

文章编号:1673-1689(2007)05-0092-07

羊肚菌培养条件响应面法优化

许 晖, 孙兰萍

(蚌埠学院 食品与生物工程系, 安徽 蚌埠 233030)

摘 要: 在 Plackett-Burman 实验设计结果基础上, 采用响应曲面法对影响羊肚菌(*Morchella esculenta*) AS51620 菌株发酵胞外多糖与菌丝生长的培养条件(发酵温度、时间和装液量)进行了探讨。结果表明, 在培养温度为 24~26 °C, 培养时间为 4.27~4.71 d 和装液量为 55~75 mL 的条件下, 每毫升发酵液可获得胞外多糖产量达 2 119.43 µg/mL; 在培养温度为 24.54~25.26 °C, 培养时间为 4~4.7 d 和装液量为 56~75 mL 的条件下, 获得的菌丝量不低于 6.77 mg/mL。通过对胞外多糖曲面方程以及菌丝干重二次多项回归方程求解得知, 在培养温度为 24.95 °C, 培养时间为 4.2 d 和装液量为 65.25 mL 的工艺条件下, 羊肚菌 AS51620 菌株发酵产生的胞外多糖和菌丝量最大预测值为 2 080.74 µg/mL 和 6.71 mg/mL。验证试验证实了该方程的预测值与实际值之间具有较好的拟合度。

关键词: 羊肚菌; 胞外多糖; 优化; 响应曲面法; Box-Behnken 设计

中图分类号: TQ 920.6

文献标识码: A

Optimization of Culture Conditions for Extracellular Polysaccharide and Mycelium Biomass by *Morchella esculenta* AS51620

XU Hui, SUN Lan-ping

(Department of Food and Bioengineering, Bengbu College, Bengbu 233030, China)

Abstract: Response surface methodology (RSM) based on a three-level three-factor Box-Behnken design of experiments was used to optimize the extracellular polysaccharide content (EPC) and the mycelium growth by submerged culture using *Morchella esculenta* AS51620. The key factors selected for the investigation were temperature, culture time and medium volume, based on the results of previous Plackett-Burman design. By analyzing the response surface plots, the optimum ranges of fermentation temperature, time and medium volume for obtaining over 2 119.43 µg/mL of EPC were in 24~26 °C, 4.27~4.71 d and 55.0~75.0 mL, respectively. While for obtaining more than over 6.77 mg/mL of dry cell weight (DCW), the parameters may be at the range of 24.54~25.26 °C, 4~4.7 d and 56.0~75.0 mL, respectively. Based on the analysis of the quadratic regression equations, a higher EPC concentration(2 080.74 µg/mL) and DCW (6.71 mg/mL) were achieved at the condition of 24.95 °C, 4.2 d and 65.25 mL.

Key words: *Morchella esculenta*; extracellular polysaccharide; optimization; response surface methodology(RSM); Box-Behnken design

收稿日期:2006-09-12.

基金项目:安徽省高等学校省级自然科学基金项目(KJ2007B051).

作者简介:许晖(1969-),男,安徽蚌埠人,副教授,工学硕士,主要从事食品科学与食品生物技术方面的研究.

Email:lotusxhc@yahoo.com.cn

羊肚菌(*Morchella esculenta*)俗称羊肚蘑、羊肚菜、阳雀菌等,属真菌中子囊菌亚门(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,羊肚菌胞多糖是其主要的有效成分之一,具有增强肌体免疫力、抗疲劳、抗病毒、抑制肿瘤等诸多作用^[2-3]。野生羊肚菌因气候、海拔、温度、湿度、土壤等环境因素影响,产量极少,价格十分昂贵^[4],所以利用野生子实体提取羊肚菌胞外多糖不但成本极高,而且原料来源有限,但羊肚菌胞外多糖可以通过深层发酵来培养产生。深层发酵技术具有菌丝体增殖快、生产周期短、产量大等优点^[3]。以深层发酵羊肚菌菌丝体和发酵液为主要原料提取羊肚菌胞外多糖可以明显降低生产成本,提高效率。

