

黄精多糖酶法脱蛋白的工艺研究

刘小攀¹, 田启建^{2*}, 田春莲¹

(1. 吉首大学 林产化工工程湖南省重点实验室, 湖南 张家界 427000;
2. 吉首大学 植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室, 湖南 吉首 416000)

摘要:以黄精多糖为原料,研究酶解温度、酶解时间、酶解 pH、酶用量对蛋白质脱除率 and 多糖损失率的影响。通过正交试验分析得到酶法脱除黄精多糖中蛋白质的最优工艺,并与 Sevage 法相比较。结果表明,酶法是最佳的脱蛋白方法,其脱蛋白最佳工艺为:木瓜蛋白酶添加量 2.5%,温度 60℃,时间 2.5 h, pH 为 6.5,蛋白质脱除率为 71.23%,多糖损失率 13.7%。

关键词:黄精;多糖;酶法;脱蛋白

中图分类号:S567.239

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2016)01-0238-05

Deproteinization of *Polygonatum* Polysaccharide

LIU Xiao-pan¹, TIAN Qi-jian^{2*}, TIAN Chun-lian¹

(1. Key Laboratory of Forest Products and Chemical Industry Engineering on Hunan Province, Jishou University, Zhangjiajie, Hunan 427000, China; 2. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Utilization of Hunan Province, Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China)

Abstract: Enzymic hydrolysis was adopted to remove the proteins contained in the polysaccharides extracted from the rhizomes of *Polygonatum sibiricum*. Conditions of the hydrolysis were optimized by orthogonal experiment, and the results were compared with Sevage method. The results suggested that enzymic method was better than Sevage method. The optimal conditions in enzymic method were papain dosage 2.5%, temperature 60℃, time of hydrolysis 2.5 h, pH 6.5, under which the removal rate of deprotein was 71.23%, polysaccharide loss rate was 13.7%.

Key words: *Polygonatum*; polysaccharide; enzymatic hydrolysis; deproteinization

黄精是百合科(Liliaceae)黄精属(*Polygonatum*)多年生草本植物的总称,我国有 30 多种^[1]。其中黄精(*P. sibiricum*)、多花黄精(*P. cyrtoneura*)及滇黄精(*P. kingianum*)为原生药来源,属于药食同源性中草药^[2]。黄精含有丰富的皂甙^[3-4]和多糖等有效成分,其中黄精多糖除具有降脂和抗实验性动脉粥样硬化形成、提高机体免疫能力、抑制和杀灭肿瘤细胞生长^[5-7]外,还有明显的抗菌消炎和延缓衰老作用^[8-9]。所以它在新药研制和保健品开发领域具有广阔的发展前景。目前黄精多糖提取主要有浸提法、微波辅助提取、闪式提取等方法^[10-12],分离纯化主要运用乙醇醇沉、大孔树脂吸附、Sevage 法及

TCA 法脱蛋白等^[13-15],酶法由于专属性强,普遍认为是较好的脱蛋白方法,酶法脱除黄精蛋白研究未涉及。因此,本试验以蛋白质脱除率和多糖损失率为指标,探讨黄精多糖的酶法脱蛋白工艺,并与传统的 Sevage 法脱多糖蛋白相比较,旨在得到一种黄精多糖脱蛋白效率高且多糖损失小的方法,对黄精多糖产业化和黄精资源的深度开发具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 2014 年 7 月采自湖南湘西州永顺县小溪乡少车村,经吉首大学资环学院刘世彪教

收稿日期:2015-04-27 修回日期:2015-10-12

基金项目:湖南省科技计划项目(2013 NK4107)。

作者简介:刘小攀,男,在读硕士,研究方向:林产化学加工工程。E-mail:lxp1990221@163.com

* 通信作者:田启建,男,研究员,研究方向:中药材 GAP 及活性成分等。E-mail:tianqjian68@163.com

授鉴定为药用植物黄精(*P. sibiricum*)的根状茎。将样品洗净后于 45 ℃烘干、粉碎,备用。

1.1.2 试剂 木瓜蛋白酶(≥ 60 万 U · g⁻¹)购自北京索莱宝生物科技有限公司,牛血清蛋白(BSA)、考马斯亮蓝 G-250、蒽酮、乙醇、浓硫酸、氯仿、正丁醇、葡萄糖、碳酸氢钠、氢氧化钠、氯化钠等为 AR。

