

植物乳杆菌胞外多糖的脱色及其体外抑瘤效应

冯美琴^{1,2}, 张琦¹, 玛依诺·木图拉¹, 黄丽娟¹, 曹林¹, 董明盛^{1,*}

(1.南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095;

2.金陵科技学院动物科学与技术学院, 江苏南京 210038)

摘要: 研究大孔吸附树脂对植物乳杆菌胞外多糖的脱色工艺, 并采用 Cell Counting Kit-8(CCK-8)法检测植物乳杆菌胞外多糖 EPS 及单一组分 EPS-1、EPS-2 对大肠癌细胞株 HT-29 的体外抑瘤效应。结果表明, 选择 S-8 树脂, 树脂用量为 4g/100mL, 调节胞外多糖溶液的 pH 值为 6, 在 25℃ 条件下, 糖液质量浓度为 2mg/mL, 静态吸附 4h 后脱色率为 72.58%, 糖保留率为 69.15%。植物乳杆菌胞外多糖 EPS、EPS-1 和 EPS-2 对大肠癌细胞 HT-29 的体外增殖均具有显著的抑制作用($P < 0.01$), 且呈现出良好的量效关系。

关键词: 植物乳杆菌; 胞外多糖; 大孔吸附树脂; 脱色; 抑瘤活性

Decolorization and Anti-tumor Activity *in vitro* of Exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* 70810

FENG Mei-qin^{1,2}, ZHANG Qi¹, Mahinur · MUTUVULLA¹, HUANG Li-juan¹,

CAO Lin¹, DONG Ming-sheng^{1,*}

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. College of Animal Science and Technology, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China)

Abstract: The effects of various operating conditions on decolorization of exopolysaccharides (EPS) from *Lactobacillus plantarum* 70810 by macroporous resin adsorption were explored in the current work. In addition, the anti-tumor effects of crude EPS from *Lactobacillus plantarum* 70810 and two fractions thereof obtained by sequential column chromatographies on DEAE-Cellulose and Sephadex G-100, named as EPS-1 and EPS-2, respectively, on large intestine carcinoma cells HT-29 *in vitro* were tested by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The results showed that macroporous resin S-8 provided optimal decolorization of crude EPS from *Lactobacillus plantarum* 70810 among all resins tested. After 4 h decolorization under the following conditions: macroporous resin S-8 amount 4 g/100 mL, sample pH adjustment until pH 6, 25 °C and polysaccharide concentration in samples 2 mg/mL, the decolorization rate and retention rate of EPS were 72.58% and 69.15%, respectively. Crude EPS, EPS-1 and EPS-2 exhibited a significant inhibitory effect on the cell growth of large intestine carcinoma cells HT-29 *in vitro* ($P < 0.01$) in a dose-dependent manner.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; exopolysaccharides; macroporous adsorption resin; decolorization; anti-tumor activity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0107-05

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)是乳酸菌在生长代谢过程中分泌到细胞壁外的黏液多糖和荚膜多糖的总称^[1-2]。由于其独特的物理功能和流变学特性, 在食品生产中常被用作增稠剂、乳化剂、胶凝剂及稳定剂^[3]。近年来的研究表明, 乳酸菌多糖还具有增强免疫力、抗肿瘤、抗氧化等功效^[4-5]。目前, 乳酸菌多糖的制备一般采用离心除菌体、除蛋白

后醇沉的方法, 得到的多糖产品纯度较低, 主要杂质有色素、蛋白质和一些小分子物质。色素的存在不仅影响多糖的色泽, 还影响多糖的纯度以及进一步对其生物活性的研究。本研究以大孔树脂为脱色剂, 考察 5 种大孔吸附树脂对植物乳杆菌胞外多糖的脱色效果, 确定静态吸附的最佳工艺参数; 另外, 采用 CCK-8 法对脱色及纯化后植物乳杆菌胞外多糖的体外抑瘤效应进行探讨。

收稿日期: 2011-08-23

基金项目: 国家“863”计划项目(2011AA100903)

