

响应面法优化超声辅助提取 杏鲍菇黄酮类化合物工艺研究

孙 琼,张直峰,李月梅*

(山西师范大学生命科学学院,山西临汾 041000)

摘 要:以工厂化生产的杏鲍菇为原料,利用超声波辅助提取,响应面法优化杏鲍菇黄酮类化合物的提取工艺参数。在单因素实验基础上,选取乙醇浓度、料液比、超声温度、超声时间进行了Box-Behnken中心组合设计实验,并运用Design Expert 8.06软件对数据进行分析和优化。结果表明:杏鲍菇黄酮类化合物的最佳提取工艺参数为乙醇浓度80%、料液比1:40(g/mL)、超声温度80℃、超声时间100min,此工艺条件下,提取液中杏鲍菇黄酮类化合物提取率为2.92%。

关键词:杏鲍菇,黄酮类化合物,超声波辅助提取,响应面分析法

Optimized ultrasonic-assisted extraction process of flavonoids from *Pleurotus eryngii* by response surface methodology

SUN Qiong,ZHANG Zhi-feng,LI Yue-mei*

(College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041000, China)

Abstract: In this study, *Pleurotus eryngii* being used as the material, flavonoids was extracted through ultrasonic-assisted method. Response surface method was applied to obtain the optimum extracting conditions for flavonoids from *Pleurotus eryngii*. The effect of ethanol concentration, liquid-solid ratio, ultrasonic time and temperature on the yield of flavonoids were investigated by single factor experiments. Subsequently, the Box-Behnken center combination experimental design was used to investigate the effect of four factors on the yield of flavonoids extraction. The optimum combination was obtained by design expert 8.06 and response surface analysis. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: ethanol concentration 80%, liquid-solid ration 1:40(g/mL), ultrasonic temperature 80℃, ultrasonic time 100min. Under the above optimized conditions, the yield of flavonoids was 2.92%.

Key words: *Pleurotus eryngii*; flavonoids; ultrasonic-assisted extraction; response surface method

中图分类号:TS201.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2015)10-0264-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.10.047

杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)又名刺芹侧耳,隶属于担子菌亚门,伞菌目,侧耳科,侧耳属^[1],是从国外引进开发的一种药食两用珍稀食用菌。杏鲍菇子实体色泽白、肉肥厚、质地脆,具有独特的杏仁香味和鲍鱼味,素有“平菇王”之称^[2]。杏鲍菇富含蛋白质、碳水化合物、维生素及钙、镁、铜、锌等多种营养成分,此外还含有多糖、多肽、酚类、海藻糖等多种活性物质,具有抗癌、降血脂、促进肠胃消化、防止心血管病等多种功效^[3-4]。因杏鲍菇主要是作为食材利用,为此对其的研究多集中在栽培技术^[5-6]、病虫害防治^[7]、加工工艺及营养成分分析^[8-9]等方面,有关其生物活性成分的研究报道较少,仅见于蛋白、多糖等方面^[10]。

黄酮类化合物是普遍存在于植物中的一类生物活性成分。因其具有抗癌、抗氧化、抗衰老、降血脂、抑菌、增强免疫调节等多种生物活性而广泛应用于医药、食品保健等领域。近年来关于黄酮类化合物的提取技术已广见报道,如水浸提法、酶解法、超临界萃取法、微波辅助提取法与超声波辅助提取法等^[11-15]。在这些技术当中,超声波辅助提取法因操作简单、方便、能耗低、无副产物等优点而备受青睐^[16]。基于此,本研究采用超声辅助法对杏鲍菇中黄酮类化合物进行了提取,并采用响应面法(RMS)^[17-19]优化了提取工艺,旨在为杏鲍菇黄酮类化合物的进一步开发利用提供一定的技术支持。

收稿日期:2014-10-08

作者简介:孙琼(1989-),女,在读硕士研究生,研究方向:食用菌栽培及生理生化研究。

* 通讯作者:李月梅(1962-),女,硕士,教授,研究方向:食用菌栽培及资源开发利用。

基金项目:山西省农业科技攻关项目(20120311020-4)。

1 材料与方

1.1 材料与仪器

杏鲍菇 由山西侯临农业有限公司提供,洗净、切片、烘干、粉碎后装于密封袋中备用;芦丁标准品 国药集团化学试剂有限公司;无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等 均为国产分析纯。

