

响应面优化超声辅助提取莲子心总生物碱工艺

罗 平, 王莎莎, 孙俊杰, 张 萌

(重庆大学 化学化工学院, 重庆 400030)

摘要: 利用响应面分析法对超声辅助提取莲子心中总生物碱的工艺条件进行优化。在单因素实验、Plackett-Burman 实验设计和最陡爬坡实验的基础上,以莲子心总生物碱提取量为响应值,利用效应响应面法研究各因素及其交互作用对莲子心总生物碱提取量的影响,优选莲子心中总生物碱的提取工艺。作者采用非线性数学模型拟合的方式,使自变量和因变量的关系扩展到曲面,从而使实验数据更加精密。实验优化得出超声辅助提取莲子心总生物碱的最佳工艺条件为:料液质量体积比 1 g:40.4 mL,乙醇体积分数 64.4%,超声提取时间 40 min,模型预测可达到 128.695 mg/g。在上述条件下,莲子心总生物碱的提取率可以达到 128.673 mg/g,与模型预测值基本一致。

关键词: 莲子心;总生物碱;超声辅助提取;响应面优化

中图分类号: X 703 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)07—0743—07

Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Total Alkaloids from Plumula Nelumbinis by Response Surface Methodology

LUO Ping, WANG Shasha, SUN Junjie, ZHANG Meng

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: The optimization of the ultrasonic-assisted extraction of total alkaloids from Plumula Nelumbinis by response surface methodology was studied. Based on the single-factor test analysis, the Plackett-Burman experimental design and steepest ascent design, while take extracted amount of total alkaloids as the response value, response surface method was applied to analyze the influence of various factors and their interaction on the extraction of total alkaloids, select an optimized progress to extract total alkaloids from Plumula Nelumbinis. In this study, nonlinear mathematical model fitting way make independent variables and the dependent variable relationship extend to curved surface, so that the experimental data become more precise. The experiments obtain an optimal ultrasound-assisted extraction of total alkaloids from Plumula Nelumbinis progress conditions: solid-liquid ratio as 1:40.4; volume fraction of ethanol as 64.4%; ultrasound extraction time as 40 min; model predict its productive yield can reach 128.695 mg/g. Under these conditions, extracted amount of total alkaloids from Plumula Nelumbinis can reach 128.673 mg/g, which is consistent with the predicted values.

收稿日期: 2013-11-17

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(CSTC, 2008BB7180); 重庆大学研究生科技创新基金项目(CDJXS10220003)。

作者简介: 罗 平(1966—), 女, 重庆人, 工学博士, 副教授, 主要从事分析化学及水处理技术研究。E-mail: cstpw@163.com

Keywords: plumula nelumbinis, total alkaloids, ultrasonic-assisted extraction, response surface methodology

莲子心是睡莲科莲属植物莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn)种子中的绿色幼叶及胚根,俗称薏、苦薏等,是我国传统中药的一种^[1]。从莲子心中提取生物碱的研究具有重要的经济价值和良好的应用前景。超声辅助提取技术由于操作简便、节能、省时,近年来广泛用于天然产物的浸提^[2-4]。作者首次采用响应面分析法对超声辅助提取莲子心中总生物碱的工艺条件进行优化,旨在为其实验研究和工业应用提供参考和依据^[5-6]。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

莲子心:由重庆百农网投资有限公司提供,干燥至恒重,粉碎备用;莲心碱:深圳市美荷生物科技有限公司提供,色谱纯;无水乙醇、石油醚、盐酸、氨水、三氯甲烷等,均为分析纯。

KQ-3200DB 超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司产品;T6 新世纪紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司产品;D2F-6050 型真空干燥箱:上海一恒科学仪器有限公司产品;FW-100 型植物粉碎机:天津泰斯特仪器有限公司产品;pHS-3B 型酸度计:成都方舟科技开发公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 莲子心中总生物碱的提取 精确称取 1.00 g 莲子心粉末于具塞锥形瓶中,30 mL 石油醚脱脂,除去石油醚,加入定量乙醇,浸泡一段时间后,将锥形瓶固定在超声波清洗器中超声提取。提取液用砂芯漏斗抽滤后,吸取 5 mL 滤液水浴蒸干,在残渣中加入体积分数 5% 盐酸溶液溶解,过滤,滤液加等量氯仿萃取 3 次,分出氯仿层,取水层用氨水调 pH 至 9~10,再用氯仿萃取至生物碱反应至阴性为止(采用碘化铋钾)。合并氯仿液,水浴蒸干,残渣用无水乙醇溶解,过滤,定溶于 50 mL 容量瓶中,得总生物碱。

