

蛹虫草N102多糖提取条件优化 及其抗肿瘤活性研究

逯城宇¹,张尊凯¹,刘艳¹,张小蕾³,张毅君¹,滕利荣^{1,2,*}

(1.吉林大学生命科学学院,吉林长春 130012;

2.吉林大学珠海学院,广东珠海 519041;

3.新加坡国立大学理学院,新加坡肯特岗 118426)

摘要:以蛹虫草高产突变株N102的胞内多糖为研究对象。在单因素实验的基础上采用响应面实验对蛹虫草N102多糖的提取工艺条件进行优化。蛹虫草N102的菌丝体干粉经乙醇除杂、水提、反复冻融、除蛋白、乙醇分级沉淀等方法得到三种多糖组分(2、4和6倍醇沉蛹虫草N102多糖),并采用MTT法分别研究了蛹虫草N102各级醇沉多糖对人宫颈癌细胞Hela体外增殖的影响。结果表明,蛹虫草N102的最佳提取工艺为:提取温度83℃,提取时间3.2h,水料比52:1(mL:g)。3次验证实验得到的蛹虫草N102多糖提取率的平均值为7.24%,相对误差为1.16%,可见该模型能较好地预测蛹虫草N102多糖的提取工艺。蛹虫草N102的4倍醇沉多糖(4FPS)对Hela细胞具有较强的抑制作用,当作用时间为72h时,抑制率可达到74.98%,IC₅₀仅1.72mg/mL。

关键词:蛹虫草,多糖,提取,响应面,抗肿瘤活性

Study on the optimization of the extraction conditions and the anticancer activity of polysaccharide from the highly-yielding strain *Cordyceps Militaris* N102

LU Cheng-yu¹,ZHANG Zun-kai¹,LIU Yan¹,ZHANG Xiao-lei³,ZHANG Yi-jun¹,TENG Li-rong^{1,2,*}

(1.College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, China;

2.Zhuhai College, Jilin University, Zhuhai 519041, China;

3.Faculty of Science, National University of Singapore, Kent Ridge 118426, Singapore)

Abstract: The polysaccharide in highly-yielding mutagenic strain *Cordyceps militaris* N102 was studied. Response surface methodology (RSM) was applied to optimize the extraction conditions of polysaccharide in *Cordyceps militaris* N102 mycelium. After repeated freeze-thaw, deproteinization, dialysis and ethanol precipitation, crude polysaccharide of *Cordyceps militaris* N102 (2FPS, 4FPS and 6FPS) was obtained. The MTT assay was applied to study the inhibitory activity of crude polysaccharide of *Cordyceps militaris* N102 on the Hela cells proliferation. The results indicated that the optimum process conditions for the extraction conditions of adenosine were as follow: extracting temperature was 83℃, extracting time was 3.2h and solvent/solid ratio was 52:1(mL:g). The average yield of adenosine in 3 validation experiments was 7.24%. The relative error was 1.16%. The results of MTT assay showed that polysaccharides presented inhibitory activity on the cells proliferation of Hela. After 72h incubation, the inhibition rate of Hela was 74.98%, and the IC₅₀ was only 1.72mg/mL.

Key words: *Cordyceps militaris*; polysaccharide; extraction; response surface methodology; anticancer activity

中图分类号:TS201.2+3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2012)14-250-05

蛹虫草[*Cordyceps militaris* (L.Fr.) Link], 隶属真菌门(Eumycota)、子囊菌纲(Ascomycotina)、肉座菌目(Clavicipitales)、麦角菌科(Hypocreaceae)、虫草属(*Cordyceps*), 又称北冬虫夏草、北虫草。蛹虫草是应用最广泛的虫草替代品, 为虫草属的模式菌种, 是与虫草同属异种的近缘种^[1]。研究证明蛹虫草具有提高

