

人工培养菌种茯苓菌丝体多糖的分离、组成和分子量*

林雨露**

(江汉大学化学与环境工程学院 武汉 430056)

张俐娜*** 金勇 陈莉 张玫 韩宏伟

(武汉大学化学与分子科学学院 武汉 430072)

张志强

陈立国

(香港中文大学生物系 香港) (华中农业大学真菌研究所 武汉 430070)

摘 要 由人工培育的茯苓菌种(5·78号)在含麸皮的培养液中于25℃培养18天得到茯苓菌丝体,分别用9 g/L NaCl水溶液、热水、0.5 mol/L NaOH和88%甲酸从菌丝体中提取7种多糖依次为:ab-PCM1、ab-PCM2-I、ab-PCM2-II、ab-PCM3-I、ab-PCM3-II、ab-PCM4-I、ab-PCM4-II,并从培养液中提取一种多糖ab-PCM0.红外光谱(IR)、气相色谱(GC)和¹³C-NMR分析结果表明ab-PCM0至ab-PCM3-I多糖主要由 α -(1→3)-D-葡萄糖、 α -D-甘露糖、 β -D-半乳糖和乙酰葡萄糖胺组成,而且随提取过程进行,葡萄糖含量逐渐增加,即从杂多糖到 α -葡聚糖,ab-PCM3-II、ab-PCM4-I和ab-PCM4-II则主要是 β -(1→3)-D-葡聚糖.有趣的是, α -葡聚糖和 β -葡聚糖共存于该菌丝体的碱水提取液中.由粘度法和光散射法测定了多糖的特性粘数 $[\eta]$ 和重均分子量 M_w .ab-PCM0、ab-PCM1、ab-PCM2-I、ab-PCM2-II、ab-PCM3-I和ab-PCM4-II多糖的 M_w 值分别为 7.7×10^4 、 5.2×10^4 、 5.0×10^4 、 24.3×10^4 、 65.2×10^4 和 25.5×10^4 .

关键词 茯苓菌丝体,多糖,分离,气相色谱,特性粘数,光散射

茯苓是我国八大中药之一,具有利尿、渗湿、补脾、安神等功能.据报道从茯苓中提取的茯苓多糖或茯苓异多糖具有促进细胞分裂、补体激活^[1]、抗诱变^[2]、抗肿瘤^[3-5]、增强免疫^[6]等生物活性.因此,茯苓多糖结构及生物活性的研究日益引人注目,尤其采用生物工程技术培养茯苓菌丝可缩短生产周期.Kanayama等从茯苓菌丝体中分离出4种多糖,包括3种杂多糖(由葡萄糖、半乳糖、木糖、甘露糖组成)和一种 β -(1→3)-D-葡聚糖(含20%支链)^[7].本实验室已从新鲜茯苓菌核中提取出3种杂多糖,一种线型 β -(1→3)-D-葡聚糖(PC3, 51%)和一种含少量支链和葡萄糖醛酸的 β -(1→3)-D-葡聚糖(PC4)^[8-11].由茯苓菌核和茯苓菌丝体提取的线型 β -D-葡聚糖的结构相同,但分子量不同,分别为 9.15×10^4 ^[9]和 1.68×10^5 ^[12].长期以来,茯苓的研究主要集中在有效的小分子组分,而对占主要成分的各种多糖的组成和分子量尚未充分研究,甚至茯苓 β -D-葡聚糖的分子量报道值竟然从 4×10^4 到 5×10^6 ^[10, 13, 14].为了有效地研究和利用茯苓多糖,必须弄清不同菌种培养

的菌丝体的一、二级结构以及结构与生物活性之间的构效关系.本文试图用5·78号菌种培养茯苓菌丝体,并从中分离出各种多糖,然后对其组成和分子量进行系统研究.

1 实验部分

1.1 茯苓菌丝体的培养和分离

茯苓菌丝体培养在华中农业大学真菌所实验室进行,经人工培养的5·78菌种由中科院微生物所提供.培养液组成为25 g D-葡萄糖,3.2 g 酵母膏,4 g KH₂PO₄,0.5 g MgSO₄·7H₂O,4 mg ZnCl₂,0.06 g CaCl₂·2H₂O,5 mg MnCl₂·4H₂O,0.1 mg 维生素B₁,5 mg Fe₂(SO₄)₃,200 g 麸皮提取液,1 L水.培养液接种后置于摇床上,在25℃恒温下培养18天得到茯苓菌丝体.从5 L培养液离心收集菌丝体,并用水洗涤5次,在P₂O₅存在下室温真空干燥7天得到干菌丝体,产量为42.52 g,经粉碎后为褐色粉末.

