

引用格式:

谭智杰, 张巧毅, 赵柔, 王常贵, 林元山. 茯苓菌液体发酵产胞内多糖条件的优化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(5): 543–548.

TAN Z J, ZHANG Q Y, ZHAO R, WANG C G, LIN Y S. Optimization of liquid fermentation conditions of *Poria cocos* to produce intracellular polysaccharide[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2023, 49(5): 543–548.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



茯苓菌液体发酵产胞内多糖条件的优化

谭智杰¹, 张巧毅², 赵柔², 王常贵², 林元山^{1,2*}

(1.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.农业生物工程研究所, 湖南 长沙 410128)

摘要:以不同碳源、氮源、pH、温度、接种量、转速、时间为单一变量,通过单因素试验和 Plackett–Burman 试验从 7 个因素中筛选显著性因素,对筛选出的显著性因素进行最陡爬坡试验,采用 Box–Behnken 试验探究茯苓菌液体发酵产胞内多糖的最优条件。结果表明:接种量、pH、葡萄糖质量分数和酵母膏质量分数是茯苓菌液体发酵产胞内多糖的显著性因素;在接种量 9%、pH 5.7、葡萄糖质量分数 4%、酵母膏质量分数 1%、时间 7 d、温度 28 °C、转速 170 r/min 的条件下,茯苓胞内多糖的含量为(5.82±0.18) g/L,生物量为(14.63±0.21) g/L,分别为未优化前的 1.6 倍和 2.0 倍。与常规栽培相比,茯苓菌液体发酵产胞内多糖的时间大大缩短,减少了松材消耗,且茯苓菌液体发酵培养基成本低廉。

关键词:茯苓;液体发酵;胞内多糖;Plackett–Burman 试验;Box–Behnken 试验

中图分类号: S567.3+2; R282.71

文献标志码: A

文章编号: 1007–1032(2023)05–0543–06

Optimization of liquid fermentation conditions of *Poria cocos* to produce intracellular polysaccharide

TAN Zhijie¹, ZHANG Qiaoyi², ZHAO Rou², WANG Changgui², LIN Yuanshan^{1,2*}

(1.College of Biological Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Agricultural Bioengineering Research Institute, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: In this study, four significant factors of seven were checked by one-way test and Plackett–Burman test using different carbon and nitrogen sources, pH, temperature, inoculum, rotational speed, and time as single variables. And the steepest-climbing test was carried out on the screened factors. The Box–Behnken test was used to investigate the optimal conditions for intracellular polysaccharide production by liquid fermentation of *Poria cocos*. The results showed that inoculum, pH, glucose mass fraction and yeast paste mass fraction were the key factors for the production of intracellular polysaccharides by liquid fermentation of *Poria cocos* bacteria. The content of intracellular polysaccharides in *Poria cocos* under the conditions of inoculum of 9%, pH 5.7, glucose mass fraction of 4%, yeast paste mass fraction of 1%, time of 7 d, temperature of 28 °C and rotational speed of 170 r/min. Intracellular polysaccharide was(5.82±0.18) g/L and biomass was (14.63±0.21) g/L, which were 1.6 and 2.0 times higher than those before optimization, respectively. Compared with conventional cultivation, the time for intracellular polysaccharide production by liquid fermentation of *Poria cocos* was greatly shortened, the consumption of pinewood was reduced, and the cost of *Poria cocos* liquid fermentation medium was inexpensive.

Keywords: *Poria cocos*(Schw.)Wolf; liquid fermentation; intracellular polysaccharide; Plackett–Burman experiment;

收稿日期: 2023–02–25

修回日期: 2023–10–11

基金项目: 湖南省高校创新平台开放项目(19K045); 湖南省重点研发计划项目(2016NK2114)

作者简介: 谭智杰(1996—), 男, 湖南凤凰人, 硕士研究生, 主要从事真菌多糖功能研究, tzj1349124876@163.com; *通信作者, 林元山, 博士, 副教授, 主要从事微生物代谢发酵调控的开发利用研究, wallsln@126.com

