

产抗氧化胞外多糖海洋细菌的筛选及发酵产糖培养基优化

房耀维¹, 吕明生¹, 徐炜枫², 刘 姝¹, 焦豫良¹, 王淑军^{1,*}

(1. 淮海工学院海洋学院, 江苏省海洋资源研究院, 江苏 连云港 222005;

2. 江苏省农产品质量检验检测中心, 江苏 南京 210036)

摘 要: 从连云港海域分离海洋细菌, 并从中筛选获得一株产抗氧化活性较强的胞外多糖的细菌菌株 OST23a。通过形态学、生理生化鉴定及 16S rRNA 分析, 将菌株 OST23a 鉴定为 *Bacillus subtilis*。采用单因素试验确定菌株 OST23a 发酵产胞外多糖的最佳碳、氮源和金属离子分别为正己烷、酵母提取物和 CaCl₂。采用正交试验确定了菌株 OST23a 产胞外多糖培养基的配方为: 正己烷 1.5%、酵母提取物 0.1%、K₂HPO₄ 0.3%、KH₂PO₄ 0.1%、CaCl₂ 0.1%。菌株在该培养基产胞外多糖可达到 9.06mg/L。

关键词: 海洋细菌; 胞外多糖; 抗氧化活性; 筛选; 培养基优化

Screening and Optimization of Fermentation Medium of an Antioxidant Exopolysaccharide-producing Marine Strain

FANG Yao-wei¹, LÜ Ming-sheng¹, XU Wei-feng², LIU Shu¹, JIAO Yu-liang¹, WANG Shu-jun^{1,*}

(1. Jiangsu Marine Resources Development Research Institute, School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 2. Jiangsu Agro-product Quality Test Center, Nanjing 210036, China)

Abstract: In this study, a marine strain named OST23a with the ability to produce antioxidant exopolysaccharide (EPS) was screened out of the strains isolated from the samples of sea water or sea mud collected from the sea area near Lianyungang. The strain OST23a was identified as *Bacillus subtilis* according to its morphological, physiological, biochemical characteristics and 16S rRNA sequence. The EPS produced by this strain exhibited an obvious antioxidant activity. The optimal carbon and nitrogen sources as well as metal ion for the production of EPS were determined to be n-hexane, yeast extract and CaCl₂ by single-factor experiments. The optimal formula of fermentation medium for the production of EPS by OST23a were explored to be 1.5% n-hexane, 0.1% yeast extract, 0.3% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, and 0.1% CaCl₂ by orthogonal array experiments. The productivity of EPS was up to 9.06 mg/L using this optimal medium.

Key words: marine strain; EPS; antioxidant activity; screening; medium composition

中图分类号: TS202.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0276-05

微生物胞外多糖(extracellular polysaccharides, EPS)是由微生物产生后分泌到细胞外的长链、高分子质量聚合物。由于微生物胞外多糖具有包括抗氧化活性在内的多种生物活性, 并且安全无毒、易于纯化和连续发酵生产, 因此成为人们研究的热点^[1-2]。目前报道较多的抗氧化微生物胞外多糖是海藻多糖和真菌多糖, 而细菌多糖研究较少。海洋的高盐、高压、低温、寡营养等特殊环境赋予海洋微生物代谢产物多样性、新颖性和

独特性。海洋微生物胞外多糖往往具有独特的生化结构和生物学活性^[3-4]。本实验从连云港海域筛选抗氧化活性的微生物胞外多糖高产菌株, 对菌株进行生理生化及 16S rDNA 序列分析鉴定, 对菌株发酵产胞外多糖的条件进行研究, 为微生物胞外多糖的应用提供实验指导。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

收稿日期: 2010-08-24

基金项目: 江苏省高校自然科学基金面上项目(08KJB550001)

作者简介: 房耀维(1978—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为海洋微生物生物技术。E-mail: foroei@yahoo.cn

* 通信作者: 王淑军(1964—), 女, 教授, 博士, 研究方向为海洋微生物活性物质。E-mail: shujunwang@163.com

海泥及海水样品采集于连云港连岛海域。

胰蛋白胨、酵母提取物 英国 Oxoid 公司; 基因组提取试剂盒 大连宝生物公司; dNTP、琼脂糖、*Taq* 酶 美国 BBI 公司; 还原型辅酶(NADH) 美国 Sigma 公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

