

植物生长调节剂促进蛹虫草液体表面培养生产虫草素

汤佳鹏¹, 汪建雄²

(1. 南通大学航海医学研究所, 生化与药学研究室, 江苏南通 226019;

2. 南通大学生命科学学院, 生物工程系, 江苏南通 226019)

摘要: 为进一步提高虫草素的产量, 研究了不同浓度的三十烷醇、赤霉素和 6-苄基腺嘌呤以及它们的组合对蛹虫草表面液体发酵生长及虫草素积累的影响。采用中心复合实验设计和响应面方法建立数学模型优化植物生长调节剂的组合。结果表明, 这三种植物生长调节剂对蛹虫草的生长及虫草素的积累均有不同程度地促进作用。单独使用时, 赤霉素的促生对蛹虫草作用最明显, 其最佳质量浓度为 10 mg/L。三十烷醇促进虫草素积累的作用最明显, 其最佳质量浓度为 0.6 mg/L。组合使用时, 0.55 mg/L 三十烷醇、22.64 mg/L 赤霉素与 1.69 mg/L 6-苄基腺嘌呤的组合是最有利于虫草素积累的组合, 虫草素最大产量达到 7.31 g/L。因此, 该植物生长调节剂的组合是有利于虫草素的积累。

关键词: 三十烷醇, 赤霉素, 6-苄基腺嘌呤, 蛹虫草, 液体表面培养, 虫草素

Plant growth regulators promote cordycepin production by liquid surface fermentation of *Cordyceps militaris*

TANG Jia-peng¹, WANG Jian-xiong²

(1. Department of Biochemistry and Pharmacy, Institute of Nautical Medicine, Nantong University, Nantong 226019, China;

2. Department of Bioengineering, School of Life Sciences, Nantong University, Nantong 226019, China)

Abstract: To further improve the cordycepin production, the effects of three plant growth regulators, triacontanol, gibberellin and 6-benzylaminopurine, and their combinations on mycelial growth of *Cordyceps militaris* and cordycepin accumulation were investigated in the surface liquid fermentation. Through central composite design and response surface method, a mathematical model was developed to identify the optimal value of plant growth regulators combination for high cordycepin production. The results showed that the three plant growth regulators can promote the growth of *Cordyceps militaris* and cordycepin accumulation to different degrees. When the three were used respectively, gibberellin exhibited the best growth promoting effect and the optimum concentration was 10 mg/L. The triacontanol exhibited the best cordycepin-producing effect and the optimum addition was 0.6 mg/L. The optimal combination of 0.55 mg/L triacontanol, 22.64 mg/L gibberellin and 1.69 mg/L 6-benzylaminopurine was the most favorable to cordycepin accumulation. Under the optimal conditions, the maximum cordycepin yield reached 7.31 g/L. Therefore, the combination of the plant growth regulators was favourable for cordycepin accumulation.

Key words: triacontanol; gibberellin; 6-benzylaminopurine; *Cordyceps militaris*; liquid surface culture; cordycepin

中图分类号: TS 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2018)10-0122-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.10.023

引文格式: 汤佳鹏, 汪建雄. 等. 植物生长调节剂促进蛹虫草液体表面培养生产虫草素[J]. 食品工业科技, 2018, 39(10): 122-127.

蛹虫草是一种历史悠久的著名中药, 现在作为新资源食品 and 一类新药已获得卫生部和国家食品药品监督管理局批准进入市场^[1]。虫草素是蛹虫草最重要的生理活性物质之一, 具有多种药理学活性, 包括免疫调节、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、降血脂等, 因此越来越受到人们的重视^[2]。目前, 蛹虫草液体发酵中虫草素分泌于胞外可直接进行提取, 优于固体发

酵而被广泛研究。钟建江等^[3]利用液体深层发酵和添加小分子效应物的方法, 虫草素产量达到 596.59 mg/L。路等学等^[4]利用振荡和静置的发酵方式液体发酵蛹虫草, 虫草素产量达到 936.225 μg/mL。Sakakibara 等^[5-8]通过长期研究利用离子束诱变菌株, 采用液体表面培养(即静置发酵)代替液体深层发酵, 添加前体物质, 优化培养基的方法, 虫草素产

收稿日期: 2017-10-16

作者简介: 汤佳鹏(1981-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 药用真菌发酵、次级代谢产物生物合成, E-mail: jtpang@ntu.edu.cn。

