

# 提高羊肚菌液态发酵三萜含量的诱导条件优化

朱永乐<sup>1</sup>, 高梦祥<sup>1</sup>, 李利<sup>1</sup>, 张佳兰<sup>2\*</sup>

(1. 长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434025) (2. 长江大学动物科学学院, 湖北荆州 434025)

**摘要:** 为了充分综合利用羊肚菌资源, 提高羊肚菌三萜含量, 该研究通过单因素试验确定多种诱导子提高羊肚菌液体发酵时三萜含量的最佳条件, 通过响应面法来优化多种诱导子对羊肚菌液态发酵三萜含量的促进条件, 并对三萜合成途径中的两种关键酶的酶活进行了测定。结果表明, 最佳处理为磁场强度 2.81 mT、赤霉素 0.56 g/L、水杨酸 214.54 mmol/L。在此条件下, 羊肚菌三萜的积累量最大达到 60.26 mg/g, 是优化前的 160.72% (*m/m*), 法尼基焦磷酸合成酶 (SS) 酶活和鲨烯合酶 (FPS) 酶活分别为 39.93 IU/L 和 71.08 IU/L 分别是对照组的 190.85% 和 178.02% (*m/m*)。因此, 采用磁场、赤霉素结合水杨酸作为处理可以显著提高羊肚菌三萜含量, 且三萜的积累是通过提高其合成途径中的两种关键酶所致。该研究为羊肚菌富集有益代谢产物的诱导剂及羊肚菌新产品的开发提供了理论依据。

**关键词:** 羊肚菌; 三萜; 诱导条件; 液态发酵; 响应面

文章编号: 1673-9078(2024)01-92-101

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.1.0145

## Optimization of Inducer Conditions for Promoting Triterpene Production in Liquid State Fermentation of *Morchella*

ZHU Yongle<sup>1</sup>, GAO Mengxiang<sup>1</sup>, LI Li<sup>1</sup>, ZHANG Jialan<sup>2\*</sup>

(1. College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

(2. College of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

**Abstract:** To fully utilize *Morchella* resources and increase its triterpene content, the optimal conditions of multiple inducers for promoting triterpene production in liquid fermentation of the fungus were determined using single-factor experiments and response surface methodology. Additionally, the activities of two key enzymes in the triterpene biosynthetic pathway were measured. According to the results obtained, the optimal treatment conditions were a magnetic field intensity of 2.81 mT, gibberellin concentration of 0.56 g/L, and salicylic acid concentration of 214.54 mmol/L. Under these conditions, the maximum concentration of triterpenes accumulated in *Morchella* was 60.26 mg/g, which was 160.72% (*m/m*) more than that before optimization. The enzymatic activities of squalene synthase and farnesyl pyrophosphate synthetase were 39.93 and 71.08 IU/L, respectively, which were 190.85% and 178.02% (*m/m*) (SS) more than that of the control group (FPS). Therefore, combined treatment with a magnetic field, gibberellins, and salicylic acid can considerably promote triterpene production by *Morchella*. Furthermore, the accumulation of triterpenes was attributed to the enhanced activity of two key enzymes in the triterpene biosynthetic pathway. This study provides a theoretical basis for the development of inducers for enriching beneficial metabolites and new products of *Morchella*.

**Key words:** *Morchella*; triterpene; inducer conditions; liquid state fermentation; response surface methodology

引文格式:

朱永乐, 高梦祥, 李利, 等. 提高羊肚菌液态发酵三萜含量的诱导条件优化[J]. 现代食品科技, 2024, 40(1): 92-101.

ZHU Yongle, GAO Mengxiang, LI Li, et al. Optimization of inducer conditions for promoting triterpene production in liquid state fermentation of *Morchella* [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(1): 92-101.

收稿日期: 2023-02-13

基金项目: 中央引导地方科技发展专项项目 (2019ZYD029)

作者简介: 朱永乐 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 发酵食品研究, E-mail: 2825724095@qq.com

通讯作者: 张佳兰 (1971-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物发酵研究, E-mail: zhangjl@yangtzeu.edu.cn

羊肚菌 (*Morchella* spp.) 作为一种大型食药两用型真菌, 不仅味道鲜美可口, 且有益于健康, 能起到抗菌、抗病毒等作用还能抑制肿瘤生长<sup>[1]</sup>。这源于其含有丰富的蛋白质、脂肪酸、萜类等有益成分<sup>[2]</sup>。其中羊肚菌三萜具有抗菌消炎、保肝、抗癌、抗病毒、降血脂和胆固醇、溶血、提高免疫力等生物活性<sup>[3,4]</sup>。

三萜化合物具有的各种功能主要来源于它的不同结构, 迄今为止报道的三萜种类已经超过 2 万种<sup>[5]</sup>。目前已知的三萜支架超过 100 种, 它们都来自简单而普遍存在的线性类异戊二烯底物 2,3-氧化角鲨烯。研究发现法尼基焦磷酸合成酶 (Squalene Synthase, SS) 和鲨烯合酶 (Farnesyl Pyrophosphate Synthetase, FPS) 是影响鲨烯合成的关键酶, 法尼基焦磷酸 (Farnesyl Diphosphate, FPP) 是三萜合成途径的关键中间产物, 是由牻牛儿基焦磷酸和异戊烯焦磷酸经过 FPS 的催化生成的, 而鲨烯则是由两分子的 FPP 经过 SS 的催化生成<sup>[6]</sup>。三萜化合物在鲨烯的基础上经过氧化还原生成 2,3-氧化角鲨烯, 再经过三萜修饰 (或裁剪) 酶 (例如细胞色素 P450s、糖转移酶和酰基转移酶) 进一步修饰, 从而形成种类多样的三萜化合物<sup>[7]</sup>。羊肚菌三萜是羊肚菌的重要功能成分, 但是野生羊肚菌资源稀少, 羊肚菌的大规模种植又受天气等环境条件的严重限制且产量不高, 因此限制了羊肚菌三萜及其他功能成分的开发利用。羊肚菌的液态发酵具有发酵周期短, 产量大的优点, 便于工业化生产, 且生长的菌丝体具有与羊肚菌子实体结构和功能基本相似的活性化合物, 因此通过羊肚菌的液体发酵法来提高菌丝体产量, 富集羊肚菌的代谢产物的研究受到研究者的青睐<sup>[8,9]</sup>。

