

文章编号:1673-1689(2007)02-0080-07

羊肚菌液体深层发酵条件

欧超, 王娣, 张兆轩, 李正鹏, 蔡永萍, 林毅

(安徽农业大学生命科学院, 安徽合肥 230036)

摘要:以羊肚菌为材料,研究了发酵过程中碳源、氮源、无机盐、培养条件对菌丝体生物量、胞外多糖的影响,以及发酵过程中菌丝体生物量、胞外多糖、总糖及还原糖质量浓度、培养基 pH 值的动态变化,并在此基础上确定了羊肚菌液体深层发酵的最佳条件。结果表明:羊肚菌液体深层发酵的最优培养基配比为:玉米粉 4.0 g/dL、葡萄糖 1.0 g/dL、黄豆粉 2.0 g/dL、酵母粉 0.3 g/dL、 KH_2PO_4 0.2 g/dL、 MgSO_4 0.1 g/dL、 CaSO_4 0.1 g/dL;最优培养条件为:24 ℃,起始 pH 5.8,250 mL 的摇瓶装液量为 100 mL,接种量 10 mL,摇瓶转速 140 r/min,发酵时间为 108 h。

关键词:羊肚菌;深层发酵;菌丝体生物量;胞外多糖

中图分类号:Q 93

文献标识码:A

Study on Liquid Fermentation Technology of *Morchella esculenta*

OU Chao, WANG Di, ZHANG Zhao-xuan, LI Zheng-peng, CAI Yong-ping, LIN Yi

(School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The effect of nutritional and enviromental conditions on polysaccharide production by *morchella escutenta* in liquid fermentation were determined. The optimal results was as follow: corn powder 4.0 g/dL, glucose 1.0 g/dL, soybean powder 2.0 g/dL, yeast extract 0.3 g/dL, KH_2PO_4 0.2 g/dL, MgSO_4 0.1 g/dL, CaSO_4 0.1 g/dL, temperature 24 ℃, initial pH 5.8, liquid volumes 100 mL/250 mL, inoculation volume 10 mL, shaking rate 140 r/min, fermentation time 108 h.

Key words: *Morchella esculenta*; liquid fermentation; mycelial biomass; extracellular polysaccharide

羊肚菌(*Morchella esculenta*),俗称羊肚蘑、羊肚菜、阳雀菌等,属于囊菌亚门(Ascomycotina),盘菌目(Pezizales),羊肚菌科(Morchellaceae),羊肚菌属(*Morchella*)^[1]。羊肚菌营养丰富,其氨基酸含量为各食用菌之首。羊肚菌多糖是其主要药用成分

之一,具有增强肌体免疫力、促进副肾皮质激素的分泌、降低胆固醇、预防动脉硬化、抗疲劳、抗病毒、抑制肌癌-180 等诸多作用^[2-5]。由于在食用、药用等方面的重要价值,羊肚菌深受各国消费者的青睐,国内外市场一直很好。但因气候、海拔、温度、湿

收稿日期:2006-08-26.

基金项目:安徽省政府人才基金项目(2003526)资助。

作者简介:欧超(1983-),男,安徽肥东人,遗传学硕士研究生。Email:ouchaoouchao@tom.com

通讯作者:林毅(1957-),男,安徽金寨人,农学硕士,教授,博士生导师,主要从事生物技术、作物遗传育种研究。

Email:xbr123@ahau.edu.cn

度、土壤等环境因素的影响,其野生产量极低,且不能完全进行人工栽培,故价格十分昂贵^[6-8]。

羊肚菌多糖可以通过深层发酵生产,具有菌丝体增殖快、产量大、生产周期短等优点,且不受环境因素的影响。以深层发酵获得的菌丝体和发酵液为原料提取羊肚菌多糖,可以显著降低成本,提高生产效率,适合工业化生产^[9]。作者对羊肚菌的液体深层发酵工艺进行了初步研究,以期为羊肚菌的进一步开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 羊肚菌(*Morchella esculenta*),由安徽农业大学食用菌研究所提供。