1.1.3 仪器 UV-3900 型紫外可见分光光度计(日本日立公司);RE-5205 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);HM-35V 酸度计(日本东亚电波公司);LD5-2A 离心机(北京医用离心机厂);AEL-40SM 十万分之一分析天平(日本岛津公司);数显恒温水浴箱(金坛市富华仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 黄精粗多糖的提取^[16] 称取黄精根状茎粉末 400 g,以 1 : 15 的料液比于 90 ℃恒温提取 4 h,离心,过滤,滤渣再加水提取 1 次,过滤,合并滤液,减压浓缩至原液的 1/5,加无水乙醇至含醇量达到 80%,4℃下沉淀 24 h,离心,沉淀加水溶解,冷冻干燥,备用。

1.2.2 黄精多糖含量的测定

1.2.2.1 标准曲线的制备 准确称取在 105℃干燥到恒重的 50 mg 葡萄糖对照品,用双蒸馏水溶解,定容至 100 mL,得到浓度为 0.5 mg · mL⁻¹ 的标准品溶液。吸取对照品溶液 1.0、2.0、4.0、5.0、6.0、8.0、10.0 mL 用蒸馏水定容至 50 mL,分别加入 0.2% 的蒽酮—硫酸试剂(80% 的浓硫酸)8 mL,沸水浴 10 min,迅速冷却至室温,在 625 nm 测定吸光度。以葡萄糖浓度 C(mg · mL⁻¹)为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,得回归方程 $A = 9.18C + 0.013$,相关系数 0.999 5。

1.2.2.2 多糖含量的测定 黄精多糖含量测定采用蒽酮—硫酸法^[17] 准确量取样液 2.0 mL,按 1.2.2.1 显色方法操作,测定吸光度,然后计算样品多糖含量与多糖损失率。

$$\text{多糖含量} = \frac{C \times V \times D}{W}$$

式中:C 为供试液中多糖浓度(mg · mL⁻¹),V 为供试液的体积(mL),D 为供试液的稀释因子,W 为样品质量(mg)。

多糖损失率=

$$\frac{(\text{脱蛋白前的多糖含量} - \text{脱蛋白后的多糖含量})}{\text{脱蛋白前的多糖含量}} \times 100\%$$

1.2.3 蛋白质含量测定

1.2.3.1 制备标准曲线 首先称取牛血清蛋白(BSA)0.1 g 溶解后定容到 100 mL,得到 1 mg · mL⁻¹ 的标准蛋白质储备液,然后分别配成 0.005、

0.01、0.02、0.04、0.06、0.08 mg · mL⁻¹ 溶液。蛋白质含量检测采用考马斯亮蓝法^[18]。横坐标为蛋白质浓度(mg · mL⁻¹),纵坐标为吸光值($\lambda = 595$ nm)绘制标准曲线,回归方程为 $y = 6.324x + 0.0089$, $r = 0.9993$,吸光度与蛋白质浓度线性关系良好(图 1)。

