

杜仲茎点霉 SP-16F 产松脂醇二葡萄糖苷 营养条件的优化

刘超, 师俊玲, 王维, 周小娟

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】对杜仲茎点霉 SP-16F 发酵生产松脂醇二葡萄糖苷(PDG)的营养条件进行优化,以提高发酵液中的 PDG 产量。【方法】在单因素实验的基础上,通过三元二次中心组合设计和响应面分析法优化杜仲茎点霉 SP-16F 发酵产生 PDG 的最佳营养条件。【结果】在液体培养条件下,茎点霉 SP-16F 产 PDG 的最佳培养基组成为:蔗糖 47.5 g/L, NaNO₃ 3.0 g/L, K₂HPO₄ 2.83 g/L。在最佳培养条件下,PDG 产量预测值较优化前的最大值提高了 3 倍以上。【结论】获得了茎点霉 SP-16F 的最佳产 PDG 培养基,有效地提高了其发酵产 PDG 的能力。

[关键词] 茎点霉;松脂醇二葡萄糖苷;发酵培养基;营养条件优化;响应面分析

[中图分类号] Q939.97

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)07-0157-08

Optimization of nutrient elements for the production of pinoresinol diglucoside by a strain of *Phoma* sp. of *Eucommia ulmoides* Oliv. using response surface analysis

LIU Chao, SHI Jun-ling, WANG Wei, ZHOU Xiao-juan

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The study aimed to optimize the nutrients in the media for the production of pinoresinol diglucoside (PDG) by *Phoma* sp. SP-16F in submerged cultivation. 【Method】Single-factor design and Response Surface Analysis were used to optimize the factors and their levels. 【Result】The optimal nutrients for production of PDG by *Phoma* sp. SP-16F were obtained as sucrose 47.5 g/L, NaNO₃ 3.0 g/L, and K₂HPO₄ 2.83 g/L. After the optimization, the PDG yield was enhanced by more than 3 times. 【Conclusion】PDG yield was highly improved by optimizing the nutrients for the liquid cultivation of *Phoma* sp. SP-16F with the aid of Response Surface Analysis.

Key words: *Phonma* sp.; Pinoresinol diglucoside; fermentation medium; optimization of nutrient; response surface analysis

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)是杜仲科杜仲属落叶乔木,属中国特有树种,是国家二级保护植物,不易进行人工种植。杜仲是中国传统的名贵中药,具有其他化学降压药无法比拟的降血压功能^[1-3],其主要降压成分是松脂醇二葡萄糖苷

(PDG)^[4-5]。获取杜仲中功能性成分的传统方法是利用杜仲的皮、叶进行提取^[6-10]。但由于材料的限制,用这种方法所获得的 PDG,远远不能满足市场需求,而且以树皮为材料的方法不利于保护特种植物资源,也不符合可持续发展的要求。

* [收稿日期] 2008-10-22

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2008K02-09);全国大学生科技创新项目(G07036);西北农林科技大学青年学术骨干支持项目

[作者简介] 刘超(1985-),男,河北沧州人,在读硕士,主要从事食品生物技术研究。

[通信作者] 师俊玲(1972-),女,陕西渭南人,教授,博士,硕士生导师,主要从事食品生物技术研究。

E-mail: sjlshi2004@yahoo.com.cn.

用发酵法生产植物有效成分具有简便、快速、成本低等特点,植物细胞培养法生产紫杉醇的成功,为发酵法生产植物功能性成分开辟了先河^[11]。但是由于植物细胞培养周期长、难度大且对培养条件要求较高,限制了植物细胞培养法的广泛应用,如果能用微生物发酵法生产植物功能性成分,则会更加简便和快速。近年来,很多研究证明,寄生在植物体内的一些内生菌,能产生与寄主植物相同或相似的活性物质^[12-13],如紫杉醇^[14]、生物碱^[15]等。笔者在前期研究工作中,从杜仲中分离到了 1 株能够在液体培养条件下产生 PDG 的微生物菌种——茎点霉 SP-16F,并对其培养条件进行了初步探讨^[16]。

响应面分析法是生物工程研究方面经常使用的一种试验设计方法,其能通过合理的试验设计,从有限的试验数据中得出较多的信息,特别适合于对多因素、多水平的试验条件进行优化,已广泛用于受多因素影响的工艺过程及微生物培养条件的优化研究^[17-21]。

为了探讨杜仲内生菌茎点霉(*Phoma* sp.)培养生产杜仲活性成分 PDG 的最佳工艺条件,本研究在单因素试验的基础上,采用响应面分析法对杜仲内生菌茎点霉 SP-16F 产生 PDG 的营养条件进行了优化,以期筛选出各营养成分间的最佳配比,为杜仲活性成分的可持续生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌种

杜仲内生菌茎点霉 SP-16F,由西北农林科技大学食品科学与工程学院食品生物工程实验室提供,分离自西北农林科技大学校园内的杜仲树^[16]。

1.2 培养基

1.2.1 斜面菌种保藏培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),自然 pH(约 7.2)。

