

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.07.032

响应面法优化人参糖蛋白制备工艺

Optimization of preparation of ginseng glycoprotein by response surface methodology

俞萍 岳煜贤 张宇 陈长宝 张庆贺

YU Ping YUE Yu-xian ZHANG Yu CHEN Chang-bao ZHANG Qing-he

(长春中医药大学, 吉林 长春 130117)

(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun, Jilin 130117, China)

摘要:目的:优化人参糖蛋白的制备工艺。方法:利用 Box-Behnken 响应面法分析提取时间、提取次数、料液比、乙醇体积分数对人参糖蛋白的影响。结果:最优人参糖蛋白制备工艺为提取时间 1.5 h、提取次数 3 次、料液比 ($m_{\text{人参粗粉}} : V_{\text{蒸馏水}}$) 1.0 : 15.4 (g/mL)、乙醇体积分数 72%, 该条件下人参糖蛋白质量分数为 24.14%。结论:优化的人参糖蛋白的制备工艺稳定性好、准确可靠、提取率高,具有一定的实用价值。

关键词:人参;糖蛋白;水提醇沉法;响应面法;制备工艺

Abstract: Objective: To optimize the preparation process of ginseng glycoprotein. **Methods:** The Box-Behnken response surface method was used to analyze the effects of extraction time, extraction times, material-to-liquid ratio, and alcohol precipitation concentration on ginseng glycoprotein. **Results:** The optimal ginseng glycoprotein preparation process extracted three times and 1.5 h with a material-to-liquid ratio 1.0 : 15.4 (g/mL) 72% of alcohol precipitation volume fraction. Under the control of these conditions, the extraction rate of ginseng glycoprotein was 24.14%. **Conclusion:** The optimized preparation technology of ginseng glycoprotein is stable, accurate, reliable, and the extraction rate is high, which has particular practical value.

Keywords: ginseng glycoprotein; water-extraction and alcohol-precipitation method; response surface methodology; preparation technology

人参为五加科植物人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey.) 的干燥根和根茎, 含有多种人体所必需的营养成分和生物活性物质, 具有较高的药用价值, 是中国传统的名贵中药^[1]。近年来, 人参被列为新资源食品, 其系列产品有人参糖蛋白肠溶胶囊、人参蛋白片、人参黑木耳多糖粉以及人参红景天鹿茸保健酒等^[2-5]。人参中发挥多重药理作用的物质基础主要有皂苷、糖蛋白、糖肽、多糖、多肽、蛋白质、挥发油等成分^[6]; 其中糖蛋白类成分被证明具有许多生物活性, 如增强学习记忆能力、抗凋亡、保护神经细胞以及抗炎镇痛等^[7-8]。由于糖蛋白具有结构稳定和潜在保健作用与药效, 成为了继多糖之后的研究热点^[9]。

糖蛋白作为一种结合蛋白, 兼具蛋白质和多糖的部分性质, 因此其提取方法多根据蛋白质与多糖的性质进行提取。目前, 天然糖蛋白的提取方法主要有水提法、醇提法、稀盐溶液或缓冲溶液提取法、酸碱溶液提取法、超声波辅助法以及微波辅助法等, 其中以水提法与超声辅助法应用较多^[10-13]。水提法与超声辅助法均具有操作工艺简单、引入杂质相对较少、成本低廉、条件控制方便等优点, 但水提法的提取率更高, 且更适用于工业化生产^[14]。糖蛋白的分离方法主要有 Sevage 法、乙醇沉淀法、碱提酸沉法、硫酸铵沉淀、超滤法、柱色谱法等, 其中乙醇沉淀法和柱色谱法常用于水提法分离^[15-16], 而乙醇沉淀法操作简单, 经济易得, 适用于糖蛋白粗提取物的工业化生产。目前有关人参糖蛋白制备工艺的研究较少, 且方法较为单一、提取率低, 一般约为 5.5%~12.6%^[17-18]。

课题组在前期试验中初步比对了煎煮法、浸渍法、回流提取法和酶解法 4 种糖蛋白类成分常用提取方法提取人参糖蛋白, 其中煎煮法的提取率最高, 在此基础上, 研究拟以煎煮法为提取方法, 水提醇沉法为分离方法, 通过响应面法优化人参糖蛋白的制备工艺, 为人参糖蛋白的开发与工业化生产提供理论依据。

