

# 大别山白及多糖酶法辅助提取及活性研究

朱富成, 罗书岚, 郑 宣, 王 芳, 何晓梅, 邓 辉, 韩邦兴\*

皖西学院 生物与制药工程学院 安徽省中药资源保护与利用工程实验室, 六安 237012

**摘要:**白及多糖具有显著的药用价值和良好的护肤作用。本研究首次利用果胶酶酶解的方法,提高白及多糖提取效率。首先,通过响应面优化法,获取最佳酶解条件,在最优条件下大别山白及多糖提取率达64.8%。随后,利用扫描电镜观察和空间构象分析表明酶法提取没有破坏多糖天然结构。体外性质研究表明在一定浓度下白及多糖对羟基自由基、DPPH和超氧阴离子的清除率分别到达87.6%、83.9%和71.5%,显示了较好的抗氧化活性。本研究中的白及多糖提取率为已报道文献的最高量,为白及多糖工业化应用奠定基础,且为其他多糖的高效提取提供参考。

**关键词:**大别山白及;白及多糖;酶法提取;响应面法;抗氧化性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)8-1389-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.8.015

## Enzyme-assisted extraction of polysaccharides of Ta-pieh Mountains *Bletilla striata* and its activities study

ZHU Fu-cheng, LUO Shu-lan, ZHENG Xuan, WANG Fang, HE Xiao-mei, DENG Hui, HAN Bang-xing\*

College of Biology and Pharmaceutical Engineering, Anhui Engineering Laboratory for Conservation and Sustainable Utilization of Traditional Chinese Medicine Resources, West Anhui University, Lu'an 237012, China

**Abstract:** *Bletilla striata* polysaccharides (BSP) have attracted extensive research interest due to their potential application of medicinal value and skin care. Herein, enzymatic assisted technique was applied to extract BSP from *B. striata* of Ta-pieh Mountains for the first time. Firstly, response surface methodology was applied to improve extraction efficiency. Under the optimal conditions, the maximum extraction yield was 64.8%. Scanning electron microscope and spatial conformation analysis shown that enzymatic extraction did not destroy the natural structure of polysaccharides. Then, antioxidant activity of extracted BSP was analyzed, and the results clearance rates of hydroxyl radical, superoxide anion and DPPH were 87.6%, 71.5% and 83.9%, respectively, at the finite concentration of BSP, which presented a good antioxidant activity. The extraction yield of BSP was highest report to data. The efficient extraction of the BSP in this study lays the foundation for its industrial application.

**Key words:** *Bletilla striata* of Ta-pieh Mountains; *Bletilla striata* polysaccharides; enzyme-assisted extraction; response surface methodology; antioxidant activity

大别山中药资源丰富,是野生中药材道地产区之一,但中药资源普查发现,部分野生中药如白及受全国药材市场影响,野生资源减少速度逐年增加,为加强保护,皖西学院对大别山野生白及进行保护和研究<sup>[1]</sup>。白及为兰科白及属(*Bletilla* Rchb. f.)植物白及 *Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rchb.

f.的干燥块茎<sup>[2]</sup>,研究表明白及块茎中含有大量天然水溶性多糖,即白及多糖,是白及的主要药效成分<sup>[3]</sup>。白及多糖在医药、化妆品及食品领域均有较广泛的应用,且具有无毒性、生物相容性等特征,使白及多糖备受关注<sup>[4]</sup>,然而白及多糖的提取率不高,研究不够系统广泛,因此如何高效制备白及多糖是该领域急需解决的关键问题。

根据已有文献,目前已有多种新颖提取技术应用于白及多糖提取<sup>[5]</sup>,如,超声辅助提取,微波辅助提取,超临界流体萃取以及红外辅助提取等方法,每种提取方法在提高提取率的同时也有各自的缺点,

收稿日期:2020-03-16 接受日期:2020-07-09

基金项目:安徽省自然科学基金(2008085QB96);国家中药材产业技术体系(CARS-21);安徽省教育厅重点项目(KJ2017A407);皖西学院博士后科研项目(WXBS H2019001)

