



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101735329 A

(43) 申请公布日 2010.06.16

(21) 申请号 200810226056.3

C12R 1/645(2006.01)

(22) 申请日 2008.11.04

(71) 申请人 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12号

(72) 发明人 胡清秀

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王朋飞

(51) Int. Cl.

C08B 37/00(2006.01)

A61K 31/715(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

C12N 1/20(2006.01)

A23L 1/30(2006.01)

A23L 1/09(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 1 页

(54) 发明名称

黄伞多糖及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种黄伞多糖,其是从黄伞菌丝体或子实体中经提取纯化获得,其是一种由葡萄糖、果糖、甘露糖以及半乳糖四种单糖组成的一种杂多糖。其能提高人体免疫力,具有防癌、抗癌,抗衰老等作用。可与灵芝多糖、云芝多糖等配合使用。本发明还提供了一种制备黄伞多糖的方法,改进水提法,粗多糖得率达 23% 以上,多糖含量 55%;粗多糖的纯化后含量高达 93.67%,结合菌丝体液体培养技术,可提高菌丝体生长量 10% 以上,从而降低生产成本,提高生产效率,特别是大大提高了多糖产品的生物活性作用。

1. 黄伞多糖,其通过如下方法制备获得:

1) 黄伞粗多糖的提取

以黄伞菌丝体或子实体为原料,经:①材料预处理,②浸提,③醇析,④浓缩,⑤真空冷冻干燥,得黄伞粗多糖;

2) 黄伞多糖纯化

将黄伞粗多糖制成 1~5%的水溶液,滴加适量的浓氨水使其 pH 值达到 8~10,静置 10~15min 后在 4500~5000rpm 下离心 10~15min 除去蛋白沉淀;然后将多糖溶液稀释 1~3 倍,再加入等体积的 seveg 试剂,剧烈振荡 25~35min 后,4500~5000rpm 下离心 10~15min,取上清液加入等体积 seveg 试剂重复除蛋白操作一次,将多糖溶液浓缩后冷冻干燥;取多糖溶于蒸馏水后经由 D152 及 D301T 串联而组成的离子交换柱进一步室温 20~28℃下纯化,洗脱液为蒸馏水,纯化后,再经 Sephadex G-100 凝胶柱层析纯化,以蒸馏水作为洗脱液进行洗脱,即得黄伞多糖。

2. 一种制备黄伞多糖的方法,其包括如下步骤:

1) 黄伞粗多糖的提取

以黄伞菌丝体或子实体为原料,经:①材料预处理,②浸提,③醇析,④浓缩,⑤真空冷冻干燥,得黄伞粗多糖;

2) 将黄伞粗多糖制成 1~5%的水溶液,滴加适量的浓氨水使其 pH 值达到 8~10,静置 10~15min 后在 4500~5000rpm 下离心 10~15min 除去蛋白沉淀;然后将多糖溶液稀释 1~3 倍,再加入等体积的 seveg 试剂剧烈振荡 25~30min 后,4500~5000rpm 下离心 10~15min,取上清加入等体积 seveg 试剂重复除蛋白操作一次,将多糖溶液浓缩后冷冻干燥;取多糖溶于蒸馏水后经由 D152 及 D301T 串联而组成的离子交换柱进一步室温 20~28℃下纯化,洗脱液为蒸馏水,纯化后,再经 Sephadex G-100 凝胶柱层析纯化,以蒸馏水作为洗脱液进行洗脱,即得黄伞多糖。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,其中步骤 1)

①材料预处理将黄伞菌丝体或子实体冻干,粉碎至 120~160 目,加去离子水 1:20~30,超声波处理 5~15min;

②浸提回流提取,提取时间 1~4 小时、提取温度 60~90℃;

③醇析向浸提液中加入 3~5 倍量的无水乙醇,醇析 8~16 小时;

④浓缩醇析后 3500~5000rpm 离心 15~25min 弃上清液,得沉淀物,先用无水乙醇洗涤沉淀一次,再用丙酮洗涤沉淀两次;

⑤真空冷冻干燥。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,其中步骤 1)

①材料预处理将黄伞菌丝体或子实体冻干,粉碎至 140 目,料水比 1:30、超声波功率 600W,处理时间 10min;

②浸提回流提取,提取时间 3 小时、提取温度 75℃;

③醇析向浸提液中加入 4 倍量的无水乙醇,醇析 12 小时;

④浓缩醇析后 3500-5000rpm 离心 20min 弃上清液,得沉淀物,先用无水乙醇洗涤沉淀一次,再用丙酮洗涤沉淀两次;

⑤真空冷冻干燥。

5. 如权利要求 2 ~ 4 任一项所述的方法,其中所述黄伞菌丝体通过如下方法制备获得:

①液体培养基配方:葡萄糖 15 ~ 25g/L、酵母浸粉 6 ~ 10g/L、维生素 B₁200 ~ 400 μg/L、Mg₂SO₄0.3 ~ 0.5g/L、KH₂PO₄0.8 ~ 1.2g/L、K₂HPO₄0.8 ~ 1.2g/L,水余量,高压灭菌备用;

②种子培养:按无菌操作方法,取母种菌丝体,按接种量 1 ~ 10% (V/V),转接灭菌后的液体培养基中,培养温度:在 24 ~ 26℃;摇床转速 120r/min ~ 140r/min 条件下,培养时间 10 ~ 14 天;

③发酵培养:将种子培养菌种,无菌操作方法,按接种量 5 ~ 10% (V/V) 接种至发酵罐中,按常规发酵培养,发酵培养基为:葡萄糖 20 ~ 40g/L,玉米浆 15 ~ 25g/L,磷酸二氢钾 1.5 ~ 2.5g/L,pH 值 6.5 ~ 7.0,控制温度 24 ~ 26℃、搅拌转速 150 ~ 180r/min,通气量为 0.8 ~ 2(V/V · min),发酵培养 7 ~ 10 天。

6. 含有权利要求 1 所述黄伞多糖的药物或保健食品。

黄伞多糖及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种黄伞多糖,其是从黄伞中提取得到的多糖,该多糖的纯化产品能够提高人体免疫力,本发明还涉及该多糖的制备方法。

