

# 蜜环菌液体培养基配方优选及其活性成分和 抗氧化活性研究

李昕阳<sup>1</sup>, 王淑敏<sup>1</sup>, 冷悦<sup>1</sup>, 陆珠<sup>2</sup>, 王旭<sup>3</sup>, 王欢<sup>1\*</sup>, 陈长宝<sup>1\*</sup>

(1. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 长春 130000; 2. 吉林省蔬菜花卉科学研究院, 长春 130000;  
3. 延边朝鲜族自治州农业科学院, 龙井 133400)

**摘 要:** **目的** 从 4 种蜜环菌液体培养基配方中筛选出最佳液体培养基配方, 并测量其菌丝提取物和发酵液提取物的活性成分含量及抗氧化活性。**方法** 采用目前 4 种较常用的液体培养基配方在相同温度、转速、时间条件下对蜜环菌进行液体发酵, 制备菌丝提取物和发酵液提取物, 通过紫外分光光度法测量其主要活性成分含量和抗氧化活性。**结果** 4 种配方菌丝生物量、生物活性物质含量及抗氧化能力差异显著。其中配方 1 菌丝生物量最高, 为 1.21 g/L, 显著高于其余 3 种配方( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ )。4 种配方菌丝提取物总黄酮、总三萜、总酚含量差异显著, 均为配方 2 最高且显著高于子实体( $P<0.001$ ,  $P<0.01$ ); 发酵液提取物主要活性物质含量, 配方 4 总黄酮和总酚含量最高, 配方 2 总三萜含量最高, 均显著高于子实体( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ )。抗氧化能力方面, 配方 1 菌丝提取物·OH 清除率及总还原力最高; 配方 4 发酵液提取物总还原能力表现最佳, 且抗氧化能力表现更为稳定。**结论** 针对不同目标产物筛选出了具体的最佳蜜环菌液体培养基配方, 对后续蜜环菌的研究提供参考文献意义, 也为今后蜜环菌的开发利用奠定基础。

**关键词:** 蜜环菌; 液体深层发酵; 菌丝生物量; 活性成分; 抗氧化活性

## Study on the optimal liquid medium formulation of *Armillaria mellea* and its active ingredients and antioxidant capacity

LI Xin-Yang<sup>1</sup>, WANG Shu-Min<sup>1</sup>, LENG Yue<sup>1</sup>, LU Zhu<sup>2</sup>, WANG Xu<sup>3</sup>,  
WANG Huan<sup>1\*</sup>, CHEN Chang-Bao<sup>1\*</sup>

(1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130000, China; 2. Jilin Academy of Vegetable and Flower Science, Changchun 130000, China; 3. Yanbian Korean Autonomous Prefecture Academy of Agricultural Sciences, Longjing 133400, China)

**ABSTRACT: Objective** To select the optimal liquid medium formulation from 4 kinds of liquid medium

**基金项目:** 吉林省科技发展规划项目(YDZJ202301ZYTS509)、吉林省中医药科技项目(2023009)、长春中医药大学“杏林学者工程”青年科学家项目培养计划项目(QNKXJ2-2021ZR03)

**Fund:** Supported by the Science and Technology Development Plan Project of Jilin Province, China (YDZJ202301ZYTS509), the Jilin Province Traditional Chinese Medicine Technology Project (2023009), and the Changchun University of Chinese Medicine “Xinglin Scholar Project” Youth Scientist Program Training Plan, China (QNKXJ2-2021ZR03)

**\*通信作者:** 王欢, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为食药菌资源开发与利用。E-mail: wanghuanmyco@163.com

陈长宝, 博士, 教授, 主要研究方向为药用植物资源学研究。E-mail: ccb2021@126.com

**\*Corresponding author:** WANG Huan, Ph.D, Assistant Professor, Jilin Ginseng Academy of Changchun University of Chinese Medicine, No.1035, Boshuo Road, Nanguan District, Changchun 130000, China. E-mail: wanghuanmyco@163.com

CHEN Chang-Bao, Ph.D, Professor, Jilin Ginseng Academy of Changchun University of Chinese Medicine, No.1035, Boshuo Road, Nanguan District, Changchun 130000, China. E-mail: ccb2021@126.com

formulations of *Armillaria mellea*, and measure the content of active components and antioxidant activity of mycelium extract and fermentation broth extract. **Methods** Four kinds of commonly utilized liquid culture medium formulations for *Armillaria mellea* were employed under identical temperature, speed, and time conditions to prepare mycelium extracts and fermentation broth extracts. The quantification of the main active ingredient content and antioxidant activity was conducted using ultraviolet spectrophotometry. **Results** There were notable variations observed in the mycelium biomass, bioactive substance content, and antioxidant capacity among the 4 kinds of formulations. Specifically, formula 1 exhibited the highest mycelial biomass at 1.21 g/L, which was significantly greater than the biomass of the remaining 3 kinds of formulas ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ). Moreover, significant disparities were observed in the total flavonoids, total triterpenes, and total phenols content among the mycelium extracts of 4 kinds of formulations. Formula 2 displayed the highest content, which was significantly higher than that of the fruiting body ( $P<0.001$ ,  $P<0.01$ ). The content of main active substances in fermentation broth extract, formula 4 had the highest content of total flavonoids and total phenols, and formula 2 had the highest content of total triterpenes, which were significantly higher than those in fruiting body ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ). Regarding antioxidant activity, the mycelium extract of formula 1 displayed the highest  $\cdot\text{OH}$  scavenging rate and total reducing capacity. Notably, the extract derived from the fermentation broth of formula 4 exhibited superior total reducing capacity and demonstrated a more stable antioxidant capacity. **Conclusion** According to different target products, the best liquid culture medium formula of *Armillaria mellea* has been screened out, which provides references for the subsequent research of *Armillaria mellea* and lays the foundation for the development and utilization of *Armillaria mellea* in the future.