FW100型高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司;101-3BS型电热鼓风干燥箱 金坛市荣华仪器制造有限公司;KQ-500E型超声波清洗器(功率200W) 昆山市超声仪器有限公司;RE-52型旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;722s可见分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司;电子天平(max210g, d=0.1mg) 北京赛多利斯仪器系统有限公司;SHZ-D(III)循环水式真空泵 巩义市予华仪器有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 杏鲍菇黄酮类化合物提取工艺流程^[20] 杏鲍菇→干燥→粉碎→过筛→称量→料液混匀→超声波处理→过滤→离心分离→取上清液测含量

1.2.2 标准曲线的绘制与杏鲍菇黄酮类化合物含量测定 精确称取在120℃干燥至恒重的芦丁标准品10mg,用70%的乙醇溶解并定容至100mL,使其浓度为100μg/mL。将芦丁溶液用70%乙醇稀释成0、20、40、60、80、100μg/mL,各取1mL于10mL带塞比色管中,加70%乙醇1mL,加5% NaNO₂溶液0.3mL,摇匀,静置6min,然后加10%的Al(NO₃)₃溶液0.3mL,摇匀,静置6min,再加4% NaOH溶液2mL,蒸馏水定容至5mL,摇匀静置15min后,以加入芦丁溶液0mL的比色管作为参比,于510nm波长处测其吸光度A。以芦丁浓度为横坐标,吸光值A为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程 $y=0.0026x-0.0019$,相关系数 $R^2=0.9996$ 。

杏鲍菇黄酮类化合物含量测定采取硝酸铝显色法^[21],根据标准曲线回归方程计算出杏鲍菇黄酮类化合物含量。

1.2.3 单因素实验 在进行响应面分析之前,先通过单因素实验确定不同因素的水平。分别考察乙醇浓度、料液比、超声温度、超声时间四个因素对超声波辅助提取效果的影响,以杏鲍菇黄酮类化合物提取率作为考察指标。

1.2.3.1 不同乙醇浓度对杏鲍菇黄酮类化合物提取率的影响 准确称取杏鲍菇粉末5份,每份1.00g,设定超声温度60℃,料液比1:30,超声时间60min时,考察不同乙醇浓度(40%~90%)对杏鲍菇黄酮类化合物提取率的影响。

1.2.3.2 不同料液比对杏鲍菇黄酮类化合物提取率的影响 准确称取杏鲍菇粉末5份,每份1.00g,设定超声温度为60℃,乙醇浓度70%,超声时间60min时,考察不同料液比(1:10~1:60)对杏鲍菇黄酮类化合物提取率的影响。

1.2.3.3 不同超声温度对杏鲍菇黄酮类化合物提取率的影响 准确称取杏鲍菇粉末5份,每份1.00g,设定乙醇浓度为70%,料液比1:30,超声时间60min时,考察不同超声温度(40~80℃)对杏鲍菇黄酮类化合物提取率的影响。

1.2.3.4 不同超声时间对杏鲍菇黄酮类化合物提取率的影响 准确称取杏鲍菇粉末5份,每份1.00g,设定超声温度为60℃,乙醇浓度70%,料液比1:30时,考察不同的超声时间(30~180min)对杏鲍菇黄酮类化合物提取率的影响。

1.2.4 响应面优化实验 在上述单因素实验的基础上,根据Box-Behnken中心组合设计原理,选取乙醇浓度、料液比、超声温度、超声时间四个因素与杏鲍菇黄酮类化合物提取率进行响应面实验设计(见表1),得出相关实验数据,通过Design-Expert软件对实验数据进行回归分析,得出优化杏鲍菇黄酮类化合物提取工艺参数,并开展验证性实验。

表1 Box-Behnken实验设计因素水平表

Table 1 Experimental variables and levels for the Box-Behnken experimental design

编码值	因素			
	X ₁ 乙醇浓度 (%)	X ₂ 料液比 (g/ml)	X ₃ 超声温度 (°C)	X ₄ 超声时间 (min)
+1	90	1:50	80	120
0	80	1:40	70	90
-1	70	1:30	60	60