免疫力^[2]、抗菌消炎、补肺平喘^[3-4]、清除自由基^[5]、延缓衰老^[6]、抗病毒^[7]、防治癌症^[8]等药理作用。蛹虫草的生物活性物质主要包括虫草多糖、虫草素、虫草酸、腺苷、虫草蛋白、甾醇类、超氧化物歧化酶(SOD)等。目前已经有多种虫草多糖被分离纯化, 其结构和药理作用也被深入研究。研究发现虫草多糖具有抗肿瘤^[9]、免疫调节^[10]、抗病毒^[11]、抗衰老^[12]、降血糖^[13]等多种功能。本文在单因素实验的基础上, 通过Box-Behnken实验设计进行响应面分析, 对蛹虫草N102多糖的提取温度、提取时间和水料比进行优化, 通过建立的二次多

收稿日期:2012-03-06 * 通讯联系人

作者简介:逯城宇(1990-), 男, 学士, 主要从事生物技术制药方面的研究。

项式模型研究各因素之间的相互作用,及各因素对响应值的影响,从而确定蛹虫草N102胞内多糖的最佳提取工艺。采用优化后的提取工艺进行蛹虫草N102胞内多糖的提取,通过乙醇除杂、水提、反复冻融、除蛋白、乙醇分级沉淀获得蛹虫草多糖,并采用MTT法对其抗肿瘤活性进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蛹虫草N102 由蛹虫草CICC 14013经亚硝基胍诱变得来,由本实验室保存;人宫颈癌细胞Hela 本实验室保存;胎牛血清 杭州四季青生物工程材料有限公司;DMEM培养液 长春博德生物有限公司;MTT、DMSO 生工生物工程(上海)公司;胰蛋白酶、牛血清白蛋白(BAS) 宝泰克生物科技公司;萘酚、正丁醇、三氯甲烷、无水乙醇、浓硫酸 均为分析纯。

FA1004型电子天平 上海实验仪器厂;HH-66恒温水浴锅 江苏金坛市荣华仪器制造有限公司;TDL-4B高速离心机 上海安亭科学仪器厂;752紫外可见分光光度计 上海分析仪器厂;77530-30LAB冷冻干燥机 美国Labconco公司;FW100高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司;RE52AA型旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;MC0-18AIC CO₂培养箱 日本SANYO公司;IX71倒置相差显微镜 日本OLYMPUS公司;550型酶联检测仪 美国Bio-2Rad公司;可调式微量取液器 德国Eppendorf公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品预处理 采用液体深层发酵的方法获得蛹虫草N102的菌丝体^[4],发酵液4800r/min,离心15min,弃去上清液,加去离子水洗涤菌丝体2次。菌丝体真空冷冻干燥,用小型机械粉碎机粉碎后过60目筛,即得蛹虫草N102菌丝体干粉。

1.2.2 蛹虫草N102多糖的提取 取菌丝体干粉100g,加入95%乙醇,于30℃振摇过夜,真空抽率回收菌粉,重复一次,风干后,加入一定量的去离子水,于恒温水浴中提取。8000r/min离心10min,收集上清液,55℃减压浓缩至1L,离心,收集上清液,于-20℃冷冻24h,室温缓慢融化,4℃,10000r/min离心除去沉淀。反复数次直到无沉淀为止。上清液中加入10mg胰蛋白酶,于37℃水解6h。上清液中加入1/4体积的Sevag试剂(氯仿:正丁醇=4:1)充分混匀,静止分层后,12000r/min离心5min,合并上清液,反复数次至无蛋白层为止。上清液于1×10⁴u的透析袋中去离子水透析48h,收集透析内液,55℃减压浓缩至500mL,分别用2、4、6倍体积的95%乙醇于4℃进行分级沉淀,沉淀冷冻干燥后,称重,即得到蛹虫草N102的2、4、6倍醇沉多糖。

