

文章编号:1673-1689(2006)02-0042-06

纤维素金属螯合亲和膜用于蛋清中 功能性蛋白质的分离纯化

张亚辉, 杨严俊

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214036)

摘要:以纤维素滤纸为载体,通过环氧氯丙烷交联活化、亚氨基二乙酸偶联、金属离子整合制备得到亲和膜。应用该膜进行的蛋清蛋白纯化试验结果表明, Cu^{2+} 亲和膜具有较好的吸附性能和纯化效果,只需采用两步洗脱的方式即可得到具有明显纯化效果的蛋清转铁蛋白和溶菌酶。

关键词:亲和膜;纤维素;卵转铁蛋白;溶菌酶

中图分类号:Q 51

文献标识码:A

Study on the Purification of Functional Proteins from Egg White by Cellulose Metal-Chelated Affinity Membrane

ZHANG Ya-hui, YANG Yan-jun

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Affinity membrane was successfully prepared with cellulose analysis filter paper as support, epichlorohydrin(EPI) as crosslinking and activation agent, iminodiacetic acid (IDA) as ligand. Then preparation of Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} metal-chelated ligand was carried out, respectively. The experimental results showed that the absorption and purification effect of Cu^{2+} affinity membrane were better than those of Ni^{2+} and Zn^{2+} affinity membranes. The ovotransferrin and lysozyme were purified as salience with two step elution. The affinity membrane supplied a technique for industrilized membrane separation in the future.

Key words: affinity membrane; cellulose ovotransferrin(OTf); lysozyme(Lys)

固定化金属螯合亲和色谱(IMAC)具有螯合介质制备简单方便、吸附容量大、选择性及通用性较好、易于再生等优点,是由 Porath 于 1975 年引入^[1],其基本原理是在不同条件下配位键的形成和解离。由于蛋白质表面的组氨酸、色氨酸、半胱氨酸这一类电子供体可与过渡金属离子形成配位复合物,因而连接上过渡态金属离子的载体可以选择性地吸附含咪唑基或巯基的肽或蛋白质,而亲和力的大小主要取决于蛋白质分子表面咪唑基、巯基的

稠密程度。此外,不同金属离子对亲和力大小也有一定的影响。在分别螯合有 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 的 IDA 型亲和柱中, Cu^{2+} -IDA 对蛋白质或氨基酸的亲和力最强。基于该原理,若将金属离子固定于层析介质上,则能制成金属螯合亲和吸附剂,可用于纯化蛋白质等生物大分子物质^[2-3]。

传统亲和介质多为凝胶,但由于凝胶颗粒易压缩变形,蛋白质在颗粒间扩散传质慢,分离操作只能在低流速下进行,这些缺陷限制了其在实际应用

收稿日期:2005-05-15; 修回日期:2005-12-25.

作者简介:张亚辉(1976-),女,新疆石河子人,工学硕士.

中的规模和工作效率。用微孔的膜作支撑是80年代提出的,人们结合亲和和色谱特异性高和膜技术分离快、处理量大的优点,研制成功了亲和膜,使得大体积、低含量的生物工程产品的大规模分离纯化成为可能^[4]。

目前,用于生化分离的膜色谱介质多数是将一般的过滤膜进行化学改性,连接所需功能团进行分离。而商品膜受孔径大小、可活化基团数量、膜强度的限制,使制备不易根据需要进行控制,从而限制了在分离中的应用。而以纤维素滤纸为材料制备固定化金属亲和膜用于Cu/Zn-SOD的分离、人血清白蛋白除杂及其他生化制剂的纯化等,都取得良好的效果^[4-7]。

蛋清转铁蛋白(OTf)和蛋清溶菌酶(Lys)是蛋清中两种重要的功能性蛋白质,溶菌酶在食品、医药等领域的应用较多,而对于蛋清转铁蛋白的认识虽不如溶菌酶多,但其能够提高铁的转运和吸收^[8-9]等生物功能性使其具有特有的研发潜力及应用前景。

