

## 研究报告

## 两株内生真菌菌株固态发酵培养基优化

李信军<sup>1Δ</sup> 冯晓晓<sup>1Δ</sup> 金慧清<sup>2</sup> 徐清泉<sup>2</sup> 林福呈<sup>1</sup> 章初龙<sup>1\*</sup>

(1. 浙江大学生物技术研究所 浙江 杭州 310058)

(2. 浙江中烟工业有限责任公司技术中心 浙江 杭州 310024)

**摘要:**【目的】研究内生真菌菌株 YCEF005、YCEF053 固态发酵培养基。【方法】通过单因素试验和正交试验设计优化固态发酵培养基基质组成;通过单因素试验和均匀试验设计及神经网络结合遗传算法优化基质外加组分和接种量。【结果】优化的 YCEF005 培养基基质组成(质量比)为麸皮 50%、豆饼粉 10%、米糠 20%、玉米碎粒 20%; YCEF053 培养基基质组成为麸皮 60%、豆饼粉 10%、米糠 10%、玉米碎粒 20%。YCEF005 基质外加组分和接种量(kg 基质)为蔗糖 12.96 g、蛋白胨 12.70 g、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 4.00 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.50 g、CaSO<sub>4</sub> 10.00 g、MgSO<sub>4</sub> 0.48 g、含水量 500 g、接种量 24 mL。YCEF053 基质外加组分和接种量(kg 基质)为蔗糖 13.37 g、蛋白胨 14.02 g、NaNO<sub>3</sub> 3.85 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.23 g、CaSO<sub>4</sub> 10.89 g、MgSO<sub>4</sub> 0.52 g、含水量 480 g、接种量 20 mL。在优化培养基上发酵 7–9 d 获得最大发酵生物产量。【结论】通过对固态发酵培养基的优化提高了发酵的生物产量。

**关键词:** 内生真菌, 固态发酵, 人工神经网络, 遗传算法

## Optimization of solid-state fermentation media for growth of two endophytic fungal strains

LI Xin-Jun<sup>1Δ</sup> FENG Xiao-Xiao<sup>1Δ</sup> JIN Hui-Qing<sup>2</sup> XU Qing-Quan<sup>2</sup>  
LIN Fu-Cheng<sup>1</sup> ZHANG Chu-Long<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

(2. Technology Center, China Tobacco Zhejiang Industrial Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang 310024, China)

**Abstract:** [Objective] Solid-state fermentation (SSF) media for growth of the two endophytic fungal strains (YCEF005 and YCEF053) were investigated. [Methods] The composition of fermentation substrates were optimized through single factor experiment and orthogonal experimental design. The additional nutrients and inoculum dose on the basis of the fermentation substrates were optimized through the combination of single factor experiment, uniform experimental design as well as artificial

**Foundation item:** Key Science and Technique Programs of the China Tobacco Zhejiang Industrial Co., Ltd.

\*Corresponding author: Tel: 86-571-88982291; E-mail: clzhang@zju.edu.cn

ΔThese authors equally contributed to this work

**Received:** June 10, 2015; **Accepted:** September 07, 2015; **Published online** (www.cnki.net): November 10, 2015

基金项目: 浙江中烟工业有限责任公司重点科技项目

\*通讯作者: Tel: 86-571-88982291; E-mail: clzhang@zju.edu.cn

Δ并列第一作者

收稿日期: 2015-06-10; 接受日期: 2015-09-07; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-11-10

neural network with genetic algorithm. **[Results]** The optimal fermentation substrates for YCEF005 are as follows (W/W): 50% wheat bran, 10% bean cake powder, 20% rice bran, 20% corn flour. The optimal fermentation substrates for YCEF053 are as follows (W/W): 60% wheat bran, 10% bean cake powder, 10% rice bran, 20% corn flour. The optimal additional nutrients and inoculum dose (per kg substrates) for YCEF005 is as follows: sucrose 12.96 g, peptone 12.70 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  4.00 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.50 g,  $\text{CaSO}_4$  10.00 g,  $\text{MgSO}_4$  0.48 g, water content 500 g, inoculum dose 24 mL. The optimal additional nutrients and inoculum dose (per kg substrates) for YCEF053 is as follows: sucrose 13.37 g, peptone 14.02 g,  $\text{NaNO}_3$  3.85 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.23 g,  $\text{CaSO}_4$  10.89 g,  $\text{MgSO}_4$  0.52 g, water content 480 g, inoculum dose 20 mL. The maximum fungal biomass was achieved when cultured on the optimal medium for 7–9 d. **[Conclusion]** The biomass of fungal SSF was improved by optimizing the media compositions.

