

# 响应面法优化桦褐孔菌产三萜化合物发酵培养基

向 超, 徐向群\*

(浙江理工大学理学院, 杭州 310018)

**摘 要:** 通过单因子实验筛选出桦褐孔菌发酵产三萜化合物最佳碳源和氮源分别为葡萄糖和混合氮源, 采用部分因子实验得到对三萜含量有显著影响的4个组分, 即葡萄糖、蛋白胨、 $\text{CaCl}_2$  和酵母粉, 再利用最陡爬坡实验并结合中心组合实验和响应面分析得到最佳培养基组成: 葡萄糖 58.9 g/L、蛋白胨 2.9 g/L、 $\text{CaCl}_2$  0.5 g/L、酵母粉 1.2 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g/L 和  $\text{MgSO}_4$  0.2 g/L。采用该优化培养基发酵, 三萜含量达到 57.1 mg/g, 较优化前(41.8 mg/g)和天然子实体(36.3 mg/g)分别提高了 36.6% 和 57.3%。

**关键词:** 桦褐孔菌; 三萜化合物; 响应面法; 深层发酵

**中图分类号:** Q815

**文献标志码:** A

## 0 引 言

桦褐孔菌是一种非常珍稀的药用真菌, 在东亚及亚洲国家民间广泛用于治疗各种疑难杂症<sup>[1]</sup>。研究表明其主要的生物活性物质包括: 甾体类化合物<sup>[2]</sup>、酚类化合物<sup>[2]</sup>、三萜化合物<sup>[3]</sup> 和 多糖类<sup>[4]</sup>, 特别是三萜化合物具有非常好的抗肿瘤活性<sup>[5-6]</sup>; 而这些活性成份主要从桦褐孔菌野生子实体分离得到, 但天然资源非常稀缺, 价格昂贵。随着生物工程技术的发展, 已经有许多药用真菌通过液体深层发酵并获得主要活性化合物, 且这些物质的含量均高于野生的子实体<sup>[7-8]</sup>。目前对于桦褐孔菌的液体深层发酵主要集中在菌丝体生物量以及多糖和酚类化合物的研究<sup>[2]</sup>, 而对三萜化合物研究甚少。响应面法是一种优化条件非常好的统计学方法, 已经成功用于发酵培养基的优化并取得了很好的效果<sup>[9-10]</sup>。因此, 笔者通过响应面法对桦褐孔菌液体深层发酵培养基进行优化, 获得高产量三萜化合物的发酵条件, 为工业化生产提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

桦褐孔菌菌丝体通过液体深层培养获得。菌种来源: Centraal Bureau voor Schimmelcultuur, Utrecht, Netherlands; 桦褐孔菌子实体购于吉林。

### 1.2 主要试剂

白桦脂醇购买于 sigma, 纯度为色谱纯; 其他试剂均为国内购买的分析纯。

### 1.3 培养基及培养条件

斜面培养基: 麦芽浸粉 30 g/L、蛋白胨 3 g/L、琼脂 15 g/L、pH 5.6±0.2。28℃条件下培养 10 d。

液体种子培养基: 葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 3 g/L、酵母浸膏 2 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L、 $\text{MgSO}_4$  1.5 g/L、 $\text{CaCl}_2$  0.1 g/L。取桦褐孔菌斜面菌块 0.5 cm<sup>2</sup> 大小的 4~5 块接种到装有 100 mL 液体种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 25℃, 静置 3~4 d, 待液体培养基中出现半透明菌丝体小球后, 将摇瓶转入摇床, 28℃, 转速 150 r/min, 培养 4 d 左右获得液体种子。

发酵基础培养基: 葡萄糖 30 g/L、蛋白胨 4 g/L、 $\text{MgSO}_4$  0.5 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g/L、 $\text{CaCl}_2$  0.1

收稿日期: 2011-11-09

基金项目: 浙江省科技厅科技计划项目(2007C24016)

作者简介: 向 超(1986-), 男, 湖北荆门人, 硕士研究生, 主要从事生物技术与生物化工的研究。

\* 通信作者: 徐向群, 电子邮箱: xuxiangqun@zstu.edu.cn

g/L。接种量体积分数 10%，28℃，转速 150 r/min 摇床培养 10 d。

1.4 菌丝体生物量和总三萜化合物含量分析

生物量分析方法<sup>[11]</sup>：通过抽滤除去发酵液（滤纸先干燥至恒重），菌丝体用蒸馏水反复冲洗至洗出液为无色，滤渣 70℃干燥至恒重，除去滤纸重量即为菌丝体生物量。

