DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260305005
引用格式: 王静, 陈紫薇, 文钢, 等. 香菇多糖发酵工艺优化、结构表征与抗氧化功能研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(13): 90–101.
Wang Jing, Chen Ziwei, Wen Gang, et al. Research on the optimization of fermentation process, structural characterization and antioxidant activity of *Lentinula edodes* polysaccharides [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(13): 90–101. (in Chinese with English abstract).

香菇多糖发酵工艺优化、结构表征与抗氧化功能研究

王 静[1], 陈紫薇[1], 文 钢[2], 陈 龙[1], 崔淑真[1], 郭心洁[1], 高宏伟[2], 李艳杰[1*]
(1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 晋中 030619; 2. 新疆泰昆集团昌吉饲料有限责任公司, 昌吉 831100)

摘 要: 目的 研究香菇液体发酵高产胞外多糖的最适培养基组成及发酵工艺, 并对所得胞外多糖进行结构表征和抗氧化活性评价。**方法** 通过单因素试验筛选最适碳源、氮源及其浓度, 同时筛选在发酵条件(pH、装液量、转速、接种量、发酵天数)中对香菇胞外多糖产量影响显著的 3 因素(pH、装液量、转速)进行响应面优化。采用扫描电镜、紫外光谱、红外光谱及热重分析对最优条件下制备的胞外多糖进行结构表征, 并测定其对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH)自由基、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2-biazo-di (3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS]阳离子自由基及羟基自由基的清除能力。**结果** 香菇液体发酵最适碳氮源及浓度为葡萄糖 20 g/L、酵母膏 5 g/L; 最佳发酵工艺为 pH 6、装液量 101 mL、转速 149 r/min、接种量 5%、发酵天数 8 d。扫描电子显微镜显示在此条件下所得胞外多糖结构疏松; 紫外光谱显示无核酸和蛋白质特征吸收, 红外光谱在 3408.1、2920.5、1646.1、1324.5 cm^{-1} 等处呈现多糖特征吸收峰, 热重分析表明在 28~180 ℃香菇多糖热稳定性较好, 胞外多糖对 DPPH 自由基、ABTS 阳离子自由基及羟自由基均有较好的清除率, 分别为 60.14%、53.47%、93.94%。**结论** 本研究优化香菇菌种液体发酵产胞外多糖的工艺, 确定该工艺稳定可行, 为提升发酵效率、增加香菇多糖产量及其进一步开发利用提供理论依据。

关键词: 香菇; 胞外多糖; 单因素试验; 响应面; 结构表征; 抗氧化
中图分类号: TS201.2 **文献识别码:** A **文章编号:** 2095–0381(2026)13–0090–12

Research on the optimization of fermentation process, structural characterization and antioxidant activity of *Lentinula edodes* polysaccharides

WANG Jing[1], CHEN Zi-Wei[1], WEN Gang[2], CHEN Long[1], CUI Shu-Zhen[1], GUO Xin-Jie[1], GAO Hong-Wei[2], LI Yan-Jie[1*]
(1. *School of Traditional Chinese Medicine and Food Engineering*, *Shanxi University of Chinese Medicine*, *Jinzhong* 030619, *China*; 2. *Xinjiang Taikun Group Changji Feed Co.*, *Ltd.*, *Changji* 831100, *China*)

收稿日期: 2026-03-05
基金项目: 山西省基础研究计划项目(202303021221166); 优秀博士毕业生来晋工作奖励经费科研启动基金项目(2023BKS01); 山西中医药大学科技创新能力培育计划项目(2024PY-NS-010); 新疆维吾尔自治区重点研发项目(2024B02016-2); 山西省科技创新团队专项资金项目(202304051001043)

第一作者: 王静(1999—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为药食同源功能食品开发与利用。E-mail: 15835096196@163.com
***通信作者:** 李艳杰(1984—), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为药食同源功能食品及食药用菌生理代谢。E-mail: liyanjie@sxtcm.edu.cn

ABSTRACT: Objective　To determine the best medium composition and fermentation conditions to maximize the production of exopolysaccharides from *Lentinula edodes* through submerged fermentation, as well as to analyze the structure and assess the antioxidant properties of the extracted exopolysaccharides. **Methods**　Single-factor experiments were conducted to identify the optimal carbon and nitrogen sources and their concentrations. Furthermore, 3 key factors influencing the yield of *Lentinula edodes* exopolysaccharides—pH, liquid volume and agitation speed were selected for response surface methodology optimization under controlled fermentation parameters (pH, liquid volume, rotation speed, inoculum size and fermentation time). The exopolysaccharides produced under these optimized conditions were characterized using scanning electron microscopy, ultraviolet spectroscopy, infrared spectroscopy and thermogravimetric analysis. Their ability to scavenge free radicals, including 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH), 2,2-biazo-di (3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonic acid) diammonium salt, and hydroxyl radicals, was also evaluated. **Results**　Glucose at 20 g/L and yeast extract at 5 g/L were identified as the optimal carbon and nitrogen sources, respectively, for submerged fermentation of *Lentinula edodes*. The ideal fermentation parameters were pH 6, liquid volume of 101 mL, agitation speed of 149 r/min, inoculum size of 5% and an 8-day fermentation period. Scanning electron microscope images showed that the exopolysaccharides had a loose structural morphology. Ultraviolet spectroscopy revealed no absorption peaks indicative of nucleic acids or proteins, while infrared spectroscopy displayed characteristic polysaccharide absorption bands at 3408.1, 2920.5, 1646.1 and 1324.5 cm^{-1}. Thermogravimetric analysis demonstrated that the polysaccharides maintained good thermal stability between 28 ℃ and 180 ℃. The exopolysaccharides exhibited strong antioxidant activity, with scavenging rates of 60.14% for DPPH radicals, 53.47% for ABTS cationic radicals and 93.94% for hydroxyl radicals. **Conclusion**　The study optimize the submerged fermentation process for producing exopolysaccharides from *Lentinula edodes*, confirming the method's stability and practicality. These findings provide a theoretical foundation for enhancing fermentation efficiency, increasing polysaccharide yields and supporting further development and application of *Lentinula edodes* polysaccharides.

KEY WORDS: *Lentinula edodes*; exopolysaccharides; single-variable experiment; response surface analysis; structural characterization; antioxidant properties

0　引　言

香菇(*Lentinula edodes*), 属担子菌门, 作为全球第二大食用菌, 富含多糖、蛋白质、氨基酸等活性成分, 其中香菇多糖(lentinan, LNT)为主要活性成分[1], 具有抗癌、抗氧化、免疫调节等功能, 拥有生物活性强、毒性小的优点, 这些特性能够使其作为功能食品开发原材料, 通过调节肠道菌群等多方面, 增强机体对疾病防御作用, 从而促进人类健康[2]。

近年来, 国内外多围绕香菇多糖的提取制备与生物活性评价开展了大量研究, 例如, 通过双酶耦合超高压技术提取香菇多糖, 响应面法优化得到最佳提取条件为双酶(纤维素酶:木瓜蛋白酶, 质量比为 1:2)添加量 2.5%, 酶解 pH 5.5, 压力 450 MPa[3]。Wen 等[4]将低共熔溶剂与亚临界水提取技术相结合用于提取香菇多糖, 分离纯化得到两种均一多糖组分 LEP1 与 LEP2, 对其结构特征及抗氧化、免疫调节活性进行分析, 发现分子量较低的 LEP2 表现出更强的生物活性, 为香菇多糖的高效提取提供了新的方法。在实际应用方面, 研究证实日粮添加香菇多糖可显著调控奶牛血清免疫因子与炎症因子水平, 改善机体代谢通路, 有效降低奶牛炎症发生风险[5], 印证了其在体内的免疫调节活性, 为香菇多糖的功能活性研究提供了理论参考。

然而, 香菇多糖在细胞中含量低, 生产成本高, 严重限制了其广泛应用。通过培养香菇子实体生产多糖, 这种方法耗时长、产量低、产品质量难以控制[6]。相比之下, 液体发酵技术可缩短发酵周期、降低投入成本[7], 通过调控发酵参数提升菌丝体生物量及目标活性物质产量[8]。近年来, 关于提升香菇多糖产量的研究仍相对有限, 多集中在不同香菇菌株[9]、培养基添加不同金属离子[10–11]或发酵条件单一因素的考察[12–13], 对发酵培养基和发酵条件参数的系统筛选优化相对较少。基于此, 本研究通过筛选培养基组成, 并通过单因素、响应面法优化发酵工艺以提高香菇胞外多糖产量, 并对其理化指标、抗氧化特性进行检测。本研究为香菇多糖规模化生产及其功能性食品的开发奠定理论基础, 为推动微生物发酵实现高质量可持续发展。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

香菇 L808 菌株, 由山东效峰生物科技有限公司提供。

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司); 酵母膏、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、牛肉膏(北京奥博星生物技术有限责任公司); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2-biazo-di (3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS]、溴化钾(KBr)(上海麦克林生化科技有限公司); 过硫酸钾、水杨酸、硫酸铁($FeSO_4$)(分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司); KH_2PO_4、$MgSO_4$(北京欣盛百泰科技有限公司); 土豆、玉米面(市售); 蛋白胨(北京索莱宝科技有限公司); 酒石酸铵(分析纯, 北京百灵威科技有限公司); 抗坏血酸(*L*-ascorbic acid, VC)、过氧化氢(H_2O_2)、乙醇、苯酚(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

BSA224S-CW 万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); FD-1A-50 真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); HC-3018R 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); SPECTRAMAX190 型酶标仪(北京生原诚业科技有限公司); R-1001LN 型旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司); pHS-3C+型酸度计(成都世纪方舟科技有限公司); HZ-2011KB 型恒温振荡培养箱(金坛市杰瑞尔电器有限公司); IRAffinity-IS 傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR, 株式会社岛津制作所); STA 200 同步热分析仪(日立高新技术公司); UV 1780 紫外-可见分光光度计(ultraviolet-visible spectrophotometry, UV-Vis, 株式会社岛津制作所)。

1.3 试验方法

1.3.1 菌种活化

将香菇菌种接种于 PDA 培养基, 于 28 ℃恒温培养, 待菌丝完全长满培养基即培养完成。

1.3.2 液体培养基的筛选

碳源筛选: 土豆 200 g/L、KH_2PO_4 2 g/L、$MgSO_4$ 1 g/L 为基础培养基, 分别加入 10 g/L 葡萄糖、玉米面、蔗糖、麦芽糖, 观察菌丝体生物量生长情况。

氮源筛选: 在筛选出最适碳源基础上, 分别加入 5 g/L 牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、酒石酸铵, 观察菌丝体生物量生长情况。将装有 80 mL 发酵液的锥形瓶置于摇床中, 在 28 ℃、120 r/min 的条件下恒温振荡培养 8 d。

碳氮源浓度筛选: 碳源质量浓度梯度为 5、10、15、20 g/L, 氮源质量浓度梯度为 2.5、5.0、7.5、10.0 g/L。

1.3.3 发酵条件单因素试验

基于 1.3.2 所确定的最适液体发酵培养基, 以香菇胞外多糖含量为主要评价指标, 同时监测菌丝体生物量变化, 对发酵液初始 pH (4、5、6、7、8)、装液量(40、60、80、100、120 mL)、发酵时间(0、4、8、12、16 d)、摇床转速(130、140、150、160、170 r/min)、接种量(1%、3%、5%、7%、9%)进行单因素试验。并通过单因素方差分析评估各因素对香菇多糖含量影响程度。

1.3.4 响应面法优化发酵条件

使用响应面分析筛选胞外多糖含量最佳发酵工艺。采用 Box-Behnken 实验设计方法, 选择对胞外多糖含量影响显著的 3 个因素: pH、装液量、转速, 进行 3 因素 3 水平响应面分析, 优化液体菌种发酵条件(表 1)。

表 1 响应面试验因素水平

Table 1 Levels of factors in response surface experiments

水平	*A*: pH	*B*: 装液量/mL	*C*: 转速/ (r/min)
–1	5	80	140
0	6	100	150
1	7	120	160

1.3.5 菌丝体生物量测定

采用 180 目滤布过滤发酵液收集菌丝体, 菌丝体经蒸馏水多次冲洗, 于 60 ℃下烘干至恒重并称重, 结果以 g/L 表示。

1.3.6 胞外多糖含量检测

发酵液蒸发浓缩至原体积 1/7, 加入 4 倍体积 95%乙醇, 4 ℃静置过夜。4000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 经冷冻干燥获得香菇胞外多糖样品并称重。采用苯酚-硫酸法测定多糖含量, 以葡萄糖为标准品制作标准曲线 Y=0.0134+9.4351X, 决定系数 r^2=0.996; 在不同组各取 0.1 g, 蒸馏水溶解, 依次加入 0.4 mL 5%苯酚与 2 mL 浓硫酸, 于 490 nm 测定吸光度, 根据标准曲线计算该溶液中多糖含量, 根据各组冻干样品总质量, 最终计算为发酵液中实际胞外多糖含量, 结果以 g/L 表示[14]。

1.3.7 扫描电镜检测

取香菇多糖干燥粉末直接粘到导电胶上固定, 进行喷金处理, 将样品放置在扫描式电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察台上在不同倍数下观察微观形态。

1.3.8 紫外-可见吸收光谱

配制质量浓度 1 mg/mL 的多糖溶液, 通过紫外-可见分光光度计测定在 200~600 nm 范围内多糖样品水溶液的紫外-可见吸收光谱。

1.3.9 傅里叶变换红外光谱检测

干燥样品与 KBr 以 1:100 质量比混匀, 研钵研磨压薄片, 将压片置于 IRAffinity-IS FT-IR 在 4000~400 cm^{-1} 对多糖样品进行 32 次扫描。

1.3.10 热稳定性研究

通过 STA 200 同步热分析仪分析香菇多糖热稳定性。称取 10 mg 多糖样品粉末, 置于坩埚内, 以空白坩埚做对照组。以氮气作为载气, 升温速率 10 ℃/min, 升温范围 30~800 ℃。

1.3.11 香菇胞外多糖 DPPH 自由基清除率检测

参照文献[15]方法并进行改进。将 2 mL 不同质量浓度

(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)多糖溶液与 2 mL 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液混匀, 避光放置 30 min, 在 517 nm 处测定吸光度。以 VC 为阳性对照, 按以下公式(1)计算。

$$\text{DPPH自由基清除率}\% = (1-\frac{A_1-A_2}{A_0})\times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0为蒸馏水与 DPPH 溶液 OD 值; A_1为多糖溶液与 DPPH 溶液 OD 值; A_2为多糖溶液与无水乙醇 OD 值。

1.3.12　香菇胞外多糖 ABTS$^+$自由基清除率检测

根据文献[16]的方法略加修改进行测定。将 7.4 mmol/L ABTS 溶液和 2.6 mmol/L 过硫酸钾溶液等比例混合, 避光放置过夜, 取适量 95%乙醇稀释至 734 nm 下吸光度值达到 0.70±0.02, 即得 ABTS 测定液。

将 0.5 mL 不同质量浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)多糖溶液与 4.5 mL ABTS$^+$测定液混匀, 室温避光反应 5 min, 于 734 nm 测量吸光度。以 VC 为阳性对照, 按以下公式(2)计算。

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率}/\% = (\frac{A'_0-A'_1}{A'_0})\times 100\% \quad (2)$$

式中: A'_0为蒸馏水与 ABTS 测定液 OD 值; A'_1为多糖溶液与 ABTS 测定液 OD 值。

1.3.13　香菇胞外多糖羟自由基清除率测定

参照文献[17]中的方法进行修改。配制 1.0 mL 不同质量浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)多糖溶液, 加入 2 mL 9 mmol/L $FeSO_4$, 2 mL 9 mmol/L 乙醇-水杨酸和 1 mL 9 mmol/L H_2O_2混匀, 反应体系水浴加热 15 min, 在 510 nm 测量吸光度。以 VC 为阳性对照。按以下公式(3)计算。

$$\text{羟自由基清除率}/\% = (1-\frac{A''_1-A''_2}{A''_0})\times 100\% \quad (3)$$

式中: A''_0为蒸馏水取代多糖溶液与所有试剂反应 OD 值; A''_1为多糖溶液与全试剂反应 OD 值; A''_2为多糖溶液与以蒸馏水代替 H_2O_2的其他试剂反应 OD 值。

1.4　数据处理

试验数据以重复 3 次的平均值表示, 采用单因素方差分析进行差异显著性检验, 利用 Duncan 法进行多重比较。其中, $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 分别被视为差异显著和极显著。数据分析使用 SPSS Statistics 27 软件, 响应面优化设计借助 Design-Expert 10 软件, 图片由 Origin 2024 软件绘制。

2　结果与分析

2.1　液体培养基的筛选结果

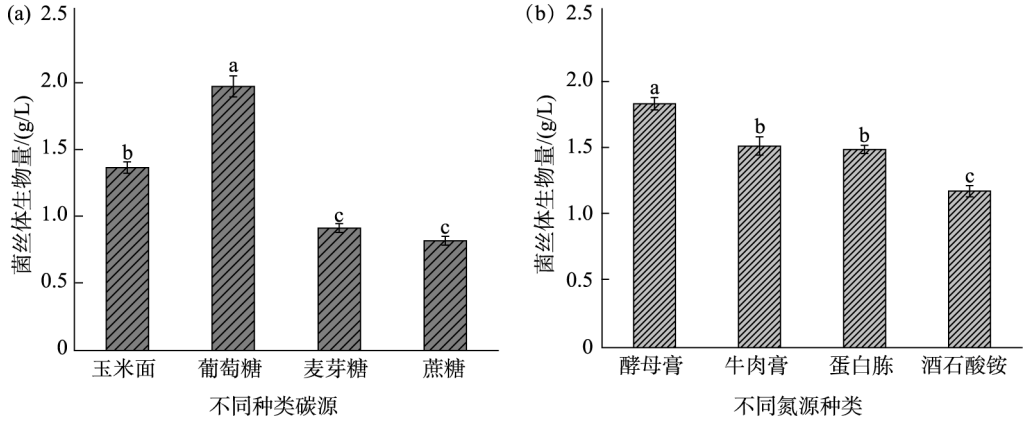
2.1.1　液体发酵不同碳氮源的筛选

以菌丝体生物量为评价指标优化液体发酵培养基, 碳源作为能量来源, 其类型对微生物生长具有较大影响, 图 1~2。图 1(a)所示不同碳源对菌丝体生长影响显著($P<0.05$)。葡萄糖作为碳源时菌丝体生物量最高, 为 0.89 g/L; 且菌丝体悬浮均匀、团聚少[图 2(a)]。证实葡萄糖更易于被微生物利用, 该结果与血红铆钉菇发酵研究中葡萄糖可作为优质碳源促进生物量积累的结论一致[18], 因此确定其为最佳碳源。

氮源为微生物生长提供营养物质。图 1(b)中不同氮源对菌丝体生物量影响显著($P<0.05$), 其中, 酵母膏组菌丝体生物量最高, 达到 0.76 g/L; 且菌丝体密度高[图 2(b)]。该结果与李昆等[19]真菌发酵中酵母膏为优质氮源的研究结果相符, 故确定酵母菌为最佳氮源。

2.1.2　不同碳源浓度筛选

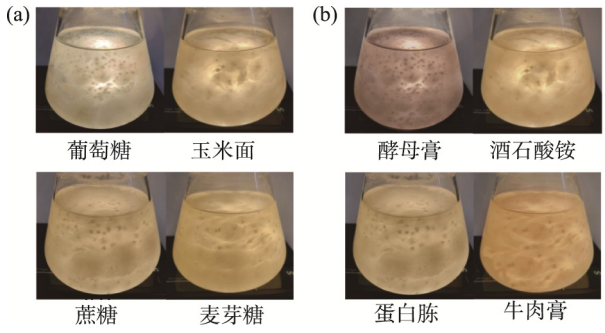
图 3 显示, 葡萄糖质量浓度显著影响菌丝体生长($P<0.05$), 生物量随质量浓度升高呈现先上升后下降的趋势。当质量浓度为 20 g/L 时达最大值(0.94 g/L)。低浓度抑制菌丝体生长, 高浓度破坏菌丝体细胞渗透压。这一结果与秀珍菇发酵中适宜葡萄糖质量浓度可促进菌丝体生长的结论一致[20]。因此, 葡萄糖最终质量浓度为 20 g/L。



注: 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 图 3~9 同。

图 1　不同碳、氮源对菌丝体生物量的影响

Fig.1　Effects of different carbon and nitrogen sources on mycelial growth biomass



注: (a)不同碳源; (b)不同氮源。

图 2 不同碳、氮源对香菇菌丝体形态的影响

Fig.2 Effects of various carbon and nitrogen sources on the morphology of *Lentinula edodes* mycelium

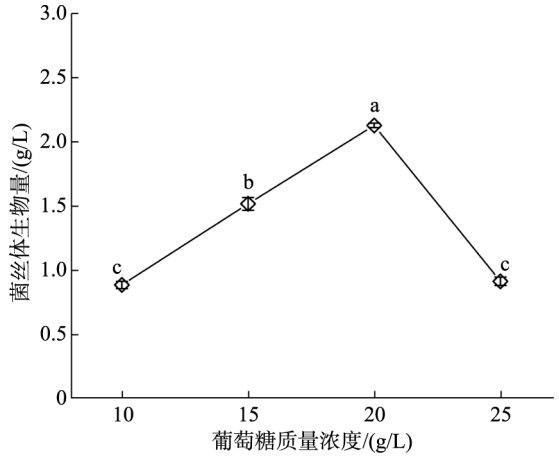


图 3 不同葡萄糖质量浓度对菌丝体生物量的影响

Fig.3 Effects of different mass concentrations of glucose on mycelial biomass

2.1.3 不同氮源质量浓度筛选

图 4 显示, 随质量浓度增加生物量先上升后下降(P<0.05)。当质量浓度为 5.0 g/L 时, 生物量达最大值 1.06 g/L。酵母膏作为复合有机氮源, 适宜质量浓度可满足菌体增殖营养需求, 促进生物量积累; 质量浓度过高易造成营养过剩, 加重菌丝体细胞代谢负担, 对菌丝体生长产生抑制作用[21]。最终, 选取酵母膏质量浓度为 5 g/L。

2.2 液体发酵条件单因素结果

2.2.1 pH 变化对胞外多糖含量及菌丝体生长的影响

胞外多糖积累与菌丝体生长均受 pH 显著影响(P<0.05)。图 5 所示, pH=6 时胞外多糖含量最高(0.95 g/L)。弱酸性环境利于菌丝体对碳、氮源等营养物质的吸收效率[22], 改变细胞膜通透性, 促进胞内物质释放, 增加胞外多糖产量。因此, 选取 pH=6 为最佳发酵条件。

2.2.2 装液量对胞外多糖产量及菌丝体生物量的影响

装液量通过影响通气量间接调控发酵溶氧水平, 溶氧水平对真菌生长及多糖产量至关重要。图 6 表明, 装液量对胞外多糖产量及生物量影响显著(P<0.05), 生物量随装液量增加而上升, 胞外多糖含量先升高后下降, 装液量 100 mL 时达到峰值, 为 0.81 g/L。装液量过少导致发酵液蒸发; 过多则通气量不足, 抑制胞外多糖合成。装液量 100 mL, 在保障菌丝体生长同时, 为胞外多糖合成提供充足供氧。因此, 选择 100 mL 为最佳装液量。

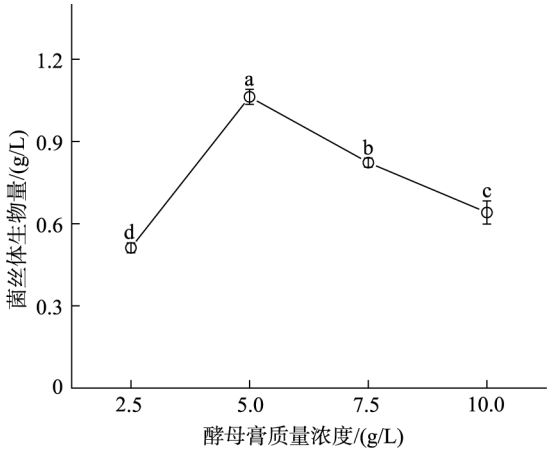


图 4 不同酵母膏质量浓度对菌丝体生物量的影响

Fig.4 Effects of different mass concentrations of yeast extract on mycelial biomass

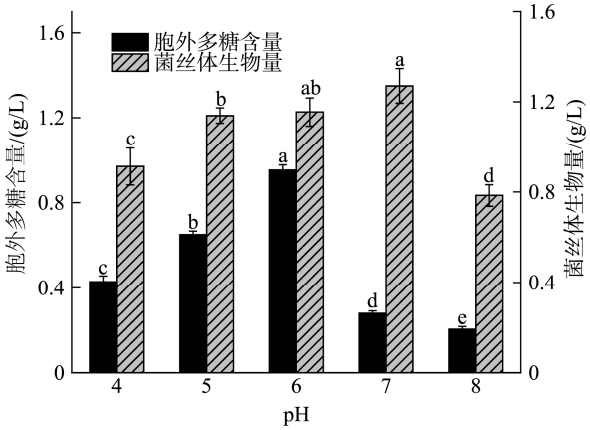


图 5 pH 对香菇胞外多糖含量和菌丝体生物量的影响

Fig.5 Effects of pH on exopolysaccharide content and mycelial biomass of *Lentinula edodes*

2.2.3 摇床转速对胞外多糖产量及菌丝体生物量的影响

摇床转速影响发酵通气状况, 对胞外多糖含量具有显著影响(P<0.05), 对生物量影响较小。图 7 所示, 转速 150 r/min 时胞外多糖含量最高, 为 1.11 g/L。转速较低导致氧气供应不足, 抑制微生物发酵; 转速过高会因剪切效应及酶解作用导致多糖降解, 适当增加转速能够促进氧气与菌体接触, 增加多糖合成[23]。因此, 选用 150 r/min 为最佳转速。

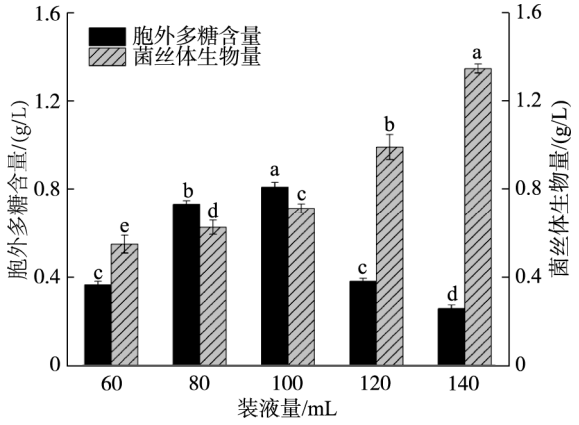


图 6　装液量对香菇胞外多糖含量和菌丝体生物量的影响
Fig.6　Effects of liquid volume on exopolysaccharide content and mycelial biomass of *Lentinula edodes*

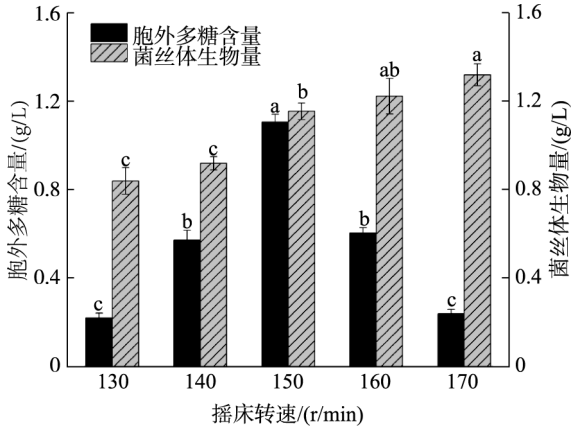


图 7　摇床转速对香菇胞外多糖含量和菌丝体生物量的影响
Fig.7　Effects of shaking speed on exopolysaccharide content and mycelial biomass of *Lentinula edodes*

2.2.4　发酵时间对胞外多糖产量及菌丝体生物量的影响

图 8 显示, 发酵天数对胞外多糖与菌丝体生物量的影响显著(P<0.05), 两者随发酵时间先升后降, 胞外多糖含量在发酵 8 d 达到最大值, 为 0.76 g/L。这可能是因为在发酵初、中期, 微生物发酵处于对数生长期, 营养物质多用于合成胞外多糖[24]; 后期由于营养物质缺乏细胞开始自溶[25], 胞外多糖含量下降。因此, 选用 8 d 为最佳发酵天数。

2.2.5　接种量对胞外多糖产量及菌丝体生物量的影响

接种量是影响发酵菌种生长繁殖速度的重要因素。图 9 显示, 接种量对多糖含量影响显著(P<0.05), 接种量 5%时, 胞外多糖产量最大, 为 0.69 g/L, 接种量过低会延长发酵周期, 增加染菌风险; 过高使营养消耗过快, 导致菌体提前衰亡。5%接种量能够确保菌体生长和代谢活动, 促进胞外多糖合成[26]。因此, 选用 5%为最佳接种量。

2.2.6　单因素方差分析

本研究中选取发酵液初始 pH、装液量、发酵时间、摇床转速、接种量对胞外多糖含量的影响见表 2。方差越小, 对胞外多糖含量影响越弱[27], 影响程度为: 摇床转速>pH>装液量>发酵时间>接种量。最终确定摇床转速、pH 和装液量为核心影响因素。

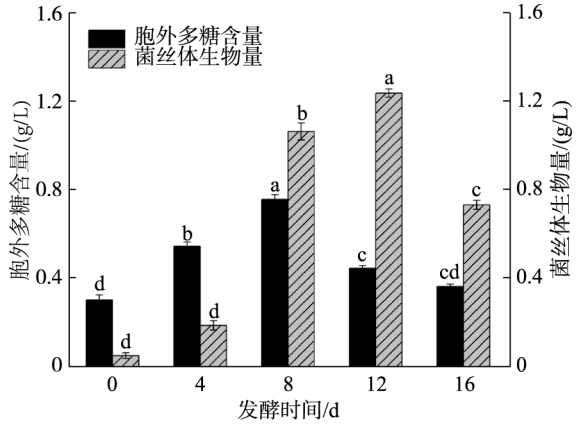


图 8　发酵时间对香菇胞外多糖含量和菌丝体生物量的影响
Fig.8　Effects of fermentation time on exopolysaccharide content and mycelial biomass of *Lentinula edodes*

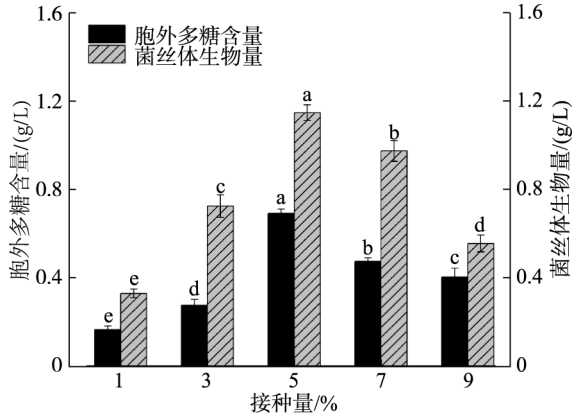


图 9　接种量对香菇胞外多糖含量和菌丝体生物量的影响
Fig.9　Effects of lnoculum size on exopolysaccharide content and mycelial biomass of *Lentinula edodes*

表 2　单因素试验方差分析
Table 2　Analysis of variance for single factor experiments

因素	胞外多糖含量/(g/L)	
	平均值	方差
接种量	0.40	0.04
发酵时间	0.48	0.03
装液量	0.50	0.07
摇床转速	0.55	0.13
pH	0.50	0.09

2.3 响应面法优化液体发酵条件

2.3.1 响应面法试验设计及结果

借助 Design-Expert 10.1 软件对表 3 进行分析, 建立二次多元回归方程: 胞外多糖含量=1.16455+0.0906474A+0.00927862B–0.023062C+0.015872AB-0.0412843AC+0.0169553BC–0.176956A^2–0.232088B^2–0.241389C^2。

2.3.2 模型建立与方差分析

对回归方程进行方差分析(表 4), 模型显著性检验 P<0.01, 失拟项 P>0.05, 表明该模型显著且无失拟。结合 F, 各因素对胞外多糖含量的影响顺序为 A>C>B (pH>摇床转速>装液量)。该模型的决定系数 R^2 达 0.9953, R^2_{Adj}=0.9896, 意味着模型能解释 98.96%的响应值变异, 且与预测相关系数 R^2_{Pred} 差值较小, 说明模型拟合效果优异, 可用于最优发酵工艺分析。

2.3.3 响应面交互作用分析

图 10 显示, pH-装液量、装液量-转速等高线图呈类圆形, 对胞外多糖含量影响不显著。pH-转速交互曲面纵向跨度明显且等高线呈椭圆形, 表明二者交互作用显著。经软件优化得最佳发酵条件为: pH 为 6.27、装液量为 100.52 mL、摇床转速为 149.31 r/min, 该条件下模型预测的胞外多糖含量为 1.18 g/L。

表 3 试验设计与结果

Table 3 Design and results of experimental

序号	A	B	C	胞外多糖含量/(g/L)
1	–1	–1	0	0.68
2	1	–1	0	0.84
3	–1	1	0	0.64
4	1	1	0	0.87
5	–1	0	–1	0.66
6	1	0	–1	0.91
7	–1	0	1	0.67
8	1	0	1	0.76
9	0	–1	–1	0.70
10	0	1	–1	0.70
11	0	–1	1	0.64
12	0	1	1	0.72
13	0	0	0	1.14
14	0	0	0	1.16
15	0	0	0	1.18
16	0	0	0	1.17
17	0	0	0	1.16

表 4 响应面拟合回归方程的方差分析结果

Table 4 Results of analysis of variance for response surface fitted regression equation

方差来源	平方和	自由度	方差	F	P	显著性
回归模型	0.7530	9	0.0837	166.42	<0.0001	**
A	0.0657	1	0.0657	130.76	<0.0001	**
B	0.0007	1	0.0007	1.37	0.2801	ns
C	0.0043	1	0.0043	8.46	0.0227	*
AB	0.0010	1	0.0010	2.00	0.1998	ns
AC	0.0068	1	0.0068	13.56	0.0078	**
BC	0.0011	1	0.0011	2.29	0.1742	ns
A^2	0.1318	1	0.1318	262.26	<0.0001	**
B^2	0.2268	1	0.2268	451.14	<0.0001	**
C^2	0.2453	1	0.2453	488.02	<0.0001	**
残差	0.0035	7	0.0005			
失拟项	0.0028	3	0.0009	4.85	0.0806	ns
纯误差	0.0008	4	0.0002			
合计	0.7565	16				
	R^2=0.9953		R^2_{Adj}=0.9894		R^2_{Pred}=0.9401	

注: *代表差异显著, P<0.05; **代表差异极显著, P<0.01; ns 代表差异不显著。

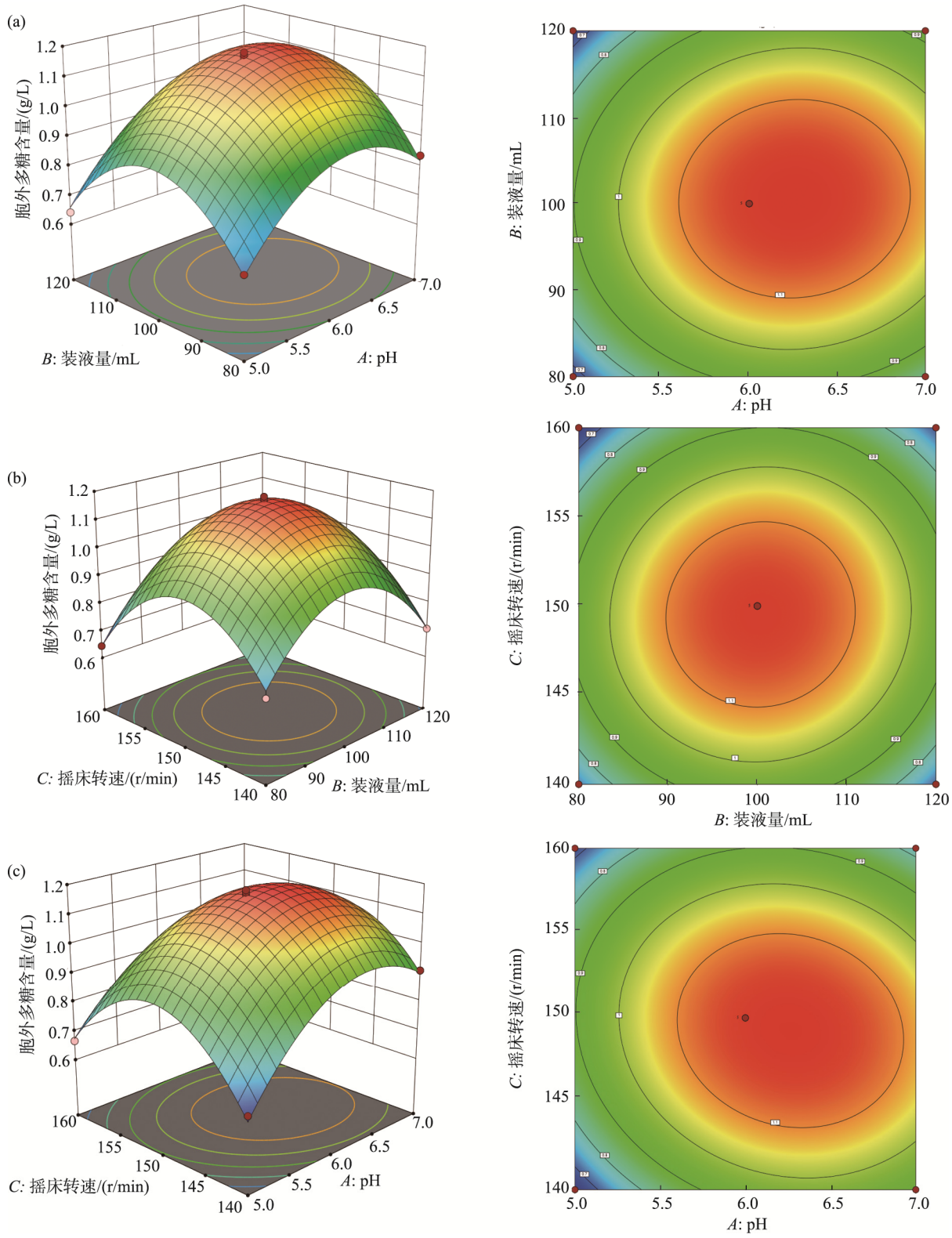


图 10　各因素交互作用对香菇胞外多糖含量影响的响应曲面及等高线图

Fig.10　Response surface and contour plots showing the interaction effects of various factors on the exopolysaccharide content of *Lentinula edodes*

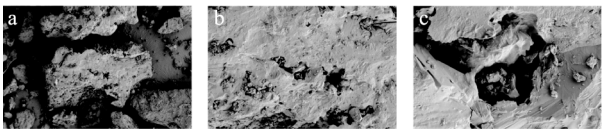
2.3.4　工艺条件验证性试验

结合软件预测结果与实际生产工艺的设置合理性，选取 pH=6、装液量 101 mL、转速 149 r/min 进行验证。3 次重复试验测得胞外多糖平均含量为(1.35±0.24) g/L，与

预测值接近，表明优化工艺可行。

2.4 SEM 结果分析

SEM(图 11)观察发现，香菇多糖在 300×和 1000×低倍数下，呈不规则块状，整体结构较为疏松，表面平滑。5000×高倍数下，可见明显孔隙结构。这种多孔形貌有助于水分快速渗入，促进多糖分散与溶解，更好发挥其功能特性。



注: a. 300×; b. 1000×; c. 5000×。

图 11 不同放大倍数下香菇多糖微观结构

Fig.11 Microscopic structure of *Lentinula edodes* polysaccharides at various magnifications

2.5 紫外光谱分析

图 12 显示，210.2 nm 处有吸收峰，为糖分子结构特征峰；280 nm、260 nm 处均无明显吸收峰，说明样品不含核酸和蛋白质等杂质，样品纯度较高。

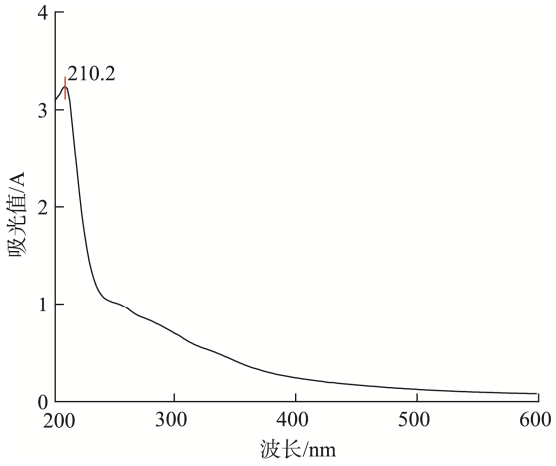


图 12 香菇胞外多糖的紫外光谱分析

Fig.12 Ultraviolet spectrum analysis of exopolysaccharide from *Lentinula edodes*

2.6 FT-IR 分析

图 13 结果显示，3408.1 cm^{-1} 处出现宽而强的 O-H 键伸缩振动[28]，表明香菇多糖分子内富含羟基，使多糖空间构象稳定，羟基是影响多糖抗氧化活性主要基团；2920.5 cm^{-1} 为 C–H 伸缩振动[29]，是葡萄糖基等单糖侧链特征结构；1646.1 cm^{-1} 为 C=O 的伸缩振动；1324.5 cm^{-1} 对应 C–H 键变角振动[29]；1097 cm^{-1} 强吸收峰为吡喃糖环中 C–O–C 和 C–O–H 伸缩振动，表明香菇多糖骨架以吡喃糖环为主[30]；799.4 cm^{-1} 处弱吸收峰，说明香菇多糖分子中可能含有少量 α-型糖苷键[31]。

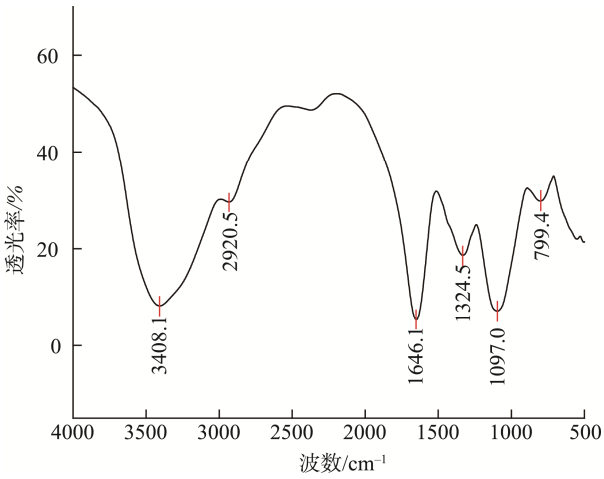


图 13 香菇胞外多糖的红外光谱分析

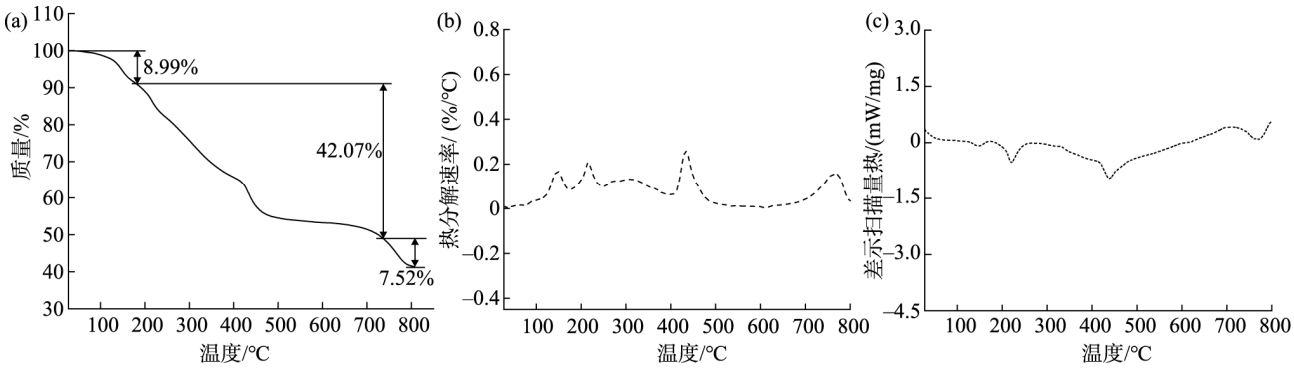
Fig.13 Infrared spectroscopy analysis of exopolysaccharide from *Lentinula edodes*

2.7 热稳定性研究分析

同步热分析显示香菇多糖热分解分为 3 个阶段(图 14)。第一阶段(28~180 ℃)质量损失 8.99%，主要为水分挥发，差示扫描量热曲线 147 ℃处的弱吸热峰。第二阶段(180~737 ℃)质量损失高达 42.07%，差热重曲线在 434 ℃时热分解速率达到最大值 0.26%/℃，差示扫描量热曲线在 221 ℃和 437 ℃附近出现两个明显吸热峰，表明糖苷键发生断裂，产生挥发性小分子物质[32]，表明热分解以吸热为主。第三阶段(737~800 ℃)样品失重渐缓，质量损失 7.52 %，表明大部分多糖在高温下被分解碳化[33]，最终香菇多糖的质量残留率为 41.41%。结果表明，香菇多糖在 180 ℃以下热稳定性良好。

2.8 体外抗氧化分析

DPPH 自由基是一种含有孤电子、结构相对稳定的自由基，清除率主要反映多糖通过提供氢原子或电子，将 DPPH 自由基还原为联氨化合物的能力[34]。香菇胞外多糖抗氧化活性表明，对 DPPH 自由基的清除能力随质量浓度(0.2~1.0 mg/mL)升高持续增强，在 1.0 mg/mL 时清除率达 60.14%[图 15(a)]，说明香菇胞外多糖能够提供较为充足的氢供体，有效终止 DPPH 自由基的链式反应。ABTS 与过硫酸钾反应生成蓝绿色阳离子自由基 $ABTS^{+}$，当加入具有抗氧化活性的样品后，$ABTS^{+}$被还原为 ABTS，导致吸光度下降[35]。对 $ABTS^{+}$自由基的清除率呈先升后降趋势，在 0.8 mg/mL 时达到峰值 53.47%[图 15(b)]，抗氧化能力最佳，而浓度过高样品中的多糖分子发生聚集，影响了抗氧化基团与自由基的反应，吸光度降低。羟自由基是一种具有高度活性的自由基，它极易氧化各种生物大分子，导致氧化损伤[36]。对羟自由基的清除效果与 VC 对照品趋势一致，均随浓度阶梯式上升，在 1.0 mg/mL 时清除率达 93.94%，接近 VC 水平[图 15(c)]，这是由于香菇多糖可能通过提供大量氢原子、稳定自由基中间体等方式，对羟自由基进行高效清除[37]。以上结果表明，该多糖在适宜浓度下均具有良好自由基清除能力。



注: a. 热重曲线; b. 差热重曲线; c. 差示扫描量热曲线。

图 14　香菇多糖同步热分析图谱

Fig.14　Thermogravimetric-differential scanning calorimetry profile of *Lentinula edodes*

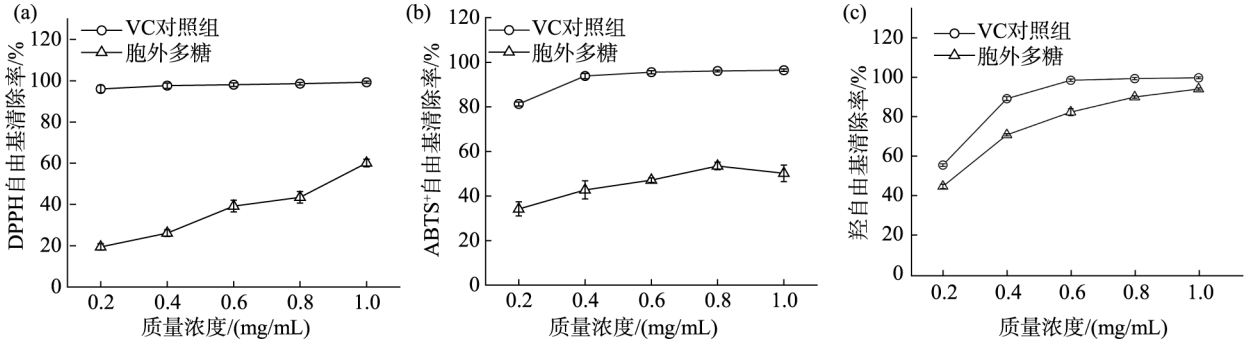


图 15　不同质量浓度下体外抗氧化分析

Fig.15　*In vitro* antioxidant analysis at various mass concentrations

3　结　论

本研究优化香菇胞外多糖发酵工艺, 确定最佳培养基为 20 g/L 葡萄糖、5 g/L 酵母膏; 在 pH 6、装液量 101 mL、转速 149 r/min、接种量 5%、发酵 8 d, 多糖产量达 (1.35±0.24) g/L。所得多糖样品结构疏松、纯度高、热稳定性良好; 胞外多糖浓度在 1.0 mg/mL 时 DPPH 自由基和羟自由基清除率为 60.14%、93.94%, 在 0.8 mg/mL 时, $ABTS^{+}$清除率为 53.47%, 均表现出良好抗氧化活性。综上, 经工艺优化不仅提高香菇多糖产量, 而且所得香菇多糖品质高, 质量稳定, 具有良好抗氧化特性, 具备规模化生产的潜力。

参考文献

[1] Reis F S, Barros L, Martins A, et al. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(2): 191–197.

[2] 张淇淇, 周良, 朱俊豪, 等. 香菇的药用价值及其产品开发前景[J]. 长江蔬菜, 2020(2): 38–43.
Zhang Qiqi, Zhou Liang, Zhu Junhao, et al. Medicinal value of *Lentinus edodes* and its product development prospects [J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2020(2): 38–43.

[3] 张彩芳, 秦令祥, 周婧琦, 等. 基于响应面法优化双酶耦合超高压提取香菇多糖工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(9): 69–74.
Zhang Caifang, Qin Lingxiang, Zhou Jingqi, et al. Optimization of dual-enzyme coupled ultra-high pressure extraction of Lentinan from *Lentinus edodes* by response surface methodology and its antioxidant activity [J]. China Food Additives, 2022, 33(9): 69–74.

[4] Wen Chaoting, Ye Zhiqiang, Liu Guoyan, et al. Isolation, purification, and characterization of *Lentinus edodes* polysaccharides extracted with subcritical water enhanced with deep eutectic solvent [J]. Chemistry & Biodiversity, 2025, 22(6): e202402658.

[5] Tan Lun, Fan Caiyun, Wang Dian, et al. The effects of lentinan on the hematological and immune indices of dairy cows [J]. Animals (Basel), 2024, 14(9): 1314.

[6] Xu Hongyan, Han Guocai, Li Yanyan, et al. Enhancing yield and quality: research and practice of agro-forest waste for *Lentinus edodes* (shiitake mushroom) cultivation [J]. Frontiers in Nutrition, 2025, 12: 1538039.

[7] 颜梦秋, 刘艳芳, 唐传红, 等. 食药用菌液体发酵产品在食品领域应用进展[J]. 食品与机械, 2023, 39(8): 227–233.
Yan Mengqiu, Liu Yanfang, Tang Chuanhong, et al. Progress in the application of submerged fermentation products of edible and medicinal fungi in the food field [J]. Food & Machinery, 2023, 39(8): 227–233.

[8] 于亚宁, 邱田美, 侯杰, 等. Box-Behnken 响应面法优化荷叶离褶伞液体发酵培养基[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2023, 40(3):

182–187.
Yu Yaning, Qiu Tianmei, Hou Jie, et al. Optimization of liquid fermentation medium for *Lyophyllum decastes* using Box-Behnken response surface methodology [J]. Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science), 2023, 40(3): 182–187.

[9] 侯诗瑶. 不同香菇菌株菌丝体多糖含量、组成及其体外抗氧化活性分析[D]. 成都: 四川农业大学, 2023: 21–27.
Hou Shiyao. Analysis of polysaccharide content, composition, and *in vitro* antioxidant activity in mycelia of different *Lentinus edodes* strains [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2023: 21–27.

[10] 何茂兰. 不同金属离子对香菇菌丝体多糖含量的影响及其机制研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2019: 19–28.
He Maolan. Effects of different metal ions on polysaccharide content in mycelia of *Lentinus edodes* and its mechanism study [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2019: 19–28.

[11] Adil B, Xiang Q, He M, et al. Effect of sodium and calcium on polysaccharide production and the activities of enzymes involved in the polysaccharide synthesis of *Lentinus edodes* [J]. AMB Express, 2020, 10(1): 47.

[12] 黄蓓蓓, 王永志. 香菇菌株 LE08 液体发酵及多糖提取工艺的优化[J]. 中国调味品, 2021, 46(11): 65–68.
Huang Beibei, Wang Yongzhi. Optimization of liquid fermentation and polysaccharide extraction process of *Lentinus edodes* strain LE08 [J]. China Condiment, 2021, 46(11): 65–68.

[13] 徐冲, 冯敏, 柴林山, 等. 香菇液体发酵高产多糖菌株筛选[J]. 微生物学杂志, 2022, 42(1): 107–111.
Xu Chong, Feng Ming, Chai Linshan, et al. Screening of high polysaccharide-producing strains of *Lentinus edodes* by liquid fermentation [J]. Journal of Microbiology, 2022, 42(1): 107–111.

[14] Liang Yi, Dai Dan, Chang Wanqiu, et al. Biological characteristics, domesticated cultivation protocol, antioxidant activity, and protective effects against cellular oxidative stress of an underutilized medicinal mushroom: *Fomitopsis palustris* [J]. Journal of Fungi, 2024, 10(6): 380.

[15] 甘宇萌, 陈钢, 刘凯莉. 赣南脐橙皮茶发酵工艺及抗氧化功能研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(4): 186–193.
Gan Yumeng, Chen Gang, Liu Kaili. Study on the fermentation process and antioxidant function of Gannan navel orange peel tea [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(4): 186–193.

[16] 逄梦玉, 隋昕怡, 刘丹, 等. 桑黄多糖提取工艺优化、结构表征及抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(12): 48–57.
Pang Mengyu, Sui Xinyi, Liu Dan, et al. Study on optimization of extraction process, structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Sanghuangpororus* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(12): 48–57.

[17] 陈衍真, 满文娟, 程雷娜, 等. 响应面法优化肉苁蓉多糖提取液的脱色工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(5): 94–103.
Chen Yanzhen, Man Wenjuan, Cheng Leina, et al. Optimization of decolorization process of *Cistanche deserticola* polysaccharide extract by response surface methodology and its antioxidant activity [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(5): 94–103.

[18] Liu Min, Liu Lu, Zhang Guoli, et al. Study on optimization of liquid fermentation medium and antitumor activity of the mycelium on *Phyllopora lonicerae* [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2024, 34(9): 1898.

[19] 李昆. 松乳菇菌多糖的纯化、结构表征及抗肥胖作用研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2022: 19–20.
Li Kun. Purification, structural characterization and anti-obesity effect of polysaccharides from *Lactarius deliciosus* [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2022: 19–20.

[20] 黄显斌, 蔡为明, 陈青, 等. 秀珍菇液体菌种培养基及培养条件优化[J]. 北方园艺, 2025(3): 105–113.
Huang Xianbin, Cai Weiming, Chen Qin, et al. Optimization of liquid spawn medium and culture conditions for *Pleurotus geesteranus* [J]. Northern Horticulture, 2025(3): 105–113.

[21] 张泽生, 史佳宁, 商蕊. 桦褐孔菌菌丝体深层培养条件优化的研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(10): 49–53.
Zhang Zesheng, Shi Jianing, Shang Rui. Study on optimization of submerged culture conditions for *Inonotus obliquus* Mycelium [J]. Food Research and Development, 2009, 30(10): 49–53.

[22] Hamza A, Khalad A, Kumar D S. Enhanced production of mycelium biomass and exopolysaccharides of *Pleurotus ostreatus* by integrating response surface methodology and artificial neural network [J]. Bioresource Technology, 2024, 399: 130577.

[23] Miyazaki T. Glycoside hydrolases active on microbial exopolysaccharide α-glucans: structures and function [J]. Essays in Biochemistry, 2023, 67(3): 505–520.

[24] Lakshmi S A, Alexpandi R, Shafreen R M B, et al. Evaluation of antibiofilm potential of four-domain *α*-amylase from *Streptomyces griseus* against exopolysaccharides (EPS) of bacterial pathogens using *Danio rerio* [J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(5): 243.

[25] Ren Kexin, Wang Qiang, Hu Mengkai, et al. Research progress on the effect of autolysis to *Bacillus subtilis* fermentation bioprocess [J]. Fermentation, 2022, 8(12): 685.

[26] 崔林虎 赵丽, 孙闯, 等. 蛹虫草液体发酵菌株筛选及其胞外产虫草素多糖条件的初步优化[J]. 食药用菌, 2025, 33(1): 47–51.
Cui Linhu, Zhao Li, Sun Chuang, et al. Screening of *Cordyceps militaris* strains for liquid fermentation and preliminary optimization of conditions for exopolysaccharide production with cordycepin [J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2025, 33(1): 47–51.

[27] 李玉婷, 陈梦, 李安妮, 等. 细脚虫草多糖发酵条件优化及抗氧化活性[J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2025, 34(1): 31–40.
Li Yuting, Chen Meng, Li Anni, et al. Optimization of fermentation conditions and antioxidant activity of polysaccharides from *Cordyceps gracilis* [J]. Journal of Jiangsu Ocean University (Natural Science Edition), 2025, 34(1): 31–40.

[28] 刘潇婕, 黄青巧, 刘秀宇, 等. 灵芝-刺梨双向发酵工艺及发酵产物抗氧化活性评价[J]. 现代食品科技, 2025, 41(7): 125–132.
Liu Xiaojie, Huang Qingqiao, Liu Xiuyu, et al. Evaluation of the bidirectional fermentation process of *Ganoderma lucidum* and *Rosa roxburghii* tratt and the antioxidant activity of the fermentation products [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(7): 125–132.

[29] 吴欢琪, 周思怡, 周洋漾, 等. 超声辅助低共熔溶剂提取苦竹笋多糖及其体外活性分析[J]. 食品工业科技, 2026, 47(8): 250–262.
Wu Huanqi, Zhou Siyi, Zhou Yangyang, et al. Ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of polysaccharides from bitter

bamboo shoots and their *in vitro* activity analysis [J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(8): 250–262.

[30] 赵婷婷, 商洛华, 姚肖翰, 等. 香菇菌柄营养成分、多糖结构表征及其体外抗氧化活性[J]. 菌物研究, 2024, 22(4): 387–394.
Zhao Tingting, Shang Luohua, Yao Xiaohan, et al. Nutritional components, structural characterization of polysaccharides from *Lentinus edodes* stipe and their *in vitro* antioxidant activity [J]. Journal of Fungal Research, 2024, 22(4): 387–394.

[31] 朱俊友, 李志佳, 董赵微, 等. 香菇多糖提取、结构和生物活性的研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2022, 43(5): 125–136.
Zhu Junjie, Li Zhijia, Dong Zhaowei, et al. Research progress on extraction, structure and biological activity of *Lentinus edodes* polysaccharides [J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2022, 43(5): 125–136.

[32] 王爽, 夏禛, 胡亚敏, 等. 基于试验和分子动力学模拟的海藻多糖热解机理[J]. 农业工程学报, 2016, 32(S2): 338–343.
Wang Shuang, Xia Zhen, Hu Yamin, et al. Pyrolysis mechanism of seaweed polysaccharides based on experiment and molecular dynamics simulation [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2016, 32(S2): 338–343.

[33] 钟思彦, 邹波, 吴继军, 等. 黄皮多糖结构表征及抗氧化与益生活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(3): 234–242.
Zhong Siyan, Zou Bo, Wu Jijun, et al. Structural characterization, antioxidant and prebiotic activities of polysaccharides from *Clausena lansium* [J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(3): 234–242.

[34] 熊双丽, 卢飞, 史敏娟, 等. DPPH 自由基清除活性评价方法在抗氧化剂筛选中的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(8): 380–383.
Xiong Shuangli, Lu Fei, Shi Minjuan, et al. Research progress in evaluation method of DPPH free radical scavenging activity in antioxidant screening [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(8): 380–383.

[35] 李希尤, 顾笑远, 毛江浩, 等. 体内和体外抗氧化活性检测方法[J]. 生命的化学, 2024, 44(5): 853–862.
Li Xiyou, Gu Xiaoyuan, Mao Jianghao, et al. *In vivo* and *in vitro* detection methods for antioxidant activity [J]. Chemistry of Life, 2024, 44(5): 853–862.

[36] 崔素华, 梁枫, 丁伯平, 等. 青钱柳提取物体内外抗氧化活性评价方法研究进展[J]. 医学理论与实践, 2023, 36(15): 2552–2554, 2557
Cui Suhua, Liang Feng, Ding Boping, et al. Research progress on evaluation methods for antioxidant activity of *Cyclocarya paliurus* extracts *in vivo* and *in vitro* [J]. Journal of Medical Theory and Practice, 2023, 36(15): 2552–2554, 2557.

[37] Cheng Shuang, He Fei, Fu Longyang, et al. Polysaccharide from rubescens: extraction, optimization, characterization and antioxidant activities [J]. RSC Advances, 2021, 11 (31): 18974–18983.

(责任编辑: 蔡世佳　曹岱琳)