

龙眼、枸杞和红枣多糖的理化性质及其协同益生活性

周文君^{1,2}, 池建伟², 易阳¹, 张名位², 张瑞芬², 刘磊², 贾栩超², 董丽红², 黄菲^{2*}

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东广州 510610)

摘要:为了比较龙眼多糖(LP)、枸杞多糖(GP)和红枣多糖(JP)的理化特性及其益生活性差异,探究其是否具有协同增效作用,本文分析了三种多糖的基本成分、分子量分布、单糖组成、显微结构、溶解性、粒径、溶液电位等理化特性,以及三种多糖单独作用或复合作用对益生菌增殖的影响。结果表明 LP、GP 和 JP 主要含有中性糖、少量糖醛酸和蛋白质,其中中性糖含量分别为 86.25%、72.36%、82.98%;LP 和 JP 的 Mw 分别是 70.73 ku、185.93 ku; GP 的 Mw 为 120.61 ku、4.53 ku; LP 和 GP 主要由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖组成,其摩尔比分别为 22.49:56.81:10.18 和 16.84:62.05:11.08,JP 主要由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖醛酸组成,其摩尔比为 10.63:70.05:10.88;三种多糖的微观结构有较大差异,LP 为碎片化聚集体,GP 呈片状,JP 为网状结构;三种多糖的粒径、粒度分散系数、溶液电位均不同;三种多糖均能显著促进益生菌增殖,并呈现剂量依赖效应,在浓度为 30 mg/mL 时,三者的益生活性为 $JP > GP > LP$;当 LP、GP 和 JP 以质量比 2:3:1 复配时,其益生活性最强,且远好于相同浓度下三种多糖单独作用的益生效果。由此表明,龙眼、枸杞和红枣三种多糖复配后,对益生菌的增殖具有协同增效作用。

关键词:龙眼多糖; 枸杞多糖; 红枣多糖; 益生活性

文章篇号: 1673-9078(2021)11-58-67

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0504

Physicochemical Properties and Synergistic Prebiotic Activities of Polysaccharides from Longan Fruits, Goji Berries, and Jujube Fruits

ZHOU Wenjun^{1,2}, CHI Jianwei², YI Yang¹, ZHANG Mingwei², ZHANG Ruifen², LIU Lei², JIA Xuchao², DONG Lihong², HUANG Fei^{2*}

(1. College of Food Science & Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

(2. Sericultural and Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)

Abstract: The physical and chemical properties and prebiotic activities of polysaccharides from longan fruits, goji berries, and jujube fruits, hereafter referred to as longan polysaccharide (LP), goji berry polysaccharide (GP) and jujube polysaccharide (JP), respectively, were studied and the existence of their synergistic effects was explored. For this, several features of the polysaccharides, such as the basic composition, molecular weight distribution, monosaccharide composition, microstructure, solubility, particle size and solution potential, were measured, and the effects of the polysaccharides, alone or in combination, on the proliferation of the probiotics were analyzed. The results show that the three polysaccharides mainly contain neutral sugars and a small amount of proteins and uronic acids. More specifically, the neutral sugar contents of LP, GP, and JP are 86.25%, 72.36%, and 82.98%, respectively. The Mw values of LP and JP are 70.73 ku and 185.93 ku, respectively, while the

引文格式:

周文君,池建伟,易阳,等.龙眼、枸杞和红枣多糖的理化性质及其协同益生活性[J].现代食品科技,2021,37(11):58-67

ZHOU Wenjun, CHI Jianwei, YI Yang, et al. Physicochemical properties and synergistic prebiotic activities of polysaccharides from longan fruits, goji berries, and jujube fruits [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 58-67

收稿日期: 2021-05-12

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFD1002300); 国家自然科学基金项目 (32072178); 广东省引进创新创业团队项目 (2019BT02N112); 广东省科技专项资金项目 (mmkj2020001); 广东省农业科学院农业优势产业学科团队建设项目 (202108TD)

作者简介: 周文君 (1997-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品营养, E-mail: 2767209476@qq.com

通讯作者: 黄菲 (1987-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 功能食品, E-mail: hf1311@163.com

Mw of GP is 120.61 ku and 4.53 ku. Furthermore, LP and GP mainly consist of arabinose, glucose, and galactose in molar ratios of 22.49:56.81:10.18 and 16.84:62.05:11.08, respectively, while JP is mainly composed of arabinose, glucose, and galacturonic acid in a molarratio of 10.63:70.05:10.88. The microstructures of the three polysaccharides are significantly different. LPs were observed as fragmented aggregates, while GPs and JPs showed lamellar and mesh structures, respectively. The particle size, particle size dispersion index, and Zeta potential of the three polysaccharides are different. All the three polysaccharides promoted the proliferation of probiotics significantly and their effectiveness was dose dependent. In particular, at a concentration of 30 mg/mL, the probiotic activities of the three polysaccharides followed the order of JP>GP>LP. The highest probiotic activity was observed when the three polysaccharides, LP, GP, and JP, were used in a mass ratio of 2:3:1, respectively, and this joint effect was far greater than that observed when the three polysaccharides were used alone at the same concentration. The results showed that the mixture of LP, GP, and JP has a synergistic effect on the proliferation of probiotics.

Key words: longan polysaccharide; goji berry polysaccharide; jujube polysaccharide; prebiotic activity

龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 为无患子科龙眼属常绿乔木，主产于广东、海南、广西等地区，是典型的南方特色水果。龙眼多糖 (longan polysaccharide, LP) 是龙眼中最丰富的活性成分，具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化等多种生物活性^[1]。枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 属于茄科枸杞属落叶灌木植物，主产于宁夏、甘肃、青海、新疆等地，是我国西北干旱地区重要经济作物^[2]。枸杞多糖 (goji polysaccharide, GP) 是枸杞的主要活性成分，具有抗糖尿病、改善睾丸功能、抗衰老、免疫调节、抗结肠癌、细胞保护和神经调节等功效^[3]。红枣 (*Zizyphus jujube* Mill.) 是鼠李科枣属植物枣树的果实，主产于新疆、河南、山东、河北等地区，是典型的北方特色水果。红枣多糖 (jujube polysaccharide, JP) 是红枣的主要活性物质，具有抗衰老、增强肌力、护肝抗炎、降血糖、免疫调节等多种生物活性^[4,5]。研究发现不同来源多糖的结构和活性均有显著差异^[6]。虽然关于龙眼、枸杞和红枣多糖的研究已有较多报道，但对于三种多糖的理化特性和活性差异的研究较少。将南方特色水果龙眼、北方特色水果红枣和西北干旱地区经济作物枸杞中的多糖进行比较，明确其构效关系，对丰富植物多糖的理论研究有重要意义。

