钟瑜, 邵庆辉, 李姗瑜, 等. 番荔枝多糖分离纯化、结构表征及抑菌活性分析 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(5): 208−216. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030187

ZHONG Yu, SHAO Qinghui, LI Shanyu, et al. Isolation, Purification, Structure Characterization and Antibacterial Activity Analysis of Polysaccharides from *Annona squamosa* L.[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(5): 208−216. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030187

·生物工程·

番荔枝多糖分离纯化、结构表征及抑菌活性分析

钟　瑜[1], 邵庆辉[2], 李姗瑜[1], 曾宇峰[1], 卢金霞[2], 梁嘉伟[2], 何秋星[1,*]

（1.广东药科大学医药化工学院, 广东中山 528405;
2.中山市天图精细化工有限公司, 广东中山 528445）

摘　要: 为探究番荔枝果肉多糖的结构特性及其对食源性致病菌的抑菌作用，采用超声辅助提取并分离纯化得到番荔枝果肉多糖（WPAS），通过离子色谱、高效凝胶渗透色谱、红外光谱、刚果红试验、X 射线衍射、Zeta 电位分析及扫描电镜等技术表征其结构特征。结果表明，WPAS 是一种以阿拉伯糖为主要单糖组成的中性多糖，重均分子量 14.99 kDa，呈无定形非晶态结构，表面具有多孔网状形貌，且其溶液具有良好的稳定性。体外抑菌实验显示，在质量浓度为 20 mg/mL 时，对枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌抑菌圈直径分别为 20.34±0.75 mm 和 10.21±1.47 mm，MIC 值分别为 12.50 mg/mL 和 17.50 mg/mL。通过细胞膜通透性及 ATP 酶活性检测评估其对枯草芽孢杆菌、绿脓杆菌的抑菌效应。结果显示，WPAS 可破坏菌体细胞膜完整性及显著抑制 ATP 酶活性发挥抑菌效应。综上，WPAS 对枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌具有较好的抑菌能力，研究结果可为番荔枝多糖在食品防腐以及功能性产品的开发方面提供理论参考。

关键词: 番荔枝, 多糖, 分离纯化, 结构表征, 抑菌活性

中图分类号: Q946.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)05−0208−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030187

本文网刊:

Isolation, Purification, Structure Characterization and Antibacterial Activity Analysis of Polysaccharides from *Annona squamosa* L.

ZHONG Yu[1], SHAO Qinghui[2], LI Shanyu[1], ZENG Yufeng[1], LU Jinxia[2], LIANG Jiawei[2], HE Qiuxing[1,*]

（1.School of Pharmaceutical and Chemical Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528405, China;
2.Zhongshan Tiantu Fine Chemical Co., Ltd., Zhongshan 528445, China）

Abstract: To investigate the structural characteristics of water soluble polysaccharides in the pulp of *Annona squamosa* L. (WPAS) and their antibacterial effects against foodborne pathogens, WPAS was extracted using ultrasound assisted extraction, then purified. Its structures were characterized using ion chromatography, high-performance gel permeation chromatography, infrared spectroscopy, Congo red assay, X-ray diffraction, Zeta potential analysis, and scanning electron microscopy. The results indicated that WPAS was a neutral polysaccharide composed mainly of arabinose as the primary monosaccharide, with an average molecular weight of 14.99 kDa, an amorphous structure, a porous network morphology on the surface, and good stability in solution. *In vitro* antibacterial assays revealed that at a mass concentration of 20 mg/mL, the antibacterial zone diameters against *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* were 20.34±0.75 mm and 10.21±1.47 mm, respectively, and minimum inhibitory concentrations of 12.50 mg/mL and 17.50 mg/mL, respectively. Antibacterial efficacy against *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated using cell-membrane permeability assays and

收稿日期: 2025−03−17

基金项目: 广东省教育厅 2020 年度普通高校重点科研平台和项目（2020ZDZX2101）。

作者简介: 钟瑜（2000−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然植物化妆品研究与开发, E-mail: 1428999612@qq.com。

*** 通信作者:** 何秋星（1965−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能化妆品的开发与评价, E-mail: 123090561@qq.com。

adenosine triphosphatase (ATPase) activity measurements. The results showed that WPAS disrupted bacterial cell membrane integrity and significantly inhibited ATPase activity, thereby exerting significant antibacterial effects. In summary, WPAS demonstrates significant antibacterial activity against *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. These findings provide a theoretical foundation for the application of *Annona squamosa* L. polysaccharides in food preservation and functional product development.

Key words: *Annona squamosa* L.; polysaccharide; separation and purification; structural characterization; bacteriostatic activity

番荔枝(*Annona squamosa* L.)作为典型的热带药食同源植物，其果实不仅因独特风味广受消费者青睐，更因其富含番荔枝内酯、黄酮类、生物碱类及多糖等生物活性成分而备受关注[1−2]。营养学分析表明，其果肉中糖含量可达 19.16%~25.29%，显著高于草莓和梨，且含有 16 种氨基酸及镁、铁、锌等必需微量元素[3−4]。然而，该果实采后呼吸强度剧增导致货架期仅 2~3 d，加之果皮机械损伤敏感性，制约其商业化深加工进程[5]。多糖是由十个以上单糖通过糖苷键聚合形成的高分子化合物，是番荔枝中重要的生物活性成分之一。研究表明，其具有免疫调节[6]、降血糖[7]、抗氧化[8]、抗肿瘤[9] 等多种药理作用。然而，现有研究多聚焦于番荔枝内酯类、生物碱类及多糖的抗氧化、免疫调节和抗肿瘤等传统活性方向，其多糖的抑菌活性还尚未被研究[10−12]。

近年来，随着消费者对化学合成防腐剂安全性的担忧加剧，具有广谱抑菌活性的天然多糖逐渐成为研究热点。目前已有 23 种植物多糖被证实对食源性致病菌具有抑制作用，如枸杞多糖通过破坏金黄色葡萄球菌生物膜实现抑菌[13]。相较于药用植物(如黄芪、人参)和大型真菌来源多糖，果蔬多糖因兼具高生物安全性和成本效益更适于食品防腐应用。然而，现有研究多集中于柑橘[14]、苹果[15] 等大宗水果，对热带特色水果多糖的抑菌机制研究不足，特别是多糖分子量分布、单糖组成等结构特征与抑菌活性的构效关系亟待阐明[16−17]。

