

变转速策略调控灵芝菌丝体发酵高产三萜

赵娜^{1,2} 贾薇^{1*} 冯杰¹ 冯娜¹ 唐传红¹ 刘艳芳¹ 杨焱¹唐庆九¹ 张劲松^{1*}

¹ 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 上海市农业科学院食用菌研究所 上海 201403

² 上海海洋大学食品学院 上海 201306

摘要: 灵芝发酵过程中, 采用变转速调控策略, 对振荡发酵阶段进行优化, 以期达到高产三萜的目的。振荡阶段最佳条件为转速由 150r/min 变为 100r/min, 该策略与液体静置培养相结合, 最终菌丝体三萜产量高达 678.0g/L, 比优化前提高了 21%。振荡发酵阶段的变转速策略有效地提高了三萜的产量。

关键词: 灵芝, 两阶段静置培养, 变转速, 三萜

Enhancement of ganoderic acid production in the two-stage fermentation by using variable speed control strategy

ZHAO Na^{1,2} JIA Wei^{1*} FENG Jie¹ FENG Na¹ TANG Chuan-Hong¹ LIU Yan-Fang¹ YANG Yan¹
TANG Qing-Jiu¹ ZHANG Jing-Song^{1*}

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

² College of Food Science & Engineering, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: By using key stage-speed control strategy, the two-stage culture process of *Ganoderma lingzhi* was optimized in order to obtain hyper-production of total GA content. The process of variable speed from 150r/min to 100r/min, as the optimal condition in oscillation culture phase, was combined with liquid static culture. In process of the novel two-stage culture, the total Ganoderic acids production (GA) of *G. lingzhi* was improved to 678.0g/L which was 21% higher than the control. It is effective to improve total GA production by using stage-speed control strategy in oscillation culture stage.

Key words: *Ganoderma lingzhi*, a two-stage static culture, variable speed, Ganoderic acids

* Corresponding author. E-mail: 18918162047@189.cn, jiawei@saas.sh.cn

收稿日期: 2013-11-14, 接受日期: 2014-02-25

灵芝 *Ganoderma lingzhi* Sheng H. Wu *et al.* 俗称灵芝草 (Cao *et al.* 2012; 戴玉成等 2013), 在中国叫“Ling-zhi”, 在日本叫“Reishi”, 属担子菌门, 伞菌纲, 多孔菌目, 灵芝科, 灵芝属, 它有滋补壮阳, 扶正固本的药用功效 (林志斌 2001)。近代医学临床上将灵芝用于治疗癌症、胃病、肾病、糖尿病、高血脂、关节炎、神经衰弱等症 (Wang *et al.* 2007; Mojadadi *et al.* 2006), 作为一种名贵的中草药在东亚地区已有几千年的历史。灵芝酸是灵芝的重要活性成分之一, 其作为一种萜类次级代谢产物具有许多重要的药理活性, 包括抑制肝癌细胞、抑制组胺释放、抑制胆固醇合成、刺激血小板凝聚、抗癌等作用 (Shiao *et al.* 1994; Zhong & Tang 2004; Tang *et al.* 2006; El-Mekkaway *et al.* 1998; Akihisa *et al.* 2007)。

近几年, 灵芝的深层发酵受到广泛关注, 特别是其代谢物三萜和多糖, 大量研究集中于它们的药理应用。灵芝是振荡静置两阶段的培养方式, 对于培养过程中环境因素的研究甚多, 如培养基优化、溶氧、pH 值、添加诱导剂等方面 (Tang *et al.* 2009; Liang *et al.* 2010; Fang & Zhong 2002), 而对于振荡阶段转速、剪切力等重要因素的研究方面鲜有报道。然而上述环境因素之间存在着紧密的联系, 培养基的变化可以导致 pH 的变化, 转速的改变可以导致溶氧的变化等。灵芝两阶段培养过程中, 体系中溶氧的变化对于灵芝菌丝体生物量和三萜含量均有影响。Tang & Zhong (2003) 发现灵芝深层发酵过程中, 体系中相对溶氧保持 25% 时菌丝体生物量达最高, 溶氧保持在 10% 时, 其三萜产量最高。两阶段变溶氧试验中, 将生物量与三萜产量结合考虑, Tang *et al.* (2009) 发现在深层发酵过程中, 在发酵第 6 天, 溶氧量从 25% 变为 10% 时, 三萜增长最迅速。Zhang & Zhong (2010) 对灵芝发酵两阶段进行研究, 发现静置阶段分别通入不同浓度氧气, 高浓度的溶氧, 有助于灵芝生物量和三萜含量的生成。

