

块菌多糖复合酶法提取工艺优化

Optimization of the extraction of truffle polysaccharide by multi-enzyme hydrolysis

清源¹ 陈甜甜^{1,2}

QING Yuan¹ CHEN Tian-tian^{1,2}

(1. 西昌学院农业科学学院, 四川 西昌 615013; 2. 西华大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610000)

(1. Department of Agricultural Science of Xi Chang University, Xichang, Sichuan 615013, China;

2. School of Food and Bioengineering of Xihua University, Chengdu, Sichuan 610000, China)

摘要:以印度块菌为原料,运用复合酶法提取块菌多糖。采用单因素和均匀试验设计方法,考察酶配比、酶解时间、酶解温度、酶用量、料液比、pH值6个因素对块菌多糖得率的影响。按照 $U_{10}(10^8)$ 进行试验,考察各因素及其交互作用对块菌多糖得率的影响,预测和验证最佳工艺参数。结果表明:块菌多糖提取的最佳工艺条件为中性蛋白酶与纤维素酶1:7(g/g)、酶解时间48 min、酶解温度41℃、酶用量3.6%、料液比1:29(g/mL)、酶解pH值4.8,多糖得率可达14.50%,含量可达75.96%。经验证,该工艺稳定可行,适用于块菌多糖的提取。

关键词:块菌;多糖;复合酶法

Abstract: The polysaccharide was extracted by compound enzyme method from the Indian truffle. Through single factor and uniform design experiments, the effect on the yield of truffle polysaccharide were investigated, including the enzyme ratio, zymolytic time and temperature, enzyme dosage, material/ liquid ratio and pH value. According to $U_{10}(10^8)$ experiment, the effects of six single factors as well as their interactions on the yield of polysaccharide were studied. The optimal process parameters were predicted and verified. The results showed that the best extraction conditions of truffle polysaccharide was as follows: dispace and cellulase ratio of 1:7(g/g), zymolytic time 48 min, zymolytic temperature 41℃, enzyme dosage 3.6%, material/ liquid ratio 1:29(g/mL) and pH 4.8. The yield of polysaccharide was up to 14.50%, and the content of polysaccharide could reach 75.96%. The confirmatory tests proved that the optimal conditions were reliable and suitable for extracting truffle polysaccharides.

基金项目:西昌市科技项目(编号:15YYJS001);西昌学院博士研究生启动项目(编号:15BZ03)

作者简介:清源(1983—),女,西昌学院副教授,博士。

E-mail: yuanqing_12@aliyun.com

收稿日期:2018-05-01

Keywords: truffle; polysaccharide; multi-enzyme hydrolysis

块菌(Truffles)又名松露、无娘果等,属于块菌科(Tuberaceae Dumort)块菌属(*Tuber Micheli*)。块菌中富含氨基酸、蛋白质、维生素、雄烷醇、微量元素等生理活性成分,具有提高机体免疫力、抗肿瘤等保健功效,是典型的药食同源真菌^[1-3]。中国商业块菌品种包括印度块菌(*T. indicum*)、夏块菌(*T. aestivum*)等,主要产自西南山区的四川和云南^[4-6]。研究^[7-9]表明,块菌的很多生物学功效都与其多糖密切相关。

目前,常用的多糖提取方法主要有热水浸提法、微波辅助法、超声波辅助法、酶法等^[10]。利用不同方法制备多糖的得率、糖含量、单糖组分等大不相同^[11]。其中,热水浸提法耗时长、提取效率低,且液体量太大不宜处理;微波和超声波辅助提取,不仅会影响多糖空间微结构,也容易导致多糖化学键断裂和相对分子量降低,从而对多糖的抗氧化等生物学活性造成影响^[12-13]。目前,利用生物酶提取多糖的方法已经得到广泛应用,此法具有成本低和使用方便的优点^[14],与超声波和微波辅助提取方法在大规模生产时的局限性相比,其反应条件温和,对多糖结构的破坏较少,对设备和工艺的要求也较低。此前已有酶解提取块菌多糖的研究,但均采用单一酶法辅助提取^[15-16]。

