

银杏落叶粗多糖除蛋白方法的筛选及优化

王筱瑜, 季子非, 萨日娜, 耿丽晶*, 周 围*

(锦州医科大学食品科学与工程学院, 辽宁锦州 121001)

摘要:本文以除蛋白率和多糖损失率为指标, 比较了 Sevage 法、TCA 法、等电点法和酶法清除银杏落叶粗多糖中蛋白的效果, 筛选出最优除蛋白方法, 并寻求银杏落叶粗多糖除蛋白的最佳工艺。结果表明, 酶法和等电点法都为除蛋白较好方法, 并优化酶-等电点结合法除蛋白的最佳工艺条件为: 酶添加量为 0.90% (以底物计算), 酶解时间为 1.1 h, 酶解温度 46 ℃, 酶解 pH 为 4.7。在此条件下, 除蛋白率 92.73% ± 0.13%, 多糖损失率 9.28% ± 0.12%。此方法除蛋白率较高, 多糖损失率较低, 为多糖在食品领域中的利用提供实验依据。

关键词:银杏落叶, 除蛋白, 工艺优化, 酶-等电点结合法

Screen and Optimization of the Methods for Removing Protein from Crude Polysaccharide in Ginkgo Biloba Leaves

WANG Xiao-yu, JI Zi-fei, SA Ri-na, GENG Li-jing*, ZHOU Wei*

(College of Food Science and Engineering, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China)

Abstract: In this paper, the effects of sevage method, TCA method, isoelectric point method and enzymatic method on the removal of ginkgo biloba leaves polysaccharide protein were compared with the indicator of the protein clearance and loss rate of polysaccharide. Results showed that both enzymatic and isoelectric methods were good methods for removing proteins. And the best optimized steps of enzymatic-isoelectric point method were as follows: The enzyme addition amount of 0.90% (calculated as substrate), the enzymatic hydrolysis time of 1.1 h, the enzymatic hydrolysis temperature of 46 ℃, and the enzymatic hydrolysis pH of 4.7. Under the conditions, the protein loss rate was 92.73% ± 0.13%, and the polysaccharide loss rate was 9.28% ± 0.12%. This method had a higher protein rate and loss rate of polysaccharide was low. It would provide an experimental basis for the utilization of polysaccharides in the food field.

Key words: ginkgo biloba leaves; protein removal; process optimization; enzyme-isoelectric point combination

中图分类号: TS255

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)10-0232-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.10.038

引文格式: 王筱瑜, 季子非, 萨日娜, 等. 银杏落叶粗多糖除蛋白方法的筛选及优化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(10): 232-237.

银杏叶是银杏科银杏树的叶。银杏树是古老的树种之一, 世界上 70% 的银杏资源分布在我国^[1]。目前, 已经从银杏叶中发现了 140 多种化学成分^[2], 这说明银杏叶存在很大的开发潜力。目前, 我国每年有大量的银杏落叶被燃烧处理, 不但浪费资源, 而且污染环境, 如若将其有效成分提取出来, 运用到医药、食品等行业中, 将对人类生活有较大意义。银杏多糖是银杏叶中的一种有效成分, 其可从银杏叶、果和外种皮中提取, 具有抗肿瘤、调节免疫、降血脂^[3]、

抗炎^[4]、抗氧化^[5]等功能。姚鑫^[6]的研究表明, 银杏落叶中的多糖含量高于其他时期, 而影响银杏落叶中的多糖提取率的主要影响因素是提取过程中蛋白的去除效果。植物多糖最常用的清除蛋白方法是 Sevage 法和 TCA 法, 虽然除蛋白效果较好^[7], 但多糖损失较多^[8], 且该两种方法所涉及的试剂氯仿、正丁醇和三氯乙酸等均为有毒的有机试剂, 存在安全隐患。

为获得更高多糖提取率和更为安全的银杏落叶多糖, 本实验以银杏落叶为研究对象, 比较 Sevage

收稿日期: 2018-10-12

作者简介: 王筱瑜(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: 15040823155@163.com。

* 通讯作者: 耿丽晶(1981-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: gengli777@126.com。

周围(1981-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 人才培养, E-mail: zhouwei37@sina.com。

基金项目: 辽宁省“百千万人才工程”培养项目资助; 国家自然科学基金(81401189); 辽宁省自然科学基金指导计划项目(20170540385); 锦州医科大学“大学生创新创业训练计划”项目(201769)。