1.2.2 种子培养基 采用察氏培养基,组成为蔗糖 30.0 g,NaNO₃ 2.0 g,K₂HPO₄ 1.0 g,KCl 0.5 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,FeSO₄·7H₂O(100 g/L)2 滴,蒸馏水 1 000 mL,自然 pH(约 7.89)。

1.2.3 发酵培养基 基本组成与种子培养基相同,根据试验设计变换其组分的含量,以获得不同的发酵培养基。

1.3 SP-16F 种子液的制备

取 2 cm² 活化的 SP-16F 斜面菌种,接入装有 100 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中,在 28 ℃、180 r/min 的条件下摇床培养 120 h,即得 SP-16F 种子

液。

1.4 SP-16F 的发酵培养

取培养好的 SP-16F 种子液,按体积分数 5% 的接种量,接入装有 100 mL 发酵培养液的 250 mL 三角瓶中,在 28 ℃、180 r/min 的条件下摇床培养 216 h(9 d)。

1.5 试验设计

1.5.1 适宜碳源、氮源、无机盐种类的筛选 碳源是菌体代谢和合成含碳产物时必需的能量来源和原料;氮源是构成菌体细胞物质(氨基酸、蛋白质、核酸、酶类等)和含氮目的代谢产物的营养物质;无机盐参与细胞结构物质的组成、能量转移,调控原生质的胶态和细胞透性,有些无机盐还是酶活性基的组成成分,或是酶的激活剂,对微生物的生长和代谢有很大影响。受菌体生长代谢及营养物质代谢途径和用途特点的影响,这些营养物质的种类对菌体的生长和产物的合成速度有重要影响。本研究以细胞干质量和 PDG 产量为考察指标,采用单因素试验确定茎点霉 SP-16F 适宜的碳源、氮源和无机盐。

(1)碳源的筛选。保持发酵培养基中的其他组分和含量不变,分别用 30 g 乳糖、葡萄糖、麦芽糖、可溶性淀粉代替其中的蔗糖,进行发酵培养,筛选适宜的碳源种类。

(2)氮源的筛选。保持发酵培养基中的其他组分和含量不变,分别用 2.0 g(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、酵母膏、蛋白胨、牛肉膏代替其中的硝酸钠,进行发酵培养,筛选适宜的氮源种类。

(3)无机盐的筛选。保持发酵培养基中的其他组分和含量不变,用与培养基中 K、Mg、Fe 离子总量等物质质量的锰离子(硫酸锰)、锌离子(硫酸锌)、钙离子(氯化钙)、铝离子(硝酸铝)、钾离子(磷酸氢二钾)代替原培养基中的无机盐组分,进行发酵培养,筛选适宜的无机盐。

1.5.2 主要营养物质质量浓度范围的确定 适当的营养物质浓度对微生物的生长代谢是非常重要的,营养物质浓度过小,不能满足微生物自身生长及产生代谢产物的需求,过大则可能导致细胞渗透压加大,不利于细胞生长代谢。另外,一些营养物质的大量存在还可能导致微生物代谢途径发生改变,影响代谢产物的积累。为了进一步确定茎点霉 SP-16F 培养基主要营养物质的浓度范围,在 1.5.1 节的基础上,固定发酵培养基中其他组分及含量不变,选定适宜的碳源为蔗糖、氮源为 NaNO₃、无机盐为 K₂HPO₄,以细胞干质量和 PDG 产量为考察指标,

设计单因素试验,确定发酵培养基中各营养成分的质量浓度。

(1)蔗糖质量浓度。在蔗糖质量浓度分别为 15,20,25,30,35,40 和 45 g/L、 NaNO_3 质量浓度为 2 g/L、 K_2HPO_4 质量浓度为 1 g/L 的条件下,进行发酵培养,测定蔗糖质量浓度对细胞干质量和 PDG 产量的影响。

(2) NaNO_3 质量浓度。在蔗糖质量浓度为 30 g/L、 K_2HPO_4 质量浓度为 1 g/L、 NaNO_3 质量浓度分别为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 和 3.5 g/L 的条件下,进行发酵培养,测定 NaNO_3 质量浓度对细胞

干质量和 PDG 产量的影响。

(3) K_2HPO_4 质量浓度。在蔗糖质量浓度为 30 g/L、 NaNO_3 质量浓度为 2 g/L、 K_2HPO_4 质量浓度分别为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 和 3.5 g/L 的条件下,进行发酵培养,测定 K_2HPO_4 质量浓度对细胞干质量和 PDG 产量的影响。

1.5.3 响应面分析法试验设计 在 1.5.2 节所得结果的基础上,利用 Design-Expert 软件(version 5.0.7)设计三元二次中心组合试验,对茎点霉 SP-16F 产 PDG 营养条件进行优化。各试验因子的编码与取值见表 1,具体试验方案见表 2。

