

振荡-静置循环培养新策略提升灵芝三萜合成与菌丝体活性

姜幸怡^{1,2}, 韩伟², 郭嘉¹, 刘艳芳¹, 徐爱国³, 唐传红¹, 冯杰^{1*}, 张劲松^{1*}

1 上海市农业科学院食用菌研究所 国家食用菌工程技术研究中心 农业农村部南方食用菌资源利用重点实验室, 上海 201403

2 华东理工大学 药学院 制药工程与过程化学教育部工程研究中心 上海市新药设计重点实验室, 上海 200237

3 西藏自治区高原生物研究所, 西藏 拉萨 850000

姜幸怡, 韩伟, 郭嘉, 刘艳芳, 徐爱国, 唐传红, 冯杰, 张劲松. 振荡-静置循环培养新策略提升灵芝三萜合成与菌丝体活性[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3189-3200.

JIANG Xingyi, HAN Wei, GUO Jia, LIU Yanfang, XU Aiguo, TANG Chuanhong, FENG Jie, ZHANG Jinsong. Oscillation-static cycle cultivation enhances the synthesis of triterpenes and mycelium activity in *Ganoderma lucidum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3189-3200.

摘要: 灵芝作为历史悠久的食药两用型真菌, 其药用价值主要源自灵芝三萜这一主要活性物质, 灵芝三萜具有抗肿瘤、抗氧化等药理活性。本研究旨在建立高效液态发酵生产灵芝三萜的技术体系。针对传统深层发酵和振荡-静置两阶段培养的局限性, 利用振荡-静置循环培养工艺, 结合遗传算法构建人工神经网络模型进行优化。在优化条件下, 液态发酵高产灵芝三萜的最佳培养方式为振荡 2.8 d-静置 7.3 d-振荡 0.2 d-静置 0.3 d。此条件下, 灵芝三萜含量达到 20.82 mg/g, 灵芝酸得率为 129.09 mg/L, 与 Z10J0 相比提高了 324.78%, 且培养周期缩短至 10.6 d。同时, 该培养方式下菌丝体具有较好的抗肿瘤活性和抗氧化活性。本研究开发了一种经济有效的液态发酵培养方式, 可简化工艺流程、缩短发酵周期并有效改善传统培养方式的弊端; 同时为液态发酵高产灵芝三萜的规模化应用提供了参考, 具有广阔的应用前景。

关键词: 液态发酵; 灵芝三萜; 振荡-静置循环培养; 人工神经网络; 抗肿瘤活性; 抗氧化活性

资助项目: 上海市现代农业产业技术体系项目(沪农科产字[2022]第9号); 西藏自治区重点研发计划(XZ202301ZY0007N); 上海市农业科学院卓越团队建设计划(2022A-03); 上海市农业科学院攀高计划(2022-2024)

This work was supported by the Project of Shanghai Agriculture Research System ([2022]9), Xizang Autonomous Region Key Research and Development Plan (XZ202301ZY0007N), the Project of Shanghai Academy of Agricultural Sciences Excellent Team (2022A-03), and the Shanghai Academy of Agricultural Sciences Climbing Project (2022-2024).

*Corresponding authors. E-mail: FENG Jie, fengjie@saas.sh.cn; ZHANG Jinsong, syja16@saas.sh.cn

Received: 2023-12-22; Accepted: 2024-03-25

Oscillation-static cycle cultivation enhances the synthesis of triterpenes and mycelium activity in *Ganoderma lucidum*

JIANG Xingyi^{1,2}, HAN Wei², GUO Jia¹, LIU Yanfang¹, XU Aiguo³, TANG Chuanhong¹, FENG Jie^{1*}, ZHANG Jinsong^{1*}

1 Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China

2 Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, Engineering Research Centre of Pharmaceutical Process Chemistry, Ministry of Education, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

3 Xizang Plateau Institute of Biology, Lhasa 850000, Xizang, China

Abstract: *Ganoderma lucidum* is a precious fungus with both edible and medicinal values and has a long history of medical use. Triterpenes as the main active components endow *G. lucidum* with anti-tumor, antioxidant, and other pharmacological activities. The present study endeavors to establish a proficient liquid-state fermentation technology for the enhanced production of triterpenes. In view of the limitations inherent in conventional submerged fermentation and oscillation-static two-stage cultivation, this study established an oscillation-static cycle cultivation process and optimized the cultivation conditions by building an artificial neural network model based on genetic algorithms. The cultivation conditions for the high-yield production of triterpenes were optimized as follows: 2.8 days of oscillation, 7.3 days of static cultivation, 0.2 day of oscillation, and 0.3 day of static cultivation. Under these conditions, the content of triterpenes reached 20.82 mg/g. The yield of triterpenes reached 129.09 mg/L, showing a remarkable increase of 324.78% compared with that of the Z10J0 method. Moreover, the established method shortened the cultivation cycle by 10.6 days. The mycelia cultivated under this regimen exhibited commendable anti-tumor and antioxidant activities. This study not only presents an economical liquid-state fermentation approach but also streamlines the fermentation flow, reduces fermentation duration, and effectively ameliorates drawbacks associated with conventional cultivation methods. In addition, this study gives valuable insights into the scaled application of liquid-state fermentation in the high-yield production of triterpenes, which showcases broad prospects.

