

药用昆虫蜣螂对灵芝发酵和抗小鼠肝癌活性的影响

刘高强¹, 丁重阳², 章克昌², 王晓玲¹

1 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 长沙 410004

2 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122

摘要: 采用液体深层发酵方式, 研究了药用昆虫蜣螂对灵芝细胞生长、关键活性产物发酵动力学和抗小鼠肝癌活性的影响。结果表明, 药用昆虫蜣螂在各添加浓度下对灵芝的细胞生长均无显著促进作用; 但在添加量为 5 g/L 时, 对灵芝多糖和灵芝三萜的发酵动力学有显著影响($P < 0.05$), 在发酵第 7 天时, 灵芝总多糖和总三萜的产量分别达到 2.81 g/L 和 539.0 mg/L(对照组分别为 2.25 g/L 和 428.2 mg/L)。小鼠体内抗肝癌结果表明, 灵芝对照发酵物的抑癌率为 41.61%, 灵芝-蜣螂配合物的抑癌率为 42.24%; 而补加蜣螂发酵后的灵芝加蜣螂发酵物的抑癌率高达 57.21%, 与灵芝对照发酵物的抑癌率相比, 提高了 37.49%。研究表明, 采用昆虫蜣螂补料-分批发酵后, 灵芝发酵物抗小鼠肝癌的活性得到显著增强。

关键词: 药用昆虫, 灵芝, 深层发酵, 抗癌活性

Effects of medicinal insect *Catharsius molossus* on submerged fermentation and *in vivo* anti-hepatoma activity of *Ganoderma lucidum*

Gaoqiang Liu¹, Chongyang Ding², Kechang Zhang², and Xiaoling Wang¹

1 College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

2 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: We studied the effects of *Catharsius molossus* (a Chinese medicinal insect) on the cell growth, fermentation kinetics of key bioactive substances and anti-cancer activity of *Ganoderma lucidum* in submerged fermentation. The results showed that *C. molossus* at all the tested concentrations had no stimulatory effect on the cell growth. However, addition of *C. molossus* at 5 g/L lead to significant effects on the fermentation kinetics of polysaccharides and triterpenoids of *G. lucidum*, and at 7th day in fermentation process, the yields of polysaccharides and triterpenoids reached 2.81 g/L and 539.0 mg/L, respectively, while they were 2.25 g/L and 428.2 mg/L in control. *In vivo* anti-cancer studies showed that the inhibitory rates of control fermented *G. lucidum* (CFG) and a combination of water extract from *C. molossus* and CFG on the developed tumor (Heps) in mice were 41.61% and 42.24%, respectively. Moreover, the inhibitory rate of the *G. lucidum* fermented with *C. molossus* (GFC) reached 57.21%, which was enhanced 37.49%, compared to the inhibitory rate of the control fermented *G. lucidum*. These results suggest that supplementation of *C. molossus* in submerged fermentation of *G. lucidum* lead to a significant enhancement of the anti-cancer activity of cultured *G. lucidum*.

Keywords: medicinal insects, *Ganoderma lucidum*, submerged fermentation, anti-cancer activity

Received: February 16, 2009; **Accepted:** April 28, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30700552).

Corresponding author: Gaoqiang Liu. Tel: +86-731-5623392; E-mail: gaoliuedu@yahoo.com.cn

国家自然科学基金项目(No. 30700552) 资助。

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是我国著名的药用真菌。现代药理学研究表明, 灵芝具有预防或治疗肿瘤、慢性肝炎、支气管炎、高血压等疾病的作用^[1]。由于灵芝液体发酵物中的关键活性成分(如多糖和三萜)与灵芝子实体中的基本一致, 且药理活性相近^[2-4], 因此, 现代液体深层发酵技术是获取灵芝产品的主要手段。但如何进一步提高灵芝关键活性成分(多糖和三萜)的产量, 仍然是目前国内外相关研究者的主要课题。

目前提高灵芝活性产物产量的研究主要集中在灵芝发酵基质和发酵过程的优化, 如优化发酵过程参数, 或采用两阶段培养或补料-分批发酵等策略^[4-6]。但有关加入外源物质调节(促进或抑制)灵芝关键活性物质形成的研究却鲜有报道。