2216E 液体培养基(%): 胰蛋白胨 0.5、酵母提取物 0.1、海水配制, pH7.0, 固体培养基添加 2% 琼脂; 种子培养基(%): 葡萄糖 1、胰蛋白胨 0.5、酵母提取物 0.1、海水配制, pH7.0, 固体培养基添加 2% 琼脂; 发酵培养基(%): 葡萄糖 1、胰蛋白胨 0.5、酵母提取物 0.1、 K_2HPO_4 0.3、 KH_2PO_4 0.1、 $MgSO_4$ 0.05、海水配制, pH7.0。

1.2 仪器与设备

PHS-3C 型精密酸度计 上海精密科学仪器厂; 680 ELX-800 酶标仪、Gel Doc 2000 凝胶成像系统 美国 Bio-Rad 公司; Centrifuge 5804R 高速冷冻离心机 美国 Eppendorf 公司; DV-I Prime 黏度计 美国 Brookfield 公司。

1.3 产抗氧化胞外多糖菌株的筛选

1.3.1 连云港海域海洋细菌的筛选

将取自连云港连岛海域的海水 1mL、潮间带海泥 1g 添加到 250mL 三角瓶装有 50mL 的 2216E 培养基中, 28℃、160r/min 培养 36h 后, 将培养液稀释 10^6 倍, 吸取 10~100 μ L 涂布 2216E 培养基平板。在 28℃ 培养箱中培养 2d, 观察菌落颜色、形态, 划线纯化至纯种后保藏备用。

1.3.2 产胞外多糖产生菌的初筛

初筛获得的菌株接种到种子培养基, 28℃、160r/min 培养 24h 后, 以 1% 接种量接种至发酵培养基, 28℃、160r/min 培养 36h 后, 测定发酵液黏度和 OD_{600nm}, 从中选择黏度/OD_{600nm} 比值最高的 12 株菌备用。所有实验设 3 个重复。

1.3.3 高产胞外多糖产生菌的复筛

将上述发酵液 $8000 \times g$ 离心 10min, 取 20mL 上清液加 3 倍体积的 95% 乙醇, 4℃ 沉淀过夜, $10000 \times g$ 离心 20min, 所得沉淀用蒸馏水定容到 20mL, 获得粗胞外多糖, 测定粗多糖含量。

1.3.4 多糖含量的测定

采用苯酚-硫酸显色法测定多糖含量^[5]。

1.3.5 抗氧化胞外多糖产生菌的筛选

复筛获得高产胞外多糖菌株后, 将所有菌株的粗多糖质量浓度稀释至 0.05g/L, 测定 1.3.3 节所获得的粗胞外多糖清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和羟自由基($\cdot OH$)能力。

1.3.6 对 $O_2^{\cdot-}$ 清除能力的测定^[6]

采用氮蓝四唑(NBT)法。配制 50mmol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液(含 150 μ mol/L 的 NBT)、60 μ mol/L 的吩嗪硫酸甲脂(PMS)、468 μ mol/L 的 NADH, 量取 1mL 该缓冲液加入 1mL 1.3.5 节所获得的粗胞外多糖溶液, 25℃ 反应 5min, 然后在波长 560nm 处测定吸光度(A_i)。对照液以 1mL 蒸馏水代替待测液, 测定其吸光度(A_{01})。 $O_2^{\cdot-}$ 清除能力用 TR 表示, 通过式(1)计算。

$$TR/\% = \frac{A_{01} - A_i}{A_{01}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.7 对 $\cdot OH$ 清除能力的测定^[7]

采用 α -脱氧核糖氧化法。准确量取 0.2mL $FeSO_4$ -EDTA 混合液(10mmol/L)移至具塞试管中, 加入 10mmol/L 2-脱氧核糖溶液 0.2mL, 再加入 1.0mL 不同质量浓度的 1.3.5 节所获得的粗胞外多糖溶液, 随后用磷酸盐缓冲液(pH7.4)定容至 1.8mL, 最后加入 10mmol/L 过氧化氢溶液 0.2mL, 混合均匀后将该体系置于 37℃ 恒温水浴中 1h, 取出, 再向该体系加入 1.0mL 2.8% 的三氯乙酸溶液(TCA), 1.0mL 1.0% 的硫代巴比妥酸溶液(TBA), 混合均匀后于水浴中反应 10min, 取出, 冷水冷却, 在 532nm 波长处测定该体系的吸光度 A_s 。对照液以 1.0mL 蒸馏水代替待测液, 测定吸光度 A_{02} 。

