

固态酶型时间温度指示器的研发

徐凤娟, 葛 蕾, 李振兴*, 林 洪, 毛相朝

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003)

摘 要: 目的 开发出一种新型的以酪氨酸酶酶促褐变原理为基础的固态酶型时间温度指示器(time-temperature indicator, TTI)。**方法** 通过单因素实验, 确定各因素的取值范围, 并建立以 TTI 指示时间为响应值, 以酪氨酸含量、酪氨酸酶含量以及聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)浓度为自变量的数学模型。**结果** 根据响应面模型预测, 确定了 TTI 达到最长时间时各因素的取值: 酪氨酸 30.08 mg, 酪氨酸酶 0.30 mL, PVA 15.18%, 此时 TTI 的最长指示时间可以达到 50.48 h。**结论** 优化了固态酶型时间温度指示器, 并确定了该指示器的最长指示时间, 为该指示器的应用提供了基础。

关键词: 时间温度指示系统; 酶促褐变; 酪氨酸酶

Development of a novel time-temperature indicator based on tyrosinase

XU Feng-Juan, GE Lei, LI Zhen-Xing*, LIN Hong, MAO Xiang-Zhao

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT: Objective To develop a new kind of solid-state time-temperature indicator (TTI) based on enzymatic browning principle of tyrosinase. **Methods** In order to confirm the value ranges of different factors, single factor experiments were studied. A mathematical model was established according to response surface experiments. The dependent variable of the model was the instruction time of TTI, and the independent variables of the model were tyrosine content, tyrosinase concentration and polyvinyl alcohol (PVA) concentration. **Results** The value of each independent variable could be determined according to the forecast of the model when TTI achieved the longest instruction time. The values were as follows: tyrosine was 30.08 mg, tyrosinase was 0.30 mL and polyvinyl alcohol was 15.18%. The longest instruction time of TTI could reach 50.48 h under these conditions. **Conclusion** This research confirms the best recipe of different factors and determines the longest instruction time of the TTI, which lays the foundation for the application of the indicator.

KEY WORDS: time-temperature indicator; enzymatic browning reaction; tyrosinase

1 引 言

时间-温度指示器是一种简易的质量记录装置, 可以

对产品的整个货架期中的一些关键参数进行操纵、监控和记录, 通过时间温度积累效应指示食品的温度变化历程和剩余货架期信息^[1,2]。目前, 在不同种易腐食品中已有广泛

基金项目: 山东省重大科技项目(2015ZDZX05003)、国家科技支撑计划(2015BAD16B0902)

Fund: Supported by the Science and Technology Major Projects of Shandong Province (2015ZDZX05003) and National Science & Technology Pillar Program (2015BAD16B0902)

*通讯作者: 李振兴, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn

*Corresponding author: LI Zhen-Xing, Professor, Ph.D, College of Food Science and Engineering of Ocean University of China, No 5, Yushan Road, Shinan District, Qingdao 266003, China. E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn

应用,如奶制品^[3]、肉类^[4,5]、海产品^[6]、农产品^[7,8]中。然而,我国对于时间温度指示器(time-temperature indicator, TTI)的研究尚处于起步阶段,理论研究不系统,开发的 TTI 产品因存在诸多问题而鲜有应用。国外研究的 TTI 种类多为微生物型、酶型、扩散型和化学型,很多 TTI 已经实现了商业化^[9]。在过去的 20 多年中,科学研究和商品开发所关注的 TTI 主要有:扩散型、化学型、酶型、微生物型及其他一些新型的 TTI^[10],其中以酶型 TTI 研究居多,包括淀粉酶型 TTI^[11,12]、碱性脂肪酶 TTI^[13,14]、漆酶型 TTI^[15]、脲酶 TTI^[16]和糖化酶 TTI^[17,18]。

