



浙江工业大学

硕士学位论文

论文题目：鹿茸菇子实体多糖提取分离、
结构鉴定及抗氧化研究

作者姓名 秦春青

指导教师 张安强

学科专业 食品加工与安全（095113）

培养类别 全日制专业学位硕士

所在学院 海洋学院

提交日期 2019 年 1 月

浙江工业大学

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的研究成果。除文中已经加以标注引用的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得浙江工业大学或其它教育机构的学位证书而使用过的材料。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人承担本声明的法律责任。

作者签名：

秦青青

日期：2018年12月17日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权浙江工业大学可以将本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、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

- 1、保密□，在一年解密后适用本授权书。
- 2、保密□，在二年解密后适用本授权书。
- 3、保密□，在三年解密后适用本授权书。
- 4、不保密☒。

(请在以上相应方框内打“√”)

作者签名：

秦青青

日期：2018年12月17日

导师签名：

蒋

日期：2018年12月17日

摘 要

鹿茸菇，学名荷叶离褶伞 (*Lyophyllum decastes* (Fr. : Fr.) Sing., LDS)，是一种珍贵的野生食药兼用的大型真菌，其子实体作为一种传统的中药，主要成分为鹿茸菇多糖，具有抗肿瘤、降血糖、降血脂、抗氧化等一系列作用。本文对鹿茸菇子实体常规营养成分分析发现，鹿茸菇子实体表现出高蛋白低脂肪（粗蛋白 22.16%，粗脂肪 2.69%）等特点，与文献报道相似；鹿茸菇多糖提取液经分级醇沉得 LDS30、LDS60 和 LDS80 三个组分，其中 LDS60 组分多糖含量最高，为 $44.293 \pm 3.988\%$ 。

通过响应面优化设计高速剪切提取 LDS 多糖工艺得出最佳工艺参数为：液料比 18 mL/g，转速 9500 r/min，剪切时间 2.3 min，在此条件下，LDS 子实体多糖实际得率为 26.56%（理论值 26.62%）。

体外抗氧化研究表明，三个多糖组分均表现出良好的 ABTS、DPPH 自由基清除能力并且都具有一定的还原能力，其中 LDS60 多糖组分抗氧化活性高于 LDS30 和 LDS80 多糖组分，ABTS 和 DPPH 自由基清除能力的 IC_{50} 值分别为 0.147 mg/mL 和 0.299 mg/mL。综合理化性质结果选择 LDS60 组分进行后续的分离纯化与结构鉴定。

LDS60 粗多糖组分经 DEAE Sepharose Fast Flow 离子柱层析和 Sephacryl S-500 HR 凝胶柱层析分离纯化得均一组分 LDS60-A。经高效液相色谱、紫外全扫描和红外光谱分析其不含核酸和蛋白质，符合多糖特征，相对分子量为 5.729×10^6 Da，属于 β -构型中性多糖。

再利用单糖组成和甲基化分析，结合气质联用仪、核磁共振仪和扫描电镜等仪器对 LDS60-A 组分的结构进行解析。单糖组成分析结果表明 LDS60-A 组分主要由 D-葡萄糖和 D-半乳糖组成，并含有少量 L-岩藻糖、L-阿拉伯糖、D-木糖和 D-甘露糖，其摩尔比为 1.56 : 1.00 : 0.28 : 0.12 : 0.18 : 0.28；核磁共振分析结合甲基化分析结果得出 LDS60-A 组分主链主要为 1-6 连接的中性 β -吡喃型葡聚糖 (β -1,6-linked Glcp)；扫描电镜表明 LDS60-A 表面较粗糙，主要以片状或碎屑状堆积形式存在，且分子间作用力弱。

关键词：鹿茸菇子实体；多糖；抗氧化；分离纯化；结构鉴定

Abstract

Lyophyllum decastes Sing., also known as antler mushroom, is a precious edible medicinal fungus. At the same time, the fruiting body is used as a traditional medicine, its main ingredient is polysaccharide (LDS), which has a series of important biological activities, such as anti-tumor, hypoglycemic and hypolipidemic, anti-oxidant. By analyzing the conventional nutrient composition from the fruiting bodies of *L. decastes*, it showed that the fruiting body of *L. decastes* showed high protein and low fat (crude protein 22.16%, crude fat 2.69%), which was similar to the literature report. Three polysaccharide fractions (LDS30, LDS60 and LDS80) were obtained by ethanol gradient precipitation, the content of polysaccharide in LDS60 was the highest, which was $48.58 \pm 4.141\%$.

The High-speed shearing homogenization extraction process of *L. decastes* polysaccharide was optimized by Box-Benhnken response surface design. The optimum conditions were predicted as follows: ratio of water to material 18 mL/g, rotate speed 9500 r/min, extraction time 2.3 min, under this conditions *L. decastes* polysaccharide extraction yield was 26.56%, close to the predicted value 26.62%.

Evaluation of the *in vitro* antioxidant activities of these three polysaccharide fractions from *L. decastes* indicated all three polysaccharide components showed good 2,21-azino-bis(3-ethylbonzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging ability and had certain reducing power. Among the antioxidant activity of LDS60 polysaccharide component was higher than that of LDS30 and LDS80 polysaccharide components, and the IC₅₀ values of ABTS and DPPH radical scavenging capacity were 0.147 mg/mL and 0.299 mg/mL. Comprehensive physical and chemical properties results selected LDS60 components for subsequent separation and purification and structural identification.

Crude polysaccharide LDS60 was purified by DEAE-Sepharose Fast Flow and Sephacryl S500 gel column chromatography. After purification, the homogeneous fraction LDS60-A was acquired, which was no nucleic acids and proteins, and has the characteristics of polysaccharide, the average molecular weight was 5.729×10^6 Da, which belongs to β -configuration neutral polysaccharide.

The structure of the LDS60-A component was analyzed by means of acetylation,

methylation, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), nuclear magnetic resonance (NMR) and scanning electron microscopy (SEM). The monosaccharide composition, obtained by GC-MS analysis, showed that the LDS60-A was composed of D-glucose, D-galactose and a small amount of L-fucose, L-arabinose and D-xylose and D-mannose in the molar contents of 1.56 : 1.00 : 0.28 : 0.12 : 0.18 : 0.28. NMR and methylation analysis results obtained LDS60-A major component of the main chain of β - (1 $\rightarrow$ 6) - D - glucopyranose. SEM showed LDS60-A rough surface, mainly in the form of flake or clastic accumulationa, and the intermolecular force was weak.

Key words: *L. decastes*; polysaccharide; anti-oxidant; isolationn and purification; structural identification

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 鹿茸菇子实体的研究概况.....	1
1.1.1 鹿茸菇子实体生物学特性研究.....	1
1.1.2 鹿茸菇子实体化学成分研究进展.....	5
1.1.3 鹿茸菇子实体多糖研究进展.....	6
1.2 真菌多糖的研究概况.....	8
1.2.1 真菌多糖提取、分离纯化.....	8
1.2.2 真菌多糖纯度及分子量的测定.....	10
1.2.3 真菌多糖的结构鉴定.....	11
1.3 本课题研究目的、意义及主要研究内容.....	14
1.3.1 研究背景、目的及研究意义.....	14
1.3.2 研究的主要内容.....	14
1.3.3 研究创新点.....	15
第二章 鹿茸菇子实体营养成分分析及多糖理化性质研究.....	16
2.1 材料和仪器.....	16
2.1.1 实验原料与试剂.....	16
2.1.2 主要仪器与设备.....	16
2.2 实验方法.....	17
2.2.1 鹿茸菇子实体常规营养成分分析.....	17
2.2.2 鹿茸菇粗多糖的提取.....	17
2.2.3 鹿茸菇粗多糖含量的测定.....	17
2.2.4 分级醇沉.....	18
2.2.5 粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 的理化性质测定.....	19
2.3 结果与讨论.....	22
2.3.1 鹿茸菇子实体营养成分分析.....	22
2.3.2 鹿茸菇粗多糖理化性质分析.....	23
2.4 本章小结.....	27
第三章 鹿茸菇子实体多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究.....	28

3.1 材料与仪器.....	28
3.1.1 实验原料与试剂.....	28
3.1.2 主要仪器与设备.....	28
3.2 实验方法.....	29
3.2.1 高速剪切提取鹿茸菇子实体多糖的工艺优化.....	29
3.2.2 粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 体外抗氧化活性研究.....	30
3.3 结果与讨论.....	32
3.3.1 高速剪切提取单因素实验.....	32
3.3.2 响应面结果分析.....	34
3.3.3 粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 体外抗氧化活性研究.....	41
3.4 本章小结.....	43
第四章 鹿茸菇子实体粗多糖组分 LDS60 的分离纯化.....	44
4.1 材料与仪器.....	44
4.1.1 实验原料与试剂.....	44
4.1.2 主要仪器.....	44
4.2 实验方法.....	45
4.2.1 鹿茸菇子实体均一多糖的制备.....	45
4.2.2 多糖分子量和纯度的测定.....	46
4.2.3 紫外 (UV) 全扫描检测.....	46
4.2.4 红外光谱 (IR) 检测.....	46
4.3 结果与讨论.....	47
4.3.1 鹿茸菇子实体均一多糖的制备.....	47
4.3.2 多糖纯度鉴定及分子量测定.....	50
4.3.3 UV 全扫描分析.....	50
4.3.4 IR 分析.....	51
4.4 本章小结.....	52
第五章 鹿茸菇均一多糖 LDS60-A 结构的初步鉴定.....	53
5.1 材料与试剂.....	53
5.1.1 实验原料与试剂.....	53
5.1.2 主要仪器.....	53
5.2 实验方法.....	53

5.2.1 单糖组成分析.....	53
5.2.2 甲基化分析.....	55
5.2.3 核磁 (NMR) 分析.....	56
5.2.4 扫描电子显微镜 (SEM) 分析.....	56
5.3 结果与讨论.....	56
5.3.1 单糖组成分析.....	56
5.3.2 甲基化分析.....	59
5.3.3 核磁分析.....	62
5.3.4 扫描电镜分析.....	63
5.4 本章小结.....	64
第六章 结论与展望.....	66
6.1 结论.....	66
6.2 展望.....	67
参考文献.....	69
致 谢.....	74
附录 A LDS60-A 的核磁共振图谱.....	75
攻读学位期间发表的学术论文及研究成果.....	82

主要符号说明

缩写	英文名称	中文名词
LDS	<i>Lyophyllum decastes</i> Sing.	鹿茸菇多糖
R ²	Determination coefficient	决定系数
RSD	Relative Standard Deviation	相对标准偏差
UV	Ultraviolet Spectrophotometry	紫外-可见光谱
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy	傅立叶变换红外光谱法
GC	Gas Chromatography	气相色谱
MS	Mass Spectrum	质谱
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrum	气相色谱-质谱联用
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	核磁共振
SEM	Scanning electron microscope	扫描电子显微镜
DNS	3,5-Dinitrosalicylic acid	3,5-二硝基水杨酸
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical	1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)	2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐
DEAE	Diethylaminoethyl	二乙氨基乙基纤维素
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高效液相色谱
MW	Molecular Weight	分子量
Rha	Rhamnose	鼠李糖
Fuc	Fucose	岩藻糖
Ara	Arabinose	阿拉伯糖
Xyl	Xylose	木糖
Man	Mannose	甘露糖
Glc	Glucose	葡萄糖
Gal	Galactose	半乳糖
TIC	Total ion chromatogram	总离子流色谱
TCA	Trichloroacetic Acid	三氯乙酸
TFA	Trifluoroacetic Acid	三氟乙酸
COSY	H-H chemical shift correlation spectroscopy	H-H 相关谱

续表 主要符号说明

缩写	英文名称	中文名词
TOCSY	Total correlation Spectroscopy	总相关谱
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence	异核单量子相干相关谱
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence	异核多键相关谱
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy	二维 NOE 谱

第一章 绪论

1.1 鹿茸菇子实体的研究概况

1.1.1 鹿茸菇子实体生物学特性研究

鹿茸菇，学名荷叶离褶伞（*Lyophyllum decastes* (Fr.:Fr.) Sing., LDS），由于其切片酷似名贵中药材鹿茸而得此名，它是一种珍稀食药兼用的大型野生真菌，在日本有“闻香松口蘑，食味离褶伞”之美誉。鹿茸菇主要以鲜食为主，含有丰富的营养物质，在干制后主要营养和口感均不变，它的子实体可以作为一种传统的中药。国际上已有研究表明从鹿茸菇子实体中分离出的多糖具有抗肿瘤、降血糖、降血脂和抗氧化等一系列重要作用。



图 1.1 鹿茸菇

Fig. 1.1 *Lyophyllum decastes* (Fr.:Fr.) Sing.

近些年来，鹿茸菇凭借着安全和营养等优点及广阔的开发前景越来越引起广泛关注。在国外，研究学者主要进行的是分子生物学、抗肿瘤活性物质、免疫学等方面研究；而国内对鹿茸菇及其生物活性成分鹿茸菇多糖的研究总体上还处于起步阶段，其中多集中在鹿茸菇的生物学特征、食用价值、人工栽培驯化、营养组成、成分分析及鹿茸菇多糖的提取制备和药理活性的研究等领域。

1.1.1.1 鹿茸菇形态特征研究

基于国内外对鹿茸菇的研究, 目前对鹿茸菇的生物学特性已经有了一定的了解。鹿茸菇子实体大小一般为中等到偏大, 菌盖的直径在 5-16 cm 左右, 形状不一, 有的呈扁半球形, 有的稍平缓, 中部稍有向下凹陷; 颜色多为灰白色或者深米黄色, 表面光亮滑嫩有光泽, 手感不粘; 其菌盖边缘生长初期会有些向内卷, 后期会向外伸展呈现无规则的波状瓣裂形。菌肉中间部位轻微厚且为奶白色; 菌褶则为白色, 呈现竖直或者平延生长, 致密且长度不等; 菌柄白色、光滑, 内实, 有的略稍扁状, 有的近似柱形, 长为 3-8 cm, 粗为 0.7-1.8 cm; 孢子近似球形, 无色光滑, 直径 4-7 μm ; 菌柄呈圆柱状, 长 6-10 cm, 粗 0.5-1.5 cm, 常见中生或偏生, 有弹性, 白色至淡色, 基部灰色至褐色。生长方式大多数为丛生或者簇生一起^[1-3]。

1.1.1.2 鹿茸菇发酵条件研究进展

李晓^[4]等人以不同碳源、氮源、无机盐、不同 pH 及含水量对鹿茸菇菌丝生长进行实验发现, 当以葡萄糖作为碳源、牛肉膏作为氮源、在马铃薯葡萄糖琼脂培养基中添加 0.1%硫酸镁和磷酸二氢钾、pH 为 10、含水量控制在 65%的时候鹿茸菇菌丝生长情况最好, 菌丝长速快并且浓密; 通过三角摇瓶液体发酵培养时发现, 250 mL 三角摇瓶装液 100 mL 培养 9-10 d 后, 菌丝干重达到发酵终点, 而从第 11 d 时菌丝球开始老化, 表面变得光滑。

魏生龙^[5]等人通过瓶栽和袋栽的实验分别验证了鹿茸菇菌丝体生长的最适温度范围为 5-35 $^{\circ}\text{C}$, 且最适温度为 25 $^{\circ}\text{C}$; 子实体分化最适温度范围为 13-25 $^{\circ}\text{C}$, 最适温度为 19 $^{\circ}\text{C}$, 0-3 $^{\circ}\text{C}$ 的温差刺激最利于其分化, 温差过大反而不利于子实体的分化; 孢子萌发的最适温度范围在 10-25 $^{\circ}\text{C}$, 最适温度 20 $^{\circ}\text{C}$; 菌丝生长最适 pH 4-5, 孢子萌发的最适 pH 4-6; 菌丝和担孢子的致死温度则分别为 45 $^{\circ}\text{C}$ /30 min 和 50 $^{\circ}\text{C}$ /15 min。鹿茸菇菌丝在以淀粉、蔗糖、葡萄糖、果糖、玉米粉、乳糖和甘露糖为碳源的培养基上均可生长, 最适其生长的碳源为蔗糖和葡萄糖, 此时菌丝长速快、长势旺盛和浓密; 同时, 菌丝在以甘氨酸、蛋白胨、硫酸铵、黄豆粉、硝酸铵、谷氨酸和麦麸为氮源的培养基上也都可生长, 最适生长的氮源为麦麸, 在此培养基上生长速度亦是最快, 菌丝浓密, 长势最旺盛; 鹿茸菇菌丝在 C/N 15/1-50/1 的范围内均可生长, 当 C/N 为 50/1

时生长速度最快、菌丝浓密且长势旺。子实体在完全没有光照下不能形成，光照和黑暗交替变换对子实体的形成影响不明显。

席亚丽^[6]等人使用摇瓶发酵的方法得出菌丝体发酵的最佳碳源为玉米面水解液，最佳氮源为麸皮，最适碳氮比为 16:1，最适发酵 pH 7.0、最适温度 26 °C、最佳接种量 10%和转速 160 r/min；最佳培养基配方则为：玉米面水解液 200 g/L、蔗糖 15 g/L、麸皮 35 g/L 和酵母膏 1.5 g/L；其菌丝体稳定生长期为接菌后 6-8 d。

王晓琴^[7]等人研究了不同发酵时间对鹿茸菇菌丝体深层发酵的影响，结果表明，在恒温 25 °C、连续发酵 13 d 期间内，当随着发酵时间的延长，菌丝体生物量和胞内多糖的含量均为先上升后下降，两者在前 11 d 内均与发酵时间呈正相关，并且在第 11 d 时均达到最大值，后期生物量和胞内多糖的含量开始下降；而胞外多糖和还原糖的含量分别在第 3 d 和第 12 d 时下降到最低，此后胞外多糖含量直到发酵结束基本不变，而还原糖含量在第 13 d 略有回升。因此，探究菌丝体生长、胞内外多糖及胞外还原糖含量随发酵时间的变化时选择发酵时间为 11 d 最为合适。

高慧娟^[8]等人在灭菌条件、培养时间、添硒量和添硒时间的单因素试验基础上，利用 Box-Behnken 试验对富硒鹿茸菇菌丝体胞内粗多糖发酵条件进行了优化，得出深层发酵的最佳条件即在 121 °C、20 min 条件下对培养基和 Na₂SeO₃ 溶液分别灭菌混合后在发酵至第 129 h 时，发酵液中添加 4 µg/mL Na₂SeO₃，继续发酵至第 244 h，发酵产生的富硒鹿茸菇菌丝体胞内粗多糖含量为 349.8 mg/100 mL。

闫培生^[9]等人首次通过利用 10 L 发酵罐发酵研究鹿茸菇菌丝生长、胞内和胞外多糖产量的变化。实验表明，在 25 °C、120 r/min，空气流量为 200 L/h 的条件下发酵，发酵至第 9 d 时菌丝体产量最高且与其他各天的菌丝体产量差异明显；菌丝体胞内多糖含量和产量达到最高时分别为发酵第 8 d 和第 9 d；而菌丝体胞外多糖产量达到最高时为发酵第 8 d；同时选择了菌丝体、胞内和胞外多糖产量 3 个指标分别对摇瓶和发酵罐发酵进行了对比，发现发酵罐发酵更有利于鹿茸菇菌丝生长和多糖的产生。

1.1.1.3 鹿茸菇人工栽培研究进展

我国关于成功栽培荷叶离褶伞的相关记录最早是在 1973 年，云南昭通^[10]李植森利用蕨苔根和茅草制作腐殖土作培养料，在室内和山林就地栽培成功，发展速度并非

很快。鹿茸菇是离褶伞科中少有的腐生型真菌，在世界范围内分布在北半球温带，一般秋季发生在林地内、田地边或公园道路两边。在我国，鹿茸菇多分布于江苏、广西、青海、云南、甘肃新疆和西藏等地。日本从 80 年代就开始对鹿茸菇进行驯化栽培研究，已经开发出成熟的栽培技术，但还没有实现大面积的推广^[1,11]，而国内总体对鹿茸菇的研究进展的较慢。魏生龙^[5]等人 2000 年从祁连山金露梅灌木丛中采集到野生鹿茸菇子实体，并对其进行了分离驯化和生物学特性研究。该菌种在 2008 年获得了国家发明专利授权。目前，该菌种保藏在“中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心”（保藏号 CGMCC 1518，菌株号 ZY48-1）。程继红^[12]等人首次报道鹿茸菇（*L. decastes*）在中国工厂化的栽培，其栽培方式与市场上主流的菇类相似，2 次重复下污染率、发菌期、采收期及单瓶产量的指标均相接近，表明鹿茸菇的工厂化生产可重复性良好，平均污染率为 0.94%，单瓶产量平均 104 g，突破了鹿茸菇菌种栽培过程中污染率高及野外栽培或仿野外栽培工艺覆土出菇限制等难点，基本实现了菌种栽培的机械操作及工厂化稳定生产。

1.1.1.4 鹿茸菇营养成分研究进展

β -葡聚糖是某些多糖的主要功效成分，与其生物活性功能密切相关。研究表明鹿茸菇子实体富含 β -1,3-D 和 β -1,6-D 葡聚糖^[11]。Yuuichi Ukawa^[13]等人通过实验表明最终对小鼠 S180 癌细胞具有显著的抑制活性的 3 种多糖分别为(1 $\rightarrow$ 3)- β -D 型葡萄糖、(1 $\rightarrow$ 6)- β -D 型葡萄糖和 (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)- β -D 型葡萄糖。张汉燚^[14]等人研究比较了鹿茸菇、香菇、双孢菇、平菇和金针菇的营养成分变化，结果表明鹿茸菇中粗脂肪含量最低，灰分含量最高；粗蛋白含量略低于香菇（最高），粗纤维含量仅次于双孢蘑菇，碳水化合物含量也适中（平菇和香菇较高）。同时，检测到鹿茸菇中氨基酸种类齐全，氨基酸总量高于香菇和金针菇，且必需氨基酸占比达到了 35.78%；还含有大量的 B 族维生素。席亚丽^[15]等人按照国家标准对鹿茸菇子实体、菌丝体和发酵液中含有的主要营养成分和含量进行了检测，具体如表 1.1 所示。

表 1.1 鹿茸菇子实体、菌丝体和发酵液中的营养成分和含量

Table 1.1 Contents of nutrients in fruit body, mycelia and fermentation broth of *L.decastes*

组分	子实体	菌丝体	发酵液
粗蛋白含量	21.40%	28.30%	0.08%
粗脂肪含量	1.44%	2.78%	0.11%
碳水化合物含量	53.04%	54.70%	2.82%
粗纤维含量	9.52%	5.32%	- ^a
粗多糖含量	3.55%	1.77%	0.12%
灰分含量	13.60%	6.06%	- ^a
氨基酸种类	17	18	6
锌含量	50.00 mg/kg	1.92×10 ³ mg/kg	0.92 mg/kg
铜含量	19.0 mg/kg	38.7 mg/kg	- ^b
硒含量	0.013 mg/kg	0.080 mg/kg	- ^b
维生素种类	5	5	4
烟酸含量	21.20 mg/100 g	25.00 mg/100 g	0.08 mg/100 g

-^a: 未检测; -^b: 未检出

除多糖外,麦角甾醇也是真菌中常见的重要活性成分之一,广泛存在于子实体及其发酵产物中,是真菌的特征化合物。研究表明麦角甾醇亦具有抗肿瘤、抗炎、抑菌等多种活性。郑宏亮^[10]通过对野生和人工栽培鹿茸菇营养成分分析及对麦角甾醇含量的比较发现,人工栽培鹿茸菇中粗纤维、灰分和维生素含量均高于野生鹿茸菇;而粗蛋白、粗脂肪和风味氨基酸含量则为人工栽培低于野生鹿茸菇;人工栽培鹿茸菇中麦角甾醇含量(0.756 mg/g)略高于野生鹿茸菇(0.681 mg/g),更适宜食用。

1.1.2 鹿茸菇子实体化学成分研究进展

鹿茸菇属离褶伞属,目前有文献^[16]记载的离褶伞属真菌在中国有荷叶离褶伞、银白离褶伞、角孢离褶伞、灰离褶伞、榆干离褶伞、墨染离褶伞、炭色离褶伞、玉蕈离褶伞、烟色离褶伞、簇生离褶伞等菌物。国内外研究学者对离褶伞属化学成分的研究主要集中于大分子多糖、蛋白质及常见小分子化合物。其中对小分子化合物的研究,国内外学者涉及的较少,主要集中在氨基酸、色素、神经酰胺、甾醇及倍半萜类等。

郑宏亮^[17]等人通过质谱和核磁等手段对鹿茸菇 (*L. decastes.*) 子实体进行了研究, 首次从石油醚、二氯甲烷和乙酸乙酯提取物中分离鉴定出 13 种化合物, 其中化合物 2-10 为首次从离褶伞属真菌中分离得到。项晨^[18]等人首次对银白离褶伞 (*Lyophyllum connatum* (Schum.: Fr.) Sing.) 子实体氯仿/甲醇 (1:1) 提取物分离纯化, 得到 8 种化合物, 利用现代波谱技术对其进行结构鉴定, 化合物分别为: (1) 9(Z)-十八烷烯酸、(2) 麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮、(3) 麦角甾-5,7,22-三烯-3 β -醇、(4) 过氧麦角甾醇、(5) 烟酰胺、(6) 尿嘧啶、(7) 麦角甾-7,22-二烯-3 β ,5 α ,6 β -三醇和(8) 腺嘌呤核苷。Kimure^[19]等人从银白离褶伞中分离出了 β -羟基麦硫因 (β -Hydroxyergothioneine), 麦硫因 (Ergothionein), 离褶啉 (Lyophyllin) 和银白离褶素 (Connatin), 均具有很强的抗氧化性。魏雨恬^[20]等人对鹿茸菇 (*L. decastes*) 子实体有机溶剂萃取物的化学成分及抗肿瘤活性研究发现, 95%醇提物的石油醚、氯仿和乙酸乙酯萃取物中均含有甾类(或三萜)物质, 体外抗肿瘤活性显示这三种萃取物对 K562、HepG2 和 SW620 肿瘤细胞的增殖均具有抑制作用, 表明鹿茸菇子实体中甾类成分有明显抑制肿瘤细胞增殖的能力。

1.1.3 鹿茸菇子实体多糖研究进展

国内外学者对鹿茸菇的药理学活性方面进行了广泛的研究, 结果均表明鹿茸菇多糖具有良好的生物活性。已有研究表明鹿茸菇子实体多糖具有抗肿瘤、抗菌性、降血糖、降血脂和抗氧化等一系列作用, 为其进一步开发利用提供了理论基础。鹿茸菇凭借其天然、安全和无毒副等优点, 引起国内外广泛关注并深受消费者青睐, 有着广阔的开发前景。