本研究以番荔枝果肉多糖为研究对象，采用超声辅助热水浸提法提取多糖，并进行分离纯化，分析多糖单糖组成、分子量及结构特征，体外抑菌活性菌株主要针对食源性疾病防控需求，选取金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)、大肠杆菌(革兰氏阴性菌)、枯草芽孢杆菌(芽孢形成菌)及绿脓杆菌(生物膜强菌)构建差异化菌株模型，其致病机制覆盖毒素分泌、生物膜形成等主要食源感染途径[18−19]；探究其活性与结构的构效关系，为番荔枝加工产品及植物源防腐剂的开发与利用提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

番荔枝(*Annona squamosa* L.)　购于海南鲜汇果业，产自海南海口，选择成熟且外表无损伤的番荔枝，保存于 15 ℃ 冰箱中；枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、大肠杆菌 *Escherichia coli*　医药化工实验室−80 ℃ 密封保存；ATP 酶试剂盒　南京建成生物工程研究所；岩藻糖(L-Fucose, L-Fuc)、鼠李糖(L-Rhamnose, L-Rha)、阿拉伯糖(L-Arabinose, L-Ara)、半乳糖(D-Galactose, D-Gal)、葡萄糖(D-Glucose, D-Glc)、木糖(D-Xylose, D-Xyl)、甘露糖(D-Mannose, D-Man)、果糖(D-Fructose, D-Fru)、核糖(D-Ribose, D-Rib)、半乳糖醛酸(D-Galacturonic acid, D-GalA)、葡萄糖醛酸(D-Glucuronic acid, D-GlcA)　分析纯，博睿糖生物技术有限公司。

RE 52-99 旋转蒸发器　上海亚荣生化仪器厂；D-37520 离心机、Varioskan LUX 酶标仪、ICS5000 离子色谱仪　赛默飞世尔科技有限公司；JGL-10G 冷冻干燥机　北京四环科技开发有限公司；UV2600 紫外可见分光光度计、IRAFLINITY-1S 傅里叶红外光谱仪、LC-10A 高效液相色谱仪　岛津(上海)实验器材有限公司；G300 扫描电子显微镜　卡尔蔡司(上海)管理有限公司；D8 advance X 射线衍射仪　德国 Burker 科技有限公司；Nano-ZS90 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪　英国马尔文仪器有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　番荔枝多糖提取　参考刘芬等[20] 的方法稍作修改，选取成熟完好的番荔枝果实，去除表皮及种子，组织破碎后通过 20 目筛网制备均质浆体。采用分步提取法，按料液比 1∶15(g/mL)加入纯化水，经超声辅助搅拌 20 min 后于 100 ℃ 进行 3 h 回流提取，在 4000 r/min 离心 20 min 分离得初提液。滤渣经 15 倍纯化水分别再次提取两次，合并上清液浓缩至上清液体积的五分之一，加入 5 倍体积分数为 95% 乙醇溶液于 4 ℃ 静置 12 h 后，4000 r/min 离心 20 min 收集沉淀物，得到番荔枝粗多糖。

1.2.2　番荔枝多糖分离纯化　根据文献方法[21]，将粗多糖与纯化水按重量比 1∶2 混合后，加入 Sevag 试剂(氯仿∶正丁醇=5∶1)进行脱蛋白，不断摇晃 15 min。在 8000 r/min，离心 20 min，重复至无蛋白絮状物。水相旋蒸除有机溶剂，加入质量分数 15% 过氧化氢溶液(添加量为溶液体积 20%)于 40 ℃ 恒温振荡脱色 4 h，所得溶液经浓缩处理后置入截留分子量 3500 Da 的透析袋，双蒸水透析 32 h 后进行冷冻干燥。并进一步采用 DEAE-52 纤维素(Diethylaminoethyl-52 Cellulose, DEAE-52)柱进行

分级纯化：将预处理层析柱平衡后，将 30 mg 多糖溶于 1 mL 双蒸水中（0.45 μm 滤膜过滤），洗脱剂为蒸馏水、0.2、0.4、0.6、0.8 mol/L 的氯化钠溶液，流速为 1 mL/min 下，10 mL/管收集洗脱液，使用苯酚-硫酸法测总糖的流出[22]，根据峰形特征合并主峰对应洗脱组分，经透析脱盐、浓缩及冻干后，得到的番荔枝果肉水溶性多糖（Water soluble polysaccharides in the pulp of *Annona squamosa* L.，WPAS）。

1.2.3 番荔枝多糖的结构表征

1.2.3.1 紫外光谱分析和单糖组成测定 紫外光谱分析参照张帅[23]的方法进行；单糖组成测定根据欧云付等[24]的方法，将冻干样品溶于 2 mL 3 mol/L 三氟乙酸，80 ℃ 下水解 2 h 后用氮气吹干，加入 5 mL 水混匀，取 50 μL 样品，加入 950 μL 蒸馏水，11000 r/min 离心 5 min，取上清液进行离子色谱分析。离子色谱条件为：Dionex CarbopacTM PA20 色谱柱和电化学检测器，流动相：A：H_2O；B：15 mmol/L NaOH；C：NaOH-NaAc 混合液（15 mmol/L NaOH 和 100 mmol/L NaOAc）；洗脱梯度：0~30 min 由 100% C 线性变至 50%A 和 50%C；30.1 min 切换到 30%B 并维持至 46 min；流速 0.3 mL/min，进样量 25 μL，柱温 30 ℃。

1.2.3.2 分子量测定 参照 CHANG 等[25]方法稍作修改。色谱系统配备 BRT105-103-101（8×300 mm）凝胶柱及示差折光检测器，流动相为 0.5 mol/L NaCl，流速 0.7 mL/min，柱温 40 ℃，进样量 100 μL。将葡聚糖标准品（5、10、20、50、100、200、400、800 Da）和样品分别溶解于 1 mL 流动相中，配制成 5 mg/mL 溶液，超声处理 15 min 后 11000 r/min 离心 10 min，取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后进样。根据标准品保留时间绘制校准曲线：lgMp=−0.1188x+9.1895，R^2=0.9953；lgMw=−0.1179x+9.1556，R^2=0.9947；lgMn=−0.1185x+9.1642，R^2=0.9960；根据标准品曲线，计算出样品的分子量大小。

1.2.3.3 红外光谱分析 红外测定根据朱和权[26]的方法，取 1 mg 多糖与 100 mg KBr 研磨压片，在 4000~400 cm^{-1} 进行红外光谱扫描。