1.2.5 杏鲍菇黄酮类化合物提取率计算

$$\text{杏鲍菇黄酮类化合物提取率}(\%) = \frac{c \cdot v \cdot n}{m} \times 100$$

式中,c: 线性计算出杏鲍菇黄酮类化合物的浓度(mg/mL);v: 提取液定容量(mL);n: 稀释倍数;m: 取样的质量(g)。

1.2.6 数据处理 每次实验设3个平行,取平均值,数据采用Sigma Plot 10.0软件和Design Expert 8.06软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 乙醇浓度对黄酮类化合物提取率的影响 由图1可知,随着乙醇浓度的增大,杏鲍菇中黄酮类化合物的提取率也相应的提高,当乙醇浓度大约为80%时提取率达到最大,此后随着乙醇浓度的增大提取率开始下降。分析其原因一方面可能是黄酮类化合物的极性范围很大,随着乙醇浓度的变化,溶剂

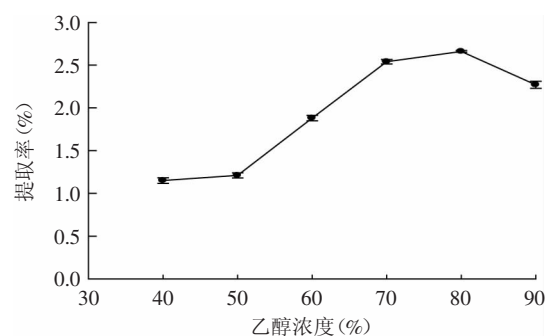


图1 乙醇浓度对杏鲍菇黄酮类化合物提取率的影响
Fig.1 Effect of ethanol concentration on yield of total flavonoids in *Pleurotus eryngii*

的极性也在改变,根据相似相溶原理,推测80%乙醇极性可能与杏鲍菇中黄酮类化合物的极性相似,更有利于化合物的溶出;另一方面,可能是随着乙醇浓度的增大,一些醇溶性的杂质溶出,与黄酮类化合物竞争乙醇,导致其提取率的降低。因此,在其他条件确定时乙醇适宜浓度约为80%。

2.1.2 料液比对黄酮类化合物提取率的影响 由图2可知,料液比在1:10~1:40之间,随着提取剂用量的增大,黄酮类化合物的提取率也随之增加,提取剂在一定范围内,随着其量的增加,增大了物料与溶剂的接触面积,有利于反应的充分进行及物质的溶出。当料液比超过1:50时,黄酮类化合物的提取率呈明显的下降趋势,推测其原因是提取剂过量,材料内部与溶剂之间的溶质已经达到平衡,材料表面与溶剂之间的浓度差不再是影响黄酮类化合物提取率的主要因素,此时溶剂溶解的杂质也随着增多,使得黄酮类化合物提取率下降。因此,在其他条件一定时,适宜的料液比为1:40。

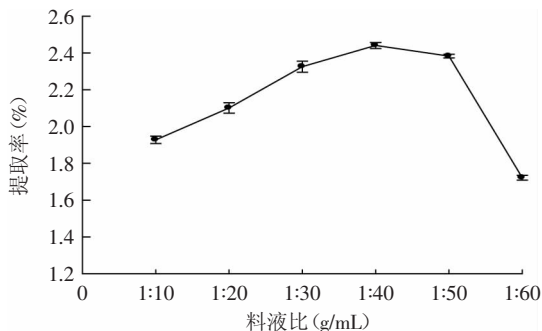


图2 料液比对杏鲍菇黄酮类化合物提取率的影响

Fig.2 Effect of liquid to solid ratio on yield of total flavonoids in *Pleurotus eryngii*

2.1.3 超声温度对黄酮类化合物提取率的影响 由图3可知,随着温度的不断增高,黄酮类化合物的提取率呈现先增加后下降的趋势,在70℃时提取率达到最大值。分析其原因为,在一定温度范围内,随着温度的升高分子运动速度加快和渗透扩散能力增强,更有利于物质的溶出,但是温度过高可能会导致黄酮类化合物的结构破坏,其提取率有所下降。因此,在其他条件确定时,黄酮类化合物超声提取的适

