

酿酒酵母细胞表面电位与絮凝相关性分析

李瑞龙¹, 陈杰², 王金辉¹, 周彦平¹, 赵长新^{2,*}

(1.大连工业大学生物工程学院, 辽宁大连 116034;

2.辽宁省发酵工程重点实验室, 辽宁大连 116034)

摘要:为探究酿酒酵母细胞表面所带电荷与絮凝的相关性,以两种液态发酵酵母和两种固态发酵酵母为研究对象,并对液态发酵酵母FFC2144和固态发酵酵母L₂Y进行连续传代培养,用zeta电位仪测定其zeta电位,以细胞沉降速率的方法考察酵母的絮凝性。结果显示,离子强度为0时,固态发酵酵母zeta电位(绝对值)均小于30 mV,液态发酵酵母均大于30 mV,培养72 h后的固态发酵酵母絮凝率达到了80.2%,液态发酵酵母絮凝率最大仅为14.4%。在发酵过程中不同酿酒酵母电位无明显变化。随着传代次数的增加酿酒酵母FFC2144 zeta电位无明显变化,絮凝性能却逐渐增强,到第20代时絮凝率达到了94.8%。不同酿酒酵母具有不同的zeta电位,其大小客观地反映出酿酒酵母絮凝性的强弱。酿酒酵母在衰老过程中细胞的絮凝性与zeta电位无关。

关键词:酿酒酵母, zeta电位, 絮凝, 传代培养

Correlation between surface potential and flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*

LI Rui-long¹, CHEN Jie², WANG Jin-hui¹, ZHOU Yan-pin¹, ZHAO Chang-xin^{2,*}

(1.School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;

2.Key Laboratory of Fermentation Engineering in Liaoning Province, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract:Two liquid fermentating yeasts and two solid fermentating yeasts were prepared for the research to study the relevance between surface potential and flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* FFC144 and L2Y were inoculated from generation to generation, zeta potentials of different breed yeasts and different generation were measured using a standard instrument, yeast flocculability was measured by the method of calculating cells sedimentation rate. Results showed that, when ionic strength was 0, zeta potential of solid fermentating yeasts were less than 30 mV (absolute value), while the liquid fermentating yeasts in all cases were more than 30 mV, the flocculation rate of the solid fermentating yeasts which were cultivated 72 h reached 80.2%, and the liquid fermentating yeasts possessed a maximum value of only 14.4%. There was no significant alteration of the zeta potential in the process of fermentation, and so was the *Saccharomyces cerevisiae* FFC2144 in the process of subculturing. Flocculability of the *Saccharomyces cerevisiae* FFC2144 was enhanced gradually which reached 94.8% in the 20th generation. Different *Saccharomyces cerevisiae* possessed different zeta potential, the magnitude of which objectively reflected the strength of flocculability. In the process of yeast aging, flocculation had nothing to do with the surface potential of cells.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; zeta potential; flocculation; subculture

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)22-0100-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.22.012

酿酒酵母在传代过程中会出现衰老现象,主要表现在发酵能力降低、菌体沉降与衰亡,菌体絮凝增加等方面^[1]。酿酒酵母的自絮凝过程是成千上万个细胞形成的一个不可逆的、无性的且依赖钙离子的聚集过程^[2-3]。酿酒酵母絮凝一直以来都是国际上研究

的热点课题,从生物学的角度来看,引起酵母絮凝的机制纷繁复杂,包括外源性的凝集素、基因调控、含氧量、温度和pH等^[4-5]。酿酒酵母絮凝的好坏对于发酵工业是至关重要的,例如在啤酒发酵过程中酵母提前絮凝会导致一系列不良后果,降低生产效率,而

