

不同蛋白酶的猪、兔骨酶解液对小鼠脾淋巴细胞增殖作用的比较

曾珍, 李诚*, 付刚, 苏赵, 杨勇, 何利, 胡滨

(四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 以鲜猪骨、鲜兔骨为原料, 采用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和 Alcalase 碱性蛋白酶分别进行酶解制备猪、兔骨胶原蛋白肽。以小鼠脾淋巴细胞的增殖率为指标, 通过单因素实验及正交实验得到最佳的酶解条件。结果表明: 酶解猪骨的最佳酶为 Alcalase 碱性蛋白酶, 酶解条件为时间 4 h、pH 9.5、酶与底物比 6 000 U/g、温度 45 ℃、底物蛋白质量分数 6%, 其酶解液的脾细胞增殖率为 83.41%; 酶解兔骨的最佳酶为木瓜蛋白酶, 酶解条件为 4 h、pH 5.5、酶与底物比 7 000 U/g、温度 65 ℃、底物蛋白质量分数 6%, 其酶解液的脾细胞增殖率为 80.70%。

关键词: 猪骨; 兔骨; 酶解; 脾淋巴细胞增殖

中图分类号: TS 251.94 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)02—0181—08

Comparison of Proliferation from Rabbit Bone and Pig Bone Hydrolysates on Spleen Lymphocyte in Mouse

ZENG Zhen, LI Cheng*, FU Gang, SU Zhao, YANG Yong, HE Li, HU Bin

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China)

Abstract: Fresh pig, fresh rabbit bone were enzymolyzed by trypsin, papain or Alcalase to obtain collagen peptides. The proliferation of hydrolysates on spleen lymphocyte in mouse was selected as an indicator. The best hydrolysis conditions were got by single factor experiment and orthogonal experiment. Results indicated that the optimal condition of pig bone were Alcalase, 4 h (t), pH 9.5, 6 000 U/g (E/S), 45 ℃ (T) and 6% (S). The proliferation rate of hydrolysates from pig bone on spleen lymphocyte was 83.41%. The optimal condition of rabbit bone were papain, 4 h (t), pH 5.5, 7 000 U/g (E/S), 65 ℃ (T) and 6% (S). The proliferation rate of hydrolysates from rabbit bone on spleen lymphocyte was 80.70%.

Keywords: pig bone, rabbit bone, enzymatic, spleen lymphocyte

我国是各类动物骨生产的大国, 据统计每年约有 2 183 万 t 的各类动物骨骼产生^[1], 但绝大多数骨

头都没有得到充分利用。骨头含有大量的骨胶原蛋白, 这些蛋白质所含氨基酸种类较为丰富^[2], 是一种

收稿日期: 2013-06-26

基金项目: 国家科技部“十二五”农村领域科技计划预备项目库星火计划项目。

* 通信作者: 李 诚(1964—), 男, 四川三台人, 工学硕士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事畜产品加工与质量安全控制方面的研究。

E-mail: lichenglcp@163.com

良好的蛋白源。近年来针对动物骨的利用开发引起了科研人员的关注,特别是通过水解动物骨获得功能肽成为了研究的热点。赵玲等人从鳕鱼骨里提取出具有抗氧化作用的胶原蛋白肽^[3]。Saiga 等人也从鸡腿骨里提取出了具有抗高血压活性的多肽,其氨基酸序列为 Gly-Ala-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro,且其活性较高(IC₅₀=29 mmol/L)^[4]。YANG Hua 等人用木瓜蛋白酶从羊骨里提取出免疫活性肽^[5]。免疫活性肽通常被认为是一种能够增强机体免疫力^[6]、增强巨噬细胞吞噬功能^[7]、提高机体抵御外界病原体感染能力^[8],因其相对分子质量低、活性强、用量少、稳定性强、生物活性高的独特优势受到了人们的重视。作者采用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和 Alcalase 碱性蛋白酶分别水解猪骨、兔骨,研究各水解产物的对小鼠脾淋巴细胞增殖活性,为利用猪、兔骨制备免疫活性肽提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜猪骨(猪后腿股骨头)、兔骨(除头骨以外的全身骨骼):市售;昆明种小鼠:5 周龄,体重 18 g,雌性,由四川农业大学兽医院提供;胰蛋白酶(7.8×10⁴ U/g)、木瓜蛋白酶(13×10⁴ U/g):广西南宁庞博生物有限公司;Alcalase 碱性蛋白酶(11.5×10⁴ U/g):丹麦 NOVO 公司;其它试剂:均为分析纯。

