

墨汁鬼伞液体发酵营养因子对菌丝体生长和胞外多糖产量影响的研究

毕华南, 丁重阳, 石贵阳*, 章克昌

(江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 本研究实现了墨汁鬼伞[*Coprinus atramentarius*(Bull.Fr.)Fr.]的液体培养, 通过单因素试验研究了不同碳源、氮源及无机盐对墨汁鬼伞菌丝体生长和胞外多糖产量的影响。在此基础上, 通过响应曲面法(RSM)研究了各营养因子的最佳水平, 得到当葡萄糖、玉米粉、麸皮、 KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 分别为 13.51、17.07、7.62、2.29 和 2g/L 时, 胞外多糖最大预测值为 293.73mg/L; 当上述变量为 10.07、18.02、11.63、1.58 和 4g/L 时, 菌丝体最大生长量为 6.24g/L。

关键词: 墨汁鬼伞; 液体发酵; 胞外多糖; 生物量; 响应曲面法

Study on Effects of Nutritional Factors for Liquid Fermentation of *Coprinus atramentarius* on Mycelium Growth and Yield of Extracellular Polysaccharide

BI Hua-nan, DING Zhong-yang, SHI Gui-yang*, ZHANG Ke-chang

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, China)

Abstract: *Coprinus atramentarius* was cultivated with submerged fermentation method. Various nutritional factors including carbon sources, nitrogen sources and inorganic salt affecting the yield of extracellular polysaccharide (EPS) and mycelium growth were studied by single factor test. The key influential factors were further investigated by response surface methodology. By solving the quadratic regression model equation with appropriate statistic methods, the optimum concentrations for the submerged fermentation medium are determined that glucose, corn powder, wheat bran, KH_2PO_4 and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ are 13.51, 17.07, 7.62, 2.29 and 2 g/L, respectively, and the predicted yield of the extracellular polysaccharide is 293.73 mg/L. When the above values are 10.07, 18.02, 11.63, 1.58 and 4 g/L respectively, the maximum biomass is 6.24 g/L.

Key words: *Coprinus atramentarius*; liquid fermentation; extracellular polysaccharide; biomass; response surface methodology

中图分类号: TQ929.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)07-0291-06

药食用真菌是天然药物中的一个重要组成部分, 其化学成分种类丰富, 药理作用显著, 已成为探索和发掘新药的重要领域, 日益受到人们的重视^[1]。墨汁鬼伞又名柳树蘑、柳树钻, 是鬼伞属真菌中具有代表性的一种^[2]。墨汁鬼伞在食用时或食用后的 2~3d 之内饮用酒精饮料即可引起脸部红肿^[3], 心率上升, 头晕、恶心、呕吐, 并出现呼吸困难等现象, 其毒性成分为鬼伞素, 首先由美国人 Hatfield 等于 1936 年分离得到^[4]。

虽然墨汁鬼伞作为食用菌存在一定的局限性, 但是对其进行深入研究进而探询其中可能存在的生物活性物

质仍然非常有意义。在民间, 人们常用它的子实体煮熟后烘干研成细末与醋调成糊状治疗外伤和无名肿毒; 而民间的验方中, 它也用来治疗中、晚期癌症。而亦有报导认为, 墨汁鬼伞具有降糖降脂功能, 入药有益肠胃、理气化痰、解毒消肿的作用^[2,5]。目前对墨汁鬼伞研究主要在其生物学特性以及固体栽培方面^[2], 但是固体栽培存在着生物周期长, 由于培养基的不均一性而导致其生理活性的波动等缺点; 从子实体中获取有效成份也需要更为复杂的提取步骤^[6]。同传统的固体栽培相比, 液体发酵周期短, 易规模化特点则更凸显。目前,

收稿日期: 2007-09-18

作者简介: 毕华南(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程。E-mail: bhncn@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 石贵阳(1963-), 男, 教授, 研究方向为发酵工程。E-mail: gyshi@sytu.edu.cn

