

# 响应面法优化玉米黄粉蛋白的酶解工艺

郑明洋<sup>1,2</sup>, 王元秀<sup>2,\*</sup>, 张桂香<sup>2</sup>, 孙纳新<sup>2</sup>

(1.山东省医学科学院, 山东 济南 250062; 2.济南大学-山东省医学科学院医学与生命科学学院, 山东 济南 250022)

**摘要:** 利用 pH-stat 法测定碱性蛋白酶和中性蛋白酶对玉米黄粉蛋白的水解度, 通过 Box-Behnken 响应曲面法优化水解条件。根据单因素试验结果设计中心组合试验, 以水解度为指标, 采用响应面分析法确定最优水解工艺参数。结果表明: 蛋白酶水解的最适条件为酶解 pH11.10、酶解温度 55.00℃、底物质量浓度 112g/L、碱性蛋白酶与中性蛋白酶酶活单位比值 5:1、加酶量 48000U/g、酶解时间 120min; 在此条件下, 玉米黄粉蛋白水解度实测值为 30.23%, 模型的预期值为 30.84%。采用复合酶水解可提高玉米黄粉蛋白水解度, 且工艺简单。

**关键词:** 蛋白酶; 玉米黄粉蛋白; 响应面; 酶解工艺

## Optimization of Hydrolysis Process for Corn Gluten Meal by Response Surface Methodology

ZHENG Ming-yang<sup>1,2</sup>, WANG Yuan-xiu<sup>2,\*</sup>, ZHANG Gui-xiang<sup>2</sup>, SUN Na-xin<sup>2</sup>

(1. Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China;

2. College of Medicine and Life Sciences, Shandong Academy of Medical Sciences-University of Jinan, Jinan 250022, China)

**Abstract** Response surface methodology based on Box-Behnken experimental design was employed to optimize conditions for the dual-enzymatic hydrolysis of corn gluten meal to obtain the maximum degree of hydrolysis. The optimal hydrolysis conditions were found as follows: pH 11.10, hydrolysis temperature 55.00 °C, substrate concentration 112 g/L, activity ratio of alkaline protease to neutral protease 5:1, total enzyme dose 48000 U/g, and hydrolysis time 120 min. Under these conditions, the actual degree of hydrolysis was 30.23%, and the predicted value 30.84%. The dual-enzymatic hydrolysis process was simple and provided a high degree of hydrolysis.

**Key words:** protease; corn gluten meal; response surface methodology; hydrolysis

中图分类号: Q814.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-0071-06

玉米黄粉蛋白是利用玉米湿法加工淀粉的一种副产品, 其中含有 62%~71% 的蛋白质<sup>[1]</sup>。目前, 玉米黄粉蛋白大多是作为动物饲料或当作“三废”直接排放, 极大地浪费了资源并对环境造成污染。通过酶法水解, 可以提高玉米黄粉蛋白的水溶性, 并且其水解产物具有许多生理功能, 如抗菌、调节神经系统功能、抗氧化活性等, 有利于深层次开发玉米蛋白, 提高玉米资源的利用率<sup>[2-3]</sup>。对玉米黄粉蛋白水解常用的蛋白酶有碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶等<sup>[4-5]</sup>。碱性蛋白酶是一种丝氨酸型的内切蛋白酶, 它能水解蛋白质分子肽链生成多肽或氨基酸, 是一种金属激活酶<sup>[6]</sup>。中性蛋白酶是由枯草芽孢杆菌经发酵提取而得到的, 属于一种内切酶。目前玉米黄粉蛋白水解国内多采用单一酶<sup>[2,5]</sup>或多酶分步水解的方法, 并且采用多酶水解玉米黄粉蛋白比

单一酶要好<sup>[4,7]</sup>, 而采用多酶复合水解的研究较少, 云霞等<sup>[8]</sup>研究了碱性蛋白酶和复合风味蛋白酶共同对玉米黄粉蛋白的水解作用。

本实验拟利用碱性蛋白酶和中性蛋白酶共同水解玉米黄粉蛋白, 通过单因素试验和响应面法对影响玉米蛋白水解度的因素进行优化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