法、TCA法、等电点法和酶法的除蛋白效果和多糖损失率,并将筛选除蛋白效果最佳的酶法和等电点法相结合,运用响应面法优化出一种除蛋白效率更高、更安全的银杏落叶多糖除蛋白方法,为进一步提供可食用性多糖除蛋白的方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

银杏落叶 锦州医科大学 2017 年 11 月校园内收集;木瓜蛋白酶 CAS:G8430,酶活力:≥60 万,纯度 99%,索莱宝生物科技有限公司;纤维素酶 CAS:C109262,酶活力:1 万,阿拉丁生化科技股份有限公司;葡萄糖标准品 CAS:14431-43-7,纯度 99%,上海山浦化工有限公司;考马斯亮蓝试剂盒 CAS:A045-2,南京建成生物工程研究所;透析袋 MD55 截留分子量 3500 Da,上海哈灵生物科技有限公司;萘酚等试剂均为分析纯 天津风船化学试剂科技有限公司。

HH-1 型电子恒温水浴锅 上海医疗器械五厂;752 型紫外可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;HR/T20MM 立式高速冷冻离心机 湖南赫西仪器装备有限公司;PHS-3C 型精密 pH 计 上海雷磁;FD-1B-80 冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司;RE5298A 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;JYL-C051 物料机 九阳股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 银杏落叶多糖的提取 将收集来的银杏落叶清洗后在鼓风干燥箱中于 60 °C 烘至完全干燥,并在物料机中研磨成粉末。准确称取 5.0 g 银杏落叶粉末,按料液比 1:30 g/mL 加入蒸馏水,添加 2% 的纤维素酶,酶解 pH 为 5.0,酶解温度为 50 °C,酶解 40 min 后,再于 80 °C 浸提 3 h,重复浸提两次。合并浸提液,浓缩至体积 1/3,加入 4 倍体积的 95% 乙醇,混匀后 4 °C 过夜,收集沉淀冷冻干燥后得银杏落叶粗多糖。测得粗多糖得率为 61.29% ± 0.13%,粗多糖中的多糖含量为 88.12% ± 0.16%。

1.2.2 评价指标

1.2.2.1 多糖含量测定 配制 0.1 mg/mL 的水溶性粗多糖溶液,以葡萄糖溶液做标准曲线,参考王宏军等^[9]方法,测定样品的吸光度 A_{620} ,以葡萄糖标准品浓度 (mg/mL) 为横坐标,以吸光度 ($A_{620\text{nm}}$) 为纵坐标,绘制标准曲线图得到葡萄糖浓度与吸光度的线性关系方程为 $y = 16.677x + 0.0423$,决定系数 $R^2 = 0.998$,并按照公式计算多糖含量。

多糖质量 (mg) = 测定多糖浓度 (mg/mL) × 样品体积 (mL)

$$\text{多糖含量}(\%) = \frac{\text{多糖质量}(\text{mg})}{\text{粗多糖质量}(\text{mg})} \times 100$$

1.2.2.2 多糖损失率的计算

$$\text{多糖损失率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 为除蛋白前样品中多糖含量,%; A_1 为除蛋白后样品中多糖含量,%。

1.2.2.3 蛋白含量测定 配制 50 mg/mL 样品溶液,

根据考马斯亮蓝蛋白定量测试盒说明书的方法,以蛋白标准品为对照,双蒸水调零,于波长 595 nm 处测定吸光度,根据公式计算样本蛋白浓度。

待测样本蛋白浓度 (mg/mL) = (测定 OD 值 - 空白 OD 值) / (标准 OD 值 - 空白 OD 值) × 标准品浓度 (0.5 mg/mL)

1.2.2.4 除蛋白率的计算

$$\text{除蛋白率}(\%) = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$$

式中: C_0 为除蛋白前样品中蛋白浓度,mg/mL; C_1 为除蛋白后样品中蛋白浓度,mg/mL。

1.2.3 除蛋白方法的筛选

1.2.3.1 Sevage 法 配制 50 mg/mL 水溶性粗多糖溶液,参考胡日查^[10]、陈静静等^[11]的 Sevage 除蛋白方法配制 Sevage 混合液 (氯仿:正丁醇 = 4:1, v/v),加入样品溶液体积 1/4 的混合液,震荡后静置 20 min,5000 r/min 离心 10 min,除去下层变性蛋白沉淀,重复此方法直至无沉淀物后进行测定。

1.2.3.2 TCA 法 配制 50 mg/mL 水溶性粗多糖溶液,参考阮世良^[12]的 TCA 方法除蛋白后,5000 r/min 离心 10 min,取上清进行测定。

1.2.3.3 酶法除蛋白 配制 50 mg/mL 水溶性粗多糖溶液,参考陈静静等^[11]的木瓜蛋白酶法除蛋白,调节 pH 为 6.0,酶解后放至室温,于 5000 r/min 离心 10 min,取上清溶液调 pH 为中性 (pH = 7.0),灌装至透析袋透析,用流动的自来水透析 12 h,蒸馏水透析 24 h,每 2~3 h 更换一次蒸馏水^[13]。透析后进行测定。

1.2.3.4 等电点法除蛋白 配制 50 mg/mL 水溶性粗多糖溶液,用 1% 的盐酸调节 pH 到 2.5,参考陈丽娟^[14]的等电点法除蛋白,4 °C 沉淀过夜后取上清液,用 1% 的 NaOH 调 pH 到 7.0,进行测定。

1.2.4 酶-等电点法除蛋白关键因素的优化 根据 1.2.3 实验结果,经过综合考量,选择酶法结合等电点法进行除蛋白工艺的优化。首先,进行酶法除蛋白工艺优化,再利用响应面法进一步优化酶-等电点结合法除蛋白工艺参数。

1.2.4.1 酶法除蛋白关键单因素实验 参考陈丽娟^[14]中的除蛋白方法,以除蛋白率和多糖损失率为考察指标,实验设计如下,分别取 5 mL 50 mg/mL 的水溶性粗多糖溶液于试管中,以木瓜蛋白酶做水解酶,分别考察酶添加量 (0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%)、酶解时间 (0.5、1、1.5、2、2.5、3 h)、酶解温度 (40、45、50、55、60 °C)、酶解 pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0) 四个单因素,在考察某一单因素时,其他基础条件为固定酶添加量 1.0%,酶解时间 1 h,酶解温度 45 °C,酶解 pH = 5.0。在酶解结束后结合等电点法,即将样品溶液 pH 调节至 2.5,于 4 °C 放置过夜,5000 r/min 离心 10 min,取上清溶液调节 pH 为中性 (pH = 7.0),透析 48 h 后测定蛋白浓度。

1.2.4.2 响应面法优化酶-等电点法除蛋白方法 根据单因素实验结果,以除蛋白率 (%) 为指标,选取每个单因素中三个效果最佳的水平设计响应面试验,以确定酶法除蛋白的最佳方法,Box-Behnken 试验因

素与水平如表 1。

表 1 响应面实验因素水平表
Table 1 Factors and levels of response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
A 酶添加量(%)	0.5	1.0	1.5
B 酶解时间(h)	0.5	1.0	1.5
C 酶解温度(°C)	40	45	50
D 酶解 pH	4	5	6

1.3 数据处理

每个实验平行重复 3 次,数据用 Mean ± SD 形式表示。用 SPSS 17.0 进行相关性、显著性分析和 Design-Expert V8.0.6 统计软件对数据进行处理和统计分析。统计结果中不同大写字母表示不同组间均数差异极显著($p < 0.01$),不同小写字母表示不同组间均数差异显著($0.01 < p < 0.05$),相同字大写字母表示差异不显著($p > 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 除蛋白方法比较结果

以多糖损失率和除蛋白率为指标,比较四种清除蛋白方法。结果显示(图 1),Sevage 法清除蛋白的效果(除蛋白率为 72.02%)最好($p < 0.01$),但多糖损失率(26.95%)也最高($p < 0.01$);酶法(除蛋白率为 67.54%)的清除蛋白效果低于 Sevage 法,差异极显著($p < 0.01$),但酶法的多糖损失率(14.29%)极显著低于 Sevage 法和 TCA 法($p < 0.01$);TCA 法(除蛋白率为 59.11%)清除蛋白效果低于酶法,差异极显著($p < 0.01$),且多糖损失率(15.44%)也高于酶法($p < 0.01$);等电点法除蛋白效果(除蛋白率为 49.85%)相对其他方法较差($p < 0.01$),但多糖损失率(9.51%)也最低($p < 0.01$),可降低至 10% 以下。实验中发现,Sevage 法和 TCA 法中的有毒有机溶剂在醇沉过程中仍有残留,虽然除蛋白率都较高,但相对安全性过低;酶法清除蛋白效果相对较好,且方法安全,但对于多糖损失仍有提升空间,故本实验最终选择以危害较低的酶法和等电点法开展下一步实验,将酶法和等电点法结合,以提高除蛋白率,降低多糖损失率。