茯苓菌丝体粉末依次用乙酸乙酯、丙酮进行索氏提取各48 h除去脂肪.然后浸泡在9 g/L NaCl

* 2002-03-14收稿,2002-07-10修稿;国家自然科学基金资助项目(基金号20074025)、香港AoE项目和RGC(UHK4161/99M)基金以及中国科学院广州化学所纤维素开放实验室资助课题;** 武汉大学国内访问学者;*** 通讯联系人

水溶液中过夜,按图 1 程序进行多糖的分离.每种多糖均用 30% H_2O_2 脱色,Savage 法除蛋白 10 次,并用紫外分光光度计(UV-160 Shimadzu, Japan)检测是否已除去蛋白质,直至多糖试样基本无蛋白质(280 nm)吸收峰.此外,由菌丝体的培养液经浓缩、脱色及脱蛋白后,用甲醇沉淀得胞外多糖,其编号为 ab-PCM0.由此得到的各种多糖均经重新溶解后进一步纯化.多糖 ab-PCM0、ab-PCM1 和 ab-PCM2-Ⅱ用水溶解,ab-PCM2-Ⅰ、ab-PCM4-Ⅰ和 ab-PCM4-Ⅱ用 0.25 mol/L LiCl/DMSO 溶解,ab-PCM3-Ⅰ和 ab-PCM3-Ⅱ用 0.5 mol/L NaOH 水溶液溶解,然后分别用自来水透析 5 天,蒸馏水再透析 3 天除去小分子杂质,最后冷冻干燥得多糖纯品.(透析袋为美国进口,透过分子量最大极限为 8×10^3 .)ab-PCM0、ab-PCM1 和 ab-PCM2-Ⅱ、ab-PCM3-Ⅰ、ab-PCM3-Ⅱ为浅黄色鳞片状固体,ab-PCM2-Ⅰ为白色粉末状固体,ab-PCM4-Ⅰ和 ab-PCM4-Ⅱ为浅褐色鳞片状固体.

1.2 红外光谱和气相色谱测定

试样经 KBr 压片后采用 Nicolet FT-IR 红外光谱仪测定其红外光谱,波长范围为 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$.

按文献[15]报道的方法进行气相色谱分析.采用 HP6890 气相色谱仪(Hewlett Packard, USA),色谱柱为 DB-225 毛细管柱(15 m $\times$ 0.25 mm),以 4 K/min 升温速度从 453 K 升至 493 K,并于 453 K 保持 30 min 后进样.进样量 2 μL ,氦气为载气,用氢离子火焰检测.

多糖中的蛋白质由 Kjeletc 1030 自动分析仪(Tecator, Switzerland)按照 semi-micro Kjeldahl 原理测定蛋白质含量.ab-PCM0、ab-PCM2-Ⅰ和 ab-PCM3-Ⅰ 3 种多糖采用元素分析仪(Mod,1106, Carlo Erba Strumentazione, Italy)测定多糖中 N 含量,从而测定多糖中的乙酰葡萄糖胺的含量.