1.2.3 蛹虫草N102多糖提取工艺条件的优化 为了确定蛹虫草N102多糖的最佳水提工艺,采用单因素实验对影响多糖提取率的提取温度、提取时间和水料比三个主要因素进行优化。并在此基础上,根据Box-Behnken实验设计进行三因素三水平的响应面实验,考察提取温度、提取时间、水料比三个自变量对响应值(多糖提取率)的影响,并得到蛹虫草N102多糖的最佳提取工艺条件。响应面分析的因素水平设

计如表1所示。

表1 响应面分析因素与水平表

Table 1 Factors and levels of RSM analysis

因素	水平		
	-1	0	1
Z ₁ 提取温度(℃)	70	80	90
Z ₂ 提取时间(h)	2	3	4
Z ₃ 水料比(mL:g)	40	50	60

1.2.4 MTT比色法测定蛹虫草N102多糖抗肿瘤活性 收集对数生长期的Hela细胞,以0.25%胰酶消化后,加DMEM培养液吹打成细胞悬液,并接种于96孔板中,每孔100μL,调整细胞浓度至1.0×10⁴个每孔后,于37℃,5% CO₂培养箱中培养,至细胞在孔内铺满。换无血清DMEM培养基,孵育24h后,弃培养液,实验组加入150μL样品浓度分别为0.04、0.08、0.16、0.32、0.64、1.28、2.56、5.12mg/mL的无血清培养基,对照组则加入等体积的完全培养基,每组设5个复孔,置于37℃、5% CO₂条件下培养24、48、72h。每孔加入20μL MTT试剂,继续培养4h。小心弃去上清液,每孔加入150μL DMSO,振荡10min,再用酶标仪测定OD₅₇₀,计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组OD值} - \text{给药组OD值}}{\text{对照组OD值}} \times 100$$

1.2.5 分析方法 样品中多糖含量采用萘酚硫酸法进行测定^[5],还原糖含量采用DNS法进行测定^[6],蛋白质含量采用Bradford法进行测定^[7]。

多糖提取率 (w/w,%)=[提取液中多糖含量(g)/原料重量(g)]×100

多糖得率 (w/w,%)=[醇沉粗多糖质量(g)/原料重量(g)]×100

2 结果与讨论

2.1 蛹虫草N102多糖提取工艺的优化

2.1.1 提取温度对多糖提取率的影响 以30:1(mL:g)水料比,分别将蛹虫草N102菌粉悬液于40、50、60、70、80、90℃恒温水浴中浸提4h,8000r/min离心10min,分离上清液并测定多糖提取率,结果如图1所示,多糖提取率随着提取温度的增加而增大,当提取温度达到80℃时提取率达到最大值,大于80℃时多糖提取率反而呈下降趋势。

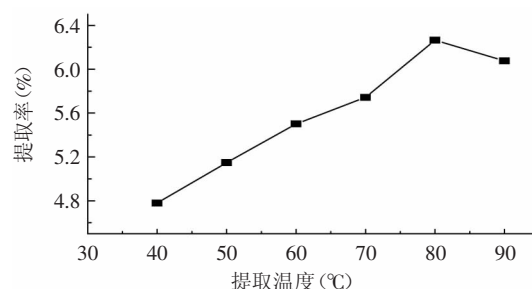


图1 提取温度对多糖提取率的影响

Fig.1 Effect of extraction temp on the yield of polysaccharide

2.1.2 提取时间对多糖提取率的影响 以30:1(mL:g)水料比,将蛹虫草N102菌粉悬液于80℃恒温水浴中,分别浸提1、2、3、4、5h,8000r/min离心10min,分离上清

液并测定多糖提取率。结果如图2所示,随提取时间的增长蛹虫草N102多糖提取率逐渐增大,提取时间达到3h时蛹虫草N102多糖提取率达到最大,其后多糖提取率则趋于平稳。

