

辣椒粕分离蛋白酶解工艺条件的优化

Optimization on enzymatic hydrolysis processing from pepper meal protein isolate

赵 静 王 燕

ZHAO Jing WANG Yan

(湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128)

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

摘要:从辣椒粕中提取粗蛋白,建立蛋白酶水解辣椒粕分离蛋白制备呈味肽的最佳条件。以水解度和肽得率为指标,对胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、复合蛋白酶 4 种酶水解辣椒粕分离蛋白的效果进行比较研究。结果表明:复合蛋白酶的水解效果最佳。通过单因素试验选取复合蛋白酶作用的固液比、酶用量、酶解时间、酶解 pH 值及酶解温度作为试验因素,初步确立复合蛋白酶的水解条件。并通过正交试验优化最终确定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。通过实验验证,在该条件下,复合蛋白酶对辣椒粕分离蛋白具有较好的水解效果,其水解度为 19.60%,肽得率为 6.30%。

关键词:辣椒粕;复合蛋白酶;酶解;呈味肽

Abstract: Extraction of crude protein from pepper meal, by the establishment of protease hydrolysis pepper meal protein isolate preparation in the best condition of flavor peptides was studied. Through judging the degree of hydrolysis and yield of peptide, the compound protease had the best hydrolyzation effect in digesting pepper meal protein isolate among the trypsin, papain, alkaline, compound protease. The results showed that compound protease had best effect. Selecting solid-liquid ratio ($m:V$), amount of enzyme, hydrolysis time, pH and hydrolysis temperature as experiment factors, the best technological condition of digesting pepper meal protein isolate was determined by method of single factor experiment and orthogonal experiment. The result showed that the best effect of Compound protease was in the condition of solid-liquid ratio ($m:V$) 1:10, enzyme dosage 2.0%, pH 6.5, time 5 h and 50 °C. On the conditions, compound protease has better hydrolyzation effect on digesting pepper

meal protein isolate, after digesting the degree of hydrolysis is 19.60%, yield of peptide is 6.30%.

Keywords: pepper meal; compound protease; enzymatic hydrolysis; flavor peptide

辣椒粕(又名辣椒渣)是红辣椒提取天然色素及辣椒精后的剩余物,1 t 辣椒可产生 0.8 t 左右辣椒粕。辣椒粕中含有蛋白质、脂肪、糖类、 V_{B1} 、 V_{B2} 、尼克酸及多种矿物质,纤维素含量高达 23.84%,蛋白质含量可达 14%~19%,含有多种人体必需氨基酸^[1]。目前,大量的辣椒粕仅仅作为动物饲料或生产废料被直接丢弃。虽然已有学者对辣椒粕进行了深度开发:汪靖超等^[2]采用酸碱化处理从辣椒渣中提取不溶性膳食纤维,提取率高达 86.79%;张津凤等^[3]以辣椒粕、花生米和小麦粉为原料制得含高纤维素的辣椒花生酥,成品色泽为棕黄色,咸甜香辣、酥脆可口;赵国群等^[4]以辣椒粕水浸提液作为培养基,对 4 种酵母菌进行发酵培养,筛选出适宜以辣椒粕为原料生产细胞蛋白的优良菌种,为充分利用辣椒粕这一资源提供了依据;唐鑫媛等^[5]采用超声波辅助碱法提取辣椒渣中的蛋白质,提取率高达 86.41%。但在实际应用中就辣椒粕蛋白综合利用的研究和报道较少。

水解植物蛋白是众所周知的调味产品^[6]。到目前为止,大豆蛋白^[7]、玉米蛋白^[8]、小麦蛋白^[9]、花生蛋白^[10]、米糠蛋白^[11]等酶解产物中,相继被发现含有独特生理活性的功能肽抑或是风味增强肽,其中大豆多肽、玉米多肽等成功进行了产业化。但辣椒粕蛋白尚未得到较好的开发利用。若用酶法将辣椒粕分离蛋白降解得到多肽,则可大大提高辣椒粕的附加值。酶解过程较其他化学降解具有条件温和、高效、易控、安全等优势,这使得酶解技术逐渐取代传统酸碱等化学法,在蛋白质深加工和活性成分提取领域被广泛应用和研究^[12]。采用蛋白酶水解辣椒粕分离蛋白制备多肽的研究,目前尚未见报道。

本试验拟从 4 种蛋白酶中筛选出适于辣椒粕分离蛋白

基金项目:湖南省教育厅重点项目(编号:13A040)

作者简介:赵静(1990—),女,湖南农业大学在读硕士研究生。

E-mail:1101898249@qq.com

通讯作者:王燕

收稿日期:2015-09-19

的最佳水解酶,并对酶解辣椒粕分离蛋白的条件进行优化,以期对辣椒粕蛋白资源的开发利用提供理论依据和生产指导。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

辣椒粕:山东中椒英潮辣业发展有限公司;

辣椒粕分离蛋白:蛋白质含量约为 59.14%,实验室自制;

胰蛋白酶(EC3.4.21.4):2 500 U/mg,国药集团化学试剂有限公司;

木瓜蛋白酶:400 U/mg,北京鼎国生物技术有限责任公司;

碱性蛋白酶:200 U/mg,上海楷洋生物技术有限公司;

复合蛋白酶:120 U/mg,上海楷洋生物技术有限公司;

氢氧化钠、甲基红—溴甲酚绿混合指示剂、盐酸、硼砂、甲醛、无水硫酸钾、硫酸铜、浓硫酸、硼酸等:分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司;

D_{45} mm 透析袋:截留分子量 8 000~14 000 u,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;

试验用水为去离子水。

1.2 仪器与设备

中草药粉碎机:FW177 型,天津市泰斯特仪器有限公司;

分析天平:AUY220 型,日本岛津公司;

数控超声波清洗器:KQ-250DE 型,昆山市超声仪器有限公司;

电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9146A 型,上海精宏实验设备有限公司;

pH 计:pHS-3C 型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

电热恒温水浴锅:DK-S28 型,上海精宏实验设备有限公司;

定氮仪:KDN-103F 型,上海纤检仪器有限公司;

台式低速离心机:TDZ5 型,湖南赫西装备仪器有限公司;

磁力搅拌器:GL-3250B 型,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;

冷冻干燥机:FD-1B 型,北京博医康实验仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 辣椒粕分离蛋白的提取 参照超声辅助碱溶酸沉法提取^[5],略有改动。将辣椒粕粉碎并过 100 目筛后,在料液比 1:20($m:V$),温度 50 ℃,时间 4 h,超声功率 250 W 的条件下提取。将碱提液在 3 000 r/min 下离心 15 min,收集上清液,再加入稀盐酸调节 pH 至 3.6,离心,收集沉淀,经透析袋脱盐后冷冻干燥,即辣椒粕分离蛋白。

1.3.2 最佳蛋白酶的确 定 辣椒粕分离蛋白和水 1:10($m:V$)在室温下混合搅拌均匀后,选用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、复合蛋白酶分别在各自最佳酶解条件下对辣椒粕分离蛋白进行酶解。水解完成后,在沸水中保持

5 min 灭酶,3 000 r/min 离心 15 min,过滤,得辣椒粕分离蛋白酶解液。测定酶解液中游离氨基氮的含量并计算水解度以及肽得率。各蛋白酶的最适酶解条件见表 1。

表 1 不同蛋白酶的酶解条件

Table 1 Enzymatic hydrolysis conditions of different proteases

酶制剂	酶用量/%	酶解 pH	酶解温度/℃	酶解时间/h
胰蛋白酶	2.0	8.0	50	4
木瓜蛋白酶	2.0	7.0	55	4
碱性蛋白酶	2.0	8.5	55	4
复合蛋白酶	2.0	6.5	50	4

1.3.3 单因素试验设计方案

(1) 固液比对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响:拟定复合蛋白酶的酶用量 2.0%(g/g ,相对于辣椒粕分离蛋白的质量),酶解 pH 6.5,酶解时间 4 h,酶解温度 50 ℃,设定固液比的水平梯度为 1:8,1:10,1:12,1:14,1:16($m:V$),重复 3 次试验。测定酶解液水解度和肽得率,分析固液比对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响。

(2) 酶用量对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响:拟定复合蛋白酶的固液比 1:10($m:V$),酶解 pH 6.5,酶解时间 4 h,酶解温度 50 ℃,设定酶用量的水平梯度为 1.0%,1.5%,2.0%,2.5%,3.0%,重复 3 次试验。测定酶解液水解度和肽得率,分析酶用量对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响。

(3) 酶解 pH 对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响:拟定复合蛋白酶的固液比 1:10($m:V$),酶用量 2.0%,酶解时间 4 h,酶解温度 50 ℃,设定酶解 pH 的水平梯度为 6.0,6.5,7.0,7.5,8.0,重复 3 次试验。测定酶解液水解度和肽得率,分析酶解 pH 对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响。

(4) 酶解时间对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响:拟定复合蛋白酶的固液比 1:10($m:V$),酶用量 2.0%,酶解 pH 6.5,酶解温度 50 ℃,设定酶解时间的水平梯度为 4,5,6,7,8 h,重复 3 次试验。测定酶解液水解度和肽得率,分析酶解时间对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响。

(5) 酶解温度对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响:拟定复合蛋白酶的固液比 1:10($m:V$),酶用量 2.0%,酶解 pH 6.5,酶解时间 4 h,设定酶解温度的水平梯度为 40,45,50,55,60 ℃,重复 3 次试验。测定酶解液水解度和肽得率,分析酶解温度对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响。

1.3.4 正交试验优化 在单因素试验结果的基础上,将固液比定为 1:10($m:V$),以水解度和肽得率为评价指标,做酶用量、酶解时间、酶解 pH 值、酶解温度的 4 因素 3 水平的正交试验设计,并对试验结果进行分析验证,以期得到复合蛋白酶水解辣椒粕分离蛋白的最佳工艺条件。

1.4 指标测定

1.4.1 辣椒粕分离蛋白酶解液水解度的测定 根据文献^[13],按照凯氏定氮法测定总氮(TN)和甲醛电位滴定法测定酶解液中游离氨态氮(AN)。水解度按式(1)计算:

$$DH = \frac{AN}{TN} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

DH——水解度, %;

AN——酶解液中的氨基酸含量, g;

TN——酶解液中的总氮含量, g。

1.4.2 辣椒粕分离蛋白酶解液肽得率的测定 根据文献[14]。肽得率按式(2)计算:

$$c = \frac{m_1 - m_2}{m} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

c——肽得率, %;

m——原料总蛋白氮含量, g。

m_1 ——酶解上清液总氮含量, g;

m_2 ——酶解上清液总氮态氮含量, g。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白酶对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响

不同蛋白酶对底物作用的位点不同,将影响蛋白酶对辣椒粕分离蛋白的水解效果。由图1可知,复合蛋白酶酶解产物的水解度和肽得率在4个酶解产物中均属最高,碱性蛋白酶和胰蛋白酶次之,木瓜蛋白酶最低。酶解产物的水解度越高,其肽得率也越高,二者呈正相关。其中复合蛋白酶的酶解效果最好,故确定适合于辣椒粕分离蛋白水解的蛋白酶为复合蛋白酶。

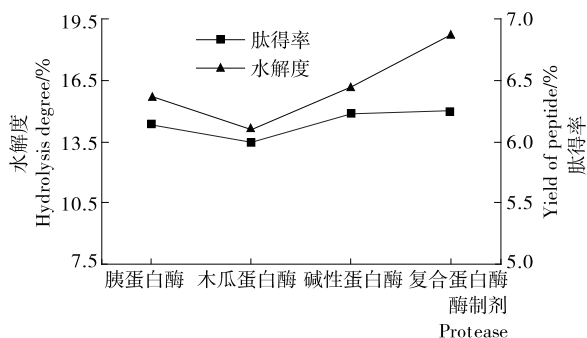


图1 蛋白酶对辣椒粕分离蛋白水解的影响

Figure 1 Effect of different kinds of protease on the hydrolysis

2.2 单因素试验结果

2.2.1 固液比对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响 由图2可知,在底物浓度不同时,蛋白酶水解效果也有差异。辣椒粕分离蛋白酶解液的水解度随着固液比的增大而呈降低趋势;而肽得率则随着固液比的增大先升高,后降低,并且在固液比为1:10(m:V)时,辣椒粕分离蛋白酶解液的肽得率最高。由于固液比对酶解液的水解度影响很大,很可能会掩盖其他因素的作用效果,并考虑到要求酶解得到的产物是呈味肽,综合两个指标从而确定复合蛋白酶水解辣椒粕分离蛋白的最佳固液比为1:10(m:V)。

2.2.2 酶用量对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响 由图3可知,在其他因素固定不变的条件下,辣椒粕分离蛋白酶解液

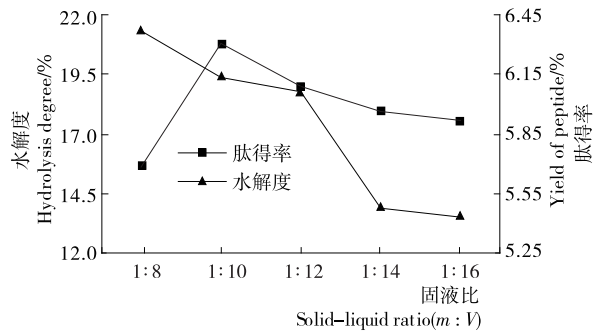


图2 固液比对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响

Figure 2 Effect of solid-liquid ratio on the hydrolysis by compound

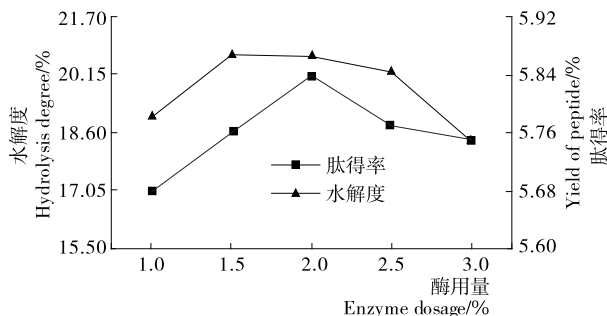


图3 酶用量对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响

Figure 3 Effect of enzyme dosage on the hydrolysis by compound protease

的水解度和肽得率随着酶用量的增多呈先升高后降低趋势。当酶用量为2.0%时,辣椒粕分离蛋白酶解液的水解度较高,且肽得率达到最大值。考虑到蛋白酶的价格,故确定复合蛋白酶水解辣椒粕分离蛋白的最适酶用量为2.0%。

2.2.3 酶解时间对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响 酶解时间会对蛋白酶水解效率产生重要的影响,酶解时间过短,水解不充分;酶解时间过长,酶易失活,水解液易腐败,且水解效率不高。由图4可知,辣椒粕分离蛋白酶解液的水解度和肽得率随酶解时间的延长而升高。在酶解5h以前,水解度和肽得率逐渐升高,继续延长酶解时间,水解度和肽得率呈显著降低趋势,且在酶解5h时均达到最大值。为了节约时间成本,确定复合蛋白酶水解辣椒粕分离蛋白的最佳酶解时间为5h。

2.2.4 酶解 pH 对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响 酶解

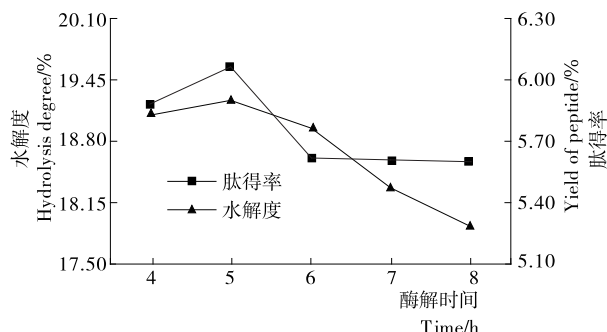


图4 酶解时间对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响

Figure 4 Effect of time on the hydrolysis by compound

pH 可改变蛋白质和蛋白酶的空间结构,可使蛋白质发生变性,使蛋白酶失去活性。酶解 pH 通过改变底物浓度解离状态,影响底物与酶结合,同时影响一些氨基酸微链的解离状态,特别是酶催化活性所需要的侧链基团的解离状态,进而影响水解效果。由图 5 可知,辣椒粕分离蛋白酶解液的水解度和肽得率随酶解 pH 的增大先升高,后降低。在 pH 值为 6.5 时,水解度相对较高,肽得率达到最大值。故确定复合蛋白酶水解辣椒粕分离蛋白的最佳酶解 pH 为 6.5。

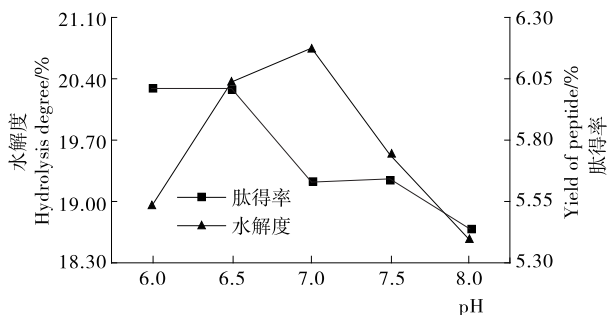


图 5 酶解 pH 对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响

Figure 5 Effect of pH on the hydrolysis by compound protase

2.2.5 酶解温度对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响 由图 6 可知,当酶解温度从 40 °C 上升到 55 °C 时,辣椒粕分离蛋白酶解液的水解度和肽得率显著升高;随着酶解温度的继续升高,水解度和肽得率急剧降低。这是因为随着温度的升高,酶与底物之间的接触机会增多,水解度增大,肽得率升高;当温度过高,导致酶失活,酶解效果下降^[15-16]。故确定复合蛋白酶水解辣椒粕分离蛋白的最佳酶解温度为 55 °C。

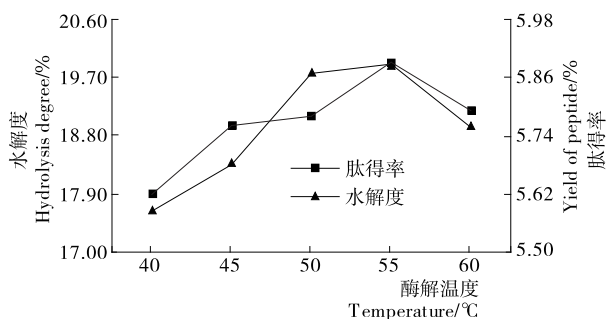


图 6 酶解温度对辣椒粕分离蛋白水解效果的影响

Figure 6 Effect of temperature on the hydrolysis by compound protase

2.3 复合蛋白酶水解辣椒粕分离蛋白的正交试验结果

由单因素试验可以看出,辣椒粕分离蛋白酶解的固液比为 1:10(m:V)时的水解度和肽得率相对最高,故选择固液比为 1:10(m:V)较为合适。固液比对蛋白酶解效果影响很大,很可能掩盖试验中其他因素的作用效果,因此在正交试验中不予考虑。辣椒粕分离蛋白酶解正交试验的因素与水平设计见表 2,结果见表 3。

由复合蛋白酶水解辣椒粕分离蛋白的正交试验 L₉(3⁴) 结果可知,水解度最高的酶解最佳工艺组合为 A₂B₃C₁D₂,水

表 2 辣椒粕分离蛋白酶解正交试验的因素与水平设计

Table 2 Factors and levels of orthogonal design hydrolysis by compound protease

水平	A 酶用量/%	B 酶解时间/h	C 酶解 pH 值	D 酶解温度/°C
1	1.5	4	6.0	50
2	2.0	5	6.5	55
3	2.5	6	7.0	60

表 3 辣椒粕分离蛋白酶解正交试验结果

Table 3 L₉(3⁴) orthogonal design and results hydrolysis by compound protease

序号	A	B	C	D	水解度/%	肽得率/%
1	1	1	1	1	19.43	5.75
2	1	2	2	2	19.82	5.76
3	1	3	3	3	19.27	5.58
4	2	1	2	3	19.66	5.97
5	2	2	3	1	19.37	6.31
6	2	3	1	2	20.28	5.67
7	3	1	3	2	19.73	6.02
8	3	2	1	3	19.60	5.61
9	3	3	2	1	19.34	6.25

水 解 度	k ₁	19.51	19.61	19.77	19.38	
	k ₂	19.77	19.60	19.61	19.94	
	k ₃	19.56	19.63	19.46	19.51	
	R	0.26	0.03	0.31	0.56	
肽 得 率	k ₁	5.70	5.91	5.68	6.10	
	k ₂	5.98	5.89	6.11	5.82	
	k ₃	5.96	5.83	5.97	5.72	
	R	0.28	0.08	0.43	0.38	

解度达到 20.28%,根据极差 R 值可知影响水解度的因素主次关系是 D>C>A>B;而肽得率最高的酶解工艺组合为 A₂B₂C₃D₁,肽得率达到 6.31%,根据极差 R 值可知影响肽得率的因素主次关系是 C>D>A>B。而根据指标极差大小得到最优的水平组合为 A₂B₃C₁D₂或 A₂B₁C₂D₁。

通过综合平衡法可知,对于因素 A,两个指标都是取 A₂ 好;对于因素 B,水解度指标取 B₃,肽得率指标取 B₁,而肽得率指标为主要指标且因素 B 总是处于末位的次要因素,本着降低时间成本的原则,选取 B₁;对于因素 C,水解度指标取 C₁,肽得率指标取 C₂,而肽得率指标为主要指标且因素 C 为主要因素,本着提高酶解效果的原则,选取 C₂;对于因素 D,水解度指标取 D₂,肽得率指标取 D₁,而肽得率指标为主要指标且因素 D 为较次要因素,故选取 D₁。综合分析选择的理论最优水平组合为 A₂B₁C₂D₁,即固液比为 1:10(m:V),酶用量为 2.0%,酶解时间为 4 h,酶解 pH 值为 6.5,酶解温度为 50 °C。

2.4 最优组合验证实验

由于理论最优水平组合 A₂B₁C₂D₁未出现在试验方案中,故应进行验证实验,即酶解条件为: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 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.