

油茶籽粕多糖羧甲基化、乙酰化修饰及其对透明质酸酶的抑制作用

Study on carboxymethylated and acetylated modification process of *Camellia Oleifera* seed meal polysaccharides and its hypoglycemic activity

杨建安¹ 张超² 文焱炳¹ 方芳²

YANG Jian-an¹ ZHANG Chao² WEN Yan-bing¹ FANG Fang²

(1. 贵州省化工研究院, 贵州 贵阳 550002; 2. 长沙理工大学化学与食品工程学院, 湖南 长沙 410114)

(1. Guizhou Research Institute of Chemical Engineering, Guiyang, Guizhou 550002, China; 2. School of Chemistry and Food Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China)

摘要:目的:研究羧甲基化油茶籽粕多糖(CM-COP)和乙酰化油茶籽粕多糖(Ac-COP)的修饰工艺,并研究其对透明质酸酶的抑制作用。方法:以取代度为指标,采用氢氧化钠—氯乙酸法和乙酸酐法分别对油茶籽粕多糖(COP)进行羧甲基化和乙酰化修饰。结果:CM-COP 最佳修饰工艺为氢氧化钠浓度 1.5 mol/L,反应时间 3 h,反应温度 60 ℃;Ac-COP 最佳修饰工艺为乙酸酐用量 3.0 mL,反应时间 3 h,反应温度 60 ℃;COP、CM-COP、Ac-COP 对透明质酸酶的抑制率分别为 78.0%、90.3%、92.2%。结论:COP、CM-COP、Ac-COP 对透明质酸酶均具抑制作用,且 CM-COP 和 Ac-COP 的抑制活性高于 COP,说明改性修饰能增加 COP 的生物活性。

关键词:油茶籽粕;多糖;羧甲基化;乙酰化;透明质酸酶

Abstract: Objective: To study the modification process of carboxymethylated *Camellia Oleifera* seed meal polysaccharide (CM-COP) and acetylated *Camellia Oleifera* seed meal polysaccharide (Ac-COP), and to study their inhibitory effects on hyaluronidase. Methods: Using the degree of substitution as an index, the carboxymethylation and acetylation modification of *Camellia Oleifera* seed meal polysaccharide (COP) were carried out by sodium hydroxide-chloroacetic acid method and acetic anhydride method, respectively. Results: The best modification process for CM-COP was: sodium hydroxide concentration of 1.5 mol/L, reaction time of 3 h, reaction temperature of 60 ℃; Ac-COP best

modification process is: acetic anhydride dosage 3.0 mL, reaction time 3 h. The reaction temperature was 60 ℃; and the inhibition rates of COP, CM-COP, and Ac-COP to hyaluronidase were 78.0%, 90.3% and 92.2%, respectively. Conclusion: COP, CM-COP, and Ac-COP all have inhibitory effects on hyaluronidase, and the inhibitory activities of CM-COP and Ac-COP are higher than COP, indicating that the modification can increase the biological activity of COP.

Keywords: *Camellia Oleifera* seed meal; polysaccharides; carboxymethylation; acetylation; hyaluronidase

多糖是一类由不少于 10 个单糖分子通过糖苷键结合而成的多羟基醛或者酮的高分子聚合物^[1]。研究表明,天然植物多糖具有抗肿瘤^[2]、降血糖^[3]、降血脂^[4]、抗氧化^[5]、抗癌^[6]、抗辐射、抗衰老、保肝、抗菌^[7]等多方面的生物活性作用。油茶籽粕是油茶籽经机械榨油后的副产物,其中含有多糖、残油、茶皂素、蛋白质等物质^[8]。

油茶籽粕中含有 20%~40% 的油茶籽粕多糖(*Camellia Oleifera* seed meal Polysaccharides, COP)^[9],但目前其利用率较低。研究^[10-11]发现,大部分天然植物多糖都具有活性或只具有较弱的活性,其大多受多糖分子中化学结构的影响,所以通过改变天然植物多糖的大分子结构、分子量、取代基团种类、作用点位置和数量等就可以改变其理化性质和生物活性,从而扩大植物多糖的应用范围和利用率。多糖的羧甲基化及乙酰化修饰产物可能对透明质酸酶的抑制活性产生积极影响^[12-13],但目前有关 COP 羧甲基化、乙酰化修饰及其修饰产物对透明质酸酶的抑制活性影响尚未见报道。文章拟通过单因素试验,研究各因素对 COP 羧甲基化及乙酰化修饰的影响规律,并探索不同取代度修饰产物对透明质酸酶抑制活性的影响,以期对 COP 更好的开发应用提供理论依据。

