

紫芝子实体活性多糖的纯化和结构解析

应一君¹, 刘艳芳², 张劲松², 唐庆九², 杨焱²,
周帅², 颜梦秋², 张忠², 韩伟^{*1}

(1. 华东理工大学药学院, 上海 200237; 2. 国家食用菌工程技术研究中心/农业部应用真菌资源与利用重点开放实验室/上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201403)

摘要: 以刺激 RAW264.7 细胞释放 NO 活性模型为指导, 通过乙醇沉淀和 DEAE 阴离子交换柱层析, 从紫芝子实体中分离得到均一多糖 GS30S1-20E, 采用红外光谱、核磁共振、气相色谱-质谱法和高效液相等现代仪器, 研究了 GS30S1-20E 的结构特性。结果表明: GS30S1-20E 是一种 β -D-葡聚糖, 其重均相对分子质量为 2.418×10^6 , 数均相对分子质量为 1.668×10^6 , 多分散指数为 1.450, 特性粘度为 927.49 mL/g, 以 β -(1,3)-糖苷键为主链和 β -(1,6)-糖苷键为支链, 主链与支链上糖残基的摩尔比为 3:1, 具有刺激巨噬细胞释放 NO 的活性。

关键词: β -葡聚糖; 分离纯化; 活性; 多糖

中图分类号: Q 53 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.01.020

Purification and Structure Elucidation of Bioactive Polysaccharide from the Fruiting Bodies of *Ganoderma sinense*

YING Yijun¹, LIU Yanfang², ZHANG Jingsong², TANG Qingjiu², YANG Yan²,
ZHOU Shuai², YAN Mengqiu², ZHANG Zhong², HAN Wei^{*1}

(1. College of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. National Engineering Research Center of Edible Fungi / Key Laboratory of Applied Mycological Resources and Utilization, Ministry of Agriculture / Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

Abstract: Crude polysaccharide GS30 precipitated from hot water extracts of the fruiting bodies of *Ganoderma sinense* were separated by DEAE-column chromatography, and then treated with ethanol precipitation to get a purified polysaccharide fraction GS30S1-20E. Modern analytical techniques, such as IR, NMR, GC/MS and HPSEC were conducted to analyze the structural characteristics of GS30S1-20E. Results showed that GS30S1-20E was a β -D-glucan with a high weight average molecular mass of 2.418×10^6 and number average molecular weight of 1.668×10^6 , polydispersity of 1.450 and large viscosity of 927.49 mL/g. GS30S1-20E contains a backbone of (1 $\rightarrow$ 3)-linked- β -D-glucopyranosyl residues, bearing branches at the O-6 position of every three sugar

收稿日期: 2016-09-21

基金项目: 上海市农委重点攻关项目(沪农科攻字(2015)第 6-1-6 号)。

作者简介: 应一君(1992—), 女, 硕士, 主要从事多糖分离纯化研究。E-mail: 769885274@qq.com

* 通信作者: 韩伟(1968—), 男, 博士, 教授, 主要从事天然产物提取分离研究。E-mail: whan@ecust.edu.cn

引用本文: 应一君, 刘艳芳, 张劲松, 等. 紫芝子实体活性多糖的纯化和结构解析[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(01): 133-138.

residues along the backbone. An *in vitro* immunomodulating activity assay revealed that GS30S1-20E could significantly increase the release of NO from RAW 264.7 cells.

Keywords: β -glucan, isolation and purification, activity, polysaccharide

紫芝多糖在抗肿瘤^[1-3]、抗氧化^[4]、抗运动性疲劳和抗组织损伤^[5]、免疫调节^[6-8]和抗炎镇痛^[9]等方面都有着显著作用。目前,已经从紫芝子实体和菌丝体中纯化出 20 多种多糖类物质^[10-12],其中大部分组分相对分子质量均在 10 万以下。研究人员从紫芝子实体中还分离得到相对分子质量为 1.86×10^6 的糖蛋白(编号为 GSP-6B)和相对分子质量为 8.3×10^5 的杂多糖(编号为 GSP-4)。其中 GSP-6B 以 β -1,6-葡萄糖残基为主链,以 β -1,3-和 β -1,4-葡萄糖残基为支链,蛋白质约占质量分数 10.13%,具有激活树突状细胞的免疫活性;GSP-4 以葡萄糖残基为主链,以半乳糖和甘露糖残基为支链,连接方式较复杂^[6-7]。作者以紫芝子实体为材料,以活性实验为指导,对其进行分离纯化得到均一多糖,并进行结构解析,为紫芝多糖结构和活性关系的研究提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

