

链霉菌 H03 发酵液中具有抗菌活性多糖的分离纯化及其单糖组成分析

何 峰, 杨 英, 周蓬蓬, 余龙江 *

(华中科技大学 生命科学与技术学院 资源生物学与生物技术研究所, 中国湖北 武汉 430074)

摘 要: 对链霉菌 H03 发酵产物进行了分离纯化, 并对其进行了初步鉴定. 对链霉菌 H03 发酵产物离心, 采用减压蒸馏, 乙醇沉淀, 沉淀组分用 *Sevage* 法、盐析法去蛋白, 用透析法除去小分子物质以及用 *Sephadex-100* 柱层析等技术进行纯化, 纯化物质仍具有较强的抗菌活性. 利用化学方法、紫外光谱、红外光谱、气质联用等方法分析该抗菌活性物质的理化性质. 结果表明: 从链霉菌的发酵产物中分离纯化得到的具有抗菌活性物质是多糖, 这种多糖是由甘露糖、葡萄糖、半乳糖 3 种单糖组成的, 其组成比例约为 2 1 1.

关键词: 链霉菌; 多糖; 分离纯化; 气质联用

中图分类号: Q636.1

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2007)03-0212-06

Isolation, Purification and Composition of Antibacterial Polysaccharide from the Broth of *Streptomyces* H03

HE Feng, YANG Ying, ZHOU Peng-peng, YU Long-jiang *

(Institute of Resource Biology & Biotechnology, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China)

Abstract: The antibacterial compound was isolated, purified and identified from the broth of *Streptomyces* H03. The crude compound was precipitated with volume 95% ethanol from condensed fermented broth after centrifugated and distilled. Then the protein was removed from the deposition by *Sevage* method and deposited by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and dialysed. The rest was still antibacterial when it was purified by the *Sephadex* G-100 chromatography. The composition of the purified sample was analyzed by chemical method, ultraviolet spectrum, infrared spectrum, GC-MS and so on. The results showed that the sample was a kind of antibacterial polysaccharide made of mannose, glucose, galactose, which was 2 1 1 by proportion.

Key words: *Streptomyces*; polysaccharide; isolate and purify; GC-MS

(Life Science Research, 2007, 11(3):212-217)

链霉菌是具有复杂生活周期的革兰氏阳性放线菌 (actinomycete), 在系统生物学上归于链霉菌属 (*Streptomyces*)。该属的许多成员都能产生对人类具有重要意义天然产物, 如抗肿瘤剂、免疫抑

制剂、杀虫剂以及淀粉酶、几丁质酶、纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶和蛋白酶等胞外水解酶。因此, 近几十年来, 关于链霉菌遗传、发育及代谢调控的研究倍受重视^[1]。

收稿日期: 2007-03-30; 修回日期: 2007-07-02

基金项目: 国家科技支撑计划课题 2007BAD73B02

作者简介: 何峰 (1974-), 男, 湖北黄冈人, 博士研究生, 主要从事微生物发酵及生物技术方面研究; 余龙江 (1966-), 男, 湖北黄冈人, 华中科技大学教授, 博士, 通讯作者, 主要从事资源生物学与生物技术方面研究, Tel: 027-87792265, E-mail: yulj@hust.edu.cn.

本实验室分离到一株链霉菌 H03, 该链霉菌发酵后产生一种非抗生素的大分子物质, 这种大分子物质对多种植物病原真菌 (如棉花枯萎病、小麦赤霉病菌、油菜菌核病、黄瓜炭疽、甜菜褐斑、稻瘟病菌)、常见病源细菌 (如大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌) 具有较强的抗菌活性^[2]. 为了更好地研究这种具有抗菌活性的大分子物质, 本研究对这种链霉菌发酵产物中抗菌活性物质进行分离纯化, 并对该物质进行了初步鉴定.

1 材料与方法

1.1 材料

链霉菌菌种由本实验室分离纯化并保存, Sephadex G-100 (Pharmacia 公司), 标准单糖 (生化试剂, 亚法公司), 所有试剂均为分析纯.

种子和发酵培养基均选用液体培养基, 培养基的组成为: 蔗糖 3%, 豆饼粉 3%, 酵母浸膏 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, NaCl 0.1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.04%, CaCO_3 0.1%, 初始 pH 7.2-7.4.

