

有限酶解猪血红蛋白制备亚硝基血红素多肽的研究

马美湖^{1,2}, 黄 群², 麻成金², 顾仁勇²

(1. 湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128 2. 吉首大学食品科学研究所, 湖南 吉首 416000)

摘 要: 为了使亚硝基(NO^-)更易结合于血红素亚铁离子及提高色素稳定性, 本研究采用蛋白酶有限酶解猪血红蛋白, 酶解液中高分子血红素多肽与亚硝基反应合成亚硝基血红素多肽。试验表明, 以选用木瓜蛋白酶效果较好, 最佳酶解条件为: 底物浓度 16%, 加酶量 4000U/g, 水解时间 6h; 酶解液合成色素最佳参数为: pH5.00, 反应时间 12min, 反应温度为 55℃, NaNO_2 的添加量为 1.6%。

关键词: 猪血红蛋白; 蛋白酶; 酶解; 亚硝基血红素多肽; 参数

Study on Processing Nitrosyl Heme-polypeptide by Partly Hydrolyzing Porcine Hemoglobin with Protease

MA Mei-hu^{1,2}, HUANG Qun², MA Cheng-jin², GU Ren-yong²

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2. Institute of Food Science, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstract: In order to facilitate NO^- to combine with the heme iron ion so as to improve the stability of pigment, this experiment utilized protease to hydrolyze Hb to some degree and then made NO^- react with Heme-iron to concatenate large molecule polypeptide, into nitrosyl heme-polypeptide. The results showed that the optimum enzymatic conditions were: choosing papain, with substrate concentration 16%, enzyme concentration 4000U/g, hydrolysis time 6h, and the optimum conditions for the enzymatic hydrolysate of porcine blood to synthesize nitrosyl heme-polypeptide were: NaNO_2 added 1.6%, pH5.00 and reaction time to 12min at 55℃.

Key words porcine hemoglobin, protease, enzymatic hydrolysis, nitrosyl heme-polypeptide, parameter

中图分类号: TS209

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0131-05

畜禽血液中的血红蛋白分子量大并呈卷曲状排列, 对其预处理后利用特定的蛋白酶作用于某些位点, 在酶的催化下有控制地酶法水解, 将蛋白质分子中的肽键有限水解切开, 血红素暴露使 NO^- 更容易且牢固地结合其上生成亚硝基血红素多肽, 因为血红素仍有较长的多肽链保护而稳定性比用纯血红素合成的色素高。此外, 有限酶解后的血红蛋白具有优良的溶解血红蛋白有限酶解后产生少量小分子多肽及游离氨基酸, 能促进人体的生长发育, 提高人体免疫力, 促进铁在人体内的吸收。目前国内外均未见相关报道, 属创新之举。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料血 购自湖南农大附近屠宰场。

1.1.2 试剂与药品

亚硝酸钠(AR); 烟酰胺(AR); 抗坏血酸(AR); 80% 丙酮溶液(自配); 柠檬酸三钠(AR); 2709 碱性蛋白酶 房山酶制剂厂; 精制木瓜蛋白酶 广州远天酶制剂厂; AS.1398 中性蛋白酶 房山酶制剂厂; 胰蛋白酶 上海实验试剂有限公司。

1.1.3 仪器与设备

电子分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 722S 分光光度计 上海棱光技术有限公司; LD5-2A 型离心机 北京医用离心机厂; pH5-3C 型精密 pH 计 上海雷磁仪器厂; 电热恒温水浴锅 江苏省金坛市医疗仪器厂; 78-2 型双向磁力搅拌器 常州华普达教学仪器有限公司; FD-3 型真空冷冻干燥机 北京博医康技术公司。

收稿日期: 2005-06-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270976)

作者简介: 马美湖(1957-), 教授, 博士, 研究方向为动物食品科学、食品生物技术。

1.2 方法

1.2.1 制取工艺流程

鲜猪血→抗凝、离心→破胞→血红蛋白→稀释、调pH值与温度→加酶酶解→调酸→加亚硝酸钠→升温反应→真空冷冻干燥→亚硝基血红素多肽

1.2.2 酶解条件研究的试验设计

为了获得酶解程度适当的猪血红蛋白酶解液,一方面使血红蛋白有一定程度的水解,使血红素暴露利于NO⁻牢固结合;另一方面血红蛋白水解成比较长的多肽链,利于多肽链对色素的保护以防氧化变色。研究中采用不同种类的酶(胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、AS.1398中性蛋白酶、2709碱性蛋白酶),以及不同的酶解条件(底物浓度8%、12%、16%,加酶量以血红蛋白计2000、4000、6000U/g,酶解时间3、6、9h,有限酶解预处理后的猪血红蛋白,酶解液在相同的合成条件下与亚硝酸钠反应,进行四因素三水平L₉(3⁴)正交试验(表1),以合成色素得分为指标选择适宜酶种类和酶解条件。