国内外尚无关于墨汁鬼伞液体发酵的研究报道。

真菌多糖大都具有复杂的、多方面生物活性,对肿瘤、心血管疾病有一定疗效^[7]。随着香菇多糖、灵芝多糖、云芝多糖等真菌多糖在临床上的广泛应用,人们对真菌多糖的研究日益重视^[7-9]。

本实验以墨汁鬼伞生物量和胞外多糖为指标,采用液体发酵培养方法,首先通过较为广泛的单因素试验寻求影响墨汁鬼伞液体发酵的培养基关键因子,进而通过响应曲面法对培养基进行进一步优化,以提高墨汁鬼伞液体发酵胞外多糖产量和生物量,以利于下一步开展墨汁鬼伞生物活性物质研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

购自陕西省微生物研究所,由本研究室复壮保藏。

1.2 培养基

斜面培养基: PDA(马铃薯葡萄糖琼脂)斜面固体培养基。

种子培养基: PDA 培养基不加琼脂粉,装液量为 75ml/250ml 摇瓶。

发酵基础培养基(g/L): 葡萄糖 10、玉米粉 15、麸皮 10、 KH_2PO_4 2、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3。

1.3 培养方法

菌种活化: 菌种接入斜面培养基, 25℃ 恒温通风培养 7 d。

种子培养: 取 3~4 块约 0.5cm² 大小的活化菌种, 接入 250ml 三角瓶中, 于 28℃、150r/min 摇床培养 5d。

液体培养: 将成熟种子按 10% 接种量转接入 500ml 三角瓶中, 于 25℃、150r/min 摇床培养 4d。

1.4 检测方法

生物量测定: 以测定核酸的方法进行生物量测定^[10]; 还原糖测定: 采用 3,5-二硝基水杨酸法^[11]; 胞外粗多糖测定: 采用酒精分步沉淀法提取胞外粗多糖^[12], 称干重。

1.5 试验设计

1.5.1 单因素优化试验

保持含碳量相同条件下分别用葡萄糖、果糖、蔗糖、玉米粉、可溶性淀粉代替基础培养基中的葡萄糖和玉米粉, 每个因素选取三个不同水平, 添加量见表 1; 保持含氮量相同条件下分别用麸皮、豆饼粉、酵母粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 代替基础培养基中的麸皮, 每个因素选取三个不同水平, 添加量见表 2; 分别用 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、 FeSO_4 、 NaCl 代替基础培养基中的 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 每个因素选取两个不同水平, 添加量见表 3。测定各因素不同水平下的墨汁鬼伞生物量(biomass)和胞外粗多糖(extracellular polysaccharide, EPS)含量。

表 1 碳源因素水平表(g/L)

Table 1 Factors and levels of various carbon sources (g/L)

水平	A 葡萄糖	B 果糖	C 蔗糖	D 玉米粉	E 可溶性淀粉
1	5	5	4.5	7.5	4
2	10	10	9	15	8
3	15	15	13.5	22.5	12

表 2 氮源因素水平表(g/L)

Table 2 Factors and levels of various nitrogen sources (g/L)

水平	A 麸皮	B 豆饼粉	C 酵母粉	D $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	E $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
1	5	1.5	1	0.5	1
2	10	3	2	1	2
3	15	4.5	3	1.5	3

表 3 无机盐因素水平表(g/L)

Table 3 Factors and levels of various inorganic matters (g/L)

水平	A KH_2PO_4	B $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	C CaCl_2	D FeSO_4	E NaCl
1	2	2	2	2	2
2	4	4	4	4	4

1.5.2 响应面优化试验设计

研究采取响应曲面法(RSM), 根据单因素试验结果, 通过全因子中心组合设计^[13](full-factorial central composite design), 以葡萄糖、玉米粉、麸皮、磷酸二氢钾为考察因子(自变量), 其实际浓度水平分别以 X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 代表, 其编码水平分别以 A、B、C、D 代表, 各自变量的实验水平及其编码范围见表 4(其中 $\alpha=2.0$)。评价指标(响应值)为墨汁鬼伞发酵液生物量和胞外多糖含量, 其预测模型通过最小二乘法拟合的二次多项方程为:

$$\hat{Y} = c_0 + \sum_{i=1}^n a_i X_i + \sum_{j=1}^n b_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