作者简介: 冯美琴(1975—), 女, 讲师, 博士研究生, 研究方向为食品微生物与生物技术。

E-mail: fengmeiqin@jit.edu.cn

*通信作者: 董明盛(1961—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物与生物技术。E-mail: dongms@njau.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

植物乳杆菌 70810(*Lactobacillus plantarum* 70810)由本实验室分离纯化并冷冻保存。

大孔树脂 DM-130、NKA-II、S-8 天津南开大学化工厂; 大孔树脂 DA201-B 江苏苏青水处理工程集团有限公司; 大孔树脂 HP-20 日本三菱化成公司; 95%乙醇、氢氧化钠、浓盐酸、浓硫酸、苯酚均为国产分析纯; 大肠癌细胞株 HT-29 中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库; Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒上海贝博生物试剂公司; 胎牛血清 杭州四季青生物工程材料有限公司; RPMI1640 培养基 美国 Gibco 公司; 胰蛋白酶 美国 Sigma 公司; 5-Fu(5-氟尿嘧啶) 上海旭东海普药业有限公司。

1.2 仪器与设备

LRH-150 型生化培养箱 上海益恒实验仪器有限公司; TU-1800PC 紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; DJ300 型电子天平 常熟衡器工业公司; LDZX-40AI 型立式电热压力灭菌锅 上海申安医疗器械厂; 64RL 高速冷冻离心机 美国 Beckman 公司; LABOROTA 4003 型旋转蒸发仪 德国 Heidolph 公司; SHZ-IIIB 循环水真空泵 上海亚荣生化有限公司; Thermo Scientific Forma 3111 型 CO₂ 培养箱 美国 Thermo 公司; BX-50 型倒置显微镜 日本 Olympus 公司; Synergy 美国宝特-2 酶标仪 美国 BioTek 公司; SW-CJ-IBU 型超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 植物乳杆菌胞外多糖的制备工艺流程

植物乳杆菌按体积分数 3% 接种 MRS 培养液 → 30℃ 培养 24h → 发酵液离心(10000 × g, 30min, 4℃)取上清液 → 加三氯乙酸(TCA)至终体积分数为 4% → 离心(10000 × g, 30min, 4℃)除蛋白 → 上清液醇沉 → 透析 → 冷冻干燥 → 粗多糖

脱色后多糖(EPS)经过 DEAE-Cellulose 52 和 Sephadex G-100 进一步纯化后获得单组分 EPS-1 和 EPS-2, 研究 EPS、EPS-1、EPS-2 三组分的体外抑瘤实验。

1.3.2 多糖的脱色实验

1.3.2.1 多糖含量测定和保留率计算

采用苯酚-硫酸法, 以葡萄糖为标准品^[6-7], 以葡萄糖质量浓度(x, mg/L)对吸光度(y)作回归处理, 得线性回归方程: $y = 0.0099x + 0.013$, $R^2 = 0.9992$ 。

$$\text{多糖保留率}/\% = \frac{M_{\text{后}}}{M_{\text{前}}} \times 100 \quad (1)$$

式中: $M_{\text{前}}$ 为脱色前多糖的含量; $M_{\text{后}}$ 为脱色后多糖的含量。

1.3.2.2 脱色率测定及计算

将 5mg/mL 植物乳杆菌胞外多糖溶液于 190~700nm 波长范围内进行全波长扫描, 发现溶液在可见光区无吸收峰且吸收呈递减趋势, 通过颜色观察, 实验选定 420nm 为检测波长测定其吸光度。

$$\text{脱色率}/\% = \frac{A_{\text{前}} - A_{\text{后}}}{A_{\text{前}}} \times 100 \quad (2)$$

式中: $A_{\text{前}}$ 为脱色前溶液的吸光度; $A_{\text{后}}$ 为脱色后溶液的吸光度。

1.3.2.3 树脂的预处理

取一定量的树脂先用 5% HCl 溶液浸泡 6h, 去离子水洗涤至 pH 值为中性; 再用质量浓度为 5g/100mL 的氢氧化钠溶液浸泡 6h, 去离子水洗涤至 pH 值为中性; 而后用体积分数为 95% 的乙醇浸泡 6h, 去离子水洗涤至无醇味, 抽干备用^[8]。