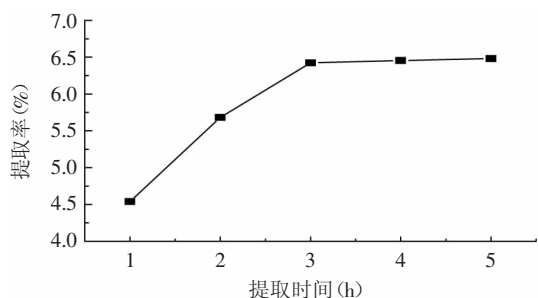


图2 提取时间对多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of extraction time on the yield of polysaccharide

2.1.3 水料比对多糖提取率的影响 分别以20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1 (mL:g) 水料比,将蛹虫草N102菌粉悬液于80℃恒温水浴中,浸提3h,8000r/min离心10min,分离上清液,测定蛹虫草N102多糖提取率。结果如图3所示,水料比未达到50:1 (mL:g) 时,蛹虫草N102多糖提取率随着水料比的增加而增大,水料比为50:1 (mL:g) 时蛹虫草N102多糖提取率达到最大值,然后随着水料比的增大蛹虫草N102多糖的提取率趋于稳定。

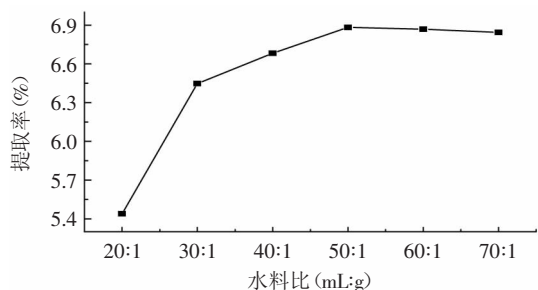


图3 水料比对多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of solvent/solid ratio on the yield of polysaccharide

2.1.4 响应面法优化蛹虫草N102多糖的提取工艺 根据单因素实验的结果,以提取温度、提取时间、水料比为自变量,菌丝体多糖提取率为响应值,采用响应面分析法对三个因素进行优化,以得到最佳的蛹虫草N102多糖提取工艺。

根据表1设计因素水平,对提取温度(X_1)、提取时间(X_2)和水料比(X_3)分别进行编码如下: $X_1=(Z_1-80)/10$, $X_2=(Z_2-3)/1$, $X_3=(Z_3-50)/10$ 。表2显示了响应面分析方案及结果,采用SAS RSREG对表2中数据进行分析,得到响应值对三个自变量的多项二次回归方程为:

$$Y=7.1233+0.1313X_1+0.1075X_2+0.0788X_3-0.1879X_1^2-0.0900X_1X_2-0.0025X_1X_3-0.2704X_2^2+0.0900X_2X_3-0.2429X_3^2 \quad (1)$$

采用F检验对回归方程中各自变量对响应值(Y)的显著性进行判定,回归结果如表3所示。方程中 X_1X_2 、 X_2X_3 为影响显著项($p<0.05$), X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 为影响极显著项($p<0.01$),一次项($p=0.00105$)和平方项

($p=0.00022$)均为极显著项,而交互项($p=0.02655$)为影响显著项,这说明各自变量对响应值的影响除了线性关系外,平方项和交互项对响应值的影响也很大,而回归方程的相关系数 R^2 为0.9840,说明该模型可较为准确描述各自变量与响应值之间的相互关系。

表2 Box-Behnken实验设计方案及实验结果

Table 2 Box-Behnken experiments design and the results of experiments

实验号	X_1	X_2	X_3	多糖提取率(%)
1	-1	-1	0	6.35
2	-1	1	0	6.74
3	1	-1	0	6.77
4	1	1	0	6.80
5	0	-1	-1	6.55
6	0	-1	1	6.45
7	0	1	-1	6.59
8	0	1	1	6.85
9	-1	0	-1	6.43
10	1	0	-1	6.72
11	-1	0	1	6.67
12	1	0	1	6.95
13	0	0	0	7.12
14	0	0	0	7.15
15	0	0	0	7.10