式中, \hat{Y} 为预测响应值; X_i 和 X_j 为自变量编码值; C_0 为常数项; a_i 为线性系数; b_{ij} 为二次项系数; n 为因子数, 本实验 $n=4$ 。

表 4 中心组合试验因素水平及编码

Table 4 Levels and codes of variables chosen for full-factorial CCD

变量	代码		编码水平				
	未编码	编码	$-\alpha$	-1	0	1	α
葡萄糖(g/L)	X_1	A	2	6	10	14	18
玉米粉(g/L)	X_2	B	5	10	15	20	25
麸皮(g/L)	X_3	C	5	7.5	10	12.5	15
磷酸二氢钾(g/L)	X_4	D	1	1.5	2.0	2.5	3.0

注: 自变量编码值与真实值之间的关系分别为: $A = (X_1 - 10)/4$, $B = (X_2 - 15)/5$, $C = (X_3 - 10)/2.5$, $D = (X_4 - 2)/0.5$ 。

本实验借助 Design Expert 软件(version 6.0.5, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA)进行 CCD 设计。

2 结果与分析

2.1 培养基选择

2.1.1 碳源选择

如图1、2所示,葡萄糖和玉米粉是墨汁鬼伞液体发酵的理想碳源。而且相对而言,单糖更适宜于墨汁鬼伞的液体发酵培养,这与蔗糖是墨汁鬼伞固体栽培的理想碳源存在差异。由于葡萄糖和玉米粉均可作为墨汁鬼伞液体培养的单一碳源,综合考虑促进菌丝体生长的因素,将二者同时用于其液体发酵培养基。

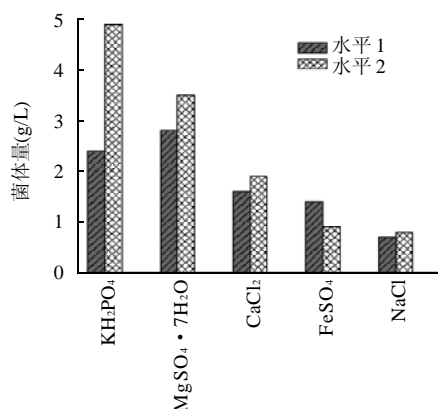


图1 不同碳源对墨汁鬼伞生物量的影响

Fig.1 Effects of various carbon sources on growth of *C. atramentarius*

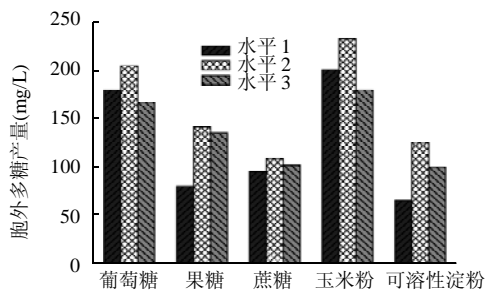


图2 不同碳源对墨汁鬼伞胞外多糖产量的影响

Fig.2 Effects of various carbon sources on yield of EPS in *C. atramentarius* broth

2.1.2 氮源选择

各氮源不同水平下的墨汁鬼伞生物量和胞外粗多糖含量,如图3、4所示,墨汁鬼伞对无机氮源利用较差,但能很好的利用有机氮源。在有机氮源中,麸皮和酵母粉是墨汁鬼伞液体发酵的适宜氮源,综合考虑培养基成本和取材便捷,本实验选取麸皮为墨汁鬼伞培养基的氮源。

