黑松露多糖分离纯化与抗炎活性研究

王海燕，张隆龙，张凤兰，赵晓宇
（中国食品药品检定研究院，北京 100050）

摘要：以黑松露为原料，通过水提醇沉法提取黑松露多糖。提取的黑松露多糖经过 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析柱分离得到两个块菌多糖组分，分别为 TP1 和 TP2。检测 TP1 和 TP2 对小鼠巨噬细胞（RAW264.7）增殖抑制作用、中性红吞噬能力影响。TP1 进一步用葡聚糖凝胶层析柱纯化，得 TP1-1 并进行结构表征。结果表明：黑松露多糖两种组分 TP1 和 TP2 对 RAW264.7 细胞没有毒性作用，且都能显著增强 RAW264.7 细胞的中性红吞噬能力，但 TP1 的作用优于 TP2。TP1-1 的数均分子量为 757910 u，其单糖组成为 D-葡萄糖和 D-甘露糖，比例分别为 88.94%和 1.19%。紫外光谱扫描结果显示块菌多糖 TP1-1 不含蛋白质和核酸。红外光谱分析结果表明，TP1-1 具有吡喃环的结构，具有 α-型糖苷键，含有甘露糖。

关键词：黑松露多糖；提取工艺；分离纯化；抗炎活性
文章篇号：1673-9078(2017)8-30-35 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.8.006

Isolation, Purification, and Characterization of Anti-inflammatory Activity of Truffle Polysaccharides

WANG Hai-yan, ZHANG Long-long, ZHANG Feng-lan, ZHAO Xiao-yu
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Using Yunnan truffle as the raw material, black truffle polysaccharides (TPs) were obtained by water extraction and alcohol precipitation. The extracted black TPs were separated by DEAE Sepharose Fast Flow ion exchange chromatography to obtain two truffle polysaccharide fractions: TP1 and TP2. The inhibitory effects of TP1 and TP2 on the proliferation of mouse macrophages (RAW264.7) and the capacities of TP1 and TP2 for the phagocytosis of neutral red pigment were investigated. TP1 was further purified by Sephadex chromatography column to yield TP1-1, which was used for structural characterization. The results showed that TP1 and TP2 had no toxic effects on RAW264.7 cells; they could significantly increase the phagocytic capacity of RAW264.7 cells, and the effect of TP1 was greater than that of TP2. The average molecular weight of TP1 was 757910 u, and its monosaccharide composition was D-glucose and D-mannose, in proportions of 88.94% and 1.19%, respectively. Ultraviolet (UV) spectra revealed that TP1-1 did not contain protein or nucleic acid. The results of infrared spectrum analysis showed that TP1-1 had a pyran ring structure and contained alpha-glycosidic bonds and mannose.

Key words: truffle polysaccharides; extraction process; isolation and purification; anti-inflammatory activity

黑松露（Truffle），又称块菌、块菇、猪拱菌和无娘果等，是一类蕈类的总称，属子囊菌门西洋块菌科西洋块菌属，是一类与树木共生的药食两用珍惜名贵食用菌[1,2]。我国的云南、四川、新疆和西藏等地为主要分布区，欧洲的分布以意大利、法国和西班牙等地为主[3]，研究表明，黑松露含有丰富的多糖、蛋白质、氨基酸和多不饱和脂肪酸，同时，还含有丰富的矿物质和固醇类物质[4]。多糖的种类繁多，来源很广泛，在植物、动物、微生物（细菌和真菌）及海藻中均有分布，它们又可分为胞外多糖和胞内多糖，其中植物多糖和微生物多糖是目前研究最多的[5,6]。多糖不仅是生命的能源物质、细胞的结构物质，还广泛参与细胞生长分化、细胞识别、免疫应答、细胞癌变、病毒感染及胚胎发育等各种生命活动，具有多种生理功能，如抗氧化、抗肿瘤、抗凝血、降血糖、降血脂、抗感染及防衰老等，且毒副作用低，因而受到广泛地关注[7,8]。目前国内对于黑松露多糖的研究尚少，主要是关于种属分类和资源分布等，对于多糖的生理活性研究也仅停留在抗氧化上，其他活性鲜有报道。

本论文首先对云南产的黑松露多糖进行提取并对制备后的块菌粗多糖进行脱蛋白，并借助离子交换层析柱、凝胶色谱分离柱等分离纯化手段等得到较纯的多糖，再对纯化后的多糖免疫活性进行测定，包括考察了黑松露多糖对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增值活性影响，进而通过对黑松露多糖孵育后 RAW264.7 细胞

收稿日期：2017-07-22

作者简介：王海燕（1971-），女，博士，副研究员，研究方向：食品安全检测

吞噬中性红能力的测定，来评价多糖抗炎活性。选取活性更好的组分进一步纯化，并将进一步纯化后的多糖样品进行一系列结构解析。本文研究可为黑松露多糖功能食品及药物的研究开发提供重要的理论基础及科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

无水乙醇、浓硫酸、苯酚和葡萄糖，美国 Sigma 公司。数显鼓风干燥箱，上海博讯实业有限公司医疗设备厂；旋转蒸发仪，上海亚荣生化仪器厂；中草药粉碎机，美的有限公司；紫外分光光度计，上海棱光技术有限公司；循环水真空泵，郑州长城科工贸有限公司；恒温水浴摇床，天津奥特赛恩斯仪器有限公司；分析天平，上海天平仪器厂；冷冻干燥机，德国 CHRIST 公司；酶标仪，美国 Thermo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黑松露多糖的提取

黑松露多糖的具体提取流程见图 1。

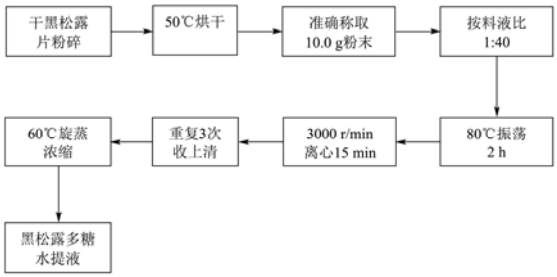


图 1 黑松露多糖提取流程

Fig.1 Flow chart of the extraction of crude polysaccharides from truffle

1.2.2 黑松露多糖的粗分离纯化[9]

利用 Sevage 法将粗提多糖样品进行杂蛋白去除。黑松露多糖水提液中加入两倍体积的 Sevage 试剂，25 ℃下振荡 20 min，之后在 5000 r/min 转速下离心 15 min，取上清液，上述步骤重复 3 次，除去蛋白。继续在上清液中加 90%乙醇，静置，4000 r/min 转速离心 10 min，取沉淀干燥后冻干备用。

1.2.3 黑松露多糖的阴离子交换柱层析纯化

柱填料：DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换纤维素，蒸馏水平衡 6 h；样品配制：称取 2 g 黑松露多糖冻干粉溶解于 100 mL 蒸馏水中；每次上样体积：10 mL；流速：1.0 mL/min；洗脱液：蒸馏水、0.05、0.1、0.2、0.3 和 0.5 mol/L 的 NaCl 溶液；分部收集，5 min/管。取上述 200 μL 纯化液，加 200 μL 蒸馏水和 200 μL 5%的苯酚溶液以及 1 mL 浓硫酸，混匀静置 10 min，在 490 nm 下测定吸光值，绘制洗脱曲线，并以此收集不同峰段的多糖组分。收集的多糖组分 60 ℃旋蒸浓缩，并用 3000 u 的透析袋透析。透析液为蒸馏水，透析温度 4 ℃，透析时间为 3 d，透析液更换时间为 6 h。冻干，得到不同组分冻干粉。

1.2.4 黑松露多糖的凝胶柱层析纯化

柱填料：葡聚糖凝胶 Sephadex G-100；样品配制：准确称取 200 mg 样品溶于 100 mL 蒸馏水；每次上样体积：10 mL；洗脱条件：蒸馏水洗脱，1 mL/min，5 min/管；分部收集。

按照 1.2.3 的步骤绘制洗脱曲线，并得到冻干粉。

1.2.5 细胞抗炎活性评价

1.2.5.1 黑松露多糖溶液的配制

样品溶于 DMEM 培养基，浓度为 1 mg/L，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌（无菌环境）。将样品溶液稀释，得到浓度梯度为 1000 μg/mL、500 μg/mL、250 μg/mL、125 μg/mL 和 62.5 μg/mL 的五个剂量组。

1.2.5.2 细胞培养

取出液氮罐中的小鼠巨噬细胞 RAW264.7，恒温水浴 37 ℃解冻细胞。细胞解冻完成后转移到放有 4 mL DMEM 培养基（含 10%胎牛血清、1%双抗）的 15 mL 无菌离心管中混匀。1000 r/min 离心 5 min，弃上清液，再加入 1 mL DMEM 培养基混匀成悬液，转移至无菌细胞培养皿中，再加 3 mL DMEM 培养基。恒温培养箱（5%CO_2，37 ℃）中培养，培养基每天更换一次。

1.2.5.3 MTT 实验

将 RAW264.7 细胞悬液以浓度 1×106 个/mL、每孔 100 μL 接种于 96 孔板中，恒温培养箱（5%CO_2，37 ℃）中培养贴壁 24 h，弃去上清液。加入 1.2.5.1 中的五组浓度样品溶液 100 μL，阳性对照组加 50 μg/mL 的脂多糖（LPS）溶液 100 μL，调零组加入 DMEM 培养基 100 μL，做 3 组平行。放回恒温培养箱（5%CO_2、37 ℃）中培养 24 h。

加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL，继续培养 4 h，弃去上清液。加入 DMSO 溶液 150 μL，振荡 10 min，490 nm 下测吸光值。细胞存活率的计算公式为：

细胞存活率=A/B×100%

其中 A 为实验组吸光度，B 为对照组吸光度。

1.2.5.4 中性红实验

前期步骤参考 1.2.5.3 的第一部分进行。弃去上清液，加入 0.1%中性红溶液 150 μL（过 0.22 μm 的微孔滤膜），放回恒温培养箱培养 3 h 后，弃去上清液，常温下 PBS 缓冲液清洗 3 次，再加入 200 μL 细胞裂解

液（乙酸:无水乙醇=1:1，*V/V*），静置 20 min，540 nm 下测定吸光值。

1.2.6 黑松露多糖的结构解析

1.2.6.1 黑松露多糖分子量的分布测定

色谱条件：采用美国 Water 公司的高效凝胶渗透色谱（High-Performance Gel Permeation Chromatography，HPGPC）法对黑松露多糖 TP1-1 的分子量分布进行测定。色谱柱为日本 Tosoh 公司的 TSK-GEL G-5000 PWXL column（300 mm×7.8 mm i.d.，10 μm）和 TSK-GEL G-3000 PWXL column 串联使用。流动相为 0.01 mol/L 的 KH_2PO_4；流速为 0.6 mL/min；柱温为 35 ℃；检测器为 2414 型示差折光检测器。

分子量校正标准曲线：将不同分子量的葡聚糖标准品（5200、16800、273000、410000、670000、1400000 u）用流动相 KH_2PO_4 溶液配成 1.0 mg/mL 的标准液，上样量为 10 μL。以葡聚糖标准品的分子量对数值 logMW 为横坐标，以分子量的微分分布 dwt/d(logM) 为纵坐标，采用 Breeze GPC 软件对曲线进行回归拟合以绘制分子量校正标准曲线。

1.2.6.2 黑松露多糖的单糖组成分析[10~12]

吸取标准品溶液和样品水解液各 200 μL，依次加入 200 μL、0.5 mol/L 的 PMP（1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮）甲醇溶液和 200 μL、0.3 mol/L 的 NaOH 溶液，70 ℃水浴 60 min。冷却至室温后加入 200 μL、0.3 mol/L 的 HCl 溶液，加去离子水补充至 2 mL，分三次加入三氯甲烷 5 mL 并涡旋震荡均匀，3000 g 离心 5 min 后弃去下层，重复三次至三氯甲烷层无颜色，上层溶液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后供 HPLC 进样。HPLC 分析条件：色谱柱 Dionex Acclaim 120 C18（4.6×250 mm，5 μm）；流动相 0.1 M（pH=6.7）PBS:乙腈=81:19（*V/V*），流速 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 250 nm；进样量 10 μL。

1.2.6.3 黑松露多糖 TP1-1 的紫外光谱扫描[13]

精确称取 1 mg 黑松露多糖 TP1-1，用蒸馏水充分溶解，配成浓度为 1 mg/mL 的多糖溶液，以蒸馏水为空白对照，于 200~400 nm 波长范围内扫描。

1.2.6.4 黑松露多糖 TP1-1 的红外光谱扫描[14]

精确称取 2 mg 黑松露多糖 TP1-1，加入适量干燥的 KBr 粉末，充分混合，在玛瑙研钵中研磨均匀后加入压膜内压片，制成直径约 10 mm、厚约 1 mm 的透明压片。

将上述制好的压片放入傅里叶变换红外光谱仪（FT-IR）内，在波长 400~4000 cm^{-1} 范围内进行扫描，采集样品红外吸收图谱，并用 Nexus 系统软件对图谱进行处理分析。

1.3 数据处理

采用 Excel 软件整理数据，Origin 8.5 软件作图，组间数据比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），$p<0.05$ 视为统计学意义上的显著性差异。

2 结果与分析

2.1 黑松露多糖的提取及离子交换柱层析分离

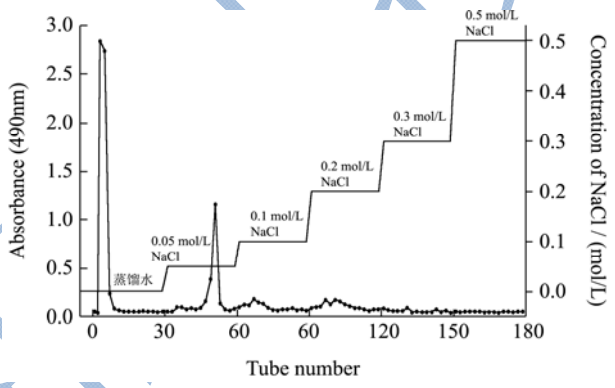


图 2 黑松露多糖离子交换层析（DEAE Sepharose Fast Flow）洗脱图

Fig.2 Elution profile of truffle polysaccharide by anion-exchange chromatography (DEAE Sepharose Fast Flow)

黑松露干片经水提、除蛋白和醇沉等工艺处理后冷冻干燥得到黑松露粗多糖，测得粗多糖得率为 8.37%。经脱蛋白的黑松露粗多糖利用 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析分离，经过蒸馏水和不同浓度 NaCl 溶液洗脱后得到两个吸收峰（图 2），分别命名为 TP1（蒸馏水洗脱组分）和 TP2（0.05 mol/L NaCl 洗脱组分）。分别收集两个吸收峰，经浓缩、透析和真空冷冻干燥后得到 TP1 和 TP2 干品。

2.2 黑松露多糖 TP1 和 TP2 组分的抗炎活性评价

采用 MTT 法考察了黑松露多糖两个组分 TP1 和 TP2 对于小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的增值活性影响。如图 3A 和 B 所示，不同浓度的黑松露多糖 TP1、TP2 与 RAW264.7 细胞共同培养 24 h 后，对 RAW264.7 细胞的增殖无抑制作用。因此，黑松露多糖对于 RAW264.7 细胞无毒性作用。

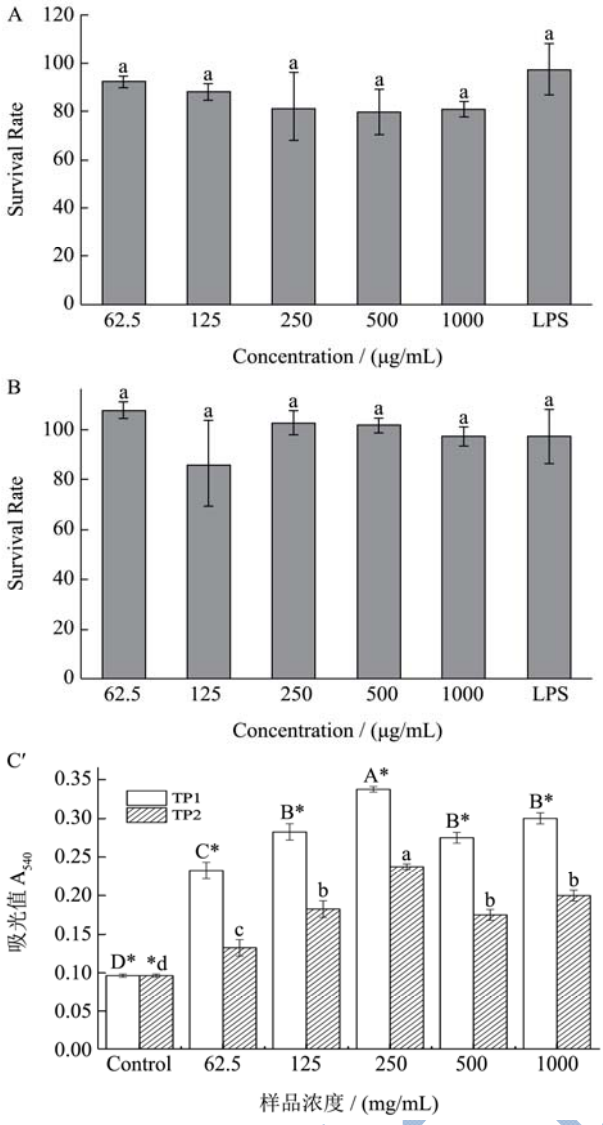


图 3 黑松露多糖 TP1 及 TP2 组分抗炎活性评价

Fig.3 Evaluation of the anti-inflammatory activity of TP1 and TP2

注：A，TP1 对 RAW264.7 细胞的增殖抑制作用；B，TP2 对 RAW264.7 细胞的增殖抑制作用；C′，TP1 和 TP2 对 RAW264.7 细胞吞噬中性红能力的影响。

进而通过对黑松露多糖 TP1 和 TP2 孵育后 RAW264.7 细胞吞噬中性红能力的测定，来评价 TP1 和 TP2 抗炎活性。如图 3C′所示，随着 TP1 和 TP2 浓度的不断增加，吸光值不断增大，与 TP1 和 TP2 的作用浓度呈正相关。当浓度为 250 mg/mL 时，吸光值达到最高，RAW264.7 细胞吞噬中性红的量最多，即 TP1 和 TP2 对 RAW264.7 细胞吞噬中性红的能力影响最大。当浓度继续增大至 1000 mg/mL 时，RAW264.细胞吞噬中性红的能力略有下降，但跟对照组相比较，仍有显著性增强（p<0.05）。

不同浓度下，TP1 对 RAW264.7 细胞吞噬能力的影响明显高于 TP2，即 TP1 能更好的促进 RAW264.7 细胞吞噬能力地增强，因 TP1 组分的抗炎活性相较 TP2 组分更好，选择 TP1 组分进行后面的实验。

2.3 黑松露多糖 TP1 的凝胶柱层析纯化

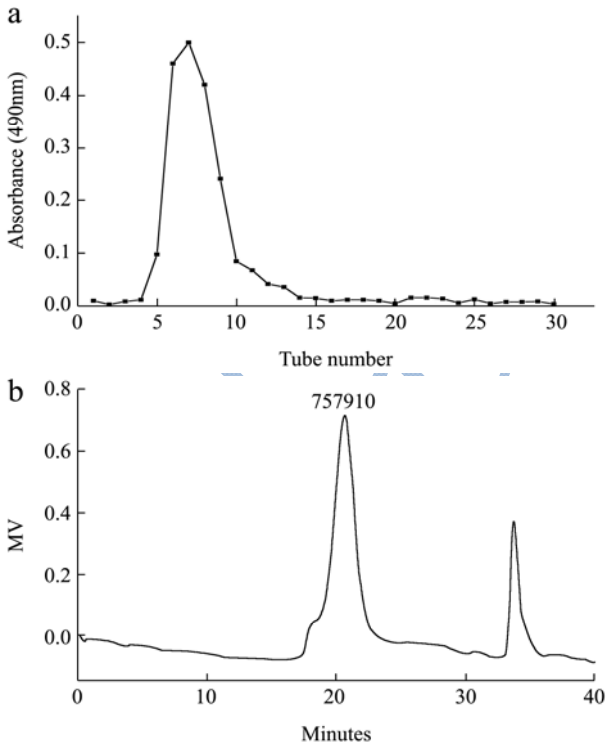


图 4 黑松露多糖 TP1 进一步分离纯化

Fig.4 Further purification of TP1 by (a) Sephadex G-100 gel chromatography and (b) HPGPC

注：a，TP1 凝胶（Sephadex G-100）层析洗脱图；b，TP1-1 的 HPGPC 色谱图。

黑松露多糖 TP1 经葡聚糖凝胶 Sephadex G-100 进一步分离纯化后，得到单一、高而尖的吸收峰（图 4a），收集吸收峰对应的收集管内多糖，经浓缩、透析、冷冻干燥后得到高纯度的黑松露多糖 TP1-1 干品，测得 TP1-1 多糖含量为 91.51%。通过 Breeze GPC 软件计算得出 TP1-1 数均分子量为 757910 u，如图 4b 所示，该分子量的黑松露多糖之前未见报道。

2.4 黑松露多糖 TP1-1 的单糖组成分析

将三氟乙酸（TFA）水解后的黑松露多糖 TP1-1 采用 PMP 对糖进行衍生化，使其带共轭基团，在紫外区能有吸收峰，以同样的方式衍生化单糖标准品并将其作为对照，然后通过液相色谱分析 TP1-1 的单糖组成。本实验测定了混合单糖标准品衍生物在 HPLC 上的出峰时间，再进行样品衍生物的测定，收集液相色谱图以作对比。根据各单糖标准品的保留时间不同（如表 1），单糖衍生物出峰顺序如图 5a 所示。将黑松露多糖 TP1-1 经水解和衍生化后进液相色谱得到的

图 5b 与 5a 相比可知。黑松露多糖 TP1-1 主要有葡萄糖和甘露糖组成，比例分别为 88.94%及 1.19%。说明 TP1-1 的单糖组成以葡萄糖含量较高，另有少量甘露糖。

表 1 各单糖标准品的出峰时间

Table 1 Retention time of each monosaccharide standard

出峰顺序	单糖名称	出峰时间/min
1	甘露糖	26.03
2	核糖	34.01
3	鼠李糖	34.87
4	葡萄糖醛酸	41.50
5	半乳糖醛酸	47.27
6	葡萄糖	54.72
7	半乳糖	62.69
8	木糖	66.61
9	阿拉伯糖	68.69
10	岩藻糖	78.07

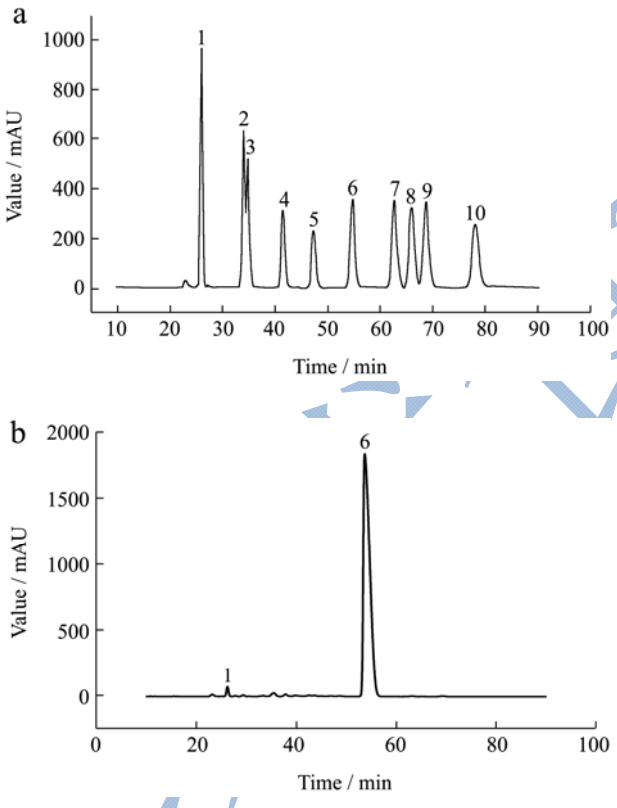


图 5 黑松露多糖 TP1-1 单糖组成分析

Fig.5 (a) Liquid chromatogram of standard monosaccharides; (b) liquid chromatogram of TP1-1

注：a，单糖标准品的液相色谱图；b，TP1-1 的液相色谱图。

2.5 黑松露多糖 TP1-1 的光谱特征研究

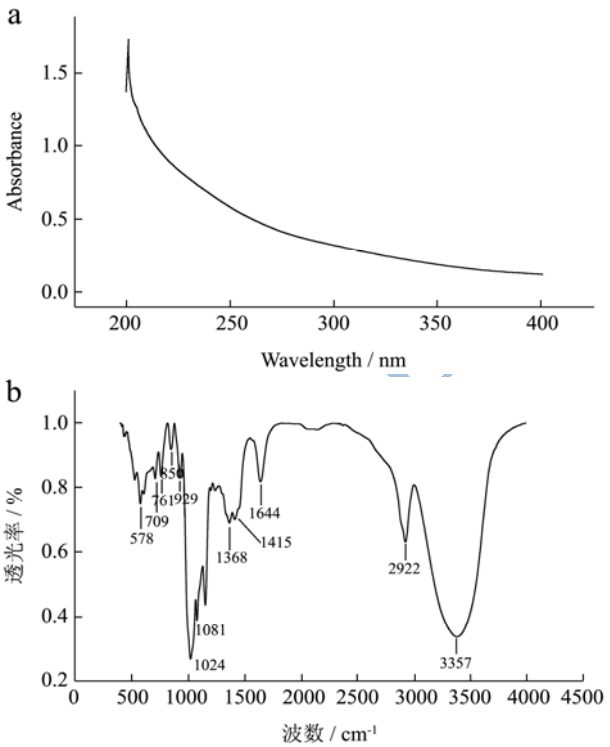


图 6 黑松露多糖 TP1-1 的光谱特征研究

Fig.6 (a) UV spectrum of TP1-1; (b) infrared spectrum of TP1-1

注：a，TP1-1 的紫外光谱图；b，TP1-1 的红外光谱图。

黑松露多糖 TP1-1 样品紫外扫描结果及红外吸收光谱分别如图 6a 及 b 所示。由图可知，TP1-1 样品在 260 nm 及 280 nm 处波长的紫外扫描结果未见吸收峰，说明经粗多糖除蛋白后所得样品较纯，不含蛋白质。由图 6b 的红外光谱图可知，TP1-1 在 3357 cm^{-1}（吸收波长范围为 3600~3200 cm^{-1}）处有吸收峰，这是糖类中 H-O 键的伸缩振动，峰形宽而钝，可推测是羟基在分子间发生缔合而不是游离的羟基；在 2922 cm^{-1}（吸收波长范围为 3000~2800 cm^{-1}）处有吸收峰是 C-H 键的伸缩振动产生，且在 1368 cm^{-1}（吸收波长范围为 1400~1200 cm^{-1}）处有吸收峰是由-CH2-基团和 C-H 伸缩振动和变角振动引起，综合以上三组峰可初步判断该物质为糖类化合物；在 1644 cm^{-1}（吸收波长范围为 1665~1625 cm^{-1}）处有吸收峰是-CHO 的 C=O 键的伸缩振动引起，该吸收峰为肽键上酰胺羰基的吸收峰，表明 TP1-1 是一种含有氨基的糖类聚合物；在 1081 cm^{-1} 和 1024 cm^{-1} 两处的吸收峰（吸收波长范围为 1200~1000 cm^{-1}）是属于吡喃环的伸缩振动，因此 TP1-1 具有吡喃环的结构；TP1-1 在 929 cm^{-1} 处的吸收峰是吡喃糖环的醚键（C-O-C）的非对称伸缩振动引起；TP1-1 在 850 cm^{-1} 处的吸收峰表明其糖苷键为 α-型吡喃糖苷键；在 1750~1700 cm^{-1} 之间无吸收峰，表明该多糖不含糖醛酸。761 cm^{-1} 和 709 cm^{-1} 处有吸收

峰表明含有甘露糖，这与单糖组成分析的结果相互印证。

3 结论

本实验以黑松露干片为原料，通过热水浸提法获得的黑松露多糖，经离子交换层析分离纯化后得到 TP1 和 TP2 组分，其中 TP1 组分的抗炎效果优于 TP2 组分。TP1 经葡聚糖凝胶层析柱进一步纯化后得到 TP1-1 组分纯度较高（多糖含量为 91.51%），其数均分子量为 757910 u，主要由 D-葡萄糖（88.94%）和 D-甘露糖（1.19%）组成，且 TP1-1 的光谱学特征分析，其纯度较高，具有吡喃环的结构，含有甘露糖。该结论可为黑松露多糖的产业化应用提供重要信息。

参考文献

[1] Poma A, T Limongi, G Pacioni. Current state and perspectives of truffle genetics and sustainable biotechnology [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2006, 72(3): 437-441

[2] 李博,孙丽华.中国块菌研究现状[J].阴山学刊:自然科学版,2015,4:49-52
LI Bo, SUN Li-hua. Chinese of research status of truffle [J]. Yinshan: Natural Science Edition, 2015, 4: 49-52

[3] 陈应龙,弓明钦.块菌资源多样性及其地理分布[J].中国食用菌,2000,19(5):6-7
CHEN Ying-long, GONG Ming-qin. Truffles (*Tuber* spp.): biodiversity and geological distribution [J]. Chinese Edible Fungi, 2000, 19(5): 6-7

[4] Angelini P, B Tirillini, A Properzi, et al. Identification and bioactivity of the growth inhibitors in *Tuber* spp. methanolic extracts [J]. Plant Biosystems, 2014, 2: 21

[5] 金城,张树政.糖生物学与糖工程的兴起与前景[J].中国生物工程杂志,1995,15(3):12-17
JIN Cheng, ZHANG Shu-zheng. The rise and prospect of sugar biology and sugar engineering [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 1995, 15(3): 12-17

[6] 吴祖云,姜豇,刘祝英.植物多糖应用研究进展[J].湖南饲料,2016,2:44-46
WU Zu-yun, JIANG Jiang, LIU Zhu-ying. Research progress in application of plant polysaccharides [J]. Hunan Feed, 2016, 2: 44-46

[7] 岳金玫.攀枝花块菌多糖的提取、纯化及抗氧化活性研究[D].雅安:四川农业大学,2012
YUE Jin-mei. Extraction, purification and antioxidant activities of polysacchardies from Panzhihua *Truffles* [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2012

[8] 张世奇.会东块菌多糖的纯化及其分子量测定[J].食品与发酵科技,2010,46(6):97-100
ZHANG Shi-qi. Purification and molecular weight determination of Huidong *Turffles* polysaccharide [J]. Food and Fermentation Technology, 2010, 46(6): 97-100

[9] 张婷,吴晖,赖富饶,等.紫芝菌丝体多糖提取工艺的优化[J].安徽农业科学,2016,44(29):63-76
ZHANG Ting, WU Hui, LAI Fu-rao, et al. Extraction process of polysaccharide of *Ganoderma sinense* mycelia [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(29): 63-76

[10] 向莹.滑子菇多糖结构和生物活性的研究[D].广州:华南理工大学,2013
XIANG Ying. Study on nameko polysaccharide structure and biological activity [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013

[11] Kim H, B S Kwak, H D Hong, et al. Structural features of immunostimulatory polysaccharide purified from pectinase hydrolysate of barley leaf [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 87: 308-316

[12] Wei W, L Feng, W R Bao, et al. Structure characterization and immunomodulating effects of polysaccharides isolated from dendrobium officinale [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2016, 64(4): 881-889

[13] Dai Y C, CAO Y, Zhou L W, et al. Notes on the nomenclature of the most widely cultivated *Ganoderma* species in China [J]. Mycosystema, 2013, 32(6): 947-952

[14] Guo F C, Kwakkel R P, Williams B A, et al. Coccidiosis immunization: effects of mushroom and herb polysaccharides on immune responses of chickens infected with Eimeria tenella [J]. Avian Diseases, 2005, 49(1): 70-73