

金钗石斛多糖的酶解工艺优化及其抗氧化活性

王筱玥¹, 刘学^{1*}, 刘春环¹, 刘晶², 杨成¹

[1. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 国珍健康科技(北京)有限公司, 北京 102200]

摘要: 采用 α -半乳糖苷酶对金钗石斛多糖 30%醇沉 (30%为乙醇水溶液中乙醇的质量分数) 组分 (DNP-30) 进行了酶解。以酶解产物 (DNP-30E) 对 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS⁺) 自由基清除率为指标, 通过单因素和响应面实验确定了最佳酶解条件。采用 FTIR、NMR、高效凝胶渗透色谱仪对 DNP-30 和 DNP-30E 进行了表征。基于体外和细胞内抗氧化活性实验、建立十二烷基硫酸钠 (SDS) 刺激 HaCaT 细胞氧化应激模型, 探究了 DNP-30 和 DNP-30E 的抗氧化能力。结果表明, 在 α -半乳糖苷酶加酶量 20 U/mL、pH=7.0、酶解温度 46 °C、酶解时间 11 h 的最佳酶解条件下, DNP-30E 对 ABTS⁺ 自由基清除率平均值为 85.62%。与 DNP-30 相比, DNP-30E 还原糖含量由 0.63%±0.35% 升至 48.66%±0.51%, 重均相对分子质量由 7.95×10^5 Da 降至 2083 Da。酶解过程造成多糖中的葡萄糖(1 α →6)-甘露糖 [Glu(1 α →6)-Man] 键发生断裂, 并引起葡萄糖端基氢构型翻转。当多糖质量浓度为 2.0 g/L 时, DNP-30E 提高了 ABTS⁺ 自由基、羟基自由基、超氧自由基清除率; 当多糖质量浓度为 5.0~10.0 g/L 时, DNP-30E 细胞毒性比 DNP-30 显著降低。多糖质量浓度为 0.5 g/L 时, DNP-30E 组比 DNP-30 组的活性氧含量降低了 34.21%, 丙二醛含量降低了 50.2%, 超氧化物歧化酶活力提升了 84.17%, 表现出更强的抗氧化能力。

关键词: 金钗石斛多糖; α -半乳糖苷酶; 酶解工艺优化; 抗氧化活性; HaCaT 细胞; 中药现代化技术

中图分类号: R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2025) 04-0837-12

Process optimization of *Dendrobium nobile* polysaccharide on enzymatic hydrolysis and its antioxidant activity

WANG Xiaoyue¹, LIU Xue^{1*}, LIU Chunhuan¹, LIU Jing², YANG Cheng¹

[1. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. Guozhen Health Technology (Beijing) Co., Ltd., Beijing 102200, China]

Abstract: α -Galactosidase was used to enzymolyze 30% alcohol precipitation (30% is the mass fraction of ethanol in ethanol aqueous solution) component (DNP-30) of *Dendrobium nobium* polysaccharide, and the optimal enzymolysis conditions were determined by single factor and response surface experiments using scavenging rate of 2,2-diazo-bis(3-ethyl-benzothiazole-6-sulfonic acid)diammonium salt (ABTS⁺) free radicals by enzymolysis product (DNP-30E) as index. DNP-30 and DNP-30E were characterized by FTIR, NMR and high performance gel permeation chromatograph. The oxidative stress model of HaCaT cells stimulated by sodium dodecyl sulfate (SDS) was established to investigate the antioxidant capacity of DNP-30 and DNP-30E based on *in vitro* and intracellular antioxidant activity experiments. The results showed that under the optimum enzymolysis conditions of α -galactosidase dosage 20 U/mL, pH=7.0, temperature 46 °C and time 11 h, the average scavenging rate of DNP-30E on ABTS⁺ free radicals was 85.62%. Compared with those of DNP-30, the reducing sugar content of DNP-30E increased from 0.63%±0.35% to 48.66%±0.51%, and the mass-average relative molecular mass decreased from 7.95×10^5 Da to 2083 Da. Enzymolysis might break glucose (1 α →6)-mannose [Glu(1 α →6)-Man] bond in DNP-30 and reversed the configuration of glucose terminal hydrogen. When the mass concentration of

收稿日期: 2024-03-16; 定用日期: 2024-04-08; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240230

作者简介: 王筱玥 (2000—), 女, 硕士生, E-mail: 15251627903@163.com。联系人: 刘学 (1983—), 男, 副教授, E-mail: xueliu@jiangnan.edu.cn。

polysaccharide was 2.0 g/L, DNP-30E increased the scavenging rate of ABTS⁺ free radicals, hydroxyl free radicals, superoxide free radicals. When the mass concentration of polysaccharide was 5.0~10.0 g/L, the cytotoxicity of DNP-30E was significantly lower than that of DNP-30. When polysaccharide concentration was 0.5 g/L, the active oxygen content, malondialdehyde content and superoxide dismutase activity of DNP-30E group were decreased by 34.21%, 50.2% and 84.17%, respectively, compared with DNP-30 group, showing stronger antioxidant capacity.

Key words: polysaccharide of *Dendrobium nobile*; α -galactosidase; enzymatic hydrolysis process optimization; antioxidant activity; HaCaT cells; modernization technology of traditional Chinese medicines

金钗石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl.) 是一种名贵中草药^[1-2], 被列入《国家重点保护野生植物名录》。金钗石斛多糖是金钗石斛的主要活性成分, 具有抗氧化、抗炎、降血糖、保护皮肤等多种功效, 常作为一种天然植物活性成分添加到药品、保健品中^[3-4]。LONG 等^[5]研究发现, 石斛多糖可降低紫外线辐射 (UVB) 刺激对 HaCaT 细胞氧化应激和凋亡的影响, 起到抗氧化的作用。ZHANG 等^[6]比较了水提法和聚乙二醇 200 (PEG-200) 法提取得到的金钗石斛多糖, 发现二者均在 0.125~4.00 g/L 的质量浓度范围内具有一定的体外自由基清除能力。

张心驰等^[7]研究表明, 多糖的活性与相对分子质量密切相关, 相对分子质量更低的多糖具有更强的生物活性。XING 等^[8]通过分步醇沉法制备得到 4 种相对分子质量不同的铁皮石斛多糖, 发现相对分子质量最低的铁皮石斛多糖-70 (DOP-70) 具有最强的体外及 HepG2 细胞内抗氧化活性。XU 等^[9]通过果胶酶和葡萄糖淀粉酶对浒苔多糖进行了酶解, 发现酶解多糖具有更低的相对分子质量, 且自由基清除能力强于未降解多糖。鉴于多糖的活性与其相对分子质量等结构特征密切相关, 金钗石斛多糖可能由于其相对分子质量大、水溶性差, 限制了其抗氧化活性的充分发挥。

本文拟选择酶水解技术^[10-12]断裂多糖的糖苷键, 通过响应面实验对金钗石斛多糖的酶解工艺进行优化; 利用 α -半乳糖苷酶制备得到抗氧化活性更强的金钗石斛酶解多糖, 并对酶解前后的多糖进行结构分析及抗氧化活性考察, 确定金钗石斛多糖经过 α -半乳糖苷酶酶解成为天然抗氧化剂的能力。以期获得相对分子质量更低、水溶性更强、结构更简单且抗氧化活性更高的活性片段, 为拓展金钗石斛多糖在医药、化妆品中的应用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

金钗石斛干茎, 购于贵州省赤水县芝绿金钗石斛生态园开发有限公司, 经中国科学院华南植物园华南植物鉴定中心段俊及曾飞燕鉴定为赤水金钗石

斛芝绿-丹霞一号 (*Dendrobium nobile* Lindl.); 活性氧检测试剂盒、脂质氧化 (MDA) 检测试剂盒、总超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测试剂盒 (WST-8 法), 碧云天生物技术有限公司。HaCaT 细胞 (人永生角质形成细胞), 北纳生物科技有限公司。

α -半乳糖苷酶 (黑曲霉来源)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS⁺)、2,4,6-三(2-吡啶基)三嗪 (TPTZ), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 碧云天生物技术有限公司; DNS 试剂, 上海源叶生物科技有限公司; 水杨酸, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 单糖标准品, 美国 Sigma 公司; 其余试剂, 国药集团化学试剂有限公司; 以上所有试剂均为分析纯。

5804R & 5418 型低温高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; CYTATION 5 型多功能微孔板酶标仪, 美国 BioTek 公司; UB-1800PC 型紫外-可见分光光度计, 翱艺仪器上海有限公司; Waters 1525EF 型高效凝胶液相色谱仪 (HPGPC) (配 2414 示差折光检测器), 美国 Waters 公司; Nicolet iS50 型傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR)、DIONEX ICS-5000+SP-5 型高效阴离子色谱仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; AVANCE NEO 600 MHz 型核磁共振波谱仪 (NMR), 德国 Bruker 公司; BD FACSAria III 流式细胞仪, 美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 金钗石斛粗多糖的提取

