

响应面法优化酪蛋白磷酸肽生产工艺研究

邵孟秋¹, 李祖赐¹, 卜尔红², 杨芳芳²

(1. 岳阳职业技术学院, 湖南岳阳 414000;

2. 湖南农业大学食品科技学院, 湖南长沙 410128)

摘要:在单因素实验的基础上, 根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理, 采用 3 因素 3 水平的响应曲面分析法, 建立了胰蛋白酶水解酪蛋白制备酪蛋白磷酸肽的二次多项数学模型, 并以水解度为响应值作响应面和等高线, 得到酶水解酪蛋白制备酪蛋白磷酸肽的优化工艺条件为: 水解时间为 6h + 12min、酶底比为 2.23%、温度 50℃, 底物浓度为 4%、pH8.4、旋转振荡速度 120r/min, 在此条件下实际水解度为 62.04%。

关键词:酪蛋白, 胰蛋白酶, 响应面优化, 酪蛋白磷酸肽

Optimum of casein phosphopeptides production process by using response surface methodology

SHAO Meng-qiu¹, LI Zu-ci¹, BU Er-hong², YANG Fang-fang²

(1. Yueyang Vocational and Technical College, Yueyang 414000, China;

2. The Food Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract: By single factor experiment, the proper hydrolysis time, temperature, substrate concentration and enzyme-substrate ratio were determined. The quadratic function mathematics model, for the processing of CPP from trypsin hydrolyzed casein was built. According to the Box-Behnken design principles, by three factors of exercise at three levels response surface methodology, with the Minitab14 statistics analysis software. By analyzing the response surface and contour based on the degree of hysrolysis as response value, the optimal processing was obtained as follows: hydrolysis time 6h + 12min, substrate concentration and enzyme-substrate ratio 2.23%, temperature 50℃, substrate concentration 4%, pH 8.4, with 120r/min, and the actual degree of hysrolysis was 62.04%.

Key words: casein protein; trypsin; response surface optimization; casein phosphopeptides

中图分类号: TS201.2⁺1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2010)08-0225-05

早在上世纪 50 年代在国外就开始了酪蛋白磷酸肽(CPP)的研究, 80 年代后期 CPP 的性质和作用机理日趋明朗化。酪蛋白磷酸肽是以牛奶酪蛋白为原料, 经过蛋白酶水解, 再分离纯化之后得到的含有磷酸丝氨酸基的肽, 具有促进钙质、铁和锌等微量元素的吸收与利用, 抗氧化, 促进益生菌增殖等作用^[1-5]。CPP 的核心部位由三个磷酸丝氨酸残基组成一个-Ser(P)-残基簇, 后面紧接着两个 Glu-残基。由于牛乳酪蛋白存在四种不同的蛋白质结构, 因此不同结构的酪蛋白水解得到的 CPP 的结构也有所差别, CPP 主要有两种, 分别是来自 α_s -酪蛋白的 α -CPP 和 β -酪蛋白的 β -CPP。此外, 用胰蛋白酶水解 β -酪蛋白得到的 1~18 氨基酸残基组成的肽段和

105~107 氨基酸残基组成的肽段能够刺激 BA LB/ α 3T3 细胞合成 DNA, 并促进了细胞的增殖。用胰蛋白酶水解 α_s 酪蛋白得到的 1~23 氨基酸残基组成的肽段具有抗菌的作用^[6]。酪蛋白磷酸肽(CPP)作为一种活性多肽, 由于其稳定性好、有多种生物活性, 因此具有相当大的开发应用潜力^[7-8]。并且由于制造 CPP 的原料即酪蛋白是天然蛋白质, 所以 CPP 的应用不存在安全性问题^[9]; CPP 作为一种功能性原料, 在日本、德国等已开发出添加 CPP 的保健食品; 有些国家已将 CPP 作为添加剂应用于饲料工业中^[10]。可用于生产 CPP 的酶类很多, 如胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰酶和碱性蛋白酶, 多来源于动物、植物和微生物。胰蛋白酶和胰酶来源于动物胰脏, 胰蛋白酶专一性强, 但其本身很容易自水解, 且价格较高, 目前主要用于酪蛋白水解特性的研究。从动物的胰脏中提取出来的胰酶是由胰蛋白酶、糜蛋白酶、羧肽酶、脂肪酶和淀粉酶等构成的混合酶体系, 来源丰

