

营养限制对桦褐孔菌生长及三萜合成的影响

曾丽梅, 柳巧, 武慧, 杨梦媛, 曹舒佳, 杨绪勤, 蒋继宏, 曹小迎*

江苏师范大学 生命科学学院, 江苏省药食植物生物技术国家重点实验室(培育), 江苏 徐州 221116

曾丽梅, 柳巧, 武慧, 杨梦媛, 曹舒佳, 杨绪勤, 蒋继宏, 曹小迎. 营养限制对桦褐孔菌生长及三萜合成的影响[J]. 微生物学报, 2025, 65(1): 362-370.

ZENG Limei, LIU Qiao, WU Hui, YANG Mengyuan, CAO Shujia, YANG Xuqin, JIANG Jihong, CAO Xiaoying. Effects of nutrient restriction on growth and triterpene synthesis of *Inonotus obliquus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(1): 362-370.

摘要:【目的】碳源和氮源在提供真菌所需的能量和增加次级产物代谢方面具有重要的作用。本研究旨在确认碳、氮限制对桦褐孔菌生长及三萜类次级代谢产物生产的影响。【方法】以 L-谷氨酰胺和 D-无水葡萄糖分别作为氮源和碳源,以营养充足培养基(0.877 g/L L-谷氨酰胺, 20.000 g/L 无水葡萄糖)作为对照组,实验组分为添加 0.044 g/L L-谷氨酰胺的 N 元素限制培养基(N-L)和添加 2.000 g/L 无水葡萄糖的 C 元素限制培养基(C-L)。平板实验中,接种后的平板置于 28 °C 恒温培养箱培养,每天测量并记录其菌落直径。摇瓶发酵实验中,摇瓶接种后分别于 5 d 和 10 d 收样,测定生物量、三萜含量及三萜合成相关基因的表达量。【结果】平板实验结果显示, C-L 组菌丝延伸速度最快,但菌丝稀疏,菌丝的老化速度也得到较大延缓, N-L 组菌丝延伸速度较 CK 组快但低于 C-L 组,菌丝老化速度最快;摇瓶发酵实验结果显示, N-L 组生物量最高; RT-qPCR 结果显示, C-L 和 N-L 条件下,多数三萜类合成酶基因出现上调趋势; GC-MS 结果显示,与 CK 组相比, C-L 和 N-L 组中羊毛甾醇以及桦褐孔菌醇含量均有所上升。【结论】营养限制条件下会刺激桦褐孔菌三萜类化合物的积累。

关键词: 桦褐孔菌; 营养限制; 生长; 羊毛甾醇; 桦褐孔菌醇

资助项目: 国家自然科学基金(32030072)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32030072).

*Corresponding author. Tel: +86-516-83656598, E-mail: cxy4868@jsnu.edu.cn

Received: 2024-07-27; Accepted: 2024-11-02; Published online: 2024-11-06

Effects of nutrient restriction on growth and triterpene synthesis of *Inonotus obliquus*

ZENG Limei, LIU Qiao, WU Hui, YANG Mengyuan, CAO Shujia, YANG Xuqin, JIANG Jihong, CAO Xiaoying*

The Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal and Edible Plants of Jiangsu Province, School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] Carbon and nitrogen sources play an important role in providing the energy required for fungal growth and increasing secondary metabolite production. This study aims to investigate the effects of carbon and nitrogen restriction on the growth of *Inonotus obliquus* and the production of triterpenoid secondary metabolites. [Methods] L-glutamine and D-anhydrous glucose were used as the nitrogen and carbon sources, respectively. A nutrient-sufficient medium (0.877 g/L L-glutamine and 20.000 g/L of D-anhydrous glucose) served as the control group (CK). The experimental groups included a nitrogen-limited medium (N-L) with 0.044 g/L L-glutamine and a carbon-limited medium (C-L) with 2.000 g/L D-anhydrous glucose. In the plate experiment, inoculated plates were incubated at 28 °C in a constant temperature incubator, and colony diameters were measured and recorded daily. In the shake flask fermentation experiment, samples were collected on the 5th and 10th days to measure biomass, triterpene content, and the expression levels of triterpene synthesis-related genes. [Results] The plate experiment showed that the C-L group had the fastest mycelium extension, but the mycelium was sparse, and the aging was greatly delayed. The N-L group exhibited faster mycelium extension than the CK group but slower than the C-L group, with the fastest mycelium aging. The shake flask fermentation results showed that the N-L group had the highest biomass. qPCR results demonstrated an upregulation trend in most triterpenoid synthase genes under C-L and N-L conditions. GC-MS analysis revealed that both lanosterol and inotodiol content increased in the C-L and N-L groups compared to the CK group. [Conclusion] Nutritional restriction conditions stimulate the accumulation of triterpenes in *I. obliquus*.

Keywords: *Inonotus obliquus*; nutritional restriction; growth; lanosterol; inotodiol

桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*), 俄语命名为 Chaga, 属于担子菌亚门层菌纲非褐菌目多孔菌科纤孔菌属, 是一种生长在桦树上的寄生真菌, 子实体呈深褐色瘤状, 直径 25–40 cm, 表面分布不规则的深色沟痕, 质地脆而硬^[1]。桦褐孔菌主要分布在北纬 40°–50°的地区, 包括俄罗斯、芬兰、波兰、北美、中国、日本等地^[2-3]。

野生桦褐孔菌依靠吸食桦树精华来满足自身营养需求, 富含多糖、萜类、多酚等多种生物活性物质^[4]。作为中国 6 种重要的药用真菌之一^[5], 桦褐孔菌在抗肿瘤、抗氧化、治疗慢性炎症、降血糖等方面的研究逐年成为热点^[6-10]。

生物的生命活动离不开营养。碳、氮元素广泛存在于自然界中, 是合成蛋白质、脂质和

核酸的重要营养元素,在真菌的生长发育和代谢中发挥了至关重要的作用。真菌在缺乏碳或氮元素的逆境中,会通过产生次级代谢产物以抵御不良环境。营养限制影响真菌的次级代谢,在黄曲霉菌、构巢曲菌、灵芝等菌种中都有研究^[11-13],Lian 等^[11]研究发现氮限制会高度诱导转录因子 GCN₄ 基因的表达,而 Wang 等^[14]的研究表明,GCN₄ 通过直接与 *GIMPC* 的启动子结合并激活 *GIMPC* 表达来积极调节灵芝中的氮利用,Zhao 等^[15]的研究表明,适当的氮限制和液体静态培养可以促进灵芝中灵芝酸的积累。真菌营养元素限制的研究主要集中在灵芝方面,而关于营养限制对桦褐孔菌生长及次级代谢产物影响的研究鲜有报道。

三萜类化合物是一种重要的次级代谢产物,广泛分布于自然界中^[16],也是桦褐孔菌中有效的生物活性成分之一,在抗肿瘤、抵御癌细胞增殖方面发挥了重要的功能,因此备受研究者关注。目前仍在桦褐孔菌中持续分离出有效的三萜化合物,并验证它们的生物活性。Zhao 等^[17]从桦褐孔菌菌核中分离到 11 个羊毛甾烷类化合物,其中 inonotusane D 和 saponaceic acid I 对鼠乳腺癌细胞及人乳腺癌细胞表现出强细胞毒性。Kim 等^[18]检测出桦褐孔菌菌核外围三萜化合物(包括白桦脂醇、白桦脂酸、桦褐孔菌醇和栓菌酸等)的含量及抗肿瘤增殖活性高于菌核内部。Zou 等^[19]从桦褐孔菌中分离出 9 个羊毛甾烷三萜类化合物,其中, inonotsutriol A 表现出最有效的神经保护活性,可以通过抑制细胞凋亡来保护 SH-SY5Y 细胞免受氧化损伤。桦褐孔菌的活性三萜成分主要为羊毛脂烷型三萜类化合物,桦褐孔菌中三萜类化合物的合成包括 MVA 途径获得的萜类骨架的合成,随后异戊酸焦磷酸和二甲烯异戊二烯焦磷酸在法尼基焦磷酸合成酶(farnesyl pyrophosphate synthase,

FPPS)作用下生成法尼基焦磷酸,2 个法尼基焦磷酸在鲨烯合酶(squalene synthase, SQS)作用下生成三萜类化合物的前体角鲨烯。角鲨烯在鲨烯环氧化酶(squalene epoxidase, SQE)的作用下生成环氧鲨烯,然后羊毛甾醇合酶(lanosterol synthase, LSS)催化生成羊毛甾醇^[20]。羊毛甾醇后续已经阐明的催化步骤包括在羊毛甾醇 14 α -去甲基酶(lanosterol 14 α -demethylase, LAD)等一系列酶的催化下生成麦角甾醇等化合物,但桦褐孔菌中的羊毛甾烷类化合物的生物合成途径目前尚缺乏清晰的认识。有文献综合分析桦褐孔菌中羊毛脂烷型三萜的结构相关性及其化合物含量,预测其生物合成途径,该途径以主成分羊毛甾醇为起点,在不同酶的催化作用下生成,先由不同的酶催化生成桦褐孔菌醇、3 β -hydroxy-lanosta-8,24-diene-21-al 和栓菌酸后,再分别由其他酶催化生成复杂多样的次级代谢产物。因此,羊毛甾醇是合成桦褐孔菌中活性三萜类化合物的重要骨架^[20-21],而桦褐孔菌醇是桦褐孔菌中最主要的抗癌活性物质^[22]。

本研究参考其他真菌在碳、氮限制条件下的发酵研究方法,探究碳、氮限制对桦褐孔菌的生长情况,以及对桦褐孔菌中三萜类化合物积累的影响,研究结果为后续桦褐孔菌发酵高效生产菌丝体及活性代谢产物提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种

桦褐孔菌菌种分离自东北长白山的野生桦褐孔菌菌核,保藏于江苏省药食植物生物技术国家重点实验室(培育)。

1.2 培养基

碳、氮源限制培养基(g/L): KH₂PO₄ 1.000, K₂HPO₄ 2.000, NaCl 0.200, MgSO₄·7H₂O 1.023, 维生素 B₁ 0.050, CaCl₂

1.110, L-谷氨酰胺(氮源), D-无水葡萄糖(碳源), 琼脂粉 20.000 (培养基配方根据 Lian 等^[11]稍作改进)。其中氮限制培养基(N-L) (g/L): L-谷氨酰胺 0.044, D-无水葡萄糖 20.000; 碳限制培养基(C-L) (g/L): L-谷氨酰胺 0.877, D-无水葡萄糖 2.000; 对照培养基(CK) (g/L): L-谷氨酰胺 0.877, D-无水葡萄糖 20.000。PDB 培养基(g/L): 葡萄糖 20.000, 新鲜土豆 200.000; PDA 培养基(g/L): 葡萄糖 20.000, 新鲜土豆 200.000, 琼脂粉 20.000; 各配制好的培养基 pH 值为 6.0 左右, 115 °C 灭菌 30 min 后待用。

1.3 平板及摇瓶发酵实验

将斜面保藏的桦褐孔菌于新鲜的 PDA 平板上活化, 待菌丝体直径长至 6 cm 左右, 用直径 0.5 cm 的琼脂打孔器在菌落边缘用十字交叉法打 4 个孔, 挑取菌丝块至 50 mL PDB 培养基中, 28 °C、160 r/min 培养 5 d 后匀浆, 吸取 50 mL 匀浆液至新的 100 mL PDB 培养基中, 继续摇瓶培养 6–8 d, 过滤得菌丝体, 用 100 mL 无菌去离子水重悬匀浆(15 s/次, 共 3 次), 此匀浆液为后续种子液。

吸取上述种子液 2 μL, 点植新的平板培养基中, 28 °C 培养箱黑暗培养, 每日测量菌丝直径、拍照记录。

分别吸取 2 mL 种子液至 N-L、C-L 以及 CK 组培养基中, 28 °C、160 r/min 分别培养 5 d 及 10 d, 取出后真空抽滤得菌丝体, 冷冻干燥后称重得菌丝体干重, 取部分菌丝体用于 RNA 提取, 其余菌丝体研磨成细粉(过 60 目筛)用于三萜类化合物含量测定。

1.4 RT-qPCR 三萜类合成酶基因表达量

总 RNA 提取按照 FastPure Universal Plant Total RNA Isolation Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)标准步骤进行, 总 RNA 检测合格后用于后续实验; 逆转录按照试剂盒 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)标准步骤进行; qPCR 按照试剂盒 ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)标准步骤进行, 反应体系配制及反应程序参照试剂盒说明书, 以 18S rRNA 基因为内参, qPCR 引物见表 1。

表 1 本研究所用 qPCR 检测引物

Table 1 Primers for qPCR

基因名缩写 Abbreviation of gene name	基因名全称 Full name of gene	引物序列 Primer sequences (5'→3')
<i>SQS</i>	Squalene synthase gene	F: GTTGGTCATTTCGAGGAAAC R: GCGGTAAGAAGAAGGGAGAAG
<i>SQE</i>	Squalene epoxidase gene	F: AACTCGGAGACCGATACCA R: TCAAACGCCTCCTCCAATAC
<i>LAD</i>	Lanosterol 14 α -demethylase gene	F: CAGTACGGAAATGACCCAATCA R: CCTAACGCAACCACCATCTT
<i>FPPS</i>	Farnesyl pyrophosphate synthase gene	F: GCCAACTCGTCGATCTTATCA R: GGAGTAGAACGCAGTCTTGTATAG
<i>MVD</i>	Mevalonate diphosphate decarboxylase gene	F: CGGGACACGAAACTCATTCT R: CCAAAGTCTGTCTGCTTGA
<i>LSS</i>	Lanosterol synthase gene	F: AAGGTCTGGCTGTCGATACT R: CACCACCGATGAGGATGTAATG
<i>18S rRNA</i>	18S rRNA gene	F: CTTGACACTACGAGGGATAAC R: TCCATCATCAATCCCGAACAA

1.5 菌丝体内三萜类化合物的 GC-MS 的相对定量

称取 1.3 中的菌丝体粉 0.3 g 至 100 mL 离心管中, 加入 30 mL 乙酸乙酯(料液比=10:1), 回流提取 2 h 以上, 取出后过滤, 收集滤液浓缩至 2 mL, 用有机相滤膜过滤浓缩液, 取适量浓缩液送 GC-MS 检测(参考徐明雅等^[23]方法进行改进)。GC 检测条件, 色谱柱: Agilent HP-5MS 19091S-433 (30 m×250 μm×0.25 μm); 升温程序: 起始温度 150 °C, 100 °C 保持 1 min; 以 30 °C/min 升至 280 °C, 保持 24 min; 载气为氮气, 流速 1 mL/min, 分流进样, 分流比 10:1, 进样口温度 250 °C。MS 检测条件, 质谱条件: 电子轰击离子源; 离子源温度 230 °C; 接口温度 250 °C; 电子能量 70 eV; 质量扫描范围(m/z) 30–500。

1.6 数据处理

采用 GraphPad Prism 9 软件进行方差分析和作图, 所有数据取 3 次平行试验的平均值, 以平均值±标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 营养限制条件下桦褐孔菌菌丝体在平板上的生长情况

菌丝体接种的 C、N 限制平板实验中, 前 3 天内, 实验组和对照组的菌丝状态相差不大; 第 6 天时, 对比 N-L 组和 CK 组, C-L 组生长速度最快, 已出现明显差异; 第 9 天时可以看出 CK 组菌丝较实验组致密, C-L 组菌丝圈直径最大, N-L 组次之, CK 组菌丝圈直径最小。之后, N-L 组与 CK 组菌丝圈直径出现显著差异; 第 15 天时, 各组菌丝长满培养基, 其中, C-L 组菌丝延伸最长且中心部分菌丝体较少, 推测在营养限制的条件下, C-L 组为了汲取更多的营养成分, 促使菌丝体延伸; 第 18 天时, C-L 组菌丝纵向生长, 中心部分已长满; 观察 21–45 d 的生长情况, 各组均出现褐化的

现象, 其中 N-L 组褐化最严重, 推测 N-L 组产生了更多的次级代谢产物(图 1、图 2)。

2.2 营养限制对桦褐孔菌生物量的影响

当摇瓶发酵第 10 天时, 发酵液出现褐化现象, 因此选取第 5 天和第 10 天的菌丝液进行生物量指标测定。图 3 的生物量结果显示, 摇瓶发酵第 5 天时, N-L 组生物量最高, CK 组次之, C-L 组的生物量最低; 第 10 天时, N-L 组生物量仍然最高, CK 组次之, C-L 组最低。总体说来, N-L 组与 C-L 相对于 CK 组均无显著差异, 说明营养限制的情况下, 对摇瓶发酵菌丝体的生物量并无明显影响。

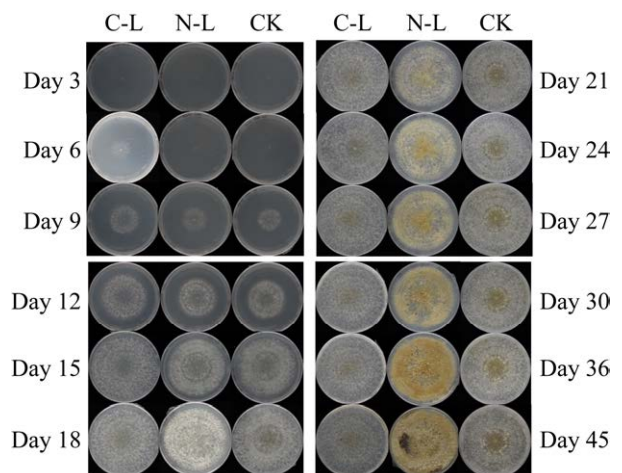


图 1 平板实验菌丝体生长情况

Figure 1 The growth of mycelium in plate experiment.

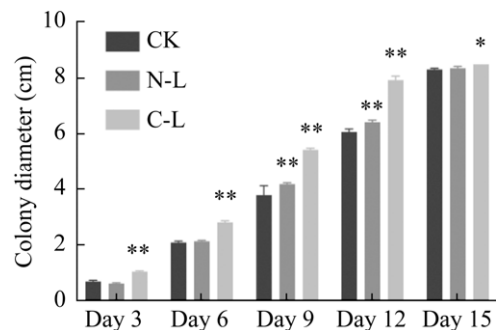


图 2 平板实验菌丝圈直径变化

Figure 2 Change of mycelial ring diameter in plate experiment. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

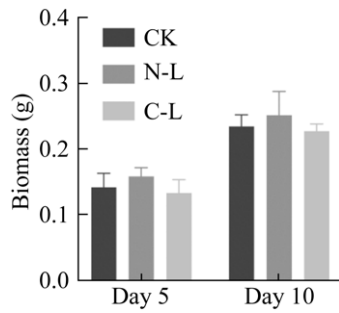


图 3 摇瓶发酵生物量变化

Figure 3 Variation of biomass in shake flask fermentation.

2.3 营养限制条件下萜类合成酶基因的相对表达量

qPCR 结果显示, 摇瓶发酵 5 d 时, N-L 组中三萜类合成相关酶基因 *MVD*、*FPPS*、*LSS* 表达量上调, 而 *SQE* 表达量下调。C-L 组 *SQS* 表达量上调, 而 *SQE* 表达量也下调。摇瓶发酵 10 d 时, N-L 组 *MVD* 和 *LSS* 表达量显著上调, 其中 *MVD* 和 *LSS* 表达量分别升高 9.70 倍和 14.09 倍, C-L 组 *MVD*、*FPPS* 和 *LSS* 表达量显著上调, 其中 *MVD*、*FPPS*、*LSS* 表达量分别升高 12.30 倍、6.82 倍和 11.55 倍(图 4)。

2.4 营养限制条件对菌丝体三萜类化合物含量的影响

GC-MS 初步鉴定出 16 种物质, 其中, 羊毛甾醇和桦褐孔菌醇显示出上调表达, 结果见图 5。在营养限制 5 d 时, 与 CK 组相比, C-L 组或 N-L 组羊毛甾醇含量无显著变化; N-L 组桦褐孔菌醇含量则是 CK 组的 4.17 倍, C-L 组未检测到桦褐孔菌醇吸收峰。在营养限制 10 d 时, N-L 组和 C-L 组菌丝体羊毛甾醇和桦褐孔菌醇均有所提高, 其中, N-L 组羊毛甾醇含量是 CK 组的 1.81 倍, C-L 组羊毛甾醇含量是 CK 组的 1.47 倍; N-L 组桦褐孔菌醇含量是 CK 组的 2.76 倍, C-L 组桦褐孔菌醇含量是 CK 组的 1.07 倍。同时, 在桦褐孔菌的培养过程中, 培

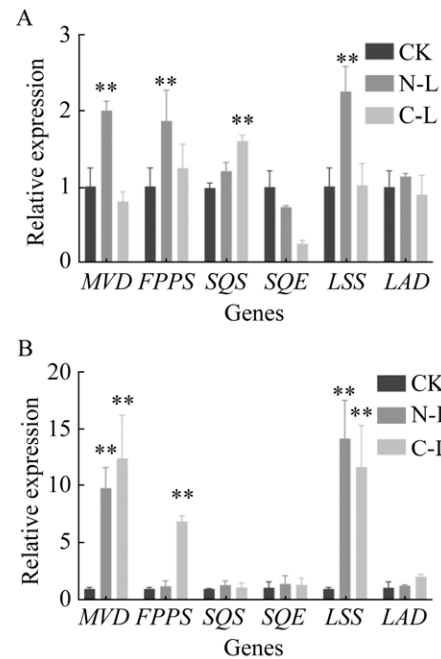


图 4 摇瓶发酵萜类合成酶基因相对表达量。

A: 摇瓶发酵 5 d 萜类合成酶基因相对表达量; B: 摇瓶发酵 10 d 萜类合成酶基因相对表达量。

Figure 4 Relative expression of terpenoid synthase genes in shaken bottle fermentation. A: Relative expression of terpenoid synthase genes in shaken bottle fermentation at 5 days; B: Relative expression of terpenoid synthase genes in shaken bottle fermentation at 10 days. **: $P < 0.01$.

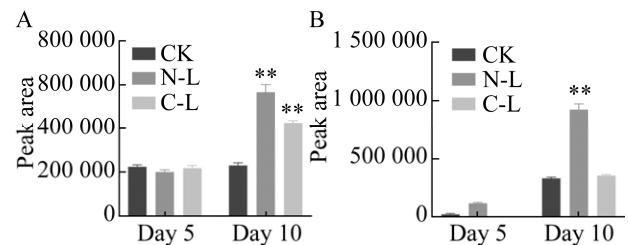


图 5 摇瓶发酵 5 d、10 d 羊毛甾醇、桦褐孔菌醇含量变化。A: 羊毛甾醇含量变化; B: 桦褐孔菌醇含量变化。

Figure 5 Changes in the contents of lanosterol and inotodiol at 5 days and 10 days after shaking bottle fermentation. A: Changes in the contents of lanosterol; B: Changes in the contents of inotodiol. **: $P < 0.01$.

养 5 d 和 10 d 时,羊毛甾醇的含量无明显变化,而桦褐孔菌醇在 5 d 时含量很低,而在 10 d 时含量有大幅度提高。

3 讨论

真菌的生长发育除了受到本身的遗传特性及温度、光照等环境条件影响外,培养基的组成对菌丝生长、孢子萌发、子实体产量和品质等也会产生重要的影响^[24-27]。与其他生物相同,真菌的生长发育需要碳源、氮源、无机盐、生长因子和水等营养要素,其中培养基中的碳含量、氮含量和碳氮比(C/N)对真菌生长发育的影响较为显著^[28]。如酵母在营养短缺如较低氮浓度的情况下会发生细胞形态和细胞分裂方式的改变,并导致侵入性丝状生长^[24]。平菇在缺 N 的培养基上生长表现为长势差,菌落极薄,菌丝细弱、稀疏^[29]。本研究结果表明在 N 限制和 C 限制的情况下桦褐孔菌菌丝会侵入性生长,表现为较正常培养基上的菌丝圈直径增长快,菌丝稀疏。同时 C 限制较 N 限制更为明显。平菇菌丝在缺 N 的培养基上生长,第 4 天起,培养基中出现黄色分泌物,以种块为中心其范围很快扩大,颜色逐渐加深^[29-30]。本研究结果显示,桦褐孔菌菌丝在限 N 情况下,第 21 天开始中心出现褐化,很快延伸至整个平板。然而限 C 和正常培养基褐化程度不高。

近年来,通过营养物质的饥饿胁迫培养,微生物代谢物质的产量得到了显著提高,已成为一种有效的发酵策略。其中,氮饥饿培养是最常用的促进活性代谢产物积累的手段。在藤仓赤霉(*Gibberella fujikuroi*)中,减少培养基中铵盐的浓度可以大幅提高赤霉素、红色色素比卡韦林、胡萝卜素的合成^[31-32];在氮饥饿的条件下,玉米瘤黑粉菌(*Ustilago maydis*)产生大量的纤维二糖脂类 *ustilagic acid*^[33]。灵芝发酵培养基

中以谷氨酰胺作为 N 源,当添加浓度为 3 mmol/L 时,4 种单体灵芝酸较添加浓度为 60 mmol/L 时分别提高了 2.8 倍、5.8 倍、8.3 倍和 5.1 倍^[15]。在 5 mmol/L 的天冬氨酸浓度作为氮源限制条件时,获得了 0.4 g/L 的多糖产量,与氮源浓度为 20 mmol/L 的天冬氨酸相比,产量提高了 23.21%^[34]。本研究结果表明,除了 N 限制外,C 限制也能提高桦褐孔菌中次级代谢产物的产量。其中,羊毛甾醇在 C、N 限制时提高幅度最高,在培养 10 d 时,C 限制的羊毛甾醇含量较对照提高了 1.47 倍,N 限制的提高了 1.81 倍。除此之外,N 限制提高了桦褐孔菌醇的产量,在培养 5 d 时,桦褐孔菌含量较对照提高了 4.17 倍,而在培养 10 d 时,桦褐孔菌含量较对照提高了 2.76 倍。

在营养限制策略调控真菌次级代谢物产量的研究中,需要了解营养限制条件下通过调控哪些真菌次级代谢物合成关键酶达到提高次级代谢物合成的作用,最终从转录水平了解营养限制提高真菌次级代谢物合成的机理。如在氮限制的条件下,灵芝酸产量提高的同时灵芝酸合成途径中 4 个重要的结构基因 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)、FPS、SQS 和 LSS 的转录水平在整个灵芝发酵过程中都高于对照,其 mRNA 的最高水平分别是对照的 37.0 倍、18.0 倍、4.5 倍及 3.2 倍^[15]。在氮限制的情况下灵芝多糖含量增加的同时多糖生物合成途径中葡萄糖激酶(glucokinase)、 α -磷酸葡萄糖变位酶(α -phosphoglucomutase)、UDP 葡萄糖焦磷酸化酶(UDP-glucose pyrophosphorylase)以及 1,3- β -葡聚糖合成酶(1,3- β -glucan synthase)等关键酶的基因比氮充足情况下分别上调了 30.00%、35.00%、16.67%和 17.85%^[34]。本研究也检测了各样品中三萜合成途径中的一些关键酶基因的表达情况,结果在培养第 5 天时,C、N 限制的条件下,除 SQE 表达量下调外,其他 5 个基因

都无显著变化或上调, 其中 N 限制条件下的基因上调情况更显著, 这可能是桦褐孔菌醇含量大幅度提高的原因。在培养第 10 天时, 在 C、N 限制条件下, 检测的 6 个基因中 *MVD* 和 *LSS* 表达量大幅度提高, 另外在 C 限制条件下 *FPPS* 表达量也大幅度提高。相比之下, 桦褐孔菌醇和羊毛甾醇在 N 限制条件下含量提高幅度最大, 分析原因可能与 N 限制条件下 *LSS* 表达量提升的幅度最高有关。LAD 作为羊毛甾醇下游的另外一条途径的第一个催化酶, 其基因表达量无显著变化, 说明桦褐孔菌的次级代谢调控较为复杂, 还需要深入研究探讨。

4 结论

在缺少氮元素或碳元素的条件下, 桦褐孔菌菌丝的延伸速度会加快, 菌丝体较松散, 且氮元素和碳元素限制可以刺激桦褐孔菌中羊毛甾醇和桦褐孔菌醇的积累。本研究初步证明了氮元素限制、碳元素限制和桦褐孔菌生长及其主要的三萜类次级代谢产物合成之间的关系, 相关研究成果可为后续桦褐孔菌液体深层发酵生产活性三萜奠定理论基础。

作者贡献声明

曾丽梅: 实验及论文撰写; 柳巧: 实验设计、框架指导; 武慧: 文献调研; 杨梦媛: 数据分析; 曹舒佳: 图片绘制; 杨绪勤: 课题指导; 蒋继宏: 拟定课题、修改论文; 曹小迎: 课题设计、组织实施、论文修改和润色。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

[1] 黄年来. 俄罗斯神秘的民间药用真菌: 桦褐孔菌[J]. 中国食用菌, 2002, 21(4): 7-8.

