

蜂蜜中外源性 γ -淀粉酶残留量的测定

费晓庆*, 吴 斌, 沈崇钰, 张 睿, 丁 涛, 李丽花

(江苏出入境检验检疫局食品实验室, 江苏 南京 210001)

摘要:采用液相色谱-同位素质谱联用法(LC-IRMS)建立了测定蜂蜜中外源性 γ -淀粉酶残留量的方法。先采用凝胶色谱柱对蜂蜜样品进行预分离,将样品中所含的酶与糖分离开。根据 γ -淀粉酶可将底物麦芽糖酶解为葡萄糖的原理,在 55 °C、pH 4.5 的 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液中将 γ -淀粉酶与麦芽糖反应 48 h 后,采用 LC 分离麦芽糖和葡萄糖,以 IRMS 测定酶解产物葡萄糖的含量来确定 γ -淀粉酶的残留量。本方法的线性范围为 5 ~ 200 U/kg,定量限为 5 U/kg,回收率为 89.6% ~ 108.2%,相对标准偏差为 3.3% ~ 4.9%。采用本方法对市售蜂蜜和米糖浆共 38 个样本进行了考察, γ -淀粉酶的检出率为 76.3%。为了进一步验证本方法的检测能力,测定了掺入 15% (质量分数) 米糖浆的蜂蜜样品,测得 γ -淀粉酶的含量为 10.2 U/kg。本方法能够有效地从酶学的角度鉴定蜂蜜中是否含有米糖浆。

关键词:液相色谱-同位素质谱联用法;凝胶柱色谱;酶反应; γ -淀粉酶;米糖浆;掺假;蜂蜜

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2012)08-0777-05

Determination of exogenous γ -amylase residue in honey

FEI Xiaoqing*, WU Bin, SHEN Chongyu, ZHANG Rui, DING Tao, LI Lihua

(Laboratory of Food, Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

Abstract: A novel method for the determination of exogenous γ -amylase residue in honey using liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry (LC-IRMS) was established. After pre-separation by gel column chromatography, the γ -amylase in honey samples was separated from the sugars. The γ -amylase was then used to catalyze maltose into glucose. This enzymatic reaction was under the conditions of 55 °C and 0.03 mol/L phosphate buffer solution (pH 4.5) for 48 h. The maltose and glucose in the above enzymatic reaction solution were separated using liquid chromatography. By measuring the content of glucose with isotope ratio mass spectrometry, the γ -amylase in honey can be determined. The linear range of γ -amylase was 5 – 200 U/kg with the quantification limit of 5 U/kg. The recoveries were between 89.6% and 108.2% with the relative standard deviations from 3.3% to 4.9%. This method was used to analyze 38 honey and rice syrup samples, and the detection rate of γ -amylase was 76.3%. To further verify the detection capability of this method, an authentic honey was adulterated with 15% (mass fraction) rice syrup. The γ -amylase content in this sample was 10.2 U/kg. This method can effectively identify honey adulteration with rice syrups from the perspective of enzymology.

Key words: liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry (LC-IRMS); gel column chromatography; enzymatic reaction; γ -amylase; rice syrup; adulteration; honey

天然纯正的蜂蜜具有较高的营养价值,它富含各种糖、氨基酸、维生素、多酚、类黄酮等多种活性物质。由于纯正蜂蜜经济价值较高,少数蜂蜜生产商为了牟取非法利益,在纯正蜂蜜中掺入成本便宜各类糖浆,米糖浆是最近用于蜂蜜掺假的主要原

料。蜂蜜掺假对蜂产品市场造成了极大的负面影响,使得广大消费者经济利益受损。因此,开发有效、灵敏的蜂蜜掺假检测方法变得极为迫切。

目前,蜂蜜掺假的鉴定方法主要有理化参数检测(糖指纹图谱^[1]、氨基酸指纹图谱^[2]、5-羟甲基糠

* 通讯联系人:费晓庆,硕士,研究方向为食品检测和食品掺假鉴定研究。Tel: (025)52345193, E-mail: dii01208@163.com.