诱导剂的添加是提高微生物次级代谢物产量的重要手段。不同的诱导剂使得细胞产生不同的刺激反应, 有些刺激反应会导致生物体内的某些次级代谢物的产生或合成增加<sup>[10,11]</sup>。植物激素作为诱导剂对真菌生长有明显的刺激作用。赤霉素 (Gibberellin, GA)、 $\alpha$ -萘乙酸 (1-Naphthylacetic Acid, NAA) 两种激素对羊肚菌的生长有不同程度的促进作用<sup>[12]</sup>; 一定浓度的 GA 和 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, 2,4-D) 对刺芹侧耳 (*Pleurotuseryngii*) 和金针菇 (*Flammulianvelutipes*) 的菌丝生长有明显的促进作用<sup>[13]</sup>。金属离子也会影响真菌的生长及次生代谢, 在灵芝 (*Ganodermalucidum*) 中加入  $\text{Ca}^{2+}$  可以诱发

钙信号的传递从而调控灵芝酸的合成<sup>[14]</sup>;  $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  可以促进灵芝多糖液态发酵<sup>[15]</sup>。此外, 一些物理因素也会影响真菌的生长及代谢。红光能够显著影响紫色红曲菌的色素及莫纳卡林等次级代谢产物的含量<sup>[16]</sup>; 0.3 mT 的磁场处理会抑制金针菇菌丝体生长<sup>[17]</sup>; 20.1 mT 的静磁场处理可以促进枝孢菌 (*Cladosporium* sp) 的能量代谢和蛋白质合成, 从而促进其生长<sup>[18]</sup>; 紫外线照射 4 min 时, 对羊肚菌和松茸 (*Tricholomamatsutake*) 的菌丝体生长有显著的促进作用<sup>[19]</sup>。

目前对羊肚菌三萜的研究较少, 各种诱导剂应用于羊肚菌发酵中也很少报道, 对于羊肚菌三萜合成途径, 以及外源诱导对羊肚菌三萜合成的影响鲜有报道。因此本研究以三萜含量为主要衡量指标, 探究磁场强度、GA、水杨酸 (Salicylic Acid, SA)、2,4-D、 $\text{Ca}^{2+}$  对羊肚菌液态发酵的菌丝体生长及三萜含量的影响, 进一步利用 Box-Behnken 响应面法优化提高羊肚菌三萜含量的诱导条件, 并利用对羊肚菌合成途径关键酶酶活的变化来探究外源诱导影响羊肚菌三萜代谢的途径, 以期对羊肚菌三萜的制备及诱导剂在羊肚菌液体发酵中的应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 实验材料

羊肚菌菌株 (Y-1), 由长江大学生命科学学院食品微生物实验室提供; 土豆, 市售; 试剂均为分析纯, 其中葡萄糖、蛋白胨、硫酸镁、磷酸二氢钾, 购自天津福晨; SA、GA、2,4-D, 购自生工生物股份有限公司; 香草醛、冰醋酸、 $\text{CaCl}_2$ , 购自上海麦克林生化科技有限公司; 而法尼基焦磷酸合成酶、鲨烯合酶, 购自上海源桔生物科技公司。

#### 1.1.2 培养基

菌种活化培养基 (g/L): 马铃薯 200.00, 葡萄糖 20.00, 蛋白胨 5.00,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.00,  $\text{MgSO}_4$  1.00, 琼脂 20.00, 固体则需加琼脂 20.00。

基础发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 20.00, 蛋白胨 5.00,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.20。

#### 1.1.3 仪器设备

UV-2600 紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; 千分之一电子天平, 上海恒平公司; Scientz-1200E 超声破碎机, 宁波新芝公司; 台式高速冷冻离心机

CFGR-B18B, 星辰(山东)科技有限公司。低频磁场发生器, 自行设计研制<sup>[20]</sup>。

## 1.2 方法

### 1.2.1 羊肚菌的液体发酵及菌丝体质量的测定

将保存的菌种接种到 PDA 培养基培养至菌丝铺满平板, 然后用菌块取样器取 0.5 cm<sup>2</sup> 大小的菌块, 接入 100 mL 的种子培养基培养 6 d 后过滤取发酵液。以 5% (V/V) 的接种量接种发酵培养基, 培养温度 25 °C、转速 150 r/min、培养 6 d。

将培养液进行抽滤并用蒸馏水重复洗涤 3 次, 冷冻干燥至恒重, 称质量。菌丝体密封保存于 -20 °C 冰箱备用。

### 1.2.2 羊肚菌三萜的提取及检测

羊肚菌三萜用总三萜含量表示。其提取制备方法如下: 称取 50 mg 提前制备好的干菌丝体与 1.5 mL 无水乙醇混匀, 超声辅助提取(温度 60 °C、超声功率 700 W) 50 min, 静置 2 h 后于 10 000 r/min 离心十分钟, 取上清待测。

采用高氯酸-冰乙酸法测总三萜<sup>[21]</sup>并稍作调整: 准确吸取 100 μL 的上清待测液于 10 mL 离心管中, 60 °C 金属浴挥干, 冷却至室温后加入 5% (m/m) 的香草醛-冰乙酸溶液(现用现配) 0.3 mL 和 1 mL 高氯酸, 混匀, 60 °C 水浴反应 20 min, 流水快速冷却至室温, 加入 5 mL 冰乙酸, 上下摇晃混匀, 以不加待测液的溶液为空白对照, 于 550 nm 处测吸光值。根据吸光度计算羊肚菌总三萜含量。

### 1.2.3 不同诱导子对羊肚菌三萜含量影响的单因素试验

#### 1.2.3.1 不同磁场强度处理

接种后将对照组与试验组同时置于恒温摇床培养 1 d, 之后将试验组放于低频磁场中分别用 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mT 的强度处理 2 d (每 12 h 取出振荡摇匀), 总共培养 6 d 后收集菌体, 测总三萜含量。

#### 1.2.3.2 不同GA添加质量浓度

于接种时在培养基中添加不同质量浓度的 GA 使得其终质量浓度为 0.004、0.04、0.40、4.0 mg/L。

#### 1.2.3.3 不同2,4-D添加质量浓度

于接种时在培养基中添加不同质量浓度的 2,4-D 使得其终质量浓度为 0.004、0.04、0.40、4.0 mg/L。

#### 1.2.3.4 不同SA添加浓度

于接种时在培养基添加 SA, 使培养基中 SA 的终浓度分别为 50、100、200、400、800 μmol/L。

### 1.2.3.5 不同CaCl<sub>2</sub>添加浓度

于接种时在培养基中添加的 CaCl<sub>2</sub> 使其添加终浓度为 1、5、10、25、125 mmol/L。

每个处理设 3 个平行, 采用单因素轮换法考察五种因素对羊肚菌三萜合成的影响。

## 1.2.4 响应面优化试验

### 1.2.4.1 Plackett-Burman (PB) 试验设计

根据单因素试验结果, 筛选 5 种不同的诱导子(磁场强度、GA 添加量、2,4-D 添加量、SA 添加量、CaCl<sub>2</sub> 添加量) 对羊肚菌液态发酵三萜的影响程度, 利用 Design Expert 10 软件设计 5 因素 3 水平的 PB 试验, PB 试验设计因素与水平见表 1。

