

张雨,陈爱华,吴杨平,等. 大竹蛏消化酶活性的响应面法分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(11):166-171.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.11.033

# 大竹蛏消化酶活性的响应面法分析

张雨<sup>1</sup>,陈爱华<sup>1</sup>,吴杨平<sup>1</sup>,曹奕<sup>1</sup>,陈素华<sup>1</sup>,张志东<sup>1,2</sup>,田镇<sup>1,2</sup>

(1. 江苏省海洋水产研究所,江苏南通 226007; 2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

**摘要:**旨在利用响应面法研究温度、盐度和 pH 值 3 个因素及其联合效应对大竹蛏 3 种消化酶(蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶)活性的影响。结果表明,大竹蛏消化酶活性随着盐度、温度及 pH 值的变化呈先增大后减小的变化规律。另外,通过 Box-Behnken 模型预测大竹蛏中 3 种消化酶活性最佳时的养殖条件,得出蛋白酶活性在盐度为 27.89‰、温度为 27.29 ℃、pH 值为 7.75 时最佳,为 0.479 U/mg;脂肪酶活性在盐度为 28.19‰、温度为 26.80 ℃、pH 值为 7.99 时最佳,为 0.291 U/mg;淀粉酶活性在盐度为 27.85‰、温度为 25.97 ℃、pH 值为 8 时最佳,为 0.958 U/mg。考虑到实际养殖操作的便利性,将养殖条件调整为盐度 28‰、温度 27 ℃、pH 值 8,在该条件下大竹蛏的消化能力较好。

**关键词:**大竹蛏;消化酶;响应面;养殖条件

**中图分类号:** S968.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)11-0166-06

消化酶(digestive enzyme)是指由动物消化腺和消化系统分泌的起消化作用的酶类,主要包括糖类水解酶(淀粉酶、纤维素酶)、蛋白酶和脂肪酶,是衡量生物体生理健康状态的重要指标<sup>[1]</sup>。消化酶不但随动物种类、健康状况和生长阶段的不同而有所差异,还受温度、盐度、pH 值等的诸多环境因子的影响<sup>[2]</sup>。目前,有关贝类消化酶的研究仅限于单一环境因素,如有关褶纹冠蚌(*Cristaria plicata*)<sup>[3]</sup>、三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)<sup>[3]</sup>、紫贻贝(*Mytilus edulis*)<sup>[4]</sup>、滨螺(*Littorina littorea*)<sup>[4]</sup>、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)<sup>[5]</sup>及鲍(*Abalone*)<sup>[6-7]</sup>等消化酶的研究,较少考虑环境因素的联合作用。大竹蛏俗称蛏子王,是广泛分布于我沿海的贝类之一。江苏吕四渔场内如东、启东一线历来具有相当的大竹蛏资源量,但是近年来围填海、港口建设等因素对海洋生境造成了不同程度的影响,使得大竹蛏的生理健康状态受到了严重挑战。因此,开展环境因素联合作用对大竹蛏消化酶的影响研究具有重要意义。

响应面法是一种解决多变量问题的数学统计

分析方法,主要通过提供合理的试验设计和数据统计分析、评价多种变量之间的交互作用而建立数学模型和三维立体响应曲面图形,最终得出最优参数组合的多元回归方程<sup>[8]</sup>。目前,响应面法在食品工艺优化<sup>[9-11]</sup>和药物研发<sup>[12-13]</sup>等领域有较多应用,在水产动物研究方面运用得较少。本研究利用响应面法研究温度、盐度和 pH 值 3 个因素及其联合效应对大竹蛏消化酶活性的影响,并利用多元回归方程模拟出大竹蛏消化酶活性最高时的养殖条件,以期为大竹蛏养殖条件优化、人工苗种繁育和增殖放流提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本试验所用大竹蛏取自江苏省海洋水产研究所文蛤良种场,选取相同规格、健康无损的大竹蛏作为试验用贝,在聚乙烯水槽中暂养 7 d 后,投喂  $10^5$  inds/mL 的球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)并每天换 1 次水,试验开始前停喂 1 d。

