

# $\beta$ -聚苹果酸/壳聚糖在香精微胶囊制备中的应用

马霞,吴艳丽,俞鸿千

上海应用技术学院香精香料与工程技术学院,上海 201418

**摘要** 通过复凝聚法将 $\beta$ -聚苹果酸(PMA)与壳聚糖(CS)作为壁材,制得粒径为200~600nm,分散系数<0.30的具有长久缓释效果的香精微胶囊。通过Plackett-Burman(PB)实验和Box-Behnken Design(BBD)优化确定了制备缓释型香精微胶囊的最佳工艺条件,得出制备香精微胶囊的最优条件为:壳聚糖浓度1.5g/L,乳化时间45min、转速600r/min、反应时间60min,聚苹果酸浓度为1.0g/L,聚苹果酸(mL):壳聚糖(mL)=1:2,pH值为6.0,滴加速度为7.5mL/h,芯材添加量为1mL/15mL壁材。借助扫描电镜观察与壁材形成的微球形微胶囊,粒径为480.1nm,包埋率为28.57%,缓释效果持续长久。

**关键词**  $\beta$ -聚苹果酸;微胶囊;Plackett-Burman实验;Box-Behnken Design;缓释

**中图分类号** R318.08

**文献标志码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2013.04.008

## Application of $\beta$ -Poly-Malic Acid/Chitosan in the Preparation of Essence Microcapsule

MA Xia, WU Yanli, YU Hongqian

School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China

**Abstract** The paper studies the preparation of the fragrance microcapsule, of diameter in the range of 200–600nm and with the coefficient of dispersion less than 0.30, enjoying a long sustained-release effects, based on  $\beta$ -poly-malic acid (PMA) and chitosan (CS) as the wall materials. The Plackett-Burman design was adopted to select the most important nutrients and Box-Behnken Design was used to identify the optimum concentrations of the key nutrients. The optimum conditions were determined: the chitosan concentration of 1.5g/L, the emulsification of 45min, the rotational speed of 600r/min, the reaction time of 60min, the poly (malic acid) concentration of 1.0g/L, the ratio of poly (malic acid) to chitosan of 1:2, the pH value of 6.0, the dropping speed of 7.5mL/h, and the core material amount of 1mL. In the SEM observation of the micro-spherical microcapsules, the particle size is 481.0nm, and the embedding ratio is 28.57% with a continuous long-term releasing effect.

**Keywords**  $\beta$ -poly-malic acid; microcapsule; Plackett-Burman experiment; Box-Behnken Design; release

### 0 引言

$\beta$ -聚苹果酸( $\beta$ -poly-malic acid,PMA)是一种新型的生物高分子材料,具有易水解、易修饰、易降解等优良的生物特性。 $\beta$ -聚苹果酸是由L-苹果酸通过酯键聚合而成的,以3种形式存在,分别为 $\alpha$ -聚苹果酸、 $\beta$ -聚苹果酸、 $\gamma$ -聚苹果酸<sup>[1]</sup>。目前,研究发现在人体中仅存在 $\beta$ -聚苹果酸,因此 $\beta$ -聚苹果酸成为国内外研究的热点。根据 $\beta$ -聚苹果酸的生物特性,可将其应用到生物医药材料和化妆品中,通过与小分子结合制备药物缓释或者作为壁材进行微胶囊的包埋等。由于 $\beta$ -聚苹

果酸具有大量的游离羧基,能够与正电荷相结合,故将其与壳聚糖作为壁材进行微胶囊的制备来包埋香精。目前,微胶囊的制备方法分为物理方法、化学方法及物理化学方法<sup>[2]</sup>,本文根据壁材的性质采用复凝聚法进行微胶囊的制备,从而实现香精的包埋。微胶囊制备技术不仅节约了原料,降低了成本,而且能使药物和香精长久缓慢释放并降低毒副作用,被广泛应用到医药、食品和化妆品行业。 $\beta$ -聚苹果酸的分子结构如图1。

目前,Portilla-Arias等<sup>[3]</sup>将PMA作为药物载体,通过乳

收稿日期:2012-10-09;修回日期:2012-11-29

基金项目:上海市科委重点项目(10540501100)

