

杨 勇, 杨小生, 杨 玲, 等. 淫羊藿药渣总氨基酸水解液分析及其制备工艺优化[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(23): 226–229.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.057

# 淫羊藿药渣总氨基酸水解液分析及其制备工艺优化

杨 勇<sup>1,2</sup>, 杨小生<sup>2</sup>, 杨 玲<sup>1,2</sup>, 杨 娟<sup>2</sup>

(1. 贵州大学药学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州贵阳 550014)

**摘要:** 为了建立适用于淫羊藿药渣总氨基酸分析的快速定量方法, 并提高其利用率, 采用茚三酮显色法对其进行定量分析, 同时以高效液相色谱法与凯氏定氮法测定值作为对比参照, 通过响应面法优化淫羊藿药渣总氨基酸水解液制备工艺。结果表明, 茚三酮显色法测得淫羊藿药渣中总氨基酸含量为 6.12%, 介于其他 2 种方法测定值之间; 淫羊藿药渣总氨基酸制备工艺优化条件如下: 盐酸浓度为 6.0 mol/L, 水解时间为 23.4 h, 水解温度为 115 ℃。由结果可以看出, 茚三酮显色法适用于淫羊藿药渣中总氨基酸的快速定量分析, 通过响应面法优化其制备工艺后, 氨基酸提取率为 6.50%, 有效提高了淫羊藿药渣资源的利用率。

**关键词:** 氨基酸; 淫羊藿药渣; 茚三酮显色法; 响应面法

**中图分类号:** R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)23-0226-04

随着我国中药资源的迅速推广与利用, 全国各大药企的药渣废弃量日益增加, 年排放量达 3 000 万 t<sup>[1]</sup>。当前, 药渣被广泛应用于众多行业中, 如造纸、栽培食用菌、生产有机肥、处理废水和用作饲料添加剂等<sup>[2]</sup>。药渣中除了含有粗纤维、粗蛋白质和微量元素等营养成分外, 还残留一定量的多糖、黄酮<sup>[3]</sup>和萜类等生物活性成分。如何高值化利用这些功能性成分成为当前研究的热点。

氨基酸作为机体必需的营养素, 对其进行分析是利用该营养素的必要前提<sup>[4]</sup>。总氨基酸含量分析的方法有凯氏定氮法、茚三酮显色法、考马斯亮蓝法、高效液相色谱 (HPLC) 柱前/柱后衍生化法<sup>[5]</sup>等。茚三酮显色法在氨基酸定量分析中具有灵敏度高、成本低廉、过程简易、分析迅速等优点<sup>[6]</sup>。但是, 由于不同样品含氮组分比例不同, 茚三酮显色法对于不同样品的氨基酸含量测定都会产生一定误差。因此, 本试验以高效液相色谱法和凯氏定氮法测定值作为参考指标, 考察茚三酮显色法对淫羊藿药渣水解液中总氨基酸定量分析的适用性和准确性。

淫羊藿经水提后, 药渣中仍剩余大量的功能性成分, 如粗蛋白、总黄酮、萜类等。因此, 将淫羊藿药渣作为禽畜类饲料添加剂加以利用, 不仅能增强禽畜的抗病能力<sup>[7]</sup>, 还能促进禽畜生长发育。但是, 禽畜对淫羊藿药渣的适应性较差, 采食量较少。本试验考虑将淫羊藿药渣制成总氨基酸水解液, 以快速简捷的氨基酸定量分析方法为基础, 优化淫羊藿药渣总氨基酸水解液制备工艺, 为高效开发与利用淫羊藿药渣功能性成分提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

淫羊藿药渣, 由贵州同济堂制药有限公司提供; 活性炭; 精密 pH 试纸; 内螺纹式消解管, 购自盐城庆胜实验室装备有限公司; 浓硫酸、硼砂, 均为优级纯; 其余试剂均为分析纯。