总三萜化合物含量分析方法：干燥菌丝体研磨成粉过 50 目筛，取 100 mg 菌粉，异丙醇 8 mL，溶剂浸提 24 h，离心取上清液，定容至 10 mL，准确吸取 0.1 mL，利用香草醛—冰醋酸法进行总三萜化合物含量的测定<sup>[12]</sup>，白桦脂醇作为三萜化合物标准品。子实体总三萜化合物含量用同样的方法进行分析。

1.5 实验设计

1.5.1 单因素实验

以发酵基础培养基为基础，分别以不同碳源和氮源来筛选出桦褐孔菌发酵产三萜化合物最佳的碳源和氮源。

1.5.2 部分因子实验

通过较少的实验从众多因素中选出显著影响因子，本实验在单因素实验的基础上用该设计方法对发酵培养基组分的 6 个因素进行设计，每个因子取高(1)或低(−1)两个水平，试验次数为 8 次。实验结果通过 SPSS13.0 软件进行分析。

1.5.3 最陡爬坡实验

根据部分因子实验结果确定显著影响因子，通过拟合的回归方程系数的符号和大小来设定显著因子的步长和方向，再通过实验使响应值快速逼近最

大响应区域。

1.5.4 中心组合实验及响应面分析

根据部分因子实验结果，中心组合实验为 4 因子 5 水平(2, 1, 0, −1, −2)，各因素水平见表 1，通过 Design Expert 7.1.6 软件进行设计和结果分析。

1.5.5 验证实验

对响应面优化得到的最佳培养基组成以及预计结果进行实验验证，重复 3 次，分析模型的可靠性，得到最后优化结果。

表 1 中心组合实验因素水平

因素	水平				
	−2	−1	0	1	2
A(葡萄糖 g/L)	35	45	55	65	75
B(蛋白胨 g/L)	0.5	1.5	2.5	3.5	4.5
C(CaCl <sub>2</sub> g/L)	0.25	0.35	0.45	0.55	0.65
D(酵母粉 g/L)	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6

2 结果与分析

2.1 最佳碳源和氮源的筛选

不同碳源和氮源对桦褐孔菌发酵菌丝体生物量和总三萜含量的影响见表 2，葡萄糖对三萜化合物的合成以及菌丝体生长是最有利的，菌丝生物量和总三萜化合物含量分别达到 8.52 g/L 和 41.7 mg/g，而在大分子糖类作为碳源时菌丝体生长缓慢且三萜化合物含量也非常低。在氮源中，蛋白胨和酵母粉是三萜化合物合成以及菌丝体生长的最佳氮源，而单独使用无机氮源时桦褐孔菌基本不利用。因此，葡萄糖作为碳源，蛋白胨和酵母粉作为混合氮源进行进一步的优化。

表 2 不同碳源和氮源对三萜含量和生物量的影响

碳源	生物量/(g/L)	三萜含量/(mg/g)	氮源	生物量/(g/L)	三萜含量/(mg/g)
葡萄糖	8.52±0.47 <sup>a</sup>	41.7±0.7 <sup>a</sup>	蛋白胨	8.61±0.38 <sup>a</sup>	40.9±0.4 <sup>a</sup>
蔗糖	6.78±0.24 <sup>b</sup>	27.2±1.1 <sup>c</sup>	酵母粉	8.55±0.21 <sup>a</sup>	41.9±0.8 <sup>a</sup>
果糖	8.33±0.35 <sup>a</sup>	37.8±0.6 <sup>b</sup>	KNO <sub>3</sub>	2.11±0.19 <sup>b</sup>	13.0±0.2 <sup>c</sup>
麦芽糖	5.67±0.28 <sup>c</sup>	25.6±0.5 <sup>d</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.78±0.25 <sup>b</sup>	22.4±0.4 <sup>b</sup>
玉米粉	3.29±0.16 <sup>d</sup>	25.8±0.5 <sup>d</sup>	—	—	—
可溶性淀粉	2.88±0.53 <sup>d</sup>	23.2±0.3 <sup>c</sup>	—	—	—