基金项目:贵州省科学技术基金重点项目(编号:黔科合基础[2017]1414);贵州省科技计划项目(编号:黔科合支撑[2020]1Y143号);湖南省教育厅优秀青年项目(编号:19B015);湖南省重点研发项目(编号:2020SK2100)

作者简介:杨建安(1981—),男,贵州省化工研究院高级工程师,硕士。E-mail:357454719@qq.com

收稿日期:2021-08-03

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

油茶籽粕饼:市售;

氯乙酸、乙酸酐、羟基乙酸、盐酸羟胺、三氯化铁、2,7-二羟基萘、邻苯三酚、水杨酸钠、 α -五乙酰基葡萄糖、透明质酸酶等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

恒温磁力搅拌器:85-2型,常州亿通分析仪器制造有限公司;

旋转蒸发仪:RE-201D型,巩义市予华仪器有限责任公司;

减压抽滤装置(循环水式真空泵):SHZ-D(Ⅲ)型,巩义市予华仪器有限责任公司;

真空干燥箱:DZF-6010型,巩义市予华仪器有限责任公司;

紫外分光光度计:723型,天津冠泽科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 油茶籽粕多糖的制备 油茶籽粕经干燥、粉碎、石油醚脱脂,在料液比1:8(g/mL)、时间2 h、温度70℃下,采用95%乙醇对茶皂素进行脱除,离心收集沉淀。将脱除茶皂素的粉末按固液比1:10(g/mL)加入蒸馏水,75℃下搅拌浸提3 h,离心后取上层清液,多次浸提合并上清液,即获得COP水提液,将上清液旋蒸浓缩至原体积的1/4,用Sevage法除去蛋白,加入其4倍体积浓度为95%的乙醇,4℃醇沉24 h,离心,取上清液,沉淀冷冻干燥得COP。

1.3.2 羧甲基化修饰COP工艺研究 采用氢氧化钠—氯乙酸法^[14]。取240 mg COP,在NaOH浓度1.5 mol/L,反应时间3 h,反应温度60℃下进行羧甲基化修饰。采用控制变量法,选择NaOH浓度分别为0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 mol/L,反应时间分别为1,2,3,4,5 h,反应温度分别为40,50,60,70,80℃,以羧甲基取代度为指标,考察各单因素对羧甲基取代度的影响,确定羧甲基化修饰COP的最佳工艺。

1.3.3 乙酰化修饰COP工艺研究 采用乙酸酐法^[15]。取100 mg COP,在乙酸酐用量3.0 mL,反应时间3 h,反应温度60℃下进行乙酰化修饰。采用控制变量法,选择乙酸酐用量分别为2.0,2.5,3.0,3.5,4.0 mL,反应时间分别为1,2,3,4,5 h,反应温度分别为30,40,50,60,70℃,以乙酰基取代度为指标,考察各单因素对乙酰基取代度的影响,确定乙酰化修饰COP的最佳工艺。

1.3.4 取代度的测定

(1) 羧甲基取代度:采用分光光度法^[12]。按式(1)计算羧甲基取代度。

$$D_{S1} = \frac{162A}{76 - 80A}, \quad (1)$$

式中:

D_{S1} ——羧甲基取代度;

A ——多糖中羧基乙酸百分含量, %。

(2) 乙酰基取代度:采用羟胺比色法^[16]。按式(2)计算乙酰基取代度。

$$D_{S2} = \frac{162M}{4300 - (43 - 1)M}, \quad (2)$$

式中:

D_{S2} ——乙酰基取代度;

M ——多糖中乙酰基百分含量, %。

1.3.5 COP、CM-COP 和 Ac-COP 的红外光谱表征 取COP、CM-COP 和 Ac-COP 干燥后样品各6 mg,分别与100 mg 已烘干的KBr混合,研磨,压片,使用红外光谱仪于4 000~400 cm^{-1} 进行扫描^[17]。

1.3.6 溶解度分析 称取一定量的COP、CM-COP 及 Ac-COP,加入20 mL 蒸馏水,震荡至充分均匀,观察其在冷水、加热或超声辅助条件下的溶解情况,并采用紫外可见分光光度计扫描其水溶液的透光率(400~600 nm)。