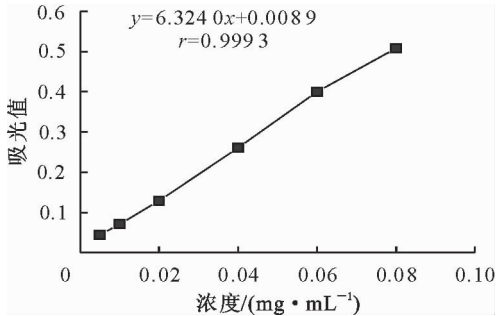


图 1 蛋白质的标准曲线

Fig.1 Protein standard curve

1.2.3.2 样品蛋白质含量检测 首先吸取浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的多糖溶液 1 mL 于试管中,然后加入考马斯亮蓝 G-250 溶液 5.0 mL,摇匀,3 次平行;空白管以蒸馏水代替多糖溶液,测吸光度,计算样品蛋白质含量及蛋白质脱除率。

$$\text{蛋白质含量} = \frac{C \times V \times D}{W}$$

式中:C 表示供试液蛋白质浓度(mg · mL⁻¹),V 为供试液的体积(mL),D 为供试液的稀释因子,W 为样品质量(mg)。

蛋白脱除率=

$$\frac{\text{脱蛋白前蛋白质含量} - \text{脱蛋白后蛋白质含量}}{\text{脱蛋白前蛋白质含量}} \times 100\%$$

1.3 黄精多糖脱蛋白工艺

1.3.1 sewage 法脱蛋白 取黄精粗多糖溶液(5 mg · mL⁻¹)20 mL,加 1/5 sewage(氯仿 : 正丁醇 = 4 : 1)试剂,剧烈震荡 20 min,离心弃去中间变性蛋白和下层溶剂,重复多次,采用 1.2.2.2 和 1.2.3.2 中方法检测多糖和蛋白质含量,然后计算多糖损失率和蛋白除去率。

1.3.3 酶法脱蛋白工艺的研究

1.3.3.1 单因素试验 取黄精粗多糖溶液,加入木瓜蛋白酶,调至酶反应的适宜 pH,在一定温度下水浴一定时间,然后煮沸灭酶 10 min,使酶失活沉淀,酶解液 4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上清液加入无水乙醇 4℃放置过夜,离心,将多糖沉淀烘干,复溶,最后测蛋白质含量。单因素考察条件分别为酶解温度 30、40、50、60、70 ℃(木瓜蛋白酶添加量 2%、pH 为 6.5,时间 2 h),酶解时间 0.5、1.5、2.5、

3.5、4.5 h(木瓜蛋白酶添加量 2 %,pH 为 6.5,温度为 50 ℃),酶解 pH 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5(木瓜蛋白酶添加量 2%,时间 2.5 h,温度为 50 ℃),酶用量 1%、1.5%、2%、2.5%、3%(时间 2.5 h,pH 为 5.5,温度为 50 ℃),这些因素对蛋白质脱除率的影响。

1.3.3.2 正交试验 在上述单因素试验基础上采用酶解温度、酶解时间、酶解 pH 及酶用量 4 因素正交试验(表 1),优选黄精多糖中蛋白质酶法脱除的最佳工艺参数。

表 1 因素水平
Table 1 Factors and levels

水平	酶解温度 (A)/℃	酶解时间 (B)/h	pH 值 (C)	酶用量 (D)/%
1	40	2	4.5	2
2	50	2.5	5.5	2.5
3	60	3	6.5	3

2 结果与分析

2.1 酶法脱蛋白工艺条件的优化

2.1.1 单因素试验结果

2.1.1.1 酶解温度 从图 2(a)可以看出,酶解温度 30~50℃时,由于酶活力随温度上升而增加,从而对蛋白脱除率提高。温度达 50℃,蛋白脱除率达最大值。在酶解温度作用范围内,最适温度酶作用最强,低温抑制酶活性,而较高的温度可促进酶作

用,使蛋白质脱除率显著增加。在此之后,再继续增加温度,蛋白脱除率反而下降,可能是由于温度过高导致酶失活及多糖分解。故酶解温度以 50 ℃为宜。

2.1.1.2 酶解时间 由图 2(b)得到,在一定范围内,蛋白质去除效果随着酶解时间的增大而呈上升趋势,当酶解时间达到 2.5 h 时,蛋白脱除率达最高为 64.73%,再增加酶解时间,蛋白脱除率基本趋于平稳。主要因为随着反应时间的增加,使酶与蛋白充分作用,但当酶反应达到饱和时,蛋白的脱除效果受反应时间延长影响不大。因此,考虑到蛋白除杂效率,酶解时间确定为 2.5 h。

2.1.1.3 pH 酶液 pH 对蛋白脱除率影响见图 2(c)。当酶液 pH 5.5 时,蛋白脱除率达最高。酶液 pH>5.5 或<5.5,都减弱蛋白的脱除,可能是过高或过低的 pH 能导致木瓜蛋白酶结构的变化,从而降低酶活性。所以酶解 pH 确定为 5.5。

2.1.1.4 酶用量 由图 2(d)看出,木瓜蛋白酶的用量有一定影响。木瓜蛋白酶的用量较低时黄精多糖中的蛋白质含量随酶用量的增加而减少,但当酶用量为 2.5%时,蛋白脱除率最高达到 62.19%,然后随酶用量的增加蛋白质脱除效果基本趋于平稳。说明木瓜蛋白酶能降解多糖中的蛋白质,从而达到脱除效果,从考虑酶成本和避免酶蛋白过多而进入酶解液,木瓜蛋白酶用量以 2.5%为好。

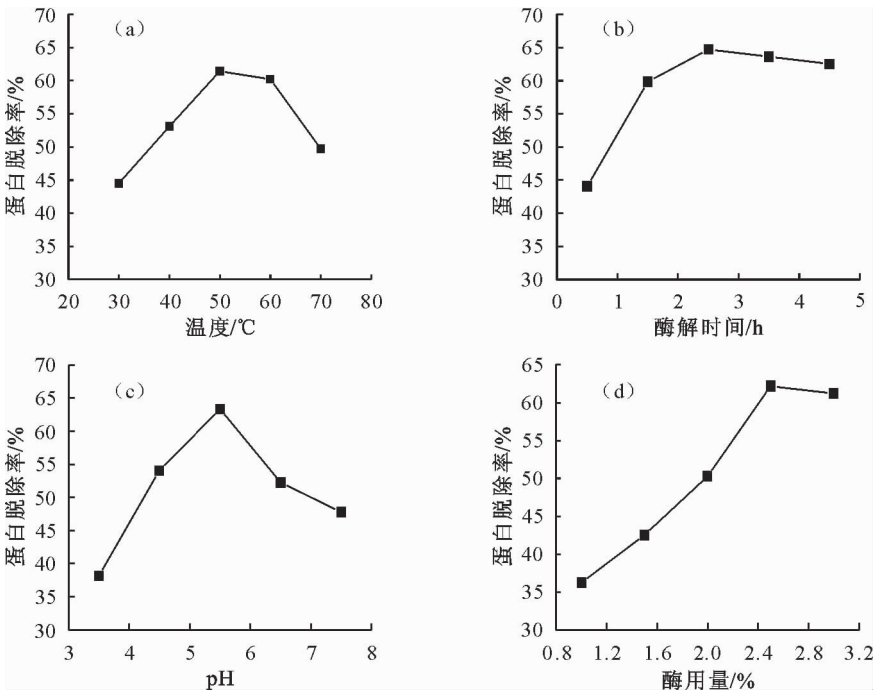


图 2 酶解温度、酶解时间、pH、酶用量对蛋白脱除率的影响

Fig. 2 Effect of reaction temperature (a), reaction time (b), pH (c), enzyme to substrate ratio (d) on protein removal rate

2.1.2 酶法脱蛋白正交试验结果与分析 以蛋白质脱除率为指标,通过正交试验考察酶解温度(A)、

酶解时间(B)、酶解 pH(C)和酶用量(D)4 因素,研究黄精粗多糖中蛋白质的酶法脱除最佳工艺。正交

试验结果见表 2 和表 3。由表 2 直观分析可知,各因素对蛋白质脱除率影响顺序为 酶解温度 $A>$ 酶解 pH 值 $C>$ 酶解时间 $B>$ 酶用量 D ,以温度对多糖中蛋白质脱除影响最关键。酶法脱除黄精粗多糖蛋白质的最优工艺参数为 $A_3B_2C_3D_3$,即酶解温度 60°C ,pH 为 6.5,作用时间 2.5 h,酶用量为 3%。因酶用量对试验结果影响不显著,酶用量在 3%和 2.5%时变化很小,因此选择 $A_3B_2C_3D_2$ 进行验证性试验,在此条件下,蛋白质脱除率为 71.23%,多糖损失率 13.7%。经方差分析(表 3),可看出酶解温度和 pH 值达显著水平($p<0.05$),而酶解时间及酶用量对蛋白质脱除率影响不明显。

表 2 正交试验结果与分析

Table 2 Results and analysis of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	蛋白质 脱除率/%
1	1	1	1	1	61.37
2	1	2	2	2	63.03
3	1	3	3	3	66.21
4	2	1	2	3	64.51
5	2	2	3	1	69.02
6	2	3	1	2	66.57
7	3	1	3	2	70.29
8	3	2	1	3	69.40
9	3	3	2	1	67.43
k1	63.537	65.390	65.780	65.940	
k2	66.700	67.150	64.990	66.630	
k3	69.040	66.737	68.507	66.707	
R	5.503	1.760	3.517	0.767	

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	45.769	2	42.775		$p<0.05$
B	5.082	2	4.750		
C	20.426	2	19.090	19.000	$p<0.05$
D	1.070	2	1.000		
误差	1.07	2			

2.2 Sevage 法脱蛋白

由图 3 得出,Sevage 法脱黄精粗多糖中蛋白质进行了 10 次,随脱蛋白次数的增加蛋白质含量减少,但减少幅度不大,尤其是第 8~第 10 次脱蛋白之间蛋白质脱除率变化更小,可认为达到终点。蛋白质脱除率为 61.32%,多糖损失率为 25.81%。可见,Sevage 法脱蛋白次数需要较多,消耗有机溶剂量大,同时由于有机溶剂的多次处理,导致少量多糖物质夹带于所形成的凝胶状物质中,特别是随形成糖复合物的多糖一同沉淀,造成多糖损失率增大。

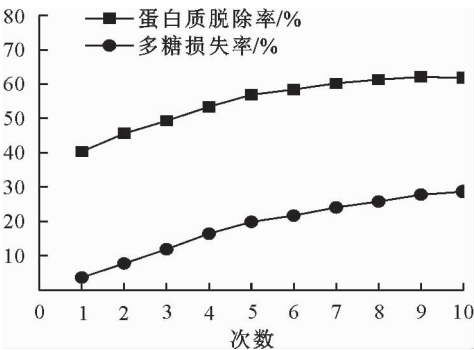


图 3 Sevage 法脱蛋白

Fig. 3 Sevage method to remove protein

3 结论与讨论

采用正交试验设计,以蛋白脱除率为指标,优选了木瓜蛋白酶去除黄精多糖蛋白质工艺。正交试验结果表明,酶解温度和 pH 值对蛋白质脱除率影响达显著水平($p<0.05$),时间和酶用量对蛋白质脱除率效果影响不显著。最佳工艺条件为:酶解温度 60°C ,pH6.5,作用时间 2.5 h,酶用量为 2.5%。验证试验表明,蛋白脱除率为 71.23%,多糖损失率 13.7%。

酶法和 Sevage 法除蛋白方法一定程度上都能将黄精多糖中的蛋白质脱除。蛋白质脱除主要是为了分离纯化黄精粗多糖,进而研究黄精多糖的理化性质,为黄精多糖的药理活性研究和深度开发提供试验依据,故除去多糖蛋白质的同时尽量减少多糖损失。图 3 中,利用 Sevage 法脱蛋白的蛋白质脱除率较酶法低且脱除过程非常复杂,多糖损失率也高。运用木瓜蛋白酶来酶解蛋白,使其成为相对分子质量较小多肽或者更为彻底的氨基酸,然后醇沉,绝大多数大分子多糖将沉淀,而分子质量相对较小的多肽和氨基酸则大部分保留于溶液中,因此,酶法是黄精多糖脱蛋白较好的方法。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 15 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1978: 52-80.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: I 部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 275-287.