玉米黄粉蛋白 山东鲁洲集团。

Protex6L 碱性蛋白酶、Protex7L 中性蛋白酶 美国 Genencor 公司; 其他试剂均为分析纯。

PHS-3B 精密 pH 计 上海雷磁仪器厂; DK-8D 型电热恒温水槽 上海精宏实验设备有限公司; 增力电动搅

收稿日期: 2011-10-30

基金项目: 济南市科技发展计划项目(TNK0908)

作者简介: 郑明洋(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物活性物质制备。E-mail: zhengmingyangyx@163.com

\* 通信作者: 王元秀(1966—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为生物活性物质制备。E-mail: chm\_wangyx@ujn.edu.cn

拌机 上海标本模型厂; 电子天平 上海光正医疗仪器有限公司; 723 型可见光分光光度计 上海精密仪器仪表有限公司。

## 1.2 蛋白水解度(degree of hydrolysis, DH)的测定

通过 pH-stat 法<sup>[2,9]</sup>测定蛋白的水解度, 以消耗碱的量进行表征。

$$DH/\% = \frac{V \times N_b}{a \times m \times h_{tot}} \times 100$$

式中:  $V$  为消耗碱的体积/mL;  $N_b$  为碱液浓度/(mol/L);  $a$  为  $\alpha$  氨基平均解离度;  $m$  为蛋白粉质量/g;  $h_{tot}$  为样品肽键量/(mol/g)。

## 1.3 单因素试验<sup>[10-11]</sup>

**酶解 pH 值的确定:** 玉米黄粉质量浓度 60g/L, 以缓冲液调初始 pH 值为 9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0, 按每克玉米黄粉加入 48000U 蛋白酶加入碱性蛋白酶, 50℃ 水解 60min。测定消耗 1mol/L NaOH 溶液体积, 计算玉米黄粉的水解度。

**酶解温度的确定:** 玉米黄粉质量浓度 60g/L、调初始 pH11.0, 按每克玉米黄粉加入 48000U 蛋白酶加入碱性蛋白酶, 分别于 40、45、50、55、60、65℃ 水解 60min, 测定消耗 1mol/L NaOH 溶液体积, 计算玉米黄粉的水解度。

**加酶量的确定:** 玉米黄粉质量浓度 60g/L, 调节初始 pH11.0, 分别按每克玉米黄粉 24000、36000、48000、60000、72000、84000U 加入碱性蛋白酶, 55℃ 水解 60min, 测定消耗 1mol/L NaOH 溶液体积, 计算玉米黄粉的水解度。

**酶解底物质量浓度的确定:** 取玉米黄粉, 调其质量浓度为 60、80、120、160、200、240g/L, 调初始 pH11.0, 按每克玉米黄粉加入 48000U 蛋白酶加入碱性蛋白酶, 55℃ 水解 60min, 测定消耗 1mol/L NaOH 溶液体积, 计算玉米黄粉的水解度。

**酶解时间的确定:** 玉米黄粉质量浓度 120g/L, 调初始 pH11.0, 按每克玉米黄粉 48000U 蛋白酶加入碱性蛋白酶, 55℃ 水解, 在 0~60min 每 5min 测定 1 次, 在 60~120min 每 10min 测定 1 次, 在 120~180min 每 30min 测定 1 次, 记录不同时间消耗的 1mol/L NaOH 溶液体积, 计算玉米黄粉的水解度。

**复合酶配比的确定:** 碱性蛋白酶与中性蛋白酶按酶活单位比值为 1:0、3:1、2:1、1:1、1:2、0:1 添加, 控制总酶量为每克黄粉加 48000U 蛋白酶, 调初始 pH11.0, 55℃ 水解 120min, 测定消耗的 1mol/L NaOH 溶液体积, 计算玉米黄粉水解度。

## 1.4 Box-Behnken 试验设计<sup>[12-14]</sup>

在单因素试验基础上, 根据中心组合试验设计原

理, 以水解率为指标, 设计 4 因素 3 水平响应面分析试验, 数据用 Design-Expert 软件统计, 确定最优水解工艺参数。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶解单因素试验条件对玉米黄粉水解度的影响

