

米糠多糖羧甲基化反应条件优化

Technology optimization of carboxymethylation on polysaccharide from rice bran

李哲¹ 袁媛² 朱旻鹏² 肖志刚^{1,2} 王娜¹ 王崇¹

LI Zhe¹ YUAN Yuan² ZHU Ming-peng² XIAO Zhi-gang^{1,2} WANG Na¹ WANG Chong¹

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 沈阳师范大学粮食学院, 辽宁 沈阳 110034)

(1. Department of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;

2. Department of Grain Science and Technology, Shenyang Normal University, Shenyang, Liaoning 110034, China)

摘要:选用脱脂米糠提取水溶性多糖,进行羧甲基化修饰,期望通过改性处理提高其功能活性。将米糠多糖与单氯乙酸(MCA)在碱性条件下进行反应,将得到的终产物利用傅里叶红外光谱检测,其证明在未改变原有基团的条件下成功完成羧甲基修饰。试验结果表明,米糠多糖羧甲基化修饰的最优工艺条件为:反应温度 52 ℃、反应时间 2.5 h、NaOH 溶液浓度 1.20 mol/L、MCA 剂量 3.20 g,在该条件下可以得到反应产物取代度的最大值,为 0.99。

关键词:米糠;多糖;羧甲基化;红外光谱

Abstract: The experiment used defatted rice bran as materials which extract water-soluble polysaccharide from it, expecting to improve its functional activities by modification. The carboxymethylated derivative of polysaccharide was prepared by the reaction between rice bran polysaccharide and chloroacetic acid (MCA) in alkaline condition and fourier infrared spectrum suggested that carboxymethylated rice bran polysaccharide was successfully carboxymethylated without changing the original structure of rice bran polysaccharide. The optimal technological conditions for the reaction are: reaction temperature 52 ℃, reaction time 2.5 h, concentration of NaOH 1.2 mol/L, MCA dose 3.20 g. This condition of the rice bran polysaccharide carboxymethylated substitution degree(DS) resulted to a maximum value of 0.99.

Keywords: rice bran; polysaccharide; carboxymethylation; infrared spectrum

基金项目:哈尔滨市优秀学科带头人基金(编号:2012RFXXN107);黑龙江省教育厅科学技术研究重点项目(编号:12511z006);“十二五”农村领域国家科技支撑计划课题(编号:2012BAD34B02)

作者简介:李哲(1991—),女,东北农业大学在读硕士研究生。

E-mail: lizhe0407@126.com

通讯作者:肖志刚

收稿日期:2015-11-20

米糠是稻谷脱壳后依附在糙米上的表面层,占稻谷总质量的 5%~7%,仅在中国其年产量已超过 1 000 万 t^[1-2]。天然米糠中含有多种生物活性成分和抗氧化成分,例如谷维素、神经酰胺、脂多糖、生育酚、 α -硫辛酸、生育三烯酚等^[3-5]。然而,由于多种原因,目前尚未得到合理利用,仍主要作为动物饲料进行处理,米糠中可以被人类所利用的营养物质并没有充分发挥其优势。米糠中无氮浸出物含量为 33%~56%,包括淀粉、纤维素和半纤维素,其中水溶性多糖是半纤维素中重要的组成部分^[6]。水溶性米糠多糖的结构较复杂,分子量大小存在差异,并由种类不同的单糖构成,属于一种杂聚糖^[7]。

多糖与蛋白质、核酸同样都是生命物质的重要组成部分,是执行生物功能的前提,可以广泛参与各种生命活动和生理活性的调节。目前已有大量研究^[3,6,8]证明:经不同手段制得的不同类型米糠多糖在预防治疗疾病方面具有广泛及重要的作用,例如抗肿瘤、免疫增强、抗细菌感染、降血糖及降血脂等方面。虽然米糠多糖存在大量的生物活性物质,但利用化学方法来修饰米糠多糖以增强其活性的研究国内外却鲜有报道。其中,王莉^[9]选取硫酸酯化的方法对米糠多糖进行修饰,确定了氯磺酸-吡啶法修饰的最佳工艺条件。然而对于植物多糖,仍然存在其它多种修饰方式^[10-12],包括磷酸化、硫酸酯化、羧甲基化、乙酰化等,而且在功能活性方面都取得了良好的效果。其中羧甲基化修饰已应用于多种多糖,相对而言其操作方法简单易于实现,成本较低并且产物毒性小,现已成为重要的分子修饰手段之一。已有研究^[13]证明,经羧甲基化修饰的多糖在抗氧化活性、 α -葡萄糖苷酶活性抑制、透明质酸酶活性抑制等方面有显著的效果。