[3] 尤新军, 郭蕊, 王琳, 等. 黄精总皂苷超声提取工艺研究 [J]. 西北林学院学报, 2010, 25(3): 163-166.

YOU X J, GUO R, WANG L, et al. Ultrasonic extraction process of saponins from *Polygonatum sibiricum* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2010, 25(3): 163-166. (in Chinese)

[4] 王冬梅, 朱玮, 张存莉, 等. 卷叶黄精总皂苷含量测定方法及提取工艺研究 [J]. 西北林学院学报, 2006, 21(3): 107-110.

WANG D M, ZHU W, ZHANG C L, et al. Content determination and extraction of steroids saponins from the root of *Po-*

lygonatum cirrhifolium [J]. Journal of Northwest Forest-ry University, 2006, 21(3): 107-110. (in Chinese)

[5] 李友元, 邓洪波, 向大雄, 等. 黄精多糖的降血脂及抗动脉粥样硬化作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(4): 429-431. LI Y Y, DENG H B, XIANG D X, *et al.* The effect of polygonatic rhizome on hyperlipoidemia and anti-atherosclerosis[J]. Chinese Journal of Arteriosclerosis, 2005, 13(4): 429-431. (in Chinese)

[6] 傅圣斌, 钱建鸿, 陈乐意, 等. 黄精多糖的提取及其对小鼠免疫活性的影响[J]. 中国食品学报, 2013, 13(1): 68-72. FU S B, QIAN J H, CHEN L Y, *et al.* Extracting of *Polygonatum* polysaccharides and effecting on the immunological activity in immunosuppressed mice[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(1): 68-72. (in Chinese)

[7] 江华. 黄精多糖的抗肿瘤活性研究[J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26(6): 479-481. JIANG H. The study of anti-tumour activity of rhizoma polygonati[J]. Journal of Nanjing Tcm University, 2010, 26(6): 479-481. (in Chinese)

[8] 郑春燕, 汪好芬, 张庭廷. 黄精多糖的抑菌和抗炎作用研究[J]. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 2010, 33(3): 272-275.

[9] 刘萍. 黄精多糖对老龄大鼠老化相关酶的影响[J]. 华西医药, 2010, 25(7): 1259-1261. LIU P. Effect of polygonatum sibiricmu polysaccharides on enzymes related to the aging of aged rats[J]. West China Medical Journal, 2010, 25(7): 1259-1261. (in Chinese)

[10] 孙庭阁, 赵瑞萌, 张玲. 热水浸提法提取黄精多糖最佳工艺研究[J]. 泰山医学院学报, 2010, 131(2): 128-130. SUN T G, ZHAO R M, ZHANG L. The study of optimal flow-sheet of extracting *polygonatum* polysaccharides with hotwater diffusion[J]. Journal of Taishan Medical College, 2010, 131(2): 128-130. (in Chinese)

[11] 张瑞堂, 石晓峰, 马趣环, 等. 微波辅助提取黄精多糖的工艺研究[J]. 中国药师, 2009, 12(12): 1733-1735. ZHANG R T, SHI X F, MA Q H, *et al.* Study on the micro-wave-assistant extraction polysaccharide in *Polygonatum sibiricum* red [J]. China Pharmacist, 2009, 12(12): 1733-1735. (in Chinese)

[12] 徐蔚, 王宫, 王瑾, 等. 闪式提取黄精多糖[J]. 实用中医内科杂志, 2013, 27(8): 49-50. XU W, WANG G, WANG J, *et al.* Flash extraction of rhizoma polygonati polysaccharide research process [J]. Journal of Practical Traditional Chinese Internal Medicine, 2013, 27(8): 49-50. (in Chinese)