丝状菌丝体在深层发酵过程中的形态对一些

代谢物合成有重要影响, 许多丝状真菌以游离菌丝体或者球状生长。其中搅拌剪切力等影响因素对于扩大菌丝体生长影响较为显著 (Biebl *et al.* 1999)。通过 Fang *et al.* (2002) 的研究提出了灵芝振荡静置两阶段培养能有效地提高三萜产量, 经过后期的静置培养后, 液体表面出现的白色菌丝层比传统的深层发酵菌丝中的三萜含量提高约 3 倍。在灵芝两阶段培养实验中, Xu *et al.* (2010) 发现静置阶段其三萜自身生物合成基因 (*hmgr*, *sqs*, *ls*) 的转录能力明显增强。灵芝的振荡静置两阶段培养已经成为灵芝液态发酵中高产三萜的可行且有效的方式。在此两阶段培养过程中, 振荡阶段时间虽短, 但为静置阶段提供良好的菌丝量和合成三萜的基础, 振荡阶段转速的变化与溶氧密切相关。目前, 溶氧对菌丝振荡阶段影响的试验研究很少, 由于其在菌丝体上下层变化的研究较为困难, 在静置阶段仅限于溶氧的外界控制。转速在振荡阶段的研究更是少有。因此本文是以两阶段培养为基础, 以高产三萜为目的, 在静置阶段培养条件不变的情况下, 对摇床振荡培养阶段的转速策略进行重点研究, 以期得到高产三萜的最佳发酵工艺, 为灵芝深层发酵提供新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

灵芝 *Ganoderma lingzhi* G0023 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。

1.2 培养基

斜面培养基: PDA 培养基 (g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20。种子培养基 (g/L): 豆饼粉 20, 葡萄糖 25, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.5, KH_2PO_4 3.0, 自然 pH。发酵培养基 (g/L): 豆饼粉 30, 可溶性淀粉 20, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.25, KH_2PO_4 1.5, 自然 pH。

1.3 主要仪器

5.5L 自动发酵罐 (上海保兴生物设备工程有限

公司, Biotech-5BGZ+50JS-3000PLC); 酶标仪 (BIO-TEK, synergy HT); 灭菌锅 (Tomy, autoclave SS-325); 回转式恒温调速摇瓶柜 (HYG-II, 上海欣蕊自动设备有限公司); LRH 系列生化培养箱 (上海一恒科技有限公司)。

1.4 培养方法

1.4.1 液体种子制备: 250mL 摇瓶装液 100mL, 从活化好的斜面铲出黄豆大小菌丝体 6 块, 接入锥形瓶中。26℃ 和 150r/min 培养 7d, 收集一级种子液。

250mL 摇瓶装液 100mL, 按照接种量 20%, 将一级种子液接入锥形瓶中, 26℃ 和 150r/min 培养 5d, 收集二级种子液。

1.4.2 发酵罐培养: 5L 发酵罐中装液量为 3L, 接种量 10%, 温度为 26℃, 搅拌转速为 100r/min, 通气量 3L/min, 自然 pH, 发酵 3d 后接入 250mL 锥形瓶中进行后续的液体静置培养。