Keywords: liquid-state fermentation; triterpenes; oscillation-static cycle cultivation; artificial neural network; anti-tumor activity; antioxidant activity

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是一种历史悠久的食药两用型真菌,最早记录于《神农本草经》,为担子菌门(Basidiomycota)、伞菌纲(Agaricomycetes)、多孔菌科(Polporaceae)、灵芝属(*Ganoderma*)真菌^[1]。灵芝中有多糖、三萜、

有机酸、核苷酸等多种活性物质,具有广泛的药用及营养保健价值。三萜类物质是灵芝次级代谢产物中的主要活性物质,具有抗肿瘤^[2]、抗氧化^[3]、保肝排毒^[4]、抗 HIV 病毒^[5]等药理活性。

灵芝三萜绝大部分是属于高度氧化的羊毛

甾烷衍生物,包括灵芝酸、灵芝醇、灵芝醛和赤芝酮等,按分子中所含碳原子数分为 C24、C27 和 C30 这三大类^[6]。一般将含有羧基的三萜类物质称为灵芝酸,灵芝酸是最主要的灵芝三萜类物质,目前已分离到上百种,包括灵芝酸 A、灵芝酸 D、灵芝酸 R、灵芝酸 S 和灵芝酸 T 等^[7]。现阶段获取灵芝三萜主要有 3 种途径,一是野生或人工栽培的子实体,二是孢子粉,三是液态发酵的菌丝体^[8-9]。野生子实体稀少且较难获取;人工栽培虽然扩大了生产规模,但目前技术不稳定且生产周期较长、参数不易控制;孢子粉产量较少且需要繁琐的破壁和浸提工艺;液态发酵具有周期短、反应条件温和、菌丝生长具有较高的稳定性和规范性、环境条件可控制等优点^[10],因此液态发酵手段是获取灵芝三萜乃至实现规模化应用的一种重要方式^[11-12]。

目前液态发酵主要有两种方式,一是传统的液态深层发酵^[13],即将菌丝体生长所需营养物质配制成液体培养基,再接入菌种进行培养,发酵结束后获得菌丝体或胞外液;二是振荡-静置两阶段培养^[14],该方式由深层发酵衍生而来,第一个阶段通过一定时间的振荡培养,获得发酵液,第二个阶段将第一阶段的发酵液转入生物反应器中,进行静置培养,培养结束后在表面形成一层白色的上层菌皮,下层则为发酵液。传统的液态深层发酵现阶段研究主要集中在发酵方式优化^[15-16]、发酵参数优化^[17]、菌株代谢工程改造等方面,主要通过收取菌丝体获得灵芝三萜,此方法可以缩短原料的生长周期,易在现有设备基础上实现规模化应用;但是存在氧传递不足等问题,不利于细胞生长和产生生物活性物质^[18-19],且菌丝体中三萜含量较低,不能广泛应用于菌丝体及其生物活性物质的工业化生产^[20],对于工业化生产灵芝三萜的应用有较大局限性。另一方面,利用香草醛-高氯酸显色反应的分光光度法

是目前检测灵芝三萜最常用的检测方法之一,但张忠等^[21]运用分光光度法和 HPLC 法对比发现,以齐墩果酸为标准品,采用分光光度法计算灵芝酸标准品的量,灵芝酸 A 的测定值只有真实含量的 1/30,灵芝酸 DM 实际值是测定值的 51.55 倍,且干扰物质麦角甾醇测定值较高,采用香草醛-高氯酸显色法测定灵芝三萜无特异性。程池露等^[22]探讨了分光光度法测定灵芝三萜的干扰因素,研究表明,甾醇、脂肪酸等物质会干扰灵芝三萜的测定结果,且齐墩果酸会造成灵芝三萜含量的测定值远小于实际,不适合作为测定灵芝三萜的标准品值。因此,利用分光光度法测定液态发酵菌丝体中三萜的含量会呈现假阳性,不能反映样品中三萜的真实含量,不适用于灵芝菌丝体中三萜含量的测定。

振荡-静置两阶段培养^[14]结合了振荡和静置两种不同的培养条件,在振荡阶段有利于促进菌丝体的生长和代谢,在静置阶段有利于提高代谢产物的积累,主要通过收取上层菌皮获得灵芝三萜,此方法可以有效提高灵芝三萜的含量且三萜种类较多^[23],但菌皮得率较低、耗时较长,且此方法需在特定培养装置如三角瓶、培养瓶中实现,目前大多集中在实验室阶段,离规模化生产仍有较大差距,必须根据工艺打造特定的设备以适应生产的需要,成本和投入较高。

基于以上研究成果,本研究集合两种液态发酵方式的优势,弥补不足,探索了一种新的培养方式,即振荡-静置循环培养新策略,该方法采用振荡-静置交替培养,期间无需更换培养设备,能在保证稳定生物量的前提下同时提高灵芝三萜含量,并兼顾现有发酵设备。此外,本研究引入人工神经网络(artificial neural networks, ANN)这一学习算法,结合遗传算法(genetic algorithm, GA)优化振荡-静置循环培养的最佳培养方式,这种优化方法具有较高的拟合度和准确性,利用

人工神经网络对发酵条件进行优化的研究越来越受关注^[24]。本研究以灵芝三萜得率为指标优化液态发酵高产灵芝三萜的最佳培养方式,可为液态发酵高产灵芝三萜及工业化生产提供参考及数据支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

灵芝菌株由中国微生物菌种保藏管理委员会农业微生物中心上海食用菌分中心提供和保藏,菌株编号: *Ganoderma lucidum* G0023。

1.1.2 培养基与amp;主要试剂

酵母粉购自安琪酵母股份有限公司;齐墩果酸标准品购自Sigma公司;无水葡萄糖、磷酸二氢钾、七水硫酸镁、香兰素、无水乙醇、冰醋酸、高氯酸均购自国药集团化学试剂有限公司;甲醇、乙腈购自上海安谱实验科技股份有限公司;2,2'-联氮-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(agreement on basic telecommunication services, ABTS)总抗氧化能力检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,其他试剂为国产分析纯。

平板培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)按照39 g/L的比例用蒸馏水配制,121 °C灭菌20 min后备用。

种子液及发酵培养基(g/L):无水葡萄糖20,酵母粉4,磷酸二氢钾1.5,七水硫酸镁1.5,用去离子水溶解后于121 °C灭菌30 min后备用。

1.2 方法

1.2.1 液态发酵样品制备

种子液制备:用直径3 mm打孔器打孔,从平板上取9块菌块接种于含有100 mL种子液培养基的250 mL三角瓶中,于26 °C、150 r/min摇床中培养9 d,即得种子液。将种子液以10% (体积分数)的接种量分别接种至发酵培养基中,

于26 °C、150 r/min培养5 d,即得发酵液。每组做3个重复。

液态深层发酵样品制备:将发酵液以10% (体积分数)的接种量分别接种至发酵培养基中,于26 °C、150 r/min摇床中培养7 d。

振荡-静置两阶段培养样品制备:将发酵液以10% (体积分数)的接种量分别接种至发酵培养基中,于26 °C、150 r/min摇床中培养7 d,转入26 °C恒温培养箱中静置14 d,培养完成后将上层菌皮与下层菌丝体培养液分离。

