

网络出版时间:2013-11-21 17:28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20131121.1728.019.html>

林蛙卵多糖的提取工艺及其抗氧化作用研究

陈大勇¹, 杨靖^{1,2}, 李硕¹, 郑毅男¹, 卫功庆¹

(1 吉林农业大学 中药材学院, 吉林 长春 130118; 2 内蒙古自治区党委宣传部, 内蒙古 呼和浩特 010000)

[摘要] **【目的】**研究木瓜蛋白酶解法提取林蛙卵多糖的最佳工艺,测定提取的林蛙卵多糖的抗氧化活性。**【方法】**以林蛙卵为材料,通过单因素试验和正交试验分析料(g)液(mL)比、木瓜蛋白酶加酶量、pH值和酶解时间对多糖提取率的影响,确定林蛙卵多糖的木瓜蛋白酶法最佳提取工艺;应用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法测定林蛙卵多糖的抗氧化活性。**【结果】**木瓜蛋白酶提取林蛙卵多糖的最佳条件为:料(g)液(mL)比1:20,酶添加量为每g样品70 mg, pH 6.0,酶解时间2.5 h,在此条件下,林蛙卵多糖提取率为2.67%。林蛙卵多糖对DPPH自由基的半数清除率为1.81 mg/mL。**【结论】**木瓜蛋白酶法对林蛙卵多糖的提取效果较好,林蛙卵多糖具有明显的抗氧化作用。

[关键词] 木瓜蛋白酶;林蛙卵;多糖;工艺优化;抗氧化;

[中图分类号] R282.740.2;R282.740.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2013)12-0149-06

Optimization of polysaccharides extraction from brown frog egg and the antioxidant activity of extracted polysaccharides

CHEN Da-yong¹, YANG Jing^{1,2}, LI Shuo¹, ZHENG Yi-nan¹, WEI Gong-qing¹

(1 Traditional Chinese Medicine Material College, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China;

2 Propaganda Department of Inner Mongolia Party Committee, Huhhot, Inner Mongolia 010000, China)

Abstract: **【Objective】** This study focused on the optimization of polysaccharides extraction from brown frog egg with papain enzymatic hydrolysis and the determination of antioxidant activity of extracted polysaccharides. **【Method】** Using brown frog egg as material, the effects of material to liquid ratio, enzyme concentration, pH and hydrolysis time on the extraction rate of polysaccharides were studied through the single factor experiments and orthogonal test analysis. The optimum extraction conditions were determined and the antioxidant activity of extracted polysaccharides was measured by DPPH method. **【Result】** The obtained optimum conditions were: material to liquid ratio was 1 g : 20 mL, the enzyme amount was 70 mg/g, pH value was 6.0 and hydrolysis time was 2.5 h. Under the optimal conditions, the extraction yield of polysaccharides from brown frog egg was 2.67%, and the half clearance rate on DPPH radicals was 1.81 mg/mL. **【Conclusion】** Extraction of polysaccharides from brown frog egg with papain enzymatic hydrolysis was efficient and the extracted polysaccharides had significant antioxidant activity.

Key words: papain; brown frog egg; polysaccharides; optimum extracting technology; antioxidant activity

中国林蛙(*Rana temporaria chensinensis* David), 俗称田鸡、哈士蟆, 属两栖纲、无尾目、蛙科、林

[收稿日期] 2013-01-04

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(08SYS-097)

[作者简介] 陈大勇(1986—), 男, 吉林长春人, 硕士, 主要从事中药新药开发研究。E-mail: chendayong605001@163.com

[通信作者] 卫功庆(1966—), 男, 安徽六安人, 副教授, 博士, 主要从事特种经济动物和动物药材研究。

E-mail: wgq6611@126.com

蛙属,主产于我国东北地区。中国林蛙体内富含蛋白质、糖类以及多种维生素和激素等^[1-2],是我国特有的药用经济动物之一,具有重要的保健功能^[3]。目前,关于林蛙油、林蛙皮的研究报道较多,林蛙油又称哈蟆油(*Oviductus Ranae*),系中国林蛙雌蛙的输卵管干制品^[4],具有增强免疫力^[5],抗衰老、抗疲劳^[6],镇咳祛痰等功效;林蛙皮具有抗炎、抗菌^[7-8]、抗氧化^[9]等作用。但林蛙卵作为哈蟆油生产的副产品,一直未被充分利用,对其研究也较少。

