

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2019.01.008

文章编号:2095-6002(2019)01-0047-07

引用格式:钟敏,汤庆莉,吴天祥,等.天麻醇提物对灰树花发酵菌丝体多糖及 β -葡聚糖合成量的影响[J].食品科学技术学报,2019,37(1):47-53.



ZHONG Min, TANG Qingli, WU Tianxiang, et al. Effects of *Rhizoma gastrodiae* ethanol extracts on mycelia polysaccharides and β -glucan biosynthesis quantity of *Grifola frondosa*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019,37(1): 47-53.

天麻醇提物对灰树花发酵菌丝体多糖及 β -葡聚糖合成量的影响

钟敏¹, 汤庆莉¹, 吴天祥^{1,2,*}, 芦红云¹, 聂文强¹

(1. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州 贵阳 550025;

2. 贵州大学明德学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要:在灰树花液体深层发酵体系中添加天麻醇提物,考察天麻醇提物对灰树花发酵菌丝体生物量、菌丝体多糖及 β -葡聚糖含量的影响,并进一步研究起显著促进作用的关键特征成分;同时,采用高效液相色谱法对7 g/L天麻醇提物中的特征成分进行定量分析,研究了对灰树花菌丝体生物量、菌丝体多糖及 β -葡聚糖起促进作用的关键特征成分及优化添加量。结果表明,适当浓度的天麻醇提物能够显著提高灰树花菌丝体生物量、菌丝体多糖及 β -葡聚糖的含量,在其质量浓度为7 g/L时,菌丝体干重、菌丝体多糖及 β -葡聚糖含量均达到最大值,分别为1.708 g/L、5.974%和2.055 mg/g,与不添加天麻醇提物相比分别增加了0.36、1.29和1.44倍($P < 0.05$)。天麻醇提物中的特征成分分别为天麻素5.8375 mg/g,对羟基苯甲醇1.1072 mg/g,对羟基苯甲醛0.6601 mg/g,对灰树花菌丝体生物量、菌丝体多糖及 β -葡聚糖起促进作用的关键特征成分均为对羟基苯甲醛,其优化添加量分别为100、250、150 mg/L。

关键词:天麻特征成分;灰树花;菌丝体多糖; β -葡聚糖;对羟基苯甲醛

中图分类号:TS201.1; Q538

文献标志码:A

灰树花(*Grifola frondosa*)是一种食药两用真菌,其营养价值较高且生物活性物质丰富^[1-2]。灰树花多糖是最主要的一类活性成分,其结构复杂,按链键结构可分为 α 型与 β 型,其中具有生物活性作用的多糖大多为 β 构型葡聚糖。 β -葡聚糖不仅可构筑各种生物的细胞壁,而且还能参与到各种生化反应过程中^[3]。药食两用菌 β -葡聚糖因其独特的生物活性而引起国内外学者的广泛关注,目前已有大量关

于药食两用菌 β -葡聚糖生物活性的研究报道。 β -葡聚糖具有抗肿瘤^[4-6]、消炎^[7-8]、抗病毒^[9]、抗氧化^[10-11]及抗血栓和抗凝血^[12]等作用。因此, β -葡聚糖的研究具有非常重要的意义。

天麻(*Rhizoma gastrodiae*)为我国名贵中药材之一,含有的特征成分有天麻素(GA)、对羟基苯甲醇(HA)、对羟基苯甲醛(HBA)等^[13-15]。研究表明,适量中药或特殊刺激物在发酵培养基中的添加,可

收稿日期:2018-03-19

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目([2014]31460537)。

第一作者:钟敏,女,硕士研究生,研究方向为发酵工程。

*通信作者:吴天祥,男,教授,博士,主要从事发酵工程与生物转化方面的研究。

促进药用真菌的菌体生长和活性物质的产生。Yang 等^[16]和 Tang 等^[17]发现通过添加乙醇、乳酸到灵芝液体发酵培养基中可显著促进灵芝菌丝体生长和多糖的合成。

课题组前期研究结果表明,在灰树花液体发酵体系中添加天麻提取物可显著促进灰树花细胞生长和胞外多糖的生物合成^[18-22],而天麻醇提物对灰树花菌丝体多糖及起活性作用的关键成分 β -葡聚糖的影响未进行研究,实验首先研究了天麻醇提物对灰树花发酵菌丝体生物量、菌丝体多糖及 β -葡聚糖合成量的影响,然后研究了影响它们的关键特征成分及最适添加量,为探明液体深层发酵提高灰树花菌丝体生物量、菌丝体多糖及 β -葡聚糖产量提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

灰树花: AS51616, 中国微生物菌种保藏管理中心。

天麻, 贵州省德江县天麻基地; 对羟基苯甲醛(144088-50G)、对羟基苯甲醇(H20806-10G)和 β -葡聚糖(G6513-50MG), 美国 Sigma 公司; 天麻素(20 mg)、纤维素酶(3 U/mg)、果胶酶(40 U/mg), 北京索莱宝科技有限公司; 木瓜蛋白酶(1×10^5 U/g), 南宁庞博生物工程有限公司; 刚果红, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 葡萄糖, 天津市大茂化学试剂厂; 蛋白胨, 上海盛思生化科技有限公司; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、无水乙醇, 成都金山化学试剂有限公司; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 天津市光复科技发展有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

BXM-30R 型立式灭菌锅、GZX-9070 MBE 型数显鼓风干燥箱、SPX-150B-Z 型恒温培养箱, 上海博讯医疗生物仪器股份有限公司; SW-CJ-1D 型净化工作台, 苏州净化设备有限公司; SG8200HPT 型超声波清洗机, 上海冠特超声仪器有限公司; TDL-40B 型高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; CP114 型电子天平, 奥豪斯仪器(上海)有限公司; TS-2102C 型恒温振荡器, 上海天呈实验仪器制造有限公司; UV-1800 型双光路紫外可见光光度计, 上海欣茂仪器有限公司。

1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)斜面培养基(g/L): 马铃薯(去皮) 200, 葡萄糖 20, 蛋白胨 2, KH_2PO_4 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, 琼脂 20, 自然 pH 值条件。

液体种子培养基(g/L): 葡萄糖 30, 蛋白胨 2, 酵母膏 6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KH_2PO_4 0.5, 自然 pH 值条件。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 50, 蛋白胨 5, 酵母膏 10, KH_2PO_4 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2, 自然 pH 值条件。

1.4 培养方法

1.4.1 斜面种子培养

用接种铲从母种试管中挑取黄豆粒大小的菌丝块于 PDA 斜面培养基中部, 置于 25 ℃ 的恒温培养箱中培养至菌丝体长满整个斜面。

1.4.2 液体种子培养

用接种勺从斜面种子培养基中刮取蚕豆粒大小的菌丝体, 接种于液体培养基中, 250 mL 锥形瓶装液量 100 mL, 25 ℃、150 r/min 摇床培养 4~7 d。

1.4.3 摇瓶发酵培养

用移液枪按接种量体积分数 10% 吸取液体种子培养液接种于发酵培养基中, 250 mL 锥形瓶装液量 100 mL, 25 ℃、150 r/min 摇床培养 12 d。

1.5 天麻醇提物制备

参照文献[23]制备天麻醇提物。天麻清水洗净后于 55 ℃ 条件下烘干, 粉碎机粉碎后过 80 目筛即得天麻粉末。准确称取 20 g 天麻粉末加体积分数 75% 乙醇 200 mL, 常温浸提 48 h, 过滤, 减压旋转蒸发除去乙醇, 用蒸馏水定容至 50 mL, 过滤, 滤液用于添加至灰树花发酵培养基中。

1.6 灰树花菌丝体多糖及 β -葡聚糖的提取

将发酵液用滤纸过滤收集菌丝体, 蒸馏水洗多次后于 55 ℃ 干燥箱中烘至恒重并研磨成粉末, 称取一定质量的灰树花菌丝体粉末, 加适当比例蒸馏水, 室温条件下 300 W 超声处理 15 min, 然后按菌丝体质量的 1.5% 添加复合酶(纤维素酶: 木瓜蛋白酶: 果胶酶=2:1:2), 于 50 ℃ 恒温水浴锅中浸提 1 h 后迅速升温至 90 ℃ 灭酶 10 min, 6 000 r/min 离心 20 min, 取上清液加 4 倍体积乙醇溶液(体积分数为 95%), 4 ℃ 醇沉 24 h, 4 000 r/min 离心 15 min 后得沉淀, 用乙醇溶液(体积分数为 95%)清洗沉淀 2 次, 最后将沉淀烘干即得胞内多糖。

