

# 功能性骨胶原多肽提取前处理的 脱脂脱钙条件研究

唐莹莹<sup>1</sup>, 罗爱平<sup>1,\*</sup>, 何光中<sup>2</sup>, 郎小琴<sup>1</sup>, 陈 维<sup>1</sup>

(1. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省畜牧兽医科学研究所, 贵州 贵阳 550000)

**摘 要:** 将牛骨制备成骨泥为试验材料, 对提取牛骨胶原多肽的前处理脱脂脱钙条件进行研究。比较石油醚、无水乙醇、正己烷 3 种脱脂剂的脱脂效果; 在单因素试验基础上利用二次正交旋转组合设计优化脱钙条件。结果表明: 脱脂工艺最佳条件为无水乙醇作为骨泥脱脂剂, 骨泥与无水乙醇料液比 1:20(g/mL)、150r/min 振荡浸泡脱脂 24h, 骨泥脱脂率可达 97.46%。骨泥柠檬酸脱钙工艺最佳条件为柠檬酸浓度 0.43mol/L、脱钙时间 16h、料液比 1:21(g/mL), 脱钙率可达 96.53%。

**关键词:** 骨泥; 脱脂; 脱钙; 二次正交旋转组合设计

## Optimization of Process Condition for Defatting and Decalcification of Bovine Bone before Extraction of Functional Collagen Polypeptides

TANG Ying-ying<sup>1</sup>, LUO Ai-ping<sup>1,\*</sup>, HE Guang-zhong<sup>1</sup>, LANG Xiao-qin<sup>1</sup>, CHEN Wei<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Guizhou Provincial Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Guiyang 550000, China)

**Abstract:** The defatting and decalcification of bovine bone paste before extraction of functional collagen polypeptides was optimized with respect to the selection of defatting agent and decalcification conditions including citric acid concentration, soaking time and solid-to-liquid ratio. Absolute ethanol was found to be the best defatting solvent among the investigated three. Following one-factor-at-a-time experiments, a quadratic orthogonal rotation combination design was performed to optimize the decalcification conditions. The best results for the defatting and decalcification of bovine bone paste were obtained as a defatting rate of 97.46% and a decalcification rate of 96.53% by suspension in absolute ethanol at a solid-to-liquid ratio of 1:20 (g/mL) with shaking at 150 r/min and then decalcification for 16 h with 0.43 mol/L citric acid at a solid-to-liquid ratio of 1:21 (g/mL).

**Key words:** bone paste; defatting; decalcification; quadratic orthogonal rotation combination design

中图分类号: TS251

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)24-0064-05

胶原多肽是胶原经蛋白酶等降解处理后制得的分子质量低于 10000D、具有较高消化吸收性且不被三氯乙酸(TCA)所沉淀的肽类物质<sup>[1]</sup>。是涉及生物体内各种细胞功能的生物活性物质, 具有优越的加工特性和生理功能, 能抑制皮肤老化及各种损伤<sup>[2]</sup>。尤其具有美容功效、预防关节炎及骨质疏松症效果<sup>[3]</sup>, 可开发出美容饮料和预防骨质疏松症等功能性食品。

动物骨中除富含胶原蛋白外还含有脂肪及钙、磷等矿物质<sup>[4]</sup>。骨中钙主要以羟基磷灰石的形式存在, 羟基

磷灰石与胶原有机结合形成坚硬难溶的骨盐沉积在胶原表面<sup>[5]</sup>, 因此水解胶原蛋白前应进行脱钙处理, 降低胶原蛋白中无机杂质的含量, 得到纯度高的胶原多肽。骨中含脂量过多, 在水解过程中将生成难溶的脂肪酸钙沉积在骨的表面, 严重地妨碍酶水解反应的进行<sup>[6]</sup>。此外, 脂肪含量过高, 还会影响胶原多肽的色泽和透明度<sup>[7]</sup>。

目前, 大都采用盐酸等强酸脱钙, 但强酸易导致胶原变性<sup>[8]</sup>, 影响胶原多肽的结构和功能。脱脂常采用

收稿日期: 2011-06-23

基金项目: 贵州省科技厅资助项目(黔科合 NY 字[2007]3021 号); 贵州省肉牛产业技术体系建设专项(GZCYTX-0301-03)