1.2.3.4 X 射线衍射测定 采用 X 射线衍射仪在室温条件下测定 5°~90°（2θ）范围内样品的晶体结构，Cu-Kα 辐射，电压为 40 kV，电流 40 mA，速率 10°/min，步长 0.02°。

1.2.3.5 三螺旋结构测定 根据唐婷[27]的方法，将 1 mL 多糖溶液（1 mg/mL）与刚果红溶液（80 μmol/L）等体积混合，刚果红可与具有三螺旋结构的多糖通过疏水作用形成特异性复合物，导致其最大吸收波长发生红移。每管加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液，使氢氧化钠终质量浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L，混合振荡均匀后室温静置 25 min。随着碱浓度升高，三螺旋结构逐渐解旋使刚果红脱离结合位点，导致吸收波长发生规律性蓝移。于 400~600 nm 波长内进行波谱扫描，确定体系最大吸收波长（Maximum absorption wavelength，λ_{max}）为纵坐标，再分别以各混合体系的 NaOH 终质量浓度为横坐标绘制曲线。

1.2.3.6 Zeta 电位测定 根据文献方法[28]，研究 WPAS 溶液的电位变化。配制 1 mg/mL 的 WPAS 水溶液，并通过 HCl 和 NaOH 溶液调节其 pH 至 2、4、6、8 和 10，在室温下利用 Zate 电位分析仪测定 pH 对 WPAS 溶液电位的影响。此外，制备 1 mg/mL 的 WPAS 溶液，分别添加 NaCl、$CaCl_2$、$MgCl_2$、KCl 和 $FeCl_3$，使最终混合溶液中 Na^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、K^+和 Fe^{3+}的离子浓度达到 1 mmol/L，并使用 Zate 电位分析仪在室温下分析不同离子对 WPAS 溶液电位的影响。

1.2.3.7 扫描电子显微镜测定 将取适量的多糖样品分散到导电胶上，在 20 kV 的加速电压下，并在不同的放大倍数（2000 倍和 20000 倍）下，观察其形态特征，拍摄特征形态图片。

1.2.4 番荔枝多糖体外抑菌活性测定

1.2.4.1 抑菌圈实验 参照 JAHANGIRIAN 等[29]的方法稍作修改，将冷冻菌株（枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌）分别接种于灭菌营养琼脂斜面培养基中，于 36 ℃ 恒温培养箱中静置培养 24 h 完成初步活化。在无菌条件下，挑取 2~3 环活化菌苔转接至灭菌营养琼脂斜面培养基中，于 36 ℃ 恒温培养箱中二次活化 15 h。随后使用无菌生理盐水冲洗斜面菌苔，收集菌体并调节菌悬液浓度至 1×10^8 CFU/mL。将菌悬液与冷却至 45~50 ℃ 的营养琼脂培养基按 1∶10 体积比混合后倾注平皿中，凝固后以无菌打孔器制备直径 6 mm 孔穴，每孔加入 80 μL 不同质量浓度（5、10、20、40 mg/mL）的多糖溶液，并分别加入阳性对照（30 mg/mL 氯霉素溶液）及阴性对照（无菌水）。37 ℃ 恒温培养 24 h 后，采用游标卡尺测定抑菌圈直径（mm）。

1.2.4.2 最小抑菌浓度（MIC）的测定 根据文献方法[30]测定 WPAS 对受试菌的最小抑菌浓度。在 96 孔板中分别加入质量浓度为 20.0、17.5、15.0、12.5、10.0、7.5、5.0、2.5 mg/mL 的 WPAS（100 μL），再等体积加入菌悬液（菌量约 1×10^8 CFU/mL）与培养基混合，总体积为 300 μL。将 96 孔板置于 36 ℃ 培养箱中培养 24 h 后，通过酶标仪检测 OD_{600} 值和肉眼观测受试微生物的生长情况，以无菌落形成的最低样品质量浓度判定 MIC 值。

1.2.4.3 细胞膜通透性测试 采用电导率法评估多糖对细菌细胞膜通透性的影响。将处于对数生长期的枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌经离心收集后，用 0.01 mo1/L 磷酸缓冲盐溶液洗涤三次并重悬。取 10 mL 菌悬液分别加入 1 mL 浓度梯度为 2MIC、

MIC、0.5MIC 的多糖溶液及等体积无菌水（空白对照），混合后立即采集 0 min 初始样本，随后按 30 min 间隔持续取样至 180 min。各时间点收集 5 mL 混合液，2000 r/min 离心 10 min 后取上清液稀释 10 倍，采用电导率仪检测溶液电导值，相对电导率反映细胞膜渗透性变化[31]。计算公式如下：

$$n(\%) = \frac{E_1 - E_0}{E_2 - E_0} \times 100$$

式中：n 表示相对电导率，%；E_0 表示未被样品处理时的电导率，μS/cm；E_1 表示样品处理 0~180 min 时的电导率，μS/cm；E_2 表示样品处理 180 min 后经煮沸冷却后的电导率，μS/cm。

1.2.4.4　ATP 酶活性测定　采用 ATP 酶活性检测试剂盒评估多糖对细菌能量代谢的影响，参照 1.2.4.3 节方法制备枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌菌悬液。分别向菌悬液中添加质量浓度为 MIC 的多糖溶液处理 5 h，2000 r/min 离心 10 min 后收集菌体经 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐溶液洗涤三次并重悬，8000 r/min 离心 10 min 获取上清液，经 10 倍稀释后参照试剂盒测定 ATP 酶活性[32]，以无菌水处理组作为空白对照。

1.3　数据处理

实验均重复 3 次，数据用 Excel 2021 进行整理，采用 DPS 软件进行差异显著性分析，图片绘制使用 GraphPad Prism 8、Origin 9.0 等软件。

2　结果与分析

2.1　番荔枝多糖的提取、分离纯化

粗多糖通过 DEAE-52 柱层析分离后，在 0.2 mol/L NaCl 梯度洗脱条件下，获得一主要组分（WPAS）如图 1 所示。收集该组分经透析及冷冻干燥处理后，以苯酚-硫酸法测定其总糖含量，采用葡萄糖为标准绘制吸光度-浓度曲线（y=0.0078x+0.1405，R^2=0.9911），结果表明 WPAS 总糖含量为 85.26%±0.69%。与文献 [33] 报道的番荔枝果实多糖总糖含量（51.54%±1.30%）相比，此次分离纯化后的总糖含量更高。

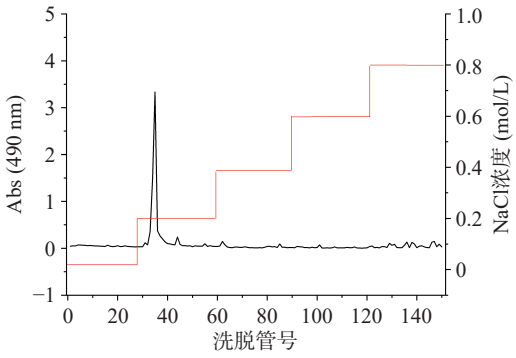


图 1　WPAS 的 DEAE-52 洗脱曲线

Fig.1　DEAE-52 elution curve of WPAS

2.2　番荔枝多糖结构表征

2.2.1　紫外光谱及单糖组成分析　WPAS 紫外光谱（图 2）在 260 nm 和 280 nm 处未见明显吸收峰，表明不含核酸和蛋白质。离子色谱分析结果显示（图 3 为混合单糖标准，图 4 为 WPAS 样品），WPAS 由 Ara、Gal、Glc、Rha 和 Xyl 五种单糖组成，摩尔比为 0.892∶0.066∶0.020∶0.017∶0.005（表 1），以 Ara 和 Gal 为主，属于中性多糖。与屠文松[34] 报道的番荔枝多糖（Rha∶Ara∶Gal∶Glc∶Man=3.79∶58.08∶4.75∶1.34∶1.00）

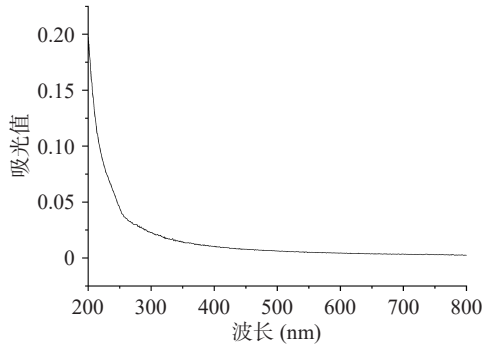


图 2　WPAS 紫外光谱图

Fig.2　UV spectrum of WPAS

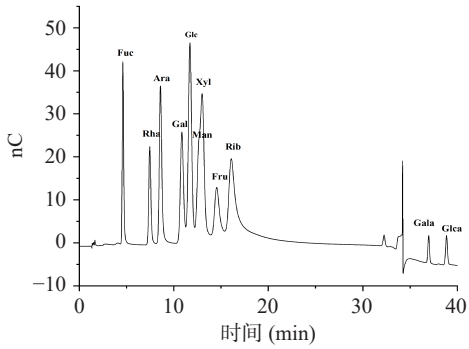


图 3　混合单糖标准品色谱图

Fig.3　Chromatogram of mixed monosaccharide standards

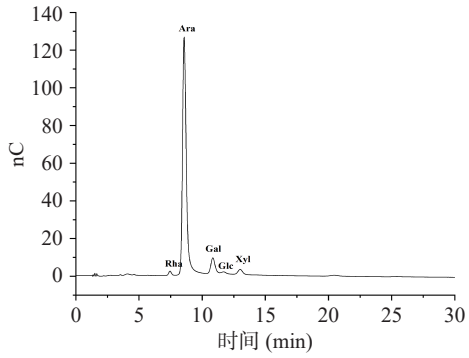


图 4　WPAS 的单糖色谱图

Fig.4　Monosaccharide composition chromatogram of WPAS

表 1　WPAS 单糖组成的摩尔比

Table 1　Molar ratio of monosaccharide composition in WPAS

样品	WPAS
Ara	0.892
Gal	0.066
Glc	0.020
Rha	0.017
Xyl	0.005

相比, 本次研究发现了 Xyl 的存在, 这一差异可能与实验材料或分析方法的不同有关。

2.2.2　分子量分析　分子量是多糖的关键特征之一, 较高的分子量通常导致溶解性下降和溶液黏度增加, 从而限制其生物利用度和活性发挥[35]; 如图 5 所示, WPAS 在 35 min 左右开始出峰, 表明其分子量相对较小。根据葡聚糖标准曲线计算, WPAS 的重均分子量(Weight average molecular weight, Mw)为 14.99 kDa, 峰值分子量(Peak molecular weight, Mp)为 14.85 kDa, 数均分子量(Number average molecular weight, Mn)为 14.42 kDa。CHEN 等[36] 研究发现, 分子质量较小的方竹笋渣多糖展现出最佳的抗氧化活性。说明较低的分子量使多糖分子内部的氢键作用较弱, 提供了更多的游离氨基和羟基, 这有助于其生物活性的发挥[37]。

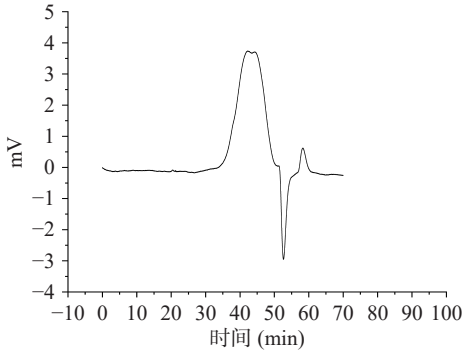


图 5　WPAS 的分子量色谱图

Fig.5　Molecular weight distribution chromatogram of WPAS

2.2.3　红外光谱结果分析　WPAS 红外光谱图如图 6 所示, 在 3440 和 2941 cm^{-1} 处出现的吸收峰分别归因于 O-H 伸缩振动和 C-H 伸缩振动[38]; 1624、1411 和 1346 cm^{-1} 处的吸收峰分别与 C=O、C-H 及 C-O 的特征振动相关; 1097 和 1028 cm^{-1} 处的吸收峰指示糖环中的 C-O-H 和 C-O-C 键振动, 作为吡喃环的特征性吸收峰, 表明该多糖分子至少含有一个吡喃糖环[39]; 位于 840 cm^{-1} 处的吸收峰为 α 型吡喃醛糖环的特征, 而 910 cm^{-1} 附近的吸收峰则对应 β 型吡喃醛糖的特征[34]。由上可知, WPAS 是一种含 α 和 β 型糖苷键结构的吡喃糖。

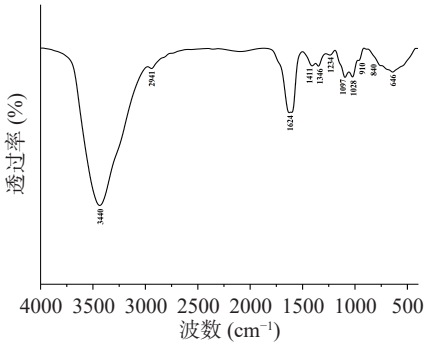


图 6　WPAS 的红外光谱图

Fig.6　FT-IR spectrum of WPAS

2.2.4　X-射线衍射结果分析　通过 X-射线衍射技术对 WPAS 的晶体学特性进行表征, 其衍射图谱如图 7 所示。实验结果显示, WPAS 在 2θ 角 21°附近呈现宽化弥散衍射峰, 未检测到尖锐的晶体特征峰, 这表明该多糖体系中不存在长程有序的晶体结构, 其主要以无定形态形式存在。此非晶特征可能由多糖链间较弱的氢键和范德华相互作用所致, 无法形成稳定的晶体排列[40]。