注：每组实验重复 3 次，结果取平均值±标准差；同一列中相同字母表示之间无显著差异(P<0.05)。

2.2 显著因子的筛选

通过部分因子实验设计，以菌丝体生物量(Y<sub>B</sub>)和总三萜含量(Y<sub>T1</sub>)对培养基组分：葡萄糖(x<sub>1</sub>)，蛋白胨(x<sub>2</sub>)，酵母粉(x<sub>3</sub>)，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(x<sub>4</sub>)，MgSO<sub>4</sub>(x<sub>5</sub>)和 CaCl<sub>2</sub>(x<sub>6</sub>)进行了考察，实验设计及结果见表 3。通过方差分析(表 4)各因子对菌丝体生物量无显著作用，而对于三萜化合物含量，葡萄糖、蛋白胨、酵母

粉和 CaCl<sub>2</sub> 具有显著影响(P<0.05)，通过 SPSS 13.0 软件进行线性拟合得到回归方程(x<sub>4</sub> 和 x<sub>5</sub> 不显著剔除)：

Y<sub>T1</sub>(%)=

$$4.17+0.20x_1-4.19x_2-2.01x_3+49.25x_6$$

(1)

方程的决定系数为 0.985，表明回归方程拟合

良好。通过拟合方程的系数符号判断葡萄糖和  $\text{CaCl}_2$  的浓度对合成三萜化合物呈正效应,蛋白胨和酵母粉浓度则呈负效应。因此要提高三萜化合物

含量应当提高葡萄糖和  $\text{CaCl}_2$  的浓度,同时降低蛋白胨和酵母粉的浓度,其他因子影响不大,实验选择低水平。

表3 部分因子实验设计及结果

实验组	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5$	$x_6$	生物量/(g/L)	三萜含量/(mg/g)
1	-1(20)	-1(3)	-1(1)	1(2.5)	1(1)	1(0.2)	$7.93 \pm 0.47$	$40.5 \pm 0.7$
2	1(50)	-1(3)	-1(1)	-1(1)	-1(0.2)	1(0.2)	$8.01 \pm 0.46$	$47.2 \pm 0.3$
3	-1(20)	1(5)	-1(1)	-1(1)	1(1)	-1(0.1)	$7.98 \pm 0.13$	$27.9 \pm 0.5$
4	1(50)	1(5)	-1(1)	1(2.5)	-1(0.2)	-1(0.1)	$8.23 \pm 0.52$	$33.2 \pm 0.1$
5	-1(20)	-1(3)	1(3)	1(2.5)	-1(0.2)	-1(0.1)	$7.83 \pm 0.31$	$33.1 \pm 1.2$
6	1(50)	-1(3)	1(3)	-1(1)	1(1)	-1(0.1)	$8.12 \pm 0.24$	$38.7 \pm 0.3$
7	-1(20)	1(5)	1(3)	-1(1)	-1(0.2)	1(0.2)	$7.65 \pm 0.62$	$27.4 \pm 0.4$
8	1(50)	1(5)	1(3)	1(2.5)	1(1)	1(0.2)	$7.87 \pm 0.35$	$35.5 \pm 0.2$

注:括号内为各变量的实际值,单位为 g/L;每组实验重复 3 次,结果取平均值±标准差。

表4 各因素对生物量和三萜含量的影响

变量	生物量			三萜含量		
	相关系数	$t$ -值	$\text{Prob} >  t $	相关系数	$t$ -值	$\text{Prob} >  t $
$x_1$	0.07	3.50	0.177	0.20	6.15	0.009*
$x_2$	-0.20	-0.62	0.626	-4.19	-8.70	0.003*
$x_3$	-0.85	-2.83	0.216	-2.01	-4.18	0.025*
$x_4$	0.17	0.42	0.749	0.52	0.74	0.968
$x_5$	0.56	0.75	0.590	-0.09	-0.05	0.534
$x_6$	-17.5	-2.92	0.210	49.25	5.11	0.014*

\* 表示显著( $P < 0.05$ )。

### 2.3 中心实验点的确定

对三萜化合物含量具有显著影响的因子葡萄糖、蛋白胨、酵母粉和  $\text{CaCl}_2$  以及它们的正负效应进行最陡爬坡实验设计,实验设计及结果见表 5。第 4

组实验三萜化合物的含量达到最高值  $55.4 \pm 0.6$  mg/g,此时生物量也达到较高水平。因此响应面实验水平的中心点确定为:葡萄糖 55 g/L;蛋白胨 2.5 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.45 g/L,酵母粉 1.25 g/L。

表5 最陡爬坡实验设计及结果

实验组	葡萄糖/(g/L)	蛋白胨/(g/L)	酵母粉/(g/L)	$\text{CaCl}_2$ /(g/L)	生物量/(g/L)	三萜含量/(mg/g)
1	40	4	2	0.15	$7.87 \pm 0.21$	$44.1 \pm 0.3$
2	45	3.5	1.75	0.25	$7.79 \pm 0.34$	$47.2 \pm 0.6$
3	50	3	1.5	0.35	$8.17 \pm 0.15$	$51.7 \pm 0.5$
4	55	2.5	1.25	0.45	$8.12 \pm 0.62$	$55.4 \pm 0.6$
5	60	2	1	0.55	$8.32 \pm 0.54$	$53.2 \pm 0.2$
6	65	1.5	0.75	0.65	$7.82 \pm 0.43$	$41.2 \pm 1.3$

注:每组实验重复 3 次,结果取平均值±标准差。

### 2.4 中心组合实验优化培养基的浓度

根据最陡爬坡实验确定的响应面实验的中心点,运用 Design Expert 7.1.6 软件进行中心组合实验设计,实验设计及结果见表 6,对实验结果进行响应面分析,拟合分别得到了生物量以及三萜化合物含量的多元回归模型。

表6 中心组合实验设计及结果

实验组	A	B	C	D	生物量/(g/L)	三萜含量/(mg/g)
1	-1	-1	-1	-1	$7.72 \pm 0.31$	$50.2 \pm 0.2$
2	1	-1	-1	-1	$7.67 \pm 0.25$	$46.7 \pm 0.3$
3	-1	1	-1	-1	$7.89 \pm 0.17$	$44.6 \pm 0.1$
4	1	1	-1	-1	$7.55 \pm 0.71$	$45.5 \pm 0.2$
5	-1	-1	1	-1	$7.75 \pm 0.24$	$52.3 \pm 0.5$

表 6 续

实验组	A	B	C	D	生物量/ (g/L)	三萜含量/ (mg/g)
6	1	-1	1	-1	7.86±0.11	49.9±0.3
7	-1	1	1	-1	7.77±0.22	47.2±0.2
8	1	1	1	-1	8.13±0.13	50.2±0.4
9	-1	-1	-1	1	7.56±0.41	42.6±0.3
10	1	-1	-1	1	7.99±0.27	49.1±0.3
11	-1	1	-1	1	7.89±0.34	44.0±0.2
12	1	1	-1	1	7.95±0.26	48.5±0.7
13	-1	-1	1	1	8.05±0.19	44.1±0.1
14	1	-1	1	1	8.11±0.21	50.5±0.9
15	-1	1	1	1	7.81±0.31	47.2±0.2
16	1	1	1	1	8.12±0.12	50.5±0.5
17	-2	0	0	0	7.75±0.63	46.0±0.7
18	2	0	0	0	8.02±0.27	53.2±1.2
19	0	-2	0	0	8.32±0.15	50.5±0.5
20	0	2	0	0	7.97±0.12	45.8±0.3
21	0	0	-2	0	7.98±0.30	46.1±0.1
22	0	0	2	0	8.34±0.23	49.5±0.3
23	0	0	0	-2	7.67±0.71	46.5±0.2
24	0	0	0	2	8.12±0.13	43.3±0.4
25	0	0	0	0	7.85±0.34	55.7±0.9
26	0	0	0	0	8.52±0.12	56.0±0.7
27	0	0	0	0	8.49±0.09	55.2±0.5
28	0	0	0	0	8.37±0.10	55.9±2.1
29	0	0	0	0	8.51±0.24	55.3±0.6
30	0	0	0	0	8.43±0.35	57.2±0.7
31	0	0	0	0	8.48±0.13	54.8±0.2

注:每组实验重复 3 次,结果取平均值±标准差。

$$Y_B=8.38+0.062A-0.013B+0.087C+0.085D-0.01AB+0.046AC+0.049AD-0.017BC-0.017BD+0.001CD-0.15A^2-0.085B^2-0.081C^2-0.15D^2 \quad (2)$$

$$Y_{T_2}=5.57+0.13A-0.084B+0.13C-0.052D+0.011AB+0.031AC+0.16AD+0.046BC+0.12BD-0.047CD-0.15A^2-0.19B^2-0.20C^2-0.28D^2 \quad (3)$$

其中  $Y_B$  为菌丝体生物量,  $Y_{T_2}$  为三萜化合物含量, A、B、C 和 D 分别为葡萄糖、蛋白胨、 $CaCl_2$  和酵母粉的实验编码值。

模型的方差(ANOVA)分析见表 7,生物量的回归模型和三萜化合物的回归模型的  $F$  值分别为 2.86 和 24.98,表明模型是显著的。两个模型的决定系数分别为 0.956 和 0.714,说明回归方程良好,  $P$  值考察方程相关系数的显著性,结果见表 7。根据响应面分析三维图和等高线可以看出葡萄糖、蛋白胨、 $CaCl_2$  和酵母粉 4 个因素对生物量和三萜化合物含量的影响,如图 1 和图 2 所示。通过两个响应值的分析,葡萄糖、蛋白胨、 $CaCl_2$  和酵母粉 4 个因素的最优值分别为 58.9、2.9、0.5 和 1.2 g/L,模型预测在最优条件下的最大生物量和三萜化合物含量分别为 8.42 g/L 和 56.2 mg/g。

表 7 多元回归模型方差分析

来源	生物量			三萜含量		
	单方和	$df$	$P$ 值 Prob> $F$	单方和	$df$	$P$ 值 Prob> $F$
模型	1.83	14	0.023 5	5.63	14	<0.000 1
A	0.09	1	0.177 1	0.38	1	0.000 2
B	3.75E-003	1	0.778 4	0.17	1	0.005 2
C	0.18	1	0.062 4	0.39	1	0.000 1
D	0.175	1	0.069 4	0.065	1	0.061 5
AB	1.60E-003	1	0.854 0	1.81E-003	1	0.742 0
AC	0.03	1	0.400 0	0.015	1	0.348 7
AD	0.04	1	0.375 6	0.41	1	0.000 1
BC	4.90E-003	1	0.747 8	0.033	1	0.169 6
BD	4.90E-003	1	0.747 8	0.21	1	0.002 2
CD	2.50E-003	1	0.981 6	0.035	1	0.158 9
$A^2$	0.64	1	0.001 8	0.68	1	<0.000 1
$B^2$	0.20	1	0.050 4	1.03	1	<0.000 1
$C^2$	0.19	1	0.060 3	1.14	1	<0.000 1
$D^2$	0.62	1	0.020 0	2.20	1	<0.000 1
模型失拟	0.39	10	0.715	0.22	10	0.061 4
误差	0.34	6	—	0.036	6	—
总和	2.56	30	—	5.89	30	—

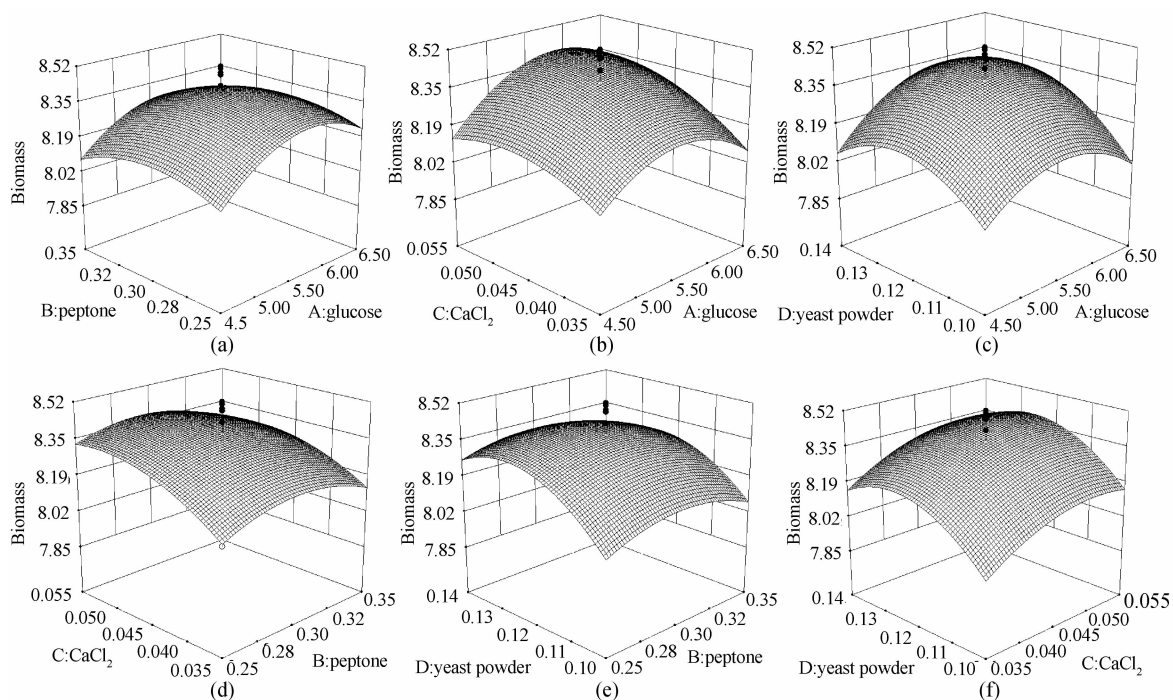


图1 葡萄糖、蛋白胨、 $\text{CaCl}_2$  和酵母粉对生物量的影响

a. 蛋白胨和葡萄糖对生物量的影响;b. 葡萄糖和  $\text{CaCl}_2$  对生物量的影响;c. 及酵母粉和葡萄糖对生物量的影响;d.  $\text{CaCl}_2$  和蛋白胨对生物量的影响;e. 酵母粉和蛋白胨对生物量的影响;f. 酵母粉和  $\text{CaCl}_2$  对生物量的影响

