

## 植物激素及木质素对牛樟芝菌丝体生长情况的影响

李一凡<sup>1</sup>, 谢观雯<sup>1</sup>, 李翁坤<sup>1</sup>, 刘宏源<sup>2</sup>, 刘卓斌<sup>2</sup>, 赖小平<sup>1</sup>, 张桂芳<sup>1\*</sup>

1. 广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东省中药新药研发重点实验室, 广东 广州 510006

2. 广东茂丰源农业科技有限公司, 广东 饶平 515700

**摘要:** **目的** 探究植物激素及木质素对牛樟芝菌丝体生长情况的影响, 并对其培养产物进行粗多糖、粗三萜含量及抗氧化活性测定研究。 **方法** 采用皿式培养法培育牛樟芝, 超声提取培养产物, 选用苯酚-硫酸法测定粗多糖含量、香草醛-冰醋酸法测定粗三萜含量, 并以 DPPH 自由基、ABTS 自由基的半数清除浓度(IC<sub>50</sub>)作为培养产物抗氧化活性的评价指标。 **结果** 菌种活化方法为培养 20 d 后靠近菌丝层边缘取样, 可获得生长活力好的接种原料; 改良 PCA 培养基上牛樟芝菌丝长势较好、粗三萜及粗多糖含量高; 以改良 PCA 培养基为基础, 向其中添加 0.5 g/L 木质素时菌丝生长最快, 菌丝层直径为对照组的 1.19 倍; 当 IBA 添加质量浓度为 0.5 mg/L 时, 菌丝体干质量较对照组增加了 89.51%, 粗多糖产量较对照组提升了 130.57%, 远高于其他组别, 与此同时, 菌丝体粗三萜含量及产量也显著提升, 其含量较对照组提高了 61.31%, 粗三萜产量达到 133.24 mg/L; 添加牛樟树粉末 0.5 g/L 时, 菌丝体粗三萜含量最高, 为 5.62%, 较对照组提升了 84.26%; 此外, 向培养基中加入植物激素及木质素对牛樟芝菌丝体的抗氧化能力提升有一定作用, 整体来说加入不同物质后实验组抗氧化活性良好。 **结论** 通过向改良 PCA 培养基中添加植物激素及木质素, 可有效促进牛樟芝菌丝体生长、提高活性成分含量并提升其抗氧化活性。

**关键词:** 牛樟芝; 菌丝体; 皿式培养; 粗多糖; 粗三萜; 抗氧化

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)06-1453-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.030

## Effects of phytohormones and lignin on growth of *Antrodia cinnamomea* mycelium

LI Yi-fan<sup>1</sup>, XIE Guan-wen<sup>1</sup>, LI Weng-kun<sup>1</sup>, LIU Hong-yuan<sup>2</sup>, LIU Zhuo-bin<sup>2</sup>, LAI Xiao-ping<sup>1</sup>, ZHANG Gui-fang<sup>1</sup>

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine; Guangdong Provincial Key Laboratory of New Drug Development and Research of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Maofengyuan Agricultural Science and Technology Limited Company, Raoping 515700, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of phytohormones and lignin on the growth of *Antrodia cinnamomea* mycelium, and to determine the content of crude polysaccharide and crude triterpenoid and antioxidant activity of cultured products. **Methods** The product cultured by solid-state fermentation in petri dish was ultrasonically extracted. The phenol-sulfuric acid method was selected to determine the content of crude polysaccharide of the extract, and the vanillin-glacial acetic acid method was used to determine the content of crude triterpenoids of the extract. The half-clearing concentrations (IC<sub>50</sub>) of DPPH free radicals and ABTS free radicals were indexes for evaluating the anti-oxidant activity of the culture product. **Results** Sampling near the outer edge of the mycelium layer after 20 d of culture was performed by the activation method to obtain inoculated raw materials with better growth activity; The basal medium with good growth, high content of crude polysaccharide and crude triterpenoids was modified PCA medium; On the basis of this medium, the mycelia with 0.5 g/L lignin added into the medium grew fastest, and the diameter of mycelium layer increased to 1.19 times of the control group; When the concentration of IBA was 0.5 mg/L, the dry weight of mycelium was increased by 89.51% compared with the control group, and the yield of crude polysaccharide was increased by 130.57% compared with the control group, which was much higher than other groups. The content and yield of triterpenoids were also increased significantly, 61.31% higher than the control group, and crude triterpenoids yield reached 133.24 mg/L; The content of crude triterpenoids in mycelium was

收稿日期: 2018-10-19

基金项目: 国家中医药管理局全国中药资源普查项目 (GZY-KJS-2018-823-001); 国家级重大培育项目 (自然科学类) (2014GKXM032); 广东省科技厅项目 (2017B030314096)

作者简介: 李一凡 (1994—), 女, 在读硕士, 研究方向为真菌的培养及研究。Tel: (020)39356380 E-mail: 474035456@qq.com

\*通信作者 张桂芳 (1980—), 女, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为濒危药用植物的研究与开发。

Tel: (020)39356380 E-mail: zhanggf@gzucm.edu.cn

the highest (5.62%) when adding 0.5 g/L powder of *Cinnamomum kanehirai*, which was 84.26% higher than that of the control group; In addition, the addition of plant hormones and lignin to the culture medium has a certain effect on the anti-oxidant capacity of the *Antrodia cinnamomea* mycelium, on the whole, the experimental group had good anti-oxidant activity after adding different substances. **Conclusion** By adding phytohormone and lignin to the modified PCA medium, the growth of the mycelium of *Antrodia cinnamomea* can be effectively promoted, the content of the active ingredient can be increased, and the anti-oxidant activity can be enhanced.

**Key words:** *Antrodia cinnamomea* T. T. Chang & W. N. Chou; mycelium; solid-state fermentation in petri dish; crude polysaccharide; triterpenoids; anti-oxidant

牛樟芝 *Antrodia cinnamomea* T. T. Chang & W. N. Chou 又称牛樟菇、红樟芝等, 属于多孔菌科 (Polyporaceae) 薄孔菌属 *Antrodia*, 是中国台湾特有的一种珍稀药用真菌, 素有“森林中的红宝石”之称<sup>[1]</sup>。牛樟芝的菌丝体及子实体均含有丰富的生理活性物质, 包括三萜类化合物、多糖、马来酸和琥珀酸衍生物等<sup>[2-5]</sup>。现代学者研究发现, 牛樟芝具有抗氧化、抗炎、抗癌、保肝、免疫调节等作用<sup>[6-11]</sup>。

野生牛樟芝子实体生长极为缓慢, 其宿主牛樟树为台湾珍稀保护树种, 因此现多采用人工培养方式培育牛樟芝, 主要有椴木培养、固体培养和液体培养。椴木培养生长周期长, 成本高, 较难实现规模化生产; 液体培养可在短时间内得到大量菌丝体产物, 但无法培养得到子实体。固体培养分为固态发酵培养和皿式培养, 固态发酵培养周期适中, 质量可控, 培养达到一定时间可得到牛樟芝子实体, 但培养产物往往较难与基质分离; 皿式培养质量可控, 操作方便, 且可视化强。本实验期望以更直观的方法比较不同添加物质对牛樟芝生长情况的影响, 因此选用皿式培养的方法培育牛樟芝。

在牛樟芝的培育研究中, 研究者们探究了不同外源物质如柑橘皮提取物<sup>[12]</sup>、樟木白酒浸出物<sup>[13]</sup>、单萜类化合物<sup>[14]</sup>等对牛樟芝生长情况的影响, 但关于植物激素及木质素对牛樟芝生长影响的研究目前未见报道。植物激素类物质能够激活菌体胞外酶活性, 增加其对培养基中营养物质的吸收利用, 还可通过加速细胞成熟来促进菌丝体的生长发育<sup>[15]</sup>。作为一种腐木菌, 木材为牛樟芝生长所需的重要物质, 牛樟芝的宿主牛樟树为国家珍稀保护树种, 研究者们尝试用其他树种替代牛樟树来培育牛樟芝<sup>[16-17]</sup>, 取得了较好的效果。木材中含有丰富的纤维素、半纤维素及木质素, 三者天然结合在一起, 较难分开, 真菌需在多种酶的作用下才能将其吸收利用。有研究者<sup>[18]</sup>比较了纤维素、半纤维素及木质素对灵芝菌丝体生长的影响, 发现木质素对促进菌丝体生长并提高其活性成分含量发挥

了很好的作用。本实验选用植物激素、木质素、牛樟树粉末为添加物质, 探究比较不同添加物质对牛樟芝菌丝体生长的影响, 并考察培养产物的粗多糖、粗三萜含量及抗氧化活性, 为牛樟芝人工培养方面的研究提供参考。

## 1 仪器与材料

A390 紫外分光光度计 (上海翱艺仪器有限公司); SCIENTZ-12N 冷冻干燥机、SB-120DT 超声波清洗机 (宁波新芝生物有限公司); BSA224S 分析天平 (Sartorius 公司); DHP-9272 电热恒温培养箱、DK-8AD 电热恒温水槽 (上海一恒有限公司); 冷冻高速离心机, Eppendorf-5424R-PCR 仪 (Thermo Scientific 公司); 葡萄糖、琼脂、无水乙醇、苯酚、浓硫酸、香草醛、冰醋酸、高氯酸、1,1-二苯基-2-苦基肼、2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸、过硫酸钾, 以上试剂均为色谱级; 熊果酸对照品、生长素 (IBA)、赤霉素 (GA<sub>3</sub>)、细胞分裂素 (6-KT)、表油菜素内酯 (EBR)、木质素, 以上试剂均购自 Sigma 公司。

所用牛樟芝原料为广东茂丰源农业科技有限公司提供的子实体, 经广州中医药大学张桂芳副教授鉴定为牛樟芝 *Antrodia cinnamomea* T. T. Chang & W. N. Chou, 本实验室人员进行菌丝体分离培养后保存至 4 °C 冰箱。

## 2 方法

### 2.1 牛樟芝菌种鉴定

取本实验室保存的牛樟芝菌种, 接种于 PDA 平板培养基上, 28 °C 暗培养 30 d 后刮取培养基表面的牛樟芝菌丝体 0.1 g, 液氮研磨, 用改良 CTAB 法<sup>[19]</sup>提取其 DNA。以 ITS 序列为引物进行扩增, 引物序列为 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTG-CGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 反应体系: Taq Master Mix 12.5 μL、上下游引物各 0.4 μL、模板 DNA 1 μL、无菌 ddH<sub>2</sub>O 10.7 μL。扩增程序为 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 次循环; 72 °C

延伸 5 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶检验纯度和浓度，合格后送由华大基因进行测序。

### 2.2 接种操作及培养条件

将活化好的原料用直径为 0.8 cm 的打孔器打孔后接种在不同培养基上，置于恒温培养箱中 28 °C 暗培养 30 d。观察并记录菌丝层的颜色、生长直径、菌丝体疏密程度，取样冻干后记录菌丝体干质量。

### 2.3 接种原料活化方法的选择

实验比较了不同活化时间（15、20、25、30

d）及不同取样位置（分别在打孔器中心距离菌丝层边缘 0.4 cm 及 1.2 cm 处打孔取样）的接种原料长势差别，将不同来源的原料接种在 PDA 培养基上，观察不同方法活化得到接种原料的生长情况。

### 2.4 基础培养基的选择

先对牛樟芝皿式培养的基础培养基进行选择（表 1）。观察比较不同培养基上牛樟芝菌丝体的生长情况，选出牛樟芝长势较好的基础培养基用于后续实验。

表 1 待筛选的基础培养基

Table 1 Basic medium to be selected

培养基名称	培养基配方
PDA 培养基	土豆 200 g·L <sup>-1</sup> 、葡萄糖 20 g·L <sup>-1</sup> 、琼脂 20 g·L <sup>-1</sup> ，pH 自然
PCA 培养基	土豆 200 g·L <sup>-1</sup> 、胡萝卜 20 g·L <sup>-1</sup> 、葡萄糖 20 g·L <sup>-1</sup> 、琼脂 20 g·L <sup>-1</sup> ，pH 自然
胡萝卜培养基	胡萝卜 200 g·L <sup>-1</sup> 、葡萄糖 20 g·L <sup>-1</sup> 、琼脂 20 g·L <sup>-1</sup> ，pH 自然
苹果培养基	苹果 200 g·L <sup>-1</sup> 、葡萄糖 20 g·L <sup>-1</sup> 、琼脂 20 g·L <sup>-1</sup> ，调节 pH 值至 5.8
改良 PCA 培养基	土豆 100 g·L <sup>-1</sup> 、胡萝卜 100 g·L <sup>-1</sup> 、葡萄糖 20 g·L <sup>-1</sup> 、琼脂 20 g·L <sup>-1</sup> ，pH 自然

### 2.5 植物激素及木质素对牛樟芝生长情况的影响

向牛樟芝长势较好的基础培养基中添加不同质量浓度（0.5、1.0、1.5、3.0、5.0 mg/L）的植物激素，包括生长素（IBA）、赤霉素（GA<sub>3</sub>）、细胞分裂素（6-KT）、表油菜素内酯（EBR），观察比较植物激素对牛樟芝生长情况的影响。取烘干的牛樟树木屑打粉，过 80 目筛，向牛樟芝长势较好的基础培养基中添加不同质量浓度（0.5、1.0、1.5、3.0、5.0 g/L）的木质素和牛樟树粉末，观察比较二者对牛樟芝生长情况的影响。

### 2.6 培养产物活性成分含量测定

**2.6.1 培养产物的提取** 采用超声提取的方法，将培养产物冷冻干燥后粉碎，称取牛樟芝菌丝粉 0.12 g，10 倍量的 90%乙醇，超声提取 2 次，每次 40 min，超声功率 120 W，提取完毕后 3 000 r/min 离心 10 min，取上清液用于粗三萜含量测定及抗氧化活性实验。用于粗多糖含量测定的牛樟芝提取液提取方法：称取牛樟芝菌丝粉 0.15 g，20 倍量的水超声提取 40 min，提取温度为 55 °C，超声功率 120 W，提取完毕后 3 000 r/min 离心 10 min，取上清液加入等体积无水乙醇沉淀 12 h 后再次离心（3 000 r/min，10 min），取其沉淀即得牛樟芝菌丝粗多糖，加入一定量蒸馏水溶解得粗多糖溶液。

**2.6.2 粗多糖含量测定<sup>[20]</sup>** 标准曲线的绘制：精密称取 105 °C 干燥至恒定质量的标准葡萄糖 100 mg 定容于 100 mL 量瓶中，配制成 1.0 mg/mL 的母液。

精密吸取该母液 1.0 mL 定容于 10 mL 量瓶中，配制成 0.1 mg/mL 的葡萄糖标准液。分别吸取标准液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 于 10 mL 具塞试管中，加蒸馏水至 2.0 mL，然后向各管加入 5% 苯酚试液 1.0 mL，摇匀，迅速滴加 5.0 mL 浓硫酸振荡混匀，静置 5 min 后置沸水中加热 15 min，取出，冷却至室温。于 490 nm 波长处测定吸光度（A）值，以葡萄糖质量为横坐标（X），A 值为纵坐标（Y），绘制标准曲线。以葡萄糖为标准品，得到的标准曲线方程为  $Y=5.7346X+0.064$ ， $r=0.9982$ ，表明在 10~120 μg 线性关系良好。

样品溶液的测定：取样品溶液 0.5 mL 置于具塞试管中，加蒸馏水至 2.0 mL，按照制作标准曲线的方法测定其 A 值，通过标准曲线方程计算牛樟芝菌丝中的粗多糖含量。

**2.6.3 粗三萜含量测定<sup>[21]</sup>** 熊果酸标准曲线的绘制：准确称取熊果酸对照品 20.0 mg，加无水乙醇溶解并定容至 100 mL，分别吸取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 置于具塞磨口试管中，用沸水浴加热挥去溶剂。然后再向上述烘干的试管中加入 0.3 mL 新鲜配制的 5%香草醛-冰醋酸溶液，混匀，加入 1.0 mL 高氯酸，振荡混匀，在 60 °C 水浴锅中保温 20 min，冷却至室温后加入 5.0 mL 冰醋酸，振荡摇匀。在波长为 548 nm 处测定 A 值，以熊果酸质量为横坐标（X），A 值为纵坐标（Y）绘制标准曲线。以熊果酸为对照品，得到的标准曲线方程为  $Y=$

7.586 4 X+0.026 2, r=0.999 2, 表明在 20~120 μg 线性关系良好。

样品溶液的测定: 取样品溶液 0.3 mL 置于磨口试管中, 按照制作标准曲线的方法测定其 A 值, 通过标准曲线方程计算牛樟芝菌丝中的粗三萜含量。

**2.6.4 抗氧化活性研究 DPPH 自由基清除实验<sup>[22]</sup>:** 分别取 2.0 mL 不同质量浓度 (1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mg/mL) 的牛樟芝菌丝体醇提物, 向各提取物中加入 2.0 mL DPPH 溶液 (0.1 mmol/L, 以无水乙醇溶液溶解), 混合均匀, 在室温下遮光反应 30 min, 在 517 nm 波长处测定样品的 A 值。以 90% 乙醇为空白对照, 重复 3 次实验, 按照下式计算不同浓度提取物的 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = 1 - (A_i - A_j) / A_c$$

A<sub>i</sub> 为加入 DPPH 溶液反应后牛樟芝提取液的 A 值, A<sub>j</sub> 为 2.0 mL 牛樟芝提取液加入 2.0 mL 无水乙醇后的 A 值, A<sub>c</sub> 为 2.0 mL DPPH 溶液加入 2.0 mL 无水乙醇后的 A 值

**ABTS 自由基清除实验<sup>[23]</sup>:** 取 0.5 mL 7.0 mmol/L 的 ABTS 水溶液和 0.5 mL 2.45 mmol/L 的过硫酸钾, 混匀后室温避光反应 16 h, 得 ABTS 阳离子溶液。ABTS 阳离子溶液用超纯水稀释至其在 734 nm 波长处 A 值为 0.70±0.01。取 0.3 mL 不同质量浓度 (1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mg/mL) 的牛樟芝菌丝体醇提物, 加入稀释后的 3.9 mL ABTS 阳离子溶液, 混匀, 用紫外可见分光光度计在 734 nm 波长处测定其 A 值。以 90% 乙醇为空白组, 重复 3 次实验, 按照公式测定 ABTS 自由基的清除率:

$$\text{ABTS 自由基清除率} = 1 - (A_x - A_b) / A_0$$

A<sub>0</sub> 为空白组的 A 值, A<sub>x</sub> 为加入样品溶液反应后的 A 值, A<sub>b</sub> 为样品溶液的 A 值

### 3 结果与分析

#### 3.1 牛樟芝菌种鉴定结果

测序结果经 NCBI 数据库中 Blast 比对显示, 本实验室保存菌种所测得的 ITS 序列与多孔菌科薄

孔菌属牛樟芝 (Genbank: EU077562.1) 的 ITS 序列相似度为 100%, 可确定该菌种为牛樟芝。

#### 3.2 牛樟芝基础培养条件的选择结果

**3.2.1 接种原料活化方法选择结果** 不同活化条件的接种原料生长 30 d 后生长直径见图 1。由图可知, 活化时间为 20 d 的原料生长直径高于其他组别, 生长活力最好。不同取样位置的原料长势差别明显, 在靠近活化原料菌丝层边缘的位置打孔取样, 菌丝生长活力好。综合以上, 本实验的接种原料为活化培养 20 d 在打孔器中心距离菌丝层边缘 0.4 cm 处打孔。

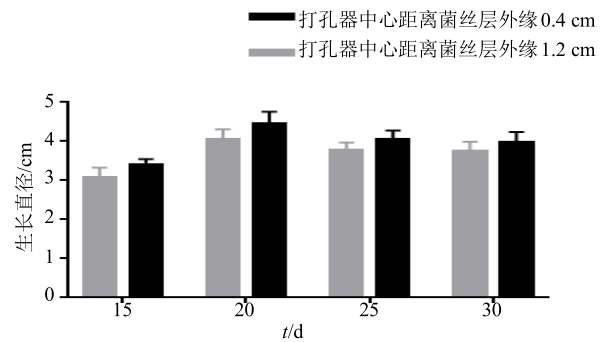


图 1 不同活化条件的原料生长直径

Fig. 1 Growth diameter of raw material under different activation conditions

**3.2.2 基础培养基的选择结果** 牛樟芝菌丝体在胡萝卜培养基上生长速度最快, 其次为苹果培养基与改良 PCA 培养基。胡萝卜及苹果培养基所得菌丝层颜色较浅, 菌丝稀疏, 改良 PCA 培养基上菌丝层颜色橘红, 菌丝致密。进一步对培养产物的粗多糖及粗三萜含量进行比较发现, 在 PDA 培养基上生长的牛樟芝菌丝体粗多糖含量最高, 其次为改良 PCA 培养基和胡萝卜培养基。在改良 PCA 培养基上生长的牛樟芝菌丝体粗三萜含量明显高于其他组别, 其余组别间差别不明显 (表 2)。综合考虑本实验选用改良 PCA 培养基为基础培养基。

表 2 不同基础培养基上牛樟芝菌丝体的生长情况 (30 d)

Table 2 Growth of *A.cinnamomea* mycelium on different basic culture media (30 d)

培养基	菌丝生长情况	菌丝生长直径/cm	粗多糖/%	粗三萜/%
PDA 培养基	菌丝层为橘红色, 菌丝致密, 接种块周围菌丝生长较慢	5.38±0.35 c	0.61±0.06 a	2.43±0.43 b
PCA 培养基	菌丝层为黄色, 菌丝致密, 接种块周围菌丝生长较慢	4.97±1.05 c	0.24±0.01 c	2.49±0.11 b
胡萝卜培养基	菌丝层为浅黄色, 菌丝稀疏, 接种块周围菌丝生长快	8.83±0.29 a	0.43±0.13 b	2.50±0.23 b
苹果培养基	菌丝层为浅黄色, 菌丝稀疏, 接种块周围菌丝生长快	7.13±0.96 b	0.24±0.04 c	2.01±0.24 b
改良 PCA 培养基	菌丝层为橘红色, 菌丝致密, 接种块周围菌丝生长较快	6.63±0.17 b	0.43±0.01 b	3.05±0.16 a

表中不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著

Different lowercase letters in table indicated significant differences at 0.05 level

### 3.3 外源物质对牛樟芝生长情况的影响

**3.3.1 不同植物激素对牛樟芝生长及粗多糖、粗三萜的影响** 不同植物激素对牛樟芝菌丝体的生长影响不同,较其他激素而言,GA<sub>3</sub>对牛樟芝生长促进作用最明显。各激素对牛樟芝菌丝体生长的影响随着浓度的增加呈现低浓度促进,高浓度抑制的现象,IBA和6-KT质量浓度为1.0 mg/L时牛樟芝菌丝体生长较快,GA<sub>3</sub>和EBR质量浓度为3.0 mg/L时牛樟芝菌丝体生长较快,整体来说植物激素对牛樟芝菌丝体生长的促进作用不强。比较各组菌丝体干质量发现添加植物激素可明显提高牛樟芝菌丝体产量,其中提升作用最强

的组别为添加 IBA 0.5 mg/L, 该组菌丝体干质量较对照组增加了 89.51% (表 3)。

比较各组菌丝体粗多糖含量及产量发现,添加 IBA 对提升菌丝体粗多糖含量作用最明显,GA<sub>3</sub>、6-KT 在达到一定质量浓度时对其有促进作用,EBR 对此无影响。就 IBA 而言,当其添加质量浓度为 1.0 mg/L 时菌丝体粗多糖含量最高,为 0.62%,但当其添加质量浓度为 0.5 mg/L 时,菌丝体粗多糖产量较对照组提升了 130.57%,远高于其他组别。GA<sub>3</sub>、6-KT 在添加质量浓度为 1.5 mg/L 时,菌丝体粗多糖产量较高(表 3)。

表 3 添加不同植物激素培养基上牛樟芝生长情况及粗多糖、粗三萜含量及产量

Table 3 Growth condition of *A. cinnamomea* and content and yield of crude polysaccharide and crude triterpenoids on media with different plant hormones

激素/(mg·L <sup>-1</sup> )	生长直径/cm	干质量/(g·L <sup>-1</sup> )	粗多糖/%	粗多糖产量/(mg·L <sup>-1</sup> )	粗三萜/%	粗三萜产量/(mg·L <sup>-1</sup> )	
IBA	0.0	6.63±0.17 aA	1.43±0.02 cC	0.43±0.01 cA	6.15±0.07 cdC	3.05±0.16 dB	43.53±2.28 dD
	0.5	6.26±0.51 abB	2.71±0.14 aA	0.52±0.07 bA	14.18±1.96 aA	4.92±0.14 aA	133.24±3.85 aA
	1.0	6.30±0.59 abB	1.86±0.22 bA	0.62±0.07 aA	11.53±1.26 bA	3.41±0.05 cA	63.51±0.83 cA
	1.5	5.93±0.72 bB	2.08±0.01 bA	0.51±0.02 bA	10.63±0.44 bA	2.84±0.22 dA	59.02±4.46 cA
	3.0	6.11±0.50 bB	2.01±0.10 bA	0.27±0.01 dA	5.48±0.17 dA	3.99±0.23 bA	80.14±4.55 bA
	5.0	5.91±0.70 bB	1.87±0.29 bA	0.33±0.01 dA	6.24±0.20 cA	3.96±0.19 bA	74.14±3.59 bA
GA <sub>3</sub>	0.0	6.63±0.17 abA	1.43±0.02 bC	0.43±0.01 bA	6.15±0.07 bcC	3.05±0.16 bB	43.53±2.28 cD
	0.5	6.42±0.55 bcA	2.14±0.37 aA	0.32±0.02 cAB	6.92±0.35 bB	2.71±0.10 bcdB	57.98±2.20 bB
	1.0	6.28±0.34 cA	1.88±0.12 abA	0.21±0.02 dAB	3.92±0.28 dB	4.32±0.26 aB	81.20±4.95 aB
	1.5	6.46±0.48 bcA	2.25±0.26 aA	0.46±0.04abAB	10.33±0.95 aB	2.46±0.17 cdB	55.27±3.80 bB
	3.0	6.78±0.11 aA	1.92±0.15 abA	0.28±0.01 cAB	5.45±0.19 cB	2.31±0.38 dB	44.40±7.35 cB
	5.0	6.28±0.32 cA	2.07±0.09 aA	0.48±0.04 aAB	9.98±0.86 aB	2.75±0.15 bcB	56.72±3.09 bB
6-KT	0.0	6.63±0.17 aA	1.43±0.02 bC	0.43±0.01 bA	6.15±0.07 cC	3.05±0.16 bB	43.53±2.28 dD
	0.5	6.15±0.73 bcB	2.03±0.06 aAB	0.42±0.03 bAB	8.63±0.54 aBC	3.51±0.05 aB	71.33±1.04 aC
	1.0	6.37±0.50 abB	2.05±0.07 aAB	0.25±0.01 dAB	5.16±0.06 dBC	2.29±0.15 cB	46.96±3.01 dC
	1.5	6.15±0.21 bcB	1.88±0.17 aAB	0.46±0.01 aAB	8.71±0.21 aBC	3.05±0.17 bB	57.29±3.18 bC
	3.0	6.05±0.19 cB	1.91±0.13 aAB	0.38±0.03 cAB	7.22±0.48 bBC	2.36±0.11 cB	45.10±2.18 dC
	5.0	5.67±0.58 dB	1.84±0.05 aAB	0.22±0.01 eAB	3.99±0.25 eBC	2.84±0.09 bB	52.35±1.63 cC
EBR	0.0	6.63±0.17 aA	1.43±0.02 aC	0.43±0.01 aA	6.15±0.07 bC	3.05±0.16 aB	43.53±2.28 abD
	0.5	5.98±0.16 cB	1.94±0.03 aB	0.20±0.04 cC	3.81±0.70 cD	2.68±0.42 aB	52.06±8.11 aD
	1.0	5.89±0.32 cB	1.78±0.20 aB	0.40±0.02 aC	7.16±0.38 aD	2.17±0.24 bB	38.51±4.18 bD
	1.5	6.18±0.30 bcB	1.77±0.10 aB	0.25±0.03 bC	4.48±0.52 cD	1.97±0.22 bB	34.88±3.91 bD
	3.0	6.21±0.40 bB	1.58±0.30 aB	0.27±0.03 bC	4.32±0.42 cD	3.13±0.29 aB	49.55±4.51 aD
	5.0	6.10±0.32 bcB	1.61±0.44 aB	0.26±0.01 bC	4.19±0.07 cD	2.71±0.25 aB	43.60±4.07 abD

以添加物质的种类分组,小写字母表示以各添加物质不同质量浓度为变量比较组内的显著性差异,大写字母表示以不同添加物质为变量比较组间的显著性差异;不同字母表示两处理组之间存在显著性差异(P<0.05),下同

Grouped by type of added substances, lowercase letters indicated the significant differences in groups with different concentrations of each additive, and uppercase letters indicated significant differences between groups with different added substances as variables; different letters in table indicated there was significant differences between two treatment groups (P<0.05), same as below

由结果可知, 添加 IBA 可明显提升菌丝体粗三萜含量及产量, 当其质量浓度为 0.5 mg/L 时粗三萜含量较对照组提高了 61.31%, 粗三萜产量达到 133.24 mg/L。添加 GA<sub>3</sub> 和 6-KT 虽对菌丝体粗三萜含量的提升作用较弱, 但因其可增加菌丝体产量, 综合来说二者均可提高菌丝体粗三萜产量, 而 EBR 对此影响较小。

**3.3.2 木质素及牛樟树粉末对牛樟芝生长及粗多糖、粗三萜的影响** 添加木质素可明显促进牛樟芝菌丝体生长, 牛樟树粉末对菌丝体生长也有一定的促进作用。木质素质量浓度为 0.5 g/L 时, 菌丝层直径为对照组的 1.19 倍, 牛樟树粉末质量浓度为 5.0 g/L 时, 菌丝层直径为对照组的 1.14 倍。随着浓度增加, 木质素对菌丝体生长表现出抑制作用, 而牛樟树粉末组的菌丝体生长直径随着质量浓度的增加而增大, 添加低质量浓度的木质素其生长直

径大于添加高浓度的牛樟树粉末。在菌丝体干质量方面, 木质素及牛樟树粉末均可提高菌丝体产量, 且牛樟树粉末对菌丝体干质量的影响较大, 当牛樟树粉末质量浓度为 5.0 g/L 时, 菌丝体干质量较对照组增加了 48.41% (表 4)。

比较不同组别菌丝体粗多糖、粗三萜含量及产量发现, 添加木质素对牛樟芝菌丝体粗多糖含量及产量提升有一定作用, 而对粗三萜无影响, 相反, 添加牛樟树粉末对牛樟芝菌丝体粗三萜含量及产量提升作用明显, 而对粗多糖无影响。当木质素质量浓度为 3.0 g/L 时, 菌丝体粗多糖含量较对照组提升了 27.90%, 产量为对照组的 1.44 倍。牛樟树粉末质量浓度为 0.5 g/L 时, 菌丝体粗三萜含量为 5.62%, 较对照组提升了 84.26%, 其产量为 98.87 mg/L (表 4)。

表 4 添加木质素及牛樟树粉末培养基上牛樟芝生长情况及粗多糖、粗三萜含量及产量

Table 4 Growth condition of *A. cinnamomea* and content and yield of crude polysaccharide and crude triterpenoids on medium with lignin and powder of *Cinnamomum kanehirai*

处理 $\rho$ /(g·L <sup>-1</sup> )	生长直径/cm	干质量/(g·L <sup>-1</sup> )	粗多糖/%	粗多糖产量/(mg·L <sup>-1</sup> )	粗三萜/%	粗三萜产量/(mg·L <sup>-1</sup> )	
木质素	0.0	6.63±0.17 cB	1.43±0.02 bC	0.43±0.01 cA	6.15±0.07 cB	3.05±0.16 aB	43.53±2.28 abB
	0.5	7.90±0.42 aA	1.78±0.09 aB	0.34±0.02 dA	5.95±0.41 cA	2.37±0.17 abB	42.14±3.07 abB
	1.0	7.06±0.66 bA	1.58±0.14 abB	0.49±0.01 bA	7.71±0.19 bA	2.84±0.98 abB	44.95±15.54 abB
	1.5	7.07±0.27 bA	1.68±0.17 abB	0.46±0.02 bcA	7.72±0.48 bA	2.98±0.31 abB	49.97±5.19 aB
	3.0	6.77±0.38 cA	1.60±0.10 abB	0.55±0.02 aA	8.85±0.33 aA	2.14±0.17 bB	34.31±2.78 bB
	5.0	6.52±0.29 cA	1.66±0.09 abB	0.37±0.02 dA	6.09±0.40 cA	2.99±0.11 abB	49.62±1.87 aB
牛樟树粉末	0.0	6.63±0.17 bB	1.43±0.02 cC	0.43±0.01 aA	6.15±0.07 abB	3.05±0.16 cB	43.53±2.28 cB
	0.5	6.09±0.35 cB	1.76±0.06 bA	0.29±0.01 bB	5.08±0.20 cB	5.62±0.18 aA	98.87±3.16 aA
	1.0	6.81±0.50 abB	1.76±0.23 bA	0.31±0.06 bB	5.41±1.13 bcB	4.63±0.58 bA	81.42±10.11 bA
	1.5	6.55±0.25 bB	1.98±0.08 abA	0.29±0.01 bB	5.67±0.26 abcB	4.28±0.40 bA	84.79±8.02 bA
	3.0	6.86±0.43 abB	1.99±0.10 abA	0.29±0.01 bB	5.74±0.20 abcB	4.42±0.21 bA	87.88±4.13 bA
	5.0	7.58±0.34 aB	2.12±0.06 aA	0.31±0.03 bB	6.52±0.58 aB	4.04±0.05 bA	85.56±1.03 bA

**3.4 培养产物抗氧化活性比较结果**

**3.4.1 添加不同植物激素培养基上牛樟芝菌丝体的抗氧化活性** 实验结果表明, 添加植物激素对提升菌丝体清除 DPPH 自由基的能力有一定作用, 而对 ABTS 自由基的作用较弱。与对照组相比, IBA 对提升菌丝体抗氧化能力的作用较强, 当 IBA 添加量为 1.0 mg/L 时, 菌丝体对 DPPH 自由基的 IC<sub>50</sub> 为 2.51 mg/mL。整体来说, 添加植物激素对牛樟芝菌丝体的抗氧化活性影响不大 (表 5)。

**3.4.2 添加木质素及牛樟树粉末培养基上牛樟芝菌丝体的抗氧化活性** 比较发现, 木质素及牛樟树

粉末在提升菌丝体对 ABTS 自由基的清除能力方面均表现出较好的作用, 但在对 DPPH 自由基清除能力的提升方面作用较弱。随着添加浓度的增加, 木质素对菌丝体抗氧化作用的影响不断增强, 而牛樟树粉末对菌丝体抗氧化作用的影响逐渐减弱。总体来说, 木质素及牛樟树粉末对提升菌丝体抗氧化性有一定作用 (表 6)。

**4 讨论**

本研究采用皿式培养法培育牛樟芝, 探究了植物激素及木质素对牛樟芝菌丝体生长情况的影响。实验发现接种原料活化时间及取样位置对菌丝生

表 5 添加植物激素培养基培养产物对不同自由基的清除能力

Table 5 Scavenging ability of different culture products for different free radicals on media with different plant hormones

激素/(mg·L <sup>-1</sup> )	IC <sub>50</sub> /(mg·mL <sup>-1</sup> )		
	DPPH	ABTS	
IBA	0.0	3.64±0.13 aA	7.04±0.19 aA
	0.5	2.72±0.01 dC	6.49±1.04 aA
	1.0	2.51±0.03 eC	6.25±0.76 aA
	1.5	2.52±0.02 eC	6.96±1.04 aA
	3.0	3.08±0.06 cC	7.53±1.37 aA
	5.0	3.31±0.03 bC	6.85±0.13 baA
GA <sub>3</sub>	0.0	3.64±0.13 aA	7.04±0.19 bA
	0.5	3.50±0.05 bBC	6.39±0.30 bA
	1.0	2.96±0.03 dBC	5.56±0.14 bA
	1.5	2.75±0.02 eBC	5.54±0.19 bA
	3.0	3.09±0.03 cBC	6.88±0.04 bA
	5.0	2.79±0.10 eBC	8.77±2.07 aA
6-KT	0.0	3.64±0.13 bA	7.04±0.19 cA
	0.5	2.84±0.01 cAB	7.69±0.83 bcA
	1.0	2.82±0.08 cAB	10.29±1.23 aA
	1.5	3.00±0.05 cAB	6.51±0.39 cA
	3.0	4.02±0.73 abAB	8.48±0.27 bA
	5.0	4.32±0.03 aAB	5.30±0.31 dA
EBR	0.0	3.64±0.13 aA	7.04±0.19 aA
	0.5	3.26±0.03 cAB	3.88±0.15 cA
	1.0	3.48±0.03 bAB	6.51±1.00 abA
	1.5	3.40±0.11 bcAB	5.98±0.59 bA
	3.0	3.31±0.06 cAB	7.18±0.27 aA
	5.0	3.29±0.02 cAB	7.26±0.14 aA

表 6 添加木质素及牛樟树粉末培养基培养产物对不同自由基的清除能力

Table 6 Scavenging ability of different culture products for different free radicals on medium with lignin and powder of *Cinnamomum kanehirai*

处理 ρ/(g·L <sup>-1</sup> )	IC <sub>50</sub> /(mg·mL <sup>-1</sup> )		
	DPPH	ABTS	
木质素	0.0	3.64±0.13 bA	7.04±0.19 aA
	0.5	4.04±0.06 aA	5.88±0.41 bB
	1.0	3.71±0.08 bA	5.02±0.16 cB
	1.5	3.60±0.06 bA	5.08±0.32 cB
	3.0	3.35±0.03 cA	4.90±0.10 cB
	5.0	3.31±0.06 cA	4.11±0.28 dB
牛樟树粉末	0.0	3.64±0.13 cA	7.04±0.19 aA
	0.5	3.02±0.01 dA	3.92±0.10 cB
	1.0	3.50±0.06 cA	5.60±0.20 bB
	1.5	3.57±0.03 cA	5.27±0.17 bB
	3.0	3.97±0.05 bA	5.44±0.23 bB
	5.0	4.16±0.13 aA	5.58±0.18 bB

长活力有一定影响，因此筛选了牛樟芝接种原料生长活力较好的活化方法，之后在牛樟芝长势较好的改良 PCA 培养基中添加不同物质，分别从生长情况、活性成分含量和抗氧化活性 3 个方面考察了不同外源物质对牛樟芝菌丝体的影响。实验结果表明植物激素及木质素能促进牛樟芝菌丝体生长、提高菌丝体产量及活性成分含量，同时对牛樟芝菌丝体的抗氧化能力提升也有一定作用。所有添加物中，木质素对菌丝体生长的促进作用最强，生长素 (IBA) 在有效提高菌丝体产量的同时，对菌丝体粗多糖、粗三萜的含量及产量表现出显著的提升作用。除此之外，添加牛樟树粉末也可明显提高牛樟芝菌丝体粗三萜含量及产量。在抗氧化能力方面，添加不同外源物质对提升菌丝体抗氧化活性有一定作用。

实验筛选出对牛樟芝菌丝体生长有利的外源添加物质，但仍存在一些问题需要改进。总体来说，在实验中，不同质量浓度的添加物质对牛樟芝菌丝体某方面的影响有时表现出的量效关系较差，在低浓度范围时呈规律变化而高浓度时变化未成规律，这可能由于本实验选用的浓度梯度跨度较大，后续将继续对激素使用的浓度梯度进行细分，让激素的影响作用更准确。另外，添加木质素对牛樟芝生长促进作用明显，可有效提升菌丝体粗多糖产量，但对粗三萜产量影响较弱，而添加牛樟树粉末在促进菌丝体生长的同时还可明显提升菌丝体粗三萜产量，由此推测在牛樟树木屑中，木质素可能发挥出更多的促进菌丝体生长的作用，而牛樟树粉末中促进三萜类物质产生的成分还需更深入的研究。最后，筛选出对牛樟芝生长有利的激素与其他物质的配比使用及其培养产物的药理活性仍有待进一步探究。

参考文献

[1] 臧 穆, 苏庆华. 我国台湾产灵芝属一新种: 樟芝 [J]. 云南植物研究, 1990, 12(4): 395-396.  
 [2] Cheng I H, Chiang H C, Cheng M C, et al. Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea* [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58(3): 365-371.  
 [3] Cheng I H, Wu D P, Chiang H C. Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(1): 263-267.  
 [4] Nakamura N, Hirakawa A, Gao J J, et al. Five new maleic and succinic acid derivatives from the mycelium of *Antrodia camphorata* and their cytotoxic effects on LLC tumor cell line [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(1): 46-48.

- [5] Meng L M, Pai M H, Liu J J, *et al.* Polysaccharides from extracts of *Antrodia camphorata* mycelia and fruiting bodies modulate inflammatory mediator expression in mice with polymicrobial sepsis [J]. *Nutrition*, 2012, 28(9): 942-944.
- [6] Song T Y, Yen G C. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged cultures [J]. *J Agri Food Chem*, 2002, 50(11): 3322-3327.
- [7] Huang T T, Wu S P, Chong K Y, *et al.* The medicinal fungus *Antrodia cinnamomea*, suppresses inflammation by inhibiting the NLRP3 inflammasome [J]. *J Ethnopharm*, 2014, 155(1): 154-164.
- [8] Hsu Y L, Kuo P L, Cho C Y, *et al.* *Antrodia cinnamomea* fruiting bodies extract suppresses the invasive potential of human liver cancer cell line PLC/PRF/5 through inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(7): 1249-1257.
- [9] Hsiao G, Shen M Y, Lin K H, *et al.* Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(11): 3302-3308.
- [10] Kuo M C, Chang C Y, Cheng T L, *et al.* Immunomodulatory effect of *Antrodia camphorate* mycelia and culture filtrate [J]. *J Ethnopharm*, 2008, 120(2): 196-203.
- [11] 李晶, 林雄杰, 王泽辉, 等. 牛樟芝鲨烯环氧酶基因的克隆、生物信息学及表达分析 [J]. *中草药*, 2018, 49(10): 2440-2446.
- [12] Yang F C, Ma T W, Chuang Y T, *et al.* Medium modification to enhance the formation of bioactive metabolites in shake flask cultures of *Antrodia cinnamomea* by adding citrus peel extract [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2012, 35(8): 1251-1258.
- [13] Hu Y D, Lu R Q, Liao X R, *et al.* Stimulating the biosynthesis of antroquinonol by addition of effectors and soybean oil in submerged fermentation of *Antrodia camphorata* [J]. *Biot Appl Bioch*, 2016, 63(3): 398-406.
- [14] Ma T W, Lai Y, Chen L T, *et al.* The cultivation strategy of enhancing triterpenoid production in submerged cultures of *Antrodia cinnamomea* by adding monoterpenes [J]. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 2016, 58(1): 210-218.
- [15] 张知晓, 季梅, 泽桑梓. 牛樟芝培养技术的研究进展 [J]. *热带农业科学*, 2015, 35(3): 94-99.
- [16] Lin T Y, Chen C Y, Chien S C, *et al.* Metabolite profiles for *Antrodia cinnamomea* fruiting bodies harvested at different culture ages and from different wood substrates [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(14): 7626-7635.
- [17] Shen Y C, Chou C J, Wang Y H, *et al.* Anti-inflammatory activity of the extracts from mycelia of *Antrodia camphorata* cultured with water-soluble fractions from five different *Cinnamomum* species [J]. *FEMS Micro Lett*, 2004, 231(1): 137-143.
- [18] 裴海生, 孙君社, 王民敬, 等. 木质素对灵芝菌丝体生长的影响 [J]. *农业工程学报*, 2017, 33(6): 309-314.
- [19] 钟志敏, 赖小平, 黄松, 等. 石斛内生炭角菌 DNA 提取方法优化及分子鉴定 [J]. *菌物学报*, 2018, 37(1): 73-78.
- [20] 郭金龙, 陈有君, 孙国琴, 等. 苯酚-硫酸法测定杏鲍菇多糖方法的研究 [J]. *食品科学*, 2008, 29(12): 555-558.
- [21] 吕莎, 张梦雅, 罗晓云, 等. 星点设计-效应面法优化牛樟芝总三萜提取工艺及其抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(22): 3990-3996.
- [22] Qiu J, Wang X, Song C. Neuroprotective and antioxidant lanostanoid triterpenes from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum* [J]. *Fitoterapia*, 2016, 109(1): 75-79.
- [23] Singh P, Singh R, Sati N, *et al.* Antioxidant and antibacterial activity of *Jurineadolomiaea boiss* extract [J]. *Inter J Life Sci Res*, 2015, 1(2): 74-78.