

基于抑制非酶糖基化效果的金耳液体发酵

郑俊丽^{1,2}, 陶冠军³, 彭林^{1,2}, 丁重阳^{*1,2}, 顾正华², 张梁², 石贵阳²

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 3. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 非酶糖基化是引起糖尿病并发症的主要因素之一, 因此抑制非酶糖基化反应成为控制糖尿病并发症的重要手段。作者以抑制非酶糖基化反应活性为指标, 对金耳液体发酵培养基和发酵条件进行了优化。培养基经正交实验优化后, 最优培养基组成为: 葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 玉米粉 20 g/L, 麸皮 15 g/L, CoCl_2 0.5 g/L, MnSO_4 0.5 g/L。最适发酵条件为: 培养温度 25 ℃, 培养基初始 pH 6.5, 500 mL 三角瓶装液量 150 mL, 接种体积分数 10%。经发酵条件优化后, 金耳发酵液对非酶糖基化抑制率达 89.74%。在对金耳发酵液活性物质分析中发现, 金耳发酵液对非酶糖基化的抑制作用是由金耳多糖及其它小相对分子质量物质共同作用的结果。

关键词: 金耳; 非酶糖基化; 液体发酵

中图分类号: TS 920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)08—0861—07

Study on Submerged Fermentation of *Tremella aurantialba* Based on Inhibition of Non-Enzymatic Glycosylation

ZHENG Jun-li^{1,2}, TAO Guan-jun³, PENG Lin^{1,2}, DING Zhong-yang^{*1,2},
GU Zheng-hua², ZHANG Liang², SHI Gui-yang²

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The non-enzymatic glycosylation reaction is one of main factors causing diabetes complications, therefore inhibition of non-enzymatic glycosylation reaction become an effective way to control the complications of diabetes. In this study, the inhibitory rate by *Tremella aurantialba* culture broth was enhanced by the optimization of medium composition and culture conditions. The culture medium optimized by orthogonal experiments was (g/L): glucose 10, peptone 5, corn cob powder 20, wheat bran 15, CoCl_2 0.5, MnSO_4 0.5. The optimized culture conditions were 25 ℃, initial pH of 6.5, 150 mL medium in 500 mL flask and 10% inoculums. After optimization, the inhibitory rate of non-enzymatic glycosylation reaction achieved 89.74%. The *T. aurantialba* culture

收稿日期: 2013-01-22

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2011154)。

*通信作者: 丁重阳(1975—), 男, 江苏南通人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事发酵工程方面研究。

E-mail: zyding@jiangnan.edu.cn

broth was purified and the main components were analyzed. The result indicated that both polysaccharide and small molecular weight in culture broth were responsible for the inhibition.

Keywords: *Tremella aurantialba*, non-enzymatic glycosylation, submerged fermentation

金耳(*Tremella aurantialba*)是一种重要的食药真菌,其子实体味道鲜美,营养丰富。现代药理学研究表明,金耳多糖作为金耳的有效化学物质之一,具有降血糖^[1]、抗肿瘤增强免疫^[2]、抗氧化^[3-4]等药理作用。研究表明,金耳发酵液具有明显的抑制非酶糖基化反应的活性^[5]。所谓非酶糖基化反应,是指还原糖与体内蛋白质、氨基酸等的游离氨基端无需酶的催化,不可逆的以共价键结合形成结构多样的聚合物的过程。它是引起糖尿病肾病^[6]、白内障^[7]和动脉粥样硬化^[8]等并发症的主要因素之一。

目前,关于金耳的研究主要集中在多糖的分离提取、生物活性以及以多糖产率为指标的发酵条件优化等方面。作者以抑制非酶糖基化反应为指标,研究了培养基成分和培养条件对金耳发酵液抑制非酶糖基化反应的影响,并以此优化了发酵培养基和发酵条件;同时初步分析了金耳发酵液中抑制非酶糖基化反应的活性成分。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与设备

