

动态高压微射流处理对低酯果胶物化性质及其结构的影响

梁瑞红, 王玲华, 帅希祥, 陈军, 刘成梅, 刘伟, 郭文丽

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047)

摘要: 本文研究了动态高压微射流(DHMP)处理对薜荔籽低酯果胶物化性质及其结构的影响。采用不同压力(0~160 MPa)和次数(1~9次)对其进行处理,以分子量、特性粘度、粒径、还原糖含量、红外光谱、表观形貌等为评价指标,综合分析了DHMP处理对其分子结构和物化性质的影响。研究表明:随着DHMP处理压力和次数的增加,低酯果胶的特性粘度,分子量及粒径降低,还原糖含量升高,同时低酯果胶表观形貌由片状结构向丝状结构转变,表明低酯果胶在DHMP处理过程中发生了降解,其降解主要原因是DHMP机械力对糖苷键的断裂作用。经处理果胶和未处理果胶的红外图谱基本相似,但是在 1744.8 cm^{-1} 处的C=O的吸收峰随着处理压力的增加而增大。甲氧基和双键含量测定实验表明DHMP处理不会导致低酯果胶发生去甲酯化和 β -消除反应。

关键词: 动态高压微射流; 低酯果胶; 分子量; 降解; 物化性质; 结构

文章编号: 1673-9078(2015)1-115-119

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.021

Effects of Dynamic High-pressure Microfluidization on the Physicochemical Properties and Structure of Low-methoxyl Pectin

LIANG Rui-hong, WANG Ling-hua, SHUAI Xi-xiang, CHEN Jun, LIU Cheng-mei, LIU Wei, GUO Wen-li

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: In this study, the effects of dynamic high-pressure microfluidization (DHMP) on the physicochemical properties and structure of low-methoxyl pectin (LMP) from *Ficus pumila* L. seeds were studied. LMP was treated under different DHMP pressures (0~160 MPa) and cycles (1~9 times), and the structure and physicochemical properties of DHMP-treated LMP were comprehensively evaluated using various indicators such as molecular weight, intrinsic viscosity, particle size, reducing sugar level, Fourier transform infrared (FT-IR) spectra, and surface morphology. The results showed that with increasing DHMP pressures and cycles, the molecular weight, intrinsic viscosity, and particle size of LMP decreased, whereas the amount of reducing sugars increased. At the same time, the surface topography of LMP changed from a foliated structure to a filament structure, indicating that LMP degraded during DHMP. The degradation of LMP mainly resulted from the rupture of the glycosidic bond by DHMP mechanical forces. The FT-IR spectra of DHMP-treated pectin had features similar to those of untreated pectin; however, the intensity of the absorption peak at 1744.8 cm^{-1} (C=O) increased with increasing DHMP pressures. The experimental determination of the methoxyl group and double bond contents revealed that demethoxylation and β -elimination did not occur during DHMP.

Key words: dynamic high-pressure microfluidization; low-methoxyl pectin; molecular weight; degradation; physicochemical properties; structure

果胶是一种由部分甲酯化的D-半乳糖醛酸残基以 α -1,4糖苷键连接并聚合而形成的高分子复杂多糖,主要存在于植物的初生细胞壁和胞间层中^[1]。根据酯化度

收稿日期: 2014-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31260386); 江西省科技支撑计划(20121BBF60039)

作者简介: 梁瑞红(1966-),女,博士,研究员,研究方向:天然产物的研究与开发

通讯作者: 陈军(1986-),男,博士,助理研究员,研究方向:食品资源的开发利用

的不同,果胶可分为高酯果胶(酯化度 $>50\%$)和低酯果胶(酯化度 $<50\%$)。果胶被公认为是一种安全无毒,应用价值高,使用无任何限制的高分子多糖,因而被广泛应用于食品、医药和化妆品等行业。然而在生产加工过程中,高温、酸碱、酶解以及各种机械作用常导致果胶的降解,导致其功能性质发生变化,从而严重影响了其在工业生产中的应用。近年来,关于高温、酸碱水解、酶解及机械降解的研究已有较多报道^[2-4]。动态高压微射流(DHMP)作为一种集输送、混合、超微粉碎、加压、膨化等多种单元操作于一体的新兴动态

