

纤维素酶和碱性蛋白酶联合提取茶渣中蛋白质的工艺参数研究

于鹏亮¹, 李立祥^{1*}, 卢昭¹, 张雁飞¹, 薛晨¹, 华再欣², 梅玉³

(1. 安徽农业大学茶叶生物化学与生物技术教育部、农业部重点实验室, 合肥 230036;

2. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036; 3. 安徽农业大学理学院, 合肥 230036)

摘要: 研究纤维素酶和碱性蛋白酶联合作用提取绿茶茶渣中蛋白质的工艺。以提取温度、加酶量、pH 值、提取时间为参考因素设计实验, 响应面设计确定最佳提取条件。结果表明, 纤维素酶酶解最佳工艺: 温度 41℃、加酶量 2%、pH 值 6.4、时间 64 min, 蛋白质提取率 6.58%。碱性蛋白酶酶解工艺: 温度 60℃、加酶量 2%、pH 值 8.7、时间 90 min, 蛋白质提取率 20.93%。最终双酶联合提取茶叶蛋白质的提取率为 32.18%。

关键词: 纤维素酶; 碱性蛋白酶; 茶渣; 蛋白质; 响应面设计

中图分类号: TS272.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)05-0771-07

Optimizing process parameters for the extract of protein from tea residue by cellulose enzyme and alkaline protease

YU Peng-liang¹, LI Li-xiang¹, LU Zhao¹, ZHANG Yan-fei¹, XUE Chen¹, HUA Zai-xin², MEI Yu³

(1. Key Lab of Tea Biochemistry & Biotechnology, Ministry of Education and Agriculture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Tea and Food Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036; 3. School of Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: The extraction process of protein from green tea residue by cellulose enzyme and alkaline protease was investigated. Reference factors including the extraction temperature, enzyme dosage, pH value and extraction time were considered to determine the best extraction condition by response surface design. The results showed that the optimum condition for protein extract with cellulose enzyme was 41℃, 2% cellulose enzyme, pH 6.4, and 64 min for enzymolysis. The protein extraction rate was 6.58% under the condition. The optimum condition for protein extract with alkaline protease was 60℃, 2% alkaline protease, pH 8.7, and 90 min for enzymolysis. The protein extraction rate was 20.93% under this condition, and the rate with combination of these two enzymes was 32.18%.

Key words: cellulose enzyme; alkaline protease; tea residue; protein; response surface design

我国茶饮料年产量已超过 700 万 t, 每年会产生大量的茶渣, 但是我国目前对茶渣的回收利用还处于初步研究阶段^[1]。茶叶经浸提后产生的茶渣中仍含有 20%~30% 的非水溶性茶叶蛋白和 30% 左右的粗纤维。据初步研究报道, 茶叶蛋白质和茶多酚一样具有较强的保健功能^[2], 如茶叶蛋白质具有抵抗突变^[3-5]和降血脂效果, 对动脉粥样硬化及冠心病可

能有一定的预防作用^[6]。目前在国内对茶叶蛋白的提取研究报道中多采用的是碱液提取的方法, 但碱法提取茶叶蛋白质有其缺点, 如会改变茶叶蛋白质的营养学特性, 使蛋白质的半胱氨酸和丝氨酸结合形成赖-丙氨酸, 这种物质不但有毒, 而且还会引起营养物质的损失。

本研究在前人研究的基础上, 利用纤维素酶和

收稿日期: 2012-12-31

基金项目: 安徽省高等学校“十五”优秀人才培养项目资助。

作者简介: 于鹏亮, 男, 硕士研究生。

* 通信作者: 李立祥, 男, 教授。E-mail: llx@ahau.edu.cn

碱性蛋白酶联合处理茶渣进行蛋白提取。一方面利用纤维素酶水解粗纤维,增加茶叶蛋白的溶出率,另一方面用碱性蛋白酶水解非水溶性的茶叶蛋白,增大茶叶蛋白的水溶性,提高茶叶蛋白的提取率。以期达到充分利用茶叶资源,提高经济效益,为茶渣再利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器设备

茶渣:浙江茗皇天然食品开发有限公司;试剂:纤维素酶(合肥志宏生物科技有限公司 活性 ≥ 0.3 U·mg⁻¹);碱性蛋白酶(江苏锐阳生物科技有限公司 20万 U·g⁻¹);氢氧化钠、盐酸、磷酸氢二钠、柠檬酸、浓硫酸、茚三酮、考马斯亮蓝 G250、磷酸、95%乙醇、中性甲醛(均为分析纯)。

