

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250222001

引用格式: 罗联钰, 刘焯, 林幼红, 等. 扇贝蛋白质提取工艺的优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(13): 37–46.

LUO LY, LIU Y, LIN YH, *et al.* Optimization of protein extraction process from *Pectinidae* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(13): 37–46. (in Chinese with English abstract).

扇贝蛋白质提取工艺的优化

罗联钰, 刘焯, 林幼红, 艾永亮, 吴清朋, 刘家光*

(福建正味生物科技有限公司, 福州 350015)

摘要: **目的** 优化扇贝蛋白质提取工艺。**方法** 利用不同蛋白酶的酶切作用方式及酶切位点的不同, 采用复合酶与分段酶解相结合。利用单因素结合 Plackett-Burman 筛选出显著因素和 Box-Behnken 模型优化一段蛋白质提取工艺, 并通过正交实验优化二段酶解工艺参数。**结果** 复合酶分段酶解提取蛋白质的最佳条件为: 一段最佳提取工艺参数为: 固液比 1:3.9 (*m:V*)、酶解时间 80.0 min、复合酶加酶量 1.1%、复合酶配比(胰蛋白酶:碱性蛋白酶)1:2 (*m:m*)、酶解 pH 8.2、酶解温度 52.5 °C; 二段最佳提取工艺参数为: 酶解 pH 7.0、酶解温度 50.0 °C、中性蛋白酶添加量 0.8%、酶解时间 40 min。在此条件下, 蛋白质提取率为 76.3%。**结论** 由于复合酶同步和分段酶解形成协同效应和互补作用, 扇贝蛋白质提取率得到有效提高, 为后续扇贝蛋白质的开发和利用提供了一定的理论依据。

关键词: 扇贝; 蛋白质; 分段酶解; 提取率

Optimization of protein extraction process from *Pectinidae*

LUO Lian-Yu, LIU Ye, LIN You-Hong, AI Yong-Liang, WU Qing-Peng, LIU Jia-Guang*

(Fujian Zhengwei Biotechnology Co., Ltd., Fuzhou 350015, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the protein extraction process of *Pectinidae*. **Methods** A combination of composite enzymes and segmented enzymatic hydrolysis was employed, utilizing different protease enzymes with mode of enzyme digestion and cleavage sites. Significant factors were screened by single factor combined with Plackett-Burman and Box-Behnken model was used to optimize the one-stage protein extraction process, and the parameters of the two-stage enzymatic digestion process were optimized by orthogonal tests. **Results** The optimal extraction conditions for complex enzyme-assisted stepwise hydrolysis in protein extraction were as follows: The optimal extraction process parameters of the one-stage were as follows, solid-liquid ratio was 1:3.9 (*m:V*), enzyme digestion time was 80.0 min, compound enzyme addition was 1.1%, complex enzyme ratio (trypsin:alkaline protease) was 1:2 (*m:m*), enzyme digestion pH was 8.2, enzyme digestion temperature was 52.5 °C; the optimal extraction parameters of the two-stage were as follows: Enzyme digestion pH was 7.0, enzyme digestion temperature was 50.0 °C, neutral protease addition was 0.8%, and enzyme digestion time was 40 min. Under these conditions, the protein extraction rate was 76.3%. **Conclusion** Due to synergistic and complementary effects between the complex

收稿日期: 2025-02-22

基金项目: 福建省区域发展项目(2024N3001); 福建省产业领军团队项目([2024]720 号)

第一作者: 罗联钰(1979—), 男, 高级工程师, 主要研究方向为水产品的深加工研究与质量管理。E-mail: 377052969@qq.com

*通信作者: 刘家光(1970—), 男, 教授级高级工程师, 主要研究方向为水产品的深加工研究。E-mail: 1877339548@qq.com

enzymes and segmented enzymatic hydrolysis, the protein extraction rate of *Pectinidae* is effectively improved, which provide some theoretical basis for the subsequent development and utilization of proteins from *Pectinidae*.

KEY WORDS: *Pectinidae*; protein; segmented enzymatic hydrolysis; extraction rate

0 引言

扇贝是珍珠贝目海扇蛤科的软体动物,也是我国重要的海水养殖经济贝类之一^[1],到 2023 年,全国贝类的产量为 1665.90 万 t^[2],主要分布在山东、辽宁、河北、广东、福建^[3]。扇贝富含蛋白质,低脂肪,其粗蛋白高达到 50%,粗脂肪低于 10%^[4],还包括不饱和脂肪酸、氨基酸、多糖等多种营养物质及钙、镁、锌、硒等无机元素^[5]。扇贝是蛋白质类开发利用的理想原料,研究发现,扇贝蛋白质具有抗氧化、降血压、促进骨髓基质细胞以及增强免疫力^[6-7]等多种生物功能。目前扇贝蛋白已应用到食品和功能性食品领域中^[8-9],可以开发扇贝裙边调味基料^[10]、贝煮浓缩液^[11]、水产调味品^[12]及具有氧化活性的小分子肽^[13]等新型食品,但扇贝的蛋白质尚未得到充分利用。

目前提取水产蛋白质的技术有酶解法^[14-15]、化学水解法^[16]、物理辅助提取法(利用超声波、微波等物理方法辅助提取)^[17]。其中酶解法应用最为广泛,但蛋白提取率较低。目前为止,鲜少见复合酶分段酶解提取水产品蛋白质的相关研究。鉴于此,本研究以扇贝为原料,采用复合酶解与分段酶解相结合,以提高蛋白质提取率,为扇贝蛋白提取工艺的工业化应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜华贵栉孔扇贝(规格 20~40 粒/500 g,福州市马尾水产批发市场)。

胰蛋白酶(6.0×10^5 U/g)、海产品水解专用酶(2.5×10^5 U/g)、羧肽酶(1.0×10^5 U/g)(上海华上翔洋生物技术有限公司);碱性蛋白酶(400 U/mg)、中性蛋白酶(200 U/mg)、木瓜蛋白酶(3.2×10^4 U/g)、菠萝蛋白酶(200 U/mg)、风味蛋白酶(120 U/mg)、组织蛋白酶(200 U/mg)、胃蛋白酶(300 U/mg)(山东新雄生物科技有限公司);氢氧化钠(分析纯,济南鸿宇化工有限

公司);盐酸(纯度 36%,茂名市雄大化工有限公司)。以上材料均符合食品卫生标准。

1.2 仪器与设备

HWS-24 电热恒温水浴锅(上海尚道仪器制造有限公司);JDSF-Z200 振筛器(新乡高服机械股份有限公司);FE28 酸度计[梅特勒托利多(上海)电子有限公司];JJ-1B 强力(恒速)电动搅拌器(金坛市科析仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 扇贝酶解液的制备

扇贝肉或裙边→打浆(研磨成扇贝浆料)→过滤→加水调底物浓度→根据不同蛋白酶的特性调节 pH→加入所需量的蛋白酶→设定蛋白酶适宜的酶解反应温度及反应时间→升温至 95~98 °C 灭酶 10 min→冷却→离心(7500 r/min, 15 min)→取酶解上清液测定水解度或计算蛋白质提取率。

分段酶解:10%扇贝浆液加入所需的复合酶,在设定的酶解条件下酶解,得到第一段酶解液,在第一段酶解液灭酶后冷却到第二阶段蛋白酶所需温度,加入蛋白酶并调整 pH,在第二阶段蛋白酶工艺参数下酶解,95~98 °C 灭酶 10 min,冷却、离心得到酶解液。

