

粉碎程度对杏鲍菇下脚料粗多糖理化性质和巨噬细胞活性的影响

薛令坤^{1,2}, 唐庆九¹, 刘艳芳^{1*}, 周 帅¹, 杨 焱¹, 吴 迪¹, 于华峥^{1,3}, 张劲松^{1*}¹国家食用菌工程技术研究中心 农业部南方食用菌资源利用重点实验室 上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201403; ²上海海洋大学食品学院, 上海 201306; ³上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234

摘要: 本文以杏鲍菇下脚料为材料, 比较了碎块、细粉和超细粉末三种粉碎程度对杏鲍菇粗多糖提取及其理化性质和刺激巨噬细胞活性的影响。结果表明, 细粉和超细粉末体积平均粒径分别为 83.548 μm 和 17.553 μm , 其中超细粉末均匀性好。与碎块相比, 两种处理都可以显著提高杏鲍菇粗多糖的得率, 其得率分别是碎块的 3.04 倍和 4.14 倍, 粗多糖中多糖和 β -葡聚糖含量也明显提高。HPSEC-MALLS-VS-RI 联用分析多糖分子量分布结果显示, 三种处理所得粗多糖均主要含有 3 个组分, 其中组分 1 和组分 2 分子量都在 100 万道尔顿以上, 为高分子量组分, 粉碎处理可以使粗多糖中高分子量组分所占比例增加, 且粉碎后各分组的分子量大于碎块相应分组的分子量。单糖组成分析结果显示, 不同粉碎程度所得多糖的单糖种类相同, 但单糖组成摩尔比差异较大, 葡萄糖所占摩尔比随粉碎程度增加明显增大。三种粉碎程度所得粗多糖均具有体外刺激巨噬细胞释放 NO 的活性, 但总体上超细粉碎方式所得多糖的活性最高。

关键词: 杏鲍菇下脚料; 超细粉末; β -葡聚糖; 单糖组成; 分子量; 激活巨噬细胞活性

中图分类号: Q71

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.08.020

Physicochemical Properties and Macrophages-activation Activity of Crude Polysaccharides from *Pleurotus eryngii* Leftover with Different Particle Sizes

XUE Ling-kun^{1,2}, TANG Qing-jiu¹, LIU Yan-fang^{1*}, ZHOU Shuai¹,
YANG Yan¹, WU Di¹, YU Hua-zheng^{1,3}, ZHANG Jin-song^{1*}

¹National Engineering Research Center of Edible Fungi; Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, China; Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China;

²College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

³Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

Abstract: The differences of physicochemical properties and macrophages-activation activity of crude polysaccharides extracted from *Pleurotus eryngii* leftover with different particle sizes were compared in this paper. The results revealed that average particle sizes of fine powder and ultrafine powder were 83.548 μm and 17.553 μm , respectively. Ultrafine powder showed well uniformity. Crude polysaccharide yields of fine powder and ultrafine powder of *P. eryngii* leftover were 3.04 times and 4.14 times higher than that of fragments, respectively. Meanwhile, the contents of polysaccharides and β -glucan in crude polysaccharides also increased. The high performance size exclusion chromatography-multiple angle laser light scattering-viscosar-refractive index detector (HPSEC-MALLS-VS-RI) was adopted to determine the molecular weight and characteristics of these fractions. Analysis results indicated that all three crude polysaccharides mainly contained three fractions with different molecular weights. High molecular weight fractions (Fraction 1 and 2) with Mw higher than 1×10^6 Da possessed higher proportion in grinding powder compared with that in the fragments. Furthermore, the molecular weight of all fractions in crude polysaccharides extracted from fine powder and ultrafine powder was higher than that of the corresponding fractions from fragments. Monosaccharide composition analysis indicated that all crude polysaccharides consisted of 5 monosaccharides with varied molar ratios. The molar ratio of glucose increased along with the increasing of degree of grinding. All samples exhibited inhibited activities on stimulating RAW 264.7 macrophages to release NO.

NO.