1.3.7 COP、CM-COP 和 Ac-COP 对透明质酸酶的抑制作用 取50 μL 一定浓度的COP、CM-COP 和 Ac-COP,分别加入4.85 mL 乙酸—乙酸钠溶液(pH 6.0, 0.2 mol/L)及50 μL 透明质酸酶(1 mg/mL),充分摇匀,37℃下加入50 μL 透明质酸钠(3.44 mg/mL),反应15 min,加入2 mL 2.5%的CTAB(溶于2%氢氧化钠溶液),15 min后,测定400 nm处吸光度 A_1 ,样品对照(缓冲液代替酶液)吸光度为 A_{C1} ,空白对照(缓冲液代替酶液和样品溶液)吸光度为 A_{C2} ,用缓冲液代替样品测吸光度 A_0 ^[18]。按式(3)计算抑制率。

$$R = \frac{(A_{C2} - A_0) - (A_1 - A_{C1})}{(A_{C2} - A_0)} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

R ——抑制率, %;

A_1 ——样品吸光度;

A_{C1} ——样品对照(缓冲液代替酶液)吸光度;

A_{C2} ——空白对照(缓冲液代替酶液和样品溶液)吸光度;

A_0 ——缓冲液代替样品吸光度。

1.3.8 数据处理 采用Excel 2016、Origin 2018、SPSS 25.0 软件进行数据分析处理, $P < 0.05$ 有显著性差异。所有试验均重复3次,结果以平均值±标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 羧甲基化修饰单因素试验

2.1.1 NaOH 浓度 由图1可知,当NaOH浓度<1.5 mol/L时,CM-COP取代度随NaOH浓度的升高而升高,但当NaOH浓度>1.5 mol/L时,CM-COP取代度开始下降。因此,NaOH浓度太高或太低,都会影响COP的羧甲基化效果。这可能是因为随着NaOH浓度的不

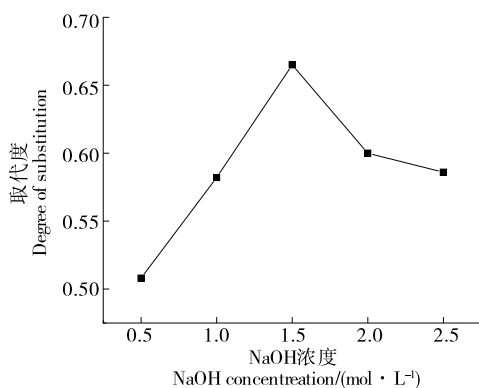


图 1 NaOH 浓度对 CM-COP 的影响

Figure 1 Effects of NaOH concentration on CM-COP

断升高,由于空间位阻,使得 COP 溶胀得更为充分,与氯乙酸接触的机会也增多,醚化反应效率提高,从而使反应取代度增加。但溶液中 NaOH 过量,氯乙酸可能发生副反应,使其利用率降低,反而使取代度降低。因此,当 NaOH 浓度为 1.5 mol/L 时,取代度达最大 0.665。

2.1.2 反应温度 由图 2 可知,当反应温度 $< 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,随着反应温度的不断升高,CM-COP 的取代度逐渐升高,但当反应温度 $> 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,取代度呈下降趋势,说明适当提高反应温度有利于羧甲基的修饰,但温度过高不利于羧甲基的取代。这可能是因为温度不断升高,加快了分子运动速度,增加了分子间相互碰撞机会,致使多糖取代度增加。因此,选择反应温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为宜。

2.1.3 反应时间 由图 3 可知,当 NaOH 浓度和反应温度一定时,随着反应时间的延长,CM-COP 取代度逐渐提高。当反应时间 $> 3\text{ h}$ 时,CM-COP 的取代度反而有所降低,可能是因为当反应时间为 $1\sim 3\text{ h}$ 时,随着反应时间的延长,反应活性中心增多,醚化反应速率加快,因此 CM-COP 的取代度显著增加。当反应时间超过 3 h 后,可能其体系内副产物增多或不稳定,导致中间产物分解,造成取代度降低。因此,最佳反应时间为 3 h ,此时取代度为 0.665。