[13] 白俊毅, 沈立, 张艳琳, 等. 复方中黄精多糖的提取纯化工艺研究[J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(3): 52-55. BAI J Y, SHEN L, ZHANG Y L, *et al.* Study on extraction and purifi cation process of rhizoma-polygonati-polysaccharide [J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2010, 24(3): 52-55. (in Chinese)

[14] 高嵩, 王鹤潼, 王立芳, 等. 黄精多糖提取纯化工艺研究[J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(3): 86-90. GAO S, WANG H T, WANG L F, *et al.* On extraction and purification technology of rhizoma polygonati polysaccharide[J]. Acta Universitatis Traditionis Medicalis Sinensis Pharmacologiaeque Shanghai, 2015, 29(3): 86-90. (in Chinese)

[15] 梁引库, 吴三桥. 黄精多糖脱色和脱蛋白工艺研究[J]. 食品科技, 2012, 37(12): 166-169. LIANG Y K, WU S Q. Bleaching and removal protein of *Polygonatum* polysaccharide[J]. Food Science and Technology, 2012, 37(12): 166-169. (in Chinese)

[16] 梁引库. 黄精多糖提取工艺的研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(12): 269-272. LIANG Y K. Study on the extraction process of *Polygonatum* polysaccharide [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(12): 269-272. (in Chinese)

[17] 刘小攀, 田春莲, 覃基信, 等. 响应面法优化超声波辅助提取忽地笑多糖工艺研究[J]. 中药材, 2015, 38(7): 1520-1523

[18] 史德芳, 韩淑琴. 仙人掌多糖提取过程中三种脱蛋白方法的比较研究[J]. 现代食品科学, 2006, 22(4): 93-95. SHI D F, HAN S Q. Comparison of three methods of removing protein from polysaccharide extract in the cactus[J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(4): 93-95. (in Chinese)

(上接第 230 页)

[11] 邹勇, 尉芹, 赵忠, 等. 木屑快速热解生物油中酚类提取物的抗氧化及抑真菌活性研究[J]. 西北林学院学报, 2014, 29(1): 116-121. ZOU Y, WEI Q, ZHAO Z, *et al.* Antioxidant and antifungal activities of phenolic extract from bio-oil by fast pyrolysis of sawdust [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2014, 29(1): 116-121. (in Chinese)

[12] 钱华, 王衍彬, 许炯, 等. 竹醋液中酚类化合物 Folin-Ciocalteu 法测定[J]. 林产化学与工业, 2007, 10(27): 105-108. QIAN H, WANG Y B, XU J, *et al.* Determination of the cntent of penolic cmpounds in bmboo vnegar by folin-ciocalteu's mthod[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2007, (27): 105-108. (in Chinese)

[13] ÖZBAYA G, AYRILMISB N. Bonding performance of wood bonded with adhesive mixtures composed of phenol formaldehyde and bio-oil [J]. Industrial Crops and Products, 2015, 66: 68-72.

[14] CHOI G G, OH S J, LEE S J, *et al.* Production of bio-based phenolic resin and activated carbon from bio-oil and biochar derived from fast pyrolysis of palm kernel shells [J]. Biore-source Technology, 2015, 178: 99-107.

[15] 杜洪双, 徐显涛, 拱国华, 等. 生物油脲醛树脂胶合成研究[J]. 木材加工机械, 2015(5): 59-61. DU H S, XU X T, GONG G H, *et al.* Study on bio-oil urea-formaldehyde resin[J]. Wood Processing, 2015(5): 59-61. (in Chinese)

[16] 伊江平, 李本, 王宇飞, 等. 可发性生物油-酚醛树脂制备工艺研究[J]. 热固性树脂, 2013, 28(4): 29-33. YI J P, LI B, WANG Y F, *et al.* Study on the preparation of foamable bio-oil phenolic resin [J]. Thermosetting Resin, 2013, 28(4): 29-33. (in Chinese)