1.3.2.4 树脂的筛选

准确称取 2g 经预处理的树脂于具塞磨口三角瓶中, 加入 30mL 质量浓度为 2mg/mL 的粗多糖溶液(溶液 pH 值调至 7.0), 于 35℃、120r/min 条件下恒温振荡 3h, 然后双层滤纸过滤, 对滤液进行测定并计算多糖的脱色率和多糖保留率, 研究树脂类型对植物乳杆菌胞外多糖脱色的影响。

1.3.2.5 单因素试验确定静态吸附的最佳条件

单因素试验确定树脂静态吸附时树脂用量(2、4、6、8、10g/100mL), 溶液的 pH 值(4、5、6、7、8、9), 静态吸附时摇床中的温度(15、20、25、30、35℃), 静态吸附时间(1、2、3、4、5h)和糖液质量浓度(0.5、1、1.5、2、2.5、3 mg/mL)。

1.3.3 多糖的体外抑瘤效应

1.3.3.1 细胞培养

大肠癌细胞株 HT-29 采用含 10g/100mL 胎牛血清的 RPMI1640 完全培养液(含青霉素 100U/mL 和链霉素 100mg/L)在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 0.25g/100mL 胰蛋白酶消化传代。

1.3.3.2 CCK-8 法检测对 HT-29 细胞的增殖抑制作用

取对数生长期的 HT-29 细胞, 以 5×10^3 cells/mL 接种于 96 孔板内, 每孔 100 μL, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24h 后细胞贴壁, 每孔加入含不同质量浓度多糖的细胞培养液 100 μL。实验设空白对照组、阳性对照组、阴性对照组和实验组。空白组只加细胞培养液(不含细胞), 阳性对照组加入 5-Fu(终质量浓度 50 μg/mL), 阴性对照组不加样品而加入等体积的细胞培养液, 实验组加入含不同质量浓度多糖的细胞培养液(终质量浓度 25~

400 μg/mL), 每组实验均设 5 个平行孔。各组加样后继续培养 72h, 每孔加入 10 μL 的 CCK-8 继续培养 2h, 采用酶标仪在 450nm 波长处检测吸光度(A_{450nm})。

$$\text{抑制率} / \% = \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白对照组}}}{A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{空白对照组}}} \times 100 \quad (3)$$

式中: A_{实验组} 为实验组样品的吸光度; A_{阴性对照组} 为阴性对照组样品的吸光度; A_{空白对照组} 为空白对照组样品的吸光度。

1.3.3.3 数据分析

体外抑瘤实验数据均采用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 使用 SAS System for Windows V8 统计软件进行数据分析, 组间比较采用 One-Way ANOVA 分析。

2 结果与分析

2.1 大孔树脂的筛选

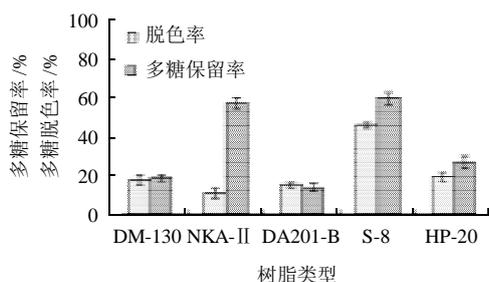


图1 不同型号大孔树脂对胞外多糖脱色效果的影响

Fig.1 Effect of macroporous resin type on decolorization efficiency of EPS

5 种大孔吸附树脂 DM-130、NKA- II、DA201-B、S-8、HP-20 对植物乳杆菌胞外多糖溶液的脱色效果如图 1 所示。由图 1 可知, 5 种大孔树脂的脱色效果有明显的差异。从脱色率来看, S-8 树脂对色素的吸附能力最强, 脱色率达到了 46.62%; 从多糖保留率来看, NKA- II 和 S-8 的多糖保留率较好, 分别为 57.85% 和 60.54%。

