

基于膜技术的桑葚多糖分级分离及生物活性组分筛选

袁心田, 陈华国, 赵超, 龚小见, 周欣

Separation of *Mori fructus* Polysaccharides and Screening of Bioactive Fractions Based on Membrane Technology

YUAN Xintian, CHEN Huaguo, ZHAO Chao, GONG Xiaojian, and ZHOU Xin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022030166>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于膜技术的灵芝粗多糖分级分离及抗氧化活性比较

Fractionation and Antioxidant of Crude Polysaccharide from *Ganoderma lucidum* Based on Membrane Technology

食品工业科技. 2021, 42(10): 29-35

分级醇沉发酵麸皮多糖的成分分析与抗氧化活性研究

Studies on Composition Analysis and Antioxidant Activities of Bran Polysaccharides by Fractional Alcohol Submerged Fermentation

食品工业科技. 2020, 41(5): 58-62

桦褐孔菌纯化多糖体外降血糖活性研究

Hypoglycemic Activity of Purified Polysaccharides from *Inonotus obliquus* in Vitro

食品工业科技. 2020, 41(10): 316-320,326

蜂王浆蛋白肽的制备及其降血糖和抗氧化活性研究

Preparation, Hypoglycemic and Antioxidative Activity of Peptide from Royal Jelly Protein

食品工业科技. 2020, 41(17): 45-50,57

桑叶提取物、茶多酚及其复配物的抗氧化和降血糖活性

Antioxidant and Hypoglycemic Activities of Mulberry Leaves Extract, Tea Polyphenols and Their Compounds

食品工业科技. 2018, 39(21): 299-305

高钙菜黄酮的分级分离各级分的抗氧化活性

Antioxidant Activity of Flavonoids Fractionation Extracts from *Sedum aizoon* L.

食品工业科技. 2019, 40(5): 108-113,123



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

袁心田, 陈华国, 赵超, 等. 基于膜技术的桑葚多糖分级分离及生物活性组分筛选 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(24): 72–80. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030166

YUAN Xintian, CHEN Huaguo, ZHAO Chao, et al. Separation of *Mori fructus* Polysaccharides and Screening of Bioactive Fractions Based on Membrane Technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(24): 72–80. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030166

· 研究与探讨 ·

基于膜技术的桑葚多糖分级分离及生物活性组分筛选

袁心田^{1,2,3}, 陈华国^{2,3}, 赵超^{2,3}, 龚小见^{2,3}, 周欣^{1,2,3,*}

(1. 贵州中医药大学药学院, 贵州贵阳 550002;

2. 贵州师范大学, 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵州贵阳 550001;

3. 贵州师范大学, 贵州省药物质量控制及评价技术工程实验室, 贵州贵阳 550001)

摘要: 采用了膜技术分级分离桑葚多糖 (*Mori fructus* polysaccharide, MFP), 并探究了不同分子量桑葚多糖的抗氧化、降血糖、抗过敏和体外乙醇脱氢酶活性。以桑葚为原料, 通过热水浸提后采用 300、50、5 和 1 kDa 超滤膜对桑葚多糖进行分级分离, 分别记为 MFP300、MFP50、MFP5 和 MFP1。比较 4 种孔径的超滤膜分离的桑葚多糖组分主要成分、抗氧化活性、降血糖活性、抗过敏活性和体外乙醇脱氢酶活性的差异。结果表明, 4 种多糖的主要成分和生物活性表现出一定的差异。MFP1、MFP5、MFP50 和 MFP300 的总糖含量分别为 46.34%、68.45%、48.60% 和 66.32%, 糖醛酸含量分别为 3.34%、22.78%、16.11% 和 21.48%, 还原糖含量分别为 16.51%、6.03%、7.90% 和 6.67%。生物活性筛选表明, MFP300 清除 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基的 IC₅₀ 值分别为 0.2235 和 0.2979 mg·mL⁻¹, 抑制透明质酸酶能力的 IC₅₀ 值为 0.6634 mg·mL⁻¹, 激活体外乙醇脱氢酶能力的 IC₅₀ 值为 10.2646 mg·mL⁻¹, 表现出最好的抗氧化、抗过敏和体外乙醇脱氢酶活性。MFP1 抑制 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶能力的 IC₅₀ 值分别为 0.7944 和 4.6419 mg·mL⁻¹, 表现出最好的降血糖活性。综上所述, 经膜技术分级分离得到的不同分子量范围的桑葚多糖在主要成分和生物活性方面有一定差异, 为桑葚多糖分级技术的改进升级和桑葚多糖“构-效”关系研究提供理论基础。

关键词: 桑葚多糖, 膜技术, 多糖分级, 抗氧化活性, 降血糖活性, 抗过敏活性, 乙醇脱氢酶活性

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)24-0072-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030166



本文网刊:

Separation of *Mori fructus* Polysaccharides and Screening of Bioactive Fractions Based on Membrane Technology

YUAN Xintian^{1,2,3}, CHEN Huaguo^{2,3}, ZHAO Chao^{2,3}, GONG Xiaojian^{2,3}, ZHOU Xin^{1,2,3,*}

(1. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;

2. Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;

3. Guizhou Engineering Laboratory for Quality Control & Evaluation Technology of Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: Membrane technology was used for the graded separation of *Mori fructus* polysaccharides, and its antioxidant, hypoglycemic, anti-allergic and *in vitro* alcohol dehydrogenase activities were studied. The *Mori fructus* polysaccharides were carried out by hot water extraction using ultrafiltration membranes with pore sizes of 300, 50, 5 and 1 kDa, respectively, as MFP300, MFP50, MFP5 and MFP1. The differences in the main components, antioxidant activity,