目前,已研究出的酶型指示器主要通过酶与底物的反应,随着时间的延长和温度积累产生明显的可视颜色变化^[19]。这些酶型 TTIs 基本可以分为 2 种,一种是以碘为指示剂,通过淀粉酶与淀粉的水解反应引起颜色变化为原理进行指示^[20,21],该 TTIs 一旦制作完成即自动活化,需要在-40℃下保存。另一种是通过酶促反应降低 pH,使指示剂变色来指示反应进行的程度。蔡华伟等^[22]进行了淀粉酶型 TTI 的研制,宁鹏等^[23]研究了碱性脂肪酶型 TTI,通过反应体系的 pH 变化原理制成时间温度指示器。酶型 TTI 属于生物型 TTI,主要通过酶催化底物水解释放 H⁺降低体系 pH 值,进而致使酸碱指示剂产生颜色变化来指示食品品质变化^[24]。这种类型的 TTIs,反应产生的弱酸在低于一定浓度时,不容易使指示剂发生颜色变化并且反应过程中颜色较浅,不方便肉眼观察。此外,该种 TTIs 各反应物均为液态,在实际应用中易发生泄漏,污染产品^[25]。

本文以酪氨酸和酪氨酸酶为研究对象,旨在开发一种全新固态酶型时间温度指示器。该指示器利用酶促反应原理,通过反应体系自身产生的颜色变化来显示时间、温度累积效应。反应体系构成简单,无需加入任何指示剂,且由无色至黑色的颜色变化过程更加方便肉眼观察。本研究为我国生鲜食品流通的监测提供了新的选择,为消费者选择物有所值的新鲜食品提供方便。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

UV1101 紫外分光光度计(杭州艾普仪器设备有限公司);JA2003 精密电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);HH-1 恒温水浴锅(国华电器有限公司);隔水式电热恒温培养箱(上海安亭科学仪器厂);78-1A 型磁力加热搅拌器(金坛市双捷实验仪器厂);SHZ-III型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂)。

酪氨酸酶 1715 U/mg(美国 Sigma 公司);酪氨酸(北京 Solarbio 公司);EDTA(分析纯,北京 Solarbio 公司);十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、甘油(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);聚乙烯醇(化学纯,国药集团化学

试剂有限公司)。

2.2 试验方法

2.2.1 酪氨酸和酪氨酸酶的固定化

称取一定量的酪氨酸,加入 30.0 mL 双蒸水中,95℃水浴至酪氨酸完全溶解。加入适量聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA),继续水浴溶解,直至 PVA 溶液呈透明胶体状态(全部溶解)。将溶解好的酪氨酸和 PVA 混合物于 30℃下超声脱气 20 min,倒模(膜厚度 1 mm),冻存于-40℃冰箱中,3 h 后取出,放置于室温下解冻 3 h。反复 5 次后,将成型的 PVA 薄膜取下,用打孔器打出直径约 1 cm 的 PVA 薄膜。同时,以同样的方法制备固定有酪氨酸酶的 PVA 缓释薄膜,但是在制备过程中需要等 PVA 溶液降温后再加入酪氨酸酶,以防止酶失活。

2.2.2 TTI 制备条件的单因素试验

(1)酪氨酸含量的优化

在实验中固定各个溶液的体积用量、酪氨酸酶含量为 0.2 mL(2 mg/mL)、PVA 浓度为 15%、反复冷冻-解冻循环时间 36 h,为研究酪氨酸含量对 TTI 指示时间的影响,酪氨酸含量选取范围为 10、20、30、40、50、60 mg/30 mL 双蒸水。

(2)酪氨酸酶含量的优化

固定各个溶液的体积用量,酪氨酸含量为 50 mg/30 mL 双蒸水(把 50 mg 酪氨酸溶入 30.0 mL 双蒸水中)、PVA 浓度为 15%、反复冷冻-解冻循环时间 36 h,为研究酪氨酸酶含量对 TTI 指示时间的影响,酪氨酸酶含量选取范围为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL。