表 1 5 种树脂的物理特性

Table 1 Physical properties of five kinds of macroporous resins

大孔树脂型号	粒径/mm	比表面积/(m ² /g)	平均孔径/nm	外观	极性
DM-130	0.3~1.25	500~550	9.0~10.0	乳白色	弱极性
NKA- II	0.3~1.25	160~200	14.5~15.5	红棕色	极性
DA201-B	0.3~1.25	500~600	8.0~9.0	乳白色	非极性
S-8	0.3~1.25	100~120	28.0~30.0	微黄色	极性
HP-20	0.3~1.25	600	26	乳白色	非极性

5 种大孔树脂对色素、多糖的吸附各不相同, 这与树脂的性能和被吸附物质的性质有关(表 1)。根据物理化

学中的吸附理论, 树脂的吸附主要是极性吸附机理, 即被吸附物质与树脂符合相似相吸原理^[9]。从树脂的极性来看, DM-130 是弱极性大孔吸附树脂, DA201-B 和 HP-20 是非极性大孔吸附树脂, 它们具有疏水性表面结构, 通过分子内的疏水基与被吸附物质相互作用而进行吸附, 适宜从极性溶液中吸附弱极性或非极性溶质, 实验中三者的脱色率均较低, 说明多糖溶液中的色素可能为极性分子^[10]。考察极性大孔吸附树脂, 发现 NKA-II 对该色素的吸附能力较低, 而 S-8 的吸附能力则较强, 这是因为树脂的吸附性能还与其比表面积和孔径有关。一般来说, 对同一种溶质而言, 比表面积越大, 吸附效果越好; 同时, 适宜的孔径对吸附也会产生很大影响, 因为要使大孔树脂的比表面积得到充分的利用, 被吸附分子首先要能通过孔道到达树脂内表面, 因此, 对于大分子溶质来说, 树脂就必须有足够大的孔径^[11]。由表 1 可知, NKA-II 的比表面积较 S-8 大, 但平均孔径将近 S-8 的一半, 可见 S-8 较强的脱色率是由其较大的孔径所决定的。可见多糖溶液中的色素可能属于极性的大分子物质。综合考虑脱色率和多糖保留率, 选择 S-8 树脂进行进一步的吸附实验。

2.2 树脂用量对脱色效果的影响

改变 S-8 树脂的用量, 分别对植物乳杆菌胞外多糖溶液(糖液质量浓度 2mg/mL, 溶液 pH 值调至 7.0)脱色, 脱色温度为 35℃, 脱色时间为 3h。不同树脂用量条件下多糖的脱色率和多糖保留率见图 2。

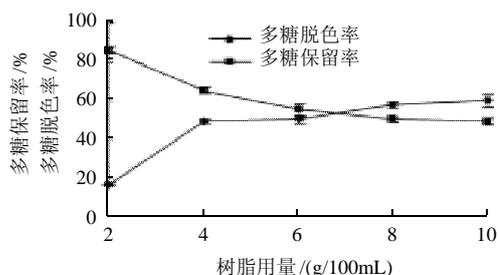


图 2 S-8 树脂用量对胞外多糖脱色效果的影响

Fig.2 Effect of S-8 macroporous resin amount on decolorization efficiency of EPS

由图 2 可知, 随着树脂用量的增加, 脱色率也随之增大, 当树脂用量从 2g/100mL 提高到 4g/100mL 时, 脱色率迅速从 16.84% 增大到 49.96%, 但随着树脂用量的进一步增加, 脱色率虽仍有增长, 但增长幅度已减小, 当树脂用量增加到 8~10g/100mL 时, 脱色率趋于平稳。此现象可能是由于对于一定浓度的溶液, 存在着一个吸附平衡点, 超过这个平衡点, 增加树脂的用量脱色效果并不会会有较大的改善。另外, 从多糖保留率的角度来看, 随着树脂用量的增加, 多糖损失率也

增加,当树脂用量从2g/100mL提高到10g/100mL时,多糖保留率从86.17%下降到49.98%。考虑到脱色剂的成本和多糖保留率,选择4g/100mL的树脂用量进行下一步实验。