1.2 方法

1.2.1 链霉菌的发酵

将菌种接种于种子培养基中, 28 ℃ 振荡培养 48 h 后, 以 8% 的接种量转种至 B. Braun 发酵罐 (BIOSTAT B, GERMANY) 中. 在发酵温度为 28 ℃、搅拌转速为 200 r/min、通气量为 2.0-3.0 VVM 条件下培养 150 h, 此时生物活性最强、多糖产量

较高, 随即放罐, 以 8 000 r/min 离心 (RD-20111, TOMY SEIKO CO., LTD TOKYO JAPAN) 发酵液 20 min 得到上清液.

1.2.2 发酵液中活性物质的分离纯化

为了获得发酵产物中具有抗菌活性的物质, 将上清液进行如图 1 所示工艺流程处理, 并采用抑菌圈试验方法^[3]检测图 1 工艺流程中 (1) ~ (12) 编号对应的各种物质的抗菌活性, 指示菌为金黄色葡萄球菌. 其中, 采用 *Sevage* 法去蛋白时, 向浓缩液中加入等体积的 *Sevage* 试剂 (氯仿:正丁醇=5:1 (V/V)), 最少重复 6 次. 而采用硫酸铵盐析法时, 缓慢向浓缩液中加入固体硫酸铵, 使其饱和度达到 100%. 为了除去小分子杂质, 将上清液用截留分子质量 20 000 Da 的透析袋 (36, 武汉亚法公司) 置于双蒸水中透析 48 h. 透析袋中截留的溶液加入 2 倍体积 95% 乙醇, 充分振荡, 静置过夜. 次日离心, 得到沉淀和上清液.

将溶液 (11)、(12) 分别进行冷冻干燥后, 各取 50 mg 溶于 2 mL 0.1 mol/L NaCl 溶液中, 充分溶解后进行柱层析. 用 Sephadex G-100 装柱 (75 cm × 3 cm), 流动相为 0.1 mol/L NaCl 水溶液, 流速 0.3 mL/min, 每管收集 3 mL. 分部收集, 用硫酸-蒽酮法^[4]检测, 在 620 nm 条件下比色, 并以管号为横坐标, 吸光度为纵坐标绘图. 收集洗脱时主峰对应的溶液, 进行冷冻干燥后, 取少量配成浓度为 2 g/L 的水溶液 (分别记作 13、14, 并进行抑菌圈试验), 剩下的样品置于干燥器中保存、备用.

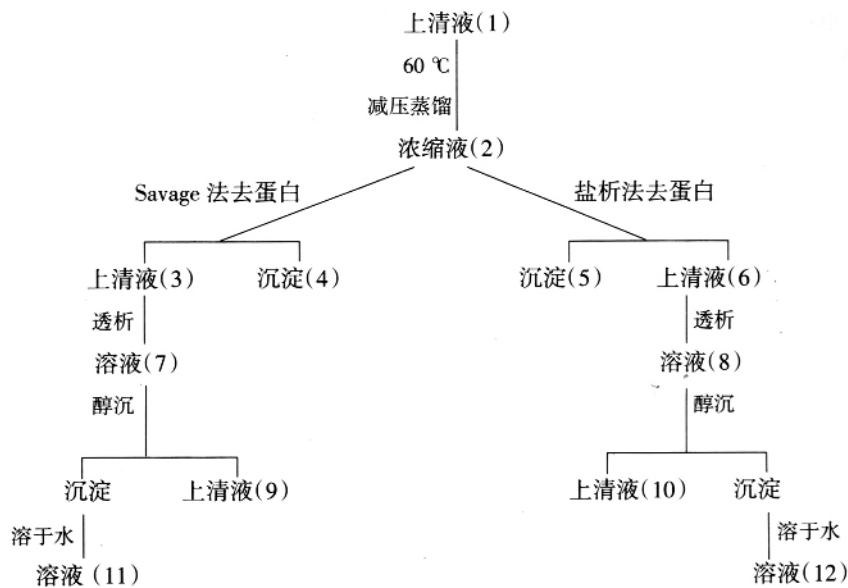


图 1 链霉菌发酵产物中抗菌活性物质提取工艺

Fig.1 Procedures for the antibacterial compound extraction and isolation

1.2.3 链霉菌 H03 发酵产物的鉴定

1.2.3.1 化学方法鉴定

1) 茚三酮反应

将 2 mg 样品完全水解后定容至 2 mL, 再取 1 mL 该水解液于试管中, 加茚三酮试剂 1 mL, 在沸水中加热 20 min, 冷却后观察. 分别取蒸馏水和小牛血清溶液 (1.0 g/L) 1 mL 作为对照^[5].

