

杏鲍菇多肽提取工艺优化及其抗氧化活性研究

Optimization Extraction of polypeptide from *Pleurotus eryngii* mycelium and Its Antioxidation *in vitro*

孙亚男¹ 李文香^{1,2} 胡欣蕾¹ 李铭¹ 于戈¹ 张欣¹

SUN Ya-nan¹ LI Wen-xiang^{1,2} HU Xin-lei¹ LI Ming¹ YU Ge¹ ZHANG Xin¹

(1. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266109; 2. 山东省应用真菌重点实验室, 山东 青岛 266109)

(1. Food Science and Engineering College, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China;

2. Shandong Provincial Laboratory of Applied Mycology, Qingdao, Shandong 266109, China)

摘要:为研究杏鲍菇菌丝体多肽提取工艺及其抗氧化活性,以杏鲍菇菌丝体多肽提取率为考查指标,在单因素试验的基础上采用 Box-Behnken 方法,通过响应面设计优化提取菌丝体多肽的工艺,用 Sephadex-50 葡聚糖凝胶对所提取的多肽进行纯化,并测定其还原力及清除 DPPH·、O₂⁻·、·OH 能力。结果表明,在试验范围内各因素对杏鲍菇菌丝体多肽提取率的影响程度从大到小依次为:pH 值>料液比>提取时间;杏鲍菇菌丝体多肽的最佳提取工艺参数为 pH 值 8.85,提取时间 4.17 h,提取料液比 1:11.86 (g/mL),在该工艺条件下,多肽的提取率为 50.88%;杏鲍菇菌丝体多肽具有一定的抗氧化能力,并与多肽质量浓度呈一定的量效关系。

关键词:杏鲍菇;菌丝;多肽;抗氧化

Abstract: The optimal extraction conditions of polypeptide from *Pleurotus eryngii* mycelium was investigated, and activity of the antioxidant was evaluated in this study. Based on the single-factor tests, the extraction conditions of polypeptide from *P. eryngii* mycelium were optimized by Response Surface Methodology(RSM) to increase the extraction rate of polypeptide. Moreover, the polypeptide was purified with Sephadex-50, and the antioxidant activity of polypeptide was assessed using several assay model systems *in vitro*. The optimal extraction conditions of polypeptide were pH 8.85, extraction time 4.17 h, liquid-to-material ratio 1:11.86 (g/mL). Under the optimal extraction conditions, the maximum extraction rate of polypeptide was 50.88%. Extracted polypeptide showed good antioxidant activity in a dose-dependent manner.

Keywords: *Pleurotus eryngii*; mycelium; polypeptide; antioxidant activity

基金项目:山东省农业产业技术体系建设经费资助项目(编号:SDAIT-07-07)

作者简介:孙亚男,女,青岛农业大学在读硕士研究生。

通信作者:李文香(1963-),女,青岛农业大学教授,博士。

E-mail:xiang7332@126.com

收稿日期:2016-12-14

杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)学名刺芹侧耳,隶属于真菌门,担子菌纲,伞菌目,侧耳科,侧耳属^[1],是一种药食皆宜的珍稀真菌。相关研究^[2]表明,杏鲍菇发酵菌丝体与生长成熟期子实体营养成分相比,在蛋白质与微量元素含量上相差不大,但菌丝体的多糖含量较子实体略高,因此,杏鲍菇发酵菌丝体和子实体都具有较好的营养价值。但是,从杏鲍菇保健食品的开发上看,发酵菌丝体具有培养周期短、工艺简单、成本低产量大、易控制、便于工业化生产等优点,避免了传统生子实体栽培周期长,劳动强度大,受气候环境的影响,易造成重金属富集等弊端,因而利用发酵技术将生产的菌丝体及其活性成分制成相应的保健品具有广阔的市场前景^[3-4]。目前,中国对杏鲍菇的研究多集中在对其子实体多糖的研究,主要是利用多糖的抗氧化、抗肿瘤活性,生产高附加值产品如保健饮料、口服液等^[5-6]。本试验拟采用响应面法优化杏鲍菇菌丝体多肽的提取工艺,通过测定多肽的还原能力和清除 O₂⁻·、·OH、DPPH· 的能力,分析杏鲍菇菌丝体多肽的体外抗氧化活性,为杏鲍菇菌丝体多肽功能性食品的开发提供进一步的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

杏鲍菇菌丝体:山东省应用真菌重点实验室培养;

Sephadex-50 葡聚糖凝胶:北京 Solarbio 公司;

磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、铁氰化钾、三氯化铁、邻二氮菲、H₂O₂ 溶液、邻苯三酚、三氯乙酸、盐酸、无水乙醇、2,2-二苯基-1-苦基苯肼(DPPH)等:均为分析纯。

1.2 仪器与设备

旋转蒸发仪:RE-2000A 型,上海亚荣精华有限公司;

电子天平:EP114C 型,上海精科天平有限公司;

离心机:TD4K-Z 型,德国 Eppendorf 公司;

恒温水浴锅:XM TD-8222 型,上海精宏有限公司;

分光光度计:424 UV1101 型,日本岛津公司;

超净工作台:SW-CJ-2D型,苏州净化设备有限公司;

冷冻干燥机:LJG-10型,德国 Christ 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 单因素试验

(1) pH 值对杏鲍菇菌丝体多肽提取率的影响:配置 pH 分别为 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 的 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液,以料液比 1:10 (g/mL),于 4 °C 下浸提 4 h,得到的粗提液测定蛋白含量,确定最佳提取 pH。

(2) 提取时间对杏鲍菇菌丝体多肽提取率的影响:配置 pH 为 6.5 的 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液,以料液比 1:10 (g/mL),于 4 °C 下分别浸提 2, 4, 6, 8, 10 h,得到的粗提液测定蛋白含量,确定最佳提取时间。

(3) 料液比杏鲍菇菌丝体多肽提取率的影响:配置 pH 为 6.5 的 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液,分别以料液比 1:8, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16 (g/mL),于 4 °C 下浸提 4 h,得到的粗提液测定蛋白含量,确定最佳提取料液比。

1.3.2 多因素综合模拟试验 以杏鲍菇菌丝体为原料, pH、提取时间和料液比为自变量,多肽提取率为响应值设计。

1.3.3 杏鲍菇菌丝体多肽的纯化 将上述所得杏鲍菇菌丝体提取液,用硫酸铵分级沉淀(30%, 75%, 100%),于 4 °C 下,3 000 r/min 离心 20 min,得到蛋白沉淀,用去离子水溶解沉淀,将其于 30 kDa 透析膜进行透析,收集透析液,得到分子质量小于 30 kDa 纯净多肽。

1.3.4 杏鲍菇菌丝体多肽的分离 用 Sephadex-50 葡聚糖凝胶进行纯化。洗脱流速:每 5 min 4~5 mL。

1.3.5 多肽抗氧化活性研究

(1) 多肽相对还原力的测定:在 10 mL 试管中加入不同浓度的多肽溶液各 1.0 mL,然后加入磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH=6.6) 3 mL 和 $K_3[Fe(CN)_6]$ (1%)溶液 3 mL,水浴温度保持在 50 °C,反应 20 min。反应结束后冷却,再加入 10%三氯乙酸溶液 2.5 mL 混匀,3 000 r/min 离心 10 min。离心完毕后,试管中依次加入 2.5 mL 上清液、2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% $FeCl_3$ 溶液,反应 10 min(条件为室温),然后测吸光度(波长为 700 nm)^[7],以抗坏血酸和 BHT 作对照。

(2) 多肽对 $O_2^- \cdot$ 的清除能力测定:采用邻苯三酚自氧化法。向试管中加入 4.5 mL Trise-HCl 缓冲液和 4.2 mL 蒸馏水,25 °C 水浴 20 min,取出迅速加入预热的 0.3 mL 3 mmol/L 邻苯三酚溶液,混匀后,于 325 nm 下每隔 30 s 测一次吸光值,记录 8 组数据。空白组为 10 mmol/L 的 HCl。一定线性范围内,计算每分钟吸光度的增加值。加入杏鲍菇菌丝体多肽后其自氧化速率的测定。样品管在加邻三苯酚前,先加不同浓度的多肽溶液 1.0 mL,蒸馏水对应减少,其余操作不改变^[8],以抗坏血酸和 BHT 作对照。清除率按式(1)计算:

$$H = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

H——清除率, %;

A_1 ——邻苯三酚自氧化速率;

A_2 ——加多肽液后邻苯三酚的自氧化速率。

(3) 多肽对 $\cdot OH$ 的清除能力测定:取不同浓度的多肽溶液 1.0 mL,加入浓度 9 mmol/L $FeSO_4$ 溶液和浓度 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液各 1.0 mL,混匀后加入 1.0 mL 8.8 mmol/L H_2O_2 启动反应,37 °C 水浴 30 min,于 510 nm 处测定吸光值。空白对照为蒸馏水代替水杨酸^[9],以抗坏血酸和 BHT 作对照。清除率按式(2)计算:

$$S = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

S——清除率, %;

