

龙须菜非琼胶多糖初级结构及细胞免疫调节活性的研究

史晨杉¹, 孙桂清², 武瑞霞¹, 龚正斯¹, 王向红¹

(1. 河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071001) (2. 河北省海洋与水产科学研究院, 河北秦皇岛 063000)

摘要: 龙须菜是生产琼胶的重要原料, 而其中的非琼胶部分常常被忽略。本文以龙须菜为原料, 提取其中的非琼胶多糖, 并对其结构及体外生物活性进行初探。采用常规工艺提取得到非琼胶多糖 GCP, 柱前衍生高效液相色谱法分析 GCP 主要由半乳糖组成, 高碘酸氧化及 Smith 降解表明单糖基由 1→3 及 1→4 位糖苷键链接, I₂-KI 试验及刚果红试验表明 GCP 中存在较多的分支和较长的侧链, 空间构型表现为单股螺旋或自由卷曲状。利用 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱对其进行进一步分离纯化, 得到分子量为 1.05×10⁴U 的组分 GCP-2, 通过脾细胞增殖试验及脾细胞损伤试验探讨 GCP 及 GCP-2 的细胞免疫调节活性, 结果表明在试验浓度范围内 GCP 活性略高于 GCP-2, GCP 对脾细胞的最大增值率为 7.45%, 脾细胞损伤最大保护率为 51.50%。本研究表明龙须菜非琼胶多糖具有较好的细胞免疫调节活性和较高的细胞损伤保护作用, 可作为新型药物及保健品研发的重要原料。

关键词: 龙须菜; 多糖; 结构; 生物活性; 脾淋巴细胞

文章编号: 1673-9078(2016)07-12-17

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.003

Primary Structural Characterization and Cell Immunomodulatory Activity of a Non-agar Polysaccharide Obtained from *Gracilaria Lemaneiformis*

SHI Chen-shan¹, SUN Gui-qing², WU Rui-xia¹, GONG Zheng-si¹, WANG Xiang-hong¹

(1. Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 070001, China)

(2. Hebei Ocean and Fisheries Science Research Institute, Qinhuangdao 066000, China)

Abstract: *Gracilaria lemaneiformis* is an important source of agar, but its non-agar part is often ignored. A non-agar polysaccharide fraction was isolated from *Gracilaria lemaneiformis*, and its primary structure and *in vitro* biological activity were preliminarily explored. The non-agar polysaccharide fraction was isolated through the conventional process and was named GCP. The results of pre-column derivatization and high performance liquid chromatography (HPLC) suggested that GCP was composed of galactose. Periodate oxidation and Smith degradation showed that the monosaccharide group was linked by 1→3 and 1→4 glycosidic bonds. I₂-KI test and a Congo red test showed that GCP had a large number of branches and long side chains, and the spatial configuration was a single helix or a coil in its free form. A main component, GCP-2 with a molecular weight of 1.05 × 10⁴ U, was obtained after further purification using DEAE Sepharose Fast Flow (DEAE FF) column chromatography. Splenocyte damage and splenocyte proliferation assays were used to analyze the cell immunomodulatory activities of GCP and GCP-2. GCP showed a slightly higher activity than GCP-2 in the test concentration range. The highest splenocyte proliferation rate and the greatest protection rate for damaged splenocytes by GCP were 7.45% and 51.50%, respectively. This study shows that non-agar polysaccharides have good cellular immunomodulatory activity and a strong cell protective effect. In addition, they could be used as raw materials for production of new drugs and health products.

Key words: *Gracilaria lemaneiformis*; polysaccharides; structure; bioactivity; splenocyte

龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*), 红藻门, 杉藻木, 江蓐科, 江蓐属植物, 是重要的海洋经济藻类, 主要分布在山东、广东等沿海区域, 含有丰富的碳水

收稿日期: 2015-09-07

基金项目: 国家科技支撑课题 (2011BAD13B06)

作者简介: 史晨杉 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与安全

通讯作者: 王向红 (1973-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与安全

化合物。由于海藻的生存环境比较特殊, 常含有一些具有特殊结构多糖, 研究发现海藻中的多糖类化合物具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等多种生物活性^[1], 具备较高的开发利用价值。