表 1 杜仲内生茎点霉 SP-16F 产 PDG 营养条件三元二次中心组合试验的因素水平及其编码值

Table 1 Code of the levels and factors of the experiments

变量 Variable	代码 Code		编码水平 Code levels		
	未编码 Uncoded	编码 Coded	-1	0	1
蔗糖/(g·L ⁻¹) Sucrose	X1	A	30	40	50
NaNO_3 /(g·L ⁻¹)	X2	B	2	3	4
K_2HPO_4 /(g·L ⁻¹)	X3	C	1	2	3

表 2 杜仲内生茎点霉 SP-16F 产 PDG 营养条件三元二次中心组合试验方案

Table 2 Design of central composite designed experiments

试验序号 Num	A 蔗糖 Sucrose	B NaNO_3	C K_2HPO_4	试验序号 Num	A 蔗糖 Sucrose	B NaNO_3	C K_2HPO_4
1	0	0	0	11	0	0	0
2	1	-1	-1	12	1	-1	1
3	0	-1.68	0	13	-1	1	1
4	0	0	1.68	14	1	1	1
5	-1	-1	-1	15	0	0	0
6	-1.68	0	0	16	0	0	-1.68
7	0	0	0	17	0	1.68	0
8	-1	-1	1	18	1.68	0	0
9	-1	1	-1	19	0	0	0
10	0	0	0	20	1	1	-1

1.6 测定指标与方法

1.6.1 细胞干质量 将发酵液以 4 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,沉淀用去离子水洗 3 次,将菌丝体置 100 ℃干燥箱中烘至质量恒定,称其质量。

1.6.2 PDG 的提取与检测 样品处理方法:发酵液→低速离心(4 000 r/min、10 min)→取全部上清液醇沉(加入 100 mL 体积分数 60%乙醇溶液,醇沉 24 h)→离心(5 000 r/min、10 min)→取上清液→旋转蒸发→高速离心(13 000 r/min、10 min)→取上清液→微膜过滤(孔径为 0.45 μm)→收集滤液备检。

参考文献[22-23],采用高效液相色谱法检测滤液中 PDG 含量,检测条件为:检测波长 228 nm,柱温 25 ℃,流速 1 mL/min,进样量 10 μL,流动相为体积分数 26%甲醇。

2 结果与分析

2.1 杜仲内生茎点霉 SP-16F 适宜碳源、氮源和无机盐种类的确定

2.1.1 碳源种类 图 1 显示,在碳源用量相同的条件下,以蔗糖为碳源更有利于 PDG 的合成,且菌体生长也处于较高水平;以可溶性淀粉为碳源时,菌体生长量最大,但 PDG 产量不及以蔗糖为碳源时的 PDG 产量。考虑到生产的主要目的是获取高产量的 PDG,故选用蔗糖为最适碳源。

2.1.2 氮源种类 图 2 表明,在氮源用量相同的条件下,以硝酸钠为氮源更有利于 PDG 的合成;而以牛肉膏为氮源,则更利于菌体的生长。为了最大量的获得 PDG,选用硝酸钠为最适氮源。

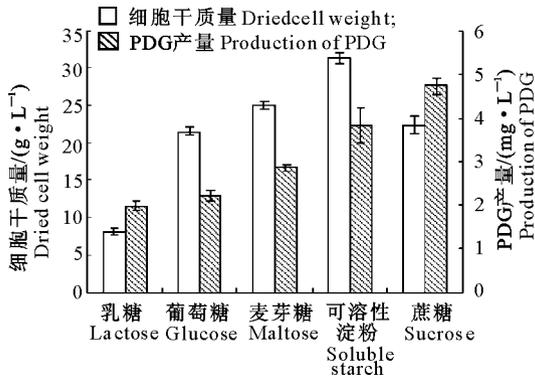


图 1 碳源对杜仲内生茎点霉 SP-16F 菌体生长和 PDG 产量的影响

Fig. 1 Effect of carbon sources on the cell growth and PDG yield of *Phoma* sp. SP-16F of *Eucommia ulmoides* Oliv.

2.1.3 无机盐种类 无机盐对杜仲内生茎点霉 SP-16F 菌体生长和 PDG 产量的影响结果见图 3。

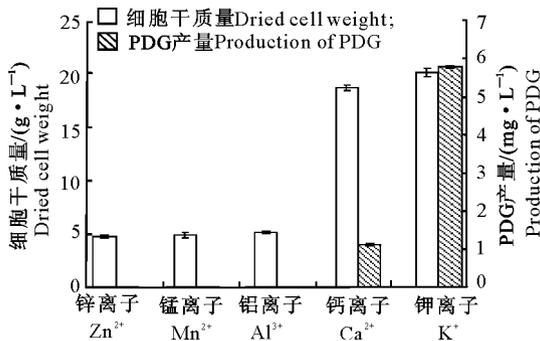


图 3 无机盐对杜仲内生茎点霉 SP-16F 菌体生长和 PDG 产量的影响

Fig. 3 Effect of inorganic ions on the cell growth and PDG yield of *Phoma* sp. SP-16F of *Eucommia ulmoides* Oliv.