表1 因素水平表
Table 1 Factors and levels of experiment

水平	A 底物浓度(%)	B 加酶量(U/g)	C 酶解时间(h)
1	8	2000	3
2	12	4000	6
3	16	6000	9

1.2.3 合成制取方法

采集屠宰场新鲜猪血,加入猪血量0.5%的柠檬酸三钠并用玻璃棒顺同一方向不断搅拌使血中的纤维蛋白完全分离出来到达抗凝目的;用100目干净纱布过滤除纤,再用离心机4000r/min转速离心15min,弃去上层血清,获得红细胞血浆;得到的红细胞血浆用0.9%的生理盐水洗涤两次并离心,收集红血球并记录体积。然后加0.75倍去离子水及0.25倍乙醇,且加入0.1%~0.2%的抗氧化剂(亚硫酸氢钠)溶液,磁力加热搅拌30min,冰浴冷却至室温进行冷热破壁处理,使血红蛋白游离出来。

将预处理得到的血红蛋白稀释成所需浓度,并调节pH值至所用酶的最适范围,然后加入蛋白酶进行酶解,酶解过程中通过加入NaOH维持适宜pH值,恒温酶解一定时间后调pH值、降温使酶失活终止酶解。以1%抗坏血酸及0.6%烟酰胺为抗氧化剂,酶解液与亚硝酸钠反应合成亚硝基血红素多肽,产物采用真空冷冻干燥。

1.2.4 合成制取条件研究的试验设计

在适宜酶解条件下获得酶解液的基础上,考虑到反应对象的特殊性,各种合成参数可能有所不同,故需要重新确定合成条件。以木瓜蛋白酶在适宜酶解条件下获得的血红蛋白酶解液为反应液,采用正交试验(表2)研

究pH值、反应温度、反应时间及亚硝酸钠添加量等四个因素对酶解液合成色素的影响,分析产物得分结果,选择适宜的酶解液合成亚硝基血红素多肽工艺条件。

表2 合成正交因素试验水平表
Table 2 Factors and levels of experiment

水平	A 酶解液pH值	B 反应时间(min)	C 反应温度(℃)	D NaNO ₂ 用量(%)
1	4.50	6	55	1.2
2	5.00	9	60	1.4
3	5.50	12	65	1.6

1.2.5 测定方法

蛋白酶活力测定:Folin-酚法^[20];

血红蛋白含量(总氮)测定:凯氏定氮法^[19];

水解度测定:用甲醛滴定法^[19]测氨基氮,然后按下式计算:

$$\text{水解度DH}(\%) = (\text{氨基氮} / \text{总氮}) \times 100\%$$

1.2.6 合成产物评分标准

血红蛋白有限酶解液合成亚硝基血红素多肽色素的数量与质量集中表现在色泽鲜艳度与稳定性两个方面,而且色泽是首要因素,稳定性表现其结合的牢固程度,综合上述因素制订色素评分标准:色泽得分以色素红色的鲜艳度不同进行比较记分,产物用20ml 80%丙酮溶解,搅拌均匀后过滤,滤液在540nm处测吸光度,每组试验中OD值最大者为100分,其它的以OD值与最大OD值之比记分;色泽稳定性以合成产物置于试管中在自然状态下放置,观察试管四周色泽完全褪去时间,1h之内褪色计0分,4h之内褪色计20分,8h之内褪色计40分,16h之内褪色计60分,24h之内褪色计70分,36h之内褪色计80分,48h之内褪色计90分,48h之后褪色计100分。两项指标进行加权记分,色泽计0.7,色泽稳定性计0.3,因此合成色素最后得分的详细计算公式为:

$$\text{酶解液合成色素得分} = \text{色泽} \times 0.7 + \text{色泽稳定性} \times 0.3$$

1.2.7 合成产物鉴定

无论是亚硝基肌红蛋白还是亚硝基血红蛋白,呈现色泽的物质均为亚硝基结合在血红素铁上而生成的二亚硝基亚铁血色原色素(DNFH)。采用紫外-可见吸收光谱图谱法^{[22][24]},即用80%的丙酮溶液提取产物色素,离心后的上层色素液在波长450~650nm处用紫外-可见分光光度计扫描吸收光谱图,看是否与亚硝酸钠发色的商品香肠提取色素、相关文献报道的图谱一致。