Key words: *Pleurotus eryngii* leftover; ultrafine powder; β -glucan; monosaccharide composition analysis; molecular weight distribution; macrophages-activation activity

收稿日期: 2015-01-15 接受日期: 2015-04-02

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项(201303080)

* 通讯作者 Tel: 86-532-88963253; E-mail: aliu-1980@163.com;

syja16@saas.sh.cn

杏鲍菇 (*Pleurotus eryngii*), 又名刺芹侧耳, 隶属于伞菌目侧耳科。它口味鲜美, 富含多糖、蛋白质、维生素和矿物质等多种营养成分, 是近年来开发的集食用和药用于一体的新型真菌^[1]。多糖是其活性成分之一, 因具有抗肿瘤^[2]、降血脂^[3]、润肠胃^[4]等多种活性而备受关注。目前关于杏鲍菇子实体和菌丝体多糖提取工艺的报道较多^[5,6], 对于杏鲍菇菇脚、菇片等下脚料提取的研究较少。据报道, 杏鲍菇下脚料与其子实体营养成分相近, 下脚料中也含有大量的多糖^[7], 因此以下脚料为原料进行多糖提取, 可以有效降低成本。

近年来, 为提高天然产物活性成分的提取率, 超细粉碎技术已在中药加工制剂过程中有较多应用。研究认为, 物料经超细粉碎后细胞壁大部分被破坏, 从而增加了有效成分的提取率^[8]。现如今, 该工艺在食用菌有效成分提取尤其是多糖提取工艺研究中也多有应用。但超细粉碎技术对杏鲍菇下脚料粗多糖提取及多糖理化性质的影响未见报道。本研究选取杏鲍菇下脚料为材料, 采用常规粉碎和超细粉碎对其进行处理, 比较粉碎程度对粗多糖提取率、理化性质和生物活性产生的影响, 以期对杏鲍菇多糖的进一步研究与利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

杏鲍菇下脚料碎块 (约 $1 \times 3 \times 0.5$ cm) 由上海国森生物科技有限公司提供, 于 60°C 烘干至恒重后置于干燥器备用。DMEM 高糖培养基、RPMI-1640、胎牛血清 (FBS)、胰酶为 GIBCO 公司产品, 三氟乙酸 (TFA)、细菌脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 为 Sigma 公司产品, 其他为国产分析纯试剂, RAW 264.7 细胞株购自中科院细胞所。

1.2 仪器与设备

中药粉碎机 DJ-10A (上海淀久公司), 超微粉碎震动磨机 BFM100B (济南倍力粉公司), 光学显微镜 (Olympus IX71), 激光粒度仪 (微米级, Malvern Mastersizer 2000), 台式高速大容量离心机 (Eppendorf 公司), Synergy HT 多功能酶标仪 (Bio-Tek 公司), 二氧化碳培养箱 (Thermo Forma 公司), 细胞计数仪 (Beckman Coulter 公司), ICS-2500 型高效离子色谱仪 (Dionex 公司), 脉冲安培检测器 (Dionex 公司), HPSEC-MALLS-RI 联用系统由 Waters 2695 HPLC 泵, 氩-氦激光光源的八角度激光光散射检测器

(MALLS, Wyatt 公司)、ViscosStar II 粘度检测器 (Wyatt 公司) 和 Waters 2414 示差检测器 (RI) 组成。

1.3 方法

1.3.1 杏鲍菇下脚料细粉与超细粉末的制备

用中药粉碎机在常温下将杏鲍菇下脚料碎块粉碎 1 min 左右, 过 80 目筛, 收集粉末为细粉; 用超微粉碎震动磨机 10°C 下粉碎 30 min, 过 200 目筛, 收集粉末为超细粉末。

1.3.2 显微观察与粒径分析

采用光学显微镜对杏鲍菇下脚料粉末进行显微观察, 并通过激光粒度分析仪, 根据 GB/T 19077.1-2008 对其粒径大小及分布进行测定。

1.3.3 粗多糖提取

取不同处理的杏鲍菇下脚料样品 10 g, 料液比 1:20 (g:mL), 沸水浴提取 2 h, 提取液经 10000 rpm 离心 15 min, 残渣以相同方式再提取一次, 合并两次上清液, 浓缩, 加无水乙醇调至乙醇终浓度为 70%, 静置过夜, 10000 rpm 离心 15 min, 沉淀加适量蒸馏水复溶, 用截留分子量为 3500 Da 透析袋对粗多糖溶液 4°C 透析 3 d, 去除小分子物质, 然后将透析好的粗多糖溶液冷冻干燥, 得粗多糖干品。