1.2.2 单因素实验 采用单因素实验法,一次改变 1 个因素的水平而其它因素保持不变,依次进行考察优化。

1.2.3 Plackett-Burman 实验设计 Plackett -

Burman 实验设计^[7-8]又被称作筛选实验设计,在单因素实验的基础上,进行 Plackett-Burman 实验设计及数据分析,选取料液质量体积比(*A*),超声时间(*B*),超声功率(*C*),乙醇体积分数(*D*),超声温度(*E*),提取前浸泡时间(*F*),提取次数(*G*)7 个因素,以总生物碱提取率为响应值进行二级水平(低水平“-1”,高水平“+1”)实验。Plackett-Burman 实验设计因素水平编码见表 1。

表 1 Plackett-Burman 设计因子水平范围

Table 1 Range and factors of Plackett-Burman design

水平	<i>A</i> /(g/mL)	<i>B</i> /min	<i>C</i> /w	<i>D</i> /%	<i>E</i> /℃	<i>F</i> /min	<i>G</i>
-1	1:20	15	60	70	30	40	1
1	1:30	35	90	90	40	60	2

1.2.4 最陡爬坡实验设计 PB 实验通常只能分析各因子对实验结果影响的大小,从而筛选出对实验结果影响显著的因子,而不能确定最优点所在的区域,因此根据因子对指标的影响差异情况,继续设计一个最陡爬坡实验来寻找最优点所在的区域^[9]。

1.2.5 中心组合实验设计 中心组合实验设计^[10-11]是一种常见的响应面设计方法,用来评价实验指标与各因素之间的非线性关系,估计一阶、二阶与一阶相互交互作用项的多项式模式。选取料液质量体积比(*A*)、超声时间(*B*)、乙醇体积分数(*D*)3 个对莲子心总生物碱提取效果影响显著的因素,采用 3 因素 5 水平的响应面分析方法进行设计,实验设计因素水平见表 2。

1.3 分析检测方法

标准曲线的绘制:以莲心碱为对照品,采用分光光度法测定,以吸光度 *A* 为纵坐标,质量浓度(*c*, μg/mL)为横坐标,绘制标准曲线并建立回归方程: $A=0.015\ 2c-0.002\ 5$, $R^2=0.999\ 8$ 。

表 2 中心组合实验设计因素水平

Table 2 Factors and levels in response surface design

因素	水平				
	-1.682	-1	0	1	1.682
<i>A</i> 料液质量体积比/(g/mL)	1:31.59	1:35	1:40	1:45	1:48.41
<i>B</i> 超声时间/min	31.59	35	40	45	48.41
<i>D</i> 乙醇体积分数/%	56.59	60	65	70	73.41

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

2.1.1 料液比对总生物碱提取率的影响 按照 1.2.1 方法,在温度 25 ℃,超声功率 105 W,超声时间 15 min,乙醇体积分数 70 %,提取前无浸泡,提取 1 次的条件下,考察不同料液质量体积比对提取效果的影响,结果见图 1。由图 1 可知,总生物碱得率随料液质量体积比增加而增加,但超过 1 g:30 mL 时,由于总生物碱的溶出率趋于饱和,提取率不再增长,而且过高液相浓度会提高生产成本及后续处理的难度。因此,选用 1 g:30 mL 的料液质量体积比作为后续试验的参考值。

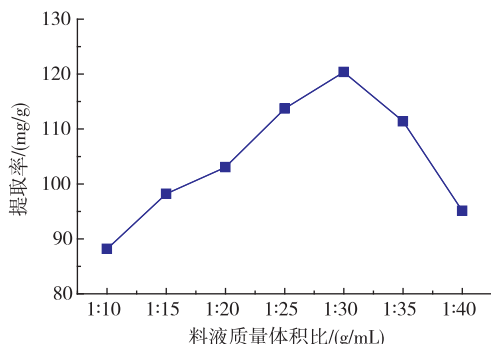


图 1 料液质量体积比对总生物碱提取率的影响

Fig. 1 Effect of liquid-solid ratio on extraction yield of total alkaloids

2.1.2 超声时间对总生物碱提取率的影响 按照 1.2.1 方法,其它因素条件保持不变,考察不同超声时间对提取效果的影响。由图 2 可知,从 10~35 min 之间,总生物碱得率随提取时间增加而持续增加,35 min 时达到提取率的最大值,继续增加超声时间,得率反而下降,这可能是因为随着提取时间的增加,莲子心细胞中生物碱浓度降低,溶出速度变慢,同时在超声波高能量的作用下,生物碱中不稳定成分也逐渐被破坏。因此,选用 35 min 作为后续试验的参考值。