A_0 ——空白对照液的吸光度;

A_1 ——加入多肽溶液后的吸光度;

A_2 ——无显色剂时多肽的自身吸收值。

(4) 多肽对 DPPH 自由基的清除能力测定:1.0 mL 多肽溶液和 4.0 mL DPPH 混合为反应体系,1.0 mL 50%乙醇溶液和 4.0 mL 多肽溶液混合为空白组,1.0 mL 50%乙醇溶液和 4.0 mL DPPH 混合为对照组^[9],将各组静置室温暗处,反应 30 min,测吸光值(517 nm),以抗坏血酸和 BHT 作对照。清除率按式(3)计算:

$$F = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

F——清除率, %;

A_1 ——多肽溶液吸光值;

A_2 ——空白组吸光值;

A_3 ——对照组吸光值。

1.3.6 数据分析 所有试验进行 3 次重复。试验数据采用 Origin 8.0 和 SPSS 17.0 软件进行处理和差异显著性分析,以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义^[10]。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 pH 对多肽提取率的影响 由图 1 可知,随着缓冲液 pH 值的增大,杏鲍菇菌丝体多肽的提取率先增大后减小,在 pH 值为 8.5 时,提取率最大, pH 值大于 8.5 后提取率逐渐下降,可能是碱性增强会使蛋白变性。所以,提取 pH 值为 8.5 时较为合适。

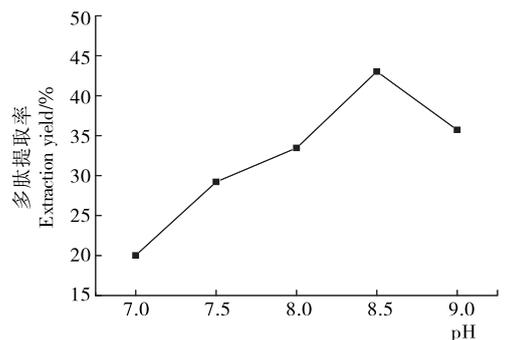


图 1 pH 值对多肽提取率的影响

Figure 1 Effect of pH on extraction yield of polypeptide

2.1.2 提取时间对多肽提取率的影响 由图 2 可知,提取时间对杏鲍菇菌丝体多肽的提取率有一定的影响。随着提取时间的延长,多肽的提取率先增加后减小,提取 4 h 时多肽提取率达到最大值,4 h 后多肽提取率逐渐下降,这是因为随着提取时间的延长杏鲍菇菌丝体粉末内的蛋白质充分溶出,在提取 4 h 后多肽提取率随时间延长而减少,可能是长时间的浸提造成部分多肽链断裂损失,从而影响蛋白提取率,所以提取 4 h 较为合适。

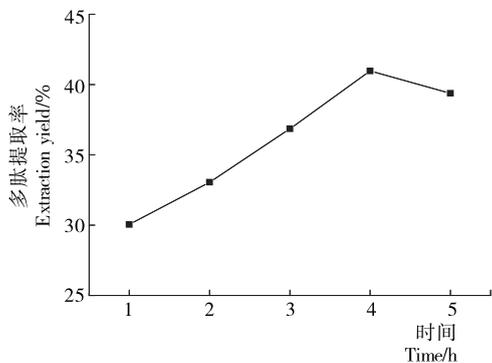


图 2 提取时间对多肽提取率的影响

Figure 2 Effect of extract time on extraction yield of polypeptide

2.1.3 料液比对多肽提取率的影响 料液比是影响杏鲍菇菌丝体多肽提取率的另一重要因素。由图 3 可知,随着料液比的增加,多肽的提取率先增加后减小,当料液比为 1:12 (g/mL) 时多肽提取率达到最大值,随后多肽提取率逐渐下降,这是因为溶剂较少时,蛋白扩散阻力较大,溶出率小,随着溶剂用量的增加,蛋白更容易溶入溶剂中,提取率随之增加,当溶剂用量过大时,部分溶质会残留在水相中造成损失,而且不利于后续的减压浓缩,增加提取成本,这与罗璇等^[10]的研究结果相一致,综合考虑,提取料液比为 1:12 (g/mL) 较为合适。