高压均质技术^[5],其处理条件(如高速剪切、压力梯度、高速撞击等)十分剧烈,易导致大分子聚合物发生降解^[6-8]。本课题组前期研究表明DHPM对高酯果胶具有明显的降解作用^[9]。

近年来,随着低糖、低热量食品需求量的大幅度增加,人们对低酯果胶需求的年增长率远远高于高酯果胶。对低酯果胶的各种物理化学处理的研究报道也越来越多,然而关于典型均质手段-动态高压微射流处理对低酯果胶性质和结构的研究目前还未见报道。本课题组前期研究的薛荔(*Ficus pumila* L.)籽果胶具有高分子量,高半乳糖醛酸含量和低酯化度等特点,是一种典型的低酯果胶^[10]。

因此本文采用薛荔籽低酯果胶作为研究对象,经不同DHPM压力和次数处理后,研究其表观粘度、平均分子量、粒径、还原糖含量、表观形貌和红外谱图的变化,分析DHPM处理对低酯果胶物化性质和结构的影响,为DHPM在低酯果胶中的应用提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

干燥的薛荔籽,购于江西南昌洪城大市场,为桑科榕属植物薛荔(*Ficus pumila* L.)果实的种子;半乳糖醛酸, Sigma Aldrich(上海)公司;间羟基联苯、溴化钾(光谱级),阿拉丁试剂(上海)有限公司;无水乙醇、二硝基水杨酸、苯酚、亚硝酸钠、氢氧化钠、亚硫酸钠、酒石酸钾钠、盐酸、氯化钠、叠氮钠、硝酸钠等均为分析纯,国药集团化学试剂。

1.2 主要仪器设备

M-110EH-30 超高压微射流均质机,美国 Microfluidics 公司; Nicolet 5700 傅里叶红外光谱仪,美国 Thermo 公司; Nicomp 380/ZLS Zeta potential 粒度仪,美国 PSS 公司; UV-1600 PC 紫外可见分光光度计,上海天美科学仪器有限公司; FEI Quanta200F 环境扫描电子显微镜,美国 FEI 公司; Agilent 1200 高效液相色谱仪,北京京科瑞达科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 果胶的提取及纯化

根据 Liang^[10]等报道的方法提取薛荔籽果胶,采用水提方法,所得的薛荔籽果胶依次用不同体积分数乙醇进行洗涤纯化。冻干获得的果胶样品用间羟基联苯法^[11]和红外光谱法分别测的其半乳糖醛酸和酯化度为 87.65%±1.47%和 14.81%±1.32%。

1.3.2 DHMP 处理

将纯化冻干后的果胶分散于去离子水中,浓度为 2.0 mg/mL,在室温下搅拌使其完全溶解。采用不同的 DHMP 条件处理果胶:(1)分别用 40 MPa、80 MPa、120 MPa 和 160 MPa 的压力处理 5 次;(2)在 160 MPa 压力下分别处理 1, 3, 5, 7 和 9 次。每个实验做三次平行操作,以此来验证实验重复性。

1.3.3 特性粘度的测定

果胶样品的特性粘度采用乌式粘度计测定^[12]。在 25±1℃ 的条件下,使用 0.1 M 的氯化钠溶解,并进行梯度稀释,根据溶液流出时间得到。首先,16 mg 经冷冻干燥的果胶样品溶解在 8 mL 0.1 M 氯化钠溶液中,然后用 0.1 M 氯化钠溶液逐渐稀释成浓度为 0.13%(m/V)、0.10%(m/V)、0.08%(m/V)和 0.07%(m/V)的溶液。分别测定五个不同浓度的果胶溶液从乌式粘度计中流下的时间。每个浓度的果胶溶液流下时间分别测定五次。特性粘度值采用 Huggin 和 Kraemers 公式通过外推至无穷稀的溶液来计算。