1.1.2 培养基

1) 斜面培养基(组分 g/dL):马铃薯 20,葡萄糖 2,蛋白胨 0.3,琼脂 1.8,KH₂PO₄ 0.1,MgSO₄ 0.3。

2) 液体种子培养基(组分 g/dL):葡萄糖 2,蛋白胨 0.2,酵母膏 0.1,MgSO₄ 0.1,KH₂PO₄ 0.046,K₂HPO₄ 0.1。

3) 发酵基础培养基(组分 g/dL):葡萄糖 4,蛋白胨 0.5,KH₂PO₄ 0.15,MgSO₄ 0.075。

1.2 实验方法

1.2.1 摇瓶培养 从已活化的斜面上挑取两小块 0.5 cm² 的菌丝体,接入到装有 100 mL 液体种子培养基的 250 mL 的三角瓶中,置于 25 ℃ 的摇床上培养 4~5 d。按体积分数 10% 的接种量,将 10 mL 摇瓶种子液接入到装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 的三角瓶中,25 ℃、150 r/min 条件下,摇瓶培养 5 d。

1.2.2 碳源、氮源的单因素筛选试验

1) 碳源筛选实验:在基础培养基中分别以 4 g/dL 的玉米粉、可溶性淀粉、蔗糖、麦芽糖、果糖代替葡萄糖作为碳源;

2) 氮源筛选实验:在基础培养基中分别以黄豆粉、酵母粉、麸皮、硝酸铵、氯化铵代替蛋白胨作为氮源,其添加量根据各自的全氮含量相对于 0.5 g/dL 蛋白胨的全氮量折合而成。玉米粉、黄豆粉均需煮沸取汁,其他条件与基础发酵培养基相同,设 3 个重复,进行摇瓶发酵。

1.2.3 碳源、氮源正交试验 根据碳、氮源的单因素筛选试验的结果,选择较好的碳源、氮源各 2 个,设计 L₉(3⁴) 正交试验,发酵条件与上述相同,设 3 个重复,见表 1。

1.2.4 无机盐正交试验 在最佳碳、氮源培养基

的基础上,选用 KH₂PO₄、MgSO₄、CaSO₄、ZnSO₄,设计 L₉(3⁴) 正交试验,发酵条件相同,设 3 个重复,见表 2。

表 1 碳源、氮源正交试验设计表

Tab. 1 Scheme of carbon and nitrogen sources in orthogonal experiment

水平	因 素			
	A 玉米粉 质量浓度/ (g/dL)	B 葡萄糖 质量浓度/ (g/dL)	C 黄豆粉 质量浓度/ (g/dL)	D 酵母粉 质量浓度/ (g/dL)
1	3.5	1.0	1.0	0.1
2	4.0	1.5	2.0	0.2
3	4.5	2.0	3.0	0.3

表 2 无机盐正交试验设计表

Tab. 2 Scheme of inorganic salt in orthogonal experiment

水平	因 素			
	A KH ₂ PO ₄ 质量浓度/ (g/dL)	B MgSO ₄ 质量浓度/ (g/dL)	C CaSO ₄ 质量浓度/ (g/dL)	D ZnSO ₄ 质量浓度/ (g/dL)
1	0.100	0.050	0.100	0.000
2	0.200	0.100	0.200	0.001
3	0.300	0.150	0.300	0.003

1.2.5 液体发酵条件的优化 在确定最佳发酵培养基成分的基础上,设计不同温度、pH 值、装液量、接种量和转速,进行单因素试验,测定菌丝体生长量、胞外多糖质量浓度,从而确定最佳发酵条件,设 3 个重复,见表 3。

表 3 发酵条件优化设计表

Tab. 3 Scheme of optimization for fermentation conditions

水平	因 素				
	温度/℃	pH 值	装液量/ mL	接种量/ mL	转速/ (r/min)
1	20	4.5	40	5	80
2	22	5.0	60	10	100
3	24	5.5	80	15	120
4	26	6.0	100	20	140
5	28	6.5	120	—	160
6	—	7.0	—	—	180

1.2.6 摇瓶发酵 按照筛选出来的发酵培养基和发酵条件进行摇瓶发酵,在发酵过程中检测菌丝体生物量,胞外多糖、总糖及还原糖质量浓度,培养基 pH 值等。

1.3 测定方法

1.3.1 菌丝体生物量的测定 将发酵液过滤,滤液留用,所得菌丝体用蒸馏水反复洗涤,置于 60 ℃ 干燥箱中烘干并称重^[10]。

1.3.2 胞外多糖的测定 取 30 mL 过滤所得的滤液,4 500 r/min 下离心 20 min,取上清液加 3 倍体积(即 90 mL)的无水乙醇,置冰箱中 24 h 后,再于 4 500 r/min 下离心 20 min,去上清液,沉淀溶于一定量去离子水中稀释,用硫酸苯酚法测定胞外多糖含量^[11]。