2.1.3 无机盐选择

各因素不同水平下的墨汁鬼伞生物量和胞外粗多糖含量见图5、6。可以看出, KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 是墨汁鬼伞液体发酵培养的主要生长因子,而且 KH_2PO_4 添加量的不同对于墨汁鬼伞菌丝体生长和胞外多

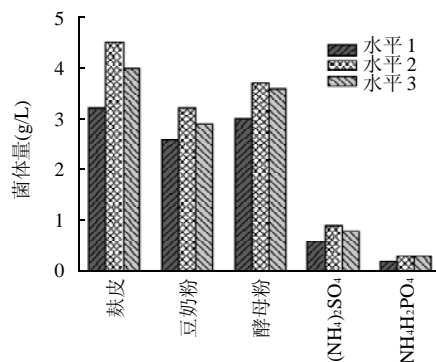


图3 不同氮源对墨汁鬼伞生物量的影响

Fig.3 Effects of various nitrogen sources on growth of *C. atramentarius*

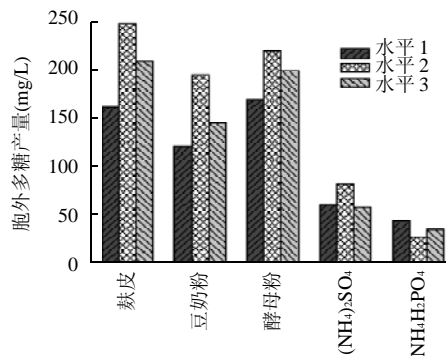


图4 不同氮源对墨汁鬼伞胞外多糖产量的影响

Fig.4 Effects of various nitrogen sources on yield of EPS in *C. atramentarius* broth

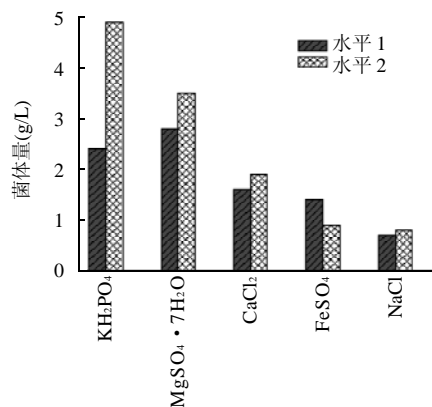


图5 添加不同无机盐对墨汁鬼伞生物量的影响

Fig.5 Effects of various inorganic salts on growth of *C. atramentarius*

糖分泌均有较大影响。相反, Fe^{2+} 、 Na^+ 和 Cl^- 对于墨汁鬼伞生长存在负作用。因此,在液体发酵培养中,有必要在培养基中添加磷、钾、钙等无机盐离子。

2.2 液体发酵培养基优化

2.2.1 模型建立

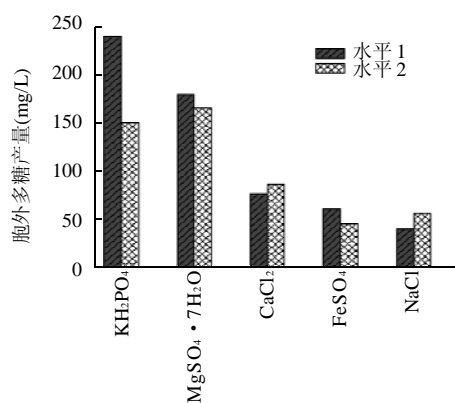


图6 添加不同无机盐对墨汁鬼伞胞外多糖产量的影响
Fig.6 Effects of various inorganic salts on yield of EPS in *C. atramentarius* broth