近年来的研究发现,多糖具有增强机体免疫力,降血糖^[10],降血脂^[11],抗肿瘤^[12],抗病毒、延缓衰老^[13]等多种药理作用。酶解法是获取天然多糖的重要手段之一,具有保持多糖生物活性的优点。杨靖等^[14]用酶解法从哈蟆油中提取多糖,并对其抗肿瘤和抗疲劳作用进行了研究。刘晓丹等^[15]用碱法提取的林蛙卵团胶状物粗多糖含量可达 24.01 g/mL。但是,目前对于林蛙卵多糖的酶解提取工艺及其活性尚未见研究报道。为此,本试验以林蛙卵为材料,通过单因素试验和正交试验,分析料液比、木瓜蛋白酶添加量、pH 值和酶解时间对林蛙卵多糖提取率的影响,筛选最佳提取工艺,并对林蛙卵多糖的抗氧化活性进行了研究,旨在为林蛙卵的进一步开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 林蛙卵 东北林蛙购自吉林省珲春市华瑞参业生物工程有限公司。将林蛙处死后冷冻干燥,取林蛙油后得到的林蛙卵经粉碎后过 0.174 mm 筛备用。

1.1.2 试剂与主要仪器 苯酚、浓硫酸、氯仿、正丁醇、氢氧化钠、盐酸、无水乙醇和葡萄糖均为分析纯试剂,购于北京化工厂;木瓜蛋白酶,购于西安沃尔森生物技术有限公司,酶活力 1 000 U/mg。

主要仪器有 GL-20G-II 离心机(上海安亭科学仪器厂)、XMTD 数显水浴锅(余姚市东方电工仪器厂)、UV-5100 紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司)、SHA-CA 水浴恒温振荡器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)、高速万能粉碎机(北京科伟永兴仪器有限公司)、KQ-250DB 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 林蛙卵多糖的提取

1.2.1 葡萄糖标准溶液的配制与标准曲线的绘制 精确称取葡萄糖标准品 10 mg,用蒸馏水溶解并

定容到 100 mL 容量瓶中,分别吸取 1,2,3,4,5,6,7,8 mL 葡萄糖溶液,加蒸馏水定容至 10 mL 容量瓶中,制成葡萄糖系列标准溶液。分别吸取各葡萄糖标准溶液 2 mL,加入 1 mL 质量分数 6% 苯酚和 5 mL 浓硫酸,摇匀后在沸水浴上加热 30 min,然后取出晾凉并在 490 nm 处测量吸光度值(OD_{490})。以 OD_{490} 为纵坐标(y),葡萄糖质量浓度为横坐标(x),绘制标准曲线(图 1),拟合其回归方程为: $y = 14.998x + 0.0009, R^2 = 0.9987$ 。

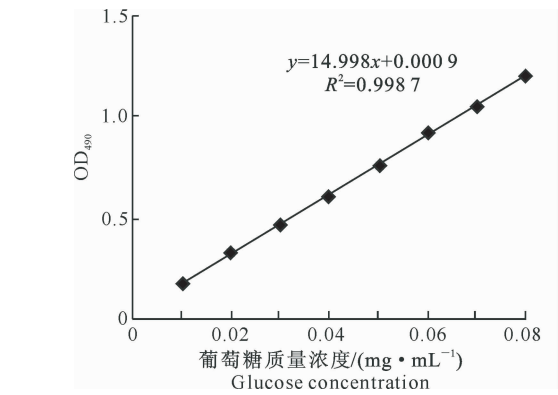


图 1 葡萄糖标准曲线
Fig. 1 Glucose standard curve

1.2.2 提取与测定 准确称取 1 g 林蛙卵干粉,加入 20 mL 蒸馏水,100 r/min 下浸泡 2 h,调节 pH 值为 6 (用 0.1 mol/L NaOH 和 HCl 进行调节^[16]),加木瓜蛋白酶,100 r/min、55 ℃下酶解 2.5 h,之后在沸水浴中加热 10 min 以灭活酶,5 000 r/min 离心 10 min,去除沉淀,取上清液,用 Sevage 法除蛋白^[17],倒入分液漏斗中充分振荡 20~30 min,静置至分层后,将其上下层分别进行 9 000 r/min 离心 15 min,取上清液混合,加入 3 倍体积无水乙醇进行醇沉;低温静置过夜,9 000 r/min 离心 15 min,取沉淀冷冻干燥,通过莫利胥(Molish)反应^[18],确定干燥物即为林蛙卵多糖提取物。

