

响应曲面分析法优化苹果渣中多酚类物质的果胶酶辅助提取工艺

崔春兰^{1,2}, 郑虎哲^{1,2}, 顾立众^{1,2}, CHUNG Shin-kyo³

(1. 江苏食品加工技术研发中心, 江苏淮安 223003) (2. 江苏食品药品职业技术学院食品与营养工程学院, 江苏淮安 223003) (3. 大韩民国国立庆北大学校食品工学科, 韩国大邱 702701)

摘要: 研究了响应面分析法对苹果渣中多酚类物质的果胶酶辅助提取工艺。以总多酚、咖啡酸提取量为评价指标, 在单因素实验基础上根据中心组合实验设计原理, 采用3因素5水平的响应曲面分析法对提取工艺进行了优化。通过响应曲面实验及回归分析得出最佳工艺条件为: 果胶酶/基质比 0.11、反应温度 38.00 °C、反应时间 12.53 h。在此条件下, 预测总多酚和咖啡酸提取量分别为 11.32 g GAE/kg 和 173.87 mg/kg。经验证, 总多酚和咖啡酸提取量分别达到 11.08 g GAE/kg 和 170.03 mg/kg。另外, 相对于对照组的 6.78 g GAE/kg 和 13.14 mg/kg 分别提高 1.6 倍和 12.9 倍。表明由响应曲面法获得的二次模型方程能较好地预测实验结果及优化条件; 果胶酶辅助提取工艺稳定合理、准确可靠, 是提取苹果渣中总多酚、咖啡酸的可行方法。

关键词: 苹果渣; 总多酚; 咖啡酸; 果胶酶; 响应面分析法

文章编号: 1673-9078(2013)9-2235-2240

Optimization of Pectinase Aided Polyphenol Extraction from Apple Pomace by Response Surface Methodology

CUI Chun-lan^{1,2}, ZHENG Hu-zhe^{1,2}, GU Li-zhong^{1,2}, CHUNG Shin-kyo³

(1.Center of Jiangsu Food Processing Technology, Jiangsu Huai'an, 223003, China) (2.Department of Food & Nutrition Engineering, Jiangsu Food & Pharmaceutical Science College, Jiangsu Huai'an, 223003, China)

(3.School of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Republic of Korea)

Abstract: In order to enhance the extraction of polyphenol from apple pomace, carbohydrate-hydrolyzing enzyme (pectinase) aided polyphenol and caffeic acid extraction techniques were studied with response surface methodology. The optimum conditions were as follows: the ratio of pectinase to substrate 0.11, the reaction temperature 38.00 °C, and the reaction time 12.53 h. Under the optimal conditions, the predicted value of total phenolic content and caffeic acid content were 11.32 g GAE/kg and 173.87 mg/kg, respectively. The experimental values of total phenolic content (11.08 g GAE/kg) and caffeic acid content (170.03 mg/kg) of the apple pomace were well matched with the response surface methodology predicted values. In addition, the levels of total phenolic content and caffeic acid content obtained from optimal conditions were about 1.6 and 12.9 folds greater, respectively than those of the control treatment. It was a feasible method to extract the polyphenol from apple pomace.

Key words: apple pomace; phenolic compounds; caffeic acid; pectinase; response surface methodology

我国是世界上最大的苹果生产国, 由于苹果果实中富含酚类和黄酮类化合物, 具有抗炎症、提高免疫力、增强心脏功能、抗衰老、抗癌等多种生理活性功能^[1-4]。我国苹果加工产品主要为果汁和果酒等, 生产过程中产生大量废弃果渣, 苹果渣作为果汁厂榨汁后

收稿日期: 2013-04-11

基金项目: 大韩民国庆尚北道水产食品厅项目 (GBTA2009-04)

作者简介: 崔春兰 (1976-), 女, 讲师, 研究方向为功能性食品与食品安全
通讯作者: 郑虎哲 (1974-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为食品分析与功能性食品开发

产生的下脚料, 含有多丰富的多酚类化合物, 但长期以来, 将其作为废渣抛弃, 造成了环境的极大污染和资源的严重浪费^[5], 近几年来, 有关利用苹果渣提取多酚类化合物的研究比较活跃, 如微波萃取法, 超临界二氧化碳流体萃取-精馏技术等^[6-8], 但提取效果较低或成本较高, 因而在商业上利用有一定难度。