收稿日期: 2009-09-17

作者简介: 邵孟秋(1967-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术。

富,价格较低。胰酶中的两种主要成分是胰蛋白酶和糜蛋白酶,它们都可以保证产品中 CPP 活性基团的完整性,而且由于多酶催化,不仅可以加快水解速度,还可以得到更短的肽段^[11]。目前欧洲、日本生产 CPP 绝大多数采用的是胰蛋白酶法^[12-13]。本文拟利用响应面分析方法对胰蛋白酶水解酪蛋白制备酪蛋白磷酸肽工艺进行优化,获得最优的工艺参数,有效减少工艺操作的盲目性,从而为进一步对其功能性进行研究奠定基础。

1 材料与设备

1.1 材料与仪器

酪蛋白、胰蛋白酶、三氯乙酸、酒石酸钾钠、硫酸铜、硫酸钾、硼酸、硼砂、NaOH、高氯酸-硝酸、硫酸、盐酸、无水乙醇、无水氯化钙 国药化学试剂有限公司。

AB-L 型分析天平 梅特勒-托利多中国;7200 型分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司;TG16-WS(1650D)高速离心机 湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司;电热恒温水浴锅 金坛市岸头国瑞实验仪器厂;电热鼓风干燥箱 上海赛欧实验设备有限公司;微量凯氏定氮仪 上海沛欧分析仪器有限公司;PHB-4 型 pH 计 上海精密仪器仪表有限公司;FD-1C 真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司;R-201 旋转蒸发器 上海盛玻仪器有限公司;G-506E 旋涡混匀器 Scientific Industries, Inc。

1.2 实验方法

1.2.1 酪蛋白磷酸肽制备工艺 酪蛋白→胰蛋白酶水解→酶灭活→调节 pH 至 4.6→离心→取上清液(加乙醇-钙)→离心→沉淀→冷冻干燥→成品

操作要点:将酪蛋白溶于碱液中,加热不断搅拌,调好 pH;配好一定浓度的酶液加入到完全溶解的酪蛋白溶液中;酶水解液置于 90℃ 水中 10min;调节酶液 pH 至等电点 4.6,使未水解酪蛋白沉淀;4000r/min 离心 15min;取上清液加入 2% 氯化钙,95% 无水乙醇;5000r/min 离心 10min;白色沉淀物至冷冻干燥机中干燥 24h。

1.2.2 水解度的测定 水解度是指酪蛋白酶解过程中断裂的肽键占全部肽键的百分数。

水解度的测定参考三氯乙酸沉淀法。取出 5mL 酶解液以 1:1 比例取三氯乙酸沉淀样品水解液中的大分子蛋白质,经 4000r/min 离心 15min 过滤后,在上清液中加入 20mL 双缩脲试剂,于 540nm 测定其 OD 值,对照标准曲线(图 1)求得样品溶液中的多肽浓度 C(mg/mL),进而可求得样品中多肽含量。

标准曲线公式:

$$X = (Y - 0.0068) / 0.0429$$

式中: X 为多肽的浓度, mg/mL; Y 为吸光度酪蛋白的水解度按下式计算:

$$\text{水解度 DH}(\%) = (X \times 100) / (Z \times 100\%) / 1000 \times 100$$

式中: X 为多肽的浓度, mg/mL; Z 为底物含量, mg。

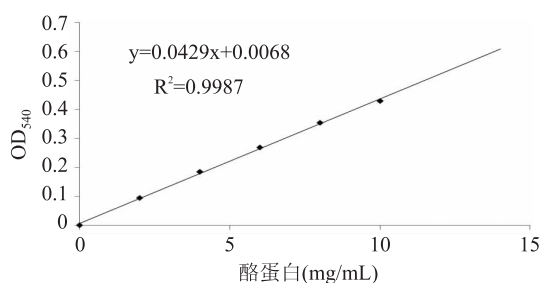


图 1 双缩脲测定法标准曲线图

1.2.3 总氮的测定 按 GB/T5009.5-2003 食品中蛋白质的测定方法执行。

1.2.4 总磷的测定 总磷量的测定参考钼蓝比色法(GB/T5009.87-2003),略加改进。

称取样品 0.5g 于 100mL 凯氏烧瓶中,加入 3mL 硫酸,3mL 高氯酸-硝酸消化液,置于消化炉上。瓶中液体初为棕黑色,待溶液变成无色或微带黄色清亮液体时,即消化完全。将溶液放冷,加 20mL 水,赶酸,冷却,转移至 100mL 容量瓶中,用水多次洗涤凯氏烧瓶,洗液合并倒入容量瓶中,加水至刻度,混匀。此溶液为试样测定液。