金钗石斛干茎粉碎后过 30 目筛, 称取金钗石斛干粉 100 g 按照料液比 (g : mL, 下同) 1 : 10 加入乙酸乙酯超声脱脂, 滤渣风干后得到金钗石斛脱脂粉末。称取一定质量金钗石斛脱脂粉末, 按照料液比 (g : mL, 下同) 1 : 15 加入去离子水, 沸水浴提取 1 h, 对提取液进行过滤, 8500 r/min 离心 15 min, 浓缩至生药质量浓度 0.2 g/L, 4 倍体积无水乙醇醇沉, 4 °C 静置 12 h 后, 收集沉淀, 经无水乙醇洗涤后加去离子水复溶, -30 °C 冷冻干燥 96 h 得到金钗石斛粗多糖 (DNPC)。

1.2.2 粗多糖分级醇沉

称取 20 g DNPC, 加热搅拌溶解于去离子水中,

配制质量浓度 20 g/L 的溶液, 8500 r/min 离心 15 min, 磁力搅拌下滴加无水乙醇使溶液中乙醇质量分数达 30%, 4 °C 静置 12 h, 10000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 置于通风橱中挥发掉乙醇后加去离子水复溶, 离心后取上清液于 -30 °C 冷冻干燥 96 h, 得到乙醇质量分数为 30% 醇沉组分, 记为 DNP-30。

1.2.3 酶解多糖的制备

称取 50 mg DNP-30, 用 pH=7.0 的 NaAc-HAc 缓冲液配制质量浓度 10 g/L 的溶液, 加入 α -半乳糖苷酶, 使其在体系中的含量为 20 U/mL, 于 46 °C, 200 r/min 的摇床中反应 11 h, 反应后沸水浴 10 min 灭活 α -半乳糖苷酶, 离心除去沉淀, 取上清液于 -30 °C 冷冻干燥 96 h, 即为酶解后的 DNP-30 多糖样品 DNP-30E。

1.3 表征方法

1.3.1 总糖和还原糖含量测定

参照文献[13]方法, 采用苯酚-硫酸法, 根据葡萄糖含量 (x)-吸光度 (y) 回归曲线方程 $y=4.77x+0.0004$ ($R^2=0.9991$) 计算 DNP-30 及 DNP-30E 的总糖含量。

参照文献[14]方法, 采用 DNS 试剂法, 根据还原糖含量 (x)-吸光度 (y) 回归曲线方程 $y=0.4309x-0.0084$ ($R^2=0.9991$) 计算 DNP-30 及 DNP-30E 的还原糖含量。

1.3.2 相对分子质量分布测试

分别将 DNP-30、DNP-30E 配制质量浓度 5 g/L 的水溶液, 采用 HPGPC 进行相对分子质量分布检测。色谱条件: 色谱柱 Ultrahydrogel™ Linear, 300 mm×7.8 mm×2 μ m; 流动相 0.1 mol/L 的 NaNO₃ 溶液, 流速 0.9 mL/min, 柱温 45 °C。

HPGPC 标准曲线方程制作: 取不同相对分子质量葡聚糖标准品用流动相配成质量浓度为 5 g/L 的溶液, 按上述条件和方法进行检测, 每个样品平行进样 3 次。以保留时间 (x) 为横坐标、相对分子质量的常用对数 (y) 为纵坐标作图, 绘制标准曲线并对曲线进行回归拟合得到回归方程为: $y=-0.518x+13.527$, $R^2=0.9906$ 。

1.3.3 单糖组成测试

取 5 mg DNP-30 或 DNP-30E 于水解管中, 加入 10 mL 三氟乙酸 (2 mol/L), 于 120 °C 下磁力搅拌水解 4 h, 再用甲醇复溶吹干, 重复 3~5 次, 直至样品无酸气味。加水配成质量浓度为 50 mg/L 溶液, 进行高效阴离子色谱 (HPAEC) 检测。色谱条件: 色谱柱 CarboPac PA 20 (3 mm×150 mm), 流动相为超纯水、1 mol/L NaAc 溶液、250 mmol/L NaOH 溶液, 流速 0.5 mL/min, 柱温 30 °C; 进样量 10 μ L; 进样质量浓度 50 mg/L。

1.3.4 FTIR 测试

取适量 DNP-30 或 DNP-30E, 采用 KBr 压片法, 扫描范围 4000~500 cm^{-1} 。

1.3.5 NMR 测试

称取 50 mg DNP-30 或 DNP-30E, 溶解于 1 mL 重水中, 取上清液过滤, 将 600 μ L 加入至核磁管中, 采用 NMR 测定。

1.3.6 刚果红实验

取 2 mL 刚果红水溶液 (8 mmol/L) 与 10 mL 样品混合, 分别添加不同体积的 1 mol/L NaOH 溶液至 NaOH 在体系中的浓度分别为 0、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L, 于多功能微孔板酶标仪中扫描全波长, 记录其最大吸收波长变化。

1.4 体外抗氧化活性测试

取一定量酶解前后冻干样品, 分别用去离子水配制质量浓度为 10、20、30L、40、50 g/L 的多糖溶液, 样品备用。

1.4.1 ABTS⁺自由基清除能力测试

将 2 mL 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液与 7.7 mg ABTS⁺反应 16 h 后, 加水稀释 40 倍, 得到 ABTS⁺工作液。

将 10 μ L 样品与 190 μ L ABTS⁺工作液加入到 96 孔板中, 反应 15 min 后为样品组; 以 190 μ L 去离子水代替 ABTS⁺工作液为空白组; 以 190 μ L 去离子水代替样品为对照组。在 734 nm 波长处测定各组吸光度。根据式 (1) 计算 ABTS⁺自由基清除率 (%):

$$\text{ABTS}^+ \text{自由基清除率}/\% = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{空白}}] \times 100 \quad (1)$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{空白}}$ 分别为样品组、对照组和空白组的吸光度。

1.4.2 羟基自由基清除能力测试

向 96 孔板中依次加入 50 μ L 酶解前后多糖样品、50 μ L 水杨酸溶液 (9 mmol/L)、50 μ L FeSO₄ 溶液 (4 mmol/L)、50 μ L 过氧化氢 (10 mmol/L), 于 37 °C 下反应 30 min, 为样品组; 以去离子水代替样品为空白组; 以去离子水代替过氧化氢为对照组, 在 510 nm 波长处测定各组吸光度。根据式 (2) 计算羟基自由基清除率 (%):

$$\text{羟基自由基清除率}/\% = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{空白}}] \times 100 \quad (2)$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{空白}}$ 分别为样品组、对照组和空白组的吸光度。

1.4.3 超氧自由基清除能力测试

在 96 孔板中分别依次加入 50 μ L 酶解前后多糖样品、100 μ L Tris-HCl 缓冲液, 振摇后加入 50 μ L 邻苯三酚溶液 (2 mmol/L) 后为样品组; 以去离子水代替邻苯三酚溶液为对照组; 以去离子水代替样品为空白组, 立即在 325 nm 波长处测定各组吸光

度。根据式(3)计算超氧自由基清除率(%):

$$\text{超氧自由基清除率}/\% = \frac{1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{空白}}}{A_{\text{空白}}} \times 100 \quad (3)$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{空白}}$ 分别为样品组、对照组和空白组的吸光度。

1.4.4 铁离子还原力测试(FRAP)

即时将 25 mL NaAc-HAc 缓冲液(pH=3.6)、2.5 mL TPTZ 溶液、2.5 mL FeCl₃ 溶液混合制备 TPTZ 工作液。

依次将 10 μL 样品、190 μL TPTZ 工作液加入到 96 孔板中,多功能微孔板酶标仪振动 10 s,于 37 °C 下保温 10 min,在 593 nm 波长处测量吸光度,代入到硫酸亚铁标准曲线方程($y=0.0006x+0.0714$)中,计算得出相应 FRAP 值。

1.5 细胞内抗氧化活性测试

1.5.1 细胞培养

在细胞培养皿中,将 HaCaT 细胞置于完全培养基(含体积分数 10% 胎牛血清和体积分数 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基)中,将培养皿置于含体积分数 5% 的 CO₂、37 °C 的细胞培养箱中进行培养。待细胞生长至铺满培养皿面积的 80%~90% 时,进行下一次传代,约 2 d 传代 1 次。

1.5.2 细胞毒性测试

将 HaCaT 细胞按照 2×10^5 个/mL, 100 μL/孔接种于 96 孔板中,置于 37 °C 培养箱中培养 24 h 后分别将质量浓度 10、5、2、1、0.5 g/L 的 DNP-30 或 DNP-30E (DMEM 配制),以每孔 100 μL 加入到 96 孔板中,每个质量浓度平行 5 次。以 DMEM 代替样品为空白对照。于 37 °C 培养箱内孵育 24 h,按照 CCK-8 试剂盒说明书测定细胞存活率。