HUANG NL. *Inonotus obliquus*, a mysterious folk medicinal fungus in Russia[J]. Edible Fungi of China, 2002, 21(4): 7-8 (in Chinese).

[2] ZHENG WF, MIAO KJ, LIU YB, ZHAO YX, ZHANG MM, PAN SY, DAI YC. Chemical diversity of biologically active metabolites in the *Sclerotia* of *Inonotus obliquus* and submerged culture strategies for up-regulating their production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(4): 1237-1254.

[3] ZHONG XH, REN K, LU SJ, YANG SY, SUN DZ. Progress of research on *Inonotus obliquus*[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2009, 15(2): 156-160.

[4] JOO JI, KIM DH, YUN JW. Extract of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) stimulates 3T3-L1 adipocyte differentiation[J]. Phytotherapy Research, 2010, 24(11): 1592-1599.

[5] 戴玉成, 李玉. 中国六种重要药用真菌名称的说明[J]. 菌物学报, 2011, 30(4): 515-518.

DAI YC, LI Y. Notes on the nomenclature of six important medicinal fungi in China[J]. Mycosystema, 2011, 30(4): 515-518 (in Chinese).

[6] CHEN YF, ZHENG JJ, QU C, XIAO Y, LI FF, JIN QX, LI HH, MENG FP, JIN GH, JIN D. *Inonotus obliquus* polysaccharide ameliorates dextran sulphate sodium induced colitis involving modulation of Th1/Th2 and Th17/Treg balance[J]. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2019, 47(1): 757-766.

[7] KIM YO, HAN SB, LEE HW, AHN HJ, YOON YD, JUNG JK, KIM HM, SHIN CS. Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*[J]. Life Sciences, 2005, 77(19): 2438-2456.

[8] MIZUNO T, ZHUANG C, ABE K, OKAMOTO H, KIHO T, UKAI S, LECLERC S, MEIJER L. Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from the *Sclerotia* and mycelia of *Inonotus obliquus* (pers.: Fr.) pil. (aphyllophoromycetidae)[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 1999, 1(4): 301-316.

[9] NIU H, SONG D, MU HB, ZHANG WX, SUN FF, DUAN JY. Investigation of three lignin complexes with antioxidant and immunological capacities from *Inonotus obliquus*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 86: 587-593.

[10] YOON BG, NOH JY, YOON JJ. Composition for prevention and treatment of type1 and type2 diabetes, containing water extract of cordyceps militaris and *Inonotus obliquus* as effective ingredient: KR20030014648[P]. 2004-09-16.

[11] LIAN LD, WANG LS, SONG SQ, ZHU J, LIU R, SHI L, REN A, ZHAO MW. GCN4 regulates secondary metabolism through activation of antioxidant gene expression under nitrogen limitation conditions in *Ganoderma lucidum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(14): e0015621.

[12] SCHERLACH K, SARKAR A, SCHROECKH V, DAHSE HM, ROTH M, BRAKHAGE AA, HORN U, HERTWECK C. Two induced fungal polyketide pathways converge into antiproliferative spiroanthrones[J]. ChemBiochem, 2011, 12(12): 1836-1839.

[13] EHRlich KC, COTTY PJ. Variability in nitrogen regulation of aflatoxin production by *Aspergillus flavus*

- strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60(1/2): 174-178.
- [14] WANG Z, CHEN JH, DING J, HAN J, SHI L. *GIMPC* activated by *GCN4* regulates secondary metabolism under nitrogen limitation conditions in *Ganoderma lucidum*[J]. *mBio*, 2023, 14(5): e0135623.
- [15] ZHAO W, XU JW, ZHONG JJ. Enhanced production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under nitrogen-limiting conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(17): 8185-8190.
- [16] LYU H, CHEN J, LI WL. Natural triterpenoids for the treatment of diabetes mellitus: a review[J]. *Natural Product Communications*, 2016, 11(10): 1579-1586.
- [17] ZHAO FQ, XIA GY, CHEN LX, ZHAO JL, XIE ZF, QIU F, HAN G. Chemical constituents from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities[J]. *Journal of Natural Medicines*, 2016, 70(4): 721-730.
- [18] KIM J, YANG SC, HWANG AY, CHO H, HWANG KT. Composition of triterpenoids in *Inonotus obliquus* and their anti-proliferative activity on cancer cell lines[J]. *Molecules*, 2020, 25(18): 4066.
- [19] ZOU CX, DONG SH, HOU ZL, YAO GD, LIN B, HUANG XX, SONG SJ. Modified lanostane-type triterpenoids with neuroprotective effects from the fungus *Inonotus obliquus*[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 105: 104438.
- [20] 赵芬琴, 王雪慧, 王宁宁, 蒋莉珂, 郁慧敏, 陈文娟. 桦褐孔菌中羊毛脂烷型三萜的生物合成途径探讨[J]. *河南大学学报(医学版)*, 2017, 36(1): 64-69.
ZHAO FQ, WANG XH, WANG NN, JIANG LK, YU HM, CHEN WJ. Discussion on the biosynthetic pathway of lanostanes in *Inonotus obliquus*[J]. *Journal of Henan University (Medical Science)*, 2017, 36(1): 64-69 (in Chinese).
- [21] 高铤晖, 王高乾, 黄蕙芸, 高昊, 姚新生, 胡丹. 真菌三萜及甾体的生物合成研究进展[J]. *有机化学*, 2018, 38(9): 2335-2347.
GAO YH, WANG GQ, HUANG HY, GAO H, YAO XS, HU D. Biosynthesis of fungal triterpenoids and steroids[J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2018, 38(9): 2335-2347 (in Chinese).
- [22] 赵卓卓, 冉棋, 丁辉, 刘秀琨, 余河水, 宋新波, 张丽娟. 桦褐孔菌醇研究进展[J]. *食用菌学报*, 2018, 25(4): 121-129.
ZHAO ZZ, RAN Q, DING H, LIU XK, YU HS, SONG XB, ZHANG LJ. Advances in inotodiol research[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2018, 25(4): 121-129 (in Chinese).
- [23] 徐明雅, 丰文燕, 申屠婉铃, 周旭. GC-MS/MS 国标法检测稻谷中 11 种农药残留存在的问题及改进[J]. *粮食与油脂*, 2024, 37(4): 140-144, 157.
XU MY, FENG WY, SHENTU WL, ZHOU X. Problems and improvements of GC-MS/MS national standard method for determination of 11 pesticide residues in rice[J]. *Cereals & Oils*, 2024, 37(4): 140-144, 157 (in Chinese).
- [24] GIMENO CJ, LJUNGDAHL PO, STYLES CA, FINK GR. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and *RAS*[J]. *Cell*, 1992, 68(6): 1077-1090.
- [25] SUN MH, LIU XZ. Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic hyphomycetes as fungal biocontrol agents[J]. *Mycopathologia*, 2006, 161(5): 295-305.
- [26] GUO JW, YU ZF, QIAO M, ZHANG KQ. Effects of carbon and nitrogen sources on sexual reproduction of five strains from the ascomycete *Orbilia*[J]. *Annals of Microbiology*, 2009, 59(1): 51-55.
- [27] GUO JW, YU ZF, LI CY, ZHANG KQ. The evaluation of sexual reproduction capacity of orbiliaceous anamorphs[J]. *Mycosystema*, 2009, 28(5): 692-697.
- [28] GAO L, SUN MH, LIU XZ, CHE YS. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi[J]. *Mycological Research*, 2007, 111(1): 87-92.
- [29] 殷红. 氮源浓度对平菇菌丝生长和子实体形成的影响[J]. *西北植物学报*, 1995, 15(6): 91-94.
YIN H. Effect of nitrogen source concentration on *Mycelium* growth and fruiting body formation of *Pleurotus ostreatus*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 1995, 15(6): 91-94 (in Chinese).
- [30] 殷红. 缺素对平菇菌丝生长速率和菌落形态的影响[J]. *西北植物学报*, 1995, 15(2): 149-153.
YIN H. Influences of mineral element deficiency on the mycelial growth rate and colonial morphology of *Pleurotus ostreatus*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 1995, 15(2): 149-153 (in Chinese).
- [31] TEICHERT S, RUTHERFORD JC, WOTTAWA M, HEITMAN J, TUDZYNSKI B. Impact of ammonium permeases *mepA*, *mepB*, and *mepC* on nitrogen-regulated secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7(2): 187-201.
- [32] TEICHERT S, WOTTAWA M, SCHÖNIG B, TUDZYNSKI B. Role of the *Fusarium fujikuroi* TOR kinase in nitrogen regulation and secondary metabolism[J]. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(10): 1807-1819.
- [33] TEICHMANN B, LIU LD, SCHINK KO, BÖLKER M. Activation of the ustilagic acid biosynthesis gene cluster in *Ustilago maydis* by the C₂H₂ zinc finger transcription factor *Rual*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(8): 2633-2640.
- [34] 艾斯卡尔·艾拉提. 灵芝菌胞外多糖生物合成的氮源调控及其纳米微粒的应用[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2019.
Eschal Erati. Nitrogen source regulation of extracellular polysaccharide biosynthesis by *Ganoderma lucidum* and application of nanoparticles[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2019 (in Chinese).