准确吸取试样测定液 2mL 及同量的空白溶液,分别置于 20mL 具塞试管中,依次加入 2mL 钼酸溶液,摇匀,静置几秒钟,加入 1mL 亚硫酸钠溶液,1mL 对苯二酚溶液,摇匀,加水至刻度,混匀,静置 0.5h 以后,在分光光度计 660nm 波长处测定吸光度,以测出的吸光度在标准曲线上查得试样液中的磷含量。

1.2.5 氮/磷摩尔比的测定

$$N/P(\text{摩尔比}) = \frac{N \text{ 的质量百分含量}}{P \text{ 的质量百分含量}} \times \frac{31}{14}$$

1.2.6 酶解工艺参数选择实验

1.2.6.1 不同水解时间对酪蛋白水解度的影响 在 pH8.4, 50℃, 底物浓度为 4%, 酶的添加量为 2.0‰ 时,测定不同水解时间对酪蛋白水解度的影响。

1.2.6.2 不同水解温度对酪蛋白水解度的影响 在时间为 6h, E/S 为 2.0‰, 底物浓度为 4%, pH8.4 时,测定不同水解温度对酪蛋白水解度的影响。

1.2.6.3 不同底物浓度对酪蛋白水解度的影响 在时间为 6h, E/S 为 2.0‰, pH8.4, 温度 50℃ 时,测定不同底物浓度对酪蛋白水解度的影响。

1.2.6.4 不同酶底比对酪蛋白水解度的影响 在 pH8.4, 50℃, 底物浓度为 4%, 时间为 6h 时,测定不同酶底比对酪蛋白水解度的影响。

2 结果与讨论

2.1 不同水解时间对酪蛋白水解度的影响

从图 2 可以得出,酪蛋白的水解度随酶解时间的延长而增加。当反应时间在 4~6h 时,水解度增长较快,水解度与时间呈线性关系;当水解时间在 7~10h 时,水解度随时间增加的幅度趋于平缓;在水解 6h 时,酪蛋白水解度达到最大,为 60.51%。究其原因,主要是随着酶解反应的进行:底物浓度减少,反应位点逐渐被酶分子饱和,可与酶作用的肽键数量减少;产物浓度增加,其竞争性抑制增强;酶活性逐渐降低。因此,实验选取 6h 为最佳水解时间。

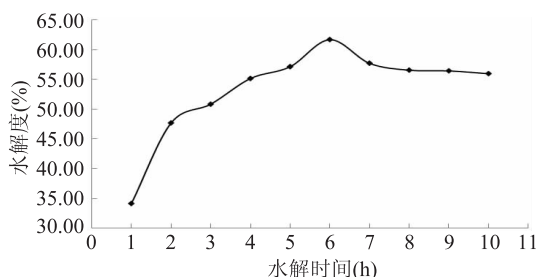


图2 不同时间对酶水解的影响

2.2 不同水解温度对酪蛋白水解度的影响

从图3可以看出,在35℃时,酪蛋白水解度较小;然后随温度的升高,酶水解速度逐渐加快,50℃时水解度达到最大值,其水解度为61.79%。当温度高于50℃时,随着温度的升高,酪蛋白的水解度逐渐下降。

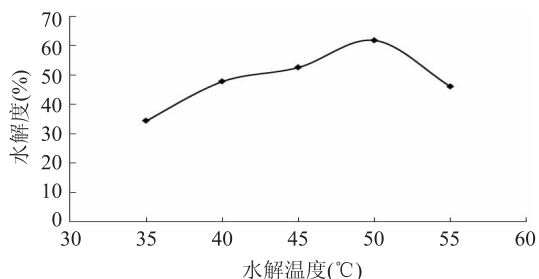


图3 不同温度对酶水解的影响

温度对酪蛋白水解反应速度的影响分析如下:在低温段酶活力较小,酶水解速度较低;在适宜温度下,有利于酪蛋白折叠结构的舒展(解聚),肽键更易与酶结合,酶水解速度加快;随着温度继续升高,酶蛋白变性失活,酶水解速度降低。因此,实验确定最佳酪蛋白水解温度为50℃。

