

一株野生桑黄的分离鉴定与生物学特性*

王寿南¹ 陈青君² 张国庆^{1**} 韩 鹏¹ 张宇轩¹ 李 兵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 桑黄是我国传统名贵的药用真菌, 在分类学上是锈革孔菌科(Hymenochaetaceae)几种药用真菌的总称. 从北京延庆区四海镇黑汉岭采集到一株桑黄子实体, 经分离纯化获得纯培养(编号SS). 进一步开展其分类鉴定、最适培养条件和液体发酵产物活性研究. 根据ITS鉴定, 确定SS菌株属于锈革孔菌科针层孔菌属(*Phellinus*), 与苹果木层孔菌(*Phellinus tuberculosus*)的相似性为95%; 结合子实体、菌丝特征和寄主植物类型, 确定SS菌株为苹果木层孔菌. SS菌株菌丝体最适培养条件研究表明, 其最适碳源为葡萄糖, 最适氮源为黄豆粉, 最适C/N比为20/1, 最适生长因子为维生素C, 最适温度为28 °C, 最适pH为7.0. 以马铃薯葡萄糖液体(PD)培养基、10%接种量、28 °C、150 r/min培养7 d, 发酵液中多糖含量为176.71 mg/L, 黄酮含量为0.11 mg/L, 抗氧化活性为7.82 mol/L (FeSO₄), 未检测到多酚的存在. 本研究从野外获取新的桑黄药用资源, 其生物学特性结果可为野生药用真菌的人工驯化和开发利用提供理论依据. (图2 表6 参36)

关键词 桑黄; 鉴定; 培养条件; 发酵液; 抗氧化

CLC Q949.320.5 : TQ925

Isolation, identification, and biological characterization of a wild Sanghuang mushroom*

WANG Shounan¹, CHEN Qingjun², ZHANG Guoqing^{1**}, HAN Peng¹, ZHANG Yuxuan¹ & LI Bing¹

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

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

Abstract Sanghuang is a famous traditional Chinese medicinal fungus and a generic term of medicinal mushroom species taxonomically belonging to the family Hymenochaetaceae. In the present study, fruiting bodies of a wild Sanghuang species were collected from the Heihan Mountain, Sihai Town, Yanqing District, Beijing. Pure culture strain was obtained and numbered as SS. We then studied its classification, optimum culture conditions, and bioactivities of fermentation broth. Morphology and ITS identification showed it as a polypores fungus of genus *Phellinus* and family Hymenochaetaceae. Strain SS manifested high sequence similarity of 95% with *Phellinus tuberculosus* based on ITS identification, and was further classified as *P. tuberculosus* based on its morphological characteristics of fruiting bodies, mycelia, and the host plant. Culture conditions study showed the optimum condition for the mycelia growth included glucose as the carbon source, soybean powder as the nitrogen source, the C/N rate of 20/1, growth factor as Vitamin C, temperature as 28 °C, and pH as 7.0. After incubation in potato dextrose (PD) medium, 10% inoculation amount, 28 °C and 150 r/min for 7 d in the shaking flask, fermentation broth of strain SS was harvested. Crude polysaccharides and flavonoids of fermentation broth were evaluated to be 176.71 mg/L and 0.11 mg/L, respectively. Total antioxidant activity was 7.82 mol/L (FeSO₄). Polyphenol was not found in the fermentation broth. It suggested that the newly obtained fungal species demonstrates potential application in medicine industry. It is an important reference for further artificial domestic cultivation and applications of the medicinal mushroom resources.

Keywords Sanghuang; identification; optimal cultivation conditions; fermentation broth; antioxidant

收稿日期 Received: 2016-02-23 接受日期 Accepted: 2016-04-10

*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)和北京市本科生命科学计划项目(BJNXYT20160412)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 Supporting Project of the Undergraduate Research Program of Beijing (BJNXYT20160412)

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

桑黄, 又称为桑耳、桑臣、桑黄菇、树鸡、胡孙眼等, 是我国传统的药用真菌, 属于一类硬质多孔菌。“桑黄”一词最早出现于唐初藤仝所著《药性论》中, 而后又被记载于唐代苏敬《新修本草》、明代李时珍《本草纲目》等药典中^[1-2]。桑黄作为一种珍贵的药用真菌, 有“森林黄金”之美称, 中医认为桑黄能“利五脏、软坚、排毒、止血、活血、胃止泻”。《中药大辞典》记载, 子实体入药, 用于治疗痢疾、盗汗、闭经等疾病。《神农本草经》描述“久服轻身不老延年”^[2-4]。1968年, 日本学者首次报道 *Phellinus linteus* 热水萃取液对小鼠S180肉瘤抑制率为96.7%^[5]。随后, 越来越多国家的科研工作者致力于“桑黄”的药理作用研究, 现代药理学研究表明, 桑黄抗肿瘤、抗氧化、免疫调节等功能^[6-8]。

桑黄在分类学上隶属于真菌界(Fungi)担子菌门(Basidiomycota)伞菌纲(Agaricomycetes)锈革孔菌目(Hymenochaetales)锈革孔菌科(Hymenochaetaceae), 但在种属划分上一直存在争议。在中国及东南亚地区, 过去一般认为“桑黄”的学名为 *Phellinus linteus* (Berk. et Curt.) Teng (裂蹄木层孔菌)^[1, 9]。刘波在1974年《中国药用真菌》(1版)中指出, 真桑黄的学名是 *Phellinus igniarius*, 中文名称“火木层孔菌”; 而在1978年版的第2版中, 他接受日本学者的观点, 认为真桑黄是 *Pyropolyporus yucatanensis*, 是 *P. linteus* 的同物异名。近年来, 随着分子生物学手段的不断进步, 基于形态学和分子标签(如ITS序列)的研究方法, 人们对桑黄类多孔菌的分类有了进一步认识^[7, 10-11]。戴玉成教授通过研究将 *Phellinus* 属的20个种整合为一个亚属 *Fuhifomes*, 又通过比较 *P. linteus* 和 *P. baumii* 的标本, 确定 *Phellinus baumii* 才是传统中药“桑黄”的拉丁学名。一些原本属于 *Phellinus* 属的种被划到了 *Inonotus* 属, 其中包括 *P. baumii*-*P. linteus* 类群的所有种^[10, 12-14]。目前, 认为可以属于药用真菌桑黄类群的种包括: *I. baumii*、*I. linteus*、*I. vcminii*、*I. lonicericola*、*I. lonicerinus*、*I. sanghuang*、*I. tenuicontextus*、*I. weirianus* 和 *I. weigela*, 被称为“真桑黄”的药用真菌, 是以往未曾发表过的新种 *Inonotus sanghuang* Sheng H. Wu, T. Hatt. & Y.C. Dai^[1-2, 7]。

目前, 被视为桑黄类的多孔菌主要是 *Inonotus*、*Phellinus* 及 *Fomitiporia* 等属真菌, 它们具有显著抗肿瘤活性的多孔菌子实体^[1]。对这些类群真菌的开发, 可以丰富我国药用真菌资源。我们从北京市延庆区四海镇黑汉岭采集野生桑黄子实体, 并获得菌丝体纯培养, 进一步开展分类学鉴定、最适培养条件、发酵产物的研究, 旨在为野生药用真菌资源的驯化和利用提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

野生桑黄子实体采集于北京市延庆区四海镇黑汉岭, 分离自山荆子 (*Malus baccata*) 腐木, 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SS。

1.2 培养基

PDA培养基: 马铃薯200 g, 葡萄糖20 g, 琼脂18 g, pH 7.0-7.2, 蒸馏水1 000 mL, 用于菌种分离与保藏。

PD液体培养基: 马铃薯200 g, 葡萄糖20 g, pH 7.0-7.2, 蒸馏水1 000 mL, 用于菌丝体液体发酵培养试验。

基础培养基: 葡萄糖20 g, 大豆蛋白胨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, 蒸馏水1 000 mL, 用于菌丝体最适培养条件试验。

加富培养基: 葡萄糖20 g, 大豆蛋白胨2 g, 马铃薯200 g, 硫酸镁0.5 g, 磷酸二氢钾1 g, 维生素B₁ 10 mg, 琼脂20 g, 蒸馏水1 000 mL, 用于菌丝体最适培养条件试验。

1.3 菌株的分离、培养与保存

采用组织分离法^[15]。在无菌条件下, 用70%酒精棉球, 对桑黄子实体进行表面消毒。用无菌的解剖刀在子实体中部纵切, 掰开菌体后, 再用无菌的接种钩挑取菌体内部一小块组织, 迅速移接到PDA平板培养基上, 置于28℃恒温培养箱中避光培养。待组织块萌发后, 从菌落边缘挑取新鲜菌丝进行进一步纯化培养, 直至获得菌丝体纯培养, 转接PDA斜面培养基, 28℃恒温培养箱中避光培养, 待斜面长满后, 将斜面试管转移到4℃下避光保存备用。

1.4 菌株的形态鉴定

观察SS菌株的子实体形态特征并记录。在无菌条件下, 将直径为5 mm的SS菌株纯培养接种在PDA平板中央, 在距离接种点1.5 cm左右处的培养基上, 以30-45°斜插入无菌的盖玻片, 28℃避光培养。待菌丝体蔓延上载玻片后, 取出载玻片进行菌丝体显微观察并拍照。

1.5 基于ITS序列分析的分类学鉴定

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)。ITS鉴定利用真菌ITS通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 扩增5.8S rDNA及其两侧的ITS1和ITS2基因片段^[16]。PCR扩增体系采用50 μL体系, PCR产物利用1%琼脂糖凝胶检测。引物合成与PCR产物测序由上海生工生物工程股份有限公司完成。将获得的ITS序列利用NCBI进行在线BLAST比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。选取相近属不同种的ITS序列, 利用Clustal_X软件对所得序列进行校正和比对分析, 采用MEGA 6.0软件、以Neighbor-joining法构建系统进化树, 进行同源关系比较与作图, 并将SS菌株ITS序列提交至GenBank数据库^[17]。

1.6 不同碳源对菌丝体生长的影响

以基础培养基中20 g葡萄糖为含碳量标准, 分别用麦芽糖、蔗糖、淀粉、乳糖、甘露醇、山梨醇、羧甲基纤维素钠替换, 配置成不同碳源且相同含碳量的培养基, pH 7.0-7.2, 以基础培养基不加碳源为对照, 每个处理设3次重复。用基础培养基活化菌丝体纯培养, 待菌落长至直径4-5 cm, 用直径为5 mm的无菌打孔器、距离菌落中央1.5 cm左右处打孔。将菌饼倒扣于各培养基中央, 28℃恒温培养箱中避光培养, 定期观察菌丝体的生长状况, 待任一平皿菌丝体长满或培养14 d后, 停止培养, 观察菌落形态、测量菌落直径。计算菌丝体日均生长速度[菌丝生长速度=菌落半径增长长度(mm)÷培养天数(d)]^[15]。下同。

1.7 不同氮源对菌丝体生长的影响

以基础培养基中的2 g胰蛋白胨为含氮量标准, 分别用酵母浸粉、牛肉浸膏、尿素、黄豆粉、玉米浆、硝酸铵、硫酸铵、甘氨酸替换, 配置成不同氮源且相同含氮量的培养基, pH 7.0-7.2, 以基础培养基不加氮源为对照, 每个处理设3次重复。

1.8 不同C/N比对菌丝体生长的影响

以基础培养基为基础,通过添加不同质量的大豆蛋白胨,配制成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,每个理设3次重复。

1.9 不同生长因子对菌丝体生长的影响

以基础培养基中的10 mg维生素B₁为标准,分别用等质量的维生素B₂、维生素B₆、维生素C、肌醇替代维生素B₁,配制成不同生长因子的培养基,pH 7.0-7.2,以基础培养基中不加生长因子作为对照,每个理设3次重复。

1.10 不同温度对菌丝体生长的影响

配制加富培养基,pH 7.0-7.2.接种后分别在16、20、24、26、28、30、32和36 °C恒温培养箱中避光培养,每个处理设3次重复。

1.11 不同pH值对菌丝体生长的影响

配制加富培养基,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,每个理设3次重复。

1.12 发酵培养与发酵液收集

液体发酵采用PD培养基,以10%接种量、28 °C、150 r/min培养7 d,以8层纱布过滤菌丝体,收集滤液,4 °C、10 000 r/min离心20 min,收集上清液备用。

1.13 发酵液中多糖、多酚和黄酮含量的测定

发酵液中总糖含量测定采用苯酚-硫酸法^[18-19]。还原糖含量测定采用3,5-二硝基水杨酸法^[20]。多糖含量=样品中总糖含量-样品中还原糖含量^[21]。多酚含量测定采用酒石酸亚铁法^[22]。黄酮含量测定采用亚硝酸钠-硝酸铝法^[23]。

1.14 发酵液抗氧化活性的测定

采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)。采用FRAP(ferric reducing antioxidant

power)值法^[24]。FRAP值(FeSO_4 mmol/100g)=[反应体系 FeSO_4 浓度($\mu\text{mol/L}$) $\times$ 样液稀释倍数/1000]/[样液浓度(g/L)/100]。

1.15 统计学分析

所有数据采用SPSS 20.0统计软件进行处理和分析。

2 结果与分析

2.1 形态鉴定

SS菌株子实体形态如图1A所示。子实体较小、单生、无菌柄,直径3-5 cm,菌盖马蹄形、木栓质、灰白至褐色,有细绒毛。纯培养菌落形态如图1B所示。该菌株在PDA平板上生长速率较慢,28 °C培养20 d后直径约70 mm。菌丝浓密,生长前期为白色,随着培养时间的推移,菌落逐渐变成浅黄至黄褐色,而边缘保持白色。以牛肉膏、蛋白胨等有机氮源时,菌落会形成明显的同心纹。培养过程中,菌落会产生芳香气味。菌丝体显微观察发现,SS菌株菌丝显微形态如图1C所示,菌丝浅黄至黄褐色,很少分枝,多为无隔菌丝。未观察到锁状联合及分生孢子。



图1 SS菌株形态特征。A: 子实体; B: 菌落; C: 菌丝体。

Fig. 1 Morphological characteristics of SS strain. A: Fruiting bodies; B: Colony; C: Mycelia.

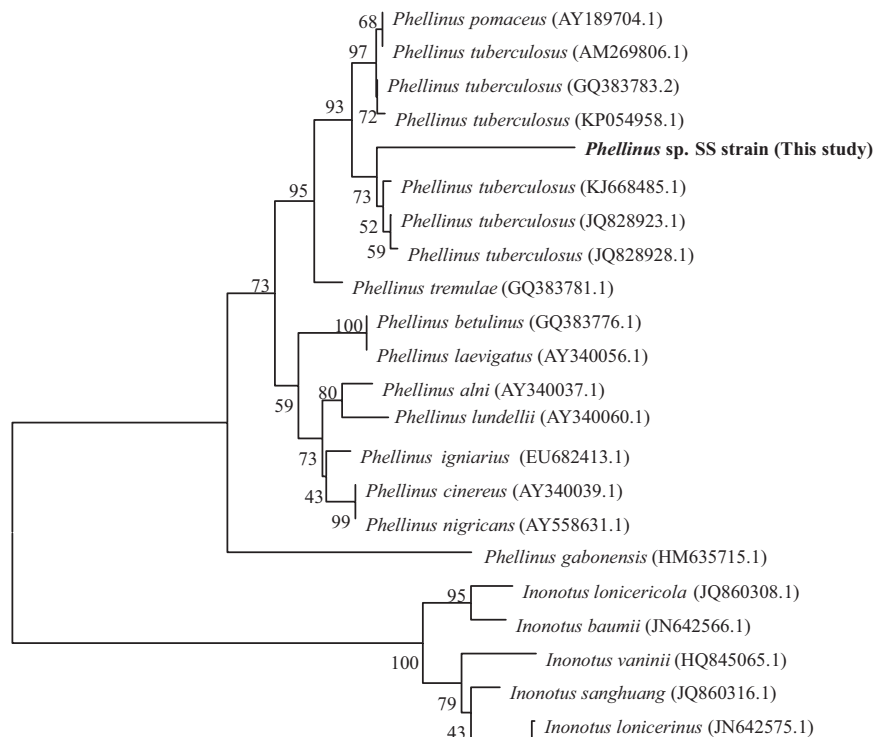


图2 基于ITS序列的SS菌株与其它层孔菌属和纤孔菌属真菌的系统发育分析。

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

2.2 基于ITS序列的系统发育分析

经PCR扩增和序列测定, 获得长度为653 bp的SS菌株ITS序列片段, GenBank登录号为KU745284. 进一步经过Blast在线比对, 并利用MEGA 6.0软件与相近种构建系统发育树, 如图2所示. 结果表明, SS菌株为层孔菌属 (*Phellinus*), 与苹果木层孔菌*Phellinus tuberculosus* (JQ828928.1) 和窄盖木层孔菌*Phellinus tremulae* (GQ383781.1) 相似性最高, 分别为95%和92%, 遗传距离分别为0.028和0.033.

2.3 碳源对菌丝体生长的影响

在碳源实验中, 菌丝在添加不同碳源与对照培养基中除羧甲基纤维素钠实验组外均能生长, 菌丝生长以葡萄糖最佳, 麦芽糖次之, 羧甲基纤维素钠和对照最差 (表1). 不同碳源培养基上菌丝生长速度依次为葡萄糖>麦芽糖>对照>山梨醇>甘露醇>蔗糖>淀粉>乳糖>羧甲基纤维素钠. 综合菌丝长势、菌丝生长速度, SS菌株菌丝培养的最适碳源为葡萄糖 (3.15 ± 0.19 mm/d), 其次为麦芽糖 (3.07 ± 0.37 mm/d). SS菌株生长过程中可以分泌色素, 而在不同碳源的培养基上, 菌落形态和色素分泌情况差异明显. 在各碳源的培养基上, 菌落颜色白色至黄褐色. 在以葡萄糖、麦芽糖、山梨醇、甘露糖和淀粉为碳源时, 分泌浅褐至黄褐色色素; 而以蔗糖和乳糖为碳源时, 则不分泌色素. 另外, 随着菌落的生长, 在葡萄糖、麦芽糖组会出现不明显同心圆现象.

2.4 氮源对菌丝体生长的影响

在氮源实验中, 菌丝在添加不同氮源的培养基中均生长, 菌丝生长速度黄豆粉最佳, 硫酸铵次之, 对照最差 (表2). 不同氮源培养基上菌丝生长速度依次为黄豆粉>硫酸铵>硝酸铵>牛肉浸膏>胰蛋白胨>玉米浆>酵母浸粉>甘氨酸>尿素>对照. 黄豆粉培养基上菌丝生长速度最快, 对照培养基上菌丝不生长. 综合菌丝长势、菌丝生长速度, SS菌株培养的最适氮源为黄豆粉 (4.65 ± 0.06 mm/d), 其次为硫酸铵 (4.29 ± 0.19 mm/d). SS菌株在除尿素之外的各氮源培养

基中, 菌丝长势良好、不产色素; 而在尿素培养基中生长缓慢、菌丝稀疏, 但分泌较多的色素, 导致菌落和培养基均呈现灰褐色.

2.5 C/N比对菌丝体生长的影响

C/N比实验中, 菌丝在各培养基中均生长良好, 其中菌丝生长速度以10/1最佳 (表3). 不同氮源培养基上菌丝生长速度依次为10/1 > 20/1 > 30/1 > 40/1 > 50/1 > 60/1, 而20/1培养基中菌丝长势最佳. 综合菌丝长势、菌丝生长速度, SS菌株菌丝培养的最适C/N比为20/1 (3.65 ± 0.16 mm/d), 其次为10/1 (4.16 ± 0.04 mm/d). SS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, 并逐渐开始向胞外分泌色素.

2.6 生长因子对菌丝体生长的影响

不同生长因子实验中, 菌丝在各培养基中均生长良好, 其中维生素C最佳 (表4). 不同生长因子培养基上菌丝生长速度接近, 依次为维生素C>维生素B₂>维生素B₁>维生素B₆>对照>肌醇. 其中, 以维生素C培养基的菌丝长势最佳, 菌丝浓密. 综合菌丝长势、菌丝生长速度, 桑黄SS菌株培养的最适生长因子为维生素C (3.32 ± 0.01 mm/d), 其次为维生素B₂ (3.24 ± 0.12 mm/d). 培养基中除维生素B₂培养基之外, 均产浅褐至褐色色素.

2.7 温度对菌丝体生长的影响

在不同温度实验中, 菌丝在16-36 ℃条件下均能生长, 其中28 ℃时生长最佳, 24 ℃次之, 16 ℃长势较弱 (表5). 在16-36 ℃条件下菌丝生长速度依次为28 ℃ > 24 ℃ > 32 ℃ > 36 ℃ > 20 ℃ > 16 ℃. 28 ℃时菌丝生长速度最快. 综合菌丝长势、菌丝生长速度, 桑黄BJ菌株培养的最适温度为28 ℃ (4.12 ± 0.38 mm/d), 其次为24 ℃ (3.53 ± 0.07 mm/d). 在加富培养基上, SS菌株不产色素. 菌丝的生长对温度比较敏感, 高温和低温都会降低菌丝体的生长速度. 菌丝体生长最适温度均为28 ℃, 并且能够形成类子实体的“菌皮”样结构.

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

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	3.15 ± 0.19 a	++	菌落淡黄至褐色, 有同心圆, 产褐色色素 Light yellow to brown, concentric circles, producing brown pigment
麦芽糖 Maltose	3.07 ± 0.37 b	++	菌落黄褐色, 边缘白色, 有同心圆, 产褐色色素 Brown, white edge, concentric circles, producing brown pigment
对照 CK	2.27 ± 0.26 b	+	菌落白色至淡黄色, 不产色素 White to light yellow, unpigment
山梨醇 Sorbitol	2.24 ± 0.09 b	+	菌落黄褐色, 产褐色色素 Brown, producing brown pigment
甘露醇 Mannitol	2.10 ± 0.14 b	+	菌落黄褐色, 产褐色色素 Brown, producing brown pigment
蔗糖 Sucrose	2.00 ± 0.02 b	+	菌落浅灰色, 不产色素 Light gray, unpigment
淀粉 Starch	1.96 ± 0.11 b	+	菌落灰褐色, 产浅褐色色素 Gray brown, producing light brown pigment
乳糖 Lactose	1.61 ± 0.11 c	+	菌落浅黄色, 不产色素 Light yellow, unpigment
羧甲基纤维素钠 Carboxymethylcellulose sodium	- d	-	菌丝不生长 No growth

-: 不生长; +: 生长稀疏; ++: 生长较致密. 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$).
-: mycelia did not grow; +: mycelial growth weak; ++: mycelial growth ordinary. Different small letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

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

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
黄豆粉 Soybean meal	4.65 ± 0.06 a	+++	菌落中央为均一的黄色, 边缘浅灰色, 不产色素 Yellow center, white edge, unpigment
硫酸铵 (NH ₄) ₂ SO ₄	4.29 ± 0.19 ab	+++	菌落浅黄至白色, 有不明同心圆, 不产色素 Yellow to white, unapparent concentric circles, unpigment
硝酸铵 NH ₄ NO ₃	4.17 ± 0.05 ab	+++	菌落中央为均一的黄色, 边缘浅灰色, 不产色素 Yellow center, light gray edge, unpigment
牛肉浸膏 Beef extract	3.89 ± 0.14 bc	+++	中央为黄色, 边缘为白色, 有明显同心圆, 不产色素 Yellow center, white edge, concentric circles, unpigment
胰蛋白胨 Casein Tryptone	3.81 ± 0.17 bc	+++	菌落黄褐色至浅灰色, 有明显同心圆, 不产色素 Yellow brown to light gray, concentric circles, unpigment
玉米浆 Corn syrup	3.51 ± 0.23 cd	++	中央为黄色, 边缘为白色, 有明显同心圆, 不产色素 Yellow center, white edge, concentric circles, unpigment
酵母浸粉 Yeast extract	3.14 ± 0.67 d	++	菌落为均一的灰白色, 有不明同心圆, 不产色素 Gray, unapparent concentric circles, unpigment
甘氨酸 Glycine	2.62 ± 0.5 e	++	菌落黄色至白色, 存在明显同心圆现象, 不产色素 Yellow to white, concentric circles, unpigment
尿素 Urea	2.03 ± 0.03 f	+	菌落灰褐色, 产褐色色素 Gray brown, producing brown pigment
对照 CK	- g	-	菌丝不生长 Not grow

-: 不生长; +: 生长稀疏; ++: 生长较致密; +++: 生长致密. 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$).
 -: mycelia did not grow; +: mycelial growth weak; ++: mycelial growth ordinary. Different small letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

表3 C/N比对SS菌株菌丝体生长的影响
Table 3 Effect of the C/N ratio on mycelial growth of strain SS

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	4.16 ± 0.04 a	+++	菌落黄色, 边缘为浅黄色, 存在明显同心圆, 不产色素 Yellow center, light yellow edge, concentric circles, unpigment
20/1	3.65 ± 0.16 b	+++	菌落中央至外周由黄褐渐变为浅黄色, 不产色素 Yellowish-brown to light yellow, unpigment
30/1	3.44 ± 0.03 b	+++	菌落中央至外周由黄褐渐变为浅黄色, 存在明显同心圆现象, 不产色素 Yellowish-brown to light yellow, concentric circles, unpigment
40/1	3.37 ± 0.08 b	++	菌落中央至外周由浅黄渐变为浅灰色, 存在明显同心圆现象, 产浅褐色色素 Light yellow to light gray, concentric circles, producing light brown pigment
50/1	3.36 ± 0.43 b	++	菌落中央至外周由浅黄渐变为浅灰色, 存在明显同心圆现象, 产浅褐色色素 Light yellow to light gray, concentric circles, producing light brown pigment
60/1	2.86 ± 0.12 c	+	菌落中央至外周由黄渐变为浅灰色, 存在明显同心圆现象, 产褐色色素 Yellow to light gray, concentric circles, producing brown pigment

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

表4 生长因子对SS菌株菌丝体生长的影响
Table 4 Effect of growth factor on mycelial growth of strain SS

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
VC	3.32 ± 0.01 a	++	菌落中央至外周由黄褐渐变为白色, 具同心圆结构, 产浅褐色色素 Yellowish-brown to white, concentric circles, producing light brown pigment
VB ₂	3.24 ± 0.12 a	++	菌落中央为黄色, 边缘为白色, 具同心圆, 不产色素 Yellow center, white edge, concentric circles, unpigment
VB ₁	3.22 ± 0.19 a	++	菌落中央至外周由黄色渐变为白色, 具同心圆, 产褐色色素 Yellow to white, concentric circles, producing brown pigment
VB ₆	2.91 ± 0.04 b	++	菌落中央至外周由黄色渐变为白色, 具同心圆, 产褐色色素 Yellow to white, concentric circles, producing brown pigment
对照 CK	2.88 ± 0.07 b	++	菌落中央为淡黄色, 边缘为白色, 具同心圆, 产褐色色素 Yellow to white, concentric circles, producing brown pigment
肌醇 Inositol	2.84 ± 0.05 b	++	菌落中央为淡黄色, 边缘为白色, 具同心圆, 产褐色色素 Yellow to white, concentric circles, producing brown pigment

++: 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 ($P < 0.05$).

表5 温度对SS菌株菌丝生长的影响
Table 5 Effect of temperature on mycelial growth of strain SS

温度 Temperature ($\theta/^{\circ}\text{C}$)	菌丝生长速度 Mycelial growth rate ($\mu\text{mm d}^{-1}$)	菌丝长势 Mycelial growth	菌落形态 Colony morphology
28	$4.12 \pm 0.38 \text{ a}$	+++	菌落为均一的白色, 中央产生褐色类子实体结构, 不产色素 White, brown similar fruiting body structure in center, unpigment
24	$3.53 \pm 0.07 \text{ b}$	++	菌落中央浅褐色, 边缘白色, 有环状色素圈, 边缘不规则, 不产色素 Light brown to white, pigment ring, irregular edge, unpigment
32	$3.24 \pm 0.12 \text{ bc}$	++	菌落中央白色, 边缘浅灰色, 有环状色素圈, 不产色素 White to light gray, pigment ring, unpigment
36	$2.97 \pm 0.26 \text{ cd}$	++	菌落为均一的白色, 不产色素 White, unpigment
20	$2.78 \pm 0.04 \text{ de}$	++	菌落浅灰至白色, 不产色素 Light gray to white, unpigment
16	$2.5 \pm 0.01 \text{ e}$	+	菌落中央至外周由浅黄至白色, 不产色素 Light yellow to white, unpigment

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

表6 pH值对SS菌株菌丝体生长的影响
Table 6 Effect of pH value on mycelial growth of strain SS

pH值 pH value	菌丝生长速度 Mycelial growth rate ($\mu\text{mm d}^{-1}$)	菌丝长势 Mycelial growth	菌落形态 Colony morphology
7.0	$3.86 \pm 0.09 \text{ a}$	+++	菌落中央至外周由黄褐至白色, 具不明显同心圆, 不产色素 Yellowish-brown to white, unapparent concentric circles, unpigment
7.5	$2.97 \pm 0.05 \text{ b}$	+++	菌落中央至外周由黄褐至白色, 具明显同心圆, 不产色素 Yellowish-brown to white, concentric circles, unpigment
8.0	$2.61 \pm 0.13 \text{ c}$	++	菌落中央至外周由黄褐至灰白色, 具明显同心圆, 不产色素 Yellowish-brown to white, concentric circles, unpigment
8.5	$0.78 \pm 0.05 \text{ d}$	+	菌丝稀疏, 不产色素 Sparse hyphae, unpigment
9.0	- e	-	不生长 No growth
5.0	- e	-	不生长 No growth
5.5	- e	-	不生长 No growth
6.0	- e	-	不生长 No growth
6.5	- e	-	不生长 No growth

-: 不生长; +: 生长稀疏; ++: 生长较致密; +++: 生长致密. 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$).
-: mycelia did not grow; +: mycelial growth weak; ++: mycelial growth ordinary; +++: mycelial growth vigorous. Different small letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.8 pH值对菌丝体生长的影响

在pH实验中, 菌丝在pH 7.0-8.5条件下均能生长, 其中pH 7.0长势最佳, pH 7.5、8.0次之, pH 8.5长势较弱, 其他条件不生长 (表6). 在不同pH值条件下菌丝生长速度依次为7.0 > 7.5 > 8.0 > 8.5 > 5.0 = 5.5 = 6.0 = 6.5 = 9.0. pH 7.0时菌丝生长速度最快. 综合菌丝长势、菌丝生长速度, 桑黄SS菌株培养的最适pH为7.0 ($3.86 \pm 0.09 \text{ mm/d}$), 其次为pH 7.5 ($2.97 \pm 0.05 \text{ mm/d}$). 结果表明, SS菌对pH较为敏感, 最适pH为7.0.

2.9 发酵液生物学特性

SS菌株经培养7 d的发酵液中总糖、还原糖、多糖、多酚、黄酮含量及发酵液总抗氧化活性. 测定结果表明, 发酵液中总糖含量270.21 mg/L、还原糖含量93.50mg/L、多糖含量176.71 mg/L、黄酮含量0.11 mg/L, 未检测到多酚的存在. 发酵液总抗氧化活性 (FeSO_4) 为7.82 mol/L.

3 讨论与结论

桑黄是我国及东亚国家传统名贵中药. 近年来, 真桑黄被确定为*I. sanghuang*^[7], 而传统上被视作桑黄菌的*Inonotus*、

*Phellinus*及*Fomitiporia*等属真菌, 以其显著抗肿瘤、免疫调节等活性, 为人们所重视, 是重要的药用真菌资源. 本研究以采集于北京市延庆区四海镇黑汉岭山荆子腐木的多孔菌子实体为研究对象, 开展药用真菌资源开发与利用研究.

SS菌株分离自蔷薇科苹果属植物山荆子, 其子实体较小, 单生、无柄、菌盖马蹄形、栓质、灰白至褐色、外被细绒毛. 菌丝体少分枝、少隔膜、无锁状联合、无分生孢子. 其形态特征与苹果木层孔菌 (*P. tuberculosis*) 一致^[25-26]. ITS鉴定是真菌分离的重要分子生物学手段之一^[7, 11, 20]. 本研究中, 获得SS菌株ITS序列片段长度653 bp, 与苹果木层孔菌 (*P. tuberculosis*) 和窄盖木层孔菌 (*P. tremulae*) 亲缘关系最近, 相似性分别为95%和92%. 窄盖木层孔菌主要是寄生在杨属植物, 其子实体中等大小, 表面灰黑至黑色, 菌盖近三角形或斜马蹄形. 而苹果木层孔菌则主要寄生于苹果属、李属、丁香属植物, 子实体小、单生、马蹄状、灰白至褐色. SS菌株分离自苹果属植物山荆子, 子实体形态特征与报道一致. 因而, 结合形态与分子鉴定, 确定SS菌株为苹果木层孔菌 (*P. tuberculosis*).

SS菌株最适培养条件研究表明, 其菌丝体生长的最适碳

源为葡萄糖,最适氮源为黄豆粉,最适C/N比为20/1,最适生长因子为维生素C,最适温度为28℃,最适pH为7.0。雷萍等报道,从桦树上分离到野生桑黄菌丝生长的最适碳源是葡萄糖,最适氮源是蛋白胨,最适温度为28℃,最适pH为6.5^[27]。曹春蕾等报道,桑木层孔菌(*Phellinus mori*)在淀粉为碳源时生长速度最快但长势较弱,以葡萄糖和麦芽糖为碳源长势最好,最适氮源为酵母浸粉,pH 5.5-8.0时菌丝生长差异不大,28-33℃温度菌丝生长最佳^[28]。SS菌株的最适碳源和培养温度与桦树桑黄、桑木层孔菌一致。关园园等报道,火木层菌(*Phellinus igniarius*)菌丝培养最适条件等进行了研究,其菌丝生长的最适碳源、氮源、C/N、pH值、温度分别为果糖、酵母粉、20:1、6.9和30℃^[29]。孙浩等报道,红缘拟层孔菌(*Fomitopsis pinicola*)菌丝最佳碳源为乳糖,最佳氮源为豆饼粉,最适pH为7.0^[30]。相关研究表明,SS菌株最适C/N比与pH值与上述层孔菌属桑黄真菌近似,而各种真菌的最适氮源差异较大,可以以黄豆粉、豆饼粉、蛋白胨、酵母浸粉等为最适氮源。本研究中,SS菌株可以利用葡萄糖、黄豆粉等常见原料和28℃、pH 7.0等温和培养条件进行培养,为SS菌株进一步开发利用提供了适宜条件。

桑黄作为一类传统中药使用由来已久,多部中医典籍都对桑黄治疗疾病有所记载。现代科学研究也大量报道了桑黄具有抗肿瘤、抗氧化、免疫调节、神经保护的作用,其活性物质则主要为多糖、黄酮等^[31-34]。关于苹果木层孔菌的研究较少。He等从苹果木层孔菌子实体中获得7种Drimane型倍半萜Phellinuins A-G^[35];另外,还分离到一种新的Illudin型倍半萜类化合物Phellinuin J,并评估了该化合物对HL-60、SMMC-7721等肿瘤细胞株的毒性作用^[36]。本研究中采用液体发酵的手段,从苹果木层孔菌SS菌株发酵液中获得总多糖含量176.71 mg/L,总黄酮含量0.11 mg/L,总抗氧化活性(FeSO₄)为7.82 mol/L,为其活性物质的开发提供了实验基础。

参考文献 [References]

- 1 包海鹰,王超仪,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]
- 2 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]
- 3 Zhu T, Kim SH, Chen CY. A medicinal mushroom: *Phellinus linteus* [J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15: 1330-1335
- 4 黄年来,林志彬,陈国良.中国食药用菌学[M].上海:上海科学技术文献出版社,2010: 1690-1695 [Huang N, Lin Z, Chen G. Medicinal and edible fungi [M]. Shanghai: Shanghai science and Technology Literature Publishing House, 2010: 1690-1695]
- 5 Ikekawa T, Nakanishi M, Uehara N, Chihara G, Fukuoka F. Antitumor action of some Basidiomycetes, especially *Phellinus linteus* [J]. *Jap J Cancer Res*, 1968, 59: 155-157
- 6 耿燕,王英辉,陆震鸣,许泓瑜,许正宏.火木层孔菌发酵菌粉及其组分对小鼠移植性肝癌H22的体内生长作用[J].菌物学报,2013,32(6): 1046-1055 [Geng Y, Wang Y, Lu Z, Xu H, ZH X. Effects of dry matter of culture broth from *Phellinus igniarius* submerged fermentation and its fractions on mice hepatoma 22 [J]. *Mycosystema*, 2013, 32(6): 1046-1055]
- 7 Wu S, Dai Y, Hattori T, Yu T, Wang D, Parmasto E, Chang H, Shih S. Species clarification for the medicinally valuable ‘sanghuang’ mushroom [J]. *Bot Stud*, 2012, 53: 135-149
- 8 Sliva D. Medicinal mushroom *Phellinus linteus* as an alternative cancer therapy [J]. *Exp Ther Med*, 2010, 1: 407-411
- 9 吴声华.珍贵药用菌“桑黄”物种正名[J].食药用菌,2013,20: 177-179
- 10 Dai YC, Yang ZL, Cui BK, Yu CJ, Zhou LW. Species Diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China [J]. *Int J Med Mushrooms*, 2009, 11: 287-302
- 11 Jeong W, Yong W, Jin S, Hack S. Phylogeny of *Phellinus* and related genera inferred from combined data of ITS and mitochondrial SSU rDNA sequences [J]. *J Microbiol Biotech*, 2005, 15: 1028-1038
- 12 Tian X, Yu H, Zhou L, Decock C, Vlasák J, Dai Y. Phylogeny and taxonomy of the *Inonotus linteus* complex [J]. *Fungal Divers*, 2013, 58: 159-169
- 13 Dai Y. Hymenochaetaceae (Basidiomycota) in China [J]. *Fungal Divers*, 2010, 45: 131-343
- 14 Wagner T, Fischer M. Proceedings towards a natural classification of the worldwide taxa *Phellinus* s.l. and *Inonotus* s.l., and phylogenetic relationships of allied genera [J]. *Mycologia*, 2002, 94: 998-1016
- 15 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 G, Wang S, Chen Q, Zhang H, Zhang G. Isolation, identification, and biological characteristics of a wild *Amauroderma* mushroom [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2015, 21(3): 464-469]
- 16 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
- 17 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]
- 18 Wang LY, Cheong KL, Wu DT, Meng LZ, Zhao J, Li SP. Fermentation optimization for the production of bioactive polysaccharides from *Cordyceps sinensis* fungus UM01 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 79: 180-185
- 19 刘旸,陈敏,庞昕,梁曼曼,马路路.一株产胞外多糖的山药内生细菌 *Lysinibacillus fusiformis* S-1的分离和鉴定[J].应用与环境生物学报,2014,20(3): 382-388 [Liu Y, Chen M, Pang X, Liang M, Ma L. Isolation and identification of an exopolysaccharide producing endophytic strain *Lysinibacillus fusiformis* S-1 [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2014, 20(3): 382-388]
- 20 张志君,孙伟,李永亮,张朝凤.3,5-二硝基水杨酸法联合苯酚-浓硫酸法测定不同产地黄精中多糖含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6): 106-109 [Zhang Z, Sun W, Li Y, Zhang C. Determination of polysaccharide in rhizoma polygonati by phenol-sulfuric acid and DNS methods [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formu*, 2012, 18(6): 106-109]
- 21 钱骅,赵伯涛,陈斌,黄晓德,朱羽尧,吕娟.桑黄子实体多糖、黄酮和多酚含量与抗氧化活性相关性[J].食品工业科技,2014,36(12): 104-108 [Qian H, Zhao B, Chen B, Huang X, Zhu Y, Lv J. Relationship between the content of polysaccharides, flavonoids and polyphenols from the sporocarp of *Phellinus linteus* and the antioxidant activity [J].

- Sci Technol Food Ind*, 2014, **36** (12): 104-108]
- 22 费雯, 淳泽, 何沁崑, 王森雨, 罗傲雪, 范益军. 金钗石斛总多酚提取工艺及体外抗氧化活性[J]. 应用与环境生物学报, 2015, **21** (4): 623-628 [Fei W, Chun Z, He Q, Wang M, Luo A, Fan YL. Extraction conditions and in vitro antioxidant activities of polyphenols from *Dendrobium nobile* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2015, **21** (4): 623-628]
- 23 黄琴, 沈杨霞, 张成静, 罗傲雪, 范益军. 铁皮石斛多酚和黄酮含量及与抗氧化活性的相关性[J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20** (3): 438-442 [Huang Q, Shen Y, Zhang C, Luo A, Fan Y. Correlation of the antioxidant property with the total phenolic content and total flavonoids of different *Dendrobium officinale* extracts [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2014, **20**: 438-442]
- 24 Chaillou LL, Nazareno MA. New method to determine antioxidant activity of polyphenols [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, **54**: 8397-8402
- 25 戴玉成. 中国林木病原腐朽菌[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 154-157 [Dai Y. Illustrations of pathogenic wood-edcaying fungi in China [M]. Beijing: Science Press, 2005: 154-157]
- 26 吴兴亮, 卯晓岚, 图力古尔, 宋斌, 李泰辉, 赵友兴, 陈双林, 曾念开, 黄圣卓, 文庭池, 邓春英. 中国药用真菌[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 536-538 [Wu XL, Mao XL, Bau T, Song B, Li TH, Zhao YX, Chen SL, Zeng LK, Huang SZ, Wen TC, Deng CY. Medicinal fungi of China [M]. Beijing: Science Press, 2013: 536-538]
- 27 雷萍, 孙悦迎, 张文隽, 张慧. 野生桑黄菌种分离与培养特性研究初报[J]. 食用菌学报, 2007, **14** (2): 71-75 [Lei P, Sun Y, Zhang W, Zhang H. Growth characteristics of vegetative mycelium isolated from wild *Phellinus* fruit bodies [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2007, **14**: 71-75]
- 28 曹春蕾, 崔宝凯, 包海鹰. 桑木层孔菌固体培养条件的研究[J]. 菌物学报, 2011, **30** (3): 486-490 [Cao C, Cui B, Bao H. Solid culture conditions of *Phellinus mori* [J]. *Mycosystema*, 2011, **30** (3): 486-490]
- 29 关园园, 余海尤, 申进文, 程雁, 郭恒. 火木层孔菌菌丝生长最适条件研究[J]. 河南农业大学学报. 2008, **42** (6): 650-654 [Guan Y, Yu H, Shen J, Cheng Y, Guo H. Studies on optimum conditions for hypha growth of *Phellinus igniarius* [J]. *J Henan Agric Univ*, 2008, **42** (6): 650-654]
- 30 孙浩, 刘寅, 于静, 贺新生, 何培新. 红缘拟层孔菌发酵条件优化及菌丝化学成分定性分析[J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2012, **41** (3): 50-53 [Sun H, Liu Y, Yu J, He X, He P. Fermentation optimization of *Fomitopsis pinicola* and qualitative analysis of the mycelia chemical ingredients [J]. *J Henan Instit Sci Tech (Nat Sci Edi)*, 2012, **41**: 50-53]
- 31 Choi DJ, Cho S, Seo JY, Lee HB, Park YI. Neuroprotective effects of the *Phellinus linteus* ethyl acetate extract against H₂O₂-induced apoptotic cell death of SK-N-MC cells [J]. *Nutr Res*, 2016, **36**: 31-43
- 32 Suabjakyong P, Nishimura K, Toida T, Van Griensven LJ. Structural characterization and immunomodulatory effects of polysaccharides from *Phellinus linteus* and *Phellinus igniarius* on the IL-6/IL-10 cytokine balance of the mouse macrophage cell lines (RAW 264.7) [J]. *Food Funct*, 2015, **6**: 2834-2844
- 33 Li SC, Yang XM, Ma HL, Yan JK, Guo DZ. Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides extracted from *Phellinus igniarius* mycelia [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, **133**: 24-30
- 34 Liu Y, Liu C, Jiang H, Zhou H, Li P, Wang F. Isolation, structural characterization and neurotrophic activity of a polysaccharide from *Phellinus ribis* [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, **127**: 145-151
- 35 He JB, Feng T, Zhang S, Dong ZJ, Li ZH, Zhu HJ, Liu JK. Seven new drimane-type sesquiterpenoids from cultures of fungus *Phellinus tuberculosus* [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2014, **4**: 21-25
- 36 He JB, Tao J, Miao XS, Feng YP, Bu W, Dong ZJ, Li ZH, Feng T, Liu JK. Two new illudin type sesquiterpenoids from cultures of *Phellinus tuberculosus* and *Laetiporus sulphureus* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2015, **17**: 1054-1058