由图 3 可以看出,选用含钙离子和钾离子的无

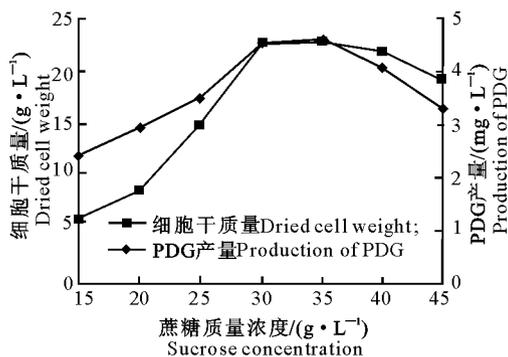


图 4 蔗糖质量浓度对杜仲内生茎点霉 SP-16F 菌体生长和 PDG 产量的影响

Fig. 4 Effect of the concentration of sucrose on the cell growth and PDG yield of *Phoma* sp. SP-16F of *Eucommia ulmoides* Oliv.

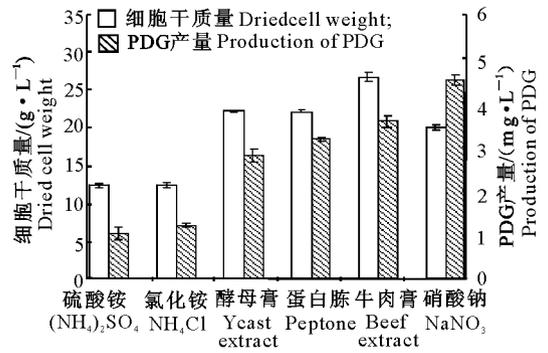


图 2 氮源对杜仲内生茎点霉 SP-16F 菌体生长和 PDG 产量的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen sources on the cell growth and PDG yield of *Phoma* sp. SP-16F of *Eucommia ulmoides* Oliv. 机盐均利于菌体的生长;选用含钾离子的无机盐, PDG 产量最大。因此,含钾离子的磷酸氢二钾为最适无机盐种类。

2.2 杜仲内生茎点霉 SP-16F 主要营养物质质量浓度的确定

2.2.1 蔗糖质量浓度 由图 4 可以看出,在 15~30 g/L,随着蔗糖质量浓度的增加,细胞干质量和 PDG 产量均大幅增加;蔗糖质量浓度为 30~35 g/L 时,细胞干质量和 PDG 产量均达最大;随着蔗糖质量浓度的继续增加,细胞干质量和 PDG 产量开始缓慢下降。

2.2.2 硝酸钠质量浓度 图 5 表明,随着硝酸钠质量浓度的增加,细胞干质量和 PDG 产量增加;当硝酸钠质量浓度增加到 2.0 g/L 时,细胞干质量和 PDG 产量均达到最大值;随着硝酸钠质量浓度的继续增加,细胞干质量开始下降,PDG 产量平缓下降。

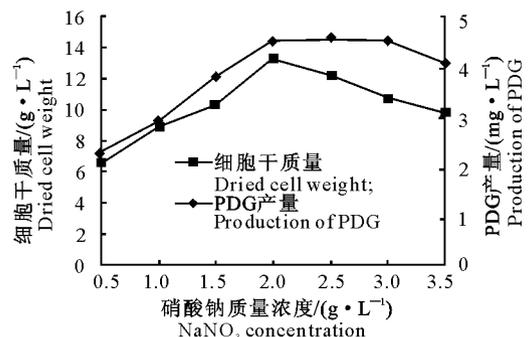


图 5 硝酸钠质量浓度对杜仲内生茎点霉 SP-16F 菌体生长和 PDG 产量的影响

Fig. 5 Effect of the concentration of NaNO₃ on the cell growth and PDG yield of *Phoma* sp. SP-16F of *Eucommia ulmoides* Oliv.

2.2.3 K_2HPO_4 质量浓度 K_2HPO_4 质量浓度对杜仲内生茎点霉 SP-16F 菌体生长和 PDG 产量的影响结果见图 6。

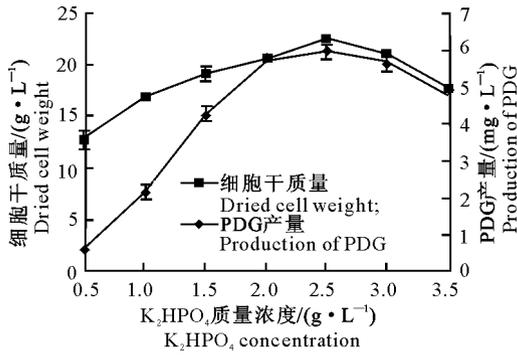


图 6 K_2HPO_4 质量浓度对杜仲内生茎点霉 SP-16F 菌体生长和 PDG 产量的影响

Fig. 6 Effect of the concentration of K_2HPO_4 on the cell growth and PDG yield of *Phoma* sp. SP-16F of *Eucommia ulmoides* Oliv.

图 6 显示,随着 K_2HPO_4 质量浓度的增加,细胞干质量和 PDG 产量增大;当 K_2HPO_4 质量浓度为

2.5 g/L 时,细胞干质量和 PDG 产量达到最大;随着 K_2HPO_4 质量浓度的继续增大,细胞干质量和 PDG 产量均开始下降。

2.3 杜仲茎点霉 SP-16F 发酵培养基营养组分回归模型的建立及响应面分析

为了最大量地获得 PDG,本研究采用响应面分析法,在蔗糖质量浓度分别为 30,35,40,45 和 50 g/L、 $NaNO_3$ 质量浓度分别为 2.0,2.5,3.0,3.5 和 4.0 g/L、 K_2HPO_4 质量浓度分别为 1.0,1.5,2.0,2.5 和 3.0 g/L 的条件下,对培养基进行进一步优化,所得不同组合的 PDG 实测值见表 3 所示。采用统计软件 Design-Expert (version 5.0.7) 对表 3 所得结果进行多元回归拟合,以 PDG 的产量(Y)为响应值进行 RSM 分析,得回归方程:

$$Y = 24.69 + 3.35A + 1.04B + 1.62C - 2.73A^2 - 1.93B^2 - 1.73C^2 + 1.11AB + 0.94AC - 0.23BC. \quad (1)$$

由方程(1)可求得 PDG 预测值(表 3);回归方程(1)的显著性检测结果见表 4,各回归项系数的显著性检测结果见表 5。

表 3 杜仲内生茎点霉 SP-16F 产 PDG 营养条件的三元二次中心组合试验结果

Table 3 Results of central composite designed experiments

mg/L

试验序号 Num	PDG 产量实 测值 Real value	PDG 产量预测值 Predicated value	试验序号 Num	PDG 产量实 测值 Real value	PDG 产量预测值 Predicated value
1	23.49	24.69	11	26.00	24.69
2	16.15	17.06	12	21.95	22.65
3	17.80	17.48	13	16.00	15.68
4	24.50	23.55	14	25.05	26.50
5	15.34	14.49	15	24.25	24.69
6	10.46	11.48	16	18.00	18.11
7	24.05	24.69	17	21.50	21.84
8	16.03	16.29	18	24.33	22.60
9	14.90	14.80	19	25.69	24.08
10	24.50	24.69	20	21.50	20.98

表 4 杜仲内生茎点霉 SP-16F PDG 产量与营养因素回归模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance for the regression equation

变异源 Source	调和平方和 Sum of Squares	自由度 df	调和均方差 Mean Square	F 值 F value	P 值 P value	R	R ²	R _{adj} ²
模型 Model	381.40	9	42.38	29.66	0.000 1			
失拟项 Lack of fit	9.50	5	1.90	2.59	0.235 3	0.981 8	0.963 9	0.931 4
纯误差 Pure error	4.79	5	0.96					
总变异 Total variation	395.69	19						

显著性检验结果(表 4)表明,回归方程达极显著水平($P < 0.000 1$),在 $\alpha = 0.05$ 水平上失拟项不显著($P = 0.235 3$),模型的决定系数 $R^2 = 0.963 9$,说明该模型能解释约 96% 试验所得响应值的变化,仅有总变异的 4% 不能用此模型来解释。PDG 产量模型预测值与实测值间的相关系数 $R = 0.981 8$,说

明该模型预测值与实测值间的拟合程度较高,将其用于预测实际值的误差较小。各回归项的显著性检验结果(表 5)显示,在试验设计的水平范围内,A、B、C 的一次项和二次项对 PDG 产量的影响均达极显著水平($P < 0.01$);A 与 B、A 与 C 交互项的影响达显著水平($P < 0.05$),其交互作用对 PDG 产量的

影响分别见图 7 和图 8。

表 5 杜仲内生茎点霉 SP-16F PDG 产量与营养因素回归方程系数的显著性检验

Table 5 Significance of the regression coefficients

系数项 Constant term	回归系数 Regression coefficient	标准误差 Standard error	<i>t</i> 值 <i>t</i> value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
常数项 Constant	24.69	0.49	—	—
A	3.35	0.32	10.35	<0.000 1
B	1.04	0.32	3.22	0.009 2
C	1.62	0.32	5.00	0.000 5
A ²	-2.73	0.31	-8.66	<0.000 1
B ²	-1.93	0.31	-6.13	0.000 1
C ²	-1.37	0.31	-4.34	0.001 5
AB	1.11	0.42	2.64	0.024 9
AC	0.94	0.42	2.23	0.049 5

