

不同碳源对黑芝菌丝体液体发酵的影响

唐兴国¹, 周全², 赵丹², 王峰³

(1. 台州市农业科学研究院, 浙江 临海 317000; 2. 武汉生物工程学院, 湖北 武汉 430415; 3. 山西省农牧业应急物资储备中心, 山西 太原 030001)

摘要:对黑芝菌丝体液体发酵体系进行了研究。实验中以黑芝菌丝体生物量为主要评价指标,通过正交实验研究了无机盐、维生素和碳源在黑芝菌丝体发酵中的交互作用。结果显示:黑芝菌丝体对果糖的吸收利用要优于蔗糖和乳糖,且当碳源种类不同时,黑芝菌丝体对无机盐和維生素的需求也明显不同。实验中筛选出的较适宜黑芝菌丝体液体发酵的培养基为:果糖 20 g/L+KH₂PO₄ 2 g/L+K₂HPO₄ 2 g/L+MgSO₄·7H₂O 2 g/L+CaCl₂·2H₂O 1 g/L+VB₁ 20 mg/L,pH 自然。黑芝菌丝体在此培养基中发酵培养 7 d,菌丝生物量可达 0.808 6 g/dL。

关键词: 黑芝;果糖;碳源;生物量;正交实验

中图分类号: S 646.2; Q 949.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2012)12—1331—07

Effects of Different Carbon Sources on Mycelium Submerged Fermentation of *Ganoderma atrum*

TANG Xing-guo^{1*}, ZHOU Quan², ZHAO Dan², WANG Feng³

(1. Taizhou Academy of Agricultural Sciences, Linhai 317000, China; 2. Department of Biological Engineering, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan 430415, China; 3. Shanxi Emergency Materials Reserve Center for Agricultural and Animal Husbandry, Taiyuan 030001, China)

Abstract: In this manuscript, the effect of carbon sources on the mycelium growth of *Ganoderma atrum* in submerged fermentation was studied by orthogonal experiment. furthermore, the the interactions of inorganic salt, vitamin and carbon source were also discussed. The main results was obtained and listed as follows; 1) fructose was much better than that of sucrose and lactose on mycelium reproduction, and the demands for inorganic salt and vitamin were dependent on the kinds of carbon sources; 2) the optimum medium for mycelium was 20 g/L fructose, 2 g/L KH₂PO₄, 2 g/L K₂HPO₄, 2 g/L MgSO₄·7H₂O, 1 g/L CaCl₂·2H₂O, 20 mg/L VB₁, natural pH. with the optimum medium, the the mycelium biomass of *G. atrum* could reach at 0.808 6 g/dL after 7 days culture.

Keywords: *Ganoderma atrum*, fructose, carbon source, biomass, orthogonal experiment

收稿日期: 2012-03-22

作者简介: 唐兴国(1979—),男,湖北宜昌人,理学硕士,讲师,主要从事植物生物技术方面的研究。E-mail: ahgotang@sohu.com

黑 芝 (*Ganoderma atrum*) 属 灵 芝 科 (*Ganodermataceae* Donk, Bull) 灵芝属 (*Ganoderma*) 大型真菌,野生分布于我国福建、浙江、湖南、广西、海南等地区。据《神农本草经》记载:黑芝,味咸平。主治癰,利水道,益肾气,通九窍,聪察。久食轻身不老,延年神仙。一名玄芝,生山谷。

灵芝属的药用菌如紫芝、赤芝、黑芝等都具有十分重要的药理作用。长期以来,灵芝的生产以野生采集及人工固体基质栽培为主。近年来的研究表明:用液体深层培养方法获取的灵芝发酵菌丝体与固体基生长的灵芝子实体不仅主要活性成分相同,而且药理作用也基本一致^[1-3],这使得灵芝液体培养研究有了较深入的发展。在液体培养体系中,菌以悬浮的菌丝体形式进行生长^[4-6],由于液体深层培养灵芝菌丝体不受季节和原材料的限制,具有培养周期短、成本低、可快速增殖菌体细胞和显著提高资源利用率等优点,正受到业界的广泛关注,有望成为十分重要的生产应用方向^[7-10]。