由于不同的酶作用位点不同,复合酶解作用效率更高^[17]。通常多糖被包裹在植物细胞壁内,纤维素酶能破坏细胞壁,使多糖易于从胞内释放。蛋白酶对细胞中游离的蛋白质具有分解作用,并水解糖蛋白和蛋白聚糖中游离的蛋白质,有利于多糖的浸出。本研究选用中性蛋白酶和纤维素酶辅助提取块菌多糖,并采用均匀试验设计法优选复合酶解工艺,以期获得高效温和的提取条件,避免超声波或微波对多糖结构与活性的影响,为块菌多糖结构和功能的进一步研究提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料

印度块菌:购自四川会东;

纤维素酶(3 units/mg)、中性蛋白酶(60 000 U/g):北京索莱宝科技有限公司;

盐酸、氢氧化钠、无水乙醇、浓硫酸、苯酚、葡萄糖、混合磷酸盐、邻苯二甲酸氢钾等:分析纯。

1.2 仪器

电热恒温鼓风干燥箱:GZX-9023MBE型,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;

粉碎机:DC-200型,浙江武义鼎盛日用金属制品厂;

紫外可见分光光度计:TU-1810型,北京普析通用仪器有限责任公司;

pH计:PHS-3C型,上海精密仪器仪表有限公司;

恒温水浴锅:HW.SY21-K4C型,北京市长风仪器仪表公司;

分析天平:ME204型,梅特勒-托利多仪器(中国)有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 多糖提取工艺

块菌→干燥(55℃)→粉碎(过60目筛)→干粉→加蒸馏水→调pH→酶解→沸水灭酶(10 min)→冷却→真空抽滤→滤液→沉淀物二次提取→合并2次滤液→定容(80 mL)→块菌粗多糖溶液→苯酚-硫酸法测多糖含量

1.3.2 单因素试验设计

(1) 酶配比对块菌多糖得率的影响:设定酶用量为2.5%,酶解时间65 min,酶解温度55℃,酶解pH值6.0,料液比1:40(g/mL),探讨酶配比(中性蛋白酶:纤维素酶)分别为1:1,1:2,1:3,1:4,1:5(g/g)时对块菌多糖得率的影响。

(2) 酶解时间对块菌多糖得率的影响:设定酶配比1:4(g/g),酶用量2.5%,酶解温度55℃,酶解pH值6.0,料液比1:40(g/mL),探讨酶解时间分别为45,65,85,105,125 min时对块菌多糖得率的影响。

(3) 酶解温度对块菌多糖得率的影响:设定酶配比1:4(g/g),酶用量2.5%,酶解时间65 min,酶解pH值6.0,料液比1:40(g/mL),探讨酶解温度分别为45,50,55,60,65℃时对块菌多糖得率的影响。

(4) 酶用量对块菌多糖得率的影响:设定酶配比1:4(g/g),酶解时间65 min,酶解温度55℃,酶解pH值6.0,料液比1:40(g/mL),探讨酶用量分别为1.0%,1.5%,2.0%,2.5%,3.0%时对块菌多糖得率的影响。

(5) 酶解pH值对块菌多糖得率的影响:设定酶配比1:4(g/g),酶用量2.5%,酶解时间65 min,酶解温度55℃,料液比1:40(g/mL),探讨酶解pH值分别为4.5,5.0,5.5,6.0,6.5时对块菌多糖得率的影响。

(6) 料液比对块菌多糖得率的影响:设定酶配比1:4(g/g),酶用量2.5%,酶解时间65 min,酶解温度55℃,酶解pH值6.0,探讨料液比分别为1:20,1:30,1:40,1:50,

1:60(g/mL)时对块菌多糖得率的影响。

1.3.3 均匀设计试验 根据单因素试验结果,按照 $U_{10}(10^8)$ 进行均匀设计试验,得出块菌多糖的最佳复合酶解工艺。

1.3.4 块菌多糖含量的测定 采用硫酸-苯酚法^[18]。

(1) 葡萄糖标准曲线的绘制:以标准葡萄糖溶液浓度(mg/mL)为横坐标,吸光度值A为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程 $Y=6.4257X+0.2917$, $R^2=0.9995$ 。