龙须菜藻体较硬并且腥味较浓, 因此人们很少直接食用, 多用于生产琼胶^[2]。以龙须菜为原料生产琼胶时, 从中分离出的非琼胶组分通常作为废料丢弃而

未得到充分的利用。有研究表明江蓠非琼胶多糖溶解性较高往往表现较高的生理活性。在琼胶的常规生产中,碱处理能有效提高琼胶凝胶强度,但同时也可能脱除多糖的硫酸基团致使其生理活性降低^[4,5,10],此外,有研究表明多糖结构与生物活性相关,比如在水溶液中呈现三股螺旋状态的多糖生物活性高于单股螺旋,多糖中的 1→3 位糖苷键是表现高生物活性的键型^[5]。目前有关龙须菜非琼胶多糖 (*Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide, 简称 GCP) 的相关报道,其结构和活性如何还有待进一步研究。

本文以龙须菜为原料,利用碱提醇沉法得到非琼胶多糖,采用 β -消除反应、刚果红试验、高碘酸氧化及 Smith 降解等对其结构表征进行探究,通过 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析得到纯化级份,并采用脾淋巴细胞增殖试验及脾淋巴细胞损伤试验对非琼胶多糖的细胞免疫调节活性进行了研究,旨在为龙须菜的深加工和综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

样品:龙须菜采于河北省秦皇岛市。

单糖标准品:葡萄糖 (Glu)、半乳糖 (Gal)、鼠李糖 (Rha)、阿拉伯糖 (Ara)、甘露糖 (Man)、半乳糖醛酸 (Gal-Aic), 购于上海源叶公司; 衍生试剂: 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP), 纯度 99% 购于阿拉丁公司; DEAE-Sepharose Fast Flow, 购于 Biotopped 公司, 柱规格: 16 mm×30 cm; 葡聚糖标准物 ($M_w=4.32\times 10^3$ 、 1.26×10^4 、 6.06×10^4 、 1.1×10^5 、 2.89×10^5 、 6.7×10^5), 纯度 99%, 购于中国计量科学研究院; RPMI-1640 培养基、ConA, 购于索莱宝公司; 无支原体新生牛血清, 购于杭州四季青公司; MTT (四甲基偶氮唑盐), 购于上海源叶公司; 色谱纯乙腈, 购于 Honeywell 公司。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪 (Agilent 1200 型), 安捷伦科技有限公司; 色谱柱: Thermo C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 美国热电分析仪器有限公司; CO₂ 培养箱 (MCO-18AC), 日本 SANYO 三洋有限公司; 高效气相色谱仪 (Agilent 7890B 型), 安捷伦科技有限公司。

1.3 实验动物

昆明种小鼠 (合格证号: 1410087), 购自河北医

科大学实验动物中心。

1.4 试验方法

1.4.1 提取与纯化

提取方法在史晨杉^[6]等的方法的基础上进行改进: 龙须菜清洗, 经冻干后粉碎; 称取龙须菜样品, 按照常规琼胶提取工艺, 以 1:20 (g:mL) 的比例加入 6% 的 NaOH, 90 °C 水浴 120 min, 用水洗至中性, 以 1:100 (g:mL) 的比例加入蒸馏水, 90 °C 浸提 3 h, 将提取液过滤, 加入 3 倍体积无水乙醇, 醇沉过夜, 蒸馏水溶解沉淀后转移至 -30 °C 冷冻 24 h, 4 °C 解冻。解冻后的提取液采用 10000 r/min 的离心力, 4 °C 离心 30 min 进行分离, 上层溶液 *savage* 除蛋白, 透析 (4 °C, 48 h), 真空冷冻干燥后即 GCP。

取 40 mg 粗多糖, 溶于 6 mL 去离子水中, 过 0.45 μ m 滤膜, 上 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析柱, 先用过膜去离子水洗脱, 苯酚硫酸法测基本无多糖洗脱出, 再用 1 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱, 洗脱速度均为 2 mL/min, 6 mL/管。苯酚硫酸法检测糖含量, 以洗脱管数为横坐标, 以吸光值为纵坐标, 绘制出洗脱曲线。根据洗脱曲线分别收集各洗脱峰, 经浓缩、透析 (4 °C、48 h)、冷冻干燥得纯化多糖样品 (GCP-1, GCP-2)。