\*通信作者 Tel:86-564-3305073;E-mail:hanbx1978@sina.com

例如需要昂贵的精密设备,部分提取方法对多糖结构会造成不同程度影响甚至造成多糖降解<sup>[6]</sup>。因此,开发简便高效的提取方法对于白及多糖提取极为重要。生物酶(如纤维素酶、果胶酶等)作为高效催化剂,能作用于植物细胞,增加细胞通透性,促进胞内物质渗漏,研究表明生物酶辅助植物多糖提取可以促进提取率<sup>[7]</sup>。Xia等<sup>[8]</sup>利用淀粉酶水解提取枸杞多糖,提取率达到13.2%;Zhu等<sup>[9]</sup>利用复合酶制剂酶解灵芝提取多糖,提取率达到4.4%;Wang等<sup>[10]</sup>研究纤维素酶酶解荸荠多糖,提取率为32.3%。目前,利用酶法辅助白及多糖的提取仍然鲜有报道。果胶酶是一种高效生物催化剂,能专一性识别并作用于植物细胞壁中的果胶,增加细胞壁通透性。Song等<sup>[11]</sup>通过比较几种酶辅助提取荷莲叶多糖,发现果胶酶对于多糖的结构最具保护性。基于果胶酶的水解选择性高,作用专一,可以在保护多糖结构不受破坏的基础上增加细胞壁的通透性,进而提升多糖的提取率,故在白及多糖的提取研究中具有重要的意义。

本研究通过果胶酶预处理大别山白,结合传统水提方式提取白及多糖,运用响应面法优化果胶酶预处理,获得最优白及多糖提取工艺,并进而分析果胶酶辅助提取对多糖天然构象影响,研究其体外抗氧化活性。本研究为酶法辅助提取白及多糖奠定基础,同时研究结果对产业化应用具有重要参考意义。

## 1 材料仪器

### 1.1 材料与试剂

大别山白及(皖西学院植物园栽培);果胶酶(国药集团,活力单位50 U/g);葡萄糖;硫酸;苯酚;无水乙醇;邻苯三酚(焦性没食子酸);盐酸;邻二氮菲;三羟甲基氨基甲烷(Tris);1,1-二苯基-2-三硝基

苯肼(DPPH);硫酸亚铁;双氧水;氯化钠;氯化钾;磷酸二氢钾;十二水磷酸氢二钠;均为市售国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

UV-5500型紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);SU8010发射场扫描电镜(日立有限公司);TU-1901紫外分光光度计(北京普析通用有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 白及多糖提取

将白及于60℃烘干后打粉,并过30目筛,得到固体粉末用石油醚脱脂,并用10 mL/g的95%(V/V)乙醇回流两次去除寡糖,色素以及其他小分子化合物,经过离心过滤后得到产物进行真空干燥(40℃)获得预处理白及粉。称量一定量的白及粉,加入果胶酶于一定温度下预热一定时间,80℃下热浴10 min变性果胶酶终止酶解,然后热水浸提3 h,离心后取上清测定多糖得率,多糖得率采用苯酚-硫酸法测定<sup>[12]</sup>。

### 2.2 响应面法优化白及多糖提取工艺

设计单因素变量,保持其他条件不变,以果胶酶为酶制剂,分别考察酶解时间、酶解温度、酶添加量对白及多糖提取率的影响,每个因素平行测定3次,取平均值。

在单因素实验基础上,采用Box-Behnken<sup>[13]</sup>设计原理,以酶解时间(70、80、90 min)、酶解温度(40、50、60℃)、酶添加量(7.5%、10.0%、12.5%)为自变量组合,多糖提取率为响应值进行响应面优化实验,利用Design-Expert 8.0.6Trial软件对数据进行分析,得最优酶解提取工艺。