(2) 块菌多糖含量的计算:

$$A = \frac{Y \times V \times n}{N \times 1000} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

A——块菌多糖含量,%;

Y——块菌多糖溶液浓度,mg/mL;

V——多糖溶液体积,mL;

n——稀释倍数;

N——多糖粗提物质量,g。

1.3.5 块菌多糖得率的计算

$$B = \frac{Y \times V \times n}{M \times 1000} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

B——块菌多糖得率,%;

Y——块菌多糖溶液浓度,mg/mL;

V——多糖溶液体积,mL;

n——稀释倍数;

M——块菌干粉质量,g。

1.3.6 试验统计与分析 运用DPS 9.50软件对均匀试验结果进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 酶比对多糖得率的影响 由图1可知,块菌多糖得率随中性蛋白酶与纤维素酶配比的逐渐增大先升高,在1:4(g/g)时达到最高,之后呈现下降趋势。纤维素酶能有效地分解或破坏细胞壁,中性蛋白酶能有效酶解与多糖结合在一起的蛋白质,从而更有利于多糖的提取^[19]。故提取块菌多糖的最适酶配比为1:4(g/g)。

2.1.2 酶解时间对多糖得率的影响 由图2可知,随着酶解时间的延长,多糖得率提高,在65 min处达到最大,之后再延长,多糖得率下降。酶解时间太短,底物不能被充分

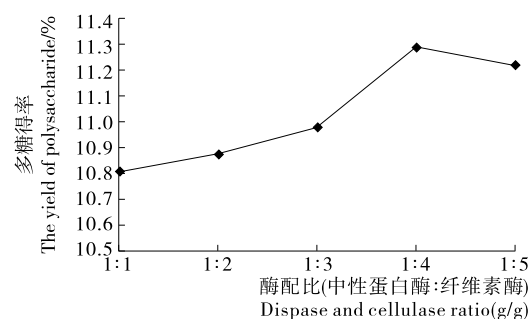


图1 酶比对多糖得率的影响

Figure 1 Effect of enzyme ratio on polysaccharide yield

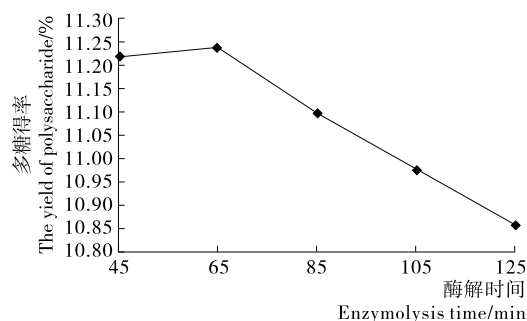


图 2 酶解时间对多糖得率的影响

Figure 2 Effect of enzymolysis time on polysaccharide yield

酶解;时间太长,高温使得被提取出来的多糖分解,或者高温导致多糖结构发生变化,从而使多糖得率降低。提取块菌多糖的最佳酶解时间为 65 min。

2.1.3 酶解温度对多糖得率的影响 由图 3 可知,块菌多糖的得率随着温度的升高先增加,在 55 ℃ 处达到最大,之后呈下降的趋势。因温度较低时,达到反应所需的活化能较困难,因而反应速度较慢,多糖的得率也较低;当温度较高时,酶活性丧失,反应速率减慢,多糖得率也低。故提取块菌多糖的最合适酶解温度为 55 ℃。

2.1.4 酶用量对多糖得率的影响 由图 4 可知,块菌多糖的得率随酶用量的增加先增加,在 2.5% 处达到最大,之后多糖得率减少。因酶用量较低时,2 种酶不能完全使结合在一起的多糖和蛋白质分开,因而多糖提取率较低;当酶用量较高时,由于酶分子已经达到饱和,一部分酶分子不能与底物结合,底物被水解的速率下降,多糖得率减少。故提取块菌多

