

抗氧化紫球藻胞外多糖酶解物制备工艺优化

Optimization on the enzymatic preparation of extracellular polysaccharide from *Porphyridium creuntum* with antioxidant activities *in vitro*

董乐^{1,2,3} 何静艳^{1,2,3} 郑婷婷^{1,2,3} 戴聪杰^{1,2,3}
DONG Le^{1,2,3} HE Jing-yan^{1,2,3} ZHENG Ting-ting^{1,2,3} DAI Cong-jie^{1,2,3}
黄卫红^{1,2,3} 李元跃⁴
HUANG Wei-hong^{1,2,3} LI Yuan-yue⁴

(1. 泉州师范学院海洋与食品学院, 福建 泉州 362000; 2. 泉州师范学院福建省海洋藻类活性物质制备与功能开发重点实验室, 福建 泉州 362000; 3. 泉州师范学院近海资源生物技术福建省高校重点实验室, 福建 泉州 362000; 4. 集美大学福建省海洋渔业资源与生态环境重点实验室, 福建 集美 361000)
(1. College of Ocean and Food Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou, Fujian 362000, China; 2. Fujian Province Key Laboratory for the Development of Bioactive Material from Marine Algae, Quanzhou, Fujian 362000, China; 3. Key Laboratory of Inshore Resources and Biotechnology, Fujian Province University, Quanzhou, Fujian 362000, China; 4. Key Laboratory of Marine Fisheries Resources and Environment of Fujian Province, Jimei, Fujian 361000, China)

摘要:以紫球藻胞外多糖为原料, $\cdot\text{OH}$ 清除率为评价指标, 依据单因素试验, 利用 Box-Behnken 中心组合试验和响应面分析法, 对 EPS 粗品的酶解工艺进行优化, 并评价 EPS 粗品酶解前后的抗氧化活性。结果表明, EPS 粗品酶解最佳工艺参数为: 酶解时间 6.3 h, 酶解 pH 8.0, 酶解温度 63 $^{\circ}\text{C}$, 酶添加量(酶/底物) 2.7 U/mg, 酶解液对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率达到 $(70.64 \pm 0.38)\%$; 优化酶解条件下酶解产物的抗氧化活性显著提高, 酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 、DPPH $\cdot$ 、ABTS $^{+}\cdot$ 和 $\text{O}_2^{-}\cdot$ 的半数清除浓度(IC_{50}) 分别为 (1.67 ± 0.58) 、 (1.08 ± 0.01) 、 (0.64 ± 0.01) 、 (4.16 ± 0.01) mg/mL。

关键词: 紫球藻; 胞外多糖; 酶解; 抗氧化活性

Abstract: The optimum enzymatic conditions of extracellular polysaccharide of *Porphyridium creuntum* (EPS) were investigated in this research. Based on the results of single factor experiment, by using the Box-Behnken response surface method array design, the op-

timum conditions for hydrolyzing EPS to obtain antioxidant hydrolysates with the highest hydroxyl radical scavenging activity were as follows: enzymolysis reaction time 6.3 h, enzymolysis reaction pH 8.0, enzymolysis temperature 63 $^{\circ}\text{C}$, and enzyme-to-substrate ratio 2.7 U/mg. Under the conditions, the scavenging rate of hydroxyl radical was 70.64%. Subsequently, the antioxidant activity of the enzymatic hydrolysates were determined *in vitro*. The results showed that the enzymatic hydrolysates had good scavenging abilities on $\cdot\text{OH}$, DPPH $\cdot$, ABTS $^{+}\cdot$ and $\text{O}_2^{-}\cdot$, the half-scavenging concentration values of the crude hydrolysates against $\cdot\text{OH}$, DPPH $\cdot$, ABTS $^{+}\cdot$ and $\text{O}_2^{-}\cdot$ radicals were (1.67 ± 0.58) mg/mL, (1.08 ± 0.01) mg/mL, (0.64 ± 0.01) mg/mL and (4.16 ± 0.01) mg/mL respectively.