分析天平称量粗多糖干品的质量, 按以下公式计算粗多糖得率:

$$\text{粗多糖得率}(\%) = \frac{\text{粗多糖的质量}(\text{g})}{\text{称取样品的质量}(\text{g})} \times 100\%$$

1.3.3.1 粗多糖中水溶性多糖含量测定

精密称取 5 mg 粗多糖样品, 加蒸馏水充分溶解并定容至 10 mL, 离心, 采用苯酚-硫酸法测定总糖含量^[9]。由于粗多糖在制备时经过醇沉及透析去除小分子, 故粗多糖中还原糖含量极低, 可以忽略不计, 用苯酚-硫酸法测得的总糖含量, 即为多糖含量。

1.3.3.2 粗多糖中 β -葡聚糖含量测定

精密称取 10 mg 粗多糖样品, 参照 Megazyme 公司的酵母和蘑菇 β -葡聚糖检测试剂盒中的方法, 对粗多糖中 β -葡聚糖及 α -葡聚糖含量进行测定。

1.3.4 HPSEC-MALLS-VS-RI 联用^[10]分析粗多糖分子量分布及多糖分子特性

称取 5 mg 粗多糖, 加入 1 mL 流动相, 充分溶解, 12000 rpm 离心 10 min, 上清液经 $0.22 \mu\text{m}$ 水相过滤头过滤后进行 HPSEC-MALLS-VS-RI 分析。

色谱分析条件为: 色谱柱为 TSK PWXL6000 和 TSK PWXL3000 凝胶色谱柱串联, 流动相为含 0.05 mol/L 的 NaH_2PO_4 和 0.15 mol/L 的 NaNO_3 溶液

(pH=7, 0.02% 叠氮钠), 流速为 0.5 mL/min, 柱温为 35 ℃; 检测器采用多角度激光光散射检测器(光源波长选用 623.8 nm)、粘度检测器、示差折光检测器串联使用, 多糖在溶液中的折光指数增量(dn/dc)按照 0.146 mL/g 计算。

使用 Astra (version 6.1.1, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA) 数据分析软件对光散射数据进行采集和分析, 计算多糖分子量和其他分子特性。

1.3.5 单糖组成分析

称取 2 mg 粗多糖置于带盖玻璃瓶中, 加入 3 mL 2 mol/L 的三氟乙酸(TFA), 110 ℃ 油浴 4 h, 冷却至室温, 50 ℃ 条件下氮气吹干, 再加甲醇吹干, 重复以上操作 3~4 次以完全除去 TFA, 用超纯水溶解并转移至 50 mL 容量瓶, 定容, 稀释 20 倍后上样测定。

色谱条件: 参照文献^[11]的方法进行。

1.3.6 粗多糖对巨噬细胞活性的影响

精密称取透析后的粗多糖样品 5 mg, 加入灭菌的 eppendorf 管中, 用无菌的 PBS 配制成 5 mg/mL 的浓度, 充分溶解, 13200 rpm 离心 30 min 除菌, 无菌条件下, 用移液枪将离心上清液转移至新的无菌 eppendorf 管中, 然后取一定量稀释成 2 mg/mL、0.5 mg/mL 的浓度备用, 并以 10 μg/mL LPS 为阳性对照, 以 PBS 为阴性对照, 按文献^[12]的方法测定巨噬细胞释放 NO 的产量。

2 结果与分析

2.1 显微形态观察与粉体粒径分布比较

从图 1 显微形态观察结果可知, 杏鲍菇下脚料细粉(图 1A)在显微镜下观察可见菌丝体片段和较大组织碎片, 且颗粒大小不均匀, 存在少许细小颗粒; 而超细粉末(图 1B)在整个视野遍布细小的颗粒, 有少许小的组织片段, 但没有明显的块状物。

杏鲍菇下脚料细粉粒径分布图(图 2A)分析结果显示, 其粒度范围(D50-D90)在 48.828 ~ 210.617 μm, 分布不对称, 其体积平均粒径为 83.548 μm, 均匀性差; 而超细粉末(图 2B) D50-D90 为 13.548 ~ 36.954 μm, 分布范围较窄, 粒度分布为成正态分布的单峰, 体积平均粒径为 17.553 μm, 均匀性好。与细粉相比, 超细粉体积平均粒径降低了 65.995 μm。