本试验通过果胶酶的水解反应, 将与苹果渣果胶质紧密结合在一起的多聚体形态的多酚类物质释放, 使之转变成具有活性的单聚体物质, 并加以回收渣中的活性物质, 并用响应曲面法对提取工艺进行优化,

实现了对苹果资源的二次利用,提高了苹果加工业的经济效益。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本试验所用的苹果渣是韩国某一苹果饮料公司提供。为了增加与果胶酶的接触面积,烘干和粉碎后的样品过 60~80 目筛,保存在-10 ℃中。试验用的果胶酶(Pectinex 5XL, 5000 ferment depectinization units (FDU)/mL)为 NOVO ZYMES 公司生产,其他试剂均采用优级纯以上试剂。

1.2 提取工艺

1.2.1 传统提取法(乙醇提取法)

准确称取适量苹果渣,加入 5 倍量的 60%乙醇,在 60 ℃条件下提取 6 h,过滤后,滤渣再用 5 倍量 60%乙醇提取 6 h,重复 2 次。合并 3 次滤液,并定容,供测定总多酚和咖啡酸含量。

1.2.2 单因素实验

准确称取适量苹果渣,在酶/基质比为 0.10, pH 为 4.50,酶反应 10 h 的条件下,在 20、37、50 和 80 ℃下进行酶反应,并定容,供测定总多酚和咖啡酸含量。固定其它条件不变,分别改变酶/基质比(0.05、0.11、0.16 和 0.33),酶反应时间(7、9、11、15、18 h),pH(3.00、3.60、4.20、5.00、5.70、6.20、7.00、7.50、8.10),考察各因素对苹果渣总多酚和咖啡酸提取效果的影响^[9]。

1.2.3 响应曲面优化试验设计

在单因素实验的基础上,进一步考察提取因素对苹果渣总多酚和咖啡酸提取效果的影响,利用 Statistical Analysis System 9.1 (SAS 9.1) 和 STATISTICA 6.0 软件,设计 3 因素 5 水平的响应分析实验,选取酶/基质比、反应温度和反应时间 3 个因素,分别以 X_1 、 X_2 、 X_3 表示,每一个自变量的低、中、高实验水平分别以-2、-1、0、1、2 进行编码,以总多酚($Y_{总多酚}$)和咖啡酸($Y_{咖啡酸}$)提取量为响应值,各因素水平安排见表 1。

1.3 总多酚与咖啡酸含量的测定

总多酚含量的测定采用 Folin-Ciocalteu 法,用没食子酸(Gallic acid)作标准曲线,样品总多酚含量以达到同样吸光度所需的没食子酸的 g 每 kg 数(g GAE/kg)表示^[2]。

咖啡酸含量的测定采用高效液相色谱法,选用

Shimadzu LC-6A (Shimadzu, Japan) 型高效液相色谱仪,色谱柱选用 RPC18 柱(4.6×250 mm, Alltech Co, USA);流动相为含有 0.025 mol/L 磷酸二氢钾和 0.1% 四氢呋喃的去离子水(A)和甲醇(B);流速为 1.0 mL/min;检测器为紫外-可见光检测器;检测波长为 295 nm;进样量为 20 μ L。

2 结果与讨论

2.1 传统提取法(乙醇提取法)

经传统提取法的实验结果表明,60%乙醇提取苹果渣中总多酚提取量为 7.05 g GAE/kg^[9]。

2.2 单因素实验

在植物细胞中,多酚类物质主要积聚在液泡或细胞壁中^[4]。在苹果果汁制作过程中,存在于液泡中的大多数可溶性多酚类物质被提取并释放到果汁里,但与细胞壁紧密结合的多酚类物质会随着苹果渣一起被抛弃。近年来开始研究利用纤维酶、 β -葡聚糖酶、木聚糖酶和果胶酶分解各种水果渣,提取总多酚类物质^[3,10~12]。但其水解能力受反应时间、反应温度、酶/基质比、反应液 pH 等因素的影响^[3]。