1.2 主要仪器

BR4i 型多功能冷冻离心机:法国 THERMO JOUAN 公司;iMark 酶联免疫检测仪:美国伯乐公司;311 型 CO₂ 培养箱:美国 Thermo Scientific 公司;HH-4 数显恒温水浴锅:金坛市富华仪器有限公司;PHS-3C 酸度计:方舟科技公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酶解工艺流程 猪、兔骨(剔净残肉、皮、腱、软骨及其它非骨骼成分)→宰碎至 5~6 cm→脱脂(1:1 甲醛/氯仿 37 °C,浸泡 24 h)^[9]→蒸馏水清洗(除去残渣)→高压蒸煮 2 h(0.1 MPa, 121 °C)→常温干燥→粉碎→过筛(80 目)→加入 100 mL 蒸馏水→混匀→预处理(90 °C 热处理 10 min)→冷却至常温→调节 pH 到指定值→加入一定量的酶在指定温度下酶解指定的时间→灭酶(100 °C、10 min)→离心过滤(8 000 g 20 min),取上清液测定脾淋巴细胞增殖率。

1.3.2 猪、兔骨酶解工艺参数的单因素实验

1) 底物浓度对酶解效果的影响:用胰蛋白酶(温度 50 °C、pH 8、酶底比 5 000 U/g、水解时间 4 h)、木瓜蛋白酶(pH 7、酶底比 5 000 U/g、水解时间 4 h,水解温度 60 °C)和 Alcalase 碱性蛋白酶(pH 9、酶底比 6 000 U/g、水解时间 2 h、温度 55 °C)酶解不同底物蛋白质量分数 2%、4%、6%、8%、10%的猪、兔骨,测定其对小鼠脾淋巴细胞增殖率。

2) 温度对酶解效果的影响:以小鼠脾淋巴细胞增殖率为指标,在猪、兔骨底物蛋白质量分数 6%、pH 8、酶底比 5 000 U/g、水解时间 4 h 的条件下研究不同水解温度 30、40、50、60、70 °C 对胰蛋白酶酶解效果的影响;在猪、兔骨底物蛋白质量分数 6%、pH 7、酶底比 5 000 U/g、水解时间 4 h 条件下,研究不同水解温度 50、55、60、65、70 °C 对木瓜蛋白酶酶解效果的影响;在猪、兔骨底物蛋白质量分数 6%、pH 9、酶底比 6 000 U/g、水解时间 2 h 下研究 40、45、50、55、60 °C 对 Alcalase 碱性蛋白酶酶解效果的影响。

3) pH 值对酶解效果的影响:以小鼠脾淋巴细胞增殖率为指标,在猪、兔骨底物蛋白质量分数 6%、水解温度 50 °C、酶底比 5 000 U/g、水解时间 4 h 条件下,研究 pH 7、7.5、8、8.5 对胰蛋白酶酶解效果的影响;在猪、兔骨底物蛋白质量分数 6%、水解温度 60 °C、酶底比 5 000 U/g、水解时间 5 h 条件下,研究不同 pH 5、5.5、6、6.5、7 对木瓜蛋白酶酶解效果的影响;在猪、兔骨底物蛋白质量分数 6%、水解温度 50 °C、酶底比 6 000 U/g、水解时间 2 h 条件下研究 pH 8、8.5、9、9.5、10 对 Alcalase 碱性蛋白酶酶解效果影响。

4) 酶与底物蛋白浓度比对酶解效果的影响:以小鼠脾淋巴细胞增殖率为指标,在猪、兔骨底物蛋白质量浓度 6%、水解温度 50 °C、pH 8、水解时间 4 h 条件下,研究不同酶底比 4 000、5 000、6 000、7 000、8 000 U/g 对胰蛋白酶酶解效果的影响;在猪、兔骨底物蛋白质量分数 6%、水解温度 60 °C、pH 7、水解时间 4 h 条件下,研究不同酶底比 4 000、5 000、6 000、7 000、8 000 U/g 对木瓜蛋白酶酶解效果的影响;在猪、兔骨底物蛋白质量分数 6%、水解温度 50 °C、pH 9、水解时间 2 h 的条件下研究不同的酶与底物比 2 000、4 000、6 000、8 000、10 000 U/g 对 Alcalase 碱性蛋白酶酶解效果的影响。