1.3.2 酶的选择

酶的特异性使得酶的种类成为影响酶解过程的重要因素之一,不同酶在酶解过程中表现出不同的水解效率和产物特性。本研究采用商业常见的蛋白酶(胰蛋白酶、海产品水解专用酶、羧肽酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、风味蛋白酶、组织蛋白酶、胃蛋白酶),详见表 1,以酶解液的水解度和蛋白质提取率为指标,选出较优的蛋白酶为后续实验用蛋白酶。

1.3.3 单因数实验设计

以扇贝蛋白质提取率为评价指标,研究复合酶配比、复合酶加酶量、反应 pH、酶解时间、酶解温度以及固液比等因素对提取效率的影响。实验因素水平如表 2 所示,并通过 Plackett-Burman 设计筛选出显著因素。

表 1 实验用蛋白酶的酶解温度和反应 pH
Table 1 Enzyme digestion temperature and reaction pH of experimental proteases

序号	酶	温度/°C	pH	序号	酶	温度/°C	pH
1	胰蛋白酶	50	8.0	6	木瓜蛋白酶	50	4.0
2	海产品水解专用酶	55	7.0	7	菠萝蛋白酶	50	7.0
3	风味蛋白酶	50	7.0	8	羧肽酶	50	7.0
4	碱性蛋白酶	55	8.5	9	组织蛋白酶	45	7.0
5	中性蛋白酶	50	7.0	10	胃蛋白酶	40	2.0

表 2 单因素实验与水平
Table 2 Single factor test and level table

因素	水平							
*复合酶配比(m:m)	1:1	2:3	1:2	1:3	3:2	2:1	3:1	
复合酶加酶量/%	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8
反应 pH	7.0	7.3	7.6	7.9	8.2	8.5	8.8	9.1
酶解时间/min	30	40	50	60	70	80	90	100
酶解温度/°C	42.5	45.0	47.5	50.0	52.5	55.0	57.5	60.0
固液比(m:V)	1:2	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7	1:8

注: *复合酶配比为胰蛋白酶:碱性蛋白酶。

1.3.4 一段复合酶酶解工艺优化

按表 2 的单因素实验结果结合 Plackett-Burman 设计筛选出对扇贝蛋白质提取率影响显著的因素有固液比、酶解时间、复合酶加酶量。以扇贝蛋白质提取率为响应指标, 选取这 3 个因子作为自变量, 运用响应面设计中的 Box-Behnken 模型构建三因素三水平的优化实验方案。具体的实验设计方案见表 3。

表 3 响应面分析因素与水平表

Table 3 Response surface analysis factors and level table

水平	因素		
	A(固液比) (m:V)	B(酶解时间) /min	C(复合酶加酶量) /%
-1	1:3	70	1.0
0	1:4	80	1.2
1	1:5	90	1.4

1.3.5 二段酶解工艺优化

由于不同蛋白酶的酶切作用方式及酶切位点的偏好存在差异, 通过分阶段、分条件使用不同特性的酶, 实现对复杂蛋白底物的高效定向水解。不同蛋白酶因底物适应性差异而具有互补性, 协同作用于蛋白质水解。胰蛋白酶与碱性蛋白酶优先水解大分子胶原蛋白及弹性蛋白的刚性结构域, 实现初步降解; 中性蛋白酶随后作用于残留的疏水聚集区, 进一步消除大分子片段残留。将中性蛋白酶的添加量、酶解温度、酶解时间和 pH 作为 4 个因素, 分别设置 5 个水平, 通过正交实验设计来优化二段酶解工艺的参数。4 因素 5 水平正交实验因素水平表 $L_{25}(5^4)$ 如表 4 所示。

表 4 二段酶解酶水解因素与水平表

Table 4 Two-stage enzymatic hydrolysis factors and level table

水平 因素	E(酶解 pH)	F(酶解 温度)/°C	G(加酶量) /%	H(酶解 时间)/min
1	6.0	45.0	0.2	10
2	6.5	47.5	0.4	20
3	7.0	50.0	0.6	30
4	7.5	57.5	0.8	40
5	8.0	60.0	1.0	50

1.3.6 检测方法

(1) 蛋白质提取率的测定

蛋白质含量参照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中的第一法采用凯氏定氮法进行测定。蛋白质提取率的计算如公式(1)。

蛋白质提取率/%=酶解上清液蛋白质总量/原料蛋白质含量×100% (1)

(2) 水解度测定和计算

根据采用三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)沉淀法^[18], 按照公式(2)计算水解度(degree of hydrolysis, DH):

$$DH/\% = \frac{N_1 - N_2}{N_0 - N_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中: N_1 为反应后酶解液中可溶性蛋白质含量, mg/mL; N_2 为反应前扇贝浆液中可溶性蛋白质含量, mg/mL; N_0 为扇贝浆液中总蛋白质含量, mg/mL。

1.4 数据处理

采用 Excel 2014、IBM SPSS Statistics 27 和 Design Expert 13 对实验数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的筛选

在酶解进程中, 蛋白酶的高度底物特异性使得酶源筛选成为调控该进程的核心要素^[19]。蛋白酶的结构差异导致切割位点选择性不同, 致使其作用于同一底物时生成 DH, DH 是表征酶解效果的重要指标^[20], 蛋白酶的选择对产品的 DH 起着至关重要的作用。在进一步优化扇贝酶解条件之前, 需要对蛋白酶进行筛选。本研究以蛋白质提取率、DH 为指标, 对胰蛋白酶、海产品水解专用酶、羧肽酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、风味蛋白酶、组织蛋白酶、胃蛋白酶进行筛选, 以获得酶解扇贝蛋白的较适合蛋白酶。

按表 1 的单酶酶解适宜条件对样品的酶解, 从表 5 可知, 选用的 10 种商业蛋白酶中, 中性蛋白酶、胰蛋白酶和碱性蛋白酶的水解率较好, DH 分别达到 13.47%±0.27%、13.13%±0.31%、14.02%±0.25%, 这 3 种蛋白酶的蛋白质提

取率也较高。其中碱性蛋白酶的水解率最好,与王共明等^[21]研究的结论一致,可能是扇贝液在pH较大环境中,其蛋白质更易暴露,且碱性蛋白酶自身的酶解点位比较宽泛^[22]。同一浓度溶度的扇贝溶液分别通过10种酶水解后,其DH和蛋白质提取率有所差异,是由于蛋白酶水解作用位点的特异性,不同的蛋白酶对肽键专一性不同。故选用这3种蛋白酶作为后续实验用酶。由表1可知,胰蛋白酶和碱性蛋白酶的水解条件差别不大,进行复合使用;胰蛋白酶、碱性蛋白酶与中性蛋白酶的水解条件差异较大,选用分段酶解进一步优化水解工艺条件。

表5 不同蛋白酶对扇贝蛋白质提取率及DH的影响

Table 5 Effects of different proteases on the extraction rate and DH of *Pectinidae* protein

