



青島農業大學

# 学士学位论文

|      |                  |
|------|------------------|
| 题 目  | 美味扇菇菌丝多糖提取与抗氧化研究 |
| 姓 名  | 朱陆陆              |
| 学 号  | 20170205534      |
| 学 院  | 生命科学学院           |
| 专 业  | 生物技术             |
| 班 级  | 201702           |
| 指导教师 | 于浩               |

二〇二一年 五月

## 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是在导师的指导下进行研究工作所取得的原创性成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中标明。

本声明的法律后果由本人承担。

论文作者（签名）：

年 月 日

## 学位论文授权使用授权书

本论文作者完全了解青岛农业大学有权保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权青岛农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。

论文作者（签名）：

年 月 日

指导教师（签名）：

年 月 日

## 美味扇菇菌丝多糖提取与抗氧化研究

**摘要：**元蘑（*Hohenbuehelia serotina*）学名美味扇菇，是我国有名的食用药用真菌，味道鲜美，富有营养，更含有维生素、氨基酸、蛋白质、脂质、碳水化合物及矿物质等多种营养。此外该菌中含有的多糖可以防止动脉硬化，是具有增强机体免疫力、抑制肿瘤的药用价值物质。本论文的发酵培养试验结果初步证实：美味扇菇液体发酵适宜以蔗糖为碳源，以蛋白胨为氮源，培养温度为 25 °C，起始 pH 值 7.0，发酵时间为 5-6 d。以蔗糖液体发酵培养基中美味扇菇上清提取液为原料，稀释一定倍数加入适当蒽酮硫酸溶液，测定吸光度值，导入标准曲线，分别测定总糖的量和还原糖的量，进而计算多糖的量，实验主要测定了美味扇菇的胞外多糖，其中蔗糖液体发酵培养基的胞外多糖浓度为 26.36388 mg/mL。通过多糖提取实验初步得到提取工艺为：水浴加热时间 20 min，固液比 1:35，但是由于实验数据过少，可能结果不具有重现性。

**关键词：**美味扇菇；胞外多糖；抗氧化作用

## **Delicious mushroom filament polysaccharide extraction and antioxidant research**

**Abstract:** *Honheuehelia serotina* is a kind of edible and medicinal fungus, which has delicious taste and rich nutrition, and contains vitamins, amino acids, proteins, lipids, carbohydrates and minerals and other nutrients. In addition, the fungus polysaccharides can prevent atherosclerosis, with the body's immunity, inhibition of tumors of medicinal value of substances. The results of fermentation culture test of this paper are initially confirmed: *Honheuehelia serotina* liquid fermentation is suitable for sucrose as the carbon source, peptone as nitrogen source, culture temperature is 25 °C, the initial pH is 7.0, fermentation time is 5-6 d. The extracellular polysaccharides of the culture medium were determined by using the extract of the supernatant of the mushroom in the liquid fermentation medium of sucrose as the raw material, and the concentration of extracellular polysaccharide in the medium was 26.36388 mg / mL. The extraction technology of *Honheuehelia serotina* was obtained by the experiment of polysaccharide extraction: the heating time of water bath was 20 min, the solid-liquid ratio was 1:35, but the results may not be reproducible because of the lack of experimental data.

**Key words:** Delicious mushrooms; Cell outside polysaccharide; Anti-oxidation effect

# 目 录

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 1 引言 .....                   | 1  |
| 1.1 美味扇菇简介 .....             | 1  |
| 1.2 多糖研究意义 .....             | 1  |
| 1.3 多糖发酵条件及含量测定 .....        | 2  |
| 1.4 抗氧化研究 .....              | 2  |
| 2 材料与方法 .....                | 3  |
| 2.1 实验材料 .....               | 3  |
| 2.2 实验试剂 .....               | 3  |
| 2.3 常用培养基组成及基本试剂 .....       | 3  |
| 2.3.1 PDB 培养基成分及配制方法 .....   | 3  |
| 2.3.2 SBM 液体培养基成分及配制方法 ..... | 3  |
| 2.3.3 液体优化培养基成分及配制方法 .....   | 3  |
| 2.4 实验方法 .....               | 4  |
| 2.4.1 标准曲线的制作 .....          | 4  |
| 2.4.2 多糖发酵条件的优化 .....        | 5  |
| 2.4.3 上清溶液中总糖含量的测定 .....     | 5  |
| 2.4.4 上清溶液中还原糖含量的测定 .....    | 6  |
| 2.4.5 多糖的提取条件及测定 .....       | 6  |
| 2.4.6 抗氧化活性研究 .....          | 7  |
| 3 结果与分析 .....                | 7  |
| 3.1 发酵条件的确定 .....            | 7  |
| 3.1.1 液体深层发酵培养基优化 .....      | 7  |
| 3.1.2 液体发酵上清中多糖的含量 .....     | 10 |
| 3.2 子实体多糖提取结果分析 .....        | 11 |
| 3.2.1 不同固液比对总糖浓度的影响 .....    | 11 |
| 3.2.2 不同提取时间对总糖浓度的影响 .....   | 12 |
| 3.3 美味扇菇多糖抗氧化活性研究 .....      | 13 |
| 4 讨论 .....                   | 14 |
| 4.1 美味扇菇液体发酵条件 .....         | 14 |
| 4.2 多糖的提取结果 .....            | 14 |

|                    |    |
|--------------------|----|
| 4.3 多糖抗氧化能力研究..... | 14 |
| 5. 展望.....         | 14 |
| 参考文献.....          | 15 |
| 致谢.....            | 17 |

# 1 引言

食用菌多糖属于天然活性物质,具有抗肿瘤、增强免疫力等多种生物学功效,因此收到了广泛关注<sup>[1]</sup>。本实验拟选取美味扇菇为原材料,对美味扇菇菌株的子实体和液体深层发酵中产生的多糖进行提取,并优化发酵和提取条件,从而获得最优的美味扇菇多糖提取方法,为食用菌多糖研究提供基础。

## 1.1 美味扇菇简介

元蘑 (*Hohenbuehelia serotina*) 学名美味扇菇<sup>[2]</sup>,是我国有名的食用药用真菌,味道鲜美,富有营养,更含有维生素、氨基酸、蛋白质、脂质、碳水化合物及矿物质等多种营养。此外该菌中含有的多糖可以防止动脉硬化,具有增强机体免疫力、抑制肿瘤的药价值物质<sup>[3]</sup>。

## 1.2 多糖研究意义

多糖是天然高分子碳水化合物,完全水解后可以产生 10 个分子以上的单糖分子,多糖结构极其复杂,再加上国内外对多糖的研究远远不及蛋白质和核酸两大基本生命物质,因此多糖的科研进展并没有取得多少跨越性的成果,目前主要是应用于食品领域,近年来,虽然人们对多糖的关注越来越多,但是对多糖的研究还远远不足,多糖结构的多样性绝不亚于蛋白质和核酸,相信不久的将来,多糖会出现在各个领域,发挥巨大的作用。多糖大部分都具有免疫调节作用<sup>[4]</sup>。本论文的发酵培养试验结果初步证实:美味扇菇液体发酵适宜以蔗糖为碳源,以蛋白胨为氮源,培养温度为 25 °C,起始 pH 值 7.0,发酵时间为 5-6 d。以蔗糖液体发酵培养基中美味扇菇上清提取液为原料,稀释一定倍数加入适当蒽酮硫酸溶液,测定吸光度值,导入标准曲线,分别测定总糖的量和还原糖的量,进而计算多糖的量,实验主要测定了美味扇菇的胞外多糖,其中蔗糖液体发酵培养基的胞外多糖浓度为 26.36388 mg/mL。通过多糖提取实验初步得到提取工艺为:水浴加热时间 20 min,固液比 1:35,但是由于实验数据过少,可能结果不具有重现性。多糖包括胞外多糖和胞内多糖<sup>[5]</sup>,一般就是液体发酵培养液中测定的多糖就是胞外多糖,烘干的菌球中测定的多糖是胞内多糖。研究证明,多糖具备抗感染、抗辐射、抗凝血、降血糖、预防和治疗肿瘤、抗疲劳等各种生物学功能<sup>[6]</sup>。研究一般表明在酸性条件下多糖的活性会降低,酸性较强时甚至会使糖苷键断裂,所以提取多糖时一定要调 pH 值,保证提取环境为中性条件<sup>[7]</sup>。

### 1.3 多糖发酵条件及含量测定

食用菌多糖分为胞外多糖和胞内多糖，分别可以从其发酵液、菌丝体和子实体中获得，考虑到子实体来提取多糖，不仅成本较高，时间跨度大，且原材料有限，因此采用液体发酵的方法来获得多糖。

液体发酵的培养液配方成分众多，包括碳源、氮源、无机盐等，但为菌体提供所需营养的主要还是碳源与氮源。为了获得较高产量的多糖，本研究拟采用在基础培养基的配方上，改换碳源和氮源，通过进行相关生物量的测定从而获得最佳培养基配方。

评价培养基优劣的最主要指标之一就是发酵液中所含多糖含量，而测定多糖的方法有多种：苯酚-硫酸法、硫酸-蒽酮法、DNS 比色法等。考虑到具体操作，DNS 法不做考虑，而经过一系列的实验证明，硫酸-蒽酮法的稳定性更高且操作简单，因此选用硫酸-蒽酮法来测定多糖含量<sup>[8-10]</sup>。

### 1.4 抗氧化研究

真菌的体内有氧代谢的时候会不停地产生自由基，DPPH 的自由基含有一个单电子，在 517 nm 处有一次强吸收，它的醇溶液会产生紫色效应，当多糖与 DPPH 溶液混合时，就会发生氧化还原反应，DPPH 自由基的单电子被多糖吸收而消失，会发生一个颜色变化的反应，其变色程度与接受的电子的数量呈正相关，所以这个反应可以用紫外分光光度计进行快速的定量分析，但是反应非常快，测量数据一定要迅速。实验中配置试剂时一定要使用 100% 的乙醇（易挥发，不影响实验结果）溶解，一定要保证整个反应体系中无水分，因为蒸馏水和 DPPH 溶液互不相溶，会产生沉淀，影响紫外分光光度计的准确性，从而影响整个实验的结果<sup>[11-12]</sup>，自然界存在的食用菌大多数含有多糖，它们具有抗氧化性，会帮助生物体减少损伤，起到保护机体的作用，大量研究表明多糖具有对 DPPH 自由基的清除作用，而且许多研究已经证明食用菌类中的多糖是具有抗氧化性的，而且无毒副作用，是具备清除 DPPH 自由基能力和免疫调节作用的天然物质<sup>[13-17]</sup>。本实验针对于 DPPH 自由基进行清除率实验的测定，从而获得多糖抗氧化活性的数据。



## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

实验材料：实验室冰箱保藏的 S20-3,S20-4 美味扇菇菌种，作为本实验的原材料。

### 2.2 实验试剂

浓硫酸、蒽酮、蔗糖、蛋白胨、酵母粉、玉米浆粉、硫酸铵、葡萄糖、果糖、麦芽糖、磷酸二氢钾、无水硫酸镁、DPPH 试剂、无水乙醇等均购买自国药集团。

### 2.3 常用培养基组成及基本试剂

#### 2.3.1 PDB 培养基成分及配制方法

表 2.1 PDB 液体培养基(g/L)

| 名称            | 含量  |
|---------------|-----|
| 土豆 (Potato)   | 200 |
| 葡萄糖 (Glucose) | 20  |

用蒸馏水定容到需要的体积，自然 pH 即可,121 °C 高压灭菌 20 min。

#### 2.3.2 SBM 液体培养基成分及配制方法

表 2.2 SBM 液体培养基(g/L)

| 名称            | 含量  |
|---------------|-----|
| 葡萄糖           | 20  |
| 蛋白胨 (protein) | 5.0 |
| 酵母粉 (aluzym)  | 5.0 |
| 磷酸二氢钾         | 1.0 |
| 无水硫酸镁         | 1.0 |

用蒸馏水定容到需要的体积，自然 pH 即可,121 °C 高压灭菌 20 min。

#### 2.3.3 液体优化培养基成分及配制方法

培养基筛选优化，就是将菌种培养在三角瓶内，放在摇床中不断摇晃，使菌体在瓶内均匀的生长繁殖，通过测量菌球干重和菌液中的多糖含量，筛选出产多糖最好的培养基，然后使用最佳培养基大量培养，以求获得更多的目标产物。在液体培养基中分别改变氮源和碳源，通过测多糖的量，寻求最优培养基。

## 2.4 实验方法

### 2.4.1 标准曲线的制作

#### 2.4.1.1 0.1 mg/mL 葡萄糖标准溶液配置

准确称取 1 g 干燥至恒重的葡萄糖标准药品，然后用蒸馏水定容到 1000 mL 摇匀，然后取 10 mL，加入 90 mL 蒸馏水置于 250 mL 三角瓶中，摇晃均匀就得到 0.1 mg/mL 葡萄糖标准溶液。

#### 2.4.1.2 0.2% 蒽酮硫酸溶液配置

精确称量 100 mg 蒽酮药品，缓慢将 50 mL 浓硫酸加入烧杯中，边加入边搅拌散热，最后完全转入深色瓶中保存，即得到 2 g/L 的蒽酮硫酸溶液，溶解后为黄绿色透明液体(现用现配)。

#### 2.4.1.3 标准曲线测定

用移液器准确量取 0  $\mu$ L, 48  $\mu$ L, 72  $\mu$ L, 96  $\mu$ L, 120  $\mu$ L, 144  $\mu$ L 标准葡萄糖溶液加入试管中，加蒸馏水定容至 1.2 mL，对照组只加入 1.2 mL 蒸馏水，再缓慢加入已配好的 0.2% 蒽酮 2.4 mL，把 1000  $\mu$ L 移液器调到 800  $\mu$ L，加三次，用漩涡振荡器摇匀后,再进行沸水浴加热 10 min,取出，后迅速冰水浴 10 min，冷却至室温,在 610 nm 波长下,以不添加标准葡萄糖溶液的管为对照调零，测定其吸光值 A<sub>0</sub>，然后测定其余各管的吸光度，以葡萄糖浓度为横坐标，吸光值为纵坐标，绘制标准曲线见图 2.1。数值见表 2.3。

表 2.3 葡萄糖浓度——吸光度值

|                  | 0     | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 标准葡萄糖 ( $\mu$ L) | 0.0   | 48    | 72    | 96    | 120   | 144   |
| 蒸馏水 ( $\mu$ L)   | 1200  | 1152  | 1128  | 1104  | 1080  | 1056  |
| 0.2% 蒽酮硫酸 (mL)   | 2.4   | 2.4   | 2.4   | 2.4   | 2.4   | 2.4   |
| 葡萄糖浓度 (mg/mL)    | 0     | 0.04  | 0.06  | 0.08  | 0.10  | 0.12  |
| 吸光度值             | 0.000 | 0.363 | 0.492 | 0.646 | 0.785 | 0.938 |

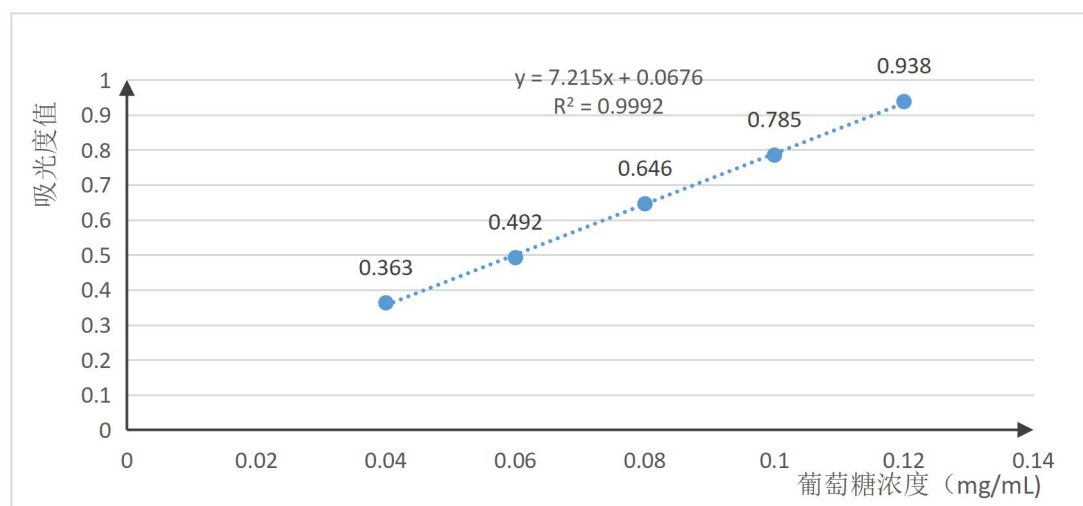


图 2.1 标准曲线

## 2.4.2 多糖发酵条件的优化

### 2.4.2.1 制作 PDB 培养基

取削皮后的马铃薯 200 g, 切成 1 cm 左右小方块, 先烧水, 水开后下马铃薯块, 煮沸 10 min, 用玻璃棒可以戳烂即可, 八层纱布过滤, 分装于 10 个锥形瓶中置于灭菌锅中灭菌, 煮沸期间多搅拌, 防止糊锅。超净工作台中每瓶接菌 5%, 放于 25 °C 恒温摇床中振荡 6 d, 过滤后菌球烘干测干重 (放于培养皿中摊平, 经常活动菌球, 防止和培养皿粘在一起), 上清稀释后测多糖。

### 2.4.2.2 改变氮源

制作四种培养基, 每种各五瓶, 分别以酵母粉、蛋白胨、玉米浆粉、硫酸铵为氮源, 添加 20% 葡萄糖, 1% 磷酸二氢钾, 1% 无水硫酸镁。超净工作台中每瓶接菌 5%, 放于 25 °C 恒温摇床中振荡 6 d, 过滤后菌球烘干测干重 (放于培养皿中摊平, 经常活动菌球, 防止和培养皿粘在一起), 上清稀释后测多糖。

### 2.4.2.3 改变碳源

制作四种培养基, 每种各五瓶, 分别以葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、果糖为碳源, 添加 10% 蛋白胨, 1% 磷酸二氢钾, 1% 无水硫酸镁。超净工作台中每瓶接菌 5%, 放于 25 °C 恒温摇床中培养 6 d, 过滤后菌球烘干测干重 (放于培养皿中摊平, 经常活动菌球, 防止和培养皿粘在一起), 上清稀释后测多糖。

## 2.4.3 上清溶液中总糖含量的测定

精确取 5 mL 待测上清液, 用蒸馏水定容至 100 mL 容量瓶中, 摇匀。取 60  $\mu$ L

加入试管中,加 1140  $\mu\text{L}$  蒸馏水(对照加 1.2 ml 蒸馏水),再缓慢加入已配好的蒽酮硫酸溶液 2.4 mL,把 1000  $\mu\text{L}$  移液器调到 800  $\mu\text{L}$ ,加三次,用漩涡振荡器摇匀后沸水浴加热 10 min,取出后迅速用冰水浴,降温 10 min,610 nm 波长下测定吸光值。每个样品三个平行。

#### 2.4.4 上清溶液中还原糖含量的测定

精确取 0.5 mL 菌液上清液,用 95%乙醇定容至 25 mL 容量瓶中,混匀后静置 24 h 后进行 8000 rpm 离心 10 min,取 60  $\mu\text{L}$  上清液加入试管中(对照中加入 1.2 mL 95%乙醇),加 1140  $\mu\text{L}$  蒸馏水,再缓慢加入 0.2%蒽酮硫酸溶液 2.4 mL,把 1000  $\mu\text{L}$  移液器调到 800  $\mu\text{L}$ ,加三次,用漩涡振荡器摇匀后沸水浴加热 10 min,取出后迅速用冰水浴,降温 10 min (使反应停止),610 nm 波长下测定吸光值。每个样品三个平行。测得总糖浓度,以及还原糖的浓度,进而得出多糖的浓度。

#### 2.4.5 多糖的提取条件及测定

(1) 以蔗糖为碳源,以蛋白胨为氮源,添加 1%磷酸二氢钾,1%无水硫酸镁为液体发酵培养基,接种量 5%于恒温摇床培养。

(2) 将培养六天的菌种过滤,然后在烘箱中烘干,用研钵研磨成粉末状;

(3) 量取 0.1 g 研磨过的粉末放在离心管中,按不同的比例(1:10、1:15、1:20、1:25 和 1:30)加入超纯水,于不同功率(100 W、200 W、250 W、300 W、350 W 和 400 W)下进行了不同时间(10 min、15 min、20 min、25 min 和 30 min)的不同温度(60  $^{\circ}\text{C}$ )的超声辅助提取;

(4) 100,00 rpm 离心 10 min 然后收集上清液;

(5) 加入 2000  $\mu\text{L}$  的 100%的乙醇,轻微混匀后放在低温下冷藏 10 h;

(6) 再 100,00 rpm 离心 10 min,弃上清,干燥沉淀得到粗多糖;

(7) 把粗多糖用超纯水再次溶解,加入 200  $\mu\text{L}$  的胰蛋白酶(10 mg/mL,配置时用浓氨水调 pH 至 8.0),常温下保存 3 h;

(8) 加入 100 $\mu\text{L}$  的过氧化氢,隔夜脱色;

(9) 再加入 2000  $\mu\text{L}$  的 100%的乙醇,稍混匀后放在低温冷藏 10 h;

(10) 100,00 rpm 离心 10 min,弃上清,干燥沉淀得到除杂后的多糖。

(11)用超纯水按不同的比例重悬多糖沉淀,得到稀释 20 倍的固液比 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 和 1:35 多糖溶液,测定标准曲线,测吸光度值,每组三个平行。

(12) 将提取时间为 10 min,20 min,25 min,30 min 的多糖沉淀用超纯水重悬,制作稀释 10 倍的多糖溶液,测定标准曲线,测吸光度值,每组三个平行。

## 2.4.6 抗氧化活性研究

### 2.4.6.1 DPPH 贮备液的制作

利用无水乙醇溶解 DPPH，配制 0.1 mM 的 DPPH 储存液，用锡纸包住放于冰箱中冷藏备用。

### 2.4.6.2 DPPH 清除率的测定

在 15 mL 试管中依次加入 1.6 mL DPPH 溶液和不同稀释浓度的多糖溶液，再加入 0.8 mL 无水乙醇，混匀立即用 1 cm 比色皿在 517 nm 波长处测吸光值(A)，吸光值记为 A1，再在温室避光保存 30 min 后测吸光值，记为 A2,对照试验为只加 DPPH 的乙醇溶液<sup>[13]</sup>，其吸光值记为 A0。按下式计算自由基清除率(K):  

$$K(\%)=[1-(A1-A2)/A0]* 100\%$$

## 3 结果与分析

### 3.1 发酵条件的确定

#### 3.1.1 液体深层发酵培养基优化

从表 3.1, 3.2, 3.3 和图 3.1, 3.2, 3.3 可见，使用 PDB 培养基多糖浓度很高，但是 PDB 成分复杂，不作考虑，除 PDB 外使用蛋白胨作为氮源，多糖浓度较高；而利用酵母粉、硫酸铵和玉米浆粉时多糖浓度较低，差异很大，这说明美味扇菇基本不用玉米浆粉和硫酸铵为氮源，从图中可以看到利用蛋白胨作为氮源比利用酵母粉时多糖浓度要高，从多方面考虑所以应用蛋白胨作为氮源。使用的 5 种碳源都可以被美味扇菇利用，大多数食用菌都可以使用蔗糖、麦芽糖、葡萄糖进行液体发酵，其中以果糖作为碳源时，菌丝体干重最高，以蔗糖作为碳源时，上清多糖含量最高，其余依次为麦芽糖、果糖、葡萄糖,以麦芽糖和果糖作为碳源时菌丝体干重较高，但是多糖含量不如蔗糖，整体考虑产多糖量、成本、干重等因素，碳源应该使用蔗糖更好。

表 3.1 菌球的干重

| 培养基 | 均干重重量/g | 偏差    |
|-----|---------|-------|
| PDB | 0.625   | 0.205 |

|     |       |       |
|-----|-------|-------|
| 葡萄糖 | 0.925 | 0.072 |
| 蛋白胨 | 0.781 | 0.022 |
| 酵母粉 | 0.970 | 0.055 |
| 玉米浆 | 1.033 | 0.000 |
| 硫酸铵 | 0.099 | 0.020 |
| 蔗糖  | 0.857 | 0.088 |
| 麦芽糖 | 1.078 | 0.130 |
| 果糖  | 1.300 | 0.086 |

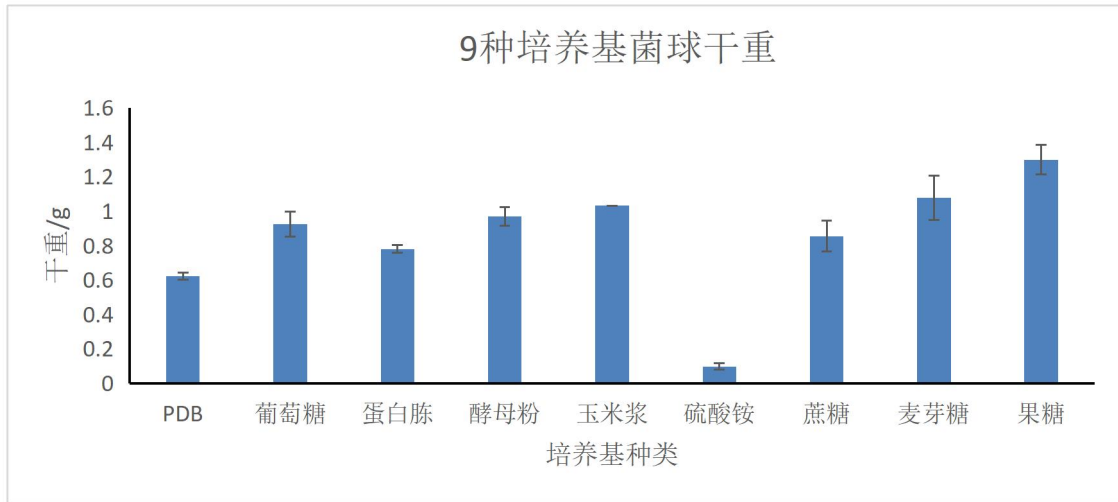


图 3.1 菌球的干重

表 3.2 主要是对各种培养基的上清溶液进行稀释，然后测定其吸光度，每组三个平行，带入标准曲线，分别求得其总糖浓度。表中省去了中间数据，只给出了最终结果。

表 3.2 上清中总糖含量

| 培养基 | 平均浓度(mg/mL) | 偏差    |
|-----|-------------|-------|
| PDB | 25.064      | 0.136 |
| 葡萄糖 | 1.216       | 0.069 |
| 蛋白胨 | 16.526      | 0.686 |
| 酵母粉 | 1.157       | 0.044 |
| 玉米浆 | 8.902       | 0.000 |
| 硫酸铵 | 21.058      | 0.469 |
| 蔗糖  | 29.920      | 2.384 |
| 麦芽糖 | 22.584      | 0.360 |
| 果糖  | 15.251      | 0.576 |

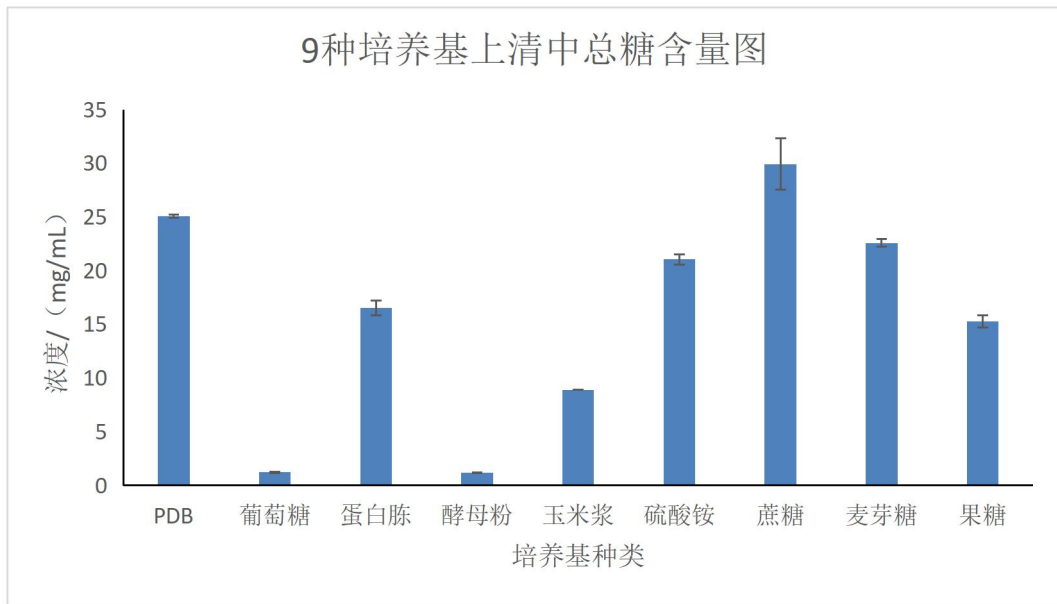


图 3.2 上清中总糖含量

精确取 0.5 mL 各培养基菌球上清液，用 95%乙醇定容至 25 mL 容量瓶中，混匀后静置 24 h 后进行 8000 rpm 离心 10 min，取 60  $\mu$ L 上清液加入试管中(对照中加入 1.2 mL 95%乙醇)，加 1140  $\mu$ L 蒸馏水，再缓慢加入 0.2%蒽酮硫酸溶液 2.4 mL，把 1000  $\mu$ L 移液器调到 800  $\mu$ L，加三次，用漩涡振荡器摇匀后，再进行沸水浴加热 10 min，取出后迅速用冰水浴，降温 10 min，610 nm 波长下测定吸光值。每个样品三个平行，表 3.3 省去了中间数据，只给出了最终结果。测得总糖浓度，以及还原糖的浓度，进而得出多糖的浓度。

表 3.3 上清中还原糖含量

| 培养基 | 平均浓度 (mg/mL) | 偏差    |
|-----|--------------|-------|
| PDB | 0.626        | 0.009 |
| 葡萄糖 | 0.027        | 0.003 |
| 蛋白胨 | 0.419        | 0.015 |
| 酵母粉 | 0.034        | 0.003 |
| 玉米浆 | 0.289        | 0.000 |
| 硫酸铵 | 0.647        | 0.040 |
| 蔗糖  | 0.628        | 0.051 |
| 麦芽糖 | 0.462        | 0.100 |
| 果糖  | 0.502        | 0.009 |

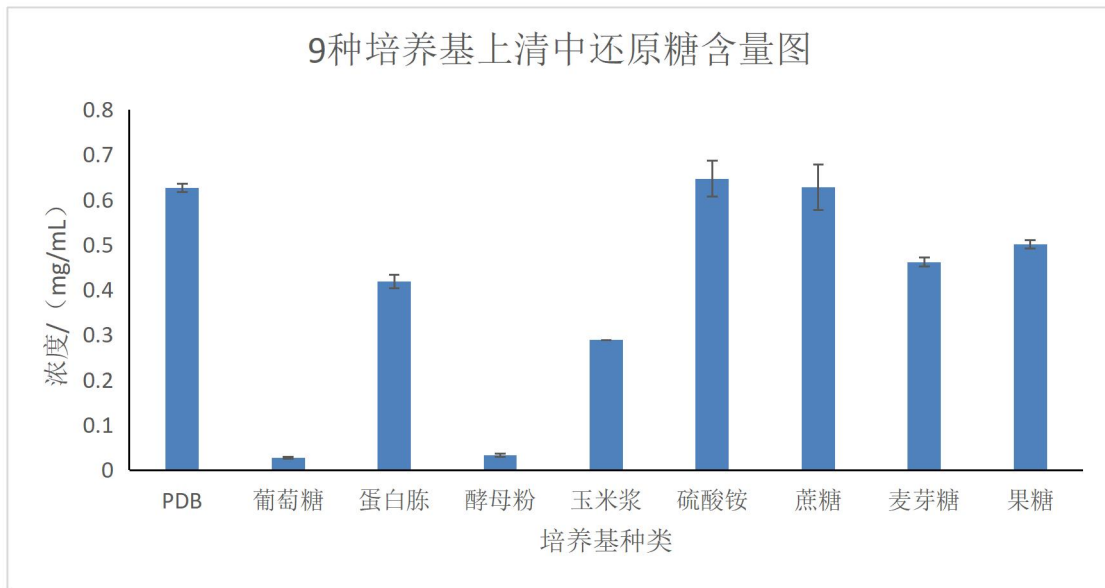


图 3.3 上清中还原糖含量

### 3.1.2 液体发酵上清中多糖的含量

测得总糖的含量以及还原糖的含量，多糖的含量就是它们差值的 90%。从结果中可以看出蔗糖培养基是产多糖最好的。

表 3.4 上清中多糖含量

| 培养基 | 平均浓度 (mg/mL) | 偏差    |
|-----|--------------|-------|
| PDB | 21.995       | 0.130 |
| 葡萄糖 | 1.700        | 0.061 |
| 蛋白胨 | 14.496       | 0.604 |
| 酵母粉 | 1.011        | 0.038 |
| 玉米浆 | 7.751        | 0.000 |
| 硫酸铵 | 18.370       | 0.411 |
| 蔗糖  | 26.364       | 2.102 |
| 麦芽糖 | 19.910       | 0.315 |
| 果糖  | 13.275       | 0.510 |



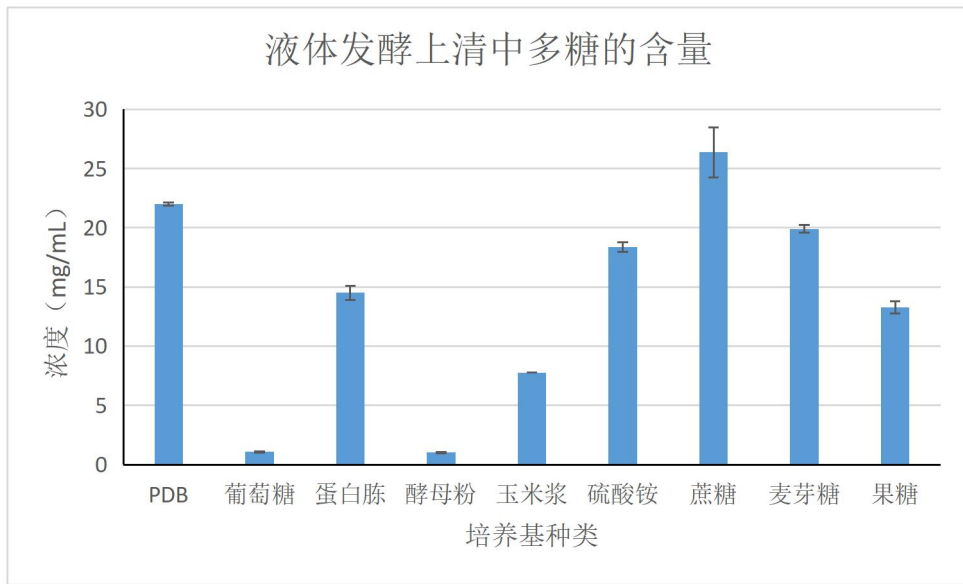


图 3.4 上清中多糖含量

## 3.2 子实体多糖提取结果分析

### 3.2.1 不同固液比对总糖浓度的影响

把不同固液比的菌种上清液稀释 20 倍后测吸光度，然后导入标准曲线求得其总糖浓度。

表 3.5 不同固液比的比较

| 固液比  | 1:10  | 1:15  | 1:20  | 1:25  | 1:30  | 1:35  |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 平行 1 | 0.413 | 0.314 | 0.344 | 0.346 | 0.470 | 0.558 |
| 平行 2 | 0.439 | 0.369 | 0.386 | 0.342 | 0.548 | 0.468 |
| 平行 3 | 0.441 |       |       | 0.358 | 0.318 | 0.327 |
| 吸光度  | 0.431 | 0.342 | 0.365 | 0.349 | 0.445 | 0.451 |
| 均浓度  | 0.057 | 0.045 | 0.048 | 0.046 | 0.059 | 0.059 |
| 原浓度  | 1.132 | 0.892 | 0.955 | 0.911 | 1.171 | 1.186 |
| 浓度 1 | 1.084 | 0.818 | 0.898 | 0.904 | 1.237 | 1.474 |
| 浓度 2 | 1.154 | 0.966 | 1.011 | 0.893 | 1.447 | 1.232 |
| 浓度 3 | 1.159 |       |       | 0.936 | 0.828 | 0.853 |
| 偏差   | 0.034 | 0.074 | 0.056 | 0.018 | 0.257 | 0.256 |

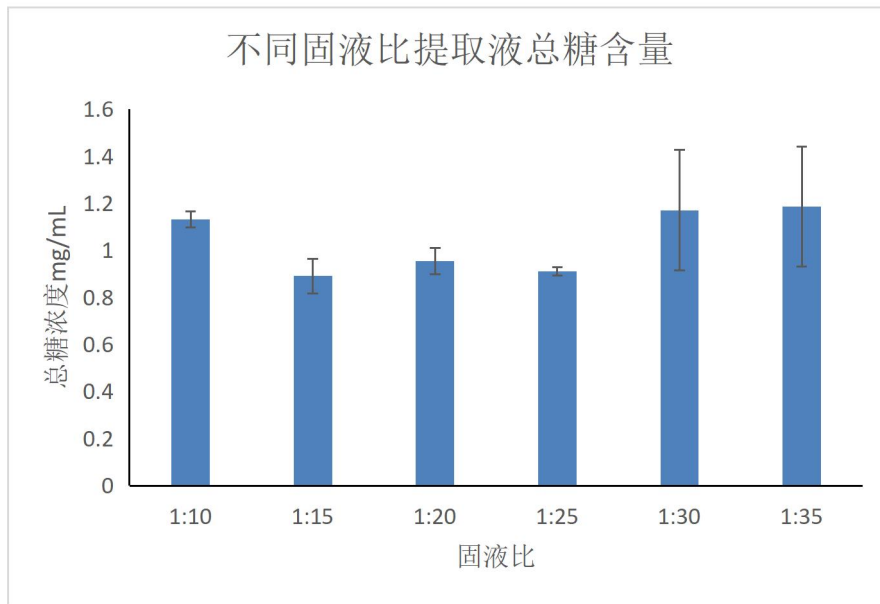


图 3.5 不同固液比的比较

### 3.2.2 不同提取时间对总糖浓度的影响

把不同提取时间的菌种上清液稀释 10 倍测吸光度，然后导入标准曲线求得其总糖浓度。

表 3.6 不同提取时间的比较

| 提取时间   | 10    | 20    | 25    | 30    |
|--------|-------|-------|-------|-------|
| 平行 1   | 0.502 | 0.561 | 0.693 | 0.476 |
| 平行 2   | 0.494 | 0.551 | 0.481 | 0.457 |
| 平行 3   | 0.531 | 0.596 | 0.531 | 0.480 |
| 吸光度    | 0.509 | 0.569 | 0.568 | 0.471 |
| 原液浓度   | 0.506 | 0.561 | 0.560 | 0.471 |
| 浓度 1   | 0.050 | 0.055 | 0.067 | 0.048 |
| 浓度 2   | 0.049 | 0.054 | 0.048 | 0.046 |
| 浓度 3   | 0.053 | 0.059 | 0.053 | 0.048 |
| 平均浓度   | 0.051 | 0.056 | 0.056 | 0.047 |
| 原液浓度 1 | 0.499 | 0.553 | 0.674 | 0.476 |
| 原液浓度 2 | 0.492 | 0.544 | 0.480 | 0.458 |
| 原液浓度 3 | 0.526 | 0.585 | 0.526 | 0.479 |
| 稀释偏差   | 0.001 | 0.002 | 0.008 | 0.001 |
| 偏差     | 0.014 | 0.018 | 0.082 | 0.009 |

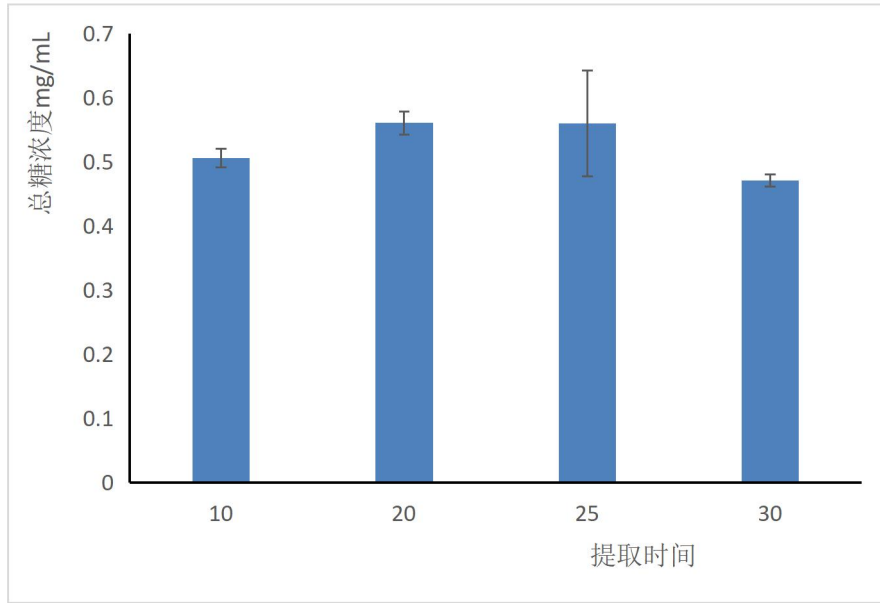


图 3.6 不同提取时间的比较

### 3.3 美味扇菇多糖抗氧化活性研究

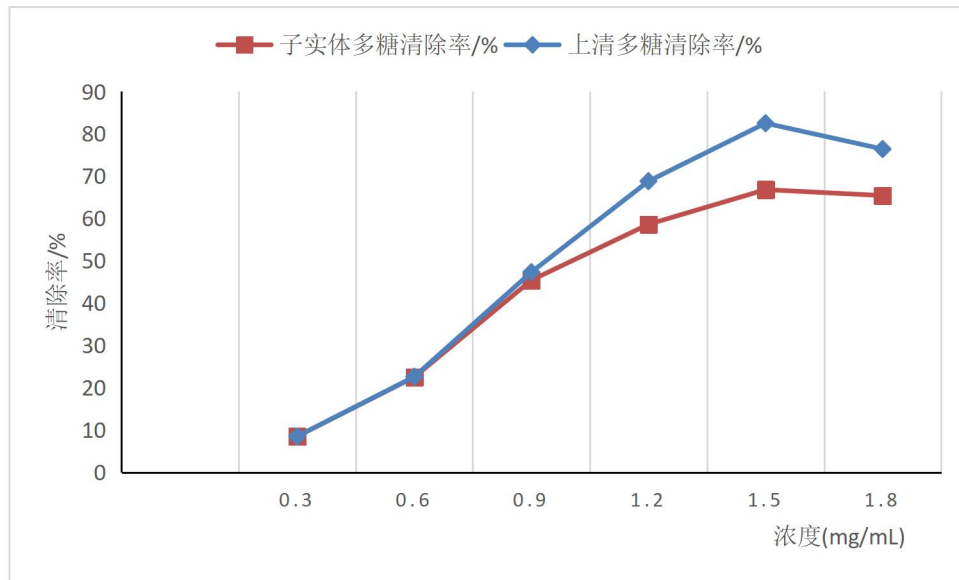


图 3.7 多糖对 DPPH 自由基的清除率

由图 3.7 可知在一定的范围内,随着浓度的增大,美味扇菇多糖对 DPPH 自由基清除能力逐渐增强,并且液体发酵上清多糖的清除能力更强。

## 4 讨论

### 4.1 美味扇菇液体发酵条件

菌株液体发酵成功的关键在于培养基，菌株需要的发酵条件不同，自然需要不同的培养基。本实验通过改变氮源和碳源，分别探究菌球的干重和胞外多糖的含量，结果表明最适宜的氮源是蛋白胨，最适宜的碳源为蔗糖，进一步表明了大多数食用菌都可以使用蔗糖、麦芽糖、葡萄糖进行液体发酵，实验主要测定了美味扇菇的胞外多糖，其中蔗糖液体发酵培养基的胞外多糖浓度为 26.36388 mg/mL；实验中还发现了有机氮源更适宜菌种生长，但是由于实验数据过少，可能结果不具有重现性。好的培养基理应具备菌种生长迅速，发酵时间短，价格优惠，来源广泛，目标产物产量足等特点，由于实验条件限制未能完全达到实验目标，所以发现更加优异的发酵条件是以后研究的关键。

### 4.2 多糖的提取结果

本实验初步研究了美味扇菇多糖提取的条件，将粗多糖沉淀用超纯水重新溶解测吸光度值，根据标准曲线得到多糖浓度来比较不同提取条件获得多糖的量，从而探究最优提取温度和固液比，初步发现提取温度为 80 °C，提取 20 min 时，以及固液比为 1:35 时多糖浓度最高，但是由于实验数据过少，可能结果不具有重现性。

### 4.3 多糖抗氧化能力研究

由实验结果得出，一定范围内随着浓度的增大，美味扇菇多糖对 DPPH 自由基清除能力逐渐增强，胞外多糖的抗氧化能力更强。

## 5 展望

近年来，人们对多糖的关注越来越多，但是对多糖的研究还远远不足，目前，多糖主要应用于食品，多糖结构的多样性绝不亚于蛋白质和核酸，相信不久的将来，多糖会出现在各个领域，发挥巨大的作用。美味扇菇胞外多糖的含量符合国家药典中对食用真菌的胞外多糖含量的要求，而且美味扇菇胞外多糖的抗氧化能力较强，清除自由基作用明显，可以代替同物种进行性质研究。最后希望多糖作为对人类有益的天然成分进一步开发利用。

## 参考文献

- [1] 刘宇,王建瑞,鲁铁,郝晓东,&图力古尔.元蘑不同菌株的菌丝发酵液多糖含量比较[J]. 北方园艺,2013(19):155-158.
- [2] 林杰.元蘑(亚侧耳)栽培技术[J].福建农业,2004(1):13-13.
- [3] 季瑞雪,鹿保鑫,王新茹,等. 野生亚侧耳多糖的提取和对巨噬细胞 Raw264.7 的免疫调节作用研究[J]. 食品工业科技,2020,41(4):271-276.
- [4] 李灵香玉,马香娟.羟自由基的特性及其在光化学氧化中的反应机理[J]. 化工技术与开发,2006, 35(8):27-28.
- [5] Butterfield DA, Castenga A, Pocemich CB. Nutritionl approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease[J]. J Nrtr Biochem, 2002,13(8):444 - 461.
- [6] 梁瑞璋,王钊.木屑栽培榆黄蘑及其常量,微量元素的研究[J].中国食用菌,1998, 17(4):20-21.
- [7] 王迪,王伟,牟洪举.响应面法优化松茸菌丝体多糖超声提取工艺及其抗氧化研究[J].林产化学与工业, 2009(5): 51-53.
- [8] Guo J,Fang W,Lu H,et al . Inhibition of green mold disease in mandarins by preventive applications of methyl jasmonate and antagonistic yeast *Cryptococcus larentill* [J]. Postharvest Biology and Technology,2014,88:72-78.
- [9] 崔福顺,王玉珍.响应面法优化元蘑总黄酮提取工艺研究[J].食品工业,2014, 035(002):36-38.
- [10]冀经伦,王淼,刘桂萍,张立新.微波辅助提取杜仲籽壳酸性多糖及杜仲胶的工艺研究[J].辽宁化工,2021,50(04):470-473.
- [11]王一鸣,王兴录.人参多糖提取分离及药理作用研究进展[J].东北农业科学,2021,46(02):103-119.
- [12]Santos Dayane Kelly Dias do Nascimento et al. Pectin-like polysaccharide extracted from the leaves of *Conocarpus erectus* Linnaeus promotes antioxidant, immunomodulatory and prebiotic effects[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2021,100:263-264.
- [13]毛月东,金青.响应面优化海风藤多糖提取工艺及其抗氧化活性研究[J].江苏农业科学,2021,49(08):171-176.
- [14]刘庆,李化强,吴菲菲,王美英,彭洁,胡平.超声辅助提取突隔梅花草多糖的工艺优化及抗氧化活性研究[J].中国野生植物资源,2021,40(04):15-21.

- [15]魏晴,卢虹志,张俊,梁珊珊,薛娟.响应面法优化艳山姜多糖提取工艺及抗氧化研究[J].食品研究与开发,2021,42(07):70-75.
- [16]Olawuyi Ibukunoluwa Fola and Lee Won Young. Structural characterization, functional properties and antioxidant activities of polysaccharide extract obtained from okra leaves (*Abelmoschus esculentus*)[J]. Food Chemistry, 2021, 35:4-4.
- [17]杨立红,刘林德,姜华,等.野生元蘑多糖的分离鉴定及其清除氧自由基作用[J]. 食品科学, 2007(11):59-63.

## 致谢

光阴似箭，日月如梭，不知不觉大学生活即将结束，陪伴着大学的有很多人，很多事，感谢各科任课老师对我的帮助，感谢我的导师于浩老师，让我知道了实验室的重要性，一个优秀的毕业论文一定离不开好的导师还有实验室，于老师教会了我太多太多，感谢张晨晓师姐对我的悉心帮助，让我的实验技能有了飞速的提升，以及每天亲力亲为和我一起做实验，使我才能顺利完成整个的实验过程。最后感谢我的舍友们给我的帮助和支持，感谢自己，我相信属于自己的明天定会来临。