1.4.3 摇床转速单因素试验: 250mL 摇瓶装液 100mL, 接种量 10%, 将二级种子液接入每个锥形瓶中, 26℃ 自然 pH 条件下培养, 分别在 80、100、120、140、160r/min 转速摇床下, 培养 3d, 进行液体静置培养。

1.4.4 摇床变转速发酵两阶段试验: 250mL 摇瓶装液 100mL, 接种量 10%, 将二级种子液接入锥形瓶中, 26℃ 培养, 自然 pH, 培养 3d 的过程中, 选择中间时间 1.5d 作为转速变化时间点。分别设计 4 组变转速 100r/min (培养 3d)、100→150r/min (第 1.5 天改变转速)、150r/min (培养 3d)、150→100r/min (第 1.5 天改变转速), 培养 3d 后, 进行液体静置培养。

1.4.5 灵芝的两阶段摇瓶培养方式: 液体振荡培养, 参照 1.4.3 和 1.4.4 进行试验。液体静置培养, 即振荡培养 3d 后, 将装有培养液的锥形瓶在 26℃ 的培养箱中静置培养, 观察菌丝体的生长情况。

1.5 分析测定

1.5.1 菌丝体含量测定: 收取静置上层菌丝体, 用去离子水洗 3 次, 培养基中悬浮细胞 $10\ 000\times g$ 离

心 10min, 上清液用于测定发酵液中的残糖量。将菌丝体置于 55℃ 烘箱中, 烘干至恒重。称重后研磨成粉末。所有的样品作 3 个平行样。

1.5.2 pH 值测定: 将 pH 计校正后, 插入摇匀的上清发酵液直接测定。

1.5.3 残糖量测定 (苯酚硫酸法): 取上清发酵液摇匀, 稀释 200–500 倍, 稀释液用苯酚硫酸法测总糖量 (张惟杰 1999)。

1.5.4 总三萜测定: 称取干菌丝体粉末 200mg, 加入 5mL 95%乙醇, 超声 2h (重复一次), 过滤后取得上清液, 合并两次上清制成待测液。以齐墩果酸为标准品, 用香草醛-冰醋酸法测定总三萜的含量 (赵明文等 2003)。

1.5.5 单体灵芝酸的测定: 称取干菌丝体粉末 100mg, 加入 5mL 95%乙醇, 超声 2h (重复一次), 过滤后取得上清液, 合并两次上清, 用旋转蒸发仪, 45℃ 真空蒸干, 用 5mL 甲醇溶解, 0.22μm 滤膜过滤。以灵芝酸 T、灵芝酸 R、灵芝酸 S 为标品 (纯度>98%), 用 HPLC 测定菌丝体中单体含量。液相条件: YMC C₁₈ 色谱柱 (250mm×4.6mm, 5μm); 流动相 0.5%冰醋酸水溶液 (A)-甲醇 (C), 梯度洗脱 (0–20min: 85% C→100% C; 20–30min: 100% C), 流速: 1mL/min; 检测波长: 245nm; 柱温: 30℃; 进样量: 10μL。

2 结果与分析

2.1 发酵曲线绘制

灵芝菌丝体的两阶段发酵, 振荡阶段在发酵罐中进行, 培养 3d 后, 分别接入 250mL 锥形瓶 (装液量 100mL) 中进入静置阶段, 再培养 14d 后, 绘制发酵各参数变化曲线。发酵罐仪器记录 pH 数据, 培养过程中固定时间取样测得生物量、三萜含量和发酵液中的残糖量。

在振荡发酵阶段 (第 1 天到第 3 天), 溶氧量变化明显 (图 1)。其中从 0–36h 相对溶氧由 100% 迅速降至 9.9%, 36–72h 溶氧有略微回升的趋势,

