

响应面法优化超声提取木槿花多酚的工艺研究

张雪娇¹,金晨钟^{1,2},胡一鸿^{1,2},谭显胜¹,何丽芳¹,王艳¹,陈勇^{1,2,*}

(1.湖南人文科技学院农业与生物技术学院,湖南娄底 417000;

2.湖南省 2011 协同创新中心,湖南娄底 417000)

摘要:以木槿花为原料,利用响应面法对提取木槿花多酚的工艺条件进行优化。在单因素实验的基础上,以超声功率、超声时间、料液比、乙醇体积分数为影响因素,利用 Box-Behnken 中心组合方法进行 4 因素 3 水平实验设计,以多酚得率为响应值进行响应面分析。结果表明,最优提取条件是:超声功率 112 W,时间 49 min,料液比 1:36 (g/mL),乙醇体积分数 69%,在此条件下木槿花多酚得率达 20.507 mg/g,与理论值 20.518 mg/g 相近,比用乙醇溶液浸提的多酚得率提高 12.91%;超声波辅助法提取木槿花多酚简便、提取率高,回归模型合理可靠,可用于实际预测。

关键词:木槿花,多酚,响应面,超声辅助提取

Ultrasonic-assisted extraction technology optimization of polyphenols from *Hibiscus syriacus* L.

ZHANG Xue-jiao¹, JIN Chen-zhong^{1,2}, HU Yi-hong^{1,2},

TAN Xian-sheng¹, HE Li-fang¹, WANG Yan¹, CHEN Yong^{1,2,*}

(1. Department of Agriculture and Biotechnology, Hunan University of Humanities, Science and Technology, Loudi 417000, China;

2. Hunan Provincial Collaborative Innovation Center, Loudi 417000, China)

Abstract: The ultrasonic-assisted extraction of polyphenols from *Hibiscus syriacus* L. was optimized by using response surface methodology. According to the previous study of single variable test, an ultrasonic procedure for the extraction of polyphenols from *H. syriacus* L. was established. A three-level-four-factor test was employed in this study to optimize the factorial parameters (ultrasonic power, ultrasonic time, ratio of solvents to raw material, and ethanol concentration) by employing Box-Behnken design (BBD) of response surface methodology, and the polyphenols yield was taken as the response of the designed experiments. The results showed that the optimal extraction conditions for the extraction of polyphenols from *H. syriacus* L. were ultrasonic power 112 W, ultrasonic time 49 min, ratio of solvents to raw material 1:36 (g/mL), and ethanol concentration 69%, respectively. Under these conditions, the yield of *H. syriacus* L. polyphenols was 20.507 mg/g, close to the theoretical value 20.518 mg/g. Extraction rate of the ultrasonic assisted extraction of polyphenols from *H. syriacus* L. was increased by 12.91% as compare to the ethanol extraction. The study revealed that this ultrasonic-assisted methodology, which was simply and high efficient, was suitable for extraction of *H. syriacus* L. polyphenols, and the regression model was reliable for the yield prediction in practice.

Key words: *Hibiscus syriacus* L.; polyphenols; response surface methodology; ultrasonic-assisted technology

中图分类号:TS201.1 文献标识码:B 文章编号:1002-0306(2015)21-0228-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.21.039

植物多酚又称为植物单宁,是植物体内复杂酚类的次生代谢物,其含量仅次于纤维素、半纤维素和木质素,具有独特的生理活性和药用价值^[1],在制药、食品以及精细化工等领域具有广阔的应用前景。近

年来,植物多酚因其在人体健康方面的积极作用成为了研究热点^[2]。研究表明,植物多酚具有较强的清除自由基、抗氧化活性、抗病毒、抗微生物、抗肿瘤、抗辐射、抗诱变、抗衰老以及保护心血管系统等的重