1.5.3 SDS 氧化应激模型的建立

1.5.3.1 对 HaCaT 细胞存活率的影响

将 HaCaT 细胞按照 2×10^5 个/mL, 100 μL/孔接种于 96 孔板中,37 °C 贴壁培养 24 h 后,每孔加入 100 μL 质量浓度 0、5、10、15、18、20、22、25、28、30 mg/L 的十二烷基硫酸钠(SDS)(DMEM 配制)刺激 HaCaT 保持 4 h。空白组用不加血清的 DMEM 代替 SDS。刺激完成后,用 CCK-8 试剂盒测定细胞存活率。

1.5.3.2 对 HaCaT 细胞活性氧(ROS)含量的影响

将 HaCaT 细胞按照 8×10^5 个/mL, 1 mL/孔接种至 6 孔板中,37 °C 贴壁培养 24 h 后,每孔加入 1 mL 质量浓度 0、5、10、20、30 mg/L 的 SDS (无血清培养基配制),37 °C 下刺激 4 h。空白组用不加血清的 DMEM 代替 SDS。刺激完成后,加入 1 mL DCFH-DA 探针,于 37 °C 下孵育 30 min,收集细胞,用流式细胞分析仪测定其荧光强度。

1.5.4 HaCaT 细胞内 ROS 含量、MDA 含量、SOD 活力检测

按照 1.5.3 节中建立的 SDS 氧化应激模型对 HaCaT 细胞进行培养,模型组和样品组每孔分别加入 1 mL SDS (质量浓度 10 mg/L,无血清培养基配制),空白组用 1 mL DMEM 代替 SDS,37 °C 下刺激 4 h。刺激结束后,样品组分别加入 1.5 mL DNP-30 (质量浓度 0.5 g/L)或 DNP-30E (质量浓度 0.5 g/L),空白组和模型组分别加入 1.5 mL DMEM,修复 24 h,分别按照试剂盒操作,检测 HaCaT 细胞内 ROS 含量、MDA 含量及 SOD 活力。ROS 相对含量、MDA 相对含量、SOD 相对活力均是指测得的模型组及样品组的 ROS 含量、MDA 含量、SOD 活力占空白对照(100%)的百分数。

1.6 单因素实验

以 DNPC 的 ABTS⁺ 自由基清除率为评价指标,根据糖苷酶最适酶解条件,并结合预实验结果,对金钗石斛多糖酶解工艺进行单因素实验考察。

固定加酶量 20 U/mL、酶解温度 45 °C、酶解 pH=7.0、酶解时间 12 h,考察酶的种类[α-半乳糖苷酶(α-Gal)、α-淀粉酶(α-Amy)、β-甘露聚糖酶(β-Man)、β-葡萄糖苷酶(β-Glu)、纤维素酶(Cell)]对酶解产物 ABTS⁺ 自由基清除率的影响。

固定 α-半乳糖苷酶、酶解温度 45 °C、酶解 pH=7.0、酶解时间 12 h,考察加酶量(10、15、20、25、30 U/mL)对酶解产物 ABTS⁺ 自由基清除率的影响。

固定 α-半乳糖苷酶加酶量 20 U/mL、酶解 pH=7.0、酶解时间 12 h,考察酶解温度(35、40、45、50、55、60 °C)对酶解产物 ABTS⁺ 自由基清除率的影响。

其次,固定酶解温度 45 °C、α-半乳糖苷酶加酶量 20 U/mL、酶解时间 12 h,考察酶解 pH(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)对酶解产物 ABTS⁺ 自由基清除率的影响。

最后,固定酶解 pH=7.0、α-半乳糖苷酶加酶量 20 U/mL、酶解温度 45 °C,考察酶解时间(2、4、6、8、10、12、14、16、18 h)对酶解产物 ABTS⁺ 自由基清除率的影响。

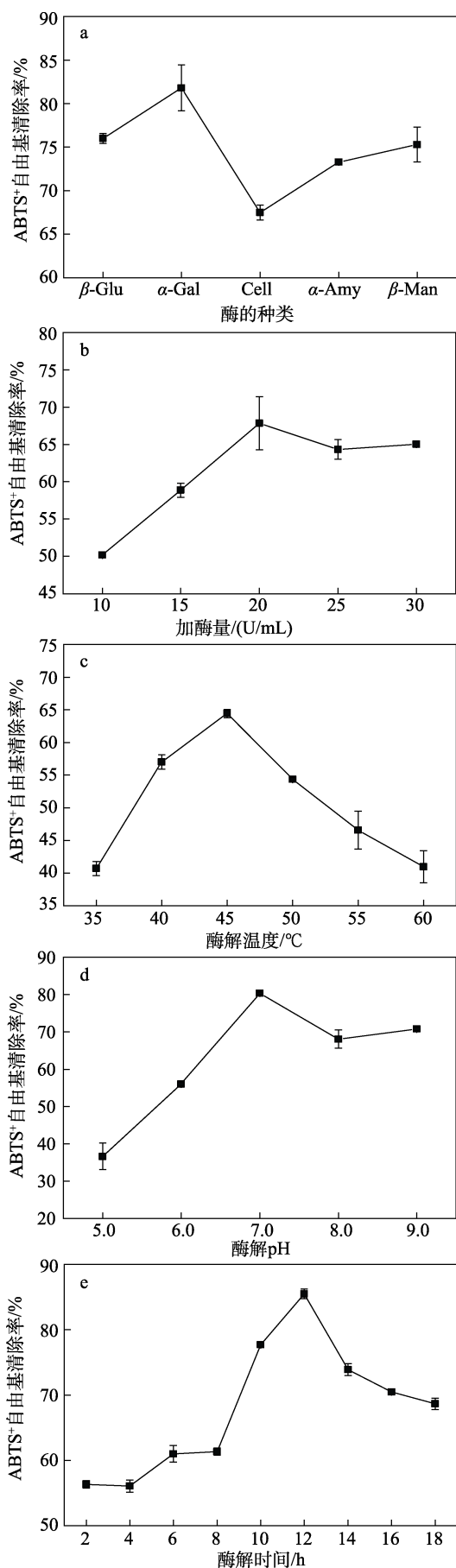
1.7 响应面优化实验

根据单因素实验结果,以加酶量(A)、酶解温度(B)、酶解 pH(C)和酶解时间(D)为响应面设计的自变量、酶解产物的 ABTS⁺ 自由基清除率为响应值(Y),根据响应面 Box-Behnken 设计原理,利用 Design Expert 13.0.6 软件进行四因素三水平的响应面分析实验。加酶量、酶解温度、酶解 pH 和酶解时间根据单因素研究结果中心点取值。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

图 1 为金钗石斛多糖酶解工艺单因素实验结果。



a—酶的种类; b—加酶量; c—酶解温度; d—酶解 pH; e—酶解时间

图1 单因素实验结果

Fig. 1 Results of single factor experiments

从图 1a 可以看出,在根据金钗石斛多糖可能存在的单糖类型选择出的 5 种糖苷酶中, α -半乳糖苷酶(α -Gal)显示出比其他酶更高的 ABTS⁺自由基清除率,为 81.80%±2.64%。因此,选定 α -半乳糖苷酶对金钗石斛多糖进行水解。

从图 1b 可以看出,随着 α -半乳糖苷酶加酶量的增加,DNPC 酶解产物的 ABTS⁺自由基清除率先上升后下降,最后趋于平稳的趋势,在加酶量 20 U/mL 时达到峰值,为 67.83%±3.57%,继续增大酶用量,ABTS⁺自由基清除率略有下降。这是因为,当酶加量增大到一定程度,酶与底物之间达到饱和,降低了两者的作用效果^[15]。因此,确定 α -半乳糖苷酶最佳加酶量为 20 U/mL。

从图 1c 可以看出,在 35~60 °C 范围内,DNPC 酶解产物的 ABTS⁺自由基清除率先上升后下降。在酶解温度 45 °C 后,达到最大(64.44%±0.63%)。45 °C 之前,温度的提高使酶解反应速率提高,当温度 >45 °C 后,酶活降低,从而酶解效率降低^[16-17]。因此,确定最佳酶解温度为 45 °C。

从图 1d 可以看出,在 pH=5.0~9.0 的范围内,DNPC 酶解产物的 ABTS⁺自由基清除率先上升后下降的趋势。当 pH 为 7.0 时,达到最大(80.32%±0.35%),说明 α -半乳糖苷酶水解金钗石斛多糖的最适 pH 为 7.0,反应体系的 pH 越接近 7.0,产物的 ABTS⁺自由基清除率越高。因此,确定最佳酶解 pH 为 7.0。

从图 1e 可以看出,当酶解时间 >8 h 后,随着反应时间的延长,酶解程度增大,酶解产物的相对分子质量减小,暴露出的还原性羟基越多;在 12 h 处达到最大(85.50%±1.20%);当酶解时间 >12 h 后,酶解产物的 ABTS⁺自由基清除率开始下降,说明随着反应时间的延长,多糖中具有抗氧化活性的结构可能被破坏。因此,确定最佳酶解时间为 12 h。

