

Box-Behnken 响应面设计法优化微波辅助提取猪苓多糖工艺

乔艳明¹, 陈文强^{*1,2}, 邓百万^{1,2}, 彭浩^{1,2}, 解修超^{1,2}, 张辉³, 潘嘉伟³

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西 汉中 723000; 3. 陕西省南郑中学, 陕西 南郑 723100)

摘要: 为了优化猪苓多糖的微波提取工艺, 采用 Box-Behnken 响应面设计法, 研究液料比、pH、微波功率、提取时间、提取次数及其交互作用对多糖提取率的影响。应用 Design Expert 和响应面分析相结合的方法, 模拟得到回归方程的预测模型和可信度, 分析得到最佳提取工艺条件为: 液料比 30:1 (mL/g), pH 6.6, 微波功率 614 W, 提取时间 2.5 min, 提取次数 2 次。在此条件下, 多糖提取率达到 6.75%。利用 Box-Behnken 响应面设计法优化得到的猪苓多糖提取条件参数, 为猪苓多糖工业化生产提供技术支持。

关键词: 猪苓; 微波辅助提取; 多糖; Box-Behnken 设计; 响应面分析

中图分类号: Q 949.329.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)09—0986—09

Microwave-Assisted Extraction of Polysaccharides from *Polyporus umbellatus* Optimized by Box-Behnken Design-Response Surface Methodology

QIAO Yanming¹, CHEN Wenqiang^{1,2}, DENG Baiwan^{1,2}, PENG Hao^{1,2},
XIE Xiuchao^{1,2}, ZHANG Hui³, PAN Jiawei³

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China; 2. Shaanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fungi, Hanzhong 723000, China; 3. Nanzheng Middle School of Shaanxi, Nanzheng 723100, China)

Abstract: To optimize the microwave-assisted extraction technique of polysaccharide from *Polyporus umbellatus*, the effects of the liquid to solid ratio, pH, microwave power, extraction time, extraction number and their interaction on extraction were studied by Box-Behnken design. The predictive model and reliability were developed by Design Expert software and response surface analysis (RSM). The optimal extraction conditions were achieved and listed as follows: liquid-to-solid ratio 30 :1 mL/g, pH 6.6, microwave power 614 W, extraction time 2.5 mins, extraction number 3 times. Under these conditions, the extraction yield of polysaccharide was up to 6.75%. The extraction conditions achieved by RSM provided technical support for the industrial

收稿日期: 2014-10-07

基金项目: 陕西省“春算计划”研究项目(2014-2015)。

* 通信作者: 陈文强(1956—), 男, 陕西洋县人, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物资源的保护与利用研究。

E-mail: wenqiangc@126.com

production of polysaccharide from *Polyporus umbellatus*.

Keywords: *Polyporus umbellatus*, microwave-assisted extraction, polysaccharides, Box-Behnken design, response surface analysis

猪苓(*Polyporus umbellatus*), 俗称猪屎苓、野猪粪等。属真菌门、担子菌纲、多孔菌目、多孔菌科、猪苓(地花)属。猪苓主要分布于河北、陕西、四川等地^[1], 其菌核含麦角甾醇、粗蛋白质、可溶性糖分、多糖及 X-羟基二十四碳酸等成分^[2-3]。现代药理学研究表明, 猪苓提取物中多糖成分具有抗氧化^[4]、增强免疫功能^[5]和保护肝脏^[6]等作用, 临床应用也取得了较好疗效。

近年来, 真菌多糖的提取技术已由传统的溶剂提取法逐渐转向运用超声波^[7-8]和微波辅助提取^[9-10]新技术。与传统方法相比, 微波辅助提取真菌多糖具有速度快、选择性高、提取率高、溶剂消耗少、操作简便等特点^[11-13], 同时可以防止提取物在长时间、高温条件下发生降解和褪色。响应面法(Response Surface Methodology, RSM) 是可通过回归方程的分析来寻求最优工艺参数, 解决多变量问题, 具有周期短、精度高、实用价值高等特点, 已广泛应用于化学工业、生物学、食品学、工程学等领域, 在真菌多糖微波辅助提取条件优化研究中也取得了良好效果^[14]。2011 年, 曾维才^[15]等采用响应面法优化微波辅助提取黑木耳多糖工艺, 黑木耳多糖提取率可达 16.53%; 2012 年, Zhao^[16]等用响应面分析法优化微波辅助提取梭柄松苞菇多糖, 梭柄松苞菇多糖提取率为 (7.83±0.19)%; 2012 年, Chen^[17]等用响应面法优化微波辅助提取银耳多糖, 银耳多糖提取率为 (65.07±0.99)%; 2013 年, 杨开^[18]等用响应面法优化了微波辅助提取松木层孔菌多糖, 松木层孔菌多糖提取率为 3.88%; 2014 年, 岳春^[19]等用响应面法优化了微波辅助提取虫草多糖, 虫草多糖提取率为 12.1%。

目前, 响应面法用于优化微波辅助提取猪苓多糖的工艺尚未见研究报道, 本研究中采用微波辅助提取猪苓多糖, 并通过响应面分析法优化提取工艺, 借助 Design Expert 软件, 采用 Box-Behnken 模式对各主要影响因素之间的单一和交互作用等进行了研究, 得出最佳提取工艺参数, 为从猪苓菌核