#### 2.1.1 酶解 pH 值

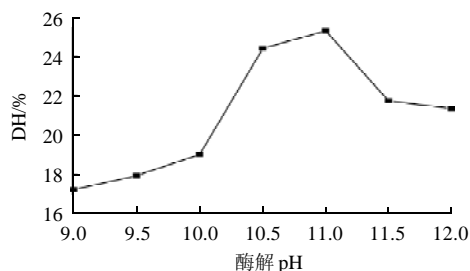


图1 不同酶解 pH 值条件下玉米黄粉的水解度

Fig.1 Effect of pH value on degree of hydrolysis of corn gluten meal

由图 1 可知, 在 pH9.0~11.0 范围内, 水解度随着 pH 值增大而增大, 当 pH11.0 时水解度达到最大, 在 pH11.0~12.0 范围内, 随着 pH 值增大水解度反而降低, pH 值改变能影响酶活性中心上必需基团的解离程度, 同时影响底物和辅酶的解离程度, 从而影响酶分子对底物分子的结合和催化作用, 由此选定 pH11.0 为酶解 pH 值。

#### 2.1.2 酶解温度

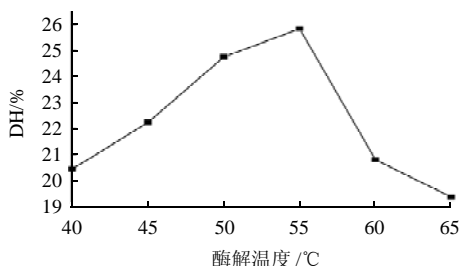


图2 不同酶解温度条件下玉米黄粉的水解度

Fig.2 Effect of hydrolysis temperature on degree of hydrolysis of corn gluten meal

由图 2 可知, 在酶解温度 40~55℃ 范围内, 水解度随着温度升高而增大, 55℃ 时水解度达到最大, 55~65℃ 范围内, 随着温度升高水解度反而降低, 这是因为酶分子吸收了过多的能量, 引起维持酶分子结构的次级键解体, 导致蛋白质空间结构发生改变, 使得酶活力减弱。由此选定 55℃ 为最适酶解温度。

#### 2.1.3 加酶量

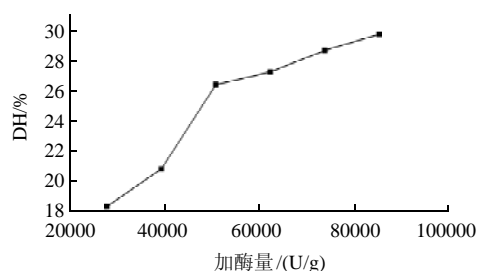


图3 不同加酶量条件下黄粉水解度的变化  
Fig.3 Effect of total enzyme dose on degree of hydrolysis of corn gluten meal

由图3可知,加酶量在24000~48000U/g范围内,水解度随着加酶量增大而增加的幅度很大,但当加酶量达到48000U/g时,随着加酶量的增大,水解度增大趋于平缓,由于对于酶有最适底物浓度,当加酶量不断增加时,只有一部分酶与底物结合,反应速度增加缓慢。出于经济考虑,选择48000U/g为最适加酶量。

#### 2.1.4 酶解底物质量浓度

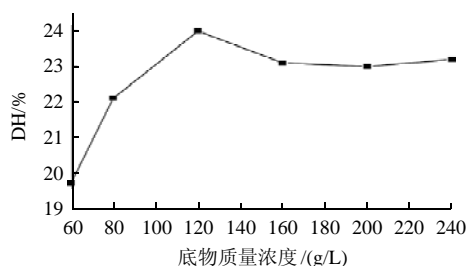


图4 不同底物质量浓度条件下玉米黄粉的水解度  
Fig.4 Effect of substrate concentration on degree of hydrolysis of corn gluten meal

由图4可知,底物质量浓度在60~120g/L水解度随质量浓度增大而增大,在120g/L时水解度达最大,底物质量浓度继续增大,酶活中心分子逐渐被饱和,反应速率会达到一个极限值,即最大反应速率。底物质量浓度在120~240g/L范围内,随质量浓度增大水解度反而降低,其原因可能是由于植物蛋白中含有植物蛋白酶抑制剂,能与蛋白酶作用与底物竞争蛋白酶的结合基团,表现为竞争性抑制作用。当底物质量浓度过大时,酶量相对减少,同时抑制剂含量也相对增加,从而导致底物不能够完全水解,故玉米黄粉蛋白质质量浓度不断增大时水解度表现为下降趋势<sup>[15]</sup>。因此确定120g/L为最适底物质量浓度。