基金项目:吉林省科技发展计划项目(编号:20200708049YY);国家自然科学基金项目(编号:82073969)

作者简介:俞萍,女,长春中医药大学在读硕士研究生。

通信作者:陈长宝(1967—),男,长春中医药大学教授,博士。

E-mail:ccb2021@126.com

张庆贺(1987—),女,长春中医药大学讲师,博士。

E-mail:zhangqh@ccucm.edu.cn

收稿日期:2021-03-17

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

5年生人参:经长春中医药大学陈长宝教授鉴定为五加科植物人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)的干燥根和根茎,吉林省怡生对外贸易有限公司;

浓硫酸:分析纯,太原化肥厂化学试剂厂;

苯酚:分析纯,四川佰春科技有限责任公司;

葡萄糖:分析纯,常州市海拓实验仪器有限公司;

95%乙醇:分析纯,无锡市晶科化工有限公司;

氯化钠注射液:辰欣药业股份有限公司;

BCA蛋白浓度测定试剂盒:增强型,碧云天生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

多功能粉碎机:BG-1001型,中山市长柏电器实业有限公司;

电子天平:JM-A2002型,余姚纪铭称重校验设备有限公司;

电磁炉:IH-H208C型,佛山市富士宝电器科技股份有限公司;

增力电动搅拌器:JJ-1型,江苏金坛市江南仪器厂制造;

旋转蒸发器:EYELA N-1100型,东京理化器械株式会社;

冻干机:EYELA-FDU2100型,东京理化器械株式会社;

电子天平:ME204/02型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

EYELA油浴锅:0SB-2100型,上海爱朗仪器有限公司;

酶标仪:M200pro型,瑞士TECAN集团公司;

振荡培养箱:ZQZY-85CNS型,上海知楚仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 人参糖蛋白的提取

人参粗粉→浸泡→煎煮、过滤→合并滤液、浓缩→醇沉→抽滤→沉淀→冷冻干燥→人参糖蛋白

1.3.2 单因素试验

(1) 提取时间:固定提取次数3次,料液比($m_{\text{人参粗粉}} : V_{\text{蒸馏水}}$)1:14(g/mL),乙醇体积分数90%,考察提取时间(1,2,3,4,5 h)对人参糖蛋白中多糖和蛋白质质量分数的影响。

(2) 提取次数:固定提取时间1 h,料液比($m_{\text{人参粗粉}} : V_{\text{蒸馏水}}$)1:14(g/mL),乙醇体积分数90%,考察提取次数(1,2,3,4,5次)对人参糖蛋白中多糖和蛋白质质量分数的影响。

(3) 料液比:固定提取次数3次,提取时间1 h,乙醇体积分数90%,考察料液比($m_{\text{人参粗粉}} : V_{\text{蒸馏水}}$)[1:8,1:14,1:20,1:26,1:32(g/mL)]对人参糖蛋白中多糖和蛋白质质量分数的影响。

(4) 乙醇体积分数:固定提取次数3次,提取时间1 h,料液比($m_{\text{人参粗粉}} : V_{\text{蒸馏水}}$)1:14(g/mL),考察乙醇体积分数(50%,60%,70%,80%,90%)对人参糖蛋白中多糖和蛋白质质量分数的影响。

1.3.3 响应面试验设计 在单因素试验的基础上,以提取时间、提取次数、料液比、乙醇体积分数为自变量,采用Design-Expert 8.0.6软件进行四因素三水平的Box-Behnken响应面分析试验设计^[19],平行3次。

1.3.4 多糖质量分数测定

(1) 标准曲线的绘制:根据文献^[20]并修改。精密吸取0.1,10,20,30,40,50,60,70,80,90,100 μL质量浓度为0.1 mg/mL的葡萄糖标准液于离心管中,加超纯水补充至100 μL,混匀,得到质量浓度分别为0.00,0.01,0.02,0.03,0.04,0.05,0.06,0.07,0.08,0.09,0.10 mg/mL的标准溶液。加入质量分数为0.5%苯酚溶液100 μL,缓缓加入浓硫酸500 μL,混匀,100℃水浴5 min,待水浴锅中温度降至室温,取出。精密吸取200 μL置于96孔板中,以超纯水为空白,测定490 nm处吸光度。绘制标准曲线得回归方程 $y=5.1716x+0.1484$, $R^2=0.999$ 。