药用昆虫是我国传统中药的重要组成部分。一些昆虫中含有许多已知和未知的生物活性物质。从众多的药用昆虫中有可能筛选到对灵芝细胞生长或活性产物合成有显著提高作用的昆虫。同时, 灵芝对药用昆虫进行发酵, 有可能增强灵芝的抗癌活性。为此, 本研究室大量筛选试验了一些典型的药用昆虫对灵芝细胞生长和活性产物合成的影响^[7-9], 并采用高通量筛选技术检测了补加药用昆虫蛭螂前后灵芝发酵产物的体外抗肿瘤活性^[10]。本研究则进一步报道了蛭螂对灵芝关键活性产物——多糖和三萜发酵动力学的影响, 并在此基础上, 比较了补加蛭螂前后灵芝发酵物体内抗小鼠肝癌的活性。

1 材料和方法

1.1 灵芝发酵

1.1.1 药用昆虫

蛭螂(*Catharsius molossus*)由安徽省药材公司赠送, 样品风干, 经适当处理, 粉碎过 60 目后备用。

1.1.2 灵芝培养

菌种: 灵芝(*Ganoderma lucidum*), 本研究室保存。培养基组成(g/L): 玉米粉 15, 麸皮粉 12, 葡萄糖 20, KH_2PO_4 1.5, MgSO_4 0.75。液体发酵: 在液体发酵过程中以适当的方式和时间补加受试昆虫样品。500 mL 摇瓶中装液量为 140 mL。培养条件: 28°C、150 r/min, 培养 7 d。

1.1.3 灵芝细胞生物量的测定

菌体用 40 目的滤网反复分离, 分离后的菌体离

心, 用水洗 2 次后, 再离心, 沉淀的菌体在 60°C 下烘至恒重, 称重得生物量^[11]。

1.1.4 多糖的测定

多糖的测定采用苯酚-硫酸法^[4]。

1.1.5 灵芝三萜的测定

灵芝三萜的测定参考文献^[4]和^[12]进行。

1.2 抑癌试验

1.2.1 肿瘤细胞株及实验鼠

小鼠移植性肝癌实体型 Heps, 由江苏省肿瘤防治研究所提供; 昆明系(K·M)小白鼠, 18 日龄, 体重(20±2) g, 雌雄各半, 购自南京青龙山实验动物饲养中心。合格证号: SCXK(苏)2002-0018。

1.2.2 供试样品和阳性药物

灵芝对照发酵物(Control fermented *G. lucidum*, CFG): 为未补加蛭螂发酵后的灵芝发酵物; 蛭螂水提物(Water extract from *C. molossus*, WEC)。灵芝加蛭螂发酵物(*G. lucidum* fermented with *C. molossus*, GFC): 以一定的方式补加蛭螂发酵后制备的灵芝发酵物。灵芝-蛭螂配合物(A combination of WEC and CFG, WCG): 为灵芝发酵物与蛭螂水提物的简单配合样品。上述各样品经同样条件处理, 并冻干后, 作为抗肿瘤样品。

阳性试验药物: 5-FU(5-氟脲嘧啶), 南通制药厂生产; 阴性对照品: 蒸馏水。

1.2.3 肿瘤模型的建立

取已接种 Heps 肿瘤细胞(腹水型)的荷瘤鼠(种鼠)2 只, 在超净工作台上 25°C 环境下用 1 mL 注射器从其腹腔内抽取乳白色的含肿瘤细胞的腹液, 用 0.9% 无菌生理盐水稀释 5 倍至肿瘤细胞浓度为 $10^8/\text{mL}$; 在每只供试小鼠背部皮下注射肿瘤细胞悬液 0.2 mL, 全部实验鼠随机分组, 每组 10 只分笼饲养, 雌雄各半, 任意两组间平均体重差值不大于 1 g; 分组后用苦味酸-酒精溶液作标记, 正常进食饮水 24 h 之后开始给药^[13]。

1.2.4 给药方法

采用灌胃给药。每日早上给药一次, 其间正常进食饮水。给药时间为 8 d, 第 9 天颈椎脱臼处死小鼠, 解剖、测定抑瘤率、胸腺指数和脾指数。所检测的器官或瘤块质量均于离体后立即称量^[13]。