2.1.4 不同取代度 CM-COP 的制备 根据 COP 羧甲基

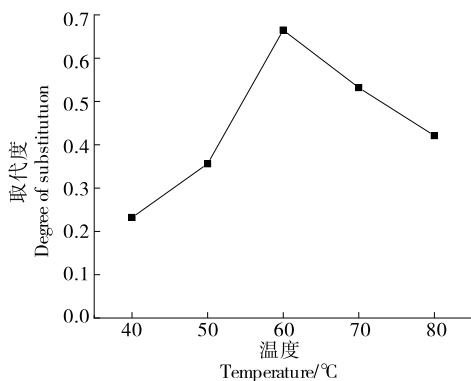


图 2 反应温度对 CM-COP 的影响

Figure 2 Effects of reaction temperature on CM-COP

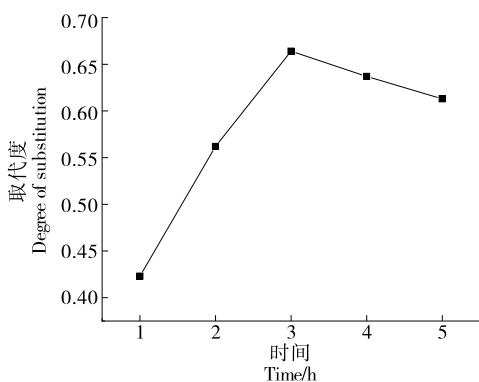


图 3 反应时间对 CM-COP 的影响

Figure 3 Effects of reaction time on CM-COP

化修饰单因素试验结果,调整反应条件,制备 CM-COP-A、CM-COP-B、CM-COP-C、CM-COP-D 4 种不同取代度的 CM-COP,其羧甲基取代度及制备工艺见表 1。

2.1.5 COP 及 CM-COP 的红外光谱 由图 4 可知,与 COP 相比,CM-COP 的红外图谱除了具有 $3\,413\text{ cm}^{-1}$ 处 O—H 的伸缩振动吸收峰和 $2\,930\text{ cm}^{-1}$ 处 C—H 的伸缩振动吸收峰的特征吸收峰外,还增加了 $1\,611\text{ cm}^{-1}$ 羧基(—COOH)的 C=O 非对称振动吸收峰、 $1\,420\text{ cm}^{-1}$ 处与羧基相连的甲基(—CH₃)的 C—H 变角振动吸收峰、 $1\,323\text{ cm}^{-1}$ 处 C=O 的对称伸缩吸收增强,这些都是羧甲基(—OCH₂—COOH)的特征吸收峰,说明羧甲基化官

表 1 CM-COP 的制备条件及取代度

Table 1 Preparation conditions and degree of substitution of CM-COP

样品	NaOH 浓度/ (mol · L ⁻¹)	反应温 度/°C	反应时 间/h	取代度
CM-COP-A	1.5	40	3	0.232
CM-COP-B	1.5	50	3	0.356
CM-COPvC	1.5	60	1	0.423
CM-COP-D	1.5	60	3	0.665

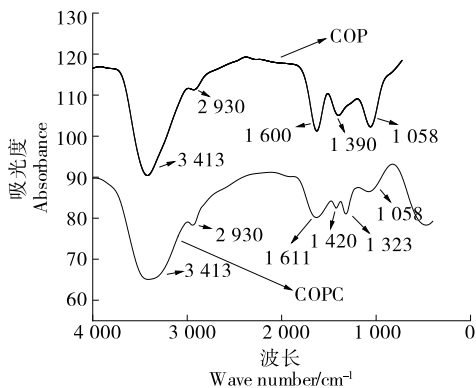


图 4 COP 及 CM-COP 的红外光谱图

Figure 4 Infrared spectrum of COP and CM-COP

能团在未改变原多糖分子结构的情况下已成功连接到多糖分子上。

2.1.6 羧甲基化多糖的溶解性 试验发现,在同浓度条件下,用氯乙酸法制得的 CM-COP 与 COP 相比,在加热或超声波等外界辅助条件下,溶解度均有不同程度的提高,其修饰产物在冷水中稍稍振荡即可溶解。由图 5 可知,同一浓度条件下,CM-COP 水溶液的透光率明显高于 COP 溶液,说明羧甲基化修饰能提高其水溶性。

2.2 乙酰化修饰单因素试验

2.2.1 乙酸酐用量 由图 6 可知,取代度随乙酸酐用量的增加而上升,可能是因为随着乙酸酐用量的增多,增加了 COP 乙酰化的反应几率,乙酰基取代度也随之增加。但当乙酸酐用量 >3 mL 时, COP 乙酰基的取代度逐渐下降,可能是因为反应体系的 pH 值随乙酸酐的增加逐渐下降,增大了乙酸酐水解的副反应程度。因此适宜的乙酸酐用量为 3 mL,此时取代度为 0.400。