1.2.8 合成产物干燥

反应产物在真空冷冻干燥机内进行干燥,整个干燥过程设三段,温度分别为-20、-10、0℃,每段时间均为16h。

2 结果与分析

2.1 酶解制取亚硝基血红素多肽酶种类的选择

选用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、AS. 1398 中性蛋白酶、2709 碱性蛋白酶等四种蛋白酶有限酶解预处理后的猪血红蛋白，酶解条件及合成参数相同，以合成色素得分为指标选择适宜酶种类，试验结果见表 3。

表 3 酶种类对色素合成的影响

Table 3 The effect of the enzyme species on synthesis of nitrosyl heme-peptide

酶种类	1 组			2 组			平均得分
	OD 值	褪色时间(h)	总评分	OD 值	褪色时间(h)	总评分	
胰蛋白酶	0.844	36	92	0.811	36	89	90.5
木瓜蛋白酶	0.872	48	97	0.835	48	94	95.5
2709 碱性蛋白酶	0.736	24	80	0.797	16	82	81
AS. 1398 中性蛋白酶	0.784	36	87	0.786	24	85	86

由实验结果表 3 分析可知，试验使用的酶分别是微生物来源的中性蛋白酶和碱性蛋白酶、植物来源的木瓜蛋白酶和动物来源的胰蛋白酶，其中木瓜蛋白酶酶解液合成色素得分最高，胰蛋白酶、AS. 1398 中性蛋白酶次之，最低的是 2709 碱性蛋白酶。

分析原因可能是因为木瓜蛋白酶为内肽酶，专门作用于肽链内部的肽键，将舒展开的蛋白质肽链切成很长的肽段，血红素充分暴露易与 NO⁻ 结合但仍然受到大分子多肽长链的保护。虽然胰蛋白酶也属于内肽酶，但它只能催化底物蛋白质分子由赖氨酸或精氨酸残基端所构成的肽链的水解，特异性很强，酶解程度相对较低。中性蛋白酶、碱性蛋白酶的特异性不强，而且还可以把从蛋白质上水解下来的肽段继续酶解成分子量小的短肽和游离氨基酸，此外碱性蛋白酶在碱性环境中作用，血红素在强碱作用下从珠蛋白肽键上脱离下来成为游离血红素，虽然易与 NO⁻ 结合但失去多肽链的保护而稳定性不好。

本试验希望猪血红蛋白酶解成大分子多肽，而非小分子多肽或游离氨基酸，使得猪血红蛋白有限酶解液与 NO⁻ 反应合成的色素多且稳定，木瓜蛋白酶能较好的满足这一目的，同时属植物蛋白酶，来源广泛价格低廉，从试验效果和经济角度考虑宜选择木瓜蛋白酶。

2.2 酶解制取亚硝基血红素多肽酶解条件的确定

选用专一性比较强的木瓜蛋白酶，在其适宜的 pH 值(8.0)和温度(40℃)条件下有限酶解猪血红蛋白，酶解液在相同的合成条件下与亚硝酸钠反应。研究底物浓度、加酶量、水解时间等三个因素对合成色素的影响，底物浓度设 8%、12%、16% 三个水平，加酶量以血红蛋白计设 2000、4000、6000U/g 三个水平，酶解时间设 3、6、9h 三个水平，进行四因素三水平 L₉(3⁴) 正交

试验，分析色素得分结果，选择利于色素合成的酶解条件，试验结果如表 4。

采用直观分析法对结果进行极差分析，比较三因素的 R 值，由表 4 可以判断 A₃B₃C₂ 分别为 A、B、C 因素的优水平，即 A、B、C 三个因素的优水平组合 A₃B₃C₂ 为本试验的最优水平组合，即有限酶解猪血红蛋白合成亚硝基血红素多肽的最优酶解条件为：选用木瓜蛋白酶，底物浓度 16%，加酶量 6000U/g，水解时间 6h，此时血红蛋白的水解度(DH)为 10.73%，酶解程度比较低。比较各因素 R 值可见，R_C > R_B > R_A，因素对试验指标影响的主→次顺序是 CBA，即水解时间影响最大，由图 1 也可以看出，水解时间的直线最陡，波动最大；其次是加酶量和底物浓度。