(3)PVA 浓度的优化

固定各个溶液的体积用量、酪氨酸含量 50 mg/30 mL 双蒸水、酪氨酸酶含量为 0.2 mL、反复冷冻-解冻循环时间 36 h,为研究 PVA 浓度对 TTI 指示时间的影响,PVA 浓度的选取范围为 10%、13%、15%、17%、20%。

2.2.3 TTI 制备条件的响应面优化

在单因素实验的基础之上,根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理,以酪氨酸含量(Factor 1, A),酪氨酸酶含量(Factor 2, B)及 PVA 浓度(Factor 3, C)为自变量,以 TTI 指示时间为响应值,设计 3 因素 3 水平实验。采用总体颜色变化(total color difference, ΔE)判断 TTI 指示终点。所有实验均在 4℃下进行,实验因素及其水平取值见表 1。

表 1 实验因素水平及编码

Table 1 Levels and coding of experimental factors

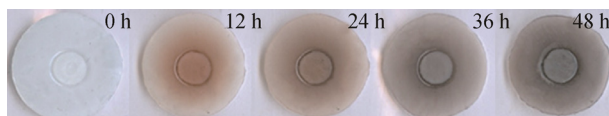
因素	编码	-1	0	+1
酪氨酸(mg)	A	20	30	40
酪氨酸酶(mL)	B	0.2	0.3	0.4
PVA(%)	C	13	15	17

3 结果与分析

3.1 酪氨酸和酪氨酸酶的固定化

不同时间下酪氨酸酶 TTI 的颜色变化见图 1, 可以看出, TTI 的颜色呈现出由无色到褐色再到黑色的褐变过程, 整个过程颜色变化明显, 便于肉眼观察。从图中我们也可看出, 该 TTI 在变色过程中, 不仅呈现出明显的颜色变化, 同时在薄膜上形成了一个逐渐增大的扩散圈。这可能是由于酪氨酸的分子量较低, 可以在 PVA 凝胶形成的网状结构中向外扩散, 并在扩散过程中与酪氨酸酶接触, 酶促反应发生, 从而形成了有颜色的扩散圈。

现有的一种基于脂肪酶反应研制的 TTI, 通过显色圈的大小来判断指示器的反应程度^[25]。而本实验中 TTI 颜色变化明显, 易于观察和测量, 因此本实验中选择颜色变化作为衡量指示器反应程度的指标。



注: TTI 的固定方式: 面积较小的薄膜为固定化有底物酪氨酸的 PVA 缓释薄膜, 面积较大的薄膜为固定化有酪氨酸酶的 PVA 缓释薄膜。

图 1 不同时间下酪氨酸酶 TTI 的颜色变化

Fig. 1 Color changes of the tyrosinase-based TTI at different time

3.2 TTI 制备单因素分析

3.2.1 酪氨酸含量对指示时间的影响

酪氨酸含量对 TTI 指示时间的影响如图 2 所示。随着酪氨酸含量的增加, TTI 的指示时间不断延长。在酪氨酸酶含量一定的条件下, 酪氨酸含量过高导致反应时间延长, 是导致 TTI 指示时间延长的主要原因。但是酪氨酸含量过高时, 扩散圈范围会在极短的时间内覆盖整个 TTI, 不利于 TTI 指示时间的观察; 而当酪氨酸含量过低时, TTI 的颜色变化和扩散圈并不十分明显, 也不利于 TTI 指示时间的观察。综上所述, 适宜的酪氨酸含量范围确定为 20~40 mg。

3.2.2 酪氨酸酶含量对指示时间的影响

酪氨酸酶含量对 TTI 指示时间的影响如图 3 所示。随着酪氨酸酶含量的增加,

TTI 的指示时间不断缩短。这可能是由于当酪氨酸含量一定时, 酪氨酸酶含量的增加加快了酶促反应的速率。但是酪氨酸酶含量过低(0.1 mL)时, TTI 的颜色变化和扩散圈并不明显, 不利于 TTI 指示时间的观察, 综合考虑, 最终选取的酪氨酸酶含量范围确定为 0.2~0.4 mL (2 mg/mL)。