金耳(*Tremella aurantialba*)菌株:由江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室保存;葡萄糖、蛋白胨、牛血清白蛋白;均购自国药生化试剂有限公司;所用试剂均为分析纯。

斜面培养基(组分 g/L):马铃薯 200,葡萄糖 20,琼脂条 20~22。

种子培养基(组分 g/L):葡萄糖 20,玉米粉 20,麸皮 10, KH_2PO_4 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, VB1 15×10^{-3} 。

发酵基础培养基(组分 g/L):葡萄糖 20,麸皮 10, KH_2PO_4 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1。

HITACHI 650-60 荧光分光光度计:株式会社日立制作所;回转式恒温调速摇床:上海新星自动化控制设备成套厂;DRP-9082 型电热恒温培养箱:上海森信实验仪器有限公司;星海旋转蒸发器:无锡市星海王生化设备有限公司。

1.2 方法

在优化碳源、氮源和复合营养源时,以基础培

养基作为对照进行优化;在考察无机盐对发酵的影响时,以不加 KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的基础培养基作为对照。

1.2.1 液态发酵培养 在种子培养时,在 250 mL 三角瓶中加入 80 mL 种子培养基,灭菌后每瓶接入 4 块 0.5 cm^2 大小的活化菌种斜面,在 25°C 、150 r/min 条件下培养 144 h。在发酵培养时,将液态种子以 5% 的接种体积分数接种于装有 150 mL 发酵基础培养基的 500 mL 三角瓶中,在 25°C 、150 r/min 条件下培养 120 h。

1.2.2 碳源的优化 实验中考察碳源为木糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、可溶性淀粉、微晶纤维素和甘露醇,分别以 2 g/L 考察碳源代替发酵基础培养基中的葡萄糖,对照组为发酵基础培养基。发酵结束后测定发酵液对非酶糖基化的抑制作用,每组设 3 个平行,取其平均值,根据抑制率确定最佳碳源。

1.2.3 氮源的优化 在基础培养基中分别加入 5 g/L 酵母膏,蛋白胨,酪蛋白,氯化铵,硫酸铵,尿素,确定最佳氮源。

1.2.4 复合营养源的确定 用马铃薯和玉米粉分别代替发酵基础培养基中的麸皮,另设不加任何复合营养源作为空白对照考察复合营养源对抑制非酶糖基化的影响,玉米粉和麸皮添加量 10 g/L,马铃薯 100 g/L,确定最佳复合营养源。

1.2.5 无机盐的优化 在发酵基础培养基中分别加入 0.5 g/L 的 FeSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 , Cr_2O_3 , CaCl_2 , CoCl_2 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 Na_2MoO_4 ,以确定最佳无机盐。

1.2.6 正交试验设计 根据单因素试验结果,选用葡萄糖,蛋白胨,玉米粉与麸皮为影响因素,设计四因素三水平($L_9(3^4)$)正交试验。基础培养基为:0.5 g/L CoCl_2 , 0.5 g/L MnSO_4 , 装液量 150 mL,接种体积分数 5%,温度 25°C , 150 r/min 培养 120 h。按表 1 进行正交试验,每组试验重复 3 次,测定发酵液对非酶糖基化反应的抑制率,分析确定抑制率最高的培养基配比。

1.2.7 温度和起始 pH 的优化 金耳摇瓶试验分别

在 20、25、28、30、37 ℃条件下进行,发酵结束后通过发酵液对非酶糖基化反应的抑制率确定最适温度。在确定最适温度的基础上,分别用 2 mol/L HCl 和 NaOH 调整发酵基础培养基的初始 pH 为 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5,接种后培养 120 h,确定最佳 pH。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平
Table 1 Orthogonal test of $L_9(3^4)$

水平	因素			
	葡萄糖质量浓度/(g/L)	蛋白胨质量浓度/(g/L)	玉米粉质量浓度/(g/L)	麸皮质量浓度/(g/L)
1	10	5	10	10
2	20	10	15	15
3	30	15	20	20