紫芝子实体(编号为 305):浙江龙泉基地提供;9 种单糖标准品(Gal、Man、Ara、Glc、Rha、Fuc、Xyl):Sigma 公司产品;葡聚糖(Pullulan-50):Shodex 公司产品;细菌脂多糖(LPS)、植物凝集素(PHA):Sigma 公司产品;青霉素和链霉素:Amresco 公司产品;RPMI1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶、磷酸缓冲盐溶液(PBS):Gibco 公司产品。

1.2 仪器

高效液相色谱仪(2695 型)、示差折光检测器(2414 型):Waters 公司产品;八角度激光光散射仪:Wyatt 公司产品;台式高速大容量离心机:Eppendorf 公司产品;粘度检测器:Wyatt 公司产品;高效离子色谱仪(ICS-2500 型):Dionex 公司产品;微型漩涡混匀仪(XW-80A):Kylin-bell 公司产品;傅里叶红外光谱仪:Thermo Fisher 公司产品;气相色谱-质谱联用仪:Agilent 公司产品;DD2 600 MHz 液体宽腔核磁仪:Agilent 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 多糖的提取和分离纯化 精密称取 1 kg 紫芝子实体粉末,加入蒸馏水,使料液体积质量比为 20 mL/g,沸水浴提取 2 h,将提取液在 10 000 r/min 条件下离心 30 min。取离心残渣,按上述提取方法提取 1 h 后,过滤离心,合并两次提取液,真空减压浓缩至 1 L,加入无水乙醇使醇浓度达到 30%,4 ℃ 静置 12 h,12 000 r/min 离心收集沉淀(命名为 GS30),沉淀用体积分数 30%乙醇洗涤 2 次后,离心,沉淀加水溶解,80 ℃ 水浴挥去乙醇后冷冻干燥。

精密称取醇沉干燥物 50 mg 溶于 10 mL 蒸馏水中,12 000 r/min 离心 15 min,弃沉淀。将上清液过 DEAE-Sephrose 离子柱层析进行分析。洗脱溶剂为蒸馏水和 2 mol/L NaCl,进行梯度洗脱,流量为 10 mL/min,每管收集 5 mL,逐管苯酚-硫酸法检测。根据糖趋势曲线分别收集水相 2 个组分(命名为 GS30W1、GS30W2)和盐相 3 个组分(命名为 GS30S1、GS30S2、GS30S3),减压浓缩,透析,冷冻干燥。取 GS30S1 粗多糖干燥物配成 2 mg/mL,加入无水乙醇使醇体积分数达到 20%,4 ℃ 静置 12 h,12 000 r/min 离心分别收集沉淀和溶液。沉淀用体积分数 20%乙醇洗涤 2 次后,离心,沉淀加水溶解,80 ℃ 水浴挥去乙醇后冷冻干燥(命名为 GS30S1-20E)。上清液减压浓缩,冷冻干燥(命名为 GS30S1-20S)。

1.3.2 各组分对刺激 RAW264.7 细胞释放 NO 活性的影响 RAW264.7 细胞株用含有质量分数 1%青链霉素混合液和 10%胎牛血清的 DMEM 培养液培养,培养条件为:CO₂ 体积分数 5%,37 ℃,湿度 95%。取对数生长期的 RAW264.7 细胞,调节密度为 10^6 个/mL,以每孔 180 μ L 接种于 96 孔板,培养 5 h,分别以 PBS 和 LPS(6 μ g/mL)为阴性对照和阳性对照,加样量为 20 μ L,以多糖样品液为实验组(使终浓度分别为 50,200,500 μ g/mL),在培养箱(37 ℃、体积分数 5% CO₂)中培养 3 d。取上清液 100 μ L,加入 50 μ L Griess 试剂,10 min 后测定 543 nm 处的吸光度,计算培养基中 NO 的生成量。