序号	酶品种	蛋白质提取率/%	DH/%
1	中性蛋白酶	31.63±0.66 ^b	13.47±0.27 ^b
2	海产品水解专用酶	27.12±0.50 ^c	12.23±0.22 ^c
3	胰蛋白酶	30.34±0.70 ^c	13.13±0.31 ^b
4	碱性蛋白酶	37.60±0.62 ^a	14.02±0.25 ^a
5	羧肽酶	28.30±0.59 ^d	12.49±0.16 ^c
6	木瓜蛋白酶	16.47±0.49 ⁱ	7.55±0.29 ^h
7	菠萝蛋白酶	22.29±0.56 ^g	9.73±0.22 ^f
8	风味蛋白酶	25.02±0.41 ^f	10.42±0.31 ^e
9	组织蛋白酶	26.75±0.37 ^e	11.32±0.24 ^d
10	胃蛋白酶	19.11±0.63 ^h	8.83±0.22 ^g

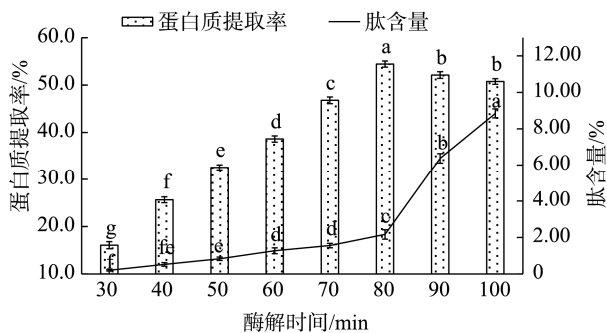
注: 同列不同字母表示差异显著, $P < 0.05$, 下同。

在相同的用酶量、时间、固液比,按一段、分段及加酶的顺序对扇贝浆料进行酶解。从表6可知,采用分段酶解的蛋白质提取率高于一段酶解;加酶顺序以先加复合蛋白酶,后加中性蛋白酶为宜。在先使用中性蛋白酶进行水

表6 不同蛋白酶组合及加酶顺序对扇贝的酶解效果

Table 6 Enzymatic effects of different protease combinations and adding order in *Pectinidae*

序号	酶品种	方式	蛋白质提取率/%	备注
1	复合酶(胰蛋白酶+碱性蛋白酶+中性蛋白酶)	一段酶解	55.2	
2	复合酶(胰蛋白酶+碱性蛋白酶)+中性蛋白酶	二段酶解	62.5	先加复合酶后加中性蛋白酶
3	中性蛋白酶+复合酶(胰蛋白酶+碱性蛋白酶)	二段酶解	58.2	先加中性蛋白酶后加复合酶



注: 不同小写字母表示具有显著性差异($P < 0.05$), 图2~6同。

图1 不同酶解时间对扇贝蛋白质提取率的影响

Fig.1 Effects of different enzyme digestion time on the extraction rates of *Pectinidae* protein

解, 随后再用碱性蛋白酶进行水解的过程中, 需要添加碱来调节pH, 会导致反应体系中引入较多的盐分, 进而显著提高溶液的离子强度, 会影响底物蛋白质的解离状态, 同时抑制酶的活性, 最终导致后续碱性蛋白酶的水解效果不理想。故选中性蛋白酶放在二段酶解, 以期获得扇贝生物蛋白含量较高的水解液。

2.2 单因素实验结果分析

2.2.1 不同酶解时间对扇贝蛋白质提取率的影响

从图1可知, 在30~70 min内, 肽含量趋于稳定, 80 min后酶解液中肽含量上升速度加快明显, 是由于扇贝蛋白质进一步水解成肽和氨基酸。从图1可知, 在30~80 min内, 随着反应时间的增加, 蛋白质提取率呈现出显著的上升趋势($P < 0.05$)。提取时间太短, 扇贝溶液与蛋白酶接触不充分, 蛋白质没有完全溶出, 导致蛋白质提取率低。当反应时间为80 min时, 蛋白质提取率达峰值; 当反应时间大于80 min时, 蛋白质提取率随时间增加而降低。这可能因为当提取时间超出适宜范围时, 部分蛋白质可能会发生过度水解^[23]或因变性而凝聚沉淀, 从而使得蛋白质的提取率降低。因此, 蛋白质提取率随时间的变化呈现出先上升后下降的规律。这与耿乐等^[24]、武婷等^[25]研究结论相似。因此最终选择80 min为最佳酶解时间。

2.2.2 不同复合酶配比对扇贝蛋白质提取率的影响

从图2可知, 单一的胰蛋白酶或碱性蛋白酶的水解效果明显弱于两种酶的复合。复合酶体系通过多种酶的协同作用显著提升蛋白质提取率。由图2可知复合酶比对蛋白质的提取率影响具有显著性($P < 0.05$), 其中效果最好的复合酶配比为胰蛋白酶:碱性蛋白酶=1:2 ($m:m$)。因此, 在后面的实验中采用胰蛋白酶:碱性蛋白酶(1:2, $m:m$)。

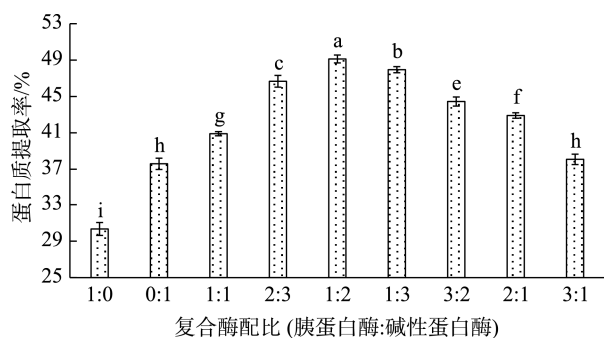


图2 不同复合酶比对扇贝蛋白提取率的影响

Fig.2 Effects of different complex enzyme ratios on the extraction rates of *Pectinidae* protein

2.2.3 不同复合酶加酶量对扇贝蛋白质提取率的影响

由图 3 可知, 复合酶加酶量与蛋白质提取效率间存在显著量效关系($P < 0.05$)。在 0.4%~1.2% 的添加梯度内, 提取率随加酶量升高呈现正向响应, 并于 1.2% 添加量时达到峰值。当酶添加量大于 1.2% 时, 提取效率出现逆向衰减现象, 推测可能与底物饱和效应或酶自抑制作用相关。复合酶加酶量增加, 会增大酶与底物接触机会, 蛋白酶对蛋白质的酶切位点增加, 提高 DH, 增加蛋白质提取率。进一步增加酶用量, 扇贝蛋白质提取率有所下降。复合酶添加量为 1.2% 和 1.4% 时, 蛋白质的提取率无显著性差异($P > 0.05$), 可能酶自身相互水解, 导致酶的活性降低, 阻碍酶与底物结合, 也可能进一步水解成小肽或游离氨基酸。综合考虑蛋白质提取效果, 确定最适复合酶加酶量为 1.2%。

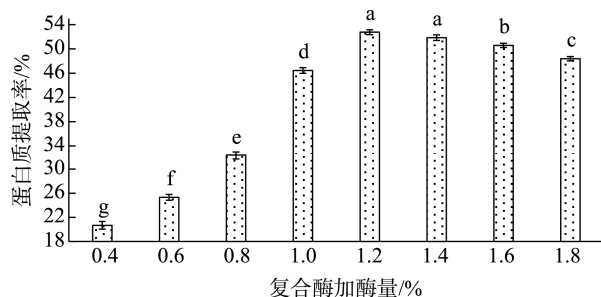


图3 不同复合酶加酶量对扇贝蛋白质提取率的影响

Fig.3 Effects of different enzyme dosages on the extraction rates of Pectinidae protein