收稿日期:2015-03-10

作者简介:张雪娇(1985-),女,硕士,讲师,研究方向:天然产物提取,E-mail:380711974@qq.com。

* 通讯作者:陈勇(1974-),男,博士,副教授,研究方向:天然产物提取,E-mail:renwen1000@sina.com。

基金项目:湖南省教育厅项目(13C442);湖南省自然科学基金(12JJ6019);湖南省高校产业化培育项目(13CY030);国家大学生创新性实验项目(201410553005,2014-502)。

要功能^[3]。木槿(*Hibiscus syriacus* L.), 又名木锦、篱障花、朱槿, 为锦葵科木槿属落叶灌木或小乔木^[4], 其花、果、根、叶和皮均可入药。木槿花不仅具有观赏价值, 而且还具有食用和药用价值。木槿花含有蛋白质、纤维素、胡萝卜素、多种维生素等大量人体所需营养成分和钙、镁、锌、铜、磷、钾、硒、铬等微量元素, 并含有肥皂草苷、异牡荆素、皂苷、黄酮类化合物等, 具有抗炎、降血脂、抑菌, 治疗肠风泻血。目前国内外已经对木槿属植物进行了一些研究, 如张婕等^[5]研究了木槿花中花青素的提取; 吕惠卿等^[4]研究了木槿花中总黄酮的提取; 蔡定建等^[6]对木槿花挥发油的成分进行了分析; 金月亭等^[7]对木槿花生物活性进行了初步研究; Bong-Sik Yun 等^[8]从木槿根皮中提取出环状缩氨酸, 具有抗菌、抗癌的功能; Chang 等^[9]报道木槿属植物的花青素可以诱导癌细胞凋亡; K.R.Christian 等^[10]用正己烷、乙酸乙酯和甲醇对三种木槿属植物的花瓣进行提取, 表明其提取物具有抗氧化活性和降低血液黏度的作用。但有关木槿花多酚的研究报道甚少, Folashade B.Awe 等^[11]在研究一种由可可、木槿花提取物、姜汁混合而成的饮料中发现, 木槿花提取物的总酚含量较高, 且具有较强的抗氧化活性。

超声波提取法是通过超声波的机械破损能作用, 利用空化效应、机械效应和热效应破坏植物细胞, 使溶媒渗透到植物细胞中, 以期达到缩短浸提时间的效果。该方法具有提取温度低、得率高、操作简便快捷、成本低廉、提取物结构不易被破坏等特点, 目前已广泛应用于多种天然植物资源, 如茶叶^[12]、葡萄^[13]、石榴^[14]、板栗^[3]、野木瓜^[15]、紫菜^[16]、苹果^[17]中多酚的提取, 但目前采用该方法对木槿花多酚的提取研究尚未见报道。本研究选用超声辅助溶剂提取木槿花多酚, 运用 Folin-Ciocalteu 法测定木槿花多酚的得率, 并在单因素实验的基础上采用响应面法优化实验设计, Design-Expert7.0 软件分析数据, 确定最佳提取工艺条件, 为木槿花多酚的深加工提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

木槿花 6~9 月采自湖南株洲, 经湖南省娄底市农科所刘泽发副研究员鉴定为木槿(*Hibiscus syriacus* L.)的花部, 冻干, 粉碎, 80 目过筛备用; 没食子酸标准品、福林-酚试剂(FC) 美国 Sigma 公司; 乙醇、Na₂CO₃(分析纯) 天津市光复科技发展有限公司。

SK3300HP 型超声波清洗器 重庆东悦仪器有限公司; UV-1240 紫外分光光度计 日本岛津; FD-2A 冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; D-37520 冷冻离心机 Thermo Fisher。

1.2 实验方法

1.2.1 福林酚法测定木槿花多酚含量 采用 Folin-Ciocalteu 法确定最大吸收波长^[18-19]。分别量取 0.04 mg/mL 没食子酸标准液 0.5 mL 和样品溶液 0.5 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加入 0.5 mL FC 试剂, 摆匀, 5 min 后, 加入 20% Na₂CO₃ 溶液 1 mL, 混匀后定容, 30 ℃ 下避光反应 1.5 h。在 330~1100 nm 波长