本研究拟选取从脱脂米糠中提取的米糠多糖,进行羧甲基化改性,以羧甲基取代度为指标,通过单因素试验和响应面法优化反应条件,为进一步研究米糠多糖羧甲基修饰及其构效关系提供基础数据和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

米糠粕:含水率 11%,蛋白质质量分数 15.6%,脂肪质量分数 0.5%,黑龙江米糠油厂;

98%浓硫酸、无水乙醇、NaOH、苯酚、单氯乙酸 MCA 等:均为分析纯。

紫外可见分光光度计:UV9000 型,上海元析仪器有限公司;

高效高速离心机:Avanti J-E 型,美国贝克曼公司;

数显台式酸度计:PHS-3C 型,上海仪电仪器有限公司;

真空冷干机:ALPHA1-4 型,德国 Christ 公司;

恒温电热水浴锅:HH-S4 型,北京科伟永型仪器有限公司;

傅里叶红外光谱仪:Nicolet 6700 型,赛默飞世尔有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 米糠多糖的提取及纯化 米糠粗多糖的提取参考文献[14]修改如下:脱脂米糠经粉碎过筛后通过挤压膨化一起声处理促进米糠多糖的酶法提取。此方法相较传统水浴法,虽然在提取率方面得到很大提高,但是纯度仅能达到 40%左右。因而将提取的粗多糖进一步柱层析,采用 DEAE-Cellulose 柱及 SephadexG-100 柱分离纯化,利用苯酚硫酸法逐管检测^[15],收集并浓缩米糠多糖组分,去离子水透析 24 h,浓缩真空冷冻干燥,制得米糠多糖纯品。

1.2.2 羧甲基化米糠多糖的制备工艺及参数研究 羧甲基化米糠多糖的制备参考文献[16]修改如下:精确称取经纯化后的米糠多糖 500 mg,使其溶于 20 mL NaOH 溶液,置于室温下匀速搅拌 20 min 后缓慢加入 MCA,混合物于水浴条件下继续搅拌使其充分反应,然后将溶液冷却至室温,将体系的 pH 调至 7.0,过滤,再将滤液在 4 °C 条件下循环透析约 24 h,透析液浓缩后冷冻干燥制得羧甲基化米糠多糖(CRBP)。

以反应温度、NaOH 浓度、MCA 剂量、反应时间为影响因素,以 CRBP 的取代度为指标进行单因素试验。单因素试验固定参数值为:反应温度 50 °C、NaOH 浓度 1.0 mol/L、MCA 剂量 3 g、反应时间 2.5 h。4 种影响因素每个因素选 5 组数值,反应温度梯度 3,选取 44~56 °C;NaOH 浓度梯度 0.20,选取 0.60~1.40 mol/L;MCA 剂量梯度 0.3,选取 2.4~3.6 g;反应时间梯度 0.25,选取 2.00~3.00 h。在单因素基础上进行优化试验,确定米糠多糖羧甲基化修饰的最佳工艺参数。

1.2.3 羧甲基化反应产物取代度的测定 根据文献[17]略有修改,将 50 mg CRBP 充分溶于 20 mL 浓度为 0.1 mol/L 的标准 HCl 溶液中,在室温条件下匀速搅拌使其完全溶解,用 0.1 mol/L 标准 NaOH 溶液进行滴定。记录当 pH 2.1 和 pH 4.3 时消耗 NaOH 溶液的体积,按式(1)计算取代度。

$$DS = \frac{0.203 \times (V_2 - V_1) \times c}{m - 0.058 \times (V_2 - V_1) \times c} \quad (1)$$

式中:

DS——取代度;

V_1 ——当 pH 2.1 时消耗 NaOH 溶液的体积,mL;

V_2 ——当 pH 4.3 时消耗 NaOH 溶液的体积,mL;

m ——样品质量,g;

c ——NaOH 标准溶液的浓度,mol/L。

1.2.4 羧甲基化米糠多糖的红外光谱检测 羧甲基化米糠多糖 3 mg 与 KBr 混合,经研磨后压片,利用傅里叶红外变换光谱仪检测 4 000~400 cm^{-1} 波段,以 DTGS 为检测器。