表 1 Plackett-Burman 试验设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman experiments design

因素	-1	0	1
A-磁场强度/mT	2.0	2.5	3.0
B-GA 添加量/(mg/L)	0.04	0.4	4
C-SA 添加量/(μmol/L)	100	200	400
D-2,4-D 添加量/(mg/L)	0.04	0.4	4
E-CaCl <sub>2</sub> 添加量/(mmol/L)	5	10	25

### 1.2.4.2 Box-Behnken 中心组合试验设计

根据 PB 试验结果将磁场强度、GA 添加量、SA 添加量作为自变量, 三萜含量作为因变量, 运用 Design-Expert 12 软件设计 BBD 响应面试验, 试验因素设计与水平见表 2。

表 2 中心组合试验设计因素与水平

Table 2 Factors and levels of central composite experiments design

水平	A-磁场强度/mT	B-GA 添加量/(mg/L)	C-SA 添加量/(mmol/L)
-1	2.0	0.04	100
0	2.5	0.4	200
1	3.0	4	400

### 1.2.5 几种诱导因子对羊肚菌三萜合成影响途径初探

FPS 和 SS 是三萜合成途径的两个关键酶<sup>[22]</sup>。根据 PB 试验结果选择磁场强度、GA、SA 三个因素, 在响应面试验的基础上选择单因素试验的最佳值及左右两点为施加的处理项, 每个处理三个重复, 对 SS、FPS 的酶活性进行检测, 具体方法参照相关试剂盒说明书。

### 1.2.6 数据分析

采用 GraphPad Prism 9.0 对数据进行统计分析并作图, 利用 SPSS 分析数据显著差异性。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同磁场强度处理对羊肚菌生长及三萜含量的影响

通过前期预试验可得磁场的处理时长为 2 d, 介入时间为接种 1 d 最佳。结果如图 1 所示, 在磁场强度较低时其菌丝体质量和三萜含量都比对照组低, 随着处理强度的增加羊肚菌菌丝体质量和三萜含量呈现先增加再降低的趋势。当磁场强度为 2.5 mT 时, 菌丝体质量和三萜含量分别为 4.23 g/L、45.30 mg/g, 分别增加了 33.70% 和 18.10% (质量分数), 显著促进了羊肚菌菌丝体质量和三萜含量 ( $P < 0.05$ )。这与 Drozd 等<sup>[23]</sup>的研究一致, *Komagataeibacter xylinus* 菌株间断暴露在 50 Hz 的磁场中 6 d, 细菌纤维素产量增加 10%, 这说明适当强度的磁场处理有利于微生物的生长和代谢。外加磁场能影响细胞膜的通透性从而影响细胞的新陈代谢, 这可能是羊肚菌的菌丝体质量增加的原因<sup>[24]</sup>。

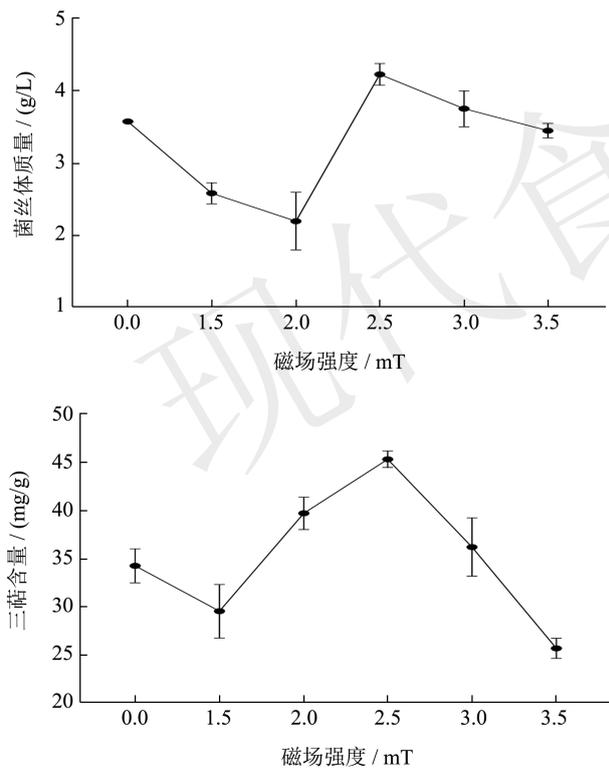


图 1 不同磁场强度处理对羊肚菌生长及三萜含量的影响

Fig.1 Effects of magnetic field intensity on *Morchella* growth and triterpene content

### 2.2 不同GA添加量对羊肚菌生长及三萜含量的影响

GA添加量对羊肚菌生长及三萜含量的影响如

图 2 所示。由图 2 可知, GA 在低质量浓度时对菌丝体质量的积累有抑制作用但对三萜含量影响不显著 ( $P > 0.05$ ), 在 0.4 mg/mL 时菌丝体质量和三萜含量分别为 3.18 g/L 和 46.54 mg/g, 与对照组相比促进效果最显著 ( $P < 0.05$ ), 分别增加了 20.99% 和 22.58% (质量分数), GA 质量浓度为 4 mg/L 时, 三萜含量和菌丝体质量降低至对照水平。Hong 等<sup>[25]</sup>发现在 GA 处理过的人参根样品中, 大部分类型的人参皂苷含量显著增加, 增加量约为 10%, 这与本文的研究结果类似。外源添加 GA 会使细胞内的活性 GA 含量增加, 从而抑制 GA 的生物合成, 使得萜类代谢流向三萜合成途径。另一方面, 外源 GA 会增强羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶的酶活性, 从而提高三萜合成的前体物质——角鲨烯的含量<sup>[24]</sup>。而且, 适当浓度的 GA 能够通过缩短细胞周期从而促进细胞分裂, 还可以通过影响木葡聚糖合成的相关基因来增加细胞壁中的木葡聚糖, 继而引起细胞伸长, GA 促进细胞分裂和伸长的效应可能促进羊肚菌的生长, 即菌丝体质量的增加。但是 GA 浓度过高又会刺激细胞产生乙烯, 引起细胞老化凋亡<sup>[26]</sup>。因此当 GA 质量浓度为 4 mg/L 时菌丝体质量下降为 2.72 g/L, 出现羊肚菌菌丝体质量下降的情况。综上所述 GA 的最佳添加比例为 0.4 mg/L。

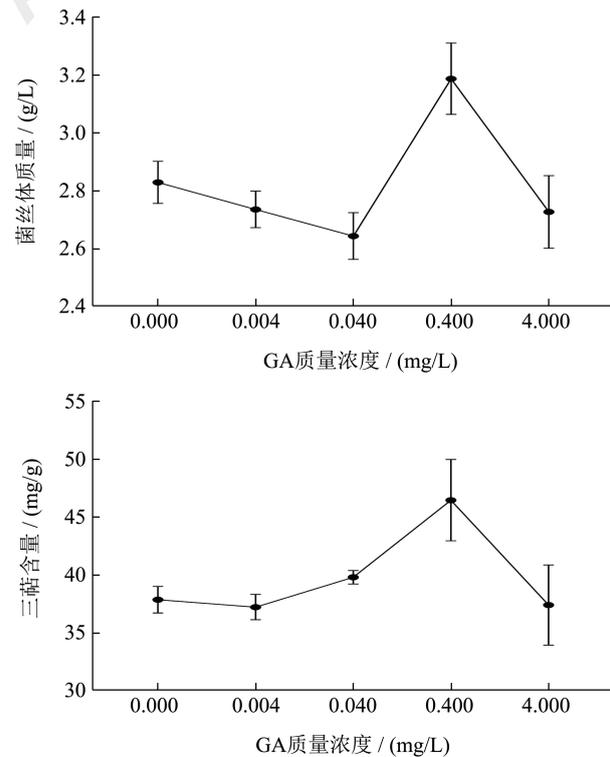


图 2 GA 添加量对羊肚菌生长及三萜含量的影响

Fig.2 Effects of GA supplemental level on growth and triterpene content of *Morchella*

### 2.3 2,4-D添加量对羊肚菌的生长及三萜含量的影响

2,4-D添加量对羊肚菌生长及三萜含量的影响如图3所示。由图3可知, 2,4-D质量浓度为0~0.04 mg/mL时对羊肚菌菌丝体质量和三萜含量无明显作用, 在质量浓度增加至0.4 mg/mL, 菌丝体质量和三萜含量分别为2.87 mg/L和41.69 mg/g, 质量分数与对照组比分别增加了14.80%和10.73%(质量分数), 促进效果显著( $P < 0.05$ ); 并且当2,4-D质量浓度继续增大, 羊肚菌的菌丝体质量和三萜含量都呈现出抑制效应。这是2,4-D类植物生长调节剂表现出的两重性, 既能促进生长又能抑制生长, 尤其当添加量过高时还会干扰体内激素平衡, 破坏核酸和蛋白质代谢。赵晶<sup>[27]</sup>在研究甘草诱导的愈伤组织的最佳培养基时发现一定浓度的2,4-D能够显著提高愈伤组织中的甘草酸(一种三萜化合物)含量(27.67 mg/g)。综上, 羊肚菌中添加0.4 mg/mL的2,4-D可以有效提高羊肚菌菌丝体质量和三萜含量。

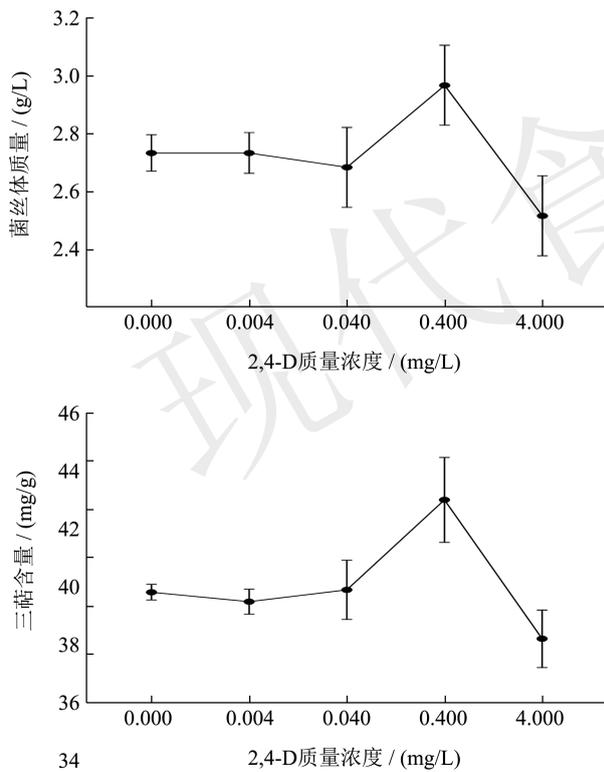


图3 2,4-D添加量对羊肚菌的生长及三萜含量的影响  
Fig.3 Effects of 2,4-D supplemental level on growth and triterpene content of *Morchella*

### 2.4 SA添加量对羊肚菌的生长及三萜含量的影响

SA添加量对羊肚菌的生长及三萜含量的影响

见图4。由图4可知, SA浓度在0~100  $\mu\text{mol/L}$ 之间时, 羊肚菌菌丝体质量随着SA浓度的增加也逐渐增大; SA浓度为100  $\mu\text{mol/L}$ 时, 菌丝体质量最高为4.67 g/L; 随着SA浓度的增加, 羊肚菌菌丝体质量较100  $\mu\text{mol/L}$ 时有所下降, 但总体水平还是高于对照组; 而三萜含量则随着SA浓度的增加呈现先增加后降低的趋势, 在SA浓度为200  $\mu\text{mol/L}$ 时三萜含量为45.57 mg/g, 此时的促进效果最显著, 而随着SA浓度继续增大羊肚菌三萜含量则急剧降低。王艳<sup>[28]</sup>在研究中也发现, 用SA处理白桦树细胞发现SA处理组的齐墩果酸与白桦脂醇(均为三萜类化合物)含量分别是空白对照组的1.59倍和1.34倍, 并且三萜的含量呈现先增加后减少的趋势。SA作为二级信号分子不仅能够快速的诱导靶向基因表达, 使次级代谢途径活化, 还能刺激细胞的抗氧化防御机制, 影响苯丙烷代谢以及过氧化氢酶等抗氧化酶的活力, 从而使得三萜的产量增加的同时对羊肚菌也有促生长的效果<sup>[29]</sup>。此外, SA还能作为碳源被真菌利用, 这导致的结果为SA浓度过高时与对照组相比菌丝体质量仍然被促进而三萜含量却无差异。

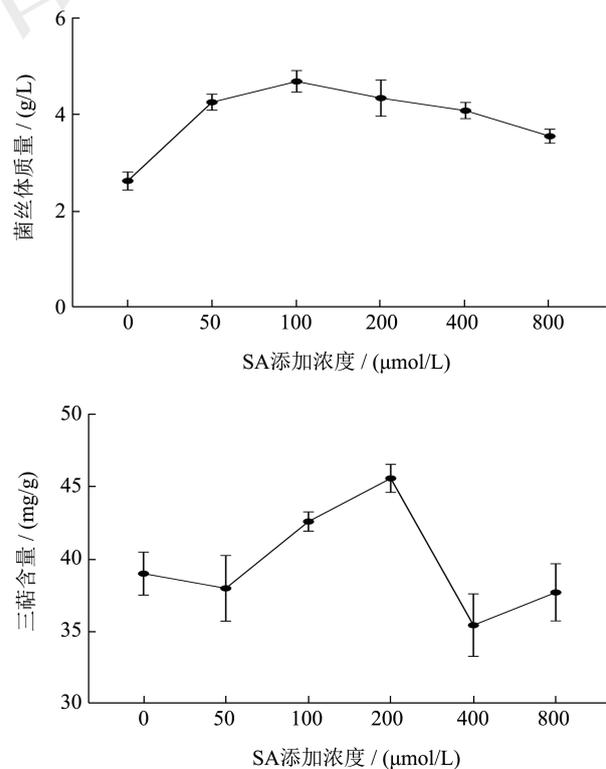


图4 SA添加量对羊肚菌的生长及三萜含量的影响  
Fig.4 Effect of SA supplemental level on growth and triterpene content of *Morchella*

### 2.5 CaCl<sub>2</sub>添加量对羊肚菌生长及三萜含量的影响

CaCl<sub>2</sub>添加量对羊肚菌生长及三萜含量的影响见图5。由图5可知,随Ca<sup>2+</sup>浓度的继续增加菌丝体质量增加,CaCl<sub>2</sub>浓度为5 mmol/L时最大为4.58 mg/L,而当CaCl<sub>2</sub>浓度≥5 mmol/L时菌丝体质量则逐渐降低。而羊肚菌的三萜含量在CaCl<sub>2</sub>浓度10 mmol/L时最高为48.24 mg/g;并且随着Ca<sup>2+</sup>添加浓度增加,羊肚菌三萜含量呈降低趋势。外源添加的Ca<sup>2+</sup>使细胞外Ca<sup>2+</sup>浓度增加,胞内外之间存在的Ca<sup>2+</sup>浓度梯度引起了Ca<sup>2+</sup>的转移从而形成了钙信号,最终改变细胞内游离Ca<sup>2+</sup>浓度,从而引起细胞反应<sup>[28]</sup>。Ca<sup>2+</sup>在浓度较低时,有利于钙信号的形成,从而促进羊肚菌的生长及代谢。但随Ca<sup>2+</sup>浓度的增大会造成胞内的游离Ca<sup>2+</sup>浓度过高,破坏钙泵和内贮Ca<sup>2+</sup>的平衡,会严重影响细胞的生长和代谢,从而使得低浓度时对三萜含量和菌丝体质量的促进效果先后消失<sup>[13]</sup>。

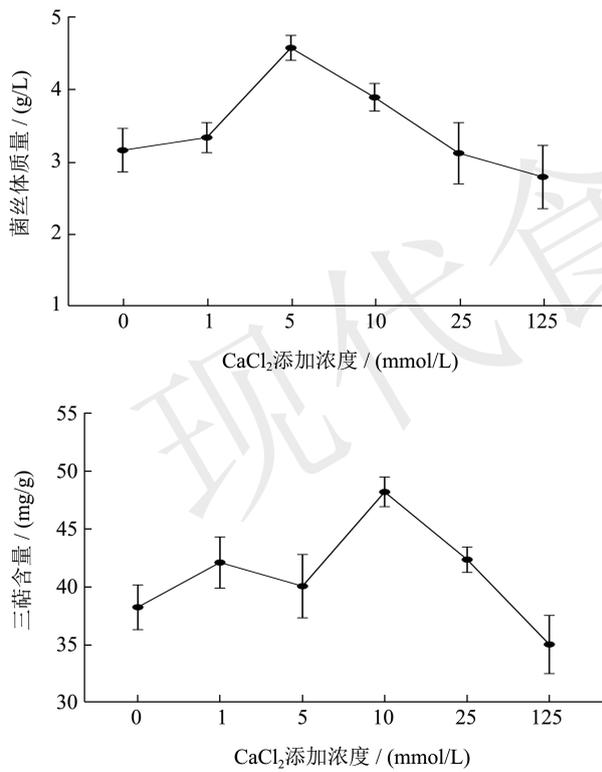


图5 CaCl<sub>2</sub>添加量对羊肚菌生长及三萜含量的影响

Fig.5 Effects of CaCl<sub>2</sub> supplemental level on *Morchella* growth and triterpene content

### 2.6 PB试验结果及分析

根据单因素试验结果,以三萜含量(Y)为响应值,设计PB试验,实验设计及结果见表3,方差分析结果见表4。

表3 Plackett—Burman设计试验方案及结果

Table 3 Plackett-Burman design test scheme and results

序号	A	B	C	D	E	Y-三萜含量/(mg/g)
1	1	-1	-1	-1	1	31.24
2	1	1	1	-1	1	31.68
3	-1	-1	1	-1	-1	28.62
4	1	-1	1	1	1	30.23
5	-1	1	1	1	-1	30.13
6	1	-1	1	1	-1	31.21
7	1	1	-1	-1	-1	31.59
8	-1	1	1	-1	1	29.24
9	-1	-1	-1	-1	-1	29.01
10	-1	-1	-1	1	1	28.86
11	1	1	-1	1	-1	31.46
12	-1	1	-1	1	1	29.90

表4 Plackett—Burman试验结果方差分析

Table 4 Variance analysis of Plackett-Burman experiments results

项	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	9	1.61	171.02	0.005 8	Significant
A	1	8.31	885.4	0.001 1	**
B	1	2.47	263.24	0.003 8	**
C	1	0.18	19.31	0.048 1	*
D	1	0.033	3.47	0.203 6	
E	1	0.074	7.83	0.107 5	

注:“\*”代表P<0.05,差异显著;“\*\*”代表P<0.01,差异极显著。下同。

对表3试验结果进行多元回归拟合,得到各变量与三萜含量关系的拟合方程为:

$$Y=30.27+1.14A+0.53B+0.067C-0.13D-0.009 6E$$

根据各因素的影响显著性,其中磁场强度(A)、GA添加量(B)两个因素影响极显著(P<0.01),SA添加量(C)影响显著(P<0.05),24-D添加量(D)、CaCl<sub>2</sub>添加量(E)影响不显著,故将此A、B、C三个因子作为后续BBD响应面法的考察因素。

### 2.7 BBD响应面试验

表5 BBD试验因素水平

Table 5 Test factor levels of BBD

水平	A-磁场强度/mT	B-GA添加量/(mg/L)	C-SA添加量/(mmol/L)
-1	2.0	0.04	100
0	2.5	0.4	200
1	3.0	4	400

表 6 BBD试验设计及结果

Table 6 BBD experiment design and results

序号	A	B	C	(Y) 三萜含量
1	-1	0	-1	42.56
2	-1	1	0	54.00
3	0	0	0	61.43
4	-1	-1	0	44.45
5	0	0	0	60.75
6	1	0	-1	54.12
7	0	-1	1	48.95
8	0	-1	-1	43.95
9	1	0	1	51.35
10	1	-1	0	53.12
11	0	0	0	57.90
12	0	1	1	52.23
13	1	1	0	53.95
14	0	0	0	59.82
15	0	1	-1	47.77
16	0	0	0	56.27
17	-1	0	1	51.71

表 7 回归模型方差分析

Table 7 Variance analysis of regression model

项	平方和	df	均方	F值	P值	显著性
模型	504.33	9	56.04	18.32	0.000 5	significant
A	49.12	1	49.12	16.06	0.005 1	**
B	38.22	1	38.22	12.5	0.009 5	**
C	31.38	1	31.38	10.26	0.015	*
AB	19.01	1	19.01	6.22	0.041 4	*
AC	35.49	1	35.49	11.6	0.011 3	*
BC	0.074	1	0.074	0.024	0.881 1	
A <sup>2</sup>	39.7	1	39.7	12.98	0.008 7	**
B <sup>2</sup>	96.29	1	96.29	31.49	0.000 8	**
C <sup>2</sup>	163.37	1	163.37	53.42	0.000 2	**
残差	21.41	7	3.06			
失拟项	3.38	3	1.13	0.25	0.858 1	not significant
误差项	18.03	4	4.51			
总和	525.74	16				R <sup>2</sup> =0.959 3

根据 PB 试验结果将磁场强度、GA 添加量、SA 添加量作为自变量，三萜含量作为因变量，运用 Design-Expert 12 软件设计 BBD 响应面试验，其中表 5 为响应面试验因素水平，表 6 为响应面试验

设计及结果。

通过对表 6 结果进行分析，得出三萜含量 (Y) 的拟合方程为：

$$Y=59.23+2.48A+2.19B+1.98C-2.18AB-2.98AC-0.14BC-3.07A^2-4.78B^2-6.23C^2$$

由表 7 可知模型的 P 值为 0.000 5 (P<0.01) 极显著；失拟项为 0.855 1 (P>0.05) 不显著；修正系数 R<sup>2</sup>=0.959 3，说明回归模型拟合度较高，模型可靠。而且，一次项 A、B 对结果影响极显著 (P<0.01) C 对结果影响显著 (P<0.05)。一次交互项 AB、AC 对结果影响显著 (P<0.05)。各因素交互作用的三维响应曲面图 6 所示。

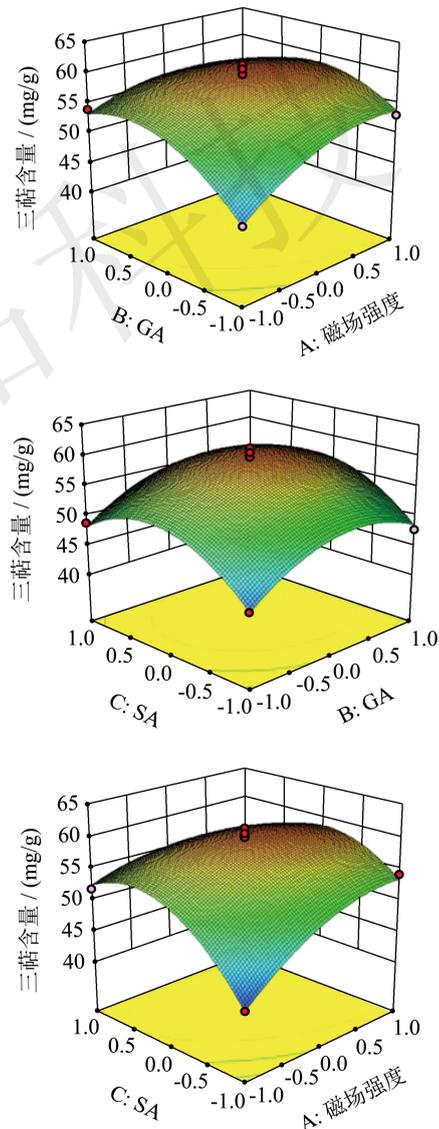


图 6 诱导因子交互作用对三萜含量的影响

Fig.6 Effects of inducible factors effect of the interaction on triterpene content

### 2.8 验证试验

根据软件分析的结果,得出的最佳诱导剂组合参数为:磁场强度 2.81 mT、GA 质量浓度 0.56 g/L、SA 浓度 214.54  $\mu\text{mol/L}$ 。在此组合下三萜含量的预测值为 59.87 mg/g。在此条件下进行验证试验测得羊肚菌三萜含量为 60.26 mg/g,是对照组的 160.72% (质量分数),试验结果与预测值接近,表明此组合可以使用。

### 2.9 不同处理对羊肚菌三萜合成途径关键酶酶活的影响

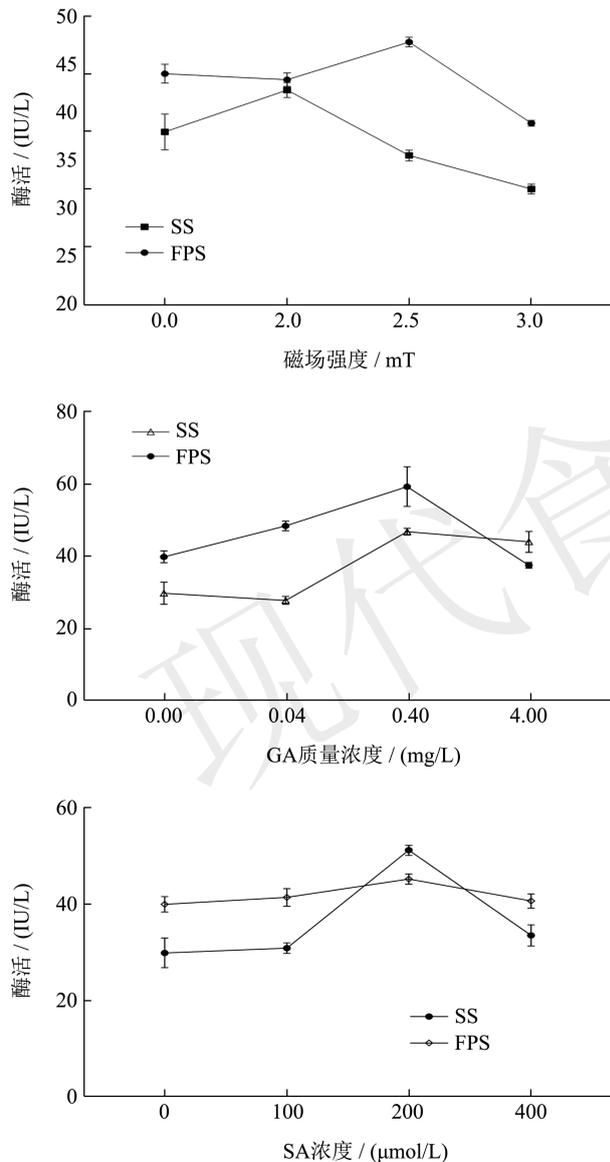


图 7 不同处理对羊肚菌三萜合成途径关键酶酶活的影响  
Fig.7 Effects of different treatments on enzyme activities of key enzymes of triterpene synthesis pathway in *Morchella*

根据响应面试验的结果用三种影响显著的因素对羊肚菌三萜合成关键酶的酶活进行了测定,其中图 7 是三种因素对三萜合成途径关键酶酶活的影响,图 8 是响应面优化结果对关键酶酶活的影响。

由图 7 可知适当强度的磁场对 FPS 酶和 SS 酶的酶活性都有促进作用,但对两种酶产生促进效应的场强不同,SS 酶在磁场强度为 2.0 mT 时酶活为 37.1 IU/L,与对照组比有显著促进作用 ( $P < 0.05$ ),并随着磁场强度增大酶活显著降低;磁场强度为 2.5 mT 时 FPS 酶活性最高,为 45.44 IU/L,随后酶活随着磁场强度的增加呈现减弱的趋势。造成这种情况的原因可能是外加磁场处理通过影响一些金属结合蛋白上的金属离子,来影响相关蛋白质和酶的结构,从而影响了三萜合成途径上的关键酶活性<sup>[30]</sup>。生物量的变化与三萜含量的变化趋势略有不同,这可能与三萜合成途径有关。FPS 酶活性增强,导致其下游产物法尼基焦磷酸 (FPP) 含量增多,而三萜是由 FPP 经 SS 酶催化生成鲨烯 (三萜合成前体物质) 并进一步经过一系列修饰生成。尽管 SS 酶活性在 2.5 mT 时活性降低,但是上游化合物 FPP 含量增多,导致三萜的合成显著增加。GA 处理对两种酶的影响与三萜含量的变化一致,都是在 GA 质量浓度为 0.4 mg/L 时最高,SS 和 FPS 的酶活性分别为 46.89 IU/L 和 59.39 IU/L;并且整体趋势呈现先升高再降低,说明 GA 处理对羊肚菌三萜合成途径的 FPS 和 SS 酶都产生了正向的调控效应继而促进了三萜合成。SA 的添加对 FPS 酶活性变化不明显,而 SS 酶在 SA 添加量为 200  $\mu\text{mol/L}$  时活性最高,为 51.16 IU/L,说明 SA 能通过影响 SS 酶的活性来调控羊肚菌三萜的合成。

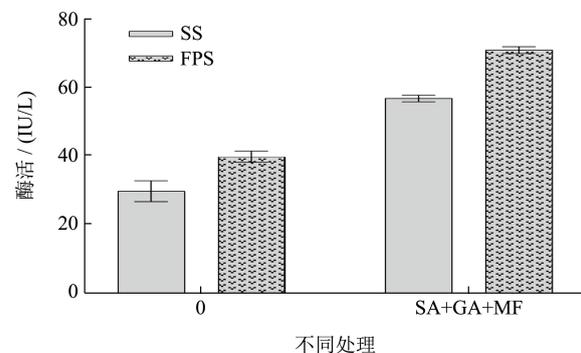


图 8 响应面优化实验结果对羊肚菌三萜合成关键酶的影响  
Fig.8 Effect of response surface optimization on key enzymes of triterpene synthesis in *Morchella*

从图8中则可以看出来采用响应面优化结果诱导子处理羊肚菌显著提高两种酶的酶活, SS酶活性和FPS酶活性分别为39.93 IU/L和71.08 IU/L, 是对照组的190.85%和178.02%。酶活结果与响应面试验的结果一致, 说明几种因素交互作用影响了三萜合成关键酶的酶活, 从而促进三萜的合成。

### 3 结论

本研究以羊肚菌三萜含量为响应值, 分别进行了磁场强度、GA、SA、2,4-D、CaCl<sub>2</sub> 5种诱导子的单因素试验, 结果磁场强度2.5 mT、GA、2,4-D质量浓度0.4 mg/L、SA浓度200 μmol/L、CaCl<sub>2</sub>浓度10 mmol/L时三萜含量增加最大。在此基础上, 对不同诱导子的处理条件进行了响应面优化, 得到的最佳诱导条件为磁场强度2.81 mT、GA质量浓度0.56 g/L、SA浓度214.54 μmol/L, 此时三萜的含量为60.26 mg/g, 是优化前的160.72% (质量分数), SS酶活和FPS酶活分别为39.93 IU/L和71.08 IU/L, 分别是对照组的190.85%和178.02%。充分说明添加适量诱导剂能够有效促进羊肚菌的生长及三萜合成。这三种诱导剂提高了三萜合成途径的关键酶的酶活, 从而促进三萜的合成。研究结果为羊肚菌液体发酵促进代谢物产生提供了理论依据, 为外源诱导子对三萜合成的影响进行了初步探索, 同时也为诱导子在大型真菌的发酵与次级代谢产物富集等领域的应用提供理论支撑。

### 参考文献

- [1] 辛青霞, 芦永昌, 赵英, 等. 羊肚菌多糖的提取及含量测定[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2020, 43(5): 671-676.
- [2] WU H, CHEN J, LI J, et al. Recent advances on bioactive ingredients of *Morchella esculenta* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(12): 4197-4213.
- [3] WANG Z, WANG H, KANG Z, et al. Antioxidant and anti-tumour activity of triterpenoid compounds isolated from *Morchella mycelium* [J]. Archives of Microbiology, 2020, 202(7): 1677-1685.
- [4] 郭睿昕. 羊肚菌发酵菌丝体三萜的提取、纯化及生物活性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
- [5] HUANG H, LIANG J, TAN Q, et al. Insights into triterpene synthesis and unsaturated fatty-acid accumulation provided by chromosomal-level genome analysis of *Akebia trifoliata* subsp. *Australis* [J]. Horticulture Research, 2021, 8(1): 33.
- [6] 肖丹, 杨洪岩, 由香玲, 等. 植物异戊二烯生物反应器研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(24): 3641-3650.
- [7] ANDRE C M, GUERRIERO G, LATEUR M, et al. Identification of novel candidate genes involved in apple cuticle integrity and russeting-associated triterpenesynthesis using metabolomic, proteomic, and transcriptomicdata [J]. Plants, 2022, 11(3): 289.
- [8] SU C A, XU X Y, LIU D Y, et al. Isolation and characterization of exopolysaccharide with immunomodulatory activity from fermentation broth of *Morchellaconica* [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013, 21(1): 1-6.
- [9] LI W, CAI Z N, MEHMOOD S, et al. Anti-inflammatory effects of *Morchella esculenta* polysaccharide and its derivatives in fine particulate matter-treated NR8383 cells [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 129: 904-915.
- [10] GREICIUS A, BALIUTAVICIUS T, LASTAUSKIENE E, et al. Application of milk permeate as an inducer for the production of microbial recombinant lipolytic enzymes [J]. Fermentation, 2022, 9(1): 27.
- [11] CHEN J H, WEI D, LIM P E, et al. Screening and effect evaluation of chemical inducers for enhancing astaxanthin and lipid production in mixotrophic *Chromochloris zofingiensis* [J]. Journal of Applied Phycology, 2021, 34(1): 159-176.
- [12] 侯集瑞, 李玉, 图力古尔, 等. 赤霉素和 $\alpha$ -萘乙酸对羊肚菌菌丝生长的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(4): 41-43.
- [13] 王言, 余昌霞, 曹晖, 等. 四种植物激素对刺芹侧耳和金针菇菌丝生长的影响[J]. 食用菌学报, 2015, 22(4): 23-26.
- [14] XU J W, YUE T H, YU X, et al. Enhanced production of individual ganoderic acids by integrating *Vitreoscilla* haemoglobin expression and calcium ion induction in liquid static cultures of *Ganoderma lingzhi* [J]. Microbial Biotechnology, 2019, 12(6): 1180-1187.
- [15] 叶盛权, 吴晖, 余以刚, 等. 不同金属离子对灵芝多糖液态发酵的影响[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(1): 106-108.
- [16] XIONG X Q, LIU Y B, ZHANG J L, et al. Mutational analysis of *MpPhy* reveals magnetoreception and photosensitivity involvement in secondary metabolites biosynthesis in *Monascus purpureus* [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2021, 217: 112164.
- [17] 宋寒冰, 李建, 严俊杰, 等. 磁场对金针菇菌丝生长的影响及磁受体和铁离子转运蛋白的鉴定表达[J]. 菌物学报, 2020, 39(6): 1006-1015.
- [18] WANG M, XU Z, HUANG Y, et al. Static magnetic field enhances *Cladosporium* sp. XM01 growth and fungal Mn(II) oxidation [J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 437: 129332.
- [19] 侯集瑞, 李玉, 图力古尔, 等. 紫外线诱导对药用真菌菌丝

- 体生长的影响[J].吉林农业大学学报,2002,24(6):20-24.
- [20] 高梦祥,夏帆,王青.低频交变磁场辅助发酵摇床实验装置:ZL 2011 2 0383728.9[P].2012-05-30.
- [21] 刘奇,彭浩,乔伟,等.灵芝菌丝体总三萜超声辅助提取工艺优化[J].食品研究与开发,2020,41(5):85-92.
- [22] 代红洋,柏旭,李晓岗,等.植物激素在三萜类化合物生物合成中的作用及调控机制研究进展[J].中草药,2021, 10(52):6391-6402.
- [23] DROZDR, SZYMAŃSKA M, ŻYWICKAA, et al. Exposure to non-continuous rotating magnetic field induces metabolic strain-specific response of *Komagataeibacter xylinus* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, 166: 107855.
- [24] SALIEV T, BEGIMBETOVA D, MASOUD A R, et al. Biological effects of non-ionizing electromagnetic fields: Two sides of a coin [J]. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 2019, 141: 25-36.
- [25] HONG C P, JANG G Y, RYU H. Gibberellins enhance plant growth and ginsenoside content in *Panax ginseng* [J]. Journal of Plant Biotechnology, 2021, 48(3): 186-192.
- [26] VALDEVITE M, BERTONI B W, CREVELIN E J, et al. Modulation of quinonemethiditerpenes biosynthesis in *Monteverdia floribunda* (Reissek) biral root cultures by exogenous inhibitors [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2022, 149(1-2): 313-324.
- [27] 赵晶.甘草组织快繁技术及次生代谢产物的研究[D].兰州:甘肃农业大学,2013.
- [28] 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.
- [29] LEIY, HARRISAJ, WANGA, et al. Comparative transcriptomic analysis of genes in the triterpenesaponin biosynthesis pathway in leaves and roots of *Ardisia kteniophylla* A. DC, a plant used in traditional Chinese medicine [J]. Ecology and Evolution, 2022, 12: e8920.
- [30] MARTINELLI I, CINATO M, KEITA S, et al. Cardiac cell exposure to electromagnetic fields: focus on oxidative stress and apoptosis [J]. Biomedicines, 2022, 10(5): 929.