1.3.3 多糖纯度鉴定及相对分子质量分析 采用苯酚-硫酸法测定 GS30S1-20E 样品中的多糖质量分数。

称取 5 mg 粗多糖样品,加入 1 mL 流动相充分溶解,离心,上清液用 0.25 μm 的水相微孔膜过滤后取 100 μL 进样分析。采用高效凝胶尺寸排阻色谱-多角度激光光散射-示差折光检测仪联用分析技术(HPSEC-MALLS-RI)对 GS30S1-20E 相对分子质量进行分析。色谱柱为:G6000PWXL 和 G4000PWXL(7.8 mm $\times$ 300 mm,TOSOH,日本)连用。流动相:pH=7 且含有质量分数 0.02%叠氮钠的 0.15 mol/L NaNO_3 和 0.05 mol/L NaH_2PO_4 缓冲液。以 35 $^\circ\text{C}$ 的温度和 0.5 mL/min 流速进行洗脱分析,其它条件参考文献[13]。

1.3.4 单糖组成分析 称取 2~3 mg GS30S1-20E,加入 3 mL 浓度为 2 mol/L 的 TFA,在 110 $^\circ\text{C}$ 下水解 3 h 后,加入 3 mL 甲醇吹干,洗涤 4 次以上至无酸味。加入超纯水溶解,定容至 50 mL。色谱条件参照文献[14]。

1.3.5 甲基化分析 按照方法,精密称取样品 2 mg 于 V-型样品瓶,进行甲基化,水解及还原和乙酰化后,进行 GC-MS 分析,色谱条件为:色谱柱为 HP-5MS 型石英毛细管柱,30 m $\times$ 250 μm $\times$ 0.25 μm 。载气为氦气,恒流模式进样。进样口温度 250 $^\circ\text{C}$,流量为 1 mL/min。升温程序:柱初始温度 160 $^\circ\text{C}$,2 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 210 $^\circ\text{C}$,然后 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 240 $^\circ\text{C}$,一共需要 7 min。传输线温度 280 $^\circ\text{C}$,不分流模式进样,进样量为 2 μL 。四级杆温度 150 $^\circ\text{C}$,离子源温度 230 $^\circ\text{C}$ 。

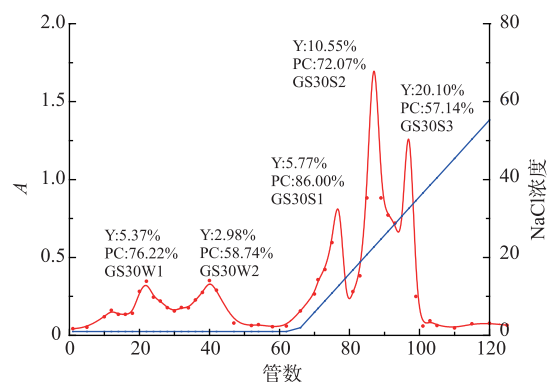
1.3.6 核磁共振分析 称取 30 mg GS30S1-20E 多糖样品,加入 2.0 mL 的 D_2O ,充分溶解,冷冻干燥,重复此步骤 3 次,最后用 1.0 mL D_2O 和氘代 DMSO 的混合溶剂(体积比为 1:10)溶解样品,进行一维氢谱(^1H -NMR)、碳谱(^{13}C -NMR)分析。

2 结果与分析

2.1 紫芝多糖的柱层析分离及活性比较

紫芝子实体热水提取物经体积分数 30%乙醇沉淀后所得粗多糖 GS30 的多糖质量分数为 41.20%,为了进一步对该组分进行纯化,将其溶解后经 DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子柱洗脱分离,收集得到 5 个组分(图 1),分别为水洗脱部分 GS30W1 和 GS30W2,NaCl 洗脱部分 GS30S1、

GS30S2 和 GS30S3,各组分多糖含量均有所提高,其中 GS30S1 的多糖质量分数达到 86%,证明经过离子柱层析分离,有效富集了多糖组分。



注:Y 表示柱层析组分得率;PC 表示柱层析组分多糖含量

图 1 GS30 多糖 DEAE-Sephrose Fast Flow 离子柱层析分离曲线

Fig. 1 Elution curve of GS30 by DEAE-Sephrose Fast Flow Column chromatography

体外刺激巨噬细胞释放 NO 的活性结果显示(图 2),与乙醇沉淀所得粗多糖 GS30 相比,经离子柱分离所得的 3 个盐相组分活性均有提高,水相的两个组分活性降低。经检测发现,GS30S1 组分的分子量较大,为了解析该多糖的结构特征,对其进行了进一步纯化。

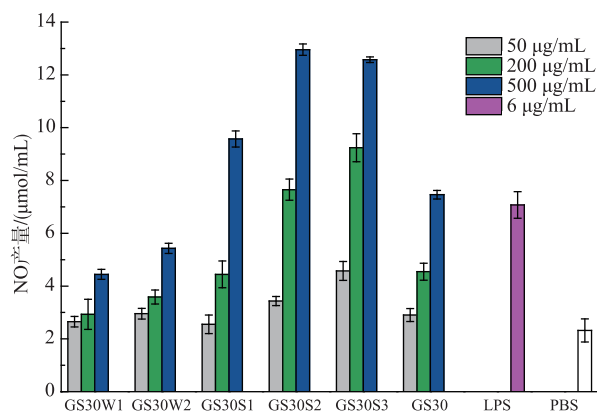


图 2 GS30 柱层析 5 个组分刺激 RAW264.7 产生 NO 的结果

Fig. 2 Results of five fractions of GS30 after the column chromatography on NO release from RAW264.7 cells

2.2 紫芝多糖的纯化及相对分子质量特征和活性分析

参考文献[15]所述,以体积分数 20%乙醇沉淀法对大分子量的多糖组分 GS30S1 进行纯化,得到

沉淀 GS30S1-20E 和上清 GS30S1-20S, 活性比较结果(图 3)显示, 沉淀 GS30S1-20E 活性远高于上清部分, 表明通过该方法有效的保留了多糖的有效成分。

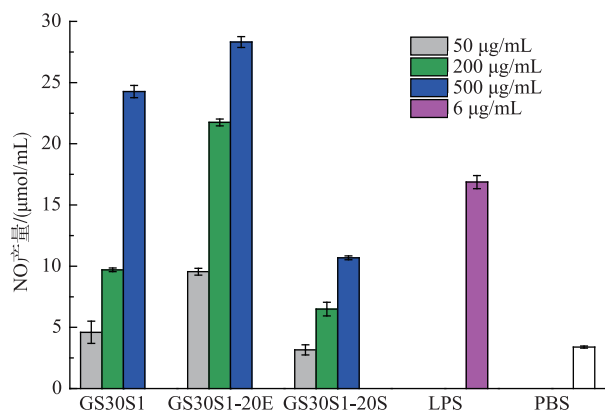


图 3 体积分数 20% 醇沉各部分刺激 RAW264.7 产生 NO 的结果

Fig. 3 Results of polysaccharide fractions by 20% ethanol precipitation on NO release from RAW264.7 cells

GS30S1-20E 多糖质量分数为 96.63% 且其水溶液在 260 nm 和 280 nm 处均无紫外吸收峰, 说明该组分不含有核酸和蛋白质。经 HPAEC 测定表明该多糖只含葡萄糖一种单糖, 因此判定 GS30S1-20E 为一种葡聚糖。

HPSEC-MALLS-RI 法分析其相对分子质量特征, 结果如图 4 所示, 示差检测器(RI)信号峰为单一一对称峰, 表明该多糖为均一组分, Astra 软件计算其重均相对分子质量为 2.418×10^6 , 数均相对分子质量为 1.668×10^6 , 多分散指数为 1.450, 特性粘度为 927.49 mL/g。

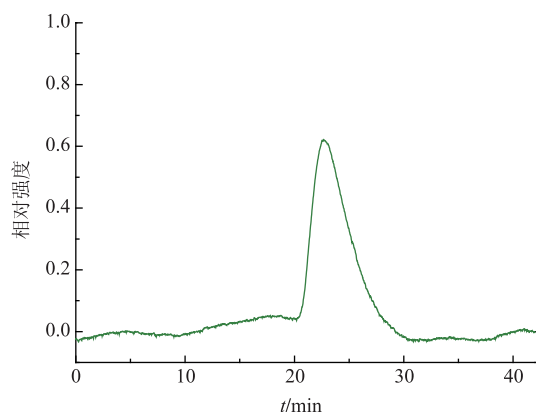


图 4 GS30S1-20E 液相图谱

Fig. 4 The HPSEC spectrum of GS30S1-20E

2.3 傅里叶红外光谱分析结果

GS30S1-20E 红外光谱图谱如图 5 所示, 在 3328 cm^{-1} 处有一个较宽且强的吸收峰, 该吸收峰为多糖分子内-OH 的伸缩振动峰; 在 2924 cm^{-1} 处有一个较弱的吸收峰, 为多糖的 C-H 伸缩振动峰, 以上两个吸收峰为多糖的特征吸收峰, 表明该样品为多糖。在 1640 cm^{-1} 的吸收峰, 是 C-O 的伸缩振动峰, 在 1369 cm^{-1} 处的吸收峰是 C-H 键的变角振动峰; 在 $1200 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 之间的吸收峰, 表明该多糖属于吡喃型多糖; 在 889 cm^{-1} 处是 β -构型的特征吸收峰, 表明该多糖为 β -葡聚糖。

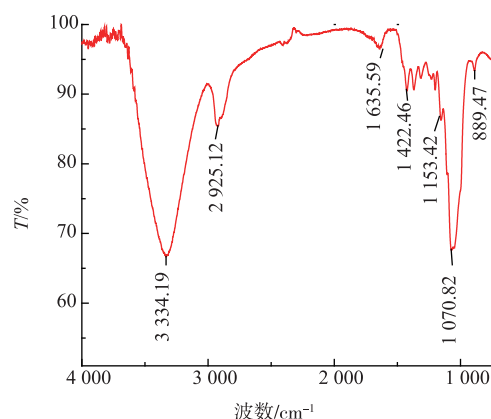


图 5 紫芝多糖 GS30S1-20E 红外图谱

Fig. 5 Infrared spectrogram of polysaccharide fraction GS30S1-20E from *Ganoderma sinense*

2.4 紫芝子实体多糖 GS30S1-20E 甲基化分析结果

GS30S1-20E 通过甲基化后, 经 GC-MS 分析, 如图 6 和表 1 所示, GS30S1-20E 主要包含末端连接、1,3-连接、1,3,6-连接的葡萄糖残基, 且摩尔比为 1.00:2.32:1.01。表明此多糖是以 1,3-连接为主链, 以 1,6-连接为支链。

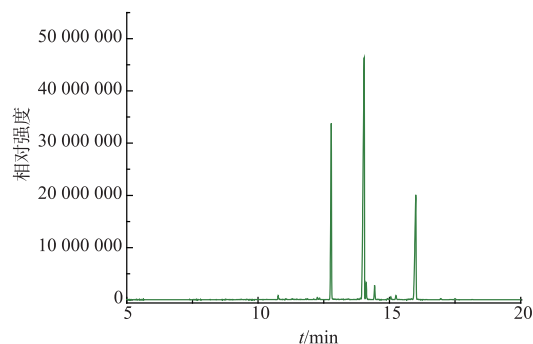


图 6 GS30S1-20E 的 GC-MS 图谱

Fig. 6 GC-MS spectrum of GS30S1-20E

表 1 紫芝多糖 GS30S1-20E 的甲基化分析结果

Table 1 Result of methylation of GS30S1-20E

链接方式	主要质谱碎片	摩尔比
Glc(1→	43,45,87,102,118,129,145,161,162,205	1.00
→3)-Glc-(1→	43,45,71,87,101,118,129,161,234,277	2.32
→3,6)-Glc-(1→	43,87,118,129,189,234	1.01

2.5 GS30S1-20E 的核磁共振分析结果

为了进一步验证其结构,对 GS30S1-20E 多糖进行了核磁共振分析。从 ^1H -NMR 谱图(图 7)可以看出,异头氢区域有 4 个共振峰信号,分别在 84.76×10^{-6} (3 个 H 重叠)、 84.46×10^{-6} 处出现,表明 GS30S1-20E 为 β 构型葡聚糖。

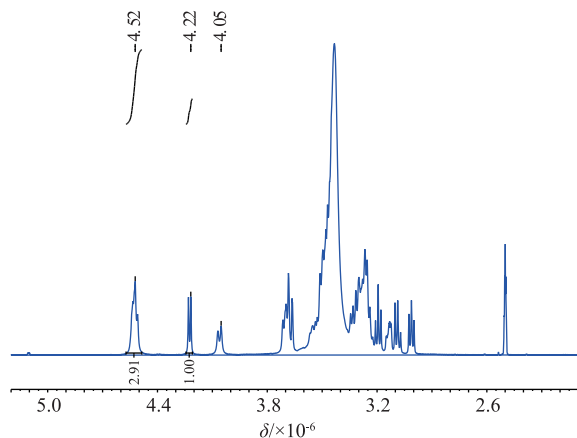


图 7 紫芝多糖 GS30S1-20E 的 ^1H -NMR 谱图

Fig.7 ^1H -NMR spectra of polysaccharide fraction GS30S1-20E from *Ganoderma sinense*

从 ^{13}C -NMR 谱图(图 8)可以看出,异头碳区域的共振信号峰出现在 $\delta 102.89\times 10^{-6}$ 和 $\delta 102.79\times 10^{-6}$ 处,表明 GS30S1-20E 为 β 构型,与红外光谱结果和氢谱一致。经与文献[16]比对,图谱中 $\delta 75\times 10^{-6}$ 、 $\delta 76.2\times 10^{-6}$ 、 $\delta 72.7\times 10^{-6}$ 、 $\delta 68.3\times 10^{-6}$ 和 $\delta 60.8\times 10^{-6}$ 处的信号峰依次归属于未被取代的 C3、C5、C2、C4 和 C6, $\delta 85.9\times 10^{-6}$ 和 $\delta 70\times 10^{-6}$ 分别归属于被取代的 C3 和 C6。该结果进一步证明该多糖是以 β -(1,3)-糖苷键为主链和 β -(1,6)-糖苷键为支链的葡聚糖。

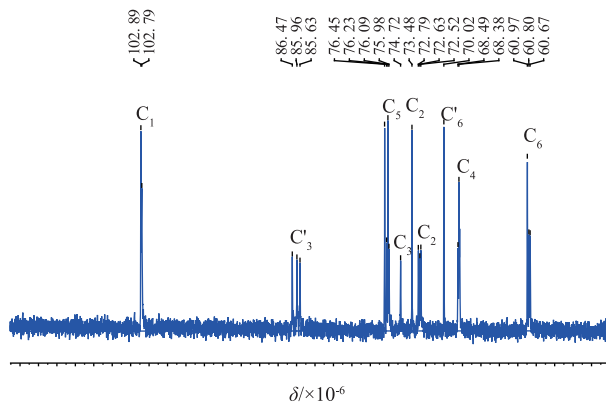


图 8 紫芝多糖 GS30S1-20E 的 ^{13}C -NMR 谱图

Fig. 8 ^{13}C -NMR spectra of polysaccharide fraction GS30S1-20E from *Ganoderma sinense*

3 结 语

以 RAW264.7 细胞释放 NO 免疫活性实验为指导,通过多次乙醇沉淀和 DEAE 阴离子交换柱层析的方法从紫芝子实体中分离得到均一多糖,该多糖重均相对分子质量为 1.825×10^6 ,以 β -(1,3)-糖苷键为主链和 β -(1,6)-糖苷键为支链,主链与支链上糖残基的摩尔比为 3:1。目前研究表明,紫芝子实体多糖以杂多糖为主,主要的单糖有葡萄糖、半乳糖、甘露糖和岩藻糖。Lan-Zhen Meng 等[17]分离得到的 GSPS 由葡萄糖、甘露糖、半乳糖和岩藻糖组成,Gao 等[11]通过超滤方法分离得到的 GS-6b 包含有岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖组成,作者从紫芝子实体中分离得到的大分子 β -葡聚糖,为首次从紫芝子实体中分离得到。

体外活性实验显示该多糖能够显著刺激 RAW264.7 细胞释放 NO,随着多糖质量分数的增加,其 NO 释放量也逐渐增加,呈现质量分数依赖性。NO 是一种具有广泛生物活性的细胞信号因子,它可参与神经、免疫等调节作用[18]。Murata 等[19]研究表明 β -葡聚糖可通过刺激巨噬细胞产生 IL-12、IL-10、IL-6 和 PGE2 来调节细胞免疫反应。据报道 β -葡聚糖广泛地分布于真菌、细菌和植物体内,并且真菌 β -葡聚糖是公认的活性成分之一[20],具有多种生物活性,包括免疫调节[21]、抗肿瘤[22]、抗氧化[23]等,作者分离得到的 β -葡聚糖表现出较好的免疫活性,其免疫机制有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 林志彬. 灵芝的现代研究[M]. 北京:北京医科大学出版社,2001.
- [2] 章国镇. 神农本草经[M]. 福州:福建科学技术出版社,2006.
- [3] NIU Lixing, YANG Yifang, ZHAO Zhengbao. Structure identification of bioactive polysaccharide (GS-A-1) from *Ganoderma sinense*[J]. **Chinese Traditional Patent Medicine**, 2012, 34(5):968-971.(in Chinese)
- [4] 赵美林. 紫芝多糖的提取、分离纯化及其药效活性的初步研究[D]. 张家口:河北北方学院,2013.
- [5] ZHU Zixin. The *Ganoderma sinense* effect in the exhaustive rat of resistant sport fatigue and resistant tissue damage [J]. **China Sport Science**, 2012, 32(9):75-80.(in Chinese)
- [6] XIAO-QIANG H, CHAN B C L, HUA Y, et al. Structural characterization and immuno-modulating activities of a polysaccharide from *Ganoderma sinense*[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2012, 51(4):597-603.
- [7] HAN X Q, CHUNG L C B, DONG C X, et al. Isolation, structure characterization, and immunomodulating activity of a hyperbranched polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma sinense* [J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, 2012, 60(17):4276-4281.
- [8] YUE G G, CHAN B C, HAN X Q, et al. Immunomodulatory activities of *Ganoderma sinense* polysaccharides in human immune cells[J]. **Nutrition & Cancer**, 2013, 65(5):765-774.
- [9] WAN F, HUANG D. [Anti-inflammatory and analgesic actions of artificial and fermentative *Ganoderma sinense* (AFGS)] [J]. **China journal of Chinese materiamedica**, 1992, 17(10).
- [10] WANG Saizhen, LIN Shuqian, LIN Zhibin, et al. Study on properties of *Ganoderma Sinense* mycelia polysaccharide peptide GS-PPA[J]. **Strait Pharmaceutical Journal**, 2006, 18(6):48-50.(in Chinese)
- [11] GAO, Yang, JIANG, et al. Characterization and anti-tumor activity of glycopeptides from *Ganoderma sinensis* [J]. **Chemical Research in Chinese Universities**, 2009, 25(1):47-51.
- [12] 高阳. 紫芝糖蛋白化学结构及抗肿瘤活性的研究[D]. 长春:吉林大学,2007.
- [13] LIU Y F, ZHAO Y, YANG Y, et al. Structural characteristics and hypoglycemic activity of polysaccharides from *Coprinus comatus*[J]. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, 2013, 2(2):164-169.
- [14] YU Qing, SHANG Shu, FENG Youlong, et al. Determination of monosaccharide composition of polysaccharide in *Ganoderma lucidum* spore by ion chromatography[J]. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, 2014, 49(4):344-347.(in Chinese)
- [15] LIU Yanfang, TANG Qingjiu, ZHANG Jingsong, et al. Analysis of large molecular weight polysaccharide in the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* cultivar 'Hunonglingzhi 1' [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(10):1078-1082.(in Chinese)
- [16] ZHANG Haibo, DAI Jun, LUO Biying, et al. Analysis of the structure of yeast glucan[J]. **Food and Fermentation Technology**, 2011, 47(5):31-33.(in Chinese)
- [17] MENG L Z, XIE J, LV G P, et al. A comparative study on immunomodulatory activity of polysaccharides from two official species of *Ganoderma*(Lingzhi)[J]. **Nutrition & Cancer**, 2014, 66(7):1-8.
- [18] WANG Zhong, NIE Wei, GUO Yuming, et al. The advances of immunological regulation and its action mechanism of β -1, 3-D-Glucan[J]. **Acta Zoonutrimenta Sinica**, 2007, 19(s1):481-486.(in Chinese)
- [19] MURATA Y, SHIMAMURA T, TAGAMI T, et al. The skewing to Th1 induced by lentinan is directed through the distinctive cytokine production by macrophages with elevated intracellular glutathione content [J]. **International Immunopharmacology**, 2002, 2(5):673-689.
- [20] MA Zheng, REN Chonghua, ZHANG Zhiying. Application of yeast β -parent dextran in livestock and poultry production [J]. **Journal of Animal Science and Veterinary Medicine**, 2014, 33(1):29-32.(in Chinese)
- [21] WU Hao, ZHANG Jianfa. The advances of immunological regulation of β -Glucan [J]. **Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology**, 2014, 30(1):97-100.(in Chinese)
- [22] MIZONO M, MINATO K I, TSUCHIDA H. Preparation and specificity of antibodies to an anti-tumor β -glucan, lentinan [J]. **International Union of Biochemistry & Molecular Biology Life**, 1996, 39(4):679-685.
- [23] KOGAN G, STASKO A, BAUEROVA K, et al. Antioxidant properties of yeast (1 to 3)- β -D-glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy and its activity in the adjuvant arthritis[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2005, 61(1):18-28.