对 $\cdot OH$ 的清除能力用 SA 表示, 通过式(2)计算。

$$SA/\% = \frac{A_{02} - A_s}{A_{02}} \times 100 \quad (2)$$

1.4 细菌鉴定

对菌株进行形态学及生理生化鉴定^[8]。进一步对菌株 16S rRNA 进行扩增, 序列测定后 Blast 搜索同源序列并构建进化树^[9]。

1.5 培养基成分对胞外多糖产量的影响

1.5.1 碳源对胞外多糖产量的影响

发酵培养基其他成分以及发酵条件不变, 分别用 1% 的果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、可溶性淀粉、正己烷替换培养基中的葡萄糖和蛋白胨, 用苯酚-硫酸法测定胞外多糖产量确定最佳碳源。实验设 3 个重复, 下同。

1.5.2 氮源对胞外多糖产量的影响

发酵培养基其他成分以及发酵条件不变, 分别用 0.1% 的牛肉膏、硝酸钾、硫酸铵、尿素、酪蛋白替换培养基中的酵母提取物, 用苯酚-硫酸法测定胞外多糖产量确定最佳氮源。

1.5.3 金属离子对胞外多糖产量的影响

发酵培养基其他成分以及发酵条件不变，分别用 0.05% 的 MnSO_4 、 FeSO_4 、 CuSO_4 、 ZnSO_4 、 CaCl_2 替换培养基中的 MgSO_4 ，用苯酚-硫酸法测定胞外多糖产量，确定最佳金属离子。

1.5.4 正交试验设计

以正己烷、酵母提取物、 CaCl_2 为因素进行 $L_9(3^3)$ 正交试验设计。

1.6 数据处理与统计

采用 SPSS 13.0 软件对数据进行标准差分析。

2 结果与分析

2.1 产抗氧化胞外多糖菌株的筛选

通过 2216E 培养基平板对所采样品中海洋细菌进行分离，获得菌株 389 株。研究表明，产胞外多糖菌株使发酵液黏度增加，并呈一定的相关性。用 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 测定生物量，二者的比值可以衡量菌株产胞外多糖的能力。对 389 株海洋细菌发酵液黏度和 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 进行测定，比值最高的 12 株菌的测定结果如表 1 所示。在黏度/ $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 比值最高的 12 株菌中，不同菌株的黏度/ $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 和多糖之间相关性较差，这可能是由于不同菌株使发酵液变黏稠的原因不同，或者即使都是多糖导致的黏稠度增加，不同菌株多糖的种类亦有差别，因此造成相关性较差，因此黏度只能作为多糖产生菌株筛选的初筛指标。GDM21 产粗多糖的能力最高，但是该多糖检测不到对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 的清除能力。结合产多糖能力及对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 清除能力，选取菌株 OST23a 作为出发菌株进行进一步研究。

2.2 菌种鉴定

表 2 菌株 OST23a 形态、生长特性及生理生化特征
Table 2 Morphological, physiological and biochemical characteristics of strain OST23a

| 特征 | 结果 | 特征 | 结果 |
|------------------------|---------------|------------|----|
| 形态 | | 柠檬酸盐实验 | + |
| 形状 | 杆状 | 硝酸盐还原 | + |
| 色素 | — | 水解利用 | |
| 革兰氏染色 | — | 三丁酸甘油酯 | + |
| 芽孢 | — | 明胶 | + |
| 鞭毛 | + | 吐温-80 | + |
| 培养 | | 淀粉 | — |
| 最适生长温度及生长范围 | 30℃，10~40℃ | 酪蛋白 | — |
| 最适生长 pH 值及生长范围 | 9.0，4.0~12.0 | 糖发酵 | |
| 最适生长 NaCl 质量浓度及生长范围 | 24g/L，0~70g/L | 葡萄糖 | + |
| 厌氧生长 | — | 蔗糖 | + |
| 生化特征 | | 甘油 | + |
| 产 H_2S | — | 乳糖 | + |
| 荧光 | — | 果糖 | + |
| 接触酶 | + | 蔗糖 | + |
| 氧化酶 | — | 麦芽糖 | + |
| VP | + | 木糖 | + |
| MR | — | 甘露醇 | + |
| 尿素利用 | — | 纤维糖 | — |
| 吲哚 | — | | |