Box-Behnken experiment

茯苓(PORIA)为多孔菌科真菌茯苓(*Poria cocos*(Schw.)Wolf)的干燥菌核,其性甘、淡、平^[1]。茯苓中富含多种化学成分^[2],如三萜^[3]、多糖和甾醇^[4]等。茯苓多糖具有护肝^[5-6]、诱导凋亡^[7]、抗肿瘤、抗氧化^[8-9]、利尿^[10]、强化巨噬细胞的吞噬功能^[11-12]等。茯苓的生产现主要依靠人工栽培,需耗费大量松材,种植周期近一年或更长,且管理要求高、效益低^[13]。相比于传统的人工种植,茯苓菌种液体发酵无需砍伐木材,具有发酵周期短、过程可控等优点,可为解决茯苓人工栽培与林地生态的矛盾提供新的思路。本研究中,探讨了茯苓菌种液体发酵高产胞内多糖的条件,旨在为规模化生产茯苓多糖提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

茯苓菌株由湖南农业大学农业生物工程研究所筛选;98%浓硫酸、苯酚、磷酸二氢钾、硫酸镁、维生素 B₁ 等均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 培养基及种子液的制备

斜面及平板培养基的制备:将 PDA 培养基置于 28 °C 恒温培养箱培养 7 d。

种子液培养基的制备:准确称取葡萄糖 20 g、蛋白胨 5 g、磷酸二氢钾 1 g、硫酸镁 0.75 g 溶于 1000 mL 蒸馏水中。

摇瓶发酵液体培养基的制备:准确称取葡萄糖 30 g、蛋白胨 5 g、磷酸二氢钾 1 g、硫酸镁 0.75 g、维生素 B₁ 0.05 g 溶于 1000 mL 蒸馏水中。

种子液的制备:将 100 mL 种子液培养基装入 250 mL 三角瓶中,121 °C 灭菌 25 min 后冷却至室温,用接种环挑取斜面茯苓菌丝体,接入种子培养基中,26 °C 培养 4 d,作为液体菌种备用。

初始摇瓶发酵液的制备:将 100 mL 摇瓶发酵液体培养基装入 250 mL 三角瓶中,按 4% 比例接种种子液,初始 pH 5.5,于 150 r/min、26 °C 摇床培养箱中培养 7 d。

1.2.2 菌体量及胞内多糖含量的测定

菌体量的测定:将发酵液抽滤后用蒸馏水清洗菌丝体,3 次重复,再将菌丝体放入 60 °C 烘箱中烘干至恒重,称取菌丝体的干质量。

胞内多糖的测定:发酵液 4000 r/min 离心 15 min,弃上清,蒸馏水清洗菌丝体 3 次,将菌丝体置于 60 °C 烘箱烘干,取 0.1 g 菌丝体,加入 5 mL 0.5 mol/L NaOH,细胞破碎仪破碎 5 min,4000 r/min 离心 5 min 后取上清,2 次重复,合并液体。以葡萄糖为标样,采用苯酚-硫酸法^[14]测定多糖含量,参考周跃斌等^[15]的方法制作标准曲线。

1.2.3 茯苓菌多糖液体发酵的单因素试验

以不同碳源(果糖、蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉、乳糖)、氮源(酵母粉、酵母膏、蛋白胨、牛肉浸膏、豆浆)、时间(3、4、5、6、7、8 d)、温度(22、24、26、28、30 °C)、pH(3、4、5、6、7、8)、接种量(2%、4%、6%、8%、10%)、转速(140、150、160、170、180 r/min)为单一变量,依次进行茯苓菌液体发酵,按照 1.2.2 中的方法测定茯苓菌丝体干质量和胞内多糖的含量。

1.2.4 Plackett-Burman 试验筛选茯苓多糖的显著因素

在单因素试验的基础上,以胞内多糖作为响应值,对接种量(X_1)、温度(X_2)、时间(X_3)、酵母膏质量分数(X_4)、转速(X_5)、pH(X_6)、葡萄糖质量分数(X_7)等 7 个因素进行评价,筛选出显著性因素。每个因素取最低(-1)和最高(1)水平,共 12 组试验,试验因素及其水平如表 1 所示。

