

# 酸提香菇多糖的分离纯化及结构鉴定

梅光明<sup>1</sup>, 郝强<sup>2</sup>, 张小军<sup>1</sup>, 郭远明<sup>1</sup>, 陈雪昌<sup>1</sup>

(1. 浙江省海洋水产研究所, 浙江舟山 316021) (2. 北京海燕药业有限公司, 北京 102206)

**摘要:** 本文研究了用盐酸水溶液从香菇柄中提取并分离纯化得到一种香菇多糖 SP2, 运用凝胶柱层析和滤纸电泳进行纯度鉴定, 通过高效凝胶渗透色谱法测定分子量及其分布, 利用紫外可见光谱法、气相色谱法、红外光谱法、X-射线衍射法、DSC 热分析、高碘酸氧化法、Smith 降解法和刚果红实验分析香菇多糖 SP2 的结构。分析研究表明 SP2 具有典型的多糖显色反应后的特征吸收峰, 组成相对均一, 相对分子量分布范围较窄, 重均分子量为  $5.203 \times 10^4$  u; 单糖组成为甘露糖、葡萄糖和半乳糖, 其组成摩尔比为 0.32:58.6:2.82; 经高碘酸氧化和 Smith 降解后表明 SP2 中 C-C 单键有 1→2 键、1→3 键和 1→6 键, 且比例为 9.43:5.44:1; SP2 是一种含有吡喃环的糖蛋白缀合物, 不能形成单晶, 为无定型形态, 在分子之间无较强的作用力存在, 且具有螺旋结构。本研究结果为阐明香菇多糖的构效关系提供依据。

**关键词:** 香菇; 多糖; 结构鉴定

文章编号: 1673-9078(2014)9-79-84

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.014

## Purification and Structural Analysis of a Polysaccharide from *Lentinusedodes* Extracted using an Acid Solution

MEI Guang-ming<sup>1</sup>, HAO Qiang<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-jun<sup>1</sup>, GUO Yuan-ming<sup>1</sup>, CHEN Xue-chang<sup>1</sup>

(1. Marine Fishery Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China)

(2. Beijing HaiYan Pharmaceutical CO., Ltd, Beijing 102206, China)

**Abstract:** A new polysaccharide SP2 was isolated from *Lentinusedodes* using an aqueous HCl solution and purified using gel column chromatography, the purity was determined using filter paper electrophoresis. The relative molecular mass and distribution of SP2 were analyzed by high-performance gel permeation chromatography, and the structure was analyzed by UV-Vis spectroscopy, gas chromatography, infrared spectroscopy, X-ray diffraction, and differential scanning calorimetry, as well as periodate oxidation, Smith degradation, and Congo red experiments. The results indicated that SP2 showed a typical absorption peak for polysaccharides after the color reaction and had a relatively homogeneous composition. In addition, the molecular weight distribution range was relatively narrow, with a weight-average molecular weight of  $5.203 \times 10^4$  u. SP2 was found to be composed of mannose, glucose, and galactose with a molar ratio of 0.32:58.6:2.82. Periodate oxidation and Smith degradation experiments indicated that the C-C bonds in the branches of SP2 were composed of (1→2), (1→3), and (1→6) linkages with a molar ratio of 9.43:5.44:1. SP2 was found to be a glycoprotein conjugate containing pyranose rings that was amorphous and could not form the monocry stalline structure. SP2 contained spiral structures and had no strong intermolecular interactions. These results provided evidence to explain the structure-activity relationships of polysaccharides from *L. edodes*.

**Key words:** *Lentinusedodes*; polysaccharides; structural analysis

香菇 (*Lentinan*) 在生物学分类上属于真菌门, 伞菌目, 侧耳科, 香菇属<sup>[1]</sup>。香菇不仅口味鲜美独特, 而且具有较高的药用价值和保健作用, 其中主要成分为香菇多糖, 研究证实香菇多糖具有抗肿瘤、抗氧化和

收稿日期: 2014-04-20

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2012F20026)

作者简介: 梅光明 (1984-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向为食品加工与质量安全控制

通讯作者: 陈雪昌 (1970-), 男, 硕士, 教授级高工, 研究方向为食品加工与质量安全控制

提高人体免疫力等多种生理活性功能<sup>[2-5]</sup>。从 1969 年日本学者 Chihara 首先利用热水浸提法从香菇子实体中分离出一种能抑制肿瘤的  $\beta$ -(1→3) 葡聚糖多糖以来<sup>[6]</sup>, 香菇多糖就引起了各国科学家的研究兴趣, 且目前已经有商品化的产品较好地应用于临床疾病治疗中。目前研究较多的香菇多糖主要采用热水浸提法、碱提取法、超声波或微波辅助热水提取法和酶解辅助提取法<sup>[7-9]</sup>。香菇加工过程中会产生大量的香菇柄, 经常作为废弃物处理掉, 或者被用来进行简单的粗加工制成肉松、调味料等低附加值产品。水浸提提取香菇多糖的得率

较低, 课题组前期通过研究建立了从香菇加工废弃物—香菇柄中用稀盐酸溶液提取香菇多糖的方法, 采用五元二次回归正交旋转组合实验设计和统计学分析对酸提香菇多糖的工艺进行优化<sup>[10]</sup>, 在提高香菇多糖提取效率的同时也为香菇资源的综合利用提供了思路。多糖的组成和结构极其复杂, 与提取溶剂的选择、提取方式和分离纯化条件均有密切的关系, 研究对酸提香菇多糖进行了分离纯化, 分析香菇多糖级分 SP2 组成成分和测定分子量及其分布, 并采用紫外光谱、傅立叶红外光谱、气相色谱、X-射线衍射、DSC 热分析、高碘酸氧化、Smith 降解法和刚果红实验对香菇多糖级分 SP2 进行结构分析, 以期推测其初步的结构, 为阐明香菇多糖的构效关系提供依据, 对农产品资源综合利用和深加工产业具有理论指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与仪器

主要实验材料如下: 香菇柄, 由湖北房县华榕香菇加工厂提供; 葡萄糖、木糖、葡萄糖醛酸、半乳糖、甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖和岩藻糖均为生化试剂, 购于 sigma 公司; 多糖标准品为 Pullulan 系列, 日本东京化成公司产品; 其他试剂均为分析纯或化学纯级别, 购于上海化学试剂厂。

主要实验仪器如下: AL204 分析天平, 上海梅特勒公司; S22 分光光度计, 上海棱光技术有限公司; Agilent 1100 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Agilent 6890 气相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Nexus-870 傅立叶变换红外光谱仪, 美国赛默飞世尔科技公司; D/MAX-RB X-射线衍射仪, 日本日立公司; DCS-204F1 型差示扫描量热仪, 美国耐驰公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 样品前处理

称取烘干粉碎并经 40~60 目筛分后的香菇柄样品 100 g, 经 300 mL 石油醚 (30~60 °C 沸程) 提取 3 h 进行脱脂, 用滤布过滤后, 滤渣用 80% 乙醇 300 mL 再回流提取 2 次, 每次 2 h, 除酚类色素、单糖和低聚糖, 过滤后固体残渣经 70 °C 烘干备用。

#### 1.2.2 香菇多糖的提取

参照文献<sup>[10]</sup>中的方法提取粗香菇多糖。

#### 1.2.3 香菇多糖的纯化和分级

粗提液经鞣酸法脱蛋白<sup>[11]</sup>、双氧水脱色<sup>[12]</sup>后, 经醇沉、离心后纯水复溶。利用不同分子量大小的多糖在乙醇-水溶液中溶解度不同的原理将其进一步分离纯

化。在乙醇-水溶液终浓度分别为 50%、70%、90% 的条件下, 得到三个级分多糖, 分别命名为 SP1、SP2、SP3, 三个级分多糖的得率分别为 25.58%、64.77%、9.64%。

#### 1.2.4 香菇多糖 SP2 的纯度鉴定

##### 1.2.4.1 Sephadex G-100 凝胶柱层析

取冷冻干燥后的 SP2 多糖样品 10 mg, 溶于 1 mL 纯水后过 Sephadex G-100 凝胶色谱柱。蒸馏水洗脱, 流速 10 mL/h, 分部收集洗脱液, 收集 30 管, 每管 3 mL。以苯酚-硫酸法<sup>[13]</sup>检测每管中多糖的含量, 紫外吸收法检测蛋白质<sup>[13]</sup>。以洗脱管数为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制洗脱曲线图。

##### 1.2.4.2 滤纸电泳<sup>[14]</sup>

对香菇多糖进行滤纸电泳分离。取 8 cm×24 cm 滤纸条线形点样, 电压 400 V 电泳 2 h 后取出滤纸条, 置于乙醇中固定, 然后浸入高碘酸-西夫试剂中染色 5 min, 取出用 70% 乙酸冲洗。置于亚硫酸品红溶液中 25~45 min, 然后用亚硫酸盐溶液冲洗 3 次, 最后放入乙醇中脱水, 置玻璃板上风干, 有糖处呈现紫红色带。

#### 1.2.5 香菇多糖 SP2 结构鉴定

##### 1.2.5.1 紫外-可见光分析

香菇多糖 SP<sub>2</sub> 配成 0.1 mg/mL 的水溶液, 在 190~400 nm 进行紫外光扫描; 取 1 mL 0.1 mg/mL 多糖水溶液, 经苯酚-硫酸法显色后, 在 340~700 nm 可见光扫描。

##### 1.2.5.2 红外光谱分析

香菇多糖 SP<sub>2</sub> 经过 KBr 压片, 上红外光谱仪扫描分析, 分辨率为 4 cm<sup>-1</sup>, 累加 32 次, 扫描前扣除空气背景, 扫描范围 4000 cm<sup>-1</sup>~400 cm<sup>-1</sup>。

##### 1.2.5.3 分子量的测定<sup>[15]</sup>

采用凝胶渗透色谱法, Agilent 1100 高效液相色谱仪, PL aquagel-OH MIXED 柱, 检测器为示差折光检测器, 流动相为 0.2 M 醋酸钠-醋酸缓冲溶液 (pH 6.0), 流速为 1 mL/min, 柱温 30 °C, 进样 50 μL, 样品浓度 1.0 mg/mL。

##### 1.2.5.4 单糖组成分析

准确称取香菇多糖 SP<sub>2</sub> 15 mg 置于安培瓶中, 加入 2 mL 2 M 的三氟乙酸, 封管, 120 °C 水解 4 h, 冷却至室温, 50 °C 减压干燥除去三氟乙酸。向水解物中分别加入 10 mg 盐酸羟胺及 1 mL 无水吡啶, 在 90 °C 水浴反应 30 min, 冷却至室温, 加入 1 mL 无水醋酸酐, 在 90 °C 水浴反应 30 min, 冷却后加入 1 mL 水搅拌, 然后用氯仿萃取 3 次, 合并氯仿层、减压抽干后加入 1 mL 氯仿溶解后, 进行气相色谱分析。分别称取各种标准单糖 10 mg, 用无水吡啶溶解并定容至 10 mL。分别吸

取各标准单糖溶液 0.1~1.0 mL, 10 mg 盐酸羟胺, 并用无水吡啶补足 2 mL, 其余操作同上进行衍生化处理后上机分析。

气相色谱检测程序: OV-1701 石英毛细管柱 (30 m×0.32 mm×0.25 μm); 进样体积 1 μL, 分流比为 1:50; 进样口温度 250 °C, 毛细管柱程序升温, 初始柱温 190 °C, 保持 5 min, 然后以 10 °C/min 升至 280 °C, 保持 6 min。

#### 1.2.5.5 X-射线衍射分析<sup>[6]</sup>

采用 X-射线衍射测定香菇多糖的结晶性能, X-射线的条件为: CuKα 辐射, 管压 100 kV, 管流 50 mA, Ni 为过滤器, 入射波长为 0.154 nm, 扫描速度为 15°/min, 发射狭缝 0.3 mm, 扫描步长 0.02°, 扫描角度 (2θ) 范围为 10~70°。

#### 1.2.5.6 DSC 热分析

称取 3-5 mg 多糖, 放置于铝制小坩埚中压紧后, 在流速为 45 mL/min 的氮气气氛下, 空铝为参比, 以 10 °C/min 的升温速率, 从 30~300 °C 范围内扫描。

#### 1.2.5.7 相邻单糖糖基连接方式

高碘酸氧化: 制作高碘酸钠标准曲线, 配制浓度为 15 mM 的高碘酸钠溶液, 用纯水稀释至浓度分别为 0、0.03 mM、0.06 mM、0.09 mM、0.12 mM 和 0.15 mM 的标准系列, 在 223 nm 处测定吸光值, 以高碘酸钠的浓度 (mM) 为横坐标, 以吸光值为纵坐标, 绘制高碘酸钠消耗量的标准曲线。