对菌株 OST23a 进行形态学及生理生化鉴定，结果如表 2 所示，对照文献[8]，初步将菌株 OST23a 鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。对该菌株扩增的部分 16S rRNA 序列(GenBank HQ141318)长度为 1345bp，经 Blast 比对，与之相似度最高的菌株均为 *Bacillus* sp.；其中与 *Bacillus subtilis* 的 16S rRNA (AF142577) 相似度最高。选取相似度最高的部分序列，经 Clustal X 多序列比对

表 1 抗氧化活性多糖产生菌的筛选($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 1 Screening of marine strains with the ability to produce antioxidant EPS ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

| 菌株 | 黏度/(Pa·s) | $\text{OD}_{600\text{nm}}$ | 黏度/ $\text{OD}_{600\text{nm}}$ | 粗多糖产量/(mg/L) | 清除率/% | |
|---------|--------------|----------------------------|--------------------------------|--------------|---------------------|------------------|
| | | | | | $\text{O}_2\cdot^-$ | $\cdot\text{OH}$ |
| LDM21 | 2.79 ± 0.11 | 2.12 ± 0.10 | 1.41 | 5.66 ± 0.26 | 18.31 ± 1.22 | 35.62 ± 1.68 |
| LDM131 | 2.76 ± 0.12 | 1.98 ± 0.11 | 1.55 | 4.92 ± 0.27 | — | — |
| LDM135 | 2.83 ± 0.12 | 2.02 ± 0.10 | 1.48 | 6.01 ± 0.23 | — | — |
| LDM1521 | 2.79 ± 0.13 | 1.32 ± 0.12 | 1.48 | 5.93 ± 0.22 | 27.91 ± 1.83 | 45.87 ± 2.65 |
| OST23a | 2.88 ± 0.11 | 1.82 ± 0.09 | 1.58 | 5.99 ± 0.23 | 38.3 ± 2.6 | 55.56 ± 2.11 |
| OSTK93 | 2.91 ± 0.14 | 1.76 ± 0.11 | 1.66 | 5.66 ± 0.23 | — | — |
| OSTK95 | 2.80 ± 0.12 | 1.83 ± 0.13 | 1.53 | 5.46 ± 0.22 | 31.12 ± 1.79 | 44.6 ± 2.1 |
| OSTK102 | 2.81 ± 0.12 | 2.00 ± 0.12 | 1.46 | 5.62 ± 0.26 | 12.78 ± 1.16 | 25.33 ± 1.20 |
| GDM0 | 2.73 ± 0.11 | 2.10 ± 0.13 | 1.59 | 6.00 ± 0.26 | — | — |
| GDM21 | 2.80 ± 0.13 | 1.76 ± 0.12 | 1.59 | 6.13 ± 0.24 | — | — |
| GDM29 | 2.80 ± 0.12 | 1.79 ± 0.11 | 1.57 | 5.87 ± 0.23 | 21.90 ± 1.52 | 37.41 ± 1.98 |
| GDM51 | 2.915 ± 0.12 | 2.12 ± 0.11 | 1.54 | 5.97 ± 0.23 | 30.13 ± 1.77 | 40.45 ± 1.90 |

注：—，无活性检出。

表3 培养基中碳源对多糖产量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 3 Effect of carbon source type on EPS production ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

| 碳源 | 果糖 | 蔗糖 | 麦芽糖 | 乳糖 | 可溶性淀粉 | 正己烷 | 葡萄糖+蛋白胨 |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 胞外多糖产量/(mg/L) | 3.35 ± 0.13 | 2.66 ± 0.12 | 5.81 ± 0.38 | 4.09 ± 0.22 | 4.12 ± 0.23 | 6.15 ± 0.26 | 5.99 ± 0.19 |

表4 培养基中氮源对多糖产量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 4 Effect of nitrogen source type on EPS production ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

| 氮源 | 牛肉膏 | 硫酸铵 | 酪蛋白 | 酵母提取物 | 硝酸钾 | 尿素 |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 胞外多糖产量/(mg/L) | 4.68 ± 0.18 | 1.23 ± 0.08 | 4.52 ± 0.19 | 5.99 ± 0.23 | 1.02 ± 0.06 | 1.32 ± 0.09 |

