

朱晓璐,韩伟,冯娜,等.赤芝规模化液态深层发酵及其产物抗肿瘤活性研究[J].上海农业学报,2021,37(3):24-28.

赤芝规模化液态深层发酵及其产物抗肿瘤活性研究

朱晓璐^{1,2},韩伟²,冯娜¹,唐庆九¹,袁峰³,徐国华³,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,农业部南方食用菌资源利用重点实验室,上海市农业遗传育种重点开放实验室,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江苏神华药业有限公司,江苏省药用真菌生物工程技术研究中心,淮安211600)

摘要:利用1000 L工业级别发酵罐规模化制备赤芝液态深层发酵活性产物,获得的30 L发酵产物经醇提浓缩后用石油醚、乙酸乙酯依次萃取,得到3种不同极性部位的萃取物,分别评价其抗肿瘤活性。结果表明:发酵过程中添加油酸可以促进活性产物的合成,发酵产物中三萜及甾醇含量高达8.91 mg/(100 mg干菌丝);石油醚萃取物与乙酸乙酯萃取物均表现出良好的抗L1210和K562肿瘤细胞活性。可见,液态深层发酵技术是规模化制备赤芝活性物质的有效手段,可为后续活性成分分离纯化的研究提供稳定的材料来源。

关键词:灵芝;液态深层发酵;规模化制备;抗肿瘤活性

中图分类号:S567.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-3924(2021)03-024-05

Large scale submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* and antitumor activity of its product

ZHU Xiaolu^{1,2}, HAN Wei², FENG Na¹, TANG Qingjiu¹, YUAN Feng³,
XU Guohua³, FENG Jie^{1*}, ZHANG Jingsong¹

(¹ Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences; National Engineering Research Center of Edible Fungi; Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, P. R. China; Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding of Shanghai, Shanghai 201403, China; ² Engineering Research Centre of Pharmaceutical Process Chemistry, Ministry of Education, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology; Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, Shanghai 200237, China; ³ Jiangsu Shenhua Pharmaceutical Co. Ltd.; Medicinal Fungi Biotechnology Research Center of Jiangsu Province, Huai'an 211600, China)

Abstract: The 30 L fermentation product of *Ganoderma lucidum* was prepared by large-scale production of 1000 L industrial grade fermentor. After ethanol extraction and concentration, the fermentation product was extracted with petroleum ether and ethyl acetate in turn to obtain three extracts with different polarity, and their antitumor activities were evaluated respectively. The results showed that the addition of oleic acid could promote the synthesis of active product, and the content of triterpenoids and sterols in fermentation product was up to 8.91 mg/(100 mg dry mycelium); Petroleum ether extract and ethyl acetate extract showed good anti-L1210 and K562 tumor activity. It can be seen that submerged fermentation technology is an effective method for large-scale preparation of active substances of *G. lucidum*, which can provide a stable material source for the subsequent study of separation and purification of active ingredients.

Key words: *Ganoderma lucidum*; Submerged fermentation; Large-scale preparation; Antitumor activity

收稿日期:2019-12-30

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(31801919);上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科创字(2018)第1-1号];上海人才发展资金项目(2019052)

作者简介:朱晓璐(1994—),女,在读硕士,研究方向为天然产物的分离纯化及药理活性。E-mail:zhuxiaolu1217@163.com

*通信作者, E-mail: sytufengjie@163.com

灵芝是担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌,为我国名贵的中药材,赤芝是栽培与应用最为广泛且可作药物使用的一种灵芝。多糖、三萜、甾醇及生物碱等物质均为灵芝中具有良好生物活性的有效成分,其中,三萜是灵芝最主要的活性成分之一。目前,研究发现的三萜类化合物已超过 300 种^[1],由于其具有抗肿瘤、抗炎、免疫调节、保护肝脏及神经等作用^[2-10],近年来成为国内外学者研究的热点。

灵芝中三萜及甾醇的主要获得途径为人工栽培和液态发酵^[11]。相较于人工栽培,液态深层发酵技术具有生产周期短、不受环境影响、产品质量稳定、产量大、过程可控等优势。获得高产三萜的灵芝发酵菌丝体主要有两种途径:一是对发酵过程中的工艺参数进行优化^[12],二是添加外源物质调控三萜及甾醇的合成。目前已发现中药提取物、金属离子、茉莉酸甲酯、稀土元素、真菌激发子等皆可提高发酵体系中三萜及甾醇的含量^[13-17]。油酸的添加可以刺激灵芝生物发酵过程中三萜的合成,从而得到高三萜含量、高收率的灵芝发酵菌丝体^[18],且油酸价廉易得,具有食用安全的特点,因此成为一种良好的诱导灵芝三萜合成的外源物质^[19]。

目前,有关灵芝中三萜液态深层发酵的研究尚停留在实验室阶段,规模化生产的报道很少。本实验室前期进行了添加油酸诱导赤芝中三萜及甾醇合成的摇瓶培养试验及 6 L 发酵罐培养试验^[18],发现油酸的最佳添加量和时间分别为 30 mL/L 和 0 h,并利用 Plackett-Burman 设计对培养基中的葡萄糖与硫酸镁含量及发酵温度进行了优化,最终在优化条件下 6 L 发酵罐所得发酵产物中三萜及甾醇含量达 1.076 g/L;还探究了赤芝液态深层发酵过程中通气量^[20]与温度调控^[21]对三萜及甾醇含量的影响。此外,本实验室开发了一种简单可重现的两阶段搅拌速度控制策略,以实现同时满足高浓度、高产量、高生产率的赤芝三萜及甾醇液态深层发酵工艺^[22];并基于 Logistic 和 Luedeking-Piret 方程构建了灵芝细胞生长、底物消耗、三萜形成的非结构动力学模型,通过 Runge-Kutta 遗传算法优化了模型的动力学参数,该模型可指导赤芝液态深层发酵的工业化生产^[23]。基于此,本研究拟采用工业级别 1 000 L 发酵罐进行放大,将获得的赤芝菌丝体发酵浓缩物(包括菌丝体及胞外液)经醇提浓缩后,再依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,对不同萃取物的抗肿瘤活性进行测定与评价,以期筛选出赤芝发酵产物的活性部位,进而为赤芝液态深层发酵的规模化制备及其活性成分研究提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验菌株和细胞

赤芝 *Ganoderma lucidum* G0023 由上海市农业科学院食用菌研究所深加工技术与发酵工程研究室提供。

L1210;小鼠白血病细胞株;K562;人慢性髓原白血病细胞株。以上细胞株均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要试剂

5-氟尿嘧啶(5-FU,美国 Sigma 公司);Alamar Blue Assay Kit(美国 Biosource 公司);RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FBS)、磷酸缓冲盐溶液(PBS)(美国 Gibco 公司);青霉素、链霉素(美国 Amresco 公司);乙醇、石油醚、乙酸乙酯均为国药试剂分析纯。

1.2.2 主要仪器

1 000 L 发酵罐(江苏神华药业有限公司);旋转蒸发仪(德国 BüCHI 公司);真空离心浓缩仪(德国 Christ 公司);多功能倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);二氧化碳培养箱、超低温冰箱(美国 Thermo Forma 公司);细胞计数仪(美国 Beckman-Coulter 公司);台式高速大容量离心机(德国 Eppendorf 公司);电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.3 培养基

种子培养基:葡萄糖 20 g/L,801 酵母粉 3 g/L,磷酸二氢钾 2 g/L,七水硫酸镁 2 g/L,自然 pH。

发酵培养基:油酸 30 mL/L,葡萄糖 30 g/L,801 酵母粉 3.5 g/L,磷酸二氢钾 2 g/L,七水硫酸镁 2 g/L,自然 pH。

1.4 培养方法

1.4.1 斜面培养

挑取保藏菌株接种于 PDA 培养基上,并于 26 ℃ 进行活化培养。

1.4.2 种子液培养

将菌块接种到种子培养基中,制备种子液。

1.4.3 发酵培养

转接种子培养液到 1 000 L 发酵罐中,装液量 700 L,接种量 10%;培养温度 26 ℃;无搅拌,100 r/min;通气比 0.8,对应通气量 560 L/min。

1.5 测定方法

发酵过程中每隔 24 h 取样检测 pH;将赤芝菌丝体用 95% (体积分数,下同)乙醇清洗,去除表面附着的油酸,离心后收集菌丝体,取适量按料液比 1:50(g/mL)加入 95%乙醇并用细胞破碎仪破碎 4 min,再于 60 ℃、400 W 条件下超声提取 1 h,重复 1 次,离心合并上清液,定容后采用香草醛-冰醋酸法^[21]测定三萜及甾醇含量。