2.3 不同底物浓度对酪蛋白水解度的影响

由图4看出,底物浓度由2%增加到8%时,水解度呈逐渐降低的趋势,这是因为酪蛋白分子可以在水溶液中聚合形成分子量为10万以上的大分子,这些大分子阻碍胰酶对切割位点的作用,从而降低了反应的水解度。而且随着底物浓度的提高,当超过饱和状态时,抑制作用就会越来越严重,表现为水解度值明显降低,底物浓度升至8%,最终水解度降为35%。虽然底物浓度越低,水解度越高,但是绝对产物得率却不一定高,所以底物浓度也存在一个最佳值。

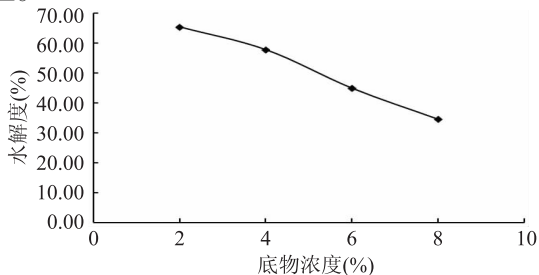


图4 不同底物浓度对酶水解的影响

2.4 不同酶底比对酪蛋白水解度的影响

从图5可以看出,当酶底比为0.5‰时,随着酶底比增大,酪蛋白的水解度逐渐增大,当酶底比大于2.0‰时,酪蛋白的水解度不再随酶底比的增大而增大。这是因为当酶底比较低时,底物过量,酶与底物

完全结合,水解程度增大;当酶底比较高时,蛋白质浓度相对较小,有一部分酶分子没有机会与蛋白质结合,所以水解程度变化不大,由此可以确定最适酶底比为2.0‰。

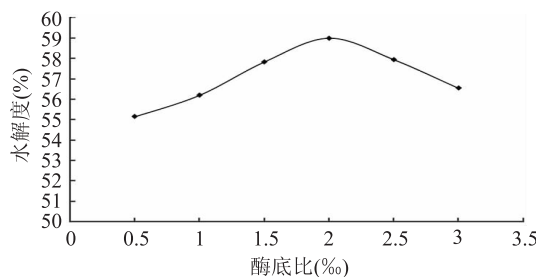


图5 不同酶底比对酶水解的影响

2.5 响应曲面法实验结果

根据 Box-Behnken 响应曲面设计的中心组合实验设计原理,结合以上实验结果,运用 Minitab14 数据统计分析软件,选取水解时间、酶底比、温度3个影响因子,各取3个水平,采用3因素3水平的响应曲面分析方法,对水解条件进行优化设计。实验因素与水平设计见表1,共15个实验点,其中12个为析因点,3个为零点,零点实验进行了3次,以估计误差。

表1 3因素3水平响应面分析实验设计表

因素	水平		
	-1	0	1
X ₁ 水解时间(°C)	4	6	8
X ₂ 酶底比(E/S,‰)	1	2	3
X ₃ 温度(h)	45	50	55

响应曲面法的实验设计及结果见表2。运用 Minitab14 数据统计分析软件使用未编码单位对实验数据进行多元回归拟合,设时间、酶底比、温度分别为 X₁、X₂、X₃,回归模型系数及显著性检验结果见表3,回归模型的方差分析表见表4。

表2 响应面优化制备 CPP 工艺实验设计与结果

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	水解度(%)
1	-1	-1	0	51.07
2	1	-1	0	56.67
3	-1	1	0	56.67
4	1	1	0	56.55
5	-1	0	-1	53.40
6	1	0	-1	56.20
7	-1	0	1	54.80
8	1	0	1	55.97
9	0	-1	-1	52.24
10	0	1	-1	56.43
11	0	-1	1	52.24
12	0	1	1	58.07
13	0	0	0	61.54
14	0	0	0	62.04
15	0	0	0	61.10