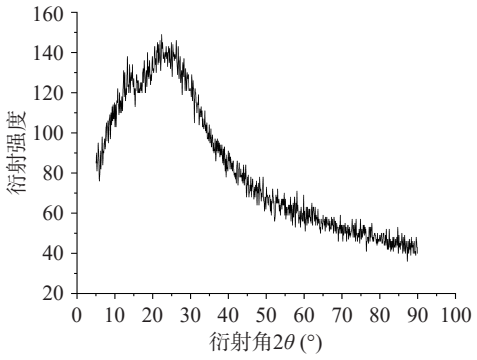


图 7　WPAS 的 X 射线衍射图

Fig.7　X-ray diffraction pattern of WPAS

2.2.5　三螺旋结构分析　刚果红与多糖的结合导致了 λ_{max} 的红移, 因此可以确定多糖样品是否具有三螺旋结构[41]。实验结果如图 8 所示, 随着氢氧化钠溶液浓度的梯度增加, WPAS-刚果红复合体系的 λ_{max} 呈现持续下降趋势, 且其变化轨迹与阴性对照组(水相体系)相似, 表明 WPAS 无三螺旋构象特征。这一结果与谷爽爽[42] 关于番荔枝果渣多糖的研究存在差异, 可能源于原料基质差异、提取工艺的影响。

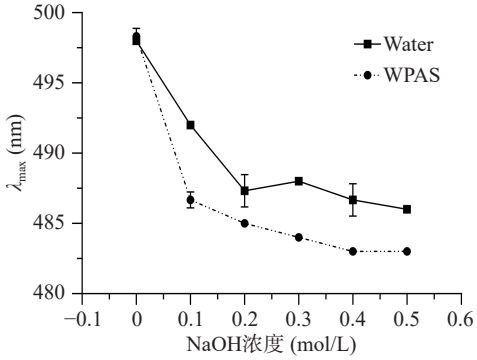


图 8　WPAS 的刚果红结果图

Fig.8　Congo red binding assay result of WPAS

2.2.6　多糖溶液的稳定性分析　Zeta 电位反映分散体系的表面电荷及静电排斥力, 其绝对值越大, 体系越稳定[43]。如图 9 所示, WPAS 溶液的 Zeta 电位随 pH 改变呈现显著规律性变化: 在酸性环境(pH2)下, Zeta 电位为−5.81 mV, 较低绝对值表明此时表面电荷密度不足, 粒子间静电斥力不足以克服范德华引力, 体系处于动力学不稳定状态; 当 pH 升至 4 时, Zeta 电位为−33.86 mV, 这归因于多糖分子羧基等官能团的去质子化作用显著提升了表面电荷密度, 促使

静电排斥力成为主导相互作用，从而形成稳定的分散体系；在 pH6~10 范围内，Zeta 电位绝对值始终高于 10 mV，表明体系仍保持较好的稳定性，但随着碱度增加，羟基解离程度增强可能引起分子链构象改变，导致静电屏蔽效应与空间位阻效应的协同作用发生变化[44]。进一步探究金属离子对 WPAS 溶液稳定性的影响见图 10，结果显示：与空白对照组（Zeta 电位绝对值为 36.03 mV）相比，二价（Ca^{2+}、Mg^{2+}）及高价态（Fe^{3+}）金属离子明显降低 Zeta 电位绝对值，其中 Fe^{3+}作用最强。此现象符合 Schulze-Hardy 规则，即高价态阳离子通过压缩双电层产生电荷屏蔽效应，削弱静电排斥力并促进分子间疏水缔合，导致体系稳定性下降。Na^{+}的引入使 Zeta 电位绝对值增大（37.13 mV），可能因特异性吸附增强表面电荷。上述研究结果提示，WPAS 在生理 pH 及低离子强度条件下具有优异的分散稳定性。

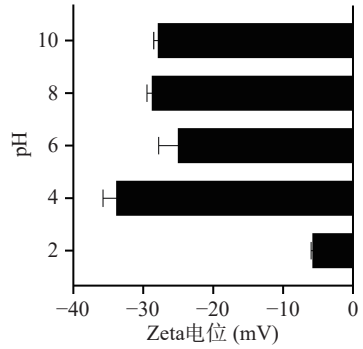


图 9　WPAS 在不同 pH 条件下的电位

Fig.9　Zeta potential of WPAS at different pH

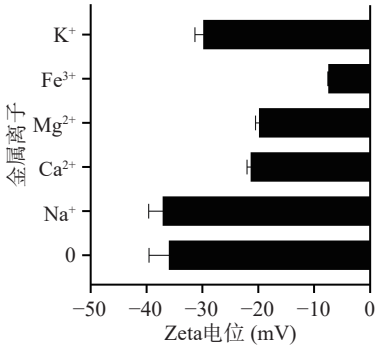


图 10　WPAS 在不同金属离子条件下的电位

Fig.10　Zeta potential of WPAS in the presence of different metal ions

2.2.7　扫描电子显微镜分析　扫描电子显微镜结果如图 11，WPAS 在 2000×放大倍数下呈现无定形特征，其表面形貌主要表现为粗糙的碎片状结构，并伴有层片状形态不规则分布。当放大倍数提升至 20000×时，可观察到表面形成独特的网状多孔结构。其特征性孔隙的形成机制可能与提取工艺和冷冻干燥工艺相关。刘春宇[45] 的研究显示，番荔枝细胞壁多糖的表面形貌表现为丝状物且附着有紧蹙的球状物。多糖的表面形貌受原料来源、提取工艺、分离纯化方法及干燥方式等因素共同影响，如超声辅助

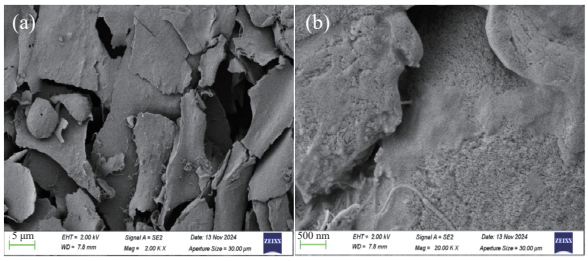


图 11　WPAS 在 2000×(a)和 20000×(b)倍镜下的扫描电子显微镜图

Fig.11　Scanning electron microscopy images of WPAS at magnifications of 2000× (a) and 20000× (b)