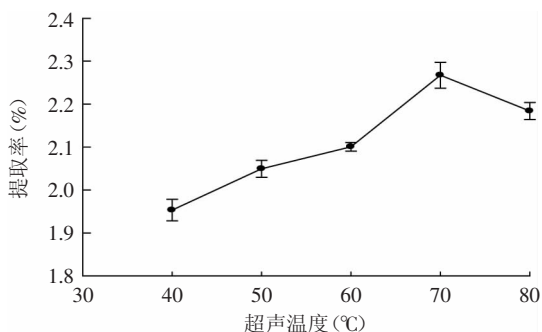


图3 超声温度对杏鲍菇黄酮类化合物提取率的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic treatment temperature on yield of total flavonoids in *Pleurotus eryngii*

宜温度为70℃。

2.1.4 超声时间对黄酮类提取率的影响 由图4可知,黄酮类化合物的提取率随着超声时间的增加呈上升趋势,在90min时达到最大,之后随着时间的加长,提取率有所下降。分析其原因可能为一方面提取时间太长,导致乙醇挥发增大,其浓度下降,不利于物质的提取。另一方面可能是提取时间过长,温度有所增加,可能造成黄酮类化合物结构的破坏。因此,在其他条件确定时,适宜的超声时间为90min。

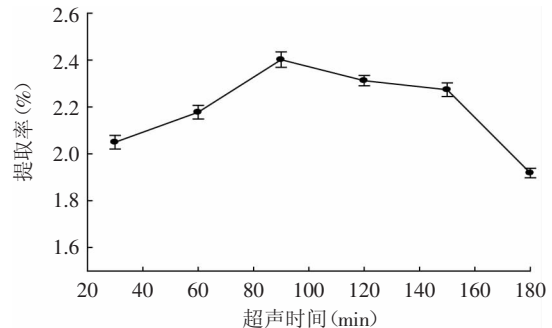


图4 超声时间对杏鲍菇黄酮类化合物提取率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic treatment time on yield of total flavonoids in *Pleurotus eryngii*

2.2 响应面实验

2.2.1 二次响应面回归模型的建立 响应面法优化杏鲍菇中黄酮类化合物提取的实验设计与结果见表2。

采用Design-Expert 8.06软件对表2中的数据进行多元回归拟合分析,可得到提取条件与黄酮类化合物提取率之间的二次多项式模型为:

$$Y = 2.91 + 0.013X_1 - 0.069X_2 + 0.064X_3 + 0.047X_4 - 0.015X_1X_2 - 0.042X_1X_3 + 0.027X_1X_4 + 0.015X_2X_3 + 0.083X_2X_4 + 0.05X_3X_4 - 0.051X_1^2 - 0.063X_2^2 - 0.053X_3^2 - 0.091X_4^2$$

2.2.2 响应面结果分析 为了检验回归方程的可靠性,进一步确定各影响因素对黄酮类化合物提取率的影响程度,对回归方程进行了方差分析,结果见表3。

表3为回归分析结果,回归方差分析显著性检验表明,该模型回归极显著 ($p < 0.01$)。失拟项 $p = 0.9385 > 0.05$,意味着其相对于纯误差是不显著的,此结果表明,在被检测变量值的任意组合条件下,用模型方程预测杏鲍菇黄酮类化合物的提取率都是适合的。对方程对实验拟合程度较好,模型能够较好地预测杏鲍菇黄酮类化合物提取实验结果,并能较准确地对响应值进行预测。方差分析还表明,回归方程一次项 X_2 和 X_3 对黄酮类化合物的提取率影响极显著 ($p < 0.01$), X_4 对黄酮类化合物提取率影响显著 ($p < 0.05$); 交互项 X_2X_4 影响显著 ($p < 0.05$), 其余不显著; 二次项 X_4^2 达到极显著 ($p < 0.01$) 水平, X_2^2 达到显著 ($p < 0.05$) 水平, 其余不显著。进一步表明各因素的交互作用对黄酮类化合物的提取存在影响,而不是简单的线性关系。另外,由 F 值得到各因素的主效应关系为: X_2 (料液比) $> X_3$ (温度) $> X_4$ (时间) $> X_1$ (乙醇浓度)。

