

张知晓,季梅,刘凌,等. 外源茉莉酸甲酯对牛樟芝产总三萜及多糖含量的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(19):133-136.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.19.032

外源茉莉酸甲酯对牛樟芝产总三萜及多糖含量的影响

张知晓,季梅,刘凌,户连荣

(云南省林业科学院,云南昆明 650201)

摘要:为了探讨茉莉酸甲酯(MeJA)对牛樟芝(*Antrodia camphorata*)发酵产三萜及多糖的影响及 Ca^{2+} 对 MeJA 的诱导作用,向牛樟芝发酵基础培养基中加入 MeJA 溶液,设置不同添加浓度(0、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)、不同时间(0、2、4、6、8 d)、不同溶剂 3 组试验,培养后检测牛樟芝生物量、三萜、胞外多糖及胞内多糖的含量,并同样测试添加 CaCl_2 的效果。结果表明,用 MeJA 处理牛樟芝,对其发酵产总三萜、多糖具有积极的促进作用,并且于培养 4 d 时向发酵培养基中添加用吐温-80 溶解的 50 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 溶液,促进作用最佳。此外,在添加 MeJA 的同时添加 CaCl_2 的处理较仅添加 MeJA 的处理的牛樟芝生物量、三萜、胞外多糖及胞内多糖含量显著增加。

关键词:牛樟芝;MeJA; Ca^{2+} ;总三萜;多糖

中图分类号:S646.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)19-0133-04

牛樟芝(*Antrodia camphorata*)又名樟芝、樟生薄孔菌等,是隶属担子菌亚门(Basidiomycotina)层菌纲(Hymenomycetes)非褶菌目(Polyporales)多孔菌科(Polyporaceae)薄孔菌属(*Antrodia*)的珍稀药用真菌^[1],被誉为“森林中的红宝石”^[2]。牛樟芝中的三萜类物质是其最主要的 1 种药用化学成分,可以起到保肝护肝、抑制癌细胞生长、降血压、抗炎症的作用,且牛樟芝中三萜类化合物的含量和种类都是灵芝的数倍,樟芝三萜也因此成为开发樟芝的研究重点之一^[3]。此外,樟芝中含有的多糖对人体起到提高免疫力、抑制病毒的作用,对保护肝脏也有一定的效果^[4]。

茉莉酸甲酯(MeJA)是一种脂肪酸衍生物,在植物中起着信号传递的作用,同时能够明显促进植物产生次级代谢产物^[5]。已有研究表明,将 MeJA 作为诱导剂添加到灵芝(*Ganoderma lucidum*)和桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*)的发酵培养基中,发酵后的三萜产量均较对照有明显提高^[6-7]。而在这方面,关于同属多孔菌目牛樟芝的研究还未见报道。此外,钙(Ca)是生物生长必需的营养元素,参与构成生物组织,调节生物生长发育,参与调控植物抗逆等生理反应^[8]。已有部

分研究发现, Ca^{2+} 参与 MeJA 介导的信号转导过程,如马泓思等发现,外源 Ca^{2+} 离子能进一步增强 MeJA 诱导的白桦(*Betula platyphylla*)细胞悬浮液合成三萜类物质的效果^[9]。而关于 Ca^{2+} 促进 MeJA 诱导真菌合成三萜类物质方面的研究尚未见报道。基于牛樟芝中的三萜、多糖具有极高的药用价值,本研究以牛樟芝为试验材料,研究 MeJA 对牛樟芝 2 种药用成分的影响及 Ca^{2+} 处理对 MeJA 作用的影响,以期初步探明 1 种增加牛樟芝三萜及多糖产量的方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究所用菌种为从中国台湾引进的牛樟芝优良菌株。

1.1.1 培养基和菌株培养条件 基础培养基配方:25 g 葡萄糖,5 g 蛋白胨,3 g 麦芽糖,3 g 酵母提取物,1 g KH_2PO_4 ,1 g MgSO_4 ,1 g 维生素 B_1 ,1 L 水,pH 值 5.5。

孢子悬浮液的制备方法:取已培养 20d 的牛樟芝培养皿,用 20 mL 无菌水洗下培养皿表面的孢子备用。

基础培养方法:在 500 mL 三角瓶中装 100 mL 基础培养基,接入 1 mL 牛樟芝孢子悬浮液,摇床上于 100 r/min、26 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 12 d 后,收集菌丝。

1.1.2 主要试剂 茉莉酸甲酯,购于 Sigma 公司;齐墩果酸及其他试剂,购于昆明腾科科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 试验时间和地点 本试验于 2018 年 3—7 月在云南省林业科学院实验室内进行。

2008,40(3):484-490.

[17] 苏洁琼,李新荣,鲍婧婷. 施氮对荒漠化草原土壤理化性质及酶活性的影响[J]. 应用生态学报,2014,25(3):664-670.

[18] 刘建国,张伟,李彦斌,等. 新疆绿洲棉花长期连作对土壤理化性状与土壤酶活性的影响[J]. 中国农业科学,2009,42(2):725-733.

[19] 樊后保,刘文飞,徐雷,等. 杉木人工林土壤酶活性对氮沉降

的响应[J]. 林业科学,2012,48(7):8-13.

[20] 杜锐,张江勇,林勇明,等. 邓恩桉(*Eucalyptus dunnii*)人工幼龄林土壤酶活性对模拟硫、氮复合沉降的响应[J]. 热带作物学报,2015,36(3):504-509.

[21] Waldrop M P, Zak D R, Sinsabaugh R L. Microbial community response to nitrogen deposition in northern forest ecosystems[J]. Soil Biology and Biochemistry,2004,36(9):1443-1451.

1.2.2 样品处理 (1)将 MeJA 用无水乙醇配制成终浓度为 25、50、75、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液。采用 0.2 μm 的无菌针头式过滤器过滤进行灭菌处理后,在基础摇瓶发酵方法的基础上,于 4 d 后添加到培养基中,添加量为 2 $\mu\text{L/mL}$,摇床培养,每个处理设 3 个重复。培养结束后取样分析其生物量、总三萜量、胞内多糖和胞外多糖量。

(2)将 MeJA 用无水乙醇配制成终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液。于不同培养时间(培养 0、2、4、6、8d)添加到培养基中,摇床培养,每个处理设 3 个重复。培养结束后取样分析。

(3)以无水乙醇、吐温-20、吐温-80 作为助溶剂,将 MeJA 配制成终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液,于 4 d 后添加到培养基中,摇床培养,每个处理设 3 个重复。培养结束后取样分析,筛选出 MeJA 的最佳添加方案。

在 MeJA 最佳添加方案的基础上,向培养基中同时添加 CaCl_2 ,使 CaCl_2 的终浓度为 75 nmol/L 。另外设置 2 组对照组,分别仅向培养基中添加 MeJA、 CaCl_2 。设 3 组独立试验。培养结束后取样分析其生物量、总三萜量、胞内多糖和胞外多糖量。

1.2.3 生物量的测定 生物量的测定方法参照文献[10]。通过抽滤分离发酵液与菌丝体,菌丝体用蒸馏水反复冲洗至洗液变为无色,置于干燥箱中,于 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒质量,对干燥菌丝体用精度为 0.001 g 的电子天平称量,即得菌丝体生物量。

1.2.4 菌丝体内总三萜含量的测定 采用香草醛-冰醋酸-高氯酸显色体系对总三萜含量进行测定。具体步骤参考杨彬君等的方法^[11]。

1.2.5 胞外多糖含量的测定 胞外多糖含量的测定方法参照文献[12]。将发酵液(用滤纸)过滤,取 100 mL 滤液在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发,使滤液浓缩至原体积的 1/3,加 3 倍体积的无水乙醇静置沉淀 24 h,4 000 r/min 离心分离 15 min,沉淀

经无水乙醇轻轻冲洗后,用烘箱于 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒质量,得到胞外粗多糖。

1.2.6 胞内多糖含量的测定 胞内多糖含量的测定方法参照文献[13]。将菌丝体用烘箱烘干至恒质量,研磨过筛,置于圆底烧瓶中,加 30 倍体积的水,于 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h,水浴提取后,再用超声波提取 30 min,重复 2 次提取多糖,合并提取液,离心、过滤,滤液用硫酸-苯酚法测定多糖含量。

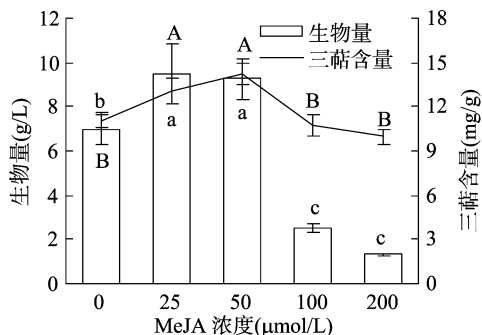
1.2.7 统计学分析 采用 SPSS 11.5 软件对数据进行统计和数理分析。

2 结果与分析

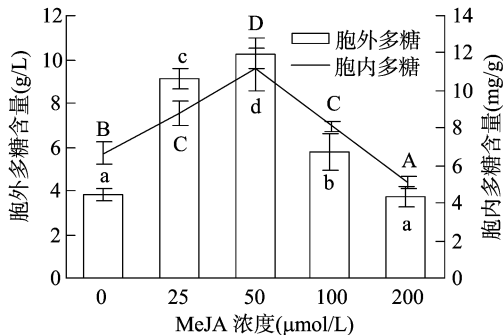
2.1 MeJA 不同添加浓度对牛樟芝发酵特性的影响

MeJA 不同添加浓度对牛樟芝生物量及三萜含量的影响如图 1-a 所示,可见当 MeJA 添加浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时,1L 发酵液中的牛樟芝生物量达 9.46 g;当 MeJA 添加浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,牛樟芝的生物量达 9.25 g/L,与 MeJA 添加浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 处理间的生物量无显著差异;当 MeJA 添加浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 时,牛樟芝的生物量较 MeJA 添加浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时降低了 2.55 g/L,但显著高于 MeJA 添加浓度为 100、200 $\mu\text{mol/L}$ 时的生物量。三萜含量在 MeJA 添加浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时最高(14.21 mg/g),其次为 MeJA 添加浓度为 25、100 $\mu\text{mol/L}$ 的处理,当 MeJA 添加浓度为 0、200 $\mu\text{mol/L}$ 时,三萜含量最低。

MeJA 不同添加浓度对牛樟芝胞外多糖及胞内多糖含量的影响如图 1-b 所示,可见当 MeJA 添加浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,牛樟芝胞外多糖、胞内多糖含量均最高,分别为 10.27 g/L、11.5mg/g;当 MeJA 添加浓度为 0、200 $\mu\text{mol/L}$ 时,胞外多糖含量均较低,二者间无显著差异,而当胞内多糖含量最低时,对应的 MeJA 添加浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 。



a. 对牛樟芝发酵生物量及三萜含量的影响



b. 对牛樟芝发酵产生胞外多糖与胞内多糖含量的影响

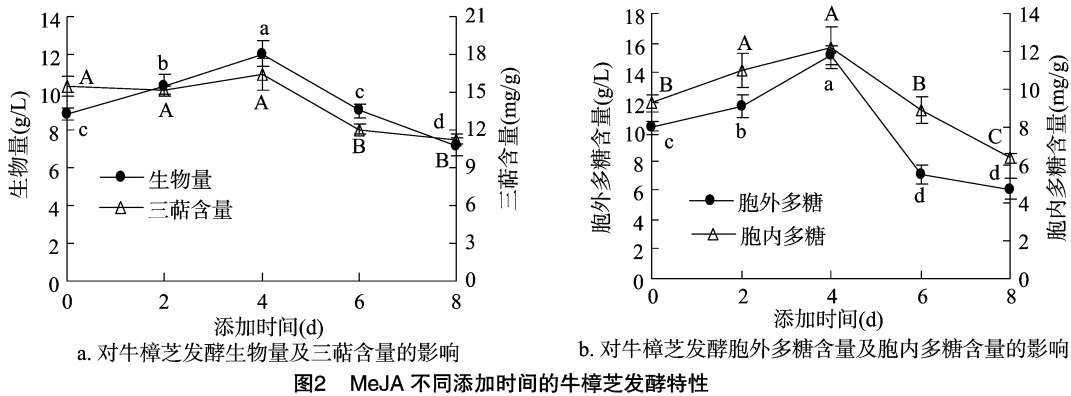
不同小写字母表示不同 MeJA 浓度下牛樟芝发酵生物量及胞外多糖含量差异显著 ($P<0.05$); 不同大写字母表示不同 MeJA 浓度下牛樟芝三萜含量及胞内多糖含量差异显著 ($P<0.05$)。图 2、图 3 同

图1 MeJA 不同添加浓度下的牛樟芝发酵特性

2.2 MeJA 不同添加时间对牛樟芝发酵特性的影响

MeJA 不同添加时间对牛樟芝生物量及三萜含量的影响如图 2-a 所示,可以看出,于培养 4 d 时添加 MeJA 发酵的牛樟芝生物量显著高于其他时间的生物量,为 12.04 g/L,而于培养 8 d 时添加 MeJA 产生的生物量最低,仅为 7.11 g/L。于培养 0、2、4 d 时添加 MeJA 的三萜含量分别为 15.48、15.12、16.42 mg/g,三者间无显著差异,但显著高于其他试验组。

MeJA 不同添加时间对牛樟芝胞外多糖及胞内多糖含量的影响如图 2-b 所示,可以看出,于培养 4 d 时添加 MeJA 发酵的胞外多糖含量最高,达 15.18 g/L,于培养 6、8 d 时添加 MeJA 产生的胞外多糖含量较低,分别较培养 4 d 时降低了 53%、60%。同样,于培养 4 d 时添加 MeJA 产生的胞内多糖含量最高(12.2 mg/g),其次是培养 2 d 时添加 MeJA 的胞内多糖含量,二者间无显著差异,于培养 8 d 时添加 MeJA 产生



的胞内多糖含量最低,仅为 6.4 mg/g。

2.3 MeJA 不同溶剂对牛樟芝发酵特性的影响

由表 1 可以看出,以吐温-80 为溶剂的 MeJA 溶液对牛樟芝发酵后生物量的促进作用最佳,生物量达到 8.25 g/L,单独添加吐温-80 溶液的效果次之;以无水乙醇为溶剂的 MeJA 溶液处理的生物量为 6.16 g/L,单独添加无水乙醇溶液的生物量为 3.48 g/L;以吐温-20 为溶剂的 MeJA 溶液和单

独添加吐温-20 的溶液发酵的牛樟芝生物量均为 0 g/L。几组处理的三萜含量排序如下:添加 MeJA (无水乙醇) 溶液 \geq 添加 MeJA (吐温-80) 溶液 $>$ 吐温-80 \geq 无水乙醇。

比较胞内多糖、胞外多糖含量可知,两者均在以吐温-20 为溶剂的试验组最低,次低的是以无水乙醇为溶剂的试验组,而在以 MeJA (吐温-80) 溶液为溶剂的试验组最高,较无水乙醇试验组分别提高了 71%、34%。

表 1 MeJA 不同溶剂处理下的牛樟芝发酵特性

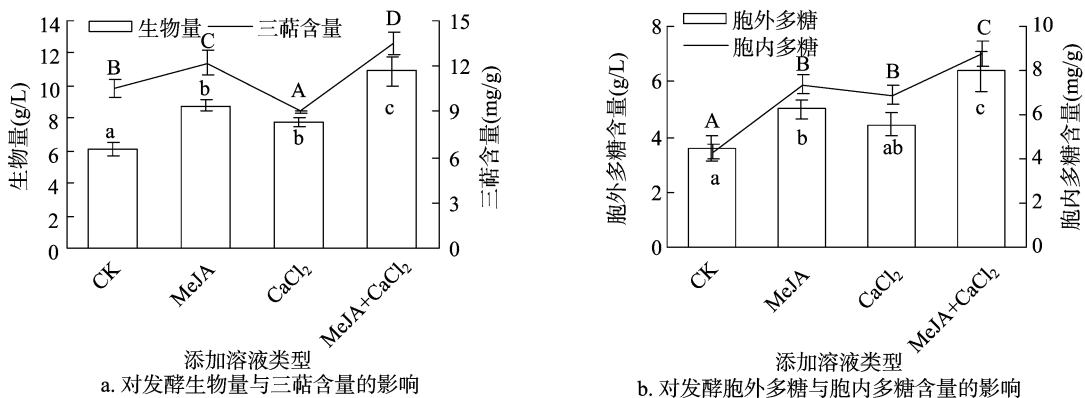
溶剂类型	生物量 (g/L)	三萜含量 (mg/g)	胞外多糖含量 (g/L)	胞内多糖含量 (mg/g)
无水乙醇	3.48 \pm 0.45d	15.46 \pm 0.83c	3.30 \pm 0.07a	5.88 \pm 0.18a
吐温-20	0 \pm 0b	0 \pm 0b	0 \pm 0b	0 \pm 0b
吐温-80	7.01 \pm 0.64a	16.62 \pm 1.22c	4.34 \pm 0.46ac	7.46 \pm 0.56d
无水乙醇 + MeJA (50 μ mol/L)	6.16 \pm 0.95a	18.88 \pm 1.16a	3.80 \pm 0.12a	6.59 \pm 0.48a
吐温-20 + MeJA (50 μ mol/L)	0 \pm 0b	0 \pm 0b	0 \pm 0b	0 \pm 0b
吐温-80 + MeJA (50 μ mol/L)	8.25 \pm 0.83c	18.84 \pm 0.90a	4.42 \pm 0.64c	10.05 \pm 0.65c

注:不同小写字母表示不同 MeJA 溶剂处理的牛樟芝发酵生物量、三萜含量、胞外多糖及胞内多糖含量间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 Ca^{2+} 介导 MeJA 的影响 (添加 Ca^{2+} 对 MeJA 诱导作用的影响)

如图 3 所示,发酵后牛樟芝生物量、胞外多糖含量和胞内多糖含量均呈现出相同的趋势,表现为 $\text{MeJA} + \text{CaCl}_2 > \text{MeJA} > \text{CaCl}_2 > \text{CK}$,而发酵后的三萜含量为 $\text{MeJA} + \text{CaCl}_2 > \text{MeJA} >$

$\text{CK} > \text{CaCl}_2$ 。其中,效果最好的 MeJA + CaCl_2 组牛樟芝的生物量、三萜含量、胞外多糖含量和胞内多糖含量分别为 10.91 g/L、13.48 mg/g、6.36 g/L、8.80 mg/g,分别较 CK 提高了 79.10%、27.90%、77.20%、103.02%。



3 结论与讨论

茉莉酸甲酯对多种次生代谢产物的合成具有诱导作用^[14],近些年来也陆续出现将其用于微生物发酵上的研究。

辛燕花等将 MeJA 添加于灵芝发酵培养基中,发现它能够提高灵芝多糖、灵芝酸的产量^[15]。杨文建等发明了 1 种用 MeJA 溶液喷洒双孢蘑菇的方法,经证实该方法能够促进双孢蘑菇产麦角甾醇^[16]。此外,MeJA 还能够促进微生物细胞中

萜类物质的合成, Ren 等首次将 MeJA 作为诱导剂添加到灵芝发酵培养基中, 发现其灵芝三萜的产量比未经处理的提高了 45.3%^[6]。向超也证实, 用 MeJA 诱导桦褐孔菌发酵产三萜, 其三萜总产量较对照提高了 53.2%^[7]。本研究结果表明, 在液体发酵过程中添加 MeJA, 能显著提高牛樟芝发酵的生物量与三萜、胞外多糖、胞内多糖含量, 最适宜的添加浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 于培养 4d 时对各指标的促进效果最佳, 以吐温-80 作为溶剂最有利于 MeJA 发挥促进作用。而有研究发现, 吐温-20 对牛樟芝的生长具有强烈的抑制作用, 这可能由于其具有较短的碳链, 作为表面活性剂在细胞壁内表现出较高的扩散率, 可能会造成细胞膜受损, 或者影响与其他细胞内生物分子的相互作用, 甚至会降低细胞的存活率^[17]。

目前, MeJA 诱导微生物产三萜的机制已经明确, 这些萜类化合物都是由单个异戊二烯通过甲羟戊酸途径合成得到的, MeJA 能够促使甲羟戊酸途径中 *hmgs*、*hmgr*、*mvd*、*fps*、*sqs*、*osc*、*lss* 和 *ss* 等相关酶基因的超表达^[18-21]。以茯苓为研究对象, 探究 MeJA 诱导其产三萜的效果及机制发现, 于发酵第 4 天添加 MeJA 溶液 (150 $\mu\text{mol/L}$), 可使得到的三萜含量较空白组增加 0.55 倍; 实时荧光定量 PCR 分析可知, 其 *sqs* (甲基戊酸途径鲨烯合酶基因) 和 *fps* (法尼基焦磷酸合成酶基因) 的表达水平均发生了显著上调^[22]。任昂也以灵芝为材料, 探究了在三萜的生物合成途径中, 关键酶编码基因转录受 MeJA 的影响, 结果表明, *hmgr*、*fps*、*sqs*、*osc* 等基因均被诱导表达^[23]。

钙有多种生物学功能, 是非常重要的第二信使, 通过改变细胞质中游离的 Ca^{2+} 浓度, 可以将细胞表面上接收的信号传递到细胞内, 并由一系列效应器接收和分析, 调节生物生长、发育等生理反应^[24], 在微生物中, Ca^{2+} 经常作为活性酶的辅助因子或激活因子发挥作用^[25]。在本研究中, 同时添加 MeJA、 CaCl_2 时, 牛樟芝发酵后的生物量、三萜含量、胞外多糖和胞内多糖含量较单独添加 MeJA 及其他试验组明显提高。结果表明, Ca^{2+} 对 MeJA 诱导牛樟芝发酵产三萜等有用物质起到了积极的介导作用, 这与王艳用 Ca^{2+} 介导 MeJA 诱导白桦悬浮培养产三萜的试验结果相似^[26]。

参考文献:

- [1] 胡 鸥, 张君逸, 卢 喜. 樟芝及其研究开发概况[J]. 福建热作科技, 2006, 31(4): 40-42.
- [2] 马晓蕾. 台湾红宝石——牛樟菇[J]. 中国商贸, 2013(19): 42-43.
- [3] 张知晓, 季 梅, 泽桑梓. 牛樟芝培养技术的研究进展[J]. 热带农业科学, 2015, 35(3): 94-99.
- [4] 于 宏. 樟芝化学成分与生物活性研究进展[J]. 国外医药: 植物药分册, 2006, 21(5): 199-202.
- [5] 朱宏涛, 李 江, 李 元, 等. 激素类农药茉莉酸及其甲酯的植物生物活性及其在农业生产中的应用[J]. 农药, 2013, 52(8): 552-557, 562.
- [6] Ren A, Qin L, Shi L, et al. Methyl jasmonate induces ganoderic acid biosynthesis in the basidiomycetous fungus *Ganoderma lucidum*[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(17): 6785-6790.
- [7] 向 超. 液体深层发酵培养的桦褐孔菌三萜化合物的生物合成研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2011.
- [8] 朱纵宇. 钙的生理作用及钙肥的施用方法[J]. 西北园艺, 2015(6): 5-8.
- [9] 马泓思, 潘亚婕, 王 艳, 等. Ca^{2+} 在介导 MeJA 诱导白桦悬浮培养三萜合成中的作用[J]. 植物研究, 2015, 35(1): 117-126.
- [10] 姚秀英. 牛樟芝人工培养条件的初步研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2011: 37-39.
- [11] 杨彬君, 吴建国, 吴岩斌, 等. 紫外分光光度法测定牛樟芝子实体的总三萜含量[J]. 福建中医药, 2018, 49(4): 70-71.
- [12] 高玉梅. 香菇液体发酵培养胞外多糖高产菌株的筛选及抗氧化活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2009: 27-28.
- [13] 叶丽云, 林 强, 刘 梅, 等. 钙离子和水杨酸诱导灵芝多糖和三萜的合成[J]. 菌物学报, 2017, 36(2): 220-228.
- [14] 徐 伟, 严善春. 茉莉酸在植物诱导防御中的作用[J]. 生态学报, 2005, 25(8): 2074-2082.
- [15] 辛燕花, 张铁丹, 杨龙龙, 等. 外源茉莉酸甲酯对灵芝多糖及灵芝酸含量的影响[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2017, 37(9): 656-662.
- [16] 杨文建, 杜恒君, 胡秋辉. 一种提高双孢蘑菇中麦角甾醇含量的方法: 105706741[P]. 2016-06-29.
- [17] 陈 程. 诱导剂对桦褐孔菌深层发酵生物合成三萜化合物的影响[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2014.
- [18] Ding Y X, Ouyang X, Shang C H, et al. Molecular cloning, characterization, and differential expression of a farnesyl diphosphate synthase gene from the basidiomycetous fungus *Ganoderma lucidum*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2008, 72(6): 1571-1579.
- [19] Shang C H, Shi L, Ren A, et al. Molecular cloning, characterization, and differential expression of a lanosterol synthase gene from *Ganoderma lucidum*[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2010, 74(5): 974-978.
- [20] Shang C H, Zhu F, Li N, et al. Cloning and characterization of a gene encoding HMG-CoA reductase from *Ganoderma lucidum* and its functional identification in yeast[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2008, 72(5): 1333-1339.
- [21] Zhao M W, Liang W Q, Zhang D B, et al. Cloning and characterization of squalene synthase (SQS) gene from *Ganoderma lucidum*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17(7): 1106-1112.
- [22] 陈 林, 崔培梧, 鲁耀邦, 等. 茉莉酸甲酯对茯苓三萜生物合成的调控研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(6): 606-610.
- [23] 任 昂. 茉莉酸甲酯对灵芝三萜生物合成的影响及其灵芝应答基因的差异表达研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 31.
- [24] 余朝闻, 李天来, 张亢亢, 等. 钙对茉莉酸甲酯诱导番茄抗灰霉病及防御酶活性的调控作用[J]. 中国蔬菜, 2012, 3(18): 166-170.
- [25] 庞建勋. 产脂肪酶微生物的筛选及钙对其发酵产酶与酶学性质的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2008: 7-8.
- [26] 王 艳. 钙离子在 SA 和 MeJA 诱导白桦三萜合成中的作用及机制[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014: 21.