收稿日期: 2015-03-19

作者简介: 李瑞龙(1989-),男,硕士,研究方向:发酵工程, E-mail: pennyrlr@163.com。

* 通讯作者: 赵长新(1955-),男,大学本科,教授,研究方向:发酵工程, E-mail: zhaocx@dipu.edu.cn。

在发酵终点酵母的絮凝性能差将不利于产物的分离纯化^[6-7]。

酵母细胞在代谢上的变化会通过细胞壁成分的改变体现出来。酿酒酵母悬浊液是一种分散体系,絮凝能否发生取决于两方面的因素:一是由酵母细胞壁带有的净电荷引起的排斥作用,酵母表面的zeta电位恰好能表征这种电荷的大小,当电位的绝对值大于30 mV时,双电层厚度较大,酿酒酵母之间发生弹性碰撞,不利于酵母絮凝,当其小于30 mV时酵母细胞不稳定,增加了絮凝的可能性;二是由细胞壁表面的物质之间发生的吸附架桥作用,这种作用在酿酒酵母的絮凝过程中也起到至关重要的作用^[8]。

国外早有利用zeta电位对酿酒酵母进行研究,但大多是与酿酒酵母固定化吸附发酵相关的报道^[9-10],应用zeta电位对酿酒酵母絮凝性能进行分析的报道并不多见^[11-12]。固态发酵酵母与液态发酵酵母絮凝性有较大差异,本文试图通过对不同酿酒酵母以及不同衰老程度酵母的zeta电位和絮凝性能进行研究以期找到zeta电位在酿酒酵母絮凝中起到的作用,为酿酒酵母的絮凝研究提供一种新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) FFC2146、酿酒酵母FFC2144、酿酒酵母L₂Y 大连工业大学菌种保藏所;衡水酵母 河北衡水老白干酿酒(集团)有限公司;葡萄糖 天津市科密欧化学试剂有限公司,分析纯;酵母膏、蛋白胨 北京奥博星生物技术责任有限公司,化学纯;超纯水 电阻率为18 mΩ·cm。

低温冷冻干燥机 美国LABCONCO公司;低速离心机 安徽中佳科学仪器有限公司;Zetasizer Nano ZS90型Zeta电位测定仪 英国Malvern仪器有限公司;85-2型磁力搅拌器 常州国华电器有限公司;JSM-6460LV型扫描电镜 日本JEOL公司;JA2003型电子天平 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酿酒酵母的培养 以斜面保藏的酵母菌种经过二次活化,按照5% (v/v)的接种量接种,培养温度为30 ℃,摇床转速为160 r/min,培养72 h后转接到新鲜的酵母浸出粉葡萄糖培养基(YPD)中,以第一次培养收获的酵母为第1代酵母菌株,每转接1次增加1代,转接9次后获得第10代酵母细胞,转接19次后获得第20代菌株。

1.2.2 酿酒酵母菌悬液的制备 培养72 h后的酿酒酵母发酵液经4000 r/min离心10 min,收集沉淀,再用超纯水反复洗涤3次离心收集沉淀,将菌体于-80 ℃冰箱冷冻12 h,真空冷冻干燥(-48 ℃, 4 Pa)得到干燥的酵母细胞,取一定量的菌体用超纯水和不同浓度的NaCl溶液配制成0.2% (w/v)的菌悬液,于磁力搅拌器下搅拌30 s(转速200~222 r/min)后立即进行zeta电位测量。本实验选取第2、10、20代酿酒酵母为典型研究对象。

1.2.3 酿酒酵母zeta电位测量 将制备好的酿酒酵母菌悬液样品注入“U”型弯曲式毛细管样品池中,激

光多普勒技术的应用能够测定出酿酒酵母细胞在体系中的电泳迁移速率,从而计算出zeta电位的大小。本实验所有样品均重复测定五次,测定结果取平均值。所有测量均在25 ℃条件下进行,对于同一个样品zeta电位的测量显示良好的重复性。

为探究离子强度和pH对液态发酵酵母zeta电位的影响,在0~10 mmol/L离子强度梯度,3~10 pH梯度范围内对培养72 h的液态发酵酵母FFC2144与FFC2146进行zeta电位测量。在离子强度为0时,于超纯水中测量第1代四种不同酿酒酵母的zeta电位。分别于0、1、10 mmol/L离子强度条件下对不同代数的液态发酵酿酒酵母FFC2144和固态发酵酿酒酵母L₂Y进行zeta电位测量。并测量发酵过程中不同时期四种酿酒酵母的zeta电位。