1.3.4 还原糖含量的测定

参照 Miller^[13]的方法测定果胶的还原糖含量。经过简单修改操作如下:取 2 mL 样品,加入 1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂(1000 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂中含有 6.3 g 3,5-二硝基水杨酸、10 g NaOH、185 g 酒石酸钾钠、5 g 结晶酚和 5 g 亚硫酸钠)在沸水中加热 5 min,冷却至室温,加蒸馏水补足至 10 mL,混匀,最后用紫外-可见分光光度计在波长 540 nm 时检测样品。

1.3.5 平均分子量及分布的测定

采用 Flourey^[14]等用高效分子排阻色谱检测平均分子量的变化。分子排阻色谱系统包括 Agilent 1200 泵、自动进样器和示差检测器。流动相为 50 mmol/L NaNO₃,且含有 0.2% Na₃N 作为抑菌剂,流动相过 0.45 μm 的滤膜,进行超声脱气后,以流速为 0.7 mL/min 洗脱。果胶样品用流动相溶解,配成的果胶溶液浓度为 1 mg/mL,并过 0.45 μm 的过滤器,自动进样。通过示差检测器记录果胶洗脱的变化数据,绘制其变化曲线。

1.3.6 平均粒径及分布的测定

采用 Nicomp 380/ZLS Zeta potential/Particle sizer 测定果胶的平均粒度和分布。测定前,果胶用去离子水溶解,浓度为 2 mg/mL,整个测定过程在常温下进行。

1.3.7 傅里叶红外光谱分析

将干燥的果胶样品在红外灯的照射下,置于玛瑙研钵,加入干燥的 KBr 粉末一起研磨,将研磨好的混合物挤压成平整的小块,采用 Nicolet 5700 傅里叶红外光谱仪,在 4 cm⁻¹ 的分辨率下重复扫描 128 次,光谱扫描

范围为4000~400 cm⁻¹，Ominic 7.2软件采集数据，origin 8.0软件绘制红外光谱曲线。

1.3.8 环境扫描显微镜观察

经 DHMP 处理前后的果胶样品，冷冻干燥后，粘附于贴有导电双面胶的样品台上，然后在不同的倍数条件下，进行扫描电镜观察，拍摄具有代表性的果胶样品表现形貌。

1.4 数据分析

所有试验重复进行三次，实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行分析，结果表示为均值±标准偏差，作图采用 origin 8.0 软件。

2 结果与分析

2.1 DHMP 处理对低酯果胶分子量分布的影响

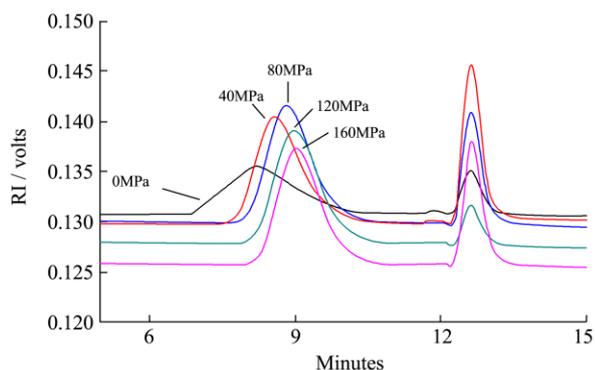


图1 动态高压微射流处理压力对低酯果胶分子质量分布的影响

Fig.1 Effect of different DHPM pressures on the molecular weight distribution of LMP

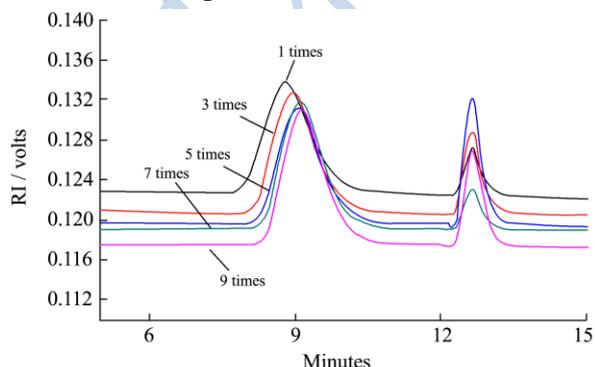


图2 动态高压微射流处理次数对低酯果胶分子质量分布的影响

Fig.2 Effect of different DHPM cycles on the molecular weight distribution of LMP