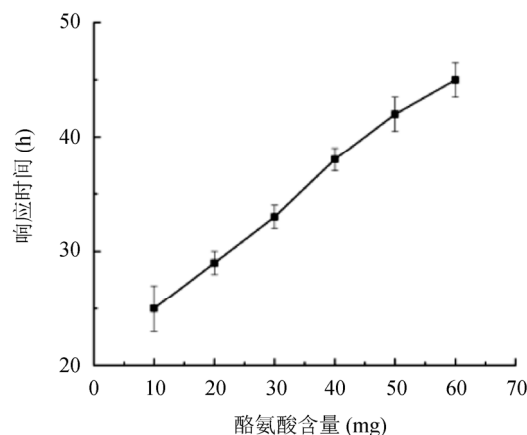


图 2 酪氨酸含量对指示时间的影响(n=5)

Fig. 2 Effect of tyrosine content on corresponding time (n=5)

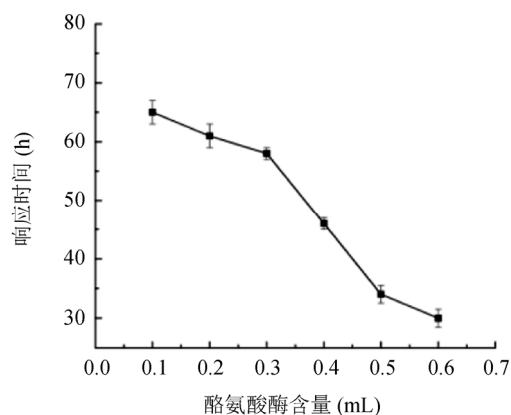


图 3 酪氨酸酶含量对指示时间的影响(n=5)

Fig. 3 Effect of tyrosinase content on corresponding time (n=5)

3.2.3 PVA 浓度对指示时间的影响

PVA 浓度对 TTI 指示时间的影响如图 4 所示。从图中可以看出, 随着 PVA 浓度的增加, TTI 的指示时间不断延长。但是当 PVA 浓度过高时(如 20%), TTI 的扩散圈很小, 这主要是由于 PVA 浓度较高, 导致形成的 PVA 凝胶的网状结构致密^[26-28], 影响了酪氨酸在其中的扩散, 另外, PVA 浓度过高时, PVA 的溶解过程极长^[29], 并且在溶解过程中极易出现凝结现象; 而当 PVA 浓度过低时, 同样存在着 PVA 薄膜强度较低, 出现粘连的现象。综上所述, 适宜的 PVA 浓度范围确定为 13%~17%。

根据单因素实验的结果, 最终确定响应面实验中各因素的范围为: 酪氨酸含量 20~40 mg, 酪氨酸酶量 0.2~0.4 mL, PVA 浓度 13%~17%。

3.3 响应面优化分析

3.3.1 数学模型的建立

响应面法(response surface methodology, RSM)可以用比较少的实验次数完成全面的分析研究, 评价各个因素的

影响以及交互作用,并且可以快速确定实验的最佳条件,已经在许多工艺优化中成功应用^[30-32]。本实验中响应面优化分析设计的所有实验均在 4℃下进行,其结果见表 2。

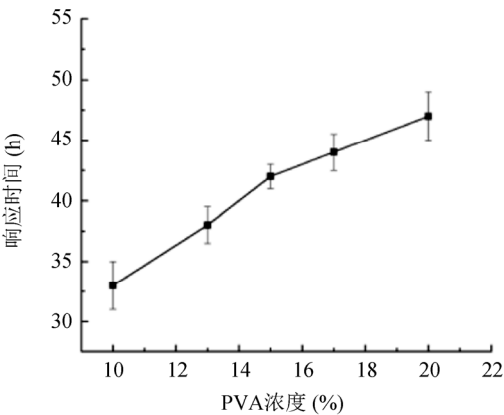


图 4 PVA 浓度对指示时间的影响($n=5$)
Fig. 4 Effect of PVA content on corresponding time ($n=5$)

表 2 实验设计及结果
Table 2 Experimental design and results

编号	酪氨酸含量 <i>A</i>	酪氨酸酶含量 <i>B</i>	PVA 含量 <i>C</i>	指示时间 <i>t</i> (h)
1	0	0	0	51
2	-1	0	+1	31
3	0	+1	-1	32
4	0	+1	+1	40
5	-1	+1	0	34
6	-1	0	-1	33
7	-1	-1	+1	32
8	-1	-1	0	29
9	0	0	0	52
10	0	0	0	50
11	0	0	0	48
12	+1	-1	0	38
13	+1	0	-1	30
14	+1	0	+1	32
15	+1	+1	0	28
16	0	-1	-1	30
17	0	0	0	51

采用总体颜色变化判断指示终点。实验中当 $\Delta E=38.21\pm2.00$ 时,TTI 达到指示终点黑色。利用 Design Expert 软件对表 2 数据进行回归拟合,建立数学模型,得

到如下方程:
$$t=50.40+0.25A+0.50B+1.50C-10.33A^2-7.83B^2-8.83C^2-3.75AB+0.75AC+1.25BC。$$

3.3.2 数学模型的显著性检验

数学模型的方差分析见表 3。从表中可以看出,拟合后得出的数学模型具有高度的显著性($P=0.0003<0.01$),失拟项在 $\alpha=0.05$ 水平上并不显著。($P=0.0638>0.05$),这表明该数学模型的拟合程度良好,误差相对较小,可以用来预测 TTI 的指示时间。对拟合数学模型显著性检验的结果见表 4。交互项 AB 的影响显著,这表明在 TTI 的制备过程中,酪氨酸含量和酪氨酸酶含量对 TTI 的指示时间有着显著的交互作用。

表 3 回归模型方差分析
Table 3 Analysis of variance for regression model

变异来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型	1239.33	9	137.70	20.00	0.0003
失拟项	39.00	3	13.00	5.65	0.0638
误差	9.20	4	2.30		
和	1287.53	16			

表 4 回归模型系数的显著性检验
Table 4 Significance test of regression model coefficients

模型系数	预测系数	标准误差	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
<i>A</i>	0.25	0.93	0.073	0.7953
<i>B</i>	0.50	0.93	0.29	0.6066
<i>C</i>	1.50	0.93	2.61	0.1500
<i>A</i> ²	-10.33	1.28	65.19	<0.0001
<i>B</i> ²	-7.83	1.28	37.44	0.0005
<i>C</i> ²	-8.83	1.28	47.62	0.0002
<i>AB</i>	-3.75	1.31	8.17	0.0244
<i>AC</i>	0.75	1.31	0.33	0.5854
<i>BC</i>	1.25	1.31	0.91	0.3725

根据响应面优化实验所得结果和二次多项方程,利用 Design Expert 软件预测得到 TTI 最长指示时间,最长指示时间为 50.4763 h,达到这一指示时间时 3 个因素的取值为:酪氨酸含量为 30.08 mg,酪氨酸酶含量为 0.3 mL(2 mg/mL),PVA 浓度为 15.18%。为了验证模型预测的准确性,在最优响应条件下,3 组平行实验所能达到的最长指示时间分别为 50、50.5 和 49.5 h,实际值与预测值相接近,可以看出该模型可以用于 TTI 指示时间的预测。