2.3 多糖溶液的pH值对脱色效果的影响

分别调节植物乳杆菌胞外多糖溶液(糖液质量浓度2mg/mL)的pH值为4~9,树脂用量4g/100mL,脱色温度为35℃,脱色时间为3h,研究粗多糖溶液的pH值对脱色效果的影响,结果见图3。

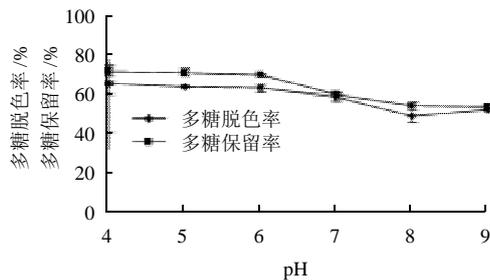


图3 pH值对胞外多糖脱色效果的影响
Fig.3 Effect of sample pH on decolorization efficiency of EPS

由图3可知,在pH4~6的范围内脱色率相差不大,这可能与植物乳杆菌胞外多糖溶液中的色素在偏酸性条件下表现为极性有关,因为S-8树脂为极性树脂,易于吸附极性的物质。偏碱性条件下脱色率较低,这可能是由于在碱性条件下,部分还原糖发生了美拉德反应,故颜色较原来变深,影响了S-8对溶液的脱色效果。多糖保留率的变化趋势与脱色率相似。考虑到过低的pH值可能会造成多糖的水解,因此选择粗多糖溶液的pH值为6进行下一步实验。

2.4 温度对脱色效果的影响

在15~35℃条件下,树脂用量4g/100mL,脱色时间为3h,研究不同脱色温度下S-8树脂对植物乳杆菌胞外多糖溶液(糖液质量浓度2mg/mL,溶液pH值调至6.0)脱色效果的影响,结果见图4。

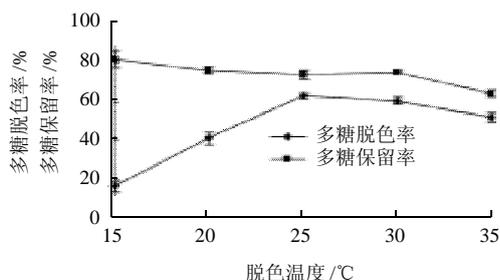


图4 温度对胞外多糖脱色效果的影响
Fig.4 Effect of static adsorption temperature on decolorization efficiency of EPS

由图4可知,温度对脱色率的影响比较大。当温度由15℃提高到25℃时,脱色率随温度的升高而升高,这是因为随着温度的升高,多糖溶液黏度下降,色素分子扩散速度加快,有利于色素的吸附。当温度进一步升高时,脱色率呈下降趋势,因为吸附为一放热过程,当温度超过树脂的最适脱色温度时,色素的解吸速度同样会加快,脱色率随之下降^[12-15]。同时,随着温度的升高,多糖的保留率呈现逐渐下降趋势。综合考虑脱色率、多糖保留率,选择25℃进行进一步的吸附实验。

2.5 吸附时间对脱色效果的影响

以S-8树脂为脱色剂分别对植物乳杆菌胞外多糖溶液(糖液质量浓度2mg/mL,溶液pH值调至6.0)脱色1、2、3、4、5h,树脂用量4g/100mL,温度为25℃。不同脱色时间下多糖脱色率和多糖保留率结果见图5。

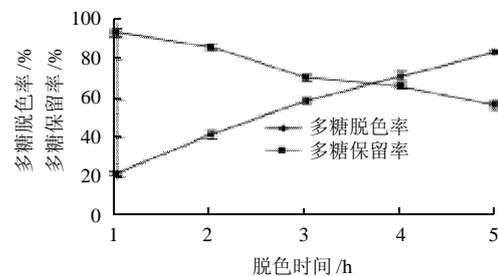


图5 静态吸附时间对胞外多糖脱色效果的影响
Fig.5 Effects of static adsorption time on decolorization efficiency of EPS