2.2.2 反应温度 由图 7 可知,一定程度的反应温度有利于 COP 的乙酰化修饰。当反应温度为 $30\sim 60$ $^{\circ}\text{C}$ 时,随反应温度升高, COP 的乙酰基取代度几乎呈直线增加,可能是在一定温度范围内,温度越高,反应物活性越强,

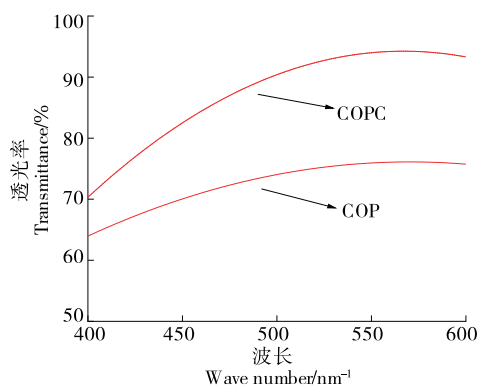


图 5 COP 及 CM-COP 水溶液的透光率

Figure 5 Transmittance of COP and CM-COP in water solutions

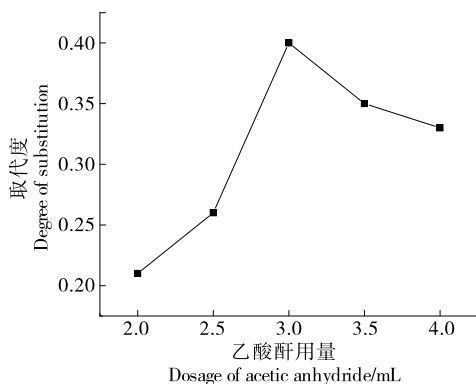


图 6 乙酸酐用量对 Ac-COP 的影响

Figure 6 Effects of acetic anhydride dosage on Ac-COP

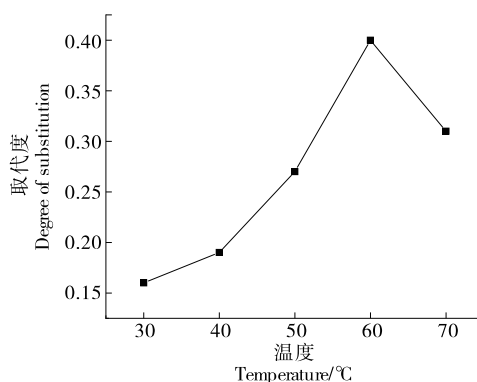


图 7 反应温度对 Ac-COP 的影响

Figure 7 Effects of reaction temperature on Ac-COP

COP 乙酰基取代度随之增大。但当反应温度 >60 $^{\circ}\text{C}$ 时,乙酰基取代度快速下降,说明温度太高并不利于 COP 的乙酰化反应,可能是当反应温度 >60 $^{\circ}\text{C}$ 时,乙酸酐的水解速度过快,导致 COP 乙酰基的取代度减小。

2.2.3 反应时间 由图 8 可知,当反应时间为 $1\sim 3$ h 时, Ac-COP 乙酰基的取代度随反应时间的延长而提高,3 h 后, Ac-COP 乙酰基的取代度随反应时间的延长而下降,可能是因为 Ac-COP 在体系中并不稳定,随着反应时间的延长,部分产物发生分解,引起乙酰化程度降低。因此, COP 的乙酰化修饰的较佳反应时间应为 3 h。

2.2.4 不同取代度 Ac-COP 的制备 根据对 COP 乙酰化修饰的 3 个影响因素的研究结果,调整反应条件,制备由低到高 4 种不同取代度的 Ac-COP (Ac-COP-A、Ac-COP-B、Ac-COP-C、Ac-COP-D),其乙酰基取代度及制备工艺见表 2。

2.2.5 COP 及 Ac-COP 的红外光谱 由图 9 可知, 3413 cm^{-1} 处为糖分子内或分子间氢键 $\text{O}-\text{H}$ 伸缩振动峰, 2930 cm^{-1} 处为次甲基 ($-\text{CH}_2-$) 中 $\text{C}-\text{H}$ 的伸缩振动吸收峰,修饰后的 Ac-COP 在 1724 cm^{-1} 处出现的吸收峰为酯基 $\text{C}=\text{O}$ 双键的收缩振动, 1247 cm^{-1} 处有一个较弱的酯基 $\text{C}-\text{O}$ 的收缩振动,说明乙酰化衍生物中已成功连接到乙酰基官能团中。Ac-COP 在 3413 cm^{-1} 处

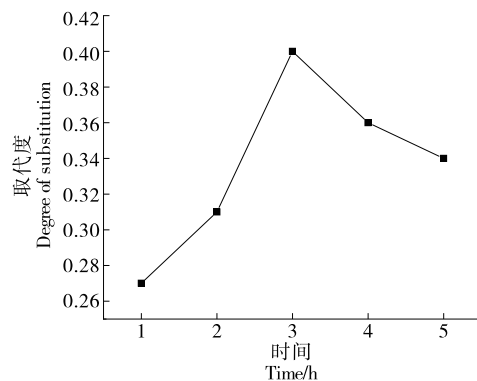


图 8 反应时间对 Ac-COP 的影响

Figure 8 Effects of reaction time on Ac-COP

表 2 Ac-COP 的制备条件及取代度

Table 2 Preparation conditions and degree of substitution of Ac-COP

样品	乙酸酐用量/mL	反应温度/℃	反应时间/h	取代度
Ac-COP-A	3	30	3	0.171
Ac-COP-B	2	60	1	0.268
Ac-COP-C	3	60	4	0.333
Ac-COP-D	3	60	3	0.400

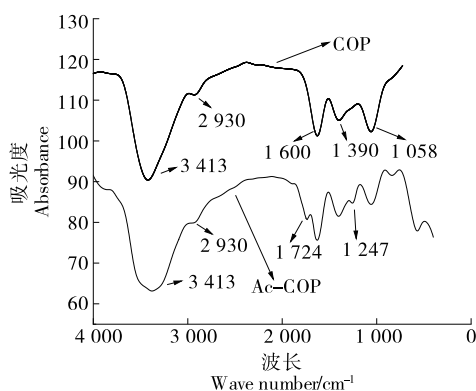


图 9 COP 及 Ac-COP 的红外光谱图

Figure 9 Infrared spectrum of COP and Ac-COP

的—OH 吸收有所减弱,推测可能是因为部分糖链在修饰过程中被水解。

2.2.6 乙酰化多糖的溶解性 由图 10 可知,同一浓度条件下,Ac-COP 水溶液的透光率明显高于 COP 溶液,说明乙酰化修饰可明显提高 COP 在水溶液中的溶解性。

2.3 COP、CM-COP 和 Ac-COP 对透明质酸酶的抑制作用

2.3.1 羧甲基化修饰 由图 11 可知, COP 和不同取代度的 CM-COP 均对透明质酸酶活性具有良好的抑制作用,且抑制能力有明显浓度依赖性,即随着样品浓度的增加其抑制率不断提高。当多糖质量浓度为 1 mg/mL 时,

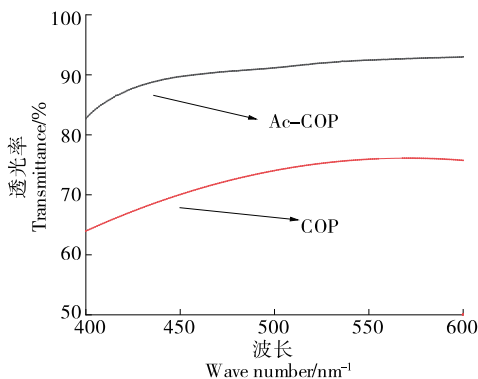


图 10 COP 及 Ac-COP 水溶液的透光率

Figure 10 Transmittance of COP and Ac-COP in water solutions

COP、CM-COP-A、CM-COP-B、CM-COP-C、CM-COP-D 对透明质酸酶的抑制率分别为 51.1%, 53.3%, 56.3%, 61.3%, 63.7%, 与 COP 相比,不同取代度的 CM-COP 对透明质酸酶活性的抑制能力均有一定程度的提高,且随取代度的增加抑制率越大,说明 COP 的羧甲基化有利于增加 COP 的透明质酸酶抑制活性。这可能是羧甲基化后多糖内部结构发生改变,从而影响抑制透明质酸酶的活性,其具体机理有待深入研究。综上,不同取代度的 CM-COP 均有利于增强 COP 对透明质酸酶活性的抑制作用。