2) Molish 反应

取 1.0 mL 样品溶液 (1.0 g/L) 于试管中, 然后加 2 滴 Molish 试剂 (α-萘酚), 摇匀. 倾斜试管, 沿管壁加入约 1 mL 浓硫酸, 小心竖直后仔细观察两层液面交界处的颜色变化. 以蒸馏水和淀粉 (1.0 g/L) 作为对照^[4].

3) 硫酸萘酮反应

取 2 mL 萘酮溶液于试管中, 加入样品溶液 (1.0 g/L) 0.5 mL, 充分混匀后观察各试管颜色变化. 以蒸馏水和淀粉 (1.0 g/L) 作为对照^[4].

4) DNS 法检测还原糖

取 2 mg 样品于试管中, 并加入 3 mL 2 mol/L 三氟乙酸, 封口后置于 110 °C 烘箱水解 3 h, 样品完全水解后减压浓缩至干. 再取 2 mg 样品于另一只试管中, 向二管中分别加入 10 mL 双蒸水, 将两者配成等体积的溶液, 用 DNS 法测还原糖^[4].

1.2.3.2 紫外光谱分析

将样品配制成浓度为 500 mg/L 溶液, 利用 UV-240 紫外扫描仪在波长 400 nm 至 190 nm 范围内扫描^[6].

1.2.3.3 红外光谱分析

利用 Nicolet Impact 420 型红外光谱仪 (KBr 压片) 进行样品检测^[7].

1.2.4 多糖的单糖组成成分分析

利用 GC-MS 可以确定多糖的单糖组成, 首先将阿拉伯糖 (Ara)、木糖 (xyl)、甘露糖 (Man)、葡萄糖 (Glu) 和半乳糖 (Gal) 等单糖的糖腈乙酸酯衍生物依次进样进行 GC-MS 分析得到各单糖的出峰时间和质谱信号, 然后将样品水解后的衍生物进样进行 GC-MS 分析, 根据出峰时间和质谱信号可以确定样品的单糖组成成分, 而且根据出峰面积可以确定单糖的组成比例^[7,8].

检测仪器及条件: FINIGAN TRACE 气相色谱仪、质谱仪, DB-FFAP 毛细管柱 (30 cm × 0.25 mm × 0.25 μm); 程序升温: 80 ~ 140 °C, 30 °C/min; 保留 2 min; 140 ~ 250 °C, 10 °C/min 保留 7 min.

样品酸水解: 精密称取样品 10 mg, 加入 3 mL 2 mol/L 三氟乙酸, 封口后置于在 110 °C 烘箱水解 2 h, 真空干燥除去三氟乙酸.

糖腈乙酸酯衍生物的制备: 向除去三氟乙酸的水解物中分别加入 10 mg 盐酸羟胺, 0.6 mL 吡啶, 密封后于 90 °C 水浴振荡反应 30 min, 取出冷却至室温, 再加入 0.9 mL 乙酸酐反应 40 min, 反应产物直接进行 GC-MS 分析. 另取各标准单糖 10 mg, 按上述条件衍生化后进行 GC-MS 分析, 以确定各单糖衍生物在 GC-MS 分析时的出峰时间和质谱信号, 然后比较各单糖衍生物和样品水解物在相同条件下的保留时间和质谱信号就可确定多糖样品的单糖组成.

2 结果与分析

2.1 发酵产物分离过程中抗菌活性试验结果(表 1)

表 1 发酵产物分离过程中抗菌活性试验

Table 1 Antibacterial activity of the products in each step

Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Results	+	++	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	++	++

注: “+”, “++”, “-” 分别表示具有抑菌效果, 抑菌效果非常明显, 没有抑菌效果.

Notes: +, ++ and - represent strong antibacterial activity, stronger antibacterial activity and no antibacterial activity, respectively.

活性试验表明, 链霉菌发酵液 1) 具有抗菌活性, 经浓缩后的发酵液 (2) 抗菌活性更强, 用 *savage* 法和盐析法得到的沉淀部分即蛋白质 (4 和 5) 都没有抗菌活性; 而上清液 (3 和 6) 仍有抗菌活性; 上清液经过 36 透析袋透析去掉小分子物质后, 透析袋内的物质 (7 和 8) 具有抗菌活性, 当透析袋内的物质用乙醇沉淀后其上清液 (9 和

10) 没有抗菌活性而沉淀部分 (11 和 12) 具有抗菌活性, 最后将沉淀部分用 Sephadex G-100 进行柱层析处理, 主峰对应溶液仍然具有非常强的抗菌活性 (13 和 14); 而且抑菌活性随着产物的纯度的增加而增强; 随着产物的浓度的增加而增强.

从上述分离纯化试验和抗菌试验中可以看出, 最后得到的具有抑菌活性的物质是一种非蛋

白质类的大分子物质. 由于 36 透析袋能透过的物质的最大分子质量为 20 000 Da^[9], 所以透析袋内截留下来的物质分子质量大于 20 000 Da. 此外, 根据所采用的分离纯化方法, 可以推断该大分子物质可能是糖类物质, 但该大分子物质的具体杀菌机理和准确的分子质量大小有待于进一步的试验说明.

2.2 H03 发酵产物的初步鉴定

2.2.1 颜色反应的结果

茚三酮反应的结果显示, 蒸馏水、样品对应试管无色, 而小牛血清对应的试管变成蓝紫色. 由于小牛血清中的蛋白质水解后, 氨基酸与茚三酮发生反应生成蓝紫色物质, 故反应呈阳性, 而蒸馏水和样品与茚三酮反应均呈阴性, 说明样品中不含有蛋白质.

Molish 反应的结果显示, 在含有样品的试管和以淀粉作为对照的试管中, 两层液面交界处出现紫红色环, 而以蒸馏水作为对照的试管中没有任何颜色变化. 由于糖类物质在浓硫酸的作用下脱水形成糠醛及其衍生物, 后者与 α -萘酚作用形成紫红色复合物, 因而在糖液和浓硫酸的液面间形成紫环. 样品溶液和淀粉溶液都是 Molish 阳性反应, 说明待测样品溶液中有糖类物质存在.

硫酸-萘酮反应的结果显示, 在含有样品的试管和以淀粉作为对照的试管中, 溶液变成蓝绿色, 而以蒸馏水作为对照的试管中没有任何颜色变化. 由于糖类物质在浓硫酸的作用下脱水形成糠醛及其衍生物, 后者与萘酮作用生成蓝绿色复合物. 样品溶液和淀粉溶液都是硫酸-萘酮阳性反应, 说明待测样品溶液中有糖类物质存在.

在波长 540 nm 下比色发现, 未水解的样品 OD 是 0.028, 经过水解的样品 OD 是 0.376. 水解后 OD 约为水解之前的 13.4 倍. 由于 3,5-二硝基水杨酸与还原糖共热后在碱性条件下生成棕红色化合物, 在一定范围内还原糖含量与反应液颜色成正比, 因而用比色法测得的 OD 可反应还原糖含量. 从试验结果可以看出, 样品水解之前 DNS 反应的 OD 非常小, 说明样品几乎不含有还原糖, 而在样品经酸水解之后, DNS 反应的 OD 比较大, 说明样品水解后的溶液中含有较多的还原糖, 可以推测样品经水解后释放出了还原糖.

2.2.2 紫外光谱分析

样品在波长 400~190 nm 范围内进行紫外光谱扫描结果如图 2 所示.

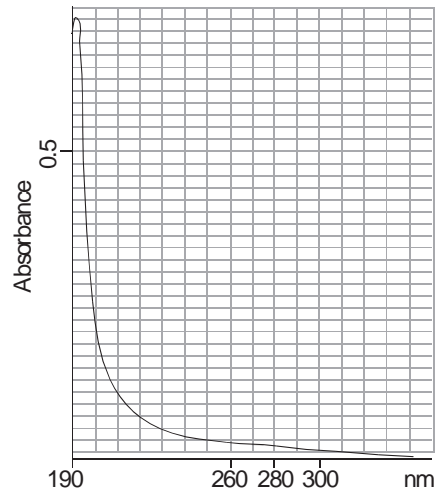


图 2 发酵产物在 UV-240 紫外扫描仪上扫描图

Fig.2 Ultraviolet spectrum of the sample

一般认为, 在紫外光谱的吸收中, 蛋白质在 280 nm 左右具有特征吸收峰, 核酸 260 nm 左右具有吸收峰, 而多糖在 195 nm 处左右有特征吸收峰^[10,11]. 从图 2 可以看出, 样品在波长 400 nm 至 190 nm 范围内进行紫外光谱扫描后, 在 195 nm 左右有多糖特征吸收峰, 未发现有蛋白质 (280 nm 左右) 和核酸 (260 nm 左右) 及其它杂质特征吸收峰. 紫外扫描的结果表明, 该样品是一种不含有蛋白质和核酸的大分子多糖.

2.2.3 红外光谱分析

红外光谱广泛应用于有机化学、高分子化学以及药物化学分析, 近年来人们对多糖的红外光谱进行广泛的研究. 利用 Nicolet Impact 420 型红外光谱仪进行样品扫描的图谱如图 3 所示: 红外光谱结果表明, 样品在 $4\ 000\text{ cm}^{-1}$ ~ 700 cm^{-1} 主要特征吸收峰有 $3\ 409$ 、 $2\ 932$ 、 $1\ 660$ 、 $1\ 402$ 、 $1\ 185$ 、 $1\ 113$ 、 879 、 814 cm^{-1} . 其中 $3\ 600\text{ cm}^{-1}$ ~ $3\ 200\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 665\text{ cm}^{-1}$ ~ $1\ 635\text{ cm}^{-1}$ 的两组峰, 表明为糖类化合物^[12]. $3\ 400\text{ cm}^{-1}$ 的强吸收峰为糖分子中羟基的伸缩振动吸收峰, $2\ 930\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰是 C-H 的伸缩振动峰, $1\ 660\text{ cm}^{-1}$ 附近强吸收峰是 C=O 的伸缩振动, $1\ 185\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰证明其中的单糖以吡喃糖苷的形式存在. $1\ 113\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰是由糖环的 C-O-C 伸缩振动所产生. 870 cm^{-1} 、 810 cm^{-1} 附近有吸收峰, 说明样品中可能有甘露糖^[7]. 840 cm^{-1} 处无吸收, 说明不含 β -糖苷键, 而含 α -糖苷键. 红外光谱在 $1\ 700\text{ cm}^{-1}$ ~ $1\ 775\text{ cm}^{-1}$ 处无吸收, 表明多糖不含有葡萄糖醛酸^[13].

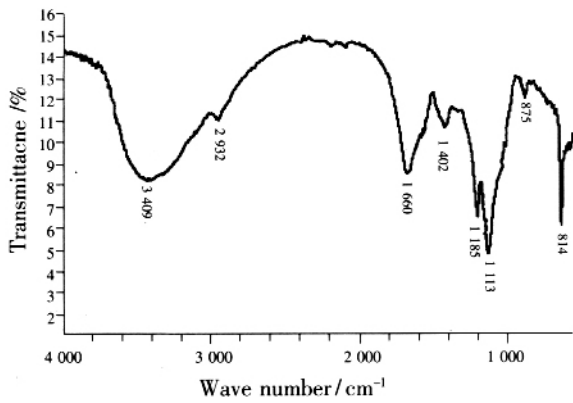


图3 样品红外光谱图
Fig.3 IR spectrum of the sample

通过颜色反应试验可以确定样品是一类多糖类物质,紫外光谱分析表明样品中不含有蛋白质、核酸等杂质,红外光谱分析进一步证明样品是多糖类的物质.综上所述,从链霉菌发酵液中分离纯化的产物是具有杀菌活性的大分子多糖.

2.3 多糖的单糖组成成分分析

标准单糖和样品水解物衍生物的气相色谱分析的保留时间如图4所示,各峰对应物质的质谱信号如表2和表3所示.

比较各标准单糖出峰时间和质谱信号,可以看出阿拉伯糖(Ara)衍生物、木糖(xyl)衍生物、甘露糖(Man)衍生物、葡萄糖(Glu)衍生物和半乳糖

(Gal) 衍生物的出峰时间分别是 14.23、15.79、18.42、18.97 和 19.83 min(图4a);质谱信号 m/z 分别是 256、256、315、315、315(表2).样品衍生物气相色谱图中3个峰对应出峰时间分别是 18.40、18.95 和 19.82 min(图4b),质谱信号分别是 315、315、315(表3).由此可以看出,样品水解物的3个峰对应的分别是甘露糖、葡萄糖和半乳糖^[14].用积分的方法(即面积归一法)计算样品气相色谱图中各峰的面积所占的比例分别为 51.76%、24.08%和 24.16%.由此可以得出甘露糖、葡萄糖和半乳糖这3种单糖的组成比例约为 2:1:1.

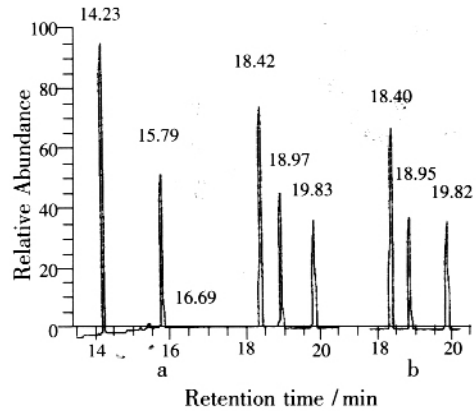


图4 标准单糖混合物的衍生物和样品水解物的衍生物气相色谱图
Fig.4 The gas chromatography of acetylated of aldonitrile of the standard and the sample

表2 标准单糖衍生物的保留时间及质谱信号
Table 2 Retention time and MS signal of each monosaccharide derivative

单糖混合物 Monosaccharides	Ara	xyl	Man	Glu	Gal
保留时间 Retention time / min	14.22	15.79	18.42	18.97	19.83
质谱信号 MS signal / m.z ⁻¹	256	256	315	315	315

表3 多糖水解后的衍生物保留时间及质谱信号
Table 3 Retention time and MS signal of each monosaccharide derivative of the sample

Sample	Ara	xyl	Man	Glu	Gal
保留时间 Retention time / min	-	-	18.40	18.95	19.82
质谱信号 MS signal / m.z ⁻¹	-	-	315	315	315

3 讨论

多糖作为三大类生物大分子物质之一,较早为人们所认识.但是对多糖的研究却远远落后于

对蛋白质和核酸的研究,其主要原因在于多糖复杂的结构难以研究.随着对多糖的认识不断深入,发现多糖具有各种各样的生物功能,如多糖的糖链能控制细胞的分裂与分化,调节细胞的生长

与衰老,能增强机体的免疫功能等.20世纪70年代,对多糖生物活性的研究领域日趋广泛,相继发现糖类物质具有抗炎、抗病毒、抗辐射、降血脂、抗水肿等多种生物活性.如 Wang 和 Luo 从绞股蓝提取了一种抗氧化活性的水溶性多糖^[15];赵国华等报道了百合多糖具有抗肿瘤活性^[16];芮雯等从带形蜈蚣藻中提取一种硫酸多糖并研究了其抗病毒活性^[17].这些具有生物活性的多糖绝大部分是从植物中提取,而具有生物活性的微生物多糖报道较少,特别是具有抗菌活性的微生物多糖几乎未见报道.

链霉菌属是放线菌中最大的一个属,种类繁多,而且有一半以上能产生重要的抗生素,如链霉素、金霉素、四环素、土霉素、氯霉素、红霉素、螺旋霉素、新霉素、制霉菌素、巴龙霉素和丝裂霉素^[18]等.所以,人们的注意力主要集中在链霉菌生产抗生素的研究上.本实验室分离到的链霉菌 H03,经过发酵后能产生一种大分子多糖.该多糖是由甘露糖、葡萄糖、半乳糖3种单糖组成的,其组成比例约为2:1:1.这种多糖具有较强的抗菌活性,可以将其开发成生物防腐剂或抗感染药物.关于这种多糖的分子质量的测定、各单糖的连接方式、抗菌机理等其他生理活性研究与应用,将在其他文章中继续报道.

参考文献(References):

- [1] WILLIAMS S T, GOODFELLOW M, ALDERSON G, et al. Numerical classification of Streptomyces and related genera [J]. J Gen Microbiol, 1983, 129: 1747-1813.
- [2] 何峰,余龙江,杨英,等.链霉菌 H03 发酵液提取物的抗菌活性研究[J].微生物学杂志(HE Feng, YU Long-jiang, YANG Ying, et al. Antibiotic activity of H03 streptomyces fermentation broth extract[J]. J Microbiology), 2005, 25(6): 11-13.
- [3] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学(第二版)[M].北京:人民卫生出版社 XU Shu-yun, BIAN Ru-lian. CHEN Xiu. Medicine Pharmacological Research Technique / Experiment [M]. Beijing: People Health Press, 1991.1340-1350.
- [4] 李如亮.生物化学试验[M].武汉:武汉大学出版社 LI Ru-liang Biochemistry Test[M]. Wuhan: Wuhan University Press, 1998.1-10.
- [5] 沈同,王镜岩.生物化学[M].北京:高等教育出版社 SHEN Tong WANG Jing-yan. Biochemistry[M]. Beijing Higher Education Press, 1990, 97-98.
- [6] 陈和生,孙振亚,李汉东,等.罗田板栗多糖的分离纯化及成分分析[J].中国药学杂志 CHEN He-sheng, SUN Zhen-ya, LI Han-dong, et al. Isolation, purification and components of the polysaccharide from Luotian nut[J]. Chinese Pharmacology Journal, 2002, 37(1): 63-64.
- [7] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社 ZHANG Wei-jie. The Research of Biochemical Technology to Complex Polysaccharide[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1999. 38-198.
- [8] 闫吉昌,崔春月,张奕,等.芦荟多糖的分离纯化及结构分析[J].高等学校化学学报(YAN Ji-Chang, CUI Chun-yue, ZHANG Yi, et al. Separation, purification and structural analysis of polysaccharides from aloe[J]. Chemical Research in Chinese Universities), 2003, (7): 1189-1192.
- [9] 赵永芳.生物化学技术原理及其应用(第二版)[M].武汉:武汉大学出版社(ZHAO Yong-fang. Principle and Application of Biochemical Technology(2th edition)[M]. Wuhan: Wuhan University Press, 2001.25-33.
- [10] 徐旭东,阮期平,徐有斌.红栓菌胞外多糖分离纯化和性质研究[J].中国天然药物 XU Xu-dong, RUAN Qi-ping, XU You-bin. Purification and characterization of polysaccharide from pycnoporus cinnabarinus[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2003, (4): 243-245.
- [11] 霍光华,李来生.波谱在多糖结构分析上的应用[J].生命的化学(HUO Guang-hua, LI Lai-sheng. Applications of spectrum in analyzing structure of polysaccharide[J]. Chemistry of Life), 2002, 22(2): 194-196.
- [12] 谢晶曦.红外光谱在有机化学和药物化学中的应用[M].北京:科学出版社 XIE Jing-xi. Applications of Infrared Ray Spectrum in Organic Chemistry and Pharmic Chemistry[M]. Beijing: Science Press, 1987.77-78.
- [13] 张俐娜,朱荣平.香菇多糖的成分及其分子量研究[J].高等学校化学学报 ZHANG Li-na, ZHU Rong-ping. Studies on components and molecular weights of polysaccharides from lentinus edode[J]. Chemical Research in Chinese Universities, 1998, 19(9): 1513-1517.
- [14] 周鹏,沈金灿,谢明勇,等. GC-MS 法分析茶叶提取物 TGP 的单糖组成及机理探讨[J].厦门大学学报(ZHOU Peng, SHEN Jin-can, XIE Ming-yong, et al. Studies on monosaccharide composition of TGP extracted from tea and its ionization mechanism by GC-MS[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2003, 42(2): 213-217.
- [15] WANG Z J, LUO D H. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from Gynostemma pentaphyllum Makino[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68: 54-58.
- [16] 赵国华,李志孝,陈宗道.百合多糖的化学结构及抗肿瘤活性[J].食品与生物和技术(ZHAO Guo-hua, LI Zhi-xiao, CHEN Zong-dao. Chemical structure and antitumor activity of polysaccharide from liliium brownii[J]. Journal of Food Science and Biotechnology), 2002, 21(1): 62-66.
- [17] 芮雯,岑颖洲,李药兰,等.带形蜈蚣藻硫酸多糖的提取、分析及其抗病毒活性[J].中国海洋药物(RUI Wen, CEN Ying-zhou, LI Yao-lan, et al. Extraction, analysis of sulfated polysaccharides from Grateloupia turuturu Yamada and their antiviral activities[J]. Chinese Journal of Marine Drugs), 2006, 25(2): 12-16.
- [18] 杨汝德,许喜林,罗立新,等.现代工业微生物[M].广州:华南理工大学出版社(YANG Ru-de, XU Xi-lin, LUO Li-xin, et al. Modern Industrial Microbe[M]. Guangzhou: South China University of Technology Press), 2001.28-33.