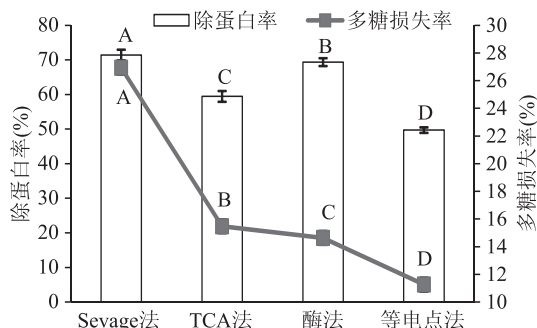


图 1 四种除蛋白法组间比较结果

Fig.1 Comparison of three protein removal methods

2.2 酶-等电点结合法除蛋白方法优化结果

2.2.1 单因素实验结果

2.2.1.1 酶添加量对除蛋白率及多糖损失率的影响 由图 2 可知,随着酶添加量的增加除蛋白率也上升,但添加量大于 1.0%~2.0% 除蛋白率开始极显著下降($p < 0.01$),随后保持稳定,其原因可能由于过量的蛋白酶残留^[15],影响最终蛋白清除率。多糖损失率变化缓慢,无明显上升趋势,说明木瓜蛋白酶的添加量对多糖损失并无影响。综合评价选择酶添加量 1.0% 为宜。

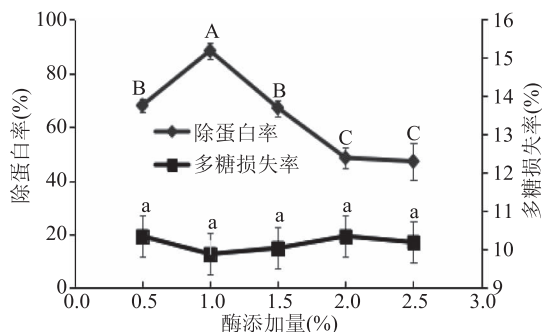


图 2 酶添加量对除蛋白率与多糖损失率的影响

Fig.2 Effects of enzyme addition on protein removal rate and polysaccharide loss rate

2.2.1.2 酶解时间对除蛋白率及多糖损失率的影响 由图 3 可知,木瓜蛋白酶开始酶解后,除蛋白率逐渐上升,达到 1 h 后,除蛋白率趋于平稳,此结果说明酶解 1 h 几乎可以达到完全水解,所以除蛋白率不再升高,整个过程多糖损失率没有明显变化,这与张曜武等^[16]研究的结果相似。综合评价选择酶解时间 1 h 为宜。

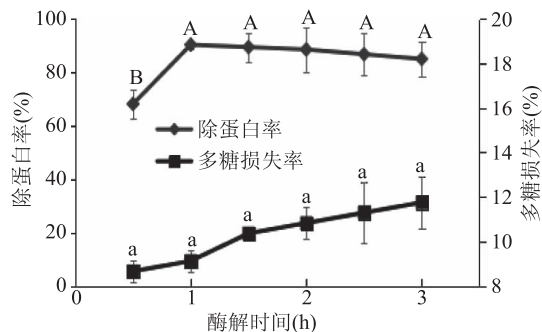


图 3 酶解时间对除蛋白率与多糖损失率的影响

Fig.3 Effects of enzymatic hydrolysis time on protein removal rate and polysaccharide loss rate

2.2.1.3 酶解温度对除蛋白率及多糖损失率的影响 由图 4 可知,随着酶解温度的升高除蛋白率也升高,达到 45 °C 时除蛋白率开始下降,可能与酶的最适作用温度有关,温度过高会影响木瓜蛋白酶的活性,导致酶解效果降低^[17]。温度升高时,酶化的反应和水解率速度都会增加,但温度过高会导致底物蛋白的变性^[18]。该过程中多糖损失率也随温度的升高缓慢上升的趋势,但无显著差异,说明 60 °C 以下的酶解温度对多糖损失率影响不显著。综合评价选择酶解温度 45 °C 为宜。

2.2.1.4 酶解 pH 对除蛋白率及多糖损失率的影响 由图 5 可知,微酸的环境下除蛋白率相对较高,最优酶解 pH 为 4.0~6.0, pH 大于 6.0 除蛋白率开始显著下降,说明该木瓜蛋白酶在微酸环境下酶解效果