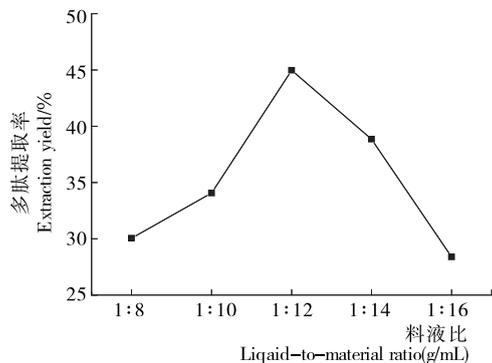


图 3 料液比对多肽提取率的影响

Figure 3 Effect of liquid-to-material ratio on extraction yield of polypeptide

2.2 响应面试验结果及分析

根据试验因素和水平的要求,设计试验因素水平见表 1,试验设计及结果见表 2,将所得的数据用 Design-Expert 8.0.6 软件分析,以提取时间、pH 值和料液比为自变量,以多

肽提取率 Y 为因变量建立提取杏鲍菇菌丝体多肽工艺的二次回归方程,方程为:

$$Y = 50.25 + 0.75X_1 + 2.7X_2 - 1.58X_3 + 1.54X_1X_2 + 1.76X_1X_3 - 0.77X_2X_3 - 5.95X_1^2 - 4.15X_2^2 - 5.95X_3^2 \quad (4)$$

方差分析结果见表 3,变异系数(C.V.) < 2%,说明该模

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Factors and levels in BBD

编码水平	X ₁ pH	X ₂ 提取时间/h	X ₃ 液料比(g/mL)
-1	8.0	2	10:1
0	8.5	4	12:1
1	9.0	6	14:1

表 2 Box-Benhnken 试验设计及结果

Table 2 BBD and corresponding results for response surface

运行序	X ₁	X ₂	X ₃	Y 多肽提取率/%
1	-1	0	-1	40.21
2	0	1	-1	45.52
3	1	1	0	44.76
4	0	1	1	40.15
5	-1	-1	0	38.62
6	0	0	0	51.06
7	0	0	0	50.21
8	1	0	-1	38.98
9	0	0	0	50.32
10	-1	1	0	40.98
11	0	-1	-1	38.62
12	0	-1	1	36.33
13	-1	0	1	34.02
14	1	-1	0	36.25
15	0	0	0	50.15
16	0	0	0	50.02
17	1	0	1	40.01

表 3 BBD 方差分析结果[†]

Table 3 BBD variance analysis results

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	519.32	9	57.70	179.01	<0.000 1
X ₁	4.46	1	4.46	13.82	0.007 5
X ₂	58.27	1	58.27	180.75	<0.000 1
X ₃	19.91	1	19.91	61.76	0.000 1
X ₁ X ₂	9.46	1	9.46	29.33	0.001 0
X ₁ X ₃	12.32	1	12.32	38.22	0.000 5
X ₂ X ₃	2.37	1	2.37	7.36	0.030 1
X ₁ ²	149.05	1	149.05	426.39	<0.000 1
X ₂ ²	72.51	1	72.51	224.93	<0.000 1
X ₃ ²	148.93	1	148.93	462.00	<0.000 1
残差	2.26	7	0.32		
失拟项	2.15	3	0.72	28.14	0.003 8
净误差	0.10	4	0.026		
校正项	521.58	16			

[†] R² 为 0.995 7; R_{Adj}² 为 0.990 1; R_{Pred}² 为 0.933 6; 变异系数为 1.33%。

型的重现性较好^[11]；调整确定系数(R_{Adj}^2)与预测确定系数(R_{Pred}^2)之差小于0.1,说明该模型的试验值与理论值相差不大,模型准确^[12]；模型的决定系数 $R^2=0.9957$,说明模型与实际拟合度良好,3个因素(pH值、提取时间和料液比)均不同程度地对响应值(多肽提取率)产生显著或极显著的影响。因此该模型准确有效。

2.3 响应面交互作用分析

如图4所示,响应面坡度较为陡峭,等高线相对较为密集,表明响应值(多肽提取率)对两两因素交互作用的变化较为敏感,等高线沿pH值轴变化的趋势明显高于浸提时间轴和料液比轴；等高线沿料液比轴变化的趋势明显高于浸提时间轴。由此推知,各因素对杏鲍菇菌丝体多肽提取率的影响程度从大到小依次为:pH值>料液比>提取时间。响应面曲线越陡,说明所对应因素对响应值的影响也越显著,这和方差分析的结果相一致。各因素在所选取的范围内均能得到最佳响应值,说明各因素所选择的试验范围合理有效。