范围扫描, 最佳吸收波长为 765 nm。绘制以吸光度(A)与浓度(C)的标准曲线, 并得到回归方程为 A = 2.5618C + 0.0169, R² = 0.9993。提取液精确吸取 0.5 mL, 按照上述方法测定, 样品中多酚物质得率(以没食子酸计, mg/g) GAE = C × V × N/W

式中, C 为根据标准曲线求得的样品浓度值(mg/mL); V 为粗提液体积(mL); N 为稀释倍数; W 为原料重量(g)。

1.2.2 木槿花中多酚的提取方法 称取木槿花粉 1 g, 加入装有一定浓度乙醇水溶液的 100 mL 锥形瓶中, 用保鲜膜封口, 避光放置润湿 20 min, 使溶液充分渗入细胞组织内, 经超声一定时间后真空抽滤, 然后 4000 r/min 离心, 收集上层清液, 定容到 50 mL 容量瓶中待测, 每组做 3 次平行实验。

1.2.3 单因素实验 按照 1.2.1 中的方法, 用超声波功率 130 W、超声时间(提取时间)40 min、料液比 1:20(g/mL), 乙醇浓度 60%, 作为单因素筛选实验的基础条件。研究超声波功率(80、105、130、155、180 W)、超声时间(20、30、40、50、60 min)、料液比(1:15、1:20、1:25、1:30、1:35)、乙醇浓度(50%、60%、70%、80%、90%)中的某一因素时, 其他条件保持不变, 提取多酚, 平行实验 3 次, 测定多酚得率。显著性差异分析采用 SPSS13.0(LSD 法, p < 0.05), 用小写英文字母在图表上标注。

1.2.4 超声波辅助提取木槿花多酚工艺 RSM 优化实验 在单因素实验基础上, 综合考虑各因素对木槿花中多酚物质得率的影响, 采用统计分析软件 Design-Expert7.0 建立 4 因素 3 水平的响应面分析实验^[20-21], 通过实验确定最优提取工艺, 以木槿花多酚得率作为响应值, 选择超声波功率、超声时间、料液比、乙醇体积分数为自变量, 变量编码值根据下列方程确定: $\chi_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i$

式中: χ_i —自变量代码值; X_i —自变量真实值; X_0 —在实验中心点自变量的真实值; ΔX_i —自变量的变化步长。自变量 X_1 (超声功率, W), 自变量 X_2 (超声时间, S), 自变量 X_3 (料液比), 自变量 X_4 (乙醇体积分数, %) 4 个自变量因素编码及水平见表 1。

表 1 自变量因素编码及水平

Table 1 Independent variable codings and levels

水平	因素			
	X_1 超声波 功率(W)	X_2 超声时间 (min)	X_3 料液比 (g·mL ⁻¹)	X_4 乙醇体积 分数(%)
-1	105	40	1:30	60
0	130	50	1:35	70
1	155	60	1:40	80
编码值	χ_1	χ_2	χ_3	χ_4

注: 对真实值的特征编码: $\chi_1 = (X_1 - 130) / 25$; $\chi_2 = (X_2 - 50) / 10$; $\chi_3 = (X_3 - 35) / 5$; $\chi_4 = (X_4 - 70) / 10$ 。

2 结果与讨论

2.1 超声波功率对多酚得率的影响

如图 1A 所示, 当提取木槿花多酚的超声波功率设定在 80~180 W 之间, 随着超声波功率的增大, 多

酚得率提高,当功率 130 W 时多酚得率最高,而当大于功率 130 W 时,多酚得率略有下降,在一定时间内,超声波功率越高,体系升温越快,固液扩散速度也越快,有利于物料中有效成分的浸出。然而,当功率过大时,会破坏多酚的结构,多酚易发生降解,因此选取 130 W 为最佳提取功率。

