

分类号_____

密 级_____

UDC_____

单位代码_____

青島農業大學

硕士学位论文

食用菌资源高效挖掘

及其二元共培养活性次生代谢产物研究

Study on Efficient Mining of Edible Fungi Resources and

Active Secondary Metabolites of Binary Co-Culture

姓 名：_____ 吉建成 _____

指导教师：_____ 郭立忠 教授 _____

_____ 樊亚琴 副教授 _____

学科专业：_____ 微生物学 _____

研究方向：_____ 食用菌活性代谢产物研究 _____

中国·青岛
二〇二一年六月

Study on Efficient Mining of Edible Fungi Resources and Secondary Metabolites of Binary Co-Culture

Thesis submitted to

Qingdao Agricultural University

In Fulfillment of the Requirement

for the Degree of

Master of Science

Ji Jiancheng

(College of Life Science)

Supervisor: Prof. Guo Lizhong

Qingdao, China

June, 2021

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得青岛农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的人员对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间：

年 月 日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解青岛农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意青岛农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：

时间：

年 月 日

导师签名：

时间：

年 月 日

食用菌资源高效挖掘及其 二元共培养活性次生代谢产物研究

摘要

本研究收集并整合可栽培及野外新分离食(药)用菌菌株 2500 份样本,包括广泛商业化栽培食用菌子实体 1100 份(27 个种)、珍惜野生种类 178 份(92 个种)、食用菌菌丝体 1222 份(36 个种)。对收集的 2500 份食用菌进行营养成分测定,筛选出食用菌多糖含量丰富(每 100 g 多糖含量>30 g)的 5 份,蛋白质含量丰富(每 100 g 含蛋白量>30 g)的 8 份,微量元素含量丰富(每 100 g 含微量元素>300 mg)的 6 份,维生素含量丰富(每 100 g 含维生素>100 mg)的 6 份。通过综合筛选分析,确定食用菌优势资源菌株 10 种。以上数据均已录入到中国食用菌加工原料数据库,该数据库为本课题组与中国科学院微生物研究所等 4 个单位合作共建的、涵盖 10000 余份食用菌营养成分数据的权威数据库,网址为 <http://124.16.144.116:8092/biostrains/index.jsp>。该网站已经具备分类检索、关键词检索等功能。以上为食用菌加工产业发展提供可靠的原材料营养成分数据来源。

将部分营养成分丰富、具有生物学功能的菌株进行二元共培养液体发酵试验。通过发酵培养、化学萃取、HPLC 检测和抑菌活性筛选,确定以桑黄 PI-2 和桦褐孔菌 IO-2 为目标菌株进行共培养,并对其活性次级代谢产物进行研究。通过对菌株发酵条件的探索,选择能够产生丰富活性代谢产物的条件进行规模发酵,其发酵产物通过乙酸乙酯提取获得粗提物。

粗提物通过硅胶柱层析、凝胶柱层析及高效液相色谱分离制备,共获得 7 个化合物。对得到的化合物进行抑菌活性筛选,化合物 1 显示出对大肠埃希氏菌、金色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、产气荚膜梭菌、产气肠杆菌有较强抑制作用(MIC 均为: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),对苏云金芽孢杆菌、溶藻弧菌有强抑制活性, MIC 为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对该化合物进行结构鉴定,确定化合物 1 为倍半萜类化合物(2E, 4E)-5-(2,2-二甲基-6-亚甲基环己基)-3-甲基戊-2,4-二烯酸。据报道,该化合物显示了牙龈假单胞菌抑制活性。该研究为食(药)用菌二元共培养活性代谢产物的研究提供了物质基础。

关键词: 食用菌; 资源挖掘; 营养成分; 数据库; 活性代谢产物; 抑菌活性

Abstract

In this study, 2500 samples edible (medicinal) strains from cultivable and field were collected and integrated, including 1100 parts (27 species) of widely commercialized cultivated edible mycelium, 178 parts (92 species) of precious wild species, and 1222 parts (36 species) of edible mycelium. Nutrition composition of 2500 samples of edible fungi were determined. Five samples of edible mushroom cultivars with abundant polysaccharide content (> 30 g per 100 g of polysaccharide) higher than 30 g / 100 g and eight samples of edible mushroom cultivars with abundant protein content (> 100 g per 100 g of polysaccharide) containing protein quantity > 30 g), six samples of were screened for abundant trace elements contents (> 300 mg per 100 g containing trace elements), six samples of were screened for abundant vitamins contents (> 100 mg per 100 g containing vitamin). Through comprehensive screening analysis, ten strains of edible fungi were determined as the dominant strain resources.

All the above data had been input into the database of processing raw materials of edible fungi with Chinese characteristics, which is an authoritative database of nutritional composition data of more than 10,000 edible fungi jointly built by our research group and four other institutions, including the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. <http://124.16.144.116:8092/biostrains/index.jsp>. The website already has the functions of taxonomic searching, keyword searching, etc., to provide a reliable source of data on the nutritional composition of raw materials for the development of food bacteria processing industry.

Some of nutrient-rich and biologically strains were subjected to the binary co-culture liquid fermentation test. Through fermentation culture, chemical extraction, HPLC detection and antibacterial activity screening, the target strains PI-2 and IO-2 were determined to co-culture, and their active secondary metabolites were studied. By exploring the fermentation conditions of the strain, the conditions which could produce rich active metabolites were selected for large-scale fermentation. The fermentation products were extracted by ethyl acetate to obtain crude extract.

The crude extracts were separated and prepared by silica gel column chromatography, gel column chromatography and high performance liquid chromatography and then obtained seven compounds. The

antimicrobial activity of the obtained compounds was screened. Finally, Compound **1** showed strong inhibitory activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, and *Enterobacter aerogenes* (MIC: 5 µg/mL), and strong inhibitory activity against *Bacillus thuringiensis* and *Vibrio alginolyticus* (MIC: 2.5 µg/mL). The structure of compound **1** was identified as sesquiterpene (2E, 4E) -5- (2, 2-dimethyl-6-methylene cyclohexyl) -3-methylpenta-2, 4-dienoic acid. It was reported that the compound showed inhibitory activity against *Pseudomonas gingivalis*. This study provides a material basis for the study of active metabolites in binary co-culture of edible (medicinal) bacteria.

Key words: mushroom; resource mining; nutrient composition; database; active metabolites; bacteriostatic activity

目录

第一章 前言	1
1.1 食用菌营养成分研究概况	1
1.1.1 食用菌简介	1
1.1.2 食用菌营养成分研究概况	1
1.1.3 食用菌活性物质研究概况	3
1.2 我国食用菌加工产业研究概况	6
1.2.1 我国食用菌加工产业发展情况及存在问题	6
1.2.2 构建我国特色食用菌加工原料数据库目的及意义	8
1.3 真菌二元共培养新颖次生代谢产物研究概况	8
1.4 本研究技术路线	10
第二章 食用菌资源菌株收集、鉴定与保藏	11
2.1 试验材料	11
2.1.1 仪器设备	11
2.1.2 供试培养基	11
2.2 试验方法	12
2.2.1 食用菌子实体资源收集	12
2.2.2 食用菌菌种分离纯化	12
2.2.3 食用菌菌种资源收集	12
2.2.4 食用菌种质资源 ITS 鉴定	13
2.2.5 食用菌子实体及菌种保藏	13
2.3 试验结果	14
2.3.1 栽培食用菌子实体收集结果	14
2.3.2 野生食用菌子实体收集结果	15
2.3.3 食用菌子实体组织分离结果	18
2.4 本章小结	18

第三章 食用菌营养成分测定	20
3.1 实验材料	20
3.1.1 供试菌株	20
3.1.2 主要仪器设备	20
3.1.3 主要试剂	20
3.2 实验方法	21
3.2.1 样品准备	21
3.2.2 样本处理	21
3.2.3 食用菌营养成分含量测定	22
3.2.3.1 粗多糖含量测定	22
3.2.3.2 蛋白质含量检测	22
3.2.3.3 维生素 C 含量检测	22
3.2.3.4 维生素 E 含量检测	22
3.2.3.5 钙含量检测	23
3.2.3.6 铁含量检测	23
3.3 食用菌子实体营养结果与分析	23
3.4 食用菌菌丝结果分析	27
3.5 食用菌优势资源菌株筛选结果	29
3.6 中国特色食用菌加工原料数据库构建	30
3.7 本章小结	32
第四章 二元共培养菌株筛选	33
4.1 试验材料	33
4.1.1 供试菌株	33
4.1.2 主要仪器设备	34
4.1.3 药品与试剂	34
4.1.4 供试培养基	34

4.2 二元共培养液体发酵培养菌株筛选	35
4.2.1 二元共培养液体发酵培养	35
4.2.2 二元共培养液体发酵代谢产物提取	35
4.2.3 乙酸乙酯粗提取物 HPLC 检测	35
4.2.4 二元共培养粗提取物 LC-MS 检测	35
4.2.5 乙酸乙酯粗提取物抑菌试验	36
4.3 二元共培养液体发酵菌株筛选结果	36
4.3.1 二元共培养液体发酵差异变化	36
4.3.2 二元共培养液体发酵粗提取物检测结果	37
4.3.3 抑菌试验结果	38
4.4 本章小结	39
第五章 桦褐孔菌 IO-2 和桑黄 PI-2 二元共培养发酵条件优化	40
5.1 试验材料	40
5.1.1 培养基	40
5.1.2 仪器设备	40
5.1.3 供试菌株	40
5.2 试验方法	40
5.2.1 发酵培养基筛选	40
5.2.2 发酵时间优化试验	41
5.3 发酵条件优化结果	41
5.3.1 不同培养基粗提物产量	41
5.3.2 不同培养基粗提取物 HPLC 结果	41
5.3.3 发酵时间优化结果	42
5.4 本章小结	43
第六章 次级代谢产物的分离鉴定与抑菌活性筛选	44
6.1 试验材料	44

6.1.1 试验仪器	44
6.1.2 试验材料	44
6.1.3 主要试剂	44
6.2 试验方法	45
6.2.1 粗提取物的获取	45
6.2.2 化合物的分离	45
6.2.2.1 快速液相制备色谱系统分离	45
6.2.2.2 凝胶柱分离	46
6.2.3 TLC 分析与合样	46
6.2.4 化合物制备及验纯	46
6.2.5 纯化合物抑菌活性分析	46
6.3 化合物分离结果	47
6.3.1 快速液相制备色谱系统分离结果	47
6.3.2 样品 HPLC 检测结果	47
6.3.3 HPLC 制备化合物结果	48
6.4 化合物抑菌试验结果	50
6.5 化合物 1 结构解析	50
6.5.1 化合物 1 LC-MS 结果	51
6.5.2 核磁结果分析	51
第七章 讨论	54
参考文献	55
导师组意见	59
致谢	60
作者简介	61

Contents

Chapter 1 Preface	1
Research overview of flavor, nutrition and functional components of edible fungi	1
1.1.1 Introduction to edible fungi	1
1.1.2 Study on flavor and nutrient components of edible fungi	1
1.1.3 Research overview of functional components of edible fungi	3
1.2 Research situation of edible fungi processing industry in China	6
1.2.1 Development and existing problems of China's edible fungus	6
1.2.2 Purpose and significance processing of characteristic edible fungi in China	8
1.3 Overview of studies on novel secondary metabolites in binary	8
1.4 Technical route of this research	10
Chapter 2 Collection, Identification and Preservation of Edible Fungi Strains	11
2.1 Test materials	11
2.1.1 Instruments	11
2.1.2 Test medium	11
2.2 Test methods	12
2.2.1 Edible Fungi Fruiting Body Resource Collection	12
2.2.2 Isolation and purification of edible fungi	12
2.2.3 Edible fungi species resources collection	12
2.2.4 ITS identification of edible fungi germplasm resources	13
2.2.5 Storage of fruiting bodies and strains of edible fungi	13
2.3 Test results	14
2.3.1 Results of fruiting body collection of cultivated edible fungi	14
2.3.2 Fruiting body collection results of wild edible fungi	15
2.3.3 Separation results of fruiting body tissue of edible fungi	18
2.4 Chapter summary	18

Chapter 3 Determination of Flavor, Nutrition and Functional Components of Edible Fungi	20
3.1 Test material.....	20
3.1.1 Test strain	20
3.1.3 Main Reagents	20
3.2 Experimental Methods	20
3.2 Experimental Methods	21
3.2.1 Sample preparation	21
3.2.2 Sample treatment	21
3.2.3 Determination of nutrient content of edible fungi	22
3.2.3.1 Determination of crude polysaccharide content	22
3.2.3.2 Protein content detection	22
3.2.3.3 Determination of vitamin C content	22
3.2.3.4 Vitamin E content detection	22
3.2.3.5 Determination of calcium content	23
3.2.3.6 Iron content detection	23
3.3 Nutrition results and analysis of fruiting body of edible fungi	23
3.4 Analysis of mycelium results of edible fungi	27
3.5 Screening results of new resource strains of edible fungi	29
3.6 Construction of database of processing raw materials of edible fungi with Chinese characteristics	30
3.7 Chapter Summary	32
Chapter 4 Screening of Binary Co-culture	33
4.1 Test material	33
4.1.1 Test strain	33
4.1.2 Main instruments and equipment	34
4.1.3 Drugs and reagents	34
4.1.4 Test medium	34

4.2 Screening of binary co-culture strains by liquid fermentation	35
4.2.1 Binary co-culture liquid fermentation culture	35
4.2.2 Extraction of metabolites from binary co-culture liquid fermentation	35
4.2.3 Determination of crude ethyl acetate extract by HPLC	35
4.2.4 LC-MS detection of crude extract by binary co-culture	35
4.2.5 Antibacterial test of crude ethyl acetate extract	36
4.3 Screening results of binary co-culture liquid fermentation strains	36
4.3.1 Differential changes of binary co-culture liquid fermentation	36
4.3.2 Test results of crude extract by binary co-culture liquid fermentation	37
4.3.3 Results of bacteriostatic test	38
4.4 Chapter Summary	39
Chapter 5 Optimization of Bi-culture Fermentation Conditions of IO-2 and PI-2	40
5.1 Test materials	40
5.1.1 Medium	40
5.1.2 Instruments and equipment	40
5.1.3 Test strain	40
5.2 Test method	40
5.2.1 Screening of fermentation medium	40
5.2.2 Optimization test of fermentation time	41
5.3 Optimization results of fermentation conditions	41
5.3.1 Output of crude extracts from different media	41
5.3.2 HPLC results of crude extracts from different media	41
5.3.3 Optimization results of fermentation time	42
5.4 Chapter summary	43
Chapter 6 Isolation of Secondary Metabolites and Screening of Antibacterial Activity	44
6.1 Test material	44

6.1.1 Test instrument	44
6.1.2 Test material	44
6.1.3 Main Reagents	44
6.2 Test methods	45
6.2.1 Extraction of crude extract	45
6.2.2 Separation of compounds	45
6.2.2.1 Rapid preparative liquid chromatography separation	45
6.2.2.2 Separation of gel column	46
6.2.3 TLC analysis and sampling	46
6.2.4 Preparation and purification of compounds	46
6.2.5 Analysis of antibacterial activity of pure compounds	46
6.3 Separation results of compounds	47
6.3.1 Separation results of rapid preparative liquid chromatography	47
6.3.2 Test results of samples by HPLC	47
6.3.3 Results of preparation of compounds by HPLC	48
6.4 Antibacterial test results of pure compounds	50
6.5 Structural analysis of compound 1	50
6.5.1 LC-MS results of compound 1	51
6.5.2 Analysis of NMR Results	51
Chapter 7 Discussion	54
References	55
Mentor group's opinion	59
Acknowledgement	60
The author resumes	61

第一章 前言

1.1 食用菌营养成分研究概况

1.1.1 食用菌简介

食用菌通常叫蘑菇，可用于食用和药用。近年来我国食用菌行业发展迅速，据中国食用菌协会的统计，2018 年年我国食药食用菌总产量继续增长，达 3789.03 万吨（鲜品），产值高达 2938.38 亿元（陈晓光等，2020）。但是食用菌的消费仍然以鲜菇消费为主，我国食用菌加工行业起步晚，发展速度快，但是至今没有食用菌加工原料的数据库，限制食用菌加工行业发展。食用菌具有较高的营养价值和相对较低的价格，随着人们越来越关注食物营养，它已经成为餐桌上的一种常见食物。食用菌子实体因富蛋白质、糖、含氨基酸、矿物质等营养物质和核苷酸等风味物质，味道鲜美，资源丰富，是全世界公认的健康食品（罗晓莉等，2017）。根据目前的估计，全世界至少有 12000 种蘑菇，其中有 2000 种是可食用的，中国食用菌物种资源尤其丰富，实现人工栽培的品种已达 80 多种。近年来，中国许多地方将蘑菇栽培作为农民脱贫致富的特色或主导产业，食用菌栽培行业规模快速增长。

食用菌是人类饮食的一个组成部分，但是现在食用菌的使用已经扩大到更广泛的范围，不仅作为食物，而且可以作为人类的药物、营养制品。大约 35 种食用菌被商业化种植，而近 200 种野生食用菌被用于医药和保健品研发（Phillips KM et al., 2016）。食用菌在治疗各种退行性疾病方面的巨大作用而一直受到珍视和赞赏。关于它们的化学成分、营养价值和治疗特性的信息在过去几年中不断被发掘，并应用于医疗保健品行业。蘑菇含有 50-65% 的总碳水化合物、19-35% 的蛋白质（具有各种生物和药用活性，如凝集素）和 2-6% 的干物质脂肪含量。富含脂溶性维生素和麦角固醇含量的蘑菇被认为是维生素 D 的唯一素食来源，所以说食用菌是富含营养有利健康的食物。

1.1.2 食用菌营养成分研究概况

食用菌的营养含量和保健药用价值较高，含有碳水化合物、氨基酸、蛋白质、微量元素等物质，除此之外，食用菌中含有多种人体所需的维生素，而维生素作为维持人体

内部所必需的物质，在人体内一般不能够自主合成，必须从外部摄入。下文将在营养成分和活性功能方面对食用菌进行介绍。

碳水化合物：蘑菇子实体中总碳水化合物含量占干重的 50-65%。它由单糖、单糖衍生物和寡糖组成。碳水化合物含有一定量的糖醇，如甘露醇和海藻糖。众所周知，当暴露于环境压力如热、冷、氧化、干燥等时，海藻糖通过保持细胞完整性在人类细胞中合成压力响应因子，这背后的可能机制是防止蛋白质变性，蛋白质变性通常在应激条件下降解（Zou Y and Hou X, 2017）。糖类作为人类重要的能量物质，在人的生命活动中起到至关重要的作用。人类饮食中最常见的糖类物质主要有淀粉、单糖以及双糖（欧胜平等, 2017）。对于人体来说，最易吸收的就是单糖与双糖，单糖和双糖更有利于身体利用，然而若是吸收过量就会导致肥胖、血糖高等疾病。同时，多糖和膳食纤维能够帮助人体提升免疫力、促进肠胃消化，而食用菌产品中单糖和双糖含量较低，且富含多糖类物质，经常使用食用菌类产品有利于身体健康。含有可溶性和非可溶性纤维的新鲜蘑菇被证明可以降低总胆固醇水平，从而有利于控制心血管疾病（Moxey K A, 2016）。膳食纤维与非膳食碳水化合物的存在，包括 β -葡聚糖、多糖-蛋白质复合物、甲壳素、半纤维素、甘露聚糖、木聚糖和半乳糖，为人类提供了广泛的健康益处。

氨基酸：食用菌中含有丰富的氨基酸，氨基酸含量可以达到 7-22%，其含有所有必需氨基酸，其中谷氨酸、天冬氨酸和精氨酸含量高。除此之外，还发现了两种不同寻常的氨基酸 γ -氨基丁酸和鸟氨酸，它们以其特殊的生理活性而闻名。小麦和大米中的赖氨酸含量仅为 0.2% 左右，而双孢菇中的赖氨酸含量为粮食的 4.9 倍（Esmailpour B et al., 2017）。相关数据表明，食用菌中的必需氨基酸占总氨基酸的比例很高，平菇（*Pleurotus ostreatus*）为 39.3%，猴头菇（*Hericium erinaceus*）为 44.23%。不同的氨基酸有不同的风味，依据此项特点，氨基酸可大致分为三类：甜氨基酸包括甘氨酸，丙氨酸，苏氨酸和丝氨酸；苦味氨基酸包括异亮氨酸，精氨酸，组氨酸，蛋氨酸等；鲜味氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸（于传宗等, 2018）。不同食用菌的氨基酸含量和氨基酸的组成不同，因此促成了不同的食用菌风味，通过对食用菌氨基酸含量的测定可以更好的研究食用菌风味特点。

不饱和脂肪酸：食用菌总脂质(粗脂肪)含量为 20-30 g/kg 且富含亚油酸和油酸（Ahmed M et al., 2015）。据报道，在乳腺癌、前列腺癌和结肠癌的动物模型中，亚油酸对几乎所有的肿瘤发生阶段都具有抗癌作用，并通过改变 5-脂氧合酶代谢产物 5-羟基二十碳四烯酸（5-HETE）并表达 5-脂氧合酶激活蛋白（FLAP）来减少肿瘤细胞的生长，这说明部分食用菌具有抗癌作用。亚油酸是 1-辛烯-3-醇(蘑菇的一种醇)的前体，是蘑菇

风味的关键芳香化合物（张璐等，2017）。蘑菇含有生育酚，即维生素 E 的水解产物，生育酚是一种重要的抗氧化物质。蘑菇是唯一含有维生素 D 的非动物性食物，最近的研究表明，蘑菇在一定条件下紫外线照射会产生维生素 D₂（Afagh H V et al., 2019）。维生素 D₂ 的形成过程是食用菌在阳光的紫外线辐射作用下，真菌甾醇、麦角甾醇通过一系列光化学和热化学反应转化形成。

微量元素：蘑菇富含钾、磷和铁。蘑菇中的钠相对较少，因此是高血压患者的健康食品（Fung S Y et al., 2018）。食用菌富含膳食硒，已知可以减少氧化应激。美味牛肝菌的硒含量最高（约 20 mg/g）。许多动物模型研究都强调了硒的生物利用度，饲喂富含硒的平菇 35 d 导致 64 只大鼠血浆总硒含量增加（Bhatia P et al., 2014）。硒的生物利用效率取决于硒的化学形态，同时硒也与细胞壁中的多糖结合。微量元素在人的生命活动中具有重要意思，微量元素在酶系统中起催化作用、作为激素、维生素的必要组成成分或者辅助成分、形成功能蛋白和影响免疫力的功能。人体对矿物质的吸收表明了蘑菇作为食物来源、膳食补充剂或药物的潜在用途。另一项研究报告称，施用紫外线照射的蘑菇也能促进骨骼生长和矿化。铁是人体中第二多的微量元素，铁作为血红蛋白的重要组成部分，在氧运输和造血过程中有至关重要的作用，缺少铁元素是导致贫血的最主要原因之一。

1.1.3 食用菌活性物质研究概况

许多研究人员已经证明，食用菌是多种功能成分的来源，如多糖（ β -葡聚糖）、膳食纤维、萜烯、肽、糖蛋白等（陈惜燕等，2017）。此外，特定生物活性化合物的存在使这些蘑菇具有治疗价值，从增强免疫系统到治疗和预防威胁生命的疾病，如心脏病、高血压、脑中风和癌症。蘑菇还具有抗真菌、抗炎、抗肿瘤、抗病毒、抗菌、保肝、抗糖尿病、降血脂、抗血栓和降血压的活性。蘑菇的治疗和营养探索给人的印象是它们是下一代食物，不仅提供优质蛋白质，而且治疗癌症、肿瘤和神经疾病等致命疾病。如何更好地利用食用菌中的活性物质，并用于制造人类医疗和保健药品，这是一个巨大的挑战。

食用菌的活性物质：在保健品、替代药品及药品的开发领域中成为研究的热点，食用菌含有抑菌、抗肿瘤、抗氧化等活性成分物质，具有巨大开发价值。食用菌中的功能性活性成分主要包括多糖，三萜类，多酚，甾醇，稀有矿物质等，其中多糖等成分被批准用于保健，灵芝和虫草多用于保健食品中，其他还包括杏鲍菇，双孢蘑菇，羊肚菌，黑木耳，灰树花等。斯蒂芬森等人进行了麦角甾醇相关研究，在给实验小鼠补充 42 d

麦角甾醇后,检测到小鼠血液内维生素 D 水平较高,表明在血清中对其有很强的吸收作用 (Ma Z et al., 2013)。麦角固醇的抗肿瘤活性于 1994 年首次报道, Yasukawa 等人发现从真姬菇子实体中分离出的麦角固醇有抗癌作用,现已在医药产品中应用。此后,科学家研究发现猪苓、灰树花、杨树菇等麦角甾醇,以及金针菇麦角甾醇、均具有抗癌活性。牛樟芝(*Antrodia camphorata*) 子实体获取的乙醇粗提取物 CEE (富含不饱和脂肪酸和麦角固醇) 对 T24、TSGH-8301 细胞增殖有抑制作用,抑制率分别为 54.0%、45.0% 和 37.0%; 同时发现 CEE 还能够显著抑制细胞迁移,从而诱导肿瘤细胞凋亡 (Merdivan S et al., 2017)。

蘑菇营养制品自古以来就被用来治疗人类疾病,它们的营养和药用特性,吸引了研究者、药剂师的研究,并加工成药品或保健品供人类食用。它的药用能力如维生素 B 对增强神经系统很重要,矿物质如硒和麦角硫因是一种天然抗氧化剂,可保护人体细胞免受损伤,而 β -葡聚糖通过诱导适应性和先天免疫反应来增强免疫系统,使这些蘑菇成为制作营养药物的重要来源。此外,活性分子如多糖、低分子量蛋白质、萜烯、糖蛋白和生物活性化合物的存在再次提高了人类对食用菌的开发兴趣。

近年来,多种食用菌多糖已经被分离和鉴定,如平菇的平菇多糖、香菇中的香菇多糖、灵芝中的灵芝多糖和茶薪菇中的茶薪菇多糖 (Kawagishi H, 2018)。所有的食用菌多糖都含有一个共同的连接的葡萄糖骨架,但是分枝的形式和程度因物种而异。然而,在蘑菇中也发现了一些以半乳糖或甘露糖为骨架的多糖。已知这些多糖具有各种生理活性,如抗肿瘤活性、免疫调节作用、抗氧化活性、抗病毒活性、抗炎作用和抗癌作用。多糖的抗肿瘤作用是通过胸腺依赖性免疫机制介导的,该机制涉及细胞毒性巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞、自然杀伤细胞、树突细胞和化学信使(细胞因子,如白细胞介素、干扰素和结肠刺激因子)的激活,从而触发互补和急性期反应 (Perfileva A et al., 2017)。从双孢蘑菇中提取的蘑菇多糖对人类乳腺癌表现出优异的抑制作用。冬虫夏草还富含医学上重要的多糖,多糖提取物可用于保护和治疗身体免受肾损伤。此外,已知来自姬松茸的蛋白多糖具有很强的免疫调节特性,通过上调树突细胞的成熟,在控制癌症和免疫缺陷性疾病方面具有重要的治疗作用 (Zang H et al., 2020)。最近,从杏鲍菇中分离出一种由葡萄糖单元组成的新型异多糖,它对 HepG-2 细胞显示出很强的抗肿瘤活性。从桑黄水提取物中分离的多糖-蛋白质复合物被发现对辐射诱导的氧化应激有深远的影响。有趣的是,在猴头菇多糖提取物中也观察到了抗疲劳活性,这增加了这些新型多糖在运动营养中的应用 (Shaternikov A N and Nikitina V E, 2020)。

食用菌中含有生物活性蛋白分子,具有生物功能的蛋白质通过增强营养吸收、抑制

酶和调节免疫系统以抵御病原体来显示胃肠道中的生理活性 (O'Connor E et al., 2020)。蘑菇生物活性蛋白和肽, 如凝集素、真菌免疫调节蛋白、核糖体失活蛋白、抗菌蛋白、核糖核酸酶和漆酶, 是具有巨大药用潜力的功能成分的重要组成部分 (Wei-Rui et al., 2019)。凝集素是特异性结合细胞表面碳水化合物的非免疫蛋白质或糖蛋白, 已被研究其抗增殖、抗肿瘤和免疫调节活性。其他一些表现出酶活性的蛋白质是核糖体的失活蛋白、漆酶、真菌免疫调节蛋白。这些显示出抑制肝癌 Hep G2 细胞和乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的巨大潜力 (Dongmei et al., 2019)。此外, 热、冷冻、酸、碱和脱水处理对从双孢蘑菇中分离的凝集素蛋白 (ABL) 的性质没有影响, 因此表明它们用作营养制品和功能性食品开发的稳定免疫刺激剂。在给予各种食品加工处理后的灵芝蛋白质的情况下, 也报道了类似的结果。

萜类化合物: 萜烯基本上是一组挥发性不饱和烃, 具有抗炎活性, 已从蘑菇中广泛分离出来, 这些萜类化合物具有许多药理活性, 如抗癌、抗疟药、抗胆碱酯酶、抗病毒、抗菌和抗炎活性。这些分为单萜类、倍半萜类、二萜类和三萜类。已经分离出单萜和倍半萜类化合物已经研究了来自山茱萸侧耳属和其类似物对癌细胞系的细胞毒性, 并发现阳性结果 (Pennone V, 2020)。据报道, 金针菇也含有倍半萜类化合物, 命名为金针菇醇、金针菇内酯, 并测试了它们对三种肿瘤细胞系的细胞毒性, 即: HepG2、HeLa 和 KB。关于三萜类化合物, 羊毛甾烷是一种主要从蘑菇中分离出来的化合物, 据报道是一种抗癌剂, 从灵芝中分离出两种具有抗乙酰胆碱酯酶活性的羊毛甾烷三萜, 即灵芝酸甲酯和灵芝酸正丁酯。因此, 三萜类化合物的使用为制药公司利用它们作为治疗阿尔茨海默氏症和相关神经退行性疾病的可能药物开辟了又一条途径。理论来讲这些萜烯可以有效地用于开发治疗退行性疾病的药物。

蘑菇中存在的其他生物活性营养化合物, 药用蘑菇在预防和治疗退行性疾病方面的高利用率已在世界范围内得到观察。蘑菇的药用价值包括它们作为一种抗肿瘤、抗癌、抗糖尿病、心脏保护、肝脏保护、神经保护、抗菌、抗病毒等。已经被大量研究和记录。这些蘑菇合成了不同的生物化合物, 负责上述书面功能。北冬虫夏草含有一种由葡萄糖组成的天然免疫刺激多糖, 可扩展其治疗各种癌症和肿瘤的潜力。此外, 由药用蘑菇如猴头菇制成的片剂已被广泛用于增强胃肠功能免疫功能。此外, 其生物活性化合物猴头菇烯酮和猴头菇素的药用效果也已知可预防或治疗人类慢性、认知和神经疾病。桑黄也是一种高级食用菌, 以其惊人的抗肿瘤活性和提神醒脑以延长寿命而闻名。从竹荪中分离出的活性分子竹荪碱 A 和 B 通过改善神经生长因子来治疗神经退行性疾病 (Rathore H et al., 2017)。蘑菇也出现在开发天然益生元的领域, 香菇、双孢蘑菇和银耳具有很强

的益生元活性 (Bell V et al., 2018)。

1.2 我国食用菌加工产业研究概况

1.2.1 我国食用菌加工产业发展情况及存在问题

食用菌加工业起源于西欧和美国,二十世纪五十年代,西方国家就开始加工食用菌。我国的食用菌加工业起步较晚,但发展迅速,在1980年我国已经是世界双孢蘑菇加工品的主要生产国之一。

如今,食用菌栽培的总产值在我国种植业中排名第六。我国的食用菌品种也很多,可以加工成商品的品种也很多。近年来,我国食用菌的产量近年来一直在增长,但是我国生产的大部分食用菌都用于国内销售。数据显示,2015年我国食用菌的出口量仅占总产量的1.46% (Vamanu, Emanuel et al., 2017)。可以看出,尽管近年来我国食用菌生产加工企业的数量有所增加,但只能满足我国内部消费的需求。

现代食用菌加工业是与国民的饮食营养和饮食安全密切相关的“国民健康产业”。全球食用菌加工业正朝着多领域,多梯度,深入,高科技,智能,低能耗,充分利用,高效和可持续的方向发展。随着大量新技术(例如云计算)的发展,新业务格式(例如在线电子商务)的出现,新模型的形成(例如整个产业链的控制)和发展在新兴产业(如现代空调)中,现代食用菌加工业不仅将成为驱动我国国民经济发展的“新兴产业”和新的经济增长点,还将扩大“新空间”为现代农业的发展而努力,并成为引领和驱动我国现代农业发展的新力量。新产品要求“方便,美味,可口,营养,安全,健康,个性化和多样化”和新的工业要求“智能,节能,低碳,环保,绿色和可持续”成为食用菌工业发展的“新常态”(Merilin Kakoti et al., 2021)也对食用菌加工业的技术发展提出了新的挑战。

此外,许多食用菌营养丰富,但味道不好,而通过深加工的复杂加工有效地改善了某些食用菌的味道,为消费者带来了许多食用菌的益处,将更易于享用。但是现在对食用菌加工原料的研究少,对食用菌加工原料的营养、功能成分了解不足,已经影响到食用菌加工产业的发展。

贮藏对蘑菇营养成分的影响:由于蘑菇中水分的百分比很高,新鲜蘑菇易腐烂变质,所以加工是延长食用菌贮藏的重要途径。像其他蔬菜一样,它们可以烘烤、油炸、腌制、罐装、干燥等。根据要求,蘑菇可以干燥,冷冻或罐装。热烫、浸泡在如左旋抗坏血酸、

焦亚硫酸钠等溶液中是其他一些可以用来保存新鲜蘑菇的方法。根据科学报告 (Lan Donghe and Wu Bin, 2020), 已经验证到所有方法都以这样或那样的方式影响蘑菇储存时的营养成分。在装罐过程中, 可溶性含氮物质可以浸出到盐水溶液中, 这可以导致双孢蘑菇中氨基酸含量降低 2%-16%。冷冻是最好的保存方法, 双孢蘑菇在冷冻中保存 6 个月比腌制和罐装能更好地保留营养。发现双孢蘑菇在腌制中具有最低的蛋白质含量 (16.5%); 与罐装(2.83 mg/g)和腌制(1.71 mg/g)相比, 风味核苷酸在冷冻(6.22 mg/g)中也是高的。而在环境温度为 12 °C发现双孢蘑菇增加了总的游离氨基酸, 并改善了风味核苷酸含量 (Zheng Ruihong et al., 2021)。蘑菇产品的风味已经被认为受到热处理的显著影响。双孢蘑菇的非挥发性化合物被发现受到罐装过程的极大影响。对由双孢蘑菇制成的蘑菇汤进行的一项研究表明, 与煮沸和高压灭菌的方法相比, 微波烹饪的汤更能保留其风味和游离氨基酸 (Paul et al., 2016)。

蘑菇保健品: 过去几十年来, 蘑菇不仅作为食物食用, 而且还作为主要的生物活性成分来源用于制作膳食补充剂, 以提高人类的生活质量。这反映出蘑菇提取物是针对特定目标的, 已经由研究人员和制药公司在临床试验中定期测试, 以开发功能性食品。因为从子实体、菌丝体或其提取物中制造这样的产品具有药理学益处, 有助于对人类提前改善亚健康状态, 从而防止威胁生命的疾病的后果 (Nagy László G et al., 2016)。一些市售的营养制品包括有机灵芝, 50%香菇和 50%灵芝的混合物, 是一种增强免疫的日常健康补充剂。然而, 这种营养制品的生产需要对结构和功能关系的深入了解, 经济可行、可控的生产工艺和稳定的多糖数量和质量。临床研究中使用的剂量因受试者和治疗的疾病而异并且各种物种制成的商业产品的开发仅仅是为了满足总体的日常营养需求。

未来发展: 关于不同种类蘑菇的分类、结构、生物学、营养成分、收获后技术和附加值, 有大量汇编数据。但是, 在基因组学、蛋白质组学、次级代谢物的分泌以及它们在控制其治疗作用的生化途径中的参与等领域, 需要进行广泛的研究。应该通过新的先进方法来研究这些治疗作用的确切机制, 以便普通人能够清楚地理解。 β -葡聚糖在治疗几种疾病中的作用对我们来说并不陌生。但是所涉及的活性机制, 其背后的结构和分子量的作用仍然不清楚, 因为所有种类的 β -葡聚糖都不是药物活性的 (Wang Y et al., 2017)。一些领域, 如药物活性多糖-肽复合物的生物化学, 涉及治疗活动, 需要更多的关注。此外, 根据今天的情况, 新鲜蘑菇在市场上的可接受性更高。由于缺乏适当的信息和意识, 消费者对使用药用蘑菇开发的膳食补充剂最不感兴趣。缺乏对膳食补充剂及其生化作用、反应和与其他药物相互作用的研究。蘑菇是传统药物, 由于在生产过程中缺乏适当的标准、纯度系统和临床试验不足 (Fisher L, 2017)。因此, 对于未来, 我们的主

要重点应该是在消费者中建立关于正确使用这种黄金药物的意识，这只能通过选择适当的标准和做法来制作药物。

由于世界各地不同的栖息地和不同的生态区，各种各样的蘑菇成为营养食品。蘑菇被认为是一种健康食品，适合所有年龄组，因为它含有丰富的蛋白质、膳食纤维、维生素和矿物质。随着巨大的营养优势，他们也知道含有各种生物活性成分，这些成分被药剂师持续用作开发功能性食品的原料。在增强免疫能力、降低癌症风险、抑制肿瘤生长、维持血糖等方面发挥着重要作用。这些生物活性分子的保留需要以这样的方式被捕获，即它们从农场到餐桌都保持完整，因此由于烹饪、罐装、热烫和加热等各种过程造成的损失应控制在最小程度（Naepels M and Anna Tsing, 2017）。因此，总的来说，我们可以说由蘑菇干预的各种生理活动的范围很广，并且可以预见，随着分子生物学和营养基因组学的当前科学和进步，蘑菇可以作为最佳营养食品之一。只有当我们整合了营养食品特性的所有方面的信息，以便在功能食品的开发中更好地利用它。

1.2.2 构建我国特色食用菌加工原料数据库目的及意义

我国食用菌加工行业有充足的加工原料，食用菌资源丰富，为食用菌加工行业的发展提供了前提。我国是人口第一大国，我国对食用菌加工产品的消费量巨大，国内市场潜力巨大。食用菌鲜品直接销售，利润低且新鲜食用菌更容易腐烂，对食用菌进行加工可以避免以上问题。但是我国现在食用菌加工行业还存在很多问题，食用菌加工率低，仅占食用菌鲜品的7%左右，且加工行业已粗加工为主，缺少精细加工。我国也缺少对食用菌营养成分和活性功能成分的了解，构建我国特色食用菌加工原料数据库，提供食用菌营养成分含量、活性成分等数据，指导食用菌加工行业原材料筛选，促进我国食用菌加工产业发展。

通过基因组、转录组、代谢组分析，结合高通量、多靶标活性筛选，系统挖掘新兴和传统食用菌资源菌株及其风味、营养和生物活性等功能成分，并进行全面评价，构建从菌种资源、功能成分到加工原料一体化的特色食用菌数据库。我国特色食用菌加工原料数据库可以指导在食用菌加工产业筛选出更适合的食用菌品种作为原料，大大减少资源浪费，提高食用菌加工效率，提高产品质量。

1.3 真菌二元共培养新颖次生代谢产物研究概况

真菌来源的活性次级代谢产物，作为成药的重要来源，在医药行业发挥着重要的作用。抗生素药物青霉素，免疫抑制剂环孢菌素 A，抗真菌药物灰黄霉素，治疗心血管疾病的药物美伐他汀、洛伐他汀等，均来源于真菌 (Cragg and Newman, 2013; Bertrand et al., 2014)。然而在实验室传统、常规的培养模式下许多微生物的代谢途径处于沉默状态，导致许多次级代谢产物不能产生，对微生物资源的有效利用造成浪费 (Brakhage, 2013)。同时，随着研究的不断深入，使得微生物资源越来越稀缺，发现新化合物或强活性化合物的几率越来越低、难度越来越大 (Marmann et al., 2014)。因此，迫切需要尝试各种新技术和新方法，如通过模拟微生物共培养这一共生体系，刺激微生物做出不同的代谢反应，获得结构新颖的活性代谢产物。

二元共培养的优势：当前微生物生长培养研究局限于在平板上分离单个菌落，并在实验室条件下进行纯培养。然而，在常规纯培养条件下，一些编码天然产物的基因并不会真正表达或表达率太低 (Ardin P et al., 2016)，导致微生物并不会产生其基因编码的所有化合物。现已有很多方法促进微生物代谢产物的多样性，第一种是通过改变微生物生长条件或培养基；第二种通过基因突变、敲除、异源表达等方法从分子水平上激活沉默基因；第三种就是通过微生物之间的共培养来促使微生物次级代谢产物的产生。在自然界中，微生物通常以混合菌落的形式存在，微生物与微生物之间存在着很多相互作用，例如协同代谢、竞争抑制和诱导代谢 (Mendel and Friedman, 2016)。共培养就是一种利用微生物之间的作用刺激促使微生物产生活性次级代谢产物的方法。早在 1925 年，有学者就首次报道了微生物共培养的研究，并指出了硝化细菌属与生丝微菌属在硅胶介质中共培养，从而形成了不同的产物。共培养策略是通过模拟自然生态环境来建立人工微生物群落 (El Dine R S et al., 2019)。

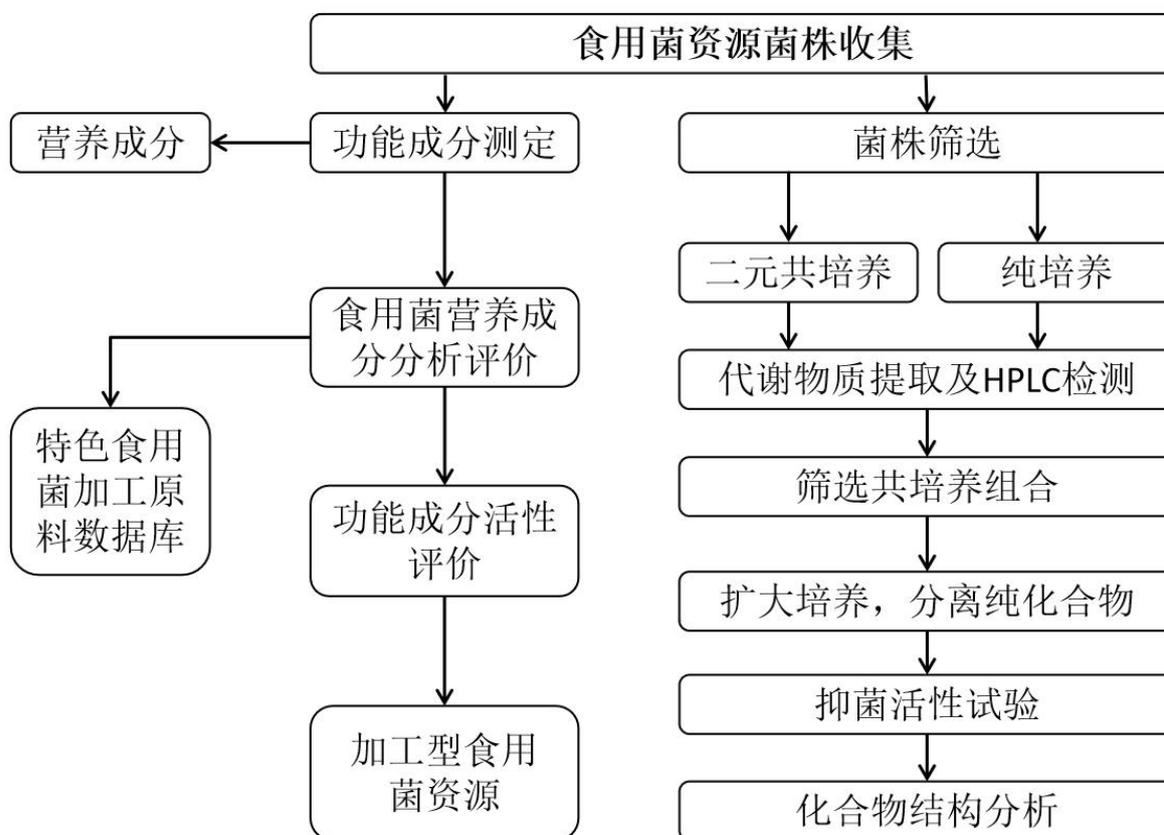
共培养可使现有次级代谢产物的积累增加，或通过微生物之间的相互作用刺激沉默基因的表达产生新的化合物 (Kovacs B et al., 2018)。近年来，人们已进行了很多关于微生物共培养的实验。真菌之间的共培养已成为可以刺激产生新型化合物的重要研究对象，当两个真菌菌落生长位置相近时，为了争夺营养，菌丝体可以以不同方式相互作用，包括共生、竞争和中立，这几种共存类型也可以相互转化。人们通过在固体培养基上进行共培养研究，总结出了 4 种主要的相互作用类型，分别为过度生长、接触抑制、区域线和距离抑制 (Bozena Muszyńska et al., 2011)。在这种生长状态下，真菌具有更强的代谢活性，容易产证更多种类，更多量的次级代谢产物 (Kumari S K, 2017)。

自然环境下，食药用真菌为获得有限的生存空间和资源，菌体间产生不同的相互作用，在这种环境下，菌体为抵御外界刺激以适应生存环境，分泌合成次级代谢产物

(Hoeksema B W and Voogd N J D, 2011)。二元共培养过程中，相应的沉默基因被激活，合成的次级代谢产物具有特定的生物活性。如通过对云芝的基因组进行解析发现，云芝合成天然产物的能力被低估，云芝整个基因组大小为 44.79 Mb，编码 14572 个预测基因，而这些基因能够编码合成成千上万的次级代谢产物，如多糖，萜类等化合物，但发现的纯化合物数量仍然只占很小部分。担子真菌斑孔木层孔菌 (*Phellinus punctatus*) 与另一担子真菌桦褐孔菌 (*Inonotus obliquus*) 共培养后，菌丝体数量减少，生长受到抑制，但是其次级代谢产物含量提高 (Shao Y et al., 2020)。二元共培养模拟了自然发生的竞争，通过构建真菌的共培养，以获得新颖或者具有良好生物活性的次生代谢产物。

1.4 本研究技术路线

本研究收集 2500 份食用菌资源，并对其进行营养成分测定，筛选加工型食用菌资源，获得数据录入中国特色食用菌加工原料数据库；通过生物活性和营养成分筛选二元共培养菌株，获得有活性的菌株组合，进行扩大发酵分离纯化化合物，对化合物进行抑菌活性筛选，对有抑菌活性化合物进行结构分析，技术路线如下：



第二章 食用菌资源菌株收集、鉴定与保藏

2.1 试验材料

2.1.1 仪器设备

表 2.1 实验中使用的主要仪器设备

Table 2.1 Main Instruments and Equipment Used in the Experiment

名称	型号	生产厂家
双人单面净化工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
电子天平	PC214	OHOUS 仪器有限公司
电热恒温培养箱	HZQ-F160	上海福玛实验设备有限公司
远红外快速恒温干燥箱	DRR-9082	上海跃进医疗器械厂
落地恒温振荡器	HZQ-F160	常州诺基仪器有限公司
玻璃纸	YA0620	Solarbio 科技有限公司
台式冷冻离心机	TGL20M	长沙湘智离心机仪器有限公司
立式高压蒸汽灭菌器	LDZF-75L	上海申安医疗器械厂
自动化 PCR 仪	Mx3000P	ABI
倒置式生物显微镜	CKX41SF	奥林巴斯工业有限公司

2.1.2 供试培养基

表 2.2 培养基配方

Table 2.2 Medium formula

培养基名称	试剂
CPDA 培养基	20%马铃薯汁, 磷酸二氢钾 3 g, 维生素 B ₁ 8 mg, pH 自然, 葡萄糖 20 g, 七水硫酸镁 1.5 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL, 121 °C 灭菌 20 min
CPDB 培养基	20%马铃薯汁, 磷酸二氢钾 3 g, 维生素 B ₁ 8 mg, pH 自然, 葡萄糖 20 g, 七水硫酸镁 1.5 g, 蒸馏水 1000 mL, 121 °C 灭菌 20 min
绣球菌培养基	香蕉粉 15 g, 蜂蜜粉 5 g, 啤酒酵母 10 g, 蛋白胨 1 g, 大豆粉 1 g, KH ₂ PO ₄ 1 g, 琼脂 20 g, pH 5.5, 蒸馏水 1000 mL, 121 °C 灭菌 20 min
双孢菇培养基	20%马铃薯汁, 琼脂 20 g, 蔗糖 10 g, 蛋白胨 7.5 g, KH ₂ PO ₄ 1 g, MgSO ₄ 0.5 g, VB ₁ 20 mg, 121 °C 灭菌 20 min

2.2 试验方法

2.2.1 食用菌子实体资源收集

野生食用菌子实体收集：在野外搜集野生食用菌子实体，地点选取在云南省昆明市、山东省烟台市、山东省青岛市、内蒙古赤峰市等。在野外发现野生食用菌后牌照记录，装入准备好的信封或者吸水纸包好，小心保存避免压坏食用菌子实体，记录采集时间、地点、编号等数据。将采集子实体平摊在阴凉处风干，根据食用菌子实体外观进行形态学鉴定，参照卯小岚《中国大型真菌》进行鉴定。对于野生食用菌子实体大小，形状，颜色进行对照，初步确定采集食用菌子实体种属。

可栽培食用菌子实体收集：通过批发市场、商超和网络等渠道购买新鲜和干制食用菌子实体，在山东省内各地购买。通过网购等途径购买全国各地标明生产厂商、生产地址的食用菌子实体，网购以干子实体为主。根据实验室已有菌株，栽培部分食用菌菌株获得子实体。

2.2.2 食用菌菌种分离纯化

食用菌子实体组织分离：取新鲜子实体，用 70%酒精对表面进行消毒，用解剖刀和镊子无菌取食用菌子实体组织块，所取位置为菌柄菌盖结合部位，该部位具有生长速度快等优势，将所取组织块接种到 CPDA 培养基上，25 °C 恒温培养，每 24 h 观察生长状况，除去污染的平板。

菌种纯化：挑选菌丝生长状态良好、菌丝粗壮且无污染的菌丝，接种到 CPDA 培养基中，25 °C 恒温培养，获得纯净菌种。

2.2.3 食用菌菌种资源收集

食用菌菌种资源以山东省农业应用真菌重点实验菌种库为基础，活化扩大及扩大培养菌种库内拥有的菌种，增加新分离的菌种。

采集的野生子实体，进行组织分离，采用 CPDA 培养基分离菌种，并进行菌种的纯化，获得纯净菌种后进行 ITS 鉴定，确定菌种品种，最后进行菌种保藏，采用低温保藏法试管斜面保藏，作为菌种资源。收集的可栽培子实体，进行组织分离，采用 CPDA 培养基分离菌种，并进行菌种的纯化，获得纯净菌种后进行 ITS 鉴定，确定菌种品种。

2.2.4 食用菌种质资源 ITS 鉴定

1) 采用 Ezup 柱式真菌 DNA 抽提试剂盒提取 DNA

按试剂盒步骤提取

2) 样品 rDNA ITS 区的 PCR 扩增

引物序列为:

引物名称	引物序列
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

PCR 扩增反应体系为:

名称	体积
Mix 2×	15 μL
模板	1 μL
ITS1	1 μL
ITS4	1 μL
ddH ₂ O	12 μL

PCR 扩增程序为:

98 °C	2 min	
98 °C	15 ses	} 35 个循环
25 °C	15 ses	
72 °C	15 ses	
72 °C	5 min	
4 °C	forever	

3) ITS 扩增产物的序列测定对比及分析

将得到的样品 ITS 扩增产物直接送至相关公司测序，测序引物为 PCR 引物。将测序得到的序列，通过 NCBI 在线 Blast，与 GenBank 中已被测序成功的序列进行同源性比对确定食用菌子实体种属。

2.2.5 食用菌子实体及菌种保藏

1) 食用菌子实体-20 °C保藏:将野生食用菌子实体称重并写明种属做好记录，装入封口袋，-20 °C冰箱保藏。

2) 野生食用菌子实体烘干保藏: 将野生食用菌子实体放入鼓风干燥箱, 40 °C 烘干 3-4 h 初步脱水, 然后 55 °C 烘干 8-10 h 固定外形, 65 °C 烘干至食用菌子实体重量恒定; 装入封口袋, 用真空封口机抽真空保存。

3) 食用菌菌种保藏: 对于纯培养菌种, 接种 7 只试管斜面, 等长满斜面后, 确定生长状态良好且无污染, 4 °C 冰箱保藏菌种, 并做好记录。

2.3 试验结果

2.3.1 栽培食用菌子实体收集结果

在本研究中, 通过实验室栽培, 市场购买等方法共收集栽培子实体 1200 份, 包含了我国北方大部分工厂化、合作社以及农户生产的食用菌产品。收集食用菌子实体还是以金针菇、香菇、平菇、杏鲍菇、蟹味菇等品种为主。收集栽培食用菌子实体共包括 27 个种, 大部分来自山东地区, 部分来自云南及东北地区。

表 2.3 栽培食用菌子实体品种汇总表

Table 2.3 Summary Table of Fruiting Body Varieties of Cultivated Edible Fungi

种/学名	种/中文名
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	肺型侧耳
<i>Hohenbuehelia reniformis</i>	肾形亚侧耳
<i>Pleurotus flabellatus</i>	美味扇菇
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	白玉菇
<i>Lentinula edodes</i>	香菇
<i>Flammulina velutipes</i>	金针菇
<i>Auricularia auricula</i>	木耳
<i>Morchella importuna</i>	羊肚菌
<i>Pleurotus albellus</i>	白鲍鱼菇
<i>Pleurotus ostreatus</i>	糙皮侧耳
<i>Phallus indusiatus</i>	竹荪
<i>Cordyceps militaris</i>	蛹虫草
<i>Pleurotus eryngii</i>	刺芹侧耳
<i>Grifola frondosa</i>	灰树花
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	大球盖菇
<i>Tremella fuciformis</i>	银耳

<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	毛柄库恩菌
<i>Volvariella volvacea</i>	草菇
<i>Cyclocybe cylindracea</i>	茶树菇
<i>Ganoderma lucidum</i>	赤灵芝
<i>Coprinus comatus</i>	鸡腿菇
<i>Hericium erinaceus</i>	珊瑚猴头
<i>Auricularia nigricans</i>	毛木耳
<i>Oudemansiella radicata</i>	长根菇
<i>Pholiota nameko</i>	滑子菇
<i>Lactarius deliciosus</i>	黄油蘑
<i>Schizophyllum commune</i>	裂褶菌

2.3.2 野生食用菌子实体收集结果

野生子实体通过在云南昆明购买和采集，山东烟台、青岛地区采集，内蒙古赤峰市采集。在网络购买和同行赠送等方式野生食用菌子实体，共收集野生子实体 178 份，包含 6 个纲，9 个目，28 个科，89 个种。其中有多种珍稀食用菌资源，如球根蚁巢伞、大白口蘑、大白桩菇、冈尼虫草、蝉花虫草等。

表 2.4 野生食用菌子实体收集情况统计

Table 2.4 Statistics of Fruiting Body Collection of Wild Edible Fungi

种/学名	种/中文名	产地
<i>Boletus subtomentosus</i>	褐盖新牛肝菌	云南省昆明市
<i>Boletus badius</i>	栗褐牛肝菌	云南省昆明市
<i>Tricholoma matsutake</i>	松口蘑	云南省昆明市
<i>Termitomyces bulborhizus</i>	球根蚁巢伞	云南省昆明市
<i>Lactarius deliciosus</i>	松乳菇	云南省昆明市
<i>Phallus indusiatus</i>	长裙鬼笔	云南省昆明市
<i>Russula virescens</i>	变绿红菇	云南省昆明市
<i>Cantharellus cibarius</i>	鸡油菌	云南省昆明市
<i>Ramaria formosa</i>	美丽枝瑚菌	云南省昆明市
<i>Boletus edulis</i>	美味牛肝菌	云南省昆明市
<i>Lycoperdon asperum</i>	粗皮马勃	云南省昆明市
<i>Russula vesca</i>	菱红菇	云南省昆明市
<i>Russula vinosa</i>	酒色红菇	山东省烟台市
<i>Ganoderma lucidum</i>	赤灵芝	山东省烟台市

<i>Schizophyllum commune</i>	裂褶菌	山东省烟台市
<i>Cortinarius cotoneus</i>	棕绿丝膜菌	山东省烟台市
<i>Coriolus versicolor</i>	杂色云芝	山东省烟台市
<i>Auricularia nigricans</i>	毛木耳	山东省烟台市
<i>Tremella aurantialba</i>	金耳	云南省昆明市
<i>Lepista sordida</i>	花脸香蘑	山东省青岛市
<i>Humidicutis auratocephala</i>	橙黄湿皮伞	青岛农业大学
<i>Auricularia delicata</i>	皱木耳	青岛农业大学
<i>Tricholoma populinum</i>	大白口蘑	内蒙古赤峰市
<i>Leucopaxillus giganteus</i>	大白桩菇	内蒙古赤峰市
<i>Lepista nuda</i>	紫丁香蘑	内蒙古赤峰市
<i>Lyophyllum fumosum</i>	烟色离褶伞	内蒙古赤峰市
<i>Pyropolyporus fomentarius</i>	木梯	内蒙古赤峰市
<i>Peziza vesiculosa</i>	泡质盘菌	内蒙古赤峰市
<i>Agaricus dulcidulus</i>	甜蘑菇	内蒙古赤峰市
<i>Auricularia mesenterica</i>	肠膜状木耳	青岛农业大学
<i>Ganoderma applanatum</i>	华盖灵芝	青岛农业大学
<i>Ganoderma sinense</i>	紫油芝	青岛农业大学
<i>Clitocybe phyllophila</i>	白杯伞	内蒙古赤峰市
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	美味蜡伞	内蒙古赤峰市
<i>Hygrophorus arbustivus</i>	树状蜡伞	内蒙古赤峰市
<i>Agaricus arvensis</i>	草原黑蘑	内蒙古赤峰市
<i>Daedaleopsis tricolor</i>	三色拟迷孔菌	山东省烟台市
<i>Agaricus silvicolae-similis</i>	拟白林地蘑菇	青岛农业大学
<i>Russula delica</i>	大白菇	内蒙古赤峰市
<i>Pluteus atricapillus</i>	光柄菇	内蒙古赤峰市
<i>Gomphidius glutinosus</i>	黏柳钉菇	青岛农业大学
<i>Sparassis crispa</i>	绣球菌	青岛农业大学
<i>Suillus flavus</i>	黄牛肝	云南省昆明市
<i>Gomphidius viscidus</i>	血红柳钉菇	云南省昆明市
<i>Geastrum hygrometricum</i>	地星	山东省青岛市
<i>Cantharellus minor</i>	小鸡油菌	青岛农业大学
<i>Albatrellus ellisii</i>	地花孔菌	青岛农业大学
<i>Suillus granulatus</i>	点柄乳牛肝菌	青岛农业大学
<i>Boletus brunneissimus</i>	黑牛肝	青岛农业大学
<i>Paxillus involutus</i>	卷边桩菇	青岛农业大学

<i>Hericium erinaceus</i>	珊瑚状猴头	青岛农业大学
<i>Amanita hemibapha</i>	浅橙黄鹅膏	青岛农业大学
<i>Amanita vaginata</i>	灰鹅膏	山东省烟台市
<i>Boletus instabilis</i>	斜脚牛肝菌	青岛农业大学
<i>Cystoderma fallax</i>	金粒囊皮伞	青岛农业大学
<i>Lactarius lilacinus</i>	淡紫乳菇	青岛农业大学
<i>Laccaria proxima</i>	条柄蜡蘑	青岛农业大学
<i>Cordyceps sinensis</i>	梁山绿僵虫草	青岛农业大学
<i>Russula atropurpurea</i>	黑紫红菇	青岛农业大学
<i>Inonotus obliquus</i>	桦褐孔菌	内蒙古赤峰市
<i>Macrocybe lobayensis</i>	洛巴伊大口蘑	青岛农业大学
<i>Lepista glaucocana</i>	紫灰香蘑	内蒙古赤峰市
<i>Clitocybe maxima</i>	大杯伞	内蒙古赤峰市
<i>Clitocybe odera</i>	香杯伞	内蒙古赤峰市
<i>Lepista luscina</i>	灰褐香蘑	内蒙古赤峰市
<i>Spathularia flavida</i>	黄地勺	内蒙古赤峰市
<i>Lepista irina</i>	肉色香蘑	内蒙古赤峰市
<i>Melanoleuca grammopodia</i>	条柄铤囊蘑	青岛农业大学
<i>Ganoderma sinense</i>	紫灵芝	青岛农业大学
<i>Morchella importuna</i>	羊肚菌	青岛农业大学
<i>Phylloporus bellus</i>	褶孔牛肝	青岛农业大学
<i>Cordyceps militaris</i>	冈尼虫草	青岛农业大学
<i>Isaria cicadae</i>	蝉花虫草	青岛农业大学
<i>Armillaria luteo-virens</i>	黄绿蜜环菌	青岛农业大学
<i>Cortinarius rufo-olivaceus</i>	紫红丝膜菌	青岛农业大学
<i>Phellinus igniarius</i>	桑黄	青岛农业大学
<i>Tuber indicum</i>	印度块菌	青岛农业大学
<i>Agrocybe dura</i>	硬田头菇	青岛农业大学
<i>Amanita esculenta</i>	可食鹅膏	青岛农业大学
<i>Amanita sinensis</i>	中华鹅膏	青岛农业大学
<i>Clitocybe candida</i>	白壳杯伞	青岛农业大学
<i>Crocinoletus rufoaureus</i>	金红橙牛肝菌	青岛农业大学
<i>Pleurotus abbellus</i>	鲍鱼菇	青岛农业大学
<i>Hygrophorus poetarum</i>	大白蜡伞	青岛农业大学
<i>Hygrophorus speciosus</i>	美丽蜡伞	青岛农业大学
<i>Lactarius piperatus</i>	辣乳菇	青岛农业大学

<i>Suillus spraguei</i>	虎皮乳牛肝菌	青岛农业大学
<i>Termitomyces clypeatus</i>	尖盾蚁巢伞	云南省昆明市
<i>Agrocybe pediades</i>	平田头菇	青岛农业大学

2.3.3 食用菌子实体组织分离结果

在获得子实体的同时，对得到的新鲜野生子实体进行组织分离，得到纯净菌种，丰富食用菌种植资源；对部分人工栽培的新鲜食用菌也进行了组织分离，便于后续继续研究，将分离菌种经 ITS 鉴定后确定其物种，并做好菌种保存工作，共分离食用菌菌种 19 个。

表 2.5 菌种分离明细表

Table 2.5 Strain Isolation Schedule

学名	中文名	产地
<i>Inonotus obliquus</i>	桦褐孔菌	内蒙古赤峰市
<i>Lentinula edodes</i>	香菇 QH-6	山东省淄博市
<i>Morchella sextelata</i>	羊六妹 13	云南省昆明市
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	肺形侧耳 5271	云南省昆明市
<i>Lepista nuda</i>	紫丁香蘑	山东省青岛市
<i>ramaria formosa</i>	枝瑚菌	内蒙古赤峰市
<i>Laetiporus sulphureus</i>	硫磺菌	内蒙古赤峰市
<i>Leucopaxillus sp.</i>	鳞盖白桩菇	内蒙古赤峰市
<i>Lepista glaucocana</i>	紫灰香蘑	内蒙古赤峰市
<i>Ampulloclitocybe clavipes</i>	大杯伞	内蒙古赤峰市
<i>Clitocybe odera</i>	香杯伞	内蒙古赤峰市
<i>Lyophyllum fumosum</i>	烟色离褶伞	内蒙古赤峰市
<i>Lepista panaeola</i>	灰褐香蘑	内蒙古赤峰市
<i>Lepista nuda</i>	肉色香蘑	内蒙古赤峰市
<i>Agaricus campestris</i>	蘑菇	内蒙古赤峰市
<i>Leucopaxillus giganteus</i>	大白桩菇	内蒙古赤峰市
<i>Pyropolyporus fomentarius</i>	木蹄层孔菌	内蒙古赤峰市

2.4 本章小结

本研究共收集食用菌种质资源 2500 份，包含山东、云南和内蒙等地野生食用菌资源共 93 个种，包括牛肝菌、鸡枞菌、灰紫香蘑等，丰富了野生食用菌资源。收集山东

周边栽培食用菌资源共包含 27 个种，包括杏鲍菇、双孢菇、真姬菇、金针菇等，丰富了对山东省以及周边栽培实用菌资源的统计。分离野生和栽培子实体，获得纯净菌种 19 个，丰富了食用菌菌种资源。

第三章 食用菌营养成分测定

3.1 实验材料

3.1.1 供试菌株

供试菌株为第二章中收集的食用菌子实体和菌种资源（见附件）。

3.1.2 主要仪器设备

表 3.1 实验中使用的主要仪器设备

Table 3.1 Main Instruments and Equipment Used in the Experiment

名称	型号	生产厂家
酶标仪	Varioskan LUX	赛默飞世尔科技有限公司
组织研磨仪	YMY-200	上海楚工实业有限公司
双人单面净化工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
电子天平	PC214	OHOUS 仪器有限公司
电热恒温培养箱	HZQ-F160	上海福玛实验设备有限公司
远红外快速恒温干燥箱	DRR-9082	上海跃进医疗器械厂
落地恒温振荡器	HZQ-F160	常州诺基仪器有限公司
玻璃纸	YA0620	Solarbio 科技有限公司
台式冷冻离心机	TGL20M	长沙湘智离心机仪器有限公司
倒置式生物显微镜	CKX41SF	奥林巴斯工业有限公司

3.1.3 主要试剂

表 3.2 食用菌营养成分测定试剂盒

Table 3.2 Edible Fungi Nutrition Determination Kit

测试项目	试剂盒名称
维生素 C 测试	南京建成科技有限公司维生素 C 测试试剂盒
维生素 E 测试	南京建成科技有限公司维生素 E 测试试剂盒
总氨基酸测试	南京建成科技有限公司总氨基酸测试试剂盒
钙含量测试	南京建成科技有限公司钙测试试剂盒
铁含量测试	南京建成科技有限公司铁测试试剂盒
蛋白质测试	南京建成科技有限公司蛋白质测试试剂盒

3.2 实验方法

3.2.1 样品准备

子实体样品可以直接进行营养成分测定。

菌种需要扩大培养后用于营养成分测定，可采用平板培养和液体摇瓶培养。

平板培养菌丝的获取：加热融化 CPDA 培养基，倒平板备用，待完全冷却后培养基表面铺一层无菌玻璃纸，接种菌种块，适当温度培养。培养完成后刮取菌丝：待菌丝长满平板后，用无菌手术刀轻轻将菌丝刮下，转移至无菌离心管备用。

二元共培养菌球获取：将平板菌种使用 6 mm 打孔器制成菌饼备用，液体 CPDA 培养基每 250 mL 装入 100 mL 培养基，每瓶培养基接入两种不同菌种，每个菌种接入 3 块。25 °C 恒温振荡培养，摇床转速 150 r/min。培养 14 d，过滤，蒸馏水清洗三遍获得菌球备用。

3.2.2 样本处理

食用菌干品样品待测液准备：将食用菌子实体放入 55 °C 烘箱烘干至恒重，称取 100 mg 子实体干品于离心管中，加入 1000 μ L 超纯水，加入 1 颗 6 mm 钢珠，在高通量组织捣碎机中 250 Hz 破碎 1 min，获得食用菌组织匀浆，后 12000 rpm 离心 2 min，取上清液为待测液。维生素 E 测定，样品的匀浆介质为维生素 E 提取液，其他步骤相同。

食用菌鲜品样品待测液准备：称取 100 mg 子实体鲜品于离心管中，加入 1000 μ L 超纯水，加入 1 颗 6 mm 钢珠，在高通量组织捣碎机中 250 Hz 破碎 1 min，获得食用菌

组织匀浆，后 12000 rpm 离心 2 min，取上清液为待测液。维生素 E 测定，样品的匀浆介质为维生素 E 提取液，其他步骤相同。

食用菌菌丝样品待测液准备：称取 100 mg 菌丝离心管中，加入 1000 μ L 超纯水，加入 1 颗 6 mm 钢珠，在高通量组织捣碎机中 250 Hz 破碎 1 min，获得食用菌组织匀浆，后 12000 rpm 离心 2 min，取上清液为待测液。维生素 E 测定，样品的匀浆介质为维生素 E 提取液，其他步骤相同。

3.2.3 食用菌营养成分含量测定

3.2.3.1 粗多糖含量测定

(1) 配制 5% 的苯酚溶液和 100 mg/L 葡萄糖标准溶液，取待测液 100 μ L 稀释 100 倍用于测定多糖。

(2) 测定方法：按照下表，精密吸取葡萄糖标准溶液，后加入蒸馏水，再加入 5% 的苯酚溶液后迅速接入浓硫酸，摇匀静置 10 min，置 30 $^{\circ}$ C 水浴 20 min，采用酶标仪每种加样 150 μ L 测定，在 490 nm 处测定吸光值。以吸光度为纵坐标，葡萄糖含量为横坐标，采绘制标准曲线。

表 3.3 总糖含量测定标准曲线

Table 3.3 Standard Curve for Determination of Total Sugar Content

试管标号	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
标准 G (mL)	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00
蒸馏水 (mL)	2.00	1.80	1.60	1.40	1.20	1.00	0.80	0.60	0.40	0.20	0.00
5% 苯酚 (mL)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
浓硫酸 (mL)	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
糖含量 (μ g/mL)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

(3) 计算

获得标准曲线后将样品吸光值带入求多糖含量，然后换算单位 (g/100 g)。

3.2.3.2 蛋白质含量检测

用试剂盒给定步骤检测，测定方法为考马斯亮蓝法测定蛋白质。

3.2.3.3 维生素 C 含量检测

用试剂盒给定步骤检测，测定方法为铁 (II) — 邻菲罗啉 — 桑色素体系分光光度法。

3.2.3.4 维生素 E 含量检测

用试剂盒给定步骤检测。

3.2.3.5 钙含量检测

用试剂盒给定步骤检测，方法为甲基百里香芬兰比色法。

3.2.3.6 铁含量检测

用试剂盒给定步骤检测，方法为 1,10-菲啰啉分光光度法。

3.3 食用菌子实体营养结果与分析

将所有收集子实体营养成分进行测定，根据测定数据进行分析，筛选出某个营养成分含量突出的品种，栽培子实体与野生子实体一同分析。

(1) 粗多糖含量分析：食用菌子实体干品粗多糖含量见下表，在测定的子实体干品营养成分数据中，香菇粗多糖含量为 33.776 g/100 g，在测定的食用菌子实体干品中含量最高，约为干重的 1/3。白玉菇、羊肚菌和杏鲍菇粗多糖含量也高于 30 g/100 g，说明这几种已经商品化的食用菌多糖含量十分丰富。球根白蚁伞粗多糖含量高达 30.339 g/100 g，是野生食用菌子实体中多糖含量较高的品种。

表 3.4 食用菌子实体干品粗多糖含量分析

Table 3.4 Analysis of Crude Polysaccharide Content in Edible Mushroom Fruitbody

种/学名	种/中文名	粗多糖 (g/100 g)
<i>Lentinula edodes</i>	香菇	33.776
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	白玉菇	32.448
<i>Morchella importuna</i>	羊肚菌	31.876
<i>Pleurotus eryngii</i>	杏鲍菇	31.268
<i>Termitomyces bulborhizus</i>	球根白蚁伞	30.339
<i>Morchella importuna</i>	诸城栽培羊肚菌	28.630
<i>Hohenbuehelia reniformis</i>	肾形亚侧耳 1710	18.668
<i>Lepista sordida</i>	花脸香蘑	17.094
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	肺形侧耳 5271	12.471

食用菌子实体鲜品粗多糖含量见下表，食用菌子实体鲜品多糖较干品含量较低，是因为鲜品中含有大量水分。白玉菇多糖含量高达 16.181 g/100 g，双孢菇、猴头菇作为可栽培的食用菌多糖含量也比较高；裂褶菌和美味牛肝菌多糖含量是野生食用菌中较高的品种；东营栽培羊肚菌新鲜子实体多糖含量为 5.613 g/100 g，作为本课题组驯化栽培的食用菌，开发潜力巨大。

表 3.5 食用菌子实体鲜品粗多糖含量

Table 3.5 Crude Polysaccharide Content of Fresh Edible Mushroom Fruiting Body

种/学名	种/中文名	粗多糖 (g/100 g)
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	白玉菇	16.181
<i>Agaricus bisporus</i>	双孢菇	12.411
<i>Hericiium erinaceus</i>	猴头菇	9.681
<i>Schizophyllum commune</i>	裂褶菌	9.606
<i>Lentinula edodes</i>	香菇	9.534
<i>Boletus edulis</i>	美味牛肝菌	6.610
<i>Morchella importuna</i>	东营栽培羊肚菌	5.613

(2) 蛋白质含量分析: 由下表食用菌子实体干品蛋白质含量分析可看出, 白鲍鱼菇子实体干品中蛋白质含量高达 41.436 g/100 g, 肺形侧耳 5271 子实体干品中蛋白质含量高达 37.225 g/100 g, 食用菌干品中蛋白质含量高, 说明食用菌子实体蛋白含量丰富, 适合作为高蛋白食品的加工原料。

表 3.6 食用菌子实体干品蛋白质含量分析

Table 3.6 Analysis of Protein Content in Dried Fruiting Body of Edible Fungi

种/学名	种/中文名	蛋白质 (g/100 g)
<i>Pleurotus albellus</i>	白鲍鱼菇	41.436
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	肺型侧耳 5271	37.226
<i>Agaricus bisporus</i>	双孢菇	37.092
<i>Pleurotus ostreatus</i>	小平菇 18	36.932
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	白玉菇	32.919
<i>Pleurotus flabellatus</i>	美味扇菇 1509	32.906
<i>Termitomyces bulborhizus</i>	球根白蚁伞	32.524
<i>Hohenbuehelia reniformis</i>	肾形亚侧耳 1710	31.159

通过对食用菌子实体鲜品蛋白含量分析见下表, 可知食用菌鲜品中也含有丰富蛋白质, 白鲍鱼菇新鲜子实体蛋白含量为 21.340 g/100 g, 在新鲜食用菌中含量最高; 蛋白含量超过 15 g/100 g 的还有双孢菇和白鲍鱼菇, 新鲜子实体含有丰富蛋白质。使用食用菌子实体鲜品, 尤其是鲍鱼菇、双孢菇和白玉菇等种类可补充人体所需蛋白质。

表 3.7 食用菌子实体鲜品蛋白质含量分析

Table 3.7 Analysis of Protein Content in Fresh Edible Mushroom Fruiting Body

种/学名	种/中文名	蛋白质 (g/100 g)
<i>Pleurotus abbellus</i>	白鲍鱼菇	21.340
<i>Agaricus bisporus</i>	双孢菇	15.466
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	白玉菇	13.959
<i>Pleurotus ostreatus</i>	小平菇 18	12.562
<i>Termitomyces bulborhizus</i>	球根蚁巢伞	11.988
<i>Pleurotus ostreatus</i>	小平菇 18	9.868
<i>Lentinula edodes</i>	香菇	9.554

(3) 微量元素铁、钙含量分析：在测定的食用菌子实体干品营养成分数据中，综合分析后筛选出以下 6 种铁、钙含量相对较高的菌株，分别是美丽枝瑚菌、栗褐牛肝菌、鸡油菌、松口蘑、主城羊肚菌和松乳菇。表中除诸城羊肚菌外是人工栽培的食用菌，其他均为野生食用菌。经常食用以上食用菌可增加铁和钙元素摄入，补充人体所需铁和钙元素。

表 3.8 食用菌子实体干品铁、钙含量分析

Table 3.8 Analysis of Iron and Calcium Content of Dried Fruit Body of Edible Fungi

种/学名	种/中文名	铁 (mg/100 g)	钙 (mg/100 g)
<i>Ramaria formosa</i>	美丽枝瑚菌	127.683	543.816
<i>Boletus badius</i>	栗褐牛肝菌	126.535	522.968
<i>Cantharellus cibarius</i>	鸡油菌	110.574	492.933
<i>Tricholoma matsutake</i>	松口蘑	106.455	487.986
<i>Morchella importuna</i>	诸城羊肚菌	103.304	372.840
<i>Lactarius deliciosus</i>	松乳菇	100.875	377.576

对于食用菌子实体鲜品中微量元素见下表，分析测定发现，含铁、钙高的食用菌也大多为野生食用菌，其中庆元竹荪铁含量高达 47.636 mg，甜蘑菇铁含量为 41 mg，常食用铁含量较高的食用菌，有益于补充铁元素预防贫血。其中白玉菇作为可工厂化栽培的食用菌含有较高的铁、钙等微量元素，且白玉菇市场上常见易于购买，是补充微量元素的健康食品。

表 3.9 食用菌子实体鲜品铁、钙含量分析

Table 3.9 Analysis of Fresh Iron and Calcium Content in Edible Fungus Fruiting Body

种/学名	种/中文名	铁 (mg/100 g)	钙 (mg/100 g)
<i>Phallus indusiatus</i>	庆元竹荪	47.636	358.192
<i>Agaricus dulcidulus</i>	甜蘑菇	41.000	230.508
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	鸿滨白玉菇	53.083	136.111
<i>Boletus edulis</i>	美味牛肝菌	93.624	286.926
<i>Lycoperdon asperum</i>	粗皮马勃	55.782	724.028
<i>Boletus edulis</i>	美味牛肝菌	103.010	327.915

(4) 维生素 C, 维生素 E 含量分析: 食用菌子实体干品维生素含量, 在测定的子实体营养成分数据中, 维生素 C 含量普遍较高。综合分析后筛选出 7 种维生素 C、维生素 E 含量相对较高的菌株, 分别是东营羊肚菌、花菇、白玉菇等食用菌子实体干品。花菇、白玉菇等子实体现已工厂化生产, 市场常见, 羊肚菌等食用菌已经实现人工栽培, 市场前景广阔。

表 3.10 食用菌子实体干品维生素 C、维生素 E 含量分析

Table 3.10 Analysis of Vitamin C and Vitamin E Content in Dried Fruit of Edible Fungi

种/学名	种/中文名	维生素 C (mg/100 g)	维生素 E (mg/100 g)
<i>Morchella importuna</i>	东营羊肚菌	270.642	0.112
<i>Lentinula edodes</i>	食菌纪花菇	221.143	0.380
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	白玉菇	189.000	1.800
<i>Morchella importuna</i>	羊肚菌	175.600	5.428
<i>Boletus edulis</i>	白牛肝	94.400	7.152
<i>Agaricus arvensis</i>	草原黑蘑	83.400	6.318
<i>Coprinus comatus</i>	鸡腿菇	166.800	3.833

通过对食用菌子实体鲜品的维生素含量测定, 筛选出下表中的含维生素含量较高的菌种, 新鲜金针菇, 白鲍鱼菇和白玉菇含维生素 E 含量较高。食菌纪花菇和双孢菇维生素 C 含量较高, 经常使用下表中食用菌有助于补充身体维生素含量。

表 3.11 食用菌子实体鲜品维生素 C、维生素 E 含量分析

Table 3.11 Analysis of Vitamin C and Eitamin E Content in Fresh Edible Fungus Fruiting Body

种/学名	种/中文名	维生素 C (mg/100 g)	维生素 E (mg/100 g)
<i>Flammulina velutipes</i>	金针菇	14.600	17.864
<i>Pleurotus abellus</i>	白鲍鱼菇	14.653	8.017
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	白玉菇	10.600	7.250
<i>Morchella importuna</i>	诸城羊肚菌	3.165	6.278
<i>Lentinula edodes</i>	食菌纪花菇	161.314	0.342
<i>Agaricus bisporus</i>	双孢菇	160.400	1.205

3.4 食用菌菌丝结果分析

(1) 粗多糖含量分析：由下表可以看出，在测定的菌丝营养成分数据中，二元共培养菌丝球粗多糖含量较高。其中金针菇 AR17 和白平菇共培养粗多糖含量为 27.718 g/100 g，金针菇 AR17 和侧耳（日本）两个菌株共培养后粗多糖含量为 21.663 g/100 g，通过下表可见金针菇 AR17 与其他食用菌共培养后，多糖产量明显升高。这 7 组对抗菌株可以通过培养条件优化，进一步筛选有可能成为大规模生产提取粗多糖的菌种。

表 3.12 食用菌菌丝多糖含量分析

Table 3.12 Analysis of Polysaccharide Content in Mycelia of Edible Fungi

种/学名	种/中文名	粗多糖 (g/100 g)
<i>Flammulina velutipes</i> + <i>Pleurotus abellus</i>	AR17+白平菇	27.718
<i>Flammulina velutipes</i> + <i>Pleurotus abellus</i>	AR17+侧耳(日本)	21.663
<i>Flammulina velutipes</i> + <i>Flammulina velutipes</i>	AR17+工厂化金针菇	20.765
<i>Flammulina velutipes</i> + <i>Pleurotus ostreatus</i>	AR17+5526	20.672
<i>Flammulina velutipes</i> + <i>Pleurotus abellus</i>	常生源金针+白平菇	20.172
<i>Pleurotus djamor</i> + <i>Hericiium erinaceus</i>	红平+大猴头	20.007
<i>Flammulina velutipes</i> + <i>Flammulina velutipes</i>	AR12+工厂化金针	19.954

(2) 蛋白质含量分析：由下表可以看出，在测定的菌丝营养成分数据中，食用菌菌丝体的蛋白质，白鲍鱼菇和侧耳（日本）共培养蛋白质含量高达 27.436 g/100 g，小平菇 18 和平菇 002 共培养蛋白含量为 19.728 g/100 g。侧耳属在以下食用菌中占多数，可以推测侧耳属普遍含有较高蛋白质。

表 3.13 食用菌菌丝蛋白质含量分析

Table 3.13 Analysis of Protein Content in Mycelium of Edible Fungi

种/学名	种/中文名	蛋白质 (g/100 g)
<i>Pleurotus abellus</i> + <i>Pleurotus ostreatus</i>	白鲍鱼菇+侧耳(日本)	27.436
<i>Pleurotus ostreatus</i> + <i>Pleurotus ostreatus</i>	小平菇 18+平菇 002	19.728
<i>Pleurotus ostreatus</i> + <i>Pleurotus ostreatus</i>	小平菇 18+5526	17.960
<i>Pleurotus ostreatus</i>	糙皮侧耳 G13	17.188
<i>Clitocybe maxima</i>	大杯伞 J1	16.046
<i>Flammulina velutipes</i> + <i>Pleurotus ostreatus</i>	工厂金针+特抗平菇 650	13.663
<i>Hypsizygus marmoreus</i> + <i>Ganoderma lucidum</i>	白玉菇(方白)+崂山赤芝	12.782
<i>Flammulina velutipes</i> + <i>Pleurotus djamor</i>	永福+红平菇台湾	12.624
<i>Flammulina velutipes</i> + <i>Auricularia auricula</i>	AR17+黑威 15 号	12.526
<i>Pleurotus ostreatus</i> + <i>Pleurotus ostreatus</i>	小平菇 18+特抗 650	10.965

(3) 微量元素铁、钙含量分析：由表下表可以看出，在测定的子实体营养成分数据中，综合分析后筛选出以下铁、钙含量相对较高的菌株。5 组共培养菌株的铁钙含量较高，铁含量高于 160 mg/100 g；5526 和白灵菇 2 号钙含量最高均大于 300 mg/100 g。

表 3.14 食用菌菌丝铁、钙含量分析

Table 3.14 Analysis of Iron and Calcium Content in Edible Fungi Hyphae

种/学名	种/中文名	铁 (mg/100 g)	钙 (mg/100 g)
<i>Flammulina velutipes</i> + <i>Hericiium erinaceus</i>	常生源金针菇+大猴头	183.636	211.688
<i>Flammulina velutipes</i> + <i>Hericiium erinaceus</i>	AR14+猴头大球 30	175.090	215.584
<i>Pleurotus ostreatus</i> + <i>Hypsizygus marmoreus</i>	夏灰 1 号+蟹味菇(ZH6)	173.181	170.129
<i>Flammulina velutipes</i> + <i>Pleurotus ostreatus</i>	金(东越)+平菇王世伟	167.652	128.395
<i>Pleurotus ostreatus</i> + <i>Flammulina velutipes</i>	平菇 002+金荣丰	161.565	39.506
<i>Pleurotus ostreatus</i>	早秋 615 平菇	160.021	507.878
<i>Pleurotus ostreatus</i> + <i>Flammulina velutipes</i>	特抗 650+金荣丰	159.217	286.419
<i>Pleurotus ferulae</i>	白灵菇 2 号	128.750	337.079
<i>Pleurotus ostreatus</i>	5526	147.158	496.364
<i>Trametes robiniophila</i>	槐耳 T19(原种)	115.000	240.449
<i>Pleurotus eryngii</i>	杏鲍菇(绿色家园)	113.500	226.966
<i>Oudemansiella radicata</i>	胶南黑皮鸡枞	144.504	238.182

(4) 维生素 C，维生素 E 含量分析：由下表可以看出，在测定的子实体营养成分数

据中，综合分析后筛选出以下维生素 C、维生素 E 含量相对较高的菌株。绣球菌和泰山赤芝维生素含量大于 100 mg/100g，是纯培养中维生素含量较高的品种。其他均为二元共培养，说明二元共培养在维生素含量上具有一定优势。

表 3.15 食用菌菌丝维生素 C、维生素 E 含量分析

Table 3.15 Analysis of Vitamin C and Vitamin E Content in Edible Fungi Hyphae

种/学名	种/中文名	维生素 C (mg/100g)	维生素 E (mg/100g)
<i>Pleurotus ostreatus</i> + <i>Hypsizygus marmoreus</i>	韩小平+白玉菇（方白）	336.886	39.281
<i>Pleurotus ostreatus</i> + <i>Hypsizygus marmoreus</i>	红平菇台湾+白玉菇（方白）	265.682	41.343
<i>Pleurotus albellus</i> + <i>Hypsizygus marmoreus</i>	白鲍鱼菇（平菇）+蟹味菇	247.083	40.03
<i>Flammulina velutipes</i> + <i>Pleurotus djamor</i>	AR12+红灵芝	246.480	81.093
<i>Flammulina velutipes</i> + <i>Hericiium erinaceus</i>	金（九道菇）+大猴头	242.685	38.90
<i>Pleurotus ostreatus</i> + <i>Hericiium erinaceus</i>	平菇 002+猴头大球 30	239.686	31.500
<i>Pleurotus ostreatus</i> + <i>Hypsizygus marmoreus</i>	平菇 002+蟹味菇（日本）	212.088	42.468
<i>Sparassis crispa</i>	绣球菌 J2	105.680	4.804
<i>Pleurotus albellus</i> + <i>Ganoderma lucidum</i>	白鲍鱼菇（平菇）+崂山赤芝	104.080	4.731
<i>Ganoderma lucidum</i>	泰山赤芝	102.280	4.649

3.5 食用菌优势资源菌株筛选结果

根据以上粗多糖含量、蛋白质含量、微量元素以及维生素含量分析，综合筛选出 3 株营养成分含量丰富的子实体干品，分别是肺形侧耳 5271、美味扇菇 1509 和东营羊肚菌；综合筛选出 3 个二元共培养组合分别是金针菇+大猴头、平菇 650+猴头 30、金针菇 AR12+红灵芝；筛选出 1 个钙含量丰富的菌株大白桩菇；筛选出 3 株多糖、蛋白质含量丰富且微量元素和维生素相对丰富的商品化食用菌香菇、白玉菇和长根菇作为加工型候选菌株。

表 3.16 加工型候选食用菌资源挖掘结果

Table 3.16 Mining Results of Candidate Processed Edible Fungus Resources

编号	种/中文名	单位: g/100 g			单位: mg/100 g		
		粗多糖	蛋白质	铁	钙	维生素 C	维生素 E
G16	肺型侧耳 5271	3.906	37.226	22.171	101.887	10.318	33.440
G586	东营羊肚菌	26.344	10.606	292.261	192.593	8.348	369.844
G18	美味扇菇 1509	32.906	8.229	133.962	27.589	16.720	32.906
G779	金针菇+大猴头	0.270	2.776	183.636	211.688	78.48	32.437
G759	平菇 650+猴头 30	0.229	4.516	39.636	558.441	116.680	43.125
G1095	AR12+红灵芝	1.277	8.713	51.454	31.168	246.480	81.093
G817	大白桩菇	0.556	6.397	41.090	251.977	95.680	16.781
G2368	香菇	21.239	29.475	41.053	220.245	70.200	3.491
G2008	白玉菇	24.637	24.110	46.579	197.429	71.365	3.000
G2277	长根菇	23.009	26.861	46.316	102.454	64.800	1.950

3.6 中国特色食用菌加工原料数据库构建

本研究向中国特色食用菌加工原料数据库提供了收集的食用菌种质资源和营养成分测定数据, 共计 2500 组数据。每组数据包含生物学分类, 具体到种属, 多糖、蛋白质、铁、钙、维生素 C、维生素 E 等营养数据, 样品的产地及收集时间, 样品的组织状态等。中国科学院微生物研究所牵头, 五家单位合作构建中国特色食用菌加工原料数据库, 现数据库已基本完成建设, 网址为 <http://124.16.144.116:8092/biostrains/index.jsp>。

网站设置数据浏览与检索、数据统计等 8 个部分, 现对各个部分做简要说明。



图 3.1 中国特色食用菌加工原料数据库首页

Figure 3.1 The first page of the database of processing raw materials of edible fungi with Chinese characteristics

首页设置热点滚动播报区，食用菌行业的研究成果及热点时间滚动播报。左下方设置最近新闻区，主要展示近期行业动向和研究成果，方便浏览者查看。走访分别设置项目简介，介绍项目的研究背景，研究目标等内容。下方是研究进展以论文形式展示。



图 3.2 数据浏览与检索页面

Figure 3.2 Data browsing and retrieval page

数据浏览与检索区，按照菌株编号列举了数据库所有食用菌的菌株编号、拉丁学名，

中文名以及营养成分。右侧为数据库检索入口，只需要输入菌株编号或者关键字等就可以找到所需要的信息。点开所需要的条目，显示具体物种分类信息，采集与保藏信息、相关菌株描述信息、营养成分信息和序列与基因信息。通过查询可以对改品种做一个详细透彻的了解。

数据统计区包含两个板块，一是物种分类区，本区是对所有测定的食用菌进行分类研究，可根据物种分类直接将所需要的一类食用菌筛选出来，并且界面简洁明了，一键直达。二是营养成分含量统计区，本区对食用菌菌落、烘干子实体和新鲜子实体进行分类统计，并根据各类营养成分数据，以柱状统计图的形式展现。如若筛选产多糖含量高的烘干子实体，则可以接着在此筛选出多糖含量高的烘干子实体品种，并可以确定其品种及来源，方便后期加工使用。

重要食用菌功效分析，此版块列举具有较好功效成分的食用菌品种，通过查阅参考文献等方式列举食用菌抗氧化、增强免疫力、降血脂等活性功能。如若以食用菌为原料来生产保健品，可直接在次查阅食用菌功效，指导食用菌的加工生产。

鉴定方法和标准是对测定营养成分方法的表述，增强网站公信力。建设团队是对本项目的参与单位及负责人的简单介绍。联系我们是为了更好地改善网站质量为浏览者提供的意见反馈通道。

3.7 本章小结

本章对已经收集的 2500 份食用菌资源样品进行粗多糖、蛋白质、微量元素和维生素等营养成分进行了测定，并依据测定数据筛选出营养丰富的子实体和菌丝体菌株，为食用菌加工产业筛选食用菌加工原材料提供依据。以营养价值高、开发潜力大和易栽培驯化为依据，综合筛选出 10 株食用菌加工新资源菌株，分别是肺型侧耳 5271、东营羊肚菌、美味扇菇 1509、金针菇+大猴头、平菇 650+猴头 30、AR12+红灵芝、大白桩菇、香菇、白玉菇和长根菇。将测定营养成分数据录入中国特色食用菌加工原料数据库，丰富数据库资源，该数据库填补了我国食用菌加工原材料营养成分方面的空白，指导我国食用菌加工产业原材料筛选，为食用菌加工产业发展奠定基础。

第四章 二元共培养菌株筛选

4.1 试验材料

4.1.1 供试菌株

根据已测定营养成分以及查阅文献等方法，筛选出用于二元共培养的菌株 10 株，见下表。

表 4.1 共培养供试菌株筛选结果

Table 4.1 Screening Results of Co-culture Tested Strains

序号	菌种名	培养基	挑选依据
1	蛹虫草 CM-1	CPDA	免疫调节，抗病毒，抗癌，抗炎，抗衰老
2	泰山赤芝 GL-1	CPDA	抗肿瘤，抗氧化，预防免疫性疾病
3	菜分灰 GF-1	CPDA	抗肿瘤，调节免疫，抗病毒，抗氧化
4	大猴头 HE-1	CPDA	抗氧化，抗肿瘤，抗溃疡，降血糖，保护肝脾
5	羊肚菌 Me261	CPDA	粗多糖、微量元素含量丰富
6	槐耳 TR-k	CPDA	抗肿瘤，抗氧化，止血
7	桑黄 PI-2	CPDA	抗肿瘤，降血糖
8	桦褐孔菌 IO-2	CPDA	降血糖，消炎，调免疫力
9	白玉菇 HM-1	CPDA	铁、钙含量丰富
10	白鲍鱼菇 PA-1	CPDA	蛋白含量丰富

表 4.2 抑菌活性试验供试菌株

Table 4.2 Antibacterial activity test of tested strains

学名	中文名
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	铜绿假单胞菌
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11775)	大肠埃希氏菌
<i>Staphylococcus aureus subsp.aureus</i> Rosenbach (ATCC 43300)	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌
<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌
<i>Clostridium perfringens</i> (ATCC 13124)	产气荚膜梭菌
<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC 19606)	鲍曼不动杆菌
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048)	产气肠杆菌
<i>Bacillus thuringiensis</i>	苏云金芽孢杆菌
<i>Bacillus cereus</i>	蜡状芽孢杆菌
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	副溶血弧菌
<i>Vibrio vulnificus</i>	创伤弧菌
<i>Vibrio alginolyticus</i>	溶藻弧菌
<i>Salmonella typhi</i>	副伤寒沙门杆菌

4.1.2 主要仪器设备

表 4.3 实验中使用的主要仪器设备

Table 4.3 Main Instruments and Equipment Used in the Experiment

名称	型号	生产厂家
高效液相色谱仪	E 2695	Waters 公司
旋转蒸发器	ER-201D	西安远舰仪器设备有限公司
电热恒温培养箱	HZQ-F160	上海福玛实验设备有限公司
酶标仪	Varioskan LUX	赛默飞世尔科技有限公司
超声波清洗仪	KQ-2600	昆山超声设备有限公司
落地恒温振荡器	HZQ-F160	常州诺基仪器有限公司
台式冷冻离心机	TGL20M	长沙湘智离心机仪器有限公司
立式高压蒸汽灭菌器	LDZF-75L	上海申安医疗器械厂
双人单面净化工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
电子天平	PC214	OHOUS 仪器有限公司

4.1.3 药品与试剂

乙酸乙酯、石油醚、乙腈、甲醇、蔗糖、葡萄糖、蛋白质、磷酸二氢钾、硫酸镁均为分析纯。

4.1.4 供试培养基

表 4.4 供试培养基

Table 4.4 Test medium

培养基名称	配方
CPDA 培养基	20%马铃薯汁, 磷酸二氢钾 3 g, 维生素 B ₁ 8 mg, pH 自然, 葡萄糖 20 g, 七水硫酸镁 1.5 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL, 121 °C 灭菌 20 min
CPDB 培养基	20%马铃薯汁, 磷酸二氢钾 3 g, 维生素 B ₁ 8 mg, pH 自然, 葡萄糖 20 g, 七水硫酸镁 1.5 g, 蒸馏水 1000 mL, 121 °C 灭菌 20 min
LB 液体培养基	5 g 酵母提取物, 10 g 胰蛋白胨, 10 g NaCl, 加水至 1000 mL, 121 °C 灭菌 20 min

4.2 二元共培养液体发酵培养菌株筛选

4.2.1 二元共培养液体发酵培养

1) 种子液制备

将表 4.1 中菌种在 CPDA 平板活化备用。配制 CPDB 培养基，每 500 mL 锥形瓶加入 200 mL 培养基，灭菌冷却后，无菌接入 3 块菌饼，25 °C、150 rpm 摇床培养 7 d 作为种子液。

2) 接种与培养

配制 CPDB 培养基，每个 500 mL 锥形瓶加入 200 mL 培养基灭菌冷却后备用。每瓶培养基接入两种种子液各 10 mL，以上菌种两两匹配共获得 45 个组合，每种组合做 3 组重复。接种后 25 °C、120 rpm 摇床培养 15 d，下发酵备用。

4.2.2 二元共培养液体发酵代谢产物提取

液体发酵二元共培养发酵液加入少量乙酸乙酯进行灭活处理，后用破壁机或组织研磨仪破碎获得组织匀浆，加入 2 倍相等体积乙酸乙酯，超声提取 20 min，采用分液漏斗收集上层乙酸乙酯，再加入等体积乙酸乙酯超声提取，重复三次。将收集的乙酸乙酯转移至旋转蒸发仪，设置温度 48 °C，抽真空，直至蒸干。蒸干后用甲醇溶解转移至玻璃瓶中，减压蒸干后称重，获得乙酸乙酯粗提物备用。

4.2.3 乙酸乙酯粗提取物 HPLC 检测

取粗提取制成 1 mg/mL 甲醇溶液，用 0.22 μm 有机相滤膜过滤，加入棕色进样瓶作为 HPLC 检测样品。方法为 25 min 指纹，采用美国 Waters 公司高效液相色谱进行检测，HPLC 条件为：色谱柱: Kromasil ODS C18 柱 (5 μm, 10 mm×250 mm)；流动相为甲醇: 0.1 %甲酸水溶液由 10:90 梯度洗脱至 90:10；柱温: 30 °C；流速: 1.0 mL /min，检测波长: 200-600 nm 扫描；进样量: 10 μL。测定完成后分析整理色谱图，将纯培养粗提取物与共培养粗提取物进行对比与分析，筛选出具有差异的共培养组合。

4.2.4 二元共培养粗提取物 LC-MS 检测

取粗提物制成 1 mg/mL 甲醇溶液，用 0.22 μm 有机相滤膜过滤，加入棕色进样瓶作为 LC-MS 检测样品，LC-MS 方法见樊亚琴硕士毕业论文（樊亚琴，2013）。

4.2.5 乙酸乙酯粗提取物抑菌试验

1) 粗浸膏一般配制成 100 mg/mL 溶液；化合物 40 mM/mL 溶液；阳性药 10 mg/mL 备用。抑菌试验菌株从甘油管中活化到 LB 平板，产生单菌落后，将单菌落接种到 LB 液体培养基三角瓶中，每瓶 50 mL 培养基。

2) 35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后，将 OD 为 1-1.2 的菌液用无菌 LB 培养基稀释 1000 倍，加入 96 孔板中，第一行每孔 198 μL ，以下几行为 100 μL 。

3) 分别加入化合物或阳性药 2 μL 放入第一行中，混合均匀后取出 100 μL 放入第二行，再搅拌均匀后放入第三行，依次往下，直到最后一行，混合均匀后吸出 100 μL 液体扔掉。最后，再向各个孔中加入 100 μL 菌液，此时，每孔共 200 μL 菌液。

4) 放入 35 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养，24 h 后观察，完全澄清孔的孔浓度即为 MIC（最小抑菌浓度）。

4.3 二元共培养液体发酵菌株筛选结果

4.3.1 二元共培养液体发酵差异变化

在二元共培养液体发酵培养 7 d 时，通过生长状态对比发现有部分组合产生了颜色变化，例如桦褐孔菌和桑黄、槐耳和蛹虫草，在共培养时，颜色明显要比纯培养颜色深，并且共培养生长速度也更快，见下图。



图 4.1 桦褐孔菌 IO-2 和桑黄 PI-2 共培养生长状态

Fig. 4.1 Growth status of co-culture of *P. obutella* IO-2 and *P. mulberry* PI-2

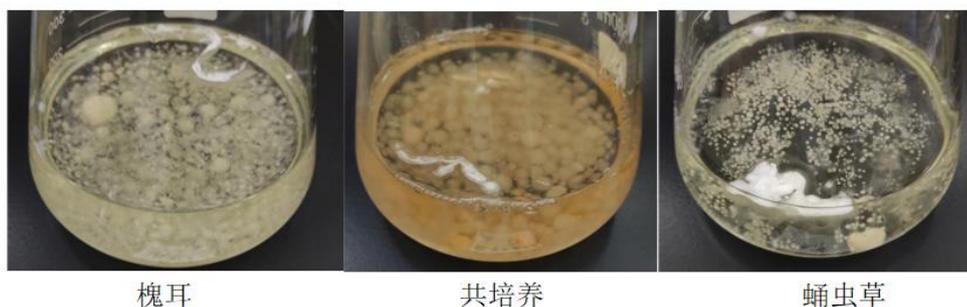


图 4.2 槐耳 TR-k 和蛹虫草 CM-1 共培养生长结果
 Fig. 4.2 Co-culture and growth results of TR-k and *Cordyceps militaris* CM-1

4.3.2 二元共培养液体发酵粗提取物检测结果

将在 45 个对抗组 HPLC 结果与空白对照和单独培养的 HPLC 结果进行对比，通过与单独培养的 LC-MS 图谱对比出峰时间，峰面积大小等，筛选出有可能产生新颖化合物的对抗组合。

1) 羊肚菌 Me261 与蛹虫草 CM-1 结果分析：两个菌株共培养在 0.57 min 出现在了菌株单独培养时没有出现的物质，在 1.74 min 又出现了一个峰面积比较小的峰型，在羊肚菌和蛹虫草的共培养中，HPLC 检测出现了两个新的峰，很有可能产生新颖化合物。羊肚菌属于子囊菌亚门，盘菌科，盘菌目，羊肚菌科；蛹虫草属于子囊菌亚门，核菌纲，麦角菌科，麦角菌目。推断亲缘关系较远的菌株共培养时更易产生新的代谢产物。

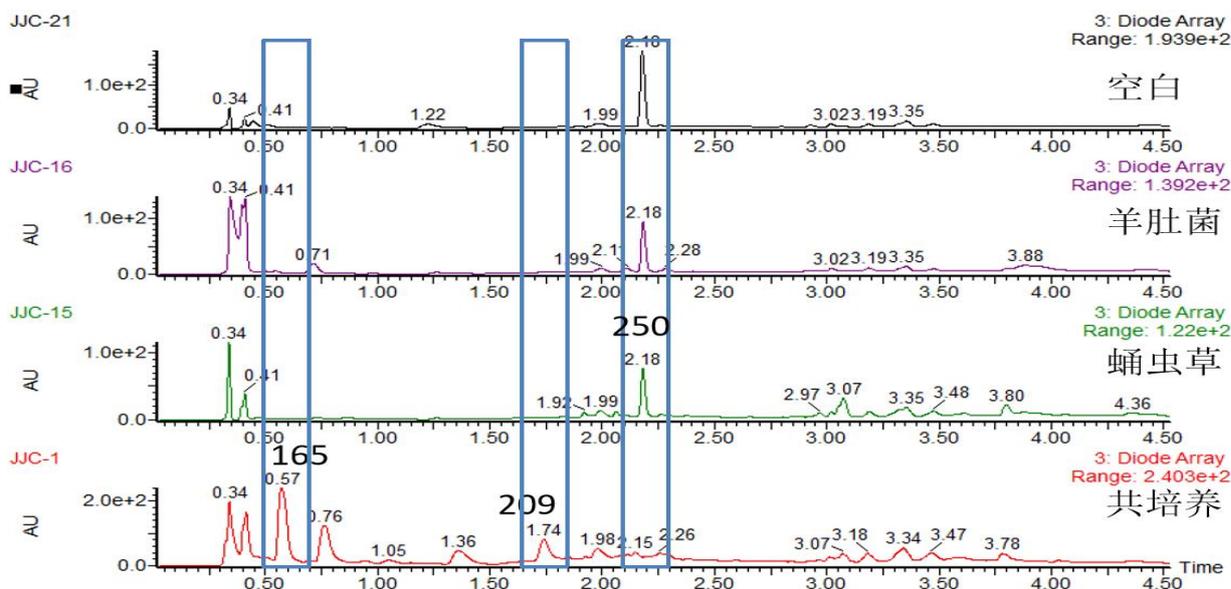


图 4.3 羊肚菌与蛹虫草共培养 HPLC 结果

Fig. 4.3 HPLC results of co-culture of *Morchella* and *Cordyceps militaris*

2) 桑黄 IO-2 与桦褐孔菌 PI-2 共培养 HPLC 结果分析：两个菌株共培养在 1.12 min 出现了在菌株纯培养时没有的峰形，并且在 3.0-3.6 min 时，共培养与纯培养差别较大，很可能有新物质产生。具体代谢情况还需要分离化合物做进一步验证。

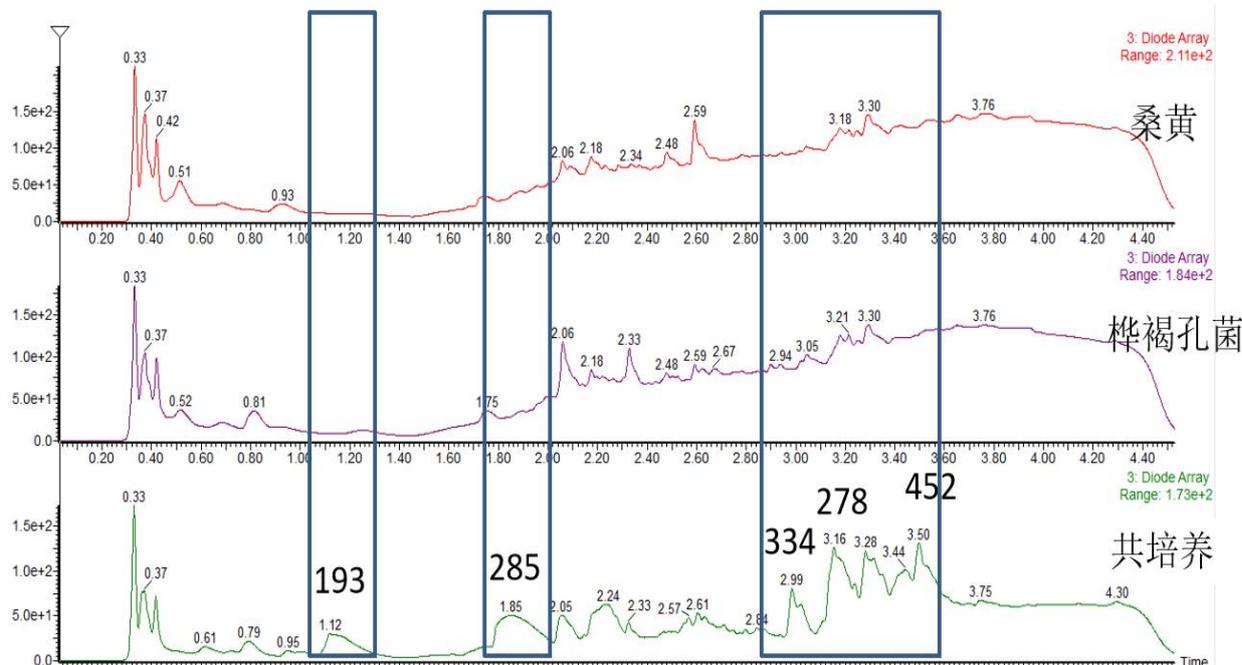


图 4.4 桦褐孔菌与桑黄共培养 HPLC 结果

Fig. 4.4 HPLC results of co-culture of *Pseudomonas obliquus* and *Pseudomonas mulberry*

4.3.3 抑菌试验结果

通过对致病菌的抑菌试验，确定桦褐孔菌 IO-2 和桑黄 PI-2 共培养的粗提取物浓度为 1 mg/mL 对枯草芽孢杆菌有抑菌作用；粗提取物为 0.5 mg/mL 对产气荚膜梭菌和蜡状芽孢杆菌有抑制作用，由此确定以桦褐孔菌和桑黄共培养作为下一步研究对象，研究其产生的抑菌活性物质。

表 4.5 共培养粗提取物抑菌作用结果

Table 4.5 Antibacterial effect of coculture crude extract

序号	中文名	Me261 与 CM-1	IO-2 与 PI-2
1	铜绿假单胞菌	——	——
2	大肠埃希氏菌	——	——
3	金黄色葡萄球菌	——	——
4	枯草芽孢杆菌	——	MIC=1
5	产气荚膜梭菌	——	MIC=0.5
6	19606 鲍曼不动杆菌	——	——
7	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	——	——
8	13048 产气肠杆菌	——	——
9	苏云金芽孢杆菌	——	——
10	蜡状芽孢杆菌	——	MIC=0.5
11	副溶血弧菌	——	——
12	创伤弧菌	——	——
13	溶藻弧菌	——	——
14	副伤寒沙门杆菌	——	——

注：MIC 为最小抑菌浓度，单位为 mg/mL。

4.4 本章小结

在筛选出的 10 株食药菌菌株二元共培养发酵试验中，根据以上代谢产物 HPLC 分析，筛选共培养与纯培养有差异的 2 个组合，分别是桦褐孔菌 IO-2 和桑黄 PI-2 和羊肚菌 Me261 与蛹虫草 CM-1。通过对乙酸乙酯粗提取物进行抑菌试验，根据实验结果，桦褐孔菌 IO-1 和桑黄 PI-2 对枯草芽孢杆菌、产气荚膜梭菌和蜡状芽孢杆菌有抑菌效果（MIC 分别为 1 mg/mL、0.5 mg/mL、0.5 mg/mL）所以确定其为研究对象进行进一步的研究。

第五章 桦褐孔菌 IO-2 和桑黄 PI-2 二元共培养发酵条件优化

5.1 试验材料

5.1.1 培养基

根据查阅文献及实验结果设置以下 4 种不同培养基：

表 5.1 供试培养基

Table 5.1 Test medium

培养基名称	培养基配方
培养基 A	葡萄糖 20 g, 蛋白胨 2 g, KH ₂ PO ₄ 1 g, MgSO ₄ 0.5 g, 蒸馏水 1000 mL
培养基 B	葡萄糖 20 g, 蛋白胨 1 g, KH ₂ PO ₄ 1 g, MgSO ₄ 0.5 g, 蒸馏水 1000 mL
培养基 C	葡萄糖 20 g, 蛋白胨 0.5 g, KH ₂ PO ₄ 1 g, MgSO ₄ 0.5 g, 蒸馏水 1000 mL
培养基 D	马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, KH ₂ PO ₄ 1 g, MgSO ₄ 0.5 g, 蒸馏水 1000 mL

5.1.2 仪器设备

同 4.1.2 主要仪器设备

5.1.3 供试菌株

桦褐孔菌 IO-1 和桑黄 PI-2。

5.2 试验方法

5.2.1 发酵培养基筛选

按照二元共培养液体发酵接种方法把桦褐孔菌 IO-2 和桑黄 PI-2 接种于培养基 A、B、C、D 四种不同培养基每种培养基做 4 个重复，接种量均为 5%，25 °C，120 rpm 震荡培养 15 d 后下发酵，破碎后加入相等体积乙酸乙酯，超声波超声提取 20 min，收集乙酸

乙酯，重复三次。将收集的乙酸乙酯用旋转蒸发仪蒸干，温度 48 °C，抽真空，蒸干后用甲醇溶解于玻璃瓶中，蒸干称重。将蒸干的粗提取物溶于甲醇配制成 1 mg/mL 溶液。0.22 μm 有机相滤膜过滤，加入进样瓶作为 HPLC 检测样品，检测方法为 25 min 指纹。根据粗提取物产量和图谱丰富度筛选合适培养基。

5.2.2 发酵时间优化试验

将桦褐孔菌和桑黄接种于 5.2.1 筛选出的培养基中，接种 20 瓶，温度 25 °C，120 rpm 恒温振荡培养。从第 12 d、15 d、18 d、21 d、24 d 分别下发酵 3 瓶，乙酸乙酯提取代谢产物，蒸干后溶于甲醇溶液，制成 1 mg/mL 溶液，0.22 μm 滤膜过滤后进行 HPLC 分析，检测方法为 25 min 指纹，根据液相结果确定最佳发酵时间。

5.3 发酵条件优化结果

5.3.1 不同培养基粗提取物产量

表 5.2 各培养基乙酸乙酯粗提取物产量

Table 5.2 The crude extraction yield of ethyl acetate in each medium

培养基种类	平均产量(mg/L)
培养基 A	653.2±3.2
培养基 B	564.9±2.6
培养基 C	532.5±3.5
培养基 D	463.7±2.1

根据上表，不同培养基粗提取的产量结果可知，产量最高的培养基是培养基 A，其次是培养基 B。

5.3.2 不同培养基粗提取物 HPLC 结果

通过 HPLC 色谱图对比与分析，发现培养基 A 代谢产物产量峰值较高，且产物较丰富，培养基 B、培养基 C 与培养基 A 色谱图峰形相似，但峰值比较低；培养基 D 色谱图可见峰形较单一，丰富度低，所以培养基 A 效果最优。

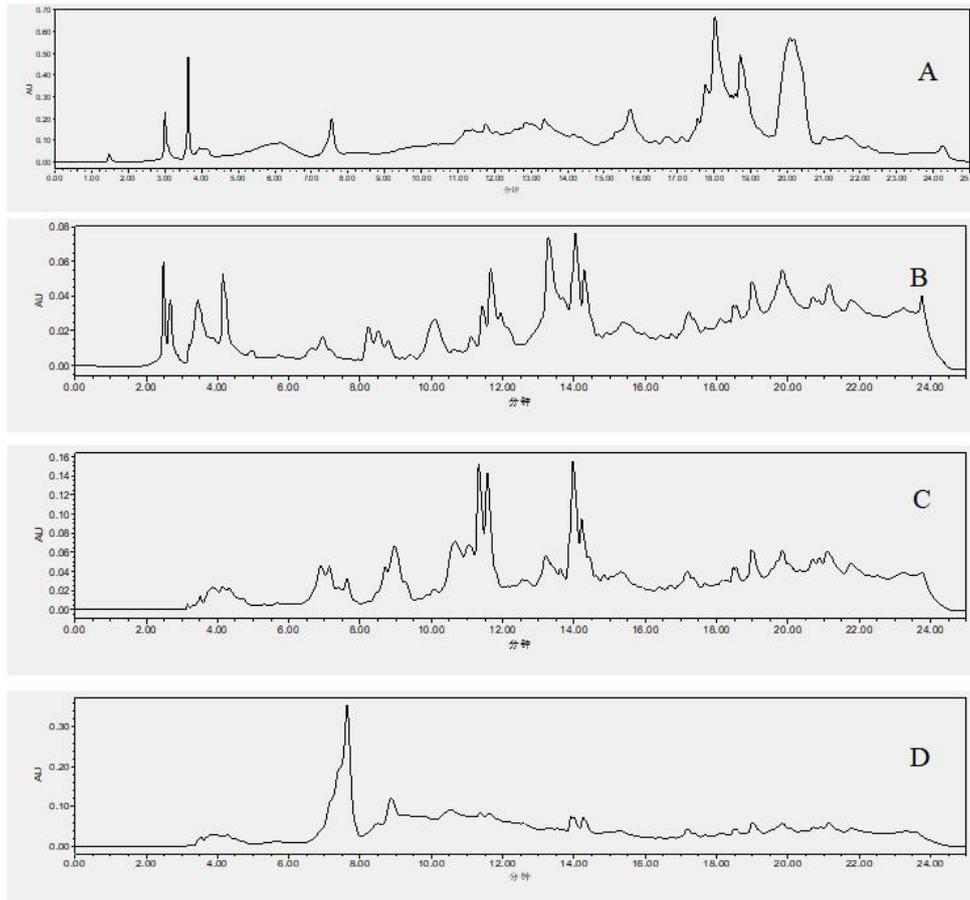


图 5.1 不同培养基粗提取物 HPLC 结果

Fig. 5.1 HPLC results of crude extracts from different media

5.3.3 发酵时间优化结果

分别取培养 12、15、18、21、24 d 下发酵，并 HPLC 检测分析，发酵至 12 d 时，发酵产物较单一，且含量较少。之后发酵产物逐渐丰富，发酵产物积累量逐渐增多，直至发酵至 21 d 时，发酵终产物丰富且与 24 d 相比已无明显变化，确定最优发酵时间为 21 d。

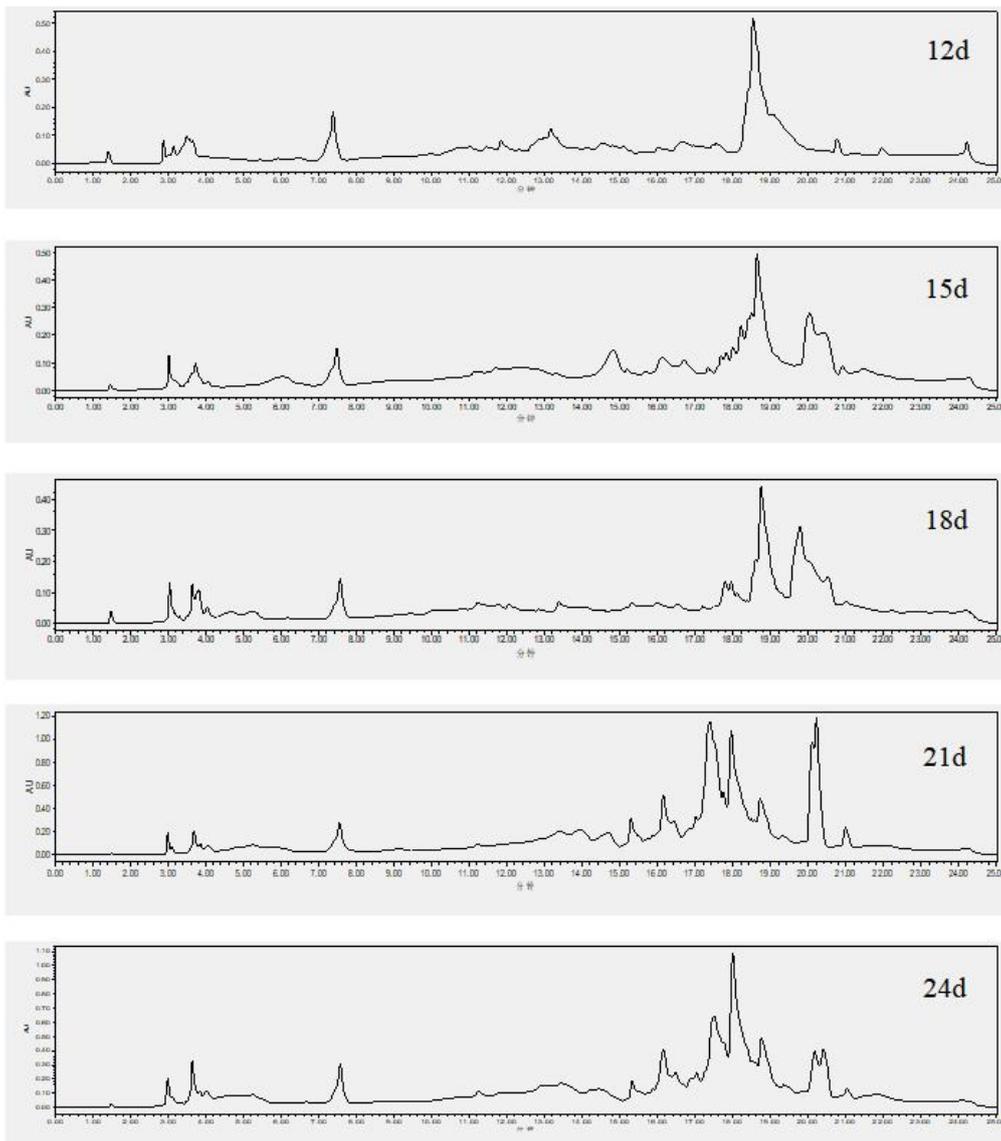


图 5.2 不同培养时间对发酵产物影响

Fig. 5.2 Influence of different culture time on fermentation products

5.4 本章小结

通过发酵条件优化试验，确定桦褐孔菌 IO-1 和桑黄 PI-2 后续大发酵培养基为培养基 A，接种方式为液体接种，接种量为 5%，培养条件为 25 °C，120 rpm 振荡培养，最佳发酵时间为 21 d。

第六章 次级代谢产物的分离鉴定与抑菌活性筛选

6.1 试验材料

6.1.1 试验仪器

表 6.1 实验中使用的主要仪器设备

Table 6.1 Main Instruments and Equipment Used in the Experiment

名称	型号	生产厂家
高效液相色谱仪	Waters 1525 泵, Water 2998 二极管 阵列检测器, Empower III 工作站	美国 Waters 公司
旋转蒸发器	N-1100	EYELA 公司
三重四级杆液质联用仪	UPLC/Q-TOF	Agilent 公司
冷冻干燥机	EZ-DRY	美国 FTS 公司
电热恒温培养箱	HZQ-F160	上海福玛实验设备有限公司
循环水式多用真空泵	SHB	郑州长城科工贸有限公司
落地恒温振荡器	HZQ-F160	常州诺基仪器有限公司
核磁共振仪	JNM-ECP600 型	日本 JEOL 公司
台式冷冻离心机	TGL20M	长沙湘智离心机仪器有限公司
快速液相制备色谱系统	LDZF-75L	上海申安医疗器械厂
电子天平	PC214	OHOUS 仪器有限公司

6.1.2 试验材料

桦褐孔菌 IO-2 和桑黄 PI-2 共培养的发酵液乙酸乙酯粗提取物共 5.36 g。

6.1.3 主要试剂

表 6.2 主要试剂及生产厂家

Table 6.2 Main reagents and manufacturers

供试试剂	生产厂家
柱层析及薄层层析用硅胶 H	青岛海洋化工集团公司
Sephadex TM LH-20	Pharmacia 公司生产
LiChroprep RRP-18 (25-40 μm)	Merck 公司
环丙沙星	J&K 百灵威
甲醇分析纯	天津市富宇精细化工有限公司
乙酸乙酯分析纯	天津市富宇精细化工有限公司
二氯甲烷分析纯	天津市富宇精细化工有限公司
正相柱层析硅胶	青岛海洋化工厂生产

香草醛-浓硫酸 TLC 显色剂：10 mL 浓硫酸+500 mL 冰醋酸，冷却后加 5 g 香草醛（香兰素）。薄层板展开后挥干展开剂，浸入显色（需要用高效板），120 °C 烤板至显色。