表 1 Plackett-Burman 试验设计的因素及水平

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman experimental design

水平	接种量/%	温度/°C	时间/d	酵母膏质量分数/%	转速/(r min ⁻¹)	pH	葡萄糖质量分数/%
低水平(-1)	6	26	6	0.75	160	5	3
高水平(1)	10	30	8	1.25	180	6	5

1.2.5 最陡爬坡试验

根据 Plackett–Burman 试验结果选取显著性因素进行最陡爬坡试验。

1.2.6 响应面法优化试验设计

根据 Plackett–Burman 试验设计及最陡爬坡试验进行 Box–Behnken 试验设计, 根据试验结果建立数学回归模型并进行分析。

1.2.7 数据处理

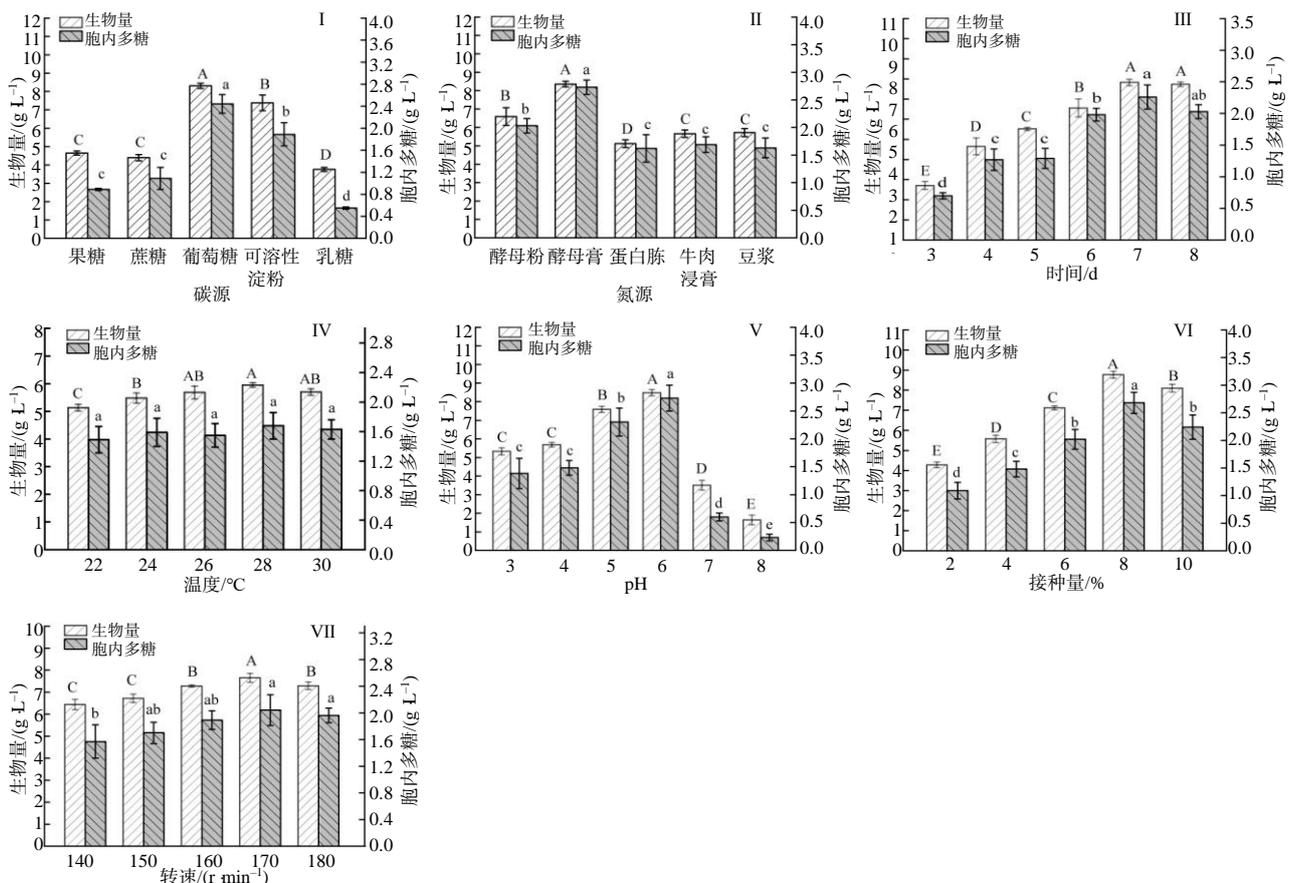
采用 SPSS 21 和 Excel 2019 进行数据处理; 采用 Origin 2021 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