1.7 分析方法

1.7.1 菌丝体干重的测定

发酵结束后,将发酵液用滤纸过滤获得湿菌丝球,用蒸馏水反复冲洗菌丝球后,置于 55 ℃ 干燥箱中烘至恒重,准确称其质量。1 L 发酵液中所得菌丝体质量即为菌丝体干重,单位 g/L。

1.7.2 菌丝体多糖及β-葡聚糖含量的测定

将 1.6 所得沉淀加蒸馏水复溶,采用苯酚-硫酸法^[24]测多糖含量,刚果红显色法^[25]测β-葡聚糖含量,每组处理 3 个平行,取各得率的平均值。菌丝体多糖及β-葡聚糖得率计算公式如式(1)、式(2)：

$$\text{多糖得率} = m(\text{多糖}) / m(\text{菌丝体}) \times 100\% ; (1)$$
$$w(\beta\text{-葡聚糖}) = m(\beta\text{-葡聚糖}) / m(\text{菌丝体})。(2)$$

式(1)、式(2)中, $m(\text{多糖})$ 、 $m(\text{菌丝体})$, g;
 $m(\beta\text{-葡聚糖})$, mg。

1.7.3 高效液相色谱分析

取 1 mL 天麻醇提液过 0.45 μm 超滤膜后用 HPLC 法检测^[2]。色谱柱为 Agilent TC - C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为体积分数 0.1% 磷酸(A)和乙腈(C)。梯度洗脱:0 ~ 35 min, 体积分数 3% ~ 30% C; 35 ~ 40 min, 体积分数 30% ~ 100% C; 40 ~ 45 min, 体积分数 100% ~ 3% C。柱温 30 ℃, 流速 1.0 mL/min; 检测波长 221 nm。

1.8 统计方法

所有实验数据均使用 SPSS 17.0 软件分析显著性,用 Origin 8.0 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 天麻醇提物添加量对灰树花菌丝体生物量、菌丝体多糖及β-葡聚糖的影响

在灰树花发酵体系中添加不同质量浓度的天麻醇提物(1 ~ 13 g/L),并以空白组作对照,发酵 12 d 后测定比较各处理对灰树花菌丝体干重、菌丝体多糖及β-葡聚糖的影响,其结果如图 1、图 2。随天麻醇提物质量浓度的增加,灰树花菌丝体干重、菌丝体多糖及β-葡聚糖整体呈现先增加后降低的趋势。由图 1 可知,天麻醇提物的各处理组中,灰树花菌丝体干重均高于空白组,并且添加量在 3 ~ 13 g/L 促进作用具有显著性($P < 0.05$),在添加量为 7 g/L 时促进效果最好(此结果与贺宗毅等^[22]和 Wu 等^[23]研究结果一致),此时菌丝体干重达最大值 1.708

g/L,与空白对照组相比增加了 35.56%。随天麻醇提物质量浓度的继续增大,菌丝体生物量有所降低,可能是因为天麻醇提物中存在一些抑制灰树花生长的成分,在天麻醇提物质量浓度过高时抑制因子的作用增强。

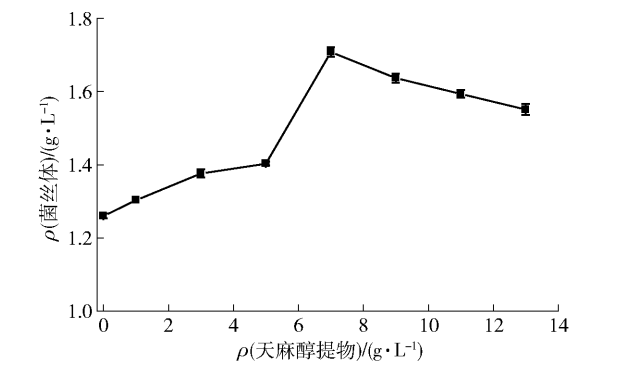


图 1 天麻醇提物对灰树花菌丝体生物量的影响
Fig. 1 Effect of concentrations of *R. gastrodiae* ethanol extract on mycelia biomass by submerged culture of *Grifola frondosa*

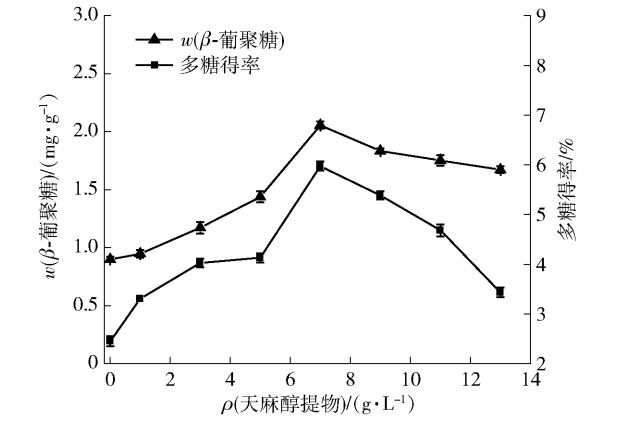


图 2 天麻醇提物对灰树花菌丝体多糖和β-葡聚糖的影响
Fig. 2 Effect of concentrations of *R. gastrodiae* ethanol extract on mycelia polysaccharides and β-glucan by submerged culture of *Grifola frondosa*

由图 2 可知,天麻醇提物的各处理组中,灰树花发酵菌丝体多糖及β-葡聚糖含量均高于空白组,添加量在 7 ~ 11 g/L 和 5 ~ 13 g/L 分别能显著增加灰树花胞内多糖和β-葡聚糖的含量($P < 0.05$)。其中在添加量为 7 g/L 时效果最佳,此时胞内多糖和β-葡聚糖的含量分别达到 5.974% 和 2.055 mg/g,与空白对照组相比分别增加了 128.84% 和 143.74%。结果表明,添加适当质量浓度的天麻醇提物能够提高灰树花胞内多糖及

β -葡聚糖的含量,可能是因为适当质量浓度的天麻醇提取物促进了葡萄糖的转运,加速了葡萄糖向糖原转化^[26],从而提高了多糖的含量,同时天麻醇提取物的添加还可能改变了多糖的合成方式,从而使多糖的构型发生了改变,使 β -葡聚糖的含量提高,具体原因还有待进一步研究。

2.2 天麻醇提取物特征成分定量分析

前期课题组研究结果表明,在经过高温高压灭菌后天麻醇提取物中的特征成分含量会发生很大的变化^[27]。由于天麻醇提取物参与灰树花深层发酵前需经高温高压灭菌,因此在探究何种特征成分对灰树花菌丝体多糖及 β -葡聚糖含量影响最显著时应按灭菌后的含量添加至发酵培养基中。天麻醇提取物灭菌后的高效液相色谱图如图3,通过与混合标准品谱图(图4)比对发现,天麻醇提取物的特征成分含天麻素、对羟基苯甲醛、对羟基苯甲醇,其含量分别为天麻素 5.838 mg/g,对羟基苯甲醛 1.107 mg/g,对羟基苯甲醇 0.660 mg/g。

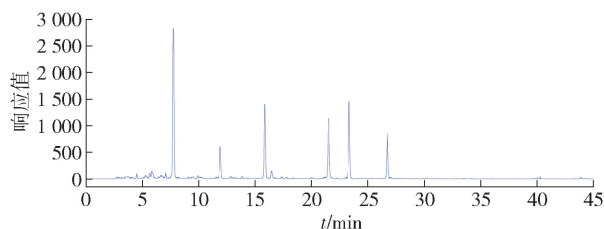


图3 天麻醇提取物高效液相色谱

Fig.3 HPLC chromatogram of *R. gastrodiae* ethanol extract

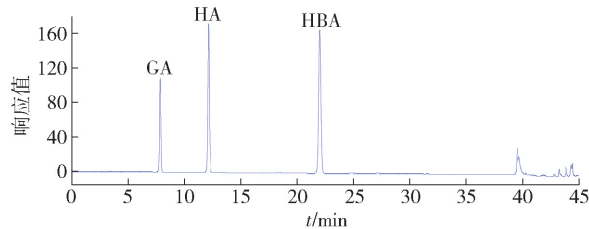


图4 GA、HA、HBA 混合标准品高效液相色谱

Fig.4 HPLC chromatogram of mixed standard of GA, HA and HBA

2.3 天麻醇提取物不同特征成分对灰树花菌丝体生物量、菌丝体多糖及 β -葡聚糖的影响

以灭菌后 7 g 天麻醇提取物中所含 GA、HA 和 HBA 的量分别添加至灰树花发酵体系中,即实验组分别为天麻醇提取物 7 g/L, GA 40.9 mg/L, HA 4.6 mg/L, HBA 7.8 mg/L,探究影响灰树花菌丝体生物量、菌丝体多糖及 β -葡聚糖含量的关键特征成分,

结果见图5、图6。整体来看,4组实验组相比于空白组均能一定程度提高灰树花菌丝体生物量、菌丝体多糖及 β -葡聚糖的含量;而单独添加3种天麻特征成分的实验组中,HBA提高灰树花菌丝体生物量、菌丝体多糖及 β -葡聚糖的含量效果最佳,但都低于天麻醇提取物实验组。初步断定HBA可能是天麻醇提取物中提高灰树花菌丝体生物量、菌丝体多糖及 β -葡聚糖含量的关键成分,后续实验将对关键特征成分的最适添加量进行研究。

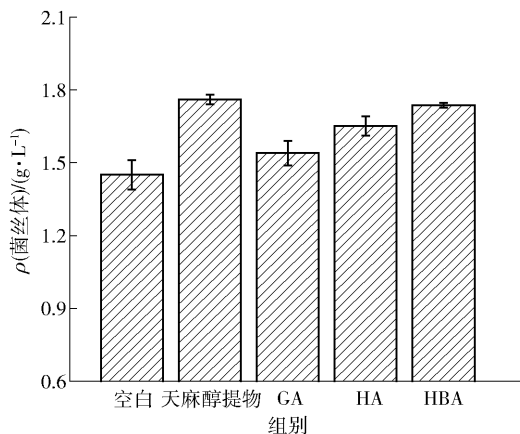


图5 天麻醇提取物特征成分对灰树花菌丝体生物量的影响

Fig.5 Effect of characteristic components of *R. gastrodiae* ethanol extract on mycelia biomass by submerged culture of *Grifola frondosa*

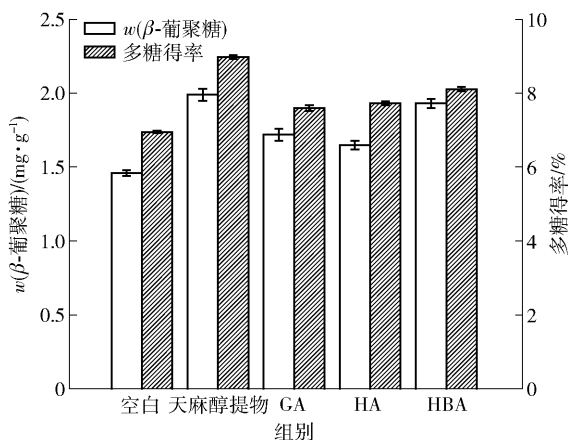


图6 天麻特征成分对灰树花菌丝体多糖和 β -葡聚糖的影响

Fig.6 Effect of characteristic components of *R. gastrodiae* ethanol extract on mycelia polysaccharides and β -glucan by submerged culture of *Grifola frondosa*

2.4 天麻醇提取物特征成分添加量对灰树花发酵菌丝体生物量的影响

为进一步确定对羟基苯甲醛是否是促进灰树花

菌丝体生物量的关键成分及其最适添加浓度,在灰树花发酵体系中分别添加不同质量浓度的3种单一天麻特征成分,发酵12 d后分别测定灰树花菌丝体生物量,结果如图7。菌丝体干重随3种单一天麻特征成分质量浓度的增大整体呈先增加至最大值然后降低的趋势。与空白组相比,天麻素质量浓度在50~200 mg/L时可促进灰树花菌丝体生长但效果不显著($P>0.05$),质量浓度在250~350 mg/L时表现出抑制作用;对羟基苯甲醇质量浓度在50~300 mg/L时可不同程度促进灰树花菌丝体生长,但在200 mg/L时促进效果显著;对羟基苯甲醛质量浓度在100~150 mg/L时均可显著促进灰树花菌丝体生长($P<0.05$),其中对羟基苯甲醇和对羟基苯甲醛质量浓度分别为200 mg/L和100 mg/L时效果最佳,菌丝体干重最大值分别为1.577 g/L和1.653 g/L,与空白组比较,分别增加了28.63%和34.83%。因此,在3种天麻特征成分的添加中,100 mg/L对羟基苯甲醛对灰树花菌丝体生物量的促进效果是较优的。

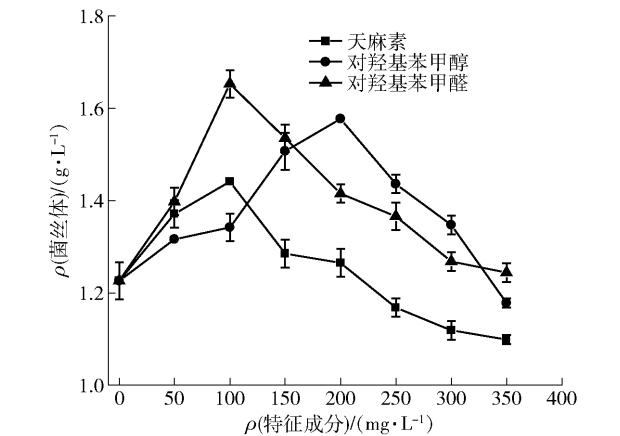


图7 天麻醇提物特征成分添加量与灰树花菌丝体生物量的关系

Fig.7 Effect of various concentrations of GA, HA and HBA on mycelia biomass by submerged culture of *Grifola frondosa*

2.5 天麻醇提物特征成分添加量对灰树花发酵菌丝体多糖的影响

为确定3种天麻特征成分对灰树花胞内多糖影响的关键成分及最适添加量,向灰树花发酵体系中分别添加不同质量浓度的3种单一天麻特征成分,发酵12 d后分别测定灰树花胞内多糖含量,结果如图8。从整体看来,随3种天麻特征成分添加量的

增大,胞内多糖的含量先逐渐增大至最大值,随后又逐渐降低。与空白组比较,天麻素质量浓度在50~150 mg/L时均可促进胞内多糖的合成但效果不显著($P>0.05$),质量浓度在250~350 mg/L时表现出抑制作用;添加对羟基苯甲醇和对羟基苯甲醛的实验组相比空白组均能一定程度提高灰树花胞内多糖的含量,并且在150~350 mg/L时,对羟基苯甲醛对胞内多糖含量的影响均高于其他2种特征成分,其中对羟基苯甲醛添加量为250 mg/L时对灰树花胞内多糖合成的促进作用效果较优。因此,3种天麻特征成分中对羟基苯甲醛对灰树花胞内多糖合成的促进作用最大,其优化添加量为250 mg/L。

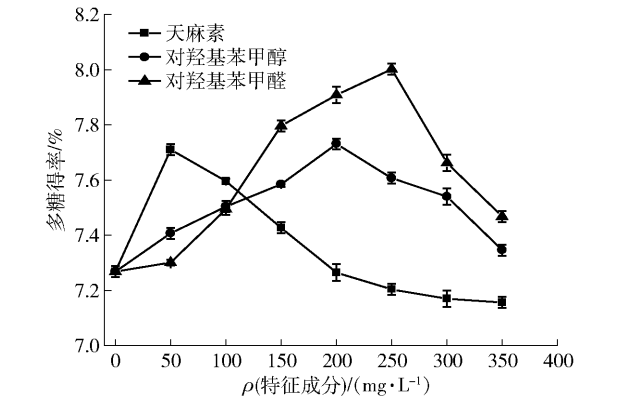


图8 天麻醇提物特征成分添加量与灰树花菌丝体多糖的关系

Fig.8 Effect of various concentrations of GA, HA and HBA on mycelia polysaccharides by submerged culture of *Grifola frondosa*

2.6 天麻醇提物特征成分添加量对灰树花发酵菌丝体β-葡聚糖的影响

将不同浓度的3种天麻特征成分分别添加至发酵培养基中,探究对灰树花菌丝体β-葡聚糖影响的关键特征成分及其最适添加量,发酵12 d后分别测定其菌丝体β-葡聚糖含量,结果如图9。整体看来,灰树花菌丝体β-葡聚糖含量随添加物质量浓度的增大先增加至最大值后降低。添加物质量浓度为50~250 mg/L时,对羟基苯甲醇和对羟基苯甲醛均能一定程度提高灰树花菌丝体β-葡聚糖的含量;天麻素质量浓度为50~200 mg/L时,对β-葡聚糖含量的影响是起促进作用的,后随添加量继续增大菌丝体β-葡聚糖的合成作用受到抑制。对羟基苯甲醛的添加量为150 mg/L时,对菌丝体β-葡聚糖合成的

促进作用较优。

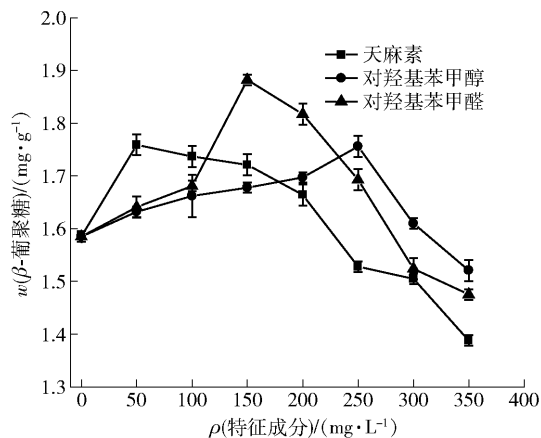


图9 天麻醇提取物特征成分添加量与灰树花菌丝体 β -葡聚糖的关系

Fig. 9 Effect of various concentrations of GA, HA and HBA on mycelia β -glucan by submerged culture of *Grifola frondosa*

3 结 论

主要研究了天麻醇提物的特征成分对灰树花发酵菌丝体生长、菌丝体多糖及 β -葡聚糖的影响。不同浓度的天麻醇提物均能一定程度促进灰树花菌体的生长、菌丝体多糖及 β -葡聚糖的合成,在其质量浓度为7 g/L时促进效果较优。利用高效液相色谱对7 g/L天麻醇提物中的特征成分进行定量分析,所得天麻素、对羟基苯甲醇和对羟基苯甲醛的含量分别为5.837 5、1.107 2、0.660 1 mg/g。将灭菌后7 g/L天麻醇提物中所含的3种单一成分分别添加到培养基中,发现对羟基苯甲醛是均能显著促进灰树花菌丝体生长、菌丝体多糖和 β -葡聚糖合成的关键特征成分,其优化添加量分别为100、250、150 mg/L。天麻醇提物影响胞内多糖及 β -葡聚糖合成的机理可能是因为不同天麻醇提物添加量影响了葡萄糖的转运,改变了葡萄糖向糖原转化,从而影响了胞内多糖的合成,同时天麻醇提物的添加还可能改变了多糖的合成方式,从而使多糖的构型发生了改变,使 β -葡聚糖的含量发生改变,具体原因还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 聂文强, 吴天祥, 钟敏, 等. 真菌灰树花菌丝体转录

组测序及分析[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 13-18.

NIE W Q, WU T X, ZHONG M, et al. Transcriptome sequencing and analysis of *Grifola frondosa* mycelia[J]. Food Science, 2017, 38(20): 13-18.

[2] 徐晓宝, 吴天祥. 灰树花发酵过程天麻成分变化的HPLC检测方法研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(5): 182-185.

XU X B, WU T X. Determination of extracts from *Gastrodia tuber* fermented with *Grifola frondosa* by HPLC method[J]. China Brewing, 2012, 31(5): 182-185.

[3] MCLINTOSH M, STONE B A, STANISICH V A. Curdlan and other bacterial (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucans[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 68(2): 163-173.

[4] FANG J, WANG Y, LV X, et al. Structure of a β -glucan from *Grifola frondosa* and its antitumor effect by activating dectin-1/Syk/NF- κ B signaling[J]. Glycoconjugate Journal, 2012, 29(5/6): 365-377.

[5] HONG J H, JUNG H K. Antioxidant and antitumor activities of β -glucan-rich exopolysaccharides with different molecular weight from *Paenibacillus polymyxa* JB115[J]. Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2014, 57(1): 105-112.

[6] SONG G, DU Q. Structure characterization and antitumor activity of an α β -glucan polysaccharide from *Auricularia polytricha*[J]. Food Research International, 2012, 45(1): 381-387.

[7] 吴昊, 张建法. β -葡聚糖免疫调节作用的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(1): 97-100.

WU H, ZHANG J F. Research progress about immunomodulatory effect of β -glucan glucan[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2014, 30(1): 97-100.

[8] SMIDERLE F R, BAGGIO C H, BORATO D G, et al. Anti-inflammatory properties of the medical mushroom *Cordyceps militaris* might be related to its linear (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan[J]. PLOS One, 2014, 9(10): 1-11.

[9] JUNG K, HA Y, HA S K, et al. Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* beta-glucan to swine influenza virus by increased production of interferon-gamma and nitric oxide[J]. Zoonoses & Public Health, 2010, 51(2): 72-76.

[10] MAITY P, SEN I K, MAJI P K, et al. Structural, immunological, and antioxidant studies of β -glucan from

- edible mushroom *Entoloma lividoalbum* [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 123:350–358.
- [11] KAO P F, WANG S H, HUNG W T, et al. Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights beta-1,3-glucan from the residue of extracted *Ganoderma lucidum* fruiting bodies [J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2015, 2012(1): 673–764.
- [12] MARTINICHENHERRERO J C, CARBONERO E R, PAJ G, et al. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema maitakei* Hale [J]. Carbohydrate Polymers, 2005, 60(1): 7–13.
- [13] UAN X H, LI Z L, YANG D S, et al. Study on the chemical constituents of *Gastrodia elata* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2013, 36(10): 1608–1611.
- [14] 王亚威, 李志峰, 何明珍, 等. 天麻化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(21): 2974–2976.
WANG Y W, LI Z F, HE M Z, et al. Chemical constituents of *Gastrodia elata* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 44(21): 2974–2976.
- [15] 段小花, 李资磊, 杨大松, 等. 昭通产天麻化学成分研究 [J]. 中药材, 2013, 36(10): 1608–1611.
DUAN X H, LI Z L, YANG D S, et al. Study on the chemical constituents of *Gastrodia elata* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2013, 36(10): 1608–1611.
- [16] YANG H L, WU T X, ZHANG K C. Enhancement of mycelial growth and polysaccharide production in *Ganoderma lucidum* (the Chinese medicinal fungus, ‘Lingzhi’) by the addition of ethanol [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(10): 841–844.
- [17] TANG Y J, ZHONG J J. Exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus, *Ganoderma lucidum*, grown on lactose in a bioreactor [J]. Biotechnology Letters, 2002, 24(12): 1023–1026.
- [18] 张勇, 吴天祥, 徐晓宝, 等. 天麻提取物的制备及其对灰树花发酵的影响 [J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 150–153.
ZHANG Y, WU T X, XU X B, et al. Preparation of *Gastrodia elata* BL. extracts and their effects on *Grifola* *frondosa* in submerged culture [J]. Food & Machinery, 2012, 28(1): 150–153.
- [19] ZHANG Y, WANG N, WU T X. Effect of the extracts from *Gastrodia elata* BL. on mycelial growth and polysaccharide biosynthesis by *Grifola frondosa* [J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(2): 379–384.
- [20] XU X B, WU T X, WANG F. The effect of exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of *Grifola frondosa* by the addition of ethanol extracts from traditional Chinese medicine, *Gastrodia tuber* [J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11(15): 3656–3662.
- [21] WANG N, WU T X, ZHANG Y, et al. Experimental analysis on the effect of addition of *Rhizoma gastrodiae* on mycelia and exopolysaccharide productions by submerged culture of *Grifola frondosa* [J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11(20): 4666–4672.
- [22] 贺宗毅, 吴天祥, 徐晓宝. 中药天麻成分对灰树花胞外多糖合成及相关关键酶的影响 [J]. 食品科学, 2013, 34(11): 199–202.
HE Z Y, WU T X, XU X B. Effect of *Rhizoma gastrodiae* on key enzyme activities involved in the biosynthesis of exopolysaccharides from *Grifola frondosa* in submerged culture [J]. Food Science, 2013, 34(11): 199–202.
- [23] WU C Y, WU T X. Effect of the main ingredients of *Rhizoma gastrodiae* on mycelial biomass and exopolysaccharide productions by submerged culture of *Grifola frondosa* [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2015, 50: 1726–1730.
- [24] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28: 350–356.
- [25] 熊婷. 灵芝发酵物中功能性 β -葡聚糖的提取技术研究 [D]. 株洲: 中南林业科技大学, 2015.
- [26] 上官端琳, 吴素蕊, 赵天瑞, 等. α -萘乙酸对黑脉羊肚菌生物量、胞内多糖含量及多糖抗氧化性能的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(11): 159–162.
- [27] 朱俊杰. 天麻醇提物对灰树花深层发酵代谢影响及其机制研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2016.