基金项目:国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2011IK212)和江苏出入境检验检疫局科研项目(2011KJ40)。

收稿日期:2012-04-10

醛含量、脯氨酸含量)、红外光谱法^[3]、薄层色谱法^[4]、核磁共振法^[5]和元素分析-同位素质谱联用法^[6]等,这些检测手段存在着干扰多、耗时长、灵敏度低、无法鉴定碳-3植物糖浆掺假等不足。费晓庆等^[7]利用液相色谱(LC)/元素分析-同位素质谱联用法测得蜂蜜中各组分碳同位素值的差值,提出了蜂蜜掺假鉴定的新方法,能够有效鉴定碳-3植物糖浆的掺假。

大米糖浆是国内蜂蜜掺假使用较多的碳-3植物糖浆,根据大米糖浆的生产工艺,需要使用 γ -淀粉酶对大米淀粉进行酶解^[8]。 γ -淀粉酶(又称糖化酶、葡萄糖淀粉酶、淀粉葡萄糖苷酶)能水解淀粉中的 α -1,4葡萄糖苷键,它与 α -淀粉酶联合作用能较快地将淀粉转化成葡萄糖,再经过葡萄糖异构化酶进行异构化,得到的大米糖浆在糖的组成方面与蜂蜜相似,将其掺入蜂蜜中即可实现掺假。文献报道指出,纯正蜂蜜中含有少量的淀粉酶(α -淀粉酶和 β -淀粉酶),它们能将淀粉和糖原水解成糊精和麦芽糖,而 γ -淀粉酶不具有上述性质;同时到目前为止,尚未见纯正蜂蜜中含有 γ -淀粉酶的文献报道^[9,10],因此通过测定蜂蜜中 γ -淀粉酶残留量,可以从酶学的角度来鉴定蜂蜜是否掺入大米糖浆。

γ -淀粉酶的测定主要有分光光度法^[11]、葡萄糖酶电极法^[12]、液相色谱法^[13]和滴定法^[14]等。这些方法主要用于研究淀粉生产糖浆工艺中的样本,目前尚无文献报道蜂蜜中 γ -淀粉酶残留量的检测方法。本文首先采用凝胶色谱根据分子体积大小将蜂蜜中的糖与酶进行预分离,确保完全收集样品中的酶溶液后,以麦芽糖作为酶解反应底物,在55℃和pH 4.5的0.03 mol/L磷酸缓冲液条件下酶解反应48 h。酶解反应所得各组分经LC分离后,在同位素质谱(IRMS)的氧化炉中依次被氧化成CO₂,通过IRMS在线测定各组分产生的CO₂的峰面积,即得到相应各组分的含量,然后利用葡萄糖含量与酶含量之间的对应关系来确定 γ -淀粉酶的残留量。本法灵敏度较高,通过对纯正蜂蜜、市售蜂蜜、大米糖浆和掺入一定量大米糖浆的蜂蜜样本的考察,能够有效检测出蜂蜜中 γ -淀粉酶的残留量,从而能够鉴定出蜂蜜中是否掺有大米糖浆。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Surveyor液相色谱仪、Delta V Plus碳同位素质谱仪(Thermo Fisher公司);恒温水浴振荡器(SHZ-88型,江苏太仓市实验设备厂);pH计(Sev-

enmulti型,梅特勒-托利多公司);涡旋混合器(XW-80A型,上海医科大学仪器厂)。

γ -淀粉酶(国际分类编号为EC 3.2.1.3, CAS号为9032-08-0, 70 U/mg,提取自黑曲霉(*Aspergillus niger*))和麦芽糖均购于Sigma公司(纯度均>99.0%),过二硫酸钠和高纯磷酸购于Fluka公司(纯度均>99.0%),磷酸二氢钾和用于配制缓冲溶液的磷酸为分析纯。聚丙烯酰胺凝胶填料(Bio-Gel P-2, BioRad公司)。

1 g/L γ -淀粉酶标准溶液:准确称取 γ -淀粉酶标准品0.01 g(精确到0.000 1 g)于10 mL容量瓶中,用水溶解并定容,摇匀备用,于-4℃保存。使用时稀释成0.01 g/L的工作溶液。

100 g/L 麦芽糖溶液:称取10.0 g麦芽糖,用超纯水溶解定容至100 mL容量瓶中,摇匀备用。

磷酸盐缓冲溶液:称取适量磷酸二氢钾于1 000 mL烧杯中,加800 mL水溶解后,用1 mol/L磷酸溶液调节至pH 4.50,用超纯水定容至1 000 mL。