#### 2.1.5 酶解时间

由图5可知,在0~120min内,水解度增加迅速,水解反应剧烈,当超过120min时,水解度增加趋于平缓,再继续延长水解时间也无大意义。由于产物的增

加,酶可作用的肽键逐渐减少,酶催化反应达到平衡状态,酶活力受到抑制<sup>[8]</sup>,因此选定120min为酶解最适作用时间,这样既能做到节约能源又能达到水解较完全的目的。

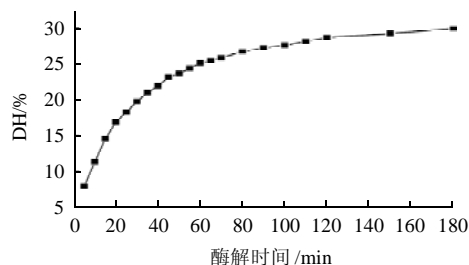


图5 不同酶解时间条件下玉米黄粉的水解度  
Fig.5 Effect of hydrolysis time on degree of hydrolysis of corn gluten meal

#### 2.1.6 复合酶配比

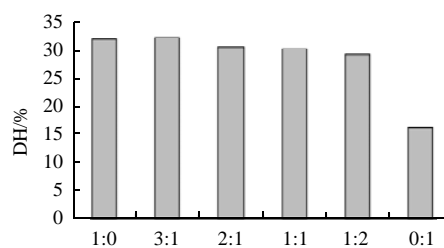


图6 不同碱性蛋白酶与中性蛋白酶酶活单位比值条件下玉米黄粉的水解度  
Fig.6 Effect of activity ratio of alkaline protease to neutral protease on degree of hydrolysis of corn gluten meal

由图6可知,当碱性蛋白酶和中性蛋白酶酶单位比值为3:1时水解度最大,随着中性蛋白酶比例增大水解度降低。因此选定碱性蛋白酶与中性蛋白酶比例3:1为最佳酶配比。

### 2.2 响应曲面法优化酶解条件

#### 2.2.1 酶解条件优化

表1 Box-Behnken 试验因素水平和编码  
Table 1 Factors and levels in Box-Behnken experimental design

因素	代码	编码水平		
		-1	0	1
酶解 pH	A	10.5	11.0	11.5
酶解温度/℃	B	50	55	60
底物质量浓度/(g/100mL)	C	8	12	16
碱性蛋白酶与中性蛋白酶酶活单位比值	D	6:1	4:1	2:1

利用软件 Design-Expert, 分别对酶解温度、酶解 pH 值、底物质量浓度、碱性蛋白酶与中性蛋白酶酶活单位比值 4 个因素进行 Box-Behnken 试验设计<sup>[16]</sup>, 因素

水平编码如表 1 所示。

设计如下 29 个试验, 中心试验进行 5 次用来估计试验误差, 其余为析因点。控制酶添加量为 48000U/g, 各组试验作用时间为 120min。具体设计组合及试验值和软件预测值如表 2 所示。

表 2 酶解条件优化响应面试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design arrangement and results

试验号	因素				DH/%	
	A	B	C	D	实验值	预测值
1	0	1	-1	0	27.44	28.22
2	1	0	-1	0	28.52	28.33
3	0	-1	0	1	28.34	28.86
4	1	1	0	0	27.47	27.73
5	-1	0	0	-1	27.65	27.67
6	0	0	0	0	32.34	30.74
7	0	0	0	0	31.44	30.74
8	-1	1	0	0	29.26	28.60
9	-1	0	1	0	26.23	27.00
10	0	0	0	0	31.42	30.74
11	0	0	0	0	29.26	30.74
12	0	-1	0	-1	28.7	28.68
13	-1	-1	0	0	26.39	26.48
14	0	0	1	-1	26.1	26.96
15	1	0	1	0	26.9	27.52
16	0	1	0	1	27.98	28.58
17	0	0	-1	-1	27.44	26.93
18	1	0	0	1	29.26	28.31
19	1	-1	0	0	28.34	29.35
20	0	0	-1	-1	30.13	29.98
21	0	0	0	0	29.26	30.74
22	-1	0	0	1	28.19	28.02
23	0	-1	-1	0	27.98	28.03
24	-1	0	-1	0	26.9	26.86
25	0	1	1	0	29.06	28.02
26	0	0	1	1	28.79	29.26
27	1	0	0	-1	30.13	29.37
28	0	-1	1	0	29.33	29.48
29	0	1	0	-1	29.42	28.98