综上所述,得出的最佳的酶解条件为: α -半乳糖苷酶加酶量 20 U/mL、酶解温度 45 °C、酶解 pH=7.0、酶解时间 12 h。

2.2 响应面优化实验结果

2.2.1 响应面实验设计及结果

表 1 为 Box-Behnken 设计编码值与实际值对照。采用 Design Expert 13.0.6 软件对表 1 中的数据进行二项式拟合,并对模型进行方差分析,得到二项式拟合方程为: $Y = -1453.41 + 25.10A + 26.65B + 136.05C + 35.21D - 0.180AB + 0.150AC - 0.220AD + 0.02BC - 0.30BD + 0.72CD - 0.38A^2 - 0.21B^2 - 10.70C^2 - 0.96D^2$ ($P < 0.0001$, $R^2 = 0.9752$)。

表 1 Box-Behnken 设计编码值与实际值对照

Table 1 Comparison of coding values of Box-Behnken design with actual values

序号	编码值				实际值				Y/%
	A	B	C	D	加酶量/ (U/mL)	温度/ °C	pH	时间/h	
1	-1	-1	0	0	15	40	7	12	63.33
2	1	-1	0	0	25	40	7	12	75.44
3	-1	1	0	0	15	50	7	12	75.03
4	1	1	0	0	25	50	7	12	68.88
5	0	0	-1	-1	20	45	6	10	75.32
6	0	0	1	-1	20	45	8	10	71.34
7	0	0	-1	1	20	45	6	14	67.56
8	0	0	1	1	20	45	8	14	69.37
9	-1	0	0	-1	15	45	7	10	70.12
10	1	0	0	-1	25	45	7	10	75.11
11	-1	0	0	1	15	45	7	14	72.56
12	1	0	0	1	25	45	7	14	68.65
13	0	-1	-1	0	20	40	6	12	70.02
14	0	1	-1	0	20	50	6	12	71.33
15	0	-1	1	0	20	40	8	12	66.25
16	0	1	1	0	20	50	8	12	68.02
17	-1	0	-1	0	15	45	6	12	66.35
18	1	0	-1	0	25	45	6	12	65.28
19	-1	0	1	0	15	45	8	12	63.52
20	1	0	1	0	25	45	8	12	65.48
21	0	-1	0	-1	20	40	7	10	71.68
22	0	1	0	-1	20	50	7	10	84.69
23	0	-1	0	1	20	40	7	14	73.63
24	0	1	0	1	20	50	7	14	74.55
25	0	0	0	0	20	45	7	12	86.25
26	0	0	0	0	20	45	7	12	83.77
27	0	0	0	0	20	45	7	12	84.45
28	0	0	0	0	20	45	7	12	85.17
29	0	0	0	0	20	45	7	12	86.52

表 2 为方差分析结果。

从表 2 可以看出, 该模型的 $P < 0.0001$, 说明该拟合方程具有较好的回归效果和极强的显著性。 B 、 D 、 AB 和 BD 对结果的影响程度均达到极显著水平 ($P < 0.01$), C 、 AD 对结果的影响程度也达到了显著性水平 ($0.01 < P < 0.05$), 各因素对 $ABTS^+$ 自由基清除率的影响顺序为 $B > D > C > A$ 。回归方程的回归系数 (R^2) 为 0.9752, 校正系数 (R_{adj}^2) 为 0.9505, 预测系数 (R_{pre}^2) 为 0.8734, 变异系数 (C.V.%) 为 2.18%, $< 10\%$, 说明该模型回归方程有较高的可信度, 能够较好地反映真实值。

综上所述, 响应面二次回归方程的拟合度较好, 该模型可用于 $ABTS^+$ 自由基清除率的预测和分析。

表 2 方差分析结果

Table 2 Results of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1394.70	14	99.62	39.38	<0.0001	**
A	5.24	1	5.24	2.07	0.1720	○
B	40.89	1	40.89	16.16	0.0013	**
C	11.76	1	11.76	4.65	0.0489	*
D	40.11	1	40.11	15.86	0.0014	**
AB	83.36	1	83.36	32.95	<0.0001	**
AC	2.30	1	2.30	0.91	0.3570	○
AD	19.80	1	19.80	7.83	0.0142	*
BC	0.05	1	0.05	0.02	0.8871	○
BD	36.54	1	36.54	14.45	0.0019	**
CD	8.38	1	8.38	3.31	0.0902	○
A ²	580.51	1	580.51	229.49	<0.0001	**
B ²	183.77	1	183.77	72.65	<0.0001	**
C ²	742.49	1	742.49	293.52	<0.0001	**
D ²	96.47	1	96.47	38.14	<0.0001	**
残差	35.41	14	2.53			
失拟项	29.97	10	3.00	2.20	0.2326	
纯误差	5.45	4	1.36			
总变异	1430.11	28				
					$R_{adj}^2=0.9505$	
					$R_{pre}^2=0.8734$	
					信号与噪声比=19.7292	
					C.V.%=2.18%	

注: **表示差异极显著 ($P < 0.01$); *表示差异显著 ($0.01 < P < 0.05$); ○表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2.2 响应面分析

图 2 为采用 Design Expert 13.0.6 软件绘制 $ABTS^+$ 自由基清除率、加酶量、酶解温度、酶解 pH 和酶解时间之间的三维曲面图。

从图 2 可以看出, 交互项 AB 和 BD 对实验结果 $ABTS^+$ 自由基清除率影响达到极显著水平 ($P < 0.01$), 交互作用极显著 (图 2a、e); 交互项 AD (图 2c) 对结果影响程度为显著性水平 ($0.01 < P < 0.05$), 其他交互项影响程度稍小一些。交互项对样品 $ABTS^+$ 自由基清除率的影响顺序为 $AB > BD > AD > CD > AC > BC$ 。

2.2.3 响应面优化与验证实验

由响应面图可得到优化条件为: 加酶量 20.045 U/mL、酶解温度 46.350 °C、pH=6.931、酶解时间 11.283 h, $ABTS^+$ 自由基清除率为 85.847%。考虑实验条件、可操作性及合理性, 各因素设置为加酶量 20 U/mL、酶解温度 46 °C、pH=7.0、时间 11 h, 进行 3 次重复实验验证, $ABTS^+$ 自由基清除率平均值 85.62%, 相对标准偏差 (RSD) 为 2.76%。与响应预测值 (85.847%) 基本一致, 表明该模型的准确性和可靠性, 得到的最佳参数可以进行实际应用。