2.2 粗多糖得率及多糖和葡聚糖含量测定结果比较

由表 1 结果可知, 随着杏鲍菇下脚料粉碎程度的增大, 粗多糖得率和粗多糖中多糖含量均有明显的增加, 超细粉末提取得率和多糖含量均为最高, 分别为 11.52% 和 56.97%, 是碎块提取多糖得率和多糖含量的 4.14 倍和 1.37 倍。说明粉碎程度的增加, 有利于多糖的溶出和释放提取^[13]。

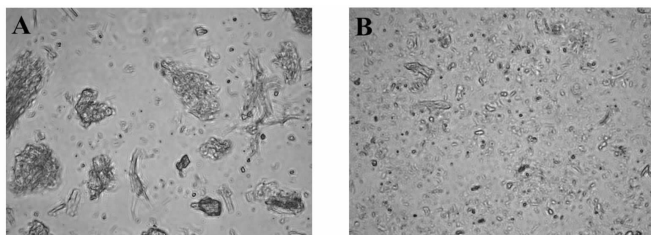


图 1 杏鲍菇下脚料细粉(A)和超细粉末(B)的显微形态(10×40)

Fig. 1 Microscopic configuration of fine powder (A) and ultrafine powder (B) of *P. eryngii* leftover

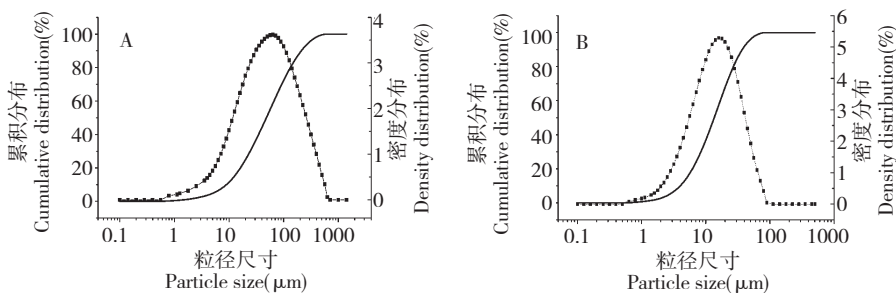


图 2 细粉(A)和超细粉末(B)的粒径分布图

Fig. 2 Particle size distribution of fine powder (A) and ultrafine powder (B)

同时,随着粉碎程度的增加,粗多糖中 β -葡聚糖含量明显增加,且 β -葡聚糖含量占粗多糖含量的比例也在增大,超细粉末提取所得粗多糖中, β -葡聚糖含量为23.61%、占粗多糖的41.44%。另外,与

碎块相比,粉末提取所得粗多糖中的 α -葡聚糖含量也明显增加,这可能与杏鲍菇下脚料的细胞壁组成有关^[14]。

表1 粉碎程度对粗多糖得率、多糖含量和葡聚糖含量的影响

Table 1 Effect of different size powders on yields, polysaccharide content and glucan content of crude polysaccharides

多糖样品 Polysaccharide sample	粗多糖得率 Polysaccharides yields (%)	多糖含量 Polysaccharides content (%)	β -葡聚糖含量 β -Glucan content (%)	α -葡聚糖含量 α -Glucan content (%)
碎块 Fragment	2.78 ± 0.51	41.49 ± 2.36	10.61 ± 1.63	2.58 ± 0.28
细粉 Fine powder	8.45 ± 0.28	53.94 ± 2.60	18.96 ± 1.55	14.30 ± 2.03
超细粉末 Ultrafine powder	11.52 ± 0.44	56.97 ± 0.64	23.61 ± 1.21	12.76 ± 2.27

2.3 粗多糖分子量分布及特征分析

不同粉碎程度所得杏鲍菇下脚料粗多糖的HPSEC-MALLS-VS-RI分析图谱(图3)显示,三种粗多糖均主要含有3个组分,且各样品中相应组分的保留时间基本接近,但经粉碎后,组分1和组分2的峰面积明显增加,组分3的峰面积相对减小。各组分的分子量、多分散指数和特性粘度分析结果如表2所示。其中组分1与组分2的重均分子量(M_w)均达到200万道尔顿以上,为高分子量部分,且细粉组分1与2的重均分子量均高于碎块和超细粉末;组分3的分子量相对较低,在碎块提取粗多糖中,该组分重均分子量约为6.35万道尔顿,经过细粉和超微粉碎后,该部分的重均分子量明显增大,达到20万道尔顿以上。总的来讲,粉碎后提取粗多糖中各组分的分子量大于碎块中相应组分的分子量,且高分子量部分所占比例增加。这说明粉碎处理有助于杏鲍菇下脚料中大分子多糖的释放。

另外,由表2数据还可以看出,与碎块提取多糖相比,经细粉后,组分2和3的多分散系数均降低,证明多糖的分子量分布范围变窄。就高分子量组分而言,组分2虽然重均分子量大于组分1,但其特性粘度($[\eta]$)较小,其中组分1的特性粘度为1300 mL/g以上,而组分2的仅为100~186 mL/g之间。特性粘度为多糖的特征参数,与其结构和构象有关,说明组分1和2的结构特征差异明显。

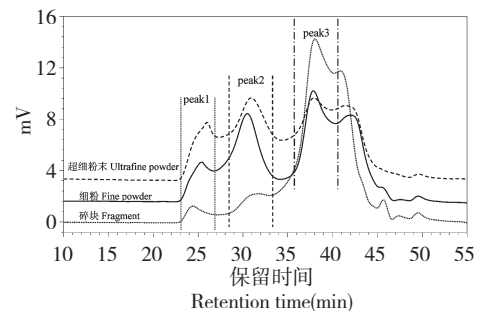


图3 不同粉碎程度所得粗多糖的液相分析图谱

Fig. 3 HPSEC chromatograms of crude polysaccharides extracted from different size powders

表2 不同粉碎程度所得粗多糖分子量分布范围

Table 2 Molecular weight distribution of crude polysaccharides extracted from different size powders

多糖样品 Polysaccharide sample	组分 Peak number	重均分子量 Weight average molecular weight M_w (Da)	数均分子量 Number average molecular weight M_n (Da)	多分散指数 Polydispersity index (M_w/M_n)	特性粘度 Intrinsic viscosity $[\eta]_w$	Mass Fraction (%)
碎块 Fragment	peak1	4.539×10^6	2.786×10^6	1.629	1399.84	6.2
	peak2	2.714×10^6	1.453×10^6	1.868	115.07	12.3
	peak3	6.811×10^4	4.977×10^4	1.368	111.02	81.5
细粉 Fine powder	peak1	6.426×10^6	4.446×10^6	1.445	1341.15	19.3
	peak2	6.245×10^6	5.724×10^6	1.091	81.51	27.3
	peak3	4.582×10^5	3.232×10^5	1.418	13.71	53.3

超细粉末 Ultrafine powder	peak1	5.074×10^6	4.635×10^6	1.095	1466.20	15.3
	peak2	5.046×10^6	3.469×10^6	1.455	225.01	34.5
	peak3	4.531×10^5	3.477×10^5	1.303	21.74	50.2

2.4 粗多糖单糖组成分析

各粗多糖水解后,经高效阴离子色谱(HPAEC)检测所得单糖组成及其摩尔百分比结果如表3和图4所示。三种粉碎方式所得粗多糖的单糖组成种类相同,都含有阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖和甘露糖五种单糖,但单糖组成摩尔比存在明显差异(表3

表3 不同粉碎程度所得粗多糖的单糖组成摩尔百分比

Table 3 Molar ratio of monosaccharide of crude polysaccharides of different size powders

多糖样品 Polysaccharide sample	阿拉伯糖 Arabinose (%)	半乳糖 Galactose (%)	葡萄糖 Glucose (%)	木糖 Xylose (%)	甘露糖 Mannose (%)
碎块 Fragment	6.53	22.37	29.99	19.39	21.72
细粉 Fine powder	1.71	13.04	65.11	4.90	15.24
超细粉末 Ultrafine powder	1.37	9.04	75.58	5.28	8.73

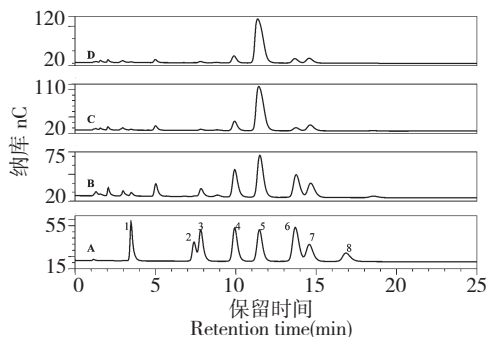


图4 不同粉碎程度所得粗多糖的单糖组成

Fig. 4 Monosaccharide compositions of crude polysaccharides extracted from different size powders

注:A:标品;B:碎块;C:细粉;D:超细粉末;1:岩藻糖;2:鼠李糖;3:阿拉伯糖;4:半乳糖;5:葡萄糖;6:木糖;7:甘露糖;8:果糖
Note: A: standard; B: fragment; C: fine powder; D: ultrafine powder; 1: fucose; 2: rhamnose; 3: arabinose; 4: galactose; 5: glucose; 6: xylose; 7: mannose; 8: fructose

2.5 粗多糖激活 RAW264.7 细胞释放 NO 活性的比较

不同粉碎程度所得粗多糖体外活性测试结果如图5所示。结果显示,碎块、细粉和超细粉所得粗多糖均具有体外刺激巨噬细胞释放 NO 的活性,且随着各样品浓度的增加,其刺激巨噬细胞释放 NO 的量也有所增加,呈现出一定的浓度依赖性。总的来看,细粉和超细粉提取所得粗多糖活性略好于碎块,这可能与其多糖的含量及种类相关,需要进一步开

展研究。与碎块所得粗多糖相比,粉碎后所得粗多糖中葡萄糖所占比例大大增加,表现为超细粉末葡萄糖摩尔百分比最高,为 75.58%,是碎块提取多糖葡萄糖摩尔百分比的 2.5 倍,说明粉碎处理促进了葡聚糖类多糖的释放,这也和表1中细粉、超细粉末的葡聚糖含量较高相吻合。

展研究。

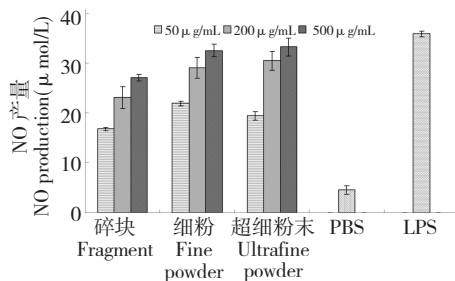


图5 不同粉碎程度所得粗多糖对 RAW264.7 细胞分泌 NO 的影响

Fig. 5 Effects of polysaccharides extracted from different size powders on NO release from RAW264.7 cells

3 讨论

本文分别以杏鲍菇下脚料碎块、细粉和超细粉末为材料,分析比较了其提取所得粗多糖的理化性质和生物活性的差异,发现与碎块提取所得粗多糖相比,细粉、超细粉末所得粗多糖在多糖得率、多糖含量以及葡聚糖含量上都有显著增加,且粉碎处理后,提取多糖中 400 ~ 800 万道尔顿大分子量多糖组分所占比例明显增大,说明粉碎处理对细胞壁产生一定的破坏,从而促进细胞内容物的释放。据报道,真菌细胞壁多糖成分以葡聚糖为主^[15],经过粉碎处理后,杏鲍菇下脚料的细胞壁遭到破坏,胞壁多糖大量释放,使得葡聚糖含量及葡萄糖的摩尔百分比均

增大。尤其是经超细粉碎处理后,提取所得多糖的 β -葡聚糖含量是碎块的2.2倍,葡萄糖摩尔百分比是碎块的2.5倍,因此,超细粉碎技术在杏鲍菇胞壁 β -葡聚糖高效提取工艺方面将有很大的实用价值和前景。

本研究发现,超细粉末提取的杏鲍菇下脚料多糖具有比碎块提取多糖更高的刺激巨噬细胞活性。文献报道^[16],分子量大于3000 kDa的灰树花高分子量多糖具有更高的活性,而超微粉末多糖含有更多的高分子量组分,因而可以推测杏鲍菇多糖的活性部位可能为高分子量多糖。而多糖的分子量与其特性粘度有很大关联性,一般来讲分子量较大的多糖具有更高的特性粘度^[17],但杏鲍菇多糖的组分1与组分2却呈现相反的规律,这可能与两组分具有不同的高级结构相关。多糖的活性也受其高级结构的影响,如香菇 β -(1-3)-D-葡聚糖以三重螺旋的链构象存在时具有抗肿瘤活性,当其分解为单一螺旋时,抗肿瘤活性显著下降或消失。因而有必要对杏鲍菇多糖组分1与组分2进行分离纯化,进而探究杏鲍菇多糖高级结构与其活性的关系。

参考文献

- 1 Wang SX, Yin YG, Liu Y, et al. Evaluation of genetic diversity among Chinese *Pleurotus eryngii* cultivars by combined RAPD/ISSR marker. *Current Micro-biology*, 2012, 65: 421-431.
- 2 Jung HY, Bae IY, Lee SY, et al. Effect of the degree of sulfation on the physicochemical and biological properties of *Pleurotus eryngii* polysaccharides. *Food Hydrocolloid*, 2011, 25: 1291-1295.
- 3 Chen JJ, Mao D, Yong YY, et al. Hepatoprotective and hypolipidemic effects of water-soluble polysaccharidic extract of *Pleurotus eryngii*. *Food Chem*, 2012, 130: 687-694.
- 4 Synytsya A, Micvkova K, Synytsya A, et al. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydr Polym*, 2009, 76: 548-556.
- 5 Meng S (孟思), Liu XY (刘晓宇), Li XH (李信辉), et al. Study on extraction of polysaccharides from *Pleurotus eryngii*. *Food Sci* (食品科学), 2007, 28: 141-143.
- 6 Zhang ZJ (张志军), Li SF (李淑芳), Huang C (黄超), et al. Optimization of polysaccharide extraction from *Pleurotus eryngii* using ultrasound and the moisturizing effect of extracted material. *Acta Edul Fun* (食用菌学报), 2010, 17(2): 76-79.
- 7 Zhang Q (张庆), Lin K (林凯), Yuan CH (袁春红), et al. Optimization of polysaccharide from the residue of *Pleurotus eryngii* using response surface methodology. *J Xihua Univ: Nat Sci* (西华大学学报, 自科版), 2014, 33(2): 88-92.
- 8 Chen YH (陈宇红). The effect of superfine grind process on dissolving of effective components of Radix Astragali. *Ningxia Med J* (宁夏医学杂志), 2007, 29: 215-217.
- 9 Zhang WJ (张维杰). Sugar Complex Biochemical Research Technology. Zhejiang: Zhejiang University Press, 1994.
- 10 Liu YF, Tang QJ, Zhang JS, et al. Structural characteristics and hypoglycemic activity of polysaccharides from *Coprinus comatus*. *Bioactive Carbohydr Dietary Fibre*, 2013, 2: 164-169.
- 11 Yang Y, Zhang JS, Liu YF, et al. Structural elucidation of a 3-O-methyl-galactose-containing neutral polysaccharide from fruiting bodies of *Phellinus igniarius*. *Carbohydr Res*, 2007, 342: 1063-1070.
- 12 Du XJ (杜秀菊). Purification, structural characterization, molecular modification and biological activities of polysaccharides from of *Tremella aurantialba* fruiting bodies. Nanjing: Nanjing Agricultural University (南京农业大学), PhD. 2009.
- 13 Yang XL (杨晓丽), Li X (李翔), Shen LR (沈立荣), et al. Physicochemical properties of ultrafine *Ganoderma lucidum* powder. *J Food Sci Biotechnol* (食品与生物技术学报), 2013, 32: 69-74.
- 14 Klis FM, Ram AFJ, De Groot PWJ. A molecular and genomic view of the fungal cell wall. *Biol Fungal Cell*, 2007, 8: 97-120.
- 15 Ruthes AC, Smiderle FR, Iacomini M. D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydr Polymer*, 2014, 117: 753-761.
- 16 Zhou CY (周昌艳), Wu AZ (吴爱忠), Yan PL (严陪兰), et al. Isolation and purification of GFLP, a high-molecule polysaccharide from *Grifola frondosa* fruit bodies and its effect on immune cells. *Acta Edul Fun* (食用菌学报), 2013, 20(4): 39-42.
- 17 Wang ZM, Cheung YC, Leung PH, et al. Ultrasonic treatment for improved solution properties of a high-molecular weight exopolysaccharide produced by a medicinal fungus. *Biores Technol*, 2010, 10: 5517-5522.