

灵芝液态发酵胞内外多糖结构特征及其活性研究进展

段语嫣^{1,2}, 冯杰¹, 刘艳芳^{*1}, 周帅¹, 唐传红¹, 刘利平¹, 张劲松^{*1}

1 上海市农业科学院食用菌研究所 国家食用菌工程技术研究中心 农业农村部南方食用菌资源利用重点实验室 国家食用菌加工技术研发分中心, 上海 201403

2 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

段语嫣, 冯杰, 刘艳芳, 周帅, 唐传红, 刘利平, 张劲松. 灵芝液态发酵胞内外多糖结构特征及其活性研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2721-2737.

DUAN Yuyan, FENG Jie, LIU Yanfang, ZHOU Shuai, TANG Chuanhong, LIU Liping, ZHANG Jingsong. Structural characteristics and biological activity of polysaccharides produced by liquid fermentation of *Ganoderma*: a review[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2721-2737.

摘要: 灵芝是一味传统的中药材, 具有很高的药用价值, 多糖是其主要的活性成分之一, 可从其子实体、孢子粉、发酵菌丝体和胞外液中获得。近年来, 从灵芝菌丝体和胞外液中发现的多糖越来越得到研究者的关注。本文从发酵培养基成分及发酵条件对灵芝胞内外多糖的影响、灵芝胞内外多糖的结构、灵芝胞内外多糖生物活性 3 个方面进行综述, 为发酵来源灵芝多糖的开发利用提供科学理论依据。

关键词: 灵芝胞内外多糖; 液态深层发酵; 结构特征; 生物活性

资助项目: 上海市现代农业产业技术体系项目(沪农科产字[2022]第 9 号); 上海市农业科学院卓越团队建设计划(2022A-03)
This work was supported by the Project of Shanghai Modern Agricultural Industrial Technology System ([2022] 09) and the Project of Shanghai Academy of Agricultural Sciences Excellent Team (2022A-03).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Yanfang, aliu-1980@163.com; ZHANG Jingsong, syja16@saas.sh.cn

Received: 2022-09-11; Accepted: 2022-12-23; Published online: 2023-02-02

Structural characteristics and biological activity of polysaccharides produced by liquid fermentation of *Ganoderma*: a review

DUAN Yuyan^{1,2}, FENG Jie¹, LIU Yanfang^{*1}, ZHOU Shuai¹, TANG Chuanhong¹,
LIU Liping¹, ZHANG Jingsong^{*1}

¹ Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Research and Development Center for Edible Fungi Processing, Shanghai 201403, China
² College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Polysaccharides, a major group of active components in the medicinal *Ganoderma* spp., are mainly extracted from the fruiting body, spore powder, and liquid submerged fermentation broth of mycelium and extracellular fluid. In recent years, polysaccharides extracted from the mycelia and extracellular fluid have attracted wide attention from scholars. In this paper, the effect of composition of fermentation medium and fermentation conditions on the intracellular and extracellular polysaccharides of *Ganoderma* spp., and the structures and biological activities of the polysaccharides were reviewed, which could lay a theoretical basis for the development and utilization of the polysaccharides produced by liquid fermentation.

Keywords: intracellular and extracellular polysaccharides of *Ganoderma* spp.; liquid submerged fermentation; structural characteristics; biological activity

灵芝(*Ganoderma* spp.)在古代被称为“仙草”,在亚洲多个国家广泛使用^[1],是中国传统的扶正固本、滋补强壮名贵药材。2000年版的《中国药典》首次正式收录赤芝(*Ganoderma lucidum*)和紫芝(*Ganoderma sinense*)为法定中药材^[2]。

灵芝的活性成分包含多糖、三萜类、油脂类、多种氨基酸及蛋白质类等^[3],其中多糖是主要的活性成分之一。研究表明灵芝多糖有许多有益于人体的生物活性,如抗肿瘤、免疫调节、抗炎、保肝、降血糖、抗菌等^[4]。

灵芝多糖主要从灵芝子实体、菌丝体、孢子粉和发酵液中分离得到。截至目前已分离得到大约 200 多种^[5]。随着生物技术的不断发展,因在灵芝菌株的诱变、筛选及改良方面

具有易操作等优势,以及从灵芝菌丝体和胞外液中获取灵芝多糖具有周期短、易操作、可控性高及可实现大规模生产等优点,通过液态深层发酵方式获得目标产物的研究获得了国内外研究人员的广泛重视^[6-10]。目前关于灵芝多糖的研究主要集中在子实体和孢子粉上,有关液态发酵来源灵芝多糖的研究还比较少,仅有百余篇,而且研究主要集中在灵芝多糖的生物合成代谢及调控、高产多糖液态发酵培养基优化及工艺优化等方面,对相关多糖结构特征和生物活性方面的研究较少。本文从发酵培养基成分及发酵条件对灵芝胞内外多糖的影响、液态发酵来源胞内外多糖的结构和生物活性 3 个方面进行综述,以期对灵芝多糖的开发利用提供科学的理论依据。

1 液态深层发酵条件对灵芝多糖结构的影响

采用液态深层发酵技术可在短时间内制备大量灵芝原料, 从而大大降低成本, 有利于工业化生产, 可有效克服野生采集和人工栽培获得灵芝原料的局限性^[11]。目前研究发现, 液态深层发酵过程中主要因素的变化可能会影响到最终代谢产物的形成^[2], 其中, 液态发酵培养基成分和培养条件的改变会使灵芝菌丝体和胞外液中的多糖结构发生改变, 进而会影响其生物活性。

1.1 培养基对灵芝多糖的影响

在灵芝液态深层发酵过程中, 菌丝体通过培养基获得生长繁殖和合成代谢产物所必需的营养物质。培养基组成的不同不仅会对灵芝菌丝体形态和胞内外多糖的产量有明显的影响, 还能改变胞内外多糖的单糖组成、分子量分布等结构特征, 从而进一步会影响其生物活性。

1.1.1 碳源的影响

灵芝深层发酵中可利用的碳源包括葡萄糖、果糖、淀粉、玉米粉、木糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖和酒糟等^[11]。在灵芝多糖合成的过程中, 培养基中的碳源主要负责提供能量和合成多糖所需的单糖。

培养基中所用单糖的浓度、种类对多糖产量和其单糖组成有明显的影响。Feng 等^[12]研究表明, 当提高培养基中的葡萄糖浓度至 40 g/L 时, G0119 (沪农灵芝 1 号) 的胞内多糖得率最高为 2.21 g/L。Long 等^[13]研究发现当培养基中的葡萄糖为碳源时, 胞外多糖最高产量为 1.60 g/L。刘雨欣^[14]研究发现向含有葡萄糖的培养基中添加 4.8 g/L 岩藻糖时, 灵芝多糖中的岩藻糖含量由 1% 提高到 17%。王琼^[15]分别将 6 种碳源(葡萄糖、甘露糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖和鼠

李糖) 作为培养基中的唯一碳源, 发现灵芝在生长过程中均能利用这 6 种碳源进行多糖合成, 而且所产胞外多糖的单糖组成呈规律性变化: 以某一单糖为唯一碳源时, 灵芝能够快速利用该单糖合成多糖, 而且所产多糖组分中该单糖所占的比例最高, 均超过了 80%; 葡萄糖、甘露糖和半乳糖是灵芝多糖中经常出现的组分, 这 3 种单糖之间能够互相转化, 比例均在 1%–10% 之间; 木糖、阿拉伯糖和鼠李糖这 3 种单糖是比较难合成的单糖, 所占比例均小于 1%; 6 种单糖作为碳源时灵芝多糖中均出现了岩藻糖, 但所占比例非常低。