后,利用 Mega4.0 软件的 Neighbour-Joining 方法构建系统发育树,结果如图 1 所示。菌株 OST23a 与菌株 *Bacillus subtilis* (AF142577) 的 16S rDNA 位于同一簇群,亲缘关系最近。结合形态学及生理生化特征将菌株鉴定为 *Bacillus subtilis*。目前报道的产抗氧化多糖的微生物主要有 *Lactococcus lactis*^[10]、*Keissleriella* sp.^[11]、*Paenibacillus polymyxa*^[12]、*Penicillium* sp.、*Epicoccum nigrum*^[3]、*Bacillus* sp.亦有报道,该菌株筛选于新疆罗布泊沙漠^[13]。

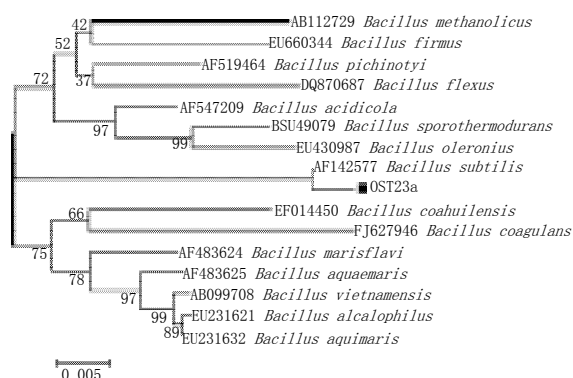


图1 利用 16S rDNA 同源序列和邻接法(Neighbor-Joining)构建的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree based on homologous sequences of 16SrRNA and Neighbor-Joining analysis

2.3 培养基成分对胞外多糖产量的影响

2.3.1 碳源对胞外多糖产量的影响

由表 3 可见,在供试的碳源中,葡萄糖和蛋白胨利于胞外多糖的产生,正己烷为碳源时,多糖产量最高,这可能是由于正己烷为有机溶剂,具有一定的极性(极性常数 3.5),菌株通过产生多糖来抵御有机溶剂对细胞造成的危害,所以多糖产量增加,但是正己烷并不是菌株生长的最佳碳源,生物量减少,因此多糖产量增加不明显。

2.3.2 氮源对胞外多糖产量的影响

由表 4 可知,供试氮源中,无机氮不利于多糖的

产生,有机氮中酵母提取物为氮源时胞外多糖产量最高,达到 5.99mg/L。氮源主要通过影响微生物的生长速率影响多糖、酶等代谢产物的分泌。无机氮源不利于微生物的生长,使生物量减少,导致胞外多糖产量下降。

2.3.3 金属离子对胞外多糖产量的影响

表5 培养基中金属离子对多糖产量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 5 Effect of metal ions on EPS production ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

| 金属离子 | MnSO ₄ | FeSO ₄ | CuSO ₄ | MgSO ₄ | ZnSO ₄ | CaCl ₂ |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 多糖产量/(mg/L) | 4.68 ± 0.18 | 2.12 ± 0.08 | 4.52 ± 0.19 | 5.99 ± 0.24 | 4.21 ± 0.24 | 6.12 ± 0.26 |

由表 5 可见, CaCl₂ 可以提高多糖产量。有研究表明, CaCl₂ 可以提高酵母、地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌产多糖的能力^[14-15]。

2.3.4 正交试验

表6 优选产 EPS 条件正交试验结果

Table 6 Results of orthogonal array design experiments for optimizing fermentation medium formula

| 序号 | 因素 | | | 胞外多糖产量/(mg/L) |
|----------------|---------|-----------|------------------------|---------------|
| | A 正己烷/% | B 酵母提取物/% | C CaCl ₂ /% | |
| 1 | 0.5 | 0.05 | 0.025 | 4.69 |
| 2 | 0.5 | 0.1 | 0.05 | 5.37 |
| 3 | 0.5 | 0.15 | 0.1 | 5.22 |
| 4 | 1.0 | 0.05 | 0.05 | 5.03 |
| 5 | 1.0 | 0.1 | 0.1 | 6.82 |
| 6 | 1.0 | 0.15 | 0.025 | 4.26 |
| 7 | 1.5 | 0.05 | 0.1 | 6.29 |
| 8 | 1.5 | 0.1 | 0.025 | 4.65 |
| 9 | 1.5 | 0.15 | 0.05 | 5.52 |
| K ₁ | 15.28 | 16.01 | 13.60 | |
| K ₂ | 16.11 | 16.84 | 15.92 | |
| K ₃ | 16.46 | 15.00 | 18.33 | |
| R | 1.18 | 1.84 | 4.73 | |