1.3 核磁共振谱测定

多糖溶液的 ^{13}C -NMR 谱用 Bruker ARX-400 高

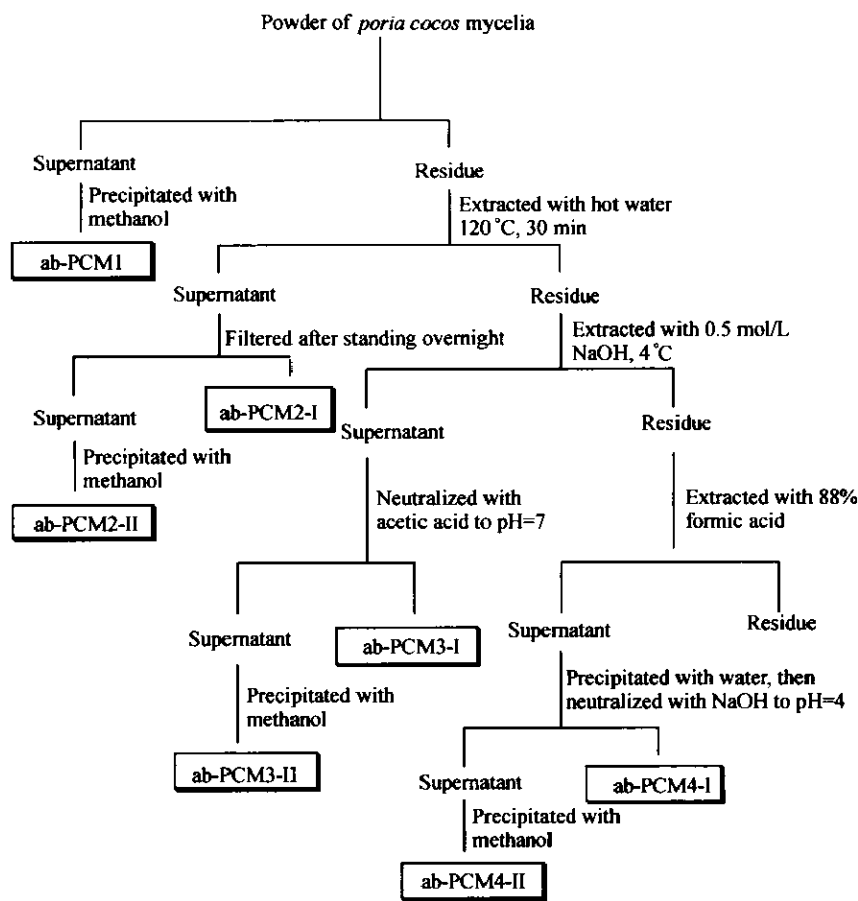


Fig. 1 Extraction of polysaccharides from *poria cocos* mycelia

分辨核磁共振仪于 400 MHz 下进行测定.ab-PCM0 试样溶于 D₂O 中,ab-PCM2-Ⅰ 和 ab-PCM3-Ⅰ 试样溶于 DMSO-*d*₆ 中,温度为 320 K.

1.4 粘度和光散射法

多糖特性粘数[η]用 Ubbelohde 粘度计在 30℃ 下测定.ab-PCM0、ab-PCM1 和 ab-PCM2-Ⅱ 的溶剂为 0.2 mol/L NaCl 水溶液,ab-PCM2-Ⅰ、ab-PCM3-Ⅰ、ab-PCM3-Ⅱ、ab-PCM4-Ⅰ 和 ab-PCM4-Ⅱ 的溶剂为 0.25 mol/L LiCl/DMSO.用逐步稀释法按 Huggins 和 Kraemer 方程式计算特性粘数[η].由于 PCM3-Ⅱ 样品量太少,采用一点法按 Solomo-Ciuta 公式:[η] = $\sqrt{2(\eta_{sp}-\ln \eta_r)/c}$ 计算特性粘数[η].

多糖溶液的散射光强度由多角激光光散射仪 (DAWN-DSP, Wyatt Technology Co., USA) 于 633 nm 下测定.测定的角度从 45° 到 135°, 温度为 (30 ± 1)℃.ab-PCM0 溶于 0.2 mol/L NaCl 水溶液中,ab-PCM2-Ⅰ、ab-PCM3-Ⅰ 和 ab-PCM4-Ⅱ 分别溶于 0.25 mol/L LiCl/DMSO 中,配制浓度为 3 ~ 5 g/L 的溶液.测量时将每个多糖溶液稀释成不同浓度后

用 0.45 μm (Whatman, England) 过滤器过滤,并经 0.2 μm (Whatman, England) 过滤器直接滤入散射池中进行散射光强测量.ab-PCM1 和 ab-PCM2-Ⅱ 的分子量采用凝胶渗透色谱和光散射联用法 (GPC-LS) 测量,在 DAWN DSP 多角激光光散射仪上进行,配置 P100 泵 (Thermo separation products, San Jose, USA) 和 PSW5000 与 PSW3000 (TSK) 柱和示差折光检测器 (Optilab/903, Wyatt Technology, USA).GPC 色谱柱温为 30℃,流动相为 0.2 mol/L NaCl,流速为 1.0 mL/min.溶液经 0.45 μm 过滤器后进行测量.多糖在 0.2 mol/L NaCl 水溶液和 0.25 mol/L LiCl/DMSO 中的示差折光指数 (dn/dc) 分别为 0.140 mL/g 和 0.058 mL/g. Astra 软件用于数据采集和处理.

2 结果与讨论

茯苓菌丝体中分离出的 7 种多糖和培养液提取的一种多糖的红外光谱图示于图 2.每种多糖均在 1250 cm⁻¹、1650 cm⁻¹ 和 2930 cm⁻¹ 附近显示

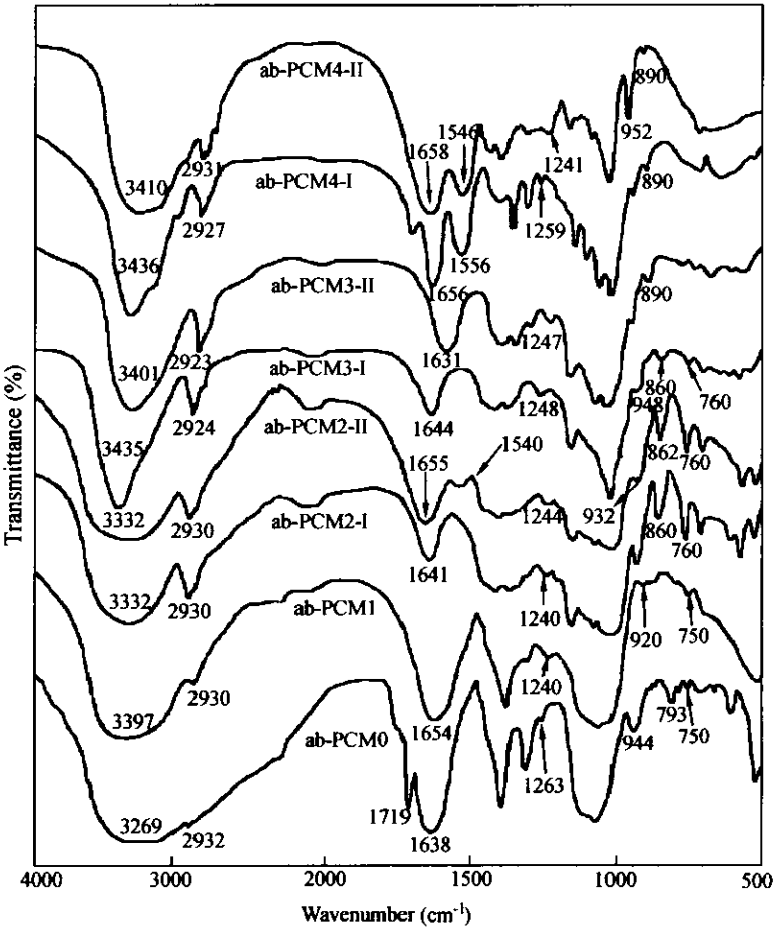


Fig. 2 FT-IR spectra of polysaccharides from poria cocos mycelia

出多糖的特征吸收峰,其中 2930 cm^{-1} 附近的一组峰是糖类 C—H 的伸缩振动, $1400\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 附近的峰是 C—H 的变角振动. 多糖 ab-PCM0 在 800 cm^{-1} 和 870 cm^{-1} 附近有甘露糖的吸收峰, 而且在 930 和 850 cm^{-1} 以及 750 cm^{-1} 的吸收峰分别归属 α -D-葡聚糖和木糖, 表明它为杂多糖. ab-PCM1、ab-PCM2-I、ab-PCM2-II 和 ab-PCM3-I 在 860 cm^{-1} 有半乳糖的吸收峰, 同时在 850 cm^{-1} 和 920 cm^{-1} 附近有吸收峰, 表明它们含有 α -D-葡聚糖. ab-PCM3-II、ab-PCM4-I 和 ab-PCM4-II 在 890 cm^{-1} 有明显吸收峰, 表明它们的主要成分为 β -D-葡聚糖. ab-PCM0 和 ab-PCM4-I 在 1720 cm^{-1} 附近有明显的吸收峰, 可归结为葡萄糖醛酸. ab-PCM2-II、ab-PCM4-I 和 ab-PCM4-II 在 1550 cm^{-1} 有吸收峰(N—H 的变角振动), 表明它们含有乙酰葡萄糖胺. 值得注意的是, ab-PCM0、ab-PCM1、ab-PCM2-I 和 ab-PCM2-II 在 3300 cm^{-1} 附近吸收峰(—OH 伸缩振动)明显变宽且移向低波数, 表明存在分子内和分子间氢键. 此处宽峰应归结于较强的分子内氢键, 并且随分离过程的进行, 分子内氢键削弱, 同时分子间聚集趋势增加, 多糖水溶性降低.

7 种多糖水解衍生物的 GC 谱示于图 3. 通过

与单糖标样的图谱对比, 确定试样单糖的组成和含量, 其结果汇集于表 1. 由此得出, ab-PCM0、ab-PCM1 和 ab-PCM2-II 主要由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖和乙酰葡萄糖胺组成, 而 ab-PCM2-I、ab-PCM3-I、ab-PCM3-II 和 ab-PCM4-II 则主要由葡萄糖组成. 随着提取过程的进行, 各多糖组分中的葡萄糖含量逐渐增加, 该规律与茯苓菌核多糖类似^[8]. 所不同的是这里大部分多糖都含有阿拉伯糖和乙酰葡萄糖胺, 在文献中曾报道过茯苓多糖含阿拉伯糖^[6]. 本工作用 GC 从茯苓菌丝体中检测出乙酰葡萄糖胺, 而且其含量随提取过程而急剧减少. 然而 ^{13}C -NMR 谱未看出样品中含乙酰葡萄糖胺. 气相色谱和元素分析测得的乙酰葡萄糖胺含量汇集于表 2. 测定结果表明, 两种方法测得的乙酰葡萄糖胺含量基本相同.

ab-PCM0、ab-PCM2-I、ab-PCM3-I 3 种多糖的 ^{13}C -NMR 谱示于图 4. 多糖 ab-PCM0 的 ^{13}C -NMR 谱图中化学位移 110.6 , 110.1 和 109.04 归属于 β -D-半乳聚糖的 C1; 103.6 , 102.7 和 101.04 为 α -D-甘露聚糖的 C1; 101.9 和 99.54 为 α -D-葡聚糖的 C1. 同时, 85.7 (C3), 74.6 (C5), 72.5 (C4), 68.2 (1 $\rightarrow$ 6) 和 62.4 (C6) 可归属为带 1 $\rightarrow$ 6 支链的 α -D-葡

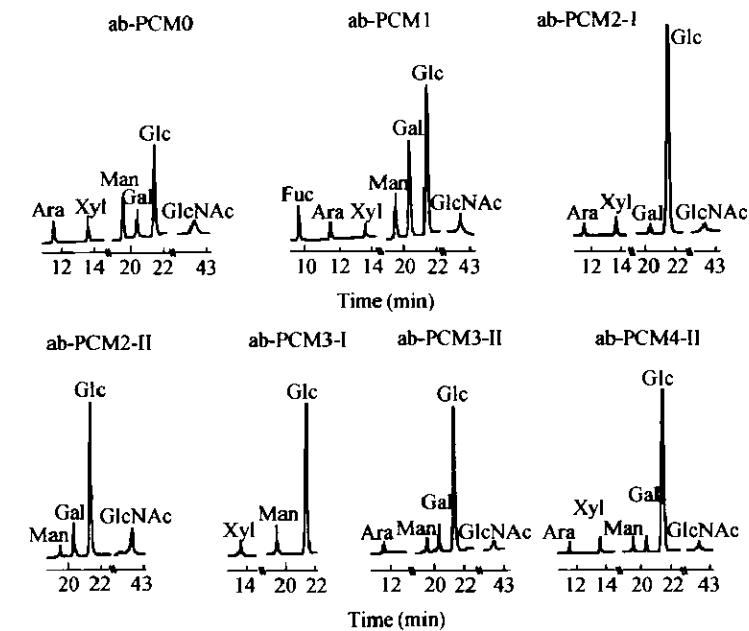


Fig. 3 GC traces of polysaccharides from *poria cocos* mycelia
Ara: arabinose; Xyl: xylose; Man: mannose; Fuc: fucose; Gal: galactose;
Glc: glucose; GlcNAc: N-acetyl glucosamine

Sample	Content (%)							Protein (%)	Yield (%)
	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	GlcNAc		
ab-PCM0	-	8.3	10.0	19.4	11.5	41.0	9.6	11.6	-
ab-PCM1	7.5	3.8	2.5	10.0	26.3	45.0	4.9	-	1.5
ab-PCM2- I	-	1.6	2.4	-	+	96.0	+	0.7	8.1
ab-PCM2- II	-	-	-	5.0	11.6	71.8	11.6	11.7	2.5
ab-PCM3- I	-	-	2.4	9.2	-	88.4	-	1.6	13.1
ab-PCM3- II	-	+	-	2.9	6.4	88.7	1.2	-	2.5
ab-PCM4- II	-	1.6	2.8	2.4	2.5	89.3	1.4	-	1.8

Fuc: fucose; Ara: arabinose; Xyl: xylose; Man: mannose; Glc: glucose; Gal: galactose; GlcNAc: *N*-acetyl glucosamine
- Not detected; + Trace amount

Table 2 Comparison of content for GlcNAc in the polysaccharides used GC and elementary analysis methods

Sample	GC GlcNAc	Elementary analysis
	(%)	GlcNAc(%)
ab-PCM0	9.6	13.3
ab-PCM2- I	0.6	2.6
ab-PCM3- I	0	0

GlcNAc: *N*-acetyl glucosamine

聚糖的特征峰^[16]. 在 172.9 ~ 179.24 处为蛋白质 NHCO 基的羰基 C 峰. 由此证明 ab-PCM0 主要由

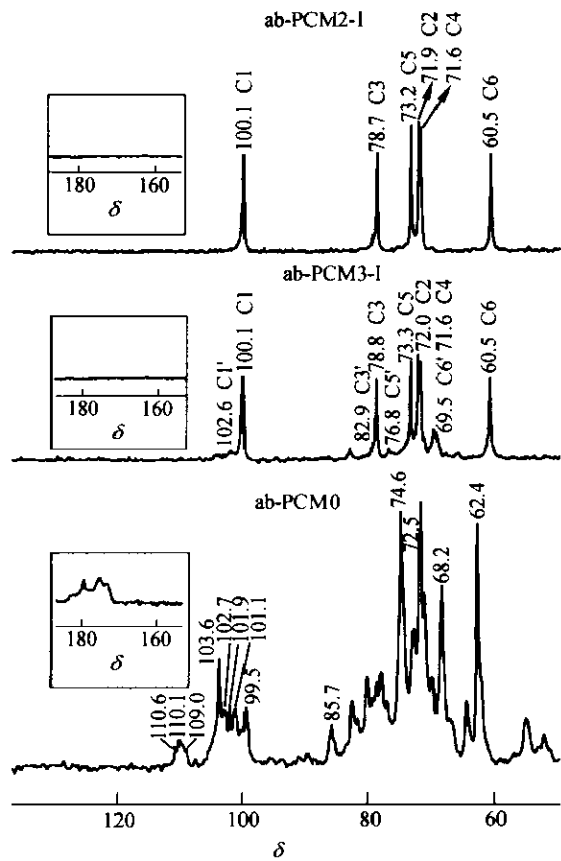


Fig. 4 ¹³C-NMR spectra for ab-PCM2- I and ab-PCM3- I in DMSO-*d*₆ and ab-PCM0 in D₂O at 320 K

α -D- 葡聚糖、 α -D- 甘露聚糖和 β -D- 半乳聚糖组成, 而且含蛋白质, 其结果与 IR 和 GC 分析结果一致. 多糖 ab-PCM2- I 和 ab-PCM3- I 显示出几乎相同的化学位移, 即 100.1 (C1), 78.7 (C3), 73.2 (C5), 71.9 (C2), 71.6 (C4) 和 60.5 (C6) 表明它们基本上为 α -(1 $\rightarrow$ 3) -D- 葡聚糖, 但是 ab-PCM2- I 几乎为一种直链 α -(1 $\rightarrow$ 3) -D- 葡聚糖. 然而, ab-PCM3- I 多糖的 ¹³C-NMR 谱上出现一些较弱的信号, 其化学位移 102.6, 82.9, 76.8 和 66.3 分别为 1 $\rightarrow$ 6 键接的侧基上的 C1', C3', C5' 和 C6', 并且 69.5 可归属为主链上取代的 C6_s 信号^[16]. 由此表明 ab-PCM3- I 为带 1 $\rightarrow$ 6 键接支链的 α -(1 $\rightarrow$ 3) -D- 葡聚糖. 然而, IR 结果表明水溶性的 ab-PCM3- II 是 β -D- 葡聚糖. 由此表明 α -和 β -葡聚糖共同存在茯苓菌丝体的碱水提取液. 该现象类似于我们以前所报道的香菇多糖的结果, 即在它的碱水提取液中同时存在 α -(1 $\rightarrow$ 3) -D- 葡聚糖和 β -(1 $\rightarrow$ 3) -D- 葡聚糖, 并通过醋酸水溶液中和分离它们^[17].

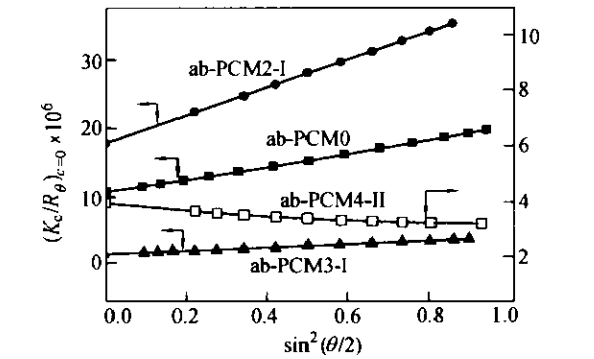


Fig. 5 Angular dependence of $(K_c/R_9)_{c=0}$ of ab-PCM0 in 0.2 mol/L NaCl and ab-PCM2- I , ab-PCM3- I , ab-PCM4- II in 0.25 mol/L LiCl/DMSO at 30 $^{\circ}$ C , respectively

Table 3 Experimental results of $[\eta]$ and M_w of the polysaccharides in different solvents at 30 °C

Sample	Solvent	$[\eta]$ (mL·g ⁻¹)	$M_w \times 10^{-4}$
ab-PCM0	0.2 mol/L NaCl	6.5	7.7
ab-PCM1	0.2 mol/L NaCl	32.0	5.2**
ab-PCM2-II	0.2 mol/L NaCl	41.5	24.3**
ab-PCM2-I	0.25 mol/L LiCl/DMSO	12.0	5.0
ab-PCM3-I	0.25 mol/L LiCl/DMSO	124.6	65.2
ab-PCM3-II	0.25 mol/L LiCl/DMSO	11.9*	—
ab-PCM4-II	0.25 mol/L LiCl/DMSO	39.3	25.5

* $[\eta]$ determined by one point method;

** Data obtained by GPC-LS

图 5 示出 ab-PCM0、ab-PCM2-I、ab-PCM3-I 和 ab-PCM4-II 的 $(K_c/R_\theta)_{c=0}$ 的角度依赖关系. 由光散射以及 GPC-LS 测得的多糖分子量以及由粘度法测得的 $[\eta]$ 结果列于表 3. 由此本工作系统得出了人工培养的菌种在含有麸皮的培养液中培育得到的茯苓菌丝体的各种多糖的分子量. 多糖 ab-PCM0、ab-PCM1、ab-PCM2-I、ab-PCM2-II、ab-PCM3-I 和 ab-PCM4-II 的 M_w 值依次为 7.7×10^4 、 5.2×10^4 、 5.0×10^4 、 24.3×10^4 、 65.2×10^4 和 25.5×10^4 .