2.2.4 不同酶解 pH 对扇贝蛋白质提取率的影响

由图 4 可知, pH 与蛋白质提取效率间存在显著量效关系($P < 0.05$)。当 pH 在 7.0~8.2 之间时, 蛋白质提取率随着 pH 的升高而增加。提取溶液体系 pH 上升, 使蛋白质发生空间结构改变, 结构疏松^[26], 降低蛋白质分子之间的作用力, 同时增加与蛋白酶接触概率, 提高蛋白质提取率。在 pH 8.2 时达峰值, 当 pH 8.2~9.1 时, 蛋白质提取率随着 pH 升高而逐渐减小; pH 过高, 造成部分蛋白质变性^[27]和增加发生脱羧、脱氨等反应而水解^[28]的概率, 同时也会造成酶失活, 使蛋白质提取率下降。因此, 提取最佳 pH 为 8.2。

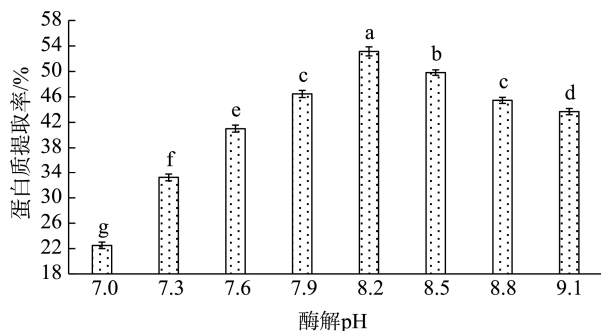


图4 不同酶解pH对扇贝蛋白质提取率的影响

Fig.4 Effects of different enzymatic pH on the extraction rates of Pectinidae protein

2.2.5 不同酶解温度对扇贝蛋白质提取率的影响

由图 5 可知, 在温度 42.5~52.5 °C 时, 蛋白质提取率随温度的升高呈现正向响应; 当温度为 52.5 °C 时, 蛋白质提取率达峰值; 当温度高于 52.5 °C 时, 蛋白质提取率呈逆向衰减现象。在不同温度中蛋白质的溶解度有差异, 分子运动随着温度增加而增强^[29], 增加水分子与蛋白质之间碰撞概率, 促进蛋白质空间结构伸展和分子间松动, 从而提高蛋白质的提取率; 温度过高, 可能造成蛋白质变性和产生聚合交联现象^[29-30], 影响蛋白质溶出及与不溶物质一起被分离除去, 导致蛋白质提取率变小。所以确定最适温度为 52.5 °C。

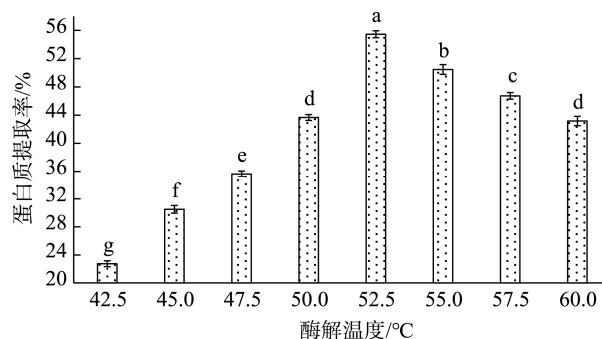


图5 不同酶解温度对扇贝蛋白质提取率的影响

Fig.5 Effects of different enzymatic hydrolysis temperatures on the extraction rates of Pectinidae protein

2.2.6 不同固液比对扇贝蛋白质提取率的影响

由图 6 可知, 随着固液比的增大, 蛋白质的提取率呈现正向响应不断增大。在固液比为 1:1~1:4 ($m:V$) 的范围内, 蛋白质提取率显著上升, 且在固液比为 1:4 ($m:V$) 时达到峰值。当固液比在 1:4~1:8 ($m:V$) 时, 蛋白质提取率呈下降趋势。当固液比过低, 溶质过稠、黏度较大, 影响了酶与扇贝组织溶液接触, 蛋白质无法充分溶出, 蛋白质提取率不高; 随着酶溶液比例的提升, 扇贝与酶溶液充分接触, 使扇贝蛋白质易于溶解到提取液中, 从而提高蛋白质分散效率, 促使蛋白提取率升高。但固液比过高时, 蛋白质提取率反而有所下降, 这可能是因为扇贝组织在溶液中过于分散, 导致有效成分浓度降低, 颗粒间接触不足, 进而增加了溶解难度, 影响了蛋白质的提取效率。这一现象与耿乐等^[24]和 MONCEF 等^[31]的研究结果一致。所以最适固液比确定为 1:4 ($m:V$)。

2.3 Plackett-Burman 设计筛选显著因素

采用 Plackett-Burman 设计, 能够在少量实验中高效筛选出对扇贝蛋白质提取率影响显著的因素^[32]。以固液比(X_1)、酶解时间(X_2)、酶解 pH (X_3)、复合酶加酶量(X_4)、酶解温度(X_5)和复合酶配比(X_6)作为自变量, 以扇贝蛋白质提取率为响应变量, 设计六因素二水平的实验方案进行筛选。各因素的水平设置详见表 7, 筛选结果分析见表 8。

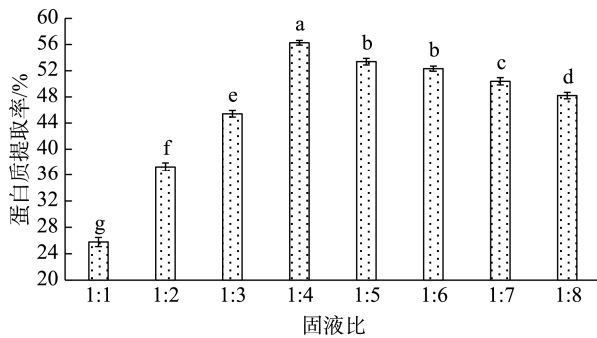


图6 不同固液比对扇贝蛋白质提取率的影响

Fig.6 Effects of different solid-liquid ratio on the extraction rates of *Pectinidae* protein

表 7 Plackett-Burman 实验因素水平

Table 7 Factor levels in Plackett-Burman design

变量	因素	水平	
		-1	1
X_1	固液比(m:V)	1:3	1:5
X_2	酶解时间/min	70	90
X_3	酶解 pH	7.9	8.5
X_4	复合酶加酶量/%	1.0	1.4
X_5	酶解温度/°C	50	55
X_6	复合酶配比(m:m)	2:3	1:3

表 8 Plackett-Burman 实验设计与结果

Table 8 Design and results of Plackett-Burman experiment

实验号	X_1 (m:V)	X_2 /min	X_3	X_4 /%	X_5 /°C	X_6 (m:m)	蛋白质提取率/%
1	1:5	70	8.5	1.4	50	1:3	54.68
2	1:3	70	8.5	1.0	55	1:3	51.36
3	1:5	90	7.9	1.0	50	1:3	53.66
4	1:3	90	7.9	1.4	55	2:3	54.46
5	1:3	70	7.9	1.4	50	1:3	54.86
6	1:5	90	8.5	1.0	50	2:3	52.42
7	1:3	70	7.9	1.0	50	2:3	51.34
8	1:5	70	7.9	1.0	55	2:3	52.26
9	1:5	90	7.9	1.4	55	1:3	57.52
10	1:3	90	8.5	1.4	50	2:3	54.58
11	1:5	70	8.5	1.4	55	2:3	55.32
12	1:3	90	8.5	1.0	55	1:3	53.04

