

谢春芹, 杨鹤同, 吴琴燕, 等. 桑黄黄酮、多糖高产优良菌株的筛选试验[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(14): 209–212.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.049

桑黄黄酮、多糖高产优良菌株的筛选试验

谢春芹¹, 杨鹤同¹, 吴琴燕², 姜爱良³, 张雪姣³, 王晶晶¹, 任 昂³

(1. 江苏农林职业技术学院, 江苏句容 212400; 2. 镇江市农业科学技术实业公司, 江苏句容 212400;
3. 南京农业大学, 江苏南京 210095)

摘要:为了筛选出黄酮和多糖产量较高的优良桑黄菌株, 对 17 株桑黄菌株的生物量、黄酮和多糖含量及总产量进行分析, 采用酵母提取物麦芽糖完全培养基(CYM)液体培养基对 17 株不同的桑黄菌株发酵培养 7 d, 收集液体菌丝, 烘干至恒质量后测定菌丝干质量, 用 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法测定菌丝黄酮含量, 用苯酚-硫酸法测定菌丝多糖含量。结果表明: 在 17 株桑黄菌株中, 生物量最大的是 JNSH-14, 达到 0.645 g/100 mL; 黄酮产量最大的是 JNSH-15, 达到 42.048 mg/L; 多糖产量最大的是 JNSH-15, 达到 834.146 mg/L。由研究结果可以看出, JNSH-15 菌株无论是在生物量还是总黄酮、总多糖产量方面, 都处于较高水平。研究结果可为下一步桑黄黄酮、多糖发酵工艺优化中发酵菌株的选择提供参考依据。

关键词:桑黄; 黄酮; 多糖; 菌株

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)14-0209-04

桑黄 (*Phellinus* spp.) 在分类学上属于真核真菌亚界 (Eukaryomycota) 真菌门 (Eumycota) 担子菌亚门 (Basidiomycotina) 层菌纲 (Hymenomycetes) 多孔菌目 (Polyporales) 锈革孔菌科 (Hymenochaetaceae) 针层孔菌属 (*Phellinus*)^[1], 在我国有着悠久的历史, 最早在李时珍所著的《本草纲目》中就已经有了关于桑黄的记载, 常用于治疗内脏下垂、脱肛泻血、血崩气血两虚等症状^[2-4]。日本学者

IkeKawa 等在 1968 年研究发现, 桑黄 (*Phellinus linteus*) 子实体提取物具有非常好的抗癌效果, 对小鼠肉瘤 S180 的抑制率可达 96.7%, 对正常细胞无毒害作用^[5-6]。现代医学研究证实, 桑黄提取物对小鼠肝癌 H22、肉瘤 s180、肺癌 Lewis^[7]、脑胶质瘤 U251^[8]、乳腺癌细胞 MCF-7^[9]、人源性结肠癌细胞 HT-29^[10] 等均有良好的抗癌作用, 同时可以提高人体免疫能力, 保护肝脏, 治疗关节炎等^[11-12]。这些都使得桑黄的研究成为人们关注的热点, 使其在药品研发与临床应用领域以及保健品开发领域有着广阔的应用前景。

桑黄广泛的药理功能得益于其多种多样的化学成分, 现代生物学研究发现, 桑黄的主要化学成分有多糖、黄酮、香豆素、氨基酸、萜类物质和酚类物质等, 其中具有较强生物学活性的有效成分主要是多糖、黄酮和三萜等^[13-14], 其中又以多糖、黄酮的研究最为系统。多糖存在于子实体、菌丝体和发酵液中, 分为子实体多糖、菌丝体胞内多糖 (intracellular

收稿日期: 2018-05-02

基金项目: 江苏省句容市农业支持计划 (编号: NY2016674621); 江苏省科技支撑计划 (编号: BE2014338); 江苏省重点研发计划 (编号: BE2015361)。

作者简介: 谢春芹 (1976—), 女, 江苏沐阳人, 硕士, 副教授, 主要从事食用菌的教学与应用研究。E-mail: xiechunqin@163.com。

通信作者: 任 昂, 博士, 副教授, 主要从事食用菌真菌遗传与育种方面的基础应用研究。E-mail: angren@njau.edu.cn。

[4] 刘 伟, 腊 萍, 杨如箴, 等. 野生樱桃李清除 DPPH 自由基能力及抑制 α -葡萄糖苷酶活性[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(17): 183–185.

[5] Hafeez K, Andleeb S, Ghous T, et al. Phytochemical screening, α -glucosidase inhibition, antibacterial and antioxidant potential of *ajuga bracteosa* extracts [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2017, 18(4): 336–342.

[6] 刘钱薇, 葛小东, 张 钱, 等. 山芝麻多糖的超声辅助提取工艺优化及对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(5): 183–188.

[7] Yin Z H, Zhang W, Feng F J, et al. α -glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants[J]. Food Science and Human Wellness, 2014, 3(3): 136–174.

[8] 颜 欢, 邱 琛, 钟 凯, 等. 金银花花蕾中 3,5-二咖啡酰奎宁酸对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(7): 44–49.

[9] 刘雪辉, 李觅路, 谭 斌, 等. 紫甘薯茎叶中绿原酸及异绿原酸对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2014, 30(3): 103–107.

[10] 朱娟娟, 尹忠平, 陈继光, 等. 微量 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型及抑制类型的判断方法[J]. 现代食品科技, 2016, 32(12): 164–170.

[11] 刘 伟, 李明玺, 王俊龙, 等. 余甘子酚类成分及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(12): 45–50.

[12] 林志灿, 郑 溢, 李 旒, 等. 不同植物中柯里拉京的含量测定及其对胃癌细胞增殖的抑制作用[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2016, 55(6): 847–852.

[13] 陈一燕, 陈崇宏. 柯里拉京药理活性研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(5): 390–394.

[14] 王雪洁, 林志健, 张 冰, 等. 菊苣小分子化合物对黄嘌呤氧化酶抑制作用的分子对接研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(19): 3818–3825.

polysaccharide, 简称 IPS) 和胞外多糖 (extracellular polysaccharide, 简称 EPS)^[15-16], 具有抗肿瘤、提高免疫力、降血糖等功效^[2]。子实体多糖以杂多糖为主, 研究发现的主要单糖有甘露糖、半乳糖、葡萄糖、树胶醛糖、果糖、木糖^[17-18]。黄酮类化合物是桑黄抗氧化作用的重要物质, 总黄酮含量可作为桑黄抗氧化效用的评价标准^[19]。现代药理学研究表明, 桑黄黄酮类化合物具有抗肿瘤、抗氧化、抗肝纤维化、增强免疫的作用^[20-21]。

本研究通过液体发酵培养, 比较 17 株桑黄菌株的生物量和黄酮、多糖含量, 从中筛选出桑黄黄酮、多糖总产量较高的菌株, 以期在生产上桑黄的液体发酵高效生产提供优良菌株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 17 株桑黄菌株 (JNSH-1 ~ JNSH-17) 保存于南京农业大学生命科学学院应用真菌实验室, 各类菌株的来源见表 1。

表 1 17 株菌株的来源情况

| 菌株编号 | 菌种名称 | 来源地 |
|---------|-------|---------|
| JNSH-1 | 杨树桑黄 | 山东省德州市 |
| JNSH-2 | 桦树桑黄 | 山东省德州市 |
| JNSH-3 | 桑黄 | 山东省单县 |
| JNSH-4 | 韩桑 | 吉林省长春市 |
| JNSH-5 | 京桑 | 吉林省长春市 |
| JNSH-6 | 榆林松桑黄 | 黑龙江省五常市 |
| JNSH-7 | 桑树桑黄 | 黑龙江省五常市 |
| JNSH-8 | 云杉桑黄 | 黑龙江省五常市 |
| JNSH-9 | 杨树桑黄 | 黑龙江省五常市 |
| JNSH-10 | 黑松桑黄 | 黑龙江省五常市 |
| JNSH-11 | 桑黄 | 江苏省南京市 |
| JNSH-12 | 桑黄 | 湖北省武汉市 |
| JNSH-13 | 桑黄 | 黑龙江省伊春市 |
| JNSH-14 | 桑黄 | 山东省淄博市 |
| JNSH-15 | 桑黄 | 江苏省南京市 |
| JNSH-16 | 桑黄 | 河南省驻马店市 |
| JNSH-17 | 桑黄 | 安徽省凤阳县 |