在单因素实验中,首先在酶/基质比为 0.10, pH 为 4.50,酶反应时间为 10 h 的条件下,研究了温度对果胶酶提取总多酚类物质的影响^[9]。从结果中看出在 37 ℃时,反应体系中的总多酚类物质的提取量最大,随着温度的进一步上升,反应体系中的总多酚类物质提取量迅速下降。酶/基质比是重要的一个因素。酶/基质比过小时,导致原料利用不充分;酶/基质比过大时,不仅浪费酶,而且使反应体系中的总多酚提取量太低。本试验中,在 37 ℃, pH 5.5,反应时间为 10 h 的条件下进行反应,并将酶/基质比设计为 0.05、0.11、0.16 和 0.33。结果表明,在酶/基质比为 0.11 时,总多酚物质的得率最大。在反应温度为 37 ℃,酶/基质比为 0.11 的条件下,研究了不同 pH 对总多酚类物质的提取效果。在 pH 为 4.2 时,反应体系中总多酚类物质提取量最大。在反应温度为 37 ℃,酶/基质比为 0.11,反应溶液 pH 为 4.20 的条件下,最后研究了反应时间对总多酚提取率的影响。在 4~10 h 内,随着时间的延长反应液中总多酚提取量逐渐加大,到第 11 h 时达到最大,随后迅速下降^[9]。

2.3 响应曲面优化试验

2.3.1 优化实验设计

通过单因素实验对提取总多酚和咖啡酸的过程

中起主要影响的因素进行了初步摸索,并最终确定三个关键因素,即酶/基质比、反应温度和反应时间,进行了三元二次回归旋转正交组合设计实验优化,其中,选酶/基质比0.10,反应温度40℃,反应时间12h为反应中心点,实验重复三次。实验方案及结果见表1。

表1 响应曲面分析3因素5水平设计及实验结果

Table 1 Experimental design of the three-factor five-variable central composite, and results

实验编号	因素			响应值	
	酶/基质	温度/℃	时间/h	总多酚/(g GAE/kg)	咖啡酸/(mg/kg)
1	0.05 (-1)	30 (-1)	8 (-1)	8.30±0.10	123.10±0.50
2	0.15 (1)	30 (-1)	8 (-1)	9.60±0.20	138.20±0.30
3	0.05 (-1)	30 (-1)	16 (1)	8.70±0.10	136.20±0.40
4	0.15 (1)	30 (-1)	16 (1)	9.80±0.30	135.50±0.60
5	0.05 (-1)	50 (1)	8 (-1)	8.70±0.20	81.40±0.40
6	0.15 (1)	50 (1)	8 (-1)	9.90±0.10	90.10±0.10
7	0.05 (-1)	50 (1)	16 (1)	8.90±0.20	74.40±0.10
8	0.15 (1)	50 (1)	16 (1)	9.50±0.10	84.70±0.20
9	0.10 (0)	40 (0)	12 (0)	11.10±0.10	169.20±0.30
10	0.10 (0)	40 (0)	12 (0)	11.20±0.20	166.00±0.30
11	0.10 (0)	20 (-2)	12 (0)	7.40±0.10	100.70±0.20
12	0.10 (0)	60 (2)	12 (0)	7.50±0.10	73.80±0.10
13	0.10 (0)	40 (0)	4 (-2)	8.80±0.30	87.30±0.10
14	0.10 (0)	40 (0)	20 (2)	9.30±0.20	132.40±0.20
15	0 (-2)	40 (0)	12 (0)	6.80±0.20	13.10±0.10
16	0.20 (2)	40 (0)	12 (0)	9.50±0.20	82.30±0.10

2.3.2 总多酚优化模型的组建

表2 回归模型系数及方差分析结果

Table 2 Analysis of variance of the regression model

来源	总多酚/(g GAE/kg)			咖啡酸/(mg/kg)		
	回归系数	t-值	F-值	回归系数	t-值	F-值
常数项	-15.32	-8.01 ^a	0.0002	-415.4250	-2.45 ^c	0.0495
X ₁	84.0	8.50 ^a	<0.0001	2673.250	3.06 ^c	0.0223
X ₂	0.79	13.72 ^a	<0.0001	15.20875	2.99 ^c	0.0245
X ₃	0.959375	7.24 ^a	0.0004	26.771875	2.29	0.0623
X ₁₁	-300.0	-12.42 ^a	<0.0001	-11990	-5.61 ^b	0.0014
X ₂₂	-0.009250	-15.32 ^a	<0.0001	-0.200875	-3.76 ^b	0.0094
X ₃₃	-0.032812	-8.69 ^a	0.0001	-0.902344	-2.70 ^c	0.0354
X ₁₂	-0.15	-0.88	0.4136	1.15	0.08	0.9418
X ₁₃	-0.5	-1.17	0.286	-8.8750	-0.24	0.8220
X ₂₃	-0.0025	-1.17	0.286	-0.071250	-0.38	0.7189
R ²	0.9841 ^a			0.8874 ^c		
修正 R ²	0.9730			0.8086		
失拟检验	0.2015			0.0733		