由图5可知,静态吸附的时间对多糖脱色率和多糖保留率的影响较大。随着静态吸附时间的延长,脱色效果明显增强,多糖保留率呈快速下降趋势。可见树脂在吸附色素的同时,亦会吸附部分多糖,从而影响多糖的含量。虽然S-8树脂在实验时间内仍未达到吸附与解吸的动态平衡,考虑到吸附时间越长,脱色效果会越好,但多糖保留率下降亦越多,选择4h进行下一步实验。

2.6 多糖溶液的质量浓度对脱色效果的影响

以S-8树脂为脱色剂分别对不同质量浓度(0.5~3mg/mL)的植物乳杆菌胞外多糖溶液(溶液pH值调至6.0)脱色4h,树脂用量4g/100mL,温度为25℃,研究不同多糖质量浓度对脱色效果的影响,结果见图6。

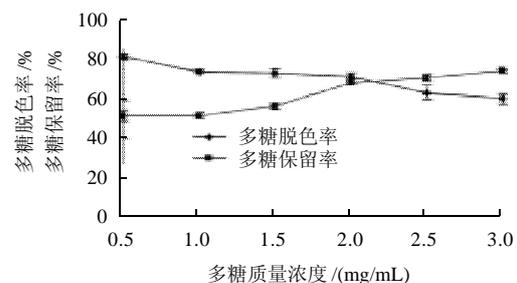


图6 多糖质量浓度对胞外多糖脱色效果的影响
Fig.6 Effect of polysaccharide concentration in samples on decolorization efficiency of EPS

由图 6 可知,随着多糖质量浓度的升高,脱色率不断降低,而多糖保留率则呈现上升趋势,此现象可能是由于对于一定剂量的吸附树脂,吸附位点一定,而随着多糖溶液质量浓度的增加,溶液中的色素和多糖分子的总量也相应增加,从而导致脱色率下降、多糖保留率上升。综合考虑以上因素,选择 2mg/mL 植物乳杆菌胞外多糖溶液作为脱色的质量浓度较适宜。

2.7 多糖的体外抑瘤效应

CCK-8 试剂盒检测结果如表 2 所示,结果表明,无论是脱色后的粗多糖 EPS 或进一步纯化后的单组分 EPS-1、EPS-2 对体外培养的大肠癌细胞 HT-29 的增殖均具有明显的抑制作用,且呈现出良好的量效关系,即随着多糖质量浓度的增加,抑制率逐渐增大,与空白对照组比较效果较为显著($P < 0.01$)。阳性对照 5-Fu 在 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,对肿瘤细胞的抑制率达到 68.51%。多糖组分 EPS-2 的抑制率明显高于 EPS 和 EPS-1,其原因可能与其结构参数(表 3),如分子质量、硫酸化程度、单糖组成等有关^[16],但不同种类的多糖目前尚未发现较为统一的构效关系,其抗肿瘤的机制还有待进一步研究。

表 2 胞外多糖对 HT-29 的体外抑制作用

Table 2 Inhibitory effects of crude EPS, EPS-1 and EPS-2 on HT-29 *in vitro*

组别	质量浓度 /($\mu\text{g/mL}$)	$A_{450\text{nm}}$	抑制率 /%
空白对照组	—	0.360 \pm 0.001	—
阴性对照组	—	1.373 \pm 0.009	—
EPS	25	0.851 \pm 0.027*	15.99
	50	0.837 \pm 0.018*	17.37
	100	0.761 \pm 0.008*	24.88
	200	0.633 \pm 0.030*	37.51
	400	0.546 \pm 0.012*	46.10
EPS-1	25	0.892 \pm 0.011*	11.94
	50	0.835 \pm 0.002*	17.57
	100	0.824 \pm 0.010*	18.66
	200	0.700 \pm 0.045*	30.90
	400	0.610 \pm 0.031*	39.78
EPS-2	25	0.855 \pm 0.021*	15.60
	50	0.66 \pm 0.007*	34.85
	100	0.624 \pm 0.016*	38.40
	200	0.530 \pm 0.039*	47.68
阳性对照组(5-Fu)	400	0.431 \pm 0.014*	57.45
	50	0.319 \pm 0.005*	68.51

注:与空白对照组比较, * $P < 0.01$ 。

表 3 多糖的组成及分子质量

Table 3 Chemical composition, molecular weights and monosaccharide composition of crude EPS, EPS-1 and EPS-2

测定指标	EPS	EPS-1	EPS-2	
蛋白质含量 /%	0.32	1.58	0.82	
糖醛酸含量 /%	3.19	2.09	1.71	
硫酸基含量 /%	nd	nd	nd	
分子质量 /u	—	1.75 $\times 10^4$	1.20 $\times 10^5$	
单糖组成 (物质的量比)	葡萄糖	—	53.24	3.48
	甘露糖	—	10.41	9.61
	半乳糖	—	1	nd
	岩藻糖	—	nd	1

注: nd. 未检出; —. 未测定。

3 结 论

大孔吸附树脂对植物乳杆菌胞外多糖脱色纯化的结果表明:选择 S-8 树脂,树脂用量为 4g/100mL,多糖溶液质量浓度为 2mg/mL,调节多糖溶液的 pH 值为 6.0,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,静态吸附 4h,脱色率为 72.58%,多糖保留率为 69.15%。

多糖对 HT-29 的体外抑瘤实验结果表明:植物乳杆菌胞外多糖 EPS、EPS-1 和 EPS-2 对大肠癌细胞 HT-29 的体外增殖均具有明显的抑制作用,且呈现出良好的量效关系。该研究结果说明植物乳杆菌胞外多糖在抗肿瘤作用方面具有重要的应用潜力,今后需对其抗肿瘤的确切作用机制作进一步地深入研究。

参考文献:

- [1] AI Lianzhong, ZHANG Hao, GUO Benheng, et al. Preparation, partial characterization and bioactivity of exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74(3): 353-357.
- [2] YANG Zhennai, LI Shengyu, ZHANG Xue, et al. Capsular and slime-polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: potential application in fermented milk products [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(1): 53-57.
- [3] LAWS A P, MARSHALL V M. The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 2001, 11(9): 709-721.
- [4] 陈晓红. 乳酸菌胞外多糖的生物合成及其组成和体外抑瘤活性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2003.
- [5] PAN Daodong, MEI Xiuming. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 908-914.
- [6] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356.
- [7] TORINO M I, TARANTO M P, SESMA F, et al. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in response to environmental pH[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(5): 846-852.
- [8] GAO Min, HUANG Wei, LIU Chunzhao. Separation of scutellarin from crude extracts of *Erigeron breviscapus* (vant.) Hand. Mazz. by macroporous resins[J]. Journal of Chromatography B, 2007, 858(1/2): 22-26.
- [9] 梅秀明, 潘道东. 乳酸菌胞外多糖的纯化及对小鼠血清和肝组织抗氧化性的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 220-224.
- [10] 李丹丹, 金征宇. 牛蒡菊糖脱色工艺的研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(8): 241-244.
- [11] 谢红旗, 周春山. 香菇多糖脱色工艺研究[J]. 离子交换与吸附, 2007, 23(2): 158-165.
- [12] 易阳, 张名位, 廖森泰, 等. 龙眼多糖树脂脱色工艺优化[J]. 农业机械学报, 2010, 41(8): 146-150.
- [13] 袁红波, 张劲松, 贾薇, 等. 利用大孔树脂对低分子量灵芝多糖脱色的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(3): 204-206.
- [14] LIU Jun, LUO Jianguang, SUN Yi, et al. A simple method for the simultaneous decoloration and deproteinization of crude levan extract from *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 by macroporous resin[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(15): 6077-6083.
- [15] FU Yujie, ZU Yuangang, LIU Wei, et al. Optimization of luteolin separation from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves by macroporous resins[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1137(2): 145-152.
- [16] 叶红. 马尾藻多糖的分离纯化、生物活性及结构分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.