IRMS所用的氧化剂为含1.12 mol/L过二硫酸钠和0.33 mol/L磷酸的水溶液。

本实验所用水均为Millipore公司Milli-Q超纯水仪制备的超纯水(电阻率为18.2 M Ω ·cm)。

天然蜂蜜样品包括油菜蜜、洋槐蜜、荆条蜜、椴树蜜、紫云英蜜、葵花蜜、芦苕蜜、三叶草蜜、麦卢卡蜜、香橙蜜、棉花蜜和龙眼蜜(来自国内外不同地区的蜂农或者蜂蜜供应商),共计12个蜜种30个样本。这些蜂蜜通过其他检测手段(包括液相色谱/元素分析-同位素质谱法、薄层色谱法、糖的组成、5-羟甲基糠醛含量、酶值)被确认为纯正蜂蜜。

为了验证方法对掺假蜂蜜的检测能力,选取20个蜂蜜和18个糖浆样品共38个样品采用本方法检测 γ -淀粉酶的残留量,这些蜂蜜来自日常检测样品、国内蜂农、蜂蜜供应商和糖浆生产企业。

1.2 凝胶色谱柱填装和样品处理

称取适量聚丙烯酰胺凝胶填料于烧杯中,加水静置过夜,使其充分溶胀,将溶胀后的凝胶装入15 cm×1.5 cm玻璃色谱柱中,装入的凝胶高度为10 cm,避免凝胶色谱柱中的填料干涸。

称取2.00 g蜂蜜或者糖浆样品于10 mL容量瓶中,以少量水溶解后定容至10 mL,然后过0.45 μ m的水相滤膜。移取上述样品滤液5.0 mL于色谱柱中,溶液流尽后以3.0 mL水冲洗,然后再加5.0 mL水并收集洗脱液。此溶液为含 γ -淀粉酶的水溶液。

在含 γ -淀粉酶的水溶液中加入2.00 mL 100

g/L的麦芽糖溶液,用pH 4.5的0.03 mol/L磷酸盐缓冲液定容至10 mL,混匀,盖上塞子于55 °C恒温水浴中振荡48 h后过0.22 μ m的水相滤膜后进行LC检测。

1.3 标准曲线的建立

分别取0.01 g/L γ -淀粉酶标准溶液7、14.5、28.5、72、143和286 μ L,加入2 mL的100 g/L麦芽糖溶液,用pH 4.5的0.03 mol/L磷酸盐缓冲液定容至10 mL,于55 °C恒温水浴中振荡48 h后过0.22 μ m的水相滤膜后进行LC检测。上述标准溶液对应于 γ -淀粉酶的含量依次为5、10、20、50、100和200 U/kg(折算公式:酶含量 = $V \times 0.01 \times 70/m$, V 为加入 γ -淀粉酶工作溶液体积,以mL计; m 为样品质量,以kg计)。

以酶解反应生成的葡萄糖的峰面积 $A(\text{mV} \cdot \text{s})$ 为纵坐标,以 γ -淀粉酶的含量 $C(\text{U/kg})$ 为横坐标,绘制标准曲线,外标法定量。

1.4 实验条件

液相色谱条件:色谱柱为Carbomix Ca-NP5(交联度8%,300 mm \times 7.8 mm,5 μ m, Sepax Technologies);流动相为超纯水,流速为0.35 mL/min;柱温为85 °C;进样体积3 μ L。

质谱条件:氧化炉温度:99.9 °C;离子源:电子轰击(EI)离子源;扫描方式:正离子扫描;辅助气压力:0.4 MPa;电子轰击能量:120.8 eV;离子源电压:2.97 kV;真空度: 2.0×10^{-4} Pa。

2 结果与讨论

2.1 反应体系及其反应条件的选择

由于本文采用的检测器为碳同位素质谱仪,含有碳元素的缓冲体系均会增强检测本底,导致实验误差,因此选择磷酸盐缓冲液作为反应缓冲体系。

反应温度和pH值是影响酶解反应的重要因素。过低的反应温度会抑制酶的活性,过高的反应温度可能会使酶失去活性。选取温度分别为45、50、55、60和65 °C进行实验,不同温度下生成的葡萄糖的响应信号见图1。从图1中可以看出,当温度升至65 °C时,酶的活性迅速降低。当温度为55 °C时,响应信号最大,因此选取该温度为反应温度。