Keywords: *Porphyridium creuntum*; extracellular polysaccharide; enzymatic hydrolysis; antioxidant activity

基金项目: 福建省教育厅科技计划项目(编号:JK2013039); 2014 年福建省引导性科技项目(编号:2014N0017); 2013 年泉州市“海纳百川”高端人才聚集计划高端海洋人才引进资助项目; 2014 年福建省海洋渔业资源与生态环境重点实验室开放基金(编号:fjmf2014008); 2017 年国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:201710399002)

作者简介: 董乐, 男, 泉州师范学院教授, 硕士。

通信作者: 戴聪杰(1966—), 男, 泉州师范学院教授, 博士。

E-mail: congjielai501@163.com

收稿日期: 2017-10-17

紫球藻(*Porphyridium cruentum*)是红藻门中发现的唯一一种单细胞藻类, 在生长稳定期后会大量合成并向胞外分泌一种分子量较大的磺酸化多糖, 其相对分子质量可以达到 $2 \times 10^6 \sim 7 \times 10^6$ [1]。研究表明, 紫球藻胞外磺酸化多糖(Extracellular polysaccharide of *Porphyridium creuntum*, EPS)具有抗病毒、降血脂、抗辐射和降胆固醇等生物活性 [2-5], 在离体和在体条件下均具有抗炎特性 [6]; EPS 对 $\cdot\text{OH}$ 、DPPH $\cdot$ 和 $\text{O}_2^{-}\cdot$ 有一定的清除能力 [7-9], 其降解产品具有良好的吸

湿和保湿性能,且与分子量呈正相关^[9]。天然的 EPS 由于分子量大、黏度较高、溶解性差,使其生物学构象和生物活性的研究受到一定的限制。多糖构效关系研究^[10]表明多糖的生理活性随着其由高分子量被降解为低分子量而得到显著提高。EPS 降解的研究多采用过氧化氢和辅助超声波的方法^[11-13],未见酶法降解 EPS 的报道。

本课题组前期从非洲大蜗牛消化道中分离出一种混合酶,酶自身无抗氧化能力,但 EPS 经其酶解后产物的抗氧化能力显著提高。本研究拟以该混合酶为酶制剂,以羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率为综合评价指标,对 EPS 的酶解工艺进行优化,并评价 EPS 粗品酶解前后的抗氧化活性,以期为 EPS 在功能性食品和药品方面的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料与试剂

紫球藻藻种:中国科学院海洋研究所藻种库;

非洲大蜗牛消化道中制备的混合酶:1 874.52 U/g,泉州师范学院福建省海洋藻类活性物质制备与功能开发重点实验室。

1.1.2 主要仪器设备

台式高速离心机:Allegra 64R 型,美国贝克曼库尔特有限公司;

恒温水浴锅:HH-6D 型,金坛市城东宏业实验仪器厂;

紫外可见分光光度计:UV-1200 型,上海美谱达仪器有限公司;

冷冻干燥机:FDU-2110 型,上海纪革森实业有限公司;

旋转蒸发仪:W2-100S 型,上海申生科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 EPS 粗品的提取 取紫球藻的 KOCH 培养液,4 000 r/min 离心 20 min,留上清液,旋转蒸发浓缩(45℃),加入 3 倍体积无水乙醇醇析过夜,4 000 r/min 离心 10 min,收集醇析物,真空冷冻干燥(-80℃,-5 Pa,48 h),得 EPS 粗品。

1.2.2 酶解液的制备工艺 取一定量 EPS 粗品配成水溶液,依次调节酶解温度、酶解时间、酶解 pH 值、酶添加量(酶/底物)、保温酶解(不断调节 pH 值,使酶解过程在初始 pH 值下进行)一定时间后,沸水浴灭酶活 10 min,10 000 r/min 离心 10 min,得酶解液。

1.2.3 单因素试验 通过预试验确定酶解 EPS 粗品单因素试验的基本条件为:酶解温度 65℃、酶解时间 6 h、酶解 pH 值 7.0 以及酶添加量(酶/底物, E/S)2.8 U/mg。通过固定其他条件只改变其中一个条件来分析各单因素对酶解产物清除 $\cdot\text{OH}$ 能力的影响^[14]。

(1) 酶解温度:酶解温度分别选取 25,35,40,45,55,60,65,70,75℃,在酶解时间 6 h,酶解 pH 值 7.0,酶添加量 2.8 U/mg 的条件下,测定 EPS 粗品酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率。

(2) 酶解时间:在酶解温度 65℃,pH 值 7.0,酶添加量 2.8 U/mg 的条件下,分别酶解 2,3,4,5,6,7 h,测定 EPS 粗

品酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率。

(3) 酶解 pH 值:酶解 pH 分别选用 4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,在酶解温度 65℃,酶解时间 6 h,酶添加量 2.8 U/mg 的条件下,测定 EPS 粗品酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率。

(4) 酶添加量:酶添加量分别选用 0.1,0.7,1.4,2.0,2.8 U/mg,在酶解温度 65℃,酶解时间 6 h,pH 值 8.0 的条件下,测定 EPS 粗品酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率。