从图 1 可知: 在不同碳源(图 1-I)中, 葡萄糖为最优碳源, 其生物量和胞内多糖含量分别达到 8.31 g/L 和 2.44 g/L; 在不同氮源(图 1-II)中, 酵母膏为

最优氮源, 其生物量和胞内多糖含量分别达到 8.36 g/L 和 2.73 g/L; 图 1-III 表明, 当发酵时间在 3~7 d 内, 生物量和胞内多糖随着发酵时间的延长而增加, 当发酵时间为 7 d 时, 生物量和胞内多糖含量分别达到 7.83、2.26 g/L, 第 8 天略有下降; 图 1-IV 表明, 26~30 °C 茯苓菌生长状态良好, 处理间的生物量和胞内多糖含量差异不显著($P>0.05$), 其中 28 °C 时最优; 图 1-V 表明, 培养基在 pH 3~6 范围内, 生物量和胞内多糖含量较高, 说明茯苓菌适合在偏酸性培养基上生长, pH 为 6 时最优, 生物量和胞内多糖含量分别达到 8.48、2.73 g/L; 图 1-VI 表明, 当接种量为 2%~8% 时, 生物量和多糖含量随着接种量的增加而增加, 当接种量为 8% 时达到最优, 分别达到 8.77、2.68 g/L, 当接种量为 10% 时, 生物量和多糖含量下降; 图 1-VII 表明, 摇床转速为 170 r/min 时, 生物量和胞内多糖含量达到最优, 分别达到 7.65、2.04 g/L。



不同大写字母示处理间生物量的差异有统计学意义($P<0.05$); 不同小写字母示处理间胞内多糖含量的差异有统计学意义($P<0.05$)。

图 1 茯苓菌液体发酵单因素试验结果

Fig.1 Single factor test results of *Poria cocos* liquid fermentation

2.2 显著性因素的确定

表2为Plackett-Burman试验设计以及以胞内多糖作为响应值的结果。用Design-Expert12对表2进行多元回归分析得到表3。由表3可知,该回归分析模型的 P 值 <0.05 ,具有显著性,表明此模型可靠。根据效应 P 值大小可以得知接种量(X_1)、pH(X_6)、酵母膏质量分数(X_4)、葡萄糖质量分数(X_7)、温度(X_2)、转速(X_5)、时间(X_3)对茯苓菌液体发酵产胞内多糖的影响依次降低。其中:接种量(X_1)、pH(X_6)、

酵母膏质量分数(X_4)、葡萄糖质量分数(X_7)的 P 值 <0.05 ,达到显著水平,说明接种量、pH、酵母膏质量分数、葡萄糖质量分数是影响茯苓菌液体发酵产胞内多糖的显著性因素;而温度(X_2)、转速(X_5)、时间(X_3)的 P 值 >0.05 ,说明温度、转速、时间对茯苓菌液体发酵产胞内多糖的影响不显著:因此,后续选择接种量、pH、酵母膏质量分数、葡萄糖质量分数4个显著性因素进行响应面试验设计。

表2 Plackett-Burman 试验设计及响应值

Table 2 Experimental design and response value of Plackett-Burman

处理号	接种量(X_1)	温度(X_2)	时间(X_3)	酵母膏质量分数(X_4)	转速(X_5)	pH(X_6)	葡萄糖质量分数(X_7)	胞内多糖含量/(g L ⁻¹)
1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	2.07
2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.06
3	1	1	-1	-1	-1	1	-1	3.38
4	-1	1	1	1	-1	-1	-1	0.84
5	1	-1	1	1	1	-1	-1	1.68
6	1	1	-1	1	1	1	-1	2.43
7	-1	1	1	-1	1	1	1	2.64
8	1	1	1	-1	-1	-1	1	3.16
9	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1.97
10	-1	1	-1	1	1	-1	1	1.32
11	1	-1	1	1	-1	1	1	2.86
12	-1	-1	-1	1	-1	1	1	2.21