1.2.8 装液量及接种体积分数的优化 500 mL 三角瓶分别装有 80、100、120、150、180 mL 发酵基础培养基,pH 调节至 1.2.4 确定的最佳 pH,在最适温度下培养 120 h,确定最佳装液量。将种子分别以 5%、10%、15%、20% 的接种体积分数接种到已确定的最佳装液量的培养基中,在最佳初始 pH、最适温度下培养 120 h 后,测定发酵液对非酶糖基化反应的抑制率,确定最佳接种体积分数。

1.2.9 生物活性物质的提取 在优化培养基和培养条件下发酵得到的金耳发酵液,经 8 000 r/min 离心 10 min 除去菌体,向离心得到的发酵液中加入体积分数 30% 酒精,搅拌 20 min 后 8 000 r/min 离心 5 min,除去蛋白质,离心后的上清液继续加入酒精至体积分数 70%,搅拌 20 min 后 4 ℃冰箱静置过夜。上清液除去酒精后,采用 D101 大孔树脂脱色除杂得非糖类粗品,4 ℃保存备用。沉淀加 95% 工业酒精洗涤 3 次,60 ℃烘箱烘干,得多糖粗品。粗多糖上 DEAE 离子交换柱,经蒸馏水洗脱后,用 0~2 mol/L NaCl 梯度洗脱,洗脱体积 300 mL,流速 2 mL/min,自动部分收集仪收集洗脱液,每管收集 5 mL,苯酚-硫酸法检测收集液吸光度,绘制洗脱曲线,并合并相应洗脱峰部分,主要吸收峰样品冷冻干燥用于活性分析。

1.2.10 体外抑制非酶糖基化反应测定方法 所有摇瓶发酵液经离心,上清液定容至原发酵液体积供分析测定。测定方法参考文献[9]进行适当修改,反应体系包含 12 mg/mL 乙二醛,10 mg/mL 牛血清白

蛋白,2 mg/mL 叠氮化钠以及 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)。测定中 1 mL 样品液和 1 mL 反应液混合(对照组中由 1 mL 蒸馏水代替样品液),混合液 37 ℃反应 15~17 d 后,在激发波长 370 nm,发射波长 440 nm 波长处测定荧光强度,重复三次,三次平均值计算抑制率。计算公式如下:

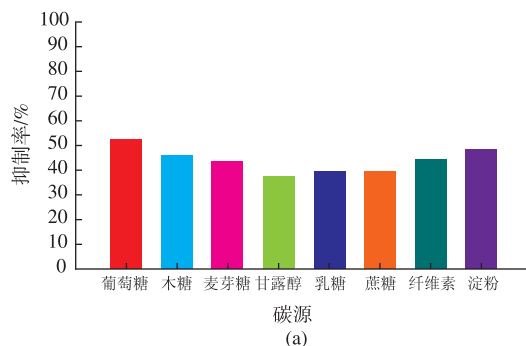
$$I = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

式中: I 为抑制率; a 为空白组荧光强度; b 为样品组荧光强度。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基的优化

2.1.1 不同碳、氮源的确定 在真菌发酵过程中,培养基组成和培养条件是影响真菌生长及代谢产物合成的重要因素^[10]。就发酵过程中所需碳氮源种类而言,不同菌株、不同目标产物对碳氮源的需求有明显差别。王吉中等以产胞外多糖为目标,确定了云芝液体发酵培养的最优碳氮源分别为麦芽糖和多价脲^[11]。刘艳芳^[12]以生物量为主要指标确定了鸡腿蘑摇瓶培养的最佳碳源为玉米粉和蔗糖,氮源为麸皮。董昌金等发现利于金耳菌丝体生长的最佳碳氮源分别为玉米粉和蛋白胨^[13]。作者在考察碳源对抑制非酶糖基化反应的作用中发现,实验中选用的不同碳源对于非酶糖基化的抑制作用影响较小,最高抑制率为对照组中选用的葡萄糖,抑制率达到 52.81%,其他碳源均维持在 40% 左右(图 1a)。在考察的氮源中,发现无机氮源和有机氮源对非酶糖基化反应的影响具有较大差别(图 1b)。添加无机氮源后,非酶糖基化反应的抑制率对比未添加氮源有较大下降,而有机氮源则提升了金耳发酵液的抑制能力,其中蛋白胨的抑制率达到 71.41%。通过碳源和氮源的优化,分别选定葡萄糖和蛋白胨作为培养基的碳源和氮源。