1.2.5 试验数据 采用 Design-Expert 8.0、Origin 85 分析。

2 结果与分析

2.1 米糠多糖羧甲基化反应的单因素试验结果

2.1.1 反应温度对米糠多糖羧甲基化产物取代度的影响

由图 1 可知,随着反应温度的升高,米糠多糖的羧甲基化取代度呈现先增加后降低的趋势。当反应温度达到 50 °C 时,修饰效果最佳,取代度得到最大值(0.88)。由此可以看出反应温度对于取代度有很大的影响,温度较高可以加快分子运动速率,促进取代反应的发生。然而温度过高,分子运动剧烈又不利于分子的结合。

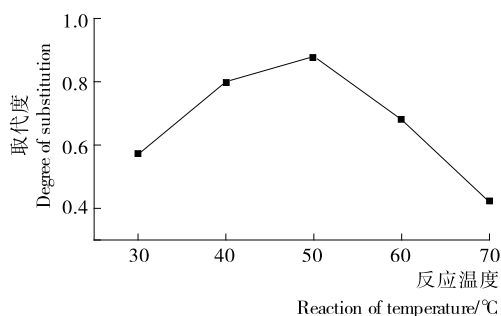


图 1 反应温度对米糠多糖羧甲基化修饰的影响
Figure 1 Effect of reaction temperature on CRBP

2.1.2 NaOH 浓度对米糠多糖羧甲基化产物取代度的影响

由图 2 可知,当 NaOH 浓度逐渐上升时,米糠多糖的取代度也随之增加,当浓度为 1.0 mol/L 时取代度最大(0.88)。但 NaOH 浓度高于 1.0 mol/L 之后,取代度却呈下降趋势。有研究^[18]指出 NaOH 溶液浓度增加可以加快离子向米糠多糖分子的渗透速率,使米糠多糖分子充分溶胀,暴露更多的活性中心,生成大量的米糠多糖钠盐,使分子与 MCA 接触面增大,进而羧甲基可以更好地完成修饰过程。但是 NaOH 浓度过高时,还可能会伴随着 MCA 碱化副反应的发生,造成 MCA 的浪费。另外,高浓度的碱性溶液条件下多糖分子、多糖钠盐、羧甲基化多糖同样也会部分降解,破坏本身自有的结构,这同样不利于多糖的羧甲基化修饰,从而降低取代度^[19-20]。

2.1.3 MCA 剂量对米糠多糖羧甲基化产物取代度的影响 由图 3 可知,随着 MCA 剂量逐渐增加,米糠多糖羧甲基取代度值先增加后降低。当 MCA 用量为 3 g 时,修饰效果最佳,米糠多糖羧甲基取代度最大值为 0.88。取代度呈现增

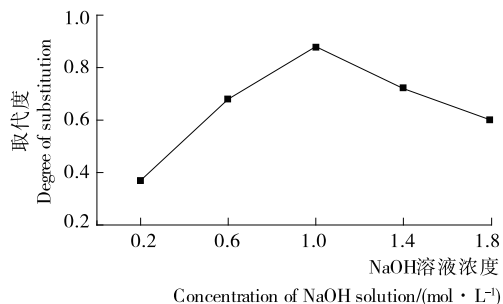


图 2 NaOH 浓度对米糠多糖羧甲基化修饰的影响

Figure 2 Effect of NaOH concentration on CRBP

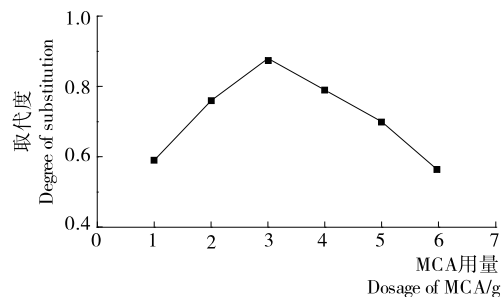


图 3 MCA 剂量对米糠多糖羧甲基化修饰的影响

Figure 3 Effect of the amount of added MCA on CRBP

大的变化趋势主要是由于米糠多糖分子可以更多地与 MCA 反应所致,但随着 MCA 用量的继续增加,中和了部分 NaOH, pH 值会持续降低,进而羧甲基化米糠多糖的取代度也随之降低。