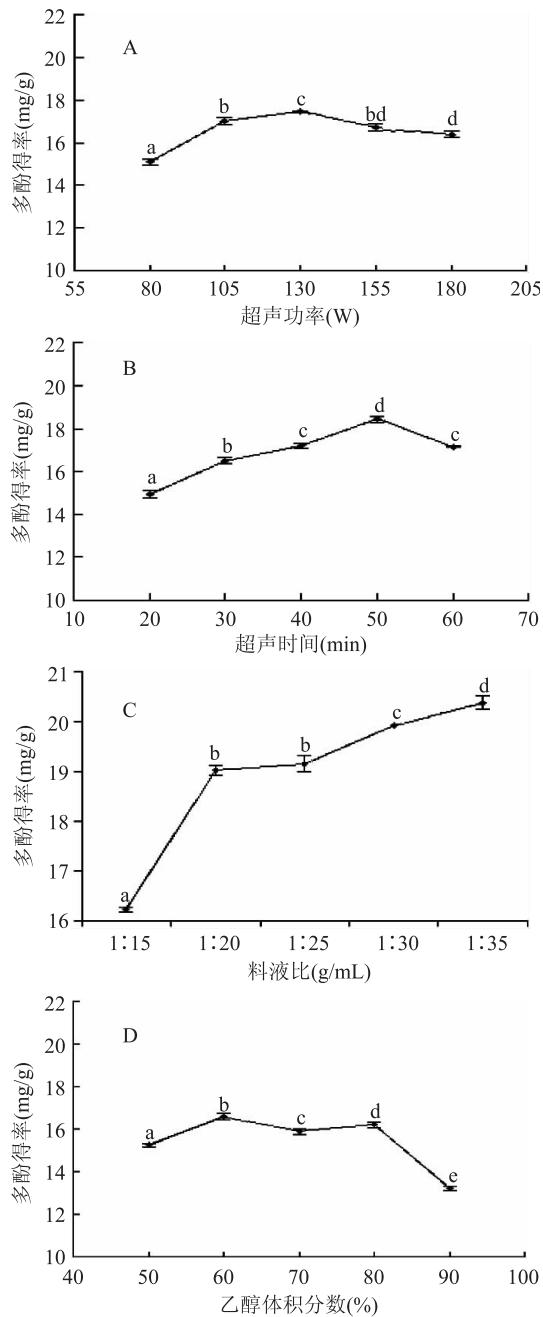


图 1 木槿花多酚提取单因素实验结果

Fig.1 Single variable test of polyphenols extraction from *Hibiscus syriacus* L.

2.2 超声时间对多酚得率的影响

从图 1B 可以看出,当超声时间为 50 min 时,多酚得率最高,随着时间的延长,多酚得率有所下降。其原因可能是超声时间过长使细胞内温度升高,以及多酚暴露在空气中时间的延长,使得多酚发生氧化、缩合、降解等反应的概率增加,导致木槿花多酚的表观得率下降。因此,选取 50 min 作为较佳超声时间。

2.3 料液比对多酚得率的影响

由图 1C 可知,随着料液比的增加,木槿花多酚得率增加,说明溶剂比例大有利于多酚物质的溶出。但当料液比增加到 1:30 (g/mL) 后,多酚得率基本保持不变,溶剂用量多少,关系生产成本,综合考虑多酚得率,确定最佳料液比为 1:30 (g/mL)。

2.4 乙醇体积分数对多酚得率的影响

如图 1D 所示,随着乙醇体积分数的增加,多酚得率整体呈先升高后降低的趋势。当乙醇体积分数为 60% 时提取效果最佳。由于多酚是水溶性物质,根据相似相溶原理,提取多酚需使用与多酚极性相似的溶剂以使其充分溶出。多酚在植物体内常以氢键的形式与蛋白质等形成稳定复合物,过低体积分数的乙醇不足以使氢键破坏或破坏程度不够,导致多酚得率不高;过高体积分数的乙醇使溶剂极性降低,导致多酚得率下降,因此,多酚得率在乙醇体积分数为 60%~80% 之间有所波动,考虑到节省试剂降低提取成本及乙醇体积分数过高会增加脂溶性物质的溶出,不利于后续多酚的分离纯化^[14],确定最优乙醇体积分数为 60%。

