

# 不同茯苓菌株胞外代谢产物及抗氧化活性比较

谭云<sup>1,2,3</sup>, 申爱荣<sup>1,2,3</sup>, 沈宝明<sup>1,2,3</sup>, 喻锦秀<sup>1,\*</sup>, 刘丽娜<sup>1,2</sup>, 李赛男<sup>1</sup>, 谭著明<sup>1,2,3,\*</sup>

(1.湖南省林业科学院, 湖南 长沙 410004; 2.湖南省菌根性食用菌种质资源保护与利用中心, 湖南 长沙 410004;  
3.湖南省林下特色生物资源培育与利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410004)

**摘要:** 本研究比较8个茯苓菌株胞外代谢产物和体外抗氧化活性的差异, 并采用主成分分析(principal components analysis, PCA)法对茯苓菌株进行综合评价。使用广泛靶向代谢组学分析胞外黄酮类和胞外酚类化合物的组成, 研究茯苓发挥抗氧化作用的主要成分。结果表明, 茯苓GTR1菌株胞外多糖、胞外三萜和胞外甾醇含量最高; 茯苓GTR2菌株胞外黄酮和胞外总酚含量最高。体外抗氧化实验结果表明, 茯苓F5.78菌株对2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)阳离子自由基的清除能力最高, 茯苓GTR2菌株的1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率最高, 茯苓XJ28菌株的羟自由基清除率最高。相关性分析结果表明, 茯苓菌株的DPPH自由基清除率、胞外总酚含量与胞外黄酮含量呈极显著正相关( $P<0.01$ )。通过超高效液相色谱-质谱联用仪定性检测出55种黄酮类化合物和33种酚类化合物, 不同茯苓菌株之间各组分的相对含量存在差异, 其中茯苓FLA、FGD、FGZ、FHB、GTR1、XJ28和F5.78菌株相对含量最高的黄酮类组分是丙二酰大豆黄酮, 相对含量最高的酚类组分是3-醛基水杨酸。茯苓GTR2菌株相对含量最高的黄酮类组分是山柰酚-3-*O*-(6-没食子酰)葡萄糖苷, 该组分相对含量与DPPH自由基清除率呈极显著正相关( $P<0.01$ ), 相对含量最高的酚类组分为 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸, 该组分与DPPH自由基清除率呈显著正相关( $P<0.05$ )。根据PCA评价, 综合得分最高的是GTR2菌株。GTR2菌株胞外活性成分含量较高、抗氧化活性好, 可作为茯苓抗氧化产品开发的潜力菌株。

**关键词:** 茯苓菌株; 胞外代谢产物; 抗氧化活性; 山柰酚-3-*O*-(6-没食子酰)葡萄糖苷;  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸; 主成分分析; 广泛靶向代谢组学

## Comparison of Extracellular Metabolites and Antioxidant Activity of Different Strains of

*Wolfiporia hoelen* (Fr.) Y.C. Dai & V. Papp

TAN Yun<sup>1,2,3</sup>, SHEN Airong<sup>1,2,3</sup>, SHEN Baoming<sup>1,2,3</sup>, YU Jinxiu<sup>1,\*</sup>, LIU Lina<sup>1,2</sup>, LI Sainan<sup>1</sup>, TAN Zhuming<sup>1,2,3,\*</sup>

(1. Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004, China; 2. Hunan Germplasm Resources Protection and Utilization Center for Mycorrhizal Edible Fungi, Changsha 410004, China; 3. Hunan Engineering Research Center for Cultivation and Utilization of Distinctive Bio-resources Under Forest, Changsha 410004, China)

**Abstract:** This study examined the differences in the extracellular metabolites and *in vitro* antioxidant activity of 8 strains of *Wolfiporia hoelen* (Fr.) Y.C. Dai & V. Papp and conducted their comprehensive evaluation using principal component analysis (PCA). To investigate the major antioxidant components of *W. hoelen*, widely targeted metabolomics was used to analyze the composition of extracellular flavonoids and phenolic compounds. The results showed that the contents of extracellular polysaccharides, total triterpenes and sterols were the highest in strain GTR1. The contents of extracellular flavonoids and phenolics were the highest in strain GTR2. The results of *in vitro* antioxidant tests showed that strains

收稿日期: 2024-04-15

基金项目: “十四五”国家重点研发计划重点专项(2023YFD2200903);

湖南省林业生态保护修复及发展专项(湘财环资指[2022]63);

湖南省农业种质资源保护与利用专项(湘财农指[2021]37; 湘财农指[2022]23; 湘财农指[2023]43)

第一作者简介: 谭云(1989—)(ORCID: 0000-0002-8129-0163), 男, 助理研究员, 博士研究生, 研究方向为微生物资源学。

E-mail: tany\_hncu@163.com

\*通信作者简介: 喻锦秀(1979—)(ORCID: 0009-0002-8598-6552), 女, 副研究员, 博士, 研究方向为植物病理学。

E-mail: yujinxiu2000@hnlky.cn

谭著明(1966—)(ORCID: 0000-0001-6696-1179), 男, 研究员, 博士, 研究方向为菌物学。

E-mail: tanzm@hnlky.cn

F5.78, GTR2 and XJ28 had the highest capacity to scavenge 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) cation, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl radicals, respectively. The results of correlation analysis showed that the contents of extracellular flavonoids was highly significantly positively correlated with the DPPH radical scavenging capacity and the contents of extracellular total phenols in *W. hoelen* ( $P < 0.01$ ). Totally 55 flavonoids and 33 phenolic compounds were qualitatively detected using ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS). The relative content of each component varied among different *W. hoelen* strains; the most abundant flavonoid was malonyldaidzin and the most abundant phenolic component was 3-formylsalicylic acid in *W. hoelen* strains FLA, FGD, FGZ, FHB, GTR1, XJ28 and F5.78. The most abundant flavonoid component in strain GTR2 was kaempferol-3-*O*-(6-galloyl)glucoside, which was highly significantly positively correlated with the DPPH radical scavenging capacity ( $P < 0.01$ ). In this strain, the most abundant phenolic component was  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, which was significantly positively correlated with the DPPH radical scavenging capacity ( $P < 0.05$ ). PCA showed that GTR2 scored highest among the eight strains. In conclusion, this strain has a high content of extracellular bioactive ingredients and good antioxidant activity, making it a potential candidate for the development of antioxidant products.

**Keywords:** *Wolfiporia hoelen* (Fr.) Y.C. Dai & V. Papp; extracellular metabolites; antioxidant activity; kaempferol-3-*O*-(6-galloyl)glucoside;  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid; principal component analysis; widely targeted metabolomics

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240415-120

中图分类号: Q93

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 24-0150-11

引文格式:

谭云, 申爱荣, 沈宝明, 等. 不同茯苓菌株胞外代谢产物及抗氧化活性比较[J]. 食品科学, 2024, 45(24): 150-160.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240415-120. <http://www.spkx.net.cn>

TAN Yun, SHEN Airong, SHEN Baoming, et al. Comparison of extracellular metabolites and antioxidant activity of different strains of *Wolfiporia hoelen* (Fr.) Y.C. Dai & V. Papp[J]. Food Science, 2024, 45(24): 150-160. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240415-120. <http://www.spkx.net.cn>

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 (*Wolfiporia hoelen* (Fr.) Y.C. Dai & V. Papp) 的干燥菌核<sup>[1]</sup>。其味甘、淡, 性平, 主要用于治疗水肿尿少、痰饮眩悸、脾虚食少、便溏泄泻、心神不安、惊悸失眠等症状<sup>[2]</sup>。茯苓在2002年入选国家食药同源目录, 是重要的食品原料, 茯苓可以制作成茯苓饼、茯苓膏、茯苓酸奶等食疗佳品<sup>[3]</sup>。现有研究表明, 不同茯苓菌株在遗传发育、菌丝生长速度、有效成分含量、菌核产量和食药价值等方面都有较大差别<sup>[4-7]</sup>, 且对于茯苓有效成分的研究主要集中在胞内代谢产物<sup>[8-9]</sup>, 包括胞内多糖和胞内三萜, 而对茯苓的胞外代谢产物的相关研究较少。茯苓胞外代谢产物有多糖类、黄酮类、三萜类、酚类、甾醇类等<sup>[10]</sup>, 其中茯苓多糖<sup>[11]</sup>和茯苓三萜<sup>[12]</sup>为主要活性成分, 这些活性成分的药理作用和应用是研究热点。茯苓多糖有抗氧化<sup>[13]</sup>、抗癌<sup>[14]</sup>、抗抑郁<sup>[15]</sup>、提高免疫力<sup>[16]</sup>、调节血脂<sup>[17]</sup>、调节肠道菌群<sup>[18]</sup>等作用, 同时茯苓多糖还可以作为添加剂运用在饲料<sup>[19]</sup>、保鲜<sup>[20]</sup>及化妆品<sup>[21]</sup>等领域。茯苓三萜类化合物具有抗肿瘤<sup>[22]</sup>、抗炎<sup>[23]</sup>、抗氧化<sup>[24]</sup>、治疗糖尿病溃疡<sup>[25]</sup>、预防肝损伤<sup>[26]</sup>等功效。茯苓黄酮类和酚类化合物是茯苓重要的次级代谢产物, 也是天然的抗氧化剂, 可有效清除体内自由基, 是市场上抗氧化产品的主要来源, 其开发潜力极大。

由于茯苓代谢产物种类的多样性和功能的复杂性, 2020版《中国药典》没有明确茯苓的药用成分及含量, 为茯苓菌株的质量评价增加了难度。邓桃妹等<sup>[27]</sup>从亲缘学及化学成分特有性、传统药效药性、化学成分可预测性等方面对茯苓中药质量标志物进行预测分析, 认为茯苓三萜类和多糖类成分是中药茯苓的质量标志物, 可以为茯苓质量控制提供参考。不同来源的茯苓菌株代谢产物中有效成分及其含量各不相同, 筛选茯苓优良菌株对于不同茯苓产品的开发十分重要。本研究以8个不同来源的茯苓菌株为研究对象, 通过测定茯苓菌株胞外多糖、胞外黄酮、胞外三萜、胞外总酚、胞外甾醇含量和体外抗氧化活性, 并采用定性准确、灵敏度高、重复性好的广泛靶向代谢组学技术探究茯苓胞外黄酮类和胞外酚类化合物组成, 利用相关性分析法结合主成分分析 (principal components analysis, PCA) 法进行茯苓菌株的综合评价, 旨在筛选出活性成分含量高、抗氧化能力强的优良菌株, 为茯苓有效成分的提取及抗氧化功能食品的开发提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

茯苓菌株FLA、FGD、FGZ、FHB、GTR1、GTR2、

XJ28、F5.78均保存于湖南省菌根性食用菌种质资源保护与利用中心,具体信息见表1。

表1 茯苓菌株相关信息

Table 1 Information of *W. hoelen* strains included in this study

序号	菌株编号	名称	来源	获取方式
1	FLA	<i>W. hoelen</i> (Fr.) Y.C. Dai & V. Papp	安徽省六安市	菌种分离
2	FGD	<i>W. hoelen</i> (Fr.) Y.C. Dai & V. Papp	广东省广州市	菌种分离
3	FGZ	<i>W. hoelen</i> (Fr.) Y.C. Dai & V. Papp	贵州省黔东南苗族侗族自治州	菌种分离
4	FHB	<i>W. hoelen</i> (Fr.) Y.C. Dai & V. Papp	湖北省荆州市	菌种分离
5	GTR1	<i>W. hoelen</i> (Fr.) Y.C. Dai & V. Papp	贵州省铜仁市	菌种分离
6	GTR2	<i>W. hoelen</i> (Fr.) Y.C. Dai & V. Papp	贵州省铜仁市	菌种分离
7	XJ28	<i>W. hoelen</i> (Fr.) Y.C. Dai & V. Papp	湖南省靖州苗族侗族自治县	购买
8	F5.78	<i>W. hoelen</i> (Fr.) Y.C. Dai & V. Papp	上海保藏生物技术中心	购买

芦丁、熊果酸、没食子酸、齐墩果酸(均为色谱纯) 上海源叶生物科技有限公司; JC0410-M多糖试剂盒、JC0109-M总酚试剂盒 南京集测生物科技有限公司; 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 北京索莱宝生物科技有限公司。

## 1.2 仪器与设备

Infinite 200 Pro M Nano酶标仪 美国Tecan公司; Acquity I-Class PLUS超高效液相色谱(ultra-high performance liquid chromatography, UPLC)仪、Xevo G2-XS QTOF高分辨质谱(mass spectrometry, MS)仪 美国沃特世公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 茯苓待测液制备

液体发酵培养基配方(pH 6.5): 葡萄糖15.0 g/L、蛋白胨5.0 g/L、酵母提取物2.0 g/L、磷酸二氢钾1.0 g/L、硫酸镁0.5 g/L、VB<sub>1</sub> 1.0×10<sup>-3</sup> g/L。将培养好的8个茯苓菌株分别接种到液体培养基中,于24℃、170 r/min条件下黑暗培养14 d。发酵结束后,用双层无菌滤纸过滤掉茯苓菌丝,用无菌试管收集发酵液,即为待测液,可直接用于茯苓胞外代谢产物测定。

### 1.3.2 茯苓胞外代谢产物成分分析

#### 1.3.2.1 胞外多糖测定

采用苯酚-硫酸法测定胞外多糖含量<sup>[28]</sup>。按照多糖试剂盒说明书测定,以葡萄糖为标准品,在490 nm波长处测定吸光度,绘制标准曲线,根据标准曲线方程计算胞外多糖含量。

#### 1.3.2.2 胞外黄酮测定

采用三氯化铝法测定胞外黄酮含量。准确吸取1.0 mL待测液置于10 mL容量瓶中,分别加入0.1 mol/L三氯化铝溶液2.0 mL、1.0 mol/L乙酸钾溶液3.0 mL,用体积分数70%的甲醇溶液定容至刻度,摇匀,室温放置

30 min。在4 000 r/min条件下离心10 min,在420 nm波长处测定吸光度。以芦丁为标准品绘制标准曲线,根据标准曲线方程计算胞外黄酮含量。

#### 1.3.2.3 胞外三萜测定

参照2020版《中国药典》采用香草醛比色法测定胞外三萜含量。准确吸取1.0 mL待测溶液,用液氮吹干,然后加入质量分数5.0%香草醛-冰乙酸0.4 mL、高氯酸1.6 mL,于65℃水浴加热45 min,冷却至室温,加入5.0 mL冰乙酸,摇匀室温静置15 min,于548 nm波长处测定吸光度。以熊果酸为标准品绘制标准曲线,根据标准曲线方程计算胞外三萜含量。

#### 1.3.2.4 胞外总酚测定

参照总酚试剂盒说明书测定胞外总酚含量。以没食子酸为标准品,在760 nm波长处测定吸光度,并绘制标准曲线,根据标准曲线方程计算胞外总酚的含量。

#### 1.3.2.5 胞外甾醇测定

参照2020版《中国药典》采用香草醛比色法测定胞外甾醇含量。吸取待测液1.0 mL,加无水乙醇25.0 mL,超声提取45 min,离心取上清液转入50.0 mL容量瓶中,残渣加入20.0 mL无水乙醇,超声提取30 min,重复上述操作,合并2次提取液并定容至刻度。准确吸取提取液0.6 mL于10.0 mL具塞试管中,吹干溶剂,加入质量分数5.0%香草醛-冰乙酸溶液0.2 mL、高氯酸0.8 mL,混匀,于70℃水浴加热15 min,立即置于冰浴中冷却5 min,取出加入4.0 mL乙酸乙酯,摇匀,在546 nm波长处测定吸光度。以齐墩果酸为标准品绘制标准曲线,根据标准曲线方程计算胞外甾醇含量。

### 1.3.3 体外抗氧化活性测定

#### 1.3.3.1 ABTS阳离子自由基清除能力

准确量取1.00 mL待测液,再加入1.50 mL ABTS阳离子自由基工作液(使用前将工作液在734 nm波长处的吸光度调为0.70),用无水乙醇补足至3.0 mL,反应20.0 min后,于734 nm波长处测定吸光度。以无水乙醇代替ABTS阳离子自由基工作液为样品背景,以二甲基亚砷为空白对照,以0.10 g/L VC溶液为阳性对照组。参照式(1)计算ABTS阳离子自由基清除率:

$$\text{自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

式中:  $A_0$ 为空白对照的吸光度;  $A_i$ 为实验组/阳性对照组的吸光度;  $A_j$ 为样品背景的吸光度。

#### 1.3.3.2 DPPH自由基清除能力

准确量取1.00 mL待测液,再分别加入4.00 mL 0.24 mmol/L DPPH自由基溶液后摇匀,反应20 min后,于516 nm波长处测定吸光度。以无水乙醇代替DPPH自由基溶液为样品背景,以二甲基亚砷为空白对照,以0.10 g/L VC溶液为阳性对照组。按式(1)计算DPPH自由基清除率。



### 1.3.3.3 羟自由基清除能力

准确量取1.00 mL待测液,再分别加入1.00 mL 1.20 mmol/L硫酸亚铁溶液、2.00 mL 1.20 mmol/L水杨酸溶液、1.00 mL 1.20 mmol/L过氧化氢溶液、2.00 mL蒸馏水后摇匀,反应30 min于522 nm波长处测定吸光度。以水代替过氧化氢溶液为样品背景,以二甲基亚砜为空白对照,以2.00 g/L VC溶液为阳性对照组。参照式(1)计算羟自由基清除率。

### 1.3.4 胞外黄酮和胞外总酚组分鉴定

吸取100.0  $\mu$ L茯苓发酵液待测液,加入500.0  $\mu$ L含有内标的提取液(甲醇-乙腈体积比为1:1,内标质量浓度20 mg/L),涡旋混匀30 s;于4  $^{\circ}$ C冰水浴超声10.0 min。取上清液于进样瓶进行UPLC-MS分析<sup>[29]</sup>,色谱柱为Acquity UPLC HSS T3柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8  $\mu$ m)。

色谱条件:正离子模式:流动相A为0.1%甲酸-水溶液,流动相B为0.1%甲酸-乙腈。负离子模式:流动相A为0.1%甲酸-水溶液,流动相B为0.1%甲酸-乙腈。梯度洗脱条件:0.0 min, 98% A、2% B; 0.0~0.25 min, 98% A、2% B; 0.25~10.0 min, 98%~2% A、2%~98% B; 10.0~13.0 min, 2% A、98% B; 13.0~13.1 min, 2%~98% A、98%~2% B; 13.1~15.0 min, 98% A、2% B。流速400  $\mu$ L/min,柱温25  $^{\circ}$ C,进样量1.0  $\mu$ L。MS条件:毛细管电压为2 500 V(正离子模式)或-2 000 V(负离子模式);锥孔电压30 V;离子源温度100  $^{\circ}$ C;脱溶剂气温度500  $^{\circ}$ C;反吹气流速50 L/h;脱溶剂气流速800 L/h;采集范围 $m/z$  50~1 200。

### 1.4 数据处理

实验重复3次,采用Origin 2018软件进行数据处理,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。用SPSS 20.0软件进行单因素方差分析,用Duncan法进行多重比较显著性分析。用GraphPad 8.0软件绘图。

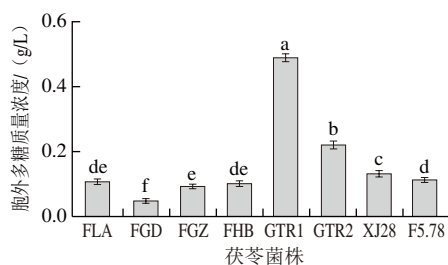
## 2 结果与分析

### 2.1 胞外代谢产物成分分析

#### 2.1.1 胞外多糖含量

茯苓多糖是中药材茯苓的主要有效成分之一,包括水溶性茯苓多糖和碱溶性茯苓多糖。水溶性茯苓多糖具有抗肿瘤、抗氧化、降血糖血脂、提高免疫力等作用,虽然含量较低,但因其主要为胞外代谢产物,具有良好的溶解性,可应用于医疗、保健食品等领域,开发应用前景广阔。由图1可知,不同茯苓菌株胞外多糖质量浓度基本上存在显著差异( $P<0.05$ ),茯苓GTR1菌株胞外多糖质量浓度最高,达到0.489 g/L,显著高于其他菌株。茯苓GTR2和XJ28菌株胞外多糖质量浓度次之,分

别为0.222、0.133 g/L。茯苓F5.78、FLA、FHB和FGZ菌株产胞外多糖能力无显著差异,其胞外多糖质量浓度为0.098~0.114 g/L。茯苓FGD菌株胞外多糖质量浓度最低,仅为0.048 g/L,显著低于其他菌株。从胞外多糖含量来看,茯苓GTR1菌株为优势菌株。肖扬波等<sup>[30]</sup>利用干燥茯苓菌核提取的水溶性多糖含量在7.60~25.55 mg/g之间;姜悦航等<sup>[31]</sup>测定的松茯苓水溶性多糖含量为8.40 mg/g。而茯苓GTR1菌株发酵后,1 L发酵液中胞外多糖质量可达489 mg,对比用茯苓菌核直接提取多糖的方法,液体发酵产量更高、培养时间更短,后期分离和纯化操作便捷,具有较大的优势。



不同字母表示组间差异显著( $P<0.05$ ),下同。

图1 不同茯苓菌株胞外多糖含量

Fig. 1 Contents of extracellular polysaccharides in different *W. hoelen* strains

#### 2.1.2 胞外黄酮含量

由图2可知,不同菌株茯苓胞外黄酮含量存在差异,其中茯苓GTR2菌株胞外黄酮的质量浓度最高,达到0.113 g/L,显著高于其他菌株( $P<0.05$ )。茯苓FLA、FHB、FGZ和XJ28菌株的胞外黄酮质量浓度次之,为0.043~0.049 g/L,且相互之间无显著差异。茯苓GTR1、F5.78和FGD菌株胞外黄酮质量浓度较低,为0.019~0.025 g/L,相互之间无显著差异,且显著低于其他5个菌株。邹文静等<sup>[32]</sup>对黔产茯苓黄酮进行测定,其含量为18.76 mg/g。而茯苓GTR2菌株发酵后,1 L发酵液中胞外黄酮质量可达113.0 mg,可能是茯苓黄酮多以胞外代谢产物为主,茯苓菌核在干燥过程中部分黄酮类成分损失较大所致。

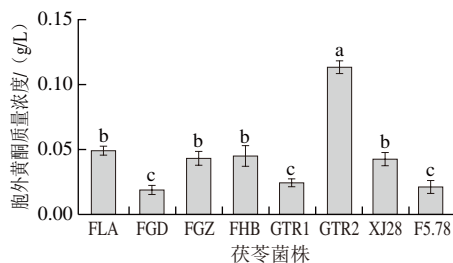


图2 不同茯苓菌株胞外黄酮含量

Fig. 2 Contents of extracellular flavonoids in different *W. hoelen* strains

### 2.1.3 胞外三萜含量

茯苓胞外三萜是茯苓的主要药用成分之一,其中茯苓酸、去氢茯苓酸、松苓新酸、去氢土莫酸和茯苓新酸等是茯苓三萜类发挥抗肿瘤、抗氧化作用的主要药用成分,应用潜力大。由图3可知,不同茯苓菌株胞外三萜含量存在差异。其中茯苓GTR1菌株的胞外三萜质量浓度最高,达到0.976 g/L,显著高于其他菌株( $P<0.05$ )。茯苓GTR2和F5.78菌株胞外三萜质量浓度次之,分别为0.312、0.223 g/L。茯苓FLA和FGD菌株胞外三萜质量浓度分别为0.097、0.104 g/L,二者之间无显著差异。茯苓FGZ和FHB菌株胞外三萜质量浓度最低,分别为0.076、0.064 g/L,二者之间无显著差异。姜悦航等<sup>[31]</sup>采用超声辅助萃取茯苓菌核三萜,其含量为1.10 mg/g;张越等<sup>[33]</sup>测定了安徽大别山区金寨县野生、椴木栽培和仿野生栽培3种不同生长环境下的茯苓三萜,其含量在1.60~1.80 mg/g,表明不同来源的茯苓菌核中三萜含量差异较小。本研究中1 L茯苓GTR1菌株发酵液中胞外三萜质量达到976 mg,后期可进行发酵条件的优化,进一步提高茯苓胞外三萜含量,提高其产业化价值。

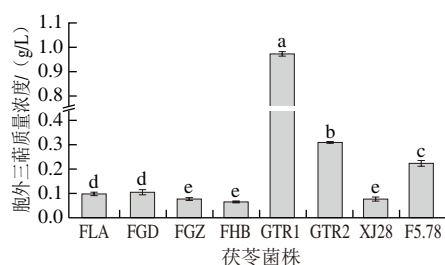


图3 不同茯苓菌株胞外三萜含量

Fig. 3 Contents of extracellular triterpenoids in different *W. hoelen* strains

### 2.1.4 胞外总酚含量

由图4可知,茯苓GTR2菌株胞外总酚质量浓度最高,达到0.206 g/L,显著高于其他7个菌株。茯苓FLA、XJ28、F5.78、FGZ和FHB菌株胞外总酚质量浓度次之,为0.080~0.091 g/L,且相互之间无显著差异。茯苓FGD和GTR1菌株胞外总酚质量浓度较低,分别为0.064、0.063 g/L,两组之间无显著差异,且显著低于其他6个菌株。邹文静等<sup>[32]</sup>对黔产茯苓的多酚进行测定,其含量为18.73 mg/g,而郭文等<sup>[34]</sup>用超声波辅助萃取茯苓多酚,经响应面法优化后,茯苓多酚得率达到59.23 mg/g,二者都是以茯苓菌核为原料进行提取。而1 L茯苓GTR2菌株发酵液中胞外总酚质量为206 mg,从胞外总酚含量来看,对比用茯苓菌核直接提取总酚的方法,采用液体发酵法提取茯苓总酚是可行的。但是从菌核直接提取的是胞内总酚,用液体发酵获取的为胞外总酚,后续可对2种总酚进行成分组成测定,进一步分析其化合物种类和含量差异,为茯苓总酚化学成分研究提供参考。

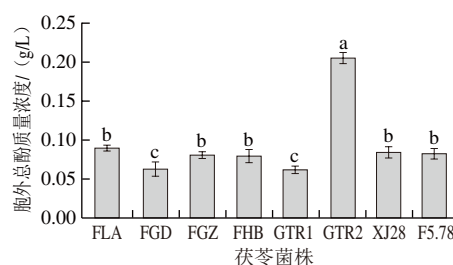


图4 不同茯苓菌株胞外总酚含量

Fig. 4 Contents of extracellular total phenolic components in different *W. hoelen* strains

### 2.1.5 胞外甾醇含量

甾醇是茯苓的一类重要次级代谢产物,属二萜类化合物,主要为麦角甾醇及其衍生物,在食品和医药领域应用广泛。虽然茯苓甾醇的系统研究相对较少,但因其具有抗肿瘤、抗衰老、抗病毒的功效,目前也成为研究者关注的热点。由图5可知,8个茯苓菌株胞外甾醇含量之间均存在显著差异( $P<0.05$ ),茯苓GTR1菌株胞外甾醇质量浓度最高,达到2.354 g/L,显著高于其他菌株。茯苓XJ28菌株胞外甾醇质量浓度最低,仅为1.064 g/L,显著低于其他7个菌株。以胞外甾醇含量来看,茯苓GTR1菌株为优选菌株。

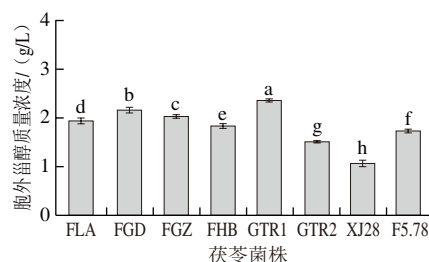


图5 不同茯苓菌株胞外甾醇含量

Fig. 5 Contents of extracellular sterols in different *W. hoelen* strains

## 2.2 不同茯苓菌株体外抗氧化活性分析

### 2.2.1 ABTS阳离子自由基清除能力

ABTS经氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基,在734 nm波长处有最大吸收峰,可用于亲水性物质抗氧化能力测定。由图6可知,不同茯苓菌株胞外代谢产物的ABTS阳离子自由基清除能力存在差异。以0.10 g/L的VC溶液为阳性对照,其对ABTS阳离子自由基清除率为32.67%。茯苓F5.78菌株的ABTS阳离子自由基清除率最高,达到64.93%,且显著高于其他7个菌株( $P<0.05$ )。茯苓FHB、FLA、XJ28和FGZ菌株的ABTS阳离子自由基清除率较高,在46.48%~52.26%之间。茯苓FGD和GTR1菌株的ABTS阳离子自由基清除率分别为39.86%和38.25%,且相互之间无显著差异。茯苓GTR2菌株的ABTS阳离子自由基清除率最低,为31.27%,且显著低于其他菌株。

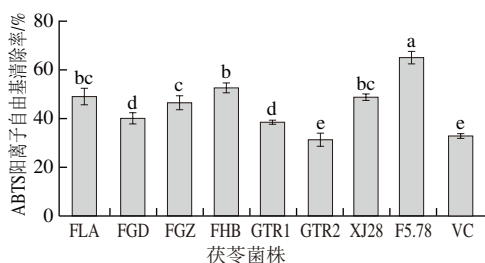


图6 茯苓菌株发酵液的ABTS阳离子自由基清除率  
Fig. 6 ABTS cation radical scavenging capacity of *W. hoelen* fermentation broth

### 2.2.2 DPPH自由基清除能力

DPPH自由基是一个稳定的自由基,在516 nm波长处有强吸收,常用于抗氧化成分的体外抗氧化活性评价。由图7可知,阳性对照0.10 g/L VC溶液的DPPH自由基清除率为32.60%,不同茯苓菌株胞外代谢产物的DPPH自由基清除能力存在差异。茯苓GTR2菌株的DPPH自由基清除率最高,达到44.60%,且显著高于其他菌株 ( $P<0.05$ )。茯苓F5.78、FLA、FHB、XJ28和FGZ菌株的DPPH自由基清除率较高,为19.11%~22.68%,除F5.78和FGZ之间外其他各组间无显著差异 ( $P>0.05$ )。茯苓FGD菌株的DPPH自由基清除率为14.17%。茯苓GTR1菌株的DPPH自由基清除率最低,仅为10.50%,且显著低于其他菌株。这与肖扬波等<sup>[30]</sup>的研究结果类似。

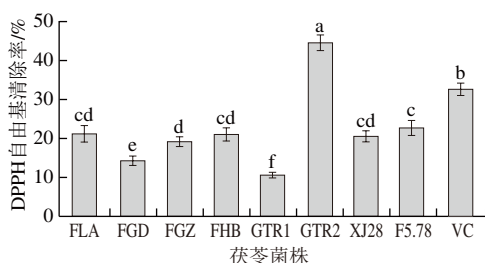


图7 茯苓菌株发酵液的DPPH自由基清除率  
Fig. 7 DPPH radical scavenging capacity of *W. hoelen* fermentation broth

### 2.2.3 羟自由基清除能力

羟自由基具有极强的氧化性,是一种重要的氧化剂,常被用于检测化合物的抗氧化活性。由图8可知,不同茯苓菌株胞外代谢产物的羟自由基清除能力存在差异,阳性对照2.00 g/L VC溶液的羟自由基清除率为6.53%。茯苓XJ28菌株的羟自由基清除率最高,达到81.90%,且显著高于其他菌株 ( $P<0.05$ )。茯苓FGD菌株的羟自由基清除率最低,仅为3.84%,与GTR1之间无显著差异,且显著低于其他6个菌株。

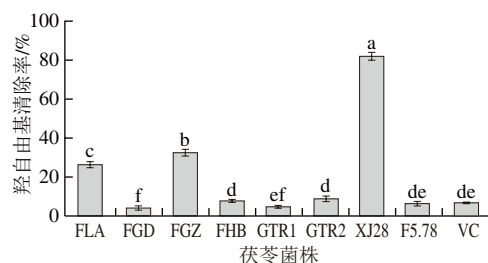
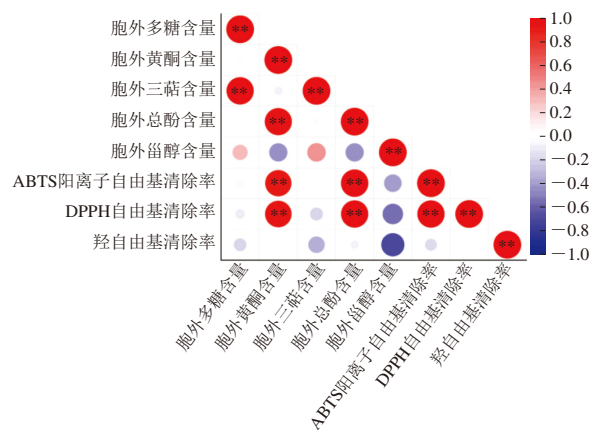


图8 茯苓菌株发酵液的羟自由基清除率  
Fig. 8 Hydroxyl radical scavenging capacity of *W. hoelen* fermentation broth

### 2.3 相关性分析

对茯苓胞外代谢产物主要成分和体外抗氧化能力进行Pearson相关性分析,结果如图9所示。茯苓胞外多糖含量与胞外三萜含量呈极显著正相关 ( $P<0.01$ ),相关系数为0.972,这与姜悦航等<sup>[31]</sup>用茯苓菌核提取的水溶性多糖与三萜含量呈正相关的结论相符;茯苓胞外黄酮含量与胞外总酚含量、DPPH自由基清除率呈极显著正相关 ( $P<0.01$ ),其相关系数分别为0.959、0.922;茯苓胞外总酚含量与DPPH自由基清除率呈极显著正相关 ( $P<0.01$ ),相关系数为0.972。上述结果表明,茯苓胞外代谢产物中抗氧化活性的主要成分是胞外黄酮和胞外总酚,后续将采用广泛靶向代谢组学方法对胞外黄酮类和胞外酚类化合物进行成分分析,发掘其抗氧化作用的主要成分。



\*.显著相关 ( $P<0.05$ ); \*\*.极显著相关 ( $P<0.01$ )。

图9 茯苓胞外代谢产物及抗氧化活性的相关性分析

Fig. 9 Correlation analysis between extracellular metabolites and antioxidant activity in *W. hoelen* fermentation broth

### 2.4 茯苓抗氧化组分鉴定

#### 2.4.1 茯苓黄酮类组分鉴定

本实验定性出55种黄酮类化合物,其中在正离子模式下鉴定出19个化合物,负离子模式下鉴定出36个化合物,主要包括香豆素类、黄酮类、黄烷酮类和芹菜素类化合物等,具体信息见表2。从整体来看,山柰酚-3-O-(6-没食子酰)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、7,3,4-三羟基-5-

甲氧基-5-戊烯异黄酮、香豆素、山柰酚-3-*O*-(6-没食子酰)葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*-新橙皮苷、商陆素、木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、芹菜素-4-*O*-鼠李糖苷、丙二酰大豆黄酮和5,6,7-三甲氧基黄酮是茯苓黄酮类化合物的主要成分（至少在1种菌株中的相对含量大于0.01%）。

对55种黄酮类化合物的相对含量与3种自由基清除率进行Pearson相关性分析，结果如表3所示。5,7-二羟基-8-甲基黄烷酮、5,7-二甲氧基香豆素、6,7-二甲氧基-4-甲基香豆素、5-羟基黄酮、6-羟基-4-甲基香豆素、山柰酚-3-*O*-(6-没食子酰)葡萄糖苷、新橙皮苷、商陆素、花

表2 茯苓黄酮类化合物组成  
Table 2 Composition of flavonoids in *W. hoelen*

序号	保留时间/min	<i>m/z</i>	化合物	分子式	相对含量/%							
					FLA	FGD	FGZ	FHB	GTR1	GTR2	XJ28	F5.78
1	0.550	652.163	新橙皮苷	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	0.000 112	0.001 223	0.000 133	0.000 110	0.002 123	0.000 167	0.000 092	0.000 584
2	0.551	1183.323	蒙花苷	C <sub>38</sub> H <sub>52</sub> O <sub>14</sub>	0.002 475	0.003 243	0.002 473	0.002 605	0.002 456	0.000 661	0.001 056	0.001 474
3	0.552	643.157	香叶木素-7-新橙皮糖苷	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	0.000 166	0.001 414	0.000 110	0.000 043	0.002 589	0.000 096	0.000 098	0.001 441
4	0.622	635.037	山柰酚-3- <i>O</i> -(6-没食子酰)-β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	0.005 033	0.024 415	0.005 503	0.005 767	0.002 911	0.003 735	0.002 138	0.010 009
5	0.637	213.010	东莨菪内酯	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	0.000 219	0.000 570	0.000 263	0.000 293	0.000 174	0.000 168	0.000 164	0.000 177
6	0.658	646.155	矮牵牛苷-3- <i>O</i> -芸香苷	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	0.002 045	0.006 158	0.002 139	0.002 606	0.007 248	0.001 065	0.000 954	0.002 506
7	0.665	938.213	花青素-3-(对香豆酰基)-芸香苷-5-葡萄糖苷	C <sub>42</sub> H <sub>46</sub> O <sub>22</sub>	0.001 181	0.003 794	0.001 065	0.001 720	0.003 992	0.000 718	0.000 513	0.001 784
8	0.900	786.229	天竺葵素-3- <i>O</i> -芸香苷-5- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	C <sub>35</sub> H <sub>41</sub> O <sub>19</sub>	0.000 445	0.001 560	0.000 417	0.000 553	0.001 736	0.000 303	0.000 176	0.000 740
9	0.915	321.074	杜鹃素	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	0.000 897	0.002 114	0.001 163	0.001 208	0.001 991	0.000 527	0.000 564	0.000 686
10	1.150	403.134	7,3,4-三羟基-5-甲氧基-5-戊烯异黄酮	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	0.002 705	0.009 479	0.003 081	0.003 011	0.012 036	0.001 532	0.001 418	0.004 502
11	1.388	178.086	6-甲基香豆素	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	0.000 380	0.001 322	0.000 404	0.000 589	0.000 776	0.000 202	0.000 085	0.001 071
12	1.399	373.087	4-羟基-5,6,7-三甲氧基黄酮	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	0.000 004	0.000 016	0.000 016	0.000 009	ND	0.000 001	0.000 004	ND
13	1.770	219.049	5,7-二羟基-4-苯基香豆素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	0.000 245	0.000 858	0.000 246	0.000 259	0.000 667	0.000 194	0.000 140	0.000 403
14	1.878	353.107	甘草异黄酮	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	0.000 480	0.000 808	0.000 534	0.000 556	0.000 291	0.000 315	0.000 209	0.000 249
15	2.390	616.139	矢车菊素-3-芸香糖苷	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub>	0.000 461	0.001 249	0.000 601	0.000 384	0.000 772	0.000 186	0.000 270	0.000 794
16	2.476	291.060	5,7-二羟基-8-甲基黄烷酮	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	0.000 005	ND	ND	0.000 033	ND	0.000 192	0.000 007	ND
17	2.534	251.055	5,7-二甲氧基香豆素	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	0.000 031	0.000 065	0.000 025	0.000 037	ND	0.000 375	0.000 032	ND
18	2.984	257.045	5,6,7-三甲氧基香豆素	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	0.000 070	0.000 103	0.000 083	0.000 038	ND	0.000 062	0.000 002	0.000 074
19	3.062	181.005	香豆素	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	0.007 755	0.021 836	0.008 223	0.008 776	0.028 002	0.003 575	0.004 373	0.011 628
20	3.062	183.002	4-羟基香豆素	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	0.002 387	0.006 913	0.002 482	0.002 665	0.008 577	0.001 052	0.001 283	0.003 567
21	3.436	166.086	二氢香豆素	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	0.000 314	0.000 790	0.000 290	0.000 353	0.001 011	0.000 125	0.000 120	0.000 468
22	4.427	296.092	7,4-二羟基黄酮	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	0.000 059	0.000 806	0.000 041	0.000 046	0.000 903	0.002 402	0.000 005	0.000 537
23	4.794	469.196	槐黄烷酮G	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	0.001 551	0.002 143	0.001 508	0.001 706	0.002 421	0.000 525	0.001 062	0.001 288
24	4.884	288.084	染料木素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	0.000 156	0.000 204	0.000 182	0.000 171	0.000 112	0.000 053	0.000 162	0.000 095
25	5.226	208.097	4-甲基-6-甲氧基香豆素	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	0.000 119	0.000 044	0.000 128	0.000 103	0.000 060	0.000 031	0.000 084	0.000 040
26	5.293	357.093	甘草黄酮A	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	0.000 100	0.000 506	0.000 162	0.000 105	0.000 315	0.000 067	0.000 095	0.000 292
27	5.447	290.102	柚皮素	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	0.000 613	0.001 652	0.000 606	0.000 861	ND	0.000 264	0.000 329	0.001 259
28	5.506	609.144	芹菜素-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	0.000 038	0.001 650	0.005 659	0.000 256	0.004 013	0.000 623	0.001 226	0.000 877
29	5.542	255.040	6,7-二甲氧基-4-甲基香豆素	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	0.000 009	ND	ND	0.000 029	ND	0.002 282	ND	0.000 020
30	5.592	535.140	2-羟基异黄酮	C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0.000 658	0.000 368	0.000 798	0.000 603	ND	0.000 255	0.000 054	0.000 217
31	5.714	657.203	新橙皮苷二氢查耳酮	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	0.002 171	0.002 415	0.002 868	0.002 434	0.001 615	0.000 958	0.000 654	0.001 558
32	5.770	283.060	5-羟基黄酮	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	ND	0.000 212	ND	ND	ND	0.001 235	0.000 004	0.000 110
33	6.089	350.206	马尔敏	C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	0.000 017	0.000 574	ND	0.000 023	0.000 030	0.000 002	ND	0.000 396
34	6.262	175.039	6-羟基-4-甲基香豆素	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0.000 006	0.000 004	0.000 064	0.000 046	ND	0.000 348	0.000 002	0.000 001
35	6.431	306.097	2-羟基-2,3-二氢染料木素	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	0.000 050	ND	0.000 086	0.000 067	ND	0.000 004	0.000 047	ND
36	6.575	599.102	山柰酚-3- <i>O</i> -(6-没食子酰)葡萄糖苷	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	0.002 251	0.006 565	0.000 892	0.000 343	0.000 032	2.467 050	0.000 429	0.000 061
37	6.704	323.033	圣草酚	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	ND	0.000 924	ND	0.000 002	ND	0.000 009	0.000 003	0.001 492
38	6.868	579.173	柚皮苷	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	0.000 136	0.005 519	0.000 121	0.000 384	0.000 209	0.000 132	0.000 031	0.000 138
39	7.274	345.061	7-羟基香豆素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	0.000 050	0.000 831	ND	ND	0.000 429	0.000 256	ND	0.000 293
40	7.359	377.078	3,4,7-三乙酰山柰酚	C <sub>21</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	0.000 135	0.000 396	0.000 093	0.000 149	ND	0.000 043	0.000 021	0.000 145
41	8.720	593.187	新橙皮苷	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	0.000 003	ND	ND	ND	0.000 001	0.000 584	ND	ND
42	9.247	577.160	芹菜素-7- <i>O</i> -新橙皮苷	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	0.027 327	0.002 961	0.015 753	0.042 467	0.000 334	0.008 637	0.001 535	0.012 836
43	9.439	329.059	商陆素	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	0.000 012	0.002 933	0.000 025	0.000 041	0.000 133	0.043 379	0.000 014	0.001 187
44	9.548	163.039	3-羟基香豆素	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	0.000 079	0.000 243	0.000 084	0.000 081	0.000 227	0.000 050	0.000 028	0.000 116
45	9.839	487.079	花旗松素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	0.000 014	0.000 048	ND	ND	ND	0.008 030	0.000 019	0.000 086
46	10.580	507.081	木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	0.003 251	ND	0.002 395	0.001 836	ND	0.484 207	0.001 358	ND
47	11.072	637.179	苜蓿素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> O <sub>16</sub>	0.000 209	0.001 473	0.000 219	0.000 305	0.000 764	0.000 244	0.000 040	0.000 671
48	11.919	305.081	5,7-二甲氧基黄烷酮	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	0.001 707	0.005 722	0.001 889	0.001 927	0.006 874	0.000 943	0.000 800	0.003 234
49	17.877	451.084	芹菜素-4- <i>O</i> -鼠李糖苷	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	0.005 127	0.016 650	0.005 577	0.006 920	0.022 875	0.003 093	0.002 858	0.009 013
50	21.274	575.077	芹菜素-7- <i>O</i> -(6-丙二酰基)葡萄糖苷	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>14</sub>	0.001 399	0.004 659	0.001 623	0.001 491	0.005 781	0.000 802	0.000 970	0.002 666
51	22.202	541.072	丙二酰大豆黄酮	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	0.124 467	0.364 934	0.135 896	0.138 349	0.464 939	0.066 702	0.074 540	0.194 694
52	22.209	328.122	5,2-二羟基-7-甲氧基黄酮	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	0.000 396	0.001 113	0.000 400	0.000 420	0.001 383	0.000 202	0.000 221	0.000 618
53	22.737	503.078	杨梅素-3- <i>O</i> -半乳糖苷	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	0.000 234	0.000 739	0.000 283	0.000 244	0.000 943	0.000 151	0.000 176	0.000 422
54	23.109	591.134	杨梅素-3- <i>O</i> -芸香糖苷	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	0.001 682	0.006 046	0.001 665	0.001 677	0.005 025	0.000 653	0.000 960	0.001 756
55	23.137	354.136	5,6,7-三甲氧基黄酮	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	0.009 960	0.033 017	0.009 777	0.009 939	0.026 411	0.003 602	0.005 304	0.010 493
			总和		0.211 396	0.553 280	0.218 047	0.244 640	0.623 183	3.113 068	0.106 731	0.288 770

注：ND.未检测到，下同。



旗松素-3-*O*-葡萄糖苷和木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷10种化合物相对含量和DPPH自由基清除率呈极显著正相关( $P<0.01$ ),与上述茯苓胞外黄酮含量和DPPH自由基清除率呈极显著相关的结果相符,推测这10种黄酮类化合物是茯苓抗氧化作用的主要成分。对10种黄酮类化合物的总相对含量进行排序,依次为茯苓GTR2(3.007 681%)>FGD(0.009 826%)>FLA(0.005 582%)>FGZ(0.003 401%)>FHB(0.002 365%)>XJ28(0.001 866%)>F5.78(0.001 466%)>GTR1(0.000 166%),茯苓GTR2菌株明显高于其他7个菌株,从侧面反映出茯苓GTR2菌株具有较强的抗氧化性。

由表2可知,茯苓FLA、FGD、FGZ、FHB、GTR1、XJ28和F5.78菌株相对含量最高的黄酮类化合物均为丙二酰大豆黄酮,分别占黄酮类化合物总量的58.55%、65.96%、62.32%、56.55%、74.61%、69.84%、67.42%。茯苓GTR2菌株相对含量最高的黄酮类化合物为山柰酚-3-*O*-(6-没食子酰)葡萄糖苷(2.467 050%),占黄酮类化合物总量的79.25%。而山柰酚-3-*O*-(6-没食子酰)葡萄糖苷的相对含量与DPPH自由基清除率呈极显著正相关

( $P<0.01$ ),显示出较强的抗氧化作用,这可能是茯苓GTR2菌株具有较强抗氧化能力的原因。

表3 黄酮类化合物与自由基清除率的Pearson相关性分析  
Table 3 Pearson correlation analysis between flavonoid compounds and free radical scavenging capacity

序号	化合物	ABTS阳离子 自由基清除率	DPPH自由基 清除率	羟自由基 清除率
1	5,7-二羟基-8-甲基黄酮	-0.562	0.925**	-0.197
2	5,7-二甲氧基香豆素	-0.639	0.900**	-0.175
3	6,7-二甲氧基-4-甲基香豆素	-0.590	0.918**	-0.198
4	5-羟基黄酮	-0.588	0.885**	-0.261
5	6-羟基-4-甲基香豆素	-0.582	0.915**	-0.193
6	山柰酚-3- <i>O</i> -(6-没食子酰)葡萄糖苷	-0.598	0.914**	-0.193
7	新橙皮苷	-0.598	0.914**	-0.193
8	商陆素	-0.603	0.905**	-0.220
9	花旗松素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	-0.592	0.916**	-0.195
10	木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	-0.597	0.916**	-0.190

注:\*.显著相关( $P<0.05$ );\*\*.极显著相关( $P<0.01$ );下同。

2.4.2 茯苓酚类组分鉴定

如表4所示,本实验定性出33种酚类化合物,其中正离子模式下鉴定出12个,负离子模式下鉴定出21个,主要为水杨酸、肉桂酸、槲皮素及其衍生物等。从整体来看,槲皮素3-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、

表4 茯苓酚类化合物组成  
Table 4 Composition of phenolic compounds in *W. hoelen*

序号	保留 时间/min	<i>m/z</i>	化合物	分子式	相对含量/%							
					FLA	FGD	FGZ	FHB	GTR1	GTR2	XJ28	F5.78
1	0.537	585.084	槲皮素3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -丙二酰- $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖苷)	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> O <sub>15</sub>	0.000 638	0.002 093	0.000 575	0.000 683	0.002 717	0.000 277	0.000 323	0.001 528
2	0.729	647.133	槲皮素3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖苷	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	0.004 343	0.010 494	0.005 161	0.004 692	0.011 446	0.002 203	0.002 119	0.005 505
3	0.871	153.043	3-氨基-4-羟基苯甲酸	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	0.000 048	0.000 066	0.000 062	0.000 045	0.000 274	0.000 012	0.000 036	0.000 032
4	0.928	171.029	没食子酸	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	0.001 657	0.001 084	0.001 815	0.001 954	0.000 113	0.000 033	0.001 015	0.000 408
5	1.086	225.041	5-乙酰基水杨酸	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	0.000 294	0.001 037	0.000 327	0.000 438	0.000 891	0.001 541	0.000 131	0.000 373
6	1.086	337.056	原儿茶酸-4- <i>O</i> -葡萄糖苷	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>9</sub>	0.000 143	0.000 418	0.000 164	0.000 275	0.000 812	0.000 292	0.000 120	0.000 137
7	1.307	375.065	绿原酸	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	0.000 080	ND	0.000 217	0.000 106	0.000 001	ND	0.000 002	ND
8	1.388	107.050	对羟基苯甲醇	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	0.000 090	0.000 419	0.000 056	0.000 019	0.006 146	0.000 127	0.000 020	0.000 616
9	1.599	121.029	对羟基苯甲醛	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	0.000 556	0.044 344	0.000 310	0.000 544	0.001 636	0.010 001	0.000 127	0.038 931
10	1.614	223.062	芥子酸	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub>	0.000 036	ND	0.000 076	0.000 075	ND	0.000 061	0.000 019	0.000 012
11	2.091	179.035	咖啡酸	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	0.000 349	0.003 195	0.000 442	0.000 474	0.003 600	0.003 217	0.000 229	0.002 111
12	2.390	153.018	3,4-二羟基苯甲酸	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	0.000 331	0.012 526	0.000 346	0.000 505	0.000 023	0.003 453	0.000 127	0.003 310
13	2.773	174.096	5-氨基水杨酸	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	0.000 007	ND	0.000 015	0.000 009	ND	0.000 008	0.000 006	ND
14	2.984	347.040	槲皮素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	0.020 712	0.046 425	0.028 816	0.019 809	0.016 836	0.015 178	0.004 890	0.035 794
15	2.991	163.039	2-羟基肉桂酸	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0.000 007	0.004 184	0.000 006	0.000 039	0.000 606	0.001 581	0.000 008	0.006 168
16	3.351	303.088	对羟基奎宁酸	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	0.000 231	0.000 001	0.000 271	0.000 222	0.000 012	0.000 017	0.000 236	0.000 005
17	3.383	152.034	3-氨基水杨酸	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	0.000 882	0.000 285	0.001 317	0.001 411	ND	0.002 891	0.000 704	0.000 105
18	3.411	188.034	$\alpha$ -氨基-4-羟基肉桂酸	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub>	0.003 316	0.001 919	0.005 655	0.019 490	0.000 328	0.022 789	0.001 959	0.001 073
19	3.618	194.045	<i>N</i> -乙酰基-5-氨基水杨酸	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	0.000 102	0.000 620	0.000 094	0.000 063	ND	0.011 673	0.000 144	0.000 144
20	4.470	291.085	4- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖基-4-香豆酸	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	0.000 464	0.000 177	0.000 465	0.000 339	ND	0.000 014	0.000 214	0.000 066
21	4.879	383.120	奎宁酸	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	0.000 345	0.000 065	0.000 419	0.000 476	0.000 006	0.000 088	0.000 125	0.000 061
22	6.196	372.111	3,7-二- <i>O</i> -甲基槲皮素	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	0.000 036	0.000 532	0.000 025	0.000 066	0.000 632	0.000 246	0.000 002	0.000 237
23	6.504	137.023	对羟基苯甲酸	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	0.000 267	0.000 689	0.000 291	0.000 719	0.000 480	0.002 186	0.000 098	0.000 364
24	6.504	163.039	间香豆酸	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	0.000 054	0.000 111	0.000 062	0.000 153	0.000 012	0.000 621	0.000 025	0.000 053
25	8.121	137.024	原儿茶醛	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	0.000 096	0.000 614	0.000 105	0.000 108	0.000 330	0.001 081	0.000 044	0.000 463
26	8.193	359.070	3- <i>O</i> -对香豆酰基奎宁酸	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	ND	0.000 106	ND	ND	ND	0.000 078	ND	0.000 098
27	8.456	363.070	香草酸4- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖醛酸	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	ND	0.000 995	0.000 002	0.000 001	0.000 819	0.000 440	ND	0.000 647
28	8.899	311.065	阿魏酸	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	ND	0.000 046	ND	ND	0.000 373	0.002 587	ND	0.000 140
29	20.305	599.379	番石榴香豆酸	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	0.000 041	0.000 082	0.000 018	0.000 036	0.000 014	0.000 004	0.000 006	0.000 007
30	20.640	301.075	5- <i>O</i> -咖啡酰莽草酸	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	0.002 567	0.008 040	0.002 840	0.002 817	0.011 458	0.002 539	0.002 075	0.007 317
31	21.296	301.074	3- <i>O</i> -咖啡酰莽草酸	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	0.000 136	0.000 375	0.000 141	0.000 162	0.000 527	0.000 077	0.000 096	0.000 231
32	23.109	149.023	3-醛基水杨酸	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	0.037 894	0.116 865	0.044 951	0.044 141	0.155 605	0.021 588	0.024 536	0.063 784
33	23.802	388.121	三羟基肉桂酰奎宁酸 总和	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	0.000 079	0.000 242	0.000 055	0.000 074	0.000 162	0.000 026	0.000 036	0.000 073
					0.076 285	0.258 357	0.095 953	0.100 288	0.216 104	0.107 030	0.039 587	0.170 074



对羟基苯甲醛、3,4-二羟基苯甲酸、槲皮素、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸、*N*-乙酰基-5-氨基水杨酸、5-*O*-咖啡酰莽草酸和3-醛基水杨酸是茯苓酚类化合物的主要成分（相对含量大于0.01%），与郭文<sup>[34]</sup>以茯苓菌核为原材料提取的酚类成分相似。

对33种酚类化合物与3种自由基清除率进行Pearson相关性分析，结果如表5所示。3-氨基水杨酸、*N*-乙酰基-5-氨基水杨酸、间香豆酸、阿魏酸的相对含量与DPPH自由基清除率呈极显著正相关（ $P<0.01$ ）， $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸、对羟基苯甲酸相对含量与DPPH自由基清除率呈显著正相关（ $P<0.05$ ），与上述9种茯苓菌株胞外总酚含量和DPPH自由基清除率呈极显著相关的结论相符，推测这6种酚类化合物是茯苓发挥抗氧化作用的主要成分。这6种化合物的总相对含量大小顺序为茯苓GTR2（0.042 748%）>FHB（0.021 836%）>FGZ（0.007 419%）>FLA（0.004 622%）>FGD（0.003 670%）>XJ28（0.002 929%）>F5.78（0.001 880%）>GTR1（0.001 193%），茯苓GTR2菌株明显高于其他7个菌株，从侧面反映出茯苓GTR2菌株具有较强的抗氧化性。

表5 茯苓酚类化合物与自由基清除率的Pearson相关性分析

Table 5 Pearson correlation analysis between phenolic compounds and free radical scavenging capacity

序号	化合物	ABTS阳离子 自由基清除率	DPPH自由基 清除率	羟自由基 清除率
1	3-氨基水杨酸	-0.459	0.872**	-0.011
2	$\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸	-0.330	0.750*	-0.253
3	<i>N</i> -乙酰基-5-氨基水杨酸	-0.607	0.909**	-0.200
4	对羟基苯甲酸	-0.622	0.818*	-0.430
5	间香豆酸	-0.563	0.910**	-0.280
6	阿魏酸	-0.621	0.865**	-0.252

由表4可知，不同茯苓菌株产酚类化合物能力各不相同，茯苓FLA、FGD、FGZ、FHB、GTR1、XJ28和F5.78菌株相对含量最高的组分是3-醛基水杨酸，各组中的3-醛基水杨酸含量分别占酚类化合物总量的49.99%、45.29%、47.27%、44.17%、72.09%、62.16%、37.57%。茯苓GTR2菌株相对含量最高的组分是 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸（相对含量0.022 789%），占酚类化合物总量的21.31%。而 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸相对含量与DPPH自由基清除率呈显著正相关（ $P<0.05$ ），显示出较强的抗氧化作用，这可能是茯苓GTR2菌株具有较强抗氧化能力的原因。

人工种植茯苓的主要菌材是马尾松、湿地松等松科植物，但其很容易感染松材线虫病，形成松材线虫疫木。疫木的处理方法以就地焚烧为主，资源浪费极大。现有研究表明，在松材线虫疫木上种植茯苓可以杀死松材线虫，显著抑制松墨天牛发育，有效防控松材线虫病<sup>[35-36]</sup>，但作用机理尚不清楚，推测与茯苓胞外代谢产物中的活性成分有关。咖啡酸是茯苓重要的胞外代谢产

物，属于酚类化合物，能有效毒杀松材线虫，其半致死浓度为46.8  $\mu\text{g/mL}$ ，防治效果明显<sup>[37]</sup>。本实验的8个茯苓菌株均可以产咖啡酸，其中茯苓GTR1、GTR2和FGD菌株中咖啡酸的相对含量较高，可以作为利用松材疫木栽培茯苓的实验菌株，进一步研究茯苓对松材线虫的致死机理。

## 2.5 茯苓菌株活性成分与抗氧化活性的PCA

PCA是一种可靠的质量评价方法，其能将多个变量转化为少数的综合指标，可最大限度地保留原始高维的变量信息。如表6所示，3个PC特征值均大于1，累计方差贡献率达90.811%，表明这3个PC能反映8项指标的绝大部分信息。其中PC1特征值为3.429，方差贡献率为42.865%，其中贡献最大的为DPPH自由基清除率，载荷值为0.958，其次为胞外黄酮含量和胞外总酚含量，载荷值分别为0.947和0.944，表明PC1主要与胞外黄酮含量、胞外总酚含量及DPPH自由基清除率相关，主要反映了茯苓的抗氧化成分及抗氧化活性。PC2特征值为2.690，方差贡献率为33.620%，其中贡献最大的为胞外三萜含量，载荷值为0.869，其次是胞外多糖含量，载荷值为0.849，主要反映了茯苓的主要活性成分。PC3特征值为1.146，方差贡献率为14.326%，其中贡献最大的为羟自由基清除率，载荷值为0.761，主要反映了茯苓对羟自由基的清除能力。

表6 不同茯苓菌株PC载荷矩阵、特征值及贡献率

Table 6 Load matrix, eigenvalues and contribution rates of PC

因子	PC1	PC2	PC3
胞外多糖含量	-0.156	0.849	0.452
胞外黄酮含量	0.947	0.257	-0.039
胞外三萜含量	-0.294	0.869	0.318
胞外总酚含量	0.944	0.285	-0.115
胞外甾醇含量	-0.663	0.523	-0.452
ABTS阳离子自由基清除率	-0.368	-0.679	-0.099
DPPH自由基清除率	0.958	0.086	-0.181
羟自由基清除率	0.193	-0.569	0.761
特征值	3.429	2.690	1.146
方差贡献率/%	42.865	33.620	14.326
累计方差贡献率/%	42.865	76.485	90.811

根据成分得分系数矩阵计算各PC得分，结果如下： $F_1 = -0.046X_1 + 0.276X_2 - 0.086X_3 - 0.275X_4 - 0.193X_5 - 0.107X_6 + 0.279X_7 + 0.056X_8$ ； $F_2 = 0.316X_1 + 0.096X_2 + 0.323X_3 + 0.106X_4 + 0.194X_5 - 0.252X_6 + 0.032X_7 - 0.212X_8$ ； $F_3 = 0.394X_1 - 0.034X_2 + 0.278X_3 - 0.100X_4 - 0.395X_5 - 0.087X_6 - 0.158X_7 + 0.664X_8$ 。其中， $X_1$ 为胞外多糖含量、 $X_2$ 为胞外黄酮含量、 $X_3$ 为胞外三萜含量、 $X_4$ 为胞外总酚含量、 $X_5$ 为胞外甾醇含量、 $X_6$ 为ABTS阳离子自由基清除率、 $X_7$ 为DPPH自由基清除率、 $X_8$ 为羟自由基清除率。根据PCA结果，构建出综合得分评价模型： $F = 0.429F_1 + 0.336F_2 + 0.143F_3$ 。

通过3个PC代替8项指标对茯苓菌株进行综合评价,根据所建立的综合得分评价模型,获得各菌株的综合得分及排名,得分高低反映出菌株的综合品质。由表7可知,PC1、PC2、PC3得分最高的茯苓菌株分别为GTR2、GTR1、XJ28。综合得分排名前3的菌株分别为GTR2、GTR1和XJ28,表明这些菌株综合品质相对较好。

表7 不同茯苓菌株PC得分及综合得分

Table 7 Principal component scores and comprehensive scores of different *W. hoelen* strains

菌株	$F_1$	$F_2$	$F_3$	$F$	排名
FLA	-0.010	-0.320	-0.293	-0.624	4
FGD	-0.679	-0.117	-0.944	-1.740	8
FGZ	-0.166	-0.366	-0.204	-0.735	5
FHB	-0.127	-0.391	-0.688	-1.206	6
GTR1	-1.191	1.918	0.969	1.696	2
GTR2	2.171	1.071	-0.321	2.921	1
XJ28	0.418	-1.179	2.040	1.278	3
F5.78	-0.417	-0.615	-0.557	-1.590	7

### 3 结 论

本实验对8个茯苓菌株胞外代谢产物进行测定,发现茯苓GTR1菌株胞外多糖(0.489 g/L)、胞外三萜(0.976 g/L)和胞外甾醇(2.354 g/L)的质量浓度最高;茯苓GTR2菌株胞外黄酮(0.113 g/L)和胞外总酚(0.206 g/L)质量浓度最高。体外抗氧化实验结果表明,茯苓菌株对3种自由基都有一定的清除能力,其中茯苓F5.78菌株的ABTS阳离子自由基清除率最高,为64.93%;茯苓GTR2菌株的DPPH自由基清除率最高,为44.60%;茯苓XJ28菌株的羟自由基清除率最高,为81.90%。茯苓胞外代谢产物与抗氧化活性的相关性分析结果表明,DPPH自由基清除率与茯苓胞外黄酮和胞外总酚含量呈极显著正相关( $P<0.01$ )。通过植物广泛靶向代谢组学方法共定性分析出55种黄酮类化合物和33种酚类化合物,不同茯苓菌株之间各组分的相对含量存在差异:茯苓FLA、FGD、FGZ、FHB、GTR1、XJ28和F5.78菌株相对含量最高的黄酮类组分是丙二酰大豆黄酮,酚类组分是3-醛基水杨酸;茯苓GTR2菌株相对含量最高的黄酮类组分是山柰酚-3-*O*-(6-没食子酰)葡萄糖苷,酚类组分是 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸,这可能是其具有较强抗氧化能力的原因。

进一步分析的结果表明,5,7-二羟基-8-甲基黄酮酮、5,7-二甲氧基香豆素、6,7-二甲氧基-4-甲基香豆素、5-羟基黄酮、6-羟基-4-甲基香豆素、山柰酚-3-*O*-(6-没食子酰)葡萄糖苷、新橙皮苷、商陆素、花旗松素-3-*O*-葡萄糖苷和木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷这10种黄酮类化合物相对含量和DPPH自由基清除率呈极显著正相关,是茯苓发挥抗氧化作用的主要黄酮类成分。3-氨基水杨酸、

*N*-乙酰基-5-氨基水杨酸、间香豆酸、阿魏酸、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸、对羟基苯甲酸这6种酚类化合物相对含量与DPPH自由基清除率呈显著正相关,是茯苓发挥抗氧化作用的主要酚类成分。根据茯苓菌株胞外代谢产物和抗氧化能力指标进行PCA,GTR2菌株综合得分最高。GTR2菌株胞外活性成分含量高、抗氧化活性好,可作为茯苓抗氧化产品开发的潜力菌株。

### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 251-252.
- [2] KIM H, CHOI H, PARK B G, et al. Efficacy of *Poria cocos* extract on sleep quality enhancement: a clinical perspective with implications for functional foods[J]. *Nutrients*, 2023, 15(19): 4242. DOI:10.3390/nu15194242.
- [3] 崔向清. 学做茯苓美食, 助您健脾安神[J]. *大众健康*, 2021(11): 66-67. DOI:10.3969/j.issn.1002-574X.2021.11.029.
- [4] 吴胜莲, 谭明辉, 邵晨霞, 等. 不同茯苓菌株生物学特性和菌核主要成分比较[J]. *食用菌学报*, 2016, 23(2): 20-22. DOI:10.16488/j.cnki.1005-9873.2016.02.004.
- [5] 贾定洪, 王波, 彭卫红, 等. 8个茯苓菌株的菌丝生长速度及菌核产量分析[J]. *食用菌*, 2009, 31(6): 23-24. DOI:10.3969/j.issn.1000-8357.2009.06.013.
- [6] 徐雷, 陈科力. 不同茯苓菌株的菌核产量比较及内在品质评价[J]. *北方园艺*, 2014(9): 176-178.
- [7] 屈直, 刘永翔, 朱国胜, 等. 贵州茯苓优良菌株的筛选[J]. *菌物学报*, 2009, 28(2): 226-235. DOI:10.13346/j.mycosystema.2009.02.017.
- [8] 金文松, 刘文君, 李立志, 等. 16种茯苓菌株液体发酵产胞内多糖与三萜的比较研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(5): 878-886. DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.5.022.
- [9] 谭智杰, 张巧毅, 赵柔, 等. 茯苓菌液体发酵产胞内多糖条件的优化[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2023, 49(5): 543-548. DOI:10.13331/j.cnki.jhau.2023.05.007.
- [10] 张年, 李兆星, 李娟, 等. 茯苓的化学成分与生物活性研究进展[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2019, 21(2): 220-233. DOI:10.11842/wst.2019.02.012.
- [11] NG C Y J, LAI N P Y, NG W M, et al. Chemical structures, extraction and analysis technologies, and bioactivities of edible fungal polysaccharides from *Poria cocos*: an updated review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 261: 129555. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2024.129555.
- [12] 陈红梅. 茯苓皮多糖和三萜类物质提取及其抗氧化活性研究[J]. *生物学杂志*, 2015, 32(2): 48-52. DOI:10.3969/j.issn.2095-1736.2015.02.048.
- [13] WU P, TAN H Y, ZHAN J F, et al. Optimization of bioprocess extraction of *Poria cocos* polysaccharide (PCP) with *Aspergillus niger*  $\beta$ -glucanase and the evaluation of PCP antioxidant property[J]. *Molecules*, 2020, 25(24): 5930. DOI:10.3390/molecules25245930.
- [14] 孙恺婧, 刘馨泽, 孙莹, 等. 茯苓多糖对非小细胞肺癌NCI-H460细胞的抑制作用[J]. *食用菌学报*, 2024, 31(1): 76-83. DOI:10.16488/j.cnki.1005-9873.2024.01.008.
- [15] ZHANG W X, CHEN L, LI P, et al. Antidepressant and immunosuppressive activities of two polysaccharides from *Poria cocos* (Schw.) Wolf[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 1696-1704. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.171.

- [16] LV Y Z, YANG Y J, CHEN Y, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a water-soluble polysaccharide from *Poria cocos*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 261: 129878. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2024.129878.
- [17] ZHANG X Y, LIN W, LEI S Y, et al. The anti-hyperlipidemic effects of *Poria cocos* (Schw.) Wolf extract: modulating cholesterol homeostasis in hepatocytes via PPAR $\alpha$  pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2024, 321: 117532. DOI:10.1016/j.jep.2023.117532.
- [18] ZHANG F M, ZHENG H, ZHENG T, et al. Adsorption, *in vitro* digestion and human gut microbiota regulation characteristics of three *Poria cocos* polysaccharides[J]. Food Science and Human Wellness, 2024, 13(3): 1685-1697. DOI:10.26599/FSHW.2022.9250195.
- [19] 王小建, 李果, 孙秋枝, 等. 茯苓多糖对仔猪生长性能、养分表观消化率及免疫功能的影响[J]. 中国饲料, 2023(18): 37-40. DOI:10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20231810.
- [20] 姚韶华, 程雅清, 武若楠, 等. 羧甲基茯苓多糖对香菇贮藏保鲜效果的影响[J]. 武汉工程大学学报, 2022, 44(4): 428-433. DOI:10.19843/j.cnki.CN42-1779/TQ.202112021.
- [21] 王兆梅, 李琳, 郭祀远, 等. 生物活性多糖在化妆品中的应用[J]. 日用化学工业, 2004, 34(4): 245-248. DOI:10.13218/j.cnki.csdc.2004.04.013.
- [22] 代君怡, 方潇, 朱瑶, 等. 基于非标记定量蛋白质组学技术研究茯苓三萜对小鼠腹水瘤抑瘤作用机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(9): 3114-3124. DOI:10.11842/wst.20220907001.
- [23] 吕婷婷, 王妍妍, 张越, 等. 茯苓皮总三萜大孔树脂纯化工艺及体外抗炎活性研究[J]. 安徽中医药大学学报, 2023, 42(6): 86-92. DOI:10.3969/j.issn.2095-7246.2023.06.018.
- [24] 程水明, 桂元, 沈思, 等. 茯苓皮三萜类物质抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 27-30. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201109006.
- [25] DING X F, LI S Y, HUANG H Y, et al. Bioactive triterpenoid compounds of *Poria cocos* (Schw.) Wolf in the treatment of diabetic ulcers via regulating the PI3K-AKT signaling pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2024, 325: 117812. DOI:10.1016/j.jep.2024.117812.
- [26] 张先淑, 饶志刚, 胡先明, 等. 茯苓总三萜对小鼠肝损伤的治疗作用[J]. 食品科学, 2012, 33(15): 270-273.
- [27] 邓桃妹, 彭代银, 俞年军, 等. 茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中草药, 2020, 51(10): 2703-2717. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.013.
- [28] YI Y, HUA H M, SUN X F, et al. Rapid determination of polysaccharides and antioxidant activity of *Poria cocos* using near-infrared spectroscopy combined with chemometrics[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 240: 118623. DOI:10.1016/j.saa.2020.118623.
- [29] WANG J L, ZHANG T, SHEN X T, et al. Serum metabolomics for early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma by UHPLC-QTOF/MS[J]. Metabolomics, 2016, 12(7): 116. DOI:10.1007/s11306-016-1050-5.
- [30] 肖扬波, 刘琪, 彭逸斯, 等. 干燥方法对茯苓产品显微性状、营养成分及抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械, 2021, 37(3): 175-179. DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2021.03.032.
- [31] 姜悦航, 张越, 段雨婷, 等. 不同树种栽培茯苓品质的比较[J]. 中成药, 2022, 44(5): 1527-1530. DOI:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.028.
- [32] 邹文静, 刘程程, 方天艳, 等. 5种黔产药食两用植物总黄酮、多酚及多糖的含量测定[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(7): 1929-1930, 1999. DOI:10.13989/j.cnki.0517-6611.2014.07.057.
- [33] 张越, 程玥, 刘洁, 等. 不同生长环境下茯苓总三萜和水溶性总多糖含量比较[J]. 安徽中医药大学学报, 2019, 38(4): 81-84. DOI:10.3969/j.issn.2095-7246.2019.04.022.
- [34] 郭文. 茯苓多酚的超声萃取工艺优化及其化学成分分析[J]. 食品工业, 2015, 36(6): 65-70.
- [35] 蒙海勤, 叶建仁, 王旻嘉, 等. 木腐真菌对松材线虫病疫木处理初探[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2021, 45(4): 183-189. DOI:10.12302/j.issn.1000-2006.202001019.
- [36] 陈元生, 李新远, 于海萍, 等. 松材线虫病疫木生物除害技术研究[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(2): 82-86; 52. DOI:10.3969/j.issn.1672-6820.2019.02.018.
- [37] DONG J Y, WANG L, SONG H C, et al. Ophiocerosol, a novel macrocyclic neolignan from the aquatic fungus *Ophioceras dolichostomum* YMF1.00988[J]. Natural Product Research, 2010, 24(11): 1004-1012. DOI:10.1080/14786410902854126.