2.1.4 反应时间对米糠多糖羧甲基化产物取代度的影响 由图 4 可知,反应时间对米糠多糖羧甲基化反应的影响,随着反应时间的增长,米糠多糖的羧甲基化取代度呈增加的变化趋势,当反应时间由 0.5 h 增大到 2.5 h 时,米糠多糖的羧甲基化取代度不断增加,但当反应时间超过 2.5 h 后,米糠多糖的羧甲基化取代度仅略有增加,并且逐渐趋于平缓,对于取代度值影响较低。故考虑将 2.5 h 作为后续研究的最佳反应条件。

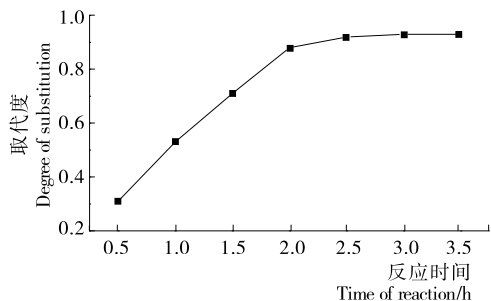


图 4 反应时间对米糠多糖羧甲基化修饰的影响

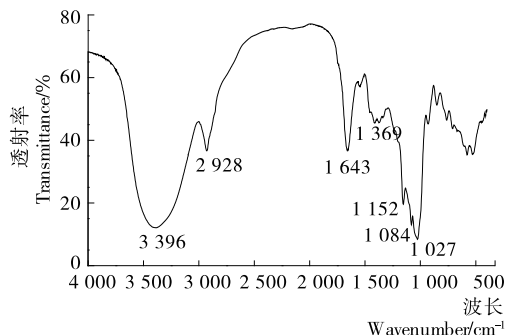
Figure 4 Effect of reaction time on CRBP

2.2 羧甲基化米糠多糖傅里叶红外光谱检测结果

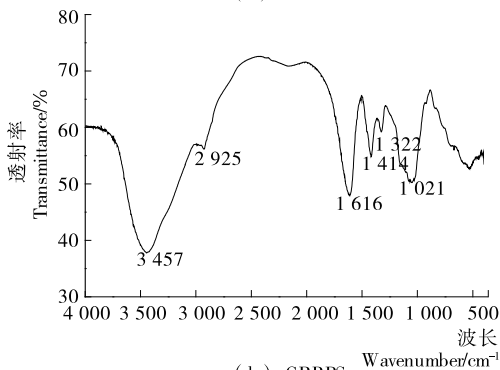
羧甲基化米糠多糖的傅里叶红外光谱图见图 5。由图 5 可知:米糠多糖具有多糖典型的红外特征吸收峰,波长 $3\ 396\text{ cm}^{-1}$ 处为 O—H 的伸缩振动, $2\ 928\text{ cm}^{-1}$ 处为 C—H

伸缩振动, $1\ 027\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 084\text{ cm}^{-1}$ 处为 C—O—H 伸缩振动, $1\ 369\text{ cm}^{-1}$ 处为 CH_2 对称变形振动, $1\ 152\text{ cm}^{-1}$ 处为 CH_2 反对称变形振动, $1\ 643\text{ cm}^{-1}$ 处为 C=O 伸缩振动。

而经过羧甲基化修饰的米糠多糖除了具有上述部分多糖的特殊红外吸收峰外,还有下述红外吸收峰: $1\ 616\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 322\text{ cm}^{-1}$ (COO^- 伸缩振动)、 $1\ 414\text{ cm}^{-1}$ (连接 COO^- 的 C—H 基团的弯曲振动),这两个特殊的红外吸收峰可以说明,米糠多糖羧甲基化反应的试验成功^[21]。



(a) RBPS



(b) CRBPS

图 5 米糠多糖羧甲基化米糠多糖的红外光谱

Figure 5 IR spectra of RBP and CRBP

2.3 米糠多糖羧甲基化修饰响应面试验结果与分析

通过对影响米糠多糖羧甲基化取代度单因素试验进行分析,选用以响应面中心组合为优化的分析手段,利用软件 Design-Expert 8.0 对结果数据进行处理。分别以米糠多糖羧甲基化取代度为响应值 R ,选择反应温度、反应时间、NaOH 溶液浓度、MCA 剂量为因素,依据响应曲面法试验设计原理,设计二次回归方程来拟合因素和响应值之间的函数关系,优化反应条件。设计编码表见表 1,响应面试验方案及结果见表 2。