表3 Plackett-Burman 试验因素的效应

Table 3 Effect evaluation of each factor in Plackett-Burman experiment

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	6.880 0	7	0.983 1	12.01	0.015 0	*
X_1	2.560 0	1	2.560 0	31.25	0.005 0	**
X_2	0.307 2	1	0.307 2	3.75	0.124 7	
X_3	0.038 5	1	0.038 5	0.47	0.530 3	
X_4	0.720 3	1	0.720 3	8.80	0.041 3	*
X_5	0.163 3	1	0.163 3	2.00	0.230 6	
X_6	2.390 0	1	2.390 0	29.26	0.005 7	**
X_7	0.700 8	1	0.700 8	8.56	0.043 0	*
残差	0.327 3	4	0.081 8			
总和	7.210 0	11				

“*”“**”“***”分别表示在0.05、0.01水平有统计学意义。

2.3 最陡爬坡试验

根据Plackett-Burman试验结果选取葡萄糖质量分数、酵母膏质量分数、接种量、pH等4个显著性因子进行最陡爬坡试验。试验结果(表4)表明,

最陡爬坡试验中第4组胞内多糖含量最大,所以选择第4组作为响应面设计的中心水平进行后续的Box-Behnken试验设计。

表4 最陡爬坡试验设计及结果

Table 4 Desig and results of steepest climbing experiment

组号	葡萄糖质量分数/%	酵母膏质量分数/%	pH	接种量/%	胞内多糖含量/(g L ⁻¹)
1	1	0.25	2.5	2	1.68±0.12
2	2	0.55	3.5	4	3.03±0.19
3	3	0.75	4.5	6	3.12±0.25
4	4	1.00	5.5	8	3.99±0.14
5	5	1.25	6.5	10	3.23±0.23
6	6	1.50	7.5	12	1.91±0.07

2.4 响应面优化

根据Plackett-Burman试验设计及最陡爬坡试验结果,选取葡萄糖质量分数(x_1)、接种量(x_2)、酵母膏质量分数(x_3)、pH(x_4)等4个显著性因子进行4因素3水平的Box-Behnken试验设计(表5),试验结果如表6所示。

表 5 Box-Behnken 试验的因素及水平

Table 5 Factors and levels of Box-Behnken experiment

水平	葡萄糖质量 分数/%	接种量/%	酵母膏质量 分数/%	pH
-1	3	6	0.75	5.0
0	4	8	1.00	5.5
1	5	10	1.25	6.0

其他发酵条件分别为时间 7 d、温度 28 °C、转速 170 r/min。

表 6 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 6 Design and results of Box-Behnken experiment

处理号	葡萄糖质 量分数(x ₁)	接种量(x ₂)	酵母膏质 量分数(x ₃)	pH(x ₄)	胞内多糖 含量/(g L ⁻¹)
1	0	-1	-1	0	3.34
2	0	0	0	0	4.98
3	-1	1	0	0	4.83
4	0	1	-1	0	5.24
5	0	0	0	0	5.69
6	0	-1	0	1	3.09
7	1	1	0	0	5.07
8	0	1	0	1	4.42
9	1	0	0	-1	2.86
10	-1	0	-1	0	3.84
11	0	-1	0	-1	2.97
12	-1	0	0	1	3.91
13	0	-1	1	0	3.47
14	1	-1	0	0	3.75
15	0	0	1	-1	3.54
16	0	0	0	0	5.71
17	0	0	0	0	5.47
18	0	0	-1	1	4.18
19	1	0	-1	0	4.03
20	0	1	0	-1	3.47
21	1	0	0	1	4.32
22	-1	0	0	-1	3.18
23	1	0	1	0	4.61
24	0	0	-1	-1	3.26
25	0	0	1	1	4.79
26	0	0	0	0	5.43
27	0	1	1	0	5.84
28	-1	0	1	0	4.26
29	-1	-1	0	0	3.21