作者简介:马霞,教授,研究方向为生物发酵工程,电子信箱:maxia0126@126.com

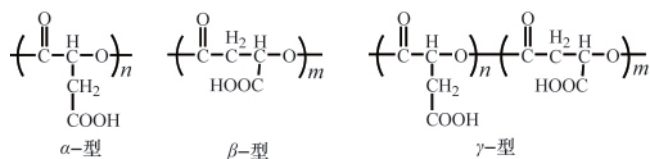


图 1 聚苹果酸的结构式

Fig. 1 The molecular structures of poly malic acid

化——溶剂挥发法与红霉素共同溶于氯仿中,通过观察后发现载药微囊的直径在 1~20 $\mu\text{m}$ ,红霉素能够很好地包埋在这些微球体内。当该载体负载 30%红霉素时,包封率达 92%。Abdellaoui 等<sup>[4]</sup>将抗肿瘤药物多柔比星(Dox)通过酰胺和 PMA 侧链上的羧基键合,形成 PMA-Dox 共聚物;Ljubimova 等<sup>[5]</sup>先对 PMA 侧链上的羧基进行共价修饰,与 IV-一羟基琥珀酰胺酯化反应,然后通过共聚形成酰胺,再通过二硫键与硫醚键将抗癌药物反义核苷酸和单克隆抗体与 PMA 共价键合。PMA 是具有生物相容性和生物降解性的聚羧酸。作为药物载体,其功能侧基—COOH 可与药物的活性物质结合,使药物能够缓释、长效的释放,同时还避免了某些生理毒性<sup>[6]</sup>。免疫学研究证明,PMA 无免疫原性。5-氟尿嘧啶是一种抗癌药物,其活性基团可与 PMA 的羧基形成疏水酯键、酰胺和氨基甲酰,能够有效地降低毒副作用,增加抗癌作用<sup>[7]</sup>。因此,将 PMA 用到医药和香精中能够大大提高人们的生活质量。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

$\beta$ -聚苹果酸(上海应用技术学院生物实验室自制),晚香玉(上海应用技术学院调香实验室提供),壳聚糖(CS,上海生物技术有限公司,分子量:1.5 $\times 10^5$ ,壳聚糖脱乙酰度 $\gg 90.0\%$ ),醋酸(国药集团化学试剂有限公司,T20090312)。

酸式滴定管(实验室常规用),恒温磁力搅拌器(524G,上海梅颖仪器仪表制造有限公司),UV757CRT 紫外可见分光光度计(上海精密仪器有限公司),YP1002N 电子天平(上海精密仪器有限公司),扫描电子显微镜(泰思肯贸易(上海)有限公司),Zetasizeva Nano ZS 型纳米粒度仪(英国 Malvern 仪器有限公司),pHS-3D 型 pH 计(上海三倍仪器厂),Fox-4000 气味指纹分析仪(电子鼻)(法国 AlphaM.O.S 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 $\beta$ -聚苹果酸的发酵提取及分析测定

用接种环挑 1 环出芽短梗霉,接种至种子发酵培养基内,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200r/min 条件下,摇床培养 3d。取 1mL 种子发酵液至 100mL 发酵培养基内,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200r/min 条件下,摇床培养 7d,然后进行分离提取。分离过程如图 2 所示<sup>[8,9]</sup>。

取发酵液离心去除菌体等杂质,取上清液除去多糖,离心后取 10mL 上清液加入 10mL 2mol/L 硫酸,90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 9h。取 1mL  $\beta$ -聚苹果酸水解液加 6mL 98%浓硫酸和 0.1mL 1mg/mL 的 2,7-萘二酚(浓硫酸溶解)溶液,沸水浴反应 20min,在最大吸收波长 390nm 处测其吸光值<sup>[10-12]</sup>,并根据

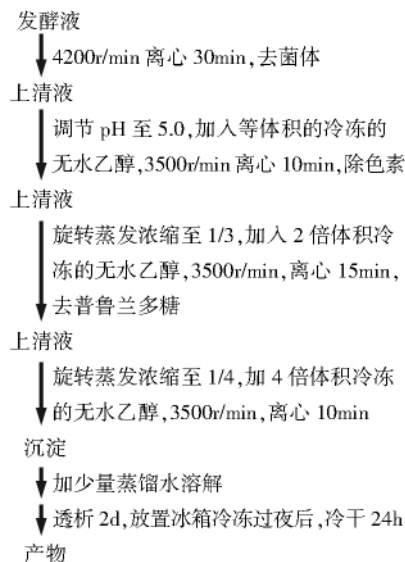


图 2  $\beta$ -聚苹果酸的提取过程

Fig. 2 The extraction process of the  $\beta$ -poly-malic acid

L-苹果酸标准曲线确定水解液中苹果酸的浓度,并转化为  $\beta$ -聚苹果酸的产量。

本文通过 TLC(薄层色谱法)、HPLC(高效液相色谱法)和液质联用、核磁等对  $\beta$ -聚苹果酸进行分析,发现  $\beta$ -聚苹果酸提取过程中结合了副产物普鲁兰糖,因普鲁兰糖是高分子物质,也被广泛用到医药等方面,考虑到成本及分离纯化的困难,本文忽略普鲁兰糖对实验结果的影响,分 3 步提纯,聚苹果酸的纯度 $>88\%$ 。

#### 1.2.2 微胶囊的制备

配制壳聚糖醋酸溶液,加入香精乳化剂复配溶液,在搅拌状态下,慢慢滴加  $\beta$ -聚苹果酸,滴加完后继续搅拌,得到微胶囊溶液,冷冻干燥得微胶囊产品<sup>[13]</sup>。

通过 Plackett-Burman 实验和 Box-Behnken Design 得到最优的条件<sup>[14,15]</sup>。

Plackett-Burman 实验是两水平的实验设计,通过对多个影响因素选择低水平和高水平如表 1 进行实验得出影响较显著的影响因素,从而对主要因素设计响应面进行筛选最优条件。

表 1 Plackett-Burman 设计中各因素的水平  
Table 1 The levels of various factors in Plackett-Burman Design

变量	条件	低水平(-)	高水平(+)
$X_1$	PMA/(g·L <sup>-1</sup> )	0.5	1.0
$X_2$	CS/(g·L <sup>-1</sup> )	2	4
$X_3$	PMA(mL):CS(mL)	0.5	2
$X_4$	乳化液添加量/mL	1	2
$X_5$	CS 的 pH 值	3	4
$X_6$	滴加后反应时间/min	30	60
$X_7$	滴速/(mL·h <sup>-1</sup> )	5	10
$X_8$	转速/(r·min <sup>-1</sup> )	200	400
$X_9$	PMA 的 pH 值	3	6

根据上述实验设计 Box-Behnken Design 如表 2, A 为壳聚糖浓度、B 为滴加后反应时间、C 为  $\beta$ -聚苹果酸的 pH 值、D 为滴加速度。

表 2 Box-Behnken 设计中各因素的水平

Table 2 The levels of various factors in Box-Behnken Design

水平编码	因素			
	A	B	C	D
-1	1.0	20	3.0	5.0
0	1.5	40	4.5	7.5
1	2.0	60	6.0	10.0

### 1.2.3 包埋率的测定

香精微胶囊包埋率的测定方法通常为热重法和紫外分析法,实验分别采用这两种方法进行测定,鉴于紫外分析方法操作简便,费用较低,以紫外分析法为首要方法<sup>[16]</sup>。首先配置一定浓度的香精-乙醇溶液进行最大吸收波长的扫描,测得最大吸收波长为 285nm,并配置 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10mg/mL 的香精溶液绘制标准曲线(图 3)。对香精微胶囊的包埋率进行测定。

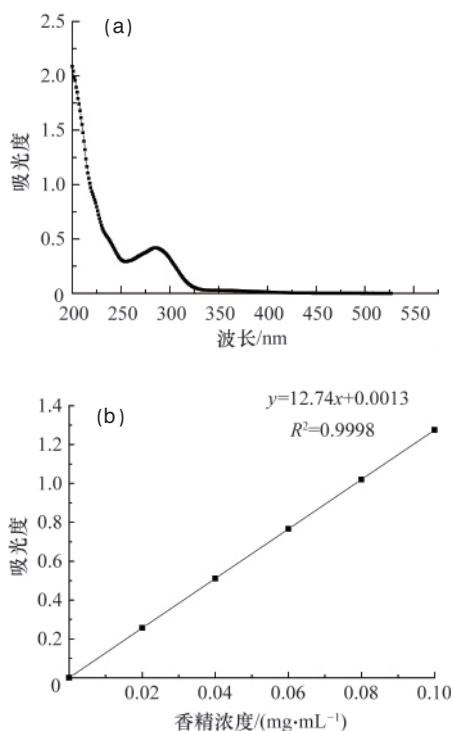


图 3 晚香玉香精的最大吸收波长(a)和晚香玉香精标准曲线(b)

Fig. 3 The maximum absorption wavelength of the tuberose flavor (a) and the standard curve of the tuberose flavor (b)

香精包埋率的测定公式为

$$\text{包埋率} = \frac{\text{原始香精添加量} - \text{溶液中香精含量}}{\text{原始香精添加量}} \times 100\% \quad (1)$$

### 1.2.4 缓释性能测定

香精微胶囊可以通过电子鼻测定其溶液中香精成分的含量来确定其缓释性能,也可以通过紫外分光光度计、热重法<sup>[17]</sup>等手段进行测定分析。在通过电子鼻测定香精微胶囊的缓释性能的实验中,分别取在室温下放置不同时间的晚香玉香精微胶囊。将香精微胶囊溶液敞口释放一定时间进行电子鼻测定,测定其香气释放效果。将制得的微胶囊溶液放置在室温下,每隔一段时间取一定量微胶囊溶液进行电子鼻分析。

电子鼻参考参数如下<sup>[18,19]</sup>。载气(合成干燥空气):流速 150mL/min;顶空产生参数:产生时间 120s,产生温度 60℃,搅动速度 500r/min;顶空注射参数:注射体积 1000 $\mu$ L,注射速度 1000 $\mu$ L/s,注射总体积 2.5mL,注射针温度 60℃;获取参数:获取时间 120s,延滞时间 60s。

## 2 结果和讨论

### 2.1 香精乳化

因晚香玉香气独特,实验选择晚香玉作为微胶囊的芯材,Tween-80 作为乳化剂对其乳化制备。同时也对香精与乳化剂的比值、水的添加量、乳化时间及其搅拌速度进行选择。

#### 2.1.1 香精与乳化剂比值的选择

根据前期实验经验确定水添加量为 50mL,乳化时间为 30min,搅拌速度为 600r/min,确定香精与乳化剂的比值,如图 4 所示。

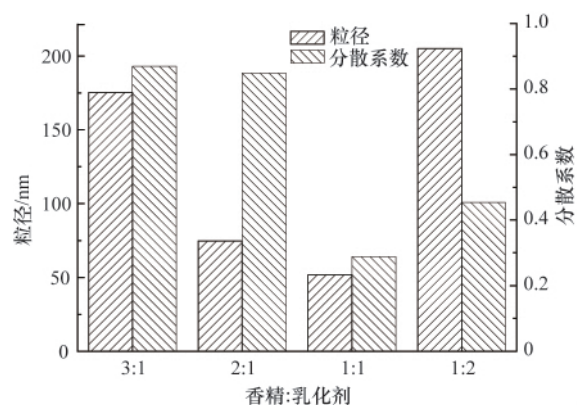


图 4 香精与乳化剂比值对乳化效果的影响

Fig. 4 The impact of flavor and emulsifier ratio on the emulsifying effect

当水添加量为 50mL、乳化时间为 30min、搅拌速度为 600r/min、香精与乳化剂比值为 1:1 时,粒径均一,体系稳定,重合性较好。当香精量增多时,乳化不均一,导致香精无法被彻底分散,使粒径增大,分散不均一而导致不稳定,使粒径分

布系数(PdI)变大;当乳化剂增多时,多余的乳化剂会分散在体系中,使整个体系的粒径不均一,同样会使粒径变大,PdI变大。

### 2.1.2 水的添加量的选择

固定香精与乳化剂的比值为 1:1, 乳化时间为 30min, 搅拌速度为 600r/min 时, 确定水的添加量, 如图 5 所示。

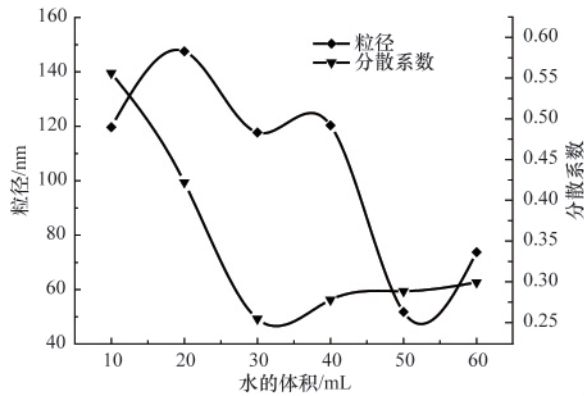


图 5 水的添加量对乳化效果的影响

Fig. 5 The impact of the amount of water added on the emulsifying effect

当香精比乳化剂为 1:1、乳化时间为 30min、搅拌速度为 600r/min、水的添加量为 50mL 时, 粒径及分散系数较优。当水添加量 < 30mL 时, 分散系数随着水量的增加而变小, 说明在少量水的情况下, 体系浓度过高而导致颗粒碰撞形成粒径不均一的颗粒, 分散系数较大, 整个体系不稳定; 当水添加量 > 30mL 时, 浓度较低, 存在较大的空间, 使分散系数变大。在水添加量依次增多的过程中, 粒径总体呈下降趋势, 在 50mL 时粒径最小, 同时分散系数虽较 30mL 时大, 仍能满足体系需要。

### 2.1.3 乳化时间的选择

当香精比乳化剂的比值为 1:1, 搅拌速度为 600r/min, 水的添加量为 50mL 时, 确定乳化时间, 如图 6 所示。

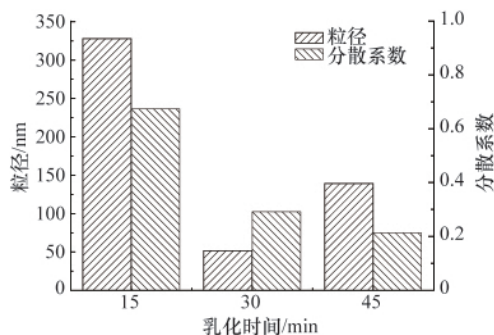


图 6 乳化时间对乳化效果的影响

Fig. 6 The impact of the time on the emulsifying effect

当香精比乳化剂为 1:1、搅拌速度为 600r/min、水的添加量为 50mL、乳化时间为 45min 时, 粒径较 30min 时有所上升,

但是分散系数较小, 能够使整个体系更稳定, 所以选择乳化时间为 45min。

综合上述因素得出, 香精与乳化剂比值为 1:1、搅拌速度为 600r/min、水添加量为 50mL、乳化时间为 45min 时乳化效果较优。

## 2.2 Plackett-Burman 实验和 Box-Behnken 设计

通过 Plackett-Burman 实验对香精微胶囊中相关因素  $\beta$ -聚苹果酸的浓度、壳聚糖的浓度、 $\beta$ -聚苹果酸与壳聚糖的比值、乳化液添加量、壳聚糖的 pH 值、 $\beta$ -聚苹果酸的 pH 值、滴加后反应时间、滴速和转速进行评价。

筛选出有显著影响效应的因素, 分别为 A (壳聚糖浓度)、B (滴加后反应时间)、C ( $\beta$ -聚苹果酸的 pH 值)、D (滴加速度)。从而 Box-Behnken 设计结果如表 3。

表 3 Box-Behnken 设计结果  
Table 3 The results of Box-Behnken design

试验号	A	B	C	D	粒径/nm
1	1.5	40	6.0	5.0	440.6
2	2.0	40	4.5	5.0	436.4
3	2.0	20	4.5	7.5	523.8
4	1.5	60	3.0	7.5	715.4
5	1.5	40	3.0	10.0	581.5
6	1.5	40	6.0	10.0	380.3
7	1.0	40	4.5	10.0	300.9
8	1.5	40	4.5	7.5	607.0
9	2.0	40	4.5	10.0	985.2
10	1.0	60	4.5	7.5	271.9
11	1.5	20	3.0	7.5	787.0
12	1.5	60	4.5	5.0	496.5
13	1.5	40	4.5	7.5	514.3
14	1.5	60	4.5	10.0	431.0
15	1.0	40	6.0	7.5	750.0
16	1.5	60	6.0	7.5	419.1
17	1.5	40	3.0	5.0	591.7
18	2.0	40	6.0	7.5	523.1
19	1.5	20	4.5	5.0	523.7
20	1.0	40	3.0	7.5	514.2
21	1.5	20	6.0	7.5	512.0
22	1.5	40	4.5	7.5	558.7
23	2.0	40	3.0	7.5	784.8
24	1.0	20	4.5	7.5	395.3
25	2.0	60	4.5	7.5	673.7
26	1.5	20	4.5	10.0	600.0
27	1.0	40	4.5	5.0	597.3
28	1.5	40	4.5	7.5	1016.0
29	1.5	40	4.5	7.5	851.7

根据响应面设计结果得出, 壳聚糖浓度 1.5g/L, 反应时间 60min,  $\beta$ -聚苹果酸 pH 值 6.0, 滴速 7.5mL, 粒径 471.8nm 时, 在本文所制备微胶囊的要求范围内 (200~600nm)。验证实验