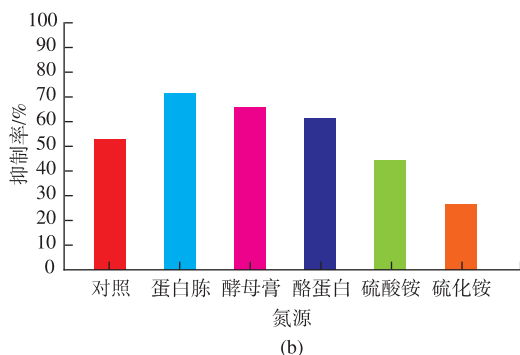


图 1 不同碳氮源对非酶糖基化反应抑制率的影响

Fig. 1 Effect of carbon and nitrogen resources on inhibitory ratio of non-enzymatic glycosylation

2.1.2 不同复合营养源的确定 在考察的三种复合营养源中,发现对照组麸皮的抑制率最高,其抑制率为 52.81%,玉米粉(47.94%)的抑制率虽低于麸皮,但相比无任何复合营养源组(18.31%),抑制率也有显著提高,见图 2。因此选用麸皮和玉米粉作为复合营养源。

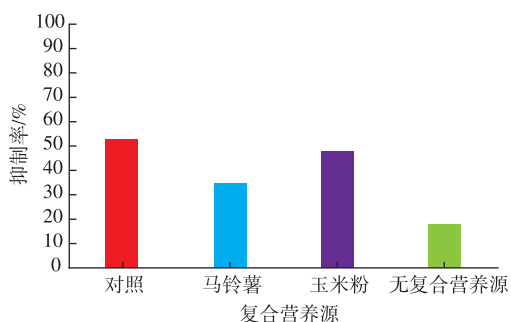


图 2 不同复合营养源及无机盐对非酶糖基化反应抑制率的影响

Fig. 2 Effect of nutrition comoplex source on inhibitory ratio of non-enzymatic glycosylation

麸皮和玉米粉作为复合营养源含有大量碳水化合物和多种维生素,为菌体生长提供碳源的同时又作为复合维生素增加菌丝的悬浮性,促进菌体生长,利于代谢产物的合成^[14]。

2.1.3 无机盐的确定 添加 CoCl_2 和 MnSO_4 能稍许提高抑制率(抑制率分别为 54.52%和 55.73%), KH_2PO_4 和 Na_2MoO_4 与未加无机盐相比抑制率基本一致,而添加其他无机盐后抑制率均明显降低,见图 3。说明在金耳发酵培养基中添加无机盐对非酶糖基化反应抑制率没有显著增强作用。在以后试验中除补加 CoCl_2 和 MnSO_4 外不再补加其他无机盐。

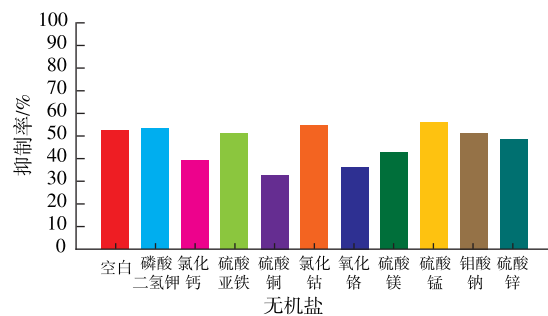


图 3 不同无机盐对非酶糖基化反应抑制率的影响

Fig. 3 Effect of inorganic salt on inhibitory ratio of non-enzymatic glycosylation

2.1.4 正交试验及验证实验结果 金耳发酵培养基组分由正交试验优化,结果见表 2,试验结果显示,蛋白胨质量浓度极差最大,其次是玉米粉质量浓度,由此得出蛋白胨质量浓度对抑制率影响最大。结合均值分析后得出最佳培养基组成是 $A_1B_1C_3D_2$,即最佳培养基组成为(g/L):葡萄糖 10,蛋白胨 5,玉米粉 20,麸皮 15, CoCl_2 0.5, MnSO_4 0.5。在该条件下所得发酵液对非酶糖基化反应的理论抑制率为 74.89%。经实验验证在此培养基组成条件下培养,发酵液对非酶糖基化反应的抑制率达 75.82%,与理论值相符。

表 2 优化培养基成分 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Tab. 2 Orthogonal array design matrix and experimental results for optimizing fermentation medium

试验号	因素				抑制率/%
	葡萄糖质量浓度/(g/L)	蛋白胨质量浓度/(g/L)	玉米粉质量浓度/(g/L)	麸皮质量浓度/(g/L)	
1	10	5	10	10	73.60
2	10	10	15	15	71.33
3	10	15	20	20	65.27
4	20	5	15	20	69.14
5	20	10	20	10	70.38
6	20	15	10	15	64.28
7	30	5	20	15	74.89
8	30	10	10	20	68.31
9	30	15	15	10	61.32
K_1	70.067	72.543	68.730	68.443	
K_2	67.933	70.007	67.263	70.167	
K_3	68.173	63.623	70.180	67.573	
R	2.134	8.920	2.917	2.594	

2.2 发酵条件优化

2.2.1 不同温度及初始 pH 对非酶糖基化反应抑制率的影响 通过考察温度对抑制率的影响时发现,在温度为 25 ℃ 时获得最高抑制率 75.93%, 提高或降低培养温度时会降低发酵液对非酶糖基化反应的抑制率(图 4a)。初始 pH 对抑制非酶糖基化反应的结果见图 4b。结果显示,偏酸环境下发酵液对非酶糖基化的抑制作用较稳定,当 pH 小于 6.5 时,抑制率随 pH 的升高而提高,pH 6.5 左右时抑制率达到最大值 82.20%;pH 超过 8.5 时,抑制率呈明显下降趋势,当 pH 为 9.5 时,抑制率仅为 43.04%。通过对温度及 pH 的优化,分别选定 25 ℃ 和 pH 6.5 为发酵温度和培养基初始 pH。

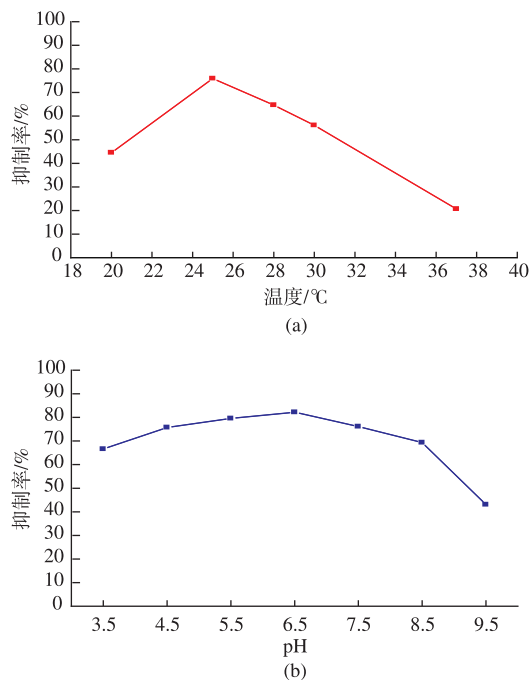


图 4 不同温度及初始 pH 对非酶糖基化反应抑制率的影响
Fig. 4 Effect of temperature and initial pH on inhibition ratio of non-enzymatic glycosylation

2.2.2 不同装液量及接种量对非酶糖基化反应抑制率的影响 装液量主要通过溶氧影响菌体生长及代谢产物的合成,进而导致抑制率的变化。通过对装液量的考察发现,500 mL 三角瓶装液量 150 mL 时抑制率最高,增加或减少装液量时抑制率略有下降。因此,装液量对抑制率的影响较小(图 5a),在以后实验中采用 500 mL 三角瓶装液量 150 mL。接种量的大小决定了菌种在发酵过程中的生长速度,采用大接种量有利于缩短生长延迟期,但过高的接种量使菌丝体迅速生长,消耗大量营养物质,

反而影响后期的生长及代谢产物生成^[15]。在考察接种量的实验中发现,当接种量为 10% 时,抑制率最高(89.74%),接种量低于或高于 10% 时,抑制率均有所下降,尤其是接种量高于 10% 后,抑制率下降较明显(图 5b)。所以在以后实验中采用 10% 的接种量。

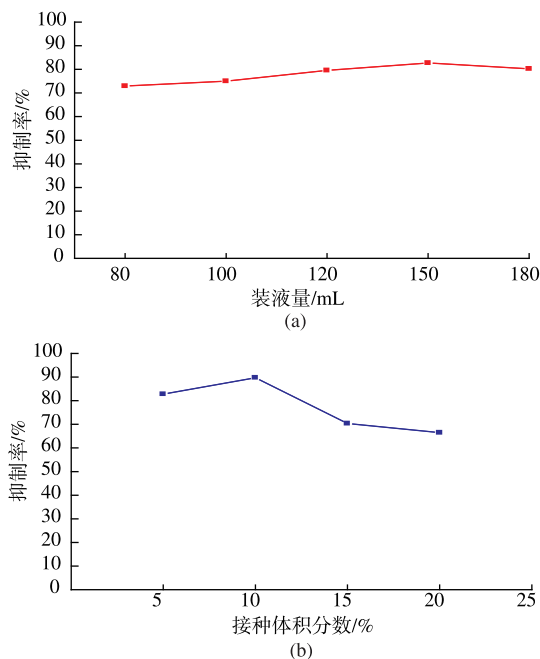


图 5 不同装液量及接种体积分数对非酶糖基化反应抑制率的影响

Fig. 5 Effect of different volume medium and inoculum size on inhibition ratio of non-enzymatic glycosylation

2.3 金耳活性物质对非酶糖基化反应的抑制作用

分别称取多糖和非多糖类粗品 240 mg,溶于 6 mL 去离子水中,待完全溶解后取 3 mL 做两倍稀释,依次稀释 7 次,分别测定不同浓度梯度的粗提物对非酶糖基化反应的抑制率,见图 6。

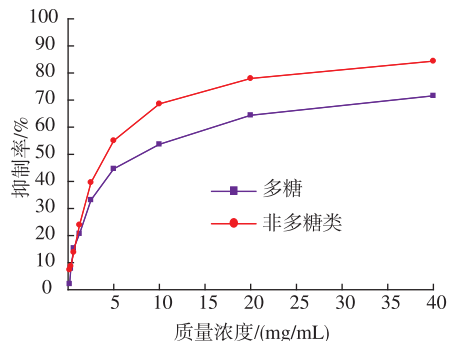


图 6 多糖和其他活性物质对非酶糖基化反应的抑制作用
Fig. 6 Effect of different concentration polysaccharides and non-polysaccharides on non-enzymatic glycosylation in vitro

结果显示,多糖和非多糖类物质对体外非酶糖基化反应均有抑制作用,其中多糖类物质对非酶糖基化抑制作用的半抑制率质量浓度 IC_{50} 为 7.15 mg/mL,而非多糖类物质为 4.26 mg/mL。这说明在金耳发酵液中多糖和其它非多糖类物质对抑制非酶糖基化反应起共同抑制作用,并且以非多糖类物质为主。

药用真菌作为药物资源丰富,目前已开发的药用真菌主要以多糖成分为主,而药用真菌除含有多糖外还含有生物碱、甾醇类和萜类等化合物。研究表明,灵芝中萜类化合物活性高,可以降血糖,降低血压,而樟芝对晚期癌症有较好的疗效主要也是萜类化合物起作用^[16]。Kim 等研究发现,姬松茸中的 β -葡聚糖和寡糖均能使糖尿病小鼠的血糖水平显著下降,其中寡糖的功效最为明显^[17]。目前为止,关于金耳代谢物的研究,张志才曾报道了金耳粗提物(TBE,非多糖类小相对分子质量物质,具体结构尚不清楚。)对非酶糖基化反应有抑制作用^[18];有研究者从金耳子实体中分离出一个对称结构(金耳素)^[19],关于其抑制非酶糖基化方面的生物学功能还没有报道。本研究发现金耳多糖和非多糖类物质对非

酶糖基化反应均有抑制作用。金耳多糖的研究主要集中在降血糖,降血脂,抗氧化等方面,其抑制非酶糖基化方面却鲜有报道。非多糖类粗品中具有抑制非酶糖基化作用的物质可能也是某种寡糖或萜类物质。

3 结 语

作者以抑制非酶糖基化为检测平台,通过单因素和正交试验,确定了培养基成分:葡萄糖 10 g/L,蛋白胨 5 g/L,玉米粉 20 g/L,麸皮 15 g/L, $CoCl_2$ 0.5 g/L, $MnSO_4$ 0.5 g/L。在优化培养基的基础上通过单因素试验得出最佳培养条件为:培养温度 25 °C,初始 pH 6.5,500 mL 三角瓶装液量 150 mL,接种体积分数 10%,优化后的抑制率达 89.74%,是基础培养基的 1.7 倍。

通过对金耳发酵液抑制非酶糖基化的物质的初步分析,发现除多糖外可能还含有某种寡糖或萜类物质具有抑制非酶糖基化的作用,具体的化学结构正在进一步研究中。

参考文献:

- [1] 张雯,赵旌旌,王捷思,等. 耳菌丝体多糖对实验性 2 型糖尿病大鼠的降血糖作用研究[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(1):49-53.
ZHANG Wen,ZHAO Jing-jing,WANG Jie-si, et al. Polysaccharides from *Tremella aurantialba* mycelia(TMP) insulin sensitivity type 2 diabetic rats hypoglycemic activity hypolipidemic activity [J]. *Natural Product Research and Development*,2010,22(1):49-53.(in Chinese)
- [2] DU Xiu-ju,ZHANG Jing-song,YANG Yan,et al. Purification,chemical modification and immunostimulating activity of polysaccharides from *Tremella aurantialba* fruit bodies[J]. *Zhejiang Univ-Sci B:Biomed & Biotechnol*,2010,11(6):437-442.
- [3] 邓云霞,瞿伟菁. 金耳胞外多糖体外抗氧化作用研究[J]. 食用菌学报,2007,14(3):47-49.
DENG Yun-xia,QU Wei-jing. In vitro antioxidant function of extracellular polysaccharides from *Tremella aurantialba* [J]. *Acta Edulis Fungi*,2007,14(3):47-49.(in Chinese)
- [4] 杜秀菊,张劲松,刘艳芳,等. 金耳子实体不同提取物的抗氧化性和对 PC12 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 上海农业学报,2010,26(2):49-52.
DU Xiu-ju,ZHANG Jing-song,Liu Yan-fang,et al. The antioxidant activity of various extracts from *Tremella aurantialba* fruiting bodies and their protective effects on PC12 cells injured by oxidation[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*,2010,26(2):49-52.(in Chinese)
- [5] 张志才. 金耳抑制糖尿病活性物质及转化黄酮类中药的研究[D]. 无锡:江南大学,2006.
- [6] 廉永昕,张嘉莉,李兢. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国疗养医学,2012,21(6):515-516.
LIAO Yong-xin,ZHANG Jia-li,LI Jing. Progress in pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Chinese Journal of Convalescent Medicine*,2012,21(6):515-516.(in Chinese)
- [7] 杨玲. 糖尿病视网膜病变的发病机制及治疗进展[J]. 右江医学,2011,39(1):77.
YANG Ling. Progress in pathogenesis and treatment of diabetic retinopathy[J]. *Youjiang Medical Journal*,2011,39(1):77.(in

- Chinese)
- [8] 李爱萍,田波,张瀚,等. 晚期糖基化终产物在糖尿病诱发动脉粥样硬化中的作用[J]. 中国疗养医学,2011,20(10):913-914.
LI Ai-ping,TIAN Bo,ZHANG Han,et al. The role of advanced glycation end products in atherosclerosis Reduced by diabetes Chinese[J]. **Journal of Convalescent Medicine**,2011,20(10):913-914.(in Chinese)
 - [9] Pampati P K,Suravajjala S,Dain J A. Monitoring nonenzymatic glycation of human immunoglobulin G by methylglyoxal and glyoxal;a spectroscopic study[J]. **Analytical Biochemistry**,2011,408:59-63.
 - [10] Maria P. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes [J]. **Biotechnology Advances**,2004,22(3):189-259.
 - [11] 王吉中,耿卢婧,许春平. 产云芝胞外多糖发酵工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(7):752-757.
WANG Ji-zhong,GENG Lu-jing,XU Chun-ping. Fermentation and extraction of polysaccharides from coriolus versicolor and its antioxidant activity[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012,31(7):752-757.(in Chinese)
 - [12] 刘艳芳,杨焱,张劲松,等. 鸡腿蘑菌株筛选及深层发酵培养基的优化[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(2):14-17.
LIU Yan-fang,YANG Yan,ZHANG Jin-song. Screening of coprinus comatus strains and optimization of the submerged fermentation medium[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2005,24(2):14-17.(in Chinese)
 - [13] 董昌金. 金耳菌丝体液体深层发酵和多糖提取研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(1):342-344.
DONG Chang-jin. Study on the liquid-submerged fermentation and polysaccharide extraction of *Tremella aurantialba* mycelia[J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**,2010,38(1):342-344.(in Chinese)
 - [14] 王玉,李政,班立桐. 猴头菇液体菌种培养基配方的研究[J]. 北方园艺,2011,09:202-204.
WANG Yu,LI Zheng,BAN Li-tong. Optimization of fermentation medium for improving mycelium of *Hericium erinaceus* (Bull.) per[J]. **Northern Horticulture**,2011,09:202-204.(in Chinese)
 - [15] 李寅,高海军,陈坚.高细胞密度发酵技术[M]. 北京:化学工业出版社,2006:5.
 - [16] 杨立红,张丽娟,代小青. 中国药用真菌及其产品研究与开发[J]. 当代生态农业,2003,1:30-33.
YANG Li-hong,ZHANG Li-juan,DAI Xiao-qing. The research and development of Chinese medicinal fungi and its products[J]. **Contemporary Eco-Agri Culture**,2003,1:30-33.(in Chinese)
 - [17] Kim Y W,Kim K H,Choi H J,et al. Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*[J]. **Biotechnology Letters**,2005,27:483-487.
 - [18] ZHANG Zhi-cai,CUI Feng-jie. Non-enzymatic glycosylation reaction contributes to a rise of blood glucose in alloxan-induced diabetic rats[J]. **Int J Diabetes & Metabolism**,2007,15(2):52-53.
 - [19] DING Zhi-hui,LI Jing-ping,LIU Ji-kai. Tremellin,a novel symmetrical compound,from the basidiomycete *Tremella aurantialba* [J]. **Helvetica Chimica Acta**,2002,85(3):882-884.