以纤维素分析滤纸为材料制备亲和膜的方法,本实验室已进行过研究和报道^[10],本文将此方法制成的亲和膜应用于蛋清转铁蛋白和溶菌酶的分离提取,并对分离提取的工艺条件进行了初步的研究。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与仪器

纤维素分析滤纸:杭州新华造纸厂产品;环氧氯丙烷(EPI)、亚氨基二乙酸(IDA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、牛血清白蛋白(BSA):上海试剂公司产品;溶菌酶(Lys):华美生物工程公司;乳铁蛋白(Lf):Morinaga Milk Industry Co. Ltd产品;蛋清转铁蛋白(OTf):Sigma Chemical Co.产品;乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、CuSO₄·5H₂O等,均为国产分析纯试剂;752紫外光栅分光光度计,DYY-III电泳仪,DSHZ-300多用途水浴恒温振荡器,TDL-40B离心机等。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质质量浓度测定 紫外吸收法^[11]。

1.2.2 Me(金属离子)亲和膜的制备 将纤维素分析滤纸放入4 mol/L NaOH中,经碱溶胀45 min后,再加入5 mL EPI、5 mL DMSO,放入70℃水浴中反应45 min,将活化后的膜用大量去离子水冲洗至无残余的EPI;称取4.5 g IDA,用30 mL 1.5

mol/L Na₂CO₃溶解,放入30张活化好的膜,于60℃反应15~16 h,再将偶联好配基的膜用去离子水洗至中性;取4份分别浸入到浓度为0.05 mol/L的CuSO₄、Fe₂(SO₄)₃、ZnSO₄、NiSO₄溶液中,2 h后取出,并用去离子水洗至无残余的金属离子,即得4种金属离子螯合的纤维素亲和膜,待用^[10]。

1.2.3 蛋清转铁蛋白和溶菌酶的分离纯化 新鲜鸡蛋,将蛋清分离出,去离子水稀释,于10℃条件下搅拌30 min,再将稀释并搅拌后的蛋清液4 000 r/min离心10 min,取上清液作为料液A;将螯合有金属离子的亲和膜放入一定体积料液A中,于4℃条件下静态吸附10 h,再用去离子水冲去黏附在金属离子亲和膜上多余的料液A及杂质;依次用不同pH条件的0.05 mol/L Tris-HCl/0.5 mol/L NaCl进行洗脱,最后用0.01 mol/L的咪唑进行洗脱^[12]。

1.2.4 SDS-PAGE 凝胶电泳 采用15 g/dL分离胶,见参考文献[11]。

1.2.5 凝胶色谱(GPC)测定蛋白质相对分子质量分布 色谱条件如下:色谱柱:Shodex PROTEIN KW-802.5;Detector:Shodex UV(280 nm);Eluent:50 mmol/L Sodium phosphate buffer + 0.3 mmol/L NaCl(pH 7.0);体积流量:1.0 mL/min;Column temp: Ambient。

2 结果与讨论

2.1 Me亲和膜的制备

纤维素不仅是一种优良的膜材料,还是良好的亲和载体,因此成为亲和膜介质的首选基质材料。按照方法1.2.2所得纤维素膜和原滤纸的扫描电镜图分别为图1,2所示。从图中可以看出,滤纸中有大量的自由纤维,结构散乱,而碱处理可以除去纤维中的不均匀的短链部分,只剩下均匀粗大的纤维,再经过交联活化后,纤维被共价键限制在固定的位置上,大大强化了其松散的网状结构,且膜的孔径在10~50 μm之间,因此能够满足快速传质的要求。

图1 活化反应后的纤维素分析滤纸

Fig. 1 Cellulose analysis filter paper after activation

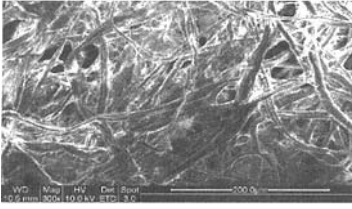


图2 纤维素分析滤纸

Fig. 2 Cellulose analysis filter paper

2.2 分离条件的确定

2.2.1 蛋清稀释倍数的选择 蛋清中的蛋白质分子之间存在着静电作用,对其进行合理的稀释不仅可以削弱分子之间的静电作用,便于蛋清转铁蛋白和溶菌酶的分离纯化,还可以提高原材料的利用率。

