



# LED光源的不同光质对灵芝菌丝体生长及抗氧化酶活性的影响

王立华, 陈向东, 王秋颖, 郝俊江, 兰进\*

(中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193)

**[摘要]** 目的:研究不同光质对灵芝菌丝体生长及抗氧化酶活性的影响,为灵芝菌丝体培养提供科学的理论依据。方法:采用新型半导体发光二极管(LED)光源设置不同光质处理,动态观测灵芝菌丝体生长、多糖含量及抗氧化酶活性变化。结果:蓝光处理及黑暗对照条件下灵芝菌丝体生长较快,黑暗对照条件下菌丝体形态纤细、菌落淡薄,蓝光、白光处理菌丝体粗壮、菌落浓密。白光处理菌丝体生物量积累最高,蓝光次之。绿光处理灵芝菌丝体 POD 酶活性波动变化较大,生长中后期显著高于其他处理。白光处理菌丝体 CAT 酶在生长过程中始终保持较高活性。生长前期黄光处理菌丝体 SOD 酶活性最高,后期黑暗对照 SOD 酶活性较高。前期绿光处理菌丝体多糖含量较高,生长后期蓝光处理菌丝体多糖含量显著高于其他处理。结论:光质影响灵芝菌丝体生长代谢,蓝光利于灵芝菌丝体生长代谢。

**[关键词]** 灵芝;光质;发光二极管;生长;抗氧化酶活性;灵芝多糖

光作为重要的环境因子,通过光强、光周期和光质影响生物生存与发展。光质即不同波长光谱成分<sup>[1]</sup>。近年来,国内外有关光质的研究已成为热点<sup>[2-3]</sup>,但关于真菌方面研究报道较少。

灵芝 *Ganoderma lucidum* 属担子菌纲、多孔菌目、多孔菌科、灵芝属真菌,在我国有 2 000 多年药用历史,其子实体、孢子、菌丝体均可入药<sup>[4]</sup>。传统上灵芝菌丝体在黑暗条件下培养,本文选用光质纯、光效高、波长固定、发热低<sup>[5]</sup>的发光二极管(LED)光源设置光质条件,研究不同光质处理灵芝菌丝体生长及抗氧化酶活性差异,为灵芝菌丝体培养提供理论依据。

## 1 材料

供试菌株 S<sub>3</sub> 灵芝菌株,由中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所生物发酵实验室提供,该菌株经太空搭载,具有优质高产特性和稳定遗传性。

## 2 方法

### 2.1 光质选择及处理条件

LED光源购自淄博曙光科技公司,功率 24 W,分为红光 R、蓝光 B、黄光 Y、绿光 G 及白光 W 5 个处理,设黑暗为对照。不同光质波长采用美国产 ASD FieldSpec HandHeld 光谱分析仪测定。培养架高度一致,光源均匀分布于顶部,外层由黑色遮光材料覆盖。

### 2.2 培养基及培养条件

**2.2.1 供试培养基** ①母种培养基:保藏母种采用 PDA 培养基。②实验培养基:每 1 L 水中加入麸皮 50 g(煮后滤汁);葡萄糖 20 g;马铃薯 100 g(煮后滤汁);琼脂粉 16 g;Vit B<sub>1</sub> 20 mg;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5 g;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g,pH 约 7.0。

**2.2.2 培养条件** 超净工作台下,将实验培养基定量装入直径 12 cm 的培养皿中,装液量 50 mL。凝固后,接入菌龄一致直径 1 cm 的圆形母种菌块。不同光质处理培养 12 d,培养温度 25 ℃。

### 2.3 灵芝菌丝体生长速度及生物量测定

**2.3.1 生长速度观测** 培养后第 4 天起,不同光质处理随机取样,采用十字交叉法每 1 d 测定 1 次菌落直径并观察各处理菌落形态至第 12 天结束,每个处理重复 3 次。

**2.3.2 生物量测定** 培养后第 6 天起,不同光质处理随机取样,采用烘干恒重法每 2 d 测其生物量 1 次至第 12 天结束,每个处理重复 3 次。

[稿件编号] 20110419004

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173660)

[通信作者] \* 兰进, Tel/Fax: (010) 62899723, E-mail: lanjin60@hotmail.com

[作者简介] 王立华, 硕士研究生, 主要从事药用真菌生理生化研究



## 2.4 灵芝菌丝体 POD, CAT, SOD 酶活性测定

培养后第6天起,不同光质处理每2 d 随机取样1次。至第12天结束,分别测其POD, CAT, SOD酶活性。

**2.4.1 POD 酶活性测定** 准确称取鲜重样品0.1 g,加入3 mL PBS 缓冲液(pH 6.0)冰浴研磨,于4 °C 下10 000 r · min<sup>-1</sup>离心15 min,取上清液即酶提取液,采用“愈创木酚法”<sup>[6]</sup>测定其POD酶活,每个处理重复3次。

**2.4.2 CAT 酶活性测定** 准确称取鲜重样品0.1 g,加入3 mL PBS 缓冲液(pH 7.8)冰浴研磨,于4 °C 下8 000 r · min<sup>-1</sup>离心15 min,取上清液即酶提取液,采用Cakmark 方法<sup>[7]</sup>测定其CAT酶活,每个处理重复3次。

**2.4.3 SOD 酶活性测定** 准确称取鲜重样品0.1 g,加入3 mL Tris 缓冲液(pH 8.2)冰浴研磨,于4 °C 下4 000 r · min<sup>-1</sup>离心15 min,取上清液即酶提取液,采用“邻苯三酚自氧化法”<sup>[8]</sup>测定其SOD酶活,每个处理重复3次。

## 2.5 灵芝菌丝体多糖含量测定

培养后第6天起至第12天结束,不同光质处理每2 d 随机取样1次,于60 °C 烘干至恒重,粉碎,过60目筛,作为测定菌丝体多糖含量样品。精确称取样品0.1 g 加入10 mL 无水乙醇,60 °C 恒温水浴30 min。过滤取滤渣,加入20 mL 蒸馏水,95 °C 恒温水浴振荡提取2 h,过滤,取滤液定容至25 mL,得待测样品溶液。以葡萄糖浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 5.832X - 0.0328 (R^2 = 0.9941)$ 。采用苯酚-硫酸法<sup>[9]</sup>对各处理样品多糖含量进行测定,每个处理重复3次。

## 2.6 数据分析

采用SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行统计分析。Duncan 新复极差法比较各处理间及处理与对照间差异。

## 3 结果与分析

### 3.1 LED 光质对灵芝菌丝体生长影响

黑暗对照条件下灵芝菌丝体前期生长较快,后期生长速度明显下降。培养后第9天黑暗对照和蓝光处理灵芝菌丝体长满培养皿,菌落直径达12 cm。绿光处理菌丝体生长最慢,至第9天菌落直径仅9.12 cm。菌落形态方面,黑暗对照条件下菌落生长

淡薄,菌丝纤细呈螺旋状。蓝光、白光处理菌落生长浓密,菌丝呈匍匐状。红光处理菌落轮纹状生长,菌丝呈绒毛状,见图1。

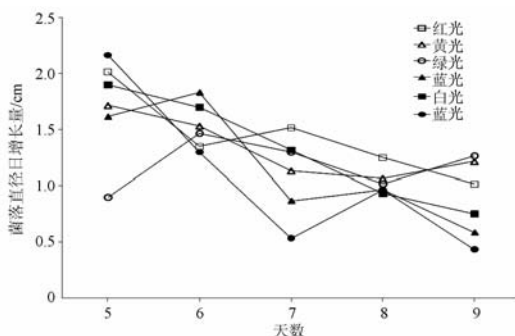


图1 不同光质处理5~9 d 菌落直径日增长变化

### 3.2 LED 光质对灵芝菌丝体生物量积累影响

灵芝菌丝体生长过程中生物量积累呈“S”形变化,前期积累较快,中期积累速度放缓,后期有所升高。白光处理灵芝菌丝体在整个生长过程中生物量始终保持最高,蓝光处理次之。黄光、绿光处理菌丝体在生长中期生物量积累较高,后期积累速度下降明显,见图2。

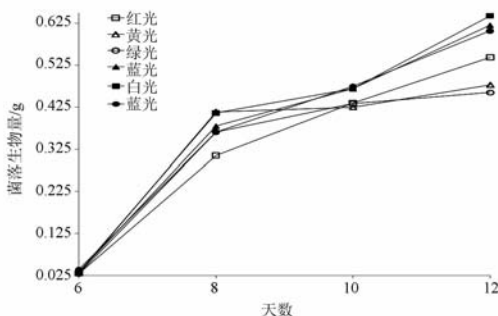
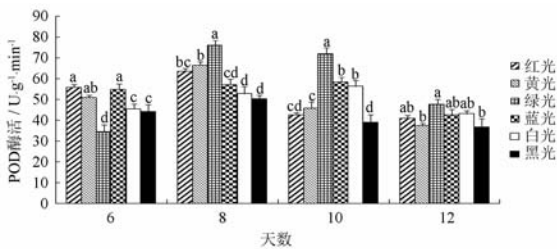


图2 不同光质处理6~12 d 灵芝菌落生物量积累变化

### 3.3 LED 光质对灵芝菌丝体抗氧化酶活性影响

**3.3.1 对POD酶活性影响** 不同LED光质处理灵芝菌丝体POD酶活性总体表现先升后降趋势。培养至第8天红光、黄光、绿光及黑暗对照条件下POD酶活性均达到最大值。绿光处理灵芝菌丝体POD酶活性变化较大,第6天绿光处理菌丝体POD酶活性显著低于其他处理,第8天和第10天其POD酶活性显著高于其他处理。黑暗对照条件下菌丝体在整个生长过程中POD酶始终表现较低活性,见图3。



柱体间不同字母差异显著 ( $P < 0.05$  图 4,5 同)。

图 3 不同光质处理 6~12 d 灵芝菌丝体 POD 酶活变化

**3.3.2 对 CAT 酶活性影响** 各 LED 光质处理灵芝菌丝体 CAT 酶活性总体表现逐渐降低趋势。培养至第 6 天各光质处理菌丝体 CAT 酶活性均达到最高,大小依次为绿光 > 白光 > 蓝光 > 黑暗对照 > 黄光 > 红光,见图 4。第 8 天白光处理菌丝体 CAT 酶活性显著高于其他处理及黑暗对照。红光处理灵芝菌丝体生长前期 CAT 酶表现较低活性,后期黄光处理 CAT 酶活性较低。

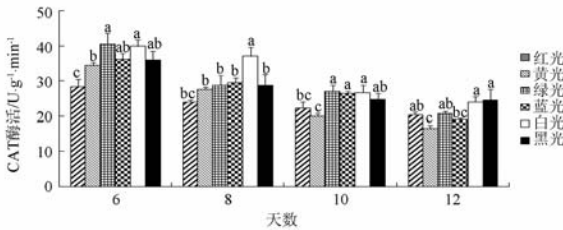


图 4 不同光质处理 6~12 d 灵芝菌丝体 CAT 酶活变化

**3.3.3 对 SOD 酶活性影响** 灵芝菌丝体 SOD 酶活性随培养时间延长逐渐升高。黄光处理菌丝体第 10 天 SOD 酶活性达到最高且显著高于其他处理及黑暗对照,第 12 天其酶活性有所下降。其他处理及黑暗对照条件下菌丝体至第 12 天 SOD 酶活性达到顶峰,第 12 天黑暗对照条件下灵芝菌丝体 SOD 酶活性最高,达到  $104.04 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,见图 5。

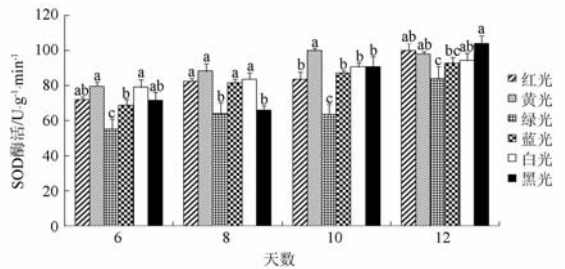


图 5 不同光质处理 6~12 d 灵芝菌丝体 SOD 酶活变化

**3.4 LED 光质对灵芝菌丝体多糖含量影响**

不同 LED 光质处理灵芝菌丝体多糖含量达到最大值的时间不同。绿光处理第 8 天菌丝体多糖含量达到最大,显著高于其他处理及黑暗对照。蓝光处理第 10 天菌丝体含量最高且显著高于其他处理及黑暗对照。黑暗对照条件下菌丝体多糖含量始终保持较低水平,见表 1。

表 1 不同光质处理 6~12 d 灵芝菌丝体多糖含量变化 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

光质	第 6 天	第 8 天	第 10 天	第 12 天
红光	21.94 ± 0.59ab	22.54 ± 0.76b	24.11 ± 0.35b	23.14 ± 0.81a
黄光	18.62 ± 0.72c	19.94 ± 0.97c	19.80 ± 1.04c	19.09 ± 0.32b
绿光	20.66 ± 0.35b	27.85 ± 0.61a	19.40 ± 0.70c	19.98 ± 1.29b
蓝光	22.24 ± 0.92a	22.99 ± 0.93b	27.16 ± 1.32a	23.10 ± 0.96a
白光	19.02 ± 0.53c	20.64 ± 0.90c	19.61 ± 0.86c	19.39 ± 0.83b
黑暗对照	16.37 ± 1.07d	17.75 ± 0.92d	17.14 ± 0.57d	16.04 ± 0.78c

注:同一列不同小字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

**4 讨论**

研究发现,蓝光处理和黑暗对照条件下灵芝菌丝体生长较快,黑暗对照条件下菌丝体形态呈螺旋状、菌落淡薄,生物量积累较慢。白光和蓝光处理灵芝菌落浓密,菌丝体生长粗壮呈匍匐状且生物量积累较快,其中白光处理生物量积累最快。可见,混合光照射灵芝菌丝体生长可加快其生物量积累。不同

光质处理灵芝菌丝体多糖含量最高值出现的时间不同,综合分析蓝光利于灵芝菌丝体多糖合成。

POD, CAT, SOD 是生物体内主要保护酶类,有清除自由基,维持膜系统完整性,减轻不良环境对生物伤害等作用。研究表明,不同光质处理灵芝菌丝体 POD, CAT 酶活性高峰分别出现在第 6 天和第 8 天,结合菌丝体生长速度和生物量积累分析,此时期

正值菌丝体生长高峰。这与文献报道<sup>[10-11]</sup>,愈伤组织 POD, CAT 活性最高值标志其生长高峰到来的观点基本一致。绿光在灵芝菌丝体生长中后期 POD 酶活性保持较高水平,说明绿光对菌丝体生长形成逆境。第6天不同光质处理菌丝体 CAT 酶活均达到最高值,白光处理菌丝体 CAT 酶活始终高于其他处理和黑暗对照,表明白光下菌丝体过早老化。灵芝菌丝体生长过程中 SOD 酶活性随培养时间延长逐渐升高,与植物生长过程中 SOD 酶活变化出现2个波峰的结论<sup>[12]</sup>不一致,初步推测是植物与真菌遗传背景和代谢途径差异造成。整个生长过程中黄光处理菌丝体 SOD 酶始终处于较高水平,表明黄光不利于灵芝菌丝体生长。

#### [参考文献]

- [1] 李慎英. 花果蔬菜快速繁殖新技术[M]. 2版. 北京: 中国人事出版社, 1996:63.
- [2] C D Onofrio, S Morini, G Bellocchi. Effect of light quality on somatic embryogenesis of quince leaves[J]. Plant Cell, Tissue Organ Cult, 1998, 53:98.
- [3] Qian Li, Chieri Kubota. Effects of supplemental light quality on growth and phyto-chemicals of baby leaf lettuce[J]. Environ Exp Bot, 2009, 67:64.
- [4] 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.
- [5] Wu Mingchang, Hou Chiyao, Jiang Chiiming, et al. A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings[J]. Food Chem, 2007, 101:1758.
- [6] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000:164.
- [7] Cakmark I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves[J]. Plant Physiol, 1991, 98:1222.
- [8] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997:217.
- [9] 李晓辉, 李书平, 何云庆, 等. 灵芝多糖的含量测定研究[J]. 中草药, 1997, 28(9):530.
- [10] Lai Z X, Chen Z G. Progress in biotechnology research[J]. Acta Horticulturae, 2001, 558:137.
- [11] 靳占忠, 侯占铭. 红花的愈伤组织诱导及其与过氧化物酶和酯酶同工酶的关系[J]. 植物生理学通讯, 1989, 3:15.
- [12] 林小苹, 赖钟雄, 黄浅. 不同光质对龙眼胚性愈伤组织生长和细胞膜保护酶活性的影响[J]. 福建农林大学学报, 2008, 37(3):253.

## Effect of different light of LED light quality on growth and antioxidant enzyme activities of *Ganoderma lucidum*

WANG Lihua, CHEN Xiangdong, WANG Qiuyin, HAO Junjiang, LAN Jin\*

(The Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of light quality on growth, antioxidant enzyme activities of *Ganoderma lucidum* mycelium. **Method:** *G. lucidum* mycelium was cultured under different light qualities by light emitting diodes(LED). The growth *G. lucidum* mycelium was observed and antioxidant enzyme activities was determined in different growth periods. **Result:** Under the red LED, the blue LED and dark condition(CK), the mycelium grew faster than that under other light qualities. The white LED resulted in a largest increase in the amount of the mycelium and always kept the activities of CAT high level. Major fluctuations of POD activities emerged under the green LED, while enhanced severely in the late phase. Under the yellow LED, the activities of SOD appeared high level. However, SOD activities on dark(CK) raised obviously in late period. At the late stage, the content of mycelium polysaccharides was significant higher than that under the blue LED. **Conclusion:** The light quality could influence the growth and metabolism of *G. lucidum* mycelium.

[Key words] *Ganoderma lucidum*; light quality; LED; growth; antioxidant enzyme activities; *Ganoderma lucidum* polysaccharide

doi:10.4268/cjcmm20111804

[责任编辑 吕冬梅]