1.6 样品的浓缩、提取与制备

发酵结束后,将 700 L 发酵液直接减压浓缩获得 30 L 待用的赤芝发酵浓缩物,然后加入 70 L 无水乙醇浸提 48 h,再将其残渣过滤后以 14 L 无水乙醇浸提 2 次,每次 24 h,得到的乙醇提取物经减压浓缩后,依次用石油醚、乙酸乙酯等体积萃取各 3 次,分别减压浓缩回收溶剂,得到石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物和剩余水溶性物质,取少量各萃取物进行减压离心浓缩后备用。

1.7 抗肿瘤活性试验

精确称取 3 种萃取物,在无菌条件下用二甲基亚砜(DMSO)溶解配制成 40 mg/mL(作用终质量浓度 200 μg/mL)的样品溶液,再依次将样品稀释成 20 mg/mL(作用终质量浓度 100 μg/mL)、10 mg/mL(作用终质量浓度 50 μg/mL)和 5 mg/mL(作用终质量浓度 25 μg/mL)备用。

将 L1210、K562 细胞分别接于 RPMI 1640 培养基中,放入 5% CO₂ 培养箱中于 37 ℃ 及饱和湿度下进行传代培养。

取对数生长期的 L1210、K562 细胞分别以 RPMI 1640 培养基稀释成 2×10^4 个/mL 的细胞悬液,按每孔 199 μL 加入 96 孔板,于培养箱中培养 4 h 后再加入 1 μL 不同浓度待测样品,每个浓度 3 个平行。阴性对照为 1 μL 的 DMSO,阳性对照为 1 μL 的 5-FU 和 1 μL 的油酸(作用终质量浓度皆为 50 μg/mL),置于培养箱中 72 h 后取出,每孔加入 30 μL 0.1 mg/mL Alamar Blue 试剂,继续培养 4—6 h 后,于 570 nm 和 600 nm 两个波长下测定吸光度值。依据 Alamar Blue 试剂计算公式得出各样品对肿瘤细胞的抑制率^[24]。

$$\text{细胞抑制率} = \left(1 - \frac{117\ 216 \times A_1 - 80\ 568 \times A_2}{117\ 216 \times A_3 - 80\ 568 \times A_4} \right) \times 100\%$$

式中: A_1 为样品在 570 nm 波长下的吸光度; A_2 为样品在 600 nm 波长下的吸光度; A_3 为阴性对照在 570 nm 波长下的吸光度; A_4 为阴性对照在 600 nm 波长下的吸光度。

1.8 统计分析

pH、三萜及甾醇含量的测定以及抗肿瘤活性试验均作 3 次平行重复,试验数据以平均值 ± 标准偏差表示。采用 Excel 2013 软件处理试验数据。

2 结果与分析

2.1 赤芝菌丝体发酵过程中三萜及甾醇含量测定

液态深层发酵过程中的 pH 变化范围为 4.44—5.00,呈现出缓慢降低的趋势,这与发酵过程中酸性代谢产物的生成有关,也符合灵芝的液态深层发酵规律^[25]。

如图 1 所示,与相同条件下未添加油酸的赤芝发酵产物中的三萜及甾醇含量变化相比,添加油酸的赤芝液态深层发酵过程中处于延滞期的时间很短,可以快速进入对数生长期,三萜及甾醇含量增长较快,并于 24 h 后保持稳定增长的态势,120 h 时达到最大值 8.91 mg/(100 mg 干菌丝)。可见,油酸的添加对促进赤芝中三萜及甾醇的合成具有重要作用。

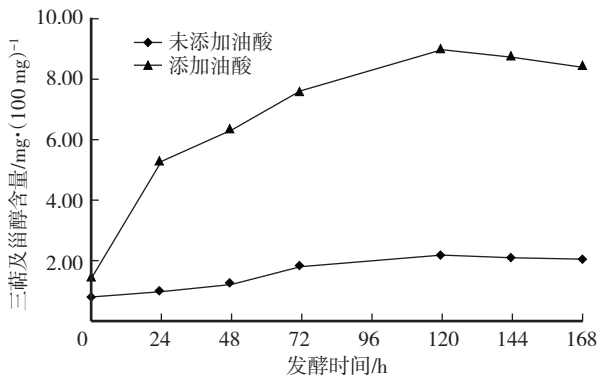


图1 添加油酸对赤芝液态深层发酵过程中三萜及甾醇含量的影响

Fig. 1 Effects of oleic acid on the content of triterpenoids and sterols in submerged fermentation of *G. lucidum*

2.2 赤芝发酵产物不同萃取物的抗肿瘤活性

由图2可知,在高浓度条件下,石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物和剩余水溶性物质对L1210细胞增殖均表现出较好的抑制作用;中等浓度时,石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物依旧有着良好的抗肿瘤活性,抑制率均高于90%,而剩余水溶性物质抑制率下降较明显;低浓度条件下,各萃取物抑制率均有一定程度下降,但乙酸乙酯萃取物的抑制率仍达到了83.65%,可见其对L1210细胞有着极强的抑制作用。油酸对L1210细胞无抑制效果,因此可以忽略各萃取物中可能残留的油酸对抑制率结果的影响。

如图3所示,石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物在200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对K562细胞的抑制率高达89%以上,而在50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时下降明显,但与阳性对照5-FU相比,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物的抑制率仍略高;剩余水溶性物质在高浓度条件下抑制率仅为62.75%,其余浓度条件下均不到30%,对K562的抑制作用不佳。同样,油酸对K562细胞几乎亦无抑制效果,因此可以忽略各萃取物中可能残留的油酸对抑制率结果的影响。

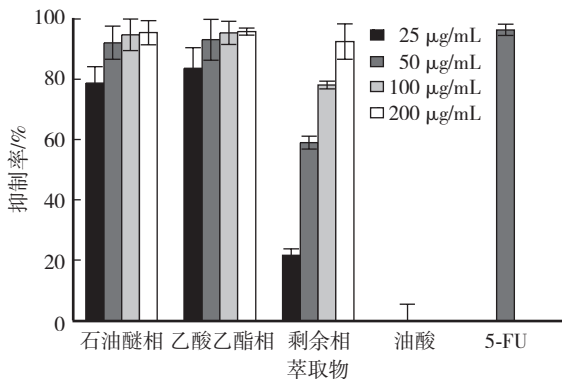


图2 不同萃取物对L1210细胞增殖的抑制作用

Fig. 2 Inhibition of different extracts on the proliferation of L1210 cells

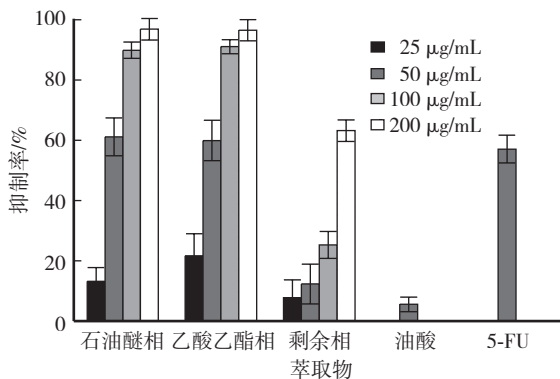


图3 不同萃取物对K562细胞增殖的抑制作用

Fig. 3 Inhibition of different extracts on the proliferation of K562 cells

3 讨论与结论

本研究采用添加油酸促进液态深层发酵过程中赤芝三萜及甾醇生成的方法,以1 000 L的工业级别发酵罐规模化制备获得30 L赤芝发酵浓缩物。对比早期200 L搅拌槽生物反应器^[26],本研究在规模上取得了较大进展,此外,所得赤芝发酵产物中的三萜及甾醇含量相较于先前报道^[27-28]也表现出了较大优势。研究发现:石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物对L1210及K562两种肿瘤细胞都表现出良好的抑制作用,其抑制作用强度均高于剩余的水溶性物质,由此可推测弱极性的甾醇及中等极性的三萜类化合物可能是发酵产物中主要的抗肿瘤活性物质,这为赤芝液态深层发酵产物后续的分离纯化及其在医药、食品、保健品行业的研究与应用提供了依据,也为今后规模化制备赤芝发酵产物开拓了思路。

参 考 文 献

- [1] 张双双. 四种灵芝科真菌和硬柄小皮伞的化学成分及生物活性研究[D]. 南京:南京农业大学,2015.
- [2] TUNG N T, TRANG T T T, CUONG T D, et al. Cytotoxic triterpenoids from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* [J]. *Natural Product Sciences*, 2014, 20(1):7-12.
- [3] SU H G, ZHOU Q M, GUO L, et al. Lanostane triterpenoids from *Ganoderma luteomarginatum* and their cytotoxicity against four human cancer cell lines [J]. *Phytochemistry*, 2018, 156:89-95.
- [4] WU Y L, HAN F, LUAN S S, et al. Triterpenoids from *Ganoderma lucidum* and their potential anti-inflammatory effects [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(18):5147-5158.
- [5] LIANG C Y, TIAN D N, LIU Y Z, et al. Review of the molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* triterpenoids; Ganoderic acids A, C2, D, F, DM, X and Y [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 174:130-141.
- [6] PENG X R, LIU J Q, HAN Z H, et al. Protective effects of triterpenoids from *Ganoderma resinaceum* on H₂O₂-induced toxicity in HepG₂ cells [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(2):920-926.
- [7] LIU L Y, CHEN H, LIU C, et al. Triterpenoids of *Ganoderma theaeacolum* and their hepatoprotective activities [J]. *Fitoterapia*, 2014, 98:254-259.
- [8] LI T Q, YU H R, SONG Y Y, et al. Protective effects of *Ganoderma* triterpenoids on cadmium-induced oxidative stress and inflammatory injury in chicken livers [J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2019, 52:118-125.
- [9] LEE I S, AHN B R, CHOI J S, et al. Selective cholinesterase inhibition by lanostane triterpenes from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011, 21(21):6603-6607.
- [10] LU S Y, PENG X R, DONG J R, et al. Aromatic constituents from *Ganoderma lucidum* and their neuroprotective and anti-inflammatory activities [J]. *Fitoterapia*, 2019, 134:58-64.
- [11] LIU G Q, WANG X L, HAN W J, et al. 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.
- [12] 翟双星, 冯杰, 冯娜, 等. 灵芝三萜液态深层发酵的研究进展 [J]. *农学学报*, 2018, 8(1):118-124.
- [13] 赵小瑞, 负建民, 艾对元, 等. 4 种中草药提取物对灵芝液态发酵三萜产物形成的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(3):97-103.
- [14] XU Y N, ZHONG J J. Impacts of calcium signal transduction on the fermentation production of antitumor ganoderic acids by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6):1301-1308.
- [15] 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.
- [16] 姚强, 高兴喜, 宫志远, 等. 部分稀土元素对灵芝多糖和三萜类物质液体发酵的影响 [J]. *食品科学*, 2011, 32(5):224-227.
- [17] ZHU L W, ZHONG J J, TANG Y J. Significance of fungal elicitors on the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by the submerged culture of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(12):1359-1370.
- [18] FENG J, ZHANG J S, FENG N, et al. A novel *Ganoderma lucidum* G0119 fermentation strategy for enhanced triterpenes production by statistical process optimization and addition of oleic acid [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2017, 17:430-439.
- [19] 孙冰沁, 秦可欣, 王桂荣, 等. 基于油酸诱导的高产三萜灵芝菌丝体发酵条件优化 [J]. *食品工业科技*, 2016(24):233-237, 244.
- [20] 冯杰, 冯娜, 杨焱, 等. 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.
- [21] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部 [M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:188-189.
- [22] FENG J, FENG N, YANG Y, et al. Simple and reproducible two-stage agitation speed control strategy for enhanced triterpene production by Lingzhi or Reishi medicinal mushrooms, *Ganoderma lucidum* ACCC G0119 (higher basidiomycetes) based on submerged liquid fermentation [J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2015, 17(12):1151-1159.
- [23] FENG J, ZHANG J S, JIA W, et al. An unstructured kinetic model for the improvement of triterpenes production by *Ganoderma lucidum* G0119 based on nitrogen source effect [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2014, 19(4):727-732.
- [24] 刘伟, 唐庆九, 张光亚, 等. 层选灵芝子实体的体外抗肿瘤及免疫活性 [J]. *微生物学通报*, 2018, 45(4):819-824.
- [25] 凌庆枝, 王林, 魏兆军, 等. pH 控制灵芝发酵产生灵芝酸的研究 [J]. *中国酿造*, 2009, 28(3):117-120.
- [26] TANG Y J, ZHANG W, LIU R S, et al. Scale-up study on the fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for the hyperproduction of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides [J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(1):404-408.
- [27] TANG Y J, ZHONG J J. Scale-up of a liquid static culture process for hyperproduction of ganoderic acid by the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *Biotechnology Progress*, 2003, 19(6):1842-1846.
- [28] 冯杰, 冯娜, 唐庆九, 等. 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.

(责任编辑:闫其涛)