1.2.4 Box-Behnken 响应面优化试验 根据单因素试验结果,采用统计软件 Design-Expert 8.0.6 中 Box-Behnken Design 试验设计原理^[15-16],以 $\cdot\text{OH}$ 清除率为响应值,确定中心点试验是自变量取值为试验设计水平中值,非中心点试验为其他取值,重复 5 次中心点试验,以估计试验误差。

1.2.5 EPS 粗品酶解产物的制备 以响应面最佳优化参数酶解 EPS 粗品得酶解液,10 000 r/min 离心 5 min,Sevage 法除蛋白^[17-18]后,4 000 r/min 离心 10 min,上清液旋转蒸发浓缩(45℃),加入 3 倍体积无水乙醇醇析过夜,4 000 r/min 离心 10 min,收集醇析物,真空冷冻干燥(-80℃,-5 Pa,48 h),得 EPS 酶解产物。

1.2.6 EPS 粗品酶解前后抗氧化活性的测定

(1) $\cdot\text{OH}$ 清除能力:参考文献[14]。

(2) DPPH $\cdot$ 清除能力:参考文献[19]。

(3) ABTS $^{+}$ $\cdot$ 清除能力:参考文献[20]。

(4) O_2^{-} $\cdot$ 清除能力:参考文献[21]。

1.3 数据处理

所有试验至少重复 3 次,用 Microsoft Excel 进行数据整理,所得数据以均值±标准差表示。不同平均值之间的差异显著性检验采用 SPSS 11.5 统计软件中的邓肯氏多重比较法进行。显著差异水平 $P<0.05$,极显著差异水平 $P<0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 酶解温度 由图 1 可知,EPS 粗品酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率随酶解温度的升高呈先上升后下降的趋势。当酶解温度升至 65℃时,EPS 粗品酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率达到最大值。酶解过程中,酶催化反应的速度和酶的稳定性会受到温度的影响。随着温度的升高,反应速度会加快,但

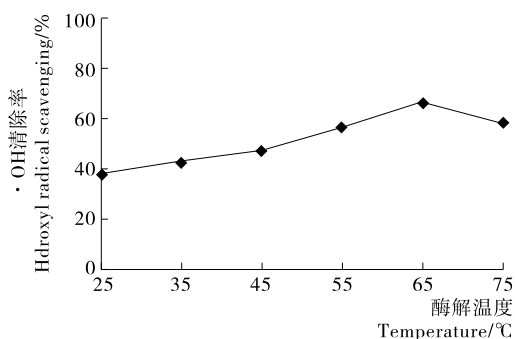


图 1 酶解温度对 EPS 粗品酶解产物 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的影响

Figure 1 Effect of enzymolysis temperature on hydroxyl radical scavenging activity of the enzymatic hydrolysates

温度过高会导致酶失活以及变性,从而影响反应速度。因此,最佳酶解温度选取 65 ℃。

2.1.2 酶解时间 由图 2 可知, EPS 粗品酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率随酶解时间的延长先增大后减小,在 6 h 时达到最大值。酶解时间大于 6 h 后,由于大部分 EPS 粗品已被酶解,且酶活力逐渐下降,酶解产物不再随时间的延长而增加,酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率开始下降。因此,酶解时间选取 6 h 为宜。

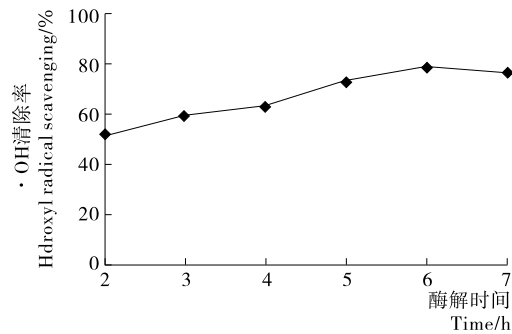


图 2 酶解时间对 EPS 粗品酶解产物 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的影响

Figure 2 Effect of enzymolysis time on hydroxyl radical scavenging activity of the enzymatic hydrolysates

2.1.3 酶解 pH 由图 3 可知,酶解体系中 pH 对酶解效果有显著的影响。当酶解 pH 在 4.0~8.0 时,随 pH 的升高 EPS 粗品酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率急剧增大,pH 8.0 时达到最大值,随后快速下降。这是因为不同的酶对应不同的最适 pH,过酸过碱都会使酶失活。所以酶解 pH 选择 8.0。