作者简介: 唐莹莹(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药食资源利用。E-mail: yingying243546928@163.com

\* 通信作者: 罗爱平(1958—), 女, 教授, 学士, 研究方向为畜产品加工。E-mail: luoaiping58@126.com

正己烷、石油醚及乙醚静置浸泡脱脂、乙醚低温回流等方法脱脂。本研究在低温条件下制备牛骨泥为试验材料,考察牛骨胶原多肽提取前处理——脱脂、脱钙条件,在最大程度保持胶原多肽活性前提下,为提取高品质胶原多肽提供技术参数。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

新鲜牛管骨、扁骨 贵阳花溪农贸市场。

柠檬酸(食品级)、正己烷、无水乙醇、石油醚(沸点 60~90℃)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、三乙醇胺、氯化钙、氨水等均为分析纯;铬黑 T 指示剂。

### 1.2 仪器与设备

WH-10 切割机 日本三洋株式会社;高速万能粉碎机 东莞市创瑞工业试验设备有限公司;THZ-98A 恒温振荡培养箱 上海一恒科技有限公司;FA2004N 电子天平 上海民桥精密科学仪器有限公司;HI98128 型 pH 计 北京惠通卓越科技发展有限公司。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 骨泥制备

工艺流程:牛管骨、扁骨各 50%→清洗去血污→冷冻 48h→切割→粗粉碎→加冰屑细粉碎→骨泥。

操作要点:牛骨置于-18℃冷冻 48h,切割、粗粉碎。细粉碎时加冰屑控制温度,保持温度在 10℃以下,骨与冰屑的添加比例为 3:1,骨泥冷藏保存备用。

#### 1.3.2 骨泥脱脂工艺

分别采用石油醚、无水乙醇、正己烷 3 种不同的脱脂剂,骨泥与脱脂剂的料液比为 1:20(g/mL),150r/min 振荡浸泡 24h 脱脂,测定脱脂前后骨泥中脂肪质量,比较 3 种脱脂剂的脱脂效果,计算脱脂率。

$$\text{脱脂率}/\% = \frac{\text{脱脂前骨泥中脂肪质量} - \text{脱脂后骨泥中脂肪质量}}{\text{脱脂前骨泥中总脂肪质量}} \times 100$$

#### 1.3.3 骨泥脱钙工艺

##### 1.3.3.1 单因素试验

选择柠檬酸溶液为脱除骨泥中钙的脱钙液<sup>[9]</sup>。研究不同柠檬酸浓度、反应时间、料液比对骨泥脱钙效果的影响,以脱钙液中钙含量为指标,确定合适的脱钙条件对钙溶出量的影响,通过测定脱钙液中钙离子的含量,确定合适的脱钙条件。骨泥脱钙率计算公式为:

$$\text{脱钙率}/\% = \frac{\text{柠檬酸溶液中含钙总量}}{\text{骨泥中含钙总量}} \times 100$$

##### 1.3.3.2 二次正交旋转组合试验

在单因素试验基础上,根据 Box-Behnken 模型设计原理<sup>[10]</sup>,以柠檬酸脱钙液中钙含量为响应值,进行三因素三水平二次正交旋转组合试验,优化骨泥脱钙条件。

#### 1.3.4 骨泥基本成分的测定

水分测定:参照 GB 5009.3—2010《食品中水分的测定》直接干燥法;灰分测定:参照 GB 5009.4—2010《食品中灰分的测定》灼烧称重法;脂肪测定:参照 GB/T 22223—2008《食品中总脂肪、饱和脂肪(酸)、不饱和脂肪(酸)的测定:索氏抽提法》;蛋白质、总氮量测定:参照 GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定:微量凯氏定氮法》;pH 值测定:pH 测定仪测定。

#### 1.3.5 钙含量测定

钙标准溶液的配制<sup>[11]</sup>:准确称取已质量恒定的无水氯化钙 11.0984g,定容至 1000mL,配制成 0.1mol/L 的氯化钙溶液,此时钙离子的质量浓度为 4mg/mL。