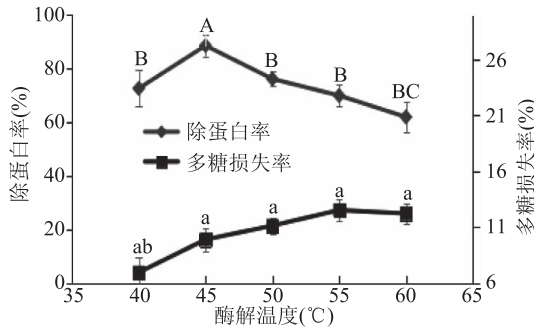


图4 酶解温度对除蛋白率与多糖损失率的影响
Fig.4 Effects of enzymatic hydrolysis temperature on protein removal rate and polysaccharide loss rate

较好,此结果与说明书中提供的酶解条件信息相符。多糖损失率随酶解 pH 升高无显著变化。综合评价选择酶解 pH = 5.0 为宜。

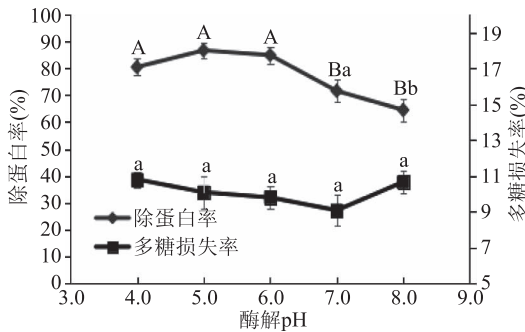


图5 酶解 pH 对除蛋白率与多糖损失率的影响
Fig.5 Effects of enzymatic hydrolysis pH on protein removal rate/polysaccharide loss rate

2.2.2 响应面法优化结果

2.2.2.1 回归模型的建立及显著性检验 采用 Design-Expert8.0.6 软件进行响应面设计,以除蛋白率(Y)为响应值获得响应面实验结果如表2。

对表2进行回归分析,得到回归方程为:

$$Y(\text{除蛋白率, \%}) = 92.03 - 3.31A + 2.37B + 2.54C - 2.54D + 0.13AB - 0.80AC + 1.25AD - 1.87BC - 0.38BD + 0.50CD - 10.75A^2 - 2.23B^2 - 5.38C^2 - 5.98D^2$$

响应面实验设计对回归模型进行方差分析和显著性检验如表3。

模型中 F 值为 44.18, $p < 0.0001$, 表示该回归模型极显著,而且失拟项 $p = 0.119 > 0.05$, 表示失拟项不显著,其中 $R^2 = 0.9779$, $R^2_{adj} = 0.9557$, 说明这个模型可以解释 95.57% 的响应值变化,表示该模型的拟合度在接受范围内,用该模型对酶法除银杏落叶粗多糖蛋白方法进行优化是合适的。对各实验指标进行显著性分析,其结果可以用 F 值来表示。其中 BC 具有显著性 ($p < 0.05$), A、B、C、D、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 为极显著 ($p < 0.01$)。结合方差分析结果为: $F_A > F_D > F_C > F_B$, 由于 F 值越大,影响越大,即对除蛋白率的影响因素的顺序为酶添加量(A) > 酶解 pH(D) > 酶解温度(C) > 酶解时间(B)。

2.2.2.2 响应面交互作用分析 结果见图6, B 酶解时间与 C 酶解温度的等高线图形为椭圆形,且等高

表2 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of response surface

实验号	A	B	C	D	Y 除蛋白率 (%)
1	0	-1	0	1	79.48
2	0	1	0	-1	87.49
3	0	0	0	0	91.48
4	0	0	0	0	91.87
5	1	1	0	0	77.97
6	0	0	0	0	90.99
7	0	1	0	1	82.47
8	1	0	0	-1	74.47
9	0	-1	1	0	86.49
10	0	0	1	-1	84.49
11	0	0	0	0	93.05
12	-1	0	-1	0	74.46
13	0	0	-1	0	69.46
14	0	0	-1	-1	80.96
15	-1	0	0	1	75.98
16	0	0	-1	1	74.97
17	0	1	-1	0	88.45
18	-1	-1	0	0	79.49
19	0	0	1	1	80.48
20	0	0	0	0	92.77
21	-1	0	0	-1	84.49
22	0	-1	0	-1	82.98
23	1	-1	0	0	73.46
24	0	1	1	0	88.99
25	0	-1	-1	0	78.47
26	-1	1	0	0	83.48
27	1	0	0	1	70.97
28	1	0	1	0	74.28
29	-1	0	1	0	82.49