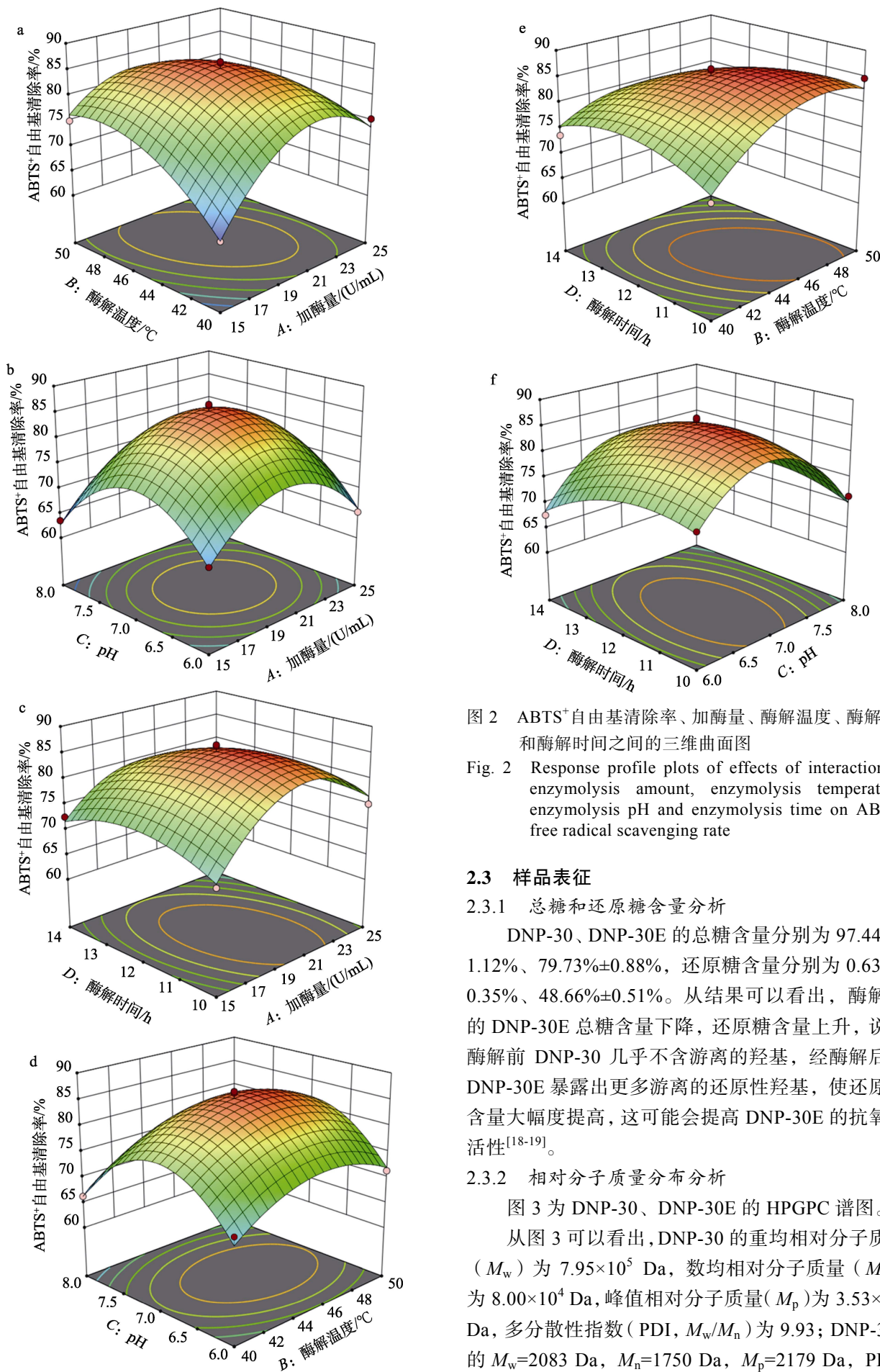


图 2 ABTS⁺ 自由基清除率、加酶量、酶解温度、酶解 pH 和酶解时间之间的三维曲面图

Fig. 2 Response profile plots of effects of interaction of enzymolysis amount, enzymolysis temperature, enzymolysis pH and enzymolysis time on ABTS⁺ free radical scavenging rate

2.3 样品表征

2.3.1 总糖和还原糖含量分析

DNP-30、DNP-30E 的总糖含量分别为 97.44%±1.12%、79.73%±0.88%，还原糖含量分别为 0.63%±0.35%、48.66%±0.51%。从结果可以看出，酶解后的 DNP-30E 总糖含量下降，还原糖含量上升，说明酶解前 DNP-30 几乎不含游离的羟基，经酶解后，DNP-30E 暴露出更多游离的还原性羟基，使还原糖含量大幅度提高，这可能会提高 DNP-30E 的抗氧化活性^[18-19]。

2.3.2 相对分子质量分布分析

图 3 为 DNP-30、DNP-30E 的 HPGPC 谱图。

从图 3 可以看出，DNP-30 的重均相对分子质量 (M_w) 为 7.95×10^5 Da，数均相对分子质量 (M_n) 为 8.00×10^4 Da，峰值相对分子质量 (M_p) 为 3.53×10^5 Da，多分散性指数 (PDI, M_w/M_n) 为 9.93；DNP-30E 的 $M_w=2083$ Da, $M_n=1750$ Da, $M_p=2179$ Da, PDI=

1.19。与 DNP-30 相比, 酶解后的 DNP-30E 相对分子质量明显降低, 且分布集中, 表明酶解后多糖的均一性提高。

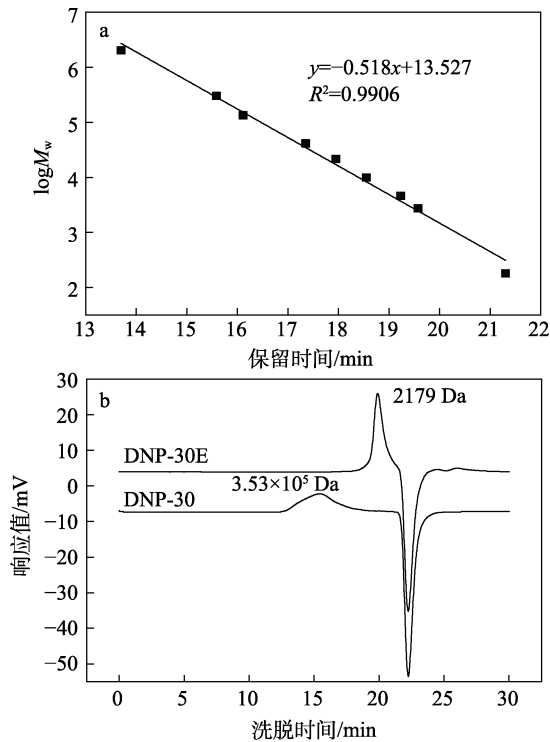
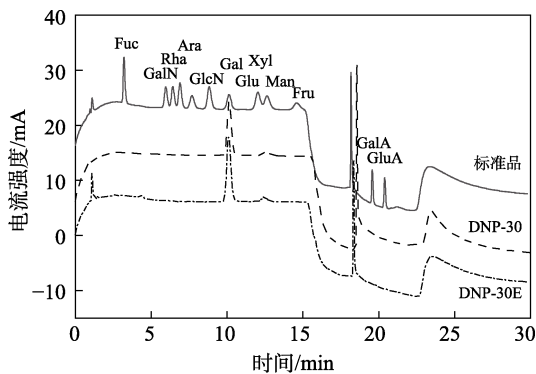


图 3 多糖重均相对分子质量与保留时间的线性关系 (a); DNP-30 和 DNP-30E 的 HPGPC 谱图 (b)

Fig. 3 Linear relationship between relative Mass average molar mass of polysaccharide and retention time (a); HPGPC spectra of DNP-30 and DNP-30E (b)

2.3.3 单糖组成分析

图 4 为 DNP-30、DNP-30E 的单糖组成高效阴离子交换色谱 (HPAEC) 谱图。



Fuc—岩藻糖; GalN—氨基半乳糖; Rha—鼠李糖; Ara—阿拉伯糖; GlcN—氨基葡萄糖; Gal—半乳糖; Glu—葡萄糖; Xyl—木糖; Man—甘露糖; Fru—果糖; GalA—半乳糖醛酸; GluA—葡萄糖醛酸

图 4 DNP-30、DNP-30E 的单糖组成 HPAEC 谱图

Fig. 4 HPAEC spectra of monosaccharide composition of DNP-30 and DNP-30E

从图 4 可以看出, DNP-30 由葡萄糖、甘露糖组成, 其物质的量比为 91.02 : 8.98; DNP-30E 也由葡

萄糖、甘露糖组成, 其物质的量比为 91.11 : 8.89, 说明酶解并不会改变单糖组成。结合 DNP-30E 的 $M_w=2083$ Da, 可以推断, DNP-30E 是一种由葡萄糖、甘露糖组成的十一糖, 其中, 葡萄糖与甘露糖的物质的量比约为 10 : 1。

2.3.4 FTIR 分析

图 5 为 DNP-30 和 DNP-30E 的 FTIR 谱图。

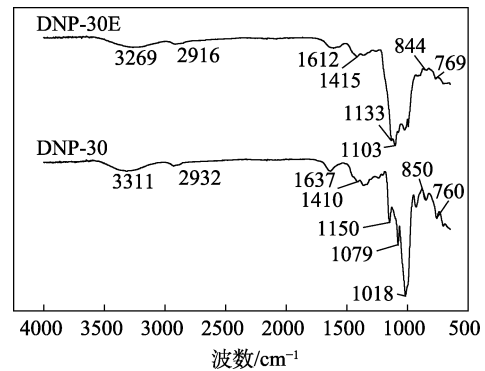


图 5 DNP-30、DNP-30E 的 FTIR 谱图

Fig. 5 FTIR spectra of DNP-30 and DNP-30E

从图 5 可以看出, 3311、3269 cm^{-1} 处分别为 DNP-30 和 DNP-30E 的羟基伸缩振动吸收峰, 2932、2916 cm^{-1} 处分别为 C—H 的伸缩和弯曲振动, 这两个出峰位置是糖的特征峰; 1637、1612 cm^{-1} 归属于羟基的弯曲振动吸收峰; 1410、1415 cm^{-1} 处为 C—H 的变形振动吸收峰; 850 cm^{-1} 代表 α -吡喃糖^[20]。DNP-30 和 DNP-30E 的 FTIR 谱图变化主要集中在 1200~1000 cm^{-1} 区域内, 此部分为吡喃糖的特征吸收峰^[13]。1150、1079 和 1018 cm^{-1} 处这 3 个特征吸收峰表明 DNP-30 是由吡喃糖连接而成。其中, 1079 cm^{-1} 处为葡聚糖主链的特征峰, 酶解后 DNP-30E 这个特征吸收峰消失, 可能是发生了位移或重叠, 证明有糖苷键 C—O 键断裂, 引起了多糖相对分子质量的减小、还原糖含量的升高等。

2.3.5 ¹HNMR 分析

图 6 为 DNP-30 和 DNP-30E 的 ¹HNMR 谱图。

从图 6 可以看出, δ 4.50~5.50 的最低场信号归属于甘露糖和葡萄糖的异头氢。酶解前, DNP-30 在 δ 5.32 处有一个异头氢信号峰, 偶合常数 (J) 为 3.9 Hz, 因此, 此处对应 α -葡萄糖的端基氢, 说明 DNP-30 存在 α -葡萄糖结构单元; 酶解后, DNP-30E 在 δ 5.16、5.15 处出现了异头氢信号峰, 与酶解前的 α -葡萄糖结构单元信号相对应。此外, DNP-30E 在 δ 4.57、4.56 处也出现了异头氢信号峰, 裂分为两个峰, $J=8.0$ Hz, 为 β -吡喃糖的特征信号, 说明在 α -半乳糖苷酶的催化下, DNP-30 中的葡萄糖和甘露糖之间的糖苷键发生了水解, 葡萄糖(1 α →6)-甘露糖 [Glu(1 α →6)-Man] 键发生断裂, 同时引起葡萄糖端基氢构型翻转, 生成了 β -型糖残基。

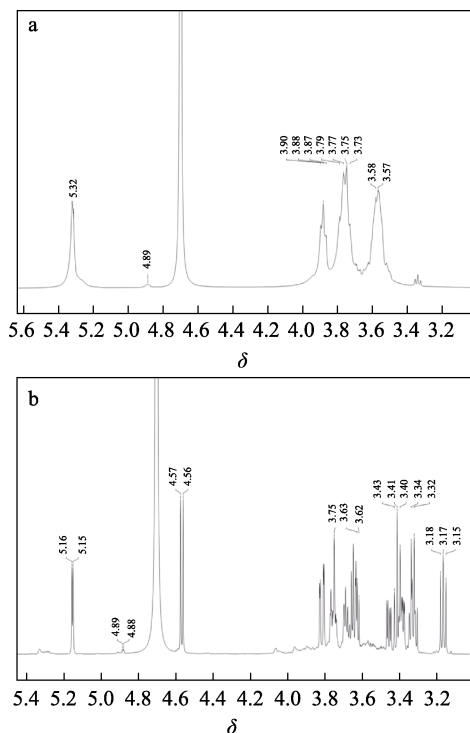


图 6 DNP-30 (a) 和 DNP-30E (b) 的 ¹H NMR 谱图
Fig. 6 ¹H NMR spectra of DNP-30 (a) and DNP-30E (b)

结合 α-半乳糖苷酶的作用特点, 推测 DNP-30E 的结构可能为 Man(1α/1β→6)-Glu(1α→6)-Glu(1α→6)-Glu(1α→6)-Glu(1α→6)-Glu(1α→6)-Glu(1α→6)-Glu(1α→6)-Glu(1α→6)-Glu(1β), DNP-30 是以 DNP-30E 为重复单元的具有一定立体结构的大分子多糖^[21]。δ 3.10~4.00 内的氢信号峰彼此重叠, 为葡萄糖或甘露糖的 H-2 至 H-6^[22]。

2.3.6 刚果红实验分析

图 7 为 DNP-30 和 DNP-30E 的刚果红染色结果。

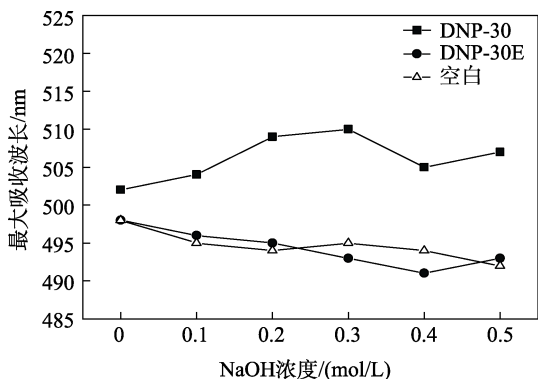


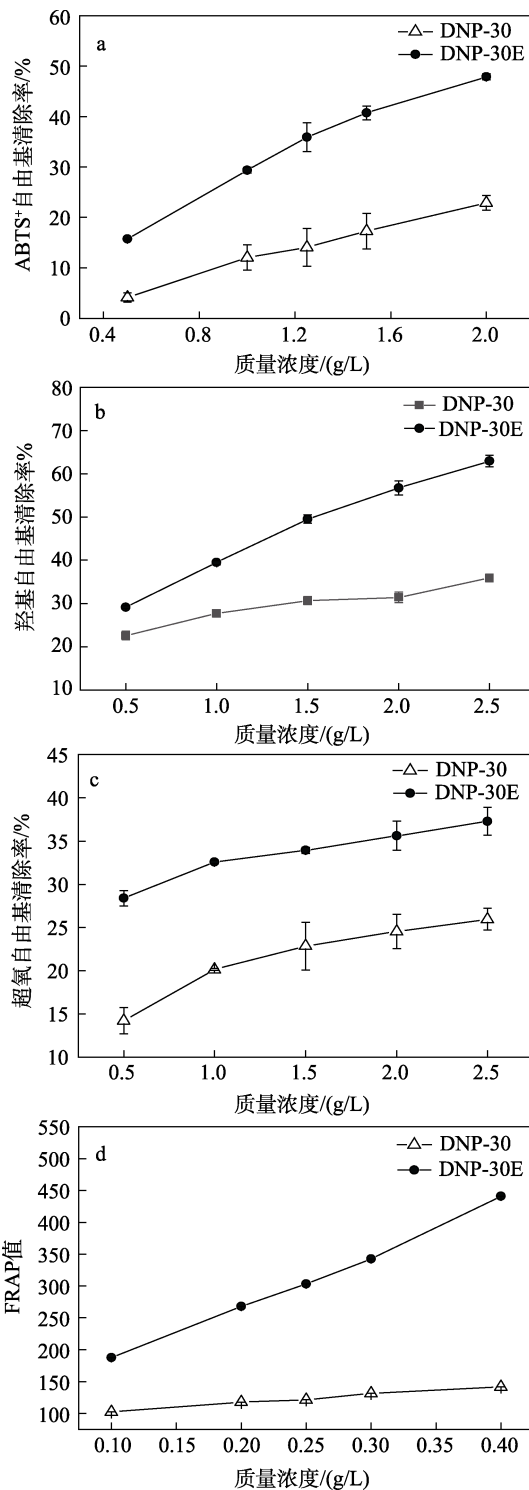
图 7 刚果红三股螺旋染色图
Fig. 7 Congo Red triple spiral stain

从图 7 可以看出, DNP-30 刚果红溶液在 NaOH 浓度 0~0.3 mol/L 内, 随着 NaOH 浓度的增大, 最大吸收波长红移, 说明 DNP-30 存在三股螺旋结构; NaOH 浓度增至 0.3 mol/L 后, 最大吸收波长蓝移, 说明 DNP-30 三股螺旋结构解体。DNP-30E 在 NaOH

浓度为 0~0.5 mol/L 的范围内, 与空白对照刚果红溶液呈现出相同的趋势, 说明酶解后三股螺旋结构可能解体, DNP-30E 可能不存在稳定的三股螺旋结构^[23]。

2.4 体外抗氧化活性分析

图 8 为 DNP-30 和 DNP-30E 的自由基清除能力和 FRAP 值测试结果。



a—ABTS⁺自由基清除率; b—羟基自由基清除率; c—超氧自由基清除率; d—FRAP 值

图 8 DNP-30 和 DNP-30E 的体外抗氧化活性
Fig. 8 Antioxidant activity of DNP-30 and DNP-30E *in vitro*

从图 8a 可以看出, DNP-30 和 DNP-30E 对 ABTS⁺ 自由基清除率随着质量浓度的升高而上升。相比 DNP-30 的半数清除质量浓度 (IC₅₀) (4.16±0.46) g/L, DNP-30E 的 IC₅₀ 降低至 (1.99±0.06) g/L。当多糖质量浓度为 2.0 g/L 时, ABTS⁺ 自由基清除率从 DNP-30 的 22.92%±1.46% 升至 DNP-30E 的 47.87%±0.62%, 说明酶解能显著提高 DNP-30 多糖的抗氧化活性。

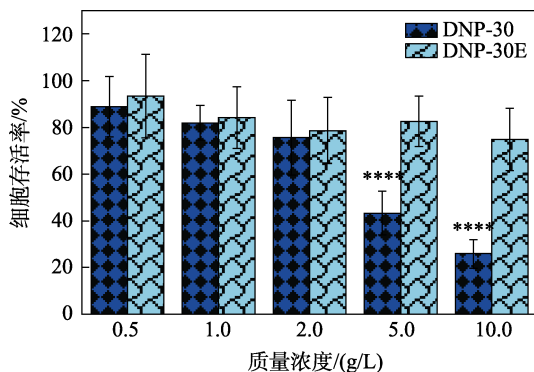
在活性氧物种中, 羟基自由基是最具活性的, 并可能对相邻的生物分子造成严重损伤。过氧化氢和超氧化物分子可通过 Fenton 反应和/或铁催化的 Haber-Weiss 反应产生羟基自由基, 间接导致生物分子的氧化损伤。从图 8b 可以看出, DNP-30 的羟基自由基清除率的 IC₅₀ 为 (4.84±0.16) g/L, DNP-30E 的 IC₅₀ 降为 (1.64±0.02) g/L。多糖质量浓度为 2.0 g/L 时, 羟基自由基清除率从 DNP-30 的 31.46%±1.22% 升至 DNP-30E 的 56.75%±1.63%。