采用 Design Expert 软件对所得数据进行回归分析, 回归分析结果如表 3 所示。

利用设计软件 Design-Expert 对数据进行多元回归拟合, 获得酶解 pH 值(A)、酶解温度(B)、底物质量浓度(C)和酶配比(D)的二次多项回归方程为:

$$\begin{aligned} \text{DH}/\% = & 27.94 + 0.83A - 0.037B - 0.17C - 0.34D - \\ & 1.23A^2 + 0.077B^2 + 0.22C^2 + 0.38D^2 - 1.44AB - 0.24AC - \\ & 0.85AD + 0.067BC - 0.27BD + 1.34CD \end{aligned} \quad (1)$$

由表 3 可知, 方程(1)复相关系数  $R^2 = 0.7220$ , 说明拟合程度良好, 实验误差较小<sup>[12]</sup>。模型  $P$  值为 0.0424 ( $P < 0.05$ )表明该模型具有显著性, 不同条件下水解度的差异有显著性, 实验方法可行。失拟项  $P = 0.8075 >$

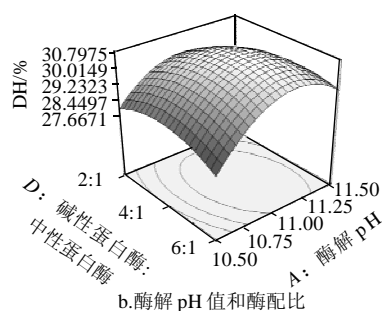
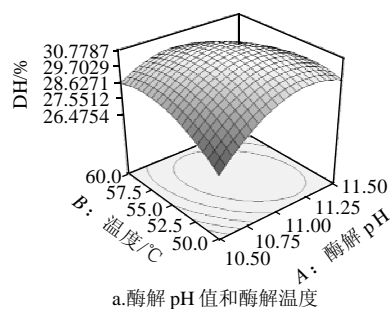
0.1000, 即方程模型失拟不显著, 说明该方程可以很好地描述各水解条件和水解度的关系。 $R_{SN}$  大于 4.0 视为合理<sup>[12]</sup>, 本模型为 5.170, 说明具有较好的预测作用。各项  $P$  值小于 0.05 时, 说明其对模型作用显著, 由  $P$  值大小可知, 在所选各因素水平范围内, 对结果的影响大小为酶解 pH 值 > 酶配比 > 底物质量浓度 > 酶解温度。一次项 A、B、C、D 都不显著( $P > 0.05$ ), 二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  显著( $P < 0.05$ ), 交互项 AB、AC、AD、BC、BD 不显著( $P > 0.05$ ), CD 显著( $P < 0.05$ ), 这表明底物质量浓度和酶配比之间存在显著交互作用, 底物质量浓度和酶配比的交互作用对水解度的影响具有显著性。

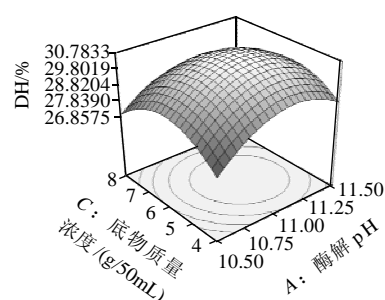
表 3 响应面回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model equation

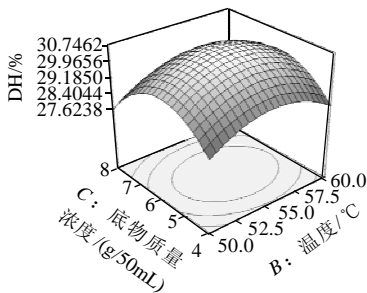
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	47.92	14	3.42	2.60	0.0424
A	3.00	1	3.00	2.28	0.1536
B	0.2	1	0.20	0.15	0.7026
C	0.33	1	0.33	0.25	0.6228
D	0.38	1	0.38	0.29	0.6006
$A^2$	17.27	1	17.27	13.10	0.0028
$B^2$	7.47	1	7.47	5.67	0.0321
$C^2$	18.40	1	18.40	13.96	0.0022
$D^2$	3.85	1	3.85	2.92	0.1095
AB	3.50	1	3.5	2.65	0.1256
AC	0.23	1	0.23	0.17	0.6853
AD	0.50	1	0.50	0.38	0.5490
BC	0.018	1	0.018	0.019	0.9081
BD	0.29	1	0.29	0.22	0.6453
CD	7.24	1	7.24	5.49	0.0344
参差	18.45	14	1.32		
失拟项	10.56	10	1.06	0.53	0.8075
纯误差	7.89	4	1.97		
总离差	66.37	28			

