

## 淡紫拟青霉胞外多糖的分离、纯化及结构分析

史怀, 刘波, 苏明星, 黄素芳, 朱育菁

福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003

**摘要:** 淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株的胞外多糖粗提物对枯萎病病原菌-尖孢镰刀菌具有较好的抑制效果, 文中对淡紫拟青霉胞外多糖进行了分离纯化和结构分析, 以期为其构效关系研究奠定基础。采用乙醇沉淀法从淡紫拟青霉发酵液中提取粗多糖, 经 Sevage 法脱蛋白后, 过 Superdex-G75 凝胶层析柱分离得到胞外多糖 EP-1。紫外分光法和 Sephacryl S-200 HR 凝胶层析柱检测 EP-1 为均一多糖, Sephacryl S-200 柱层析测得 EP-1 的分子量为 35.2 kDa, 完全酸水解后纸层析检测 EP-1 的单糖组成中仅有葡萄糖, 红外光谱、高碘酸氧化和 Smith 降解结果表明 EP-1 的化学结构是以  $\beta$ -(1,3) 糖苷键连接而成的无分枝的葡聚糖。刚果红络合试验表明 EP-1 在稀的碱溶液中以 3 股螺旋构象存在。

**关键词:** 淡紫拟青霉, 多糖, 结构分析

## Isolation, purification and structure analysis of polysaccharides from *Paecilomyces lilacinus*

Huai Shi, Bo Liu, Mingxing Su, Sufang Huang, and Yujing Zhu

Agricultural Bioresources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China

**Abstract:** The paper dealt with the characterization of polysaccharide of *Paecilomyces lilacinus* NH-PL-03 strain. First, we extracted and purified exude polysaccharide from the fungal fermentation broth by ethanol depositing method. Second, the proteins were removed by the Sevage method from the crude polysaccharide. Third, the purified polysaccharide (EP-1) was obtained after Superdex G-75 column separation. The results of UV-spectrometer and Sephacryl S-200 HR chromatography experiments showed that the EP-1 was a homogeneous pure polysaccharide with molecular weight of 35.2 kDa. Tested by paper chromatography analysis using the complete hydrolysis by sulfuric acid, we found that the EP-1 comprise single component as glucose. The chemical structure of EP-1 was confirmed as a kind of linear glucan linked by  $\beta$ -(1,3) linkage. The Congo red reaction performed that EP-1 probable presented a triple-helica conformation in the dilute alkali.

**Keywords:** *Paecilomyces lilacinus*, polysaccharide, structure analysis

淡紫拟青霉 *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson 属半知菌纲、丝孢菌目、拟青霉属, 对多种植物寄生线虫有着良好的防治效果<sup>[1-2]</sup>、此外还具有杀虫<sup>[3]</sup>、促长<sup>[4]</sup>、拮抗<sup>[5]</sup>、降解<sup>[6]</sup>等多种功效, 是极具推广潜力的生防菌与功能菌。淡紫拟青霉生物学功能与其次生代谢物关系密切, 该菌不但能分泌对

**Received:** February 4, 2010; **Accepted:** May 6, 2010

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10A211), Natural Science Foundation of Fujian Province of China (No. 2008J0320).

**Corresponding author:** Bo Liu. Tel: +86-591-87884601; E-mail: fzliubo@163.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA10A211), 福建省自然科学基金项目 (No. 2008J0320) 资助。

线虫具有毒杀作用的毒素<sup>[7-8]</sup>,还能分泌吡啶乙酸<sup>[9]</sup>、以及蛋白酶、淀粉酶、右旋糖苷酶等多种酶类<sup>[10-11]</sup>。国内对淡紫拟青霉在植物线虫及病害生物防治上的应用进行了广泛的研究,但对菌株所产生的各种次生代谢物的提取及结构、功能等深层次的研究十分薄弱。本实验室在先期工作中筛选到一株对尖孢镰刀菌具有拮抗抑制作用的淡紫拟青霉菌株 NH-PL-03,对抗性物质进行了初步的筛选分析,结果表明其抑菌活性来自胞外多糖的粗提物<sup>[12]</sup>。

微生物多糖是目前生物发酵工程和生物医药领域的一大研究热点。多糖及其复合物在生命活动中有着极其重要的生物功能,但由于多糖本身的结构复杂,很多特殊的生物活性都与其复杂的空间结构关系密切,因此对多糖结构的研究是开发利用糖类物质的关键。

拟青霉属真菌的多糖国内外研究报道多为医药方面,如古尼拟青霉、细脚拟青霉、蝉拟青霉等菌株的胞外多糖经研究发现具有免疫调节、抗肿瘤、抗肝炎病毒等作用<sup>[13-15]</sup>。但关于淡紫拟青霉多糖的活性及结构方面的研究尚未见他人报道。

本研究对淡紫拟青霉胞外多糖进行提取、分离、纯化后,对多糖的结构进行了分析,为明确其构效关系、推断抑菌机理,以及更好地开发利用淡紫拟青霉提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌种:淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株。

发酵培养基:查氏培养基(蔗糖 3%, NaNO<sub>3</sub> 0.3%, KCl 0.05%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, FeSO<sub>4</sub> 0.001%, pH 自然)。

试剂:葡萄糖、果糖、木糖、甘露糖、鼠李糖、半乳糖标准品均为 Sigma 公司产品;层析分离材料 Superdex G-75、Sephacryl S-200 HR 葡聚糖凝胶均为 Pharmacia 公司产品;其余试剂为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 多糖的提取、分离和纯化

淡紫拟青霉摇床培养 7 d 后收集发酵液,8 000 r/min 离心 15 min,取上清液。上清液加入 3

倍体积的 95%乙醇沉淀过夜,2 000 r/min 离心 30 min,收集沉淀,依次用丙酮、乙醚洗涤数次后真空干燥即得多糖粗提物。Sevage 法<sup>[16]</sup>初步纯化去除多糖粗提物中的游离蛋白质后,多糖溶液经逆流水透析 48 h,蒸馏水透析 24 h 后,用 3 倍体积 95%乙醇醇析过夜,2 000 r/min 离心 30 min,收集沉淀,无水乙醇冲洗后真空干燥即得淡紫拟青霉胞外粗多糖。

Superdex G-75 装柱 (1.6 cm×60 cm),粗多糖上柱后以 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱,流速 24 mL/h,酚-硫酸法检测,收集最大洗脱峰,真空冷冻干燥得到多糖 EP-1。

#### 1.2.2 多糖的纯度鉴定

紫外光谱分析:多糖样品 EP-1 溶解于 0.2 mol/L 的 NaOH,200~400 nm 区间扫描。

Sephacryl S-200 HR 凝胶层析: Sephacryl S-200 HR 装柱 (1.6 cm×80 cm),样品上柱后以 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱,流速 12 mL/h,酚-硫酸法检测多糖峰位。

#### 1.2.3 分子量测定<sup>[17]</sup>

采用 Sephacryl S-200 HR 层析柱(操作条件同上),取 T 系列标准葡聚糖上柱,0.2 mol/L NaCl 溶液洗脱,各测得洗脱体积  $V_e$ ,用蓝色葡聚糖 T2000 上柱,测得洗脱体积  $V_0$ 。根据  $V_e/V_0$  与分子量对数值  $\log M \cdot W$  测出标准曲线。相同浓度待测样品于同样条件下上柱,据其  $V_e/V_0$  值从标准曲线上查算分子量。

#### 1.2.4 多糖组成分析

EP-1 多糖样品 5 mg 加入 2 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.5 mL,封管,100℃水解 8 h, BaCO<sub>3</sub> 中和,离心取上清,浓缩后作纸层析。以葡萄糖、果糖、木糖、甘露糖、鼠李糖、半乳糖标准品为对照,乙酸乙酯:吡啶:水=10:4:3 (V/V) 为展开剂,苯胺-邻苯二甲酸显色,105℃烘干 5 min。

#### 1.2.5 多糖结构分析

红外光谱分析:取 EP-1 多糖样品 2 mg 与 100 mg 干燥的 KBr 粉末于玛瑙研钵中在红外灯下磨匀压片,红外光谱仪于 4 000~400 cm<sup>-1</sup> 波长区间内扫描。

高碘酸氧化及甲酸测定<sup>[18]</sup>: EP-1 样品 50 mg,加去离子水 50 mL,磁力充分搅拌,使样品的悬浮

液均匀, 然后加入 30 mmol/L  $\text{NaIO}_4$  25 mL, 定容, 使  $\text{NaIO}_4$  终浓度为 15 mmol/L。置于暗处反应, 每隔 6 h 取样 0.1 mL, 蒸馏水稀释 250 倍, 分光光度计测定 223 nm 处光密度值至恒定为止 (蒸馏水为空白对照)。加一滴乙二醇终止反应, 高碘酸氧化完成。查标准曲线, 计算高碘酸消耗量。取上述氧化液 2 mL, 加 1 滴溴甲酚紫为指示剂, 0.0045225 mol/L NaOH 滴定, 计算甲酸生成量。

**Smith 降解:** 乙二醇处理后的溶液透析 48 h, 浓缩, 加入  $\text{NaBH}_4$  还原过夜。50% HAc 中和至 pH 为 6~7, 去离子水透析 48 h。透析液加入等体积的 1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 25°C 水解 40 h,  $\text{BaCO}_3$  中和至 pH 为 6, 过滤后透析 48 h, 袋外部分干燥做 G.C. 分析, 袋内加乙醇醇析, 离心, 上清及沉淀部分干燥后分别进行 G.C. 分析。G.C. 条件: HP-5 石英毛细管柱 (30 m×0.32 mm×0.25 μm), 恒流模式, 流量 1 mL/min, 程序升温为: 以 3°C/min 从 120°C 升到 210°C, 保持 4 min。进样口采用不分流模式, 温度 250°C, 载气为氮气, 检测器温度 300°C, 氮、氢、空气的流速分别为 25、30、400 mL/min。进样量 1 μL。

刚果红结合实验分析<sup>[18]</sup>: 5 mg EP-1 样品, 加入 2 mL 去离子水和 2 mL 80 μmol/L 刚果红试剂, 逐渐加 4 mol/L NaOH 溶液, 使溶液的碱浓度由 0 mol/L 增加到 0.4 mol/L, 然后紫外扫描, 测不同碱浓度条件下的最大光吸收波长。

### 1.2.6 淡紫拟青霉胞外多糖的生物活性测定

EP-1 溶解于 0.2 mol/L 的 NaOH 中, 将 PDA 固体培养基融化后冷却至 45°C 左右, 迅速添加 EP-1 溶液并充分摇匀, 使其终浓度为 200 μg/mL, 制成平板。以同浓度的 NaOH 溶液为空白对照。用 6 mm 打孔器从长势旺盛的尖孢镰刀菌平板上打取菌饼, 并各移 1 块菌饼倒扣在上述制备的平板中央, 25°C 恒温培养箱培养 6 d 后取出观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 多糖的提取、分离和纯化

发酵上清液中加入 95% 乙醇后立即产生暗绿色胶团状凝集物, 其内裹有大量气泡浮于溶液表面,

离心后得到果冻状凝胶, 该提取物具有多糖常见的各种颜色反应, 可溶于碱液, 在水及酸中基本不溶。多糖粗提物经 Sevage 法脱蛋白并透析后, 冷冻干燥获得的粗多糖样品呈淡黄色粉末状。粗多糖经 Superdex G-75 柱层析纯化得到 3 个洗脱峰 (图 1), 收集最大洗脱峰并真空冷冻干燥后得到白色粉末, 将其命名为 EP-1。

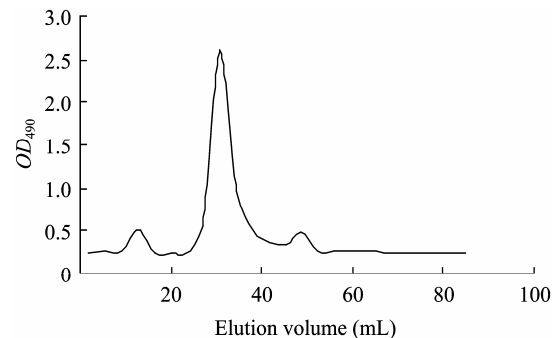


图 1 胞外粗多糖的 Superdex G-75 柱层析图谱

Fig. 1 Chromatogram of the crude exo-polysaccharides on Superdex G-75 column.

在实验过程中观察到淡紫拟青霉胞外多糖 EP-1 具有凝胶多糖的特性, 即多糖的碱溶液在透析和中和过程中均可以形成微凝胶状, 不易搅碎、破坏凝胶状态, 用碱溶解后可以恢复溶液状; 加热过程中可以形成有一定强度的凝胶, 高温 (>80°C) 下形成的凝胶不可逆。

### 2.2 多糖的纯度鉴定

#### 2.2.1 紫外光谱分析

EP-1 溶液在紫外光波长 260 nm 与 280 nm 处均无显著吸收峰, 说明样品中已基本去除蛋白质、多肽、核酸类等杂质 (图 2)。

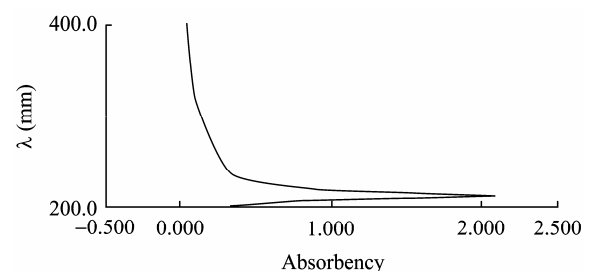


图 2 EP-1 样品的紫外光谱

Fig. 2 Ultraviolet spectrum of EP-1.

## 2.2.2 凝胶柱层析

多糖的洗脱收集液用酚-硫酸法检测, 得到的洗脱峰为单一的对称峰 (图 3), 表明 EP-1 多糖为均一多糖。

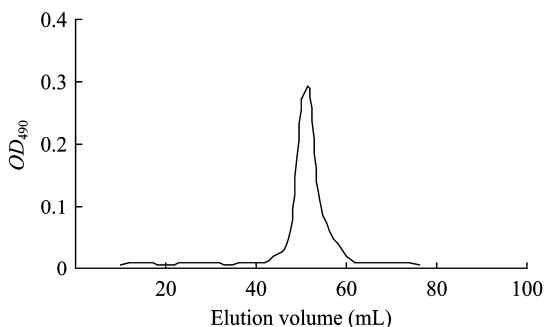


图 3 EP-1 样品的 Sephacryl S-200 HR 柱层析图谱  
Fig. 3 Chromatogram of the sample EP-1 on Sephacryl S-200 HR column.

## 2.3 多糖的分子量测定

根据 T-系列标准葡聚糖制作的标准曲线, 求得 EP-1 的分子量为 35.2 kDa (图 4)。

## 2.4 多糖的组成分析

EP-1 水解产物与标准单糖的纸层析图谱表明: EP-1 的单糖组成只有葡萄糖, 不含果糖、木糖、甘露糖、鼠李糖、半乳糖, 可见 EP-1 是一种单一单糖组分的葡聚糖 (图 5)。

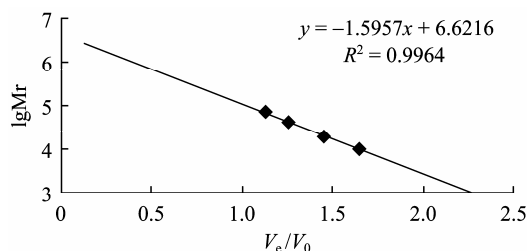


图 4 多糖分子量标准曲线  
Fig. 4 Standard curve of polysaccharides molecular weight.

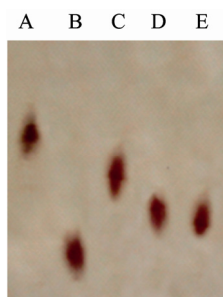


图 5 EP-1 水解产物的纸层析图谱  
Fig. 5 Paper chromatogram of EP-1. A: rhamnose; B: galactose; C: mannose; D: glucose; E: hydrolysate of EP-1.

## 2.5 多糖的结构分析

### 2.5.1 红外光谱结果分析

EP-1 样品的红外光谱显示了多糖的特征吸收峰:  $3\ 405\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰为 -OH 的伸缩振动吸收峰,  $2\ 925\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰为 C-H 的伸缩振动吸收峰,  $1\ 373\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰为 C-H 变角振动吸收峰,  $1\ 315\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰为 C-H 弯曲振动吸收峰,  $1\ 162\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰为环上的 C-O 吸收峰,  $889\ \text{cm}^{-1}$  处的特征吸收峰表示了 EP-1 为  $\beta$ -D-吡喃型糖苷键构型;  $800\sim 870\ \text{cm}^{-1}$  处无吸收峰, 表明无甘露聚糖存在;  $1\ 650\sim 1\ 550\ \text{cm}^{-1}$  之间无吸收峰, 表明无明显氨基存在 (图 6)。

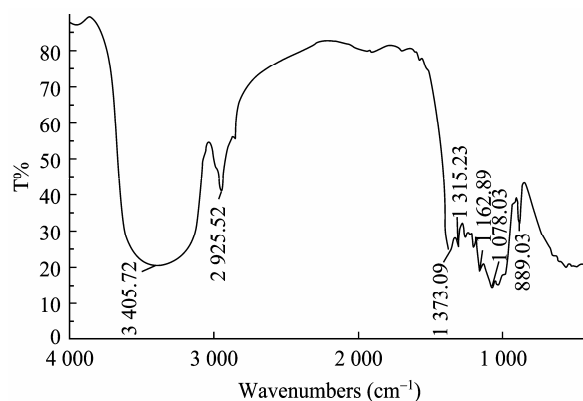


图 6 EP-1 的红外光谱  
Fig. 6 Infrared spectrum of EP-1.

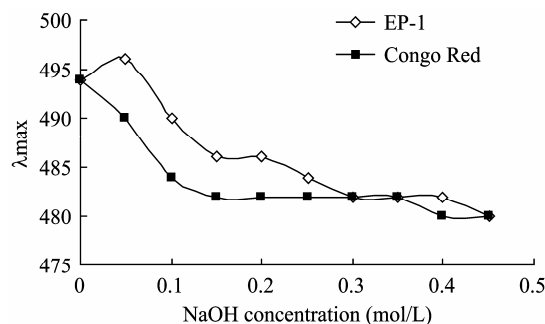


图 7 不同浓度 NaOH 溶液中 EP-1 样品与刚果红络合物最大吸光值的变化  
Fig. 7 Change in the absorption maximum of the Congo Red-sample complex at various concentrations of NaOH.

### 2.5.2 高碘酸氧化及甲酸测定

用  $\text{NaIO}_4$  对 IP-1 及 EP-1 样品进行选择定性氧化实验, 间隔时间取样, 发现其紫外吸收数值始终保持恒定不变, 并且用 NaOH 溶液滴定没有发现甲

酸生成。以上结果表明 EP-1 样品是以不消耗  $\text{NaIO}_4$  的葡萄糖残基以 1→3 糖苷键方式连接而成的直链葡聚糖。

### 2.5.3 Smith 降解

经透析后袋内物质醇析仍然有大量沉淀产生，而袋外部分用 G.C. 分析未检测出任何物质。Smith 降解的结果同样验证了 EP-1 由高碘酸氧化不能打断的 1→3 糖苷键方式连接而成。

### 2.5.4 刚果红结合实验分析

$\text{NaOH}$  浓度较小时，溶液的紫外吸收移向长波，表明 EP-1 样品能与刚果红形成络合物，样品呈有规则的螺旋构象； $\text{NaOH}$  浓度增大到一定程度，最大吸收波长下降，多糖的螺旋结构解体，变成无规则的线团形式 (图 7)。即 EP-1 在弱碱性范围内可形成有序的 3 股螺旋结构，在强碱性条件下，分子间的氢键被破坏，3 股螺旋结构解体为单股，不能与刚果红形成络合物。通常的凝胶多糖分子量在 40~77 kDa 之间，容易形成 3 股螺旋结构。

### 2.5.5 多糖结构还原

EP-1 样品完全酸水解后的纸层析和高碘酸氧化实验、Smith 降解实验均确定多糖 EP-1 是以 1→3 葡萄糖苷键连接的单糖组分单一、无分支结构的多聚葡萄糖；Sephacryl S-200 HR 凝胶层析求得 EP-1 样品的平均分子量为 35.2 kDa；红外光谱分析证明，EP-1 样品的红外光谱显示了多糖的特征吸收峰， $890\text{ cm}^{-1}$  处的特征峰表示了该多糖的糖苷键为  $\beta$ -吡喃型糖苷键构型。与刚果红试剂形成的络合物其紫外吸收波长随  $\text{NaOH}$  浓度变化而变化的构象检测表明 EP-1 样品在稀碱溶液中 (浓度  $< 0.3\text{ mol/L}$ ) 可能存在 3 股螺旋构象。

综上所述，可知淡紫拟青霉胞外多糖 EP-1 的结构式可以图 8 表示，其中  $n$  代表聚合度，约为 195。

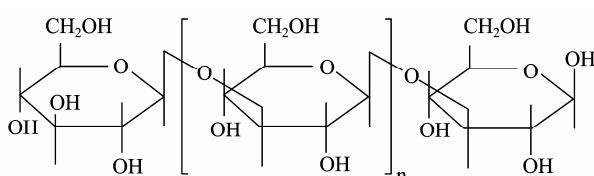


图 8 EP-1 的结构式

Fig. 8 Structural formula of EP-1.

## 2.6 多糖的生物活性测定

对照组尖孢镰刀菌菌落呈白色絮状，菌丝致密饱满，几乎布满整个平板 (图 9A)。镜检观察可见菌丝细胞质均匀、直长、少分支、节间较长、有卵形分生孢子产生。

培养基中添加 EP-1 多糖处理的尖孢镰刀菌，其生长受到抑制，菌丝稀疏，气生菌丝围绕中央的菌饼呈簇状分布，在菌丝团的间隙间可见坏死的菌丝紧贴在培养基表面，呈黑色 (图 9B)。镜检可见受抑制的菌丝生长异常，多处局部膨大，坏死的菌丝细胞质严重浓缩，部分菌丝消解，胞内物质溢出，未观察到孢子产生。粗多糖对尖孢镰刀菌的抑制能力更强，可使尖孢镰刀菌菌丝大面积坏死，在菌落上形成黑斑 (图 9C)。

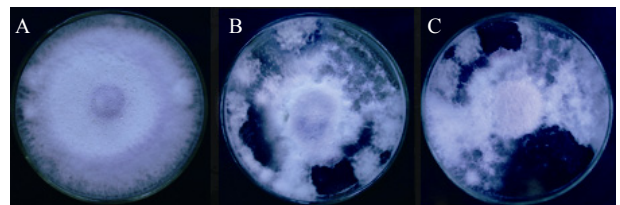


图 9 淡紫拟青霉多糖对尖孢镰刀菌的抑制活性

Fig. 9 Inhibition activity of *Paecilomyces lilacinus* polysaccharide to *F. oxysporum*. (A) The control group. (B) Adding EP-1 to the medium. (C) Adding crude exopolysaccharides to the medium.

与未纯化的粗多糖相比，EP-1 对镰刀菌菌落生长的抑制能力略低，推测 Superdex G-75 层析分离时获得的另外 2 个低含量的组分也对镰刀菌具有一定的抑制能力。

## 3 讨论

到目前为止，从真菌中分离得到的多糖有几十种，可分为聚糖、杂多糖、蛋白糖和肽糖，糖的种类与真菌种属间无明显的相关性。近年研究报道的真菌多糖以葡聚糖居多。Mondal 等<sup>[19]</sup>从食用蘑菇 *Termitomyces eurhizus* 的子实体中得到 2 个多糖 PS-I 和 PS-II，均为  $\alpha$ -葡聚糖，其中 PS-I 结构主链由  $\alpha$ -(1,6)-D-葡萄糖和  $\alpha$ -(1,3)-D-葡萄糖按 2.5:1 的比例组成，无分枝；PS-II 则为  $\alpha$ -(1,6)-D-葡聚糖。陆榕等<sup>[20-21]</sup>提取出细脚拟青霉 *Paecilomyces tenuipes* 粗

多糖, 纯化后经研究确定了细脚拟青霉多糖 I 为  $\alpha$ -(1,6) 连结的无分枝的葡聚糖, 相对分子量为  $2.05 \times 10^4$ , 细脚拟青霉多糖 II 则以  $\beta$ -(1,6)-D-葡聚糖为主链,  $\beta$ -(1,6)-D-甘露糖和  $\beta$ -(2,6)-D-半乳糖组成侧链。

淡紫拟青霉胞外多糖 EP-1 的结构为以  $\beta$ -(1,3) 糖苷键连接而成的无分枝的葡聚糖。此前报道的此类结构的多糖被称为凝胶多糖 (又名 Curdlan 多糖、热凝多糖), 目前发现的凝胶多糖为粪产碱杆菌 *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 或土壤杆菌 *Agrobacterium species* 所产生<sup>[22]</sup>, 由于其独特的结构和理化性质, 具有多种生理活性与应用价值。作为食品添加剂, 可用于改善加工食品的粘弹性、稳定性、保湿性、抗冷冻性及增稠性等, 并可制成可食的生物可降解膜<sup>[23]</sup>; 作为免疫调节剂, 具有抗肿瘤<sup>[24]</sup>、降血脂、降胆固醇<sup>[25]</sup>的作用; 此外, 经硫酸化修饰的凝胶多糖可用于抗人类 HIV 病毒<sup>[26]</sup>。真菌特别是淡紫拟青霉产生此类结构的多糖以及该多糖对尖孢镰刀菌的抑菌活性尚未见报道。

多糖是极其复杂的多聚体, 具有微观不均匀一性等特点, 即使不同来源的相同多糖其构象、理化性质乃至生物活性及其作用机理也可能不同。如不同来源的  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖, 化学组成虽然相同, 但分子大小和空间构象相差很大。黑木耳  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖为单股螺旋, 香菇  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖为三股螺旋, 虎奶菇  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖为柔顺链, 而它们的生物活性相差很大<sup>[27]</sup>。本研究结果表明淡紫拟青霉胞外多糖 EP-1 在稀碱溶液中以 3 股螺旋的构象存在, 该多糖对尖孢镰刀菌具有较高的抑菌活性。这种由淡紫拟青霉所产生的凝胶多糖的发现, 表明淡紫拟青霉不仅在植物病害的生物防治领域具有推广价值, 同时在食品工业、医药工业等领域也展现出一定的开发利用前景。

现有的结果表明, 高级结构对多糖的影响非常大, X-衍射结果显示 3 股螺旋结构是真菌多糖最具活性的空间构象<sup>[28]</sup>。如天然香菇多糖的高级结构与其抗肿瘤活性密切相关, 当在香菇多糖溶液中加入脲、胍等变性剂, 改变其三股螺旋立体构型, 其抗肿瘤免疫活性消失<sup>[29-30]</sup>; 向水不溶性的裂褶菌多糖

种添加尿素或 NaOH, 则可诱导产生三股螺旋构象, 从而表现出抗肿瘤活性<sup>[31]</sup>。但并不是所有多糖其螺旋结构与活性存在必然关系, 如有研究表明灰树花多糖<sup>[32]</sup>以及从 *Glomerella cingulata* 的培养液中分离出的  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖 (Glomerellan)<sup>[33]</sup>, 其抗肿瘤活性均与有序结构无关。淡紫拟青霉胞外多糖 EP-1 对生存能力很强的枯萎病原尖孢镰刀菌具有很好的抑制作用, 但该多糖的抑菌能力是否与其螺旋结构之间存在关联还有待于进一步的研究。

## REFERENCES

- [1] Zaki FA. Biological control of *Meloidogyne javanica* in tomato by *Paecilomyces lilacinus* and castor. *Indian J Nematol*, 1998, **28**(2): 132-139.
- [2] Xiao S, Zhang SS, Liu GK. Control effect of *Paecilomyces lilacinus* on *Meloidogyne* spp.. *J Fujian A & F Univ: Nat Sci Ed*, 2006, **35**(5): 463-465.  
肖顺, 张绍升, 刘国坤. 淡紫拟青霉对根结线虫的防治作用. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, **35**(5): 463-465.
- [3] Debnath S. Occurrence of native entomogenous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson on eggs and larvae of bunch caterpillar (*Andraca bipunctata*). *Two and a Bud*, 1998, **45**: 24-25.
- [4] Lin MS, Shen JD, Wen L, et al. Bioassay of physiological activities of metabolic product of *Paecilomyces lilacinus*. *Acta Agri Jiangsu*, 1999, **14**(6): 71-74.  
林茂松, 沈纪东, 文玲, 等. 淡紫拟青霉代谢产物生理活性物质分析和生物测定. 江苏农业学报, 1999, **14**(6): 71-74.
- [5] Li F, Shi H, Liu B, et al. Antagonistic effect of biocontrol fungus, *Paecilomyces lilacinus* strain NH-PL-03 and its mechanism against *Fusarium oxysporum*. *Acta Phytophyl Sin*, 2005, **32**(4): 373-378.  
李芳, 史怀, 刘波, 等. 淡紫拟青霉对尖孢镰刀菌的拮抗作用与机制分析. 植物保护学报, 2005, **32**(4): 373-378.
- [6] Li F, Huang SF, Liu B. Degradation of phoxim by *Paecilomyces lilaciuns*. *Chin J Appl Environ Biol*, 2006, **12**(1): 104-107.  
李芳, 黄素芳, 刘波. 淡紫拟青霉对辛硫磷的降解效应. 应用与环境生物学报, 2006, **12**(1): 104-107.
- [7] Segers R, Butt TM, Kerry BR, et al. The role of the proteinase VCP1 produced by the nematophagous *Verticillium chlamydosporium* in the infection process of nematode eggs. *Mycol Res*, 1996, **100**(4): 421-428.

- [8] Costa MJN, Campos VP, Pfenning LH, *et al.* Fungus filtrates toxicity to *Meloidogyne incognita*. *Fitopatologia Brasileira*, 2001, **26**(4): 749–755.
- [9] Voinove-Raikova Z, Bakalivanov D, Chanova D. Betainoleacetic acid in some soil microorganisms. *Pochvozn Agrokhim*, 1969, **4**: 85–90.
- [10] Gunasekera TS, Gillings MR, Briscoe DA, *et al.* Phenotypic and genetic characterization of *Paecilomyces lilacinus* strains with biocontrol activity against root-knot nematodes. *Can J Microbiol*, 2000, **46**(9): 775–783.
- [11] Cheng XL, Sun JW, Yang J, *et al.* Conditions for dextranase formation by *Paecilomyces lilacinus*. *Acta Microbiol Sin*, 1992, **32**(5): 334–339.  
程秀兰, 孙晋武, 杨敬, 等. 淡紫拟青霉右旋糖酐酶的形成条件. *微生物学报*, 1992, **32**(5): 334–339.
- [12] Shi H, Zhu YJ, Li F, *et al.* Polysaccharides of *Paecilomyces lilacinus* strain NH-PL-03 and its inhibitory effects on *Fusarium oxysporum*. *China Plant Propt*, 2006, **26**(9): 5–8.  
史怀, 朱育菁, 李芳, 等. 淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株的多糖及其对尖孢镰刀菌的抑制作用. *中国植保导刊*, 2006, **26**(9): 5–8.
- [13] Jin LQ, Lü JX, Yang JZ. *Paecilomyces cicadidae* total polysaccharides regulates immune function in immunosuppressed rats. *Chin J Pathophysiol*, 2006, **22**(5): 881–884.  
金丽琴, 吕建新, 杨介钻. 蝉拟青霉总多糖对免疫抑制大鼠组织器官免疫功能调节的实验研究. *中国病理生理杂志*, 2006, **22**(5): 881–884.
- [14] Mei DQ, Wen TC, Liang ZQ. Effects of polysaccharides from mycelia of *Paecilomyces gunnii* (MPPG) on the immunosuppressive factors deriving from tumor cells. *J Guizhou Univ: Nat Sci Ed*, 2006, **23**(2): 191–195.  
梅德强, 文庭池, 梁宗琦. 古尼拟青霉菌丝体多糖 (MPPG) 对肿瘤细胞产生免疫抑制因子的影响. *贵州大学学报: 自然科学版*, 2006, **23**(2): 191–195.
- [15] Li BJ, Jin LQ, Zuo JC. Experimental study on the anti-HBV effect of polysaccharides from *Paecilomyces tenuipes*. *J Chin Med Matr*, 2007, **30**(2): 200–202.  
李宝剑, 金丽琴, 左江成. 细脚拟青霉多糖抗乙型肝炎病毒的体外实验研究. *中药材*, 2007, **30**(2): 200–202.
- [16] Qi HL, Wei SY, Wang JL. Removal of proteins from polysaccharides by Sevage method. *Tianjin Chem Ind*, 2000, **12**(3): 20–21.  
齐慧玲, 魏绍云, 王继伦. Sevage 法去除多糖中蛋白的研究. *天津化工*, 2000, **12**(3): 20–21.
- [17] Zhang WJ. Research Technology of Glycoconjugates Biochemistry. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1999.  
张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [18] Zhou L, Guo SY, Cai MY, *et al.* Research on the viscosity and conformation character of *Schizophyllum*. *Food Ferm Ind*, 2005, **31**(11): 1–5.  
周林, 郭祀远, 蔡妙颜, 等. 裂褶菌胞外多糖的粘度性质及其构象研究. *食品与发酵工业*, 2005, **31**(11): 1–5.
- [19] Mondal S, Chakraborty I, Pramanik M, *et al.* Structural studies of water-soluble polysaccharides of an edible mushroom, *Termitomyces eurhizus*. A reinvestigation. *Carbohydr Res*, 2004, **339**(1): 1135–1140.
- [20] Lu R, Sun LS, Wang ZF, *et al.* Studies on chemical structure of polysaccharide I obtained from *Paecilomyces tenuipes*. *Chin Trad Herbal Drugs*, 2001, **32**(10): 865–867.  
陆榕, 孙立崧, 王仲孚, 等. 细脚拟青霉多糖 I 的化学结构. *中草药*, 2001, **32**(10): 865–867.
- [21] Lu R, Miyakoshi T, Tian G. Structural studies of *Paecilomyces tenuipes* Samson polysaccharide-part-2. *Carbohydrate Polymers*, 2007, **67**(3): 343–346.
- [22] Ai ZL, Huang ZM. Curdlan and its application in food industry. *Food Sci Technol*, 1998, **24**(4): 25–27.  
艾志录, 黄忠民. 凝结多糖及其在食品工业中的运用. *食品科技*, 1998, **24**(4): 25–27.
- [23] Jezequel V. Curdlan: a new functional beta-glucan. *Cereal Foods Word*, 1998, **43**(5): 361–364.
- [24] Kudoh Y, Shimizu J, Ishiyama A, *et al.* Secretion and excretion of immunoglobulin A to cecum and feces differ with type of digestible saccharine. *J Nutr Sci Vitaminol*, 1999, **45**(2): 173–181.
- [25] Takeda HN, Neoh LP, Akimoto H, *et al.* Role of curdlan sulfate in binding of HIV-1 gp120 to CD4 molecules and the production of gp120-mediated TNF-alpha. *Microbiol Immunol*, 1997, **41**(9): 741–745.
- [26] Sun YS, Wang L, Zhan XB, *et al.* Influence of nitrogen source NH<sub>4</sub>Cl Concentration on Curdlan Production in *Alcaligenes faecalis*. *Chin J Biotech*, 2005, **21**(2): 328–331.  
孙永生, 王磊, 詹晓北, 等. 氮源 NH<sub>4</sub>Cl 浓度对粪产碱杆菌发酵生产热凝胶的影响. *生物工程学报*, 2005, **21**(2): 328–331.
- [27] Wang DM, Li L, Guo SY, *et al.* Relationship between structure and activity of active polysaccharides. *Mod Chem Ind*, 2002, **22**(8): 18–22.  
王当梅, 李琳, 郭祀远, 等. 活性多糖构效关系研究综述. *现代化工*, 2002, **22**(8): 18–22.
- [28] Xiao JH. Current status and ponderation on preparations and chemical structures of polysaccharide in fungi of

- Cordyceps* (Fr.) Link. *Chin Trad Herbal Drugs*, 2008, **39**(3): 454–460.
- 肖建辉. 虫草属真菌多糖制备及化学结构的研究现状与思考. *中草药*, 2008, **39**(3): 454–460.
- [29] Matsuoka H, Seo Y, Wakasugi H, *et al.* Lentinan potentiates immunity and prolongs the survival time of some patients. *Anticancer Res*, 1997, **17**(4A): 2751–2755.
- [30] Zhang PY, Zhang LN, Cheng SY. Effect of urea and sodium hydroxide on the molecular weight and conformation of  $\beta$ -(1,3)-D-glucan from *Letinus edodes* in aqueous solution. *Carbohydr Res*, 2000, **327**(2): 431–438.
- [31] Young SH, Jacobs RR. Sodium hydroxide-induced conformational change in schizophyllan detected by the fluorescence dye, aniline blue. *Carbohydr Res*, 1998, **310**(1): 91–99.
- [32] Bian B, Ye BP, Xi T, *et al.* Advance in the study on polysaccharides from *Grifola frondosa*. *Pharm Biotechnol*, 2004, **11**(1): 60–63.
- 边彬, 叶波平, 奚涛, 等. 灰树花多糖的研究进展. *药物生物技术*, 2004, **11**(1): 60–63.
- [33] John A Bohn, James N BeMiller. (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr Polym*, 1995, **28**(1): 3–14.