### 1.2 试验方法

试验采用 Box-Behnken 模型设计,根据预试验结果,设计 3 因素 3 水平试验,试验设计及其结果见表 1。本试验所用盐度、温度及 pH 值均设 3 个梯度,其中盐度分别设为 22‰、28‰、34‰,温度分别设为 20、27、34 ℃,pH 值分别设为 6.5、8.0、9.5。海水盐度通过海水、海水晶及淡水配制得到;温度通过加热板进行调节;pH 值通过 1 mol/L NaOH 或

收稿日期:2019-07-09

基金项目:江苏省海洋水产研究所青年科学基金(编号:SQ201704);南通市科技创新计划(编号:JC2018136)。

作者简介:张雨(1986—),男,广西玉林人,硕士,工程师,主要研究方向为贝类遗传育种与增养殖技术。E-mail: zhangyutan610@163.com。

通信作者:陈爱华,研究员,主要研究方向为贝类遗传育种与增养殖技术。E-mail: chenah540540@aliyun.com。

1 mol/L HCl 调至本试验所需值。试验在 17 个聚乙烯水槽中进行,每个水槽中放置 20 个大竹蛭,在试验过程中应及时挑出死亡个体,胁迫 3 d 后任取 3 个大竹蛭进行解剖,取肝胰脏组织,用于消化酶[蛋白酶(PRS)、脂肪酶(LPS)和淀粉酶(AMS)]活性的测定。

表 1 本试验的设计组合

组合 编号	编码值			实际值		
	A: 盐度	B: 温度	C: pH 值	A: 盐度(‰)	B: 温度(℃)	C: pH 值
1	0	0	0	28	27	8.0
2	0	0	0	28	27	8.0
3	-1	0	1	22	27	9.5
4	1	0	1	34	27	9.5
5	0	-1	1	28	20	9.5
6	0	1	-1	28	34	6.5
7	0	0	0	28	27	8.0
8	-1	1	0	22	34	8.0
9	1	0	-1	34	27	6.5
10	1	1	0	34	34	8.0
11	0	0	0	28	27	8.0
12	0	1	1	28	34	9.5
13	-1	0	-1	22	27	6.5
14	1	-1	0	34	20	8.0
15	0	0	0	28	27	8.0
16	0	-1	-1	28	20	6.5
17	-1	-1	0	22	20	8.0

1.3 消化酶活性的测定

蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活性及总蛋白含量均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定并按说明书上的公式计算。

1.4 数据统计

使用 Design - Expert 8.0 软件进行试验设计和数据分析,以盐度(A)、温度(B)、pH 值(C)为自变量,分别以蛋白酶活性、脂肪酶活性、淀粉酶活性为因变量建立模型方程,并对 3 种消化酶活性的最大值进行预测和条件优化。回归拟合大竹蛭消化酶模型曲线并用 Origin 8.0 软件作相应的 3D 响应面图。消化酶活性( $\gamma$ )的模型方程如下:

$$\gamma = k + x_1A + x_2B + x_3C + x_4AB + x_5AC + x_6BC + x_7A^2 + x_8B^2 + x_9C^2 + \varepsilon。$$

式中: $k$  为截距; $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_3$  分别为盐度与温度、盐度与 pH 值、温度与 pH 值的一次效应; $x_4$ 、 $x_5$ 、 $x_6$  分别为盐度与温度、盐度与 pH 值、温度与 pH 值之间的交互作用; $x_7$ 、 $x_8$ 、 $x_9$  分别为盐度、温度、pH 值之间的二次

效应; $\varepsilon$  为残差,假定其服从均值为 0 的正态分布。

通过方差分析 (analysis of variance, 简称 ANOVA) 确定回归方程模型及各试验因素的显著性,给出决定系数以考察模型的拟合优度,模型中各项效应采用最小二乘法进行估计。采用  $F$  统计量进行显著性检验,当  $P < 0.05$  时,表示差异显著;当  $P < 0.01$  时,表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶活性模型分析及响应面分析

利用 Design - Expert 8.0 软件对表 2 数据进行二次多元回归拟合。如表 3 所示, $F$  值为 53.52,  $P < 0.0001$ , 模型  $R^2$  为 0.9807, 修正系数为 0.9673, 表明该模型的拟合度较好,预测值与试验值高度吻合,因此可用该模型来分析并预测大竹蛭蛋白酶活性。本试验的精确度 (Adeq precision) 为 19.917%,说明本试验结果可信。另外,本试验结果显示,盐度、温度对大竹蛭蛋白酶活性的一次效应影响不显著;pH 值对大竹蛭蛋白酶活性的一次效应影响极显著 ( $P < 0.01$ );盐度、温度交互作用对大竹蛭蛋白酶活性的影响显著 ( $P < 0.05$ ),盐度和 pH 值、温度和 pH 值交互作用对大竹蛭蛋白酶活性的影响不显著;盐度、温度和 pH 值的二次效应对大竹蛭蛋白酶活性的影响极显著 ( $P < 0.01$ )。由上述回

表 2 本试验不同组合的酶活性

组合编号	蛋白酶活性 (U/mg)	脂肪酶活性 (U/mg)	淀粉酶活性 (U/mg)
1	0.469 ± 0.009	0.270 ± 0.009	1.010 ± 0.124
2	0.488 ± 0.010	0.286 ± 0.004	0.920 ± 0.110
3	0.263 ± 0.013	0.200 ± 0.048	0.626 ± 0.112
4	0.254 ± 0.069	0.213 ± 0.013	0.521 ± 0.098
5	0.267 ± 0.011	0.193 ± 0.021	0.635 ± 0.041
6	0.324 ± 0.036	0.165 ± 0.024	0.470 ± 0.074
7	0.488 ± 0.008	0.292 ± 0.011	0.933 ± 0.067
8	0.234 ± 0.021	0.239 ± 0.022	0.578 ± 0.033
9	0.325 ± 0.022	0.238 ± 0.038	0.667 ± 0.146
10	0.276 ± 0.013	0.219 ± 0.015	0.455 ± 0.122
11	0.471 ± 0.009	0.307 ± 0.009	0.896 ± 0.039
12	0.311 ± 0.015	0.204 ± 0.024	0.492 ± 0.065
13	0.333 ± 0.032	0.177 ± 0.037	0.633 ± 0.013
14	0.216 ± 0.048	0.193 ± 0.013	0.711 ± 0.033
15	0.466 ± 0.004	0.299 ± 0.011	1.008 ± 0.009
16	0.297 ± 0.018	0.228 ± 0.037	0.542 ± 0.142
17	0.284 ± 0.049	0.231 ± 0.034	0.633 ± 0.096

注:组合编号同表 1。

表 3 蛋白酶回归模型方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.15	9	0.016	53.52	<0.000 1	**
A	$2.311 \times 10^{-4}$	1	$2.311 \times 10^{-4}$	0.76	0.413 1	
B	$8.201 \times 10^{-4}$	1	$8.201 \times 10^{-4}$	2.69	0.145 2	
C	$4.232 \times 10^{-3}$	1	$4.232 \times 10^{-3}$	13.86	0.007 4	**
AB	$3.025 \times 10^{-3}$	1	$3.025 \times 10^{-3}$	9.91	0.016 2	*
AC	$2.5 \times 10^{-7}$	1	$2.5 \times 10^{-7}$	$8.189 \times 10^{-4}$	0.978 0	
BC	$7.225 \times 10^{-5}$	1	$7.225 \times 10^{-5}$	0.24	0.641 5	
A <sup>2</sup>	0.056	1	0.056	182.25	<0.000 1	**
B <sup>2</sup>	0.050	1	0.050	163.72	<0.000 1	**
C <sup>2</sup>	0.019	1	0.019	63.21	<0.000 1	**
残差	$2.137 \times 10^{-3}$	7	$3.053 \times 10^{-4}$			
失拟项	$1.676 \times 10^{-3}$	3	$5.586 \times 10^{-4}$	4.84	0.080 8	
纯误差	$4.612 \times 10^{-4}$	4	$1.153 \times 10^{-4}$			
总离差	0.15	16				

注: $R^2=0.980\ 7$ ,修正系数为 0.967 3,精确度为 19.917%。\* 表示影响显著( $P<0.05$ ), \*\* 表示影响极显著( $P<0.01$ ),下表同。

归结果拟合的盐度(A)、温度(B)和 pH 值(C)与蛋白酶活性的编码值回归方程如下:

PRS 活性 =  $0.48 - 5.375 \times 10^{-3} A + 0.01 B - 0.023 C + 0.028 AB - 2.5 \times 10^{-4} AC + 4.25 \times 10^{-3} BC - 0.11 A^2 - 0.11 B^2 - 0.068 C^2$ ;

实际值方程如下:

PRS 活性 =  $-0.49 - 0.16 A + 0.1 B + 0.46 C + 6.55 \times 10^{-4} AB - 2.78 \times 10^{-5} AC + 4.05 \times 10^{-4} BC - 3.19 \times 10^{-3} A^2 - 2.22 \times 10^{-3} B^2 - 0.03 C^2$ 。

根据上述结果,用 Origin 8.0 作出 3D 响应面图。如图 1 所示,当保持温度、盐度、pH 值 3 个因子中的 1 个为中值时,随着其他 2 个因子数值的升高,大竹蛭体内蛋白酶活性均呈现先上升后下降的趋势;各响应曲面图均显示,在本试验设置的温度、盐度、pH 值范围内存在蛋白酶活性的最大值。根据上述模型结果优化出蛋白酶活性最大时的养殖条件如下:盐度为 27.89‰,温度为 27.29 ℃,pH 值为 7.75,此时的 PRS 活性为 0.479 U/mg。

2.2 脂肪酶活性模型的分析及响应面分析

用 Design - Expert 8.0 软件对表 2 中的脂肪酶活性进行二次多元回归拟合。如表 4 所示, $F$  值为 5.43, $P<0.05$ ,模型的  $R^2$  为 0.874 7,修正系数为 0.713 5,表明该模型的拟合度较好,预测值与试验值高度吻合,因此可以用该模型来分析并预测大竹蛭的脂肪酶活性。本试验的精确度为 6.319%,说明本试验结果较为可信。另外,本试验结果显示,盐度、温度和 pH 值的一次效应及交互效应对大竹蛭脂肪酶活性的影响不显著;温度、盐度的二次效

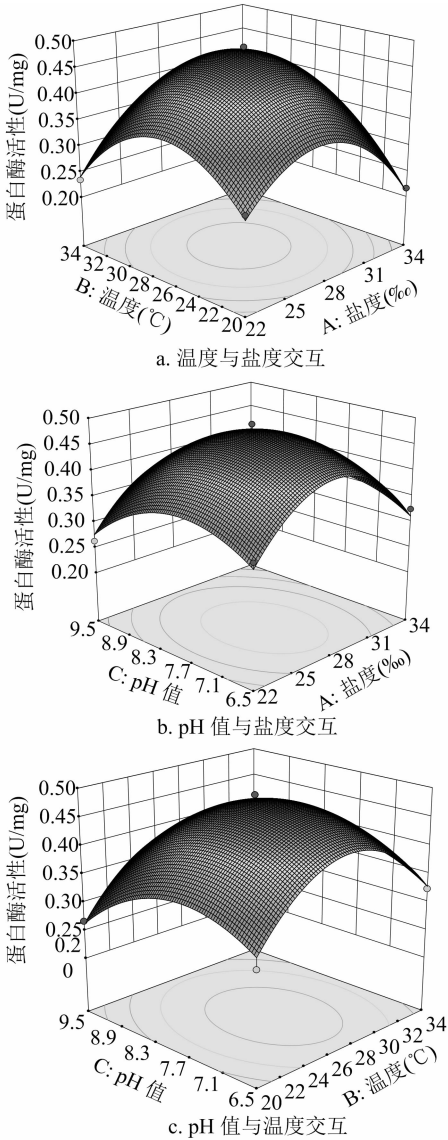


图1 2 因素交互作用对大竹蛭蛋白酶活性影响的响应面

应对大竹蛭脂肪酶活性的影响显著 ( $P < 0.05$ ), pH 值的二次效应对大竹蛭脂肪酶活性的影响极显著 ( $P < 0.01$ )。由上述回归结果拟合出的盐度 ( $A$ )、温度 ( $B$ ) 和 pH 值 ( $C$ ) 与脂肪酶活性的编码值回归方程如下:

$$\text{LPS 活性} = 0.29 + 2 \times 10^{-3} A - 2.25 \times 10^{-3} B +$$

$$2.5 \times 10^{-4} C + 4.5 \times 10^{-3} AB - 0.012 AC + 0.018 BC - 0.03 A^2 - 0.04 B^2 - 0.053 C^2;$$

实际值方程如下:

$$\begin{aligned} \text{LPS 活性} = & -2.32 + 0.06A + 0.03B + 0.04C + \\ & 1.07 \times 10^{-4} AB - 1.33 \times 10^{-3} AC + 1.76 \times 10^{-3} BC - \\ & 8.44 \times 10^{-4} A^2 - 8.14 B^2 - 0.02 C^2。 \end{aligned}$$

表 4 脂肪酶回归模型方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.027	9	$3.019 \times 10^{-3}$	5.43	0.018 2	*
A	$3.2 \times 10^{-5}$	1	$3.2 \times 10^{-5}$	0.058	0.817 3	
B	$4.05 \times 10^{-5}$	1	$4.05 \times 10^{-5}$	0.073	0.795 1	
C	$5 \times 10^{-7}$	1	$5 \times 10^{-7}$	$8.989 \times 10^{-4}$	0.976 9	
AB	$8.1 \times 10^{-5}$	1	$8.1 \times 10^{-5}$	0.15	0.714 1	
AC	$5.76 \times 10^{-4}$	1	$5.76 \times 10^{-4}$	1.04	0.342 7	
BC	$1.369 \times 10^{-3}$	1	$1.369 \times 10^{-3}$	2.46	0.160 7	
A <sup>2</sup>	$3.891 \times 10^{-3}$	1	$3.891 \times 10^{-3}$	7.00	0.033 2	*
B <sup>2</sup>	$6.703 \times 10^{-3}$	1	$6.703 \times 10^{-3}$	12.05	0.010 4	*
C <sup>2</sup>	0.012	1	0.019	21.58	0.002 4	**
残差	$3.894 \times 10^{-3}$	7	$5.563 \times 10^{-4}$			
失拟项	$3.017 \times 10^{-3}$	3	$1.036 \times 10^{-3}$	5.27	0.071 2	
纯误差	$7.868 \times 10^{-4}$	4	$1.967 \times 10^{-4}$			
总离差	0.031	16				

注:  $R^2 = 0.874\ 7$ , 修正系数为 0.713 5, 精确度为 6.319%。

根据上述结果, 用 Origin 8.0 作出 3D 响应面图。如图 2 所示, 当保持温度、盐度、pH 值 3 个因子

中的 1 个为中值时, 随着其他 2 个因子数值的升高, 大竹蛭体内的脂肪酶活性均呈现先上升后下降的

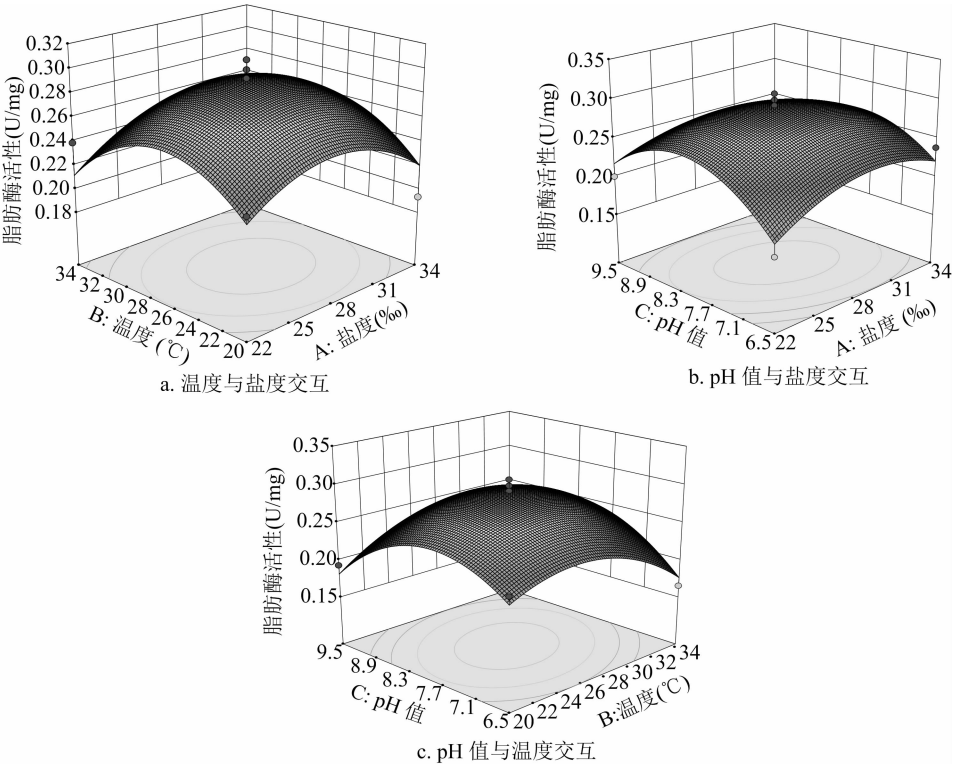


图2 2 因素交互作用对大竹蛭脂肪酶活性影响的响应面

趋势;各响应曲面图均显示,在本试验设置的温度、盐度、pH 值范围内存在脂肪酶活性的最大值。根据上述模型结果优化出脂肪酶活性最大时的养殖条件如下:盐度为 28.19‰,温度为 26.80 ℃,pH 值为 7.99,此时的 LPS 活性为 0.291 U/mg。

2.3 淀粉酶活性模型分析及响应面分析

用 Design - Expert 8.0 软件对表 2 中的淀粉酶活性进行二次多元回归拟合。如表 5 所示, $F$  值为 20.41, $P < 0.01$ ,模型的  $R^2$  为 0.963 3,修正系数为 0.916 1,表明该模型的拟合度较好,预测值与试验值高度吻合,因此可以用该模型来分析和预测大竹蛏淀粉酶活性。本试验的精确度为 12.002%,说明本试验结果可信。另外,本试验结果显示,盐度和 pH 值对大竹蛏淀粉酶活性的一次效应影响不显著,

温度对大竹蛏淀粉酶活性的一次效应影响显著 ( $P < 0.05$ );盐度、温度和 pH 值交互作用对大竹蛏淀粉酶活性的影响不显著;盐度、温度和 pH 值的二次效应对大竹蛏淀粉酶活性的影响极显著 ( $P < 0.01$ )。由上述回归结果拟合的盐度( $A$ )、温度( $B$ )和 pH 值( $C$ )与淀粉酶活性的编码值回归方程如下:

AMS 活性 = 0.95 - 0.015A - 0.066B - 4.75C - 0.050AB - 0.035AC - 0.018BC - 0.14A<sup>2</sup> - 0.22B<sup>2</sup> - 0.20C<sup>2</sup>;

实际值方程如下:

AMS 活性 = - 12.86 + 0.28A + 0.28B + 1.58C - 1.20 × 10<sup>-3</sup>AB - 3.86 × 10<sup>-3</sup>AC - 1.69 × 10<sup>-3</sup>BC - 3.92 × 10<sup>-3</sup>A<sup>2</sup> - 4.45B<sup>2</sup> - 0.09C<sup>2</sup>。

表 5 淀粉酶回归模型的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值	显著性
模型	0.56	9	0.062	20.41	0.000 3	**
$A$	$1.682 \times 10^{-3}$	1	$1.682 \times 10^{-3}$	0.55	0.480 7	
$B$	0.035	1	0.035	11.41	0.011 8	*
$C$	$1.805 \times 10^{-4}$	1	$1.805 \times 10^{-4}$	0.06	0.814 2	
$AB$	0.01	1	0.01	3.33	0.110 7	
$AC$	$4.830 \times 10^{-3}$	1	$4.830 \times 10^{-3}$	1.59	0.247 3	
$BC$	$1.26 \times 10^{-3}$	1	$1.26 \times 10^{-3}$	0.42	0.539 7	
$A^2$	0.084	1	0.084	27.64	0.001 2	**
$B^2$	0.20	1	0.20	66.04	<0.000 1	**
$C^2$	0.17	1	0.17	55.86	0.000 1	**
残差	0.021	7	$3.032 \times 10^{-3}$			
失拟项	0.010	3	$3.405 \times 10^{-3}$	1.24	0.406 4	
纯误差	0.011	4	$2.753 \times 10^{-3}$			
总离差	0.58	16				

注: $R^2$  = 0.963 3,修正系数为 0.916 1,精确度为 12.002%。

根据上述结果,用 Origin 8.0 作出 3D 响应面图。由图 3 可见,当保持温度、盐度、pH 值 3 个因子中的 1 个为中值时,随着其他 2 个因子数值的升高,大竹蛏体内的淀粉酶活性均呈现先上升后下降的趋势,各响应曲面图均显示,在本试验设置的温度、盐度、pH 值范围内存在淀粉酶活性的最大值。根据上述模型结果优化出淀粉酶活性最大时的养殖条件如下:盐度为 27.85‰,温度为 25.97 ℃,pH 值为 8,此时的 AMS 活性为 0.958 U/mg。

3 讨论

盐度、温度及 pH 值均是影响滤食性贝类消化

酶活性的关键因素<sup>[1]</sup>。贝类是变渗透压动物,当海水盐度过高或过低时,贝类机体会主动排除水分或盐分以适应环境<sup>[14]</sup>。在调节渗透压的过程中,贝类会消耗大量能量,消化能力相应减小。本试验结果显示,大竹蛏消化酶活性在盐度为 28‰左右时较大。盐度过高或过低,消化酶活性均有所降低,符合上述规律。酶促反应动力学认为,在一定温度范围内,随着温度的升高,酶促反应的速度也加快,超出一定温度后便开始下降。本试验结果表明,当温度约为 27 ℃时,消化酶活性达到较大值,符合上述规律。pH 值可以通过影响底物的解离状况、酶分子活性部位上有关基团的解离、中间络合物(ES)的解

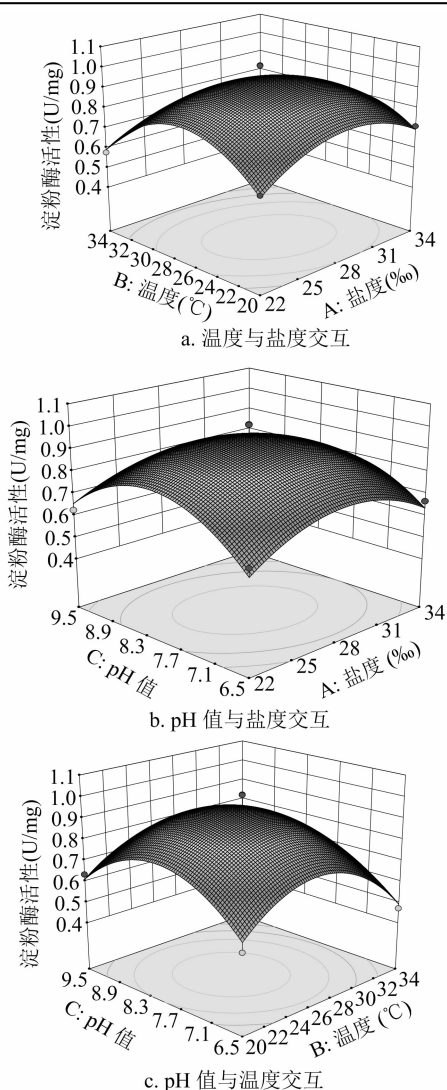


图3 2 因素交互作用对大竹蛏淀粉酶活性影响的响应面

离状态来影响酶活性<sup>[15]</sup>。本试验结果表明,大竹蛏在 pH 值约为 8 时,其消化酶活性达到较大值,可作为养殖的最佳参考条件。

不同贝类体内的消化酶活性与其食性有关,喜食大型藻的贝类一般其纤维素酶活性相对较高,如滨螺等腹足纲贝类;而食单细胞藻类的贝类淀粉酶、蛋白酶活性相对较高,如紫贻贝等双壳贝类<sup>[4]</sup>。在本试验中,投喂大竹蛏的饵料为球等鞭金藻,没有纤维素构成的细胞壁,鉴于食性对贝类消化酶种类的影响,本试验仅测定大竹蛏 3 种功能消化酶(蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶)活性而未考察纤维素酶活性。本研究结果显示,大竹蛏体内消化酶活性排序淀粉酶>蛋白酶>脂肪酶,这与马氏珠母贝的研究结果<sup>[16]</sup>相似。

目前针对贝类消化酶的研究较少考察环境因

素的联合作用及曲面效应。本试验构建的 Box - Behnken 模型拟合度很高,说明该模型能够很好地解释大竹蛏消化酶随环境因素的变化。本试验得出大竹蛏消化酶活性最佳时的养殖条件如下:盐度为 28‰左右,温度为 27℃左右,pH 值约为 8,该条件可用于实际生产。

#### 参考文献:

- [1] 杨蕙萍,童圣英,王子臣. 国内外关于水产动物消化酶研究的概况[J]. 大连水产学院学报,1998,13(3):64-71.
- [2] 刘敏. 不同温度和盐度对施氏獭蛤消化酶和免疫酶活力的影响[D]. 湛江:广东海洋大学,2015.
- [3] 费志良,乔慧,郝忱,等. 3 种淡水蚌消化酶活力的初步研究[J]. 淡水渔业,2006,36(4):3-6.
- [4] 刘万顺,李濒. 海洋无脊椎动物消化酶的研究——I、紫贻贝、日本扇、滨螺消化酶的初步分析及其应用[J]. 山东海洋学院学报(自然科学版),1988(1):54-62.
- [5] 张硕,赵艳. 栉孔扇贝蛋白酶和淀粉酶活力的初步研究[J]. 大连水产学院学报,1997,12(1):15-20.
- [6] 杨蕙萍,童圣英,王子臣. 皱纹盘鲍淀粉酶和褐藻酸酶的研究[J]. 水产学报,1998,22(4):345-351.
- [7] 黄勃,王桂林,李二超. 杂色鲍与九孔鲍消化酶活力的比较[J]. 水产学报,2003,27(2):119-123.
- [8] Xu D P, Zhou Y, Zheng J, et al. Optimization of ultrasound - assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Jatropha integerrima* by response surface methodology[J]. Molecules, 2016, 21(1):1-12.
- [9] 涂行浩,张帅中,唐景华,等. 澳洲坚果油微乳体系的构建[J]. 热带作物学报,2019,40(2):359-367.
- [10] 高丹丹,郭鹏辉,祁高展,等. 响应面法优化薄荷全草总黄酮的提取工艺[J]. 食品工业科技,2015,36(2):299-303,322.
- [11] 高丹丹,常通,曹郁生,等. 响应面法优化中性蛋白酶水解棉籽蛋白工艺[J]. 食品科学,2009,30(16):153-157.
- [12] Vuong Q V, Nguyen V T, Thanh D T, et al. Optimization of ultrasound - assisted extraction conditions for euphol from the medicinal plant, *Euphorbia tirucalli*, using response surface methodology[J]. Industrial Crops and Products, 2015, 63:197-202.
- [13] Goudarzi M, Madadlou A, Mousavi M E, et al. Optimized preparation of ACE - inhibitory and antioxidative whey protein hydrolysate using response surface method (RSM) [J]. Dairy Science and Technology, 2012, 92(6):641-653.
- [14] 吕昊泽,刘健,陈锦辉,等. 盐度对长江口 3 种滤食性贝类滤水率、摄食率、同化率的影响[J]. 海洋科学,2016,40(8):10-17.
- [15] 范德朋,潘鲁青,肖国强,等. 温度、pH 对缢蛏(*Sinovacula constricta*)消化酶活力的影响[J]. 海洋湖沼通报,2003(4):69-73.
- [16] 朱晓闻. 温度、盐度、pH 对马氏珠母贝稚贝生理学特征的联合效应研究[D]. 湛江:广东海洋大学,2012.