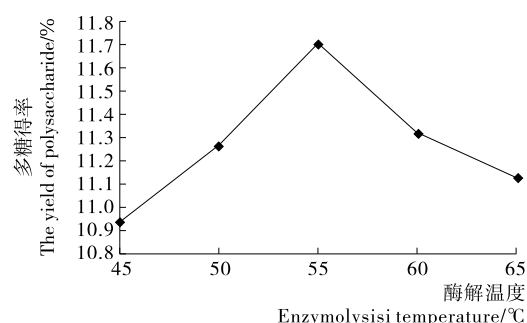


图 3 酶解温度对多糖得率的影响

Figure 3 Effect of enzymolysis temperature on polysaccharide yield

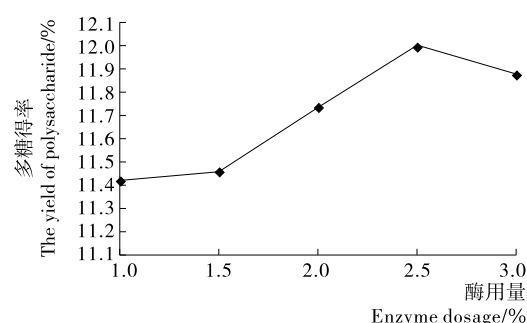


图 4 酶用量对多糖得率的影响

Figure 4 Effect of enzyme dosage on polysaccharide yield

糖的最适酶用量为 2.5%。

2.1.5 pH 值对多糖得率的影响 由图 5 可知,pH 值从 4.5 增加至 6.0 块菌多糖的得率随之增加,当 pH 值为 6.0 时块菌多糖的得率达到最高,之后开始降低。因 pH 较低时,中性蛋白酶的活性受到抑制;同样当 pH>6.0 时,纤维素酶的活性受到抑制。故提取块菌多糖的最适 pH 值为 6.0。

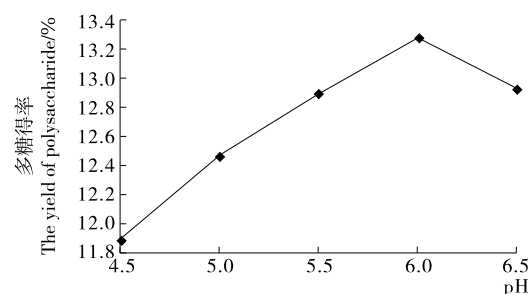


图 5 pH 值对多糖得率的影响

Figure 5 Effect of pH on polysaccharide yield

2.1.6 料液比对多糖得率的影响 由图 6 可知,块菌多糖的得率随料液比的增加呈先上升的趋势,在 1:40 (g/mL) 处达到最大值,随后开始下降。可能是当料液比较小时,短时间内多糖的浸出受到抑制,所以得率较低;而料液比较大时,水分的增加使酶的浓度降低,多糖得率也会降低^[8]。故提取块菌多糖的最合适料液比为 1:40 (g/mL)。

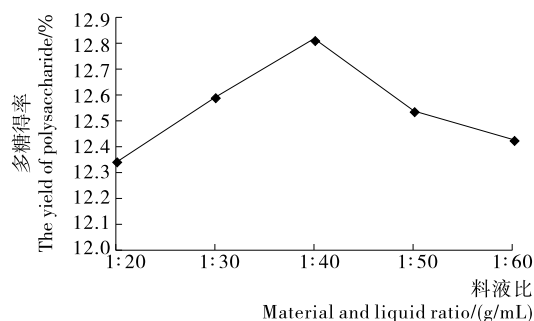


图 6 料液比对多糖得率的影响

Figure 6 Effect of material/liquid ratio on polysaccharide yield

2.2 均匀试验

2.2.1 均匀设计 根据单因素试验结果,选择酶配比、酶解时间、酶解温度、酶用量、pH 值和料液比 6 个因素的较优水平(见表 1),按照 $U_{10}(10^8)$ 设计进行均匀试验。