(2) 样品溶液的测定:取人参糖蛋白粉配制成0.1 mg/mL的样品溶液,测定490 nm处吸光度,按式(1)计算多糖质量分数。

$$W_1 = \frac{C \times V \times m_1}{m_2 \times m_3} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

W_1 ——多糖质量分数,%;

C ——样品溶液中多糖质量浓度,mg/mL;

V ——样品定容体积,mL;

m_1 ——粗提物质量,g;

m_2 ——样品溶液的质量,g;

m_3 ——原料质量,g。

1.3.5 蛋白质质量分数测定 采用BCA法^[21]。按式(2)计算蛋白质质量分数。

$$W_2 = \frac{C \times V \times m_1}{m_2 \times m_3} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

W_2 ——蛋白质质量分数,%;

C ——样品溶液中蛋白质质量浓度,mg/mL;

V ——样品定容体积,mL;

m_1 ——粗提物质量,g;

m_2 ——样品溶液质量,g;

m_3 ——原料质量,g。

1.3.6 人参糖蛋白质量分数计算 按式(3)进行计算。

$$W = W_1 + W_2, \tag{3}$$

式中:

W——人参糖蛋白质量分数, %。

1.3.7 数据处理 各指标测定均重复 3 次, 采用 Excel 软件进行统计分析, 使用 Design-Expert 8.0.6 软件进行试验设计和方差分析, 并通过 prism7.0、Origin 2019 软件作图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 提取时间 由图 1 可知, 随着提取时间的延长, 多糖质量分数变化不明显, 而蛋白质质量分数显著降低。这可能是随着提取时间的延长, 杂质大量溶出并且使蛋白质稳定性下降, 不利于蛋白质溶出, 因此最适提取时间为 1 h。

2.1.2 提取次数 由图 2 可知, 随着提取次数的延长, 多糖和蛋白质质量分数均升高, 提取 3 次后, 多糖和蛋白质质量分数降低。提取次数过多, 提取物中黏液质等其他水溶性杂质含量升高, 主成分含量反而降低, 故选择提取次数为 3 次。

2.1.3 料液比 由图 3 可知, 随着料液比的增大, 多糖和蛋白质质量分数均先增加后降低, 当料液比 ($m_{\text{人参粗粉}} : V_{\text{蒸馏水}}$)

为 1 : 14 (g/mL) 时多糖质量分数最高; 当料液比 ($m_{\text{人参粗粉}} : V_{\text{蒸馏水}}$) 为 1 : 20 (g/mL) 时蛋白质质量分数最高。这可能是由于液料比的增加, 使原料与浸提液的接触面积增大, 目标成分充分溶出, 而当料液比增加到一定程度时, 蛋白质和多糖溶出达到平衡, 而杂质扩散相对增多。因此, 选择最适料液比 ($m_{\text{人参粗粉}} : V_{\text{蒸馏水}}$) 为 1 : 14 (g/mL)。

2.1.4 乙醇体积分数 由图 4 可知, 多糖质量分数随乙醇体积分数的升高先增加后降低, 当乙醇体积分数为 70% 时, 多糖质量分数最高; 蛋白质质量分数随乙醇体积分数的升高而升高, 当乙醇体积分数为 90% 时, 蛋白质质量分数最高。这可能与多糖和蛋白质的溶解性有关, 二者对高浓度醇的亲合力不同, 且乙醇体积分数过高, 沉淀出的非糖类成分增多, 提取物中多糖质量分数降低。综上, 选择最适乙醇体积分数为 70%。

2.2 响应面法优化人参糖蛋白制备工艺

2.2.1 模型方程建立与显著性检验 结合单因素试验结果, 以提取时间、提取次数、料液比和乙醇体积分数为自变量, 以人参糖蛋白质量分数为响应值, 运用 Design-Expert 8.0.6 软件进行 Box-Behnken 响应面试验设计, 因素水平见表 1, 试验设计与结果见表 2。