2.1.3 超声功率对总生物碱提取率的影响 按照 1.2.1 方法,其它因素条件保持不变,考察不同率对提取效果的影响,结果见图 3。当超声功率在 90 W 以下时,随超声功率的不断增强,生物碱与提取剂的接触机会逐渐增加,空化效应逐渐增强,生物碱的溶出率不断提高。当超声功率超过 90 W 时,得率下降,这是因为莲子心中有机杂质种类多,随功率的增强,细胞破碎时里面的色素、脂溶性成分的溶

出不断增加,而生物碱成分则遭到一定的破坏,因此,选择超声功率 90 W 为后续实验的参考值。

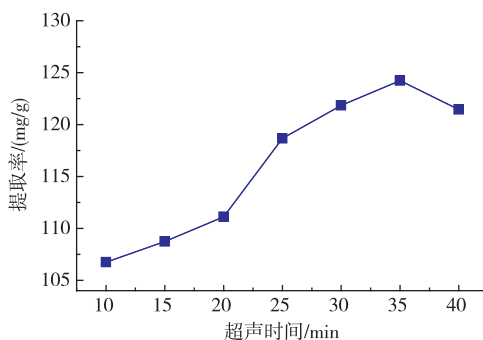


图 2 超声时间对总生物碱提取率的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic time on extraction yield of total alkaloids

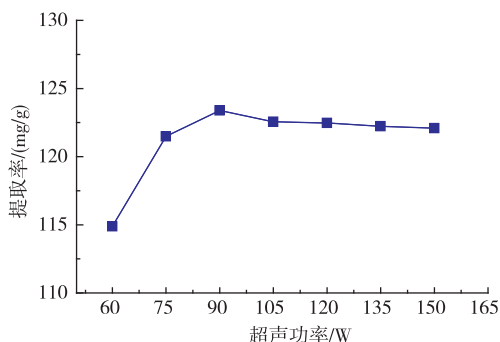


图 3 超声功率对总生物碱提取率的影响

Fig. 3 Effect of ultrasonic power on extraction yield of total alkaloids

2.1.4 乙醇体积分数对总生物碱提取率的影响 按照 1.2.1 方法,其它因素条件保持不变,考察不同乙醇体积分数对提取效果的影响。由图 4 可知,当乙醇体积分数在 70 % 以下时,随提取剂体积分数的不断增加,生物碱与提取剂的极性越靠近,生物碱的溶出率不断提高。因此,选择乙醇体积分数为 70% 为后续实验的参考值。

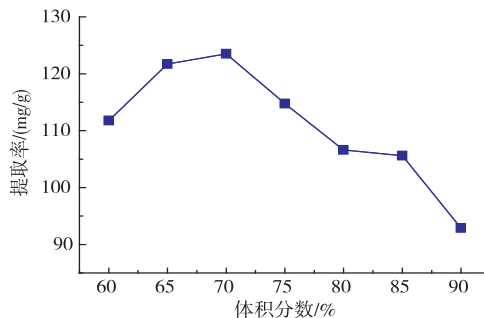


图 4 乙醇体积分数对总生物碱提取率的影响

Fig. 4 Effect of ethanol concentration on extraction yield of total alkaloids

2.1.5 超声温度对总生物碱提取率的影响 按照 1.2.1 方法,其它因素条件保持不变,考察不同提取温度对提取效果的影响,结果见图 5。由图 5 可知,当提取温度在 20~30 ℃时,总生物碱得率逐渐增高,当提取温度继续升高,莲子心中生物碱结构不稳定,易被破坏,加之此时杂质溶出率增加,导致提取量下降。因此,选择超声温度为 30 ℃作为后续实验的参考值。