表3 回归分析结果

Table 3 Statistical results of regression analysis

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	p值
X_1	1	0.13781	0.13781	48.0462	0.00096
X_2	1	0.09245	0.09245	32.2313	0.00236
X_3	1	0.04961	0.04961	17.2966	0.00883
X_1^2	1	0.13039	0.13039	45.4568	0.00109
X_1X_2	1	0.03240	0.03240	11.2958	0.02009
X_1X_3	1	0.00003	0.00003	0.0087	0.92924
X_2^2	1	0.27000	0.27000	94.1315	0.00020
X_2X_3	1	0.03240	0.03240	11.2958	0.02009
X_3^2	1	0.21788	0.21788	75.95964	0.00033
回归	9	0.88335	0.09815	34.21854	0.00058
线性	3	0.27988	0.09329	32.52469	0.00105
平方	3	0.53865	0.17955	62.59752	0.00022
交互	3	0.06483	0.02161	7.53341	0.02655

图4为回归模型的响应面及等高线图,可以清晰直观的反映三个因素对蛹虫草N102多糖提取率的影响。由图4(A)可以看出,其等高线呈椭圆形,椭圆形的轴线与 X_1 和 X_2 坐标轴间存在一个夹角,图中等高线较为密集,且 X_1 (提取温度)处于不同水平时, X_2 (提取时间)对响应值Y的影响变化规律不同;同样, X_2 处于不同水平时, X_1 对Y值的影响也呈不同规律变化,表明提取温度和提取时间的交互作用对蛹虫草N102多糖的提取率影响显著($p=0.02009$)。由图4(B)可以看出, X_1 (提取温度)与 X_3 (水料比)对Y值的影响规律随另一因素的改变并不明显,说明提取温度与水料比的交互作用对蛹虫草N102多糖提取率的影响不显著($p=0.92924$)。由图4(C)可以看出,其等高线呈椭圆形,椭圆形的轴线与 X_2 和 X_3 坐标轴间存在一定夹角,图中等高线较为密集,且 X_2 (提取时间)处于不同水

平时, X_3 (水料比) 对Y值的影响的变化规律不同; 同样, X_3 处于不同水平时, X_2 对响应值的影响也呈不同规律变化, 表明 X_2 、 X_3 的交互作用对蛹虫草N102多糖的提取率影响显著 ($p=0.02009$)。对图4的直观分析结果与回归分析结果一致。

采用SAS工具箱对回归方程进行一阶求偏导, 得到响应值(Y)处于最大值时的 X_1 、 X_2 、 X_3 的编码值分别为: $X_1=0.3048$, $X_2=0.1803$, $X_3=0.1939$, 即蛹虫草N102多糖提取的最佳提取工艺条件为: 提取温度为 83°C , 提取时间为3.2h, 水料比为52:1 (mL:g), 在此条件下, 预测多糖的提取率为7.16%。

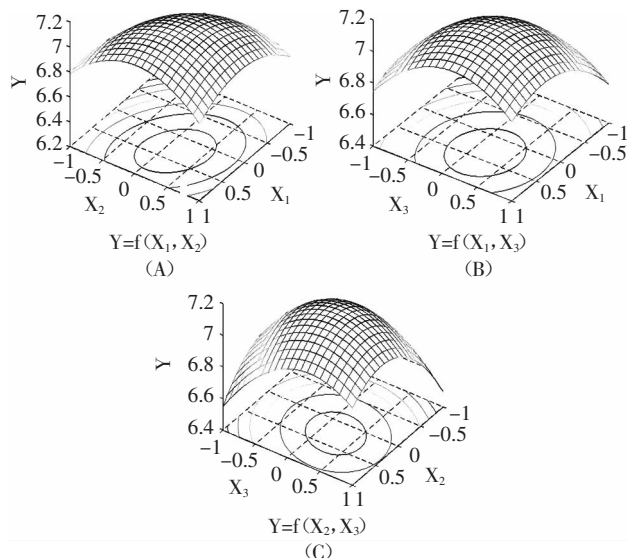


图4 响应面图和等高线图

Fig.4 Response surface graphs and contour plots

2.1.5 验证实验 在蛹虫草N102多糖的最佳提取条件下, 进行3次重复验证实验。得到的蛹虫草N102多糖提取率分别为7.28%、7.19%、7.25%, 平均值为7.24%, 与理论预测值的相对误差仅为1.16%, 证实了该模型的预测性。由此得到蛹虫草N102菌丝体多糖的最佳提取工艺为: 提取温度为 83°C , 提取时间为3.2h, 水料比为52:1 (mL:g)。

2.2 蛹虫草N102多糖的制备

采用乙醇分级沉淀制备蛹虫草N102菌丝体2倍醇沉(2FPS)、4倍醇沉(4FPS)和6倍醇沉(6FPS)多糖。乙醇沉淀法能去除多糖中的杂质, 并且根据乙醇的浓度, 将不同分子量的物质进行分级。2FPS、4FPS和6FPS的得率、蛋白质含量、还原糖含量及总糖含量如表4所示, 4FPS的纯度最高且得率最大, 其中多糖含量可达到73.43%, 而蛋白质含量仅为1.39%, 且多糖得率为1.97%, 分别是2FPS和6FPS得率的4.58倍和2.94

表4 2FPS、4FPS和6FPS的得率、蛋白质及糖含量

Table 4 The yield, protein and sugar content of 2FPS 4FPS and 6FPS

项目	2FPS	4FPS	6FPS
多糖得率(%)	0.43	1.97	0.67
蛋白质含量(%)	1.67	1.39	1.82
还原糖含量(%)	6.03	6.59	9.35
多糖含量(%)	48.67	73.43	59.84

倍。由此可见, 4倍乙醇沉淀是分离蛹虫草N102多糖的有效手段。

2.3 蛹虫草N102多糖抗肿瘤活性研究

2.3.1 2FPS对Hela细胞体外增殖的影响 2FPS对Hela细胞体外增殖的作用与给药浓度的关系密切, 如图5所示。当作用时间相同时, 随给药浓度的增大2FPS对Hela细胞的体外抑制作用也显著提高。当作用时间为24h时, 在给药浓度范围内, 2FPS对Hela细胞的抑制作用不超过15%。作用时间达到48h后, 2FPS对Hela细胞的抑制作用大幅度提高。当作用时间增大时, 2FPS对Hela细胞的抑制作用也显著提高, 作用时间由24h增大到72h, 5.12mg/mL的2FPS对Hela细胞的抑制作用由14.63%增大到50.25%。当2FPS对Hela细胞作用72h时其 IC_{50} 为4.70mg/mL。

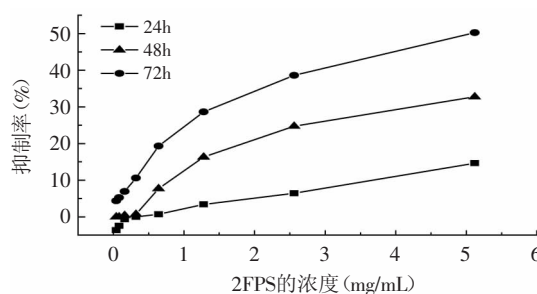


图5 2FPS对Hela细胞体外增殖的影响

Fig.5 Inhibition of proliferation of Hela cells by 2FPS

2.3.2 4FPS对Hela细胞体外增殖的影响 4FPS对肿瘤细胞的抑制率随作用时间明显提高, 如图6所示。4FPS对Hela细胞的体外抑制作用具有明显的时间依赖性。在作用时间较短时(24h), 给药浓度低于0.64mg/mL时, 4FPS对Hela细胞的增殖表现出促进作用; 给药浓度高于0.64mg/mL时, 4FPS逐渐对Hela细胞呈现出一定的抑制作用。当作用时间达到48h时, 4FPS对Hela细胞增殖的抑制作用明显增大, 当给药浓度达到5.12mg/mL时, 4FPS对Hela细胞的抑制作用可达到57.11%。在作用时间为72h时, 随着给药浓度的增加, 4FPS对Hela细胞的体外增殖的抑制作用大幅度提高, 抑制率由11.79%增大到74.98%。当4FPS对Hela细胞作用时间为48和72h时, 其 IC_{50} 分别为3.06和1.72mg/mL。

