

16种茯苓菌株液体发酵产胞内多糖与三萜的比较研究

金文松^{1,2}, 刘文君¹, 李立志¹, 夏俊慧¹, 李长乐¹, 林 辉^{1,2}, 张燎原^{1,2*}, 胡开辉^{1,2*}

¹福建农林大学生命科学学院,福州 350002; ²福建农林大学(古田)菌业研究院,古田 352200

摘要:筛选茯苓高产胞内多糖和胞内三萜的优良液体发酵出发菌株。采用PDA富集固体平板培养与液体发酵培养测定菌丝体生长速率;采用液体发酵策略分析16种茯苓菌株产胞内多糖与胞内三萜的潜能。实验结果表明菌株生长于固体培养基与种子培养基的生长速率之间没有关联性;降低一级种子培养基初始pH值到4.0时能有效缓解茯苓菌株培养物褐化现象;AS5.137胞内多糖含量最高,达 377.60 ± 0.10 mg/g,而DB菌株显示出最高的胞内多糖产量,达 1.01 ± 0.13 g/L;Y1菌株胞内三萜含量最高,达 83.89 ± 4.28 mg/g,而Jingzhou28菌株胞内三萜产量最高,达 136.63 ± 26.66 mg/L。就生产茯苓胞内多糖与胞内三萜而言,AS5.137与DB菌株适合作为液体发酵产胞内多糖的出发菌株;Y1,Jingzhou28,Z(z)与Xingpinzhong菌株均较适合作为液体发酵产胞内三萜的出发菌株。

关键词:茯苓;胞内多糖;胞内三萜;液体发酵

中图分类号:R282.6; Q939.96

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)5-0878-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.5.022

Comparative study on the intracellular polysaccharides and triterpenoids produced by 16 *Wolfiporia cocos* strains with submerged fermentation strategies

JIN Wen-song^{1,2}, LIU Wen-jun¹, LI Li-zhi¹, XIA Jun-hui¹,
LI Chang-le¹, LIN Hui^{1,2}, ZHANG Liao-yuan^{1,2*}, HUI Kai-hui^{1,2*}

¹College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

²Edible Fungi Research Institute (Gutian) of Fujian Agriculture and Forestry University, Gutian 352200, China

Abstract: Experiments were performed aimed to screen out submerged fermentation start *Wolfiporia cocos* strains, which should be high intracellular polysaccharide yield and triterpenoid yield. PDA enrichment plates and submerged fermentation cultures were adopted to determine the mycelium growth rate, respectively. The submerged fermentation strategy was employed to analyze the potentials of 16 *W. cocos* strains producing intracellular polysaccharides and intracellular triterpenoids. The data from mycelium growth rate determination assays demonstrated that there is no correlation between the growth rate of mycelium grown on PDA plate and that cultured in seed medium. And our data showed that the browning phenomenon of *W. cocos* could be alleviated by decreasing the initial pH value of primary seed medium to 4.0. Furthermore, AS5.137 exhibited the highest intracellular polysaccharide content, up to 377.60 ± 0.10 mg/g, but DB displayed the highest intracellular polysaccharide yield, up to 1.01 ± 0.13 g/L. Y1 produced the most amount of intracellular triterpenoids, and the corresponding value was 83.89 ± 4.28 mg/g. However, Jingzhou28 displayed the highest intracellular triterpenoids, up to 136.63 ± 26.66 mg/L. As far as on the production of intracellular polysaccharides and triterpenoids of *W. cocos* is concerned, the data from this study suggested that AS5.137 and DB are suitably employed as submerged fermentation start strains for producing intracellular polysaccharides, while Y1, Jingzhou28, Z(z), and Xingpinzhong as submerged fermentation start strains for producing intracellular triterpenoids.

Key words: *Wolfiporia cocos*; intracellular polysaccharides; intracellular triterpenoids; submerged fermentation

收稿日期:2018-09-29 接受日期:2019-02-22

基金项目:国家自然科学基金(81803667);福建省产业技术重大研发平台设计计划(2014N2001);福建省教育厅中青年教师科研项目(KLA17041A);福建农林大学科技创新专项(114/KFA17322A)

*通信作者 Tel:86-591-83789492; E-mail: zliaoyuan@126.com, Hukh@fafu.edu.cn

茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 是一种古老的大型药食两用真菌,在我国具有悠久的药用历史。茯苓主要成分包括多糖、三萜、蛋白质、脂肪与氨基酸,同时还含有少量的月桂酸、胆碱及一些微量元素,其

中茯苓三萜类化合物与多糖因其药用功效备受关注。截至目前为止,对茯苓进行的植物化学研究结果表明超过80种茯苓三萜类化合物被成功分离与鉴定^[1-6];根据化合物结构特征,茯苓三萜类化合物可以细分为四大类,分别为羊毛甾烷-8-烯型,羊毛甾烷-7,9(11)-二烯型,3,4-开环-羊毛甾烷-8-烯型与3,4-开环-羊毛甾烷-7,9(11)-二烯型^[5]。并且茯苓三萜类化合物几乎都被认为是羊毛甾烷与开环羊毛甾烷骨架的衍生物。药理学研究结果表明茯苓三萜类化合物具有显著的利尿、健胃补脾、治疗失眠、抗炎症,抗肿瘤细胞增殖,抗氧化和抗高血糖症等功效^[1,5,7]。真菌多糖因其免疫调节功能与抗肿瘤功效受到了越来越多的关注^[8]。茯苓菌核与菌丝中主要成分为茯苓多糖,茯苓多糖含量可以达到茯苓干重的80%以上。然而茯苓发酵菌丝与菌核中多糖主要是一种水不溶性多糖^[9,10], β -(1→3)-D-葡聚糖,其并没有展现抗肿瘤活力,而 β -(1→3)-D-葡聚糖的三种水溶性衍生物均表现出体内与体外抗肿瘤细胞的生物学功能^[11,12]。