表 4 酶解正交试验结果

Table 4 The results of the orthogonal test on the hydrolysis of hemoglobin

试验号	因素			产物评价		
	A 底物、浓度 (%)	B 加酶量 (U/g)	C 酶解时间 (min)	OD 值	褪色时间 (h)	总评
1	1(8)	1(2000)	1(3)	0.697	24	81
2	1(8)	2(4000)	2(6)	0.801	36	93
3	1(8)	3(6000)	3(9)	0.799	16	87
4	2(12)	1(2000)	3(9)	0.743	24	85
5	2(12)	2(4000)	1(3)	0.709	24	82
6	2(12)	3(6000)	2(6)	0.813	48	97
7	3(16)	1(2000)	2(6)	0.791	36	92
8	3(16)	2(4000)	3(9)	0.786	48	95
9	3(16)	3(6000)	1(3)	0.745	36	88
K ₁	261	258	251	Σ = 800		
K ₂	264	270	282			
K ₃	275	272	267			
K ₁	87	86	83.67			
K ₂	88	90	94			
K ₃	91.67	90.67	89			
优水平	A ₃	B ₃	C ₂			
R _j	4.67	4.67	10.33			
主次顺序	CBA					

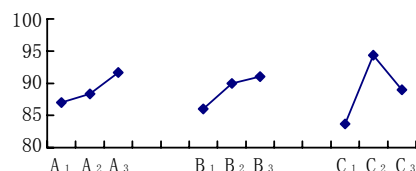


图 1 因素与指标趋势图

Fig.1 The tendency of factors and index

酶解度越高，结合血红素的肽链越短，游离氨基酸和小分子多肽增多，亚硝基血红素多肽没有大分子多肽链的保护而稳定性下降，因此正确控制水解度至关重要，使血红蛋白既有一定程度的分解，血红素又结合比较长的多肽链。

酶解时间极大影响着猪血红蛋白的酶解度,酶解时间短则水解度比较低,酶的作用位点较少且肽链相对较长;随着时间延长,水解度随之增加,肽链水解成分子量较小的多肽、游离氨基酸,肽链变短,合成的亚硝基血红素多肽没有多肽链的保护而不稳定。

底物浓度直接关系到酶解度及酶解液的组成,底物浓度大,不利于蛋白酶水解作用,酶解反应进行的不彻底,游离氨基酸及小分子多肽含量低而大分子多肽含量高,有利于色素的稳定;底物浓度小则相反。

一般说来,水解度随加酶量的增加而逐渐上升,但酶浓度太大会发生酶的自溶(自水解)现象,在本试验中加酶量6000U/g与4000U/g效果相差不大,所以从降低成本考虑加酶量可选4000U/g,即实际生产中有限酶解猪血红蛋白合成亚硝基血红素多肽的酶解条件为:选用木瓜蛋白酶,底物浓度16%,加酶量4000U/g,水解时间6h,此条件下血红蛋白的水解度(DH)为8.71%,比正交试验所选择酶解条件的水解度更低。

2.3 酶解制取亚硝基血红素多肽合成参数的确定

以木瓜蛋白酶在适宜酶解条件下获得的血红蛋白酶解液为反应液,综合考虑各因素对色素合成的影响。采用四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验,酶解液pH值设4.50、5.00、5.50,反应时间(min)设6、9、12,反应温度(℃)设55、60、65,亚硝酸钠添加量(%)设1.2、1.4、1.6,反应结果见表5。

表5 合成正交试验结果

Table 5 The results of the orthogonal test on the synthesis of nitrosyl heme-polypeptide

试验号	因素				产物评价		
	A	B	C	D	OD 值	褪色时间	总评
	酶解液 pH 值	反应时间 (min)	反应温度 (℃)	NaNO ₂ 用量(%)			
1	1(4.50)	1(6)	1(55)	1(1.2)	0.743	24	84
2	1(4.50)	2(9)	2(60)	2(1.4)	0.733	48	89
3	1(4.50)	3(12)	3(65)	3(1.6)	0.741	36	87
4	2(5.00)	1(6)	2(60)	3(1.6)	0.816	36	93
5	2(5.00)	2(9)	3(65)	1(1.2)	0.661	48	83
6	2(5.00)	3(12)	1(55)	2(1.4)	0.827	48	97
7	3(5.50)	1(6)	3(65)	2(1.4)	0.756	24	85
8	3(5.50)	2(9)	1(55)	3(1.6)	0.839	36	95
9	3(5.50)	3(12)	2(60)	1(1.2)	0.659	48	83
K ₁	260	262	276	250	Σ = 796		
K ₂	273	267	265	271			
K ₃	263	267	255	275			
K ₁	86.67	87.33	92	83.33			
K ₂	91	89	88.33	90.33			
K ₃	87.6	89	85	91.67			
优水平	A ₂	B ₂	C ₁	D ₃			
R _j	4.33	1.67	7	8.34			
主次顺序D C A B							