回归模型方差分析表表明回归模型是显著的(P=0.001),回归模型系数的显著性检验结果 R-Sq(残差的平方)=96.62%,对于加工过程中数据,96.62%的变异可由该模型解释。方差分析表中失拟

P 值为 0.709, 大于 0.05, 因此证明该模型可以充分地解释响应中的变异, 模型拟合度很高。

表3 回归模型系数及显著性检验结果

系数项	回归系数	系数标准误	T	P
常量	-406.474	63.9829	-6.353	0.001
X_1	14.532	3.4409	4.223	0.008
X_2	17.507	6.4699	2.706	0.042
X_3	16.099	2.4287	6.629	0.001
X_1^2	-0.873	0.1495	-5.839	0.002
X_2^2	-3.841	0.5979	-6.424	0.001
X_3^2	-0.159	0.0239	-6.668	0.001
X_1X_2	-0.714	0.2872	-2.485	0.055
X_1X_3	-0.041	0.0574	-0.710	0.509
X_2X_3	0.082	0.1149	0.710	0.509

表4 回归模型的方差分析表

方差来源	自由度	连续平方和	校正平方和	校正均方	F	P
回归	9	188.841	188.841	20.9824	15.89	0.004
线性	3	42.154	76.141	25.3802	19.23	0.004
平方	3	137.202	137.202	45.7340	34.64	0.001
交互作用	3	9.485	9.485	3.1617	2.39	0.184
残差误差	5	6.601	6.601	1.3201		
失拟	3	2.897	2.897	0.9656	0.52	0.709
纯误差	2	3.704	3.704	1.8519		

在该模型中, 回归进一步分解为不同阶的项: 线性、平方和交互作用。平方响应的 $P = 0.001$ 小于 0.05, 因此具有显著的二次效应。观察回归模型系数显著性检验结果, 其中 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 项的 P 值均小于 0.01, 也就是说时间、酶底比、温度对水解度均具有显著的二次效应, 它们与水解度之间的关系符合曲线规律。

观察表 3 中, 各系数的 P 值, 发现 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 的 P 值均大于 0.05, 说明时间、酶底比、温度之间的相互作用对水解度的影响不大, 这与方差分析表中交互作用检验结果一致, 方差分析表中交互作用的 P 值为 0.184 大于 0.05, 交互作用不显著。

综合上述分析结果, 去除模型中不显著的项, 得到时间(X_1)、酶底比(X_2)、温度(X_3)的二次多项回归模型:

$$\text{综合得分}(Y) = -406.474 + 14.532X_1 + 17.507X_2 + 16.099X_3 - 0.714X_1X_2 - 0.041X_1X_3 + 0.082X_2X_3 - 0.873X_1^2 - 3.841X_2^2 - 0.159X_3^2 \quad \text{模型(1)}$$

2.6 水解条件的响应曲面分析与优化

模型(1)的响应曲面见图 6~图 8, 3 组图直观地反映了各因素对响应值的影响。由图 6 可知, 水解时间保持在 6h 时, 水解度随着温度的提高而增加。温度在 50℃ 左右时水解度达到最高, 随着温度的继续升高又开始降低。由图 7 可知, 酶底比保持在 2.0‰ 时, 水解度随时间延长显著增加, 温度从 45℃ 开始水解度呈逐步上升的趋势, 到 50℃ 时水解度达到最大。由图 8 可以看出, 酶底比从 1‰ 开始随着时间的延长水解度逐步升高, 当酶底比为 2‰, 时间为 6h 时水解度达到最大。