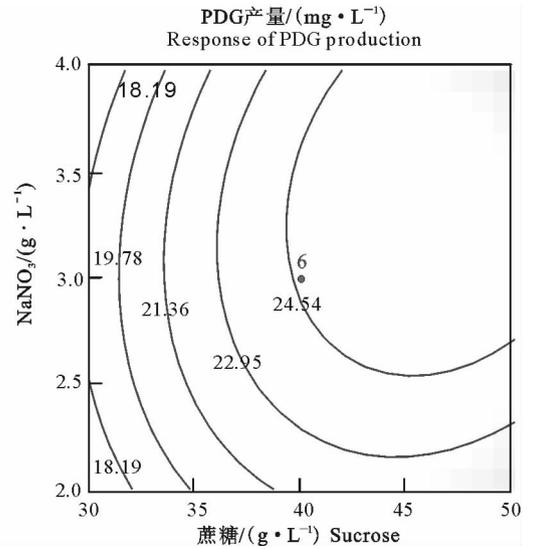
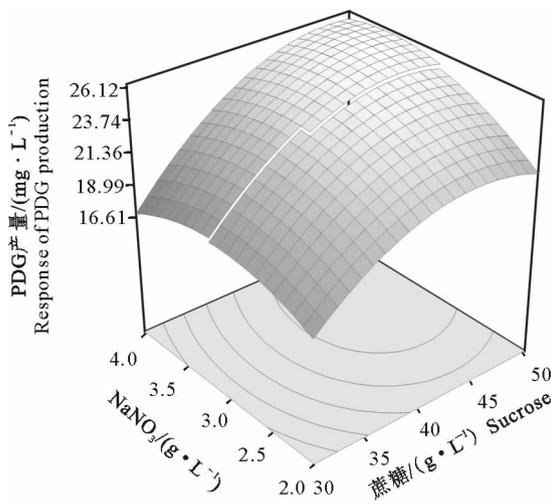


图 7 蔗糖、NaNO₃ 对 PDG 产量影响的响应面和等高线分析

Fig. 7 Response surface and contour plots of sucrose and NaNO₃ on PDG production

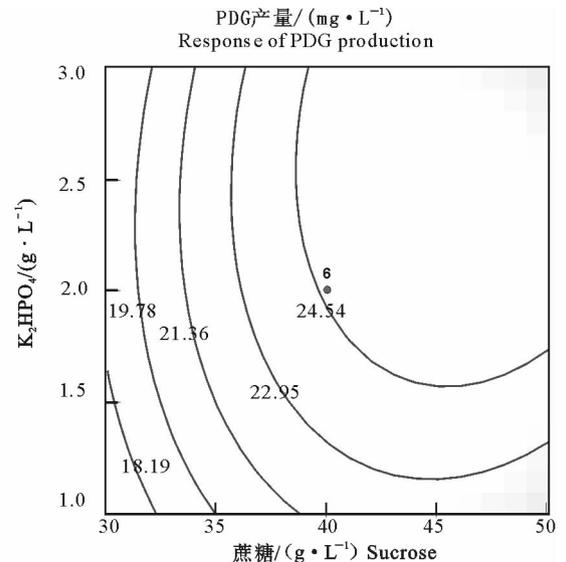
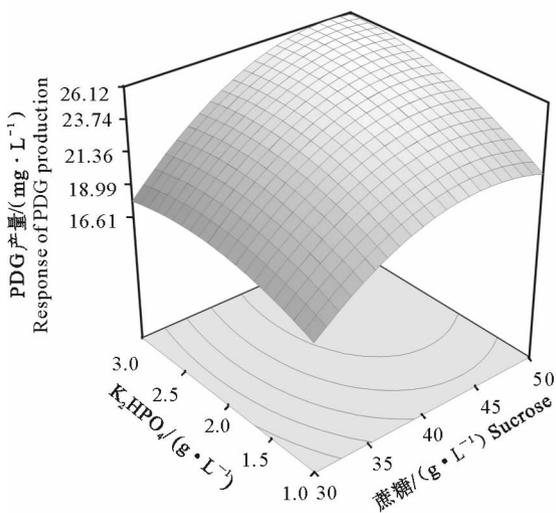


图 8 蔗糖、K₂HPO₄ 对 PDG 产量的响应面及等高线分析

Fig. 8 Response surface and contour plots of saccharide and K₂HPO₄ on PDG production

图7反映的是 K_2HPO_4 水平为零时,蔗糖与 $NaNO_3$ 交互作用对 PDG 产量的影响。从图7可以看出,在营养物质含量较低时,随着蔗糖与 $NaNO_3$ 用量的增加,PDG 产量持续增大;但当蔗糖添加量为 47.5 g/L 时,PDG 产量随 $NaNO_3$ 用量的增加而下降。这表明,适宜的碳氮比对 PDG 的生产很重要。

图8反映的是 $NaNO_3$ 水平为零时,蔗糖与 K_2HPO_4 交互作用对 PDG 产量的影响。从图8可以看出,随着蔗糖与 K_2HPO_4 用量的增加,PDG 产量逐步增加;但当 K_2HPO_4 含量高于 2.80 g/L 时,随其用量的增加,PDG 产量先增大后减小。这是因为 HPO_4^{2-} 是许多酶的激活剂,可以促进碳水化合物的代谢,但是过量的 HPO_4^{2-} 反而不利于 PDG 的产生。

从图7和图8可以看出,拟合曲面有最大值。对模型(1)的 A、B 和 C 求偏导,利用 Design-Expert (version 5.0.7) 软件对得到的3个方程求解,可得发酵培养基组分的最佳配比为:蔗糖 47.5 g/L, $NaNO_3$ 3.0 g/L, K_2HPO_4 2.83 g/L。在此最优条件下,PDG 产量的预测值为 27 mg/L。