钙标准曲线的制定:分别精确吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0mL 的氯化钙溶液于 100mL 的三角瓶中,每瓶准确补双蒸水至总体积为 10mL。分别在待测液中加入 3mL 三乙醇胺溶液,20mL 的氨水缓冲溶液,2 滴铬黑 T 指示剂,摇匀,用 0.01mol/L EDTA 标准溶液滴定至溶液由紫红色变蓝,平行滴定 3 次。以 EDTA 滴定体积和钙浓度作图得到钙标准曲线。

骨泥脱钙液中钙含量的测定采用 EDTA 滴定法<sup>[12]</sup>:取脱钙液 1mL,加水 9mL,分别加入 3mL 三乙醇胺和 20mL 的氨水缓冲溶液,2 滴铬黑 T 指示剂,以标准 EDTA 溶液滴定到溶液由紫蓝色转为蓝色。根据标准回归方程求解脱钙液中钙含量。

#### 1.3.6 数据处理

每组数据平行测定 3 次,采用 Design Expert 7.1.6 软件进行二次正交旋转组合试验设计,并对数据分析处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 骨泥的基本成分

#### 2.1.1 钙质量浓度标准曲线的制作

以 EDTA 标准溶液滴定钙标准溶液,得到滴定体积 y(mL)与钙离子质量浓度 x(mg/mL)的关系,通过线性回归得到标准方程:  $y = 9.9593x - 9.66 (R^2 = 0.9997)$ 。

#### 2.1.2 骨泥的基本成分

骨泥中水分含量为 75.66%,蛋白质 9.30%,脂肪 5.48%,灰分 8.17%。由标准曲线方程计算出骨泥中钙含量为 4.32mg/mL。

### 2.2 骨泥脱脂试验

石油醚、无水乙醇、正己烷3种脱脂剂对骨泥脱脂效果的影响,结果见图1。

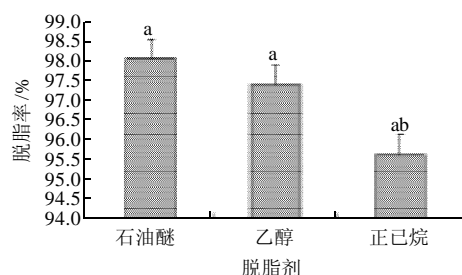


图1 不同脱脂剂对骨泥脱脂效果的影响

Fig.1 Effect of defatting agents on defatting rate of bone cement

由图1可知,石油醚、无水乙醇、正己烷脱脂率分别为98.12%、97.46%、95.65%。石油醚脱脂效果比无水乙醇、正己烷分别提高0.6%、2.5%,差异不显著( $P > 0.05$ )。

比较3种脱脂剂的脱脂效果,石油醚优于无水乙醇、正己烷,差异不显著( $P > 0.05$ )。但鉴于石油醚价格较高,且有刺激性气味,作为功能性食品及化妆品等领域的应用,存在溶剂残留及安全隐患;无水乙醇价格便宜,无刺激性气味,无毒副作用。故选择无水乙醇为脱脂剂。

## 2.3 骨泥脱钙试验

### 2.3.1 骨泥脱钙单因素试验

#### 2.3.1.1 柠檬酸浓度对骨泥脱钙率的影响

选择柠檬酸浓度0.2、0.3、0.4、0.5、0.6mol/L,固定骨泥与脱钙液料液比为1:20(g/mL)、脱钙时间15h,考察柠檬酸浓度对骨泥脱钙率的影响,结果见图2。