2.5 响应面优化实验

用 Design-Expert7.0 软件对实验数据进行回归分析。Box-Behnken 的 4 因素 3 水平实验共 29 个实验点,前 24 个是析因点,自变量取值在 X_1, X_2, X_3, X_4 所构成的三维顶点;后 5 个为零点,为区域的中心点,用来估计实验误差。木槿花多酚得率见表 2。

2.5.1 模型建立与显著性检验 运用 Design-Expert7.0 软件对表 2 实验数据进行多元回归拟合,获得响应值—多酚得率(Y)与 4 个因素(超声功率、超声时间、料液比、乙醇体积)二次多项式回归模型:

$$Y = -221.67 + 0.12X_1 + 1.70X_2 + 5.36X_3 + 2.84X_4 + 0.0021X_1X_2 - 0.0027X_1X_3 + 0.00050X_1X_4 + 0.0048X_2X_3 - 0.00049X_2X_4 - 0.0012X_3X_4 - 0.00073X_1^2 - 0.21X_2^2 - 0.073X_3^2 - 0.021X_4^2$$

表 2 响应值中木槿花多酚的得率(实验值)与回归方程预测值的相关系数 R^2 为 0.9489, 拟合状况良好,说明建立的回归模型可行。对回归方程系数进行显著性检验(表 3),由 F 值可知 4 个因素对木槿花多酚得率影响的排序为:超声功率(X_1)>乙醇体积分数(X_4)>料液比(X_3)>超声时间(X_2)。其中,作用显著的是 X_1^2 , 极显著的是 X_1, X_2^2, X_3^2, X_4^2 。可见,各因素对木槿花多酚得率的影响不是简单的线性关系。在 $\alpha=0.05$ 显著水平下剔除不显著项后,对模型式进行优化,其结果: $Y = -221.67 + 0.12X_1 - 0.00073X_1^2 - 0.21X_2^2 - 0.073X_3^2 - 0.021X_4^2$ 。

2.5.2 反应条件的优化及模型验证 结合同归模型的数学分析结果,超声波辅助提取木槿花多酚最佳工艺条件为:超声功率 111.91 W, 超声时间 48.91 min, 料液比 1:35.68 g/mL, 乙醇体积分数 69.05%。此时,木槿花多酚的理论得率达 20.518 mg/g。为检验响应面的可靠性,采用最佳提取工艺条件做木槿花多酚超声提取的验证实验。同时考虑实际操作的局限性,将工艺参数修正为超声功率 112 W, 超声时间 49 min,

乙醇体积分数 69%, 料液比 1:36(g/mL)。在此修正条件下做 3 次平行验证实验, 测得木槿花多酚得率为 20.507 mg/g, 与理论预测值 20.518 mg/g 基本吻合, 说明采用响应面法优化得的提取条件准确可靠。

表 2 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 2 Box-Behnken design and data of the investigated responses of extracts

实验号	X ₁ 超声 功率 (W)	X ₂ 超声 时间 (min)	X ₃ 料液比 (g·mL ⁻¹)	X ₄ 乙醇 体积分数 (%)	多酚得率 (mg/g)
1	-1	-1	0	0	18.650
2	1	-1	0	0	17.361
3	-1	1	0	0	16.503
4	1	1	0	0	17.348
5	0	0	-1	-1	16.216
6	0	0	1	-1	16.503
7	0	0	-1	1	15.956
8	0	0	1	1	16.008
9	-1	0	0	-1	19.300
10	1	0	0	-1	17.335
11	-1	0	0	1	18.181
12	1	0	0	1	16.711
13	0	-1	-1	0	16.360
14	0	1	-1	0	16.086
15	0	-1	0	0	16.321
16	0	1	1	0	17.010
17	-1	0	-1	0	17.947
18	1	0	-1	0	17.296
19	-1	0	1	0	19.639
20	1	0	1	0	17.622
21	0	-1	0	-1	16.360
22	0	1	0	-1	16.633
23	0	-1	0	1	15.930
24	0	1	0	1	16.008
25	0	0	0	0	20.160
26	0	0	0	0	20.302
27	0	0	0	0	20.120
28	0	0	0	0	20.393
29	0	0	0	0	20.432

2.6 超声波辅助木槿花多酚提取法与溶剂提取法的比较

通过前期单因素和正交实验, 溶剂法提取木槿花多酚的最佳条件为: 提取温度 70 °C, 提取时间 2 h, 乙醇体积分数 70%, 料液比 1:40(g/mL), 在此条件下, 其多酚得率为 18.163 mg/g(本文具体数据未列出)。在超声功率 112 W, 超声时间 49 min, 乙醇体积分数 69%, 料液比 1:36(g/mL) 条件下, 用超声波辅助提取法提取木槿花多酚, 木槿花多酚得率为 20.507 mg/g。相对溶剂提取法, 超声波辅助提取法提取木槿花多酚, 得率提高了 12.91%。这可能是超声促使样品中偶极分子旋转导致氢键破裂及离子迁移, 加速了溶剂对样品的渗透, 并使多酚很快溶解于溶剂

中; 此外, 超声波具有生物效应, 也会使样品细胞壁破裂, 从而加速多酚从细胞中释放^[22-23]。

表 3 木槿花多酚提取的方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model for the extraction of *Hibiscus syriacus* L. polyphenols

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
X ₁	3.57	1	3.57	14.20	0.0021	**
X ₂	0.16	1	0.16	0.64	0.4358	
X ₃	0.88	1	0.88	3.48	0.0832	
X ₄	1.05	1	1.05	4.18	0.0601	
X ₁ X ₂	1.14	1	1.14	4.53	0.0517	
X ₁ X ₃	0.47	1	0.47	1.85	0.1948	
X ₁ X ₄	0.061	1	0.06	0.24	0.6294	
X ₂ X ₃	0.23	1	0.23	0.92	0.3534	
X ₂ X ₄	0.0095	1	0.0095	0.038	0.8487	
X ₃ X ₄	0.014	1	0.014	0.055	0.8182	
X ₁ ²	1.36	1	1.36	5.40	0.0357	*
X ₂ ²	29.23	1	29.23	116.20	<0.0001	**
X ₃ ²	21.57	1	21.57	85.75	<0.0001	**
X ₄ ²	27.30	1	27.30	108.5	<0.0001	**
模型	65.35	14	4.67	18.55	<0.0001	
残差	3.52	14	0.25			
失拟项	3.45	10	0.34	4.32	0.0588	
纯误差	0.076	4	0.02			
总和	68.87	28				

注: ** 表示 $p < 0.01$, 极显著; * 表示 $p < 0.05$, 显著。

3 结论

采用 Folin-Ciocalteu 法测定木槿花多酚得率, 木槿花多酚的最大吸收峰在波长 750 nm 处。应用 Design-Expert7.0 软件, 采用 Box-Behnken Design 建立了超声功率(X₁)、超声时间(X₂)、料液比(X₃)、乙醇体积分数(X₄)与木槿花提取液多酚得率之间数学模型, 即: $Y = -221.67 + 0.12X_1 - 0.00073X_1^2 - 0.21X_2^2 - 0.073X_3^2 - 0.021X_4^2$ 。回归分析表明, 相关系数 $R^2 = 0.9489$, 回归模型显著, 拟合程度好, 有实际应用前景。通过显著性检验, 各因素的影响排序为: 超声功率(X₁) > 乙醇体积分数(X₄) > 料液比(X₃) > 超声时间(X₂)。