所用碳源的种类也会对灵芝多糖的相对分子量产生影响。杨静静等^[16]研究发现添加玉米粉能够提高灵芝多糖中高分子量多糖的比例, 在添加玉米粉后发酵 5 d 时, 高分子量灵芝多糖的比例达 50% 以上, 同时也发现灵芝多糖中岩藻糖和甘露糖的比例相对减少。王海燕^[17]研究表明, 葡萄糖、麦芽糖或可溶性淀粉作为碳源时发酵后期高分子量区间多糖明显增多。Liu 等^[18]研究表明, 鼠李糖作为碳源时更适宜产胞外多糖中的低分子量(70 E) 组分。刘雨欣^[14]发现未添加岩藻糖培养基培养的灵芝多糖其主要组分子量为 1.262×10^4 Da, 而添加岩藻糖培养基培养的灵芝多糖的主要组分子量有小幅度降低, 为 1.233×10^4 Da。以上研究表明, 玉米粉、葡萄糖、麦芽糖或可溶性淀粉作为碳源时有利于灵芝多糖中高分子量多糖的合成, 鼠李糖有利于低分子量多糖的合成, 岩藻糖的添加能够小幅度降低所灵芝多糖的相对分子量。

通过对培养基中碳源的调控, 可以实现对多糖产量、单糖组成和相对分子量的调控, 但其中相对分子量的改变机制仍不清晰, 需进一步探究。

1.1.2 氮源的影响

真菌的生长离不开氮源,有机氮源在提供给真菌合成蛋白质等生命物质的同时还能提供一些微量元素,对多糖等代谢产物的合成也有促进作用。培养基中的氮源常分为有机和无机氮源两种。采用有机氮源有利于提高细胞生长速率和最终生物量,并可促进代谢产物的合成,并且灵芝对有机氮源利用更迅速。Feng 等^[12]研究表明酵母粉和蛋白胨为氮源时胞内多糖产量较高,当酵母粉浓度为 12 g/L 时胞内多糖得率最高为 1.30 g/L。Chang 等^[19]研究表明酵母抽提物和脱脂牛奶(大量乳糖)有助于灵芝菌株 CCRC 36124 菌丝体的生长和多糖的产生。Long 等^[13]对比了 6 种氮源对胞外多糖产量的影响,发现当氮源为蛋白胨时胞外多糖产量最高为 1.87 g/L。

除明显影响灵芝多糖的产量外,氮源种类、浓度的调控也对灵芝多糖的相对分子量产生影响。有研究表明,氮源浓度过低时灵芝液态发酵所产多糖多为低分子量多糖,而氮源浓度过高时则会抑制菌丝体和胞外多糖的产量^[20]。王海燕^[17]发现酵母膏和黄豆饼粉作为氮源时,灵芝液态发酵所产胞内多糖的高分子量区间多糖更多。Liu 等^[18]发现培养基中的碳、氮源为葡萄糖和酵母粉时更适合灵芝液态发酵产生胞外多糖中高分子量组分(20 E)。这表明使用葡萄糖和酵母粉作为培养基所需碳氮源时,有助于提升灵芝胞内外多糖的高分子量组分的含量。

1.2 发酵条件对灵芝多糖的影响

灵芝胞内外多糖的产量、结构及活性除了受到发酵培养基影响外,也受到初始 pH、发酵温度、转速等发酵条件的影响。

1.2.1 初始 pH 的影响

初始 pH 不同会对胞外代谢产物和菌丝体生物量有较大的影响。Fang 等^[21]研究发现,起始 pH 为 6.5 时,生物量达到最高值(17.3±0.12) g/L

(干重),而将起始 pH 值从 6.5 降低至 3.5 时,胞外多糖产量有着明显的提高。Kim 等^[22]采用两阶段控制 pH 策略得到胞外多糖的最高产量为 4.7 g/L,比不控制 pH 条件下提高了 160%。乔双逵^[23]选用对胞外多糖中单糖占比影响较大的 pH 4.0、pH 6.0 和 pH 7.0 作为考察条件,发现随着 pH 的增加,葡萄糖的占比呈逐渐增大趋势,其摩尔占比分别为 77.474%、81.959%和 89.306%;而甘露糖及半乳糖的占比呈逐渐减小趋势,甘露糖的摩尔比例分别为 13.036%、11.366%和 5.723%,半乳糖的摩尔比例分别为 8.786%、6.267%和 4.456%。

1.2.2 温度的影响

由于温度对机体酶促反应有极大影响,所以对灵芝菌丝体生长和代谢物的积累至关重要。Lee 等^[24]发现 25 °C 时灵芝胞外多糖的产量最高,10 °C 时胞内多糖含量和生物量最高。Peng 等^[25]发现随着培养基温度的升高,灵芝胞外多糖中的葡萄糖逐渐减少,甘露糖和半乳糖的比例随着温度的增高而升高。乔双逵^[23]研究表明灵芝多糖中葡萄糖、半乳糖和甘露糖的比例受到发酵条件的影响较大,甘露糖和半乳糖的比例随着培养温度的升高呈先增大后减小趋势,30 °C 时达到最大值。

1.2.3 转速的影响

灵芝是好氧真菌,所以供氧对菌体生长和代谢产物的合成有重要影响,而供氧跟转速或搅拌密切相关。适当提高发酵培养时的转速有助于提高灵芝多糖的产量,同时随着转速的提高,灵芝多糖中甘露糖、半乳糖和葡萄糖所占比例也会相应有所变化。张璐^[26]研究表明,当转速区间为 120–160 r/min 时,金地灵芝液态发酵产灵芝多糖的产量随转速的增加而不断增加,而且在转速为 160 r/min 时多糖产量最高,达到 1.926 g/100mL。邹佳好^[27]研究表明转速过

低或过高都会造成胞外多糖产量下降, 当转速在 120–180 r/min 范围内时, 胞外多糖产量随转速的升高不断增加, 而且在摇床转速为 180 r/min 时达到最高, 之后随着转速的增加胞外多糖的产量开始减少。乔双逵^[23]选用 100、150 和 200 r/min 的转速考察灵芝多糖的单糖组成变化, 结果表明随着转速的增大所获多糖的甘露糖及半乳糖的摩尔比例先减小后增大, 而葡萄糖的摩尔比例先增大后减小。

液体深层发酵生产灵芝多糖与菌种、培养基和发酵条件密切相关, 因此对培养基和发酵条件进行一定的调控, 从而实现对产量、结构及相应活性定向改良有利于灵芝多糖的后续应用。

2 灵芝液态发酵来源多糖的结构

液态发酵来源灵芝多糖的化学结构呈现明显的多样性, 也造成了其生物活性的变化, 研究其结构与生物活性之间的关系对合理开发利用这些多糖具有重要的应用价值。

大量的研究表明, 从菌丝体中获取灵芝胞内多糖的方式多为热水提取, 其类型主要为同多糖(主要为葡聚糖)和杂多糖, 分子量从几千到几十万均有分布。同时, 灵芝胞内多糖的单糖组成多为阿拉伯糖、甘露糖、木糖、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖和鼠李糖等, 组成比例也不尽相同。单糖间的连接方式多为 β -(1 \rightarrow 3)、 β -(1 \rightarrow 4)、 α -(1 \rightarrow 4) 和 α -(1 \rightarrow 6)糖苷键。葡聚糖大多以 α -(1 \rightarrow 4)、 β -(1 \rightarrow 3)糖苷键连接的葡萄糖做为主链, 杂多糖大多以 β -(1 \rightarrow 3)、 β -(1 \rightarrow 4)和 α -(1 \rightarrow 4)糖苷键连接的同种单糖或不同单糖作为主链, 如 GCPB-3 的主链是由 β -(1 \rightarrow 4)糖苷键依次连接木糖和阿拉伯糖构成^[28], 并且大多杂多糖主链上都有糖残基分支。目前有关胞外多糖的结构研究还相对较少, 并且主要集中于单糖组成分析方面。大量研究表明, 灵芝胞外多糖类型多为杂多糖,

分子量从几千到几十万均有分布, 多由半乳糖、甘露糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖和岩藻糖等单糖以不同比例组成; 单糖间的连接方式多为 β -(1 \rightarrow 3)、 β -(1 \rightarrow 4)、 α -(1 \rightarrow 4)、 α -(1 \rightarrow 6)糖苷键, 不同品种灵芝所产胞内外多糖的单糖组成也有一定差异, 其中赤芝所产多糖的单糖组成较其他品种更为丰富^[28-41]。如表 1 所示, 作者对已知液态发酵来源灵芝胞内外多糖的结构解析情况进行了梳理总结。

3 发酵来源灵芝多糖的生物活性

灵芝多糖作为灵芝中的主要活性物质之一, 具有抗肿瘤、免疫调节、保肝、降血糖、抗高血压和抗菌等生物活性。现在已经开展的大量研究主要是以子实体和孢子粉为原料制备得到的灵芝多糖, 针对液态发酵来源灵芝多糖的生物活性研究还比较少, 已经发现发酵来源的灵芝多糖具有抗肿瘤、免疫调节、调节肠道菌群、抗炎和修复愈伤等生物活性^[4]。这些活性与灵芝多糖的结构密切相关, 如单糖组成会对其抗肿瘤活性产生影响; 分子量变化也会影响灵芝多糖免疫活性, 分子量大的组分其免疫活性更好等。

3.1 抗肿瘤活性

众多研究表明, 灵芝多糖有显著的体内外抗肿瘤效果, 弥补了服用抗肿瘤药物带来副作用的弊端。

3.1.1 抗肿瘤活性机制

大量研究表明, 灵芝多糖并未通过直接杀灭肿瘤细胞的方式实现其抗肿瘤活性。目前得到广泛认可的灵芝多糖抗癌机制中, 比较有代表性的是免疫抗肿瘤机制、调控肿瘤细胞周期和调控肿瘤细胞基因表达的抗肿瘤机制^[42]。

免疫抗肿瘤机制可能是灵芝多糖发挥抗肿瘤功效的主要途径。灵芝多糖激活和促进免疫

表 1 灵芝发酵来源多糖结构研究现状总结

Table 1 Summary on the structure of polysaccharides from <i>Ganoderma</i> spp. in liquid submerged fermentation						
材料来源 Material sources	种类来源 Category source	提取纯化方式 Extraction and purification method	多糖类型 Polysaccharide type	单糖组成(摩尔比) Monosaccharide composition (molar ratio)	连接方式 Linkage	分子量 Molecular weight (kDa)
菌丝体 Mycelium	薄盖灵芝 <i>Ganoderma capense</i>	料液比 1:10, 37 °C 热水提取 3 次, 重复 3 次; DEAE cellulose (二乙胺基纤维素)-52 column, Sephadex G-75 gel-filtration column 进行纯化 The extraction was carried out at a ratio of 1:10 with hot water at 37 °C for 3 times and repeated 3 times; DEAE cellulose-52 column and Sephadex G-75 gel-filtration column were used for purification	杂多糖 Heteropolysaccharide	木糖:阿拉伯糖(吡喃糖), 1:1 Xylose:arabinose (pyranose), 1:1	β -(1,4)糖苷键依次连接两种单糖 The β -(1,4) glycosidic bond connects the two monosaccharides sequentially	124 [28]
赤芝 <i>Ganoderma lucidum</i>		95 °C, 2 倍体积水, 提取 3 次, 每次 3.5 h; 用 3 倍体积的 95%乙醇在 4 °C 下沉淀 24 h, 得到粗多糖; 然后溶于蒸馏水中并用 Savage 法脱蛋白; 溶液用蒸馏水透析 3 d Extraction in twice volume of water at 95 °C for 3.5 h for three times; Precipitated with 3 volume of 95% ethanol at 4 °C and remained for 24 h to harvest the crude polysaccharides; Then dissolved in distilled water and deproteinated using the Savage assay; The solution was dialyzed against distilled water for 3 days	葡聚糖 Glucan	葡萄糖 Glucose	α -(1,4)-糖苷键连接的葡萄糖为主链 Glucan linked by α -(1,4)-glycosidic bonds as the main chain	849 [29]
		乙醇沉淀/Toyopearl HW-65S 柱色谱 Ethanol precipitations/Toyopearl HW-65S column chromatography	葡聚糖 Glucan	葡萄糖 Glucose	β -(1,3)糖苷键连接的葡萄糖为主链 Glucan linked by β -(1,3) glycosidic bonds as the main chain	未测定 Not determined [30]

(待续)

(续表 1)								
材料来源	种类来源	提取纯化方式	多糖类型	单糖组成(摩尔比)	连接方式	分子量	文献	
Material	Category	Extraction and purification method	Polysaccharide type	Monosaccharide composition (molar ratio)	Linkage	Molecular weight (kDa)	References	
		DEAE-Sepharose Fast Flow 柱收集 主要峰组分, 除盐后得 GLMP1、 GLMP2、GLMP3 DEAE-Sepharose Fast Flow columns were used to collect the main peak fractions, and after desalting, GLMP1, GLMP2, GLMP3 were obtained	GLMP1: 杂多糖	GLMP1: 甘露糖: 鼠李糖: 半乳糖醛酸: 葡萄糖: 半乳糖: 木糖: 阿拉伯糖: 岩藻糖, 2.21:2.46:5.36:1.00:7.67: 12.85:6.44:5.07	GLMP1、GLMP2、 GLMP3 均为紧密且 具有高度分支结构的 大分子聚合物, 其中 GLMP2 可能是球形 构象	462.36	[31]	
			GLMP1: Heteropolysaccharide					
				GLMP1:Mannose:rhamnose: galacturonic acid:glucose: galactose:xylose:arabinose: fucose, 2.21:2.46:5.36:1.00: 7.67:12.85:6.44:5.07	GLMP1, GLMP2, and GLMP3 are all compact and highly branched macropolymers, with	65.22		
			GLMP2: 杂多糖	GLMP2: 甘露糖: 鼠李糖: 半乳糖醛酸: 葡萄糖: 半乳糖: 木糖: 阿拉伯糖: 岩藻糖, 0.40:0.28:0.59:1.00:1.45: 1.09:0.93:0.47	GLMP2 possibly in a spherical conformation			
			GLMP2: Heteropolysaccharide					
				GLMP2:Mannose:rhamnose: galacturonic acid:glucose: galactose:xylose:arabinose: fucose, 2.21:2.46:5.36:1.00: 7.67:12.85:6.44:5.07				
				GLMP3: 甘露糖: 鼠李糖: 半乳糖醛酸: 葡萄糖: 半乳糖: 木糖: 阿拉伯糖: 岩藻糖, 0.13:0.10:0.13:1.00:0.73: 0.19:0.39:0.10				
			GLMP3: 杂多糖	GLMP3: 甘露糖: 鼠李糖: 半乳糖醛酸: 葡萄糖: 半乳糖: 木糖: 阿拉伯糖: 岩藻糖, 0.13:0.10:0.13:1.00:0.73: 0.19:0.39:0.10				
			GLMP3: Heteropolysaccharide					
				GLMP3:Mannose:rhamnose: galacturonic acid:glucose: galactose:xylose:arabinose: fucose, 0.13:0.10:0.13:1.00: 0.73:0.19:0.39:0.10				
(待续)								

(续表 1)							
材料来源 Material sources	种类来源 Category source	提取纯化方式 Extraction and purification method	多糖类型 Polysaccharide type	单糖组成(摩尔比) Monosaccharide composition (molar ratio)	连接方式 Linkage	分子量 Molecular weight (kDa)	文献 References
		料液比 1:10, 80 °C, 80 W 的功率比提取 30 min; 阴离子交换 DEAE Sephadex A-5 纯化得到 GLPI、GLPII、GLPIII 和 GLPIV The extraction was carried out at 80 °C for 30 minutes at a power ratio of 80 watts at a stock ratio of 1:10; Anion exchange DEAE Sephadex A-5 columns were used to collect the main peak fractions: GLMPI, GLPII, GLMPIII and GLPIV	GLMPI: 杂多糖	GLMPI:阿拉伯糖:鼠李糖:木糖:甘露糖:葡萄糖, 4.66:1.23:3.14:0.61:1.29	未进行详细解析	未测定	[32]
			GLMPI:		No detailed analysis	Not	
			Heteropolysaccharide			determined	
				GLMPI:Arabinose:rhamnose:xylose:mannose:glucose, 4.66:1.23:3.14:0.61:1.29			
			GLPII: 杂多糖	GLPII:阿拉伯糖:木糖:葡萄糖, 2.82:1.33:0.87	未进行详细解析	未测定	
			GLPII:		No detailed analysis	Not	
			Heteropolysaccharide			determined	
				GLPII:Arabinose:xylose:glucose, 2.82:1.33:0.87			
			GLMPIII: 杂多糖	GLMPIII:阿拉伯糖:鼠李糖:木糖:甘露糖:葡萄糖:半乳糖, 5.09:0.52:1.07:1.29:0.48:2.76	未进行详细解析	未测定	
			GLMPIII:		No detailed analysis	Not	
	未进行详细说明 No detailed description		Heteropolysaccharide			determined	
				GLMPIII:Arabinose:mannose:rhamnose:xylose:glucose:galactose, 5.09:0.52:1.07:1.29:0.48:2.76			
				glucose:galactose, 5.09:0.52:1.07:1.29:0.48:2.76			
			GLPIV: 杂多糖	GLPIV:岩藻糖:鼠李糖:木糖:甘露糖:半乳糖:葡萄糖, 4.73:0.65:0.72:2.27:0.52:0.92	未进行详细解析	未测定	
			GLPIV:		No detailed analysis	Not	
			Heteropolysaccharide			determined	
				GLPIV:Fucose:rhamnose:xylose:e-mannose:galactose:glucose, 4.73:0.65:0.72:2.27:0.52:0.92			
			杂多糖	葡萄糖:甘露糖:岩藻糖:木糖:半乳糖, 58:16:14:7:5	大多数糖为 α 构型	未测定	[33]
			Heteropolysaccharide		Most are in the α configuration	Not	
				Glucose:mannose:fucose:xylose:galactose, 58:16:14:7:5		determined	
(待续)							

(待续)

(续表 1)

材料来源 Material sources	种类来源 Category source	提取纯化方式 Extraction and purification method	多糖类型 Polysaccharide type	单糖组成(摩尔比) Monosaccharide composition (molar ratio)	连接方式 Linkage	分子量 Molecular weight (kDa)	文献 References
胞外液 Extracellular fluid	灵芝 9519 <i>Ganoderma sinensis</i>	含菌丝体的大豆培养基干粉经乙醚脱脂, 用水浸提; 使用 Sephadex G-100 柱进行纯化得到组分 I	杂多糖 Heteropolysaccharide	阿拉伯糖:半乳糖:葡萄糖, 44.80:37.47:17.73 Arabinose:galactose:glucose, 44.80:37.47: 17.73	以 β -糖苷键相连接, 单糖以六元杂环形式存在, 含有乙酰氨基团 Connected by β -glycosidic bonds, the monosaccharide exists as a six-membered heterocycle containing an acetyl amino group	72	[34]
	赤芝 <i>Ganoderma lucidum</i>	The dried soybean medium containing mycelium was defatted with ether and extracted with water; The fraction I was purified using a Sephadex G-100 column 灵芝多糖发酵上清液用膜过滤, 运用 DEAE-Sephadex A25 离子色谱和 Sepharose CL-6B 凝胶色谱分离纯化得到一种灵芝多糖组分 GLPS1a The supernatant of <i>Ganoderma lucidum</i> polysaccharide fermentation was filtered by membrane, then was purified by DEAE-Sephadex A25 ion chromatography and Sepharose CL-6B gel chromatography to obtain a <i>Ganoderma lucidum</i> polysaccharide fraction GLPS1a	杂多糖 Heteropolysaccharide	阿拉伯糖:半乳糖:葡萄糖:木糖, 4:2:10:1 Arabinose:galactose:glucose:xylose, 4:2:10:1	具有一条以 $\beta \rightarrow (1,3)$ 位键合的吡喃葡萄糖主链, 同时存在 $\beta \rightarrow (1,3)$ 阿拉伯糖、 β -D-(1,4) 半乳糖、 α -D-(1,2) 木糖和 α -D-(1,6) 葡萄糖的分支残基 It has a glucopyranose backbone bonded at the $\beta \rightarrow (1,3)$ position, with branching residues of $\beta \rightarrow (1,3)$ arabinose, β -D-(1,4) galactose, α -D-(1,2) xylose and α -D-(1,6) glucose	180	[35]
		30% 4 °C 醇沉 12 h 后, 上清 60% 乙醇 4 °C 醇沉 12 h 得到粗多糖; DEAE-Sephadex (2.6 cm \times 100 cm) column 纯化得到 GLP-1、GLP-2 和 GLP-3 After 30% alcohol precipitation at 4 °C for 12 h, the supernatant was purified by 60% ethanol at 4 °C for 12 h to obtain crude polysaccharide; DEAE-Sephadex (2.6 cm \times 100 cm) column to obtain GLP-1, GLP-2 and GLP-3	GLP-2:杂多糖 GLP-2: Heteropolysaccharide	GLP-2:半乳糖:甘露糖:葡萄糖:阿拉伯糖:鼠李糖, 103:17:12:10:3 GLP-2:Galactose:mannose:glucose:arabinose:rhamnose, 103:17:12:10:3	鼠李糖和阿拉伯糖残基为 L-构型, 其余为 D-构型; α -(1,4) 糖苷键连接的半乳糖基为主链, 在半乳糖基 O-6 处有分支, 分别连接 α -(1,4) 和 β -(1,4) 糖苷键连接的葡萄糖和甘露糖、基构成的侧链和鼠李糖、阿拉伯糖残基	22	[36]

(待续)

(续表 1)

材料来源 Material sources	种类来源 Category source	提取纯化方式 Extraction and purification method	多糖类型 Polysaccharide type	单糖组成(摩尔比) Monosaccharide composition (molar ratio)	连接方式 Linkage	分子量 Molecular weight (kDa)	文献 References
					The rhamnose and arabinose residues are in the L-configuration and the rest are in the D-configuration; the α -(1,4) glycosidic bond-linked galactosyl group is the main chain with branches at the galactosyl group O-6, connecting the side chains composed of the α -(1,4) and β -(1,4) glycosidic bond-linked glucose and mannose groups and the rhamnose and arabinose residues, respectively	10.97	[37]
		DEAE 纤维素柱(2.6 cm×30 cm)进行纯化得到 GLPs DEAE cellulose columns (2.6 cm×30 cm) were used to obtain GLPs	杂多糖 Heteropolysaccharide	鼠李糖:阿拉伯糖:甘露糖:葡萄糖:半乳糖, 9:3:2:4:48 Rhamnose:arabinose:mannose:glucose:galactose, 9:3:2:4:48	其主链可能是以 α -D-Gal (1→6)为主或混杂有 α -D-Gal, Rha、 α -D-Glc、 α -D-Man 以及 Ara 为侧链 The main chain may be dominated by α -D-Gal (1→6) or mixed with α -D-Gal, Rha, α -D-Glc, α -D-Man and Ara as side chains		
		经过乙醇沉淀后, 采用 DEAE-650 离子交换柱层析纯化, 后采用葡聚糖凝胶 G-100 柱层析进一步纯化 After ethanol precipitation, it was purified by chromatography using a DEAE-650 ion exchange column, followed by further purification by Sephadex G-100 column chromatography	杂多糖 Heteropolysaccharide	核糖:鼠李糖:阿拉伯糖:木糖:甘露糖:葡萄糖:半乳糖, 0.10:0.09:0.20:0.11:0.56:1.00:0.52 Ribose:rhamnose:arabinose:xylose:mannose:glucose:galactose, 0.10:0.09:0.20:0.11:0.56:1.00:0.52	未进行详细解析 No detailed analysis	2.15	[38]

(待续)

(续表 1)						
材料来源 Material sources	种类来源 Category source	提取纯化方式 Extraction and purification method	多糖类型 Polysaccharide type	单糖组成(摩尔比) Monosaccharide composition (molar ratio)	连接方式 Linkage	分子量 Molecular weight (kDa)
						文献 References
		胞外粗多糖采用 DEAE-cellulose DE-52, Sephadex G-200 层析柱分离纯化得到均一多糖 EPS-2-1	杂多糖 Heteropolysaccharide	甘露糖:葡萄糖:半乳糖:阿拉伯糖, 27.90:13.90:50.20:8.00	未进行详细解析 No detailed analysis	未测定 Not determined
		The extracellular polysaccharide EPS-2-1 was isolated and purified by DEAE-cellulose DE-52 and Sephadex G-200		Mannose:glucose:galactose:arabinose, 27.90:13.90:50.20:8.00		
	树舌灵芝 <i>Ganoderma applanatum</i>	浓缩后的胞外液用 4 倍体积的 95% (体积分数)乙醇处理, 4 °C 过夜将沉淀溶于去离子水中, 透析 48 h 后冻干; 将冻干后的样品进行脱蛋白, 然后与 Sevag 试剂混合; 除去 Sevag 试剂后, 将上清液浓缩, 透析 48 h 后冻干	杂多糖 Heteropolysaccharide	甘露糖:鼠李糖:葡萄糖:半乳糖:木糖, 0.03:0.004:1.00:0.03:0.01	未进行详细解析 No detailed analysis	2.72
		The concentrated extracellular fluid was treated with 4-fold volume of 95 % (V/V) ethanol at 4 °C overnight; The precipitate was dissolved in deionized water and lyophilized after dialysis for 48 h; The freeze-dried samples were deproteinized and mixed with Sevag reagent; After the Sevag reagent was removed, the supernatant was concentrated and lyophilized after dialysis for 48 h		Mannose:rhamnose:glucose:galactose:xylose, 0.03:0.004:1.00:0.03:0.01		
		上清液:乙醇=1:4, 4 °C 醇沉 24 h; Sevag 法脱蛋白, 蒸馏水透析 3 d 后冻干	杂多糖 Heteropolysaccharide	葡萄糖:半乳糖:阿拉伯糖:岩藻糖:木糖:甘露糖, 52.01:19.36:6.41:4.67:7.45:10.11	未进行详细解析 No detailed analysis	未测定 Not determined
		The supernatant:ethanol=1:4, 4 °C alcohol precipitation 24 h; Protein was removed by Sevag method, dialyzed with distilled water for 3 days and lyophilized		Glucose:galactose:arabinose:fucose:xylose:mannose, 52.01:19.36:6.41:4.67:7.45:10.11		

细胞增殖, 增强吞噬作用和细胞因子的产生, 并增强天然杀伤细胞介导的细胞毒性作用^[43]。Oka 等^[44]研究表明, 灵芝胞内多糖的 β -葡聚糖通过作用于免疫效应细胞如巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞, 使这些免疫细胞产生细胞分裂素能够抑制结直肠癌的生长。

除了通过增强免疫功能实现抗肿瘤活性之外, 有研究证明液态灵芝多糖可以通过调控基因表达来实现抗肿瘤的目的。Shen 等^[45]研究表明灵芝胞内多糖能够通过直接通过调控肝癌基因表达中的 miRNAs (在 61 个受调控的 miRNA 中, 对 miR-313 的上调作用最强), 从而显著抑制 HepG2 的增殖。

艾斯卡尔^[46]通过分析灵芝胞外多糖对两种肿瘤细胞 A431 和 MDA-MB-231 细胞周期的影响发现, 与对照组相比, 灵芝胞外多糖处理的两种肿瘤细胞 G1/G0 期比例分别增加了 73.77% 和 28.60%。这表明灵芝胞外多糖可能是通过调控细胞周期的方式抑制肿瘤细胞。

3.1.2 结构对灵芝多糖抗肿瘤活性的影响

各种研究证实液态发酵来源的灵芝多糖抗肿瘤活性与其结构特征(如单糖组成等)密切相关。研究表明, 提高灵芝胞外多糖中甘露糖和半乳糖的含量, 以及提高灵芝胞内多糖岩藻糖的含量均可提高其抗肿瘤活性。李洁等^[47]研究发现, 提高灵芝胞外多糖中半乳糖含量可提升其对皮肤基底癌细胞 A431、人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖的抑制作用; 提高灵芝胞外多糖中甘露糖含量也可提升其对上述癌细胞增殖的抑制作用, 此时抑制率可达到 80%–85%。Peng 等^[48]研究发现, 灵芝胞内多糖中含有较高比例半乳糖(含量达 30%以上)的多糖组分具有较高的抗肿瘤活性。也有研究发现含有更高甘露糖及半乳糖比例的胞外多糖具有更高的抗肿瘤活性^[23]。乔双逵等^[23]发现当提升灵芝胞外多

糖中半乳糖、甘露糖比例时, 该灵芝胞外多糖对 Hepa 1-6 和 MDA MB-231 肿瘤细胞的抑制效果有所增加。刘雨欣^[14]体内抗肿瘤实验结果表明, 在灵芝胞内多糖给药剂量为 300 mg/kg 时, 实验组与对照组相比抑瘤率由 37%提高到 58%, 表明岩藻糖含量较高(17%)的灵芝胞内多糖具有更好的抗肿瘤活性。

3.2 免疫调节活性

灵芝多糖通过影响免疫相关细胞, 包括 T 淋巴细胞、树突状细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞促进细胞因子的生成, 全面发挥对机体的免疫调节作用^[49]。

3.2.1 调节免疫活性

肠道黏膜屏障作为先天性免疫系统的一部分, 可以抵抗一些病原体的入侵, 从当前免疫学发展的方向看, 肠道黏膜免疫将是未来发展的重要方向。灵芝胞内外多糖可以通过提高肠道免疫相关蛋白表达、正向刺激肠道内免疫细胞等途径, 实现肠道黏膜免疫调节活性。Jin 等^[50]发现灵芝胞内多糖能够诱发肠道代谢物的改变来影响肠道微生物稳态, 从而进一步调节肠道免疫。Jin 等^[51]研究表明灵芝胞内多糖能够显著提高小鼠回肠中 NF- κ B、SIgA 的表达和 IFN- γ 、IL-2、IL-4 的水平, 从而实现对肠道免疫屏障功能的调控。Nagai 等^[52]发现胞内多糖能够刺激腹膜巨噬细胞, 从而抑制吲哚美辛诱导的肠道损伤, 说明胞内多糖也可对肠道内免疫细胞产生一定的正向刺激作用。

液态发酵来源的胞内外多糖能够正向刺激免疫系统即直接作用于免疫细胞, 而免疫细胞中的巨噬细胞吞噬能力是宿主防御系统免疫应答的重要组成部分。Ubaidillah 等^[53]研究表明, 液态发酵来源的灵芝胞内外多糖能够促进 RAW264.7 增殖并且加强其吞噬功能, 是强有力的刺激物, 效果高于直接使用菌丝体和胞外液; 实验发现

在摄取 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 胞内多糖后吞噬能力较干菌丝体提高了 4.6 倍, 胞外多糖促进巨噬细胞分化的能力较胞外液提高了 200%。Shi 等^[32]发现灵芝胞内多糖能促进巨噬细胞 RAW 264.7 的增殖和释放 NO。Lai 等^[54]研究表明灵芝胞内外多糖不仅能活化 T 淋巴细胞, 还可以增强巨噬细胞的吞噬能力; 同时灵芝胞内外多糖可以通过促进产生和释放免疫活性物质如一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 等进一步实现免疫调节活性。

3.2.2 结构对灵芝多糖免疫调节活性的影响

灵芝多糖的免疫调节活性与其单糖组成和分子量有关。王海燕^[17]进行多糖级分的分子量分布与其免疫活性的相关性分析, 发现大分子量区间 50–100 kDa 和 100–500 kDa 与多糖免疫活性呈正相关。Liu 等^[18]发现胞外多糖的 20 E 组分(分子量范围 2.78×10^6 – 3.96×10^6 Da, 主要由葡萄糖组成)表现出更好的免疫活性, 而且 20 E 组分的免疫调节活性与其单糖组成中的葡萄糖摩尔比呈正相关, 与木糖摩尔比呈负相关。

3.3 其他生物活性

液态发酵来源的灵芝胞内外多糖除了具有抗肿瘤活性、免疫调节活性外, 还具有显著的抗炎活性、修复愈伤活性等。灵芝胞内多糖被证明有一定的抗炎活性, 可以通过降低脂酶、AMS、IFN- γ 和 TNF- α 水平并升高 SOD 活性来减轻胰腺炎症状^[55]。Zhao 等^[56]研究表明, 0.1 g/L 的灵芝胞内多糖能够增强成纤维细胞(NIH/3T3)的迁移和修复愈伤活性, 使抓伤在 24 h 内愈合。

4 展望

目前, 国内外学者针对液态发酵来源灵芝多糖的发酵条件优化、提取分离纯化、结构鉴定和活性评价等方面开展了大量工作, 关于发

酵来源灵芝多糖构效关系的研究也有少量报道。但灵芝多糖生物活性受其分子量、单糖组成、摩尔比、连接方式和顺序等结构特征的影响, 今后仍需针对发酵培养基成分及发酵条件的改变对灵芝多糖结构、活性的影响等开展深入研究, 明确多糖结构特征与构效关系, 为灵芝多糖的应用奠定基础。

现有研究表明培养基成分的改变对灵芝胞内外多糖结构和活性影响较大, 温度、pH 和转速等非营养因素条件的改变对灵芝发酵胞内外多糖特性也会有一定的影响, 但相对培养基成分的改变影响较小。在实际发酵培养过程中, 针对目标产物优选控制培养基成分组成, 同时严格调控发酵工艺参数来保证各批次发酵产物的稳定性, 可为灵芝发酵多糖的品质提供保障。

REFERENCES

- [1] 张汇, 聂少平, 艾连中, 夏永军, 熊智强, 王光强. 灵芝多糖的结构及其表征方法研究进展[J]. 中国食品学报, 2020, 20(1): 290-301.
ZHANG H, NIE SP, AI LZ, XIA YJ, XIONG ZQ, WANG GQ. Review on structure and characterization methodology of polysaccharides from *Ganoderma*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(1): 290-301 (in Chinese).
- [2] 张冬雪, 王晓玲, 刘高强. 灵芝多糖的结构及构效关系[J]. 食品工业, 2015, 36(11): 258-261.
ZHANG DX, WANG XL, LIU GQ. The structure and the structure-activity relationships of *Ganoderma lucidum* polysaccharides[J]. The Food Industry, 2015, 36(11): 258-261 (in Chinese).
- [3] 马传贵, 张志秀, 闫梅霞, 王寿江, 简青燕. 灵芝的活性成分及其抗肿瘤研究进展[J]. 食药菌, 2022, 30(2): 114-118.
MA CG, ZHANG ZX, YAN MX, WANG SJ, JIAN QY. Research status of bio-active components and anti-tumor of *Ganoderma lucidum*[J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2022, 30(2): 114-118 (in Chinese).
- [4] 杨占涛, 刘超, 李月, 黄平, 徐永航. 灵芝多糖的研究现状[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(20): 8651-8652, 8739.
YANG ZT, LIU C, LI Y, HUANG P, XU YH. Research status of *Ganoderma lucidum* polysaccharide[J]. Journal of

- Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(20): 8651-8652, 8739 (in Chinese).
- [5] 蔡梦婷. 灵芝多糖保湿能力研究及其应用[D]. 上海: 上海应用技术大学硕士学位论文, 2018.
- CAI MT. Study on the moisturizing activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its application[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Institute of Technology, 2018 (in Chinese).
- [6] FENG J, FENG N, TANG QJ, LIU YF, TANG CH, ZHOU S, WANG JY, TAN Y, ZHANG JS, LIN CC. Development and optimization of the triterpenoid and sterol production process with Lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* strain G0017 (Agaricomycetes), in liquid submerged fermentation at large scale[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2021, 23(3): 43-53.
- [7] 李源, 张赫男, 谭贻, 刘艳芳, 冯杰, 张越野, 唐传红, 张劲松. 常压室温等离子体诱变选育高产多糖灵芝新菌株[J]. 食用菌学报, 2021, 28(2): 36-41.
- LI Y, ZHANG HN, TAN Y, LIU YF, FENG J, ZHANG YY, TANG CH, ZHANG JS. Screening of a high polysaccharide content *Ganoderma lucidum* strain by ARTP[J]. Acta Edulis Fungi, 2021, 28(2): 36-41 (in Chinese).
- [8] 高坤, 冯杰, 颜梦秋, 唐庆九, 张劲松, 周帅, 杨焱, 冯娜, 刘艳芳. 灵芝液态发酵高产胞外多糖菌株筛选及多糖特性分析[J]. 菌物学报, 2019, 38(6): 886-894.
- GAO K, FENG J, YAN MQ, TANG QJ, ZHANG JS, ZHOU S, YANG Y, FENG N, LIU YF. Screening of extracellular polysaccharide high-yielding strains of *Ganoderma lingzhi* in liquid submerged fermentation and polysaccharide characteristic analysis[J]. Mycosystema, 2019, 38(6): 886-894 (in Chinese).
- [9] FENG J, FENG N, ZHANG JS, YANG Y, JIA W, LIN CC. A new temperature control shifting strategy for enhanced triterpene production by *Ganoderma lucidum* G0119 based on submerged liquid fermentation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 180(4): 740-752.
- [10] 唐晨旻, 张劲松, 刘艳芳, 唐庆九, 冯娜, 唐传红, 王金艳, 谭贻, 刘利平, 冯杰. 常压室温等离子体诱变育种与微生物液滴培养筛选技术应用进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1177-1194.
- TANG CM, ZHANG JS, LIU YF, TANG QJ, FENG N, TANG CH, WANG JY, TAN Y, LIU LP, FENG J. Application progress of atmospheric and room temperature plasma mutation breeding and microbial microdroplet culture screening technology[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1177-1194 (in Chinese).
- [11] 侯晓梅, 张敏, 杨海龙. 灵芝多糖深层发酵生产研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(15): 126-130.
- HOU XM, ZHANG M, YANG HL. Research progress on the production of *Ganoderma* polysaccharides by submerged culture of *Ganoderma lucidum*[J]. Food Research and Development, 2014, 35(15): 126-130 (in Chinese).
- [12] FENG J, FENG N, TANG QJ, LIU YF, YANG Y, LIU F, ZHANG JS, LIN CC. Optimization of *Ganoderma lucidum* polysaccharides fermentation process for large-scale production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019, 189(3): 972-986.
- [13] LONG ZD, XUE Y, NING ZX, SUN JS, LI JG, SU Z, LIU QB, XU CP, YAN JK. Production, characterization, and bioactivities of exopolysaccharides from the submerged culture of *Ganoderma cantharelloideum* M. H. Liu[J]. 3 Biotech, 2021, 11(3): 145.
- [14] 刘雨欣. 培养基组分对灵芝多糖单糖组成的影响以及生物活性的研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2016.
- LIU YX. Effect of medium composition of the *Ganoderma lucidum* polysaccharide on monosaccharide composition and biological activity[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2016 (in Chinese).
- [15] 王琼. 灵芝菌丝体培养中多糖组分的变化与相关酶活性分析[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2013.
- WANG Q. Effect of polysaccharides composition and the related enzymatic analysis in *Ganoderma lucidum* submerged culture[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2013 (in Chinese).
- [16] 杨静静, 丁重阳, 顾正华, 张梁, 石贵阳. 玉米粉对灵芝菌体形态及胞外多糖的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(4): 383-388.
- YANG JJ, DING ZY, GU ZH, ZHANG L, SHI GY. Effect of corn powder on *Mycelium* morphology and exopolysaccharides of *Ganoderma lucidum* in submerged culture[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2017, 36(4): 383-388 (in Chinese).
- [17] 王海燕. 灵芝菌丝体多糖的免疫活性指纹图谱及其发酵优化[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2015.
- WANG HY. Study on chromatographic fingerprint of polysaccharides from *G. lucidum* mycelia based on immunocompetence and optimization of its fermentation[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2015 (in Chinese).

- [18] LIU LP, FENG J, GAO K, ZHOU S, YAN MQ, TANG CH, ZHOU J, LIU YF, ZHANG JS. Influence of carbon and nitrogen sources on structural features and immunomodulatory activity of exopolysaccharides from *Ganoderma lucidum*[J]. Process Biochemistry, 2022, 119: 96-105.
- [19] CHANG MY, TSAI GJ, HOUNG JY. Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(3-4): 407-414.
- [20] HSIEH CY, TSENG MH, LIU CJ. Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC 36041) under limitations of nutrients[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(1/2): 109-117.
- [21] FANG QH, ZHONG JJ. 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.
- [22] KIM HM, PARK MK, YUN JW. Culture pH affects exopolysaccharide production in submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006, 134(3): 249-262.
- [23] 乔双逵. 液态发酵过程发酵条件对灵芝形态及灵芝多糖合成影响的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2014.
- QIAO SK. The effect of fermentation conditions on mycelium morphology and polysaccharides biosynthesis of *Ganoderma lucidum* in submerged culture[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2014 (in Chinese).
- [24] LEE WY, PARK Y, AHN JK, KA KH, PARK SY. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(2): 249-254.
- [25] PENG L, QIAO SK, XU ZH, GUAN F, DING ZY, GU ZH, ZHANG L, SHI GY. Effects of culture conditions on monosaccharide composition of *Ganoderma lucidum* exopolysaccharide and on activities of related enzymes[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 133: 104-109.
- [26] 张璐. 金地灵芝液态发酵产灵芝多糖条件优化及其发酵产物功能的研究[D]. 成都: 四川师范大学硕士学位论文, 2016.
- ZHANG L. Optimizing liquid fermentation conditions of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and analyzing functions of the fermentation products[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan Normal University, 2016 (in Chinese).
- [27] 邹佳妤. 灵芝发酵条件优化及其对免疫抑制小鼠的免疫调节作用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2016.
- ZOU JY. The optimization of *Ganoderma lucidum* fermentation condition and immune regulating effects to immunosuppressive mice[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [28] HUANG YT, LI NS, WAN JB, ZHANG DZ, YAN CY. Structural characterization and antioxidant activity of a novel heteropolysaccharide from the submerged fermentation mycelia of *Ganoderma capense*[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 134: 752-760.
- [29] SUI XC, GUO QB, XIA YM, CUI SW, SHEN J, ZHANG J, DING ZY. Structure features of the intracellular polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and the irrelative immune-anticancer activities of GLPs[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2016, 8(2): 43-50.
- [30] FERREIRA ICFR, HELENO SA, REIS FS, STOJKOVIC D, QUEIROZ MJRP, VASCONCELOS MH, SOKOVIC M. Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities[J]. Phytochemistry, 2015, 114: 38-55.
- [31] 王海燕, 戴军, 陈尚卫. 灵芝菌丝体多糖的分离纯化及其单糖组成分析与分子量测定[J]. 食品与机械, 2015, 31(5): 201-205.
- WANG HY, DAI J, CHEN SW. Separation, monosaccharide composition and molecular weight analysis of polysaccharide from *G. lucidum* mycelium[J]. Food & Machinery, 2015, 31(5): 201-205 (in Chinese).
- [32] SHI M, ZHANG ZY, YANG YN. Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP)[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 95(1): 200-206.
- [33] CARRIERI R, MANCO R, SAPIO D, IANNACCONE M, FULGIONE A, PAPAANNI M, de FALCO B, GRAUSO L, TARANTINO P, IANNIELLO F, LANZOTTI V, LAHOZ E, CAPPARELLI R. Structural data and immunomodulatory properties of a water-soluble heteroglycan extracted from the mycelium of an Italian isolate of *Ganoderma lucidum*[J]. Natural Product Research, 2017, 31(18): 2119-2125.
- [34] 张卫国, 刘欣. 固体发酵紫芝 9519 菌丝体多糖组分I的分离纯化及结构分析研究[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(9): 32-33, 37.

- ZHANG WG, LIU X. Isolation, purification and structure analysis of polysaccharide I from solid fermented mycelia of *Ganoderma sinensis* 9519[J]. Chemistry & Bioengineering, 2006, 23(9): 32-33, 37 (in Chinese).
- [35] 黄静涵, 艾斯卡尔·艾拉提, 毛健. 灵芝多糖的分离纯化及结构鉴定[J]. 食品科学, 2011, 32(12): 301-304.
- HUANG JH, AISIKAER A, MAO J. Purification and structural identification of a bioactive polysaccharide fraction from *Ganoderma lucidum*[J]. Food Science, 2011, 32(12): 301-304 (in Chinese).
- [36] LI YQ, FANG L, ZHANG KC. Structure and bioactivities of a galactose rich extracellular polysaccharide from submergedly cultured *Ganoderma lucidum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68(2): 323-328.
- [37] 张珏, 沈洁, 刘昱均, 夏咏梅. 硫酸化发酵灵芝胞外多糖的组成与结构[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(5): 547-553.
- ZHANG J, SHEN J, LIU YJ, XIA YM. Constituents and structures of sulfated extracellular polysaccharides from *Ganoderma lucidum* fermentation broth[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 34(5): 547-553 (in Chinese).
- [38] 陶如玉. 固、液态发酵培养灵芝多糖的性质、活性对比分析[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2015.
- TAO RY. A comparative study on the characterization and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides produced by solid state, liquid fermentation[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2015 (in Chinese).
- [39] WU QZ, ZHANG HC, WANG PG, CHEN M. Evaluation of the efficacy and safety of *Ganoderma lucidum* mycelium-fermented liquid on gut microbiota and its impact on cardiovascular risk factors in human[J]. RSC Advances, 2017, 7(71): 45093-45100.
- [40] SI J, MENG G, WU Y, MA HF, CUI BK, DAI YC. Medium composition optimization, structural characterization, and antioxidant activity of exopolysaccharides from the medicinal mushroom *Ganoderma lingzhi*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 124: 1186-1196.
- [41] SUN XB, CHEN Z, PAN W, WANG JP, WANG WJ. Carboxylate groups play a major role in antitumor activity of *Ganoderma applanatum* polysaccharide[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 123: 283-287.
- [42] 蔺丽, 方能虎, 吴旦. 灵芝的主要生物活性研究概况[J]. 中国食用菌, 2002, 21(3): 38-40.
- LIN L, FANG NH, WU D. General situation of research on main biological activities of *Ganoderma lucidum*[J]. Edible Fungi of China, 2002, 21(03): 38-40 (in Chinese).
- [43] 李亚晗, 刘佳琳, 王天添, 刘玟妍, 孙丽媛, 李明成. 灵芝多糖抗肿瘤免疫调节机制的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(4): 511-514.
- LI YH, LIU JL, WANG TT, LIU WY, SUN LY, LI MC. Research progress of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in anti-tumor immunomodulatory mechanism[J]. Chinese Journal of Immunology, 2021, 37(4): 511-514 (in Chinese).
- [44] OKA S, TANAKA S, YOSHIDA S, HIYAMA T, UENO Y, ITO M, KITADAI Y, YOSHIHARA M, CHAYAMA K. A water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia suppresses the development of colorectal adenomas[J]. Hiroshima Journal of Medical Sciences, 2010, 59(1): 1-6.
- [45] SHEN J, PARK HS, XIA YM, KIM GS, CUI SW. The polysaccharides from fermented *Ganoderma lucidum* mycelia induced miRNAs regulation in suppressed HepG2 cells[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 103: 319-324.
- [46] 艾斯卡尔·艾拉提. 灵芝菌胞外多糖生物合成的氮源调控及其纳米微粒的应用[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2019.
- ASKE A. Polysaccharide biosynthesis in *Ganoderma lucidum* under nitrogen availability and application of its nanoparticles[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2019 (in Chinese).
- [47] 李洁, 丁重阳, 顾正华, 张梁, 石贵阳. 混合碳源对灵芝多糖发酵及其抗肿瘤活性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(2): 129-135.
- LI J, DING ZY, GU ZH, ZHANG L, SHI GY. Effects of mixed carbon sources on production and antitumor activity of *Ganoderma lucidum* exopolysaccharides by submerged culture[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2017, 36(2): 129-135 (in Chinese).
- [48] PENG YF, ZHANG LN, ZENG FB, KENNEDY JF. Structure and antitumor activities of the water-soluble polysaccharides from *Ganoderma tsugae* mycelium[J]. Carbohydrate Polymers, 2005, 59(3): 385-392.
- [49] 李晓冰, 赵宏艳, 郭栋. 灵芝多糖药理学研究进展[J]. 中成药, 2012, 34(2): 332-335.
- LI XB, ZHAO HY, GUO D. Advances in pharmacology of *Ganoderma lucidum* polysaccharides[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2012, 34(2): 332-335 (in Chinese).

- [50] JIN ML, ZHANG H, WANG JJ, SHAO DY, YANG H, HUANG QS, SHI JL, XU CL, ZHAO K. Response of intestinal metabolome to polysaccharides from mycelia of *Ganoderma lucidum*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 122: 723-731.
- [51] JIN ML, ZHU YM, SHAO DY, ZHAO K, XU CL, LI Q, YANG H, HUANG QS, SHI JL. Effects of polysaccharide from mycelia of *Ganoderma lucidum* on intestinal barrier functions of rats[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 94(Pt A): 1-9.
- [52] NAGAI KT, UENO Y, TANAKA S, HAYASHI R, SHINAGAWA K, CHAYAMA K. Polysaccharides derived from *Ganoderma lucidum* fungus mycelia ameliorate indomethacin-induced small intestinal injury via induction of GM-CSF from macrophages[J]. Cellular Immunology, 2017, 320: 20-28.
- [53] UBAIDILLAH NHN, ABDULLAH N, SABARATNAM V. Isolation of the intracellular and extracellular polysaccharides of *Ganoderma neojaponicum* (Imazeki) and characterization of their immunomodulatory properties[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2015, 18(3): 188-195.
- [54] LAI CY, HUNG JT, LIN HH, YU AL, CHEN SH, TSAI YC, SHAO LE, YANG WB, YU J. Immunomodulatory and adjuvant activities of a polysaccharide extract of *Ganoderma lucidum* *in vivo* and *in vitro*[J]. Vaccine, 2010, 28(31): 4945-4954.
- [55] LI KK, ZHUO C, TENG CY, YU SM, WANG X, HU Y, REN GM, YU M, QU JJ. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on chronic pancreatitis and intestinal microbiota in mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93: 904-912.
- [56] ZHAO SZ, LEI M, XU H, HE HL, SUVOROV A, WANG JH, QIU JY, ZHOU QX, YANG JY, CHEN LL. The normal cell proliferation and wound healing effect of polysaccharides from *Ganoderma amboinense*[J]. Food Science and Human Wellness, 2021, 10(4): 508-513.