

马冠骅, 姜斯琪, 张劲松, 等.  $\beta$ -葡寡糖的制备及其结构鉴定和生物活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(8): 429–436. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050169

MA Guanhua, JIANG Siqu, ZHANG Jingsong, et al. Research Progress on Preparation, Structure Identification and Bioactivity of  $\beta$ -Glucooligosaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(8): 429–436. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050169

· 专题综述 ·

# $\beta$ -葡寡糖的制备及其结构鉴定和生物活性研究进展

马冠骅<sup>1,2</sup>, 姜斯琪<sup>1,2</sup>, 张劲松<sup>1</sup>, 秦 秀<sup>1</sup>, 冯 杰<sup>1</sup>, 刘艳芳<sup>1,2,\*</sup>

(1.上海市农业科学院食用菌研究所, 农业农村部南方食用菌资源利用重点实验室,  
国家食用菌工程技术研究中心, 上海 201403;  
2.上海理工大学健康科学与工程学院, 上海 200093)

**摘 要:** 低聚糖是一种新型功能性糖原, 在食品领域应用广泛。 $\beta$ -葡寡糖是一类由 2~20 个葡萄糖通过  $\beta$ -糖苷键连接而成的低聚糖, 主要由葡聚糖经不同方法降解制备得到, 因其分子量低、水溶性好、结构独特、吸收效率高等特点, 在调节肠道菌群、增强免疫、抗肿瘤等方面表现出较好的生物活性, 在食品、保健品和药品等领域具有广阔的应用前景。为促进  $\beta$ -葡寡糖的研究与开发, 本文就近年有关  $\beta$ -葡寡糖的降解制备、分离纯化、结构表征方法及其生物活性方面的研究进行系统综述, 以期对  $\beta$ -葡寡糖的深度研究与利用提供一定的参考。

**关键词:**  $\beta$ -葡寡糖, 制备, 纯化, 结构表征, 生物活性

中图分类号: R151.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)08-0429-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050169

本文网刊:



## Research Progress on Preparation, Structure Identification and Bioactivity of $\beta$ -Glucooligosaccharides

MA Guanhua<sup>1,2</sup>, JIANG Siqu<sup>1,2</sup>, ZHANG Jingsong<sup>1</sup>, QIN Xiu<sup>1</sup>, FENG Jie<sup>1</sup>, LIU Yanfang<sup>1,2,\*</sup>

(1. Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Edible Fungal Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, China, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Shanghai 201403, China;

2. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** Oligosaccharide is a new type of functional glycogen and widely used in the food field.  $\beta$ -glucooligosaccharides are kinds of oligosaccharides composed of 2~20 glucoses connected by  $\beta$ -glycosidic bonds, which are mainly prepared by the degradation from  $\beta$ -glucans with different methods.  $\beta$ -glucooligosaccharides possess characteristics of low molecular weight, good water solubility, unique structure and high absorption efficiency, resulting in many biological activities such as regulating intestinal flora, enhancing immunity and anti-tumor, etc. Therefore, they have a broad application prospect in food, health products, medicine and other fields. In order to promote the research and development of  $\beta$ -glucooligosaccharides, this paper reviews the recent studies on the degradation preparation, separation and purification, structural characterization and biological activity of  $\beta$ -glucooligosaccharides, which is expected to provide references for the further research and utilization of  $\beta$ -glucooligosaccharides.

**Key words:**  $\beta$ -glucooligosaccharide; preparation; purification; structural characterization; biological activity

收稿日期: 2022-05-17

基金项目: 上海市自然科学基金项目 (20ZR1418700); 上海市闵行区领军人才项目 (201844)。

作者简介: 马冠骅 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 糖化学及其功效学研究, E-mail: 528691363@qq.com。

\* 通信作者: 刘艳芳 (1980-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 糖化学及其功效学研究, E-mail: aliu-1980@163.com。

随着糖科学的发展,越来越多的学者认识到多糖是生命过程中不可或缺的信息和功能分子,在细胞的生长、分化、发育过程中担任着关键角色。葡聚糖是由葡萄糖单体聚合而成的一类高分子多糖,可分为 $\alpha$ 型和 $\beta$ 型。常见的 $\alpha$ -葡聚糖主要有淀粉、糊精、糖原等,常作为能量物质用于食品工业。 $\beta$ -葡聚糖作为高效的生物反应调节因子(biological response modifiers, BRM),广泛存在于植物、真菌、细菌、藻类和酵母等生物中,具有重要的研究和开发前景。研究表明, $\beta$ -葡聚糖有多种生物学活性,如免疫调节、抗肿瘤<sup>[1]</sup>、抗氧化、抗衰老、防辐射<sup>[2-4]</sup>、抗炎、降血糖和降血脂<sup>[5-9]</sup>等,但是因其来源不同会导致其结构和生物活性存在差异,几种不同来源 $\beta$ -葡聚糖的结构信息见表1。但由于自然界中提取到的 $\beta$ -葡聚糖相对分子质量较大、水溶性差,不利于人体吸收发挥其生物活性,因此极大地限制了 $\beta$ -葡聚糖的应用。

$\beta$ -葡寡糖是由2~20个葡萄糖通过 $\beta$ -糖苷键连接而成的低聚糖。相关研究表明低聚糖的低分子量和简单结构能增加多糖原有的生物活性<sup>[8]</sup>,如Kim等<sup>[9]</sup>用 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-葡聚糖酶降解姬松茸 $\beta$ -葡聚糖得到 $\beta$ -葡寡糖(DP2、DP3),其在糖尿病大鼠中降血糖活性约为 $\beta$ -葡聚糖的两倍。低聚木糖、低聚半乳糖、壳寡糖等作为一种新型功能性糖源,现已广泛应用于食品、保健品、畜牧业和医药等领域。近些年,随着对 $\beta$ -葡聚糖研究工作的不断深入,其对应降解组分 $\beta$ -葡寡糖(Glucooligosaccharides, GOS)的研究也逐渐得到重视。现有研究表明, $\beta$ -葡寡糖具有较好的抗菌、免疫、抗氧化等生物活性,具有多方面开发应用的潜力。本文主要针对 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)糖苷键为主链连接的葡聚糖降解制备 $\beta$ -葡寡糖的方法及其分离纯化、结构表征和生物活性等方面进行全面综述,以期对 $\beta$ -葡寡糖的进一步研究与开发应用提供科学基础。

## 1 $\beta$ -葡寡糖的制备

$\beta$ -葡寡糖的制备方法主要有两种:人工合成法和多糖降解法。人工合成法可以精确制备得到确切结构的 $\beta$ -葡寡糖,如Sujit等<sup>[19]</sup>利用自组装膜电化学合