REFERENCES

- 1 Yamada H, Kiyohara H, Takemoto N, Zhan J, Kawamura H, Komatsu Y, Cyong J C, Aburada M, Hosoya E. *Planta Med*, 1992, 58(2): 166 ~ 170
- 2 Nunoshiro T, Ohtsuka A, Nishioka H, Suemitsu R. *Sci Eng Rev Doshisha Univ*, 1990, 30(4): 266 ~ 272
- 3 Hamuro J, Maeda Y Y, Arai Y, Fukuoka F, Chihara G. *Chem Biol Interaction*, 1971, 3(1): 69 ~ 71
- 4 Chihara G, Hamuro J, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka F. *Nature*, 1970, 225: 943 ~ 944
- 5 Japan Synthetic Rubber Co Ltd. JP 82 38, 794 (G107G1/00). 1982-03-03
- 6 Wang S X, Wen Y Y, Hu C X. *Phytother Res*, 1995, 9(6): 448 ~ 451
- 7 Kanayama H, Adachi N, Fukai Y. *Yakugaku Zasshi*, 1986, 106(3): 199 ~ 205
- 8 Zhang Lina (张俐娜), Ding Qiong (丁琼), Zhang Pingyi (张平义), Feng Hanqiao (冯汉桥). *Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报)*, 1997, 6: 990 ~ 993
- 9 Ding Q, Jiang S, Zhang L, Wu C. *Carbohydr Res*, 1998, 308: 339 ~ 343
- 10 Zhang L, Ding Q, Zhang P, Zhu R, Zhou Y. *Carbohydr Res*, 1997, 303: 193 ~ 197
- 11 Zhang L, Ding Q, Meng D, Ren L, Yang G, Liu Y. *J Chromatogr A*, 1999, 839: 49 ~ 55
- 12 Ding Qiong (丁琼), Zhang Lina (张俐娜), Cheung Peter Chi Keung (张志强). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2002, (2): 224 ~ 227
- 13 Saito H, Misaki A, Harade T. *Agr Biol Chem*, 1968, 32(10): 1261 ~ 1269
- 14 Kanayama H, Adachi N, Fukai Y. *Yakugaku Zasshi*, 1986, 106(3): 206 ~ 211
- 15 Englyst H N, Quigley M E, Hudson G J. *Analyst*, 1994, 119: 1497 ~ 1509
- 16 Gorin P A J. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 1981, 38: 14 ~ 97
- 17 Zhang P, Zhang L. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(7): 1197 ~ 1202

ISOLATION, CHEMICAL COMPONENTS AND MOLECULAR WEIGHTS OF POLYSACCHARIDES FROM *PROIA COCOS* MYCELIA WITH CULTIVATED STRAIN

LIN Yulu¹, ZHANG Lina², JIN Yong², CHEN Li², ZHANG Mei²,
HAN Hongwei², CHEUNG Peter Chi Keung³, CHEN Ligu⁴

(¹ College of Chemistry and Environment Engineering, Jiang Han University, Wuhan 430056)

(² College of Chemistry and molecular Science, Wuhan University, Wuhan 430072)

(³ Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong)

(⁴ Fungus Institute Huazhong University of Agriculture, Wuhan 430070)

Abstract *Poria cocos* mycelia were cultivated from artificial strain No.5·78 in medium containing bran at 25°C for eighteen days. Seven polysaccharides coded as ab-PCM1, ab-PCM2-I, ab-PCM2-II, ab-PCM3-I, ab-PCM3-II, ab-PCM4-I and ab-PCM4-II were isolated from the *poria cocos* mycelia by using 9 g/L NaCl aqueous solution, hot water, 0.5 mol/L NaOH aqueous solution and 88% formic acid, respectively, and an exo-polysaccharide coded as ab-PCM0 was isolated from the medium. The components of the polysaccharides were analyzed by using infrared spectroscopy (IR), gas chromatography (GC) and ¹³C-NMR. The results indicated that the polysaccharides from ab-PCM0 to ab-PCM3-I consist of α -(1→3)-D-glucose, α -D-mannose, β -D-galactose, and N-acetyl glucosamine, and with the isolation progress the glucose content in the polysaccharides increased, namely from heteropolysaccharide to α -glucan. The ab-PCM3-II, ab-PCM4-I and ab-PCM4-II mainly consist of β -(1→3)-D-glucan. Interestingly, α -glucan and β -glucan coexist in the alkali extracted solution of the mycelia. The intrinsic viscosities $[\eta]$ and weight average molecular weights M_w were determined by viscometry and light scattering. The values of M_w for samples of ab-PCM0, ab-PCM1, ab-PCM2-I, ab-PCM2-II, ab-PCM3-I and ab-PCM4-II are 7.7×10^4 , 5.2×10^4 , 5.0×10^4 , 24.3×10^4 , 65.2×10^4 and 25.5×10^4 , respectively.

Key words *Poria cocos* mycelia, Polysaccharide, Isolation, Gas chromatography, Intrinsic viscosities, Light scattering