

灵芝子实体、菌丝体和孢子粉化学成分的比较

于华峥^{1,2}, 刘艳芳¹, 周 帅¹, 张 忠¹, 王晨光¹, 唐庆九^{*1}, 张劲松¹

(1. 上海市农业科学院 食用菌研究所, 上海 201403; 2. 上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要: 为探讨灵芝子实体、菌丝体和孢子粉中化学成分的差异, 主要对 3 种材料中的蛋白质、氨基酸、葡萄糖、糖醇、核苷以及三萜等成分含量进行测定, 并对三萜的 HPLC 指纹图谱进行相似度分析。结果发现, 灵芝孢子粉中蛋白质质量分数最高为 11.1%, 而菌丝体中蛋白质质量分数最低为 7.1%。灵芝子实体中灵芝三萜含量高, 种类全, 而菌丝体中的三萜种类少, 含量低, 同时未破壁的孢子粉中基本测不到灵芝三萜。糖醇含量也有差别, 菌丝体中有较高含量的阿糖醇, 而在未破壁孢子粉和子实体中, 都是甘露醇含量较高。同时发现 3 种材料所含核苷的类别、含量均不同。实验结果表明, 灵芝子实体、菌丝体和孢子粉 3 种材料的化学成分差异大, 在保健品使用上应区分使用。

关键词: 灵芝; 化学成分; 指纹图谱比较

中图分类号: S 646; Q 51/57 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)08—0823—05

Difference of Chemical Components in Fruiting Body, Mycelium and Spore Powder of *Ganoderma lingzhi*

YU Huazheng^{1,2}, LIU Yanfang¹, ZHOU Shuai¹, ZHANG Zhong¹,
WANG Chenguang¹, TANG Qingjiu^{*1}, ZHANG Jingsong¹

(1. Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; 2. College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: The study aimed to compare the chemical compositions of fruiting body, mycelium and spore powder of *Ganoderma lingzhi*. Contents of proteins, amino acids, glucose, sugar alcohols, nucleosides and triterpenes were determined, and the HPLC fingerprints of triterpenes were analyzed by similarity. Results indicated that spore powder had the highest protein content of 11.1 % and mycelium possessed the lowest of 7.1 %. *Ganoderma lingzhi* triterpenoids occurred in fruit body with the highest content and diverse varieties but with low content and less varieties in mycelium and were hardly detected in unbroken spore powder. The content of arabitol was higher than those of other sugar alcohols in mycelium, whereas in unbroken spore powder and fruit body mannitol contents were relatively higher. Varieties and contents of nucleosides also differed in three samples. The study demonstrated the difference of chemical components in three portions of *Ganoderma lingzhi* and

收稿日期: 2015-03-09

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2013BAD16B08-02)。

* 通信作者: 唐庆九(1969—), 女, 江苏建湖人, 理学博士, 研究员, 主要从事药用真菌的研发。E-mail: tangqingjiu@saas.sh.cn

indicated that they should be distinguished when applied in health care products.

Keywords: *Ganoderma Lingzhi*, chemical component, fingerprint comparison

灵芝(*Ganoderma lingzhi*)是担子菌门、伞菌纲、多孔菌目、灵芝科、灵芝属真菌^[1],早在《神农本草经》就记载其具有扶正固本、滋补强壮、延年益寿等功效^[2]。现代研究发现,灵芝在抗肿瘤^[3]、免疫调节^[4]、镇静安神、抗心肌缺血、调节血脂等方面均有较好的疗效^[5],也是目前国内保健品主要原料之一^[6]。2010年版《中国药典》规定,灵芝药材来源于赤芝或紫芝的干燥子实体^[7],但灵芝孢子粉和灵芝菌丝体往往也作为灵芝原料应用于保健品及药品中,随着孢子粉产量的大幅度提高,灵芝孢子粉在保健产品中的应用已超过子实体。

前期研究比较了灵芝子实体、孢子粉及菌丝体3种材料中多糖成分的差异,发现三者多糖含量、单糖组成、HPLC图谱中的多糖出峰位置和相对分子质量及免疫活性等方面差异很大^[8]。灵芝中主要的活性成分除多糖外还含有三萜类、氨基酸、核苷等多种化学成分。因此,通过对灵芝菌株G0109分别进行液体发酵、栽培及孢子粉收集,获得来自同一菌株的菌丝体、子实体和孢子粉,对其所含蛋白质、氨基酸、糖醇、核苷等含量进行测定并比较;同时对三者所含三萜的指纹图谱进行对比,探讨这3种材料中化学基础的差异,为将来产品开发的原料选择提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

G0109菌株,源于上海市农业科学院食用菌研究所菌种保藏中心;灵芝子实体和孢子粉材料,采收获自G0109菌株,由浙江龙泉灵芝基地栽培;菌丝体,由上海市农业科学院食用菌研究所发酵G0109菌株获得。

3,5-二硝基水杨酸、氯化钠、浓硫酸、葡萄糖、亚硫酸钠、氢氧化钠、酒石酸钾钠、乙醇、硝酸钠、磷酸二氢钠,均为国产分析纯试剂;苯酚,国产分析纯试剂,重蒸馏后使用;甘露醇、阿拉伯糖醇、赤藓糖醇和葡萄糖标准物质,美国Sigam公司制品;水为去离子水,甲醇为分析纯,灵芝酸A、B、C2、DM、S、T、R及灵芝醇B和灵芝酮三醇,均由作者所在实验室分

离纯化制备获得。

1.2 仪器与设备

756型紫外分光光度计,上海第三分析仪器厂制造;KQ-600B超声清洗器,昆山市超声仪器有限公司制造;H. H. S热恒温水浴锅,上海医疗器械五厂制造;高效液相色谱系统,Waters公司制造;W-80型漩涡混合器,上海精科实业有限公司制造;FA2004N电子天平,Synergy HT多功能酶标仪,BIO-TEK公司制造;Centrifuge 5810R高速冷冻离心机,Eppendorf公司制造;Büchi Vacuum Controller V-800型旋转蒸发仪,BUCHI公司制造;ICS-2500型高效离子色谱仪,美国Dionex公司制造。

1.3 方法

1.3.1 蛋白质含量的测定 参照国家标准GB/T 15673—2009进行测定,蛋白质的含量按照氮含量的4.38倍计。

1.3.2 氨基酸含量的测定 参照GB/T 5009.124—2003进行分析测定。

1.3.3 葡萄糖和糖醇含量的测定 参照文献[9]进行单糖及糖醇的测定,运用高效阴离子色谱法,色谱条件为:色谱柱采用Dionex公司CarboPacMAI检测柱(4 mm×250 mm),流动相为水(A)-氢氧化钠(B),等梯度洗(0~40 min,体积分数52% A,体积分数48% B),体积流量0.40 mL/min,上样量25 μL,柱温30℃。

1.3.4 三萜含量测定及HPLC指纹图谱的比较 参照文献[10]进行灵芝三萜的含量测定和HPLC指纹图谱分析,色谱条件:色谱柱为Agilent ZORBA×SB-AQ (4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为质量分数0.01%冰醋酸(B)-乙腈(C),梯度洗脱(0~40 min,体积分数60% B,体积分数40% C);体积流量1 mL/min;柱温30℃;进样量20 μL。将检测出的色谱数据以cdf格式文件导出,并将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版”作相似度计算。

1.3.5 核苷含量的测定 参照文献[11]进行分析测定,色谱条件:色谱柱为Ultimate[®] LP-C18(4.6 mm×250 mm);流动相为水(B)-甲醇(C),梯度洗脱(0~40 min,体积分数100% B,0% C);体积流量1 mL/min;

柱温30℃;进样量10 μL。根据标准曲线计算不同核苷的含量。

2 结果与分析

2.1 蛋白质及其氨基酸的质量分数比较

运用凯氏定氮法对灵芝子实体、菌丝体和孢子粉中蛋白质的量进行测定,发现(见图1)未破壁孢子粉、子实体和菌丝体中差别明显,其中灵芝孢子粉中蛋白质量最高,达到质量分数11.1%,灵芝菌丝体中蛋白质质量分数最低,仅为7.1%。

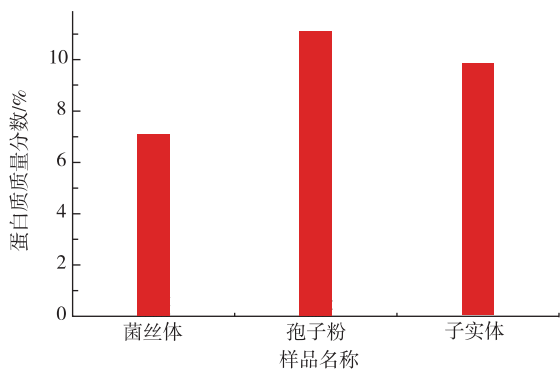


图1 各样品中蛋白质的含量比较

Fig. 1 Comparison of protein contents

运用离子色谱对灵芝子实体、菌丝体或孢子粉中氨基酸进行检测,结果如表1显示,3种样品中含有的氨基酸比率有所不同,并且含有大部分必需氨基酸。其中菌丝体中总氨基酸质量分数是最高的,达6%左右;而龙泉子实体总氨基酸质量分数最低,只有3%左右。

2.2 甘露醇、阿糖醇、赤藓糖醇和葡萄糖质量分数比较

运用高效阴离子色谱对灵芝子实体、菌丝体和孢子粉中单糖及糖醇进行分析,结果发现这3种材料中均含甘露醇、阿糖醇、赤藓糖醇和葡萄糖(表2),但含量相差较大。葡萄糖在菌丝体中含量最高,在子实体中含量最低,并且含量差别明显;甘露醇在孢子粉中含量最高,在子实体中含量最低;阿糖醇在菌丝体中含量高,在子实体中含量低。

2.3 三萜类成分的质量分数及 HPLC 图谱的比较

运用高效液相色谱对3种材料中的三萜类成分进行分析测定,根据标准品计算出的几种灵芝三萜含量如表3所示,子实体含有检测所获8种三萜,其中灵芝酸A、B和C的含量较高,而菌丝体中

三萜主要为灵芝酸S,基本不含有子实体中的灵芝酸A、B和C,而孢子粉中三萜类成分非常少,仅有微量的灵芝醇B。

表1 灵芝菌丝体、子实体和孢子粉中氨基酸质量分数

Table 1 Contents of amino acids in fruiting body, mycelium and spore powder of *Ganoderma lingzhi*

氨基酸	质量分数/(mg/g)		
	菌丝体	孢子粉	子实体
Asp	7.49±0.04	6.27±0.06	2.95±0.03
Thr	4.10±0.03	3.27±0.04	1.78±0.02
Ser	3.85±0.05	3.36±0.03	1.76±0.01
Glu	9.18±0.07	6.93±0.05	3.28±0.02
Gly	3.84±0.02	3.10±0.02	1.69±0.03
Ala	4.56±0.02	3.97±0.04	1.76±0.02
Cys	0.23±0.01	0.05±0.01	0.12±0.00
Val	3.68±0.04	3.14±0.04	1.53±0.03
Met	0.29±0.00	nd	0.07±0.00
Leu	4.56±0.05	4.53±0.05	2.09±0.01
Tyr	2.66±0.02	2.22±0.01	2.10±0.03
Phe	3.35±0.06	2.45±0.02	1.27±0.01
Lys	2.94±0.03	3.48±0.04	1.36±0.02
His	1.53±0.02	1.50±0.02	0.77±0.01
Arg	3.09±0.05	3.78±0.06	1.20±0.03
Pro	2.80±0.06	2.98±0.03	1.32±0.03
EAA	18.91±0.13	16.87±0.15	8.10±0.09
Total	58.14±0.21	51.03±0.27	25.05±0.14

注:EAA代表必需氨基酸,包括表中Thr、Lys、Val、Leu、Phe、Met等6种氨基酸;nd表示未检测到。

表2 各样品中3种糖醇和葡萄糖的质量分数

Table 2 Contents of three sugar alcohols and glucose

单糖或糖醇	质量分数/(mg/g)		
	菌丝体	孢子粉	子实体
赤藓糖醇	0.18±0.04 ^a	0.04±0.00 ^b	0.01±0.00 ^b
阿糖醇	8.41±1.55 ^a	4.37±0.07 ^b	0.32±0.00 ^c
甘露醇	3.59±0.62 ^b	16.95±0.28 ^a	1.47±0.08 ^c
葡萄糖	48.61±9.73 ^a	32.84±2.34 ^b	0.95±0.06 ^c

注:*所有数值均表示为平均值±标准偏差SD(重复次数n=3);相同字母的数据表示其相互之间无显著性差异($p < 0.05$),由SAS 8.2软件通过邓肯多重范围检验分析取得。

表 3 3 种样品中三萜类成分的质量分数比较
Table 3 Contents of triterpenes in three samples

三萜类成分	质量分数/(mg/g)		
	菌丝体	子实体	孢子粉
灵芝酸 C2	—	0.59±0.04	—
灵芝酸 B	—	0.6±0.05	—
灵芝酸 A	—	2.01±0.14	—
灵芝酮三醇	0.15±0.02	0.26±0.02	—
灵芝酸 DM	0.075±0.006	0.067±0.008	0.005±0.001
灵芝酸 S	0.16±0.03	0.017±0.003	—
灵芝酸 T	0.58±0.06	0.039±0.005	—
灵芝醇 B	0.12±0.01	0.16±0.02	0.038±0.006

注:—表示未检测到。

HPLC 指纹图谱如图 2 所示,子实体的峰最多,主要集中在 60 min 以前,菌丝体 60 min 之前基本没有峰,几乎所有的峰均在 60 min 之后,而孢子粉图谱中几乎没有峰。三者的 HPLC 图谱用相似度分析发现,灵芝子实体、菌丝体或孢子粉三萜类成分的指纹图谱的相似度极低,小于 0.1(表 4)。

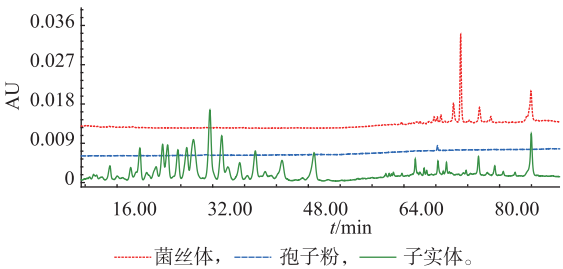


图 2 3 种样品中三萜类成分叠加 HPLC-UV 指纹图谱
Fig. 2 HPLC-UV fingerprint of triterpenes from three samples

表 4 3 种样品中三萜类成分的相似度分析

Table 4 Similarity analysis of triterpenes from three samples

样品	S1	S2	S3
S1	1		
S2	0.025	1	
S3	0.086	0.042	1

注:S1:菌丝体; S2:子实体; S3:孢子粉。

2.4 核苷类成分含量及指纹图谱的比较

运用高效液相色谱对 3 种材料中的核苷类成分进行分析测定(表 5),结果发现菌丝体核苷类成分主要有尿嘧啶、胞苷、次黄嘌呤、尿苷等,其中尿苷含量最高;孢子粉主要含尿苷和腺苷 2 种核苷,

含量也较低;而子实体中核苷种类较多,含量也较菌丝体和孢子粉中高。如图 3 所示。

表 5 各样品中核苷类成分的质量分数

Table 5 Contents of nucleosides in three samples

样品	质量分数/(mg/g)						
	尿嘧啶	胞苷	次黄嘌呤	尿苷	肌苷	鸟苷	腺苷
菌丝体	0.213	0.44	0.348	0.726	—	—	—
孢子粉	—	—	—	0.143	—	—	0.119
子实体	0.208	0.718	—	1.192	0.73	0.619	—

注:—未检测到。

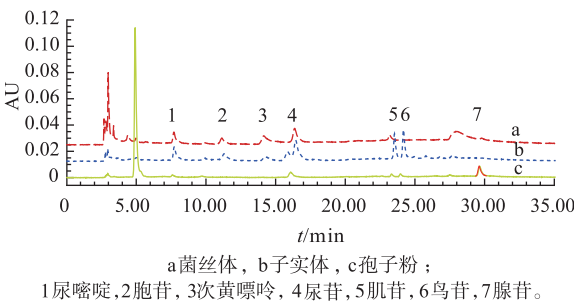


图 3 3 种样品中核苷类成分叠加 HPLC-UV 指纹图谱
Fig. 3 HPLC-UV fingerprint of nucleosides from three samples

3 结语

灵芝三萜是灵芝中的主要活性成分之一,具有抗炎、抗肿瘤等多种生理活性。大量文献报道,从灵芝子实体和菌丝体中分离纯化得到了不同的灵芝三萜。本实验中通过对灵芝子实体、菌丝体和孢子粉的三萜的含量测定及 HPLC 指纹图谱分析,发现这 3 个材料中的三萜成分含量相差很大,极性较大的灵芝酸 A、B、C2 等基本仅在子实体中,菌丝体中的三萜种类和含量均较少,而未破壁的灵芝孢子粉中基本不含灵芝三萜。

灵芝成分分析方面,商振华等^[12]文献中探讨了测定灵芝中氨基酸含量的一种方法,而并未与其他两者比较;核苷类成分的研究也有一些报道,但仅进行不同品种子实体之间的比较研究^[13],没有孢子粉和菌丝体的比较。作者所做的研究对灵芝子实体、菌丝体和孢子粉这 3 种材料进行多种化学成分的比较,结果表明,灵芝子实体、菌丝体或孢子粉的

蛋白质、氨基酸、单糖、糖醇,以及核苷类成分的含量等相差很大,说明三者的化学基础具有比较大的差异。

通过对灵芝子实体、菌丝体和孢子粉这3种材料的多种化学成分进行比较研究,了解了三者材料的化学基础异同,特别是对其中活性成分三萜的比

较,以及对核苷成分的差异的比较,发现不同来源的灵芝其化学基础差异很大,为将来更有针对性、更有效、更合理地开发灵芝产品提供一定参考。本文对3种材料中的多种成分进行了深入的探讨,为进一步了解灵芝子实体、菌丝体和孢子粉中化学成分之间的差异建立了基础。

参考文献:

- [1] 戴玉成,曹云,周丽伟,等. 中国灵芝学名之管见[J]. 菌物学报,2013,32(6):947-952.
DAI Yucheng, CAO Yun, ZHOU Liwei, et al. Notes on the nomenclature of the most widely cultivated *Ganoderma species* in China[J]. *Mycosystema*, 2013, 32(6):947-952. (in Chinese)
- [2] 游丽君,冯梦莹,刘钧发,等. 不同提取方法对灵芝多糖性质的影响研究[J]. 现代食品科技,2013,29(6):1207-1212.
YOU Lijun, FENG Mengying, LIU Junfa, et al. Characteristics of *Ganoderma lucidum* polysaccharide prepared by different methods[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(6):1207-1212. (in Chinese)
- [3] ZHAO L Y, DONG Y H, CHEN G T, et al. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 80(3):783-789.
- [4] HELENO S, BARROS L, MARTINS A, et al. Fruiting body, spores and in vitro produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts[J]. *Food Research International*, 2012, 46(1):135-140.
- [5] 林志彬. 灵芝的现代研究[M]. 第2版. 北京:北京医科大学出版社,2001:1-327.
- [6] 张劲松,贾薇,邢增涛,等. 灵芝子实体和菌丝体的提取物及其各纯化组份生物活性的比较[J]. 菌物学报,2004,23:85-92.
ZHANG Jinsong, JIA Wei, XING Zhentao, et al. Comparison of bioactivity of fruiting body and mycelia of *Ganoderma lucidum* and their purified fractions[J]. *Mycosystema*, 2004, 23:85-92. (in Chinese)
- [7] 国家药典委员会. 中国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:174.
- [8] 于华峥,刘艳芳,周帅,等. 灵芝子实体、菌丝体及孢子粉中多糖成分差异比较研究[J]. 菌物学报,2016(2):170-177.
YU Huazheng, LIU Yanfang, ZHOU Shuai, et al. Comparison of the polysaccharides from fruiting bodies, mycelia and spore powder of *Ganoderma lingzhi*[J]. *Mycosystema*, 2016(2):170-177. (in Chinese)
- [9] 周帅,薛俊杰,贾薇,等. 食用菌菌丝体中糖醇类成分含量测定的研究[J]. 菌物学报,2013,32(5):862-867.
ZHOU Shuai, XUE Junjie, JIA Wei, et al. Alditol content in edible fungal mycelia[J]. *Mycosystema*, 2013, 32(5):862-867. (in Chinese)
- [10] 冯慧琴,杨明俊,杨晓彤,等. 不同部位灵芝及子实体提取物中总三萜酸含量测定[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2013, 42(2):192-196.
FENG Huiqin, YANG Mingjun, YANG Xiaotong, et al. Determination of total triterpenoid acids in different part and extract of *Ganoderma lucidum* [J]. *Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences Edition)*, 2013, 42 (2):192-196. (in Chinese)
- [11] 张圣龙,周菁,唐庆九,等. 不同品种灵芝中4种核苷类成分的含量比较[J]. 食用菌学报,2012,19(4):67-70.
ZHANG Shenglong, ZHOU Jing, TANG Qingjiu et al. Comparative analysis of uracil, uridine, adenine and guanosine levels in the fruit bodies of different *Ganoderma lucidum* strains[J]. *Acta edulis Fungi*, 2012, 19(4):67-70. (in Chinese)
- [12] 商振华,于亿年,郭为,等. 反相高效液相色谱—紫外吸收法测定灵芝中氨基酸的含量[J]. 药物分析杂志,1994(4):30-33.
SHANG Zhenhua, YU Yinian, GUO Wei, et al. The separation of amino acids in *Glossy Ganoderma* on reversed phase column and quantitative determination with UV absorption detector [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 1994(4):30-33. (in Chinese)
- [13] 任为之,姜雯. 毛细管电泳法测定灵芝中核苷类成分的含量[J]. 中外医学研究,2009(7):25-27.
REN Weizhi, JIANG Wen. Determination of nucleosides in *Ganoderma* by CE[J]. *Chinese and Foreign Medical Research*, 2009 (7):25-27. (in Chinese)