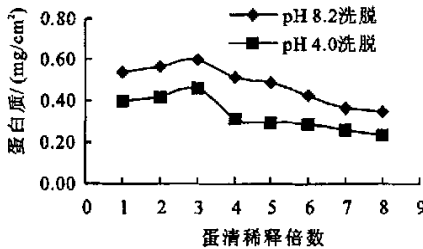


图3 蛋清稀释倍数对亲和膜吸附效果的影响

Fig. 3 Effect of different elute time on the protein adsorption by affinity membrane

从图3中可以看出,随着蛋清稀释倍数的增加,亲和膜吸附力,先升高后降低,3倍稀释后的蛋清料液吸附效果最好。蛋清经过稀释和搅拌后,蛋清体系已经变稀薄,蛋白质分布较均匀,蛋白质之间的静电作用减弱,比较容易吸附。但随着稀释倍数的进一步增加,蛋白质浓度进一步降低,膜表面的亲和基团与蛋清稀释液中蛋白质的接触机会减少,使得亲和膜吸附到的蛋白质减少,蛋白质收率也降低^[13]。

2.2.2 金属离子的选择 Fe^{3+} 作为螯合金属离子,比 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 3种金属离子不稳定,较容易随着洗脱液被洗下来,所以在此试验中只考察 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 3种金属离子亲和膜对蛋清转铁蛋白和溶菌酶的分离效果^[10]。

由于试验条件所限,且乳铁蛋白(相对分子质量约为76 000)和蛋清转铁蛋白(相对分子质量约为79 000)同属于转铁蛋白、相对分子质量相近,所以试验采用乳铁蛋白为标准转铁蛋白质进行对照,并增加牛血清白蛋白(相对分子质量约为67 000)和溶菌酶(相对分子质量约为14 300)2种蛋白质标样对纯化试验结果进行对比。蛋清料液经吸附、洗

脱、浓缩后的样品,再进行SDS-PAGE凝胶电泳,结果如图4所示。

1. Lf标样(Mr 76 000); 2. BSA标样(Mr 67 000); 3. Lys标样(Mr 14 000); 4. Zn^{2+} -pH 8.2洗脱; 5. Cu^{2+} -pH 8.2洗脱; 6. Ni^{2+} -pH 8.2洗脱; 7. Zn^{2+} -pH 4.0洗脱; 8. Cu^{2+} -pH 4.0洗脱; 9. Ni^{2+} -pH 4.0洗脱

图4 不同Me亲和膜对蛋清转铁蛋白和溶菌酶纯化效果的SDS-PAGE图

Fig. 4 SDS-PAGE of purified ovotransferrin and Lysozyme by different Me affinity membrane

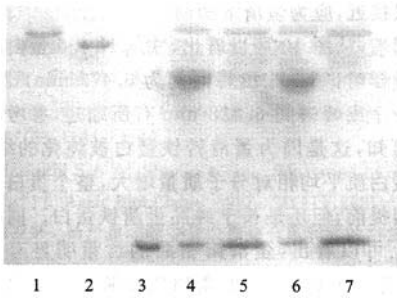
由图4中可以看出,相同的实验条件下,用pH 8.2洗脱液进行蛋白质洗脱时, Zn^{2+} 离子亲和膜上的蛋白质洗脱下来最多,其次是 Ni^{2+} 亲和膜, Cu^{2+} 亲和膜最少;当用pH 4.0洗脱液进行洗脱时, Zn^{2+} 和 Ni^{2+} 离子亲和膜上的蛋白质洗脱下来的很少, Cu^{2+} 亲和膜还有相当数量的蛋白质被洗脱下来。这说明, Cu^{2+} 与蛋白质形成的络合物比其他两种金属离子都稳定。

由电泳结果上还可以看出,对于 Cu^{2+} 亲和膜上的吸附蛋白质,通过两步洗脱后,pH 4.0的蛋白质洗脱液中,蛋清溶菌酶和转铁蛋白的含量均有所提高,具有明显的纯化效果。

2.2.3 洗脱方式的选择 将吸附有蛋清蛋白的亲和膜分别用以下两种方式进行洗脱:方式一,依次用pH 8.2和pH 4.0的0.05 mol/L Tris-HCl/0.5 mol/L NaCl缓冲液洗脱;方式二,采用pH梯度进行洗脱,即采用pH 8.2,7.0,6.0,5.0,4.0的0.05 mol/L Tris-HCl/0.5 mol/L NaCl缓冲液依次进行洗脱,通过SDS-PAGE凝胶电泳对比纯化结果,如图5,6所示。

图5中,pH 8.2洗脱、pH 4.0洗脱分别进行两次上样,只是上样量不同。可以看出,pH 8.2洗脱时,蛋清白蛋白(相对分子质量约为45 000)及其他杂蛋白明显洗脱下来很多,再用pH 4.0洗脱时,基本上是蛋清转铁蛋白和溶菌酶被洗脱下来,蛋清白蛋白较少,有些相对分子质量介于转铁蛋白和白蛋白之间的蛋白质也被洗脱下来,理论估计是蛋清抑

制物,它的相对分子质量约为 49 000。



1. Lf 标样(Mr 76 000); 2. BSA 标样(Mr 67 000); 3. Lys 标样(Mr 14 000); 4、6 为 pH 8.2 洗脱; 5、7 为 pH 4.0 洗脱

图 5 pH 8.2 和 pH 4.0 Tris-HCl 蛋白质洗脱液的 SDS-PAGE 图

Fig.5 SDS-PAGE of protein elution by Tris-HCl buffer at pH 8.2 and pH 4.0

图 6 是采用 pH 梯度进行洗脱后所得的电泳图谱,在 pH 8.2 时,是相对分子质量约为 45 000 的蛋清白蛋白被洗脱下来的多;pH 7.0 时,除溶菌酶之外,只有少量其他蛋白质被洗脱下来;当 pH 6.0 时,偏酸条件下,又有部分蛋清转铁蛋白和蛋清白蛋白洗脱下来;当 pH 5.0 和 4.0 洗脱时,只有与这种 Cu²⁺ 亲和膜结合较强的蛋清转铁蛋白和溶菌酶被洗脱下来,溶菌酶含量仍较高。

1. Lf 标样(Mr 76 000); 2. BSA 标样(Mr 67 000); 3. Lys 标样(Mr 14 000); 4. pH 8.2 洗脱; 5. pH 7.0 洗脱; 6. pH 6.0 洗脱; 7. pH 5.0 洗脱; 8. pH 4.0 洗脱

图 6 不同 pH Tris-HCl 蛋白质洗脱液电泳图

Fig.6 SDS-PAGE of protein elution by Tris-HCl buffer with different pH

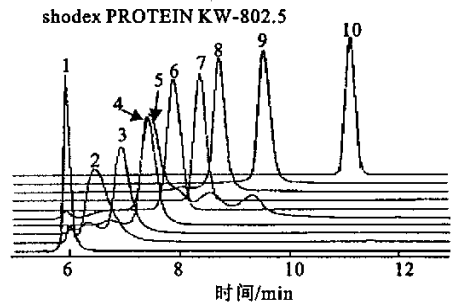
对比图 5 和图 6 可以看出,不论是采用两种 pH 条件洗脱还是采用 pH 梯度洗脱,杂蛋白和吸附力不强的蛋白质均可以在 pH 8.2 条件下被洗脱下来,pH 7.0、pH 6.0 时洗脱下来的蛋白质很少,我们所需的蛋清溶菌酶和转铁蛋白,均在 pH 4.0 时能够很好地被洗脱下来。而且这种 Cu²⁺ 亲和膜对蛋清溶菌酶比其他蛋白质具有更好的纯化效果,其次是蛋清转铁蛋白,需要在较低的 pH 条件下