注: ^a在 p<0.001 水平上显著; ^b在 p<0.01 水平上显著; ^c在 p<0.05 水平上显著。

为了检验回归方程的有效性,进一步确定各因素对响应值总多酚提取量的影响程度,对回归模型进行了方差分析,结果见表2和3。由表2中模型系数的显著性检验数据可知,酶/基质比、反应温度和反应时间的一次项和二次项对总多酚提取量的影响达到极显著水平(P<0.001),各因素的交互项对总多酚提取量的影响均不显著。从各因素的F值可知,3个因素对苹果渣中总多酚提取量的影响依次为酶/基质比(X₁)>反应温度(X₂)>反应时间(X₃)。

表3 利用回归模型预测总多酚以及咖啡酸最佳提取工艺条件及预测值

Table 3 The predicted optimum conditions for maximum extract of total phenolic and caffeic acid by ridge analysis

反应响应值	F-值	p-值	预测的最佳反应条件			预测值
			酶/基质	温度/℃	时间/h	
总多酚/(g GAE/kg)	41.16 ^a	0.0001	0.12	40.09	12.18	11.38
咖啡酸/(mg/kg)	5.25 ^b	0.0282	0.11	35.88	12.89	174.84

注: ^a在 p<0.001 水平上显著; ^b在 p<0.05 水平上显著。

利用软件对表2中试验数据进行多元回归分析,以总多酚提取量(Y_{总多酚})为因变量,酶/基质比(X₁)、反应温度(X₂),反应时间(X₃)为自变量,建立回归方程,如下:

$$Y_{总多酚} = -15.32 + 84.0X_1 + 0.79X_2 + 0.959375X_3 - 300X_1^2 - 0.15X_1X_2 - 0.00925X_2^2 - 0.5X_1X_3 - 0.0025X_2X_3 - 0.032812X_3^2 \quad (1)$$

对此二元回归模型进行方差分析中观察到模型的确定系数R²为0.9841,说明模型拟合程度良好,R²修正值为0.9730,表明与确定系数R²具有很高的一致性;变异系数为2.6651,说明实验的重复性良好。回归方程显著性检验F值为41.16(P<0.0001),表明回归方程达到极显著;失拟性检验F值为0.2015(P>0.05),差异不显著,表明回归方程无失拟因素存在,可用该模型来预测未知条件下果胶酶提取苹果渣中总多酚的提取量。

响应面图形是响应值对各实验因素所构成的三维空间的曲面图,从响应面分析图上可以找出最佳参数以及各参数之间的相互作用^[14]。响应面分析利用STATISTICA 6.0软件对数据进行二次多元回归拟合,所得到的二次回归方程的响应面图如图1所示。酶/基质比、反应温度及反应时间其交互作用对响应值的影响可以从图中直观地反映出来,并确定各个因素的

最佳水平。图中的等高线形状可以反映交互作用大小，当为椭圆形时，表示交互作用显著，而圆形则表示交互作用不显著^[14]。

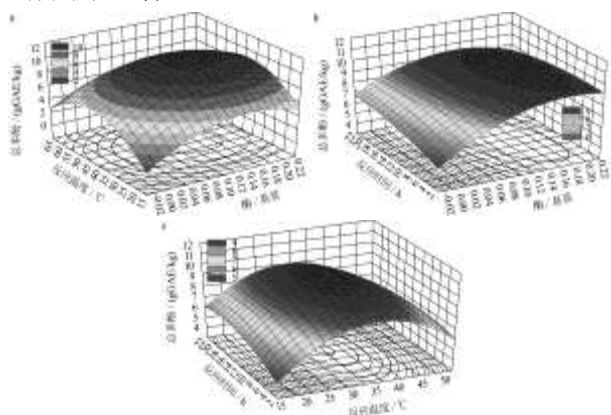


图1 三因素交互作用对苹果渣总多酚提取量影响的响应曲面
Fig.1 Three-dimensional response surface optimization of total phenolic yield versus