缓冲体系的pH值对酶的活性影响较大,因此必须寻找缓冲体系的最佳pH条件。 γ -淀粉酶在pH 3.50~5.50范围内均有较好的稳定性,因此本实验配制了pH分别为3.50、4.00、4.50、5.00和5.50的0.03 mol/L磷酸盐缓冲溶液,考察不同pH条件对酶解产物葡萄糖响应信号的影响。不同pH

值条件下葡萄糖的峰面积见图2。结果表明,pH为4.50时酶解产物葡萄糖的峰面积最大。因此选定pH 4.50作为最适宜的pH条件。

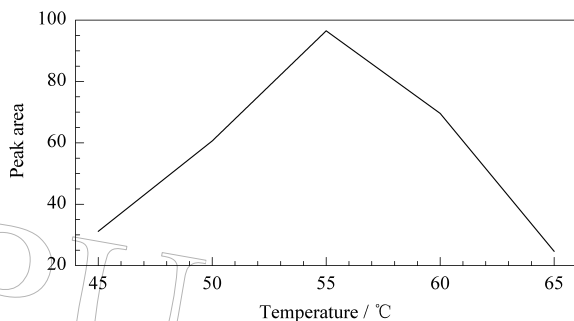


图1 不同反应温度下葡萄糖的峰面积

Fig. 1 Peak area of glucose at different reaction temperatures

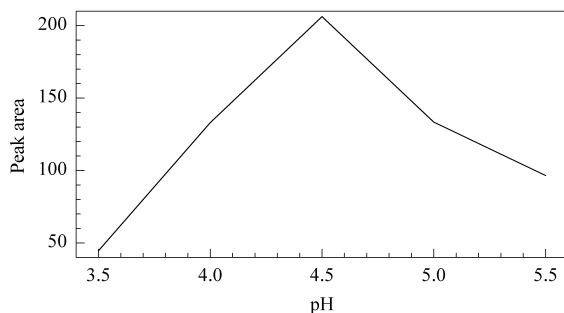


图2 不同pH条件下葡萄糖的峰面积

Fig. 2 Peak area of glucose at different pH values

由于在反应初始阶段,底物麦芽糖的浓度足以使酶饱和,酶的浓度与酶解反应的初速度成正比,所以与酶解产物葡萄糖的生成量也呈线性关系。但是随着酶解反应的进行,酶解产物的浓度逐渐升高,将抑制酶解反应向正方向进行,导致酶解产物的增加量也减少,其浓度与酶的浓度不再呈线性关系。所以必须找出酶浓度与反应速度呈正比的最佳时间段,通过比较24、48和72 h 3个不同反应时间下所得标准曲线的相关系数,可以发现随着反应时间的延长,酶解产物的量与酶浓度的线性关系逐渐变差。另外考虑到在相对较长的反应时间下,酶解产物的峰面积较大,这样有利于降低方法的检出限。因此综合上述因素选择反应时间为48 h。

2.2 样品预处理

麦芽糖经过 γ -淀粉酶酶解后的产物为葡萄糖,由于蜂蜜中含有大量的葡萄糖,会抑制反应向正方向进行,这样就会干扰 γ -淀粉酶的检测,所以考虑用凝胶色谱柱对蜂蜜进行预处理。

本文采用分子体积排阻色谱法,以聚丙烯酰胺凝胶色谱柱对样品进行预处理。根据被分离物质的分子大小、扩散到凝胶孔隙内的速度不同,通过色谱

柱的速度也不同,从而达到将 γ -淀粉酶与葡萄糖分离的目的。由于 γ -淀粉酶的分子体积较大,不易进入凝胶颗粒的微孔,而只能分布在凝胶颗粒之间,所以在洗脱时以较快移动的速度通过色谱柱。而蜂蜜中的葡萄糖、果糖等小分子除了可在凝胶颗粒间隙中扩散外,还可以进入凝胶颗粒的微孔中,即进入凝胶相内,向下移动的速度比较慢。