万方数据

才能被洗脱下来。

为了实际操作的简洁性和经济性,可以采用两步 pH 洗脱条件,即第一种洗脱方式就将我们的目标蛋白蛋清溶菌酶和转铁蛋白进行纯化。至于如何将 pH4.0 洗脱液中的蛋清溶菌酶和转铁蛋白作进一步的分离纯化,因为这两种蛋白质相对分子质量分别为 79 000 和 14 300,相差很大,所以可以采用膜分离的手段将二者进行分离^[14],这方面有待进一步的研究。

2.2.4 蛋白质洗脱液的凝胶色谱分析 为了进一步验证这种 Cu²⁺ 亲和膜对蛋清转铁蛋白和溶菌酶具有较为显著的纯化效果,接下来将实验得到的 pH 8.2、pH 4.0 两种蛋白质洗脱液进行了 KW802.5 凝胶层析。图 7 是 KW802.5 凝胶柱分离标准蛋白质相对分子质量与时间关系图,从图中可以看出,采用 KW802.5 凝胶柱分离蛋白质,相对分子质量越大出峰所需时间越短。



1. Thyroglobulin(Mr, 669 000); 2. Aldolase(Mr, 158 000); 3. BSA (Mr: 67 000); 4. Ovalbumin (Mr: 43 000); 5. Peroxidase(Mr, 40 200); 6. Adenylate Kinase(Mr, 32 000); 7. Mvoglobin(Mr, 17 000); 8. Ribonuclease A(Mr, 13 700); 9. Aprotinin(Mr, 6 500); 10. Vitamin B12(Mr, 1 350)

图 7 KW-802.5 分离蛋白质标准曲线图

Fig.7 KW-802.5 - GPC of shodex protein

本实验先采用商品化蛋清转铁蛋白(OTf)和蛋清溶菌酶(Lys)配制蛋白质标样液,进行 KW802.5 凝胶柱分离,所得图谱如图 8 所示。

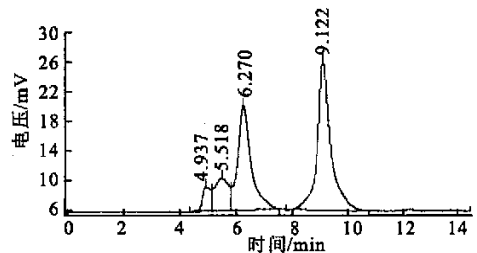


图 8 OTf - Lys 标样

Fig.8 KW-802.5 - GPC of OTf and Lys

OTf 相对分子质量约为 79 000,大于 3 号标准蛋白质牛血清白蛋白 BSA(相对分子质量为 67

000),所以由图5推测出峰时间相应也比BSA时间短,应在6~7 min之间。而Lys是属于小分子蛋白质,分子量只有14 000,应该同8号标准蛋白质Ribonuclease A(相对分子质量为13 700)出峰时间近似,应在9 min左右出峰。

从图8中可以看出,第一个峰出峰时间为6.270 min,应为标准Otf,第二个峰出峰时间为9.122 min,为标准Lys,此结果与预测接近。同样,再分别以pH 8.2和pH 4.0蛋白质洗脱液进样,所得图谱分别为图9、图10。