2.4 响应面模型的验证

利用响应面分析得到杏鲍菇菌丝体多肽提取工艺的最佳组合为pH值8.85,料液比1:11.86(g/mL),提取时间4.17h,最高多肽提取率预测值为50.88%。出于对实际操作可行性考虑,验证实验需根据实际试验条件稍加修改为:pH值8.9,料液比1:11.9(g/mL),提取时间4.2h,多肽提取率实际值为(50.76±0.05)%,相对误差0.24%,实验值和预测值之间有很好的 consistency,因此,该模型较准确可靠。

2.5 杏鲍菇菌丝体多肽的鉴定

由图5可知,杏鲍菇菌丝体提取液在220nm处有最大吸收峰,与标准蛋白溶液相一致(肽键吸收波长200~230nm),所以该提取液为蛋白提取液。

2.6 杏鲍菇菌丝体多肽的纯化

由图6可知,经过Sephadex-50葡聚糖凝胶过滤后的杏鲍菇菌丝体多肽溶液经蒸馏水洗脱后,洗脱曲线上出现了2个明显的波峰,分别在10min和40min左右。在10min

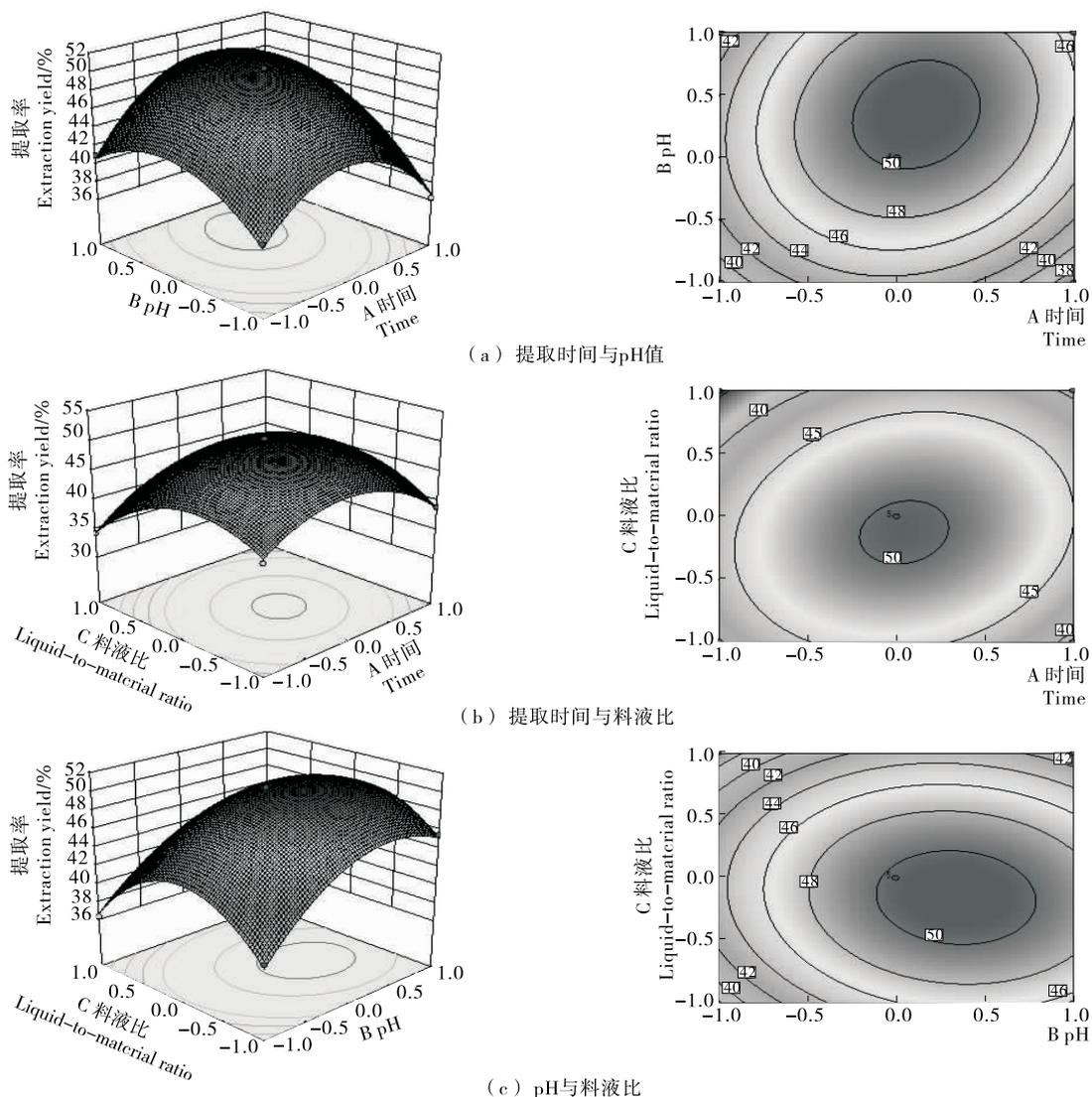


图4 各两因素交互作用对多肽提取率影响的曲面图和等高线图

Figure 4 Response surface showing the effects of four variables on the extraction yield of polypeptide

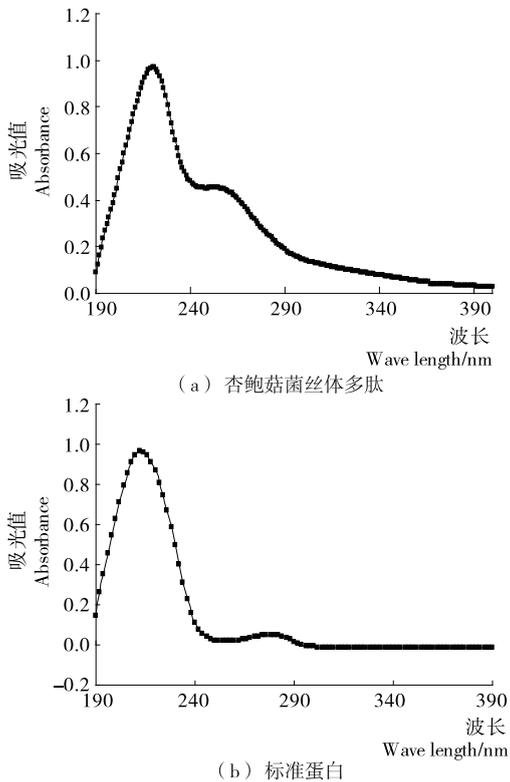


图 5 杏鲍菇菌丝体多肽和标准蛋白紫外扫描