为了优化色谱柱分离条件,以确定哪段洗脱液含有酶,实验中称取 2.00 g 蜂蜜于 10 mL 容量瓶中,加入一定量的 γ -淀粉酶标准溶液,以少量水溶解并定容后过 0.45 μm 的水相滤膜。移取上述滤液 5.0 mL 加入色谱柱中,该溶液流尽后,每次以 0.5 mL 水冲洗,同时收集 0.5 mL 洗脱液。总计收集 10.0 mL 洗脱液。

上述分段收集的洗脱液按照 1.2 节实验条件进行酶解反应,用 LC-IRMS 检测酶解产物葡萄糖的含量。结果表明,前 3 mL 未检测到葡萄糖,从第 3.5 mL 至第 8.0 mL 能检测到葡萄糖,第 8.5 mL 开始虽然也能检测到葡萄糖,但同时能检测到果糖,表明该段洗脱液已经包含蜂蜜自身的果糖和葡萄糖。

上述实验可以确定第 3.5 mL 至第 8.0 mL 这 5 mL 洗脱液含有 γ -淀粉酶,即为能排除蜂蜜基质干扰的 γ -淀粉酶水溶液。

2.3 方法的线性范围、精密度和回收率

2.3.1 线性范围和检出限

取不同浓度的 γ -淀粉酶,按 1.3 节进行操作,以酶解产物葡萄糖峰面积 A ($\text{mV} \cdot \text{s}$) 对酶的含量 C (U/kg) 作图建立标准曲线,酶的含量与葡萄糖峰面积有良好的线性关系,线性范围为 5 ~ 200 U/kg ,标准曲线方程为 $A = 3.432C + 19.53$,相关系数(r^2) > 0.99。同时在纯正蜂蜜中添加低浓度水平的酶标准溶液,获得信噪比等于 10 ($S/N = 10$) 时的酶含量 5 U/kg ,以此为本方法的定量限。

2.3.2 精密度和回收率

以不含 γ -淀粉酶的纯正蜂蜜为基质做添加回收实验,选择了 4 种常见品种的蜂蜜(洋槐蜜、油菜蜜、荆条蜜和椴树蜜),添加水平分别为 20、50 和 100 U/kg ,每个添加水平测定 6 次,计算得到的回收率和实验室内精密度(见表 1)。结果表明,4 种蜂蜜样本的回收率为 89.6% ~ 108.2%,相对标准偏差(RSD)为 3.3% ~ 4.9%,可见本方法具有较高的精密度,并且对于常见蜜种的检测具有较好的适用性。

同样选取上述 4 种蜜种的蜂蜜,经实验室外 5 家单位对每个蜜种测定 3 个浓度水平,方法的实验室间相对标准偏差为 4.3% ~ 5.8%。由结果可以看

出,方法精密度高、实用性强、可操作性好,适用于蜂蜜中 γ -淀粉酶的检测。

表 1 4 种蜂蜜样品中 γ -淀粉酶的回收率及相对标准偏差 ($n=6$)
Table 1 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of γ -amylase in four honey samples ($n=6$)

| Species | Added/ (U/kg) | Found/ (U/kg) | Recovery/ % | RSD/ % |
|--------------|------------------|------------------|----------------|-----------|
| Vitex honey | 20 | 20.6 | 103.0 | 4.4 |
| | 50 | 53.0 | 106.1 | 3.3 |
| | 100 | 104.9 | 104.9 | 3.5 |
| Acacia honey | 20 | 17.9 | 89.6 | 4.6 |
| | 50 | 46.6 | 93.2 | 4.6 |
| | 100 | 99.0 | 99.0 | 3.9 |
| Rape honey | 20 | 20.9 | 104.3 | 4.9 |
| | 50 | 50.7 | 101.3 | 4.2 |
| | 100 | 106.3 | 106.3 | 4.4 |
| Linden honey | 20 | 20.9 | 104.6 | 4.5 |
| | 50 | 50.5 | 101.1 | 4.7 |
| | 100 | 108.2 | 108.2 | 4.4 |