**Keywords:** Endophytic fungi, Solid-state fermentation, Artificial neural network, Genetic algorithm

生产中一个新菌株的引入,首先需要设计一个合适的发酵培养基,其步骤主要由试验设计、数学建模和优化设计三部分组成。合理的试验设计可以用更少的实验数据获得更优的建模效果,合理的模型能够准确预测培养基配比对所考察目标的影响规律,优化方法则是在已建立数学模型的基础上运用最优化技术,搜索出因子空间中的最优解。固态发酵(Solid-state fermentation, SSF)是菌体生产的常用工艺,是一个多相多变量、强耦合的非线性系统<sup>[1]</sup>,发酵过程机理复杂、影响因素众多,其培养基优化面对许多挑战。人工神经网络技术是一种“黑箱”模型,根据输入输出数据来建立模型,网络的统计信息储存在连接权矩阵内,可用于反映非线性条件下难以用常规数学模型描述的问题。遗传算法是以自然选择和遗传理论为基础,将生物进化过程中适者生存规则与群体内部染色体的随机信息交换机制相结合的高效全局寻优搜索算法。人工神经网络和遗传算法的结合可以通过引入非线性的模型来描述各因素间复杂的关系,并在遗传算法的基础上,通过全局寻优找出最佳值。目前已经有不少学者通过神经网络和遗传算法来优化发酵培养基<sup>[2-7]</sup>。

内生真菌对植物生长、抗逆性<sup>[8-12]</sup>等方面具有重要作用。镰刀菌 *Fusarium* sp.菌株 YCEF005、棘壳孢 *Pyrenochaeta* sp.菌株 YCEF053 是本实验室分离筛选的两株内生真菌,具有促进烟草生长、降低烟叶重金属含量的作用(另文发表),可作为烟草生

产的内生真菌促进剂。本文应用神经网络结合遗传算法的优化方法,优化两株内生真菌的固态发酵培养基,以提高固态发酵的生物产量,为应用廉价的培养基质进行内生真菌制剂商品化生产及在农业中大规模的应用提供理论依据和技术参数。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

烟草内生真菌:镰刀菌 *Fusarium* sp.菌株 YCEF005 (CCTCCM2013592)和棘壳孢 *Pyrenochaeta* sp.菌株 YCEF053 (CCTCCM2013593)由本实验室分离,现保存于中国典型培养物保藏中心。

### 1.2 培养基

种子培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato dextrose agar, PDA)<sup>[13]</sup>。

液体种子培养基:马铃薯葡萄糖培养液(Potato dextrose broth, PDB)<sup>[13]</sup>。

### 1.3 培养方法

菌株活化:用灭菌的牙签挑取 PDA 斜面保存管中的少许菌丝,接种于 PDA 培养基上,封口后置于恒温培养箱中,25 °C 黑暗培养活化。

一级种子液培养:将 10 块直径 5 mm 的菌饼,接种于 200 mL PDB 中,于 25 °C、150 r/min 培养 72 h。

二级种子液培养:200 mL 一级种子液用搅拌器打碎并混匀,吸取 20 mL 接种于 200 mL PDB 中,于 25 °C、150 r/min 培养 72 h。

固态培养:于 50 mL 锥形瓶中放置 10 g 配制的培养基, 0.15 MPa 灭菌 30 min 备用。将 200 mL 二级种子液打碎并混匀, 吸取 2 mL 接种于培养基中, 25 °C 暗培养 7 d。

#### 1.4 固态发酵中菌丝生物量的测定方法

二级种子培养液用 8 层纱布过滤, 用无菌水充分洗涤滤出物, 收集滤出物即为纯菌体, 65 °C 烘干至恒重, 保存备用。精密称取 0.01、0.03、0.05、0.1、0.15、0.2 g 纯菌体, 加入 25 mL 5%三氯乙酸溶液, 于 80 °C 水浴中搅拌提取 25 min, 取出后冰浴冷却, 然后 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min, 稀释 2 倍, 以 5%三氯乙酸作空白对照, 分光光度计测定  $OD_{260}$  值。

取 0.25 g 烘干至恒重的固态发酵物, 在液氮中充分研磨, 按照纯菌体中核酸的提取方法进行提取, 未经发酵的固态基质采用同样的方法处理作为空白对照, 测定  $OD_{260}$  值。

#### 1.5 固态发酵培养组分优化

**1.5.1 发酵基质优化:** 发酵基质: 麸皮、米糠、豆饼、玉米碎粒(市售)。发酵基质单因素试验: 分别称取麸皮、米糠、豆饼、玉米碎粒各 10 g 作为单一基质, 在初始含水量 50%、接种量 20%、25 °C 条件下培养 7 d, 重复 3 次, 以确定最佳的单因素基质。发酵基质正交试验设计: 基于单因素试验筛选的最佳单基质, 配合另外 3 种基质, 设计 4 因素 3 水平的正交试验(表 1), 优化固态发酵基质组合。