通过单因素和响应面实验得到最佳超声波提取条件为: 超声功率 112 W, 超声时间 49 min, 料液比 1:36(g/mL), 乙醇体积分数 69%。在此条件下做验证实验, 得到木槿花多酚得率为 20.507 mg/g。该值与理论预测值 20.518 mg/g 基本吻合, 说明响应面模型可预测理论得率并用于木槿花多酚提取工艺条件的优化。相比于溶剂浸提法, 超声波辅助提取法木槿花多酚得率提高了 12.91%, 可显著缩短提取时间, 提高效率, 且提取效果好。

参考文献

- [1] 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [2] 程正涛, 丁庆波, 张昊, 等. 海红果多酚提取工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 172-176.

(下转第 236 页)

Expert”软件中的 Optimization 功能对制曲工艺进行优化,得到其最佳工艺条件为:培养温度 33 ℃,接种量 0.6 mL/瓶,培养时间 115 h。在此条件下糖化酶活力的预测值为 295.2 U/g。在本实验最佳培养条件下对预测值进行验证,实际测得的糖化酶活力为 290.5 U/g,与模型预测值基本一致,从而验证了模型的可靠性。

随着白酒行业的发展,纯种根霉酒曲替代传统小曲应用于小曲酒的生产势不可挡,在这种情况下,必然会有越来越多的小曲酒企业应用这种工艺。在这种背景下,本实验达到了预期的效果,同时为接下来的纯种根霉酒曲酿酒实验奠定了基础。

参考文献

- [1] 谭映月,胡萍,谢和.我国白酒酿造微生物多样性的研究现状及展望[J].酿酒科技,2011,(11):100-105.
- [2] Lv XC, Huang ZQ, Zhang W, et al. Identification and characterization of filamentous fungi isolated from fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing[J].The Journal of General and Applied Microbiology,2012,58(1):33-42.
- [3] 于博,董开发,张凤英.广东肇庆传统酒曲优势霉菌的分离及鉴定[J].中国食品学报,2007,(1):95-98.
- [4] Hye - Ryun Kim, Jae - Ho Kim, Dong - Hoon Bai, et al. Identification and characterization of useful fungi with α -amylase activity from the Korean traditional Nuruk[J].Mycobiology,2011,39(4):278-282.
- [5] 王新惠,李再新,刘达玉,等.米根霉糖化酶酶促反应条件

(上接第 231 页)

- [3] 石恩慧,李红,谷明灿,等.响应面法优化超声提取板栗总皂多酚工艺条件[J].中国食品学报,2013,13(5):69-76.
- [4] 吕惠卿,吴晓莉.木槿花总黄酮超声提取工艺的优化[J].中国中医药科技,2009,16(6):461-463.
- [5] 张婕,李瑞光,陈卫航.木槿花中原花青素的提取工艺研究[J].郑州大学学报,2009,30(4):53-57.
- [6] 蔡定建,戎敢,靖青秀,等.木槿花挥发油化学成分的 GC/MS 分析[J].中国农学通报,2009,25(21):93-96.
- [7] 金月亭,应铁进.木槿花生物活性的初步研究[J].中国食品学报,2008,8(3):37-41.
- [8] Yun B S, Ryo I J, Hibispeptin B. A novel cyclic peptide from hibiscus syriacus[J].Tetrahedron,1998,54:15155-15160.
- [9] Chang Y C, Huang K X. Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL - me - diatedmacrophages apoptosis [J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44: 1015 - 1023.
- [10] Christian K P, Nair M G. Antioxidant and cy - clooxygenase inhibitory activity of sorrel [J].Journal of Food Composition and Analysis,2006,19:778-783.
- [11] Folashade B Awe, Tayo Nathaniel Fagbemi, Beatrice Olawunmi T. Ifesan, et al. Antioxidant properties of cold and hot water extracts of cocoa, Hibiscus flower extract, and ginger beverage blends[J].Food Research International,2013,52(2):490-495.
- [12] 付婧,岳田利,袁亚宏,等.真空耦合超声提取茶多酚的工艺研究[J].西北农林科技大学学报,2013,41(3):172-178.