2.4 方法应用

以国内外各地区 12 个蜜种 30 个蜂蜜样本为研究对象,从酶的角度分析这些蜂蜜是否为纯正蜂蜜。由于天然纯正蜂蜜中不含有 γ -淀粉酶,而本方法定量限为 5 U/kg ,因此当检测到样本中 γ -淀粉酶含量 > 5 U/kg 时,即判定该样品含有 γ -淀粉酶,为掺假蜂蜜。经过检测,上述纯正蜂蜜均未检出 γ -淀粉酶(见图 3),从酶学的角度进一步验证了上述蜂蜜为纯正蜂蜜。

同时选取 20 个日常检测蜂蜜样品和 18 个糖浆样品,采用本方法检测 γ -淀粉酶的残留量,用于进一步验证本方法鉴定掺假蜂蜜的能力。检测结果表明,有 29 个样本检出含有 γ -淀粉酶,检出率为

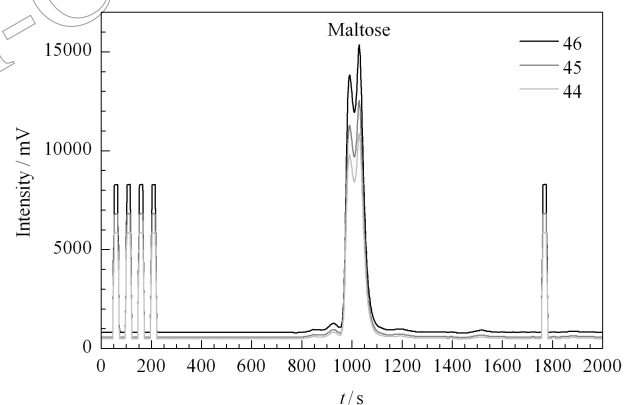


图 3 纯正蜂蜜样品的 LC-IRMS 图

Fig. 3 LC-IRMS chromatogram of an authentic honey sample

HPLC column: Carboximix Ca-NP5 (8%, 300 mm \times 7.8 mm, 5 μm); mobile phase: water; flow rate: 350 $\mu\text{L}/\text{min}$; column temperature: 85 $^{\circ}\text{C}$. IRMS oxidation oven temperature: 99.9 $^{\circ}\text{C}$.

76.3%。其中 20 个蜂蜜样品的检出率为 75%；18 个糖浆样品中有 14 个含有 γ -淀粉酶,检出率为 77.8%,表明这 14 个样本为大米糖浆。

糖浆样本中有 6 个样本为反映大米糖浆生产流程的样本,依次为米浆出料、液化出料、糖化出料、过滤脱渣出料、离子交换出料和异构化出料,这 6 个样本中 γ -淀粉酶的含量依次为 <5、<5、287.3、286.3、47.3 和 32.6 U/kg。

米浆出料为大米磨成粉后加入水溶解的样本,按照生产工艺尚未添加 γ -淀粉酶;液化出料是在米浆出料中加入 α -淀粉酶进行液化反应,产物为高含量的麦芽糖和其他低聚糖;糖化出料为液化出料中加入 γ -淀粉酶进行糖化反应,将麦芽糖酶解为葡萄糖,因此该料中的 γ -淀粉酶含量很高,底物麦芽糖被完全酶解为葡萄糖;过滤脱渣出料为液化出料经过过滤,脱去一些残渣后的出料,同样该料中 γ -淀粉酶的含量很高,与液化出料中 γ -淀粉酶的含量接近;离子交换出料为过滤脱渣出料经过离子交换树脂后得到的中间产品,该料 γ -淀粉酶含量明显降低,可能大部分的酶被树脂吸附;异构化出料为在离子交换出料中加入异构化酶,将部分葡萄糖转化为果糖,得到的产品主要含有果糖和葡萄糖,在糖的组成方面与蜂蜜比较相似,利用常规检测技术无法鉴定出该样本为大米糖浆,但利用本方法可以检测到该样本中含有 γ -淀粉酶(见图 4),含量为 32.6 U/kg,从而能鉴定出该样本含有大米糖浆。

为了进一步验证本方法对蜂蜜中掺入大米糖浆的鉴定能力,本文选取纯正蜂蜜和大米糖浆样本各 1 个,在该纯正蜂蜜中掺入 15% (质量分数) 的大米糖浆,采用本方法进行检测,测得该样本中 γ -淀粉酶含量为 10.2 U/kg(见图 5)。