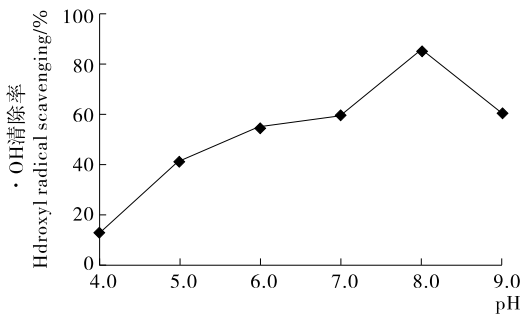


图 3 酶解 pH 对 EPS 粗品酶解产物 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的影响

Figure 3 Effect of enzymolysis pH on hydroxyl radical scavenging activity of the enzymatic hydrolysates

2.1.4 酶添加量 由图 4 可知, EPS 粗品酶解产物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率随酶添加量的增加逐渐增加,可能是酶量的增加而可提高其水解能力,从而使酶解产物中对 $\cdot\text{OH}$ 清除活性强的组分增加。但考虑到试验条件的可控性和重现性,酶添加量选择 2.8 U/mg 为佳。

2.2 Box-Behnken 响应面试验

在单因素试验的基础上,利用响应面分析法对 EPS 粗品酶解工艺条件进行优化,因素水平见表 1。

利用软件 Design-Expert 8.0.6 对试验结果(表 2)进行多

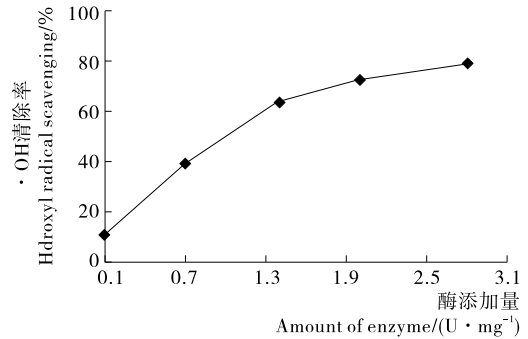


图 4 酶添加量对 EPS 粗品酶解产物 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的影响

Figure 4 Effect of enzyme-to-substrate ratio on hydroxyl radical scavenging activity of the enzymatic hydrolysates

表 1 Box-Behnken 设计试验因素水平编码

Table 1 Factors, levels and coding table of Box-Behnken design test

水平	A 酶解温度/ ℃	B 酶解时间/ h	C 酶解 pH	D 酶添加量/ (U · mg ⁻¹)
-1	55	5	7.0	1.4
0	60	6	8.0	2.0
1	65	7	9.0	2.8

元回归拟合,得数学回归模型:

$$Y=62.27+2.18A+3.25B+1.51C+9.31D+0.78AB-2.92AC+1.73AD-3.48BC+1.02BD+0.36CD-2.15A^2-7.31B^2-6.31C^2-4.76D^2. \quad (1)$$

对结果进行统计分析,结果见表 3。

由表 3 可知,该模型 P 值 $<0.000\ 1$,表明模型是极显著的,而且失拟项 P 值为 0.154 2,表明失拟项不显著,该模型稳定。由表 3 中回归系数的显著性检验可知,A、B 和 D 对 EPS 粗品酶解产物的 $\cdot\text{OH}$ 清除率影响极显著($P<0.01$),C 对 EPS 粗品酶解产物的 $\cdot\text{OH}$ 清除率影响显著($P<0.05$);AC 和 BC 对 EPS 粗品酶解产物的 $\cdot\text{OH}$ 清除率影响均显著($P<0.05$), A^2 对 EPS 粗品酶解产物的 $\cdot\text{OH}$ 清除率影响显著($P<0.05$), B^2 、 C^2 和 D^2 对 EPS 粗品酶解产物的 $\cdot\text{OH}$ 清除率影响极显著($P<0.01$)。

将不显著项从回归方程中剔除,进行二次方差分析,结果见表 4。结果表明,回归方程中各项均达显著水平,失拟项不显著($P>0.05$)。回归方程为:

$$Y=62.27+2.18A+3.25B+1.51C+9.31D-2.92AC-3.48BC-2.15A^2-7.31B^2-6.31C^2-4.76D^2. \quad (2)$$

响应面中的等高图能够直观地反映出各因素交互作用对响应值的影响,酶解温度和酶解 pH、酶解时间和酶解 pH 之间交互作用的等高线图和响应面见图 5、6。

酶解温度和酶解 pH 对 EPS 粗品酶解产物的 $\cdot\text{OH}$ 清除率的影响近似椭圆形,说明有交互作用[图 5(b)]。由图 5(a)可知,当酶解温度一定时, EPS 粗品酶解产物对