2.2.3 响应面图形分析 由以上方差分析表可知,本实验所建立的数学模型中,仅有 X_2X_4 (料液比与超

表2 Box-Behnken实验设计及结果

Table 2 Design and results of the Box-Behnken experiments

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	黄酮类化合物提取率(%)
1	0	1	1	0	2.85
2	-1	0	-1	0	2.68
3	-1	-1	0	0	2.80
4	1	1	0	0	2.78
5	0	-1	1	0	2.96
6	0	-1	0	-1	2.87
7	-1	0	0	-1	2.77
8	1	0	0	-1	2.72
9	1	0	1	0	2.79
10	-1	1	0	0	2.75
11	0	1	-1	0	2.65
12	0	0	1	1	2.94
13	0	0	-1	-1	2.71
14	0	0	1	-1	2.73
15	1	0	-1	0	2.78
16	1	0	0	1	2.87
17	0	0	0	0	2.96
18	-1	0	1	0	2.86
19	0	0	0	0	2.89
20	-1	0	0	1	2.81
21	0	0	0	0	2.96
22	0	1	0	1	2.75
23	0	-1	-1	0	2.82
24	0	0	0	0	2.77
25	0	0	-1	1	2.72
26	0	-1	0	1	2.78
27	0	1	0	-1	2.51
28	0	0	0	0	2.97
29	1	-1	0	0	2.89

表3 回归方程方差分析表

Table 3 Analysis results of regression and variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	p	显著性
模型	26.48	14	1.89	4.92	0.0026	**
X ₁	0.21	1	0.21	0.55	0.4708	
X ₂	5.90	1	5.90	15.36	0.0015	**
X ₃	5.11	1	5.11	13.29	0.0026	**
X ₄	2.67	1	2.67	6.95	0.0196	*
X ₁ X ₂	0.074	1	0.074	0.19	0.6679	
X ₁ X ₃	0.73	1	0.73	1.90	0.1900	
X ₁ X ₄	0.32	1	0.32	0.82	0.3794	
X ₂ X ₃	0.077	1	0.077	0.20	0.6605	
X ₂ X ₄	2.71	1	2.71	7.05	0.0188	*
X ₃ X ₄	1.02	1	1.02	2.65	0.1258	
X ₁ ²	1.72	1	1.72	4.47	0.0530	
X ₂ ²	2.60	1	2.60	6.77	0.0209	*
X ₃ ²	1.70	1	1.70	4.41	0.0543	
X ₄ ²	5.35	1	5.35	13.93	0.0022	**
残差	5.38	14	0.38			
失拟项	2.36	10	0.24	0.31	0.9385	不显著
纯误差	3.02	4	0.76			

注:**差异极显著p<0.01;*差异显著p<0.05。

声时间)的交互作用影响显著,简单的一次线性方程难以对其进行解析,故进一步采用X₂与X₄响应面图形进行分析(图5),其余交互项均不显著,故不再列出。响应面图形是响应值对各因素构成的三维空间曲面图^[23],在其他两因素固定不变的情况下,可直观的反映交互项对响应值的影响。响应曲面越陡峭,表明操作条件的改变对响应值的影响越大;相反曲面坡度越平缓,表明响应值对于操作条件的改变越不敏感。

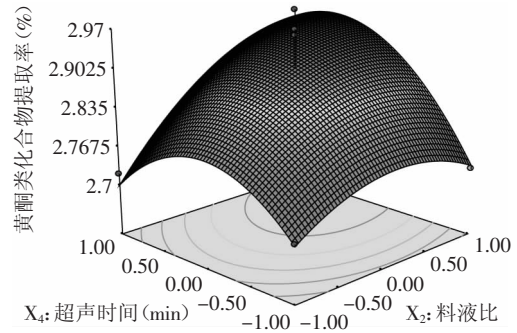


图5 超声时间和料液比对黄酮类化合物提取率的交互影响
Fig.5 Effect of ultrasonic treatment time and liquid to solid ratio on yield of total flavonoids

由图5可以看出,响应面为开口向下的突出椭圆形曲面,当料液比一定时,黄酮类化合物提取率随着超声时间的增加呈现先上升后下降的趋势;当超声时间一定时,黄酮类化合物提取率也随着料液比的增加呈现先升高后降低的趋势;表明超声时间过长或过短、料液比过大或过小都不利于杏鲍菇中黄酮类化合物的提取。另外等高线呈椭圆形,也说明超声时间与料液比交互作用显著,等高线沿料液比轴向较超声时间轴向密集,说明料液比对杏鲍菇黄酮类化合物提取率的影响比超声时间的影响大。

