

DOI:10.3969/j.issn.1000-1298.2010.11.028

纤维素酶协同超声波辅助提取苦瓜多糖工艺优化*

张利芳¹ 张名位² 黄文¹ 张雁² 张瑞芬² 魏振承²

(1. 华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070;

2. 广东省农业科学院生物技术研究所, 广州 510610)

【摘要】 为了得到纤维素酶协同超声波法提取苦瓜多糖的最佳工艺条件,利用 Box-Behnken 的中心组合设计及响应面法(RSM)探讨了超声波功率、酶量、料液比、时间、pH 值和温度等因素的优化组合,通过建立二次回归模型,确定其最佳提取工艺条件为:超声波功率 390 W、纤维素酶量 3 500 U/g(酶活 200 U/mg 以上)、料液比 1:38、时间 40 min、pH 值 5、温度 56℃。在此工艺条件下,苦瓜多糖的提取率为 21.1%,比热水浸提法、超声波法、纤维素酶法分别提高了 7.8%、13.5%、7.7%。结果表明纤维素酶协同超声波法是提高苦瓜多糖得率的有效途径之一。

关键词: 苦瓜 多糖 纤维素酶 超声波 提取 响应面法

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2010)11-0142-06

Optimization on Cellulase and Ultrasonic Wave Assisted Extraction Technology of *Momordica charantia* Polysaccharides

Zhang Lifang¹ Zhang Mingwei² Huang Wen¹ Zhang Yan² Zhang Ruifen² Wei Zhencheng²

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

2. Bio-technology Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China)

Abstract

To establish the extraction technology of cellulase assisted by ultrasonic wave of *Momordica charantia* polysaccharides (MCP), the optimization was applied to discuss some factors including ultrasound power, enzyme amount, the ratio of solid to liquid, extracting time, pH value, temperature with Box-Behnken center-united design and the method of response surface analysis (RSM). Through establishing the second regression model, the optimal parameters were conformed as follows: ultrasound power 390 W, cellulase amount 3 500 U/g (enzyme activity was more than 200 U/mg), ratio of solid to liquid 1:38, extracting time 40 min, pH value 5, temperature 56℃. Then the yield of crude *Momordica charantia* polysaccharides is 21.1%, higher 7.8%, 13.5% and 7.7%, respectively, comparing with the specific heat of flooding, ultrasonic wave and cellulase. These results suggested that cellulase assisted by ultrasonic wave extraction technology was one of the effective ways to improve the yield of *Momordica charantia* polysaccharides.

Key words *Momordica charantia*, Polysaccharides, Cellulase, Ultrasonic wave, Extraction, Response surface methodology

引言

多糖是苦瓜的重要生物活性成分之一^[1~3],已

有研究报道苦瓜多糖(*Momordica charantia* polysaccharides,简称 MCP)是一种由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成的杂多糖^[4~5],研

收稿日期: 2009-10-14 修回日期: 2010-02-10

* 广东省自然科学基金研究团队项目(06200586)和广东省院合作项目(2009B091300135)

作者简介: 张利芳,硕士生,主要从事功能食品与活性物质研究,E-mail: zlf6666@126.com

通讯作者: 张名位,研究员,主要从事功能食品与活性物质研究,E-mail: mwzhh@163.com

究苦瓜多糖的提取分离技术,对揭示其保健机制和指导其精深加工具有重要意义。

近几年来,生物酶技术、超声技术在多糖等生物活性物质提取工艺中的应用已引起广泛的关注,有关植物多糖的超声提取和生物酶提取工艺已有不少报道^[6-7]。关于苦瓜多糖的提取工艺报道主要集中在热水浸提法^[8]、纤维素酶和中性蛋白酶水解法^[9]和微波萃取法^[10],但关于其超声波-生物酶协同辅助提取工艺尚未见报道。为此,本文探讨采用纤维素酶结合超声波提取法提取苦瓜多糖的工艺条件,旨在为苦瓜多糖的工业化生产提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