中提取多糖的工业化生产提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 猪苓菌核由陕西天美绿色产业有限公司提供。

1.1.2 主要试剂 无水乙醇、葡萄糖、苯酚、硫酸、氯仿等均为分析纯, 试验用水为纯化水。

1.1.3 主要仪器 723N 型可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司制造; FW177 型高速万能粉碎机, 北京市永光明医疗仪器厂制造; 101A-1 型鼓风干燥箱, 上海试验仪器总厂制造; RV10 基本型 V 旋转蒸发仪, 广州仪科试验室技术有限公司制造; WD700 型微波炉, 乐金电子电器有限公司制造; WF-2000 型微波快速反应系统, 上海屹尧分析仪器有限公司制造; BSA8201 型电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司制造; PHS-3C 型精密酸度计, 上海大普仪器有限公司制造。

1.2 方法

1.2.1 材料预处理 将新鲜猪苓菌核除杂, 60℃烘干至恒质量, 24 000 r/min 粉碎 1 min, 40 目过筛, 备用。

1.2.2 微波提取方法 精确称取猪苓粉末 5.0 g, 按照一定的液料比加入纯化水, 调节 pH, 在一定的微波功率下提取一定时间, 抽滤, 按照此法提取若干次, 合并滤液真空浓缩, 室温下定容至 200 mL。

1.2.3 多糖的测定方法 苯酚-硫酸法^[20]。

1.2.4 单因素试验 按照 1.2.2 提取步骤, 研究提取次数、液料比、pH、微波功率、提取时间 5 个因素对猪苓多糖提取率的影响。

1) 提取次数试验: 准确称取猪苓粉末 5.0 g, 分别选择不同提取次数, 其他条件不变, 进行单因素试验。

2) 液料比试验: 准确称取猪苓粉末 5.0 g, 分别选择不同液料比, 其他条件不变, 进行单因素试验。

3) pH 试验: 准确称取猪苓粉末 5.0 g, 分别选择

不同 pH,其他条件不变,进行单因素试验。

4)微波功率试验:准确称取猪苓粉末 5.0 g,分别选择不同微波功率,其他条件不变,进行单因素试验。

5)提取时间试验:准确称取猪苓粉末 5.0 g,分别选择不同提取时间,其他条件不变,进行单因素试验。

1.2.5 微波提取最佳工艺的响应面法优化 在单因素试验的基础上,根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,选取液料比(X_1)、pH(X_2)、微波功率(X_3)、提取时间(X_4)、提取次数(X_5)为考察对象,以猪苓多糖提取率(Y)为响应值,采用 5 因素 3 水平响应面分析法确定最佳提取工艺条件。试验因素水平编码见表 1。

表 1 5 因素 3 水平试验设计

Table 1 Experiment design of 5 factors and 3 levels

水平	因素				
	X_1 /(mL/g)	X_2	X_3 /W	X_4 /min	X_5 /次
-1	25:1	6.0	420	1	1
0	30:1	6.5	560	2	2
1	35:1	7.0	700	3	3

2 结果与分析

2.1 微波辅助提取猪苓多糖的单因素试验

2.1.1 提取次数对多糖提取率的影响 准确称取猪苓粉末 5.0 g,在液料比 25:1 (mL/g)、pH 6.5、微波功率 420 W、提取时间 3 min 的条件下,研究不同提取次数(1,2,3,4 次)对多糖提取率的影响,结果见图 1。

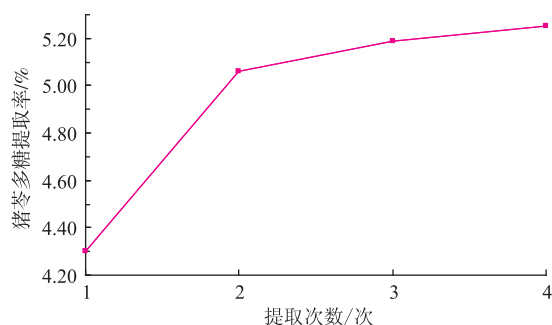


图 1 提取次数对多糖提取率的影响

Fig. 1 Effect of extraction number on extraction rate of polysaccharide

图 1 结果表明,随着提取次数的增加,多糖提取率也逐渐增大。当提取 2 次时,提取率为 5.06%。

当提取次数大于 2 次时,多糖提取率增加缓慢,基本趋于稳定。增加提取次数,会增加提取成本,同时会造成溶剂和能源的浪费。综合考虑提取效果和经济节约等因素,因此,选择微波提取猪苓多糖的提取次数为 2 次。

2.1.2 液料比对多糖提取率的影响 准确称取猪苓粉末 5.0 g,在 pH 6.5、微波功率 420 W、提取时间 3 min、提取次数 2 次的条件下,研究不同液料比 15:1,20:1,25:1,30:1,35:1 (mL/g)对多糖提取率的影响,结果见图 2。

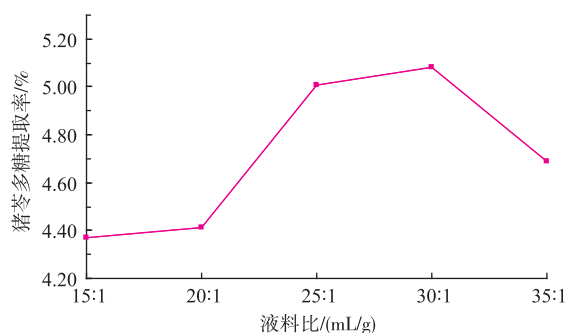


图 2 液料比对多糖提取率的影响

Fig. 2 Effect of the ratio of liquid to solid on extraction rate of polysaccharide

图 2 结果表明,猪苓多糖提取率随着液料比的增大呈现先增大后减小的趋势,在液料比为 30:1 (mL/g)时达到最大,提取率为 5.08%。因此,选择微波提取猪苓多糖的液料比为 30:1 (mL/g)。

2.1.3 pH 对多糖提取率的影响 准确称取猪苓粉末 5.0 g,在液料比 30:1 (mL/g)、微波功率 420 W、提取时间 3 min、提取次数 2 次的条件下,研究不同 pH(5.5,6.0,6.5,7.0,7.5)对多糖提取率的影响,结果见图 3。

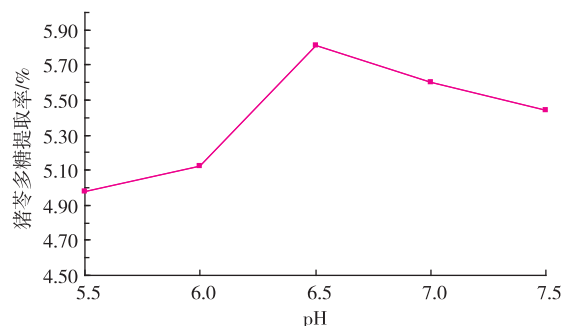


图 3 pH 对多糖提取率的影响

Fig. 3 Effect of pH on extraction rate of polysaccharide

图3结果表明,多糖提取率在pH为6.5时达到最大,提取率为5.81%,增大或减小pH均会导致多糖提取率降低。因此,选择微波提取猪苓多糖的pH为6.5。

2.1.4 微波功率对多糖提取率的影响 准确称取猪苓粉末5.0 g,在液料比30:1 (mL/g)、pH 6.5、提取时间3 min、提取次数2次的条件下,研究不同微波功率(140,280,420,560,700 W)对多糖提取率的影响,结果见图4。

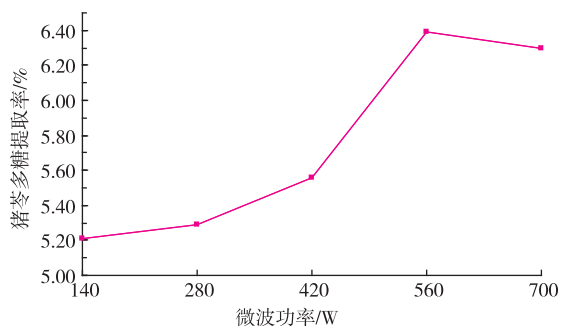


图4 微波功率对多糖提取率的影响

Fig. 4 Effect of microwave power on extraction rate of polysaccharide

图4结果表明,多糖提取率随着微波功率的增大呈现先增加后减小的趋势,在微波功率为560 W时达到最大,提取率为6.39%。因此,选择微波提取猪苓多糖的微波功率为560 W。

2.1.5 提取时间对多糖提取率的影响 准确称取猪苓粉末5.0 g,在液料比30:1 (mL/g)、pH 6.5、微波功率560 W、提取次数2次的条件下,研究不同提取时间(1、2、3、4、5 min)对多糖提取率的影响,结果见图5。

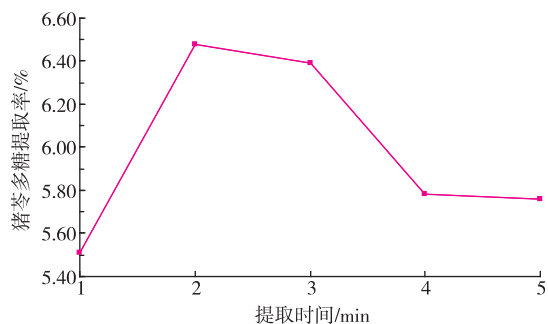


图5 提取时间对多糖提取率的影响

Fig. 5 Effect of extraction time on extraction rate of polysaccharide

图5结果表明,多糖提取率随着提取时间的增

加呈现先增加后减小的趋势,在提取时间为2 min时达到最大,提取率为6.48%。因此,选择微波提取猪苓多糖的提取时间为2 min。

2.2 Box-Behnken 设计优化主要影响因素水平

采用5因素3水平响应面分析法进行研究,考虑各因素间的交互作用以及各因素对多糖提取率的影响。试验结果见表2。

表2 Box-Behnken 设计和试验结果

Table 2 Box-Behnken design and experimental result

试验号	水平					多糖提取率/%
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	
1	-1	-1	0	0	0	5.46
2	1	-1	0	0	0	4.86
3	-1	1	0	0	0	5.57
4	1	1	0	0	0	5.33
5	0	0	-1	-1	0	4.64
6	0	0	1	-1	0	4.70
7	0	0	-1	1	0	5.58
8	0	0	1	1	0	6.46
9	0	-1	0	0	-1	4.71
10	0	1	0	0	-1	4.80
11	0	-1	0	0	1	5.02
12	0	1	0	0	1	5.23
13	-1	0	-1	0	0	5.25
14	1	0	-1	0	0	4.61
15	-1	0	1	0	0	5.64
16	1	0	1	0	0	5.31
17	0	0	0	-1	-1	3.61
18	0	0	0	1	-1	5.28
19	0	0	0	-1	1	4.49
20	0	0	0	1	1	5.67
21	0	-1	-1	0	0	4.63
22	0	1	-1	0	0	5.89
23	0	-1	1	0	0	6.28
24	0	1	1	0	0	5.29
25	-1	0	0	-1	0	4.21
26	1	0	0	-1	0	3.87
27	-1	0	0	1	0	5.98
28	1	0	0	1	0	5.78
29	0	0	-1	0	-1	4.59
30	0	0	1	0	-1	4.78
31	0	0	-1	0	1	4.71
32	0	0	1	0	1	5.80
33	-1	0	0	0	-1	4.32
34	1	0	0	0	-1	3.97

续表 2

试验号	水平					多糖提取率/%
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	
35	-1	0	0	0	1	5.09
36	1	0	0	0	1	4.70
37	0	-1	0	-1	0	4.66
38	0	1	0	-1	0	4.45
39	0	-1	0	1	0	6.01
40	0	1	0	1	0	6.45
41	0	0	0	0	0	6.17
42	0	0	0	0	0	6.54
43	0	0	0	0	0	6.50
44	0	0	0	0	0	6.35
45	0	0	0	0	0	6.38
46	0	0	0	0	0	6.26

经 Design Expert 软件对 46 个试验点的多糖提取率进行回归统计分析,得出二次模型回归统计分析表(表 3)。

多糖提取率的回归方程如下:

$$Y = -112.714\ 58 + 1.489\ 37X_1 + 22.235\ 83X_2 + 0.068\ 33X_3 + 0.315\ 42X_4 + 3.422\ 29X_5 + 0.036\ 00X_1X_2 + 1.107\ 14 \times 10^{-4}X_1X_3 + 7.000\ 00 \times 10^{-3}X_1X_4 - 2.000\ 00 \times 10^{-3}X_1X_5 - 8.035\ 71 \times 10^{-3}X_2X_3 + 0.325\ 00X_2X_4 + 0.060\ 00X_2X_5 + 1.464\ 29 \times 10^{-3}X_3X_4 + 1.607\ 14 \times 10^{-3}X_3X_5 - 0.122\ 50X_4X_5 - 0.030\ 567X_1^2 - 1.493\ 33X_2^2 - 2.108\ 84 \times 10^{-5}X_3^2 - 0.606\ 67X_4^2 - 1.029\ 17X_5^2 \quad (1)$$

表 3 结果表明, X_2 、 X_2X_4 、 X_3X_4 、 X_3X_5 4 项显著; X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_2X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 、 X_5^2 10 项极显著, 其他 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_1X_4 、 X_1X_5 、 X_2X_5 、 X_4X_5 不显著。模型

表 3 回归分析结果

Table 3 Result of regression analysis

方差来源	平方和	自由度	均方根误差	F 值	P 值	显著性
模型	26.98	20	1.35	74.13	< 0.000 1	**
X_1	0.60	1	0.60	32.80	< 0.000 1	**
X_2	0.12	1	0.12	6.54	0.017 0	*
X_3	1.19	1	1.19	65.30	< 0.000 1	**
X_4	9.89	1	9.89	543.62	< 0.000 1	**
X_5	1.35	1	1.35	74.27	< 0.000 1	**
X_1X_2	0.032	1	0.032	1.78	0.194 1	
X_1X_3	0.024	1	0.024	1.32	0.261 4	
X_1X_4	4.900×10^{-3}	1	4.900×10^{-3}	0.27	0.608 4	
X_1X_5	4.000×10^{-4}	1	4.000×10^{-4}	0.022	0.883 3	
X_2X_3	1.27	1	1.27	69.56	< 0.000 1	**
X_2X_4	0.11	1	0.11	5.81	0.023 7	*
X_2X_5	3.600×10^{-3}	1	3.600×10^{-3}	0.20	0.660 3	
X_3X_4	0.17	1	0.17	9.24	0.005 5	*
X_3X_5	0.20	1	0.20	11.13	0.002 7	*
X_4X_5	0.060	1	0.060	3.30	0.081 3	
X_1^2	5.10	1	5.10	280.10	< 0.000 1	**
X_2^2	1.22	1	1.22	66.85	< 0.000 1	**
X_3^2	1.49	1	1.49	81.95	< 0.000 1	**
X_4^2	3.21	1	3.21	176.53	< 0.000 1	**
X_5^2	9.24	1	9.24	508.04	< 0.000 1	**
残差	0.45	25	0.018			
失拟项	0.36	20	0.018	0.91	0.610 3	
纯误差	0.098	5	0.020			
总离差	27.43	45				
$R^2=0.983\ 4$				$R^2_{Adj}=0.970\ 2$		

注:** 差异极显著($P<0.001$);* 差异显著($P<0.05$)。

P 值小于 0.000 1, 可信度水平大于 99.99%, 说明该模型有意义。回归模型的 $R^2=0.983\ 4$, $R^2_{Adj}=0.970\ 2$, 说明多糖提取率的试验值和预测值之间具有良好的拟合度。该模型失拟项 P 值为 $0.610\ 3>0.05$, 失拟项差异不显著, 说明试验操作可信, 试验理论可使用。另外从 F 值可看出单因素对多糖提取率的影响顺序: $X_4>X_5>X_3>X_1>X_2$, 即影响顺序依次为: 提取时间>提取次数>微波功率>液料比>pH。

2.3 响应面及最佳优化条件的验证

根据回归方程绘制多糖提取率随各因素变化的响应曲面图。由响应曲面图可知, 液料比、pH、微波功率、提取时间、提取次数 5 个因素对多糖提取率的影响(图 6—15)。每个响应曲面分别代表着两个独立因素间的相互作用, 其余两个因素保持在编码水平的 0 水平。

由图 6—9 可知, 液料比与其它各因素之间的交互作用对多糖提取率的影响均不显著。

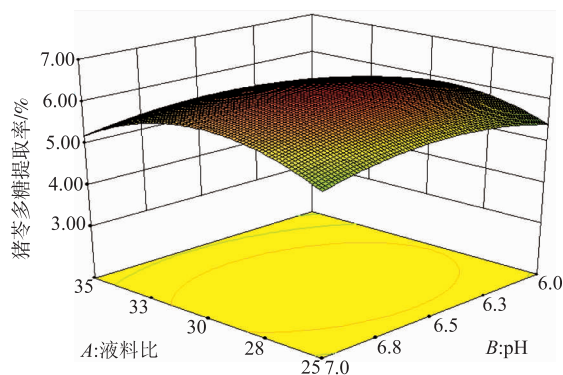


图 6 $Y=f(X_1, X_2)$ 响应曲面
Fig. 6 Response surface of $Y=f(X_1, X_2)$

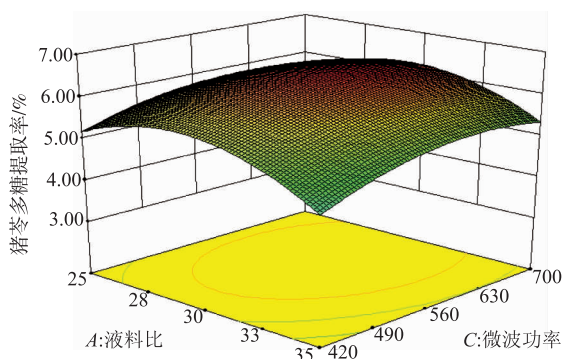


图 7 $Y=f(X_1, X_3)$ 响应曲面
Fig. 7 Response surface of $Y=f(X_1, X_3)$

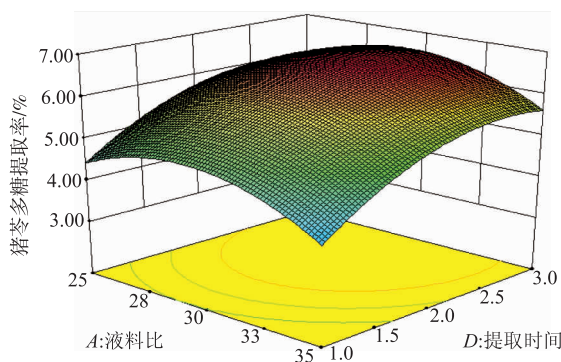


图 8 $Y=f(X_1, X_4)$ 响应曲面
Fig. 8 Response surface of $Y=f(X_1, X_4)$

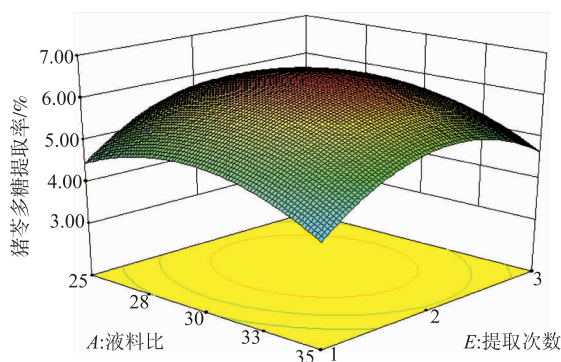


图 9 $Y=f(X_1, X_5)$ 响应曲面
Fig. 9 Response surface of $Y=f(X_1, X_5)$

由图 10 可知, 微波功率和 pH 的交互作用十分显著; 在低微波功率条件下随着 pH 的增大, 多糖提取率会逐渐升高, 最后趋于平稳; 而在高微波功率条件下, 随着 pH 的增大, 多糖提取率会先缓慢升高然后迅速下降。

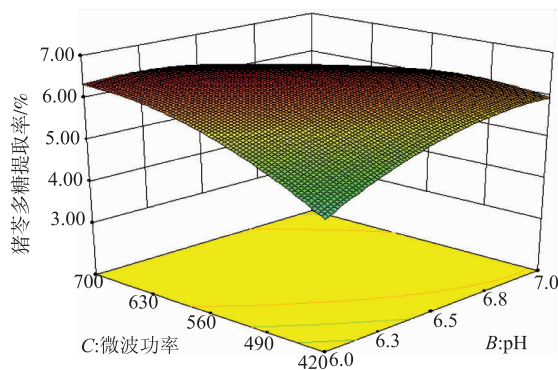
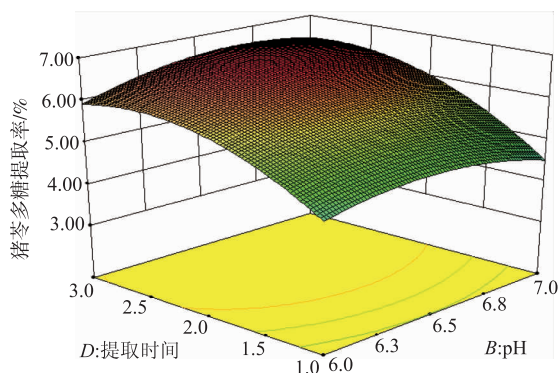
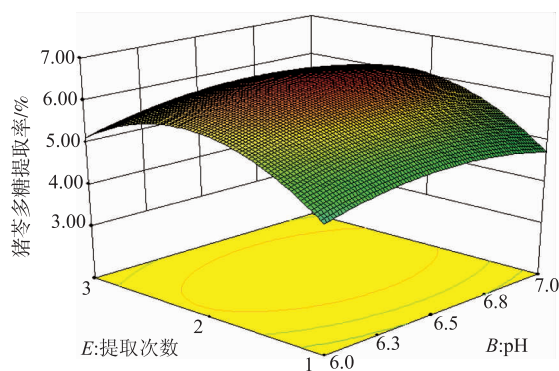


图 10 $Y=f(X_2, X_3)$ 响应曲面
Fig. 10 Response surface of $Y=f(X_2, X_3)$

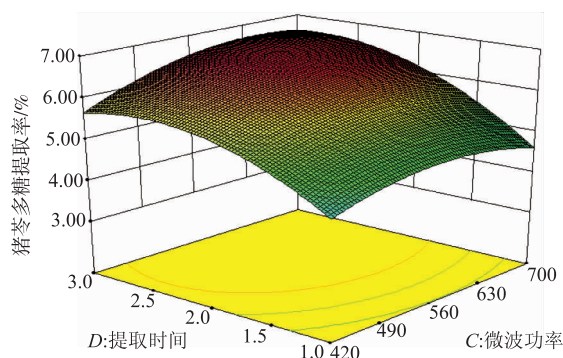
由图 11 可知, pH 和提取时间的交互作用显著; 在一定 pH 条件下, 随着提取时间的增加, 多糖提取率会迅速升高至平稳, 然后略有下降。

图 11 $Y=f(X_2, X_4)$ 响应曲面Fig. 11 Response surface of $Y=f(X_2, X_4)$

由图 12 可知, 提取次数和 pH 的交互作用不显著。

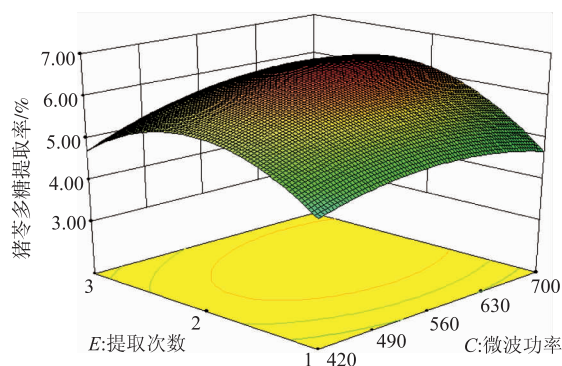
图 12 $Y=f(X_2, X_5)$ 响应曲面Fig. 12 Response surface of $Y=f(X_2, X_5)$

由图 13 可知, 微波功率和提取时间的交互作用显著; 在低微波功率条件下, 多糖提取率会随着提取时间的延长, 先升高至平稳, 后略有下降; 在高微波功率条件下, 随着提取时间的延长, 起初升高较快, 后来比较缓慢, 逐渐趋于平稳。

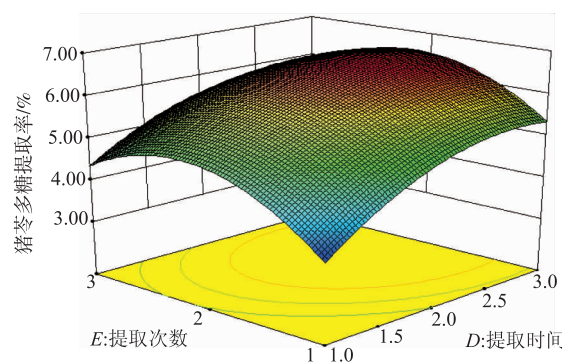
图 13 $Y=f(X_3, X_4)$ 响应曲面Fig. 13 Response surface of $Y=f(X_3, X_4)$

由图 14 可知, 微波功率和提取次数的交互作用不显著。

用显著; 在一定的微波功率条件下, 随着提取次数增加和微波功率的增大, 多糖提取率都是起始升高较快, 最后趋于平稳。

图 14 $Y=f(X_3, X_5)$ 响应曲面Fig. 14 Response surface of $Y=f(X_3, X_5)$

由图 15 可知, 提取时间和提取次数的交互作用不显著; 按照一定的提取次数, 随着提取时间的增加, 多糖提取率起始升高较快, 最后趋于平稳。

图 15 $Y=f(X_4, X_5)$ 响应曲面Fig. 15 Response surface of $Y=f(X_4, X_5)$

综上所述, 由回归模型得到影响猪苓多糖提取率的各因素最优值为液料比 30:1 (mL/g), pH 6.6, 微波功率 614 W, 提取时间 2.5 min, 提取次数 2 次, 此时猪苓多糖提取率的最大预测值为 6.68%。为了检验该最佳提取工艺的可靠性, 采用上述最优提取条件进行验证试验, 得到多糖提取率的验证值为 6.75%。由于多糖提取率的验证值与最大估计预测值非常接近, 因此, 利用 Box-Behnken 响应面法优化微波辅助提取猪苓多糖的工艺是有效可行的。

3 结语

通过单因素和 Box-Behnken 响应面试验得到

微波辅助提取猪苓多糖的最佳工艺条件为:液料比 30:1 (mL/g), pH 6.6, 微波功率 614 W, 提取时间 2.5 min, 提取次数 2 次。在此工艺条件下, 获得猪苓多糖的提取率为 6.75%。

近年来, 利用微波辅助提取猪苓多糖的研究报道甚少。2012 年, 李志洲^[21]用二次回归正交试验优化微波辅助提取猪苓多糖工艺, 提取率仅 2.86%; 2012 年, 孙纓^[22]等用正交试验优化微波辅助提取猪苓多糖工艺, 提取率为 3.663%。

与李、孙的研究相比, 本研究中采用 Box-Behnken 响应面法优化微波辅助提取猪苓多糖的工艺, 其提取率显著高于现有文献报道。一方面由于多糖检测方法(苯酚-硫酸法)的稳定性和准确性较好^[23]; 另一方面是基于响应面法可在更广泛的范围内考虑因素的组合, 预测响应值, 比其他分析方法更为高效^[14]。利用 Box-Behnken 响应面法优化得到的猪苓多糖提取工艺参数准确可靠, 可为猪苓多糖的工业化生产提供必要的技术支持。

参考文献:

- [1] 陈文强, 邓百万, 彭浩, 等. 药用真菌猪苓的研究现状及应用展望[J]. 中国食用菌, 2012, 31(1): 1-4.
CHEN Wenqiang, DENG Baiwan, PENG Hao, et al. The status and application prospects of *Polyporus umbellatus* [J]. **Edible Fungi of China**, 2012, 31(1): 1-4. (in Chinese)
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2005 版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 222.
- [3] 陈文强, 邓百万. 秦巴山区野生与栽培猪苓菌核主要成分的测定[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(6): 96-98.
CHEN Wenqiang, DENG Baiwan. Determination of main components of sclerotia in wild and cultivated *Polyporus umbellatus* in Mt. Qinling and Mt. Bashan regions[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2003, 22(6): 96-98. (in Chinese)
- [4] 朱月, 李彩霞, 毕晓丹. 猪苓多糖分级纯化及对羟自由基清除作用的研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(30): 18553-18555.
ZHU Yue, LI Caixia, BI Xiaodan. Research on graded purification of polysaccharides of *Polyporus* and its scavenging effects on $\cdot\text{OH}$ [J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, 2011, 39(30): 18553-18555. (in Chinese)
- [5] 陶娟, 李涛, 薛国平, 等. 猪苓多糖在血液透析患者乙肝疫苗免疫接种中的应用研究[J]. 中国医药指南, 2013, 11(22): 7-8.
TAO Juan, LI Tao, XUE Guoping, et al. PUPS in hemodialysis patients with hepatitis B vaccine immunization application research[J]. **Guide of China Medicine**, 2013, 11(22): 7-8. (in Chinese)
- [6] 杜金梁, 贾睿, 曹丽萍, 等. 猪苓多糖对四氯化碳诱导建鲤肝损伤的保护作用[J]. 南方农业学报, 2013, 44(9): 1564-1570.
DU Jinliang, JIA Rui, CAO Liping, et al. Protective effects of *Polyporus umbellatus* polysaccharide on liver injury induced by carbon tetrachloride in *Cyprinus carpio* var. jian[J]. **Journal of Southern Agriculture**, 2013, 44(9): 1564-1570. (in Chinese)
- [7] 陈文强, 邓百万, 刘开辉, 等. 猪苓多糖超声提取工艺条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(4): 53-57.
CHEN Wenqiang, DENG Baiwan, LIU Kaihui, et al. Study on the optimization of ultrasonic extraction technique of polysaccharide from *Polyporus umbellatus*[J]. **Journal of Food and Biotechnology**, 2008, 27(4): 53-57. (in Chinese)
- [8] 杨润亚, 李维焕, 吕芳芳. 秀珍菇子实体多糖的提取工艺优化及体外抗氧化性 [J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(10): 1093-1099.
YANG Runya, LI Weihuan, LV Fangfang. Optimization of extraction technique and the antioxidant activity of polysaccharides from *Pleurotus geesteranus*[J]. **Journal of Food and Biotechnology**, 2012, 31(10): 1093-1099. (in Chinese)
- [9] Hang S Q, Ning Z X. Extraction of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and its immune enhancement activity [J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2010, 47(3): 336-341.
- [10] 赖谱富, 沈恒胜, 陈君琛, 等. 大杯蕈菇柄多糖微波提取工艺优化[J]. 福建农业学报, 2014, 29(3): 271-275.
LAI Pufu, SHEN Hengsheng, CHEN Junchen, et al. Optimization of microwave extraction of polysaccharides from *Clitocybe maxima* stem[J]. **Fujian Journal of Agricultural Science**, 2014, 29(3): 271-275. (in Chinese)
- [11] 史碧波. 微波辅助提取鸡油菌多糖的工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(30): 18533-18535.
SHI Bibo. Study on microwave assisted extraction of polysaccharides from *Cantharellus cibarius* [J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, 2011, 39(30): 18533-18535. (in Chinese)

- [12] 郭永月,陶明焯,赵云霞,等. 白玉菇多糖提取方法的比较和优化[J]. 南京大学学报,2013,36(3):87-92.
GUO Yongyue,TAO Mingxuan,ZHAO Yunxia,et al. Comparison and optimization among extraction technologies of polysaccharide from *Pleurotus nebrodensis*[J]. **Journal of Nanjing Normal University**,2013,36(3):87-92.(in Chinese)
- [13] 张颖. 对茯苓多糖提取方法的比较研究[J]. 中国实用医药,2012,7(4):249-250.
ZHANG Ying. Comparison among extraction technologies of polysaccharide from *Poria cocos* [J]. **China Practical Medical**, 2012,7(4):249-250.(in Chinese)
- [14] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报,2001,22(3):91-94.
MU Yundong. Response surface methodology and its application in food industry [J]. **Journal of Zhengzhou Institute of Technology**,2001,22(3):91-94.(in Chinese)
- [15] 曾维才,张曾,贾利蓉. 响应面法优化微波辅助提取黑木耳多糖工艺的研究[J]. 食品与发酵科技,2011,47(5):45-48.
ZENG Weicai,ZHANG Zeng,JIA Lirong. Optimization of microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Auricularia auricular* with response surface methodology[J]. **Food and Fermentation Technology**,2011,47(5):45-48.(in Chinese)
- [16] Zhao L,Wang K Y,Wang D X,et al. Response surface methodology (RSM) for optimization of the microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Catathelasma ventricosum*[J]. **Agricultural Journal**,2012,7(4):255-259.
- [17] Chen Y Z,Zhao L,Liu B G,et al. Application of response surface methodology to optimize microwave-assisted extraction of polysaccharide from *Tremella*[J]. **Physics Procedia**,2012,24(A):429-433.
- [18] 杨开,薛介丰,金月忠,等. 松木层孔菌多糖的微波提取和体外活性研究[J]. 食药菌,2013(2):45-49.
YANG Kai,XUE Jiefeng,JIN Yuezhong,et al. Study on microwave extraction and evaluation in vitro of *Phellinus pini* polysaccharides[J]. **Edible and Medicinal Mushrooms**,2013(2):45-49.(in Chinese)
- [19] 岳春,李靖靖,方永远. 虫草多糖微波辅助提取工艺的优化[J]. 食品与机械,2014(1):192-195.
YUE Chun,LI Jingjing,FANG Yongyuan,et al. Optimization of microwave-assisted extraction on polysaccharides from *Cordyceps militaris*[J]. **Food & Machinery**,2014(1):192-195.(in Chinese)
- [20] 李志洲. 猪苓多糖的提取及其锌配合物抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发,2011,32(2):45-49.
LI Zhizhou. Study on extraction conditions of polysaccharide from *Polyporus umbellatus* and the anti-oxidation of polysaccharide zinc[J]. **Food Research and Development**,2011,32(2):45-49.(in Chinese)
- [21] 李志洲. 回归正交试验设计优化猪苓多糖的提取工艺[J]. 光谱实验室,2012,29(5):3047-3050.
LI Zhizhou. Optimization of extraction technology of polysaccharide in *Polyporus* by regression orthogonal test design[J]. **Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory**,2012,29(5):3047-3050.(in Chinese)
- [22] 孙纓,赵懿清,鲍佳春,等. 猪苓多糖微波辅助提取工艺的正交实验法优选[J]. 时珍国医国药,2012,23(10):2624-2625.
SUN Ying,ZHAO Yiqing,BAO Jiachun,et al. Microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Polyporus umbellatus* optimized by orthogonal method [J]. **Lishizhen Medicine and Materia Medica Research**,2012,23 (10):2624-2625. (in Chinese)
- [23] 姜琼,谢妤. 苯酚-硫酸法测定多糖方法的改进[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):316-318.
JIANG Qiong,XIE Yu. Improvement of phenol-sulfuric acid method for determination of polysaccharides [J]. **Jiangsu Agricultural Sciences**,2013,41(12):316-318.(in Chinese)