

陈凌,曹巧巧,张建群. Box-Behnken 中心组合设计优化酶法提取马齿苋多糖的工艺[J].江苏农业学报,2020,36(2):500-506.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2020.02.034

Box-Behnken 中心组合设计优化酶法提取马齿苋多糖的工艺

陈凌, 曹巧巧, 张建群

(嘉兴职业技术学院农业与环境学院,浙江 嘉兴 314036)

摘要: 采用 Box-Behnken 中心组合试验设计,以果胶酶添加量、酶解温度、料液比为自变量,以多糖得率和羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除率为因变量,利用响应面法优化果胶酶酶解提取马齿苋多糖的工艺。结果表明,料液比 1:37(g/ml)、果胶酶添加量 10.67 g/kg、酶解温度 36.4 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值 5.0、酶解时间 80 min 条件下,马齿苋多糖得率预测值与测定值的相对标准偏差为 2.29%,模型拟合度较高。体外抗氧化试验结果表明,马齿苋多糖具有较好的抗氧化性。因此,采用响应面法优化酶法提取马齿苋多糖工艺条件是可行的。

关键词: Box-Behnken 中心组合设计; 马齿苋; 多糖; 酶解提取

中图分类号: TS201.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)02-0500-07

Optimization on enzymatic extraction of polysaccharides from *Portulaca oleracea* L. by Box-Behnken central composite design

CHEN Ling, CAO Qiao-qiao, ZHANG Jian-qun

(Jiaxing Vocational and Technical College of Agriculture and Environment, Jiaxing 314036, China)

Abstract: The Box-Behnken central composite design was used in this study. Taking pectinase addition, hydrolysis temperature and solid-liquid ratio as independent variables, the extraction rate of polysaccharides and the clearance rate of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) as dependent variables, the response surface method was adopted to optimize the enzymatic extraction process of polysaccharides from *Portulaca oleracea* L.. The results showed that the optimal conditions were as follows: the solid-liquid ratio was 1:37 (g/ml), pectinase addition was 10.67 g/kg, hydrolysis temperature was 36.4 $^{\circ}\text{C}$, pH value was 5.0, and enzymolysis time was 80 min. Under the optimal conditions, the relative standard deviation of polysaccharide yield between the predicted value and the measured value was 2.29%, and the model fitting degree was high. The results of antioxidant test *in vitro* indicated that polysaccharides from *Portulaca oleracea* L. had better antioxidant properties. Therefore, it is feasible to optimize the extraction conditions of *Portulaca oleracea* L. polysaccharides by the method of response surface.

Key words: Box-Behnken central composite design; *Portulaca oleracea* L.; polysaccharide; enzymatic extraction

马齿苋(*Portulaca oleracea* L.)为马齿苋科一年生肉质草本植物,在中国分布广泛,是中国卫生部划定的药食两用植物之一^[1]。多糖作为马齿苋药材中一种非常重要的活性成分,有抗癌、抗氧化和降糖

等生物活性作用^[2]。马齿苋多糖对核桃油的抗氧化性较好^[3]。因此,有效提取马齿苋多糖,对开发多功能食品抗氧化剂具有重要意义。酶法提取多糖使得植物细胞壁及组织能够快速降解^[4],具有反应温度温和,易于控制等诸多优点^[5]。目前,酶法提取马齿苋多糖的工艺已有一些研究。钱志伟等^[6]用纤维素酶提取马齿苋多糖,吕萍等^[7]比较了木瓜蛋白酶、纤维素酶、果胶酶酶解提取马齿苋多糖的效果,米热班古·木太力甫等^[8]用纤维素酶超声辅助

收稿日期:2019-08-29

基金项目:浙江省嘉兴市科技局资助项目(2018AY11013)

作者简介:陈凌(1962-),女,浙江天台人,本科,教授,主要从事植物源食品抗氧化剂研究。(E-mail)chenlingx@163.com

法提取马齿苋多糖,上述研究均以多糖含量为指标,用正交试验法研究马齿苋多糖的提取工艺。李良等^[9]建立苯酚-硫酸法的多糖测定原理是:利用浓硫酸将多糖水解成单糖,并迅速脱水生成糠醛衍生物,再与苯酚缩合成有色化合物,用分光光度法测定多糖含量。在酶法提取植物多糖的工艺研究中,若用苯酚-硫酸法测定多糖含量,需要以双因子为应变量,以防止酶解过度产生的葡萄糖对多糖测量结果的影响。在利用不同酶酶解提取马齿苋多糖的体外抗氧化试验中,从马齿苋多糖对铁离子(Fe^{3+})和铈离子(Ce^{4+})的还原能力,对超氧阴离子(O_2^-)和羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除率这4个方面进行综合评价,发现果胶酶酶解提取的多糖抗氧化性最强^[10]。本研究拟以多糖得率和 $\cdot\text{OH}$ 清除率为响应值,采用响应面法优化果胶酶酶解提取马齿苋多糖的工艺,修正酶解过度产生的误差,以期为马齿苋多糖的高效提取提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与试剂

马齿苋采自嘉兴有机农业示范园,经嘉兴职业技术学院园艺教研室陈玉琴副教授鉴定。葡萄糖、浓硫酸、苯酚、无水乙醇、浓盐酸、水杨酸、双氧水、柠檬酸、柠檬酸钠均为分析纯,由上海联试化工试剂有限公司提供。 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 由江苏强盛功能化学股份有限公司提供, Na_2SO_4 由兰溪中星化工试剂有限公司提供, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 由北京康普汇维科技有限公司提供,1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)由东京化成工业株式会社提供, V_c 由天津博迪化工股份有限公司提供,果胶酶(含量99%)由无锡市百瑞多化工产品有限公司提供。

1.2 仪器与设备

试验所用仪器有CP225D型1/100 000电子分析天平(SATORIOS公司产品)、JP-500B-2型多功能粉碎机(上海久品贸易有限公司产品)、UV-1102 II型单光束紫外/可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司产品)、DK-S24型恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司产品)、DGG-9240BD型电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司产品)、Millipore超纯水仪(Merck millipore公司产品)、Smartpark DQ3纯水柱(Merck millipore公司产品)。

1.3 试验方法

1.3.1 马齿苋多糖的提取 新鲜马齿苋洗净,50℃烘干后粉碎,用石油醚脱脂后50℃烘干。以超纯水为溶剂,酶解一定时间后,加热至100℃灭酶5 min,离心分离,取上清液,保存于4℃冰箱中备用。

1.3.2 马齿苋多糖含量测定 采用苯酚-硫酸法,以葡萄糖为标准品(纯度 $\geq 99\%$),利用分光光度计测定多糖含量^[10]。

1.3.3 马齿苋多糖对 $\cdot\text{OH}$ 清除率的测定 采用水杨酸捕获法测定马齿苋多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率^[11]。

1.3.4 还原能力的测定 基于金属离子还原能力的抗氧化能力评价方式,根据四价铈离子[Ce(IV)]和三价铈离子[Ce(III)]之间的转化度,评价样品的总还原能力^[12]。

1.3.5 马齿苋多糖对DPPH自由基清除率的测定 准确称取30.6 mg DPPH,用70%乙醇溶解后定容于500.0 ml容量瓶中,作为储备液贮藏在棕色瓶中,置于4℃的冰箱中保存,用时取出。DPPH溶液呈紫红色,加入抗氧化剂后颜色的变淡程度可以表示其对自由基的清除能力。取0.5 ml马齿苋多糖溶液,加入10.0 ml DPPH乙醇溶液,摇匀,37℃避光反应15 min,在523 nm处测定其吸光度(以70%乙醇为空白调零),重复测定3次,取平均值。根据下列公式计算样品对DPPH自由基的清除率:

$$\text{DPPH 清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

式中, A_0 表示加入0.50 ml水时溶液的吸光值, A_i 表示加入0.50 ml样品时溶液的吸光值, A_j 表示在0.50 ml样品中加入70%乙醇的吸光值。

1.3.6 单因素试验 按照试验方法1.3.1中所述的方法提取马齿苋多糖,用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液调整pH值,酶解后在沸水浴中灭酶5 min。酶添加量(0 g/kg、5.0 g/kg、7.5 g/kg、10.0 g/kg、12.5 g/kg、15.0 g/kg)对马齿苋多糖得率及 $\cdot\text{OH}$ 清除率的影响,其他提取条件为料液比1:25(g/ml)、pH值5.0、酶解温度40℃、酶解时间60 min。pH值(3.0、3.4、4.0、4.4、5.0、5.4、6.0)对马齿苋多糖得率及 $\cdot\text{OH}$ 清除率的影响,其他提取条件为料液比1:25(g/ml)、酶添加量10.0 g/kg、酶解温度40℃、酶解时间60 min。酶解时间(30 min、60 min、80 min、100 min、120 min、140 min)对马齿苋多糖得率及 $\cdot\text{OH}$ 清除率的影响,其他提取条件为料液比1:25(g/ml)、

pH 值 5.0、酶添加量 10.0 g/kg、酶解温度 40 ℃。酶解温度(30 ℃、35 ℃、40 ℃、45 ℃、50 ℃、55 ℃、60 ℃)对马齿苋多糖得率及·OH清除率的影响,其他提取条件为料液比1:25(g/ml)、pH 值 5.0、酶解时间 60 min、酶添加量 10.0 g/kg。料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50,g/ml)对马齿苋多糖得率及·OH清除率的影响,其他提取条件为 pH 值 5.0、酶添加量 10.0 g/kg、酶解温度 40 ℃、酶解时间 60 min。

1.3.7 Box-Behnken 中心组合试验设计 在单因素试验的基础上,选定对多糖得率和·OH清除率影响较大的3个因素,建立三因素三水平的 Box-Behnken 中心组合试验,以多糖得率和·OH清除率为响应值,各因素及水平如表1显示。

表1 响应面分析因素和水平

Table 1 Factors and levels of response surface methodology

因素	水平		
	-1	0	1
酶添加量 (g/kg)	7.5	10.0	12.5
酶解温度 (°C)	30	35	40
料液比 (g/ml)	1:20	1:30	1:40

1.3.8 数据统计与分析 所有测定均重复3次,数据采用平均值±标准差的形式表示。采用 Origin Pro 9.0 软件作图,用 Design-Expert 8.0.6 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 酶添加量对多糖得率及·OH清除率的影响

图1显示,随着果胶酶添加量的增加,马齿苋多糖的吸光度和·OH清除率均呈先上升后下降的趋势。这是因为酶添加量增加导致酶解速度加快,当果胶酶的添加量大于10 g/kg时,底物全部与酶结合,多余的酶进一步酶解多糖,使多糖的浓度降低,导致其对·OH的清除率降低,这与邹雪等^[13]的研究结果相吻合。多糖浓度最大时,其对·OH的清除率并不是最大的,原因可能是测得的多糖包含了酶解过度产生的葡萄糖。因此,选择果胶酶添加量为10 g/kg。

2.1.2 pH 值对多糖得率及·OH清除率的影响 图

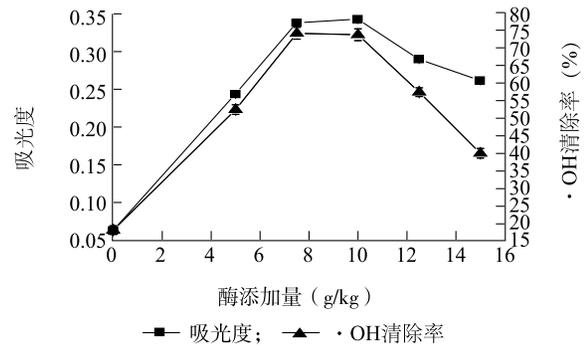


图1 酶添加量对多糖得率及·OH清除率的影响

Fig.1 Effects of enzyme addition on polysaccharide yield and clearance rate of hydroxyl radical (·OH)

2显示,pH 值小于5.0时,随着 pH 值的增大,吸光度和·OH清除率增加。当 pH 值达到5.0后,继续增大 pH 值,吸光度和·OH清除率降低。这是因为在最适 pH 值时,酶分子上的活性基团发生解离,其离子最适合与底物结合,故多糖得率最高,·OH清除率也最大。当 pH 值高于或低于最适 pH 值时,活性基团的解离状态可能发生改变,酶与底物的结合力减弱,酶反应速率降低,多糖得率降低^[14],·OH清除率也减小。因此,选择 pH 值为5.0。

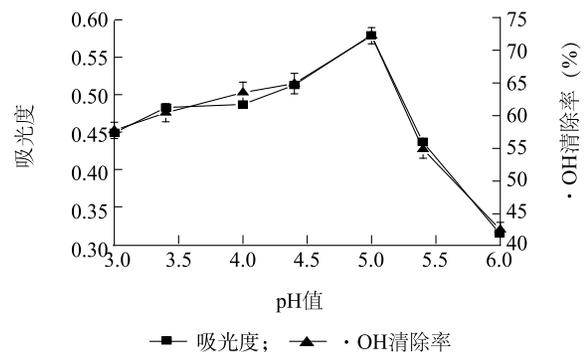


图2 酶解 pH 值对多糖得率和·OH清除率的影响

Fig.2 Effects of pH on polysaccharide yield and clearance rate of ·OH

2.1.3 酶解时间对多糖得率及·OH清除率的影响

图3显示,马齿苋多糖吸光度随着酶解时间的增加而增加,·OH清除率在酶解时间为80 min时达到最大,之后随酶解时间的增加而下降。说明,酶解时间对多糖得率有着比较明显的影响,时间过短,多糖提取不充分,时间过长,可能引起多糖分解,导致其对·OH的清除率减少。综合考虑,确定酶解时间为80 min。

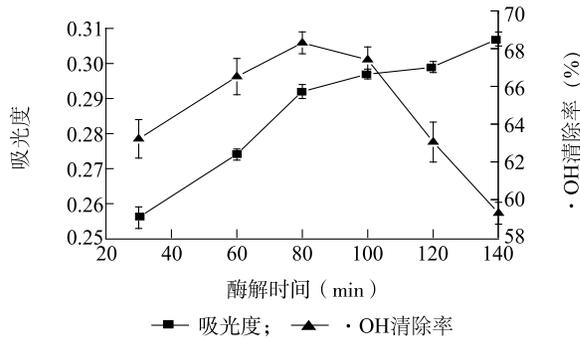


图3 酶解时间对多糖得率及·OH清除率的影响

Fig.3 Effects of enzymolysis time on polysaccharide yield and clearance rate of ·OH

2.1.4 酶解温度对多糖得率及·OH清除率的影响

图4显示,酶解温度为35℃时吸光度和·OH清除率最高,酶解温度为35~55℃时,随着酶解温度升高,吸光度和·OH清除率下降,这可能是由于温度升高导致酶失活。酶解温度高于55℃时,吸光度和·OH清除率又开始上升,这是因为提取剂温度的升高使多糖的提取率增加。因此,最适酶解温度为35℃。

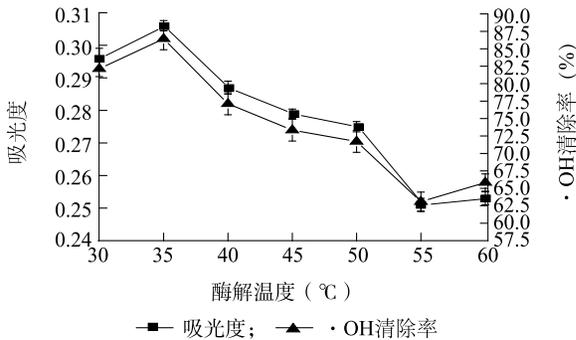


图4 酶解温度对多糖得率及·OH清除率的影响

Fig.4 Effects of hydrolysis temperature on polysaccharide yield and clearance rate of ·OH

2.1.5 料液比对多糖得率及·OH清除率的影响

表2显示,当料液比为1:30(g/ml)时,吸光度及·OH清除率最高。原因可能是当提取剂比较少时,不利于多糖的溶出,使得多糖得率较低,对·OH的清除率也较低,而当提取剂体积过大时,酶浓度降低导致酶解作用下降,并且多糖成分已充分溶出,因此多糖得率会趋于恒定甚至下降^[15],从而对·OH的清除率恒定甚至降低。因此,采用料液比1:30

(g/ml)来完成进一步的优化试验。

表2 料液比对多糖得率及·OH清除率的影响

Table 2 Effects of the solid-liquid ratio on polysaccharide yield and clearance rate of ·OH

料液比 (g/ml)	·OH清除率 (%)	吸光度
1:10	35.32±2.54	0.196 0±0.024 8
1:20	62.53±1.56	0.302 0±0.015 2
1:30	73.22±1.24	0.406 0±0.012 1
1:40	68.89±1.58	0.382 0±0.013 8
1:50	63.44±2.00	0.350 0±0.015 8

2.2 响应面法优化试验

在单因素试验的基础上,采用 Design-Expert 8.0.6 软件中 Box-Behnken 的试验设计,以酶添加量、酶解温度、料液比为自变量,以马齿苋多糖得率和·OH清除率为响应值,具体试验方案见表3。

表4显示,回归模型对马齿苋多糖得率的影响显著($P=0.024 1 < 0.050 0$,相关系数为0.924 4),回归模型对·OH清除率的影响极显著($P=0.001 6 < 0.010 0$,相关系数为0.975 6),表明该回归模型的拟合情况良好,回归模型的代表性较好,能准确地预测实际情况。对多糖得率的回归模型进行分析,酶解温度与料液比的 F 值较大,交互作用较大;对·OH清除率的回归模型进行分析,酶添加量与酶解温度的 F 值较大,交互作用较大。

多糖得率的校正决定系数为0.788 3,表明此模型能解释78.83%的多糖得率的变化。·OH清除率的校正决定系数为0.931 8,表明此模型能解释93.18%的·OH清除率变化。多糖得率的变异系数为0.095 1%,·OH清除率的变异系数为0.626 1%,说明试验离散性小,该模型拟合程度较好,试验误差小,可以用来进行分析和预测。由线性项可以看出,酶解温度对多糖提取率的影响最大,其次是酶添加量,第三是料液比。

采用 Design-Expert.V8.0.6 软件制作响应面图,根据响应面图曲面坡度越陡峭,等高线越密集成椭圆形表示两因素交互影响越大的原则^[16]进行分析。多糖得率响应面图(图5)显示,酶解温度与料液比之间的交互作用较大。·OH清除率响应面图(图6)显示,酶添加量与酶解温度之间的交互作用较大,与表4结论一致。

表3 Box-Behnken 设计方案及试验结果

Table 3 Design scheme and test results of Box-Behnken

试验编号	酶添加量 (g/kg)	酶解温度 (°C)	料液比 (g/ml)	多糖得率 (%)		·OH清除率 (%)	
				实测值	预测值	实测值	预测值
1	7.5	30	1:30	3.73	3.74	53.3	50.3
2	7.5	40	1:30	4.56	4.79	60.6	59.8
3	12.5	30	1:30	5.08	4.91	54.7	55.5
4	12.5	40	1:30	5.75	6.06	46.3	49.3
5	10.0	30	1:20	3.96	4.11	41.0	42.3
6	10.0	30	1:40	5.25	5.26	45.8	44.9
7	10.0	40	1:20	4.20	4.24	69.1	70.1
8	10.0	40	1:40	5.55	5.29	72.0	70.8
9	7.5	35	1:20	4.57	4.45	39.8	41.6
10	12.5	35	1:20	5.69	5.38	42.0	40.0
11	7.5	35	1:40	3.98	4.23	67.4	69.5
12	12.5	35	1:40	5.58	5.75	67.5	65.8
13	10.0	35	1:30	6.33	6.13	61.5	60.7
14	10.0	35	1:30	6.21	6.13	59.6	60.7
15	10.0	35	1:30	5.86	6.13	61.0	60.7

表4 多糖得率和·OH清除率二项式回归模型系数显著性检验

Table 4 Significance test of coefficients in binomial regression model of polysaccharide yield and ·OH clearance

方差来源	多糖得率(Y_1)					·OH清除率(Y_2)				
	平方和	自由度	均方和	F值	P值	平方和	自由度	均方和	F值	P值
模型	9.590 0	9	1.070 0	6.790	0.024 1	1 628.890 0	9	180.990 0	22.250	0.001 6
A	2.420 0	1	2.420 0	15.430	0.011 1	5.440 0	1	5.440 0	0.670	0.450 5
B	3.000 0	1	3.000 0	19.140	0.007 2	14.050 0	1	14.050 0	1.730	0.245 9
C	0.011 0	1	0.011 0	0.072	0.799 5	1 441.850 0	1	1 441.850 0	177.220	<0.000 1
AB	0.002 5	1	0.002 5	0.016	0.904 4	61.600 0	1	61.600 0	7.570	0.040 2
AC	0.002 5	1	0.002 5	0.016	0.904 4	0.900 0	1	0.900 0	0.110	0.752 6
BC	0.090 0	1	0.090 0	0.570	0.482 9	1.100 0	1	1.100 0	0.140	0.727 9
A ²	2.030 0	1	2.030 0	12.950	0.015 6	16.090 0	1	16.090 0	1.980	0.218 6
B ²	0.990 0	1	0.990 0	6.280	0.054 0	88.200 0	1	88.200 0	10.840	0.021 7
C ²	1.640 0	1	1.640 0	10.460	0.023 1	9.900 0	1	9.900 0	1.220	0.320 2
残差	0.780 0	5	0.160 0			40.680 0	5	8.140 0		
失拟	0.700 0	3	0.230 0	5.370	0.161 1	38.740 0	3	12.910 0	13.310	0.070 7
纯误差	0.087 0	2	0.043 0			1.940 0	2	0.970 0		
总和	10.370 0	14				1 669.570 0	14			

A:酶添加量;B:酶解温度;C:料液比。

2.3 验证试验

利用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验结果进行

优化,果胶酶酶解提取马齿苋多糖的最佳工艺参数为:酶解 pH 值 5.0、酶解时间 80 min、酶添加量

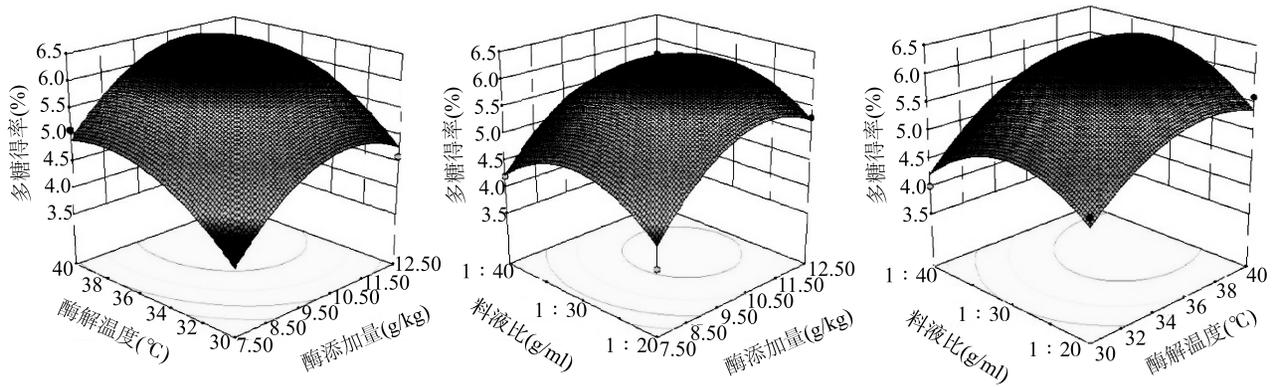


图 5 多糖得率的三维响应面图

Fig.5 Three-dimensional response surface of polysaccharide yield

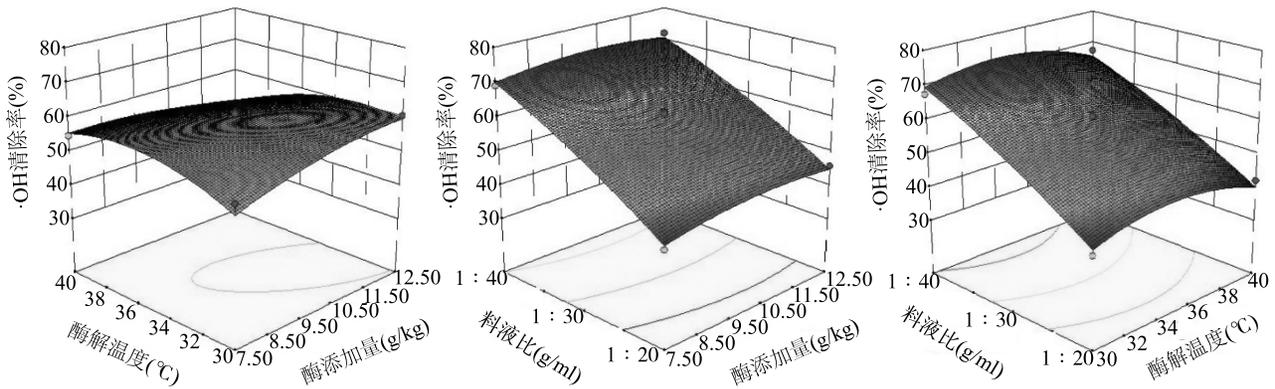


图 6 ·OH清除率的三维响应面图

Fig.6 Three-dimensional response surface of ·OH clearance

10.67 g/kg、料液比 1 : 37 (g/ml)、酶解温度 36.4 °C。在此条件下,马齿苋多糖得率理论值为 6.06%,对·OH清除率为 68.40%。为检验响应面法所得结果的准确性和可靠性,又考虑到实际操作的情况,将提取工艺参数修正为:酶解 pH 值 5.0、酶解时间 80 min、酶添加量 10.67 g/kg、料液比 1 : 37 (g/ml)、酶解温度 36.0 °C,做 3 次平行试验,多糖平均得率为 6.20%,与理论预测值相比,相对标准偏差为 2.29%,基于响应面法所得的优化提取工艺参数准确可靠。

2.4 马齿苋多糖与V_c抗氧化活性比较

图 7 显示,随着马齿苋多糖和V_c体积的增加,DPPH 清除率也逐渐增加,所试范围内马齿苋多糖提取液(多糖质量分数为 0.053%)对 DPPH 的清除能力小于V_c(质量分数为 0.100%)。

图 8 显示,随着马齿苋多糖和V_c体积的增加,

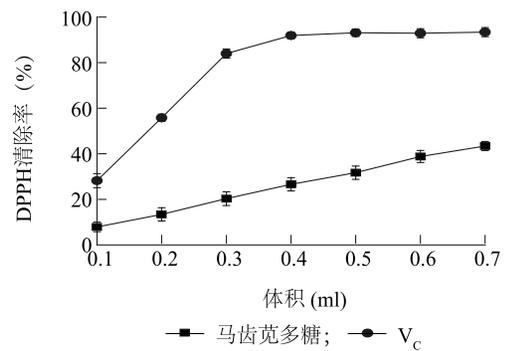


图 7 马齿苋多糖和V_c对 DPPH 清除率的比较

Fig.7 Comparison of DPPH clearance rate between *Portulaca oleracea* L. polysaccharide and V_c

Ce(IV) 还原能力逐渐增加,并呈现良好的线性关系,所试范围内马齿苋多糖提取液对 Ce(IV) 的还原能力大于V_c。

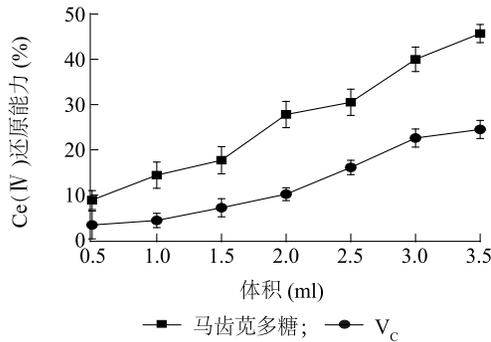


图8 马齿苋多糖和V_c对Ce(IV)还原能力的比较

Fig.8 Comparison of Ce(IV) reduction ability between *Portulaca oleracea* L. polysaccharide and V_c

3 结论

在单因素试验的基础上,采用响应面法对果胶酶酶解提取马齿苋多糖的工艺进行优化,影响马齿苋多糖提取的工艺因素表现为酶解温度>酶添加量>料液比。最终确定了其最优工艺条件为:酶解pH值为5.0,酶解时间为80 min,酶添加量为10.67 g/kg、料液比为1:37(g/ml)、酶解温度为36.4℃。回归模型预测多糖得率为6.06%,验证试验的马齿苋多糖得率为6.20%。体外抗氧化试验结果表明,马齿苋多糖具有较好的抗氧化性。

参考文献:

- [1] 张志强,梁魁景,高小宽,等.超声波辅助法优化马齿苋多糖的提取工艺[J].食品研究与开发,2017,38(8):41-45.
- [2] 胡庆娟,吴光杰,牛庆川,等.响应面法优化木瓜蛋白酶法脱马齿苋多糖蛋白工艺[J].食品科学,2018,39(20):246-252.

- [3] 陈凌,骆卢佳,曹巧巧,等.马齿苋不同溶剂提取物对核桃油的抗氧化动力学研究[J].中国粮油学报,2018,33(11):39-44.
- [4] FAN T, HU J, FU L, et al. Optimization of enzymolysis-ultrasonic assisted extraction of polysaccharides from *Momordica charantia* L. by response surface methodology [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 115: 701-706.
- [5] 尹学伟,王秋月,李清虎,等.响应面法优化糯高粱多糖提取工艺及其抗氧化活性分析[J].南方农业学报,2019,50(7):1572-1578.
- [6] 钱志伟,王会晓,杨海蛟.酶法提取马齿苋多糖[J].中国农学通报,2011,27(5):475-478.
- [7] 吕萍,李倩.马齿苋多糖三种提取方法的比较研究[J].食品工业,2014,35(8):82-84.
- [8] 米热班古·木太力甫,敬思群.马齿苋多糖提取工艺优选及活性初筛[J].食品与发酵工业,2013,39(5):246-250.
- [9] 李良,金文娟.枸杞多糖含量测定方法的比较分析[J].食品研究与开发,2016,37(11):143-146.
- [10] 陈凌,陈召桂,骆卢佳,等.不同方法提取马齿苋多糖的抗氧化活性比较[J].食品研究与开发,2015,36(22):14-18.
- [11] 陈凌,贺伟强,陶昆,等.不同采收期马齿苋活性成分含量及抗氧化性的变化[J].北方园艺,2015(8):157-160.
- [12] 陈凌,骆卢佳,曹巧巧.冷藏对马齿苋榨汁抗氧化能力的影响[J].安徽农业大学学报,2019,46(3):510-514.
- [13] 邹雪,李然洪,周靖,等.果胶酶处理对蓝莓半甜红酒风味成分影响的研究[J].酿酒科技,2013(9):37-42,48.
- [14] 蒋德旗,陈晓白,农贵珍,等.鸡骨草多糖的酶法提取工艺优化及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2019,40(3):153-158.
- [15] 游金坤,朱岩,高观世,等.水酶法提取金耳多糖的工艺优化[J].食品工业科技,2019,40(4):189-194.
- [16] 江宇琪,王琪,刘琨毅,等.Box-Behnken 中心组合设计优化复合奶酒发酵工艺[J].中国乳品工业,2019,47(4):60-64.

(责任编辑:王妮)