表 1 因素水平编码表

Table 1 Encode table of factors and levels

水平	A 反应温度/℃	B 反应时间/h	C NaOH 浓度/(mol·L ⁻¹)	D MCA 剂量/g
-2	44	2.00	0.60	2.4
-1	47	2.25	0.80	2.7
0	50	2.50	1.00	3.0
1	53	2.75	1.20	3.3
2	56	3.00	1.40	3.6

表 2 试验安排及试验结果
Table 2 Test arrangement and test results

编号	A	B	C	D	取代度	编号	A	B	C	D	取代度
1	-1	-1	-1	-1	0.81	16	1	1	1	1	0.96
2	1	-1	-1	-1	0.89	17	-2	0	0	0	0.86
3	-1	1	-1	-1	0.90	18	2	0	0	0	0.98
4	1	1	-1	-1	0.90	19	0	-2	0	0	0.88
5	-1	-1	1	-1	0.90	20	0	2	0	0	0.98
6	1	-1	1	-1	0.92	21	0	0	-2	0	0.87
7	-1	1	1	-1	0.95	22	0	0	2	0	0.98
8	1	1	1	-1	0.93	23	0	0	0	-2	0.84
9	-1	-1	-1	1	0.82	24	0	0	0	2	0.94
10	1	-1	-1	1	0.90	25	0	0	0	0	0.97
11	-1	1	-1	1	0.94	26	0	0	0	0	0.99
12	1	1	-1	1	0.96	27	0	0	0	0	0.96
13	-1	-1	1	1	0.93	28	0	0	0	0	0.97
14	1	-1	1	1	0.96	29	0	0	0	0	0.98
15	-1	1	1	1	0.96	30	0	0	0	0	0.96

通过统计分析软件 Design-Expert 8.0 进行数据统计分析,得到羧甲基化米糠多糖的数值模型方程:

$$R = 0.97 + 0.019A + 0.024B + 0.025C + 0.018D - 0.013AB - 9.375E - 003AC + 3.125E - 003AD - 0.012BC + 3.125E - 003BD - 6.250E - 004 CD - 0.013A^2 - 0.011B^2 - 0.012C^2 - 0.021D^2 \quad (2)$$

由表 3 可知,各个因素(A、B、C、D)的 P 值都小于 0.000 1,说明该试验选取的 4 个因素对取代度影响均为极显著,失拟

项 P 值大于 0.05 不显著,模型中 $R^2 = 0.9451$ (大于 0.800 0),可以充分说明方程与试验拟合良好,自变量与响应值之间呈显著的线性关系,试验误差小,模型能够较好地反映数据规律,可以检验各因素之间的关系并作为此反应的理论推测。由 F 检验可以查询到因子贡献率为:C>B>A>D。并且可以得知,反应温度与反应时间、反应温度与 NaOH 浓度、反应时间与 NaOH 浓度两两交互作用显著。所建立模型,各因素两两交互对羧甲基化取代度的影响见图 6。

表 3 回归与方差分析
Table 3 Regression and variance analysis

变量	自由度	均方	平方和	F 值	Pr>F
A	1	8.067E-003	8.437E-003	31.44	<0.000 1
B	1	0.014	0.014	50.45	<0.000 1
C	1	0.016	0.016	57.78	<0.000 1
D	1	7.704E-003	7.704E-003	28.71	<0.000 1
AB	1	2.756E-003	2.756E-003	10.27	0.005 9
AC	1	1.406E-003	1.406E-003	5.24	0.037 0
AD	1	1.562E-004	1.562E-004	0.58	0.457 2
BC	1	2.256E-003	2.256E-003	8.41	0.011 0
BD	1	1.562E-004	1.562E-004	0.58	0.457 2
CD	1	6.250E-006	6.250E-006	0.023	0.880 7
A ²	1	4.800E-003	4.800E-003	17.89	0.000 7
B ²	1	3.157E-003	3.157E-003	11.77	0.003 7
C ²	1	3.936E-003	3.936E-003	14.67	0.001 6
D ²	1	0.012	0.012	43.92	<0.000 1
模型	14	4.948E-003	0.069	18.44	<0.000 1
失拟	10	3.342E-004	3.342E-003	2.45	0.167 9
误差	5	1.367E-004	6.833E-004		
总和	29		0.073		