**KEY WORDS:** *Armillaria mellea*; liquid submerged fermentation; mycelial biomass; active ingredient; antioxidant activity

## 0 引 言

蜜环菌(*Armillaria mellea*), 真菌界(Eumycetes)、担子菌亚门(Basidiomycota)、伞菌纲(Agaricomycetes)、伞菌目(Agaricales)、白蘑科(Tricholomataceae)、蜜环菌属(*Armillaria*)<sup>[1]</sup>。野生蜜环菌常见于夏秋两季<sup>[2]</sup>, 以营腐生和营寄生为主<sup>[3]</sup>, 具有抗痉挛、镇静、扩张血管、降血压等多种药理作用<sup>[4]</sup>, 是我国珍贵的药食两用型真菌。除此之外还是我国名贵中药材兰科植物天麻(*Gastrodia elata*)和猪苓的共生真菌<sup>[5]</sup>, 有着极高的药用价值<sup>[6-7]</sup>。

相比于固体发酵, 液体发酵具有工艺简单、发酵周期短、成本低等优点<sup>[8]</sup>, 且液体发酵技术已应用于灵芝、猴头菇、杏鲍菇等食用菌<sup>[9]</sup>。目前, 虽有大量关于蜜环菌液体培养技术的研究<sup>[2,10-11]</sup>, 但大部分研究聚焦于碳源和氮源的选择和搭配, 由于菌株不同、目标产物不同, 研究结果的普适性并不高。ERBIAI 等<sup>[12]</sup>研究结果显示, 蜜环菌的生长发育主要受其生理生化等因素的影响; LAI 等<sup>[13]</sup>通过蜜环菌菌索纯培养实验, 证明了营养源是蜜环菌菌索产生的关键, 可以看出适宜的培养基配方对蜜环菌的培养意义重大。因此本研究在对相关文献进行总结比较的基础上, 发现目前关于蜜环菌液体发酵的大部分研究均以菌丝生物量和多糖含量作为最佳培养基的筛选指标, 刘景圣<sup>[14]</sup>优化后的培养基菌丝体生物量比优化前提高了 18.30%; 罗

智文<sup>[2]</sup>优化后蜜环菌菌丝体干重可达 23.63 g/L, 在同类研究中属于较高水平; 肖前青<sup>[15]</sup>筛选得到的培养基蜜环菌多糖得率可达 13.55%; 张颖等<sup>[16]</sup>优化后得到的菌丝体粗多糖含量高于人工栽培十倍以上; 焦迎春等<sup>[17]</sup>、周劲松等<sup>[18]</sup>则对培养基中微量元素对菌丝体生长的影响进行了研究。综上, 本研究选择刘景圣<sup>[14]</sup>、罗智文<sup>[2]</sup>、肖前青<sup>[15]</sup>、焦迎春等<sup>[17]</sup>、周劲松等<sup>[18]</sup>所使用的 4 种最佳液体培养基配方, 并以菌丝生物量、总黄酮、总酚及总三萜含量为考察指标, 对比筛选出蜜环菌长势最好、菌丝生物量最多, 且活性成分含量最高、抗氧化活性最强的最佳液体培养基配方, 为蜜环菌深层液体发酵技术的研究提供借鉴意义和参考价值, 推动蜜环菌扩大生产并提高其利用价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

蜜环菌(*Armillaria mellea*)菌种, 由中科院昆明植物研究所杨祝良研究员和郭婷博士赠予; 土豆、黄豆、燕麦、蚕蛹均购自供销粮油吉林有限公司。

芦丁、没食子酸(纯度 $\geq 98\%$ , 上海宝曼生物科技有限公司); 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol, BHT)、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt, ABTS]、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼

(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、2,4,6-三吡啶基三嗪、水杨酸、过氧化氢(分析纯,上海广锐生物科技有限公司);三氯化铁、硝酸铝、氢氧化钠、95%乙醇(分析纯,天津市光复科技发展有限公司);葡萄糖、七水硫酸镁、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾(分析纯)、酵母粉、琼脂粉、蛋白胨、蔗糖、维生素 B<sub>1</sub> (vitamin B<sub>1</sub>, VB<sub>1</sub>)(生化试剂)(国药集团化学试剂有限公司);香草醛、冰醋酸、甲醇、高氯酸、乙酸乙酯、无水乙醇、盐酸、硫酸亚铁、过硫酸钾、乙酸铵(分析纯,北京化工厂)。

## 1.2 仪器与设备

SLI-700 型恒温培养箱(上海爱朗仪器有限公司); YXQ-LS-50A 型压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司); EYELA-NVC2200 旋转蒸发仪(日本东京理化器械株式会社); SW-CJ-2F 型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); BT 25s 电子分析天平[50e, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; M200 Pro 多功能酶标仪[帝肯(上海)实验器材有限公司]; HH-8 数显恒温水浴锅(常州智博瑞仪器制造有限公司); DHZ-DA 大容量全温振荡器(常州金坛精达仪器制造有限公司); Thermo Scientific MicroCL 21R(美国赛默飞世尔科技公司); SHZ-DIII 循环水式真空泵(上海达丰玻璃仪器厂); DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 培养基

母种培养基配方: 土豆 100 g, 葡萄糖 20 g, 酵母粉 5 g, 七水硫酸镁 1.5 g, 磷酸二氢钾 3 g, 琼脂 18 g, 水 1000 mL。

一级发酵液配方: 葡萄糖 20 g, 酵母粉 5 g, 七水硫酸镁 1.5 g, 磷酸二氢钾 3 g, VB<sub>1</sub> 10 mg。

液体发酵培养基配方: 配方 1<sup>[14]</sup>: 葡萄糖 20 g, 蚕蛹粉 20 g, 土豆 200 g, 七水硫酸镁 1.5 g, 磷酸二氢钾 3 g, VB<sub>1</sub> 10 mg, 自然 pH; 配方 2<sup>[15]</sup>: 葡萄糖 10 g, 燕麦粉 10 g, 蛋白胨 1 g, 酵母粉 1 g, 自然 pH; 配方 3<sup>[2,16]</sup>: 葡萄糖 12 g, 黄豆 12 g, 蔗糖 24 g, 蚕蛹粉 6 g, 七水硫酸镁 0.9 g, 磷酸二氢钾 1.8 g, 自然 pH; 配方 4<sup>[17-18]</sup>: 葡萄糖 15 g, 酵母粉 5 g, 七水硫酸镁 0.3 g, 磷酸二氢钾 1 g, 磷酸氢二钾 0.5 g, VB<sub>1</sub> 10 mg, 自然 pH。