在 8.5%–14.5% 之间波动; 同样, 在 0–72h, pH 值由初始 5.43 迅速降至 3.03。灵芝是需氧型真菌, 在振荡阶段, 体系中溶氧量迅速降低, 说明菌丝体处于大量生长时期。此时菌丝体对营养物质需求高, 由于对培养基中氮源、碳源、无机盐等物质的消耗, 以及自身代谢物的生成, 导致体系中 pH 的骤降。

振荡发酵阶段 (图 2A), 0–2d 菌丝体生物量由 2.7g/L 增加到 4.8g/L, 第 3 天增至 7.3g/L。说明菌丝体接入新的培养环境后需要一段适应过程, 大约 2d 后才大量繁殖。从发酵整个过程分析, 生物

量在静置阶段增长更快, 3–17d, 由 7.3g/L 增至最终 20.3g/L, 糖消耗也是在此时变化剧烈。振荡阶段, 总三萜由 6.57mg/g 缓慢增长到 10.07mg/g, 在静置 14d 后高达 45.05mg/g。说明振荡阶段菌丝体主要处于生长繁殖时期, 三萜产量很低。在静置阶段三萜才大量合成, 其中目标灵芝酸在第 5 天后迅速增加 (图 2B), 也证明了这一点。振荡阶段是菌丝体生长的关键阶段, 为静置阶段三萜合成提供了良好的生物量基础, 是否提高此时菌丝体生物量会更好促进最终三萜产量的提高, 有待进一步研究。

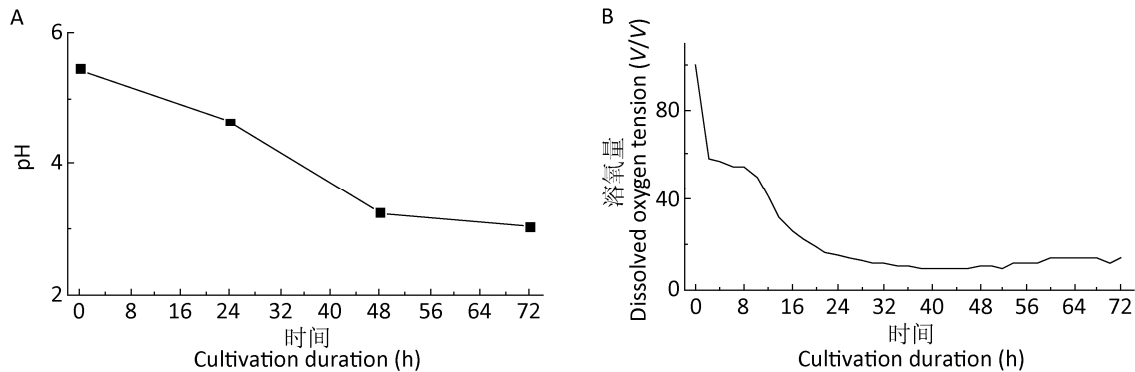


图 1 灵芝两阶段发酵过程中 pH 值和溶氧量的变化曲线

Fig. 1 Time courses of culture pH values and dissolved oxygen tension in two-stage cultures of *Ganoderma lingzhi*.

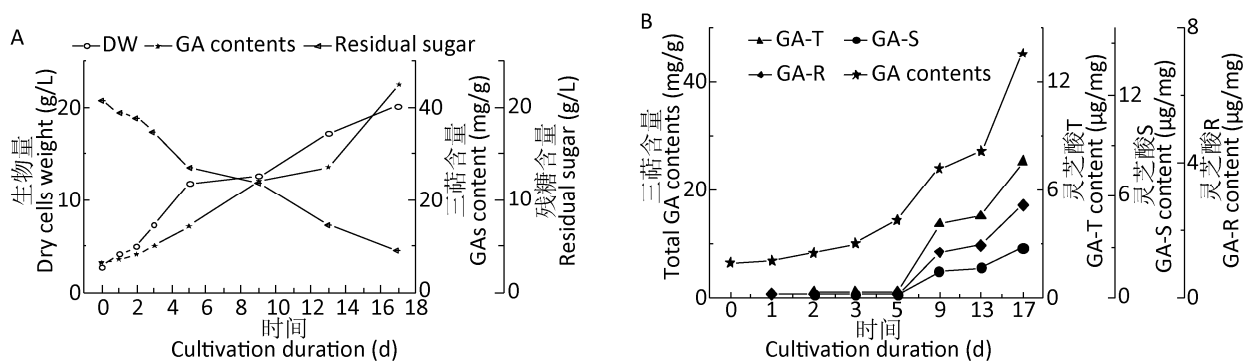


图 2 灵芝菌丝体两阶段发酵生物量、灵芝酸含量、残糖量的变化

Fig. 2 Dynamic profiles of total cell density, GA contents and sugar consumption in second-stage cultures of *Ganoderma lingzhi*.

GA: Ganoderic acids; GA-T: Ganoderic acid T; GA-S: Ganoderic acid S; GA-R: Ganoderic acid R.

2.2 摇床转速单因素试验

在振荡阶段, 摇床转速分别控制在 80、100、120、140、160r/min, 发酵 3d, 26℃培养箱静置 14d, 最终测得终点 pH 值、残糖量、生物量和三萜含量。

随着转速的增加, 体系中的终点 pH 变化幅度小 (图 3A); 最终发酵液的残糖量也差别不大 (图 3B); 灵芝上层菌丝体生物量随转速增大而增加,

下层菌丝体却随之减小 (图 3C); 转速高于 120r/min 时三萜含量变化不明显 (图 3D)。转速的变化对于菌丝体上下层的生物量影响存在差异。低转速条件下, 生成的上层菌丝体量少, 下层菌丝体多, 高转速则相反。说明振荡阶段高转速生成的菌丝体, 在静置阶段更利于转化成上层菌丝体, 然而上层菌丝体的三萜含量远高于下层, 因此转速对于三萜产量有重要影响。

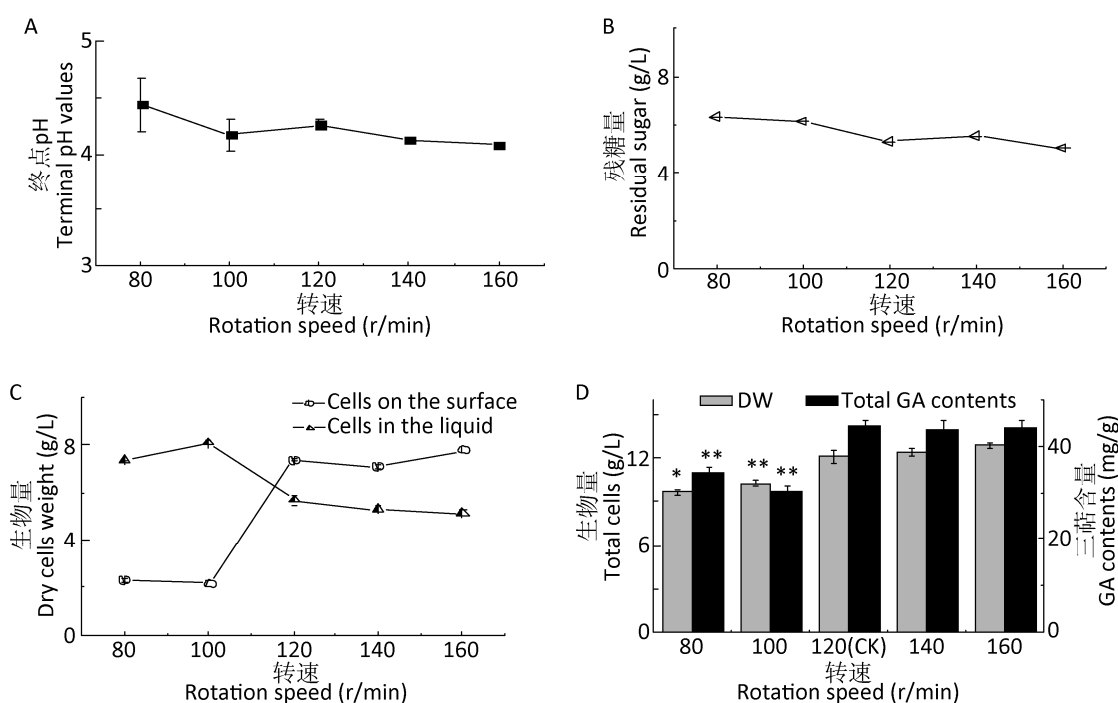


图 3 振荡阶段不同转速对发酵各因素的影响 * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Fig. 3 Effects of different rotational speed on terminal culture pH values (A), sugar consumption (B), cell growth in the liquid and on the liquid surface (C), GA content (D) in oscillation culture of *Ganoderma lingzhi*. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

随着初始转速的增大, 灵芝菌丝体总生物量则保持缓慢增长的状态, 其中 100r/min 时, 灵芝生物量较低为 10.27g/L, 三萜含量为 30.4mg/g 最低; 转速达到 120r/min 以上时, 三萜含量较高且趋于稳定。通过 SPSS 16.0 软件分析, 转速在 120、140 和 160r/min 时, 三者的生物量和三萜含量不存在差异 ($P>0.05$), 然而三者的三萜含量明显高于

100r/min 和 80r/min 时的值, 说明转速为 100r/min 不利于三萜合成, 而在高于 120r/min 时利于三萜合成, 因此确定最低转速为 100r/min, 最高转速为 150r/min。

2.3 摇床变转速发酵两阶段试验

2.3.1 变转速发酵两阶段生物量与三萜量的变化: 振荡培养阶段, 是灵芝菌丝体生长的关键时期, 且

转速的大小对于最终三萜的产量具有重要的影响,对转速进一步优化很有意义。因此,在振荡阶段,进行两阶段变转速试验,其中分为4组:100r/min(恒速度)、100→150r/min(1.5d变转速)、150r/min(恒速度)、150→100r/min(1.5d变转速)。

在两阶段变转速的试验(图4)中,转速和生物量依然存在相依关系,其中变转速(150→100r/min)的三萜含量为58.65mg/g,比优化前(150r/min)三萜量45.87mg/g略高,三萜产量达到678.0g/L,比优化前提高了21%;然而变转速(150→100r/min)生物量为11.56g/L,比优化前12.21g/L小。说明在振荡过程中,前1.5d,菌丝体处于适应环境阶段,此时150r/min高转速有利于其更快地适应环境,进入迅速生长阶段;1.5d时改变转速,新的剪切力对菌丝体形态产生影响,同时也改变了此时体系中的溶氧量,100r/min转速下的溶氧更有利于菌丝体后期生长和代谢,因此,变转速策略有助于最终高产三萜。

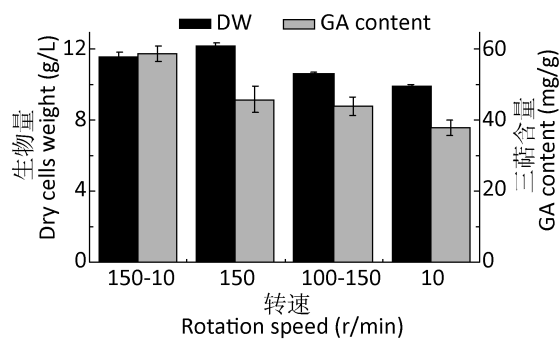


图4 振荡发酵阶段变转速对灵芝菌丝体生物量和三萜产量的影响

Fig. 4 Effects of variable speed on total biomass (by dry weight) and GA content in oscillation culture of *Ganoderma lingzhi*.

2.3.2 变转速发酵两阶段对灵芝酸单体变化影响:两阶段变转速试验证明其有利于最终三萜合成。通过HPLC的检测,比较4组变转速试验中,GA-T、GA-S、GA-R 3种主要灵芝酸的含量。

在变转速的体系中,随着剪切力的改变,3种主要灵芝酸含量的变化与总三萜含量变化一致(图5),150→100r/min时3种主要灵芝酸GA-T、GA-S、GA-R分别为8.24μg/mg、6.49μg/mg、3.29μg/mg,明显高于对照组灵芝酸(150r/min时)的含量。这进一步证明了两阶段变转速策略有利于高产三萜。

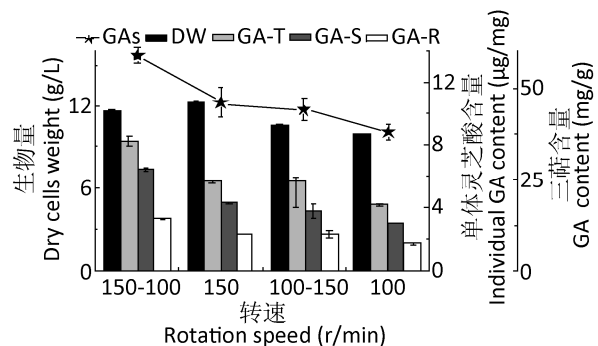


图5 振荡发酵阶段变转速对菌丝体生物量和单体灵芝酸影响

Fig. 5 Effects of variable speed on total cells and individual GA content in the oscillatory stage culture of *Ganoderma lingzhi*.

通过对3种灵芝酸含量分析,3种主要灵芝酸的比例也存在变化,GA-T:GA-S:GA-R的比例分别为3:2:1(150→100r/min),2:2:1(150r/min),2:2:1(100r/min),2:2:1(100→150r/min)。说明最优变转速模式下,由大转速变至小转速的过程,有效地促进了菌丝体适应环境的能力,同时改变了过程中的溶氧量,使得最终产物更多地向GA-T转化。

3 讨论

在灵芝菌丝体两阶段发酵过程中,我们通过各参数变化曲线,分析发现溶氧量和体系的pH在振荡阶段变化剧烈,其余参数则变化相对缓慢,说明在振荡阶段菌丝体处于细胞聚集的关键时期,需要消耗大量营养物质,此阶段虽然发酵时间短,却为最终高产三萜奠定基础。

通过转速的单因素研究,我们确定了 100r/min 为最不利于三萜合成转速, 150r/min 为最佳转速。利用这两个高低转速设计了振荡阶段变转速策略试验。在静置培养条件不变的情况下只对振荡阶段培养中的转速进行变转速调节控制, 结果表明 150→100r/min 组的三萜产量, 比对照组 (150r/min 恒转速) 的三萜产量高了 21%, 其三萜含量高达 58.65mg/g, 说明在振荡阶段, 变转速调控策略打破了原有体系中溶氧量, 使得体系各参数更利于菌丝体的生长, 为后期液体静置阶段奠定生物量基础, 从而最终达到高产三萜的目的。

目前灵芝发酵工艺大多数的报道, 都是针对液体静置阶段发酵条件进行优化, 对细胞聚集生长关键期——振荡阶段的优化报道很少, 本试验的成功优化, 将会为今后灵芝高产三萜方面提供新的参考, 同时对灵芝菌丝体两阶段培养有了更深层的理解。

[REFERENCES]

- Akihisa T, Nakamura Y, Tagata M, Tokuda H, Yasukawa K, Uchiyama E, Suzuki T, Kimura Y, 2007. Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Chemistry and Biodiversity*, 4: 224-231
- Biebl H, Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD, 1999. Microbial production of 1,3-propanedio. *Microbiology and Biotechnology*, 52: 289-297
- Cao Y, Wu SH, Dai YC, 2012. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom "Lingzhi". *Fungal Diversity*, 56: 49-62
- Dai YC, Cao Y, Zhou LY, Wu SH, 2013. Notes on the nomenclature of the most widely cultivated *Ganoderma* species in China. *Mycosystema*, 32: 947-952
- El-Mekkaway SR, Meselhy M, Nakamura N, Tezuka Y, Hattori M, Kakiuchi N, Shimotohno K, Kawahata T, Otake T, 1998. Anti-HIV-1 and anti-HIV-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 49: 1651-1657
- Fang QH, Tang YJ, Zhong JJ, 2002. Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, 37: 1375-1379
- Fang QH, Zhong JJ, 2002. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal*, 10: 61-65
- Liang CX, Li YB, Xu JW, Wang JL, Miao XL, Tang YJ, Gu TY, Zhong JJ, 2010. Enhanced biosynthetic gene expressions and production of ganoderic acids in static liquid expressions and production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under phenobarbital induction. *Microbiology and Biotechnology*, 86: 1367-1374
- Lin ZB, 2001. Modern research of *Ganoderma lucidum*. 2nd edition. Beijing Medical University Press, Beijing. 1-327 (in Chinese)
- Mojadadi S, Ebtekar M, Hassan ZM, 2006. Immunomodulatory effects of *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae) on CD4+/CD8+ tumor infiltrating lymphocytes in breast-cancer-bearing mice. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 8 (4): 315-320
- Shiao MS, Lee KR, Lee JL, Cheng TW, 1994. Natural products and biological activities of the Chinese medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. Food phytochemicals for cancer prevention II. In: ACS Symposium Series. Vol. 547. American Chemical Society, Washington. 342-354
- Tang W, Liu JW, Zhao WM, Zhong JJ, 2006. Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. *Life Sciences*, 80: 205-211
- Tang YJ, Zhong JJ, 2003. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 478-484
- Tang YJ, Zhang W, Zhong JJ, 2009. 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*. *Bioresource Technology*, 100: 1852-1859
- Wang G, Zhao J, Liu JW, Huang YP, Zhong JJ, Tang W, 2007. Enhancement of IL-2 and IFN- γ expression and NK cells activity involved in the anti-tumor effect of ganoderic acid Me *in vivo*. *International Immunopharmacology*, 7(6): 864-870
- Xu JW, Xu YN, Zhong JJ, 2010. Production of individual ganoderic acids and expression of biosynthetic genes in liquid static and shaking cultures of *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 941-948
- Zhang WJ, 1999. Sugar complex biochemical research techniques. 2nd edition. Zhejiang University Press, Hangzhou. 9-15 (in Chinese)
- Zhang WX, Zhong JJ, 2010. Impact of oxygen level in gaseous phase on gene transcription and ganoderic acid biosynthesis in liquid static cultures of *Ganoderma lucidum*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33: 683-690
- Zhao MW, Wang CG, Wang N, Bao P, Xing ZT, Liang WQ, Yu JQ, Shang XD, Men DY, Pan YJ, 2003. The comparison of triterpene and polysaccharide content in different mycelium. *Edible fungi of China*, 22(2): 43-461 (in Chinese)
- Zhong JJ, Tang YJ, 2004. Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. *Advances in Biochemical Engineering*, 87: 25-59
- [附中文参考文献]
- 戴玉成, 曹云, 周丽伟, 吴声华, 2013. 中国灵芝学名之管见. *菌物学报*, 32: 947-952
- 林志彬, 2001. 灵芝的现代研究. 第二版. 北京: 北京医科大学出版社. 1-327
- 张惟杰, 1999. 糖复合物生化研究技术. 第二版. 杭州: 浙江大学出版社. 9-15
- 赵明文, 王晨光, 鲍鹏, 邢增涛, 梁婉琪, 郁键强, 尚晓冬, 门殿英, 王南, 潘迎捷, 2003. 不同菌丝体中三萜与多糖含量的比较. *中国食用菌*, 22(2): 43-461