苦瓜干:苦瓜品种为“碧绿 2 号”,由广东省农业科学院蔬菜研究所提供。新鲜苦瓜切成薄片,热风干燥箱中 60℃ 以下脱水干燥,密封保存备用。

主要试剂:95% 乙醇、苯酚、浓硫酸、葡萄糖均为分析纯;纤维素酶(酶活 200 U/mg 以上,fluka 公司)

主要仪器:SHZ-III 型旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;TDL-5 型离心机,上海安亭科学仪器厂;UV-1800 型紫外可见分光光度计,日本岛津有限公司;HWS-26 型电热恒温水浴锅,上海一恒科技有限公司;HS-900 型超声波细胞粉碎机,宁波科生仪器厂;PHS-3C 型精密酸度 pH 计,上海大普仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 苦瓜多糖的提取工艺流程

苦瓜干制备→粉碎,过 40 目筛→80% 乙醇回流浸提(水浴温度 60℃)→过滤→滤渣风干→样品称重(预处理样)→纤维素酶协同超声波法提取→抽滤→粗多糖提取液浓缩至原体积的 1/4→醇析→沉淀→冷冻干燥→多糖粗品。

1.2.2 苦瓜多糖含量的测定

采用改进的苯酚-硫酸法^[11]测定多糖含量,葡萄糖标准曲线为

$$Y_1 = 0.0129X + 0.02 \quad (R^2 = 0.9994)$$

式中 Y_1 ——波长 490 nm 处吸光度

X ——葡萄糖质量浓度,mg/L

为了操作方便,直接测量超声提取并抽滤后得到的溶液中多糖含量,将其与预处理样品质量的比值定义为多糖提取率,并由此作为不同工艺条件下多糖提取效果的衡量标准,多糖提取率计算公式为

$$W = \frac{10^{-6} X V n}{m} \times 100\%$$

式中 V ——样品溶液的体积,mL

n ——测定时多糖液的稀释倍数

m ——苦瓜干样的质量,g

1.2.3 单因素试验

(1) 超声波功率

称取 2 g 预处理后的苦瓜粉,在酶量 2 000 U/g、料液比(苦瓜预处理样品质量(g)与双蒸水体积(mL)的比例)1:50、提取时间 40 min、pH 值 5、提取温度 50℃ 的条件下,考察不同超声波功率(270、360、450、540、630、720 W)对苦瓜多糖提取率的影响。

(2) 纤维素酶量

称取 2 g 预处理后的苦瓜粉,在超声波功率 360 W、料液比 1:50、提取时间 40 min、pH 值 5、提取温度 50℃ 的条件下,考察不同酶添加量(1 000、1 500、2 000、2 500、3 000、3 500、4 000、4 500 U/g)对苦瓜多糖提取率的影响。

(3) 料液比

称取 2 g 预处理后的苦瓜粉,在超声波功率 360 W、酶量 3 500 U/g、提取时间 40 min、pH 值 5、提取温度 50℃ 的条件下,考察不同料液比(1:30、1:40、1:50、1:60、1:70)对苦瓜多糖提取率的影响。

(4) pH 值

称取 2 g 预处理后的苦瓜粉,在超声波功率 360 W、酶量 3 500 U/g、料液比 1:40、提取时间 40 min、提取温度 50℃ 的条件下,考察不同 pH 值(3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5)对苦瓜多糖提取率的影响。

(5) 提取时间

称取 2g 预处理后的苦瓜粉,在超声波功率 360 W、酶量 2 000 U/g、料液比 1:50、pH 值 5、提取温度 50℃ 的条件下,考察不同提取时间(10、20、30、40、50、60 min)对苦瓜多糖提取率的影响。

(6) 提取温度

称取 2 g 预处理后的苦瓜粉,在超声波功率 360 W、酶量 3 500 U/g、料液比 1:40、pH 值 5、提取时间 40 min 的条件下,考察不同温度(35、40、45、50、55、60、65℃)对苦瓜多糖提取率的影响。

1.2.4 多因素响应面设计试验

根据单因素试验结果,对超声波功率、料液比、pH 值、温度进行四因素 Box-Behnken 中心组合设计^[12],利用软件 SAS 分析其对响应值(苦瓜多糖提取率)的影响,建立数学模型,优化苦瓜多糖的提取工艺。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 超声波功率

由不同超声波功率对苦瓜多糖提取率的影响结果(图1)可知,超声波功率为360 W时酶解效果最好,多糖提取率最高。但当超声波功率继续增强时,多糖提取率不但没增加反而减小,这是因为超声波的剧烈刺激对酶的结构产生影响,使酶活力下降。

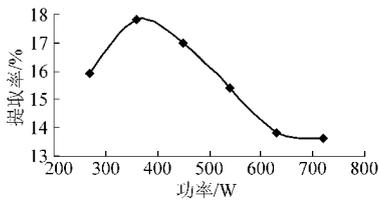


图1 超声波功率对苦瓜多糖提取率的影响

Fig. 1 Effect of ultrasound power on the *Momordica charantia* polysaccharides extraction rates

2.1.2 纤维素酶量

由图2可以看出,酶量增加到3 500 U/g的时候,提取率达到最大,之后不再随着酶量的增加而增大。

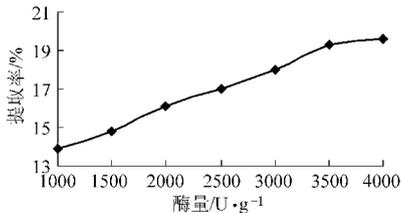


图2 酶量对苦瓜多糖提取率的影响

Fig. 2 Effect of enzyme content on the *Momordica charantia* polysaccharides extraction rates

2.1.3 液料比

由图3可知,液料比在20~40之间时,多糖提取率随溶剂比例的增大而提高,在液料比40时达到最大,但之后随着溶剂比例的增大提取率反而减小。这是因为随着溶剂量的增大,超声波介质的液体增多,细胞内部的多糖物质开始向外扩散,此时多糖的含量也随之增大。但随着反应体系中水分的增加,酶和反应底物的浓度均会相应下降,进而导致多糖提取率减小。

2.1.4 提取时间

不同提取时间对苦瓜多糖提取率的影响结果见图4。由图4可明显看出,多糖的提取率随着时间的延长逐渐升高,到40 min时达到提取最大值,在40~50 min之间变化很小,在50 min之后苦瓜多糖提取率不但没有上升反而下降,这是因为超声波引起的热量积聚或机械剪切作用导致多糖的结构变化而损失^[13],同时超声波时间的延长导致纤维素酶结

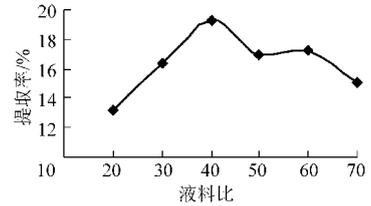


图3 液料比对苦瓜多糖提取率的影响

Fig. 3 Effect of the ratio of liquid to solid on the *Momordica charantia* polysaccharides extraction rates

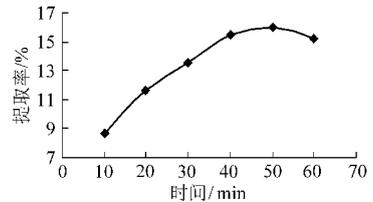


图4 时间对苦瓜多糖提取率的影响

Fig. 4 Effect of treatment time on the *Momordica charantia* polysaccharides extraction rates

构和活性变化所致。

2.1.5 pH值

不同pH值对苦瓜多糖提取率的影响结果见图5。当pH值为5.5时,多糖的提取率达到最大,随着pH值的不断增加,提取率开始下降,这说明pH值在5.5时酶活性达到了峰值。

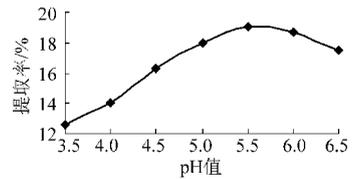


图5 pH值对苦瓜多糖提取率的影响

Fig. 5 Effect of pH value on the *Momordica charantia* polysaccharides extraction rates

2.1.6 提取温度

不同提取温度对苦瓜多糖提取率的影响结果见图6。在60℃时多糖提取率达到最大,温度继续升高时,提取率随着温度的升高迅速下降。这是因为在酶促反应中,随温度的升高,反应物的能量增加,使反应速度加快,但超过最适温度后,酶蛋白质变性,直至丧失活性。

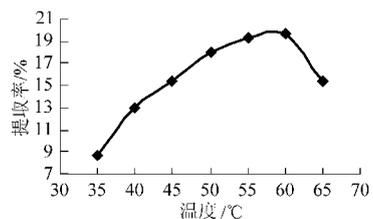


图6 提取温度对苦瓜多糖提取率的影响

Fig. 6 Effect of treatment temperature on the *Momordica charantia* polysaccharides extraction rates

2.2 苦瓜多糖提取工艺条件优化

2.2.1 多糖提取率模型的建立与检验

超声波功率、液料比、pH 值、温度四因素三水平的 Box-Behnken 中心组合设计编码水平, 试验方案及结果分别见表 1、2, 具体的回归统计分析结果见表 3。

表 1 苦瓜多糖提取 Box-Behnken 中心组合设计的试验因素和编码水平

Tab. 1 Experimental factors and levels of Box-Behnken experiments design of the *Momordica charantia* polysaccharides extraction rates

编码	因素			
	液料比 x_1	温度 $x_2/^\circ\text{C}$	pH 值 x_3	功率 x_4/W
-1	30	50.0	5	270
0	40	57.5	6	360
1	50	65.0	7	450

表 2 苦瓜多糖提取 Box-Behnken 中心组合设计试验方案及结果

Tab. 2 Box-Behnken experiments design and the results of the *Momordica charantia* polysaccharides extraction rates

试验序号	X_1	X_2	X_3	X_4	苦瓜多糖得率 $Y/\%$
1	-1	-1	0	0	15.93
2	-1	1	0	0	16.86
3	1	-1	0	0	15.22
4	1	1	0	0	16.09
5	0	0	-1	-1	16.90
6	0	0	-1	1	19.97
7	0	0	1	-1	12.53
8	0	0	1	1	13.49
9	-1	0	0	-1	15.60
10	-1	0	0	1	18.69
11	1	0	0	-1	15.79
12	1	0	0	1	18.09
13	0	-1	-1	0	20.81
14	0	1	1	0	10.91
15	0	-1	-1	0	16.89
16	0	1	1	0	12.90
17	-1	0	-1	0	19.26
18	-1	0	1	0	11.74
19	1	0	-1	0	19.21
20	1	0	1	0	12.77
21	0	-1	0	-1	13.51
22	0	-1	0	1	15.99
23	0	1	0	-1	10.81
24	0	1	0	1	13.82
25	0	0	0	0	20.01
26	0	0	0	0	20.00
27	0	0	0	0	19.99

采用 SAS 程序对所得数据进行响应面分析, 回归方程为

$$Y = 20 - 0.076X_1 - 0.417X_2 - 3.225X_3 + 1.243X_4 - 1.168X_1^2 - 0.015X_1X_2 + 0.27X_1X_3 - 0.198X_1X_4 - 3.107X_2^2 + 1.478X_2X_3 + 0.136X_2X_4 - 2.152X_3^2 - 0.528X_3X_4 - 2.425X_4^2$$

由表 3 可知, 响应面回归模型达到了高度显著水平, 决定系数 R^2 为 0.921, 表明模型的预测值与实际值非常吻合, 模型成立。模型一次项 X_3 、 X_4 和二次项 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 影响达到极显著水平 ($P < 0.01$); 交互项 X_2X_3 影响达到显著水平 ($P < 0.05$), 表明各种影响因素对于苦瓜多糖提取率的影响不是简单的线性关系。模型的失拟项检验不显著, 说明该二次方程能够很好地拟合真实的响应面。通过 GLM Procedure 对模型处理, 保留 $P < 0.30$ 的各项, 得到优化后的回归模型为

$$Y = 20 - 0.381X_2 - 3.098X_3 + 1.243X_4 - 0.850X_1^2 - 3.743X_2^2 + 1.908X_2X_3 - 2.788X_3^2 - 2.108X_4^2$$

表 3 回归模型统计分析结果

Tab. 3 Results of statistical analysis for regression coefficients of model

方差来源	自由度	平方和	均方	F	P	显著性
X_1	1	0.070	0.070	0.044	0.838 0	
X_2	1	2.080	2.080	1.298	0.277 0	
X_3	1	124.848	124.848	77.912	0.000 1	**
X_4	1	18.499	18.499	11.544	0.005 3	**
X_1^2	1	7.310	7.310	4.562	0.054 0	
X_1X_2	1	0.001	0.001	0.001	0.982 1	
X_1X_3	1	0.292	0.292	0.182	0.676 8	
X_1X_4	1	0.158	0.158	0.099	0.759 0	
X_2^2	1	51.636	51.636	32.224	0.000 1	**
X_2X_3	1	8.732	8.732	5.449	0.037 8	*
X_2X_4	1	0.068	0.068	0.043	0.839 7	
X_3^2	1	24.738	24.738	15.438	0.002 0	**
X_3X_4	1	1.112	1.112	0.694	0.421 2	
X_4^2	1	31.391	31.391	19.590	0.000 8	**
一次项	4	145.496	0.599	22.700	<0.000 1	**
二次项	4	67.898	0.279	10.590	0.000 7	**
交互项	6	10.363	0.043	1.080	0.427 3	
回归模型	14	223.757	15.983	9.974	0.000 1	**
失拟	8	13.965	1.746	0.72	0.678 0	
纯误差	4	9.663	2.416			
总和	26	242.986				

注: * 为 0.05 水平上显著, ** 为 0.01 水平上显著。

2.2.2 试验因子间交互效应分析

提取温度与 pH 值之间存在交互作用。由图 7 可知, 随着提取温度和 pH 值的升高, 苦瓜多糖提取

率均先增加后下降。其中,提取温度升高时,响应曲面上升和下降坡度均较明显,表明提取温度对苦瓜多糖提取率影响较大;当 pH 值增加时,响应曲面上升坡度较平缓,表明此时 pH 对苦瓜多糖提取率影响较小,但当 pH 值达到最适值并继续增加时,响应曲面下降坡度陡峭,表明此时提取率对 pH 值的改变非常敏感。

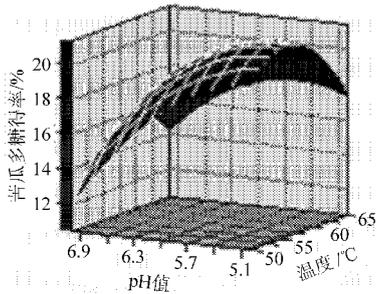


图7 提取温度与pH值交互作用对苦瓜多糖提取率影响的响应面

Fig. 7 Response surface for effects of temperature and pH value on the polysaccharides extraction rates

2.2.3 提取条件的优化及验证

结合回归模型的数学分析,苦瓜多糖提取最优工艺参数:以苦瓜干为原料,超声波功率 391.7 W,纤维素酶量 3 500 U/g,料液比 1:38.4, pH 值 5.1,提取时间 40 min,提取温度为 55.5°C。此工艺条件下苦瓜多糖的提取率预测值为 21.7%。为进一步检验响应面分析法的可靠性,选取超声波功率 390 W,纤维素酶量 3 500 U/g,料液比 1:38, pH 值 5,提取时间 40 min,提取温度 56°C 的条件进行多糖的提取,实际测得苦瓜多糖提取率为 21.1%,与模型预测值的差值仅占预测值的 2.8%。因此,采用响应面分析优化得到的浸提条件参数准确可靠,可用于实际操作。

将纤维素酶协同超声波法、超声波法和纤维素酶法进行了比较。在最优化工艺条件下,用纤维素酶协同超声波法提取时苦瓜多糖提取率为 21.1%,同等条件下,不加纤维素酶,但有超声波作用时苦瓜多糖提取率仅为 7.6%;只添加纤维素酶,无超声波作用时提取率为 13.4%。以上数据表明,纤维素酶协同超声波法对苦瓜多糖的提取效果明显优于单纯

的超声波法和纤维素酶法。

3 讨论

纤维素酶协同超声波法提取苦瓜多糖具有提取率高、工艺简单、条件温和等特点。本文条件下,苦瓜多糖的得率比常规热水浸提法提高了 7.8%^[2],也明显高于单纯的超声波法和纤维素酶法。超声波可以产生强烈振动、空化效应及搅拌作用,纤维素酶对细胞壁的破坏作用降低了超声传质阻力^[14],二者协同促使苦瓜多糖更快进入溶剂,提高多糖得率,缩短超声提取时间。本文中当超声波功率增强到某一值后,苦瓜多糖提取率随超声波功率的增强反而下降,这一结果与国内外关于超声波功率在一定强度范围内可促进酶介导的反应,但强度过大酶结构会发生不可逆变化的报道一致^[15-16]。

另外,该方法对试验设备有较高的要求,存在一定的局限性。酶的最佳温度及最佳 pH 值往往在一个很小的范围内,反应条件的微小波动,都可能使酶的活性大大降低,因此必须严格控制酶反应时的温度及 pH 值。超声波提取的效果与超声波的频率、强度、超声时间、温度、作用方式以及提取对象密切相关,应用超声波提取技术时应考虑这些处理,否则不仅发挥不了超声波对提取过程的强化作用,甚至还可能导致提取物的结构与性质发生改变,使提取率降低^[17]。

4 结束语

建立以料液比 X_1 、提取温度 X_2 、pH 值 X_3 、超声波功率 X_4 为自变量和多糖提取率 Y 为因变量的纤维素酶协同超声波法提取苦瓜多糖的回归模型,即 $Y = 20 - 0.381X_2 - 3.098X_3 + 1.243X_4 - 0.850X_1^2 - 3.743X_2^2 + 1.908X_2X_3 - 2.788X_3^2 - 2.108X_4^2$,确定最佳工艺条件为超声波功率 390 W,纤维素酶量 3 500 U/g,料液比 1:38, pH 值 5,提取时间 40 min,提取温度 56°C,该工艺条件下,苦瓜多糖提取率达 21.1%,明显高于单纯的超声波法和纤维素酶法,同常规的热热水浸提取法相比更省时有效,可应用于苦瓜多糖的工业化生产。

参 考 文 献

- Lolita L C, Nina G B, Sorietta E R, et al. Studies on the immunomodulating activities of the polysaccharide extracts from *Momordica charantia* L (Ampalaya)[J]. Philippine Journal of Nutrition, 2003, 50(1~2): 10~27.
- 张慧慧,董英. 苦瓜碱提多糖降小鼠血糖功能的实验研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(7): 7~9.
Zhang Huihui, Dong Ying. Studies on antihyperglycemic effect of alkali-extracted polysaccharides from *Momordica charantia* L. in mice[J]. Food Research and Development, 2006, 27(7): 7~9. (in Chinese)
- 吴笏笛,陈红漫. 水溶性苦瓜多糖的分离纯化及生物学活性的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(3): 82~86.

- Wu Jiadi, Chen Hongman. Study on separation, purification and biological activity for soluble polysaccharide from *Momordica charantia*[J]. Food Science, 2006, 27(3): 82 ~ 86. (in Chinese)
- 4 初敏, 齐锡祥, 朱飞, 等. 多糖研究概述[J]. 中药研究与信息, 2003, 5(4): 18 ~ 20.
- 5 黄婧, 张名位, 辛修锋, 等. 苦瓜粗多糖提取工艺的优化[J]. 农业机械学报, 2007, 38(6): 112 ~ 116.
Huang Jing, Zhang Mingwei, Xing Xiufeng, et al. Optimization of extraction parameters for *Momordica charantia* polysaccharides[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2007, 38(6): 112 ~ 116. (in Chinese)
- 6 易阳, 张名位, 廖森泰, 等. 龙眼多糖超声波-酶解辅助提取工艺优化[J]. 农业机械学报, 2010, 41(5): 131 ~ 136.
Yi Yang, Zhang Mingwei, Liao Sentai, et al. Optimization of ultrasonic-enzyme-assisted extraction technology of polysaccharides from longan pulp[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(5): 131 ~ 136. (in Chinese)
- 7 邹东恢, 梁敏, 杨勇, 等. 香菇多糖复合酶法提取及其脱色工艺优化[J]. 农业机械学报, 2009, 40(3): 135 ~ 138, 134.
Zou Donghui, Liang Min, Yang Yong, et al. Optimum technology on extraction and decoloration of lentinan by composite enzyme method[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(3): 135 ~ 138, 134. (in Chinese)
- 8 刘金福, 张平平, 赵鑫. 苦瓜多糖提取工艺的研究[J]. 天津农学院学报, 2003, 10(3): 30 ~ 34.
Liu Jinfu, Zhang Pingping, Zhao Xin. Study on extraction techniques of polysaccharide from *Momordica charantia* L. [J]. Journal of Tianjin Agricultural College, 2003, 10(3): 30 ~ 34. (in Chinese)
- 9 吴笏笛, 阚国仕, 陈红漫, 等. 双酶水解法提取水溶性苦瓜多糖的研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(1): 73 ~ 74.
Wu Jiadi, Kan Guoshi, Chen Hongman, et al. Studies on the enzyme hydrolysis of soluble polysaccharide from *Momordica charantia*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2005, 33(1): 73 ~ 74. (in Chinese)
- 10 袁媛, 张华, 陈光英. 微波萃取苦瓜多糖的研究[J]. 海南师范大学学报, 2008, 21(1): 44 ~ 46.
Yuan Yuan, Zhang Hua, Chen Guangying. Study on the conditions of extracting polysaccharides in *Momordica charantia* L. by means of microwave[J]. Journal of Hainan Normal University, 2008, 21(1): 44 ~ 46. (in Chinese)
- 11 徐斌, 董英, 林琳, 等. 改良苯酚-硫酸法测定苦瓜多糖含量[J]. 食品科技, 2005(7): 79 ~ 82.
Xu Bin, Dong Ying, Lin Lin, et al. Determination of *Momordica charantia* L. polysaccharide by improved phenol-sulfuric acid method[J]. Food Science and Technology, 2005(7): 79 ~ 82. (in Chinese)
- 12 Annadurai G, Sheeja R Y. Use of Box-Behken design of experiments for the adsorption of verofix red using biopolymer[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 1998, 18(6): 463 ~ 466.
- 13 廖建明, 张谨, 沈子龙. 超声波法提取海带多糖的研究[J]. 药物生物技术, 2002, 9(3): 157 ~ 160.
Liao Jianmin, Zhang Jin, Shen Zilong. Extraction of laminaran by supersonic method[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2002, 9(3): 157 ~ 160. (in Chinese)
- 14 刘富梁, 金卫根, 梁华正, 等. 酶法在中药提取中的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1 152 ~ 1 153.
Liu Fuliang, Jin Weigen, Liang Huazheng, et al. Advances on application of enzyme to extraction of Chinese native medicine[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2006, 17(7): 1 152 ~ 1 153. (in Chinese)
- 15 何泽超. 纤维素的酶水解及超声波对其加速作用的研究[D]. 成都: 四川大学, 2001.
- 16 Mohammad H E, Christian P. A combination of ultrasound and oxidative enzyme: sono-biodegradation of substituted phenols [J]. Ultrasonic Sonochemistry, 2003, 10(4 ~ 5): 241 ~ 246.
- 17 Cacace E, Mazza G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol[J]. Journal of Food Science, 2003, 68(1): 240 ~ 248.
- 18 Yachmenev V G, Blanchard E J, Lambert A H. Use of ultrasonic energy in the enzymatic treatment of cotton fabric[J]. Ind. Eng. Chem. Res., 1998, 37(10): 3 919 ~ 3 923.
- 19 Kim M H, Lee S B, Ryu D D Y, et al. Surface deactivation of cellulase and its prevention[J]. Enzyme Microb. Technol., 1982, 4(2): 99 ~ 103.