3 结论与讨论

利用响应面分析法优化培养基组成,可有效地提高发酵法生产 PDG 的产量。在响应面分析试验中,PDG 产量的最小值为 10.46 mg/L,而单因素试验中 PDG 最大值还不足 6 mg/L。解析回归方程所得最优条件下的 PDG 产量预测值(27 mg/L)和试验中 PDG 产量最大的实测值(25.69 mg/L)较优化前的最大值高3倍以上。这说明,响应面分析法可以用于发酵法生产 PDG 的培养基优化研究。

发酵法生产 PDG 具有良好的应用前景,临床研究证明,在血液中注射 30 mg/kg 的 PDG 可以使血压降低 3.3~4.7 kPa^[24]。杜仲内生茎点霉 SP-16F 在最佳培养条件下进行发酵培养,发酵液中的 PDG 含量接近这一有效浓度。因此,在保证发酵液食用安全性的前提下,对发酵液进行适当的浓缩和处理,有望制成具有一定降压功效的功能性食品或药品。

本研究结果为微生物发酵法生产 PDG 提供了依据。与传统方法相比,微生物发酵法生产 PDG 具有成本低、便于工业化生产、利于农业可持续发展等优点。传统的杜仲用药方式是以其皮入药,新生杜仲树苗生长 15 年以后才能取皮,此后的取皮间隔时间不能少于 5 年,因此传统用药方式受到很大限制。

此外,杜仲皮中的 PDG 最高含量仅为 6 g/kg^[25],以熬制中药时用水量为皮重的 100 倍计,药水中的 PDG 含量为 60 mg/L,将本研究所得发酵液浓缩 2 倍,即可得到与其相当的 PDG 浓度。因此,发酵法生产 PDG 与传统的植物提取方法相比,具有明显的优势。

本研究只对所得菌种生产 PDG 的培养条件进行了初步探讨,有关菌种改良和 PDG 形成条件与途径对其产量的影响,有待进一步深入研究。

【参考文献】

- [1] 尉芹,马希汉,张康健.杜仲化学成分研究[J].西北林学院学报,1995,10(4):88-93.
Wei Q, Ma X H, Zhang K J. Advances in the research of the constituents of *Eucommia ulmoides* [J]. Journal of Northwest Forestry College, 1995, 10(4): 88-93. (in Chinese)
- [2] 王亚琴,张康健.杜仲次生代谢物的研究进展[J].中草药,2004,35(7):836-839.
Wang Y Q, Zhang K J. Advances in research on secondary metabolites of *Eucommia ulmoides* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2004, 35(7): 836-839. (in Chinese)
- [3] 胡佳玲.杜仲研究进展[J].中草药,1999,30(5):394-396.
Hu J L. Advances in the research of *Eucommia ulmoides* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1999, 30(5): 394-396. (in Chinese)
- [4] 张瑛朝.复方杜仲叶提取液对大鼠血脂的调节作用实验研究[J].中成药,2000,22(4):291-292.
Zhang Y C. Experimental study on regulation action of compound *Eucommia* (Leave) extract solution on rat blood-fat [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2000, 22(4): 291-292. (in Chinese)
- [5] 杜红岩.杜仲活性成分与药理研究的新进展[J].经济林研究,2003,21(2):58-61.
Du H Y. The progress in research of the active component from *Eucommia ulmoides* and its pharmacology [J]. Economic Forest Researches, 2003, 21(2): 58-61. (in Chinese)
- [6] 张丽萍,许国,赵红杰,等.杜仲叶降压成分鉴别及其含量分析[J].山地农业生物学报,2000,19(3):191-193.
Zhang L P, Xu G, Zhao H J, et al. The identification of depressor component from leaves of *Eucommia ulmoides* and analysis of contents at different age and season [J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2000, 19(3): 191-193. (in Chinese)
- [7] 张康健,王蓝,张风云.杜仲叶与皮有效成份含量的比较研究[J].西北林学院学报,1996,11(2):42-46.
Zhang K J, Wang L, Zhang F Y. A comparison between active component contents in the bark and leaves of *Eucommia ulmoides* [J]. Journal of Northwest Forestry College, 1996, 11(2): 42-46. (in Chinese)
- [8] 陈晓青,李宇萍,彭密军,等.杜仲中松脂醇二葡萄糖苷的提纯[J].中南工业大学学报:自然科学版,2003,34(3):262-265.

