

胶质芽孢杆菌 SM-01 胞外多糖提取纯化工艺

郁莉^{1,2}, 付海田^{1,2}, 彭梦霞², 邓超³, 陈敬华^{*2}

(1. 江南大学 工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 针对胶质芽孢杆菌 SM-01 发酵液粘度高, 菌液分离困难而导致胞外多糖提取效率低的问题, 采用硅藻土吸附-抽滤法, 对提取工艺及超滤条件进行了研究, 确定了工艺参数。结果表明, 发酵液中 NaCl 添加量为 3 g/dL, 发酵液稀释倍数为 3 倍, 硅藻土添加量为 10 g/L 时, 在室温下抽滤可除去菌体和蛋白质。滤液在 0.1 MPa 下经截留相对分子质量为 200 000 的超滤膜超滤纯化, 多糖回收率可达 73.2%。

关键词: 胶质芽孢杆菌; 胞外多糖; 硅藻土; 提取工艺; 超滤

中图分类号: TQ 929.2 文章编号: 1673-1689(2019)11-0078-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.11.011

Isolation and Purification of Exopolysaccharide from *Bacillus mucilaginosus* SM-01

YU Li^{1,2}, FU Haitian^{1,2}, PENG Mengxia², DENG Chao³, CHEN Jinghua^{*2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Since the broth of *Bacillus mucilaginosus* SM-01 was of high viscosity and hard to be separated, the diatomite sorption-filtration method was applied to improve the extraction efficiency of exopolysaccharide by optimizing the process and ultrafiltration conditions. The bacteria and protein of the broth can be removed facilely by filtration at room temperature under the optimal conditions included: the addition of NaCl is 3 g/dL, the dilution ratio of the broth is 3 times, and the amount of diatomite is 10 g/L. The filtrate can be purified by ultrafiltration (relative molecular-weight cut-off of 200 000) at 0.1 MPa. The recovery of exopolysaccharide was up to 73.2%.

Keywords: *Bacillus mucilaginosus*, exopolysaccharide, diatomite, extraction technology, ultrafiltration

微生物胞外多糖是自然界中来源比较丰富的一类生物大分子, 因其独特的理化性质和生物活性

而被广泛的应用于食品和非食品工业以及医药领域^[1]。近年来, 随着糖化学和糖生物学研究的深入,

收稿日期: 2017-04-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(21574059)。

* 通信作者: 陈敬华(1971—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物制药及活性大分子方面的研究。E-mail: jhchenwhut@126.com

引用本文: 郁莉, 付海田, 彭梦霞, 等. 胶质芽孢杆菌 SM-01 胞外多糖提取纯化工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(11): 78-84.

越来越多的新型微生物多糖相继被发现。尽管如此,真正接近工业化生产的却仅有十几种,其中提取纯化工艺是微生物多糖工业化生产的制约因素之一^[2],微生物胞外多糖提取工艺直接影响多糖的质量以及生产成本。因此,经济可行的提取工艺对提高多糖的市场竞争力和拓展多糖的应用领域具有现实意义。

胶质芽孢杆菌胞外多糖(BMPS)是胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)在微氮培养基中产生的一类类葡甘聚糖的酸性杂多糖^[3],因其具有良好的保水性、生物相容性、毒性低以及环境友好等优点,广泛应用于医药、化妆品、食品和环保等领域^[4-6],具有极大的开发价值和广阔的市场前景。随着胶质芽孢杆菌胞外多糖在更多新领域的应用,其相关研究也越来越受到人们的关注。目前,胶质芽孢杆菌胞外多糖的生产基本采用液体发酵工艺,其发酵液含有少量蛋白质且无色素产生,但多糖含量较高,粘度较大,发酵液与菌体难以分离,给后续的分选纯化带来较大困难,从而导致产品收率低,生产成本高,对其推广应用极为不利。

作者所在实验室对 *B.mucilaginosus* SM-01 发酵得到的发酵液进行预处理,利用稀释和加入 NaCl 的方法降低粘度,同时加入适当的硅藻土作为预吸附剂;在布氏漏斗中加入载片,预涂一定量的硅藻土作为自制的抽滤装置,采用抽滤的方法可以通过一步法去除菌体和杂蛋白质。对得到的滤液采用超滤浓缩提取胞外多糖,建立了一条高效可行且经济的胞外多糖提取纯化工艺路线。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*) SM-01:保藏于中国菌种保藏中心,保藏号 5766。