过量的超氧自由基对细胞的 DNA 具有损伤作用, 也容易导致脂质过氧化, 对机体具有致病作用^[24]。从图 8c 可以看出, 多糖质量浓度为 2.0 g/L 的 DNP-30、DNP-30E 的超氧自由基清除率分别为 24.52%±1.97%、35.61%±1.69%。在质量浓度为 0.5~2.5 g/L 时, DNP-30E 的超氧自由基清除率比同质量浓度下的 DNP-30 的超氧自由基清除率高 15% 左右, 说明酶解后的 DNP-30E 抗氧化活性提高显著。

从图 8d 可以看出, 当质量浓度在 0.10~0.40 g/L 时, DNP-30、DNP-30E 的 FRAP 值随质量浓度的增大而增大。当多糖质量浓度为 0.40 g/L 时, DNP-30 的 FRAP 值为 141.67±2.15, 几乎无还原力; 而 DNP-30E 的 FRAP 值提升至 441.06±2.37, 说明酶解可提高金钗石斛多糖的还原力。

2.5 细胞毒性分析

图 9 为采用 CCK-8 法检测的 DNP-30、DNP-30E 对 HaCaT 细胞的细胞毒性结果。



****代表同种样品不同浓度之间存在极显著差异 ($P < 0.001$), 下同

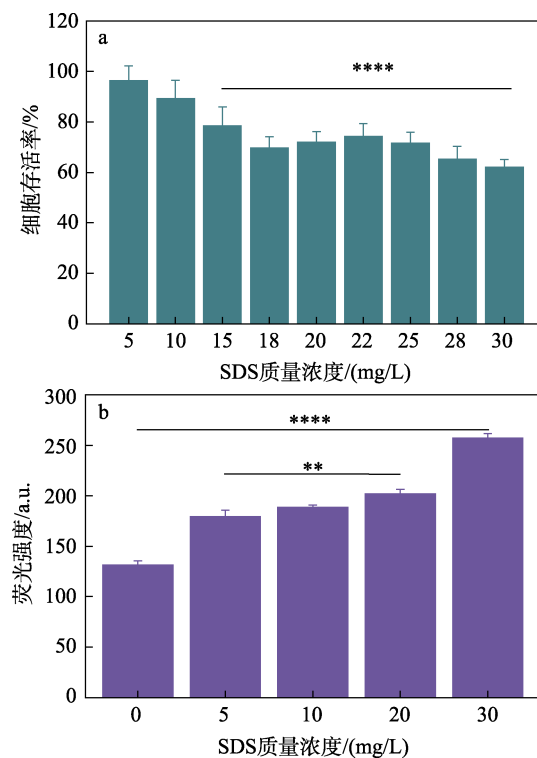
图 9 DNP-30 和 DNP-30E 对 HaCaT 细胞的细胞毒性
Fig. 9 Cytotoxicity of DNP-30 and DNP-30E to HaCaT cells

从图 9 可以看出, 当多糖质量浓度为 0.5~2.0 g/L

时, DNP-30 和 DNP-30E 对 HaCaT 细胞均无明显细胞毒性, DNP-30E 处理后的细胞存活率比 DNP-30 略高。当多糖质量浓度增至 5.0 g/L 时, DNP-30 处理后的 HaCaT 细胞存活率急剧降低, 为 43.28%, 表现出对 HaCaT 细胞存活的明显抑制作用; 而经 DNP-30E 处理后的 HaCaT 细胞, 在多糖质量浓度为 5.0~10.0 g/L 时, 细胞存活率仍维持在 80% 左右, 说明 DNP-30E 在高质量浓度范围内, 仍比 DNP-30 具有更低的细胞毒性, 说明酶解有效降低了金钗石斛多糖的细胞毒性。为了保证后续实验不受细胞毒性的影响, 选择 0.5 g/L 作为给药质量浓度。

2.6 SDS 氧化应激模型建立

SDS 是常用的表面活性剂, 在皮肤表面经常致含水量降低、干燥脱屑等现象。通过测定质量浓度 0~30 mg/L 的 SDS 对细胞存活率及细胞内 ROS 含量的影响, 确定 SDS 最佳实验质量浓度, 建立氧化应激模型。图 10 为氧化应激模型中 SDS 最佳实验质量浓度考察结果。



**代表与 SDS 质量浓度为 0 的模型组相比, 差异极显著 ($P < 0.01$)
图 10 SDS 质量浓度对细胞存活率 (a) 及刺激 HaCaT 细胞产生的 ROS 荧光强度 (b) 的影响

Fig. 10 Effects of mass concentration of SDS on cell survival rate (a) and fluorescence intensity of ROS produced by HaCaT cells stimulated (b)

从图 10a 可以看出, 当 SDS 质量浓度在 5~10 mg/L 时, 刺激 4 h 后细胞存活率在 80% 以上, 当 SDS 质量浓度在 5~15 mg/L 时, 随着 SDS 质量浓度的升高,

细胞的存活率显著下降; 当 15 mg/L < SDS 质量浓度 < 30 mg/L 时, SDS 对细胞存活率没有显著变化。从图 10b 可以看出, 荧光强度越高, 表示 ROS 含量越高, 当 SDS 质量浓度在 5~20 mg/L 时, 产生的 ROS 含量与刺激前相比差异性显著。

为了后续研究免受细胞毒性相关因素的影响, 既要保证 SDS 能刺激 HaCaT 细胞产生 ROS, 又要保持细胞存活率在 80% 以上, 便于分析金钗石斛多糖对 HaCaT 细胞的修复能力, 后续实验选用 SDS 质量浓度 10 mg/L 为最终诱导损伤条件。

2.7 ROS、MDA、SOD 水平检测分析

ROS 在细胞内通过氧化作用来传递信号, 反映着细胞内的氧化还原水平。MDA 是脂质过氧化的附带生成物, 通过监测 MDA 水平, 可以反映出肝细胞脂质过氧化损害的程度^[25], 人体通过关键的抗氧化酶 (如 SOD^[26]) 来对抗自由基引发的氧化应激。图 11 为 DNP-30 和 DNP-30E 对 SDS 刺激后的 HaCaT 细胞内的 ROS 相对含量、MDA 相对含量、SOD 相对活力测定结果。

从图 11 可以看出, 经 SDS 刺激后, HaCaT 细胞内 ROS 相对含量 (图 11a) 及 MDA 相对含量 (图 11b) 明显升高, SOD 相对活力 (图 11c) 显著下降 ($P \leq 0.001$), 说明 HaCaT 细胞在此状态下处于氧化应激反应状态, 经 DNP-30、DNP-30E 处理后, HaCaT 细胞内 ROS 相对含量及 MDA 相对含量有所下降, SOD 相对活力有所提升, 说明 DNP-30、DNP-30E 在 HaCaT 细胞内均呈现出一定的抗氧化活性。

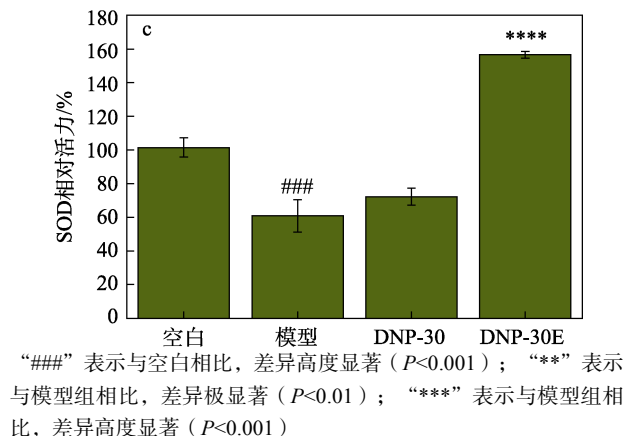
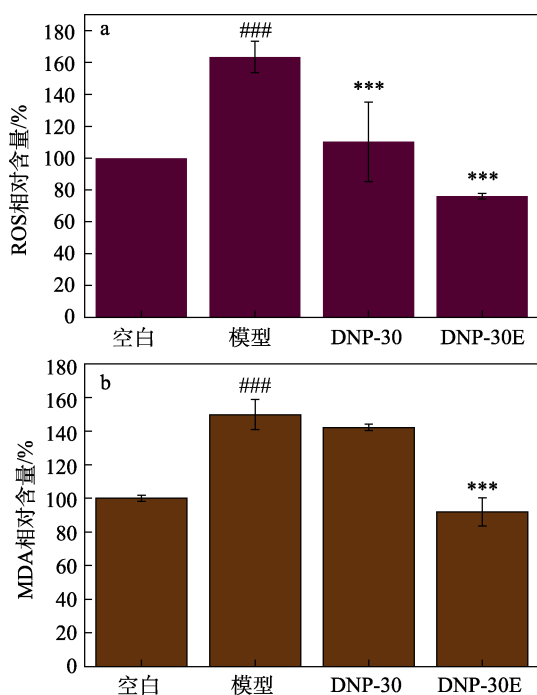