1.1.2 培养基 菌种活化用培养基为马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 固体培养基^[22], 配方如下: 200 g 马铃薯, 20 g 葡萄糖, 20 g 琼脂粉, 1 000 mL 水。配制方法同常规, 装量为 8 mL/平皿 (直径为 5 cm), 倒板后冷却, 备用。

种子液体培养基为 PDA 液体培养基, 配方如下: 200 g 马铃薯, 20 g 葡萄糖, 1 000 mL 水。配制方法同常规, 装量为 100 mL/瓶 (三角瓶容量为 250 mL), 灭菌后冷却, 备用。

液体发酵培养培养基为 CYM (酵母提取物麦芽糖完全培养基), 配方如下: 10 g 麦芽糖, 20 g 葡萄糖, 2 g 酵母提取物, 2 g 蛋白胨, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 4.6 g KH₂PO₄, 1 000 mL 去离子水。配制方法同常规, 装量为 100 mL/瓶 (三角瓶容量为 250 mL), 灭菌后冷却, 备用。

1.1.3 试剂与溶液 主要试剂有 5% NaNO₂、浓硫酸、70% 乙醇、10% 葡萄糖、Al (NO₃)₃、芸香苷 (纯度 > 95%)、4% NaOH、6% 苯酚。

1.1.4 仪器设备 主要仪器设备有 28 ℃ 恒温培养箱、烘箱、

722 型可见分光光度计、分析天平、天平、小型种子打碎机、摇床、超声波清洗仪、超净台、台式高速离心机、高压蒸汽灭菌锅、酶标仪等^[22]。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种平板的活化 从冰箱保存的斜面试管菌种 (母种) 中挑取 1 小块菌饼块, 接种于 PDA 固体平板培养基中央, 于 28 ℃ 恒温培养箱中静置培养。

1.2.2 桑黄一级种的制备 用 250 mL 三角瓶分装 PDA 液体培养基, 每瓶装 100 mL, 高压灭菌后使用。用直径为 6 mm 的无菌打孔器在活化的平板菌种上选取活力较高的靠近菌丝边缘的菌丝打孔^[19], 挑取 8 块带有培养基的菌丝接种于三角瓶内, 于 150 r/min、28 ℃ 恒温摇床中培养 7 d。

1.2.3 二级摇瓶发酵培养 用 250 mL 三角瓶分装 CYM 液体培养基, 每瓶装 100 mL, 高压灭菌后使用。将制备好的一级种在无菌条件下用组织匀浆破碎机打碎, 按 4% 的接种量接种到 CYM 液体培养基中, 于 150 r/min、28 ℃ 恒温摇床中培养 7 d。

1.2.4 菌丝生物量的测定 发酵培养 7 d 后, 将菌丝球用 20 目筛网收集起来, 于清水下冲洗, 直至培养基完全被洗净, 再将菌丝平摊于已称质量的无纺布上, 在烘箱中于 60 ℃ 烘干, 称量此时的质量, 得到菌丝干质量。

1.2.5 黄酮含量的测定 精确称取 0.05 g 菌丝粉末, 加入 5 mL 70% 乙醇, 放入超声清洗机中超声 1 h, 获得萃取液。取 1 mL 提取液, 用 NaNO₂ - Al (NO₃)₃ 比色法测定黄酮含量。用 0.1 mg/mL 芸香苷标准品制作标准曲线, 计算桑黄中的黄酮含量^[22]。

1.2.6 胞内多糖含量的测定 将菌丝烘干研磨成粉末后, 精确称取 0.05 g 粉末, 加入 5 mL 1 mol/L NaOH 溶液, 沸水浴 1 h, 吸取提取液备用。采用苯酚 - 硫酸法测定多糖含量, 用 1 mg/mL 葡萄糖标准溶液绘制标准曲线^[23-24]。

1.2.7 数据统计与分析 每组试验都以 3 组生物学重复的“平均值 ± 标准差”作为最终结果。对试验结果进行多重比较分析, 不同小写字母代表在 0.05 水平上差异显著。

2 结果与分析

2.1 17 株桑黄菌株菌丝干质量的比较

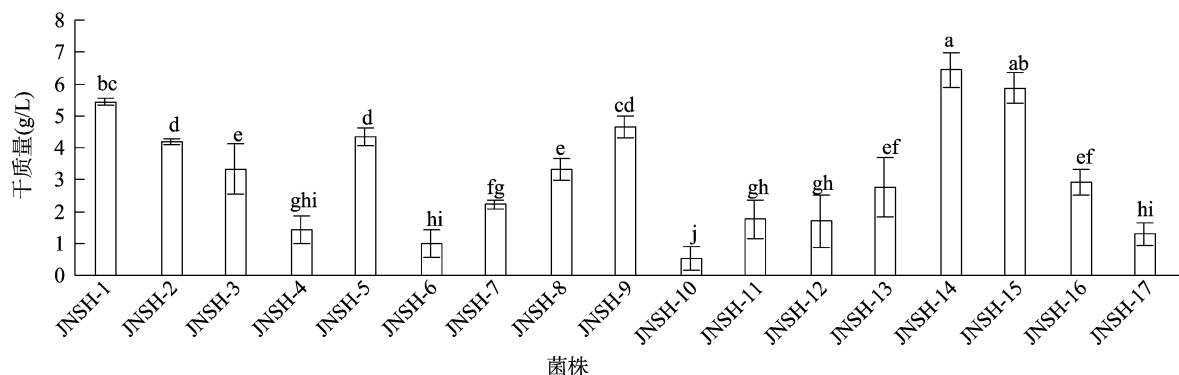
用 CYM 培养基对 17 株不同的桑黄菌株进行发酵培养, 测定菌丝干质量。如图 1 所示, 不同菌株间的生物量差异较大, 在 0.054 ~ 0.645 g/100 mL 之间; 生物量较高的菌株有 JNSH-14、JNSH-15、JNSH-1、JNSH-9、JNSH-5、JNSH-2, 分别达到 6.45、5.87、5.44、4.65、4.34、4.18 g/L。

2.2 17 株桑黄菌株菌丝黄酮含量的比较

如图 2 所示, 17 株桑黄菌株的黄酮含量有一定差异, 在 0.116 ~ 0.717 mg/100 mg 之间。黄酮含量较高的菌株有 JNSH-15、JNSH-2、JNSH-5, 分别达到 0.717、0.589、0.532 mg/100 mg。

2.3 17 株桑黄菌株菌丝多糖含量的比较

如图 3 所示, 17 株桑黄菌株的多糖含量差异相对较小, 在 6.778 ~ 15.876 mg/100 mg 之间。桑黄多糖含量较高的菌株有 JNSH-8、JNSH-12、JNSH-15, 分别达到 15.876、15.106、14.218 mg/100 mg。



不同菌株间标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下图同

图1 17 株桑黄的菌丝干质量

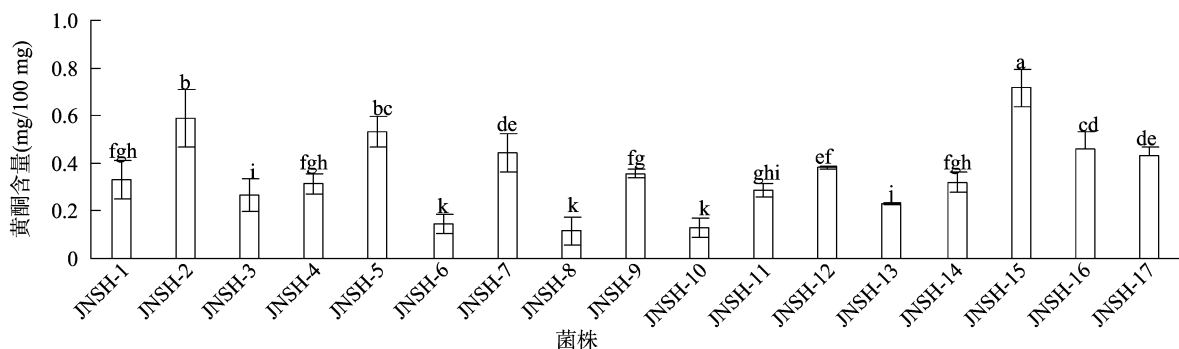


图2 17 株桑黄菌株的黄酮含量

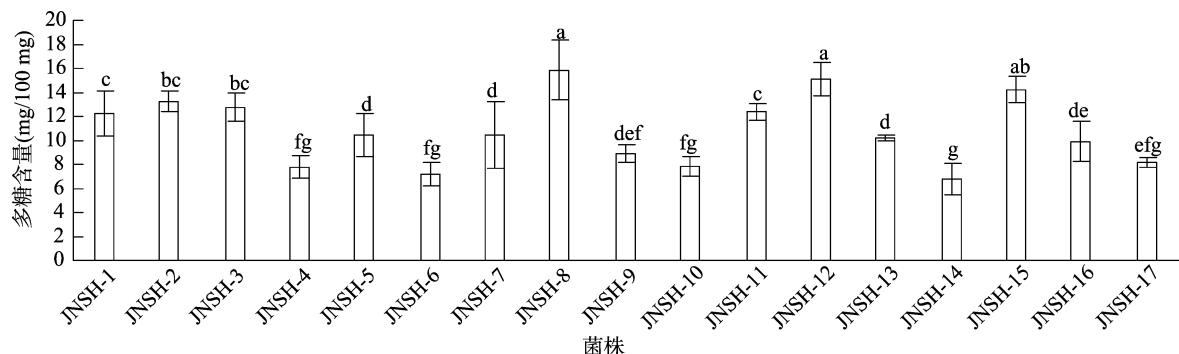


图3 17 株桑黄菌株的多糖含量

2.4 17 株桑黄菌株菌丝总黄酮产量的比较

为了综合比较各桑黄菌株的产黄酮特性,计算 17 株桑黄菌株的总黄酮产量。如图 4 所示,JNSH-15 菌株的总黄酮产

量最高,达到 42.048 mg/L;JNSH-2、JNSH-5、JNSH-14 的总黄酮产量较高,分别达到 24.645、23.086、20.634 mg/L;其他桑黄菌株的总黄酮产量较低。