称取多糖样品 20 mg, 置于 50 mL 棕色容量瓶中, 加入 15 mM 的高碘酸钠溶液 20 mL, 溶解后置于 4 °C 冰箱黑暗处, 并间歇振荡, 间隔时间 (0、6、12、24、48...h) 取样, 用纯水稀释 250 倍后用分光光度法测定 223 nm 处的吸光值, 直至吸光值基本稳定。通过标准曲线计算出平均每摩尔糖基消耗的高碘酸量。向剩余的溶液中加入 2 滴乙二醇终止反应, 放置 20 min, 以酚酞为指示剂, 用 0.01 M NaOH 标准液滴定甲酸的生成量。

Smith 降解反应: 经高碘酸氧化后的多糖溶液, 加入乙二醇 4 mL, 并于室温搅 30 min 终止反应。自来水透析 48 h, 再用蒸馏水透析 24 h。袋内液体在 45 °C 下减压浓缩后加入 30 mg NaBH<sub>4</sub>, 搅拌均匀后室温暗处放置 24 h 以还原多糖醛。滴加 0.1 M 的醋酸溶液调 pH 至 5.0, 以自来水流水透析 48 h、蒸馏水透析 24 h 后冷冻干燥得到多糖醇产物。将多糖醇产物置于安培瓶中, 按照 1.2.5.4 的方法进行水解、衍生化处理后用气相色谱仪测定单糖。

#### 1.2.5.8 刚果红试验

取 0.5 g/L 的香菇多糖 SP<sub>2</sub> 水溶液 2 mL 与 2 mL 50

μM 的刚果红溶液混合, 逐渐加入 1 M NaOH 溶液, 使 NaOH 最终浓度为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 M, 室温下放置 10 min, 在 400~600 nm 范围内扫描, 将 NaOH 溶液浓度为横坐标, 以最大吸收波长为纵坐标作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 香菇多糖级分的纯度鉴定

香菇多糖级分 SP1 和 SP2 经 Sephadex G-100 柱层析后, 蒸馏水洗脱曲线见图 1, SP1 的蛋白质洗脱曲线和多糖洗脱曲线出现双重峰, SP2 的蛋白质洗脱曲线和多糖洗脱曲线只有一个单一对称峰。对香菇多糖 SP2 进行滤纸电泳后, 发现 SP2 呈现单一色带, 以上结果表明香菇多糖级分 SP2 组成相对均一。

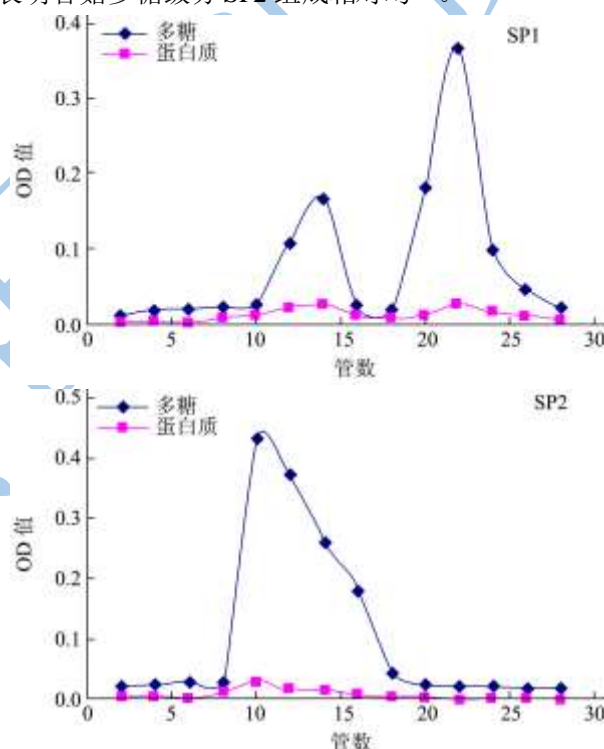


图 1 SP1、SP2 凝胶柱层析图

Fig.1 Elution patterns of SP1/SP2 with gel chromatography

### 2.2 香菇多糖 SP2 结构鉴定

#### 2.2.1 紫外-可见光谱分析

由图 2 (a) 可知, 香菇多糖 SP2 的紫外扫描图在 260~280 nm 下无明显的蛋白质特征吸收峰, 这可能是蛋白质含量较低的缘故; 由图 2 (b) 可知, 香菇多糖 SP2 的水溶液经苯酚-硫酸法显色后, 在 490 nm 附近有明显的吸收, 这是多糖显色反应后的特征吸收峰。

#### 2.2.2 红外光谱分析

图 3 为香菇多糖 SP2 经 KBr 压片后测定的红外光谱图: 3400 cm<sup>-1</sup> 左右是形成氢键缔合的-OH 伸缩振动

吸收峰,说明存在分子间的氢键;3000~2800 cm<sup>-1</sup>的一组峰是糖类 C-H 伸缩振动吸收峰;1400~1200 cm<sup>-1</sup>的一些峰是糖类 C-H 变角振动吸收峰,因此可以判断该化合物是糖类化合物<sup>[7]</sup>。1630.84 cm<sup>-1</sup>是酰胺的羰基(C=O)的伸缩振动,1611.87 cm<sup>-1</sup>是 N-H 的变角振动,进一步证明该糖是一种糖蛋白缀合物;1043.51 cm<sup>-1</sup>是伯羟基的吸收峰;914.29 处的吸收峰是 β-型 C-H 变角振动特征吸收峰,表明该糖是吡喃型多糖<sup>[8]</sup>。

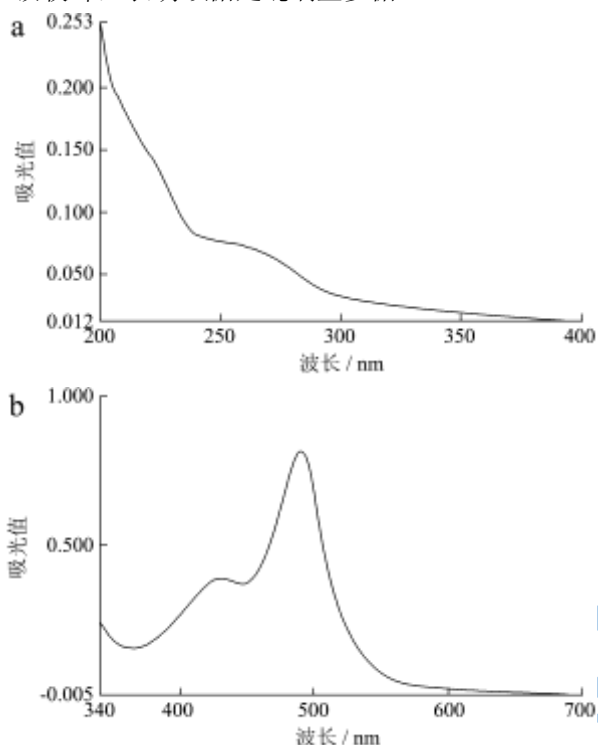


图2 香菇多糖 SP2 的紫外-可见扫描图

Fig.2 UV-Vis scanning spectrophotometry of SP2

注: a: 紫外扫描图, b: 苯酚-硫酸法显色可见光扫描图。

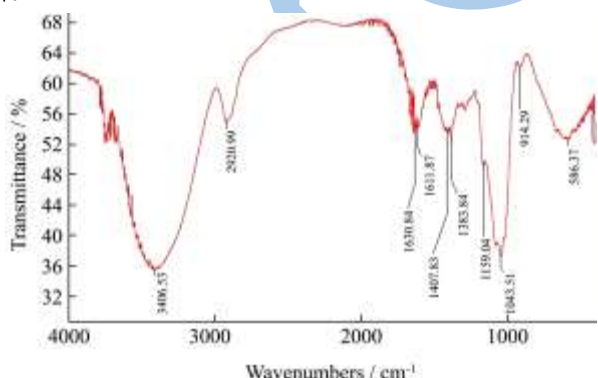


图3 香菇多糖 SP2 的红外谱图

Fig.3 Infrared spectrum of SP2

### 2.2.3 分子量的测定

多糖的分子量具有相对性,通常所测定的分子量只是一种统计平均值,代表相似链长的平均分布。GPC 法测定结果表明香菇多糖 SP2 的 Z 均相对分子质量 Mz

为  $5.879 \times 10^4$  u, 数均分子量 Mn 为  $4.707 \times 10^4$  u, 重均分子量 Mw 为  $5.203 \times 10^4$  u, 多分散系数 Mw/Mn 为 1.105, 这说明香菇多糖 SP2 的相对分子质量较为集中,分布范围比较窄,这与阮征测定的香菇多糖分子量  $2.03 \times 10^5$  u 有差别<sup>[9]</sup>,这可能是因为所采用的提取方法不同或是香菇的品种不同。

### 2.2.4 香菇多糖 SP2 单糖组成分析

多糖样品经水解、乙酰化衍生反应后与 7 种标准单糖的糖腈乙酰酯衍生物的气相色谱仪测定图谱进行对比,根据保留时间定性,外标法定量,结果表明香菇多糖 SP2 的单糖组成为甘露糖、葡萄糖、半乳糖,其组成摩尔比为:0.32:58.6:2.82,由此可判断出香菇多糖 SP2 的单糖组成主要是葡萄糖。

### 2.2.5 X-射线衍射分析

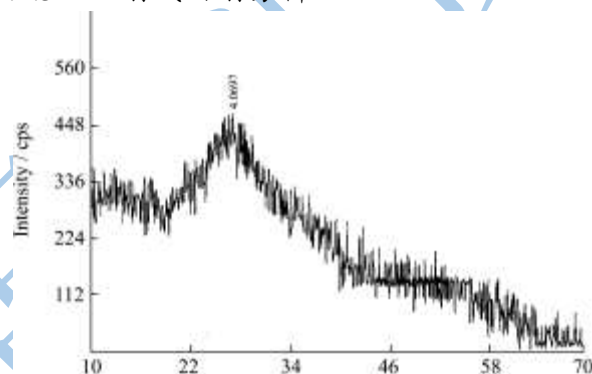


图4 香菇多糖 SP2 的 X-衍射图谱

Fig.4 X-ray diffraction of SP2

图4为香菇多糖 SP2 的 X-衍射图谱,香菇多糖 SP2 在 2θ 为 10°至 70°范围内无明显的强吸收峰,这说明香菇多糖 SP2 在此条件下不能形成单晶,为无定型形态。香菇多糖分子规整性不强,这与多糖的复杂结构有关。

### 2.2.6 香菇多糖 SP2 的 DSC 分析

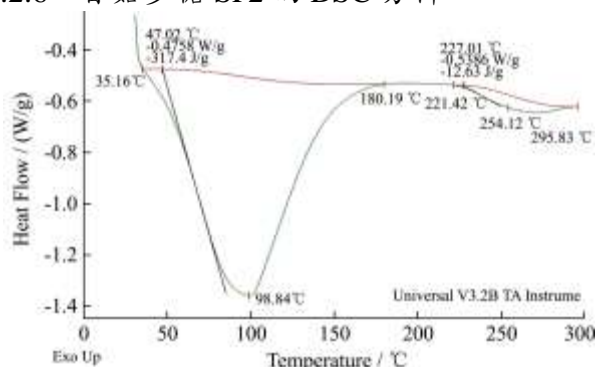


图5 香菇多糖 SP2 的 DSC 图谱

Fig.5 DSC of SP2

图5为 SP2 的 DSC 分析测定图谱,结果显示香菇多糖 SP2 的热焓变化分成两个阶段,第一阶段 35.16~180.19 °C 为吸热,焓变较大为 317.4 J/g;第二阶段 221.42~295.83 °C 为吸热,焓变较小为 12.63 J/g。说

明香菇多糖的组成较复杂,并且在分子内部和分子之间无较强的作用力存在。SP2 第一个吸热峰,为脱去所带的结合水,第二个吸热峰表示完全分解。

## 2.2.7 高碘酸氧化-Smith 降解反应

### 2.2.7.1 高碘酸氧化反应

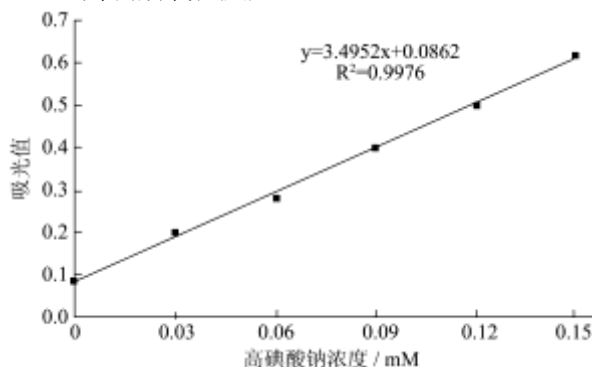


图 6  $\text{NaIO}_4$  标准曲线

Fig.6 Standard curve of  $\text{NaIO}_4$  concentration

香菇多糖 SP2 在高碘酸钠溶液中进行氧化, 12 d 后反应达到平衡, 根据  $\text{NaIO}_4$  消耗量标准曲线 (图 6) 计算出 20 mg 香菇多糖 SP2 高碘酸的消耗量为 0.08 mmol, 通过 NaOH 滴定发现有甲酸生成, 且甲酸的生成量为 0.007 mmol, 按葡萄糖分子量为 180 计算, 即每摩尔糖残基消耗的高碘酸量为 0.72 mol, 生成的甲酸量为 0.063 mol, 说明 SP2 中存在 1→3 键和 1→6 键, 同时高碘酸的消耗量远大于甲酸生成量的 2 倍, 说明还存在大量的只消耗高碘酸而不生成甲酸的类型, 即存在 1→2 或 1→4 键, 且 1→3 键与消耗高碘酸的 1→2 (1→4, 1→6 键) 之比约为 0.52:1。

### 2.2.7.2 Smith 降解反应

Smith 降解是将高碘酸氧化产物还原后进行酸水解或部分水解, 由于糖基之间以不同的位置缩合, 用高碘酸氧化后则生成不同的产物, 由降解产物来推断糖苷键的位置。香菇多糖 SP2 经过高碘酸氧化后的多糖溶液用  $\text{NaBH}_4$  进行还原, 还原产物水解、衍生化反应后经气相色谱分析检测出有甘油、葡萄糖、半乳糖存在, 没有赤鲜醇生成, 说明 SP2 中不含 1→4 键, 且其中 1→2 键:1→3 键:1→6 键为 9.43:5.44:1。部分葡萄糖和半乳糖以不被氧化的 1→3 键连接, 且位于分子的核心部位, 并以 1→3 键构成主链; 葡萄糖是 1, 3-葡萄糖残基的降解产物; 而甘油是 1, 2-葡萄糖残基和 1, 6-葡萄糖残基或非还原末端的葡萄糖残基的降解产物; 甘露糖以可氧化的方式存在。

### 2.2.8 刚果红试验

刚果红与具有螺旋结构的多糖可形成络合物, 络合物的最大吸收波长较刚果红移向长波。香菇多糖 SP2 与刚果红络合物的最大吸收波长随氢氧化钠浓度而变

化 (结果见图 7)。氢氧化钠浓度小于 0.3 mol/L, 最大吸收波长呈现上升趋势, 表明糖与刚果红形成络合物, 香菇多糖 SP2 呈有规则的螺旋构象。氢氧化钠浓度大于 0.3 mol/L, 最大吸收波长呈现下降趋势, 表明螺旋构象开始解体, 转变成无规则的自由卷曲形态。

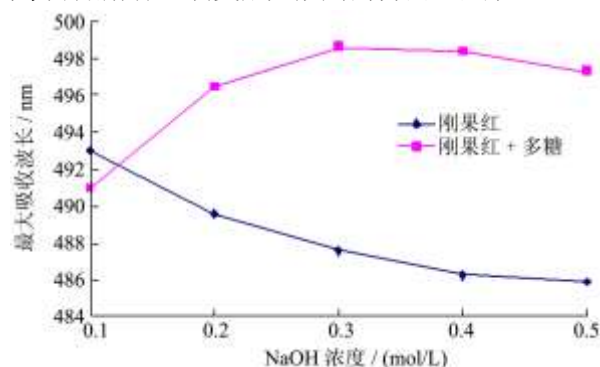


图 7 SP2-刚果红复合物最大吸收波长的变化

Fig.7 Maximum absorption of SP2-Congo red complex in solution with various concentrations of NaOH

## 3 结论

本文对酸提香菇多糖进行脱蛋白、脱色和醇沉分级后得到一种相对分子质量分布较集中的多糖 SP2。SP2 重均分子量为  $5.203 \times 10^4$  u, 单糖组成为甘露糖、葡萄糖、半乳糖, 组成摩尔比为 0.32:58.6:2.82。红外光谱分析表明香菇多糖 SP2 是一种含有吡喃环的糖蛋白缀合物。X-射线衍射结果显示 SP2 不能形成单晶, 为无定形态, DSC 热分析试验表明 SP2 组成较复杂, 在分子内部和分子之间无较强的作用力存在。通过高碘酸氧化、Smith 降解分析 SP2 中 C-C 单键有 1→2 键、1→3 键和 1→6 键, 且 1→2 键:1→3 键:1→6 键为 9.43:5.44:1; 部分葡萄糖和半乳糖以不被氧化的 1→3 键连接, 且位于分子的核心部位, 并以 1→3 键构成主链; 葡萄糖是 1, 3-葡萄糖残基的降解产物; 而甘油是 1, 2-葡萄糖残基和 1, 6-葡萄糖残基或非还原末端的葡萄糖残基的降解产物; 甘露糖以可氧化的方式存在。刚果红试验表明 SP2 具有螺旋结构。

### 参考文献

- [1] 申进文, 冯雅岚, 庄庆利, 等. 香菇子实体多糖提取工艺优化研究[J]. 河南农业科学, 2010, 3: 90-92  
SHEN Jing-wen, FENG Ya-lan, ZHUANG Qing-li, et al. Optimization on the extraction technology of polysaccharides from sporocarp of *Lentinus Edodes* [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2010, 3: 90-92
- [2] Ina K, Kataoka T, Ando T. The use of lentinan for treating gastric cancer [J]. Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry,

- 2013, 13(5): 681-688
- [3] Attia S M, Harisa G I, Abd-Allah A R, et al. The influence of lentinan on the capacity of repair of DNA damage and apoptosis induced by paclitaxel in mouse bone marrow cells [J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2013, 27(7): 370-377
- [4] Isoda N, Eguchi Y, Nukaya H, et al. Clinical efficacy of superfine dispersed lentinan (beta-1, 3-glucan) in patients with hepatocellular carcinoma [J]. Hepatogastroenterology. 2009, 56: 437-41
- [5] Bisen P S, Baghel R K, Sanodiya B S, et al. *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmacological activities [J]. Current Medicinal Chemistry, 2010, 17(22): 2419-2430
- [6] Chihara G, Maeda Y Y, Hamuro J, et al. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*[J]. Nature, 1969, 222: 687-688
- [7] Chihara G, Hamuro J, Maeda Y Y, et al. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom) [J]. Cancer Research, 1970, 30(11): 2776-2781
- [8] 游丽君, 邹林武, 梁彦豪, 等. 超声-高温热水提取香菇多糖及其产物特性研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(9): 2167-2172  
YOU Li-jun, ZOU Lin-wu, LIANG Yan-hao, et al. Characteristics of lentinan polysaccharide extracted by ultrasonic wave and hot water [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(9): 2167-2172
- [9] 张楷正, 杨跃寰, 李光辉, 等. 香菇多糖提取方法研究进展[J]. 四川理工学院学报: 自然科学版, 2009, 22(6): 63-66  
ZHANG Kai-zheng, YANG Yue-huan, LI Guang-hui, et al. Research advances on the extracting methods of lentinan[J]. Journal of Sichuan University of Science and Engineering (Natural Science Edition), 2009, 22(6): 63-66
- [10] 郝强, 刘晓宇, 冯睿, 等. 香菇多糖的提取数学模型研究[J]. 食品科技, 2008, 32(11): 87-89  
HAO Qiang, LIU Xiao-yu, FENG Rui, et al. Study on the mathematical model of optimum yield of lentinan polysaccharide [J]. Food Science and Technology, 2008, 32(11): 87-89
- [11] 余华. 海带多糖中蛋白质去除方法的对比研究[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2006, 24(4): 265-268  
YU Hua. Study on in four methods in comparison removing of protein from polysaccharide of *laminaria japonica aresch* [J]. Journal of Chengdu University (Natural Science), 2006, 24(4): 265-268
- [12] 高石花, 黎国庆, 覃江克, 等. 油茶枯多糖的水提工艺及纯化研究[J]. 食品科技, 2013, 4: 191-195  
GAO Shi-hua, LI Guo-qing, QIN Jiang-ke, et al. Extraction and purification of polysaccharides from camellia cake by water [J]. Food Science and Technology, 2013, 4: 191-195
- [13] 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 Wei-jie. The glycoconjugates biochemical research techniques[M]. Hang Zhou: Zhejiang University Press, 1999
- [14] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000  
LI He-sheng. The principle and technology of experiment in plant physiology and biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000
- [15] Yang W, Pei F, Shi Y, et al. Purification, characterization and anti-proliferation activity of polysaccharides from *Flammulina velutipes* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 88(2): 474-480
- [16] Bluhm T L, Sarko A. The triple helical structure of lentinan, a linear  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan [J]. Canadian Journal of Chemistry, 1977, 55(2): 293-299
- [17] Xu W T, Zhang F F, Luo Y B, et al. Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum* [J]. Carbohydrate Research, 2009, 344 (2): 217-222
- [18] Cai W R, Gu X H, Tang J. Extraction, purification, and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa alta* [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71(3): 403-410
- [19] 阮征. 香菇多糖的分离、结构分析与抑制肿瘤生物活性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005  
RUAN Zheng. Study on separation, structural analysis and biological activity in inhibiting tumor of lentinan [D]. A Dissertation Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy, 2005