

文章编号:1673-1689(2009)03-0390-07

褐环乳牛肝菌发酵条件的优化

李敏^{1,2}, 闫伟^{*1}, 堵国成², 陈坚², 刘立明²

(1. 内蒙古农业大学 林学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要:研究了褐环乳牛肝菌(*Suillus luteus*)发酵的营养条件及环境条件。在单因素实验优化的基础上,进一步采用正交实验对麦芽汁、酵母膏、装液量和接种量进行了研究。单因素实验及正交实验优化后得到褐环乳牛肝菌液体发酵的适宜培养基组成为:麦芽汁 270 mL/L, 酵母膏 6.7 g/L, KH_2PO_4 0.25 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.19 g/L, FeCl_3 48 mg/L, 柠檬酸 0.1 g/L, VB_1 2 mg/L。在装液量为 100 mL/500 mL、接种体积分数 10%, 初始 pH 值 5.5~6.5, 转速 150 r/min 的条件下,最终菌体量达 12.0 g/L,比优化前提高了 40.19%。在小型发酵罐上研究了 pH 和溶氧对菌体生长的影响, pH 值恒定在 5.5 时要优于自然 pH 值下的情况,而逐渐提高转速使溶氧保持在 20% 以上要优于较高转速下的供氧模式。

关键词:褐环乳牛肝菌; 发酵; 菌体量

中图分类号:S 718

文献标识码:A

Optimization of Fermentation Conditions by *Suillus luteus*

LI Min^{1,2}, YAN Wei^{*1}, DU Guo-cheng², CHEN Jian², LIU Li-ming²

(1. College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Huhho 010019, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The biomass production by *Suillus luteus* under submerged fermentation was carefully investigated. The optimum medium components and environmental conditions for the mycelium biomass of *Suillus luteus* were obtained by the single factor experiment and the orthogonal experiments, as follows: 270 mL/L wort, 6.7 g/L yeast extract, 0.25 g/L KH_2PO_4 , 0.3 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.19 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 48 mg/L FeCl_3 , 0.1 g/L citric acid, and 2 mg/L VB_1 , and broth content 100 mL/500 mL, inoculation size 10%, initial pH value 5.5~6.5 and agitation speeds 150 r/min. The highest mycelium biomass was achieved at 12.0 g/L after 10 d cultivation combined with those optimum conditions, higher 26.35% than that of the control. In addition, it also observed that the high mycelium biomass was attained at pH 5.5 and $\text{DO} > 20\%$, by enhancing agitation speeds step by step.

Key words: *Suillus luteus*; submerged fermentation; mycelia biomass

收稿日期:2008-03-20

基金项目:内蒙古自治区科技攻关项目(20050605)。

作者简介:李敏(1979-),女,内蒙古巴彦淖尔市人,农学博士,主要从事微生物发酵及蛋白质纯化工作。

* 通讯作者:闫伟(1959-),男,内蒙古呼和浩特人,农学博士,教授,博士生导师。主要从事外生菌根真菌方面的研究, Email: weiyang@jmau.edu.cn。

菌根是高等植物的根系受一类特殊土壤真菌的侵染而形成的一种互惠共生体系。菌根形成后可增强宿主植物根系对水分及矿质营养的吸收^[1-2],增强植物的抗逆性,以及提高植物对土传病害的抗性^[3]。褐环乳牛肝菌(*Suillus luteus*)是应用最为广泛的外生菌根真菌之一,有关褐环乳牛肝菌的研究报道主要集中在褐环乳牛肝菌在抗重金属^[4-5]、改善磷营养^[6-9]以及菌根合成等方面^[10]。然而,其液体培养时菌体量较低,限制了其在实际生产中的广泛应用。为此,Tomoyuki Hatakeyama等对乳牛肝菌属真菌进行了摇瓶静止培养的研究,发现褐环乳牛肝菌在以甘露糖、纤维二糖或海藻糖化合物为碳源,丙胺酸为氮源的培养基中生长良好^[11]。姚庆智等在温度为22.5~25℃和pH 6~7等最适环境条件下可使菌体干重达到6 g/L^[12]。陈连庆等系统地研究了营养与环境条件对菌体生长的影响,但其最终菌体干重仅为0.49 g/L^[13]。实际上,在褐环乳牛肝菌液体培养过程中,除碳、氮源外,其他条件如装液量、接种量、溶解氧、转速同样对菌体生长产生重要的影响。因此,作者在单因素实验的基础上,采用正交实验,系统地研究了营养环境条件对液体培养基中褐环乳牛肝菌生长的影响,以期获得大量菌丝体,为实现菌根菌剂产品的规模化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