利用 Design-Expert12 对表 6 中的试验数据进行拟合回归, 得到茯苓菌液体发酵产胞内多糖(y)对葡萄糖质量分数(x₁)、接种量(x₂)、酵母膏质量分数(x₃)、pH(x₄)的回归方程:

$$y=5.46+0.117 5x_1+0.735 5x_2+0.218 3x_3+0.452 5 x_4-0.075 0x_1x_2+0.040 0x_1x_3+0.182 5x_1x_4+0.117 5 x_2x_3+0.207 5x_2x_4+0.082 5x_3x_4-0.722 6x_1^2-0.618 8 x_2^2-0.406 3 x_3^2-1.21x_4^2。$$

表 7 结果显示此模型 P <0.000 1, 极显著; 失

拟项 P 值(0.377 5)>0.05, 不显著, 说明该回归模型可靠。在此回归模型中, 一次项 x₃对茯苓菌液体发酵产胞内多糖的影响达到显著水平(P<0.05); 而 x₂、x₄、x₁²、x₂²、x₃²、x₄²对茯苓菌液体发酵产胞内多糖的影响达到极显著水平(P<0.01)。由 Design-Expert12 软件对回归模型进行优化分析, 得到茯苓菌液体发酵产胞内多糖的最优条件为: 接种量 9.37%, pH 为 5.76, 酵母膏质量分数 1.1%, 葡萄糖质量分数 4.09%。在此条件下, 软件预测茯苓菌液体培养产胞内多糖的最大理论值为 5.82 g/L。结合实际发酵情况, 调整茯苓菌液体培养产胞内多糖的最优条件: 接种量 9%、pH 5.7、酵母膏质量分数 1%、葡萄糖质量分数 4%、时间 7 d、温度 28 °C、转速 170 r/min, 生物量和胞内多糖含量分别为(14.63±0.21)、(5.82±0.18) g/L, 分别达到未优化前的 1.6 倍和 2.0 倍, 其中, 产胞内多糖含量与二次回归方程预测值 5.84 g/L 基本吻合。

表 7 回归模型方差分析结果

Table 7 ANOVA results for response surface quadratic model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	22.220 0	14	1.590 0	13.670 0	<0.000 1	**
x ₁	0.165 7	1	0.165 7	1.430 0	0.252 0	
x ₂	6.810 0	1	6.810 0	58.670 0	<0.000 1	**
x ₃	0.572 0	1	0.5720	4.930 0	<0.043 4	*
x ₄	2.460 0	1	2.460 0	21.170 0	<0.000 4	**
x ₁ x ₂	0.022 5	1	0.022 5	0.193 9	0.666 5	
x ₁ x ₃	0.006 4	1	0.006 4	0.055 1	0.817 7	
x ₁ x ₄	0.133 2	1	0.133 2	1.150 0	0.302 1	
x ₂ x ₃	0.055 2	1	0.055 2	0.475 8	0.501 6	
x ₂ x ₄	0.172 2	1	0.172 2	1.480 0	0.243 3	
x ₃ x ₄	0.027 2	1	0.027 2	0.234 6	0.635 7	
x ₁ ²	3.310 0	1	3.390 0	29.180 0	<0.000 1	**
x ₂ ²	2.480 0	1	2.480 0	21.400 0	<0.000 4	**
x ₃ ²	1.070 0	1	1.070 0	9.230 0	<0.008 9	**
x ₄ ²	9.460 0	1	9.460 0	81.490 0	<0.000 1	**
残差	1.620 0	14	0.116 1			
失拟项	1.280 0	10	0.127 8	1.470 0	0.377 5	
总和	23.840 0	28				

、*、*分别表示 0.05、0.01 水平差异有统计学意义。

3 结论与讨论

茯苓适宜栽培于海拔高度 600~1000 m 的松林地, 以背风向阳、坡度 10°~35°、pH 5~6 的沙质壤土为宜, 栽培时间长, 传统菌体栽培需要 8~10 个月, 即使是最快、最先进的嫁接栽培也需要 3~4 个月, 而且茯苓栽培离不开松材^[16], 这与国家绿色环