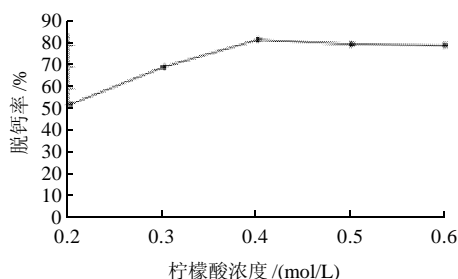


图2 柠檬酸浓度对骨泥脱钙率的影响

Fig.2 Effect of citric acid concentration on decalcification rate

由图2可知,随着柠檬酸浓度的增加,骨泥脱钙率呈急剧上升趋势,当柠檬酸浓度达到0.4mol/L时,达最大脱钙率82.8%,后随柠檬酸浓度的增加逐渐趋于平

缓,表明随柠檬酸浓度的增加,骨泥脱钙率不再上升。故选择柠檬酸浓度0.4mol/L。

#### 2.3.1.2 脱钙时间对骨泥脱钙率的影响

固定0.4mol/L柠檬酸溶液、料液比1:20,脱钙时间分别选择5、10、15、20、25h,考察脱钙时间对骨泥脱钙率的影响,结果见图3。

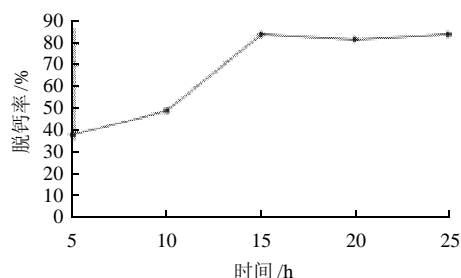


图3 脱钙时间对骨泥脱钙率的影响

Fig.3 Effect of decalcification time on decalcification rate

由图3可知,随脱钙时间的延长,脱钙液中钙含量逐渐增大,在15h骨泥脱钙率可达最大值84.5%,后随脱钙时间的增加而趋于平稳,这可能是由于随脱钙时间的进行,柠檬酸处理后形成的膜覆盖在骨泥表面,阻碍了脱钙反应的进行。故选择脱钙时间为15h。

#### 2.3.1.3 料液比对骨泥脱钙率的影响

固定柠檬酸溶液浓度0.4mol/L、脱钙时间15h,料液比分别选取1:5、1:10、1:15、1:20、1:25,考察料液比对骨泥脱钙率影响,结果见图4。

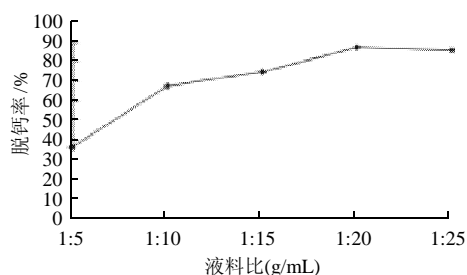


图4 料液比对骨泥脱钙率的影响

Fig.4 Effect on solid-to-liquid ratio on decalcification rate

由图4可知,当料液比为1:5时,骨泥与脱钙液未能充分接触,因此骨泥脱钙液中钙含量较低。随着料液比的增加,骨泥脱钙液中钙含量迅速提高,当料液比为1:20时,骨泥脱钙率最大值可达87.3%,随后随料液比的增加,骨泥脱钙率呈平稳趋势。故选择料液比为1:20作为骨泥脱钙的反应条件。

## 2.3.2 骨泥脱钙的二次正交旋转组合试验

为优化脱钙工艺条件,将筛选出的单因素进行三因素三水平二次正交旋转组合试验,因素水平见表1,结果见表2。

表1 骨泥脱钙二次正交旋转组合试验分析因素及水平表

Table 1 Coded values and corresponding real values of the optimization parameters used in quadratic orthogonal rotation combination design

| 因素            | 编号 | 水平   |      |      |
|---------------|----|------|------|------|
|               |    | -1   | 0    | 1    |
| 柠檬酸浓度/(mol/L) | A  | 0.3  | 0.4  | 0.5  |
| 时间/h          | B  | 10   | 15   | 20   |
| 料液比(g/mL)     | C  | 1:15 | 1:20 | 1:25 |