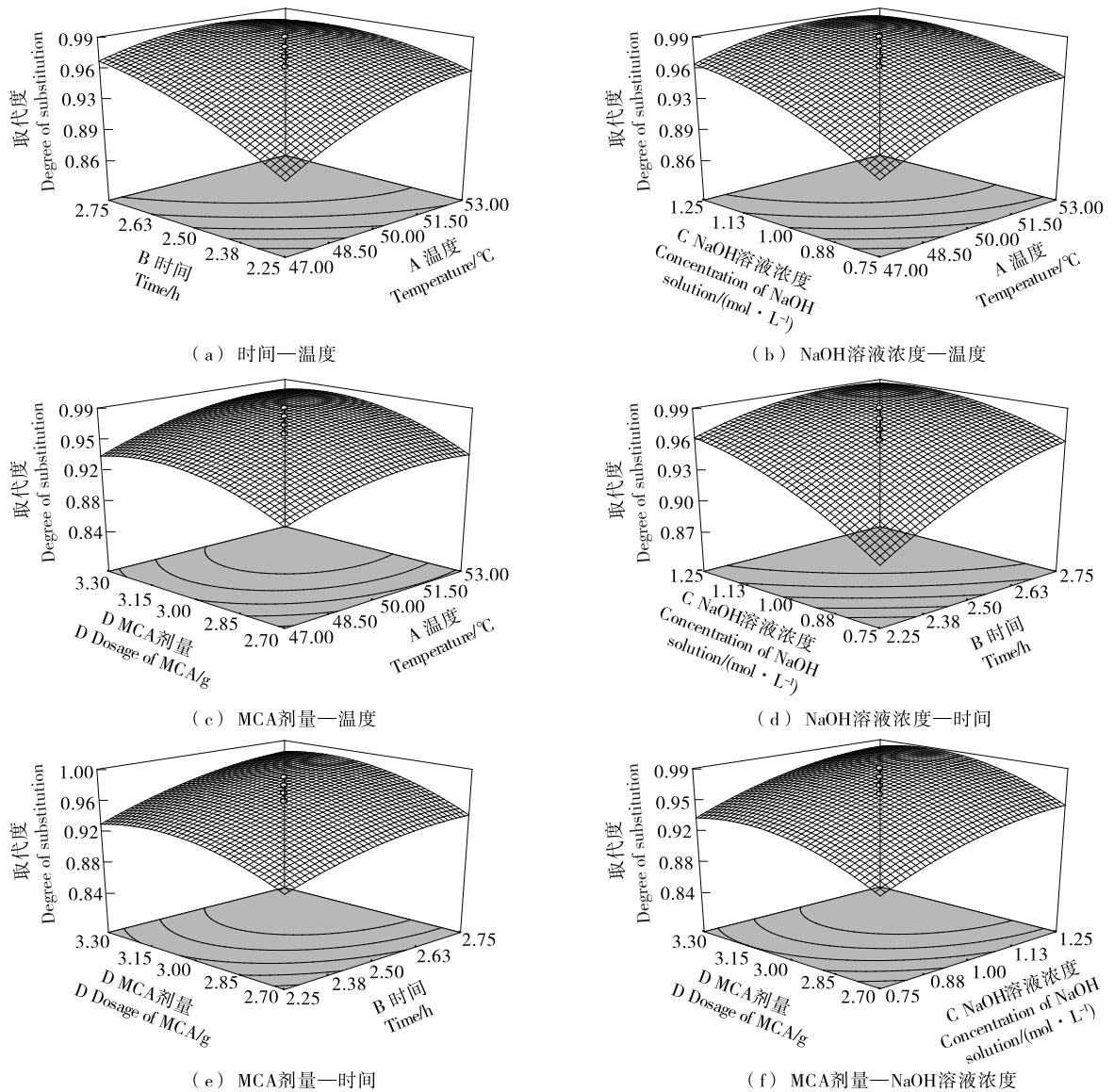


图 6 两因素交互作用(显著项)对取代度影响的响应面图

Figure 6 Effects of interactions between two factors (significantly) on response surface of DS

本试验应用响应面求得最优值的分析方法对回归模型进行分析,通过 Design-Expert 8.0 来获得最佳的试验结果。由响应面优化出经过羧甲基化修饰米糠多糖的最优反应工艺条件为:反应温度 52.22 °C、反应时间 2.57 h、NaOH 溶液浓度 1.16 mol/L、MCA 剂量 3.22 g。并且羧甲基化取代度有最大值为 0.99。考虑试验的可操作性,将最优条件变更为:反应温度 52 °C、反应时间 2.5 h、NaOH 溶液浓度 1.20 mol/L、MCA 剂量 3.20 g。在此条件下,进行 3 次平行验证实验,测得羧甲基化取代度为 0.99。进而说明响应值的试验值与回归方程预测值吻合良好。