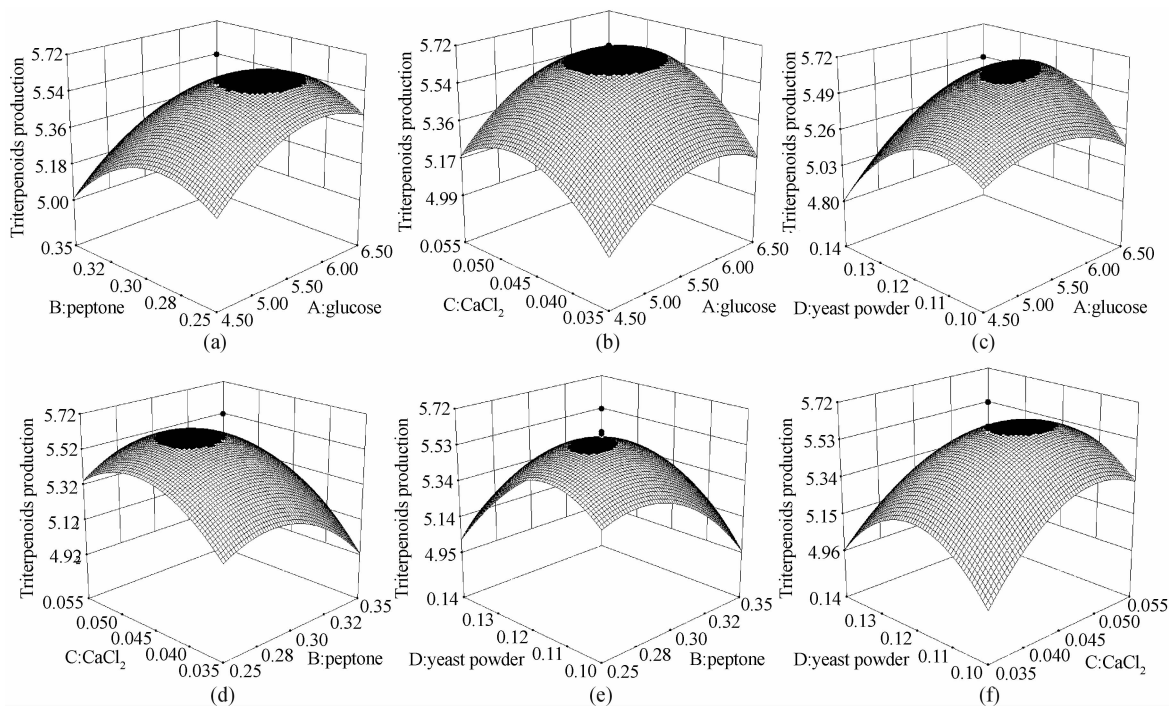


图2 葡萄糖、蛋白胨、 $\text{CaCl}_2$  和酵母粉对三萜含量的影响

a. 蛋白胨和葡萄糖对三萜含量的影响;b. 葡萄糖和  $\text{CaCl}_2$  对三萜含量的影响;c. 及酵母粉和葡萄糖对三萜含量的影响;d.  $\text{CaCl}_2$  和蛋白胨对三萜含量的影响;e. 酵母粉和蛋白胨对三萜含量的影响;f. 酵母粉和  $\text{CaCl}_2$  对三萜含量的影响

## 2.5 模型验证

根据优化得到的最优培养基进行3次以上的发酵实验,菌丝体生物量平均为8.38 g/L,三萜化合物含量平均为57.1 mg/g,这说明响应面分析得到

的最优发酵培养基与预测结果符合实际,且相对优化前三萜化合物含量41.8 mg/g提高了36.6%,比天然子实体中三萜化合物含量36.3 mg/g提高了57.3%。

### 3 讨 论

三萜化合物在生物体内是通过甲戊二羟酸途径合成,其含量受生物合成前体以及限制性步骤酶的含量和活性共同决定<sup>[13]</sup>,有研究表明葡萄糖代谢为三萜化合物的生物合成提供前体<sup>[14]</sup>,因此葡萄糖为桦褐孔菌发酵产三萜化合物的最佳碳源。实验中发现酵母粉对三萜化合物的合成有显著影响,原因可能是酵母粉中的酵母激发子能促进三萜化合物合成途径中磷脂酶 A2 的活性<sup>[15]</sup>。适当浓度钙离子能促进生物体内羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMG-CoAR)的活性,而 HMG-CoAR 是三萜合成途径中重要的限制性酶<sup>[16]</sup>。

本研究结果显示,桦褐孔菌内三萜的合成受生长环境影响较大,通过对发酵培养基的优化得到了更适合三萜化合物合成的条件:葡萄糖 58.9 g/L、蛋白胨 2.9 g/L、CaCl<sub>2</sub> 0.5 g/L、酵母粉 1.2 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L 和 MgSO<sub>4</sub> 0.2 g/L。采用该优化培养基进行发酵,三萜含量达到 57.1 mg/g,这为今后工业化发酵生产三萜化合物提供了一定的依据。实验中还发现了一些物质能促进三萜生物合成途径中关键性酶的活性,从而提高了三萜含量,为今后研究提供了很好的思路。

### 参考文献:

- [1] Wasser S P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89 (5): 1323-1332.
- [2] Zheng W, Miao K, Liu Y, et al. Chemical diversity of biologically active metabolites in the sclerotia of *Inonotus obliquus* and submerged culture strategies for up-regulating their production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(4): 1237-1254.
- [3] Handa N, Yamada T, Tanaka R. An unusual lanostane-type triterpenoid, spiroinonotsuoxodiol, and other triterpenoids from *Inonotus obliquus* [J]. Phytochemistry, 2010, 71(14/15): 1774-1779.
- [4] Xu X, Wu Y, Chen H. Comparative antioxidative characteristics of polysaccharide-enriched extracts from natural sclerotia and cultured mycelia in submerged fermentation of *Inonotus obliquus* [J]. Food Chemistry, 2011, 127(1): 74-79.
- [5] Taji S, Yamada T, Wada S. Lanostane-type triterpenoids from the sclerotia of *Inonotus obliquus* possessing anti-tumor promoting activity[J]. European Journal of