1.1.3.1 抗肿瘤作用

有研究表明从鹿茸菇子实体中分离得到的多糖对老鼠进行抗肿瘤实验表明鹿茸菇多糖对老鼠癌细胞有很好的抑制作用。Yuuichi Ukawa^[13]等人对鹿茸菇子实体的热水浸提物分离纯化得到 11 种多糖, 其中主要由葡萄糖组成的三种多糖 (IV-1, IV-2 和 IV-3) 表现出较强的对肉瘤 180 的抗肿瘤活性 (分别为 97.1%、96.7%和 89.3%)。闫肃^[2]通过 MTT 法对体外抗人体卵巢癌研究表明鹿茸菇多糖对人体卵巢癌具有一定的

抑制作用。

1.1.3.2 抗氧化作用

贾宁^[21]通过研究发现鹿茸菇子实体多糖可以去除小鼠体内超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$)，提高小鼠的免疫功能，增强机体抗氧化作用延缓衰老。张春梅^[22]等人通过鹿茸菇多糖对还原力研究表明鹿茸菇多糖具备一定的还原能力。

1.1.3.3 降血糖降血脂作用

Toshihiro Miura^[23]等人研究发现鹿茸菇多糖对 II 型糖尿病动物模型 KK-Ay 小鼠的高胰岛素血症有治疗作用，对 KK-Ay 小鼠投食鹿茸菇多糖后，通过改善小鼠血液中胰岛素和葡萄糖的含量起到降血糖作用。Ukawa^[24]等人研究发现喂食大鼠鹿茸菇多糖能够对其血脂水平产生有益影响从而降低血清总胆固醇浓度，促进小鼠体内胆汁酸的分泌。

1.1.3.4 抗菌性作用

Pushpa 和 Purushothama^[25]通过同时对 7 种细菌和 5 种真菌进行抑菌性研究，表明鹿茸菇具有广谱抗菌性。王小琴^[26]等人利用圆纸片法对鹿茸菇多糖的抑菌活性进行研究，发现鹿茸菇多糖提取物对细菌和真菌都有一定程度抑制作用。其中，在供试细菌中对四叠球菌的抑制作用最大，其次为枯草杆菌和大肠杆菌；在供试真菌中对黑曲霉的抑制作用较强，其次分别为啤酒酵母、米曲霉和桔青霉。

1.1.3.5 其它作用

Ukawa^[27]等人研究了 9 种食用菌的水提取物对血管紧张素 I 转换酶的抑制作用，结果表明，在 9 种食用菌中鹿茸菇子实体水提取物对血管紧张素 I 转换酶的抑制性最高，起到降低血压的作用。Ukawa^[28]等人还通过实验发现了鹿茸菇多糖对小鼠的特异性皮肤炎症有很好的治疗作用，对皮肤病严重且血液中缺少 Ig 的小鼠投食鹿茸菇多糖，结果表明鹿茸菇多糖能够抑制血清 IgE。Gu Y^[29]等人研究了鹿茸菇对小鼠照射 X 射线和免疫增强后小鼠放射副作用的影响，结果表明增强了放射治疗中的免疫恢复，并且防止了放射的副作用。而 Nakamura^[30]等人对小鼠进行了 X 射线照射后发现鹿茸菇多糖可以有效提高小鼠体内淋巴细胞、单核细胞和颗粒细胞的增生数量，增强了细

胞免疫活性及对抗 X 射线作用。

1.2 真菌多糖的研究概况

真菌多糖指由十个及以上的单糖以糖苷键的形式连接而成的具有生物活性功能的高分子多聚物；在国际上，真菌多糖被称为“生物反应调节物（BRM）”，不仅是细胞和组织的主要构成成分，也是参与能量储存和多种生命活动等功能，具有极其重要的作用。

20 世纪 70 年代，香菇多糖由日本学者率先证实其具有抗肿瘤活性。至此，真菌多糖在不同领域掀起狂澜大波，包括生物学、医学、药理学及食品科学等领域。食药真菌多糖由于其独特的生理活性，国外研究也是最为深入和广泛。Chihara^[31]等人在 *Nature* 上相继发表香菇多糖和经修饰的茯苓多糖具有明显的抗肿瘤活性，引起了学术界的轰动，从此真菌多糖的研究慢慢成为了生命科学的研究热点。

多糖结构类似于蛋白质，具有复杂多样的结构性质，如单糖组成、分子量、支链度、糖苷键构型、构象、及各糖残基连接顺序等，均能对生物活性功能产生影响，使多糖具有多种不同的生理功能^[32]。大量的研究证明菌物的子实体、菌丝体多糖的降脂降糖、抗氧化和抗癌的生物活性非常明显，且已经有大量的菌物资源被用作药物服务于临床，菌物资源的开发利用逐渐成为药物研究的一个新热点^[13,33,34]。

1.2.1 真菌多糖提取、分离纯化

1.2.1.1 真菌多糖提取及预处理

真菌多糖在提取之前一般先用乙醇进行预处理除去小分子糖类、脂类物质和部分色素。常见提取方法^[35-41]优缺点具体见表 1.2，可以依据不同的情况选取适合的方法，通过优化实验来获得最高的提取效率。研究发现通过复合方法比单一种方法提取多糖提取率高且降低了成本，达到更好的提取效果^[42]。

粗多糖一般含有大量的蛋白质、色素及低聚糖等小分子杂质。其中 Sevag 法脱蛋白在真菌多糖中较为广泛使用即：将氯仿与正丁醇按 4：1 混合后加到粗多糖溶液中，搅拌、离心除去胶凝状蛋白质，作用条件温和，但多糖不易降解，需重复多次才可除

尽蛋白质。色素分为游离色素和结合色素，前者大多呈阴离子状态，可在前期预处理和后续离子交换阶段除去；后者结合色素易被吸附，一般采用氧化法脱色，常用 H_2O_2 脱色。最后，低聚糖等小分子杂质可通过离心和超滤等方法除去^[43]。

表 1.2 不同提取方法的比较

Table 1.2 Comparison of different extraction methods

提取方法	优点	缺点
热水浸提法	设备简单、操作方便、成本低，适合工业上的大规模使用等	提取率低、周期长、产品损失较大等
稀酸或稀碱浸提法	提取时间降低、提高得率等	只适用于酸溶性或碱溶性多糖、破坏多糖结构等
酶法	提取率高、作用条件温和、杂质容易除去等	酶易失活、温度要求高、成本较大等
超声波辅助法	提取时间降低、无其它溶剂干扰、提取率高、不影响生物活性等	成本高、超声时间要求高（过长会使多糖链和化学键断裂）等
微波辅助法	提取时间降低、提取率高、操作简便、有效成分不被破坏等	易使多糖糖苷键断裂、营养成分损失等
超滤法	常温下进行、分离效率高、操作简单方便、不损害生物活性等	预处理工艺难度过高、工艺线路过长、超滤膜易污染等
超临界流体萃取法	保留生物活性、操作简便、防止多糖物质被氧化、无试剂残留、无污染以及低耗等	设备成本高、参数要求严格、化合物分子量影响较大、强极性基团(-OH、-COOH)萃取困难等
高速剪切法	提取时间降低、提取率高、耗能低、无需加热和化学物质处理、操作方便、不影响生物活性等	不适宜提取颗粒细小的原料

1.2.1.2 真菌多糖分离纯化

真菌多糖分子量范围一般较大，它是呈一定分子量分布的中性与酸性多糖的混合物，非糖组分去除之后提取得到的多糖并不均一，可能是不同分子量的混合物，一般

统称粗多糖。因此，为了得到一定分子量范围的均一多糖，还需要进一步分离纯化。常用分离纯化的方法有乙醇分级沉淀、柱层析法和膜分离技术。此外，还可采用季铵盐沉淀法、制备性电泳法和盐析法等。

乙醇分级沉淀主要通过多糖溶液在不同浓度的乙醇溶液中溶解度的不同，梯度醇沉得不同分子量的多糖，一般适用于粗分离。

超滤膜分离技术，利用超滤膜的分子筛作用，在一定的压力下，只可以让一定分子量范围的多糖通过，常用来除杂和分离纯化大分子物质等。Ma^[44]等人通过超滤法从杏鲍菇中分离出两种多糖组分 CPPS-1 和 CPPS-2，并对其进行体外抗氧化和细胞毒性研究，发现多糖 CPPS-1 组分活性最强。但多糖具有一定的黏性，在用膜分离过程中可能会使膜受到污染（膜吸附等）和膜两侧产生浓差极化造成膜通量的下降，使其得率大大降低。

柱层析法是目前多糖分离、纯化最常用的方法之一，主要分为离子交换柱层析^[45,46]和凝胶柱层析^[47]，原理主要为根据各组分在两相中分配系数的不同，在流经填料时反复分配，前者通过多糖在不同浓度洗脱剂的作用下通过吸附和解吸附作用得以分离，常用的离子交换剂有 DEAE-Sephacrose Fast Flow、DEAE-Sephadex、DEAE-cellulose 和 DEAE-Sephacrose；后者根据填料的分子筛作用达到分离，常用的凝胶填料有葡聚糖凝胶（Sephacryl）、系列葡萄糖凝胶（Sephadex）、琼脂糖凝胶（Sephacrose）、聚丙烯酰胺凝胶（Bio-gel）等系列。多糖分离纯化一般是粗多糖先过离子交换柱层析经不同浓度洗脱剂洗脱，再用凝胶柱层析进一步纯化，得到均一多糖组分^[34]。一般分离纯化粗多糖需要根据其化学成分、分子量等性质来选择不同的方法。

1.2.2 真菌多糖纯度及分子量的测定

经柱层析法分离得到的均一多糖组分并不是广义上的“纯多糖”，它是指一定分子量范围的均一多糖组分，分子量为均值。常用纯度检测方法有：（1）高效液相色谱法（HPLC）：多糖处理后经 HPLC 法检测出峰是否为单一的对称峰。若是，则为均一多糖组分；（2）旋光法测定：多糖在分离纯化前后，若旋光度无变化，则视为均一多糖组分；（3）凝胶柱层析法：经离子交换柱层析分离后的多糖根据其分子量范围选择合适的凝胶填料进行洗脱，若洗脱曲线是单一对称峰型，即为均一组分；（4）

超速离心法：多糖经过处理后在密度梯度超速离心场中运动，密度大小相同的颗粒移动相同，形成单一的区带，也即为均一组分；除此之外还有高压电泳等方法。多糖分子量测定有相对分子量测定和绝对分子量测定之分。常见多糖分子量测定一般指相对分子量的测定，测定方法有超速离心法、HPLC 法、膜渗透法、膜分离法及蒸汽压法等。目前较常见的方法是 HPLC 法，它是根据多糖的出峰时间对照已知分子量的葡聚糖标准品的标准曲线得出多糖的相对分子量，具有操作条件温和、快速和重复性好等特点。

1.2.3 真菌多糖的结构鉴定

真菌多糖具有抗肿瘤等多种不同的生理功能，主要归因于多糖本身复杂的结构性性质，当前多糖作为具有重要生物活性成分正在或者已经应用于保健食品或药品中。多糖类似于蛋白质，也具有一级、二级、三级和四级结构，一般常说的初级结构鉴定即为多糖的一级结构鉴定，它是指单糖的组成和比例、糖苷键的连接形式、糖苷键的链接位点、单糖残基的类型、排列顺序、有无支链以及羟基取代情等^[43]。多糖由于其结构的复杂性，一般选择多种方法联用，常见结构鉴定方法有化学分析法、生物学法和仪器分析法三种，通过以上所分析得出多糖的初级结构，再进行多糖高级结构的鉴定。

1.2.3.1 化学分析法

化学分析法常见有水解法、Smith 降解、高碘酸氧化、甲基化分析和刚果红试验等，具体见表 1.3。

表 1.3 化学分析法在结构鉴定中的应用

Table 1.3 Application of chemical analysis method in structural identification	
项目	方法原理
水解法	利用酸或碱等手段将多糖链水解成单糖，再结合层析法、色谱法和仪器分析法等对多糖进行结构分析；
高碘酸氧化	测定高碘酸溶液消耗量和甲酸生成量，由此判断分子中糖苷键所在位置、链接方式、聚合度和支链数目等信息；
Smith 降解	在高碘酸氧化的基础上再进行适当的酸水解，分析水解产物来得到多糖的结构信息；
甲基化分析	单糖残基上的游离羟基全部甲基化后将其水解，根据羟基所在位置结合气质联用判断原来糖基的连接位置；
刚果红试验	在一定 NaOH 浓度范围内，刚果红与三股螺旋链构象的多糖形成络合物，其最大吸收波长同刚果红相比发生红移；而当浓度大于 0.3 mol/L，三股螺旋链解旋成单链，最大吸收波长下降，出现亚稳区，可判断多糖是否为三螺旋链。

1.2.3.2 生物学方法

酶法和免疫学法作为生物学法^[48]，常用于多糖结构鉴定。酶法具有高度专一性、作用条件温和及杂质易除去等特点，在多糖结构分析中发挥着重要作用，常见糖苷酶有 α -糖苷酶和 β -糖苷酶。而免疫学法则根据不同结构的多糖的抑制常数不同来抑制抗原、抗体的特异性结合，通过与已知结构的糖链相比较，分析多糖结构之间的相似性，最终确定未知糖类的部分结构。

1.2.3.3 仪器分析法

多糖因其结构的复杂性，一般仅依靠单一分析方法只能获得相对简单的结构信息，仪器分析法具有灵敏、快速和相对稳定等特点，所以还需利用现代仪器来对多糖的结构进行进一步分析鉴定。常见仪器分析法包括紫外-可见光谱法（UV）、红外光谱法（IR）、气相色谱（GC）、质谱（MS）、气质联用（GC-MS）、核磁共振法（NMR）、扫描电子显微镜（SEM）、原子力显微镜（AFM）、多检测器凝胶渗透色谱（SEC-MALS-RI-Vis）、激光光散射（LLS）及小角度 X-射线散射（SAXS）等。

（1）紫外-可见光谱法（UV）和红外光谱法（IR）

UV 在多糖结构分析中常常用来定性分析，可以根据多糖在 206、260、280 及 620

nm 处有无特征吸收峰来判断多糖中是否含有多糖、核酸、游离蛋白质和色素等；IR 一般也做定性分析，常用来判别多糖特征官能团、糖苷键、糖构型、多糖种类及是否含有糖醛酸等信息。糖环上主要特征峰有：3600-3200 cm^{-1} 处 O-H 强伸缩振动峰；1740-1680 cm^{-1} 处 C=O 伸缩振动峰；1300-1250 cm^{-1} 磷酸基的 P=O 伸缩振动峰；1240 cm^{-1} 磺酸基的 S=O 伸缩振动峰；1200-1000 cm^{-1} 处 C-O-C 非对称振动；1730 cm^{-1} 及 1259 cm^{-1} 为糖醛酸的特征吸收峰；1100-1010 cm^{-1} 若有两个吸收峰为呋喃糖苷，三个则为吡喃糖苷；890 cm^{-1} 和 850 cm^{-1} 处分别为 α -构型和 β -构型多糖等^[49,50]。

（2）气相色谱（GC）、质谱（MS）、气质联用（GC-MS）

气相色谱（GC）主要用于单糖组成、糖苷键位置的确定及连接顺序方面的信息，糖类因其自身挥发性较差，在分析前需对多糖进行柱前衍生化处理，对其衍生物进行 GC 分析；质谱（MS）通过糖键的断裂得出一系列碎片离子，将它们分别聚焦得到质谱图，根据相对强度来推测可能的结构；常用的质谱法有电子轰击质谱（EI-MS）、快原子轰击质谱（FAB-MS）、化学电离质谱（CI-MS）及场解吸电离质谱（FD-MS）等；实验室分析多糖结构常用色谱法与质谱法联用对其进行定性定量分析，比如气相质谱联用（GC-MS）技术，已经广泛用于糖组成及甲基化分析，大大简化了糖结构的解析^[51-52]。

（3）核磁共振法（NMR）

多糖结构解析中常使有一维核磁共振（氢谱 ^1H -NMR、碳谱 ^{13}C -NMR）和二维核磁共振，包括（ ^1H - ^1H COSY 谱、全相关 TOCSY 谱、NOESY 谱、HMQC 谱、HSQC 谱、HMBC 谱）。NMR 分析可以在有或没有结构背景知识下，获得多糖最完全的结构信息，包括糖苷键的构型、糖残基数、构象、各糖残基中 C、H 化学位移归属、各糖残基连接顺序及重复结构中单糖的数目等多种信息。多糖为大分子化合物，分子量较大且结构较为复杂，在经 NMR 分析检测时，样品的浓度最好超过 30 mg/mL，且浓度越高越有利于信息获取，但浓度（黏度）也不宜过大，且具有一定的流动性以使各部分的磁场均匀等^[53-55]。

（4）扫描电子显微镜（SEM）

目前国内外学者对多糖结构研究多集中在初级结构（即一级结构）上，对多糖的高级结构（例如链构象）研究甚少。多糖链构象指多糖分子在溶液中的形态和尺寸（二

级结构的范围)。多糖在溶液的形态主要有无规则线团链、半柔顺性链、螺旋链(单螺旋、双螺旋、三螺旋)和聚集体等,测定的方法主要有光散射法、刚果红实验、示差扫描微量热法、透射电镜、扫描电镜和原子力显微镜等^[56]。扫描电子显微镜(SEM)能够直接观察样品表面的结构,且电子束对样品的损伤与污染程度较小,是研究多糖形貌的有效手段之一,常用来对多糖样品的分子形貌进行研究。

1.3 本课题研究目的、意义及主要研究内容

1.3.1 研究背景、目的及研究意义

鹿茸菇学名荷叶离褶伞(*L. decastes*, LDS),隶属于担子菌纲、伞菌目、口蘑科,离褶伞属,是食药兼用的大型野生优良真菌,含有丰富的营养物质,日本农谚流传:“闻则松茸,味则しめじ(离褶伞)”;在欧洲则被誉为“Fried chicken mushroom”。因酷似名贵的药材鹿茸而得此名,具有很高的营养价值。已有研究表明鹿茸菇子实体作为传统的中药具有抗肿瘤、降血糖、降血脂和抗氧化等一系列重要作用。

现有关于鹿茸菇的多种生物活性研究已被证实与其多糖组分相关,而进一步对鹿茸菇多糖的提取、分离纯化及结构鉴定等性质的系统阐述却鲜少报道。本课题立足于国内外学者对鹿茸菇的基础研究上,主要对鹿茸菇多糖进行提取工艺优化、粗多糖的分离纯化、体外抗氧化活性及纯化后的均一多糖组分结构鉴定等进行了系统研究,以期为促进鹿茸菇多糖在医学、药学和保健食品等多领域的应用及多糖的构效关系深入解析提供一定的理论基础。

1.3.2 研究的主要内容

- (1) 鹿茸菇子实体常规营养成分分析及粗多糖的理化性质研究;
- (2) 鹿茸菇子实体多糖高速剪切提取工艺优化及多糖体外抗氧化活性研究;
- (3) 鹿茸菇子实体粗多糖 LDS60 组分的分离纯化、纯度以及分子量的测定;
- (4) 鹿茸菇子实体均一多糖 LDS60-A 组分结构的初步鉴定。

1.3.3 研究创新点

(1) 国内对鹿茸菇的研究总体上还属于起步阶段，多数集中在鹿茸菇生物学特征、食用价值、人工栽培驯化、营养成分分析及多糖提取制备和药理活性等研究上；而国外则侧重于分子生物学、抗肿瘤活性物质、免疫学等方面研究。国际上整体对鹿茸菇多糖的分离纯化以及结构性质的系统阐述却少有报道；

(2) 现有的对鹿茸菇多糖提取技术一般都是传统办法（水提醇沉），提取方法单一、耗时长、提取率低且损失较大，不能达到工业化生产要求；利用高速剪切提取技术对鹿茸菇多糖进行提取，并且对提取条件进行了工艺优化，大大提高了鹿茸菇多糖的得率；

(3) 利用化学和现代仪器分析等手段系统研究了鹿茸菇多糖的初级结构性质，为多糖高级结构的深入解析和多糖生物活性作用的发挥机制（构效关系），提供了较为系统的理论支持，也对开发和应用多糖类的相关产品具有至关重要的现实意义。

第二章 鹿茸菇子实体营养成分分析及多糖理化性质研究

鹿茸菇，是一种食药兼用的大型野生优良真菌，具有很高的营养价值，已有研究表明鹿茸菇子实体作为传统中药，具有抗肿瘤、降血糖、降血脂和抗氧化等一系列重要作用。

2.1 材料和仪器

2.1.1 实验原料与试剂

实验原料：鹿茸菇子实体 (*Lyophyllum decastes* (Fr.:Fr.) Sing., LDS) 由江苏菇本堂生物科技股份有限公司提供。

主要试剂：间羟基联苯，Sigma 公司；半乳糖醛酸标准品，Aladdin 公司；无水葡萄糖、三氯乙酸 (TCA)、盐酸、浓硫酸、磷酸、酒石酸钾钠、苯酚、无水亚硫酸钠、硫酸钾、95%乙醇、四硼酸钠、氯化钡、氢氧化钠、明胶、3,5-二硝基水杨酸 (DNS)、考马斯亮蓝 G-250 和牛血清白蛋白，国产分析纯。

2.1.2 主要仪器与设备

仪器名称	型号	生产商
电子天平	ME204E	METTLER TOLEDO 公司
半自动凯氏定氮仪	UDK139 型	意大利 VELP 公司
马弗炉	SX2-8-10	上海意丰电炉有限公司
电热恒温水浴锅	DK-S24 型	上海森信实验仪器有限公司
超声波清洗器	DS-7510DTH	上海生析超声仪器有限公司
紫外-可见分光光度计	752N	上海仪电分析仪器有限公司
恒温电热套	TC-15	海宁市华星仪器厂
高速冷冻台式离心机	Bechman Allegra	日本 Hitachi 公司
循环水式多用真空泵	SHB-III	郑州长城科工贸有限公司
旋转蒸发仪	R-1001VN	郑州长城科工贸有限公司
涡旋振荡混合器	QT-2	上海琪特仪器有限公司
真空冷冻干燥机	BTP-3XL	美国 Virtis 公司

2.2 实验方法

2.2.1 鹿茸菇子实体常规营养成分分析

鹿茸菇子实体营养成分分析按如下标准测定：粗蛋白，《GB 5009.5-2016 食品安全国家标准》及《食品分析综合实验指导》中粗蛋白含量的测定；粗脂肪，《GB 5009.6-2016 食品安全国家标准》中脂肪的测定；碳水化合物，《食品营养标签管理规范》；粗纤维，《GB/T 5009.10-2003 植物类食品中粗纤维的测定》；总灰分，《GB 5009.4-2016 食品安全国家标准》中灰分的测定；水分，《GB 5009.3-2016 食品安全国家标准》中水分含量的测定。

2.2.2 鹿茸菇粗多糖的提取

将干燥的鹿茸菇子实体经粉碎机粉碎后加入 4 倍体积的 95%乙醇浸泡过夜以除去其中的小分子糖、部分色素及脂溶性成分。收集滤渣，自然挥干，并回收酒精，即得鹿茸菇子实体脱脂粉末。准确称取鹿茸菇子实体脱脂粉末于烧杯中，每份称取 100 g，采用热水浸提法按照特定的工艺参数，即：液料比 20:1 mL/g，温度 85 °C，提取时间 2.5 h，提取鹿茸菇子实体多糖；离心、过滤去除滤渣，收集上清液；上清液经旋转蒸发仪减压浓缩，最后定容到 100 mL，得鹿茸菇子实体多糖提取液。

2.2.3 鹿茸菇粗多糖含量的测定

一般采用苯酚硫酸法测出总糖含量和 3,5-二硝基水杨酸法（DNS）法测出还原糖含量间接得到多糖含量。苯酚硫酸法^[57]利用多糖或寡糖在浓硫酸的作用下水解成单糖，脱水生成糖醛衍生物最后与苯酚形成橙黄色化合物，在 490 nm 下有最大吸光值；DNS^[58]法在碱性加热条件下，3,5-二硝基水杨酸被还原成红棕色 3-氨基-5 硝基水杨酸，在波长 540 nm 处有最大吸光值。总糖和还原糖含量与吸光值在一定浓度范围内呈线性相关。多糖含量为总糖与还原糖含量的差值。

2.2.3.1 苯酚-硫酸法标准曲线的绘制

取固体无水葡萄糖粉末适量，在 105 °C 烘箱中干燥至恒重。准确称取干燥后无水葡萄糖粉末 50.0 mg，蒸馏水溶解并在 500 mL 容量瓶定容后配制成 0.1 mg/mL 葡萄糖

标准溶液。分别量取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mL 葡萄糖标准溶液于具塞试管中，均加蒸馏水定容至 2.0 mL；然后向每个试管中依次加入 1.0 mL 6% 苯酚溶液和 5.0 mL 浓硫酸溶液，加塞，漩涡振荡器振荡摇匀，沸水浴 15 min 后冷却至室温，490 nm 处测定吸光值；未加葡萄糖标准溶液的试管作为空白对照，葡萄糖含量（mg/mL）为横坐标，吸光值为纵坐标，线性拟合得葡萄糖标准曲线，平行试验三次，取平均值。

2.2.3.2 DNS 法葡萄糖标准曲线的绘制

（1）DNS 试剂的配制：

精确称取 3,5-二硝基水杨酸 10.0 g，600 mL 蒸馏水溶解，向其中逐渐加入 10.0 g NaOH，50 °C 水浴下用玻璃棒充分搅拌溶解，再依次加入 200.0 g 酒石酸钾钠，2.0 g 重蒸苯酚，5.0 g 无水亚硫酸钠，全部溶解澄清后，室温冷却，最后蒸馏水定容到 1000 mL，过滤，棕色试剂瓶保存，暗处放置 7 d 后使用。

（2）DNS 法标曲的配制

取固体无水葡萄糖粉末适量，干燥至恒重。精确称取干燥无水葡萄糖粉末 100.0 mg，蒸馏水溶解到 100 mL 容量瓶中，定容混匀后配制成 1.0 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。分别吸取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mL 葡萄糖标准溶液于具塞试管中，加入 3.0 mL DNS 试剂，漩涡振荡器上振荡混匀后沸水浴 5 min，取出后冷却至室温，再加蒸馏水定容至 25 mL，摇匀后在 540 nm 处测定吸光值；未加葡萄糖标准溶液的试管作为空白对照，以葡萄糖含量（mg/mL）为横坐标，吸光值为纵坐标，线性拟合得葡萄糖标准曲线，平行试验三次，取平均值。

2.2.4 分级醇沉

向 2.2.2 鹿茸菇子实体多糖提取液中缓慢加入 95% 的乙醇，用玻璃棒不断搅拌，直到浓缩液中乙醇浓度达到 30%，静止过夜，次日离心（10000 r/min，10 min）过滤，分离沉淀和上清液 I；接着向上清液 I 中继续缓慢加 95% 的乙醇并不断搅拌至溶液中乙醇浓度达到 60%，静止过夜，次日离心（10000 r/min，10 min），分离沉淀 II 和上清液 II；继续往上清液 II 中缓慢加入 95% 的乙醇并不断搅拌至溶液中乙醇浓度达到