得出平均粒径大小为 481.0nm(图 7)。误差为 1.95%。

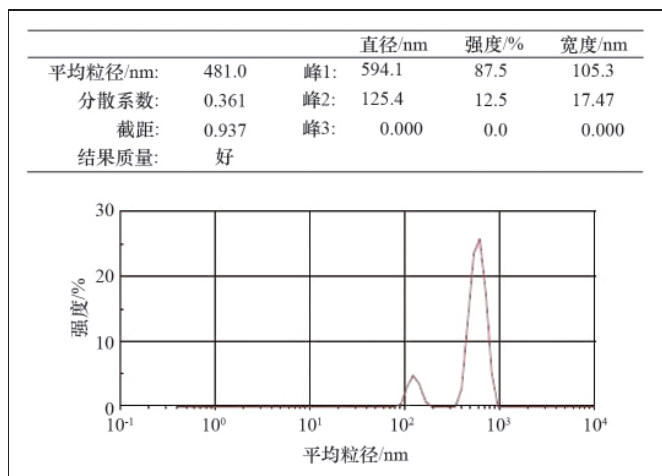


图 7 最优条件下测得粒径图

Fig. 7 The the particle diameter distribution measured under the optimal condition

### 2.3 表面形态的表征

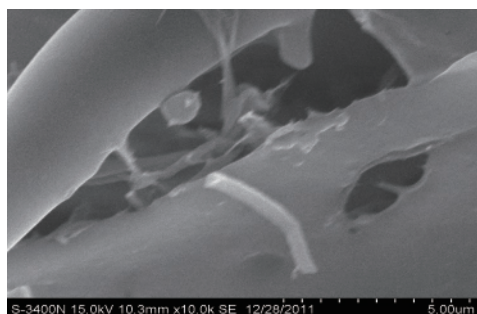
在扫描电镜下观察经冷冻干燥后的聚苹果酸和香精微胶囊进行电镜扫描,观察表面形态结构<sup>[13]</sup>,结果如图 8。

从图 8(a)中可以看出,β-聚苹果酸为絮状,本身无小颗粒,呈网状,但交联不密集。图 8(b)中网状交联程度更大,这说明 β-聚苹果酸和壳聚糖发生了反应并进一步验证了理论上的 β-聚苹果酸带负电荷、壳聚糖带正电荷,两者正负电荷结合发生复相凝聚反应;同时可以看见有很多细小颗粒粘附在絮状物上,这些细小颗粒即为微胶囊。从图 8(c)中可以看出,微胶囊外形呈棉花状,大小不一,表面较光滑。

### 2.4 香精包埋率的测定

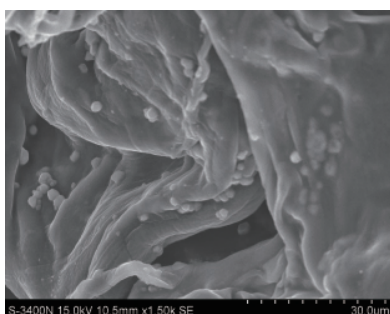
以空白微胶囊为空白对照,用紫外分光光度计在 285nm 处测定微胶囊溶液的吸光值为 0.320,对照香精含量标准曲线得出溶液中香精浓度为 0.025mg/mL。最初香精浓度为 0.035mg/mL。根据式(1)计算得

$$\text{包埋率} = \frac{0.035 - 0.025}{0.035} \times 100\% = 28.57\%$$



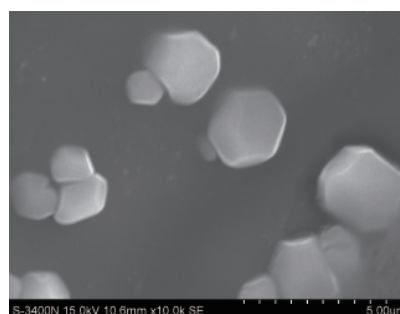
(a) β-聚苹果酸

(a) The picture of β-poly malic acid



(b) 香精微胶囊(1.5x)

(b) The flavor microcapsules (1.5x)



(c) 香精微胶囊(10x)

(c) The flavor microcapsules (10x)

图 8 香精微胶囊和 β-聚苹果酸的电镜图

Fig. 8 The electron microscopy pictures of the fragrance microcapsule and β-poly-malic acid