3 结论

本研究通过单因素以及响应面优化试验,确定米糠多糖羧甲基化反应的最优工艺条件为:反应温度 52 °C、反应时间 2.5 h、NaOH 溶液浓度 1.20 mol/L、MCA 剂量 3.20 g,在此条件下米糠多糖羧甲基化取代度为 0.99。通过红外光谱分析确定了羧甲基化反应的成功。

本试验为米糠综合利用拓展了新的应用方向,然而,米糠多糖的羧甲基化修饰仍有许多需要进一步研究并解决的问题,如功能性质方面的深入探讨,生物活性的研究等,但是羧甲基化反应工艺的优化可为其后续研究提供参考依据,起到一定的推动和引导作用。

参考文献

- [1] 曹蕊. 米糠营养成分分析及其应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008: 1-3.
- [2] 韩素云, 刘磊, 张名位, 等. 米糠整体加工利用研究进展[J]. 广东农业科学, 2014(12): 89-94.
- [3] Min B, McClung A M, Chen M H. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color[J]. J. Food Sci., 2011, 76(1): C117-C126.
- [4] Garc E R M, Guerra H E, Garc V B. Phytic acid content in milled cereal products and breads[J]. Food Research International, 1999, 32(3): 217-221.

(下转第 166 页)

($m:V$), 酶用量 2.0%, 酶解时间 4 h, 酶解 pH 值 6.5, 酶解温度 50 °C 进行酶解实验, 重复 3 次, 测得酶解液的水解度为 19.60%, 肽得率为 6.30%。经验证实验比较得出, 最优的水平组合为 $A_2B_1C_2D_1$ 。

3 结论

以水解度和肽得率为指标, 从胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、复合蛋白酶 4 种蛋白酶中筛选出了水解辣椒粕分离蛋白的最佳用酶为复合蛋白酶。通过单因素试验和正交试验优化, 最终确定了复合蛋白酶水解辣椒粕分离蛋白的最佳工艺条件为: 固液比 1:10($m:V$), 酶用量 2.0%, 酶解时间 4 h, 酶解 pH 值 6.5, 酶解温度 50 °C。在此条件下得到的辣椒粕分离蛋白酶解液的水解度为 19.60%, 肽得率为 6.30%。研究结果为辣椒粕分离蛋白水解制备多肽提供了理论依据, 对低值动植物蛋白的精深加工具有现实的指导意义。本研究的不足之处在于: 在蛋白质酶解过程中, 为了使蛋白酶处于最适 pH 范围内尽量维持其水解速度, 必须加入一些酸或碱来调节水解体系的 pH 值, 因此得到的蛋白酶解液中含有一定的盐分, 且颜色较深、味道略苦。所以, 在后续试验中要对酶解液进行脱盐、脱色和脱苦处理。

参考文献

- [1] 杨清香, 葛亮, 潘锋, 等. 辣椒资源开发利用状况[J]. 农产品加工·学刊, 2010(10): 80-92.
- [2] 汪靖超, 杨宏, 姚海军, 等. 利用辣椒渣提取不溶性膳食纤维的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(4): 130-132.
- [3] 张津凤, 姚秀玲. 辣椒花生酥的研制[J]. 现代食品科技, 2008, 24(10): 1 026-1 028.

(上接第 139 页)

- [5] 王旭, 王鹏, 王娜, 等. 米糠营养速溶粉工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 247-249.
- [6] 胡国华, 杨帆, 马正智, 等. 米糠多糖的研究及应用进展[J]. 中国食品添加剂, 2007(5): 80-82.
- [7] Wang Li, Zhang Hong-bin, Zhang Xiao-yan, et al. Purification and identification of a novel heteropolysaccharide RBPS2a with anti-complementary activity from defatted rice bran [J]. Food Chemistry, 2008, 110(1): 150-155.
- [8] Li Shu-fang, Yang Han-chun, Zhang Ji-dong, et al. Effects of rice bran polysaccharide on peripheral T lymphocyte proliferation activation and serum ND antibody titer after vaccination in immunosuppression chickens induced by cyclophosphamide[J]. Veterinary Science in China, 2007, 37(7): 588-592.
- [9] 王莉. 米糠多糖及其硫酸酯的结构、抗肿瘤活性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009: 58-63.
- [10] 孙月娥, 王卫东, 王陶. 菊糖硫酸化改性研究[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(11): 95-98.
- [11] 王争昱, 贾小燕, 柴保臣, 等. 菊粉提取及羧甲基菊粉钠的制备[J]. 郑州大学学报, 2007, 44(1): 192-194.
- [12] Verraest D L, Peters J A, Kuzee H C, et al. Distribution of substituents in O-carboxymethyl and O-cyanoethyl ethers of inulin[J]. Carbohydrate Research, 1997, 30(2): 203-212.
- [13] 焦中高. 红枣多糖的分子修饰与生物活性研究[D]. 陕西: 西北