采用直观分析法对结果进行极差分析,比较四因素

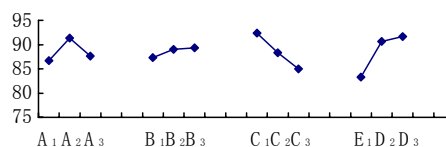


图2 因素与指标趋势图

Fig.2 The tendency of factors and index

的R值,由表5可以判断A₂、B₂、C₁、D₃分别为A、B、C、D因素的优水平,即A、B、C、D四个因素的优水平组合A₂B₂C₁D₃为本试验的最优水平组合,即血红蛋白酶解液合成亚硝基血红素多肽的最优工艺参数为pH5.00,反应时间9min,反应温度为55℃,NaNO₂的添加量为1.6%。合成产物色泽情况见图5。

比较各因素R值可见,R_D > R_C > R_A > R_B,因素对试验指标影响的主→次顺序是DCAB,即NaNO₂添加量影响最大,由图2也可以看出,NaNO₂添加量的直线最陡,波动最大;其次是反应温度与pH值,而反应时间影响较小。

由于反应对象为血红蛋白有限酶解后的大分子血红素多肽占优势的酶解液,其结构、性质发生了改变而具有一定的特殊性,合成参数也随之发生改变。因酶解后血红蛋白分解成长肽,变性温度降低,反应温度也随之比血红蛋白直接反应低;血红素更为暴露NO⁻更易于结合,所需反应时间缩短。

2.4 合成产物鉴定结果

将制得的亚硝基血红素多肽产物转移至离心管中,加入适量氯化钠溶液,在3000r/min速度下离心10min,弃上层清液,红色沉淀加入80%丙酮水溶液,搅拌1min,过滤得红色滤液,用紫外-可见分光光度计在450~650nm处扫描吸收光谱图,如图3所示。采用同样方法对市场购买的、用亚硝酸钠发色的某品牌商品香肠提取色素并扫描吸收光谱图,如图4所示。

从吸收光谱图3可以看出,产物在约480、540和570nm处有较强的吸收峰,与从商品香肠中提取色素的吸收光谱图4以及Shahidi^[12]和陶菲^[8]等文献报道的吸收曲线基本一致,但出现峰值位移现象,这可能与产物中

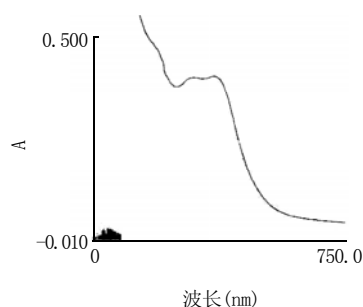


图3 产物亚硝基血红素多肽紫外-可见光谱图

Fig.3 UV- visible absorption spectrum of nitrosyl heme-polypeptide

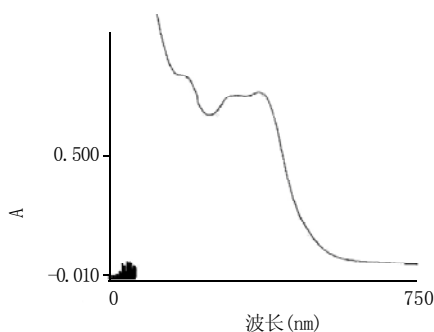


图4 商品香肠色素紫外-可见光谱图

Fig.4 UV-visible absorption spectrum of pigment abstracted from commercial sausage