2.2.4 验证实验 采用Design-Expert 8.06软件对回归模型进行分析,获得的最佳工艺参数为:乙醇浓度79.1%、料液比1:38、提取温度78.4℃、提取时间101.7min,考虑到实际操作的可行性,将最佳提取工艺参数修正为乙醇浓度80%、料液比1:40、提取温度80℃、提取时间100min。此外,在最佳提取条件下经3次平行验证实验所得杏鲍菇的平均提取率为2.92%,与模型预测值2.95%相近。说明运用Box-Behnken设计及响应面法获得提取工艺参数准确可靠,具有一定的实用价值。

3 结论

杏鲍菇中含有丰富的黄酮类化合物,具有很好的食用、药用价值,具有一定的开发利用前景,而超声波辅助提取具有操作简便,能耗低等优点,利用其产生的“空穴作用”,加速黄酮类化合物的溶出与扩散。本文通过响应面分析得出影响黄酮类化合物提取率的主次因素为:X₂(料液比)>X₃(温度)>X₄(时间)>X₁(乙醇浓度)。通过回归方程优化得到杏鲍菇中黄酮类化合物的最佳提取工艺为乙醇浓度80%、料液比1:40、提取温度80℃、提取时间100min,此条件下,杏鲍菇中黄酮类化合物提取率为2.92%。本研究结果为杏鲍菇黄酮类化合物的进一步开发利用提供

技术支持。

参考文献

- [1] 姚自奇,兰进. 杏鲍菇研究进展[J]. 食用菌学报,2004,11(1):52-58.
- [2] 姚祥坦,张敏,徐素琴. 不同桑枝屑配比培养料对杏鲍菇生长季产量影响[J]. 中国食用菌,2009,28(2):65-66.
- [3] 潘崇环,孙萍. 珍稀食用菌栽培与名贵野生菌的开发利用[M]. 北京:中国农业出版社,2004:93.
- [4] 刘鹏,邢增涛. 杏鲍菇研究进展[J]. 食用菌,2011(6):6-8.
- [5] Shoji O, Daniel J R. Cultivation of *Pleurotus eryngii* on umbrella plant (*Cyperus alternifolius*) substrate[J]. J Wood Sci, 2004,50(5):466-469.
- [6] 李月梅,采俊香,牛瑞青. 不同基质配方工厂化栽培杏鲍菇研究[J]. 北方园艺,2012(7):177-179.
- [7] Russo A, Filippi C, Tombolini R, et al. Interaction between gfp-tagged *Pseudomonas tolaasii* P12 and *Pleurotus eryngii* [J]. Microbiol Res, 2003, 158(6):265-270.
- [8] Carbonero E R, Gracher A H P, Smiderle F R, et al. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 66(2): 252-257.
- [9] 李志豪,王东明,冯福娟. 杏鲍菇不同保鲜加工方法对其几种易溶性营养成分的影响[J]. 食用菌,2009(2):58-59.
- [10] 钟耀广,刘长江,林楠,等. 食用菌活性成分研究现状[J]. 食品研究与开发,2007,28(10):170-172.
- [11] 王婧,李祝,任秀秀. 箭叶淫羊藿总黄酮水提法提取工艺的研究[J]. 天津农业科学,2012,18(3):39-41.
- [12] 王鸿飞,刘飞,徐超,等. 费菜总黄酮碱法提取工艺及抗氧化活性[J]. 农业工程学报,2012,28(1):317-321.
- [13] 张伟,张焕新,施帅. 银杏叶中总黄酮类物质的酶法提取研究[J]. 食品研究与开发,2014,35(7):48-51.
- [14] 林英男,时伟. 超临界CO₂提取桑叶中总黄酮的工艺研究[J]. 齐鲁工业大学学报,2014,28(3):32-36.
- [15] 周芳,赵鑫,宫婕,等. 响应面法优化超声辅助提取红皮云杉提取工艺[J]. 食品工业科技,2014,35(1):213-218.
- [16] 王小溪,陈贵林. 超声波法提取南瓜籽油的工艺条件优化研究[J]. 食品科学,2009,30(8):60-63.
- [17] 尹泉雄,方旭波,余波,等. 响应面法优化白骨壤多糖的辅助水提工艺[J]. 食品工业科技,2014,35(3):225-229.
- [18] Lin Y, Wei S L, Liao M C. Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Euryale ferox* seed shells using response surface methodology[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 49:837-843.
- [19] 吕国英,张作法,潘慧娟,等. 响应面分析法优化香菇多糖发酵培养基[J]. 菌物学报,2010,29(1):106-112.
- [20] Wang X S, Wu Y F, Wu Q N. Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii* rhizome with response surface methodology [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2013, 20:846-854.
- [21] Yue M, Jiang T F, Shi Y P. Fast determination of flavonoids in *Hippocampis rhamnoides* and its medicinal preparation by capillary zone electrophoresis using dimethyl- γ -cyclodextrin as modifier[J]. Talanta, 2004, 62(4):695-699.
- [22] 王淑霞,李爱梅,张俊杰,等. 响应面分析法优化龙眼核中多酚物质提取工艺[J]. 食品科学,2011,32(10):35-39.