褐环乳牛肝菌(*S. luteus*),由内蒙古农业大学林学院菌根生物技术研究室保存。

1.2 培养基

固体培养基:葡萄糖 20 g/L,酒石酸铵 2.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L,麦芽汁 15 mL/L,柠檬酸铁 0.03 g/L,微量元素 1 mL, VB_1 40 $\mu\text{g/L}$,琼脂 16 g/L;微量元素(g/L): H_3BO_3 2.8, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3.67, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.3, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.925, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.27。

发酵培养基:葡萄糖 20 g/L,麦芽汁 10 mL/L,蛋白胨 2 g/L,酵母膏 5 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/L,柠檬酸 0.1 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.25 g/L, FeCl_3 0.12 g/L, VB_1 2 mg/L。

1.3 培养方法

取新鲜斜面菌丝转接于固体培养基中,长出菌丝后再连续转接2~3次,25℃暗培养6d备用。

液体培养时如无特殊说明,均为500 mL三角瓶中分装50 mL液体培养基,接种体积分数10%,于25℃、150 r/min培养10 d。分批培养时,5 L发酵罐装液量2 L,温度25℃,通气量2 L/min,用3 mol/L NaOH控制pH在合适范围内。

1.4 分析方法

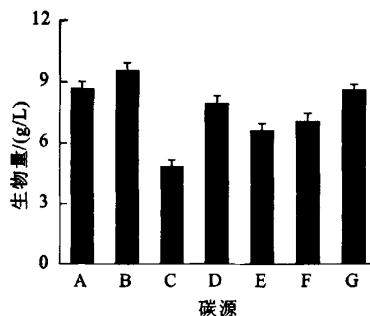
菌丝生物量测定采用干重法,还原糖测定采用费林法^[14]。

2 结果与分析

2.1 营养条件对褐环乳牛肝菌菌体生长的影响

2.1.1 不同碳源对褐环乳牛肝菌菌体生长的影响

维持发酵基本培养基其它成分不变,考察不同碳源(按相同的碳克分子量换算出不同碳源相应添加的数量)对褐环乳牛肝菌菌体量的影响,结果见图1。在不同碳源中培养,菌体量有明显变化。当以麦芽汁为碳源时,菌体量最大(9.5 g/L),其次为葡萄糖。方差分析发现, $(F = 12.32) > (F_{0.01} = 4.01)$,差异极显著,表明不同碳源对菌体生长有显著影响。



A. 葡萄糖; B. 麦芽汁; C. 蔗糖; D. 麦芽汁; E. 果糖; F. 可溶性淀粉; G. 葡萄糖 1 g/dL 和 麦芽汁 1 %

图1 不同碳源对褐环乳牛肝菌菌体量的影响

Fig.1 Effects of carbon sources on DCW

2.1.2 碳源体积分数对褐环乳牛肝菌菌体生长的影响

确定最佳碳源为麦芽汁后,考察了麦芽汁体积分数对褐环乳牛肝菌发酵的影响,见图2。麦芽汁体积分数为270 mL/L时,菌体量达到最大,为10.2 g/L,进一步提高麦芽汁体积分数则会对菌体生长产生很大的抑制作用。方差分析发现, $(F = 44.61) > (F_{0.01} = 5.99)$,差异极显著,表明麦芽汁体积分数对褐环乳牛肝菌菌体生长有显著影响。