1.1.2 培养基

1)斜面培养基(g/L):葡萄糖 10,尿素 0.1,轻质 CaCO₃ 3.0,MgSO₄·7H₂O 0.2,K₂HPO₄ 0.2,NaCl 0.2,琼脂 20;pH 7.0~7.2。

2)种子培养基(g/L):葡萄糖 10,尿素 0.1,轻质 CaCO₃ 3.0,MgSO₄·7H₂O 0.2,K₂HPO₄ 0.2,NaCl 0.2;pH 7.0~7.2。

3)发酵培养基(g/L):葡萄糖 60,尿素 0.3,轻质 CaCO₃ 3.0,MgSO₄·7H₂O 0.6,K₂HPO₄ 0.2,NaCl 0.4;

pH 7.0~7.2。

1.2 仪器与设备

UV-2550 型分光光度计:日本岛津公司; HeraeusMultifuge X3R 高速冷冻离心机:美国 Thermo 公司;THZ-C 型恒温振荡器:江苏太仓市实验设备厂;隔水式电热恒温培养箱:上海市跃进医疗器械一厂;硅藻土抽滤装置:自制;真空冷冻干燥机:美国 Labconco 公司;磁力搅拌器:上海司乐仪器有限公司;SevenEasy 精密 pH 计:上海 Mettler-Toledo 公司;NDJ-1 型旋转粘度计:上海恒平科学仪器有限公司;Labscale TFF System 小型切向超滤系统:美国 Millipore 公司;BiomaxPolythersulfone 小型超滤膜包(膜面积 50 cm²,截留相对分子质量 10 000、200 000、500 000):美国 Millipore 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 胶质芽孢杆菌胞外多糖的发酵 将斜面保藏的菌种于平板上划线,30℃恒温培养 24 h,活化两次,将活化后的菌种接种到种子培养基中,30℃、150 r/min 培养 24 h,再将此种子液按 4%的接种体积分数接入到 30 L 的罐中,30℃、600 r/min、2 vvm 发酵培养 72 h 获得发酵液。

1.3.2 发酵液的预处理 发酵液于 80℃下搅拌加热 20 min 进行菌体灭活,同时加入 6 mol/L 盐酸适量除去发酵液中残留的 CaCO₃,由于发酵液中多糖含量较高而导致粘度较大,给后续的分选纯化带来一定困难,降低发酵液的粘度有利于实现菌液分离。通常对于含有聚电解质的发酵液可以通过添加盐、稀释体积、改变 pH 值以及升高温度的方式降低粘度。

1)无机盐质量分数的选择:鉴于 BMPS 为阴离子聚电解质,无机盐的加入对其分子链上的电荷具有屏蔽效应而使得分子链收缩,粘度降低。考虑到培养基中无机盐含量较低,加入适当的无机盐将有效降低发酵液的粘度。取等体积发酵液,分别加入质量分数 1%~5%的 NaCl,搅拌均匀后在 25℃下测定其粘度。

2)稀释体积的选择:将发酵液加入不同体积去离子水稀释,依次稀释到原体积的 1、2、3、4、5 倍,分别测量稀释后发酵液粘度,将稀释后的发酵液进行离心和抽滤,比较离心和抽滤两种方法对去除菌体和蛋白质的影响。

3)pH 的选择:发酵液的 pH 对其粘度也有一定

的影响,但是pH 过高或过低都会破坏多糖的分子结构,因此将发酵液的 pH 调节为 1、3、5、7、9、11,分别测试不同 pH 条件下发酵液的粘度。

4) 硅藻土添加量的确定:在等体积发酵液中分别加入 10、20、30 g/L 硅藻土,充分搅拌,在相同条件下抽滤,比较硅藻土添加量对去除菌体和蛋白质的影响以及对多糖回收率的影响。

1.3.3 超滤条件的确定 通常对滤液中多糖的提取可以采用醇沉法,但对于较大体积滤液的醇沉易造成醇类的损耗,增加成本,且在醇沉过程中很多小分子物质如盐类也会随之沉淀出来。膜超滤分离技术作为一种提纯和浓缩的技术,具有设备简单、对样品无破坏、安全等优点,易于工业放大,该技术应用在中多糖的制备中已有不少报道^[7-9]。

1) 超滤膜的选择:在 25 °C、0.1 MPa 条件下,采用三种超滤膜(10 000、200 000、500 000)对 1 000 mL 滤液进行超滤浓缩,考察膜通量随超滤时间的变化,比较不同超滤膜的多糖截留率。