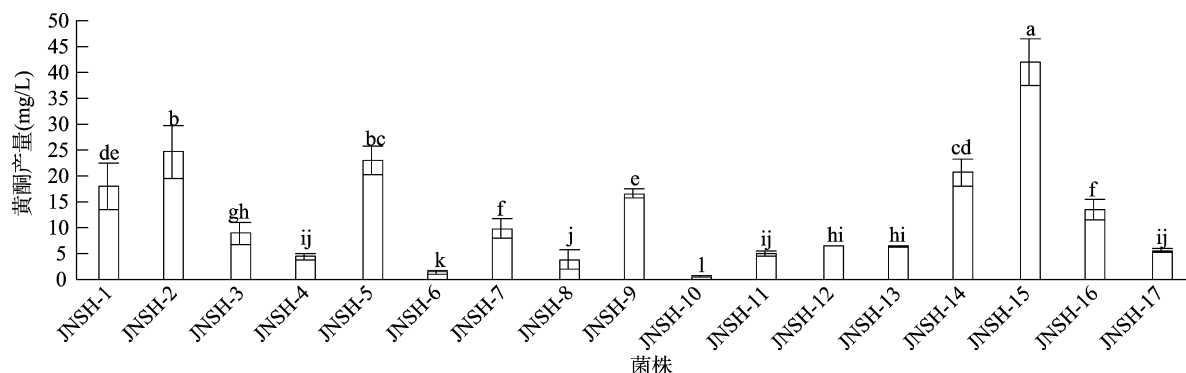


图4 17 株桑黄菌株的总黄酮产量

2.5 17 株桑黄菌株菌丝总多糖产量的比较

为了综合比较各桑黄菌株产多糖的特性,计算 17 株桑黄菌株的总多糖产量。如图 5 所示,JNSH-15 菌株的桑黄总多

糖产量最高,达到 834.146 mg/L;JNSH-1、JNSH-2、JNSH-8 的总多糖产量较高,分别达到 665.822、553.897、528.135 mg/L;其他桑黄菌株的总多糖产量较低。

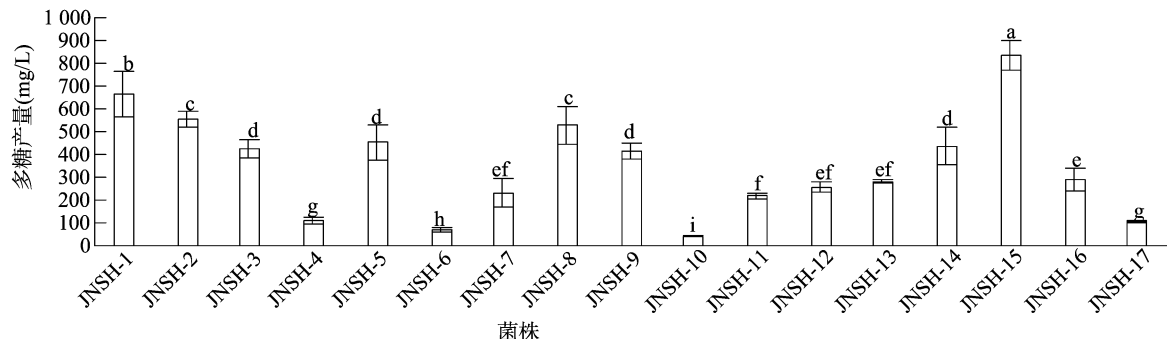


图5 17 株桑黄菌株的多糖总产量

3 结论

不同桑黄菌株类别对活性物质产量有着非常重要的影响。本研究首先进行初始菌株的筛选,从 17 株不同的桑黄菌株(JNSH-1~JNSH-17)中筛选出 1 株活性物质总产量最高的菌株。黄酮、多糖作为桑黄药用组成中最为重要、研究得最为系统的 2 种成分,其产量的高低影响着桑黄的价值^[24-25]。因此,本研究选择黄酮、多糖这 2 种活性物质的产量作为评判桑黄菌株优劣的标准,从而筛选出最优的桑黄菌株。试验结果表明,筛选出的 JNSH-15 菌株在菌丝干质量、黄酮及多糖产量方面均处于较高水平,综合考虑,将其作为液体发酵生产的最优菌株。

参考文献:

- [1] 吴声华,黄冠中,陈愉萍,等. 桑黄的分类及开发前景[J]. 菌物研究,2016,14(4):187-200,185.
- [2] 张维博,王家国,李正阔,等. 药用真菌桑黄的研究进展[J]. 中国中药杂志,2014,15(15):2838-2845.
- [3] 王超儀,包海鹰. 6 种“桑黄”石油醚提取物的体内抗肿瘤活性[J]. 菌物研究,2013,11(3):196-201.
- [4] Dai Y C, Zhou L W, Cui B K, et al. Current advances in *Phellinus sensu lato*: medicinal species, functions, metabolites and mechanisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(5):1587-1593.
- [5] Ikekawa T, Nakanishi M, Uehara N, et al. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*[J]. Gann, 1968, 59(9):155-157.
- [6] 史幺婷,包海鹰. 桑黄类真菌有效成分及功效研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(22):197-202.
- [7] 周洪英,孙波,吴洪丽,等. 桑黄的类型、功用及开发利用[J]. 北方蚕业,2014,35(4):4-8.
- [8] 张林芳,孙婷婷,邹莉. 鲍姆纤孔菌总三萜的提取及其体外抗乳腺癌细胞 MCF-7 活性[J]. 药物评价研究,2015,38(5):497-502.
- [9] 谢江宁,宋素芬,李香,等. 桑黄总三萜的提取及其体外脑胶质瘤 U251 活性[C]. 成都:中华医学会急诊医学分会第十六次全国急诊医学学术年会,2013.

- [10] 钟石,计东风,李有贵,等. 桑黄多糖激活 P27kip1-cyclin D1/E-CDK2 途径诱导 HT-29 细胞 S 期阻滞[C]. 贵阳:中国菌物学会第六届会员代表大会暨贵州省食用菌产业发展高峰论坛,2014.
- [11] Quang D N, Hashimoto T, Asakawa Y. Inedible mushrooms: a good source of biologically active substances[J]. Chemical Record, 2006, 6(2):79-99.
- [12] 林希,傅海庆,李鸣,等. 复方桑黄口服液粗多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国农学通报,2014,16(27):304-308.
- [13] 王超儀. 桑黄的生药学鉴定及抗肿瘤活性的对比研究[D]. 长春:吉林农业大学,2013.
- [14] 丁兴红,温成平,丁志山,等. 桑黄液体发酵生产多糖工艺研究[J]. 中草药,2012,43(5):906-909.
- [15] 闫国卿. 中药桑黄和鼠妇化学成分研究[D]. 合肥:安徽大学,2014.
- [16] 王清,沈业寿,赵浩如. 桑黄子实体水提物抗肿瘤和抗环磷酰胺致突变作用研究[J]. 食用菌,2006,28(5):57-59.
- [17] 葛青. 桑黄子实体多糖的分离纯化、结构鉴定及结构修饰研究[D]. 杭州:浙江工业大学,2009.
- [18] Kim G Y, Park H S, Nam B H, et al. Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus* (Berk. & M. A. Curtis) Teng[J]. Bioresource Technology, 2003, 89(1):81-87.
- [19] 刘凡,庞道睿,邹宇晓,等. 桑黄总黄酮含量及其体外抗氧化活性研究[J]. 中国食用菌,2014,33(2):47-49,56.
- [20] 黄孝闻,俞忠明,邹宇晓,等. 桑黄在古代中医典籍中的应用记载及其现代药用研究进展[J]. 中华中医药学刊,2014,32(9):2249-2252.
- [21] 咎立峰. 粗毛纤孔菌与椭圆嗜蓝孔菌子实体的化学成分及其药理活性研究[D]. 长春:吉林农业大学,2012.
- [22] 杜睿琦,王芯蕾,许谦. 桑黄扩大培养过程中黄酮产量变化研究[J]. 安徽农业科学,2017,45(29):109-111.
- [23] 史幺婷,包海鹰. 桑黄多糖提取工艺研究进展[J]. 北方园艺,2017(1):191-195.
- [24] 应瑞峰,黄梅桂,王耀松,等. 桑黄子实体与桑黄菌丝多糖抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发,2017,38(21):1-5.
- [25] 李善姬,梁承武,崔承弼,等. 野生桑黄总黄酮提取工艺及其抗氧化作用的研究[J]. 食品研究与开发,2015,36(20):32-35.