- Chen X Q, Li Y P, Peng M J, et al. The extraction and purification of pinoresinol diglucoside in *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Journal of Central South University of Technology: Natural Science Edition, 2003, 34(3): 262-265. (in Chinese)
- [9] Deyama T, Ikawa T, Kitagawa S, et al. The constituents of *Eucommia ulmoides* Olive 2. Isolation and structure of three new lignan glycosides [J]. Chem Pharm Bull, 1985, 33: 3651-3657.
- [10] Takeshi D. The constituent of *Eucommia ulmoides* Olive 1. Isolation of (+)-mediovesinol-Di-O- β -D glucopyranoside [J]. Chem Pharm Bull, 1983, 31(9): 2993-2997.
- [11] 唐雪辉, 毛凯, 于友民, 等. 植物内生真菌的应用研究概况 [J]. 草原与草坪, 2005, 25(5): 16-21.
Tang X H, Mao K, Yu Y M, et al. Research and application of plant endophyte [J]. Grassland and Turf, 2005, 25(5): 16-21. (in Chinese)
- [12] 郭志刚, 都军, 刘瑞芝. 紫杉细胞生长过程与营养物质消耗的动态研究 [J]. 清华大学学报: 自然科学版, 2002, 42(5): 34-37.
Guo Z G, Du J, Liu R Z. Kinetic investigation of Taxus cell growth and nutrient consumption [J]. Journal of Tsinghua University: Natural Science Edition, 2002, 42(5): 34-37. (in Chinese)
- [13] 李桂玲, 王建锋, 黄耀坚, 等. 植物内生真菌抗肿瘤活性菌株的筛选 [J]. 菌物系统, 2001, 20(3): 387-391.
Li G L, Wang J F, Huang Y J, et al. Screening of endophytic fungi with antitumor activities [J]. Mycosystema, 2001, 20(3): 387-391. (in Chinese)
- [14] 周东坡, 平文祥, 孙建秋, 等. 紫杉醇产生菌分离的研究 [J]. 微生物学杂志, 2001, 21(1): 18-19.
Zhou D P, Ping W Q, Sun J Q, et al. Isolation of taxol producing fungi [J]. Journal of Microbiology, 2001, 21(1): 18-19. (in Chinese)
- [15] 郭波, 李海燕, 张玲琪. 一种产长春碱内生真菌的分离 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 1998, 20(3): 214-215.
Guo B, Li H Y, Zhang L Q. Isolation of an fungus producing vinbrastine [J]. Journal of Yunnan University: Natural Sciences Edition, 1998, 20(3): 214-215. (in Chinese)
- [16] 李爱华, 樊明涛, 师俊玲. 杜仲内生菌的分离及产 PDG 菌株的筛选 [J]. 西北农业学报, 2007, 27(3): 616-619.
Li A H, Fan M T, Shi J L. Isolation of Endophytes from *Eucommia ulmoides* Oliv and Screening for strains with PDG production [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2007, 27(3): 616-619. (in Chinese)
- [17] 张名位, 陈恩成, 张雁, 等. 柚型黑木萌芽积累 g-氨基丁酸的工艺条件研究 [J]. 农业工程学报, 2007, 23(3): 213-218.
Zhang M W, Chen E C, Zhang Y, et al. Effect of technological conditions on γ -aminobutyric acid accumulation in germinated indica black rice [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2007, 23(3): 213-218. (in Chinese)
- [18] 郝学财, 余晓斌, 刘志钰, 等. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用 [J]. 食品研究与开发, 2006, 33(1): 5-9.
Hao X C, Yu X B, Liu Z Y, et al. The application of response surface methodology in optimization of microbial media [J]. Food Research and Development, 2006, 33(1): 5-9. (in Chinese)
- [19] 高年发, 晋明芬, 张健. 玉米粉细菌发酵生产 L-乳酸的研究 [J]. 农业工程学报, 2007, 23(6): 233-236.
Gao N F, Jin M F, Zhang J. L-lactic acid zymotechnics using corn flour [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2007, 23(6): 233-236. (in Chinese)
- [20] Annadurai G. Design of optimum response surface experiments for adsorption of direct dye on chitosan [J]. Bioproc Eng, 2000, 23: 451-455.
- [21] Muralidhar R V, Chirumamila R R, Marchant R, et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources [J]. Biochem Eng J, 2001, 9: 17-23.
- [22] 戚向阳, 张声华. 反相高效液相色谱法测定杜仲中的松脂醇二葡萄糖甙 [J]. 色谱, 1998, 16(2): 161-163.
Qi X Y, Zhang S H. A reversed phase high performance liquid chromatographic method for the determination of pinoresinol diglucopyranoside in *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Chinese Journal of Chromatography, 1998, 16(2): 161-163. (in Chinese)
- [23] 徐长根, 冯建斌, 孙文基. RP-HPLC 法测定杜仲中松脂醇二葡萄糖苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2000, 20(1): 56-57.
Xu C G, Feng J B, Sun W J. RP-HPLC method for the determination of pinoresinol diglucopyranoside in *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2000, 20(1): 56-57. (in Chinese)
- [24] 阴健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用 [M]. 北京: 学苑出版社, 1993: 39.
Yin J, Guo L G. Research of chinese medicines and clinical application [M]. Beijing: Academy Press, 1993: 39. (in Chinese)
- [25] 冯锁民, 甘志杰, 翟西峰, 等. 杜仲原生皮与再生皮中松脂醇二葡萄糖苷的含量比较 [J]. 中药材, 2006, 29(8): 792-794.
Feng S M, Gan Z J, Zhai X F, et al. Content comparison of pinoresinol diglucoside in original and reborn bark of *Eucommia ulmoides* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2006, 29(8): 792-794. (in Chinese)