UV-1800 紫外-可见分光光度计; L-8900 日立全自动氨基酸分析仪; SKD-100 自动凯氏定氮仪; JKXZ06-20B 恒温消煮仪; FE-20K pH 计; GZX-9023 电热鼓风干燥箱; AG285 梅特勒-托利多电子分析天平。

### 1.2 茚三酮显色法

**1.2.1 样品预处理** 酸水解法: 精确称取 100 mg 干燥至恒质量的样品, 置于 15 mL 消解管中, 加入 10 mL 6 mol/L 盐酸溶液, 然后置于 (110 ± 1) ℃ 烘箱中水解 20 ~ 24 h, 取出冷却、过滤, 调节至 pH 值为 9.0<sup>[8]</sup> 左右, 脱色、过滤、离心, 转移上清液至 50 mL 容量瓶中, 定容, 作为供试品溶液。

**1.2.2 对照品溶液的配制** 精确称取 0.1 g 干燥至恒质量的 L-天门冬氨酸标准品, 配制成 1.00 mg/mL 天门冬氨酸溶液, 取该溶液稀释 10 倍, 即得 100 μg/mL 天门冬氨酸对照品溶液。

### 1.2.3 测定方法的考察

**1.2.3.1 最大吸收波长的确定** 取适量对照品溶液与供试品溶液, 以水作为空白对照, 于 200 ~ 800 nm 扫描最大吸收波长<sup>[9]</sup>, 结果显示, 对照品无吸收峰, 且供试品吸收峰不明显。因此考虑加显色剂, 观察结果。

**1.2.3.2 磷酸盐缓冲液用量的考察** 精确移取 1.0 mL 对照品溶液至 10 mL 具塞刻度试管中, 加水补足至 2.0 mL<sup>[10]</sup>, 以 1.0 mL 纯水作为空白对照, 分别加入 pH 值为 6.0 的 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mL, 各加入 1.0 mL 2.0% 茚三酮溶液, 于沸水浴中加热 15 min, 冷却, 于 567 nm 处测定吸光度。

**1.2.3.3 磷酸盐缓冲液 pH 值的考察** 与第“1.2.3.2”节同法操作, 考察 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液 pH 值分别为 5.0、

收稿日期: 2017-07-19

基金项目: 贵州省科技厅农业攻关重点项目 [编号: 黔科合 NY (2015)3005-1]。

作者简介: 杨 勇 (1989—), 男, 贵州凯里人, 硕士, 从事天然药物化学与结构修饰研究。E-mail: 947032982@qq.com。

通信作者: 杨小生, 博士, 研究员, 从事天然药物化学与结构修饰研究。E-mail: yangxz2002@126.com。

5.5、6.0、6.5、7.0、8.5、8.0 时对吸光度测定的影响。

1.2.3.4 显色剂用量的考察 与第“1.2.3.2”节同法操作,考察显色剂(2.0% 茚三酮)用量分别为 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 时对吸光度测定的影响。

1.2.3.5 沸水浴加热时间的考察 与第“1.2.3.2”节同法操作,考察沸水浴加热时间分别为 10、15、20、25、30、35、40 min 时对吸光度测定的影响。

1.2.4 供试品方法学的考察

1.2.4.1 精密度试验 精确移取 1.0 mL 供试品溶液,共 9 份,进行 9 次试验( $n=9$ ),按照第“1.2.3.2”节方法处理,测定吸光度。

1.2.4.2 稳定性试验 精确移取 1.0 mL 供试品溶液,共 9 份,进行 9 次试验,按照第“1.2.3.2”节方法显色,分别于 0、10、20、30、40、50、60 min 后测定吸光度。

1.2.4.3 重复性试验 精确称取 100 mg 同一批次的淫羊藿药渣,共 9 份,进行 9 次试验,按照第“1.2.1”节的方法制备供试品溶液,每份精确移取 1.0 mL 该供试品溶液,按照第“1.2.3.2”节方法处理,测定吸光度。