2.1.3 不同氮源对褐环乳牛肝菌菌体生长的影响

以270 mL/L麦芽汁为碳源(按相同的氮克分子量换算出不同氮源相应添加的数量),考察不同氮源对褐环乳牛肝菌生长的影响,结果见图3。有机氮源比无机氮源能有效地促进褐环乳牛肝菌的生

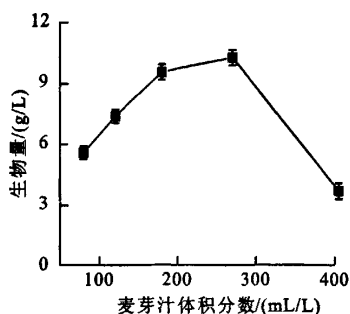
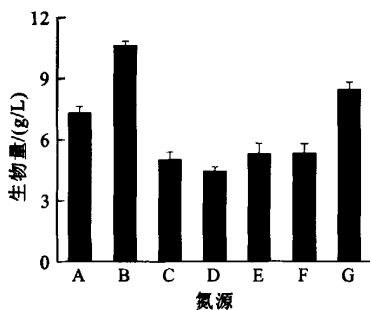


图2 麦芽汁体积分数对褐环乳牛肝菌菌体量的影响

Fig. 2 Effects of wort concentration on DCW

长,其中当以酵母膏为氮源时,菌体量达到最大。方差分析发现, ($F=21.23$) $>$ ($F_{0.01}=4.01$),表明菌体在不同氮源中培养,菌体量有显著变化。



A. 蛋白胨; B. 酵母膏; C. 酒石酸铵; D. 磷酸氢二铵; E. 硫酸铵; F. 硝酸铵; G. 蛋白胨 0.2 g/dL, 酵母膏 0.5 g/dL 和磷酸氢二铵 0.025 g/dL

图3 不同氮源对褐环乳牛肝菌菌体量的影响

Fig. 3 Effects of nitrogen sources on DCW

2.1.4 氮源质量浓度对褐环乳牛肝菌菌体生长的影响 确定酵母膏为氮源后,考察了酵母膏质量浓度对菌体量的影响,见图4。酵母膏质量浓度为 6.7 g/L 时,菌体量最高,为 10.9 g/L,进一步提高酵母膏质量浓度,菌体量明显降低。方差分析表明, ($F=25.99$) $>$ ($F_{0.01}=5.06$),说明发酵体系中酵母膏质量浓度对菌体量有显著影响。

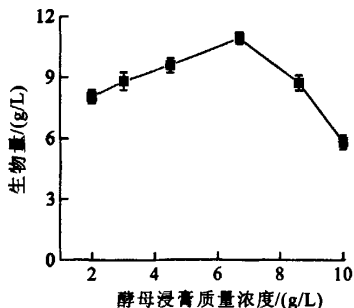


图4 酵母膏质量浓度对褐环乳牛肝菌菌体量的影响

Fig. 4 Effects of C/N ratio on DCW

2.2 环境条件对褐环乳牛肝菌菌体生长的影响

万方数据

2.2.1 装液量对褐环乳牛肝菌菌体生长的影响

不同装液量对菌体生长的影响见图5。装液量为 30 mL/500 mL 时,菌体量达到最高。装液量从 30 mL/500 mL 上升到 200 mL/500 mL 时,菌体量下降了 32.1%。方差分析表明, ($F=25.48$) $>$ ($F_{0.01}=5.99$),说明菌体在不同装液量条件下培养,菌体量有显著变化。

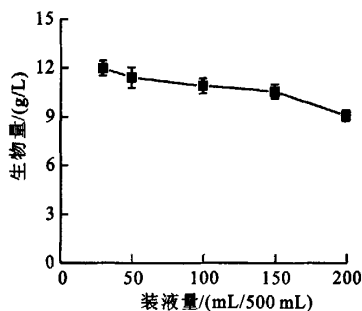


图5 装液量对褐环乳牛肝菌菌体量的影响

Fig. 5 Effects of medium volume on DCW

2.2.2 接种体积分数对褐环乳牛肝菌菌体生长的影响 随着发酵培养基中接种体积分数的增加 (5%~20%),菌体量逐渐增加。当接种体积分数为 10%~15% 时,菌体量增加幅度达到最大值,见图6。因此,在后续研究中以接种体积分数 10% 为宜。方差分析表明, ($F=103.22$) $>$ ($F_{0.01}=7.59$),说明不同接种量对菌体量有显著影响。

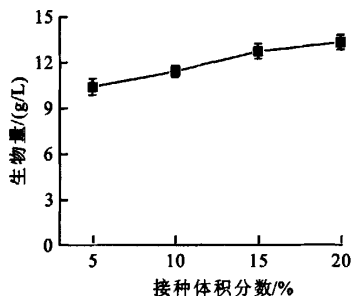


图6 接种体积分数对褐环乳牛肝菌菌体量的影响

Fig. 6 Effects of inoculation size on DCW

2.2.3 初始 pH 值对褐环乳牛肝菌菌体生长的影响 由图7可以看出,培养基初始 pH 值对菌体生长有很大的影响。在初始 pH 值低于 5.5 或高于 6.5 时,菌体生长很差; pH 值在 5.5~6.5 范围内菌体生长基本保持不变,故初始 pH 值可选择为 5.5~6.5。方差分析表明, ($F=414.05$) $>$ ($F_{0.01}=5.99$),说明 pH 值对菌体生长有显著影响。

2.2.4 搅拌转速对褐环乳牛肝菌菌体生长的影响

转速对菌体生长的影响见图8。转速过大或过小均不利于菌体的生长。转速为 125~175 r/min 时菌体生长较好,150 r/min 时菌体量达到最大。因

此,后续研究在 150 r/min 条件下培养。方差分析表明, $(F=96.69) > (F_{0.01}=5.06)$, 说明菌体在不同转速下培养, 菌体量有显著变化。

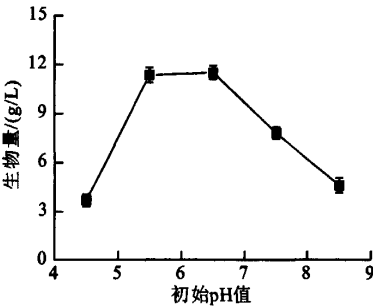


图 7 初始 pH 值对褐环乳牛肝菌菌体量的影响
Fig. 7 Effects of initial pH values on DCW

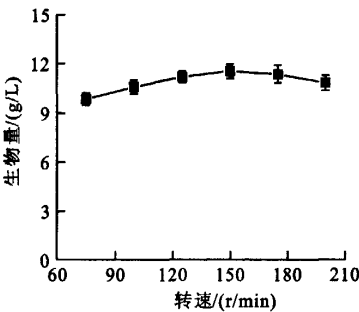


图 8 搅拌转速对褐环乳牛肝菌菌体量的影响
Fig. 8 Effects of agitation speeds on DCW

2.2.5 营养及环境条件正交实验设计及分析 根据以上实验结果, 选择对菌体生长产生明显影响的碳源(麦芽汁)、氮源(酵母膏), 并考虑其交互作用, 采用四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交实验设计进一步改

进培养基组成, 实验设计见表 1。同时考虑接种量和装液量, 每一实验重复 3 次, 菌体干重取 3 组实验平均值。实验设计及结果分析见表 2~3。

表 1 正交试验因素及水平
Tab. 1 The design form of the orthogonal

水平\因子	A 麦芽汁 体积分数/ (mL/L)	B 酵母浸膏 质量浓度/ (g/L)	C 接种 体积分数/ %	D 装液量/ (mL/ 500 mL)
1	120	2.97	10	50
2	180	4.46	15	100
3	270	6.70	20	150

方差分析结果表明, 葡萄糖、麦芽汁对褐环乳牛肝菌菌体生长都有显著影响, 各因素对菌体的影响次序为: 麦芽汁 > 酵母膏 > 装液量 > 接种量。其最优配置为 $A_3B_3C_2D_3$, 即麦芽汁 270 mL/L, 酵母膏 6.7 g/L, 接种体积分数为 10%, 装液量 100 mL。培养基经实验改进后使单位发酵液生物量提高到 12.0 g/L, 较优化前(8.56 g/L)提高了 40.19 %。