响应面试验设计及考察指标见表5(表中实验值为2次重复平均值)。
利用上述设计软件，对表5实验数据进行二次多项回归拟合，分别获得了胞外多糖预测值和生物量预测值

对葡萄糖(A)、玉米粉(B)、麸皮(C)和 KH₂PO₄(D)的多元回归方程(1)和方程(2)：

$$\hat{Y}_{\text{胞外多糖产量}}=279.83+25.44A+21.42B+4.65C-1.93D-24.66A^2-21.63B^2-20.51C^2-13.93D^2+19.41AB-12.54AC+2.32AD-11.92BC-17.82BD-27.31CD \tag{1}$$
$$\hat{Y}_{\text{生物量}}=5.98+0.48A+0.40B+0.062C+0.0069D-0.52A^2-0.45B^2-0.46C^2-0.29D^2+0.44AB-0.24AC-0.17BC-0.39BD-0.59CD \tag{2}$$

对模型方程(1)和方程(2)方差分析结果表明，两方程差异性显著(p < 0.0001)，而且各因子系数均有意义，拟合优度良好。方程(1)相关系数 R=0.9863，校正决定系数 R²_{Adj}=0.9728；方程(2)的 R=0.9837，R²_{Adj}=0.9676。

2.2.2 以胞外多糖产量为指标的发酵培养基优化与分析
根据模型方程(1)所作的响应曲面图及等高线图见图7~9。通过该组动态图可评价试验因素对墨汁鬼伞胞外多糖的两两交互作用，并确定各因素的最佳水平范围。
等高线的形状可反映出交互效应的强弱大小，椭圆形表示两因子交互作用显著，反之则与之相反。图7显

表5 全因子中心组合设计以及 *C. atramentarius* 生物量的实测值和预测值
Table 5 CCD matrix of four variables with experimental and predicted values of biomass and EPS

组别	编码				生物量(g/L)		胞外多糖产量(mg/L)	
	A	B	C	D	实测值	预测值	实测值	预测值
1	-1	-1	-1	-1	2.23	2.33	98.47	101.67
2	1	-1	-1	-1	2.79	2.96	130.72	134.16
3	-1	1	-1	-1	3.18	3.36	160.88	165.16
4	1	1	-1	-1	6.05	5.74	283.36	275.31
5	-1	-1	1	-1	4.75	4.46	222.21	214.50
6	1	-1	1	-1	4.09	4.11	191.21	196.85
7	-1	1	1	-1	5.08	4.82	237.78	230.31
8	1	1	1	-1	5.94	6.23	289.90	290.31
9	-1	-1	-1	1	4.37	4.35	168.47	183.44
10	1	-1	-1	1	4.81	4.89	225.30	225.19
11	-1	1	-1	1	4.04	3.83	188.85	175.64
12	1	1	-1	1	5.56	6.12	271.98	295.05
13	-1	-1	1	1	3.99	4.11	186.58	187.05
14	1	-1	1	1	3.58	3.67	167.56	178.66
15	-1	1	1	1	2.81	2.92	119.63	131.56
16	1	1	1	1	4.52	4.24	211.61	200.83
17	-α	0	0	0	2.77	2.94	129.64	130.31
18	α	0	0	0	5.14	4.88	240.52	232.06
19	0	-α	0	0	3.46	3.37	162.08	150.47
20	0	α	0	0	4.96	4.97	232.32	236.14
21	0	0	-α	0	4.24	4.01	198.40	188.50
22	0	0	α	0	4.12	4.26	205.00	207.11
23	0	0	0	-α	4.72	4.81	220.96	227.99
24	0	0	0	α	5.02	4.84	235.10	220.27
25	0	0	0	0	5.73	5.98	268.18	279.83
26	0	0	0	0	6.12	5.98	286.42	279.83
27	0	0	0	0	5.91	5.98	276.79	279.83
28	0	0	0	0	6.20	5.98	289.97	279.83
29	0	0	0	0	5.89	5.98	275.78	279.83
30	0	0	0	0	6.02	5.98	281.86	279.83

