

液体发酵条件对灵芝菌体形态及胞外多糖活性的影响

乔双逵^{1,2}, 彭林¹, 丁重阳^{*1,2}, 顾正华², 张梁^{1,2}, 石贵阳²

(1. 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122; 2. 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏无锡 214122)

摘要: 作者主要研究灵芝在液体发酵过程中, 发酵时间、初始 pH 值、培养温度等发酵条件对灵芝菌体形态、胞外多糖产量及多糖抗肿瘤活性的影响, 其目的在于通过调控发酵条件获得高活性、高产量的灵芝多糖。依据灵芝菌球直径的大小, 所有菌球被分为小型、中型和大型菌球, 结果表明, 发酵过程中菌体形态以中型菌球为主, 在中小型菌球比例较高时有利于胞外多糖的合成, 并且小型菌球比例大于大型菌球时, 发酵液中多糖含量较高; 在比较不同发酵条件下获得的胞外多糖对肿瘤细胞抑制作用时发现, pH 4.0 和 30 ℃ 条件下获得的多糖对小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 具有更高的抑制作用。

关键词: 灵芝; 液体发酵; 胞外多糖; 菌体形态; 抗肿瘤活性

中图分类号: TS 201.1; R 979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)10—1070—07

Effect of Different Culture Conditions on Mycelium Morphology and Activity of Exopolysaccharides from *Ganoderma lucidum* in Submerged Culture

QIAO Shuangkui^{1,2}, PENG Lin¹, DING Zhongyang^{*1,2}, GU Zhenghua², ZHANG Liang^{1,2}, SHI Guiyang²

(1. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Laboratory for Cereal Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Submerged fermentation is an important method to produce active metabolites of the edible and medicinal mushroom and attracted attentions of many researches. For obtaining polysaccharides of high yield and activity through regulating the fermentation conditions, effect of culture conditions (including culture time, initial pH and culture temperature) on *G. lucidum* mycelium morphology and biosynthesis and antitumor activity of *G. lucidum* exopolysaccharides were studied in this work. The *G. lucidum* pellets were divided to small, middle and large pellet by the diameter. The results indicated that the main form of mycelium was the M pellet, and the high percentage of M and S pellet was beneficial to the exopolysaccharides production. Moreover, high ratio of S to L pellet was good for the accumulation of *G. lucidum* exopolysaccharides. The result of antitumor activities of different *G. lucidum* EPS showed that higher inhibition effect on Hepa 1-6

收稿日期: 2014-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271918)。

* 通信作者: 丁重阳(1975—), 男, 江苏南通人, 工学博士, 副教授, 主要从事发酵过程优化控制及食药用真菌生物技术研究。

E-mail: zyding@jiangnan.edu.cn

and MDA-MB-231 cells was obtained in culture condition of initial pH 4.0 and 30 °C.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, submerged fermentation, exopolysaccharides, morphology, antitumor activity

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是一种名贵的食药两用真菌,具有极高的药用和保健价值,在亚洲作为药材使用已有2 000多年的历史^[1-2]。灵芝所具有的药用和保健功能,是由于其含有多种活性物质^[3-4]。随着近年来研究的不断深入,发现灵芝多糖是灵芝的主要活性成分之一,经现代药理学研究证明,灵芝多糖具有降血糖^[5]、降血脂^[6]、抗肿瘤^[7]、抗氧化^[8]等药理作用。灵芝的传统生产方式为固态发酵培养灵芝子实体,从子实体中获得所需的活性物质。从生物学的观点看,由于微生物本身的固有特点,便于实现工业化大规模生产^[9],因此,近年来大量学者研究了液体深层1发酵产胞外多糖^[10-12],通过发酵条件以及培养基的优化来提高胞外多糖的产量^[12-14]。与固态发酵相比,液体发酵具有不受季节影响、液体培养周期短、成本低等优点,因此受到研究者的广泛关注。

在液体发酵过程中,丝状真菌菌体形态受到培养条件的影响后会产生不同的变化,菌体形态的变化与代谢产物的合成有直接联系^[15-16],在灵芝发酵产胞外多糖的研究中也有类似的报道^[17]。作者通过控制不同发酵条件,研究发酵过程中灵芝胞外多糖产量和菌体形态的变化和联系,同时研究了不同发酵条件下获取的灵芝胞外多糖对不同肿瘤细胞的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种及肿瘤细胞株 灵芝(*Ganoderma lucidum*)菌株:江南大学粮食发酵工艺与生物技术国家工程实验室保藏;小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6;购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;人乳腺癌细胞 MDA-MB-231;江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室保藏。