•OH清除率随pH的增加呈先增加后减小的趋势,在pH为7.0~7.8时,EPS粗品酶解产物的•OH清除率较高,在pH一定时,EPS粗品酶解产物对•OH清除率随酶解温度的变化较小,当酶解温度为65℃左右时,EPS粗品酶解产物的•OH清除率较高。

酶解时间和酶解pH对EPS粗品酶解产物的•OH清除率的影响近似椭圆形,说明有交互作用[图6(b)]。由图6(a)可知,当酶解pH一定时,EPS粗品酶解产物的•OH清除率随时间的延长呈先增加后减小的趋势,在酶解时间达6h时,EPS粗品酶解产物的•OH清除率较高,在酶解时间一定时,EPS粗品酶解产物的•OH清除率随pH的增加有较小幅度的变动,在酶解pH7.0~7.8时,EPS粗品酶解产物的•OH清除率高。

表2 试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results

序号	A	B	C	D	•OH清除率/%
1	0	0	0	0	63.72±0.23
2	-1	0	0	-1	43.72±0.42
3	1	0	-1	0	53.86±0.36
4	-1	0	1	0	57.98±0.29
5	0	-1	1	0	49.30±0.68
6	0	-1	-1	0	39.64±0.37
7	0	0	-1	1	60.62±0.32
8	0	0	1	1	60.22±0.42
9	0	-1	0	-1	38.88±0.53
10	-1	-1	0	0	49.58±0.38
11	1	1	0	0	58.98±0.42
12	-1	1	0	0	54.76±0.33
13	0	1	0	1	61.94±0.47
14	-1	0	-1	0	44.68±0.56
15	0	1	-1	0	55.18±0.34
16	0	0	0	0	61.90±0.22
17	0	0	0	0	59.84±0.27
18	0	0	0	0	63.50±0.45
19	0	0	-1	-1	44.26±0.54
20	1	0	1	0	55.46±0.36
21	1	0	0	-1	47.34±0.57
22	1	-1	0	0	50.66±0.29
23	0	-1	0	1	55.76±0.42
24	1	0	0	1	70.68±1.61
25	-1	0	0	1	60.14±0.32
26	0	1	0	-1	40.98±0.56
27	0	0	0	0	62.38±0.49
28	0	1	1	0	50.92±0.25
29	0	0	1	-1	42.42±0.67

表3 回归方程显著性检验和方差分析[†]

Table 3 Analysis of variance and significance test of regression equation

差异源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	1 910.70	14	136.48	23.58	<0.000 1	* *
A	56.85	1	56.85	9.82	0.007 3	* *
B	126.36	1	126.36	21.83	0.000 4	* *
C	27.18	1	27.18	4.70	0.048 0	*
D	1 040.86	1	1 040.86	179.84	<0.000 1	* *
AB	2.46	1	2.46	0.43	0.524 6	
AC	34.22	1	34.22	5.91	0.029 1	*
AD	11.97	1	11.97	2.07	0.172 4	
BC	48.44	1	48.44	8.37	0.011 8	*
BD	4.16	1	4.16	0.72	0.410 7	
CD	0.52	1	0.52	0.09	0.769 1	
A ²	30.05	1	30.05	5.19	0.038 9	*
B ²	346.60	1	346.60	59.88	<0.000 1	* *
C ²	258.66	1	258.66	44.69	<0.000 1	* *
D ²	147.11	1	147.11	25.42	0.000 2	* *
残差	81.03	14	5.79			
失拟	71.36	10	7.14	2.95	0.154 2	
误差	9.67	4	2.42			
总和	1 991.73	28				

[†] *表示差异显著,P<0.05; **表示差异极其显著,P<0.01; R²=0.959 3,Adj.R²=0.918 6。

表4 二次方差分析[†]

Table 4 Quadratic analysis of variance

差异源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	1 891.59	10	189.16	34.00	<0.000 1	* *
A	56.85	1	56.85	10.22	0.005 0	* *
B	126.36	1	126.36	22.71	0.000 2	* *
C	27.18	1	27.18	4.89	0.040 3	*
D	1 040.86	1	1 040.86	187.08	<0.000 1	* *
AC	34.22	1	34.22	6.15	0.023 2	*
BC	48.44	1	48.44	8.71	0.008 6	* *
A ²	30.05	1	30.05	5.40	0.032 0	*
B ²	346.60	1	346.60	62.30	<0.000 1	* *
C ²	258.66	1	258.66	46.49	<0.000 1	* *
D ²	147.11	1	147.11	26.44	<0.000 1	* *
残差	100.15	14	5.56			
失拟	90.48	14	6.46	2.67	0.176 7	
误差	9.67	4	2.42			
总和	1 991.73	28				

[†] *表示差异显著,P<0.05; **表示差异极其显著,P<0.01; R²=0.949 7,Adj.R²=0.921 8。

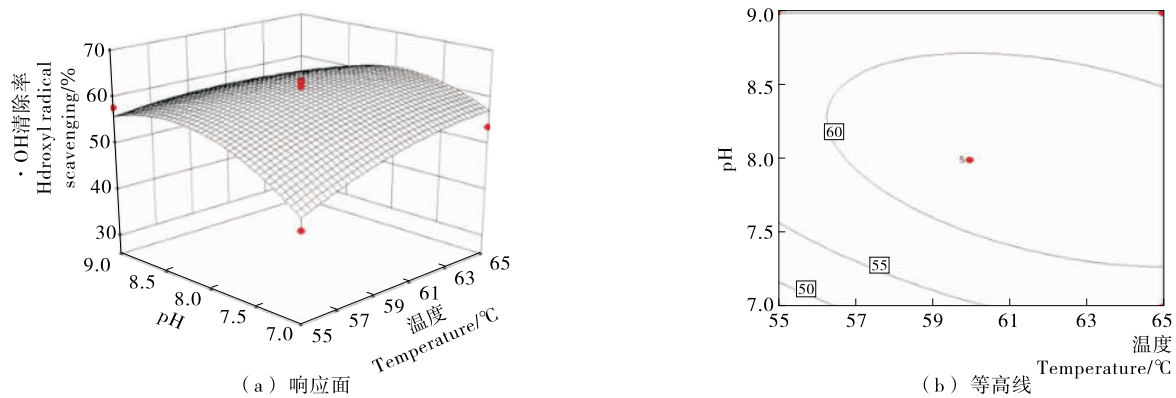


图 5 酶解温度和酶解 pH 对 ·OH 清除率影响的响应曲面和等高线图

Figure 5 Response surface plot and contour plot for effects of enzymolysis temperature and pH and their mutual interaction on hydroxyl radical scavenging

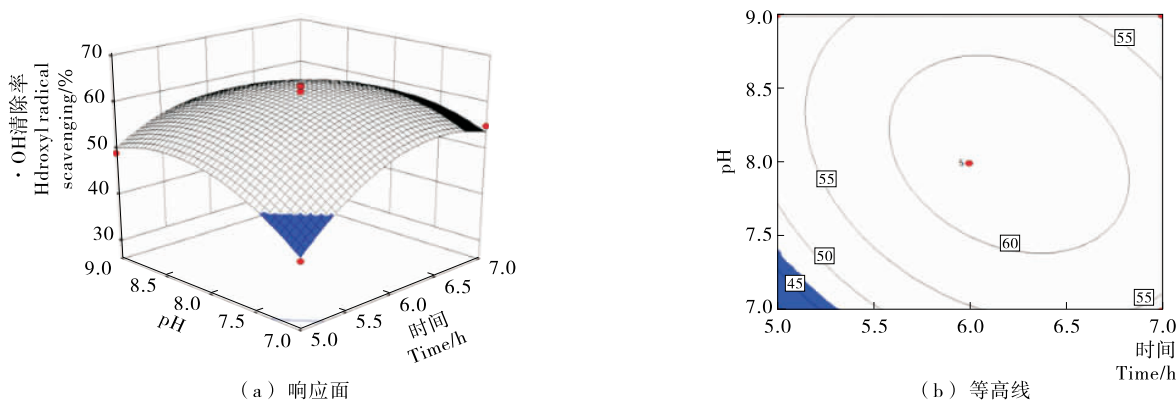


图 6 酶解时间和酶解 pH 对 ·OH 清除率影响的响应曲面和等高线图

Figure 6 Response surface plot and contour plot for effects of enzymolysis time and pH and their mutual interaction on hydroxyl radical scavenging

2.3 验证实验

根据 Design-Expert 8.0.6 软件计算出的最优工艺条件: 酶解温度 63 °C、酶解 pH 8.0、酶添加量 2.7 U/mg、酶解时间 6.3 h。按该条件进行 3 次平行实验, 实际测定 EPS 粗品酶解产物对 ·OH 的清除率为 (70.64±0.38)%, 理论预测值为 67.78%, 两者非常接近, 表明模型预测值与实际值的误差在允许范围之内。说明采用响应面法优化得到的 EPS 粗品酶解工艺条件参数是可信的。