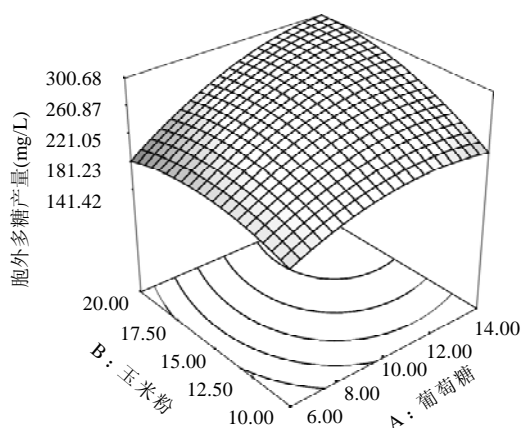


图7 葡萄糖和玉米粉交互影响EPS的曲面图及等高线图

Fig.7 Response surface and contour plots of EPS versus glucose and corn powder

示了当麸皮和 KH_2PO_4 处于最佳值, 即 11.63g/L 和 1.58g/L 时, 葡萄糖和玉米粉对墨汁鬼伞EPS的交互影响效应。可知, 它们的交互作用显著。当玉米粉处于低水平时, 葡萄糖浓度改变对EPS影响很小, 且处于较低水平。这可能是由于墨汁鬼伞作为一种丝状真菌, 其菌丝体在液体发酵过程中通常需要玉米粉等固形物作为附着物, 从而有利于菌丝体的生长并形成菌球。因此, 当玉米粉浓度较低时影响了菌体生长, 进而影响了胞外多糖的分泌。

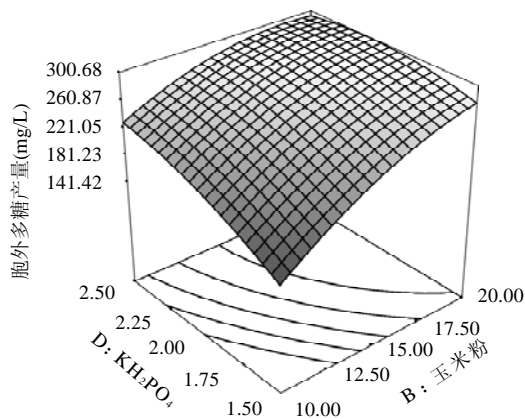
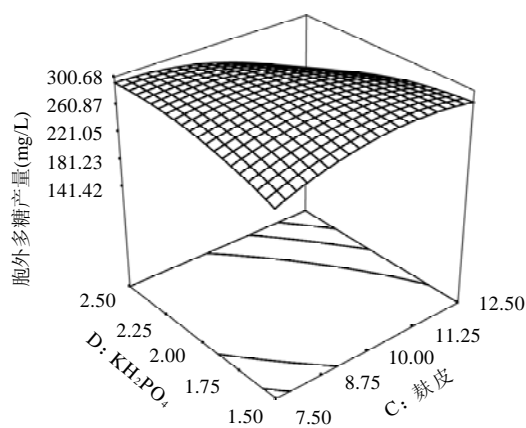
图8 玉米粉和 KH_2PO_4 交互影响EPS的曲面图及等高线图Fig.8 Response surface and contour plots of EPS versus corn powder and KH_2PO_4

图8显示了当葡萄糖和麸皮处于最佳值, 即 10.07g/L 和 11.63g/L 时, 玉米粉和 KH_2PO_4 对墨汁鬼伞EPS的交互影响效应。可知, 它们的交互作用显著。当玉米粉处于低浓度时, KH_2PO_4 浓度变化对EPS影响不明显, 而当玉米粉处于高浓度时, EPS随着 KH_2PO_4 浓度增加而减小。

图9显示了当葡萄糖和玉米粉处于最佳值, 即 10.07g/L 和 18.02g/L 时, 麸皮和 KH_2PO_4 对墨汁鬼伞EPS的交互影响效应。可知, 它们存在交互影响作用。当麸皮处于高

图9 麸皮和 KH_2PO_4 交互影响EPS的曲面图及等高线图Fig.9 Response surface and contour plots of EPS versus wheat bran and KH_2PO_4