1.2.4.4 回收率试验 精确称取 100 mg 淫羊藿药渣粉末,共 9 份,进行 9 次试验,按照第“1.2.1”节方法制备供试品溶液(经预试验,测定 100 mg 样品约含总氨基酸 6.054 mg),每份均精确加入 5.0 mg 天门冬氨酸对照品,按照第“1.2.3.2”节方法处理,测定吸光度。

1.2.5 绘制标准曲线与供试品总氨基酸含量的测定 茚三酮-紫外可见分光光度法:取 9 支试管,分别加入 0、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2 mL 100  $\mu\text{g/mL}$  天门冬氨酸标准溶液,加水补足体积至 2.0 mL,加 2.0 mL pH 值为 6.0 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液,最后每管加 1.0 mL 显色剂,摇匀,于 100  $^{\circ}\text{C}$  水浴加热 15 min,测定吸光度,平行 3 次测定,绘制标准曲线。供试品同法操作,测定吸光度。总氨基酸含量计算公式如下:

$$Y = mV_1 / (1\,000m_1V_2) \times 100\%$$

式中: $Y$  为氨基酸含量,%; $m$  为试样中氨基酸质量, $\mu\text{g}$ ; $V_1$  为供试品溶液总体积,mL; $V_2$  为测试用供试品溶液体积,mL; $m_1$  为试样质量,mg。

1.3 高效液相色谱法

试验通过日立全自动氨基酸分析仪 L-8900,采用茚三酮柱后衍生化法<sup>[11]</sup>进行氨基酸定量分析。试剂衍生化处理与具体分析过程参照 GB/T 16631—2008《高效液相色谱法通则》。

1.4 全氮含量测定(凯氏定氮法)

通过 SKD-100 自动凯氏定氮仪测定全氮含量,测定参照朱杰等的方法<sup>[12-13]</sup>。

1.5 总氨基酸水溶液制备工艺优化

1.5.1 单因素试验 考察盐酸浓度(2、4、6、8、10 mol/L)、水解时间(12、16、20、24、28 h)、水解温度(100、105、110、115、120  $^{\circ}\text{C}$ ) 3 个因素的影响,将其中 1 个单因素作为变量,在其他 2 个条件相同的前提下,考察该因素对淫羊藿药渣中氨基酸提取率的影响。

1.5.2 响应面分析 在单因素试验的基础上设计中心组合试验,选取 3 个因素中合适的梯度范围作响应面分析,优化总

氨基酸水溶液制备工艺。

1.5.3 优化酸水解后氨基酸提取率测定 以茚三酮显色法测得的氨基酸含量作为氨基酸提取率的结果,测定参照第“1.2.3.2”节的方法。

2 结果与分析

2.1 茚三酮显色法测定结果

2.1.1 方法考察结果与分析 方法考察结果显示,加显色剂后,扫描最大吸收波长时,200~800 nm 光谱范围内有 2 个明显吸收峰,但 200~440 nm 处吸收峰有拖尾现象,且分离度较低,可能会造成较大的试验误差,而在 500~700 nm 处吸收峰呈单峰,峰形明显,对称性良好,因此取该波段的最大吸收波长 567 nm 作为本试验的检测波长。当磷酸盐缓冲液用量为 2.0 mL、pH 值为 6.0、显色剂用量为 1.0 mL 时,吸光度最大,反应最完全;当沸水浴加热时间为 15 min 时,吸光度达到最大值,超过 15 min 后,显色剂有氧化趋势,溶液逐渐由紫色转变成棕黄色,在 567 nm 处不再出现明显的吸收峰。因此,考虑沸水浴加热时间为 15 min。

2.1.2 供试品方法学考察结果 本研究显示,在考察精密度时,9 组供试品溶液的吸光度相对标准偏差( $RSD$ )为 0.69%,说明此方法符合样品的精密度测试要求;在考察稳定性时,9 组供试品溶液在 40 min 内测定,吸光度的  $RSD < 2\%$  (40 min 时测定吸光度的  $RSD$  为 1.98%),而当 50 min 时测定,9 组供试品溶液的吸光度  $RSD > 2\%$ 。因此可见,本试验显色后测定吸光度尽量应控制在 40 min 内完成,才能符合该样品的稳定性测试要求;进行重复性试验考察时,9 组供试品溶液总氨基酸平均含量为 6.05%, $RSD$  为 1.5%,表明该方法重复性较好。加样回收率试验考察结果见表 1,可见该方法的分析误差在  $\pm 2.0\%$  范围内,在氨基酸微量分析中符合要求。