$$R^2 = 0.7220; R_{Adj}^2 = 0.4441; R_{SN} = 5.170$$

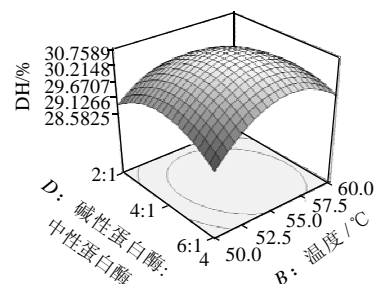




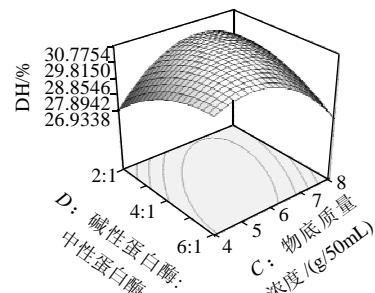
c. 酶解 pH 值和底物质量浓度



d. 酶解温度和底物质量浓度



e. 酶解温度和酶配比



f. 底物质量浓度与酶配比

图7 各两因素交互作用对碱性蛋白酶与中性蛋白酶水解玉米黄粉影响的响应曲面图

Fig.7 Response surface plots showing the interactive effects of hydrolysis conditions on degree of hydrolysis of corn gluten meal

在回归模型方差分析结果的基础上, 根据得到的回归二次方程, 利用软件作酶解 pH 值、酶解温度、底物质量浓度、酶比对水解度影响的响应面图, 分析两个因素的交互作用对玉米黄粉蛋白水解度的影响<sup>[16]</sup>。

图 7a 表明, 水解温度与酶解 pH 值交互作用较弱, 酶解 pH 值约为 11.0、酶解温度约为 55 °C 时水解度达到最高点, 沿酶解 pH 值方向等高线密度要大于沿酶解温

度方向, 说明酶解 pH 值对水解度的影响要大于酶解温度。图 7b 表明, 酶配比与酶解 pH 值的交互作用较弱, 酶配比约为 4:1、酶解 pH 值约为 11.0 时水解度达到最大, 沿酶解 pH 值方向的等高线密度大于沿酶配比方向, 说明酶解 pH 值对玉米蛋白水解度的影响大于酶配比。图 7c 表明, 酶解 pH 值与底物质量浓度的交互作用很弱, 底物质量浓度约为 120 g/L、酶解 pH 值约为 11.0 时水解度最大、曲面呈现峰值, 沿酶解 pH 值方向的等高线密度稍大于沿底物质量浓度方向, 说明酶解 pH 值对玉米蛋白水解度的影响要稍大于底物质量浓度。图 7d 表明, 酶解温度与底物质量浓度的交互作用较弱, 底物质量浓度约为 120 g/L、酶解温度约为 55 °C 时水解度达到最大, 沿底物质量浓度方向的等高线密度大于沿酶解温度方向, 说明底物质量浓度对水解度的影响要大于酶解温度。图 7e 表明, 酶解温度与酶配比的交互作用弱, 酶配比约为 5:1、酶解温度约为 55 °C 时水解度达到最大、曲面达到峰值, 沿酶解温度方向等高线密度与沿酶配比方向相当, 说明酶解温度与酶比对水解度的影响相当。图 7f 表明, 底物质量浓度与酶配比的交互作用较强, 酶配比约为 5:1、底物质量浓度约为 120 g/L 时水解度达到最大、曲面呈现峰形, 沿底物质量浓度方向等高线密度大于沿酶配比方向, 说明底物质量浓度对水解度的影响大于酶配比。

## 2.2.2 验证实验

根据所建立的数学模型进行参数最优化分析, 得到最优水解条件为初始酶解 pH 11.10、酶解温度 55.04 °C、底物质量浓度 112 g/L、碱性蛋白酶与中性蛋白酶配比 4.97:1, 此时理论水解度为 30.84%。

