

光质对灵芝菌丝体生长及三萜酸量影响的研究

梅锡玲¹, 陈若芸², 李保明², 陈向东¹, 赵 洲¹, 兰 进^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所, 北京 100050

摘要: **目的** 研究光质对灵芝菌丝体生长及三萜酸量和组分的影响。**方法** 采用新型 LED 冷光源设置不同光质处理, 动态观测灵芝菌丝体生长、总三萜酸量及三萜酸组分的变化情况。**结果** 不同光质处理灵芝菌丝体形态、生长速度、生物量和总三萜酸量及单体三萜酸在组分、相对量及各组分间的比例都有所变化。蓝光处理菌丝体在整个培养期始终保持稳定增长; 红光处理菌丝体前期生长速度及生物量最大, 但是中后期生长速度显著下降, 生物量增加缓慢, 次于蓝光; 绿光处理菌丝体前中期生长速度及生物量均最小, 然而培养后期增加明显, 干物质迅速积累。灵芝三萜酸在菌丝体培养第 7 天时已大量产生, 随培养时间延长种类增多, 组分量降低。绿光和蓝光处理对提高灵芝菌丝体三萜酸种类和量均有明显优势。**结论** 光质对灵芝菌丝体生长及三萜酸量和成分均有显著影响, 蓝光对促进灵芝菌丝体生长及三萜酸积累综合优势明显。

关键词: 灵芝; 光质; 菌丝体生长; 三萜酸; HPLC

中图分类号: R282.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)24-3546-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.24.022

Effect of light quality on growth and triterpenic acid content of *Ganoderma lucidum* mycelium

MEI Xi-ling¹, CHEN Ruo-yun², LI Bao-ming², CHEN Xiang-dong¹, ZHAO Zhou¹, LAN Jin¹

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To study the effect of light quality on the growth as well as triterpenic acid content and component of *Ganoderma lucidum* mycelium. **Methods** Light-emitting diode (LED) was used as sources of light, the growth index, content and component of triterpenic acids in *G. lucidum* mycelium cultured under different LED conditions were investigated along with culture time. **Results** The growth rate, morphology, biomass, total contents and components of triterpenic acid in *G. lucidum* mycelium varied under different lights. The mycelium cultured under blue light maintained stable growth during the whole period; Under red light, both growth rate and biomass of mycelium were the highest in early time, subsequently, decreased sharply and grew slowly. Under green light, both growth rate and biomass of mycelium were the lowest in early and medium phases, while increased significantly later, especially dry matter. Triterpenic acids were highly produced on the day 7 of cultivation, while decreased in content and increased in types. Green light and blue light had a distinct advantage of improving the type and content triterpenic acids in *G. lucidum*. **Conclusion** Light quality affects the growth as well as the content and component of triterpenic acids in *G. lucidum* mycelium, and blue light irradiation is the best for the steady growth and triterpenic acids accumulation.

Key words: *Ganoderma lucidum* (Lesyss ex Fr.) Karst; light quality; mycelium growth; triterpenic acids; HPLC

灵芝 *Ganoderma lucidum* (Lesyss ex Fr.) Karst. 属担子菌亚门多孔菌目灵芝菌科灵芝属真菌, 在我国已有两千多年的药用历史, 其子实体、孢子粉、

菌丝体均可入药^[1-2]。灵芝在栽培生长过程中会受到各种环境因子的影响, 光作为一种环境信号, 对灵芝的分化发育、形态建成及代谢等方面有深刻影响^[2]。

收稿日期: 2013-07-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173660)

作者简介: 梅锡玲 (1987—), 女, 湖北武汉人, 硕士研究生, 主要从事药用真菌生理生化研究。Tel: (010)57833426 E-mail: mei_xiling@163.com

*通信作者 兰 进 Tel/Fax: (010)62899723 E-mail: lanjin60@hotmail.com

次生代谢产物的产生和积累受到自身遗传和环境因素的调控^[3], 三萜酸是灵芝体内次生代谢产物, 同时也是其主要活性成分之一, 具有广泛药理活性如抗肿瘤、保肝、抗氧化等^[4-9]。本实验旨在研究不同光质处理对灵芝菌丝体生长及活性成分三萜酸的影响, 为灵芝菌丝体培养提供科学的理论依据, 同时丰富药用真菌光生物学理论。

1 材料

供试菌株为S3灵芝 *Ganoderma lucidum* (Lesyss ex Fr.) Karst, 由中国医学科学院药用植物研究所生物发酵实验室提供, 经中国医学科学院药用植物研究所兰进研究员鉴定。大量实验研究表明该菌株具有稳定的遗传性和优质高产的特性。

2 方法

2.1 光质的处理及培养条件

采用半导体LED发光二极管为光源(约35 lx), 分别设置红光、黄光、绿光、蓝光4个处理, 黑暗为对照。采用ASD FieldSpec HandHeld Spectroradiometer(美国)检测LED光源, 波长范围分别为红光622~645 nm, 黄光568~606 nm, 绿光478~572 nm, 蓝光430~480 nm。LED光源均匀分布于培养架顶部, 培养架四周采用黑色遮光材料隔离。

PDA培养基作为供试培养基。经过高压灭菌后, 定量倒入直径12 cm的培养皿中, 采用打孔法定量接入菌龄一致的灵芝菌种。在不同光下培养, 培养温度25 ℃。

2.2 生长速度及生物量测定

2.2.1 生长速度测定 从培养第4天起, 对不同光质处理的灵芝菌丝体采用“十字交叉法”测量菌落直径, 每2天测定1次, 至第12天结束, 每个处理重复3次, 同时, 观察记录菌落形态。

2.2.2 生物量测定 从培养第4天开始, 测量不同光质处理的灵芝菌丝体鲜质量, 并采用“烘干恒质量法”测定其干质量, 每3天测定1次, 至第13天结束, 每个处理重复3次。

2.3 总三萜酸的测定

2.3.1 总三萜酸提取 参考文献方法^[10], 从培养第7天开始, 取不同光质处理的灵芝菌丝体适量, 60 ℃烘干至恒质量, 粉碎, 过40目筛, 作为待测样品。每3天取1次, 至第13天结束。精确称取样品0.1 g, 加入三氯甲烷15 mL超声提取0.5 h, 滤过, 取滤液, 用饱和NaHCO₃萃取3次(10 mL×3), 收集NaHCO₃层(上层), 再用6 mol/L HCl调节pH 2~3, 氯仿

萃取3次(10 mL×3), 收集氯仿层(下层), 合并氯仿液, 旋转蒸发仪减压蒸干, 用甲醇定容至10 mL, 供分析测定。每个处理重复3次。总三萜酸的测定采用香草醛-冰醋酸法^[11], 以齐墩果酸质量浓度为横坐标(X), 吸光度(A)值为纵坐标(Y), 其标准曲线 $Y=0.002X+0.0434$, $r=0.9992$ 。

2.3.2 色谱条件^[12] Agilent 1200系统高效液相色谱仪(美国), DAD检测器。Alltima C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.04%甲酸溶液; 梯度洗脱条件: 0~10 min, 20%~25%乙腈, 10~20 min, 25%~30%乙腈, 20~50 min, 30%乙腈, 50~65 min, 30%~38%乙腈, 65~80 min, 38%乙腈; 柱温15 ℃; 体积流量1.0 mL/min; 进样量50 μL; 检测波长254 nm, 参比波长360 nm。

2.3.3 供试品溶液的制备 按照参考文献的方法^[13], 获得供试品溶液, 经0.45 μm微孔滤膜滤过, 按上述色谱条件进样分析。

2.4 数据分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计分析。Duncan's新复极差法比较各处理间差异。

3 结果与分析

3.1 光质对灵芝菌丝体生长的影响

光质对灵芝菌丝体的生长形态有显著影响: 蓝光处理菌丝体生长密实, 紧贴培养基生长; 绿光处理菌丝体生长前期较稀薄, 后期密实, 呈细小的絮状, 紧贴培养基生长; 红光和黄光处理菌丝体生长蓬松, 呈绒毛状; 黑暗对照菌丝体生长较蓬松。

生长速度方面, 红光处理菌丝体前期生长最快, 培养第4天生长速度达2.02 cm/d, 显著高于其他处理, 随后生长速度明显下降; 绿光处理前期生长缓慢, 后期生长较快。蓝光处理菌丝体前中期生长速度稳定, 培养至第6天后开始下降。红、黄、蓝光及黑暗对照下培养的灵芝菌丝体第10天均长满培养皿, 菌落直径达12 cm, 绿光处理培养的菌丝体菌落直径仅为10.28 cm, 至第12天才长满培养皿。培养至第13天后菌丝体开始出现老化现象。不同光质处理灵芝菌丝体4~10 d菌落直径日增长变化见图1。

3.2 光质对灵芝菌丝体生物量的影响

在整个培养时期, 蓝光处理菌丝体鲜质量始终最高, 其次为红光和黑暗对照, 绿光处理前中期菌丝体鲜质量均最小, 培养至第10天后开始明显增加, 至第13天, 各处理鲜质量相近(表1)。不同

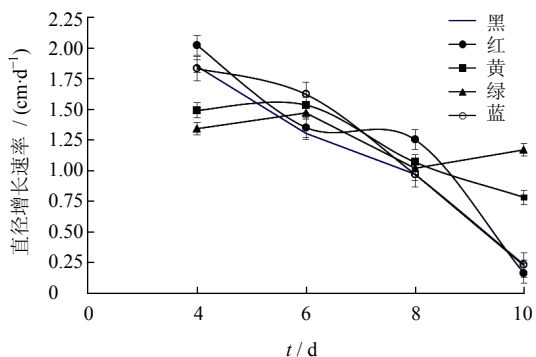


图1 不同光质处理灵芝菌丝体4~10 d 菌落直径日增长变化

Fig. 1 Variation of colony diameter of *G. lucidum* mycelium under different light qualities for 4—10 d

光质处理菌丝体干物质积累随培养时间延长发生变化: 培养至第10天, 蓝光处理菌丝体干质量显著高于其他光质处理, 比黑暗对照高2.2倍, 绿光处理干质量最小; 培养第10~13天, 绿光处理则增加明显, 至第13天显著高于其他处理。可见, 蓝光处理菌丝体在整个培养期始终保持稳定增长, 绿光处理菌丝体前中期生长速度及生物量均最小, 然而培养后期(第10~13天)增加明显, 干物质迅速积累。

3.3 光质对灵芝菌丝体总三萜酸量的影响

光质对灵芝菌丝体各培养时期总三萜酸量有显著调控作用, 各光质处理菌丝体总三萜酸量见表2。蓝光、黑暗对照灵芝菌丝体培养第7天三萜酸量高, 随培养时间延长质量分数下降。在培养第7天时蓝

表1 不同光质处理对灵芝菌丝体生物量积累的影响

Table 1 Variation of biomass accumulation of *G. lucidum* mycelium under different light qualities

光质	鲜质量 / g				干质量 / g			
	4 d	7 d	10 d	13 d	4 d	7 d	10 d	13 d
红光	0.153±0.035 a	0.601±0.076 ab	1.507±0.263 b	2.534±0.742 a	0.014±0.002 a	0.076±0.004 a	0.231±0.004 b	0.403±0.010 b
黄光	0.082±0.019 b	0.600±0.072 ab	1.040±0.422 bc	2.285±0.684 a	0.010±0.002 b	0.074±0.008 a	0.160±0.009 c	0.359±0.011 b
绿光	0.076±0.022 b	0.441±0.087 b	0.606±0.137 c	1.917±1.153 a	0.009±0.002 b	0.072±0.038 a	0.108±0.009 c	0.673±0.035 a
蓝光	0.145±0.035 a	0.694±0.159 a	2.638±0.340 a	2.871±0.042 a	0.011±0.001 b	0.088±0.009 a	0.456±0.005 a	0.543±0.012 ab
黑暗	0.150±0.072 a	0.693±0.155 a	1.084±0.360 bc	2.505±0.830 a	0.012±0.001 b	0.073±0.003 a	0.142±0.006 c	0.351±0.016 b

同一列不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Different letters in same line indicate significant difference ($P < 0.05$), same as below

表2 不同光质处理7~13 d 灵芝菌丝体总三萜酸量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Variation of total triterpenic acids content in *G. lucidum* mycelium under different light qualities for 7—13 d ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

光质	总三萜酸 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)		
	7 d	10 d	13 d
红光	1.66±0.08 d	1.68±0.02 d	1.28±0.09 c
黄光	2.11±0.08 c	1.98±0.05 c	1.93±0.05 a
绿光	2.16±0.03 c	2.73±0.02 a	1.58±0.09 b
蓝光	4.88±0.02 a	2.05±0.03 b	2.08±0.05 a
黑暗对照	2.68±0.05 b	1.55±0.03 e	1.96±0.15 a

光处理菌丝体总三萜酸量明显高于其他处理, 比黑暗对照高82%; 绿光处理菌丝体培养第10天三萜酸量达最大, 显著高于同期其他处理; 红光处理灵芝菌丝体培养第7~10天三萜酸量变化不明显, 培养第13天下降明显。统计分析结果显示, 不同光质处理灵芝菌丝体总三萜酸量差异显著, 总体表现为

蓝光处理 > 绿光处理 > 黑暗对照、黄光处理 > 红光处理, 黑暗对照和黄光处理无显著差异。

3.4 不同光质不同培养时期灵芝菌丝体三萜酸成分变化

培养各时期不同光质处理灵芝菌丝体三萜酸 HPLC 图见图2。培养第7天灵芝菌丝体内已经启动了几种单体三萜酸的合成代谢。从图2可以看出不同处理菌丝体三萜酸 HPLC 出峰情况不同。菌丝体培养至第7天, 3、4、5、6、7号峰为各处理共有峰, 其中3号峰峰高均明显。各光质处理较黑暗对照增加2号峰, 说明此时光质能够诱导2号峰所代表的三萜酸的形成。绿光、蓝光处理较红光、黄光处理2和4号峰高明显。通过峰面积比计算发现, 各光质处理3号峰峰面积均高于黑暗对照, 蓝光处理高于对照19.3倍, 绿光处理高于对照12.4倍, 红光处理高于对照5.8倍, 黄光处理高于对照5.37倍。蓝光处理2、3、4、7号峰峰面积均明显大于其他光质处理, 5、6号峰峰面积与其他光质处理

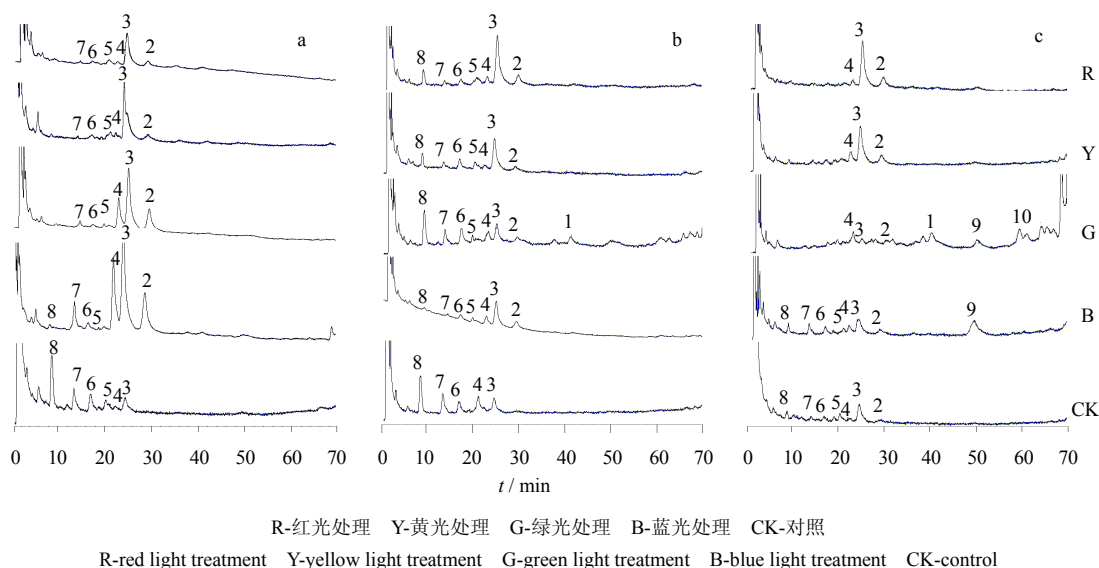


图2 不同光质处理灵芝菌丝体培养第7天 (a)、第10天 (b) 和第13天 (c) 三萜酸 HPLC 重叠图
 Fig.2 HPLC overlap graphs of triterpenic acids in *G. lucidum* mycelium cultured on day 7 (a), day 10 (b), and day 13 (c) under different light qualities

相近,可以推测此时蓝光处理菌丝体总三萜酸量高于其他光质处理,与总三萜酸量测定结果一致。菌丝体培养至第10天,红、黄、绿光处理均增加8号峰且峰高明显,绿光处理另外还增加1号峰。同第7天峰面积比发现,黑暗对照各峰面积变化不大;蓝光处理峰面积明显减小,2、3、4号峰面积比第7天分别下降85%、80%、92%;绿光处理峰面积也变化较明显,2、3、4号峰面积比第7天分别下降90%、90%、86%,5、6、7号峰面积有所增加。红光和黄光处理菌丝体三萜酸HPLC峰图相似,但红光处理3号峰面积比黄光处理大。

菌丝体培养至第13天,绿光和蓝光处理增加9号峰,绿光处理60min后洗脱峰数目增加且峰面积大。红光和黄光处理出峰数均减少,5、6、7、8号峰消失或不明显。同培养第7、10天峰面积比,3号峰面积变化情况如下,黑暗对照处理随培养时间延长增加;绿光和蓝光处理随培养时间延长递减;红、黄光处理第7天最大,第10天降低,第13天略有增加。2号峰比分析发现:红、绿、蓝光处理第7天时峰面积最大,随培养时间延长峰面积下降明显;黄光处理变化趋势相反,第13天时峰面积达最大;黑暗对照培养第7~10天无2号峰,第13天出现。

4 讨论

目前普遍认为食药真菌营养生长阶段不需要光诱导,一般在黑暗中进行,然而研究发现低热量

不同光质处理对真菌菌丝体生长有不同程度的促进作用^[14],有食用菌研究者提出利用低能源LED光源控制平菇、金针菇等的生长可以降低成本和环境污染,提高产量^[15-16]。LED光源在农业与生物领域具有良好的发展前景^[17],能否将其应用于灵芝等药用真菌的人工培育来实现灵芝的高产优质栽培是值得关注的问题。在灵芝菌丝体培养过程中,蓝光处理的灵芝菌丝体生长较稳定,生物量大,且总三萜酸量高,综合优势明显,结合本实验室已有研究报道^[18-19],可以初步推断,蓝光是灵芝菌丝体培养的优质光质。

不同光质处理灵芝菌丝体不同培养时期三萜酸成分分析发现,灵芝菌丝体培养第7天时可以检测到6种三萜酸,而有报道表明液体发酵菌丝体培养至第7天未检测到三萜化合物,至30d左右时才达到高峰^[20],说明灵芝不同菌株不同培养方式对其三萜酸类化合物的代谢合成影响显著。绿光处理菌丝体培养第10~13天均有1号峰存在,其他处理菌丝体培养第7~13天均无,说明1号峰代表的灵芝酸可在绿光诱导下合成,且于培养中后期保持稳定。红、黄、绿、蓝光处理菌丝体培养第7~13天均有2号峰存在,黑暗对照第13天才出现,且峰面积小,说明光质可诱导2号峰所代表的灵芝酸的早期形成。培养第13天,各处理菌丝体三萜酸HPLC图峰面积均有不同程度下降,然而绿光处理菌丝体三萜酸HPLC图60min后,吸收峰数目增加且峰面积

大, 这些峰代表的组分可能是极性较小的物质如灵芝醇、内酯以及甾体等。

实验中还分别取灵芝酸 C2、灵芝酸 LM1、灵芝酸 B 和灵芝酸 A 对照品适量在相同色谱条件下进行 HPLC 测定, 发现 1、2、4 号峰的保留时间分别与灵芝酸 A、B、C2 的保留时间一致, 然而对峰顶点紫外光谱分析发现其紫外吸收与对照品的均不一致, 说明这几个峰所代表的物质并非标准品物质。本实验通过 HPLC 初步比较不同光质处理灵芝菌丝体各培养时期的三萜酸情况, 未对各成分进行测定。实验发现各处理灵芝菌丝体各时期 3 号峰均有较大峰面积, 有待进一步研究, 确定其所代表的三萜酸组分及其质量分数。

参考文献

- [1] 张晓云, 杨春清. 灵芝的化学成分和药理作用 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2006, 21(4): 152-155.
- [2] 王赛贞, 林冬梅, 林占熿, 等. RP-HPLC 和 UV-VIS 法测定灵芝不同收获期的多糖肽和灵芝酸 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(3): 190-193.
- [3] 郝俊江, 陈向东, 兰 进. 光质对灵芝生长及抗氧化酶系统的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(12): 2529-2534.
- [4] 黄璐琦, 高 伟, 周 洁, 等. 系统生物学方法在药用植物次生代谢产物研究中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(1): 8-12.
- [5] Sliva D. Cellular and physiological effects of *Ganoderma lucidum* (Reishi) [J]. *Mini-Rev in Med Chem*, 2004(4): 873-879.
- [6] Liu G, Zhang K. Mechanisms of the anticancer action of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.: A new understanding [J]. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47(2): 129-135.
- [7] El-Mekkawy S, Meselhy M R, Nakamura N. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(6): 1651-1657.
- [8] Zhu M, Chang Q, Wong L K, et al. Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum* [J]. *Phytother Res*, 1999, 13(6): 529-531.
- [9] 董虹玲, 赵娜夏, 商 倩, 等. 赤芝子实体中三萜酸类成分及其抗人乳腺癌 SKBR3 细胞增殖活性[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 132-137.
- [10] 李保明, 刘 超, 王洪庆, 等. 灵芝总三萜酸含量测定方法的研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(12): 1234-1236.
- [11] 王 伟, 尚德静, 温 磊. 灵芝发酵菌丝三萜类化合物含量的测定 [J]. 中国食用菌, 2006, 25(1): 30-32.
- [12] 何晋浙, 黄霄芸, 张安强, 等. 灵芝醇提生物活性物质的指纹图谱分析及质控评价 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1125-1129.
- [13] 马 林, 吴 丰, 陈若芸. 灵芝三萜成分分析 [J]. 药学报, 2003, 38(1): 50-52.
- [14] Arjona D, Aragon C, Aguilera J A, et al. Reproducible and controllable light induction of in vitro fruiting of the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus* [J]. *Mycol Res*, 2009, 113: 552-558.
- [15] Jang M J, Kim J H, Lee Y H, et al. Method and system for culturing ergosterol-enriched oyster mushroom using led illumination: Korea, KR1168747B1 [P]. 2012-07-26.
- [16] Qiu G. Method for applying LED (light-emitting diode) lamps in growth of enoki mushrooms: China, CN102668879A [P]. 2012-09-19.
- [17] 杨其长. LED 在农业与生物产业的应用与前景展望 [J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(6): 42-47.
- [18] 梅锡玲, 赵 洲, 陈向东, 等. 光质对灵芝菌丝体生长及内源 IAA 代谢调控的研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(12): 1887-1892.
- [19] 邢增涛, 郁琼花, 张劲松, 等. 不同品种灵芝中三萜类化合物的比较研究 [J]. 中药材, 2004, 27(8): 575-576.