运用 Minitab 软件的响应优化器对实验结果进行优化, 得到模型的最优解: 水解时间为 6.22h、酶底

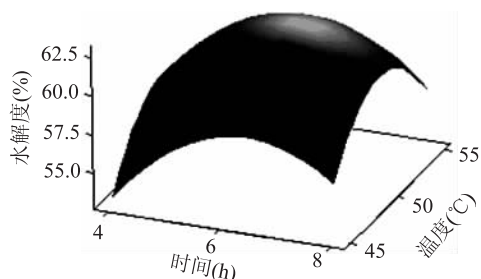


图6 水解过程中温度、时间及其交互作用对水解度影响的响应曲面图

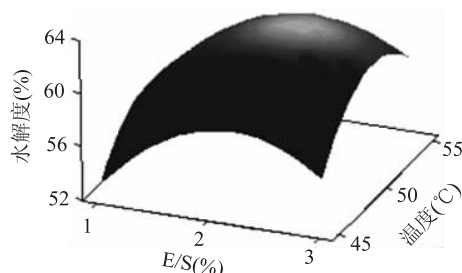


图7 水解过程中酶底比、温度及其交互作用对水解度影响的响应曲面图

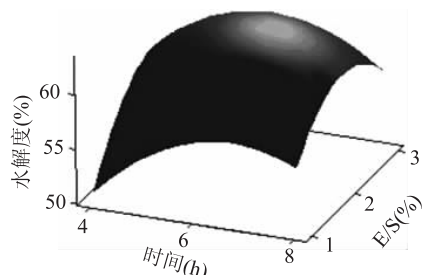


图8 水解过程中酶底比、时间及其交互作用对水解度影响的响应曲面图

比为 2.23‰、温度 50.25℃, 预测的水解度为 62.88%。

为检验响应曲面法所得结果的可靠性, 采用上述优化条件进行酶水解酪蛋白制备酪蛋白磷酸肽重复实验, 考虑到实际操作的便利, 将提取工艺参数修正为: 水解时间为 6h + 12min、酶底比为 2.23‰、温度 50℃, 底物浓度为 4%、pH8.4、旋转振荡速度 120r/min, 在此条件下实际水解度为 62.04%, 与理论预测值相比, 其相对误差约为 1.34%。因此, 基于响应曲面法所得的优化工艺参数准确可靠, 具有实用价值。

3 结论

3.1 基于实验设计软件 Minitab14, 通过二次回归设计得到了胰蛋白酶水解酪蛋白制备酪蛋白磷酸肽过程中水解度与水解时间、底物浓度、酶底比的回归模型, 经检验证明该模型是合理可靠的, 能够较好地预测水解度。

3.2 利用模型的响应面及其等高线, 在 pH8.4, 温度 50℃ 情况下对影响水解度的关键因素及其相互作用进行探讨, 得到的优化工艺参数为: 水解时间为 6.22h、酶底比为 2.23‰、温度 50.25℃, 考虑到操作的便利, 水解时间为 6h + 12min、酶底比为 2.23‰、温度 50℃, 底物浓度为 4%、pH8.4、旋转振荡速度 120r/min, 在此条件下实际水解度为 62.04%。

3.3 利用响应面分析方法对胰蛋白酶水解酪蛋白制备酪蛋白磷酸肽工艺进行优化,可获得最优的工艺参数,能有效减少工艺操作的盲目性,从而为进一步的实验研究奠定基础。

参考文献

- [1] KJ Cross, NL Huq, JE Palamara, et al. Physicochemical Characterization of Casein Phosphopeptide - Amorphous Calcium Phosphate Nanocomplexes [J]. J Biol Chem, 2005, 280: 15362-15369.
- [2] Netto, Flavia M, Galeazzi, et al. Production and Characterization of Enzymatic Hydrolysate from Soy Protein Isolate [J]. Lebensm-wiss.u-technol, 1998, 31: 624-631.
- [3] 吴建中, 赵谋明. 食品中的生物活性多肽[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(11): 46-50.
- [4] 于江虹. 乳源生物活性肽的研究进展[J]. 食品工业科技, 2003, 24(10): 165-166.
- [5] Hu M, McClements D J, Decker E A. Lipid Oxidation in Corn Oil - in - water Emulsions Stabilized by Casein, Whey Protein Isolate and Soy Protein Isolate [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51

(6): 1696-1700.

