

蛹虫草富铁液体深层发酵条件的优化

李慧英

(南通理工学院, 江苏 南通 226002)

摘要: 蛹虫草和铁元素被证明对人体有着重要的生理作用。通过设计单因素和多因素正交试验, 探讨蛹虫草富铁液体深层发酵条件的优化。试验证实, 蛹虫草富铁液体深层发酵的最佳培养基配方为: 大豆粉 35 g/L、蔗糖 30 g/L、 KH_2PO_4 1.5 g/L、 MgSO_4 1.5 g/L、硫胺素 5×10^{-5} g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L。最佳培养条件为: pH6, 温度 26 °C, 发酵 3 d, 接种量 5 %, 装液量 100 mL/250 mL 三角瓶。在此发酵条件下, 测得富铁蛹虫草生物量为 18.93 g/L, 富集铁为 16.01 mg/g。

关键词: 蛹虫草; 富铁; 液体深层发酵; 优化

The Optimization of Submerged Fermentation Condition of Iron-riched *Cordyceps militaris*

LI Hui-ying

(Nantong Polytechnic College, Nantong 226002, Jiangsu, China)

Abstract: As *Cordyceps militaris* and iron element have been proved to have important physiological functions to human body. Through designing the single factor and multi-factor orthogonal experiments to explore the optimization of submerged fermentation condition of iron-riched *Cordyceps militaris*. The best culture medium formula of submerged fermentation had been determined by experiments as follows: soybean meal 35 g/L, sugar 30 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, MgSO_4 1.5 g/L, thiamine 5×10^{-5} g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L. The best culture condition had been achieved as follows: pH6, temperature 26 °C, fermentation 3 days, inoculation quantity 5 %, fluid volume 100 mL/250 mL of triangle flask. Under the optimal conditions of the submerged fermentation, it was measured that the biomass of iron-riched *Cordyceps militaris* was 18.93 g/L, and the enrichment of iron was 16.01 mg/g.

Key words: *Cordyceps militaris*; iron-riched; submerged fermentation; optimization

近年,冬虫夏草价格高涨,市场资源更加紧缺。由于其规模化人工培养还未实现,所以寻找冬虫夏草的替代品成为一种弥补途径。很多研究显示^[1-2],蛹虫草

中含有核苷类化合物(虫草素、腺苷、鸟苷、尿苷、肌苷等)、虫草多糖、虫草酸(D-甘露醇)、氨基酸、SOD 酶等多种生物活性物质,在抗炎、抗癌、抗菌、增强免疫等方面与冬虫夏草具有相仿的功效。目前,我国市场上已有 200 多家企业在开发和生产蛹虫草,且不良反应报道不多^[3],所以可用蛹虫草替代冬虫夏草。对蛹虫草的

作者简介:李慧英(1982—),女(汉),讲师,硕士,研究方向:生物制药。

- [7] 张远荣,蒋企洲.山楂叶黄酮的抗氧化作用[J].药学与临床研究, 2011,19(3):287-288
- [8] 刘俊芳,连建学,李昌俊,等.山楂叶总黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用研究[J].中国药房, 2011, 22 (35):3277-3280
- [9] 高婷婷,韩帅,刘玉平,等.固相萃取结合 GC-MS 分析鲜山楂果肉中的挥发性成分[J].食品科学, 2013, 34 (20):144-146
- [10] 高婷婷,孙洁雯,杨克玉.SDE-GC-MS 分析鲜山楂果肉中的挥发性成分[J].食品科学技术学报,2015, 33(3): 22-27
- [11] 冷检,秦文斌,秦正龙.山楂挥发性组分色谱保留时间的定量构效

- 关系研究[J].食品研究与开发,2015, 36(15): 105-108
- [12] 孙琳娟,李晓颖,陈敏,等.山楂浆与不同加工方式山楂粉中挥发性成分分析[J].食品与发酵工业,2016,42(2): 164-171
- [13] 缪恩铭,耿永勤,杨叶昆,等.几种烟用香精香料热裂解产物、挥发性成分的分析比较[J].安徽农业科学,2012, 40(14):8205-8209
- [14] 张峻松,张文叶,刘程毅,等.生物技术制备的天然山楂香料的化学成分分析[J].精细化工,2006,23(10): 977-979,1013