为检验方法的可靠性, 采用得到的最优水解条件进行玉米黄粉的水解实验。考虑到实际操作方便, 选取初始酶解 pH 11.10、酶解温度 55.0 °C、底物质量浓度为 112 g/L、碱性蛋白酶与中性蛋白酶酶活单位比值 5:1, 在此条件下进行 3 次平行实验, 实际得到水解度平均值为 30.23%, 比预测值相比, 相对误差约为 1.9%。因此采用响应面优化玉米黄粉的酶法水解, 具有实用价值。

## 3 结 论

本实验采用碱性蛋白酶和中性蛋白酶共同作用, 确定了水解条件, 与单酶作用相比提高了水解度, 当双酶共同作用时, 不同酶对蛋白质的酶解特异性有互补作用, 作用的肽键多, 能在较短时间内发挥较强的水解作用, 大大缩短作用时间, 因此双酶法比单酶法水解效果提高。通过单因素试验和 Box-Behnken 试验设计以及响应面分析对玉米黄粉酶解工艺进行了优化, 各因素对水解度的影响大小为: 酶解 pH 值 > 酶配比 > 底物质量浓度 > 酶解温度, 确定其优化工艺条件为: 初始

pH11.10, 温度 55.0℃、底物质量浓度 112g/L、最佳加酶量 48000U/g、最佳酶解时间 120min、碱性蛋白酶与中性蛋白酶活单位比值 5:1。并得到了玉米黄粉蛋白酶解各因素变量的二次方程, 该模型回归显著, 对试验拟合良好, 具有一定的应用价值。因此, 利用响应面法对玉米黄粉水解进行优化, 可获得最优水解工艺条件, 从而为进一步实验提供基础。

#### 参考文献:

- [1] 郑喜群. 玉米黄粉的酶解工艺与抗氧化活性肽的制备[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [2] 王晶. 玉米蛋白酶水解物抗氧化活性及应用研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007.
- [3] 张美莉, 侯文娟, 杨立凤, 等. 植物蛋白源生物活性肽的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2010(11): 33-36.
- [4] 李艳丽, 丛建民, 陈光. 双酶法制备玉米肽酶解条件研究[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 145-148.
- [5] 赵晨霞, 刘新华, 李治龙, 等. 不同酶水解玉米蛋白粉制备可溶性肽最佳条件的研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(12): 33-36.
- [6] OZTURK S, OZEREN-MORGAN M, DILGIMEN A S, et al. Alkaline serine protease from halotolerant *Bacillus licheniformis* BA17[J]. *Annals of microbiology*, 2008, 59(1): 83-90.
- [7] 何莉萍, 刘良忠. 中性蛋白酶和碱性蛋白酶对玉米蛋白水解作用的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 152-157.
- [8] 云霞, 朱蓓薇, 吴海涛, 等. 玉米黄粉蛋白酶解过程的研究及产物分析[J]. 食品科学, 2003, 24(5): 75-78.
- [9] 张春芝, 江志国. pH-stat法在测定酶促反应米氏常数中的应用[J]. 农业科学研究, 2005, 26(3): 26-27; 32.
- [10] 郑冬梅, 李升福, 孔保华, 等. 玉米蛋白水解条件的优化研究[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 52-56.
- [11] 吴疆, 童应凯, 金红, 等. 碱性蛋白酶水解玉米蛋白的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2007(2): 26-27.
- [12] 张丹, 闵伟红, 刘景圣, 等. 响应面法优化蛋白酶菌株发酵条件[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 248-253.
- [13] 薛治浦, 李欣, 朱文学. 响应面法优化丹参叶总酚酸超声波辅助提取工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(12): 34-38.
- [14] 葛菁萍, 刘国明, 孙红兵, 等. 响应面法优化玉米芯半纤维素水解条件[J]. 中国农学通报, 2011, 27(18): 64-68.
- [15] 曹方. 玉米黄粉蛋白的酶法水解工艺[J]. 大连轻工业学院学报, 2003, 22(1): 36-39.
- [16] HUANG Zhonglian, LIANG Zhenyu, LI Guanjia, et al. Response surface methodology to extraction of dioscoreae polysaccharides and the effects on rat's bone quality[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83(1): 32-37.