

## 灵芝三萜酸分批发酵的非结构动力学模型

王晓玲 赵艳 刘高强\* 旷思敏

中南林业科技大学生命科学与技术学院 林业生物技术湖南省重点实验室 长沙 410004

**摘 要:** 研究了灵芝胞内和胞外三萜酸在 30L 发酵罐中分批发酵的动力学特征。利用 Sigmoid 函数构建了灵芝细胞生长、底物消耗、胞内和胞外三萜酸的非结构动力学模型,并根据 Boltzmann 拟合求解出各模型参数。结果表明,各模型预测值能够较好地吻合实验实测值。灵芝细胞比生长速率在第 2.5 天达到最大值 ( $\mu_{\max}$ ),为  $0.700\text{d}^{-1}$ ;葡萄糖比消耗速率在第 2.4 天达到最大值 ( $q_{\text{S},\max}$ )为  $1.060\text{d}^{-1}$ ;胞内三萜酸比合成速率在第 4.7 天达到最大值 ( $q_{\text{ITA},\max}$ )为  $11.345\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$ ;胞外三萜酸比合成速率在第 5 天达到最大值 ( $q_{\text{ETA},\max}$ )为  $10.077\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$ 。灵芝胞内外三萜酸的合成和细胞生长均呈现部分偶联关系。Sigmoid 模型在灵芝真菌生长和胞内外三萜酸形成规律的拟合方面有较好的适应性,研究结果为分批发酵法生产灵芝三萜酸提供了理论依据。

**关键词:** 药用真菌, 灵芝, 深层发酵, 三萜酸, 动力学模型

## Unstructured kinetic models for triterpene acids of *Ganoderma lucidum* in batch fermentation

WANG Xiao-Ling ZHAO Yan LIU Gao-Qiang\* KUANG Si-Min

Hunan Provincial Key Laboratory of Forestry Biotechnology, College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, China

**Abstract:** The dynamic behavior of intracellular triterpene acids (ITA) and extracellular triterpene acids (ETA) of *Ganoderma lucidum* by batch fermentation in a 30L stirred tank bioreactor was observed. Unstructured kinetics of cell growth, glucose consumption, ITA and ETA were investigated based on Sigmoid model. The parameters of the model were determined by Boltzmann simulation, and the values predicted by the models matched well with those obtained from the observed. The maximum rate for specific cell growth was found to be  $0.700\text{d}^{-1}$ , at day 2.5 ( $\mu_{\max}$ ), specific glucose consumption rate ( $q_{\text{S},\max}$ ),  $1.060\text{d}^{-1}$  at day 2.4 specific ITA production rate  $11.345\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$  at day 4.7 ( $q_{\text{ITA},\max}$ ) and the maximum specific ETA production rate ( $q_{\text{ETA},\max}$ )

基金项目: 教育部高校博士点基金 (No. 20094321120003); 湖南省研究生科研创新基金 (No. CX2010B315)

\*Corresponding author. E-mail: gaoliuedu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-06-06, 接受日期: 2011-07-05

10.077mg/(g·d) at day 5. Both ITA and ETA production were partially associated with cell growth, and the unstructured Sigmoid models for cell growth and ITA and ETA production showed good accordance with the experimental data.

**Key words:** medicinal fungus, *Ganoderma lucidum*, submerged fermentation, triterpene acids, kinetic model

灵芝 *Ganoderma lucidum* (W. Curtis.) P. Karst., 是我国最为名贵的药用真菌之一(戴玉成和杨祝良 2008)。近年来, 灵芝的研究已得到东南亚国家以及美国和加拿大有关学者的广泛关注(林志彬 2007; 刘高强等 2011)。灵芝含有多种生物活性成分, 如多糖、三萜、甾醇、核酸、蛋白质、多肽、脂肪酸等, 其中灵芝多糖和灵芝三萜是灵芝的关键药效成分(Russell & Paterson 2006; 林志彬 2007; Xu *et al.* 2010)。

灵芝三萜类化合物主要是一类高度氧化的羊毛甾烷衍生物。目前从灵芝子实体、孢子粉, 以及发酵菌丝体中分离得到了 190 多种三萜类化合物, 其中约 1/3 的组份是三萜酸类化合物。已有研究表明, 灵芝三萜酸具有抑制组织胺释放、保肝解毒、抗肿瘤和抑菌等药理作用(Gao *et al.* 2002; Kimura *et al.* 2002; Liu *et al.* 2007; Jie *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007)。

