

耐盐碱枸杞低聚糖结构鉴定及其体外消化能力和抑菌作用

刘昊^{1,2}, 于滨^{1,2}, 崔波^{1,2*}

(1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物基材料与绿色造纸国家重点实验室, 山东 济南 250353;

2. 齐鲁工业大学(山东省科学院)食品科学与工程学院, 山东 济南 250353)

摘要: 采用酸解和酶解联合降解方法得到耐盐碱枸杞低聚糖,通过傅里叶变换红外光谱、核磁共振氢谱、凝胶色谱和高效液相色谱对其结构进行鉴定,模拟体外胃肠液系统测定其消化产物的还原糖含量,以确定其消化性,并用紫外分光光度计测定枸杞低聚糖对金黄色葡萄球菌的生长曲线和pH值的影响,以此表明其抑菌能力。结果表明,枸杞低聚糖是一种分子量为507.48 Da,由甘露糖、鼠李糖和葡萄糖组成,苷键构型以 α 型为主的吡喃低聚糖。它不易被胃肠液消化吸收,同时通过金黄色葡萄球菌的生长曲线表明,随着枸杞低聚糖浓度的增加,其生长受到抑制,表现出一定的抑菌作用。

关键词: 耐盐碱;枸杞低聚糖;结构;体外消化;抑菌作用

Structural Identification of Saline-Alkaline Tolerant *Lycium barbarum* Oligosaccharides and Their *in vitro* Digestive Ability and Antibacterial Effect

LIU Hao^{1,2}, YU Bin^{1,2}, CUI Bo^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Biobased Material and Green Papermaking, Qilu University of Technology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250353, Shandong, China; 2. School of Food Science and Engineering, Qilu University of Technology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250353, Shandong, China)

Abstract: The saline-alkaline tolerant *Lycium barbarum* oligosaccharides were obtained by the method of acid hydrolysis and enzymatic hydrolysis. The structure of the *L. barbarum* oligosaccharides was identified by Fourier transform infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy, gel permeation chromatography, and high-performance liquid chromatography. The content of reducing sugar in its digestive products was determined by simulating the *in vitro* gastrointestinal fluid system, thereby determining its digestibility. The effects of *L. barbarum* oligosaccharides on the growth curve and pH value of *Staphylococcus aureus* were determined by ultraviolet spectrophotometer to show its antibacterial ability. The results showed that the molecular weight of *L. barbarum* oligosaccharides was 507.48 Da, and *L. barbarum* oligosaccharides were composed of mannose, rhamnose, and glucose. The glycoside bond configuration was mainly type- α . *L. barbarum* oligosaccharides were not easily digested or absorbed by gastrointestinal fluid. Meanwhile, the growth curve of *S. aureus* showed that with the increase in *L. barbarum* oligosaccharide concentrations, the growth was inhibited, showing a certain antibacterial effect.

Key words: saline-alkaline tolerance; *Lycium barbarum* oligosaccharides; structure; *in vitro* digestibility; bacteriostasis

引文格式:

刘昊,于滨,崔波.耐盐碱枸杞低聚糖结构鉴定及其体外消化能力和抑菌作用[J].食品研究与开发,2023,44(5):22-28.

LIU Hao, YU Bin, CUI Bo. Structural Identification of Saline-Alkaline Tolerant *Lycium barbarum* Oligosaccharides and Their *in vitro* Digestive Ability and Antibacterial Effect[J]. Food Research and Development, 2023, 44(5):22-28.

基金项目:国家重点研发计划课题(2019YFD1002704);山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY010722);山东省“渤海粮仓”科技示范项目(2019BHLC002);齐鲁工业大学(山东省科学院)科教产融合创新试点工程项目(2020KJC-ZD011);泰山学者工程专项基金(NO. ts201712060)

作者简介:刘昊(1995—),女(汉),硕士研究生,研究方向:食品科学。

*通信作者:崔波(1971—),男(汉),教授,博士,研究方向:农产品加工。

枸杞系茄科、枸杞属植物,广泛分布于宁夏、甘肃、青海等西北地区,在南北美洲和西欧等国家也广为引种,是深受人们欢迎的食品之一^[1-2]。枸杞作为我国传统的“药食同源”植物,具有延年益寿、滋阴补肾、强筋壮骨、养血明目、润肺止咳等多种营养价值和保健功能,其果实中有效的活性物质较为复杂^[2-6]。在目前的研究中,枸杞多糖已经被很多研究者证明其具有免疫活性和维持肠道菌群的平衡等活性^[7-11]。黄河三角洲区域内存在大面积中低产盐碱地,土壤盐渍化导致当地枸杞的开发和利用程度较低^[12]。目前,利用多糖降解的方法制备耐盐碱枸杞低聚糖,其结构的鉴定和生理活性尚未见报道。某些低聚糖片段是多糖的活性中心,多糖的活性与其结构和空间构象密切相关,其生物活性主要取决于寡糖活性片段^[13-15]。功能性低聚糖是由2个~10个单糖通过糖苷键连接而成的低分子量的非消化性碳水化合物^[16],不易被人体消化吸收,并且能够有效地抑制有害菌的生长,降低毒素在肠道内外膜上的附着力^[17],从而能够在肠道发挥独特的生理功能来维持机体健康。因此,对低聚糖消化吸收、抑制有害菌生长等生理活性的评价具有重要意义。本试验以黄河三角洲盐碱地枸杞为研究对象,对其果实提取液中的枸杞多糖进行降解,得到耐盐碱枸杞低聚糖,利用现代色谱和波谱技术对其结构进行初步鉴定,同时测定其体外消化能力和抑菌作用,探究其生理活性,为枸杞类产品开发提供参考,以期将其添加到食品中,开发具有独特生理功能的产品,实现黄河三角洲盐碱地枸杞的高效利用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枸杞:山东东营黄河三角洲盐碱地;耐盐碱枸杞低聚糖(*Lycium barbarum* oligosaccharides, LBO):齐鲁工业大学生物基材料与绿色造纸国家重点实验室自制;三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)、石油醚、重水(D₂O)、溴化钾(KBr)(光谱纯):上海麦克林生化科技有限公司;氯仿、正丁醇、碳酸钠(Na₂CO₃)、无水乙醇、95%乙醇、三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)、碳酸氢钠(NaHCO₃)、无水葡萄糖、醋酸钠(CH₃COONa):国药集团化学试剂有限公司;Tris-盐酸缓冲液:Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司;盐酸(HCl)、硫酸(H₂SO₄):烟台远东精细化工有限公司;链霉蛋白酶(Pronase E, 7 000 U/g)、胃脂肪酶(30 000 U/g)、胃蛋白酶(3 000 U/mg)、胰酶(4 000 U/g)、胰蛋白酶(4 000 U/mg)、猪胆粉、3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)溶液:北京索莱宝科技有限公司;单糖分析标准品(阿拉伯糖、木糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖)(均为色谱纯):上海源叶生物科技有限公司;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CGMCC.1.12409)、培养基 CM0002:中国

共同微生物收集与管理中心;Sephadex G-100、Sephadex G-25:北京瑞达恒辉科技发展有限公司。未单独说明的试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

FA2004 分析天平:上海舜宇恒平科学仪器有限公司;FSJ-A05N6 小型粉碎机:广东小熊电器有限公司;TDL-40B 离心机:上海安亭科学仪器厂;RE2000A 旋转蒸发器:上海贤德实验仪器有限公司;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器:郑州科泰实验设备有限公司;HH-21-8 电热恒温水浴锅:常州诺基仪器有限公司;JXDG-10 真空冷冻干燥机:上海净信实业发展有限公司;MixTable 涡旋振荡器:合肥艾本森科学仪器有限公司;LAI-3T 厌氧培养箱:上海龙跃仪器设备有限公司;FE28 型 pH 计:梅特勒-托力多仪器(上海)有限公司;UV-6100 型紫外可见分光光度计:上海元析仪器有限公司;Frontier 型傅里叶变换红外光谱仪:美国 Perkin-Elmer 公司;Avance II 400 核磁共振波谱仪:瑞士 Bruker 公司;LC-20A 液相色谱仪:日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 枸杞低聚糖的制备

将枸杞进行预处理,洗净、烘干后,用粉碎机粉碎,过筛。定量称取经预处理后的干燥枸杞粉,经石油醚加热回流重复脱脂3次,烘干后按料液比1:3(g/mL)加入蒸馏水于90℃水浴提取2h,过滤,得滤液,4 000 r/min 离心15 min,弃去残渣,重复离心2次,合并上清液。采用旋转蒸发器真空浓缩至1/4体积,冷却至室温(25℃)。加入1/5体积Sevag试剂(氯仿:正丁醇=4:1,体积比),剧烈振摇,使其充分混匀,4 000 r/min 离心15 min,倾出上清液,除去中间变性蛋白和下层氯仿,重复以上操作直至中间层无变性蛋白,收集上清液加入4倍体积的95%乙醇沉淀,静置24 h,滤布过滤,冷冻干燥后得到枸杞多糖(*Lycium barbarum* polysaccharides, LBP)^[18]。在0.1 mol/L的Tris-盐酸缓冲液加入一定量的LBP、Pronase E(LBP:Pronase E=1:2,质量比),60℃预热30 min使其它酶灭活。然后在样品液中加入样品质量1%的Pronase E,37℃消化24 h后,再补加样品质量0.5%的Pronase E,继续消化48 h,确保反应液的pH值保持在8.0左右。反应结束后以Sephadex G-100纯化,Sephadex G-25除盐,之后加入40 mmol/L H₂SO₄,80℃搅拌反应取样,以0.25 mol/L Na₂CO₃溶液中和,然后以蒸馏水透析,收集袋内液浓缩,加入0.5 mol/L TFA水解,80℃反应4 h,蒸馏水浓缩数次至中性为止,冷冻干燥后得到LBO^[19]。

1.3.2 枸杞低聚糖结构的鉴定

1.3.2.1 傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)分析

取一量干燥的LBO,按照质量比1:200~1:250

添加干燥的 KBr 粉末,混合均匀,制得压片,波数范围为 $4\,000\text{ cm}^{-1}\sim 400\text{ cm}^{-1}$,置于傅里叶变换红外光谱仪上进行扫描,绘制红外光谱图^[20]。

1.3.2.2 核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)分析

将干燥的 LBO 溶解于含有 0.1% 四甲基硅烷的 0.5 mL D_2O 中,使用核磁共振光谱仪(400 MHz)对样品进行 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 波谱分析^[20]。

1.3.2.3 高效凝胶渗透色谱(high-performance gel chromatography, HPGPC)分析

配制葡聚糖标准品,用流动相溶解 LBO 样品,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜,5 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,用流动相冲洗色谱柱至平衡,标准品和待测样品分别进样测定。色谱条件为色谱柱:TSKgel G4000-PWXL(7.8 mm $\times$ 30 cm, $10\text{ }\mu\text{m}$);流动相:0.1 mol/L NaNO_3 ;检测器:示差检测器;柱温:40 $^\circ\text{C}$;流速:0.5 mL/min;进样体积:20 μL 。以葡聚糖标准品重均分子量的对数($\lg M_w$)对保留时间(t_R)作图,通过分子量标准曲线及回归方程计算得出 LBO 分子量^[21]。

1.3.2.4 高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)分析

依次精确移取阿拉伯糖(arabinose, Ara)、木糖(xylose, Xyl)、鼠李糖(rhamnose, Rha)、半乳糖(galactose, Gal)、葡萄糖(glucose, Glu)和甘露糖(mannose, Man)标准溶液 1 000、500、200、100、50 μL ,用水定容至 1 mL,配制成浓度为 100、50、20、10、5 mg/L 系列标准溶液,上机测定。称量 0.1 g LBO,加 4 mol/L TFA 10 mL,充氮气,110 $^\circ\text{C}$ 水解 2 h,冷却至室温(25 $^\circ\text{C}$),加入 4 mol/L NaOH 调 pH 值为 6.5,加水定容。参考文献[22]的方法,取 1 mL 样品溶液同标准品一起衍生后,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜上机。色谱条件为色谱柱:Diamonsil Plus 5 μm C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm);流动相 A:0.05 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$;流动相 B:乙腈;检测器:紫外检测器;柱温:40 $^\circ\text{C}$;流速:1.0 mL/min;进样体积:20 μL 。

1.3.3 枸杞低聚糖体外模拟胃肠道消化能力的测定

1.3.3.1 消化体系的制备

参考文献[23]的方法配制胃电解质和肠电解质。胃肠液的配制:称取 12.5 mg 胃脂肪酶和 11.8 mg 胃蛋白酶,加入 50 mL 胃电解质和 1.5 mL CH_3COONa (1 mol/L, pH5),在室温(25 $^\circ\text{C}$)条件下于磁力搅拌器上搅拌,用 0.1 mol/L HCl 调 pH 值至 2;将 100 g 肠电解质、100 g 胰酶溶液、13 mg 胰蛋白酶、200 g 胆汁混合,用 0.1 mol/L NaHCO_3 调 pH 值至 7。胃肠液-4 $^\circ\text{C}$ 冷藏备用。

1.3.3.2 模拟消化

取 4 mL LBO 样品溶液(1 mg/mL),加 10 mL 胃液,放在 37 $^\circ\text{C}$ 、200 r/min 摇床内反应,在 0、2、4、6 h 时取样 1 mL,沸水浴 5 min 灭酶活。消化 6 h 后用 0.1 mol/L

NaHCO_3 调 pH 值至 7,加肠液 1.8 mL,混匀,继续 37 $^\circ\text{C}$ 、200 r/min 摇床内反应,在 0、2、4、6 h 时取样 1 mL,沸水浴 5 min 灭酶活。同时设立空白对照组,只加胃液和胃肠液,不加样品。设置 3 个重复。采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法测定消化产物中还原糖的生成量。以葡萄糖浓度为横坐标,吸光度为纵坐标建立标准曲线。取 200 μL 样品,加 600 μL DNS 溶液,沸水浴 15 min,冷却后加 3.2 mL 水,于 550 nm 处测吸光度,测定样品中还原糖含量^[24]。

1.3.4 枸杞低聚糖的抑菌性

1.3.4.1 菌种的活化

试验前在无菌操作条件下,将金黄色葡萄球菌制剂胶囊中的冻干菌粉移入盛有无菌生理盐水的试管中,充分振荡使菌体混合均匀。以 0.1% 接菌量接种于 10 mL 活化培养基,37 $^\circ\text{C}$ 厌氧培养,传代 2 次,重新接种发酵 18 h 后得菌种母液。

1.3.4.2 生长曲线的测定

参照文献[25]的方法并进行修改,LBO 添加量依次为基础培养基中葡萄糖质量的 1/3、2/3 和 1 取代基础培养基中的葡萄糖作为试验培养基,113 $^\circ\text{C}$ 湿热灭菌 20 min,取菌种母液以 0.1% 接菌量分别接种基础培养基和试验培养基。37 $^\circ\text{C}$ 厌氧培养 48 h,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 取样测定在 600 nm 下金黄色葡萄球菌的菌体浓度,每个处理设 3 个重复。以培养时间为横坐标,菌体浓度 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 为纵坐标,绘制生长曲线。

1.4 数据处理

采用 SPSS 20.0 软件中的 Duncan 法进行数据的差异性分析,Origin 8.5 作图。

2 结果与分析

2.1 枸杞低聚糖结构鉴定分析

2.1.1 FT-IR 分析

LBO 的 FT-IR 如图 1 所示。

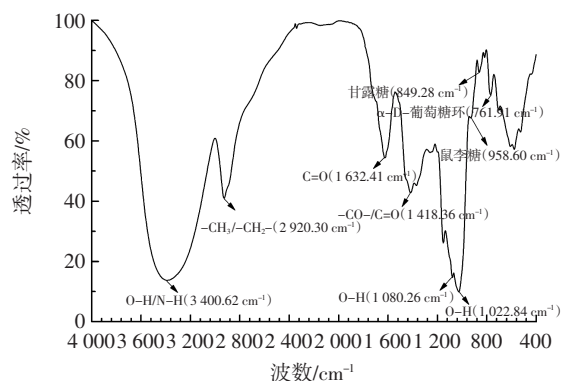


图1 LBO 红外光谱图

Fig.1 Infrared spectrum of LBO

由图 1 可知,3 400 cm^{-1} 处宽峰是由 O-H 伸缩振

动和 N-H 伸缩振动引起的^[26]。因此,LBO 可能含-OH、-NH₂ 或-NH-基团。2 930 cm⁻¹ C-H 的伸缩振动是糖类的特征峰,表明多糖发生降解后仍含有-CH₂-基团^[27]。1 640 cm⁻¹ 附近的吸收峰为一级氨基和二级氨基 N-H 的变角振动或-C=O 的非对称伸缩振动峰^[15,28],表明有蛋白质成分存在。-COOH 的 C-O 伸缩振动引起的 1 420 cm⁻¹ 吸收峰,-COO 的 C=O 对称伸缩振动引起的 1 350 cm⁻¹ 吸收峰和-COOH 的 O-H 变角振动引起的 1 250 cm⁻¹ 吸收峰表明 LBO 中含有-COOH 基团^[29]。

1 040 cm⁻¹ 处的吸收峰为一级醇羟基的变角振动峰。1 400 cm⁻¹~1 160 cm⁻¹ 处的吸收峰是 C-H 键的变角振动,它与 C-H 的伸缩振动构成了糖环的特征吸收,1 160 cm⁻¹~1 040 cm⁻¹ 间的吸收峰证明了吡喃糖糖苷的存在^[30]。840 cm⁻¹ 和 760 cm⁻¹ 左右为 α 型糖苷键和 α -D-葡萄糖环的吸收峰^[31],870 cm⁻¹~810 cm⁻¹ 为甘露糖的特征峰^[32]。

2.1.2 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 分析

LBO 的 ¹H NMR 图谱如图 2 所示。

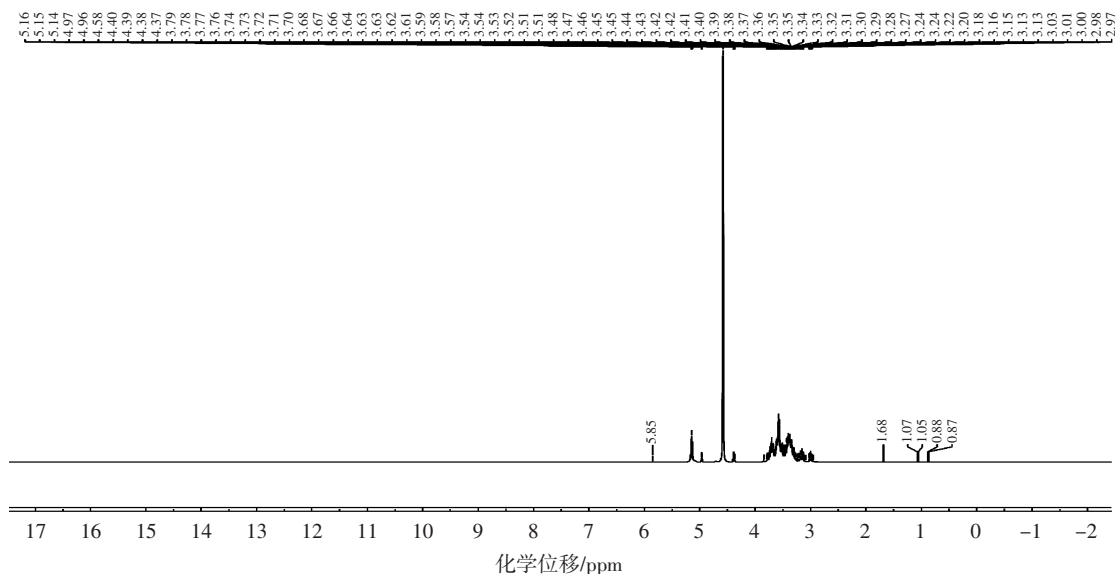


图2 LBO ¹H NMR 图谱

Fig.2 Spectrum of LBO ¹H NMR

由图 2 可知,LBO 的信号大多集中在 δ 2.9 ppm~5.1 ppm 之间, δ 4.58 ppm 处的质子信号为溶剂 D₂O 的质子位移, δ 3.2 ppm~4.3 ppm 为糖环质子信号。谱图中显示在 δ 5.15 ppm 处有端基氢质子的信号,表明 LBO 样品中含有 α 型糖苷键^[30]。异头碳上氢的化学位移 δ 2.9 ppm~4.1 ppm 出现糖类的特征分裂信号,产生吸收峰裂分的原因可能是相邻的自旋核(氢核)之间通

过成键电子发生相互干扰作用而形成的多重共振跃迁,产生共振吸收峰的裂分^[33]。除此之外,谱图显示具有小于 δ 4.8 ppm 的质子信号,这表明存在吡喃糖残基^[34]。¹³C NMR 图谱比 ¹H NMR 图谱有着范围更广的化学位移,且有着较高的分辨率,能够更好地区分分子的构型和构象。

LBO ¹³C NMR 图谱见图 3。

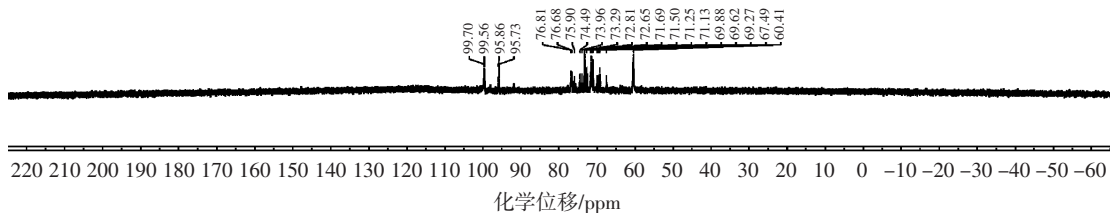


图3 LBO ¹³C NMR 图谱

Fig.3 Spectrum of LBO ¹³C NMR

如图 3 所示,异头碳的共振区有 4 个信号,均为 α 型糖苷异头碳,表明 LBO 主要以 α 型糖苷键构型存在。另外,LBO 的信号大多集中在 δ 60 ppm~77 ppm 之间,表明其中吡喃环占有较大比例,且 δ 71.50 ppm~

71.69 ppm、 δ 73.29~73.96 ppm、 δ 76.68 ppm~76.81 ppm、 δ 72.65 ppm~72.81 ppm 有着较强信号,它们属于吡喃葡萄糖残基的 C₂、C₃、C₄、C₅ 的振动信号^[35]。这与 FT-IR 和 ¹H NMR 的研究结果相一致。

2.1.3 HPGPC 分析分子量分布

葡聚糖标准品和 LBO 样品的 HPGPC 结果如图 4 所示。

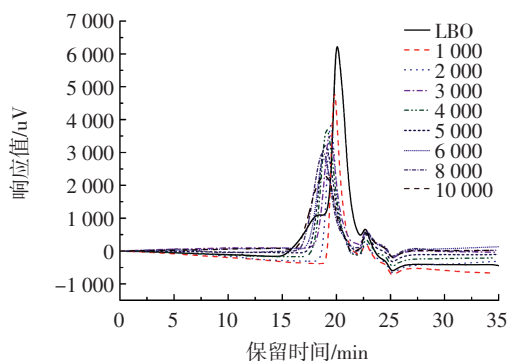


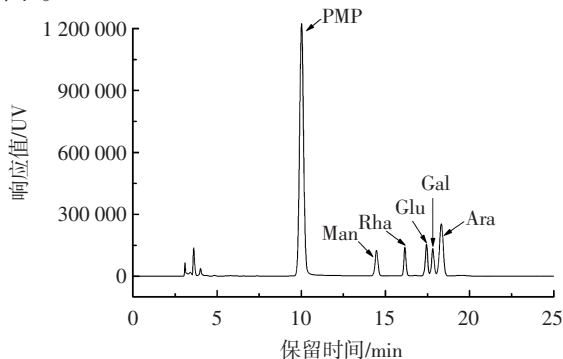
图4 LBO 的分子量分布色谱图

Fig.4 Molecular weight distribution chromatogram of LBO

由图 4 可知,黑色实线为 LBO 样品的示差信号图,图中出现了 1 个非常明显的出峰区间,其出峰的保留时间为 20.092 min,该区间为 LBO 主要的分子量组分,占 LBO 样品的 63.1%。根据葡聚糖的标准曲线, $\lg M_w = -0.043 9 t_R^3 + 2.300 1 t_R^2 - 40.552 7 t_R + 244.938 5$, $R^2 = 0.994 2$ 。计算可得 LBO 的平均重均分子量 M_w 在 507.48 Da 左右。

2.1.4 PMP-HPLC 分析单糖组成结果

通过对比添加的单糖的峰型、峰面积和出峰时间的变化,确定了 LBO 的单糖组成,结果如图 5 和图 6 所示。



PMP 表示 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone)。

图5 标准单糖的分析色谱图

Fig.5 Analysis chromatogram of standard monosaccharide

由图 5、图 6 可知,从左至右,各出峰依次为 PMP、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖;添加了样品水解液后,甘露糖、鼠李糖和葡萄糖的峰型和出峰时间保持一致,其相应的单糖的峰面积增加,各单糖的出峰顺序依次为甘露糖、鼠李糖、葡萄糖,说明样品水解液中包含这 3 种糖类。

2.2 体外模拟胃肠道消化能力分析

DNS 法绘制的还原糖标准曲线如图 7 所示。

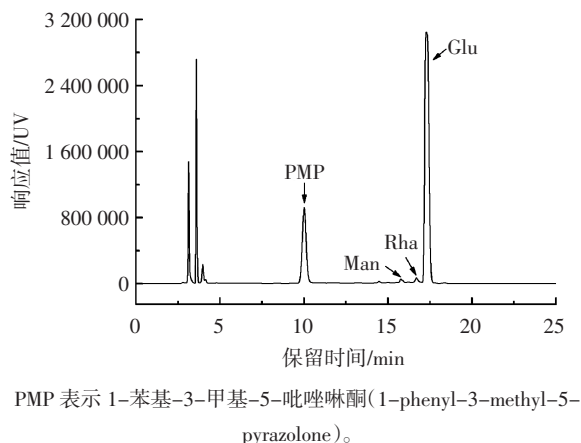


图6 LBO 单糖的组成分析色谱图

Fig.6 Composition analysis chromatogram of LBO monosaccharide

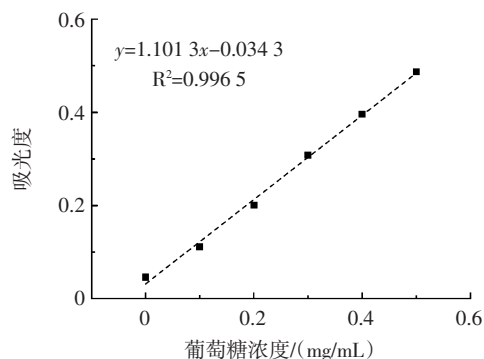


图7 DNS 法绘制葡萄糖标准曲线

Fig.7 Drawing glucose standard curve by DNS method

计算得到枸杞低聚糖经胃液消化后产物的还原糖含量,以此来表示 LBO 在胃液和胃肠液中的消化能力,消化产物的还原糖含量与消化能力成正比,其变化趋势如表 1 所示。

表1 不同模拟消化时间下 LBO 消化产物的还原糖含量

Table 1 Reducing sugar content of LBO digestion products at different simulated digestion times

样品	反应时间/h	还原糖含量/(mg/mL)
胃液	0	0.128 3±0.002 ^{AB}
	2	0.128 6±0.006 ^{AB}
	4	0.132 3±0.005 ^A
	6	0.121 3±0.002 ^B
胃肠液	0	0.083 8±0.005 ^A
	2	0.086 5±0.006 ^A
	4	0.085 6±0.002 ^A
	6	0.086 5±0.002 ^A

注:不同上标字母表示具有显著性差异($P < 0.05$)。

由表 1 可知,胃肠环境中也含有一定量还原糖。在 0、2、4、6 h 时取样检测,发现随着胃液消化的进行,还原糖含量由 0 h 的 0.128 3 mg/mL 降至 6 h 的

0.121 3 mg/mL,还原糖的含量并没有明显升高,说明枸杞多糖在胃液中只有轻微程度的降解,甚至不降解。而在胃肠液消化时,LBO的还原糖含量无显著差异($P>0.05$),说明即使在消化了6 h后,也只有少量的还原糖产生,有极少的糖苷键发生了变化。LBO在胃肠液中不发生降解这一结论,可以初步推断出LBO可作为一种益生元应用到宿主体内,调控肠道平衡。

2.3 抑菌性分析

图8为LBO对金黄色葡萄球菌在不同添加量下处理后的生长曲线。

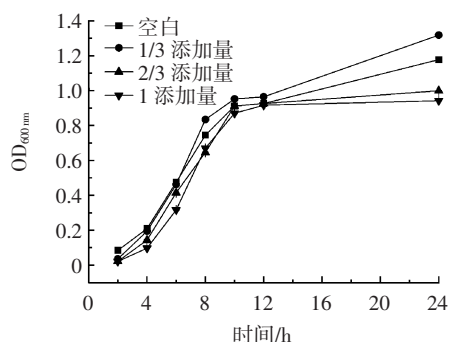


图8 金黄色葡萄球菌生长曲线

Fig.8 Growth curve of *Staphylococcus aureus*

由图8可知,未添加LBO的金黄色葡萄球菌在整个生长期间表现出了典型的细菌生长特性,生长曲线呈现S型,而添加了LBO的金黄色葡萄球菌的生长曲线逐渐趋于直线,金黄色葡萄球菌的整个生长期间的菌体浓度出现了下降的趋势,对数期增长速度减缓,稳定期菌体数量下降。添加更高浓度的LBO,对金黄色葡萄球菌的生长抑制作用更加明显。

3 结论

通过酸解和酶解联合的方法对枸杞多糖进行降解,得到了枸杞低聚糖。分别以傅里叶变换红外光谱、核磁共振波谱、高效凝胶渗透色谱和高效液相色谱对枸杞低聚糖的结构进行了初步鉴定,确定了其可能存在的基团和糖苷键、分子量和单糖组分。根据上述结果,可以确定枸杞低聚糖的分子量在507.48 Da左右,主要以 α 型糖苷键连接的吡喃糖存在,由甘露糖、鼠李糖和葡萄糖组成。要系统完整地分析其结构还需要采用高碘酸氧化、Smith降解等分析方法进行更深入的研究。同时,在模拟胃肠液试验中发现枸杞低聚糖的降解程度较低,枸杞低聚糖可能作为一种益生元被机体所利用,这可以作为下一步对其生物活性研究的全新突破口。此外,以常见的致病菌金黄色葡萄球菌为代表,枸杞聚糖对其有较强的抑制作用,且抑菌能力随着浓度的增加而增强。对作用于未来体内实验的机理研究提供了更为可靠的依据,有助于探索枸杞低聚

糖与肠道菌群间相互干预的作用关系。

参考文献:

- [1] KULCZYŃSKI B, GRAMZA-MICHAŁOWSKA A. Goji berry (*Lycium barbarum*): Composition and health effects—A review[J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2016, 66(2): 67–75.
- [2] JIN M L, HUANG Q S, ZHAO K, et al. Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 54: 16–23.
- [3] LUO Q, CAI Y Z, YAN J, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*[J]. Life Sciences, 2004, 76(2): 137–149.
- [4] 甘露, 张声华. 枸杞多糖的抗肿瘤活性和对免疫功能的影响[J]. 营养学报, 2003, 25(2): 200–202, 214.
GAN Lu, ZHANG Shenghua. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on antitumor activity and immune function[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2003, 25(2): 200–202, 214.
- [5] LIU W, XU J N, ZHU R, et al. Fingerprinting profile of polysaccharides from *Lycium barbarum* using multiplex approaches and chemometrics[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 78: 230–237.
- [6] LI X L, ZHOU A G, LI X M. Inhibition of *Lycium barbarum* polysaccharides and *Ganoderma lucidum* polysaccharides against oxidative injury induced by γ -irradiation in rat liver mitochondria[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 69(1): 172–178.
- [7] CHENG J, ZHOU Z W, SHENG H P, et al. An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of *Lycium barbarum* polysaccharides[J]. Drug Design, Development and Therapy, 2015, 9: 33–78.
- [8] CAI H Z, LIU F K, ZUO P G, et al. Practical application of antidiabetic efficacy of *Lycium barbarum* polysaccharide in patients with type 2 diabetes[J]. Medicinal Chemistry, 2015, 11(4): 383–390.
- [9] YANG Y, LI W, LI Y, et al. Dietary *Lycium barbarum* polysaccharide induces Nrf2/ARE pathway and ameliorates insulin resistance induced by high-fat via activation of PI3K/AKT signaling[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2014, 2014: 145641.
- [10] ZHOU F, JIANG X Y, WANG T, et al. *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP): A novel prebiotics candidate for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1034.
- [11] YANG Y, CHANG Y F, WU Y, et al. A homogeneous polysaccharide from *Lycium barbarum*: Structural characterizations, anti-obesity effects and impacts on gut microbiota[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 2074–2087.
- [12] 张帅, 董会忠, 曾文霞. 土地生态系统脆弱性时空演化特征及影响因素——以黄河三角洲高效生态经济区为例[J]. 中国环境科学, 2019, 39(4): 1696–1704.
ZHANG Shuai, DONG Huizhong, ZENG Wenxia. The time–space evolution characteristics of the vulnerability of land ecosystems and influencing factors: A case study of the Yellow River Delta Efficiency Eco-economic Zone[J]. China Environmental Science, 2019, 39(4): 1696–1704.
- [13] ZHOU L S, LIAO W F, CHEN X, et al. An Arabinogalactan from fruits of *Lycium barbarum* L. inhibits production and aggregation of A β 42[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 195: 643–651.
- [14] CAO C, ZHU B W, LIU Z Q, et al. An Arabinogalactan from *Lycium barbarum* attenuates DSS-induced chronic colitis in C57BL/6J mice associated with the modulation of intestinal barrier function and gut

- microbiota[J]. Food & Function, 2021, 12(20): 9829–9843.
- [15] DE MOURA F A, MACAGNAN F T, DA SILVA L P. Oligosaccharide production by hydrolysis of polysaccharides: A review[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2015, 50 (2): 275–281.
- [16] 马丽娜, 罗白玲, 史俊杰, 等. 常见几种功能性低聚糖对肠道菌群调节机制的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2017, 45(6): 89–92.
- MA Lina, LUO Bailing, SHI Junjie, et al. Progress on regulation mechanism of intestinal flora by several common functional oligosaccharides[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2017, 45(6): 89–92.
- [17] 邹月, 黄金凤, 魏琴. 功能性低聚糖的研究进展及应用现状[J]. 中国调味品, 2021, 46(2): 180–185, 195.
- ZOU Yue, HUANG Jinfeng, WEI Qin. Research progress and application status of functional oligosaccharides[J]. China Condiment, 2021, 46(2): 180–185, 195.
- [18] DING Y, CHEN D, YAN Y M, et al. Effects of long-term consumption of polysaccharides from the fruit of *Lycium barbarum* on host's health[J]. Food Research International, 2021, 139: 109913.
- [19] ZHANG X R, ZHOU W X, ZHANG Y X, et al. Macrophages, rather than T and B cells are principal immunostimulatory target cells of *Lycium barbarum* L. polysaccharide LBP4–OL[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 136(3): 465–472.
- [20] 郝林华, 陈磊, 仲娜, 等. 牛蒡寡糖的分离纯化及结构研究[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(7): 1242–1247.
- HAO Linhua, CHEN Lei, ZHONG Na, et al. Separation, purification and structure of burdock oligosaccharide[J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2005, 26(7): 1242–1247.
- [21] 赵春琦. 囊礁膜硫酸多糖及其寡糖的结构研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- ZHAO Chunqi. Structural characterization of the sulfated polysaccharides and oligosaccharides from *Monostroma angicava* keijlman[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [22] WANG L, CHENG R, SUN X Q, et al. Preparation and gut microbiota modulatory property of the oligosaccharide riclinoctase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(12): 3667–3676.
- [23] HU J L, NIE S P, MIN F F, et al. Artificial simulated saliva, gastric and intestinal digestion of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(2): 1143–1150.
- [24] 沈佳琳. 黑果枸杞多糖的提取纯化、抗氧化活性及体外模拟消化和发酵研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
- SHEN Jialin. Isolation, purification, antioxidant bioactivity, stimulated digestion and fermentation of polysaccharides from *Lycium ruthenicum* Murr.[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
- [25] 曹珈荣. 乳糖酸对金黄色葡萄球菌抑菌作用研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
- CAO Jiarong. The antibacterial effect of lactobionic acid on *Staphylococcus aureus*[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019.
- [26] XIE J H, XIE M Y, NIE S P, et al. Isolation, chemical composition and antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja[J]. Food Chemistry, 2010, 119(4): 1626–1632.
- [27] 卢旭. 莲子低聚糖制备及其对肠道益生菌和病原菌调节机制的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2015.
- LU Xu. Study on the preparation and regulatory mechanisms of lotus seed oligosaccharides to probiotics and pathogens in the intestinal tract[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2015.
- [28] LIU H H, FAN Y L, WANG W H, et al. Polysaccharides from *Lycium barbarum* leaves: Isolation, characterization and splenocyte proliferation activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(4): 417–422.
- [29] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2003.
- ZHANG Weijie. Biochemical research technology of sugar compounds[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2003.
- [30] 唐华丽. 枸杞多糖的结构分析及代谢组学研究[D]. 南京: 东南大学, 2016.
- TANG Huali. Study on the structural analysis and metabolism of *Lycium barbarum* polysaccharides[D]. Nanjing: Southeast University, 2016.
- [31] 索朗桑姆. 大蒜多糖的提取分离及含量测定分析[J]. 西藏科技, 2004(4): 22–26.
- SUO Langsangmu. Extraction, separation and content determination of garlic polysaccharide[J]. Tibet's Science and Technology, 2004(4): 22–26.
- [32] MATHLOUTHI M, SEUVRE A M, BIRCH G G. Relationship between the structure and the properties of carbohydrates in aqueous solutions: Sweetness of chlorinated sugars[J]. Carbohydrate Research, 1986, 152: 47–61.
- [33] 丁伯乐. 山药低聚糖分离纯化及益生活性研究[D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2021.
- DING Bole. Study on isolation, purification and proliferation activity of oligosaccharides from yam[D]. Wuhu: Anhui Polytechnic University, 2021.
- [34] 赵圆圆. 杏鲍菇子实体多糖的提取纯化、结构表征及降脂活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2020.
- ZHAO Yuanyuan. Study on extraction, purification, structure characterization and lipid-lowering activity of polysaccharide from *Pleurotus eryngii* fruit body[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2020.
- [35] ALQUINI G, CARBONERO E R, ROSADO F R, et al. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 230(1): 47–52.