振荡-静置循环培养样品制备:将发酵液以10% (体积分数)的接种量分别接种至发酵培养基中,按不同培养方式于26 °C、150 r/min摇床中振荡培养,一定时间后于26 °C培养箱中静置培养,其中,振荡培养 m 天用 Zm 表示,静置培养 n 天用 Jn 表示。

培养结束后将发酵培养液在8 000×g条件下离心20 min进行菌液分离,离心沉淀即菌丝体,沉淀用去离子水洗涤2次,将离心后的样品置于60 °C干燥箱中烘干至恒重后用研钵研磨。

1.2.2 反向传播(back propagation, BP)人工神经网络模型构建

参考郭嘉等^[25]的方法并加以修改,本研究将培养方式分为4个阶段,选择振荡(X1)、静置(X2)、振荡(X3)、静置(X4)为预测网络模型的输入层,灵芝三萜的得率作为输出层(Y)构建BP神经网络(back propagation neural network, BPNN)模型。将31组数据集随机分为训练集(24组)和测试集(7组),选择具有最高相关系数(R^2)和最低误差值的网络来预测响应。训练集用于构建模型,完成自我学习和预测,测试集用于评估模型。

1.2.3 灵芝菌丝体体外抗肿瘤活性测定

将灵芝菌丝体与80%乙醇按料液比1:10混合,超声提取1 h取上清,重复2次,2次离心上清合并,于65 °C烘箱干燥至浸膏状且无乙醇味,得到灵芝菌丝体乙醇提取物。称取

5 mg 的菌丝体乙醇提取物,加入 4 mL 二甲基亚砷配制成并稀释为浓度 6.25、3.13、1.56 $\mu\text{g/mL}$ 的样品溶液。参考余素萍^[26]的方法检测样品对 L1210 肿瘤细胞生长的抑制作用。

1.2.4 灵芝菌丝体抗氧化活性测定

ABTS 自由基清除能力:参考 Luo 等^[27]的方法并加以修改,使用 ABTS 试剂盒进行检测,将菌丝体按照适当比例用蒸馏水稀释后超声 30 min,将其与 ABTS 溶液反应 10 min,并检测相应的 OD_{734} 值,通过标准曲线计算结果,单位: $\mu\text{mol Trolox/g}$ 。

2,2-二苯基-1-三硝基胍(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除能力:参考 Xie 等^[28]方法略加调整,取样品 2 mL 加入 2 mL DPPH 工作溶液,摇匀后避光反应 30 min 反应结束后用酶标仪扫描样品在 517 nm 处的吸光度 A_i 。计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中, A_j 为用 95%乙醇与样品反应的本底吸光度; A_0 为去离子水与 DPPH 反应的空白吸光度。

1.2.5 检测和计算方法

分光光度法测定灵芝菌丝体三萜含量:烘干后的菌丝体用 95%乙醇溶液按一定料液比提取,超声 2 h 后在 8 000 $\times g$ 条件下离心 20 min 取上清备用。采用香草醛-冰醋酸法^[29]测定灵芝三萜含量。

HPLC 法测定灵芝菌丝体中灵芝酸含量:菌丝体用 95%乙醇溶液按一定料液比提取,超声 2 h,在 8 000 $\times g$ 条件下离心 20 min,取上清液过 0.22 μm 滤膜后进行 HPLC 检测。洗脱程序参考李娜^[30]的方法并加以调整,以乙腈-醋酸(0.01%)水溶液作为流动相进行洗脱,流速为 1.0 mL/min,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL ,检测波长为 240 nm。以灵芝酸 S 作为标准品制作标准曲线,计算其余灵芝酸相对含量。相对含量计

算公式为:

$$\text{灵芝酸含量}(\text{mg/g}) = \frac{\text{灵芝酸S含量} \times \text{灵芝酸峰面积}}{\text{灵芝酸S峰面积}}$$

以峰面积(mAU \times min) (Y)为纵坐标,对应质量浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标(X),建立灵芝酸 S 标准曲线为: $Y=269\ 02X-221\ 062$ ($R^2=0.999\ 8$)。

菌丝体生物量的测定:烘干后的灵芝菌丝体称重,计算菌丝体生物量,单位为 g/L,即每升发酵液中含有的菌丝体干质量数。

1.3 数据处理与分析

使用 Origin 2023b 对实验数据进行统计分析, Matlab R2019a 进行建模寻优。每组进行 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 液态深层发酵和振荡-静置两阶段培养合成灵芝三萜研究

灵芝液态深层发酵及振荡-静置两阶段培养的结果如图 1A、1C 所示,两阶段培养后具有上层菌皮及下层菌丝体。采用 HPLC 法检测时,选取总峰面积占比大于 85%的 20 个灵芝酸计算相对灵芝酸 S 的含量并计算总三萜含量,结果如图 2 所示。对比结果发现,液态深层发酵的菌丝体用分光光度法测得的三萜含量较高,达到(23.41 \pm 0.42) mg/g,但 HPLC 法测得的含量却较低,仅有(2.18 \pm 0.07) mg/g,分光光度法比 HPLC 法高出 973.85%。两种培养方式中,菌丝体中灵芝三萜含量均较低(图 3),HPLC 图见图 2,液态深层发酵生物量较高但其灵芝三萜含量较低。两阶段培养上层菌皮中灵芝三萜含量较高,但其生物量较低且生长周期较长。由于 HPLC 法较分光光度法具有较高的准确性,在后续研究中均采用 HPLC 法进行三萜含量的检测。

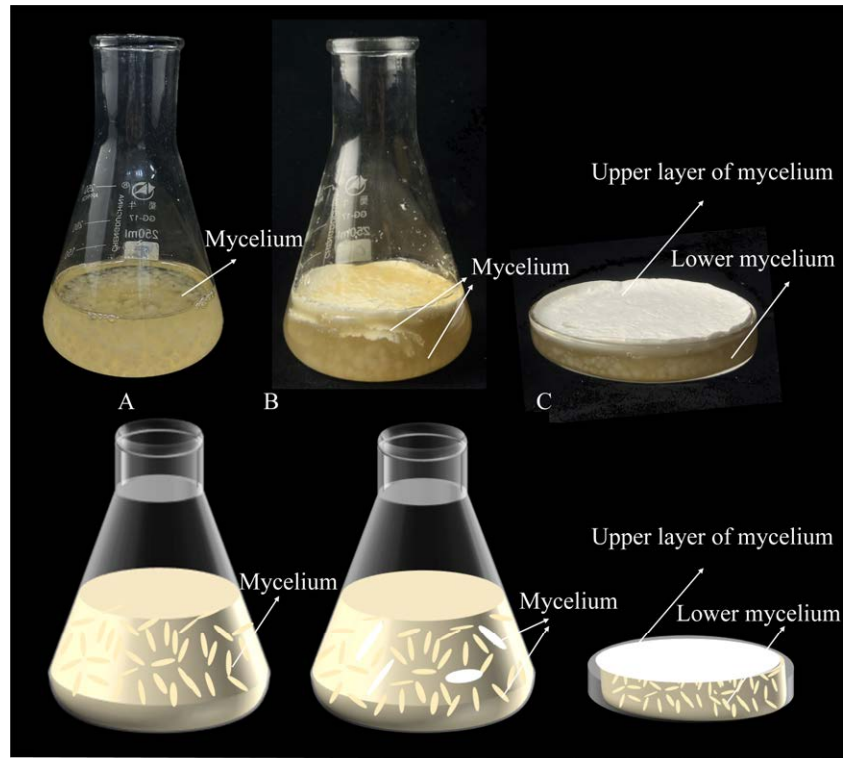


图1 灵芝液态深层发酵、振荡-静置循环培养及振荡-静置两阶段培养图 A: 液态深层发酵. B: 振荡-静置循环培养. C: 振荡-静置两阶段培养

Figure 1 *Ganoderma lucidum* liquid submerged fermentation and shaking-static two-stage cultivation shake bottle diagram. A: Liquid submerged fermentation. B: Oscillation-static cycle cultivation. C: Shaking-static two-stage culture cultivation.

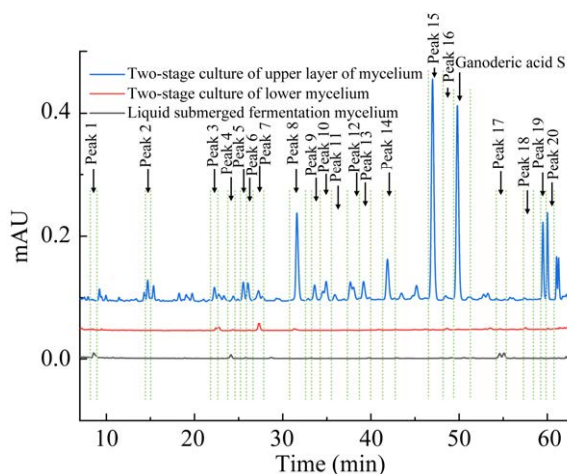


图2 两种培养方式下测定三萜含量 HPLC 分析
Figure 2 HPLC analysis for determination of triterpenes in two cultivation methods.

2.2 振荡-静置循环培养方式对灵芝三萜合成的影响

振荡-静置循环培养方式采用在摇瓶中振荡-静置-振荡-静置交替培养的形式, 发酵结束后收取菌丝体, 结果如图 1B 所示。以 14 d 为周期, 将接有种子液的发酵液分为两组, 一组为 Z1J1 交替循环(共振荡 7 d 静置 7 d), 一组为 Z1J3 交替循环(共振荡 4 d 静置 10 d)至 14 d, 发酵结束后测定菌丝体生物量及三萜含量, 两种培养方式的三萜含量及生物量见图 4。

图 4 表明两种培养方式的结果有较大差异, 振荡天数越多其生物量可能越高; 静置天数越多其三萜含量可能越高, 证明振荡静置交替循环培养是有效果的。

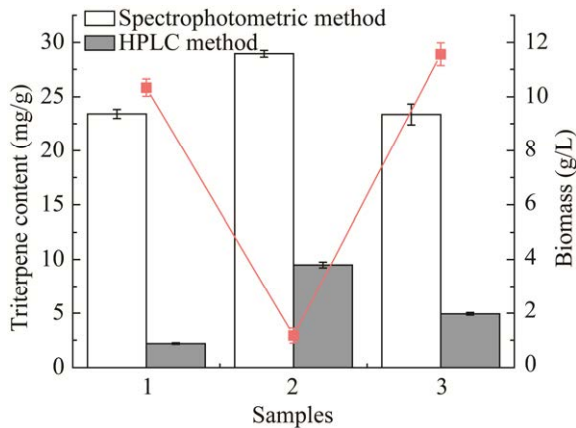


图 3 两种培养方式中灵芝的生物量及不同测定方法下的三萜含量 1: 液态深层发酵菌丝体; 2: 两阶段培养上层菌丝体; 3: 两阶段培养下层菌丝体
Figure 3 The biomass of two cultivation methods and triterpenes content under different measurement methods. 1: Liquid submerged fermentation mycelium; 2: Two-stage culture of upper layer of mycelium; 3: Two-stage culture of lower mycelium.

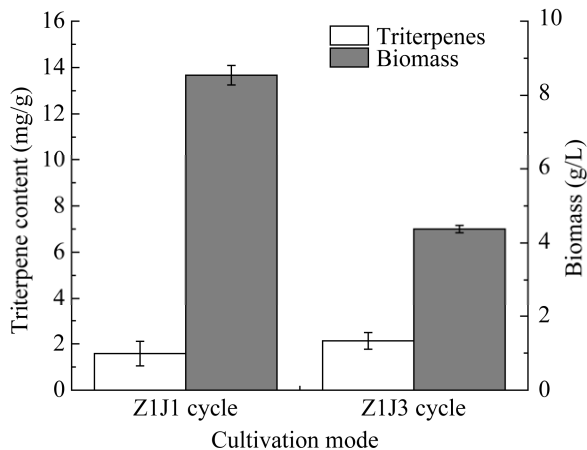


图 4 两种培养方式的三萜含量及生物量
Figure 4 Two cultivation methods' triterpene content and biomass.