1.2.4 酿酒酵母絮凝能力的测定 取1 g干燥酿酒酵母菌体,用超纯水稀释至 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个/mL,在磁力搅拌器下搅拌2 min使之充分分散到体系中。每管20 mL分装后静置,同时开始计时,每隔3 min从试管中取样4 mL立即检测其在波长600 nm处的吸光值,用该值替代酿酒酵母菌体浓度,用以下公式计算絮凝率:

$$\text{絮凝率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{絮凝前}} - \text{OD}_{\text{絮凝后}}}{\text{OD}_{\text{絮凝前}}} \times 100$$

在离子强度为0的条件下,分别测量四种酿酒酵母的絮凝率随时间的变化曲线。分别于0、1、10 mmol/L离子强度条件下测量不同代数的FFC2144和L₂Y的絮凝率。

1.2.5 数据处理 实验数据采用Excel软件求平均值,进行标准差分析,用Origin软件作图。

2 结果与讨论

2.1 pH与离子强度对液态发酵酵母细胞zeta电位的影响

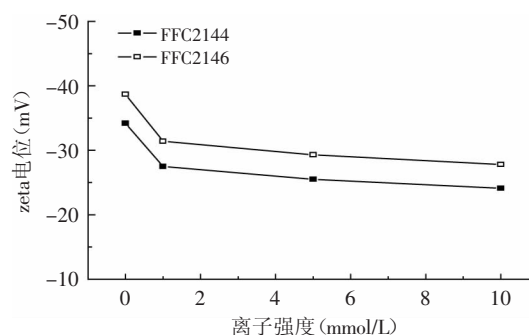


图1 离子强度对FFC2144与FFC2146 zeta电位的影响

Fig.1 Effect of ion strength on the zeta potential of FFC2144 and FFC2146

酿酒酵母细胞壁表面附着多种蛋白质和糖蛋白^[13]。研究表明,它们大致可以分为三类:其中两类通过共价键与细胞壁相偶联,另外一类则是缺少与细胞壁相连接的糖苷键而附着在细胞壁表面的蛋白质^[14-15]。蛋白质上肽链末端带电的氨基酸残基决定了酵母细胞带有静电荷。静电荷的多少决定随着酵母移动的双电层的厚薄程度,双电层的厚度越大zeta电

位测定结果越大反之则越小。图1可以看出酿酒酵母FFC2144和FFC2146 zeta电位绝对值随着体系中离子强度的增加而减小,当离子强度小于1 mmol/L时,zeta电位变化明显,离子强度大于1 mmol/L时zeta电位随离子强度变化并不明显,这是由于离子强度的增大压缩了酵母细胞表面的双电层,引起zeta电位降低,而当离子强度继续增大时双电层的压缩变得困难zeta电位的变化随之变得平缓。图2显示酿酒酵母FFC2144、FFC2146 zeta电位均为负值,FFC2144酵母zeta电位的绝对值大于FFC2146,随着pH的增大zeta电位有减小的趋势,但这种变化并不明显。可以看出,酿酒酵母细胞的zeta电位受溶液pH和离子强度大小的影响,pH的变大通过增加溶液中的-OH的浓度改变细胞zeta电位,而离子强度的变化导致的zeta电位变化则是依赖对细胞双电层的压缩和释放来完成的^[16]。

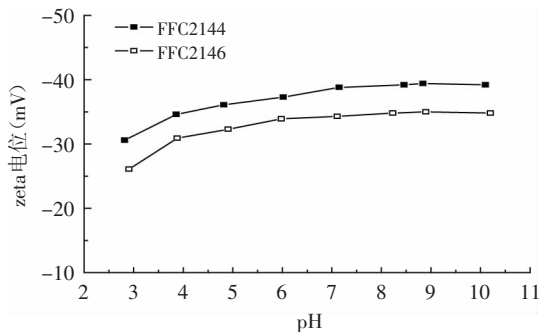


图2 pH对FFC2144与FFC2146 zeta电位的影响
Fig.2 Effect of pH on the zeta potential of FFC2144 and FFC2146