林蛙卵粗多糖提取物中的多糖含量采用苯酚-硫酸比色法测定^[19]。精确称取 10 mg 提取物,定容至 100 mL,待其溶解后,分别吸取 2 mL 于试管中,加入质量分数 6% 苯酚 1 mL 和 5 mL 浓硫酸,摇匀后于沸水浴上加热 30 min,冷却后测 OD_{490} 值,根据回归方程计算多糖含量,并计算多糖提取率:多糖提取率=提取物中的多糖质量/原料质量×100%。

1.3 木瓜蛋白酶法提取林蛙卵多糖的单因素试验 以原料(g)与蒸馏水(mL)的料液比(A)、木瓜蛋白酶的添加量(B)、pH 值(C)、酶解时间(D)为考察因子,多糖提取率为考察指标,进行单因子试验。

酶解温度设置为木瓜蛋白酶的最适温度 55 ℃^[20-21]。

1.3.1 料液比 准确称取 5 份林蛙卵干粉,每份 1 g,分别加入 10,15,20,25,30 mL 的蒸馏水,100 r/min 浸泡 2 h,调节 pH 值为 6,再加入 70 mg 的木瓜蛋白酶,后续试验操作同 1.2.2 节。

1.3.2 加酶量 准确称取 5 份林蛙卵干粉,每份 1 g,分别加入 20 mL 的蒸馏水,100 r/min 浸泡 2 h,调节 pH 值为 6,再分别加入 10,30,50,70,90 mg 的木瓜蛋白酶,后续试验操作同 1.2.2 节。

1.3.3 pH 值 准确称取 5 份林蛙卵干粉,每份 1 g,分别加入 20 mL 的蒸馏水,100 r/min 浸泡 2 h,

表 1 木瓜蛋白酶法提取林蛙卵多糖的正交试验方案

Table 1 Orthogonal experimental program for polysaccharides extraction from brown frog egg by papain enzymolysis method

水平 Level	因素 Factor			
	料液比 Material-liquid rat	木瓜蛋白酶添加量/mg Enzyme concentration	pH	酶解时间/h Time
	A	B	C	D
1	1 : 10	30	5.0	2
2	1 : 20	50	6.0	2.5
3	1 : 30	70	7.0	3

注:木瓜蛋白酶添加量为 1 g 林蛙卵的酶用量。

Note:Papain dosage was for 1 g brown frog egg.

1.5 林蛙卵多糖对 DPPH 自由基的清除作用

准确称取 50 mg 的林蛙卵多糖提取物,配置成 10 mg/mL 的溶液,吸取不同的体积,配制成质量浓度分别为 0.1,0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mg/mL 的样品溶液,备用。吸取不同质量浓度的样品溶液 1 mL,加入 4 mL DPPH 溶液,试验同时设 1 mL 蒸馏水+4 mL DPPH 溶液和 1 mL 体积分数 95%乙醇+4 mL DPPH 溶液分别为阴性对照和乙醇对照,按照 Li 等^[22]和 Qiao 等^[23]的方法,并对其略作改进,在 517 nm 处测定吸光值(OD₅₁₇),平行测定 3 次,计算林蛙卵多糖对 DPPH 自由基的清除率和半数清除率(IC₅₀,指清除率为 50%时所需抗氧化剂的质量浓度)。清除率=[阴性对照 OD₅₁₇-(待测液 OD₅₁₇-乙醇对照 OD₅₁₇)]/阴性对照 OD₅₁₇×100%。IC₅₀根据不同质量浓度抗氧化剂的清除率作曲线求出。

2 结果与分析

2.1 料液比对林蛙卵多糖提取率的影响

由图 2 可知,林蛙卵多糖提取率随料液比的增大而升高,当料液比为 1 : 20 时多糖提取率达到最高点,之后反而下降。这是因为料液比过低时,底物溶解不充分,酶解反应不彻底;料液比过高时,酶的浓度可能降低,酶解不充分,且不利于浓缩^[24]。所

调节 pH 值分别为 5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,再加入 70 mg 的木瓜蛋白酶,后续试验操作同 1.2.2 节。

1.3.4 酶解时间 准确称取 5 份林蛙卵干粉,每份 1 g,分别加入 20 mL 蒸馏水,100 r/min 浸泡 2 h,调节 pH 值为 6,再加入 70 mg 的木瓜蛋白酶,100 r/min、55 ℃下分别酶解 1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 h,后续试验操作同 1.2.2 节。