注：酶/基质比和反应温度(a)；酶/基质比和反应时间(b)；反应温度和反应时间(c)。

从图 1a 可以看出，在酶/基质比较低时，随着温度的升高总多酚提取量增大，当反应温度超过 55 °C 后，总多酚提取量反而降低。当温度小于 55 °C 时酶/基质比对总多酚提取量影响较小，当温度增高到 50 °C 左右，随着酶/基质比增大到 0.13 左右时，总多酚提取量达到最大值，再增大酶/基质比，总多酚提取量反而降低。作者前一段对分解酶的研究结果表明^[9]，较低的温度有利于果胶酶发挥最大的活性，这主要是因为果胶酶对热不稳定，在较高的温度条件下酶失去活性，无法降解或降低苹果渣中与果胶质紧密结合在一起的多聚体形态的多酚类物质。另外，当反应时间再升高后总多酚提取量率逐渐降低。这可能是由于长时间的反应时间，会进一步分解所产生的多酚类物质^[9]，这与先前 Ahn 等^[11]对柑橘皮的研究结果类似。由图 1b 可以看出，酶/基质比和反应时间 2 因素的交互作用显著。当酶/基质比较低时，随着反应时间增加总多酚提取量先增大后减小；当酶/基质比在 0.16 左右，反应时间达到 12 h 左右时，得率达到最高。由图 1c 可知，反应温度和反应时间之间交互作用不显著，总多酚提取量在一定范围内随反应温度和时间升高而变大。但当温度达到 40 °C 左右时，总多酚提取量达到最大值。根据图 1 和 Statistical Analysis System 9.1 (SAS 9.1) 软件得出最佳反应条件是酶/基质比 0.12，反应温度 40.09 °C，反应时间 12.18，用回归方程式 (1) 计算总多酚提取量为 11.38 g GAE/kg (表 3)。

2.3.3 咖啡酸优化模型的组建

Andreas Schieber 等^[7]报道苹果中主要存在的多酚

类物质为绿原酸、p-香豆酸、奎宁酸、黄酮醇的单体、二聚体以及低聚体、原花色素 B₂、槲皮素的配糖体、二氢查耳酮以及少量的咖啡酸。作者的先前研究表明利用果胶酶提取苹果渣中多酚类物质时，伴随着快速降低绿原酸含量的同时，咖啡酸含量急剧上升，说明果胶酶分解部分绿原酸和根皮苷，并使之各自转化为咖啡酸和根皮素^[9]。因此，在碳水化合物水解酶辅助提取苹果渣多酚类物质工艺中，咖啡酸成为判断分解程度的重要的标志性产物^[12]。

为了检验回归方程的有效性，进一步确定各因素对响应值咖啡酸提取量的影响程度，对回归模型进行了方差分析 (表 2 和 3)。由表 2 中模型系数的显著性检验数据可知，酶/基质比和反应温度的一次项和二次项对咖啡酸提取量的影响达显著水平 ($P < 0.001$)；反应时间的二次项对咖啡酸提取量的影响达显著水平 ($P < 0.05$)，各因素的交互项对咖啡酸提取量的影响均不显著。从各因素的 F 值可知，3 个因素对苹果渣中咖啡酸的提取量的影响依次为酶/基质比 (X_1) > 反应温度 (X_2) > 反应时间 (X_3)。

利用软件对表 2 中试验数据进行多元回归分析，以咖啡酸提取量 ($Y_{\text{咖啡酸}}$) 为因变量，酶/基质比 (X_1)、反应温度 (X_2)，反应时间 (X_3) 为自变量，建立回归方程，如下：

$$Y_{\text{咖啡酸}} = -415.4250 + 2673.250X_1 + 15.20875X_2 + 26.771875X_3 - 11990X_1^2 + 1.15X_1X_2 - 0.200875X_2^2 - 8.875X_1X_3 - 0.07125X_2X_3 - 0.902344X_3^2 \quad (2)$$

对此二元回归模型进行方差分析中观察到模型的确定系数 R^2 为 0.8874， R^2 修正值为 0.8086，表明与确定系数 R^2 具有较高的一致性；变异系数为 20.2418，说明实验的重复性良好。回归方程显著性检验 F 值为 5.25 ($P < 0.05$)，表明回归方程达到较显著，失拟性检验 F 值为 0.0733 ($P > 0.05$)，差异不显著，表明回归方程无失拟因素存在，可用该模型来预测未知条件下果胶酶提取苹果渣中咖啡酸的提取量。

