

毛蚶抗菌活性筛选 及低极性组分 GC-MS 分析

徐 艳¹, 张秀国², 黄国强¹, 张 琴¹, 杨家林¹, 孙雪萍^{1,*}

(1. 西海洋研究所, 海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000;

2. 北京航空航天大学北海学院, 广西北海 536000)

摘要:目的: 研究毛蚶的抗菌活性部位及有效成分。方法: 毛蚶软组织经乙醇提取后, 采用液液萃取法将提取物分为石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相和水相 4 个不同的极性部位; 采用抑菌圈法和最小杀菌浓度测定法, 对毛蚶乙醇提取物和各极性部位进行了抗菌活性测定, 并用正相硅胶柱对抗菌活性较好的石油醚相进行了分离纯化, 得到甾体组分; 采用 GC-MS 技术对石油醚相和甾体组分进行了化学成分分析。结果: 毛蚶石油醚相的抑菌效果最好; 从毛蚶石油醚相中鉴定出了 30 个化合物, 主要为脂肪类和甾醇类化合物; 从甾体组分中鉴定出 8 个化合物, 其中 7 个为首次从毛蚶中分离鉴定。结论: 毛蚶的石油醚相具有明显的抗菌活性, 石油醚相以甾醇类化合物为主。

关键词: 毛蚶, 抗菌活性, 气相色谱-质谱法, 甾醇

Antibacterial activities and GC-MS analysis of low polar components from *Scapharca subcrenata* Lischke

XU Yan¹, ZHANG Xiu-guo², HUANG Guo-qiang¹, ZHANG Qin¹, YANG Jia-lin¹, SUN Xue-ping^{1,*}

(1. Guangxi Institute of Oceanology, Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology, Beihai 536000, China;

2. Beihai College of Beihang University, Beihai 536000, China)

Abstract: Objective: To screen the antibacterial fractions and constituents of *Scapharca subcrenata* Lischke. Methods: The soft tissues of *S. subcrenata* was extracted by ethanol. Liquid-liquid extraction with petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol and water was used for the separation of ethanolic extract and 4 organic fractions were obtained. The antibacterial activities of the ethanolic extract and organic fractions was evaluated by diameter of inhibition zone (DIZ) and the minimum bactericidal concentration (MBC). The active petroleum ether fraction was separated and purified with silica gel column chromatography, and a sterol mixture was obtained. The compounds in the petroleum ether fraction and the sterols were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Results: The antibacterial substances were mainly in the petroleum ether fraction, and 30 compounds were identified by GC-MS, most of which were lipids and sterols. Eight compounds were identified by GC-MS from the sterol component, and seven compounds were identified for the first time from *S. subcrenata*. Conclusion: The antibacterial activities of petroleum ether fraction from *S. subcrenata* were obvious, and sterol was the major compound of petroleum ether fraction.

Key words: *Scapharca subcrenata* Lischke; antibacterial activity; gas chromatography-mass spectrometry; sterols

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)11-0127-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.11.017

毛蚶 (*Scapharca subcrenata* Lischke) 是我国重要的海产经济埋栖型贝类, 为蚶科动物, 产于我国南北沿海, 药用历史悠久, 《神农本草经》及历代主要本草中均有记载, 其以壳入药, 名瓦楞子, 具有消痰化癥、软坚散结、制酸止痛功效^[1-2]。蚶肉为海产食品, 据《随息居饮食谱》记载, 能“补血、润肠、生津、健胃”,

民间用于抗肿瘤、抗贫血和抗炎等, 有很好的药用和保健价值。

目前国内对毛蚶的研究多集中于生化性质、营养和养殖方面, 以粗提取物和营养成分分析为主^[3], 而对其小分子活性物质的分离纯化和鉴定较少。对毛蚶活性成分的研究多为毛蚶多糖、多肽这两类大