80%，静止过夜，次日离心（10000 r/min，10 min），分离出沉淀 III。分别将三次离心所得沉淀 I、II、III 加水复溶，旋转蒸发去除残留乙醇，重复操作至无明显乙醇气味，冷冻干燥得三个组分的多糖粗提物，分别命名为 LDS30、LDS60 和 LDS80，保存备用。

2.2.5 粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 的理化性质测定

2.2.5.1 多糖含量的测定

（1）鹿茸菇粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 总糖含量的测定

准确称取粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 各 50.0 mg，蒸馏水溶解，250 mL 容量瓶定容，配制成 0.2 mg/mL 的粗多糖溶液备用。

分别量取 0.2 mg/mL 粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 溶液 1.0 mL 于试管中，依次加入蒸馏水 1.0 mL，6% 苯酚溶液 1.0 mL 和浓硫酸溶液 5.0 mL，按照 2.2.3.1 方法处理，490 nm 波长下测吸光值，平行试验三次；用蒸馏水代替粗多糖溶液作为空白对照，根据 2.2.2.1 标准曲线，计算总糖含量。

（2）鹿茸菇粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 还原糖含量的测定

准确称取粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 各 200.0 mg，蒸馏水溶解，25 mL 容量瓶定容，配制成 8.0 mg/mL 的粗多糖溶液备用。

分别量取 LDS30、LDS60 和 LDS80 溶液 1.0 mL 于具塞试管中，各加入 DNS 试剂 3.0 mL，摇匀后沸水浴 5 min，冷却至室温，蒸馏水定容至 25 mL，再摇匀，540 nm 波长处测定吸光值，平行试验三次；相同体积蒸馏水代替粗多糖溶液作为空白对照，根据 2.2.3.2 标准曲线，计算出还原糖含量。

（3）鹿茸菇粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 多糖含量的测定

根据 2.2.3 多糖含量为总糖与还原糖含量差值分别计算出三个粗多糖组分 LDS30、LDS60 和 LDS80 的多糖含量。

2.2.5.2 蛋白质含量^[59]的测定

测定蛋白质含量方法有多种，本章节选用考马斯亮蓝法（Bradford 法）测定鹿茸菇多糖中蛋白质含量。原理为：在酸性溶液中，蛋白质分子上的酰胺基团可与考马斯

亮蓝 G-250 中阴离子进行特异性结合，并在波长 595 nm 处有最大吸光值且溶液颜色由棕黑色变为蓝色，吸光值与蛋白质含量呈线性相关。

(1) 配制考马斯亮蓝显色剂

称取 100.0 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶解于 50 mL 95%乙醇中，混匀加入 100 mL 85% H_3PO_4 ，蒸馏水稀释，并在 1000 mL 容量瓶中定容，摇匀后布氏漏斗过滤，最终试剂中含 0.01% (w/v) G-250，4.7% (w/v) 乙醇，8.5% (w/v) H_3PO_4 。

(2) Bradford 法蛋白质标准曲线的绘制

准确称取纯牛血清白蛋白 10.0 mg，蒸馏水溶解定容到 100 mL 容量瓶，配制成 0.1 mg/mL 标准蛋白溶液。

分别量取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mL 0.1 mg/mL 标准蛋白溶液于试管中，蒸馏水补至 2.0 mL 后加入考马斯亮蓝显色剂 5.0 mL，漩涡振荡器振荡、摇匀，反应 15 min，在 595 nm 处测定吸光值；未加标准蛋白溶液的试管作为空白对照，蛋白质含量 (mg/mL) 为横坐标，吸光值为纵坐标，线性拟合得蛋白质标准曲线。平行试验三次，取平均值。

(3) 鹿茸菇粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 蛋白质含量的测定

准确称取粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 各 200.0 mg，蒸馏水溶解，25 mL 容量瓶定容，配制成 8.0 mg/mL 的粗多糖溶液备用。

分别量取 1.0 mL 粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 溶液于试管中，各加入考马斯亮蓝显色剂 5.0 mL，漩涡振荡器上摇匀，8 min 后在 595 nm 处测定吸光值，平行试验三次；等体积蒸馏水代替粗多糖溶液作为空白对照，根据标准曲线，计算出蛋白质含量。

2.2.5.3 硫酸根含量^[60,61]的测定

含有硫酸基团的糖复合物是一大类重要的生物活性物质，比如糖蛋白、蛋白聚糖以及硫酸酯化多糖，硫酸基的含量与其生物活性功能有着直接关系。硫酸钡-比浊度法通过酸将硫酸基团从糖链上脱掉，硫酸基在氯化钡-明胶溶液中与 Ba^{2+} 特异性结合成悬浮状，360 nm 处测定吸光值与硫酸基含量成线性相关。

(1) 试剂的制备

明胶：称取 1.25 g 明胶加入少量蒸馏水，玻璃棒在 60-70 °C 搅拌溶解，待其完全溶解后 250 mL 容量瓶中定容，4 °C 静置过夜；

氯化钡-明胶溶液：量取 100 mL 明胶溶液，将称取的 0.50 g 氯化钡加入其中，4 °C 保存，若有沉淀则静置 4 h 后离心过滤；

3%三氯乙酸：3%的水溶液；

(2) 硫酸根标准曲线的绘制

精确称取 105 °C 干燥至恒重的固体 K_2SO_4 108.75 mg，用 1.0 mol/L 的 HCl 溶液溶解，100 mL 容量瓶定容，配制成 0.6 mg/mL 硫酸钾标准液备用。

分别量取 0.00、0.04、0.08、0.12、0.16 和 0.20 mL 硫酸钾标准溶液于试管中，1.0 mol/L 盐酸补至 0.2 mL，依次加入三氯乙酸 3.8 mL 和氯化钡-明胶溶液 1.0 mL，漩涡振荡摇匀，静置 25 min 后在 360 nm 波长处测定吸光值 A_1 ，1.0 mL 明胶溶液代替氯化钡-明胶溶液测定吸光值 A_2 ；以 0.2 mL HCl 溶液作空白对照，以硫酸根浓度 (mg/mL) 为横坐标， (A_1-A_2) 为纵坐标，线性拟合得硫酸根标准曲线。平行试验三次，取平均值。

(3) 鹿茸菇粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 硫酸根含量的测定

准确称取粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 各 50.0 mg，蒸馏水溶解，25 mL 容量瓶定容，配制成 2.0 mg/mL 的粗多糖溶液备用。

取 LDS30、LDS60 和 LDS80 多糖溶液各 0.2 mL，按上述方法处理，在 360 nm 处测得吸光值，平行试验三次；根据标准曲线，计算硫酸根含量。

2.2.5.4 糖醛酸含量的测定

通常采用咔唑法^[62]和间羟基联苯法^[63]测定糖醛酸含量，本章节选用间羟基联苯法测定鹿茸菇多糖中糖醛酸含量。

(1) 试剂的制备

四硼酸钠-硫酸溶液的配制：称取 0.478 g 硼砂，用浓硫酸溶于 100 mL 容量瓶并定容，配制成 0.0125 mol/L 四硼酸钠-硫酸溶液备用。

间羟基联苯溶液的配制：准确称取间羟基联苯 0.150 g，用 0.5% 氢氧化钠溶解，在 100 mL 容量瓶中定容，配制成 1.5 mg/mL 间羟基联苯溶液，冰箱中保存一个月使

其反应完全，备用。

(2) 糖醛酸含量标准曲线绘制

准确称取 105 °C 干燥至恒重的半乳糖醛酸粉末 12.5 mg，蒸馏水溶解，250 mL 容量瓶中定容，配制成 50 µg/mL 标准糖醛酸溶液备用。

分别量取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mL 标准糖醛酸溶液于具塞试管中，蒸馏水补至 1.0 mL 后置于冰水浴中预冷，随后加入四硼酸钠-硫酸溶液 5.0 mL，漩涡振荡混匀后再沸水浴 10 min，冷却至室温；再加入间羟基联苯溶液 100 µL，漩涡振荡 5 min，并超声除气泡，静置 1 h 后在 525 nm 处测定吸光值；蒸馏水作空白对照，糖醛酸浓度 (mg/mL) 为横坐标，吸光值为纵坐标，线性拟合得硫酸根标准曲线。平行试验三次，取平均值。

(3) 鹿茸菇粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 糖醛酸含量的测定

准确称取粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 各 50.0 mg，蒸馏水溶解并在 25 mL 容量瓶中定容，配制成 2.0 mg/mL 的粗多糖溶液备用。

量取 LDS30、LDS60 和 LDS80 多糖溶液各 1.0 mL，加入 1.0 mL 蒸馏水，按上述方法处理后在 525 nm 处测吸光值，平行试验三次；根据标准曲线，计算糖醛酸含量。

2.3 结果与讨论

2.3.1 鹿茸菇子实体营养成分分析

由 2.2.1 中各标准测得鹿茸菇子实体中含粗蛋白 22.16%，粗脂肪 2.69%，碳水化合物 49.17%，粗纤维 8.66%，总灰分 8.11%，水分 9.21%，实验结果与文献报道相似，鹿茸菇子实体均表现出蛋白质含量高而脂肪含量低的主要特点。

2.3.2 鹿茸菇粗多糖理化性质分析

2.3.2.1 标准曲线的绘制

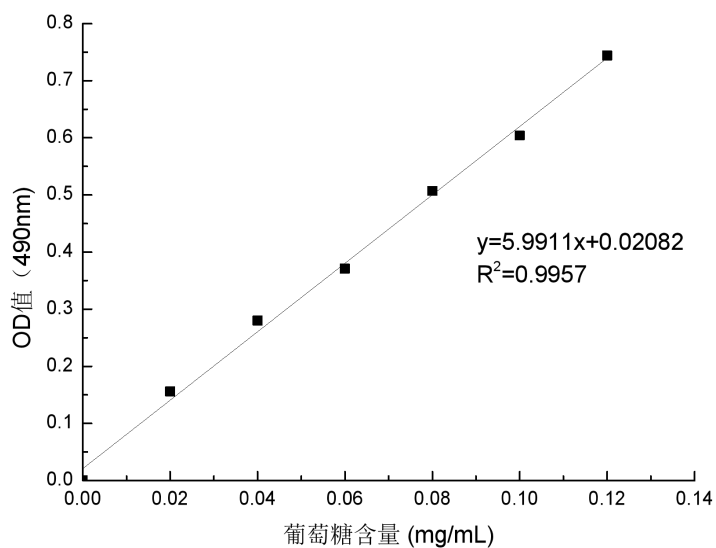


图 2.1 总糖标准曲线

Fig. 2.1 The standard curve of total sugar

如图 2.1 所示，苯酚-硫酸法测得葡萄糖标准曲线线性拟合方程为 $y=5.9911x+0.02082$ ， $R^2=0.9957$ ，其中 x 为葡萄糖含量 (mg/mL)， y 为 490 nm 波长处的吸光值。

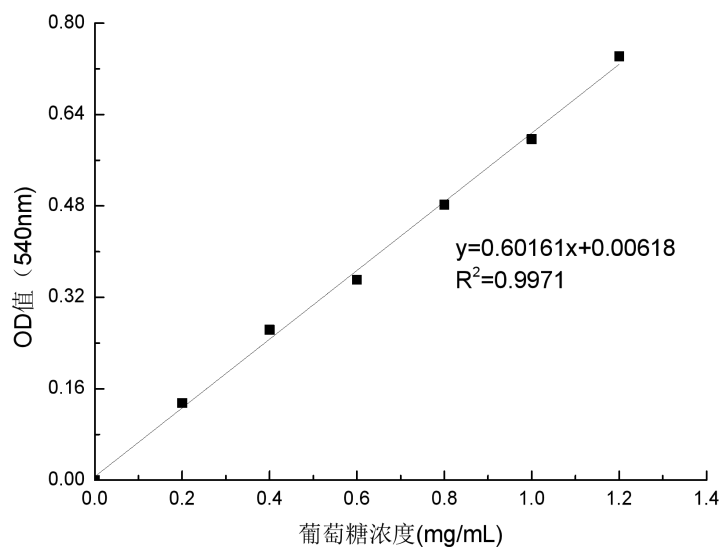


图 2.2 还原糖标准曲线

Fig. 2.2 The standard curve of reducing sugar

如图 2.2 所示，DNS 法测还原糖标准曲线线性拟合方程为 $y=0.60161x+0.00618$ ， $R^2=0.9971$ ，其中 x 为葡萄糖浓度（mg/mL）， y 为 540 nm 波长处的吸光值。

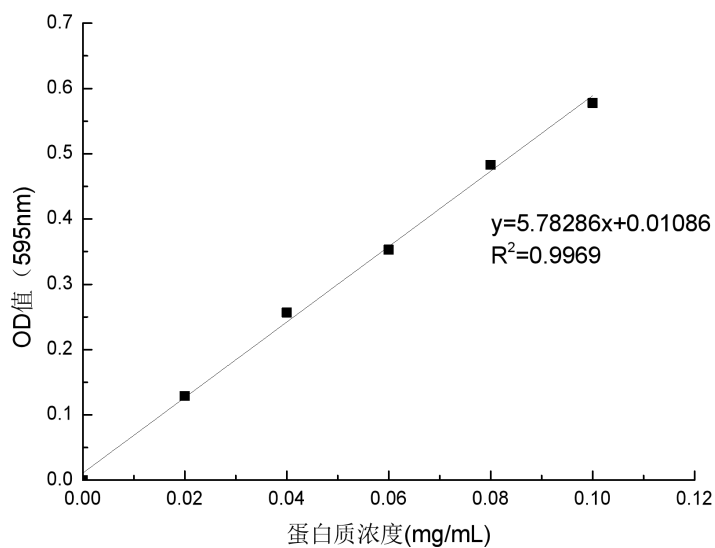


图 2.3 蛋白质标准曲线

Fig. 2.3 The standard curve of protein

如图 2.3 所示，Bradford 法测蛋白标准曲线，得线性拟合方程为 $y=5.78286x+0.01086$ ， $R^2=0.9969$ ，其中 x 为蛋白质浓度（mg/mL）， y 为 595 nm 波长处的吸光值。

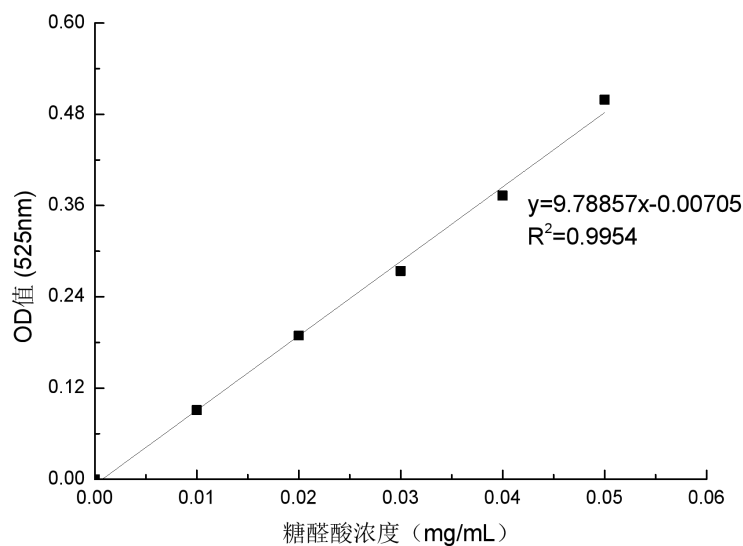


图 2.4 糖醛酸标准曲线

Fig. 2.4 The standard curve of uronic acid

如图 2.4 所示，间羟基联苯法测糖醛酸标准曲线线性拟合方程为 $y=9.78857x-0.00705$ ， $R^2=0.9954$ ，其中 x 为糖醛酸浓度（mg/mL）， y 为 525 nm 波长处的吸光值。

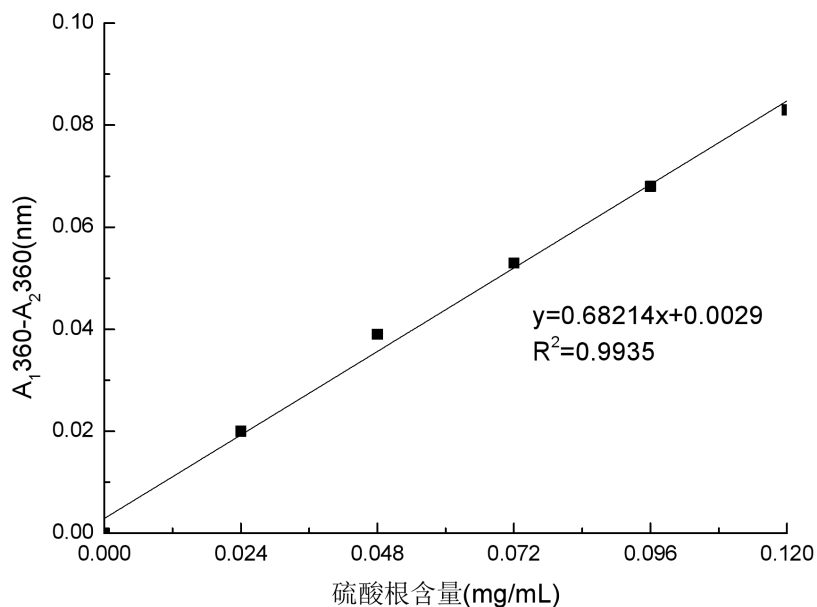


图 2.5 硫酸根标准曲线

Fig. 2.5 The standard curve of SO_4^{2-} content

如图 2.5 所示，硫酸钡-比浊法测得硫酸根标准曲线线性拟合方程为 $y=0.68214x+0.0029$ ， $R^2=0.9935$ ，其中 x 为硫酸根浓度（mg/mL）， y 为 360 nm 波长处的吸光值。

2.3.2.2 理化性质分析

以 100.0 g 脱脂后的鹿茸菇子实体粉末为原料，经热水浸提、分级醇沉后分析可知，LDS60 组分多糖含量最高，为 $44.293 \pm 3.988\%$ ；LDS80 组分次之，为 $31.404 \pm 0.831\%$ ；LDS30 组分含糖量最低，为 $24.299 \pm 1.252\%$ ，其他含量分析具体详见表 2.1。

表 2.1 LDS30、LDS60 和 LDS80 的理化性质分析

Table 2.1 Physical and chemical properties of LDS30,LDS60 and LDS80

项目	LDS 30	LDS 60	LDS 80
产量(g)	2.2517 ± 0.001	1.0041 ± 0.001	1.8674 ± 0.001
得率 (%)	2.252 ± 0.001	1.004 ± 0.001	1.867 ± 0.001
总糖含量 (%)	25.95 ± 1.146	48.58 ± 4.141	33.90 ± 1.011
还原糖含量 (%)	1.651 ± 0.106	4.290 ± 0.175	2.496 ± 0.230
多糖含量 (%)	24.299 ± 1.252	44.293 ± 3.988	31.404 ± 0.831
蛋白含量 (%)	2.194 ± 0.055	2.014 ± 0.025	3.76 ± 0.057
糖醛酸含量 (%)	3.468 ± 0.019	4.262 ± 0.086	2.726 ± 0.125
硫酸根 (%)	0.083 ± 0.075	0.033 ± 0.040	0.083 ± 0.075

2.4 本章小结

食药菌是丰富的营养物质来源,本章节通过对鹿茸菇子实体常规营养成分进行分析,结果表明鹿茸菇子实体中含粗蛋白 22.16%,粗脂肪 2.69%,碳水化合物 49.17%,粗纤维 8.66%,总灰分 8.11%,水分 9.21%,表现出高蛋白低脂肪等特点,与文献报道相似,也与菌菇类食物营养成分大致相同,是一种美味又健康的食物。

鹿茸菇子实体通过热水浸提、乙醇梯度分级沉淀后得到三个粗多糖组分 LDS30、LDS60 和 LDS80,其中 LDS60 组分多糖含量最高,LDS80 组分次之,LDS30 组分含糖量最低,所以初步选用 LDS60 组分进行后续的分离纯化。

第三章 鹿茸菇子实体多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究

高速剪切提取技术，主要通过强烈的气蚀作用、液层摩擦、机械剪切和离心挤压等协同作用，使原料中有效成分能够快速扩散到溶剂中并溶解。与已有的技术相比：传统热水浸提法提取率低、周期长、且产品损失较大；超声辅助提取成本高，对超声时间要求高（过长会使多糖链和化学键断裂）等；高速剪切技术能在短时达到溶解平衡，低耗能、不影响生物活性、无需加热和化学物质处理，操作方便、设备简单，辅助水提醇沉可以显著提高鹿茸菇多糖的得率。

3.1 材料与仪器

3.1.1 实验原料与试剂

原料：鹿茸菇子实体 (*L.decastes*) 由江苏菇本堂生物科技股份有限公司提供。

主要试剂：ABTS、抗坏血酸 (V_C) 和 DPPH，购于 Sigma 公司；过硫酸钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、无水乙醇、铁氰化钾、三氯乙酸 (TCA)、氯化铁 (FeCl₃) 等，国产分析纯。

3.1.2 主要仪器与设备

仪器名称	型号	生产商
中药粉碎机	DJ-04 型	上海淀久仪器公司
高速剪切机	T10 basic ULTRA-TURRAX	德国 IKA 公司
电热恒温水浴锅	DK-S24 型	上海森信实验仪器有限公司
超声波清洗器	DS-7510DTH	上海生析超声仪器有限公司
涡旋振荡混合器	QT-2	上海琪特仪器有限公司
电热鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科学仪器有限公司
紫外-可见分光光度计	752N	上海仪电分析仪器有限公司
旋转蒸发仪	R-1001VN	郑州长城科工贸有限公司
高速冷冻台式离心机	Bechman Allegra	日本 Hitachi 公司

3.2 实验方法

3.2.1 高速剪切提取^[64]鹿茸菇子实体多糖的工艺优化

3.2.1.1 单因素试验

分别考察液料比、转速和剪切时间对鹿茸菇多糖得率的影响。取液料比（10：1、15：1、20：1、25：1、30：1 mL/g）、转速（8000、9500、11500、14500、20500 r/min）、剪切时间（1、2、3、4、5 min）进行单因素实验，试验水平表见表 3.1，各因素进行平行试验三次。

表 3.1 单因素试验水平表

Table 3.1 Single-factor test levels

水平	液料比 (mL/g)	转速 (r/min)	剪切时间 (min)
1	10	8000	1
2	15	9500	2
3	20	11500	3
4	25	14500	4
5	30	20500	5

（1）液料比对多糖得率的影响

分别称取 10.0 g 鹿茸菇子实体粉末，按液料比 10：1、15：1、20：1、25：1 和 30：1 mL/g 依次加入蒸馏水，在室温 30000 r/min 的转速下剪切提取 5 min，提取液离心过滤（10000 r/min，10 min），从上清液中取 1.0 mL 稀释定容至 100 mL，测定粗多糖含量。

（2）转速对多糖得率的影响

分别称取 10.0 g 鹿茸菇子实体粉末，按液料比 20：1 mL/g 加入蒸馏水，分别在室温 8000、9500、11500、14500 和 20500 r/min 的转速下剪切提取 5 min，提取液离心过滤（10000 r/min，10 min），从上清液中取 1.0 mL 稀释定容至 100 mL，测定粗多糖含量。

(3) 剪切时间对多糖得率的影响

分别称取 10.0 g 鹿茸菇子实体粉末，按液料比 20:1 mL/g 加入蒸馏水，按剪切时间 1、2、3、4 和 5 min 在室温 30000 r/min 的转速下剪切提取，提取液离心过滤(10000 r/min, 10 min)，从上清液中取 1.0 mL 稀释定容至 100 mL，测定粗多糖含量。

3.2.1.2 响应面实验

在液料比、转速和剪切时间三个单因素试验的基础上，以多糖得率为响应值，根据 Box-Behnken 响应面分析法对提取鹿茸菇多糖的工艺条件进行优化。

3.2.2 粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 体外抗氧化活性研究

将鹿茸菇粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 分别配成 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mg/mL 溶液待用；

3.2.2.1 鹿茸菇粗多糖 ABTS 自由基清除能力测定^[65]

分别量取 7 mmol/L 的 ABTS 溶液 8.0 mL 与 140 mmol/L 的过硫酸钾溶液 141 μ L，混合后于 4 $^{\circ}$ C 下避光反应 12-16 h，得 ABTS 储备液；用 10 mmol/L pH=7.4 的磷酸盐缓冲液稀释 ABTS 储备液至吸光值 OD=0.70 $\pm$ 0.02，得 ABTS 自由基溶液备用。

分别量取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mg/mL 的 LDS30、LDS60 和 LDS80 溶液 1.0 mL 于试管中，依次加入 ABTS 自由基溶液 3.0 mL，漩涡振荡混匀，30 $^{\circ}$ C 下避光反应 5 min，734 nm 处测定吸光值 A_i ；用 1.0 mL 蒸馏水作空白对照，同条件下测得吸光值 A_0 ；用 3.0 mL 蒸馏水代替 ABTS 自由基溶液作为样品对照组，测吸光值 A_j ， V_c 作为阳性对照。ABTS 自由基清除能力公式如下：

$$\text{ABTS自由基清除率}(\%) = \left[1 - \frac{(A_i - A_j)}{A_0} \right] \times 100\% \quad (\text{式 3.1})$$

3.2.2.2 鹿茸菇粗多糖 DPPH 自由基清除能力测定^[66,67]

DPPH 又称 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼，其无水乙醇溶液呈紫色，在 517 nm 波长下有最大吸收且与浓度呈线性关系。

准确称取 DPPH 粉末 20.0 mg，无水乙醇溶解并定容至 500 mL 容量瓶，配制成 0.1 mmol/L 的 DPPH-无水乙醇溶液备用。

分别量取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mg/mL 的 LDS30、LDS60 和 LDS80 2.0 mL 于试管中，依次加入 0.1 mmol/L 的 DPPH-无水乙醇溶液 1.0 mL，漩涡振荡器充分混匀，在恒温 25 °C 条件下密封避光反应 1 h，517 nm 处测吸光值 A_i ；以相同体积蒸馏水代替 LDS 作空白对照，同等条件下测吸光值 A_0 ；样品对照用相同体积无水乙醇代替 DPPH-无水乙醇溶液，同等条件下测吸光值 A_j ；V_C 作为阳性对照。DPPH 自由基清除能力公式如下：

$$\text{DPPH自由基清除率(\%)} = [1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}] \times 100\% \quad (\text{式 3.2})$$

3.2.2.3 鹿茸菇粗多糖（LDS）还原力的测定^[68,69]

反应混合物的吸光度增加表明多糖还原能力增加，因此，抗氧化活性与某些植物提取物的还原能力之间存在直接关联。

分别量取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mg/mL 的 LDS30、LDS60 和 LDS80 1.0 mL 于试管中，分别加入 0.2 mol/L pH=6.6 的磷酸盐缓冲溶液 1.0 mL 和 1%的铁氰化钾溶液 1.0 mL，漩涡振荡混匀，50 °C 保温反应 20 min 后加入 1.0 mL 10%的 TCA 溶液，冷却，再加入 1.0 mL 0.1% FeCl₃ 溶液，反应 10 min，700 nm 处测定吸光值 A_x ；相同体积蒸馏水代替 LDS 多糖作空白对照，测吸光值 A_0 ；V_C 作为阳性对照。还原力公式如下：

$$\text{还原力} = A_x - A_0 \quad (\text{式 3.3})$$

3.2.2.4 统计学分析

试验均平行三次，使用 OriginPro 8.5.1 软件对数据进行分析，采用 SPSS 17.0 软件实验结果进行统计学分析，以鹿茸菇多糖浓度为横坐标（X），清除率为纵坐标（Y）绘制多糖样品的抗氧化活性线性拟合曲线，计算达到 50%清除率所需的样品溶液最低浓度，得到清除能力的 IC₅₀ 值。

3.3 结果与讨论

3.3.1 高速剪切提取单因素实验

3.3.1.1 液料比对多糖得率的影响

随着液料比增加，多糖得率呈现先上升后下降的趋势，如图 3.1 所示。当液料比为 20:1 时，多糖得率最高；液料比继续增大，多糖得率反而降低，可能因为当液料比增大时，浓度降低，鹿茸菇多糖已基本完全溶出。因此，选用液料比 15:1 mL/g、20:1 mL/g 和 25:1 mL/g 进行后面的响应面分析。

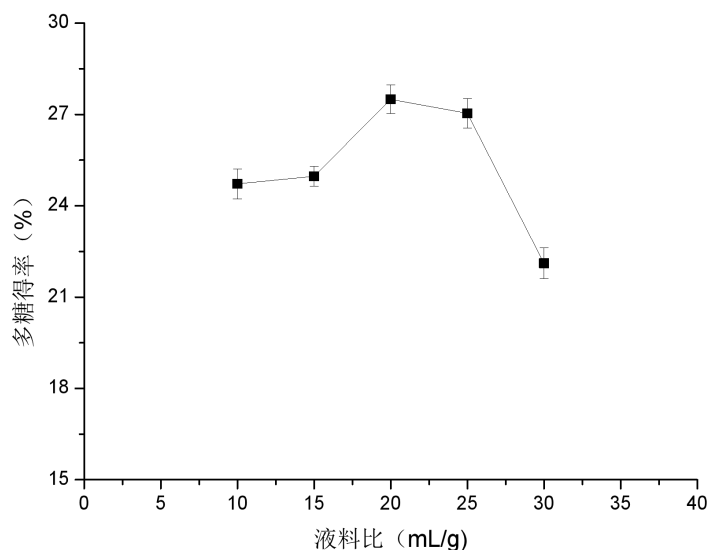


图 3.1 不同液料比对多糖得率的影响

Fig. 3.1 Effect of ratio of water to material on extraction rate of polysaccharides

3.3.1.2 转速对多糖得率的影响

如图 3.2 所示，随着转速的增大，多糖得率逐渐增大，当得率达到最大后趋于稳定并略微呈下降趋势，可能是因为当转速为 11500 r/min 时其剪切力恰好使鹿茸菇子实体完全破壁，转速继续提高 (14500 r/min) 反而破坏了多糖的结构使多糖得率下降。

因此，选用转速 9500 r/min、11500 r/min 和 14500 r/min 进行后面的响应面分析。

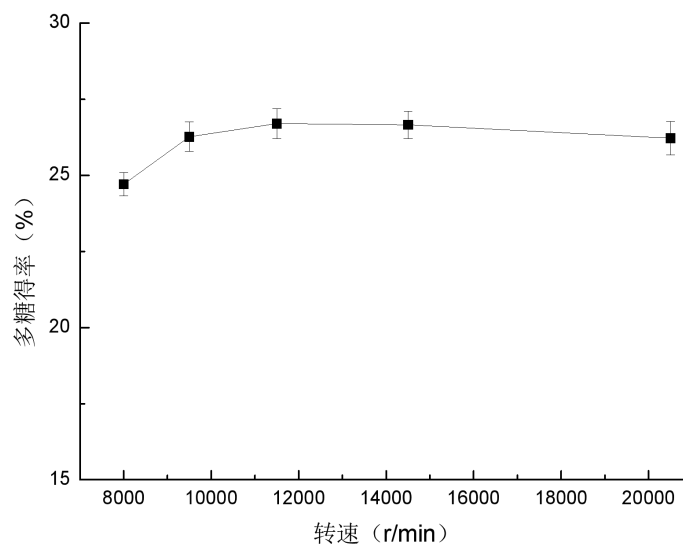


图 3.2 转速对多糖得率的影响

Fig. 3.2 Effect of rotate speed on extraction rate of polysaccharides

3.3.1.3 剪切时间对多糖得率的影响

如图 3.3 所示，多糖得率随剪切时间的延长呈现先上升后下降趋势。在 3 min 时多糖得率达到最大；当剪切时间继续延长到 4 min 和 5 min 时，多糖得率反而大幅下降，猜测可能是鹿茸菇粗多糖的结构在较长时间高速剪切作用下遭到破坏。因此，选用剪切时间 1 min、2 min 和 3 min 进行后续响应面分析。

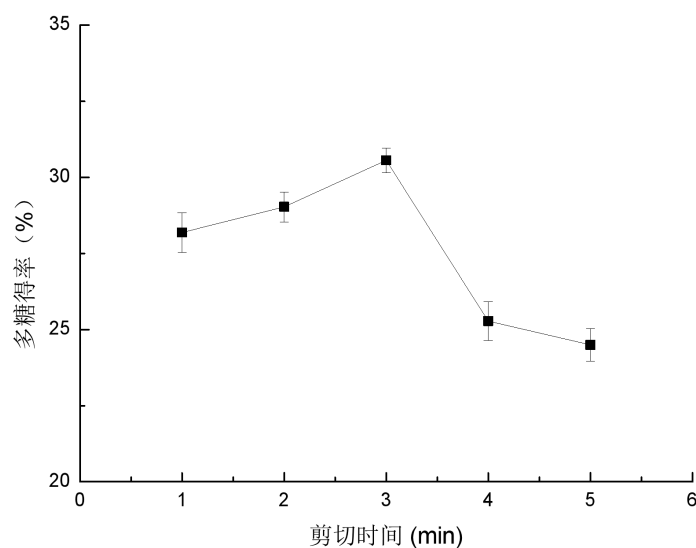


图 3.3 剪切时间对多糖得率的影响

Fig. 3.3 Effect of time on extraction rate of polysaccharides

3.3.2 响应面结果分析

3.3.2.1 单因素选取及响应面结果分析

依据 Design-Expert 的 Box-Behnken (BBD) 中心组合实验设计原理, 结合单因素试验结果, 选取液料比 (15 : 1、20 : 1 和 25 : 1 mL/g)、转速 (9500、11500 和 14500 r/min) 和剪切时间 (1、2 和 3 min) 进行三因素三水平的响应面优化实验, 响应面因素水平见表 3.2。响应面实验共有 17 个试验点, 包括 12 个析因点和 5 个中心点, 每次实验的多糖得率见表 3.3。

表 3.2 响应面分析因素及水平

Table 3.2 The factors and levels of response surface analysis

因素	水平		
	-1	0	1
液料比(A)/(mL/g)	15	20	25
转速(B)/(r/min)	9500	11500	14500
剪切时间(C)/(min)	1	2	3

表 3.3 响应面分析实验方案及结果

Table 3.3 Experimental scheme and results of the Response Analysis

No.	A 液料比 (mL/g)	B 转速 (r/min)	C 剪切时间 (min)	多糖得率 (%)
1	25	11500	3	25.36
2	20	11500	2	26.42
3	20	11500	2	26.57
4	20	9500	3	26.35
5	20	11500	2	26.47
6	15	11500	3	26.22
7	15	14500	2	25.41
8	20	9500	1	26.08
9	15	9500	2	26.31
10	15	11500	1	25.71
11	20	11500	2	26.47
12	25	14500	2	25.62
13	25	9500	2	25.56
14	20	14500	1	25.57
15	25	11500	1	25.34
16	20	11500	2	26.45
17	20	14500	3	25.63

3.3.2.2 回归方程的建立及显著性检验

以多糖得率为响应值,对上述数据进行多元回归分析后拟合得到关于液料比(A)、转速(B)、剪切时间(C)的二次多项式回归模型为:

$Y=26.43-0.20A-0.26B+0.10C+0.25AB-0.12AC-0.056BC-0.50A^2-0.21B^2-0.32C^2$; 对回归方程进行方差分析和显著性检验见表 3.4。

表 3.4 回归方程方差分析及显著性检验

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	3.28	9	0.36	39.12	<0.0001	***
液料比 A	0.30	1	0.30	32.38	0.0007	***
转速 B	0.54	1	0.54	57.52	0.0001	***
剪切时间 C	0.081	1	0.081	8.74	0.0212	*
AB	0.26	1	0.26	27.87	0.0011	**
AC	0.060	1	0.060	6.45	0.0387	*
BC	0.013	1	0.013	1.39	0.2765	
A ²	1.05	1	1.05	113.27	<0.0001	***
B ²	0.16	1	0.16	17.49	0.0041	**
C ²	0.43	1	0.43	45.72	0.0003	***
残差	0.065	7	0.0093			
失拟项	0.052	3	0.017	5.50	0.0666	
纯误差	0.013	4	0.0031			
总变异	3.34	16				
C.V.%	0.37					
R ²	0.9805					
R ² adj	0.9554					
R ² pred	0.7357					

注: ***表示 $p<0.001$ 水平极显著, **表示 $0.001<p<0.01$ 水平显著, *表示 $p<0.05$ 水平显著。

回归模型的 $F=39.12$, $P < 0.0001$, 说明模型极显著; $P=0.0666 > 失拟项 F=0.05$, 说明该模型失拟不显著, 可用回归方程来代替实验对结果进行分析; 决定系数 $R^2=0.9805$, 变异系数 $C.V.\%=0.37$, 说明该模型能够解释实验数据变化中的 98.05%, 仅有 0.37% 的变异系数不能解释, 对实验数据的拟合度较高, 能够很好地反应响应值的变化, 可以用来预测高速剪切提取鹿茸菇多糖得率及最佳提取条件。

方差分析结果表明, 液料比 (A)、转速 (B)、液料比二次项 (A^2)、转速二次项 (B^2)、剪切时间二次项 (C^2) 及液料比和转速交互作用 (AB) 对多糖得率有极其显著影响。同时, 剪切时间 (C)、液料比和剪切时间交互作用 (AC) 对多糖得率也有显著影响。对鹿茸菇多糖得率的影响因素次序为转速 > 液料比 > 剪切时间。

3.3.2.3 响应面交互作用的分析

取液料比、转速、剪切时间三个因素中任一因素，将其固定在零水平，可得另外两个因素的交互影响结果，若等高线图的形状趋近圆形，响应面图越对称，表明因素间的交互作用越不显著，反之显著。各交互因素等高线和响应面图见图 3.4-3.6。

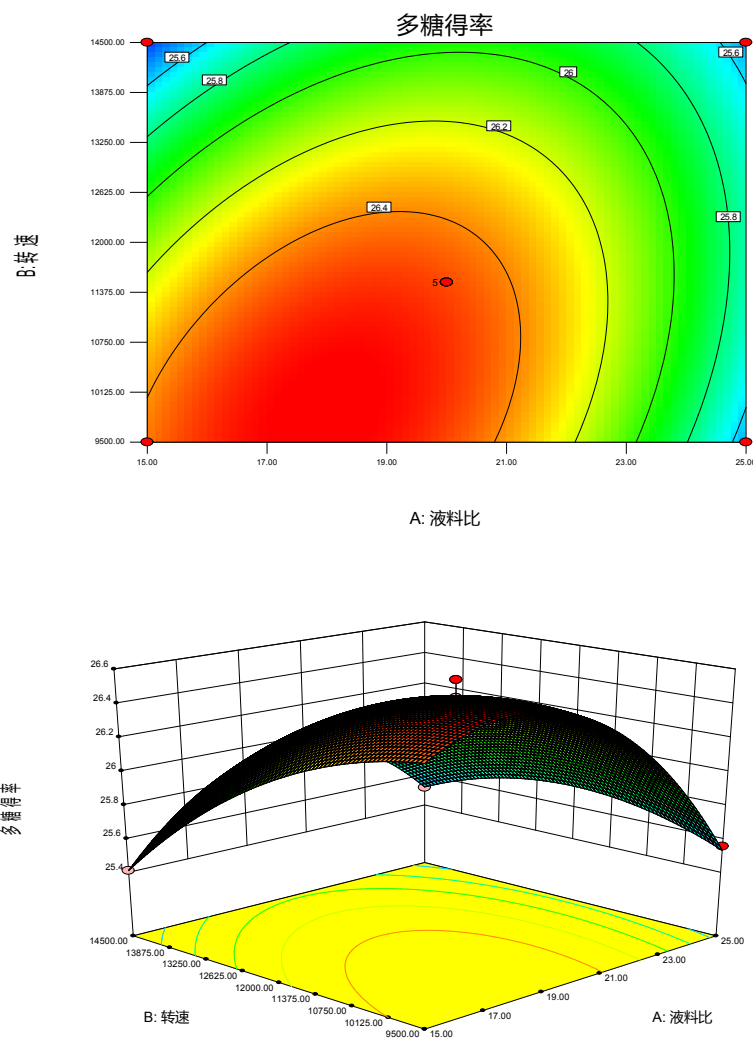


图 3.4 液料比与转速的交互作用

Fig. 3.4 The interaction between ratio of water to material and rotate speed

如图 3.4 所示，液料比与转速的交互作用 P 值为 0.0011 ($0.001 < P < 0.01$)，等高线图趋近椭圆形，响应面图对称性较差，表明两者间交互作用显著。

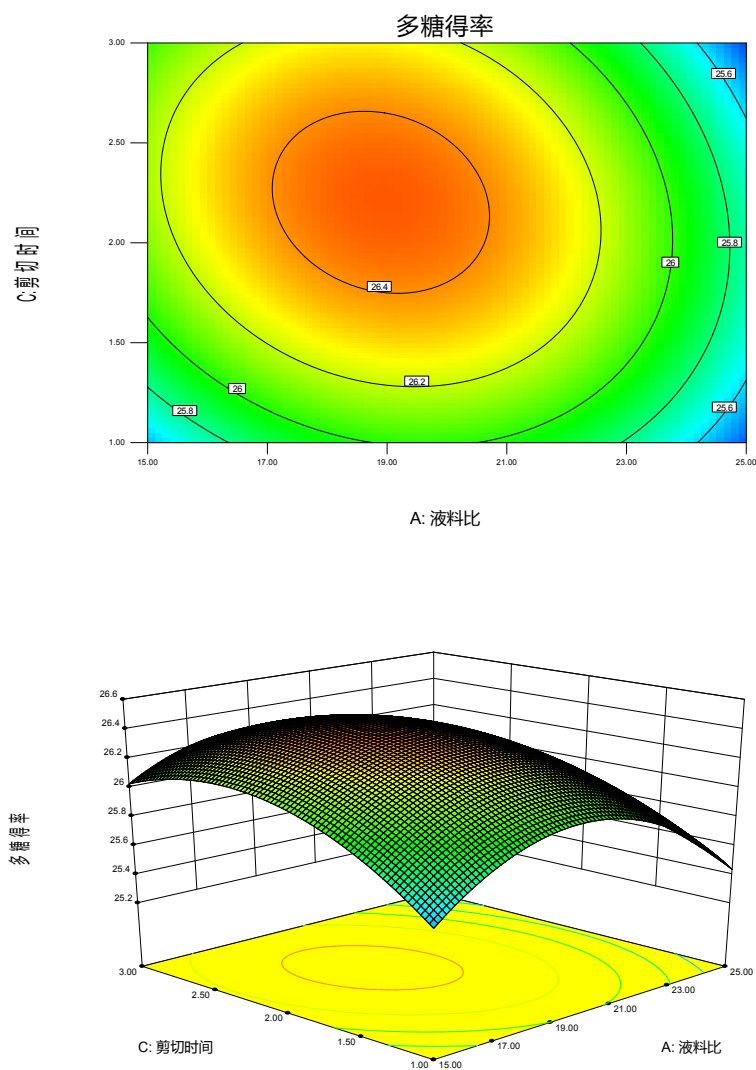


图 3.5 液料比和剪切时间的交互作用

Fig. 3.5 The interaction between ratio of water to material and extraction time

如图 3.5 所示，液料比与剪切时间的交互作用 P 值为 0.0387 ($0.01 < P < 0.05$)，等高线图近似于椭圆形，响应面图对称性较差，表明两者交互作用较显著。

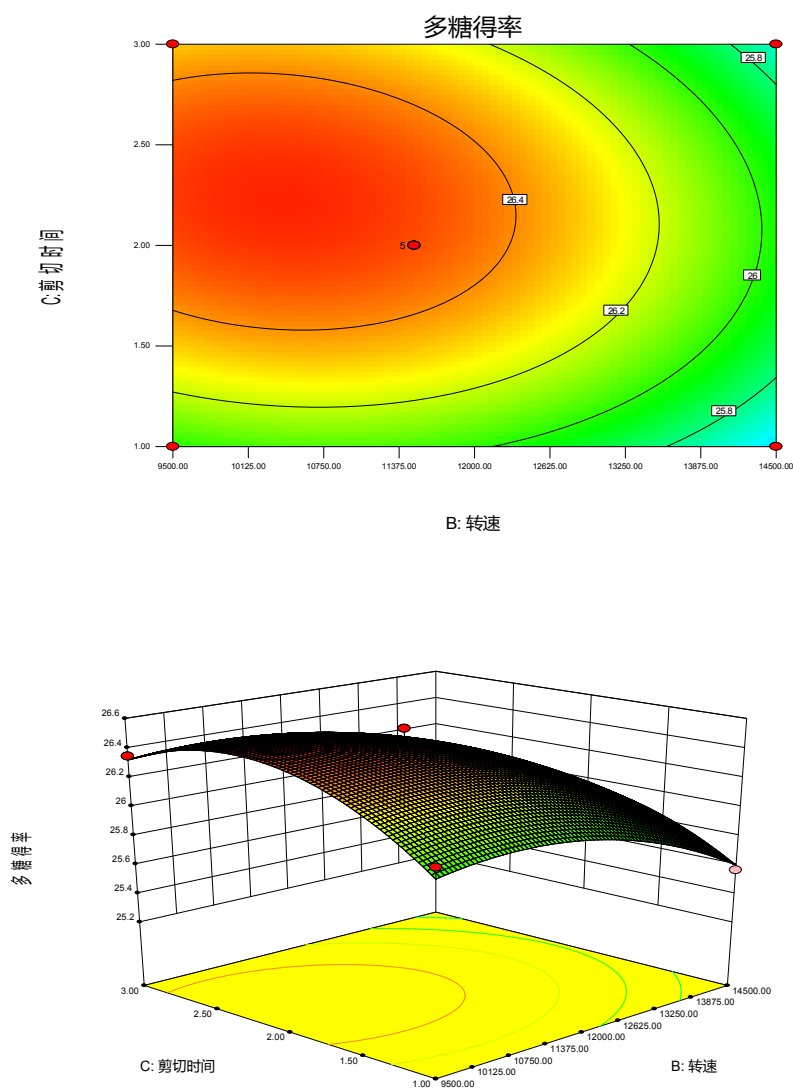


图 3.6 转速和剪切时间的交互作用

Fig. 3.6 The interaction of rotate speed and extraction time

如图 3.6 所示，转速与剪切时间的交互作用 P 值为 0.2765 ($P > 0.05$)，交互作用不显著，表明两者交互作用不强。

3.3.2.4 最佳工艺条件的确定

由 BBD 分析高速剪切提取鹿茸菇多糖的最佳工艺条件为：液料比 17.60 mL/g，转速 9592.62 r/min，剪切时间 2.34 min，此时多糖得率最高为 26.62%，结合实际情

况, 最终确定最佳工艺参数为: 液料比 18 mL/g, 转速 9500 r/min, 剪切时间 2.3 min, 此条件下重复试验 3 次, 多糖得率为 $26.56 \pm 0.015\%$ 。

3.3.3 粗多糖 LDS30、LDS60 和 LDS80 体外抗氧化活性研究

3.3.3.1 ABTS 自由基清除能力的测定

三种鹿茸菇粗多糖组分的 ABTS 自由基清除能力如图 3.7 所示, 表明所有样品均显示出清除效应的浓度-响应曲线。由图可知 ABTS 自由基清除能力的顺序为 $\text{LDS60} > \text{LDS80} > \text{LDS30}$, 且随着浓度的上升清除能力均呈上升趋势; 当浓度为 0.8 mg/mL 时, 三种多糖组分的 ABTS 自由基清除率分别为 $98.8 \pm 0.5075\%$ 、 $99.5 \pm 0.2988\%$ 和 $99.5 \pm 0.1464\%$, 均近似接近 100%, 表明鹿茸菇子实体三种粗多糖组分均具有优异的 ABTS 自由基清除能力; 三种多糖组分对 ABTS 自由基清除能力的 IC_{50} 值分别 0.353 mg/mL、0.147 mg/mL 和 0.244 mg/mL。

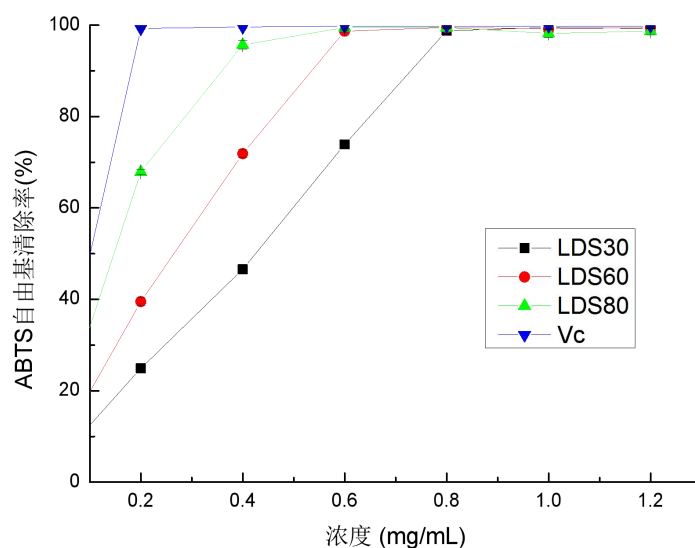


图 3.7 不同浓度下 LDS30、LDS60 和 LDS80 对 ABTS 自由基的清除活性

Fig. 3.7 Scavenging activities of LDSs on ABTS radicals at different concentrations

3.3.3.2 DPPH 自由基清除能力的测定

三种粗多糖组分在不同浓度梯度下的 DPPH 自由基清除能力均随着多糖浓度的升

高而增强,如图 3.8 所示。当 LDS 粗多糖浓度小于 0.6 mg/mL 时, LDS60 和 LDS80 组分多糖的 DPPH 自由基清除能力高于 LDS30; 当 LDS 粗多糖浓度大于 0.6 mg/mL 时, 三种多糖组分清除能力依次为 LDS60、LDS30 和 LDS80; 当浓度为 1.2 mg/mL 时 DPPH 自由基清除能力分别为 $80.0 \pm 0.553\%$ 、 $79.7 \pm 0.777\%$ 和 $77.0 \pm 0.268\%$; 三种多糖组分对 DPPH 自由基清除能力的 IC_{50} 值分别 0.434 mg/mL、0.299 mg/mL 和 0.344 mg/mL。

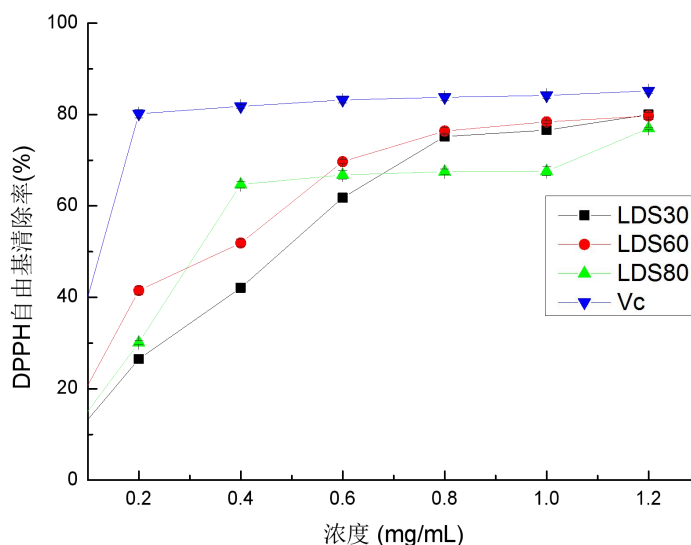


图 3.8 不同浓度下 LDS30、LDS60 和 LDS80 对 DPPH 自由基的清除活性

Fig. 3.8 Scavenging activities of LDSs on DPPH radicals at different concentrations

3.3.3.3 还原力的测定

三种鹿茸菇粗多糖组分的还原力测定结果如图 3.9 所示, 反应混合物的吸光度增加表明多糖还原能力增加。由图可知, 三种粗多糖组分的还原力均随着多糖浓度的增加而增加, 与多糖浓度呈线性相关; 当浓度小于或者大于 0.8 mg/mL, LDS80 和 LDS60 多糖组分显示出几乎相同的还原能力, 而 LDS30 则显示出最低的还原能力; 当浓度为 1.2 mg/mL 时 LDS 还原能力分别为 $0.688 \pm 0.0155\%$ 、 $0.808 \pm 0.0274\%$ 和 $0.914 \pm 0.0248\%$ 。

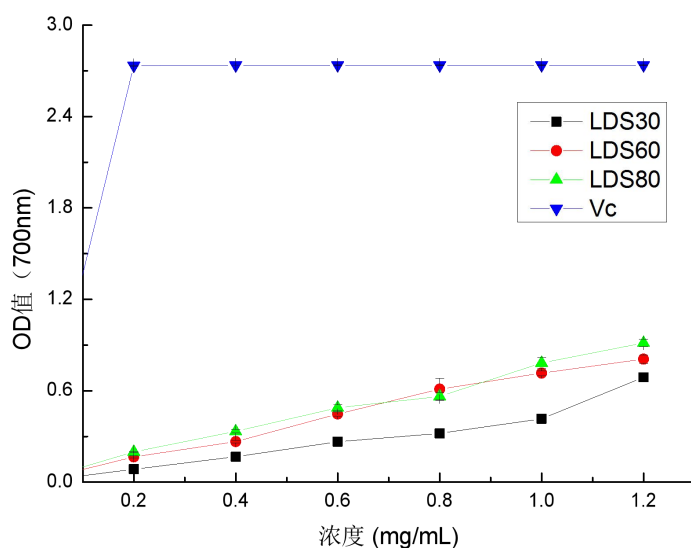


图 3.9 不同浓度下 LDS30、LDS60 和 LDS80 的还原力测定

Fig. 3.9 Determination of reducing power of LDSs at different concentrations

3.4 本章小结

本章节通过高速剪切技术对鹿茸菇子实体多糖提取工艺进行优化，在以液料比、转速、剪切时间为单因素的试验基础上，通过 BBD 响应面根据实际情况分析，最终确定最佳工艺参数为：液料比 18 mL/g，转速 9500 r/min，剪切时间 2.3 min，在此条件下，鹿茸菇子实体多糖实际得率为 26.56%（理论值 26.62%）；方差分析结果可说明建立的模型误差小，回归方程可靠。