背景技术

[0002] 黄伞学名 *Pholiota adiposa*(Fr.)Qu él. 在分类学上属真菌门 Eumycota,担子菌亚门 Basidiomycotina,层菌纲 Hymenomyces,伞菌目 Agaricales,球盖菇科 Strophariaceae,环锈伞属 Genus Pholiota,是一种食药两用菌。《中国大型真菌》(卯晓岚,2000)⁽¹⁾ 记载黄伞“子实体表面有一层粘质,经盐水、温水、碱溶液或有机溶剂提取可得多糖体,此多糖体对小白鼠肉瘤 180 及艾氏腹水癌的抑制率达 80%~90%”。苏延友(2004)⁽²⁾ 运用正交试验法初步对黄伞多糖提取工艺及有关水浸提多糖体外诱导巨噬细胞作用进行了研究,其研究表明,黄伞多糖具有免疫增强剂的作用,能有效地激活巨噬细胞,通过增强细胞因子分泌、增强 NO 的产生水平、增强其吞噬功能及体外杀伤活性等多种途径来调节免疫系统。王谦(2006)⁽³⁾ 等通过小鼠实验得知,黄伞发酵提取物具有辅助调节甘油三酯的作用;目前对黄伞的野生驯化、生物学特性及人工栽培技术、液体培养等方面的技术也取得一定进展⁽⁴⁾⁽⁵⁾。但黄伞子实体生产周期长、产量不高、产品质量不稳定,黄伞多糖提取率低,纯度不高,目前对黄伞提取多糖的纯化及其高级结构的研究国内外均未见报道,纯化后黄伞多糖的生理活性也未见有报道。

[0003] 本发明通过对黄伞液体培养菌丝体进行多糖提取与纯化,通过改进提取工艺,及多级纯化处理,获得高纯度多糖。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种黄伞多糖,其能提高人体免疫能力。

[0005] 本发明的另一个目的在于提供制备黄伞多糖的方法。

[0006] 本发明黄伞多糖是以黄伞(菌丝体或子实体)为原料,通过提取纯化获得,其是一种由葡萄糖、果糖、甘露糖以及半乳糖四种单糖组成的一种杂多糖。

[0007] 本发明黄伞多糖通过如下方法制备获得:

[0008] 1. 黄伞多糖的提取

[0009] ①材料预处理将黄伞(菌丝体或子实体)冻干,粉碎至 120~160 目,优选粉碎至 140 目;料水比 1:20~30、超声波处理 5~15min,功率 600~1000W,优选处理功率 600W,处理时间 10min。

[0010] ②浸提回流提取 1~4 小时,提取温度 60~90℃,得浸提液;

[0011] ③醇析向浸提液中加入 3~5 倍量的无水乙醇,醇析 8~16 小时。

[0012] ④浓缩醇析后 3500~5000rpm 离心 15~25min 弃上清液,得沉淀物,依次用无水乙醇(1次)、丙酮(2次)洗涤沉淀。

[0013] ⑤真空冷冻干燥得黄伞粗多糖。

[0014] 2. 黄伞多糖的纯化

[0015] 黄伞多糖纯化是将黄伞多糖中的游离蛋白及色素去除的过程,黄伞多糖中游离蛋白的去除采用等电点结合 seveg 法,首先将黄伞粗多糖制成 1 ~ 5% 的多糖溶液,滴加适量的浓氨水使其 pH 值达到 8 ~ 10,静置 10 ~ 15min 后在 4500 ~ 5000rpm 下离心 10 ~ 15min 除去蛋白沉淀。然后将多糖溶液稀释 1 ~ 3 倍,再加入等体积的 seveg 试剂(正丁醇:氯仿=1:4)剧烈振荡 25-30min 后,4500-5000rpm 下离心 10 ~ 15min,取上清液重复 seveg 除蛋白操作一次。将多糖溶液浓缩后冷冻干燥。

[0016] 取多糖溶于蒸馏水后经 D152 及 D301T 串联而组成的离子交换柱进一步室温 20 ~ 28℃ 下纯化,洗脱液为蒸馏水,纯化后,再经 Sephadex G-100 凝胶柱层析纯化(室温 20 ~ 28℃),以蒸馏水作为洗脱液,即可得到高纯度多糖产品。

[0017] 以上提取纯化过程中通过冷冻干燥可以除去浓缩过程中不能完全去除的多糖溶液中的有机溶剂,从而减少有机溶剂去后续步骤中柱子的破坏,同时,可以计算上步除蛋白过程中,多糖的得率及纯度。

[0018] 按照上述方法得到的多糖产品,采用苯酚硫酸法测定其多糖含量可达 93.67%,采用 Folin-酚法测定蛋白未检出。

[0019] 本发明还提供了一种黄伞菌丝体液体培养方法,通过该方法可以提高菌丝体的生长量,从而提高生产效率,降低成本。

[0020] 本发明提供的黄伞菌丝体液体培养方法如下:

[0021] ①液体培养基配方:葡萄糖 15 ~ 25g/L、酵母浸粉 6 ~ 10g/L、维生素 B₁ 200 ~ 400 μg/L、Mg₂SO₄ 0.3 ~ 0.5g/L、KH₂PO₄ 0.8 ~ 1.2g/L、K₂HPO₄ 0.8 ~ 1.2g/L,水余量,高压灭菌备用;

[0022] ②液体菌种培养:按无菌操作方法,取母种菌丝体,按接种量 1 ~ 10% (V/V),转接灭菌后的液体培养基中,培养温度:在 24 ~ 26℃;摇床转速 120r/min ~ 140r/min 条件下,培养时间 10 ~ 14 天;

[0023] ③发酵培养:将种子培养菌种,无菌操作方法,按接种量 5 ~ 10% (V/V) 接种至发酵罐中,发酵培养基为:葡萄糖 20 ~ 40g/L,玉米浆 15 ~ 25g/L,磷酸二氢钾 1.5 ~ 2.5g/L, pH 值 6.5 ~ 7.0,控制温度 24 ~ 26℃、搅拌转速 150 ~ 180r/min,通气量为 0.8 ~ 2(V/V · min),发酵培养 7 ~ 10 天。

[0024] 其中步骤①优选液体培养基配方为:葡萄糖 20g/L、酵母浸粉 8g/L、维生素 B₁ 300 μg/L、Mg₂SO₄ 0.4g/L、KH₂PO₄ 1g/L、K₂HPO₄ 1g/L, pH 5.5-7,余量为水。

[0025] 其中步骤②优选按无菌操作方法,用直径 0.5cm 打孔器取母种,取接种量为 3 块的固体菌种,转接灭菌后的液体培养基中(接种量约为 3%)。培养温度:在 25℃;摇床转速 120r/min ~ 140r/min 条件下,培养时间 12 天。

[0026] 其中步骤③优选发酵培养:将种子培养菌种,无菌操作方法接种至发酵罐中,接种量为 8% (V/V),发酵培养基为:葡萄糖 30g/L,玉米浆 20g/L,磷酸二氢钾 2g/L, pH 值 6.5 ~ 7.0,控制温度为 25℃,搅拌器转速为 150 ~ 180r/min,通气量为 0.8 ~ 2(V/V · min),发酵培养 7 ~ 10 天。

[0027] 在本申请中,术语“通气量”是指每分钟内通过单位体积培养液的气体体积比(V/V · min)。如:内装 3m³ 培养液的发酵罐,若每分钟通入 1.5m³ 的无菌空气,则通气比为