4 结 论

通过将酪氨酸和酪氨酸酶分别固定于 PVA 凝胶缓释薄膜, 开发出了一种新型的以酪氨酸酶促褐变原理为基础的固态酶型时间温度指示器。该指示器可提供颜色变化和扩散圈 2 个选择来指示 TTI 的指示时间。通过单因素实验, 确定了各因素的取值范围, 成功建立了以 TTI 指示时间为响应值, 以酪氨酸含量、酪氨酸酶含量以及 PVA 浓度为自变量的数学模型。根据模型预测, 确定了 TTI 达到最长时间时各因素的取值: 酪氨酸 30.08 mg, 酪氨酸酶 0.30 mL, PVA 15.18%, 此时 TTI 的最长指示时间可以达到 50.48 h。

参考文献

- [1] Aoukis PS, Labuza TP. Applicability time temperature indicators as shelf-life monitors of food products [J]. J Food Sci, 1989, 54: 783-788.
- [2] Tsironi T, Giannoglou M, Platakou E, et al. Evaluation of time temperature integrators for shelf-life monitoring of frozen seafood under real cold chain conditions [J]. Food Packag Shelf Life, 2016, 10: 46-53.
- [3] Pereira VA, De-Arruda INQ, Stefani R. Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleraceae* (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for application in intelligent food packaging [J]. Food Hydrocolloid, 2015, 43: 180-188.
- [4] Ellouze M, Augustin JC. Applicability of biological time temperature integrators as quality and safety indicators for meat products [J]. Int J Food Microbiol, 2010, 138(1): 119-129.
- [5] Kim E, Choi DY, Kim HC, et al. Calibrations between the variables of variables of microbial TTI response and ground pork qualities [J]. Meat Sci, 2013, 95(2): 362-367.
- [6] Kuswandi B, Restyana A, Abdullah A, et al. A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film [J]. Food Control, 2012, 25(1): 184-189.
- [7] Wanihsuksombat C, Hongtrakul V, Suppakul P. Development and characterization of aprototype of a lactic acid-based time-temperature indicator for monitoring food product quality [J]. J Food Eng, 2010, 100(3): 427-434.
- [8] Kang YJ, Kang JW, Choi JH, et al. A feasibility study of application of laccase-based time-temperature indicator to kimchi quality control on fermentation process [J]. J Korean Soc Appl Biol Chem, 2014, 57(6), 819-825.
- [9] Guivarç'h Y, Van LA, Zuber F, et al. Development characterization and use of a high-performance enzymatic time-temperature integrator for the control of sterilization process' impacts [J]. Biotechnol Bioeng, 2004, 88(1): 15-25.
- [10] Guivarç'h Y, Van LA, Zuber F, et al. Bacillus licheniformis α -amylase immobilized on glass beads and equilibrated at low moisture content: potentials as a time-temperature Integrator for sterilisation processes [J]. Innov Food Sci Emer, 2004, 5(3): 317-325.
- [11] Sun Y, Cai HW, Zheng LM, et al. Development and characterization of a new amylase type time-temperature indicator [J]. Food Control, 2008, 19(3): 315-319.
- [12] Smolander M, Alakomi HL, Ritvanen T, et al. Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature condition: A time-temperature indicators as quality-indicating tools [J]. Food Control, 2004, 15(3): 217-229.
- [13] Wu D, Pan JZ, Chen JC, et al. Dynamics research of time-temperature indicating system based on alkaline lipase [J]. Appl Mech Mater, 2014, 469: 422-427.
- [14] Wu D, Hou S, Chen J, et al. Development and characterization of an enzymatic time-temperature indicator (TTI) based on *Aspergillus niger* lipase [J]. LWT-Food Sci Technol, 2015, 60(2): 1100-1104.
- [15] Kim K, Kim E, Lee SJ. New enzymatic time-temperature integrator (TTI) that uses laccase [J]. J Food Eng, 2012, 113(1): 118-123.
