

药用真菌液体发酵研究进展及存在问题探讨

李 羿¹, 杨 胜¹, 万德光^{2*}

1. 成都医学院药学院, 四川 成都 610083

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075

摘 要: 液体发酵已广泛地应用于药用真菌的培养, 应用现代发酵技术生产药用真菌代用品可有效解决野生药用真菌资源逐渐枯竭和生态环境保护的难题。根据目前药用真菌液体发酵的应用状况, 结合在茯苓液体发酵研究中存在的问题及提出的解决方法进行综述和讨论, 为药用真菌液体发酵的进一步研究提供参考。

关键词: 药用真菌; 液体发酵; 培养基; 发酵条件; 茯苓

中图分类号: Q949.32; R931.71

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)10-2066-05

Advances and existed problems in studies on liquid fermentation of medicinal fungi

LI Yi¹, YANG Sheng¹, WAN De-guang²

1. School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China

2. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Key words: medicinal fungi; liquid fermentation; medium; fermentation condition; *Poria cocos* (Schw.) Wolf.

目前已知药用真菌主要分布在子囊菌亚门和担子菌亚门中^[1-2]。担子菌亚门的药用真菌种数约占药用真菌的90%, 其中70%药用真菌集中在多孔菌科。《中国药典》2010年版收载的药用真菌有冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.、赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.、紫芝 *G. sinense* Zhao, Xu et Zhang、猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries、脱皮马勃 *Lasiosphaera fenzlii* Reich.、大马勃 *Calvatia gigantea* (Batsch ex Pers.) Lloyd、紫色马勃 *C. lilacina* (Mont. et Berk.) Lloyd、茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf、雷丸 *Omphalia lapidescens* Schroet. 9种^[3]。常用的药用真菌还有蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L.) Link.、黑木耳 *Auricularia auricula* (L. ex Hook.) Underw.、云芝 *Coriolus versicolor* (L.: Fr.) Quel.、桑黄 *Phellinus igniarius* (L. ex Fr.) Quel.、灰树花 *Grifola frondosa* (Dicks. ex Fr.) S. F. Gray、竹黄 *Shiraia bambusicola* P. Henn.、密环菌 *Armillaria mucida* (Schrader. ex Fr.) Quel.、羊肚菌 *Morehella esculenta* (L.) Pers.、猴头菌 *Hericium erinaceus* (Bull. ex Fr.) Pers.、银耳 *Tremella fuciformis* Berk.、樟芝

Antrodia cinnamomea Chang et Chou、树舌 *G. applanatum* (Pers.) Pat. 等。药用真菌已广泛地应用于农业、医药、食品等领域的科学研究。

除野生采集和人工栽培药用真菌外, 还可采用发酵工程等现代生物技术进行药用真菌液体发酵, 大规模、高效率地工业化生产药用真菌菌丝体。尽管药用真菌液体发酵具有不受季节和地域影响, 可连续工业化生产, 生产时间大大少于野生或人工栽培所需时间等优点, 但也存在如何有效提高药用真菌液体发酵水平及科学评价药用真菌液体发酵质量的问题, 从而严重地制约了药用真菌液体发酵的应用。本文就目前药用真菌液体发酵的应用状况, 结合笔者多年来在茯苓液体发酵研究中发现的问题及解决方法进行综述和讨论, 以期对药用真菌液体发酵的进一步研究提供参考。

1 药用真菌液体发酵研究进展

大多药用真菌因为受生理生态特殊性 & 环境条件制约, 其野生子实体稀少, 人工栽培难度较大, 给生态环境及资源保护也造成了较大的压力, 严重地影响了药用真菌的开发利用。应用现代发酵技术

收稿日期: 2012-01-28

基金项目: 四川省教育厅科研基金项目 (09ZC031); 四川省科技厅项目 (2006J13-150)

