

超声-高温热水提取香菇多糖及其产物特性研究

游丽君, 邹林武, 梁彦豪, 赵谋明

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文采用超声-高温热水提取香菇多糖(第一步采用超声温度62 °C, 时间50 min, 功率640 W, 第二步高温热水提取温度120 °C, 时间40 min), 得率达到了15.57±0.83%, 是传统水提法(11.22%)的1.39倍, 大大提高了香菇多糖的得率。与第一步提取多糖相比, 第二步提取的多糖纯度较高(为91.98%), 蛋白含量较少, 分子量测定为单一峰(分子量为3.7×10⁵ Da), 粘度较小。在刚果红实验中两种多糖都发生了红移现象, 而且第一步提取多糖比第二步提取的多糖红移效果更显著, 表明超声提取多糖的三螺旋结构更加完整。通过扫描电子显微镜进行观察, 进一步验证了刚果红实验结果。红外光谱检测表明两种多糖的官能团组成无显著性差异。

关键词: 香菇; 多糖; 超声; 提取; 化学结构

文章编号: 1673-9078(2013)9-2167-2172

Characteristics of Lentinan Polysaccharide Extracted by Ultrasonic Wave and Hot Water

YOU Li-jun, ZOU Lin-wu, LIANG Yan-hao, ZHAO Mou-ming

(College of Light Industry and Food, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The extraction of lentinan polysaccharides by Ultrasonic wave used in the first step(62 °C, 50 min, 640 W) and hot water used in the second step (120 °C, 40 min) was investigated. The extraction yield reached 15.57±0.83%, being 1.39 times of that of the poly saccharides prepared by traditional water extraction. After the first extraction step, the polysaccharides was further extracted by high-temperature water, giving higher purity of 91.98%, a smaller molecular weight of 3.7×10⁵ Da and viscosity of 1.07 pa·s. A red shift phenomenon was observed when conducting Congo red experiments. The polysaccharides extracted in the first step showed an evident red shift, indicating that the polysaccharides extracted by ultrasound had complete triple helix structure, which were further confirmed by a scanning electron microscope. Infrared spectra showed that the chemical structural of the two polysaccharides had no significant difference.

Key words: Lentinan; polysaccharide; ultrasonic wave; extraction; chemical structural

香菇又名香蕈、厚菇, 是一种重要的食药两用栽培真菌, 具有较高的药用价值和良好的保健功能, 其主要成分为香菇多糖。香菇多糖(lentinan, 简称LNT)以葡萄糖为主, 含少量的甘露糖、岩藻糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖等; 肽链由天冬氨酸、组氨酸、丝氨酸、赖氨酸、谷氨酸等18种氨基酸组成。香菇多糖具有抗病毒、抗肿瘤活性, 并能减轻放疗和化疗的毒副作用。传统香菇多糖的提取方法有稀酸浸提法、稀碱浸提法和水提醇沉法, 后来又发展了酶解提取、超声波提取、微波提取等提取方法。其中水提醇沉法因工艺简单, 易于推广等优点被广泛应用于工业生产。但水提醇沉法的得率较低^[1], 所得残渣中仍然含有大量

收稿日期: 2013-04-11

基金项目: 国家自然科学基金(31101222)

作者简介: 游丽君(1982-), 女, 博士, 硕导, 研究方向食品生物技术

通讯作者: 赵谋明(1964-), 男, 博士, 教授, 博导, 研究方向食品生物技术

的香菇多糖未被充分提取出来, 造成了极大的浪费。为了提高香菇多糖的得率, 大量的学者对香菇多糖的提取工艺进行研究。王恒等^[2]采用超声波辅助提取法提取香菇多糖, 香菇多糖的得率为6.72%。王琚等^[3]探讨了超声波辅助法在香菇柄多糖提取中的应用, 与传统提取法相比, 得率提高14%。华洵璐等^[4]将酶法和超声波辅助法联合提取香菇多糖, 比单纯使用酶法或超声法有较大提高。虽然采用两种提取方法联合提取香菇多糖, 所得产物的得率比传统水提法高, 但香菇多糖并未提取完全, 还可对废弃的残渣进行多次提取, 使原料香菇得到充分利用, 香菇多糖的得率进一步提高。因此本文利用高温热水提取法对超声提取后的残渣进行二次提取, 进一步提高香菇的利用率, 同时比较超声提取和高温热水提取两个步骤所得的香菇多糖的化学组成与结构。本文首次比较两步法提取香菇多糖的性质差异, 旨在为生物活性多糖的高效制备提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

干香菇由无限极公司提供、浓硫酸、苯酚、葡萄糖、刚果红、氯仿、正丁醇等购于广州精科试剂有限公司,均为分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

高速冷冻离心机(GL-21M),长沙湘仪离心机有限公司;RE-52AA旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器有限公司;DFE-500摇摆式高速中药粉碎机,温岭市林大机械有限公司;Unico UV-2000型紫外可见分光光度计,尤尼科仪器有限公司;微型漩涡混合仪,上海沪西分析仪器有限公司;KQ-800KDE型高功率超声波清洗器,昆山市超声波仪器有限公司;GT7C2A立式杀菌锅,温州市安福防腐机械厂;Digital Viscometer DV-I粘度计,美国Brookfield公司;TM3000扫描电子显微镜,日本株式会社日立高新技术那河事业所;NICOLET-6700型红外光谱仪,美国NICOLET公司。

1.3 实验方法

1.3.1 香菇多糖的提取

(1)传统水提法:称取已过40目筛的香菇粉末100 g,按照料液比为1:25(m/V)加入去离子水,在微沸的条件下回流浸提2 h后,抽滤,滤饼再回流提取1 h,将滤液合并,减压浓缩至1/3左右;再加入4倍体积的95%乙醇进行醇沉,置于4℃冰箱中。静置12 h后离心(6000 r/min, 15 min),弃去上清液,用水复溶醇沉多糖得香菇多糖溶液。

(2)单独超声法:称取已过40目筛的香菇粉末100 g,按照料液比为1:25(m/V)加入去离子水,在62℃的下超声提取50 min,超声功率为640 W,抽滤,将滤液减压浓缩至1/3左右;再加入4倍体积的95%乙醇进行醇沉,置于4℃冰箱中。静置12 h后离心(6000 r/min, 15 min),弃去上清液,用水复溶醇沉多糖得香菇多糖溶液。

(3)微波法提取:称取已过40目筛的香菇粉末100 g,按照料液比为1:25(m/V)加入去离子水,在功率240 W下微波处理1 h后,抽滤,将滤液减压浓缩至1/3左右;再加入4倍体积的95%乙醇进行醇沉,置于4℃冰箱中。静置12 h后离心(6000 r/min, 15 min),弃去上清液,用水复溶醇沉多糖得香菇多糖溶液。

(4)高温提取:称取已过40目筛的香菇粉末100

g,按照料液比为1:25(m/V)加入去离子水,在120℃下高温提取40 min,将滤液减压浓缩至1/3左右;再加入4倍体积的95%乙醇进行醇沉,置于4℃冰箱中。静置12 h后离心(6000 r/min, 15 min),弃去上清液,用水复溶醇沉多糖得香菇多糖溶液。

(5)超声-高温提取:称取已过40目筛的香菇粉末100 g(m₁),按照料液比为1:25(m/V)加入去离子水,第一步按照已优化的最优条件(超声时间50 min,超声温度62℃,超声功率640 W)进行超声提取香菇多糖,抽滤,将滤液减压浓缩至1/3左右,再加入4倍体积的95%乙醇进行醇沉,离心,得超声提取多糖;第二步将滤饼置于烘箱中烘干,粉碎,称量得残渣88 g(m₂),高温热水提取(提取温度120℃,提取时间40 min),抽滤、浓缩、醇沉、离心、复溶后得到高温热水提取多糖;多糖溶液Sevage法除蛋白,透析浓缩,冷冻干燥得多糖粉末。

1.3.2 多糖化学组成的测定

采用苯酚-硫酸法测定总糖的含量^[5],用凯氏定氮法测定多糖中蛋白的含量^[6]。

总得率计算公式为:

$$Y/\%=(m_1 \times y_1 + m_2 \times y_2) \times 100\% / m_1$$

注:y₁为第一步超声提取多糖的得率,y₂为第二部高温热水提取多糖的得率。

1.3.3 刚果红实验

取2 mg的样品,加入2 mL不同浓度的NaOH溶液(0~0.5 M),再加入刚果红溶液(80 μmol/L)2 mL,混匀,常温保持1 h,然后在400~700 nm波长下扫描,测定最大吸收波长,以刚果红溶液作为对照,NaOH溶液浓度为横坐标,最大吸收波长为纵坐标作图。

1.3.4 分子形态观测

将冻干后的多糖样品粉末和提取后的残渣粉末用扫描电子显微镜观察分子形态。取少许样品粉末,直接粘在有双面胶的样品台上,用吸耳球轻轻吹去未吸附的颗粒,在离子溅射仪中进行真空喷镀,置于TM3000型扫描电子显微镜下观察。

1.3.5 分子量测定

将多糖溶液稀释成2.0 mg/mL的溶液,12000 r/min条件下离心15 min,上清液过0.45 μm的膜,采用高压排阻色谱法(GPC)测定分子量。GPC色谱条件:进样20 μL,流动相为0.02 mol/L磷酸二氢钾溶液,流速为0.6 mL/min, Waters 2410示差折光检测器检测。

1.3.6 粘度的测定

配置浓度为1 mg/mL的多糖溶液200 mL,用粘度测定仪测试其表观粘度。测定的条件为剪切速率100 s⁻¹,温度为25℃,每分钟检测一次。

1.3.7 单糖组成分析

称取多糖样品 5 mg, 加入 4 mol/L TFA 4 mL, 在 120 °C 下水解 2 h。水解液减压旋干, 再加入甲醇 2 mL 减压旋干, 重复 2 次。加入 10 mg 盐酸羟胺, 内标肌醇 1 mg, 1 mL 吡啶, 在 90 °C 下水浴 30 min; 然后加入 1 mL 醋酸酐, 在 90 °C 下水浴 30 min。加入 2 mL 水终止反应, 用二氯甲烷萃取 2 次, 定容 2 mL, 加入适量的 Na₂SO₄ 除去水分, 过 0.22 μm 的有机膜, 得到衍生化样品。

气相色谱检测程序: TR-5MS 30 m×0.25 mm×0.25 μm 规格弹性毛细管柱; 程序升温: 初始柱温 100 °C, 保持 2 min, 然后以 5 °C/min 升至 280 °C, 保持 5 min; 进样体积 1 μL, 进样口温度 250 °C; 载气量(He)流量 1 ml/min; 分流比 10:1; 质谱条件传输线温度 280 °C; 离子源温度 250 °C; 电子能量 70 eV; 质量扫描范围 m/z: 30~650 amu。

各种标准单糖(鼠李糖、阿拉伯糖、岩藻糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖)在相同条件下进行糖腈乙酸酯衍生化处理, 相同条件气相色谱分析。

根据色谱图中色谱峰出峰时间和质荷比确定样品单糖组成, 根据峰面积确定各个单糖的摩尔比。

1.3.8 红外光谱检测

准确称取样品 1.5 mg, 与适量干燥 KBr 粉末混合后置于玛瑙研钵中, 红外灯下研磨至极细, 压片后测定红外光谱, 扫描范围 4000~400 cm⁻¹。

2 结果与讨论

2.1 多糖化学组成的确定

对超声和高温热水提取的多糖进行化学组成分析, 分别测定两个步骤中多糖的得率、粗多糖的纯度和多糖中的蛋白含量。从表 1 中可知, 超声提取和高温提取都达到了较高的得率, 通过计算多糖的总得率为 15.57±0.83%。与之前的研究相比(单独的超声提取、热水回流提取、高温热水提取的得率分别为 8.33±0.93%、11.22±0.56%、14.2±0.94%), 如图 1 所示, 超声-高温提取能够较大程度地提取香菇多糖。与传统水提法(提取时间为 3 h)相比, 超声高温热水提取缩短了一半的提取时间, 整个提取过程只需要 90min, 极大地提高了提取香菇多糖的效率。

从糖纯度和蛋白含量的测定结果来看, 如表 1 中所示, 第一步超声提取多糖纯度较低, 蛋白含量高达 6.68%, 而第二步高温热水提取的多糖纯度达到了 91.98%, 蛋白含量仅有 1.09%, 这表明第二步高温提取可对多糖进行初步纯化, 使杂质与多糖分离。造成

这种结果的原因可能是先采用超声提取, 大部分可溶性物质先随热水溶出, 而且 Cheung 等^[7]研究发现较高的提取温度会使得糖类含量增多, 蛋白含量减少, 这与本实验的结果一致。

表 1 多糖的得率、纯度和蛋白含量

Table 1 Extraction yield, purity and protein contents of polysaccharides			
提取方式	多糖得率/%	糖纯度/%	蛋白含量/%
第一步(超声提取)	7.98±0.95	67.25±2.67	6.68±0.48
第二步(高温热水提取)	8.62±0.88	91.98±3.49	1.09±0.38
总得率	15.57±0.83		

注: 所有的数据都是以平均值±标准差 (n=3) 形式表示。

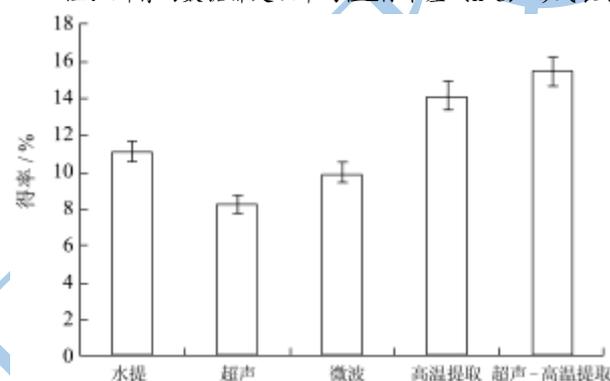


图1 不同提取方法所得多糖的得率

Fig.1 The extraction yield of polysaccharide prepared by different extraction methods

2.2 刚果红实验

刚果红是一种酸性染料, 能溶于水和酒精, 它与具有三股螺旋链构象的多糖形成络合物, 络合物的最大吸收波长同刚果红相比发生红移^[8], 在一定浓度范围内, 表现为最大吸收波长的特征变化, 当 NaOH 浓度大于某一数值后, 最大吸收波长急剧下降。由图 2 可以看到, 超声和高温热水提取的多糖与刚果红形成的络合物同刚果红相比发生了红移, 在 NaOH 浓度为 0.0 mol/L 到 0.2 mol/L 时, 第二步高温热水提取多糖的紫外吸收移向长波; 在 NaOH 浓度为 0.0 mol/L 到 0.4 mol/L 时, 第一步超声提取多糖紫外吸收也移向长波, 表明提取的多糖能与刚果红形成络合物, 具有规则的三螺旋构象; 当 NaOH 浓度继续增大到 0.4 mol/L 后, 最大吸收波长开始下降, 说明多糖螺旋结构开始解体, 变成无规则的线团形式, 不能再与刚果红形成络合物。Zhang 等^[9]通过激光光散射等光学实验发现多糖在 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液中由有序三螺旋结构变为无序的单股结构。Sletmoen 等^[10]研究发现多糖在水中以高度有序的单螺旋或三螺旋结构存在是由于分子间的作用力的结果, 如分子间和分子内的

氢键。高浓度的 NaOH 溶液会破坏分子间的氢键，导致有序的二螺旋结构解体为无规则的单股线团，不能与刚果红形成络合物。

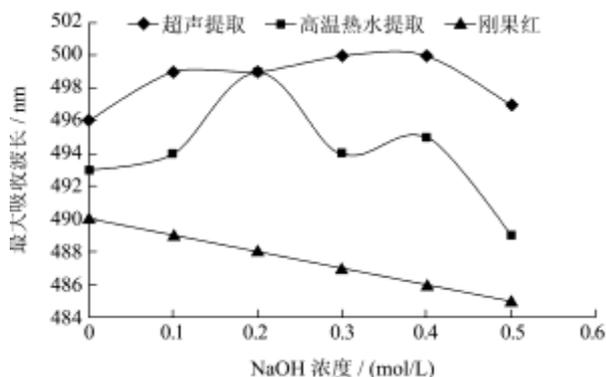


图2 最大吸收波长随 NaOH 浓度的变化

Fig.2 Change of the maximum absorption with the concentration of NaOH

超声提取比高温提取的多糖红移效果更显著可能是由于高温破坏了一些有序的二螺旋结构。Wang 等^[11]研究发现在 130~140 °C 高温下，香菇多糖的二螺旋结构会变为无规则的单股线性结构。高温热水提取的温度达到 120 °C，使得一些多糖降解并发生构象的变化，因此红移现象没有超声提取多糖那么明显和稳定。

2.3 多糖分子形态

为了证实多糖具有二螺旋的构象并比较超声和高温热水提取对香菇子实体作用的效果，采用扫描电子显微镜对提取后的香菇多糖和提取后的残渣的多糖分子形态进行观察。图 3 是各个样品在扫描电子显微镜下的表现形态，从图中可以看到，未经处理的香菇粉末的分子形态（图 3A）呈完整的块状；超声提取后，香菇的组织形态开始破裂，出现很多褶皱（图 3B）；高温热水提取后，香菇的组织被完全破坏，变为细碎的小块状，可以清晰的看到像海绵一样（图 3C）。这说明高温热水提取比超声提取对香菇组织的作用更加强烈，能够使得大分子多糖也随热水一起溶出，提高了传质的效率，可以更大程度地提取香菇多糖，所以超声高温热水提取能够较大程度的提高香菇多糖的得率。

超声提取多糖的表现形态呈一个个的球状颗粒，并聚集成簇（图 3D）；高温热水提取多糖呈片状，还具有一些球状颗粒，从图中可以清晰的看到球状颗粒之间相互连接成片（图 3E）。Huang 等^[12]通过光学仪器计算多糖的构象参数，结果表明提取的多糖为球形构象，并用原子力显微镜观察分子形态，验证了多糖的球形构象。通过多糖的粘度的测定发现球形构象是由于多糖支链间的分子内和分子间的氢键的作用限制

了分子的延伸，从而聚集成球状。多糖的二螺旋结构就是由于分子内的氢键的作用结果^[13]，所以球形构象的多糖为二螺旋结构。从图中可以看到超声提取多糖具有稳定的二螺旋结构，高温热水提取多糖只具有部分二螺旋结构，因为高温对分子内和分子间的氢键具有一定的破坏作用^[11]。这个结果与刚果红实验中超声提取多糖的红移大于高温提取多糖的结果相一致。研究表明，具有二螺旋结构的香菇多糖表现出较高的生物活性^[14]，因此超声提取多糖具有更高的抗氧化活性。

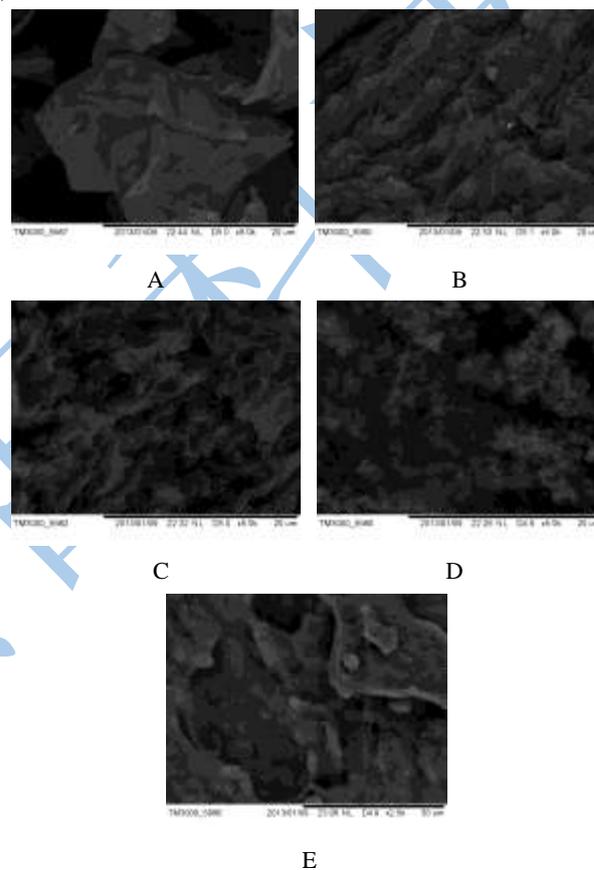


图3 多糖和提取后的残渣的扫描电子显微镜图谱

Fig.3 SEM images of the polysaccharides and residue

注：A：香菇多糖原料；B：超声提取后的残渣；C：高温提取后的残渣；D：超声提取多糖；E：高温热水提取多糖。

2.4 分子量测定

从图中可以看到，超声提取多糖出现了两个峰值，峰 1 的保留时间为 21.433 min，峰 2 的保留时间为 29.086 min，它们的分子量分别为 6.3×10^5 Da 和 13772 Da，所占百分比为 44.26% 和 56.74%，因此超声提取多糖具有不同的分子量片段，小分子多糖所占比例较大，这说明超声会打断多糖链。高温热水提取多糖只出现了一个单一峰，分子量为 3.7×10^5 Da，即高温热水提取多糖是一个均一组分。研究表明，香菇

多糖的分子量在 $2 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ Da 时表现出各种生物活性^[15], 超声提取和高温提取的多糖的分子量都在这个区间, 这表明两种多糖都具有较好的生物活性, 具有很好的应用价值。

2.5 粘度的测定

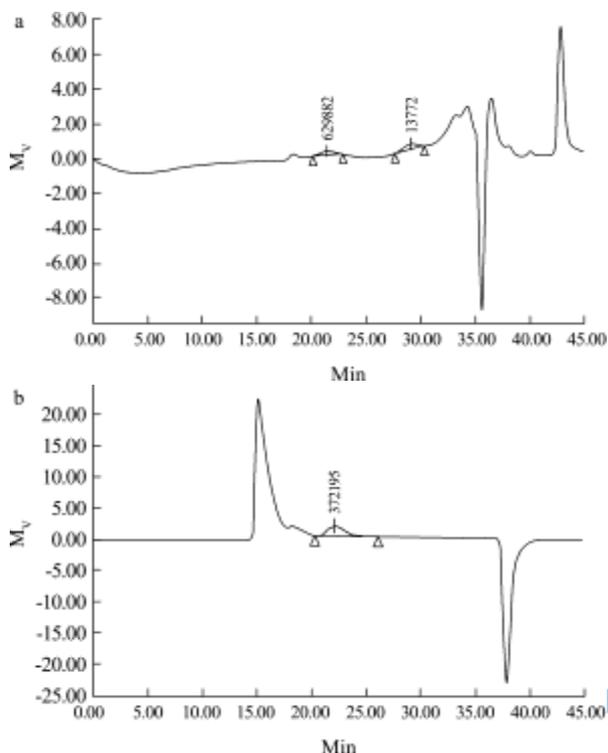


图 4 GPC 检测多糖平均分子量图谱

Fig.4 Images of polysaccharide average molecular weight by GPC

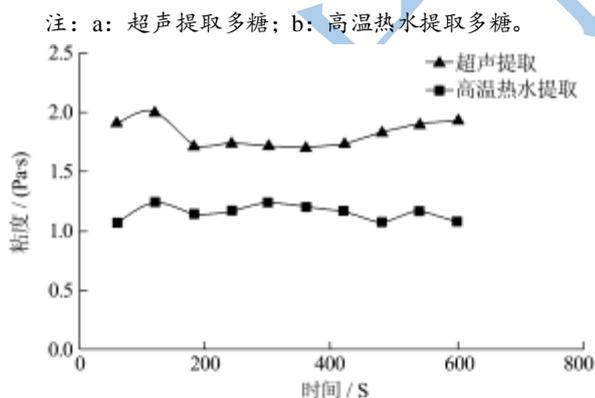


图 5 超声与高温热水提取多糖溶液的粘度的比较

Fig.5 The viscosity of polysaccharide prepared by ultrasound and ultra-temperature extraction

通过粘度测定仪测定多糖溶液的表现粘度, 如图 5 中所示, 超声提取多糖的粘度大于高温热水提取。粘度的变化与分子量的变化具有高度的相关性^[14]。从扫描电子显微镜观测图可知, 超声提取多糖刚性的三螺旋结构较完整, 而高温热水提取只有少部分的三螺旋结构, 大部分呈自由伸展的片状。三螺旋结构受到分子内和分子间的氢键的束缚, 聚集呈球形。当三螺旋结构变为单螺旋结构后, 多糖链是自由伸展的, 其溶液的粘度较小。高温热水提取破坏了部分分子间和分子内的氢键, 一些刚性结构遭到破坏, 所以超声提取多糖溶液具有更大的粘度。

2.6 单糖组成分析

表 2 不同提取方法所得香菇多糖的单糖组成

Table 2 Monosaccharide composition of *Lentinan* polysaccharides prepared by different methods

提取方式	摩尔比					
	鼠李糖	阿拉伯糖	岩藻糖	甘露糖	葡萄糖	半乳糖
超声	1	1.2	5.44	30.11	247.11	44.19
高温热水	1	7.99	1.34	2.79	83.98	14.11

超声提取多糖的摩尔比为鼠李糖:阿拉伯糖:岩藻糖:甘露糖:葡萄糖:半乳糖=1:1.2:5.44:30.11:247.11:44.19, 高温热水提取多糖的摩尔比为鼠李糖:阿拉伯糖:岩藻糖:甘露糖:葡萄糖:半乳糖=1:7.99:1.34:2.79:83.98:14.11。从两种多糖中单糖的摩尔比可以看出, 超声提取多糖的葡萄糖相对摩尔比非常高, 但主要成分为甘露糖、半乳糖和葡萄糖, 高温热水提取多糖的主要成分为葡萄糖和半乳糖, 其他单糖的成分较少。谢红旗^[16]测定分离纯化后的香菇多糖的单糖组成, 发现香菇由阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖五种单糖组成, 其中葡萄糖是主要组分。耿安静^[17]用高效液相色谱法测定了纯化后的香菇多糖的单糖组成, 与标准单糖的保留时间相比较, 得知纯化后的香菇多糖主要由 D-葡萄糖和 D-半乳糖组成, 其摩尔比为 1:1.98。本文中的香菇多糖由于还没有进行纯化, 所以含有多种单糖, 但主要成分与其他研究报道相一致。

2.7 红外光谱检测

超声、高温热水提取香菇多糖的红外光谱图谱见图 6。由图 6 可知两种多糖的吸收峰基本一致, 都是在 3415、2928、1644、1411、1043 和 577 cm^{-1} 波长处具有强吸收峰。但超声提取多糖的吸收峰整体较宽, 且峰值更强。糖链的吸收峰在 2800~3400 cm^{-1} 和 1200~1400 cm^{-1} 之间, 蛋白质的吸收峰为 1630 和 1530 cm^{-1} 。从图 6 中可以看到, 提取的香菇多糖在 3415 cm^{-1} 处出现吸收强度大的宽峰, 这是糖分子内和分子间-OH 伸缩振动的结果, 也包括 N-H 伸缩振动, 说明多糖中含有-OH、-NH₂ 或-NH 基团, 并存在分子间的氢键; 在 2928 cm^{-1} 左右的吸收是次甲基 (-CH₂-) 中

的 C-H 键伸缩振动的吸收峰; 在 1644 cm^{-1} 处和 1411 cm^{-1} 处为多糖中的羰基 C=O 的伸缩振动, 很可能是 -COOH。这些都是多糖的特征吸收峰, 红外光谱表明超声、高温热水提取多糖的化学性质没有明显改变, 且两种多糖之间并无明显差别。

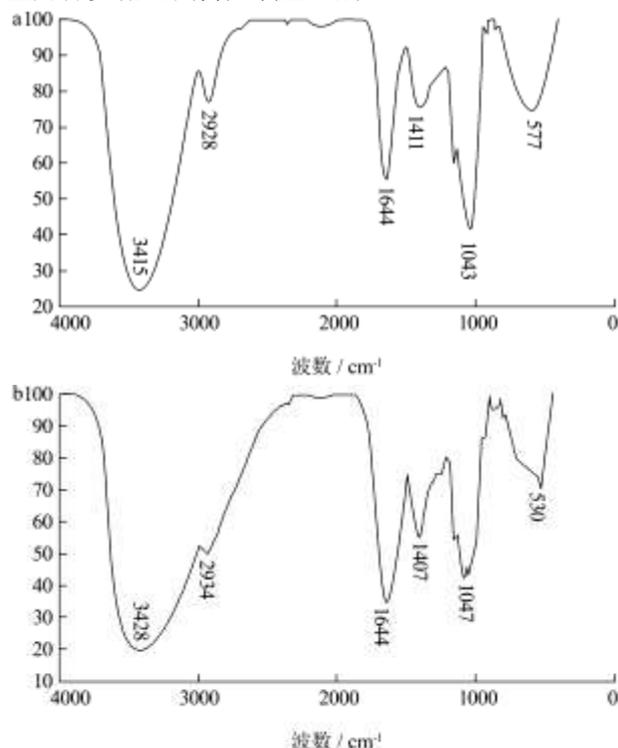


图6 红外光谱图谱

Fig.6 Infrared absorption spectra

注: a: 高温热水提取多糖; b: 超声提取多糖。

3 结论

本文采用超声、高温两步法联合提取香菇多糖, 充分利用超声提取后的香菇残渣, 使得香菇多糖总得率达到了 $15.57\pm 0.884\%$, 是单独超声提取法的 1.87 倍, 传统水提法的 1.48 倍, 大大提高了香菇多糖的得率。整个提取过程只需要 90 min, 比传统水提法的提取时间 (3 h) 缩短 2 倍, 极大地提高了香菇多糖的提取效率。对超声和高温热水提取香菇多糖的两个步骤产物进行化学组成分析, 发现超声提取的多糖纯度较低, 蛋白含量较高, 高温热水提取的多糖纯度很高, 达到了 91.98%, 蛋白含量很少。分子量测试结果表明高温热水提取多糖为均一多糖, 分子量为 $3.7\times 10^5\text{ Da}$, 而超声提取多糖具有两个峰, 分子量较大, 粘度也更大, 与分子量测定结果相吻合。两种多糖进行刚果红实验都发生了红移现象, 但超声提取比高温提取的多糖红移效果更显著, 说明超声提取的多糖的三螺旋结构更

加完整。通过扫描电子显微镜进行观察, 进一步验证了刚果红实验。对两种多糖进行单糖组成分析, 超声提取多糖的摩尔比为鼠李糖: 阿拉伯糖: 岩藻糖: 甘露糖: 葡萄糖: 半乳糖=1:1.2:5.44:30.11:247.11:44.19, 高温热水提取多糖的摩尔比为鼠李糖:阿拉伯糖:岩藻糖:甘露糖:葡萄糖:半乳糖=1: 7.99: 1.34: 2.79: 83.98: 14.11。红外光谱检测表明两种多糖的化学结构无显著性差异。

参考文献

- [1] 魏楨元,钟耀广,刘长江.响应面优化法对香菇多糖提取的工艺研究[J]. 辽宁农业科学,2010,2:11-14
Wei Z Y, Zhong Y G, Liu C J. Optimization of Extraction of Lentinan by Response Surface Methodology [J]. Liaoning Agricultural Sciences, 2010, 2: 11-14
- [2] 王恒,李凤林,马玮曼.超声波辅助法提取香菇多糖工艺优化研究[J].吉林农业,2010,7:40
Wang H, Li F L, Ma W M. Study on extraction of Lentinan by ultrasound-assisted [J]. Jilin agricultural, 2010, 7: 40
- [3] 王琿,陈平,江亮.超声波辅助技术在香菇柄多糖提取中的应用研究[J].2008,27(1):15-17
Wang H, Chen P, Jiang L. Applied Study on the Extraction of Lentinan with Ultrasonic Assistive Technologies [J]. 2008, 27(1): 15-17
- [4] 华洵璐,张一平,匡群.酶法结合超声破壁提取香菇水溶性糖和多糖的研究[J].食用菌,2011,2:54-57
Hua X L, Zhang Y P, Kuang Q. Study on extraction of water-soluble sugars and polysaccharides from Lentinan by ultrasound combined with enzymatic [J]. Edible fungi, 2011, 2: 54-57
- [5] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,1999
Zhang W J. The glycoconjugates biochemical research techniques [M]. Hang Zhou: Zhejiang University Press, 1999
- [6] 赵新淮,冯志彪.蛋白质水解物水解度的测定[J].食品科学, 1994,1(11):65-67
Zhao X H, Feng Z B. Determination of the degree of hydrolysis of the protein hydrolyzate [J]. Food Science, 1994, 1(11):65-67
- [7] Cheung Y C, Siu K C, Liu Y S, et al. Molecular properties and antioxidant activities of polysaccharide-protein complexes from selected mushrooms by ultrasound-assisted extraction [J]. Process Biochemistry, 2012, 47: 892-895
- [8] Ogawa K, Hatano M. Circular dichroism of the complex of a (1-3)-b - D-glucan with Congo Red [J]. Carbohydrate Research, 1978, 67: 527-535
- [9] Zhang L, Zhang X, Zhou Q, et al. Triple helix of b-D-glucan

- from *Lentinus edodes* in 0.5 M NaCl aqueous solution characterized by light scattering [J]. *Polymer Journal*, 2001, 33(4): 317-321
- [10] Sletmoen M, Stokke BT. Higher order structure of (1,3)-beta-D-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities [J]. *Biopolymers*, 2008, 89: 310-321
- [11] Wang X, Xu X, Zhang L, et al. Thermally induced conformation transition of triple-helical lentinan in NaCl aqueous solution [J]. *Journal of Physical Chemistry*, 2008, 112: 10343-10351
- [12] Huang Z P, Hug Y N, Li X B, et al. Molecular mass and chain conformations of *Rhizoma Panacis Japonici* polysaccharides [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 78: 596-601
- [13] Zhang Y Y, Li S, Wang X H, et al. Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25: 196-206
- [14] Zhang L, Li X, Xu X, et al. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan [J]. *Carbohydrate Research*, 2005, 340: 1515-1521
- [15] Zhou L D, Zhang Q H, Zhang Y. The shiitake mushroom-derived immuno-stimulant lentinan protects against murine malaria blood-stage infection by evoking adaptive immune-responses [J]. *International Immunopharmacology*, 2009, 9: 455-462
- [16] 谢红旗. 香菇多糖提取、纯化、结构表征及生物活性的研究[D]. 长沙: 中南大学, 2007
- Xie H Q. Study on extraction, purification, structure and biological activity of lentinan [D]. A Dissertation Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy, 2007
- [17] 耿安静. 香菇多糖的制备、结构特性及生物活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010
- Geng A J. Study on preparation, structural characteristics and bioactivities of Lentinan [D]. A Dissertation Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy, 2010