- [4] 赵国群, 张伟. 辣椒粕发酵生产单细胞蛋白的菌种筛选研究[J]. 中国酿造, 2009(7): 109-111.
- [5] 唐鑫媛, 夏延斌, 文新昱, 等. 超声波辅助碱法提取辣椒渣中蛋白质的工艺优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 222-226.
- [6] 高梅娟, 刘平, 兰小红, 等. 双酶酶解豆粕蛋白制备低苦味肽[J]. 食品工业科技, 2010, 31(2): 193-197.
- [7] Farzamirad V, Aluko R. Angiotensin-converting enzyme inhibition and free-radical scavenging properties of cationic peptides derived from soybean protein hydrolysates [J]. International Journal of Food Science and Nutrition, 2008, 59(5): 428-437.
- [8] 黄薇, 宋永康, 林虬, 等. 双酶分步酶解制备玉米寡肽的研究[J]. 福建农业学报, 2014, 29(3): 276-281.
- [9] 张锐昌, 徐志宏, 刘鄂涓. 胃蛋白酶水解小麦蛋白工艺的研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(1): 59-61.
- [10] 裴剑慧, 裴云生, 马波, 等. 花生蛋白水解条件的优化研究[J]. 粮食与食品工业, 2013, 20(1): 28-32.
- [11] 王智霖, 刘建伟, 罗子放, 等. 酶解米糠蛋白制备米糠营养液的工艺研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(6): 149-152.
- [12] 李大明, 宋焕禄, 祖道海. 大豆蛋白酶解的研究[J]. 粮食与食品工业, 2006, 13(2): 20-23.
- [13] 朱均旺, 鞠兴荣, 王立峰, 等. 超声波辅助分步酶解法制备菜籽肽及复合酶筛选[J]. 食品科学, 2010, 31(13): 244-248.
- [14] 肖如武, 黄骆镰, 黄克, 等. 不同酶水解马氏珍珠贝蛋白的特性研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(7): 725-730.
- [15] 赵延伟, 王雨生, 陈海华, 等. 响应面法优化豆粕酶解工艺条件[J]. 食品科学, 2013, 34(8): 70-75.
- [16] 王慧云, 陈海华, 王雨生. 复合酶双向酶解豆粕蛋白制备呈味肽研究[J]. 粮食与油脂, 2014, 27(5): 26-29.

农林科技大学, 2012: 112-115.

- [14] 李杰, 罗志刚, 肖志刚, 等. 挤压超声联用提取米糠多糖工艺优化[J]. 农业机械学报, 2013, 44(3): 174-179.
- [15] 刘光宪, 冯健雄, 王辉, 等. 不同纯化方法对花生多糖抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 189-190.
- [16] Durcilece A S, Regina C M, Judith P A, et al. Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide [J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 58(2): 163-171.
- [17] Eyler R W, Klug E D, Diephuis F. Determination of degree of substitution of sodium carboxymethylcellulose [J]. Analytical Chemistry, 1947, 19(1): 24-27.
- [18] 焦中高, 刘杰超, 王思新, 等. 羧甲基化红枣多糖制备及其活性[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 176-180.
- [19] Fan Jun-min, Zhang Jing-song, Tang Qing-jiu. Structural elucidation of a neutral fucogalactan from the mycelium of *Coprinus-comatus* [J]. Carbohydrate Research, 2006, 341(9): 1 130-1 134.
- [20] Verraest D L, Peters J A, Kuzee H C, et al. Carboxymethylation of inulin [J]. Carbohydrate Research, 1995, 271(1): 101-112.
- [21] Xu Jing, Liu Wei, Yao Wen-bing, et al. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78(2): 227-234.