗生物学特性及果实油脂含量分析[J]. 湖南林业科技, 2008, 35(2): 4-8.
- [2] 麻成金,吴竹青,傅伟昌,等. 响应面法优化仿栗籽油超临界萃取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(18): 196-202.
- [3] 胡欣欣,麻成金,黄群,等. 超声波辅助萃取仿栗籽油的研究[J]. 江苏食品与发酵, 2008(1): 11-14.
- [4] 官庭辉,李丹,张志翔,等. 酶法提取棉籽蛋白的工艺研究[J]. 中国油脂, 2011, 36(3): 25-28.
- [5] 王金水,李涛,焦健. 水酶法提取青稞蛋白工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(9): 267-269.
- [6] 逯与运,麻成金,黄群,等. 响应面优化超声波辅助水酶法提取蜡梅籽蛋白[J]. 中国食物与营养, 2010(9): 59-63.
- [7] 江利华,华娣,王璋,等. 水酶法从花生中提取油与水解蛋白的中试研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 35(9): 147-150.
- [8] PUCHONGKAVARIN H, VARAVINIT S, BENGTHALLER W. Comparative study of pilot scale rice starch production by an alkaline and an enzymatic process[J]. Starch/Stärke, 2005, 57(3/4): 134-144.
- [9] 杨柳,江连洲,李杨,等. 水酶法提取的大豆蛋白功能特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(6): 80-84.
- [10] 戴宇翔,钱志娟,曾晓雄,等. 菜籽蛋白提取工艺的优化[J]. 食品工业科技, 2011, 32(3): 304-306.
- [11] 徐红华,刘欣. 复合酶法改善大豆分离蛋白起泡性的工艺优化[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(1): 51-54.
- [12] 周艳华,马美湖,蔡朝霞,等. 复合酶解可溶性蛋膜蛋白制备多肽的工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 92-97.
- [13] CLEMETE A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition[J]. Trends in Food Sci Techn, 2000(11): 254-262.
- [14] 谭志光,唐书泽,汪勇,等. 酶法制取早籼米浓缩蛋白[J]. 食品科学, 2006, 27(4): 54-57.
- [15] 王雪飞,于国萍,徐红华. 不同酶类提取米糠蛋白的研究[J]. 中国粮油学报, 2004, 19(1): 8-11.
- [16] JEBRAIL M J, WHEELER A R. Digital microfluidic method for protein extraction by precipitation[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(1): 330-335.
- [17] 李杨,江连洲,隋晓楠,等. 复合酶水酶法提取大豆蛋白的工艺优化[J]. 食品科学, 2011, 32(14): 130-133.