目前茯苓资源主要以人工锻木栽培获得。这种栽培方式消耗大量林业资源,使得菌林矛盾日益尖锐化。并且人工栽培茯苓过程生长周期长,生物学效率低,产品质量稳定性差,且易受产地、气候、病虫害等环境因素影响。茯苓的人工栽培也存在连作障

碍现象,影响茯苓产量与质量^[13]。因此,寻求替代茯苓人工栽培方式获取茯苓药用成分资源成为当前的一个研究热点。茯苓菌丝液体发酵是替代人工栽培获取药用成分资源的良好选择。实验数据表明提纯的茯苓功效三萜类化合物比茯苓天然药的药效更好^[14];尽管茯苓菌丝多糖含量低于茯苓菌核^[15],但两者多糖的化学组成和结构基本相同^[9]。因此,如若应用茯苓菌丝液体发酵策略实现生产具有明确功效的茯苓药用成分,可能将进一步提高茯苓的药用功效,同时可以缓解当前日益紧张的菌林矛盾。

要实现茯苓功效药用成分的发酵生产,需要明确解决以下四个方面的科学问题。第一,筛选高产茯苓药用成分的优良菌株;第二,茯苓产药用成分培养基与培养条件的优化;第三,解析茯苓药用成分的合成途径;第四,明确茯苓药用成分的提纯条件。在本项研究中,课题组基于前期茯苓菌株的收集工作,应用液体发酵策略,分析16种茯苓菌株产胞内三萜类化合物与胞内多糖的能力,以期从这16种茯苓菌株中筛选高产三萜类化合物和多糖的优良菌株。

1 材料与方法

1.1 茯苓菌株收集

本项目前期通过菌株购买方式与新鲜茯苓菌核分离方式,共收集到16种茯苓菌株,具体菌株编号、菌株来源与菌株俗名见表1。

表1 茯苓菌株收集信息
Table 1 Collected *W. cocos* strain information

菌株编号 Strain number	菌株俗名 Popular strain name	菌株来源 Source
CGMCC 5.137	AS 5.137	中国科学院微生物研究所
CGMCC 5.78	AS 5.78	中国科学院微生物研究所
ACCC 51961	G1	中国农业微生物菌种保藏管理中心
ACCC 51962	Y1	中国农业微生物菌种保藏管理中心
ACCC 51964	SC	中国农业微生物菌种保藏管理中心
ACCC 51965	TT	中国农业微生物菌种保藏管理中心
ACCC 51968	Jingzhou28	中国农业微生物菌种保藏管理中心
ACCC 51969	Z(z)	中国农业微生物菌种保藏管理中心
ACCC 51970	DB	中国农业微生物菌种保藏管理中心
ACCC51976	Shengling	中国农业微生物菌种保藏管理中心
GIM 5.219	GIM 5.219	广东微生物研究所
P0	P0	安徽野生菌核分离株
W. C0003	W. C0003	福建农林大学生命科学学院微生物工程实验室
闽苓 A5	A5	福建省农业科学研究院
野生种	Yeshengzhong	福建古田野生菌核分离株
新品种	Xinpinzhong	福建龙岩野生菌核分离株

1.2 试剂

熊果酸(U820363-250MG)购自于北京普益华科技有限公司;Vitamin B1,苯酚,香兰素与化学试剂如KH₂PO₄,无水MgSO₄,葡萄糖等均购自国药集团化学试剂有限公司(北京,中国)。

1.3 茵苓菌株培养基配方

茵苓菌株固体PDA加富培养基(1 L)配方:土豆200 g,葡萄糖20 g,蛋白胨3 g,酵母粉3 g,KH₂PO₄1.5 g,无水MgSO₄0.75 g,Vitamin B1 100 mg,琼脂20 g,pH自然。

茵苓菌株一级种子培养基(1 L)配方:土豆200 g,葡萄糖20 g,蛋白胨3 g,酵母粉3 g,KH₂PO₄1.5 g,无水MgSO₄0.75 g,Vitamin B1 100 mg,pH4.0。二级种子培养基配方同一级种子培养基,pH自然。

茵苓菌株液体发酵培养基(1 L)配方:蔗糖20 g,酵母浸膏2 g,KH₂PO₄1.5 g,无水MgSO₄0.75 g,Vitamin B1 5 mg,pH自然。

1.4 茵苓菌丝生长特性测定

应用直径1.5 cm的打孔器在菌丝生长尖端打孔,接种到新鲜固体PDA加富平板(直径9 cm)的正中央,菌丝面朝上。26 °C,避光正置培养。应用十字交叉法测量菌株的生长速率,并仔细观察与记录菌丝生长形态。

1.4.1 固体培养基上茵苓菌丝生长速率测定

应用直径1.5 cm的打孔器在菌丝生长尖端打孔,共6块菌丝块,接种到一级种子培养基(100 mL),26 °C,120 rpm,避光培养120 h。提高摇床转速至200 rpm,培养12 h。随后于120 rpm,继续培养24 h,即为制备好的茵苓一级菌种。以5% (v/v)比例,将一级菌种接种到二级种子培养基(100 mL),120 rpm,26 °C,避光培养120 h,即为制备好的茵苓二级菌种。

本研究在制备二级菌种时,每种菌株制备4瓶菌种,其中三瓶用于测定pH值与测定二级菌种的菌丝干重,余下一瓶作为发酵菌种暂时存放于4 °C。用八层纱布过滤冲洗菌丝,收集菌丝到50 mL已称重的离心管,10 000 rpm,离心20 min,倒置沥干液体,置于60 °C烘干至恒重,大约48 h,最后称重量并作记录。计算每种菌株三瓶二级菌丝干重平均值。茵苓菌株液体菌丝生长速率=菌丝干重/菌丝培养天数(11天)。

1.5 茵苓胞内多糖含量测定

探索茵苓产胞内多糖含量的最佳发酵天数。P0二级菌种按5% (v/v)接种至100 mL发酵培养基,26 °C,120 rpm,培养1、3、5、7、9、11、13天,收集菌丝操作同1.4.2。以蔗糖作为标准品,采用苯酚-浓硫酸法测定P0胞内多糖含量^[16]。分别接种相当于0.02 g干菌丝重量的二级菌种至发酵培养基,26 °C,120 rpm,避光培养11天。测定pH值,收集菌丝操作同1.4.2。向样品加入20 mL 1 M的NaOH,60 °C浸提1 h,浸提期间每隔20 min摇晃一次。取一定稀释倍数的浸提液2 mL于试管中,最后应用苯酚-浓硫酸法测定多糖含量。多糖产量换算公式如下。

$$y = (PC \times W)/V_2$$

y指多糖产量(g/L),PC指多糖含量(mg/g),W指菌丝干重(g),V₂指发酵液体积(L)。

1.6 茵苓胞内三萜含量测定

探索茵苓产胞内三萜含量的最佳发酵天数。P0二级菌种按5% (v/v)接种至100 mL发酵培养基,26 °C,120 rpm,培养1、3、5、7、9、11、13、15天,收集菌丝操作同1.4.2。以熊果酸作为标准品,采用香草醛-高氯酸法测定P0胞内三萜含量^[17]。分别接种相当于0.02 g干菌丝重量的二级菌种至发酵培养基,26 °C,120 rpm,避光培养11天。测定pH值,收集菌丝操作同1.4.2。将样品转入到250 mL三角瓶,并向其入50 mL甲醇,37 °C,180 rpm摇床中浸提15 h,取0.2 mL浸提液加入到10 mL试管,烘干,最后应用香草醛-高氯酸法测定三萜含量。三萜产量换算公式如下。

$$y = (TC \times W)/V_2$$

y指三萜产量(g/L),TC指茵苓三萜含量(mg/g),W指菌丝干重(g),V₂指发酵液体积(L)。

1.7 数据分析

所有实验均设置三个平行,数据呈现于三个平行测定数据平均值±SD。应用SPSS 19.0进行数据统计分析。

2 结果

2.1 茵苓菌丝生长于固体培养基的特性描述

16种茵苓菌株接种于PDA加富固体平板,分析茵苓菌丝在固体培养基上的生长特性,实验结果见表2。就生长速率而言,AS5.137,AS5.78,Y1,SC与Z(z)菌株生长速率明显较其他菌株生长快,其中Z(z)表现出最快的生长速率,达1.42±0.05 cm/

天。W. C0003 生长最慢,生长速率仅为 0.81 ± 0.02 cm/天。此外,菌丝生长特性大概可以归为四类:第一类为菌丝层厚,菌丝边缘齐整,气生菌丝发达的菌株如 Jingzhou28;第二类为菌丝层中等厚度,边缘齐整,气生菌丝较发达的菌株如 Y1;第三类为菌丝层

薄或较薄,边缘齐整或较齐整,气生菌丝不发达的菌株如 AS5. 137;第四类包括 DB 与 A5 两个菌株,其菌丝边缘呈锯齿状,明显区别于其他菌株齐整或较齐整的菌丝边缘。

表 2 16 株茯苓菌丝生长于固体培养基上的特性描述($n=3, \bar{x} \pm s$)Table 2 Characteristic description of 16 *W. cocos* mycelia growing on solid medium ($n=3, \bar{x} \pm s$)

菌种名称 Strain name	菌丝生长速率 Mycelium growth rate (cm/d)	菌丝生长特性描述 Description for growth properties of mycelia
AS5. 137	1.35 ± 0.00^{abc}	菌丝层薄,贴壁生长,边缘齐整,气生菌丝不发达
AS5. 78	1.36 ± 0.14^{ab}	菌丝层较薄,边缘较齐整,气生菌丝发达
G1	1.29 ± 0.00^{bcd}	菌丝层薄,边缘较齐整,气生菌丝较发达
Y1	1.38 ± 0.00^{ab}	菌丝层中等厚度,边缘齐整,气生菌丝较发达
SC	1.36 ± 0.02^{ab}	菌丝层薄,贴壁生长,边缘齐整,气生菌丝不发达
TT	1.26 ± 0.00^{cd}	菌丝层薄,边缘较齐整,气生菌丝发达
Jingzhou28	1.21 ± 0.08^{de}	菌丝层厚,边缘齐整,气生菌丝发达
Z(z)	1.42 ± 0.05^a	菌丝层厚,边缘较齐整,气生菌丝发达
DB	1.04 ± 0.00^f	菌丝层较厚,边缘呈锯齿状,气生菌丝发达
Shengling	1.23 ± 0.00^d	菌丝层薄,贴壁生长,边缘齐整,气生菌丝不发达
GIM5. 219	1.11 ± 0.02^{ef}	菌丝层中等厚度,边缘齐整,气生菌丝较发达
P0	1.24 ± 0.02^d	菌丝层薄,边缘齐整,贴壁生长,气生菌丝不发达
W. C0003	0.81 ± 0.02^{bc}	菌丝层厚,边缘较齐整,气生菌丝较发达
A5	1.08 ± 0.00^f	菌丝层较薄,边缘呈现锯齿状,气生菌丝较发达
Yeshengzhong	1.24 ± 0.00^d	菌丝层薄,边缘齐整,贴壁生长,气生菌丝不发达
Xinpinzhi	1.10 ± 0.00^f	菌丝层中等厚度,边缘较齐整,气生菌丝较发达

注:同列中不同字母表示均值之间的显著差异性($P < 0.05$)。

Note: The different letter in the same column represents the significant difference among the mean values ($P < 0.05$).

2.2 茯苓菌丝生长于液体培养基的特性描述

16 种茯苓菌株分别被接种于 pH 自然的一级种子培养基,避光培养。培养 1 天后,菌丝开始围绕着菌种块生长,约第 5 天时,菌种块被菌丝完全包围,变成椭圆形的菌丝球。然而,在本研究分析的 16 种茯苓菌株中,发现约有一半菌株随着培养的进行,培养物颜色逐步加深,甚至完全变黑(图 1A)。我们观察到在培养基颜色发生变化之后,菌丝几乎不生长,或生长极慢。通过多次尝试,发现降低培养基的初始 pH 到 4.0 时,可以适度缓解那些大部分在 pH 自然培养基中培养时发生培养物变黑的现象(图 1B)。因此,本研究后续实验将一级菌种液体培养基的初始 pH 值调成 4.0。通过测定一级与二级培养物终 pH,数据显示茯苓菌丝会分泌酸性物质,致使培养基的 pH 下降,大部分菌株培养物的 pH 值在 2~4 之间(表 3)。此外,我们对茯苓菌株生长于固

体培养基的生长速率是否能代表其在液体中的生长速率很感兴趣。茯苓菌株在液体发酵培养基中的生长速率测定数据表明 AS5. 78 生长速率最快,超过 0.06 g/d ;G1 菌株生长最慢,仅为 0.02 g/d (表 3)。将 16 种菌株在固体培养基上的生长速率数值与它们在液体培养基中的生长速率数值进行线性回归分析,发现 R^2 小于 0.3,表明茯苓菌株生长于固体培养基与液体培养基的生长速率之间不具有关联性。

2.3 16 种茯苓菌株产胞内多糖比较

在基本了解 16 种茯苓菌株的基本生长特性之后,我们采用液体发酵策略分析这些菌株产胞内多糖的性能。为了确定茯苓产胞内多糖的最佳发酵天数,P0 菌株被随机选择作为研究对象,通过测定一系列发酵天数 P0 菌丝生物量与胞内多糖的 OD 值,根据蔗糖标准曲线回归方程(图 2A),计算发酵不同天数 P0 的胞内多糖含量。实验结果表明第 7 天

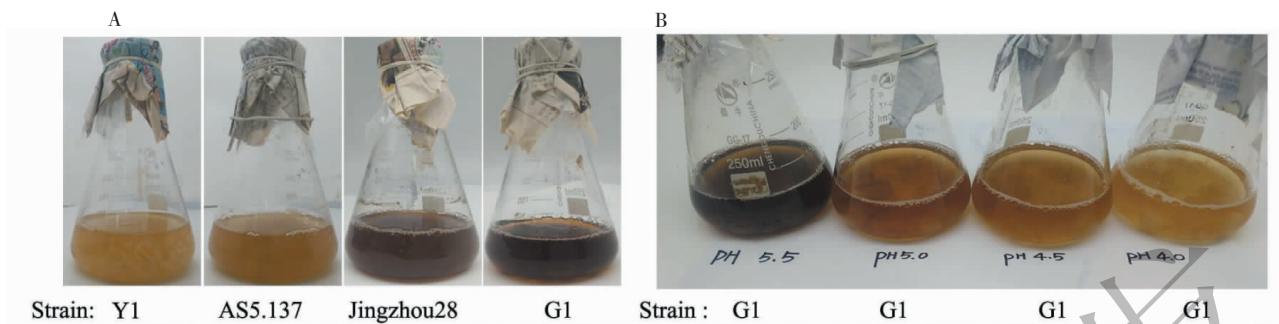


图 1 一级种子培养基初始 pH 对茯苓液体菌丝生长的影响

Fig. 1 Effect of the initial pH of the first-class seed medium on the mycelium growth of *W. cocos*

注:A;如图中的菌株接种到 pH 自然的一级种子培养基,培养 5 天,一些菌株(如 Jingzhou28)的发酵液变成褐色;B:G1 接种于不同初始 pH 的一级种子培养基,图片拍摄于培养 5 天的发酵液。

Note: A: Strains were inoculated into the first seed medium (pH nature), and cultured for 5 d. The color of the culture of certain strains like Jingzhou28 was brown; B: G1 was individually inoculated into the first-class seed media with initial pH values varying from 4.0 to 5.5, and the picture was taken at the fifth day of fermentation.

表 3 16 种茯苓菌丝生长于种子培养基的特性描述($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Characteristic description of 16 *W. cocos* mycelia cultured in seed medium ($n=3, \bar{x} \pm s$)

菌株名称 Strain name	一级培养物终 pH Final pH values of first-class culture	二级培养物终 pH Final pH values of second-class culture	二级菌种菌丝干重 Dry cell weight of second-class mycelia (g)	生长速率 Growth rate (g/d)
AS5.137	3.02 ± 0.03	2.99 ± 0.01	0.60 ± 0.06^a	0.05 ± 0.00^{ab}
AS5.78	3.08 ± 0.11	3.06 ± 0.04	0.62 ± 0.02^a	0.06 ± 0.00^a
G1	3.28 ± 0.11	3.84 ± 0.05	0.25 ± 0.01^d	0.02 ± 0.00^d
Y1	2.85 ± 0.22	2.81 ± 0.06	0.51 ± 0.02^{abc}	0.05 ± 0.00^{ab}
SC	3.05 ± 0.07	4.13 ± 0.09	0.29 ± 0.04^d	0.03 ± 0.00^{cd}
TT	3.11 ± 0.15	3.20 ± 0.07	0.57 ± 0.60^{ab}	0.05 ± 0.01^{ab}
Jingzhou28	2.61 ± 0.01	3.00 ± 0.00	0.45 ± 0.05^{bc}	0.04 ± 0.01^{bc}
Z(z)	2.56 ± 0.06	2.98 ± 0.03	0.52 ± 0.07^{ab}	0.05 ± 0.01^{ab}
DB	3.33 ± 0.04	3.55 ± 0.08	0.35 ± 0.07^{cd}	0.03 ± 0.01^{cd}
Shengling	2.67 ± 0.09	3.20 ± 0.01	0.53 ± 0.03^{ab}	0.05 ± 0.00^{ab}
GIM5.219	3.31 ± 0.00	3.23 ± 0.11	0.44 ± 0.08^{bc}	0.04 ± 0.00^{bc}
P0	2.85 ± 0.07	2.99 ± 0.05	0.47 ± 0.00^{bc}	0.04 ± 0.00^{bc}
W.C0003	3.55 ± 0.07	3.05 ± 0.07	0.48 ± 0.12^{bc}	0.04 ± 0.01^{bc}
A5	3.01 ± 0.02	3.01 ± 0.01	0.54 ± 0.07^{ab}	0.05 ± 0.01^{ab}
Yeshengzhong	2.81 ± 0.04	3.07 ± 0.04	0.58 ± 0.11^{ab}	0.05 ± 0.01^{ab}
Xinpinzhong	3.48 ± 0.03	2.65 ± 0.07	0.47 ± 0.08^{bc}	0.04 ± 0.01^{bc}

注:同列中不同字母表示均值之间的显著差异性($P < 0.05$)。

Note: The different letter in the same column represents the significant difference among the mean values ($P < 0.05$).

时菌丝生物量达到最大值,胞内多糖含量也在该天达到最大值,因此本研究确定发酵天数 7 天为茯苓产胞内多糖的最佳发酵天数(图 2B)。

通过对二级菌种的菌丝干重进行测定,Jingzhou28 二级菌种干重为 0.45 ± 0.05 g,该值居于本研究中所有菌株二级菌丝干重的中等水平(表 3),

因此本研究以 5% (V/V) Jingzhou28 二级菌种干重(0.02 g)作为参照,其他菌株按相当于各菌株菌丝干重 0.02 g 的液体菌种量接入发酵培养基,进行发酵培养 7 天,收集与检测样品胞内多糖。实验结果表明 AS5.137 胞内多糖含量最高,达 377.60 ± 0.10 mg/g,G1 胞内多糖含量最低,仅为 188.13 ± 13.58 mg/g。

mg/g,其余菌株胞内多糖含量介于 188 ~ 377 mg/g (表4)。多糖产量最高的菌株为 DB, 达 1.01 ± 0.13 g/L, 多糖产量最低的菌株为 TT, 仅为 0.34 ± 0.02

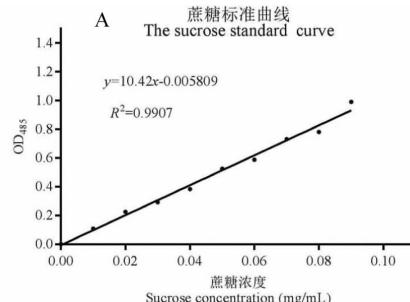


图 2 发酵天数对胞内多糖含量的影响

Fig. 2 Effect of fermentation time course on intracellular polysaccharide contents

注 A: 蔗糖标准曲线; B: P0 接入到发酵培养基, 收集不同发酵天数的菌丝体并测定菌丝干重与胞内多糖含量。

Note: A: The sucrose standard curve; B: P0 was inoculated into fermentation medium and the corresponding cultures were harvested at the indicated time points, followed by dry cell mass and intracellular polysaccharide determination assays.

表 4 16 种茯苓菌株产胞内多糖信息 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 4 Information for intracellular polysaccharides produced by 16 *W. cocos* strains ($n=3, \bar{x} \pm s$)

菌种名称 Strain name	菌丝干重 Dry cell weight (g)	胞内多糖含量 Intracellular polysaccharides content (mg/g)	胞内多糖产量 Intracellular polysaccharides yield (g/L)
AS5.137	0.26 ± 0.00^{ab}	377.60 ± 0.10^a	0.98 ± 0.02^{ab}
AS5.78	0.24 ± 0.01^{abcd}	338.72 ± 13.91^a	0.80 ± 0.01^c
G1	0.20 ± 0.00^{cdel}	188.13 ± 13.58^d	0.37 ± 0.02^{de}
Y1	0.17 ± 0.00^{ef}	226.98 ± 14.37^{cd}	0.38 ± 0.03^{cd}
SC	0.25 ± 0.09^{abc}	333.79 ± 7.14^a	0.84 ± 0.05^{bc}
TT	0.16 ± 0.00^f	206.69 ± 13.07^{cd}	0.34 ± 0.02^e
Jingzhou28	0.19 ± 0.00^{cdel}	219.29 ± 25.60^{cd}	0.42 ± 0.06^{de}
Z(z)	0.23 ± 0.02^{abcd}	345.16 ± 38.60^a	0.81 ± 0.15^c
DB	0.27 ± 0.02^a	373.55 ± 13.93^a	1.01 ± 0.13^a
Shenling	0.18 ± 0.02^{def}	247.28 ± 13.74^{bc}	0.45 ± 0.06^{de}
GIM5.219	0.21 ± 0.01^{bede}	223.34 ± 6.92^{cd}	0.51 ± 0.04^{de}
P0	0.26 ± 0.01^{ab}	332.60 ± 7.93^a	0.87 ± 0.06^c
W.C0003	0.17 ± 0.02^{ef}	208.45 ± 27.14^{cd}	0.35 ± 0.06^{de}
A5	0.18 ± 0.01^{def}	237.76 ± 15.95^{bc}	0.43 ± 0.05^{de}
Yeshengzhong	0.15 ± 0.00^f	211.93 ± 5.39^{cd}	0.34 ± 0.04^e
Xinpinzhong	0.22 ± 0.03^{bed}	274.96 ± 32.30^b	0.41 ± 0.37^d

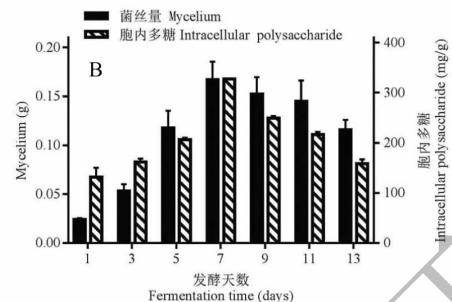
注: 同列中不同字母表示均值之间的显著差异性 ($P < 0.05$)。

Note: The different letter in the same column represents the significant difference among the mean values ($P < 0.05$)。

2.4 16 种茯苓菌株产三萜化合物比较

为了明确茯苓产胞内三萜的最佳发酵天数, 本研究以 P0 作为研究对象, 分别在如图 3B 中标示的时间点收集样品, 测定菌丝干重与测定胞内三萜类化合物在 548 nm 处的吸光值。以熊果酸作为标准

g/L, 其余菌株的多糖产量介于 0.34 ~ 1.01 g/L 之间。



品, 绘制标准曲线(图 3A), 根据熊果酸标准曲线回归方程计算茯苓产胞内三萜的量。发酵 11 天的 P0 菌丝显示最高的三萜类化合物含量, 约达 70 mg/g, 尽管发酵第 11 天的菌丝干重生物量较第 7 天有稍许减少(图 3B)。综合考虑菌丝干重与胞内三萜含

量两个参数,本研究明确茯苓产胞内三萜的最佳发酵天数为11天。为了比较16种茯苓菌株产胞内三萜的性能,我们一致地将发酵培养的接种量调整为相当于各菌株菌丝干重的0.02g。通过对16种茯苓菌株进行11天的发酵培养,收集样品,测定菌丝干重与胞内三萜含量。实验结果表明Y1菌丝胞内三萜含量最高,达 83.89 ± 4.28 mg/g,G1菌丝胞内

三萜含量最低,仅 16.09 ± 5.25 mg/g(表5)。Y1菌丝胞内三萜含量是G1菌丝胞内三萜含量的5倍多,说明茯苓菌株之间产胞内三萜能力具有显著差异性。尽管Jingzhou28胞内三萜含量仅为 73.39 ± 9.97 mg/g,但因其菌丝生物量较大,Jingzhou28显示最高的胞内三萜产量,达 136.63 ± 26.66 mg/L(表5)。

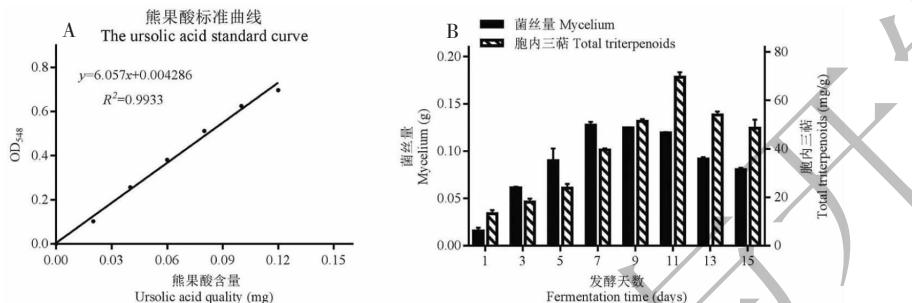


图3 发酵天数对胞内三萜含量的影响

Fig. 3 Effect of fermentation time course on intracellular triterpenoid contents

注A:熊果酸标准曲线;B:PO接入到发酵培养基,收集不同发酵天数的菌丝体并测定菌丝干重与胞内三萜含量。

Note: A: The ursolic acid standard curve; B: PO was inoculated into fermentation medium and the corresponding cultures were harvested at the indicated time points, followed by dry cell mass and intracellular triterpenoid determination assays.