高效凝胶渗透色谱法分析其纯度及分子量, 色谱条件: 采用示差折光检测器, 色谱柱: Shodex SB-804 (7.8 mm×300 mm, 柱温 40 °C); 流动相: 0.2 M Na₂SO₄。

1.4.2 粗多糖 GCP 结构表征

1.4.2.1 单糖组成

根据王向红等的方法^[7,8], 采用柱前衍生高效液相色谱法分析单糖组成, 粗多糖经水解、衍生后进行色谱分析。色谱条件: 采用 Agilent 1200 色谱系统, 单元泵, 紫外检测器, 色谱柱: Thermo C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.7)-乙腈 (体积比为 80:20); 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 250 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μ L

1.4.2.2 糖肽键链接方式

采用 β 消除反应分析糖肽键链接方式。称取 5 mg 多糖样品, 溶于 5 mL 浓度为 0.2 mol/L NaOH 溶液中, 45 °C 水浴 3 h, 紫外光谱扫描 (200~400 nm), 对照以蒸馏水代替 NaOH 溶液。

1.4.2.3 相邻单糖基链接方式

采用高碘酸氧化、Smith 降解及高效气相色谱法对糖肽键链接方式进行分析^[9]。

高碘酸氧化: 多糖样品 25 mg, 用少量水溶解, 转移至 50 mL 棕色容量瓶, 加入 25 mL NaIO₄ (30

mmol/L) 溶液, 蒸馏水定容使 NaIO_4 最终浓度为 15 mmol/L, 室温暗处反应, 间隔时间(0、6、12、24、36、48、60……h)取样 0.1 mL, 用蒸馏水稀释 250 倍, 以蒸馏水作空白对照, 在 223 nm 处测吸光值, 直到 NaIO_4 浓度恒定为止。加乙二醇终止高碘酸氧化反应。取 2 mL 氧化液, 加 1 滴酚酞作指示剂, 用 0.01 mol/L NaOH(用邻苯二氢钾标定)滴定, 计算得甲酸生成量。

Smith 降解: 高碘酸氧化产物透析 48 h, 浓缩至 10 mL, 加入硼氢化钠 50 mg, 暗处震荡过夜; 用 50% 冰醋酸中和至 pH 6~7 分解未反应硼氢化钠, 透析 48h, 冻干。

Smith 降解产物水解、乙酰化后进行 GC 分析, 色谱柱: DB-1701; 进样量: 2 μL ; 升温程序: 190 $^{\circ}\text{C}$ (2min) \rightarrow 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 230 $^{\circ}\text{C}$ (2 min) \rightarrow 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 240 $^{\circ}\text{C}$ (2min); 检测器温度: 290 $^{\circ}\text{C}$; 汽化室温度: 260 $^{\circ}\text{C}$; 柱温 190 $^{\circ}\text{C}$; 不分流。

1.4.2.4 I_2 -KI 试验

取龙须菜粗多糖 2 mg 溶于 2 mL 的蒸馏水, 加入 1.2 mL 碘试剂(含 0.02% I_2 的 0.2% KI 溶液), 混匀之后用紫外光谱在 300~700 nm 进行扫描^[9]。

1.4.2.5 刚果红试验

取 0.5 mg/mL GCP 溶液 2 mL, 加入 2 mL 80 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的刚果红试剂, 逐次加入 1 mol/L 的 NaOH, 使体系终浓度依次为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L, 静置 10 min 后测得各 NaOH 浓度条件下的最大吸收波长。以 NaOH 浓度为横坐标, 最大吸收波长为纵坐标作图。

1.4.3 非琼胶多糖的免疫调节活性

1.4.3.1 多糖对脾淋巴细胞增殖的影响

按照文献 6 的方法分析多糖对脾淋巴细胞增殖的影响。将 8-10 周龄的小鼠眼球放血, 脱颈致死, 置 75% 酒精内浸泡 5 min, 转移至超净台内, 无菌取小鼠脾脏, 用 hanks 液清洗, 转入 200 目钢网及干净的培养皿研磨。把培养皿中悬液移到离心管中, hanks 液清洗三次, 离心后静置 3 min。加入 1 mL 含 10% 无支原体新生牛血清 RPMI 1640 培养液重悬。从上述细胞悬液取出 0.1 mL 于一次性小离心管中, 加入一滴台盼蓝染液, 染色 1 min 后, 血球计数板计数, 将细胞悬液浓度调整为 2×10^5 /mL。每份细胞悬液分 8 孔加入 96 孔培养板中, 每孔 40 μL , 实验组与对照组均加入 8 μL ConA, 空白对照加入 40 μL 不含牛血清的 1640, 实验组每份细胞悬液加入 40 μL 不同梯度多糖液(50、100、200、400、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。最后用 RPMI 1640 培养液调整总体积为 160 μL 。细胞培养板置于 CO_2 培养箱培养 48 h。MTT 法测活细胞数, 加入噻唑蓝(MTT)

培养 4 h 后加入溶解剂(14% SDS+50% DMF pH=4.7) 80 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜, 震荡 5 min 后 570 nm 测吸光值。

$$\text{增值率}(\%) = (\text{A}_{\text{多糖组}} - \text{A}_{\text{对照组}}) / \text{A}_{\text{对照组}} \times 100$$

1.4.3.2 多糖对 H_2O_2 引起的脾淋巴细胞损伤的影响

按照 1.4.3.1 的方法制备脾细胞悬液, 调至 2×10^5 个/mL 后, 将细胞悬液加入 96 孔培养板中, 设双氧水损伤组(终浓度为: 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、多糖(浓度为 40、20、10、5、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)5 个剂量组和空白对照组, 每组至少设 3 个复孔。分别加入 H_2O_2 、不同浓度的多糖和培养液, 培养 2 h 后, 用 MTT 比色法测定 96 孔板细胞的 OD 值。用 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Vc 作为阳性对照。根据公式计算多糖对由 H_2O_2 引起的脾细胞损伤的保护率。

损伤组: 40 μL 细胞悬液+40 μL H_2O_2 +80 μL 完全 1640

空白组: 40 μL 细胞悬液+40 μL PBS+80 μL 完全 1640

多糖组: 40 μL 细胞悬液+40 μL H_2O_2 +40 μL 糖水+40 μL 完全 1640

$$\text{保护率}(\%) = (\text{A}_{\text{多糖组}} - \text{A}_{\text{损伤组}}) / (\text{A}_{\text{空白组}} - \text{A}_{\text{损伤组}}) \times 100$$

1.4.4 数据统计分析

利用 Excel 软件对试验数据进行分析, 结果采用平均值 \pm 正负偏差形式表示, 试验重复三次。

2 结果与讨论

2.1 离子交换层析

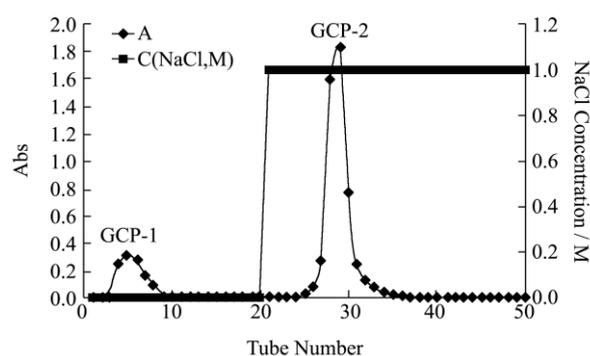


图 1 粗多糖 GCP 的洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of GCP on cellulose DEAE-FF Column

苯酚硫酸法测得 GCP 提取率为 0.21%, 称重琼胶提取率为 1.52%。采用 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱洗脱粗多糖, 洗脱曲线如图 1 所示。由图 1 可知, GCP 可分离出两个组分, 分别为: GCP-1, 由水洗脱, 是中性多糖, 在粗多糖中所占比例为 4%; GCP-2, 由盐洗脱, 是酸性多糖, 在粗多糖中所占比例为 46.67%。HPGPC 分析结果如图 2 所示 GCP-1 和

GCP-2 为均一组分, 分子量分别为 5501 U、 1.05×10^4 U。其中 GCP-1 得率较小, 不适宜大量制备。

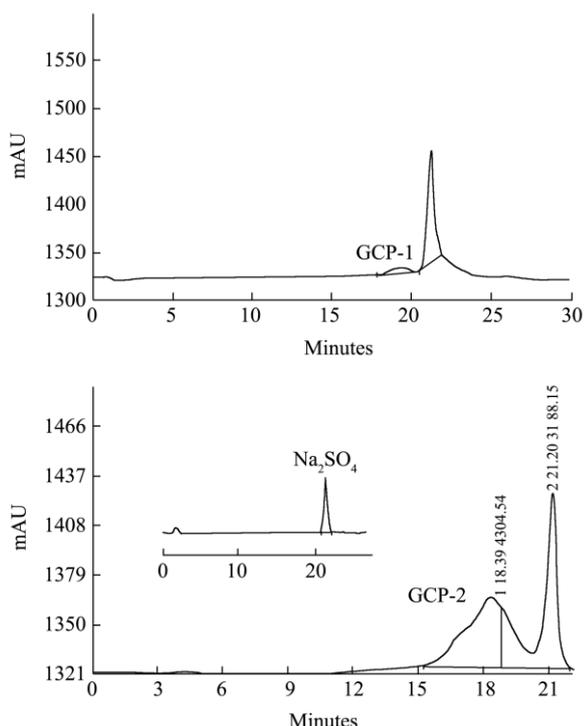


图2 GCP-1 及 GCP-2 分子量分布

Fig.2 Molecular weight distribution of GCP-1 and GCP-2

2.2 GCP 结构表征

2.2.1 一级结构的分析

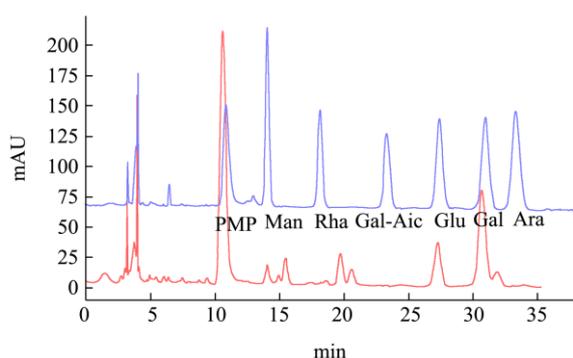


图3 HPLC 分析 GPC 单糖组成

Fig.3 Analysis of monosaccharide composition of GCP using HPLC

单糖组成分析结果如图 3。由图可知, 非琼胶多糖主要由半乳糖组成, 且含少量葡萄糖及甘露糖, 甘露糖、葡萄糖、半乳糖的摩尔浓度比为 0.07:1:2.75, 与 Fan Y L 等研究结果类似^[11]。而琼胶是半乳糖的多聚物, 因此可认为本实验提取的非琼胶多糖即为溶解度较大的小分子琼胶。

碱性 β 消除反应是分析糖蛋白中糖与氨基酸的链接键型是否为 O-糖苷键。当受温和碱处理时, 与糖肽

键相连的丝氨酸(ser)和苏氨酸(Thr)变为 α -氨基丙烯酸和 α -氨基丁烯酸, 表现为 240 nm 处吸光值增加。由图 4 可知 GCP 在 240 nm 处吸光值未增加, 证明不含 O-糖苷键; 推测是在前期提取中的碱处理过程已将 O-糖苷键打断, 在碱性 β 消除反应中不存在可以被打断的 O-糖苷键。

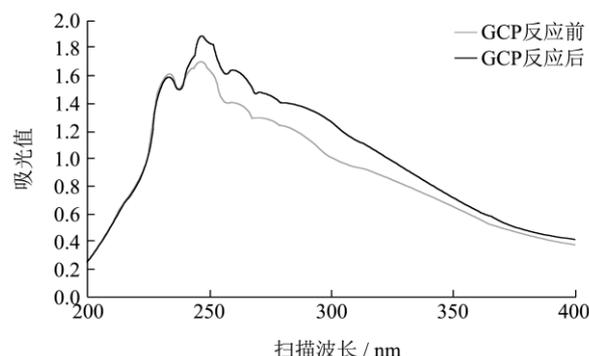


图4 β 消除反应: GCP 与碱反应前后波长扫描

Fig.4 β -elimination reaction: changes in the maximum absorption of GCP before and after reaction with a hydroxide solution

高碘酸氧化是判断单糖基连接方式的重要试验, 高碘酸可以选择性地断裂糖分子中连二羟基或连三羟基处, 生成相应的多糖醛或甲酸。连二羟基 C-C 键断裂后产生相应醛, 连三羟基 C-C 键断裂后产生甲酸及相应醛, 反应定量进行。根据高碘酸消耗量及甲酸生成量判断糖苷键的位置。试验中 GCP 在反应 72 h 达到平衡, 消耗 NaIO_4 0.10 mmol, NaOH 滴定生成甲酸 0.028 mmol, 产生甲酸说明 GCP 含有 1→及 1→6 糖苷键, 而 NaIO_4 消耗量大于 2 倍的甲酸生成量, 说明含有不产生甲酸但消耗 NaIO_4 的 1→2 及 1→4 位糖苷键, 另外, 由于高碘酸消耗量及甲酸生成量均比其他多糖少, 因此 GCP 可能含有大量不消耗 NaIO_4 的 1→3 位糖苷键。

将高碘酸氧化产物进行 Smith 降解在 GCP 中检测到了甘油、赤藓醇及 Gal, 说明 Gal 中存在 1→3 位糖苷键, 检测出的赤藓醇表明 GCP 含有 1→4 位糖苷键。因此, GCP 中的单糖基主要由 1→3 及 1→4 位糖苷键链接^[8,12], 而研究表明琼胶是由 1→3 连接的 β -D-吡喃半乳糖与 1→4 连接的 3, 6-内醚- α -L-吡喃半乳糖重复交替连接的, 因此本研究中的非琼胶多糖与琼胶有类似的结构。

2.2.2 溶液行为

根据多糖样品与碘试剂反应后在 565 nm 处是否有吸收峰判断多糖分子的侧链及分支情况。有吸收峰表明多糖含有较少的分支和较短的侧链, 无吸收峰则反之。由图 5 可知, 多糖在 565 nm 处没有吸收峰, 证明 GCP 有较多的分支及较长的侧链。

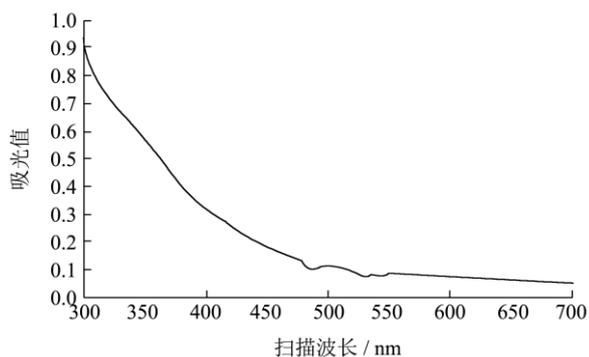


图5 I₂-KI 试验: GCP 在 300~700nm 的扫描图

Fig.5 I₂-KI test: the UV spectrum of GCP in the range of 300~700 nm

刚果红是一种酸性染料, 它可与具有三股螺旋构象的多糖形成络合物, 从而导致最大吸收波长发生红移, 然而, 一定浓度 NaOH 的存在会破坏维持三股螺旋构象的氢键, 表现为最大吸收波长减小^[13]。由图 6 可知, GCP 在 NaOH 浓度为 0-0.5 mol/L 时未发生波长红移, 因此不具有螺旋结构, 在水溶液中呈现的状态是单股螺旋。

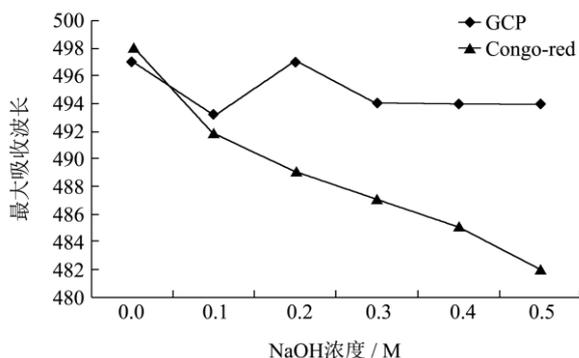


图6 刚果红与 GCP 溶液在不同碱液浓度下的最大吸收

Fig.6 Changes in the maximum absorption of the Congo red-GCP complex at various concentrations of sodium hydroxide solution

2.3 GCP 及 GCP-2 生物活性分析

2.3.1 对脾细胞增殖的影响

脾脏淋巴细胞中包含了 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞, ConA 作为 T 淋巴细胞有丝分裂原, 促进 T 淋巴细胞的增殖^[14]。淋巴细胞增殖和分化是机体免疫应答过程的一个重要阶段。因此, 检测淋巴细胞增殖水平是细胞免疫研究和临床免疫功能检测的一种常用方法。如图 7 所示, 多糖 GCP 及 GCP-2 对 T 淋巴细胞的增殖均有促进作用, 且在试验浓度范围内有剂效关系, GCP 在浓度为 400 μg/mL 时达到最大增值率 7.45%, 而 GCP-2 在浓度 800 μg/mL 时达到最大增值率 4.72%。

2.3.2 对 H₂O₂ 引起的脾淋巴细胞损伤的影响

羟基自由基被认为是最活跃的氧自由基之一, 它可以很容易地穿过细胞膜, 容易与大多数生物分子反应, 导致组织损伤或细胞死亡, 清除羟基自由基作用的强弱是反映多糖活性的重要指标。本研究将 H₂O₂ 损伤模型与多糖清除自由基活性结合, 可直接反应多糖在机体的生物活性。图 8 表明多糖对由双氧水引起的脾细胞损伤有显著保护作用。低浓度时 (<20 μg/mL) 粗多糖保护作用明显, 高浓度时纯化后的酸性多糖保护作用高于粗多糖, 粗多糖最大保护率依次为 GCP: 51.50%, GCP-2: 40.58%, 而 2.5 μg/mL Vc 的保护率为 42.02%, 略低于粗多糖 GCP, 但随浓度升高其对脾细胞的保护率均高于粗多糖。因此, 本试验提取的非琼胶多糖是良好的自由基清除剂, 可有效保护自由基存在下的细胞, 避免细胞死亡及组织损伤。

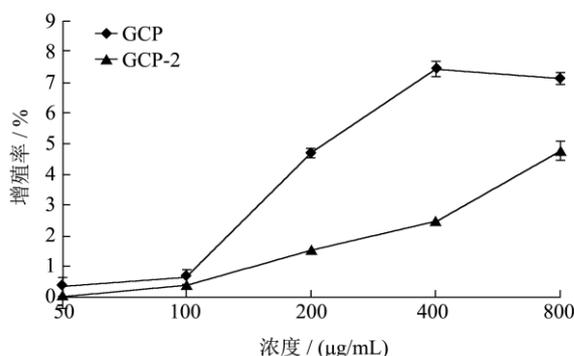


图7 多糖对脾细胞增殖的促进作用

Fig.7 Effect of different concentrations of the samples on promotion of splenocyte proliferation

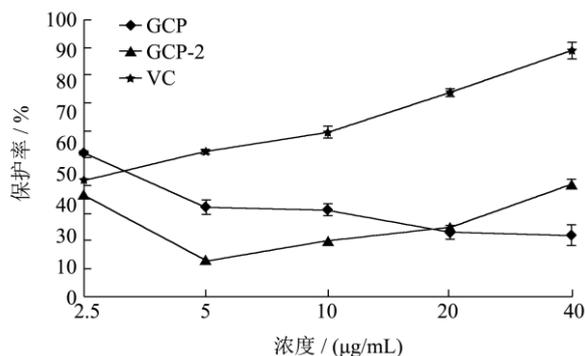


图8 多糖对脾细胞损伤的保护作用

Fig.8 Protective effect of different concentrations of the samples on damaged splenocytes

3 结论

3.1 本试验采用常规工艺提取得到龙须菜非琼胶多糖, 提取率为 0.21%, 约为琼胶提取率的 1/7, 是不可忽视多糖组分。主要由半乳糖、葡萄糖以 1→3 及 1→4 位糖苷键链接而成, 不含 O-糖苷键, 有较多的分支及较长的侧链, 在水中表现为单股螺旋或自由卷曲状。

3.2 GCP经DEAE-Sephrose Fast Flow分离纯化后得到GCP-1及GCP-2两组分,分子量分别为5501 U及 1.05×10^4 U。对GCP及GCP-2进行体外生物活性分析,试验浓度范围内粗多糖活性高于纯化后,其中GCP对脾细胞的最大增值率为7.45%,脾细胞损伤最大保护率为51.50%。

3.3 综上所述,本研究中经过碱处理得到的非琼胶多糖GCP具有多糖表现高生物活性的1→3位糖苷键,可通过促进脾淋巴细胞增殖从而提高机体免疫力,清除羟基自由基保护细胞免受伤害,因此碱处理并不能完全降低多糖的生物活性,非琼胶多糖仍然具有医药及保健品的潜在开发价值。