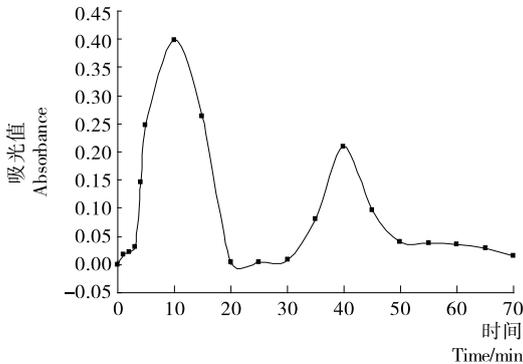
Figure 5 *Pleurotus eryngii* mycelium polypeptide and standard sample UV scan

图 6 杏鲍菇菌丝体多肽 Sephadex-50 葡聚糖凝胶层析图(595 nm)

Figure 6 The Sephadex-50 chromatography of *Pleurotus eryngii* mycelium polypeptide

出现的波峰可能为相对分子量较大的肽,所以先被洗脱下来,后出现的波峰可能为较小分子的肽。之后的溶液在 595 nm 下几乎无吸收值,可知多肽已全被洗脱下来。分别收集 2 个多肽组分,进行其抗氧化活性的研究。

2.7 多肽抗氧化活性分析

2.7.1 杏鲍菇菌丝体多肽相对还原力的测定 杏鲍菇菌丝体多肽的还原能力可以作为其潜在抗氧化活性的重要指标^[13]。由图 7 可知,在 0.1~1.0 mg/mL 有效质量浓度范围内,随着质量浓度的增大,两个菌丝体多肽组分还原能力逐渐增强,虽然其还原能力显著低于同浓度的 V_C,但是 Fr.1 的还原力显著高于同浓度 BHT 的还原能力(P<0.05),Fr.2 的

还原力与同浓度 BHT 的还原能力差异不显著(P>0.05);在 1 mg/mL 浓度时,Fr.1 的还原力约为同浓度 V_C 还原力的 50%,因此,从杏鲍菇菌丝体中提取的多肽 Fr.1 具有较强的还原力。