收稿日期: 2014-08-06

作者简介: 徐艳 (1981-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 海洋活性物质。

* 通讯作者: 孙雪萍 (1982-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然产物化学。

基金项目: 广西科学院基本科研业务费资助项目 (13YJ22HYS15); 广西科学研究与技术开发计划项目 (桂科攻 09321004)。

分子物质,活性主要集中在抗肿瘤、抗氧化、免疫活性和抗菌活性等方面^[4-6]。郭道森等^[7]对毛蚶血浆中抗菌蛋白进行了纯化,实验结果表明,所得抗菌蛋白具有选择性抑菌活性;胡显镜、陈莉莉和宋丽艳等^[8-9]对毛蚶活性多肽的抗肿瘤作用机制进行了研究;何赞绵等^[10]从毛蚶中分离纯化了一个新的糖肽类化合物,具有免疫活性,且其活性与糖侧链密切相关;孙雪萍等^[11]从毛蚶中分离鉴定了4个单体化合物,分别为:5-烯-胆甾醇、胆甾醇、3-酮-20-烯孕甾烷和3-羧基-吡啶;徐艳等^[12]对毛蚶进行了抗卤虫活性检测,结果显示,毛蚶的乙酸乙酯相和石油醚相的抗卤虫活性明显,其中甾醇类化合物是有效的抗卤虫活性成分。

本工作拟对毛蚶的醇提取物以及不同极性部位进行抗菌活性检测,研究毛蚶对9种致病菌的抑制活性,并应用气质联用仪对其活性部位进行化学成分分析,为进一步研究其生物活性物质奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

毛蚶(*S.subcrenata*) 采自广西北海;7株人体致病菌:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、白色葡萄球菌(*Staphylococcus albus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、四联球菌(*Micrococcus tetragenus*)和藤黄八叠球菌(*Micrococcus luteus*),2株海洋致病菌:副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)均为海南师范大学化学化工学院郑彩娟老师赠送;其余试剂均为国产分析纯。

NE-1101v 旋转蒸发仪 日本东京理化器械株式会社;SHB-III 循环水式真空泵 郑州长城科工贸有限公司;EZ 2.3 蒸发工作站 英国 GeneVac 公司;ML 204/02 电子分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HC-300T2 高速多功能粉碎机 永康市天祺盛世工贸有限公司;Thermo Trace GC Ultra-DSQII 气相色谱-质谱联用仪 美国赛默飞世尔科技公司;200~300 目正相硅胶、GF254 薄层层析板 青岛海洋化工有限公司;Hirayama HVE-50 高压蒸汽灭菌锅 购自广州市深华生物技术有限公司;SW-CJ-1FD 超净工作台 购自苏净集团苏州安泰空气技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 供试样品的制备 鲜毛蚶(15kg)洗净、去壳、取肉,于组织捣碎机中匀浆,经95%乙醇浸泡提取4次,每次1h,减压浓缩提取液得浸膏71.2g,浸膏用水混悬后,分别用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,减压浓缩后得到石油醚相(38.5g),乙酸乙酯相(13.5g),正丁醇相(17.3g)和水相(414.0g)。乙醇提取物和4个极性部位室温放置备用。

石油醚相浸膏经正相硅胶柱层析,石油醚-乙酸乙酯(石油醚:乙酸乙酯=20:1)梯度洗脱,收集组分,浓缩并重结晶后得到白色固体(3.7g),薄层层析和¹H-NMR 谱显示,此白色固体为甾醇组分,进一步

的柱层析分离未能获得单体化合物,故运用GC-MS法对该组分进行分析。

1.2.2 抑菌活性检测 根据文献^[13]进行培养基的制备,试管稀释法采用液体LB培养基;抑菌圈(DIZ: Diameter of inhibition zone, mm)和最小杀菌浓度(MBC: minimum bactericidal concentration, mg/mL)的测定选用LB平板。

初筛采用纸片扩散法(disk-diffusion method)^[14],检测毛蚶乙醇提取物和4个极性部位对所有供试菌株的抗菌活性,全部操作均为无菌操作,实验为单浓度三次重复。采用试管稀释法(Tube dilution method)^[15]测定了初筛有活性的样品的最小杀菌浓度。