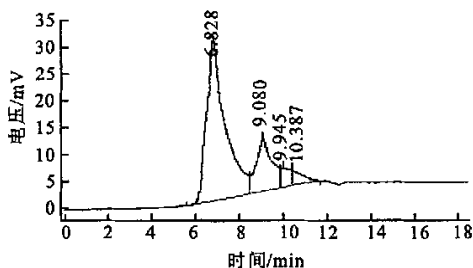


图9 pH 8.2 洗脱液

Fig. 9 KW-802.5 - GPC of protein elution at pH 8.2

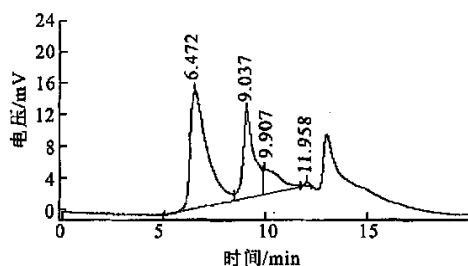


图10 pH 4.0 洗脱液

Fig. 10 KW-802.5 - GPC of protein elution at pH 4.0

由电泳图5可知,因pH 8.2时洗脱下来的蛋白质中,蛋清白蛋白最多,其次是蛋清溶菌酶和转铁蛋白,所以在图9中,第一个峰出来的时间为6.828 min,应为蛋清白蛋白和蛋清转铁蛋白的混合物,因为白蛋白的含量高,所以蛋白质平均相对分子质量变小,使得出峰时间长于蛋清转铁蛋白出峰时间;

第二个出峰时间为9.080 min,与理论中溶菌酶的时间很接近,应为蛋清溶菌酶。

同理,从图10可以看出,用pH 4.0蛋白质洗脱液进样时,第一个出峰时间为6.472 min,比图9中第一个出峰时间6.828 min有所缩短,参考电泳图5可知,这是因为蛋清转铁蛋白被纯化的结果,使得蛋白质平均相对分子质量增大,整个蛋白质出峰时间提前,但还是长于纯品蛋清转铁蛋白。同时从峰形上可以看出,蛋清溶菌酶的含量明显有所提高,这说明在pH 4.0的蛋白质洗脱液中主要含有蛋清转铁蛋白和蛋清溶菌酶这两种蛋白质,这与电泳结果相一致,证实了这种自制的 Cu^{2+} 亲和膜对蛋清溶菌酶和转铁蛋白有明显的纯化效果,具有一定的研究价值。

从上面的分析可以看出,对于pH 4.0的蛋白质洗脱液,若选用适合的膜分离条件,可对蛋清溶菌酶和蛋清转铁蛋白作进一步分离纯化,这一问题有待继续研究。

2.3 金属离子泄漏问题的研究

为了保证试验条件的稳定和避免金属离子的泄漏,参考文献[4]的方法,即在蛋白质进行吸附之前,先将制备好的金属离子亲和膜用pH 4.0 0.05 mol/L Tris-HCl/0.5 mol/L NaCl洗去未结合或结合不牢的金属离子,取得了较好的效果。据文献报道^[15],经过两次自制的TED型螯合膜介质对经IDA- Ni^{2+} 纯化的HAS溶液中的镍离子的去除,可以使纯化蛋白中的镍离子达到使用标准。

3 结论

实验结果表明,采用纤维素分析滤纸制备大孔亲和膜,不仅可以达到分离纯化生物样品的目的,而且成本低廉、易于推广应用。此方法制备的 Cu^{2+} 亲和膜对蛋清蛋白中的蛋清转铁蛋白和溶菌酶具有较好的分离纯化效果,有利于提高鸡蛋的综合利用率,具有一定的研究价值。

参考文献:

- [1] Porath J, Carlsson J, Olsson I, et al. Metal chelate affinity chromatography: A new approach to protein fractionation[J]. *Nature*, 1975, 258(5536):598-599.
- [2] 王雪峰, 杨龙寿, 陈天. 壳聚糖为载体金属亲和吸附剂的制备及性质[J]. *功能高分子学报*, 2003, 16(9):327-331.
- [3] Porath J, Olin B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials: Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions[J]. *Biochemistry*, 1983, 22:1621-1630.
- [4] 魏琪, 姚汝华, 鲍时期. 固定化金属螯合亲和膜色谱柱的制备及纯化铜锌超氧化物歧化酶的研究[J]. *色谱*, 2000, 28(4):361-363.