2.4 EPS 粗品酶解前后的抗氧化活性

未经酶解的 EPS 粗品, 当质量浓度为 10 mg/mL 时, 对 ·OH、DPPH·、ABTS⁺· 和 O₂⁻· 4 种自由基清除能力较弱, 清除率分别为 30.31%, 19.32%, 19.75%, 34.91%。

由表 5 可见, 经过酶解后的 EPS 粗品对上述 4 种自由基

清除作用明显增强。利用计算机插值法模拟结果表明, 酶解后的 EPS 粗品对 ·OH、DPPH·、ABTS⁺· 和 O₂⁻· 的半数清除浓度 (IC₅₀) 分别为 (1.67±0.58), (1.08±0.01), (0.64±0.01), (4.16±0.01) mg/mL, 但均低于维生素 E 的。

3 结论

本研究以从非洲大蜗牛消化道中分离的混合酶为酶制剂, 通过响应面法建立 EPS 粗品酶解制备抗氧化酶解物工艺的二次多项回归方程, 通过方差分析, 模型显著, 所得方程拟合度高。试验结果表明, 最优酶解工艺条件为: 酶解温度 63 °C、酶解时间 6.3 h、酶解 pH 8.0、酶添加量 2.7 U/mg, 在此条件下 EPS 酶解产物的 ·OH 清除率为 (70.64±0.38)%。

优化酶解条件下, 酶解产物的抗氧化活性显著提高, 对 ·OH、DPPH·、ABTS⁺· 和 O₂⁻· 的 IC₅₀ 分别为 (1.67±

表 5 EPS 粗品酶解产物对自由基的清除效果

Table 5 Effects of the enzymolysis EPS on radical scavenging

样品	单位	IC ₅₀			
		·OH	DPPH·	ABTS ⁺ ·	O ₂ ⁻ ·
酶解物	mg/mL	1.67±0.58	1.08±0.01	0.64±0.01	4.16±0.01
V _E	μg/mL	12.55±0.01	6.91±0.04	13.46±0.03	40.44±0.18

0.58), (1.08±0.01), (0.64±0.01), (4.16±0.01) mg/mL, 表明 EPS 粗品在经过酶解后的综合抗氧化性增强。因此, EPS 酶解产物具有潜在的作为抗氧化产品的应用前景。但本试验未对酶解产物进行进一步分离纯化和表征, 且蜗牛消化酶的分离纯化及其对 EPS 粗品的作用机制尚不明确。后续将针对上述存在问题开展研究。