### 2.5 缓释性能的测定

在利用电子鼻对香精微胶囊的缓释性能进行测定的实验中,取同一批次制备好的香精微胶囊密封保存,分别取在室温下放置不同时间的晚香玉香精微胶囊进行电子鼻分析,其雷达图分析结果见图 9。

由图 9 可知,有 18 种香气感官,根据测定不同时间香气的释放,观察香气主要表现在顺时针 TA/2 到 T30/1 这几个香气柱,随着放置时间的不断增长,溶液中香气强度由低到高排列,微胶囊溶液中香精香气强度逐渐增强,说明从微胶囊中释放至溶液中的香精不断增加,香气不断增强。同时,从雷达图中可看出,释放 69、2h 后的香精微胶囊溶液之间的增加幅度呈缓慢增长的趋势,由图 9 可知,香精释放缓慢,69h 的释放过程中较最初量增加甚少,实验表明放置 69h 后,晚香玉香精微胶囊仍能缓慢释放,具有较好的缓释性能。

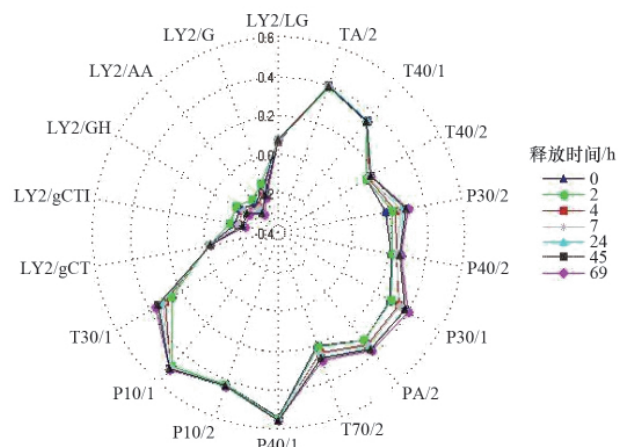


图 9 晚香玉香精微胶囊的雷达图

Fig. 9 The radar chart of the fragrance microcapsule

### 3 结论

乳化香精的最优体系为:香精(晚香玉)和乳化剂(Tween-80)的比值为1:1,水的添加量为50mL,乳化时间为45min,搅拌速度为600r/min。通过Plackett-Burman实验,对影响以 $\beta$ -聚苹果酸和壳聚糖为壁材的香精微胶囊制备的诸多因素进行了评价,成功筛选出对香精微胶囊分散系数有显著影响的因子为:壳聚糖浓度、滴加后反应时间、 $\beta$ -聚苹果酸的pH值、滴加速度。最后通过Box-Behnken设计确定缓释型香精微胶囊的最优工艺条件为:壳聚糖浓度1.5g/L、乳化时间45min、转速600r/min、反应时间60min、 $\beta$ -聚苹果酸浓度为1.0g/L、 $\beta$ -聚苹果酸(mL):壳聚糖(mL)=1:2、pH值为6.0、滴加速度为7.5mL/h、芯材添加量为1mL。微胶囊粒径为481.0nm, PDI为0.361。香精包埋率为28.57%,缓释效果持久。

$\beta$ -聚苹果酸作为新型的无毒易降解的高分子生物材料,应用到香精微胶囊的制备中能够充分降低成本,并有效利用香精,使其达到较好的释放体系。由于本文采用天然无毒条件制备香精微胶囊,体系单一较不稳定,在后续研究中,还将对其稳定性进行进一步探讨,制得粒度均一、效果稳定的香精缓释微胶囊,充分发挥微胶囊持续长久缓慢释放的作用。