- [6] Ashida K. Effect of dietary Casein phosphopeptides and calcium levels on eggshell quality and bone status in laying hens [J]. Animal Science Tech, 1996, 67(11): 967-974.
- [7] 赵一明, 王璋, 许时婴, 等. Alcalase 水解酪蛋白制备磷酸肽和非磷肽的研究 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(12): 100-103.
- [8] 牟光庆, 曹冬梅, 张丽萍. 酪蛋白磷酸肽 (CPP) 理化特性的研究 [J]. 食品工业科技, 2003, 24(10): 125-127.
- [9] 汤亚杰, 吴思方. 酪蛋白磷酸肽的研究进展 [J]. 食品科学, 1998, 19(5): 3-6.
- [10] 薛正莲. 生物活性肽-酪蛋白磷酸肽 (CPP) 的研究 [J]. 山西食品工业, 2000(4): 2-4.
- [11] 赵江, 刘鹏, 宋庆明, 等. 胰酶固定化条件的优化与应用 [J]. 中国酿造, 2008, 178(1): 22-25.
- [12] 王俊, 黄文, 乔宇. 酪蛋白磷酸肽的制备及其性质 [J]. 安徽农业科学, 2005(2): 291-293.
- [13] Tsuchita H, Suzuki T, Kuwata T. The effect of casein phosphopeptides on calcium absorption from calcium - fortified milk in growing rats [J]. Br J Nutr, 2001, 85: 5-10.

(上接第 224 页)

大的因素:乙醇浓度、液固比、温度、超声时间。为优化提取条件,采用正交法设计实验,选用四因素三水平正交实验表 $L_9(3^4)$ 以确定橘皮酚酸的最佳提取条件。

表 2 正交实验因素水平表

水平	因素			
	A 乙醇浓度 (%)	B 液固比 (mL/g)	C 温度 (°C)	D 超声时间 (min)
1	60	10:1	40	15
2	70	15:1	50	20
3	80	20:1	60	25

根据表 3 的数据及结果,可判断出影响橘皮酚酸的提取量因素的顺序为 $D > C > B > A$,即超声时间

表 3 正交实验结果与分析

实验号	A	B	C	D	提取量 ($\mu\text{g/g}$)
1	1	1	1	1	37.2
2	1	2	2	2	51.8
3	1	3	3	3	46.2
4	2	1	2	3	50.5
5	2	2	3	1	39.4
6	2	3	1	2	52.4
7	3	1	3	2	44.7
8	3	2	1	3	48.3
9	3	3	2	1	42.5
K_1	135.2	132.4	137.9	119.1	
K_2	142.3	139.5	144.8	148.9	
K_3	135.5	141.1	130.3	145	
k_1	45.1	44.1	46	39.7	
k_2	47.4	46.5	48.3	49.6	
k_3	45.2	47	43.4	48.3	
R	2.3	2.9	4.9	9.9	

> 温度 > 液固比 > 乙醇浓度。直观分析可知,最佳提取工艺为 $A_2B_3C_2D_2$,即 70% 乙醇,液固比 20:1,温度 50°C,超声 20min,提取 3 次。对此条件重复做验证实验 3 次,橘皮酚酸的提取量为 52.8 $\mu\text{g/g}$ 。

3 结论

3.1 用超声波来提取橘皮中酚酸物质,耗时短,提取率较高,相比于其它的传统工艺具有一定的优势。

3.2 超声波辅助提取橘皮酚酸的最佳工艺条件为:超声功率为 200W、乙醇浓度 70%、液固比 20:1、温度 50°C、超声时间 20min、提取 3 次,提取量为 52.8 $\mu\text{g/g}$ 。

参考文献

- [1] 王晓霞,汪敬武. 酚酸类化合物的测定方法研究 [J]. 江西化工, 2003(3): 24-30.
- [2] 李永库,李晓静,欧小辉. 果汁中 9 种酚酸类化合物的 RP-HPLC-PAD 分析 [J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(7): 135-138.
- [3] Bocco A, Cuvelier M E, Richard H, et al. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46: 2123-2129.
- [4] 徐贵华,胡玉霞,叶兴乾,等. 椴柑、温州蜜桔果皮中酚类物质组成及抗氧化能力研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(11): 171-175.
- [5] 马亚琴,陈健初,江萍,等. 超声辅助提取椴蜜柚皮中酚酸的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(7): 159-163.
- [6] 倪学文,吴谋成. 从银杏外种皮中提取银杏酚酸的工艺条件研究 [J]. 食品科学, 2003, 24(3): 64-67.
- [7] 廖春燕,朱海东. 超声波法提取橘皮中黄酮物质的研究 [J]. 四川食品与发酵, 2007, 43(3): 31-34.