参考文献

- [1] GERESH S, ADIN I, YARMOLINSKY E, et al. Characterization of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp. Molecular weight determination and rheological properties[J]. Carbohydrate Polymers, 2002(50): 183-189.
- [2] 顾宁琰, 刘宇峰. 紫球藻生物活性物质及其应用[J]. 中国海洋药物, 2001, 84(6): 43-81.
- [3] GINZBERG A, COHEN M, SOD-MORIAH U A, et al. Chickens fed with biomass of the red microalga *Porphyridium* sp. Have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk[J]. J Appl Phycol, 2000, 12(35): 325-330.
- [4] HUHEIHEL M, ISHANU V, TAL J, et al. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses *in vitro* and *in vivo* [J]. J Biochem Biophysical Methods, 2002 (50): 189-200.
- [5] IRIT D, RENVEN C, URIELSOD M, et al. Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *P. sp* alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats[J]. British Journal of Nutrition, 2000, 184(4): 469-472.
- [6] MATSUI M M, MUIZZUDDIN N, ARAD S, et al. Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties *in vitro* and *in vivo* [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2003(104): 13.
- [7] SUN Li-qin, WANG Chang-hai, SHI Quan-jian, et al. Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities[J]. International Journal of Biological Macro-molecules, 2009(45): 42-47.
- [8] SUN Li-qin, WANG Ling, ZHOU Yan. Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2012 (87): 1 206-1 210.
- [9] 刘红辉, 李敏. 紫球藻胞外多糖抗氧化和保湿性能的研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(5): 4-6.
- [10] 王文平, 郭祀远. 生物活性多糖的结构及构效关系研究进展[J]. 中华实用中西医杂志, 2006, 9(16): 63-67.
- [11] 刘梅, 陈必链, 陈伟平. 超声波降解紫球藻胞外多糖研究[J]. 亚热带植物科学, 2008, 37(1): 48-50.
- [12] 刘梅. 超声波降解对紫球藻胞外多糖生理活性的影响[D]. 福州: 福建师范大学, 2008: 6.
- [13] 孙利芹, 王长海, 石全见. 紫球藻多糖的降解及其体外抗氧化活性[J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2010, 36(2): 211-215.
- [14] 刘海英, 山成龙. 药用植物大黄对 ·OH 的清除作用的研究[J]. 光谱实验室, 2008, 5(4): 614-617.
- [15] 鲁晶晶, 王远亮, 谢梦琴. 植物乳杆菌 LJ-3 产细菌素的响应面优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 242-246.
- [16] 朱晓阳, 钟海雁, 周波, 等. 油茶籽多酚超声辅助提取的响应面优化[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 166-170.
- [17] 闫巧娟, 韩鲁佳. 酶法脱除黄芪多糖中的蛋白质[J]. 食品科技, 2004(6): 23-26.
- [18] 石恩慧, 李红. 响应面法优化超声提取板栗总苞多酚工艺条件[J]. 中国食品学报, 2013, 13(5): 69-76.
- [19] 王玉丽, 任海伟, 李志忠, 等. 用清除 DPPH 自由基法评价药黑豆色素的抗氧化能力[J]. 食品工业科技, 2009, 30(8): 102-105.
- [20] 倪慧艳, 陈伟, 宋文静, 等. 黄芪多糖抗氧化作用研究[J]. 中医学报, 2017, 32(9): 1 705-1 707.
- [21] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [22] 盖冬雪. 乳品中细菌与酵母菌 PMA-qPCR 活菌检测方法的建立[D]. 吉林: 吉林大学, 2016: 46-48.
- [23] KASAHARA K, ISHIKAWA H, SATO S, et al. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification assays to detect medically important yeasts in dairy products[J]. FEMS Microbiol Lett, 2014, 357(2): 208-216.
- [24] CALLON C, DELBES C, DUTHOIT F, et al. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses[J]. Syst Appl Microbiol, 2006, 29(2): 172-180.
- [25] VILJOEN B, LOURENSHATTINGH A, IKALAFENG B, et al. Temperature abuse initiating yeast growth in yoghurt[J]. Food Research International, 2003, 36(2): 193-197.
- [26] OLLÉ RESA C P, JAGUS R J, GERSCHENSON L N. Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces [J]. Food Control, 2014, 35 (1): 101-108.
- [27] NGUYEN VAN LONG N, RIGALMA K, COROLLER L, et al. Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods [J]. Food Microbiol, 2017, 68: 7-15.
- [28] 孙婷, 张兴昌, 司徒文佑, 等. 乳酸菌对酸奶保鲜作用的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(2): 601-608.
- [29] 李晓婷, 陈忠军. 抑制真菌乳杆菌发酵培养基的优化[J]. 中国乳品工业, 2017, 45(8): 22-25.
- [30] 李晶, 王鑫, 高鹏飞, 等. 益生菌在酸奶生产过程中对酵母和霉菌污染的控制[J]. 中国乳品工业, 2013, 41(9): 21-24.
- [31] NGUYEN B H. Development of a rapid detection and quantification method for yeasts and molds in dairy products[D]. Nebraska: University of Nebraska, 2017: 72-74.
- [32] BOOR K J, WIEDMANN M, MURPHY S, et al. A 100-year review: microbiology and safety of milk handling[J]. J Dairy Sci, 2017, 100(12): 9 933-9 951.

(上接第 172 页)

- [42] US Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual online: yeasts, molds, and mycotoxins[J/OL][2017-10-31]. <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071435.htm>.
- [43] 盖冬雪. 乳品中细菌与酵母菌 PMA-qPCR 活菌检测方法的建立[D]. 吉林: 吉林大学, 2016: 46-48.
- [44] KASAHARA K, ISHIKAWA H, SATO S, et al. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification assays to detect medically important yeasts in dairy products[J]. FEMS Microbiol Lett, 2014, 357(2): 208-216.
- [45] CALLON C, DELBES C, DUTHOIT F, et al. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses[J]. Syst Appl Microbiol, 2006, 29(2): 172-180.
- [46] VILJOEN B, LOURENSHATTINGH A, IKALAFENG B, et al. Temperature abuse initiating yeast growth in yoghurt[J]. Food Research International, 2003, 36(2): 193-197.
- [47] OLLÉ RESA C P, JAGUS R J, GERSCHENSON L N. Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems