研究论文

DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2017.06.011

液态发酵茯苓菌丝体形态与产胞内三萜的关系

周燕丽， 卢恒谦， 徐立伟， 岳鹏翔， 高学玲*

（安徽农业大学 茶与食品科技学院，安徽 合肥 230036）

摘要：研究茯苓菌丝体液态培养条件对菌丝体形态及胞内三萜产量的影响。结果表明，当装液量为 50 mL，接种体积分数 6%，pH 5.5，温度 26 ℃，转速 130 r/min，液态培养 11 d 时，有利于中型和光滑型菌球的生长及胞内总三萜的积累，且中型和光滑型菌球的生长与胞内总三萜的积累量呈正相关，说明茯苓液态发酵过程中菌丝体形态与胞内三萜积累量相关联。

关键字：液态发酵；茯苓；形态分析；胞内总三萜

中图分类号：Q 815　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2017)06—0635—07

Relationship between Mycelium Morphology and Intracellular Triterpenoids Production of *Poria cocos* in Submerged Culture

ZHOU Yanli， *LU Henqian*， *XU Liwei*， *YUE Pengxiang*， *GAO Xueling**

（College of Tea & Food Science and Technology，Anhui Agriculture University，Hefei 230036，China）

Abstract：This research aims at investigating the effects of fermentation conditions on mycelium morphology and total triterpenoids yield during submerged culture of *Poria cocos*. The results indicated that the total triterpenoids main derived from middle-sized equivalent diameter and pellet in smooth shape were more conducive to enhancing the total triterpenoids production. The appropriate condition of submerged culture were broth content 50 mL，inoculate size 6%，pH 5.5，temperature 26 ℃，rotation speed 130 r/min for 11 days. The positive correlations both production of total triterpenoids and M diameter growth as well as smooth pellet have shown that the relationship between mycelium morphology and intracellular triterpenoids.

Keywords：*Poria cocos*，fermentation，morphology analysis，total triterpenoids

茯苓为多孔菌科真菌 *Poria cocos*(Schw.)Wolf. 的干燥菌核，俗称茯兔、茯灵、松薯、松苓等，我国首载于《神农本草经》，被列为上品[1]。作为我国传统的食药用真菌，茯苓富含多糖、三萜、脂肪酸、甾醇、酶、矿质元素等[2-3]多种活性成分，其中，三萜类化合物具有调节机体免疫、抗肿瘤、抗惊厥和抗炎等功能[4-5]。

目前，茯苓主要以人工栽培为主，人工栽培方法易受环境因素和生产条件限制，存在生产周期长、劳动强度大、子实体品质不稳定等缺点。采用液

收稿日期：2015-11-23

基金项目：安徽省科技计划项目(15czz03101)。

* **通信作者**：高学玲(1967—)，女，安徽滁州人，工学学士，教授，硕士研究生导师，主要从事发酵食品加工方面的研究。

E-mail：sharling@ahau.edu.cn

引用本文：周燕丽，卢恒谦，徐立伟，等. 液态发酵茯苓菌丝体形态与产胞内三萜的关系[J]. 食品与生物技术学报，2017，36(06)：635-641.

态发酵技术生产茯苓有效成分,可达到缩短生长周期、活性成分稳定且可实现规模化自动化生产等优点。相关研究显示,真菌液态发酵过程中其代谢产物的合成与菌丝体形态间有密切联系[6-7],菌丝体在发酵过程中随着培养条件的变化会出现不同的形态,其中,以分散菌丝(Dispersed mycelia)、聚集成簇(Clumps)、成团结球(Dense pellets)3 种形式存在为主[8-9]。因此可通过调控培养条件改变菌丝体形态,从而影响代谢产物的合成。

前期对茯苓菌丝体液态发酵产茯苓三萜工艺参数进行了优化[10],研究发现,菌丝体生长形态和胞内总三萜含量可随发酵条件及环境改变而产生变化。作者从调控茯苓液态发酵培养条件入手,使用 IPP 软件对菌丝体形态的鉴别统计,探索培养条件对茯苓菌丝体液态培养期间菌丝体形态及产胞内三萜的影响,并进一步探究菌丝体形态与胞内总三萜积累量之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 茯苓菌株 5.78 取自于安徽农业大学茶与食品科技学院食品生物技术实验室保藏菌种,液态发酵前经菌种活化、平皿培养、一级种子液和二级种子液培养。

1.1.2 培养基

1)斜面培养基(PDA)(g/L):去皮马铃薯 200,葡萄糖 20,琼脂 20;pH 自然,去离子水;

2)平板培养基:PDA 培养基;

3)种子液摇瓶培养基(g/L):葡萄糖 30,蛋白胨 5,酵母浸出粉 4,$MgSO_4$ 0.5,KH_2PO_4 1.0,VB_1 0.006;去离子水,pH 自然;

4)基础发酵培养基(g/L):葡萄糖 30,蛋白胨 10,$MgSO_4$ 1.0,KH_2PO_4 2.0,VB_1 0.007,玉米粉 15;pH 自然,去离子水。

1.1.3 主要试剂 葡萄糖、酵母浸出粉、蛋白胨、琼脂、$MgSO_4$、KH_2PO_4、VB_1、95%乙醇、浓硫酸、苯酚等均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 发酵培养条件 种子液接种后在 28 ℃,转速 50 r/min 条件下培养,一级种子培养 7 d 后接二级种子液,二级种子培养 3 d,各级种子的接种体积分数均为 10%。

1.2.2 菌体形态分析 取 5 mL 发酵液于培养皿中,加 25 mL 蒸馏水使菌球悬浮,使用数码相机对整个平皿进行拍摄。图片使用 Image-pro-plus 6.0 软件进行图形分析和数据输出,使用标尺将拍摄照片的像素单位转换为实际长度单位,再采用“Irregular AOI”命令选择照片的测量区域,然后使用“Flatten Background”命令调整照片亮度,打开“Contrast enhancement”窗口调整照片对比度,强化测量对象与背景的差异,使菌球呈全白色,“Segmentation”命令下的“Color Cube Based”多次选中封闭区域中的菌球,使之呈红色,最后利用“Count/Size”工具统计后得到每个菌球的表面积和周长[11],利用公式(1)和公式(2)分别计算当量直径 D 和圆形度 R,见表 1。根据菌球当量直径不同将菌球形态分为小型、中型和大型菌球 3 种,按圆度不同将菌球分为粗糙型和光滑型 2 种[12]。

$$\text{当量直径 } D=\sqrt{\frac{4\times S}{\pi}} \tag{1}$$

其中,S 为菌球表面积。

$$\text{圆度 } R=\frac{P^2}{4\pi\times S} \tag{2}$$

其中,P 为菌球周长。

表 1 菌丝体不同形态分类

Table 1 Classification of different mycelium forms

菌球	当量直径/mm	菌球	圆度
小型菌球	$D<0.8$	粗糙型菌球	$R>1.5$
中型菌球	$0.8\leqslant D<2.5$	光滑型菌球	$R\leqslant 1.5$
大型菌球	$D\geqslant 2.5$		

1.2.3 胞内总三萜质量分数的测定 采用香草醛-高氯酸显色法测定三萜类化合物的质量分数。10 mL 具塞磨口试管中加入待测样,水浴挥干溶剂,然后加入 0.2 mL 新配制的 5%香草醛-冰乙酸溶液及 0.8 mL 高氯酸,在 60 ℃水浴反应 20 min,冷却至室温,加 5.0 mL 冰乙酸,摇匀,在 548 nm 处测吸光度,据标准曲线(Y=0.007 1X-0.006 7)计算待测样中总三萜质量分数。

1.2.4 发酵时间对菌体形态及胞内总三萜的影响 按发酵培养基配方接种体积分数 6%二级种子液,在 27 ℃转速为 130 r/min 条件下发酵茯苓菌丝体,定期取样分析检测菌丝体形态变化及胞内总三萜得率,各试验均进行 3 个重复。

1.2.5 不同发酵条件对茯苓菌丝体形态及三萜产量的影响 在基础发酵培养基发酵条件下,分别通过改变装液量(40、50、60、70、80 mL/250 mL);接种体积分数(3%、6%、9%、12%、15%);初始 pH(4.5、5、5.5、6、6.5);温度(22、24、26、28、30 ℃);转速(90、110、130、150、170 r/min),研究不同培养条件对液态发酵茯苓菌丝体的形态及胞内总三萜和胞外多糖产量的影响。各试验均进行 3 次重复。

1.3 数据处理方法

所有数据均平行测定 3 次,使用 WPS 2013 和 Image-pro-plus 6.0 软件进行数据处理,采用平均数±SD 表示,Origin8.5 软件作图。

2 结果与分析

2.1 发酵时间对菌体形态及胞内总三萜质量分数的影响

茯苓液态发酵期间菌丝体形态与胞内总三萜质量分数之间的关系见图 1-2。由图 1 可以看出,在发酵前期(0~4 d),菌丝体形态主要呈分散菌丝状,菌球比例较小,发酵液粘稠。在发酵中期(4~9 d),菌丝体形态主要呈菌球状态和一部分分散菌丝,发酵液较澄清。在发酵后期(9~14 d),菌丝体形态呈菌球状态,发酵液澄清;由图 2(a)可以看出,在整个发酵周期内,茯苓菌球形态主要以中型为主(按表 1 的分类方法),比例达 60%以上,且在发酵 7~14 d 内中型菌球比例相对较高,在第 11 天时达到最大,为 82.49%;大型菌球在发酵期间所占比例相对较小;小型菌球在发酵期间所占比例表现为前 8 天呈下降趋势,后期略有上升;由图 2(b)可以看出,茯苓菌丝体液态培养期间,随着培养时间的延长,菌球表面逐渐由粗糙转化为光滑,随着光滑型菌球比例的增加,胞内三萜的积累量逐渐增大,胞内三萜在发酵的 7~14 d 大量积累,质量分数均达到 8%以上,在第 11 天内光滑型菌球比例(57.03%)与胞内总三萜质量分数(8.81%)均达到最大值。

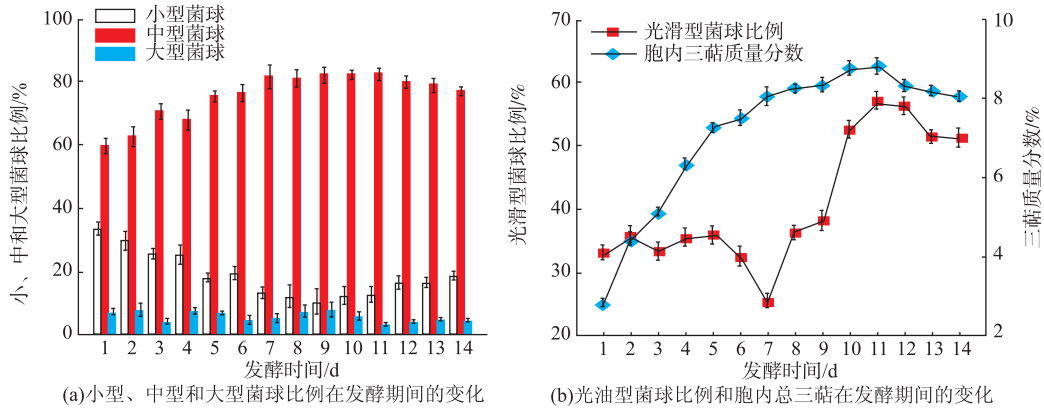
Ding 等 [13] 研究灵芝菌丝体液态发酵过程中发



(a)发酵前期 (b)发酵中期 (c)发酵后期

图 1 茯苓液态发酵基间菌丝体的形态

Fig. 1 Mycelium morphology during fermentation



(a)小型、中型和大型菌球比例在发酵期间的变化 (b)光油型菌球比例和胞内总三萜在发酵期间的变化

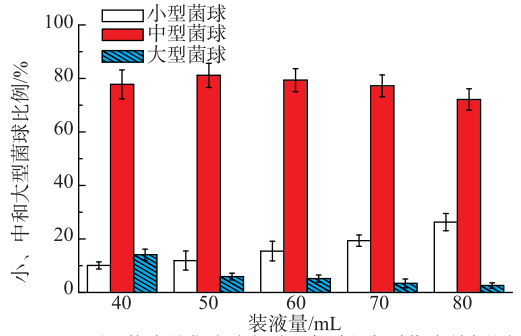
图 2 发酵时间对菌体形态及胞内总三萜质量分数的影响

Fig. 2 Effect of culture time on mycelium morphology and total *in vivo* triterpenoids production

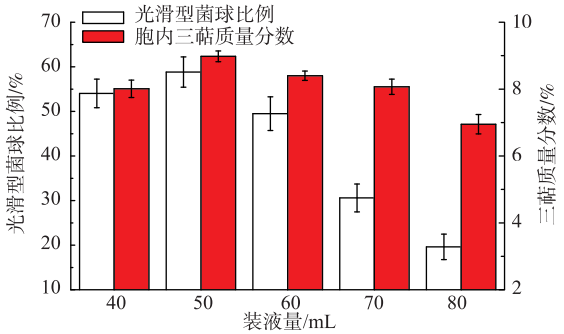
现,中型菌球有利于胞外多糖的积累,菌球的圆度与胞外多糖的积累无关。本研究显示在茯苓液态发酵过程中,菌丝体形态表现为中型和光滑型(圆度)时可促进胞内总三萜的积累。

2.2 装液量对菌体形态及胞内总三萜产量的影响

不同装液量对发酵茯苓菌丝体形态及胞内总三萜产量的影响见图 3。较低的装液量发酵的茯苓菌丝体形态主要呈稀疏的中大型菌球,当在 250 mL 的锥形瓶中装液量由 40 mL 增至 50 mL 时,剪切力逐渐减小,中型菌球增多;当装液量由 50 mL 增至 80 mL 时,虽然剪切力减小,但氧的运输受到阻碍,菌丝体生长速度减小,形成稠密的中小型菌球,且在装液量为 70 mL 和 80 mL 时出现了大量的游离菌丝。当装液量为 50 mL/250 mL 时,大量菌球形成,其中中型菌球所占比例最高,为 81.16%。光滑型菌球比例和胞内总三萜质量分数均随装液量的增加呈先上升后下降趋势。较低的装液量有利于光滑型菌球的生长和胞内三萜的合成。当装液量为 50 mL/250 mL 时,光滑型菌球所占比例和总三萜得率均达到最大,分别为 58.82%和 8.98%。



(a)不同装液量发酵时小型、中型和大型菌球所占比例



(b)不同装液量发酵时光滑型菌球所占比例和胞内总三萜质量分数

图 3 装液量对菌体形态及胞内总三萜质量分数的影响

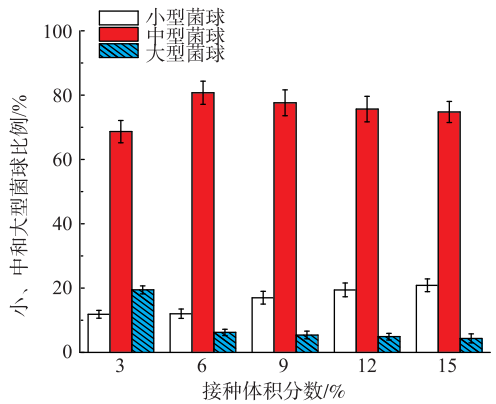
Fig. 3 Effect of broth content on the mycelium morphology and total *in vivo* triterpenoids yield

周艺博[14]在研究华根霉液态发酵菌丝体形态和脂肪酶的合成时发现,随着装液量的增加,孢子易分散,华根霉形成球状菌体概率逐渐增加,其中当装液量为 20 mL/250 mL 时有利于光滑块状菌体的形成,进而提高了脂肪酶的合成。而在茯苓液态发酵过程中,装液量可影响菌丝体形态,中型且表面光滑的菌球有利于胞内三萜类物质的合成,而游离菌丝不利于胞内三萜的合成。

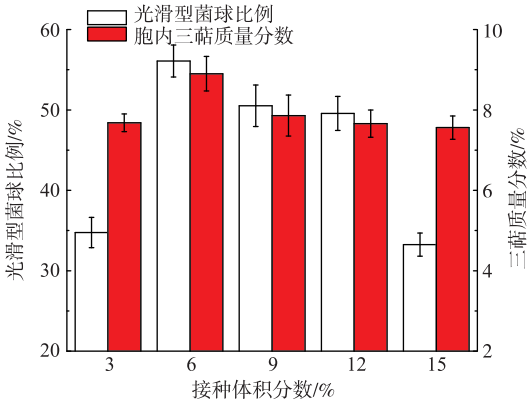
2.3 接种体积分数对菌球比例、菌体形态及胞内总三萜质量分数的影响

分别以 3%、6%、9%、12%、15%接种体积分数接入 5 组摇瓶中,培养 11 d,分析菌丝体形态,并取样检测胞内三萜产量,结果见图 4。由于菌丝体有凝聚特性,假设一定数量萌发孢子可形成一个生长点,当接种体积分数较小时,萌发孢子量较少,因而形成生长点较少,菌丝体形态表现稀疏的中大型菌球结构;随着接种体积分数的增大,形成生长点较多,菌丝体形态逐渐转化为稠密的中小型菌球和一部分游离菌丝[15-16]。当接种体积分数为 6%时,中型菌球所占比例最大,为 80.75%。接种体积分数较小和较大都不利于光滑型菌球的生产,当接种体积分数为 6%时,光滑型菌球所占比例和总三萜质量分数均达到最大,分别为 56.09%和 8.90%。

Bizukojc 等[17]研究利用 *Aspergillus terreus* 产洛伐他汀钠,当每升接种 2×10^{10} 孢子时,菌丝体形态呈直径小于 1.5 mm 的菌球状,洛伐他汀钠产量高达 60 mg/L。本研究显示,当茯苓菌丝体接种体积分数为 6%时,能促进中型和光滑型菌球的生长,且此形态下茯苓菌丝体胞内三萜质量分数最大。



(a)不同接种体积分数发酵时小型、中型和大型菌球所占比例



(b)不同接种体积分数发酵时光滑型菌球所占比例和胞内总三萜质量分数

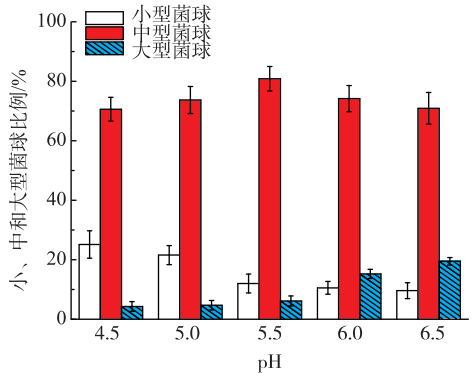
图 4　接种体积分数对菌体形态及胞内总三萜质量分数的影响

Fig. 4　Effect of inoculate size on the mycelium morphology and total *in vivo* triterpenoids yield

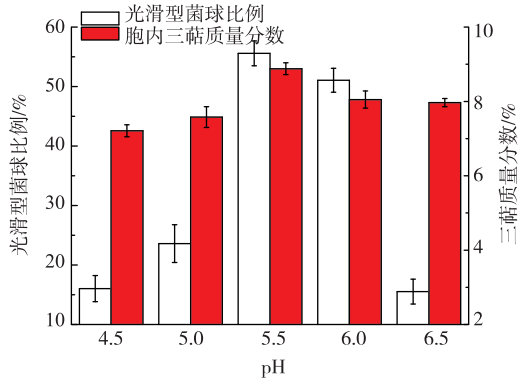
2.4　初始 pH 值对菌体形态及胞内总三萜质量分数的影响

发酵液的初始 pH 对菌丝体形态及胞内总三萜得率的影响见图 5。pH 可影响发酵液中营养物质的溶解性能、传递特性以及酶的表面结构及反应活性[18]。当发酵液初始 pH<5.5,菌丝体形态主要呈中小型菌球和分散菌丝,发酵液呈粘稠的混浊状态;当发酵液初始 pH≥5.5 时,菌丝体呈球状生长,且随着初始 pH 值的升高,菌球直径变大,菌球数量减少,游离菌丝减少,发酵液澄清。pH 也可改变接种孢子的表面特性,影响其凝聚性[19],当发酵液初始 pH 为 5.5 时,光滑型菌球比例和胞内总三萜质量分数达到最大,分别为 55.58%和 8.88%。

Zhang 等[20]研究 *Rhizopus arrhizus* 菌丝体发酵乳酸时发现,pH 为 5.0~6.0 时易形成自由分散的小菌球形态,且有利于乳酸的生产。而本研究中当初始 pH 为 5.5 时,菌丝体形态呈均匀的球状,且中型和光滑型菌球分布最多,此时胞内三萜质量分数最大。



(a)不同初始pH发酵时小型、中型和大型菌球所占比例



(b)不同初始pH发酵时光滑型菌球所占比例和胞内总三萜质量分数

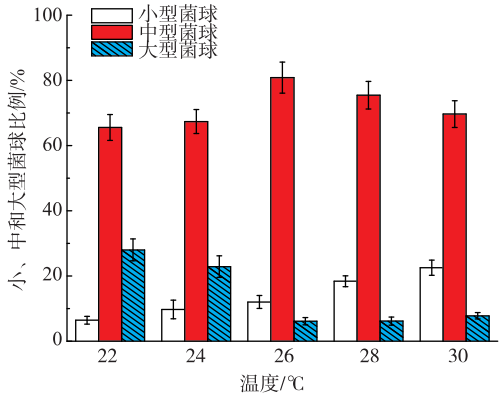
图 5　初始 pH 对菌体形态及胞内总三萜质量分数的影响

Fig. 5　Effect of initial pH on the mycelium morphology and total *in vivo* triterpenoids yield

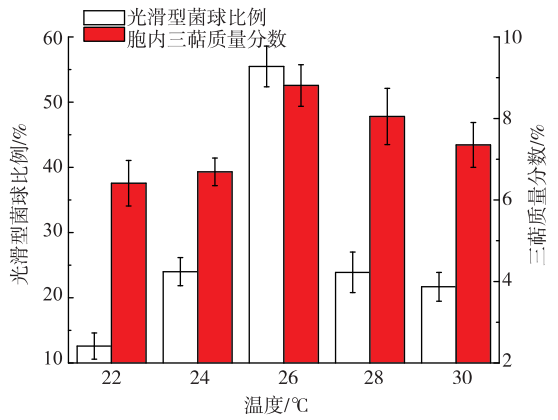
2.5　温度对菌体形态及胞内总三萜得率的影响

分别调控温度为 22、24、26、28、30 ℃培养 11 d,分析菌丝体形态,并取样进行产量检测,结果见图 6。温度较低时,菌丝体形态呈稀疏的中大型菌球和分散菌丝。随着温度的上升,菌丝体的生长繁殖加快,使衰老提前,发酵周期缩短[21],菌丝体形态呈絮状和细小的菌球。当温度为 26 ℃时,中型菌球所占比例最大,为 80.85%。温度还会影响发酵产物的生成量,温度过低和过高都不利于光滑型菌球和胞内三萜的生成,当温度为 26 ℃时,光滑型菌球所占比例和胞内三萜质量分数均达到最大,分别为 55.47%和 8.81%。

Das 等[22]研究用啤酒废水发酵 *Rhizopus oryzae* 1526 产富马酸中发现,当温度为 25 ℃时,菌丝体形态呈菌球状,富马酸产量高达 31.3 g/L。培养温度为 26 ℃时,茯苓菌丝体形态主要呈中型且表明光滑的菌球,且此时单位质量的菌球中胞内三萜的积累量最大。



(a)不同温度发酵时小型、中型和大型菌球所占比例



(b)不同温度发酵时光滑型菌球所占比例和胞内总三萜质量分数

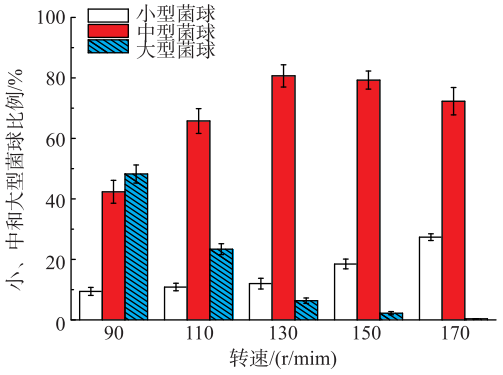
图 6　温度对菌体形态及胞内总三萜质量分数的影响

Fig. 6　Effect of temperature on the mycelium morphology and total *in vivo* triterpenoids yield

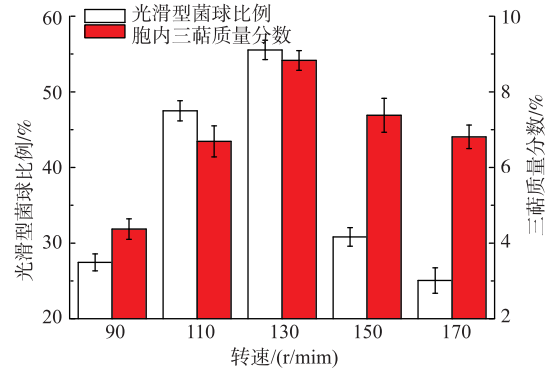
2.6　转速对菌体形态及胞内总三萜得率的影响

分别在 90、110、130、150、170 r/min 转速下培养茯苓菌丝体 11 d,取样分析菌丝体形态和胞内三萜质量分数检测。结果见图 7,搅拌转速较小时,产生的剪切力小,易形成稀疏的大型菌球,随着搅拌转速的升高,有利于溶氧,且较大剪切力去除了菌丝突出部分,限制菌丝的伸长[23],菌球直径减小,菌球致密,出现了游离菌丝。当搅拌转速为 130 r/min 时,菌丝体形态主要为均匀的菌球且表面光滑,中型菌球所占比例最大,为 80.67%。光滑型菌球比例和胞内总三萜得率均随搅拌转速的增加呈先上升后下降趋势。当搅拌转速为 130 r/min 时,光滑型菌球所占比例和总三萜质量分数均达到最大,分别为 56.67%和 8.83%。

雷萍等[24]报道了在桑黄深层发酵产胞外多糖过程中,高搅拌转速下可形成大量分散菌丝,菌丝球疏松,呈絮状;低转速下形成小型菌球,丝状体比例小,有利于胞外多糖的积累。本研究中,当转速为 130 r/min 时,易形成的均匀的中型菌球,且菌球表面光滑,在此转速下胞内三萜质量分数最大。



(a)不同转速发酵时小型、中型和大型菌球所占比例



(b)不同转速发酵时光滑型菌球所占比例和胞内总三萜质量分数

图 7　转速对菌体形态及胞内总三萜质量分数的影响

Fig. 7　Effect of rotation speed on the mycelium morphology and total *in vivo* triterpenoids yield

3　结　语

通过研究发酵期间菌丝体形态学与目标代谢产物产量之间的关系,以用于实际发酵期间通过菌体形态改变及时提示发酵进程。

在茯苓液态发酵产胞内三萜过程中,改变发酵条件,菌丝体形态变化明显,且菌丝体形态的改变与胞内三萜的合成密切相关。茯苓菌丝体液态发酵期间,当装液量 50 mL/250 mL,接种体积分数 6%,pH 5.5,温度 26 ℃,转速 130 r/min,发酵 11 d 时,菌丝体主要呈现球形,且菌球直径大多在 0.8~2.5 mm,菌球表面光滑,此时菌丝体胞内三萜的合成量最高。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.

[2] YANG Shudong,BAO Haiying. Progress of researches on triterpenes and polysaccharides of wolfiporia cocos[J]. **Journal of Fungal Research**,2005,3(3):55-61. (in Chinese)

[3] 徐国钧,徐珞珊,何宏贤,等. 中国药材学(下卷)[M]. 北京:中国医药科技出版社,1996:1706.

[4] GAPTER L,WANG Z,GLINSKI J,et al. Induction of apoptosis in prostate cancer cells by pachymic acid from *Poria cocos*[J]. **Biochemical Biophysical Research Communications**,2005,33(2-4):1153-1161.

[5] GINERLARZA E M,MANEZ S,GINERPONS R M,et al. On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A(2)activity of extracts from lanostane-rich species[J]. **Journal of Ethnopharmacology**,2000,73(1-2):61-69.

[6] DRIOUCH H,HANSCH R,WUCHERPFENNIG T,et al. Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger* targeted morphology engineering using titanate microparticles[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2012,109(2):462-471.

[7] DAI Jun,ZHAO Genhai,WANG Peng,et al. Macro-morphology characterization of *Mortierella alpine* during the cultivation[J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**,2014,12(3):47-51.(in Chinese)

[8] MULLER C,HJORT C M,HANSEN K. Altering the expression of two chitin synthase genes differentially affects the growth and morphology of *Aspergillus oryzae*[J]. **Microbiology**,2002,148:4025-4033.

[9] XIONG Qiang,XU Qing,GU Shuai,et al. Controlling the morphology of filamentous fungi for optimization of fermentation process[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,2012,28(2):178-190.(in Chinese)

[10] GAO Xueling,YANG Suyun,YAN Yunmei,et al. Optimical liquid fermentation conditions of total triterpenoids from *Poria cocos Mycelium* by response surface methodology[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012,31(10):1112-1119.(in Chinese)

[11] TANG Wenjun,XIA Jianye,CHU Ju,et al. Development and application of morphological analysis method in *Aspergillus niger* fermentation[J]. **Chin J Biotech**,2015,31(4):1-9.(in Chinese)

[12] COX P W,THOMAS C R. Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,1992,39:945-952.

[13] DING Z Y,WANG Q,PENG L,et al. Relationship between mycelium morphology and extracellular polysaccharide production of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* in submerged culture[J]. **Journal of Medicinal Plants Research**,2012,6(14):2868-2874.

[14] 周艺博. 基于 Western Blot 分析的华根霉液态发酵菌体形态与膜结合脂肪酶生产间规律的研究[D]. 无锡:江南大学,2010.

[15] YANG Bo,ZHANG Yu,PANG Li,et al. Effect of inoculate size on the mycelium morphology and C-linolenic acid yield[J]. **China Oils and Fats**,2002,27(1):45-47.(in Chinese)

[16] MIAO Xiuzhen,ZHANG Yu,YU Long. Study on morphology of γ-linolenic acid by *Cunningnamella elegans*[J]. **Cereals & Oils**,2010(3):12-14.(in Chinese)

[17] JIANG Jie,TU Lianxiang,LU Fuping,et al. Effect of condition of culture on the mycelium morphology of *Trichoderma reesei* and biosynthesis of t—PA[J]. **Industrial Microbiology**,2005,35(4):9-14.(in Chinese)

[18] BIZUKOJC M,LEDAKOWICZ S. The morphological and physiological evolution of *Aspergillus terreus* mycelium in the submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2010,26:41-54.

[19] MARIA P. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes[J]. **Biotechnology Advances**,2004,22:189-259.

[20] ZHANG Z Y,JIN B,KELLY J M. Effects of cultivation parameters on the morphology of *Rhizopus arrhizus* and the lactic acid production in a bubble column reactor[J]. **Engineering Life Science**,2007,7(5):490-496.

[21] GAO J M,WENG H B,XI Y,et al. Purification and characterization of a novel endo-β-1,4-glucanase from the thermoacidophilic *Aspergillus terreus*[J]. **Biotechnology Letters**,2008,30:323-327.

[22] DAS P K,BRAR S K. Enhanced fumaric acid production from brewery wastewater and insight into the morphology of *Rhizopus oryzae* 1526[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,2014,172:2974-2988.

[23] LIN P J,SCHOLZ A,KRULL R. Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*[J]. **Biochemical Engineering Journal**,2010,49(2):213-220.

[24] LEI Ping,WU Yazhao,ZHANG Wenxiu,et al. Effect of rotation speed and air flux on submerged fermentation of *Phellinus igniarius*[J]. **Acta Edulis Fungi**,2014,21(2):57-62.