1.3.3 总糖及还原糖的测定

1) 总糖测定:取滤液 5 mL,加入 6 mol/L 的盐酸 10 mL,水 5 mL,沸水浴 30 min 后,加入 6 mol/L 的氢氧化钠溶液调 pH 至中性,稀释,定容,过滤,用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS)测定^[11]。

2) 还原糖测定:取滤液 10 mL,再加水 10 mL 摇匀后,50 ℃ 保温 30 min,定容,过滤,用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS)测定^[11]。

1.3.4 pH 值的测定 用 S-20 型数显酸度计检测。

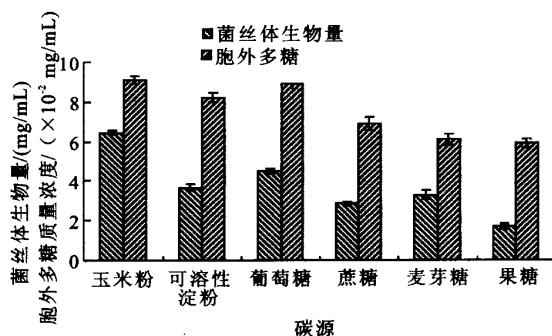


图1 碳源对羊肚菌液体发酵的影响

Fig. 1 Effect of carbon sources on liquid fermentation of *Morchella*

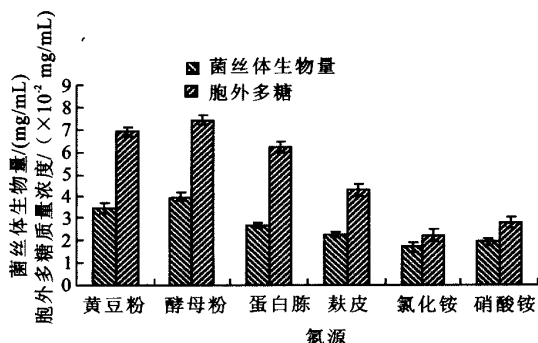


图2 氮源对羊肚菌液体发酵的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen sources on liquid fermentation of *Morchella*

2 结果与分析

2.1 碳源对羊肚菌深层发酵的影响

由图1可知,6种碳源均可被羊肚菌菌丝体利用,说明羊肚菌对碳源的要求并不苛刻,既能利用成分复杂的复合碳源,也能利用单糖和双糖等小分子碳源。其中以玉米粉和葡萄糖为碳源时,菌丝体生物量最高,其次为可溶性淀粉、麦芽糖和蔗糖,果糖最少;对胞外多糖而言,玉米粉、葡萄糖和可溶性淀粉最好,其次为蔗糖、麦芽糖和果糖。综合评比,玉米粉、葡萄糖和可溶性淀粉较好。但考虑到玉米粉价格低廉,且来源方便;同时葡萄糖作为一个速效碳源,可被菌体直接利用,能够缩短发酵延迟期。故选用玉米粉、葡萄糖作为正交试验的碳源。

2.2 氮源对羊肚菌深层发酵的影响

从图2可以看出,羊肚菌在含酵母粉、黄豆粉、蛋白胨、麸皮的培养基中均能很好生长,而在含氯化铵、硝酸铵的培养基中生长不良,说明羊肚菌对有机氮的利用比无机氮好。其中以酵母粉作为氮源时,菌丝体生物量和胞外多糖质量浓度均最高,黄豆粉次之。考虑到生产成本,黄豆粉来源方便,价格低廉,同时酵母粉作为生长因子有利于菌丝体的生长,缩短发酵周期。因此,选择黄豆粉和酵母粉作为氮源进行正交试验。