- Medicinal Chemistry, 2008, 43(11): 2373-2379.
- [6] Nomura M, Takahashi T, Uesugi A, et al. Inotodiol, a lanostane triterpenoid, from *Inonotus obliquus* inhibits cell proliferation through caspase-3-dependent apoptosis [J]. Anticancer Research, 2008, 28(5A): 2691-2696.
- [7] Gao H, Gu W. Optimization of polysaccharide and ergosterol production from *Agaricus brasiliensis* by fermentation process[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 33(3): 202-210.
- [8] Shih I, Tsai K, Hsieh C. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 33 (3): 193-201.
- [9] Gao H, Liu M, Liu J, et al. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(17): 4012-4016.
- [10] Guo W, Ren N, Wang X, et al. Optimization of culture conditions for hydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49 using response surface methodology[J]. Bioresource Technology, 2009, 100 (3): 1192-1196.
- [11] Kim H O, Lim J M, Joo J H. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agroclybe cylindracea* [J]. Bioresource Technology, 2005, 96(10): 1175-1182.
- [12] Chen Y, Xie M Y, Gong X F. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum* [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 81(1): 162-170.
- [13] Ren A, Qin L, Shi L, et al. Methyl jasmonate induces ganoderic acid biosynthesis in the basidiomycetous fungus *Ganoderma lucidum* [J]. Bioresource Technology, 2010, 101 (17): 6785-6790.
- [14] Hubert S. The role of sterols in plant growth and development [J]. Progress in Lipid Research, 2003, 42 (3): 163-175.
- [15] Yoon H J, Kim H K, Ma C J, et al. Induced accumulation of triterpenoids in *Scutellaria baicalensis* suspension cultures using a yeast elicitor[J]. Biotechnology Letters, 2000, 22(13): 1071-1075.
- [16] Zheng W, Xiang X, Chen C, et al. Effects of culture media and three metal ions on the accumulation of lanosterol and ergosterol in cultured mycelia of *Inonotus obliquus* [J]. Mycosystema, 2008, 27(1): 126-139.

## A Study on NO + CO Reaction Activity of CuO Catalysts Supported on TiO<sub>2</sub>

XU Huo-ying<sup>1</sup>, CHEN Li-jiang<sup>1</sup>, JIA Yan-rong<sup>1,2</sup>, JIANG Xiao-yuan<sup>2</sup>

(1. Department of Chemistry, School of Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Department of Chemistry, School of Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310028, China)

**Abstract:** This thesis studies the properties and activities of the CuO/TiO<sub>2</sub> by TiO<sub>2</sub> carrier calcined at different temperatures. Then, it investigates the anatase and rutile mixed-phases in TiO<sub>2</sub> carrier calcined at 600°C by XRD and carries out Raman analysis. The 6% of CuO/TiO<sub>2</sub> studied when the TiO<sub>2</sub> carrier calcines at 600°C demonstrates better activities. NO conversion is 82.6% at the reaction temperature of 375°C. All characteristics of the catalysts show CuO has strong interference with TiO<sub>2</sub>. Combined with the profiles of H<sub>2</sub>-TPR, it suggests reduction peaks are the reduction of CuO species.

**Key words:** titanium dioxide; anatase; rutile; reaction activity

(责任编辑: 许惠儿)

(上接第 129 页)

## Submerged Culture Optimization for Biomass and Triterpenoids Production by *Inonotus obliquus* Using Response Surface Methodology

XIANG Chao, XU Xiang-qun

(School of Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** This thesis uses one-factor-one-time method and finds that glucose and mixed nitrogen sources are the best carbon and nitrogen sources. With the fractional factorial experiment design, it screens the significant effect of glucose, peptone, CaCl<sub>2</sub> and yeast powder on triterpenoids biosynthesis. Ultimately, the authors employ the response surface methodology to optimize the medium composition for biomass and triterpenoids production by *I. obliquus* in shake flask culture. The optimal medium composition is: glucose 58.9 g/L, peptone 2.9 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.5 g/L, yeast powder 1.2 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L and MgSO<sub>4</sub> 0.2 g/L. Under optimal conditions, the authors significantly enhance the triterpenoids production and the mycelial biomass from *I. obliquus* and the triterpenoids production reaches up to 57.1 mg/g, representing an increase of 36.6% and 57.3% compared with that using the basal medium (41.8 mg/g) and natural sclerotia (36.3 mg/g), respectively.

**Key words:** *Inonotus obliquus*; triterpenoids; response surface methodology; submerged fermentation

(责任编辑: 马春晓)