线相对较密集,响应面图形曲线趋势陡峭,表明 B 酶解时间与 C 酶解温度交互效应对响应值的影响显著 ($p < 0.05$); 而 A 酶添加量与 B 酶解时间、A 酶添加量与 C 酶解温度、A 酶添加量与 D 酶解 pH、B 酶解时间与 D 酶解 pH、C 酶解温度与 D 酶解 pH 的等高线图形均为近似圆形,且等高线相对稀疏,结果表明 A 酶添加量与 B 酶解时间、A 酶添加量与 C 酶解温度、A 酶添加量与 D 酶解 pH、B 酶解时间与 D 酶解 pH、C 酶解温度与 D 酶解 pH 之间的交互效应对响应值的影响不显著。

2.2.2.3 优化及其验证实验 通过软件 Design-Expert V8.0.6, 得到提取的最佳工艺条件: 酶添加量为 0.90%, 酶解时间为 1.11 h, 酶解温度为 45.83 °C, 酶解 pH 为 4.66, 预测除蛋白率为 93.16%。结合实际试验的情况, 将提取条件进行修正: 酶添加量为 0.90%, 酶解时间为 1.1 h, 酶解温度 46 °C, 酶解 pH 为 4.7。此条件下重复 3 次实验, 得到除蛋白率为 $92.73\% \pm 0.13\%$, 与预测值接近, 说明该模型能够较好地反映酶-等电点法除蛋白的条件, 并测定其多糖

表3 回归模型的方差分析结果

Table 3 Analysis of variance for the fitted quadratic polynomial model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	$p > F$	显著性
模型	1289.05	14	92.1	44.18	<0.0001	**
A	131.78	1	131.78	63.23	<0.0001	**
B	67.6	1	67.6	32.45	<0.0001	**
C	77.2	1	77.2	37.06	<0.0001	**
D	77.6	1	77.6	37.25	<0.0001	**
AB	6.70×10^{-2}	1	6.70×10^{-2}	0.032	0.8605	
AC	2.57	1	2.57	1.23	0.2858	
AD	6.29	1	6.29	3.02	0.1044	
BC	14.0	1	14.0	6.71	0.0214	*
BD	5.70×10^{-1}	1	5.70×10^{-1}	0.27	0.6085	
CD	9.90×10^{-1}	1	9.90×10^{-1}	0.47	0.5027	
A ²	750.16	1	750.16	359.94	<0.0001	**
B ²	32.2	1	32.2	15.44	0.0015	**
C ²	187.79	1	187.79	90.1	<0.0001	**
D ²	231.67	1	231.67	111.16	<0.0001	**
残差	29.2	14	2.08			
失拟项	26.2	10	2.62	3.51	0.119	
纯误差	2.99	4	7.50×10^{-1}			
总和	1318.22	28				

$R^2 = 0.9779$ $R^2_{adj} = 0.9557$

注: ** 为极显著, $p < 0.01$; * 为显著, $p < 0.05$ 。

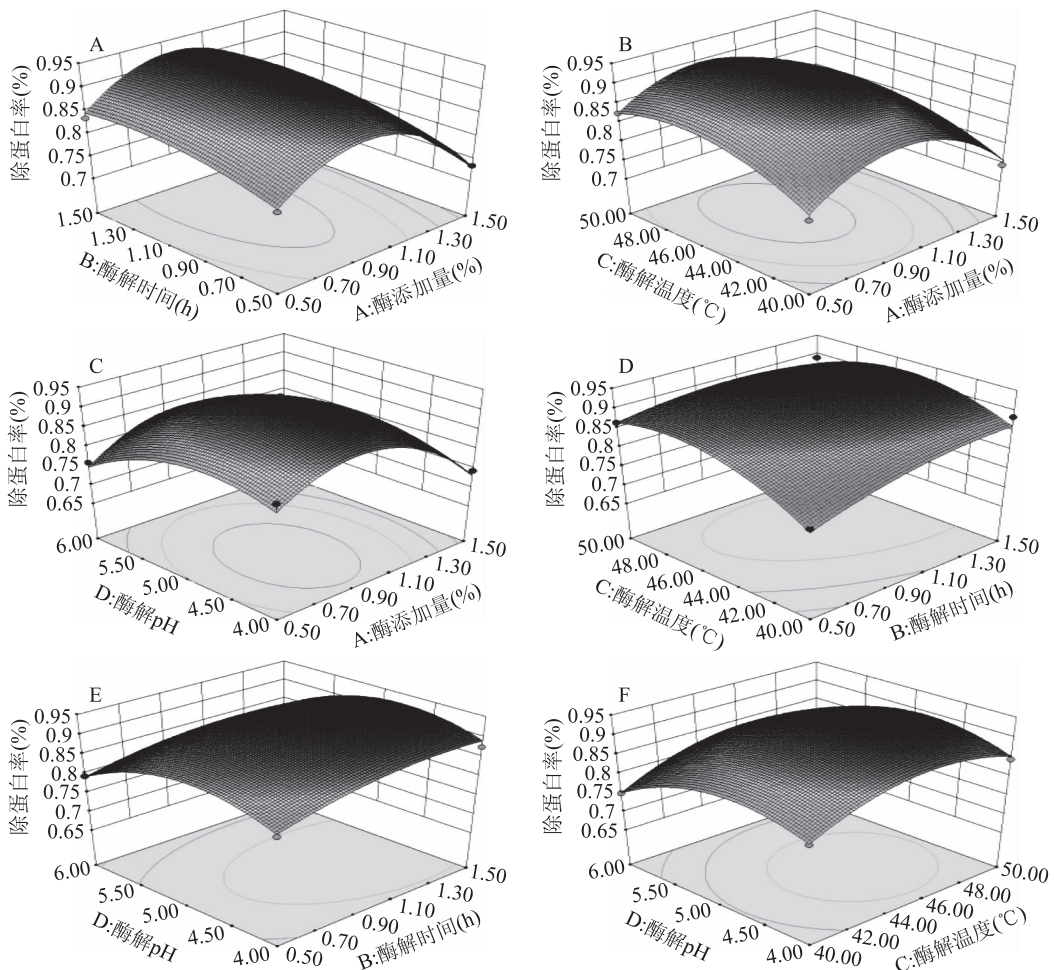


图6 酶添加量、酶解温度、酶解时间和酶解 pH 交互作用的响应面图

Fig.6 Response surface diagrams of enzyme addition amount, enzymatic hydrolysis temperature, enzymatic hydrolysis time and enzymatic hydrolysis pH interaction

损失率为 $9.28\% \pm 0.12\%$, 相比较 2.1 中酶法清除蛋白的结果, 除蛋白率提高了 25.19%, 多糖损失率也降低了 5.01%, 结果说明酶-等电点法优化工艺后可以更高效的清除银杏落叶中的蛋白并降低多糖的损失率。

相比陈丽娟^[14]研究银耳多糖的酶-等电点除蛋白法, 本实验优化了该方法, 除蛋白率提高了 1.5%, 多糖损失率升高 1.41%, 此结果可能由于银耳多糖与银杏落叶多糖成分的不同导致差异; 相比陈静静等^[11]研究银杏外种皮多糖酶法除蛋白, 蛋白质清除率提高了 40.16%, 多糖损失率降低了 6.97%, 与其相比除蛋白率与多糖损失率都有优化。侯小涛等^[19]的研究中, 采用天然澄清剂进行蛋白清除, 此方法虽然安全, 但选择的最优多糖浓度为 30 mg/mL, 而本实验选择的多糖浓度可达到 50 mg/mL, 说明此方法可以更高效率的清除蛋白, 从而节约成本。

3 结论

本实验确定酶法除蛋白的效果较好, 多糖损失率相对较低, 在食品加工方面更为安全, 所以最适合可食性多糖的除蛋白。酶-等电点法除银杏落叶多糖中蛋白的最佳工艺条件为酶添加量为 0.90% (以底物计算), 酶解时间为 1.1 h, 酶解温度 46 °C, 酶解 pH 为 4.7。在此条件下, 除蛋白率 $92.73\% \pm 0.13\%$, 多糖损失率 $9.28\% \pm 0.12\%$ 。

参考文献

[1] 孙克年. 银杏叶及其提取物在畜禽生产中的应用研究[J]. 广东饲料, 2015, 24(2): 47-49.

[2] Wohlmuth H, Savage K, Dowell A, et al. Adulteration of *Ginkgo biloba* products and a simple method to improve its detection[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(6): 912-918.

[3] 常萍. 银杏多糖对小鼠乳腺癌 4T1 细胞的抑制作用及 GLUT1 表达的作用研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.

[4] 张丽娇, 高立宏, 费瑞. 银杏叶多糖对炎症小鼠 TNF- α 表

(上接第 231 页)

[12] 曹新蕾, 王立, 钱海峰, 等. 全麦粉对油炸方便面品质的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(3): 193-197.

[13] 聂相珍, 申丽媛, 皇甫秋霞. 减少油炸方便面油脂残留的添加物研究进展[J]. 麦类作物学报, 2016, 36(5): 611-615.

