



张悦,郑凯,王茹,等. 促进桑黄次生代谢物累积的碳氮比及碳氮源优化研究[J]. 黑龙江农业科学,2019(7):109-114.

促进桑黄次生代谢物累积的碳氮比及碳氮源优化研究

张悦,郑凯,王茹,白静莹,范桂枝

(东北林业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:为促进桑黄次生代谢物累积,以仅添加碳源和氮源的培养基培养桑黄菌丝体,采用比色法测定菌丝中黄酮、多酚、甾醇以及三萜含量。结果表明:碳氮比在 60:1~100:1 的试验范围内,黄酮、多酚和甾醇含量均在碳氮比为 80:1 时达到最高,其单位含量分别为 168.27,6.70,7.95 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,而三萜含量在碳氮比为 100:1 时达最高,为 4.17 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$;在此基础上,优化了蔗糖、果糖、葡萄糖和乳糖为碳源和硝酸铵、碳酸铵和硝酸钠作为氮源的碳氮组合,黄酮、多酚和甾醇含量均在葡萄糖和碳酸铵组合下达到最高,其单位含量分别为 251.45,4.68,10.48 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,而三萜含量在乳糖和碳酸铵组合下达到最高,为 35.78 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。由上述结果可知,适合桑黄菌丝次生代谢物累积的碳氮比为 80:1,最佳碳源和氮源分别为葡萄糖和碳酸铵。

关键词:桑黄;菌丝体;次生代谢产物;碳氮比;碳氮源

桑黄(*Phellinus igniarius*)喜生于杨、柳、桑、白桦、栎、桦树、杜鹃等阔叶树的树干上,属担子菌纲、多孔菌目、多孔菌科、针层孔菌属,有“森林黄金”之美称。中医认为桑黄性甘、平、味苦、味辛,归肝、膀胱经。本品辛行甘和,入血分以化瘀,瘀血循经而行出血止,有化瘀之功效,用于治疗血崩、血淋、脱肛泻血、带下、闭经、脾虚泄泻等。近年来的研究证实^[1-2],桑黄具有抗癌、抗肿瘤、保肝和抗肝硬化、抗氧化清除自由基、抗肺炎和抑菌消炎的功能。因此,桑黄作为名贵的滋补药材,市场对其需求骤升。

研究发现,桑黄子实体的主要化学成分为多糖、黄酮、甾醇和三萜等物质。有学者对桑黄子实体与菌丝体的营养成分进行了分析比较,发现一般营养成分中,除灰分两者相差不大,而菌丝体中粗蛋白、粗脂肪、多糖、还原糖、总糖的含量均明显高于子实体^[3-6];在所测定的 17 种氨基酸中,菌丝体总氨基酸的含量明显高于子实体,两者必需氨基酸占氨基酸总量的质量分数比例基本一致;菌丝体总脂肪酸含量比子实体稍高,主要是饱和脂

肪酸和多不饱和脂肪酸的含量稍高。东北林业大学生命科学学院森林生物工程研究室前期研究也发现,4 种桑黄菌丝体中含有与子实体相同的多糖、黄酮和三萜等物质,其中桑树菌丝体中的三萜量是子实体的 7 倍左右^[7]。由此可见,桑黄子实体与菌丝体中的营养成分基本一致,因而通过发酵培养桑黄菌丝体备受关注。

发酵培养的培养基可提供菌丝生长发育所必需的水分、碳源、氮源、各种元素和生长因素,适当的营养比例能加快菌丝的生长速度和次生代谢物的累积。曾晓希等^[8]的研究表明,适宜灵芝多糖合成的最佳碳源、氮源和生长因子分别是葡萄糖、酵母膏和维生素 B₁。林辰壹等^[9]研究阐明适宜阿魏菇菌丝生长的碳氮比为 20:1,菌丝生长状况良好。因此,本试验旨在通过优化不同液体培养基的深层发酵,以黄酮、多酚、甾醇和三萜四种次生代谢物积累总量为指标,筛选最适桑黄培养的液体培养基的碳氮比、碳源和氮源,以促进桑黄次生代谢物累积,使其主要药用成份得到最大程度的积累,为桑黄高产株系的培养奠定基础,以满足现代生物医药市场的需求。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种供试桑树桑黄菌由东北林业大学生命科学学院森林生物工程实验室提供。

基础液体培养基:马铃薯 200 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

收稿日期:2019-01-29

基金项目:国家级大学生创新创业训练项目(201810225130)。

第一作者简介:张悦(1997-),女,在读学士,专业为植物细胞工程。E-mail:1904830174@qq.com。

通讯作者:范桂枝(1973-),女,博士,教授,从事植物细胞工程、逆境生理研究。E-mail:gzf325@126.com。

葡萄糖, pH 自然; 马铃薯固体培养基(PDA); 基础液体培养基中加 10% 琼脂粉; 不同碳氮比培养基: 以葡萄糖和硝酸铵分别为碳源和氮源, 碳氮比分别为 60:1、70:1、80:1、90:1、100:1 配置; 不同碳源、氮源培养基: 以葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖为碳源, 硝酸铵、碳酸铵为氮源, 碳氮比为 80:1 配置。上述液体培养基在 250 mL 三角瓶中的装液量为 100 mL, 菌丝体接种量为 10%, 培养温度为 25 ℃, 摇床转速为 110 r·min⁻¹, 恒温震荡培养 7 d 后取样。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 确定最适碳氮比: 以葡萄糖和硝酸铵分别为碳源和氮源, 按葡萄糖浓度为 20 g·L⁻¹, 碳氮比分别为 60:1、70:1、80:1、90:1、100:1 配置, 菌丝接种量为 10%, 培养 7 d 后分别测定菌丝的鲜重、干重及次生代谢物黄酮、多酚、甾醇及三萜的单位含量, 每个处理 3 次重复。

确定最佳碳源及氮源: 以葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖为碳源, 硝酸铵、硝酸钠、碳酸铵为氮源, 按葡萄糖浓度为 20 g·L⁻¹, 碳氮比为 80:1 配置, 菌丝接种量为 10%, 培养 7 d 后分别测定菌丝的鲜重、干重及次生代谢物黄酮、多酚、甾醇及三萜的单位含量, 每个处理 3 次重复。

1.2.2 菌丝体生物量的测定 培养 7 d 的桑黄菌丝, 用 200 目细胞筛过滤, 将菌丝体表面水分用滤纸吸干, 称其鲜重; 后于 60 ℃ 烘干, 称重。菌丝体生物量(g·L⁻¹) = 菌丝体干重(g)/发酵液体积(L)^[10]。

1.2.3 次生代谢物定量分析 黄酮的提取及测定: 称取干燥后的样品粉末 0.01 g, 用 3 mL 70% 乙醇浸提 1 d, 45 ℃ 水浴 1 h, 超声振提 40 min, 混匀静置。用 80% 的乙醇配成硼酸-乙酸钠络合试剂(硼酸 0.8%, 乙酸钠 1%), 测定时吸取 500 μL 总黄酮提取液于 10 mL 的离心管中, 加入 1 mL 80% 乙醇及 2 mL 络合试剂, 混匀, 以试剂空白为对照于 384 nm 处测吸光度^[11]。以芦丁为标准品, 测得的标准曲线为 $y = 0.8643x + 0.0025$, $R^2 = 0.9984$ 。

多酚的提取及测定: 称取干燥的样品粉末 0.01 g, 3 mL 70% 乙醇浸提 1 d, 70 ℃ 水浴 1.5 h 及超声振提 40 min 进行提取, 用蒸馏水配成 10%

Folin-Ciocalteu 试剂, 静置沉淀后, 吸取 800 μL 上清液加入 2 mL 的显色剂 Folin-Ciocalteu, 混匀避光反应 5 min 后迅速加入 200 μL Na₂CO₃ 溶液, 混匀后于 25 ℃ 条件下避光放置 1 h, 以试剂空白为对照, 在 765 nm 处测紫外吸光值^[12]。以没食子酸为标准品, 测得的标准曲线为 $y = 11.403x + 0.0201$, $R^2 = 0.9942$ 。

甾醇的提取及测定: 用无水乙醇和 4 mol·L⁻¹ 的 KOH 以 4:1 配置皂化液。称取干燥的样品粉末 0.01 g, 加 3 mL 皂化液提取及超声振提 20 min 进行提取, 室温对提取液进行过滤, 滤液加等量蒸馏水稀释, 并加等量环己烷萃取分离麦角甾醇。从上层萃取剂中吸取 1 mL, 通风厨中 70 ℃ 水浴蒸干萃取剂, 加 3 mL 无水乙醇, 测定 282 nm 下的吸光度^[13]。以麦角甾醇为标准品, 测得的标准曲线为 $y = 7.6514x + 0.0008$, $R^2 = 0.9996$ 。

三萜的提取及测定: 称取干燥后的样品粉末 0.01 g, 3 mL 95% 乙醇浸提 1 d, 70 ℃ 水浴 1 h, 超声振提 40 min, 混匀静置。用冰乙酸配成 5% 的香草醛试剂, 吸取 200 μL 上清液于 10 mL 的离心管中, 70 ℃ 水浴蒸干, 加入 200 μL 5% 香草醛-冰醋酸(现配现用)和 800 μL 高氯酸, 70 ℃ 水浴中反应 20 min, 冷却至室温, 加入乙酸乙酯 3 mL, 混匀, 以试剂空白为对照于紫外波长 551 nm 处测定吸光度^[14]。以齐墩果酸为标准品, 测得的标准曲线为 $y = 5.805x + 0.0038$, $R^2 = 0.9815$ 。

2 结果与分析

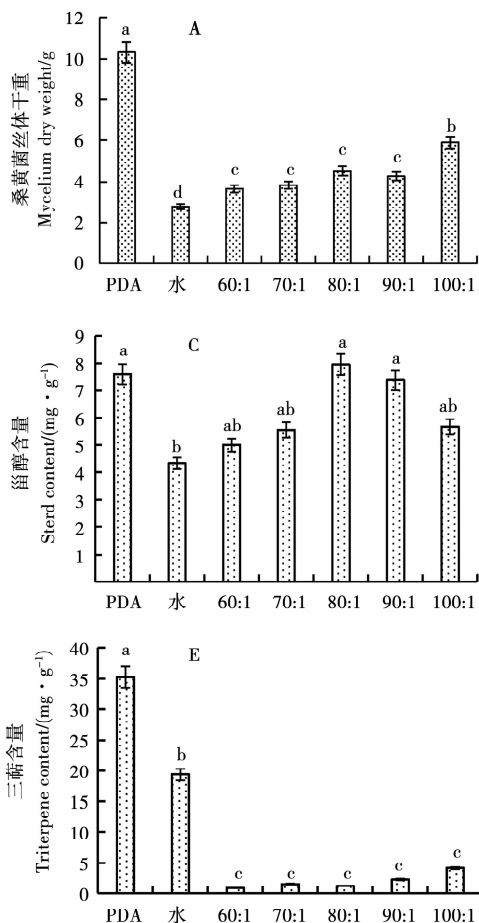
2.1 不同碳氮比对桑黄菌丝生长量和次生代谢产物积累的影响

碳氮比为 60:1、70:1、80:1、90:1 和 100:1 对桑黄菌丝生长量的影响如图 1A 所示, 碳氮比为 100:1 时, 桑黄菌丝体干重达最高为 5.9 g; 其次为 80:1 和 90:1, 干重累积分别 4.5 和 4.3 g。由此可见, 不同碳氮比在发酵过程中对菌丝体干重的累积影响显著, 随着碳氮比的增加, 其干重累积也随之增加。

碳氮比对黄酮、多酚、甾醇和三萜次生代谢物单位含量变化的影响如图 1B~F 所示, 除三萜含量外, 不同碳氮比均显著增加黄酮、多酚、甾醇含

量,且在碳氮比为 80:1 下均达到最高累积量,其含量分别为 168.27,6.70,7.95 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。因此表

明,在试验范围内,最适合次生代谢产物累积的碳氮比为 80:1。



不同小写字母代表差异显著($P < 0.05$),下同。

Different lowercase letters indicate significant difference($P < 0.05$),the same below.

图 1 不同碳氮比对桑黄菌丝干重的次生代谢物含量变化的影响

Fig.1 Effects of different C/N ratios on secondary metabolites content of mycelium dry weight of *Phellinus igniarius*

2.2 不同碳源、氮源对桑黄菌丝生长量和次生代谢物累积的影响

按上述次生代谢物累积量最优的 80:1 为碳氮比,分析葡萄糖、果糖、蔗糖和乳糖作为碳源,碳酸铵、硝酸铵和硝酸钠作为氮源的碳氮组合对桑黄菌丝干重的影响。由图 2A 可见,不同碳源和氮源组合下的干物质累积量均显著高于清水对照,仅有葡萄糖和碳酸铵、果糖和碳酸铵以及乳糖和碳酸铵组合高于对照马铃薯培养基,其中葡萄糖和碳酸铵组合下菌丝干重累积最大,其值达到 11.0 g。