根据回归方程，做出响应曲面，考察拟合响应曲面的形状，分析酶/基质比、反应温度和反应时间对咖啡酸提取量的影响，见图 2。从响应曲面图可知，三个因素对咖啡酸的提取量的影响大致类似于总多酚的提取条件。即在考察的变量水平在一定范围内，随着酶/基质比增加，咖啡酸提取量逐渐增大 (图 2a)；同样，咖啡酸提取量在一定范围内随反应温度和反应时间的增加而增大，当其水平越过一定值后，咖啡酸提取量随之降低 (图 2b 和 2c)。根据图 2 和 Statistical Analysis System 9.1 (SAS 9.1) 软件得出最佳反应条件是酶/基质比 0.11，反应温度 35.88 °C，反应时间 12.89，

用回归方程式(2)计算咖啡酸提取量为 174.84 mg/kg (表 3)。

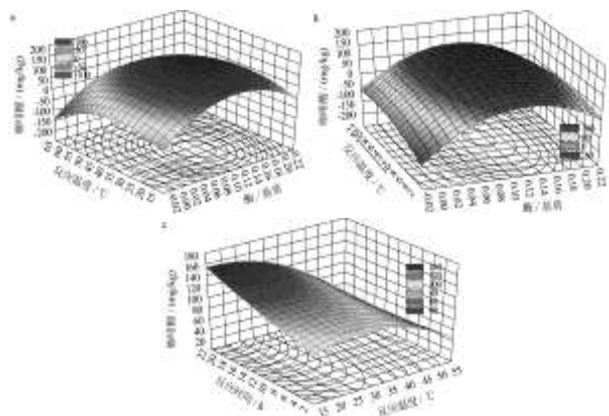


图 2 各两因素交互作用对苹果渣咖啡酸提取量影响的响应曲面图

Fig.2 Three-dimensional response surface optimization of caffeic acid yield versus

注:酶/基质比和反应温度(a);酶/基质比和反应时间(b);反应温度和反应时间(c)。

2.3.4 最佳提取条件的确定和验证

通过对回归方程进行分析处理,获得最优工艺参数范围为酶/基质比 0.11~0.12;反应温度 35.88~40.09 °C;反应时间 12.18~12.89 h,并最终优化后工艺参数确定为酶/基质比 0.11,反应温度 38.00 °C,反应时间 12.53 h (图 3)。为了验证响应面法的可靠性,在优化条件下重复实验 3 次,得出总多酚和咖啡酸提取量的平均值分别为 11.08 g GAE/kg 和 170.03 mg/kg (表 4),该实验值与理论值(11.32 g GAE/kg

和 173.87 mg/kg)非常接近(97.88%和 97.79%),说明实验结果与模型拟合良好,利用响应曲面分析法优化苹果渣中多酚类物质的果胶酶辅助提取工艺参数准确可靠,具有可行性。另外,值得注意的是利用果胶酶显著提高了总多酚和咖啡酸提取量,与对照组相比,分别提高 1.6 倍和 12.9 倍(表 4),表明果胶酶具有较强的分解果胶质的功能,并能提高总多酚类物质的提取量。

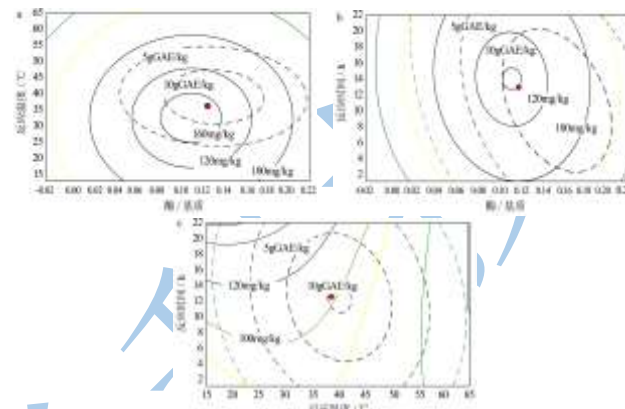


图 3 各两因素交互作用对苹果渣总多酚和咖啡酸提取量影响的叠加等高线图

Fig.3 Superimposed contour plots for yields of total phenolic and caffeic acid

注:在反应时间为 12 h 条件下酶/基质比和反应温度(a);在反应温度为 40 °C 条件下,酶/基质比和反应时间(b);在酶/基质比为 0.1 条件下反应温度和反应时间(c),实线为咖啡酸提取量(mg/kg),虚线为总多酚提取量(g GAE/kg),点为优化的最终反应条件参数值。