**1.5.2 外加营养组分优化:** 外加营养组分单因素试验: 在优化的发酵基质组合中分别添加营养组分(表 2), 每个处理 3 个重复, 考察外加营养组分对菌丝生物量的影响。

外加营养组分均匀试验设计: 基于外加营养单因素试验筛选得到的各类营养组分, 按均匀试验设计 8 因素 6 水平的 24 组试验, 每个处理 3 个重复。

**1.5.3 数据统计与分析:** 应用 Matlab R2012b 实现模型建立与优化。

(1) 基于粒子群算法(PSO)的 BP 人工神经网络模型构建。以发酵培养基的均匀设计的 24 组试验中的 19 组试验数据作为 BP 神经网络的训练样本,

表 1 发酵基质正交试验表  
Table 1 Orthogonal test level table of the fermentation substrates

水平 Level (W/W)	1 (%)	2 (%)	3 (%)
豆饼 Bean cake powder (A)	10	20	30
米糠 Rice bran (B)	10	20	30
玉米碎粒 Corn flour (C)	10	20	30

表 2 外加营养组分  
Table 2 The additional nutrient components

考察因素 Items	组分 Components	含量 Content (%)
碳源 Carbon source	葡萄糖, 蔗糖, 麦芽糖	1.0
氮源 Nitrogen source	有机氮源: 蛋白胨, 尿素 无机氮源: 硝酸铵, 硫酸铵, 硝酸钠	1.0
磷酸盐 Phosphate	磷酸氢二钾, 磷酸二氢钾	0.1
钙离子 Calcium ion	硫酸钙, 碳酸钙	1.0
镁离子 Magnesium ion	硫酸镁	0.1

另 5 组数据作为网络的预测样本。经验公式<sup>[14]</sup>如下:

$$s = \sqrt{0.43mn + 0.12n^2 + 2.54m + 0.77n + 0.35} + 0.51$$

$s$ : 隐藏层神经元个数;  $m$ : 输入层神经元个数;  $n$ : 输出层神经元个数。

根据考察组分与优化指标个数设计网络拓扑结构: 8→5→1 (图 1)。

本试验中使用粒子群算法(PSO)优化 BP 神经网络(8→5→1)权值和阈值, 即  $5 \times 8 + 5 = 45$  个权值,  $5 + 1 = 6$  个阈值, 所以个体编码长度为  $45 + 6 = 51$ 。以均匀试验的 24 组数据中的 19 组作为训练样本, 5 组作为测试样本。设定 PSO 算法的参数:  $c1 = 1.49445$ ;  $c2 = 1.49445$ ;  $Maxgen = 100$ ;  $Sizepop = 30$ ;  $Vmax = 1$ ;  $Vmin = -1$ ;  $Popmax = 5$ ;  $Popmin = -5$ 。把神经网络训练数据的仿真值与实际值的差值的绝对值 Error 作为 PSO 算法的适应度值, 即:

$$Error = |Sim - Train|$$

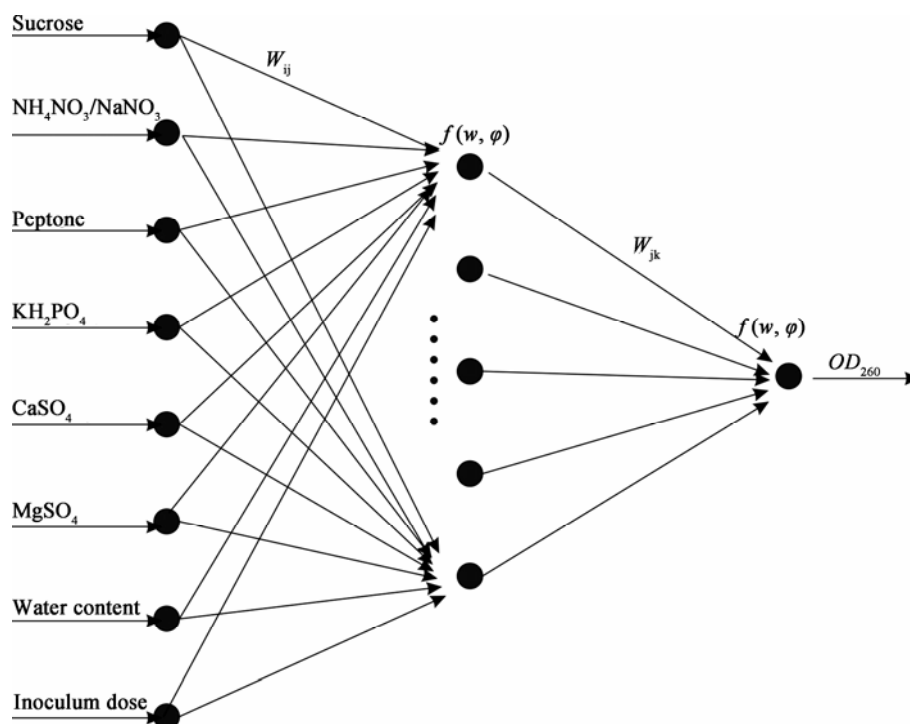


图1 网络拓扑结构

Figure 1 Artificial neural network topology

Sim: 神经网络的仿真输出值; Train: 神经网络训练样本的实际输出值。

(2) 人工神经网络遗传算法寻优。以基于 PSO 算法的 BP 神经网络模型的预测值的相反数作为 GA 算法的适应度, 寻求 BP 网络输出的最大值, 即发酵最大生物量。参数设定: 迭代次数 Maxgen=100, 种群规模 Sizepop=30, 交叉系数 Pcross=[0.4], 变异系数 Pmutation=[0.2]。遗传算法由 MTLAB 软件 GAOT 遗传算法工具箱完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 纯菌丝干重和核酸含量的线性关系

由图 2 可知, 两个烟草内生真菌菌株菌丝中的核酸量与菌丝干重之间在所测试的范围内具有良好的线性关系, 菌株 YCEF005 线性方程为  $Y_{005}=10.131X+0.0332$ ,  $R^2=0.9995$ ; 菌株 YCEF053 线性方程为  $Y_{053}=11.757X+0.0716$ ,  $R^2=0.9988$ 。

### 2.2 发酵基质优化

对内生真菌菌株 YCEF005、YCEF053 分别进

行麸皮、米糠、豆饼、玉米碎粒 4 种基质单因素试验。结果表明, 麸皮是两株内生真菌的最佳培养单基质(图 3)。麸皮碳氮比约 20:1, 除含有丰富的淀粉、蛋白质、纤维素和半纤维素等碳水化合物以外, 还含有多种维生素和金属离子<sup>[15-17]</sup>。同时, 麸皮比较松散, 具有良好的通气状态, 有利于真菌的生长。

以麸皮为主要基质, 按  $L_9(3^4)$  正交表, 设计豆饼粉、玉米碎粒、米糠 4 因素 3 水平正交试验设计, 通过各因素水平对 YCEF005、YCEF053 发酵生物量( $OD_{260}$ )影响的极差分析(图 4), 获得菌株 YCEF005、YCEF053 的最佳发酵基质组合。YCEF005 的最佳基质组合(质量比)为麸皮 50%、豆饼粉 10%、米糠 20%、玉米粉 20%; YCEF053 的最佳基质组合(质量比)为麸皮 60%、豆饼粉 10%、米糠 10%、玉米粉 20%。