基金项目: 江苏省普通高校自然科学研究计划项目(16KJB530004); 南通市应用基础研究项目(MS12015066)。

量达到 14.3 g/L, 已经成为大规模蛹虫草发酵的主流。本实验室采用液体表面培养, 通过优化发酵培养基, 虫草素产量达到 6.5 g/L^[9], 但是液体表面发酵菌体生长缓慢, 且虫草素产量仍较日本水平低, 已经成为制约我国蛹虫草及虫草素进一步研究开发利用的瓶颈^[10]。

植物生长调节剂以其特殊的生理调控机制, 能够通过影响生物的生长发育, 达到增加产量、优化品质、代谢调节等目的, 已经在固态发酵和液体深层发酵蛹虫草中被深入研究^[11-14]。通过添加 2,4-二氯苯氧乙酸、萘乙酸能够促进虫草素的积累; 玉米素、吡啶乙酸的添加能够加快子实体生长及增加子实体多糖含量。三十烷醇是一种从蜂蜡中提取的天然的长碳链植物生长调节剂, 且作用靶点多元化, 既能增加细胞膜的透性, 又能激活葡萄糖-6-磷酸脱氢酶^[4]; 赤霉素是一种产自真菌赤霉菌的激素, 本研究所采用的菌株也属于真菌; 6-BA, 即 6-苄基腺嘌呤是一种腺嘌呤的衍生物, 而本研究的主要产物虫草素也是腺嘌呤的衍生物。另外, 这三种化合物均有作为真菌发酵(主要是担子菌)效应物的报道。

本文将不同浓度的三种植物生长调节剂三十烷醇(TRIA)、赤霉素(GA)和 6-苄基腺嘌呤(6-BA)加入到蛹虫草液体表面培养培养基中, 探究植物生长调节剂对蛹虫草菌丝生长和虫草素积累的影响规律, 并通过中心复合实验设计(CCD)和响应面方法优化植物生长调节剂添加组合, 以期提高虫草素的生产效率, 为蛹虫草发酵生产的规模化、工厂化提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌种和材料

蛹虫草(*Cordyceps militaris* CICC 14014) 中国工业微生物保藏中心; 斜面培养基: 马铃薯汁 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂 15 g/L、KH₂PO₄ 3 g/L、MgSO₄·7H₂O 1.5 g/L、V_{B1} 微量; 发酵培养基: 葡萄糖 42 g/L、蛋白胨 10 g/L、酵母膏 6 g/L、KH₂PO₄ 0.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、K₂HPO₄ 0.5 g/L、腺嘌呤 4.0 g/L、花生油 4% (V/V), 用 5 mol/L HCl 调节 pH 至 5.80; TRIA 上海麦克林生化科技有限公司; GA 和 6-BA 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 虫草素标准品购自中检所。

LDZX-75KBS 立式全自动灭菌锅 上海申安医疗器械厂; GNP-9080 隔水式恒温培养箱 上海三发科学仪器有限公司; SW-CJ-1BU 超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; PHS-3E 酸度计 上海精科雷磁仪器厂; LC-20AD 高效液相色谱仪 (SPD-20A 紫外检测器) 日本岛津。

1.2 实验方法

1.2.1 孢子悬液的制备 蛹虫草在斜面培养基上 25 ℃ 恒温培养 7~10 d 后, 用无菌水将孢子刮下, 经玻璃珠振荡 30 min 后, 用 4 层无菌纱布过滤, 收集孢子悬液, 利用血球计数板测定孢子浓度^[15], 并将孢子悬液浓度稀释到 1.0 × 10³ 个/mL。

1.2.2 蛹虫草液体表面培养 以 10% (V/V) 的接种量将孢子悬液接入到含有 50 mL 发酵培养基的

250 mL 三角瓶中, 充分振荡混匀。在 27 ℃ 静置培养 28 d。每组实验进行三次。

1.2.3 生物量和虫草素含量检测 取培养一定时间的发酵液, 10000 r/min 离心 10 min。上清液经适当稀释后利用高效液相色谱法检测虫草素浓度。色谱条件: 色谱柱为 Ultimate AQ-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为无水甲醇: 10 mmol/L KH₂PO₄ 溶液 = 15: 85, 柱温 40 ℃, 流速 1 mL/min, 进样量 20 μL, 检测波长为 260 nm。虫草素浓度的 HPLC 标准曲线方程为 Y = 4.8 × 10⁷ X - 129340 (Y, 峰面积; X, 虫草素浓度, g/L), 相关系数 R² 为 0.9997。虫草素含量根据标准曲线方程采用外标法计算。虫草素产量根据以下公式计算:

$$P = \frac{c \cdot V}{V_0}$$

式中: P 为虫草素产量, g/L; c 为虫草素含量, g/L; V 为三角瓶中收集的发酵液体积, mL; V₀ 为三角瓶中初始加入的培养基体积, mL。

离心得到的沉淀用水洗涤 3 遍, 110 ℃ 烘干至恒重, 计算生物量。

菌体比生长速率按以下公式计算:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

式中: μ 为菌体的比生长速率, d⁻¹; X 为菌体生物量, g/L; t 为培养时间, d。

1.2.4 植物生长调节剂的单因素实验 在发酵培养基中分别添加不同浓度的各种植物生长调节剂(表 1), 进行液体表面培养 28 d, 测定虫草素产量和生物量。

表 1 各种植物生长调节剂的加入终浓度

Table 1 The final concentration of various plant growth regulators added

植物生长调节剂		浓度 (mg/L)				
TRIA	0	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00
GA	0	10.00	20.00	30.00	40.00	50.00
6-BA	0	0.40	0.80	1.20	1.60	2.00

1.2.5 植物生长调节剂的中心复合设计 以虫草素产量为评价指标, 采用 3 因素中心复合设计优化蛹虫草液体表面培养中的植物生长调节剂组合, 将单因素实验的最优结果作为中心复合设计的中心点, 中心实验点设为 6 次, 因素水平见表 2。

表 2 植物生长调节剂中心复合设计实验因素编码水平表

Table 2 Coded and actual values of independent factors for the CCD of plant growth regulators

因素	水平				
	-1.68	-1	0	1	1.68
A TRIA (mg/L)	0.26	0.40	0.60	0.80	0.94
B GA (mg/L)	3.18	10.00	20.00	30.00	36.82
C 6-BA (mg/L)	0.93	1.20	1.60	2.00	2.27

1.2.6 数据处理 用 Design-Expert v8.0.6 对实验进行设计与数据回归分析。利用方差分析评估实验数

据的显著性。3D 图显示变量间相互作用对虫草素产量的影响。模型的准确性利用 R^2 来评价。拟合方程的统计显著性由方差分析中的 F 检验来评价。

2 结果与分析

2.1 TRIA 浓度对蛹虫草菌体生长和虫草素积累的影响

由图 1 可知,发酵初始的 0~8 d 菌体生长缓慢,为蛹虫草菌体生长的适应期。孢子进入发酵培养基中需要适应新的生长环境,因此该阶段菌体合成相应的酶类为快速生长做准备。TRIA 的加入对蛹虫草生长的适应期没有显著影响。发酵 8 d 后,菌体快速生长,进入快速生长期。发酵 12 d,对照组的菌体最大比生长速率为 0.376 d^{-1} ,0.2 mg/L TRIA 的加入使菌体最大,生长速率达到 0.459 d^{-1} (8 d),比对照组提高了 22.1%。发酵至 28 d 时,培养基中加入 0.2 mg/L TRIA 的菌体生物量达到 37.56 g/L,比对照组高出 130%。随着 TRIA 浓度的增加,菌体生物量逐渐下降。因此,为了促进蛹虫草菌体的生长,TRIA 的最佳加入量为 0.2 mg/L。TRIA 活性的作用部位可能在细胞膜上^[16],适当浓度的 TRIA 能够增加细胞膜的透性,促进氮源和碳源的吸收、转化,加快菌丝生长。但是浓度过高时,细胞膜透性减弱,营养吸收受到阻碍,会抑制菌体的萌发^[16]。

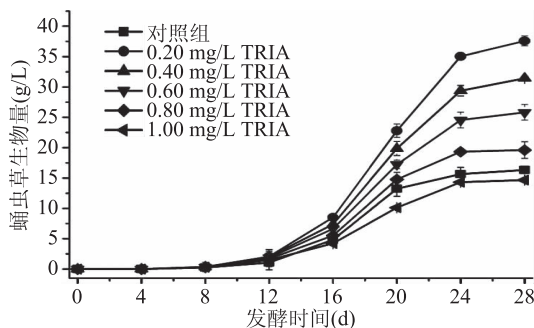


图 1 TRIA 对蛹虫草菌体生长的影响

Fig.1 Effect of TRIA on mycelial growth of *Cordyceps militaris*

由图 2 可知,随着发酵培养基中 TRIA 加入量的增加,虫草素产量也逐渐增加。当 TRIA 加入量为 0.6 mg/L 时,其促进虫草素合成的效果最佳,培养 28 d 虫草素产量达到 5.24 g/L,比对照组提高了 173%。当 TRIA 加入量继续增大时,虫草素产量又逐渐下降。TRIA 能激活菌体内的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶^[16],该酶是虫草素前体的合成途径(包括磷酸戊糖途径及核苷酸合成途径)的关键酶,因此适当浓度的 TRIA 能够促进虫草素的合成。

2.2 GA 浓度对蛹虫草菌体生长和虫草素积累的影响

由图 3 可知,对照组菌体的适应期为 8 d,而 GA 加入条件下,菌体适应期仅为 4 d。这说明 GA 的加入缩短了蛹虫草孢子萌发的适应期。同时,GA 的加入可以明显促进菌体生长。这可能是由于 GA 对细胞伸长和细胞分裂具有促进作用^[17]。发酵至 8 d,对照组的菌体比生长速率达到最大 (0.367 d^{-1}),而 10 mg/L GA 的加入将菌体比生长速率提高到

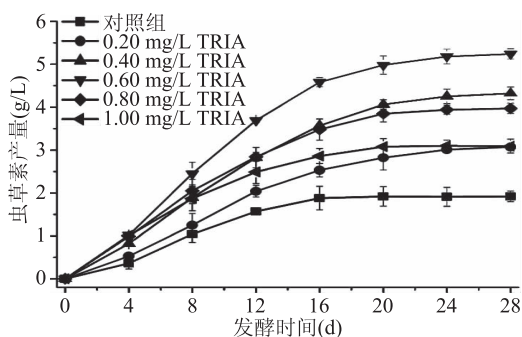


图 2 TRIA 对蛹虫草虫草素积累的影响

Fig.2 Effect of TRIA on cordycepin accumulation of *Cordyceps militaris*

0.634 d^{-1} (4 d)。当发酵培养基中加入 10 mg/L GA 时,菌体生长最旺盛,发酵至 28 d,生物量累积达到 40.66 g/L。但是随着 GA 浓度的继续增加,蛹虫草的生物量积累逐渐下降,即 GA 的促生作用仅在低浓度时最显著。

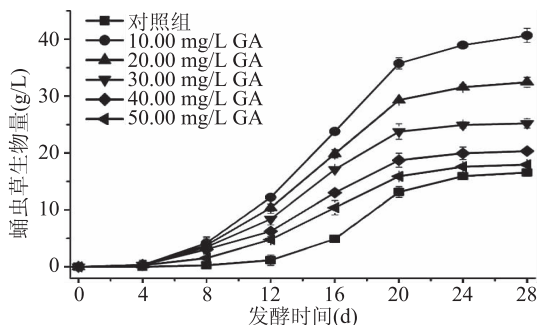


图 3 GA 对蛹虫草菌体生长的影响

Fig.3 Effect of GA on mycelial growth of *Cordyceps militaris*

由图 4 可知,除了促生作用之外,GA 也能促进虫草素的合成。当 GA 浓度为 0~20 mg/L 时,随着 GA 浓度的增大,虫草素产量呈上升趋势;当 GA 浓度超过 20 mg/L 时,随着 GA 浓度的增加,虫草素产量呈下降趋势。即 20 mg/L GA 对蛹虫草表面液体发酵合成虫草素的促进作用最明显。发酵至 28 d,虫草素的产量达到 3.16 g/L,比对照组提高了 65%。

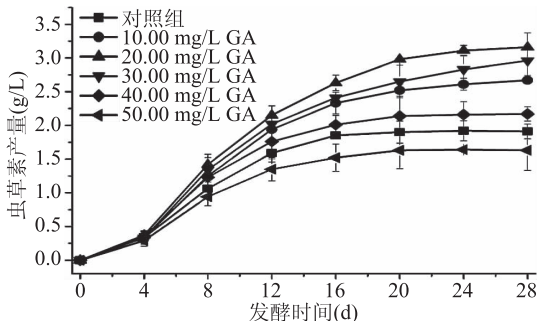


图 4 GA 对蛹虫草虫草素积累的影响

Fig.4 Effect of GA on cordycepin accumulation of *Cordyceps militaris*

2.3 6-BA 浓度对蛹虫草菌体生长和虫草素积累的影响

图 5 显示的是不同浓度的 6-BA 对表面液体发酵条件下蛹虫草菌体生长的影响。由图 5 可知,6-

BA 同 GA 一样,都有缩短蛹虫草孢子萌发适应期的作用。这可能是由于在担子菌生长过程中,6-BA 促进了菌体中核酸和蛋白的合成代谢^[18-19],从而促进孢子的生长发育。在一定浓度范围内,6-BA 能够促进菌体生长。当发酵培养基中含有 1.6 mg/L 6-BA 时,其促生作用最为显著。发酵 28 d,蛹虫草生物量达到 27.32 g/L。

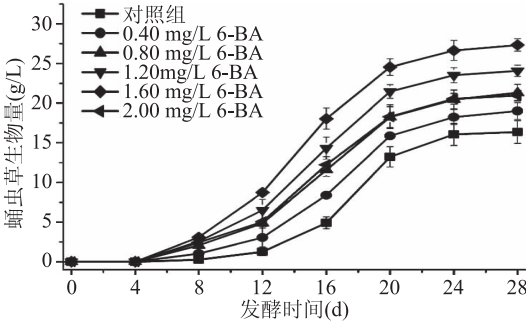


图5 6-BA 对蛹虫草菌体生长的影响
Fig.5 Effect of 6-BA on mycelial growth of *Cordyceps militaris*

另外,由图 6 可知,6-BA 也能够促进虫草素的积累。当发酵培养基中含有 0~1.6 mg/L 6-BA 时,随着 6-BA 加入量的增加,虫草素的积累也逐渐增加。当 6-BA 的浓度增加到 2.0 mg/L 时,虫草素产量反而有所下降。因此,为了提高虫草素的产量,单独添加 6-BA 时,6-BA 的最佳浓度为 1.6 mg/L。此时,发酵 28 d 的虫草素积累达到 4.36 g/L,比对照组高出 127%。

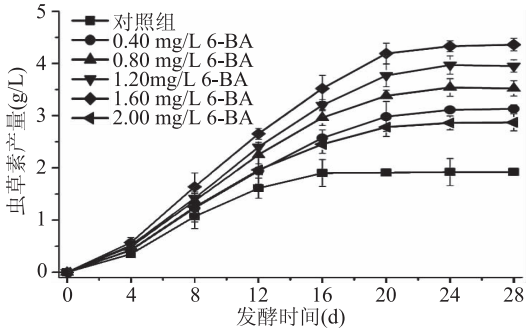


图6 6-BA 对蛹虫草虫草素积累的影响
Fig.6 Effect of 6-BA on cordycepin accumulation of *Cordyceps militaris*

2.4 中心复合实验

菌体生长是虫草素积累的前提,但菌体生长又与虫草素合成竞争性利用碳源和氮源。从上述单因素实验发现植物生长调节剂导致的菌体生长改变和虫草素积累变化,两者关系是复杂的。由单因素实验可知,分别单独加入 TRIA、GA、6-BA 时,加入量为 0.60、20.00 和 1.60 mg/L 时,均能获得较高的虫草素产量。因此,以此组合作为中心复合设计的中心点,利用 Design-Expert v8.0.6 软件设计中心复合响应面实验。实验设计及结果见表 3。

以虫草素产量为响应值,运用 Design-Expert v8.0.6 软件对表 3 中的实验结果进行二次回归分析,得到方程为 $Y = 7.21 - 0.25A + 0.40B + 0.29C - 0.13AB$

表3 中心复合实验设计及结果

Table 3 The results of the central composite experimental design

实验号	A	B	C	Y 虫草素产量(g/L)	
				实际值	预测值
1	-1	-1	-1	3.57 ± 0.15	3.55
2	1	-1	-1	4.31 ± 0.21	4.36
3	-1	1	-1	4.72 ± 0.12	4.67
4	1	1	-1	5.14 ± 0.08	4.96
5	-1	-1	1	5.10 ± 0.13	5.24
6	1	-1	1	3.95 ± 0.17	3.96
7	-1	1	1	6.31 ± 0.12	6.22
8	1	1	1	4.44 ± 0.09	4.43
9	-1.68	0	0	5.11 ± 0.23	5.05
10	1.68	0	0	4.22 ± 0.20	4.28
11	0	-1.68	0	4.42 ± 0.18	4.30
12	0	1.68	0	5.45 ± 0.20	5.63
13	0	0	-1.68	4.21 ± 0.15	4.12
14	0	0	1.68	5.33 ± 0.19	5.28
15	0	0	0	7.21 ± 0.10	7.21
16	0	0	0	7.27 ± 0.12	7.21
17	0	0	0	7.13 ± 0.17	7.21
18	0	0	0	7.09 ± 0.21	7.21
19	0	0	0	7.25 ± 0.14	7.21
20	0	0	0	7.29 ± 0.16	7.21

$-0.52AC - 0.035BC - 0.89A^2 - 0.79B^2 - 0.85C^2$ 。回归方程的方差分析及模型拟合度见表 4。

由方差分析可知,模型的 p 值小于 0.0001,表明实验所采用的二次模型是极显著的,在统计学上是有意义的。失拟项 p 值 > 0.05 ,表示所用模型与实验拟合程度较高,因此可用该回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析。另外,该模型的相关系数 $R^2 = 0.9950$,修正决定系数 $R^2_{adj} = 0.9906$,也表明模型预测值和实际值拟合良好,可以很好地解释响应值的变化。变异系数 $CV = 2.31\%$,说明该模型仅有 2.31% 的变异不能由该模型解释,因此,该模型拟合性较好。在模型各参数中,A、B、C 以及 AC 间的交互作用对虫草素产量有极显著的影响,即 TRIA、GA 和 6-BA 以及 TRIA 与 6-BA 间交互作用对实验结果影响极大,同时 TRIA 与 GA 的交互作用 p 值小于 0.05,对实验结果的影响也达到显著水平。 A^2 、 B^2 、 C^2 对虫草素产量的影响也达到了极显著的水平,说明 TRIA、GA 和 6-BA 的二次项与虫草素产量紧密关联。

由图 7 及软件分析可知,回归方程存在最高点,通过对回归方程求导及极值分析可知,TRIA 为 0.55 mg/L,GA 为 22.64 mg/L,6-BA 为 1.69 mg/L,此条件下预测得到的虫草素产量为 7.32 g/L。另外,通过方差分析(表 4)和响应面(图 7)的结果分析,TRIA 一方面增加细胞膜透性,促进了营养物质进入细胞,另一方面激活葡萄糖-6-磷酸脱氢酶促进五碳糖和嘌呤核苷酸的合成^[16],而 GA 或 6-BA 则加速同化作用,强化了细胞的分裂,增加虫草素合成的单

表 4 回归方程的方差分析

Table 4 Analysis of variance(ANOVA) of second-order polynomial model for cordycepin production obtained through CCD					
因素	平方和	自由度	均方	F 值	Pr > F
模型	32.21	9	3.58	222.73	<0.0001
A	0.83	1	0.83	51.35	<0.0001
B	2.14	1	2.14	133.48	<0.0001
C	1.14	1	1.14	70.87	<0.0001
AB	0.14	1	0.14	8.41	0.0158
AC	2.18	1	2.18	135.92	<0.0001
BC	9.800×10^{-3}	1	9.800×10^{-3}	0.61	0.4529
A ²	11.37	1	11.37	707.62	<0.0001
B ²	9.06	1	9.06	563.70	<0.0001
C ²	10.44	1	10.44	649.71	<0.0001
残差	0.16	10	0.016		
失拟项	0.13	5	0.026	3.97	0.0783
纯误差	0.032	5	6.467×10^{-3}		
总离差	32.37	19			

注:相关系数(R^2) = 0.9950;决定系数(R^2_{adj}) = 0.9906;变异系数(CV) = 2.31%; $p < 0.01$ 表示差异极显著, $p < 0.05$ 表示差异显著。