3 : 1.5 = 1 : 0.5, 简称通气量为 0.5(V/V · min)。

[0028] 本申请中涉及到的百分号“%”,若未特别说明,是指质量百分比;但溶液的百分比,除另有规定外,是指溶液 100ml 中含有溶质若干克;液体之间的百分比,系指在 20℃ 时容量的比例。

[0029] 本发明为人类提供一种新型保健食品——黄伞多糖,其能提高人体免疫力,具有防癌、抗癌,抗衰老等作用。因此,可将本发明黄伞多糖可发成具有治疗作用的药物,或者具有保健作用的功能食品。此外,本发明黄伞还可与灵芝多糖、云芝多糖等配合使用。本发明克服了黄伞多糖提取率低,含量低(一般粗多糖含量在 50% 以下),多糖组份复杂等难题,提供一种黄伞多糖的提取纯化方法,多糖得率达 60% 以上,多糖的纯度高达到 93.67%,此外结合菌丝体液体培养技术,可提高菌丝体生长量 10% 以上,从而降低生产成本,提高生产效率,特别是大大提高了多糖产品的生物活性作用,例如抗癌,搞肿瘤,清除体内自由基等。

附图说明

[0030] 图 1 为多糖 PP-HMW 的高压液相色谱图;

[0031] 图 2 为黄伞多糖 PP-HMW 的紫外线扫描图。

具体实施方式

[0032] 以下实施例进一步说明本发明的内容,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0033] 若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0034] 实施例 1 黄伞菌丝体液体培养

[0035] ①液体培养基配方:葡萄糖 20g/L、酵母浸粉 8g/L、维生素 B₁300 μg/L、Mg₂SO₄ 0.4g/L、KH₂PO₄ 1g/L、K₂HPO₄ 1g/L, pH 6, 高温灭菌备用。

[0036] ②种子培养:按无菌操作方法,用直径 0.5cm 打孔器取母种,取接种量为 3 块的固体菌种,转接灭菌后的液体培养基中(接种量约 3%)。培养温度:在 25℃;摇床转速 120r/min ~ 140r/min 条件下,培养时间 12 天。

[0037] ③发酵培养:将种子培养菌种,无菌操作方法接种至发酵罐中,接种量为 8% (V/V),发酵培养基为:葡萄糖 30g/L,玉米浆 20g/L,磷酸二氢钾 2g/L, pH 值 6.5 ~ 7.0,控制温度为 25℃,搅拌器转速为 150 ~ 180r/min,通气量为 0.8(V/V · min)。发酵结束后,每升溶液中的黄伞菌丝体干重达到 13.6g。

[0038] 实施例 2 黄伞菌丝体液体培养

[0039] ①液体培养基配方:葡萄糖 15g/L、酵母浸粉 10g/L、维生素 B₁200 μg/L、Mg₂SO₄ 0.5g/L、KH₂PO₄ 0.8g/L、K₂HPO₄ 1.2g/L, pH 6, 高温灭菌备用。

[0040] ②种子培养:按无菌操作方法,用直径 0.5cm 打孔器取母种,取接种量为 5 块的固体菌种,转接灭菌后的液体培养基中(接种量约 6%)。培养温度:在 25℃;摇床转速 120r/min ~ 140r/min 条件下,培养时间 10 天。

[0041] ③发酵培养:将种子培养菌种,无菌操作方法接种至发酵罐中,接种量为 10% (V/V),发酵培养基为:葡萄糖 40g/L,玉米浆 25g/L,磷酸二氢钾 2.5g/L, pH 值 6.5,控制温度为

25℃, 搅拌器转速为 150 ~ 180r/min, 通气量为 1.5(V/V·min)。发酵结束后, 每升溶液中的黄伞菌丝体干重达到 14.5g。

[0042] 实施例 3 黄伞菌丝体液体培养

[0043] ①液体培养基配方: 葡萄糖 25g/L、酵母浸粉 6g/L、维生素 B₁400 μg/L、Mg₂SO₄ 0.3g/L、KH₂PO₄ 0.1.2g/L、K₂HPO₄ 0.8g/L, pH 6, 高温灭菌备用。

[0044] ②种子培养: 按无菌操作方法, 用直径 0.5cm 打孔器取母种, 取接种量为 2 块的固体菌种, 转接灭菌后的液体培养基中(接种量约 2%)。培养温度: 在 25℃; 摇床转速 120r/min ~ 140r/min 条件下, 培养时间 16 天。

[0045] ③发酵培养: 将种子培养菌种, 无菌操作方法接种至发酵罐中, 接种量为 5% (V/V), 发酵培养基为: 葡萄糖 30g/L, 玉米浆 15g/L, 磷酸二氢钾 1.5g/L, pH 值 6.5, 控制温度为 25℃, 搅拌器转速为 150 ~ 180r/min, 通气量为 2(V/V·min)。发酵结束后, 每升溶液中的黄伞菌丝体干重达到 13.1g。

[0046] 实施例 4 黄伞人工栽培

[0047] 采用代料熟化栽培栽培方式, 秋季栽培应在春季 1 ~ 2 月份制栽培袋, 3 ~ 5 月份出菇。秋季在 8 ~ 9 月份制栽培袋, 10 ~ 12 月份出菇。秋季栽培较春季栽培病虫害少, 出菇质量较高。黄伞栽培菇房可选用塑料大棚或室内层架出菇方式; 也可以工厂化栽培模式, 可在控温条件下进行周年多批次的人工栽培。

[0048] 黄伞的袋料栽培有 6 个操作程序: 培养基质拌料 → 装袋灭菌 → 无菌接种 → 发菌培养 → 出菇管理 → 采收加工。

[0049] 栽培原料: 主料木屑、棉籽壳, 辅料麦麸、石膏粉。人工栽培培养基配方如下:

[0050] ①棉子壳 88%, 麸皮 10%, 石膏 1%, 过磷酸钙 1%。

[0051] ②棉子壳 68%, 杂木屑 20%, 麸皮 10%, 石膏 1%, 过磷酸钙 1%。

[0052] ③棉子壳 78%, 玉米芯粉 10%, 麸皮 10%, 石膏 1%, 过磷酸钙 1%。

[0053] 培养基配制棉子壳在使用前要按 1 : 1 加水堆置 8 ~ 12h, 这样有利于棉籽壳吸水及部分营养成分的分解, 从而确保黄伞的高产。将上述堆置好的棉籽壳按各配方加入辅料并拌匀, 再加入适量水将料培养料含水量调至 60% ~ 65%, pH 自然。

[0054] 装袋: 采用 17cm × 33cm × 0.04cm 的聚乙烯或聚丙烯塑料袋, 每袋装干料重约 0.45kg ~ 0.55kg。料要适度压紧, 然后将袋口用套环封好, 套环通气好, 可使发菌时间缩短 5 ~ 10 天。