- [16] Wu D, Wang Y, Chen J, et al. Preliminary study on time-temperature indicator (TTI) system based on urease [J]. Food Control, 2013, 34(1): 230-234.
- [17] Qian J, Zheng GL, Feng Q. Glucoamylase time-temperature indicators based on fat oxidation of chilled pork [J]. Food Sci, 2013, 34(18): 343-348.
- [18] Adams JB, Langley FM. Nitrophenyl glucoside hydrolysis as a potential time-temperature integrator reaction [J]. Food Chem, 1998, 62(1): 65-68.
- [19] Reichert H, Simmendinger P, Bolle T. Enzyme-based time temperature indicator: US, 7, 736, 866 [P]. 2010-6-15.
- [20] Yan S, Huawei C, Limin Z, et al. Development and characterization of a new amylase type time-temperature indicator [J]. Food Control, 2008, 19(3): 315-319.
- [21] 蔡华伟, 任发政, 张恒涛, 等. 淀粉酶型时间-温度指示卡的研制[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 60-62.
Cai HW, Ren FZ, Zhang HT, et al. Research of amylase-time-temperature indicator [J]. Food Sci, 2006, 27(11): 60-62.
- [22] Sun Y, Cai HW, Zheng LM, et al. Development and characterization of a new amylase type time-temperature indicator [J]. Food Control, 2008, 19(3): 315-319.
- [23] 宁鹏, 徐幸莲, 费英等. 碱性脂肪酶型时间-温度指示卡指示剂的研究[J]. 江西农业学报, 2008, 20(8): 85-87.
Ning P, Xu XL, Fei Y, et al. Study on time-temperature integrated indicator based on alkali-nelipase [J]. Acta Agric Jiangxi, 2008, 20(8): 85-87.
- [24] 卢立新, 蔡莹, 郑伟洲. 基于脂肪酶反应扩散的时间温度指示器的制备方法和应用: CN, 201110023063. 5 [P]. 2011-09-07.
Lu LX, Cai Y, Zheng WZ. Preparation and application on time-temperature indicator based on reaction diffusion of lipase: CN, 201110023063. 5 [P]. 2011-09-07.
- [25] 吕志业, 卢立新. 碱性脂肪酶时间温度指示器变色效应的研究[J]. 包装工程, 2009, 30(7): 8-9.
Lv ZY, Lu LX. Research on color change effect of alkaline lipase time-temperature indicator [J]. Pack Eng, 2009, 30(7): 8-9.
- [26] Watase M, Nishinari K. Large deformation of hydrogels of poly (vinyl alcohol), agarose and kappa-carrageenan [J]. Macromol Chem Phys, 1985, 186(5): 1081-1086.
- [27] Watase M, Nishinari K. Rheological and DSC changes in poly (vinyl alcohol) gels induced by immersion in water [J]. J Polym Sci Pol Phys, 1985, 23(9): 1803-1811.
- [28] Lozinsky VI. Cryotropic gelation of poly (vinyl alcohol) solutions [J]. Russ Chem Rev, 1998, 67(7): 573-586.

(责任编辑: 姜 珊)

- [29] Lozinsky VI, Plieva FM. Poly (vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1998, 23(4): 227–242.
- [30] Sin HN, Yusof S, Sheikh Abdul Hamid N, *et al.* Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology [J]. *J Food Eng*, 2006, 73(4): 313–319.
- [31] Van VC, Gruppen H, De DBA, *et al.* Optimization of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology [J]. *Int Dairy J*, 2002, 12: 813–820.
- [32] 应芝, 励建荣, 韩晓祥. 响应面分析法优化桑叶多糖提取工艺的研究 [J]. *中国食品学报*, 2008, 8(4): 39–45.
- Ying Z, Li JR, Han XY. Optimization of extraction process of polysaccharide from mulberry leaves by response surface methodology [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2008, 8(4): 39–45.

作者简介



徐凤娟, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工与贮藏。

E-mail: Xufengjuan103@163.com



李振兴, 教授, 研究方向为食品安全与质量控制。

E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn