

文章编号 :1673-2383(2018)01-0045-06

网络出版网址 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1378.N.20180209.1423.016.html>

网络出版时间 2018-2-9 14:24:21

双酶协同加压热水法提取与纯化香菇多糖

李 鑫^{1,2,3}, 陈 云³

(南京林业大学 1.江苏省林业资源高效加工利用协同创新中心;

2.林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室;

3.化学工程学院,江苏 南京 210037)

摘要 :香菇多糖具有增强免疫、抗肿瘤、降血压、降血脂等功效,广泛应用于食品与医药领域。以新鲜香菇为原料,采用木瓜蛋白酶和纤维素酶双酶协同加压热水法提取香菇多糖,优化双酶预水解的工艺条件。在此基础上,以凝胶层析法纯化香菇多糖,并鉴定纯化的香菇多糖。研究结果表明:纤维素酶加入量为 1.00 g/g(以 1 g 绝干香菇质量计)和木瓜蛋白酶加入量为 0.024 g/g(以 1 g 绝干香菇质量计),在 pH 4.5 和 45 ℃的条件下,双酶协同预水解香菇原料 10 h,接着采用加压热水法提取香菇多糖,在固液比 1:50(g/mL)和提取温度 115 ℃条件下,提取 80 min,香菇多糖得率可达 23.6%。采用凝胶层析法纯化香菇多糖,以 Superose 6 PG 为分离介质,流动相为脱气纯水,在流速 0.6 mL/min 和柱温 48 ℃的条件下,分离纯化香菇多糖粗品,经过两步分离纯化后,获得均一的多糖样品。以蒽酮-硫酸法、高碘酸钠法和红外光谱法鉴别纯化组分为香菇多糖;以凝胶渗透色谱法测定香菇多糖的重均分子量为 3.75×10^4 ;以刚果红法分析香菇多糖,香菇多糖与刚果红形成络合物,最大吸收波长移向长波长,发生红移现象,表明纯化的香菇多糖中存在螺旋构象。研究结果为香菇多糖的高效提取与分离纯化提供了新的路线。

关键词 :香菇多糖;纤维素酶;木瓜蛋白酶;加压热水提取;纯化;鉴定

中图分类号 :TS201.2;

文献标志码 :B

DOI:10.16433/j.cnki.issn1673-2383.2018.01.008

0 引言

香菇是药食两用菌类,营养丰富,含有香菇多糖、香菇嘌呤、氨基酸等多种药用成分^[1]。香菇多糖具有激活人体免疫力、抗肿瘤、抗病毒等功效,备受众人关注^[2]。香菇多糖的生物活性,与其重均分子质量、三螺旋构象存在相关关系,香菇多糖存在三螺旋构象以及重均分子质量较大时,其生物活性突出^[3]。

香菇多糖以 5 个 β -1,3-D-葡聚糖为主链,沿主链随机分散着 2 个 β -1,6-D-葡聚糖支链,呈梳状结构^[4]。香菇多糖的提取主要采用热水提取法、加压热水法、酸(碱)提法、超声波提取法、酶辅助提取法等^[2]。香菇多糖的纯化方法主要有分级沉淀

法、盐析法、金属络合物法、层析法、膜分离法及高速逆流色谱法^[5]。作者采用木瓜蛋白酶和纤维素酶协同加压热水法提取香菇多糖,再经凝胶层析法纯化香菇多糖,并采用蒽酮-硫酸法、高碘酸钠法、红外光谱法、刚果红法、凝胶渗透色谱法分析纯化后的香菇多糖。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜香菇:江苏宜兴市张渚镇;纤维素酶:酶活为 227 FPIU/mL,尤特尔公司;木瓜蛋白酶:酶活为 2 100 IU/g, Sigma-Aldrich 公司。其他试剂均为市售分析纯。

1.2 主要仪器与设备

AKTA Explorer 100 液相层析系统:美国 GE Healthcare 公司;FD-720 水分测定仪:日本 KETT 公司;Agilent 1200 高效液相色谱、Agilent 1260 凝胶渗透色谱:美国安捷伦公司;MLS-2420 高压灭

收稿日期:2017-07-11

基金项目:青海省重点研发与转化计划项目(2016-HZ-819);江苏省高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介:李鑫(1975—),男,辽宁大连人,副教授,研究方向为生物质资源加工与利用。

菌锅:日本三洋公司;UV-1800 紫外可见分光光度计:日本岛津公司;VERTEX80V 红外光谱仪:德国布鲁克公司。

1.3 方法

1.3.1 原料处理

新鲜香菇经除杂、去根、清洗后,切成平均粒径为 0.5 cm 的块状,挤压去除水分,平铺于自封袋中,置于 4 ℃冷藏平衡水分 2 d,待用。

1.3.2 双酶协同加压热水法提取香菇多糖

以 5 g 新鲜香菇(以绝干香菇质量计)为原料,按固液比为 1:20(g/mL)加入纯水,调节 pH 值,分别加入纤维素酶和木瓜蛋白酶,双酶预水解新鲜香菇,采用单因素方法优化酶预水解过程中的酶加入量、pH 值、温度和时间。酶解后,按照固液比 1:50(g/mL)补足纯化水,调节 pH 值至中性。采用加压热水法提取香菇多糖,加压热水法提取条件为:提取温度 115 ℃、提取时间 80 min。提取后,真空浓缩粗提液。浓缩的粗提液用 95%乙醇进行醇沉处理, $V_{\text{粗提液}}:V_{\text{乙醇}}=1:3$ 。静置过夜,7 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,冷冻干燥固体沉淀物,即为香菇多糖粗品。

1.3.3 香菇多糖的分离纯化

香菇多糖粗品复溶后,经 0.22 μm 滤膜过滤,采用 AKTA Explorer 100 液相层析系统分离纯化香菇多糖,层析柱为 XK16/100,分离介质为 Superose 6 PG,流动相为脱气纯水,流速为 0.6 mL/min,检测器为示差检测器,洗脱体积为 1.5 倍柱体积。收集每一个色谱峰的流出液,冷冻干燥得到干粉,待用。

1.3.4 分析方法

1.3.4.1 香菇多糖得率的计算

通过 8%(g/mL) H_2SO_4 完全酸解多糖为葡萄糖,采用高效液相色谱法(HPLC)分析葡萄糖含量。以体积比为 1:1,向粗提液中加入 8% H_2SO_4 ,121 ℃下酸水解 60 min。 NaOH 溶液调节 pH 至中性。采用 FD-720 型红外水分测定仪测定香菇的水分含量。HPLC 分析条件为:伯乐 HPX-87H 柱(7.8 mm×300 mm),0.005 mol/L 硫酸为流动相,流速为 0.6 mL/min,柱温为 55 ℃,示差检测器。

$$\text{香菇多糖得率}(\%) = \frac{0.9 \times C \times V}{W} \times 100,$$

式中:0.9 为单糖转化为多糖的转化系数; C 为葡萄糖质量浓度, g/L; V 为粗提液体积, L; W 为香菇绝干质量, g。

1.3.4.2 香菇多糖的鉴别

根据《中国药典》(2000 版)(WS1-(X-032)-2004Z)的药品标准,采用蒽酮-硫酸法、高碘酸钠法

和红外光吸收光谱法鉴别纯化的香菇多糖。

1.3.4.3 香菇多糖重均分子量的测定

将纯化的香菇多糖配制成 1 mg/mL 溶液,10 000 r/min 离心 5 min,上清液经 0.22 μm 滤膜过滤,采用凝胶渗透色谱仪(GPC),凝胶色谱柱为 hydrogel 120、hydrogel 250、hydrogel 2 000 三柱串联,流动相为脱气纯水,流速为 0.6 mL/min,pH 值接近中性,柱温为 65 ℃,示差检测器。

1.3.4.4 香菇多糖螺旋构象的鉴别

取 2 mg 样品,加入 2.0 mL 去离子水后加入不同体积的 4 mol/L NaOH 溶液,使溶液中 NaOH 最终浓度为 0~0.5 mol/L,再加入刚果红溶液(100 μmol/L)2 mL,混匀,于 400~600 nm 波长下扫描,测定最大吸收波长,以刚果红溶液作为对照, NaOH 浓度为横坐标,最大吸收波长为纵坐标作图。

2 结果与分析

2.1 纤维素酶与木瓜蛋白酶协同加压热水法提取香菇多糖

2.1.1 纤维素酶加入量对香菇多糖提取的影响

双酶协同水解香菇细胞壁的过程中,酶的加入量对香菇多糖得率影响较大。木瓜蛋白酶加入量为 0.02 g/g(以 1 g 绝干香菇质量计,下同),研究不同的纤维素酶加入量(0.63、0.75、0.88、1.00、1.13 g/g)对香菇多糖提取的影响,结果如图 1 所示。

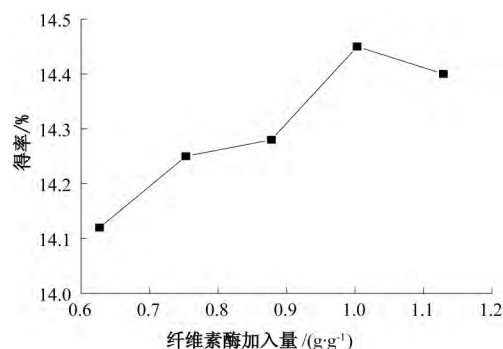


图 1 纤维素酶加入量对双酶协同加压热水法提取香菇多糖的影响

Fig.1 Effect of cellulase dosage on enzyme-assisted pressured hot water extraction of lentinan

从图 1 可知,纤维素酶加入量在 0.63~1.00 g/g 时,随着纤维素酶加入量的增加,香菇多糖得率也随之增加;进一步增加纤维素酶的加入量,香菇多糖得率趋于稳定。当纤维素酶加入量为 1.00 g/g 时,香菇多糖得率最高,为 14.45%。香菇细胞壁是由蛋白质、果胶质、木质素、纤维素和半纤维素合成致密结构;真菌细胞壁中蛋白质与几丁质和

葡聚糖形成共价键存在于细胞壁上^[10]。香菇多糖分布于香菇胞液和细胞壁中,细胞壁的致密结构导致香菇多糖不易提取。木瓜蛋白酶水解细胞壁的糖蛋白,解除糖蛋白对葡聚糖覆盖;继而,纤维素酶解除葡聚糖和几丁质的糖苷键联结,水解葡聚糖,促进香菇多糖的释放,提高香菇多糖的得率。由于纤维素酶的作用是辅助破坏香菇细胞壁,当纤维素酶加入量达到 1.00 g/g 时,对香菇细胞壁的酶解作用达到饱和,因而继续增加纤维素酶加入量无法进一步提高香菇多糖的得率^[11]。因此,最适的纤维素酶加入量为 1.00 g/g。

2.1.2 木瓜蛋白酶加入量对香菇多糖提取的影响

纤维素酶加入量为 1.00 g/g (以 1 g 绝干香菇质量计,下同),考察不同木瓜蛋白酶加入量(0.020、0.024、0.028、0.032、0.036 g/g)对香菇多糖提取的影响,结果如图 2 所示。

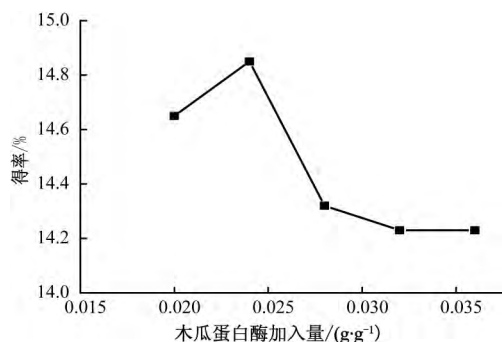


图 2 木瓜蛋白酶加入量对双酶协同加压热水法提取香菇多糖的影响

Fig.2 Effect of papain dosage on enzyme-assisted pressured hot water extraction of lentinan

从图 2 可以看出,香菇多糖得率随木瓜蛋白酶加入量的增加而升高,当木瓜蛋白酶加入量为 0.024 g/g 时,香菇多糖得率达到最大值 14.85%,随后进一步增加木瓜蛋白酶加入量,香菇多糖得率略有下降。推测可能是由于酶浓度过高出现反馈抑制^[12]或木瓜蛋白酶的自水解降低了其对香菇多糖提取的辅助水解作用。因此,最适的木瓜蛋白酶加入量为 0.024 g/g。

2.1.3 酶解 pH 值对香菇多糖得率的影响

研究不同酶解 pH 值(4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0)对香菇多糖提取的影响,结果如图 3 所示。

由图 3 可知,随着酶解 pH 值的增大,香菇多糖得率也随之增大;当 pH 值为 4.5 时,香菇多糖得率达到最大值 15.65%。进一步增加 pH 值,香菇多糖得率随着 pH 值的增大呈现下降趋势。酶解 pH 值影响酶的活力,王文文等^[13]研究表明最适 pH 值为 4.5 有利于复合酶协同破坏香菇细胞壁及降

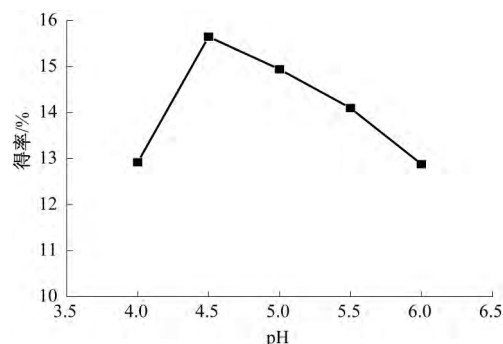


图 3 酶解 pH 值对双酶协同加压热水法提取香菇多糖的影响

Fig.3 Effect of pH on enzyme-assisted pressured hot water extraction of lentinan

解香菇蛋白。纤维素酶与木瓜蛋白酶协同作用于香菇细胞壁及水解糖蛋白,酶解 pH 值小于 4.5 或者大于 4.5 时,无法协调纤维素酶与木瓜蛋白酶的酶解。因此,确定最适的酶解 pH 值为 4.5。

2.1.4 酶解温度对香菇多糖得率的影响

研究不同酶解温度(40、45、50、55、60 °C)对双酶协同加压热水法提取香菇多糖的影响,结果如图 4 所示。

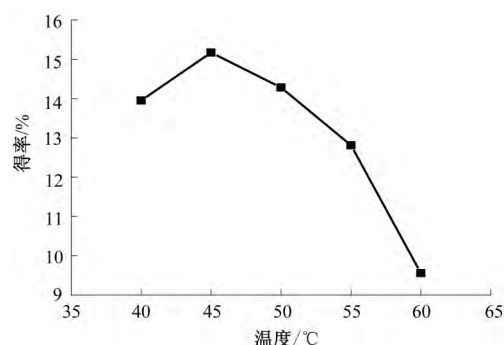


图 4 酶解温度对双酶协同加压热水法提取香菇多糖的影响

Fig.4 Effect of enzymolysis temperature on enzyme-assisted pressured hot water extraction of lentinan

由图 4 可知,当酶解温度为 40~45 °C 时,随着酶解温度的上升,香菇多糖得率也随之上升;当温度在 45~60 °C 时,香菇多糖得率随着酶解温度的升高而降低;当温度为 45 °C 时,香菇多糖得率达到最大值 15.17%。酶解温度高于 45 °C,酶受到高温影响,酶活力下降,限制了酶的协同水解作用,不利于香菇多糖的提取。因此,确定最适的酶解温度为 45 °C。

2.1.5 酶解时间对香菇多糖得率的影响

酶解时间影响香菇多糖的提取,随着酶解时间的增加,酶解作用加强,香菇多糖得率随之上升。

反之酶解时间不够,细胞壁破坏不完全,胞内物质无法全部提取出来,香菇多糖得率较低。研究不同酶解时间(2、4、6、8、10、12 h)对香菇多糖提取的影响,结果如图 5 所示。由图 5 可知,当酶解时间为 2~10 h 时,香菇多糖得率随酶解时间增长呈现上升趋势;当酶解时间为 10 h 时,香菇多糖得率达到最高值 23.6%。延长酶解时间,有助于协同水解香菇细胞壁,促进香菇多糖的释放,有利于香菇多糖的提取;但过长的酶解时间,易导致酶活力下降和过长的生产周期。因此,确定最适的酶解时间为 10 h。

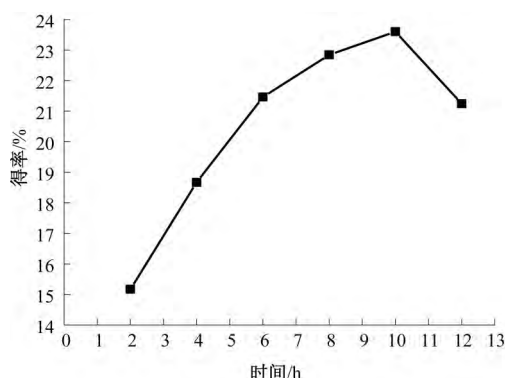


图 5 酶解时间对双酶协同加压热水法提取香菇多糖的影响

Fig.5 Effect of enzymolysis time on enzyme-assisted pressured hot water extraction of lentinan

2.2 香菇多糖的分离纯化

采用凝胶层析法纯化香菇多糖粗品,在层析柱长 1.6 cm × 100 cm、流动相脱气纯水、流速 0.6 mL/min、柱温 48 °C 的条件下,以 Superose 6 PG 为层析介质,检测器为示差检测器,可实现对香菇多糖的有效分离纯化,如图 6 所示。从图 6 可以看出,香菇多糖粗品经过层析分离纯化后,出现 A、B、C 3 种不同组分,经酸水解和 HPLC 分析后,发现只有组分 A 为多糖组分。对组分 A 进行二次纯化,表明组分 A 是均一的多糖组分。收集组分 A 的流出液,经冷冻干燥得到干粉,备用。

2.3 香菇多糖的鉴别

2.3.1 蒽酮-硫酸法

多糖在浓硫酸的作用下,脱水生成了糠醛或羟甲基糠醛,生成的糠醛或羟甲基糠醛可与蒽酮反应,生成蓝绿色糠醛衍生物^[14]。向纯化的香菇多糖溶液中加入 0.2% 蒽酮-硫酸溶液,振荡混匀,置于水浴中加热,溶液颜色显示为蓝绿色,说明溶液中有多糖的存在,且多糖与浓硫酸反应,生成了糠醛衍生物。

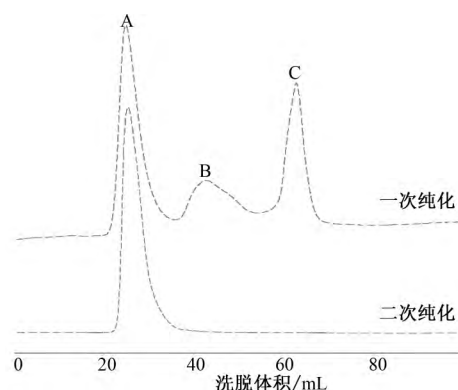


图 6 凝胶层析法分离纯化香菇多糖

Fig.6 Purification of lentinan by gel chromatography with Supersoe 6 PG

2.3.2 高碘酸钠法

用高碘酸钠法鉴定香菇多糖,以水为空白对照,在 295 nm 的波长测定的吸收度 (A_1) 为 0.17,30 °C 水浴恒温振荡 6 h 后,测定吸收度 (A_2) 为 0.33,吸收度差值为 0.16。《中国药典》(2000 版)规定两次吸收度之差应为 0.15~0.25,测定结果符合中国药典的要求。

2.3.3 香菇多糖的红外光谱表征

香菇多糖红外吸收光谱在 890 cm^{-1} 附近有弱的特征吸收峰。图 7 为香菇多糖红外光谱图。由图 7 可知,香菇多糖样品在 892.87 cm^{-1} 处有弱的吸收峰,与《中国药典》规定一致,进一步证明纯化的多糖样品是香菇多糖。香菇多糖样品在 3 448.05 cm^{-1} 处有很强的吸收峰,这是由于分子内或分子间氢键 O—H 伸缩振动而引起的强吸收峰,说明样品中含有大量的 O—H 键;1 635.32 cm^{-1} 为—OH 的特征吸收峰,或者形成了结晶水;1 450~1 220 cm^{-1} 处吸收峰为 C—H 键的变角振动,1 398.12 cm^{-1} 处吸收峰为 C—H 的变角振动引起;1 043 cm^{-1} 处为吡喃环上 C—O—C 和 C—O—H 伸缩振动引起的吸收峰^[15]。

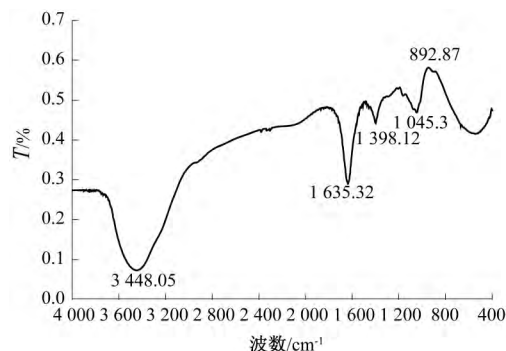


图 7 香菇多糖的红外光谱

Fig.7 IR spectrum of purified lentinan

2.4 香菇多糖重均分子量的分析

采用 hydrogel 120、hydrogel 250、hydrogel 2000 凝胶色谱柱三柱串联测定香菇多糖标准品与纯化的香菇多糖样品的重均分子量,如图 8 所示。用不同分子量的标准葡聚糖回归标准曲线和方程,将香菇多糖标准品和香菇多糖样品的洗脱体积代入方程,求得香菇多糖标准品和香菇多糖样品的重均分子量分别为 1.9×10^4 、 3.75×10^4 。

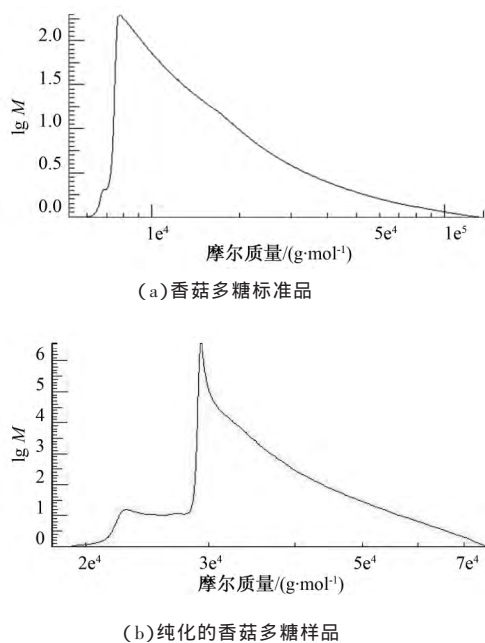


图 8 香菇多糖凝胶渗透色谱图

Fig.8 Gel permeation chromatography of lentinan

2.5 香菇多糖螺旋构象的定性分析

采用刚果红法定性分析香菇多糖的螺旋构象, NaOH 浓度较小时,具有螺旋结构的多糖与刚果红形成络合物,吸收波长移向长波;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^[16]。在 400 ~ 600 nm 的范围内,进行波长扫描,确定最大吸收峰,结果如图 9 所示。

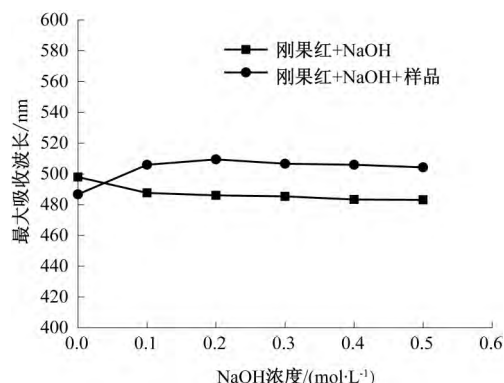


图 9 刚果红法定性分析香菇多糖螺旋构象

Fig.9 Identification of the helix conformation of lentinan by the Congo red reaction method

如图 9 所示,香菇多糖与刚果红发生红移现象,最大吸收波长发生改变。当氢氧化钠浓度为 0.2 mol/L 时,红移现象最为明显。当氢氧化钠浓度大于 0.2 mol/L 时,螺旋构象开始发生解旋,红移现象开始减弱,最大吸收波长降低。图 9 中的红移现象,证实了香菇多糖样品中存在螺旋构象^[17]。

3 结论

采用纤维素酶与木瓜蛋白酶双酶协同加压热水法提取香菇多糖,通过单因素试验优化酶水解条件为:纤维素酶加入量为 1.00 g/g (以 1 g 绝干香菇质量计),木瓜蛋白酶加入量为 0.024 g/g,在 45 ℃、pH 值 4.5 的条件下,酶解 10 h,香菇多糖得率达到最大值 23.6%。采用凝胶层析法纯化香菇多糖,以 Superose 6 PG 为分离介质,脱气纯水为流动相,在流速 0.6 mL/min、柱温 48 ℃的条件下,分离纯化出均一的香菇多糖。采用蒽酮-硫酸法、高碘酸钠法、红外光谱法和凝胶渗透色谱法进行分析鉴定,确认纯化的多糖为香菇多糖,香菇多糖重均分子量为 3.75×10^4 。刚果红法表明纯化的香菇多糖中存在螺旋构象。综上所述,双酶协同加压热水法显著提高香菇多糖得率,基于 Superose 6 PG 分离介质的凝胶层析法高效纯化提取的香菇多糖,为香菇多糖的高效提取与纯化提供了新的路线。

参考文献:

- [1] 缪建,杨文革,周彬,等.香菇多糖提取分离的研究[J].生物加工过程,2007,5(3):74-77.
- [2] ZHANG Y Y, LI S, WANG X H, et al. Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25:196-206.
- [3] ZHANG L N, LI X L, XU X J, et al. Correlation between antitumor activity, molecular weight and conformation of lentinan [J]. Carbohydrate Research, 2005, 340(8):1515-1521.
- [4] GIAVASIS I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2014, 26:162-173.
- [5] 范晓良,颜继忠,阮伟峰.香菇多糖的提取、分离纯化及结构分析研究进展[J].海峡药学,2012,24(5):1-4.
- [6] 谢红旗.香菇多糖提取、纯化、结构表征及生

- 物活性的研究 [D]. 长沙:中南大学, 2007.
- [7] 国家药典委员会. 中国药典 [M]. 北京:化学工业出版社, 2000:109-110.
- [8] 闫慧丹. 新型香菇多糖的纯化、鉴定与免疫活性研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
- [9] 张华云, 李文香, 姜连芳, 等. 酶对香菇细胞壁降解作用的研究 [J]. 中国果菜, 1996(4): 26-27.
- [10] 张成省, 李多川, 孔凡玉. 真菌菌丝细胞壁可溶性蛋白抽提方法研究 [J]. 山东科学, 2004, 17(1):12-16.
- [11] 田华, 张义明. 多糖的结构测定及应用 [J]. 中国食品添加剂, 2012 (2):177-181.
- [12] 王文文, 谭才邓, 吴亚丽, 等. 高压热水-酶法分段提取香菇多糖的研究 [J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2015, 36(4): 101-106.
- [13] 王文文, 刘嘉俊, 廖延智, 等. 高压热水-复合酶提取香菇多糖工艺研究 [J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(3): 27-30.
- [14] 易剑平, 毕雅静, 宋秀荣, 等. 蒽酮-硫酸法测定枸杞多糖质量分数的研究 [J]. 北京工业大学学报, 2005, 31(6): 641-646.
- [15] SASAKI T, TAKASUKA N. Further study of the structure of lentinan an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes* [J]. Carbohydrate Research, 1976, 47(1):99-104.
- [16] 史怀, 刘波, 苏明星, 等. 淡紫拟青霉胞外多糖的分离、纯化及结构分析 [J]. 生物工程学报, 2010, 26(8):1080-1087.
- [17] 邹林武. 香菇多糖提取工艺及其分子结构改性研究 [D]. 广州:华南理工大学, 2013.

ENZYME-ASSISTED PRESSURED HOT WATER EXTRACTION AND PURIFICATION OF LENTINAN FROM LENTINUS EDODES

LI Xin^{1,2,3}, CHEN Yun³

(1. Jiangsu Co-Innovation Center of Efficient Processing and Utilization of Forest Resources;

2. Key Laboratory of Forest Genetics & Biotechnology of the Ministry of Education;

3. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: Lentinan which has the biological activity of enhancing immune system, anti-cancer, antihypertensive and hypolipidemic activities, was widely used in medicine and food industry. The enzyme-assisted (papain and cellulase) pressured hot water extraction was applied to extract lentinan from fresh *Lentinus edodes* in the present study. The fresh *Lentinus edodes* was firstly prehydrolyzed with papain and cellulase, and followed by pressured hot water extraction. Afterwards, gel chromatography with Superose 6 PG was applied for the purification of lentinan. The optimal conditions of enzymatic prehydrolysis were as follows: cellulase of 1.00 g/g (calculated by dry mass of *Lentinus edodes*), papain of 0.024 g/g, temperature of 45 °C, pH of 4.5 and enzymatic prehydrolysis time of 10 h. After that, the pressured hot water extraction was used to extract lentinan for 80 min at 115 °C with a solid/liquid ratio of 1:50 (W/V). Under the optimal conditions, the extraction yield of lentinan was up to 23.6%. Then, purification of crude lentinan was carried out on Superose 6 PG with degassed purified water as eluent, and the flow rate and column temperature were 0.6 mL/min and 48 °C, respectively. A homogeneous polysaccharide fraction was obtained by the two-step gel chromatography. The purified lentinan was identified by anthrone-H₂SO₄ method, periodate oxidation method and infrared spectroscopy. The weight-average molecular weight of the purified lentinan was 3.75×10^4 , which was measured by gel permeation chromatography. A red shift phenomenon was observed when the Congo red reaction was used to analyse the purified lentinan, which suggested the helix conformation was existed in the purified lentinan. The results of present research will supply a new approach for extraction and purification of lentinan from fresh *Lentinus edodes*.

Key words: lentinan; cellulase; papain; pressured hot water extraction; purification; identification