图1 为低酯果胶在不同 DHPM 压力(0~160 MPa)

处理下分子量的变化图。从图可知：未经处理的果胶最先出峰，而经过处理的果胶，随着处理压力的增大，其保留时间逐渐延长，平均分子量逐渐降低。本课题组前期研究表明蒺藜籽果胶由于具有低酯化度、高半乳糖醛酸含量、相对高的 pH(4.8)以及一定的 Ca²⁺含量 (5.34 μg/mL)，使得其分子间易通过静电作用力、氢键等弱作用力相互缠结，形成团聚。由于高效分子排阻色谱测定多聚物的分子量是基于分子尺寸的大小，因此团聚现象的存在使得蒺藜籽果胶表现出较大的分子量^[15]。Silverstri^[16]等认为，DHPM 的一部分能量用于扯开聚合物的长链，当链被打开后，将使得聚合物链更加容易受到机械力的降解。本研究中，随着处理压力的增大，DHPM 提供的机械作用力越大，果胶发生解团聚和分子链断裂的程度也越来越大，表现出分子量的逐渐降低。根据前期针对高酯果胶的研究，DHPM 低压 (40 MPa) 处理时分子量的显著降低，可能主要来自于解团聚现象，而高压处理更容易造成分子链的断裂^[9]。

在相同压力 (160 MPa) 下，对低酯果胶进行不同次数的处理，其分子量的变化情况与压力对分子量的变化非常相似，如图 2 所示。从图中可以看出，随着处理次数的增加，出峰越来越晚，洗脱时间延迟，其分子量逐渐降低，处理初期的分子量降低迅速，随后逐渐变慢。表明作用次数具有一定的叠加效应，随着作用次数的增加，果胶受到强烈作用力碰击的作用次数增加，从而使果胶分子发生断裂而逐渐降解的概率增大，导致了分子量逐渐降低。这与 Zhang^[17]等研究的超声波处理时间对果胶分子量影响以及 Ma^[2]等研究的脉冲处理时间对果胶分子量的影响的结果非常相似。

2.2 DHMP 处理对低酯果胶特性粘度和粒径的影响

不同 DHPM 压力和处理次数对低酯果胶特性粘度的变化如表 1 所示。从表中可以看出：随着 DHPM 处理压力的增加，果胶溶液的特性粘度显著降低；与未处理的果胶相比，40 MPa、80 MPa、120 MPa 和 160 MPa 处理下的果胶，其特性粘度分别降低了 47.68%、64.36%、69.13%和 74.77%。在处理压力为 160 MPa 时，随着 DHPM 处理次数的增加，果胶溶液的特性粘度同样显著下降。当处理次数增加到 9 时，其特性粘度下降了 83.67%，远远低于未处理果胶溶液的特性粘度值。由于特性粘度能够反映聚合物在无限稀释下的流体力学尺寸，特性粘度的下降可以表明物质的分子

量变小,从而印证了上述分子量实验的结果。

与此同时,我们还研究了不同DHPM处理条件对低酯果胶粒径的影响。从表1中可以看出:随着DHPM作用压力和次数的增加,果胶的粒径逐渐降低。当压力从0升高到40 MPa、80 MPa、120 MPa、160 MPa,其粒径分别下降了32.82%、42.24%、57.46%、60.94%。同时,在160 MPa压力下,当处理次数从1增大到9时,其粒径分别下降了23.93%、33.60%、64.10%、80.40%。

