

刘盛荣,张维瑞,戴金玉,等. 灵芝琼脂固体菌种超声均质效果及其发酵工艺[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):363-366.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.106

灵芝琼脂固体菌种超声均质效果及其发酵工艺

刘盛荣¹, 张维瑞¹, 戴金玉², 余浩², 郑春源²

(1. 宁德师范学院生物系,福建宁德 352100; 2. 安发[福建]生物科技有限公司,福建宁德 352100)

摘要:建立一种灵芝均一性菌种制作方法及其发酵工艺。超声破碎灵芝琼脂固体平板培养物,采用镜检和涂布平板法分析超声均质效果,以生物量和胞外多糖为指标优化其发酵工艺。结果表明:灵芝琼脂固体菌种破碎完全、均一性好,菌落数达到 186.00 CFU/个(琼脂块直径 0.5 cm);以超声均质化菌种为接种物于恒摇床发酵,生物量、胞外多糖分别为 9.24、0.62 g/L,低于琼脂块菌种(分别为 13.37、1.16 g/L);采用静置加摇床两阶段发酵方法(共 10 d),以静置 3 d、摇床 7 d 为最优,生物量、胞外多糖含量分别达到 15.14、0.86 g/L;与琼脂块菌种恒摇床发酵相比分别提高 29.96%、16.21%;超声均质菌种优化后的接种量为 7 mL。

关键词:灵芝;琼脂菌种;超声波;液体发酵;发酵工艺

中图分类号: S567.3+10.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0363-04

灵芝别称瑞草、万年草、不老草、仙草、神芝,属担子菌门层菌纲多孔目灵芝科灵芝属,在我国主要指赤芝(*Ganoderma lucidum*)、紫芝(*G. sinense*)、松杉灵芝(*G. tsugae*)等具有较高药用价值的芝类。灵芝是我国、日本、韩国、泰国等东方国家的传统珍贵草药,其中灵芝多糖、灵芝酸是灵芝药效的关键物质基础^[1-3],主要用于肝炎、高血压、高血脂、胃癌等疾病的治疗。

野生灵芝资源极其稀少,人工代料栽培是目前灵芝生产的主要方法,但其栽培周期长,且不同批次产品的活性成分及其含量有较大差异,不利于灵芝产品的标准化生产、应用、推广。不同于前者,灵芝液体发酵具有周期短、过程易控制、生产自动化水平高等优点,且发酵组分活性与子实体相近^[4-8],因此研究人员以生物量、多糖、三萜为目标对发酵培养基、真菌激发子、中药提取物强化活性物质生物合成等进行研究^[9-12]。

液体发酵是当前食用菌研究的热点,其琼脂平板培养物常作为液体发酵^[13]或液体菌种生产的接种物^[14-15],其优点在于可缩短菌种制备时间,但发酵周期长。Xing 等采用小型搅拌机均质化灰树花(*Grifola frondosa*)琼脂平板培养物,作为漆酶液体发酵接种物^[16]。灵芝液体培养菌种接种前,也常采用搅拌机均质后再用于接种^[17]。研究灵芝琼脂固体菌种超声破碎效果,并优化其作为接种物的发酵工艺,为均一性菌种制备及其发酵提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 赤芝购自中国科学院微生物研究所,编号

收稿日期:2015-08-08

基金项目:宁德师范院校企科研合作项目(编号:AF-003);宁德师范学院人才启动项目(编号:2013Y008)。

作者简介:刘盛荣(1973—),男,福建三明人,博士,讲师,主要从事食用菌及药用菌液体发酵研究。E-mail:fghost@163.com。

为 CCMCC 5.535。

1.1.2 培养基 PDA 培养基:去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 18 g、去离子水 1 000 mL,于 121 ℃下灭菌 20 min。液体发酵培养基:葡萄糖 35.0 g、蛋白胨 4.0 g、酵母粉 4.0 g、KH₂PO₄ 1.0 g、MgSO₄ 0.5 g、维生素 B₁ 0.01 g、去离子水 1 000 mL,于 121 ℃下灭菌 20 min。

1.1.3 主要仪器 JY-96 IIN 型超声波细胞破碎仪(浙江宁波新芝生物科技股份有限公司),UV5800-PC 型紫外可见分光光度计(上海元析分析仪器有限公司),NRY-2102C 型恒温摇床(上海南荣实验室仪器有限公司),PHS-3C 型精密 pH 值计(上海仪电科学仪器股份有限公司),DM750 型显微镜(配 LEICA DMC2900 型相机,LEICA 公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化及平板培养 将 4 ℃冷箱保藏的斜面菌种转至新配制的 PDA 斜面,于 25 ℃下活化培养 7 d,活化菌种接至 PDA 平板培养 7 d。

1.2.2 菌种超声波破碎 采用无菌打孔器(直径 0.5 cm)在平板菌落近边缘打孔,挑取 20 个琼脂块至装有 20 mL 无菌水的 50 mL 离心管。超声前采用 75% 乙醇、无菌水依次擦拭超声波细胞破碎仪变幅杆;将其浸于悬液开始超声破碎,每次 10 s,共 6 次(合计时间 1 min),功率 250 W,形成 1 mL 悬液,生物量约相当于 1 个琼脂块所含生物量,即为超声均质菌种。

1.2.3 显微观察 吸取 50 μL 超声均质菌种至载玻片,盖上盖玻片,于 10 倍物镜下观察并拍照。

1.2.4 菌落计数 吸取 200 μL 超声均质菌种悬液至 9 cm PDA 平板上,采用涂布棒均匀涂布,于 25 ℃下培养 5 d 后观察计数。

1.2.5 恒摇床发酵 吸取 3 mL 均质菌种至装有 50 mL 发酵培养基的 150 mL 摇瓶中,接种 3 个琼脂固体菌种作为对照。于 30 ℃、160 r/min 条件下培养 10 d。

1.2.6 静置加摇床两阶段发酵 吸取 3 mL 超声均质菌种至装有 50 mL 发酵培养基的 150 mL 摇瓶中,于 30 ℃下静置培养 1~4 d,之后于 160 r/min 摇床培养,合计培养 10 d,优化其

发酵;接种 3 个琼脂菌种作为对照,同时设琼脂块菌种恒摇床发酵。基于优化的两阶段发酵,接种量分别为 1~10 mL,接种至装有 50 mL 培养基的 150 mL 摇瓶中,以优化超声均质菌种接种量。

1.2.7 发酵参数分析 (1)生物量(干质量法)。将发酵液以 3 500 r/min 离心,收集菌丝并去除琼脂块培养基,上清用于 pH 值、胞外多糖含量、残葡萄糖含量的测定;菌丝用去离子水洗涤,离心收集,重复 2 次。菌丝转至 60 目纱布,于 70 ℃ 下烘干至恒质量,计算生物量。(2)残葡萄糖含量。采用 3,5-二硝基水杨酸法测定发酵液的残葡萄糖含量。(3) pH 值。采用数显 pH 计测定发酵液的 pH 值。(4)多糖含量。参照文献[7,18]进行测定。胞外多糖含量。吸取 10 mL 离心发酵液上清于透析膜(分子截留量 10 000 u)中,流动自来水透析 24 h 以去除葡萄糖等小分子,向收集的透析液加入 40 mL 95% 乙醇,充分混合后于 4 ℃ 冰箱过夜。过夜沉淀液以 3 500 r/min 离心 10 min 并弃上清,将沉淀悬于 25 mL 1 mol/L NaOH 溶液,于 60 ℃ 下水浴 1 h,离心收集上清。胞内多糖:干菌丝于研钵中研碎,称取 100 mg 至 25 mL 1 mol/L NaOH 溶液,于 60 ℃ 下水浴 1 h,离心收集上清。采用苯酚-硫酸法测定 2 种上清液的多糖。

1.2.8 数据处理 采用 SPSS 16.0 软件对试验数据进行统计分析,作 *t* 检验分析,以 $P<0.05$ 为显著性差异。试验均重复 3 次,试验数据用“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 超声均质菌种显微观察

由灵芝琼脂固体菌种超声均质显微图(图 1)可知,菌种破碎完全,可看到均一性菌丝体及少量短菌丝。可见,超声波破碎是一种有效的琼脂固体菌种均质方法,可用于制备均一性菌种。此外,降低培养基琼脂含量可提高超声破碎效果并缩短超声时间。

2.2 超声均质菌种菌落计数

图 2 为琼脂固体菌种超声破碎悬液稀释后涂布平板培养菌落,菌落大小一致,每个琼脂块菌种超声后形成约 186.00 ± 11.35 个菌落,此为 1 mL 超声均质菌种发酵生长点。本试验条件(5 d 培养时间)下,相当数量的短菌丝片段

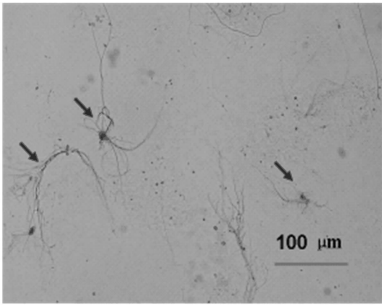


图1 灵芝琼脂固体菌种超声破碎显微观察

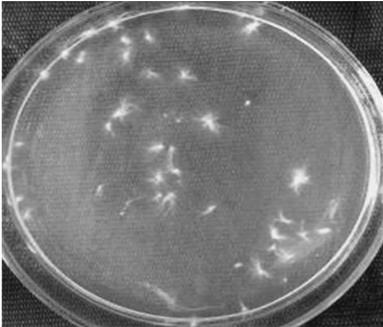


图2 灵芝超声均质菌种涂布平板培养菌落

可能未生长至可肉眼观察的菌落,因此超声均质菌种发酵生长点应高于该菌落值。

2.3 超声均质菌种恒摇床发酵

由超声均质菌种及琼脂块菌种恒摇床发酵结果(表 1)可知,超声法破碎制备的均一菌种发酵终点生物量和胞外多糖均低于琼脂块菌种。2 种菌种在葡萄糖利用方面也存在显著差异($P<0.05$),由于葡萄糖主要作为碳源提供细胞生长能量、参与合成细胞组成成分、合成代谢产物,超声均质菌种低葡萄糖消耗显示其弱发酵力,这与其发酵低生物量和多糖吻合。

超声均质菌种所含生长点远高于琼脂块菌种,但发酵液所形成菌球数量少甚至低于后者,很显然超声均质菌丝摇床过程发生聚集并降低其生长点,这是超声均质菌种发酵水平低的重要原因。此外,菌种超声破碎过程其细胞必然受损伤,或影响超声均质菌种发酵性能。

表 1 灵芝超声均质菌种和琼脂块菌种作为发酵接种物的摇瓶发酵结果

| 接种物 | 生物量 (g/L) | 胞内多糖含量 (g/L) | 胞外多糖含量 (g/L) | 终 pH 值 | 残葡萄糖含量 (g/L) |
|--------|-------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| 超声均质菌种 | $9.24 \pm 0.83a$ | $0.84 \pm 0.08a$ | $0.62 \pm 0.13a$ | $3.41 \pm 0.08a$ | $16.94 \pm 1.21a$ |
| 琼脂块菌种 | $13.37 \pm 1.64b$ | $1.11 \pm 0.07b$ | $1.16 \pm 0.16b$ | $3.60 \pm 0.12a$ | $14.88 \pm 1.75b$ |

注:超声均质菌种接种量为 3 mL,琼脂块菌种接种量为 3 个;同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$)。下表同。

2.4 超声均质菌种不同静置时间加摇床培养两阶段发酵

由超声均质菌种和琼脂块菌种作为接种物的不同静置时间加摇床培养两阶段发酵结果(表 2)可知,超声均质菌种不同静置时间加摇床发酵以静置 3 d、摇床培养 7 d 的生物量和胞外多糖含量最高,分别为 15.14、0.86 g/L,与其恒摇床发酵生物量、胞外多糖含量 9.24、0.62 g/L(表 1)相比分别提高 63.85%、38.71%。可见,静置 3 d、摇床 7 d 两阶段发酵是超

声均质菌种优化的发酵工艺。

作为对照,琼脂块菌种静置培养时间 1~3 d 加摇床培养两阶段发酵的生物量、胞外多糖含量均高于其恒摇床发酵($P<0.05$);静置时间(1~3 d)对发酵结果无显著影响($P>0.05$),但静置时间为 4 d 时生物量和胞外多糖明显下降。静置期(1~3 d)细胞可能以适应发酵环境和恢复性生长为主,即为迟滞期,细胞进入生长期后需要丰富的氧分及营养供应,

表 2 灵芝超声均质菌种及琼脂块菌种不同静置时间加摇床两阶段发酵结果

| 接种物 | 静置 (d) | 生物量 (g/L) | 胞内多糖含量 (g/L) | 胞外多糖含量 (g/L) | 终 pH 值 | 残葡萄糖含量 (g/L) |
|--------|-----------|---------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|
| 超声均质菌种 | 1 | 7.14 ± 0.23d | 0.64 ± 0.08e | 0.38 ± 0.03g | 3.74 ± 0.11a | 21.24 ± 0.72e |
| | 2 | 12.62 ± 0.37b | 1.16 ± 0.05b | 0.57 ± 0.06f | 3.54 ± 0.14a | 14.83 ± 0.84a |
| | 3 | 15.14 ± 0.46a | 1.37 ± 0.07a | 0.86 ± 0.09a | 3.64 ± 0.08a | 14.37 ± 0.44a |
| | 4 | 13.73 ± 0.41c | 1.29 ± 0.08a | 0.84 ± 0.07a | 3.44 ± 0.17a | 15.24 ± 0.62a |
| 琼脂块菌种 | 1 | 15.06 ± 0.28a | 1.34 ± 0.08a | 0.87 ± 0.13a | 3.54 ± 0.13a | 11.64 ± 0.73b |
| | 2 | 15.21 ± 0.37a | 1.29 ± 0.06a | 0.92 ± 0.16b | 3.64 ± 0.18a | 12.22 ± 0.92b |
| | 3 | 15.47 ± 1.13a | 1.42 ± 0.04c | 0.98 ± 0.24b | 3.78 ± 0.15a | 12.72 ± 0.67b |
| | 4 | 11.13 ± 0.51b | 1.12 ± 0.05b | 0.66 ± 0.13d | 4.24 ± 0.13b | 13.34 ± 0.48c |
| 琼脂块菌种 | 0 | 11.65 ± 1.05b | 0.96 ± 0.06d | 0.74 ± 0.07e | 3.63 ± 0.18a | 18.25 ± 0.79d |

而此时静置培养氧质及溶质传递有限,成为其发酵的制约因素。

2.5 超声均质菌种不同接种量静置加摇床(3 d/7 d)两阶段发酵

采用优化的静置加摇床两阶段发酵工艺(3 d 静置培养,7 d 摇床培养)对不同超声均质菌种接种量的发酵结果见表

3。由表 3 可知,随着接种量的增大,发酵终点生物量及胞外多糖含量相应提高,于接种量为 7 mL(约相当于 7 个琼脂块菌种)时达到最高,生物量、胞外多糖含量分别为 17.43、1.27 g/L;进一步增大接种量,生物量、胞外多糖含量均未提高,表明该优化发酵工艺下超声均质菌种的优化接种量为 7 mL。

表 3 超声均质菌种不同接种量静置加摇床(3 d/7 d)两阶段发酵结果

| 接种量 | 生物量 (g/L) | 胞内多糖含量 (g/L) | 胞外多糖含量 (g/L) | 终 pH 值 | 残葡萄糖含量 (g/L) |
|-----|---------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|
| 1 | 9.65 ± 0.45a | 0.87 ± 0.08a | 0.46 ± 0.04a | 3.58 ± 0.08a | 20.41 ± 0.36a |
| 2 | 11.21 ± 0.13b | 1.01 ± 0.06b | 0.61 ± 0.11b | 3.46 ± 0.11a | 16.76 ± 0.84b |
| 3 | 15.46 ± 0.41c | 1.37 ± 0.07c | 0.91 ± 0.09c | 3.44 ± 0.13a | 14.24 ± 0.82c |
| 4 | 16.22 ± 0.25d | 1.37 ± 0.10c | 1.13 ± 0.12d | 3.58 ± 0.08a | 12.14 ± 0.46d |
| 5 | 16.69 ± 0.32d | 1.44 ± 0.08c | 1.23 ± 0.08e | 3.58 ± 0.08a | 10.32 ± 0.24e |
| 6 | 17.04 ± 0.24d | 1.51 ± 0.06d | 1.34 ± 0.07e | 3.58 ± 0.06a | 9.27 ± 0.47f |
| 7 | 17.43 ± 0.36e | 1.57 ± 0.05e | 1.27 ± 0.09e | 3.58 ± 0.05a | 8.17 ± 0.27g |
| 8 | 17.44 ± 0.43e | 1.47 ± 0.07d | 1.36 ± 0.08e | 3.58 ± 0.04a | 8.03 ± 0.31g |
| 9 | 17.30 ± 0.29e | 1.34 ± 0.05c | 1.34 ± 0.11e | 3.58 ± 0.03a | 7.86 ± 0.19g |
| 10 | 17.34 ± 0.33e | 1.37 ± 0.09c | 1.28 ± 0.07e | 3.61 ± 0.07a | 8.06 ± 0.25g |

3 讨论

超声波是指频率为 $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^9$ Hz 的声波,是机械波的一种,因其超越了人类听觉的上限而被称为超声波。超声波在生物研究中的应用主要以细胞破碎^[19-20]、成分辅助提取^[21-23]为主。细胞破碎是利用超声波在液体中的空化作用产生密集小气泡,依靠小气泡的迅速炸裂将细胞破碎。本研究表明,超声波可有效破碎灵芝琼脂固体菌种。传统的搅拌法通过高速搅拌子产生巨大的机械剪切力将细胞破碎,相比之下,超声波法具有使用方便快捷、不易污染、安全性高等优点,且对细胞的损伤可能较小。超声探头(变幅杆)易与生物反应器集成,由此可实现均一性菌种的即时制备,减少污染发生,使高均一性和高纯度液体菌种发酵生产成为现实。

本研究利用超声波破碎技术成功制备高均一性、高生长点的灵芝菌种,但其作为接种物摇床发酵的生物量和胞外多糖产率低于未破碎琼脂块菌种。主要因为超声均质菌种摇床过程菌丝发生聚集现象,降低了其发酵生长点;此外,灵芝细胞超声破碎时受到损伤,这 2 种不利因素制约了其发酵水平。琼脂块菌种的起始生长点较少,但摇床培养过程中其自身逐渐碎片化,且新生长菌丝于原菌种脱落为新生长点,发酵液生

长点不断增多。尽管摇床发酵时琼脂块菌种的生长点少,但其发酵水平仍高于超声均质菌种。

两阶段发酵工艺是一种广泛应用于工业生产及科学研究的发酵技术。根据细胞生长及目标产物生物合成条件的差异,两阶段发酵有多种不同的调控模式,以最大化目标产物的合成。例如,ε-聚赖氨酸(ε-polylysine)两阶段 pH 值发酵,细胞生长期 pH 值控制在 5.0 以上,ε-聚赖氨酸合成期 pH 值控制为 4.0^[24];凝胶多糖(curdlan)两阶段细胞密度控制发酵,前期采用高密度发酵技术,凝胶多糖合成阶段采用低细胞密度^[25];虾青素(astaxanthin)发酵生产葡萄糖浓度采用两阶段控制方式,生长期、合成期分别为 20、50 g/L^[26]。

崔建东等研究发现,冬虫夏草多糖摇动加静置两阶段发酵,摇动培养 115 h 后静置培养 120 h 最优,多糖产量分别为摇动培养、静置培养的 1.5、2.0 倍^[27]。Fang 等采用先摇动培养 4 d、后静置培养 12 d 的发酵方法,灵芝菌丝灵芝酸由恒摇床发酵的 0.136 mg/g 提高至 0.319 mg/g^[28]。Bigelis 等采用静置培养 7 d、摇动培养 7 d 的两阶段发酵工艺,使抗癌疾先导化学物 Flavomannin 产率提高 10~100 倍^[29]。本研究针对超声均质菌种传统恒摇床过程中菌丝发生聚集的现象,采用先静置培养以避免和减轻菌丝聚集,从而维持其多发酵生长

点,使发酵水平大幅提高。

4 结论

超声波破碎可有效均质化灵芝琼脂固体菌种,每个琼脂块(直径为0.5 cm)菌种超声破碎可形成186.00个菌落。

采用超声波破碎制备的均一性菌种,其摇床发酵生物量和胞外多糖低于传统琼脂块菌种;静置加摇床两阶段发酵以静置3 d、摇床振荡培养7 d为最优发酵工艺。

参考文献:

- [1] Paterson R R. Ganoderma—a therapeutic fungal biofactory[J]. Phytochemistry, 2006, 67(18): 1985–2001.
- [2] Xu J W, Zhao W, Zhong J J. Biotechnological production and application of ganoderic acids[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(2): 457–466.
- [3] 刘高强, 赵艳, 王晓玲, 等. 灵芝多糖的生物合成和发酵调控[J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 198–205.
- [4] 刘高强, 丁重阳, 章克昌, 等. 药用昆虫蛭螂对灵芝发酵和抗小鼠肝癌活性的影响[J]. 生物工程学报, 2009, 25(6): 880–886.
- [5] Baek S, Kim Y, Yong H, et al. Antitumor activities of the proteoglycans from the mycelium of *Ganoderma lucidum* IY009[J]. Yakhak Hoechi, 2001, 45(6): 641–649.
- [6] 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[J]. Anticancer Research, 2002, 22(6A): 3309–3318.
- [7] Tang Y J, Zhong J J. Fed–batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(1–2): 20–28.
- [8] Sone Y, Okuda R, Wada N, et al. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing fermentation of mycelium of *Ganoderma lucidum*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1985, 49: 2641–2653.
- [9] Wagner R, Mitchell D A, Sasaki G L, et al. Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides[J]. Food Technology and Biotechnology, 2003, 41(4): 371–382.
- [10] Xu P, Ding Z Y, Qian Z, et al. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 42(4): 325–331.
- [11] 刘高强, 丁重阳, 章克昌. 蛭螂对灵芝发酵菌丝体生长和三萜产物形成影响[J]. 菌物学报, 2008, 27(5): 757–762.
- [12] 高兴喜, 姚强, 王磊, 等. 真菌激子对灵芝液体发酵生产多糖和三萜类物质的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 309–313.
- [13] Yang F C, Ke Y F, Kuo S S. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake–flask cultures[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27(3/4/5): 295–301.
- [14] Yang F C, Yang M J, Cheng S H. A novel method to enhance the mycelia production of *Ganoderma lucidum* in submerged cultures by polymer additives and agitation strategies[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2009, 40(2): 148–154.
- [15] Park J P, Kim S W, Hwang H J. Stimulatory effect of plant oils on the exo–biopolymer production in *Cordyceps militaris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(3): 250–255.
- [16] Xing Z T, Cheng J H, Tan Q, et al. Effect of nutritional parameters on laccase production by the culinary and medicinal mushroom, *Gri-fola frondosa*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 22(11): 799–806.
- [17] Lee W Y, Park Y, Ahn J W, et al. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma ap-planatum*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(2): 249–254.
- [18] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350–356.
- [19] 超瑞香, 王大红, 牛生洋, 等. 超声波细胞破碎法检测嗜酸乳杆菌–半乳糖苷酶活力的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 47–50.
- [20] 尤鑫, 庞美霞, 徐艺青. 超声波破胞条件对猪血血红素提取效果的影响[J]. 北京农学院学报, 2013, 28(3): 69–71.
- [21] 豆亚静, 张晓龙, 常丽新, 等. 响应面优化超声波法提取黑豆异黄酮的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 259–263.
- [22] 常丽新, 贾长虹, 赵永光, 等. 超声波辅助法提取月季花红色素的最佳工艺研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(4): 279–281.
- [23] 王琳, 赵荷娟, 魏启舜, 等. 双孢蘑菇子实体多糖的响应面法优化提取及其纯化[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(5): 1139–1146.
- [24] Kahar P, Iwata T, Hiraki J, et al. Enhancement of polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 91(2): 190–194.
- [25] 马立伟, 詹晓北, 吴剑荣. 基于高密度培养的两阶段发酵技术生产热凝胶的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(5): 39–44.
- [26] 鲁明波, 朱蕤, 周蓬蓬, 等. 两阶段法培养红法夫酵母生产虾青素[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(8): 65–68.
- [27] 崔建东, 张思, 齐红彦. 冬虫夏草多糖合成两阶段培养的设计与优化[J]. 食品工业科技, 2012, 33(2): 182–184, 188.
- [28] Fang Q H, Zhong J J. Two–stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*[J]. Biotechnology Progress, 2002: 51–54.
- [29] Bigelis R, He H, Yang H Y, et al. Production of fungal antibiotics using polymeric solid supports in solid–state and liquid fermentation[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006, 33: 815–826.

更正 《江苏农业科学》2016年第44卷第9期第129–132页刊登的论文《苦荞株高及主茎分枝数的遗传相关分析》中,表1的表注中的“pH值”更正为“PH”。特此更正。

《江苏农业科学》编辑部