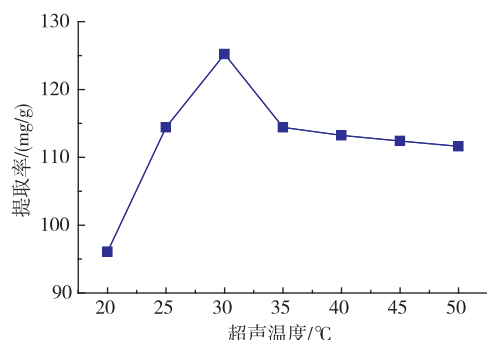


图 5 超声温度对总生物碱提取率的影响

Fig. 5 Effect of ultrasonic temperature on extraction yield of total alkaloids

2.1.6 超声提取前浸泡时间对总生物碱提取率的影响 按照 1.2.1 方法,其它因素条件保持不变,考察超声提取前不同浸泡时间对提取效果的影响。由图 6 可知,当浸泡时间在 60 min 时,生物碱的溶出率达到最大。因此,选择提取前浸泡 60 min 为下一步实验的优选值。

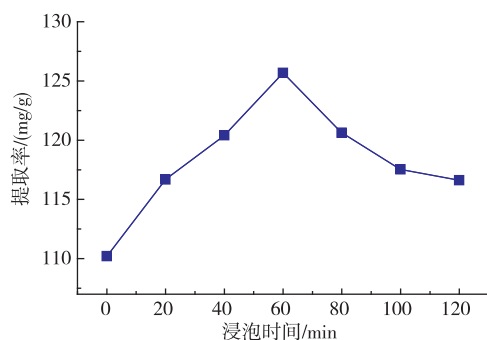


图 6 浸泡时间对总生物碱提取率的影响

Fig. 6 Effect of soak time on extraction yield of total alkaloids

2.1.7 提取次数对总生物碱提取率的影响 按照 1.2.1 方法,其它因素条件保持不变,考察提取次数对提取效果的影响。由图 7 可知,莲子心生物碱的得率随着提取次数的增加而增大,提取 2 次后变化

较缓慢。这说明当提取次数达到一定程度,有效成分基本提取完全,此时继续增加提取次数已无明显效果。所以从经济效益和时间的角度考虑,将提取次数选为 2 次。

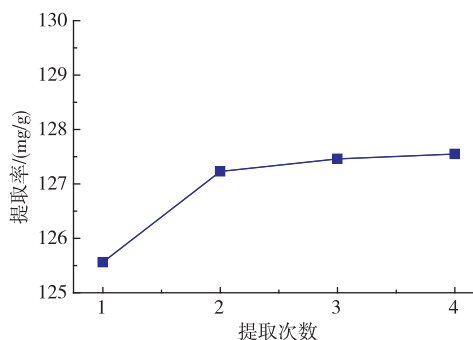


图 7 提取次数对总生物碱提取率的影响

Fig. 7 Effect of extracting times on extraction yield of total alkaloids

2.2 显著影响因子的确立

2.2.1 Plackett-Burman 实验设计处理及响应值 按照 Plackett-Burman 实验设计进行实验,实验设计 4 个空白因素,共进行 12 次,每个实验号重复 3 次取均值。实验方案及结果见表 3。

表 3 Plackett-Burman 实验设计及响应值

Table 3 Plackett-Burman test design and result

实验号	A	B	C	D	E	F	G	生物碱量/(mg/g)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	114.476
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	132.624
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	119.654
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	93.953
5	1	1	-1	1	1	-1	1	74.741
6	1	1	1	-1	1	1	-1	103.602
7	-1	1	1	1	-1	1	1	115.549
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	81.426
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	106.535
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	99.827
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	133.648
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	59.747

2.2.2 显著影响因子的确立 利用 Minitab15 软件对表 3 中的实验设计结果进行回归模型方差分析,结果见表 4。

由表 4 分析结果可知,此次实验所得到的回归拟合方程显著(模型项 $P=0.001<0.05$),具有统计学

意义, $R^2=0.988\ 8$, $R^2(\text{调整})=0.969\ 2$, 说明变异可以用模型来解释。实验回归方程系数显著性检验见表5。

表4 回归模型方差分析表

Table 4 Analysis of variance of regression equation

变异源	自由度	平方和	均方	F值	P值
模型	7	5560.08	794.30	50.49	0.001
误差	4	62.93	15.73		
总和	11				

表5 偏回归系数及显著性检验表

Table 5 Partial regression coefficients and significance test

模型项	回归系数	T检验	P值	显著性
常量	102.98	89.94	<0.001	
A	5.76	5.03	0.007	显著
B	3.89	3.40	0.027	显著
C	2.50	2.18	0.095	
D	-14.01	-12.24	<0.001	显著
E	1.98	1.73	0.159	
F	-1.82	-1.59	0.186	
G	14.32	12.51	<0.001	显著