表5 16种茯苓菌株产胞内三萜信息($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 5 Information for intracellular triterpenoids produced by 16 *W. cocos* strains ($n=3, \bar{x} \pm s$)

菌种名称 Strain name	菌丝干重 Dry cell weight (g)	胞内三萜含量 Intracellular triterpenoid content (mg/g)	胞内三萜产量 Intracellular triterpenoid yield (mg/L)
AS5.137	0.16 ± 0.01^d	74.78 ± 2.40^{ab}	116.41 ± 12.71^{abc}
AS5.78	0.17 ± 0.00^{bc}	55.25 ± 5.96^{def}	96.39 ± 12.46^{abcd}
G1	0.19 ± 0.00^{ab}	16.09 ± 5.25^h	30.00 ± 10.72^e
Y1	0.16 ± 0.02^d	83.89 ± 4.28^a	132.66 ± 11.59^{abc}
SC	0.23 ± 0.07^a	55.85 ± 7.86^{def}	127.11 ± 30.56^{abc}
TT	0.15 ± 0.03^e	52.23 ± 2.72^{ef}	81.16 ± 21.01^{cd}
Jingzhou28	0.19 ± 0.01^{ab}	73.39 ± 9.97^{ab}	136.63 ± 26.66^a
Z(z)	0.19 ± 0.02^{ab}	71.84 ± 6.44^{bc}	132.66 ± 2.32^{abc}
DB	0.21 ± 0.04^{ab}	30.76 ± 4.13^g	64.36 ± 11.15^{de}
Shengling	0.21 ± 0.02^{ab}	55.41 ± 4.77^{def}	117.77 ± 7.13^{abc}
GIM5.219	0.20 ± 0.05^{ab}	64.40 ± 0.51^{bcde}	127.83 ± 29.77^{abc}
P0	0.17 ± 0.00^{bc}	68.86 ± 3.88^{bc}	119.14 ± 6.77^{abcd}
W.C0003	0.18 ± 0.03^{abc}	59.66 ± 10.91^{cdef}	110.74 ± 38.54^{abcd}
A5	0.18 ± 0.01^{abc}	66.51 ± 0.54^{bcd}	121.33 ± 5.58^{abc}
Yeshengzhong	0.17 ± 0.02^{bc}	48.08 ± 5.90^f	81.84 ± 20.94^{bcd}
Xinpinzhong	0.21 ± 0.00^{ab}	65.64 ± 1.75^{bcde}	134.92 ± 3.19^a

注:同列中不同字母表示均值之间的显著差异性($P < 0.05$)。

Note: The different letter in the same column represents the significant difference among the mean values ($P < 0.05$).

3 结论

茯苓菌丝液体发酵的研究进展已由唐艳平等综述^[18]。但较系统地分析茯苓菌株之间产三萜与多糖的研究尚未见报导。本研究收集了共16种茯苓菌株,较系统性地分析各菌株产茯苓药效成分的潜能是本文的目的。生长速率测定结果表明菌株生长于固体培养基与液体培养基的生长速率之间不具有相关性(表2与3)。茯苓在发酵过程中培养物变黑的现象已有报导^[19],我们分析的菌株在pH自然的一级种子培养基中培养时都会或多或少出现培养物变黑的现象。通过将一级种子培养基的初始pH调整到4.0,大部分的菌株都可以正常的生长,但SD菌株(ACCC 51978)即使在初始pH3.0的条件下培养,仍会发生一定程度的褐化(数据未显示)。本研究中发现茯苓产胞内多糖的最佳发酵天数为7天,同时该天菌丝的生物量也达最大值,这与唐业刚等报导的结果大致相同^[20]。16种茯苓菌株的胞内多糖含量从 $188.13 \pm 13.58 \text{ mg/g}$ 到 $377.60 \pm 0.10 \text{ mg/g}$ 不等,胞内多糖产量介于 $0.34 \pm 0.02 \text{ g/L}$ 到 $1.01 \pm 0.13 \text{ g/L}$ 之间。以多糖含量为指标时,AS5.137菌丝单位重量内的多糖含量最高,达 $377.60 \pm 0.10 \text{ mg/g}$;然而,以胞内多糖产量为指标时,DB显示出最高的多糖产量,达 $1.01 \pm 0.13 \text{ g/L}$ 。综合来看,茯苓菌株DB与AS5.137菌株均可以考虑作为茯苓发酵产胞内多糖的出发菌株。在分析茯苓产胞内三萜类化合物最佳发酵天数时,发现第11天时胞内三萜类化合物含量最高,尽管此时的菌丝生物量较第7天有稍许下降。我们所确定的茯苓产胞内三萜类化合物最佳发酵天数与周燕丽等报导的一致^[21]。就胞内三萜含量而言,Y1的胞内三萜含量最高,达 $83.89 \pm 4.28 \text{ mg/g}$ 。但以三萜产量作为指标时,Y1,Jingzhou28,Z(z)与Xinpинzhong的胞内三萜产量均大于130 mg/L,因此该四种菌株均适合作为产胞内三萜的出发菌株。

参考文献

- Xu S, Jiang WQ, Kuang YM, et al. Research advances on chemical Constituents and bioactivities of *Poria cocos* (schw.) Wolf [J]. Northwest Pharm J (西北药学杂志), 2016, 31:327-330.
- Zheng Y, Yang XW. Two new lanostane triterpenoids from *Poria cocos* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2008, 10:289-292.
- Yang CH, Zhang SF, Liu WY, et al. Two new triterpenes from the surface layer of *Poria cocos* [J]. Helv Chim Acta, 2010, 92:660-667.
- She GM, Zhu NL, Wang S, et al. New lanostane-type triterpene acids from *Wolfiporia extensa* [J]. Chem Cent J, 2012, 6(1):39.
- Wang YZ, Zhang J, Zhao YL, et al. Mycology, cultivation, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Wolfiporia cocos* (schwein.) ryvarden et gilb.: A review [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147:265-276.
- Xia B, Zhou Y, Tan HS, et al. Advanced ultra-performance liquid chromatography-photodiode array-quadrupole time-of-flight mass spectrometric methods for simultaneous screening and quantification of triterpenoids in *Poria cocos* [J]. Food Chem, 2014, 152:237-244.
- Ma L, Yin L, Wang B, et al. Research progress of *Poria cocos* [J]. Asia-Pacific Trad Med (亚太传统医药), 2015, 11(12):55-59.
- Zhang M, Cui SW, Cheung PCK, et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity [J]. Trends Food Sci Tech, 2007, 18(1):4-19.
- Ding Q, Zhang LN, Zhang ZQ. Isolation and structural analysis of polysaccharides from *Poria cocos* mycelia [J]. Acta Polym Sin (高分子学报), 2000, 2:224-227.
- Ding Q, Zhang LN, Zeng FB. Influence of molecular and peridate-modification of β -D-glucans from *Poria coocs* sclerotium on anitumor activities [J]. Chinese J Polym Sci (高分子科学), 1998, 16(1):62-66.
- Chen XY, Zhang LN, Cheung PCK. Immunopotentiation and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated beta-(1→3)-D-glucan from *Poria cocos* [J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10:398-405.
- Chen XY, Xu XJ, Zhang LN, et al. Chain conformation and anti-tumor activities of phosphorylated (1→3)- β -d-glucan from *Poria cocos* [J]. Carbohydr Polym, 2009, 78:581-587.
- Yu SJ, Pan SB, Niu ZY. Study on artificial regulation cultivation in scrap tuckahoe cultivation field [J]. J Anhui Agri Sci (安徽农业科学), 2012, 40:795-898.
- Rios JL. Chemical constituents and pharmacological properties of *Poria cocos* [J]. Planta Med, 2011, 77:681-691.
- Li Y, Wan DG, Liu ZR, et al. Study on polysaccharide from the mycelium of fermented *Poria cocos* and natural *Poria cocos* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2006, 18:667-669.
- Zhang WF, Chen DF. Study on methdods for determination of polysaccharide in *Poria cocos* [J]. Fujian Light and Textile industry (福建轻纺), 2015, 5:35-39.
- Shen S, Li FJ, Mei GM, et al. Study on content determination

- and antibacterial effects of triterpenes from sclerotia of *Poria cocos* [J]. *Food Sci.* (食品科学), 2009, 30(1): 95-98.
- 18 Tang YP, Liu SX. The research advance of pachymaran with zymotecnics in symposium of Hannan microbiology detection and quality assurance [C]. Hainan: China, 2009.
- 19 Wang WX, Wang WF, Chen LG. Study on the relationship between *Poria cocos* cultivated on agar medium and pigment secretion [J]. *Jiangsu Agri Sci.* (江苏农业科学), 2010, 3: 311-313.
- 20 Tang YG, Hu AW. Optimization of poria liquid fermentation condition [J]. *Sci Technol Food Ind.* (食品工业科技), 2014, 35: 214-217.
- 21 Zhou YL, Lu HQ, Xu LW, et al. Relationship between mycelium morphology and intracellular triterpenoids production of *Poria cocos* in submerged culture [J]. *J Food Sci Biotech.* (食品与生物技术学报), 2017, 36: 635-641.

《天然产物研究与开发》2017~2018 年度优秀编委及影响力优秀论文

根据《天然产物研究与开发》编委工作制度以及 2017~2018 年度编委通过投稿、审稿等给予本刊指导和咨询工作情况,评选出周立刚等 9 位优秀编委;根据论文被引用及下载情况结合专家评审意见,评选出《六种中药渣的营养成分》等 10 篇影响力优秀论文。名单如下。谨向获奖专家和论文作者表示衷心感谢和热烈祝贺!

2017~2018 年度优秀编委:

周立刚 张国林 及元乔 宋流东 程永现 彭密军 李芸霞 罗应刚 黄胜雄

2017~2018 年度影响力优秀论文:

- 黎智华,祝倩,姬玉娇,印遇龙,王德云,孔祥峰.六种中药渣的营养成分, 2017.
- 全云云,袁岸,龚小红,彭成,李芸霞.连翘抗炎药效物质基础筛选研究, 2017.
- 黄雅,陈华国,周欣,巫兴东,胡恩明,蒋政萌,李洪德.黔产接骨草中总多酚的含量测定及抗氧化活性研究, 2017.
- 龙承星,贺璐,郭艳芳,刘又嘉,于子真,任婷,谭周进.铁皮石斛多糖对脾虚便秘小鼠免疫、肠道微生物及酶活性的影响, 2017.
- 邢梦雨,田崇梅,夏道宗.乌药化学成分及药理作用研究进展, 2017.
- 热孜亚木·吾甫尔,李月红,海力茜·陶尔大洪.恰麻古多糖对巨噬细胞 RAW264.7 体外免疫调节作用初探, 2018.
- 袁子文,钟立甲,纪鹏,华永丽,姚万玲,马琪,张晓松,文艳巧,魏彦明.当归干预血瘀证大鼠血浆代谢组学研究, 2018.
- 吴永祥,杨庆,李林,卞国勇,胡高峰,毕淑峰.豆腐柴叶挥发油化学成分及其抗氧化和抑菌作用研究, 2018.
- 罗林,袁岸,党珏,赵梦杰,李芸霞.不同大鼠模型探讨连翘挥发油解热、抗炎作用, 2018.
- 陈玲,李晓,魏悦,曹静亚,范毅.黄芩饮片、标准汤剂、中间体、配方颗粒的 HPLC 指纹图谱相关性研究, 2018.