2.3 碳源、氮源正交试验的结果

由表4结果可以看出,不同组合之间发酵结果是不同的。由极差可知,对菌丝体生物量、胞外多糖质量浓度而言,极差顺序均为酵母粉质量浓度>玉米粉质量浓度>黄豆粉质量浓度>葡萄糖质量浓度。极差越大,效果就越好,这说明酵母粉质量浓度对发酵的影响最大,葡萄糖的则最小。以菌丝体生物量为指标进行衡量,应该选择 $A_2B_3C_2D_3$;以胞外多糖质量浓度为指标进行衡量,应该选择 $A_2B_1C_2D_3$ 。由于 B (葡萄糖)的作用最小,故 $A_2B_3C_2D_3$ 、 $A_2B_1C_2D_3$ 相差不大,最终决定选择 $A_2B_1C_2D_3$,即玉米粉 4.0 g/dL、葡萄糖 1.0 g/dL、黄豆粉 2.0 g/dL、酵母粉 0.3 g/dL。

2.4 无机盐正交试验的结果

由表5可以看出,不同组合之间发酵结果是不同的。由极差分析可知,对菌丝体生物量而言,极差顺序为 $MgSO_4$ 质量浓度> KH_2PO_4 质量浓度> $CaSO_4$ 质量浓度> $ZnSO_4$ 质量浓度;对胞外多糖质量浓度而言,极差顺序为 KH_2PO_4 质量浓度> $MgSO_4$ 质量浓度> $CaSO_4$ 质量浓度> $ZnSO_4$ 质量浓度。极差越大,起的作用就越大,这说明在羊肚菌液体发酵过程中, $MgSO_4$ 质量浓度对菌丝体生物量

的影响最大, KH_2PO_4 质量浓度对胞外多糖质量浓度的影响最大。以菌丝体生物量为指标进行衡量, 应该选择 $A_2B_2C_2D_1$; 以胞外多糖质量浓度为指标进行衡量, 该选择 $A_2B_2C_1D_1$ 。由于 $C(\text{CaSO}_4)$ 的影响较小, 故 $A_2B_2C_2D_1$ 、 $A_2B_2C_1D_1$ 相差不大, 最终决定选择无机盐的配比为: $A_2B_2C_1D_1$, 即 KH_2PO_4 0.2 g/dL, MgSO_4 0.1 g/dL, CaSO_4 0.1 g/dL。

表 4 碳、氮源正交试验结果的极差分析
Tab. 4 Results of orthogonal experiment on carbon and nitrogen sources

序号		A(玉米粉)	B(葡萄糖)	C(黄豆粉)	D(酵母粉)	菌丝体生物量/ (mg/mL)	胞外多糖 质量浓度/(mg/mL)
1		1	1	1	1	7.804 6	0.812 3
2		1	2	2	2	10.129 7	1.119 2
3		1	3	3	3	10.084 5	1.211 2
4		2	1	2	3	10.621 2	1.512 2
5		2	2	3	1	9.312 4	0.931 4
6		2	3	1	2	10.424 2	1.235 1
7		3	1	3	2	10.172 1	1.213 1
8		3	2	1	3	10.212 4	1.310 1
9		3	3	2	1	9.314 5	0.937 5
菌丝体生物量/ (mg/mL)	k_1	9.340	9.533	9.480	8.810		
	k_2	10.119	9.885	10.022	10.242		
	k_3	9.900	9.941	9.856	10.306		
	R	0.779	0.408	0.542	1.496		
多糖质量浓度/ (mg/mL)	k_1	1.048	1.179	1.119	0.894		
	k_2	1.226	1.120	1.190	1.189		
	k_3	1.154	1.128	1.119	1.345		
	R	0.178	0.059	0.071	0.451		