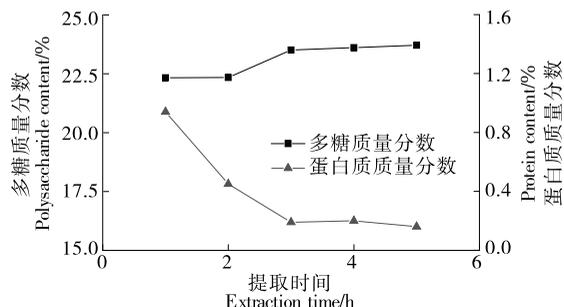


图 1 提取时间对人参糖蛋白中多糖和蛋白质质量分数的影响

Figure 1 Effect of extraction time on the content

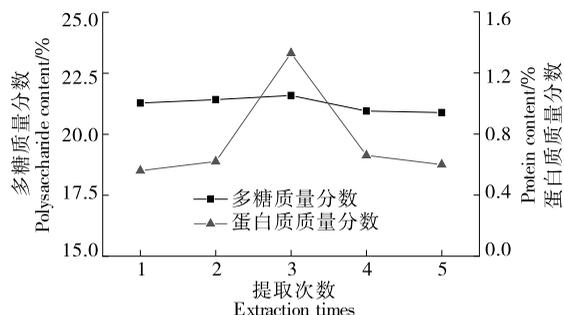


图 2 提取次数对人参糖蛋白中多糖和蛋白质质量分数的影响

Figure 2 Effect of extraction times on the content

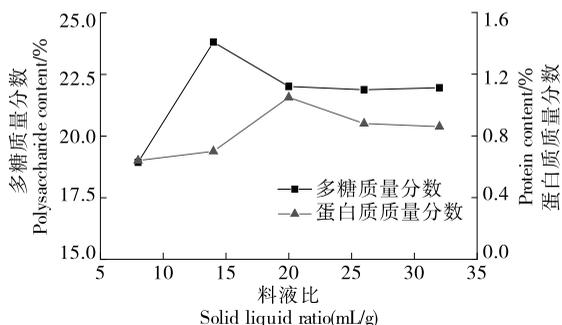


图 3 料液比对人参糖蛋白中多糖和蛋白质质量分数的影响

Figure 3 Effect of material liquid ratio on the content

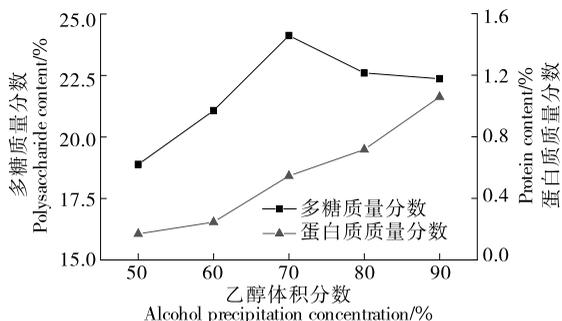


图 4 乙醇体积分数对人参糖蛋白中多糖和蛋白质质量分数的影响

Figure 4 Effect of alcohol precipitation concentration on the content

对试验结果进行二次多项式回归模型方程拟合,得回归模拟方程:

$$Y=5.209\ 83+0.655\ 67A+4.026B+0.739\ 39C+0.192\ 6D+0.02AB+0.010\ 417AC+0.022AD-0.002\ 5BC+0.000\ 75BD+0.000\ 583\ 333CD-0.732\ 25A^2-0.677\ 25B^2-0.025\ 757C^2-0.001\ 672\ 5D^2。$$

(4)

由表3可知,回归模型的F值为799.23, $P<0.001$,

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface analysis

| 水平 | A 提取时间/h | B 提取次数 | C 料液比 (g/mL) | D 乙醇体积分数/% |
|----|----------|--------|--------------|------------|
| 1 | 1 | 2 | 1:8 | 70 |
| 0 | 2 | 3 | 1:14 | 80 |
| -1 | 3 | 4 | 1:20 | 90 |