2.2.2 均匀试验结果与分析 按照优化之后的数据点,每次提取块菌干粉 1.0 g,根据选定的均匀设计表,得出试验结果见表 2。运用 DPS 9.50 软件进行二次多项式回归分析得到回归方程为:

$$Y = 9.6350 + 1.1653X_1 + 0.0325X_1^2 - 0.0058X_1X_3 - 0.1206X_1X_5 - 0.0049X_3X_4 + 0.0053X_3X_5 + 0.0547X_4X_5. \quad (3)$$

对建立的模型进行检验可知, $F = 3240.4886 > F_{0.01}(7, 2) = 99.34$, $P = 0.0003$,说明结果显著($P < 0.05$)。复相关系数 $R = 0.999956$,剩余标准差 $SSE = 0.0094$ 。说明该模

表 1 均匀设计试验因素与水平表
Table 1 Factors and levels of uniform design

水平	X ₁ 酶配比(g/g)	X ₂ 酶解时间/min	X ₃ 酶解温度/℃	X ₄ 酶用量/%	X ₅ pH 值	X ₆ 料液比(g/mL)
1	4 : 1	45	41	0.8	4.3	1 : 20
2	3 : 1	54	44	1.1	4.5	1 : 25
3	2 : 1	63	47	1.4	4.8	1 : 30
4	1 : 1	72	50	1.7	5.1	1 : 35
5	1 : 2	81	53	2.0	5.4	1 : 40
6	1 : 3	90	56	2.3	5.7	1 : 45
7	1 : 4	99	59	2.6	6.0	1 : 50
8	1 : 5	108	62	2.9	6.3	1 : 55
9	1 : 6	117	65	3.2	6.6	1 : 60
10	1 : 7	126	68	3.5	6.9	1 : 65

表 2 均匀设计试验结果
Table 2 The results of uniform experiment design

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	多糖得率/%
1	1	2	3	5	7	10	11.50
2	2	4	6	10	3	9	11.58
3	3	6	9	4	10	8	11.77
4	4	8	1	9	6	7	11.81
5	5	10	4	3	2	6	11.57
6	6	1	7	8	9	5	12.23
7	7	3	10	2	5	4	12.13
8	8	5	2	7	1	3	12.81
9	9	7	5	1	8	2	12.16
10	10	9	8	6	4	1	12.79

型与实际试验拟合度高,能很好地拟合复合酶法提取块菌多糖的工艺条件,方程有意义。

对相关系数进行检验,结果见表 3。除 X₂² 的回归系数外,X₁ 的回归系数,X₁ 与 X₃ 的交互项系数、X₁ 与 X₅ 的交互项系数、X₃ 与 X₄ 的交互项系数、X₃ 与 X₅ 的交互项系数、X₄ 与 X₅ 的交互项系数均达到了极显著水平(P<0.01),具有显著的统计学意义。表明块菌多糖得率与各因素间并非简单的线性关系,而是存在较大的交互作用。如果只用单因素法很难得到较优方案,均匀设计是很好的寻优方法。从 P 值的

表 3 相关系数及检验结果

Table 3 Correlation coefficient and test result

相关因素	偏相关系数	t 值	P 值
r(y,X ₁)	1.003 9	90.443 7	0.000 1
r(y,X ₂ ²)	0.987 0	8.079 8	0.018 0
r(y,X ₁ X ₃)	-1.035 3	40.711 4	0.000 7
r(y,X ₁ X ₅)	-1.034 7	61.111 8	0.000 3
r(y,X ₃ X ₄)	-1.000 4	17.848 8	0.003 7
r(y,X ₃ X ₅)	1.003 6	53.169 6	0.000 4
r(y,X ₄ X ₅)	1.063 6	29.734 7	0.001 3

大小可知,对块菌多糖得率影响的大小顺序为 X₁>X₁X₅>X₃X₅>X₁X₃>X₄X₅>X₃X₄>X₄²。

同时,用 DPS 软件进行分析得到复合酶法提取块菌多糖的最优条件为:酶配比 1 : 7.03 (g/g),酶解时间 47.60 min,酶解温度 41.29 ℃,酶用量为底物浓度的 3.62%,pH 值 4.79,料液比 1 : 29.08 (g/mL)时,块菌多糖的理论得率为 14.98%。

