

超声波辅助酸性缓冲液浸提木枣多糖的工艺优化

Study of optimization of extraction process of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. Muzao with acidic buffer by response surface methodology

李环宇¹ 王敏¹ 李五霞¹ 王晓琴¹ 杜丽娟² 冀晓龙¹

LI Huan-yu¹ WANG Min¹ LI Wu-xia¹ WANG Xiao-qin¹ DU Li-juan² JI Xiao-long¹

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201100)

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201100, China)

摘要:以木枣多糖的提取率为响应值, 柠檬酸盐缓冲溶液作为溶剂, 利用单因素试验和响应面设计对超声波辅助提取木枣多糖工艺进行优化。结果表明: 木枣多糖的最佳提取条件为以 pH 为 5.6 的柠檬酸盐缓冲溶液为提取剂, 液料比 23.1 : 1 (V : m), 提取温度 68 ℃, 超声波功率 420 W, 提取时间 30 min。该条件验证多糖提取率达到 (67.38 ± 0.16)%, 接近于预测值 67.63%。说明该优化方法可行, 可为木枣多糖的提取提供参考数据。

关键词: 木枣; 多糖; 酸性缓冲液; 超声辅助提取

Abstract: With extraction ratio as response from *Zizyphus jujuba* cv. Muzao and citrate buffer solution as the extraction solvent, ultrasonic extraction technology were optimized by response surface methodology (RSM). The results showed that optimal ultrasonic extraction conditions were liquid-solid ratio of 23.1 : 1 (V : m), extraction temperature of 68 ℃ and extraction power of 420 W, taking citrate buffer solution at pH 5.6 as the extraction agent. Under the optimal extraction conditions, and the resultant polysaccharides yield was (67.38 ± 0.16)%, which was close to the predicted value of 67.63%. The results demonstrated that this method was feasible, and provided reference data for the extraction of polysaccharide from *Zizyphus jujuba* cv. Muzao.

Keywords: *Zizyphus jujuba* cv. Muzao; polysaccharides; acidic buffer; ultrasonic-assisted extraction

木枣 (*Zizyphus jujuba* cv. Muzao) 为鼠李科植物枣的果实, 盛产于山西省吕梁地区和陕西省榆林地区, 作为中草药被广泛使用。枣中富含糖类、皂苷、生物碱等多种生物活

性物质^[1]。研究证实, 枣多糖具有抗肿瘤^[2]、抗氧化^[3]、调节机体免疫力^[4]等功效。

近年来, 人们围绕木枣多糖的抗小鼠运动疲劳活性^[5,6]展开了深入细致的研究, 而木枣多糖的提取是对其功能进行研究的基础, 目前专门针对木枣多糖提取工艺优化的报道还比较少。酶法和水提法是木枣多糖提取的常规方法^[5-7], 然而它们均存在耗能大、时间长、效率低等缺点, 亟需得到改进优化。杨春等^[8]采用超声波辅助传统水浸提法提取木枣多糖, 但该研究料液 pH 取值范围局限于偏中性和碱性, 没有考虑酸性条件对多糖提取效果的影响。樊君等^[9]研究发现以缓冲液作为提取剂较传统水提法在动力学上占优势, 提取率也较高。所以本试验拟采用柠檬酸盐缓冲液作为提取溶剂, 利用单因素试验和响应面法优化木枣多糖的超声波辅助提取工艺, 旨在为木枣多糖的进一步研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

木枣: 陕西省榆林市佳县;

柠檬酸、柠檬酸钠: 分析纯, 天津市博迪化工有限公司;

重蒸酚: 分析纯, 北京索莱宝科技有限公司;

浓硫酸: 分析纯, 四川西陇化工有限公司;

乙醇: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器与设备

数控超声波清洗器: KQ-700DE 型, 昆山市超声仪器有限公司;

紫外—可见分光光度计: 721 型, 上海光谱仪器有限公司;

旋转蒸发器: SHZ-III 型, 上海亚荣生化仪器厂;

低速离心机: KDC-40 型, 科大创新股份有限公司中佳分公司;

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: NSFC31401650); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (编号: 2452013py012); 陕西省科技统筹创新工程计划项目 (编号: 2013KTZB02-03-04)

作者简介: 李环宇 (1990—), 女, 西北农林科技大学在读硕士研究生。

E-mail: 1048588648@qq.com

通讯作者: 王敏

收稿日期: 2014-12-09

精密 pH 计:HS-3C 型,上海大普仪器有限公司;
真空冷冻干燥机:ZL-1 型,上海医疗器械高等专科学校
试验厂。

1.3 方法

1.3.1 超声波辅助柠檬酸盐缓冲溶液浸提木枣多糖工艺

枣粉→加入柠檬酸—柠檬酸钠缓冲溶液→超声波辅助
提取→离心→浓缩→脱蛋白→透析→浓缩→无水乙醇沉
淀→冻干→木枣多糖

1.3.2 操作要点

(1) 样品预处理:选择全熟期的木枣鲜果,剔除残次果,
清洗、沥干后人工去核、60℃干燥处理,粉碎后过 60 目筛,再
经 80%乙醇回流脱脂后风干,得到的枣粉密封保存备用。

(2) 缓冲溶液的配制:分别配制 0.1 mol/L 的柠檬酸及
柠檬酸钠溶液,并按比例配成不同 pH 的缓冲液。

(3) 离心:转速为 3 500 r/min,时间 10 min。

(4) 浓缩:采用旋转蒸发仪,温度 45℃,将提取液处理
至原体积的 1/3。

(5) 脱蛋白:采用传统 Sevag 法脱蛋白,Sevag 试剂(氯
仿:正丁醇=4:1)与提取液体积比为 3:1,重复操作
5 次。

(6) 透析:采用透析袋($M_w<3\,500\text{ Da}$),流水透析 48 h。

(7) 冻干:首先将样液置于-60℃冰箱中预冻 6 h,然后
置于冷冻干燥机处理 24 h。

1.3.3 多糖含量测定 采用苯酚—硫酸法^[10]。

1.3.4 多糖提取率计算 为了便于操作,将提取液离心处
理,直接测定上清液中的多糖含量。将其与枣粉质量的比值
定义为多糖提取率,并由此作为多糖提取效果的衡量标
准^[11],多糖提取率按式(1)计算:

$$W=\frac{10^{-3}\rho\times V\times n}{m}\times 100\%$$
 (1)

式中:

W——木枣多糖提取率,%;

ρ ——葡萄糖质量浓度,mg/mL;

V——缓冲溶液的体积,mL;

n——测定时多糖液的稀释倍数;

m——脱脂后枣粉的质量,g。

1.3.5 单因素试验设计 称取 2.0 g 枣粉置于小烧杯中,在
其他条件相同的情况下,分别以柠檬酸盐溶液 pH、提取温
度、提取时间、超声波功率、液料比为单因素进行超声辅助缓
冲液浸提木枣多糖试验,以木枣多糖提取率为响应值,逐个
考察不同条件对提取效果的影响。

(1) 柠檬酸盐溶液 pH 值的选择:设定超声波功率
420 W,提取时间 50 min,提取温度 50℃,液料比 25:1
(V:m),比较 pH 分别为 3.2、4.0、4.8、5.6、6.4 时的多糖
提取率。

(2) 提取温度的选择:设定超声波功率 420 W,提取时间
50 min,pH 5.6,液料比 25:1(V:m),比较提取温度分别

为 40、50、60、70、80℃时的多糖提取率。

(3) 提取时间的选择:设定超声波功率 420 W,pH 5.6,
提取温度 50℃,液料比 25:1(V:m),比较提取时间分
别为 10、30、50、70、90 min 时的多糖提取率。

(4) 超声波功率的选择:设定提取温度 50℃,提取时间
50 min,pH 5.6,液料比 25:1(V:m),比较超声波功率分
别为 280、350、420、490、560 W 时的多糖提取率。

(5) 液料比的选择:设定超声波功率 420 W,提取时间
50 min,提取温度 50℃,pH 5.6,比较液料比分别为 10:1、
20:1、30:1、40:1、50:1(V:m)时的多糖提取率。

1.3.6 响应面试验设计 根据单因素试验结果,筛选对提
取率影响显著的单因素为变量,以多糖提取率为响应值,采
用 Box-Behnken 试验设计方法对柠檬酸—柠檬酸盐缓冲液
作为溶剂,超声波辅助提取木枣多糖工艺进行优化。

1.3.7 热水浸提木枣多糖 以蒸馏水为提取剂,在液料比
23.1:1(V:m),浸提温度 90℃,浸提时间 180 min 条件
下提取木枣多糖。其余操作均与超声波辅助柠檬酸盐缓冲
溶液浸提木枣多糖一致。

1.3.8 数据分析 采用 Excel 2007 和 SPSS19 对单因素试
验中的各因素进行比较分析。采用 Design-Expert 8.05b 进
行响应面试验设计和分析。所有试验均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 柠檬酸盐溶液 pH 对多糖提取率的影响 由图 1 可
知,随着 pH 值的升高,木枣多糖提取率呈先降低再升高而
后又降低的趋势;在 pH 4 出现最小值,在 pH 5.6 时有明显
最大值。这可能与某些特定基团在特定 pH 条件下溶解性
不同有关^[12];超声波作用使某些酶被激活,这些酶参与的细
胞生理化学过程,在 pH 5.6 时协同作用最强。由于 pH 对
多糖提取率影响不显著,所以缓冲溶液的 pH 不作为响应面
试验设计的因素,选择固定 pH 为 5.6 进行后续试验。

2.1.2 提取温度对多糖提取率的影响 由图 2 可知,在
40~70℃范围内,随着温度的升高,多糖的提取率升高,这
可能是由于超声波引起的空化作用产生的极大压力造成生
物细胞壁破裂,多糖的溶解度升高;超声波作用激活的某些

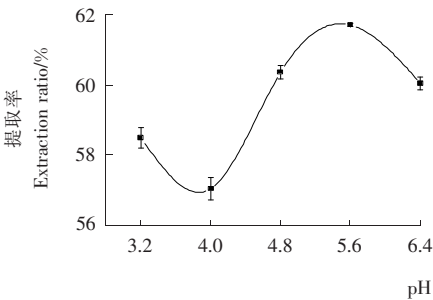


图 1 pH 对多糖提取率的影响

Figure 1 Effect of pH on extraction rate of polysaccharides

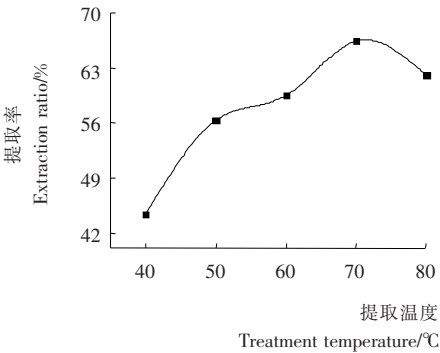


图 2 提取温度对多糖提取率的影响

Figure 2 Effect of treatment temperature on extraction rate of polysaccharide

酶,促使细胞的新陈代谢过程加速,提取率升高^[13];在 70 ℃ 达到峰值,继续升高温度,多糖提取率出现下降的情况,可能是温度过高对多糖的结构产生影响;也可能是温度过高使得某些酶活性降低,这些酶参与的生理化学反应减弱,细胞新陈代谢过程减慢导致^[14]。因此提取温度应控制在 60~80 ℃。

2.1.3 提取时间对多糖提取率的影响 由图 3 可知,提取时间越长,提取率越高。提取时间在 30 min 以内,提取率增高明显,但是由 30 min 延长至 90 min 多糖的提取率增加缓慢。这可能是由于短时间的超声处理,介质内部的空化作用增强,溶剂中瞬间产生的空化气泡迅速崩溃,温度瞬间升高,枣粉迅速被击碎^[15],多糖提取率快速升高。但是超声波处理时间过长就会产生剧烈的机械剪切作用和引起过多的热量聚集,使多糖发生降解,多糖提取率随之增长缓慢^[16]。所以从提高生产效率和节约成本的角度,选择提取时间 30 min 为宜。

2.1.4 超声波功率对多糖提取率的影响 由图 4 可知,随着超声波功率的增大,多糖提取率先升高而后逐渐降低,420 W 时出现峰值。原因可能是:超声波功率太低时,细胞壁的破碎程度低,多糖溶出慢;随着功率的提高,产生的热作用愈强,对液体颗粒的机械作用越明显,多糖溶出速率变

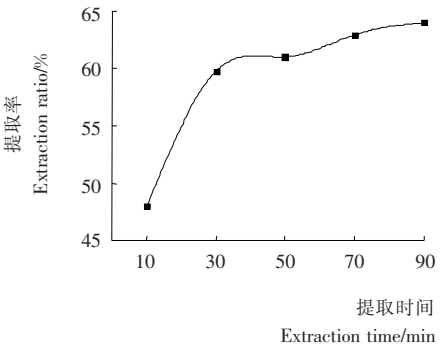


图 3 提取时间对多糖提取率的影响

Figure 3 Effect of treatment time on extraction rate of polysaccharides

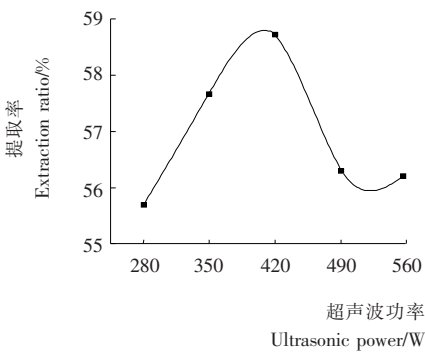


图 4 超声波功率对多糖提取率的影响

Figure 4 Effect of ultrasonic power on extraction rate of polysaccharides

快^[17];但是超声波功率太大时,一些能使目标物降解的酶被充分释放出来,造成多糖提取率降低^[18]。综合考虑,选择超声波功率 350~490 W。

2.1.5 液料比对多糖提取率的影响 由图 5 可知,液料比对多糖提取率有显著影响,随着液料比增大,木枣多糖提取率先逐渐增高而后逐渐降低,在 20 : 1(V : m)时出现峰值。其原因可能是液料比为 20 : 1(V : m)时,超声波在液体中形成最大比例的有效的搅动和流动,达到最高的提取率。随着液料比增大,样品溶液的浓度降低,超声波对悬浮于液体中的微粒的凝聚作用相对减弱,使得提取率降低^[14]。考虑到后续处理工艺,液料比取 10 : 1~30 : 1(V : m)为宜。

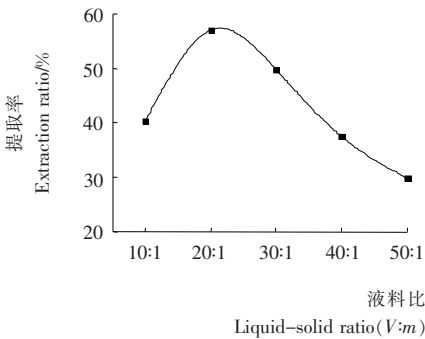


图 5 液料比对多糖提取率的影响

Figure 5 Effect of liquid-solid ratio on extraction rate of polysaccharides

2.2 响应面优化试验

2.2.1 响应面分析因素水平的选择 根据 Box-Behnken 试验设计原理,在单因素试验基础上,确定在 pH 5.6、提取时间 30 min 条件下,以提取温度、液料比、超声波功率为自变量,多糖提取率为响应值,设计三因素三水平试验,试验因素与水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

2.2.2 响应面优化试验结果分析 根据表 2 结果,利用 Design Expert 8.05b 软件对所得数据进行多元回归拟合,得到

木枣多糖提取率对提取温度、液料比和超声功率的二次多项回归方程为：

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Factors and levels used in response surface analysis

水平	X ₁ 提取温度/℃	X ₂ 液料比(V : m)	X ₃ 超声功率/W
−1	60	10 : 1	350
0	70	20 : 1	420
1	80	30 : 1	490

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Experimental design and result for response surface analysis

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	多糖提取率 Y/%
1	0	1	−1	58.96
2	0	−1	−1	49.82
3	−1	0	1	57.45
4	1	1	0	44.00
5	0	0	0	66.83
6	0	−1	1	43.99
7	−1	0	−1	53.94
8	−1	−1	0	33.29
9	0	0	0	65.43
10	0	1	1	58.23
11	1	−1	0	45.41
12	1	0	1	50.60
13	0	0	0	67.40
14	1	0	−1	56.27
15	−1	1	0	59.97

$$Y=66.55-1.05X_1+6.08X_2-1.09X_3-7.02X_1X_2-2.29X_1X_3+1.28X_2X_3-9.54X_1^2-11.35X_2^2-2.45X_3^2 \quad (2)$$

该回归模型的方差分析结果见表 3。由表 3 可知，回归模型(P<0.01)达到极显著水平；失拟项(P=0.550 1>0.1)影响不显著，且相关系数 R²=0.996 2，表明实测值与预测值高度相关。综上所述，建立的回归模型拟合度高，可用该模型较好地描述各因素与响应值之间的实际关系，可用该模型预测木枣多糖的提取工艺条件。从该回归模型的方差分析还可以看出，3 个因素对木枣多糖提取率的影响均不是简单的线性关系。除了液料比和超声功率的交互作用不显著，其他一次项、交互项和二次项对木枣多糖提取率的影响均达到显著水平。各因素对多糖提取率的影响程度大小顺序为：液料比>超声功率>提取温度。

根据表 2 试验所得的响应面图见图 6~8。由图 6~8 可

表 3 方差分析表[†]

Table 3 Analysis of variance table

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
X ₁	1	8.76	8.77	8.79	0.031 3	*
X ₂	1	295.85	296.08	296.61	<0.000 1	**
X ₃	1	9.50	9.51	9.52	0.027 2	*
X ₁ X ₂	1	197.26	197.30	197.65	<0.000 1	**
X ₁ X ₃	1	21.07	21.00	21.04	0.005 8	**
X ₂ X ₃	1	6.50	6.49	6.51	0.050 9	
X ₁ ²	1	335.72	335.78	336.38	<0.000 1	**
X ₂ ²	1	475.69	475.47	476.32	<0.000 1	**
X ₃ ²	1	22.22	22.16	22.20	0.005 2	**
模型	9	1 296.79	144.09	144.35	<0.000 1	**
误差项	5	4.98	1.00			
失拟项	3	2.92	0.98	0.95	0.550 1	
纯误差	2	2.06	1.03			
所有项	14	1 301.76				

[†] * 显著(P<0.05)；** 极显著(P<0.01)。

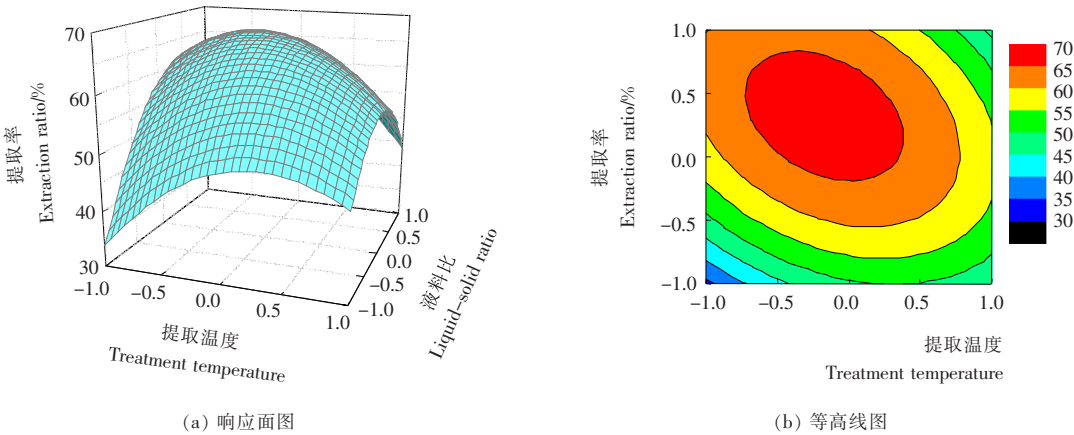


图 6 提取温度和液料比交互作用对木枣多糖的提取率影响的响应面图

Figure 6 Response surface plots for the interaction effects between extraction temperature and liquid-solid ratio on the polysaccharides extraction ratio of *Zizyphus jujube* cv. *Muzao*

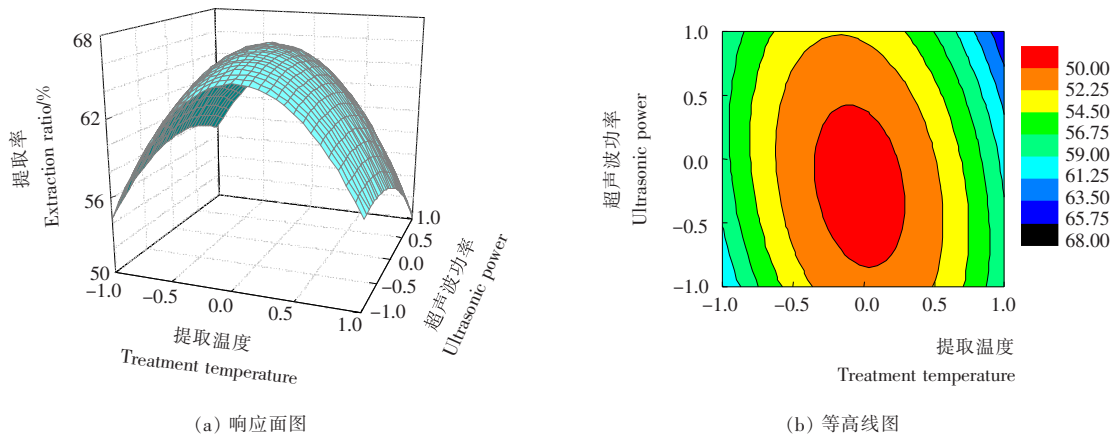


图 7 提取温度和超声功率交互作用对木枣多糖的提取率影响的响应面图

Figure 7 Response surface plots for the interaction effects between extraction temperature and ultrasonic power on the polysaccharides extraction ratio of *Zizyphus jujube* cv. *Muzao*

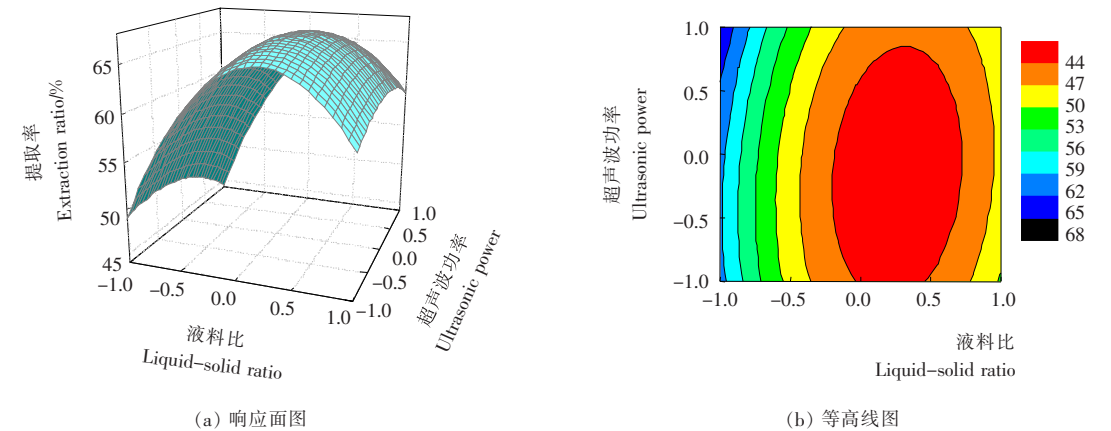


图 8 液料比和超声功率交互作用对木枣多糖的提取率影响的响应面图

Figure 8 Response surface plots for the interaction effects between liquid-solid ratio and ultrasonic power on the polysaccharides extraction ratio of *Zizyphus jujube* cv. *Muzao*

知,液料比对木枣多糖提取率的影响极为显著,其绘制的曲线最为陡峭;超声波功率对木枣多糖的影响次之,而影响最小的则是提取温度,与提取温度相比,其曲线较为平滑一些。此外,图 6(b)和图 7(b)中的等高线呈明显的椭圆形,说明提取温度和液料比,提取温度和超声功率之间均具有非常显著的交互作用。这些结果与表 3 的结果相一致。

2.2.3 模型验证 通过 Design-Expert 8.05b 软件进行数据分析确定各因素的最佳取值,Y 的最大估计值 67.63%,稳定点(X_1, X_2, X_3)的编码值为(-0.16,0.31,-0.06)。与之对应的提取温度 68.4℃、液料比 23.1 : 1(V : m)、超声波功率 415.8 W。考虑实际操作的便利,将提取工艺参数修正

为超声波功率 420 W,提取温度 68℃,液料比 23.1 : 1(V : m),pH 5.6,时间 30 min,并进行 3 次平行验证实验。实际测得的多糖提取率为(67.38±0.16)%,实测值与预测值相对误差<1%,说明回归方程拟合度高。

2.3 不同提取方法的比较

由表 4 可知,与热水浸提法相比,超声波辅助柠檬酸盐缓冲溶液浸提木枣多糖可使多糖提取率提高 66.41%,效果十分显著。

3 结论

本试验在单因素的基础上,利用 Box-Behnken 响应面法

表 4 不同提取方法的比较

Table 4 Comparison of different extraction methods

提取方法	液料比(V : m)	时间/min	温度/℃	多糖提取率/%
热水浸提法	23.1 : 1	180	90	40.49
超声波辅助柠檬酸盐缓冲溶液浸提法	23.1 : 1	30	68	67.38

对木枣多糖的超声波辅助酸性缓冲液浸提工艺进行优化研究。结果表明,其提取工艺条件为:以 pH 为 5.6 的柠檬酸盐缓冲溶液为提取剂,液料比 23.1 : 1($V : m$),超声波功率 420 W,提取温度 68 ℃,时间 30 min。该条件下木枣多糖的实测提取率为 $(67.38 \pm 0.16)\%$ 。与传统热水提取法相比,超声波辅助酸性缓冲溶液浸提木枣多糖能显著缩短提取时间,降低提取温度,提高多糖提取率,可为木枣的开发利用和木枣多糖的研究提供依据,但是关于此方法提取的木枣多糖的生物活性还有待于进一步的研究。

参考文献

1 柳杨,罗瑞明.长枣多糖水提工艺参数的响应面分析及优化[J].食品与机械,2010,26(5):128~130.

2 Hung Chi-feng, Hsu Bo-yang, Chang Shyh-chung. Antiproliferation of melanoma cells by polysaccharide isolated from Zizyphus jujuba[J]. Nutrition,2012,28(1):98~105.

3 亓树艳,王荔,莫晓燕.大枣多糖的提取工艺及抗氧化作用研究[J].食品与机械,2012,28(4):117~120.

4 Li Jin-wei, Shan Liang, Liu Yuan-fa, et al. Screening of a functional polysaccharide from Zizyphus Jujuba cv. Jinsixiaozao and its property[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2011,49(3):255~259.

5 曹犇.木枣多糖抗小鼠运动疲劳的实验研究[J].食品科学,2008,29(9):571~574.

6 池爱平,陈锦屏,熊正英.木枣多糖抗疲劳组分对力竭游泳小鼠糖代谢的影响[J].中国运动医学杂志,2007,26(4):411~415.

7 曹奔,池爱平.酶法提取木枣多糖对游泳小鼠血清酶的影响[J].食品科学,2006,27(10):531~534.

8 杨春,丁卫英,邓晓燕,等.超声波辅助浸提木枣多糖优化工艺的研究[J].农产品加工(学刊),2008(5):24~26.

9 樊君,尚红伟,王华敏,等.大枣多糖的提取工艺研究[J].食品研究与开发,2002,23(3):29~31.

10 Li Jin-wei, Liu Yuan-fa, Fan Liu-ping, et al. Antioxidant activities of polysaccharides from the fruiting bodies of Zizyphus Jujuba cv. Jinsixiaozao[J]. Carbohydrate Polymers,2011,84(1):390~394.

11 张利芳. 苦瓜多糖的纯化及其免疫和抗氧化活性作用[D].武汉:华中农业大学,2010.

12 刘鹏,程显好,刘亚丽,等.虫草菌丝体多糖的提取方法[J].食品与发酵工业,2007,33(3):140~142.

13 Wang Zhao-mei, Cheung Yi-ching, Leung Po-hong, et al. Ultrasonic treatment for improved solution properties of a high-molecular weight exopolysaccharide produced by a medicinal fungus[J]. Biore-source Technology,2010,101(14):5 517~5 522.

14 曾里,夏之宁.超声波和微波对中药提取的促进和影响[J].化学研究与应用,2002,14(3):245~249.

15 闪俊杰,杜振雷,李青,等.超声波在化学工业中的应用[J].河北工业科技,2009,26(2):127~130.

16 杨昱,白靖文,俞志刚.超声辅助提取技术在天然产物提取中的应用[J].食品与机械,2011,27(1):170~174.

17 Chen Xiao-ping, Wang Wan-xiang, Li Shui-bing, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of Lingzhi polysaccharides using response surface methodology and its inhibitory effect on cervical cancer cells[J]. Carbohydrate Polymers,2010,80(10):944~948.

18 潘利华,徐学玲,罗建平.超声辅助提取水不溶性大豆膳食纤维及其物理特性[J].农业工程学报,2011,27(9):387~392.

(上接第 174 页)

医药、食品及化妆品等方面的推广应用提供了试验数据。

参考文献

1 毛绍春,李竹英,李聪.酸果蔓中 SOD 酶的提取及活性测定[J].食品与机械,2007,23(1):62~63,68.

2 杨清媛,张相年,赵树进.聚乙二醇化学修饰超氧化物歧化酶的研究进展[J].中国老年学杂志,2012(20):4 597~4 599.

3 齐敬总,王凤山,张鸿伟,等.低分子肝素修饰超氧化物歧化酶及修饰酶的理化性质研究[J].中国药学杂志,2006,41(2):150~153.

4 杨学山,王本启,王正娟,等.月桂酰氯修饰羊血超氧化物歧化酶工艺优化及酶学性质[J].食品科学,2014(7):128~131.

5 Mülbauer M, Giannis A. The synthesis and oxidative properties of polymer-supported IBX[J]. Angew. Chem. Int. Ed., 2001,40(23):4 393~4 394.

6 阎家麒,徐龙伟,高应,等.修饰超氧化物歧化酶的制备、性质及其在化妆品中应用的研究[J].日用化学工业,1992(6):4~9.

7 周志刚.超氧化物歧化酶的化学修饰进展[J].安徽医药,2010(6):623~626.

8 Nakamura S, Kato A, Kobayashi K. New antimicrobial charac-

184

teristics of lysozyme-dextran conjugate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991,39(4):647~650.

9 Mateo C, Palomo J M, van Langen L M, et al. A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004,86(3):273~276.

10 曹向宇,刘剑利,朱俊丰,等.右旋糖苷修饰玉米 SOD 研究[J].食品研究与开发,2010(3):17~19.

11 王会文,刘建荣,静天玉,等.微量超氧化物歧化酶邻苯三酚/Vc 测活法[J].河北大学学报(自然科学),2000,20(1):61~62.

12 舒薇,贺丽苹,崔堂兵,等.聚乙二醇修饰对木瓜凝乳蛋白酶酶学及药物生物学性质的影响[J].华南农业大学学报,2006,27(1):65~68.

13 张建萍,刘恩岐,巫永华,等.右旋糖苷对生姜蛋白酶的化学修饰及其酶学性质影响[J].食品科学,2013,34(9):228~233.

14 赵洁,徐斐,曹慧,等.水溶性有机溶剂对鸡肝酯酶酶活力的影响[J].食品科学,2012,33(15):216~219.

15 蔡为荣,顾小红,汤坚.仙人掌多糖的提取及其结构初步研究[J].食品与机械,2007,23(4):68~71,101.

16 冯文娟,徐泽平,周传兵,等.酵母 β -1,3-D-葡聚糖提取及结构鉴定[J].食品与机械,2013,29(5):151~153.