注:置信度 95%, α 为 0.05。

由偏回归系数及显著性检验表5可以看出,影响提取量的主要因素为料液质量体积比、乙醇体积分数、超声时间和提取次数。回归得到多元一次方程为:

$$Y=102.98+5.76A+3.89B+2.50C-14.01D+1.98E-1.82F+14.32G$$

2.3 最陡爬坡实验设计

从表5及回归方程可知A、B、D和G对实验结果影响大,但是由于考虑到实际生产中的经济因素,从节省溶剂的角度将以下实验均选择提取次数为两次,因而对A、B、D进行最陡爬坡实验,以实验值的变化方向为爬坡方向,根据各因素效应值与比例来确定变化步长,尽快逼近最佳值区域。针对A、B、D设计最陡爬坡试验,实验设计和结果如表6。

从表6可知,随着爬坡的进行,Y值增加,在处理4处即达到最高点,之后又开始下降,说明在该点对应的条件值时,总生物碱提取量接近了最优值,因此选择这一点作为中心组合设计的中心点。

表6 最陡爬坡实验设计及结果

Table 6 Experimental design and results of steepest ascent path

实验号	A/(g/mL)	B/min	D/%	生物碱质量分数/(mg/g)
1	1:25	25	80	98.542
2	1:30	30	75	100.768
3	1:35	35	70	120.344
4	1:40	40	65	128.560
5	1:45	45	60	124.748

2.4 响应面法优化工艺条件

2.4.1 中心组合试验设计及结果 实验选取料液比(A)、超声时间(B)、乙醇体积分数(D)3个对莲子心总生物碱提取效果影响显著的因素,采用3因素5水平的响应面分析方法进行设计,以最陡爬坡实验的最优值作为中心组合实验的中心点取值。设计共20个实验点,其中14个析因点,6个中心点,设计方案及结果见表7。

表7 中心组合试验设计方案及响应值

Table 7 Experiment design and result of Central Composite Design

实验号	A	B	D	生物碱质量分数/(mg/g)
1	-1.000 00	-1.000 00	-1.000 00	120.814
2	1.000 00	-1.000 00	-1.000 00	124.807
3	-1.000 00	1.000 00	-1.000 00	122.768
4	1.000 00	1.000 00	-1.000 00	122.748
5	-1.000 00	-1.000 00	1.000 00	120.483
6	1.000 00	-1.000 00	1.000 00	122.622
7	-1.000 00	1.000 00	1.000 00	121.046
8	1.000 00	1.000 00	1.000 00	121.324
9	-1.681 79	0.000 00	0.000 00	118.535
10	1.681 79	0.000 00	0.000 00	121.224
11	0.000 00	-1.681 79	0.000 00	121.211
12	0.000 00	1.681 79	0.000 00	121.006
13	0.000 00	0.000 00	-1.681 79	125.278
14	0.000 00	0.000 00	1.681 79	124.807
15	0.000 00	0.000 00	0.000 00	128.430
16	0.000 00	0.000 00	0.000 00	128.560
17	0.000 00	0.000 00	0.000 00	128.952
18	0.000 00	0.000 00	0.000 00	128.944
19	0.000 00	0.000 00	0.000 00	128.782
20	0.000 00	0.000 00	0.000 00	128.256

2.4.2 回归模型方差分析 利用 Minitab15 软件对表 7 数据进行二次多元回归拟合后,得出回归方程系数显著性检验、方差分析结果分别如表 8、表 9 所示。由回归分析可知生物碱提取率 Y 对自变量 A 、 B 和 D 的关系可用多元二次回归方程表示:

$$Y = 128.649 + 0.608A + 0.104B - 0.282D - 3.072A^2 - 2.638B^2 - 1.247C^2 - 0.408AB + 0.132AD - 0.405BD$$

由表 8 可知,在一次项中,料液比对生物碱提取的影响最大,达到极其显著水平,此外乙醇体积分数也达到显著水平。在二次项中,料液质量体积比、乙醇体积分数、超声时间影响均达到极显著水平。在交互项中,料液质量体积比和超声时间的交互、超声时间和乙醇体积分数的交互达到显著水平。