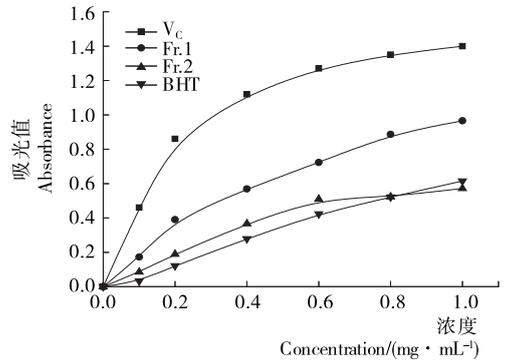
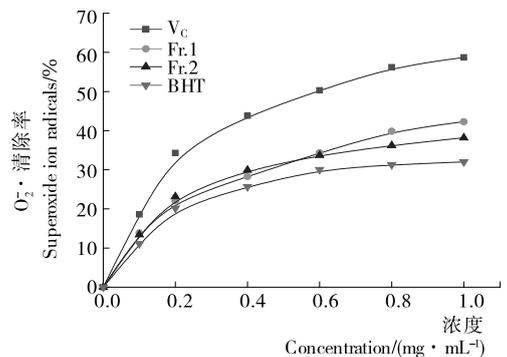


图 7 杏鲍菇菌丝体多肽还原力(700 nm)

Figure 7 Reducing power of *Pleurotus eryngii* mycelium polypeptide

2.7.2 多肽对 O₂⁻ 的清除能力 由图 8 可知,在 0.1~1.0 mg/mL 时,对 O₂⁻ 的清除能力随着多肽质量浓度的增大逐渐增强。在整个过程中,V_C 对 O₂⁻ 的清除率显著高于 2 个多肽组分和 BHT(P<0.05);Fr.1 和 Fr.2 对 O₂⁻ 的清除率差异不显著,在浓度小于 0.4 mg/mL 前,多肽组分对 O₂⁻ 的清除率与 BHT 差异不显著(P>0.05),当浓度大于 0.4 mg/mL 后,多肽组分对 O₂⁻ 的清除率显著高于 BHT (P<0.05)。因此,杏鲍菇菌丝体多肽 Fr.1 和 Fr.2 对 O₂⁻ 均有较明显的清除作用。

图 8 杏鲍菇菌丝体多肽对 O₂⁻ 的清除能力Figure 8 Scavenging effects of *Pleurotus eryngii* mycelium polypeptide on O₂⁻ radicals

2.7.3 多肽对 ·OH 的清除能力 抗氧化剂能够清除在金属离子的催化下发生 Fenton 反应生成的高活性的 ·OH^[14-15],因此可以用来反映样品抗氧化性的强弱。由图 9 可知,随着多肽浓度的增加,其对 ·OH 的清除能力逐渐增强。在整个过程中,BHT 对 ·OH 的清除率显著高于多肽和 V_C;多肽 Fr.1 对超 O₂⁻ 的清除率显著高于 V_C 和 Fr.2(P<0.05);V_C 和 Fr.2 对 ·OH 的清除率差异不显著(P>0.05)。因此,杏鲍菇菌丝体多肽 Fr.1 对 ·OH 有较明显的清除作用。

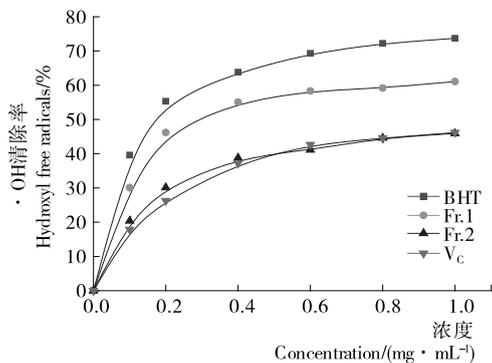


图9 杏鲍菇菌丝体多肽对·OH的清除能力

Figure 9 Scavenging effects of *Pleurotus eryngii* mycelium polypeptide on ·OH radicals

2.7.4 多肽对DPPH·的清除能力测定 由图10可知,随着多肽浓度的增加,其对DPPH·的清除能力逐渐增强,在浓度达到0.4 mg/mL以后,清除率基本保持稳定。相同浓度下,多肽Fr.1对DPPH·的清除率显著高于BHT和Fr.2,低于V_c;Fr.2对DPPH·的清除率显著高于BHT(P<0.05)。因此,可以推断杏鲍菇菌丝体多肽具有清除DPPH·的能力。