[0055] 灭菌: 高压或常压灭菌。常压灭菌要求将培养料袋放置于灭菌锅内, 加热至 100℃, 保持 10 小时, 停火焖 5 小时 ~ 6 小时, 然后将袋取出冷却接种。高压灭菌, 用大容量高压灭菌锅, 料袋亦分层放置, 保持压力 1.2kg/cm² 灭菌 2h, 然后自然冷却至压力为零时, 开锅盖将料袋取出冷却。

[0056] 接种: 按无菌操作程序进行。

[0057] 菌丝培养: 接种后将料袋直接码放于干净培养室的培养架, 培养室温度应保持在 23℃ ~ 25℃。发菌时间约 30 ~ 35 天左右。当菌袋完全成黄褐色时, 即可移入出菇室, 进行出菇管理。

[0058] 出菇管理: 菌袋移入出菇室后, 脱掉套环, 将袋口旋拧两圈, 使菌袋尽量减少与空气接触面积, 有利于菌袋保持水分, 防止表面菌皮干燥板结。进入出菇室后 6 ~ 10 天, 原

基开始分化,此时可将菌袋完全打开。出菇管理主要是湿度的控制,具体措施:1. 增加空气相对湿度:依据菌袋不同时期对水分的需要,主要可分为三个不同阶段进行管理。第一阶段原基分化前,调整出菇室内空气相对湿度 80%~90%之间,以刺激原基分化,但如果湿度过大,容易造成绿霉感染;第二阶段小菇蕾生长期,此时空气相对湿度不易过大,否则会导致小菇腐烂,降低产量,应将湿度控制在 70%~85%之间;第三阶段黄伞快速生长期,调整空气相对湿度在 85%~95%之间,以满足黄伞快速生长对水分的需要,同时有利于提高黄伞的产量和品质。加湿可采用加湿器喷雾和地面浇水相结合的方式。2. 温度:黄伞是一种中低温型食用菌,适合于春秋出菇,黄伞子实体生长发育阶段菇房内温度应维持在 15~20℃,因此在不同栽培地区要计算好时间,保证出菇温度,如有条件也可在出菇室增加降温升温设备,不过会增加成本。3. 适当通风换气:每天通风 1~2 次,每次 1~2 小时左右,要结合天气情况进行,天热早、晚通风,天寒冷,采取中午气温高时通风,以不断补充新鲜空气,排除 CO₂。4. 保持出菇室内一定的光照度,黄伞不能在完全黑暗的条件下正常发育,出菇室应有 300~800 勒克斯左右的照度,平时以正常人视力能看清报纸上的小字就可以了。5. 保持出菇室内清洁,定期清扫出菇室内卫生,以减少菌棒污染率。

[0059] 采收:黄伞在严格的出菇管理下,从原基出现开始约经过 7~10 天即可采摘。采摘标准为:菌柄不再生长,菌盖有平展趋势,此时应及时采摘,否则开伞降低商品价值。采摘后搔菌,将袋口拧紧,进入菌丝恢复期,降低出菇室空气相对湿度,控制在 60%~80%。待菌丝恢复后重复上述操作进行出菇,一般可采 3~4 潮菇,生物学转化率达 100%~120%。

[0060] 实施例 5 黄伞多糖提取与纯化

[0061] 1. 黄伞多糖提取

[0062] ①材料预处理将实施例 1 制得的菌丝体冻干,粉碎至 140 目,料水比 1:30、超声波功率 600W,处理 10min;

[0063] ②浸提将预处理后的菌丝体放入回流瓶中,浸提时提取时间 3 小时、提取温度 75℃,得多糖浸提液;

[0064] ③醇析向多糖浸提液中加入 3.5 倍量的无水乙醇,醇析 12 小时;

[0065] ④浓缩醇析后 4500rpm 离心 10min 弃上清液,得沉淀物,依次用无水乙醇(1 次)、丙酮(2 次)洗涤沉淀。

[0066] ⑤真空冷冻干燥得菌丝体粗多糖。

[0067] 按上述提取方法,黄伞粗多糖提取率达到 23.41%,多糖含量达到 55.69%。

[0068] 2. 黄伞多糖纯化

[0069] 将上述制得的多糖用蒸馏水制备成 3%的多糖溶液,滴加适量的浓氨水使其 pH 值达到 10,静置 10min 后在 4500rpm 下离心 10min 除去蛋白沉淀。然后将多糖溶液稀释一倍,再加入等体积的 seveg 试剂(正丁醇:氯仿=1:4)剧烈振荡 30min 后,4500rpm 下离心 10min,取上清液重复操作一次。将多糖溶液浓缩后冷冻干燥。

[0070] 取多糖溶于适量蒸馏水后经由 D152 及 D301T 串联而组成的离子交换柱进一步室温 20~28℃下纯化,洗脱液为蒸馏水,纯化后,再经 Sephadex G-100 凝胶柱层析纯化(室温 20~28℃),以蒸馏水作为洗脱液,即可得到高纯度多糖产品。经检测多糖含量达 93.67%。

[0071] 3、多糖纯度鉴定:

[0072] (1) 采用高压液相色谱法 (HPLC) 对上述方法获得的纯多糖样品进行鉴定, 结果如图 1. 所示。高压液相色谱图为单一对称峰, 说明所得黄伞多糖组分为均一组分。

[0073] (2) 紫外扫描结果: 如图 2 所示, 没有发现核酸吸收峰 (260nm ~ 290nm) 及蛋白质吸收峰 (250 ~ 300nm), 证明黄伞多糖溶液中无核酸及蛋白。

[0074] 4. 包装保存: 把干燥后的纯多糖粉碎成细粉后, 装入铝箔包装袋内封口保存或进行产品加工。

[0075] 实施例 6 黄伞多糖提取与纯化

[0076] 1. 黄伞多糖提取

[0077] ①材料预处理将实施例 1 制得的菌丝体冻干, 粉碎至 120 目, 料水比 1 : 30、超声波功率 1000W, 处理 15min ;

[0078] ②浸提将预处理后的菌丝体放入回流瓶中热水提取, 提取时间 2.5 小时、提取温度 90℃, 得多糖浸提液 ;

[0079] ③醇析向多糖浸提液中加入 3 倍量的无水乙醇, 醇析 12 小时 ;