表 8 回归系数显著性检验表

Table 8 Significance test table of regression coefficient

模型项	自由度	回归系数	系数标准差	T 值	$Pr> t $
常量	1	128.649	0.147 58	871.734	<0.001
A	1	0.608	0.097 92	6.209	<0.001
B	1	0.104	0.097 92	1.065	0.312
D	1	-0.282	0.097 92	-2.875	0.017
A^2	1	-3.072	0.095 32	-32.229	<0.001
B^2	1	-2.638	0.095 32	-27.671	<0.001
D^2	1	-1.247	0.095 32	-13.079	<0.001
AB	1	-0.408	0.127 93	-3.190	0.010
AD	1	0.132	0.127 93	1.029	0.328
BD	1	-0.405	0.127 93	-3.165	0.010

从表 9 中回归方程的方差分析可知, $F=196.95 > F_{0.01}(9, 5)=10.2$, 相应的概率值 $P < 0.001$, 该方程模型达到极其显著, 方程的二次项与交互项的 P 值表明各具体因子对响应值的影响不是简单的线性关系。由失拟性检验分析得 $F=2.22 < F_{0.05}(9, 5)=4.77$, 相应的概率值 $P=0.201 > 0.05$, 失拟不显著, 失拟性分析表明, 该回归方程无失拟因素存在, 回归模型与实测值能较好地拟合。通过对实验模型可信分析, 得到复相关系数 R^2 为 0.994 4, 说明模型可以解释 0.994 4 试验所得生物碱含量的变化, 表明方程拟合较好。校正后 R^2 为 0.989 3, 表明生物碱提取率 0.989 3 的变异分布在方程中, 其总变异中仅有 1.07% 不能由该模型解释。 Y 的变异系数较低, 表示实验的精确度高, 实验可靠性强, 实验操作可信。综上所述, 回归方程给生物碱的提取提供了一个合适的模型。

表 9 回归方程方差分析

Table 9 Analysis of variance of regression equation

来源	自由度	平方和	均方	F	$Pr>F$
模型	9	232.01	25.787 9	196.95	<0.001
线性	3	6.280	2.093 2	15.99	<0.001
平方	3	223.09	74.343 0	567.79	<0.001
交互	3	2.783	0.927 5	7.08	0.008
剩余	10	1.309	0.130 9		
失拟	5	0.903	0.180 5	2.22	0.201
纯误差	5	0.407	0.081 3		

2.4.3 响应曲面的拟合以及最优条件的确定 图 8~10 是由多元二次回归方程所作的各因素之间两两相互作用对响应值的影响所得到的响应面图及等高线图。由此可见, 响应值随料液质量比、超声时间和乙醇体积分数的增大呈先增后降的趋势, 说明三个因素在所选范围内能产生较佳的响应值。