鹿茸菇子实体多糖经水提醇沉得到 LDS30、LDS60 和 LDS80 三个鹿茸菇粗多糖组分，分别对其进行体外抗氧化研究。结果表明，三种鹿茸菇粗多糖组分均随着浓度的升高，呈现抗氧化活性增强趋势。其中三种多糖组分对 ABTS 自由基清除能力的 IC_{50} 值分别为 0.353 mg/mL、0.147 mg/mL 和 0.244 mg/mL；对 DPPH 自由基清除能力的 IC_{50} 值分别为 0.434 mg/mL、0.299 mg/mL 和 0.344 mg/mL。综上，三个多糖组分均表现出良好的 ABTS 自由基清除能力、DPPH 自由基清除能力并且都具有一定的还原能力。结合第二章理化性质分析，本论文选择 LDS60 组分进行后续分离纯化及结构鉴定。

第四章 鹿茸菇子实体粗多糖组分 LDS60 的分离纯化

4.1 材料与仪器

4.1.1 实验原料与试剂

实验原料：鹿茸菇子实体粗多糖 LDS60 组分。

主要试剂：DEAE Sepharose Fast Flow 琼脂糖凝胶填料和 Sephacryl S-100、S-500 葡聚糖凝胶填料，购于美国 GE 公司；葡聚糖 Dextran 标准品（5 kDa、12 kDa、50 kDa、80 kDa、150 kDa、270 kDa、670kDa、2000 kDa），购于美国 Sigma 公司；氯化钠（NaCl）、浓硫酸、苯酚和硝酸银等，国产分析纯；葡萄糖，国产优级纯。

4.1.2 主要仪器

仪器名称	型号	生产商
电子天平	ME204E	METTLER TOLEDO 公司
旋转蒸发器	R-1001VN	郑州长城科工贸有限公司
涡旋振荡混合器	QT-2	上海琪特仪器有限公司
真空冷冻干燥机	BTP-3XL	美国 Virtis 公司
高速冷冻台式离心机	Bechman Allegra	日本 Hitachi 公司
DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换柱	XK26 mm×100 cm	美国 GE 公司
Sephacryl S 系列凝胶柱	XK16 mm×100 cm	美国 GE 公司
电脑全自动部分收集器	DBS-100-LCD	上海琪特分析仪器有限公司
数显恒流泵	HL-2B	上海嘉鹏科技有限公司
高效液相色谱仪	Waters 1525	美国 Waters 公司
示差检测器	Waters 2414	美国 Waters 公司
TSKgel 液相色谱柱	G5000	日本 TOSOH 公司
紫外分光光度计	UV-2450PC	日本 Shimadzu 公司
傅立叶变换红外光谱仪	Nicolet 6700	美国 Thermo Nicolet 公司

4.2 实验方法

4.2.1 鹿茸菇子实体均一多糖的制备

4.2.1.1 DEAE Sepharose Fast Flow 弱阴离子交换柱层析

粗多糖 LDS60 组分用蒸馏水溶解，配制成 5.0 mg/mL 的粗多糖溶液备用。取 10.0 mL 粗多糖溶液用 0.45 μ m 水系滤膜过滤，上样经 DEAE Sepharose Fast Flow 弱阴离子交换柱（XK 26 $\times$ 100 cm）层析分离纯化。依次用经过滤（0.45 μ m 滤膜，砂芯过滤装置）的蒸馏水、0.1、0.2 和 0.4 mol/L NaCl 盐溶液进行一个周期的梯度洗脱，电脑全自动部分收集器收集洗脱液，各梯度均收集 100 管，每管收集 3 min，然后用 2.0 mol/L 的 NaCl 盐溶液清洗柱内残余物质，最后用蒸馏水除盐平衡。苯酚-硫酸法检测每管含糖量，以管号为横坐标，吸光值为纵坐标，绘制整个周期梯度的洗脱曲线。将相同梯度组分的洗脱液进行合并。蒸馏水洗脱组分可直接旋转蒸发浓缩，冷冻干燥后直接进行凝胶柱层析纯化；而含糖含盐的组分则需先进行脱盐处理，再进行后续的纯化。

4.2.1.2 凝胶柱层析脱盐

将含糖含盐的组分适当浓缩后用 Sephacryl S 100 HR（XK 16 $\times$ 100 cm）凝胶柱脱盐：取浓缩后的多糖溶液 10.0 mL，过 0.45 μ m 滤膜后直接上样，蒸馏水洗脱，流速为 6 mL/4 min，自动部分收集器收集 50 管。苯酚-硫酸法测定含糖管，2%硝酸银溶液检测含盐管，区分出含糖含盐组分并合并收集重新脱盐，最后收集含糖组分，HPLC 法检测是否为均一多糖。若是，收集并减压浓缩、冷冻干燥；若经脱盐后还不是均一多糖组分，可利用 Sephacryl S 200-500 HR（XK 16 $\times$ 100 cm）凝胶柱进一步分离纯化。对于 Sephacryl S 200-500 HR 填料的选择需先经 HPLC 测定多糖的相对分子量范围，根据其相对分子量大小选择填料的类型，具体 Sephacryl S 系列填料分离范围见表 4.1。称取脱盐后的多糖冻干样，蒸馏水溶解，配成 5.0 mg/mL 的溶液，取过 0.45 μ m 滤膜后的多糖溶液 5.0 mL 进样，蒸馏水洗脱，流速为 8 mL/4 min，自动部分收集器收集 50 管。苯酚-硫酸法测定各管含糖量，以管号为横坐标，吸光值为纵坐标，绘制洗脱曲线，根据洗脱曲线收集并合并相同组分多糖洗脱液，减压浓缩、真空冷冻干燥得均一多糖样品。

表 4.1 Sephacryl S 系列填料分离范围

Table 4.1 Application scope of Sephacryl S

填料类型	S100 HR	S200 HR	S300 HR	S400 HR	S500 HR
分子量 (Da)	$1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$	$1 \times 10^3 \sim 8 \times 10^4$	$2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5$	$1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$	$4 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$

4.2.2 多糖分子量和纯度的测定

多糖是大分子物质，我们通常采用 HPLC 对多糖的纯度及其分子量进行测定，如果 HPLC 谱图为单一对称峰，则可以说明该多糖为均一多糖。本章节采用 HPLC 法对 LDS60-A 进行相对分子量及纯度的测定。

4.2.2.1 高效液相色谱条件

Waters 1525 系统；TSK_{gel} G5000PW_{XL} 色谱柱；示差检测器：Waters 2414，自动进样器：Waters 2707；流动相：超纯水；流速：0.8 mL/min；进样量：1.0 μ L。

4.2.2.2 葡聚糖标准曲线绘制

称取分子量已知的 T-系列 Dextran 葡聚糖标准品（分子量分别：5 kDa、12 kDa、50 kDa、80 kDa、150 kDa、270 kDa、670 kDa、2000 kDa），超纯水溶解，配制成 2.0 mg/mL 的标准品溶液，0.45 μ m 微孔滤膜过滤，超声除气，进样；以保留时间（min）为横坐标，分子量 $\lg MW$ 为纵坐标，线性拟合，绘制葡聚糖标准曲线。

4.2.2.3 纯度鉴定及相对分子量的测定

称取均一多糖 LDS60-A 组分，蒸馏水溶解，配制成 2.0 mg/mL 的溶液，0.45 μ m 微孔滤膜过滤后按照 4.2.2.1 的条件进样。根据 LDS60-A 组分出峰时间对比葡聚糖标准曲线，计算出相对分子量大小。

4.2.3 紫外（UV）全扫描检测

准确称取多糖 DS60-A 组分 3.0 mg，超纯水溶解，配制成 1.0 mg/mL 的溶液，石英比色皿在 200 ~ 400 nm 范围内进行紫外全波段扫描。

4.2.4 红外光谱（IR）检测

取多糖样品 1~2 mg，真空干燥器干燥，溴化钾压片后进行 IR 扫描，扫描范围为 4000-400 cm^{-1} 。

4.3 结果与讨论

4.3.1 鹿茸菇子实体均一多糖的制备

4.3.1.1 DEAE Sepharose Fast Flow 弱阴离子交换柱层析

粗多糖 LDS60 经 DEAE-Sepharose Fast Flow 弱阴离子交换柱层析后分别用蒸馏水、0.1、0.2 和 0.4 mol/L 的 NaCl 溶液梯度洗脱，苯酚-硫酸法逐管测定多糖含量，周期洗脱曲线如图 4.1 所示，可以得出 LDS60 组分经离子交换柱层析后得到 LDS60-0、LDS60-1、LDS60-2 和 LDS60-4 四个组分，分别对应蒸馏水、0.1、0.2 和 0.4 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱，且一个周期梯度洗脱结束后用苯酚-硫酸法测定 2.0 mol/L NaCl 洗脱液，无明显颜色反应，说明粗多糖 LDS60 主要由 LDS60-0、LDS60-1、LDS60-2 和 LDS60-4 四个糖组分构成；其中 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱组分含糖量最高，杂峰少且峰形对称，而其他洗脱液组分糖含量较少有杂峰。综上选择 LDS60-1 糖组分进一步分离纯化。

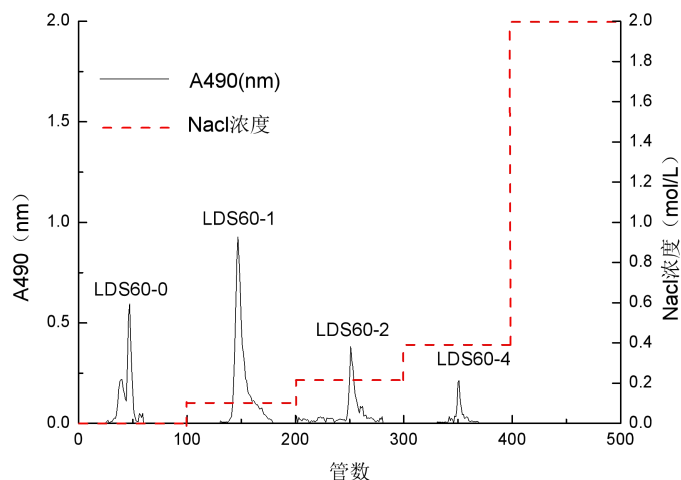


图 4.1 LDS60 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换柱层析洗脱曲线

Fig. 4.1 The elution curve of LDS60 by DEAE-Sepharose F. F. Column Chromatography

4.3.1.2 凝胶柱层析

由 4.3.1.1 知经 DEAE-Sepharose Fast Flow 洗脱得到的 LDS60-1 为盐相洗脱组分，后续分离纯化时需先脱盐，本小节选择 Sephacryl S100 HR 进行脱盐。洗脱液：蒸馏水，苯酚-硫酸法测定含糖管，2%硝酸银溶液检测含盐管，区分出含糖含盐组分，重新脱盐，收集合并只含糖管。LDS60-1 经 S100 HR 脱盐后洗脱曲线及高效液相色谱（HPLC）洗脱曲线如图 4.2 和图 4.3（保留时间 15.892 min 为溶剂峰）所示，由图均可看出 LDS60-1 主要由两种多糖组成，其主要组成多糖（大峰）经 HPLC 估测分子量后参照表 4.1 Sephacryl S 系列，选择 Sephacryl S500 HR 凝胶柱层析继续分离纯化。

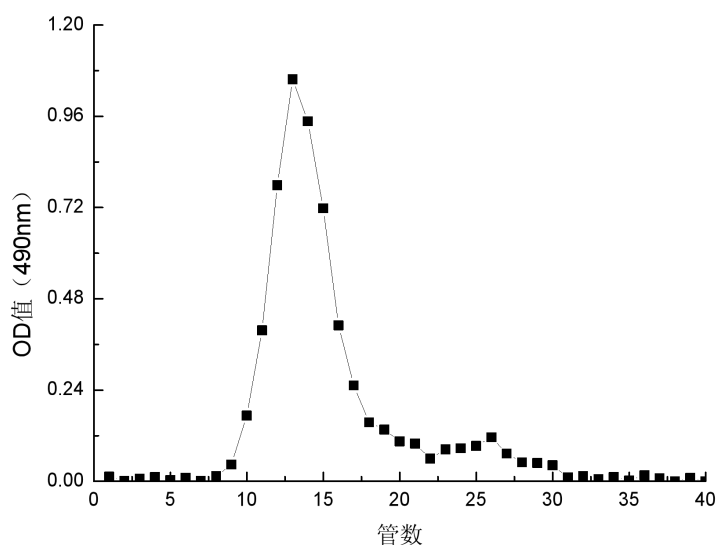


图 4.2 LDS60-1 Sephacryl S-100 凝胶柱洗脱曲线

Fig. 4.2 The elution curve of LDS60-1 by Sephacryl S-100 Column Chromatography

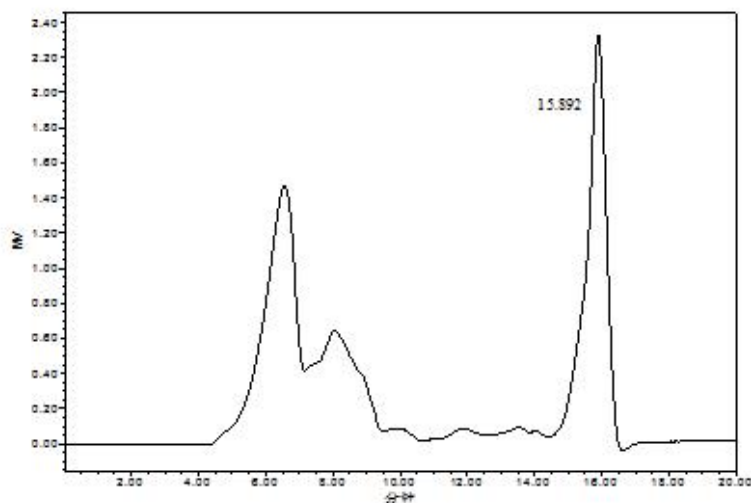


图 4.3 LDS60-1 高效液相色谱图

Fig. 4.3 Elution curve of LDS60-1 by HPLC

LDS60-1 经 S500 HR 凝胶柱层析洗脱曲线如图 4.4 所示,由图看出 S-500 凝胶柱纯化效果良好,在 17-22 管之间有单一对称峰且含量较高,收集该组分并命名为 LDS60-A。

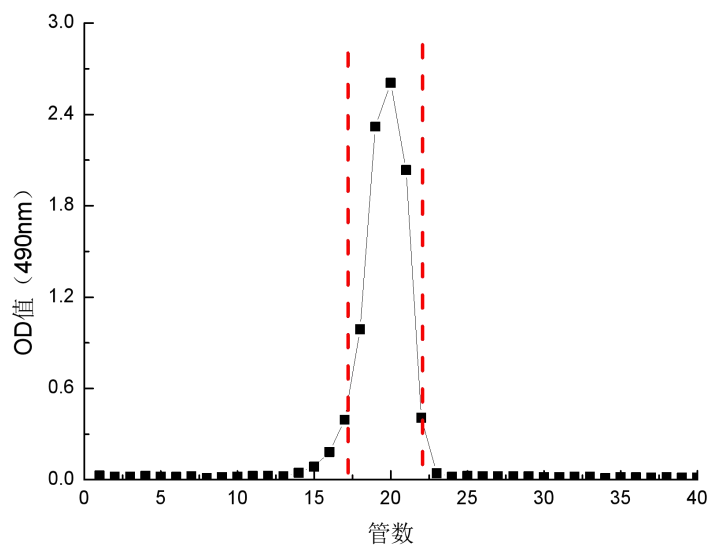


图 4.4 LDS60-1Sephacryl S-500 凝胶柱洗脱曲线

Fig. 4.4 The elution curve of LDS60-1 by Sephacryl S-500 Column Chromatography

4.3.2 多糖纯度鉴定及分子量测定

4.3.2.1 葡聚糖标准曲线的绘制

葡聚糖分子量标准曲线如图 4.5 所示，线性拟合方程为 $y=9.84759-0.47736x$ ，拟合度 $R^2 = 0.9947$ 。

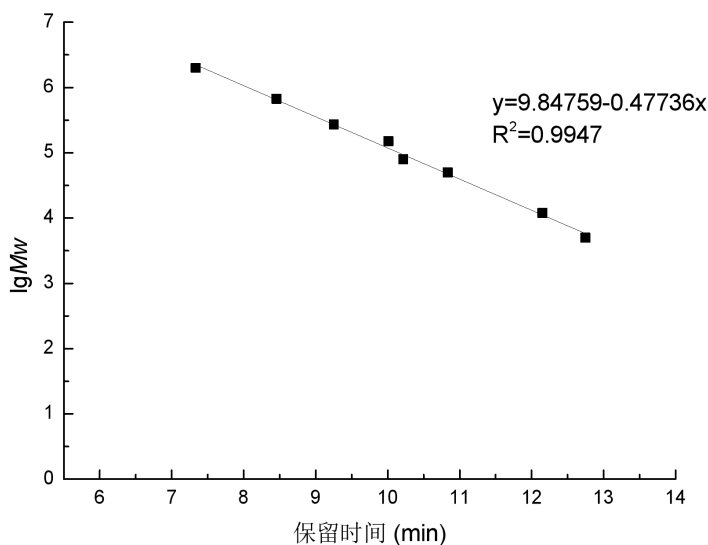


图 4.5 葡聚糖标准品分子量标准曲线

Fig. 4.5 Standard curve of molecular weight of dextran series

4.3.2.2 多糖 LDS60-A 组分纯度及分子量测定

LDS60-A 在 HPLC 色谱柱 TSK Gel G5000PW_{XL} 洗脱谱图呈单一对称峰，得出 LDS60-A 为均一多糖；根据 LDS60-A 出峰时间 $t=6.472$ min 带入标准曲线计算得分子量为 5.729×10^6 Da。

4.3.3 UV 全扫描分析

LDS60-A 多糖溶液的紫外-全扫描如图 4.6 所示，LDS60-A 在 260 nm 处没有吸收峰说明不含核酸，为单纯多糖组分；在 280 nm 处没有明显的吸收峰说明 LDS60-A 不含蛋白质或多肽；而在 206 nm 处的吸收峰一般为多糖吸收峰^[43]。

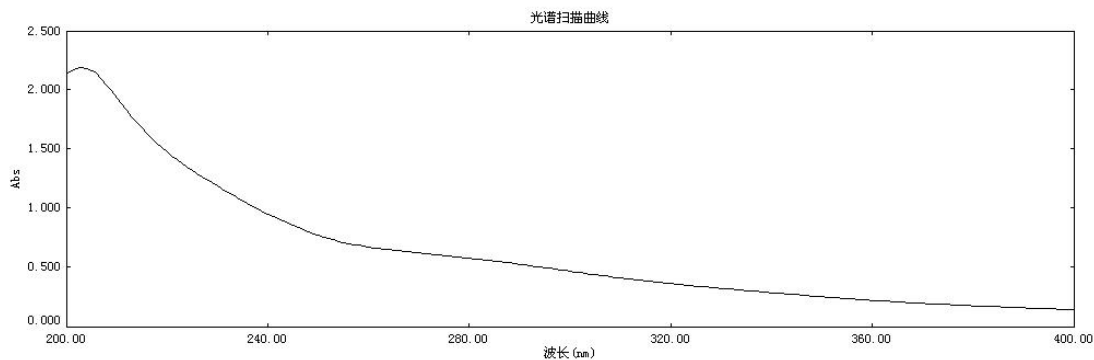


图 4.6 LDS60-A 紫外全扫描光谱图

Fig. 4.6 UV scanning curve of LDS60-A

4.3.4 IR 分析

LDS60-A 多糖经傅里叶变换红外光谱仪扫描谱图如图 4.7 所示：LDS60-A 在 3422.61 cm^{-1} 处有一个很强的 -OH 基团伸缩振动吸收峰； 2924.62 cm^{-1} 处有一个较弱的 C-H 基团的伸缩振动吸收峰^[70]； 1641.04 cm^{-1} 的吸收峰为多糖水合的振动吸收峰^[71]； 1416.24 cm^{-1} 和 1373.32 cm^{-1} 分别为 C-H 基团的弯曲振动和变角振动；在 1730.00 cm^{-1} 和 1259.00 cm^{-1} 左右，无明显吸收峰，表明不含糖醛酸和羰基，初步推断为中性多糖；在 913.55 cm^{-1} 处有一吸收峰，推断为 β -构型多糖^[50,52]。

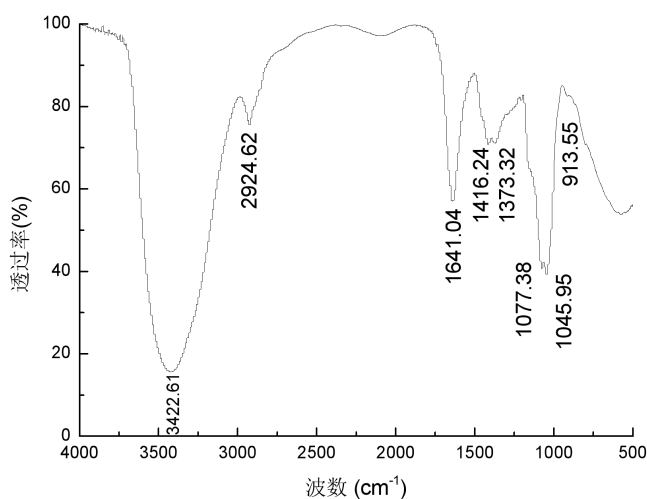


图 4.7 LDS60-A 红外光谱图

Fig. 4.7 IR spectrum of LDS60-A

4.4 本章小结

本章节首先对粗多糖 LDS60 组分经 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换柱层析和 Sephacryl S-500 HR 凝胶柱层析分离纯化，得到均一多糖 LDS60-A 组分；再通过 UV 全扫描定性分析其不含核酸和蛋白质，符合多糖特征；HPLC 测定其相对分子量为 5.729×10^6 Da；IR 显示 LDS60-A 不含糖醛酸和羰基，为 β -构型中性多糖。

第五章 鹿茸菇均一多糖 LDS60-A 结构的初步鉴定

5.1 材料与试剂

5.1.1 实验原料与试剂

实验原料：LDS60-A 均一多糖。

主要试剂：单糖标准品（L-Rhamnos、L-Fucose、L-Arabinose、D-Xylose、D-Mannose、D-Glucose、D-Galactose），德国 Sigma 公司；硼氢化钠（NaBH₄）、氘代重水和色谱级碘甲烷（CH₃I）、二甲基亚砷（DMSO），美国 Sigma 公司；三氟乙酸（TFA），德国 Merck 公司；冰醋酸、甲醇、醋酐、甲苯、氯仿、氢氧化钠（NaOH）和 88%甲酸等试剂，国产分析纯。

5.1.2 主要仪器

仪器名称	型号	生产商
电子天平	ME204E	METTLER TOLEDO 公司
涡旋振荡混合器	QT-2	上海琪特仪器有限公司
旋转蒸发器	R-1001VN	郑州长城科工贸有限公司
电热鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科学仪器有限公司
气相色谱-质谱联用仪	Thermo ISQ 单四级杆	Thermo 公司
高速冷冻台式离心机	Bechman Allegra	日本 Hitachi 公司
傅立叶变换红外光谱仪	Nicolet 6700	美国 Thermo Nicolet 公司
核磁共振波谱仪	AVANCE III	瑞士 Bruker 公司
台式扫描电子显微镜	VEGA3 SBH	捷克 Tescan 公司

5.2 实验方法

5.2.1 单糖组成分析^[72,73]

5.2.1.1 单糖标准品乙酰化分析

精确称取等摩尔浓度（2 mmol/L）的单糖（L-Rha、L-Fuc、L-Ara、D-Xyl、D-Man、

D-Glu 和 D-Gal) 标准品置于梨形瓶中, 分别用 3 mL 蒸馏水溶解, 配制成单糖单标溶液; 同上, 精确称取等摩尔浓度 (2 mmol/L) 的单糖 (L-Rha、L-Fuc、L-Ara、D-Xyl、D-Man、D-Glu 和 D-Gal) 标准品混合置于梨形瓶中, 用 3 mL 蒸馏水溶解, 配制成单糖混标溶液。

向单糖单标和混标溶液中分别加入 20-30 mg 硼氢化钠 (NaBH_4), 密封混匀, 室温下旋涡振荡器间歇振荡 3 h; 反应结束后, 向反应液中加适量冰醋酸 (中和过量的 NaBH_4), 直至其不再产生气泡 (控制 pH 在 4-5); 再向反应液中加入 3 mL 甲醇, 减压旋干, 重复操作 5 次 (去除反应副产物硼酸及水分); 最后将残留物真空干燥过夜。

次日, 先将梨形瓶置于 110 °C 烘箱中 15 min (去除残留水分), 加入 4 mL 醋酐, 继续 100 °C 反应 1 h; 冷却至室温, 加入 3 mL 甲苯, 减压旋干, 重复操作 5 次 (去除多余醋酐); 随后加 3 mL 氯仿溶解乙酰化产物, 再加入相同体积蒸馏水振荡, 静置分层, 除去上层水溶液, 重复操作 5 次; 最后向氯仿层中加入略过量的无水硫酸钠 (去除残留水分), 氯仿层定容至 10 mL, 0.45 μm 有机膜过滤, 待 GC-MS 分析。

5.2.1.2 样品乙酰化分析

准确称取多糖 LDS60-A 组分 2.0 mg 于梨形瓶中, 加入 2 mol/L TFA 溶液 6 mL, 密封摇匀, 110 °C 下水解 2 h; 冷却至室温, 水解液减压旋干, 为除去多余的 TFA, 再加入 3 mL 甲醇, 减压旋干, 此操作重复 5 次; 然后同单糖标准品乙酰化处理, 最后氯仿层定容至 5 mL, 0.45 μm 有机膜过滤, 待 GC-MS 分析。

5.2.1.3 GC-MS 分析

色谱条件: 乙酰化后的产物用 Thermo Trace 1300/ISQ GC-MS 色谱仪进行分析, 配备 TG-5MS 石英毛细管柱 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm);

升温程序: 柱初始温度: 120 °C, 保持 1 min; 以 10 °C/min 的速率升温至 165 °C 并保持 1 min; 接着以 1 °C/min 的速率升温至 169 °C, 保持 0.5 min; 再以 10 °C/min 的速率升温至 196 °C, 保持 0.5 min; 再接着以 1 °C/min 的速率升温至 200 °C, 保持 1 min; 最后以 10 °C/min 的速率升温至 240 °C, 保持 5 min。进样口和检测器的温度: 250 °C; 载气: 氮气; 流速: 1.0 mL/min, 进样量: 1.0 μL 。

单糖组成分析：根据单糖混标定性分析单标在 GC-MS 中的出峰顺序；单糖混标重复试验 6 次，计算相对标准偏差 RSD_1 ，平行试验 6 次，计算相对标准偏差 RSD_2 。根据面积归一法计算各单糖组分峰面积百分含量，建立单糖相对于仪器的响应因子，利用样品单糖组分峰面积百分比与响应因子可计算出样品中各单糖组分的摩尔比。

5.2.2 甲基化分析

5.2.2.1 NaOH-DMSO 试剂的制备

0.5 g 氢氧化钠溶于 1.0 mL 蒸馏水中，从中取 0.2 mL 与 0.2 mL 甲醇混匀后，加入 6 mL 二甲基亚砷（DMSO）配成 NaOH-DMSO 悬浮液，漩涡振荡器振荡、混匀，超声水浴 5 min，离心（1000 r/min，10 min）收集 NaOH 沉淀。从配成 NaOH-DMSO 悬浮液开始重复后续操作三次，最后用 4 mL DMSO 溶解 NaOH 沉淀，待用。

5.2.2.2 LDS60-A 样品甲基化^[56,74]

准确称取多糖 LDS60-A 组分 3.0 mg 于梨形瓶中，加入 0.5 mL DMSO，超声水浴 7 min 加速溶解，室温静置 0.5 h；加入 0.6 mL NaOH-DMSO 悬浮液和 0.6 mL 碘甲烷，密封，超声波与漩涡振荡交替操作 7 min；再加入 4 mL 蒸馏水终止甲基化反应。用等体积氯仿萃取甲基化的多糖，振荡、静置分层，除去水层，重复萃取操作 5 次；有机相在 40 °C 下减压旋干。

为使多糖甲基化完全，甲基化操作重复 3 次：DMSO 0.3 mL，NaOH-DMSO 0.3 mL，碘甲烷 0.3 mL，蒸馏水 3 mL，IR 检验多糖在 3600-3200 cm^{-1} 范围内的羟基伸缩振动峰是否消失来判断甲基化是否完全。

IR 检测甲基化完全后，向多糖样品中加入 3 mL 88% 甲酸溶液溶解密封，置于 100 °C 下解聚反应 3 h，冷却后向其中加入 3 mL 甲醇溶液，40 °C 减压旋干，重复操作以去除过量的甲酸；向反应的糖样中加入 4 mL 2 mol/L TFA 溶液后密封，100 °C 下进一步水解 6 h，冷却后加入 3 mL 甲醇，40 °C 减压旋干，重复操作至完全去除过量的 TFA；用 3 mL 蒸馏水溶解旋干后的糖样（PMAA），按照 5.2.1.1 单糖乙酰化的方法进行乙酰化处理，最后氯仿定容至 5 mL，0.45 μm 有机膜过滤，待 GC-MS 分析。

5.2.2.3 气相-质谱 (GC-MS) 联用分析

色谱条件: 5.2.2.2 中得到的样品 (PMAAs) 用 Trace 1300/ISQ, Thermo Fisher USA GC-MS 色谱仪进行分析, 配备 TG-5MS 石英毛细管柱 ($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$);

升温程序: 柱初始温度: $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 保持 0.5 min ; $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 $240\text{ }^{\circ}\text{C}$, 保持 6.5 min ; 进样口和检测器的温度: $250\text{ }^{\circ}\text{C}$; 载气: 氦气; 流速: $1.0\text{ mL}/\text{min}$, 进样量: $1.0\text{ }\mu\text{L}$; 质量扫描范围: $40\sim 500\text{ amu}$; 扫描时间: 0.28 s 。

5.2.3 核磁 (NMR) 分析^[53,54,75]

称取干燥的均一多糖 LDS60-A 30 mg , 0.5 mL 重水 D_2O (99.9%) 溶解并反复冻干 3 次, 最后一次将 LDS60-A 充分溶解于 0.5 mL D_2O 中, 转移至 5 mm 核磁管中, 600 MHz 核磁共振仪测定, ^1H NMR ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) 以 HDO $\delta\ 4.78$ 为内标, ^{13}C NMR 以 $\text{D}_2\text{O}+\text{DSS}$ (饱和三甲基硅丙烷磺酸钠的重水溶液) $\delta=0.00\text{ ppm}$ 为外标。

分别对常温下 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、DEPT-135、 ^1H - ^1H 相关谱 (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H correlated spectroscopy)、全相关谱 (TOCSY, total correlation spectroscopy)、异核多量子相关谱 (HMQC, heteronuclear multiple quantum coherence)、异核多键相关谱 (HMBC, heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy) 和 NOESY 谱 (Overhauser effect spectroscopy) 进行测定。

5.2.4 扫描电子显微镜 (SEM) 分析^[76,77]

取适量经真空干燥后的 LDS60-A 固体粉末, 粘在样品台上, 吸耳球吹扫未粘附的样品, 置于真空喷镀仪内喷金 ($2\sim 3\text{ nm}$), 加速电压 5 KV , 进行 SEM 观察。

5.3 结果与讨论

5.3.1 单糖组成分析

5.3.1.1 单糖标准品乙酰化结果

根据单糖单标对照图 5.1 混标 GC-MS 结果可知, 单糖出峰顺序依次为 L-鼠李糖、L-岩藻糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖, 各单糖具体出峰

时间、面积百分含量和相对标准偏差见表 5.1, 由表知每种单糖 RSD_1 和 RSD_2 均小于 5%, 说明采用的乙酰化方法和仪器条件均适用于单糖组成定性和定量的分析。

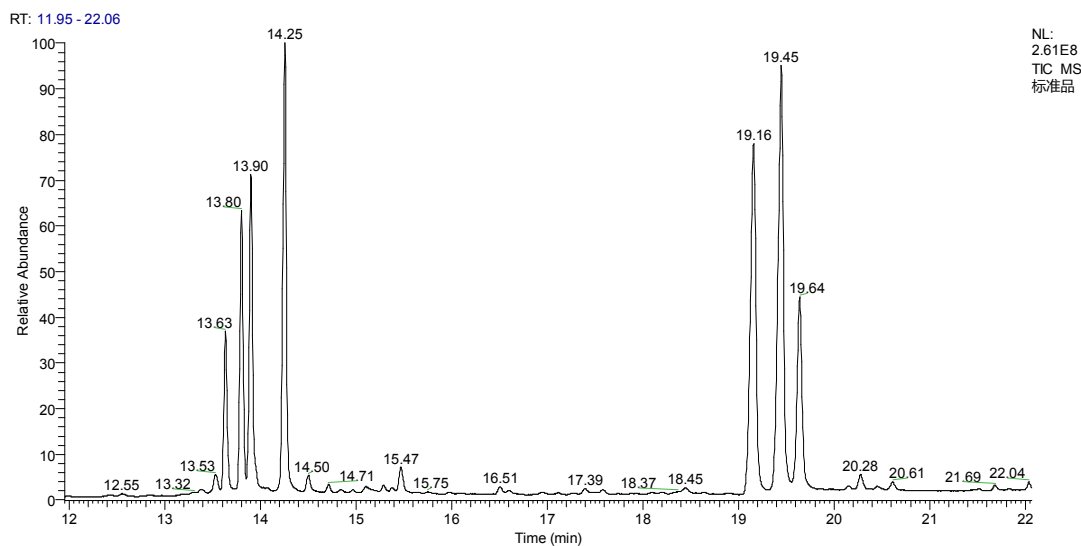


图 5.1 混合标准品乙酰化衍生物的气相色谱-质谱图

Fig. 5.1 GC-MS of acetyl derivatives of mixed standard monosaccharides

表 5.1 单糖标准品 GC-MS 分析结果

Table 5.1 The GC-MS results of monosaccharides standards

标准品	保留时间 (min)	RSD_1 (%)	RSD_2 (%)	平均含量 (%)	响应因子
L-鼠李糖	13.63	0.09	2.07	5.86	0.52
L-岩藻糖	13.80	0.08	2.76	9.41	0.84
L-阿拉伯糖	13.90	0.11	1.04	11.23	1.00
D-木糖	14.25	0.14	2.94	17.64	1.57
D-甘露糖	19.16	0.14	3.34	21.97	1.96
D-葡萄糖	19.45	0.09	1.82	23.93	2.13
D-半乳糖	19.64	0.17	2.28	9.96	0.88

5.3.1.2 样品乙酰化结果分析

LDS60-A 经乙酰化处理后的谱图如图 5.2 所示。由图 5.2 对照图 5.1 可知, LDS60-A 主要由 D-葡萄糖和 D-半乳糖组成, 并含有少量 L-岩藻糖、L-阿拉伯糖、D-木糖和 D-甘露糖, 根据表 5.2 中峰面积平均百分含量和相对于仪器的响应因子(表 5.1)得出其摩尔比为 1.56 : 1.00 : 0.28 : 0.12 : 0.18 : 0.28。

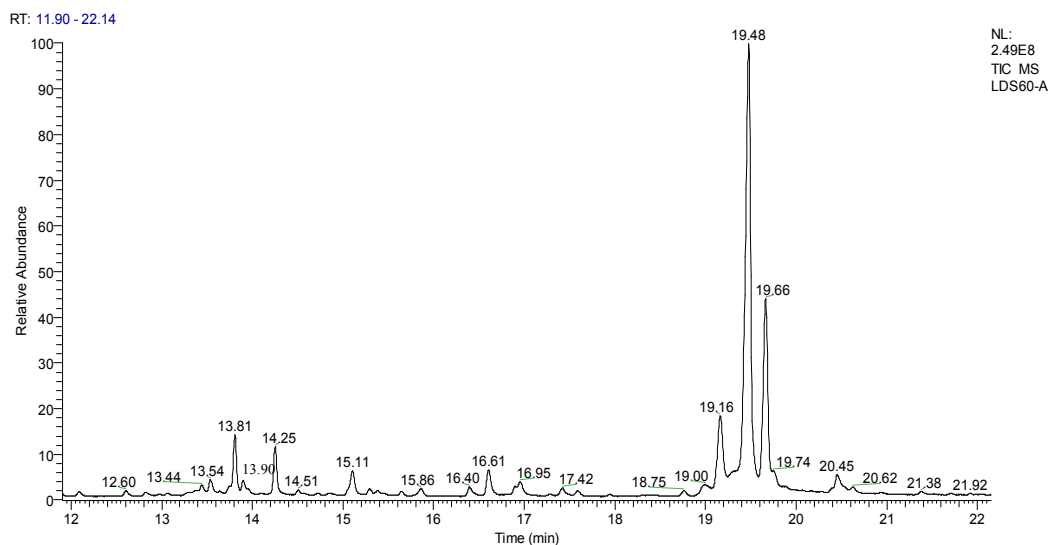


图 5.2 LDS60-A 乙酰化衍生物的气相色谱-质谱图

Fig. 5.2 The GC-MS of of acetyl derivatives from LDS60-A

表 5.2 LDS60-A 气相色谱-质谱分析结果

Table 5.2 Results of monosaccharide analysis of LDS60-A by GC-MS

标准品	保留时间 (min)	平均面积含量 (%)	摩尔比
L-岩藻糖	13.81	4.31	0.28
L-阿拉伯糖	13.90	2.24	0.12
D-木糖	14.25	5.17	0.18
D-甘露糖	19.16	10.09	0.28
D-葡萄糖	19.48	61.81	1.56
D-半乳糖	19.66	16.38	1.00

5.3.2 甲基化分析

对三次甲基化后的糖样进行傅里叶红外光谱分析可知，在 $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ 处增加了 2850.62 cm^{-1} 的甲基碳氢伸缩振动信号峰，在 $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ 处的羟基吸收峰已基本消失，表明糖样 LDS60-A 甲基化完全。

甲基化完全的多糖 LDS60-A 经水解、还原、乙酰化处理采用 GC-MS 分析的总离子流谱如图 5.3 所示，不同保留时间的质谱图如图 5.4-5.7 所示。根据相应保留时间的碎片离子峰与 CCRC 数据库 (The CCRC Spectral Database for PMAA's) 及与相关文献对比得出甲基化单糖、取代位置及对应的特征离子峰见表 5.3。结果表明组成多糖 LDS60-A 的单糖残基种连接方式的形式主要有：T-linked Glcp、1,4-linked Glcp、1,6-linked Glcp、1,6-linked Galp，各单糖残基通过峰面积计算出相应的摩尔比，具体结果如表 5.3 所示。

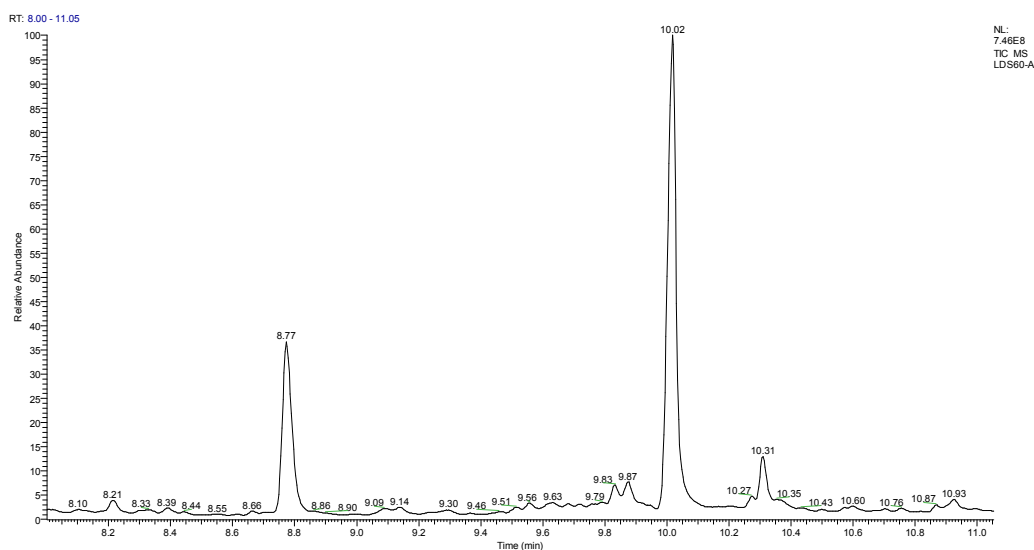


图 5.3 LDS60-A 甲基化分析的总离子流图

Fig. 5.3 The TIC chromatogram of LDS60-A in methylation analysis

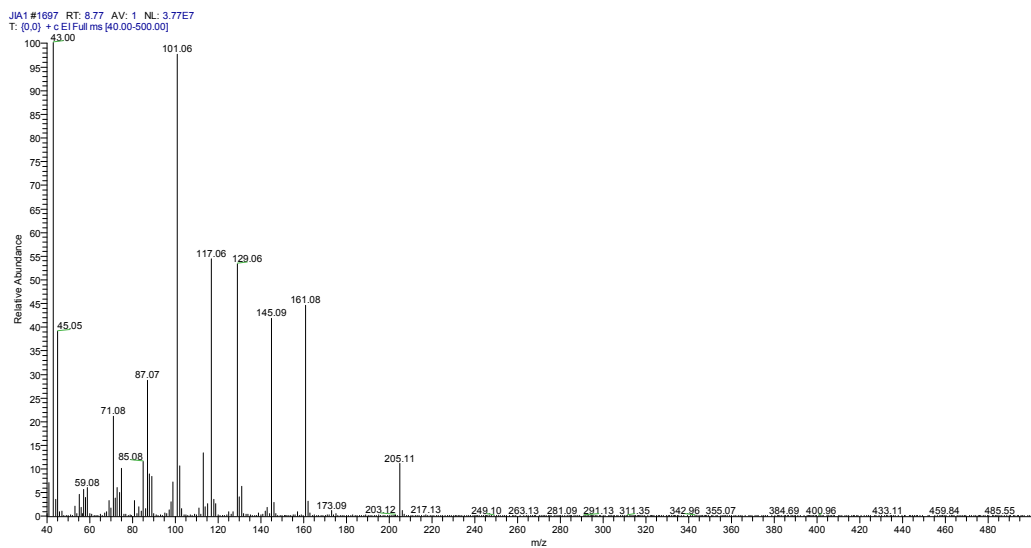


图 5.4 保留时间为 8.77 min 处的质谱图

Fig. 5.4 Mass spectrum at the retention time of 8.77 minute

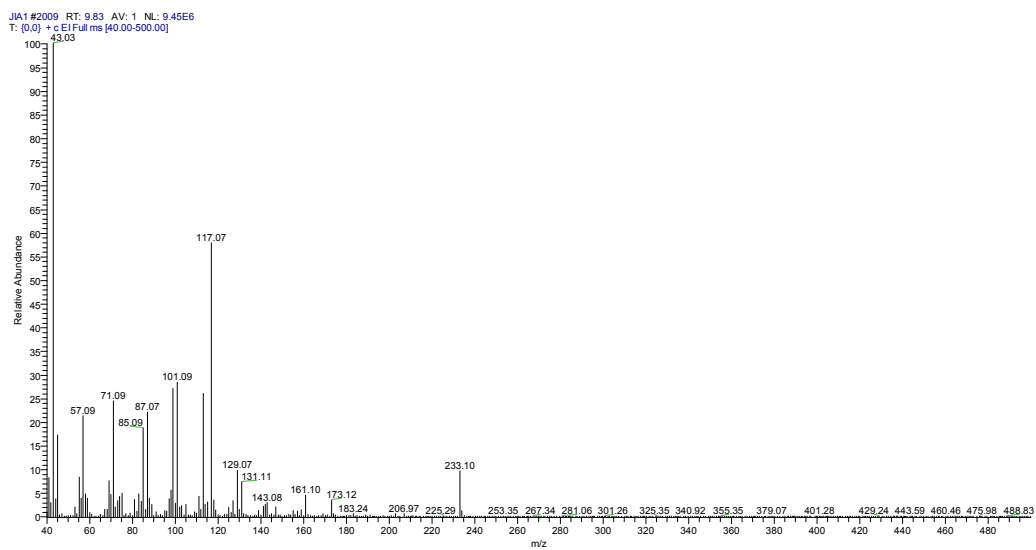


图 5.5 保留时间为 9.83 min 处的质谱图

Fig. 5.5 Mass spectrum at the retention time of 9.83 minute

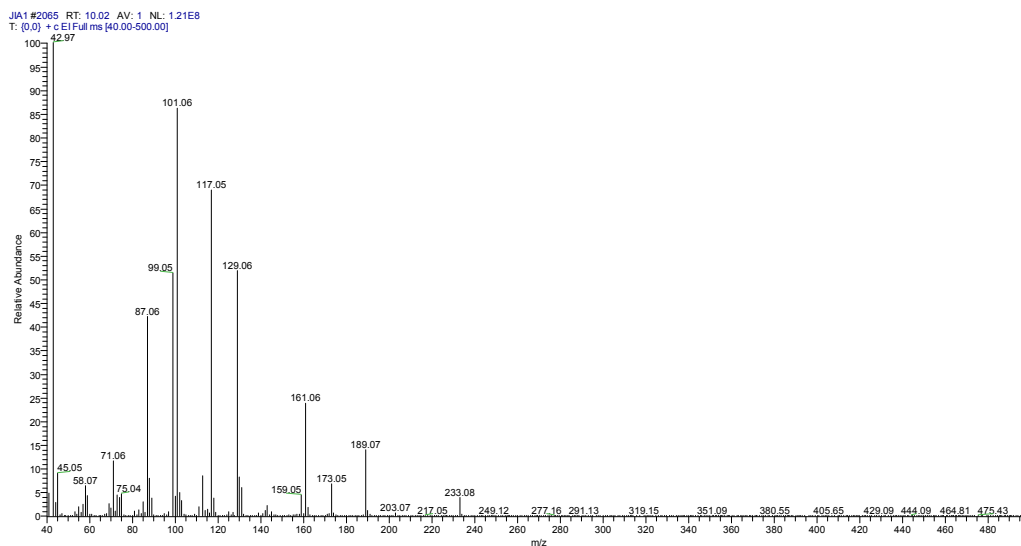


图 5.6 保留时间为 10.02 min 处的质谱图

Fig. 5.6 Mass spectrum at the retention time of 10.02 minute

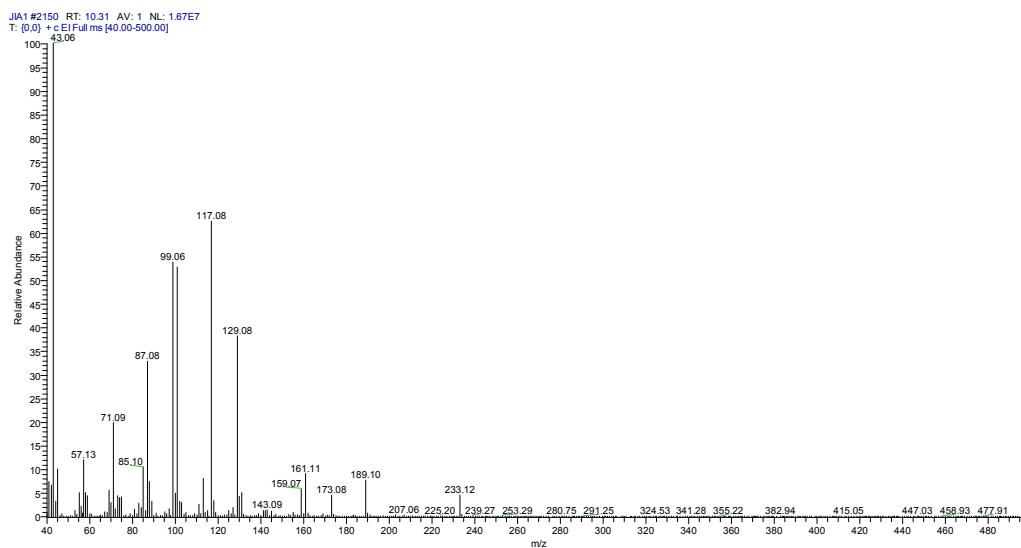


图 5.7 保留时间为 10.31 min 处的质谱图

Fig. 5.7 Mass spectrum at the retention time of 10.31 minute

表 5.3 LDS60-A 甲基化分析结果

Table 5.3 Methylation Analysis of LDS60-A

保留时间 (min)	甲基化的糖	链接位点	摩尔比	特征碎片离子峰
8.77	2,3,4,6-Me ₄ -Glc _p	T-Glc _p	5.62	43, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205
9.83	2,3,6-Me ₃ -Glc _p	1,4-linked Glc _p	0.48	43, 71, 87, 99, 113, 117, 129, 161, 233
10.02	2,3,4-Me ₃ -Glc _p	1,6-linked Glc _p	13.56	43, 87, 99, 101, 117, 129, 161, 189, 233
10.31	2,3,4-Me ₃ -Gal _p	1,6-linked Gal _p	1.00	43, 71, 87, 101, 117, 129, 161, 173, 189, 233

5.3.3 核磁分析

从 ^1H NMR 的 25 $^\circ\text{C}$ (附图 5.8) 中可知, LDS60-A 在异头氢区的共振区域 δ 4.45-5.06 主要有 δ 5.06、 δ 4.98、 δ 4.94 和 δ 4.45 等四个异头氢的共振峰, 在 δ 4.70 处有一个强的 HDO 的共振峰。 δ 1.13 处为岩藻糖 (H-6) 的甲基双峰 ($J_{5,6}=6.00$ Hz)。在 δ 3.20-4.20 处由于共振峰严重重叠, 暂时不能给出准确信息。

由 ^{13}C NMR 谱 (附图 5.9) 可知, 在 δ 98.19-102.97 之间, 主要异头碳出现在 δ 102.97 处, 其它 δ 101.56 和 δ 98.19 等也出现了弱的共振吸收峰。在 δ 15.80 处是岩藻糖 C-6 的共振峰, 糖环中的其它连氧碳信号在 δ 60.49-78.73。在核磁共振 ^{13}C -DEPT-135 谱 (附图 5.10) 中 δ 68.86、 δ 62.49 和 δ 60.73 出现反峰为吡喃糖 6 位碳的化学位移。

在 LDS60-A 的 ^1H NMR 谱中发现 δ 4.45 处为主要共振吸收峰, 在单糖组成分析和甲基化分析中葡萄糖含量最高, 所以该异头氢质子峰可能为葡萄糖残基 1 位氢的共振吸收峰, 并且耦合常数 $J_{1,2}=7.2>3$, 表明该葡萄糖残基的构型为 β -构型。通过 COSY 谱 (附图 5.11)、TOCSY 谱 (附图 5.12) 获得 δ 4.45 处的葡萄糖残基的 H1-H6 的化学位移。由 HSQC 谱 (附图 5.13) 获得该残基碳的化学位移, 氢和碳的化学位移的具体数值见表 5.4。

表 5.4 LDS60-A 的化学位移全归属

Table 5.4 Chemical shifts data for LDS60-A

Residue		Proton or carbon					
		1	2	3	4	5	6a/6b
→1,6)-β-D-Glcp	H	4.45	3.25	3.42	3.39	3.56	3.78/4.14
	C	102.97	73.14	75.56	69.41	74.74	68.86

各化学位移通过查阅与相关文献报道的糖残基的化学位移比较发现,该残基的各个氢和碳的化学位移和β-葡萄糖的化学位移一致,所以判断该残基为β-葡萄糖,并且6位与未发生取代的糖残基的化学位移向低场移动 7.4 ppm,所以该残基为6位取代位点。由远程相关谱 HMBC (附图 5.14) 可知, H-1 和 C-6 存在着共振交叉峰,说明该葡萄糖残基为 1-6 连接的β-吡喃型葡聚糖。

由于其它异头氢的质子共振峰信号较弱,含量也比较低,进一步对这些残基的核磁共振峰的连接顺序的详细结构待后续分析确认。结合甲基化分析 LDS60-A 组分主链主要为β-1,6-linked Glcp,并且还含有其它 T-linked Glcp、1,4-linked Glcp 和 1,6-linked Galp 的残基。

5.3.4 扫描电镜分析

SEM 是定性研究多糖形貌特征的有效手段之一。鹿茸菇多糖 LDS60-A 的扫描电镜图如图 5.15 所示。由图可知, LDS60-A 表面相对平整、紧密,较粗糙,主要以片状或碎屑状堆积形式存在,且在高倍镜下发现表面带有孔洞,说明其分子间作用力弱,多糖分子间存在相互排斥力。

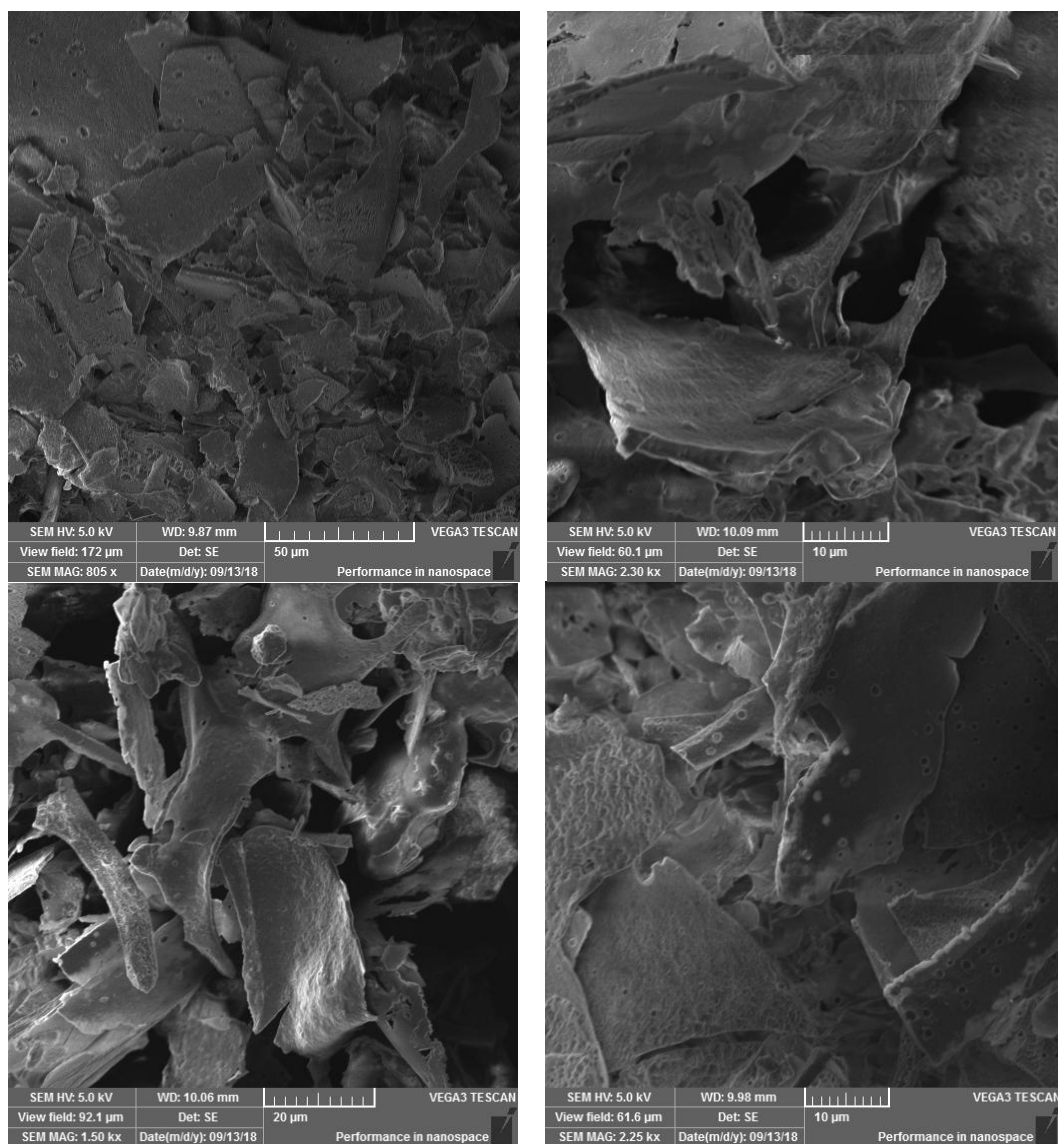


图 5.15 LDS60-A 的扫描电镜图

Fig. 5.15 The SEM images of LDS60-A

5.4 本章小结

本章节通过乙酰化和甲基化分析以及 GC-MS、NMR 和 SEM 等仪器对鹿茸菇均一多糖 LDS60-A 组分的初级结构进行解析。单糖组成分析表明 LDS60-A 组分主要由 D-葡萄糖和 D-半乳糖组成，并含有少量 L-岩藻糖、L-阿拉伯糖、D-木糖和 D-甘露糖，其摩尔比为 1.56 : 1.00 : 0.28 : 0.12 : 0.18 : 0.28；甲基化结果表明组成 LDS60-A 的糖

亚基中的单糖残基主要有 T-linked Glcp、1,4-linked Glcp、1,6-linked Glcp 和 1,6-linked Galp 残基, 根据出峰时间各单糖残基的摩尔比为 5.62 : 0.48 : 13.56 : 1.00; 核磁分析表明 LDS60-A 组分主链主要为 1-6 连接的中性 β -吡喃型葡聚糖 (β -1,6-linked Glcp), 并且还含有 T-linked Glcp、1,4-linked Glcp 和 1,6-linked Galp 残基; SEM 结果表明 LDS60-A 表面较粗糙, 主要以片状或碎屑状堆积形式存在, 高倍镜下观察发现表面带有孔洞, 说明均一多糖 LDS60-A 组分分子间作用力弱。

第六章 结论与展望

6.1 结论

鹿茸菇学名荷叶离褶伞 (*Lyophyllum decastes* (Fr.:Fr.) Sing.)，隶属于担子菌纲、伞菌目、口蘑科，离褶伞属，是食药兼用的大型野生优良真菌，具有很高的营养价值。已有研究表明鹿茸菇子实体作为传统中药，具有抗肿瘤、降血糖、降血脂和抗氧化等一系列重要作用。现有的对鹿茸菇的研究多集中在生物学特性、人工栽培、营养成分、药理活性及多糖的提取等方面，而对鹿茸菇多糖的分离纯化及结构性质的研究解析却少有报道。本论文主要对鹿茸菇多糖进行了较为系统的研究，包括多糖的提取、工艺优化、含量分析、抗氧化活性筛选、粗多糖分离纯化及纯化后的均一多糖结构鉴定等，其主要结果如下：

(1) 通过对鹿茸菇子实体常规营养成分分析，表明鹿茸菇子实体中含粗蛋白 22.16%，粗脂肪 2.69%，碳水化合物 49.17%，粗纤维 8.66%，总灰分 8.11%，水分 9.21%，表现出高蛋白低脂肪等特点，与文献报道相似，是一种美味又健康的食物；鹿茸菇子实体经水提分级醇沉得 LDS30、LDS60 和 LDS80 三个粗多糖组分，其中 LDS60 组分多糖含量最高，为 $44.293 \pm 3.988\%$ 。

(2) 通过高速剪切技术对 LDS 子实体多糖提取工艺优化，在以液料比、转速、剪切时间为单因素的基础上，通过 BBD 响应面优化设计并根据实际情况得出最终最佳工艺参数为：液料比 18 mL/g，转速 9500 r/min，剪切时间 2.3 min，在此条件下，LDS 子实体多糖实际得率为 26.56%（理论值 26.62%），方差分析表明建立的模型误差小，回归方程可靠；体外抗氧化研究表明，三个多糖组分均表现出良好的 ABTS、DPPH 自由基清除能力并且都具有一定的还原能力；其中三种粗多糖组分对 ABTS 自由基清除能力的 IC_{50} 值分别为 0.353 mg/mL、0.147 mg/mL 和 0.244 mg/mL；对 DPPH 自由基清除能力的 IC_{50} 值分别为 0.434 mg/mL、0.299 mg/mL 和 0.344 mg/mL。综合分析结果选择粗多糖 LDS60 组分进行后续分离纯化和结构鉴定。

(3) 粗多糖 LDS60 组分经 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换柱层析和 Sephacryl S-500 HR 凝胶柱层析分离纯化，得到均一多糖 LDS60-A 组分。再通过 UV

定性分析其不含核酸和蛋白质,符合多糖特征;HPLC 测定其相对分子量为 5.729×10^6 Da; IR 显示 LDS60-A 不含糖醛酸和羰基,为 β -构型中性多糖。

(4) 在 UV 和 IR 分析基础上,通过单糖组成、甲基化分析以及 GC-MS、NMR 和 SEM 等仪器对均一多糖 LDS60-A 组分的单糖组成、糖残基连接顺序和类型、糖苷键的构型以及表面形貌进行解析。结果表明 LDS60-A 组分主要由 D-葡萄糖和 D-半乳糖组成,并含有少量 L-岩藻糖、L-阿拉伯糖、D-木糖和 D-甘露糖,其摩尔比为 1.56 : 1.00 : 0.28 : 0.12 : 0.18 : 0.28; NMR 分析结合甲基化结果得出 LDS60-A 组分主链主要为 1-6 连接的中性 β -吡喃型葡聚糖(β -1,6-linked Glcp),并且还含有 T-linked Glcp、1,4-linked Glcp 和 1,6-linked Galp 残基,各单糖残基的摩尔比为 13.56 : 5.62 : 0.48 : 1.00; SEM 结果表明 LDS60-A 表面较粗糙,主要以片状或碎屑状堆积形式存在,高倍镜下观察发现其表面带有孔洞,说明均一多糖 LDS60-A 组分子间作用力弱。

6.2 展望

本论文首先通过水提醇沉法提取鹿茸菇多糖,再采用高速剪切提取技术优化以获得较好的提取效果。通过 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换柱层析和 Sephacryl S500 葡聚糖凝胶柱层析分离纯化得鹿茸菇子实体均一多糖 LDS60-A,率先对均一多糖 LDS60-A 组分的初级结构进行了系统的分析鉴定,为多糖高级结构的深入解析和多糖生物活性作用的发挥机制(构效关系),提供了一定的理论支持。

已有研究证明从鹿茸菇子实体中分离得到的多糖具有抗肿瘤、降血糖、降血脂和抗氧化等一系列作用。由于多糖分离纯化工作量大,耗时较多,经过大量的粗多糖分离纯化得到均一多糖组分含量较少,本论文仅对鹿茸菇粗多糖组分进行了抗氧化活性研究,暂不能确定是否多糖起到抗氧化作用,后续实验可以对纯多糖体外抗氧化以及小鼠实验等生物活性进行深入研究。通过核磁实验(25 °C)仅分析出 LDS60-A 组分主要以残基 β -1,6-linked Glcp 为主链,其他残基的连接顺序由于异头氢的质子共振峰信号弱,含量比较低,进一步的详细结构还有待后续分析;扫描电镜观察到的只是多糖的天然形貌,无法进一步观察到多糖的形态连接等特征,对 LDS60-A 并未得到较

为明确的结构解析，由于客观原因，本论文的研究工作十分有限，因此后续实验可进行高温状态下的核磁解析以及对 LDS60-A 的高级结构进行研究。同时，有文献表明改性后的多糖其结构发生了改变，导致生物活性也相应发生了变化，可通过不同的改性方式来研究多糖的生物活性，确定最佳生物活性多糖的结构，对开发和应用多糖类的相关产品具有至关重要现实意义。

参考文献

- [1] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000.
- [2] 闫肃. 荷叶离褶伞子实体化学成分与生物活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [3] 上海农业科学院食用菌研究所. 中国食用菌志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991.
- [4] 李晓, 李寿建, 代俊杰, 等. 黄松甸荷叶离褶伞野生菌株的生物学特性初探[J]. 食用菌, 2016, 38(6):14-16.
- [5] 魏生龙, 王治江, 于海萍, 等. 荷叶离褶伞生物学特性研究[J]. 菌物学报, 2006, 25(1):101-108.
- [6] 席亚丽, 王治江, 魏生龙, 等. 荷叶离褶伞摇瓶发酵条件研究[J]. 河西学院学报, 2011, 27(2):68-74.
- [7] 王晓琴, 张芬琴, 魏生龙, 等. 荷叶离褶伞菌丝体深层发酵及胞内外多糖含量的变化[J]. 中国酿造, 2011, 30(5):56-58.
- [8] 高慧娟, 袁承玲, 赵丽, 等. 响应面法优化富硒荷叶离褶伞菌丝体胞内粗多糖发酵条件[J]. 菌物学报, 2016, 35(1):86-93.
- [9] 闫培生, 马丽雅, 朱国振, 等. 荷叶离褶伞液体发酵及生物酶法提取菌丝体多糖的研究[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(4):84-89.
- [10] 郑宏亮. “路基蘑”的鉴定及化学成分研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [11] 程继红. 名贵食药菌鹿茸菇商业化生产现状与发展前景[J]. 食药菌, 2014(4):194-197.
- [12] 程继红, 郑慧芬, 贲伟东, 等. 荷叶离褶伞工厂化栽培[J]. 食用菌学报, 2008, 15(2):20-22.
- [13] Yuuichi U, Ito H, Makoto H. Antitumor Effects of (1→3)- β -D-Glucan and (1→6)- β -D-Glucan Purified from Newly Cultivated Mushroom, Hatakeshimaji (*Lyophyllum decastes* Sing.)[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2000, 90(1):98-104.
- [14] 张汉焱, 张芬琴, 王小明, 等. 荷叶离褶伞子实体营养成分分析与评价[J]. 菌物学报, 2008, 27(5):696-700.
- [15] 席亚丽, 王治江, 王晓琴, 等. 荷叶离褶伞子实体、菌丝体和发酵液营养成分比较分析[J]. 食品科学, 2010, 31(6):155-157.
- [16] 李晓, 李玉. 中国离褶伞属真菌研究进展[J]. 食用菌学报, 2009, 16(3):79-83.
- [17] 郑宏亮, 图力古尔, 包海鹰, 等. 荷叶离褶伞的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(24):4335.
- [18] 项晨, 刘吉开, 杜子伟, 等. 银白离褶伞的化学成分研究[J]. 安徽医药, 2011, 15(12):1482-1484.

- [19] Kimura C, Nukina M, Igarashi K, et al. Beta-Hydroxyergothioneine, a new ergothioneine derivative from the mushroom *Lyophyllum connatum*, and its protective activity against carbon tetrachloride-induced injury in primary culture hepatocytes[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2005, 69(2):357-363.
- [20] 魏雨恬, 冯娜, 张劲松, 等. 荷叶离褶伞子实体有机溶剂萃取物的化学成分和抗肿瘤活性[J]. 食用菌学报, 2016, 23(2):70-74.
- [21] 贾宁. 荷叶离褶伞多糖对小鼠免疫功能影响和抗氧化作用研究[C]. 中国畜牧兽医学会兽医病理学分会第十六次学术研讨会、中国病理生理学会动物病理生理专业委员会第十五次学术研讨会论文集. 2009.
- [22] 张春梅, 宋海, 魏生龙. 荷叶离褶伞菌丝体多糖的提取及还原力的研究[J]. 中国食用菌, 2012, 31(06):44-48.
- [23] Miura T, Kubo M, Itoh Y, et al. Antidiabetic activity of *Lyophyllum decastes* in genetically type 2 diabetic mice[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(9):1234-1237.
- [24] Ukawa Y, Furuichi Y, Kokean Y, et al. Effect of Hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.) Mushroom on serum lipid levels in rats[J]. Journal of Nutritional Science & Vitaminology, 2002, 48(1):73.
- [25] Pushpa H, Purushothama K B. Antimicrobial activity of *Lyophyllum decastes* an edible wild mushroom.[J]. World Journal of Agricultural Sciences, 2010, 6(5):506-509.
- [26] 王晓琴, 曹礼, 郑秀芳, 等. 荷叶离褶伞多糖的提取工艺及其抑菌作用的研究[J]. 中国食品工业, 2009(12):51-53.
- [27] Ukawa Y, Andou M, Furuichi Y, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antitumor activity of Hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.)[J]. Nippon Shokuhin Kogaku Kogaku Kaishi, 2001, 48: 58-63 (in Japanese).
- [28] Ukawa Y, Izumi Y, Ohbuchi T, et al. Oral administration of the extract from Hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.) mushroom inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice[J]. Journal of Nutritional Science & Vitaminology, 2007, 53(3):293-296.
- [29] Gu Y, Ukawa Y, Park S, et al. Radiation protection effect on Hatakeshimeji (*lyophyllum decastes* sing)[J]. International Congress, 2002, 1236(01):495-499.
- [30] Nakamura T, Itokawa Y, Tajima M, et al. Radioprotective Effect of *Lyophyllum Decastes* and the Effect on Immunological Functions in Irradiated Mice[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2007, 27(1):70.
- [31] Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, et al. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk) sing[J]. Nature, 1969, 222(5194):687-688.
- [32] Ferreira S S, Passos C P, Madureira P, et al. Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 132:378-396.

- [33] Chen C, Shao Y, Tao Y, et al. Optimization of dynamic microwave-assisted extraction of *Armillaria*, polysaccharides using RSM, and their biological activity[J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 64(2):1263-1269.
- [34] He P F, Zhang A Q, Wang X L, et al. Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide from *Polyporus umbellatus* sclerotia[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82:411-417.
- [35] 赵芷芊, 王敏, 张志清. 植物多糖的提取及抗氧化功效的研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(13):337-342.
- [36] 张芬琴, 李彩霞, 李鹏, 等. 荷叶离褶伞可溶性多糖提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010(5):224-225.
- [37] 宋逍, 赵鹏. 碱法提取款冬花渣多糖工艺的响应面法优化[J]. 中国医药导报, 2016, 34(13):17-20.
- [38] 魏正勋. 银耳子实体多糖的提取分离、结构鉴定及生物活性研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2015.
- [39] 郭华, 刁全平, 张博, 等. 杨树口蘑多糖的超声波辅助提取工艺及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2018(5):180-184.
- [40] Sharif K M, Rahman M M, Azmir J, et al. Experimental design of supercritical fluid extraction – A review[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 124(1):105-116.
- [41] 刘晓庆, 秦春青, 孙培龙, 等. 姬松茸子实体多糖高速剪切提取及其抗氧化活性[J]. 食药菌, 2017, 25(2):113-119.
- [42] 秦德利, 贾坤, 窦珺荣, 等. 茶树花多糖超声波辅助热水浸提工艺优化[J]. 食品工业科技, 2015, 36(4):215-218, 223.
- [43] 张安强, 张劲松, 潘迎捷. 食药菌多糖的提取、分离纯化与结构分析[J]. 食用菌学报, 2005, 12(2):64-70.
- [44] Ma G, Yang W, Fang Y, et al. Antioxidant and cytotoxicities of *Pleurotus eryngii*, residue polysaccharides obtained by ultrafiltration[J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 73:108-116.
- [45] 薛丹, 黄豆豆, 黄光辉, 等. 植物多糖提取分离纯化的研究进展[J]. 中药材, 2014, 37(1):157-161.
- [46] 舒任庚, 蒋跃平, 蔡永红. 植物多糖的提取分离方法探讨[J]. 中国药房, 2011(11):1052-1055.
- [47] 谢明勇, 聂少平. 天然产物活性多糖结构与功能研究进展[J]. 中国食品学报, 2010, 10(2):1-11.
- [48] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999:56-68.
- [49] 阮家耀, 王星丽, 瞿亮, 等. 杏鲍菇子实体多糖的分离纯化及结构研究[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(4):77-81.

- [50] 何晋浙, 邵平, 孙培龙. 灵芝红外光谱的特征峰研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(5):1202-1205.
- [51] 安晓娟, 冯琳, 宋红平, 等. 植物多糖的结构分析及药理活性研究进展[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(16):1271-1275.
- [52] 秦春青, 阮家耀, 王瑞宇, 等. 枇杷叶多糖分离纯化及其单糖组成研究[J]. 中草药, 2018, 49(14):3240-3244.
- [53] 刘明, 李春霞, 辛现良. 核磁共振技术在糖类化合物化学结构研究的应用[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(5):324-327.
- [54] 李波, 陈海华, 许时婴. 二维核磁共振谱在多糖结构研究中的应用[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(4):523-526.
- [55] He P F, He L, Zhang A Q, et al. Structure and chain conformation of a neutral polysaccharide from sclerotia of *Polyporus umbellatus*[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 155:61-67.
- [56] Zhang A, Deng J, Liu X, et al. Structure and conformation of α -glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill by high-speed shearing homogenization[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 113, 558-564.
- [57] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances - Analytical Chemistry (ACS Publications)[J]. Springerplus, 1980, 89(5):449-454.
- [58] Breuil C, Saddler J N. Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1985, 7(7):327-332.
- [59] Bradford M M. A Rapid Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72, 248-254.
- [60] 丛建波, 王长振, 李妍, 等. 褐藻硫酸多糖硫酸基含量测定—硫酸钡比浊法研究[J]. 解放军药学报, 2003, 19(3):181-183.
- [61] 陈乾, 马天翔, 郭宏举, 等. 硫酸钡-比浊法测定褐藻糖胶中硫酸根的含量[J]. 药学实践杂志, 2012, 30(2):118-120.
- [62] 夏永刚, 梁军, 杨炳友, 等. 麻黄多糖中糖醛酸含量的测定[J]. 中医药学报, 2011, 39(01):71-73.
- [63] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. Analytical Biochemistry, 1962, 4(4):330-334.
- [64] 杜津昊, 刘建飞, 刘晓风, 等. 高速剪切技术辅助提取枸杞多糖工艺[J]. 食品工业, 2017(3):128-132.
- [65] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radic Biol Med, 1999, 26(9-10):1231-1237.

- [66] Yang B, Zhao M, Shi J, et al. Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from *longan* fruit pericarp[J]. Food Chemistry, 2008, 106(2):685-690.
- [67] 赵慧芳, 方亮, 吴文龙, 等. 黑莓品种'Boysen'果实水提物和色素对 DPPH·的反应动力学特性及清除能力研究[J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(1):10-16.
- [68] Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from *Glucosamine*[J]. Jpn. J. Nutr. Diet., 1986, 44:307-316.
- [69] Tian L, Zhao Y, Guo C, et al. A comparative study on the antioxidant activities of an acidic polysaccharide and various solvent extracts derived from herbal *Houttuynia cordata*[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(2):537-544.
- [70] 栾晓红, 赵峡, 王清池. 缢蛭多糖的提取、分离和结构分析[J]. 中国海洋药物, 2015(2):22-28.
- [71] Liu W, Liu Y, Zhu R, et al. Structure characterization, chemical and enzymatic degradation, and chain conformation of an acidic polysaccharide from *Lycium barbarum* L[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 147:114-124.
- [72] He P, Zhang A, Zhang F, et al. Structure and bioactivity of a polysaccharide containing uronic acid from *Polyporus umbellatus* sclerotia[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 152:222-230.
- [73] Zhang A Q, Liu Y, Xiao N N, et al. Structural investigation of a novel heteropolysaccharide from the fruiting bodies of *Boletus edulis*[J]. Food Chemistry, 2014, 146(1):334-338.
- [74] Sun Y, Liu J. Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*[J]. Bioresource Technology, 2009, 99(2):983-986.
- [75] He P, Zhang A, Zhou S, et al. Structural elucidation of polysaccharide containing 3- *O* -methyl galactose from fruiting bodies of *Pleurotus citrinopileatus*[J]. Carbohydrate Research, 2016, 434:72-76.
- [76] Liu J, Meng C G, Yan Y H, et al. Structure, physical property and antioxidant activity of catechin grafted Tremella fuciformis, polysaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82:719-724.
- [77] 王慧力. 茶树花多糖提取条件的优化、纯化及其结构鉴定[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.

致 谢

时光匆匆，研究生两年半的生活已近尾声。回首过去两年多的时间，作为一名研究生，我经历过实验失败的迷茫和无助，但更多的则是快乐、充实和成长，并且学到了很多新知识，总的来说自己成熟了很多。工大两年半的生活终将会在我人生道路上留下不可磨灭的痕迹，在这里，我想向我的家人、老师和朋友们表达最真挚的感谢！

首先，非常感谢我的导师张安强，他不仅是我学习上的老师，更是我人生路上的指明灯。张老师有着严谨的治学态度，兢兢业业的工作作风，平易近人的人格魅力，尤其是面对生活的积极乐观的人生态度，都对我影响深远；本论文从选题、开展实验到最后论文的定稿，都要感谢张老师的指导。同时感谢江苏菇本堂生物科技股份有限公司提供的原材料，感谢杨仁智副总经理。还要特别感谢团队大家长孙培龙教授，孙教授为人和蔼可亲，在学术上总有自己独到的见解，团队在孙老师的带领下一直营造着温暖、和谐和充满正能量的氛围！

其次还要感谢邵平老师、何荣军老师、何晋浙老师、蔡铭老师、聂小华老师、杨开老师、孙玉敬老师、能静老师、叶伟伟老师、马新老师、魏正勋老师、蔡燕萍老师等在课题上给予的指导和帮助；感谢何鹏飞博士、邢辰博士、李泽桦博士、陆嘉辉博士、叶沁博士、刘晓庆师姐、吴静梅师姐、邓佳颖师姐、付言红师姐、李珅师兄等给予的学术上的指导和仪器的技术支持以及邬雨季师妹、刘高丹师妹、叶家豪师弟等给予的帮助；尤其感谢 307 休息室的同窗好基友们和同届的小伙伴们，值此毕业之际向你们以及未能一一提及的朋友们表示由衷的感谢，谢谢你们的关心和帮助。

最后，特别要感谢我的父母、弟弟以及关爱我的亲人们，谢谢你们一直默默的支持，是你们无私的爱与和支持为我撑起了一片蓝天，借此祝福你们身体健康，工作顺利！有你们的关心爱护，我相信我的明天会更好！

附录 A LDS60-A 的核磁共振图谱

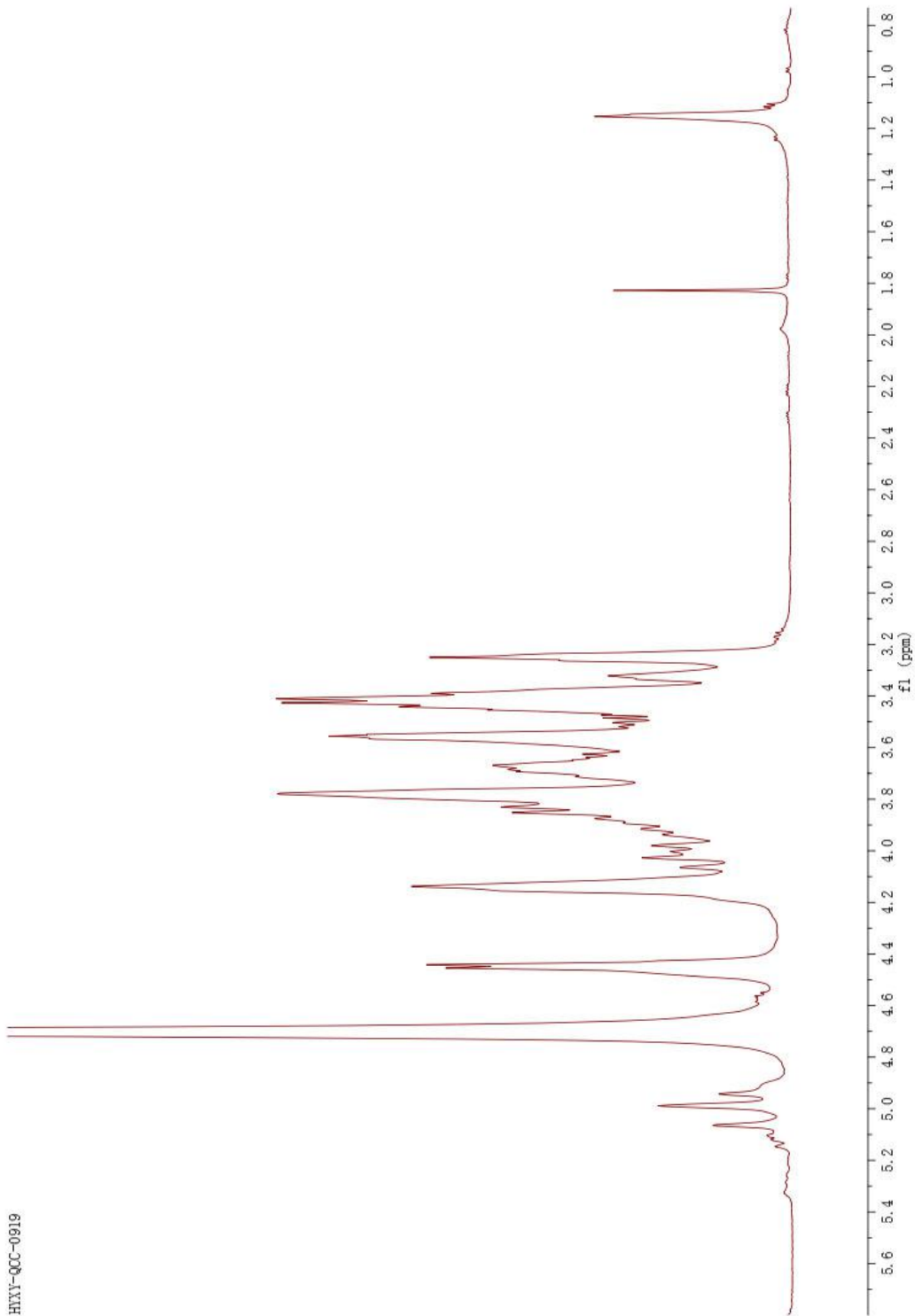


图 5.8 LDS60-A 的 ¹H 核磁共振图谱 (25 °C)

Fig. 5.8 ¹H NMR spectrum of LDS60-A at 25 °C

HXYI-QCC-0919

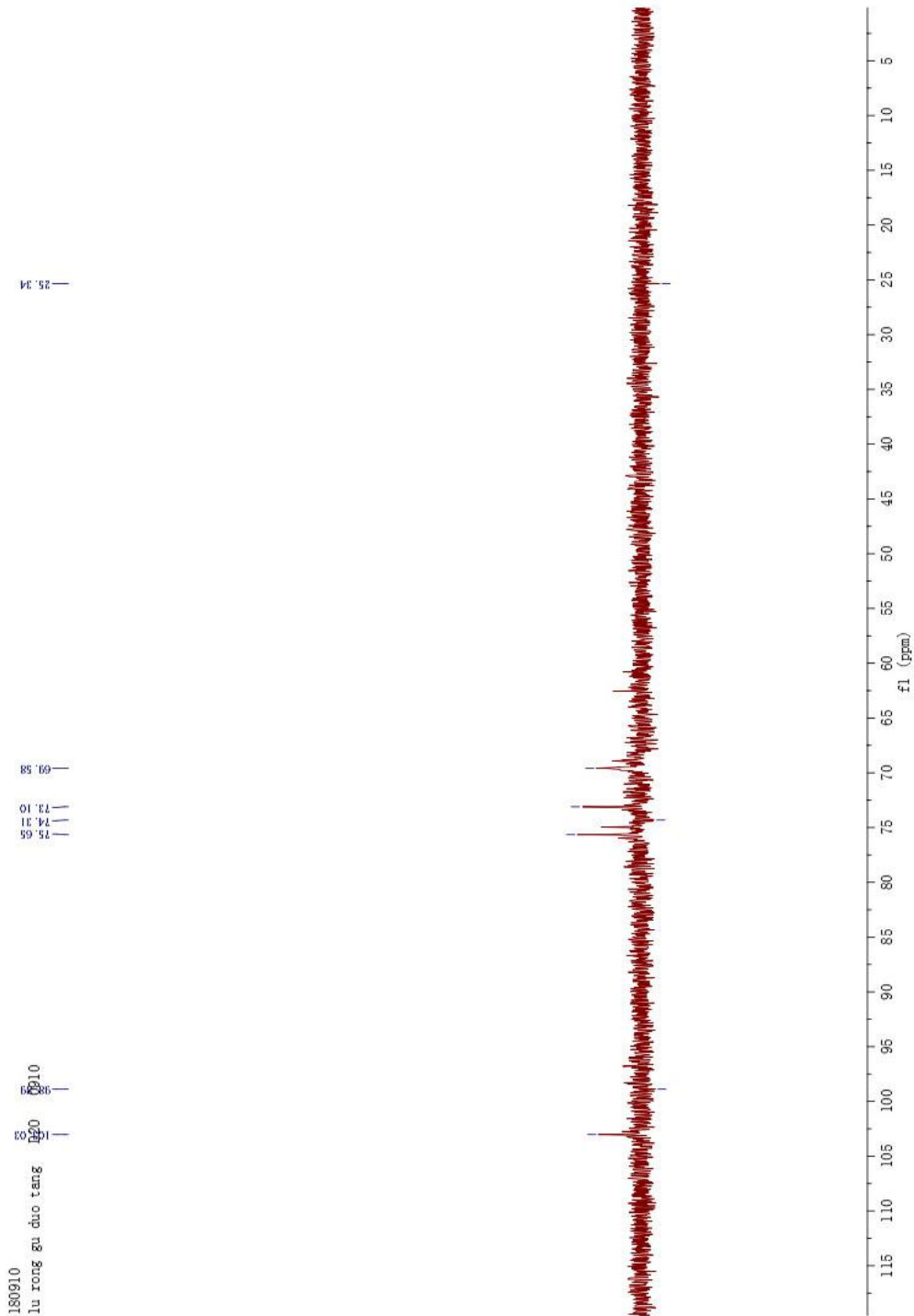


图 5.9 LDS60-A 的 ^{13}C 核磁共振图谱 (25 °C)

Fig. 5.9 ^{13}C NMR spectrum of LDS60-A at 25 °C

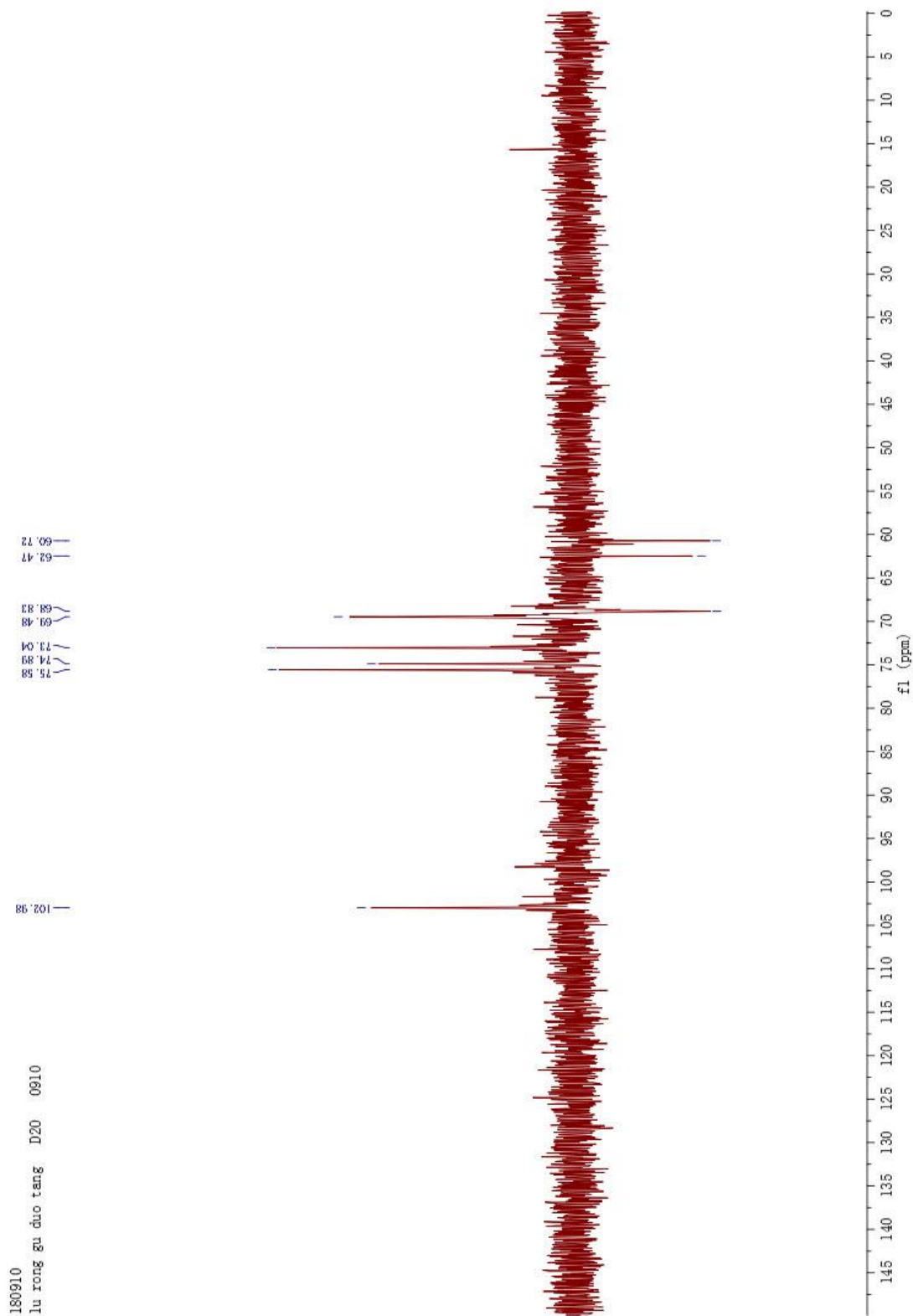


图 5.10 LDS60-A 的 DEPT-135 核磁共振图谱 (25 °C)

Fig. 5.10 DEPT-135 spectrum of LDS60-A at 25 °C

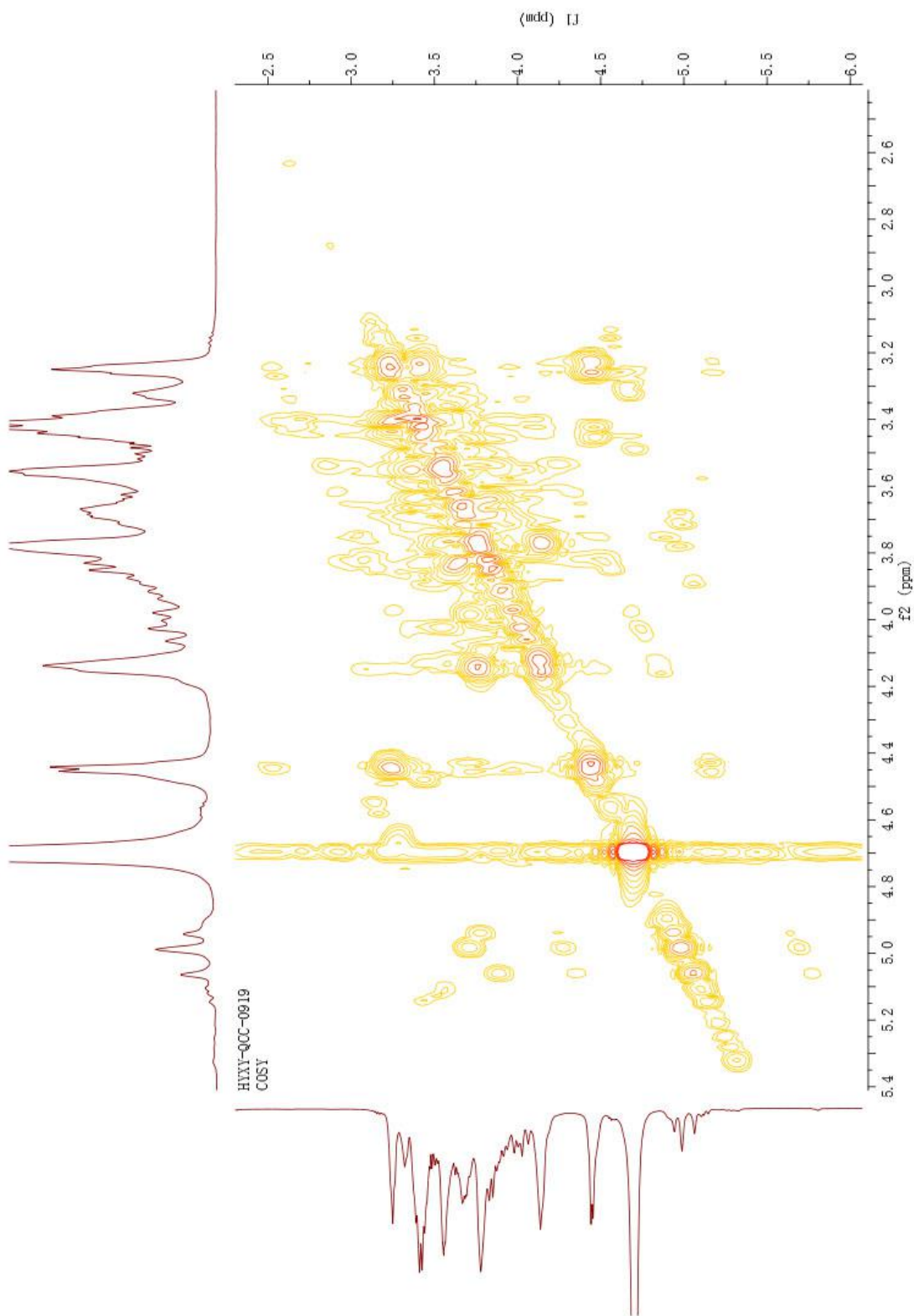


图 5.11 LDS60-A 的 ^1H - ^1H COSY 部分核磁共振图谱

Fig. 5.11 Part of ^1H - ^1H COSY spectrum of LDS60-A

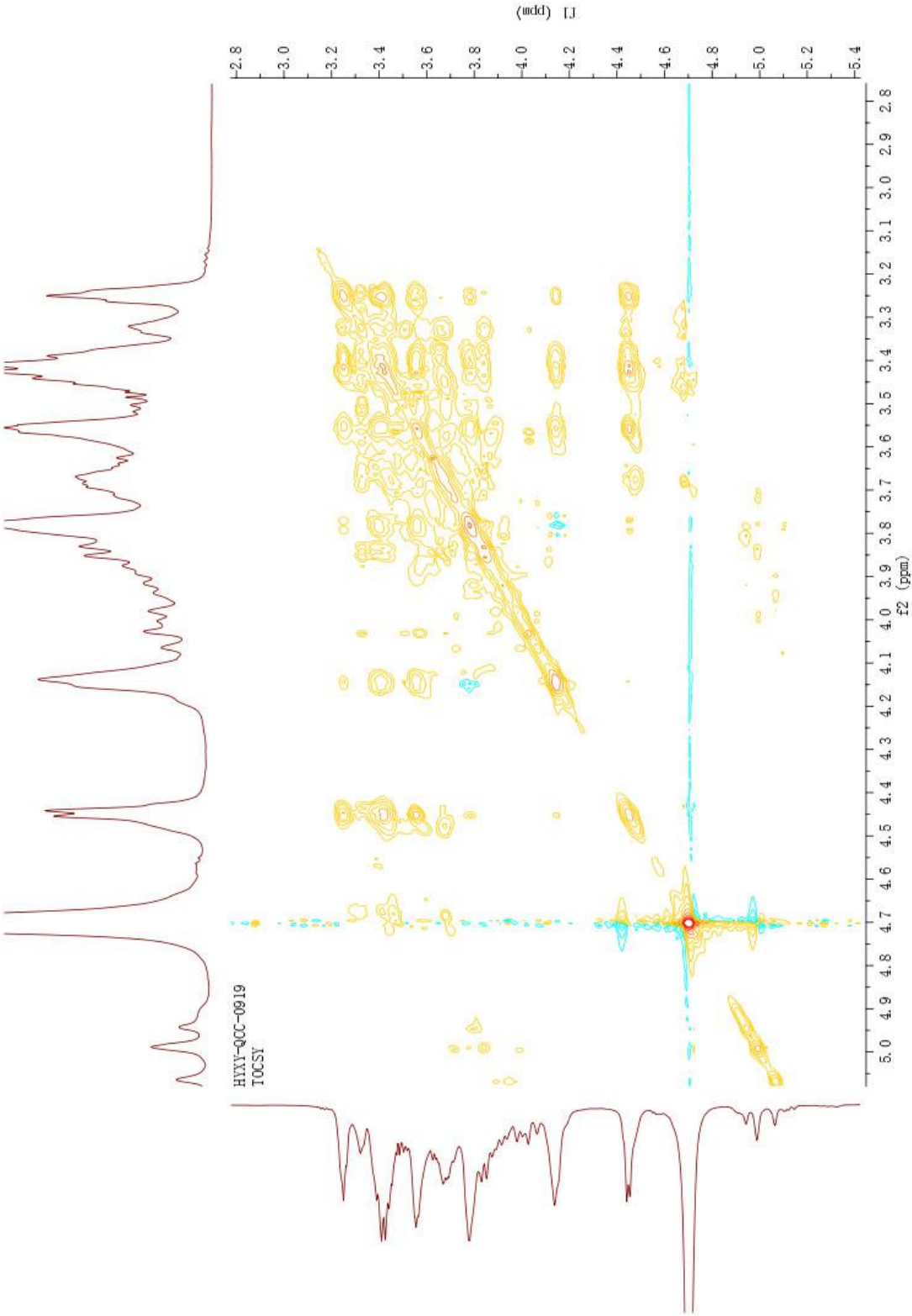


图 5.12 LDS60-A 的 TOCSY 部分核磁共振图谱

Fig. 5.12 Part of TOCSY spectrum of LDS60-A

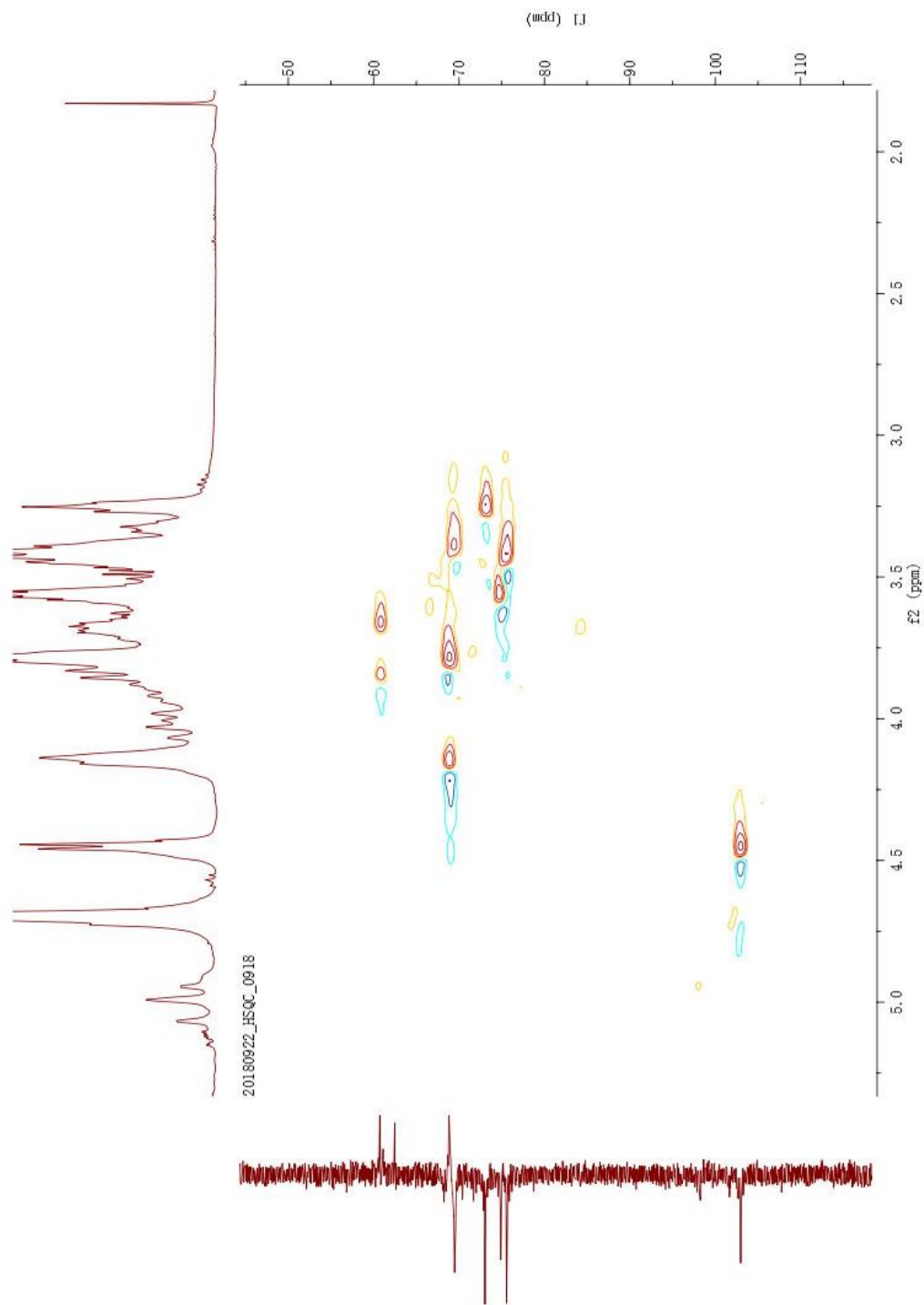


图 5.13 LDS60-A 的 HSQC 部分核磁共振图谱

Fig. 5.13 Part of HSQC spectrum of LDS60-A

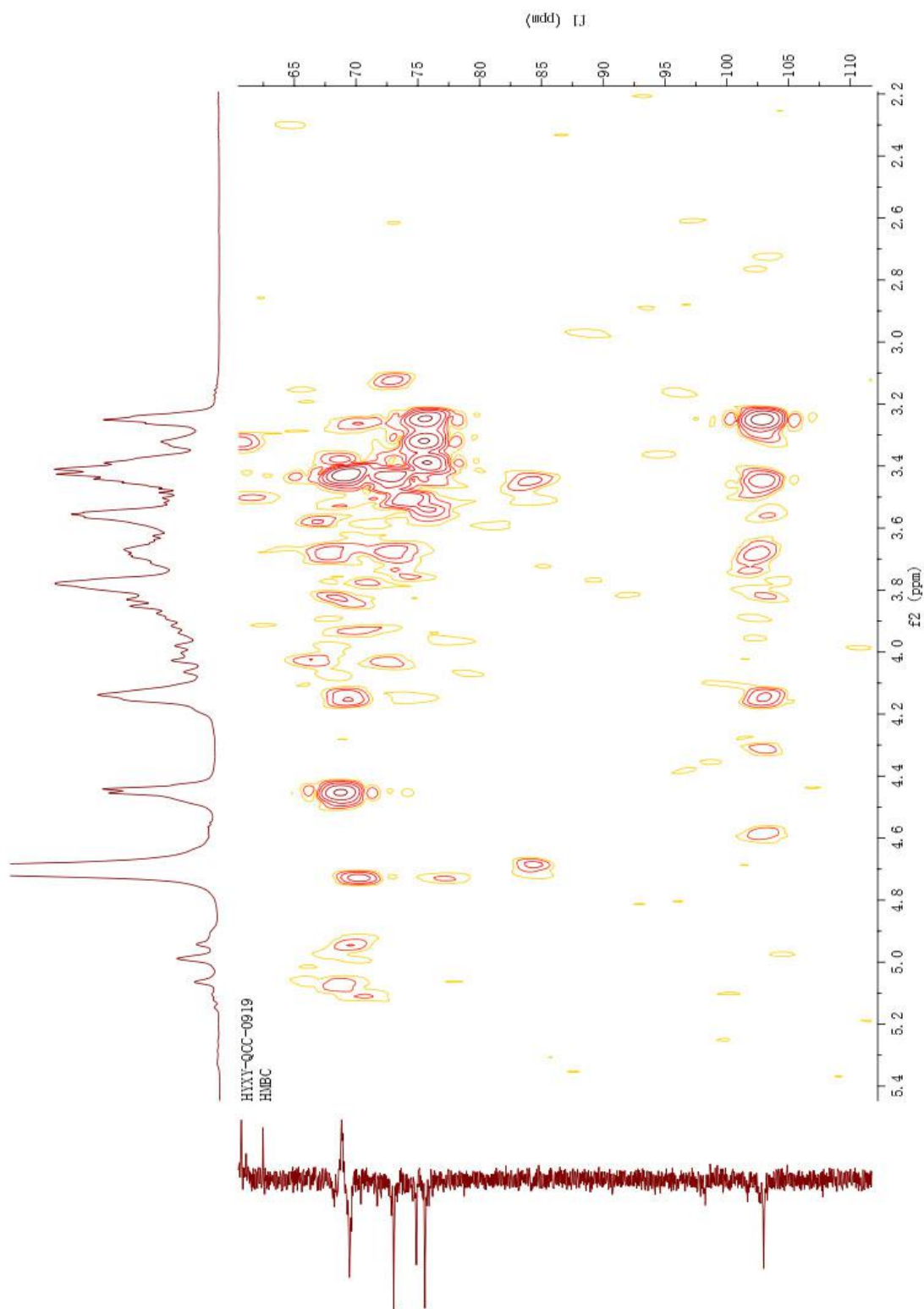


图 5.14 LDS60-A 的 HMBC 核磁共振图谱

Fig. 5.14 HMBC spectrum of LDS60-A

攻读学位期间发表的学术论文及研究成果

1. **秦春青**, 阮家耀, 王瑞宇, 孙培龙, 张安强. 枇杷叶多糖分离纯化及其单糖组成研究[J]. 中草药, 2018, 49(14):3240-3244. (中文核心期刊 A 类)
 2. 刘晓庆, **秦春青**, 孙培龙, 张安强. 姬松茸子实体多糖高速剪切提取及其抗氧化活性[J]. 食药菌, 2017, 25(2):113-119.
 3. Chen Xing, **Chunqing Qin**, Xueqing Li, Fuming Zhang, Robert J. Linhardt, Peilong Sun, Anqiang Zhang. (2018). Chemical composition and biological activities of essential oil isolated by HS-SPME and UAHD from fruits of bergamot, LWT- Food Science and Technology. (已返修, Co-first author, SCI)
- 专利:
1. 一种含有鹿茸菇的有机复合鲜味调味料及其制备方法. 张安强, **秦春青**, 李彦颖, 李迪, 陈威, 吴雯雯. 201711193462.X.
 2. 鹿茸菇多糖提取物及其制备方法与应用. 张安强, **秦春青**, 姚垚瑜. 201810729885.7.