Unico 7200 分光光度计(尤尼柯(上海)仪器厂)、PB-10 酸度计(Metter-Toledo Group)、DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司)、HH 数显恒温水浴锅(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂)、JFSD-100II 粉碎机(上海嘉定粮油仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 茶渣的预处理 将茶渣至于 55℃烘箱中烘 12 h,取出后用粉碎机粉碎,过 40 目筛后置于干燥器中备用。

1.2.2 提取方法 精确称取 5 g 处理好的茶渣于 250 mL 三角瓶中→加入适当 pH 的缓冲液 100 mL,配成固液比 1:20 的溶液→用缓冲溶液母液对 pH 值进行微调,使料液混合物的 pH 达到所要求→加酶(分别加纤维素酶、碱性蛋白酶)后于恒温水浴锅内浸提一定时间→浸提完成后将三角瓶放入 100℃水浴锅中,加热 3 min 钝化酶的活性→取出三角瓶趁热抽滤,用去离子水清洗滤渣 3 次、定容→测定相关指标。

1.2.3 纤维素酶酶解条件的确定 分别选取处理温度 20~70℃、pH4.0~9.0、加酶量 0.5%~5.5%、提取时间 30~180 min 4 个因素 6 个水平,按照上述试验过程进行提取,最后浸提液定容至 1 000 mL,测定浸提液中可溶性糖和蛋白质的含量。考察各因素对茶渣细胞壁的分解和蛋白质溶出情况的影响。

根据单因素试验结果,进行处理温度、pH 值、加酶量、提取时间因素三水平响应面试验,确定最佳的纤维素酶酶解条件。最终确定 4 个因素的取值水平如表 1 所示。

1.2.4 碱性蛋白酶水解条件的确定 分别选取提取温度 20~70℃、pH6.6~11.6、加酶量 0.5%~5.5%、提

取时间 30~180 min 四个因素六个水平,按照试验过程进行提取,最后浸提液定容至 500 mL,测定浸提液中蛋白质的含量。考察各因素对茶渣中蛋白质的提取程度的影响。

表 1 纤维素酶酶解因素水平编码

Table 1 The code for the factors and levels using cellulose enzyme

因素 Factor	代码 Code	编码水平 Coding level		
		-1	0	1
温度/℃ Temperature	A	35	40	45
加酶量/% Enzyme dosage	B	2.0	2.5	3.0
pH值 pH value	C	5.6	6.2	6.8
时间/min Time	D	45	60	75

表 2 因素水平编码

Table 2 The code for the factors and levels using alkaline protease

因素 Factor	代码 Code	编码水平 Coding level		
		-1	0	1
温度/℃ Temperature	A	50	55	60
加酶量/% Enzyme dosage	B	2.0	2.5	3.0
pH值 pH value	C	8.1	8.6	9.1
时间/min Time	D	75	90	105

根据单因素试验结果,进行处理温度、pH 值、加酶量、提取时间四因素三水平响应面试验,确定最佳的碱性蛋白酶酶解条件。最终 4 个因素的取值水平如表 2 所示。

1.2.5 双酶联合提取蛋白试验 以纤维素酶酶解和碱性蛋白酶酶解响应面结果为基础,准确称取 5 g 茶渣,依照纤维素酶酶解的最优条件进行处理,处理完成后先经灭酶再进行固液分离,液体部分定容后检测可溶性糖的含量,滤渣则按照响应面试验给出的最优结果进行碱性蛋白酶酶解,酶解结束后先钝化酶的活性再进行固液分离,滤液定容后测定茶叶蛋白提取率。

1.3 测定方法

茶渣成分:水分(GB 5009.3-2010)、灰分(GB 5009.4-2010)、粗纤维含量(GB/T 5009.10-2003)、蛋白质含量(GB/T 5511-2003)、可溶性糖含量快速测定:蒽酮-硫酸法^[7]、蛋白质含量快速测定:考马斯亮蓝比色法^[8],蛋白质提取率%=(蛋白质提取量/试样中蛋白质的含量)×100%。

可溶性糖提取^[9]:准确称取 1.5 g 茶样,加入 200 mL 水,100℃水浴加热 45 min,期间摇晃数次,2 层滤纸减压抽滤,滤液定容至 250 mL,测定可溶性