水平时, EPS随着 KH_2PO_4 浓度增加而减小, 这再次表明虽然 KH_2PO_4 是墨汁鬼伞生长的重要影响因子, 但高浓度 KH_2PO_4 对胞外多糖分泌有抑制作用。

2.2.3 以生物量为指标的发酵培养基优化与分析

根据模型方程(2)所作的响应曲面图及等高线图见图10~12。通过该组动态图可评价实验因子对墨汁鬼伞生物量的两两交互作用, 并确定各因素的最佳水平范围。

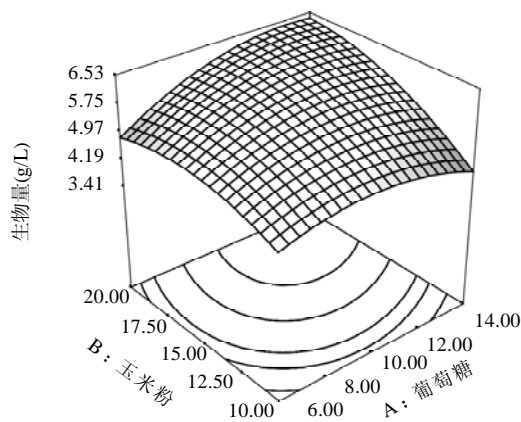


图10 葡萄糖和玉米粉交互影响生物量的曲面图及等高线图

Fig.10 Response surface and contour plots of biomass versus glucose and corn powder

图10显示了当麸皮和 KH_2PO_4 处于最佳值, 即 18.61g/L 和 1.60g/L 时, 葡萄糖和玉米粉对生物量的交互影响效应。可知, 它们的交互作用显著。当玉米粉处于低水平时, 葡萄糖浓度改变对EPS影响很小, 且处于较低水平, 这可能与玉米粉浓度对EPS的影响类似。

图11显示了当葡萄糖和麸皮处于最佳值, 即 11.79g/L 和 11.51g/L 时, 玉米粉和 KH_2PO_4 对生物量的交互影响效应。可知, 它们的交互作用显著。当 KH_2PO_4 处于低水平时, 玉米粉浓度的增加对墨汁鬼伞生物量的提高作用显著。

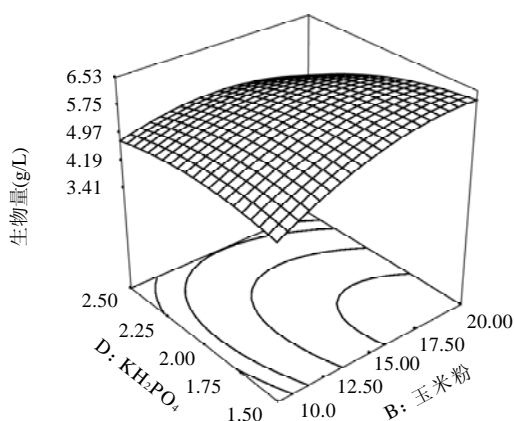


图11 玉米粉和 KH_2PO_4 交互影响生物量的曲面图及等高线图
Fig.11 Response surface and contour plots of biomass versus corn powder and KH_2PO_4

图12显示了当葡萄糖和玉米粉处于最佳值,即10.07g/L和18.02g/L时,麸皮和 KH_2PO_4 对生物量的交互影响效用。可知,它们的交互影响作用显著。生物量随着麸皮水平升高呈现先增加后降低的趋势,较高浓度的麸皮同样对于墨汁鬼伞菌体形成十分重要,但作为一种氮源,当麸皮浓度过高时,适宜菌丝体生长的培养基C/N比发生改变,使得生物量不能继续提高。