表 5 无机盐正交试验结果的极差分析
Tab. 5 Results of orthogonal experiment on inorganic salt

序号		A(KH_2PO_4)	B(MgSO_4)	C(CaSO_4)	D(ZnSO_4)	菌丝体生物量/ (mg/mL)	胞外多糖 质量浓度/(mg/mL)
1		1	1	1	1	10.212 2	1.594 2
2		1	2	2	2	10.542 3	1.547 5
3		1	3	3	3	10.121 1	1.502 1
4		2	1	2	3	10.712 4	1.701 4
5		2	2	3	1	11.122 4	1.741 2
6		2	3	1	2	10.192 1	1.651 2
7		3	1	3	2	10.321 9	1.562 2
8		3	2	1	3	10.421 3	1.670 2
9		3	3	2	1	10.518 7	1.542 1
菌丝体生物量/ (mg/mL)	k_1	10.292	10.415	10.275	10.618		
	k_2	10.676	10.695	10.591	10.352		
	k_3	10.421	10.277	10.522	10.418		
	R	0.384	0.418	0.316	0.266		
多糖质量浓度/ (mg/mL)	k_1	1.548	1.619	1.639	1.626		
	k_2	1.698	1.653	1.597	1.587		
	k_3	1.591	1.565	1.602	0.625		
	R	0.150	0.088	0.042	0.039		

2.5 温度对羊肚菌深层发酵的影响

分别在 20、22、24、26、28 °C 下培养,结果发现羊肚菌在 20~28 °C 内均能生长,见图 3。温度较低,生长较慢;在 24~28 °C 时,羊肚菌菌丝体生长均较好,没有明显差别。24 °C 时胞外多糖得率最高,温度过高,胞外多糖质量浓度反而下降。因此,确定羊肚菌最佳培养温度为 24 °C。

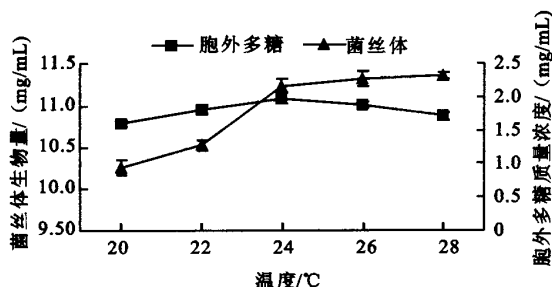


图 3 温度对羊肚菌深层发酵的影响

Fig. 3 Effect of temperature on liquid fermentation of *Morchella*

2.6 起始 pH 值对羊肚菌深层发酵的影响

用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节发酵培养基的 pH 值,分别为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0。图 4 为起始 pH 值的选择结果,pH 5.5 时可促进菌丝体的生长,pH 6.0 时有利于胞外多糖的生成,而发酵培养基的自然 pH 值偏酸,约为 5.8,因此采用培养基的自然 pH 值 5.8 即可。

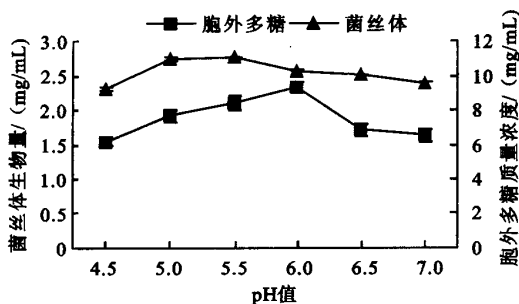


图 4 初始 pH 值对羊肚菌深层发酵的影响

Fig. 4 Effect of initial pH on liquid fermentation of *Morchella*

2.7 接种量对羊肚菌深层发酵的影响

图 5 为接种量的选择结果。接种量为 15、20 mL 时,发酵前期菌丝体生长过于旺盛,培养基营养成分迅速消耗,导致发酵后期菌丝体生长缓慢,不利于代谢产物多糖的生成;而接种量为 10 mL 时,对菌丝体和多糖有明显促进作用,故接种量选择 10 mL。

2.8 装液量对羊肚菌深层发酵的影响

由图 6 可以看出,250 mL 的三角瓶中,装液量为 100 mL 时,胞外多糖质量浓度最高;但在装液量

为 120 mL 时,菌丝体生物量最高。可能是由于装液量太高时,虽然胞外多糖质量浓度较高,但单位体积的得率反而减少。考虑到菌丝体生物量和胞外多糖的质量浓度,故装液量选择 100 mL。

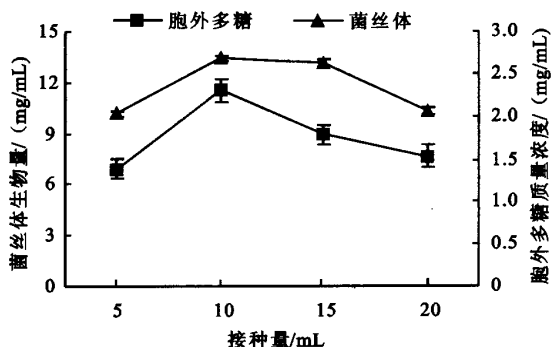


图 5 接种量对羊肚菌深层发酵的影响

Fig. 5 Effect of inoculation volume on liquid fermentation of *Morchella*

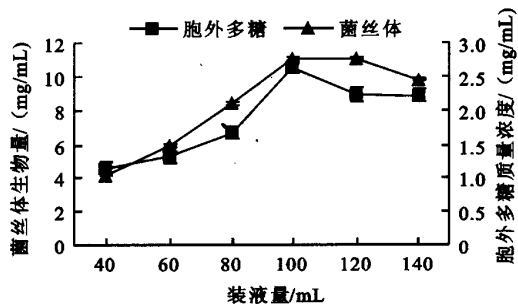


图 6 装液量对羊肚菌深层发酵的影响

Fig. 6 Effect of liquid volumes on liquid fermentation of *Morchella*

2.9 摇床转数对羊肚菌深层发酵的影响

摇床转速对菌丝生长状态和菌丝球的形成有明显作用。转速小时,菌丝体趋于分散生长,有利于形成更多新的生长点,但不利于通氧,因此菌丝体生长缓慢。转速较大时,通气量大,溶解氧增多,菌丝体生长量增多,菌球直径变小,胞外多糖产量也增加。当转速过快时,菌丝缠绕过密,形成球、块状,同样不利于菌丝体生长。从图 7 可以看出,当转速为 160 r/min 时,菌丝体生物量最大,但胞外多糖得率在 140 r/min 时达到最大。其原因可能是由于较高的转速导致发酵液流速较大,对成型的菌丝球产生的剪切力太大,从而导致胞外多糖的积累减少,故最终转速选择 140 r/min。

2.10 羊肚菌摇瓶发酵过程中的动态变化

按照筛选出来的发酵培养基和培养条件进行摇瓶发酵,每隔 12 h 取样测定生物量,胞外多糖、总糖及还原糖质量浓度、培养基 pH 值。经过 120 h 的发酵,得出以上几个参数的变化曲线,见图 8~

10. 结果表明:0~48 h 为延滞期,48~96 h 为对数期,以后进入稳定期和衰亡期。菌丝体生物量在 108 h 达到峰值,在衰亡期开始自溶,生物量开始下降;胞外多糖质量浓度仍有增长的趋势,可能是菌丝体自溶后释放多糖到培养基中所致。pH 值变化曲线为先降后升,但一直都保持在 5.5~6.0 之间,这一数值正是羊肚菌生长的适宜 pH 值的范围。从胞外多糖质量浓度的变化曲线可以看出,发酵液中总糖质量浓度在 96 h 时达到最低,可以初步确定 108 h 左右为发酵的终点时间。

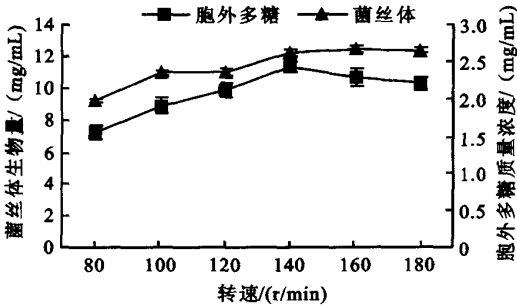


图 7 摇床转数对羊肚菌深层发酵的影响

Fig. 7 Effect of rotation rate on liquid fermentation of *Morchella*

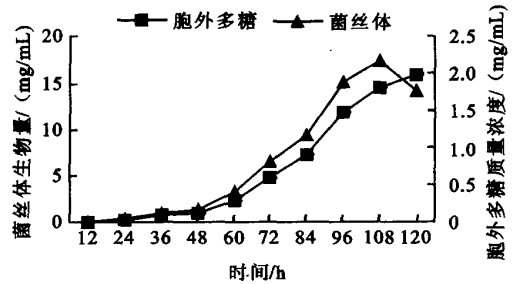


图 8 摇瓶发酵过程中羊肚菌的生长曲线

Fig. 8 Time-course of *Morchella* growth in the liquid fermentation

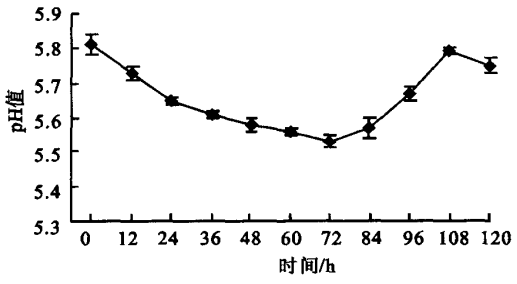


图 9 摇瓶发酵过程中 pH 变化曲线

Fig. 9 Time-course of pH in the liquid fermentation

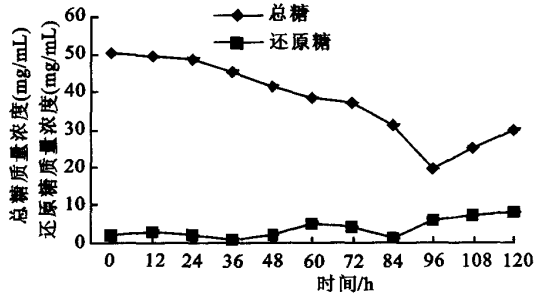


图 10 摇瓶发酵过程中总糖和还原糖的变化曲线

Fig. 10 Time course of sugar concentration in the liquid fermentation

3 讨论

碳源是发酵培养基的基础,既是菌丝体细胞结构的重要组成部分,又是菌丝体产生各种代谢产物和细胞内贮藏物质的主要原料。通过单因素试验,发现玉米粉和葡萄糖是很好的碳源。特别是玉米粉,生产成本低且含有多种复合因子,营养成分丰富,能增加培养基的粘度,使菌丝球的直径较小,数量增多,加大其与培养基中营养物质和氧气的接触面积,有利于菌丝体的生长。玉米粉中的主要碳源成分是淀粉,只有在菌丝体分泌胞外酶的作用下降解后,才能被利用;而葡萄糖可缩短发酵延迟期,但其组分单一,不利于菌丝体在对数期的生长,其价格也较高,不适合大规模的工业生产,因此结合它们的特点,选用葡萄糖与玉米粉作为正交设计的碳源。

氮源是构成菌丝体氨基酸、蛋白质、核酸的重要物质,可分为有机氮和无机氮两类。大部分真菌都能很好地利用有机氮,而对无机氮的利用较差。单因素试验证明,酵母粉和黄豆粉是很好的氮源。酵母粉对菌丝体的生长有促进作用,但作为生化试剂,价格较高,因此在正交设计时仅作为辅助因子,加入少量即可。黄豆粉作为一种复合氮源,来源方便,价格低廉,故作为羊肚菌液体发酵的主要氮源。曾有文献报道酵母提取液会抑制羊肚菌的生长,但作者选用酵母粉作为生长因子,对羊肚菌的液体发酵有明显的促进作用。

真菌在深层培养中需要少量的无机盐和微量元素,有的是细胞的重要组成部分,有的在调节细胞膜透性和酶活性方面起重要的作用。结果表明,添加微量的锌盐对菌丝体生物量和胞外多糖的产生反而有抑制作用,原因可能是在玉米粉和黄豆粉中已含有羊肚菌菌丝体生长所需的锌量。

对发酵条件的研究发现,羊肚菌生长的适宜

pH 值在 6.0 左右。所配制的发酵培养基的 pH 为 5.8, 基本适应发酵要求。羊肚菌深层培养的最适温度是 24 ℃, 比自然界中菌丝体生长的适宜温度高出 10 ℃ 左右。

摇瓶发酵的动态变化中, 菌丝体生物量在 108 h 达到峰值, 即 17.34 mg/mL, 而在 120 h 时胞外多糖质量浓度仍有增长趋势, 可能是由于菌丝体自溶导致。若不考虑其他条件, 预计 1 L 发酵液可得 17.34 g 干菌丝体和 1.81 g 胞外多糖。当然在发酵罐中进行实际生产时, 还可以进行补料分批发酵等方法的改进, 而且还要综合考虑其他条件, 所以在菌丝体和胞外多糖的产量上还有很大的提高空间。从发酵参数的变化来看, 总糖质量浓度在 96 h 达到

最低, 同时由于菌丝体生物量在 108 h 达到峰值, 所以基本可以确定发酵终点时间在 108 h。

4 结 论

羊肚菌深层发酵的最佳碳源为玉米粉+葡萄糖, 最佳氮源为黄豆粉+酵母粉。发酵的最优培养基组成为: 玉米粉 4.0 g/dL, 葡萄糖 1.0 g/dL, 黄豆粉 2.0 g/dL, 酵母粉 0.3 g/dL, KH_2PO_4 0.2 g/dL, MgSO_4 0.1 g/dL, CaSO_4 0.1 g/dL; 最优培养条件为: 24 ℃, 起始 pH 5.8, 摇瓶装液量为 100 mL/250 mL, 接种量 10 mL, 摇床转速 140 r/min, 发酵时间为 108 h。

参考文献(References):

- [1] 任桂梅, 张少刚. 羊肚菌的研究进展[J]. 延安大学学报, 1999, 18(1): 57—64.
REN Gui-mei, ZHANG Shao-gang. The progress of research on morchella[J]. *Journal of Yanan University*, 1999, 18(1): 57—64. (in Chinese)
- [2] 张广伦, 张卫明, 李玉. 羊肚菌的研究与利用[J]. 中国野生植物资源, 1999, 18(1): 1—3.
ZHANG Guang-lun, ZHANG Wei-ming, Li Yu. Research and exploitation of *Morchella*[J]. *Chinese Wild Plant Resource*, 1999, 18(1): 1—3. (in Chinese)
- [3] 欧阳天贽, 李小定, 荣建华. 真菌多糖抗肿瘤及免疫调节作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 18(3): 524—528.
OUYANG Tian-zhi, LI Xiao-ding, Rong Jian-hua. Recent studies on bioactivities of fungal polysaccharides[J]. *Natural Product Research and Development*, 2000, 18(3): 524—528. (in Chinese)
- [4] 赵桂云, 马庆斌. 羊肚菌液体培养基配方的研究[J]. 食用菌, 2002(6): 15—16.
ZHAO Gui-yun, MA Qing-bing. Research on formulas for liquid culture media of *Morchella*[J]. *Edible Fungi*, 2002(6): 15—16. (in Chinese)
- [5] 张松, 夏艳红, 姚珍平. 羊肚菌菌丝生物学特性研究[J]. 食用菌学报, 2002, 9(1): 18—21.
ZHANG Song, XIA Yan-hong, YAO Zhen-ping. Studies on the biological characteristics of *Morchella conica* Mycelia[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2002, 9(1): 18—21. (in Chinese)
- [6] 孙晓明, 吴素玲. 羊肚菌菌丝体深层发酵小试研究[J]. 江苏食品与发酵, 2000(2): 4—8.
SUN Xiao-ming, WU Su-ling. Initial study on submerged fermentation of *Mycelia of Morchella*[J]. *Jiang Su Food and Fermentation*, 2000(2): 4—8. (in Chinese)
- [7] 赵春燕, 孙军德, 李敏. 培养条件对羊肚菌菌丝生长的影响[J]. 中国食用菌, 2005, 24(1): 15—17.
ZHAO Chun-yan, SUN Jun-de, LI Min. Effect of cultural conditions of *Mycelia growth of Morchella*[J]. *Edible Fungi of China*, 2005, 24(1): 15—17. (in Chinese)
- [8] 邢增涛, 孙芳芳, 刘景圣. 尖顶羊肚菌液体培养条件的研究[J]. 食用菌学报, 2004, 11(4): 38—43.
XING Zeng-tao, SUN Fang-fang, LIU Jing-sheng. Studies on the submerge-cultured conditions of *Morchella conica* [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2004, 11(4): 38—43. (in Chinese)
- [9] Masaki H, Kaluta M. Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharide[J]. *Car Res*, 1981, 92: 115—129.
- [10] 宋士良, 杨瑞长, 陀永. 金针菇 FV008 深层发酵工艺的研究[J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(3): 8—12.
SONG Shi-liang, YANG Rui-chang, TUO Yong. Studies on submerged fermentation process of *Flammulina velutipes* FV088[J]. *Food and Fermentation Industries*, 1998, 24(3): 8—12. (in Chinese)
- [11] 杨新美. 食用菌研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 141—145.

(责任编辑: 李春丽)