根据表 9 的方差分析结果, 酶解过程中 X_1 (固液比)、 X_2 (酶解时间)、 X_4 (复合酶加酶量)3 个因素对扇贝蛋白质提取率的影响存在显著差异。通过 F 分析, 各因素的影响程度依次为: X_4 (复合酶加酶量) $>X_1$ (固液比) $>X_2$ (酶解时间) $>X_6$ (复合酶配比) $>X_3$ (酶解 pH) $>X_5$ (酶解温度), 其中复合酶加酶量对扇贝蛋白质提取率的影响达极显著 ($P=0.0004<0.01$), 而固液比 ($P=0.0321$) 和酶解时间 ($P=0.0392$) 两因素对扇贝蛋白质提取的影响为显著水平

($P<0.05$), 进一步通过响应面实验设计优化工艺参数。复合酶配比、酶解 pH 及酶解温度对扇贝蛋白质提取率影响不显著, 在后续实验中, 选择单因素中的最优水平, 即复合酶配比 1:2 (m:m)、pH 8.2、酶解温度 52.5 °C。

表 9 Plackett-Burman 实验方差分析表

Table 9 Analysis of variance table in Plackett-Burman design

方差来源	平方和	自由	均方	F	$P>F$	显著性
模型	34.11	6	5.68	15.29	0.0044	**
X_1 (m:V)	3.22	1	3.22	8.67	0.0321	*
X_2 /min	2.86	1	2.86	7.70	0.0392	*
X_3	0.6075	1	0.6075	1.63	0.2572	
X_4 /%	25.06	1	25.06	67.41	0.0004	**
X_5 /°C	0.4880	1	0.4880	1.31	0.3037	
X_6 (m:m)	1.87	1	1.87	5.04	0.0748	
残差	1.86	5	0.3717			
总离差	35.97	11				
决定系数(R^2)	0.9483					
校准系数(R^2_{adj})	0.8863					

注: **为差异极显著($P<0.01$); *为差异显著($P<0.05$), 下同。

2.4 一段酶解复合酶酶解响应面优化实验结果

为克服单酶 DH 低、蛋白质提取率不足及酶解时间长等问题, 将通过复合酶分段酶解的协同与互补作用进一步优化水解效果, 实现 DH 和蛋白质提取率的提升。汪涛等^[33]以扇贝边为原料, 以胰蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶 3:1 (m:m) 复合水解的 DH 比胰蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶单酶水解分别提高 6.2%和 9.9%。本研究选取 2.1 中蛋白质提取率较高且酶解条件相近的胰蛋白酶和碱性蛋白酶复合酶解, 以蛋白质提取率为响应值, 借助响应面分析软件的 Box-Behnken 模型, 构建了 3 因素 3 水平的优化实验方案, 实验结果见表 10。进一步运用 Design Expert 13 软件对表 10 中的实验结果进行响应面分析, 得到响应回归方程为 $Y=63.11-0.8812A+0.3500B-0.9212C-0.5225AB-1.10AC+0.6975BC-3.09A^2-3.03B^2-2.83C^2$ 。

2.4.1 响应面方差分析

根据表 11 的方差分析结果, 模型呈现极高显著性 ($P<0.0001$); $R^2=0.9926$, $R^2_{adj}=0.9831$, 表明模型对扇贝蛋白质提取率的实际值与预测值拟合度超过 98%, 模型具有较高的预测精度^[34]。失拟项 ($P=0.3969>0.05$), 表明未知因素对响应值的影响不显著, 进一步验证了模型的可靠性^[23], 该模型的可靠性得到了验证, 其可用于预测蛋白质提取的工艺参数。 F 越高, 表明该因素对提取率的影响越显著^[24,35], 3 个因素对蛋白质提取率的影响顺序为: $C>A>B$, 即复合酶加酶量 $>$ 固液比 $>$ 酶解时间, A 、 C 、 AC 、 BC 、 A^2 、 B^2 、 C^2 对蛋白质提取率的影响均为差异极显著 ($P<0.01$), B 和 AB 对蛋白质提取率的影响为差异显著 ($P<0.05$)。

表 10 响应面优化设计实验结果

Table 10 Results of response surface optimization design

实验号	因素			Y_1 蛋白质提取率/%	Y_1 预测蛋白质提取率/%
	A	B	C		
1	1:5	80	1.0	58.47	58.34
2	1:4	80	1.2	62.54	63.11
3	1:3	90	1.2	59.08	58.75
4	1:5	80	1.4	54.35	54.29
5	1:4	80	1.2	63.28	63.11
6	1:4	80	1.2	63.13	63.11
7	1:4	70	1.0	58.72	58.52
8	1:5	70	1.2	55.95	56.28
9	1:4	80	1.2	63.03	63.11
10	1:3	70	1.2	56.86	57.00
11	1:3	80	1.4	58.12	58.25
12	1:4	70	1.4	55.56	55.28
13	1:4	90	1.0	57.55	57.83
14	1:4	90	1.4	57.18	57.38
15	1:3	80	1.0	57.84	57.90
16	1:4	80	1.2	63.56	63.11
17	1:5	90	1.2	56.08	55.94

表 11 响应面优化设计实验方差分析表

Table 11 Analysis of variance table of response surface optimization design

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	147.44	9	16.38	104.20	<0.0001	**
A	6.21	1	6.21	39.52	0.0004	**
B	0.9800	1	0.9800	6.23	0.0412	*
C	6.79	1	6.79	43.19	0.0003	**
AB	1.09	1	1.09	6.95	0.0336	*
AC	4.84	1	4.84	30.79	0.0009	**
BC	1.95	1	1.95	12.38	0.0097	**
A^2	40.11	1	40.11	255.15	<0.0001	**
B^2	38.63	1	38.63	245.73	<0.0001	**
C^2	33.64	1	33.64	213.97	<0.0001	**
残差	1.10	7	0.1572			
失拟项	0.5374	3	0.1791	1.27	0.3969	不显著
纯误差	0.5631	4	0.1408			
总变异	148.54	16				
决定系数(R^2)	0.9926					
校准系数(R^2_{adj})	0.9831					
预测系数(R^2_{pred})	0.9362					

2.4.2 响应面因素交互作用分析

响应面的 3D 图及等高线直观呈现了两因素交互作用对响应值的影响^[36], 通过分析曲面与等高线形态可优化工艺参数。椭圆形等高线形态表明因素间存在显著交互效应, 曲面陡峭程度与交互作用强度呈正相关^[37-38]。复合酶加酶量、酶解时间及固液比 3 个因素的交互作用对扇贝蛋白质提取率影响的 3D 图及等高线见图 7。如图 7 所示, 等高线图 7b、图 7d 和图 7f 均呈椭圆形, 表明固液比与酶解时间、固液比与复合酶加酶量、酶解时间与复合酶加酶量之间交互作用均显著, 与表 11 响应面优化设计实验方差分析结果一致, P 均小于 0.05; 3D 响应面图 7a、图 7c 和图 7e 均呈凸面形状, 表明所建的模型的响应值有极大值。