### 2.3 外加营养组分筛选

在最佳发酵基质组合上, 单因素试验确定外加碳源、氮源、磷酸盐、钙盐和镁盐对 YCEF005、

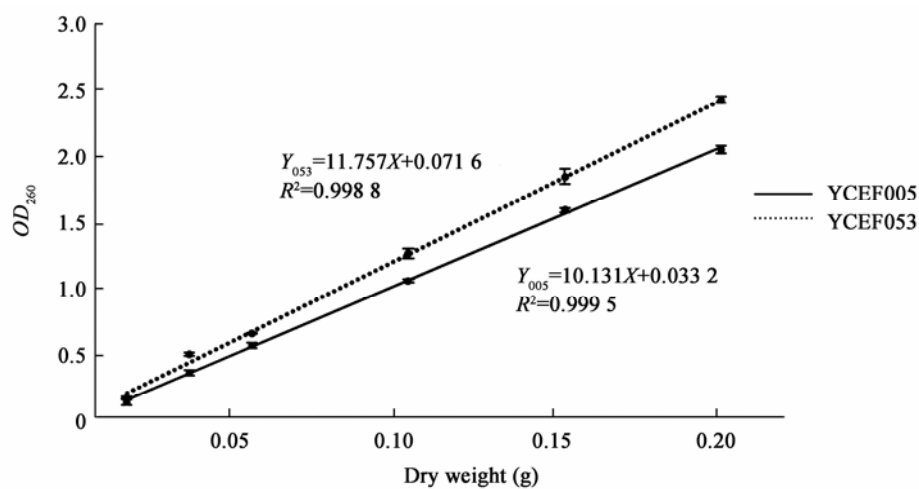


图2 菌丝中核酸量与菌丝量的关系

Figure 2 Correlation between amount of mycelia and nucleic acid content

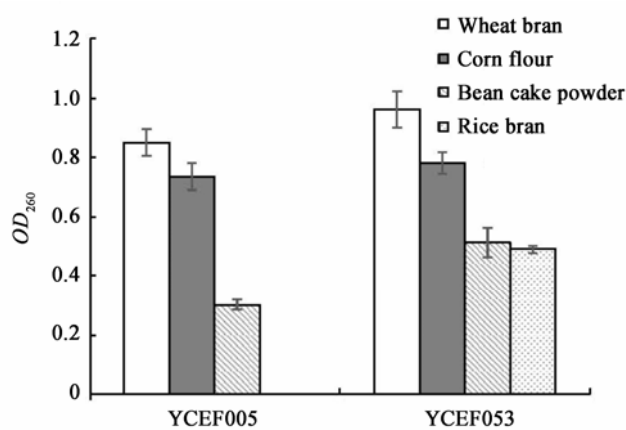


图3 不同发酵基质上内生真菌的生长

Figure 3 Growth of endophytic fungi in different fermentation substrates

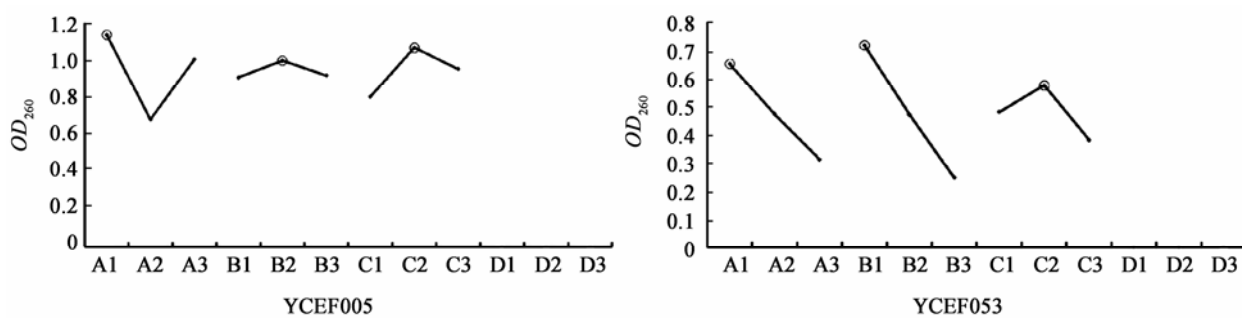


图4 发酵基质正交试验的极差分析

Figure 4 Range analysis of orthogonal experiment for fermentation substrates

YCEF053 生长的影响(图 5), 确定了外加营养组分的种类。YCEF005 外加营养组分为蔗糖、蛋白胨、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{CaSO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ ; YCEF053 发酵外加营养组分为蔗糖、蛋白胨、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{CaSO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 。

## 2.4 人工神经网络建模及其全局寻优

采用训练后得到的网络模型, 对 5 个预测集样本进行仿真运算, 结果如图 6 所示。由图 6 可知,  $OD_{260}$  值的仿真值与实测值的误差在 10% 以内, 网络具有良好的泛化能力, 可用来预测固态发酵的真菌生物量。

使用 BP-GA 优化模型对培养基配方进行全局寻优(图 7), 经过 100 次的遗传操作后, 得到最优化发酵培养基组成(表 3), 根据 BP 模型预测得到此优化条件下 YCEF005 的  $OD_{260}$  值为 1.60, YCEF053 的  $OD_{260}$  值为 1.48。

## 2.5 菌株在优化后发酵培养基上的生长曲线

两株供试内生真菌菌株在优化后的发酵培养基上的生长曲线如图 8 所示。在第 3 天至第 7 天内两个菌株的生物量快速增加, 第 7 到第 9 天缓慢增加, 9 d 时候基本保持恒定, 达到平衡的生物量。