2.3.2 乙酰化修饰 由图 12 可知, COP 及其不同取代度的 Ac-COP 均对透明质酸酶的活性抑制有明显作用。当多糖质量浓度为 0.2~1.0 mg/mL 时, COP、Ac-COP-A、Ac-COP-B、Ac-COP-C、Ac-COP-D 对透明质酸酶活性的抑制率分别为 50.9%, 54.5%, 58.3%, 61.8%, 65.3%。与 COP 相比, Ac-COP 对透明质酸酶活性具有更好的抑制作用,且抑制能力有明显浓度依赖性。这可能是因为经乙酰化修饰后的 Ac-COP 中乙酰基含量增加,从而导致 COP 的空间结构发生变化,活性提高。综上, COP 的乙

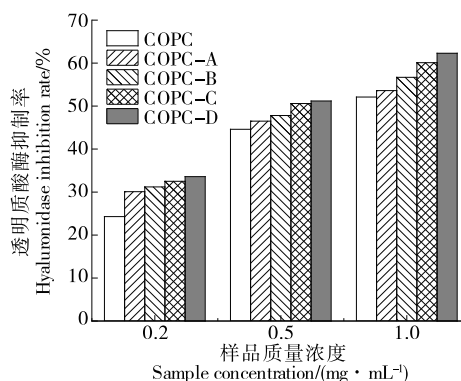


图 11 COP 及 CM-COP 对透明质酸酶的抑制作用

Figure 11 The inhibitory effect of COP and CM-COP on hyaluronidase

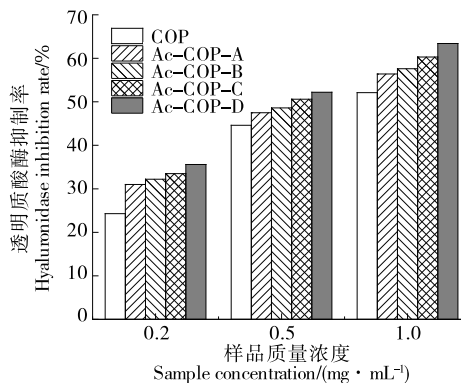


图 12 COP 及 Ac-COP 对透明质酸酶的抑制作用

Figure 12 The inhibitory effect of COP and Ac-COP on hyaluronidase

酰化修饰有利于增加 COP 对透明质酸酶活性的抑制作用。

3 结论

通过氢氧化钠—氯乙酸法和乙酸酐法分别探究了羧甲基化油茶籽粕多糖和乙酰化油茶籽粕多糖的修饰工艺。结果表明,羧甲基化油茶籽粕多糖的最佳修饰工艺条件为:NaOH 浓度 2 mol/L、反应温度 60 °C、反应时间 3 h;乙酰化油茶籽粕多糖的最佳修饰工艺条件为:乙酸酐用量 3 mL、反应温度 60 °C、反应时间 3 h。油茶籽粕多糖及其两种修饰多糖均具有多糖的显著特征峰,3 413,2 930,1 611,1 420,1 323 cm⁻¹等特殊峰值处均具有明显峰,表示羧甲基化修饰成功;3 413,2 930,1 724,1 247 cm⁻¹等特殊峰值处均具有明显峰,表示乙酰化修饰成功。油茶糖、羧甲基化油茶籽粕多糖和乙酰化油茶籽粕多糖均对透明质酸酶活性具有良好的抑制作用,且抑制能力有明显浓度依赖性。后续将进一步探索羧甲基化及乙酰化油茶籽粕多糖在体内对于透明质酸酶的活性作用情况及作用机理。