#### 参考文献 (References)

- [1] 余文兵,周华,韦萍. 生物降解材料聚苹果酸的合成方法及应用进展[J]. 化工进展, 2004, 23(10): 1086-1090.  
Yu Wenbing, Zhou Hua, Wei Ping. Chemical Industry and Engineering Progress, 2004, 23(10): 1086-1090.
- [2] 许时婴,张晓鸣,夏书芹,等. 微胶囊技术——原理与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 60-78.  
Xu Shiyong, Zhang Xiaoming, Xia Shuqin, et al. Microcapsule technology: Principles and applications[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 60-78.
- [3] Portilla-Arias J A, Garcia-Alvarez M, Dellarduya A M, et al. Synthesis, degradability, and drug releasing properties of methyl ester of fungal poly ( $\beta$ , L-malic acid)[J]. Macromolecular Bioscience, 2008, 8(6): 540-550.
- [4] Abdellaoui K, Boustta M, Vert M, et al. Metabolite-derived artificial polymers designed for drug targeting, cell penetration and bioadsorption [J]. European Journal of Pharmaceutical Science, 1998, 6(1): 61-73.
- [5] Ljubimova J Y, Fujita M, Ljubimov A V, et al. Poly (malic acid) nanoconjugates containing various antibodies and oligonucleotides for multitargeting drug delivery[J]. Nanomedicine, 2008, 3(2): 247-265.
- [6] Cammas S, Renard I, Lang lois V, et al. Poly ( $\beta$ -malic acid): Obtaining high molecular weights by improvement of the synthesis rout[J]. Polymer, 1996, 37(18): 4215.
- [7] Ouchi T, Kobayashi H, Banba T. Design of poly ( $\alpha$ -malic acid)-5FU conjugate exhibiting antitumor activity[J]. Polymer International, 1990, 23(3): 221.
- [8] 王丽燕,郑谊丰,刘婷婷,等. 聚苹果酸的发酵培养条件优化[J]. 生物加工过程, 2010, 8(2): 41-45.  
Wang Liyan, Zheng Yifeng, Liu Tingting, et al. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2010, 8(2): 41-45.
- [9] Liu S J, Steinbüchel A. Production of poly (malic acid) from different carbon sources and its regulation in aureobasidium pullulans[J]. Biotechnology Letters, 1997, 19(1): 11-14.
- [10] Gödde C, Liebergesell M, Steinbüchel A. Isolation of poly ( $\beta$ -L-malic acid)-degrading bacteria and purification and characterization of the PMA hydrolase from Comamonas acidovorans strain 7789[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 173(2): 365-372.
- [11] 尹志梅,杨青,吴秀敏,等. L-苹果酸定量检测方法 [J]. 中国酿造, 1999(4): 33-34.  
Yin Zhimei, Yang Qing, Wu Xiumin, et al. China Brewing, 1999(4): 33-34.
- [12] Goodban A E. Rapid method for determination of malic[J]. Analytical Chemistry, 1957, 29(2): 283-287.
- [13] Deng M, Cao M, Wang Y. Coacervation of cationic gemini surfactant with weakly charged anionic polyacrylamide[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2009, 113(28): 9436-9440.
- [14] 徐向宏,何明. 试验设计与 Design-Expert、SPSS 应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 146-160, 194-204.  
Xu Xianghong, He Ming. Design and application of design-expert, SPSS [M]. Beijing: Science Press, 2010: 146-160, 194-204.
- [15] 刘建峰,葛向阳,梁云祥. 响应面法优化豆粕固态发酵工艺的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(6): 87-91.  
Liu Jianfeng, Ge Xiangyang, Liang Yunxiang. China Biotechnology, 2007, 27(6): 87-91.
- [16] 杨君,赵生,陈科兵,等. 薄荷香精微胶囊包埋率不同方法比较分析 [J]. 食品科学, 2010, 31(6): 239-242.  
Yang Jun, Zhao Sheng, Chen Kebing, et al. Food Science, 2010, 31(6): 239-242.
- [17] Novaković A, van Lith S C, Frandsen F J, et al. Release of potassium from the systems K-Ca-Si and K-Ca-P [J]. Energy & Fuels, 2009, 23(7):3423-3428.
- [18] 高永梅,刘远方,李艳霞,等. 主要香型白酒的电子鼻指纹图谱[J]. 酿酒科技, 2008, 167(5): 38-44.  
Gao Yongmei, Liu Yuanfang, Li Yanxia, et al. Liquor-Making Science & Technology, 2008, 167(5): 38-44.
- [19] 肖作兵,孙佳. 电子鼻在牛肉香精识别中的应用 [J]. 食品工业, 2009(4): 63-65.  
Xiao Zuobing, Sun Jia. The Food Industry, 2009(4): 63-65.

(责任编辑 吴晓丽)

#### 《科技导报》征集“封面文章”

为快速反映我国最新科技研究成果,《科技导报》拟利用刊物最显著位置——封面将最新科研成果第一时间予以突出报道。来稿要求:研究成果具创新性或新颖性;反映该领域我国乃至世界前沿研究水平;可以图片形式予以反映,图片美观、清晰、分辨率超过300dpi;文章篇幅不限,要说明研究的背景、方法、取得的结果,以及结论。在线投稿:www.kjdb.org。