2.4.3 验证性实验

通过 Design Expert 13 的回归模型优化蛋白质提取工艺, 结果为: 固液比 1:3.874 ($m:V$)、酶解时间 80.533 min、复合酶加酶量 1.174%、复合酶配比(胰蛋白酶:碱性蛋白酶)1:2 ($m:m$)、pH 8.2、酶解温度 52.5 °C, 在此条件下扇贝蛋白质理论提取率为 63.23%。为了验证其回归模型预测结果的可靠性, 需对该模型所给出的蛋白质提取最佳工艺条件进行验证^[39]。为便于验证和实际操作性, 将扇贝蛋白质提取最佳工艺调整为: 固液比 1:3.9 ($m:V$)、酶解时间 80.0 min、复合酶加酶量 1.1%、复合酶配比(胰蛋白酶:碱性蛋白酶)1:2 ($m:m$)、pH 8.2、酶解温度 52.5 °C。在此条件下重复实验 3 次, 蛋白质实际提取率为 62.53%±0.23%, 与理论值 63.23%相差不大, 表明该响应面回归模型的预测结果较可靠, 具有较好实用参考价值。

2.5 二段酶解正交实验结果

由于不同蛋白酶的酶切作用方式及酶切位点不同, 可以通过灵活选择不同性质和水解位点的酶, 来实现深度水解并提高水解产物质量^[19-21]。按表 1 的筛选得出 DH 和蛋白质提取率较好的 3 种蛋白酶, 但中性蛋白酶与胰蛋白酶、碱性蛋白酶两种蛋白酶的酶解条件差异较大, 因而进行分段酶解。按表 3 分析的最优实验方案进行一段酶解后灭酶, 冷却酶解液再次酶解, 按表 4 的实验方案进一步优化扇贝蛋白质提取工艺条件, 正交实验方案与结果见表 12, 蛋白质提取率随因素水平变化的情况见图 8。

从表 12 结果可知, 因素影响的极差 R 值大小顺序为: $R_{G1} > R_{H1} > R_{F1} > R_{E1}$ 。极差反映因素影响情况, 极差越大, 说明该因素对指标值影响就越大, 即影响蛋白质提取的因素按重要性排序为: 复合酶加酶量 > 酶解时间 > 酶解温度 > 酶解 pH。最优实验方案为: $E_3F_3G_4H_4$, 具体条件为: 酶解 pH 7.0、酶解温度 50.0 °C、加酶量 0.8%、酶解时间 40 min。该实验条件没有在表 12 所涵盖的 25 个实验中, 因此对选出的实验方案进行 3 次平行实验, 结果扇贝蛋白质提取率分别为 76.3%、76.8%、75.8%, 平均值为 76.3%, 优于表 12 中蛋白质提取率最高的第 7 号实验的 74.94%, 说明了实验的准确性。

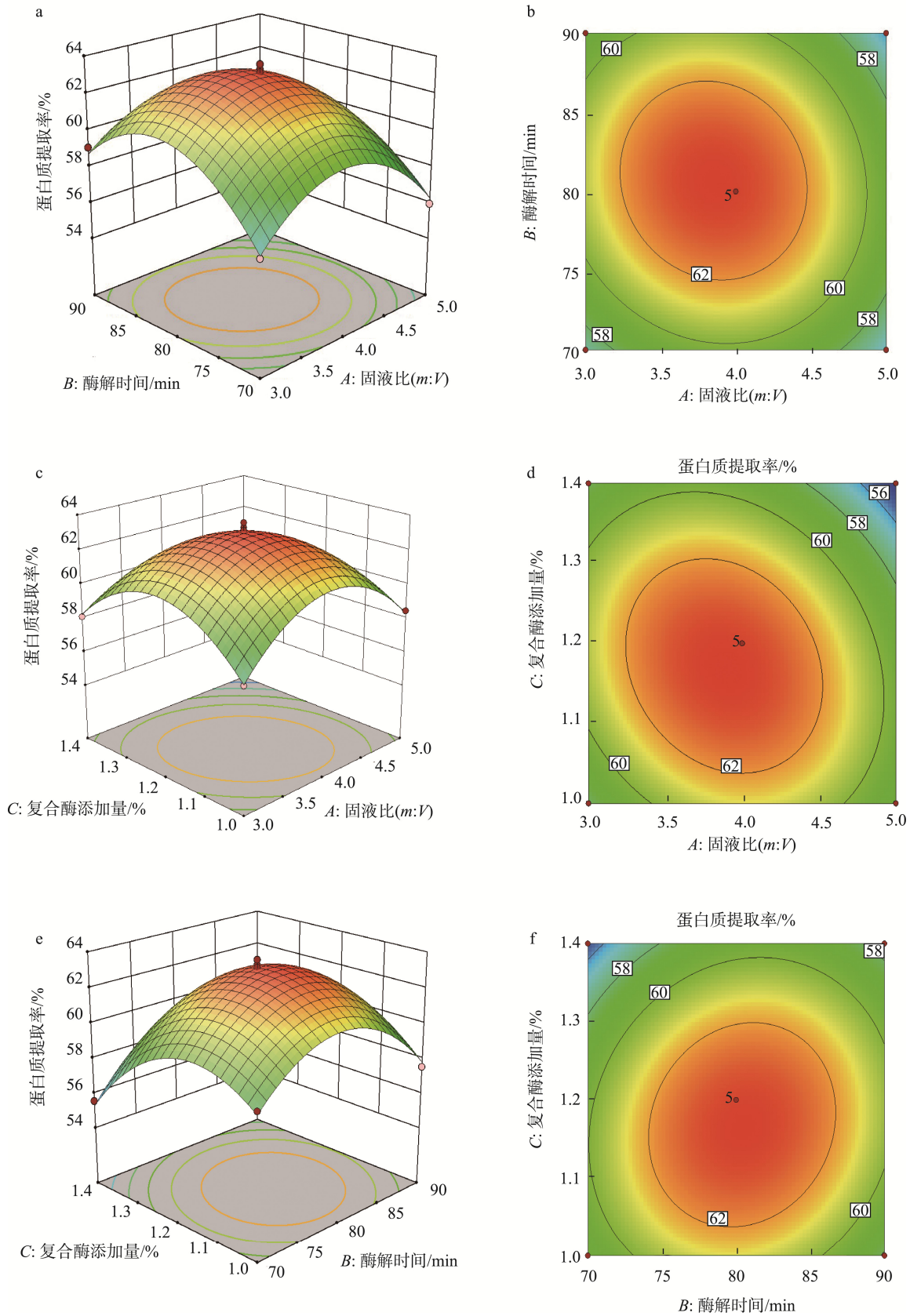


图7 各个因素对扇贝蛋白质提取率交互作用的3D图及等高线

Fig.7 3D plots and contour lines showing the interaction of various factors on the extraction rate of *Pectinidae* protein

表 12 二段酶解优化正交实验结果与分析
Table 12 Results and analysis of two-stage enzymatic hydrolysis optimization orthogonal experiment