1.4 木瓜蛋白酶法提取林蛙卵多糖的正交试验

在单因子试验基础上进行 L₉(3⁴) 正交试验,以多糖提取率为考察指标,确定林蛙卵多糖的最佳提取工艺,试验方案见表 1。

以,选择 1 : 20 为最佳料液比。

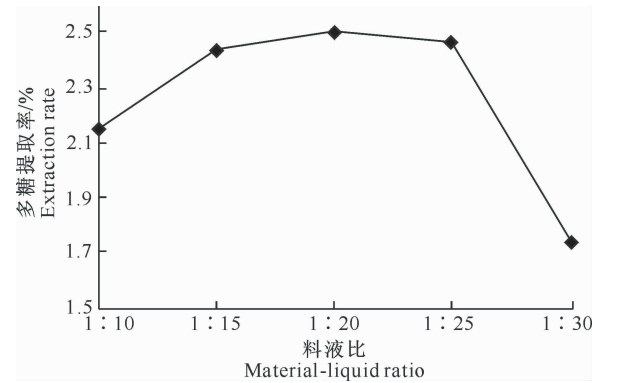


图 2 料(g)液(mL)比对林蛙卵多糖提取率的影响
Fig. 2 Effect of material to liquid ratio on extraction rate of crude polysaccharides from brown frog egg

2.2 木瓜蛋白酶添加量对林蛙卵多糖提取率的影响

由图 3 可知,随着木瓜蛋白酶添加量的增加,林蛙卵多糖的提取率逐渐上升,但当木瓜蛋白酶添加量超过每 g 样品 70 mg 时,多糖提取率呈现下降趋势。酶量过高,林蛙卵多糖中的一些糖苷键会分解,致使多糖提取率下降^[21],所以确定木瓜蛋白酶的最佳添加量为每 g 样品 70 mg。由于木瓜蛋白酶的最佳添加量超过每 g 样品 70 mg 时,林蛙卵多糖的提取率下降,考虑到试验成本,本试验选取每 g 样品加 30,50,70 mg 3 个酶添加量进行正交试验。

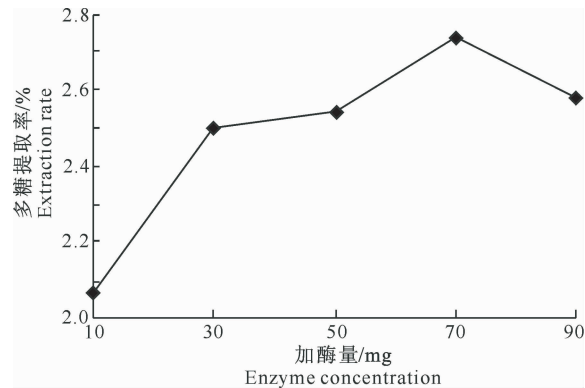


图 3 木瓜蛋白酶添加量对林蛙卵多糖提取率的影响

Fig. 3 Effect of enzyme concentration on extraction rate of crude polysaccharides from brown frog egg

2.3 溶液 pH 值对林蛙卵多糖提取率的影响

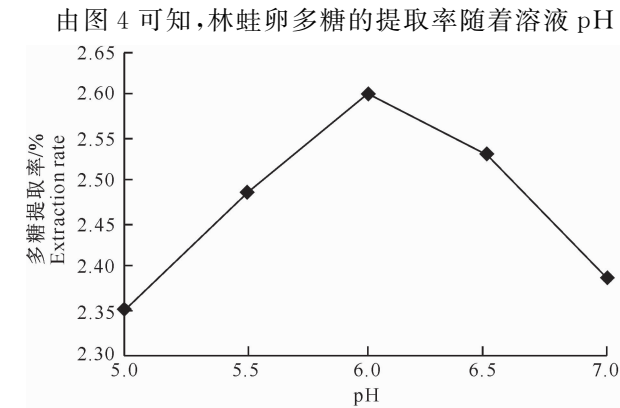


图 4 溶液 pH 值对林蛙卵多糖提取率的影响

Fig. 4 Effect of PH on extraction rate of crude polysaccharides from brown frog egg

2.5 木瓜蛋白酶法提取林蛙卵多糖的工艺优化

由表 2 和表 3 可知,4 个因素对林蛙卵多糖的提取率影响大小依次为 B>C>A>D,其中 A、B、C 3 个因素的影响均达显著水平,最优条件为

表 2 木瓜蛋白酶法提取林蛙卵多糖的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 $L_9(3^4)$ orthogonal test on polysaccharides extraction from brown frog egg by papain enzymolysis					
实验号	A	B	C	D	提取率/% Extraction rate
1	1	1	1	1	2.11
2	1	2	2	2	2.61
3	1	3	3	3	2.46
4	2	1	2	3	2.57
5	2	2	3	1	2.55
6	2	3	1	2	2.60
7	3	1	3	2	2.18
8	3	2	1	3	2.34
9	3	3	2	1	2.61
K_1	2.393	2.287	2.350	2.423	
K_2	2.573	2.500	2.597	2.463	
K_3	2.377	2.557	2.397	2.457	
R	0.196	0.270	0.247	0.040	

值的增加而升高,pH 为 6.0 时多糖提取率达到最大,之后多糖提取率持续下降。这是因为每种酶都有最适的 pH 值范围,若偏离此 pH 值范围,酶的活性降低,目标产物的提取率下降^[21]。所以,选择 pH 6.0 为林蛙卵多糖提取的最适 pH 值。

2.4 酶解时间对林蛙卵多糖提取率的影响

由图 5 可知,随着酶解时间的延长,林蛙卵多糖提取率呈先升高后下降的趋势,在 2.5 h 达到最大。这可能是由于酶解反应到 2.5 h 时,木瓜蛋白酶与底物之间作用比较完全,使多糖充分地溶出;随着酶解时间的进一步延长,多糖可能又附着在大分子蛋白上,沉降到底部,提取率反而下降。所以选择 2.5 h 为最优酶解时间。

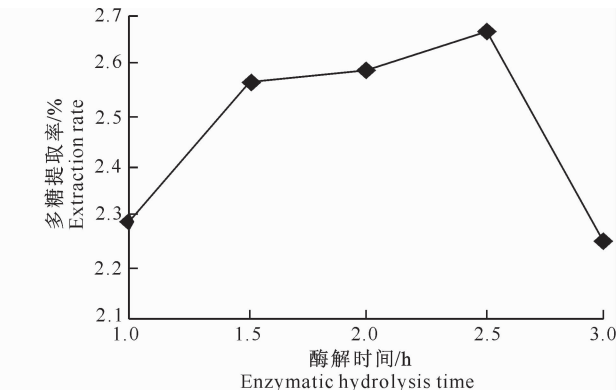


图 5 酶解时间对林蛙卵多糖提取率的影响

Fig. 5 Effect of enzymatic hydrolysis time on extraction rate of crude polysaccharides from brown frog egg

$A_2B_3C_2D_2$,即料液比 1 : 20,酶添加量为每 g 样品 70 mg,酶解时间 2.5 h,pH 6.0。在确定的最优条件下提取林蛙卵多糖,做 3 次平行实验,测得林蛙卵多糖提取率为 2.67%。

表 3 木瓜蛋白酶法提取林蛙卵多糖 L₉(3⁴)正交试验结果的方差分析

Table 3 Variance analysis of L₉(3⁴) results on polysaccharides extraction from brown frog egg by papain enzymolysis

方差来源 Source	离差平方和 Sum of squares	自由度 df	方差 Squares	F F value	显著性 Significance
A	0.071	2	0.0355	23.667	*
B	0.122	2	0.0610	40.667	*
C	0.103	2	0.5015	34.333	*
D	0.003	2	0.0015	1	

注(Note): * $P<0.05$, * * $P<0.05$; $F_{0.01(2,2)}=99.000$, $F_{0.05(2,2)}=19.000$.

2.6 林蛙卵多糖的抗氧化能力

由图 6 可知,林蛙卵多糖对 DPPH 自由基的清除率随其质量浓度的升高而增大;林蛙卵多糖对 DPPH 自由基的半数清除率为 1.81 mg/mL,表明林蛙卵多糖对 DPPH 自由基有很好的清除作用。

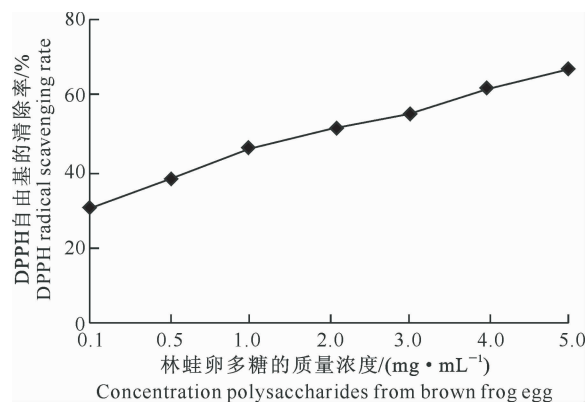


图 6 林蛙卵多糖对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.6 Scavenging of DPPH radicals by polysaccharides from brown frog egg

3 结论与讨论

目前提取动物多糖主要采用碱法和酶法,本试验选用酶解法提取林蛙卵多糖,原因在于酶法对部分蛋白质具有水解作用,降低了这些蛋白质与多糖的结合能力,有利于多糖的析出,并且不易引入杂质,保护了多糖的生物学活性^[25]。

试验过程中对下层液体进行了离心处理后将上层液体取出合并,减少了试验过程中产生的误差。本试验在体外条件下测定了林蛙卵多糖对 DPPH 自由基的清除率,验证了其体外抗氧化作用。

本试验结果表明,采用木瓜蛋白酶法提取林蛙卵多糖的最佳工艺条件是:料液比 1 : 20,木瓜蛋白酶添加量为每 g 样品 70 mg, pH 6. 0, 酶解时间为 2.5 h。在此条件下林蛙卵多糖提取率为 2.67%。林蛙卵多糖对 DPPH 自由基的半数清除率为 1.81 mg/mL,说明林蛙卵多糖具有一定的抗氧化作用。

[参考文献]

[1] 范玉林. 哈士蟆油成分研究的进展 [J]. 吉林农业大学学报, 1996,18(3):105-111.
Fan Y L. Process for frog oil constituents research [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 1996,18(3):105-111. (in Chinese)

[2] 包玉晓. 林蛙油化学成分的研究进展 [J]. 畜牧兽医杂志, 2009,28(3):37-38.
Bao Y X. Research process for the chemical composition of the oil *Rana* [J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2009,28(3):37-38. (in Chinese)

[3] 中国药用动物志. 中国药用动物志:第一册 [M]. 天津:天津科学技术出版社,1982:174-176.
China Medicinal Fauna Compile to Cooperate. China medicinal fauna:First book [M]. Tianjin:Tianjin Science and Technology Press,1982:174-176. (in Chinese)

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010 版 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
State Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China:2010 [M]. Beijing:China Medical Science and Technology Press,2010. (in Chinese)

[5] 于洋,姜大成,张炜煜. 哈蟆油对免疫力低下小鼠体内脂肪酸含量的影响 [J]. 长春中医药大学学报,2008,24(2):150-151.
Yu Y, Jiang D C, Zhang W Y. The influence kazakhstan ranae makes on fatty acid content of immunocompromised mice [J]. Journal of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, 2008,24(2):150-151. (in Chinese)

[6] 李津明,宋茜,孙仁爽,等. 林蛙油酶解前后抗疲劳作用对比研究 [J]. 黑龙江医药,2008,21(2):30-34.
Li J M, Song Q, Sun R S, et al. Comparison of effect of oil *Rana enzymatic* anti-fatigue before and after [J]. Heilongjiang Medicine Journal, 2008,21(2):30-34. (in Chinese)

[7] 姚文兵,刘煜,余江河,等. 蛙皮活性提取物的抗炎作用和体外抗菌活性研究 [J]. 中国药科大学学报,1995,26(5):314-317.
Yao W B, Liu Y, Yu J H, et al. Anti-inflammatory effects of the activity of frog skin extract and antibacterial activity *in vitro* [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 1995,26(5):314-317. (in Chinese)

[8] 傅南雁,许传喜. 抗菌肽研究进展 [J]. 生命的化学,1998,18(2):25-29.
Fu N Y, Xu C X. Advances in antimicrobial peptide research [J]. Chemistry of Life, 1998,18(2):25-29. (in Chinese)