目前国内有关黑芝的研究主要集中在引种栽培和初期的液体发酵条件探讨方面,其中关于黑芝发酵的温度、转速、装量等的研究较多,且多数研究是以复合碳氮源与无机盐组合进行实验^[1]。而有关不同碳氮源、不同无机盐水平与维生素用量的交互作用方面的研究则鲜见报道^[12-13]。

作者分别选用果糖($C_6H_{12}O_6$)、蔗糖($C_{12}H_{22}O_{11}$)、乳糖($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$)作为碳源,探讨不同无机盐水平与碳源之间的交互作用,以期找到较适宜于黑芝菌丝体发酵的营养供给模式,为规模化生产提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试菌种 黑芝(*Ganoderma atrum*)试管种:购于华中农业大学菌种中心。

1.1.2 试管种扩繁培养基 马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L。

1.1.3 摇瓶液体母种培养基 蔗糖 20 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 g/L, VB₁ 10 mg/L。此母种培养基是通过参考其他文献以及前期的预实验得出的较优配方^[1,4,7,9,14]。

1.1.4 二级摇瓶培养基 碳源:蔗糖、乳糖、果糖 (20 g/L); 无机盐: KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 氮源:酵母粉 (3 g/L); 维生素:VB₁; pH: 自然^[14-16]。

1.2 实验方法

1.2.1 试管种扩大培养 将试管原种切成 0.5 cm×0.5 cm 的方块,接入试管种扩繁培养基斜面,25℃暗培养,待菌丝长满后留作母种。

1.2.2 摇瓶液体母种的制备 将试管母种切成 0.5 cm×0.5 cm 的方块,接入摇瓶液体母种培养基,250 mL 三角瓶每瓶装入培养基 100 mL,接种量 4 块。接种后于 25℃下避光静置 24 h,待菌丝修复后转入 25℃、135 r/min、避光条件下摇瓶培养 7 d,即可制得摇瓶液体母种。

1.2.3 二级摇瓶培养基的筛选 采用正交设计与单因子实验相结合进行培养基的优化筛选,探讨无机盐水平与碳源之间的交互作用。碳源选择蔗糖、乳糖、果糖质量浓度为 20 g/L。氮源选择酵母粉,用量为 3 g/L。无机盐与维生素的水平组合见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 因素水平设计表

Tab.1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

水平	因 素			
	A $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	B [*] KH_2PO_4	C $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	D VB ₁
1	1 g/L	1 g/L	1 g/L	10 mg/L
2	2 g/L	2 g/L	2 g/L	20 mg/L
3	3 g/L	3 g/L	3 g/L	30 mg/L

*: 实验中 KH_2PO_4 与 K_2HPO_4 按特定比例添加形成缓冲体系,保持发酵期间培养基的 pH 稳定。

1.2.4 二级摇瓶的其他参数设置 装液量为 100 mL/250 mL,接种量为 5 mL/dL,摇床转速 135 r/min,25℃暗培养 7 d。

1.2.5 菌丝生物量的测定 发酵结束后,真空抽滤收集菌丝体测量鲜重,然后于 65℃烘干至恒重,测量菌丝体干重,单位为 g/dL。

1.2.6 数据处理 实验数据全部运用 SPSS13.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 以蔗糖为碳源的正交实验

从表 2 可以看出:对黑芝菌丝体生物量的影响 A ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 的 R 值为 0.093 8, B (KH_2PO_4 , K_2HPO_4) 的 R 值为 0.020 1, C ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 的 R 值

为 0.092 5, $D(VB_1)$ 的 R 值为 0.040 1。 R 值的大小次序为 $A>C>D>B$ 。 据此判断各因素对菌丝体生物

量的影响大小次序为 $CaCl_2 \cdot 2H_2O > MgSO_4 \cdot 7H_2O > VB_1 > KH_2PO_4, K_2HPO_4$ 。

表 2 黑芝液体发酵正交实验结果与分析(蔗糖)
Tab.2 Results and analysis of orthogonal experiment (sucrose)