作者简介: 李 羿 (1969—), 男, 四川成都人, 副教授, 博士, 从事发酵中药及中药品种、品质的研究。

Tel: (028)68289198 E-mail: lychengdu@yahoo.com.cn

*通讯作者 万德光 E-mail: wandeguang@163.com

生产药用真菌代用品为解决上述难题提供了一条新途径。目前,针对灵芝、冬虫夏草、蛹虫草、黑木耳、云芝、桑黄、灰树花、茯苓、竹黄、猪苓、密环菌、羊肚菌、猴头菌、樟芝和树舌等药用真菌的液体发酵均有研究报道^[4-22]。本文围绕药用真菌的发酵条件、发酵培养基和发酵工程菌的研究进展进行综述。

1.1 发酵条件

为了提高药用真菌的液体发酵水平,获得更多的药用真菌菌丝体或发酵产物,应加强药用真菌生长代谢规律的基础研究,优化发酵培养条件,加强对发酵过程的动态监控。发酵培养条件的优化主要涉及到发酵温度、培养基初始 pH 值、摇瓶装量、搅拌速度、种子液接种量、种子液菌龄、发酵时间等参数的优化。其中,发酵温度、培养基初始 pH 值、摇瓶装量、搅拌速度是最关键的 4 个参数,其参数值选择是否得当对于药用真菌的液体发酵至关重要。

发酵条件的优化对药用真菌液体发酵的菌丝体产量将产生重要影响。任丹等^[23]在单因素试验的基础上,应用二次回归正交旋转组合设计确定了紫芝最佳液体发酵条件:装液量 90 mL, pH 6.0, 转速 140 r/min, 培养温度 27 °C, 接种量 10.5%。此时紫芝的最大生物量达 3.15 g, 验证试验结果与模型值相符。蔡德华等^[24]对猴头菌摇瓶培养, 研究培养条件对猴头菌菌丝体产量的影响, 认为最适培养条件为摇瓶培养基装量 50~70 mL, 接种量 10%, pH 5.0。发酵条件的优化对药用真菌液体发酵的发酵产物表达量也将产生重要影响。牛广财等^[25]在单因素试验的基础上, 采用 Box-Behnken 设计和响应面分析法对培养条件进行了优化, 确定了桑黄菌产胞外多糖的最佳液体发酵培养条件: 温度 26.3 °C, 摇床转速 162 r/min, 装液量 81.4 mL (250 mL 三角瓶), 接种量 16.0%; 在此培养条件下, 胞外多糖平均可达 1.866 g/L。郎久义等^[7]研究了冬虫夏草液体发酵产胞外多糖的实验条件, 认为接种量 10%, 培养温度 24 °C, 发酵周期 5 d, 摇床转速 140 r/min 为最适培养条件; 在此培养条件下, 发酵液中虫草多糖质量浓度达到 3.928 g/L。

1.2 发酵培养基

1.2.1 发酵培养基的优化 药用真菌培养基的组成, 特别是培养基中碳源和氮源种类及其比对液体发酵水平高低有重要影响。另外, 培养基中微量元素对药用真菌液体发酵也有影响, 特别是 K、Mg