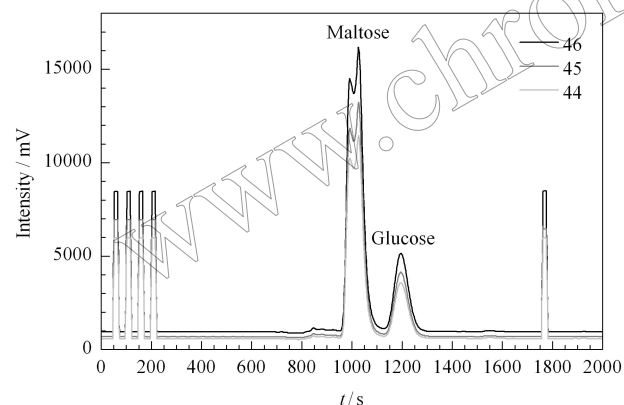


图 4 异构化处理后的米糖浆样品的 LC-IRMS 图
Fig. 4 LC-IRMS chromatogram of a rice syrup sample after isomerization

Conditions are the same as in Fig. 3.

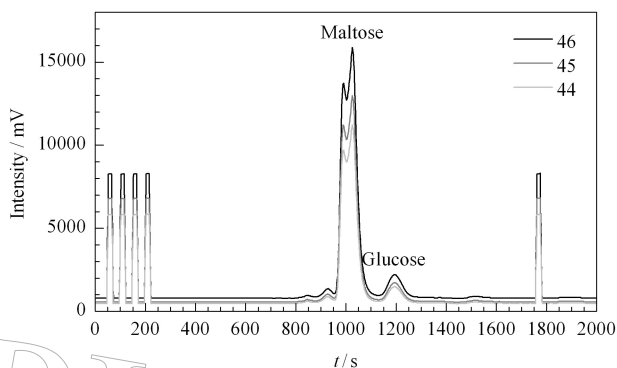


图 5 掺入 15% 大米糖浆的蜂蜜样品的 LC-IRMS 图
Fig. 5 LC-IRMS chromatogram of a honey sample adulterated with 15% rice syrup
Conditions are the same as in Fig. 3.

3 结论

本文提出一种检测蜂蜜中外源性 γ -淀粉酶残留量的检测方法,样品经过凝胶色谱柱预分离后进行酶解反应,利用酶解产物的量与酶含量之间的对应关系检测酶的残留量,方法的线性范围为 5 ~ 200 U/kg,定量限为 5 U/kg。本方法灵敏度较高,精密度高,可从酶学的角度鉴定蜂蜜中大米糖浆的掺假,有力地提高了蜂蜜掺假的检测能力。

参考文献:

- [1] Megherbi M, Herbreteau B, Faure R, et al. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(6): 2105
- [2] Cotte J F, Casabianca H, Giroud B, et al. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378(5): 1342
- [3] Kelly J D, Petisco C, Downey G. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(17): 6166
- [4] GB/T 18932.2-2002
- [5] Bertelli D, Lolli M, Papotti G, et al. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(15): 8495
- [6] GB/T 18932.1-2002
- [7] Fei X Q, Wu B, Shen C Y, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (费晓庆, 吴斌, 沈崇钰, 等. 色谱), 2011, 29(1): 15
- [8] Chen T D, Lin X H. *Journal of Zhejiang University of Technology* (陈廷登, 林夕慧. 浙江工业大学学报), 2005, 33(5): 576
- [9] Serrano S, Espejo R, Villarejo M, et al. *Int J Food Sci Tech*, 2007, 42(1): 76
- [10] Zhang B J, Cheng C S, Hu F L. *Journal of Bee* (章彬佳, 程春生, 胡福良. 蜜蜂杂志), 2007, 28(6): 11
- [11] Buckow R, Heinz V, Knorr D. *Trans IChemE, Part C, Food Bioprod Process*, 2005, 83(C3): 220
- [12] Shi J G, Zhou F Z, Yang M H, et al. *Chinese Journal of Biotechnology* (史建国, 周凤臻, 杨明慧, 等. 生物工程学报), 1996, 12(S1): 226
- [13] Sutthirak P, Dharmstithi S, Lertsiri S. *Process Biochem*, 2005, 40(8): 2821
- [14] GB 8276-2006