2.2.6 验证实验 经单因素和正交实验, 得出褐环乳牛肝菌发酵的优化营养和环境条件为: 麦芽汁 270 mL/L、酵母膏 6.7 g/L、 KH_2PO_4 0.25 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g/L、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.19 g/L、 $FeCl_3$ 48 mg/L、柠檬酸 0.1 g/L、 VB_1 2 mg/L; 接种体积分数 10%, 装液量 100 mL/500 mL, 初始 pH 值 5.5~6.5, 转速 150 r/min。进行多次摇瓶实验, 实验结果的重复性较好, 菌体量分别为 11.9、11.8、12.1、12.1 g/L。

表 2 正交实验设计 $L_9(3^4)$
Tab. 2 Orthogonal design of experiment $L_9(3^4)$

实验号	麦芽汁 A	酵母浸膏 B	麦芽汁×酵母浸膏 A×B	接种量 C	装液量 D	生物量/ (g/L)
	1	2	3 4	5	6	
1	1	1	1 1	1	1	6.7±0.3
2	1	2	2 2	2	2	7.2±0.5
3	1	3	3 3	3	3	9.6±0.4
4	2	1	1 2	2	3	8.4±0.3
5	2	2	2 3	3	1	10.7±0.5
6	2	3	3 1	1	2	9.6±0.4
7	3	1	2 1	3	2	9.5±0.2
8	3	2	3 2	1	3	9.9±0.5
9	3	3	1 3	2	1	11.5±0.3
10	1	1	3 3	2	2	6.9±0.6

续表 2

实验号	麦芽汁	酵母浸膏	麦芽汁×酵母浸膏		接种量	装液量	生物量/ (g/L)
	A	B	A×B		C	D	
	1	2	3	4	5	6	
11	1	2	1	1	3	3	7.2±0.5
12	1	3	2	2	1	1	8.6±0.5
13	2	1	2	3	1	3	7.5±0.3
14	2	2	3	1	2	1	9.8±0.4
15	2	3	1	2	3	2	10.4±0.4
16	3	1	3	2	3	1	10.3±0.5
17	3	2	1	3	1	2	11.1±0.3
18	3	3	2	1	2	3	12.0±0.4
I	46.3	49.3	55.4	54.8	53.4	57.7	
II	56.4	56.1	55.5	54.9	56.2	54.8	
III	64.6	61.8	56.2	57.6	57.6	54.6	

表 3 正交实验方差分析结果

Tab. 3 Analysis of variance of orthogonal design of experiment

来源	偏差平方和	自由度	平均偏差	F 值	显著性
A	27.88	2	13.94	29.08	<0.001
B	12.92	2	6.46	13.50	<0.001
C	1.52	2	0.76	1.58	
D	1.00	2	0.50	1.08	
A×B	0.92	4	0.46	0.50	
误差	2.92	6	1.46		

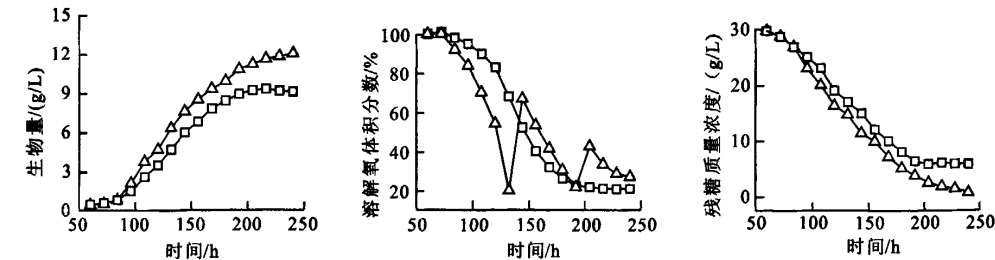
$F_{0.01}(2,6)=10.92, F_{0.05}(2,6)=5.14, F_{0.1}(2,6)=3.46,$
 $F_{0.01}(4,6)=9.15, F_{0.05}(4,6)=4.53, F_{0.1}(4,6)=3.18$

2.3 供氧方式对褐环乳牛肝菌菌体生长的影响

多种细胞的生命活动过程需要氧的参与,氧在细胞的生物合成过程中起着十分重要的作用。为

了解氧在褐环乳牛肝菌发酵过程中的作用,研究了不同供氧方式对褐环乳牛肝菌菌体生长的影响。选择了两种不同的供氧方式进行研究:Ⅰ-搅拌转速恒定在 400 r/min;Ⅱ-搅拌转速按相对溶氧不低于 20%的要求逐渐升高。

不同搅拌转速下的褐环乳牛肝菌发酵过程参数随时间的变化情况见图 9。可以看出,搅拌转速根据溶氧需要从 200 r/min 逐渐提高到 400 r/min 时,菌体量比恒定为 400 r/min 时的菌体量提高了 29%。因此,逐渐提高转速以满足菌体生长对溶氧的要求适用于褐环乳牛肝菌发酵。将搅拌转速恒定在 400 r/min 时,剪切力对菌体产生较大的影响,将溶氧控制在高于 20%即可满足菌体生长对氧的要求。此时的溶氧传质状态可作为褐环乳牛肝菌发酵比拟放大研究的重要依据。



□供氧方式Ⅰ(0~240 h,400 r/min); △供氧方式Ⅱ(0~132 h,200 r/min; 132~156 h, 300 r/min; 156~240 h, 400 r/min)

图 9 不同供氧方式下的褐环乳牛肝菌发酵过程

Fig. 9 Time-courses of batch *Suillus luteus* fermentation under diverse agitation rate

2.4 pH 值对褐环乳牛肝菌菌体生长的影响

图 10 为不同 pH 值下褐环乳牛肝菌分批发酵的过程曲线。在不控制 pH 值时,随着底物的消耗,发酵液 pH 值从 5.5 迅速下降,至 144 h 时,pH 值降至最低点 3.1,随后维持至 180 h,pH 值再逐渐升高。不控制 pH 条件下发酵液中 pH 值下降的原因在于,菌体在生长过程中产生了一些酸性代谢产物^[15],之后 pH 值又逐渐升高,说明菌体可以利用前期代谢产生的一些小分子产物继续生长。当 pH

值降至最低点 3.1 时,酸性环境对菌体生长表现出了一定的抑制性,但细胞仍能以较慢的速率继续生长。褐环乳牛肝菌能在较宽的 pH 值范围内维持一定的生长速率生长,表现出较强的 pH 值适应能力。维持发酵体系中 pH 5.5 时,与不控制 pH 值的结果相比,细胞干重高出 28.64%。这表明 pH 值恒定控制在 5.5 时,褐环乳牛肝菌菌体生长要优于自然 pH 值的情况,直至 204 h 时细胞量达最高值 12.44 g/L。

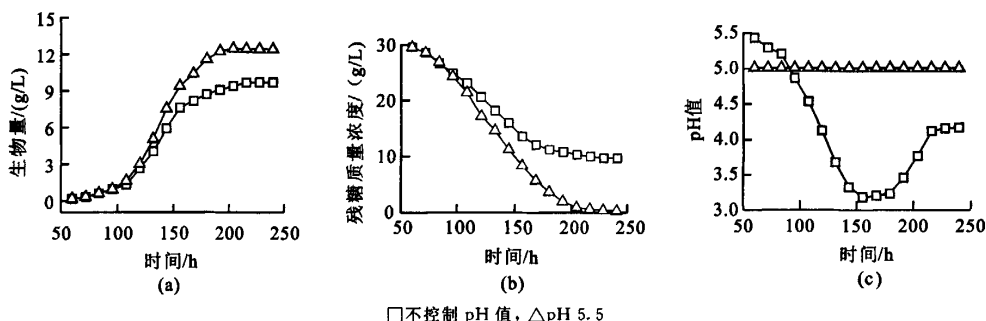


图 10 不同 pH 控制方式下的褐环乳牛肝菌发酵过程

Fig. 10 Time-course of *Suillus luteus* fermentation process under different pH control mode

3 结 论

作者考察了营养及环境条件对褐环乳牛肝菌发酵的影响,采用单因素实验及正交实验设计方法优化了褐环乳牛肝菌发酵的营养条件和环境条件,培养基各种成分的适宜浓度为:麦芽汁 270 mL/L、酵母膏 6.7 g/L、 KH_2PO_4 0.25 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.19 g/L、 FeCl_3 48 mg/L、柠檬酸 0.1 g/L、 VB_1 2 mg/L。在装液量 100 mL/500 mL、接种体积分数 10%、初始 pH 值 5.5~6.5、转速 150 r/min 的条件下最终菌体量达 12.0 g/L,比优化前 (8.56 g/L) 提高了 40.19%。

褐环乳牛肝菌对麦芽汁较其他无机成分利用

得好,说明褐环乳牛肝菌不仅能分解利用其中的碳水化合物,而且其中的维生素、生物素以及金属离子等微生物必需的生长因子也是褐环乳牛肝菌生长过程中不可缺少的。褐环乳牛肝菌对有机氮的利用优于无机氮,尤其以酵母膏为最好,因为有机氮源中除含有丰富的蛋白质、肽类、游离的氨基酸以外,还含有少量的糖类、脂肪、无机盐和生长因子等,是理想的营养物质^[16-19]。

pH 值与糖的消耗和菌体量的积累有密切关系。pH 值较低时,糖的消耗与菌体量均受到抑制。而由过高的转速引起的高剪切力对菌体生长会产生负面影响,将发酵体系中的溶氧保持在 20% 以上时,即可满足菌体生长对氧的需要。发酵过程中采用合适的 pH 值和溶氧,细胞能持续、快速地生长。

参考文献(References):

- [1] Muthukumar T, Udaiyan K, Shanmughavel P. Mycorrhiza in sedges-an overview[J]. *Mycorrhiza*, 2004, 14(2): 65-77.
- [2] Rousseau J V D, Sylvia D M, Fox A J. Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient absorbing surface of pine in pure culture[J]. *Agric Ecosys Environ*, 1994, 28: 421-424.
- [3] 杨国亭, 宋关玲, 高兴喜. 外生菌根在森林生态系统中的重要性 (I)——外生菌根对宿主树木的影响[J]. *东北林业大学学报*, 1999, 27(6): 72-77.
- YANG Guo-ting, Song Guan-ling, Gao Xing-xi. The significance of *Ectomycorrhizas* in forest ecosystems: the influence of *Ectomycorrhizas* on host trees[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 1999, 27(6): 72-77. (in Chinese)