成 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-葡寡糖,虽然可控但条件较为苛刻,每个条件只能合成一种或几种寡糖,效率不高,且自组装膜的结构和特性受多种因素的影响,如基底表面性质、溶液性质、被组装分子性质等,目前仅处于实验室制备研究阶段,无法实现规模化生产。多糖降解法是目前较大批量制备 $\beta$ -葡寡糖的常用方法。目前常用的降解方法主要有化学法、物理法、酶法等。

### 1.1 化学降解法

常用的化学降解法有酸法和氧化法。

酸法降解是经典的多糖降解方法,酸法降解的优势在于其成本低、简单易行、通过改变反应条件使多糖的糖苷键断裂从而得到单糖及不同聚合度的寡糖片段<sup>[20]</sup>。傅赟彬等<sup>[21]</sup>采用0.05 mol/L的盐酸降解可德兰多糖,结果得到了聚合度(DP)为2~19的GOS产物。也有研究发现酸法降解存在降解效率较低以及产物中寡糖聚合度较小的缺点,如秦秀等<sup>[22]</sup>对灵芝 $\beta$ -葡聚糖经0.1~1.0 mol/L的硫酸溶液降解8 h,结果表明,随着酸浓度的增加分子量变化不明显,仅从 $2.42\times 10^6$ 降至 $1.05\times 10^6$  g/mol,测定其降解率仅为5%~12%,并且产物中主要以单糖和二糖为主。

氧化降解主要分为两种,一种是基于 $\cdot\text{OH}$ 自由基对糖苷键的断裂,在降解过程中自由基攻击糖链使糖苷键发生非酶断裂,并引入新的官能团<sup>[23]</sup>,从而对 $\beta$ -葡聚糖进行降解。这种方法不仅速率快,而且可以通过改变溶液中 $\cdot\text{OH}$ 自由基的浓度得到特定分子量的产物,如采用不同浓度的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 与 $\text{FeSO}_4$ 溶液降解两种大麦 $\beta$ -葡聚糖,结果表明随着 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度由0.2%增至1.0%,产物的分子量不断降低,其中分子量为 $6.06\times 10^5$  g/mol的大麦 $\beta$ -葡聚糖随着 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度的变化,其分子量降至 $5.54\times 10^4\sim 5.61\times 10^5$  g/mol之间;而分子量为 $6.99\times 10^5$  g/mol的大麦 $\beta$ -葡聚糖,其降解产物的分子量处于 $3.73\times 10^4\sim 5.73\times 10^5$  g/mol之间<sup>[24]</sup>,此外在过程中添加还原剂如抗坏血酸也可以提高降解效率,如Faure等<sup>[23]</sup>发现 $\beta$ -葡聚糖溶液中单独存在铁(II)能够促进 $\cdot\text{OH}$ 的形成,从而促进 $\beta$ -葡聚糖的降解且在 $\beta$ -葡聚糖溶液中添加抗坏血酸和铁(II)明显加速了多糖的氧化裂解。另一种方法为

表1 不同来源 $\beta$ -葡聚糖主要结构特征和分子量

Table 1 Main structural characteristics and molecular weights of  $\beta$ -glucans from different sources

| 种类 | 来源    | 结构                                                                                                                            | 分子量(Da)                               | 参考文献 |
|----|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------|
| 植物 | 青稞    | 线性的以 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-葡萄糖和 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡萄糖连接                                                     | $9\times 10^3\sim 12\times 10^3$      | [10] |
|    | 燕麦    | 线性的以 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-葡萄糖和 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡萄糖连接,两种糖苷键比例7:3                                          | $0.35\times 10^5\sim 29.6\times 10^5$ | [11] |
| 真菌 | 灵芝子实体 | 以 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡萄糖连接为主链、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-葡萄糖连接为支链,主链与支链的比例为3:1                                   | $3.75\times 10^6$                     | [12] |
|    | 裂褶菌   | 以 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡萄糖连接为主链、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-葡萄糖连接为支链                                                | $1\times 10^6$                        | [13] |
|    | 猴头菇   | 以 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-葡萄糖连接为主链, $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡萄糖连接为支链,主链与支链的比例为6:1                                   | $3.5\times 10^4$                      | [14] |
|    | 香菇    | 以 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡萄糖连接为主链, $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-葡萄糖或 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡萄糖连接为支链,主链与支链的比例为5:2 | $3\times 10^5\sim 8\times 10^5$       | [15] |
|    | 酵母    | 以 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡萄糖连接为主链, $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-葡萄糖连接为支链                                                | $5.45\times 10^4\sim 3.7\times 10^6$  | [16] |
| 细菌 | 可德兰   | 线性的以 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡萄糖连接                                                                                       | $5.4\times 10^4\sim 9\times 10^4$     | [17] |
| 藻类 | 昆布多糖  | 以 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡萄糖连接为主链,O-6位置连接单个 $\beta$ -D-葡萄糖为支链                                                           | $2\times 10^3\sim 1\times 10^4$       | [18] |

$H_2O_2$  降解法, 这种方法采用 NaOH 与  $H_2O_2$  同时作用从而切断多糖链、达到降解效果, 过程操作简便、无副产物且降解率较高。Zhu 等<sup>[25]</sup> 以 2 mol/L 的 NaOH, 2%(v/v) 的  $H_2O_2$ , 85 °C 下降解 40 min 可将可德兰多糖由分子量为  $4.2 \times 10^5$  降至  $5.268 \times 10^3$  g/mol, 且降解率高达 83%, 并采用红外光谱证实了产物的主链未发生变化。

化学降解法能够明显降低多糖的分子量, 得到较低聚合度的寡糖, 因此所得产物的溶解度显著提高, 但是过程中会使用化学试剂, 并需要将降解产物中的盐或金属离子除去, 过程比较繁琐。

## 1.2 物理降解法

常见的物理降解包括辐射法、微波法和超声波法<sup>[26]</sup>。

辐射法是采用  $\gamma$ -射线直接照射样品, 以随机断裂的形式切断糖苷键, 从而得到分子量较低且溶解度较好的寡糖<sup>[27]</sup>。Khan 等<sup>[28]</sup> 采用了  $\gamma$ -射线对酵母  $\beta$ -葡聚糖进行了降解, 未辐照酵母  $\beta$ -葡聚糖的平均相对分子质量为 175 kDa, 经不同剂量的 (0、5、10、20、30、50 kGy) 的  $\gamma$ -射线照射发现其分子量随剂量的提高而不断降低, 其中经 50 kGy 辐照后, 其平均相对分子质量降至 27.9 kDa。且研究发现, 当辐射剂量提高至一定值时, 产物的分子量逐渐趋于平稳, 此时继续加大辐射剂量, 产物的分子量并不会发生明显降低。如 Byun 等<sup>[29]</sup> 对黑酵母  $\beta$ -葡聚糖进行降解时, 发现照射剂量由 10 增至 30 kGy 时, 产物的分子量由  $6.2 \times 10^4$  g/mol 显著降至  $3.2 \times 10^4$  g/mol, 但当继续增加照射剂量至 50 kGy 时发现, 产物的分子量仅降至  $2.5 \times 10^4$  g/mol, 此时继续加大剂量, 降解产物的分子量并没有明显的降低, 表明产物分子量在达到稳定后便不易再发生变化。