表 1 供试品总氨基酸含量测定的加样回收率试验

药渣用量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)
100.8	11.036	99.64
100.6	11.030	99.52
100.5	11.002	98.96
100.2	11.029	99.50
99.9	11.099	100.90
100.8	11.093	100.78
100.5	11.070	100.32
99.8	11.052	99.96
100.2	11.011	99.14

注: $RSD=0.69\%$ 。

2.1.3 供试品总氨基酸含量测定结果 通过紫外-可见分光光度法,绘制得标准曲线方程为  $y=0.018\,5x-0.790\,1$ , $r^2=0.995\,1$ ,使用方法考察的最佳检测条件进行 3 组平行试验,茚三酮显色测得淫羊藿药渣中总氨基酸含量平均为 6.12%。

2.2 高效液相色谱法测定结果

淫羊藿药渣水解液中含有绝大多数天然氨基酸,以天门冬氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸为主,天门冬氨酸含量最高,为 1.03% (保留时间为 31.074 min),总氨基酸含量为 4.29%。高效液相色谱结果见图 1。

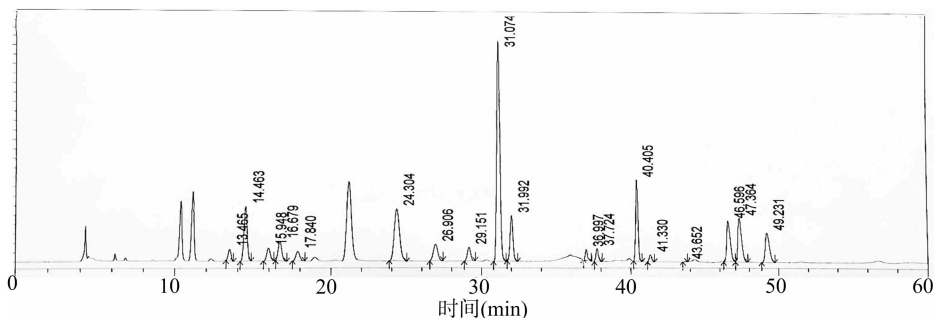


图1 淫羊藿药渣总氨基酸的 HPLC 图谱

## 2.2.3 凯氏定氮法测定结果

本研究测得淫羊藿药渣中全氮平均含量为 6.58%, 高于高效液相色谱法和茚三酮显色法的检测结果。

## 2.2.4 3 种测定方法的结果比较

用茚三酮显色法、高效液相色谱法、凯氏定氮法测得淫羊藿药渣中全氮含量分别为 6.12%、4.29%、6.58%。由于淫羊藿药渣中的氮主要以有机氮和无机氮的形式存在<sup>[14]</sup>, 其中氨氮是指以氨、铵离子或以  $\text{NH}_3$  形式存在的氮<sup>[15]</sup>, 氨基氮是指各种氨基化合物(主要是氨基酸)<sup>[16]</sup>, 总氮包括氨、铵及硝酸盐等所有氮化物的总和。根据茚三酮显色的原理<sup>[17]</sup>, 茚三酮显色法测得结果为氨氮的百分含量, 高效液相色谱法测得结果为氨基氮(氨基酸)的百分含量, 而凯氏定氮法测得结果为总氮的百分含量。因此, 从理论上分析, 茚三酮显色法测定结果应介于高效液相色谱法与凯氏定氮法测定值之间, 实际测定结果符合理论分析的参考范围。