表2 骨泥脱钙二次正交旋转组合试验结果

Table 2 Quadratic orthogonal rotation combination design matrix and results

| 试验号 | A  | B  | C  | 脱钙率/% |
|-----|----|----|----|-------|
| 1   | -1 | -1 | 0  | 41.2  |
| 2   | 1  | -1 | 0  | 59.9  |
| 3   | -1 | 1  | 0  | 64.4  |
| 4   | 1  | 1  | 0  | 262.9 |
| 5   | -1 | 0  | -1 | 49.1  |
| 6   | 1  | 0  | -1 | 56.7  |
| 7   | -1 | 0  | 1  | 48.8  |
| 8   | 1  | 0  | 1  | 89.4  |
| 9   | 0  | -1 | -1 | 50.2  |
| 10  | 0  | 1  | -1 | 60.4  |
| 11  | 0  | -1 | 1  | 53.5  |
| 12  | 0  | 1  | 1  | 72.7  |
| 13  | 0  | 0  | 0  | 86.8  |
| 14  | 0  | 0  | 0  | 87.2  |
| 15  | 0  | 0  | 0  | 92.1  |
| 16  | 0  | 0  | 0  | 95.1  |
| 17  | 0  | 0  | 0  | 96.5  |

采用 Design Expert 7.0 软件对表2结果进行分析,结果见表3。

表3 回归分析表

Table 3 Variance analysis for the established regression model

| 来源             | 平方和     | 自由度 | 均方      | F值    | P值     | 显著性 |
|----------------|---------|-----|---------|-------|--------|-----|
| 模型             | 5348.24 | 9   | 594.25  | 17.66 | 0.0005 | **  |
| A              | 534.65  | 1   | 534.65  | 15.89 | 0.0053 | **  |
| B              | 386.42  | 1   | 386.42  | 11.48 | 0.0116 | *   |
| C              | 288.00  | 1   | 288.00  | 8.56  | 0.0222 | *   |
| AB             | 102.01  | 1   | 102.01  | 3.03  | 0.1252 |     |
| AC             | 272.25  | 1   | 272.25  | 8.09  | 0.0249 | *   |
| BC             | 20.25   | 1   | 20.25   | 0.60  | 0.4633 |     |
| A <sup>2</sup> | 1121.44 | 1   | 1121.44 | 33.32 | 0.0007 | **  |
| B <sup>2</sup> | 1382.46 | 1   | 1382.46 | 41.08 | 0.0004 | **  |
| C <sup>2</sup> | 851.40  | 1   | 851.40  | 25.30 | 0.0015 | **  |
| 残差             | 235.58  | 7   | 33.65   |       |        |     |
| 失拟项            | 156.69  | 3   | 52.23   | 2.65  | 0.1851 |     |
| 纯误差            | 78.89   | 4   | 19.72   |       |        |     |
| 总离差            | 5583.82 | 16  |         |       |        |     |

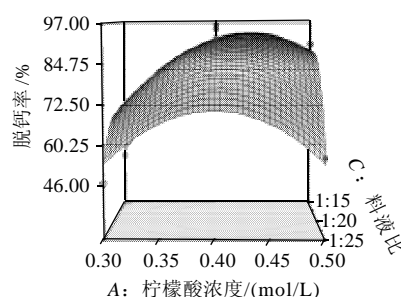
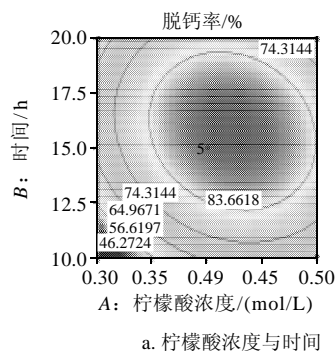
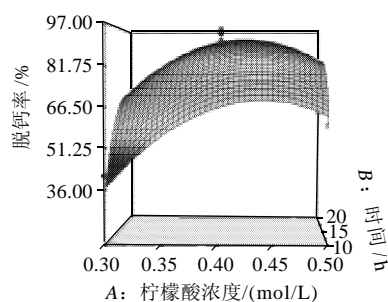
注: \*.差异显著( $P < 0.05$ ); \*\*.差异极显著( $P < 0.01$ )。