[0080] ④浓缩醇析后 3500rpm 离心 25min 弃上清液, 得沉淀物, 依次用无水乙醇 (1 次)、丙酮 (2 次) 洗涤沉淀。

[0081] ⑤真空冷冻干燥得菌丝体粗多糖。

[0082] 按上述提取方法, 黄伞粗多糖提取率达到 21.32%, 多糖含量达到 53.42%。

[0083] 2. 黄伞多糖纯化

[0084] 将上述制得的多糖用蒸馏水制备成 5% 的多糖溶液, 滴加适量的浓氨水使其 pH 值达到 9, 静置 15min 后在 4500rpm 下离心 15min 除去蛋白沉淀。然后将多糖溶液稀释一倍, 再加入等体积的 seveg 试剂 (正丁醇: 氯仿 = 1 : 4) 剧烈振荡 30min 后, 4500rpm 下离心 10min, 取上清液重复操作一次。将多糖溶液浓缩后冷冻干燥。

[0085] 取多糖溶于适量蒸馏水后经经由 D152 及 D301T 串联而组成的离子交换柱进一步室温 20 ~ 28℃ 下纯化, 洗脱液为蒸馏水, 纯化后, 再经 Sephadex G-100 凝胶柱层析纯化 (室温 20 ~ 28℃), 以蒸馏水作为洗脱液, 即可得到高纯度多糖产品。经检测多糖含量达 91.82%。

[0086] 3. 包装保存: 把干燥后的纯多糖粉碎成细粉后, 装入铝箔包装袋内封口保存或进行产品加工。

[0087] 实施例 7 黄伞多糖提取与纯化

[0088] 1. 黄伞多糖提取

[0089] ①材料预处理将黄伞子实体冻干, 粉碎至 160 目, 料水比 1 : 20、超声波功率 600W, 处理 5min ;

[0090] ②浸提将预处理后的子实体放入回流瓶中热水提取, 提取时间 3 小时、提取温度 80℃, 得多糖浸提液 ;

[0091] ③醇析向多糖浸提液中加入 5 倍量的无水乙醇, 醇析 8 小时 ;

[0092] ④浓缩醇析后 4500rpm 离心 10min 弃上清液, 得沉淀物, 依次用无水乙醇 (1 次)、丙酮 (2 次) 洗涤沉淀。

[0093] ⑤真空冷冻干燥得子实体粗多糖。

[0094] 按上述提取方法, 黄伞粗多糖提取率达到 9.39%, 多糖含量达到 41.89%。

[0095] 2. 黄伞多糖纯化

[0096] 将上述制得的多糖用蒸馏水制备成 2% 的多糖溶液,滴加适量的浓氨水使其 pH 值达到 10,静置 10min 后在 4500rpm 下离心 10min 除去蛋白沉淀。然后将多糖溶液稀释一倍,再加入等体积的 seveg 试剂(正丁醇:氯仿=1:4)剧烈振荡 30min 后,4500rpm 下离心 10min,取上清液重复操作一次。将多糖溶液浓缩后冷冻干燥。

[0097] 取多糖溶于适量蒸馏水后经由 D152 及 D301T 串联而组成的离子交换柱进一步室温 20~28℃ 下纯化,洗脱液为蒸馏水,纯化后,再经 Sephadex G-100 凝胶柱层析纯化(室温 20~28℃),以蒸馏水作为洗脱液,即可得到高纯度多糖产品。经苯酚-硫酸法检测多糖含量达 89.69%。

[0098] 3. 包装保存:把干燥后的纯多糖粉碎成细粉后,装入铝箔包装袋内封口保存或进行产品加工。

[0099] 实施例 8 黄伞多糖活性检验**[0100] (1) 黄伞多糖促进小鼠脾淋巴细胞增殖作用**

[0101] 试验材料:a. 试验样品:黄伞菌丝体多糖(样品 A);黄伞发酵液多糖(样品 a)

[0102] b. 试验小鼠:C57 纯系小鼠,体重 20 克,购于中国医学科学院实验动物研究所。

b. 主要实验试剂和仪器:新生牛血清, GIBCO 产品, Cat No. 16010-159. Lot No. 600202; RPMI 1640 培养基, GIBCO 产品, Cat No. 31800-022. LotNo. 1165062; 96 孔培养板, Costar 产品,产地美国。ATP 生物荧光检测试剂盒为北京金紫晶生物医药技术有限公司产品,产地北京;微孔板荧光分析仪, BMP9504,北京滨松光子技术有限公司产品;二氧化碳培养箱, Forma 3111,产地美国;离心机, OLYMPUS OPTICAL CO. LTD,产地日本。

[0103] 试验方法:a. 小鼠脾淋巴细胞悬液的制备:小鼠断头处死,无菌取脾。将脾脏置于盛有适量无菌 Hank's 液平皿中,用镊子轻轻将脾磨碎,制成单个细胞悬液。经 200 目筛网过滤,用 Hank's 液洗 2 次,每次离心 10min(1000r/min)。将细胞悬浮于 10% 的 NBS-RPMI-1640 中,用台盼兰染色计数,细胞活性为 98%,调整细胞浓度为 2×10^6 个/mL。b. 细胞培养和多糖浓度设定:在无菌条件下,用完全 RPMI1640 培养液将多糖溶解,多糖溶液滤器除菌,再稀释至所需浓度。每种多糖设 6 个浓度,浓度分别为 25、50、100、200、400 和 600 μ g/mL,每孔加入多糖溶液 100 μ L;空白对照组(CK)加 100 μ L 培养液,均设 3 个重复孔。于 96 孔细胞培养板中,每孔加 100 μ L 脾细胞悬液,然后加入供试样品,于 37℃、CO₂ 浓度为 5%、空气相对湿度为 95% 的 CO₂ 培养箱中培养 4 天,取出培养板每孔加入 ATP 提取液 50 μ L,室温下放置 5min,每孔取 50 μ L,加入到测定白板中,然后每孔加入 50 μ L 荧光酶/荧光素测定液,于荧光测定仪上测定吸收值。c. 检测与数据分析:据实验组吸光值与空白组比较从而确定样品对脾细胞的增殖效果。SI(刺激指数)=样品孔吸光值/空白孔吸光值。SI 值大于 1,表明样品对脾细胞有增殖作用,且 SI 越大,其增殖效果越好。实验结果采用 t 检验,当 $P \leq 0.05$ 时,各组与对照组(CK)比较有统计学意义。

[0104] 试验结果:从表 1. 可以看出:黄伞菌丝体多糖(样品 A)在剂量为 25 μ g/mL ~ 400 μ g/mL 时,具有对小鼠脾淋巴细胞的增殖作用,且与对照组差异显著($P < 0.05$)。黄伞发酵液多糖(样品 a)各剂量组具有对小鼠脾淋巴细胞的增殖作用,且随着剂量其增殖作用增强,各剂量与对照组相比差异显著。以相同剂量相比,浓度为 50 ~ 600 μ g/mL 时,黄伞发酵液多糖的增殖作用显著大于菌丝体多糖。

[0105] 表 1 黄伞多糖对小鼠脾淋巴细胞的增殖作用

| 浓度 ($\mu\text{g/mL}$) | Sample A | | Sample a | |
|-------------------------|----------|-------|----------|-------|
| | SI | P 值 | SI | P 值 |
| 25 | 1.950 | 0.000 | 1.081 | 0.452 |
| [0106] 50 | 3.837 | 0.000 | 9.232 | 0.078 |
| 100 | 3.011 | 0.045 | 8.674 | 0.002 |
| 200 | 2.623 | 0.000 | 13.552 | 0.006 |
| 400 | 1.296 | 0.025 | 15.833 | 0.003 |
| 600 | 0.993 | 0.950 | 15.674 | 0.004 |

[0107] (2) 黄伞多糖对 Lwvis 肺癌实体瘤抗性作用

[0108] 试验材料 :A. 黄伞菌丝体多糖 (实施例 5 制得) ;B. 供试小鼠 :为 C57 纯系小鼠, 雄性, 18 ~ 22g, 由北京力科爱达生物技术咨询服务中心提供, 合格证号 scxk2004-0001。 C. 供试瘤株 :Lewis 肺癌瘤株购自中国医学科学院动物研究所。阳性对照药 :环磷酰胺, 山西普德药业有限公司生产, 批号 :20061102。

[0109] 试验方法 :

[0110] A. 动物分组

[0111] 将实验动物随机分为 5 组, 空白对照组 CK1, 阳性对照组 CK2, 多糖低、中、高剂量组。每组 10 只。

[0112] CK1——生理盐水对照组, 同体积生理盐水 ;

[0113] CK2——阳性对照组, 剂量为 30mg/kg ;

[0114] A1——黄伞多糖低剂量组, 剂量 50mg/kg ;

[0115] A2——黄伞多糖中剂量组, 剂量 100mg/kg ;

[0116] A3——黄伞多糖高剂量组, 剂量 200mg/kg ;

[0117] B. 接种

[0118] 将接种 Lewis 肺癌 7 后天生长良好的 C57 荷瘤小鼠脱臼处死, 选取生长良好的瘤组织, 制作细胞悬液, 于腋下接种, 0.2ml/ 只 (5×10^6 个)。

[0119] C. 给药方案 :8 组小鼠分为于接种瘤细胞悬液 24h 后开始灌胃给药, 每日一次, 连续给药 9 天, 每次容量为 0.2ml。空白对照组每天给予等量生理盐水。

[0120] D. 观察指标 :第 10 天颈椎脱臼处死小鼠, 剥取瘤块、脾脏、胸腺, 用电子天平称重。用如下公式计算肿瘤抑制率、脾指数、胸腺指数进行药效评价。

[0121] 抑瘤率 = $(C-T)/C \times 100\%$, C :为空白对照组平均瘤重 (mg), T :为实验组平均瘤重 (mg)

[0122] 胸腺或脾脏指数 = 胸腺 (mg) 或脾脏 (mg) 质量 / 体重 (g)

[0123] 数据分析 :数据以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, , 各组分别与阴性对照组进行比较数据用 SPSS12.0 软件进行分析。P = 0.05。

[0124] 试验结果 :

[0125] A. 从表 2 可以看出, 低, 中, 高浓度抑瘤率分别为 54.7%, 34.7%, 16.5%。低剂量组抑瘤率最高, 试验组与生理盐水对照组和阳性对照组均差异显著。

[0126] 表 2 茵伞菌丝体多糖对 Lewis 肺癌小鼠瘤重的影响

[0127]

| 组别 Groups | 剂量 mg/kg · d | 动物数 | | 平均瘤重 (g) | 抑瘤率 (%) | P=0.05 |
|--------------|-----------------|-----|----|-------------|---------|--------|
| | | 始 | 末 | | | |
| CK1 | 同体积 | 10 | 10 | 1.2 ± 0.54 | 0 | △ |
| CK2 | 30 | 10 | 10 | 0.34 ± 0.24 | 87.9 | ▲ |
| A1 | 100 | 10 | 10 | 0.54 ± 0.36 | 54.7 | ▲ △ |
| A2 | 200 | 10 | 10 | 0.78 ± 0.40 | 34.7 | ▲ △ |

[0128]

| | | | | | | |
|----|-----|----|----|-------------|------|-----|
| A3 | 400 | 10 | 10 | 1.00 ± 0.56 | 16.7 | ▲ △ |
|----|-----|----|----|-------------|------|-----|

[0129] 注：▲表示与生理盐水对照组比较差异显著，△表示与阳性对照组比较差异显著。

[0130] B. 在胸腺指数方面，阳性对照 (CK2) 很低，仅为 0.39 ± 0.24 ，阳性对照组与多糖组和生理盐水组均有显著差异；多糖各剂量组与空白对照相比较，以及多糖组之间均差异不显著 (表 3)。

[0131] 表 3 黄伞菌丝体多糖对 Lewis 肺癌小鼠胸腺的影响

[0132]

| 组别 Groups | 剂量 mg/kg · d | 动物数 | | 胸腺 mg | 胸腺指数 mg/g | P=0.05 |
|--------------|-----------------|-----|----|----------|--------------|--------|
| | | 始 | 末 | | | |
| CK1 | 同体积 | 10 | 10 | 32 ± 2 | 1.34 ± 0.19 | △ |
| CK2 | 30 | 10 | 10 | 7.3 ± 5 | 0.39 ± 0.24 | ▲ |
| A1 | 100 | 10 | 10 | 24.9 ± 4 | 1.12 ± 0.23 | △ |
| A2 | 200 | 10 | 10 | 29.5 ± 4 | 1.30 ± 0.25 | △ |
| A3 | 400 | 10 | 10 | 29.5 ± 3 | 1.40 ± 0.17 | △ |

[0133] 注：▲表示与生理盐水对照组比较差异显著，△表示与阳性对照组比较差异显著。

[0134] C. 在脾脏指数方面，阳性对照 (CK2) 较低，仅为 2.06 ± 0.55 ，阳性对照组与多糖组和生理盐水组均有显著差异；多糖各剂量组与空白对照相比较，以及多糖组之间均差异不显著 (表 4)。

[0135] 表 4 黄伞菌丝体多糖对 Lewis 肺癌小鼠脾脏的影响

[0136]

| 组别 Groups | 剂量 mg/kg · d | 动物数 | | 脾脏 mg | 脾脏指数 mg/g | P=0.05 |
|--------------|-----------------|-----|----|--------------|--------------|--------|
| | | 始 | 末 | | | |
| CK1 | 同体积 | 10 | 10 | 187.2 ± 2.55 | 7.86 ± 0.71 | △ |
| CK2 | 30 | 10 | 10 | 38.7 ± 3.34 | 2.06 ± 0.55 | ▲ |
| A1 | 100 | 10 | 10 | 154.8 ± 3.73 | 6.97 ± 0.33 | △ |
| A2 | 200 | 10 | 10 | 286.5 ± 3.50 | 12.57 ± 0.21 | ▲ △ |
| A3 | 400 | 10 | 10 | 167.4 ± 4.79 | 7.94 ± 0.56 | △ |

[0137] 注:▲表示与生理盐水对照组比较差异显著,△表示与阳性对照组比较差异显著。

[0138] (3) 黄伞多糖的免疫调节作用

[0139] 试验材料:

[0140] a. 实验动物:山东实验动物中心提供的近交系、18-22 克、雄性小白鼠,试验处理共 24 组,每组试验 10 只。

[0141] b. 试剂与仪器

[0142] 生理盐水、溴甲酚紫指示剂、甲醇、Giemsa 染料、 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、DMP0(5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide)、黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶均为美国 Sigma 公司产品;二乙三胺五乙酸、过氧化氢、硫酸亚铁胺,北京化学试剂公司化学纯试剂。SRBC:绵羊颈静脉取血,将羊血放入有玻璃珠的灭菌锥形瓶中,朝一个方向摇动,摇脱纤维,放入 4℃ 冰箱保存备用。Giemsa 染液:a. 取 Giemsa 染料 0.5g,中性甘油 33mL,甲醇 333mL。先将 Giemsa 染料置清洁研钵中,加甘油后,研磨片刻,倒入棕色瓶内,放置 55 ~ 60℃ 水浴箱内 2 小时,不断摇匀,在加入甲醇摇匀,保存备用。b. 稀释姬姆萨氏染色液——使用时用 pH6.8 的缓冲液 8 份加姬姆萨氏染色原液 1 份,即成应用液。

[0143] PBS 缓冲液: KH_2PO_4 6.66g, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 将上述试剂溶于水 1000mL 蒸馏水中调 pH 值至 7.2 即成。

[0144] 1% 鸡红细胞悬液:实验前取鸡静脉或动脉血,置于盛有玻璃珠(20 个左右)的三角瓶中,连续顺一个方向充分摇动 5 ~ 10min,除去纤维蛋白,4℃ 冰箱保存。实验前用生理盐水洗涤 3 次,1500r/min,离心 10min,弃去上清,按血球压积用 Hank's 液配制成 1% 鸡红细胞悬液。

[0145] 3% 琼脂:取琼脂 3 克,加水 100mL,加热煮沸至透明,加 1% 溴甲酚紫指示剂 1 ~ 2。

[0146] Giemsa 染液的脱色液:甲醇 20mL,蒸馏水 80mL。混合后 2N HCl 两滴。

[0147] DMP0(5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide):用前经活性炭处理。

[0148] c. 仪器

[0149] 计数器、手术器械、注射器、染色槽均为实验室常规仪器;微量血凝实验板:济南博赛公司。

[0150] 实验方法:A. 体液免疫功能测定:血清溶血素测定实验(血凝法)^[7]。B. 单核-巨噬细胞功能测定:小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验(滴片法)^[7]。C. 受试样品剂量及时间:黄伞样品设 3 个剂量组,即 1mg/d、2mg/d、10mg/d 摄入量;另设阴性对照组。每组试验 10 只。D. 受试样品给予方式:高压灭菌纯水溶解后灌胃。每天灌胃一次,持续 15 天。E. 统计学方法实验数据均采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。F. 增强免疫力功能判定根据《保健食品检验与评价技术规范》中的结果判定原则,即:在细胞免疫功能、体液免疫功能、单核-巨噬细胞功能、NK 细胞活性四个方面任两个结果阳性,就可判定该受试样品具有增强免疫力功能作用。

[0151] 实验结果:

[0152] 通过小鼠每日分别灌喂 5 倍、10 倍以及 50 倍人体剂量 A1, A2 和 PA 15d 后,小鼠血清溶血素与未灌喂空白相比较,来探讨三种多糖是否具有提高人体体液免疫功能,结果显示:A1 样品 5 倍人体剂量、10 倍人体剂量、50 倍人体剂量,A2 样品 5 倍人体剂量、10 倍人体剂量,PA 样品 10 倍人体剂量实验结果为阳性,可见三种多糖均不同程度的提高小鼠体液

免疫功能,其中 A1 和 A2 均有两个(包括)以上水平实验阳性,因此可以判定 A1 和 A2 体液免疫功能测定实验阳性,即具有提高体液免疫力功能。实验结果还表明,A1 三个剂量均具有提高体液免疫功能,而 A2 只在低浓度时起作用。

[0153] (4) 黄伞多糖体外抗氧化作用

[0154] 试验材料:5 种样品:子实体提取多糖 A1、菌丝体提取多糖 A2、菌丝体粉 A3、子实体粉 A4。

[0155] 上述样品用三蒸水溶解稀释至所需浓度(1.0、10.0、100.0mg/mL+1.5mL50%乙醇)在 517nm 处测定 A2;对照组用双蒸水。

[0156] 仪器试剂:DMP0(5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide)、黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶均为美国 Sigma 公司产品。DMP0 用前经活性炭处理。检测仪器为日本 REIX 型顺磁共振波谱仪(EPR)(测试条件:实验参数:微波频率 9.66GHz,微波功率 20mW,调制频率 100kHz,调制幅度 0.5mT)。

[0157] 试验方法:EPR 测定:分别取一定量样品溶液($\leq 0.1\text{ml}$),按试剂盒所标明操作方法进行试验,反应体系的总体积为 3.4mL。

[0158] 氧自由基的产生:产生氧自由基模型为黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶体系: $\text{XH}+\text{O}_2 \rightarrow \text{X}+\text{H}^++\text{O}_2^{\cdot-}$;羟自由基产生的模型为 Fenton 反应: $\text{H}_2\text{O}_2+\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}+2\cdot\text{OH}$ 。

[0159] 波谱分析:电子自旋共振波谱信号分别为代表羟自由基和超氧阴离子自由基被捕捉后的加合物 DMP0-OH 和 DMP0-OOH,其峰值与体系中产生的氧自由基浓度呈正比。

[0160] 计算方法:样品对自由基清除的百分率 E, $E = [(h_0-h_x)/h_0] \times 100\%$, h_0 为对照组电子自旋共振信号平均峰值, h_x 为实验组峰高平均值。

[0161] 试验结果:

[0162] 三种黄伞多糖具有较好的抗氧自由基和羟自由基作用。在氧自由基实验中 A2 菌丝体提取多糖-10mg/mL 剂量清除氧自由基的效果最好,达 72.7%,其他两种多糖在最高浓度时清除率也达 69.1%,均优于菌丝体粉和子实体粉 55%左右,且除 A2 外;羟自由基实验中 A1-100mg/mL 剂量对清除率最高,达到 95.8%,也优于 A3 和 A4 的 70%左右,多糖对羟自由基的清除作用与多糖浓度也成线性关系(表 5、表 6)。

[0163] 表 5 多糖对氧自由基的清除作用

| 样品 Sample | O_2 (%) | | |
|--------------|------------------|---------|----------|
| | 1mg/mL | 10mg/mL | 100mg/mL |
| [0164] A1 | 25.5 | 56.4 | 69.1 |
| A2 | 18.18 | 72.7 | 67.3 |
| A3 | 25.9 | 50.0 | 52.6 |

| | | | |
|----|------|------|------|
| A4 | 24.2 | 44.2 | 55.2 |
|----|------|------|------|

表 6 多糖对羟自由基的清除作用

| [0165] | 样品 | ·OH (%) | | |
|--------|--------|---------|---------|----------|
| | sample | 1mg/mL | 10mg/mL | 100mg/mL |
| | A1 | 26.3 | 84.2 | 95.8 |
| | A2 | 85.5 | 89.5 | 92.1 |
| | A3 | 8.8 | 28.6 | 71.4 |
| | A4 | 17.6 | 47.3 | 75.4 |

[0166] 参考文献：

[0167] 1. 卯晓岚. 中国大型真菌 [M]. 河南:河南科学技术出版社,2000,248;

[0168] 2. 苏延友,康莉,杨志孝等. 黄伞多糖的提取及对小鼠腹腔巨噬细胞的激活效应研究. 泰山医学院学报,2004,25(1):9~11.

[0169] 3. 王谦,张俊刚,王士奎等. 黄伞发酵提制物调节血脂作用的研究. 河北大学学报(自然科学版),2006(1):101~103.

[0170] 4. 李荣春,付子艳,李信. 黄伞菌丝营养特性研究. 食用菌学报,2001,8(1):19~23

[0171] 5. 惠丰立,魏明卉,杜敏华等. 黄伞菌丝深层发酵的培养条件,无锡轻工大学学报 2004,23(4):24~27

[0172] 6. 胡清秀,宫春宇,闫梅霞. 黄伞及黄伞多糖体外抗氧化作用的研究. 中南林业科技大学学报,2007(6):58~62

[0173] 7. 保健食品检验与评价技术规范(2003版). 中华人民共和国卫生部,2003. 22~34

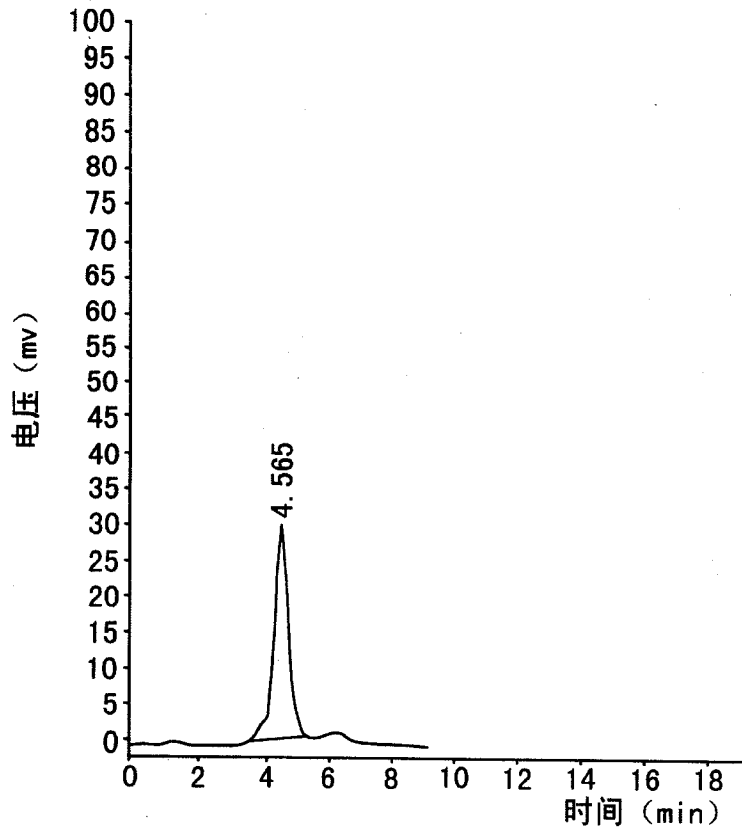


图 1

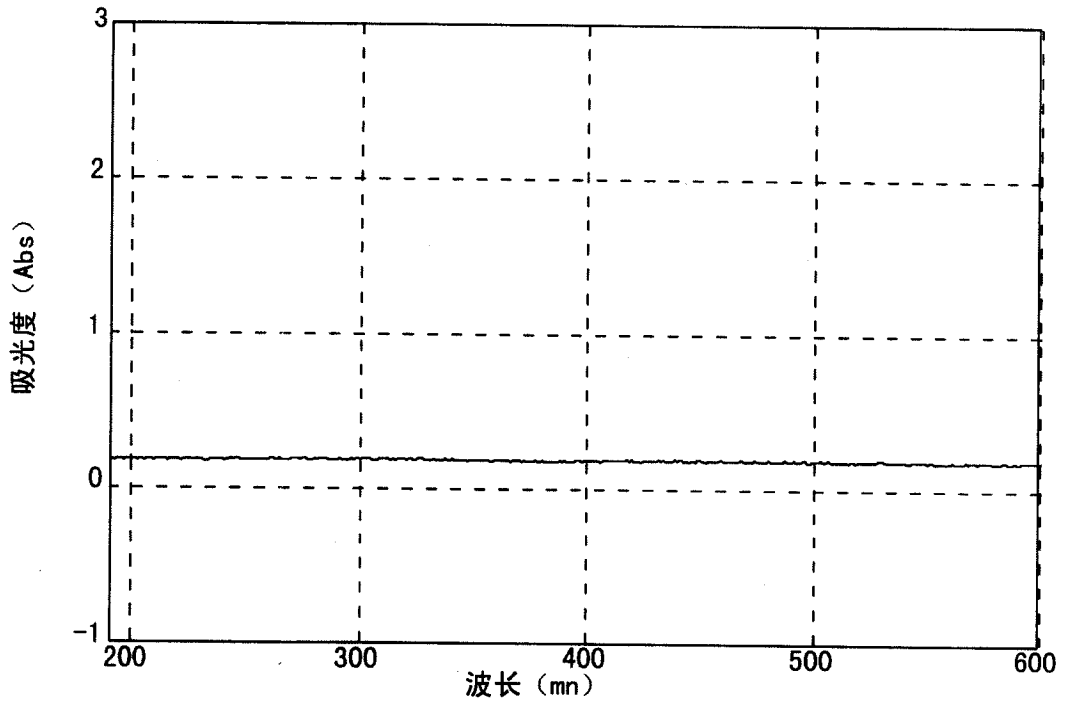


图 2