2.3 最佳工艺的确定及验证

为操作方便,设置最佳提取工艺条件为:酶配比 1 : 7 (g/g),酶解时间 48 min,酶解温度 41 ℃,酶用量为底物浓度的 3.6%,pH 值 4.8,料液比 1 : 29 (g/mL)。按上述条件进行验证,实验重复 3 次。

经验证,优化条件下提取的块菌多糖得率为 14.50%,比均匀试验中的 10 组试验结果都高,说明优化结果具有指导意义。但是与回归模型的预测值 14.98%有一定的误差,相对误差为 3.3%。在此条件下,块菌多糖含量可达 75.96%。与前人^[15,20]研究相比,该块菌多糖提取温度更低,时间更短,耗能更少,提取效率更高。

2.4 不同提取方法的比较

不加酶的对照试验,提取的块菌多糖得率仅为 9.45%,复合酶法与之相比提高了 53.44%;单一使用中性蛋白酶和纤维素酶的多糖得率仅为 10.87%和 11.43%。说明均匀设计优化多糖提取条件稳定性好,且非常可靠,可用于复合酶法提取块菌多糖。

3 结论

本研究通过单因素和均匀设计试验,得出块菌多糖最佳提取工艺条件为:酶配比 1 : 7 (g/g),酶解时间 48 min,酶解温度 41 ℃,酶用量 3.6%,酶解 pH 值 4.8,料液比 1 : 29 (g/mL),块菌多糖的得率可达 14.50%,多糖含量可达 75.96%。应用此条件提取块菌多糖稳定可靠,提取时间短,还节能减排,可为块菌多糖的开发利用提供参考。但是,本研究方法所得块菌多糖的纯化、结构鉴定及其生物活性等还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李淑超, 乔鹏, 刘思思, 等. 块菌属分子系统学及菌根共生机制研究进[J]. 菌物学报, 2016, 35(12): 131-144.
- [2] 清源, 何晓兰, 柳成益, 等. 名贵地下真菌——块菌的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 19-22.
- [3] CHATURVEDI P, KB K, KWAPE T, et al. Free radical scavenging and antioxidant properties of a truffle, *Kalaharituber pfeilii* found in Kalahari deserts of Botswana[J]. International Journal of Bioassays, 2015, 4(11): 4 533-4 537.
- [4] 王云, 刘培贵. 块菌名实考证及其资源保护[J]. 植物分类与资源学报, 2011, 33(6): 625-642.
- [5] 刘培贵, 王云, 王向华, 等. 中国块菌要览及其保护策略[J]. 菌物研究, 2012(4): 232-243.
- [6] QING Yuan, LI Shu-hong, LIU Cheng-yi, et al. *Tuber xanthomonosporum*, a new *Paradoxa*-like species from China[J]. Mycotaxon, 2015, 130(1): 61-68.
- [7] ATTIA W Y, EL-NAGGAR R E, BAWADEKJI A, et al. Evaluation of some in vitro anti-carcinogenic activities of polysaccharides extracted from ascomata of the desert truffle *terfezia clavervyi* chatin[J]. J. Appl. Environ. Biol. Sci., 2018, 8(2): 152-159.
- [8] ZHAO Wei, WANG Xiao-hua, LI Hong-mei, et al. Isolation and characterization of polysaccharides with the antitumor activity from Tuber fruiting bodies and fermentation system[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(5): 1 991-2 002.
- [9] BEARA I N, LESJAK M M, CETOJEVIC-SIMIN D D, et al. Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of black (*Tuber aestivum* Vittad.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles [J]. Food Chemistry, 2014, 165: 460-466.
- [10] 张文州, 许嵘. 食药真菌多糖的研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(15): 395-399.
- [11] 王庆, 李丹丹, 潘芸芸, 等. 提取方法对天麻多糖提取率及其抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(9): 146-150.
- [12] GUO Xin, YE Xing-qian, SUN Yu-jing, et al. Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure, and antioxidant activity of sea cucumber fucoidan[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(5): 1 088-1 095.
- [13] CHENG Zhen-yu, SONG Hai-yan, YANG Ying-jie, et al. Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 76: 161-168.