- [5] 商振华, 郭为, 于亿年, 等. 化学改性纤维素亲和膜色谱用作人血清白蛋白中杂质的去除[J]. 分析测试学报, 1995, 14(4):28-32.
- [6] 魏琪, 姚汝华. 固定化金属螯合亲和膜纯化重组抗菌肽研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(4):401-403.
- [7] 郭为, 商振华. 大孔纤维素亲和膜在生化制剂纯化中的应用[J]. 中国药学杂志, 1998, 33(12):731-734.
- [8] Keung Wing-ming, Parviz Azri. Structure and Function of Ovotransferrin[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257(3):1184-1188.
- [9] Mashikhi S A Al, Shuryo Nakai. Separation of ovotransferrin from egg white by immobilized metal affinity chromatography[J]. *Agric Biol Chem*, 1987, 51(11):2881-2887.
- [10] 张亚辉, 杨严俊. 纤维素金属螯合亲和膜的制备及其对牛血清白蛋白的吸附研究[J]. 食品工业科技, 2005, 26(3):89-92.
- [11] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 人民教育出版社, 1983. 166-168.
- [12] 杨严俊, 张亚辉. 鸡蛋清中转铁蛋白的分离提取[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(4):37-40.
- [13] 李静, 陈欢林, 柴红. 金属螯合亲和膜吸附分离与纯化溶菌酶的研究(III) [J]. 膜科学与技术, 2001, 21(4):5-8.
- [14] 姚红娟, 王晓琳. 膜分离在蛋白质分离纯化中的应用[J]. 食品科学, 2003, 24(1):167-171.
- [15] 杨利, 贾凌云. IDA 型固定化镍离子金属螯合亲和膜色谱对人血清白蛋白的分离纯化[J]. 生物工程学报, 200, 16(1):74-77.

(责任编辑:杨萌)

(上接第 41 页)

试验确立的最佳真空微波加热条件是预脱水鱼片水分质量分数控制在 $(15.3 \pm 1)\%$ (热风干燥 3.5 h), 微波功率设定为高火档 $(686 \pm 3.5) \text{W}$, 在真空度 0.095MPa 下加热 12 s 后, 间歇摇匀后再加热 10 s.

参考文献:

- [1] 段振华, 张慧, 汤坚. 鲮鱼的热风干燥规律研究[J]. 水产科学, 2004, 23(3):29-32.
- [2] 何秋生, 李向阳. 淡水鱼的加工及综合利用初探[J]. 中国水产, 1999, (7):44-46.
- [3] 严宏忠. 风味淡水鱼肉松生产工艺研究[J]. 食品科技, 2002, (3):22-23.
- [4] 杨宪时, 许钟, 马鲁勇. 微波烤制鱼片的应用试验[J]. 渔业机械仪器, 1995, (3):27-28.
- [5] 迟玉森, 朱玉晶, 崔文新. 微波膨化马哈鱼片的研究[J]. 食品科学, 1999, (7):25-28.
- [6] 吴燕燕, 李来好. 罗非鱼片干的微波烘烤技术[J]. 渔业现代化, 2002, (3):31-33.
- [7] Roudaut G, Dacremont C. Crispness: a critical review on sensory and material science approaches[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2002, (13):217-227.
- [8] 段振华. 去头鲮鱼综合利用工艺和相关机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2003.
- [9] 李远志, 郑素霞, 罗树灿. 真空微波加工马铃薯脆片的工艺特性[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(8):40-43.
- [10] 高福成, 陈卫. 微波食品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [11] Lin Y E, Ananthswaran R C. Studies in popping of popcorn in a microwave oven [J]. *Journal of Food Science*, 1988, (53):1746-1749.
- [12] 段振华, 张慧, 郝建. 香脆鲮鱼片的制备工艺[J]. 食品工业科技, 2003, (2):44-47.
- [13] 黄儒强, 芮汗明, 曾庆孝. 水分对微波真空膨化爆裂玉米的影响[J]. 食品与机械, 2002, (6):15-16.
- [14] Jaspreet S, Narpinder S. Effects of different ingredients and microwave power on popping characteristics of popcorn [J]. *Journal of Food Engineering*, 1999(42):161-165.
- [15] 滕建文. 微波膨化香蕉脆片的加工[J]. 广西轻工业, 2002, (1):27-29.

(责任编辑:朱明)