Plackett-Burman(PB)设计法是基于不完全平衡下的试验方法,用最少数试验次数尽可能精确地估计主效果因素。响应面方法(Response Surface Methodology, RSM)是综合试验分析和数学建模最经济合理的实验设计。它以回归法作为函数恒算工具,通过多项式近似,把因子与试验结果(响应值)的关系函数化,以此对因子进行面分析,研究因子与响应值之间、因子与因子之间的相互关系,弥补了以前在微生物培养基优化方面的不足^[5]。因此,近年来RSM日益受到重视,已在生物技术的众多领域得到广泛应用^[6-9]。

为了提高羊肚菌胞外多糖含量和菌丝体量,作者在Plackett-Burman实验基础上,采用RSM对影响羊肚菌As51620菌株发酵胞外多糖的培养基关键因素如发酵温度、时间和装液量的最佳水平进行了探讨,为工业化发酵生产该多糖提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

羊肚菌As51620,购自中国农业微生物菌种保藏中心。

1.2 培养基及培养方法

1.2.1 斜面培养基 采用PDA培养基。

1.2.2 液体种子培养基 蔗糖2 g/dL,酵母膏0.5 g/dL, KH_2PO_4 0.05 g/dL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/dL, pH 5.5。500 mL三角瓶每瓶装200 mL, 121 °C灭菌30 min。在无菌室中将活化的菌种接种到液体种子培养基中, 22 °C, 180 r/min摇床培养3 d。

1.2.3 摇瓶发酵培养基 蔗糖4 g/dL,酵母膏0.5 g/dL, KH_2PO_4 0.05 g/dL, 尿素0.2 g/dL, pH

5.5。500 mL三角瓶每瓶装200 mL, 121 °C灭菌30 min。在无菌室中用灭过菌的吸管吸取摇床培养的种子培养液30 mL,加到盛有发酵培养基的250 mL三角瓶中,在22 °C, 180 r/min摇床培养6 d。

1.3 羊肚菌胞外多糖含量和菌丝得率的测定

取30 mL发酵液, 3 000 r/min离心15 min。上清液中加入3倍体积的乙醇,放入冰箱冷冻室内,低温静置12 h, 3 000 r/min离心15 min,弃去上清液。将沉淀溶于20 mL去离子水中,移至1 000 mL容量瓶中,用去离子水定容,再用硫酸-蒽酮法测吸光值^[10],根据葡萄糖标准曲线计算出多糖的质量浓度,以 $\mu\text{g/mL}$ 发酵液计。

取发酵液30 mL,在3 000 r/min下离心15 min,沉淀下来的菌丝用去离子水清洗2~3次, 80 °C下烘干2 h至干透,然后用分析天平称重,以 mg/mL 发酵液计。

1.4 实验设计

Plackett-Buman实验结果表明,影响羊肚菌As51620菌株发酵产生胞外多糖的主要外界因素为培养温度、时间及装液量。采用Box-Behnken模型对影响羊肚菌As51620菌株生长及发酵产生胞外多糖的关键工艺参数进行最佳水平探索。所用软件为Design-Expert7.0.2,响应值为胞外多糖质量浓度(exopolysaccharide content, EPC)和菌丝干重(dry cell weight, DCW)。

参照文献[11]进行Box-Behnken实验,以拟合数据得到一个描述响应变量与自变量关系的二次多项方程为:

$$Y = c_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{j \leq i}^n b_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

式中, Y 为预测响应值; x_i 和 x_j 为自变量编码水平; c_0 为常数项; a_i 为线性系数; b_{ij} 为二次项系数; n 为因子数; x_i 与自变量真实值 X_i 的关系为 $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i$, 式中 X_0 为实验中心点处自变量的真实值, ΔX_i 为自变量变化步长。