- [14] 张晓, 朱彩平, 邓红, 等. 均匀设计优化超声协同酶法提取平菇多糖工艺[J]. 食品与机械, 2016, 32(9): 166-171.
- [15] 岳金玫, 蒲彪, 周月霞, 等. 响应面法优化块菌多糖的酶法辅助提取工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(2): 119-124.
- [16] 岳金玫. 攀枝花块菌多糖的提取、纯化及抗氧化活性研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2012: 20-21.
- [17] 苑璐, 冷凯良, 周余航, 等. 复合酶解法优化黄精多糖提取工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(9): 996-1 001.
- [18] 赵玉红, 林洋, 张立钢, 等. 黑木耳多糖高剪切分散乳化法与酶法提取的比较研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(4): 181-186.
- [19] 薛燕, 敢小双, 黄开丽, 等. 铁皮石斛多糖复合酶法提取工艺及其抗氧化性[J]. 食品工业科技, 2018, 39(3): 215-219.
- [20] 岳金玫, 蒲彪, 陈安均, 等. 响应面法优化块菌多糖的提取工艺[J]. 食品工业科技, 2012, 33(19): 271-274.
- (上接第 144 页)
- [8] MCCLEMENTS D J. Food emulsions : principles, practices, and techniques[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2005, 36(2): 223-224.
- [9] DICKINSON E. Food emulsions and foams: Stabilization by particles[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2010, 15(1): 40-49.
- [10] MASKAN M, GÖĞÜŞ F. Effect of sugar on the rheological properties of sunflower oil-water emulsions[J]. Journal of Food Engineering, 2000, 43(3): 173-177.
- [11] 王瑛瑶, 王璋, 罗磊. 水酶法提花生油中乳状液性质及破乳方法[J]. 农业工程学报, 2008, 24(12): 259-263.
- [12] 章绍兵. 水酶法从油菜籽中提取油和生物活性肽的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008: 52-54.
- [13] 王文睿, 江连洲, 郑环宇, 等. 热处理对大豆乳状液破乳工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(4): 285-287.
- [14] 李杨, 齐宝坤, 隋晓楠, 等. 水酶法提取大豆乙醇冷浴破乳工艺及油脂聚集状态的研究[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(12): 79-83.
- [15] 李世科, 李春阳, 曾晓雄. 油茶籽油乳状液的碱法破乳工艺研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(3): 219-222.
- [16] 吴桐, 康健, 张丽霞, 等. 水酶法提沙棘果油破乳方法的研究[J]. 食品工业科技, 2011(12): 280-283.
- [17] 朱敏敏, 王永瑞, 刘文玉, 等. 水酶法提取番茄籽油酶法破乳工艺的研究[J]. 食品工业, 2018(4): 20-23.
- [18] WU Jun, JOHNSON L, JUNG S. Demulsification of oil-rich emulsion from enzyme-assisted aqueous extraction of extruded soybean flakes [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(2): 527.
- [19] CHABRAND R M, GLATZ C E. Destabilization of the emulsion formed during the enzyme-assisted aqueous extraction of oil from soybean flour[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2009, 45(1): 28-35.
- [20] 王丽波, 徐雅琴, 杨星等. 南瓜籽油的水酶法提取工艺及产品的理化性质[J]. 农业工程学报, 2010, 27(10): 383-387.
- [21] 李杨, 齐宝坤, 隋晓楠, 等. 超声辅助二次酶解对大豆乳状液破乳工艺研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(2): 16-19.
- [22] 包怡红, 郭阳. 响应面法优化超声波辅助水酶法提取松籽油工艺及其氧化稳定性[J]. 食品科学, 2016, 37(22): 60-68.
- [23] 李鹏飞. 水酶法提取花生油及蛋白质[D]. 无锡: 江南大学, 2017: 43-44.
- [24] 张涛, 江波, 王璋. 鹰嘴豆分离蛋白的乳化性及结构关系[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(12): 10-14.