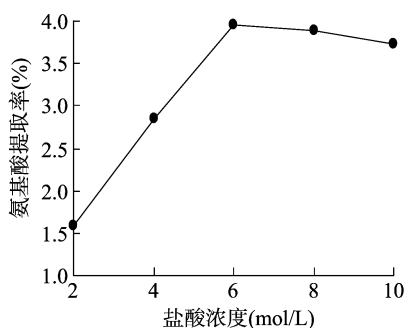


图2 盐酸浓度对氨基酸提取率的影响

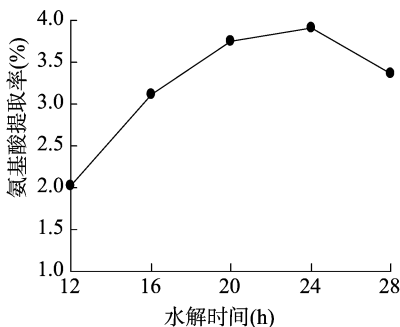


图3 水解时间对氨基酸提取率的影响

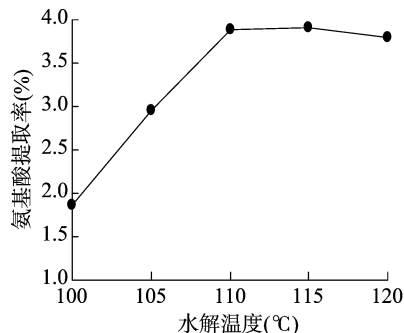


图4 水解温度对氨基酸提取率的影响

2.5.2 响应面法结果与分析 通过 Design-Expert 8.05b 软件对响应值与各因素进行回归拟合后, 得到回归方程<sup>[18]</sup>:

$$\text{氨基酸提取率} = -265.71825 + 3.27862A + 1.46888B + 4.26605C - 7.65625 \times 10^{-3}AB - 0.022625AC - 7.81250 \times 10^{-3}BC - 0.042500A^2 - 0.011250B^2 - 0.017200C^2, r^2 = 0.9541.$$

模型  $P < 0.0001$ , 失拟项  $> 0.05$ , 说明该模型具有极显著差异, 该方程的拟合度良好<sup>[19]</sup>, 可信度高, 可用于分析和预测氨基酸水解工艺最佳条件。

响应面设计的试验结果见表 2。由表 3 的响应面方差分析结果可知, 3 个因素对氨基酸含量的影响程度不一, 由大到小分别为水解温度 > 水解时间 > 盐酸浓度。盐酸浓度与水解温度之间交互影响极显著, 盐酸浓度越高, 溶液的沸点越低, 所需要的水解温度也越低(水解过程中溶液持续沸腾的状态有利于氨基酸的水解), 当水解温度提高 10 °C 时, 盐酸浓度

## 2.5 总氨基酸水解液制备工艺优化结果

2.5.1 单因素考察试验结果 由图 2 可以看出, 随着盐酸浓度的增加, 氨基酸提取率先呈提高趋势, 当盐酸浓度达到 6 mol/L 时, 氨基酸含量最高, 当超过此浓度时, 氨基酸含量不再明显升高。因此, 选择盐酸浓度为 4、6、8 mol/L 进行后续响应面设计试验。

由图 3 可以看出, 随着水解时间的延长, 氨基酸提取率先呈提高趋势, 当水解时间达到 24 h 时, 氨基酸已经水解完全, 继续延长水解时间, 可能会使部分氨基酸发生氧化, 使检测结果偏低。因此, 选择水解时间为 20、24、28 h 进行后续响应面设计试验。

由图 4 可以看出, 当水解温度达到 115 °C 时, 氨基酸提取率最高, 继续升高温度, 则氨基酸提取率不再明显升高。因此, 选择水解温度为 105、110、115 °C 进行后续响应面设计试验。