按照Box-Behnken实验设计的要求,设发酵温度、时间和装液量为自变量,分别为 X_1 、 X_2 和 X_3 ; 每一自变量的低、中、高实验水平分别以-1、0、1进行编码,见表1所示。需要17组试验对式(1)的各项回归系数进行回归拟合。

2 结果与分析

2.1 模型方程的建立与显著性检验

实验设计及结果见表2。利用Design Expert软件对表2数据进行二次多元回归拟合,获得了羊

肚菌 As51620 菌株胞外多糖对自变量发酵温度、时间和装液量的二次多项回归方程。

$$Y_{EPC} = 2119.43 - 149.31x_1 + 271.36x_2 - 425.40x_3 - 306.50x_1x_2 + 415.55x_1x_3 - 261.33x_2x_3 - 440.44x_1^2 - 619.08x_2^2 - 468.18x_3^2 \quad (2)$$

由该方程的方差分析可见,该模型极显著($P < 0.0001$),失拟项不显著,模型的校正确定系数(R_{Adj}^2)为 0.9862,相关系数(r)为 0.9940,表明模型能解释 EPC 响应值的变化,因而该模型与实际情况拟合很好,可用于预测羊肚菌 As51620 菌株产生胞外多糖的实际情况。由表 3 各项回归系数显著

性检验表明,各因素对 EPC 的曲面效应皆显著,培养时间和装液量的线性效应显著,温度不显著,两两交互效应显著。

表 1 Box-Behnken 设计试验因素水平及编码

Tab.1 Level and code of variables chosen for Box-Behnken design

自变量	代 号		编码水平		
	未编码	编码值	-1	0	1
发酵温度/℃	X_1	x_1	23	25	27
发酵时间/d	X_2	x_2	2	4	6
装液量/mL	X_3	x_3	50	75	100

表 2 Box-Behnken 实验设计与结果

Tab.2 Box-Behnken design matrix along with the experimental and predicted values of EPC and DCW

序号	发酵温度 x_1	发酵时间 x_2	装液量 x_3	EPC/(μ g/mL)		DCW/(mg/mL)	
				实验值	预测值	实验值	预测值
1	-1	-1	0	571.12	631.69	4.51	4.595
2	1	-1	0	869.71	946.07	4.76	4.925
3	-1	1	0	1 863.11	1 787.41	5.82	5.655
4	1	1	0	935.71	875.79	5.47	5.385
5	-1	0	-1	2 183.33	2 201.4	5.44	5.525
6	1	0	-1	1 069.39	1 071.68	5.08	5.075
7	-1	0	1	521.13	519.5	4.53	4.525
8	1	0	1	1 069.39	1 051.98	5.11	5.035
9	0	-1	-1	1 002.87	924.88	6.23	6.077
10	0	1	-1	1 931.97	1 990.26	6.74	6.823
11	0	-1	1	655.02	596.74	5.62	5.543
12	0	1	1	538.82	616.8	6.16	6.317
13	0	0	0	2 136.54	2 119.43	6.68	6.770
14	0	0	0	2 068.42	2 119.43	6.72	6.770
15	0	0	0	2 168.14	2 119.43	6.87	6.770
16	0	0	0	2 127.58	2 119.43	6.74	6.770
17	0	0	0	2 096.46	2 119.43	6.84	6.770

表 3 回归方程系数及其显著性检验

Tab.3 Results of regression analysis of a full second-order polynomial model for EPC production

模型项	系数估计	标准差	平方和	均方	F 值	P 值
交互作用	2119.43	35.57	—	—	—	—
X_1 —发酵温度	-149.31	28.12	178 400	178 400	28.20	0.001 1
X_2 —发酵时间	271.36	28.12	589 100	589 100	93.14	< 0.000 1
X_3 —装液量	-425.40	28.12	1 448 000	1 448 000	228.88	< 0.000 1
X_1X_2	-306.50	39.77	375 800	375 800	59.41	0.000 1
X_1X_3	415.55	39.77	690 700	690 700	109.20	< 0.000 1
X_2X_3	-261.33	39.77	273 200	273 200	43.19	0.000 3
X_1^2	-440.44	38.76	816 800	816 800	129.13	< 0.000 1
X_2^2	-619.08	38.76	1 614 000	1 614 000	255.13	< 0.000 1
X_3^2	-468.18	38.76	922 900	922 900	145.91	< 0.000 1