糖含量。

可溶性糖提取率%=(可溶性糖提取量/试样的干物质量)×100%

水解度测定。甲醛滴定法^[10]:用 0.1 mol·L⁻¹的 NaOH 标准溶液将 5 mL 提取液滴定到 pH8.2。加入 8 mL 37% 的中性甲醛溶液,再用 0.1 mol·L⁻¹的 NaOH 滴定到 pH 值 9.2。记录加入甲醛后把溶液滴定到 pH 9.2 所耗碱量,计算提取液中氨基酸的含量。用考马斯亮蓝法测定提取液中蛋白质含量。

水解度%=(提取液中氨基酸含量/提取液中蛋白质含量)×100%

2 结果与分析

2.1 茶渣成分

从茶渣成分测定结果来看,茶渣中蛋白质占了很大的比例,约 21.05%,与文献报道基本一致^[11]。这部分蛋白质为水不溶性蛋白,因此在速溶茶的生产过程中没有被很好的利用(表 3)。

表 3 茶渣主要成分

Table 3 The main ingredients in tea residue

水分含量 Moisture content	灰分 Ash content	蛋白质含量 Protein content	粗纤维含量 Crude fiber content	可溶性糖含量 Soluble sugar content
3.57%	5.83%	21.05%	23.20%	0.53%

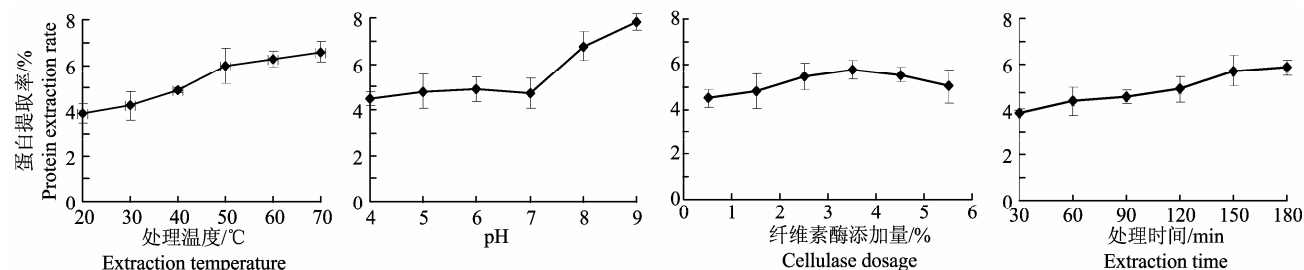


图 1 纤维素酶处理茶渣时蛋白质含量随处理温度、pH、纤维素酶添加量、处理时间的变化曲线

Figure 1 Changes of protein content with cellulase enzyme under different temperature, pH, cellulase dosage and time

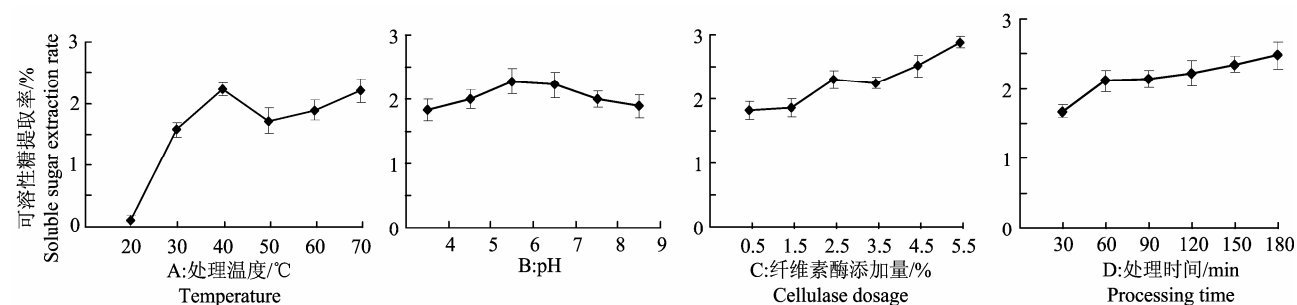


图 2 纤维素酶处理茶渣时可溶性糖提取率随处理温度(A)、pH(B)、纤维素酶添加量(C)、处理时间(D)变化曲线
Figure 2 Changes of soluble sugar extraction rate with cellulase enzyme under different temperature (A), pH(B), cellulase dosage (C) and time (D)

2.2 纤维素酶效果分析

2.2.1 纤维素酶对蛋白质的影响 由图 1 和图 2 可以看出纤维素酶处理对蛋白提取率的影响不显著,基本上在 4% 到 6% 之间。但是它会对可溶性糖含量的变化产生显著影响,而且纤维素酶破壁作用可能会为下一步的蛋白质的提取起到间接的帮助作用,因此后续纤维素酶解响应面实验中将以可溶性糖的含量为衡量指标。由图 2 最终确定纤维素酶解的最佳单因素结果为:处理温度 40℃、最适 pH 为 6.2、纤维素酶添加量 2.5%、处理时间 60 min。

2.2.2 响应面分析 由表 4 的结果和表 5 的方差分

析中可以看出模型 P 值小于 0.01,说明各响应值对该模型是高度显著的,具有统计学意义;失拟项不显著,说明该回归方程试验拟合情况好;决定系数 R^2 为 0.8959,说明应变量与全体自变量之间的多元回归关系显著,也说明该回归方程对试验拟合情况较好,试验误差小。因此,可用该回归方程对不同提取条件下的响应值进行预测。根据 F 值检验和概率 P 值可以看出,影响总糖含量的主次因素顺序为:温度(A)、pH 值(C)、时间(D)、加酶量(B),其中 A、C、D 为显著影响因素。

表 4 响应面试验方案和结果
Table 4 Experimental design and results using RSM(response surface method)

编号 Number	A	B	C	D	可溶糖提取率/% Soluble sugar extraction rate
1	1	-1	0	0	1.95
2	0	0	-1	-1	1.52
3	1	0	0	1	2.19
4	-1	0	0	1	1.53
5	0	0	-1	1	1.76
6	-1	0	1	0	1.91
7	0	-1	0	1	2.30
8	-1	0	0	-1	1.55
9	1	0	0	-1	2.01
10	1	0	-1	0	1.92
11	0	0	0	0	2.27
12	1	1	0	0	2.22
13	0	1	1	0	2.16
14	1	0	1	0	2.05
15	0	0	0	0	2.19
16	0	1	0	1	2.38
17	0	-1	0	-1	2.00
18	0	1	0	-1	2.07
19	0	-1	1	0	2.14
20	-1	-1	0	0	1.85
21	0	0	0	0	2.17
22	0	0	0	0	2.27
23	-1	0	-1	0	1.42
24	0	1	-1	0	2.09
25	0	-1	1	0	1.97
26	0	0	1	1	2.06
27	-1	1	0	0	1.90
28	0	0	1	-1	1.99
29	0	0	0	0	2.30

A.温度/°C Temperature; B.加酶量/% Enzyme dosage; C.pH值 pH value; D.时间/min Treatment time.下同 The same below.

纤维素酶酶解试验中,响应值与温度(A)、加酶量(B)、pH值(C)、时间(D)4因素之间的响应面拟合方程为:

$$\text{总糖提取率} = 2.24 + 0.18A + 0.051B + 0.14C + 0.090D + 0.055AB - 0.090AC + 0.050AD - 0.025BC + 2.500E - 0.03BD - 0.042CD - 0.26A^2 + 0.053B^2 - 0.20C^2 - 0.16D^2$$

根据程序对拟合方程的求解与响应面模型预测出纤维素酶破壁试验的最佳工艺条件为:温度 41.06 °C、加酶量 2%、pH 值 6.39、时间 64.07 min.经过试验验证,最佳工艺条件为:温度 41 °C、加酶量 2%、pH 值 6.4、时间 64 min,最终可溶糖提取率为 2.18%,与预测值 2.29%相差不大,进一步验证了模型与试验结果的可靠性。

2.3 碱性蛋白酶对茶渣中蛋白质提取率的影响

2.3.1 单因素分析 由图 3A 蛋白质(处理温度)变化曲线可以看出,蛋白质含量随处理温度的增加先增加后减少,在温度为 60 °C 时达到最大。由图 3B 蛋白质(pH)变化曲线可以看出,蛋白质含量随 pH 的增大先增加后减小,后来再次增大,在 pH 为 6 时有最大波峰,说明此种碱性蛋白酶的最适 pH 为 6。pH 低于 6 都会使碱性蛋白酶的活性受到抑制,pH 大于 9.6 后蛋白质得率上升迅速,这是因茶叶蛋白易溶于碱性溶液引起的,与碱性蛋白酶的作用无关,而且在过高碱性环境下,可溶性蛋白会发生美拉德反应^[12]。由图 3C 蛋白质(碱性蛋白酶添加量)变化曲线可以看出,蛋白质含量随碱性蛋白酶添加

量的增加呈先增加后平缓, 然后迅速下降的趋势, 这是因为碱性蛋白酶一方面可以将水不溶性的大分子蛋白降解成水溶性的小分子蛋白, 增加蛋白质的提取率。另一方面过多的酶用量可以继续将小分子的蛋白分解为游离氨基酸, 使蛋白质的提取率急速下降。因此, 为了节约成本和保证提取率的考虑,

酶添加量应选 2.5%。由图 3D 蛋白质(处理时间)变化曲线可以看出, 蛋白质含量随处理时间的延长先增加后降低, 90 min 为拐点, 这是因为蛋白质随着处理时间的延长被分解成游离氨基酸, 因此取提取时间 90 min 最适。

表 5 可溶性糖含量的方差分析
Table 5 ANOVA for the soluble carbohydrate

方差来源 Sources of variation	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance of difference
模型 Model	1.60	14	0.11	8.60	0.000 1	**
A	0.40	1	0.40	29.88	<0.000 1	**
B	0.031	1	0.031	2.34	0.148 4	
C	0.22	1	0.22	16.70	0.001 1	**
D	0.097	1	0.097	7.33	0.017 0	*
AB	0.012	1	0.012	0.91	0.355 5	
AC	0.032	1	0.032	2.44	0.140 3	
AD	0.010	1	0.010	0.75	0.399 7	
BC	2.500E-003	1	2.500E-003	0.19	0.670 7	
BD	2.500E-005	1	2.500E-005	1.886E-003	0.966 0	
CD	2.500E-003	1	2.500E-003	0.55	0.472 5	
A ²	0.45	1	0.45	33.94	<0.000 1	**
B ²	0.018	1	0.018	1.37	0.261 3	
C ²	0.26	1	0.26	19.99	0.000 5	**
D ²	0.16	1	0.16	11.88	0.003 9	**
残差 Residual	0.19	14	0.013			
失拟项 Lack of fit	0.17	10	0.017	5.40	0.059 2	
纯误差 Pure error	0.013	4	3.200E-003			
总和 Total	1.78	28		$R^2=0.895 9$	$R^2_{Adj}=0.791 7$	

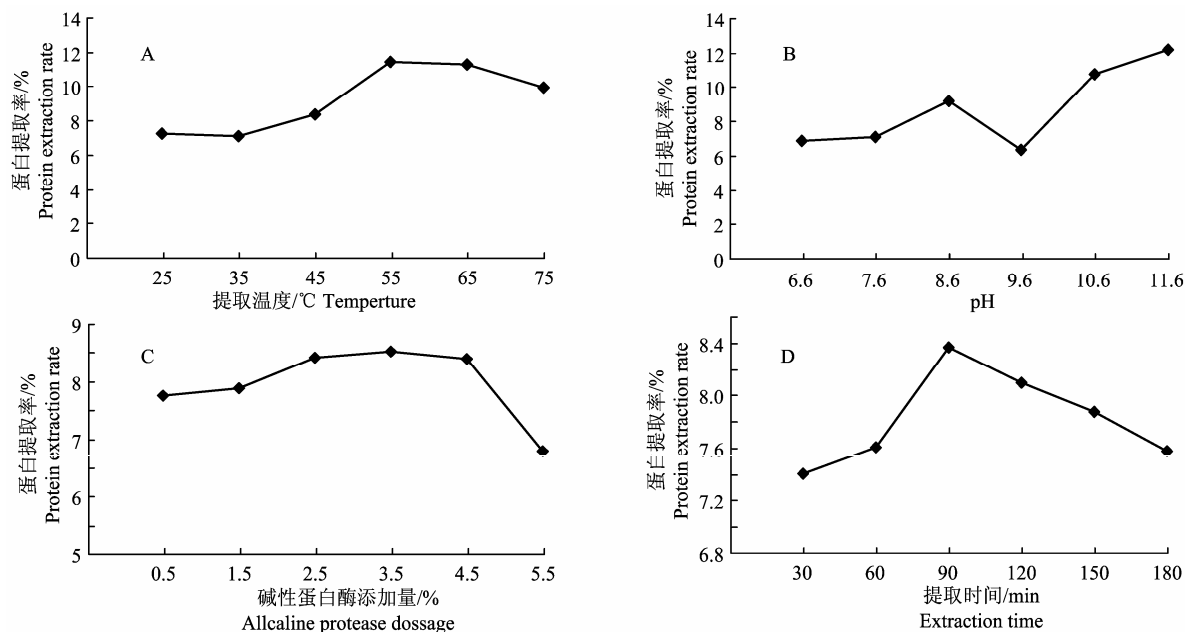


图 3 碱性蛋白酶处理时蛋白质含量随提取温度 (A)、pH (B)、碱性蛋白酶添加量 (C)、提取时间 (D) 的变化曲线
Figure 3 Changes of protein extraction rate with alkaline protease under different temperature (A), pH (B), alkaline protease dosage (C) and time (D)

表 6 响应面试验方案和结果
Table 6 Experimental design and results using RSM

编号 Number	A	B	C	D	蛋白质提取率% Protein extraction rate	水解度% Hydrolysis degree
1	0	0	1	-1	10.93	9.14
2	0	1	-1	0	7.88	9.10
3	0	0	0	0	13.45	9.93
4	-1	0	-1	0	8.35	9.54
5	0	1	1	0	10.10	8.41
6	0	0	1	1	10.59	8.95
7	1	0	0	-1	13.79	9.58
8	0	-1	1	0	10.84	8.36
9	1	1	0	0	13.94	9.98
10	0	0	0	0	13.79	10.32
11	0	0	-1	-1	8.69	7.58
12	-1	0	0	-1	9.43	8.90
13	0	-1	0	-1	9.70	8.70
14	1	-1	0	0	13.77	9.24
15	-1	-1	0	0	9.31	8.66
16	1	0	0	1	13.96	9.88
17	0	-1	-1	0	8.20	8.02
18	-1	1	0	0	9.26	8.95
19	0	0	0	0	12.98	9.78
20	1	0	1	0	14.31	10.12
21	0	-1	0	1	10.66	10.32
22	0	0	-1	1	10.54	9.58
23	0	1	0	1	10.84	11.74
24	0	1	0	-1	9.41	8.70
25	1	0	-1	0	12.63	9.54
26	-1	0	1	0	9.97	8.70
27	-1	0	0	1	9.36	9.14
28	0	0	0	0	13.57	9.54
29	0	0	0	0	13.77	10.22

表 7 蛋白质含量的方差分析
Table 7 ANOVA for the protein content

方差来源 Sources of variation	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance of difference
模型 Model	122.25	14	8.73	41.44	<0.000 1	**
A	59.50	1	59.50	282.34	<0.000 1	**
B	0.092	1	0.092	0.44	0.519 8	
C	9.10	1	9.10	43.19	<0.000 1	**
D	1.33	1	1.33	6.33	0.024 7	*
AB	0.012	1	0.012	0.057	0.814 1	
AC	9.000E-004	1	9.000E-004	4.271E-003	0.948 8	
AD	0.014	1	0.014	0.068	0.797 6	
BC	0.044	1	0.044	0.21	0.654 4	
BD	0.055	1	0.055	0.26	0.616 7	
CD	1.20	1	1.20	5.69	0.031 7	*
A ²	0.21	1	0.21	1.02	0.330 2	
B ²	24.74	1	24.74	117.42	<0.000 1	**
C ²	27.61	1	27.61	131.72	<0.000 1	**
D ²	13.72	1	13.72	65.11	<0.000 1	**
残差 Residual	2.95	14	0.21			
失拟项 Lack of fit	2.52	10	0.25	2.32	0.216 8	
纯误差 Pure error	0.43	4	0.11			
总和 Total	125.20	28			R ² =0.976 4	R ² _{Adj} =0.952 9

表 8 不同提取方法蛋白质得率
Table 8 Protein extraction rates with different extraction methods

提取方法 Extraction method	纤维素酶处理 Cellulose enzyme treatment	碱性蛋白酶处理 Alkaline protease treatment	双酶法联合作用 Double enzyme combination
蛋白质得率 Protein extraction rate	6.58%	20.93%	32.18%

2.3.2 响应面分析 从表 6 的结果和表 7 的方差分析可以看出模型 P 值小于 0.01, 说明该模型是高度显著的, 具有统计学意义; 失拟项不显著, 说明该回归方程试验拟合情况好; 决定系数 R^2 为 0.9764, 说明应变变量与全体自变量之间的多元回归关系显著, 也说明该回归方程对试验拟合情况较好, 试验误差小。因此, 可用该回归方程对不同提取条件下的响应值进行预测。根据 F 值检验和概率 P 值可以看出, 影响蛋白质含量的主次因素顺序分别为: 温度(A)、pH 值(C)、时间(D)和酶添加量(B), 其中 A、C、D 为显著影响因素, 交互项 CD 也达到显著水平。

碱性蛋白酶酶解试验中, 响应值与温度(A)、加酶量(B)、pH 值(C)、时间(D) 4 个因素之间的响应面拟合方程为:

$$\text{蛋白提取率} = 20.27 + 3.34A - 0.13B + 1.31C + 0.50D + 0.083AB + 0.022AC + 0.090AD - 0.16BC + 0.18BD - 0.82CD - 0.27A^2 - 2.93B^2 - 3.09C^2 - 2.18D^2$$

根据程序对拟合方程的求解与响应面模型预测出碱性蛋白酶酶解试验的最佳工艺条件为: 温度 60℃、加酶量 2.06%、pH 值 8.71、时间 90.85 min。经过试验验证, 最佳工艺条件为: 温度 60℃、加酶量 2%、pH 值 8.7、时间 90 min, 最终蛋白质提取率为 20.93%、水解度 9.1%, 与预测值 21.30% 相差不大, 进一步验证了模型与试验结果的可靠性。

2.4 双酶联合提取

最后茶渣经纤维素酶破壁后过滤, 用碱性蛋白酶进行提取, 重复提取 3 次测得蛋白质最终得率为 32.18%、水解度 10.37%。

由表 8 可以看出双酶法的蛋白提取率高达 32.18% 远高于碱性蛋白酶作用下的 20.93%, 而纤维素酶酶解下的提取液中蛋白质得率最高仅为 6.58%。说明双酶处理时纤维素酶的应用虽然没有直接降解水不溶性的蛋白质, 使蛋白提取率提高。但它破坏了茶渣细胞的细胞壁, 为碱性蛋白酶降解茶叶蛋白并使其溶出创造了更好的条件, 说明双酶法提取茶渣中的蛋白质是切实可行的。

3 结论

纤维素酶酶解的最佳条件为: 温度 41℃、加酶量 2%、pH 值 6.4、时间 64 min, 最终可溶糖提取率为 2.18%。

碱性蛋白酶酶解的最佳条件为: 温度 60℃、加酶量 2%、pH 值 8.7、时间 90 min, 最终蛋白质提取率为 20.93%、水解度 9.1%。

双酶法提取过程中, 先纤维素酶处理, 后碱性蛋白酶提取的分步提取效果较好。最终蛋白质的提取率为 32.18%、水解度 10.37%。

参考文献:

- [1] 焦自明, 高冉, 杨建雄, 等. 从茶渣中提取茶多糖工艺条件的优化研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(16): 285-288.
- [2] 中国科学院上海生物工程研究中心. 茶叶蛋白[J]. 技术与市场, 1999(10): 23.
- [3] 李燕, 蔡东联, 霞雪君, 等. 茶蛋白液预防辐射引起的突变效应[J]. 痛变畸变突变, 2001, 13(1): 32-36.
- [4] Bu-Abbas A, Clifford M N, Walker R, et al. Selective induction of rat hepatic CYP1 and CYP4 proteins and of peroxisomal proliferation by green tea[J]. Carcinogenesis, 1994, 11(15): 2575-2579.
- [5] 蔡东联, 梁华, 华苏, 等. 茶叶中的元素和蛋白质含量与茶叶质量的关系[J]. 中国公共卫生, 1994, 10(11): 516-518.
- [6] 活泼, 黄光荣, 张小晖, 等. 非水溶性茶叶蛋白降血脂作用的研究[J]. 茶叶科学, 2005, 25(2): 95-99.
- [7] 张维杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科技出版社, 1987.
- [8] 陈均辉, 陶力, 李俊, 等. 生物化学实验[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2003: 63-64.
- [9] 叶阳, 陈小强, 苏丽慧, 等. 3 类茶中水溶性多糖及蛋白质的含量分析[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(29): 12761-12762.
- [10] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 119-124.
- [11] 张晓晖, 章克昌, 活泼, 等. 非水溶性茶蛋白的提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(3): 64-67.
- [12] Conner M A, Saunders R M, Kohler G O. Rice bran protein concentrates by wet alkaline extraction[J]. Cereal Chemistry, 1973, 53: 488-496.