

一种野生多孔菌的分离、鉴定、培养条件及抗氧化活性*

王寿南¹ 陈青君² 张国庆^{1**} 李 兵¹ 李伟聪¹ 赵天健¹

¹北京农学院生物科学与工程学院, 农业部都市农业(北方)重点实验室 北京 102206

²北京农学院植物科学技术学院 北京 102206

摘要 多孔菌是一类子实体呈孔状且质地为革质至木质的大型担子菌, 其中一部分具有较高的药用价值。对一株野生多孔菌子实体进行分离纯化获得纯培养BJ菌株, 并对其分类、最适培养条件和液体发酵产物抗氧化活性进行分析。采用形态学和ITS分类学鉴定菌株的分类学地位; 通过测定菌株在不同碳源、氮源等培养基中的生长状况, 研究菌丝最适培养条件; 使用2, 2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 法测定菌株发酵液总抗氧化活性; 使用总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 法、1,1-二苯基-2-苦基肼基自由基 (DPPH) 法测定菌株发酵液菌体的总超氧化物歧化酶活力和自由基清除能力。结果显示: 经鉴定BJ菌株为石榴嗜蓝孢孔菌 (*Fomitiporia punicata*)。菌丝体最适培养碳源为葡萄糖、麦芽糖和淀粉, 最适氮源为酵母浸粉, 最适C/N比为10/1, 最适温度为28 °C, 最适pH为7.0。发酵液总抗氧化活性为0.517 mmol/L (维生素E), 菌体的总超氧化物歧化酶活力为770.37 U/g, DPPH自由基清除力的IC₅₀为2.14 mg/mL。本研究从野外获取了一株高抗氧化活性的药用多孔菌资源, 可为野生药用真菌的开发利用提供理论依据。(图2 表6 参29)

关键词 多孔菌; 鉴定; 培养条件; 抗氧化

CLC Q949.329.81

Isolation, identification, optimal cultivation conditions and antioxidant activity of a wild polypore*

WANG Shounan¹, CHEN Qingjun², ZHANG Guoqing^{1**}, LI Bing¹, LI Weicong¹, ZHAO Tianjian¹

¹ College of Biological Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Key Laboratory of Urban Agriculture (North) of Ministry of Agriculture, Beijing 102206, China

² College of Biological Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

Abstract Polypores are a group of macro-basidiomycetes with poroid hymenophore and corky basidiocarps that are widely distributed all over the world. Some of polypores have high medicinal value. In the present study, a pure culture fungal strain BJ was obtained from fruiting bodies of a wild polypore species. Further studies were investigated including classification, optimal culture conditions, and antioxidant activity of fermentation broth. Classification of this strain was performed using morphological and ITS identification. Optimal culture conditions of mycelia were evaluated based on their growth in different media. Total antioxidant activity of fermentation broth was assayed using the ABTS methods. Total superoxide dismutase and radical scavenging activities were determined with the T-SOD and DPPH methods, respectively. Strain BJ was classified as *Fomitiporia punicata*. Culture conditions showed that the best carbon sources was glucose, maltose, and starch; the best nitrogen source was yeast extract; the best C/N ratio was 10/1; the optimal temperature was 28 °C; and the optimal pH was 7.0. Total antioxidant activity of fermentation broth was 0.517 mM towards Trolox. Total superoxide dismutase and IC₅₀ of radical scavenging activities were 770.37 U/g and 2.14 mg/mL, respectively. This research obtained new fungal strain with antioxidant activity, and could be an important reference for further applications of the medicinal mushroom resources.

Keywords polypore; identification; optimal cultivation conditions; antioxidant

收稿日期 Received: 2016-10-08 接受日期 Accepted: 2016-11-04

*北京市自然科学基金项目(5162006)、北京市科技新星计划项目(xx2015B025)、国家自然科学基金项目(31200070)和北京农学院学位与研究生教育改革与发展项目(5056516004/022)资助 Supported by the Beijing Municipal Natural Science Foundation (5162006), the Beijing NOVA Program (xx2015B025), the National Natural Science Foundation of China (31200070) and the Research Fund for Academic Degree & Graduate Education of Beijing University of Agriculture (5056516004/022)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhangqbua@163.com)

多孔菌广泛分布于世界各地,其中一部分具有较高的药用价值,如灵芝、桑黄、猪苓、茯苓等。我国是世界上多孔菌物种多样性最丰富的国家,已知多孔菌有704种,其中已知的药用多孔菌约60余种^[1-2]。有大量研究报道,灰树花、灵芝、云芝、桦褐孔菌、桑黄等多孔菌,均具有抗氧化和抗肿瘤活性^[3]。

人体正常代谢中产生的少量自由基在体内处于动态平衡,自由基的数量过多导致平衡被打破,造成机体损害。这些自由基能够攻击DNA、蛋白质和脂质,造成DNA链断裂和氧化性损伤、蛋白质交联、脂质过氧化、生物膜结构破坏,并诱发机体衰老、癌症等疾病、造成免疫系统功能下降^[4]。通过体内摄入抗氧化剂,能直接消除自由基,或是作为体内抗氧化酶类的诱导剂,提高相关抗氧化酶类活性,从而有效清除自由基保护机体免受氧化损伤^[5]。近年来,研究人员以桑黄、桦褐孔菌等为材料,研究其提取物的抗氧化活性和抗肿瘤活性,并从多孔菌子实体或发酵液中分离出一些具有较好抗氧化、抗肿瘤作用的化合物^[6-9]。

本研究将利用从北京市密云区溪翁庄镇采集的野生多孔菌子实体为试材,分离获得其菌丝体并对其进行形态学和分子鉴定,在此基础上开展最适培养条件和发酵产物抗氧化活性的研究,旨在将为野生多孔菌资源的开发应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

野生多孔菌子实体采集于北京市密云区溪翁庄镇,采集自黄栌(*Cotinus coggygria* Scop.)树干,由北京农学院生物科学与工程学院分离、鉴定和保藏,菌株编号为BJ。

1.2 培养基

PDA培养基(用于菌株分离与保藏):马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂18 g, pH 7.0-7.2,补蒸馏水至1 L。

PD液体培养基(用于液体发酵培养):马铃薯200 g,葡萄糖20 g, pH 7.0-7.2,补蒸馏水至1 L。

基础培养基(用于最适培养条件试验):葡萄糖20 g,胰蛋白胨2 g,磷酸二氢钾1 g,硫酸镁0.5 g,维生素B1 10 mg,琼脂20 g, pH 7.0-7.2,补蒸馏水至1 L。

1.3 菌株的分离、培养与保存

菌株纯培养的获得采用组织分离法^[10]。

1.4 菌株的形态鉴定

观察记录BJ菌株子实体的形态特征。在PDA平板中央接种BJ菌株纯培养菌饼,距接种点2 cm处斜插入无菌的盖玻片,28℃避光培养。待菌落边缘蔓延至盖玻片后,取出盖玻片置于显微镜下观察并记录。

1.5 ITS分类学鉴定

菌丝体总DNA提取利用DNA提取试剂盒(天根生化科技北京有限公司)。利用真菌ITS通用引物ITS1和ITS4,对5.8S rDNA序列及其两侧的ITS1和ITS2部分序列进行PCR扩增^[11]。(上游引物序列:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';下游引物序列:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR产物利用1%琼脂糖凝胶电泳检测并测序。将测序所得的ITS序

列提交至GenBank数据库,并利用NCBI进行在线BLAST比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)^[12]。选取相近属不同种菌株的ITS序列,采用MEGA 6.0软件构建系统进化树,比较各菌株间同源关系,确定BJ菌株分类学地位。

1.6 不同碳源培养基的利用情况

将基础培养基中20 g葡萄糖作为培养基含碳量的标准,用不同的碳源替换葡萄糖,配置含碳量相同,碳源分别为葡萄糖、淀粉、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇、山梨醇、羧甲基纤维素钠的培养基, pH 7.0-7.2,基础培养基中不加碳源作为对照,每个处理设置3个平行。在各培养基中央接入新鲜的纯培养菌饼,28℃恒温避光培养,每日观察菌丝体的生长状况,待任一培养皿菌丝体铺满平板时,停止培养,观察记录所有平板的菌落形态、测量菌落直径。计算菌丝体生长速度[菌丝体生长速度=菌落直径(mm)÷培养天数(d)]^[12]。下同。

1.7 不同氮源培养基的利用情况

将基础培养基中2 g胰蛋白胨作为培养基含氮量的标准,用不同的氮源替换胰蛋白胨,配置含氮量相同,氮源分别为胰蛋白胨、酵母浸粉、黄豆粉、玉米浆、牛肉浸膏、硝酸铵、硫酸铵、尿素、甘氨酸的培养基, pH 7.0-7.2,基础培养基中不加氮源作为对照,每个处理设置3个平行^[13]。

1.8 不同C/N培养基的利用情况

以基础培养基为基础,通过添加不同质量的大豆蛋白胨,配制C/N比分别为10/1、20/1、30/1、40/1、50/1和60/1的不同培养基, pH 7.0-7.2,每个处理设置3个平行。

1.9 不同生长因子培养基的利用情况

以基础培养基中10 mg维生素B₁为标准,以不同的生长因子替换维生素B₁,配置生长因子分别为维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、维生素C、肌醇的培养基, pH 7.0-7.2,以基础培养基中无生长因子作为对照,每个处理设置3个平行。

1.10 不同pH值下的菌丝体生长情况

配制PDA培养基,调pH值分别为5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5和9.0,每个处理设置3个平行。

1.11 不同温度下的菌丝体生长情况

配制PDA培养基,调pH值为7.0-7.2。接种后分别在16、20、24、26、28、30、32和36℃恒温培养箱中避光培养,每个处理设置3个平行。

1.12 液体发酵培养与发酵产物的收集

采用PD培养基进行液体发酵,在PD培养基中按10%接种量接入液体种、150 r/min、28℃振荡培养7 d后,用8层无菌纱布过滤发酵液,收集菌体备测,并将滤液于4℃、8 000 r/min离心30 min,收集上清液备测。

1.13 发酵液抗氧化活性的测定

总抗氧化能力测定采用ABTS法^[14],使用总抗氧化能力检测试剂盒测定(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.14 发酵液中菌体总超氧化物歧化酶和自由基清除能力的测定

总超氧化物歧化酶测定采用T-SOD法^[15],使用总超氧化物歧化酶测试盒测定(南京建成生物工程研究所)。

自由基清除能力测定采用DPPH自由基清除法^[16]。

2 结果与分析

2.1 形态鉴定

BJ菌株子实体形态见图1A. 子实体为椭圆形、木栓质、有菌柄, 菌盖直径3-5 cm, 外表灰白色内部棕褐色, 有细绒毛. 菌落形态见图1B. 菌丝浓密, 生长前期为白色, 随着培养时间的延长, 菌落边缘会产生少量的黄色色素. 以牛肉膏、酵母膏等作为有机氮源时, 菌落会形成明显的辐射状同心纹. 菌丝显微形态见图1C, 菌丝近透明, 少丛枝, 菌丝有隔, 无分生孢子和锁状联合.



图1 BJ菌株形态特征. (A) 子实体; (B) 菌落; (C) 菌丝体.
Fig. 1 Morphological characteristics of the strain BJ. (A) Fruiting bodies; (B) Colony; (C) Mycelia.

2.2 基于ITS序列的系统发育分析

经PCR扩增和序列测定, 获得BJ菌株ITS序列片段, 长度为749 bp, GenBank登录号为KU842365. 经Blast在线比对后, 与相近种菌株构建系统发育树(图2). 系统发育树表明, BJ菌株为嗜蓝孢孔菌属*Fomitiporia*, 与石榴嗜蓝孢

孔菌*Fomitiporia punicata* (FJ613647.1)和假斑点嗜蓝孢孔菌*Fomitiporia pseudopunctata* (JQ087891.1)的相似性最高, 分别为99%和98%, 遗传距离分别为0.004和0.007.

2.3 不同碳源培养基的利用情况

在最适碳源实验中, 菌丝在以葡萄糖、麦芽糖、淀粉为碳源的培养基上生长速度较快、长势较好, 在以乳糖和羧甲基纤维素钠为碳源的培养基上生长最为缓慢、长势最弱(表1). 综合比较, BJ菌株菌丝培养的最适碳源为葡萄糖(5.05 ± 0.20 mm/d)、麦芽糖(4.95 ± 0.24 mm/d)和淀粉(4.85 ± 0.07 mm/d). BJ菌株生长过程中有少量色素产生. 在以葡萄糖、麦芽糖、淀粉、蔗糖为碳源时菌落出现明显的辐射状同心圆, 其中在葡萄糖和麦芽糖的培养基中, 菌丝稠密, 边缘分泌少量色素.

2.4 不同氮源培养基的利用情况

在最适氮源实验中, 菌丝在以酵母浸粉、牛肉浸膏、胰蛋白胨为氮源的培养基上生长速度较快、长势较好, 在以甘氨酸为氮源的培养基上生长最为缓慢、长势最弱, 在无氮源的培养基中菌丝不生长(表2). 综合比较, BJ菌株培养的最适氮源为酵母浸粉(4.82 ± 0.25 mm/d), 其次为牛肉浸膏(4.77 ± 0.09 mm/d). BJ菌株在除无氮源组外的各培养基中, 菌丝均生长良好. 在硫酸铵培养基中菌丝稀疏, 但分泌较多的色素, 导致菌落形成褐色的色素圈.

2.5 不同C/N培养基的利用情况

在最适C/N实验中, 菌丝在不同C/N的培养基中均可生长

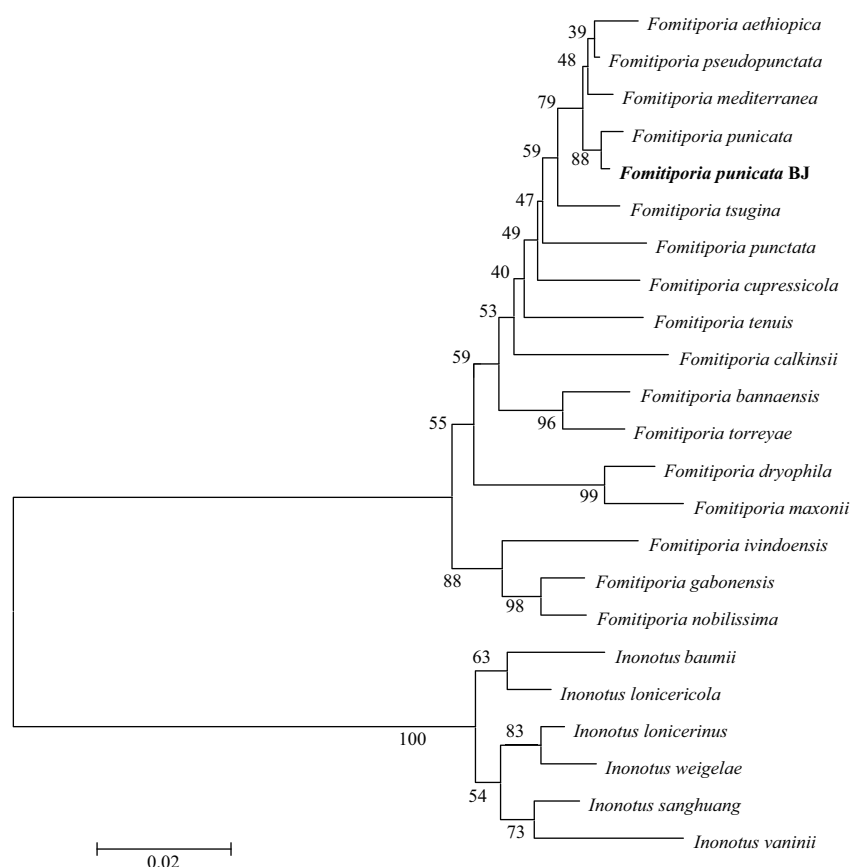


图2 基于ITS序列的BJ菌株与其它层孔菌属和纤孔菌属真菌的系统发育分析.

Fig. 2 Polymeric analysis of strain BJ and other *Phellinus* strains and *Inonotus* species based on ITS sequences.

表1 碳源对BJ菌株菌丝体生长的影响
Table 1 Effect of the carbon source on mycelial growth of strain BJ

碳源 Carbon source	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝长势 Mycelial growth	菌落形态 Colony morphology
葡萄糖 Glucose	5.05 ± 0.20 a	+++	菌落为白色, 有同心圆, 边缘产黄色色素 White, concentric circles, producing yellow pigment on edge
麦芽糖 Maltose	4.95 ± 0.24 a	+++	菌落为白色, 有同心圆, 边缘产黄色色素 White, concentric circles, producing yellow pigment on edge
淀粉 Starch	4.85 ± 0.07 a	++	菌落为白色, 有同心圆, 不产色素 White, concentric circles, unpigment
蔗糖 Sucrose	4.61 ± 0.03 b	++	菌落为白色, 有同心圆, 不产色素 White, concentric circles, unpigment
甘露醇 Mannitol	4.33 ± 0.08 c	++	菌落为白色, 有同心圆, 不产色素 White, concentric circles, unpigment
山梨醇 Sorbitol	4.15 ± 0.05 cd	++	菌落为白色, 边缘不规则, 不产色素 White, irregular edge, unpigment
对照 CK	4.01 ± 0.03 d	++	菌落为白色, 有同心圆, 不产色素 White, concentric circles, unpigment
乳糖 Lactose	2.97 ± 0.10 e	+	菌落白色, 不产色素 White, unpigment
羧甲基纤维素钠 Carboxymethylcellulose sodium	2.81 ± 0.08 e	+	菌落白色, 不产色素 White, unpigment

+: 生长稀疏; ++: 生长较致密; +++: 生长旺盛. 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$).
+: mycelial growth weak; ++: mycelial growth ordinary; +++: mycelial growth strong. Different small letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

表2 氮源对BJ菌株菌丝体生长的影响
Table 2 Effect of the nitrogen source on mycelial growth of stain BJ

氮源 Nitrogen source	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝长势 Mycelial growth	菌落形态 Colony morphology
酵母浸粉 Yeast extract	4.82 ± 0.25 a	+++	菌落中央为白色, 边缘为黄色 White center, yellow edge
牛肉浸膏 Beef extract	4.77 ± 0.09 ab	+++	菌落为白色, 边缘不规则, 不产色素 White, irregular edge, unpigment
胰蛋白胨 Casein Tryptone	4.67 ± 0.11 ab	+++	菌落为白色, 边缘不规则, 不产色素 White, irregular edge, unpigment
硝酸铵 NH ₄ NO ₃	4.61 ± 0.05 abc	+++	菌落为白色, 边缘不规则, 不产色素 White, irregular edge, unpigment
硫酸铵 (NH ₄) ₂ SO ₄	4.56 ± 0.24 bc	+++	菌落中央为白色, 边缘为黄褐色 White center, tawny edge
玉米浆 Corn syrup	4.41 ± 0.07 c	++	菌落中央为白色, 边缘为黄色 White center, yellow edge
尿素 Urea	4.37 ± 0.18 c	++	菌落为白色, 有明显同心圆, 不产色素 White, concentric circles, unpigment
黄豆粉 Soybean meal	3.98 ± 0.06 d	++	菌落中央为白色, 边缘为黄色, 有明显同心圆 White center, yellow edge, concentric circles
甘氨酸 Glycine	3.74 ± 0.07 e	+	菌落为白色, 不产色素 White, unpigment
对照 CK	- f	-	菌丝不生长 Not grow

-: 不生长; +: 生长稀疏; ++: 生长较致密; +++: 生长旺盛. 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$).
-: no mycelia growth; +: mycelial growth weak; ++: mycelial growth ordinary; +++: mycelial growth strong. Different small letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

(表3). 综合比较, BJ菌株菌丝培养的最适C/N比为10/1 (4.78 ± 0.10 mm/d), 其次为20/1 (4.39 ± 0.23 mm/d). BJ菌株菌落特征受C/N比影响较大. 随着C/N比的升高, 菌落长势受到明显抑制.

2.6 不同生长因子培养基的利用情况

在最适生长因子实验中, 菌丝在不同生长因子培养基上菌丝生长速度相近, 无显著差异 (表4). 在各处理的培养基上, 菌丝都长势良好, 并分泌少量浅黄色色素.

2.7 不同pH值下的菌丝体生长情况

在最适pH值实验中, 菌丝在pH 6.5-9.0的条件下均可生

长, 其中pH 7.0、7.5菌丝生长较快、长势较好, pH 8.0、8.5次之, pH 6.5、9.0生长缓慢、长势较弱, 在其他pH的培养基中菌丝不生长 (表5). 综合比较, BJ菌株培养的最适pH为7.0 (3.86 ± 0.03 mm/d), 其次为pH 7.5 (3.57 ± 0.05 mm/d). 结果表明, 不同的pH值对菌丝生长有显著的影响, 菌丝对碱胁迫的耐受性略高于酸, 最适pH为7.0.

2.8 不同温度下的菌丝体生长情况

在最适温度实验中, 菌丝在16-36 ℃下均能生长, 其中28 ℃时生长最佳, 24 ℃次之, 16 ℃长势较弱 (表6). 综合比较, BJ菌株菌丝培养的最适温度为28 ℃ (4.11 ± 0.15 mm/d). 不

表3 C/N比对BJ菌株菌丝体生长的影响

Table 3 Effect of the C/N ratio on mycelial growth of strain BJ

C/N比 C/N ratio	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝长势 Mycelial growth	菌落形态 Colony morphology
10/1	4.78 ± 0.10 a	+++	菌落为白色, 不产色素 White, unpigment
20/1	4.39 ± 0.23 b	+++	菌落中央为白色, 边缘为黄色 White center, yellow edge
30/1	4.07 ± 0.06 bc	+++	菌落为白色, 不产色素 White, unpigment
40/1	3.93 ± 0.36 c	++	菌落为白色, 不产色素 White, unpigment
50/1	3.91 ± 0.13 c	++	菌落为白色, 不产色素 White, unpigment
60/1	3.80 ± 0.02 c	+	菌落为白色, 不产色素 White, unpigment

+: 生长稀疏; ++: 生长较致密; +++: 生长旺盛. 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$).
+: mycelial growth weak; ++: mycelial growth ordinary; +++: mycelial growth strong. Different small letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

表4 生长因子对BJ菌株菌丝体生长的影响

Table 4 Effect of growth factor on mycelial growth of strain BJ

生长因子 Growth factor	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝长势 Mycelial growth	菌落形态 Colony morphology
肌醇 Inositol	4.56 ± 0.17 a	++	菌落中央为白色边缘为黄色, 边缘不规则 White center, yellow edge, irregular edge
VB ₂	4.54 ± 0.03 a	++	菌落中央为白色边缘为黄色, 具同心圆 White center, yellow edge, concentric circles
VB ₆	4.52 ± 0.05 a	++	菌落中央为白色边缘为浅黄色, 边缘不规则 White center, light yellow edge, irregular edge,
VC	4.47 ± 0.06 a	++	菌落中央为白色边缘为浅黄色 White center, light yellow edge
CK	4.45 ± 0.03 a	++	菌落中央为白色边缘为浅黄色 White center, light yellow edge
VB ₁	4.41 ± 0.06 a	++	菌落中央为白色边缘为浅黄色 White center, light yellow edge

++: 生长较致密. 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$).
++: mycelial growth ordinary. Different small letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

同温度对菌丝生长的影响较为显著, 高温和低温都会降低菌丝体的生长速度.

2.9 发酵液抗氧化活性

BJ菌株培养7 d后, 发酵液总抗氧化活性为0.517 mmol/L (Trolox).

2.10 发酵液中菌体总超氧化物歧化酶活性和自由基清除能力

BJ菌株培养7 d后, 发酵液中菌体的总超氧化物歧化酶活力为770.37 U/g; DPPH自由基清除力的IC₅₀为2.14 mg/mL.

3 讨论与结论

嗜蓝孢孔菌属 (*Fomitiporia*) 是属于担子菌门伞菌目锈革孔菌科的真菌. 该属的椭圆嗜蓝孢孔菌在福建中北部地区被

表5 pH值对BJ菌株菌丝体生长的影响

Table 5 Effect of pH values on mycelial growth of strain BJ

pH	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝长势 Mycelial growth	菌落形态 Colony morphology
7.0	3.83 ± 0.03 a	+++	菌落中央至外周由白色至黄褐色, 具明显同心圆, 产褐色色素 White to tawny, concentric circles, producing tawny pigment
7.5	3.57 ± 0.05 b	+++	菌落中央至外周由白色至黄褐色, 具明显同心圆, 产黄色素 White to tawny, concentric circles, producing yellow pigment
8.0	3.16 ± 0.02 c	++	菌落中央至外周由白色至黄色, 具明显同心圆, 产黄色素 White to yellow, concentric circles, producing yellow pigment
8.5	2.21 ± 0.02 d	+	菌丝中央为白色, 边缘为黄色, 产黄色色素 White center, yellow edge, producing yellow pigment
6.5	1.73 ± 0.03 e	+	菌丝稀疏, 不产色素 Sparse hyphae, unpigment
9.0	1.70 ± 0.11 e	+	菌落中央至外周由白色至黄褐色, 产黄色色素 White to tawny, producing yellow pigment
5.0	- f	-	不生长 Not grow
5.5	- f	-	不生长 Not grow
6.0	- f	-	不生长 Not grow

-: 不生长; +: 生长稀疏; ++: 生长较致密; +++: 生长旺盛. 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$).
 -: no mycelia growth; +: mycelial growth weak; ++: mycelial growth ordinary; +++: mycelial growth strong. Different small letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

表6 温度对BJ菌株菌丝生长的影响

Table 6 Effect of temperature on mycelial growth of strain BJ

温度 Temperature (θ/°C)	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (v/mm d ⁻¹)	菌丝长势 Mycelial growth	菌落形态 Colony morphology
28	4.11 ± 0.15 a	+++	菌落为浅黄色, 具有同心圆 Light yellow, concentric circles
24	3.76 ± 0.03 b	+	菌落为浅黄, 菌丝长势稀疏 Light yellow, sparse hyphae
32	3.44 ± 0.04 c	++	菌落中央白色, 有环状色素圈 White center, pigment ring
36	3.33 ± 0.03 c	++	菌落中央白色, 有环状色素圈 White center, pigment ring
20	2.81 ± 0.01 d	+	菌落为白色, 不产色素 White, unpigment
16	2.45 ± 0.03 e	+	菌落为白色, 不产色素 White, unpigment

+: 生长稀疏; ++: 生长较致密; +++: 生长旺盛. 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$).
+: mycelial growth weak; ++: mycelial growth ordinary; +++: mycelial growth strong. Different small letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

当做中药桑黄来使用^[17], 而中医认为桑黄能“利五脏、软坚、排毒、止血、活血、胃止泻”^[18]. 目前, 对嗜蓝孢孔菌同科的一些菌物如鲍姆木层孔菌、桦褐孔菌等的研究表明, 这些菌物具有较好的药理活性^[19]. 袁博等研究报道, 斑点嗜蓝孢孔菌具有活血通经、祛瘀止痛、抗心肌缺血、调节心率、降压

等作用。目前,市场上已有将斑点嗜蓝孢孔菌作为保健品的商品和治疗冠心病的药品销售^[20]。

BJ菌株分离自北京市密云区溪翁庄镇,采集自黄栌树干,其子实体为椭圆形、木栓质、有菌柄,菌盖直径3-5 cm,外表灰白色内部棕褐色,外被细绒毛。菌丝近透明,少丛枝、有隔膜。据文献记载,石榴嗜蓝孢孔菌,子实体为木栓质、黄褐色,三角形或马蹄形,该菌最初发现于陕西,生长在活的石榴树上^[21]。由此看出,BJ菌株子实体形态特征与石榴嗜蓝孢孔菌(*F. punicata*)具有一致性。在ITS分子生物学鉴定中,获得BJ菌株ITS序列片段长度749 bp,与石榴嗜蓝孢孔菌(*F. punicata*)(FJ613647.1)和假斑点嗜蓝孢孔菌(*F. pseudopunctata*)(JQ087891.1)的相似性最高,分别为99%和98%。结合ITS分子生物学鉴定、子实体和菌丝特征,确定BJ菌株为石榴嗜蓝孢孔菌。

BJ菌株菌丝最适培养条件研究表明,其最适碳源为葡萄糖,最适氮源为酵母浸粉,最适C/N比为10/1,最适pH为7.0,最适温度为28℃。本研究中,BJ菌株可以利用葡萄糖、酵母浸粉等常见原料,可在28℃、pH 7.0等温和条件下进行培养。该研究为BJ菌株进一步开发利用提供了理论基础。

在多孔菌的抗氧化研究中,Wu等从牛樟芝分离出的抗氧化物质具有DPPH自由基清除活性和较弱的过氧化物抑制作用^[22]。Lee等从桦褐孔菌子实体中分离出6种具有抗氧化活性的化合物,这6种化合物有较强的DPPH和ABTS自由基清除能力^[23]。Song等发现鲍姆木层孔菌子实体的70%乙醇提取物具有良好清除稳定自由基(DPPH)活性,其对脂质体过氧化物(LPO)抑制作用呈量效关系,对黄嘌呤氧化酶也有显著的抑制作用^[24]。本研究中采用液体发酵的手段进行抗氧化活性研究。结果表明,石榴嗜蓝孢孔菌BJ菌株发酵液的总抗氧化活性为0.517 mmol/L(Trolox)。发酵液中菌体的总超氧化物歧化酶活力为770.37 U/g,DPPH自由基清除力的IC₅₀为2.14 mg/mL。鄢嫣等研究表明,黑灵芝子实体水溶性多糖的抗氧化活性为0.376 mmol/g^[25]。郑剑玲等研究表明北虫草培养15 d时,子实体的总SOD活力为63.78 U/mg,液体发酵15 d时期,发酵液总SOD活力为9.21 U/mL^[26]。陶明焯等测定金顶侧耳、毛头鬼伞和姬菇3种食用菌的粗多糖清除DPPH自由基的IC₅₀值分别为14.5、15.02和15.36 mg/mL^[27];Lillian等测定双孢蘑菇、罗马尼斯蘑菇、林地蘑菇、白林地菇的粗多糖清除DPPH自由基的IC₅₀值分别为9.61、6.22、5.37和6.39 mg/mL^[28]。Tseng等测得松杉灵芝多糖清除DPPH自由基的IC₅₀值为4.13 mg/mL^[29]。本研究中石榴嗜蓝孢孔菌BJ菌株发酵液的抗氧化活性相较于前人关于灵芝等子实体多糖抗氧化活性偏低,而发酵菌体的抗氧化作用则优于已报道虫草、双孢蘑菇、松杉灵芝等多糖的抗氧化活性,显示BJ菌株有良好的抗氧化活性。液体发酵流程简单,成本低廉,可大规模生产,相比较子实体多糖的提取和抗氧化化合物的分离纯化,更具有应用价值。

综上,本研究采集分离一株野生多孔菌,经鉴定为石榴嗜蓝孢孔菌,并进行了培养条件与抗氧化活性等研究,为其抗氧化活性药物的开发提供了实验基础。

参考文献 [References]

- 周丽伟,戴玉成. 中国多孔菌多样性初探: 物种、区系和生态功能[J]. 生物多样性, 2013, 21 (4): 499-506 [Zhou LW, Dai YC. Chinese polypore diversities: species, mycota and ecological functions [J]. Biodiv Sci, 2013, 21 (4): 499-506]
- Dai YC. Polypore diversity in China with an annotated checklist of Chinese polypores [J]. Mycoscience, 2012, 53: 49-80
- 陈永强,陈先晖,孙勇,缪倩,王力,蒋继宏. 20种多孔类真菌乙醇提取物体外抗氧化和抗肿瘤活性的比较研究[J]. 食品科学, 2011, 32 (5): 27-31 [Chen YQ, Chen XH, Sun Y, Miao Q, Wang L, Jiang JH. Comparisons on antioxidant and anti-tumor activity of ethanol extracts from 20 polypores fungi in vitro [J]. Food Sci, 2011, 32 (5): 27-31]
- Marx JL. Oxygen free radicals linked to many diseases [J]. Science, 1987, 235: 529-531
- Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts [J]. Food Chem, 2003, 81 (2): 249-255
- Dai YC, Zhou LW, Cui BK, Chen YQ, Decock C. Current advances in *Phellinus sensu lato*: medicinal species, functions, metabolites and mechanisms [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 87: 1587-1593
- Xie C, Koshino H, Esumi Y, Takahashi S, Yoshikawa K, Abe N. Vialinin A, a novel 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenger from an edible mushroom in China [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, 69 (12): 2326-2332
- Zheng WF, Zhao YX, Zheng X, Liu YB, Pan SY, Dai YC, Liu FM. Production of antioxidant and antitumor metabolites by submerged cultures of *Inonotus obliquus* cocultured with *Phellinus punctatus* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 89: 157-167
- Wang Q, Mu H, Zhang L, Dong D, Zhang W, Duan J. Characterization of two water-soluble lignin metabolites with antiproliferative activities from *Inonotus obliquus* [J]. Intern J Biol Macromolecules, 2015, 74: 507-514.
- 刘悦萍,王子健,崔凯,张国庆. 一种野生香蘑的分离、鉴定、培养条件与产酶特性[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18 (5): 804-809 [Liu Y, Wang Z, Cui K, Zhang G. Isolation, identification, culture conditions, and enzyme products of a wild mushroom *Lepista* sp. [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2012, 18: 804-809]
- Ling ZR, Wang SS, Zhu MJ, Ning YJ, Wang SN, Li B, Yang AZ, Zhang GQ, Zhao XM. An extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus *Trametes* sp. LAC-01 [J]. Int J Biol Macromol, 2015, 81: 785-793
- 王寿南,陈青君,张国庆,韩鹏,张宇轩,李兵. 一株野生桑黄的分离鉴定与生物学特性[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22 (4): 667-674 [Wang SN, Chen QJ, Zhang GQ, Han P, Zhang YX, Li B. Isolation, identification, and biological characterization of a wild Sanghuang mushroom [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2016, 22 (4): 667-674]
- 秦改娟,王珊珊,陈青君,张昊琳,张国庆. 一株假芝的分离鉴定与生物学特性[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21 (3): 464-469 [Qin GJ, Wang SS, Chen QJ, Zhang HL, Zhang GQ. Isolation, identification, and biological characteristics of a wild *Amauroderma* mushroom [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2015, 21 (3): 464-469]

- 14 Luo JG, Li L, Kong LY. Preparative separation of phenylpropanoid glycerides from the bulbs of *Lilium lancifolium* by high-speed counter-current chromatography and evaluation of their antioxidant activities [J]. *Food Chem*, 2012, **131** (3): 1056-1062
- 15 Zhang Y, Tang HR, Luo Y. Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress [J]. *World J Agric Sci*, 2008, **4** (4): 458-462
- 16 Li XC, Lin J, Gao YX, Han WJ, Chen DF. Antioxidant activity and mechanism of *Rhizoma Cimicifugae* [J]. *Chem Central J*, 2012, **6** (1): 140
- 17 刘汉彬, 包海鹰, 崔宝凯. 椭圆嗜蓝孢孔菌子实体的化学成分[J]. 菌物学报, 2011, **30** (3): 459-463 [Liu HB, Bao HY, Cui BK. Chemical constituents of *Fomitiporia ellipsoidea* fruiting bodies [J]. *Mycosystema*, 2011, **30** (3): 459-463]
- 18 包海鹰, 王超儀, 图力古尔. “桑黄”的本草考证[J]. 菌物学报, 2013, **32**: 70-78 [Bao H, Wang C, Bau T. Herbalogical textual research on “Sanghuang” [J]. *Mycosystema*, 2013, **32**: 70-78]
- 19 戴玉成, 崔宝凯. 药用真菌桑黄种类研究[J]. 北京林业大学学报, 2014, **36** (5): 1-6 [Dai Y, Cui B. Progress on the species of medicinal fungus *Inonotus sanghuang* [J]. *J Beijing For Univ*, 2014, **36**: 1-6]
- 20 袁博, 朱峰, 陈永强, 黄天姿, 鞠秀云, 王力, 冯友建, 蒋继宏. 斑点嗜蓝孢孔菌化学成分、生物活性及水提物荧光猝灭研究[J]. 菌物学报, 2011, **30** (3): 464-471 [Yuan B, Zhu F, Chen YQ, Huang TZ, Ju XY, Wang L, Feng YJ, Jiang JH. Chemical constituents, biological activities and fluorescence quenching of *Fomitiporia punctata* fruiting body extract [J]. *Mycosystema*, 2011, **30** (3): 464-471]
- 21 郭怀宇, 陆云德, 李正辉, 王刚, 刘吉开. 石榴嗜蓝孢孔菌发酵液中一个新drimane型倍半萜[J]. 天然产物研究与开发, 2014, **26**: 6-10 [Guo HY, Lu YD, Li ZH, Wang G, Liu JK. A new drimane-type sesquiterpenoid from fermentation broth of *Fomitiporia punicata* [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2014, **26**: 6-10]
- 22 Wu MD, Cheng MJ, Wang WY, Huang HC, Yuan GF, Chen JJ, Chen IS, Wang BC. Antioxidant activities of extracts and metabolites isolated from the fungus *Antrodia cinnamomea* [J]. *Nat Prod Res*, 2011, **25** (16): 1488-1496
- 23 Lee IK, Kim YS, Jang YW, Jung JY, Yun BS. New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus* [J]. *Bioorgan Med Chem Lett*, 2007, **17** (24): 6678-6681
- 24 Song YS, Kim SH, Sa JH, Jin C, Lim CJ, Park EH. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, **88** (1): 113-116
- 25 鄢嫻, 张汇, 聂少平, 陈奕, 陈洁, 谢明勇. 黑灵芝子实体水溶性多糖的理化性质及抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2009, **19** (30): 55-60 [Yan Y, Zhang H, Nie SP, Chen Y, Cheng J, Xie MY. Physico-chemical characteristics and antioxidant activity of polysaccharide from *Ganoderma atrum* fruitbody [J]. *Food Sci*, 2009, **30** (19): 55-60]
- 26 郑剑玲, 齐贺, 黄竹青, 吴素琴, 张中林, 王美惠. 北虫草菌丝发酵液和子实体抗氧化活性测定[J]. 微生物学杂志, 2012, **6** (32): 93-95 [Zheng JL, Qi H, Huang ZQ, Wu SQ, Zhang ZL, Wang MH. Determination of antioxidant activity of mycelium fermentation broth and sporocarp from northern caterpillar fungus (*Cordyceps militaris*) [J]. *J Microbiol*, 2012, **6** (32): 93-95]
- 27 陶明煊, 王峰, 刘俊, 程光宇, 金邦基. 3种食用菌多糖自由基清除作用研究[J]. 食品科学, 2009, **30** (23): 135-137 [Tao MX, Wang F, Liu J, Cheng GY, Jin BQ. Free radical scavenging capability of polysaccharides from edible mushrooms [J]. *Food Sci*, 2009, **30** (23): 135-137]
- 28 Lillian B, Soraia F, Paula B, Cristina F, Miguel VB, Ferreira ICFR. Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays [J]. *Food Chem*, 2008, **111**: 61-66
- 29 Tseng YH, Yang JH, Mau JL. Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae* [J]. *Food Chem*, 2008, **107** (2): 732-738