编 号	因子及水平				菌丝球干重/(g/dL)				
	A	B	C	D	1	2	3	4	5
A-1	1	1	1	1	0.250 2	0.528 9	0.344 5	0.292 7	0.205 7
A-2	1	2	2	2	0.267 0	0.229 8	0.368 9	0.192 0	0.263 8
A-3	1	3	3	3	0.263 8	0.274 5	0.225 8	0.253 5	0.256 7
A-4	2	1	2	3	0.314 0	0.323 7	0.549 3	0.356 8	0.426 0
A-5	2	2	3	1	0.285 0	0.273 3	0.292 3	0.328 2	0.272 1
A-6	2	3	1	2	0.360 0	0.372 1	0.480 0	0.392 6	0.368 4
A-7	3	1	3	2	0.323 8	0.360 1	0.299 4	0.254 8	0.435 3
A-8	3	2	1	3	0.530 0	0.491 9	0.348 5	0.451 9	0.368 5
A-9	3	3	2	1	0.292 8	0.450 3	0.414 2	0.238 9	0.364 5
K_1	0.281 2	0.351 0	0.385 7	0.322 2					
K_2	0.359 6	0.330 9	0.336 8	0.331 2					
K_3	0.375 0	0.333 9	0.293 2	0.362 3					
R	0.093 8	0.020 1	0.092 5	0.040 1					

为了进一步了解不同因素水平对菌丝体生物量的影响,对上述数据作方差分析,结果见表 3。

表 3 黑芝液体发酵正交实验数据方差分析表(蔗糖)
Tab.3 Results and variance analysis of orthogonal experiment (sucrose)

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	概率
校正模型	0.157(a)	8	0.020	3.462	0.005
截距	5.159	1	5.159	910.168	0.000
Ca	0.076	2	0.038	6.697	0.003
K	0.004	2	0.002	0.312	0.734
Mg	0.064	2	0.032	5.666	0.007
VB_1	0.013	2	0.007	1.172	0.321
误差	0.204	36	0.006		
总变异	5.520	45			
校正合计	0.361	44			

由表 3 可发现, K 的 $F=0.312, P=0.734>0.05$; VB_1 的 $F=1.172, P=0.321>0.05$ 。 表明这两个因素在发酵中对黑芝菌丝体生物量的影响都不显著。而 Ca 的 $F=6.697, P=0.003<0.01$; Mg 的 $F=5.666, P=0.007<$

0.01。 表明 Ca, Mg 对黑芝液体培养的影响达到极显著水平。 需要进一步进行因素水平间的多重比较。 对以上数据进行邓肯氏多重检验(SSR 检验), 结果见表 4。

表 4 各因素水平间差异显著性比较(蔗糖)
Tab.4 Comparison of the significance of difference between each factors and levels (sucrose)

因素	水平	平均值	差异显著性 $\alpha=0.05$
Ca	3	0.375	a
	2	0.360	a
	1	0.281	b
K	1	0.351	a
	3	0.334	a
	2	0.331	a
Mg	1	0.386	a
	2	0.337	ab
	3	0.297	b
VB_1	3	0.360	a
	2	0.331	a
	1	0.322	a

由表 4 可以看出, Ca 的 1 号水平与 2、3 号水平之间的差异达到显著水平, 但 2 号与 3 号之间没有明显差异; Mg 的 1 号水平与 2 号水平之间没有显著差异, 2 号水平与 3 号水平之间没有显著差异, 但是 1 号水平与 3 号水平之间有显著差异。这说明当以蔗糖作为碳源时, 培养基中较高水平的 Ca 与较低水平的 Mg 更有利于黑芝菌丝生物量的积累。实验筛选出的最优组合为 $A_3B_2C_1D_3$, 即实验中的处理 8。

2.2 以乳糖为碳源的正交实验

从表 5 可以看出, 对菌丝体生物量的影响 A ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 的 R 值为 0.381 0, B (KH_2PO_4 , K_2HPO_4) 的 R 值为 0.085 7, C ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 的 R 值为 0.109 7, D (VB_1) 的 R 值为 0.143 9。 R 值的大小次序为 $A > D > C > B$ 。因此各因素对菌丝体生物量的影响大小次序为 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{VB}_1 > \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} > \text{KH}_2\text{PO}_4, \text{K}_2\text{HPO}_4$ 。

表 5 黑芝液体发酵正交实验结果与分析(乳糖)

Tab.5 Results and analysis of orthogonal experiment (lactose)

编 号	因子及水平				菌丝球干重/(g/dL)				
	A	B	C	D	1	2	3	4	5
B-1	1	1	1	1	0.223 8	0.224 2	0.220 4	0.196 6	0.187 1
B-2	1	2	2	2	0.285 6	0.265 8	0.215 3	0.222 6	0.207 0
B-3	1	3	3	3	0.270 4	0.230 8	0.231 1	0.172 3	0.254 4
B-4	2	1	2	3	0.715 8	0.646 2	0.418 8	0.550 3	0.533 6
B-5	2	2	3	1	0.439 3	0.481 1	0.420 7	0.434 2	0.518 1
B-6	2	3	1	2	0.450 6	0.623 0	0.522 3	0.486 8	0.282 2
B-7	3	1	3	2	0.449 2	0.488 6	0.447 6	0.473 7	0.499 6
B-8	3	2	1	3	0.709 0	0.660 3	0.873 0	0.755 8	1.016 8
B-9	3	3	2	1	0.518 7	0.568 2	0.668 8	0.456 3	0.560 7
K_1	0.226 1	0.414 6	0.494 4	0.406 8					
K_2	0.501 5	0.500 3	0.455 6	0.392 0					
K_3	0.607 1	0.419 8	0.384 7	0.535 9					
R	0.381 0	0.085 7	0.109 7	0.143 9					

为了进一步了解不同因素水平对菌丝体生物量的影响, 对上述数据作方差分析, 结果见表 6。

表 6 黑芝液体发酵正交实验数据方差分析表(乳糖)

Tab.6 Results and variance analysis of orthogonal experiment (lactose)

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	概率
校正模型	1.511(a)	8	0.189	28.353	0.000
截距	8.907	1	8.907	1337.276	0.000
Ca	1.161	2	0.580	87.139	0.000
K	0.069	2	0.035	5.199	0.010
Mg	0.093	2	0.046	6.962	0.003
VB_1	0.188	2	0.094	14.111	0.000
误差	0.240	36	0.007		
总变异	10.658	45			
校正合计	1.751	44			

由表 6 发现, K 的 $F=5.199$, $P=0.010=0.01$; VB_1 的 $F=14.111$, $P=0.000 < 0.01$; Ca 的 $F=87.139$, $P=0.000 < 0.01$; Mg 的 $F=6.962$, $P=0.003 < 0.01$ 。表明以上因素对黑芝菌丝体生物量的影响已达到极显著水平, 需要进一步进行各因素水平间的多重比较。对以上数据进行邓肯氏多重比较, 结果见表 7。

由表 7 可以看出, Ca 的 3 个水平之间的差异均达到显著水平; K 的 2 号水平与 1、3 号水平之间的差异也达到显著水平, 但 1 号与 3 号之间没有显著差异; Mg 的 3 号水平与 1、2 号水平之间的差异达到显著水平, 但 1 号与 2 号之间没有显著差异; VB_1 的 3 号水平与 1、2 号水平之间的差异达到显著水平, 但 1 号与 2 号之间没有显著差异。这说明当以乳糖作为碳源时, 培养基中添加较高水平的 Ca 和 VB_1 、较低水平的 Mg、中等水平的 K 更有利于黑芝菌丝体生物量的积累。实验筛选出的最优组合为

$A_3B_2C_1D_3$,即实验中的处理 8。

表 7 各因素水平间差异显著性比较(乳糖)

Tab.7 Comparison of the significance of difference between each factors and levels (lactose)

因素	水平	平均值	差异显著性 $\alpha=0.05$
Ca	3	0.607	a
	2	0.502	b
	1	0.226	c
K	2	0.500	a
	3	0.420	b
	1	0.415	b
Mg	1	0.494	a
	2	0.456	a
	3	0.385	b
VB ₁	3	0.536	a
	1	0.407	b
	2	0.536	b

2.3 以果糖为碳源的正交实验

从表 8 可以看出,对菌丝体生物量的影响 A ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 的 R 值为 0.106 4, B (KH_2PO_4 , K_2HPO_4) 的 R 值为 0.054 9, C ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 的 R 值为 0.983, D (VB_1) 的 R 值为 0.150 2。 R 值的大小次序为 $D>A>C>B$ 。因此各因素对黑芝菌丝体生物量的影响大小次序为 $\text{VB}_1>\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}>\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}>\text{KH}_2\text{PO}_4, \text{K}_2\text{HPO}_4$ 。

为了进一步了解不同因素水平对菌丝体生物量的影响,对上述数据作方差分析,结果见表 9。

由表 9 可以发现, K 的 $F=0.253, P=0.778>0.05$; VB_1 的 $F=1.857, P=0.171>0.05$; Ca 的 $F=0.998, P=0.379>0.05$; Mg 的 $F=0.881, P=0.423>0.05$ 。表明以上因素对黑芝菌丝体生物量的影响均未达到显著水平,这说明当碳源为果糖时,黑芝菌丝体的生长对培养基中的无机盐和维生素的依赖程度较低,这可能与单糖更容易被菌丝体细胞直接吸收利用有关。实验筛选出的最优组合为 $A_1B_2C_2D_2$,即实验中的处理 2。

表 8 黑芝液体发酵正交实验结果与分析(果糖)

Tab.8 Results and analysis of orthogonal experiment (fructose)

编 号	因子及水平				菌丝球干重/(g/dL)				
	A	B	C	D	1	2	3	4	5
C-1	1	1	1	1	0.423 5	0.677 1	0.560 9	0.449 3	0.521 5
C-2	1	2	2	2	0.446 4	0.811 0	1.146 3	0.927 1	0.712 3
C-3	1	3	3	3	0.539 2	1.139 2	0.293 2	0.646 5	0.433 9
C-4	2	1	2	3	0.462 0	0.485 5	0.680 2	0.512 2	0.699 4
C-5	2	2	3	1	0.501 2	0.427 1	0.508 5	0.469 6	0.362 0
C-6	2	3	1	2	0.382 5	0.463 2	0.565 2	0.476 6	1.136 4
C-7	3	1	3	2	0.570 5	0.609 8	0.393 1	0.411 1	0.903 0
C-8	3	2	1	3	0.772 7	0.717 2	0.387 7	0.735 1	0.257 0
C-9	3	3	2	1	0.544 7	0.496 6	0.790 8	0.382 9	0.585 8
K_1	0.648 5	0.557 2	0.568 4	0.513 4					
K_2	0.542 1	0.612 1	0.645 5	0.663 6					
K_3	0.570 5	0.591 8	0.547 2	0.584 1					
R	0.106 4	0.054 9	0.098 3	0.150 2					

表9 黑芝液体发酵正交实验数据方差分析表(果糖)
Tab.9 Results and variance analysis of orthogonal experiment (fructose)

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	概率
校正模型	0.364(a)	8	0.045	0.997	0.445
截距	15.508	1	15.508	340.022	0
Ca	0.091	2	0.046	0.998	0.379
K	0.023	2	0.012	0.253	0.778
Mg	0.080	2	0.040	0.881	0.423
VB1	0.169	2	0.085	1.857	0.171
误差	1.642	36	0.046		
总变异	17.514	45			
校正合计	2.006	44			

2.4 不同碳源间的横向比较

为进一步比较3种碳源在黑芝菌丝体发酵中的作用,将不同碳源条件下同一处理的菌丝体生物量进行横向比较,结果见图1。

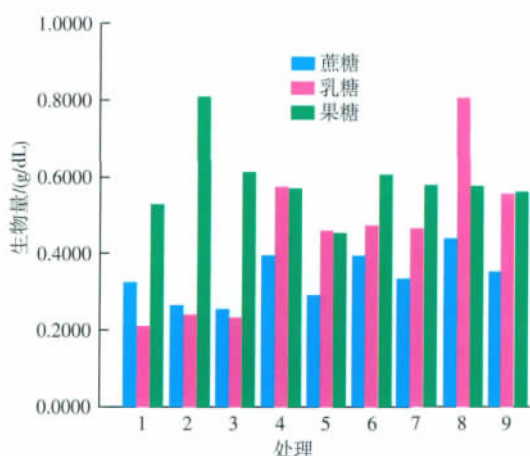


图1 不同碳源条件下黑芝菌丝体生物量的比较

Fig.1 Comparison of mycelium biomass under different carbon source

从图1可以看出,以果糖作为碳源时,菌丝体

生物量的积累有比较显著的优势,其中处理2生物量最高,达到0.8086 g/dL;而以乳糖为碳源的处理8菌丝球干重也达到0.8030 g/dL。

经综合比较发现,3种碳源条件下各处理菌丝体生物量的平均值分别为:蔗糖0.3386 g/dL,乳糖0.4449 g/dL,果糖0.5870 g/dL。本实验中的最有利于黑芝菌丝体生物量积累的碳源为果糖,乳糖次之,而蔗糖相对表现较差。

3 结 语

综合以上实验结果可以看出,实验中单糖的效果比二糖略好,且碳源种类不同时,菌丝体的生长对于无机盐和维生素的需求也有显著不同。初步分析认为 Ca^{2+} 和 VB_1 在黑芝菌丝体的对蔗糖和乳糖的利用过程当中充当了重要角色,而过高浓度的 Mg^{2+} 则不利于黑芝菌丝体对蔗糖和乳糖的分解利用。同时黑芝菌丝体对果糖的吸收利用则不受 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 VB_1 浓度的影响。

当以蔗糖和乳糖作为碳源时,无机盐和 VB_1 的用量对菌丝体生物量的积累有显著影响。实验筛选出的最佳组合为 $A_3B_2C_1D_3$, 即 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 g/L + KH_2PO_4 2 g/L + K_2HPO_4 2 g/L + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L + VB_1 30 mg/L。

而当以果糖作为碳源时,无机盐和 VB_1 的用量对菌丝体生物量的积累没有表现出显著影响。实验筛选出的最佳组合为 $A_1B_2C_2D_2$, 即 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L + KH_2PO_4 2 g/L + K_2HPO_4 2 g/L + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/L + VB_1 20 mg/L。

此外,实验初期将摇床转速设为150 r/min,培养出的菌丝球呈细小颗粒状,数量较少且外形不规则,当将摇床转速降至135 r/min后,培养出的菌丝球呈均匀的小圆球状,数量增多,且菌刺清晰可见,这说明文献报道的紫芝和赤芝的最佳发酵条件^[2-3,7-8]并不完全适用于黑芝的发酵研究。

参考文献:

- [1] 廖伟,郭成金. 黑芝菌丝体液体培养基的筛选[J]. 天津师范大学学报,2008,28(3):8-10.
LIAO Wei, GUO Cheng-jin. Selection of liquid culture media on mycelium of *Ganoderma atrum* [J]. Journal of Tianjing Normal University: Natural Science Edition, 2008, 28(3): 8-10. (in Chinese)
- [2] 杨焱,刘艳芳. 赤芝 G2 深层发酵优化模式的研究[J]. 食用菌学报,2004,11(3):43-49.
YANG Yan, LIU Yan-fang. An investigation on the optimal submerged-culture mode of *Ganoderma lucidum* G2 [J]. Acta Edulis Fungi, 2004, 11(3): 43-49. (in Chinese)

- [3] 张华山,余响华. 赤芝液体深层培养工艺条件的探索[J]. 湖北工业大学学报,2005,20(4):59-61.
ZHANG Hua-shan,YU Xiang-hua. Optimization of submerged culture of *Ganoderma lucidum*[J]. **Journal of Hubei University of Technology**,2005,20(4):59-61. (in Chinese)
- [4] 张翠霞,孟庆国,冯华,等. 食用菌液体菌种在生产和使用中应注意的问题[J]. 中国食用菌,2004,23(4):49-50.
ZHANG Cui-xia,MENG Qin-guo,FENG Hua,et al. The noticed problems in the use and production of liquid strain of edible fungi[J]. **Edible Fungi of China**,2004,23(4):49-50. (in Chinese)
- [5] 陶文沂,敖宗华,许泓瑜,等. 药食用真菌生物技术[M]. 北京:化学工业出版社,2007.
- [6] 黄小琴. 灵芝优良菌株筛选及多糖免疫活性与血芝液体发酵条件研究[D]. 雅安:四川农业大学,2006:5.
- [7] 王晓玲,刘高强. 紫芝液体发酵培养基的初步筛选和优化[J]. 食品科技,2009,34(3):14-16.
WANG Xiao-ling,LIU Gao-qiang. Preliminary select and optimization of submerged fermentation media of *Ganoderma siense* [J]. **Food Science and Technology**,2009,34(3):14-16. (in Chinese)
- [8] 张晓云. 龙泉赤芝的筛选与液体发酵条件研究[D]. 北京:中国协和医科大学中国医学科学院,2007:5.
- [9] 贺红. 灵芝液体深层发酵技术研究进展及展望[J]. 基层中药杂志,2000,14(2):48-49.
HE Hong. The research and prospect on the submerged fermentation culture of *Ganoderma* strain[J]. **Primary Journal of Chinese Materia Medica**,2000,14(2):48-49. (in Chinese)
- [10] 楼秀芳,楼锡银,钟卫鸿. 赤芝深层培养及营养液研制[J]. 中国食用菌,2000,20(2):30-31.
LOU Xiu-fang,LOU Xin-ying,ZHONG Wei-hong. Nutritinal liquid preparation of *Ganoderma lucidum* by submerged fermentation[J]. **Edible Fungi of China**,2000,20(2):30-31. (in Chinese)
- [11] 余素萍,张劲松,杨焱,等. 灵芝胞内多糖高产菌株 G7 深层发酵工艺的研究[J]. 中国食用菌,2004,23(6):36-39.
YU Su-ping,ZHANG Jing-song,YANG Yan,et al. Investigation of submerged fermentation parameters of *Ganoderma* strain G7 of high yield intracellular polysaccharide[J]. **Edible Fungi of China**,2004,23(6):36-39. (in Chinese)
- [12] 杨焱,周昌艳,冯志勇,等. 深层发酵灵芝高产菌株筛选初探[J]. 食用菌学报,2002,9(4):18-21.
YANG Yan,ZHOU Chang-yan,FENG Zhi-yong,et al. A primary investigation on the screening of high yield *Ganoderma lucidum* strains in submerged culture[J]. **Acta Edulis Fungi**,2002,9(4):18-21. (in Chinese)
- [13] 刘媛,丁重阳,章克昌,等. 10 种中药对灵芝液体发酵的影响[J]. 食品与生物技术学报,2008,27(2):123-126.
LIU Yuan,DING Zhong-yang,ZHANG Ke-chang,et al. The effect of 10 kinds of Chinese traditional medicines on submerged cultivation of *ganoderma lucidum*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2008,27(2):123-126. (in Chinese)
- [14] 刘贵巧,高会东. 食用菌液体菌种的保存期与保存温度的关系[J]. 邯郸农业高等专科学校学报,2003,20(3):8-10.
LIU Gui-qiao,GAO Hui-Dong. First report on relation between preservation period and temperature[J]. **Journal of Handan Agricultural College**,2003,20(3):8-10. (in Chinese)
- [15] 龚建华,王义军. 药用蕈菌紫芝液体培养的生长特征分析[J]. 微生物学报,2002,42(1):93-98.
GONG Jian-hua,WANG Yi-jun. The kinetic characteristics of mycelium growth of medicinal mushroom *Ganoderma sinense* in liquid-submerged cultivation[J]. **Acta Microbiologica Sinica**,2002,42(1):93-98. (in Chinese)
- [16] 宋频然,常继东. 灵芝胞外多糖高产菌株筛选及其深层发酵培养基的优化[J]. 食用菌学报,2003,10(2):9-16.
SONG Pin-ran,CHANG Ji-dong. Screening of *ganoderma lucidum* strains with high extracellular polysaccharide productivity and the optimization of submerged culture medium[J]. **Acta Edulis Fungi**,2003,10(2):9-16. (in Chinese)