提取过程中产生的强剪切力会导致多糖表面呈现粗糙多孔状结构[46]。

2.3　番荔枝多糖抑菌活性分析

2.3.1　抑菌圈和最小抑菌浓度分析　抑菌圈直径是评估抑菌效果的一种直观指标。根据图 12 和表 2 的结果，WPAS 在质量浓度为 20 mg/mL 和 40 mg/mL 时，对绿脓杆菌和枯草芽孢杆菌均表现出明显的抑菌效果，抑菌圈直径均超过 10 mm，分别为 10.21、13.52 mm 和 20.34、21.47 mm，其中，WPAS 对枯草芽孢杆菌的抑制效果最为明显。在抗菌活性的评估中，最小抑菌浓度是一个关键指标，本研究通过测定

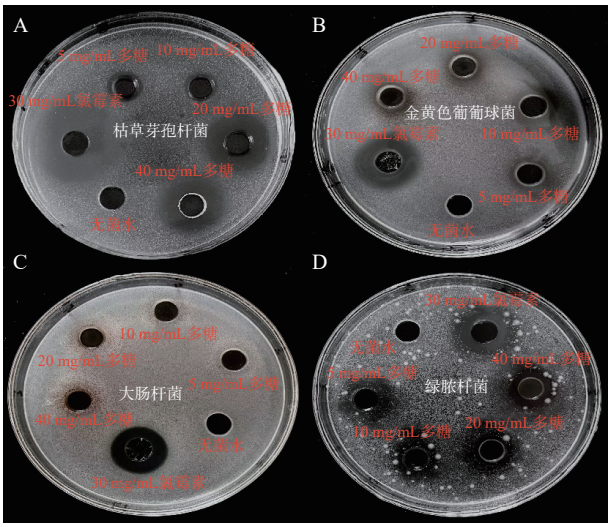


图 12　WPAS 对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌的抑菌效果

Fig.12　Antibacterial effect of WPAS on *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*

表 2　WPAS 对四种菌的抑菌直径（mm）

Table 2　Antibacterial inhibition diameters (mm) of WPAS against four bacteria

样品	绿脓杆菌	金黄葡萄球菌	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌
30 mg/mL氯霉素	18.14±1.15	19.67±0.87	17.83±0.36	28.56±0.28
5 mg/mL	/	/	/	/
10 mg/mL	/	/	/	/
20 mg/mL	10.21±1.47*	/	/	20.34±0.75*
40 mg/mL	13.52±0.88*	/	/	21.47±1.39*

注：/表明无抑菌作用；与氯霉素比较，*表示差异显著，P<0.001。

最小抑菌浓度来评价 WPAS 对枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌的抑菌能力。由表 3 可知，WPAS 对枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度为 12.50 mg/mL，而对绿脓杆菌的最小抑菌浓度为 17.50 mg/mL。

表 3 WPAS 对枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌的最小抑菌浓度

Table 3 Minimum inhibitory concentration of WPAS against *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*

供试菌	WPAS的质量浓度(mg/mL)							
	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0
枯草芽孢杆菌	++	++	++	+	−	−	−	−
绿脓杆菌	++	++	++	++	+	+	−	−

注：−表示抑菌；+表示细菌生长；++表示细菌生长旺盛。

2.3.2 细胞膜通透性和 ATP 酶活性 细胞膜完整性受损可引发胞内 K^+、Na^+、Cl^-等电解质外渗，致使菌悬液电导率显著升高，因此电导率的变化可作为膜通透性及完整性损伤程度的重要指标[47]。如图 13 所示，WPAS 处理显著提升了枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌悬液相对电导率，且呈现剂量-时间依赖性效应。对于枯草芽孢杆菌，处理 30 min 后，0.5MIC、MIC 和 2MIC 组的相对电导率分别为 1.32%、4.86% 和 6.42%，空白对照组为 0.58%。而绿脓杆菌在相同时间下，0.5MIC、MIC 和 2MIC 组的相对电导率分别为 3.46%、4.48% 和 5.21%，空白对照组为 2.81%。随着时间延长，实验组与对照组的相对电导率差异趋于稳定。结果表明，WPAS 可破坏枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌细胞膜完整性，提升膜通透性，从而增强其抑菌作用。

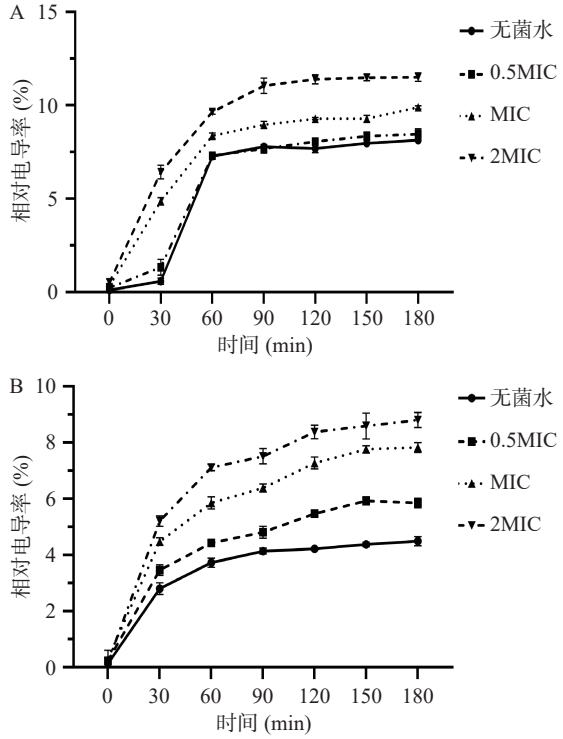


图 13 枯草芽孢杆菌(A)和绿脓杆菌(B)的相对电导率

Fig.13 Relative conductivity of *Bacillus subtilis* (A) and *Pseudomonas aeruginosa* (B)

为进一步探讨 WPAS 对细菌能量代谢的影响，检测了细胞内 ATP 酶活性。WPAS 处理后，枯草芽孢杆菌(6.42 U/mg)和绿脓杆菌(5.65 U/mg)的 ATP 酶活性较对照组(10.38、9.80 U/mg)显著降低($P<0.05$)。结合文献[48]推测，WPAS 可能通过影响细菌膜功能并干扰能量代谢相关过程，如呼吸链或 ATP 合成相关酶活性，从而导致能量代谢障碍。

3 结论

本研究通过超声辅助热水浸提和分离纯化获得的番荔枝果肉多糖组分 WPAS，其单糖组成中阿拉伯糖占比高达 89.2%，并呈现多孔片层结构和无定形结晶特征。抑菌实验结果表明，WPAS 对枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌具有选择性抑菌活性(MIC 分别为 12.50 和 17.50 mg/mL)。机制分析显示，WPAS 可破坏细胞膜完整性(电导率升高 1.6%~4.2%)并抑制 ATP 酶活性(下降 38%~42%)，从而影响细菌生长。此外，WPAS 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的低效性，暗示其靶向性与菌种特异性膜受体、代谢途径相关，这为开发窄谱低毒抗菌剂提供了新思路。然而，本研究尚未明确 WPAS 中阿拉伯糖链分支度、孔径分布与抗菌活性的构效关系，且未验证其在复杂食品基质或生物膜环境中的实用性。未来需结合分子对接技术解析多糖-膜蛋白互作机制，并通过化学修饰优化其水溶性和靶向性，以拓展其在功能性包装材料和抗生物膜感染治疗中的应用潜力。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] 雷谨莹, 梁泽锐, 张晖, 等. 中国番荔枝科野生水果资源概述及开发前景展望[J]. 果树学报, 2022, 39(1): 121−130. [LEI Jinman, LIANG Zerui, ZHANG Hui, et al. Advances in exploitation and utilization of wild fruit resources of Annonaceae in China[J]. Journal of Fruit Science, 2022, 39(1): 121−130.]

[2] BHATTACHARYA A, CHAKRAVERTY R. The pharmacological properties of *Annona squamosa* Linn: A review[J]. International Journal of Pharmaceutical Engineering, 2016, 4(2): 692−699.

[3] 丁利君, 任乃林, 周燕芳, 等. 番荔枝果肉营养成分分析[J]. 营养学报, 2006, 28(3): 275−276. [DING Lijun, REN Nailin, ZHOU Yanfang, et al. Analysis of the nutritional composition of custard apple flesh[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2006, 28(3): 275−276.]

[4] 张东华, 普燕萍, 张健, 等. 极具开发潜力的热带水果: 番荔枝[J]. 资源开发与市场, 2000, 16(6): 354−355,372. [ZHANG Donghua, PU Yanping, ZHANG Jian, et al. The characteristics of custard apple and its potential developing values[J]. Resource Development & Market, 2000, 16(6): 354−355,372.]

[5] 林燕文. 番荔枝及其在食品工业中的应用现状和开发前景[J]. 山西食品工业, 2004(4): 22−23,28. [LIN Yanwen. *Annona squamosa* L. and its application status and development prospects in the food industry[J]. Shanxi Food Industry, 2004(4): 22−23,28.]

［6］ 黄春华. 番荔枝多糖 ASPA80 及 ASPA80-1 对小鼠巨噬细胞和树突状细胞免疫功能的影响及作用机制初步研究[D]. 广州：暨南大学, 2017. ［HUANG Chunhua. Effects and preliminary mechanisms of *Annona squamosa* polysaccharides ASPA80 and ASPA80-1 on immune functions of murine macrophages and dendritic cells [D]. Guangzhou: Jinan University, 2017. ］
［7］ 邱海龙, 汤彬, 王玉, 等. 番荔枝子去蛋白多糖制备及其体外降糖作用研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2013, 15(6): 1309−1313. ［QIU Hailong, TANG Bin, WANG Yu, et al. Preparation of protein-free polysaccharide from *Annonae squamosae* Semen and its *in vitro* hypoglycemic effect[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2013, 15(6): 1309−1313. ］
［8］ DARE C, OYEDAPO O. Antioxidant and anti-inflammatory activities of polysaccharides from the coat of fermented and unfermented sugar apple (*Annona squamosa* L.) seed[J]. Advanced Materials Letters, 2023: 1058.
［9］ DARE C A, OLUREMI B B, AKINLEYE T E, et al. Fermentation enhances the antiproliferative activities of *Annona squamosa* seed polysaccharides on human MCF-7 and rhabdomyosarcoma[J]. Facta Universitatis, Series: Medicine and Biology, 2024, 26(1): 1−7.
［10］ ALAQEEL N K, ALMALKI W H, BINOTHMAN N, et al. The inhibitory and anticancer properties of *Annona squamosa* L. seed extracts[J]. Brazilian Journal of Biology, 2022, 82: e268250.
［11］ YANG Yuliang, CHANG Fangrong, WU Yangchang. Annosqualine: A novel alkaloid from the stems of *Annona squamosa* [J]. Helvetica Chimica Acta, 2004, 87(6): 1392−1399.
［12］ HUANG Chunhua, TU Wensong, ZHANG Man, et al. A novel heteropolysaccharide isolated from custard apple pulp and its immunomodulatory activity in mouse macrophages and dendritic cells[J]. Heliyon, 2023, 9(8): e18521.
［13］ LI X, ZHANG Y, HUANG F, et al. *Lycium barbarum* polysaccharide inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation by targeting quorum sensing system[J]. Food Chemistry, 2023, 405: 134952.
［14］ CHEN J, LIU X, ZHANG H, et al. Citrus pectin-derived oligosaccharides exhibit antibacterial activity against *Salmonella typhimurium*[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 276: 118789.
［15］ WANG Z, LI M, ZHOU Y, et al. Structural characterization and antibacterial activity of apple polysaccharides[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 106050.
［16］ ZHANG H, LIU S, WANG J, et al. Correlation between monosaccharide composition and antibacterial activity of plant polysaccharides[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 118: 36−47.
［17］ XU Y, LIU C, LIU K, et al. Impact of molecular weight on the antibacterial efficacy of natural polysaccharides: A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(30): 8423−8434.
［18］ 罗敬文, 司风玲, 顾子玄, 等. 3 种木耳多糖的抗氧化活性与抑菌能力比较分析[J]. 食品科学, 2018, 39(19): 64−69. ［LUO Jingwen, SI Fengling, GU Zixuan, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of polysaccharides from three species of *Auricularia* [J]. Food Science, 2018, 39(19): 64−69. ］
［19］ 王传儒. 高盐度影响绿脓杆菌生物膜形成与 pel 操纵子基因表达研究[D]. 高雄：辅英科技大学, 2014. ［WANG C R. Study on the effect of high salinity on biofilm formation and pel operon gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*[D]. Kaohsiung: Fooyin University, 2014. ］
［20］ 刘芬, 朱顺妮, 徐忠斌, 等. 超声辅助热水浸提小球藻多糖及抗氧化活性测定[J]. 中国酿造, 2020, 39(2): 177−181. ［LIU Fen, ZHU Shunni, XU Zhongbin, et al. Extraction of polysaccharides from *Chlorella* sp. by ultrasound-assisted hot water extraction and determination of antioxidant activity[J]. China Brewing, 2020, 39(2): 177−181. ］
［21］ QIN Chuanguang, HUANG Kaixun, XU Huibi. Isolation and characterization of a novel polysaccharide from the mucus of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 49(3): 367−371.
［22］ 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): 350−356.
［23］ 张帅. 笋壳多糖结构与生物活性的研究[D]. 福州：福建农林大学, 2015. ［ZHANG Shuai. Study on the structure and biological activity of bamboo shoot shell polysaccharide[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2015. ］
［24］ 欧云付, 尹平河, 赵玲. 半叶马尾藻粗糖中单糖的离子色谱法分析[J]. 色谱, 2006, 24(4): 411−413. ［OU Yunfu, YIN Pinghe, ZHAO Ling. Determination of monosaccharides in *Sargassum hemiphyllum* (Turner) C. Ag. polysaccharides by ion chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2006, 24(4): 411−413. ］
［25］ CHANG Y W, LU T J. Molecular characterization of polysaccharides in hot-water extracts of *Ganoderma lucidum* fruiting bodies[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2004, 12(1): 59−67.
［26］ 朱和权. 白首乌多糖结构解析、链构象表征及其生物活性研究[D]. 南京：南京农业大学, 2021. ［ZHU Hequan. Structural elucidation, chain conformation characterization and bioactivity of polysaccharides from *Cynanchum auriculatum*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021. ］
［27］ 唐婷. 地黄多糖提取纯化、结构表征及生物活性研究[D]. 贵阳：贵州师范大学, 2023. ［TANG Ting. Extraction, purification, structural characterization and bioactivity of *Rehmannia* polysaccharides[D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2023. ］
［28］ 胡婷. 虎乳灵芝多糖的多级结构及溶液行为研究[D]. 武汉：华中农业大学, 2017. ［HU Ting. Hierarchical structure and solution behavior of polysaccharides from *Lignosus rhinocerus*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017. ］
［29］ JAHANGIRIAN H, HARON M D J, SHAH M H, et al. Well diffusion method for evaluation of antibacterial activity of copper phenyl fatty hydroxamate synthesized from canola and palm kernel oils[J]. Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures, 2013, 8(3): 1263−1270.
［30］ WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK R E W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances[J]. Nature Protocols, 2008, 3(2): 163−175.
［31］ 吕飞. 天然植物精油的抑菌活性及其作用机理研究[D]. 北京：北京化工大学, 2011. ［LÜ Fei. Antibacterial activity and mechanism of natural plant essential oils[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2011. ］
［32］ 郭倬钰, 陈文学, 陈海明, 等. 芳樟醇对大肠杆菌的抑菌作用机制[J]. 现代食品科技, 2020, 36(4): 113−118. ［GUO Fengyu, CHEN Wenxue, CHEN Haiming, et al. Antibacterial mechanism of linalool against *Escherichia coli*[J]. Modern Food Science and

Technology, 2020, 36(4): 113−118.]
[33] 韩锐, 张园娇, 陈亚运, 等. 番荔枝果实多糖及抗氧化活性比较[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 190−195. [HAN Rui, ZHANG Yuanjiao, CHEN Yayun, et al. Extracted and antioxidant activities of crude polysaccharides from *Annona squamosa* L. fruit[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(11): 190−195.]
[34] 屠文松. 番荔枝果肉多糖的分离纯化、结构表征及体外活性初步研究[D]. 广州: 暨南大学, 2016. [TU Wensong. Isolation, purification, structural characterization, and preliminary study on in vitro activity of polysaccharides from *Annona squamosa* pulp[D]. Guangzhou: Jinan University, 2016.]
[35] 周雪艳, 常贺, 苟海芹, 等. 分子量影响多糖生物活性的研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2024, 45(1): 124−132. [ZHOU Xueyan, CHANG He, GOU Haiqin, et al. Advances in research of molecular weight affecting the bioactivities of polysaccharides[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2024, 45(1): 124−132.]
[36] CHEN Guangjing, CHEN Xuhui, YANG Bing, et al. New insight into bamboo shoot (*Chimonobambusa quadrangularis*) polysaccharides: Impact of extraction processes on its prebiotic activity [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 95: 367−377.
[37] LI X, PENG B, CHEUNG P C, et al. Depolymerized non-digestible sulfated algal polysaccharides produced by hydrothermal treatment with enhanced bacterial fermentation characteristics[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 130: 107687.
[38] NEP E I, CARNACHAN S M, NGWULUKA N C, et al. Structural characterisation and rheological properties of a polysaccharide from sesame leaves (*Sesamum radiatum* Schumach. & Thonn.)[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 152: 541−547.
[39] 林志超, 潘晓明, 吴启赐, 等. 鲍鱼脏器碱提多糖的分离纯化、结构表征及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2024, 45(4): 53−60. [LIN Zhichao, PAN Xiaoming, WU Qici, et al. Isolation, purification, structure characterization and antioxidant activity of alkali-extracted polysaccharide from abalone viscera[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(4): 53−60.]
[40] 张玉梅, 邢慧珍, 刘会平, 等. 槐花多糖的提取、纯化和抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(24): 207−215. [ZHANG Yumei, XING Huizhen, LIU Huiping, et al. Extraction, purification and antioxidant activity of polysaccharides from *Sophora japonica* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(24): 207−215.]
[41] GUO Xiaoyu, KANG Ji, XU Zhiyuan, et al. Triple-helix polysaccharides: Formation mechanisms and analytical methods[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 262: 117962.
[42] 谷爽爽. 番荔枝渣碱提多糖的结构表征及生物活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2021. [GU Shuangshuang. Structural characterization and biological activity of alkali-extracted polysaccharides from *Annona squamosa* residues[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2021.]
[43] NIKNEZHAD S V, NAJAFPOUR-DARZI G, MOROWVAT M H, et al. Eexopolysaccharide production of *Pantoea* sp. BCCS 001 GH: Physical characterizations, emulsification, and antioxidant activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118(Pt A): 1103−1111.
[44] EXARHOPOULOS S, RAPHAELIDES S N, KONTOMINAS M G. Conformational studies and molecular characterization of the polysaccharide kefiran[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 77: 347−356.
[45] 刘春宇. 番荔枝软化过程中细胞壁多糖降解特性及其调控研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2022. [LIU Chunyu. Degradation characteristics and regulation of cell wall polysaccharides during *Annona squamosa* softening process[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2022.]
[46] 陈燕云, 平华, 高媛, 等. 黍稷麸皮多糖分离纯化、结构表征及抑菌活性分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(10): 1−7. [CHEN Yanyun, PING Hua, GAO Yuan, et al. Isolation, purification, structure characterization and antibacterial activity of polysaccharides from proso millet bran[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(10): 1−7.]
[47] HELANDER I M, MATTILA-SANDHOLM T. Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 60(2-3): 153−161.
[48] LIANG L, SU Q, MA Y, et al. Research progress on the polysaccharide extraction and antibacterial activity[J]. Annals of Microbiology, 2024, 74: 17.