1.2.3 石油醚相的甲酯化 用氢氧化钾-甲醇甲酯化法^[16]对毛蚶石油醚相进行脂肪酸甲酯化,加入正己烷进行脂肪酸甲酯的萃取。静置分层后,取上层有机相(正己烷)适当稀释,用针筒式微孔滤膜过滤器过滤后进行气相色谱-质谱仪进样分析。

1.2.4 GC-MS 分析条件 气相色谱条件:色谱柱为VF-5MS 石英毛细柱(30mm×0.25mm×0.25μm);MS 条件:电子轰击(EI)离子源,电子能量70eV,操作系统 Xcalibur,谱库 NIST02;石油醚相 GC-MS 分析参数为:初始温度50℃,保持2min,程序升温至130℃,速度5℃/min,再以25℃/min升至300℃;石油醚相甾体组分升温程序:初始温度:160℃,程序升温至260℃,速度:10℃/min,再以5℃/min升至300℃,保持10min。

2 结果与分析

2.1 抑菌活性

毛蚶软体组织的乙醇提取物和4个极性部位对供试菌的抑制作用不同,毛蚶石油醚相对6株供试菌均表现出一定的抑制作用,其中有4株致病菌(大肠杆菌、白色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌、藤黄八叠球菌)和2株海洋致病菌(副溶血弧菌和鳃弧菌),抑菌圈直径约为6.5mm,而对其余3株致病菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和四联球菌)没有明显抑制作用;毛蚶乙酸乙酯相只对大肠杆菌有一定的抑制作用;毛蚶乙醇总提取物、正丁醇相和水相对所有供试菌均无抑制活性。见表1。

将毛蚶石油醚相和乙酸乙酯相进行最小杀菌浓度检测,结果显示,毛蚶石油醚相对白葡萄球菌(*S. albus*)的最小杀菌浓度为50mg/mL,对藤黄八叠球菌(*M. luteus*)的最小杀菌浓度为100mg/mL,而对大肠杆菌(*E. coli*)、蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)和鳃弧菌(*V. anguillarum*)的最小杀菌浓度均大于100mg/mL;毛蚶乙酸乙酯相对大肠杆菌(*E. coli*)的最小杀菌浓度大于100mg/mL,详见表2。

2.2 化学成分分析

2.2.1 石油醚相的化学成分分析 为了探讨毛蚶石油醚相的化学组成,本文对其进行了GC-MS分析,毛蚶石油醚相经甲酯化处理后用GC-MS联用仪分析,得到毛蚶石油醚相总离子流谱(见图1),对各峰

表1 毛蚶乙醇提取物及各相的抗菌活性

Table 1 The antimicrobial activity of the ethanolic extract and fractions from *S.subcrenata*

样品	抑菌圈直径(mm)								
	大肠杆菌	白色葡萄球菌	蜡状芽孢杆菌	副溶血弧菌	鳃弧菌	藤黄八叠球菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	四联球菌
乙醇提取物	-	-	-	-	-	-	-	-	-
石油醚相	6.5	6.8	6.5	6.5	6.5	6.5	-	-	-
乙酸乙酯相	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-
正丁醇相	-	-	-	-	-	-	-	-	-
水相	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注:抑菌圈直径以平均值表示;“-”表示无活性。

表2 毛蚶石油醚相和乙酸乙酯相的最小杀菌浓度

Table 2 Minimum bactericidal concentration of petroleum ether and ethyl acetate fraction from *S.subcrenata*

样品	最小杀菌浓度(mg/mL)					
	大肠杆菌	白色葡萄球菌	蜡状芽孢杆菌	副溶血弧菌	鳃弧菌	藤黄八叠球菌
石油醚相	>100	50	>100	>100	>100	100
乙酸乙酯相	>100	/	/	/	/	/

注:“>100”表示最小杀菌浓度大于100mg/mL;“/”表示未测。

通过 Xcalibur 工作站 NIST 标准质谱图库进行检索,共鉴定出 30 个化合物(见表3)。石油醚相主要为低级性化合物,脂肪酸脂类化合物最多(14 个),以不饱和脂肪酸为主(10 个),还有较多的甾醇类化合物(10 个),以胆甾醇为主,以及少量长链烷烃(6 个),详见表3。

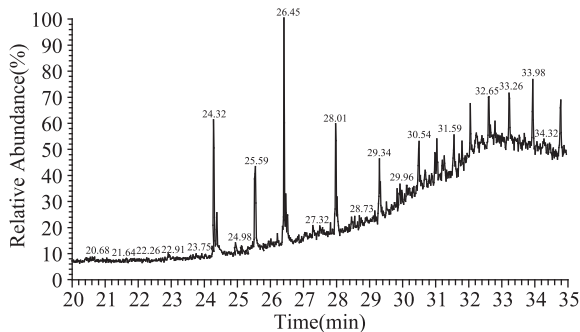


图1 毛蚶石油醚相气质分析总离子流图

Fig.1 Total ion current(TIC) chromatogram of petroleum ether fraction from *S.subcrenata*

2.2.2 甾体组分的化学成分分析 为了进一步分析石油醚相甾醇组分的化学组成,本文运用 GC-MS 法对该组分进行了分析,共鉴定出 8 个甾醇类化合物(见表4),占甾体粗晶总质量的 93.88%,包括胆甾(74.33%)、麦角甾(15.12%)、豆甾(4.17%)和雄甾(0.26%)4 种类型。胆甾类化合物有 3 个,以胆甾醇为主,占甾醇组分总质量的 53.06%,其次是胆甾-5,22-二烯-3 β -醇和脱氢胆甾醇,各占甾醇组分总质量的 20.47% 和 0.8%;麦角甾类化合物也有 3 个,分别为:麦角甾-5,22-二烯-3 β -醇、麦角甾-7,22-二烯-3 β -醇和(22Z)-26,27-二降-麦角甾-5,22-二烯-3 β -醇,占甾体组分总质量的比例分别为:11.59%、2.44% 和 1.09%;另外,还有豆甾和雄甾类化合物各 1 个,分别为豆甾-5-烯-3 β -醇和雄甾-5-烯-3 β -醇,分别占甾体组分总质量的 4.17% 和 0.26%。

3 结论

毛蚶的抑菌活性检测结果显示,石油醚相的抑菌效果较弱,但对白色葡萄球菌的抑制作用较明显,最小杀菌浓度为 50mg/mL;乙酸乙酯相仅对一株菌有微弱的抑制活性;乙醇浸膏、正丁醇相和水相都没有抑菌活性,抑菌圈和最小杀菌浓度检测结果具有一致性。具有抑菌活性的物质主要集中在极性较小的石油醚相,根据化学成分分析结果可知,毛蚶石油醚相主要含有甾体和脂肪酸等成分,以胆甾醇为主,根据文献^[17-18]推测毛蚶中所含的抗菌化学成分可能是极性较小的甾体类化合物。

本研究首次对毛蚶软组织的抗菌化学成分进行了分析,共鉴定出 30 个低极性化合物,从其甾体组分中鉴定出 8 个甾体,以胆甾醇为主,其中 7 个为首次分离鉴定,这些化合物的抑菌活性还有待于进一步检测。毛蚶石油醚相虽然有抑菌效果,但是乙醇提取物却没有抑菌活性,可能是因为毛蚶提取物中的各种抗菌有效成分之间存在着活性相互制约或抑制的作用,即只有当除去或降低对抗菌活性成分发生作用的其它次生代谢产物时,才能表现出明显的抑菌活性,由于动物天然的多糖、寡糖、糖肽、蛋白质等对免疫系统有促进作用^[19],因而极大地影响了粗提物中抗菌有效成分作用的发挥,因此,要使中药走向现代化,走向国际化,就必须加快中药的有效活性成分的提取和分离研究^[20]。

参考文献

[1]姜凤吾,张玉顺.中国海洋药物辞典[M].北京:海洋出版社,1994:50-53.
 [2]海军后勤部卫生部,上海医药工业研究院.中国药用海洋药物[M].上海:上海人民出版社.1977:67-69.
 [3]李谦,李泰明,王香琴,等.毛蚶提取物生化性质初步分析[J].药物生物技术,1999,5(4):245-246.
 [4]何赞绵,陈宇星,刘纯慧,等.毛蚶多糖的分离纯化和免疫

表3 毛蚶石油醚相 GC-MS 分析

Table 3 GC-MS analysis of the petroleum ether fraction from *S.subcrenata*

序号	保留时间	化合物	分子式	分子量
1	24.32	1-十六碳烯,1-Hexadecene	C ₁₆ H ₃₂	224
2	24.42	十六烷,Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	226
3	25.59	二十烷,Eicosane	C ₂₀ H ₄₂	282
4	25.83	十四酸甲酯,Tetradecanoic acid,methyl ester	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242
5	26.25	4,8,12-三甲基十三碳酸甲酯,4,8,12-Trimethyltridecanoic acid,methyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270
6	26.45	1-十九碳烯,1-nonadecene	C ₁₉ H ₃₈	266
7	27.39	(Z)-9-十六烯酸甲酯,(Z)-9-hexadecenoic acid methylester	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268
8	27.55	十六酸甲酯,Methyl hexadecanoate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270
9	28.2	胆固醇,Cholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O	386
10	28.8	(Z)-9-十八碳烯酸甲酯,(Z)-9-octadecenoic acid,methyl ester	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296
11	28.82	胆固醇,Cholestanol	C ₂₇ H ₄₈ O	388
12	28.93	硬脂酸甲酯,Stearic acid,methyl ester	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298
13	29.71	麦角甾-5,22-二烯-3β-醇,Ergosta-5,22-dien-3β-ol,(22E,24S)	C ₂₈ H ₄₆ O	398
14	29.78	顺-5,8,11,14-二十碳四烯酸甲酯,5,8,11,14-eicosatetraenoic acid methylester (all Z)	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	318
15	29.80	顺-5,8,11,14-二十碳四烯酸乙酯 5,8,11,14-eicosatetraenoic ethylester(all Z)	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	332
16	29.82	11-十八碳烯酸甲酯,Methyl 11-octadecenoate	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296
17	29.87	顺-5,8,11,14,17-二十碳五烯酸甲酯,Cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid methyl ester	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	316
18	29.96	11-二十碳一烯酸甲酯,11-Eicosenoic acid methyl ester	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	324
19	30.02	异别胆酸乙酯,Ethyl iso-allocholate	C ₂₆ H ₄₄ O ₅	436
20	30.52	17-三十五碳烯,17-Pentatriacontene	C ₃₅ H ₇₀	490
21	30.85	胆甾-3,5-二烯-7 酮,Cholesta-3,5-dien-7-one	C ₂₇ H ₄₂ O	382
22	30.88	顺-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸甲酯,4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid methyl ester(all-Z)	C ₂₃ H ₃₄ O ₂	342
23	31.03	11,14-二十碳二烯酸甲酯,11,14-Eicosadienoic acid,methylester	C ₂₁ H ₃₈ O ₂	322
24	31.04	12,15-十八二烯酸甲酯,12,15-Octadecadienoic acid,methylester	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294
25	31.05	胆甾-5-烯-3 醇-24-烯-亚丙基,Cholest-5-en-3β-ol,24-propylidene-	C ₃₀ H ₅₀ O	426
26	31.16	菜子甾醇,Campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	400
27	31.57	豆甾醇,Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	412
28	32.4	β-谷甾醇,β-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414
29	32.65	十八烷-3-乙基-5-(2-乙基丁基),Octadecane,3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)	C ₂₆ H ₅₄	366
30	34.29	7-酮基胆固醇,7-Ketocholesterol	C ₂₇ H ₄₄ O ₂	400

表4 甾醇组分 GC-MS 分析

Table 4 The GC-MS analysis of the sterol component from *S.subcrenata*

序号	保留时间	化合物	分子式	相对含量 (%)
1	12.69	雄甾-5-烯-3β-醇,Androst-5-ene-3β-ol	C ₁₉ H ₃₀ O	0.26
2	18.49	脱氢胆甾醇,Cholesta-4,6-dien-3β-ol	C ₂₇ H ₄₄ O	0.80
3	20.26	(22Z)-26,27-二降-麦角甾-5,22-二烯-3β-醇(22Z)-26,27-Dinoregosta-5,22-dien-3β-ol	C ₂₆ H ₄₂ O	1.09
4	22.48	胆固醇,Cholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O	53.06
5	23.06	麦角甾-5,22-二烯-3β-醇,Ergosta-5,22(E)-dien-3β-ol	C ₂₈ H ₄₆ O	11.59
6	24.05	胆甾-5,22-二烯-3β-醇,Cholesta-5,22(E)-dien-3β-ol	C ₂₇ H ₄₄ O	20.47
7	24.44	麦角甾-7,22-二烯-3β-醇,Ergosta-7,22(E)-dien-3β-ol	C ₂₈ H ₄₆ O	2.44
8	25.39	豆甾-5-烯-3β-醇,Stigmast-5-en-3β-ol	C ₂₉ H ₅₀ O	4.17

活性测定[J].中国海洋药物,2007,26(2):23-25.

[5]王勇,杨静,孙响,等.毛蚶提取物的抗氧化活性进行了分析[J].中国海洋药物,2008,27(3):11-14

[6]任胜芳,宋丽艳,严春艳,等.毛蚶中抗癌活性肽高效液相指纹图谱分析研究[J].中药材,2008,31(8):1134-1138.

(下转第140页)

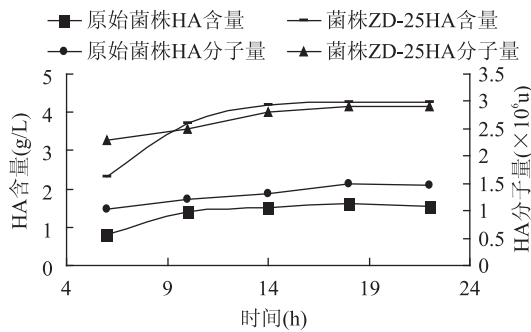


图6 原始菌株与突变菌株 ZD-25 发酵曲线

Fig.6 Fermentation diagram of original strain and mutant strain ZD-25

的复合诱变,结果显示复合诱变相对于单一的诱变还是具有明显的优势的,这可能是由于复合诱变具有协同效应,能很好的对菌株进行诱变选育。经过摇瓶发酵得到的突变菌株 ZD-25 的产量达到 1.61 g/L,相对于原始菌株摇瓶发酵提高了 120.5%。相对分子量为 2.13×10^6 u,相对于原始菌株提高了 57.8%。经过 10 次的传代,仍能保持遗传稳定。说明 H_2O_2 氧化胁迫培养与复合诱变相结合的方法能提高突变几率降低回复突变率,得到良好的菌株。通过 5L 的发酵罐初步发酵,突变株 ZD-25 的 HA 产量达到了 4.26 g/L,相对分子量达到了 2.90×10^6 u,分别比原始菌株发酵罐发酵提高了 166.3%, 93.3%。

参考文献

- [1] Rangaswamy V, Jain D. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* [J]. *Biotechnology Letters*, 2008, 30: 493-496.
- [2] 李自刚,樊国燕,边传周,等.发酵法生产透明质酸菌种的筛选[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(8): 3307-3309.
- [3] 周晓惠,陈奕涵,周庆玮,等.溶菌酶胁迫培养提高透明质酸分子量[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(11): 182-187.
- [4] 郭道森,魏玉西,李丽,等.毛蚶血浆中抗菌蛋白的纯化及抗菌活性研究[J]. *海洋科学*, 2005, 29(3): 25-29.
- [5] Chen L L, Song L Y, Li T F, et al. A New Antiproliferative and Antioxidant Peptide Isolated from *Arca subcrenata* [J]. *Mar Drugs*, 2013, 11(6): 1800-1814.
- [6] Hu X J, Song L Y, Huang L J, et al. Antitumor Effect of a Polypeptide Fraction from *Arca subcrenata* *in Vitro* and *in Vivo* [J]. *Mar Drugs*, 2012, 10(12): 2782-2794.
- [7] He Y M, Liu C H, Chen Y X, et al. Isolation and structural characterization of a novel polysaccharide prepared from *Arca subcrenata* Lischke [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 104(2): 111-116.
- [8] 徐艳,童万平,孙雪萍.毛蚶壳生活性筛选及低极性组分的气相色谱-质谱联用分析[J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(4): 811-813.
- [9] 孙雪萍,徐艳,宋成芝,等.毛蚶正丁醇相抗茵虫化学成分分析[J]. *广西科学*, 2013, 20(4): 272-275.
- [10] 黄培堂,王嘉玺,朱厚础.分子克隆实验指南[M]. 3版.北

- [4] 管世敏,荣绍丰,陈奕涵,等.响应面法优化氧化胁迫提高透明质酸分子量[J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25: 932-936.
- [5] 管世敏,荣绍丰,陈奕涵,等.外源氧化胁迫提高透明质酸分子量[J]. *中国医药工业杂志*, 2013, 44(1): 27-31.
- [6] 黄金明,张晶,汪江波.复合诱变选育透明质酸高产菌株[J]. *中国酿造*, 2010, 1: 73-75.
- [7] 陈奕涵,钱悦,侯永泰,等.复合诱变选育大分子量透明质酸高产菌株[J]. *中国酿造*, 2012, 31(9): 98-101.
- [8] 张元和,张宏.过氧化氢诱导三种念珠菌形成 L 型的初步观察[J]. *蚌埠医学院学报*, 1989(4): 235-237.
- [9] 冯建成,张荣鹤,罗素兰.高产透明质酸菌种 FJ-23 的诱变选育[J]. *生物技术*, 2006, 16(3): 28-30.
- [10] 邓静,吴明霞,吴华昌,等.不同诱变方法对兽疫链球菌产透明质酸的影响[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(4): 1391-1393.
- [11] 黄伟,刘永乐,王发祥,等.原生质诱变选育高产酸性 α -淀粉酶黑曲霉菌株[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(3): 160-162.
- [12] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction [J]. *Analytical Biochemistry*, 1962, 4: 330-334.
- [13] 凌沛学,张天民.透明质酸[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2000: 42-43.
- [14] Laurent T C. Biochemistry of hyaluronan [J]. *Acta Otolaryngologica*, 1987, 442: 7-24.
- [15] Cleary P P, Larkin A. Hyaluronic acid capsule strategy for oxygen resistance in group A streptococci [J]. *Journal of Bacteriology*, 1979, 140(3): 1090-1097.
- [16] Chong B F, Nielsen L K. Amplifying the cellular reduction potential of streptococcus zooepidemicus [J]. *Journal of Biotechnology*, 2003, 100(1): 153-162.
- [17] 丁勇,周楠,石孝勇.透明质酸产生菌的复合诱变及摇瓶发酵条件的优化[J]. *中国酿造*, 2011, 12: 100-103.
- [14] Espine-ingroff A, White T, Pfaller M A. Antifungal Agents and Susceptibility Tests. *Manual of Clinical Microbiology* [M]. 7th Edn. Washington DC: American Society for Microbiology, 1999: 1640-1652.
- [15] Sydney M M, Finegold M D, Ellen Baron J O. *Banley and Scotts Diagnostic Microbiology* [M]. 7ed. 1986: 176-177.
- [16] 范亚苇,邓泽元,余永红,等.不同脂肪酸甲酯化方法对共轭亚油酸分析的影响[J]. *中国油脂*, 2007, 32(1): 52-55.
- [17] 彭燕,黄日明,郑建仙,等.中华疣海星的化学成分及其抗菌活性研究[J]. *中草药*, 2012, 43(10): 1913-1915.
- [18] 胡静,杨斌,孙见凡,等.南海软海绵 *Halichondria* sp. 化学成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(5): 614-617.
- [19] 骆和生,罗鼎辉.免疫中药学—中药免疫药理与临床[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1999, 15-25.
- [20] 张存莉,朱玮,王冬梅,等.黑刺菝蕈根提取物的抑菌活性研究[J]. *西北植物学报*, 2005, 25(12): 2529-2532.