不同的碳源、氮源组合下桑黄菌丝中黄酮、多酚、甾醇和三萜次生代谢物单位含量如图 2B~F 所示,除三萜含量外,葡萄糖和碳酸铵组合下菌丝

中的黄酮、多酚、甾醇单位含量均高于其他碳氮组合,其单位含量分别为 251.45,4.68,10.48 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。由此可见,在试验范围内,适合桑黄次生代谢物累积的最佳碳源为葡萄糖,最佳氮源为碳酸铵。

2.3 PDA 培养基与最佳碳氮组合对桑黄菌丝生长和次生代谢物累积的影响

按上述次生代谢物累积量最优的 80:1 为碳氮比,葡萄糖为碳源,碳酸铵为氮源,分析 PDA 培养基与最佳碳氮组合对桑黄菌丝生长和次生代谢物累积的影响。菌丝干重由图 3A 可见,不同组合下的干物质累积量均显著高于水对照,其中葡萄糖、碳酸铵和马铃薯培养基组合下菌丝干重累积最大,其值达到 12.83 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。桑黄菌丝中黄酮、多酚、甾醇和三萜次生代谢物单位含量多的累

积如图 3B~F 所示,除甾醇含量外,葡萄糖和碳酸铵组合下菌丝中的黄酮、多酚、三萜单位含量均达到最高,其单位含量分别为 120.88,8.51,43.50 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。其中,黄酮、多酚含量较马铃薯培养基

培养基中显著提高。由此可见,在试验范围内,最佳碳氮组合葡萄糖和碳酸铵适合桑黄次生代谢物的积累。

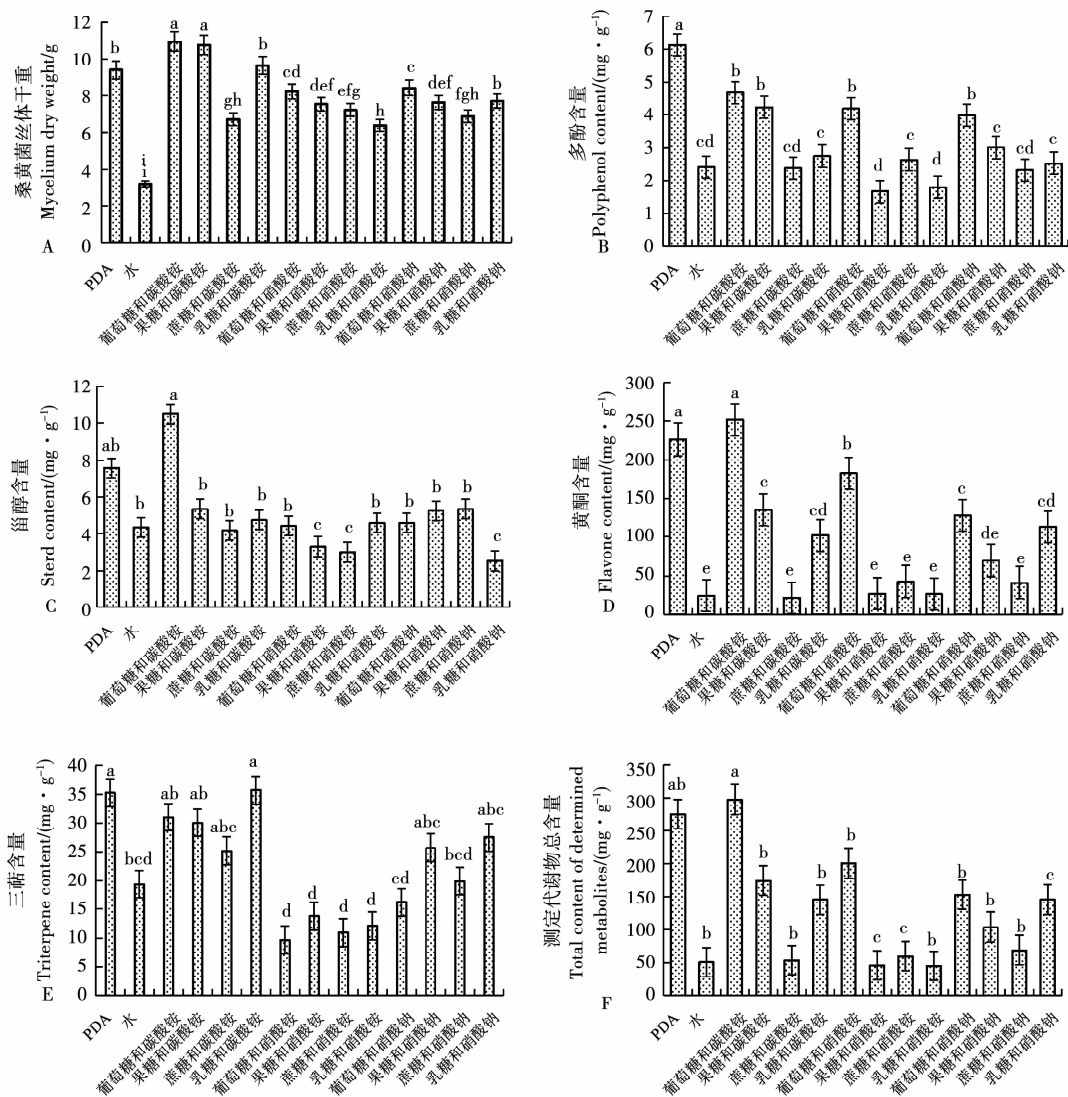


图 2 不同碳源、氮源组合对桑黄菌丝干重和次生代谢物单位含量变化影响

Fig. 2 Effects of different combinations of carbon and nitrogen sources on dry weight and secondary metabolite unit content of *Phellinus igniarius* mycelia

3 结论与讨论

一个优良的菌株只有在适宜的培养条件下才能发挥其优越性,其中培养基的 C/N 与菌丝生长关系密切^[15]。张宇^[16]研究发现,栽培料碳氮比为 67:1~69:1 时,秀珍菇菌丝生长最好,当碳氮比达到 69:1 时生物学效率达最高峰。赵秀芳等^[17]研究发现,最适白灵菇菌丝生长的碳氮比为 40:1。李翠翠等^[18]研究发现,玉米粉为碳源、麦

麸作为氮源、C/N 为 20:1 时有利于桑黄菌丝和多糖的累积。而本研究以葡萄糖和硝酸铵为碳源和氮源,在 60:1~100:1 的 C/N 试验范围,发现有利于黄酮、多酚和甾醇累积的 C/N 为 80:1,其单位含量分别为 168.27、6.70、7.95 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。由于本试验与前人研究的碳氮源的来源不同,因此其有利于桑黄菌丝生长和代谢物累积的碳氮比不同。

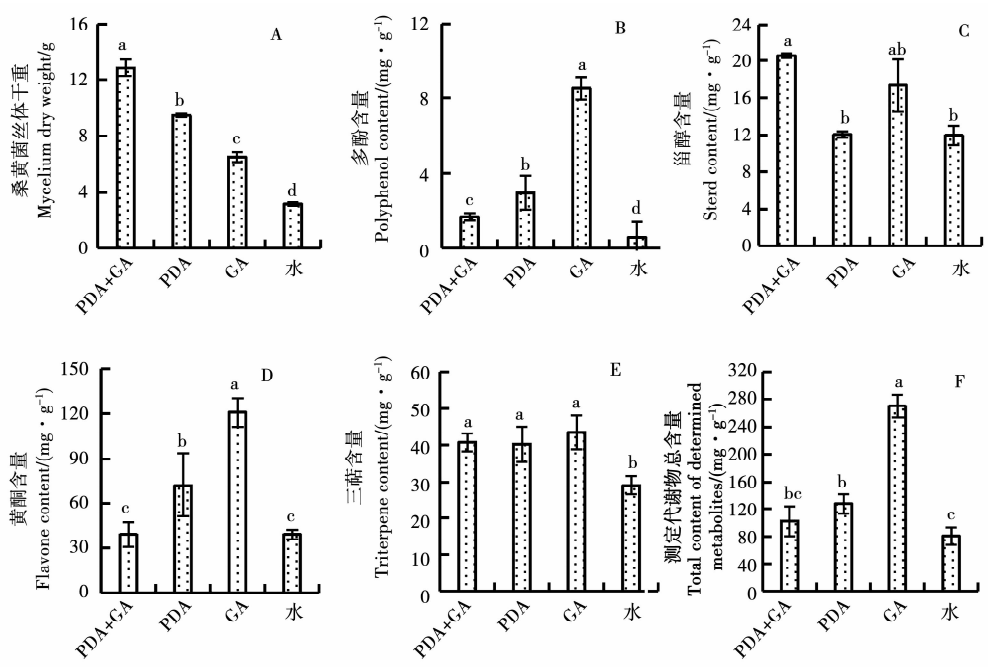


图3 PDA培养基与最佳碳氮组合对桑黄菌丝生长和次生代谢物累积的影响

Fig. 3 Effects of PDA medium and optimum combination of carbon and nitrogen on mycelial growth and secondary metabolites accumulation of *Phellinus igniarius*

在适宜的碳氮比条件下,适宜的碳源物质和氮源物质可使菌丝生长良好^[19]。孟丽等^[20]研究发现,红平菇的最适碳源、氮源分别为葡萄糖和酵母粉。郭炜等^[21]研究发现,以葡萄糖为碳源,蛋白胨为氮源时,秀珍菇菌落长势最好。Hur^[22]研究发现,桑黄 ATCC26710 在以蔗糖、甘露糖和葡萄糖为碳源时菌丝生长最好,硝酸钾和硝酸钠作为氮源对菌丝生长有良好的促进作用。而本研究上述次生代谢物累积量最优的 80:1 为碳氮比,分析葡萄糖、果糖、蔗糖和乳糖作为碳源,碳酸铵、硝酸铵和硝酸钠作为氮源的碳氮组合对桑黄菌丝体干重的影响,研究发现,葡萄糖和碳酸铵组合下菌丝干重累积最大。由此可见,葡萄糖作为碳源有利于桑黄菌丝的生长。

另外,本试验发现不同碳氮比和碳氮源对桑黄菌丝生长有显著或极显著地影响。桑黄在碳氮比为 60:1~100:1 的培养液中都能生长,但存在着碳氮比的优化选择利用。碳氮比为 60:1~80:1 时,黄酮、多酚、甾醇的单位含量均逐渐增加,且在碳氮比为 80:1 时达到最高累积量,三萜含量变化不明显;以葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖为不同碳源,以硝酸铵、硝酸钠、碳酸铵为氮源的液体培养条件下进行正交试验,结果表明,桑黄对不同碳氮

源组合的代谢能力不同,乳糖和碳酸铵组合下三萜单位含量最高,葡萄糖和碳酸铵组合下菌丝中的黄酮、多酚、甾醇单位含量均高于其他碳氮组合,黄酮、多酚含量较马铃薯培养基中显著提高,次生代谢物总含量比土豆培养基中增加了 8.1%。以果糖和葡萄糖做碳源处理菌丝时,桑黄的菌丝生物量较大可能是由于单糖葡萄糖和果糖结构相对简单,更容易被桑黄吸收和利用。

由于本试验在相同碳氮比条件下进行的最适碳源、氮源筛选,提供的碳源和氮源有限,桑黄能否利用和适应其他碳源和氮源等营养物质进行大规模的生产,仍需全面系统的研究。本试验利用液体发酵培养技术能够在较短时间内生产大量桑黄菌丝体,不受季节和环境的限制,可以大幅度降低桑黄作为新药开发的成本。试验所确定的优化液体培养基碳氮比及碳氮源对进一步分析桑黄的生理生长状态具有重要的意义,能够为工业化生产桑黄菌丝体提供指导,同时为高产桑黄菌株的培养奠定基础。

参考文献:

[1] 夏国华,戈延茹,傅海珍,等.超声法提取桑黄总黄酮的工艺研究[J].江苏大学学报(医学版),2010,20(1):40-41.

[2] 李文仙,俞丹,林玲,等. Folin-Ciocalteu 比色法应用于蔬菜和水果总多酚含量测定的研究[J].营养学报,2011,33(3):

- 302-307.
- [3] 傅海庆,陈绍军,陈汉清,等.珍稀药用菌桑黄的研究现状[J].福建农业学报,2005(20):117-120.
- [4] 回晶,李辉,朱春玉,等.桑黄子实体与菌丝体营养成分的比较分析[J].特产研究,2009(2):59-61.
- [5] Wang Z Y, Wang C Y, Quan Y. Extraction of polysaccharides from *Phellinus nigricans* mycelia and their antioxidant activities in vitro[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 99(2): 110-115.
- [6] Zang Y, Xiong J, Zhai W Z, et al. Fomentarols A - D, sterols from the polypore macrofungus fomes fomentarius[J]. Phytochemistry, 2013, 92: 137-145.
- [7] 黄丽洋,石卉,王晓婷,等.野生桑黄菌株的分离、鉴定及次生代谢物分析[J].中草药,2013,44(23):3394-3399.
- [8] 曾晓希,周洪波,符波,等.灵芝多糖液体发酵条件的研究[J].现代生物医学进展,2007(6):830-832.
- [9] 林辰壹,马娟,杨婷婷,等.优化氮源种类及碳氮比对阿魏菇液体种生长的效应[J].新疆农业科学,2012,49(11):2042-2047.
- [10] 王振河,武忠伟,赵现方,等.营养物质对桑黄菌丝生物量及胞外多糖产量的影响[J].中国野生植物资源,2009,28(1):37-40.
- [11] 夏国华,戈延茹,傅海珍,等.超声法提取桑黄总黄酮的工艺研究[J].江苏大学学报(医学版),2010,20(1):40-41.
- [12] 李文仙,俞丹,林玲,等.Folin-Ciocalteu 比色法应用于蔬菜和水果总多酚含量测定的研究[J].营养学报,2011,33(3):302-307.
- [13] 高虹,谷文英.三波长光度法测定姬松茸中麦角甾醇含量[J].分析化学,2007,35(4):586-588.
- [14] 李晓灿,詹亚光,王晓东,等.多胺对白桦悬浮细胞生长和三萜积累的影响[J].中草药,2013(4):463-467.
- [15] 刘森,杨天灵,林辰壹.阿瓦提黄伞 LL-01 培养基碳氮比优化试验[J].食用菌,2014,36(4):29-30.
- [16] 张宇.不同碳氮比栽培料对秀珍菇菌丝及子实体生长的影响[J].北方园艺,2013(3):152-154.
- [17] 赵秀芳.白灵菇菌丝对不同碳氮源利用的研究[J].土壤肥料,2005(5):54-55.
- [18] 李翠翠,尉玉晓,郭立忠.桑黄液体发酵培养基优化的初步研究[J].中国食用菌,2009,28(2):46-48.
- [19] 孙荟林,李明,李守勉,等.茶树菇母种培养基最适碳氮比及碳源、氮源筛选[J].北方园艺,2016(14):148-151.
- [20] 孟丽,宋超群,吴宝杰,等.红平菇液体发酵培养基优化[J].食品研究与开发,2018,39(6):169-171.
- [21] 郭炜,于洪久,张楠,等.不同碳氮源对秀珍菇菌丝生长的影响[J].黑龙江农业科学,2018(8):82-84.
- [22] Hur H. Cultural Characteristics and log-mediated cultivation of the medicinal mushroom, *Phellinus linteus* [J]. Mycobiology, 2008, 36(2): 81-87.

Optimization of C/N Ratio and Carbon and Nitrogen Sources for Promoting Secondary Metabolite Accumulation in *Phellinus igniarius*

ZHANG Yue, ZHENG Kai, WANG Ru, BAI Jing-ying, FAN Gui-zhi

(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: In order to optimize the carbon and nitrogen sources and C/N ratios on secondary metabolites accumulation in *Phellinus igniarius*. The contents of flavonoids, polyphenols, sterols and triterpenoids in the mycelia of *Phellinus igniarius* were determined by colorimetry. The results showed that within the range of 60:1 to 100:1 for C/N, the content of flavones, polyphenols and sterols all reached the highest when the ratio of C/N was 80:1, which was 168.27, 6.70 and 7.95 mg·g⁻¹, respectively. While the triterpenoids content reached the highest when the ratio of C/N was 100:1, which was 4.17 mg·g⁻¹; On this basis, we further analyzed the effect of different combinations with carbon sources (sucrose, fructose, glucose and lactose) and nitrogen sources (ammonium nitrate, ammonium carbonate and sodium nitrate) on the accumulation of flavonoids, polyphenols, sterols and triterpenoids. The results showed that the content of flavones, polyphenols and sterols all reached the highest under the combinations with glucose and ammonium carbonate, which was 251.45, 4.68 and 10.48 mg·g⁻¹, respectively. The content of triterpenoids reached the highest under the combinations with lactose and ammonium carbonate. According to the above results, the suitable ratio of C/N for the accumulation of secondary metabolites was 80:1, and the optimal carbon source and nitrogen source were glucose and ammonium carbonate, respectively.

Keywords: *Phellinus igniarius*; mycelium; secondary metabolites; C/N ratio; C/N source