研究发现多糖因大分子结构难以被机体直接消化吸收利用，需要依赖于肠道菌群酵解利用，通过影响肠道菌群构成及其代谢产物发挥其生理功能^[7]。多糖对肠道菌群的影响主要体现在促进肠道益生菌增殖、增加益生菌丰度^[8]。如山药多糖、发酵黄精多糖、蛹虫草多糖等可增加小鼠结肠内双歧杆菌属、乳酸菌属、罗斯氏菌属等益生菌的丰度，降低另枝菌属、螺杆菌属、梭菌属链球菌属、大肠杆菌、肠球菌等肠道病原菌的丰度，对肠道功能有一定的保护作用^[9-11]。因而，植物多糖对益生菌的影响受到越来越多的关注，多糖通过调节益生菌进而发挥其他生理功效成为一种新的研究方向。

单一多糖的功效一般具有一定的局限性，有研究发现将多糖按照一定的比例复配后，其生理功效具有协同增效的作用^[12]。如黄芪多糖和硫酸化三枝九叶草多糖组成的复合多糖可以克服环磷酰胺诱导的免疫抑制，显著促进 T 淋巴细胞增殖，提高血清抗体滴度、IFN-γ、IL-2、IgG 和 IgM 水平，其复合多糖效果优于单用黄芪多糖或硫酸化三枝九叶草多糖^[13]；Wang 等^[14]将复合多糖（枸杞多糖:黄芪多糖:香菇多糖=1:1:1）灌胃幼鼠，构建了幼龄大鼠肠道菌群与代谢产物的相关网络，发现复合多糖被微生物利用后产生的代谢产物（如氨基酸和短链脂肪酸等）可促进益生菌丰度增加和肠道功能完善。复合多糖可增加肥胖小鼠肠道菌群中双歧杆菌属、别样棒菌属、苏黎世杆菌科等益生菌的数量^[15]。龙眼、枸杞和红枣多糖的生理功效已被广泛报道，但对其调节益生菌的研究不多，其是否具有协同意生活性亦不明确。因此，本研究以南方特色水果龙眼、北方特色水果红枣和西北干旱地区经济作物枸杞为原料，通过对比三种多糖的理化性质和基本结构的差异，考察 3 种多糖单独及复合作用对益生菌增殖的影响，明确其是否具有协同意生功效。本研究的结果既可以丰富植物多糖生物活性的理论研究，又能为龙眼、枸杞、红枣功能性食品研发提供科学指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

龙眼干产地广东，品种为“储良”；红果枸杞干产地宁夏，品种为“宁夏枸杞”；红枣干产地新疆，品种为“灰枣”；以上三种原料购自天平架水果市场。

葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、岩藻糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸标准品均为色谱纯，上海源叶生物科技有限公司；葡聚糖标准品（分子量：1、5、12、25、150、270、410、670 ku）（色谱纯），美国 Sigma aldrich 公司；考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒，南

京建成科技有限公司；复合益生菌株（发酵乳杆菌、副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、长双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、瑞士乳杆菌、嗜热链球杆菌），厦门元之道生物科技有限公司；其它试剂均为国产分析纯。

GL224I-1SCN 分析天平，德国赛多利斯集团；SP902S 可拆洗静音破壁机，浙江绍兴苏泊尔生活电器有限公司；Eyelan-1100 旋转蒸发器、DRC-1000REC 冷冻干燥器，东京理化器械株式会社；MRHei-Tec 磁力搅拌器，德国海道夫集团；GL-20M 高速冷冻离心机，湖南长沙易达仪器有限公司；BioTekGen5 酶标仪，美国伯腾仪器有限公司；WatersACQUITYAPC 高效液相色谱仪，美国沃特世公司；ICS 5000 高效离子色谱仪，美国 Dionex 公司；Nexus5DXC FT-IR 傅立叶变换红外光谱仪，美国 Nicolet 公司；LEO1530VP 场发射扫描电子显微镜，德国 Zeiss 公司；Malvern Zetasizer Series 纳米粒度仪，英国 Malvern 仪器有限公司；LS-75HD 立式压力蒸汽灭菌锅，江阴滨江医疗设备有限公司；SW-OJ-1F 超净工作台，苏净集团苏州安泰空气技术有限公司；HYQX-III 厌氧培养箱，上海跃进医疗器械有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 多糖的提取

取龙眼干、枸杞干、红枣干原料洗灰去核，按料液比 1:30 (g/mL) 的比例加入蒸馏水，打浆 2 min 直至果肉变成碎小颗粒，质地均匀，将果浆转移至 5 L 烧杯中，覆膜后置于 95 °C 水浴浸提 4 h，采用纱布趁热过滤，收集上清液，将滤渣按料液比 1:30 (g/mL) 的比例加入蒸馏水二次提取，收集上清液合并，在 65 °C 的水浴温度下旋转蒸发浓缩至原体积的 1/5~1/4，得到粗多糖溶液。向粗多糖溶液中加入 1/4 体积的 Sevag 试剂（氯仿:正丁醇=4:1 混合制得）去除蛋白，800 r/min 磁力搅拌 20 min 后离心 (4000 r/min, 10 min)，收集上清液，重复多次直至多糖溶液基本无蛋白沉淀，将上清液于 65 °C 旋转蒸发去除有机试剂，得到脱蛋白多糖溶液。将脱蛋白多糖溶液加入 4 倍体积无水乙醇，于 4 °C 冰箱存放 12 h (静置过夜)，冷冻离心 (4000 r/min, 20 min) 收集沉淀，加少量预热蒸馏水溶解沉淀后，采用冷冻干燥得到三种多糖，分别标记为龙眼多糖 (LP)、枸杞多糖 (GP) 和红枣多糖 (JP)。

1.2.2 多糖基本成分分析

1.2.2.1 多糖得率

使用重量法计算多糖得率，计算公式如下：

$$\text{多糖得率} / \% = \frac{\text{多糖冻干粉 (g)}}{\text{果干重量 (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.2.2 基本化学成分

中性糖含量测定：采用苯酚-硫酸法^[16]。

糖醛酸含量测定：采用 Filisetti 的间羟基联苯法^[17]。

蛋白质含量测定：采用考马斯亮蓝蛋白试剂盒测定蛋白含量。

1.2.2.3 分子质量

样品的配制方法：称取适量样品，加入 1 mL 流动相溶解，静置 12 h，摇匀，过 0.45 μm 滤膜，等待分析。

葡聚糖标准品的配制方法：称取不同分子量的标准品各 2 mg，加入流动相 1 mL，静置 12 h，摇匀，等待分析。

色谱柱：UltrahydrogelLinear (7.8×300 mm)，柱温 35 °C；流动相：25 mmol/L Na₂HPO₄+25 mmol/L NaH₂PO₄+0.05% NaN₃ 缓冲盐溶液；流速：0.8 mL/min；等度洗脱，进样体积：10 μL；检测器：示差折光检测器，温度 35 °C。

1.2.3 单糖组成分析

参考 Zhang^[18]的研究：5 mg 样品加 4 mL 4 mol/L 三氟乙酸在安瓿瓶中溶解，酒精喷灯封管，在 110 °C 条件下水解 6 h。冷却到室温后旋转蒸发除去多余的三氟乙酸，加入 3 mL 甲醇复溶，蒸发干燥四次。最后，使用超纯水溶解残渣，定容到 50 mL 容量瓶后，过 0.22 μm 滤膜进行分析。

离子色谱条件：CarbopacPA1 分析柱 (250×4 mm²)；梯度洗脱过程如下：0~25 min, 1% 500 mmol/L NaOH；25~40 min, 线性梯度 1~100% 500 mmol/L NaOH；40~50 min, 100% 500 mmol/L NaOH。用 NaOH 和 CH₃COONa 洗脱葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸。0~20 min, 20% 500 mmol/L NaOH；20~30 min, 100% 100 mmol/L NaOH 和 170 mmol/L CH₃COONa，30~45 min, 线性梯度 20~35% 500 mmol/L NaOH。进样量为 20 μL，柱温为 30 °C。结果根据单糖标准品的保留时间进行分析，并通过出峰的面积比计算出单糖摩尔百分比。

1.2.4 红外光谱分析

取 1~2 mg 多糖样品，与 100 mg KBr 研磨混合后压片，采用傅立叶变换红外光谱仪扫描分析，扫描范围为 4000~400 cm⁻¹。

1.2.5 扫描电镜分析

取 2~3 mg 多糖粉末，使其薄且均匀的分布在导电胶上，真空喷金，用扫描电子显微镜观察其在 200 和 20000 倍下的形貌特征。

1.2.6 多糖的溶液特性分析

多糖的溶解性测定：参考尹艳^[19]的研究并稍作修改，称取 200 mg 的多糖样品，溶于 4 mL 蒸馏水中，

室温下静置 30 min, 期间每隔 5 min 涡旋振荡 10 s。静置后离心 (4000 r/min, 10 min), 取上清液 1 mL, 冷冻真空干燥, 称重干燥后的上清质量, 以每毫升水中溶解的多糖的质量来表征其溶解性。

多糖溶液的粒径与电位测定: 称取 10 mg 的多糖样品, 溶于 4 mL 蒸馏水中, 涡旋混匀后使用纳米粒度仪在 25 ℃通过动态光散射分析多糖水溶液的 Zeta 电位 (Zp) 和粒度 (Size)。

1.2.7 单一多糖对复合菌种的益活性评价

无碳 MRS 液体培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母膏 4 g, 牛肉膏 8 g, 柠檬酸氢二铵 2 g, 无水乙酸钠 5 g, 七水合硫酸镁 0.2 g, 磷酸二氢钾 2 g, 四水合硫酸锰 0.04 g, 吐温 801 mL, L-半胱氨酸 0.5 g, 加入 1 L 蒸馏水, 调整 pH 为 6.2~6.5。

菌株活化: 将保存的复合益生菌株 (发酵乳杆菌、副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、长双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、瑞士乳杆菌、嗜热链球杆菌) 溶于适量 0.9% 无菌生理盐水中制成菌悬液, 取 200 μ L 菌悬液接种到 MRS 液体培养基中, 置于厌氧恒温培养箱 (10% CO₂, 10% H₂ 和 80% N₂, 37 ℃) 中培养 24 h 进行活化。取活化好的菌液继续传代培养。将传代培养至稳定期的菌液 3500 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 用 0.9% 无菌生理盐水洗涤沉淀两次, 最后加入 10 mL 生理盐水重悬菌体制成菌悬液备用。

试验设计: 空白对照组、阳性对照组 (菊粉和葡萄糖)、LP、GP 和 JP 组, 每组均设计 5 个浓度 (1、5、10、20、30 mg/mL)。

按照 4% (V/V) 的接种量将制备好的菌悬液接种至以不同多糖样品和对照为碳源的培养基中, 于 37 ℃ 厌氧培养, 培养 48 h 后取 1.5 mL 测培养液的 pH 值, 另取 2 mL 培养液离心 (5000 r/min, 10 min), 去除上层清液, 沉淀用等量生理盐水重悬, 以生理盐水为空白, 在 600 nm 处测各组 OD 值, 每个样品重复测定 3 次。采用比浊度法, 以 OD₆₀₀ 值 (反映溶液中细菌总数) 为评价指标比较各多糖对益生菌增殖的影响作用。

1.2.8 正交试验优化三种多糖的最佳配比

表 1 LP、GP 和 JP 复合正交试验因素水平表

Table 1 Factors level of orthogonal test for probiotic activity of LP, GP and JP

水平	因素		
	A: LP/(mg/mL)	B: GP/(mg/mL)	C: JP/(mg/mL)
1	10	10	10
2	20	20	20
3	30	30	30

在单因素试验的基础上, 选择 10、20 和 30 mg/mL 三个水平, 以复合益生菌株在不同多糖配比下发酵 48 h 后的 OD₆₀₀ 值为考察指标, 设计三因素三水平正交试验优化复合多糖最佳配比, 试验因素水平安排见表 1。单因素试验中得到多糖益活性最佳浓度为 30 mg/mL, 确定复合多糖溶液最终浓度为 30 mg/mL, 培养方法及检测指标参考 1.2.7。

1.2.9 统计分析

每个试验重复 3 次, 通过 SPSS 19.0.0 软件分析数据, 并用 Duncan 检验比较组间差异, 以不同小写字母表示 ($p<0.05$)。结果以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 采用 Origin 9.0 和 Excel 软件制表作图。

2 结果与讨论

2.1 多糖基本成分

3 种多糖的得率、分子量和基本化学组成见表 2。JP 的得率最高为 4.07%, LP 和 GP 的得率分别为 1.59% 和 1.84%, 并无显著性差异 ($p>0.05$)。3 种原料多糖的得率与前人研究基本一致, 如本课题组前期研究的龙眼多糖得率为 1.06%~8.58%^[20,21], 文献报道枸杞多糖得率为 0.35%~14.12%^[22,23], 红枣多糖得率为 2.30%~8.01%^[24,25]。多糖的得率与原料品种、来源, 以及提取方式等都有密切关系。

LP 和 JP 的纯度相对较高, 含有一个分子量峰, GP 的纯度相对较差, 含有 2 个分子量峰^[26]。3 种多糖主峰分子量大小为: JP>GP>LP。3 种多糖主要由中性糖和糖醛酸组成, 含有少量的蛋白质。三种多糖的中性糖含量为: LP>JP>GP, 且均超过 70%。GP 的糖醛酸含量显著高于 LP 和 JP ($p<0.05$), 而 JP 的蛋白质含量显著高于 LP 和 GP ($p<0.05$)。

表 2 LP、GP 和 JP 的得率、分子量和化学成分

Table 2 Yield, molecular weight and chemical composition of LP, GP and JP

样品	LP	GP	JP
多糖得率/%	1.59±0.49 ^a	1.84±0.62 ^a	4.07±0.59 ^b
重均分子量 Mw/ku	70.73	120.61/4.53	185.93
中性糖含量/%	86.25±0.60 ^c	72.36±0.41 ^a	82.98±0.84 ^b
糖醛酸含量/%	10.25±0.14 ^a	13.74±0.14 ^b	10.52±0.25 ^a
蛋白质含量/%	3.02±1.14 ^a	3.37±0.45 ^a	5.36±1.06 ^{ab}

注: 不同小写字母表示样品间有显著差异 ($p<0.05$)。

2.2 多糖的单糖组成

LP、GP 和 JP 的单糖组成见表 3。3 种多糖含有 5 种中性糖、2 种糖醛酸, 且均以中性糖为主。LP 和

GP 的单糖组成比较相似, 主要由葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖组成, JP 则主要由葡萄糖、半乳糖醛酸和阿拉伯糖组成。3 种多糖中含量最高均为葡萄糖, 其比例超过 50%。3 种多糖的单糖组成与前人报道的龙眼多糖、枸杞多糖和红枣多糖的结果相似^[27-29]。

表 3 LP、GP 和 JP 的单糖组成 (摩尔比)

Table 3 Monosaccharide composition of LP, GP and JP

样品	LP	GP	JP
岩藻糖 (Fuc)	1.94	3.06	1.39
木糖 (Xyl)	1.34	1.10	0.95
阿拉伯糖 (Ara)	22.49	16.84	10.63
葡萄糖 (Glc)	56.81	62.05	70.05
半乳糖 (Gal)	10.18	11.08	5.06
半乳糖醛酸 (GalA)	5.77	3.93	10.88
葡萄糖醛酸 (GlcA)	1.47	1.95	1.04

2.3 多糖的红外光谱

3 种多糖的红外光谱吸收峰见图 1。LP、GP 和 JP 在 3600~3200 cm⁻¹ 均出现了强吸收峰, 是糖类分子之间或分子内的 O-H 伸缩振动峰^[30]; 2931 cm⁻¹ 处的吸收峰为甲基或亚甲基 C-H 键伸缩振动吸收峰; 1103 cm⁻¹、1078 cm⁻¹、1052 cm⁻¹ 和 1030 cm⁻¹ 处的吸收峰是 α 型吡喃糖苷的 C-O-C 伸缩振动特征吸收峰^[31], 由这三组糖类的特征峰可以判断, LP、GP 和 JP 是多糖。801 cm⁻¹ 处的吸收峰由呋喃环的 C-H 变角振动引起的, 865 cm⁻¹ 和 923 cm⁻¹ 处的吸收峰表示含有呋喃糖环结构。1614 cm⁻¹、1420 cm⁻¹ 为 C=O 伸缩振动特征吸收峰, 表明羧基的存在; 1261 cm⁻¹ 处的吸收峰为羧基-COOH 的 O-H 变角振动; 1371 cm⁻¹ 处的吸收峰是 -COOH 中 C=O 对称伸缩振动引起的, 表明 3 种多糖均为酸性多糖。红外光谱结果表明 3 种含有典型的多糖结构特征官能团, 且均为酸性多糖, 与其单糖组成结果一致。

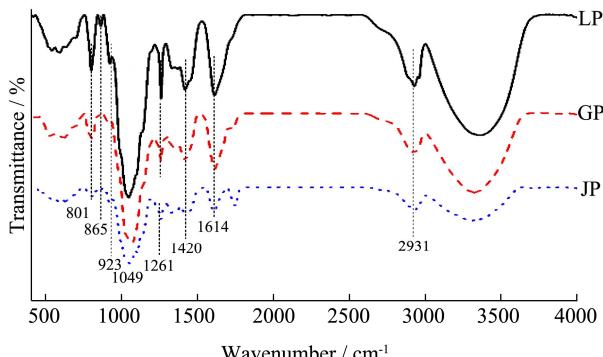


图 1 LP、GP 和 JP 的红外光谱图

Fig.1 FT-IR spectra of LP, GP and JP

2.4 多糖的微观形态

3 种多糖不同放大倍数的扫描电镜图如图 2 所示。3 种多糖的微观结构有显著差异。在低倍率下 ($\times 200$), LP 为碎片化聚集体; GP 呈片状, 碎屑化堆积形态; JP 则为网状结构。在高倍率下 ($\times 20000$), LP 表面相对光滑, 且有少量分散体缠绕; GP 表面形貌呈干燥褶皱状; JP 表面光滑, 有少量凹凸不平。

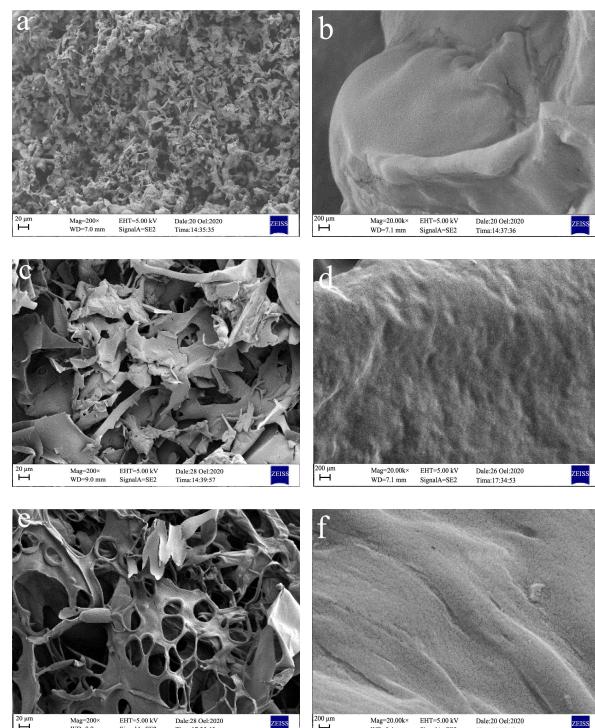


图 2 LP、GP 和 JP 的扫描电镜图

Fig.2 SEM images of LP, GP and JP

注: (a) LP, $\times 200$; (b) LP, $\times 20000$; (c) GP, $\times 200$; (d) GP, $\times 20000$; (e) JP, $\times 200$; (f) JP, $\times 20000$ 。

2.5 多糖的溶液特性

3 种多糖的溶解性、粒径、粒度分散指数 (PDI) 和 Zeta 电位结果见表 4。三者的溶解性并无显著性差异 ($p>0.05$), 均在 40 mg/mL 以上。3 种多糖的粒径大小为: JP>LP>GP。PDI 反映的是粒径分布的均匀程度, PDI 值越大表明分布越不均匀^[21]。三种多糖的 PDI 大小为: GP>LP>JP, 表明 GP 分布最不均匀。Zeta 电位反映多糖在溶液中的带电情况, 其电位绝对值越大, 表明其在溶液中越稳定^[32]。3 种多糖的 Zeta 电位都是带负电, 表明其均为阴离子多糖; 3 种多糖电位的绝对值大小为: JP>LP>GP, 表明 JP 最稳定, GP 最不稳定。这与 GP 含有 2 个分子量峰结果一致, 表明其不均匀性。

表 4 LP、GP 和 JP 溶解性、粒径、粒度分散指数与 Zeta 电位

Table 4 Solubility, particle size, particle size dispersion index and Zeta potential of LP, GP and JP

样品	溶解性/(mg/mL)	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
LP	44.13±0.67	182.70±9.18 ^b	0.50±0.02 ^b	-24.13±0.15 ^b
GP	43.37±0.75	121.07±4.28 ^a	0.81±0.06 ^c	-15.30±0.36 ^c
JP	43.60±1.61	476.57±27.21 ^c	0.36±0.06 ^a	-33.07±0.35 ^a

注：不同小写字母表示样品间有显著差异 ($p<0.05$)。

表 5 各碳源对复合益生菌株增殖的影响

Table 5 Effects of various carbon sources on the proliferation of compound probiotics

碳源	浓度/(mg/mL)				
	1	5	10	20	30
无碳源	0.20±0.01 ^A	0.20±0.01 ^A	0.20±0.01 ^A	0.20±0.01 ^A	0.20±0.01 ^A
葡萄糖	0.24±0.00 ^{ABa}	0.48±0.01 ^{Bb}	1.18±0.03 ^{Bc}	1.72±0.05 ^{Bd}	1.77±0.05 ^{BCe}
菊粉	0.29±0.00 ^{Ba}	1.06±0.00 ^{Cb}	1.52±0.05 ^{Dc}	1.87±0.05 ^{CDd}	2.00±0.07 ^{CDe}
LP	0.41±0.03 ^{Ca}	1.18±0.01 ^{Db}	1.36±0.06 ^{Cc}	1.83±0.06 ^{Bd}	2.08±0.04 ^{De}
GP	0.65±0.06 ^{Da}	1.27±0.09 ^{Eb}	1.50±0.10 ^{Dc}	1.74±0.01 ^{Bd}	2.42±0.03 ^{Ee}
JP	0.79±0.03 ^{Ea}	1.28±0.01 ^{Eb}	1.52±0.05 ^{Dc}	1.95±0.04 ^{Bd}	2.55±0.03 ^{Ee}

注：不同小写字母表示同一碳源、不同浓度间有显著差异 ($p<0.05$)；不同大写字母表示同一浓度、不同碳源间有显著差异 ($p<0.05$)。表 6 同。

表 6 各碳源对复合益生菌株产酸的影响

Table 6 Effects of various carbon sources on acid production of compound probiotics

碳源	浓度/(mg/mL)				
	1	5	10	20	30
无碳源	5.70±0.01 ^B	5.70±0.01 ^A	5.70±0.01 ^A	5.70±0.01 ^A	5.70±0.01 ^A
葡萄糖	5.65±0.01 ^{Ca}	5.04±0.04 ^{Bb}	4.51±0.01 ^{Bc}	4.00±0.03 ^{Bd}	3.73±0.03 ^{Be}
菊粉	5.82±0.04 ^{Aa}	4.79±0.04 ^{Cb}	4.23±0.01 ^{Cc}	3.90±0.01 ^{Cd}	3.76±0.01 ^{Be}
LP	5.77±0.04 ^{Ba}	4.65±0.04 ^{Db}	4.18±0.12 ^{DCc}	3.89±0.06 ^{Cd}	3.73±0.02 ^{Be}
GP	5.75±0.04 ^{Ba}	4.62±0.04 ^{Db}	4.03±0.09 ^{Dc}	3.80±0.01 ^{Dd}	3.64±0.03 ^{Ce}
JP	5.82±0.04 ^{Aa}	4.60±0.04 ^{Db}	3.98±0.05 ^{Ec}	3.70±0.01 ^{Ed}	3.50±0.03 ^{De}

理化特性不同，因而表现出不同的益生活性。

糖类物质可被益生菌作为碳源酵解利用，代谢产生乙酸、丙酸、丁酸等短链脂肪酸以及乳酸等，这些有机酸会导致培养基 pH 降低，因此，可以通过测定培养基 pH 值间接判断益生菌生长状况。从表 6 可以看出，对于同一种多糖而言，随着其浓度增加，液体培养基的 pH 值显著减小，在 30 mg/mL 的添加量下 pH 值达到最小。对于不同多糖而言，在相同浓度下，3 种多糖培养基 pH 值大小为 JP<GP<LP，这与 OD₆₀₀ 值的变化结果相符。菊粉组和 LP 组在实验浓度范围内各浓度下 pH 值都无显著性差异。葡萄糖组 pH 值是所有碳源组中最高的。Ji 等^[34]推测多糖的单糖组成影响其被肠道微生物酵解利用，如多糖中的阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、鼠李糖和甘露糖等单糖更容易被肠道微生物利用；本课题组研究发现多糖中的葡萄糖的相对含量越高，其益生活性越强；具有网状结构的多

2.6 单一多糖的益生活性

3 种多糖对复合益生菌株增殖作用的结果见表 5。由此可知，3 种多糖对复合益生菌株的增殖有促进作用。对于同一种多糖而言，随着多糖浓度的增加，其培养基的 OD₆₀₀ 值呈增大的趋势，说明多糖的增殖效果随其浓度的增加而增加，在多糖浓度为 30 mg/mL 时增殖效果最好。对于不同多糖而言，在相同浓度下，各碳源培养基 OD₆₀₀ 值整体趋势为：JP≈GP>LP>菊粉>葡萄糖>空白对照组（无碳源），但在低浓度下（1 mg/mL）JP 组的 OD₆₀₀ 值高于 GP 组，在高浓度下（20 和 30 mg/mL）菊粉组和 LP 组的 OD₆₀₀ 值相当，说明 3 种多糖对复合益生菌有显著的促进增殖效果，其效果优于菊粉和葡萄糖；JP 和 GP 的益生活性相当，均比龙眼多糖好。不同益生元的聚合度、单糖组成、支链结构都会对其益生活性产生影响^[33]，3 种多糖因其

糖,更易于被微生物分泌的碳水化合物活性酶分解利用^[35,36],这与本研究的结果一致。

2.7 三种多糖的最佳配比

正交试验优化 LP、GP 和 JP 复合配比的结果及方差分析见表 7 和表 8。由表 7 可见,3 种多糖对复合益生菌增殖的影响大小为 LP>JP>GP, 复合多糖的最佳配方为 A₂B₃C₁, 即 LP:GP:JP=2:3:1, 该最佳配比形成的复合多糖作用于复合益生菌 48 h 后, 其 OD₆₀₀ 值最大为 3.29。在表 8 方差分析中, LP 对 OD₆₀₀ 值影响极其显著 ($p<0.01$), 因素 JP 对 OD₆₀₀ 值影响不显著 ($p>0.05$), 因素 GP 可归为误差, 这与极差分析的因素主次结果一致。

进一步比较最佳配比形成的复合多糖与各单一多糖在相同浓度下对复合益生菌增殖和 pH 的影响, 结

果如图 3 所示, 在 30 mg/mL 的浓度水平上, 复合多糖促进复合益生菌株增殖的效果显著高于单一多糖及葡萄糖和菊粉对照组 ($p<0.05$), 其对应培养基的 pH 值显著低于单一多糖和其他对照组 ($p<0.05$)。由此表明, LP、GP 和 JP 多糖经复合后, 具有显著的协同益生增效作用。分析 3 种多糖具有协同增效的原因, 可能与其结构以及对不同益生菌的影响不同有关。前人研究报道龙眼多糖能促进发酵乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌等益生菌增殖表现出益生活性^[35], 而枸杞多糖可显著促进长双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、德氏乳酸杆菌保加利亚亚种等益生菌增殖^[14,37], 红枣多糖则促进发酵乳酸菌和双歧杆菌等益生菌增殖^[38,39]。由此可见, 3 种多糖对不同益生菌的影响效果是不同的, 因此 3 种多糖的复合多糖对复合益生菌的促增殖效果会显著强于单一多糖。

表 7 试验方案和极差分析结果

Table 7 Test scheme and range analysis results

试验号	A: LP/(mg/mL)	B: GP/(mg/mL)	C: JP/(mg/mL)	空列	试验方案	多糖比例	OD ₆₀₀
1	1	1	1	1	A ₁ B ₁ C ₁	1:1:1	2.77
2	1	2	2	2	A ₁ B ₂ C ₂	1:2:2	2.41
3	1	3	3	3	A ₁ B ₃ C ₃	1:3:3	2.61
4	2	1	2	3	A ₂ B ₁ C ₂	2:1:2	3.06
5	2	2	3	1	A ₂ B ₂ C ₃	2:2:3	3.28
6	2	3	1	2	A ₂ B ₃ C ₁	2:3:1	3.29
7	3	1	3	2	A ₃ B ₁ C ₃	3:1:3	3.21
8	3	2	1	3	A ₃ B ₂ C ₁	3:2:1	3.18
9	3	3	2	1	A ₃ B ₃ C ₂	3:3:2	3.20
K1	9.59	10.84	11.04	11.05			
K2	11.43	10.67	10.47	10.71			
K3	11.39	10.90	10.90	10.65			
k1	3.20	3.61	3.68	3.68			
k2	3.81	3.56	3.49	3.57			
k3	3.80	3.63	3.63	3.55			
极差 R	1.84	0.23	0.56	0.40			
因素主次					A>C>B		
优方案					A ₂ B ₃ C ₁		

表 8 正交试验的方差分析表

Table 8 Variance analysis table of probiotic activity

差异源	SS	df	MS	F	F _{0.05} (2,4)	F _{0.01} (2,4)	显著性
A (LP)	0.74	2	0.37	23.62	6.94	18.00	**
B (GP)	0.01	2	0.00	0.30			
C (JP)	0.06	2	0.03	1.86			
误差	0.04	4	0.01				

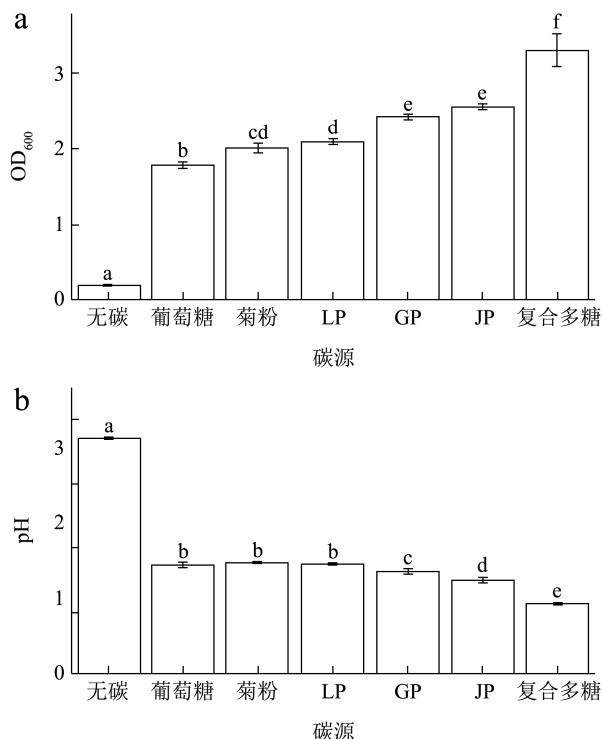


图3 各碳源对复合益生菌株增殖(a)和产酸(b)的影响

Fig.3 Effects of various carbon sources on the proliferation (a)

and acid production (b) of the compound probiotics

注: 不同小写字母表示不同碳源有显著差异 ($p < 0.05$)。

3 结论

比较龙眼多糖、枸杞多糖和红枣多糖的理化性质和益生活性差异，发现红枣多糖得率最高、分子量最大；枸杞多糖的中性糖含量最低、糖醛酸含量最高；龙眼多糖的分子量最小、中性糖含量最高；3种多糖的微观结构有显著差异，枸杞多糖在溶液中最不稳定、红枣多糖最稳定；3种多糖单独作用时均能显著促进益生菌增殖，经复配后其益生活性显著增强，最佳的复配比为龙眼多糖:枸杞多糖:红枣多糖=2:3:1。有关三种多糖协同作用的机理有待进一步研究。本研究可丰富植物活性多糖的理论基础，又可为龙眼、枸杞、红枣的精深加工提供理论依据。

参考文献

- [1] Rong Y, Yang R, Yang Y, et al. Structural characterization of an active polysaccharide of longan and evaluation of immunological activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 213: 247-256
- [2] Zhu J, Liu W, Yu J, et al. Characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide extracted from the fruit of *Lycium barbarum* L. [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1): 8-16
- [3] Lei X, Huo P, Wang Y, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides improve testicular spermatogenic function in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Frontiers in Endocrinology, 2020, 11: 1-11
- [4] Zhan R, Xia L, Shao J, et al. Polysaccharide isolated from Chinese jujube fruit (*Zizyphus jujuba* cv. *Junzao*) exerts anti-inflammatory effects through MAPK signaling [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 40: 461-470
- [5] Ji X, Hou C, Yan Y, et al. Comparison of structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 149: 1008-1018
- [6] Liu J, Willförl S, Xu C. A review of bioactive plant polysaccharides: biological activities, functionalization, and biomedical applications [J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2015, 5(1): 31-61
- [7] 李茜,吴涛,刘锐,等.植物多糖与肠道菌群互作及其对代谢综合征的影响[J].食品安全质量检测学报,2020,11(21):7649-7655
- LI Qian, WU Tao, LIU Rui, et al. Interaction between plant polysaccharide-intestinal microbiota interaction and its effect on metabolic syndrome [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(21): 7649-7655
- [8] Zhu Y, Cong W, Shen L, et al. Fecal metabonomic study of a polysaccharide, MDG-1 from *Ophiopogon japonicus* on diabetic mice based on gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry (GC TOF/MS) [J]. Molecular BioSystems, 2014, 10(2): 304-312
- [9] 张慧莹,曾丽萍,任运红,等.乳酸芽孢杆菌发酵液护色的山药多糖对DSS诱导的小鼠结肠炎的改善作用及机制[J/OL]. 食品科学:1-11[2021-08-12].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210406.1513.049.html>
ZHANG Huiying, ZENG Liping, REN Yunhong, et al. Anti-inflammatory effects of polysaccharides from Chinese yam by *Bacillus* sp. fermented color-protective agent on DSS-induced colitis in mice [J/OL]. Food Science: 1-11 [2021-08-12].<https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210406.1513.049.html>
- [10] 张智,包智影,孙家佳,等.发酵黄精多糖对肥胖小鼠肠道菌群的影响[J].华南理工大学学报(自然科学版),2021,49(3):95-105,113
ZHANG Zhi, BAO Zhiying, SUN Jiajia, et al. Effect of fermented *Polygonatum sibiricum* polysaccharides on intestinal flora in obese mice [J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2021, 49(3): 95-105, 113

- [11] 张圣方,赵龙玉,赵凤春,等.泰山蛹虫草多糖对免疫抑制小鼠肠道菌群及分泌型免疫球蛋白 A 的影响[J].食品科学, 2015, 36(5):148-152
ZHANG Shengfang, ZHAO Longyu, ZHAO Fengchun, et al. Effect of *Cordyceps taishanensis* polysaccharide on intestinal microflora and secretory immunoglobulin a in immunosuppressive mice [J]. Food Science, 2015, 36(5): 148-152
- [12] Martel J, Ko Y-F, Ojcius D M, et al. Immunomodulatory properties of plants and mushrooms [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2017, 38(11): 967-981
- [13] Guo L, Liu J, Hu Y, et al. Astragalus polysaccharide and sulfated epimedium polysaccharide synergistically resist the immunosuppression [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90: 1055-1060
- [14] Wang M, Xie Z, Li L, et al. Supplementation with compound polysaccharides contributes to the development and metabolic activity of young rat intestinal microbiota [J]. Food & Function, 2019, 10(5): 2658-2675
- [15] 沙继斌,张静,隋波,等.有氧运动与复合多糖干预对高脂膳食诱导肥胖大鼠肠道菌群的影响[J].中国运动医学杂志, 2018, 37(4):328-336
SHA Jibin, ZHANG Jing, SUI Bo, et al. Effects of aerobic exercise and polysaccharide compounds interventions on gut microbiota of the high fat diet induced obese rats [J]. Chinese Journal of Sports Medicine, 2018, 37(4): 328-336
- [16] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-354
- [17] M C C Filisetti-Cozzi T, C Carpita N. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars [J]. Analytical Biochemistry, 1991, 197(1): 157-162
- [18] Zhang J, Li C, Huang Q, et al. Comparative study on the physicochemical properties and bioactivities of polysaccharide fractions extracted from fructus Mori at different temperatures [J]. Food Function, 2019, 10(1): 410-421
- [19] 尹艳,宋冠华,李周玉,等.水溶性大豆多糖溶解性的研究[J].惠州学院学报,2009,29(3):13-16
YIN Yan, SONG Guanhua, LI Zhouyu, et al. Study on the solubility of soluble soybean polysaccharides [J]. Journal of Huizhou University, 2009, 29(3): 13-16
- [20] 白亚娟.龙眼果肉多糖的肠道免疫调节作用及其机制研究[D].武汉:华中农业大学,2018
BAI Yajuan. Intestinal immune regulation activity and mechanism of polysaccharides from longan pulp [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018
- [21] 洪锐岳.乳酸菌发酵对龙眼果肉多糖理化性质及生物活性的影响[D].广州:华南师范大学,2018
HONG Ruiyue. Research on the physicochemical property and biological activity of polysaccharides from longan pulp fermentation by lactic acid bacteria [D]. Guangzhou: South China Normal University, 2018
- [22] Yang R, Zhao C, Chen X, et al. Chemical properties and bioactivities of Goji (*Lycium barbarum*) polysaccharides extracted by different methods [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 17: 903-909
- [23] Long X, Yan Q, Cai L, et al. Box-Behnken design-based optimization for deproteinization of crude polysaccharides in *Lycium barbarum* berry residue using the Sevag method [J]. Heliyon, 2020, 6(5): e03888
- [24] Li J, Ding S, Ding X. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Ziziphus jujuba* cv. *jinsixiaozao* [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 80(1): 176-183
- [25] Yang Y, Qiu Z, Li L, et al. Structural characterization and antioxidant activities of one neutral polysaccharide and three acid polysaccharides from *Ziziphus jujuba* cv. *hamidazao*: a comparison [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 261: 117879
- [26] Chao L, Lei W, Jie X, et al. Physicochemical, functional, and biological properties of water-soluble polysaccharides from *Rosa roxburghii* tratt fruit [J]. Food Chemistry, 2018, 249: 127-135
- [27] Lan H, Cheng Y, Mu J, et al. Glucose-rich polysaccharide from dried 'Shixia' longan activates macrophages through Ca²⁺ and CR3- mediated MAPKs and PI3K-AKT pathways [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 17203: 9
- [28] Tang H, Chen C, Wang S, et al. Biochemical analysis and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 77: 235-242
- [29] Zou M, Chen Y, Sun-Waterhouse D, et al. Immunomodulatory acidic polysaccharides from *Ziziphus jujuba* cv. *huizao* : insights into their chemical characteristics and modes of action [J]. Food Chemistry, 2018, 258: 35-42
- [30] 徐金楠,刘玮,刘春晶,等.不同枸杞中多糖含量与结构特征的对比研究[J].中国食品学报,2015,15(4):233-239
XU Jinnan, LIU Wei, LIU Chunjing, et al. Comparative study of the content and structural features of polysaccharides from

- different *Lycium* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(4): 233-239
- [31] Xu Y, Liu X, Wang Y, et al. Dynamic analysis model of extraction and structural characteristics of polysaccharide from Linze jujube [J]. Food Science, 2019, 40(3): 1-8
- [32] Niu Y, Li N, Xia Q, et al. Comparisons of three modifications on structural, rheological and functional properties of soluble dietary fibers from tomato peels [J]. LWT - Food Science and Technology, 2018, 88: 56-63
- [33] 王鑫.菜籽多糖的化学修饰及其衍生物的体外抗氧化和益活性研究[D].合肥:合肥工业大学,2017
WANG Xin. Study on the chemical modification, antioxidant activity *in vitro* and prebiotic activity of rapeseed polysaccharides [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2017
- [34] Ji X, Hou C, Zhang X, et al. Microbiome-metabolomic analysis of the impact of *Zizyphus jujuba* cv. *muzao* polysaccharides consumption on colorectal cancer mice fecal microbiota and metabolites [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 131: 1067-1076
- [35] 王轶帆,邓媛元,张雁,等.龙眼多糖与燕麦多糖的结构特征及其益活性比较[J].中国食品学报,2020,20(12):62-71
WANG Yifan, DENG Yuanyuan, ZHANG Yan, et al. Comparison of structure characteristics and probiotic activity of longan polysaccharides and oat polysaccharides [J].
- [36] Huang F, Hong R, Zhang R, et al. Physicochemical and biological properties of longan pulp polysaccharides modified by *Lactobacillus fermentum* fermentation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 125: 232-237
- [37] 王瑞君.枸杞多糖对德氏乳酸杆菌在体外生长与保存活力的影响[J].河北科技大学学报,2012,33(2):115-118
WANG Ruijun. Effects of *Lycium barbarum* polysaccharides on growth and preservation of *Lactobacillus delabriicki* [J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2012, 33(2): 115-118
- [38] 崔国庭,李沁沛,王缎,等.红枣多糖对乳酸菌发酵及酸奶品质的影响[J].食品工业科技,2017,38(19):203-207
CUI Guoteng, LI Qinpei, WANG Duan, et al. Effect of jujube date polysaccharide on the fermentation of lactic acid bacteria and the quality of yogurt [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(19): 203-207
- [39] 邱宏端,林娟,宋智晶,等.植物多糖的提取及对双歧杆菌的增殖作用[J].农业工程学报,2002,18(2):96-100
QIU Duanhong, LIN Juan, SONG Zhijing, et al. Extraction of vegetal polysaccharose and its effect on *Bifidobacterium multiplication* [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2002, 18(2): 96-100

(上接第 57 页)

- [36] 郑志瑶,王伟军,陈波,等.降胆固醇乳酸菌的筛选、鉴定与益生特性评价[J].中国食品学报,2020,20(12):239-247
ZHENG Zhiyao, WANG Weijun, CHEN Bo, et al. Screening and identification of cholesterol-lowering lactic acid bacteria and evaluation of their probiotic characteristics [J]. Chinese Journal of Food, 2020, 20(12): 239-247
- [37] GB 4789.35-2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S]
GB 4789.35-2016, National Standard for Food Safety-microbiological Examination of Food-examination of Lactic Acid Bacteria [S]
- [38] 布坎南 R E,吉布斯 N E.伯杰氏细菌鉴定手册[M].中国科学院微生物研究所《伯杰氏细菌鉴定手册》翻译组,译.8 版.北京:科学出版社,1984:809-821
Buchanan R E, Gibbs N E. Berger's Manual of bacterial Identification [M]. Translation Team of Berger's Handbook on Bacterial Identification, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. 8th Edition. Beijing: Science Press, 1984: 809-821
- [39] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:370-410
DONG Xiuzhu, CAI Miaoying. Manual for Systematic Identification of Common Bacteria [M]. Beijing: Science Press, 2001: 370-410