微波降解作为目前常用的提取、降解多糖的方法, 是通过能量辐射多糖达到断裂糖苷键的效果。但是, 在对多糖进行微波降解时发现, 微波的条件对降解效率以及产物的组成有较大的影响。一方面, 若降解条件过温和可能使产物得不到充分的降解; 另一方面, 当降解条件过于剧烈时可能导致多糖过度降解为单糖, 甚至可能使多糖变性, 因此进行微波法降解时, 选择合适的降解条件至关重要。Wang 等<sup>[30]</sup> 对可德兰多糖进行降解时发现, 在 180 °C 下作用 60 min 时降解效率高达 87.4%, 并通过薄层色谱法证明了产物中 GOS 组分较丰富。但当降解温度为 170 °C 时, 多糖的降解率仅为 52.5%, 降解率相对于 180 °C 时明显降低。

超声法是将多糖置于超声场中, 通过超声的空化效应、机械效应以及热效应破坏多糖的糖苷键从而达到降低分子量的效果。其具有操作过程较简便、环境污染较低、反应速率快的特点, 因而成为目前降解多糖的主要方法之一。Yan 等<sup>[31]</sup> 利用超声降解可德兰多糖, 在超声工作频率为 20 kHz 条件下作

用 90 min, 0.05% 的可德兰多糖的分子量由  $9.5 \times 10^5$  降至  $0.92 \times 10^5$  g/mol, 同时通过 FTIR 和  $^{13}C$ -NMR 对产物进行结构解析, 证明了超声处理不影响可德兰的一级化学结构。林勤保等<sup>[32]</sup> 利用超声波对多种食用菌多糖降解, 发现经过长时间超声处理后, 分子量的值趋于一个极限恒定值, 约 50000 Da 左右。

与化学降解法相比, 物理降解过程中不需要添加或者较少添加化学试剂, 减少了对环境的污染, 且降解所用时间短, 降解效率较高。但对于超声波和辐照降解法而言, 在降解过程中随着反应条件的提高, 降解产物的分子量不断降低, 但在达到某一稳定值之后, 即使进一步提高降解条件, 产物的分子量也很难进一步降低。而微波法降解的操作条件对产物特征有极大的影响, 条件过于剧烈时, 微波会将多糖降解为单糖甚至产生副产物, 因此在采用物理法降解多糖时需要综合考虑不同方法产物的特点进行选择。

## 1.3 酶降解法

不同于对糖苷键随机断裂的化学法及物理法降解, 酶法是直接作用于多糖中特定的糖苷键, 此法因酶的专一性强、降解速度快、产物的分子量易于控制等优点, 在多糖降解研究中具有较大的潜力。 $\beta$ -葡聚糖酶按来源可分为植物性  $\beta$ -葡聚糖酶和微生物性  $\beta$ -葡聚糖酶, 后者又可再分为细菌性  $\beta$ -葡聚糖酶和真菌性  $\beta$ -葡聚糖酶, 现在主要从细菌如枯草芽孢杆菌或真菌如黑曲霉、木霉等微生物中提取  $\beta$ -葡聚糖酶。Sibakov 等<sup>[33]</sup> 采用商业酶制剂 Depol 740 L 降解具有  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4) 糖苷键结构的燕麦多糖时发现该酶制剂主要裂解  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) 糖苷键。尽管专一性酶降解具有降解率高、产物明确的特点, 但目前专一性酶不易得到, 而非专一性酶降解效率较低, 如 Li 等<sup>[34]</sup> 以内切  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡聚糖酶降解可德兰多糖时, 对结构为  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) 糖苷键结构的可德兰多糖的降解率达 70% 以上, 而 Qian 等<sup>[35]</sup> 采用非专一性的淀粉酶降解可德兰多糖时, 降解率仅为 15.6%。因此在采用酶法降解时根据样品的结构特点寻找适合的专一性酶至关重要。

与化学法及物理法相比, 酶降解能够断裂特定糖苷键, 产物的分子量较易控制, 此外过程中化学试剂用量少, 对环境污染较低。但是专一性酶不易得到, 酶制剂价格昂贵, 且酶法降解对环境的要求较高, 诸多因素都会影响酶的降解效果。

## 1.4 联合降解法

结合不同降解方法的特点和多糖自身的结构特征, 可将两种或多种降解方法联合应用于多糖的降解。如 Zheng 等<sup>[36]</sup> 将超声法与酶法降解结合, 利用超声处理将酵母  $\beta$ -葡聚糖的粒径从 8.80 降低到 1.77  $\mu m$  从而增加酶与多糖的接触面积, 使酵母多糖的降解率达到 32.3%。Kumagai 等<sup>[37]</sup> 利用在大肠杆菌中表达的  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) 葡聚糖酶 (GH64) 对可德兰多糖进行降解, 发现 GH64 酶本身对天然多糖的水解

活性较低,而将可德兰多糖经 90 °C 热预处理能够明显提高 GH64 酶对可德兰的降解效率,使其降解率从 3% 提高至 60%。联合降解法将不同降解方法相结合,能够优化产物分布、提高降解率,但同时会使降解过程变得繁琐,实验的操作变得复杂,成本增加。

综上所述,化学法、物理法、酶法以及将两种或多种降解方法联用均是目前制备寡糖常用的方法,然而各种方法的产物组成以及降解率等方面均存在较大的差异,所以,在  $\beta$ -葡寡糖的工业生产中,研究者需根据多糖特性和实验目的选择合适的降解方法进行优化,从而获得有效的降解方案。

## 2 $\beta$ -葡寡糖的分离纯化和结构表征

### 2.1 $\beta$ -葡寡糖的分离纯化

由  $\beta$ -葡聚糖水解得到的葡寡糖通常是多种聚合度片段组成的混合物,需要将其进行分离纯化,以便进行结构特征、生理功能和物理化学特性的研究。目前研究中,常采用常压或高压凝胶过滤、高效制备液相等多种方法对其进行纯化。

凝胶排阻色谱法是近年来常用的分离纯化  $\beta$ -葡寡糖的方法,此法操作简单并且可实现单一聚合度葡寡糖的分离。目前常用凝胶的种类主要有葡聚糖凝胶(Sephadex)、琼脂糖凝胶(Agarose)、聚丙烯酰胺凝胶(Bio-Gel)等,根据交联度的高低将凝胶分为不同规格,需要根据所分离物质的聚合度大小和性质选择不同规格的凝胶。由于凝胶排阻色谱法是根据样品分子量的差异进行分离<sup>[38]</sup>,因此很难分离分子量相同的寡糖,经常需要多个凝胶柱联用来达到更好的分离效果。姜瑞芝等<sup>[39]</sup>使用 DEAE-Sephadex A-50 分离得到猴头菇寡糖 HEP-1 组分,进一步通过 Sephadex G-25 分离得到 HEP-1-1、HEP-1-2、HEP-1-3,其中 HEP-1-3 是由二糖至七糖组成的混合葡寡糖。Bio-Gel P 系列凝胶色谱柱也是目前常用的寡糖分离柱,例如秦秀<sup>[40]</sup>利用 Bio-Gel P-2 将微波处理后的灵芝  $\beta$ -葡寡糖混合物分离得到 8 个寡糖组分。另外,高效液相色谱法常用于不同寡糖组分的分离分析,常用的色谱柱为:亲水作用色谱柱(HILIC)、反相  $C_{18}$  柱、高效离子交换色谱柱、凝胶柱等。分离纯化时根据纯化条件选择相应填料可保证寡糖分离效果。Fu 等<sup>[41]</sup>采用亲水液相色谱(HILIC)体系将酸水解得到的可德兰寡糖进行分离,成功获得聚合度为 2~10 的 9 个  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-葡寡糖单体,并对其进行构效关系研究,结果表明聚合度越高的葡寡糖在植物体内的防御反应越强。宗玉<sup>[42]</sup>采用半制备液相分离可德兰多糖水解液得到葡萄糖和聚合度 2~10 的葡寡糖。王仲孚等<sup>[43]</sup>用 PMP 衍生化试剂对寡糖链进行标记,通过高效液相色谱分离得到聚合度为 1~16 的葡寡糖。通过 PMP 衍生化结合 HPLC 法分离分析寡糖,可以大大提高检测灵敏度和分离效率,但分离纯化后的衍生物需经过还原处理获得寡糖单体,样品损耗较大。

### 2.2 $\beta$ -葡寡糖的结构鉴定

寡糖的结构与其生物活性密不可分。将  $\beta$ -葡寡糖混合物经色谱柱等手段分离纯化后,可获得不同聚合度的寡糖单体,为进一步探究葡寡糖的构效关系,需要对其进行结构解析。近年来,常用于葡寡糖的结构鉴定的方法如下,主要是质谱和核磁共振。

利用质谱法对寡糖样品进行分析具有准确、高效及快捷等优点。根据图谱中的  $m/z$  值可以得到产物的分子量信息,对产物的聚合度进行归属<sup>[44]</sup>。分析寡糖常用的电离方式有电喷雾电离(ESI)、基质辅助激光解析电离源(MALDI)<sup>[45]</sup>。目前,质谱(MS)分析技术样品用量少,且易于与分离手段联用,实现自动化,已成为寡糖结构分析的重要方法之一。孙玉姣等<sup>[46]</sup>以可德兰多糖为原料,利用 HPLC 和 ESI-MS 技术对酸降解后获得的可德兰的各组分进行了分离分析和结构鉴定,得到分子量及聚合度信息,确定酸降解可获得聚合度为 DP1~DP12 的葡寡糖。ESI-MS 能检测非衍生化的糖,而且灵敏度高,因而无需衍生化就能区分寡糖的连接方式(O-或 N-),确定寡糖的结构、聚合度及组成。基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)尤其适用于高聚合度寡糖和寡糖混合物的结构分析,如傅赟彬等<sup>[21]</sup>采用 MALDI-TOF-MS 对可德兰酸降解产物进行分析,结果表明降解产物主要为 DP2~19 的葡寡糖,其中 DP5 的含量最高。

普通一级质谱法可以根据分子量信息对未知的产物进行定性,但无法区分具有相同分子量的低聚物,而多级质谱技术可以对糖链碎片进行多级断裂,反映出碎片的不同层次的结构信息,已成为糖链结构鉴定的一项重要技术。目前电喷雾电离多级串联质谱(ESI-MS<sup>n</sup>)和基质辅助激光解析多级串联质谱(MALDI-MS<sup>n</sup>)是分析糖类结构的常用方法,该结构分析手段在寡糖结构分析中已有应用。韩瑶等<sup>[47]</sup>采用电喷雾二级串联质谱(ESI-MS<sup>2</sup>)与碰撞诱导解离(CID)联用技术在负离子模式下,对未衍生化的人乳寡糖直接进行分析,区分了互为异构体的几种寡糖。Xie 等<sup>[48]</sup>研究中,将一种水溶性猴头菇子实体  $\beta$ -葡聚糖使用内切  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D 葡聚糖酶消化后的寡聚糖产物,用 HPAEC-PAD-MS/MS 平台分析来确定各产物的聚合度和连接方式。首先通过 HPAEC-PAD-MS 负离子模式下确定了各峰对应的寡糖聚合度,再通过 MS/MS 二级质谱的片段离子峰信号确定其糖苷键连接方式。以二糖为例,除了能够得到典型的糖苷键解离子 B1( $m/z$  161)和 C1( $m/z$  179)外,还观察到 3 个交叉环解离子<sup>0.4</sup>A<sub>2</sub>( $m/z$  221)、<sup>0.3</sup>A<sub>2</sub>( $m/z$  251)、<sup>0.2</sup>A<sub>2</sub>( $m/z$  281)对应的还原端残基,从而确定其由  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)糖苷键连接。

核磁共振法(NMR)虽然与质谱相比需要的样品量多,但其提供的结构信息较多。核磁共振技术发展至今已经较为成熟,是糖类结构解析的重要方法之

一, 可判断糖类化合物的种类、糖与糖的连接位置、糖苷键构型、糖与糖的连接顺序等。比如: 氢谱中,  $\alpha$  型吡喃糖 H-1 质子化学位移大于 4.95 ppm,  $\beta$  型吡喃糖 H-1 质子化学位移小于 4.95 ppm, 借此可以判断糖环的构型。碳谱中, 异头碳和非异头碳的信号主要分别出现在 90~110 和 60~85 ppm 处, C-1 的出峰位置基于  $\alpha$ -构型和  $\beta$ -构型的化学位移范围分别是  $\delta$  90~102 和  $\delta$  102~112。在贺海涛等<sup>[49]</sup> 研究中, 通过昆布二糖磷酸化酶粗酶液和蔗糖磷酸化酶耦合催化合成葡寡糖, 经  $^1\text{H}$ -NMR 分析, 寡糖的异头氢的化学位移出现在  $\delta$  4.5~5.0 之间, 确定双酶催化合成寡糖为  $\beta$ -葡寡糖。此外, 核磁共振也可以应用于寡糖的构象分析, Hamagami 等<sup>[50]</sup> 通过分析双同位素 ( $^{13}\text{C}$  和  $^1\text{H}$ ) 标记的  $^1\text{H}$  NMR 图谱, 比较了线性  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡寡糖和带有  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-支链的  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡寡糖的远程耦合常数 ( $^3\text{JCH}$ ), 发现通过  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-糖苷键链接的侧链对  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) 糖苷键的构象几乎没有影响。NMR 技术在寡糖得到了广泛的应用, 成为解析其结构不可缺少的工具。

相较于传统结构解析方法, 更新的离子化质谱技术, 如基质辅助激光解吸质谱和电喷雾质谱以及 MS/MS 联用技术, 可以更直接的检测混合物并提供清晰的分子离子与碎片离子信息, 已经成为结构解析技术的重要组成部分。相信随着质谱技术的进一步发展, 并与 NMR 及各种化学分析方法相结合, 可以更深入地阐明糖的结构及其构效关系, 对糖生物学的发展起到重要的推动作用。

### 3 $\beta$ -葡寡糖的生物活性研究

$\beta$ -葡寡糖具有低热值的特点, 可作为膳食纤维在改善肠道微生物菌群、降低血清胆固醇等方面发挥重要功能。 $\beta$ -葡寡糖亦能够激发人和动物体产生细胞因子, 介导多种先天免疫和获得性免疫反应, 增强机体抵抗力。此外,  $\beta$ -葡寡糖还有抗氧化、抗肿瘤等多种生理功能。

#### 3.1 调节肠道菌群

人体实验表明, 摄入低聚糖可以促进大肠中双歧杆菌、乳酸菌等有益菌代谢生长, 抑制肠道有害细菌的生长增殖<sup>[51]</sup>, 使肠道菌群的代谢产生变化, 进而改善肠道环境。Kumar 等<sup>[52]</sup> 对昆布多糖进行酶解得到聚合度为 DP2~DP7 的昆布寡糖, 通过体外分析评估了其益生元特性, 发现昆布寡糖可以促进益生菌如植物乳杆菌 DM5 和嗜酸乳杆菌的生长。Shi 等<sup>[53]</sup> 制备获得了主要由 DP 为 2~5 的  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D 葡寡糖组成可德兰降解产物(GOS), 并检测了其益生元效应, 发现 GOS 可显著提高乳杆菌的菌落总数, 且聚合度为 2 和 3 的 GOS 更容易被消耗, 表明 GOS (DP2、3) 可以发挥较好的益生元作用, 可用于改善人类肠道健康。在 Sims 等<sup>[54]</sup> 研究表明鼠李糖乳杆菌在  $\beta$ -葡寡糖上生长并优先消耗三糖。以上研究表明, 葡寡糖的聚合度在一定程度上会影响其益生元功

能, 且不同种益生菌菌株会对不同聚合度寡糖有差异性利用, 进而调节肠道菌群。

#### 3.2 免疫调节活性

葡寡糖在生物大分子与细胞的相互作用中起着信号和桥梁的作用。研究发现, 葡寡糖可以作为免疫刺激剂诱发免疫反应。Miyanishi 等<sup>[55]</sup> 以酶法降解海带多糖制备得到  $\beta$ -葡寡糖(DP24), 通过共培养诱导人外周血单核细胞释放细胞因子, 可达到抑制肿瘤细胞增殖的效果。Gissibl 等<sup>[56]</sup> 使用葡聚糖酶处理微波预降解的裸藻  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡聚糖得到 DP2-7 和 DP2-59 的葡寡糖, 并证明低聚葡寡糖(DP2-7)相比于高聚葡寡糖(DP2-59)促进巨噬细胞释放 TNF- $\alpha$  的水平更高, 有显著的增强免疫活性。Tang 等<sup>[57]</sup> 研究发现口服给药可德兰降解所得的葡寡糖(GOS), 可以通过与受体 CR3 和 TLR2 相关的 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 途径提升 CTX 诱导的免疫抑制小鼠的免疫水平, 且与可德兰多糖相比, GOS 能更好地增强免疫活性。上述研究表明,  $\beta$ -葡寡糖相比于其对应的  $\beta$ -葡聚糖表现出更强的增强免疫功能, 因此 GOS 在调节免疫领域的开发利用很有价值。

#### 3.3 抗肿瘤活性

功能性寡糖已被证明对肿瘤有预防效果<sup>[58-59]</sup>。宁君等<sup>[60]</sup> 成功合成以  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)糖苷键连接的香菇寡糖片段, 发现其可以激活人体的免疫系统产生免疫应答进而杀死肿瘤细胞, 具有很好的抗肿瘤作用, 配合化疗药物使用具有明显的增效减毒作用。在 Mo 等<sup>[61]</sup> 用分子生物学方法研究了酿酒酵母  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡寡糖对 S180 荷瘤小鼠和荷瘤宿主免疫功能的影响及其分子机制, 结果表明, 酿酒酵母中  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-葡寡糖的抗肿瘤作用可能与其免疫刺激作用和诱导细胞凋亡的特性有关。目前,  $\beta$ -葡寡糖的抗肿瘤活性逐渐被人们所重视, 由于  $\beta$ -葡寡糖能够对多种肿瘤细胞产生抑制效果, 对正常细胞几乎没有毒副作用, 因而具有潜在的抗肿瘤药物开发应用价值, 对其性质及其相关机制的进一步研究也有助于开发基于多糖及其降解产物的有效抗肿瘤药物。

#### 3.4 抗氧化活性

氧化是机体利用氧过程中的一个环节, 在一些特殊条件下机体内会产生大量自由基, 过量自由基会产生氧化应激损伤, 破坏细胞内代谢平衡, 进而导致神经退行性疾病、癌症、炎症等一系列疾病发生<sup>[62]</sup>。王冰等<sup>[63]</sup> 在抗氧化实验中发现, 土壤杆菌生产的葡寡糖(2800~3600 Da)的 DPPH 自由基和  $\cdot\text{OH}$  清除效果可达到抗坏血酸的 80%, 还原力可达到抗坏血酸的 50%, 随着质量浓度的增加, 呈现出一定的浓度依赖性, 表明其具有良好的抗氧化活性。刘云等<sup>[64]</sup> 微波合成的葡寡糖对  $\cdot\text{OH}$  自由基、DPPH 自由基、ABTS $^{+}$  自由基具有很好的清除作用, 且随着平均聚合度、浓度及疏水性的增加, 葡寡糖对  $\cdot\text{OH}$ 、DPPH 自由基的清除作用逐渐增强。研究表明  $\beta$ -葡寡糖是一种有效

清除自由基的抗氧化剂,可通过直接清除自由基以及调节生物酶系等机制来抑制人体内的氧化应激反应,维持人体代谢平衡。

## 4 结语

以 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-糖苷键连接为主链的葡寡糖是一类具有多种生物活性的低聚糖,在食品和医药领域具有广阔的应用前景。目前已针对 $\beta$ -葡寡糖的制备方法、分离纯化、结构鉴定和生物活性评价等方面开展了深入研究,这为 $\beta$ -葡寡糖的开发应用奠定了基础。为了更好地理解其作用机制和构效关系,还需进一步对其聚合度和糖苷键连接方式等因素对生物活性的影响及其活性作用机制开展研究,从而为 $\beta$ -葡寡糖的应用提供理论指导。另外,目前 $\beta$ -葡寡糖缺乏标准化的制备和检测方法,难以大规模生产高纯度、低成本、聚合度稳定的低聚糖产品,导致其应用还存在一定瓶颈,后续研究需要解决特定聚合度 $\beta$ -葡寡糖的规模化制备,为 $\beta$ -葡寡糖在功能食品和药品领域的应用提供技术保障。

## 参考文献

- [1] 杨文卿,姜涛,程路峰.基于网络药理学与实验研究探讨 $\beta$ -葡聚糖治疗S180腹水瘤的作用机制[J].中南药学,2022,20(2):323-329. [YANG W Q, JIANG T, CHENG L F. Mechanism of  $\beta$ -glucan for S180 ascites tumor based on network pharmacology and experimental study[J]. Central South Pharmacy, 2022, 20(2): 323-329.]
- [2] NAKASHIMA A, YAMADA K, IWATA O, et al.  $\beta$ -Glucan in foods and its physiological functions[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2018, 64(1): 8-17.
- [3] CIECIERSKA A, DRYWIEN M E, HAMULKA J, et al. Nutritional functions of beta-glucans in human nutrition[J]. Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny, 2019, 70(4): 315-324.
- [4] 王颖,陆栋,魏巍,等.酵母 $\beta$ -葡聚糖对C离子辐射损伤小鼠免疫系统的防护作用[J].原子核物理评论,2012,29(3):285-289. [WANG Y, LU D, WEI W, et al. Protective effect of yeast  $\beta$ -glucan on immune system carbon ions[J]. Nuclear Physics Review, 2012, 29(3): 285-289.]
- [5] 于春微,李冬芳,刘世雄,等.酵母 $\beta$ -葡聚糖对脂多糖诱导的绵羊淋巴细胞氧化应激损伤的保护作用[J].动物营养学报,2020,32(6):2904-2910. [YU C W, LI D F, LIU S X, et al. Protective effects of  $\beta$ -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on lipopolysaccharide induced oxidative stress injury in sheep lymphocyte[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(6): 2904-2910.]
- [6] DU B, MEENU M, LIU H, et al. A concise review on the molecular structure and function relationship of  $\beta$ -glucan[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(16): 4032.
- [7] KUSMIATI, DHEWANTARA F X R. Cholesterol-lowering effect of beta-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* in rats[J]. Scientia Pharmaceutica, 2016, 84(1): 153-165.
- [8] YAN J K, WANG Y Y, MA H L, et al. Ultrasonic effects on the degradation kinetics, preliminary characterization antioxidant activities of polysaccharides from *Phellinus linteus* mycelia[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 29: 251-257.
- [9] KIM Y W, KIM K H, CHOI H J, et al. Anti-diabetic activity of beta-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*[J]. Biotechnology Letters, 2005, 27(7): 483-487.
- [10] 陈晨,何蒙蒙,吴泽蓉,等.青稞 $\beta$ -葡聚糖的研究现状与展望[J].中国食品添加剂,2020,31(2):172-177. [CHEN C, HE M M, WU Z R, et al. Research status and prospect of highland barley beta-glucan[J]. China Food Additives, 2020, 31(2): 172-177.]
- [11] 杨成峻,陈明舜,戴涛涛,等.燕麦 $\beta$ -葡聚糖功能与应用研究进展[J].中国食品学报,2021,21(6):301-311. [YANG C J, CHEN M S, DAI T T, et al. Research progress on function and application of  $\beta$ -glucan in oat[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(6): 301-311.]
- [12] LIU Y F, ZHANG J S, TANG Q J, et al. Physicochemical characterization of a high molecular weight bioactive  $\beta$ -D-glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101: 968-974.
- [13] 李兆兰.裂褶多糖的结构研究[J].南京大学学报(自然科学版),1994(3):482-487. [LI Z L. Structural study of schizophyllan[J]. Journal of Nanjing University (Natural Sciences), 1994(3): 482-487.]
- [14] 谢冰莹.猴头菇多糖的制备分离、结构鉴定和葡聚糖的序列研究[D].苏州:苏州大学,2020. [XIE B Y. The preparation, fractionation, structural elucidation of polysaccharides from *Hericium erinaceus* and the research on sequence of glucan[D]. Suzhou: Soochow University, 2020.]
- [15] 李万坤,闫鸿斌,田广孚,等.香菇 $\beta$ -葡聚糖对雏鸡脾和胸腺淋巴细胞以及腹腔巨噬细胞一氧化氮产生的影响[J].中国兽医学,2007(7):597-601. [LI W K, YAN H B, TIAN G F, et al. Effect of  $\beta$ -lentinan on NO productive capacity of splenic and thymus lymphocytes and abdominal macrophage in chickens[J]. Chinese Veterinary Science, 2007(7): 597-601.]
- [16] ZHENG Z M, HUANG Q L, KANG Y, et al. Different molecular sizes and chain conformations of water-soluble yeast  $\beta$ -glucan fractions and their interactions with receptor Dectin-1[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 273: 118568.
- [17] MENG Y, GANG F, YUMEI S, et al. Biosynthesis and applications of curdlan[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 273: 118597.
- [18] HENTATI F, TOUNSI L, DJOMDI D, et al. Bioactive polysaccharides from seaweeds[J]. Molecules, 2020, 25(14): 3152.
- [19] SUJIT M, MOEKO K, TSUYOSHI I, et al. Automated electrochemical assembly of the  $\beta$ -(1,3)- $\beta$ -(1,6)-glucan hexasaccharide using thioglucoside building blocks[J]. Asian Journal of Organic Chemistry, 2018, 7(9): 1802-1805.
- [20] 杨飞飞.中药多糖控制降解寡糖在中药鉴定中的应用研究[D].保定:河北大学,2016. [YANG F F. Study on identification of traditional Chinese medicines by the application of oligosaccharides from polysaccharide degradation products[D]. Baoding: Hebei University, 2016.]
- [21] 傅赞彬,刘启顺,李曙光,等.可德兰寡糖的制备及其组分分析[J].食品科学,2011,32(3):6-9. [FU Y B, LIU Q S, LI S G, et al. Preparation and component analysis of curdlan oligomers[J].

- Food Science, 2011, 32(3): 6–9.]
- [22] 秦秀, 刘艳芳, 张劲松, 等. 不同处理方法对灵芝  $\beta$ -葡聚糖降解效果的比较研究[J]. 菌物学报, 2021, 40(9): 2495–2504. [QIN X, LIU Y F, ZHANG J S, et al. A comparative study of different methods of degrading *Ganoderma lingzhi*  $\beta$ -glucan[J]. Mycosystema, 2021, 40(9): 2495–2504.]
- [23] FAURE A M, SANCHEZ A, ZABARA A, et al. Modulating the structural properties of  $\beta$ -d-glucan degradation products by alternative reaction pathways[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 99: 679–686.
- [24] LEE S H, JANG G Y, KIM M Y, et al. Physicochemical and *in vitro* binding properties of barley  $\beta$ -glucan treated with hydrogen peroxide[J]. Food Chemistry, 2016, 192: 729–735.
- [25] ZHU Q, WU S J. Water-soluble  $\beta$ -1,3-glucan prepared by degradation of curdlan with hydrogen peroxide[J]. Food Chemistry, 2019, 283: 302–304.
- [26] 欧春艳, 李林通. 壳聚糖降解研究的最新进展[J]. 广州化工, 2013, 41(6): 13–15. [OU C Y, LI L T. Recent progress of study on degradation of chitosan[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2013, 41(6): 13–15.]
- [27] 李兆龙, 汪瑛琦, 谢裕颖, 等. 壳聚糖的敏化辐射降解[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2017, 35(1): 37–43. [LI Z L, WANG Y Q, ZIE Y Y, et al. Irradiation and sensitizing effects on chitosan degradation[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Process, 2017, 35(1): 37–43.]
- [28] KHAN A A, GANI A, MASOODI F A, et al. Structural, thermal, functional, antioxidant and antimicrobial properties of  $\beta$ -D-glucan extracted from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)-effect of  $\gamma$ -irradiation[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 140: 442–450.
- [29] BYUN E H, KIM J H, SUNG N Y, et al. Effects of gamma irradiation on the physical and structural properties of  $\beta$ -glucan[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2008, 77(6): 781–786.
- [30] WANG D, KIM D H, YOON J J, et al. Production of high-value  $\beta$ -1,3-glucooligosaccharides by microwave-assisted hydrothermal hydrolysis of curdlan[J]. Process Biochemistry, 2016, 52: 233–237.
- [31] YAN J K, PEI J J, MA H L, et al. Effects of ultrasound on molecular properties, structure, chain conformation and degradation kinetics of carboxylic curdlan[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 121: 64–70.
- [32] 林勤保, 高大维, 闵亚光. 超声波在多糖降解及提取中的应用[J]. 应用声学, 1997, 16(5): 47–49. [LIN Q B, GAO D W, MIN Y G. Ultrasonic depolymerization and extraction of polysaccharides[J]. Applied Acoustics, 1997, 16(5): 47–49.]
- [33] SIBAKOV J, MYLLYMKI O, SUORTTI T, et al. Comparison of acid and enzymatic hydrolyses of oat bran  $\beta$ -glucan at low water content[J]. Food Research International, 2013, 52(1): 99–108.
- [34] LI J, ZHU L, ZHAN X B, et al. Purification and characterization of a new endo- $\beta$ -1,3-glucanase exhibiting a high specificity for curdlan for production of  $\beta$ -1,3-glucan oligosaccharides[J]. Food Science and Biotechnology, 2014, 23(3): 799–806.
- [35] QIAN Z G, WU S J, PAN S K, et al. Preparation of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-glucan oligosaccharides by hydrolysis of curdlan with commercial  $\alpha$ -amylase[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(3): 2362–2364.
- [36] ZHENG Z M, HUANG Q L, LUO X G, et al. Effects and mechanisms of ultrasound- and alkali-assisted enzymolysis on production of water-soluble yeast  $\beta$ -glucan[J]. Bioresource Technology, 2019, 273: 394–403.
- [37] KUMAGAI Y, OKUYAMA M, KIMURA A. Heat treatment of curdlan enhances the enzymatic production of biologically active  $\beta$ -(1,3)-glucan oligosaccharides[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 146: 396–401.
- [38] 曹柳. 褐藻胶的提取纯化、氧化降解及体外活性研究[D]. 济南: 山东大学, 2015. [CAO L. Research on isolation, purification, oxidative degradation and *in vitro* activities of alginate[D]. Jinan: Shandong University, 2015.]
- [39] 姜瑞芝, 王颖, 陈英红, 等. 猴头菌寡糖的化学研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(5): 41–344. [JIANG R Z, WANG Y, CHEN Y H, et al. Chemical study on oligosaccharides of *Hericium erinaceus*[J]. Chinese Journal of Pharmacy, 2008, 43(5): 41–344.]
- [40] 秦秀. 灵芝  $\beta$ -葡聚糖的降解工艺优化及寡糖片段的分离纯化和活性研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2021. [QIN X. Study on the degradation of *Ganoderma lingzhi*  $\beta$ -glucan and the separation and *in vitro* activities of the product[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2021.]
- [41] FU Y, WANG M, WANG W, et al. (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-glucan oligosaccharides monomers purification and its  $H_2O_2$  induction effect study[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: 1069–1073.
- [42] 宗玉. 直链  $\beta$ -1,3-葡寡糖的制备、鉴定及其抗菌活性的初步分析[D]. 无锡: 江南大学, 2013. [ZONG Y. Preparation, identification and preliminary analysis of antibacterial activity of linear  $\beta$ -1,3-glucanoligosaccharides[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013.]
- [43] 王仲孚, 张英, 林雪, 等. 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮(PMP)柱前衍生化寡糖链的 HPLC 分离及其激光解吸电离质谱分析[J]. 化学学报, 2007, 65(23): 2761–2764. [WANG Z F, ZHANG Y, LIN X, et al. HPLC separation of 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatized oligosaccharides and its matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification[J]. Acta Chemistry, 2007, 65(23): 2761–2764.]
- [44] WANG J Q, ZHAO J, NIE S P, et al. Rapid profiling strategy for oligosaccharides and polysaccharides by MALDI TOF mass spectrometry[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124: 107237.
- [45] 郜茜. 人乳寡糖的衍生化分离制备、再生及质谱结构分析[D]. 西安: 西北大学, 2019. [GAO X. Derivatization, separation, regeneration and mass spectrometry analysis of human milk oligosaccharides[D]. Xi'an: Northwest University, 2019.]
- [46] 孙玉姣, 戚歆宇, 张涵, 等. 可得然胶酸法降解寡糖的 HPLC/ESI-MS 分析[J]. 陕西科技大学学报, 2017, 35(3): 143–147, 158. [SUN Y J, QI X Y, ZHANG H, et al. Analysis on oligosaccharide products of curdlan from acidic hydrolysis by using HPLC and ESI-MS[J]. Journal of Shaanxi University of Science and Technology, 2017, 35(3): 143–147, 158.]
- [47] 韩瑶, 吕志华, 姜廷福, 等. 电喷雾多级串联质谱技术区分人乳寡糖异构体[J]. 分析化学, 2006(9): 1213–1218. [HAN Y, LÜ Z H, JIANG Y F, et al. Application of electrospray ionization-colli-

- sion induced dissociation-tandem mass spectrometry in differentiation isomers of human milk oligosaccharides[J]. *China Journal Analytical Chemistry*, 2006(9): 1213–1218. ]
- [ 48 ] XIE B, YI L, ZHU Y, et al. Structural elucidation of a branch-on-branch beta-glucan from *Hericium erinaceus* with a HPAEC-PAD-MS system[J]. *Carbohydrate Polymers: Scientific and Technological Aspects of Industrially Important Polysaccharides*, 2021, 251: 117080.
- [ 49 ] 贺海涛, 张洪涛, 曲娟娟, 等. 双酶耦合催化法合成特定聚合度  $\beta$ -1,3-葡聚糖研究[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(5): 1–9. [ HE H T, ZHANG H T, QU J J, et al. Synthesis of  $\beta$ -1,3-glucooligosaccharides by double enzyme coupling catalysis[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2018, 44(5): 1–9. ]
- [ 50 ] HAMAGAMI H, YAMAGUCHI Y, TANAKA H. Chemical synthesis of residue-selectively  $^{13}\text{C}$  and  $^2\text{H}$  double-isotope-labeled oligosaccharides as chemical probes for the NMR-based conformational analysis of oligosaccharides[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2020, 85(24): 16115–16127.
- [ 51 ] 李红. 低聚糖在功能性食品中的应用研究进展[J]. *现代食品*, 2021(11): 55–57. [ LI H. Research progress in the application of oligosaccharides in functional foods[J]. *Modern Food*, 2021(11): 55–57. ]
- [ 52 ] KUMAR K, RAJULAPATI V, GOYAL A. *In vitro* prebiotic potential, digestibility and biocompatibility properties of laminari-oligosaccharides produced from curdlan by  $\beta$ -1,3-endoglucanase from *Clostridium thermocellum*[J]. *3 Biotech*, 2020, 10(6): 1–10.
- [ 53 ] SHI Y, LIU J, YAN Q, et al. *In vitro* digestibility and prebiotic potential of curdlan (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-glucan oligosaccharides in *Lactobacillus* species[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 188: 17–26.
- [ 54 ] SIMS I M, RYAN J L, KIM S H. *In vitro* fermentation of prebiotic oligosaccharides by *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Lactobacillus* spp[J]. *Anaerobe*, 2014(25): 11–17.
- [ 55 ] MIYANISHI N, IWAMOTO Y, WATANABE E, et al. Induction of TNF- $\alpha$  production from human peripheral blood monocytes with  $\beta$ -1,3-glucan oligomer prepared from laminarin with  $\beta$ -1,3-glucanase from *Bacillus clausii* NM-1[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 95(2): 192–195.
- [ 56 ] GISSIBL A, CARE A, PARKER L M, et al. Microwave pretreatment of paramylon enhances the enzymatic production of soluble  $\beta$ -1,3-glucans with immunostimulatory activity[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 196: 339–347.
- [ 57 ] TANG J Q, ZHEN H M, WANG N N, et al. Curdlan oligosaccharides having higher immunostimulatory activity than curdlan in mice treated with cyclophosphamide[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 207: 131–142.
- [ 58 ] CHEONG K L, QIU H M, DU H, et al. Oligosaccharides derived from red seaweed: Production, properties, and potential health and cosmetic applications[J]. *Molecules*, 2018, 23(10): 2451.
- [ 59 ] WU Y, CHEN Y, LU Y, et al. Structural features, interaction with the gut microbiota and anti-tumor activity of oligosaccharides[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(28): 16339–16348.
- [ 60 ] 宁君, 孔繁祚. 具有重要生理活性寡糖的发现及其应用[J]. *世界科技研究与发展*, 2001, 23(6): 22–25. [ NING J, KONG F Z. Oligosaccharides having important biological activities and their application[J]. *World Science and Technology Research and Development*, 2001, 23(6): 22–25. ]
- [ 61 ] MO L, CHEN Y, LI W, et al. Anti-tumor effects of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* in S180 tumor-bearing mice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017(95): 385–392.
- [ 62 ] DIAS I, MILIC I, HEISS C, et al. Inflammation, lipid (Per)oxidation, and redox regulation, antioxidants and redox signaling[J]. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2020, 33(3): 166–190.
- [ 63 ] 王冰, 朱莉, 李茂玮, 等. 适应性驯化生产低分子量  $\beta$ -葡聚糖及其抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(17): 27–33. [ WANG B, ZHU L, LI M W, et al. Improvement of low-mass  $\beta$ -glucan yield by adaptive laboratory evolution and its antioxidant activity[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2021, 47(17): 27–33. ]
- [ 64 ] 刘云, 宋玉蓉, 乐国伟, 等. 微波合成葡聚糖的体外抗氧化作用的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(10): 36–39. [ LIU Y, SONG Y R, LE G W, et al. Study on anti-oxidative capacity of glucooligosaccharides synthesized by microwave-assistance[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2009, 35(10): 36–39. ]