参考文献

- [1] XIA Shun-li, ZHAI Yong-cong, WANG Xue, et al. Phosphorylation of polysaccharides: A review on the synthesis and bioactivities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 184(8): 946-954.
- [2] JIN Xian-chun, NING Yu. Antioxidant and antitumor activities of the polysaccharide from seed cake of *Camellia oleifera* Abel[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(4): 364-368.
- [3] 肖建琪, 李达, 张杰, 等. 蒿属植物降糖活性成分及提取方法研究进展[J]. 药学进展, 2019, 43(1): 59-63.
XIAO Jian-qi, LI Da, ZHANG Jie, et al. Research progress on hypoglycemic active components and extraction methods of artemisia[J]. Pharmacy Progress, 2019, 43(1): 59-63.
- [4] 郑娟霞, 陈文宁, 月金玲, 等. 海带多糖降血脂活性研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(6): 220-223.
ZHENG Juan-xia, CHEN Wen-ning, YUE Jin-lin, et al. Research progress of kelp polysaccharides in lowering blood lipid activity[J]. Food & Machinery, 2020, 36(6): 220-223.
- [5] 余腾飞, 唐年初, 刘诚毅. 忧遁草多糖提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2020, 36(2): 171-175.
YU Teng-fei, TANG Nian-chu, LIU Cheng-yi. Study on the optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharides from *Saussurea vulgaris* [J]. Food & Machinery, 2020, 36(2): 171-175.
- [6] 邵佩, 庄虎, 谢超, 等. 超声辅助提取红豆多糖及其生物活性研究[J]. 食品与机械, 2021, 37(2): 173-178.
SHAO Pei, ZHUANG Hu, XIE Chao, et al. Study on ultrasound-assisted extraction of red bean polysaccharide and its biological activity[J]. Food & Machinery, 2021, 37(2): 173-178.
- [7] LIU Feng, LIU Wen-hui, TIAN Shu-ge. Artificial neural network

- optimization of *Althaea rosea* seeds polysaccharides and its antioxidant activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 70(9): 100-107.
- [8] GAO Chang, CAI Chang-yong, LIU Jia-jia, et al. Extraction and preliminary purification of polysaccharides from *Camellia oleifera* Abel. seed cake using a thermoseparating aqueous two-phase system based on EOPO copolymer and deep eutectic solvents[J]. Food Chemistry, 2020, 313(3): 126164.
 - [9] 徐迪, 徐冰彦, 张浩, 等. 油茶子饼粕多糖的降血糖活性研究[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(20): 147-151, 160.
XU Di, XU Bing-yan, ZHANG Hao, et al. Study on hypoglycemic activity of polysaccharides from *Camellia seed cake* [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2019, 58(20): 147-151, 160.
 - [10] MACHOVÁ Eva, PETER Bystricky, MALOVÍKOVÁ Aana, et al. Preparation and characterization of carboxymethyl derivatives of yeast mannans in aqueous solutions[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 110: 219-223.
 - [11] 梁英, 毕红梅, 郑文凤, 等. 平菇多糖硫酸酯制备工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2021, 37(1): 175-179.
LIANG Ying, BI Hong-mei, ZHENG Wen-feng, et al. Optimization of preparation process and antioxidant activity of *pleurotus ostreatus* sulfate[J]. Food & Machinery, 2021, 37(1): 175-179.
 - [12] 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.
JIAO Zhong-gao, LIU Jie-chao, WANG Si-xin, et al. Preparation and activity of carboxymethylated red dates polysaccharide [J]. Food Science, 2011, 32(17): 176-180.
 - [13] 陈巧玲, 袁琳, 王也, 等. 北苍术粗多糖提取工艺优化及体外抗炎活性研究[J]. 生物医学工程与临床, 2019(5): 517-523.
CHEN Qiao-lin, YUAN Lin, WANG Ye, et al. Optimization of extraction technology of crude *atractylodes* rhizome polysaccharide and its anti-inflammatory activity in vitro[J]. Biomedical Engineering and Clinical, 2019(5): 517-523.
 - [14] MACHOVÁ E, BYSTRICKY P, MALOVÍKOVÁ A, et al. Preparation and characterization of carboxymethyl derivatives of yeast mannans in aqueous solutions[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 110(9): 219-223.
 - [15] XU C, LEPPÄNEN A S, EKLUND P, et al. Acetylation and characterization of spruce (*Picea abies*) galactoglucomannans[J]. Carbohydrate Research, 2010, 345(6): 810-816.
 - [16] SONG Yi, YANG Yang, ZHANG Yu-yu, et al. Effect of acetylation on antioxidant and cytoprotective activity of polysaccharides isolated from pumpkin (*Cucurbita pepo*, lady godiva) [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1): 686-691.
 - [17] WANG Zhi-jun, XIE Jian-hua, SHEN Ming-yue, et al. Carboxymethylation of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* and their characterization and antioxidant properties evaluation[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136(1): 988-994.
 - [18] MÖLLER S, SCHMIDTKE M, WEISS D, et al. Synthesis and antihyperthermic activity of carboxymethylated and sulfated hyaluronan derivatives[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(1): 608-615.