(a) 冷冻干燥前亚硝基血红素多肽产物



(b) 冷冻干燥后亚硝基血红素多肽产物

图5 有限酶解血红蛋白合成制取的亚硝基血红素多肽

Fig.5 Nitrosyl heme-peptide by enzymatic hydrolysis from porcine hemoglobin

含有杂质及误差有关。从而证明了本试验制得的亚硝基血红素多肽产物的结构为亚硝基亚铁血色原色素(DNFH)。

3 结论

3.1 利用蛋白酶有限酶解猪血红蛋白成结合血红素的大分子多肽酶解液,与亚硝酸钠在酸性条件下反应生成亚硝基血红素多肽的方案是可行的。

3.2 选择木瓜蛋白酶,利于亚硝基血红素多肽生成的酶解条件为:底物浓度16%,加酶量4000U/g,水解时间6h;酶解液合成色素的条件为:pH5.00,反应时间12min,反应温度为55℃,NaNO₂添加量为1.6%。

3.3 木瓜蛋白酶属植物来源蛋白酶类,在我国南方资

源丰富,其提取和生产工艺比较成熟,使试验方案经济可行,能进行规模化连续生产。

3.4 传统的富含血红素铁氨基酸中血红素在酸性环境中呈聚合物存在,生物利用率差,并且纯氨基酸的营养液在肠道内形成高渗环境,容易引起恶心、腹胀、腹泻等症状。猪血红蛋白有限酶解液不仅可以合成优质的肉品着色剂,而且酶解后产生少量小肽及氨基酸,能促进人体的生长发育,提高机体免疫力,促进铁在人体内的吸收。

参考文献:

- [1] 马美湖. 现代畜产品加工学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001.
- [2] 马美湖, 谭敬军. 香肠无硝新方法的研究[J]. 中国畜产与食品, 1997, (2): 55-56.
- [3] 曹稳根, 李卫华. 亚硝基血红素食品着色剂的研究[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 1996, (1): 75-78.
- [4] Y Henry, A Guissani. Interactions of nitric oxide with hemoproteins: roles of nitric oxide in mitochondria[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1999, (55): 1003-1014.
- [5] 王远明. 无硝血红蛋白着色剂的研制[J]. 华东理工大学学报, 1998, (6): 655-658.
- [6] Shahidi F, Pegg R B. Effect of preformed cooked cured-meat pigment (CCMP) on color parameters of muscle food[J]. Journal of Muscle Foods, 1991, (4): 297-304.
- [7] Killday K B, Michael S, Bailey M E. Structure characterization of nitrosylhemochromogen of cooked cured meat: implication in meat-curing reaction[J]. Journal of Food Chemistry, 1998, (36): 909-914.
- [8] 孔保华, 陶菲, 等. 腌肉色素制备工艺的研究[J]. 食品科学, 2002, (8): 197-199.
- [9] Bhandari B R, Dumoulin E D, Richard H N J. Flavor encapsulation by spray drying application to citral and linalyl acetate[J]. J of Food Sci, 1994, (59): 57-59.
- [10] Jankiewicz L, Kwasny M, Wasylik K, et al. A Structure characterization on the nitrosyl derivation of heme[J]. Journal of Food Science, 1994, (59): 57-59.
- [11] Pegg R B, Shahidi F. A novel titration methodology for elucidation of the structure of preformed cooked cured-meat pigment by visible spectroscopy[J]. Food Chemistry, 2002, (56): 105-110.
- [12] Shahidi F, Pegg R B. Preparation of the cooked cured-meat pigment, dinitrosyl-ferrohemochrome, from hemin and nitric oxide[J]. Journal of Food Science, 1985, (50): 272-273.
- [13] Owen R Fennema. Food chemistry[M]. New York and Basel: Marcel Dekker, INC.
- [14] Young R H, Lawrie R A. Utilization of edible protein from meat industry by-product and waste II. The spinning of blood plasma proteins[J]. J Food Technol, 1974, 9(2): 171-177.
- [15] 汪学荣(译). 亚硝基亚铁血色原的制备[J]. 肉类食品, 2004, (10): 39-40.
- [16] 钱瑞生, 檀亦兵. 新颖食品天然色素的研制[J]. 江苏食品与发酵, 1995, (2): 25-27.
- [17] 吕世明, 谭艾娟. 木瓜蛋白酶对猪血蛋白的水解作用[J]. 贵州农学, 2001, 29(4): 6-7.
- [18] 孟祥晨, 杨同舟. 碱性蛋白酶水解猪血细胞最优反应条件的研究[J]. 东北农业大学学报, 1998, (2): 173.
- [19] 张意静. 食品分析技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
- [20] 中华人民共和国专业标准[S]. SB/T10317-1999, 蛋白质酶活力测定法