2.2 不同酿酒酵母的zeta电位以及絮凝能力差异性比较

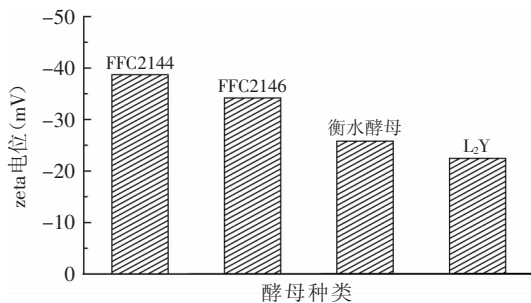


图3 不同种类酿酒酵母zeta电位差异性比较
Fig.3 The difference on zeta potential of different varieties of *Saccharomyces cerevisiae*

酿酒酵母FFC2144和FFC2146是液态发酵菌种,而衡水酵母和酿酒酵母L₂Y是固态发酵菌种。图3显示了不同酿酒酵母在离子强度为0时的zeta电位差异。从图3中可以看出固态发酵酵母的zeta电位明显高于液态发酵酵母,且液态发酵菌种zeta电位绝对值均大于30 mV,而固态发酵酵母则均低于30 mV。不同液态发酵酵母之间,不同固态发酵酵母之间zeta电位均表现出了差异性。

图4是四种菌的絮凝曲线,可以看出固体发酵酵母的絮凝能力强于液体发酵酵母,培养72 h的L₂Y絮凝率达到了80.2%,而FFC2144絮凝率仅为14.4%,这与他们细胞表面的电位差异是一致的。不同酿酒酵母细胞壁成分的差异性很可能决定了酿酒酵母zeta电位以及絮凝能力的不同。从本实验看来,不同酿酒酵母都具有固定的zeta电位,酵母细胞表面所带电荷量越大絮凝性越差。

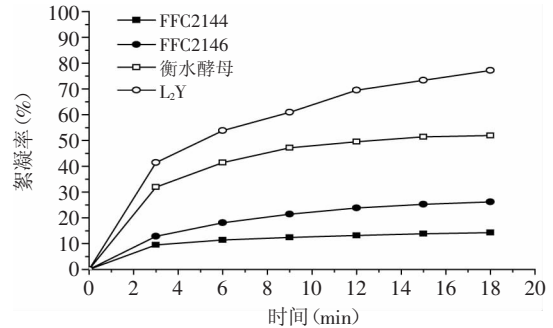


图4 不同酿酒酵母絮凝曲线
Fig.4 The flocculation curves of different varieties of *Saccharomyces cerevisiae*

2.3 不同代数酿酒酵母FFC2144和L₂Y zeta电位以及絮凝能力差异性分析

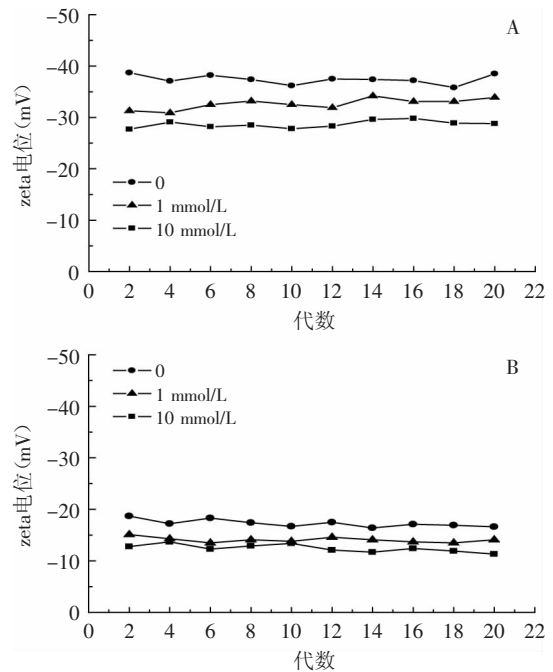


图5 不同离子强度下酿酒酵母FFC2144和L₂Y zeta电位随传代数变化曲线

Fig.5 The curves of zeta potential of different generation *Saccharomyces cerevisiae* FFC2144 and L₂Y at different ion strength

注:A为酿酒酵母FFC2144;B为酿酒酵母L₂Y;图6同。

以液态发酵酿酒酵母FFC2144和固态发酵酿酒酵母L₂Y为研究对象,图5显示了第2~20代酵母在不

同离子强度下,两种酵母zeta电位的变化趋势,随着传代次数的增加酵母zeta电位处于波动状态并未出现明显的变化。

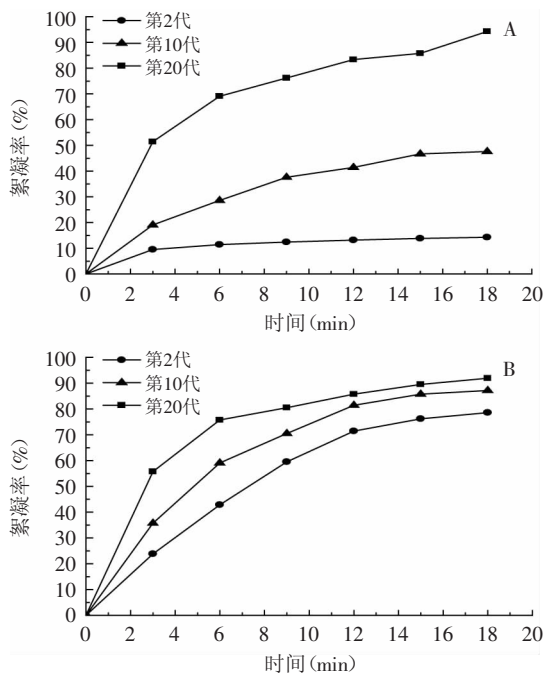


图6 不同传代次数酿酒酵母FFC2144和L₂Y絮凝曲线

Fig.6 The flocculation curves of different generation *Saccharomyces cerevisiae* FFC2144 and L₂Y

从图6显示的FFC2144酵母絮凝曲线发现不同传代次数的酵母絮凝率出现了较大的差异,第2代酿酒酵母的絮凝能力最弱,而随着传代次数的增加酵母的絮凝能力逐渐增强,第20代时达到94.8%;而酿酒酵母L₂Y絮凝性较强,第2代酿酒酵母絮凝率达到80.2%,随着传代次数的增加酵母的絮凝能力有一定增强,但增强幅度不如FFC2144显著,这与姚继斌等^[17-18]的实验结果是一致的。随着酿酒酵母FFC2144传代次数的增加细胞壁蛋白总体变化不明显,但会出现明显的差异性蛋白。结合酵母絮凝能力的变化,受传代次数的影响,细胞分泌了能引起酵母絮凝的蛋白,这些蛋白有可能是Flo基因家族表达的絮凝蛋白Flo1p、Flo5p、Flo9p,也有可能是凝集素蛋白Agalp、Aga2p和Sag1p^[19-20]。这些蛋白的表达虽然不足以引起酵母细胞zeta电位发生明显的变化,但他们却通过与邻近酵母细胞壁上的甘露糖残基发生“架桥”作用增加其絮凝能力。这种架桥作用能够抵消酵母之间由zeta电位引起的静电排斥力^[14]。

2.4 酿酒酵母在发酵过程中的zeta电位分析

图7显示了不同酿酒酵母在发酵过程中的zeta电位变化趋势,随着发酵时间的增加4种酿酒酵母均未发生明显的变化。而W Richard Bowen^[16]对3种酿酒酵母的研究表明在发酵过程中zeta电位均随发酵时间的增加而明显降低,原因在于W Richard Bowen测定zeta电位时酿酒酵母处于发酵液中,pH随着发酵时间的延长而降低,离子强度也时刻发生着变化。可能

是由于发酵液中离子强度的增大或pH的减小或两者的共同作用使电位减小。本文测量zeta电位时,将酵母置于标准条件下(超纯水制备菌悬液,离子强度为0)。结合不同代数酿酒酵母zeta电位分析,尽管细胞在发酵过程中进行着各种复杂的生命活动,随着代数的增加细胞壁表面也出现了差异性蛋白,对于同种酵母zeta电位却表现出了极强的稳定性。这种稳定性再次说明酿酒酵母具有固定的zeta电位,正是由于这种稳定性以及菌种之间的差异性,使得利用zeta电位的检测来进行菌种的鉴别以及絮凝性能的判定成为可能。

