

# 绍兴腐乳发酵过程中蛋白质水解及其对成品白点影响的研究

朱洪康<sup>1</sup>, 孙军勇<sup>1</sup>, 陆健<sup>1,2,\*</sup>

(1. 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122;  
2. 宿迁市江南大学产业技术研究院, 江苏宿迁 223800)

**摘要:**研究了绍兴腐乳发酵过程中蛋白质水解与酪氨酸含量变化的规律, 分析了不同发酵时间腐乳样品的氨基酸态氮、三氯乙酸-氮溶指数(TCA-NSI)、游离氨基酸、蛋白质水解度(DH)、酪氨酸含量及蛋白质分子量变化。结果表明: 绍兴腐乳发酵过程中坯料中酪氨酸随着氨基酸态氮、TCA-NSI、游离氨基酸、DH的增加而增加; 1~40d内主要是7S和11S蛋白质的分解, 40d以后主要是小分子蛋白质的进一步分解。相关性分析表明, 游离酪氨酸的含量与DH的Pearson相关系数最高。同时对成熟腐乳的研究发现有白点腐乳的TCA-NSI、DH和游离酪氨酸显著高于无白点腐乳, 这表明了腐乳中白点的形成是由蛋白质过度水解造成的。本研究为绍兴腐乳白点的控制提供了参考。

**关键词:** 腐乳, 白点, 酪氨酸, 蛋白水解

## Study on the hydrolysis of proteins in the process of Shaoxing sufu fermentation and the influence on white particles in products

ZHU Hong-kang<sup>1</sup>, SUN Jun-yong<sup>1</sup>, LU Jian<sup>1,2,\*</sup>

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University; The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University; School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;  
2. Industrial Technology Research Institute of Jiangnan University in Suqian, Suqian 223800, China)

**Abstract:** The rules of the protein hydrolysis and the tyrosine content were studied. The changes of amino nitrogen, TCA-soluble nitrogen index (TCA-NSI), free amino acid, degree of hydrolysis (DH), tyrosine and protein molecular weight were analyzed. Results showed that tyrosine increased with the increase of amino nitrogen, TCA-NSI, free amino acid, DH in pehtze during Shaoxing sufu fermentation. The mainly degraded proteins in the first 40 days were 7S and 11S proteins, while the mainly degraded substance after 40 days was low molecular protein. Correlation analysis indicated that the Pearson correlation coefficient of the content of free tyrosine and DH was higher than that of others. Besides this, the TCA-NSI, DH and free tyrosine were higher in sufu with white particles than those in sufu without white particles, so it could be concluded that the white particles in sufu were formed due to the excessive hydrolysis of proteins. This research could provide reference to control white particles in Shaoxing sufu.

**Key words:** sufu; white particles; Tyrosine; hydrolysis of proteins

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)14-0175-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.14.028

腐乳又称乳腐、乳豆腐、霉豆腐、豆腐乳、臭豆腐或长毛豆腐, 是我国著名的传统酿造豆制品和调味品之一<sup>[1]</sup>。它是用大豆蛋白的凝乳状物, 经过接种微

生物、加盐腌制、加酒后酵、成熟包装等工艺制成的一种干酪型产品, 在欧美地区被称为中国干酪<sup>[2]</sup>。腐乳作为佐餐食品或调味品, 因其滋味鲜美, 风味独

收稿日期: 2014-09-01

作者简介: 朱洪康(1989-), 男, 硕士研究生, 主要从事调味品方面的研究。

\* 通讯作者: 陆健(1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 啤酒酿造微生物与酶技术、传统发酵领域微生物资源与酶体系、新型生物制剂(大宗饲料原料的生物技术处理)。

基金项目: 973项目(2012CB720802); 973项目(2013CB733602); 安全食品精深加工科技创新平台建设(2012B091400030); 高等学校学科创新引智计划(111计划)资助项目(111-2-06); 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

特,营养丰富,价格低廉而深受国内外人们的喜爱<sup>[3]</sup>。而绍兴腐乳与国内其他腐乳最为本质的区别在于绍兴腐乳配料卤采用的是具有独特风味和独特营养与口感的绍兴黄酒,使绍兴腐乳产生一种与其他腐乳不同的腐乳浓香<sup>[4]</sup>。

然而,绍兴腐乳在货架期期间表面产生的白色颗粒或片状物则会影响腐乳的外观质量,影响产品的销售。这些白色颗粒或片状物大部分附在腐乳表面的菌丝体上,也有的沉积于容器底部,一般称之为腐乳白点<sup>[1]</sup>。腐乳生产企业通常采取在标签上注明“本品表面偶有白点或白片,系氨基酸结晶,食用无妨”。目前对白点的研究集中在白点分析<sup>[5]</sup>、菌株驯化和酶活控制方面<sup>[6-7]</sup>。鲍松林<sup>[5]</sup>分析了腐乳白点的成分,证实其主要成分为酪氨酸(73%~76%)、少量苯丙氨酸和一些菌丝体;何熙<sup>[6]</sup>、江景泉<sup>[7]</sup>用酪氨酸对毛霉菌株进行驯化,发现成熟腐乳中酪氨酸含量明显降低,从而认为可以有效控制白点的产生。

腐乳是豆腐经发酵制成,而已知1kg大豆分离蛋白含有酪氨酸38g<sup>[8]</sup>。目前对绍兴腐乳发酵过程中酪氨酸形成规律的研究还未见报道。何冰芳<sup>[9]</sup>研究发现豆腐经过毛霉发酵后酪氨酸与苯丙氨酸含量增加7.25倍。本研究通过分析绍兴腐乳发酵过程中大豆蛋白的水解程度与酪氨酸含量的变化,研究酪氨酸的形成规律,并且分析有白点和无白点的腐乳蛋白质水解程度的差异,为腐乳白点的控制提供理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

腐乳 绍兴当地超市;毛霉菌株 实验室保藏菌株Mucor sp. SX11;豆坯 江苏无锡农贸市场,含水量80.59%;黄酒 浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司,酒精度 $\geq 12\%$ vol;食盐 江苏省盐业集团有限责任公司;酪氨酸 Sigma-Aldrich公司;乙腈 为色谱纯,购自国药集团化学试剂有限公司;蛋白质标准品 上海生工生物工程公司;其他试剂 均为分析纯。

UV-2100紫外-可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司;SCINO KT260凯氏定氮仪 福斯赛诺分析仪器(苏州)有限公司;Agilent 1260高效液相色谱 美国安捷伦公司;垂直电泳仪 美国Bio-Rad公司;Centrifuge 5415D Eppendorf公司;JD-801凝胶成像仪 江苏省捷达科技发展有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 绍兴腐乳生产工艺 参见王瑞芝《中国腐乳酿造》中绍兴腐乳生产工艺<sup>[1]</sup>,具体参数如下:培养基为麸皮10g,水11mL,接种后30℃培养3d,加入200mL无菌水,纱布过滤后用喷壶均匀喷洒到豆坯(24mm×24mm×14mm)表面,25℃培养2d,腌制时加盐量为18%,腌至盐坯食盐含量 $\geq 12\%$ ,每14块坯料加黄酒90mL,室温发酵。

1.2.2 样品处理 取豆坯、毛坯、腌坯、后酵不同时间的腐乳样品坯料7块于漏斗上静置30min,放入洁净的研钵中研磨成糊状后冻干备用;称取1g冻干粉末于100mL烧杯中,加水20mL煮沸,冷却后定容至100mL,过滤,取滤液待测。

1.2.3 氨基酸态氮测定 甲醛滴定法<sup>[10]</sup>。

1.2.4 三氯乙酸-氮溶指数(TCA-soluble nitrogen index, TCA-NSI) 称取0.1g样品粉末,加入0.8mol/L TCA 20mL,振荡后静置10min,过滤,取滤液10mL,凯氏定氮法测其中含氮量;另称取0.1g样品粉末用凯氏定氮法直接测其含氮量,两者之比即为三氯乙酸-氮溶指数<sup>[10]</sup>。

1.2.5 氨基酸分析

1.2.5.1 游离酪氨酸分析 取0.1g样品粉末,加入5% TCA 5mL,超声处理30min后双层滤纸过滤,取滤液1mL 10000r/min离心10min,取清液100 $\mu$ L与100 $\mu$ L硼酸钠溶液(pH=10.4)混匀后用高效液相色谱法测定酪氨酸含量。采用HYPERSIL ODS(C<sub>18</sub>, 250mm×4.6mm, 5 $\mu$ m)色谱柱,5%的乙腈水溶液为流动相,柱温40℃,洗脱流速=1.0mL/min,FLD检测波长:Ex=215nm、Em=283nm<sup>[11]</sup>。

1.2.5.2 游离氨基酸分析 上述离心后的上清液,稀释适当倍数后,取1mL,参照莫蓓红<sup>[12]</sup>的方法进行。

1.2.6 蛋白水解度(degree of hydrolysis, DH) 1.2.2滤液稀释后取2mL,加入2mL茚三酮显色剂,沸水浴加热15min,冷却后加入5mL 40%乙醇溶液混匀,用50mL容量瓶定容,15min后在570nm下测吸光度,从标准曲线查得腐乳游离-NH<sub>2</sub>数<sup>[13]</sup>。

准确称取0.05g冻干豆腐样品于水解管中,加入6mol/L的盐酸10mL,抽真空后用酒精喷灯密封,110℃恒温器中反应24h,水解完后,把水解管开封,用旋转蒸发仪去除盐酸,干涸后用蒸馏水溶解,定容至100mL后过滤;稀释5倍后取稀释液2mL按上述方法操作,从标准曲线上查得蛋白强酸水解后的总游离-NH<sub>2</sub>数。按下式计算:

$$DH(\%) = \frac{N_h - N_0}{N_T - N_0} \times 100$$

式中: N<sub>h</sub>—不同时间腐乳样品中的游离-NH<sub>2</sub>数( $\mu$ mol); N<sub>0</sub>—豆腐蛋白中固有的游离-NH<sub>2</sub>数( $\mu$ mol); N<sub>T</sub>—蛋白强酸水解后的总游离-NH<sub>2</sub>数( $\mu$ mol)。

1.2.7 Tricine-SDS-PAGE分析 0.1g冻干粉末于2mL离心管,加入15%的TCA-丙酮1mL,振荡后离心,去掉上清液,重复2次,用丙酮洗涤沉淀3次后将沉淀晾干,加入1mL溶剂(含8mol/L尿素、1% SDS、1%  $\beta$ -巯基乙醇、0.05mol/L Tris),振荡后离心,取上清液作为电泳样品,上样量为10 $\mu$ L;本实验采用分析小分子肽的N-三(羟甲基)甘氨酸-十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Tricine-SDS-PAGE),采用三层不连续胶结构,配制的浓缩胶、夹层胶、分离胶分别为7%、12%、16.5%;阳极缓冲液为Tris 12.11g加水定容至500mL,用6mol/L HCl调至pH=8.90;阴极缓冲液为Tris 6.06g,Tricine 8.96g,SDS 0.5g,加水定容至500mL;先用40V电泳,样品离开加样孔后改用70V电泳至结束<sup>[14]</sup>。凝胶在50%甲醇、10%醋酸溶液中固定30min后以考马斯亮蓝R-250染色1.5h,染色结束后以10%甲醇、10%醋酸脱色至背景清晰,凝胶用JD-801凝胶成像仪记录。

1.2.8 腐乳含氮物质分析 对市售无白点腐乳和有白点腐乳按上述实验方法进行含氮物质含量分析与

显著性分析。

### 1.3 数据分析

数据用SPSS 19.0分析软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 氨基酸态氮与游离酪氨酸含量的变化

由图1可知,腐乳在后酵过程中,氨基酸态氮随着腐乳发酵的进行而增加,同时腐乳中游离酪氨酸含量也增加。氨基酸态氮在1~10d内变化不明显,从第10d开始,氨基酸态氮含量明显增加,30d以后逐渐下降可能是因为微生物对含氮物质的利用;游离酪氨酸含量在1~60d内缓慢增加,从60d开始,游离酪氨酸从0.13g/100g增加到0.24g/100g,增加79.45%。这可能是因为以蛋白酶为主的毛霉酶系在毛坯、腌坯和发酵初期主要在腐乳表面,蛋白质水解较慢;随着后酵的进行,蛋白酶渗入豆坯内部,蛋白质降解,释放出氨基端,使得氨基酸态氮增加,而小分子蛋白质和多肽水解成酪氨酸则较慢。

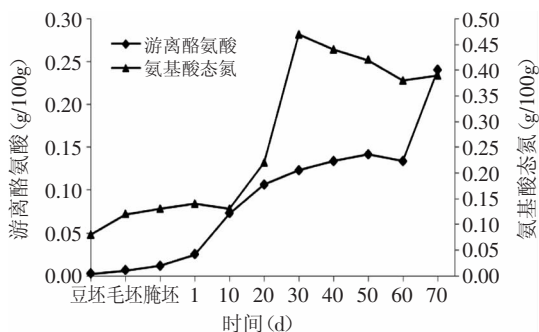


图1 腐乳发酵过程中氨基酸态氮与游离酪氨酸变化

Fig.1 Changes of the amino nitrogen and free Tyrosine during sufu fermentation

### 2.2 TCA-NSI与游离酪氨酸含量的变化

三氯乙酸能溶解小分子肽类,所以TCA-NSI表示腐乳中小分子肽的含量,从而可以表示蛋白的水解程度。由图2看出,腐乳经过接种培养、腌制和前期发酵,直到后酵20d,TCA-NSI都是增加的,从20d以后变化趋于平缓,表明此时大分子的豆坯蛋白质在毛霉内肽酶作用下已基本降解成小分子的肽。同时,游离酪氨酸含量缓慢增加,这说明小分子肽在形成的同时也被外肽酶降解形成酪氨酸。

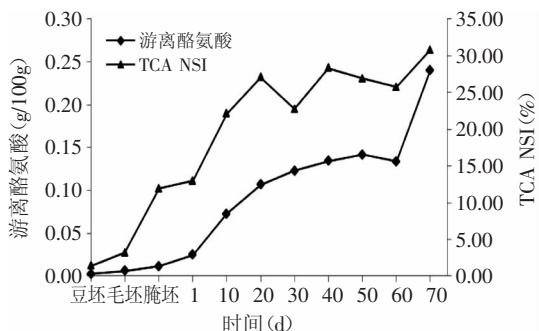


图2 腐乳发酵过程中TCA-NSI与游离酪氨酸变化

Fig.2 Changes of the TCA- NSI and free Tyrosine during sufu fermentation

### 2.3 游离氨基酸与游离酪氨酸含量的变化

由图3发现,豆坯、毛坯和腌坯时游离氨基酸含量几乎没有变化,1~30d内,游离氨基酸含量增加缓慢,而游离酪氨酸含量增幅明显高于游离氨基酸;30~50d内,游离酪氨酸增幅却低于游离氨基酸,这可能是由于外肽酶对小分子肽类作用加快,从而形成氨基酸速度加快;50~70d内,游离氨基酸含量趋于稳定,此时游离酪氨酸含量在60~70d增幅加快,这可能是因为此时的小分子肽类更适宜被分解成氨基酸。

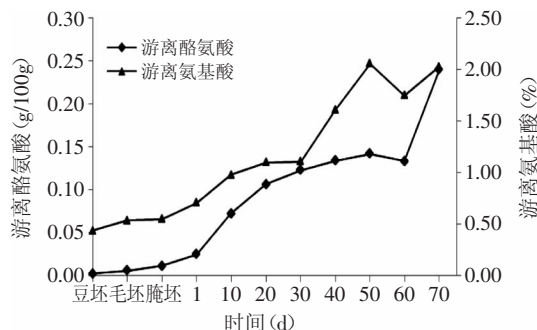


图3 腐乳发酵过程中游离氨基酸与游离酪氨酸变化

Fig.3 Changes of free amino acid and free Tyrosine during sufu fermentation

### 2.4 DH与游离酪氨酸含量的变化

水解度表示蛋白质被水解的程度,从图4可以看出,豆坯从接种培养开始水解,毛坯、腌坯和后酵1d时,蛋白水解度几乎没有变化,从1d开始到后酵结束,蛋白水解度逐渐增加,在1~40d内变化最明显,从1.92%增到5.04%。而游离酪氨酸在毛坯、腌坯和后酵1d时含量变化较小,1d以后随着蛋白质的水解度增加而缓慢增加,在发酵后10d,游离酪氨酸增幅达79.45%,说明腐乳中酪氨酸的含量是随着蛋白质的水解而产生的。

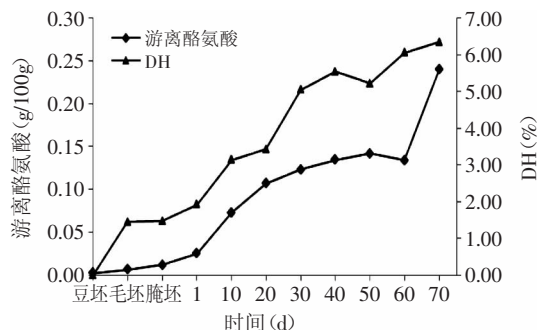


图4 腐乳发酵过程中蛋白水解度与酪氨酸变化

Fig.4 Changes of the DH of protein and Tyrosine during sufu fermentation

### 2.5 Tricine-SDS-PAGE分析

大豆贮藏蛋白的主要成分是球蛋白,根据其沉淀特征将其分为2S、7S、11S及15S,分别占总蛋白量的8%、35%、52%及5%,7S组分的分子量在150~180ku,主要是β-伴大豆球蛋白,由α'、α和β 3个亚基构成,其分子量分别为72、68、52ku;11S组分的分子量在

360ku左右,主要是大豆球蛋白,由酸性和碱性亚基构成,其分子量分别为38ku和20ku左右<sup>[15]</sup>。

由图5可知,豆坯中蛋白质主要为11S组分,其次为7S组分,而7S优先被降解,从毛坯到后酵20d,7S组分逐渐降解;11S组分中发生降解的主要是30~40ku左右的蛋白,蛋白降解后5~25ku分子量的蛋白明显增加,进入后酵40d时,蛋白质条带的变化已经不明显,说明大分子蛋白质的降解已基本结束,此后直到成熟,腐乳中主要是小分子蛋白质或多肽的降解。

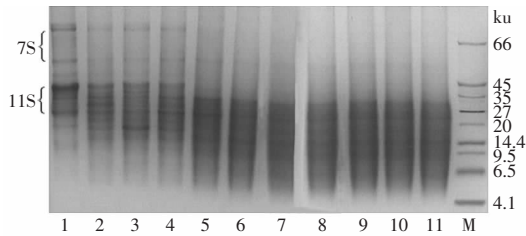


图5 腐乳发酵过程中Tricine-SDS-PAGE图谱

Fig.5 Tricine-SDS-PAGE during sufu fermentation

注:泳道1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、M分别对应豆坯、毛坯、腌坯和后酵第1、10、20、30、40、50、60、70d的样品和Marker。

## 2.6 相关性分析

以游离酪氨酸为纵坐标,分别以氨基酸态氮、TCA-NSI、游离氨基酸和DH为横坐标做散点图,利用SPSS19.0进行两变量间的相关性分析,并且进行线性回归分析,相关分析结果见表1。

显著性(双侧)小于0.01时,表示在0.01水平上显著相关,所以如表1所示,氨基酸态氮、TCA-NSI、游离氨基酸、DH与游离酪氨酸均在0.01水平上具有极显著相关性;Pearson相关系数越接近于1说明相关度越高,表1中DH-游离酪氨酸的Pearson相关系数最大,且最接近于1,所以DH-游离酪氨酸的相关度最高,线性回归方程的拟合度最好。因此,成熟腐乳中酪氨酸的过量与大豆蛋白的过度水解有很大关系。

## 2.7 含氮物质对白点影响的分析

对市售无白点腐乳和有白点腐乳坯料中的氨基酸态氮、TCA-NSI、游离氨基酸、DH与游离酪氨酸的曲线拟合模型见图6,显著性分析结果见表2。

如表2所示,有白点腐乳中氨基酸态氮、TCA-NSI、游离氨基酸、DH和游离酪氨酸都高于无白点腐乳中的成分。已知当显著性小于0.05时表示测量值有显著差异。所以,从表2中发现,有白点腐乳和无白点腐乳的氨基酸态氮、游离氨基酸无显著差异;而TCA-NSI、DH和游离酪氨酸有显著差异。由此可以认为,腐乳白点的形成与TCA-NSI、DH和游离酪氨酸有关。而TCA-

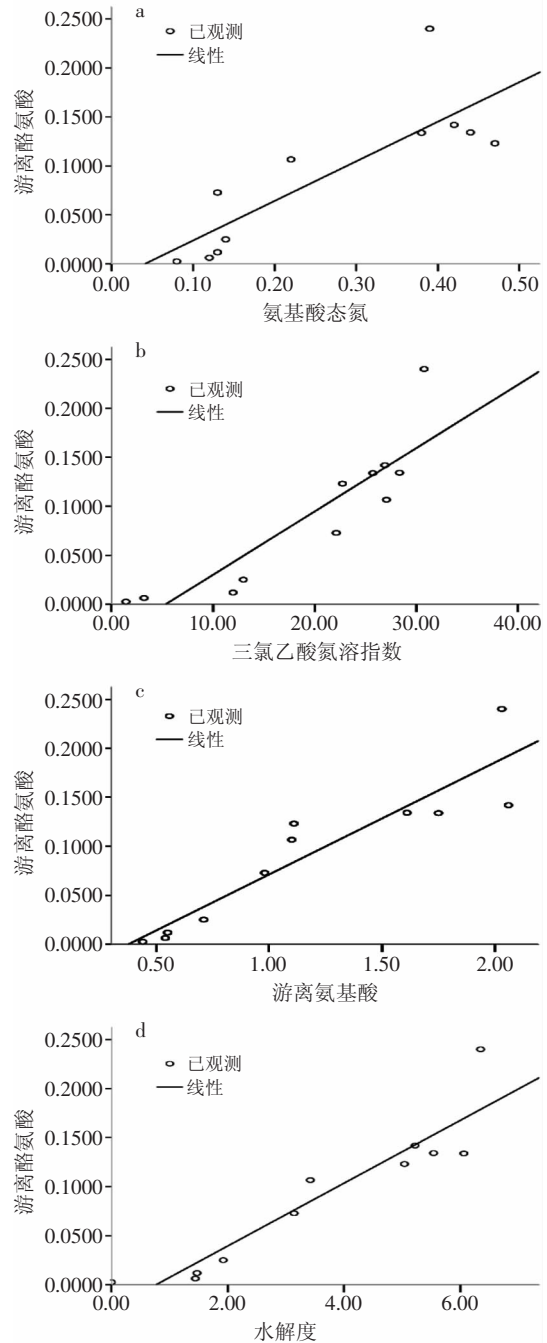


图6 氨基酸态氮、TCA-NSI、游离氨基酸、DH与游离酪氨酸的曲线拟合模型

Fig.6 Curve fitting model between amino nitrogen, TCA-NSI, free amino acid, DH and free Tyrosine

NSI、DH都表示蛋白质的水解程度,所以,腐乳白点的产生跟大豆蛋白质的过度水解产生过量酪氨酸有关,这为进一步控制腐乳白点的产生提供了理论参考。

表1 氨基酸态氮、TCA-NSI、游离氨基酸、DH与游离酪氨酸相关性分析参数估计值

Table 1 The correlation of parameter between amino nitrogen, TCA-NSI, free amino acid, DH and free Tyrosine

	Pearson相关系数	显著性(双侧)	线性方程; $R^2$ 值
氨基酸态氮-游离酪氨酸	0.830	0.002	$y=0.404x-0.017; R^2=0.688$
(TCA-NSI)-游离酪氨酸	0.894	0.000	$y=0.006x-0.035; R^2=0.799$
游离氨基酸-游离酪氨酸	0.923	0.000	$y=0.114x-0.043; R^2=0.851$
DH-游离酪氨酸	0.933	0.000	$y=0.032x-0.025; R^2=0.870$

表2 绍兴无白点腐乳与有白点腐乳坯料中氨基酸态氮、TCA-NSI、游离氨基酸、DH与游离酪氨酸分析

Table 2 The analysis of amino nitrogen, TCA-NSI, free amino acid, DH and free Tyrosine in Shaoxing sufu phetze without and with white particles

指标	无白点	有白点	T值/显著性水平
氨基酸态氮(g/100g)	2.00±0.03	2.07±0.01	-2.214/0.233
TCA-NSI(%)	28.10±1.04	36.59±0.76	-6.572/0.028
游离氨基酸(g/100g)	12.96±1.74	14.51±0.22	-0.889/0.534
DH(%)	15.54±0.24	17.99±0.11	-6.347/0.037
游离酪氨酸(g/100g)	0.10±0.02	0.43±0.005	-16.250/0.028

### 3 结论

作为传统大豆发酵制品,大豆蛋白中的酪氨酸在腐乳发酵过程中伴随着蛋白质的水解而游离出来。在绍兴腐乳发酵过程中氨基酸态氮、TCA-NSI、游离氨基酸、DH和游离酪氨酸都随着发酵的进行而增加。通过对腐乳发酵过程中氨基酸态氮、TCA-NSI、游离氨基酸、DH与游离酪氨酸的相关性分析以及对成熟无白点腐乳和有白点腐乳中此类含氮物质的分析发现,酪氨酸的产生与蛋白质的水解度相关性最高且有白点腐乳和无白点腐乳中此类含氮物质具有显著差异性。本研究通过跟踪绍兴腐乳发酵过程中蛋白质的水解和酪氨酸含量的变化以及对成熟腐乳的含氮物质分析,研究酪氨酸形成及其对成熟腐乳白点形成的影响,为进一步控制腐乳白点提供理论参考。

### 参考文献

[1] 王瑞芝. 中国腐乳酿造[M]. 北京:中国轻工业出版社,2009:1,157,242,429-431.  
 [2] 彭湘屏,卢红梅. 腐乳研究新进展[J]. 中国调味品,2010,35