表1 响应面设计因素与水平

Table 1 The factor and level used in the response surface design

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
A 酶添加量 Amount of adding enzyme(%)	7.5	10	12.5
B 酶解温度 Enzymolysis temperature(℃)	40	50	60
C 酶解时间 Enzymolysis time(min)	70	80	90

### 2.3 白及多糖纯化

将提取的白及多糖溶液进行真空浓缩至原体积

的1/3,利用Sevag试剂(氯仿:丁醇=4:1,V/V)脱出蛋白<sup>[14]</sup>,直到脱出后的液体在260 nm和280 nm

处吸收值为 0,表明核酸和蛋白已经脱完。然后加入无水乙醇至终浓度为 80% (V/V),静置 24 h,离心过滤获得多糖沉淀并保存。

## 2.4 白及多糖扫描电镜分析

参考已有文献<sup>[15]</sup>,白及多糖提取液经过冷冻干燥后,利用发射场扫描电镜(HITACHI SU8010)分析白及多糖冻干粉的纤维结构,将白及多糖冻干粉均匀铺展在试样架上,利用标度尺进行扫描观察,测定时的放大倍数为 400 倍,加速电位为 5.0 kV。

## 2.5 白及多糖三级结构分析

根据已有文献报道方法<sup>[16]</sup>,利用刚果红分析方法测定白及多糖构象结构。向 2.0 mL 的 0.2 mg/mL 的白及多糖溶液中加入 2.0 mL 的 100  $\mu$ mol/L 刚果红溶液。向混合溶液中加入梯度的 NaOH 溶液(0~0.4 mol/L)。利用紫外分光光度计(普析通用 TU-1901)对混合溶液进行扫描(250~600 nm),获得最大吸收峰。其中不含有白及多糖的刚果红溶液作为空白对照。

## 2.6 白及多糖体外抗氧化实验

### 2.6.1 羟基自由基清除能力测定

采用 Fenton 反应体系<sup>[17]</sup>测定白及多糖对羟基自由基的清除能力。在 20 mL 试管中依次加入 0.1 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS) 2 mL、5 mmol/L 邻二氮菲 1 mL、1 mmol/L 硫酸亚铁 1 mL、白及多糖样品液 1 mL、1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(1.0%, V/V),再用 0.1 mol/L PBS 定容至 10 mL,混合溶液在 37  $^{\circ}$ C 水浴中保温 60 min 后,于 536 nm 处测其吸光值 A<sub>2</sub>。用 1 mL 蒸馏水代替 1.0% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,于 536 nm 处测得吸光值为 A<sub>1</sub>。用 1 mL 蒸馏水代替多糖样品液,于 536 nm 处测得吸光值为 A<sub>0</sub>。用 2 mL 蒸馏水代替多糖样品液和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为空白对照。经计算获得羟基自由基清除率。

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - A_1}{A_2 - A_1} \times 100\%$$

### 2.6.2 白及多糖对超氧阴离子清除能力测定

采用邻苯三酚自氧化法<sup>[18]</sup>测定白及多糖对超氧阴离子的清除率。在 20 mL 试管中,加入 pH8.2、0.1 mol/L Tris-HCl 4.5 mL,再加入 4.2 mL 蒸馏水,混匀后于 25  $^{\circ}$ C 水浴中保温 20 min,加入预热的 4 mmol/L 邻苯三酚 0.3 mL,混匀后于 325 nm 处测定吸光值,每过 20 s 记录一次吸光值,共记录 3 min,绘制邻苯三酚自氧化曲线,曲线斜率为 A<sub>1</sub>。用相应体积的蒸馏水代替邻苯三酚为空白对照管。用

1 mL 不同浓度的白及多糖样品液依次代替 1 mL 蒸馏水,绘制曲线,曲线斜率为 A<sub>0</sub>。经计算获得超氧阴离子清除率。

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - A_1}{A_1} \times 100\%$$

### 2.6.3 白及多糖对 DPPH 自由基清除能力测定

根据已有文献<sup>[19]</sup>,分别取 2 mL 不同浓度的白及多糖样品液置于试管中,加入 2 mL 的 DPPH(0.1 mmol/L)溶液,混合均匀,室温避光反应 30 min,取上清于 517 nm 处测定吸光值 A<sub>1</sub>。同时测定 2 mL 乙醇代替 2 mL 样品的吸光值 A<sub>2</sub> 以及 2 mL 水代替 2 mL DPPH 的吸光值 A<sub>0</sub>。按下式计算白及多糖对 DPPH 的清除率。

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

## 3 结果与分析

### 3.1 单因素对白及多糖提取率的影响

酶的添加量可以决定酶活力,因此对白及多糖的提取具有较大影响,大量的添加酶量可以促进提取率,但是将会增加提取成本,同时大量的酶蛋白存在也将会增加去除的难度,因此加酶量对白及多糖影响十分必要。如图 1A 所示,白及多糖提取率随果胶酶添加量增加而提高,在 12.5%~20.0% 之间提取率趋于稳定。因此,结合酶制剂的实际情况,为了把成本降到最低,选择酶添加量为 7.5%、10.0%、12.5% 三水平进行响应面实验。

温度对酶活力影响较大,因此分析温度对白及多糖酶法提取十分重要。如图 1B 所示,白及多糖提取率随温度的升高而提高,并在 50  $^{\circ}$ C 时达到最大值,为 62.3%。再升高温度,白及多糖提取率反而下降。这可能是由于温度过高,果胶酶发生失活,导致酶活性降低,从而提取率下降。综合考虑,选择酶解温度为 40、50、60  $^{\circ}$ C 三水平进行响应面实验。

酶解时间对白及多糖提取率影响如图 1C 所示。白及多糖提取率随时间的增长而提高,并在 80 min 到达最大值,为 63.0%。酶解时间再加长,白及多糖提取率反而下降,可能是提取时间过长,果胶酶微弱水解白及多糖,致使得率有所降低。综合考虑,选择酶解时间为 70、80、90 min 三水平进行响应面优化实验。

### 3.2 基于响应面优化白及多糖的提取

响应面法被广泛应用于实验数据的优化处理,该方法具有实验次数合理,实验数据可靠等优点,所

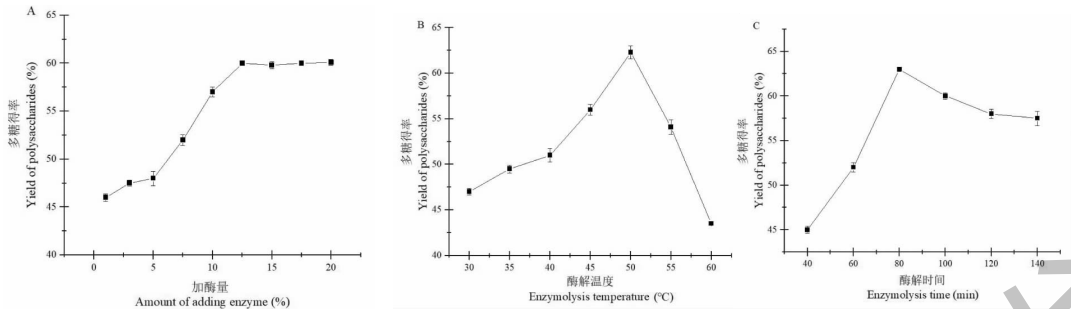


图1 单因素对白及多糖提取率的影响

Fig. 1 The effect of single factor on extraction rate of BSP

以本研究根据单因素确定的最佳水平,以白及多糖提取率为响应值,做 Box-Behnken 响应曲面设计,如表 2 所示。利用 Design Expert 8.0.6 软件对表数据进行分析,得白及多糖提取率( $Y$ )对酶添加量( $A$ )、

酶解温度( $B$ )和酶解时间( $C$ )的二次多项回归方程: $Y = 63.77 + 2.57A + 0.92B + 1.16C - 0.020AB + 0.20AC - 0.080BC - 2.01A^2 - 2.12B^2 - 3.40C^2$ ,各因素交互作用结果如图 2 所示。

表 2 响应曲面设计及多糖得率

Table 2 Response surface design and polysaccharides yield

实验号 No.	因素 Factor			多糖提取率 Polysaccharide yield (%)
	$A$	$B$	$C$	
1	0	0	0	64.83
2	-1	1	0	57.68
3	1	-1	0	61.65
4	-1	0	1	56.32
5	0	-1	-1	55.32
6	1	0	1	61.98
7	0	0	0	61.11
8	0	1	1	61.03
9	0	0	0	64.25
10	0	0	0	64.11
11	0	0	0	63.99
12	-1	0	-1	55.16
13	1	1	0	62.66
14	0	1	-1	58.12
15	-1	-1	0	56.59
16	0	-1	1	58.55
17	1	0	-1	60.01

对获得的相应曲面进行回归线性系数的显著性分析,如表 3 所示,影响因素  $A$  影响极显著; $B$  和  $C$  影响显著,即酶添加量对酶法辅助提取白及多糖提取率有着极其显著的影响,酶解时间和酶解温度有着显著的影响关系,且影响显著顺序为  $A > C > B$ 。

二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  影响均为极显著;交互项中均影响不显著,这说明白及多糖提取率与各个因素之间不单单是线性关系。此外,试验整体模型的  $P = 0.0007 < 0.01$ ,表明模型达到极显著水平,失拟项的  $P = 0.6563 > 0.05$ ,表明模型失拟不显著。 $R^2 =$

0.953 3,说明该模型能解释 95.33% 的响应值的变化。由此可见,利用 Design-Expert 8.06 软件得到的

二元多项回归方程及其显著性分析结果准确可靠,可以用此模型分析白及多糖酶提工艺结果。

表 3 显著性及方差分析

Table 3 Analysis of significance and variance

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P	显著性 Significance
模型 Model	160.3	9	17.81	15.89	0.000 7	**
A	51.11	1	51.11	45.59	0.000 3	**
B	6.75	1	6.75	6.02	0.043 8	*
C	10.97	1	10.97	9.79	0.016 6	*
AB	0.011	1	0.011	0.009 8	0.923 8	
AC	0.093	1	0.093	0.083	0.781 6	
BC	0.012	1	0.012	0.011	0.920 2	
A <sup>2</sup>	16.13	1	16.13	14.39	0.006 8	**
B <sup>2</sup>	19.36	1	19.36	17.27	0.004 3	**
C <sup>2</sup>	46.96	1	46.96	41.89	0.000 3	**
残差 Residual	7.85	7	1.12			
失拟值 Lack of fit	2.39	3	0.80	0.58	0.656 3	Not significant
纯误差 Pure error	5.45	4	1.36			
总离值 Cor total	168.15	16				
$R^2 = 0.953 3$						

注: \*\* 表示极显著,  $P < 0.01$ ; \* 表示显著,  $P < 0.05$ 。

Note: \*\* Highly significant,  $P < 0.01$ ; \* Significant,  $P < 0.05$ .

通过响应面法分析得到白及多糖酶提工艺的最优条件为:果胶酶添加量 12.5%、酶解温度 51.5℃、酶解时间 81.8 min,但考虑到实际生产条件的操作,可将最佳条件修改为果胶酶添加量 12%、酶解温度 52℃、酶解时间 82 min,在此工艺下,白及多糖提取率为 64.8%。采用酶法提取获得的白及多糖

提取率明显高于利用传统水提的效率<sup>[20]</sup>以及微波辅助提取白及多糖的效率<sup>[21]</sup>。本研究通过响应曲面优化酶法提取白及多糖的得率是目前已报道最高提取率,本方法的开发为白及多糖进一步开发利用及工业化生产提供了良好的依据。

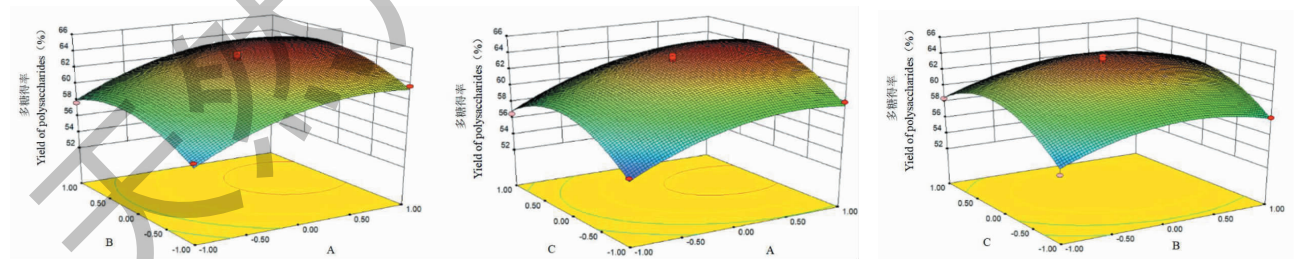


图 2 响应曲面法优化白及多糖提取率

Fig. 2 The response surface method was used to optimize the polysaccharide extraction

### 3.3 白及多糖构象

考虑到果胶酶可能对白及多糖发生酶催化作用,破坏其天然构象,因此本研究进一步分析了提取的白及多糖的构象。刚果红试剂可以与多糖的三链螺旋结构形成复合物使得最大吸收值会发生红移,

当三链螺旋发生解链变成单链时,刚果红-多糖复合物的最大吸收值会降低。分析多糖在不同浓度的 NaOH 溶液中的最大吸收值的变化将有助于分析多糖的构型<sup>[15]</sup>。如图 3 所示,含有白及多糖的刚果红溶液最大吸收波长比刚果红空白对照大,表明白及

多糖可以使得吸收值发生红移,表明在 498 ~ 487 nm 波长下白及多糖三股螺旋与刚果红络合物形成。当 NaOH 浓度超过 0.4 mol/L 后,含有白及多糖的刚果红溶液最大吸收波长发生明显的蓝移,表明高浓度的 NaOH 导致白及多糖构象发生去折叠,由三股螺旋演变为单链。本研究中的构象分析结果与前人报道通过微波辅助白及多糖提取保持天然构象的结果一致<sup>[21]</sup>,表明本研究中提取的白及多糖形成了三股螺旋的天然构象,说明本实验提取的白及多糖构象没有收到果胶酶破坏。

### 3.4 扫描电镜分析

如图 4 所示,本研究中提取的多糖微观结构在扫描电镜下呈现一定的孔状结构,与 Qu 等<sup>[21]</sup>报道的微波辅助法提取的多糖相比,电镜结构更为致密。这一结果进一步说明在酶法辅助提取中果胶酶没有

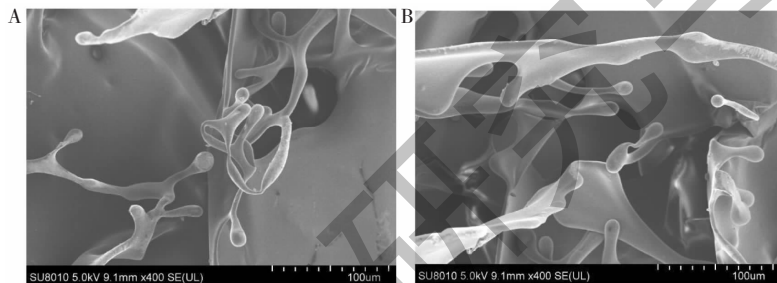


图 4 白及多糖在扫描电镜下的微观结构

Fig. 4 SEM images of BSP micro-structure

### 3.5 白及多糖体外抗氧化研究

羟基自由基、DPPH 以及超氧阴离子均是活性很强的自由基,可损伤体内多种蛋白质、核酸、脂质等生物大分子,对人体健康不利,因此,对这三种物质的清除可以有效表征其抗氧化活性<sup>[22]</sup>。本研究采用 Fenton 反应体系检测白及多糖对羟基自由基的清除能力,结果如图 5A。由图 5A 分析可知白及多糖对羟基自由基有显著的清除能力,且表现出良好的剂量依赖关系,清除率随着白及多糖浓度的增加而升高,白及多糖浓度为 15 mg/mL 时,清除率为 87.6%。本研究白及多糖对 DPPH 自由基的清除效果如图 5B。分析图 5B 可知,白及多糖对 DPPH 有很强的清除作用,且在 1 ~ 10 mg/mL 的浓度范围内,白及多糖对 DPPH 的清除率随多糖浓度的升高而逐渐增强。当多糖浓度为 10 mg/mL 时,白及多糖对 DPPH 自由基的清除率为 83.9%。实验采用邻苯三酚自氧化法测定白及多糖对超氧阴离子的清除能力,结果如图 5C。由图分析可知白及多糖对超

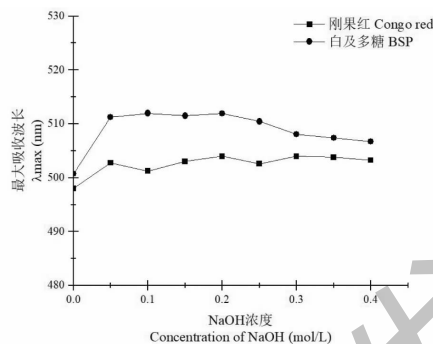


图 3 白及多糖在不同浓度 NaOH 种构型转变分析

Fig. 3 Conformation transition analysis of BSP at different concentration of NaOH.

破坏白及多糖;与微波辅助提取相比,酶法提取对白及多糖的保护性更好。

氧阴离子具有明显清除作用,且在白及多糖浓度为 1 ~ 10 mg/mL 时,表现出良好的剂量依赖关系,随着样品质量浓度升高其清除能力增强,当白及多糖浓度为 10 mg/mL 时,对超氧阴离子自由基清除率最大,为 71.5%。实验表明本研究的白及多糖对羟基自由基、DPPH 及超氧阴离子的清除作用具有清除率高、效果稳定的特点。

部分研究报道表明白及多糖可以在较低多糖浓度下(如 0.5 mg/mL)展现出较强的抗氧化活性<sup>[22]</sup>,但本研究结果表明为本实验所提取白及多糖在 10 mg/mL 以上浓度时才可以表现出较强的体外抗氧化活性,该结果与 Yang 等<sup>[23]</sup>报道表现一致。

## 4 结论

现有文献对果胶酶辅助提取白及多糖工艺及其抗氧化活性研究鲜有报道。本研究采用果胶酶辅助法提取白及多糖,采用响应面分析法优化提取工艺。在最优条件下,白及多糖提取率达到 64.8%,为目前最高报道量。通过对白及多糖空间构象分析及电



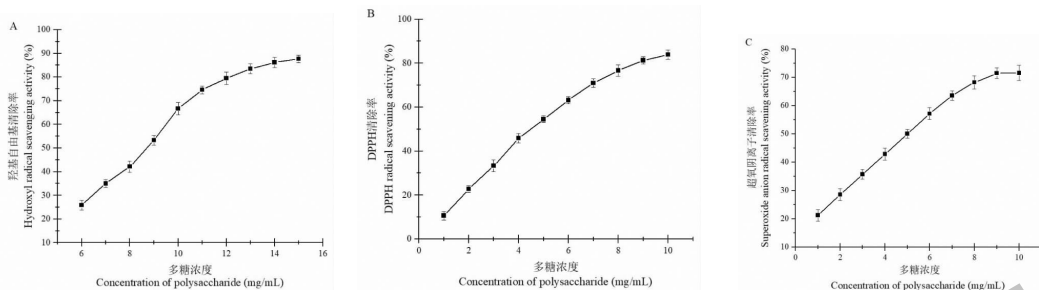


图5 不同浓度的白及多糖抗氧化性测定

Fig. 5 Resistance to oxidation analysis of different concentration of BSP

镜观察表明果胶酶提取对白及多糖具有较好的保护作用。体外性质研究表明,白及多糖对羟自由基、超氧阴离子、DPPH 自由基均有很强的清除能力。综上,本研究首次报道果胶酶辅助提取白及多糖的工艺优化及体外活性,本研究为白及多糖的工业化应用提供了良好的参考条件。