- [4] Muller L A H, Craciun A R, Ruytinx J, et al. Gene expression profiling of a Zn-tolerant and a Zn-sensitive *Suillus luteus* isolate exposed to increased external zinc concentrations[J]. *Mycorrhiza*, 2007, 17(7): 571—580.
- [5] Napierale F A, Werner A, Mardarowicz M, et al. The effects of heavy metals, content of nutrients and inoculation with mycorrhizal fungi on the level of terpenoids in roots of pinus sylvestris seedlings[J]. *Acta Physiol Plant*, 2002, 24: 137—143.
- [6] 冯固, 徐冰, 秦岭, 等. 外生菌根真菌对板栗生长及养分吸收的影响[J], 园艺学报, 2003, 30(3): 311—313.
FENG Gu, XU Bing, QIN Ling, et al. Effects of ectomycorrhizal fungi on the growth and nutrient uptake of chestnut [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30(3): 311—313. (in Chinese)
- [7] 徐冰, 冯固, 潘家荣, 等. 外生菌根菌丝桥在板栗幼苗间传递磷的效应[J]. 生态学报, 2003, 3(4): 765—770.
XU Bing, FENG Gu, PAN Jia-rong, et al. Transferring of phosphorus between chestnut seedlings via ectomycorrhizal hyphal links[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 3(4): 765—770. (in Chinese)
- [8] Meijstrik V K, Krause H H. Uptake of ^{32}P by pinus radiata roots inoculated with *Suillus luteus* and *cenococcum graniforme* from different sources of available phosphate[J]. *New Phytologist*, 1973, 72(1): 137—140.
- [9] Bousquet N, Mousain D, Salsac L. Effect of orthophosphate on phosphatase activitiex of *Suillus granulatus* in vitro culture [J]. *Physiologie Vegetale*, 1986, 24(2): 153—162.
- [10] Ruiz D B, Rincón A M, Felipe M R, et al. Molecular characterization and evaluation of mycorrhizal capacity of *Suillus l-*isolates from central spain for the selection of fungal inoculants[J]. *Mycorrhiza*, 2006, 16(7): 465—474.
- [11] Hatakeyama T, Ohmasa M. Mycelial growth of strains of the genera *suillus* and *boletinus* in media with a wide range of concentrations of carbon and nitrogen sources[J]. *Mycoscience*, 2004, 45(3): 169—176.
- [12] 姚庆智, 闫伟. 11 株外生菌根真菌菌株纯培养营养生理特性的研究[J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2005, 36(2): 186—191.
YAO Qing-zhi, YAN Wei. Study on physiological characteristics of 11 ectomycorrhizal strains on pure cultural condition [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Neimongol*, 2005, 36(2): 186—191. (in Chinese)
- [13] 陈连庆, 裴致达. 马尾松优良菌根真菌(S. l)液培条件的研究[J]. 林业科学研究, 1998, 11(4): 443—446.
CHEN Lian-qing, PEI Zhi-da. A study on the liquid cultural conditions for a mycorrhiza fungi (S. l) with pinus massoni-ana[J]. *Forest Research*, 1998, 11(4): 443—446. (in Chinese)
- [14] 蔺毅峰. 食品工艺原理与实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 179—181.
- [15] 张玉凤, 冯固. 丛枝菌根真菌对三叶草根分泌的有机酸组分和含量的影响[J]. 生态学报, 2003, 23(1): 30—37.
ZHANG Yu-feng, FENG Gu, LI Xiao-lin. The effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the components and concentrations of organic acids in the exudates of mycorrhizal red clover[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(1): 30—37. (in Chinese)
- [16] 吴祖芳, 堵国成, 陈坚. 放射型根瘤菌 WSH2601 生产辅酶 Q10 的摇瓶发酵条件[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术学报), 2003, 22(1): 65—69.
WU Zu-fang, DU Guo-cheng, CHEN Jian. Coenzyme Q10 shaking-flask culture conditions by *Rhizobus radiobacterium* WSH2601[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2003, 22(1): 65—69. (in Chinese)
- [17] 徐艳萍, 王树英, 李华钟, 等. 聚 γ -谷氨酸高产突变株的选育及摇瓶发酵条件[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术学报), 2004, 23(5): 6—10.
XU Yan-ping, WANG Shu-ying, LI Hua-zhong, et al. Screening of high productive mutant of γ -polyglutamic acid and its fermentation conditions[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2004, 23(5): 6—10. (in Chinese)
- [18] 张守亮, 陈坚, 华兆哲, 等. *Thermobifida fusca* WSH03211 突变株合成角质酶的发酵条件[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(5): 44—48.
ZHANG Shou-liang, CHEN Jian, HUA Zhao-zhe, et al. Optimization of fermentation conditions for cutinase production with a mutant of *Thermobifida fusca* WSH03211[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(5): 44—48. (in Chinese)
- [19] 张伟国, 陈坚, 伦世仪. 供氧对 L2 异亮氨酸分批发酵的影响[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术学报), 2001, 20(5): 538—542.
ZHANG Wei-guo, CHEN Jian, LUN Shi-yi. The effect of dissolving oxygen on L-isoleucine batch fermentation[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2001, 20(5): 538—542. (in Chinese)

(责任编辑: 李春丽)