收稿日期:2016-07-18

研究文献较多,但蛹虫草富铁的培养还鲜见报道。铁作为人体最重要的微量元素之一,在体内含量最高。一个成人每天需吸收 1 mg 以上的铁才可以满足生理需求^[4]。本研究通过试验,优化蛹虫草富铁液体深层发酵的营养及培养条件,为其放大培养提供借鉴。

1 材料

1.1 菌种

蛹虫草菌种来自中国科学院北京微生物研究所菌种保藏中心。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基

PDA 培养基(g/L):土豆 200 g 煮沸 15 min 八层纱布过滤,葡萄糖 20,硫胺素 5×10^{-5} , MgSO_4 1.5, KH_2PO_4 1.5,琼脂粉 20,调整初始 pH6。121 °C 下灭菌 20 min。

1.2.2 种子培养基

PDA 优化培养基(g/L):土豆 200 g 煮沸 15 min 八层纱布过滤,葡萄糖 20,蛋白胨 20,硫胺素 5×10^{-5} , KH_2PO_4 1.5, MgSO_4 1.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3,调整初始 pH6。121 °C 下灭菌 20 min。

1.2.3 摇瓶发酵培养基

同 1.2.2 种子培养基。

2 方法

2.1 蛹虫草培养

母种斜面培养:接种环划线接种 PDA 斜面,26 °C 培养 5 d~7 d。

液体种子培养:接种环划线接种 PDA 平板,26 °C 培养 5 d~7 d。切取平板菌两小块(约 8 mm²)于装液量 100 mL/250 mL 三角瓶中,26 °C、150 r/min 摇床培养 48 h 至菌液清亮(出现稠密且大小均匀的菌丝球)。

发酵培养:接种量 5%,在装液量 100 mL/250 mL 三角瓶中,26 °C、150 r/min 下,培养 3 d。

2.2 富铁蛹虫草菌丝生物量的测定及菌丝体粉的制备

据前期蛹虫草耐铁试验结果,在发酵培养基中添加 0.3 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 进行蛹虫草液体深层发酵。发酵液离心 5 min(转速 10 000 r/min),倾去上清液,将菌丝球捣碎至泥状,加去离子水 10 mL,再离心 5 min(转速 10 000 r/min),如此反复 3 次。将收集的菌丝置于干燥箱中烘干至恒重,称干重即为生物量。粉碎菌丝过 60 目筛,得到的菌丝体粉用于其他有效成分测定。

2.3 菌丝铁含量测定

用邻二氮菲比色法测定^[5]。

2.4 单因素试验

2.4.1 碳源种类及浓度对蛹虫草生物量和富集铁的影响

在蛹虫草发酵培养基中,分别添加 20 g/L 的葡萄糖、果糖、乳糖、糊精、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉替代基础培养基的碳源,发酵培养 3 d,测定菌丝体的生物量和富集铁,确定出最优碳源。设置最优碳源浓度分别为 10、20、30、40、50 g/L 进行试验,确定最佳浓度。

2.4.2 氮源种类及浓度对蛹虫草生物量和富集铁的影响

菌种液体深层发酵时添加的氮源分无机氮和有机氮,大多数菌种在无机氮中长势没有有机氮好^[5-7]。蛹虫草培养基中添加最优碳源,分别添加大豆粉、蚕蛹粉、蛋白胨、酵母浸膏、玉米浆 5 种有机氮源,于 26 °C,转速 150 r/min 下发酵培养 3 d,测定菌丝体的生物量和富集铁,确定最优氮源。调整培养基中最优氮源浓度为 10、20、30、40、50 g/L 进行试验,确定最佳浓度。

2.4.3 发酵温度对蛹虫草生物量和富集铁的影响

培养基中添加最优碳源、氮源,蛹虫草培养的初始温度分别调整为 22、24、26、28、30 °C,在 150 r/min 转速下发酵 3 d,测定蛹虫草的生物量和富集铁,确定最佳培养温度。

2.4.4 接种量对蛹虫草生物量和富集铁的影响

培养基中添加最优碳源、氮源,调整最佳培养温度,分别在培养基中接入 1%、3%、5%、7%、10% 的接种量,150 r/min 转速下发酵 3 d,测定不同接种量下富铁蛹虫草的生物量和富集铁,确定富铁蛹虫草的最佳接种量。

2.4.5 装液量对蛹虫草生物量和富集铁的影响

在最优碳源、氮源、温度及接种量条件下,分别装入 250 mL 三角瓶的 60、80、100、120、140 mL 容量的发酵液,150 r/min 转速下发酵 3 d,测定不同装液量下富铁蛹虫草菌丝体的生物量和富集铁,确定出富铁蛹虫草培养的最佳装液量。

2.4.6 培养基 pH 值对蛹虫草生物量和富集铁的影响

在最优碳源、氮源、温度、接种量及装液量条件下,分别调整培养基的初始 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0,150 r/min 转速下发酵 3 d,测定不同初始 pH 值培养基的蛹虫草的生物量和富集铁,确定出富铁蛹虫草培养基的最佳初始 pH 值。

2.5 多因素正交试验

根据单因素试验结果进一步设计正交试验以优化蛹虫草的培养。

3 结果与分析

3.1 碳源的影响

分别添加 20 g/L 的不同碳源培养富铁蛹虫草,测定其菌丝生物量和富集铁结果见图 1 和图 2。

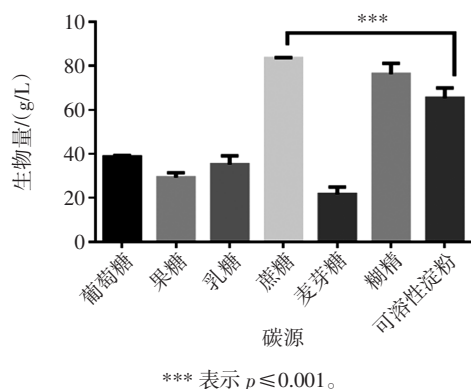


图 1 不同碳源对生物量的影响

Fig.1 Effect of different carbon sources on the biomass

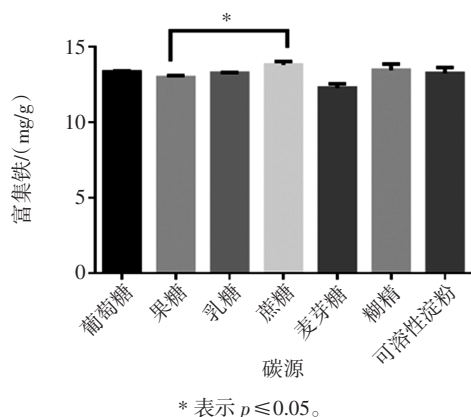


图 2 不同碳源对富集铁的影响

Fig.2 Effect of different carbon sources on the enrichment of iron

如图 1 和图 2 所示,不同碳源对蛹虫草富集铁的影响不大,但对其生物量影响较大。以生物量为考察指标时,添加不同碳源富铁蛹虫草的生物量大小依次为:蔗糖>糊精>可溶性淀粉>葡萄糖>乳糖>果糖。以富集铁为考察指标时,添加不同碳源富铁蛹虫草的富集铁大小依次为:蔗糖>糊精>葡萄糖>乳糖>可溶性淀粉>果糖。

从菌丝球长势看,蔗糖作为碳源菌丝球最大,菌丝球密度高,发酵液也比较清澈。而可溶性淀粉和糊精做为碳源时,发酵液较黏稠,有较多碳源沉淀,影响了虫草生物量的测定。综上所述,选蔗糖作为最优碳源。

富铁蛹虫草培养基中分别设置蔗糖浓度为 10、20、30、40、50 g/L 进行试验,测定富铁蛹虫草的生物量和富集铁结果如图 3 和图 4。

由图 3 所知,以生物量为考察指标时,添加不同浓

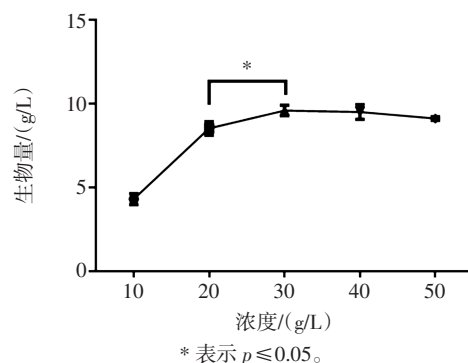


图 3 不同碳源浓度对生物量的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of carbon sources on the biomass

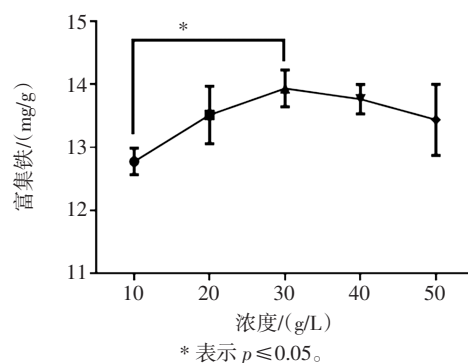


图 4 不同碳源浓度对富集铁的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of carbon sources on the enrichment of iron

度蔗糖富铁蛹虫草的生物量依次为:30 g/L>40 g/L>50 g/L>20 g/L>10 g/L。由图 4 所知,以富集铁为考察指标时,添加不同浓度蔗糖富铁蛹虫草的富集铁依次为:30 g/L>40 g/L>20 g/L>50 g/L>10 g/L。由图判断,蔗糖浓度的变化对蛹虫草富集铁的影响不明显,对生物量的影响相对明显。综合考虑,选择蛹虫草富铁过程中蔗糖浓度添加 30 g/L 最佳。

3.2 氮源的影响

富铁蛹虫草培养基中添加 30 g/L 不同种类的有机氮源,测得生物量和富集铁如图 5 和图 6 所示。

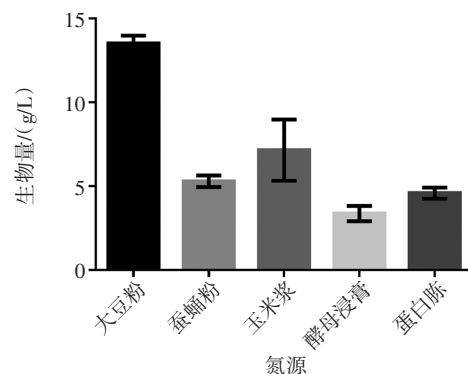


图 5 不同氮源对生物量的影响

Fig.5 Effect of different nitrogen sources on the biomass

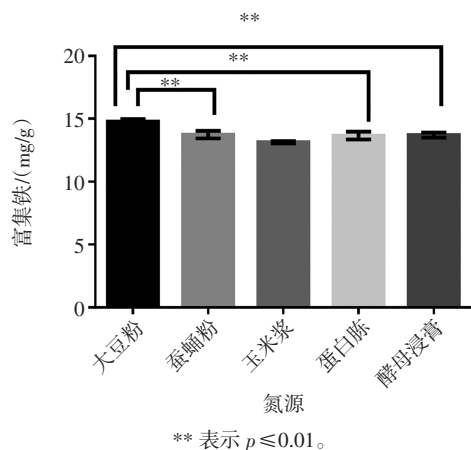


图6 不同氮源对富集铁的影响

Fig.6 Effect of different nitrogen sources on the enrichment of iron

从试验结果可知,不同的氮源对发酵蛹虫草的生物量影响比较大,但对蛹虫草富集铁元素的影响相对较小。从图5来看,不同氮源对生物量的影响依次为:大豆粉>玉米浆>蚕蛹粉>蛋白胨>酵母浸膏。从图6来看,不同氮源对富集铁的影响依次为:大豆粉>蚕蛹粉>蛋白胨>酵母浸膏>玉米浆。

观察蛹虫草的长势,大豆粉为氮源时长势最好,玉米浆为氮源时长势最差。以玉米浆为氮源生物量较高,因为发酵液较黏稠不能与菌丝球很好的分离造成的。综合考虑,判定以大豆粉为氮源最优。

为了考察大豆粉浓度变化对富铁蛹虫草的生物量、富集铁和生长的影响,本试验在发酵培养基中分别添加浓度为10、20、30、40、50 g/L的大豆粉,测定富铁蛹虫草的生物量和富集铁,结果如图7和图8所示。

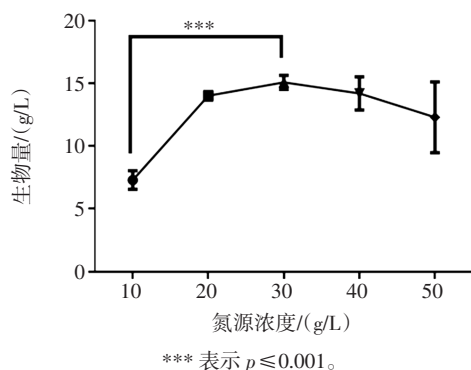


图7 不同氮源浓度对生物量的影响

Fig.7 Effect of different concentrations of nitrogen sources on the biomass

由图7所示,大豆粉浓度为30 g/L时,蛹虫草的生物量最大。图8所示,大豆粉浓度为40 g/L时,蛹虫草富铁量最高。大豆粉浓度为30 g/L或40 g/L,蛹虫草的富集铁相差不大,所以选择培养基中大豆粉的最佳浓度为30 g/L。

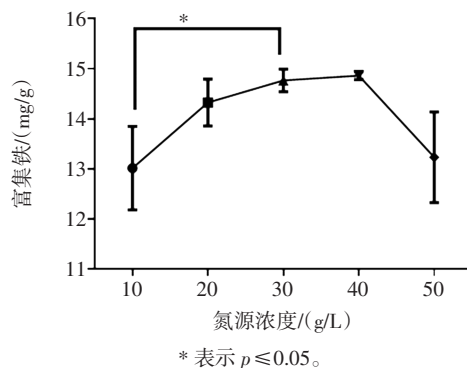


图8 不同氮源浓度对富集铁的影响

Fig.8 Effect of different concentrations of nitrogen sources on the enrichment of iron

3.3 温度的影响

发酵液初始温度不同,富铁蛹虫草的生物量和富集铁变化不大,结果如图9和图10。

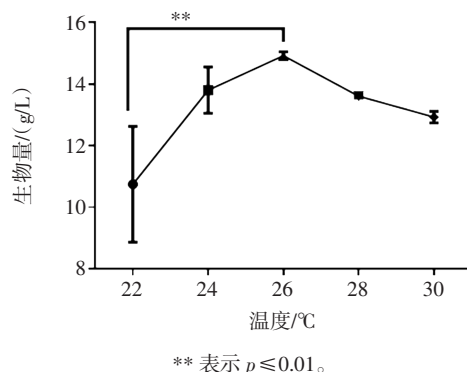


图9 不同温度对生物量的影响

Fig.9 Effect of different temperature on the biomass

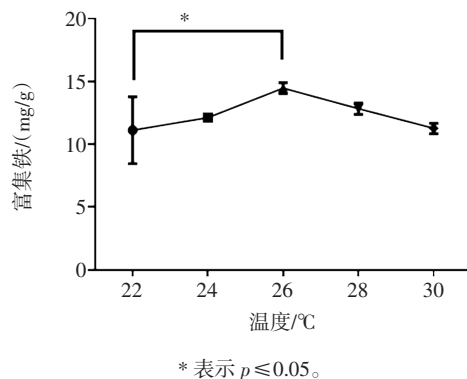


图10 不同温度对富集铁的影响

Fig.10 Effect of different temperature on the enrichment of iron

如图9和图10所示,发酵温度改变时,温度从22 °C升高到26 °C时,蛹虫草菌丝的生物量和富集铁都趋缓升高,继续升高温度,蛹虫草菌丝生物量和富集铁值都逐渐下降,26 °C时菌丝生物量和富集铁都达到最大。其中24 °C时,平行试验中有一组数据生物量和富集铁都相对其他两组数据偏小,分析可能是菌种污染

影响了蛹虫草的生长。因此,富铁蛹虫草培养确定 26 ℃ 为最适温度。

3.4 接种量的影响

图 11 和图 12 为分别以 1 %、3 %、5 %、7 %、10 % 的接种量培养富铁蛹虫草时的生物量和富集铁的变化图。

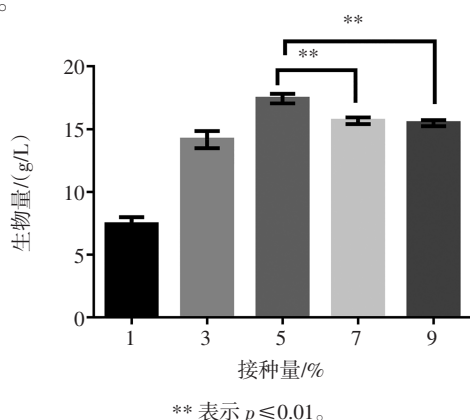


图 11 接种量对生物量的影响

Fig.11 Effect of inoculum on the biomass

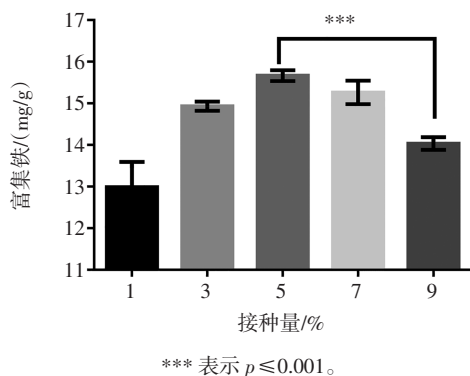


图 12 接种量对富集铁的影响

Fig.12 Effect of inoculum on the enrichment of iron

由图 11 和图 12 可知,接种量达到 5 %时,富铁蛹虫草的富集铁和生物量都达到最大值,而随着接种量的降低或升高,生物量和富集铁都会不同程度的降低。所以,蛹虫草富铁培养时选择 5 %的接种量最适合。

3.5 装液量的影响

在 250 mL 三角瓶中分别装入 60、80、100、120、140 mL 的培养液培养富铁蛹虫草,结果如图 13 和图 14。

由图 13 和图 14 可知,装液量的多少也会影响蛹虫草生物量和富集铁,装液量 100 mL/250 mL 时,生物量和富集铁达到最大值,所以选择 100 mL/250 mL 的装液量最适。

3.6 初始 pH 值的影响

将蛹虫草的培养基初始 pH 值分别调整为 4、5、6、7、8 时,结果蛹虫草培养的生物量和富集铁如图 15 和图 16。

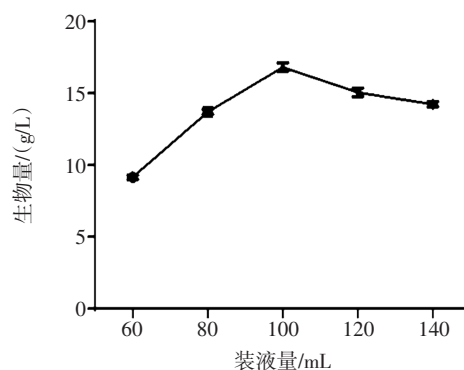


图 13 装液量对生物量的影响

Fig.13 Effect of liquid volume on the biomass

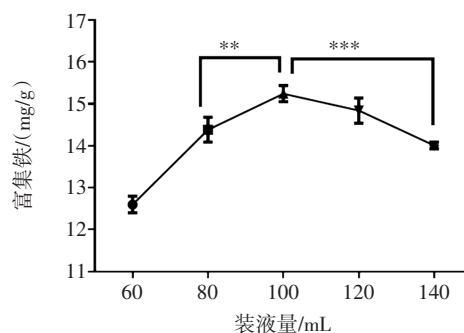


图 14 装液量对富集铁的影响

Fig.14 Effect of liquid capacity on the enrichment of iron

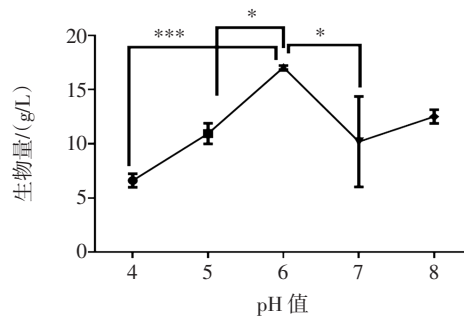


图 15 pH 值对生物量的影响

Fig.15 Effect of pH on the biomass

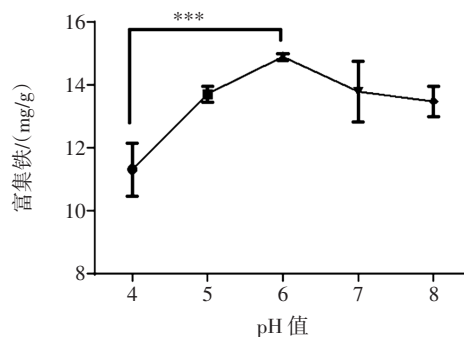


图 16 pH 值对富集铁的影响

Fig.16 Effect of pH on the enrichment of iron

由图 15 和图 16 可知,当初始 pH 值在 4~6 时,蛹虫草的菌丝体干重和富集铁含量随着初始 pH 的升高而增大;当初始 pH 值达到 6 时,蛹虫草的菌丝体干重和富集铁量均达到最大;当初始 pH 值在 6~8 时,蛹虫草的菌丝体干重和富集铁量随着初始 pH 值的升高而减小。因此确定 pH6 为最适 pH 值。

3.7 多因素正交试验

蛹虫草富铁的单因素试验结果显示,大豆粉、蔗糖、接种量、装液量这 4 个影响因素对富铁蛹虫草的生物量和富集铁影响较显著。为了进一步考察 4 个因素不同水平对蛹虫草富铁发酵的影响,确定出最佳培养基组合,本试验采用每个因素设置 3 个水平,其因素水

平如表 1,设计正交表 $L_9(3^4)$ 安排正交试验。

$L_9(3^4)$ 正交试验及其结果如表 2,生物量为考察指标的各因素水平趋势图如图 17 所示,富集铁为考察指标的各因素水平趋势图如图 18 所示。

表 1 正交试验因素水平表 $L_9(3^4)$

Table 1 The $L_9(3^4)$ table of factors and levels of orthogonal experiments				
水平	因素			
	A 大豆粉/(g/L)	B 蔗糖/(g/L)	C 接种量/%	D 装液量/mL
1	25	20	4	90
2	30	30	5	100
3	35	40	6	110

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验及其结果表

Table 2 The $L_9(3^4)$ table of orthogonal experiments and its results												
试验号	因素				生物量/(g/L)				富集铁/(mg/g)			
	A	B	C	D	I	II	III	均	I	II	III	均
1	1	1	1	1	3.56	3.78	4.17	3.84	11.25	13.38	12.98	11.87
2	1	2	2	2	6.38	6.07	5.87	6.11	13.31	13.18	13.35	13.28
3	1	3	3	3	5.11	5.29	5.42	5.27	12.03	12.98	13.04	13.02
4	2	1	2	3	12.06	13.08	13.10	12.75	13.59	13.85	13.61	13.68
5	2	2	3	1	15.08	14.86	14.83	14.92	13.76	13.86	14.13	13.92
6	2	3	1	2	14.28	14.66	14.91	14.62	14.98	15.17	15.07	15.07
7	3	1	3	2	15.20	15.08	15.34	15.21	15.19	15.21	15.25	15.22
8	3	2	1	3	16.75	16.69	16.96	16.80	15.57	15.81	15.64	15.67
9	3	3	2	1	16.80	16.29	16.69	16.59	16.02	15.73	15.97	15.91
生物量	K ₁	45.64	95.38	105.76	106.05							
	K ₂	126.86	113.48	106.34	107.79							
	K ₃	145.81	109.45	106.21	104.46							
	κ ₁	5.07	10.60	11.75	11.78							
	κ ₂	14.10	12.61	11.82	11.98							
	κ ₃	16.20	12.16	11.80	11.61							
极差		11.13	2.01	0.06	0.37							
主次顺序		A>B>D>C										
较优水平		A ₃	B ₂	C ₂	D ₂							
富集铁	K ₁	114.50	122.30	127.84	125.07							
	K ₂	128.02	128.61	128.60	130.71							
	K ₃	140.38	131.98	126.44	127.11							
	κ ₁	12.92	13.59	14.20	13.90							
	κ ₂	14.22	14.29	14.29	14.52							
	κ ₃	15.60	14.66	14.05	14.12							
极差		2.88	1.08	0.08	0.40							
主次顺序		A>B>D>C										
优水平		A ₃	B ₃	C ₂	D ₂							

蛹虫草富铁培养的生物量和富集铁的极差计算结果见表 2,比较各 R 值大小,可见 $R_A>R_B>R_D>R_C$,所以因素对试验指标影响的主→次顺序是 ABDC。即大豆粉影响最大,其次是蔗糖,再次是装液量,而接种量的影响较小。大豆粉、蔗糖、装液量是富铁蛹虫草培养中生物量和富集铁的主要影响因素,而接种量是次要因素。

见因素水平趋势图 17 和图 18,以生物量为考察指标,较优水平组合为 $A_3B_2C_2D_2$ 。以富集铁作为考查指标,较优水平组合为 $A_3B_3C_2D_2$ 。正交试验的主要指标是生物量,次要指标是富集铁,两指标都是越大越好。对照表 2,最优组合 $A_3B_2C_2D_2$ 在已做过的试验中未有出现,与它比较接近的是第 8 号和 9 号试验。

表 3 和表 4 为生物量和富集铁的方差分析结果。

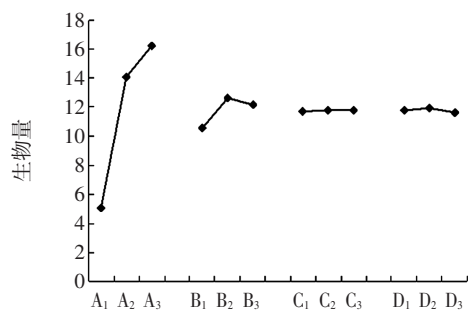


图 17 生物量为考察指标的因素水平趋势图

Fig.17 The level factor trend by biomass as index

可以看出,大豆粉、蔗糖、装液量对于蛹虫草富铁

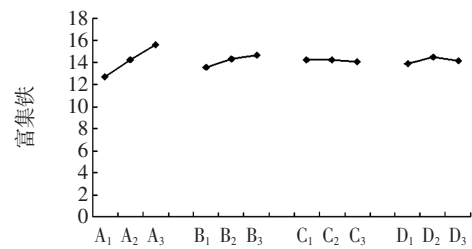


图 18 富集铁为考察指标的因素水平趋势图

Fig.18 The level factor trend by the enrichment of iron as index

培养的生物量和富集铁都有显著的影响,大小依次为大豆粉>蔗糖>装液量,而接种量对蛹虫草富铁培养的

表 3 生物量方差分析表

Table 3 The variance analysising table of biomass

方差来源	离差平方和	自由度	平均离差平方和	F 值	F 临界值	显著性	优方案
A	629.030	2	314.515	3685.723	$F_{0.05}(2, 18)=3.550$	**	A ₃
B	20.107	2	10.054	117.814	$F_{0.01}(2, 18)=6.010$	**	B ₂
C	0.021	2	0.011	0.123		无	C ₂
D	0.616	2	0.308	3.609		*	D ₂
误差	1.540	18					
总和	651.314	26					

注:表中 * 表示显著;** 表示高度显著。

表 4 富集铁方差分析表

Table 4 The variance analysising table of the enrichment of iron

方差来源	离差平方和	自由度	平均离差平方和	F 值	F 临界值	显著性	优方案
A	37.292	2	18.646	160.818	$F_{0.05}(2, 18)=3.550$	**	A ₃
B	5.354	2	2.677	23.089	$F_{0.01}(2, 18)=6.010$	*	B ₃
C	0.269	2	0.135	1.160		无	C ₂
D	1.805	2	0.903	7.793		*	D ₂
误差	2.090	18					
总和	46.810	26					

注:表中 * 表示显著;** 表示高度显著。

生物量和富集铁影响不大。所以也不能通过方差分析结果判断第 8 号试验和第 9 号试验哪个是最优方案。为了进一步验证分析结果,重新安排最优方案 A₃B₂C₂D₂ 的蛹虫草富铁培养试验,测的其生物量为 18.93 g/L,富集铁为 16.01 mg/g,高于正交试验的全部结果。得出,蛹虫草富铁培养的最佳组合为:大豆粉 35 g/L,蔗糖 30 g/L,接种量为 5 %,装液量为 100 mL/250 mL。

4 结论

通过设计单因素、多因素试验,研究了蛹虫草富铁液体摇瓶发酵过程中各营养条件和培养条件对蛹虫草生物量和富集铁的影响,确定蛹虫草富铁的最佳营养条件为:大豆粉 35 g/L,蔗糖 30 g/L,KH₂PO₄ 1.5 g/L,MgSO₄ 1.5 g/L,硫酸素 5×10⁻⁵ g/L, FeSO₄·7H₂O 0.3 g/L。最佳培养条件为:pH 6,培养温度 26 ℃,培养时间 3 d,接种量 5 %,装液量每 100 mL/250 mL 三角瓶。在此条件下,进行蛹虫草富铁的摇瓶发酵试验,测得富铁蛹

虫草的生物量为 18.93 g/L,富集铁为 16.01 mg/g,高于其他营养和培养条件下发酵的生物量和富集铁。为蛹虫草富铁大规模培养提供一定的借鉴。

参考文献:

- [1] 王奇.蛹虫草功效成分研究进展[J].辽宁师专学报, 2011,13(3): 103-106
- [2] 杨雨亭.蛹虫草与冬虫夏草营养及功效特性相似[N].中国食品报,2011-11-09(4)
- [3] 马吴伟,潘苏华.蛹虫草研究进展[J].亚太传统医药,2008,4(11): 148-150
- [4] 王雅利.铁的失衡与人体健康[J].中国食物与营养,2006(7):57-58
- [5] 陈九山.灵芝发酵、富铁条件优化及栽培[D].合肥:合肥工业大学, 2009:1-40
- [6] 袁玉兰,郭雪娜,张博润,等.高生物量富铁酵母菌的选育及其发酵条件的研究[J].工业微生物,2004,34(4):29-33
- [7] 袁红莉.高效富集镉菌株的筛选及其富集特征[D].北京:中国农业大学,2003

收稿日期:2016-06-23