参考文献

- [1] 朱振元,刘荣强,周芳,李盛峰,原静. 黄芪多糖的分离纯化和抗肿瘤活性研究[J].现代食品科技,2011,4:376-379
ZHU Zhen-yuan, LIU Rong-qiang, ZHOU Fang, et al. Extraction and purification of *Astragalus* polysaccharide and its anti-tumor activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 4: 376-379
- [2] 余杰,王欣,陈美珍,等.潮汕沿海龙须菜的营养成分和多糖组成分析[J].食品科学,2006,27(1):93-97
YU Jie, WANG Xin, CHEN Mei-zhen, et al. Analysis on nutritional components and polysaccharide composition of *Gracilaria lemaneiformis* from Chaoshan coast [J]. Food Science, 2006, 27(1): 93-97
- [3] Mazumder S, Ghosal PK, Pujol CA, et al. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilariacorticata* (*Gracilariaceae*, *Rhodophyta*) [J]. Int. J. Biol. Macromol., 2002, 29: 872-95
- [4] Meena R, Prasad K, Ganeshan M, et al. Superior quality agar from *Gracilaria* species (*Gracilariales*, *Rhodophyta*) collected from gulf of Mannar, India [J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20: 397-402
- [5] Wu Y, Li W, Cui W, et al. A molecular modeling approach to understand conformation-functionality relationships of galactomannans with different mannose/galactose ratios [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 26: 359-364
- [6] 史晨杉,孙桂清,张亚卓,等.碱处理对龙须菜非琼胶多糖的提取及体外免疫活性的影响[J].食品科技,2015,3:196-199
SHI Chen-shan, SUN Gui-qing, ZHANG Ya-zhuo, et al. Effects of alkali treatment on the extraction of *Gracilaria lemaneiformis* non-agar polysaccharide and *in vitro* immune activity [J]. Food Science, 2015, 3: 196-199
- [7] 王向红,吉爽爽,生庆海,等.柱前衍生高效液相色谱法检测8种枣水溶性多糖的单糖组成[J].中国食品学报,2014,9:257-262
WANG Xiang-hong, JI Shuang-shuang, SHENG Qing-hai, et al. Determination of monosaccharide components of eight varieties jujube water soluble polysaccharide by pre-column derivatization HPLC method [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 9: 257-262
- [8] Palaniappan S, Meivelu M, Sadhasivam S, et al. Structural characterization and bioactivities of sulfated polysaccharide from *Monostroma oxyspermum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules 2015,72: 1459-1465
- [9] 陈健,向莹.滑子菇多糖的结构分析[J].现代食品科技,2013,7:1544-1550
CHEN Jian, XIANG Ying. Structural analysis of polysaccharides from *Pholiota nameko* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 7: 1544-1550
- [10] Chirapart A, Katou Y, Ukeda H, et al. Physical and chemical properties of agar from a new member of Gracilariaceae, *G. lemaneiformis* (*Gracilariales*, *Rhodophyta*) in Japan [J]. Fisheries Science, 1996, 61(3): 450-454
- [11] Fan Y L, Wang W H, Song W, et al. Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Carbohydrate Polymers 2012, 88: 1313-1318
- [12] 梅光明,郝强,张小军,等.酸提香菇多糖的分离纯化及结构鉴定[J].现代食品科技,2014,9:79-84
MEI Guang-ming, HAO Qiang, ZHANG Xiao-jun, et al. Purification and structural analysis of a polysaccharide from *Lentinusedodes* extracted using an acid solution [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 9: 79-84
- [13] Rout D, Mondal S, Chakraborty I, et al. The structure and conformation of a water-insoluble (1→3), (1→6)-β-D-glucan from the fruiting bodies of *Pleurotus florida* [J]. Carbohydrate Research, 2008, 343: 982-987
- [14] 雷庆林,林志彬.灵芝多糖对老年小鼠脾细胞DNA多聚酶α活性及免疫功能的影响[J].药学学报,1993,28(8):577-582
LEI Qing-lin, LIN Zhi-bin. Effect of ganoderma polysaccharides on the activity of DNA polymerase α of splenocytes and immune function in aged mice [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1993, 28(8): 577-582