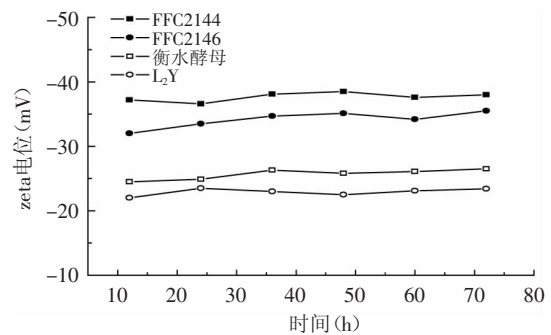


图7 发酵过程中酿酒酵母zeta电位变化曲线

Fig.7 The curves on zeta potentials of *Saccharomyces cerevisiae* in the process of fermentation

3 结论

对不同酿酒酵母的zeta电位测量以及絮凝能力的测定结果表明,酿酒酵母细胞表面均带有负电荷,不同酿酒酵母带有不同数量的电荷,pH与离子强度能对酵母zeta电位产生影响,离子强度能改变细胞表面的双电层厚度,对酵母zeta电位有一定影响。固态发酵酵母zeta电位明显大于液态发酵酵母的zeta电位,且与各自的絮凝能力表现出一致性:zeta电位绝对值越小菌体絮凝能力越强,zeta电位反映出了酵母絮凝性能的强弱。不同传代次数及发酵过程中zeta电位实验表明,酵母在传代培养以及发酵过程中zeta电位均不发生明显变化,表现出极强的稳定性,说明zeta电位对于同一酿酒酵母而言是固定不变的;而不同代数酿酒酵母絮凝能力却随着代数的增加而增强,在酿酒酵母衰老过程中其絮凝性能与细胞表面电位无关。出现这种现象的原因是酿酒酵母随着代数的增加,细胞壁表面分泌了一些能够导致絮凝的蛋白,这些蛋白通过“架桥”作用使酵母聚集^[18]。

参考文献

- [1] 季杨杨,朴永哲,袁方,等. 不同传代次数酿酒酵母细胞内蛋白质组学分析[J]. 食品科技,2014,39(7):26-30.
- [2] 岳峰,郭雪娜,何秀萍,等. 絮凝基因内衔接重复序列与酵母菌絮凝特性多样性及遗传稳定性[J]. 生物工程学报,2013,29(7):871-879.
- [3] Yue F,Guo X,He X,et al. Diversity and genetic stability of yeast flocculation caused by variation of tandem repeats in yeast flocculin genes[J]. Chinese journal of biotechnology,2013,29(7):

871-879.

- [4] Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H, et al. Yeast flocculation: what brewers should know[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003(63): 197-205.
- [5] El Kirat Chatel S, Beaussart A, Vincent S P, et al. Forces in yeast flocculation[J]. Nanoscale, 2015, 7(5): 1760-1767.
- [6] Virve V, John L. 125th anniversary review: yeast flocculation and sedimentation in brewing[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(4): 475-487.
- [7] 韩龙. 影响酵母絮凝性的因素与优化途径[J]. 啤酒科技, 2014(6): 50-51.
- [8] Narong P, James AE. Effect of pH on the ζ -potential and turbidity of yeast suspensions[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochem, Eng, Aspects, 2006(274): 130-137.
- [9] Thonart P, Custinier M, Paquot M. Zeta potential of yeast cells: application in cell immobilization[J]. Enzyme Microbial Technology, 1982(4): 191-194.
- [10] Sabina PS, Kjell MV, Kjetill. Interactions between chitosans and bacterial suspensions: adsorption and flocculation[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003(27): 71-81.
- [11] Aljuboori A H R, Idris A, Al joubory H H R, et al. Flocculation behavior and mechanism of bioflocculant produced by *Aspergillus flavus*[J]. Journal of environmental management, 2015, 150: 466-471.
- [12] Nayyar A, Walker G M, Canetta E, et al. Cell surface properties and flocculation behaviour of industrial strains of *Saccharomyces*

cerevisiae[J]. International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research, 2014(6): 194-196.

- [13] 吴敏, 崔秀云, 苗茂栋. zeta电位与菌悬液絮凝活性[J]. 化工学报, 2008, 59(9): 2263-2269.
- [14] Ecker M, Deutzmann R, Lehle L, et al. Pirproteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β -1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(17): 1523-1529.
- [15] Cappellaro C, Mra V, Tanne RW. New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating[J]. Journal of bacteriology, 1998, 180(19): 503-507.
- [16] W Richard Bowen, Timothy J Ventham. Aspects of yeast flocculation: size distribution and zeta-potential[J]. Journal of the Institute of Brewing, 1994(100): 167-172.
- [17] 姚继兵, 祖国仁, 朴永哲, 等. 不同传代次数的酿酒酵母细胞壁蛋白组学分析[J]. 微生物学通报, 2013, 40(11): 1962-1969.
- [18] 安文涛, 杨迪, 尹亚辉, 等. 酵母菌复制衰老过程中絮凝机理分析[J]. 微生物学通报, 2013, 40(12): 2189-2195.
- [19] Soares E V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review[J]. Journal of applied microbiology, 2011, 110(1): 1-18.
- [20] Zhao X Q, Li Q, He L Y, et al. Exploration of a natural reservoir of flocculating genes from various *Saccharomyces cerevisiae* strains and improved ethanol fermentation using stable genetically engineered flocculating yeast strains[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(11): 1612-1619.

(上接第99页)

文的研究可以为从贝类酶解液分离提纯活性肽提供理论和方法上的参考。

参考文献

- [1] 李军, 汪致富, 张振华, 等. 鲜榨苹果汁陶瓷膜超滤澄清与除菌的中试实验研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(1): 136-141.
- [2] 高红艳, 刘振民, 莫蓓红. 陶瓷膜超滤技术浓缩乳清的工艺参数研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(2): 351-354.
- [3] 董晶莹, 马莺, 陈历俊, 等. 陶瓷膜微滤分离酪蛋白与乳清蛋白[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2009, 41(6): 78-81.
- [4] 尹谷余, 刘伟荣. 无机陶瓷膜在酱油除杂澄清中的应用[J]. 中国调味品, 2010, 35(2): 24-26.
- [5] 安毅. 陶瓷膜技术在微生物发酵法生产大豆蛋白活性肽中的应用研究[J]. 大豆通报, 2004(6): 22-23.
- [6] 郑晓杰, 李燕, 张井, 等. 陶瓷膜微滤鳃鱼蒸煮液的条件研究[J]. 食品科学, 2009, 30(24): 217-220.
- [7] 章超桦, 吴红棉, 洪鹏志, 等. 马氏珠母贝肉的营养成分及其游离氨基酸组成[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 180-184.
- [8] 郑惠娜, 曾小勤, 廖建华, 等. 利用马氏珠母贝肉煮汁液开发调味酱[J]. 中国调味品, 2012, 37(6): 61-64.
- [9] 陈美花, 励建荣, 吉宏武, 等. 马氏珠母贝酶法抽提美拉德增香工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(5): 289-292.
- [10] 曹文红, 吴红棉, 章超桦, 等. 马氏珠母贝肉酶解产物ACE抑制活性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(8): 60-64.
- [11] 李雨哲, 任娇艳, 赵谋明. 马氏珍珠贝肉糖蛋白的提取工艺优化及其抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(4): 243-245.
- [12] 李雨哲, 吴胜旭, 赵谋明, 等. 马氏珍珠贝酶解液澄清工艺条件优化的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(8): 195-197.
- [13] 赵谋明, 肖如武, 崔春, 等. 超滤对马氏珍珠贝肉蛋白酶解液特性的影响[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2009, 37(10): 124-128.
- [14] 大连轻工业学院. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1990.
- [15] 卫生部食品卫生监督检验所. GB/T 5009.5-2003食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2003: 35-39.
- [16] 陈瑜, 李志远, 侯小祯. 膜分离技术在菠萝汁澄清中的应用研究[J]. 食品工业科技, 2005, 9(26): 63-66.
- [17] Filnn J. Membrane science and technology[M]. New York: Plenum Press, 1970: 47-97.
- [18] Marai D A, Javier F, Rodrigo B. An economic assessment of proteins recovery from fish meal effluents by ultrafiltration[J]. Trends in Food Science & Technology, 2004, 15(10): 506-512.