### 1.3.2 菌种培养

母种培养: 菌种于无菌条件下转接至马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基中, 后放置于 26℃恒温箱中黑暗避光环境培养, 待蜜环菌菌索布满平板后取出;

一级菌种培养: 于无菌条件下选取母种平板中长有洁白粗壮菌索部分, 切成 1 cm×1 cm 方块, 接种于装有 600 mL 一级发酵液的三角瓶中, 160 r/min, 25℃±5℃条件下避光培养 15 d, 得到一级发酵液;

二级菌种培养: 在无菌条件下按 10%的接种量, 将一级发酵液摇匀后分别移取至 4 种液体培养基中, 160 r/min, 25℃±5℃条件下避光培养 15 d, 备用。

### 1.3.3 菌丝生物量的测定

4 种配方各取出 3 瓶, 摇匀后各取 100 mL, 经 300~400 目钢网过滤后用双蒸水冲洗 3~4 次直至冲净附着在菌丝上的发酵液, 收集置于玻璃皿中央 50℃烘干 24 h, 称重记录菌丝干重, 记为菌丝生物量。

### 1.3.4 样品处理

发酵液提取物, 收集过滤后的发酵液, 于 60 r/min, 65℃条件下旋蒸至膏状, 放入真空干燥箱 55℃下烘干 24 h, 作为样品待用;

菌丝提取物, 取各配方剩余发酵物按上述方法收集菌丝体, 加入 1.5 倍量 95%乙醇加热、回流、过滤, 收集澄清液, 于 60 r/min, 65℃条件下旋蒸至膏状, 后放入真空干燥箱 40℃下烘干 24 h 得到菌丝提取物;

子实体提取物, 将子实体于 40℃条件下烘干 12 h 至恒重, 用粉碎机将粉碎, 过 80 目筛, 在得到的子实体粉末中加入 3 倍量 95%乙醇按照相同方法进行提取烘干, 得到子实体提取物。

### 1.3.5 总黄酮含量的测定

根据文献[19]方法并稍作改动制得标准曲线。分别取 500 μL 菌丝、发酵液、子实体样品溶液, 加入 5%亚硝酸钠溶液 150 μL, 混匀后放置 6 min, 再加入 10%硝酸铝溶液 150 μL, 混匀后放置 6 min, 最后加入 4%氢氧化钠溶液 2 mL, 95%乙醇定容, 混匀后放置 15 min, 于 510 nm 波长处测定吸光度, 每个样品组进行 3 次平行测定。

### 1.3.6 总三萜含量的测定

参考文献[20]方法并稍作改动制得标准曲线。分别取菌丝、发酵液、子实体样品溶液 0.1 mL, 50℃烘箱中挥干乙醇, 静置至室温, 然后于各样品中依次加入 0.2 mL 50 mg/mL 香草醛冰醋酸溶液、0.8 mL 高氯酸溶液, 混匀, 70℃水浴 15 min, 取出后冰浴 5 min, 精密加入乙酸乙酯 4 mL, 混匀后于 548 nm 波长处测定吸光度, 每组设置 3 次平行测定。

### 1.3.7 总酚含量的测定

根据参考文献[21]中方法绘制标准曲线并进行检测。分别取 2 mg/mL 的菌丝、发酵液、子实体样品溶液进行测量, 提取物以样品溶液代替没食子酸标准品进行测量, 每个样品组进行 3 次平行测定。

### 1.3.8 DPPH·清除能力的测定

参考文献[22]方法绘制标准曲线并进行测定。取  $2 \times 10^{-4}$  mol/L 的 DPPH 溶液 2 mL 与质量浓度为 2 mg/mL 的菌丝、发酵液、子实体、BHT 样品溶液各 2 mL 加入反应管中, 室温下避光反应 30 min, 混匀后于波长 517 nm 波长处测定吸光度。每组进行 3 次平行测定。以 BHT 为阳性对照组, 以甲醇代替样品为空白组。按公式(1)计算 DPPH·清除率:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}/\%=(1-\frac{A_x-A_{x0}}{A_0})\times 100\% \quad (1)$$

公式中:  $A_x$  为样品吸光值,  $A_{x0}$  为显色剂本底吸光值,  $A_0$  为空白吸光值。

### 1.3.9 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的测定

参考文献[23]方法绘制标准曲线并进行测定。分别取精确配制质量浓度为 10 mg/mL 的菌丝、发酵液、子实体和 BHT 样品溶液 1 mL, 并依次加入 1.0 mL 9 mmol/L 硫酸亚铁溶液、1.0 mL 9 mmol/L 水杨酸溶液和 1.0 mL 9 mmol/L 的过氧化氢溶液混匀, 37°C 水浴 30 min, 于 510 nm 波长处测定吸光度, 每组进行 3 次平行测定, 按公式(2)计算  $\cdot\text{OH}$  清除率:

$$\cdot\text{OH}\text{清除率}/\%=(1-\frac{A_x-A_{x0}}{A_0})\times 100\% \quad (2)$$

公式(2)中:  $A_x$  为样品吸光值,  $A_{x0}$  为显色剂本底吸光值,  $A_0$  为空白吸光值。

### 1.3.10 $\text{ABTS}^+$ 清除能力的测定

按照文献[24]方法绘制标准曲线并进行测定。配制  $\text{ABTS}^+$  储备液: 精密移取 7 mmol/L 的  $\text{ABTS}^+$  溶液 2.5 mL, 与 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液 2.5 mL 混和均匀后, 在室温下避光放置 12 h, 于 734 nm 波长处测定吸光度, 得  $A_{734\text{ nm}}$  为  $0.70\pm 0.02$ , 即得  $\text{ABTS}^+$  储备液。分别取质量浓度为 1 mg/mL 的菌丝、发酵液、子实体和 BHT 样品溶液 0.2 mL 与  $\text{ABTS}^+$  储备液 2.0 mL 混匀, 振荡 30 s, 室温避光放置 6 min, 混匀后于 734 nm 波长处测定吸光度, 每组进行 3 次平行测定, 按公式(3)计算  $\text{ABTS}^+$  清除率:

$$\text{ABTS}^+\cdot\text{清除率}/\%=(1-\frac{A_x-A_{x0}}{A_0})\times 100\% \quad (3)$$

公式中:  $A_x$  为样品吸光值,  $A_{x0}$  为显色剂本底吸光值,  $A_0$  为空白吸光值。

### 1.3.11 总还原能力的测定

参考 SZAFRANSKA 等<sup>[25]</sup>的方法配制铁还原抗氧化能力(ferric reducing antioxidant power, FRAP)工作液: 取 0.3 mol/L 醋酸盐缓冲液(pH=3.5) 25.0 mL, 10 mmol/L 2,4,6-三吡啶基三嗪溶液 2.5 mL、20 mmol/L 氯化铁溶液 2.5 mL (10:1:1)混匀后 37°C 水浴 30 min, 配好备用。取质量浓度为 4 mg/mL 的样品溶液 0.3 mL, 加入 FRAP 工作液 3 mL, 混匀后 37°C 水浴 5 min, 于 592 nm 波长处测定吸光度。以无水乙醇为空白, 以硫酸亚铁为标准溶液, 根据反应后的吸光度值, 在标准曲线上求得硫酸亚铁浓度(mmol/L), 定义为 FRAP 值, FRAP 值越大, 抗氧化活性越强。

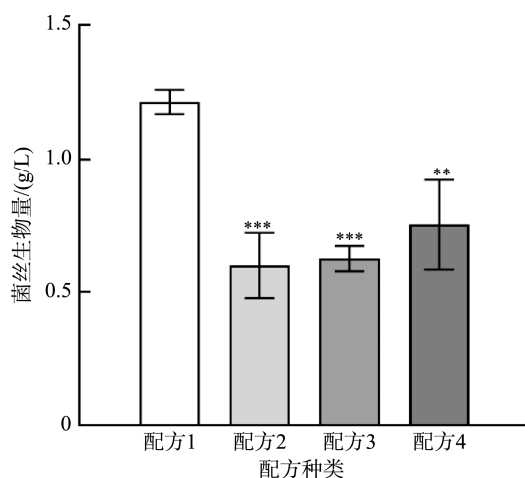
## 1.4 数据处理

实验数据用 Microsoft Excel 2019 软件进行整理, SPSS 25.0 软件对数据进行分析, 用 Graphpad Prism 8.4.8 进行制图,  $P<0.05$  表示差异具有显著性,  $P<0.01$  表示差异极显著,  $P<0.001$  表示差异具有高度统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 4 种配方下菌丝生物量的变化

在相同培养条件下, 蜜环菌于 4 种培养基配方得到的菌丝生物量差异显著。由图 1 可知, 配方 1 培养基所得蜜环菌菌丝生物量最多, 平均可达 1.21 g/L, 配方 2 培养基所得蜜环菌菌丝生物量最少, 平均为 0.60 g/L。比较两种配方可知, 配方 1 具有充足的碳源氮源, 且相较于配方 2, 配方 1 更添加微量元素和  $\text{VB}_1$ , 有利于蜜环菌生长。比较 4 种配方发现, 适量添加  $\text{VB}_1$  更有利于蜜环菌的生长。



注: 与配方1相比, \*\*表示  $P<0.01$ , \*\*\*表示  $P<0.001$ 。

图1 4种配方发酵所得菌丝生物量

Fig.1 Mycelial biomass obtained from the fermentation of 4 kinds of formulas

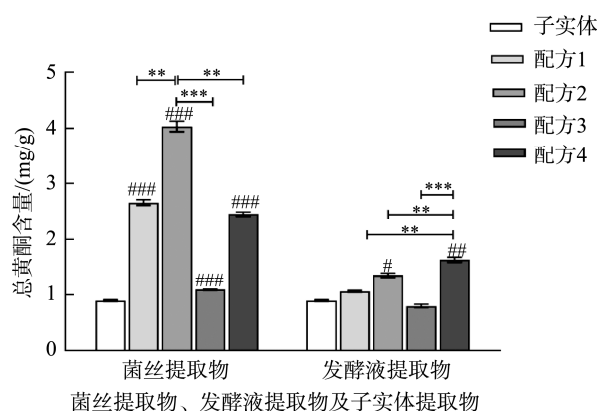
### 2.2 4 种配方菌丝提取物和发酵液提取物中总黄酮含量的变化

由图 2 可知, 配方 2 菌丝提取物总黄酮含量最高, 可达 4.03 mg/g, 显著高于其余 3 种配方( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ); 配方 4 发酵液提取物总黄酮含量最多, 为 1.63 mg/g, 与其余 3 种配方相比具有显著差异性( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ )。此外, 与子实体总黄酮含量相比, 配方 2 菌丝提取物中总黄酮含量提升了 352.24%, 差异极显著( $P<0.001$ ), 配方 4 发酵液提取物中黄酮含量提升了 83.33%, 差异性较显著( $P<0.01$ )。研究还发现, 菌丝体提取物黄酮含量显著高于发酵液提取物中的黄酮含量, 其中以配方 2 培养基表现最为突出; 此外, 菌丝体提取物和发酵液提取物的黄酮含量均高于子实体提取物, 说明经深层液体发酵后, 菌丝体中的黄酮含量显著增加。

### 2.3 4 种配方菌丝提取物和发酵液提取物中总三萜含量的变化

由图 3 可知, 配方 2 菌丝提取物和发酵液提取物的总三萜含量均为最高, 分别为 38.60 mg/g 和 35.93 mg/g, 且

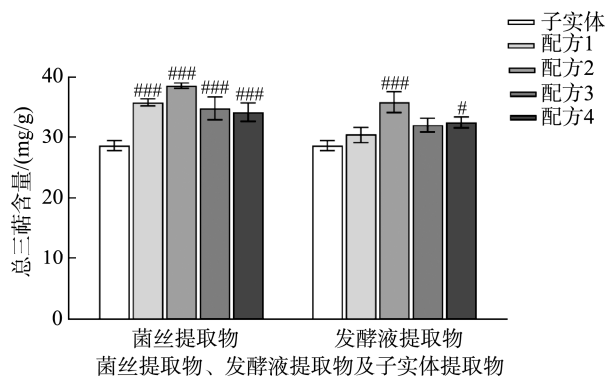
相较于子实体总三萜含量, 配方 2 菌丝提取物总三萜含量提高了 34.69%, 发酵液提取物总三萜含量提高了 25.38%, 均表现出极显著差异性( $P<0.001$ )。配方 4 菌丝提取物总三萜含量最低, 为 34.29 mg/g, 但仍显著高于子实体三萜含量( $P<0.001$ ); 配方 1 发酵液提取物总三萜含量最低, 为 30.46 mg/g, 仍高于子实体三萜含量。此外, 与总黄酮含量情况相同, 4 种配方均表现为菌丝提取物总三萜含量高于发酵液提取物总三萜含量, 且菌丝提取物和发酵液提取物总三萜含量均高于子实体总三萜含量, 说明深层液体发酵有利于三萜类物质的积累。



注: 4种配方相比, \*表示 $P<0.05$ , \*\*表示 $P<0.01$ , \*\*\*表示 $P<0.001$ ; 与子实体相比, ##表示 $P<0.01$ ; ###表示 $P<0.001$ , 下同。

图2 4种配方发酵所得菌丝提取物、发酵液提取物及子实体提取物总黄酮含量

Fig.2 Total flavonoid content of mycelium extract, fermentation broth extract and fruiting body extract obtained by fermentation with 4 kinds of formulas



注: 与子实体间相比, #表示 $P<0.05$ , 下同。

图3 4种配方发酵所得菌丝提取物、发酵液提取物及子实体总三萜含量

Fig.3 Total triterpenoid content of mycelium extract, fermentation broth extract and fruiting body extract obtained by fermentation with 4 kinds of formulas

## 2.4 4种配方菌丝提取物和发酵液提取物中总酚含量的变化

由图 4 可知, 配方 2 菌丝提取物总酚含量最高, 为

3.57 mg/g, 与其余 3 种配方相比差异性极显著( $P<0.001$ ), 此外, 4 种配方菌丝提取物的总酚含量均高于子实体总酚含量, 且均具有显著差异性( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ); 配方 4 发酵液提取物总酚含量最高, 可达 4.50 mg/g, 与其余 3 种配方相比差异性极显著( $P<0.001$ )。与子实体总酚含量相比, 配方 2 菌丝提取物总酚含量升高了 111.89%, 配方 4 发酵液提取物总酚含量升高了 166.42%, 均表现极显著差异性( $P<0.001$ )。此外, 配方 1 和配方 4 发酵液提取物总酚含量大于菌丝提取物总酚含量, 配方 2 和配方 3 则相反, 猜测可能与配方 1 和配方 4 中添加  $VB_1$  有关。此外深层液体发酵有利于菌丝提取物酚类物质的积累。

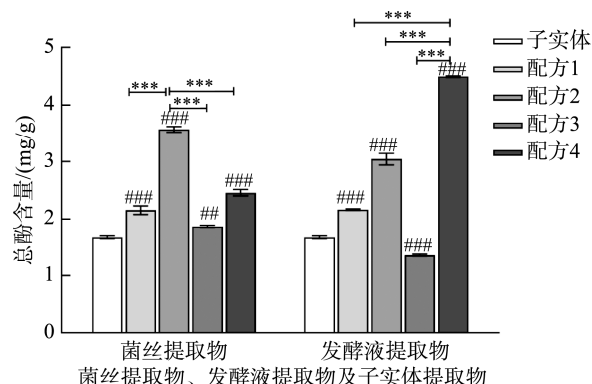


图4 4种配方发酵所得菌丝提取物、发酵液提取物及子实体提取物总酚含量

Fig.4 Total phenol content of mycelium extract, fermentation broth extract and fruiting body extract obtained by fermentation with 4 kinds of formulas

## 2.5 4种配方菌丝提取物和发酵液提取物抗氧化能力的变化

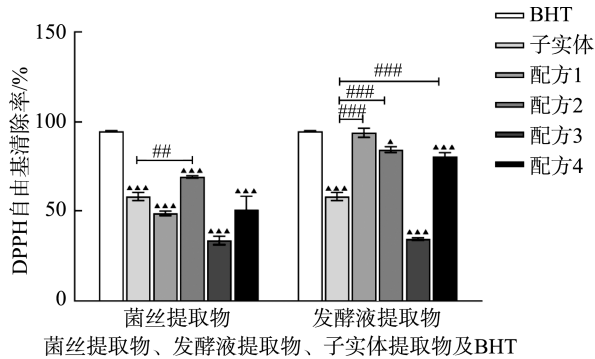
### 2.5.1 DPPH·清除能力

由图 5 可知, 配方 2 菌丝提取物 DPPH·清除率最高, 为 69.39%, 配方 1 发酵液提取物 DPPH·清除率最高, 可达 94.30%; 4 种配方及子实体的菌丝提取物 DPPH·清除率均低于 BHT, 且差异显著( $P<0.05$ ); 但与子实体相比, 配方 2 菌丝提取物 DPPH·清除率提高了 19.42%, 差异性较显著( $P<0.01$ )。配方 1、2、4 发酵液提取物 DPPH·清除率高于子实体 DPPH·清除率, 且呈现出极显著差异性( $P<0.001$ )。可以看出发酵液提取物 DPPH·清除能力优于菌丝提取物。

### 2.5.2 ·OH 清除能力

由图 6 可知, 不论是菌丝提取物还是发酵液提取物, 配方 1 ·OH 清除能力表现最佳, 与子实体相比, 菌丝提取物 ·OH 清除率上升了 33.40%, 发酵液提取物 ·OH 清除率上升了 60.95%, 均表现出极显著的差异性( $P<0.001$ ); 同样, 与 BHT 相比, 配方 1 菌丝提取物 ·OH 清除率上升了 70.44%, 发酵液提取物 ·OH 清除率上升了 88.71%, 同样表现出极显

著差异性( $P<0.001$ )。配方 1 不论是菌丝提取物还是发酵液提取物,  $\cdot\text{OH}$  清除能力都显著高于 BHT 和子实体。



注: 与BHT相比, ▲表示 $P<0.05$ , ▲▲▲表示 $P<0.001$ , 下同。

图5 菌丝提取物、发酵液提取物、子实体提取物及

BHT DPPH·清除率

Fig.5 DPPH free radical clearance rates of mycelial extract, fermentation broth extracts, fruiting body extracts, and BHT

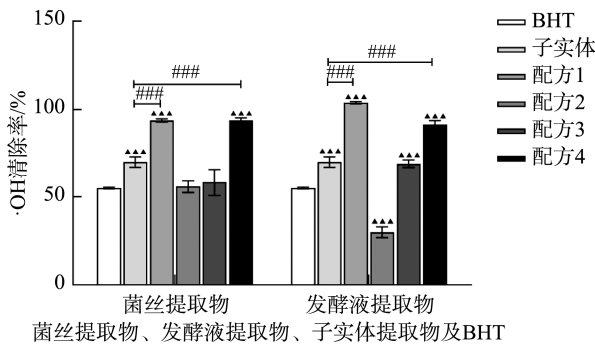


图6 菌丝提取物、发酵液提取物、子实体提取物及

BHT  $\cdot\text{OH}$ 清除率。

Fig.6 Hydroxyl radical scavenging rates of mycelial extracts, fermentation broth extracts, fruiting body extracts, and BHT

### 2.5.3 ABTS<sup>+</sup>清除能力

由图 7 可知, 4 种配方中配方 2 ABTS<sup>+</sup>清除能力表现最佳。与子实体相比, 配方 2 菌丝提取物 ABTS<sup>+</sup>清除率提高了 53.84%, 发酵液提取物 ABTS<sup>+</sup>清除率提高了 52.18%, 差异性极显著( $P<0.001$ ), 但都稍弱于 BHT 的 ABTS<sup>+</sup>清除能力。

### 2.5.4 总还原能力

由图 8 可知, 配方 1 菌丝提取物总还原能力最高为 0.67, 相比于子实体, 配方 1 菌丝提取物总还原能力提升 182.72%, 差异性极显著( $P<0.01$ ); 相比于 BHT, 配方 1 的菌丝提取物总还原能力下降了 21.80%, 差异性较为显著( $P<0.01$ )。配方 4 发酵液提取物总还原能力最强为 0.87, 与子实体相比上升了约 266.45%, 差异性极显著( $P<0.001$ ), 和 BHT 相比则下降了 20.22%, 不具有显著差异性( $P>0.05$ )。BHT 总还原能力显著高于子实体和 4 种培养基。

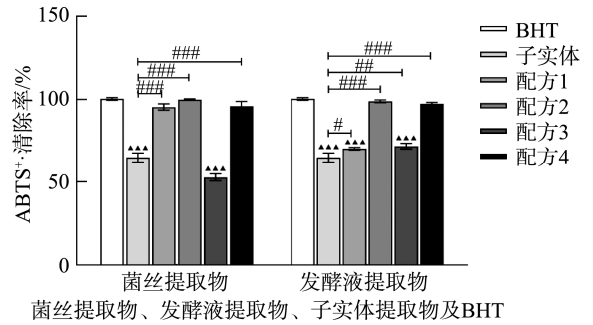
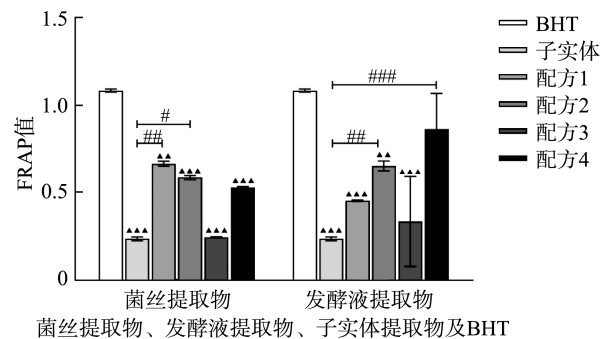


图7 菌丝提取物、发酵液提取物、子实体提取物及 BHT ABTS<sup>+</sup>清除率

Fig.7 ABTS<sup>+</sup> clearance rates of mycelial extracts, fermentation broth extracts, fruiting body extracts, and BHT



注: 与BHT相比, ▲▲表示 $P<0.01$ 。

图8 菌丝提取物、发酵液提取物、子实体提取物及BHT总还原能力

Fig.8 Total reduction capacities of mycelial extracts, fermentation broth extracts, fruiting body extracts, and BHT

## 3 讨论与结论

蜜环菌作为药食两用型真菌, 具有抗抑郁、抗肿瘤<sup>[26]</sup>、改善血液循环<sup>[27]</sup>、抗衰老、提高机体免疫力等<sup>[28]</sup>药理作用; 同时作为名贵中药材天麻的共生真菌, 对天麻的生长和药材质量也有重大影响<sup>[3]</sup>。菌种的生长情况是影响蜜环菌产量的决定性因素<sup>[4]</sup>, 因此本研究从菌丝生物量、活性成分含量及抗氧化活性 3 方面进行综合考察, 以期筛选出最佳蜜环菌液体培养基配方。

研究发现蜜环菌对生长所需的营养成分要求比较严格, 在同时满足碳源、氮源及多种微量元素的营养环境下生长最为旺盛且迅速, 以菌丝生物量为指标, 配方 1 为最佳液体培养基: 葡萄糖 20 g, 蚕蛹粉 20 g, 土豆 200 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g,  $\text{VB}_1$  10 mg, 自然 pH。将 4 种培养基配方进行比较发现葡萄糖和蚕蛹粉对蜜环菌生长助益较大, 且需求量较大, 这与唐兴国等<sup>[29]</sup>、罗智文等<sup>[30]</sup>的研究结果一致。同时还发现, 适量添加  $\text{VB}_1$  对蜜环菌的生长起促进作用, 这与陈鹏等<sup>[31]</sup>的研究结果一致; 也有利于菌丝体黄酮类物质、三萜类物质及酚类物质的积累, 但

之间的关系有待证明。此外,本研究对培养基配方发酵所得的菌丝和发酵液提取物的总黄酮含量、总酚含量、总三萜含量进行了比较,发现菌丝提取物均以配方2表现最佳,配方1稍逊于配方2;配方4发酵液提取物总黄酮和总酚含量表现最佳。对4种配方菌丝提取物和发酵液提取物的抗氧化活性进行测定,并与子实体和BHT的抗氧化活性进行比较,配方1菌丝提取物·OH清除率和总还原能力表现最佳且总体抗氧化能力表现较为稳定;配方4发酵液提取物总还原能力表现最佳。

综上,研究者若以菌丝体为研究对象,虽配方2活性成分含量最高,但配方2菌丝生物量远低于配方1,抗氧化能力也不如配方1,因此从菌丝生物量、活性成分含量及抗氧化能力方面综合考量推荐配方1;若以发酵液为研究对象,从活性成分含量方面和总还原能力方面考虑配方4表现最优,从DPPH·清除率和·OH清除率方面考虑配方1最优,从ABTS<sup>+</sup>清除率方面考虑配方2最优。研究者可根据研究目的有针对性地选择相应的培养基,以达到更好的发酵目的,同时也为日后蜜环菌进行深层发酵工艺、蜜环菌生物活性物质的含量及抗氧化活性变化的研究以及蜜环菌进一步的药理机制研究提供参考和借鉴,对天麻和猪苓的人工栽培也具有一定的参考和借鉴意义。

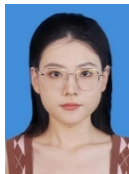
## 参考文献

- [1] 王鑫,亢学平,胡志强,等.蜜环菌原种配方筛选试验[J].中国林副特产,2017,(6):41-42.  
WANG X, KANG XP, HU ZQ, et al. Screening test of *Armillaria mellea* original seed formula [J]. Forest B-Prod Spec China, 2017, (6): 41-42.
- [2] 罗智文.蜜环菌培养条件优化及液体深层发酵工艺探究[D].昆明:昆明理工大学,2021.  
LUO ZW. Optimization of culture conditions and submerged liquid fermentation process of *Armillaria mellea* [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2021.
- [3] WANG CH, ZENG YJ, HOU YB, et al. Effects of *Armillaria* species on growth and quantity of active medicinal components of *G. elata* BL. f. *elata* tubers along an altitude gradient: Evidence from empirical experiments [J]. Phytochem Lett, 2023, (54): 101-106.
- [4] 苏沛文.高卢蜜环菌多糖的提取分离纯化及其抗氧化活性研究[D].长春:吉林大学,2022.  
SU PW. Extraction, purification and antioxidant activity of *Armillaria gallica* polysaccharide [D]. Changchun: Jilin University, 2022.
- [5] 胡德.蜜环菌液体发酵工艺优化、含量测定及药效学研究[D].长春:长春中医药大学,2022.  
HU D. Study on liquid fermentation technology, content determination and pharmacodynamic of *Armillaria mellea* [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2022.
- [6] 胡德,李正龙,赵威,等.蜜环菌菌丝与菌索活性成分含量研究[J].食品安全质量检测学报,2022,13(6):1748-1754.  
HU D, LI ZL, ZHAO W, et al. Study on the active ingredient content of mycelium and rhizomorphs of *Armillaria mellea* [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(6): 1748-1754.
- [7] 刘晓敏.天麻共生蜜环菌特性及继代培养研究[D].天津:天津中医药大学,2020.  
LIU XM. The research on the characteristics and subculture of *Armillaria* spp symbiosis with *Gastrodia elata* [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [8] ROSELLO SE, PARNIAKOV O, DENG Q, et al. Application of non-conventional extraction methods: Toward a sustainable and green production of valuable compounds from mushrooms [J]. Food Eng Rev, 2016, 8: 214-234.
- [9] 李德天.杏鲍菇液体菌种生产技术参数优化及菌丝活力变化的研究[D].长春:东北农业大学,2021.  
LI DT. Study on the optimization of production technical parameters of *Pleurotus eryngii* liquid spawn and the change of mycelial activity [D]. Changchun: Northeast Agricultural University, 2021.
- [10] 刘宇,龚思慧,彭楠,等.蜜环菌液态发酵培养基及补料分批发酵工艺的优化[J].食品与发酵工业,2016,42(5):187-191,197.  
LIU Y, PENG SH, PENG N, et al. Optimization of *Armillaria mellea* liquid fermentation medium and fed-batch culture process [J]. Food Ferment Ind, 2016, 42(5): 187-191, 197.
- [11] 陈伟,冯欢,欧江,等.蜜环菌液体培养基碳氮源的筛选和优化[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2020,48(9):128-136.  
CHEN W, FENG H, OU J, et al. Screening and optimization of carbon and nitrogen sources in liquid culture medium of *Armillaria mellea* [J]. J Northwest Agric For Univ (Nat Sci Ed), 2020, 48(9): 128-136.
- [12] ERBIAI EH, PINTODSL, RABAHS, et al. Chemical composition, bioactive compounds, and antioxidant activity of two wild edible mushrooms *Armillaria mellea* and *Macrolepiota procera* from two countries (morocco and portugal) [J]. Biomolecules, 2021, 11(4): 575-586.
- [13] LAI MN, NG LT. Antioxidant and antiedema properties of solid-state cultured honey mushroom, *Armillaria mellea* (higher Basidiomycetes), extracts and their polysaccharide and polyphenol contents [J]. Int J Med Mushrooms, 2013, 15(1): 1-8.
- [14] 刘景圣.蜜环菌催眠功能优良菌株筛选和发酵工艺优化研究[D].长春:吉林农业大学,2005.  
LIU JS. Favorable strains of soporific function screening from *Armillaria* spp. and fermentation technology optimization [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2005.
- [15] 肖前青.青海黄绿蜜环菌菌丝体生物学特性及多糖发酵工艺研究[D].西宁:青海师范大学,2009.  
XIAO QQ. A study on the polysaccharide fermenting techniques and biological characteristics of the mycelium of *Armillaria luteo-virens* in Qinghai Province [D]. Xining: Qinghai Normal University, 2009.
- [16] 张颖,沈业寿.液体发酵蜜环菌培养条件的优化及菌体多糖的分离[J].食用菌,2001,(2):5-7.  
ZHANG Y, SHEN YT. Optimization of culture conditions for liquid fermentation of *Armillaria mellea* and isolation of polysaccharides [J]. Edible Fungi, 2001, (2): 5-7.
- [17] 焦迎春,余梅,唐达.黄绿蜜环菌液体培养几种胞外酶的测定[J].食用菌,2010,32(3):6-7.  
JIAO YC, YU M, TANG D. Determination of several extracellular enzymes of *Armillaria mellea* in liquid culture [J]. Edible Fungi, 2011, 32(3): 6-7.
- [18] 周劲松,焦迎春,盛海彦,等.三十烷醇与培养液pH及培养温度的变