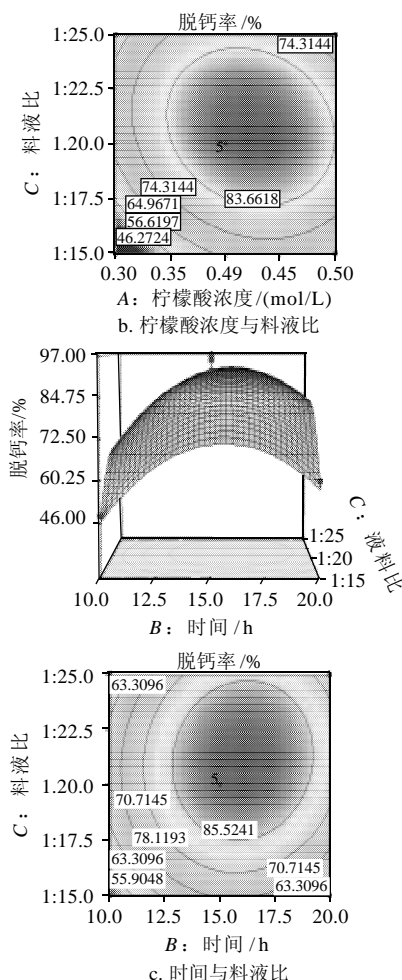
用 Design Expert 7.0 软件,对表3试验数据进行二次多项式回归拟合,得到二次多元回归方程:

$$Y = 91.54 + 8.18A + 6.95B + 6C - 5.05AB + 8.25AC + 2.25BC - 16.32A^2 - 18.12B^2 - 14.22C^2$$

由表3可知,模型极显著( $P < 0.01$ ),失拟项不显著,表明回归方程对试验拟合情况较好,试验结果与模型计算结果无显著差异。回归方程中各变量对响应值(骨泥脱钙率)影响的显著性由  $F$  检验来判定,概率  $P$  的值越小,则相应变量的显著程度越高。表3中  $A$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  各项  $P$  值均小于 0.01,为高度显著;而  $B$ 、 $C$ 、 $AC$  项  $P$  值大于 0.01 小于 0.05,为显著; $AB$ 、 $BC$  项大于 0.05,为不显著,结果表明每个因素对脱钙液中钙含量的影响都显著,因此可以利用该回归方程确定最佳提取工艺条件。三个因素对响应值影响的强烈程度顺序为  $A > B > C$ 。即柠檬酸浓度对骨泥脱钙率的影响最大,时间的影响次之,料液比的影响最小。

用 Design Expert 7.0 做各两因素交互作用对脱钙率影响的响应曲面图及等高线图,见图5。





固定水平: 柠檬酸浓度 0.4mol/L, 时间 15h, 料液比 1:20。

图5 各两因素交互作用对脱钙率影响的响应面及等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots for the interactive effect of three process conditions on decalcification rate

响应曲面出现最高点, 在等高线面具有椭圆形中心区域。表明因素在所选择范围内能产生最佳的响应值, 因素的选择在试验范围内合理有效, 能够反映出响应值的影响趋势。响应曲面坡度较大, 未出现最高点; 在等高线面上具有部分椭圆形中心区域<sup>[13]</sup>。表明具有交互作用, 但无最佳响应值。极值条件应在等高线的椭圆圆心处。为得到脱钙液中钙含量的最佳条件, 令回归方程一阶偏倒数等于零, 整理得到方程组, 方程组解即为三因素的代码值, 将代码转化得到最佳脱钙条件: 柠檬酸浓度 0.43mol/L, 反应时间 15.84h, 料液比 1:21.46。为生产操作及应用方便修正为柠檬酸浓度 0.43mol/L、反应时间 16h、料液比 1:21, 得骨泥脱钙率理论值为 96.30%。计算结果表明柠檬酸浓度、反应时间、料液比均在试验设计范围内。按最佳条件进行 3 次验证实验, 骨泥脱钙率为 96.53%, 与理论值 96.50% 相差 0.03 个百分点。

### 3 讨论

#### 3.1 强酸脱钙易导致胶原变性, 影响胶原多肽的结构

和功能。本实验采用柠檬酸脱钙, 柠檬酸主要由甜菜糖蜜、甘蔗糖蜜、玉米等天然物质生产, 是食品中应用广泛的食品添加剂, 为三元弱酸, 具有良好的缓冲作用, 无毒<sup>[14]</sup>。柠檬酸作用于蛋白质, 主要破坏蛋白质中的盐键和酯键等副价键, 使蛋白质二、三级结构受到破坏而变性分解<sup>[15]</sup>, 对于胶原蛋白, 使胶原中邻近胶原蛋白的连接处分解, 对蛋白质破坏较小<sup>[16]</sup>。脱除骨钙时对胶原影响小, 使胶原多肽保持活性和功能特性。