实验号	E (酶解 pH)	F(酶解 温度)/°C	G(加酶量) /%	H(酶解 时间)/min	蛋白质 提取率/%
1	6.0	47.5	0.2	10	62.74
2	6.0	50.0	0.4	20	70.88
3	6.0	52.5	0.6	30	68.32
4	6.0	55.0	0.8	40	74.25
5	6.0	60.0	1.0	50	71.58
6	6.5	47.5	0.4	30	69.87
7	6.5	50.0	0.6	40	74.94
8	6.5	52.5	0.8	50	74.28
9	6.5	55.0	1.0	10	65.81
10	6.5	60.0	0.2	20	62.62
11	7.0	47.5	0.6	50	72.48
12	7.0	50.0	0.8	10	68.82
13	7.0	52.5	1.0	20	74.54
14	7.0	55.0	0.2	30	69.93
15	7.0	60.0	0.4	40	62.69
16	7.5	47.5	0.8	20	74.07
17	7.5	50.0	1.0	30	63.96
18	7.5	52.5	0.2	40	72.39
19	7.5	55.0	0.4	50	68.32
20	7.5	60.0	0.6	10	66.71
21	8.0	47.5	1.0	40	71.15
22	8.0	50.0	0.2	50	67.72
23	8.0	52.5	0.4	10	66.15
24	8.0	55.0	0.6	20	70.85
25	8.0	60.0	0.8	30	70.15
K1	69.554	70.062	67.08	66.046	
K2	69.504	69.264	67.582	70.592	
K3	69.692	71.136	70.66	68.446	
K4	69.09	69.832	72.314	71.084	
K5	69.204	66.75	69.408	70.876	
R	0.602	4.386	5.234	5.038	
较优 水平	E ₃	F ₃	G ₄	H ₄	
因素 主次	E>F>G>H				

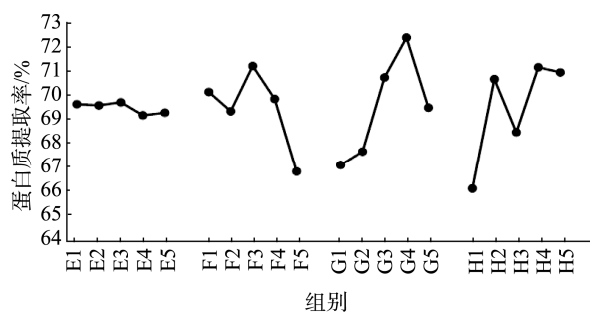


图8 中性蛋白酶水解实验因素水平与蛋白质提取率的趋势图

Fig.8 Trend graph of factor levels in neutral protease hydrolysis experiment and protein extraction rate

3 结 论

本研究对多种蛋白酶进行筛选,发现胰蛋白酶、碱性蛋白酶和中性蛋白酶在扇贝蛋白提取过程中,这3种酶在水解率和蛋白质提取率较高,以这3种酶作为后续实验用酶。根据胰蛋白酶、碱性蛋白酶和中性蛋白酶的酶解条件不同,本研究通过复合酶解和分段酶解相结合,来提高蛋白质提取率。以最适作用条件相近的胰蛋白酶和碱性蛋白酶组合进行一段复合同步酶解,并通过 Plackett-Burman 和 Box-Behnken 模型优化一段蛋白质提取工艺;与前两者最适酶解条件差异较大的中性蛋白酶,采用二段酶解并通过正交实验确定其最佳工艺条件。一段复合酶解最佳工艺为:固液比 1:3.9 (m:V)、酶解时间 80.0 min、复合酶加酶量 1.1%、复合酶配比(胰蛋白酶:碱性蛋白酶)1:2 (m:m)、酶解 pH 8.2、酶解温度 52.5 °C;二段酶解的最优酶解参数为:酶解 pH 7.0、酶解温度 50.0 °C、中性蛋白酶添加量 0.8%、酶解时间 40 min。进行 3 次平行实验,扇贝蛋白质提取率平均值为 76.3%。通过多酶复合酶解和分段酶解,形成协同效应和互补作用,显著提高扇贝蛋白质提取率,为后续扇贝中蛋白质的开发和高值化利用提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] 牟雅甜, 孙丽薇, 王义轩, 等. 不同加工时间扇贝柱煮液中营养成分分析及变化规律的研究[J]. 中国食品添加剂, 2023(2): 227-236.
MU YT, SUN LW, WANG YX, et al. Analysis of nutritional components in scallop boiling solution and the components changing regularity with different boiling times [J]. China Food Additives, 2023(2): 227-236.
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局. 《2023 中国渔业统计年鉴》[M]. 北京: 中国农业出版社, 2024.
Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. 2023 China Fishery Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2024.
- [3] 马丽艳, 汪一红, 刘志东, 等. 扇贝加工副产物资源利用进展[J]. 渔业信息与战略, 2017(3): 204-210.
MA LY, WANG YH, LIU ZD, et al. Advances in utilization of by-products from scallop processing [J]. Fishery Information & Strategy, 2017(3): 204-210.
- [4] 苏秀榕, 李太武, 丁明进. 扇贝营养成分的研究[J]. 海洋科学, 1997(2): 10-11.
SU XR, LI TW, DING MJ. Study on the nutritive content of scallop [J]. Marine Sciences, 1997(2): 10-11.
- [5] 曹善茂, 王昊, 陈炜, 等. 岩扇贝闭壳肌营养成分的分析及与中国 3 种扇贝的比较[J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(5): 544-550.
CAO SM, WANG H, CHEN W, et al. Analysis, evaluation and comparison of nutritive composition in rock scallop *Crassadoma gigantean* with three Chinese scallops [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(5): 544-550.
- [6] ZHONG QW, WEI B, WANG SJ, et al. The antioxidant activity of polysaccharides derived from marine organisms: An overview [J]. Marine Drugs, 2019, 17(12): 674.
- [7] WANG LC, CHEN LY, LI JS, et al. Structural elucidation and immune-enhancing activity of peculiar polysaccharides fractionated from marine clam *Meretrix meretrix* (Linnaeus) [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 201: 500-513.
- [8] SUBRA-PATERNAULT P, THONGDENG H, GRELARD A, et al. Extraction of phospholipids from scallop by-product using super-critical CO₂/alcohol mixtures [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(2): 990-998.