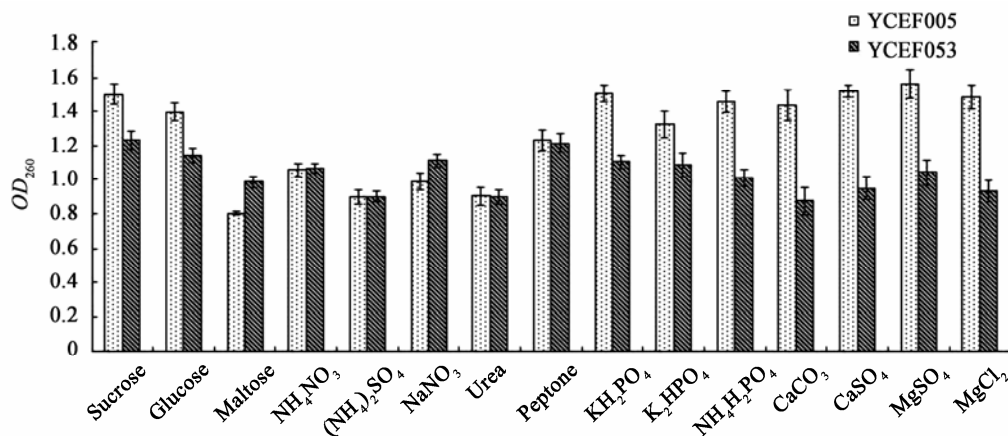


图 5 内生真菌在不同营养组分培养基上的生长

Figure 5 Growth of endophytic fungi in different components of culture medium

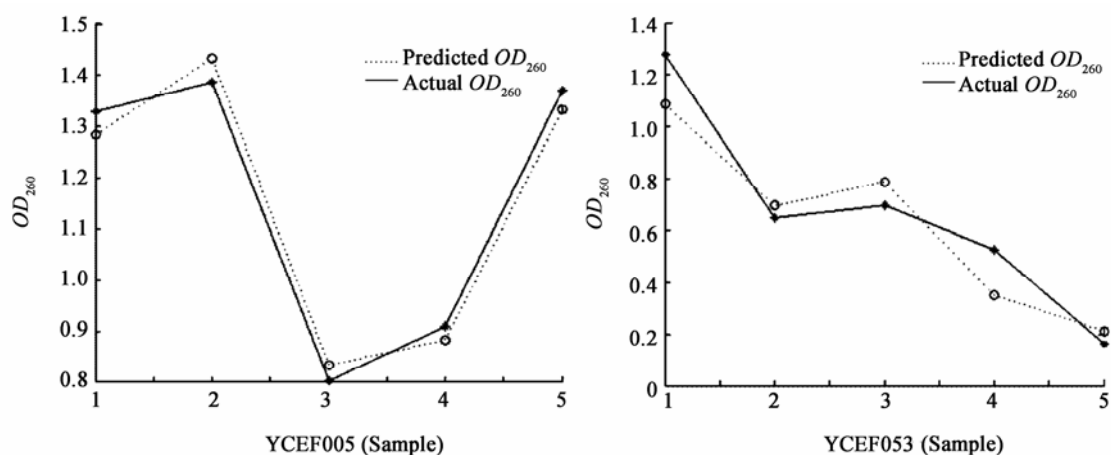


图 6 生物量的实测值与仿真值

Figure 6 Actual value and predicted value of biomass

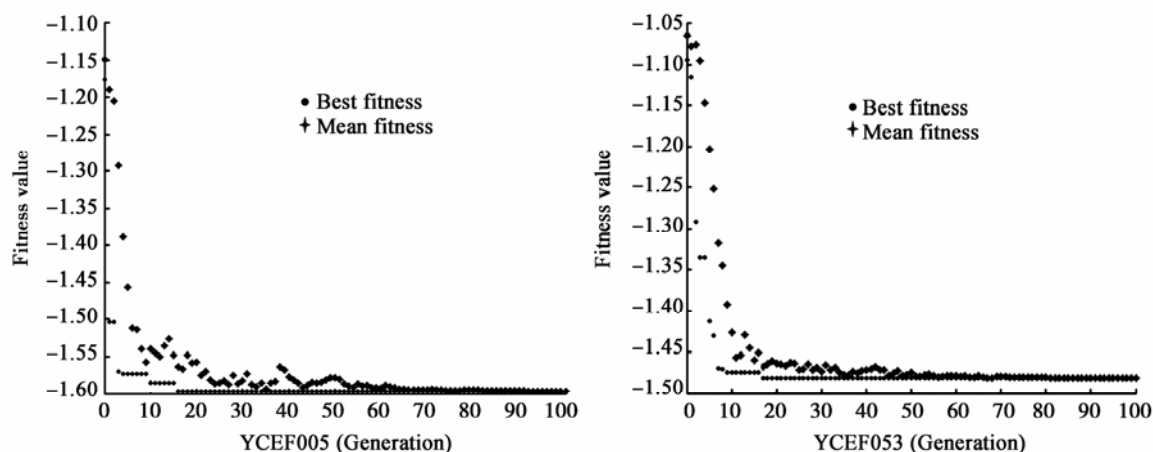


图7 人工神经网络遗传寻优过程

Figure 7 Optimization process of artificial neural network

表3 人工神经网络寻优结果  
Table 3 Optimization results of artificial neural networks

Strain	Sucrose (g/kg)	Peptone (g/kg)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> /NaNO <sub>3</sub> (g/kg)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/kg)	CaSO <sub>4</sub> (g/kg)	MgSO <sub>4</sub> (g/kg)	含水量 Water content (%)	接种量 Inoculum dose (%)	最优 Optimum	验证 Validation
YCEF005	12.96	12.70	4.00	1.50	10.00	0.48	50	24	1.60	1.513
YCEF053	13.37	14.02	3.85	1.23	10.89	0.52	48	20	1.48	1.492

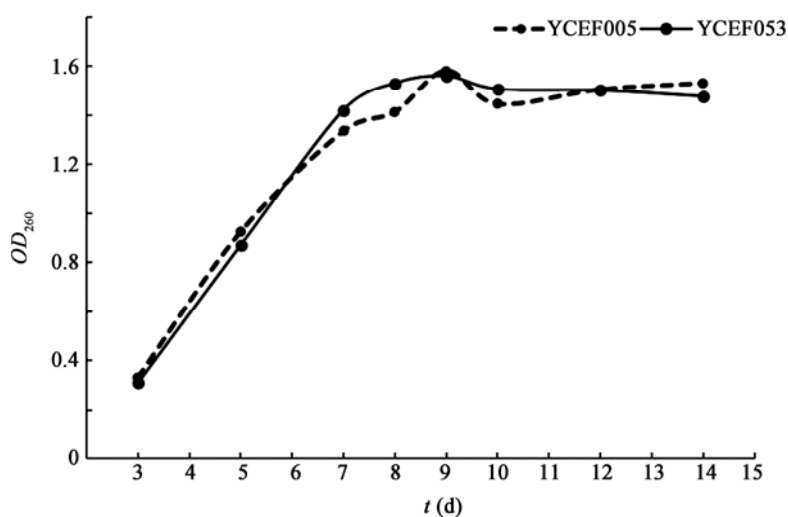


图8 菌株生长曲线

Figure 8 Growth curve of strain in the optimal medium

### 3 讨论

固态发酵是指没有或几乎没有自由水存在下,在有一定湿度的水不溶性固态基质中,培养一种或多种微生物的一个生物反应过程。在固态发酵过程中,菌丝深入培养基基质内部,菌丝体与培养基紧密缠绕在一起,很难从培养基中分离,所以很难直接测定生物量。为了解决这一问题,通常采用真菌核酸含量的测定来衡量真菌生物量。本实验所研究的两种菌,在实验测试范围内结果表明核酸含量和菌丝干重有很好的线性关系,可以用做衡量固态发酵过程中菌丝生物量的参数,这和魏培莲等<sup>[18]</sup>研究结果一致。

人工神经网络具有较好的非线性逼近能力和自学习能力,理论上它能够充分逼近任意复杂的非线性关系,但神经网络复杂性很大程度上影响神经网络的性能<sup>[19]</sup>。本试验针对实验室分离筛选的两株具有促进烟草生长、降低烟叶重金属含量的内生真菌菌株,通过基于 PSO 算法的 BP 人工神经网络对均匀设计试验结果进行较好地拟合、构建得到一个模型。使用 BP-GA 优化模型对培养基配方进行全局寻优,最终得到两株内生真菌的固态发酵培养基,以麸皮、豆饼粉、米糠和玉米粉为基质,以速效碳源(蔗糖)、氮源(蛋白胨和  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  或  $\text{NaNO}_3$ )及 P、S、K、Ca、Mg 等无机盐作为外加营养组分,能弥补真菌在麸皮等发酵基质上生长速度慢的缺点,发酵 7 d 菌体生长即进入平台期,与周惠茹等<sup>[20]</sup>研究结果一致。本试验设计的固态发酵培养基为内生真菌菌肥制剂的商品化生产及农业应用奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Fang BS, Chen HW, Xie XL, et al. The medium optimization of xylitol fermentation based on neural networks and genetic algorithms[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2000, 16(5): 648-650 (in Chinese)  
方柏山, 陈宏文, 谢晓兰, 等. 基于神经网络和遗传算法的木糖醇发酵培养基优化研究[J]. 生物工程学报, 2000, 16(5): 648-650
- [2] Zhou Y, Zheng Y, Song LD. The optimization of medium for coenzyme Q10 fermentation by artificial neural network associated with genetic algorithms[J]. China Biotechnology, 2013, 33(9): 73-78 (in Chinese)  
周勇, 郑毅, 宋利丹. 人工神经网络与遗传算法耦合优化辅酶 Q10 发酵培养基[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(9): 73-78
- [3] Lu ZM, He Z, Xu HY, et al. Medium optimization for mycelia production of *Antrodia camphorata* based on artificial neural network-genetic algorithm[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(12): 1773-1779 (in Chinese)  
陆震鸣, 何喆, 许泓瑜, 等. 基于人工神经网络-遗传算法的樟芝发酵培养基优化[J]. 生物工程学报, 2011, 27(12): 1773-1779
- [4] Wu YP, Zhou JW, Chen SW, et al. Optimization of solid-state fermentation medium for poly- $\gamma$ -glutamic acid production by *Bacillus subtilis* ME714[J]. Chinese Journal of Applied and Environment Biology, 2007, 13(5): 713-716 (in Chinese)  
吴永平, 周景文, 陈守文, 等. 枯草芽孢杆菌 ME714 产聚- $\gamma$ -谷氨酸固态发酵培养基的优化[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(5): 713-716
- [5] Lv WW, Zhang QQ, Tang WJ, et al. Fermentation conditions optimization for  $\gamma$ -aminobutyric acid production based on neural network and genetic algorithms[J]. Journal of Anhui Polytechnic University, 2012, 27(1): 5-8 (in Chinese)  
吕闻闻, 张庆庆, 汤文晶, 等. 基于神经网络与遗传算法优化  $\gamma$ -氨基丁酸的发酵条件[J]. 安徽工程大学学报, 2012, 27(1): 5-8
- [6] Desai KM, Survase SA, Saudagar PS, et al. Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: case study of fermentative production of scleroglucan[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 41(3): 266-273
- [7] Zhu XS, Yang ZQ, Li JX, et al. Optimization of *Radix astragalus* fermentation medium based on neural network and genetic algorithms[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2008, 27(3): 18-20 (in Chinese)  
朱新术, 杨志强, 李建喜, 等. 基于神经网络和遗传算法的黄芪发酵培养基优化[J]. 中兽医医药杂志, 2008, 27(3): 18-20
- [8] Mandyam K, Jumpponen A. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi[J]. Studies in Mycology, 2005, 18(53): 173-189
- [9] Newsham KK. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes[J]. New Phytologist, 2011, 190(3): 783-793
- [10] Ban YH, Tang M, Chen H, et al. The response of dark septate endophytes (DSE) to heavy metals in pure culture[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47968
- [11] Li T, Liu MJ, Zhang XT, et al. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*[J]. Science of the Total Environment, 2011, 409(6): 1069-1074
- [12] Wang C, Mao LJ, Hui FQ, et al. Effects of endophytic fungus *Piriformospora indica* on growth and metabolism of tobacco at different levels of nitrogen nutrition[J]. Tobacco Science & Technology, 2014(5): 76-81 (in Chinese)  
王衬, 毛黎娟, 惠非琼, 等. 不同氮素水平下内生真菌印度梨形孢定殖对烟草生长发育及物质代谢的影响[J]. 烟草科技, 2014(5): 76-81
- [13] Fang ZD. Research Method of Plant Pathology[M]. 3rd Edition. Beijing: Chinese Agriculture Press, 1998 (in Chinese)  
方中达. 植物研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [14] Gao DQ. On structures of supervised linear basis function feedforward three-layered neural networks[J]. Chinese Journal of Computers, 1998, 21(1): 80-86 (in Chinese)  
高大启. 有教师的线性基本函数前向三层神经网络结构研究



- [J]. 计算机学报, 1998, 21(1): 80-86
- [15] Guo N, Jiang ST, Li XJ, et al. Extraction of wheat bran protein and amino acid composition analysis[J]. Journal of Hefei University of Technology, 2013, 36(2): 224-227 (in Chinese)  
郭娜, 姜绍通, 李兴江, 等. 小麦麸皮蛋白质的提取及其氨基酸组分分析[J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2013, 36(2): 224-227
- [16] Wang JS, Liu JB. Exploitation of wheat bran in food[J]. Journal of Cellulose Science and Technology, 2005, 13(3): 61-66 (in Chinese)  
王菁莎, 刘景彬. 小麦麸皮在食品中的开发应用[J]. 纤维素科学与技术, 2005, 13(3): 61-66
- [17] Liu JN, Zhang JC, Zhang PQ, et al. Discussion on the calculation method of carbon-nitrogen ratio in substitute cultivation of black fungus[J]. Heilongjiang Science, 2014, 5(7): 16-17 (in Chinese)  
刘佳宁, 张介驰, 张丕奇, 等. 代料栽培黑木耳碳氮比计算方法的探讨[J]. 黑龙江科学, 2014, 5(7): 16-17
- [18] Wei PL, Cen PL, Sheng CQ. Comparison of three biomass estimation methods in solid state fermentation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2006, 25(1): 61-64, 69 (in Chinese)  
魏培莲, 岑沛霖, 盛春琦. 3种固态发酵生物量测定方法的比较[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(1): 61-64, 69
- [19] Zhao SL. Researches and application on the structure optimization of the BP neural networks[D]. Suzhou: Master's Thesis of Soochow University, 2010 (in Chinese)  
赵寿玲. BP神经网络结构优化方法的研究及应用[D]. 苏州: 苏州大学硕士学位论文, 2010
- [20] Zhou HR, Luan HB, Wang H, et al. Optimization of the fermentation medium of an antitumor endophytic fungus *Aspergillus oryzae* YX-5 isolated from *Ginkgo biloba*[J]. Microbiology China, 2014, 41(7): 1358-1367 (in Chinese)  
周惠茹, 栾海彬, 王慧, 等. 抗肿瘤银杏内生真菌 *Aspergillus oryzae* YX-5 发酵培养基的优化[J]. 微生物学通报, 2014, 41(7): 1358-1367

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、显微世界、专栏、书讯、会讯等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

### 3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

#### 3.1 参考文献

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过3人时全部列出, 多于3人时列出前3人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)  
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)  
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)  
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

#### 3.2 脚注(正文首页下方)

Foundation item:

\*Corresponding author: Tel: ; Fax: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(No. )

\*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-00-00; 接受日期: 20xx-00-00; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-00-00

(下转 p.566)