3.2 研究表明: 无水乙醇脱脂率 97.46%, 与刘丽莉等<sup>[12]</sup>报道的乙醚脱脂 99.95% 相比, 低 2.49%。这可能是由于选择的脱脂剂及对牛骨原料的处理各异。后者选择乙醚作脱脂剂, 该脱脂剂系易制毒毒品, 存在安全隐患、购置保存繁琐等问题; 无水乙醇使用安全、方便, 无刺激性气味, 无毒副作用。

### 4 结论

4.1 比较石油醚、无水乙醇、正己烷 3 种脱脂剂的脱脂效果。从安全性、经济性、可操作性、实用性等综合考虑, 选择无水乙醇作为功能性骨胶原多肽提取前处理的脱脂剂, 骨泥与无水乙醇料液比为 1:20、150r/min 振荡浸泡脱脂 24h, 骨泥脱脂率可达 97.46%。

4.2 在单因素基础上采用二次正交旋转组合试验设计优化骨泥脱钙条件为柠檬酸浓度 0.43mol/L、脱钙时间 16h、料液比 1:21, 骨泥脱钙率达 96.53%。

### 参考文献:

- [1] 李珂, 杨秀华, 扈麟, 等. 响应曲面法骨胶原蛋白酶解条件的优化[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 135-141.
- [2] 唐传核, 彭志英. 胶原的开发及利用[J]. 肉类研究, 2000, 14(3): 41-44.
- [3] 郭瑶, 曾名勇, 崔文莹. 水产胶原蛋白及胶原多肽的研究进展[J]. 水产科学, 2006, 25(2): 101-105.
- [4] 李帆, 贾冬英, 姚开. 骨胶原蛋白的制备及性能表征研究进展[J]. 食品科技, 2006, 12(10): 115-119.
- [5] NAGAI T, SUZUKI N. Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins[J]. Food Chemistry, 2000, 68(3): 277-281.
- [6] 赵帅, 巩旭, 李国英. 猪皮的不同脱脂方法对胶原提取率的影响[J]. 中国皮革, 2007, 36(9): 33-36.
- [7] 田昌林, 鲍忠剑, 田文儒. 丙酮法和碱法脱脂对胶原蛋白生产的影响[J]. 动物医学进展, 2007, 28(4): 43-47.
- [8] 熊善柏. 鱼鳞胶原蛋白的提取与胶原海绵的制备研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [9] 吴波, 陈运中, 律佳雪. 响应面分析法优化鱼鳞脱钙条件的研究[J]. 食品科学, 2008, 30(29): 181-185.
- [10] LIU Jing, GUAN Xiao, ZHU Daqi, et al. Optimization of the enzymatic pretreatment in oat bran protein extraction by particle swarm optimization algorithms for response surface modeling[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(10): 1913-1918.
- [11] 张丰香, 许时婴, 王璋. 鱼鳞明胶生产的浸酸脱钙工艺研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(3): 199-203.
- [12] 刘丽莉, 马美湖, 杨协力. 牛骨 I 型胶原蛋白提取及结构表征[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 87-92.
- [13] LIANG Renjie. Optimization of extraction process of *Glycyrrhiza glabra* polysaccharides by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74(4): 858-861.
- [14] 郑建光, 李忠杰, 项曙光. 柠檬酸生产工艺技术及进展[J]. 河北化工, 2006, 29(8): 20-23.
- [15] 尹彦洋, 罗爱平, 伍贤位, 等. 柠檬酸与胃蛋白酶协同水解牛骨粉的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2010(3): 248-251.
- [16] 陈效兰, 雷钢铁. 柠檬酸在食品工业中的应用[J]. 食品研究与开发, 2000, 21(3): 6-7.