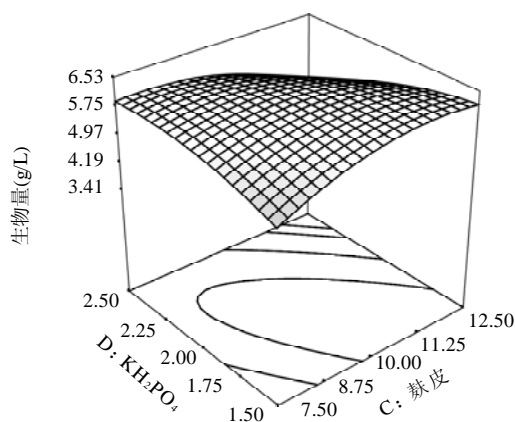


图12 麸皮和 KH_2PO_4 交互影响生物量的曲面图及等高线图
Fig.12 Response surface and contour plots of biomass versus wheat and corn powder

3 结论

本实验以墨汁鬼伞为研究对象,在现有固体栽培技术研究基础上,通过深层发酵成功实现了墨汁鬼伞的液态培养。

对墨汁鬼伞液体发酵营养因子的研究表明,葡萄糖

和玉米粉是墨汁鬼伞的适宜碳源,麸皮是其适宜氮源, KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 能够提供液体发酵所必需的无机离子。在以上重要营养因子中,葡萄糖、玉米粉、麸皮、 KH_2PO_4 的添加量改变对生物量和EPS影响较大。

进一步通过响应曲面法对以上关键营养因子对生物量和EPS的影响及交互作用进行研究,获得以胞外多糖为目的产物的最优培养基组成为:葡萄糖13.51g/L、玉米粉17.07g/L、麸皮7.62g/L、 KH_2PO_4 2.29g/L和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2g/L。在此条件下,胞外多糖产量达到最大值293.73mg/L。以生物量为指标的墨汁鬼伞最优液体发酵培养基为:葡萄糖10.07g/L、玉米粉18.02g/L、麸皮11.63g/L、 KH_2PO_4 1.58g/L和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4g/L。此时生物量达到最大值6.24g/L。

参考文献:

- [1] MAO Y, LIU J K, LU Z X, et al. Grifolin, a potential antitumor natural product from the mushroom *Albatrellus confluens*, inhibits tumor cell growth by inducing apoptosis *in vitro*[J]. FEBS Letters, 2005, 579(16): 3437-3443.
- [2] 王法云, 李良晨, 古奕庆, 等. 河南的鬼伞科真菌资源研究[J]. 河南科学, 1999, 17(1): 63-68.
- [3] LINDERBERG P, BERGMAN R, WICKBERG B. Isolation and structure of coprine, a novel physiologically active cyclopropanone derivative from *Coprinus atramentarius* and its synthesis via 1-aminocyclopropanone [J]. Chem Comm, 1975: 946-947.
- [4] MICHELOT D. Poisoning by *Coprinus atramentarius*[J]. Natural Toxins, 1992(1): 73-80.
- [5] 孙悦迎, 卫丞友, 雷萍, 等. 墨汁鬼伞生物学特性研究[J]. 食用菌学报, 2003, 10(4): 16-19.
- [6] HEANG H J, KZM S W, LIM J M, et al. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Life Sciences, 2005, 76: 3069-3080.
- [7] 黄清荣, 辛晓林, 刘新海, 等. 影响大杯伞菌丝体及胞外多糖的几种因子的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 174-178.
- [8] THAKUR A, RANA M, LAKHANPAL T N, et al. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*: lectin from *Ganoderma lucidum*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2007, 1770(9): 1404-1412.
- [9] UNURSAIKHAN S, ZHANG L, XU X J, et al. Effects of molecular structure on antitumor activities of (1→3)-β-D-glucans from different *Lentinus Edodes*[J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 63(1): 97-104.
- [10] 谢志鹏. 发酵法生产米多霉素的菌种选育、培养条件优化和动力学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [11] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 11-12.
- [12] 李平作, 章克昌. 灵芝胞外多糖的分离纯化及生物活性[J]. 微生物学通报, 2000, 40(2): 217-220.
- [13] 王敏, 陆兆新, 吕凤霞, 等. 响应曲面法优化酶法提取银杏叶总黄酮[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 117-121.