(2):31-34,45.  
 [3] 江景泉,张惟广. 腐乳的白点问题研究进展[J]. 四川食品与发酵,2008,44(1):24-27.  
 [4] 陈宇. 绍兴咸亨腐乳的生产与营养保健功能[J]. 江苏调味品副食品,2003,20(5):17-20.  
 [5] 鲍松林,丁霄霖. 腐乳白点的成分鉴定[J]. 无锡轻工业学院学报,1993,12(4):270-275.  
 [6] 何熙. 腐乳白点问题及电场磁场催熟腐乳的研究[D]. 广州:华南理工大学,2001.  
 [7] 江景泉. 毛霉驯化及微波对腐乳白点抑制效果的研究[D]. 重庆:西南大学,2009.  
 [8] 曾小波,朱新贵,林志省. 高盐稀态法酿造酱油过程中L-酪氨酸的析出规律[J]. 食品与发酵工业,2011,37(9):90-93.  
 [9] 何冰芳,王淑如,陈琼华. 霉豆腐发酵前后蛋白质氨基酸组成的变化[J]. 氨基酸杂志,1986(2):10-11.  
 [10] Govindaraj K. Studies on the preparation and characterization of protein hydrolysates from groundnut and soybean isolates[D]. Mysore:University of Mysore,2003.  
 [11] Allen KR, Degg TJ, Rushwoth PA, Smith M, et al. Measurement of phenylalanine and tyrosine in plasma by high-performance liquid chromatography using the inherent fluorescence of aromatic amino acids[J]. Ann Clin Biochem,1999,36(2):207-211.  
 [12] 莫蓓红,赵建,苗君荏,等. 一种植物乳杆菌对干酪模型成熟中微生物及蛋白质水解的影响[J]. 食品工业科技,2012,33(7):100-104.  
 [13] 余勃,陆兆新. 微生物发酵法产大豆多肽液水解度的测定[J]. 食品科学,2005,26(4):104-107.  
 [14] 张锐昌,王绮,张应龙,等. Tricine-SDS-PAGE测定小麦蛋白酶解物分子量分布[J]. 食品研究与开发,2012,33(12):168-171.  
 [15] Mirosljub B Barać, Slađana P Stanojević, Snežana T Jovanović, et al. Soy protein modification-A review[J]. Acta Periodica Technologica,2004,2004(35):3-16.

(上接第168页)

硝化作用研究[J]. 食品研究与开发,2013,34(6):9-13.  
 [12] 高丽威. 紫心甘薯黄酮类化合物的提取纯化及抗氧化活性研究[D]. 杭州:浙江大学,2010.  
 [13] 汪璇. 黄粉虫黄酮提取、分离及抗氧化性研究[D]. 杨陵:西北农林科技大学,2013.  
 [14] 张燕平,张虹. 羊栖菜提取物体外自由基清除能力的研究[J]. 郑州工程学院学报,2003,24(1):50-54.  
 [15] Stockert J C, Blazquez-Castro A, Canete M, et al. MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan productis in lipid droplets[J]. Acta Histochemca,2012,114(8):785-796.  
 [16] 张利燕,常虹,赵丽芹,等. 提取方式对板栗雄花序总黄酮抗氧化活性的影响研究[J]. 食品工业科技,2013,34(4):97-100.  
 [17] 吴雪辉,张喜梅,李廷群,等. 板栗花粗提物的抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技,2008,24(1):14-19.  
 [18] Chen J W, Zhu Z Q. Structure-activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radical-scavenging effects[J]. Acta Pharmacologica Sinica,2002,23(7):667-672.

[19] 曾伟. 芒果黄酮的纯化分离及抗氧化活性研究[D]. 广州:广东工业大学,2013.  
 [20] 马森,周旭莉,户元林,等. 乌拉甘草有效成分对人体4种肿瘤细胞增殖与凋亡的影响[J]. 时珍国医国药,2009,20(5):9-11.  
 [21] 刘素君,郭红,潘明,等. 大蓟总黄酮诱导肿瘤细胞凋亡作用的研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(2):294-295.  
 [22] Joyeux M, Lobatein A, Autom R. Comparative antilipoperoxidant,antinecrotic and scavenging properties of terpanes and bifaflavones from Ginkgo and flavonoids[J]. Planta Medica,1994,61(2):66-69.  
 [23] Huang H Y, Zha X L. Development in research of antitumor effect of flavones compounds[J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies,2002,21(7):428-433.  
 [24] Huynh H T, Teel R W. Selective induction of apoptosis in human mammary cancer cells by pycnogenol[J]. Anticancer Research,2000,20(4):2417-2420.  
 [25] 杨志峰,朱英,李珊珊. 植物黄酮的抗肿瘤作用及构效关系的研究进展[J]. 四川中医,2011,29(9):35-38.