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Experimental design and results of response surface optimization

| 试验号 | A | B | C | D | 人参糖蛋白质量分数/% | 试验号 | A | B | C | D | 人参糖蛋白质量分数/% |
|-----|----|----|----|----|-------------|-----|----|----|----|----|-------------|
| 1 | -1 | -1 | 0 | 0 | 23.14 | 16 | 0 | 1 | 1 | 0 | 23.15 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 0 | 22.50 | 17 | -1 | 0 | -1 | 0 | 22.47 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 0 | 23.12 | 18 | 1 | 0 | -1 | 0 | 21.77 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 22.56 | 19 | -1 | 0 | 1 | 0 | 23.24 |
| 5 | 0 | 0 | -1 | -1 | 22.90 | 20 | 1 | 0 | 1 | 0 | 22.79 |
| 6 | 0 | 0 | 1 | -1 | 23.79 | 21 | 0 | -1 | 0 | -1 | 23.57 |
| 7 | 0 | 0 | -1 | 1 | 22.43 | 22 | 0 | 1 | 0 | -1 | 23.64 |
| 8 | 0 | 0 | 1 | 1 | 23.46 | 23 | 0 | -1 | 0 | 1 | 23.11 |
| 9 | -1 | 0 | 0 | -1 | 24.11 | 24 | 0 | 1 | 0 | 1 | 23.21 |
| 10 | 1 | 0 | 0 | -1 | 23.00 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24.25 |
| 11 | -1 | 0 | 0 | 1 | 23.28 | 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24.22 |
| 12 | 1 | 0 | 0 | 1 | 23.05 | 27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24.25 |
| 13 | 0 | -1 | -1 | 0 | 22.13 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24.26 |
| 14 | 0 | 1 | -1 | 0 | 22.22 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24.23 |
| 15 | 0 | -1 | 1 | 0 | 23.12 | | | | | | |

表 3 回归方程各项方差分析[†]

Table 3 Analysis of variance of regression equation

| 来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------------|-----------------------|-----|-----------------------|----------|----------|-----|
| 模型 | 13.52 | 14 | 0.97 | 799.23 | <0.000 1 | ** |
| A | 1.13 | 1 | 1.13 | 939.23 | <0.000 1 | ** |
| B | 9.08×10^{-3} | 1 | 9.08×10^{-3} | 7.51 | 0.015 9 | * |
| C | 2.64 | 1 | 2.64 | 2 186.42 | <0.000 1 | ** |
| D | 0.51 | 1 | 0.51 | 420.83 | <0.000 1 | ** |
| AB | 1.60×10^{-3} | 1 | 1.60×10^{-3} | 1.32 | 0.269 1 | |
| AC | 1.60×10^{-2} | 1 | 0.02 | 12.93 | 0.002 9 | ** |
| AD | 0.19 | 1 | 0.19 | 160.25 | <0.000 1 | ** |
| BC | 9.00×10^{-4} | 1 | 9.00×10^{-4} | 0.74 | 0.402 6 | |
| BD | 2.25×10^{-4} | 1 | 2.25×10^{-4} | 0.19 | 0.672 6 | |
| CD | 4.90×10^{-3} | 1 | 4.90×10^{-3} | 4.06 | 0.063 6 | |
| A ² | 3.48 | 1 | 3.48 | 2 878.90 | <0.000 1 | ** |
| B ² | 2.98 | 1 | 2.98 | 2 462.67 | <0.000 1 | ** |
| C ² | 5.58 | 1 | 5.58 | 4 616.39 | <0.000 1 | ** |
| D ² | 0.18 | 1 | 0.18 | 150.19 | <0.000 1 | ** |
| 残差 | 0.02 | 14 | 1.21×10^{-3} | | | |
| 失拟项 | 0.02 | 10 | 1.58×10^{-3} | 5.86 | 0.051 5 | |
| 纯误差 | 1.08×10^{-3} | 4 | 2.70×10^{-4} | | | |
| 所有项 | 13.53 | 28 | | | | |

[†] ** 表示极显著 ($P<0.01$), * 表示显著 ($P<0.05$); $R^2=0.998\ 8, R^2_{adj}=0.997\ 5$ 。

说明该模型具有高度显著性。失拟项 F 值为 5.86, $P > 0.05$, 说明模型失拟性不显著。模型相关系数 $R^2 = 0.9988$, 校正系数 $R^2_{Adj} = 0.9975$, 表明该回归方程具有较好的拟合度且试验误差较小。一次项 A、C、D, 交互项 AC、AD 以及二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对糖蛋白质量分数影响极显著 ($P < 0.01$); 一次项 B 对糖蛋白质量分数影响显著 ($P < 0.05$)。由 F 值可知, 各因素对人参糖蛋白质量分数影响的主次顺序为料液比 $>$ 提取时间 $>$ 乙醇体积分数 $>$ 提取次数。

2.2.2 交互作用分析 由图 5 可知, 提取时间与料液比、提取时间与乙醇体积分数的交互作用极显著 ($P < 0.01$),

与方差分析结果一致。

2.2.3 验证实验 经响应面法优化后得到人参糖蛋白制备的最佳工艺参数为提取时间 1.68 h、提取次数 3.01 次、料液比 ($m_{\text{人参粗粉}} : V_{\text{蒸馏水}}$) 1.00 : 15.37 (g/mL)、乙醇体积分数 71.99%。此条件下预测的人参糖蛋白质量分数为 24.43%。为方便实际操作, 将工艺参数修正为: 提取时间 1.5 h、提取次数 3 次、料液比 ($m_{\text{人参粗粉}} : V_{\text{蒸馏水}}$) 为 1.0 : 15.4 (g/mL)、乙醇体积分数 72%, 经 3 次重复性实验验证, 人参糖蛋白的平均质量分数为 24.14%, 与预测值基本一致, 较文献[17-18, 22-23]有明显的提高, 证明该模型优化的人参糖蛋白的制备工艺准确可靠, 稳定可行。

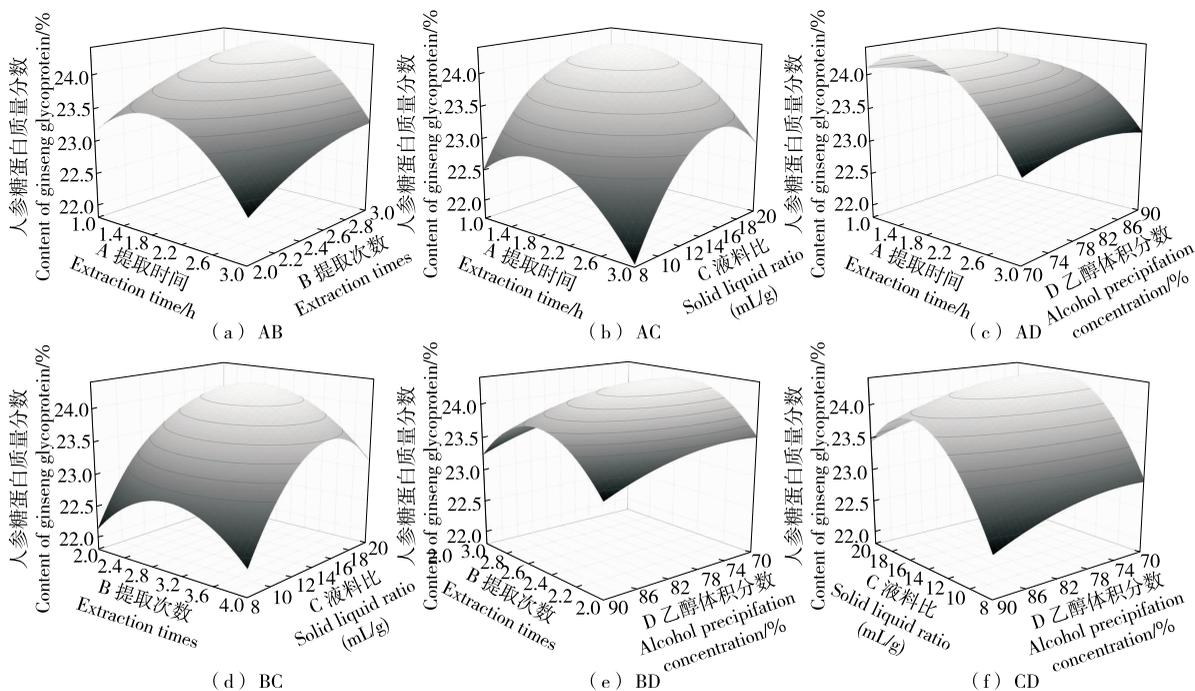


图 5 各因素间交互作用对人参糖蛋白质量分数的影响

Figure 5 The influence of the interaction of various factors on the content of ginseng glycoprotein

3 结论

采用煎煮法提取, 乙醇沉淀法分离, 并运用响应面法优化了人参糖蛋白制备工艺。结果表明, 人参糖蛋白最佳制备工艺参数为提取时间 1.5 h、提取次数 3 次、料液比 ($m_{\text{人参粗粉}} : V_{\text{蒸馏水}}$) 为 1.0 : 15.4 (g/mL)、乙醇体积分数 72%, 此条件下人参糖蛋白质量分数高达 24.14%。后续可通过色谱技术等方法对人参糖蛋白进行纯化, 以提高其纯度; 还可对其高级结构和生物活性机制进行研究。

参考文献

[1] 王影, 查琳, 杨怀雷, 等. 人参食品研究进展[J]. 人参研究, 2019, 31(5): 54-58.
WANG Ying, CHA Lin, YANG Huai-lei, et al. Research progress of Panax ginseng food[J]. Ginseng Research, 2019, 31(5): 54-58.

[2] 陈英红, 王颖, 姜翔之, 等. 吸收促进剂对人参糖蛋白肠道吸收的影响[J]. 特产研究, 2015, 37(2): 12-14, 56.
CHEN Ying-hong, WANG Ying, JIANG Xiang-zhi, et al. Effects of absorption enhancers on intestinal absorption of glycoprotein from Panax ginseng[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2015, 37(2): 12-14, 56.
[3] 于秀华, 李秉均, 王野成, 等. 多功能保健食品“人参蛋白片”的研究[Z]. 长春: 长春中医药大学, 2015.
YU Xiu-hua, LI Bing-jun, WANG Ye-cheng, et al. Research on multifunctional health food "ginseng protein tablets"[Z]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2015.
[4] 洪铁, 王永生, 杨振, 等. 辅助降血脂保健食品人参黑木耳多糖粉的研究与开发[Z]. 长春: 吉林大学, 2015.
HONG Tie, WANG Yong-sheng, YANG Zhen, et al. Research and development of ginseng black fungus polysaccharide powder as a

- health food for lowering blood lipids [Z]. Changchun: Jilin University, 2015.
- [5] 何鑫. 抗疲劳保健食品人参红景天鹿茸保健酒的研究[D]. 长春: 长春工业大学, 2020: 1-2.
HE Xin. Study on anti-fatigue health food ginseng rhodiola velvet antler health wine[D]. Changchun: Changchun University of Technology, 2020: 1-2.
- [6] 俞萍, 张庆贺, 陈长宝, 等. 人参糖肽研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(10): 215-218, 227.
YU Ping, ZHANG Qing-he, CHEN Chang-bao, et al. The research progress of ginseng glycopeptide[J]. Food & Machinery, 2020, 36(10): 215-218, 227.
- [7] 胡婧婷, 邱智东, 朱迪夫, 等. 人参糖肽的结构及其对 $A\beta_{25-35}$ 处理 PC12 细胞的抗凋亡作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2019, 45(2): 286-293.
HU Jing-ting, QIU Zhi-dong, ZHU Di-fu, et al. Structures of ginseng glycopeptides and anti-apoptotic effect on PC12 cells treated with $A\beta_{25-35}$ [J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2019, 45(2): 286-293.
- [8] LUO Hao-ming, ZHU Di-fu, WANG Ying, et al. Study on the structure of ginseng glycopeptides with anti-inflammatory and analgesic activity[J]. Molecules, 2018, 23(6): 1 325-1 339.
- [9] 王艳, 胡一鸿, 陈秋志, 等. 玉竹糖蛋白分离纯化及其体外抗氧化能力[J]. 食品科学, 2015, 36(2): 52-56.
WANG Yan, HU Yi-hong, CHEN Qiu-zhi, et al. Purification of glycoprotein from polygonatum odoratum and its antioxidant activity in vitro[J]. Food Science, 2015, 36(2): 52-56.
- [10] 李婷婷. 油茶籽糖蛋白的分离纯化及其功能活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 2-4.
LI Ting-ting. Purification of glycoprotein from *Camellia oleifera* Abel seeds and its physiological activities[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014: 2-4.
- [11] 赵文竹, 张瑞雪, 于志鹏, 等. 生姜糖蛋白提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(22): 309-314.
ZHAO Wen-zhu, ZHANG Rui-xue, YU Zhi-peng, et al. Study the extraction and antioxidant activity of ginger glycoprotein [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(22): 309-314.
- [12] 田璐, 李凌燕, 王伟青, 等. Box-Behnken 响应面法优化甘薯糖蛋白提取工艺[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(4): 169-171, 178.
TIAN Lu, LI Ling-yan, WANG Wei-qing, et al. Optimization of extraction process for glycoprotein from sweet potato by Box-Behnken response surface methodology[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(4): 169-171, 178.
- [13] 李晨晨, 贾成友, 郭华, 等. 正交试验法优化美洲大蠊糖蛋白的提取工艺[J]. 成都中医药大学学报, 2014, 37(3): 4-7.
LI Chen-chen, JIA Cheng-you, GUO Hua, et al. Optimization of extraction technology of glycoprotein from *periplaneta americana* by orthogonal test[J]. Journal of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2014, 37(3): 4-7.
- [14] 陈琼, 于佳. 蒲公英糖蛋白的含量测定及两种提取工艺优化[J]. 广州化工, 2012, 40(12): 69-71.
CHEN Qiong, YU Jia. Study of quantitative determination method and optimizing conditions for glycoprotein extraction from dandelion[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2012, 40(12): 69-71.
- [15] 唐雅楠, 韩喜桃, 刘子琴, 等. 中药糖蛋白的研究进展[J/OL]. 天然产物研究与开发. (2021-01-25) [2021-04-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.Q.20210122.1742.008.html>.
TANG Ya-nan, HAN Xi-tao, LIU Zi-qin, et al. Research progress on glycoprotein of Chinese materia medica[J/OL]. Natural Product Research and Development. (2021-01-25) [2021-04-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.Q.20210122.1742.008.html>.
- [16] 徐武, 黄浩, 宋春丽, 等. 黄芪下脚料糖蛋白分离纯化及其抗氧化活性[J]. 食品科技, 2020, 45(9): 188-195.
XU Wu, HUANG Hao, SONG Chun-li, et al. Isolation, purification and antioxidant activities of glycoprotein from astragalus membranaceus waste[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(9): 188-195.
- [17] 李红艳, 曹阳, 闫宇辉, 等. 正交试验优选人参水溶性糖蛋白提取工艺研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(5): 41-44.
LI Hong-yan, CAO Yang, YAN Yu-hui, et al. Optimization of extraction process of ginseng water-soluble glycoprotein by orthogonal test[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2018, 20(5): 41-44.
- [18] 胡婧婷. 人参糖蛋白提取工艺、结构鉴定及其生物活性验证[D]. 长春: 长春中医药大学, 2019: 13-14.
HU Jing-ting. Extraction process, structure identification and biological activity verification of ginseng glycoprotein [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2019: 13-14.
- [19] YUAN Shuai, XU Chang-yuan, XIA Jie, et al. Extraction of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* by fermentation with response surface methodology[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(12): 6 660-6 669.
- [20] 陈文博. 西藏绵头雪莲花多糖的结构鉴定及生物活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020: 16-17.
CHEN Wen-bo. Study on the structure identification and biological activity of polysaccharides of snow lotus from tibet [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020: 16-17.
- [21] YOUSEF A, SAEID A J, KEYVAN S, et al. Different methods to determine the encapsulation efficiency of protein in PLGA nanoparticles[J]. Bio-Medical Materials and Engineering, 2017, 28(6): 613-620.
- [22] 罗浩铭, 陈英红, 周婷婷, 等. 人参糖蛋白对小鼠学习和记忆能力的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2016, 42(3): 439-445.
LUO Hao-ming, CHEN Ying-hong, ZHOU Ting-ting, et al. Influence of glycoprotein from *Panax ginseng* in study and memory abilities in mice[J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2016, 42(3): 439-445.
- [23] 吕京南. 人参非皂苷成分治疗老年痴呆作用的药效物质基础研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2016: 19-20.
LU Jing-nan. The basic research of effective substance in the non-saponins from ginseng which showed the effect of treatment of Alzheimer's disease[D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2016: 19-20.