(上接第263页)

牛血红蛋工艺进行优化,可获得最优的工艺参数,从而为牛血液的开发和利用提供了理论基础。

参考文献

- [1] 黄群,马美湖,杨抚林,等. 畜禽血液血红蛋白的开发利用[J]. 肉类工业,2003(10):19-20.
- [2] 张玉斌,曹晖,郭兆斌,等. 牛血资源综合利用研究进展[J]. 肉类研究,2011(9):30-34.
- [3] 黄群,马美湖,杨抚林,等. 畜禽血液血红蛋白的开发利用[J]. 肉类工业,2003(10):21-24.
- [4] 刘峰,肖科,王翔,等. 用超滤法从猪血中分离纯化猪血红蛋白[J]. 生物学杂志,2011(2):95-97.
- [5] 黄强增,吴碧娥,刘肇榕. 丙酮法提取血红蛋白的工艺研究[J]. 海峡药学,1997(3):52.
- [6] 路秀玲,赵东旭,金业涛,等. 膨胀床吸附高效纯化牛血红蛋白[J]. 化工学报,2003(9):1257-1263.
- [7] Yun-liang Yan, Chen-huan Yu, Jing Chen, et al. Ultrasonic-assisted extraction optimized by response surface methodology, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Tremella mesenterica* [J]. Carbohydrate Polymers, 2011(83): 217-224.
- [8] 周玲,阚建全,汪学荣. 超声波法提取猪血液中血红蛋白的研究[J]. 食品科学,2009(4):92-95.
- [9] 宋清爽,吴恩应,张运佳,等. 血液制品病毒灭活及去除工艺进展[J]. 生物技术通讯,2012(4):627-630.
- [10] 曹磊,宋玉,汪晓鸣,等. 血红蛋白检测方法的探讨[J]. 农产品加工·学刊,2013(15):72-74.
- [11] 丁楠. 牛血制备亚硝基血红蛋白发色剂极其应用的研究[D]. 锦州:辽宁医学院,2011.
- [12] 刘振荣,王君,张向东,等. 超声波法提取氯化血红素的初步研究[J]. 辽宁大学学报:自然科学版,2003(4):373-377.
- [13] 李林强,李建科,刘迎利. 超声波处理提取华山松籽油的研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003(5):115-117.
- [14] 刘野,邹婷婷,宋焕禄. 响应曲面法优化西瓜籽蛋白提取工艺[J]. 食品工业科技,2013(3):250-254.
- [15] AliAbas Wani, Devinder Kaur, Idrees Ahmed, et al. Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology[J]. Journal of Food Science and Technology, 2007(10):1-7.
- [16] AliAbas Wani, DS Sogi1, L Grover, et al. Effect of Temperature, Alkali Concentration, Mixing Time and Meal/Solvent Ratio on the Extraction of Watermelon Seed Proteins—a Response Surface Approach[J]. Biosystems Engineering, 2006(1):67-73.
- [17] Sogi DS, Arora MS, Garg S K, et al. Response surface methodology for the optimization of tomato seed protein[J]. Journal of Food Science and Technology, 2003(3):267-271.