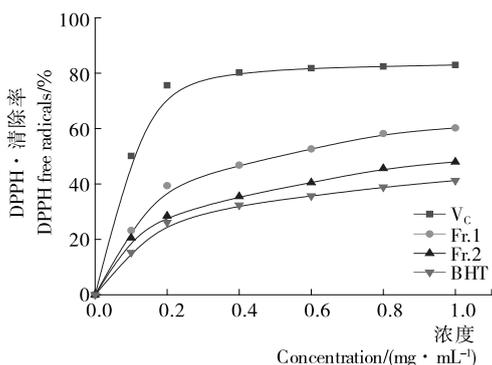


图10 杏鲍菇菌丝体多肽对DPPH·的清除能力

Figure 10 Scavenging effects of *Pleurotus eryngii* mycelium polypeptide on DPPH free radicals

3 结论

在单因素试验的基础上,通过响应面法优化杏鲍菇菌丝体提取多肽工艺,建立了多元回归模型,该模型高度显著,拟合度好。多肽提取最佳条件为pH值8.85,提取时间4.17 h,提取料液比1:11.86(g/mL),多肽提取率理论值为50.88%,实验验证值为(50.76±0.05)%,相对误差0.24%,说明回归模型准确性、可靠性较高。杏鲍菇菌丝体多肽具有还原力并对超氧阴离子自由基、羟基自由基和DPPH自由基有明显的清除作用,说明杏鲍菇菌丝体多肽具有一定的抗氧化活性,这为杏鲍菇菌丝体多肽功能性食品开发提供科学理论依据。但是,杏鲍菇菌丝体多肽的组成及构效关系有待进一步研究。

参考文献

[1] 陈君琛, 杨艺龙, 翁敏劼, 等. 即食杏鲍菇热风-真空联合干燥

工艺优化[J]. 农业工程学报, 2014, 30(14): 331-338.

- [2] 田平平, 王杰, 秦晓艺, 等. 采收处理对杏鲍菇贮藏品质及抗氧化酶系统的影响[J]. 中国农业科学, 2015, 48(5): 941-951.
- [3] RO H S, KIM S S, RYU J S, et al. Comparative studies on the diversity of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*: ITS sequence analysis, RAPD fingerprinting, and physiological characteristics[J]. Mycological Research, 2007, 111(6): 710-715.
- [4] WANG Shao-juan, LI Yong-xia, BAO Li, et al. Eryngiolide A, a cytotoxic macrocyclic diterpenoid with an unusual cyclododecane core skeleton produced by the edible mushroom *Pleurotus eryngii*[J]. Organic Letters, 2012, 14(14): 3672-3675.
- [5] RAJORIA A, KUMAR J, CHAUHAN A K. Anti-oxidative and anti-carcinogenic role of lycopene in human health-a review[J]. Journal of Dairying, Foods and Home Science, 2010, 29(3/4): 157-165.
- [6] 唐梦茹, 陈涛涛, 汪少芸, 等. 响应面优化酶解法制备韭菜籽蛋白抗氧化肽工艺[J]. 中国食品学报, 2016, 16(4): 159-166.
- [7] YAOITA Y, KIKUCHI M, MACHIDA K. Terpenoids and Sterols from Some Japanese Mushrooms[J]. Natural Product Communications, 2014, 9(3): 419-426.
- [8] 陈永生, 扶雄, 周林, 等. 亮叶杨桐叶中酚类物质抗氧化和抗HepG2细胞增殖作用[J]. 现代食品科技, 2016, 32(8): 14-20.
- [9] OYAIZU M. Antioxidative activity of brownin products of Glucosamine fractionated by organic solvent and thin layer chromatography[J]. Nippon ShoKuhin Kogyo Gakkaishi, 1986, 35: 771-775.
- [10] 罗璇, 何景. 超声辅助提取花生红衣色素工艺的优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(9): 172-176.
- [11] 刘香萍, 王国庆, 李国良, 等. 响应面法优化提取紫花苜蓿叶总黄酮及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2016, 16(4): 145-152.
- [12] OFORI-BOATENG C, LEE K T. Response surface optimization of ultrasonic-assisted extraction of carotenoids from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) fronds[J]. Food Science and Nutrition, 2013, 1(3): 209-221.
- [13] ZHANG Qing-an, ZHANG Zhi-qi, YUE Xuan-feng, et al. Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder[J]. Food Chemistry, 2009, 116(2): 513-518.
- [14] LAI Ji-xiang, XIN Can, ZHAO Ya, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of antioxidants from black soybean (*Glycine max* var) sprouts using response surface methodology [J]. Molecules, 2013, 18(1): 1101-1110.
- [15] 刘存芳, 史娟, 张强. 橘皮多糖超声辅助提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(9): 147-150.