为降低液态发酵的能耗、降低时间成本,考虑缩短液态发酵的时间。为确保灵芝有足够的生长时间且具有较强活性,故适当缩短实验周期至 10 d。共设计 6 组实验,以 Z10J0 和 J10Z0 为对照,6 组实验及其生物量和三萜含量如图 5 所示。

Z10J0 作为振荡的对照,其生物量最高;

J10Z0 作为静置的对照,其三萜含量最高。采用振荡-静置循环培养,6 组实验的三萜含量均高于 Z10J0,且生物量较采用 J10Z0 的培养方式均有提高,说明采用振荡-静置循环培养对于提高三萜含量具有一定的效果,同时实验周期也有所缩短,在实验中发现,在振荡静置相同的天数下,先振荡或先静置对于实验的结果也有较大的影响。

2.3 BP 优化振荡-静置循环培养及验证

针对上述实验结果,推测三萜含量的提高可能是振荡静置组合的结果,因此引入 BP 神经网络模型并设计 31 组实验以求得液态发酵高产灵芝三萜最佳的培养方式。实验设计了 31 组培养方式进行发酵培养,获得烘干菌丝体,按 1.2.5 的方法测定菌丝体中的三萜含量及生物量。

以灵芝三萜得率为预测值,将数据集随机分为 24 组训练集和 7 组测试集,24 组训练集的实验值与预测值如图 6 所示,实验值与预测值的拟合度较好,7 组测试集用于验证模型的可靠性,模型的决定系数 R^2 可达 0.999 7,说明该模型具有较好的拟合和预测性能,可作为预测高产灵芝三萜最佳培养方式的有效方法。

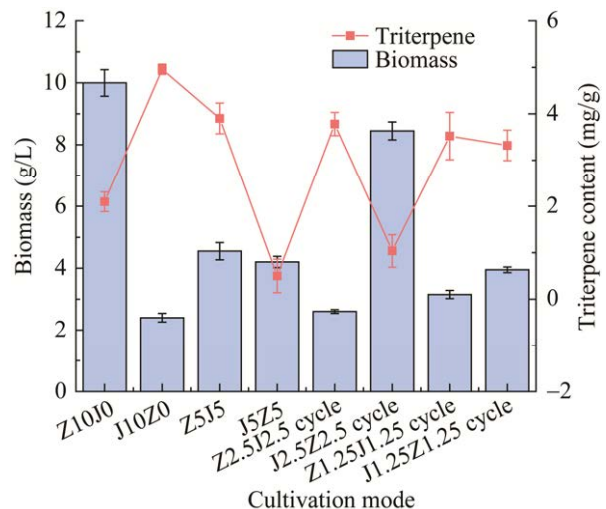


图 5 六组振荡-静置循环实验及其对照的生物量和三萜含量

Figure 5 Biomass and triterpene content of six groups of oscillating-static circulation experiments and their controls.

经过遗传算法优化, 迭代轨迹如图 7 所示, 迭代 53 次后预测值趋于稳定, 对最优值进行求解, 获得灵芝三萜得率的最优解为 123.56 mg/L, 此时对应的培养方式为振荡 2.83 d-静置 7.26 d-振荡 0.23 d-静置 0.29 d, 考虑到实验的简洁性, 验证实验选择培养方式为振荡 2.8 d-静置 7.3 d-振荡 0.2 d-静置 0.3 d (培养周期为 10.6 d)。通过实验验证, 在此种培养方式下, 灵芝三萜含量为

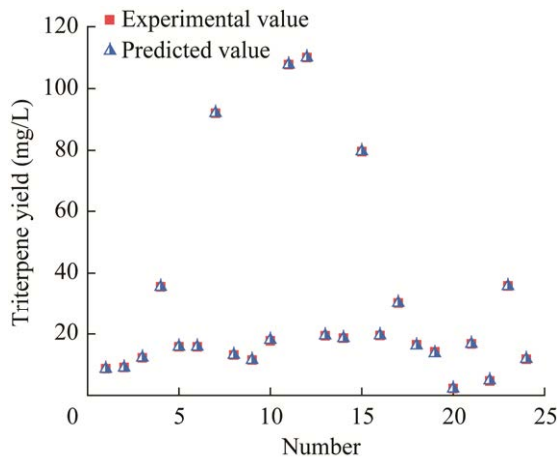


图 6 训练集中灵芝三萜得率实验值与 BP 神经网络模型预测值的比较

Figure 6 Comparison of experimental and BP neural network model predicted yield of triterpenes in the training set.

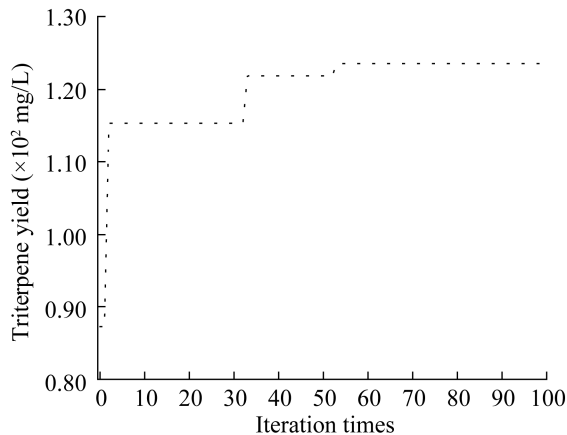


图 7 遗传算法 100 次迭代寻优轨迹

Figure 7 Optimization trajectory of genetic algorithm with 100 iterations.

20.82 mg/g, 综合考虑生物量这一因素, 计算得到灵芝三萜得率达到 129.09 mg/L, 相对误差在 5% 范围内, 与 Z10J0 相比提高了 324.78%。

2.4 灵芝振荡-静置循环培养菌丝体活性研究

2.4.1 灵芝振荡-静置循环培养菌丝体抗肿瘤活性研究

振荡-静置循环最佳培养方式下所获菌丝体的乙醇提取物与对照组 Z10J0 及 J10Z0 对 L1210 细胞的增殖抑制作用见图 8。由图可见, 样品及对照对 L1210 细胞的增殖均有较为明显的抑制作用, 并且抑制率随着样品浓度的增加而提高, 呈现出浓度依赖性。在低样品浓度(1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时, 对细胞的抑制作用较差, 为 40% 左右; 在高样品浓度(6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时样品表现出良好的抑制作用, 能达到 62.86%。但在不同的浓度时, 样品与对照组之间没有显著性差异。

2.4.2 灵芝振荡-静置循环培养菌丝体抗氧化活性研究

振荡-静置循环最佳培养方式下所获菌丝体与对照组 Z10J0 及 J10Z0 所获菌丝体对 ABTS

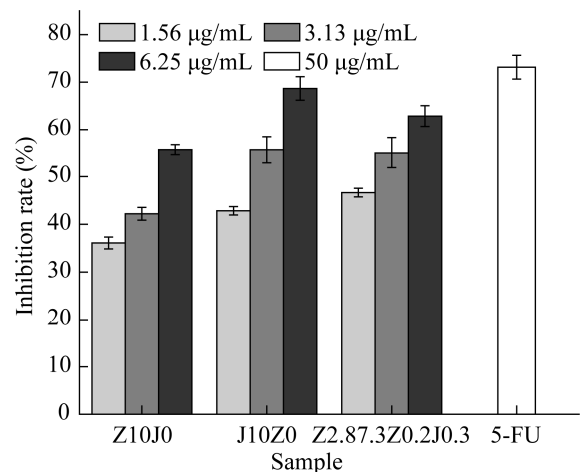


图 8 灵芝菌丝体乙醇提取物对 L1210 细胞的抑制率 5-FU (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 为阳性对照

Figure 8 Inhibition rate of ethanol extracts from mycelium of different *Ganoderma lucidum* strains on L1210 cells. 5-FU (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as positive control.

自由基清除能力如图 9 所示, 3 种培养方式对 ABTS 自由基均有不同程度的清除作用, 且清除能力与浓度呈正相关, 随着浓度的增大清除能力随之增大。当样品浓度低于 12.5 mg/mL 时, 各样品之间差异较小, 高于 12.5 mg/mL 时各样品之间差异明显变大。在样品浓度为 50 mg/mL 时, Z2.8J7.3Z0.2J0.3 培养方式与 Z10J0 相比, 清除能力提高了 36.70%。根据 IC_{50} 值比较发现, J10Z0 培养方式下的 IC_{50} 值最低, 其次为 Z2.8J7.3Z0.2J0.3, 与 Z10J0 相比, 振荡-静置循环培养最佳方式能有效提高菌丝体的 ABTS 自由基清除能力。

随样品浓度增加, DPPH 自由基清除能力也随之增强, 表现出浓度依赖性, 各样品均有较好的 DPPH 自由基清除能力, 样品浓度为 25 mg/mL 时, Z2.8J7.3Z0.2J0.3 培养方式对 DPPH 自由基的清除率达到 94.51%, IC_{50} 值为 4.53 mg/mL, 表明该培养方式下的菌丝体具有良好的抗氧化活性 (图 10)。

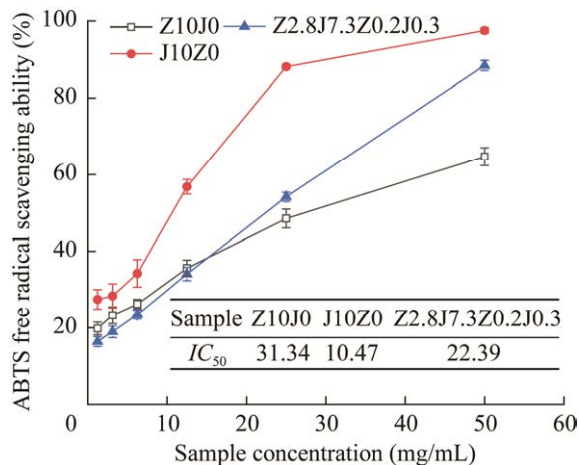


图 9 灵芝菌丝体水提取物 ABTS 自由基清除能力
Figure 9 ABTS free radical scavenging ability of water extracts from *Ganoderma lucidum* mycelium.

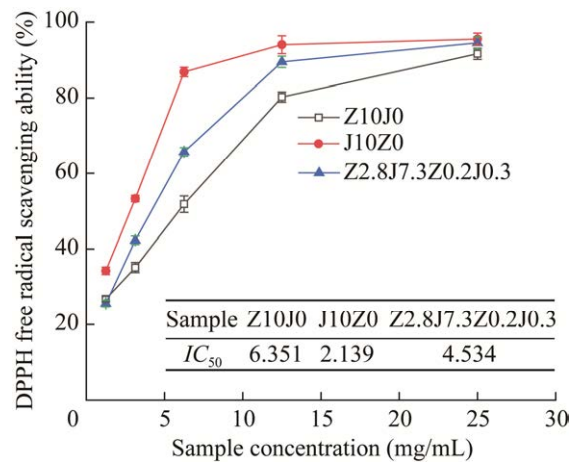


图 10 灵芝菌丝体水提取物 DPPH 自由基清除能力
Figure 10 DPPH free radical scavenging ability of water extracts from *Ganoderma lucidum* mycelium water extract.

3 讨论与结论

通过文献查阅及实验室前期研究发现, 在液态发酵时, 振荡培养可以获得生物量较高的灵芝菌丝体, 但其菌丝体中三萜含量较低; 静置培养灵芝菌丝体中有较高的三萜含量且三萜种类较多、能耗较低, 但其生物量较低。而本研究提出的振荡-静置循环培养方式以产业化应用为出发点, 集合了上述两种培养方式的优势, 弥补了其不足, 具有较好的实际应用价值。

本研究表明, 采用振荡-静置循环培养方式能够兼顾生物量与灵芝三萜的含量, 有效提高了液态发酵中灵芝三萜的得率。与传统的液态深层发酵相比, 振荡-静置循环培养减少了振荡的天数且有效提高了灵芝菌丝体中的三萜含量, 降低了能耗; 振荡-静置两阶段培养获取灵芝三萜只收取上层菌皮, 其产量较低, 振荡-静置循环培养有效提高了灵芝三萜的得率且静置阶段无需转入其他培养容器, 简化了工艺且可以有效改善传统培养方式的弊端。同时, 本文采用 HPLC 法检测灵芝三萜含量, 规避了分光光度法因含甾醇等物质呈现假阳性的问题^[22]。此外, 本文采

用遗传算法构建人工神经网络模型对振荡-循环培养方式进行寻优, 确定最佳培养方式为振荡 2.8 d-静置 7.3 d-振荡 0.2 d-静置 0.3 d。与潘江安等^[31]利用四阶段 pH 控制策略液态发酵灵芝相比, 三萜含量提高了 5.59%, 两阶段培养^[14]仅收取上层菌皮, 在本研究开发的培养方式下得到的灵芝三萜含量与之相比略低, 但得率较高, 达到 129.09 g/L, 且发酵周期缩短了 5.4 d。对振荡-静置循环培养下的菌丝体进行活性研究, 发现此培养方式下菌丝体具有较好的抗肿瘤活性及抗氧化活性, 在后续研究中将建立更好的模型证明其他药理活性。

此种培养条件下能够保证振荡天数的充足, 供氧能达到一定的时间以满足菌丝体生长的需求; 在静置状态时供氧是有限的, 而这种限氧条件有利于促进灵芝酸的生物合成从而促进三萜含量的提高^[32]。已有文献报道灵芝三萜次生代谢产物的合成与氧有关, 氧含量过低不利于菌体生长和代谢产物的积累; 而氧过高会促进菌体大量生长, 抑制代谢产物的积累^[33]。振荡培养时氧的含量较高, 但不一定是灵芝生长最适宜的氧含量, 而静置培养时表面的氧较低, 而下层菌丝体中几乎没有氧, 过高和过低的氧含量都不利于灵芝三萜的合成, 采用振荡-静置循环培养既有高氧含量的存在也有低氧含量的结合, 形成了氧的往复, 氧的浓度在某种程度上对灵芝三萜生物合成来说可能存在某种动态平衡, 在后续研究中将进一步探究其机理。

在摇瓶中充分验证了振荡-静置循环培养的可行性, 后续进一步验证时, 将通过发酵罐的方式来模拟摇瓶, 逐步放大, 这为工业化应用提供了重要的参考。

REFERENCES

- [1] 朱静, 师亮, 任昂, 刘锐, 赵明文. 灵芝三萜生物合成的研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2022, 45(5): 981-989.
- [2] 唐庆九, 季哲, 郝瑞霞, 刘艳芳, 杨焱, 张劲松. 灵芝中性三萜类成分的抗肿瘤作用[J]. 食用菌学报, 2010, 17(1): 60-64.
- [3] MAU JL, LIN HC, CHEN CC. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(21): 6072-6077.
- [4] 王明宇, 刘强, 车庆明, 林志彬. 灵芝三萜类化合物对 3 种小鼠肝损伤模型的影响[J]. 药学报, 2000, 35(5): 326-329.
- [5] 彭珍华, 韩本勇, 赵声兰, 陈朝银. 三萜类化合物抗 HIV 研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(B05): 258-262, 143.
- [6] XIA Q, ZHANG HZ, SUN XF, ZHAO HJ, WU LF, ZHU D, YANG GH, SHAO YY, ZHANG XX, MAO X, ZHANG LZ, SHE GM. A comprehensive review of the structure elucidation and biological activity of triterpenoids from *Ganoderma* spp.[J]. Molecules, 2014, 19(11): 17478-17535.
- [7] 姜沅彤. 灵芝主要活性成分的生物酶辅助提取及灵芝酸 A 药代动力学研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2015.
- [8] ZHANG JM, ZHONG JJ, GENG AL. Improvement of ganoderic acid production by fermentation of *Ganoderma lucidum* with cellulase as an elicitor[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(10): 1580-1586.
- [9] ZHONG JJ, XU YN, TAN GY, BAI LQ. Signal

- transduction engineering: a powerful platform technology for enhancing secondary metabolite production[J]. *New Biotechnology*, 2014, 31: S23-S24.
- [10] ZHOU XW, SU KQ, ZHANG YM. Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(3): 941-963.
- [11] TANG YJ, ZHANG W, ZHONG JJ. Performance analyses of a pH-shift and DOT-shift integrated fed-batch fermentation process for the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(5): 1852-1859.
- [12] LIU GQ, WANG XL, HAN WJ, LIN QL. Improving the fermentation production of the individual key triterpene ganoderic acid me by the medicinal fungus *Ganoderma lucidum* in submerged culture[J]. *Molecules*, 2012, 17(11): 12575-12586.
- [13] 毛健, 马海乐. 灵芝菌体液态深层发酵条件的优化[J]. *食品科学*, 2009, 30(23): 377-382.
MAO J, MA HL. Optimization of submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*[J]. *Food Science*, 2009, 30(23): 377-382 (in Chinese).
- [14] FANG QH, ZHONG JJ. Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*[J]. *Biotechnology Progress*, 2002, 18(1): 51-54.
- [15] 邢源月, 王佳琦, 黄红梅. 灵芝深层液态发酵培养条件与营养条件优化[J]. *当代化工研究*, 2022(10): 25-28.
XING YY, WANG JQ, HUANG HM. Optimization of culture conditions and nutritional conditions for submerged liquid fermentation of *Ganoderma lucidum*[J]. *Modern Chemical Research*, 2022(10): 25-28 (in Chinese).
- [16] 冯杰, 冯娜, 唐庆九, 颜梦秋, 杨焱, 周帅, 刘艳芳, 刘方, 张劲松. 补料方式对灵芝菌丝体液态深层发酵合成灵芝三萜的影响[J]. *食品科学*, 2017, 38(12): 57-62.
FENG J, FENG N, TANG QJ, YAN MQ, YANG Y, ZHOU S, LIU YF, LIU F, ZHANG JS. Effects of different feeding methods on production of triterpenes by *Ganoderma lucidum* in submerged fermentation[J]. *Food Science*, 2017, 38(12): 57-62 (in Chinese).
- [17] 冯杰, 冯娜, 杨焱, 刘方, 贾薇, 张劲松. 通气量对灵芝菌丝体液态深层发酵合成灵芝三萜的影响[J]. *天然产物研究与开发*, 2015, 27(9): 1564-1570.
FENG J, FENG N, YANG Y, LIU F, JIA W, ZHANG JS. Effects of aeration rate on the production of triterpenes by *Ganoderma lucidum* G0119 in liquid submerged fermentation[J]. *Natural Product Research and Development*, 2015, 27(9): 1564-1570 (in Chinese).
- [18] SINGHANIA RR, PATEL AK, SOCCOL CR, PANDEY A. Recent advances in solid-state fermentation[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 44(1): 13-18.
- [19] OSMOLOVSKIY AA, BARANOVA NA, KREIER VG, KURAKOV AV, EGOROV NS. Solid-state and membrane-surface liquid cultures of micromycetes: specific features of their development and enzyme production (a review)[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2014, 50(3): 219-227.
- [20] 王琼, 徐萌萌, 刘高强, 曹春蕾, 石贵阳, 丁重阳. 灵芝液体浅层静置培养高效生产三萜的研究[J]. *菌物学报*, 2021, 40(3): 656-667.
WANG Q, XU MM, LIU GQ, CAO CL, SHI GY, DING ZY. An efficient strategy to enhance triterpenoid production by liquid superficial-static culture (LSSC) of *Ganoderma lingzhi*[J]. *Mycosystema*, 2021, 40(3): 656-667 (in Chinese).
- [21] 张忠, 张劲松, 刘艳芳, 周帅, 王金艳, 于华峥, 唐庆九. 分光光度法测定灵芝中总三萜含量方法探讨[J]. *上海农业学报*, 2016, 32(1): 61-65.
ZHANG Z, ZHANG JS, LIU YF, ZHOU S, WANG JY, YU HZ, TANG QJ. Discussion on the determination of total triterpenoids in *Ganoderma lucidum* by spectrophotometry[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2016, 32(1): 61-65 (in Chinese).
- [22] 程池露, 汪岳, 王金艳, 唐传红, 张劲松, 冯娜, 唐庆九. 分光光度法测定灵芝三萜含量的干扰因素探讨[J]. *菌物学报*, 2022, 41(10): 1716-1725.
CHENG CL, WANG C, WANG JY, TANG CH, ZHANG JS, FENG N, TANG QJ. Discussion on interference factors in determination of triterpenes in *Ganoderma lingzhi* by spectrophotometric method[J]. *Mycosystema*, 2022, 41(10): 1716-1725 (in Chinese).
- [23] XU JW, XU YN, ZHONG JJ. Production of individual ganoderic acids and expression of biosynthetic genes in liquid static and shaking cultures of *Ganoderma lucidum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(4): 941-948.
- [24] 邹立飞, 郑鹏. 人工神经网络和响应面法优化薏苡仁酒发酵条件[J]. *中国酿造*, 2021, 40(1): 142-147.
ZOU LF, ZHENG P. Optimization of fermentation conditions of coix seed wine by artificial neural network and response surface method[J]. *China Brewing*, 2021, 40(1): 142-147 (in Chinese).
- [25] 郭嘉, 刘艳芳, 唐传红, 冯杰, 张劲松. 基于人工神经网络和遗传算法优化灵芝液态发酵培养基[J]. *食用菌学报*, 2023, 30(3): 81-89.

- GUO J, LIU YF, TANG CH, FENG J, ZHANG JS. Optimization of *Ganoderma lucidum* liquid fermentation medium based on artificial neural network and genetic algorithm[J]. Acta Edulis Fungi, 2023, 30(3): 81-89 (in Chinese).
- [26] 余素萍. 灵芝深层发酵生产生物活性物质的研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2004.
YU SP. Study on submerged fermentation of *ganoderma lucidum* to produce bioactive substances[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2004 (in Chinese).
- [27] LUO JG, LI L, KONG LY. Preparative separation of phenylpropanoid glycerides from the bulbs of *Lilium lancifolium* by high-speed counter-current chromatography and evaluation of their antioxidant activities[J]. Food Chemistry, 2012, 131(3): 1056-1062.
- [28] XIE J, SCHAICH KM. Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(19): 4251-4260.
- [29] 谭洪升, 李翔, 巩伯梁, 李刚. 灵芝子实体和孢子粉三萜含量的测定及体外抗肿瘤活性的评价[J]. 微生物学免疫学进展, 2018, 46(1): 43-48.
TAN HS, LI X, GONG BL, LI G. Determination of total triterpenoids in fruiting body and spores of *Ganoderma lucidum* and assessment of their antitumor activity *in vitro*[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2018, 46(1): 43-48 (in Chinese).
- [30] 李娜. 高产多糖和三萜的液态发酵专用灵芝优势菌株筛选及促三萜生成机制的探索[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2021.
LI N. Screening of dominant strains of *Ganoderma lucidum* for liquid fermentation with high production of polysaccharides and triterpenes and exploration of the mechanism of promoting triterpenoid production[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2021 (in Chinese).
- [31] 潘江安, 唐庆九, 冯娜, 唐传红, 王金艳, 刘艳芳, 袁峰, 徐国华, 颜梦秋, 谭贻, 张劲松, 周帅, 冯杰. 利用阶段 pH 控制提高灵芝深层发酵合成三萜能力的研究[J]. 食用菌学报, 2020, 27(2): 84-91.
PAN JA, TANG QJ, FENG N, TANG CH, WANG JY, LIU YF, YUAN F, XU GH, YAN MQ, TAN Y, ZHANG JS, ZHOU S, FENG J. Enhanced triterpene biosynthesis in *Ganoderma lucidum* by staged pH control during submerged fermentation[J]. Acta Edulis Fungi, 2020, 27(2): 84-91 (in Chinese).
- [32] TANG YJ, ZHONG JJ. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32(3/4): 478-484.
- [33] 孙金旭. 溶氧控制条件对深层灵芝发酵生产灵芝酸产量的影响[J]. 北方园艺, 2014(5): 130-132.
SUN JX. Effect of dissolved oxygen controlling conditions on production of ganoderic acids by *Ganoderma*[J]. Northern Horticulture, 2014(5): 130-132 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)