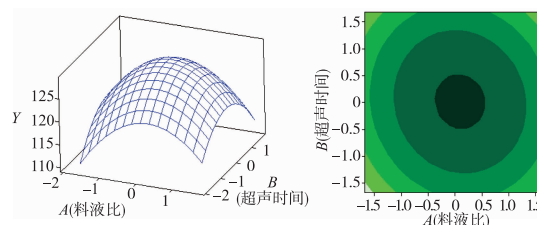


图 8 $Y=f(A, B)$ 的响应面图和等高线图

Fig. 8 Response surface and contours of $Y=f(A, B)$

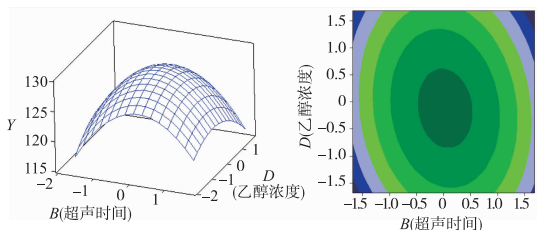


图 9 $Y=f(B, D)$ 的响应面图和等高线图

Fig. 9 Response surface and contours of $Y=f(B, D)$

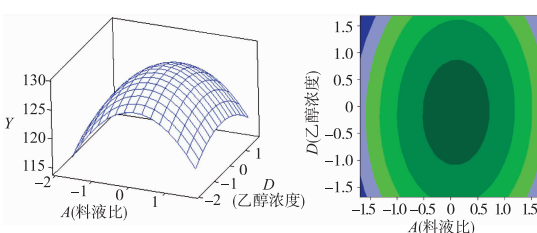


图 10 $Y=f(A, D)$ 的响应面图和等高线图

Fig.10 Response surface and contours of $Y=f(A, D)$

在获得非线性回归模型和响应面之后,为了求得生物碱的最佳提取量,对所得的回归拟和方程分别对各自的变量求一阶偏导数,得到三元一次方程组,求解此方程组可以得到最大提取量时的最佳条件,即 $A=0.084\ 939\ 0$, $B=0.016\ 987\ 8$, $D=-0.118\ 915$, $Y=128.695$ 。所以与之对应的总生物碱得率最高时的提取条件组成为:料液质量体积比为 $1\text{ g}:40.42\text{ mL}$,超声时间 40.08 min ,乙醇体积分数 64.41% 。

2.5 验证实验

为了验证模型方程的适用性与可靠性,采用上述最佳工艺条件进行生物碱提取实验,超声时间 40 min ,乙醇体积分数 64.4% ,料液质量体积比 $1\text{ g}:40.4\text{ mL}$,进行 3 次平行实验,结果表明,在此条件下,每克莲子心中生物碱的平均提取量为 128.673 mg ,与

预测值基本相符,说明此方程与实际情况拟合良好,因此基于响应面法分析所得的优化提取工艺参数准确可靠,具有实际参考价值。

3 结语

通过单因素实验、PB 实验和最陡爬坡实验对莲子心生物碱提取影响研究后,再采用中心组合设计实验对因素和水平进行优化,得出最佳提取工艺条件为:超声时间 40 min ,乙醇体积分数 64.4% ,料液质量体积比 $1\text{ g}:40.4\text{ mL}$,在此工艺条件下,生物碱提取量 128.673 mg/g 。超声辅助提取具有时间短、反应条件温和等优点,提取获得的生物碱保持了其原有功能特性。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 2010 年版. 北京:化学工业出版社,2010:256.
- [2] 郭孝武,冯岳松,等. 超声提取分离[M]. 北京:化学工业出版社,2008:5-10.
- [3] 牛立新,李章念,李红卷,等. 超声波提取卷丹鳞茎中总黄酮研究[J]. 中药材,2007,30(1):85-88.
NIU Lixin, LI Zhangnian, LI Hongjuan, et al. Study on Ultrasonic Wave Extraction of Flavonoids from the Bulb of *Lilium lancifolium*[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2007, 30(1):85-88. (in Chinese)
- [4] 周鸣谦,王仁才,刘云鹤. 超声强化超临界 CO_2 萃取柑橘落果中辛弗林[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(9):963-972.
ZHOU Mingqian, WANG Rencai, LIU Yunhe. Ultrasound-Assisted Extraction of Synephrine from Citrus Dropt Fruits in Supercritical CO_2 [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2012, 31(9):963-972. (in Chinese)
- [5] YAN Yunliang, YU Chenhuan, CHEN Jing, 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(1):217-224.
- [6] Lee W C, Yusof S, Hamid N S A, et al. Optimizing conditions for hot water extraction of banana juice using response surface methodology(RSM)[J]. *Journal of Food Engineering*, 2006, 75(4):473-479.
- [7] Montgomery D C. Design and analysis of experiment[M]. 5th ed. New York: John Wiley & Sons. 2000:46-51.
- [8] 钱毅玲,赵谋明,赵强忠,等. 亲水胶体在乳化肠体系的 Plackett-Burman 法筛选中的应用[J]. 食品科学,2009,30(22):192-197.
QIAN Yiling, ZHAO Mouming, ZHAO Qingzhong, et al. Screening of Hydrocolloids Added to Emulsion-type Sausage Using Plackett-Burman Design[J]. *Food Science*, 2009, 30(22):192-197. (in Chinese)
- [9] LI Chan, BAI Jinghua, CAI Zhaoling, et al. Optimization of a culture medium for bacitracin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology[J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 93(1):27-34.
- [10] SUN Yongxu, LIU Jicheng. Application of response surface methodology for optimization of polysaccharides production parameters from the roots of *Codonopsis pilosula* by a central composite design[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 80(3):949-953.
- [11] Julián Londono-Londono, Vania Rodrigues de Lima, Oscar Lara, et al. Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method[J]. *Food Chemistry*, 2010, 119(1):81-87.