2) 操作压力的选择:在 25 °C 下,采用 200 000 超滤膜对滤液在不同操作压力下(0.05、0.1、0.15 MPa)对 1 000 mL 滤液进行超滤浓缩,考察不同操作压力下膜通量随时间的变化。

1.3.4 方法测定

1) 发酵液粘度的测定:由于 BMPS 发酵液粘度较高,因此选用 4# 转子进行粘度检测。量取固定体积样品倒入 100 mL 烧杯中,置于数显粘度计下,放入 4# 转子,旋转检测粘度。

2) 菌体量测定:发酵液经去离子水稀释一定倍数后,660 nm 下测定吸光度。

3) 多糖质量浓度测定:总糖质量浓度测定采用苯酚硫酸法^[10];还原糖质量浓度测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法^[11]。

多糖质量浓度=总糖质量浓度-还原糖质量浓度

4) 蛋白质质量浓度的测定:按照 Bradford 方法^[12],牛血清白蛋白作为对照品。

5) 多糖截留率计算:

$$\text{多糖截留率}(\%) = (V_u \times c_u) / (V_i \times c_i) \times 100\%$$

式中, V_u 指超滤浓缩体积; c_u 指超滤浓缩液中多糖浓度; V_i 指料液体积; c_i 指料液中多糖浓度。

6) 除菌率计算:

$$\text{除菌率}(\%) = (F_a - F_b) / F_a \times 100\%$$

式中, F_a 指初始发酵液中菌体量; F_b 指处理后发酵

液中菌体量。

7) 除蛋白质率:

$$\text{除蛋白质率}(\%) = (P_a - P_b) / P_a \times 100\%$$

式中, P_a 指初始发酵液中蛋白质质量浓度; P_b 指处理后发酵液中蛋白质质量浓度。

8) 多糖回收率:

$$\text{多糖回收率}(\%) = M_d / M_b \times 100\%$$

式中, M_d 指滤液中多糖质量浓度; M_b 指初始发酵液中多糖质量浓度。

9) 热原含量:热原的测定采用鲎试剂法^[13],脂多糖作为阳性对照。

10) 紫外光谱:配制适宜浓度的多糖水溶液,进行紫外全波长扫描。

2 结果与讨论

2.1 发酵液预处理

2.1.1 无机盐、温度、pH 和稀释倍数对发酵液粘度的影响 经过 72 h 发酵得到白色粘稠初始发酵液,pH 约为 6.5,多糖质量浓度较高(32.51 g/L),为提高菌体和发酵液的分离效果,需要降低发酵液粘度。由图 1 可以看出,NaCl 的添加量、温度、pH 以及稀释倍数均对发酵液粘度有影响,其中稀释倍数对发酵液粘度的影响最为显著(图 1(d)),随着稀释倍数的增大,粘度急剧下降,当稀释倍数为 5 倍时,粘度由 6.95 Pa·s 降低为 0.16 Pa·s。这是由于在初始发酵液中多糖质量浓度较高,分子链较长,多糖分子互相缠结导致粘度增大,随着稀释倍数的增大,多糖链间距变大,分子缠结减小,粘度下降。其次对发酵液粘度有较大影响的是 NaCl 的添加量(图 1(a)),当发酵液中加入 1%NaCl 时,发酵液粘度出现一定程度的降低;继续添加时,粘度变化逐渐减小;当添加量大于 3%时,粘度基本不再变化,发酵液显示一定的抗盐性。由图 1(b)可以发现,温度对粘度的影响并不显著,当温度升至 50 °C 时,发酵液粘度仅降低到 4.9 Pa·s,虽然升温可以降低粘度,但是高温易造成分子链的断裂和构象的改变,通常提取纯化时应尽量避免高温条件。图 1(c)显示,酸性环境和碱性环境下发酵液粘度都有一定程度的降低,相比较酸性环境,碱性环境的粘度降幅更大,当 pH 为 11 时,粘度降为 4.4 Pa·s。考虑到过酸或过碱的环境都将造成多糖链上官能团的丢失以及多糖的降解,在纯化过程中应选择相对温和的 pH 条件。

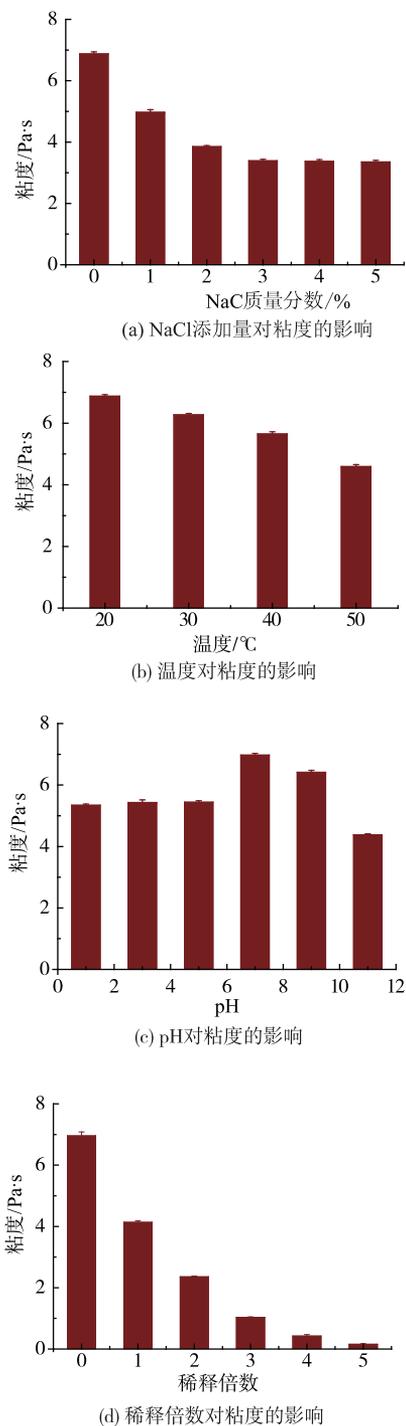


图1 不同因素对发酵液粘度的影响

Fig. 1 Influence of different factors on the viscosity of the fermentation broth for *B. mucilaginosus* SM-01

可以发现,通过升温 and 改变 pH 的方式对发酵液的粘度影响均不大,且发酵液具有一定的耐盐性和耐酸性,与黄原胶的耐酸碱和耐盐性比较相似,在黄原胶发酵液的预处理过程中,稀释法是常

采用的降低粘度的方法。考虑到向发酵液中添加 NaCl 和稀释发酵液均能降低发酵液粘度且不会影响多糖的化学结构,且过量 NaCl 的添加对粘度影响不大,因此采用 3 g/dLNaCl 添加量,稀释不同体积,考察不同稀释倍数下,离心和硅藻土过滤这两种方法对发酵液中除菌和除蛋白质的影响。

2.1.2 离心和抽滤对除菌率和蛋白质的影响 在去除 CaCO₃ 的发酵液中加入 3 g/dLNaCl,在不同的稀释倍数下分别考察离心和抽滤两种方式对发酵液除菌和除蛋白质的影响,结果见图 2。当采用抽滤的方法时,稀释倍数对除菌率的影响并不显著,除菌率在 80%左右,这是由于硅藻土涂层能够有效截留以及吸附发酵液中的菌体,即使稀释倍数较小时,通过抽滤可以除去发酵液中大部分菌体;与之相反,稀释对离心除菌效果影响比较明显,当发酵液不稀释或稀释倍数比较小时,尽管有盐的存在,发酵液粘度依旧较大,菌体被多糖紧密包裹,除菌效果不理想,随着稀释倍数的增大,除菌率逐渐增大,当稀释倍数达到 5 倍时,离心和抽滤的除菌效果比较接近。稀释倍数对离心和抽滤的除蛋白质率影响皆不明显,随着稀释倍数的增大,除蛋白质率

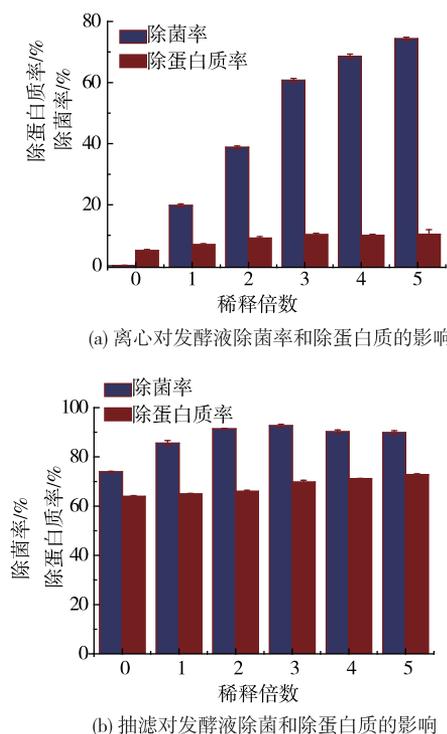


图2 离心和抽滤对发酵液除菌率和除蛋白质率的影响
Fig. 2 The influences of centrifugation and filtration on clearance of bacteria and protein

略微增大,但离心并不能有效除去发酵液中的蛋白质,除蛋白质率基本维持在6%左右;而对于预涂了硅藻土的抽滤装置来说,硅藻土涂层能较好的吸附蛋白质,达到除蛋白质的目的,除蛋白质率基本达到70%以上。且离心的方法对设备的要求较高,较难实现工业化生产,因此利用吸附性过滤介质对发酵液进行除菌和除蛋白质是一个经济简便的方法。

尽管稀释倍数对离心和抽滤的除菌率和除蛋

白质率影响皆不显著,但是其对抽滤通量和多糖回收率却有较大影响。由表1可知,当稀释倍数较小时,发酵液较为粘稠,在滤饼上容易形成凝胶层,因此,过滤通量较小,多糖回收率较低。随着稀释倍数的增大,过滤通量和回收率逐渐增大,当稀释倍数高于3倍时,多糖回收率基本维持在恒定水平,约达90%。然而过高的稀释倍数将会给后续浓缩带来麻烦,因此抽滤时采用3倍体积稀释。

表1 稀释倍数对滤液的菌体量、抽滤通量及多糖回收率的影响

Table 1 Influence of dilution ratio on filtration of fermentation broth

稀释倍数	发酵液		滤液		通量(J)/(L/(m ² ·h))	回收率/%
	BMPS/(g/L)	稀释液吸光值(OD ₆₀₀)	BMPS/(g/L)	滤液吸光值(OD ₆₀₀)		
0	32.51	1.827	4.90	0.477	0.78	15.1%
1	16.25	1.127	7.61	0.162	4.52	46.8%
2	10.83	0.821	6.75	0.071	7.07	62.3%
3	8.13	0.653	7.00	0.048	18.87	86.2%
4	6.50	0.523	5.80	0.051	25.69	89.3%
5	5.42	0.443	4.92	0.045	30.74	90.8%

2.1.3 发酵液中硅藻土的添加量对发酵液的影响

硅藻土除了作为过滤介质,还是一种理想的吸附剂,能够有效吸附菌体和杂蛋白质,且在发酵液中预先添加硅藻土还可以起到助滤剂的作用,抽滤效果更为理想,但过高的添加量通常会造造成抽滤效率的下降和多糖的损失,因此应对硅藻土的添加量进行考察。初始发酵液去除多余CaCO₃,加入3% NaCl,稀释3倍后,再加入一定量的硅藻土,充分搅拌后再进行抽滤。由表2可知,无硅藻土添加时滤液中蛋白质质量浓度已经比较低(0.025 g/L),通过硅藻土抽滤基本可以去除发酵液中的少量蛋白质。当加入10 g/L硅藻土后,滤液中菌体和蛋白质的质量浓度都有一定程度的降低,继续加入硅藻土对去除菌体和蛋白质并没有显著的影响,但是过量硅藻土则会同时吸附多糖,使滤液中多糖的质量浓度下降,多糖损失增加。因此采用10 g/L的硅藻土预吸附,再进行抽滤可以有效除去大部分菌体和蛋白质,经过反复抽滤三次后,通过对滤液进行镜检可以发现无菌体存在,说明菌体已经被完全去除,经检测蛋白质质量浓度接近零,多糖回收率可达76.4%。

2.2 超滤条件的确定

经过抽滤所得发酵液仍含有无机盐,残糖以及

一些可溶性的小分子,且稀释造成发酵液体积过大,采用醇沉法易造成乙醇的损失,增加成本,因此采用超滤的方法代替醇沉法对滤液进行浓缩提取。

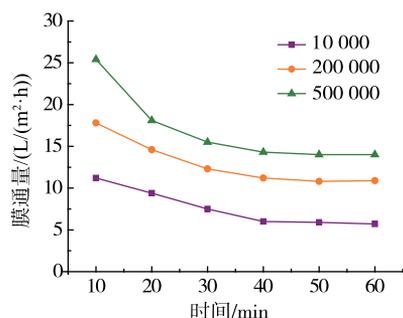
表2 硅藻土的用量对发酵液抽滤的影响

Table 2 Influence of different concentrations of diatomite on filtration

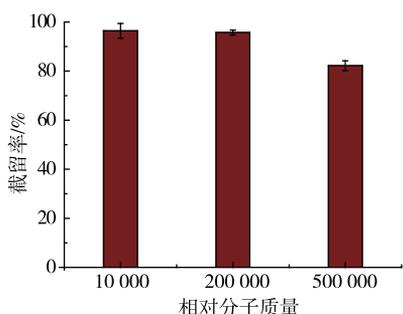
硅藻土用量/(g/L)	滤液吸光值(OD ₆₀₀)	蛋白质质量浓度/(g/L)	BMPS质量浓度/(g/L)
0	0.048	0.025	7.00
10	0.040	0.020	6.88
20	0.041	0.022	5.93
30	0.038	0.021	4.87

2.2.1 不同截留相对分子质量膜的膜通量比较在0.1 MPa、25℃下用不同截留相对分子质量的超滤膜对抽滤得到的滤液进行超滤浓缩,比较膜通量的差异,实验结果见图3。由图3(a)可知,相同条件下,不同截留相对分子质量的膜对膜通量有较大的影响。随着截留相对分子质量的增大,膜通量增大,膜通量达到稳定值的时间则越短,截留相对分子质量为500 000的超滤膜在超滤20 min后,膜通量迅速降低且趋于稳定,这可能是由于500 000截留相对分子质量的滤膜膜孔较大,发酵液中的多糖分子进入膜孔的几率较高,导致膜孔堵塞而造成膜通

量快速下降;而对于截留相对分子质量为 200 000 和 10 000 的超滤膜,由于膜孔小,大部分大分子被截留在外,膜堵塞的几率小,故膜通量下降缓慢。



(a)不同截留相对分子质量的膜对膜通量的影响



(b)不同截留相对分子质量膜的多糖截留率

图 3 不同截留相对分子质量的膜对超滤的影响

Fig. 3 Effect of membranes with different relative molecular weights cut-off on ultrafiltration

测定最终截留液中多糖质量浓度可以发现,截留相对分子质量为 10 000 和 200 000 超滤膜的多糖截留率接近,分别为 96.4%和 95.8%(图 3(b)),而 500 000 的则略有降低(82.2%),对前两者超滤后的滤液进行多糖质量浓度检测,发现质量浓度基本接近于 0,即 10 000 和 200 000 的超滤膜能将发酵液中多糖组分基本截留。而 500 000 超滤膜由于截留相对分子质量较大,损失部分多糖。因此,选取 200 000 的超滤膜进行超滤。

2.2.2 超滤压力对膜通量的影响 超滤压力增大可以提高膜通量,加快超滤速度,同时也会加速某些组分在膜孔的沉积,造成膜孔较小甚至堵塞,使膜通量下降,能耗增大,故选择合适的超滤压力对超滤过程至关重要。由图 4 可以看出,压力越大,初始膜通量越大,随着超滤时间的延长,膜通量衰减的越快,当超过 30 min 时,0.15 MPa 的膜通量接近 0.1 MPa 的膜通量,相同的超滤时间内,0.05 MPa 膜通量衰减的最慢。为了使超滤系统在较高的通量下

运行且考虑到能耗和成本,选取 0.1 MPa 作为超滤压力较合适。在此条件下对滤液进行超滤,直至滤液中糖质量浓度为零且电导率不再变化,最终多糖回收率可达 73.2%。

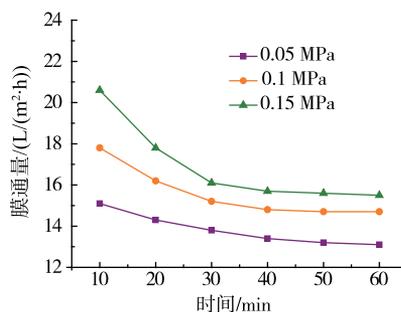


图 4 超滤压力对超滤通量的影响

Fig. 4 Effect of pressure on ultrafiltration flux

2.3 胞外多糖理化性质

将浓缩液透析冻干得到胞外多糖,其性状为白色絮状固体,无臭无味,易溶于水,难溶于大部分有机溶剂。将其多糖溶于纯水,经紫外扫描见图 5。仅在 200 和 230 nm 有吸收峰,在 260 和 280 nm 及附近没有吸收峰,表明多糖中几乎不含核酸和蛋白质等杂质。同时对多糖进行热源检查,发现其内毒素含量低于标准限度 0.25 EU/mL。

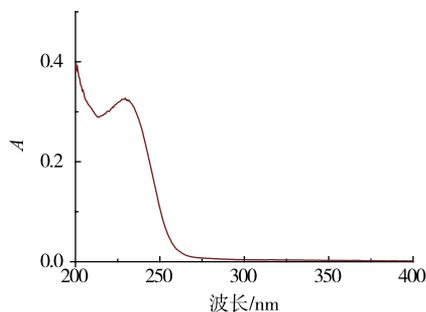


图 5 多糖水溶液的紫外扫描

Fig. 5 UV spectrum of exopolysaccharide in pure water

3 结语

胶质芽孢杆菌胞外多糖发酵液粘度较大,菌液分离困难,通过考察 NaCl 的添加量、pH、温度、稀释倍数对发酵液粘度的影响,发现将发酵液加入 3% 的 NaCl 后稀释 3 倍可以有效降低发酵液粘度,通过在发酵液中加入 10 g/L 的硅藻土作为预吸附剂,采用硅藻土吸附-抽滤的预处理方式代替离心能够有效去除菌体和杂蛋白质,经过反复抽滤 3 次后,

经镜检无菌体存在,蛋白质质量浓度接近于零,多糖回收率达76.4%。选用截留相对分子质量为200 000的中空纤维膜在0.1 MPa的操作压力下进行超滤浓缩,基本能够截留所有多糖组分,通过不断浓缩除盐得到最终产品,胞外多糖总回收率达73.2%,样品

中内毒素含量低于0.25 EU/mL。因此通过硅藻土预吸附-抽滤方式可以一步除去发酵液中的菌体和蛋白质,同时通过超滤浓缩的方法代替醇沉提取胞外多糖,极大地节约了成本,此方法简便经济,且适合工业化生产。

参考文献:

- [1] SURESH KUMAR A, MODY K, JHA B. Bacterial exopolysaccharides-a perception [J]. **Journal of basic Microbiology**, 2007, 47(2):103-117.
- [2] FREITAS F, ALVES VD, REIS MAM. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications[J]. **Trends in Biotechnology**, 2011, 29(8):388-398.
- [3] YU L, XU S Q, DENG C, et al. Preparation and partial structural characterization of the exopolysaccharide from *Bacillus mucilaginosus* SM-01[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2016, 146:217-223.
- [4] 李会, 杨庆胜, 窦文芳. 胶质芽孢杆菌胞外多糖在化妆品中的应用[P]. 中国专利:CN 103751034A, 2014-04-30.
- [5] DENG S B, BAI R B, HU X M, et al. Characteristics of a biofloculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment[J]. **Applied Microbiology Biotechnology**, 2003, 60:588-593.
- [6] RINAUDO M, MILAS M, DUNG P L. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 1993, 15:281-285.
- [7] MEI Xiuming, PAN Daodong. Study on ultrafiltration concentration technology of exopolysaccharide produced by lactic acid bacteria[J]. **Food Science**, 2008, 29(12):413-416. (in Chinese)
- [8] 张红静. 超滤法提取与纯化香菇多糖[D]. 天津:天津大学, 2006.
- [9] XUE Lingkun, ZHANG Jingsong, TANG Qingjiu, et al. Physicochemical analysis and bioactivity investigation of polysaccharides separated from *Pleurotus eryngii* by ultrafiltration[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2017, 36(1):74-79. (in Chinese)
- [10] DUBOIS M, GILLES KA, HAMILTON JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. **Analytical Chemistry**, 1956, 28(3):350-356.
- [11] YANG Jingjing, DING Zhongyang, GU Zhenghua, et al. Effect of corn powder on mycelium morphology and exopolysaccharides of *Ganoderma lucidum* submerged culture[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2017, 36(4):383-388. (in Chinese)
- [12] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72(1-2):248-254.
- [13] YAO Xingbao, TIAN Xiuli, WE Guoyi. A better method to test bacteria endotoxin in lentinan for injection with the specific *Tachypleus amebocyte* Lysate. (B, C factor)[J]. **Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, 2011, 16(11):1257-1259. (in Chinese)