等微量元素对药用真菌菌丝体产量和发酵产物表达量均有较大的影响。通过单因素、正交试验或响应面等方法优化药用真菌发酵培养基, 筛选出最适发酵培养基。

杨德等^[5]比较了单一碳源(葡萄糖、麦芽糖、蔗糖)和复合碳源(玉米粉及其与单糖的组合)对灵芝液体发酵菌丝生长及生物量和多糖量的影响。结果表明, 以玉米粉水解液发酵得到的灵芝菌丝体生物量最大, 但菌丝中多糖量较低。综合几种培养基来看, 以玉米粉为液体发酵主料, 配以蔗糖、麦芽糖等单糖的培养基为灵芝液体发酵的最佳培养基, 获得的多糖量最大。祝明思等^[11]在单因素试验的基础上, 采用 Box-Behnken 设计和响应面法对碳源、氮源、维生素对桑黄菌丝体产量的影响进行分析, 确定了其最佳液体培养基为玉米淀粉 0.5%、酵母膏 0.1%、维生素 B 0.1%, 培养时间 6 d, 结果每升液体培养基中桑黄菌丝体干质量为 18.43 g。钟石等^[26]以桑黄菌丝体干质量为评价指标, 筛选并优化确定了其最适培养基为麦芽糖 3%、酵母粉 2%、MgSO₄ 0.15%、KH₂PO₄ 0.10%、柠檬酸三铵 0.10%、复合维生素 B 0.01%, 其每升培养基中菌丝体干质量达 20.23 g。毛永强等^[27]以菌丝体干质量为指标, 通过单因素和正交试验确定了冬虫夏草液体发酵最适培养基组成为葡萄糖 2.0%、蛋白胨 4.0%、KH₂PO₄ 0.20%、MgSO₄ 0.10%, 在该条件下每毫升培养基中菌丝体干质量平均可达 15.64 mg。王广耀等^[18]采用单因素试验, 优选出适合羊肚菌液体培养的碳、氮源分别是麦芽糖和酵母膏; 通过正交试验优化了其液体发酵培养基, 其最适液体发酵培养基为麦芽糖 3.0%、酵母膏 4.0%、MgSO₄ 0.1%、KH₂PO₄ 0.15%。

1.2.2 补料发酵的研究 初始碳源或氮源浓度对茯苓液体发酵有较大影响, 浓度过高或过低都将抑制药用真菌生长。在对茯苓液体发酵的研究中, 发现初始葡萄糖浓度或氮源浓度对发酵有一定的影响, 发酵培养基营养成分的相对稳定更有利于茯苓的液体发酵。因此, 应根据茯苓液体发酵过程中碳源和氮源消耗速率适时地补充碳、氮源来提高其液体发酵的水平。李羿等^[13]研究了不同时间的不同补料方式对茯苓发酵罐液体发酵菌丝体产量、胞外多糖产量和发酵终点的影响, 确定了最佳的发酵工艺: 初始葡萄糖浓度为 2%, 初始氮源浓度为 0.05%, 在发酵培养第 48、60、72、84 h 时, 分别以 0.33%、0.67%、0.67%、0.33% 的葡萄糖浓度及 0.016 7%、0.016 7%、

0.008 3%、0.008 3%的氮源浓度补料,发酵时间为117 h。在最佳发酵工艺下,菌丝体干质量达12.56 g/L,较不补料发酵罐液体发酵时菌丝体干质量提高了14.39%。

1.2.3 药性培养基的研究 每种中药材都含有数百种不同的化学成分,不同化学成分对药用真菌生长代谢有抑制或促进作用。在营养培养基中添加适量中药材构成药性培养基,其中的化学成分将对药用真菌生长代谢产生重要的影响。对药用真菌药性培养基的研究越来越备受关注。

钟石等^[26]在桑黄最适培养基中添加0.3%桑枝水提物可促进其菌丝体生物量的增加,菌丝体干质量高达24.78 g/L。朱强等^[28]通过在灵芝液体发酵培养基中分别添加甘草、山茱萸、黄芪和黄芩,研究其对灵芝液体发酵的影响。结果表明,甘草和山茱萸对灵芝的液体发酵有明显的促进作用,黄芪表现一定的促进作用和抑制作用,黄芩则有较强的抑制作用;除黄芩外,灵芝生物量及各代谢产物量达到最大值时其余3种中药的添加量范围均在4~8 g/L,其中,甘草更利于促进灵芝酸(尤其是胞外灵芝酸)的合成,山茱萸不仅能促进灵芝快速生长,而且更利于促进灵芝多糖(尤其是胞外灵芝多糖)的合成。杨海龙等^[29]研究了以薏苡仁为基质的灵芝液体发酵,研究结果表明最适培养基中薏苡仁的量为3.59%,薏苡仁可促进灵芝的生长和胞外多糖的分泌。陈丽华等^[30]研究不同中药对黑木耳液体培养中生物量的影响,并对添加不同中药的黑木耳发酵液的体外活性进行了比较。结果表明,丹参和绞股蓝抑制黑木耳的生长;决明子对黑木耳的生物量没有大的影响;红曲、银杏叶、何首乌、葛根和苦荞均能促进黑木耳的生长。体外活性试验结果显示,在黑木耳发酵过程中添加何首乌、银杏叶和决明子能增强黑木耳的调血脂功效。

李羿等^[31]考察了薏苡仁、黄芪、金银花、甘草、淡竹叶、桑叶、丹参、灵芝和枸杞子9味中药对茯苓摇瓶液态发酵的影响,黄芪、金银花和丹参对茯苓的菌丝体生长有抑制作用,而其余6味中药则对茯苓的菌丝体生长有促进作用,其中以薏苡仁的促进作用最为显著。改变薏苡仁添加量,分别按0.25%、0.5%、0.75%、1.0%、1.5%和2.0%比例将薏苡仁粉末加入营养培养基中,研究不同薏苡仁添加量对茯苓摇瓶液体发酵的菌丝体产量的影响。研究表明,营养培养基中添加0.75%薏苡仁,茯苓菌

丝体干质量最高达14.41 g/L,较未添加薏苡仁摇瓶液体发酵时菌丝体干质量提高了22.53%。

1.3 发酵工程菌

优良的药用真菌工程菌是提高药用真菌液体发酵水平的关键。目前,对药用真菌采用的育种手段主要有自然选择、诱变育种和杂交育种。除利用紫外线、激光和化学诱变剂等物理化学诱变因素来筛选出优良药用真菌外^[32],为了提高药用真菌育种的有效性和目的性,研究人员越来越重视利用原生质体融合技术、基因重组技术等来构建新型的药用真菌发酵工程菌。

原生质体融合又称细胞融合,该技术不受亲合因子的影响,可实现药用真菌的种内不同品种间、种间以及属间细胞中的全基因组的有效混合,使遗传距离较大的远缘种间、属间杂交成为可能。但由于杂合子鉴定标准上存在着技术难度而影响了该技术的广泛应用。邱文娜等^[33]对桑黄原生质体融合菌株进行液体培养,测定各菌株的生物量及发酵液中胞外多糖量、总黄酮量、酯酶活性及pH值。研究结果表明,融合菌株与亲本具有共同的基础条带,同时还产生了自身特异性条带,融合菌株SR002、SR003菌丝生物量是亲本SA04的3倍。SR005菌株合成胞外多糖速率最快,但SR002菌株胞外多糖产量最高,较亲本SA02增加到1.8倍。融合菌株SR005在培养后期发酵液中酯酶活性最高。SR002、SR003两菌株亲缘关系极为相近。筛选得到的SR002菌株经进一步遗传稳定性验证后可用于以获得生物量、胞外多糖为目的的液体发酵培养。曾念开等^[33]采用双灭活标记,原生质体PEG诱导融合的方法,初步筛选出生长速度快的鲍氏针层孔菌菌株SA04,液体发酵生产菌丝体和胞外多糖产量高的鲍氏针层孔菌菌株SA02。

原生质体融合缺乏对所需基因的选择,因此,药用真菌基因工程育种的研究越来越受到关注,并且在理论和应用上均取得了较大进展。利用基因工程重组技术将2种或2种以上药用真菌的优良基因克隆到1个工程菌中,构建出新型高效的药用真菌发酵工程菌。新型高效药用真菌发酵工程菌必将给药用真菌液体发酵带来变革。

2 药用真菌液体发酵存在问题及解决措施

目前已在药用真菌发酵培养基和药性培养基的筛选与优化、培养条件的优化、发酵工艺的放大、补料发酵工艺的优化及优良发酵工程菌的选育等方

面取得了一定的研究成果,提高了药用真菌液体发酵的水平,但仍存在如何提高药用真菌的液体发酵水平和科学评价药用真菌液体发酵质量的问题,上述问题如不能有效解决将严重制约药用真菌液体发酵的应用。

2.1 药用真菌液体发酵水平尚需提高的问题及解决措施

提高药用真菌的液体发酵水平,即提高发酵药用真菌的质(药用真菌菌丝体中活性成分的量高,药理作用强)、量(药用真菌菌丝体的生物量高)和稳定性(不同批次药用真菌液体发酵的质和量一致性)。针对上述问题,笔者以茯苓液体发酵为例提出解决措施。

2.1.1 提高发酵茯苓质量的策略 提高发酵茯苓的质量关键在于最适培养基的筛选和优化,以及最适培养条件的优化。而对培养基或药性培养基的筛选由于缺乏科学理论指导,存在随机性较强和筛选效率不高的问题。因此,笔者拟以中药方剂理论为指导,结合药效学实验来提高药性培养基的筛选效率。通过加入1种中药(如薏苡仁或白术)或数味中药(如人参、白术、甘草)可以增加茯苓液体发酵菌丝体的产量,提高药效成分的量,增强药理作用。药物“七情和合”中的“相须”是指性能功效相似的药物配合应用,可增强其原有功效;中药复方以其配伍严谨、疗效显著著称,而经方更是千余年用之不衰。鉴于薏苡仁、白术、茯苓均具有利水、渗湿、健脾的功效,选取常见茯苓药对白术及经方四君子汤(白术、茯苓、甘草和人参,其他3味药按四君子汤的用药比例)添加到营养培养基中构成药性培养基,以添加薏苡仁的药性培养基为对照(薏苡仁对茯苓菌丝体生长的促进作用最为显著),进行茯苓摇瓶液体发酵。考察在不同药性培养基中茯苓摇瓶液体发酵后药性发酵茯苓(薏苡仁配伍发酵茯苓、白术配伍发酵茯苓、四君子汤配伍发酵茯苓)的菌丝体干质量,结合增强免疫、抗疲劳、利尿、抗肿瘤的药效学实验来评价其药效,采用多指标、多种评价手段,证明相对于薏苡仁配伍液体发酵,白术配伍发酵和四君子汤配伍发酵所得药性发酵茯苓在菌丝体干质量、药效成分量、药理作用方面均显示出优势。白术配伍发酵和四君子汤配伍发酵体现了传统中药方剂配伍理论中的相须配伍和根据病症特点所体现出来的方剂君、臣、佐、使整体协同的特点。笔者将传统中药配伍理论应用到茯苓液体发酵

过程中,提出了一种基于中药方剂理论的中药配伍发酵液体发酵理论,也为其他药用真菌的液体发酵提供理论指导。在此基础上,发酵条件和补料发酵工艺的优化将进一步提高发酵茯苓的质量。

2.1.2 提高茯苓液体发酵稳定性的策略 不同批次液体发酵的茯苓质和量一致性的关键是液体发酵工艺的稳定性,实现液体发酵工艺稳定性的关键是适时动态调控茯苓的液体发酵,而要实现液体发酵的适时动态调控又必需以加强茯苓发酵罐液体发酵动力学特性的研究为基础。邵伟等^[35]对灰树花液体发酵动力学特性进行了初步研究,建立了灰树花液体发酵过程中菌体生长、胞外多糖合成、基质消耗的动力学模型,为实现其发酵过程的优化打下了基础。因此,笔者拟采用 Origin 6.0 数据处理软件分析实验数据,通过 Logistic 方程建立发酵罐液体发酵菌体生长、基质消耗的动力学模型,比较模型计算值与实验数据的拟合度,完成茯苓发酵罐液体发酵动力学特性的研究,通过发酵过程的计算机在线控制实现对液体发酵的适时动态的调控,从而保证茯苓液体发酵的稳定性。

2.2 药用真菌液体发酵质量难以科学评价的问题及解决措施

针对药用真菌液体发酵质量难以科学评价的问题,笔者仍以茯苓液体发酵为例提出解决措施。科学评价基于中药复方药性培养基的茯苓液体发酵优于基于薏苡仁为基质的茯苓液体发酵和基于普通营养培养基的液体发酵的策略就是科学评价其发酵产物的质和量。量的问题较易解决,只需简单地比较这几种发酵方式的每升发酵液中茯苓菌丝体干质量,茯苓菌丝体干质量越高越好。质的问题主要通过药效学实验来评价。因此,笔者拟通过天然茯苓、发酵茯苓^[36]和药性发酵茯苓(薏苡仁配伍发酵茯苓、白术配伍发酵茯苓、四君子汤配伍发酵茯苓)的药效学实验,结合主要化学成分茯苓多糖、三萜类化合物、氨基酸、微量元素的测定来评价天然茯苓、发酵茯苓和药性发酵茯苓的质,并试图揭示其药效物质基础。通过上述途径有效解决茯苓液体发酵质量难以科学评价的问题。

总之,如何提高茯苓的液体发酵水平和科学评价茯苓液体发酵质量等瓶颈问题的解决将推动其液体发酵的发展和应用。同时,该解决策略还可以推广到茯苓外的其他药用真菌的液体发酵,提高药用真菌的整体发酵水平,对我国资源和生物多样性的

保护意义重大。

3 药用真菌液体发酵展望

随着影响药用真菌液体发酵瓶颈问题的有效解决,药用真菌液体发酵的应用将进入快速发展阶段。药用真菌发酵工程菌、发酵培养基和发酵条件等因素直接影响药用真菌的发酵水平,而应用现代工程技术设计和生产出适合药用真菌连续发酵且价格低廉的新型发酵罐,对于药用真菌液体发酵的生产也至关重要。随着对单菌种药用真菌液体发酵机制研究的深入,也将推动药用真菌的多菌种混合液体发酵研究,从而提高药用真菌液体发酵水平。药用真菌液体发酵的进展必将提高药用真菌的发酵水平和资源利用效率,促进药用真菌在医药食品等领域发挥更大的作用。

参考文献

- [1] 袁明生,孙佩琼. 中国蕈菌原色图集 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2007.
- [2] 陶文沂,敖中华,许泓瑜,等. 药食用真菌生物技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] 孙 静,马 琳,吕斯琦,等. 中药发酵技术研究进展 [J] 药物评价研究, 2011, 34(1): 49-52.
- [5] 杨 德,周 明,高 虹,等. 灵芝液体发酵培养基筛选研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(30): 18536-18538.
- [6] Yang F, Ke Y, Kuo S. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures [J]. *Enzyme Microbial Technol*, 2000, 27: 295-301.
- [7] 郎久义,齐旭阳,侯英雪,等. 冬虫夏草液体发酵产胞外多糖的实验条件 [J]. 大连工业大学学报, 2009, 28(2): 107-110.
- [8] 房天琪,邱芳萍,王长周,等. 蛹虫草菌丝体液体培养工艺的研究 [J]. 长春工业大学学报: 自然科学版, 2011, 32(1): 83-87.
- [9] 王 谦,贾 震. 不同条件对黑木耳液体深层发酵的影响 [J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2011, 31(1): 74-78.
- [10] 林晓霞,熊 强,陆利霞,等. 云芝糖肽的液体发酵培养基的研究 [J]. 生物加工过程, 2006, 4(2): 64-68.
- [11] 祝明思,王应男,张公亮,等. 桑黄菌丝体液体发酵培养条件的研究 [J]. 中国酿造, 2010(11): 88-91.
- [12] 邵 伟,仇 敏,唐 明. 液体发酵灰树花胞外多糖动力学研究 [J]. 中国酿造, 2009(4): 87-89.
- [13] 李 羿,李 晨,游元元,等. 茯苓发酵罐补料液体发酵的研究 [J]. 化学研究与应用, 2011, 23(7): 847-851.
- [14] Huang Q, Zhang L. Solution properties of (1 → 3)-alpha-D-glucan and its sulfated derivative from *Poria cocos* mycelia via fermentation tank [J]. *Biopolymers*, 2005, 79(1): 28-38.
- [15] 项小燕. 竹黄菌液体发酵条件的优化 [J]. 生物技术, 2010, 20(4): 73-75.
- [16] 张 鑫,余晓斌. 响应面法优化以豆饼粉为基质发酵猪苓菌 [J]. 生物加工过程, 2008, 6(2): 53-55.
- [17] 程显好,刘林德,董洪新,等. 蜜环菌菌丝体液体培养条件的优化 [J]. 中药材, 2007, 30(5): 509-512.
- [18] 王广耀,董立华,张 红. 液体羊肚菌浅层发酵培养基的优化研究 [J]. 北方园艺, 2010(7): 173-175.
- [19] 刘成荣,卢芳芳. 猴头菌深层发酵工艺条件的研究 [J]. 莆田学院学报, 2008, 15(2): 60-62.
- [20] 张宏海,张仲欣,马海乐. 樟芝深层液体发酵条件的试验研究 [J]. 食品与药品, 2011, 10(9): 18-21.
- [21] 李正鹏. 药用真菌树舌液体深层培养研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(5): 2752-2753.
- [22] 李 羿,杨 胜,李 晨,等. 茯苓摇瓶液体发酵复合药性培养基及其化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1519-1522.
- [23] 任 丹,辜运富,张小平,等. 二次回归正交旋转组合设计在紫芝液体发酵培养条件优化中的应用 [J]. 西南农业学报, 2011, 24(2): 681-686.
- [24] 蔡德华,董洪新,肖长生,等. 猴头菌液体发酵的环境条件试验 [J]. 湖北农业科学, 2003(2): 78-80.
- [25] 牛广财,朱 丹,李志江,等. 响应面法优化桑黄菌产胞外多糖的培养条件研究 [J]. 中国酿造, 2009(2): 68-71.
- [26] 钟 石,李有贵,朱俭勋,等. 优化培养基对桑黄菌丝体生长的影响 [J]. 浙江农业科学, 2011(1): 173-175.
- [27] 毛永强,李 娜. 虫草发酵培养基研究 [J]. 山西农业科学, 2009, 37(11): 20-22.
- [28] 朱 强,夏艳秋,汪志君,等. 4 种中药对灵芝生长与发酵的影响 [J]. 中国酿造, 2010(7): 163-165.
- [29] 杨海龙,章克昌. 以蕈苡仁为基质的灵芝液体发酵-I 培养基优化 [J]. 中国食品学报, 2006, 6(4): 6-10.
- [30] 陈丽华,章克昌. 8 味中药对黑木耳发酵的影响 [J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(5): 104-109.
- [31] 李 羿,李 晨,游元元,等. 不同药性培养基对茯苓液体发酵的影响 [J]. 药物生物技术, 2011, 18(2): 129-132.
- [32] 李 羿,万德光. 茯苓紫外线诱变育种 [J]. 药物生物技术, 2008, 15(1): 44-47.
- [33] 邱文娜,王秋颖,曾念开,等. 桑黄原生质体融合菌株及其亲本生物学特性的比较研究 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(15): 58-61.
- [34] 曾念开,王秋颖,苏明声. 鲍氏针层孔菌原生质体融合育种的研究 [J]. 中药材, 2008, 31(4): 475-478.
- [35] 邵 伟,仇 敏,唐 明. 液体发酵灰树花胞外多糖动力学研究 [J]. 中国酿造, 2009(4): 87-89.
- [36] 李 羿,万德光. 天然茯苓和液体发酵茯苓质量标准的研究 [J]. 成都医学院学报, 2009, 4(4): 251-254.