利用 Design Expert 软件对表 2 数据进行二次多元回归拟合,获得了羊肚菌 As51620 菌株菌丝对

自变量发酵温度、时间和装液量的二次多项回归方程。

$$Y_{DCW} = 6.77 + 0.015x_1 + 0.38x_2 - 0.26x_3 - 0.15x_1x_2 + 0.24x_1x_3 + 0.007x_2x_3 - 1.39x_1^2 - 0.24x_2^2 - 0.34x_3^2 \quad (3)$$

从该模型的方差分析可见,该模型极显著($P < 0.0001$),失拟项不显著,模型的校正确定系数 R_{Adj}^2 为 0.9665,相关系数 r 为 0.9853,且回归系数有意义。

2.2 羊肚菌胞外多糖响应面分析

由方程(2)所作的响应曲面图及其等高线图见图 1、2。各因素及其交互作用对响应值的影响结果可通过该组图直观反映出来。

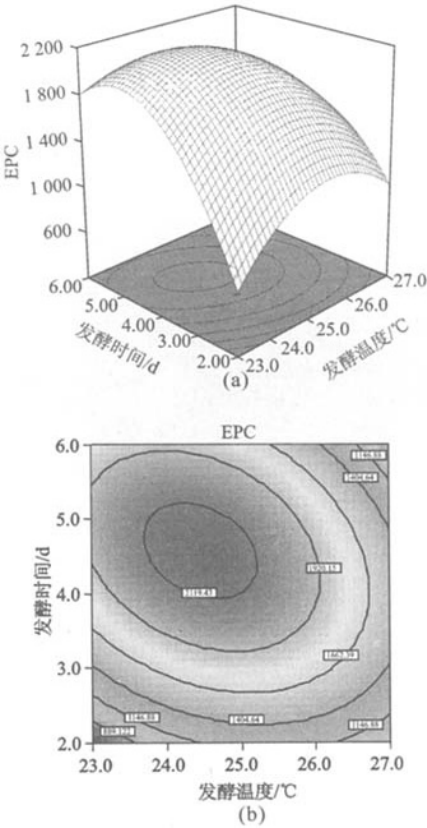


图 1 发酵温度和时间对 EPC 交互影响效应的曲面图及其等高线
Fig. 1 Three-dimensional plot and corresponding contour plot of EPC vs. fermentation temperature and time

图 1 显示了装液量位于中心水平时,发酵温度与时间对 EPC 的交互影响效应。从等高线图可以直观地看出此两因素的交互作用较显著,因为等高线的形状反映交互效应的强弱大小,圆形表示两因素交互作用不显著,而椭圆形与之相反。在 23.7℃ 时,大约在第 4.73 天,每毫升发酵液获得 2 119.43 μg 胞外多糖,而发酵温度在 25.22℃ 时则

在第 4.35 天,说明了适当提高发酵温度有利于羊肚菌 As51620 胞外多糖的产生,可以缩短发酵时间。

图 2 显示了发酵温度为 25.4℃ 时,装液量和发酵时间对 EPC 的交互影响效应。由图 2 可见,每毫升发酵液要获得 2 119.43 μg 胞外多糖,需装液量 55.25~72.76 mL,发酵 4.27~4.71 d 即可。由此可知,在实验水平范围内,发酵温度、发酵时间和装液量的最佳水平分别为 24~26℃、4.27~4.71 d 和 55~75 mL,每毫升发酵液所获得的胞外多糖不低于 2 119.43 μg。

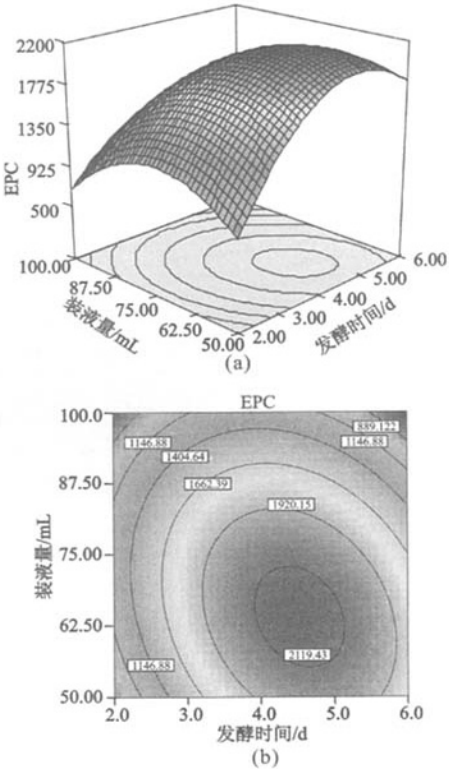


图 2 发酵时间和装液量对 EPC 交互影响效应的曲面图及其等高线
Fig. 2 Three-dimensional plot and corresponding contour plot of EPC vs. fermentation time and medium volume

2.3 羊肚菌菌丝得率响应面分析

发酵温度、时间和装液量对羊肚菌 As51620 菌株 DCW 的交互影响见图 3~5 所示。

由图 3 可见,在装液量为 75 mL 时,羊肚菌 As51620 菌株菌丝生长的最适温度为 25.05℃ 左右,且发酵的第 2~4 天菌丝生长较快,每毫升发酵液约增加 620 μg,第 4 天以后菌丝量基本处于稳定状态。因此,在 24.54~25.26℃ 发酵 4.7~6 d 的最佳条件下,每毫升发酵液能获得的最大菌丝量为 6.87 mg。

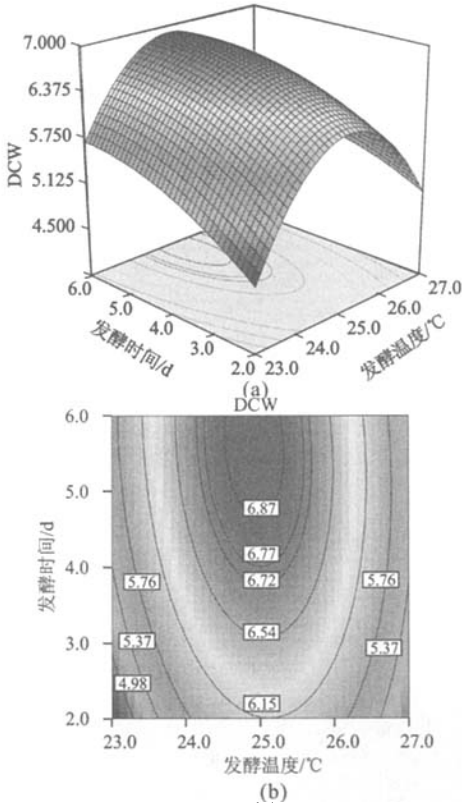


图 3 发酵温度和发酵时间对 DCW 交互影响效应的曲面图及其等高线

Fig. 3 Three-dimensional plot and corresponding contour plot of DCW vs. fermentation temperature and time

在发酵的第 4 天,装液量和发酵温度对羊肚菌 As51620 菌株 DCW 的交互影响见图 4。由图 4 可见,在 25.05 °C 左右进行发酵时,最适装液量大约为 56~75 mL,超出此范围的装液量均不利于羊肚菌 As51620 菌株的生长繁殖,同时装液量也影响发酵过程中发酵液的溶氧状态,装液量相对过多会造成发酵过程中溶氧不足而导致菌丝量减少,也不利于羊肚菌 As51620 菌株产生胞外多糖,而装液量相对过少则会造成发酵内部环境(如代谢废物浓度过高、渗透压改变等)的变化,更不利于羊肚菌 As51620 菌株的生长繁殖。

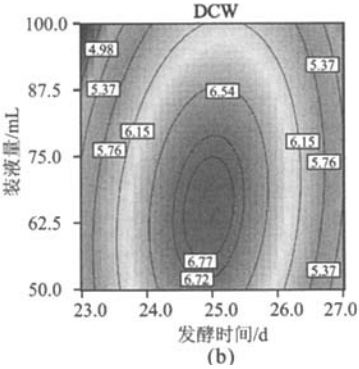
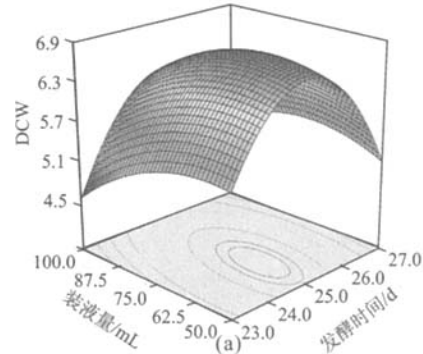


图 4 培养温度和装液量对 DCW 交互影响效应的曲面图及其等高线

Fig. 4 Three-dimensional plot and corresponding contour plot of DCW vs. fermentation temperature and medium volume

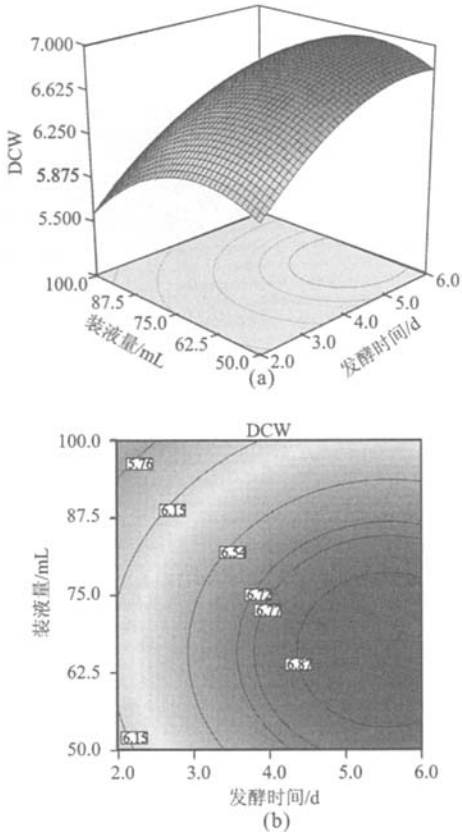


图 5 培养时间和装液量对 DCW 交互影响效应的曲面图及其等高线

Fig. 5 Three-dimensional plot and corresponding contour plot of DCW vs. fermentation time and medium volume

在发酵温度为 25 °C 左右,装液量和发酵时间对羊肚菌 As51620 菌株 DCW 的交互影响见图 5。由图 5 可知,在装液量大约为 56~75 mL、发酵 4~

4.7 d 的最佳条件下,每毫升发酵液能获得的菌丝量不低于 6.77 mg。

为了进一步验证最佳点的值,通过对胞外多糖曲面方程以及菌丝干重二次多项回归方程求解得知,在发酵温度为 24.95 ℃ 和装液量为 65.25 mL 的条件下发酵 4.2 d,预测每毫升发酵液可同时获得 2 080.72 μg 胞外多糖和 6.71 mg 菌丝。

为了证实预测的结果,在发酵温度、时间和装液量分别为 25 ℃、4.2 d 和 65 mL 试验水平范围内,进行了 3 组验证试验,平均每毫升发酵液可获得 2016.84 μg 胞外多糖和 6.62 mg 菌丝,试验值与预测值之间良好的拟合性证明此两模型是合适有效的,并具有一定的实践指导意义。

3 结 语

羊肚菌深层发酵的研究早在 20 世纪 60 年代初美、法等国就已开展,目前国外已经能够进行 500 L 以下规模的发酵生产,并出现了专门适于羊肚菌发酵的设备。我国这方面研究虽然较为滞后,目前仍处于中小试阶段,但近年来研究取得了较大的进展。人们对羊肚菌液体菌种、液体培养基以及培养条件进行了广泛的研究,并从菌丝体和发酵液中提取、分离、纯化了羊肚菌多糖^[3-4,12-14]。

作者利用统计学方法建立了羊肚菌 As51620 菌株菌丝生长和发酵胞外多糖的二次多项数学模型。通过对模型方程的响应曲面图及其等高线图进行分析,获得了影响该菌生长与发酵产糖的最佳培养条件,并利用模型方程对该菌生长与发酵产糖趋势进行了预测。研究结果证明,采用 Box-Be-

hnken 统计学试验设计方法对羊肚菌 As51620 菌株生长及发酵胞外多糖培养条件进行优化,结果表明:发酵培养基组成为:蔗糖 4 g/dL,酵母膏 0.5 g/dL, KH_2PO_4 0.05 g/dL,尿素 0.2 g/dL, pH 5.5, 在发酵温度、时间和装液量分别为 25 ℃、4.2 d 和 65 mL 试验水平范围内,平均每毫升发酵液可获得的 2016.84 μg 胞外多糖和 6.62 mg 菌丝,试验值与预测值之间具有良好的拟合性,证明此模型是合适有效的,并具有一定的实践指导意义。

发酵温度是食用菌生长的重要条件,不适宜的生长条件对菌体代谢会产生不良的影响,从而引起菌丝生长活力的降低,使菌丝生长受到抑制。通过响应面法分析表明,羊肚菌 As51620 菌株菌丝生长和胞外多糖产生的适宜温度为 24~26 ℃,最适温度为 25 ℃,武秋立^[15]研究羊肚菌液体深层发酵时,发现羊肚菌在 20~28 ℃ 内均能生长,发酵温度低时生长较慢,在 24~28 ℃ 时羊肚菌菌丝生长均较好,胞外多糖在 24 ℃ 时得率最高,因此,确定羊肚菌最佳培养温度为 24 ℃,两者基本一致。

装液量影响摇瓶过程中发酵液的溶氧状态,装液量增加会减少发酵过程中的通气量,不利于羊肚菌 As51620 菌株产胞外多糖。方差分析显示,装液量对多糖质量浓度影响极显著。因此确定最适装液量为 250 mL 三角瓶分装 65 mL 液体培养基,与李娟^[9]研究羊肚菌液体发酵装液量对胞外多糖影响的结果基本一致。

总之,通过响应面法能快速对羊肚菌 As51620 菌株产胞外多糖和菌丝生长的主要影响因子进行优化与评价,并能得到各因素最佳组合和响应值的最优值。

参考文献(References):

- [1] 沙业雄. 羊肚菌的研究进展[J]. 食用菌, 1990, 12(2): 3-4.
SHA Ye-xiong. Advances in studies on *Morchella esculenta* [J]. *Edible Fungi*, 1990, 12(2): 3-4. (in Chinese)
- [2] 李娟, 王臻, 姚良同, 等. 羊肚菌多糖研究进展[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(4): 89-91.
LI Juan, WANG Zhen, YAO Liang-tong, et al. Advanced in *Morchella esculenta* polysaccharides studies [J]. *Journal of Microbiology*, 2005, 25(4): 89-91. (in Chinese)
- [3] 贾建会, 吕晓莲, 樊利青. 深层发酵羊肚菌多糖的提取、分离及纯化研究[J]. 食品科学, 2002, 23(4): 59-62.
JIA Jian-hui, LV Xiao-lian, FAN Li-qing, et al. Studies on extraction, separation and purification of the submerged-fermentation morchella polysaccharide [J]. *Food Science*, 2002, 23(4): 59-62. (in Chinese)
- [4] 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. Studies of submerged fermentation of mycelia for *Morchella esculenta*[J]. **Jiangsu Food and Fermentation**, 2000, (2): 4—8. (in Chinese)
- [5] Myers R H, Montgomery D C. Response Surface Methodology[M]. New York: John Wiley and Sons Inc, 1995.
- [6] 胡升, 梅乐和, 姚善泾. 响应面法优化纳豆激酶液体发酵[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(1): 13—17.
- HU Sheng, MEI Le-he, YAO Shan-jing. Optimization of submerged fermentation of nattokinase production by *Bacillus subtilis* with response surface methodology[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2003, 29(1): 13—17. (in Chinese)
- [7] 王允祥, 陆兆新, 吕凤霞. 牛杆菌摇瓶发酵条件优化研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(7): 67—72.
- WANG Yun-xiang, LU Zhao-xin, LU Feng-xia. Optimization of fermentation conditions for exopolysaccharide and mycelium biomass by *Boletus sp.* ACCC 5032[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2004, 30(7): 67—72. (in Chinese)
- [8] 王允祥, 陆兆新, 吕凤霞. 翅鳞伞深层发酵胞外多糖优化研究[J]. 生物工程学报, 2004, 20(3): 414—422.
- WANG Yun-xiang, LU Zhao-xin, LU Feng-xia. Media optimization for exopolysaccharide by *Pholiota squarrosa* (Pers. ex Fr.) Quel. AS 5.245 on submerged fermentation[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2004, 20(3): 414—422. (in Chinese)
- [9] 李娟, 刘敏, 贾乐. 产胞外多糖泰山羊肚菌液体培养条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 80—82.
- LI Juan, LIU Min, JIA Le. Liquid fermentation conditions of exopolysaccharides produced by *Morchella esculenta*[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2005, 31(1): 80—82. (in Chinese)
- [10] 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(9): 550—553.
- DONG Qun, ZHENG Li-yi, FANG Jin-ian. Modified phenol-sulfuric acid method for determination of the content of oligo- and polysaccharides[J]. **Chinese Pharmaceutical Journal**, 1996, 31(9): 550—553. (in Chinese)
- [11] Montgomery D C. Design and Analysis of Experiments[M]. New York: John Wiley & Sons, 1991.
- [12] 张松. 羊肚菌液体菌种培养配方的研究[J]. 食用菌, 1996, (3): 19.
- ZHANG Song. Studies on the medium composition of liquid culture *Morchella esculenta*[J]. **Edible Fungi**, 1996, (3): 19. (in Chinese)
- [13] 刘士旺, 梁宗琦, 刘爱英, 等. 羊肚菌液体培养研究初报[J]. 食用菌学报, 1998, (3): 31—37.
- LIU Shi-wang, LIANG Zong-qi, LIU Ai-ying, et al. A preliminary study on submerged culture of *Morchella conica*[J]. **Acta Edulis Fungi**, 1998, (3): 31—37. (in Chinese)
- [14] 魏芸, 张天佑, 张姝, 等. 羊肚菌多糖的分离纯化及组成结构分析[J]. 植物资源与环境学报, 2000, (2): 14—17.
- WEI Yun, ZHANG Tian-you, ZHANG Shu, et al. Isolation, purification and characterization of polysaccharides from *Morchella esculenta* L.[J]. **Journal of Plant Resources and Environment**, 2000, (2): 14—17. (in Chinese)
- [15] 武秋立, 安家彦. 羊肚菌的液体深层培养[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(2): 72—76.
- WU Qiu-li, An Jia-yan. Submerged fermentation of *Morchella esculenta*[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2004, 30(2): 72—76. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)