由表 6 可知,培养基产胞外多糖最佳正己烷、酵母提取物、CaCl₂ 条件为 A₃B₂C₃,即正己烷、酵母提

取物、CaCl₂ 质量分数分别为 1.5%、0.1% 和 0.1%。从极差 *R* 的大小看出, 因素 C(CaCl₂) 是影响胞外多糖产量最大的因素, 其次是因素 B(酵母提取物), 因素 A(正己烷) 极差最小。对本试验确定的最佳培养基组分进行验证实验, 结果表明该菌株胞外多糖产量能维持在 9.06mg/L 左右。

3 结 论

从连云港海域细菌中筛选获得一株产抗氧化活性较强胞外多糖的细菌菌株 OST23a, 通过形态学、生理生化及 16S rRNA 分析, 将菌株 OST23a 鉴定为 *Bacillus subtilis*。该菌株分泌的胞外多糖对 ·OH 和 O₂⁻· 有较好的清除效果, 具有潜在的食品及医药应用价值。培养基中的碳、氮源及金属离子对菌株 OST23a 发酵产胞外多糖的影响研究发现, 最佳碳、氮源分别为正己烷和酵母提取物, CaCl₂ 可以提高胞外多糖产量。利于胞外多糖产量积累的发酵培养基配方为: 正己烷 1.5%、酵母提取物 0.1%、K₂HPO₄ 0.3%、KH₂PO₄ 0.1%、CaCl₂ 0.1%。在此培养基中 28℃、160r/min 培养 36h 后胞外多糖产量可达 9.06mg/L。

参考文献:

- [1] SATPUTE S K, BANAT I M, DHAKEPHALKAR P K, et al. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28: 436-450.
- [2] LUO Dianhui, FANG Baishan. Structural identification of ginseng polysaccharides and testing of their antioxidant activities[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 72: 376-381.
- [3] LIU Jun, LUO Jianguang, YE Hong, et al. Production, characterization and antioxidant activities *in vitro* of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78: 275-281.
- [4] CHI Zhengming, FANG Yan. Exopolysaccharides from marine bacteria [J]. Journal of Ocean University of China, 2005, 4(1): 67-74.
- [5] HARRAH T, PANILAITIS B, KAPLAN D. Microbial exopolysaccharides[J]. Prokaryotes, 2006(1): 766-776.
- [6] 张维杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2 版. 杭州: 浙江大学出版社, 2006: 11-12.
- [7] 李朝阳, 刘魁, 韩忠宵, 等. 大蒜多糖的酶法提取及其抗氧化性研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(11): 117-120.
- [8] BREED E G, MURRAY D, SMITH N R. Berger's manual of determinative bacteriology[M]. 9th ed. USA, Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1994: 353-376.
- [9] FANG Yaowei, LU Zhaoxin, LU Fengxia, et al. A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 produced organic solventstable lipase[J]. Current Microbiology, 2006, 53: 510-515.
- [10] 梅秀明, 潘道东. 乳酸乳球菌胞外多糖的分离及其体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(1): 232-235.
- [11] SUN Cheng, WANG Jianwen, FANG Lei, et al. Free radical scavenging and antioxidant activities of EPS2, an exopolysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Keissleriella* sp. YS 4108[J]. Life Sciences, 2004, 75(9): 1063-1073.
- [12] 孙海红. 三株海洋微生物中胞外多糖的分离、结构和抗氧化活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [13] 袁建锋, 蔡恒, 单咸旸, 等. 一株芽孢杆菌胞外多糖的分离纯化及其抗氧化性测定[J]. 微生物学通报, 2009(10): 20-24.
- [14] 包怡红, 梁雪, 李锐达, 等. 产胞外多糖酵母菌株的筛选鉴定及发酵产糖[J]. 微生物学报, 2010, 50(2): 278-283.
- [15] 韩洁, 谢和, 赵杰宏. 枯草芽孢杆菌胞外多糖的快速测定与发酵条件优化[J]. 食品科技, 2007(6): 210-213.