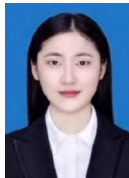
- 化对黄绿蜜环菌菌丝体生长的影响[J]. 食用菌, 2011, 33(3): 8–9.
- ZHOU JS, JIAO YC, SHENG HY, *et al.* Effects of triacontanol, pH of culture solution and culture temperature on the growth of mycelium of *Armillaria mellea* [J]. *Edible Fungi*, 2011, 33(3): 8–9.
- [19] 王迪, 王颖, 张艳莉, 等. 芸豆酵素发酵过程中组分及抗氧化功能研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(18): 18–24.
- WANG D, WANG Y, ZHANG YL, *et al.* Components and antioxidant activity during the fermentation process of kidney bean enzyme [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(18): 18–24.
- [20] 祝朋玲, 张静, 李思雨, 等. 大孔树脂纯化灵芝子实体和孢子粉中总三萜[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(4): 79–85.
- ZHU PL, ZHANG J, LI SY, *et al.* Purification of total triterpenoids from fruiting body and spore powder of *Ganoderma lucidum* by macroporous adsorption resins [J]. *Food Res Dev*, 2023, 44(4): 79–85.
- [21] 张梅梅, 魏志文, 刘玉冰, 等. Folin-Ciocalteu 比色法测定桦褐孔菌多酚的条件优化[J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 295–304.
- ZHANG MM, WEI ZW, LIU YB, *et al.* Optimization on determination of polyphenols from *Lnnotus obliquus* by Folin-Ciocalteu colorimetry [J]. *Mycosystema*, 2011, 30(2): 295–304.
- [22] CHENG HR, FENG SL, JIA XJ, *et al.* Structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Epimedium acuminatum* [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(1): 63–68.
- [23] 谢佳函, 刘回民, 刘美宏, 等. 红豆皮多酚提取工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 中国食品学报, 2020, 20(1): 147–157.
- XIE JH, LIU HM, LIU MH, *et al.* Extraction process optimization and antioxidant activity analysis of polyphenols from azuki bean coats (*Vigna angularis*) [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2020, 20(1): 147–157.
- [24] CHAO L, QIANG H, XIONG F, *et al.* Characterization, antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from *Prunella vulgaris* Linn [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 75(4): 298–305.
- [25] SZAFRANSKA K, SZEWCZYK R, JANAS KM. Involvement of melatonin applied to *Vigna radiata* L. seeds in plant response to chilling stress [J]. *Open Life Sci*, 2014, 9(11): 1117–1126.
- [26] XIALIN S, TINGWEN Z, YAN Z, *et al.* Protoilludane sesquiterpenoid aromatic esters from *Armillaria mellea* improve depressive-like behavior induced by chronic unpredictable mild stress in mice [J]. *J Funct Foods*, 2020, 66(C): 103799–103800.
- [27] 陈州莉, 伍贤进, 田玉桥, 等. 蜜环菌活性成分及产品开发生态研究进展[J]. 现代食品, 2019, (21): 25–29.
- CHEN ZL, WU XJ, TIAN YQ, *et al.* Study progress on active components and products development of *Armillaria mellea* [J]. *Mod Food*, 2019, (21): 25–29.
- [28] 赵爽, 高宜, 荣成博, 等. 不同蜜环菌属真菌胞外多糖生物功能的研究[J]. 河南农业大学学报, 2019, 53(2): 213–217.
- ZHAO S, GAO Y, RONG CB, *et al.* Study on bioactivities of extracellular polysaccharides of different genus of *Armillaria* [J]. *J Henan Agric Univ*, 2019, 53(2): 213–217.
- [29] 唐兴国, 王伯诚, 赖小芳. 天麻共生蜜环菌液体培养基的优化[J]. 浙江农业科学, 2017, 58(4): 635–637.
- TANG XG, WANG BC, LAI XF. Optimization of liquid culture medium for symbiotic *Armillaria mellea* in *Gastrodia elata* [J]. *J Zhejiang Agric Sci*, 2017, 58(4): 635–637.
- [30] 罗智文, 刘洋, 焦云健, 等. 蜜环菌 YN3862 菌株的高密度发酵工艺[J]. 北方园艺, 2020, (20): 124–129.
- LUO ZW, LIU Y, JIAO YJ, *et al.* High-density fermentation technology of *Armillaria mellea* YN3862 strain [J]. *North Horticul*, 2020, (20): 124–129.
- [31] 陈鹏, 宋佳, 郭璞, 等. 中国东北地区三种蜜环菌的生物学特性及奥氏蜜环菌人工培养[J]. 菌物学报, 2023, 42(1): 297–311.
- CHEN P, SONG J, GUO P, *et al.* Biological characteristics of three *Armillaria* species from northeast China and artificial cultivation of *A. ostoyae* [J]. *Mycosystema*, 2023, 42(1): 297–311.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

## 作者简介



李昕阳, 硕士研究生, 主要研究方向为生药资源的开发与利用。  
E-mail: 17634093266@163.com



王 欢, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为食药菌资源开发与利用。  
E-mail: wanghuanmyco@163.com



陈长宝, 博士, 教授, 主要研究方向为药用植物资源学研究。  
E-mail: ccb2021@126.com