- [9] 薛冰,金在久,施溯筠,等.林蛙皮的抗氧化性研究[J].华西药学杂志,2010,25(4):431-433.
Xue B,Jin Z J,Shi S Y,et al. Study on oxidation resistance of *Rana* skin [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010,25(4):431-433. (in Chinese)
- [10] 罗成,鲁晓翔,周达.鸡油菌多糖降血糖作用研究[J].食品工业科技,2010(12):333-337.
Luo C,Lu X X,Zhou D. Study on the effect of chanterelles polysaccharide hypoglycemic [J]. Science and Technology of Food Industry,2010(12):333-337. (in Chinese)
- [11] 李英华,韩冠英,郭斌,等.鲨鱼软骨多糖对血脂的影响[J].辽宁中医杂志,2006,33(6):760-761.
Li Y H,Han G Y,Guo B,et al. The influence shark cartilage polysaccharides makes on blood lipids [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine,2006,33(6):760-761. (in Chinese)
- [12] 江华.黄精多糖的抗肿瘤活性研究[J].南京中医药大学学报,2010(6):479-480.
Jiang H. Antitumor activity research of polygonatum polysaccharide [J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine,2010(6):479-480. (in Chinese)
- [13] 殷红玲,马媛,王璐,等.虾夷扇贝内脏多糖的提取及清除羟基自由基作用的研究[J].水产科学,2007,26(5):255-258.
Yin H L,Ma Y,Wang L,et al. The research of yessoensis viscera polysaccharide extraction and removal of the hydroxyl-radical role [J]. Fisheries Science,2007,26(5):255-258. (in Chinese)
- [14] 杨靖,李硕,陈大勇,等.正交实验法筛选蛤蟆油粗多糖酶解提取工艺的研究[J].吉林农业大学学报,2011,33(4):403-407.
Yang J,Li S,Chen D Y,et al. Study on orthogonal experiment filter crude polysaccharide of kazakhstan ranae enzymatic extraction crafts [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2011,33(4):403-407. (in Chinese)
- [15] 刘晓丹,郑明珠,刘景圣,等.响应面法优化碱法提取林蛙卵团中粗多糖的工艺研究[J].食品科学,2010,31(22):96-100.
Liu X D,Zheng M Z,Liu J S,et al. The process of using response surface and soda methodology extract crude polysaccharide from the frog egg mass [J]. Food Science,2010,31(22):96-100. (in Chinese)
- [16] Hou X J,Chen W. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible *Bachu* mushroom by response surface methodology [J]. Carbohydrate Polymers,2008,72:68-72.
- [17] Staub, A M. Removal of proteins from polysaccharides [J]. Methods in Carbohydr Chem,1965,5:5.
- [18] 杨靖.林蛙油粗多糖提取条件优化及其药理活性研究[D].长春:吉林农业大学,2011.
Yang J. Studies on optimized extracting technology of crude polysaccharides from *Oviductus Ranae* and its pharmacological activities [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2011. (in Chinese)
- [19] Dubois M,Gilles K A,Hamilton J K,et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Annal Chem,1956,28:350-354.
- [20] 殷红玲,杨静峰,李冬梅,等.酶法提取鲍鱼多糖的研究[J].食品与发酵工业,2006,32(12):158-160.
Yin H L,Yang J F,Li D M,et al. Enzymatic extraction of abalone polysaccharide [J]. Food and Fermentation Industries, 2006,32(12):158-160. (in Chinese)
- [21] 孟志芬,祝勇,张怀,等.木瓜蛋白酶酶解法提取大枣多糖的工艺研究[J].河南科技学院学报,2006,34(3):49-50.
Meng Z F,Zhu Y,Zhang H,et al. Papain enzymatic extraction process of jujube polysaccharide [J]. Journal of Henan Institute of Science and Technology,2006,34(3):49-50. (in Chinese)
- [22] Li X,Zhou A,Han Y. Anti-oxidation and anti-microorganism activities of purification polysaccharide from *Lygodium japonicum* in vitro [J]. Carbohydrate Polymers,2006,66(1):34-42.
- [23] Qiao D L,Ke C L,Hu B. Antioxidant activities of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii* [J]. Carbohydrate Polymers, 2009,78:199-204.
- [24] 许静,周凤梅,彭芳,等.酶法提取海参脏器多糖条件优化研究[J].食品研究与开发,2010,31(8):28-30.
Xu J,Zhou F M,Peng F,et al. Optimization of enzymatic extraction of the sea cucumbers organs polysaccharide conditions [J]. Food Research and Development,2010,31(8):28-30. (in Chinese)
- [25] 林宇野,杨虹.酶法提取银耳多糖的研究[J].食品与发酵工业,1995(1):13-17.
Lin Y Y,Yang H. Enzymatic extraction of tremella polysaccharides [J]. Food and Fermentation Industries,1995(1):13-17. (in Chinese)