可降低至 5.6~5.7 mol/L; 此外, 水解时间与水解温度之间交互影响极显著, 当水解温度提高时, 可以适当缩短水解时间, 水解温度每提高 10 °C, 水解时间可减少 8~10 h, 但强酸高温的环境很容易损害水解管密封圈和管盖。通过响应面法优化, 最佳水解条件<sup>[20]</sup>为盐酸浓度 5.90 mol/L、水解时间 23.41 h、水解温度 114.8 °C。结合实验室仪器精度情况, 将最佳水解条件调整为盐酸浓度 6.0 mol/L、水解时间 23.4 h、水解温度 115 °C。该条件在验证试验中用于测定氨基酸提取率, 平行测定 5 次, 氨基酸提取率平均为 6.50%, 与预测值接近, 且高于未优化水解条件的测定结果。因此可见, 该响应面模型能较好地预测氨基酸提取率。

## 3 结论与讨论

本试验以 GB/T 16631—2008《高效液相色谱法通则》和凯氏定氮法的测定值作为参考值, 考察茚三酮显色法对淫羊

表 2 响应面设计试验结果

编号	各因素水平			Y: 氨基酸提取率 (%)
	A: 盐酸浓度 (mol/L)	B: 水解时间 (h)	C: 水解温度 (℃)	
1	8	24	110	5.82
2	8	20	105	5.55
3	6	24	110	6.15
4	6	24	110	6.02
5	6	24	110	6.07
6	6	20	110	5.70
7	6	28	110	5.89
8	6	24	110	6.20
9	4	20	105	5.02
10	8	28	115	4.66
11	4	28	115	5.28
12	6	24	105	5.65
13	4	24	110	5.79
14	8	20	115	5.25
15	8	28	105	5.49
16	6	24	110	6.09
17	6	24	115	5.44
18	4	28	105	5.30
19	4	20	115	5.72
20	6	24	110	6.03

表 3 回归方程方差分析结果

方差来源	总方差	自由度	均方差	F 值	P 值
模型	3.05	9	0.34	23.07	<0.000 1
A(盐酸浓度)	0.012	1	0.012	0.79	0.395 5
B(水解时间)	0.038	1	0.038	2.62	0.136 6
C(水解温度)	0.044	1	0.044	2.97	0.115 6
AB	0.03	1	0.03	2.05	0.183 1
AC	0.41	1	0.41	27.92	0.000 4
BC	0.20	1	0.20	13.32	0.004 5
A <sup>2</sup>	0.079	1	0.079	5.42	0.042 2
B <sup>2</sup>	0.089	1	0.089	6.07	0.033 4
C <sup>2</sup>	0.510	1	0.51	34.67	0.00 02
残差	0.15	10	0.015		
失拟项	0.12	5	0.024	4.98	0.051 4
纯误差	0.025	5	$4.907 \times 10^{-3}$		
总误差	3.19	19			

藿药渣中氨基酸定量分析的适用性与准确性,其测定结果为 6.12%,介于上述 2 种方法测定结果之间,表明茚三酮显色法可作为淫羊藿药渣总氨基酸分析的快速简捷的化学分析方法,能准确定量分析淫羊藿药渣的总氨基酸含量。但其测定结果仍有一定偏差,分析其原因,可能是由于高效液相色谱法测定总氨基酸含量是委托贵州师范大学分析测试中心完成的,不同分析者预处理过程不一样,氨基酸水解率不同;此外,样品中的胱氨酸与半胱氨酸在强酸高温的条件下会发生氧化,本试验中考虑到胱氨酸和半胱氨酸在该样品中含量所占比例不大,且这 2 种氨基酸的定量分析本来就不准确<sup>[21]</sup>。因此,为进行氨基酸的快速定量分析,本试验的预处理未填充氮气。茚三酮与氨基酸产生氨反应生成有色复合物,同时茚三酮有较强氧化性,还能与样品的铵盐、联氨等还原性无机氨发生显色反应,使得检测结果偏高;此外,两者预处理脱色工艺不一样,脱色效果也不同,造成检测结果也会出现偏差。