1.2.5 抑瘤率及免疫学指数的计算

给药结束后 24 h, 称体重; 解剖, 取出瘤块、胸

腺和脾腺, 即刻称重。各指标的计算公式如下^[13]:

肿瘤抑制率 = $\{[\text{阴性对照组平均瘤重(g)} - \text{实验组平均瘤重(g)}] / \text{阴性对照组平均瘤重(g)}\} \times 100\%$

胸腺(脾)指数 = $[\text{胸腺(脾)重(mg)} / \text{体重}] \times 10$

1.3 数据分析

数据处理采用 SAS 8.1 软件, 组间显著性分析采用 *t* 检验。

2 结果和讨论

2.1 药用昆虫蛻螂对灵芝发酵的影响

2.1.1 对灵芝细胞生长的影响

分析了蛻螂虫粉在不同添加量下对灵芝液体发酵过程中细胞生长的影响, 结果如图 1。与对照(蛻螂添加量为 0 时)相比, 蛻螂虫粉在各添加量下均无明显促进灵芝细胞生长的作用($P > 0.05$), 而且当添加量超过 8 g/L 时, 细胞生物量明显下降, 表明高剂量的蛻螂虫粉对细胞生长具有抑制作用。

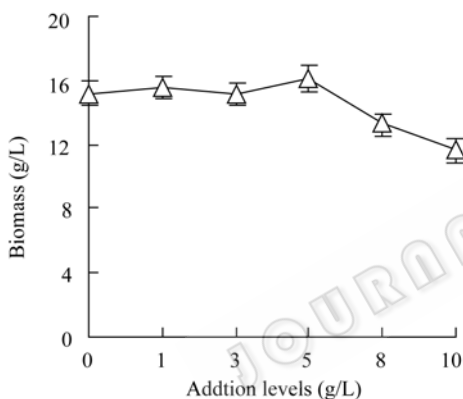


图 1 蛻螂添加量对灵芝细胞生长的影响
Fig. 1 Effect of *Catharsius molossus* concentration on mycelial growth of *Ganoderma lucidum*.

2.1.2 对灵芝总多糖和总三萜产物形成的影响

图 2 为蛻螂虫粉在不同添加量下对灵芝关键活性物质总多糖和总三萜产物形成的影响。从图可知, 与对照(蛻螂添加量为 0 时)相比, 蛻螂虫粉在添加量为 1~5 g/L 的浓度范围内, 对灵芝多糖和灵芝三萜的形成成正相关, 即当添加量为 5 g/L 时, 能显著提高灵芝多糖和灵芝三萜的产量, 分别由对照的 2.25 g/L 和 428.2 mg/L 提高到 2.81 g/L 和 539.0 mg/L ($P < 0.05$) (总多糖或总三萜, 即胞内和胞外多糖或三萜之和)。结果表明, 蛻螂虫粉虽无明显促进灵芝细胞生长的作用, 但可显著促进灵芝关键活性物质多糖和三萜的产物形成。

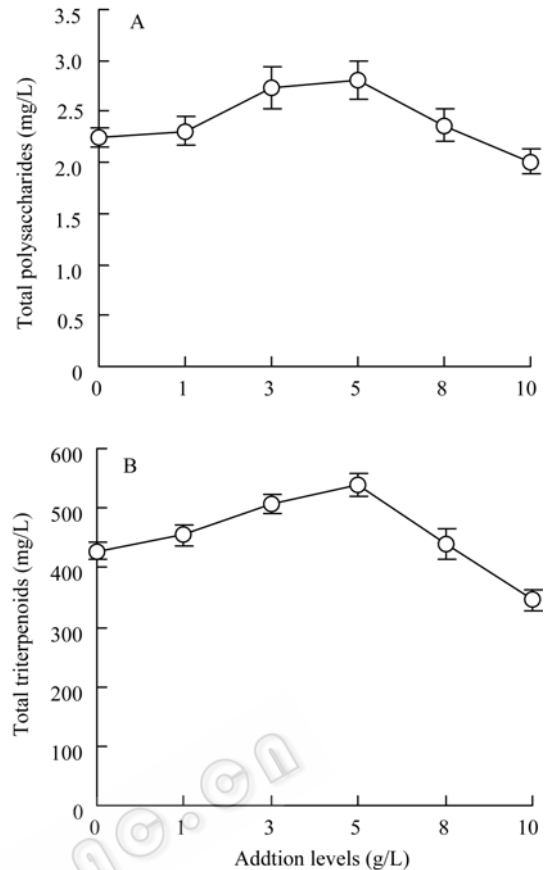


图 2 蛻螂添加量对灵芝总多糖(A)和灵芝总三萜(B)产物形成的影响

Fig. 2 Effect of *Catharsius molossus* concentration on production of polysaccharides (A) and triterpenoids (B) from *Ganoderma lucidum*.

2.1.3 对灵芝多糖和灵芝三萜产物形成动力学的影响

进一步研究了添加虫粉(5 g/L)对灵芝细胞生长和产物形成动力学的影响, 结果如图 3。由图可见, 添加虫粉与否对细胞生长无显著影响, 两种情况下, 菌体干重的动力学曲线相似(图 3(A)), 两组样品的菌体干重都在第 6 天达到最大值, 此后菌体量逐渐降低。但多糖和三萜形成的动力学曲线则有较大区别, 如图 3B 和图 3C 所示, 尽管添加和不添加虫粉实验组的多糖和三萜产量最大值都在第 7 天出现, 但添加虫粉组的总多糖和总三萜与未添加的相比, 其产量显著提高, 这与图 2 的实验结果一致。

2.2 对小鼠肝癌的抑制作用

由于蛻螂虫粉的添加, 可提高灵芝关键活性物质多糖和三萜的产量; 此外蛻螂在临床上也是一种抗肿瘤药物, 补加蛻螂发酵后, 灵芝发酵物的抗肿瘤活性是否会发生变化, 为此, 研究进一步试验了蛻螂水提物、灵芝对照发酵物、灵芝加蛻发酵物, 以

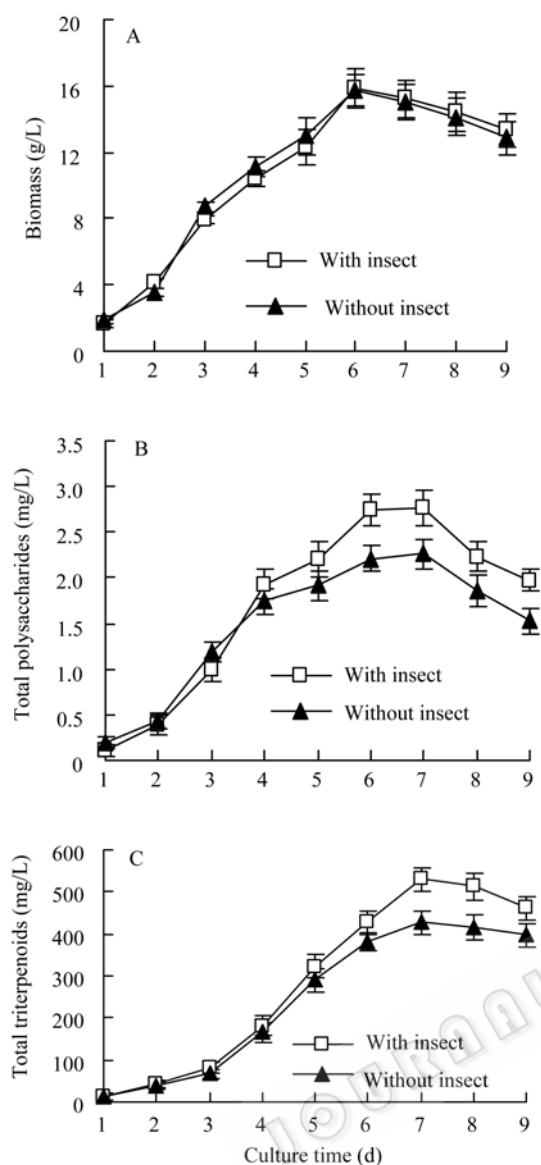


图3 蜚螂对灵芝细胞生长(A)、多糖(B)和三萜(C)产物形成动力学的影响

Fig. 3 Effect of *Catharsius molossus* on the time course of mycelial growth (A), polysaccharides (B) and triterpenoids (C) production of *Ganoderma lucidum*.

及灵芝和蜚螂简单配合的样品(灵芝-蜚螂配合物)的体内抗小鼠移植性肝癌(Heps)作用。

表1为各样品对小鼠移植性肝癌的抑制作用。从表中可以看出,阳性对照的抑癌率与阴性对照相比,差异极显著($P < 0.01$),表明该实验是成功的。

灵芝对照发酵物(CFG)[25 mg/(kg·d)]的抑癌率为41.61%,与阴性对照组相比,差异极显著($P < 0.01$),表明灵芝发酵物的确具有抗肝癌活性,且抗癌效果显著。蜚螂水提物(WED)较大剂量时的抑癌率为26.09%,表明蜚螂也有一定的抑癌能力,但与

阴性对照组相比,差异不显著($P > 0.05$),说明蜚螂水提物并无实际应用价值。蜚螂水提物简单配合灵芝发酵物组(WCG)的抑癌率为42.24%,与阴性对照组相比,差异极显著($P < 0.01$),表明两者简单配合后,无药物相互抵消作用,抑癌率与灵芝对照发酵物的抑癌率相近;但两者简单配合后,并无协同抗癌作用,抑癌率并没有得到显著提高。

补加蜚螂后的灵芝发酵物样品(灵芝加蜚螂发酵物)(GFC)与灵芝对照发酵物(CFG),以及灵芝-蜚螂配合物(WCG)样品相比,其抑癌率得到了显著提高($P < 0.05$)。在25 mg/(kg·d)剂量下,其抑癌率高达57.21%,与灵芝对照发酵物的抑癌率(41.61%)相比,提高了37.49%;与灵芝-蜚螂配合物样品(42.24%)相比,提高了35.44%。

结果表明,在灵芝发酵培养基中补加适量的蜚螂,经灵芝发酵后,可显著提高灵芝发酵物的抗癌活性;而蜚螂水提物和灵芝对照发酵物的简单配合物并不能提高灵芝发酵物的抗癌活性。

图4~6为给药结束后,从各组小鼠中剥离的肿瘤瘤块、脾腺和胸腺的实物对照图。所有图的左上角为阴性对照组的肿瘤实物图;右上角为阳性对照组的肿瘤实物图;中间为样品组的肿瘤实物图;图下面部分分别对应各组的脾腺和胸腺的实物图。从图中可以直观地看出阴性对照组、样品组和阳性对照组的肿瘤瘤块的相对大小,直观地比较各组之间的差异。

2.3 对荷瘤小鼠脾腺和胸腺的影响

表1表明,各样品均有一定的抗肝癌活性。为了考察各样品的抗肿瘤活性是否与其对小鼠免疫功能的增强有关,进一步对荷瘤小鼠在给药前后脾腺和胸腺的变化进行了研究(表2)。

各样品与阴性对照相比,均能显著增加小鼠脾脏的重量,提高小鼠脾指数。结果初步表明,这些样品的抗肿瘤活性与提高小鼠的免疫功能有一定关系。但具体的增强免疫作用及其机理有待进一步研究。

蜚螂是在临床中用于抗肿瘤的药用昆虫之一,以前尚未见有关蜚螂可提高机体免疫功能的报道。本实验结果表明,荷瘤小鼠经口腔给予蜚螂水提物后,其脾指数(89.15)与未给任何药的对照(58.87)相比,得到显著提高。胸腺指数与阴性对照相比,也有一定的提高。结果提示蜚螂水提物具有较强的免疫增强作用。该结果尚属首次发现。

表 1 各样品对小鼠肝癌(Hep5)的抑制作用 (n=10)

Table 1 Anti-tumor activity of several samples on the developed tumor in mice (n=10)

Group	Dose × oral administration time (d)	Change of body weight (g)		Average tumor weight (g)	Inhibition ratio (%)
		Before administration	After administration		
Negative control (distilled water)	0.5 mL/(mice·d)×8	21.39 ± 1.32	30.31 ± 2.70	1.61 ± 0.70	-
Positive control (5-FU)	25 mg/ (kg·d)×8	21.01 ± 1.11	31.11 ± 4.70	0.74 ± 0.39**, ◇	54.04
CFG	25 mg/ (kg·d)×8	20.92 ± 1.26	34.12 ± 3.29	0.94 ± 0.35**	41.61
	13 mg/ (kg·d)×8	20.43 ± 1.24	25.67 ± 2.33	0.99 ± 0.25*	38.51
	7 mg/ (kg·d)×8	19.76 ± 2.21	27.37 ± 1.92	1.07 ± 0.57*	33.54
WEC	25 mg/ (kg·d)×8	20.71 ± 1.01	23.61 ± 3.22	1.19 ± 0.55 ◇	26.09
	13 mg/ (kg·d)×8	19.94 ± 1.35	23.98 ± 2.45	1.22 ± 0.25	24.22
	7 mg/ (kg·d)×8	20.78 ± 2.54	24.67 ± 1.34	1.28 ± 0.57	20.49
GFC	25 mg/ (kg·d)×8	20.75 ± 1.27	23.53 ± 3.49	0.69 ± 0.09**, ◇	57.21
	13 mg/ (kg·d)×8	19.38 ± 1.70	25.39 ± 5.24	0.72 ± 0.25**, ◇	55.28
	7 mg/ (kg·d)×8	20.58 ± 1.35	23.84 ± 2.90	1.01 ± 0.57*	37.27
WCG	25 mg/ (kg·d)×8	20.47 ± 0.91	22.50 ± 3.36	0.93 ± 0.29*	42.24
	13 mg/ (kg·d)×8	21.26 ± 2.21	27.21 ± 2.35	1.02 ± 0.25*	36.65
	7 mg/ (kg·d)×8	21.42 ± 1.78	25.21 ± 1.43	1.09 ± 0.57*	32.30

CFG: control fermented *G. lucidum*; WEC: water extract from *C. molossus*; GFC: *G. lucidum* fermented with *C. molossus*; WCG: a combination of WEC and CFG. *Compared with the negative control, $P < 0.05$; **Compared with the negative control, $P < 0.01$; ◇ Compared with CFG at same dose, $P < 0.05$.

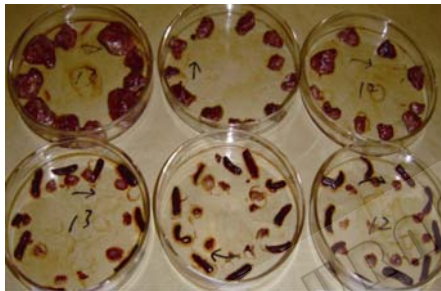


图 4 灵芝加蛭发酵物组小鼠的肿瘤瘤块、脾脏和胸腺的实物对照图

Fig. 4 Photograph of tumor, spleen and thymus from mice treated by *G. lucidum* fermented with *C. molossus* (GFC) at 25 mg/(kg·d). Left: negative control. Middle: sample. Right: positive control. Upside: tumor. Underside: lienitis and thymus.

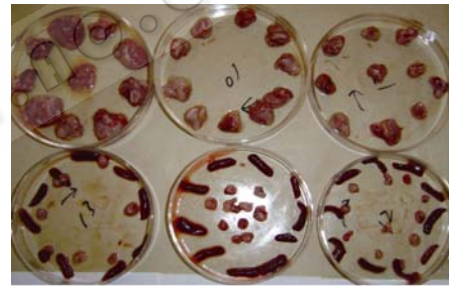


图 6 灵芝-蛭配合物组小鼠的肿瘤瘤块、脾脏和胸腺的实物对照图

Fig. 6 Photograph of tumor, spleen and thymus from mice treated by a combination of WEC and CFG (WCG) at 25 mg/(kg·d). Notes are the same as in Fig. 4.

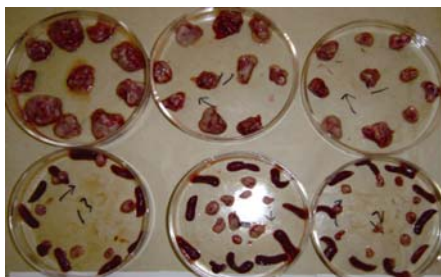


图 5 灵芝对照发酵物组小鼠的肿瘤瘤块、脾脏和胸腺的实物对照图

Fig. 5 Photograph of tumor, spleen and thymus from mice treated by control fermented *G. lucidum* (CFG) at 25 mg/(kg·d). Notes are the same as in Fig. 4.

所有样品均能提高小鼠脾指数, 但对胸腺指数的提高无显著作用。表明受试样品对小鼠的免疫作用有一定的针对性。

3 讨论

提高灵芝活性物质产量的传统方法是经典的发酵优化方法, 如发酵参数或发酵过程的优化, 如优化 pH 和溶氧, 或采用两阶段培养或补料-分批发酵等策略^[4-6]。但除了传统的发酵优化方法, 是否可以另辟蹊径呢?

表 2 各样品对荷瘤小鼠脾脏和胸腺的影响($n=10$)Table 2 Effects of several samples on spleen and thymus of mice with tumor ($n=10$)

Group	Dose \times oral administration time (d)	Spleen weight (mg)	Thymus weight (mg)	Spleen index	Thymus index
Negative control (distilled water)	0.5 mL/ (mice \cdot d) \times 8	155.1 \pm 36.24	65.30 \pm 32.8	58.87 \pm 11.85	24.83 \pm 12.50
Positive control (5-FU)	25 mg/ (kg \cdot d) \times 8	189.6 \pm 48.61	59.70 \pm 22.66	78.85 \pm 16.79**	24.77 \pm 9.04
CFG	25 mg/ (kg \cdot d) \times 8	184.1 \pm 38.66	99.40 \pm 63.48	76.71 \pm 13.70**	41.88 \pm 29.47
WEC	25 mg/ (kg \cdot d) \times 8	188.2 \pm 43.6	75.70 \pm 33.21	89.15 \pm 22.66**	33.40 \pm 14.05
GFC	25 mg/ (kg \cdot d) \times 8	184.8 \pm 61.59	75.10 \pm 25.98	90.02 \pm 32.53**	36.42 \pm 12.36*
WCG	25 mg/ (kg \cdot d) \times 8	123.3 \pm 31.12	72.33 \pm 25.19	70.03 \pm 12.58*	30.60 \pm 13.19

CFG: control fermented *G. lucidum*; WEC: sater extract from *C. molossus*; GFC: *G. lucidum* fermented with *C. molossus*; WCG: a combination of WEC and CFG. *Compared with the negative control, $P < 0.05$; **Compared with the negative control, $P < 0.01$.

药用昆虫如地鳖虫、蜣螂、九香虫、僵蚕、蚁狮、蛭螭、斑蝥等是我国中药的重要组成部分, 其所含的化学成分多种多样, 而且有些往往与植物类药物的化学成分不同^[14]。另一方面, 对于药物的研究, 人们的常规思路是研究药物对人体/动物生理的影响(即防治疾病), 但药物对有价值的微生物代谢产物的形成有无影响呢? 本研究室前期大量筛选和试验了一些典型的药用昆虫对灵芝关键活性产物合成的影响^[7-9]。本研究结果也表明, 通过添加药用昆虫蜣螂发酵而提高灵芝活性物质产量的发酵策略是可行的。

在灵芝抗肿瘤研究方面, 目前有关灵芝抗肿瘤的活性成分、抗肿瘤的作用机理等都取得了很大进展^[1-3,15]。本研究室前期研究表明^[10], 补加蜣螂发酵后, 灵芝胞外三萜对肝癌细胞 BEL7402 的抑制作用得到了增强, 其增强作用与补加蜣螂发酵后, 在胞外三萜中新分离到的一种抑癌活性较强的三萜 lucidone C 有关^[10]。因此, 本研究中灵芝发酵物体内抗肝癌活性的增强作用可能一方面与补加蜣螂发酵后灵芝发酵物中活性物质的含量高有关, 另一方面也与新生成的抗肝癌活性较强的胞外三萜 lucidone C 有关。但具体的药理增强机制尚需进一步深入研究。

由于灵芝发酵物直接作为抗癌药物具有产品不需要反复加工, 具有生产方便、成本低等优点, 因此, 灵芝加蜣发酵物直接作为抗肿瘤的辅助药物具有潜在的应用前景。本结果也表明研究药用昆虫蜣螂对灵芝深层发酵的影响不仅具有一定的学术意义, 同时也展示出潜在的应用价值。目前, 国内外尚未见有关昆虫对灵芝发酵及其体内抗肿瘤活性影响研究的报道。

REFERENCES

- [1] Shiao MS. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *Chem Record*, 2003, **3**: 172-180.
 - [2] Baek S, Kim Y, Yong H, *et al.* Antitumor activities of the proteoglycans from the mycelium of *Ganoderma lucidum* IY009. *Yakhak Hoechi*, 2001, **45**(6), 641-649.
 - [3] Kimura Y, Taniguchi M, Baba K. Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: Mechanism of action and isolation of an active substance. *Anticancer Res*, 2002, **22**: 3309-3318.
 - [4] Tang YJ, Zhong JJ. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme Microb Tech*, 2002, **31**: 20-28.
 - [5] Tang YJ, Zhang W, Zhong JJ. 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 Technol*, 2009, **100**(5): 1852-1859.
 - [6] Fang QH, Zhong JJ. Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. *Biotechnol Progr*, 2002, **18**: 51-54.
 - [7] Liu GQ, Zhang KC. Effects of water and ethanol extracts of insects on polysaccharides production by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Mycosystema*, 2006, **25**(2): 308-315.
 - [8] Liu GQ, Zhang KC. Enhancement of polysaccharides production in *Ganoderma lucidum* by the addition of ethyl acetate extracts from *Eupolyphaga sinensis* and *Catharsius molossus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **74**(3): 572-577
 - [9] Liu GQ, Ding CY, Zhang KC. Effects of powdered dung beetle (*Catharsius molossus*) on cell growth and triterpenoid production of *Ganoderma lucidum*. *Mycosystema*, 2008, **27**(5): 757-762.
- 刘高强, 丁重阳, 章克昌. 蜣螂对灵芝发酵菌丝体生长和

- 三萜产物形成的影响. 菌物学报, 2008, 27(5): 757-762.
- [10] Liu GQ, Ding CY, Zhang KC. Effects of medicinal ossified *Catharsius molossus* on *in vitro* anti-tumor activity of *Ganoderma lucidum* fermented products. *Mycosystema*, 2008, 27(5): 964-972.
- 刘高强, 丁重阳, 章克昌. 药用昆虫蜚螂对灵芝发酵产物体外抗肿瘤活性的影响. 菌物学报, 2008, 27(5): 964-972.
- [11] Zhang ZC, Li Y, Zhang KC. Application of statistical analysis for the optimization of mycelia and polysaccharide production by *Tremella aurantialba*. *Food Tech Biotech*, 2007, 45: 45-50.
- [12] Li PZ, Xu R, Xie JH, *et al.* Production of tetracyclic triterpenoid acids by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Ind Microbiol*, 2000, 30(1): 15-17.
- 李平作, 徐柔, 夏结红, 等. 灵芝深层发酵生产四环三萜酸的研究. 工业微生物, 2000, 30(1): 15-17.
- [13] Zhang XR, Ding CY, Zhang KC. Separation of intracellular polysaccharides from zinc-enriched *Agaricus blazei* and studies on their inhibitory effects upon hepatoma-bearing mice *in vivo*. *J Food Sci Biotechnol*, 2007, 26(2): 43-48.
- 张笑然, 丁重阳, 章克昌. 富锌姬松茸胞内多糖的分离及体内抑制小鼠肝癌的研究. 食品与生物技术学报, 2007, 26(2): 43-48.
- [14] Jiang SJ. Integration of Chinese Medicinal Insects. Beijing: China Forestry Publishing House, 1999.
- 蒋三俊. 中国药用昆虫集成. 北京: 中国林业出版社, 1999.
- [15] Liu GQ, Zhang KC. Mechanisms of the anticancer action of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex. Fr.) Karst: A new understanding. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47(2): 129-135.



《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论(不用单列标题书写)。目的(Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法(Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results): 本文最后得出的结果(实验数据部分)。结论(Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。

凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的(如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。