由于灵芝三萜酸具有重要的药理作用, 如何从灵芝中获取三萜酸是当前研究的热点之一。通过液体深层发酵技术生产灵芝三萜酸具有生产周期短、三萜酸含量相对稳定、主要组份和野生灵芝的基本一致等特点, 现成为获取灵芝三萜酸的最有效方法(Fang & Zhong 2002; Tang *et al.* 2009; Liu *et al.* 2011; 刘高强等 2008)。

发酵动力学是研究生物反应过程中菌体生长、基质消耗、产物生成的动态平衡及其内在规律的一门科学。发酵动力学的研究, 有助于我们更加深入地认识和掌握发酵过程, 为工业发酵的模拟、优化和控制打下良好的理论基础。

目前国内外有关灵芝深层发酵动力学研究的报道主要集中在灵芝多糖方面, 对灵芝三萜的动力学研究鲜有报道。本文在前期灵芝三萜酸发酵工艺优化研究的基础上, 从基质消耗、菌体生长以及三

萜酸产物合成方面, 利用 Sigmoid 函数构建了灵芝深层发酵生产灵芝三萜酸的非结构动力学模型, 并根据 Boltzmann 拟合求解出模型参数, 为分批发酵法生产灵芝三萜酸提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

**1.1.1 菌种:** 中南林业科技大学生物工程教研室保存的灵芝 *Ganoderma lucidum* SCIM 0006。

**1.1.2 培养基:** 种子培养基(g/L): 葡萄糖 30, 蛋白胨 8, 磷酸二氢钾 1.5, 硫酸镁 0.75, 维生素 B<sub>1</sub> 0.01。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 26.0, 玉米粉 11.2, 麸皮粉 10.8, 蛋白胨 5.9, 桔梗水提物 0.4。

**1.1.3 试剂:** 熊果酸标准品(购于中国药品生物制品检定所)。高氯酸、冰醋酸、香草醛, 无水乙醇均为分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 灵芝发酵培养:** 30L-KRH-P 系列科海生工全自动不锈钢发酵罐, 装液量 20L, 接种量(V/V) 10%, 温度 30℃, 搅拌转速 160r/min, 通气量 1.5vvm, 培养 9d。

**1.2.2 生物量测定:** 菌体用 40 目的滤网反复分离, 分离后的菌体离心, 用水洗两次后, 再离心, 沉淀的菌体在 60℃下烘至恒重, 称重得生物量。

**1.2.3 胞内三萜酸的测定:** 提取采用 Fang & Zhong (2002) 的方法, 略作改进。干燥至恒重的灵芝菌体 2g 用 50mL 氯仿超声处理(400W, 55kHz)30min, 滤过, 滤渣重复上述操作 1 次, 合并滤液。加 5% NaHCO<sub>3</sub> 溶液 20mL 萃取氯仿提取液中的灵芝三萜酸, 萃取 3 次。合并 5% NaHCO<sub>3</sub> 萃取液, 用稀盐酸调 pH 为 3 后, 移至分液漏斗中, 再反复用氯仿萃取 3 次, 每次 20mL 氯仿。合并氯仿萃取液, 挥去氯仿后, 用无水乙醇定容至 10mL 容量瓶中。含

量测定以三萜化合物熊果酸作为标准品,采用分光光度法测定(江绍琳等 2006)。结果以每升培养液中所含胞内三萜酸的毫克数表示(mg/L),即先算出每克菌体中所含的胞内三萜酸毫克数,再通过每升培养液中的菌体量换算成每升培养液中所含胞内三萜酸的毫克数(mg/L)。

**1.2.4 胞外三萜酸的测定:**胞外三萜酸样品的制备采用 Fang & Zhong (2002) 的方法。取离心菌体后的发酵液 50mL,沉淀除去多糖,得到的上清液减压浓缩至干,再用蒸馏水悬浮后,加 10mL 氯仿萃取。重复 3 次,合并萃取液,加 10mL 5% NaHCO<sub>3</sub> 溶液萃取氯仿提取液中的三萜酸,萃取 3 次。合并 5% NaHCO<sub>3</sub> 萃取液,用稀盐酸调 pH 为 3 后,再反复用氯仿萃取 3 次,每次用 10mL 氯仿。合并氯仿萃取液,挥去氯仿后,用无水乙醇溶解,定容至 10mL 容量瓶中。含量的测定方法同胞内三萜酸的测定程序。结果以每升培养液中所含胞外三萜酸的毫克数表示(mg/L)。

**1.2.5 还原糖的测定:**采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法(张龙翔 1997)。

**1.2.6 数据分析:**每个样品设 3 个重复,结果取其平均值。数据处理采用 Excel 2003 软件,应用 Origin7.0 软件得到发酵过程动力学参数变化曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 30L 发酵罐中灵芝三萜酸的发酵过程特征

图 1 为 30L 发酵罐中灵芝分批发酵过程中细胞生长、底物消耗和产物形成的过程曲线。灵芝在 3—5d 期间消耗葡萄糖的速度迅速增加,之后耗糖速度缓慢下降。发酵结束时,发酵液中残糖浓度为 2.21g/L (图 1-A)。灵芝在 2—6d 期间生长较快,细胞量于第 6 天达到最大值,此时细胞干重为 12.14g/L (图 1-B)。但随着发酵培养时间的延长,菌丝球开始出现自溶现象,菌体量缓慢下降,发酵液的颜色变得较深。胞内三萜酸(intracellular triterpene acids, ITA)在第 3—7d 大量合成,胞外三萜酸(extracellular triterpene acids, ETA)稍滞后,

于 4—7d 大量合成,二者均于第 7 天达到最大值,产量分别达到 292.34mg/L 和 250.03mg/L (图 1-C, D)。结果表明,灵芝胞内和胞外三萜酸的合成均滞后于菌体生长。

### 2.2 灵芝发酵生产三萜酸的 Sigmoid 模型

灵芝菌体的生长速率曲线与细菌或酵母的相似(图 1),二者的区别在于单细胞的细菌或酵母,在对数生长期细胞生长随时间变化呈指数增加;而对于真菌灵芝来说,细胞的生长表现出典型的“S”形曲线,且在生长最快时期呈线性增加,这是灵芝深层发酵的最显著的动力学特征(徐鹏等 2008)。Sigmoid 模型在工程领域中常用来拟合“S”形曲线,被看作是一个表征细胞生长与营养物质之间的非线性关系的经验方程,其对应的函数如式(1)所示:

Boltzmann 函数方程:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(t-t_0)/dt}} + A_2 \quad (1)$$

式中,  $t$  为自变量时间(d),  $A_2$  与  $A_1$  为“S”形曲线的上下两条渐近线,  $t_0$  为两条渐近线的中线与“S”形曲线交点(拐点)对应的自变量的值,当时间常数  $dt=1$  时,  $y$  值为两条渐近线与拐点处“S”形曲线切线斜率比值的 1/4。

相应地运用 Sigmoid 模型,推导出对灵芝深层发酵过程的菌体生长模型、底物消耗模型、胞内三萜酸和胞外三萜酸生成模型分别如下式(2—5)所示:

菌体生长模型:

$$X = \frac{X_1 - X_2}{1 + e^{(t-t_0)/dt}} + X_2 \quad (2)$$

底物葡萄糖消耗模型:

$$S = \frac{S_1 - S_2}{1 + e^{(t-t_0)/dt}} + S_2 \quad (3)$$

胞内三萜酸生成模型:

$$P_{ITA} = \frac{P_{ITA1} - P_{ITA2}}{1 + e^{(t-t_0)/dt}} + P_{ITA2} \quad (4)$$

胞外三萜酸生成模型:

$$P_{ETA} = \frac{P_{ETA1} - P_{ETA2}}{1 + e^{(t-t_0)/dt}} + P_{ETA2} \quad (5)$$

菌物学报

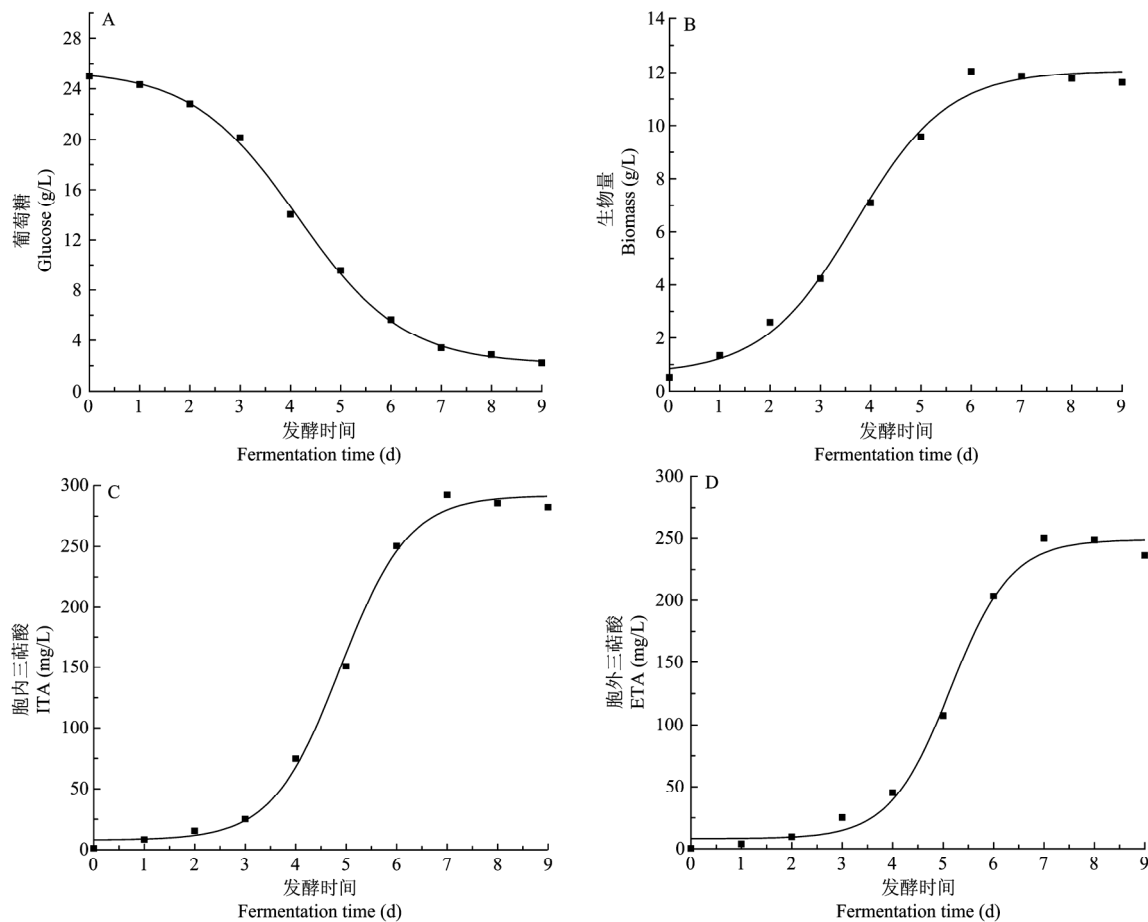


图 1 灵芝发酵过程中葡萄糖 (A)、生物量 (B)、胞内三萜酸 (C) 和胞外三萜酸 (D) 随时间的变化 ■点值: 实验实测值; 实线曲线: 模型拟合后的预测值。

Fig. 1 Concentration change of glucose (A), biomass (B), intracellular triterpene acids (ITA) (C) and extracellular triterpene acids (ETA) (D) during submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. ■: Tested values; Solid curve: The values predicted by models.

式中,  $X$ 、 $S$  分别为灵芝生物量和葡萄糖的浓度, g/L;  $P_{ITA}$ 、 $P_{ETA}$  分别代表胞内三萜酸和胞外三萜酸的浓度, mg/L;  $t$  为发酵时间, d。

运用 Sigmoid 模型对灵芝深层发酵过程的生物量、底物消耗、胞内三萜酸和胞外三萜酸形成进行拟合, 模型预测值 (实线曲线) 能够比较好地吻合实验所测值 (■标记值) (图 1)。表 1 为灵芝生物量、底物葡萄糖消耗、胞内三萜酸和胞外三萜酸形成经 Sigmoid 模型非线性拟合后的参数值。从表 1 中各变量的相关性平方  $R^2$  (均在 0.99 以上) 可知, Sigmoid 模型在灵芝真菌生长和胞内外三萜酸形成规律的拟合方面有较好的适应性。

表 1 灵芝发酵过程经 Sigmoid 模型拟合后的参数值

Table 1 Parameters of submerged culture of *Ganoderma lucidum* fitted by Sigmoid model

变量 Variables	模型参数 Sigmoid model parameters				$R^2$
	$A_1$	$A_2$	$t_0/\text{d}$	$dt/\text{d}$	
S-葡萄糖 Glucose (g/L)	25.46	2.13	4.15	1.04	0.9985
X-生物量 Biomass (g/L)	0.64	12.07	3.69	0.92	0.9903
$P_{ITA}$ -胞内三萜酸 ITA (mg/L)	7.97	291.85	4.90	0.67	0.9960
$P_{ETA}$ -胞外三萜酸 ETA (mg/L)	8.11	248.91	5.14	0.60	0.9922

Note: ITA, intracellular triterpene acids; ETA, extracellular triterpene acids.

### 2.3 动力学相关参数求解

灵芝细胞比生长速率 ( $\mu$ )、底物比消耗速率 ( $q_s$ )、胞内三萜酸比合成速率 ( $q_{ITA}$ ) 和胞外三萜酸比合成速率 ( $q_{ETA}$ ) 分别根据定义有如下关系式(6):

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} ; \quad q_s = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} ; \quad q_{ITA} = \frac{1}{X} \frac{dP_{ITA}}{dt} ;$$

$$q_{ETA} = \frac{1}{X} \frac{dP_{ETA}}{dt} \quad (6)$$

当时间间隔很小时, 可以用式 (7-8) 直接近似计算得到  $\mu$ 、 $q_s$ 、 $q_{ITA}$  和  $q_{ETA}$ 。

$$\mu \approx \frac{1}{X} \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta X}{\Delta t} ; \quad q_s \approx -\frac{1}{X} \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta S}{\Delta t} \quad (7)$$

$$q_{ITA} \approx \frac{1}{X} \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta P_{ITA}}{\Delta t} ; \quad q_{ETA} \approx \frac{1}{X} \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta P_{ETA}}{\Delta t} \quad (8)$$

式中,  $\mu$ 、 $q_s$  分别表示灵芝细胞比生长速率、底物葡萄糖比消耗速率,  $d^{-1}$ ;  $q_{ITA}$ 、 $q_{ETA}$  分别表示灵芝胞内三萜酸比合成速率和胞外三萜酸比合成速率,  $mg/(g \cdot d)$ ;  $t$  为发酵时间,  $d$ 。

采用 Excel 2003 软件求解得到不同发酵不同时刻的  $\mu$ 、 $q_s$ 、 $q_{ITA}$  和  $q_{ETA}$ , 利用 Origin7.0 软件绘制不同时刻灵芝发酵过程动力学参数变化曲线 (图 2)。灵芝细胞比生长速率在第 2.5 天达到最大值 ( $\mu_{max}$ ), 为  $0.700d^{-1}$ ; 葡萄糖比消耗速率在第 2.4 天达到最大值 ( $q_{s, max}$ ) 为  $1.060d^{-1}$ ; 胞内三萜酸比合成速率在第 4.7 天达到最大值 ( $q_{ITA, max}$ ) 为  $11.345mg/(g \cdot d)$ ; 胞外三萜酸比合成速率在第 5 天达到最大值 ( $q_{ETA, max}$ ) 为  $10.077mg/(g \cdot d)$ 。结果表明, 灵芝胞内外三萜酸的合成和细胞生长均呈现部分偶联关系 (图 2)。

类似地, 根据式 (9-11) 可以计算得到灵芝发酵过程中的细胞生长量对底物葡萄糖的得率 ( $Y_{X/S}$ ), 胞内三萜酸对底物葡萄糖的得率 ( $Y_{ITA/S}$ ) 和胞外三萜酸对底物葡萄糖的得率 ( $Y_{ETA/S}$ ) 随时间的变化曲线 (图 3)。

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} \approx -\lim_{\Delta S \rightarrow 0} \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (9)$$

$$Y_{ITA/S} = -\frac{dP_{ITA}}{dS} \approx -\lim_{\Delta S \rightarrow 0} \frac{\Delta P_{ITA}}{\Delta S} \quad (10)$$

$$Y_{ETA/S} = -\frac{dP_{ETA}}{dS} \approx -\lim_{\Delta S \rightarrow 0} \frac{\Delta P_{ETA}}{\Delta S} \quad (11)$$

式中,  $Y_{X/S}$  表示灵芝细胞生长量对底物葡萄糖的得率,  $g/g$ ;  $Y_{ITA/S}$  和  $Y_{ETA/S}$  分别表示胞内三萜酸对底物葡萄糖的得率和胞外三萜酸对底物葡萄糖的得率,  $mg/g$ 。

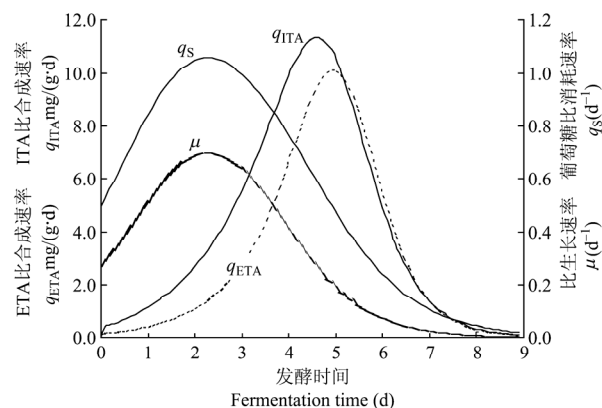


图 2 灵芝发酵过程细胞比生长速率 ( $\mu$ )、葡萄糖比消耗速率 ( $q_s$ )、胞内三萜酸比合成速率 ( $q_{ITA}$ ) 和胞外三萜酸比合成速率 ( $q_{ETA}$ ) 随时间的变化曲线

Fig. 2 Change of the specific cell growth rate ( $\mu$ ), specific glucose consumption rate ( $q_s$ ), specific ITA production rate ( $q_{ITA}$ ) and specific ETA production rate ( $q_{ETA}$ ) during submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. ITA, intracellular triterpene acids; ETA, extracellular triterpene acids.

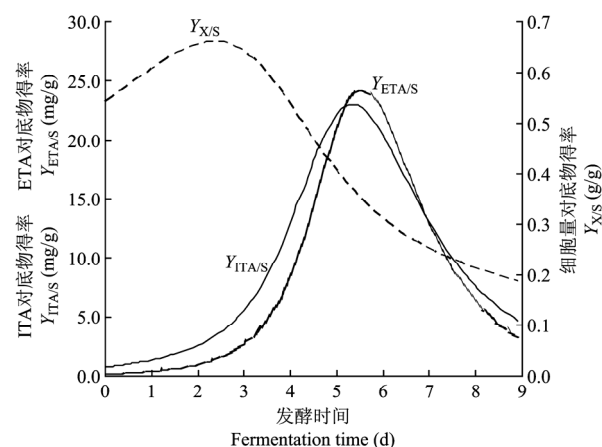


图 3 灵芝发酵过程细胞生长量对底物葡萄糖的得率 ( $Y_{X/S}$ ), 胞内三萜酸对底物葡萄糖的得率 ( $Y_{ITA/S}$ ) 和胞外三萜酸对底物葡萄糖的得率 ( $Y_{ETA/S}$ ) 随时间的变化曲线

Fig. 3 Change of production rate of cell to glucose ( $Y_{X/S}$ ), ITA to glucose ( $Y_{ITA/S}$ ) and ETA to glucose ( $Y_{ETA/S}$ ) during submerged culture of *Ganoderma lucidum*. ITA, intracellular triterpene acids; ETA, extracellular triterpene acids.

对底物的得率系数表征菌体摄取底物用于自身生长或代谢产物的合成能力。菌体生长量对于葡萄糖的得率系数随着发酵时间的延长逐渐降低,表明菌体摄取葡萄糖用于自身的生长能力在减弱。三萜酸对底物的得率系数随着发酵时间先增加,后降低,在发酵中期(第5—6天)达到最大值,说明在发酵中期菌体利用葡萄糖合成胞内和胞外三萜酸的能力最强(图3)。

### 3 讨论

液体深层发酵法生产灵芝加快了灵芝及其活性物质的应用和商业化,已成为国内外研究的热点之一,而建立数学模型则是实现灵芝产物发酵过程优化控制的基础。本文通过对灵芝关键活性成分——灵芝三萜酸发酵动力学研究和发酵模型的建立,来更好地认识灵芝发酵过程中菌体生长和产物形成的机制,为发酵法生产灵芝三萜酸提供理论依据。

微生物产物形成的动力学模型一般可分为三种:类型I称为生长偶联型,或称伴随生长的产物形成模型;类型II称为部分生长偶联型,或称不完全伴随生长的产物形成模型;类型III称为非生长偶联型或称不伴随生长的产物形成模型(陈坚等2003)。已有文献报道,真菌代谢产物如多糖的发酵动力学模型大多为部分生长相关模型(崔玉海等2009;李信等1999;张建国等2007)。本文研究表明,灵芝胞内和胞外三萜酸的发酵动力学模型也为部分生长相关模型,与以上真菌产物多糖的发酵动力学模型类似。徐鹏等(2008)的研究表明,灵芝胞外多糖的合成与细胞的生长呈现复杂的部分偶联关系,而胞外灵芝酸(三萜酸)的合成与细胞生长呈现单一偶联关系,这与本研究不同。

在动力学方程或模型的选择方面,由于微生物生长和代谢产物形成本身的复杂性,要建立一个精确或一个通用的模型来描述微生物的细胞生长或产物形成过程是十分困难的。因此,现阶段常用经验或半经验而没有明确生物学意义的数学方程描绘微生物生长和代谢产物形成的规律。如常用到Monod、Logistic、luedeking-Piret和Sigmoid等模

型。Monod模型是经典的非结构模型之一,但该模型认为培养基中只有一种基质是生长限制性基质,其他营养成分过量不影响细胞生长;同时将微生物生长视为简单反应,菌体得率为常数,没有动态滞后,显然不符合灵芝细胞培养的特征,采用Monod方程有较大偏差。Logistic方程通常被看作是一个表征细胞生长与营养物质之间的非线性关系的经验方程,能很好地反映该过程中菌体浓度增加对自身生长的抑制作用。Sigmoid模型在工程领域中也常用来拟合“S”形曲线,与Logistic模型类似。

以前文献大多采用Logistic和luedeking-Piret方程研究真菌细胞生长和产物形成的过程模型(崔玉海等2009;李信等1999;张建国等2007)。由于灵芝的细胞生长和三萜酸形成均是曲线中的“S”形曲线。因此,本文尝试采用Sigmoid模型同时探讨灵芝细胞生长和产物形成的发酵动力学。结果表明,Sigmoid模型在灵芝真菌生长和胞内外三萜酸形成规律的拟合方面有较好的适应性,为分批发酵法生产灵芝三萜酸提供了理论依据。今后需要进一步通过灵芝三萜酸的逐级放大发酵试验该模型的实用性,并在应用过程中不断对其进行校正,使其更适合于指导实际发酵生产。

### [REFERENCES]

- Chen J, Du GC, Li Y, Hua ZZ, 2003. Fermentation engineering experimental technology. Chemical Industry Press, Beijing. 1-284 (in Chinese)
- Cui YH, Tong QY, Wu SJ, 2009. Kinetic model of pululan batch fermentation. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 28: 361-365 (in Chinese)
- Dai YC, Yang ZL, 2008. A revised checklist of medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 27: 801-824 (in Chinese)
- Fang QH, Zhong JJ, 2002. Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology Progress*, 18: 51-54
- Gao JJ, Min BS, Ahn EM, 2002. New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50: 837-840

- Jiang SL, Jiang SM, Zeng LC, 2006. Method for rapid quantification of total triterpenoids in *Ganoderma lucidum* by spectrometry. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 28(4): 634-636 (in Chinese)
- Jie L, Kuniyoshi S, Fumiko K, 2007. Anti-androgenic activities of the triterpenoids fraction of *Ganoderma lucidum*. *Food Chemistry*, 100: 1691-1696
- Kimura Y, Taniguchi M, Baba K, 2002. Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: mechanism of action and isolation of an active substance. *Anticancer Research*, 22: 3309-3318
- Li X, Xu L, Cai ZL, 1999. Studies of kinetics of *Cordyceps militaris* fermentation of exopolysaccharide. *Chinese Journal of Biotechnology*, 15: 507-511 (in Chinese)
- Lin ZB, 2007. Modern research of *Ganoderma*. 3rd edition. Beijing Medical University Press, Beijing. 1-359 (in Chinese)
- Liu GQ, Ding CY, Wang XL, 2007. Mechanisms of anticancer action of triterpenoids from *Ganoderma lucidum*: a review of recent researches. *Mycosystema*, 26(3): 470-476
- Liu GQ, Ding CY, Zhang KC, 2008. Effects of powdered dung beetle (*Catharsius molossus*) on cell growth and triterpenoid production of *Ganoderma lucidum*. *Mycosystema*, 27(5): 757-762 (in Chinese)
- Liu GQ, Ren GP, Wang XL, Zhao Y, 2011. Statistical optimization of the key medium components by response surface methodology to promote ganoderic acid formation by medicinal mushroom *Ganoderma sinense* in submerged culture. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(3): 425-431
- Liu GQ, Zhao Y, Wang XL, Zhu CY, 2011. Biosynthesis and fermentation control of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Mycosystema*, 30(2): 198-205 (in Chinese)
- Russell R, Paterson M, 2006. *Ganoderma*—a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67: 1985-2001
- 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 J, Huang Y, Zhong JJ, Tang W, 2007. Enhancement of IL-2 and IFN-gamma 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, Zhao W, Zhong JJ, 2010. Biotechnological production and application of ganoderic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 457-466
- Xu P, Qian Z, Dong L, Wang W, Zhao CX, 2008. Kinetic analysis of exopolysaccharide and ganoderic acid production by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 14(4): 562-565 (in Chinese)
- Zhang JG, Chen XM, He XS, 2007. Kinetic model for exopolysaccharides (EPS) of *Ganoderma lucidum* in batch fermentation. *Chinese Journal of Biotechnology*, 23: 1065-1070 (in Chinese)
- Zhang LX, 1997. Methodology and techniques of biochemistry. 2th edition. Higher Education Press, Beijing. 1-260 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 陈坚, 堵国成, 李寅, 华兆哲, 2003. 发酵过程实验技术. 北京: 化学工业出版社. 1-284
- 崔玉海, 童群义, 吴胜军, 2009. 短梗霉多糖分批发酵动力学模型. 食品与生物技术学报, 28: 361-365
- 戴玉成, 杨祝良, 2008. 中国药用真菌名录及部分名称的修订. 菌物学报, 27: 801-824
- 江绍琳, 江绍玫, 曾令聪, 2006. 分光光度法快速测定灵芝中总三萜含量. 江西农业大学学报, 28(4): 634-636
- 李信, 许雷, 蔡照铃, 1999. 蛹虫草菌胞外多糖发酵及其发酵动力学. 生物工程学报, 15: 507-511
- 林志彬, 2007. 灵芝的现代研究. 第三版. 北京: 北京大学医学出版社. 1-359
- 刘高强, 丁重阳, 章克昌, 2008. 蛭螬对灵芝发酵菌丝体生长和三萜产物形成的影响. 菌物学报, 27(5): 757-762
- 刘高强, 赵艳, 王晓玲, 朱朝阳, 2011. 灵芝多糖的生物合成和发酵调控. 菌物学报, 30(2): 198-205
- 徐鹏, 钱竹, 董亮, 王伟, 赵长新, 2008. 灵芝深层发酵生产胞外多糖和灵芝酸的动力学分析. 应用与环境生物学报, 14(4): 562-565
- 张建国, 陈晓明, 贺新生, 2007. 灵芝胞外多糖分批发酵动力学模型. 生物工程学报, 23: 1065-1070
- 张龙翔, 1997. 生化实验方法和技术. 第二版. 北京: 高等教育出版社. 1-260