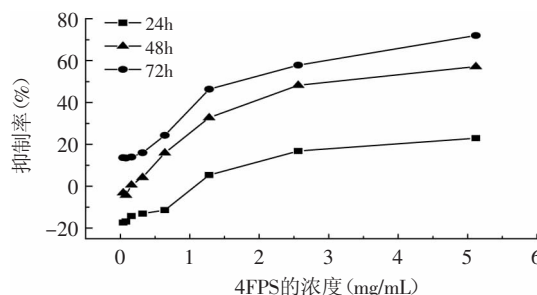


图6 4FPS对Hela细胞体外增殖的影响

Fig.6 Inhibition of proliferation of Hela cells by 4FPS

2.3.3 6FPS对Hela细胞体外增殖的影响 如图7所示, 6FPS对Hela细胞的体外增殖具有一定的抑制作用, 且抑制作用具有较强的浓度依赖关系, 而作用时间对抑制作用也有一定的影响。当给药浓度低于

1.28mg/mL时,6FPS对Hela细胞作用48h时对其抑制作用最强,其次分别为作用72h和24h时;当给药浓度高于1.28mg/mL时,随作用时间的延长6FPS对Hela细胞增殖的抑制作用逐渐增大,但即使在最大给药浓度时,6FPS对Hela细胞作用也低于40%。

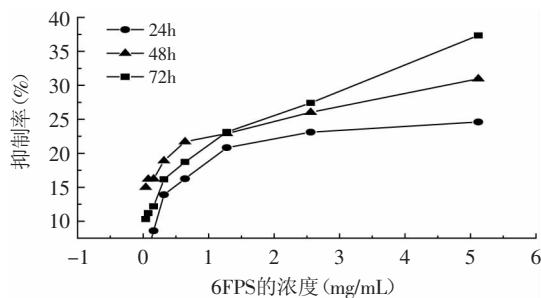


图7 6FPS对Hela细胞体外增殖的影响

Fig.7 Inhibition of proliferation of Hela cells by 6FPS

3 结论

本文在单因素实验的基础上,采用三因素三水平的响应面分析实验预测蛹虫草N102多糖的最佳提取工艺为:提取温度83℃,提取时间3.2h,水料比52:1 (mL·g⁻¹),此时预测多糖提取率为7.16%。验证实验中蛹虫草N102多糖提取率的平均值为7.24%,与理论预测值的相对误差为1.16%,可见该模型能较好地预测蛹虫草N102菌丝体多糖的提取率。采用乙醇分级沉淀的方法分离得到三种多糖组分,MTT法研究结果表明,2FPS、4FPS和6FPS对Hela细胞体外增殖的影响与作用时间和给药浓度具有显著的量效关系。其中4FPS对Hela细胞具有较强的抑制作用,当作用时间为72h时,4FPS对Hela细胞体外增殖的IC₅₀仅1.72mg/mL。通过分析证实4FPS的多糖含量最高,可见蛹虫草N102多糖具有较强的抗肿瘤作用。

参考文献

- [1] 姚国洪,刘喜屏,刘广红. 蛹虫草菌丝生长研究[J]. 微生物学杂志,2003,23(1):61-62.
- [2] 宾文,宋丽艳,于荣敏,等. 人工培养蛹虫草多糖的抗炎及免疫作用研究[J]. 时珍国医国药,2003,14(1):1-2.
- [3] 李茂,覃良,李伟芳,等. 复方c148蛹虫草粉的滋补强壮及

平喘作用[J]. 医学文选,1999,18(3):352-354.