图 11 DNP-30 和 DNP-30E 对 HaCaT 细胞内 ROS 相对含量 (a)、MDA 相对含量 (b)、SOD 相对活力 (c) 的影响

Fig. 11 Effects of DNP-30 and DNP-30E on ROS relative content (a), MDA relative content (b) and SOD relative activity (c) in HaCaT cells

与模型组相比, 质量浓度为 0.5 g/L DNP-30 和 DNP-30E 组的 ROS 相对含量分别降低了 53.09%、87.30% (图 11a), DNP-30E 组比 DNP-30 组的 ROS 相对含量降低了 34.21%; MDA 相对含量分别降低了 7.67%、57.87% (图 11b), DNP-30E 组的 MDA 相对含量比 DNP-30 组降低了 50.20%; SOD 相对活力分别提升了 11.43%、95.60% (图 11c), DNP-30E 组的 SOD 相对酶活力比 DNP-30 组提升了 84.17%。结果表明, DNP-30E 在 ROS 清除、MDA 抑制及 SOD 活力方面均体现出优于 DNP-30 的抗氧化能力。这可能是因为, 酶解后的金钗石斛多糖具有更低的相对分子量, 在细胞间渗透及扩散能力更强, 更有助于缓解氧化应激造成的细胞损伤。

3 结论

对金钗石斛多糖进行了提取分离, 制备了 DNPC, 采用分步醇沉法制得了得到乙醇质量分数为 30% 醇沉组分 DNP-30, 按最佳酶解条件制得酶解后的多糖 DNP-30E。对 DNP-30 和 DNP-30E 的化学成分、相对分子量分布及一级结构进行了分析, 并对其进行了体外抗氧化活性评价。

(1) 通过单因素和响应面实验分析, 得出最佳酶解条件为: α -半乳糖苷酶加酶量 20 U/mL、酶解温度 46 °C、酶解 pH=7.0、酶解时间 11 h。在此条件下, DNP-30E 对 ABTS⁺ 自由基清除率的平均值 85.62%。

(2) 酶解反应后, DNP-30E 中还原糖含量大幅度提高至 48.66%±0.51%, $M_w=2083$ Da, PDI=1.19。

(3) DNP-30E 可能的结构为 Man(1 α /1 β -6)-

Glu(1 α →6)-Glu(1 α →6)-Glu(1 α →6)-Glu(1 α →6)-Glu(1 α →6)-Glu(1 α →6)-Glu(1 α →6)-Glu(1 α →6)-Glu(1 α →6)-Glu(1 α →6)-Glu(1 β)。

(4) DNP-30E 对自由基具有更强的清除能力, 在细胞内具有更强的 ROS 及 MDA 抑制能力, 对 SOD 活力有更强的提升能力。

本文为金钗石斛多糖的构效关系研究提供了一定的理论依据, 为解决天然植物多糖作为中药原料在实际应用中存在的黏度大、溶解度差等问题提供了解决思路。

参考文献:

- [1] LI Z R, XIANG J, HU D Y, *et al.* Naturally potential antiviral agent polysaccharide from *Dendrobium nobile* Lindl.[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2020, 167: 104598.
- [2] LINGHU C (令狐楚), GU R H (谷荣辉), QIN L K (秦礼康). Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Dendrobium nobile*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 2021, 52(24): 7693-7708.
- [3] AN F J (安凤娟), HE Y X (何宇新). Research advance of polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl.[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences (安徽农业科学), 2014, 42(13): 3857-3862.
- [4] YU W, REN Z, ZHANG X, *et al.* Structural characterization of polysaccharides from *Dendrobium officinale* and their effects on apoptosis of HeLa cell line[J]. Molecules, 2018, 23(10): 2484.
- [5] LONG Y L, WANG W J, ZHANG Y Y, *et al.* Photoprotective effects of *Dendrobium nobile* Lindl. polysaccharides against UVB-induced oxidative stress and apoptosis in HaCaT cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24: 6120.
- [6] ZHANG Y, WANG H X, WANG P. Optimization of PEG-based extraction of polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl. and bioactivity study[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 92: 1057-1066.
- [7] ZHANG X C (张心驰), HUI H P (惠和平), GUO D F (郭栋费), *et al.* Analysis on structure and hypoglycemic activity of Lanzhou lily polysaccharides from gradient alcoholic precipitation[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2023, 40(10): 2231-2240.
- [8] XING S P, ZHANG X F, KE H N, *et al.* Physicochemical properties of polysaccharides from *Dendrobium officinale* by fractional precipitation and their preliminary antioxidant and anti-HepG2 cells activities *in vitro*[J]. Chemistry Central Journal, 2018, 12: 100.
- [9] XU J, XU L L, ZHOU Q W, *et al.* Enhanced *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* by enzymatic degradation[J]. Journal of Food Biochemistry, 2016, 40: 275-283.
- [10] PRITI K, ERANNA R, QIAO J Y, *et al.* Biotechnological potential of microbial α -galactosidases[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2014, 34(4): 307-317.
- [11] ANISHA G S. Biopharmaceutical applications of α -galactosidases[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2023, 70(1): 257-267.
- [12] WANG H, LUO H Y, LI J, *et al.* An α -galactosidase from an acidophilic *Bispora* sp. MEY-1 strain acts synergistically with β -mannanase[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(21): 8376-8382.
- [13] XING L, MIAO Y L, LI N. Molecular structure features and lactic acid fermentation behaviors of water- and alkali-soluble polysaccharides from *Dendrobium officinale*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 58(2): 532-540.
- [14] ZHANG X (张珣), WANG J (王婧), DING H (丁华), *et al.* Study on the DNS method for measuring the content of doped sucrose in tea[J]. Hubei Agricultural Sciences (湖北农业科学), 2021, 60(21): 107-111.
- [15] HUI H P (惠和平), WANG P (王萍), ZHANG X C (张心驰), *et al.* Study on the enzymatic hydrolysis of Lanzhou lily polysaccharide and its antioxidant activity *in vitro*[J]. Farm Products Processing (农产品加工), 2022, 24: 23-28.
- [16] MITTAL R, RAGHAVARAO K S. Extraction of R-Phycocerythrin from marine macro-algae, *Gelidium pusillum*, employing consortia of enzymes[J]. Algal Research, 2018, 34: 1-11.
- [17] SHAO P, CHEN X, SUN P. Improvement of antioxidant and moisture-preserving activities of *Sargassum horneri* polysaccharide enzymatic hydrolyzates[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 74: 420-427.
- [18] WANG Z R (王智荣), LIN Z Y (林宗毅), CUI C (崔春). Evaluation and optimization of acid extraction of polysaccharide from *Laminaria japonica* and optimization of extraction technology[J]. China Food Additives (中国食品添加剂), 2016, 2: 126-131.
- [19] LI H X, DONG Z, LIU X J, *et al.* Structure characterization of two novel polysaccharides from *Colocasia esculenta* (taro) and a comparative study of their immunomodulatory activities[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 42: 47-57.
- [20] HUA Y F, ZHANG M, FU C X, *et al.* Structural characterization of a 2-O-acetylglucosaminan from *Dendrobium officinale* stem[J]. Carbohydrate Research, 2004, 339(13): 2219-2224.
- [21] CHEN N D, CHEN N F, LI J, *et al.* Similarity evaluation of different origins and species of *Dendrobiums* by GC-MS and FTIR analysis of polysaccharides[J]. International Journal of Analytical Chemistry, 2015, 2015: 713410.
- [22] YANG L C, HSIEH C C, WEN C L, *et al.* Structural characterization of an immunostimulating polysaccharide from the stems of a new medicinal *Dendrobium* species: *Dendrobium Taiseed Tosnobile*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 103: 1185-1193.
- [23] GUO X Y, KANG J, XU Z Y, *et al.* Triple-helix polysaccharides: Formation mechanisms and analytical methods[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 262: 117962.
- [24] ALMALKI W H, GHONEIM M M, ALSHEHRI S, *et al.* Sepsis triggered oxidative stress-inflammatory axis: The pathobiology of reprogramming in the normal sleep-wake cycle[J]. Molecular Cellular Biochemistry, 2022, 477: 2203-2211.
- [25] WANG Y, GONG X Y, HUANG D Y, *et al.* Increasing oxytetracycline and enrofloxacin concentrations on the algal growth and sewage purification performance of an algal-bacterial consortia system[J]. Chemosphere, 2022, 286: 131917.
- [26] MANISH K T, NIHAR R J, PHOOL C M. Mechanisms of scavenging superoxide, hydroxyl, nitrogen dioxide and methoxy radicals by allicin: Catalytic role of superoxide dismutase in scavenging superoxide radical[J]. Journal of Chemical Sciences, 2018, 130(8): 105.