表 4 优化的最终反应条件下总多酚及咖啡酸提取量及对照组的比较

Table 4 Comparison between the predicted total phenolic and caffeic acid value and experimental values for the response variables at the given optimum conditions

反应响应值	优化的最终反应条件			响应值最大提取量		B/A×100/%	对照 ^a
	酶/基质	温度/°C	时间/h	预测值/A	验证值/B		
总多酚/(g GAE/kg)	0.11	38.00	12.53	11.32	11.08±0.25	97.88	6.78±0.12
咖啡酸/(mg/kg)				173.87	170.03±3.64	97.79	13.14±0.15

注:^a未加入果胶酶(其他反应条件相同)。

3 结论

苹果渣作为一种潜在的食品再利用资源,含有对人体有益的丰富有效成分,具有很好的药用价值和开发利用前景。本实验以苹果渣为原料,采用果胶酶辅助提取技术,在单因素实验的基础上,利用 Statistical Analysis System 9.1 (SAS 9.1) 和 STATISTICA 6.0 软件,通过响应曲面分析法优化果胶酶辅助提取苹果渣中总多酚和咖啡酸的工艺,建立二次多项数学模型,并对提取条件进行了优化。本实验确定的最佳提取工

艺参数为酶/基质比 0.11,反应温度 38.00 °C,反应时间 12.53 h,回归分析和验证实验表明了该响应面法的合理性和可行性,并为其将来作为天然抗氧化功能性产品和食品抗氧化添加剂的进一步开发利用提供技术和科学依据。

参考文献

[1] 凌美庭.抗氧化食品与健康[M].北京.化学工业出版社,2004
Ling G T. Antioxidant Food & Health [M]. Beijing. Chemical Industry Press, 2004

- [2] Renard C M G C, Baron A, Guyot S, et al. Interactions between apple cell walls and native apple polyphenol: quantification and some consequences [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2001, 29:115-125
- [3] Pinelo M, Arnous A, Meyer A S. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, 17:579-590
- [4] Sudha M L, Baskaran V, Leelavathi K. Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenol and its effect on the rheological characteristics and cake making [J]. *Food Chemistry*, 2007, 104(2):686-692
- [5] 张一青,陆兆新,尤华.原果胶酶提取桔柚皮中果胶的研究[J].*食品科学*,2005,26(1):151-153
Zhang Y Q, Lu Z X, You H. Study on Pectin Extraction by Protopectinase from Citrus Peel [J]. *Food Science*, 2005, 26(1): 151-153
- [6] Hayat K, Hussain S, Abbas S, et al. Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro [J]. *Separation and Purification Technology*, 2009, 70(1): 63-70
- [7] Schieber A, Petra K, Reinhold C. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 910: 265-273
- [8] Schieber A, Hilt, P, Streker P, et al. A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace [J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2003, 4(1):99-107
- [9] 郑虎哲, Lee H R, Lee S H, 等.果胶酶对苹果渣中多酚类物质的提取效果研究[J].*分析化学*,2008,36(3):306-310
Zheng H Z, Lee H R, Lee S H, et al. Pectinase Assisted Extraction of Polyphenols from Apple Pomace [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* [J]. 2008, 36(3): 306-310
- [10] Landbo A K, Meyer A S. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49: 3169-3177
- [11] Ahn S C, Kim M S, Lee S Y, et al. Increase of bioactive flavonoid aglycone extractable from Korean citrus peel by carbohydrate-hydrolyzing enzymes [J]. *Korean Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, 33(4):288-294
- [12] Isabelle B, David N, Nathalie, M, et al. Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products [J]. *Carbohydrate Research*, 2006, 341: 1820-1827
- [13] Pinelo M, Arnous A, Meyer A S. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release [J]. *Trends in food science & technology*, 2006, 17(11): 579-590
- [14] 霍丹群,蒋兰,王霜,等.响应面法优化百香果醋的发酵条件. *食品工业科技*[J],2013,34(1):145-149
Huo D Q, Jiang L, Wang S, et al. Optimization of fermentation conditions for *Passiflora edulis* vinegar by response surface methodology [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(1): 145-149