6.2 试验方法

6.2.1 粗提取物的获取

准备 80 瓶装有 200 mL PDB 培养基的 500 mL 锥形瓶中，灭菌后备用桦褐孔菌和桑黄的种子液分别接种，25 °C、120 rpm 振荡培养 21 d，下发酵，总发酵体积 16 L。对全部发酵液 16 L，破壁机破碎，加入等体积乙酸乙酯超声提取 20 min，收集上层乙酸乙酯，再加入等体积乙酸乙酯，重复三次，将三次收集的乙酸乙酯合并，旋转蒸发器减压蒸干，旋转蒸发器温度设置为 48 °C。蒸干后用甲醇溶解，转移至玻璃小瓶减压浓缩得到固体浸膏称重，共计获得乙酸乙酯粗提取物 5.36 g。取粗提取物 2 mg，甲醇溶解后进行 HPLC 检测，检测方法 25 min 指纹，获得其指纹图谱。

6.2.2 化合物的分离

6.2.2.1 快速液相制备色谱系统分离

将粗提取物加入 50 mL 甲醇溶解完全，加入等体积 200-300 目硅胶，充分混匀后，将转移至旋蒸瓶，旋转蒸发器蒸干至硅胶松散。取合适空柱，将硅胶转移至柱子中，压

实表面，表面压平，拧好盖子安装在快速液相制备色谱系统，并匹配合适正向分离柱。

流动相设置为石油醚和乙酸乙酯，设置参数石油醚和乙酸乙酯（0:1、1:4、2:3、1:1、3:2、4:1 和 1:0）梯度洗脱，共分为 7 个梯度，每个梯度流动相流量为 3 个柱体积。流动相接入洁净试管，每个试管 40 mL，直至分离结束。

流动相换为甲醇和二氯甲烷，设置参数甲醇：二氯甲烷（1:4、1:3、3:2、9:1 和 1:0）梯度洗脱，共分为 5 个梯度，每个梯度流动相流量为 3 个柱体积。每个试管接 80 mL，直至分离结束。

6.2.2.2 凝胶柱分离

用胶头吸管吸入样品，沿柱内壁缓缓加入样品，用甲醇作为洗脱液进行洗脱。

6.2.3 TLC 分析与合样

采用薄层层析（Thin Layer Chromatography, TLC）法对初步分离化合物进行定性检测，用紫外分析仪进行观察并标记化合物的位置。将粗提取物甲醇溶解，用玻璃毛细管吸取少量溶液，通过尝试初步确定展开剂及展开剂的配比确定展开剂为二氯甲烷:甲醇（30:1）。展开后于香草醛-冰醋酸显色剂中，120 °C 烘烤显色，根据 TLC 分析结果合并相同组分。

6.2.4 化合物制备及验纯

样品 HPLC 检测与筛选：将分离样品溶于甲醇，0.22 μm 滤膜过滤后转移至液相小瓶待检测。流动相采用甲醇和超纯水，流动相 0.45 μm 滤膜过滤，超声 15 min 去气泡。色谱条件为 25 min 指纹，获得色谱图，根据分离情况筛选出分离的组分。

制备条件摸索：用甲醇与超纯水作为流动相，调整不同比例进行恒梯度液相色谱分析，若出现单一且峰形良好的色谱图则确定为制备条件

化合物制备：更换制备色谱柱，后调整进样量，进样量最大设置为 100 μL，接出样品。待制备完成后，减压蒸干，用甲醇转移至洁净的玻璃小瓶中，称重确定化合物质量。

纯化合物 HPLC 验证：在旋转蒸发完成后，取第三次甲醇清洗的旋蒸瓶的溶液作为检测样品，用制备时相同方法进行 HPLC 验证，若出现单一峰形则化合物为纯化合物，此外结合 TLC 点样分析，展开剂展开后，确定为单一色带，即为纯化合物。

6.2.5 纯化合物抑菌活性分析

详细试验过程见章节 4.2.5。

6.3 化合物分离结果

6.3.1 快速液相制备色谱系统分离结果

石油醚和乙酸乙酯梯度洗脱，经 TLC 检测合并相同样品，最终将化合物粗分为 7 个组分 (Fr.1-Fr.7)。

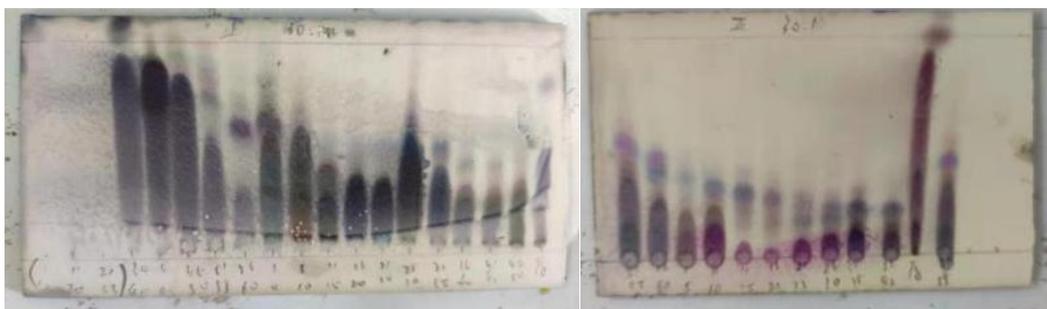


图 6.1 石油醚和乙酸乙酯分离后 TLC 分析图

Fig. 6.1 TLC analysis diagram after separation of petroleum ether and ethyl acetate

甲醇和二氯甲烷梯度梯度洗脱，经 TLC 检测合并相同样品，最终将化合物粗分为 6 个组分 (Fr.8-Fr.13)。



图 6.2 甲醇和二氯甲烷分离后 TLC 分析图

Fig. 6.2 TLC analysis diagram after separation of methanol and dichloromethane

6.3.2 样品 HPLC 检测结果

利用 HPLC 检测 Fr.1-Fr.13，根据指纹图谱结果，筛选出 Fr.2 和 Fr.4 进行后续化合物分离。根据液相色谱结果 Fr.2 直接进行 HPLC 条件摸索和分离；Fr.4 需进行 LH-20 凝胶色谱柱分离。

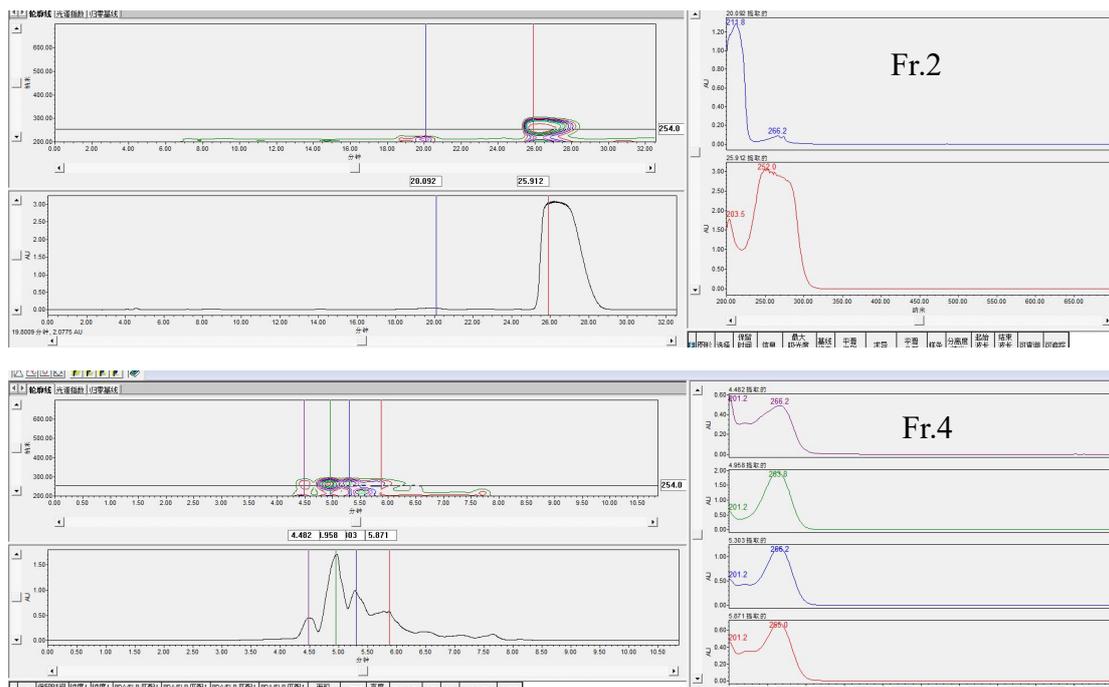


图 6.3 Fr.4 和 Fr.10 HPLC 指纹图谱

Fig. 6.3 HPLC fingerprints of Fr.4 and Fr.10

组分 4 (0.79 g) 用 Sephadex LH-20 分离 (1.0×100 cm, MeOH), 得到 7 个亚组分, 标记为 Fr.4.1-Fr.4.7, Fr.4.6 (50 mg) 经过 HPLC 检测, 峰形较好, 进行下一步化合物分离。

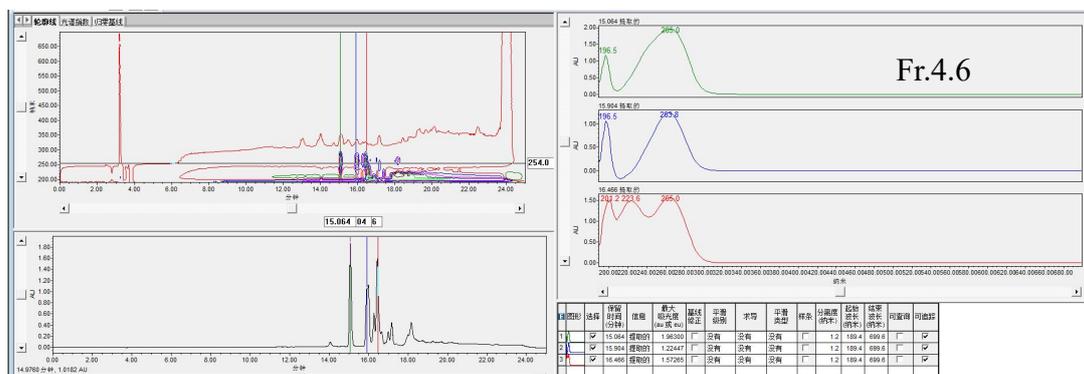


图 6.4 HPLC 指纹图谱

Fig. 6.4 Fr.4.6 HPLC fingerprints

6.3.3 HPLC 制备化合物结果

Fr.2 样品制备条件摸索: 流动相设置为甲醇与 0.1%甲酸水溶液, 根据液相结果显示

甲醇: 0.1%甲酸水溶液为 65:35 时, 分离效果较好, 此时峰形较对称, 分离效果较好, 如下图, 分离获得化合物 1 (20 mg)、化合物 2 (0.9 mg) 和化合物 3 (1.3 mg)。

Fr.4.6 样品制备条件摸索: 流动相设置为甲醇与 0.1%甲酸水溶液, 根据液相结果显示甲醇: 0.1%甲酸水溶液为 35:65 时, 分离效果较好, 此时峰形较对称, 分离效果较好, 如下图, 分离获得化合物 4 (4.7 mg)、化合物 5 (0.8 mg)、化合物 6 (0.9 mg) 和化合物 7 (1.1 mg)。

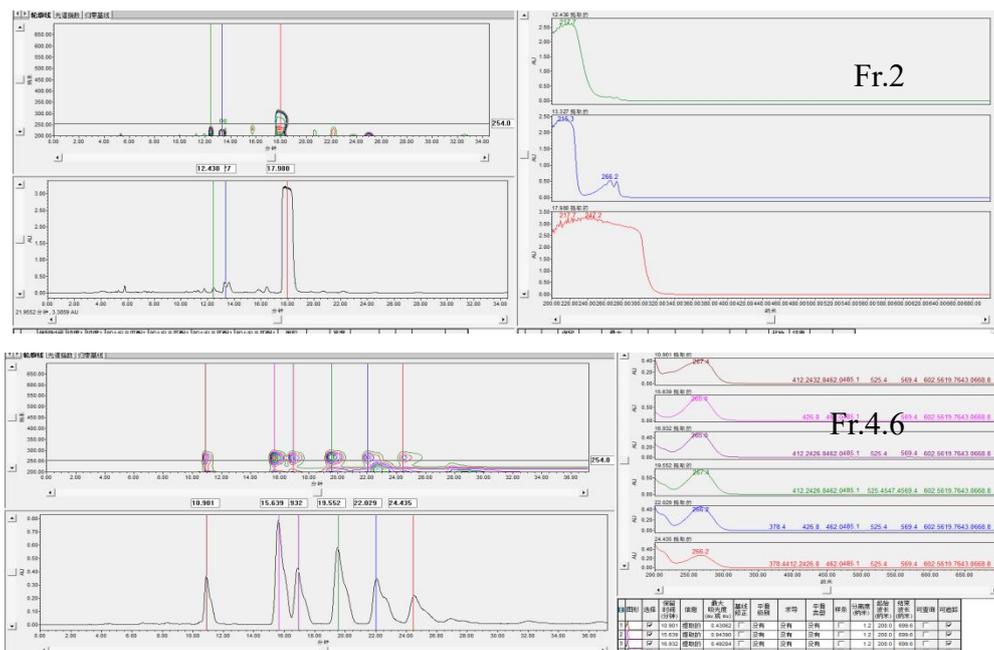


图 6.5 Fr.2 和 Fr.4.6 HPLC 指纹图谱筛选结果

Fig. 6.5 Fingerprint screening results of Fr.2 and Fr.4.6 by HPLC

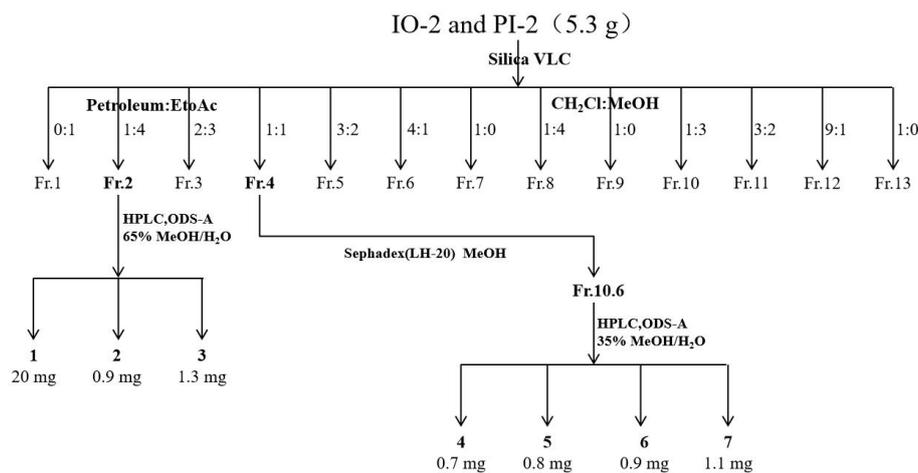


图 6.6 IO-2 和 PI-2 代谢产物分离流程图

Fig. 6.6 Flow chart of Io-2 and PI-2 metabolites separation

6.4 化合物抑菌试验结果

根据抑菌试验结果化合物 1-7 中, 仅化合物 1 有抑菌效果, 其抑菌效果和 MIC 数据见下表。

表 6.3 化合物抑菌实验结果

Table 6.3 Antibacterial test results of the compounds

序号	中文名	环丙沙星 MIC μg/mL	粗提取物 MIC mg/mL	化合物 1 MIC μg/mL
1	铜绿假单胞菌	0.12	—	—
2	大肠埃希氏菌	0.09	0.10	5.0
3	金黄色葡萄球菌	0.04	0.20	5.0
4	枯草芽孢杆菌	0.28	0.10	5.0
5	产气荚膜梭菌	0.15	0.05	5.0
6	19606 鲍曼不动杆菌	0.21	—	—
7	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	0.31	0.05	—
8	13048 产气肠杆菌	0.16	0.05	5.0
9	苏云金芽孢杆菌	0.17	0.03	2.5
10	蜡状芽孢杆菌	0.18	0.05	—
11	副溶血弧菌	0.25	0.10	—
12	创伤弧菌	0.35	0.10	—
13	溶藻弧菌	0.24	0.05	2.5
14	副伤寒沙门杆菌	0.33	0.10	—

由上表可见, 粗提取物对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等 12 种菌都具有抑制作用。分离出的化合物 1 则对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、产气荚膜梭菌、13048 产气肠杆菌具有较好抑制作用, 最小抑菌浓度 MIC 5.0 μg/mL, 对苏云金芽孢杆菌、溶藻弧菌的 MIC 为 2.5 μg/mL。

6.5 化合物 1 结构解析

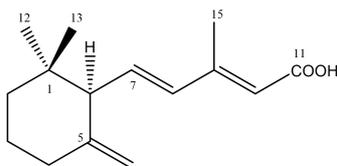


图 6.7 化合物 1 的结构式

Fig. 6.7 Structure diagram of compound 1

6.5.1 化合物 1 LC-MS 结果

对化合物 1 进行 LC-MS 检测，根据下图所示，化合物 1 分子量为 234。

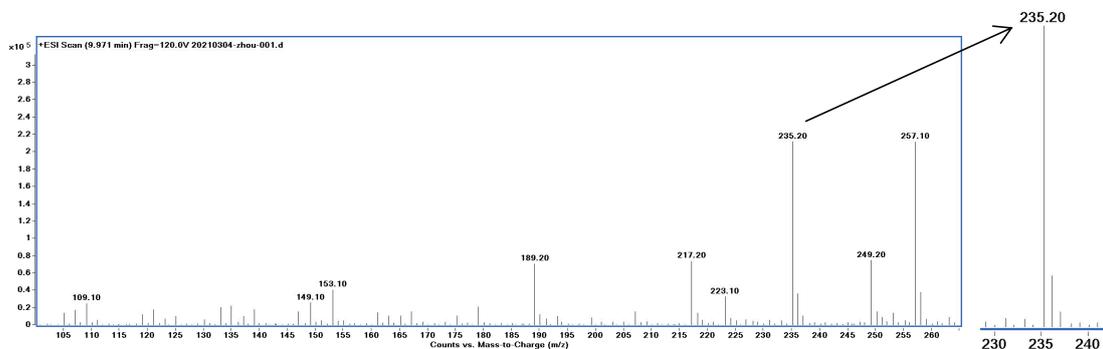


图 6.8 化合物 1 LC-MS 结果
Fig. 6.8 LC-MS results of compound 1

6.5.2 核磁结果分析

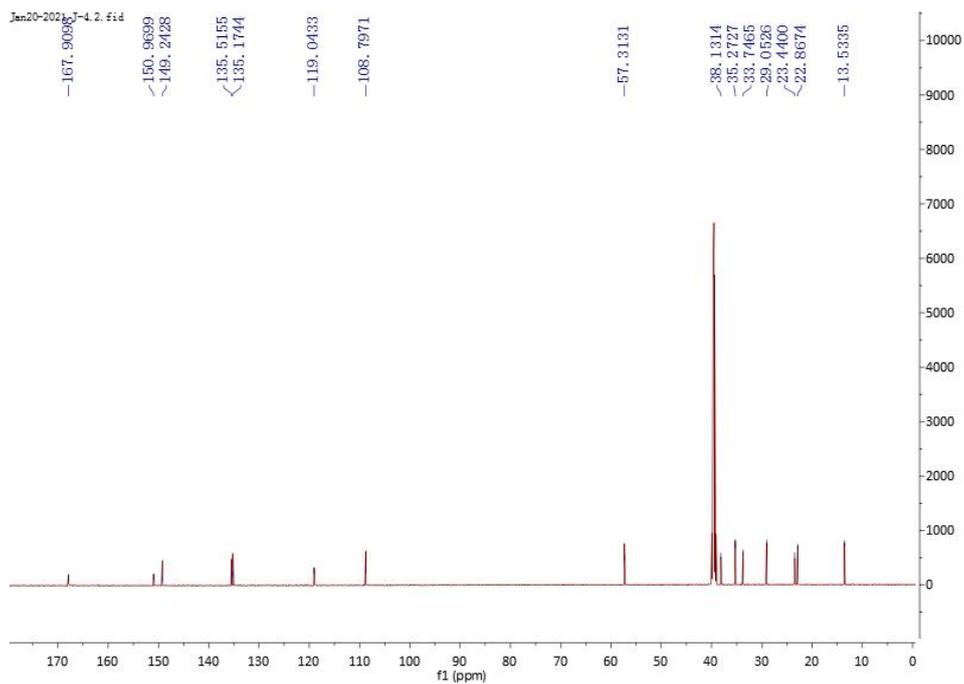


图 6.9 化合物 1 核磁共振碳谱图

Figure 6.9 ^{13}C -NMR spectrum of secopaxilline A (1) in $\text{DMSO-}d_6$

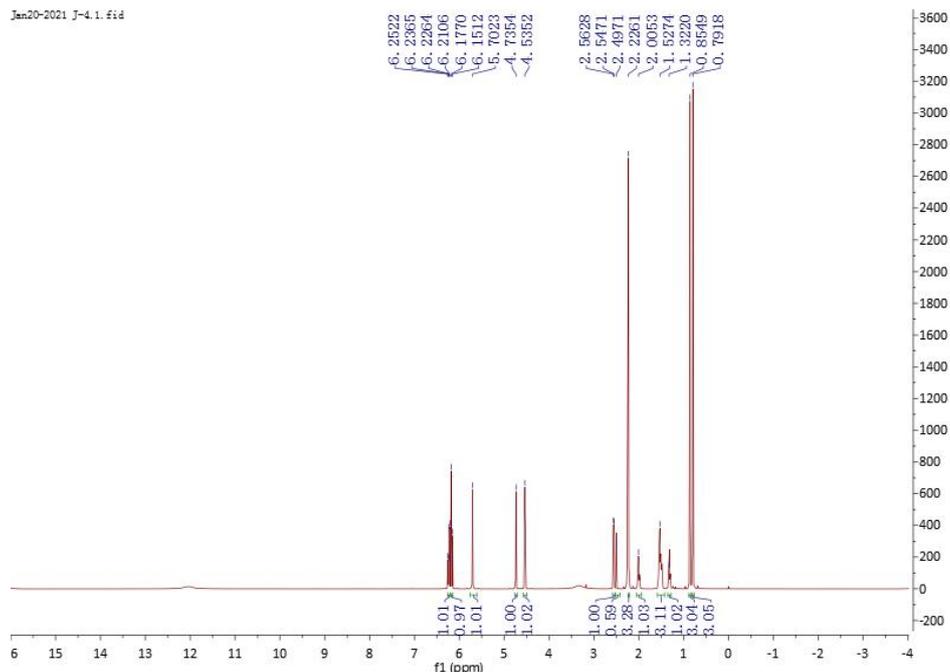


图 6.10 化合物 1 核磁共振氢谱图

Figure 6.10 ¹H-NMR spectrum of secopaxilline A (1) in DMSO-*d*₆

表 6.3 化合物 1 的 ¹H 和 ¹³C NMR 数据 (500, 125 MHz, DMSO-*d*₆)

Table 6.3 ¹H and ¹³C NMR data of compound 1 (500, 125 MHz, DMSO-*d*₆)

No.	1	
	δ _c	δ _H
1	35.3, C	—
2	38.1, CH ₂	1.32, m
3	22.9, CH ₂	1.53, m
4	33.7, CH ₂	2.01, m
5	149.2, C	—
6	57.3, CH	2.56, d (9.42)
7	135.5, CH	6.23, dd (9.42, 15.48)
8	135.2, CH	6.16, d (15.48)
9	151.0, C	—
10	119.0, CH	5.70, s
11	167.9, C	—
12	29.1, CH ₃	0.85, s
13	23.4, CH ₃	0.79, s
14	108.8, CH ₂	4.53, brs; 4.74, brs
15	13.5, CH ₃	2.23, s

化合物 1: 白色无定形粉末, 阳离子 EMIMS 在 *m/z* 235.2 给出[M+H]⁺峰, 结合 ¹H

和 ^{13}C NMR 谱推测分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$, 不饱和度为 5。其 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 显示具有 4 个季碳 (1 个羧基, 1 个非连氧 sp^3 碳和 2 个烯烃碳)、4 个次甲基 (3 个烯烃碳、一个非含氧 sp^3 碳) 和 4 个亚甲基碳 (1 个烯烃碳)、3 个甲基。综合以上信息及结合文献 (Shirahata T et al., 2017), 结合化合物 **1** ($[\alpha]_{\text{D}}^{25}+19.0$) 和文献中 ($[\alpha]_{\text{D}}^{25}+11.7$) 旋光数据一致, 化合物被鉴定为 (2E, 4E)-5-(2,2-二甲基-6-亚甲基环己基)-3-甲基戊-2,4-二烯酸。

第七章 讨论

本研究收集并整合已有的食用菌菌株及野外新分离菌株 2500 份，共涵盖了 121 个种，包含子实体 1278 株份，菌丝 310 株份，二元共培养液体发酵菌株 912 株份。对山东省烟台市、云南省昆明市、内蒙古赤峰市等地进行了野生菌株的收集，共收集野生食用菌 32 种，分离获得食用菌野生菌种 20 余种，丰富了食用菌菌种资源。

完成食用菌营养成分测定 2500 份，根据测定营养成分数据进行筛选与挖掘，现已初步挖掘出 10 个优势资源菌株，筛选出 3 株营养成分含量丰富的子实体干品，分别是肺形侧耳 5271、美味扇菇 1509 和东营羊肚菌；综合筛选出 3 个二元共培养组合分别是金针菇+大猴头、平菇 650+猴头 30、金针菇 AR12+红灵芝；筛选出 1 个钙含量丰富的菌株大白桩菇；筛选出 3 株多糖、蛋白质含量丰富且微量元素和维生素相对丰富的商品化食用菌香菇、白玉菇和长根菇作为加工型候选菌株。通过菌株筛选，为食用菌产业化发展提供菌株资源。

与中国科学院微生物研究所合作共建中国特色食用菌加工原料数据库，为食用菌加工产业发展提供可靠的原材料营养成分数据来源，为后续食用菌加工产业奠定基础。该数据库是我国首个以食用菌加工原料数据库，对我国食用菌加工产业的发展具有重要的指导作用。后续还需要丰富该数据库内容，完善该数据库功能。

根据营养成分测定以及活性成分筛选，共筛选出的 10 株菌株进行二元共培养液体发酵，通过对次级代谢产物差异性研究和抑菌活性研究，筛选出桦褐孔菌 IO-2 与桑黄 PI-2 共培养对枯草芽孢杆菌、产气荚膜梭菌、蜡状芽孢杆菌有抑菌作用。通过发酵条件优化确定其共培养液体发酵培养条件。扩大发酵后，收集次级代谢产物进行化合物的分离，获得纯化合物 7 个，其中化合物 1 具有较强抑菌效果，该化合物对大肠埃希氏菌、金色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、产气荚膜梭菌、产气肠杆菌有较强抑制作用（MIC 均为：5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），对苏云金芽孢杆菌、溶藻弧菌有强抑制活性，MIC 为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结构鉴定确定该化合物为倍半萜类化合物（2E, 4E）-5-（2,2-二甲基-6-亚甲基环己基）-3-甲基戊-2,4-二烯酸，该研究为食（药）用菌二元共培养活性代谢产物的研究提供了物质基础。

参考文献

- 陈惜燕, 蒲鹏, 康靖全, 等. 8 种食用菌游离氨基酸的组成及含量比较[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2017(5).
- 陈晓光, 刘远超, 梁晓薇, 谢意珍, 吴清平, 胡惠萍. 食药用菌数据库概况[J]. 食用菌学报, 2020, 27(03): 115-126.
- 樊亚琴. 红树林耐酸真菌 *Penicillium camemberti* OUCMDZ-1492 抗 H1N1 活性产物研究[D]. 中国海洋大学, 2013.
- 罗晓莉, 李建英, 张沙沙, 等. 云南三种特色野生食用菌营养成分分析与评价[J]. 食品工业, 2017(5): 277-280.
- 卯晓岚. 中国蕈菌[M]. 科学出版社, 2009.
- 欧胜平, 程显好, 高兴喜, 等. 卵孢小奥德蘑固体培养特性及营养成分分析[J]. 中国食用菌, 2017, 36(5): 52-59.
- 于传宗, 郝丽珍, 庞杰, 等. 我国北方三省(区)几种常见野生食用菌营养成分分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(2): 308-313.
- 张璐, 弓志青, 王文亮, 等. 7 种大家食用菌的呈味物质分析及鲜味评价[J]. 食品科技, 2017(3): 274-278.
- Aberoumand A. Nutrient composition analysis of gish fish fillets affected by different cooking methods.[J]. International Food Research Journal, 2014, 21(5): 1989-1991.
- Afagh H V, Saadatmand S, Riahi H, et al. Influence of Spent Mushroom Compost (SMC) as an Organic Fertilizer on Nutrient, Growth, Yield, and Essential Oil Composition of German Chamomile (*Matricaria Recutita* L.)[J]. 2019(1): 1-11.
- Amelie N . A Systematic Review of in-vivo Studies on Dietary Mushroom Supplementation for Cognitive Impairment (P14-021-19)[J]. Current Developments in Nutrition:Supplement_1.
- Ardin P , Peng F , Mangan M , et al. Using an Insect Mushroom Body Circuit to Encode Route Memory in Complex Natural Environments[J]. Plos Computational Biology, 2016, 12(2): e1004683.
- Bell V , Ferro J , Eusébio Chaquisse, et al. Host-Microbial Gut Interactions and Mushroom Nutrition[J]. Journal of Food and Nutrition Research, 2018, 6(9): 576-583.
- Bhatia P, Prakash R, Prakash N T. Enhanced antioxidant properties as a function of selenium uptake by edible mushrooms cultivated on selenium-accumulated waste post-harvest wheat and paddy residues[J]. International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture, 2014, 3(4): 127-132.
- Bozena Muszyńska, Katarzyna Sułkowska-Ziaja, Małgorzata Wołkowska, et al. Chemical, Pharmacological, and Biological Characterization of the Culinary-Medicinal Honey Mushroom, *Armillaria mellea* : A Review[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2011, 13(2): 167-175.
- Dongmei, Liu, Hanyu, et al. Efficient Transformation of the White Jelly Mushroom *Tremella fuciformis* (Tremellomycetes) and Its Companion Fungus *Annulohyphoxylon stygium* (Ascomycetes) Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. [J]. International journal of medicinal mushrooms, 2019, 21(9): 921-930.
- El Dine R S , El Halawany A M , Ma C M , et al. Inhibition of the dimerization and active site of HIV-1

- protease by secondary metabolites from the Vietnamese mushroom *Ganoderma colossum*. [J]. Journal of Natural Products, 2009, 72(11):2019-2023.
- Esmailpour B, Rahmanian M, Heidarpour O, et al. Effect of Vermicompost and Spent Mushroom Compost on the Nutrient and Essential Oil Composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.) [J]. Journal of essential oil-bearing plants JEOP, 2017, 20(5):1283-1292.
- Fisher L . Strangers in Their Own Land: Anger and Mourning on the American Right. By ARLIE RUSSELL HOCHSCHILD The Mushroom at the End of the World: On the Possibility of Life in Capitalist Ruins. By ANNA LOWENHAUPT TSING [J]. Journal of environmental law, 2017, 29(2): 383-387.
- Fung S Y, Pch C, Tan N H, et al. Nutrient and Chemical Analysis of Fruiting Bodies of a Cultivar of the Chinese Caterpillar Mushroom, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes) [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2018, 20(5): 459.
- Kawagishi H. Chapter 11 – Biologically Functional Compounds From Mushroom-Forming Fungi [J]. Natural Products & Drug Discovery, 2018: 309-326.
- Kawagishi H, Hayashi K, Tokuyama S, et al. Novel bioactive compound from the *Sparassis crispa* mushroom [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(7): 1804-1806.
- Kovacs B , Beni Z , Dekany M , et al. Isolation and Structure Determination of Antiproliferative Secondary Metabolites from the Potato Earthball Mushroom, *Scleroderma bovista* (Agaricomycetes) [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2018, 20(5): 411.
- Kumari S K . Cultivation of mushroom pleurotuseous and quantitative Estimation of secondary metabolites With antioxidant activity [J]. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2017, 8(3).
- Lan Donghe, Wu Bin. Chemistry and Bioactivities of Secondary Metabolites from the Genus *Talaromyces*. [J]. Chemistry & biodiversity, 2020, 17(8).
- Lee K J, Yun I J, Kim K H, et al. Amino acid and fatty acid compositions of *Agrocybe chaxingu*, an edible mushroom [J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2011, 24(2): 175-178.
- Litchfield J H. Nutrient Content of Morel Mushroom Mycelium: B-Vitamin Composition [J]. J FOOD SCI, 2014, 29(5): 690-691.
- Ma Z, Zhang W, Wang L, et al. A Novel Compound from the Mushroom *Cryptopus volvatus* Inhibits Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) In Vitro [J]. Plos One, 2013, 8(11): e79333.
- Mendel, Friedman. Mushroom Polysaccharides: Chemistry and Antiobesity, Antidiabetes, Anticancer, and Antibiotic Properties in Cells, Rodents, and Humans [J]. Foods, 2016, 5(4).
- Merdivan S, Lindequist U. Ergosterol Peroxide: A Mushroom-Derived Compound with Promising Biological Activities-A Review [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2017, 19(2): 93.
- Merilin Kakoti, Dibya Jyoti Hazarika, Amarendra Kumar, Madhumita Barooah, Mahendra Kumar Modi, Ashok Bhattacharyya, Robin Chandra Boro. Genetic Diversity and DNA Barcoding of Wild Mushrooms from Northeast India [J]. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science, 2021.
- Moxey K A. Estimating the spatial distribution of field-applied mushroom compost in the

- Brandywine-Christina River Basin using multispectral remote sensing[J]. 2016.
- Naepels M . Anna Tsing, The Mushroom at the End of the World. On the Possibility of Life in Capitalist Ruins[J]. 2017.
- Nagy László G, Robert R , Andrew T , et al. Comparative Genomics of Early-Diverging Mushroom-Forming Fungi Provides Insights into the Origins of Lignocellulose Decay Capabilities[J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2016(4): 959.
- O'Connor E , Owens R A , Doyle S , et al. Proteomic investigation of interhyphal interactions between strains of *Agaricus bisporus*[J]. *Fungal Biology*, 2020, 124(6).
- Paul, Ardin, Fei, et al. Using an Insect Mushroom Body Circuit to Encode Route Memory in Complex Natural Environments[J]. *Plos Computational Biology*, 2016.
- Pennone V , Dygico K L , Coffey A , et al. Effectiveness of current hygiene practices on minimization of *Listeria monocytogenes* in different mushroom production-related environments[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020.
- Perfileva A, Tsvileva O. Selenium Compounds Biotransformed by Mushrooms: Not Only Dietary Sources, But Also Toxicity Mediators[J]. *Current Nutrition & Food Science*, 2017, 13(2).
- Phillips K M , Rasor A S . A mixed mushroom control material to facilitate inter-laboratory harmonization of mushroom composition analyses[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2016, 48: 48-66.
- Rathore H , Prasad S , Sharma S . Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review[J]. *PharmaNutrition*, 2017, 5(2): 35-46.
- Shao Y , Guo H , Zhang J , et al. The Genome of the Medicinal Macrofungus Sanghuang Provides Insights Into the Synthesis of Diverse Secondary Metabolites[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 3035.
- Shaternikov A N , Nikitina V E . Bacteria of the *Azospirillum* Genus for the Optimization of the Artificial Culture of Xylotrophic Mushrooms[J]. *Biotekhnologiya*, 2020, 36(2): 16-25.
- Shen Xiao-Ting, Mo Xu-Hua, Zhu Li-Ping, Tan Ling-Ling, Du Feng-Yu, Wang Qian-Wen, Zhou Yuan-Ming, Yuan Xiao-Jie, Qiao Bin, Yang Song. Unusual and Highly Bioactive Sesterterpenes Synthesized by *Pleurotus ostreatus* during Coculture with *Trametes robiniophila* Murr.[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2019, 85(14).
- Shirahata T , Ino C , Mizuno F , et al. γ -Ionylidene-type sesquiterpenoids possessing antimicrobial activity against *Porphyromonas gingivalis* from *Phellinus linteus* and their absolute structure determination [J]. *Journal of Antibiotics*, 2017, 70(5): 695.
- Tobias, Policha, Aleah, et al. Disentangling visual and olfactory signals in mushroom-mimicking *Dracula orchids* using realistic three-dimensional printed flowers[J]. *New Phytologist*, 2016.
- Vamanu, Emanuel, Pelinescu, et al. Antioxidative Effects of Phenolic Compounds of Mushroom Mycelia in Simulated Regions of the Human Colon, In Vitro Study[J]. *Polish Journal of Food & Nutrition Sciences*, 2018.
- Wang Y , Tian Y , Shao J , et al. Macrophage immunomodulatory activity of the polysaccharide isolated from *Collybia radicata* mushroom[J]. *International journal of biological macromolecules*, 2017, 108: 300.
- Wei-Rui, Zhang, Sheng-Rong, et al. Development of a Novel Spawn (Block Spawn) of an Edible

- Mushroom, *Pleurotus ostreatus*, in Liquid Culture and its Cultivation Evaluation.[J]. Mycobiology, 2019.
- Zang H , Liu W , Cheng Y , et al. Bioremediation of Historically Chlorimuron-Ethyl-Contaminated Soil by Co-Culture Chlorimuron-Ethyl-Degrading Bacteria Combined with the Spent Mushroom Substrate[J]. Microorganisms, 2020, 8(3).
- Zhao J H , Ding Y , Nie Y , et al. Glass transition and state diagram for freeze-dried *Lentinus edodes* mushroom[J]. Thermochimica Acta, 2016: 82-89.
- Zheng Ruihong,Li Shoujie,Zhang Xuan,Zhao Changqi. Biological Activities of Some New Secondary Metabolites Isolated from Endophytic Fungi: A Review Study[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(2).
- Zou Y, Hou X. Extraction Optimization, Composition Analysis, and Antioxidation Evaluation of Polysaccharides from White Jelly Mushroom, *Tremella fuciformis* (Tremellomycetes).[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2017, 19(12): 1113.

导师组意见

导师组已通过_____的论文审查，同意并推荐其参加硕士学位论文答辩。

导 师:

导师组成员:

年 月 日

致谢

本文是在我的导师郭立忠教授和樊亚琴副教授的悉心指导下完成的，从课题的选题、方案的设计与实施、试验及论文的书写，整个过程导师对我进行了无私的关怀与帮助。在此，想我的导师表示衷心的感谢！我的导师郭立忠教授学识渊博、严谨治学、思维敏捷，在对我的试验和论文的指导过程中，我受益匪浅。导师为人师表的、豁然开朗的高尚品德是我一生学习的楷模。三年来，导师言传身教，不仅教给我学习、科研和工作方法，更教给我如何做人，如何实现自身的价值，这是我人生中的一笔宝贵财富。

樊亚琴副教授在我进行毕业设计进行化合物分离纯化过程，给与我细心耐心的指导，樊老师科研态度严谨细致、一丝不苟是我学习的典范。有很多问题在樊老师的指导下迎刃而解，感谢樊老师对我的悉心指导。

在试验和论文完成过程中，也得到了课题组内许多老师的指导和同学的帮助。徐丽丽老师在食用菌资源收集测定等工作中给与我很大的帮助和指导。李树文副教授、卢伟东副教授、于浩副教授、刘琳副教授、张燕娇副教授、杨秀清老师等对本研究提出的宝贵意见和在试验期间的帮助。感谢江春娇师妹、赵书雪师姐、王同海师兄、杨霆师兄、赵建俊师兄、高杰、王菲、孙倩淑、孟祥麟师弟、徐康师弟等在试验过程中给与的帮助和在生活中对我的关心与支持。

最后我还要深深感谢我的家人对我的支持和帮助，是你们的理解和支持让我顺利完成学业。在论文的研究工作中，我得到了太多人的关心、支持和帮助，值此论文完成之际，值此论文完成之际，再次向所有帮助、支持过我的老师与同学致以最诚挚的谢意。

作者简介

个人简介:

吉建成, 男, 1995 年出生于山东省济南市, 汉族, 中共党员。

2014 年 9 月至 2018 年 7 月就读于青岛农业大学生命科学学院, 生物技术专业, 食用菌方向, 获得理学学士学位。

2018 年 9 月至 2021 年 7 月就读于青岛农业大学生命科学学院, 微生物专业, 导师是郭立忠教授和樊亚琴副教授。

发表文章:

Chunjiao jiang, **Jiancheng ji** (并列一作), et al, New lanostane-type triterpenoids with proangiogenic activity from the fruiting body of *Ganoderma applanatum* [J]. *Natural Product Research* .

赵建俊, **吉建成**, 于国民, 董相军, 徐丽丽. 采自山东的几株野生羊肚菌鉴定[J]. *中国食用菌*, 2020, 39(12): 28-32.

吉建成, 赵林, 王同海, 史志超, 徐丽丽. 一株野生紫丁香蘑的分离纯化与鉴定[J]. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 2019, 36(03): 183-187.

赵书雪, 刘苗苗, **吉建成**, 卢思雨, 徐丽丽. 2 株野生侧耳的驯化栽培及营养成分分析[J]. *中国食用菌*, 2020, 39(11): 35-40.

申请专利:

徐丽丽, 陆秀华, 郭立忠, **吉建成**. 一种功能性酸奶及其制备方法 (CN201810627630.X)