

野生四川灵芝的生物学特性和抗氧化活性

钱坤¹, 武冬梅², 王豪¹, 孙一翡¹, 司静^{1*}, 崔宝凯^{1*}

1 北京林业大学生态与自然保护学院微生物研究所, 北京 100083

2 新疆农垦科学院生物技术研究所作物种质创新与基因资源利用兵团重点实验室, 新疆 石河子 832000

摘要: 灵芝是我国一类传统药用真菌的统称, 具有极高的药用价值和经济价值。为了充分保护和利用该类野生药用真菌资源, 本研究对采自广西壮族自治区南宁市的一株野生灵芝进行了菌株分离纯化培养, 通过基于内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列的分子生物学分析鉴定为四川灵芝 *Ganoderma sichuanense*。以此为实验菌株, 对该种的生物学特性和抗氧化活性进行了研究。探索了不同碳源、氮源、无机盐、pH、温度在固体培养条件下对野生四川灵芝菌丝生长速度的影响。对上述5因子进行单因子试验, 从中筛选出4因子再进行正交试验。在试验范围内野生四川灵芝菌丝生长的最佳碳源为麦芽糖, 氮源为牛肉膏, 无机盐为 KH_2PO_4 , 最适 pH 7.0, 温度 30 °C。通过正交试验进一步优化, 得到最佳因子组合为麦芽糖 30.0 g/L、牛肉膏 5.0 g/L、 KH_2PO_4 1.0 g/L、pH 6.0。针对液体培养过程中的多糖、三萜、多酚、抗坏血酸含量、超氧化物歧化酶活性及羟自由基清除能力变化进行了测定, 发现该野生四川灵芝具有一定的抗氧化活性。

关键词: 野生药用真菌; 灵芝; 生物学特性; 抗氧化活性; 驯化

[引用本文] 钱坤, 武冬梅, 王豪, 孙一翡, 司静, 崔宝凯, 2022. 野生四川灵芝的生物学特性和抗氧化活性. 菌物学报, 41(4): 601-617

Qian K, Wu DM, Wang H, Sun YF, Si J, Cui BK, 2022. Biological characteristics and antioxidant activities of wild *Ganoderma sichuanense*. Mycosystema, 41(4): 601-617

基金项目: 新疆生产建设兵团重点领域科技攻关计划项目(2021AB004); 国家自然科学基金(U2003211); 北京林业大学杰出青年人才培养计划项目(2019JQ03016)

Supported by the Scientific and Technological Tackling Plan for the Key Fields of Xinjiang Production and Construction Corps (2021AB004), the National Natural Science Foundation of China (U2003211), and the Beijing Forestry University Outstanding Young Talent Cultivation Project (2019JQ03016).

*Corresponding authors. E-mail: jingsi1788@126.com, cui.baokai@bjfu.edu.cn

ORCID: QIAN Kun (0000-0003-1564-8371), SI Jing (0000-0001-9229-0727), CUI Baokai (0000-0003-3059-9344)

Received: 2021-08-18, accepted: 2021-10-25

Biological characteristics and antioxidant activities of wild *Ganoderma sichuanense*

QIAN Kun¹, WU Dongmei², WANG Hao¹, SUN Yifei¹, SI Jing^{1*}, CUI Baokai^{1*}

1 Institute of Microbiology, School of Ecology and Nature Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2 Biotechnology Research Institute, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Sciences, Xinjiang Production and Construction Group, Key Laboratory of Crop Germplasm Enhancement and Gene Resources Utilization, Shihezi 832000, Xinjiang, China

Abstract: *Ganoderma* species, generally used as traditional medicine in China, have considerably high medicinal and economic values. A wild *Ganoderma* isolate collected from Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region was purified and identified as *Ganoderma sichuanense* by molecular biology analysis based on ITS sequences, and its biological characteristics and antioxidant activities were studied. The effects of different carbon and nitrogen sources, inorganic salts, pH, and temperature on the mycelial growth rate under solid cultivation were investigated. Single-factor tests were conducted on the five factors, among which four factors were screened and subjected to an orthogonal test. The results showed that the optimal carbon and nitrogen sources, and inorganic salt for the mycelial growth of wild *G. sichuanense* were maltose and beef extract, and KH_2PO_4 , respectively, under conditions of pH 7.0 at 30 °C. Further optimization based on orthogonal test proved that the optimal composition of the culture medium was maltose 30.0 g/L, beef extract 5.0 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, and pH 6.0. The contents of polysaccharide, triterpenoid, polyphenol, and ascorbic acid, the variation of superoxide dismutase activity, and scavenging ability to hydroxyl radicals were determined during the liquid cultivation. It was found that the wild *G. sichuanense* owned antioxidant activity.

Keywords: wild medicinal fungi; *Ganoderma*; biological characteristic; antioxidant activity; domestication

灵芝 *Ganoderma* P. Karst. 隶属于担子菌门 Basidiomycota、伞菌纲 Agaricomycetes、多孔菌目 Polyporales、灵芝科 Ganodermataceae (崔宝凯和吴声华 2020)。崔宝凯和吴声华(2020)在《普遍栽培灵芝种类的拉丁学名》一文中阐述目前世界灵芝科物种有 400 多个分类单元, 其中中国报道的约有 100 个。该类真菌在中国、日本、韩国、印度、菲律宾、美国、法国等均有分布, 在中国主要集中在热带和亚热带地区, 其中海南、贵州、云南地区遍布了国内大部分的灵芝种类(吴兴亮等 2004a, 2004b, 2004c; 邢佳慧 2019)。四川灵芝 *G. sichuanense* 是灵芝的一种, 因首次在中国四川被

发现而得名(赵继鼎和张小青 2000; Wang *et al.* 2012)。

灵芝具有极高的药用价值和经济价值, 在我国古语中被称为瑞草、仙草、还阳草等。明代李时珍在《神农本草》中已介绍了灵芝是明目、补肝、安神、健骨的良方(王朝川 2018)。彭杨芷等(2016)也证实了灵芝确实具有补益安神、平咳止喘的作用。进一步研究发现灵芝含有多糖、三萜、多酚、脂肪酸、矿物质等多种有效成分, 在抑肿瘤、抗炎、调节免疫力、降血糖血压、改善人体机能等方面有着非常显著的功效, 因而在食品、保健、医疗方面均具有非常良好的前景(柴佳和闫

荣 2019; 刘洋等 2020)。

随着人们生活质量的逐步提升及生活压力的日益增大,尤其是成功人士更是长期处于压力和超负荷工作状态,对养生保健商品始终保持着刚性需求,这就使灵芝保健品变得炙手可热。但目前成功实现商业化栽培的灵芝仅局限于几个种,对其他种类的开发和利用并不充分,且部分菌种出现退化现象等。本研究在全国范围野外调查时采集并通过分离、纯化得到一株野生四川灵芝菌株,在准确鉴定的基础上对其进行固体培养,系统研究其生物学特性,包括最佳碳氮源、无机盐、最适温度、pH,在此基础上进行最佳组合筛选,得出最适合野生四川灵芝菌丝生长的条件,同时还探究了该菌株的抗氧化活性,从而为充分保护利用该类真菌资源、对其进行驯化并开发成为天然保健品提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株

野生四川灵芝子实体采自广西壮族自治区南宁市良凤江森林公园,通过组织分离法分离纯化获得,现保存于北京林业大学生态与自然保护学院微生物研究所。

1.1.2 培养基

加富 PDA 培养基:去皮马铃薯 200.0 g/L,琼脂粉 20.0 g/L,葡萄糖 20.0 g/L,蛋白胨 5.0 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L,维生素 B_1 0.01 g/L, pH 自然, 121 °C、 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 备用。碳源零添加培养基:琼脂粉 20.0 g/L, KNO_3 5.0 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, pH 自然, 121 °C、 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 备用。氮源零添加培养基:琼脂粉 20.0 g/L,葡萄糖 20.0 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, pH 自然, 121 °C、 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 备用。无机盐零添加培养基:琼脂粉 20.0 g/L,葡萄糖 20.0 g/L, KNO_3 5.0 g/L, pH 自然, 121 °C、 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 备用。

1.2 分子生物学鉴定

利用十六烷基三甲基溴化铵(cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)植物基因组 DNA 快速提取试剂盒提取经分离纯化获得的野生四川灵芝菌株基因组 DNA,对其内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)片段进行 PCR 扩增,通用引物选取 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTC GTAACAAGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT GATATGC-3') (White *et al.* 1990)。PCR 反应体系共 30.0 μL , 包含 2×Easy Taq PCR SuperMix 15.0 μL 、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 引物 ITS5 和 ITS4 各 1.0 μL 、基因组 DNA 1.0 μL 、去离子水 12.0 μL 。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 40 s, 54 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 34 个循环; 72 °C 延伸 10 min 后于 4 °C 保温。将 PCR 产物送至北京六合华大基因科技有限公司测序,测序结果在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中进行 Blast 比对分析。

1.3 固体活化培养

加富 PDA 培养基灭菌后,倒入直径 90 mm 培养皿制成平板。将保藏的野生四川灵芝菌株从斜面培养基接种至平板中央,28 °C 恒温培养箱中黑暗培养至菌丝长满平板 90%。用内径 1 cm 打孔器在平板边缘同一半径打孔得完整菌饼待用。

1.4 生物学特性研究

1.4.1 碳源单因子试验

以碳源零添加培养基作为空白对照,设置分别加入 20.0 g/L 葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、玉米粉作为不同碳源处理,均接种直径 1 cm 菌饼至直径 90 mm 平板中央后于 28 °C 恒温培养箱中黑暗培养。

1.4.2 氮源单因子试验

以氮源零添加培养基作为空白对照,分别加入 10.0 g/L 蛋白胨、麦芽浸粉、牛肉膏、麦麸、 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为不同氮源处理,均接种直径 1 cm 菌饼至直径 90 mm 平板中央后于 28 °C 恒

温培养箱中黑暗培养。

1.4.3 无机盐单因子试验

以无机盐零添加培养基作为空白对照，分别加入 1.0 g/L KH₂PO₄、MgSO₄、MnSO₄、FeSO₄ 作为不同无机盐处理，均接种直径 1 cm 菌饼至直径 90 mm 平板中央后于 28 ℃恒温培养箱中黑暗培养。

1.4.4 pH 单因子试验

以加富 PDA 培养基作为空白对照，灭菌前利用 1.0 mol/L HCl 和 1.0 mol/L NaOH 分别调节培养基 pH 至 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0，以此设置不同 pH 处理，均接种直径 1 cm 菌饼至直径 90 mm 平板中央后于 28 ℃恒温培养箱中黑暗培养。

1.4.5 温度单因子试验

以加富 PDA 培养基作为空白对照，接种直径 1 cm 菌饼至直径 90 mm 平板中央后分别于 15、20、25、30、35 ℃恒温培养箱中黑暗培养，以此设置不同温度处理。

1.4.6 正交试验

选择最佳碳源、氮源、无机盐及 pH 进行 L₉(3⁴) 4 因子 3 水平正交试验(表 1)。

表 1 正交试验各因子水平

Table 1 The levels of factors of the orthogonal design

水平	因子 Factor			
Level	麦芽糖	牛肉膏	KH ₂ PO ₄	pH (D)
	Maltose	Beef extract	(C, g/L)	
	(A, g/L)	(B, g/L)		
1	10.0	1.0	0.5	6.0
2	20.0	5.0	1.0	7.0
3	30.0	9.0	1.5	8.0

1.5 种子发酵及液体培养

在上述单因子和正交试验结果基础上，除不添加琼脂外，制备液体培养基，121 ℃、1×10⁵ Pa 灭菌 30 min 备用。每个 250 mL 三角瓶分装 100 mL 液体培养基，接种 5 个经优化固体培养基活化的直径 90 mm 平板边缘同一半径处的直

径 1 cm 菌饼，28 ℃恒温摇床、150 r/min 黑暗振荡培养 5–6 d。内切式匀浆机将种子发酵菌液制成悬液，充分振荡，按照 5% (V/V)接种量接种至含 100 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中，28 ℃恒温摇床、150 r/min 黑暗振荡培养。

每隔 1 d 将整瓶培养物经抽滤后取菌丝球和培养液。其中，菌丝球经去离子水反复冲洗、65 ℃烘干至恒重后称重，得菌丝体生物量；培养液经 4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min 后得上清液，用于抗氧化活性研究。

1.6 抗氧化活性研究

1.6.1 多糖含量

参照 DuBois *et al.* (1956)的方法采用苯酚-硫酸法，制得标准曲线为： $y=23.75x+1.235\ 2$ ，相关系数 $R^2=0.996\ 9$ 。

吸取 1.0 mL 上清液加入 3 倍体积预冷无水乙醇，充分混匀后 4 ℃静置过夜，12 000 r/min 离心 20 min 所得沉淀经冷冻干燥后配制成 1.0 mg/mL 溶液，再加入 1.0 mL 6% (V/V)苯酚溶液，充分混匀后快速垂直滴加 4.0 mL 浓硫酸，注意该过程中切勿触碰管壁，静置 10 min 后 30 ℃恒温水浴反应 20 min，于 490 nm 处测定吸光值，继而通过标准曲线计算上清液的多糖含量。分别以去离子水替代上清液、苯酚的反应体系设置为空白及对照，多糖含量以上清液中葡萄糖当量计。

1.6.2 三萜含量

参照 Wang *et al.* (2016)的方法并稍做改动，制得标准曲线为： $y=0.033\ 6x+0.049\ 9$ ，相关系数 $R^2=0.997\ 8$ 。

吸取 1.0 mL 上清液加入 0.4 mL 由冰醋酸新鲜配制的 5% (M/V)香草醛溶液及 1.6 mL 高氯酸，充分混匀后 70 ℃恒温水浴静置 15 min，冷却至室温，再加入 4.0 mL 乙酸乙酯，充分混匀后 25 ℃恒温静置 15 min，于 550 nm 处测定吸光值，继而通过标准曲线计算上清液的三萜含量。分别以去离子水替代上清液、齐墩果酸的反应体系设置

为空白及对照,三萜含量以上清液中齐墩果酸当量计。

1.6.3 多酚含量

参照张梅梅等(2011)的方法采用 Folin-Ciocalteu 法,制得标准曲线为: $y=54.732x+0.0631$, 相关系数 $R^2=0.9904$ 。

吸取 0.7 mL 上清液加入 0.3 mL 1.0 mol/L Folin-Ciocalteu 试剂,充分混匀后 25 °C 恒温黑暗静置 8 min,再加入 0.6 mL 10% (M/V) Na_2CO_3 溶液,充分混匀后 25 °C 恒温黑暗静置 30 min,用去离子水定容至 5.0 mL,于 750 nm 处测定吸光值,继而通过标准曲线计算上清液的多酚含量。分别以去离子水替代上清液、Folin-Ciocalteu 试剂的反应体系设置为空白及对照,多酚含量以上清液中邻苯三酚当量计。

1.6.4 抗坏血酸含量

选取抗坏血酸测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)采用比色法进行测定。

1.6.5 超氧化物歧化酶活性

选取超氧化物歧化酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)采用羟胺法进行测定。

1.6.6 羟自由基清除能力

选取羟自由基测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)采用比色法进行测定。

1.7 数据处理

采取完全随机试验设计,结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。生物学特性研究中,每个处理设置 5 个平行,从第 2 天开始采用十字交叉法每天测量记录菌丝直径、长势,以生长最快的菌丝覆盖直径 90 mm 平板不超过 90% 为准,同时对其他平板进行测量,按公式得:菌丝生长速度(mm/d)=(最后一次测量菌落直径-第一次测量菌落直径)/培养时间。抗氧化活性研究中,每个处理设置 3 个平行。采用 SPSS 26.0 软件对所得数据进行 Walker-Duncan 多重方差检验分析。同列内不同小写字母和大写字母分别代表差异显著($P<0.05$)和差异极显著($P<0.01$)。

2 结果与分析

2.1 分子生物学鉴定

通过 DNA 提取、ITS5/ITS4 (650 bp) PCR 扩增、测序得到野生灵芝菌株 ITS 序列,提交至 GenBank,获序列号:OK021577,在 NCBI 数据库中比对发现与 *G. sichuanense* MZ706465.1 的相似度达到 99.36%,与 *G. sichuanense* JQ781878.1 的相似度达到 98.58%,与 *G. sichuanense* MN523252.1 的相似度达到 98.43%,因此将该野生菌株鉴定为四川灵芝 *G. sichuanense*。

2.2 生物学特性

2.2.1 碳源对野生四川灵芝菌丝生长速度的影响

在不同碳源条件下,野生四川灵芝菌丝均可生长,但生长速度有所差异,由大到小依次排序为麦芽糖>淀粉>果糖>空白对照>葡萄糖>玉米粉>蔗糖(图 1A、图 2 和表 2)。其中,麦芽糖为碳源时菌丝浓密、长势旺盛且生长速度最快,达到(11.35 $\pm$ 0.41) mm/d;其次为淀粉[(10.66 $\pm$ 0.96) mm/d];而玉米粉与蔗糖为碳源时菌丝的生长速度分别为(8.91 $\pm$ 0.44) mm/d 和 (7.92 $\pm$ 0.96) mm/d,甚至低于空白对照组[(9.81 $\pm$ 0.95) mm/d]。综合考虑菌丝生长速度、长势及数据方差分析,选取麦芽糖作为碳源更适合野生四川灵芝菌丝的生长。

2.2.2 氮源对野生四川灵芝菌丝生长速度的影响

在不同氮源条件下,野生四川灵芝菌丝均可生长,但生长速度有所差异,由大到小依次排序为牛肉膏>蛋白胨>麦麸>麦芽浸粉>空白对照> KNO_3 > $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (图 1B、图 2 和表 2)。其中,牛肉膏与蛋白胨为氮源时菌丝浓密,生长速度最快,分别达到(18.33 $\pm$ 0.85) mm/d 和(17.71 $\pm$ 0.62) mm/d;其次为麦麸[(15.56 $\pm$ 1.09) mm/d]和麦芽浸粉[(15.29 $\pm$ 0.43) mm/d];而 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KNO_3 为氮源时菌丝的生长速度分别为(9.01 $\pm$ 0.44) mm/d 和

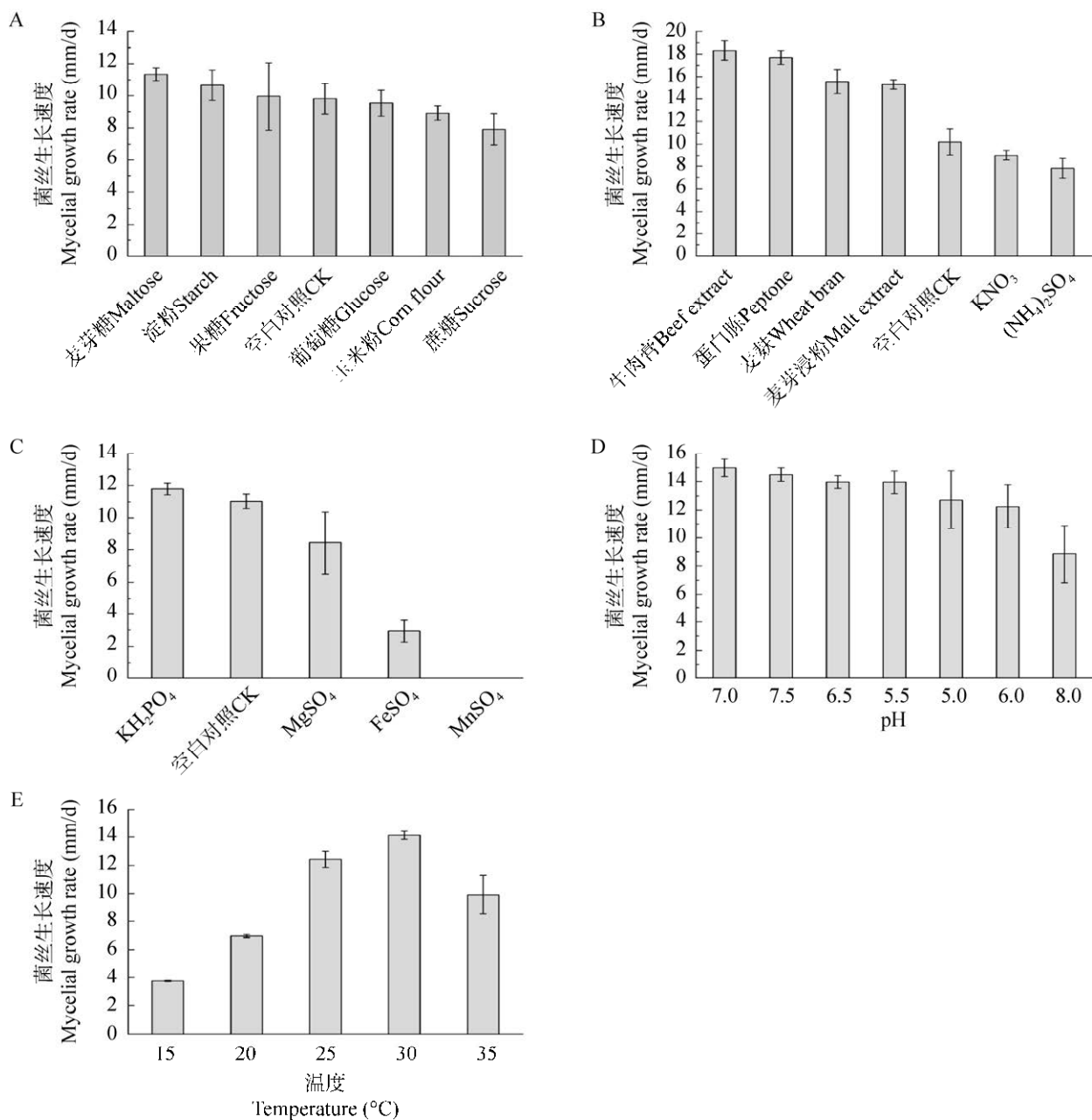


图 1 不同单因子条件对野生四川灵芝菌丝生长速度的影响 A: 碳源; B: 氮源; C: 无机盐; D: pH; E: 温度

Fig. 1 The effects of various single factors on the mycelial growth of wild *Ganoderma sichuanense*. A: Carbon source; B: Nitrogen source; C: Inorganic salt; D: pH; E: Temperature.

(7.81±0.88) mm/d, 甚至低于空白对照组[(10.20±1.16) mm/d]。综合考虑菌丝生长速度、长势及数据方差分析, 选取牛肉膏作为氮源更适合野生四川灵芝菌丝的生长, 也说明该菌株对有机氮的利用率更高。

2.2.3 无机盐对野生四川灵芝菌丝生长速度的影响

野生四川灵芝菌丝可以在除了 $MnSO_4$ 外添加其他无机盐的培养基上生长, 但生长速度有所差异, 由大到小依次排序为 KH_2PO_4 >空白对照>

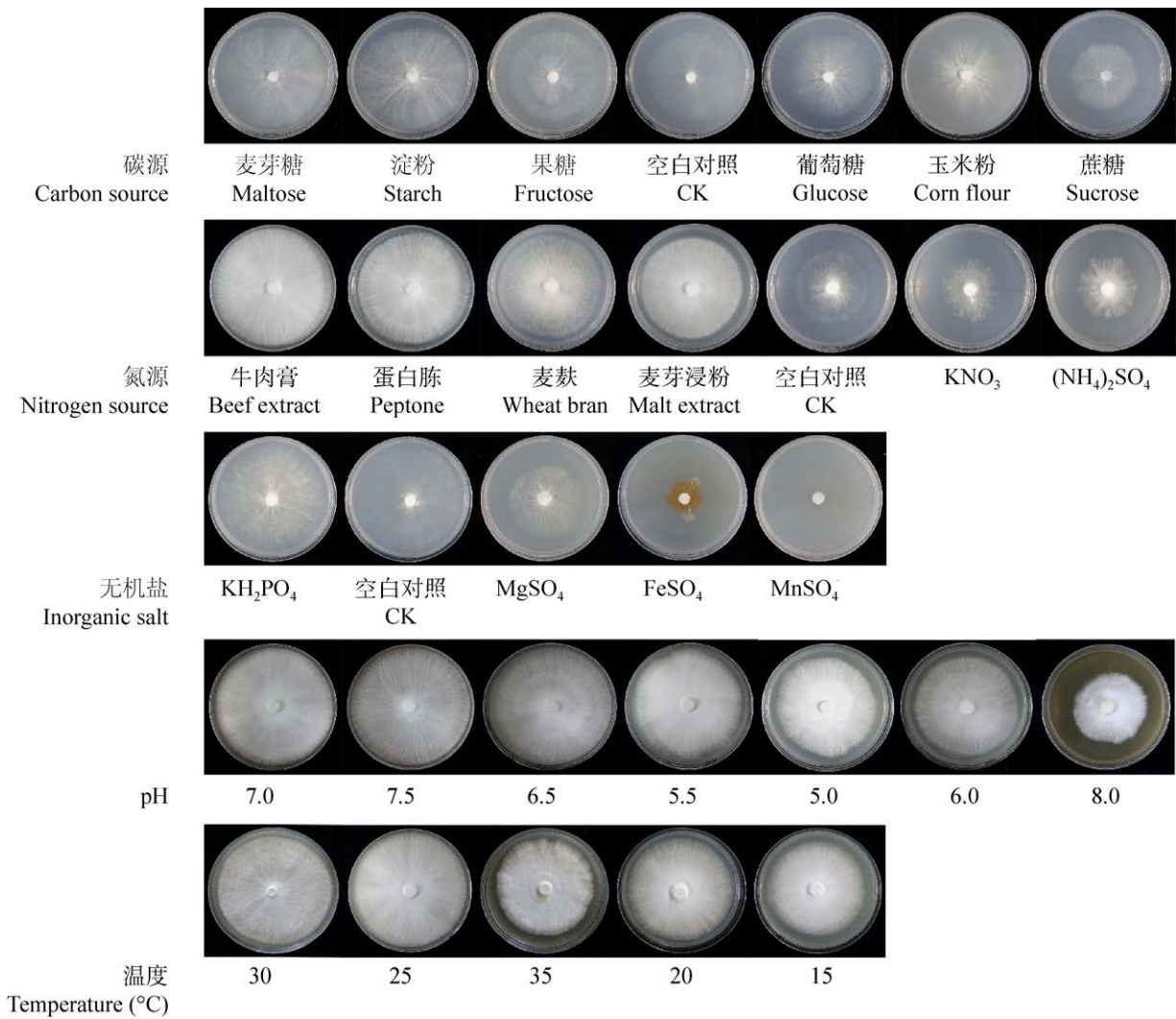


图 2 不同单因子条件对野生四川灵芝菌丝生长的影响
Fig. 2 The effects of various single factors on the mycelial growth of wild *Ganoderma sichuanense*.

$\text{MgSO}_4 > \text{FeSO}_4 > \text{MnSO}_4$ 。其中, KH_2PO_4 为无机盐时菌丝生长速度最快, 达到 $(11.79 \pm 0.35) \text{ mm/d}$; MgSO_4 $[(8.44 \pm 1.93) \text{ mm/d}]$ 和 FeSO_4 $[(2.94 \pm 0.67) \text{ mm/d}]$ 的添加反而抑制菌丝生长; 而添加 MnSO_4 后菌丝则不生长(图 1C、图 2 和表 2)。综合考虑菌丝生长速度、长势及数据方差分析, 选取 KH_2PO_4 作为无机盐添加后更有利于野生四川灵芝菌丝的生长。

2.2.4 pH 对野生四川灵芝菌丝生长速度的影响
在不同 pH 条件下, 野生四川灵芝菌丝均可生长, 但生长速度有所差异, 由大到小依次排序为 $\text{pH } 7.0 > \text{pH } 7.5 > \text{pH } 6.5 > \text{pH } 5.5 > \text{pH } 5.0 >$

$\text{pH } 6.0 > \text{pH } 8.0$ (图 1D、图 2 和表 2)。其中 pH 7.0 时菌丝生长速度较快、长势旺盛, 达到 $(14.98 \pm 0.63) \text{ mm/d}$; 其次为 pH 7.5 $[(14.50 \pm 0.48) \text{ mm/d}]$ 、6.5 $[(13.97 \pm 0.45) \text{ mm/d}]$ 和 5.5 $[(13.96 \pm 0.79) \text{ mm/d}]$, 菌丝生长速度相差不大, 且长势相近; pH 为 5.0 $[(12.71 \pm 2.05) \text{ mm/d}]$ 和 6.0 $[(12.24 \pm 1.54) \text{ mm/d}]$ 条件下的菌丝生长速度相对较缓; 而 pH 8.0 时菌丝生长速度显著下降, 为 $(8.85 \pm 2.03) \text{ mm/d}$ 。综合考虑菌丝生长速度、长势及数据方差分析, 得到 pH 5.5–7.0 均较有利于野生四川灵芝菌丝的生长, 也说明该菌株适宜生长的环境为酸性–中性。

表 2 不同单因子条件对野生四川灵芝菌丝生长的影响

Table 2 The effects of various single factors on the mycelial growth of wild *Ganoderma sichuanense*

培养条件 Condition	因子 Factor	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (mm/d)	显著性 Significance		菌丝长势 Mycelial growth vigor
			0.05	0.01	
碳源 Carbon source	麦芽糖 Maltose	11.35±0.41	a	A	++
	淀粉 Starch	10.66±0.96	a	AB	++
	果糖 Fructose	9.96±2.10	ab	AB	++
	碳源空白对照 CK	9.81±0.95	ab	AB	+
	葡萄糖 Glucose	9.53±0.81	ab	AB	++
	玉米粉 Corn flour	8.91±0.44	ab	AB	++
	蔗糖 Sucrose	7.92±0.96	b	B	++
氮源 Nitrogen source	牛肉膏 Beef extract	18.33±0.85	a	A	++++
	蛋白胨 Peptone	17.71±0.62	a	A	++++
	麦麸 Wheat bran	15.56±1.09	b	B	+++
	麦芽浸粉 Malt extract	15.29±0.43	b	B	++++
	氮源空白对照 CK	10.20±1.16	c	C	++
	KNO ₃	9.01±0.44	d	CD	++
无机盐 Inorganic salt	(NH ₄) ₂ SO ₄	7.81±0.88	e	D	+++
	KH ₂ PO ₄	11.79±0.35	a	A	++
	无机盐空白对照 CK	11.04±0.44	a	A	+
	MgSO ₄	8.44±1.93	b	B	++
	FeSO ₄	2.94±0.67	c	C	+
	MnSO ₄	0.00±0.00	d	D	—
pH	7.0	14.98±0.63	a	A	++++
	7.5	14.50±0.48	a	A	++++
	6.5	13.97±0.45	a	A	++++
	5.5	13.96±0.79	a	A	++++
	5.0	12.71±2.05	a	A	++++
	6.0	12.24±1.54	a	A	+++
	8.0	8.85±2.03	b	B	++++
温度 Temperature (°C)	30	14.12±0.29	a	A	++++
	25	12.41±0.57	b	B	++++
	35	9.91±1.39	c	C	++++
	20	6.96±0.11	d	D	++++
	15	3.75±0.04	e	E	++++

注：“—”代表菌丝不生长；“+”代表菌丝极稀疏；“++”代表菌丝稀疏；“+++”代表菌丝浓密；“++++”代表菌丝极浓密。同列内不同小写字母和大写字母分别代表差异显著($P<0.05$)和差异极显著($P<0.01$)，下同

Note: “—”, no growth; “+”, very weak growth; “++”, weak growth; “+++”, vigorous growth; “++++”, very vigorous growth. Different lowercase and uppercase letters in the same column represent significant differences ($P<0.05$) and extremely significant differences ($P<0.01$), respectively. The same below.

2.2.5 温度对野生四川灵芝菌丝生长速度的影响

在不同温度条件下，野生四川灵芝菌丝均可生长，且长势旺盛，但生长速度有所差异，由大到小依次排序为 30℃>25℃>35℃>20℃>15℃

(图 1E、图 2 和表 2)。其中在 30℃时菌丝生长速度较快，达到(14.12±0.29) mm/d；其次为 25℃ [(12.41±0.57) mm/d]；35℃和 20℃条件对菌丝生长则有抑制作用(碳氮源、无机盐、pH 单因子试验均在 28℃进行)，分别为(9.91±1.39) mm/d

和(6.96±0.11) mm/d; 15 ℃时菌丝生长速度最慢, 为(3.75±0.04) mm/d。综合考虑菌丝生长速度、长势及数据方差分析, 得到 30 ℃最有利于野生四川灵芝菌丝的生长。

2.2.6 最佳因子组合

根据以上单因子试验结果, 选取最佳碳源、氮源、无机盐和 pH 进行 4 因子 3 水平正交试验(表 3)。碳源、氮源、无机盐和 pH 这 4 个因子的极差 *R* 分别为 5.38、2.47、1.68 和 2.08, 所以 4 因子对野生四川灵芝菌丝生长的影响由大到小依次排序为碳源>氮源>pH>无机盐。其中, 碳源均值由大到小依次排序为 *X*₃>*X*₂>*X*₁, 氮源均值由大到小依次排序为 *X*₂>*X*₁>*X*₃, 无机盐均值由大到小依次排序为 *X*₂>*X*₁>*X*₃, pH 均值由大到小依次排序为 *X*₁>*X*₃>*X*₂, 综合考虑得到最佳组合为 *A*₃*B*₂*C*₂*D*₁, 即麦芽糖 30.0 g/L、牛肉膏 5.0 g/L、KH₂PO₄ 1.0 g/L、pH 6.0, 此时菌丝生长速度可达(22.49±0.55) mm/d, 效果显著。进一步验证, 确认此组合的菌丝生长速度比其他正交组合菌丝生长

速度更快。对上述数据进行方差分析, 得出碳源、氮源、无机盐、pH 这 4 个因子对野生四川灵芝菌丝的生长具有极显著影响(*P*<0.01)(表 4)。

2.3 抗氧化活性

2.3.1 野生四川灵芝液体培养过程中菌丝体生物量的变化

野生四川灵芝在液体培养过程中的菌丝体生物量呈现上升趋势。在 2–8 d 时, 菌丝干重增加缓慢, 分别为(0.027±0.001 0) g、(0.028±0.001 2) g、(0.029±0.001 0) g 和(0.035±0.001 5) g, 菌丝球饱满, 但体积略小, 长势不明显; 在第 10 天, 菌丝体干重迅速增加, 达到(0.081±0.006 0) g, 菌丝球体积相对较大; 12–14 d, 菌丝体趋于稳定, 到第 14 天达到峰值, 干重为(0.084±0.003 1) g (图 3A)。

2.3.2 野生四川灵芝液体培养过程中多糖含量的变化

野生四川灵芝在液体培养过程中的多糖含量呈现增长趋势, 在第 12 天以后趋于稳定。前

表 3 正交试验结果

Table 3 The results of the orthogonal test

试验号 Test No.	因子 Factor				菌丝生长速度	显著性		菌丝长势
					Mycelial growth	Significance		Mycelial
	麦芽糖 Maltose (A, g/L)	牛肉膏 Beef extract (B, g/L)	KH ₂ PO ₄ (C, g/L)	pH (D)	rate (mm/d)	0.05	0.01	growth vigor
1	10.0	1.0	0.5	6.0	16.77±0.47	b	B	++++
2	10.0	5.0	1.0	7.0	16.19±1.47	b	B	++++
3	10.0	9.0	1.5	8.0	12.80±1.41	c	C	++++
4	20.0	1.0	1.0	8.0	19.63±2.02	a	A	+++
5	20.0	5.0	1.5	6.0	19.54±0.41	a	A	++++
6	20.0	9.0	0.5	7.0	15.44±0.48	b	B	++++
7	30.0	1.0	1.5	7.0	19.61±1.19	a	A	+++
8	30.0	5.0	0.5	8.0	21.09±0.54	a	A	+++
9	30.0	9.0	1.0	6.0	21.18±1.28	a	A	++++
K ₁	45.76	56.01	53.30	57.49				
K ₂	54.61	56.82	57.00	51.24				
K ₃	61.88	49.42	51.95	53.52				
X ₁	15.25	18.67	17.77	19.16				
X ₂	18.20	18.94	19.00	17.08				
X ₃	20.63	16.47	17.32	17.84				
R	5.38	2.47	1.68	2.08				

表 4 正交实验方差分析

Table 4 The analysis of variance for the orthogonal test

来源 Source	III型平方和 Type III sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	显著性 Significance
模型 Model	328.540	8	41.067	25.480	0.000
截距 Intercept	19 270.182	1	19 270.182	11 956.195	0.000
碳源 Carbon source	217.445	2	108.722	67.457	0.000
氮源 Nitrogen source	54.991	2	27.496	17.060	0.000
无机盐 Inorganic salt	22.736	2	11.368	7.053	0.003
pH	33.367	2	16.684	10.351	0.000
误差 Error	58.022	36	1.612		
总计 Total	19 656.745	45			
修正后总计 Corrected total	386.562	44			

注：模型判定系数 $R^2=0.850$ ，校正后判定系数 $R^2=0.817$

Note: The coefficient of determination R^2 is 0.850, and the adjusted coefficient of determination R^2 is 0.817.

2–4 d, 菌丝生长迅速、活力强, 多糖含量迅速增加, 分别为(33.85±4.65) μg/mL 和(52.94±7.54) μg/mL; 在第 6 天略有下降, 为(50.92±1.64) μg/mL; 8–12 d 内, 多糖含量持续上升, 从(72.17±7.62) μg/mL 升至(101.78±4.19) μg/mL; 第 12 天以后多糖含量增加缓慢, 趋于稳定, 第 14 天达到试验测定峰值[(102.13±1.37) μg/mL] (图 3B)。

2.3.3 野生四川灵芝液体培养过程中三萜含量的变化

野生四川灵芝在液体培养过程中的三萜含量在第 2–10 天内呈现下降趋势, 从(7.65±0.45) μg/mL 下降至(5.40±0.14) μg/mL; 第 10 天开始反而增加, 到第 12 天时三萜含量比初始第 2 天还高, 达到峰值(7.97±0.57) μg/mL; 随后又下降, 第 14 天时三萜含量为(7.07±0.04) μg/mL (图 3C)。

2.3.4 野生四川灵芝液体培养过程中多酚含量的变化

野生四川灵芝在液体培养过程中的多酚含量在前 2–6 d 呈现上升趋势, 到第 6 天达到峰值, 为(2.06±0.27) μg/mL; 随后开始下降, 第 8 天的多酚含量仅为(1.52±0.12) μg/mL; 继而在第 10 天又出现一个峰值[(1.87±0.19) μg/mL], 这可能与第 10 天菌丝干重迅速增加有关; 测定第 12–14 天的多酚含量继续有所波动, 分别为(0.72±0.05) μg/mL 和(0.97±0.05) μg/mL (图 3D)。

2.3.5 野生四川灵芝液体培养过程中抗坏血酸含量的变化

野生四川灵芝在液体培养过程中的抗坏血酸含量在 2–12 d 呈上升趋势, 由(6.54±0.76) μg/mL 上升至(9.75±0.81) μg/mL; 在第 12 天达到峰值[(13.97±0.97) μg/mL]; 随后有所下降, 第 14 天的抗坏血酸含量为(9.41±1.17) μg/mL (图 3E)。

2.3.6 野生四川灵芝液体培养过程中超氧化物歧化酶活性的变化

野生四川灵芝在液体培养过程中的超氧化物歧化酶活性在前 2–4 d 内基本无变化, 分别为(44.90±2.50) U/mL 和(43.76±2.74) U/mL; 随后开始均匀增加, 到第 10 天达到峰值, 为(55.22±2.00) U/mL; 随着菌丝老化, 第 12 天[(50.70±0.29) U/mL]和第 14 天[(45.14±2.86) U/mL]时测得的超氧化物歧化酶活性又有所降低(图 3F)。

2.3.7 野生四川灵芝液体培养过程中羟自由基清除能力的变化

野生四川灵芝在液体培养过程中对羟自由基的清除能力在第 2 天时较强, 为(27.50±2.12) U/mL; 随后有所下降, 第 4 天时为(21.22±0.21) U/mL; 从第 4 天开始, 羟自由基清除能力逐渐提高, 到第 10 天达到峰值, 为(29.69±0.42) U/mL; 后期对羟自由基的清除能力趋于稳定, 第 12 天和 14 天分别为(28.43±0.98) U/mL 和(29.20±0.63) U/mL (图 3G)。

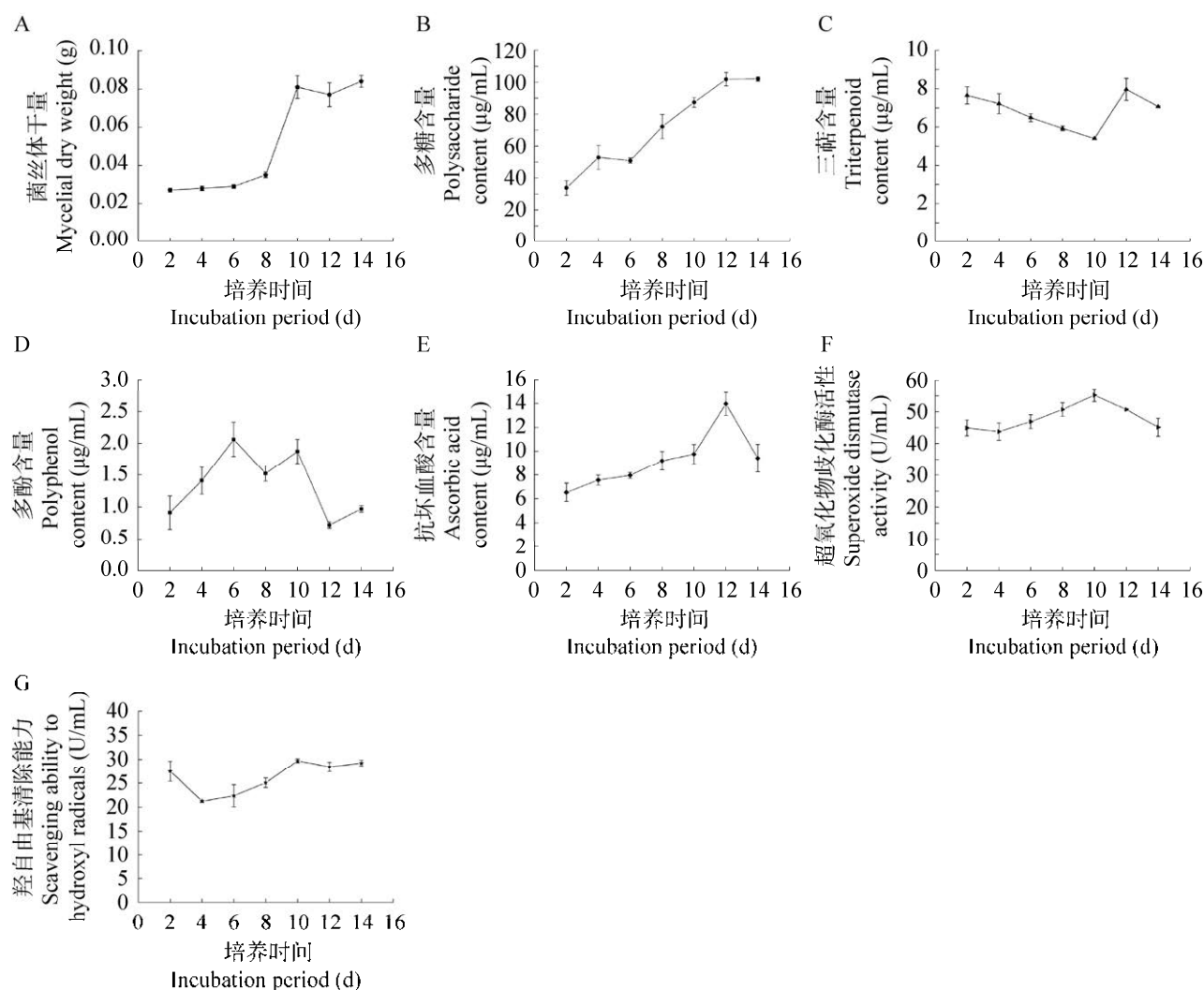


图3 野生四川灵芝液体培养过程中抗氧化活性的变化 A: 菌丝体生物量; B: 多糖含量; C: 三萜含量; D: 多酚含量; E: 抗坏血酸含量; F: 超氧化物歧化酶活性; G: 羟自由基清除能力

Fig. 3 The variations of antioxidant activities of wild *Ganoderma sichuanense* during liquid cultivation. A: Mycelial biomass; B: Polysaccharide content; C: Triterpenoid content; D: Polyphenol content; E: Ascorbic acid content; F: Superoxide dismutase activity; G: Scavenging ability to hydroxyl radicals.

3 讨论

多项研究表明, 灵芝含有多糖、三萜、多酚、蛋白质、脂肪酸、矿物质等多种活性成分。其中, 灵芝多糖和三萜具有抗氧化、抑肿瘤、抗炎、调节免疫力、降血糖血压等多种功效(邓海林等 2005; 闫征等 2017; 孟歌等 2018; Si *et al.* 2019; Lu *et al.* 2020; Su *et al.* 2020)。灵芝蛋白质易被人体吸收, 具有促进骨骼生长、增强抗氧化能力、

减轻焦虑等作用(李晓凤等 2018)。灵芝脂肪酸能够延缓免疫功能衰退、抗血栓、增加新生儿孕周和出生体重(刘振东等 2018; Bruschi *et al.* 2020)。除此之外, 灵芝中还含有丰富的有机锗, 尽管该化合物有轻微毒性(Reddeman *et al.* 2020), 但少量摄入可提高人体血液的含氧量, 促进造血功能和血液循环, 进而美化皮肤、清洁血管(王朝川 2018; Zheng *et al.* 2020)。大多数研究主要针对的是灵芝 *G. lingzhi*、亮壳灵芝 *G. lucidum*、热带灵

芝 *G. tropicum*、松杉灵芝 *G. tsugae* 等种类,关于四川灵芝的报道却相对较少,仅少数研究证实四川灵芝发酵液中含有高含量的黄豆苷元和染料木素,进而可获得异黄酮类成分(梁艳华等 2020),这表明目前对于野生四川灵芝的开发和利用还不充分。因此本研究通过全国范围野外调查时采集分离纯化到一株野生四川灵芝菌株,在准确鉴定的基础上对其固体培养,系统研究其生物学特性,包括最佳碳源、氮源、无机盐、pH、温度,在此基础上进行最佳组合筛选,得出最适合野生四川灵芝菌丝生长的条件,同时还探究了该菌株的抗氧化活性,从而为该类野生药用真菌资源的驯化栽培及其功能的开发和利用提供了重要的理论基础和依据。

通过对碳源、氮源、无机盐、pH、温度 5 个因子的单因子试验,确定了适宜野生四川灵芝菌丝生长的最佳碳源为麦芽糖、氮源为牛肉膏、无机盐为 KH_2PO_4 、pH 7.0、温度为 30 °C,将该结果与其他食药用真菌固体培养条件下的最佳碳源、氮源、无机盐、pH 和温度条件进行了对比,如鹿角灵芝 *G. amboinense*、有柄灵芝 *G. gibbosum*、白肉灵芝 *G. leucocontextum*、亮壳灵芝、絮缘蘑菇 *Agaricus subfloccosus*、茶树菇 *Agrocybe aegerita*、杨柳田头菇 *Ag. salicicola*、亚假芝 *Amauroderma subrugosum*、紫色秃马勃 *Calvatia lilacina*、毛头鬼伞 *Coprinus comatus*、裂拟迷孔菌 *Daedaleopsis confragosa*、桑木层孔菌 *Phellinus mori*、冷杉侧耳 *Pleurotus abieticola*、大革耳 *Pl. giganteus*、肺形侧耳 *Pl. pulmonarius*、云芝栓孔菌 *Trametes versicolor* (曹春蕾等 2011; 梁志群和陈子武 2011; 孔怡等 2014; 秦改娟等 2015; 王庆武等 2015; 陈旭等 2016; 鲁欣等 2017; 莫伟鹏等 2017; 孟灵思等 2018; 汪阳等 2019; 梁倩倩等 2020; 罗智檣等 2020; 穆双双等 2020; 张秀伟等 2020; 杨珍福等 2021)(表 5)。结果表明,对于碳源而言,本研究中的野生四川灵芝与有柄灵芝、茶树菇、杨柳田头菇、云芝栓

孔菌的试验结果一致,都是麦芽糖作为碳源时菌丝生长速度较快。但与表 5 中其他食药用真菌对比发现,大多数的最佳碳源为淀粉,少数为蔗糖、甘露醇、糊精、葡萄糖,这说明不同种类或同一种类不同菌株的食药用真菌对于优势碳源的偏好性存在明显差异。此外,本研究发现当 KNO_3 作为碳源筛选培养基底物时,野生四川灵芝菌丝稀疏,导致空白对照组比葡萄糖、玉米粉、蔗糖作为碳源时菌丝长势更旺盛,由此得到当麦芽糖为碳源时极大提高了野生四川灵芝菌丝的生长速度。最佳氮源通过综合考虑菌丝生长速度、长势及数据方差分析确定为牛肉膏,同时当蛋白胨为氮源时,野生四川灵芝的菌丝生长速度也较快,但当 KNO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时菌丝生长速度则低于空白对照,说明野生四川灵芝更喜好有机氮。与表 5 中其他食药用真菌对比后发现,除了絮缘蘑菇、毛头鬼伞 MT-1 和裂拟迷孔菌的菌丝生长最佳氮源为无机氮外,其他均为有机氮。值得注意的是,毛头鬼伞 2 个菌株 MT-1 和 MT-2 对蛋白胨的利用与 NH_4NO_3 基本无差异,裂拟迷孔菌对酵母浸粉的利用率也较高,说明有机氮对不同食药用真菌的菌丝生长促进作用显著,这可能是由于该类氮源结构复杂、营养充分,存在有利于真菌生长的多种成分。野生四川灵芝菌丝生长的最佳无机盐为 KH_2PO_4 ,而添加 MnSO_4 时菌丝却不生长,这一结果与絮缘蘑菇的无机盐研究结果相同,但与有柄灵芝则不同,其在以 MnSO_4 为无机盐的培养基条件下菌丝浓密、长势迅速。此外,以 FeSO_4 为无机盐时野生四川灵芝菌丝基本不生长,这与有柄灵芝的生物学特性研究中 FeSO_4 的筛选结果相似,但絮缘蘑菇却对 Fe^{3+} 具有较强的适应能力。本研究中添加无机盐 FeSO_4 时菌丝生长速度比空白对照组低,添加 MnSO_4 时菌丝则不生长,证明这两种金属离子均会不同程度地抑制野生四川灵芝的菌丝长势。野生四川灵芝菌丝在筛选 pH 5.0–8.0 下均能生长,其中最佳 pH 为 7.0, pH 8.0 时菌丝生长速度显著下降,

表 5 野生四川灵芝与其他食药真菌菌丝生长最佳条件的对比
Table 5 Comparisons between the optimal conditions for the mycelial growth of wild *Ganoderma sichuanense* and those of other edible and medicinal fungi

食药真菌	碳源	氮源	无机盐	pH	温度	参考文献
Edible and medicinal fungi	Carbon source	Nitrogen source	Inorganic salt		Temperature (°C)	Reference
四川灵芝	麦芽糖	牛肉膏	KH ₂ PO ₄	7.0	30	本研究
<i>Ganoderma sichuanense</i>	Maltose	Beef extract				The present study
鹿角灵芝	淀粉	蛋白胨	—	6.0	26	陈旭等 2016
<i>G. amboinense</i>	Starch	Peptone				Chen <i>et al.</i> 2016
有柄灵芝	麦芽糖	胰蛋白胨	MgSO ₄	5.0	28	梁志群和陈子武 2011
<i>G. gibbosum</i>	Maltose	Tryptone				Liang & Chen 2011
白肉灵芝	淀粉	麦麸	—	3.0	25	莫伟鹏等 2017
<i>G. leucocontextum</i>	Starch	Wheat bran				Mo <i>et al.</i> 2017
亮壳灵芝	蔗糖	麦麸	—	6.0	25	王庆武等 2015
<i>G. lucidum</i>	Sucrose	Wheat bran				Wang <i>et al.</i> 2015
絮缘蘑菇	蔗糖	KNO ₃	MgSO ₄	6.0	16	梁倩倩等 2020
<i>Agaricus subfloccosus</i>	Sucrose					Liang <i>et al.</i> 2020
茶树菇	麦芽糖	酵母粉	—	6.0	25	杨珍福等 2021
<i>Agrocybe aegerita</i>	Maltose	Yeast extract				Yang <i>et al.</i> 2021
杨柳田头菇	麦芽糖	酵母粉	—	8.0	25	
<i>Ag. salicicola</i>	Maltose	Yeast extract				
亚假芝	淀粉	黄豆粉	—	7.5	26	秦改娟等 2015
<i>Amauroderma subrugosum</i>	Starch	Soybean flour				Qin <i>et al.</i> 2015
紫色秃马勃	葡萄糖	酵母粉	MgSO ₄	—	—	穆双双等 2020
<i>Calvatia lilacina</i>	Glucose	Yeast extract				Mu <i>et al.</i> 2020
毛头鬼伞 MT-1	甘露醇	NH ₄ NO ₃	—	7.0	25	张秀伟等 2020
<i>Coprinus comatus</i> MT-1	Mannose					Zhang <i>et al.</i> 2020
毛头鬼伞 MT-2	甘露醇	蛋白胨	—	7.0	25	
<i>Co. comatus</i> MT-2	Mannose	Peptone				
裂拟迷孔菌	淀粉	(NH ₄) ₂ HPO ₄	—	8.0	30	汪阳等 2019
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	Starch					Wang <i>et al.</i> 2019
桑木层孔菌	淀粉	酵母浸粉	—	6.0	33	曹春蕾等 2011
<i>Phellinus mori</i>	Starch	Yeast extract				Cao <i>et al.</i> 2011
冷杉侧耳	淀粉	豆粉	—	7.0	25	罗智檜等 2020
<i>Pleurotus abieticola</i>	Starch	Soybean flour				Luo <i>et al.</i> 2020
大革耳	糊精	酵母浸粉	—	6.0	25	孟灵思等 2018
<i>Pl. giganteus</i>	Dextrin	Yeast extract				Meng <i>et al.</i> 2018
肺形侧耳	蔗糖	酵母粉	—	7.0	30	鲁欣等 2017
<i>Pl. pulmonarius</i>	Sucrose	Yeast extract				Lu <i>et al.</i> 2017
云芝栓孔菌	麦芽糖	酵母膏	—	6.0	28	孔怡等 2014
<i>Trametes versicolor</i>	Maltose	Yeast extract				Kong <i>et al.</i> 2014

Note: -, not detected.

表 5 中其他食药真菌的菌丝生长最佳 pH 也均在 6.0–7.5 之间，推测该类真菌对酸性-中性条件存在广泛适应性。不同的是，白肉灵芝在 pH 3.0 时菌丝生长迅速，裂拟迷孔菌的菌丝最佳生长 pH 为 8.0。对于试验的不同温度而言，野生四川灵

芝的菌丝长势都比较旺盛，这可能是由于加富 PDA 培养基营养成分十分丰富所致。尤其在 25–30 °C 之间野生四川灵芝的菌丝生长速度均较快，表 5 中的大多数食药真菌的菌丝生长最佳温度也在此范围内，仅絮缘蘑菇的菌丝最佳生长

温度为 16℃。

在单因子试验基础上,进一步对最佳碳源、氮源、无机盐和 pH 进行了 4 因子 3 水平正交实验,得到这 4 个因子对野生四川灵芝菌丝的生长均具有显著影响($P < 0.05$),根据极差 R 值大小将影响依次排序为碳源>氮源>pH>无机盐。莫伟鹏等(2017)、梁倩倩等(2020)和穆双双等(2020)针对影响白肉灵芝、絮缘蘑菇和紫色秃马勃菌丝生长的因子进行正交试验时发现,同样碳源的影响也最大,但其中无机盐 $MgSO_4$ 的添加对絮缘蘑菇和紫色秃马勃菌丝生长的影响作用仅次于碳源,与本试验结果有所不同。此外,利用正交试验得到亮壳灵芝、野生大革耳及裂拟迷孔菌菌丝生长的最佳影响因子时发现,氮源的作用大于碳源(梁志群和陈子武 2011;孟灵思等 2018;汪阳等 2019),说明不同因子对不同种类食药真菌菌丝生长的影响各有差异。

此外,本研究对野生四川灵芝液体培养过程中的菌丝体生物量、多糖、三萜、多酚、抗坏血酸含量、超氧化物歧化酶活性及羟自由基清除能力变化也进行了测定,发现菌丝体生物量在发酵前期增重较慢,变化较小,8–10 d 迅速增加,10 d 后趋于稳定。而其多糖含量整体呈现上升趋势,但在第 6 天时出现小幅度下降,这可能是由于野生四川灵芝在该时间段长势缓慢所致,随后多糖含量到第 12 天达到峰值,之后也趋于平稳。三萜含量呈现不规则变化趋势,即先下降(2–10 d)后上升(10–12 d)再下降(12–14 d),其中第 12–14 天的突然增加可能是基于菌丝体生物量的迅速上升后次级代谢产物显著累积的表现。多酚含量也呈现反复变化趋势,前期迅速增加是因为摇瓶中 O_2 含量相对较高,菌丝需要相应地合成多酚以抵抗氧化作用(解凡等 2018),随着 O_2 的消耗,菌丝对于能够抗氧化的多酚物质的合成需求也就随之降低,而第 8 天菌丝体生物量的迅速增加又致使多酚含量在第 8–10 天有所上升。

抗坏血酸是一种抗氧化剂,可清除机体内自由基(孟歌等 2018)。本研究中野生四川灵芝在液体培养过程中分泌的抗坏血酸含量随菌丝体生物量的增加而增大,说明二者呈正相关,后期由于菌丝体活力减弱,导致抗坏血酸含量也随之降低。超氧化物歧化酶可维持机体平衡,在延缓衰老、提高免疫力等方面具有广阔前景(Miller 2012;孟歌等 2018;宋吉玲等 2022)。野生四川灵芝的超氧化物歧化酶活性随菌丝体生物量的增加而增大,到第 10 天达到峰值,与菌丝体生物量出现峰值的时间一致,说明野生四川灵芝分泌超氧化物歧化酶的能力与其自身的生长活力密切相关。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是指由氧形成并在分子组成上有氧的一类化学性质非常活泼的物质的统称,具有很强的氧化作用。正常状态下活性氧在机体内维持动态平衡,一旦过量则会对机体造成严重损伤。作为活性氧的一种,羟自由基可氧化胞内一切有机物和无机物,破坏膜系统,危害严重,而研究羟自由基清除能力也是检测样品本身抗氧化活性的一项重要指标(Barja 2004;郑飞等 2017)。本研究中野生四川灵芝的羟自由基清除能力随菌丝体生物量的增加而提高,于培养后期趋于稳定,这与孟歌等(2018)针对灵芝 *G. lingzhi* 的研究结果相同,与郑飞等(2017)针对桑黄 *Sanghuangporus sanghuang* 的研究结果不同,其在菌丝体生物量降低时,羟自由基清除能力却在维持一定时间的高水平后再降低,而宋吉玲等(2022)也发现同为药用真菌的杨树桑黄 *S. vaninii*、鲍姆桑黄 *S. baumii* 和桑黄均具有较强的抗氧化活性,其中杨树桑黄最佳,均说明不同种类或同一种类不同菌株之间的羟自由基清除能力存在较大差异。

综上所述,通过野外资源调查时分离纯化到一株野生灵芝菌株,基于 ITS 片段、凭借分子生物学手段将其鉴定为四川灵芝,进而对该菌株的生物学特性进行研究。根据单因子、正交试验

结果得到, 适合该菌株菌丝生长的最佳碳源为麦芽糖 30.0 g/L, 氮源为牛肉膏 5.0 g/L, 无机盐为 KH_2PO_4 1.0 g/L, 最适 pH 6.0, 温度为 30 °C, 此时菌丝生长速度可达到(22.49±0.55) mm/d。同时针对液体培养过程中的多糖、三萜、多酚、抗坏血酸含量、超氧化物歧化酶活性及羟自由基清除能力变化进行测定, 发现该野生四川灵芝具有一定的抗氧化活性。本研究为充分保护利用药用真菌灵芝资源、对其进行驯化栽培并开发成为天然保健品提供了基础资料。

[REFERENCES]

- Barja G, 2004. Free radicals and aging. *Trends in Neurosciences*, 27(10): 595-600
- Bruschi M, Santucci L, Petretto A, Bartolucci M, Marchisio M, Ghiggeri GM, Verrina E, Ramenghi LA, Panfoli I, Candiano G, 2020. Association between maternal omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation and preterm delivery: a proteomic study. *The FASEB Journal*, 34(5): 6322-6334
- Cao CL, Cui BK, Bao HY, 2011. Solid culture conditions of *Phellinus mori*. *Mycosystema*, 30(3): 486-490 (in Chinese)
- Chai J, Yan R, 2019. Development status and trend of solid drink from health care *Ganoderma*. *China Food Safety*, 6: 151 (in Chinese)
- Chen X, Zeng Q, Zhu SL, Du MY, Liu PY, Yang RD, Wei SY, 2016. Mycelium biological characteristics of GL11 *Ganoderma amboinense* strain. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 29(9): 2212-2215 (in Chinese)
- Cui BK, Wu SH, 2020. The scientific name of the widely cultivated *Ganoderma* species. *Mycosystema*, 39(1): 7-12 (in Chinese)
- Deng HL, Wu PY, Wang JX, 2005. Research advances on *Ganoderma*. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 16(2): 141-143 (in Chinese)
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3): 350-356
- Kong Y, Wang P, Jin Y, Wu XL, Wang QW, Tang LN, An XR, 2014. Domestication and cultivation of a *Trametes versicolor* strain collected from Tai Mountain. *Acta Edulis Fungi*, 21(1): 21-24 (in Chinese)
- Li XF, Zhang HQ, Shi XL, Yang B, 2018. Nutritional value of *Ganoderma applanatum* Pat. grown in Changbai Mountain. *Food Research and Development*, 39(16): 170-173 (in Chinese)
- Liang QQ, Song LR, Niu X, Xi YL, Feng JH, Cao XL, He YS, Zhu JX, Wei SL, 2020. Biological characteristics and domestic cultivation of *Agaricus subfloccosus*. *Mycosystema*, 39(7): 1301-1311 (in Chinese)
- Liang YH, Sun Y, Wu LL, Zhang LQ, Li YM, 2020. Structural identification and preliminary biogenic activity of two isoflavones from *Ganoderma sichuanense* liquid fermentation samples. *Natural Products Research and Development*, 32(3): 398-402 (in Chinese)
- Liang ZQ, Chen ZW, 2011. Study on the biological characteristics of mycelium of *Ganoderma gibbosum*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 27(18): 164-167 (in Chinese)
- Liu Y, Qin MM, Luo YB, Ma XH, Zhou HL, 2020. Research progress on component and function of *Ganoderma lucidum* species. *Northern Horticulture*, 5: 138-146 (in Chinese)
- Liu ZD, Li L, Luo Z, Xue B, Zha L, Wang B, Liu SX, 2018. The analysis of the fatty acid compositions in Tibet common edible-medicinal fungi fruiting body. *Food Research and Development*, 39(17): 117-123 (in Chinese)
- Lu JH, He RJ, Sun PL, Zhang FM, Linhardt RJ, Zhang AQ, 2020. Molecular mechanisms of bioactive polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150: 765-774
- Lu X, Zheng QX, Ye LY, Ding ZQ, Chu YR, Huang QX, Wu XP, 2017. Identification and biological characteristics analysis of a wild *Pleurotus pulmonarius*. *Genomics and Applied Biology*, 36(5): 1997-2004 (in Chinese)
- Luo ZH, Niu X, Wei SL, Yu HP, Zhang B, Li Y, 2020. Biological characteristics and cultivation conditions of *Pleurotus abieticola* from Qilian Mountains, northwestern China. *Mycosystema*, 39(9): 1741-1749 (in Chinese)
- Meng G, Cui BK, Li CD, Liu HX, Si J, 2018. Antioxidant activities of medicinal fungus *Ganoderma lingzhi* in the process of liquid cultivation. *Mycosystema*, 37(4): 486-501 (in Chinese)
- Meng LS, Hu JJ, Ma A, Cheng GH, Song B, Li Y, 2018. Selected biological characteristics and artificial cultivation of *Pleurotus giganteus*. *Northern Horticulture*, 21: 165-168 (in Chinese)
- Miller AF, 2012. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters*, 586: 585-595
- Mo WP, Liu YC, Hu HP, Huang LH, Liang XW, Xie YZ, Tamdrin T, 2017. Preliminary study on biological

- characteristics of *Ganoderma leucocontextum*. Edible Fungi of China, 36(6): 33-38 (in Chinese)
- Mu SS, Bu HS, Hu D, Li XH, Li ZL, Wang H, Wang SM, 2020. Biological characteristics of *Calvatia lilacina*. Journal of Fungal Research, 18(1): 31-36+42 (in Chinese)
- Peng YZ, Su Y, Lu GL, Jiang Y, 2016. Modern research progress on main function of *Ganoderma*. Asia-Pacific Traditional Medicine, 12(18): 71 (in Chinese)
- Qin GJ, Wang SS, Chen QJ, Zhang HL, Zhang GQ, 2015. Isolation, identification, and biological characteristics of a wild *Amauroderma* mushroom. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 21(3): 464-469 (in Chinese)
- Reddeman RA, Glávits R, Endres JR, Murbach TS, Hirka G, Vértési A, Béres E, Szakonyiné IP, 2020. A toxicological evaluation of germanium sesquioxide (organic germanium). Journal of Toxicology, 2020: 6275625
- Si J, Meng G, Wu Y, Ma HF, Cui BK, Dai YC, 2019. Medium composition optimization, structural characterization, and antioxidant activity of exopolysaccharides from the medicinal mushroom *Ganoderma lingzhi*. International Journal of Biological Macromolecules, 124: 1186-1196
- Song JL, Wang WK, Yan J, Lu N, Zhou ZF, Yuan WD, 2022. Antioxidant substances and activity of medicinal fungus *Sanghuangporus*. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), Doi:10.13207/j.cnki.jnwafu.2022.03.018 (in Chinese)
- Su HG, Peng XR, Shi QQ, Huang YJ, Zhou L, Qiu MH, 2020. Lanostane triterpenoids with anti-inflammatory activities from *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry, 173: 112256
- Wang CC, 2018. Research status of components and functions of *Ganoderma lucidum*. China Fruit & Vegetable, 38(8): 45-47+53 (in Chinese)
- Wang QW, Lan YF, An XR, 2015. Study on biological characteristics of Taishan *Ganoderma lucidum*. Shandong Agricultural Sciences, 47(11): 64-67 (in Chinese)
- Wang XC, Xi RJ, Li Y, Wang DM, Yao YJ, 2012. The species identity of the widely cultivated *Ganoderma*, '*G. lucidum*' (Ling-zhi), in China. PLoS One, 7: e40857
- Wang XL, Yang HL, Liu GQ, 2016. Enhanced triterpene acid production by *Ganoderma lucidum* using a feeding stimulus integrated with a two-stage pH-control strategy. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 91(12): 2974-2982
- Wang Y, Li S, Zhang T, Guo YF, Li D, Zhang B, Li Y, 2019. Biological characteristics and domestic cultivation analysis of *Daedaleopsis confragosa*. Edible Fungi of China, 38(7): 9-14+18 (in Chinese)
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego. 315-322
- Wu XL, Dai YC, Lin YH, 2004a. Resources and geographical distribution of Ganodermataceae in China I. Guizhou Science, 2: 27-33 (in Chinese)
- Wu XL, Dai YC, Lin YH, 2004b. Resources and geographical distribution of Ganodermataceae in China II. Guizhou Science, 3: 34-37+53 (in Chinese)
- Wu XL, Dai YC, Lin YH, 2004c. Resources and geographical distribution of Ganodermataceae in China III. Guizhou Science, 4: 36-40 (in Chinese)
- Xie F, Ye LY, Zhao LL, Tang KP, Wu XP, 2018. Identification of three wild *Ganoderma multipileum* and analysis of polysaccharides and triterpenoids content therein. Acta Edulis Fungi, 25(3): 8-14 (in Chinese)
- Xing JH, 2019. Species diversity, taxonomy and phylogeny of *Ganoderma*. PhD Dissertation, Beijing Forestry University, Beijing. 1-160 (in Chinese)
- Yan Z, Wang HX, Liu LY, Du GH, Chen RY, 2017. Study on *in vitro* anti-tumor activity of triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. International Journal of Laboratory Medicine, 38(5): 633-634+637 (in Chinese)
- Yang ZF, Chen H, Guo X, Zheng HH, Ma M, Sun DF, 2021. Identification and biological characteristics of two strains from wild *Agrocybe*. Northern Horticulture, 6: 116-122 (in Chinese)
- Zhang MM, Wei ZW, Liu YB, Zhao YX, Zheng WF, 2011. Optimization on determination of polyphenols from *Inonotus obliquus* by Folin-Ciocalteu colorimetry. Mycosystema, 30(2): 295-304 (in Chinese)
- Zhang XW, Niu LL, Cai PG, Bao J, Cao JH, Zhang WP, 2020. Identification and biological characteristics of two strains from wild *Coprinus comatus*. Edible Fungi, 42(5): 15-18 (in Chinese)
- Zhao JD, Zhang XQ, 2000. Flora fungorum sinicorum vol. 18 Ganodermataceae. Science Press, Beijing. 1-201 (in Chinese)
- Zheng F, Meng G, An Q, Tian XM, Si J, 2017. Antioxidant activities of medicinal fungus *Sanghuangporus sanghuang* during liquid cultivation. Mycosystema, 36(1): 98-111 (in Chinese)
- Zheng JF, Yang LH, Deng YC, Zhang CY, Zhang Y, Xiong S, Ding CX, Zhao J, Liao CJ, Gong DX, 2020. A review of public and environmental consequences of organic germanium. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 50(13): 1384-1409

[附中文参考文献]

- 曹春蕾, 崔宝凯, 包海鹰, 2011. 桑木层孔菌固体培养条件的研究. 菌物学报, 30(3): 486-490
- 柴佳, 闫荣, 2019. 保健型灵芝固体饮料发展现状及趋势. 食品安全导刊, 6: 151
- 陈旭, 曾茜, 朱森林, 杜慕云, 刘璞玉, 杨仁德, 魏善元, 2016. 灵芝南 GL11 菌丝的生物学特性. 西南农业学报, 29(9): 2212-2215
- 崔宝凯, 吴声华, 2020. 普遍栽培灵芝种类的拉丁学名. 菌物学报, 39(1): 7-12
- 邓海林, 吴佩颖, 王建新, 2005. 灵芝的研究进展. 时珍国医国药, 16(2): 141-143
- 孔怡, 王鹏, 金莹, 武晓亮, 王庆武, 唐丽娜, 安秀荣, 2014. 泰山云芝生物学特性与驯化. 食用菌学报, 21(1): 21-24
- 李晓凤, 张华琦, 施晓丽, 杨兵, 2018. 长白山野生平盖灵芝蛋白质营养价值分析. 食品研究与开发, 39(16): 170-173
- 梁倩倩, 宋利茹, 牛鑫, 席亚丽, 冯九海, 曹选莉, 贺宇杉, 祝建烜, 魏生龙, 2020. 絮缘蘑菇生物学特性及驯化栽培. 菌物学报, 39(7): 1301-1311
- 梁艳华, 孙勇, 吴龙龙, 张刘强, 李医明, 2020. 四川灵芝液体发酵样品两种异黄酮的结构鉴定和生源初探. 天然产物研究与开发, 32(3): 398-402
- 梁志群, 陈子武, 2011. 有柄灵芝菌丝生物学特性研究. 中国农学通报, 27(18): 164-167
- 刘洋, 覃媚媚, 罗印斌, 马先红, 周鸿立, 2020. 灵芝孢子主要活性成分及其功能研究进展. 北方园艺, 5: 138-146
- 刘振东, 李梁, 罗章, 薛蓓, 扎罗, 王波, 刘世璇, 2018. 西藏常见食药两用真菌子实体脂肪酸组成研究. 食品研究与开发, 39(17): 117-123
- 鲁欣, 郑秋霞, 叶丽云, 丁智权, 出怡汝, 黄清雄, 吴小平, 2017. 一株野生秀珍菇的鉴定及其生物学特性的分析. 基因组学与应用生物学, 36(5): 1997-2004
- 罗智檣, 牛鑫, 魏生龙, 于海萍, 张波, 李玉, 2020. 采自祁连山的冷杉侧耳生物学特性及栽培条件探索. 菌物学报, 39(9): 1741-1749
- 孟歌, 崔宝凯, 李春道, 刘红霞, 司静, 2018. 药用真菌灵芝液体培养过程中的抗氧化活性研究. 菌物学报, 37(4): 486-501
- 孟灵思, 胡佳君, 马敖, 程国辉, 宋冰, 李玉, 2018. 野生大革耳的生物学特性及驯化栽培. 北方园艺, 21: 165-168
- 莫伟鹏, 刘远超, 胡惠萍, 黄龙花, 梁晓薇, 谢意珍, 旦真次仁, 2017. 白肉灵芝菌丝体生物学特性的初步研究. 中国食用菌, 36(6): 33-38
- 穆双双, 步洪石, 胡德, 李小欢, 李正龙, 王欢, 王淑敏, 2020. 紫色秃马勃的生物学特性. 菌物研究, 18(1): 31-36+42
- 彭杨芷, 苏悦, 芦光亮, 江泳, 2016. 灵芝主要功效现代研究进展. 亚太传统医药, 12(18): 71
- 秦改娟, 王珊珊, 陈青君, 张昊琳, 张国庆, 2015. 一株假芝的分离鉴定与生物学特性. 应用与环境生物学报, 21(3): 464-469
- 宋吉玲, 王伟科, 闫静, 陆娜, 周祖法, 袁卫东, 2022. 药用真菌桑黄抗氧化物质及其活性研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), Doi:10.13207/j.cnki.jnwafu.2022.03.018
- 王朝川, 2018. 灵芝成分及功能的研究现状. 中国果菜, 38(8): 45-47+53
- 王庆武, 兰玉菲, 安秀荣, 2015. 泰山赤灵芝菌株生物学特性研究. 山东农业科学, 47(11): 64-67
- 汪阳, 李硕, 张桐, 郭艳芳, 李丹, 张波, 李玉, 2019. 裂拟迷孔菌生物学特性及驯化栽培分析. 中国食用菌, 38(7): 9-14+18
- 吴兴亮, 戴玉成, 林允河, 2004a. 中国灵芝科资源及其地理分布 I. 贵州科学, 2: 27-33
- 吴兴亮, 戴玉成, 林允河, 2004b. 中国灵芝科资源及其地理分布 II. 贵州科学, 3: 34-37+53
- 吴兴亮, 戴玉成, 林允河, 2004c. 中国灵芝科资源及其地理分布 III. 贵州科学, 4: 36-40
- 解凡, 叶丽云, 赵丽丽, 汤坤鹏, 吴小平, 2018. 三株野生重伞灵芝的鉴定及其多糖、三萜含量分析. 食用菌学报, 25(3): 8-14
- 邢佳慧, 2019. 灵芝属的物种多样性、分类与系统发育研究. 北京林业大学博士论文, 北京. 1-160
- 闫征, 王宏旭, 刘莉莹, 杜国华, 陈若芸, 2017. 灵芝三萜类化合物的体外抗肿瘤活性研究. 国际检验医学杂志, 38(5): 633-634+637
- 杨珍福, 陈惠, 郭相, 郑惠华, 马明, 孙达锋, 2021. 两株田头菇属野生菌株的鉴定及生物学特性. 北方园艺, 6: 116-122
- 张梅梅, 魏志文, 刘玉冰, 赵艳霞, 郑维发, 2011. Folin-Ciocalteu 比色法测定桦褐孔菌多酚的条件优化. 菌物学报, 30(2): 295-304
- 张秀伟, 牛力立, 蔡甫格, 鲍菊, 曹家洪, 张万萍, 2020. 两株野生鸡腿菇分离鉴定及生物学特性研究. 食用菌, 42(5): 15-18
- 赵继鼎, 张小青, 2000. 中国真菌志·第一版·第十八卷·灵芝科. 北京: 科学出版社. 1-201
- 郑飞, 孟歌, 安琪, 田雪梅, 司静, 2017. 药用真菌桑黄液体培养过程中的抗氧化活性研究. 菌物学报, 36(1): 98-111