保经济策略不相适应:因此,茯苓多糖发酵法在绿色生产中具有重大意义。本研究中,在接种量9%、pH 5.7、葡萄糖质量分数4%、酵母膏质量分数1%、时间7 d、温度28 °C、转速170 r/min的条件下,茯苓菌可以短时间(7 d)内完成多糖发酵,且培养基配方简单(仅含1%酵母膏、4%葡萄糖),可以避免松材消耗。另外,在液体发酵过程中,转速170 r/min,只需通入少量无菌空气,成本可控,工业化生产成本进一步压缩。从液体发酵产胞内多糖的水平来看,本研究采用单批发酵法,菌丝体生物量达(14.63±0.21) g/L,与李羿等^[17]补料发酵的菌丝体含量14.85 g/L接近;茯苓胞内多糖含量为(5.82±0.18) g/L,优于李羿等^[18]摇瓶液体发酵的胞内多糖含量(3.62 g/L)。本研究结果可为茯苓菌液体发酵产胞内多糖的规模生产提供参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 张超伟,张钰,苏珊,等. 茯苓类药材本草学、化学成分和药理作用研究进展[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(2): 9-14.
- [3] 崔鹤蓉,王睿林,郭文博,等. 茯苓的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(5): 694-700.
- [4] LI X L, MA L N, ZHANG L J. Molecular basis for *Poria cocos* mushroom polysaccharide used as an antitumor drug in China[J]. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2019, 163: 263-296.
- [5] CHENG Y, XIE Y, GE J C, et al. Structural characterization and hepatoprotective activity of a galactoglucan from *Poria cocos*[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 263: 117979.
- [6] 程玥. 茯苓多糖分离纯化、结构表征、保肝活性及其对CYP2E1酶影响研究[D]. 合肥:安徽中医药大学, 2021.
- [7] LEE S, LEE S, ROH H S, et al. Cytotoxic constituents from the sclerotia of *Poria cocos* against human lung adenocarcinoma cells by inducing mitochondrial apoptosis[J]. Cells, 2018, 7(9): 116.
- [8] WANG N N, ZHANG Y, WANG X P, et al. Antioxidant property of water-soluble polysaccharides from *Poria cocos* Wolf using different extraction methods[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 83: 103-110.
- [9] 项飞兵,熊天涵,胡书午,等. 复合酶法提取九资河茯苓多糖及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(9): 118-123.
- [10] 邓刚民,许津. 茯苓素:一种潜在的醛固酮拮抗剂[J]. 中国抗生素杂志, 1992, 17(1): 34-37.
- [11] 廖海锋,邓向亮,罗霞,等. 羧甲基茯苓多糖对巨噬细胞极化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(13): 122-126.
- [12] 高贵珍,孙冰清,吴超,等. 硫酸化茯苓多糖对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J]. 安徽工程大学学报, 2015, 30(1): 1-5.
- [13] 於小波,咎俊峰,王金波,等. 我国茯苓药材主要产区资源调查[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 714-716.
- [14] 殷腊生. 硫酸苯酚法测定灵芝多糖肽胶囊中总多糖含量的研究[J]. 中国商办工业, 2000, 12(11): 44-45.
- [15] 周跃斌,王伟,李适,等. 竹叶多糖提取条件的优化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2006, 32(2): 206-209.
- [16] 刘明新,杨华,王先有. 茯苓人工栽培历史与栽培技术研究进展[J]. 湖南生态科学学报, 2022, 9(2): 97-102.
- [17] 李羿,李晨,杨万清,等. 茯苓补料液体发酵工艺优化及不同来源茯苓所含成分比较[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1520-1524.
- [18] 李羿,杨胜,李晨,等. 茯苓摇瓶液体发酵复合药性培养基及其化学成分研究[J]. 中草药, 2012, 43(8): 1519-1522.

责任编辑:毛友纯
英文编辑:柳正