的研究[J].食品科技,2008,(5):26-29.

- [6] 王新惠,刘达玉.米根霉产糖化酶发酵条件的研究[J].中国酿造,2009,(9):85-87.
- [7] 徐成勇,郭波,周莲,等.酿酒小曲研究进展[J].食品与发酵工业,2002,28(3):72-75.
- [8] 龙可,赵中开,马莹莹,等.酿酒根霉菌研究进展[J].现代食品科技,2013,29(2):443-447.
- [9] 李云雁,胡传荣.实验设计与数据处理[M].北京:化学工业出版社,2008.
- [10] 徐向宏,何明珠.实验设计与 Design-Expect、SPSS 应用[M].北京:科学出版社,2010.
- [11] 刘寅,张永光,张汝兵,等.响应面法优化产酸丙酸杆菌丙酸发酵条件的研究[J].食品工业科技,2010,(5):167-170.
- [12] 杨建刚,赵中开,马莹莹.纯种米根霉种曲的制备及工艺条件优化[J].酿酒科技,2014,(9):33-41.
- [13] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,2014:618-619.
- [14] GB8267-2006:食品添加剂-糖化酶制剂.中华人民共和国国家标准,2006.
- [15] 叶磊.小曲中优良根霉的分离筛选及产酶条件研究[D].西南大学,2009.
- [16] Ali Oguz Büyükkileci, Haluk Hamamci, Meral Yuçel. Lactate and ethanol production by Rhizopus oryzae ATCC 9363 and activities of related pyruvate branch point enzymes[J].Journal of Bioscience and Bioengineering,2006,(102):464-466.
- [17] 林晓庆,黄志清,刘志彬,等.米根霉液态发酵产糖化酶工艺条件研究[J].酿酒科技,2014,(9):9-13.
- [18] 令博,王捷,吴洪斌,等.葡萄皮渣多酚超声波辅助提取工艺响应面法优化及抗氧化活性研究[J].食品科学,2011,32(18):24-29.
- [19] 房玉林,齐迪,郭志君,等.超声波辅助法提取石榴皮中总多酚工艺[J].食品科学,2012,33(6):115-118.
- [20] 夏季,郑炯,陈光静,等.响应面法优化超声辅助提取野木瓜多酚工艺[J].食品工业科技,2014,35(21):253-258.
- [21] 李颖畅,张笑,吕艳芳,等.响应面优化超声波辅助提取紫菜多酚[J].中国食品学报,2014,14(9):82-89.
- [22] 周丽萍,杨瑞华,张悦.响应面法优化研磨珠辅助超声波萃取苹果多酚的工艺研究[J].食品工业科技,2012,33(21):277-281.
- [23] 缪晓平,邓开野,谭梅唇,等.苹果渣中多酚物质的提取工艺研究[J].安徽农业科学,2012,38(20):11004-11005.
- [24] 包怡红,王硕,王文琼,等.超声波酶法提取红松树皮中多酚类化合物的研究[J].食品工业科技,2013(3):232-236.
- [25] 王雅,樊明涛,赵萍,等.沙枣多酚超声波辅助提取工艺优化及抗氧化性研究[J].中国食品学报,2011,11(2):95-102.
- [26] 白雪莲,岳田利,章华伟,等.响应曲面法优化微波辅助提取苹果渣多酚工艺研究[J].中国食品学报,2010,10(4):169-176.
- [27] 李珍,哈益明,李安,等.响应面优化苹果皮渣多酚超声提取工艺研究[J].中国农业科学,2013,46(21):4569-4577.
- [28] 李颖畅,张笑,吕艳芳,等.响应面优化超声波辅助提取紫菜多酚[J].中国食品学报,2014,14(9):82-89.