1.1.2 主要试剂 胰蛋白胨(Tryptone):购自英国Oxoid公司;无氨基酵母氮源(YNB):购自拜耳迪公司;DMEM液体培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶:美国Hyclone公司产品;1× penicillin/streptomycin:

美国Gibco公司产品。

1.1.3 培养基

1) 斜面培养基(g/L):土豆 200,葡萄糖 20,琼脂条 20~22。

2) 种子及发酵培养基(g/L):葡萄糖 20,胰蛋白胨 5,无氨基酵母氮源 5,磷酸二氢钾 3,七水硫酸镁 2,初始 pH 6.0;考察 pH 条件时,发酵培养基初始 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0;种子及发酵培养基灭菌条件为 110 °C 灭菌 20 min,葡萄糖单独灭菌后加入培养基。

3) Hepa 1-6 及 MDA-MB-231 肿瘤细胞 DMEM 基础培养基:DMEM 培养基+质量分数 10% 胎牛血清+质量分数 1% penicillin/streptomycin。

1.2 实验方法

1.2.1 液体发酵培养 种子培养时,将 4 块 0.5 cm² 大小的活化菌种斜面接入装有 80 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,150 r/min、30 °C 条件下培养 10 d。发酵培养时,将种子以 0.5 g 菌体湿重的接种量接种到含有 150 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,150 r/min、30 °C 条件下培养 10 d。

1.2.2 不同发酵条件培养

1) 发酵时间:培养条件如 1.2.1 所述。

2) 初始 pH 值:在研究初始 pH 值对灵芝发酵影响时,初始 pH 值分别用 HCl 和 NaOH 调为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0,以初始 pH 6.0 为对照,培养时间为 5 d。

3) 培养温度:在研究培养温度对灵芝发酵影响时,培养温度分别为 20、25、30、35 °C,以培养温度 30 °C 为对照,培养时间为 5 d。

1.2.3 胞外多糖体外抑制肿瘤细胞增殖实验

1) 胞外多糖样品的选择:当考察 pH 条件时,选择初始 pH 值 4.0、6.0、7.0 在第 3 天和第 5 天的胞外多糖;当考察培养温度条件时,选择 20、25、30、35 °C 在第 1 天及第 6 天时所获得的胞外多糖,并用 DMEM 基础培养基将多糖样品稀释成 2.5 mg/mL 的多糖溶液。

2) 体外抗肿瘤活性的测定:小鼠肝癌细胞

Hepa 1-6 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 在 DMEM 基础培养基中,体积分数 5% CO₂、37 ℃环境下培养至细胞贴壁率达 80%后,制成 4×10⁴ 个细胞/mL 的细胞悬浮液,96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬浮液,空白组为不含细胞的 DMEM 基础培养基,置 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养 1 天后,除去孔内的培养基,分别加入终浓度为 2.5 mg/mL 的多糖溶液 100 μL,每个样品设 5 个复孔。其中以不加多糖溶液细胞为对照组,其余组为实验组。在 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养 2 d,加入 MTT,继续于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养 4 h,移去所有培养基,每孔加入二甲基亚砷 150 μL,反复洗吹后在酶标仪上双波长 595 nm(检测波长)和 655 nm(参考波长)下,测定各孔的 A 值,并按照以下公式计算肿瘤细胞抑制率。

肿瘤细胞抑制率=((对照组 A 值-实验组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值))×100%

1.2.4 菌体生物量测定 取 100 mL 发酵液抽滤,经蒸馏水充分洗涤 2 次后抽滤收集,60 ℃烘干至恒重,称量后计算菌体生物量。

1.2.5 胞外多糖产量测定 取 1 mL 发酵液上清,加 4 倍体积分数 95%乙醇(工业酒精),充分混合后 4 ℃静置过夜,10 000 r/min 离心 5 min,去上清,沉淀加 4 mL 蒸馏水溶解,取 400 μL 上清用苯酚-硫酸法^[18]测定多糖。

1.2.6 胞外多糖的获得 取 100 mL 发酵液,10 000 r/min 离心 5 min,上清液中加入 0.45 倍的体积分数 95%乙醇(工业酒精),充分混合后除去蛋白,再加

2.25 倍体积分数 95%乙醇(工业酒精),4 ℃静置过夜,10 000 r/min 离心 5 min,去上清,通风 1 d 挥发酒精,沉淀加 30 mL 蒸馏水溶解,10 000 r/min 离心 10 min,上清液冷冻干燥后获得胞外多糖。

1.2.7 菌体形态分析 取 5 mL 发酵液于 6 cm×6 cm 的玻璃平皿中,加 15 mL 蒸馏水使菌球悬浮,数码相机拍照,使用 Image-pro-plus 软件分析菌球当量直径 D ,并按照公式(1)计算当量直径 D 。

菌球平均直径=所有菌球当量直径之和/总菌球数 (1)

其中 A 为菌球表面积。

根据菌球当量直径将菌球形态分为小型、中型和大型菌球(表 1)。

表 1 基于直径的菌体形态分类

Table 1 Classification of fungi pellet by diameter

直径/mm	菌球分类
$D < 0.8$	小型
$0.8 \leq D < 2.5$	中型
$D \geq 2.5$	大型

2 结果与分析

2.1 菌体形态与胞外多糖产量的关系

2.1.1 发酵时间对菌体形态及胞外多糖产量的影响 灵芝液体发酵过程中,灵芝菌体生物量和胞外多糖产量变化见表 2。随着发酵时间的进行,菌体生物量持续增加,第 10 天时达到了 10.57 g/L;胞外多糖产量先增加后减少,第 5 天时达到最大值 0.472 g/L,随后开始逐渐减少,在第 10 天时降至 0.108 g/L。

表 2 灵芝菌体生物量、胞外多糖产量及菌球平均直径在发酵过程中的变化

Table 2 Biomass, exo-polysaccharose production and average pellet diameter of *Ganoderma lucidum* during the submerged fermentation

发酵时间/d	生物量/(g/L)	胞外多糖/(g/L)	菌球平均直径/mm
1	0.16±0.02	0.285±0.03	0.95±0.1
2	0.91±0.14	0.359±0.01	1.26±0.2
3	1.41±0.15	0.377±0.04	1.78±0.1
4	3.24±0.32	0.451±0.03	1.67±0.3
5	4.31±0.35	0.472±0.04	1.68±0.5
6	7.32±0.41	0.420±0.06	2.07±0.1
7	8.34±0.36	0.413±0.04	2.29±0.2
8	9.29±0.48	0.194±0.04	2.40±0.7
9	10.16±0.55	0.128±0.01	2.79±0.1
10	10.57±0.38	0.108±0.01	3.06±0.1

灵芝菌体在液态发酵过程中主要以菌球形态存在,利用 Image-pro-plus 软件分析灵芝菌球形态后,根据当量直径将灵芝菌球分为小型、中型和大型菌球(表 1)。对发酵过程中菌体形态变化进行分析后发现,发酵初期灵芝菌球直径较小,小型菌球是灵芝菌体的主要形态;随着发酵时间的进行,小型灵芝菌球逐渐变大,表现为前 3 天小型菌球比例减少和中型菌球比例的增大(图 1);第 4 天到第 5 天,新的小型菌球的生成使小型菌球比例重新增加,在前 5 天的发酵过程中,大型菌球比例始终保持较低水平,与此相对应的是灵芝胞外多糖在这一时间中积累到最高值。第 5 天后,大型菌球比例不断增加,与之相对应的是胞外多糖浓度逐渐降低,在发酵结束时,大型菌球比例达到最高,而多糖浓度降至最低。因此,通过此结果可以得出,中小型菌球的存在有利于灵芝胞外多糖的合成,而大型菌球的存在会对多糖的积累产生不利的影响。有研究也发现,小菌球有利于灵芝多糖的合成而不利于灵芝酸的合成,当灵芝菌球直径分别为 $D < 1.2 \text{ mm}$ 、 $1.2 \leq D < 1.6 \text{ mm}$ 及 $D \geq 1.6 \text{ mm}$,其胞内多糖产量(多糖产量/菌体生物量)分别为 85、69、55 mg/g,而灵芝酸产量(灵芝酸产量/菌体生物量)分别为 10、13、16 mg/g^[19]。

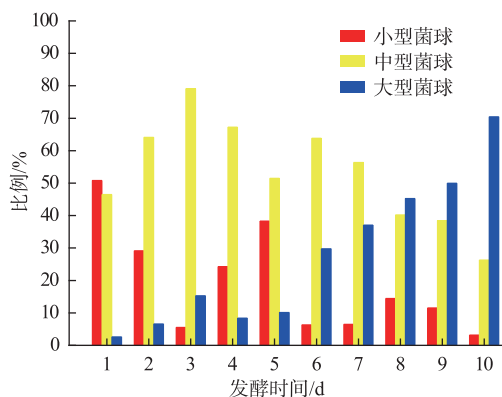


图 1 灵芝菌体直径在液态发酵过程中的分布

Fig. 1 Distribution of *Ganoderma lucidum* pellet diameter during the submerged fermentation

2.1.2 培养基初始 pH 值对菌体形态以及胞外多糖产量的影响 液体发酵过程中,pH 值是影响微生物生长的重要参数,对营养物质的溶解和传递、代谢相关酶的活性以及菌体形态的变化有着重要的影响。灵芝菌体的生长以及胞外多糖的生成随着 pH 值的增加呈现规律性变化(表 3),随着 pH 值的升高,多糖产量先增加后减少,当 pH 值为 6.0 时,

多糖产量达到最大值 0.456 g/L,较高的 pH 值(5.0~7.0)有利于多糖的合成;菌体生物量随着 pH 值的升高逐渐减小,说明较低 pH 值有利于菌体的生长。与 Lee 等^[20]的研究结果一致,较低 pH 值有利于菌体的生长,而较高的 pH 值有利于多糖的生成。

表 3 初始 pH 值对菌体生物量、胞外多糖产量及菌球平均直径的影响

Table 3 Effect of initial pH on biomass,exo-polysaccharose yield and average pellet diameter of *Ganoderma lucidum*

初始 pH 值	生物量/(g/L)	胞外多糖/(g/L)	菌球平均直径/mm
3.0	5.54±0.13	0.195±0.02	1.81±0.09
4.0	5.22±0.40	0.242±0.03	1.97±0.11
5.0	4.92±0.24	0.359±0.03	1.59±0.20
6.0	4.23±0.34	0.456±0.12	1.60±0.13
7.0	3.84±0.52	0.318±0.04	1.99±0.10
8.0	3.64±0.07	0.296±0.09	2.09±0.16

Carlsen 等在研究 pH 值对真菌菌体形态时发现,较低 pH 值(3.0~3.5)时,*Aspergillus oryzae* 主要以松散丝状形态存在,pH 值的增加会导致球形菌体的出现,当 pH 值大于 6.0 时丝状菌体全部消失,并且菌球直径逐渐变大^[21]。在本研究中,不同初始 pH 值(3.0~8.0)条件下,主要菌球形态均为中型菌球(图 2)。在比较初始 pH 值对胞外多糖合成影响中发现,初始 pH 值为 5.0 和 6.0 时胞外多糖产量较高,分别为 0.359 g/L 和 0.456 g/L,与之对应的菌球形态均为小型菌球比例较高。此处结果与 2.1.1 结果类似,皆表明中小型菌球有利于灵芝胞外多糖的合成。

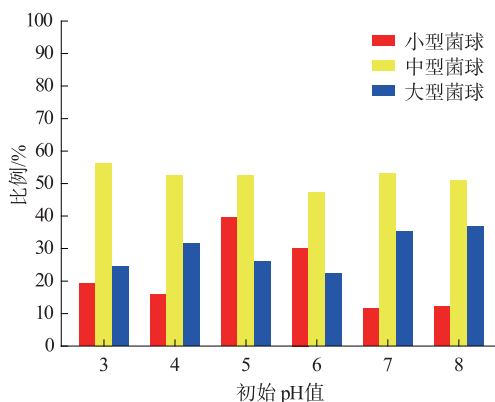


图 2 初始 pH 值对菌体形态的影响

Fig. 2 Effect of initial pH on the mycelium morphology during submerged culture of *Ganoderma lucidum*

2.1.3 培养温度对菌体形态以及胞外多糖产量的影响 培养温度对真菌菌体生长及菌体形态具有重要影响^[22],在研究培养温度对灵芝菌体生物量和多糖合成的影响时发现,随着培养温度的升高,胞外多糖产量及菌体生物量均呈现先增加后减小的趋势,当温度为 30 ℃时,多糖产量以及菌体生物量均为最大值,分别为 0.487,4.18 g/L(表 4)。其他研究者取得了类似的结果,Yang 等在研究温度对灵芝胞外多糖合成时发现,30~35 ℃可以获得较大的多糖产量及菌体生物量^[23]。

表 4 培养温度对菌体生物量、胞外多糖产量及菌球平均直径的影响

Table 4 Effect of culture temperature on biomass,exo-polysaccharose yield and average pellet diameter of *Ganoderma lucidum*

培养温度/℃	生物量/(g/L)	胞外多糖/(g/L)	菌球平均直径/mm
20	1.16±0.12	0.285±0.05	1.03±0.10
25	2.38±0.20	0.396±0.02	1.94±0.13
30	4.18±0.42	0.487±0.04	1.57±0.23
35	2.93±0.15	0.416±0.09	1.88±0.08

在分析不同培养温度条件下菌体形态时发现,在多糖产量最高的 30 ℃条件下,主要以中型菌球为主,且小型菌球所占的比例大于大型菌球所占的比例,对应的菌球平均直径为 1.57 mm(图 3),而其他温度下的菌体形态不呈现此规律,表现为灵芝胞外多糖产量较低,此结果进一步表明,菌球形态对灵芝胞外多糖合成有重要影响,并且进一步验证了中小型菌球有利于灵芝胞外多糖合成的结果。

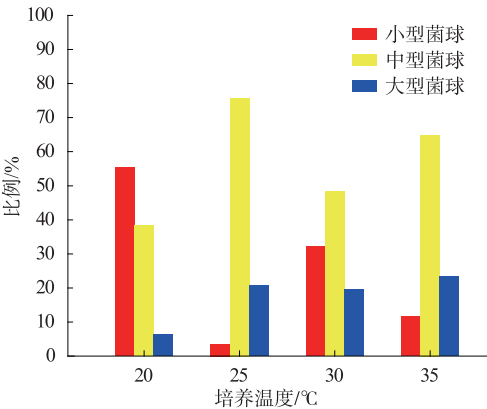


图 3 培养温度对菌体形态的影响
Fig. 3 Effect of culture temperature on the mycelium morphology during submerged culture of *Ganoderma lucidum*

2.2 发酵条件对灵芝胞外多糖抗肿瘤活性的影响

2.2.1 培养基初始 pH 值对灵芝胞外多糖的抗肿瘤活性的影响 真菌类多糖的组成及结构会影响其抗肿瘤活性^[24]。液体发酵过程中,培养基 pH 值对灵芝胞外多糖的组成及结构有重要影响,因此有必要考察不同初始 pH 值对灵芝胞外多糖的抗肿瘤活性的影响。

在考察不同初始 pH 值条件下获得的灵芝胞外多糖对小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的抑制作用后发现,随着 pH 值的增大,所获得的灵芝胞外多糖对 Hepa 1-6 和 MDA-MB-231 肿瘤细胞的抑制作用逐渐减小,表明初始 pH 值对灵芝胞外多糖的抗肿瘤活性具有影响,低 pH 值条件下获得的胞外多糖具有更高的抗肿瘤活性(表 5)。同时,同一初始 pH 条件下不同发酵时间获得的灵芝胞外多糖对肿瘤细胞的抑制率也具有差异,第 5 天获得的胞外多糖比第 3 天获得的胞外多糖对 Hepa 1-6、MDA-MB-231 细胞具有更高的抑制作用。而 Lee 等^[25]研究培养条件对裂蹄木层孔菌多糖的影响时,发现 pH 值对多糖的单糖组成及活性的影响不大,而培养基对它们的影响较大,当以甘露糖或淀粉作为唯一碳源时,获得的多糖的免疫调节活性是以葡萄糖作为唯一碳源时的 1.5 倍。

表 5 不同 pH 值条件下获得的灵芝胞外多糖对 Hepa 1-6、MDA-MB-231 细胞抑制作用

Table 5 Effect of exo-polysaccharide obtained under different initial pH on Hepa 1-6 and MDA-MB-231 cells growth

初始 pH 值	发酵时间/d	抑制率/%	
		Hepa 1-6	MDA-MB-231
pH 4.0	3	48.73	36.72
	5	50.78	39.57
pH 6.0	3	38.61	32.14
	5	42.68	37.70
pH 7.0	3	20.85	14.60
	5	35.49	25.29

2.2.2 培养温度对灵芝胞外多糖的抗肿瘤活性的影响 有研究发现,液体发酵过程中培养温度会影响多糖的抗肿瘤活性,较低温度(20~24 ℃)下获得的姬松茸多糖比较高温度(30~34 ℃)下获得的多糖拥有更高的抗肿瘤活性^[26]。不同的培养温度下获得的灵芝胞外多糖对肿瘤细胞的抑制作用结果见表 6。结果表明,培养温度会影响灵芝胞外多糖对

Hepa 1-6、MDA-MB-231 细胞的抑制作用,随着培养温度的升高,灵芝胞外多糖对 Hepa 1-6 和 MDA-MB-231 肿瘤细胞的抑制作用先增大后减小,30 ℃ 时抑制率最大。相同培养条件下,随着发酵时间的变化,灵芝胞外多糖对肿瘤细胞的抑制率会有所提高,表现为第 6 天胞外多糖比第一天胞外多糖的抑制率高,此结果与 2.2.1 部分的实验结果一致,表明较长发酵时间下获得的灵芝胞外多糖具有更高的抗肿瘤活性。

表 6 不同培养温度下获得的灵芝胞外多糖对 Hepa 1-6、MDA-MB-231 细胞的抑制作用

Table 6 Effect of ex-polysaccharide obtained under different culture temperature on Hepa 1-6 or MDA-MB-231 cells growth

培养温度/℃	发酵时间/d	抑制率/%	
		Hepa 1-6	MDA-MB-231
20	1	24.02	6.76
	6	39.40	33.03
25	1	27.10	17.53
	6	42.89	40.80
30	1	39.06	27.17
	6	46.15	44.73
35	1	37.70	9.89
	6	43.28	29.93

3 结 语

液体发酵过程中,不同的菌体形态和菌球大小均会影响丝状真菌次级代谢产物的产量^[16],因此可以通过菌体形态或者菌球大小的控制来获得较高产量的代谢产物。作者通过控制发酵时间、培养基 pH 值、培养温度,研究了液体发酵过程中,灵芝菌体形态与胞外多糖产量之间的关系,发现中小型菌球有利于多糖的生成,而大型菌球不利于多糖的生成。通过灵芝胞外多糖体外抑制肿瘤细胞增殖实验,发现灵芝胞外多糖对 Hepa 1-6 和 MDA-MB-231 肿瘤细胞都具有抑制作用,并且不同培养条件(发酵时间、初始 pH 值及培养温度)下获得的灵芝胞外多糖对肿瘤细胞的抑制率有所不同,这可能是由于不同的发酵条件改变了灵芝胞外多糖的单糖组成及化学结构,从而使其生物活性发生了变化,但发酵条件对多糖结构的影响及机制还需后续工作进行深入的研究。

参考文献:

- [1] Paterson R R M. *Ganoderma*-a therapeutic fungal biofactory[J]. **Phytochemistry**, 2006, 67(18):1985-2001.
- [2] Sone Y, Okuda R, Wada N, et al. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1985, 49(9):2641-2653.
- [3] Huang C Y, Chen J Y F, Wu J E, et al. *Ling-Zhi* polysaccharides potentiate cytotoxic effects of anticancer drugs against drug-resistant urothelial carcinoma cells[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2010, 58(15):8798-8805.
- [4] Harhaji Trajkovic L M, Mijatovic S A, Maksimovic-Ivanic D D, et al. Anticancer properties of *Ganoderma lucidum* methanol extracts in vitro and in vivo[J]. **Nutrition and Cancer**, 2009, 61(5):696-707.
- [5] 朱科学, 聂少平, 宋丹, 等. 黑灵芝多糖对 II 型糖尿病大鼠血糖、血脂及肠系膜上动脉病变改善作用[J]. **食品科学**, 2013, 34(23):300-304.
ZHU Kexue, NIE Shaoping, SONG Dan, et al. Protective Effect of polysaccharide from *Ganoderma atrum* on Fasting Blood Glucose, Serum Lipids and Arteriosclerotic Narrowing of Superior Mesenteric Arteries in Type II Diabetic Rats[J]. **Food Science**, 2013, 34(23):300-304. (in Chinese)
- [6] 孙可. 灵芝多糖抗高血脂症作用研究[D]. 长春:吉林大学生命科学院, 2008.
- [7] 曹琦珍, 林树钱, 王赛贞, 等. 灵芝多糖肽对人肺癌细胞侵袭的影响[J]. **北京大学学报:医学版**, 2008, 39(6):653-656.
CAO Qizhen, LIN Shuqian, WANG Saizhen, et al. Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide on invasion of human lung carcinoma cells in vitro[J]. **Journal of Peking University: Health Sciences**, 2008, 39(6):653-656. (in Chinese)
- [8] 游育红, 林志彬. 灵芝多糖肽对 ECV304 细胞氧化损伤的保护作用[J]. **中国药理学通报**, 2008, 23(11):1510-1513.
YOU Yuhong, LIN Zhibin. The protection of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide on ECV304 injury [J]. **Chinese**

- Pharmacological Bulletin**, 2008, 23(11):1510–1513. (in Chinese)
- [9] 王玉红, 丁重阳, 徐鹏, 等. 中药黄芪对发酵生产灵芝多糖的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(2):38–40.
WANG Yuhong, DING Zhongyang, XU Peng, et al. The Effect of *A. mongholicum* on Polysaccharides in *Ganoderma lucidum* Fermentation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(2):38–40. (in Chinese)
- [10] Fang Q H, Zhong J J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2002, 10(1):61–65.
- [11] Tang Y J, Zhong J J. Submerged fermentation of higher fungi for production of valuable bioactive metabolites[J]. **Journal of East China University of Science and Technology**, 2000, 27(6):704–711.
- [12] Hsieh C, Tseng M H, Liu C J. Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC 36041) under limitations of nutrients[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006, 38(1):109–117.
- [13] Tang Y J, Zhang W, Zhong J J. 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.
- [14] Babitskaya V G, Shcherba V V, Puchkova T A, et al. Polysaccharides of *Ganoderma lucidum*: factors affecting their production[J]. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 2005, 41(2):169–173.
- [15] Oncu S, Tari C, Unluturk S. Effect of Various Process Parameters on morphology, rheology, and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* in a batch bioreactor[J]. **Biotechnology Progress**, 2007, 23(4):836–845.
- [16] Driouch H, Hansch R, Wucherpfennig T, et al. Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: targeted morphology engineering using titanate microparticles[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2012, 109(2):462–471.
- [17] Wagner R, Mitchell D A, Sasaki L G, et al. Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide[J]. **Journal of Biotechnology**, 2004, 114(1):153–164.
- [18] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. **Analytical Chemistry**, 1956, 28(3):350–356.
- [19] Fang Q H, Tang Y J, Zhong J J. Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*[J]. **Process Biochemistry**, 2002, 37(12):1375–1379.
- [20] Lee K M, Lee S Y, Lee H Y. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 1999, 88(6):646–650.
- [21] Carlsen M, Spohr A B, Nielsen J, et al. Morphology and physiology of an alpha-amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1996, 49:266–276.
- [22] Kossen N W F. The morphology of filamentous fungi [M]. History of Modern Biotechnology II. Springer Berlin Heidelberg, 2000, 70:1–33.
- [23] Yang F C, Liao C B. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures[J]. **Process Biochemistry**, 1998, 33(5):547–553.
- [24] Zhang M, Cui S W, Cheung P C K, et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity[J]. **Trends in Food Science and Technology**, 2007, 18(1):4–19.
- [25] Lee J H, Cho S M, Kim H M, et al. Immunostimulating activity of polysaccharides from mycelia of *Phellinus linteus* grown under different culture conditions[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 1997, 7(1):52–55.
- [26] Shu C H, Lin K J, Wen B J. Effects of culture temperature on the production of bioactive polysaccharides by *Agaricus blazei* in batch cultures[J]. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2007, 82(9):831–836.