表1 不同高压微射流条件处理后低酯果胶的特性粘度、粒径和还原糖含量

Table 1 Intrinsic viscosity ($[\eta]$), particle size (PS), and reducing sugar content (C_R) of LMP treated under different DHPM conditions

samples	$[\eta]$ (dl/g)	PS/nm	C_R /mM
untreated	7.53±0.05a*	18633.5±829.9 ^a	0.0683±0.0006 ^f
40 MPa-5times	3.94±0.04 ^c	12518.9±842.5 ^{bc}	0.0784±0.0002 ^e
80 MPa-5times	2.68±0.03 ^e	10762.9±654.6 ^c	0.0811±0.0001 ^e
120 MPa-5times	2.32±0.01 ^f	7927.3±664.6 ^d	0.0897±0.0004 ^c
160 MPa-1times	4.34±0.02 ^b	14175.3±978.5 ^b	0.0854±0.0003 ^d
160 MPa-3times	2.88±0.03 ^d	12372.2±185.4 ^{bc}	0.0885±0.0003 ^{cd}
160 MPa-5times	1.90±0.02 ^g	7278.4±664.6 ^d	0.0950±0.0002
160 MPa-7times	1.62±0.02 ^h	6690.6±889.2 ^d	0.0963±0.0004 ^b
160 MPa-9times	1.23±0.03 ⁱ	3652.7±370.6 ^e	0.1022±0.0004 ^a

注:实验数据采用均值±标准偏差,*同一组数据,不同字母表示显著性差异(Tukey test, $p < 0.05$)。

2.3 DHPM 处理对低酯果胶还原糖含量的影响

果胶分子链的断裂会造成还原糖含量的增加。从表1中可以看出,随着压力的增大,低酯果胶溶液中的还原糖含量增加,其糖苷键裂解程度越大。当处理压力为40 MPa时,还原糖含量即有明显的变化。其结果与Chen^[9]等报道DHPM对高酯果胶还原糖的变化有差异,可能的原因是由于薜荔籽果胶分子量较大,DHPM的机械作用力更容易使它发生降解。当压力从40 MPa增加到160 MPa时,还原糖含量从0.0683 mM增加到0.0950 mM。当处理压力为160 MPa时,随着DHPM处理次数的增加,还原糖含量也逐步增加。表明随着DHPM处理次数越多,果胶的糖苷键断裂程度越大。

果胶经DHPM处理后,能够引起内部共价键的断裂,形成还原末端,导致还原糖含量的升高。但是 β -消除反应同样可以导致果胶中还原糖含量的升高。因此需测定样品在235 nm下的吸光度,以此监控DHMP

处理过程是否发生了 β -消除反应。实验结果显示所有样品在235 nm下都没有吸收值,表明处理过程中没有发生 β -消除反应。

2.4 DHPM 处理对低酯果胶表观形貌的影响

低酯果胶经不同压力DHPM处理后进行冷冻干燥,得到的样品用于环境扫描电镜观察,其结果如图3所示。从图中可以看出:未经处理的果胶样品微观结构呈现出片状薄片;经40 MPa处理后,果胶结构变化并不明显,相对未处理的样品而言,其结构较为“松散”;经80 MPa处理后,仍存在少量片层结构,但是已经出现了孔洞,可以看出果胶发生了一定程度的降解;经120 MPa处理后,果胶已由片层结构变成了丝状结构,降解程度明显;经160 MPa处理后,果胶已基本呈现丝状结构,表明降解程度已十分剧烈。

实验表明,经过DHPM处理后,果胶出现丝状结构,而且该丝状结构的数量随着处理压力的升高而显著增加。这与Chen^[9]等研究DHPM处理对苹果果胶的表观形貌以及Jiang^[18]等研究热处理对爱玉子果胶的表观形貌都非常相似。

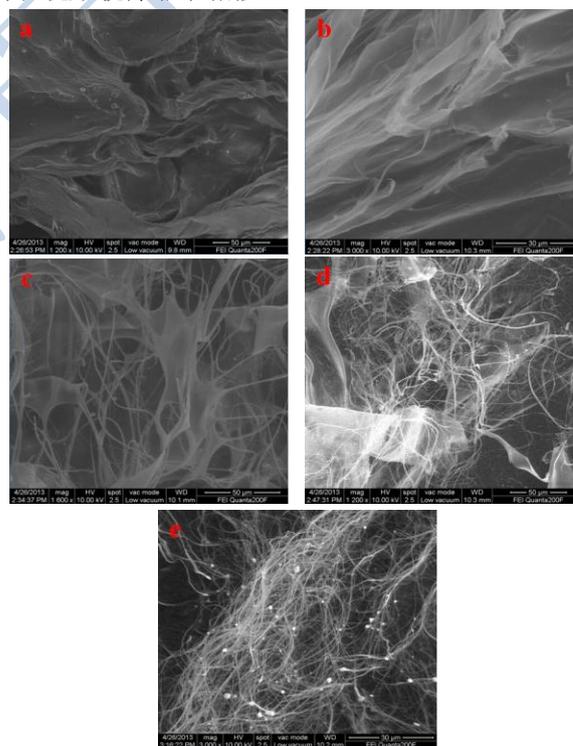


图3 DHPM处理压力对低酯果胶的表观形貌影响

Fig.3 Effects of different DHPM pressures on the morphology of LMP

注: a原样; b 40 MPa; c 80 MPa; d 120 MPa; e 160 MPa。

2.5 DHPM 处理对低酯果胶红外光谱的影响

采用傅里叶红外光谱仪对经冷冻干燥后的果胶样

品进行结构分析,其结果如图4所示。3428.7 cm^{-1} 处的宽峰为 O-H 的伸缩振动吸收峰,2934.4 cm^{-1} 左右的峰由 C-H 吸收引起的,主要包括 CH、 CH_2 和 CH_3 的伸缩振动,1747.4 cm^{-1} 和 1634.5 cm^{-1} 分别为由酯化的羰基和未酯化的羰基振动吸收峰^[9]。对于所有的果胶样品,其红外光谱图非常相似的,除了在 1744.4 cm^{-1} 处的 C=O 的吸收峰,它的强度随着 DHPM 处理压力的增加而增强。这与 Ma^[2]等研究脉冲处理对甜菜果胶红外影响结果很相似。

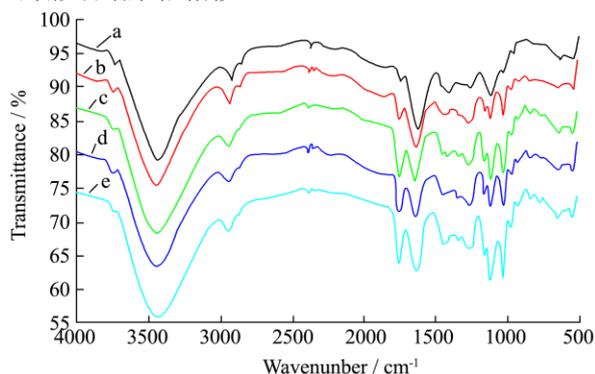


图4 DHPM 处理对低酯果胶傅里叶红外光谱的影响

Fig.4 Effects of DHPM process on the FT-IR spectra of LM-pectin

注: a 原样; b 40 MPa; c 80 MPa; d 120 MPa; e 160 MPa。

同时,本研究还采用乙醇氧化酶测定甲醇^[20]的形成来说明此过程是否发生了去甲酯化反应,发现经不同 DHPM 条件处理的样品都没有检测到甲醇的存在,说明 DHPM 处理没有引起低酯果胶的去甲酯化。

3 结论

3.1 本实验研究了不同 DHPM 条件处理对低酯果胶物化性质和结构的影响。研究表明:随着处理压力和次数的增加,低酯果胶的分子量、特性粘度和粒径大小均发生降低现象,且降低程度随处理压力和次数的增加而增大;还原糖含量则随处理压力和处理次数的增加而增加,表观形貌也由片状结构向丝状结构转变,表明 DHPM 会引起低酯果胶的降解,且随着处理压力和次数的增加而加剧,可能原因是果胶分子内糖苷键发生了断裂。

3.2 傅里叶红外光谱图、甲氧基和双键含量实验显示:随着处理压力的增加,低酯果胶在 1744.4 cm^{-1} 处的 C=O 吸收峰强度会逐渐增强,其甲氧基及双键含量没有发生变化,表明 DHPM 处理不会导致低酯果胶发生去甲酯化反应和 β -消除反应。