本试验对淫羊藿药渣总氨基酸水解液制备工艺进行优

化,优化试验水解条件如下:盐酸浓度为 6.0 mol/L,水解时间为 23.4 h,水解温度为 115 ℃。经验证,在该条件下,氨基酸提取率为 6.50%。淫羊藿药渣作为一种可回收利用资源,提高氨基酸提取率有利于提高动植物对小分子营养成分的利用率,例如作为良好的禽畜饲料添加剂,生物工程培养菌培养液配料或食用菌栽培的生长因子等。本试验通过建立快速简捷、适宜的分析方法,定量分析淫羊藿药渣中总氨基酸成分;同时,优化其总氨基酸水解液制备工艺,用以提高淫羊藿药渣的二次利用率,为实现药渣资源的高值化利用提供参考依据。

## 参考文献:

- [1] 谭显东,王向东,黄健盛,等. 中药渣资源化技术研究进展[J]. 中成药,2010,32(5):847-849.
- [2] 张红刚,滕婧,李顺祥,等. 资源节约——中药渣高效综合利用研究进展[J]. 广州化工,2013,41(12):16-18.
- [3] 裴文琪,刘国宇,刘娜,等. 中药渣栽培平菇营养成分和重金属分析[J]. 辽宁农业科学,2016(5):86-87.
- [4] 黄春霞. 稀土氨基酸咪唑配合物和稀土异核氨基酸配合物的合成及表征[D]. 镇江:江苏大学,2011:13-14.
- [5] 姜云. 芦笋质量控制的现代分析方法研究[D]. 上海:第二军医大学,2009:23-25.
- [6] 邢健,李巧玲,耿涛华,等. 氨基酸分析方法的研究进展[J]. 中国食品添加剂,2012(5):187-191.
- [7] 卢炳瑞. 禽畜饲料配制技术(一)[M]. 长春:吉林摄影出版社,2005:100-101.
- [8] 田浩,肖丹,钊助胜,等. 运用改性活性炭对烟叶氨基酸水解液进行脱色最佳工艺研究[J]. 中国烟草科学,2012(4):85-89.
- [9] 王培培,鲁芹飞,李婧,等. 铁皮石斛中总游离氨基酸的含量测定及提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(14):30-33.
- [10] 刘荣. 不同栽培品种橘的主要药效成分动态变化与遗传多样性分析研究[D]. 成都:成都中医药大学,2014:34-37.
- [11] 毕华,饶春明,刘兰,等. 重组人粒细胞集落刺激因子的氨基酸组成分析[J]. 中国生物制品学杂志,2008,21(12):1121-1123.
- [12] 朱杰. 虎杖药渣的生态化综合利用研究[D]. 吉首:吉首大学,2013:22-28.
- [13] 李晴媛,徐晓娜. 饲料中粗蛋白含量的测定方法[J]. 中国畜牧兽医文摘,2013(2):197,190.
- [14] 李秀婷. 负载金属的二氧化钛光催化耦合脱氮的研究[D]. 大连:大连理工大学,2006:12-34.
- [15] 魏康林. 基于微型光谱仪的多参数水质检测仪关键技术研究[D]. 重庆:重庆大学,2012:32-36.
- [16] 林榕嫻. 细菌型豆豉发酵机理及功能性研究[D]. 泰安:山东农业大学,2012:55-56.
- [17] 路苹,于同泉,王淑英,等. 谷物赖氨酸测定方法的评价[J]. 北京农学院学报,2005,20(3):73-76.
- [18] 保玉心,邱树毅. 响应面法优化黑曲霉产单宁酶的固体发酵条件[J]. 现代食品科技,2012,28(8):986-989.
- [19] 刘兰香,郑华,张雯雯,等. DDSA 酯化法制备胭脂虫红色素衍生物[J]. 林产化学与工业,2015,35(4):117-124.
- [20] 代凤,毛建霏. 响应面法优化紫甘薯花色苷水解条件[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(9):1245-1248,1228.
- [21] 李梅,王桂荣. 酸水解——氨基酸分析前处理方法的应用实践[J]. 安徽农业科学,2014(10):2846-2847,2862.