5)时间对酶解效果的影响:以小鼠脾淋巴细胞增殖率为指标,在猪、兔骨底物蛋白质量分数 6%, pH 8, 温度 50 ℃, 酶底比 5 000 U/g 条件下, 研究不同水解时间 3、4、5、6、7 h 对胰蛋白酶酶解效果的影响。在猪、兔骨底物蛋白质量分数 6%, pH 7, 温度 60 ℃, 酶底比 5 000 U/g 条件下, 研究不同水解时间 2、3、4、5、6 h 对木瓜蛋白酶酶解效果的影响; 在猪、兔骨底物蛋白质量分数 6%, pH 9, 温度 50 ℃, 酶底比 6 000 U/g 条件下研究不同酶解时间 2、3、4、5、6 h 对 Alcalase 碱性蛋白酶酶解效果的影响。

1.3.3 优化猪、兔骨酶解工艺参数的正交实验 根据单因素实验结果确定酶解的底物蛋白质量分数为 6%, 选用 Alcalase 碱性蛋白酶水解猪骨, 选用木瓜蛋白酶水解兔骨, 选择水解温度(℃)、pH 值、水解时间(h)、酶/底物(U/g)作为实验因子, 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计。以脾淋巴细胞增殖率为主要指标, 确定蛋白酶酶解猪、兔骨蛋白的最佳工艺参数。

1.3.4 检测方法

- 1)酶活性测定:福林酚法 SB/T 10317-1999。
- 2)蛋白质的测定:凯氏定氮法(GB 5009.5-2010)。
- 3)水解度的测定:采用双指示剂甲醛滴定法^[10]。
- 4)无菌小鼠脾淋巴细胞制备:小鼠禁食 12 h, 摘眼球放血后脱颈处死, 浸泡在 75%的乙醇中 3~5 min, 于超净工作台上无菌打开腹腔, 取出小鼠脾脏置于含有无菌 Hanks 液的平皿中, 去除外周结缔组织, 并用无菌 Hanks 液清洗脾脏, 去除血液。用无菌注射器芯挤压研磨, 制成细胞悬液。用 Hanks 液洗 3 次, 然后于 1 500 r/min 离心 8 min, 弃上清液。然后将细胞悬浮于 2 mL 的 RPMI 1640 完全培养液中。调整细胞浓度为 2.0×10^6 个/mL^[11-12]。

5) MTT 法测定脾淋巴细胞增殖: 设实验组和对照组。在 96 孔板中每孔加入已制备好的小鼠脾细胞悬液 100 μ L。对照组加入 RPMI 1640 完全培养液 100 μ L, 实验组加入 100 μ L 酶解液, 置于 37 ℃ 下 5% CO₂ 培养箱中培养 68 h, 再加入 MTT 50 μ L, 4 h 培养结束后, 每孔加入 1 mL 酸性异丙醇, 吹打混匀, 使紫色结晶完全溶解。室温下放置 15 min 后, 用酶联免疫检测仪, 于 570 nm 波长测定光密度值^[13]。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 底物蛋白质量浓度对酶解效果的影响 由图 1 可知, 随着底物蛋白质量分数的增加, 酶解液

的脾细胞增殖率也在升高, 在 6% 时脾细胞增殖率达到最高, 而后脾细胞增殖率开始下降。因此 6% 为最适的底物浓度。

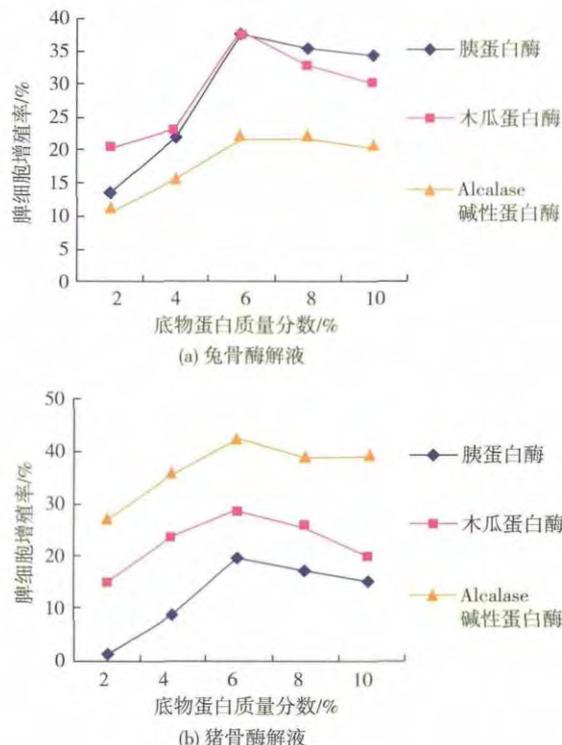
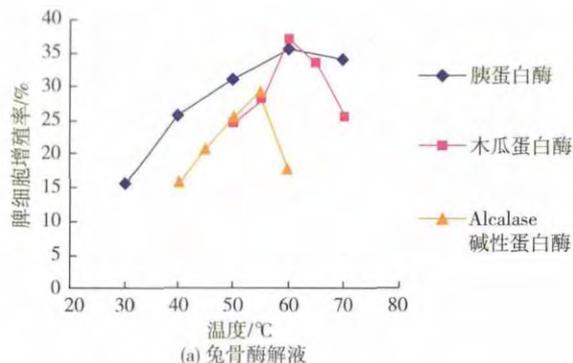


图 1 底物蛋白浓度对脾淋巴细胞增殖率的影响

Fig. 1 Effect of Substrate concentration on proliferative activity of spleen cells

2.1.2 温度对酶解效果的影响 由图 2 可知, 随着温度的升高, 酶解液的脾细胞增殖活性呈先升高后下降的趋势。胰蛋白酶最适温度范围为 50~60 ℃, 木瓜蛋白酶的最适温度范围为 55~65 ℃, Alcalase 碱性蛋白酶最适温度为 45~55 ℃。

2.1.3 pH 值对酶解效果的影响 由图 3 可知, 随着 pH 值的升高, 酶解液的脾细胞增殖活性呈先升高后下降的趋势。胰蛋白酶最适 pH 值范围为 7.5~8, 木瓜蛋白酶的最适 pH 至范围为 5.5~6.5, Alcalase 碱性蛋白酶最适 pH 值范围为 8.5~9.5。



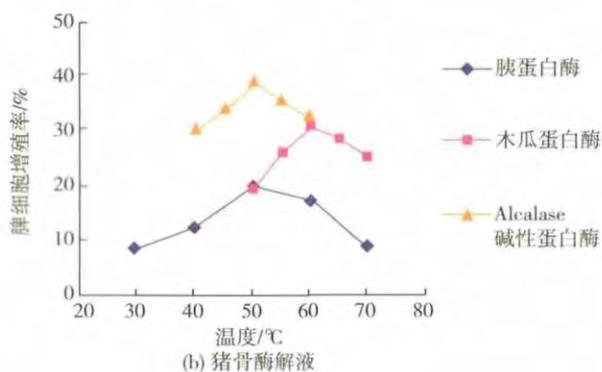


图 2 温度对脾淋巴细胞增殖率的影响

Fig. 2 Effect of temperature on proliferative activity of spleen cells

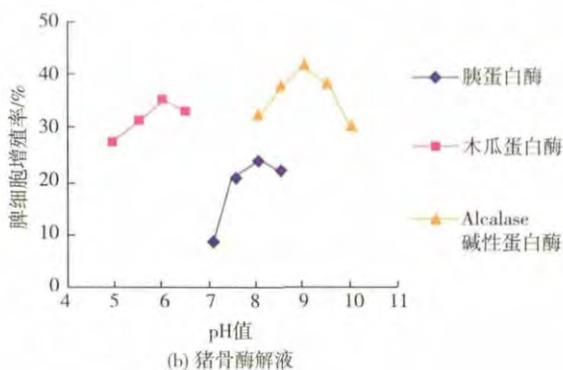
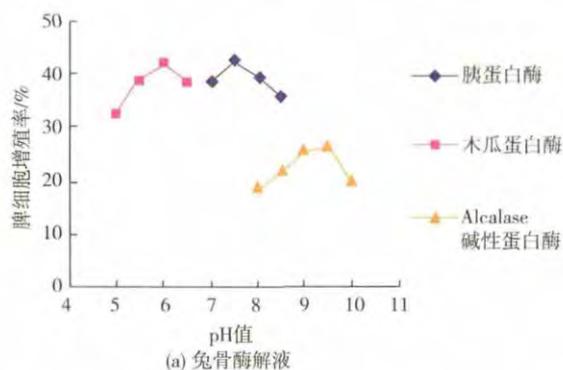


图 3 pH 值对脾淋巴细胞增殖率的影响

Fig. 3 Effect of pH on proliferative activity of spleen cells

2.1.4 酶与底物蛋白浓度比对酶解效果的影响

由图 4 可知,随着酶底比的升高酶解液的脾细胞增殖活性呈先升高后下降的趋势。胰蛋白酶最适酶底比范围为 6 000~7 000 U/g,木瓜蛋白酶的最适酶底比范围为 5 000~7 000 U/g,Alcalase 碱性蛋白酶最适酶底比范围为 4 000~8 000 U/g。

2.1.5 时间对酶解效果的影响 由图 5 可知,随着水解时间的增加酶解液的脾细胞增殖活性呈先升高后下降的趋势。胰蛋白酶最适水解时间比范围为 4~5 h,木瓜蛋白酶的最适水解时间范围为 3~5 h,

Alcalase 碱性蛋白酶最适水解时间范围为 3~5 h。

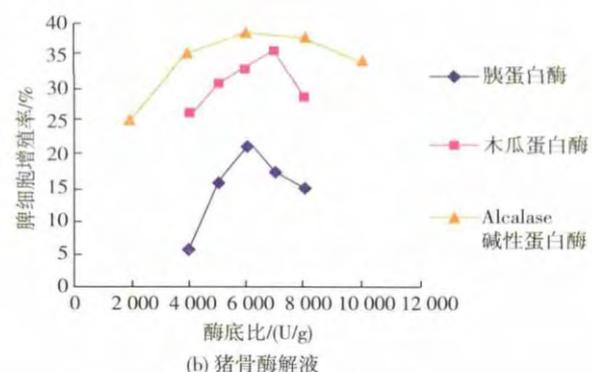
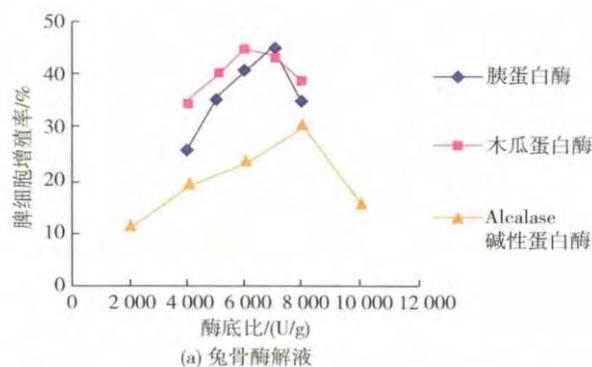


图 4 酶底比对脾淋巴细胞增殖率的影响

Fig. 4 Effect of E/S on proliferative activity of spleen cells

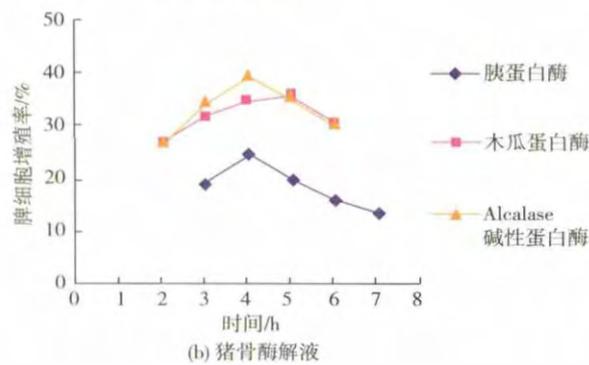
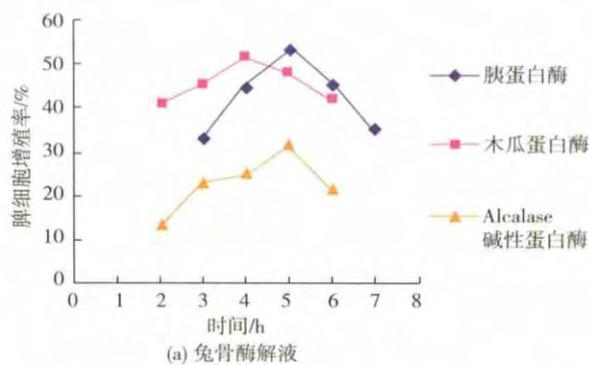


图 5 水解时间比对脾淋巴细胞增殖率的影响

Fig. 5 Effect of time on proliferative activity of spleen cells

2.2 Alcalase 碱性蛋白酶酶解猪骨实验结果

由单因素实验结果可知,三种蛋白酶酶解兔骨产物对小鼠脾细胞增殖作用的强弱为:木瓜蛋白酶>胰蛋白酶>Alcalase 碱性蛋白酶,因此选用木瓜蛋白酶作为酶解兔骨正交实验的使用酶。

由表 1 和表 2 分析知,在 Alcalase 碱性蛋白酶酶解猪骨正交实验中,酶与底物比、温度、pH、时间四个因素对脾细胞增殖率的影响顺序为:酶与底物比>pH>时间>温度,其中 pH、酶与底物比的影响显

著($P<0.05$),最优组合为:时间 4 h、pH 9.5、酶与底物比 6 000 U/g、温度 45 ℃。通过对两个指标的极差和方差分析,选择脾细胞增殖能力的最优组合为最佳组合,即利用 Alcalase 碱性蛋白酶酶解猪骨的最佳反应条件为:时间 4 h、pH 9.5、酶与底物比 6 000 U/g、温度 45 ℃、底物质量分数 6%。验证实验测得在最佳条件下酶解液的水解度为 16.82%,脾细胞增殖率为 83.41%。

表 1 Alcalase 碱性蛋白酶酶解正交实验结果及分析

Table 1 Results and analysis of alcalase orthogonal test

实验号	时间/h	pH 值	酶底比/(U/g)	温度/℃	脾细胞增殖率/%	水解度/%
1	1(3)	1(8.5)	1(4 000)	1(45)	72.70	12.75
2	1	2(9.0)	2(6 000)	2(50)	70.48	13.50
3	1	3(9.5)	3(8 000)	3(55)	62.14	14.21
4	2(4)	1	2	3	79.35	17.22
5	2	2	3	1	52.60	18.58
6	2	3	1	2	77.01	17.60
7	3(5)	1	3	2	50.20	17.21
8	3	2	1	3	57.14	14.87
9	3	3	2	1	81.32	15.22
K_1	205.31	202.25	206.85	206.61		
K_2	208.97	180.22	231.15	197.69		
K_3	188.65	220.47	164.94	198.63		
k_1	68.44	67.42	68.95	68.87		
k_2	69.66	60.07	77.05	65.90		
k_3	62.88	73.49	54.98	66.21		
R	6.77	13.42	22.07	2.97		

表 2 Alcalase 蛋白酶方差分析表

Table 2 Analysis of variance from alcalase orthogonal test

因素	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
A(时间)	78.159 8	2	39.079 9	4.877 0	0.170 2
B(pH)	270.814 5	2	135.407 2	16.898 4	0.055 9
C(E/S)	747.869 0	2	373.934 5	46.665 8	0.021 0*
D(温度)	16.026 1	2	8.013 0	1	0.5
误差	16.026 1	2	8.013 0		
总和	1 112.869 4	8	139.108 7		

注:* $P<0.05$ 。

2.3 木瓜蛋白酶酶解兔骨实验结果

由单因素实验结果可知,而三种蛋白酶酶解猪骨产物对小鼠脾细胞增殖作用的强弱为:Alcalase 碱性蛋白酶>木瓜蛋白酶>胰蛋白酶。因此 Alcalase 碱性蛋白酶作为酶解猪骨正交实验的使用酶。

由表 3 和表 4 分析知,在木瓜蛋白酶酶解兔骨正交实验中,酶与底物比、温度、pH、时间四个因素的对脾细胞增殖率的影响顺序为:时间>温度>酶与底物比>pH,其中时间和温度的影响显著($P<0.05$),最优组合为:时间 4 h、pH 5.5、酶与底物比 7

000 U/g、温度 65 ℃。通过对两个指标的极差和方差分析,选择脾细胞增殖能力的最优组合为最佳组合,即利用木瓜蛋白酶酶解兔骨的最佳反应条件为时间

4 h、pH 5.5、酶与底物比 7 000 U/g、温度 65 ℃、底物质量分数 6%。验证实验测得在最佳条件下酶解液的水解度为 16.25%,脾细胞增殖率为 80.70%。

表 3 木瓜蛋白酶酶解正交实验结果及分析

Table 3 Results and analysis of Papain orthogonal test

实验号	时间/h	pH 值	酶底比/(U/g)	温度/℃	脾细胞增殖率/%	水解度/%
1	1(3)	1(5.5)	1(5 000)	1(55)	21.06	7.12
2	1	2(6.0)	2(6 000)	2(60)	29.87	8.74
3	1	3(6.5)	3(7 000)	3(65)	42.77	12.54
4	2(4)	1	2	3	79.55	15.10
5	2	2	3	1	57.92	13.83
6	2	3	1	2	57.59	14.18
7	3(5)	1	3	2	49.62	11.24
8	3	2	1	3	50.76	14.53
9	3	3	2	1	39.83	13.65
K_1	93.70	150.23	129.41	118.80		
K_2	195.06	138.55	149.25	137.08		
K_3	140.21	140.19	150.31	173.08		
k_1	31.23	50.08	43.14	39.60		
k_2	65.02	46.18	49.75	45.69		
k_3	46.74	46.73	50.10	57.69		
R	33.79	3.89	6.96	18.09		

表 4 木瓜蛋白酶方差分析表

Table 4 Analysis of variance from papain orthogonal test

因素	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
时间	1716.138 6	2	858.069 3	64.414 6	0.015 3*
pH	26.642 1	2	13.321 0	1.000 0	0.500 0
E/S	92.328 8	2	46.164 4	3.465 5	0.223 9
温度	508.538 4	2	254.269 2	19.087 8	0.049 8*
误差	26.642 1	2	13.321 0		
总和	2 343.647 9	8	292.956 0		

注:* $P < 0.05$ 。

2.4 水解度对小鼠脾淋巴细胞增殖率的影响

图 6 为木瓜酶解兔骨产物和 Alcalase 碱性蛋白酶酶解猪骨产物的水解度对脾细胞增殖活性的影响。在 Alcalase 碱性蛋白酶酶解条件下,随着 DH 的增加,脾细胞增殖率呈先增加后减小的趋势。水解度在 15%~18%时,酶解液对小鼠脾淋巴细胞增殖率最高。而在木瓜蛋白酶酶解条件下,随着 DH 的增加,脾细胞增殖率也呈增加的趋势,但水解度均没有超过 17%。

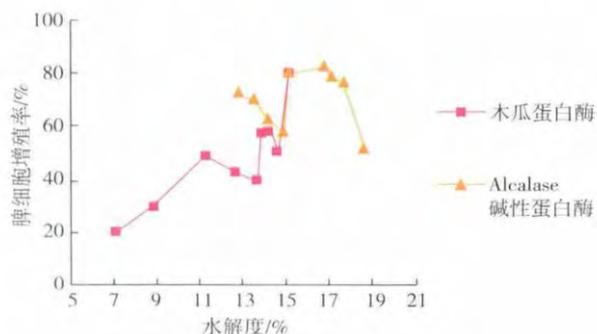


图 6 水解度对脾细胞增殖活性的影响

Fig. 6 Effects of degree of hydrolysis on proliferative activity of spleen cells

3 结 语

蛋白质中包含有许多生物活性序列,其中包括多种免疫活性肽,这些生物活性肽,均以无活性的形式存在于蛋白前体物中,只有用适当的蛋白酶水解并从蛋白中释放出来后,才能成为具有生理活性的肽段^[14]。用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和 Alcalase 碱性蛋白酶分别酶解猪、兔骨,得到的酶解液对小鼠脾淋巴细胞均有增殖作用,这是因为水解物能诱导细胞因子的释放,这些细胞因子能够激活免疫细胞产生免疫应答^[15]。蛋白酶对水解的肽键具有专一性,所以不同蛋白酶对不同底物的作用结果不同^[16]。胰蛋白酶酶解底物的脾细胞增殖活性强弱为:兔骨>猪骨;木瓜蛋白酶酶解底物的脾细胞增殖活性强弱为:兔骨>猪骨;Alcalase 碱性蛋白酶酶解底物的脾细胞增殖活性强弱为:猪骨>兔骨。经过正交实验可知,在猪骨最佳水解条件下得到的小鼠脾细胞增殖率为 83.41%,略高于在兔骨最佳水解条件下得到

的小鼠脾细胞增殖率 80.70%。由实验结果可以看出,水解度对免疫活性影响显著。随着 DH 的增加,脾细胞增殖率呈先增加后减小的趋势。这可能是由于随着酶解程度的提高,酶解物中有活性的短肽被分解成氨基酸或其活性基团被破坏,从而导致产物活性下降^[7]。因此水解度在 15%~18% 时,酶解液对小鼠脾淋巴细胞增殖率最高。Hou 和 Kong 等研究发现,水解度以及影响水解度的各因素如加酶量、底物质量浓度、pH、温度等,对酶解鳕鱼骨架和大豆蛋白质得到的多肽的体外免疫活性有显著影响^[17-18]。

研究结果表明,酶解猪骨的最佳酶为 Alcalase 碱性蛋白酶,其最佳条件为时间 4 h、pH 9.5、酶与底物比 6 000 U/g、温度 45 ℃、底物质量分数 6%,其小鼠脾细胞增殖率为 83.41%;酶解兔骨的最佳酶为木瓜蛋白酶,其最佳条件为时间 4 h、pH 5.5、酶与底物比 7 000 U/g、温度 65 ℃、底物质量分数 6%,其小鼠脾细胞增殖率为 80.70%。

参考文献:

- [1] 张根生. 畜禽骨骼营养成分提取分离技术及应用进展[J]. 肉类研究, 2011(12):48-52.
ZHANG Gensheng. Progress in extraction and separation technologies and applications of nutrients from livestock and poultry bones[J]. *Meat Research*, 2011(12):48-52. (in Chinese)
- [2] 孙蓓,王龙刚. 畜禽骨的综合利用现状及发展前景[J]. 中国调味品, 2011(4):1-4.
SUN Bei, WANG Longgang. Utilization of animal bone and future prospects[J]. *China Condiment*, 2011(4):1-4. (in Chinese)
- [3] 赵玲,李亚,刘淇,等. 鳕鱼骨胶原蛋白肽的抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报, 2013(4):425-429.
ZHAO Ling, LI Ya, LIU Qi, et al. Antioxidative activity of collagen peptides extracted from cod bone [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013(4):425-429. (in Chinese)
- [4] Saiga A, et al. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate [J]. *Agric Food Chem*, 2008, 56(20):86-91.
- [5] YANG Hua, LIU Yuhua, et al. Hydrolyzing condition and immunocompetence of sheep bone protein enzymatic lysates [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2009, 8(11):1332-1338.
- [6] 吕学泽,王雪敏,梁玉荣,等. 免疫活性肽的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011(4):170-172.
LU Xueze, WANG Xuemin, LIANG Yurong, et al. Research progress of immune peptides [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2011(4):170-172. (in Chinese)
- [7] Hartmann R, H Meise. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(2):163-169.
- [8] Horiguchi N, H Horiguchi, Y Suzuki. Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subjects [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(12):2445-2449.
- [9] 田家亮,周宗科,廉永云,等. 三种不同脱脂方法对猪骨脱脂的效应[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(16):3133-3135.
TIAN Jialiang, ZHOU Zongke, LIAN Yongyun, et al. Effects of three defatting ways on porcine bone [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2009, 13(16):3133-3135. (in Chinese)
- [10] 大连轻工业学院, 华南理工大学. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.

- [11] 刘建文,殷明,季光,等. 药理实验方法学—新技术与新方法[M]. 北京:化学工业出版社,2008:128-131.
- [12] 司书毅,张月琴. 药物筛选——方法与实践[M]. 北京:化学工业出版社,2007:341.
- [13] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范(2003年版)[M]. 北京:中华人民共和国卫生部,2003:20-25.
- [14] 王秋韞,庞广昌,陈庆森. 免疫活性肽的研究进展与展望[J]. 食品科学,2002(7):136-139.
WANG Qiuyun,PANG Guangchang,CHEN Qingsen. Immunoreactive peptide progress and prospects [J]. **Food Science**,2002 (7):136-139.(in Chinese)
- [15] Suthasinee Nilsang,Sittiwat Lertsiri,Manop Supphantharika,et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases[J]. **Journal of Food Engineering**,2005,70(4):571-578.
- [16] 胡学智,王俊. 蛋白酶生产和应用的进展[J]. 工业微生物,2008(4):49-61.
HU Xuezhi,WANG Jun. Advances in protease production and application [J]. **Industrial Microbiology**,2008 (4):49-61.(in Chinese)
- [17] Hu Hou,Yan Fan,Bafang Li,et al. Purification and identification of immunomodulating peptides from enzymatic hydrolysates of alaska pollock frame[J]. **Food Chemistry**,2012,134(2):821-828.
- [18] KONG Xiangzhen,GUO Mingming,HUA Yufei,et al. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins [J]. **Bioresource Technology**,2008,99:8873-8879.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第五届食物微量元素国际研讨会

会议名称(英文): 5th International Symposium on Trace Elements in Food - (TEF-5)

所属学科: 分析化学,生物物理学、生物化学及分子生物学,动物食品科学

开始日期: 2014-05-06

结束日期: 2014-06-09

所在国家: 丹麦

具体地点: Copenhagen, Denmark

主办单位: Technical University of Denmark

联系人: Dr. Jens J. Sloth

联系电话: + [45] 35 887 625

传真: + [45] 35 887 448

E-MAIL: jjsl@food.dtu.dk

会议网站: <http://tef5-copenhagen.com/>

会议背景介绍: On behalf of the organizing committee it is our pleasure to invite you for the 5th International IUPAC Symposium for Trace Elements in Food (TEF-5) to be held in the harbour area of beautiful Copenhagen, 6th - 9th May 2014. The conference venue is "The Danish Society of Engineers" (IDA), which is a modern and attractive waterfront building, in central Copenhagen. At the TEF-5 symposium in 2014, we expect to welcome 150 participants from around the World.

The conference is the continuation of a series of successful symposia focusing on various issues related to the presence and function of toxic or essential trace elements in food. The previous two TEF conferences were held in Rome (2008) and Aberdeen (2011) and attracted worldwide experts from different disciplines to present recent results and discuss all aspects of trace elements in relation to food, with special emphasis on the biological effects of trace elements. The TEF-5 program will consist of several topical sessions initiated with key-note lectures from renowned experts, followed by oral presentations on recent developments in the area. The conference will also include a poster session and an instrument exhibition at the same facilities, which allows further scientific highlights and the most recent technical advances to be presented.