- [9] JENSEN IJ, WALQUIST M, LIASET B, *et al.* Dietary intake of cod and scallop reduces atherosclerotic burden in female apolipoprotein-deficient mice fed a western type high fat diet for 13 weeks [J]. *Nutrition Metabolism*, 2016, 13(1): 1–11.
- [10] 刘鹏莉, 遇艳萍, 王晶, 等. 酶解联合美拉德反应制备具有抗氧化活性的扇贝裙边调味基料[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(23): 7708–7714.
LIU PL, YU YP, WANG J, *et al.* Preparation of scallop mantle seasoning material with antioxidant activity by enzymolysis coupled with Maillard reaction [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(23): 7708–7714.
- [11] 陶美洁. 贻贝蒸煮液浓缩及风味改良研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2020.
TAO MJ. Study on the concentration and flavor improvement of mussel cooking liquor [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2020.
- [12] 崔妍春, 张化贤, 王爱辉, 等. 三种贝类蒸煮液主要滋味化合物的分析与比较[J]. *中国调味品*, 2022, 47(1): 1–7.
CUI YC, ZHANG HX, WANG AIH, *et al.* Analysis and comparison of main taste compounds in three kinds of shellfish boiling liquid [J]. *China Condiment*, 2022, 47(1): 1–7.
- [13] 郭宇, 文诗雨, 倪霖, 等. 扇贝加工副产物中蛋白质提取及其酶解物抗氧化活性分析[J]. *食品与机械*, 2022(11): 176–183.
GUO Y, WEN SY, NI C, *et al.* Analysis of protein extraction and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from scallop processing by-products [J]. *Food and Machinery*, 2022(11): 176–183.
- [14] RHESSA GGO, VISHAL S, MEILING T, *et al.* Extraction of novel bioactive peptides from fish protein hydrolysates by enzymatic reactions [Z]. *Applied Sciences*, 2023.
- [15] VENKATESAN J, ANIL S, KIM SK, *et al.* Marine fish proteins and peptides for cosmeceuticals: A review [Z]. *Marine Drugs*, 2017.
- [16] ZHANG HT, WU XX, QUAN L, *et al.* Characteristics of marine biomaterials and their applications in biomedicine [Z]. *Marine Drugs*, 2022.
- [17] ZAKY AA, JESUS SG, EUN JB, *et al.* Bioactivities, applications, safety, and health benefits of bioactive peptides from food and by-products: A review [Z]. *Frontiers in Nutrition*, 2022.
- [18] 张健, 刘少伟, 张毅, 等. 仿刺参精酶解工艺条件优化及体外抗氧化[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(5): 232–237.
ZHANG J, LIU SW, ZANG Y, *et al.* Optimization of enzymolysis technology of *Apostichopus japonicus* spermary and antioxidant activities *in vitro* of hydrolysates [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(5): 232–237.
- [19] DENG JC. Effect of temperatures on fish alkaline protease, protein interaction and texture quality [J]. *Food Science*, 1981, 46(1): 6265.
- [20] 张毅, 万金庆, 杨帆, 等. 冰温酶解贮藏对低盐脱水牡蛎滋味的的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2021, 36(5): 815–825.
ZHANG Y, WAN JQ, YANG F, *et al.* Effects of ice temperature enzymatic hydrolysis on taste of low salt dehydrated oyster during storage [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2021, 36(5): 815–825.
- [21] 王共明, 姜立生, 黄会, 等. 扇贝蒸煮液低聚肽的制备工艺优化及体外抗氧化研究[J]. *中国食品添加剂*, 2023(6): 91–100.
WANG GM, JIANG LS, HUANG H, *et al.* Optimization of extraction process of oligopeptide from scallop cooking liquid and its antioxidant *in vitro* [J]. *China Food Additives*, 2023(6): 91–100.
- [22] 杨志荣, 恒泰, 莎丽娜. 羊软骨中II型胶原蛋白肽的制备和抑菌活性[J]. *食品科技*, 2016, 41(3): 134–138.
YANG ZR, HENG T, SHA LN. Preparation and antioxidant activity of type II collagen peptides from sheep cartilage [J]. *Food Science and Technology*, 2016, 41(3): 134–138.
- [23] 李若敏, 张焕新, 盘赛昆, 等. 牡丹籽粕蛋白提取工艺优化和功能性质分析[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(8): 197–204.
LI RM, ZHANG HX, PAN SK, *et al.* Process optimization and functional properties of peony seeds protein [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(8): 197–204.
- [24] 耿乐, 王洪斌, 刘志东, 等. 脱脂南极磷虾蛋白质提取条件优化[J]. *渔业现代化*, 2023, 50(5): 71–78.
GENG L, WANG HB, LIU ZD, *et al.* Optimization of extraction conditions for defatted antarctic krill protein [J]. *Fishery Modernization*, 2023, 50(5): 71–78.
- [25] 武婷, 康明丽, 程雅如, 等. 微波辅助酶法提取香菇柄蛋白工艺研究[J]. *粮食与油脂*, 2024, 37(9): 129–134.
WU T, KANG ML, CHENG YR, *et al.* Study on microwave-assisted enzymatic method extraction process of protein from *Lentinus edodes* stem [J]. *Cereals & Oils*, 2024, 37(9): 129–134.
- [26] BING SJ, LI YQ, SUN GL, *et al.* Effect of different acidic or alkaline environments on structural characteristics, functional and physicochemical properties of *Lentinus edodes* protein [J]. *Process Biochemistry*, 2023, 130: 15–25.
- [27] 朱小燕, 李相前, 王杰, 等. pH 调节法制备河蚬蛋白质及其营养评价[J]. *食品科技*, 2017, 42(1): 175–181.
ZHU XY, LI XQ, WANG J, *et al.* Nutrition evaluation and preparation of protein from freshwater clam by pH-shifting method [J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(1): 175–181.
- [28] 李丽, 曹亚男, 姜雯, 等. 栉孔扇贝中蛋白质的提取条件优化[J]. *鲁东大学学报(自然科学版)*, 2021, 37(2): 157–161, 182.
LI L, CAO YN, JIANG W, *et al.* Optimized extraction conditions of protein from scallop *Chlamys farreri* [J]. *Journal of Ludong University (Natural Science Edition)*, 2021, 37(2): 157–161, 182.
- [29] XUE YF, SUN Q, WANG L, *et al.* Preliminary study on protein isolation process of walnut dregs by single factor experiments and response surface method [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2021, 15(2): 2193–4126.
- [30] DEEPANSU G, SNEHASIS C, JYOTI SG. Optimizing the extraction of protein from *Prosopis cineraria* seeds using response surface methodology and characterization of seed protein concentrate [J]. *LWT-Food Science Technology*, 2020, 117: 108630.
- [31] MONCEF C, AMEL B, FRANCESCO D, *et al.* Optimization of the extraction process by response surface methodology of protein isolate from defatted jujube *Zizyphus lotus* L. seeds [J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2019, 25(4): 1509–1521.
- [32] 楚文靖, 叶双双, 张付龙, 等. 超声处理对蓝莓汁杀菌效果和品质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(13): 203–208.
CHU WJ, YE SS, ZHANG FL, *et al.* Effects of ultrasonic treatment on the sterilization and quality of blueberry juice [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(13): 203–208.
- [33] 汪涛, 曾庆祝, 谢智芬. 内肽酶与端肽酶水解扇贝边蛋白质工艺的研究[J]. *大连水产学院学报*, 2003(2): 125–129.
WANG T, ZENG QZ, XIE ZF. Studies on the technics of enzymatic hydrolysis of protein in scallop skirts by using endoenzymes and exopeptidases [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2003(2): 125–129.
- [34] 秦莹, 马丹妮, 陆节堃, 等. 复合酶解南美白对虾虾头制备 ACE 抑制肽的工艺优化[J]. *食品研究与开发*, 2024, 45(13): 120–128, 149.
QIN Y, MA DN, LU JK, *et al.* Optimization of ACE inhibitory peptide preparation from the head of *penaeus albus* by complex enzymatic hydrolysis [J]. *Food Research and Development*, 2024, 45(13): 120–128, 149.
- [35] 戚亭, 陈雪忠, 刘志东, 等. 响应面优化的南极磷虾蛋白磷酸化改性工艺[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(1): 204–210.
QI T, CHEN XZ, LIU ZD, *et al.* Phosphorylation process of antarctic krill protein with response surface optimization [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(1): 204–210.
- [36] MANEL M, FAWEN K, MONCEF C, *et al.* Optimization of extraction parameters of protein isolate from tomato seed using response surface methodology [J]. *Food Analytical Methods*, 2017, 10(3): 809–819.
- [37] SOBHANI A, NOORMOHAMMADI N, MORADI K, *et al.* Optimization of heat and ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Echinacea purpurea* using response surface methodology [J]. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2022, 31: 100399.
- [38] CHEN Z, ZENG J, ZHANG ZB, *et al.* Preparation and application of polyethyleneimine-modified corncob magnetic gel for removal of Pb(II) and Cu(II) ions from aqueous solution [J]. *RSC Advances*, 2022, 12: 1950–1960.
- [39] ALI AW, DEVINDER K, IDRESS A, *et al.* Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2007, 41(8): 1514–1520.

(责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)