[14] Gulia N, Khatkar B S. Relationship of dough thermomechanical properties with oil uptake, cooking and textural properties of instant fried noodles[J]. *Food Science & Technology International*, 2014, 20(3): 171-182.

[15] 丁士勇. 油炸方便面货架期探讨[J]. 食品科学, 2006(5): 276-277.

[16] Cao X, Zhou S, Yi C, et al. Effect of whole wheat flour on the quality, texture profile, and oxidation stability of instant fried noodles[J]. *Journal of Texture Studies*, 2017, 48(1): 607-615.

[17] Lim J, Jeong S, Oh I K, et al. Evaluation of soybean oil-carnauba wax oleogels as an alternative to high saturated fat frying media for instant fried noodles[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2017, 84: 788-794.

[18] 小圆. 冷冻保存鲜面条[J]. 农产品加工, 2013(2): 12.

[19] 王春香, 姚忠臣. 马铃薯方便面的研制[J]. 食品科技, 2004(7): 89-90.

[20] 张森, 李博, 钱平. 食品中油脂提取及过氧化值检测方法

的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(16): 172-173.

[5] 吴巧攀, 乔洪翔, 何厚洪, 等. 银杏叶渣中多糖的提取及其抗氧化活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(1): 9-13.

[6] 姚鑫. 不同来源银杏叶资源化学研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.

[7] 李小蓉, 郭惠, 龙旭, 等. 倒卵叶五加多糖脱蛋白工艺研究[J]. 化学与生物工程, 2018, 35(8): 53-56, 68.

[8] 杨斌, 杨英, 王雪飞, 等. 响应面法优化蓝刺头多糖除蛋白工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(10): 287-291.

[9] 王宏军, 邓旭明, 蒋红, 等. 蒽酮-硫酸比色法检测多糖条件的优化[J]. 中国饲料, 2011(4): 39-41.

[10] 胡日查. 黄秋葵多糖分离、纯化及其免疫调节活性研究[D]. 海口: 海南大学, 2015.

[11] 陈静静, 江波, 张涛, 等. 银杏外种皮多糖的提取和纯化工艺研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(7): 242-245.

[12] 阮世良. 硫酸化黑木耳多糖的抗病毒和增强免疫活性及其与其他九种硫酸化多糖的比较[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.

[13] 原菲. 银杏多糖的提取分离、结构鉴定及活性测定[D]. 广州: 暨南大学, 2010.

[14] 陈丽娟. 银耳多糖快速提取及可控降解的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017.

[15] 李月, 何杰, 王昀, 等. 云南野生玛卡多糖脱蛋白工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2018(9): 149-157.

[16] 张曜武, 王薇薇, 王超, 等. 淫羊藿多糖的酶法除蛋白工艺研究[J]. 青岛科技大学学报: 自然科学版, 2014(2): 167-169, 173.

[17] 王琳炜, 欧阳臻, 马青, 等. 霍山铁皮石斛多糖的脱蛋白工艺及结构分析[J]. 食品科学, 2017, 38(12): 164-170.

[18] 王龙艳, 王文侠, 张慧君, 等. 豆渣碱溶性粗多糖除蛋白工艺的研究[J]. 中国食品添加剂, 2013(1): 98-103.

[19] 侯小涛, 赵超超, 邓家刚. 甘蔗叶多糖除蛋白工艺研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 240-244, 247.

的优化[J]. 食品工业科技, 2011(12): 497-500.

[21] GB/T 25005-2010 方便面感官评价方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[22] GB 5009.227-2016 食品中过氧化值的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[23] GB 5009.229-2016 食品中酸价的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[24] GB/T 35252-2017 动植物油脂 2-硫代巴比妥酸值测定: 直接法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.

[25] 谷利军. 油条品质评价体系的建立及实验室制作方法的研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2012: 10-11.

[26] 王中旺. 中华面文化大典[M]. 经济日报出版社, 2005: 832-833.

[27] 彭亚锋, 黄文, 郭顺清. 焙烤食品科学与技术[M]. 北京: 中国计量出版社, 2011: 233-234.

[28] 杨燕. 济南市食用油中苯并芘、酸价及过氧化值的调查分析[D]. 济南: 山东大学, 2012: 17-18.

[29] 赵紫萌. 油炸方便面酸败指标检验分析[J]. 科学与财富, 2013, 3(12): 57-58.

[30] 孙艳梅, 徐雅琴, 杨林. 天然物质类黄酮的抗氧化活性的研究[J]. 中国油脂, 2003, 28(3): 54-57.