参考文献

[1] 蔡为荣,孙元琳,汤坚.果胶多糖结构与降血脂研究进展[J].食

品科学,2010,31(05):307-311

CAI Wei-rong, SUN Yuan-lin, TANG Jian. Research progress in structure and hypolipidemic mechanisms of pectic polysaccharides [J]. Food Science, 2010, 31(05): 307-311

[2] Ma S, Yu S, Zhang B, et al. Physicochemical properties of sugar beet pulp pectin by pulsed electric field treatment [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2012, 47(12): 2538-2544

[3] Vani M M, Narasu M L, Rao D G, et al. Kinetic studies on degradation of pectin in synthetic pectin solutions using immobilized pectinase enzyme [J]. Vegetos, 2011, 24(2): 202-207

[4] Einhorn-Stoll U, Kastner H, Drusch S. Thermally induced degradation of citrus pectins during storage-Alterations in molecular structure, colour and thermal analysis [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35: 565-575

[5] 刘成梅,刘伟,高荫榆,等.微射流均质机的流体动力学行为分析[J].食品科学,2004,25(4):58-62

LIU Cheng-mei, LIU Wei, GAO Yin-yu, et al. Analysis on Fluid Dynamic Behavior in High Velocity Jet Homogenizer [J]. Food Science, 2004, 25(4): 58-62

[6] Kasemwong K, Ruktanonchai U R, Srinuanchai W, et al. Effect of high - pressure microfluidization on the structure of cassava starch granule [J]. Starch-Stärke, 2011, 63(3): 160-170

[7] Zhong J, Liu C, Liu W, et al. Effect of dynamic high-pressure microfluidization at different temperatures on the antigenic response of bovine β -lactoglobulin [J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(1): 95-102

[8] 刘国琴,阎乃珺,陈璐瑶.动态高压微射流对小麦面筋蛋白功能性质影响的研究[J].现代食品科技,2013,29(5):936-940

LIU Guo-qin, YAN Nai-jun, CHEN Lu-yao. Functional properties of wheat gluten influenced by dynamic high pressure microfluidization treatment [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(5): 936-940

[9] Chen J, Liang R H, Liu W, et al. Degradation of high-methoxyl pectin by dynamic high pressure microfluidization and its mechanism [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 28(1): 121-129

[10] Liang R, Chen J, Liu W, et al. Extraction, characterization and spontaneous gel-forming property of pectin from creeping fig (*Ficus pumila* Linn.) seeds [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(1): 76-83

[11] Nelly B, Gustav A H. New method for quantitative determination of uronic acids [J]. Analytical Biochemistry, 1973, 54: 484-489

[12] Peterson J M, Fixman M. Viscosity of polymer solutions [J].

- The Journal of Chemical Physics, 1963, 39(10): 2516-2523
- [13] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428
- [14] Flourey J, Desrumaux A, Axelos M A V, et al. Degradation of methylcellulose during ultra-high pressure homogenization [J]. Food Hydrocolloids, 2002, 16(1): 47-53
- [15] Chen J, Wu S S, Liang R H, et al. The effect of high speed shearing on disaggregation and degradation of pectin from creeping fig seeds [J]. Food Chemistry, 2014, 165: 1-8
- [16] Silvestri S, Gabrielson G. Degradation of tragacanth by high shear and turbulent forces during microfluidization [J]. International Journal of Pharmaceutics, 1991, 73(2), 163-169
- [17] Zhang L, Ye X, Xue S J, et al. Effect of high - intensity ultrasound on the physicochemical properties and nanostructure of citrus pectin [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(8): 2028-2036
- [18] Jiang C M, Lai Y J, Lee B H, et al. Changes in physico-chemical properties of pectin from jelly fig (*Ficus awkeotsang* Makino) seeds during extraction and gelling [J]. Food Research International, 2002, 35(1): 31-35
- [19] Monfregola L, Leone M, Vittoria V, et al. Chemical modification of pectin: environmental friendly process for new potential material development [J]. Polymer Chemistry, 2011, 2(4): 800-804
- [20] Anthon G E, Barrett D M. Comparison of three colorimetric reagents in the determination of methanol with alcohol oxidase. Application to the assay of pectin methylsterase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(12): 3749-3753