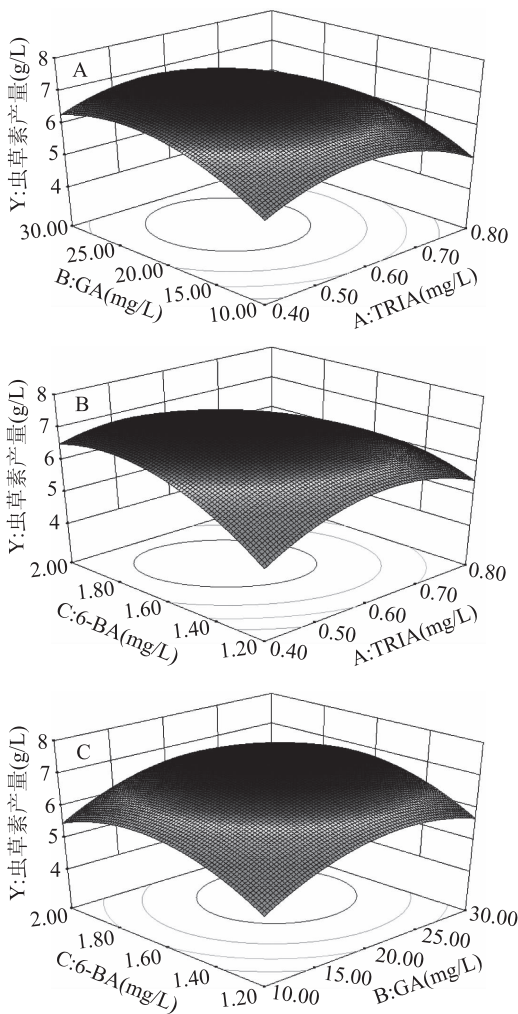


图 7 三十烷醇浓度、赤霉素浓度与 6-苄基腺嘌呤浓度对虫草素产量的响应面图

Fig.7 Response surface graph of cordycepin production as a function of TRIA concentration, GA concentration and 6-BA concentration

元^[17-19]。因此,GA 与 6-BA 和 TRIA 均存在互补效应,在虫草素合成上 TRIA 能够与 GA 或 6-BA 产生协同促进作用。但是,GA 与 6-BA 作用靶点重复,交互作用不明显。

2.5 验证实验

为检验响应面方法回归方程预测结果是否可靠,采用上述最佳条件进行液体表面培养。最终,虫草素产量达到 7.31 ± 0.19 g/L ($n = 5$)。与方程预测值相比,相对误差在 1% 以内。这表明响应面法拟合的回归方程可以用于预测实际的虫草素产量。

3 结论

本文利用三种植物生长调节剂 TRIA、GA 和 6-BA 对蛹虫草液体表面培养过程的菌体生长、虫草素合成进行调控,并结合多因素响应面实验研究了植物生长调节剂的组合对蛹虫草虫草素积累的影响规律。三种植物生长调节剂 TRIA、GA 和 6-BA 均能不同程度的促进蛹虫草的生长,但不同浓度的生长调节剂促进效果不同。经中心复合实验设计和响应面实验,三种植物生长调节剂的最佳组合为 0.55 mg/L TRIA、22.64 mg/L GA 与 1.69 mg/L 6-BA,在该条件下虫草素最大产量达到 7.31 g/L 接近预测值,可用于预测实际虫草素产量。

参考文献

[1] 文庭池,雷帮星,康冀川,等.添加前体促进蛹虫草发酵生产菌丝体和虫草菌素的研究[J].食品与发酵工业,2009,35(8):49-53.
[2] Cui J D. Biotechnological production and applications of *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine[J]. Crit Rev Biotechnol, 2015, 35(4):475-484.
[3] Fan D D, Wang W, Zhong J J. Enhancement of cordycepin production in submerged cultures of *Cordyceps militaris* by addition of ferrous sulfate [J]. Biochem Eng J, 2012, 60(1): 30-35.
[4] 秦鹏,王龙,赵玉卉,等.响应面法优化蛹虫草菌丝液体发

- 酵产虫草素培养基[J].食品工业科技,2016,37(8):185-190.
- [5] Masuda M, Das S K, Hatashita M, et al. Efficient production of cordycepin by the *Cordyceps militaris* mutant G81-3 for practical use[J]. Process Biochem, 2014, 49(2): 181-187.
- [6] Masuda M, Das S K, Fujihara S, et al. Production of cordycepin by a repeated batch culture of a *Cordyceps militaris* mutant obtained by proton beam irradiation[J]. J Biosci Bioeng, 2011, 111(1): 55-60.
- [7] Das S K, Masuda M, Sakurai A, et al. Effects of additives on cordycepin production using a *Cordyceps militaris* mutant induced by ion beam irradiation[J]. Afr J Biotechnol, 2009, 8(13): 3041-3047.
- [8] Das S K, Masuda M, Hatashita M, et al. Optimization of culture medium for cordycepin production using *Cordyceps militaris* mutant obtained by ion beam irradiation[J]. Process Biochem, 2010, 45(1): 129-132.
- [9] 汤佳鹏, 柳依婷. 蛹虫草静置发酵产虫草素的优化[J]. 食品工业科技, 2013, 34(20): 225-229, 245.
- [10] Zhang Q, Liu Y, Di Z B, et al. The strategies for increasing cordycepin production of *Cordyceps militaris* by liquid fermentation[J]. Fungal Genomics & Biology, 2016, 6(1): 1000134.

(上接第121页)

接近,说明优化结果良好。在该酶解条件下,不仅保存了牡蛎酶解液中的营养成分,氨基酸种类丰富,几乎包含所有的必需氨基酸种类,能够满足人体所需的各种氨基酸,为牡蛎的深加工和综合利用提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 汪何雅, 杨瑞金, 王璋. 牡蛎的营养成分及蛋白质的酶法水解[J]. 水产学报, 2003, 27(2): 163-168.
- [2] Wang J P, Hu J N, Cui J Z, et al. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats[J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 302-308.
- [3] 沈亮. 食品源性降血压活性肽的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013(14): 390-394.
- [4] 林端权, 郭泽铤, 张怡, 等. 海洋生物活性肽的研究进展[J]. 食品工业科技, 2016(18): 367-373.
- [5] 陈艳辉, 李超柱, 黎丹戎. 牡蛎蛋白活性肽的分离及生物活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2015(15): 135-138.
- [6] 杨韵, 徐波. 牡蛎的化学成分及其生物活性的研究进展[J]. 中国现代中药, 2015(12): 1345-1349.
- [7] 郭玉华, 曾名勇. 牡蛎酶解工艺的研究[J]. 中国海洋药物, 2008(2): 40-44.

- [11] 阮元, 马进川, 薛元, 等. 维生素 B₁、B₆ 和生长激素 2,4-D 对蛹虫草液体发酵虫草素产量的影响[J]. 菌物学报, 2014, 33(2): 477-482.
- [12] 汪宇, 于荣敏, 佟志清, 等. 蛹虫草液体培养条件的优化及生长动力学考察[J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(4): 56-60.
- [13] 张慧锋. 北冬虫夏草子实体培养条件的探索[J]. 吉林医药学院学报, 2005, 26(4): 192-194.
- [14] 欧阳召, 王春梅, 陶志. 适合虫草素积累的蛹虫草液体培养条件的优化[J]. 中国食用菌, 2012, 31(01): 26-28.
- [15] 尚晓东, 李明容, 王南, 等. 应用血球计数板检测灵芝破壁孢子粉破壁率的研究[J]. 食用菌学报, 2005, 12(2): 37-40.
- [16] 刘华, 韩文儒, 徐晓华. 三十烷醇对庆大霉素产生菌生长代谢影响的研究[J]. 微生物学通报, 1996, 23(4): 222-223, 216.
- [17] 胡现龙. 植物激素对黑曲霉生长的影响和黑曲霉的固定化[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [18] 徐平. 6-苄基腺嘌呤对双孢蘑菇菌丝体生长及生理生化特性的影响研究[J]. 食用菌, 2004, 26(6): 12-13.
- [19] 邱昌思, 江涓. 6-苄基腺嘌呤促进香菇菌丝体生长的作用机理研究[J]. 食用菌, 2002, 24(5): 4-5.

- [8] 苗慧丽, 方富勇, 纪晓德, 等. 牡蛎肉双酶复合水解和酸水解工艺[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(4): 21-24.
- [9] 李园, 刘艳, 段振华. 双酶法制备牡蛎抗氧化酶解液的工艺优化[J]. 食品开发与研究, 2016(15): 118-121.
- [10] 赵鸿霞, 朱蓓薇, 周大勇, 等. 响应面法优化牡蛎酶解工艺[J]. 大连工业大学学报, 2010(6): 421-425.
- [11] 张水华. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.
- [12] 赵英莲, 牟德华, 李艳. 2,4-二硝基氟苯柱前衍生 HPLC 检测树莓中游离氨基酸[J]. 食品科学, 2015(6): 178-182.
- [13] 曾少葵, 杨萍, 陈秀红. 微生物发酵对罗非鱼下脚料蛋白酶解液脱腥去苦效果比较[J]. 南方水产, 2009(4): 58-63.
- [14] 莫英杰. 超声波对蒜氨酸酶性质和结构的影响研究[D]. 北京: 北京工商大学, 2010.
- [15] 刘莹, 胡建民, 富亮. 牛磺酸的性质及其生理功能[J]. 畜禽业, 2006(2): 14-15.
- [16] 高亚, 郭俊霞, 张艳贞, 等. 牛磺酸降血糖作用研究进展[J]. 中国食品学报, 2016(1): 202-210.
- [17] Costache Romulus, Fontanine Iulia, Corodescu Ema. Assessment of surface runoff depth changes in Sărâțel River basin, Romania using GIS techniques[J]. Central European Journal of Geosciences, 2014, 6(3): 363-372.
- [18] 林海生, 曹文红, 卢虹玉, 等. 牡蛎酶解产物改善小鼠学习记忆能力的初步研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(19): 341-345.

权威 · 核心 · 领先 · 实用 · 全面