#### 参考文献

- Song XW, Zhu FC, Chen CW, et al. Development status and existing problems of traditional Chinese medicine industry in Lu'an[J]. J West Anhui Univ (皖西学院学报), 2019, 35(5):20-23.
- Sun AJ, Pang SQ, Wang GQ. Advances of chemical constituents and pharmacological activities of *Bletilla striata* [J]. Global Tradit Chin Med (环球中医药), 2016, 9:507-511.
- Wang W, He S, Hong T, et al. Synthesis, self-assembly, and in vitro toxicity of fatty acids-modified *Bletilla striata* polysaccharide[J]. Artif Cell Nanomed B, 2016, 45(1):1-7.
- Zhu JX, Lin YM, Yang Y, et al. Advances in the application of white and polysaccharide in biomedical materials [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2018, 41:1011-1014.
- Chen ZY, Cheng LZ, He YC, et al. Extraction, characterization, utilization as wound dressing and drug delivery of *Bletilla striata* polysaccharide: a review [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 120:2076-2085.
- Zhang MS, Sun L, Zhao WC, et al. Cholesteryl-modification of a glucomannan from *Bletilla striata* and its hydrogel properties [J]. Molecules, 2014, 19:9089-9100.
- Wang XX, Li Y, Li GQ, et al. Enzymatic extraction of inulin from Jerusalem artichoke pulp and its composition and antioxidant analysis [J]. Nat prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31:1408-1417.
- Xia F, Zhou S, Sun DF. Surface optimization method to optimize the enzymatic extraction of *Lycium barbarum* polysaccharides [J]. Chin Wild Plan Res (中国野生植物资源), 2017, 36(5):27-33.

- Zhu L, Shi JP, Wang CG, et al. Optimization of enzymatic extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* using response surface methodology [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2016, 37(24):238-244.
- Wang JH, Li D. Study on the extraction technology of polysaccharide in water chestnut peel by cellulase [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2016, 37(5):248-251.
- Song YR, Han AR, Park SG, et al. Effect of enzyme-assisted extraction on the physicochemical properties and bioactive potential of lotus leaf polysaccharides [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 153:169-179.
- Liu Y, Zhang GZ, Fan KF, et al. Study on the technologies for extraction and purification of *Astragalus* polysaccharides [J]. J Henan Agr Sci (河南农业科学), 2010, 31(3):199-207.
- Qu Y, Li C, Zhang C, et al. Optimization of infrared-assisted extraction of *Bletilla striata* polysaccharides based on response surface methodology and their antioxidant activities [J]. Carbohyd Polym, 2016, 148:345-353.
- Jia X, Ding C, Yuan S, et al. Extraction, purification and characterization of polysaccharides from Hawk tea [J]. Carbohyd Polym, 2014, 99:319-324.
- Kong L, Yu L, Feng T, et al. Physicochemical characterization of the polysaccharide from *Bletilla striata*: effect of drying method [J]. Carbohyd Polym, 2015, 125:1-8.
- Lee H, Lee J, Cho J, et al. Structural characteristics of immunostimulating polysaccharides from *Lentinus edodes* [J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 19(5):455-461.
- Li, X C. Solvent effects and improvements in the deoxyribose degradation assay for hydroxyl radical-scavenging [J]. Food Chem, 2013, 141:2083-2088.
- Wang ZJ. Study on the extraction and anti-oxidant activity of polysaccharide from *Agrocybe aegerita* [J]. Nanning: Guangxi University (广西大学), 2007.
- Song F L, Gan R Y, Zhang Y, et al. Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants [J]. Int J Mol Sci, 2010, 11:2362-2372.