- [4] 戴瑛,张斌,周勇,等. 蛹虫草提取物对内毒素引起小鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9(4):386-388.
- [5] 王琦,韩晓龙. 蛹虫草对老年大鼠自由基代谢影响的研究[J]. 辽宁师专学报,2002,4(4):104-106.
- [6] 贡成良,潘中华,郑小坚,等. 家蚕蛹虫草的延缓衰老作用研究[J]. 苏州大学学报:工科版,2005,25(2):24-27.
- [7] Knubel G, Larsen L K, Moore R E, et al. Cytotoxic, antiviral indolocarbazoles from a blue-green alga belonging to the Nostocaceae[J]. J. Antibiot., 1990, 43: 1236-1239.
- [8] 秦建春,李晓明,张鞍灵,等. 蛹虫草发酵液抗菌活性初步研究[J]. 西北植物学报,2006,26(2):402-406.
- [9] Kanekiyo K, Lee J B, Hayashi K, et al. Isolation of an antiviral polysaccharide nostoflan from a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*[J]. J Nat Prod, 2005, 68(7): 1037-1041.
- [10] 吴光昊,王文. 蛹虫草多糖的分离及免疫活性的研究[J]. 中国天然药物,2007,5(1):73-76.
- [11] Knubel G, Larsen L K, Moore R E, et al. Cytotoxic, antiviral indolocarbazoles from a blue-green alga belonging to the Nostocaceae[J]. J Antibiot, 1990, 43, 1236-1239.
- [12] Chen W, Zhang T, Lu J, et al. Morphological and genetic characterization of a cultivated *Cordyceps sinensis* fungus and its polysaccharide component possessing antioxidant property in H22 tumour-bearing mice[J]. Life Sci., 2006, 78: 2742-2748.
- [13] 黄志江,季晖,李萍,等. 人工虫草多糖降血糖作用及其机制研究[J]. 中国药科大学学报,2002,33(1):51-54.
- [14] Liang D X, Zhang N, Zhang Y W, et al. Response Surface Methodology Used for Statistical Optimization of Fermentation Media of *Cordyceps Militaris*[J]. Advances in Intelligent and Soft Computing, 2012, 134: 485-491.
- [15] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,2003,12-13.
- [16] 滕利荣. 生物学基础实验教程[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1999,474-476.
- [17] Tsaffir Zor, Zvi Selinger. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies [J]. Analytical Biochemistry, 1996, 236: 302-308.
- [11] 凌代文,东秀珠. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999:117-129.
- [12] 王永斌. 乳酸发酵澄清猕猴桃汁的研制[J]. 食品工业科技, 2004(6):96-97.
- [13] 檀子贞,王红育. 乳酸菌发酵山药饮料的研究[J]. 食品科技,2001(1):54-55.
- [14] 邓随胜. 薏米苹果汁复合饮料的研制[J]. 食品科技,2004(4):64-67.
- [15] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京:轻工业出版社,1989.
- [16] 李锋. 大豆酸奶的研究现状[J]. 中外食品工业,2003(9):58-60.
- [17] 马冬雪. 具有缓解牛乳β-乳球蛋白过敏作用乳杆菌的筛选及其机制初探[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2009.

(上接第246页)

- cabbage juice by lactic acid bacteria[J]. Bioresource Technology, 2006, 97: 1427-1430.
- [7] Kyung Y Y, Edward E W, Yong D H. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria[J]. Lebensm.-Wiss. u.-Technol, 2005, 38: 73-75.
- [8] Ana Lúcia F. Pereira, Tatiane C. Maciel, Sueli Rodrigues. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*[J]. Food Research International, 2011, 44: 1276-1283.
- [9] 王中风,曾凡坤. 蔬菜乳酸发酵饮料及其加工技术[J]. 软饮料工业,1991(4):18-19.
- [10] Douglas C M[美],汪仁官. 实验设计与分析[M]. 中国统计出版社,1998.