收稿日期: 2022-03-15

基金项目: 国家自然科学基金 (82160786); 贵州师范大学学术新苗培养及创新探索专项项目 (黔科合平台人才 [2018]5769-27)。

作者简介: 袁心田 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药及民族药质量控制及新药研究, E-mail: 18786091463@163.com。

* 通信作者: 周欣 (1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药质量控制、药物体内代谢以及药品、保健食品开发, E-mail: alice9800@sina.com。

hypoglycemic activity, antiallergic activity and *in vitro* ethanol dehydrogenase activity of *Mori fructus* polysaccharide fractions separated by ultrafiltration membranes of four pore sizes were compared. The results showed that the major components and biological activities of the four polysaccharides showed some differences. The total sugar content of MFP1, MFP5, MFP50 and MFP300 were 46.34%, 68.45%, 48.60% and 66.32%, respectively, while the glyoxylate content were 3.34%, 22.78%, 16.11% and 21.48%, respectively, and the reducing sugar content were 16.51%, 6.03%, 7.90% and 6.67%, respectively. Bioactivity screening showed that MFP300 scavenged DPPH radicals and ABTS⁺ radicals with IC₅₀ values of 0.2235 and 0.2979 mg·mL⁻¹, respectively, inhibited hyaluronidase with IC₅₀ values of 0.6634 mg·mL⁻¹, and activated *in vitro* ethanol dehydrogenase with IC₅₀ values of 10.2646 mg·mL⁻¹. MFP300 was exhibited the best antioxidant, anti-allergic and *in vitro* ethanol dehydrogenase activities compared with the other three components. Compared with the other three components, MFP1 exhibited the best hypoglycemic activity with IC₅₀ values of 0.7944 and 4.6419 mg·mL⁻¹ for its ability to inhibit α -glucosidase and α -amylase, respectively. In conclusion, there were some differences in the main components and biological activities of *Mori fructus* polysaccharides obtained by membrane classification and separation, which could provide a theoretical basis for the improvement and upgrading of *Mori fructus* polysaccharide classification technology and the study of the "structure-effect" relationship of *Mori fructus* polysaccharides.

Key words: *Mori fructus* polysaccharides; membrane technology; polysaccharide fractionation; antioxidant activity; hypoglycemic activity; antiallergic activity; alcohol dehydrogenase activity

桑葚(*Mori fructus*)为桑树的成熟果实,属于桑科植物桑(*Morus alba* L.)的果穗。桑葚味甘性寒,酸甜汁多,入心、肝、肾经,为常食的水果之一,被收录于中国“药食同源”目录和《中国药典》2020 版,具有补肝益肾、生津润燥、乌发明目、利尿、保健和消暑等功效^[1]。现代研究表明,桑葚中含有多种维生素、蛋白质、游离氨基酸、有机酸和微量元素等营养成分和多酚类、多糖、生物碱、类胡萝卜素等多种活性成分^[2-3]。桑葚多糖(*Mori fructus* polysaccharide, MFP)是桑葚中主要活性成分之一,具有抗氧化、抗疲劳、抗肿瘤、保护肝脏等多种生物活性^[4]。

随着对多糖构-效关系的深入研究,多糖的生物活性受到其相对分子量、单糖组成、糖苷键类型、分子支链分支度及化学修饰等影响^[5]。不同分子量对多糖的生物活性有一定的影响^[6],而筛选出活性较好的分子量范围有利于提高多糖的利用度,开发出活性更好的多糖。目前常用的多糖分级技术为柱层析法和分级醇沉法^[7],而利用膜技术对多糖进行分级,可以提高分级效率、控制多糖分子量范围,并且确保多糖的结构和纯度不受化学试剂的影响。蔡铭等^[8]采用膜技术分级分离灵芝多糖,发现 3 种粗多糖均有一定的抗氧化能力,其中 GLP100 的羟自由基和 DPPH 自由基清除能力好于其他两种多糖,GLP1 的 ABTS⁺自由基清除能力比其他两种多糖效果更好。崔婷婷等^[9]利用膜技术分级分离锁阳多糖,发现在 50~100 kDa 分子量范围的锁阳多糖有更好的抗氧化活性。

目前对于桑葚多糖分级常用的方法为柱层析法^[10-11]和分级醇沉法^[12]。暂无文献采用膜技术对桑葚多糖进行分级,且无研究表明不同分子量的桑葚多糖具有生物活性的差异。所以本实验采用膜技术对桑葚多糖进行分级,对不同分子量的桑葚多糖的主要化学成分进行测定,以及对不同分子量的桑葚多糖进行活性筛选。通过以上研究为后期桑葚多糖分级技

术的改进升级和桑葚多糖生物活性的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

桑葚干品 购买于贵州中医药大学第一附属医院,产品批号 210702,四川博仁药业有限责任公司;葡萄糖(纯度 $\geq 98\%$)、葡萄糖醛酸(纯度 $\geq 96\%$) 上海西宝生物科技股份有限公司;苯酚、3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)、十六烷基三甲基溴化铵(Cetyltrimethylammonium Bromide, CTAB)、焦磷酸钠 上海凇恩科技发展有限公司;牛血清蛋白、 α -葡萄糖苷酶(酶活力 1 kU)、阿卡波糖、 α -淀粉酶(酶活力 1 KU)、木瓜蛋白酶(酶活力 100 kU/g)、可溶性淀粉、透明质酸酶、透明质酸钠、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD)、乙醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase, ADH) 北京索莱宝科技有限公司;浓硫酸 国药集团化学试剂有限公司;水杨酸、硫酸亚铁、无水碳酸钠、氢氧化钠、亚硫酸钠、无水乙醇 天津市致远化学试剂有限公司;抗坏血酸(Vitamin C, V_C) 天津博迪化工股份有限公司;四硼酸钠 天津市永大化学试剂有限公司;考马斯亮蓝 上海蓝季生物科技发展有限公司;吡唑 上海麦克林生化科技有限公司;以上试剂 均为分析纯。

HC-GL1812-1X 多功能膜分离实验系统 成都和诚过滤技术有限公司;XS105DU METTLER TOLEDO 十万分之一电子天平 国际贸易(上海)有限公司电子天平;Max Plus 384 光吸收酶标仪 美谷分子仪器(上海)有限公司酶标仪;FD-80 冷冻干燥机 北京博益康医院实验仪器有限公司;RE-2000 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 原料预处理 取一定量的桑葚, 70 °C 烘干, 用粉碎机粉碎, 过 40 目筛后得到桑葚干粉。以石油醚为溶剂, 采用冷却回流法脱脂, 料液比 1:2 g·mL⁻¹, 脱脂 2 次, 每次 2 h, 温度 65 °C, 滤渣为脱脂桑葚样品, 备用。

1.2.2 桑葚多糖的提取与纯化 参考谭西^[13]的提取方法, 并进行一定的修改。取 200 g 的脱脂桑葚样品, 以水为溶剂, 在热水(90 °C)中浸提 2 h, 料液比 1:15 g·mL⁻¹。对滤液离心(转速 4000 r·min⁻¹, 10 min)和减压过滤后保存滤液, 对滤渣以相同条件进行热水浸提。反复 2 次并合并滤液, 最后用旋转蒸发仪浓缩滤液至 1000 mL 左右得到浓缩液。参考王倩等^[14]采用三氯乙酸+木瓜蛋白酶法进行脱蛋白, 并进行一定的修改。向浓缩液中加入 3% 三氯乙酸溶液, 体积比 1:1, 室温放置 20 min, 离心收集上清液。调节上清液 pH 至 6~7, 加入 3% 木瓜蛋白酶, 50 °C 反应 45 min, 离心(转速 4000 r·min⁻¹, 10 min)收集上清液。此过程进行两次, 最终得到桑葚多糖粗提液。

1.2.3 桑葚多糖粗提液的分级分离 取桑葚多糖粗提液, 用 300 kDa 滤膜在 0.2 MPa, 5.5 L·min⁻¹ 条件下超滤分级, 截留液用旋转蒸发仪浓缩后按体积比 1:4 加入乙醇, 4 °C 下静置过夜。次日离心(转速 4000 r·min⁻¹, 10 min)得沉淀, 真空冷冻干燥得多糖, 记为 MFP300; 取 300 kDa 滤过液, 用 50 kDa 滤膜进行上述操作得多糖, 记为 MFP50; 取 50 kDa 滤过液, 用 5 kDa 滤膜进行上述操作得多糖, 记为 MFP5; 取 5 kDa 滤过液, 用 1 kDa 滤膜进行上述操作得多糖, 记为 MFP1。

1.2.4 桑葚多糖中总糖含量的测定

1.2.4.1 标准曲线绘制 参考论文中的苯酚-硫酸法^[13]。标准溶液的配制: 准确称取 10.00 mg 葡萄糖标准品, 将浓度配制为 0.1 mg·mL⁻¹。标准曲线的绘制: 吸取 0、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45 mL 葡萄糖标准溶液, 用蒸馏水补至 0.50 mL, 各加入 0.30 mL 的 5% 苯酚溶液, 迅速加入 1.50 mL 浓硫酸, 摇匀, 沸水浴 30 min, 冷却至室温后, 490 nm 处测定吸光度 A₄₉₀。以葡萄糖浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。得到葡萄糖标准曲线回归方程为 $y=5.172x+0.109$, $R^2=0.999$ 。

1.2.4.2 总糖含量的测定 用 1.2.4.1 中的方法测定吸光度。桑葚多糖中总糖含量计算公式为:

$$W(\%) = \frac{(A-0.109) \times m \times 10}{5.172} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

式中: W 为桑葚多糖中总糖含量, %; A 为样品溶液反应后在 490 nm 处的吸光度; m 为稀释倍数。

1.2.5 桑葚多糖中蛋白质含量的测定

1.2.5.1 标准曲线的绘制 参考论文中的考马斯亮蓝 G-250 法^[13]。标准溶液的配制: 准确吸取 1 mL

5 mg·mL⁻¹ 牛血清蛋白, 将浓度配制为 0.2 mg·mL⁻¹。标准曲线的绘制: 吸取 0、20、40、60、80、100、120、140 μL 牛血清蛋白溶液于试管中, 补蒸馏水至 200 μL, 摇匀, 各加入 1 mL 考马斯亮蓝溶液, 摇匀, 避光放置 10 min, 595 nm 处测定吸光度值 A₅₉₅。以牛血清蛋白溶液浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。得到蛋白质标准曲线回归方程为 $y=0.704x+0.2221$, $R^2=0.9928$ 。

1.2.5.2 蛋白质含量的测定 用 1.2.5.1 中的方法测定吸光度。桑葚多糖中蛋白质含量计算公式为:

$$Y(\%) = \frac{(A-0.2221) \times m \times 10}{0.704} \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中: Y 为桑葚多糖中蛋白质含量, %; A 为样品溶液反应后在 595 nm 处的吸光度; m 为稀释倍数。

1.2.6 桑葚多糖中糖醛酸含量的测定

1.2.6.1 标准曲线的绘制 参考咪唑-硫酸法^[15]。标准溶液的配制: 准确称取 10.00 mg 葡萄糖醛酸标准品, 将浓度配制为 0.1 mg·mL⁻¹。标准曲线的绘制: 准确吸取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL 葡萄糖醛酸标准溶液, 加蒸馏水定容至 1 mL, 冰水浴中加入 5 mL 四硼酸钠-硫酸溶液, 旋涡混合器混匀, 沸水浴 20 min, 取出后立即冷却至室温, 加 0.15% 咪唑溶液 0.2 mL, 摇匀, 室温反应 2 h, 523 nm 处测定吸光度值 A₅₂₃。以葡萄糖醛酸溶液浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。得到糖醛酸标准曲线回归方程为 $y=5.2456x+0.1$, $R^2=0.9992$ 。

1.2.6.2 糖醛酸含量的测定 用 1.2.6.1 中的方法测定吸光度。桑葚多糖中糖醛酸含量计算公式为:

$$T(\%) = \frac{(A-0.1) \times m \times 10}{5.2456} \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

式中: T 为桑葚多糖中糖醛酸含量, %; A 为样品溶液反应后在 523 nm 处的吸光度; m 为稀释倍数。

1.2.7 桑葚多糖中还原糖含量的测定

1.2.7.1 标准曲线的绘制 参考文献 [16] DNS 法。标准溶液的配制: 准确称取 100.00 mg 葡萄糖标准品, 将浓度配制为 1 mg·mL⁻¹。标准曲线的绘制: 精确吸取葡萄糖标准液 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mL, 分别置于 25 mL 试管中, 不足 1 mL 的用蒸馏水补充至 1 mL, 再加入 DNS 溶液 2 mL, 混合均匀后, 沸水浴 5 min, 迅速流水冷却, 加水至刻度线, 550 nm 测定吸光度值 A₅₅₀。空白调零, 以葡萄糖溶液浓度为横坐标, 吸收度为纵坐标, 绘制标准曲线。得到还原糖标准曲线回归方程为 $y=0.3529x+0.0913$, $R^2=0.9993$ 。

1.2.7.2 还原糖含量的测定 用 1.2.7.1 中的方法测定吸光度。桑葚多糖中还原糖含量计算公式为:

$$D(\%) = \frac{(A-0.0913) \times m \times 1}{0.3529} \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

式中: D 为桑葚多糖中还原糖含量, %; A 为样品溶液反应后在 550 nm 处的吸光度; m 为稀释倍数。

1.2.8 不同分子量桑葚多糖的抗氧化活性测定

1.2.8.1 DPPH 自由基清除活性测定 DPPH 自由基清除活性测定选参考 Zhang 等^[17] 的方法, 并稍作修改。取 3 mL 0.2 mg·mL⁻¹ 的 DPPH 乙醇溶液, 与 2 mL MFP 溶液充分混匀, 避光静置 20 min 后, 以无水乙醇作空白调零, 517 nm 波长测吸光度 A_{517} , 以蒸馏水代替多糖溶液作阴性对照, V_C 作阳性对照, DPPH 自由基清除率计算公式如下所示。

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式 (5)}$$

式中: A_1 为样品溶液的吸光度; A_0 为空白溶液吸光度; A_2 为不含 DPPH 的样品溶液吸光度。

1.2.8.2 ABTS⁺自由基清除活性测定 ABTS⁺自由基清除活性测定参考田义敏^[18] 的方法。精密称取 38.90 mg ABTS 和 15.16 mg 过硫酸钾溶液混合, 分别用蒸馏水定容至 10 mL, 按 1:1 混合后置于 4 ℃ 冰箱中避光反应 12~16 h, 形成 ABTS 储备液。使用前用水稀释成工作液, 使其在 734 nm 下的吸光度在 0.70±0.02。将 MFP 溶液和 ABTS 储备液溶液按 1:1 体积加入 96 孔板中, 在室温黑暗条件下反应 15 min, 以蒸馏水代替多糖溶液作为空白, 测定在 734 nm 下的吸光度 A_{734} , V_C 做阳性对照, ABTS⁺自由基清除率计算公式如下所示。

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式 (6)}$$

式中: A_1 为样品溶液的吸光度; A_0 为空白溶液吸光度; A_2 为不含 ABTS 的样品溶液吸光度。

1.2.9 不同分子量桑葚多糖的降血糖活性测定

1.2.9.1 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定参考龙晓珊^[19] 的方法, 并稍作修改。 α -葡萄糖苷酶溶液 (0.1 U·mL⁻¹) 由 PBS 缓冲溶液 (0.1 mol·L⁻¹, pH6.9) 配制。将 50 μ L MFP 溶液和 25 μ L α -葡萄糖苷酶溶液混合, 37 ℃ 反应 10 min, 之后加入 25 μ L 对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (1.5 mmol·L⁻¹)。充分混匀后于 37 ℃ 反应 30 min, 反应结束后加入 100 μ L 碳酸钠 (0.2 mol·L⁻¹) 停止反应, 在 405 nm 下测定其吸光度 A_{405} , 以阿卡波糖作为阳性对照, 计算 α -葡萄糖苷酶抑制率, 抑制率公式如下所示。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式 (7)}$$

式中: A_1 为样品溶液得吸光度; A_2 为不含 α -葡萄糖苷酶的样品溶液吸光度; A_0 为空白溶液的吸光度。

1.2.9.2 α -淀粉酶抑制活性测定 α -淀粉酶抑制活性测定参考 Chen 等^[20] 方法, 并稍作修改。 α -淀粉酶溶

液 (0.5 mg·mL⁻¹) 由 PBS 缓冲溶液 (0.1 mol·L⁻¹, pH6.9) 配制。将 100 μ L MFP 和 100 μ L α -淀粉酶溶液混合, 37 ℃ 水浴 10 min, 加入 200 μ L 1% 可溶性淀粉溶液, 37 ℃ 反应 10 min, 沸水浴中反应 10 min。沸水浴结束后加入 200 μ L DNS 试剂, 在沸水浴显色反应 10 min。反应结束后, 反应物冷却至室温并加入 4 mL 蒸馏水稀释, 在 540 nm 处测定吸光度 A_{540} , 抑制率公式如下所示。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4}\right) \times 100 \quad \text{式 (8)}$$

式中: A_1 为多糖溶液及 α -淀粉酶溶液正常反应的吸光度; A_2 为用缓冲液代替 α -淀粉酶溶液时的吸光度; A_3 为用缓冲液代替多糖溶液时的吸光度; A_4 为用缓冲液代替多糖溶液及 α -淀粉酶溶液时的吸光度。

1.2.10 不同分子量桑葚多糖的透明质酸酶抑制活性测定

透明质酸酶抑制活性采用 CTAB 浊度法进行测定, 参考易晓敏^[21] 的方法, 并稍作修改。以 pH6.0, 0.2 mol·L⁻¹ 乙酸-乙酸钠溶液为缓冲液, 用缓冲液配制 0.5 mg·mL⁻¹ 透明质酸酶的溶液及 3.44 mg·mL⁻¹ 透明质酸钠溶液。取 100 μ L MFP 溶液于 10 mL 试管中, 加入 100 μ L 透明质酸酶溶液, 再用缓冲液补充定容至 0.9 mL, 振荡均匀后, 置于 37 ℃ 的恒温水浴中, 预热 15 min 后加入 100 μ L 透明质酸钠溶液, 并开始计时, 准确计时 10 min, 迅速加入 4 mL CTAB 溶液 (以 2% NaOH 溶液为溶剂配制的 2.5% CTAB 溶液) 终止反应, 混合均匀, 常温静置 10 min 后测定反应液在 405 nm 波长下的吸光度 A_{405} , 抑制率公式如下所示。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4}\right) \times 100 \quad \text{式 (9)}$$

式中: A_1 为多糖溶液及透明质酸酶溶液正常反应的吸光度; A_2 为用缓冲液代替透明质酸酶溶液时的吸光度; A_3 为用缓冲液代替多糖溶液时的吸光度; A_4 为用缓冲液代替多糖溶液及透明质酸酶时的吸光度。

1.2.11 不同分子量桑葚多糖体外乙醇脱氢酶活性测定

乙醇脱氢酶活性采用瓦勒-霍赫法测定, 参考了邓青芳^[22] 的方法。在酶标板中依次加入 100 μ L 焦磷酸钠缓冲液 (pH8.8)、70 μ L 2 mmol·L⁻¹ NAD⁺、35 μ L 2 mol·L⁻¹ 乙醇及 20 μ L MFP 溶液, 混匀后, 35 ℃ 下密封温育 5 min, 时间到后立即向酶标板中加入 20 μ L 0.1 U·mL⁻¹ ADH, 摇匀后立即用酶标仪测定其 340 nm 处的吸光度 A_{340} , 每隔 10 s 读取 1 次吸光度值, 连续测定 5 min, 并记录数据, 空白组则是以 20 μ L 蒸馏水代替样品溶液, 其余步骤不变, 最后根据公式 (10) 计算 ADH 活性、公式 (11) 计算 ADH 的抑制 (激活) 率。

$$E(U \cdot mL^{-1}) = \Delta A_{340} \times \frac{\text{反应总体积}}{\text{酶量}} \times \frac{10^6}{6.2 \times 10^3} \quad \text{式 (10)}$$

$$\text{抑制(激活)率(\%)} = \frac{E_0 - E_1}{E_0} \times 100 \quad \text{式 (11)}$$

式中: E 为 ADH 酶活性, $U \cdot mL^{-1}$; E_1 为样品组酶活性, $U \cdot mL^{-1}$; E_0 为空白组酶活性, $U \cdot mL^{-1}$; ΔA_{340} 为反应最初线性部分 340 nm 波长处吸光度每 1 min 的增值; 6.2 为 NAD^+ 在 340 nm 处的摩尔消光系数。

1.3 数据处理

本文所有实验数据均重复 3 次, 使用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行数据处理, $P < 0.05$ 表示显著差异, $P < 0.01$ 表示极显著差异。采用 GraphPad Prism 8 软件作图, 实验结果采用平均值 \pm 标准偏差来表示。

2 结果与分析

2.1 不同分子量的桑葚多糖的主要成分分析

采用水提醇沉法从桑葚中提取多糖, 并使用多功能膜分离设备对提取液进行分级得到 MFP1、MFP5、MFP50 和 MFP300。四个组分颜色变化由浅到深, MFP1 颜色最浅, 为紫红色; MFP300 颜色最深, 为深紫色。四个组分的主要成分如表 1 所示。结果表明, MFP5 中总糖和糖醛酸含量最高, 为 $68.45\% \pm 1.53\%$ 和 $22.78\% \pm 2.32\%$; 其次是 MFP300, 为 $66.32\% \pm 0.70\%$ 和 $21.48\% \pm 1.24\%$; MFP1 两者含量最低, 为 $46.34\% \pm 0.73\%$ 和 $3.34\% \pm 1.57\%$ 。MFP5 中还原糖含量最低, 为 $6.03\% \pm 3.92\%$; MFP1 中还原糖含量最高, 为 $16.51\% \pm 0.83\%$ 。蛋白质含量普遍偏低, MFP300 含量最高, 为 $3.67\% \pm 0.18\%$, MFP1 含量最低, 为 $0.10\% \pm 0.08\%$ 。桑葚多糖的主要成分含量不是按照分子量大小顺序依次降低, 且多糖主要集中在 MFP5 和 MFP300 两个组分。四个组分中蛋白质含量较低, 说明纯化效果较好, 蛋白质对活性影响可以忽略。

表 1 不同分子量桑葚多糖的主要成分含量

Table 1 Contents of main components of MFP with different molecular weights

MFP组分	总糖(%)	蛋白质(%)	还原糖(%)	糖醛酸(%)
MFP1	46.34 ± 0.73^a	0.10 ± 0.08^a	16.51 ± 0.83^b	3.34 ± 1.57^a
MFP5	68.45 ± 1.53^b	1.94 ± 0.1^c	6.03 ± 3.92^a	22.78 ± 2.32^c
MFP50	48.60 ± 1.75^a	0.89 ± 0.21^b	7.90 ± 2.46^a	16.11 ± 2.49^b
MFP300	66.32 ± 0.70^b	3.67 ± 0.18^d	6.67 ± 0.48^a	21.48 ± 1.24^c

注: 同一列不同小写字母代表有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2 不同分子量桑葚多糖的抗氧化活性

2.2.1 DPPH 自由基清除活性 四个组分的 DPPH 自由基清除活性如图 1a 所示, 4 种多糖均有较好的 DPPH 自由基清除活性, 其中, MFP300 在 0.1、0.6 和 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下清除率最高, 且与其他三组多糖相比有极显著差异 ($P < 0.01$), 所以选择 MFP300 研究其“量-效”关系, 如图 1b 所示。MFP300 的 DPPH

自由基清除能力随浓度的升高而增强。当 MFP300 浓度为 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 清除率最大为 $97.09\% \pm 0.14\%$, 与同等浓度下 V_C 对 DPPH 自由基的清除率无显著差异 ($P > 0.05$)。MFP300 的 IC_{50} 值为 $0.2235 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, V_C 的 IC_{50} 值为 $0.005276 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与钱燕芳等^[23]通过超声提取得到的桑葚多糖相比, MFP300 的 IC_{50} 值较小, 表现出较好的 DPPH 自由基清除活性。

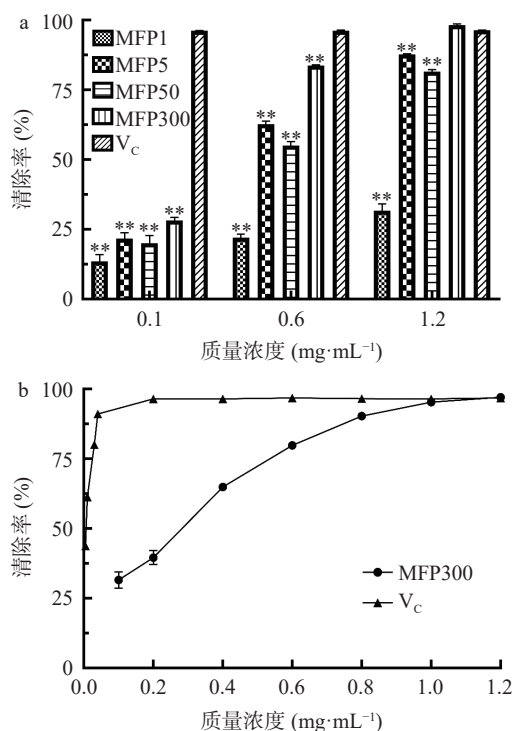


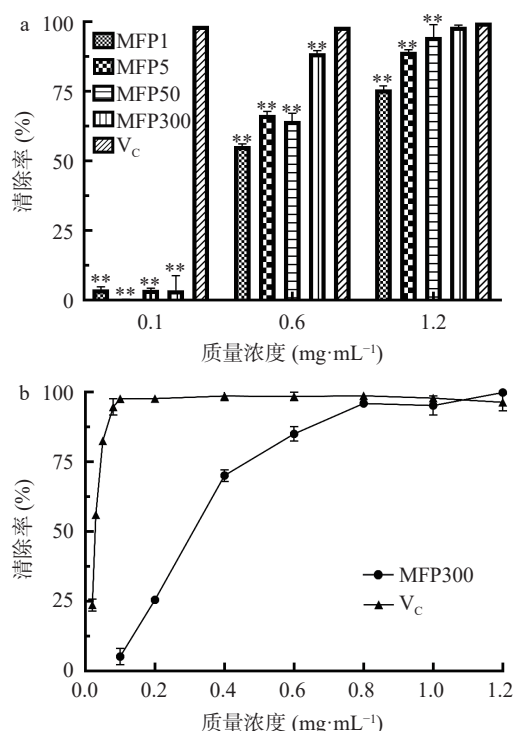
图 1 不同分子量桑葚多糖对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.1 Scavenging ability of MFPs of different molecular weight against DPPH free radicals

注: *表示与阳性组有显著差异 ($P < 0.05$); **表示与阳性组有极显著差异 ($P < 0.01$); 图 2~图 4 同; a: 不同分子量桑葚多糖的 DPPH 自由基清除能力的筛选; b: MFP300 的 DPPH 自由基清除能力的“量-效”曲线。

2.2.2 ABTS⁺自由基清除活性 四个组分的 ABTS⁺自由基清除活性如图 2a 所示, 当浓度为 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 4 种多糖的清除率均大于 50%, 其中 MFP300 活性最好, 在浓度为 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, MFP300 的 ABTS⁺自由基清除率为 $98.23\% \pm 0.54\%$, 与 MFP1 和 MFP5 相比有极显著差异 ($P < 0.01$), 与 MFP50 相比有显著差异 ($P < 0.05$), 所以选择 MFP300 研究其“量-效”关系, 如图 2b 所示。MFP300 的 IC_{50} 值为 $0.2979 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, V_C 的 IC_{50} 值为 $0.02981 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 在测定范围内, MFP300 对 ABTS⁺自由基的清除率随浓度先升高后趋于平缓, 在 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时与同浓度下的 V_C 无显著差异 ($P > 0.05$), 与 Deng 等^[24]采用酶辅助提取的桑葚多糖相比, MFP300 的 IC_{50} 值更小, 表明 MFP300 有较好的 ABTS⁺自由基清除能力。

多糖是天然高分子多聚物, 分子量高低会影响其生物活性。一般而言, 低分子量多糖更容易进入生物体内, 活性更好; 但多糖并非分子量越低活性越好,

图2 不同分子量桑葚多糖对 ABTS⁺自由基的清除能力Fig.2 Scavenging ability of MFPs of different molecular weight against ABTS⁺ free radicals

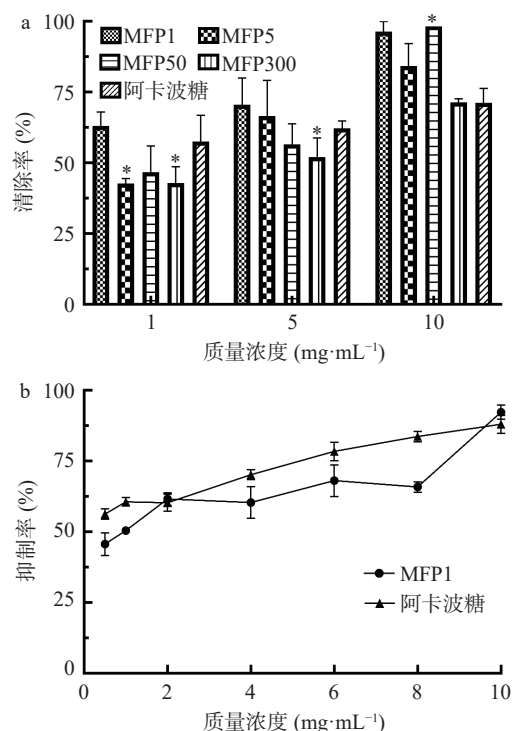
注: a: 不同分子量桑葚多糖的 ABTS⁺自由基清除能力的筛选; b: MFP300 的 ABTS⁺自由基清除能力的“量-效”曲线。

因为分子量过低,无法形成多糖产生活性的聚合结构^[25]。Su 等^[26]发现木耳多糖的 DPPH、ABTS⁺和羟自由基清除活性与其分子量呈显著正相关;李小蓉等^[27]发现海带中高分子量的岩藻多糖具有较好的抗衰老活性。与其他组分相比, MFP300 分子量较大,可形成较多产生活性的聚合结构,进而表现出较好的 DPPH 和 ABTS⁺自由基清除能力。

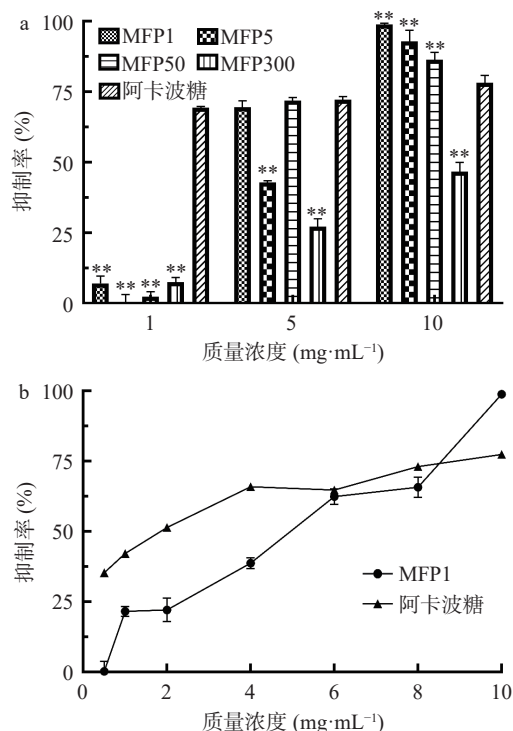
2.3 不同分子量桑葚多糖的降血糖活性

2.3.1 α -葡萄糖苷酶抑制活性 α -葡萄糖苷酶抑制剂可降低食物中葡萄糖的消化速率,抑制餐后血糖的升高,是防治糖尿病的有效手段之一^[28]。如图 3a 所示,不同分子量的桑葚多糖对 α -葡萄糖苷酶均有一定抑制作用,且有随着浓度升高抑制率增强的趋势。在同等浓度对比下, MFP1 与阿卡波糖相比均无显著差异 ($P > 0.05$); 1 mg·mL⁻¹ 时, MFP1 抑制率已超过 50%, 为 $63.02\% \pm 4.99\%$, 与其他组多糖相比有显著差异 ($P < 0.05$), 故选取 MFP1 绘制其“量-效”关系曲线, 如图 3b 所示。MFP1 的 IC₅₀ 值为 0.7944 mg·mL⁻¹, 阿卡波糖的 IC₅₀ 值为 0.4050 mg·mL⁻¹, 表明阿卡波糖的抑制效果要优于 MFP1, 但与文献报道的相比^[29], MFP1 的 IC₅₀ 更小。综上所述, MFP1 有较好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

2.3.2 α -淀粉酶抑制活性 α -淀粉酶抑制剂可降低食物中淀粉的消化速率,抑制餐后血糖的升高是防治糖尿病的有效手段之一^[30]。如图 4a 所示,不同分子量的桑葚多糖对 α -淀粉酶均有一定抑制作用,且有

图3 不同分子量桑葚多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制能力Fig.3 Inhibitory activity of MFPs of different molecular weights against α -glucosidase

注: a: 不同分子量桑葚多糖的 α -葡萄糖苷酶抑制能力的筛选; b: MFP1 的 α -葡萄糖苷酶抑制能力的“量-效”曲线。

图4 不同分子量桑葚多糖对 α -淀粉酶的抑制能力Fig.4 Inhibitory ability of MFPs of different molecular weights on α -amylase

注: a: 不同分子量桑葚多糖的 α -淀粉酶抑制能力筛选; b: MFP1 的 α -淀粉酶抑制能力的“量-效”曲线。

随着浓度升高抑制率增强的趋势。与其他三组多糖相比, MFP1 表现出更强的抑制活性: 5 mg·mL⁻¹

时, MFP1 的抑制率超过 50%, 为 $69.51\% \pm 2.23\%$; $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, MFP1 的抑制率极显著地高于其他三组多糖和阿卡波糖的抑制率 ($P < 0.01$), 所以选取 MFP1 研究其“量-效”曲线如图 4b 所示。MFP1 的 IC_{50} 值为 $4.6419 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 阿卡波糖的 IC_{50} 值为 $1.5916 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 表明阿卡波糖的抑制效果要优于 MFP1, 但与已有文献相比^[29], MFP1 的 IC_{50} 更小。结果表明, MFP1 有较好的 α -淀粉酶抑制活性。

2.4 不同分子量桑葚多糖的抗过敏活性

透明质酸酶是降解透明质酸的水解酶, 是机体结缔组织细胞外基质的主要成分, 与大多数由 IgE 介导的 I 型和 T 细胞介导的 IV 型过敏反应有关, 因此, 透明质酸酶体外抑制实验是体外快速筛选抗过敏药物的有效方法^[31]。如图 5a 所示, 不同分子量的桑葚多糖对透明质酸酶均有一定的抑制作用。其中, MFP300 的抑制率随浓度增大而升高, 且在 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 抑制率为 $53.9\% \pm 5.87\%$, 与其他三组有显著差异 ($P < 0.05$), 所以选取 MFP300 研究其“量-效”关系, 如图 5b 所示。MFP300 的透明质酸酶抑制能力的 IC_{50} 值为 $0.6634 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 表明 MFP300 有较好的抗过敏活性。

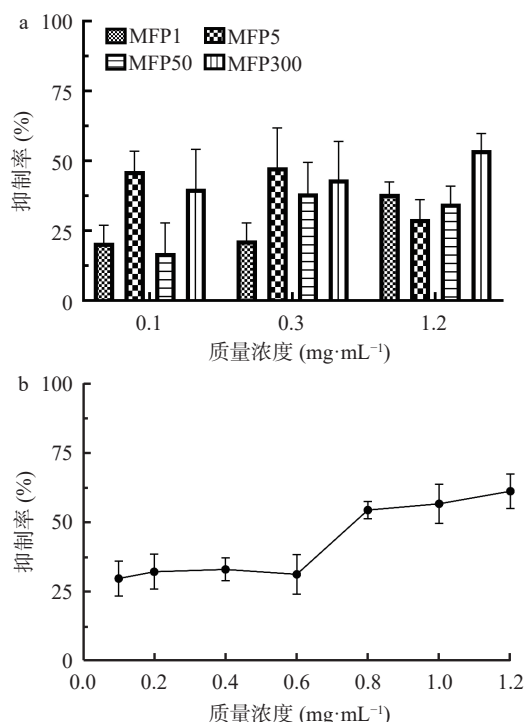


图5 不同分子量桑葚多糖对透明质酸酶的抑制能力

Fig.5 Inhibitory ability of MFPs of different molecular weight on hyaluronidase

注: a: 不同分子量桑葚多糖的透明质酸酶抑制能力筛选; b: MFP300 的透明质酸酶抑制能力的“量-效”曲线。

2.5 不同分子量桑葚多糖的体外乙醇脱氢酶活性

ADH 是一种肝脏中重要的代谢酶, 它能利用 NAD^+ 作为辅助性因子催化乙醇氧化生成还原型辅酶 I (Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 和相应的羰基化合物, 这是哺乳动物肝脏酒精代谢的限速

步骤^[13]。因此, 通过检测 ADH 体外活性来评价活性物质对肝脏的保护作用具有重要意义。如图 6a 所示, 大部分桑葚多糖在体外表现出激活 ADH 活性。尽管 MFP300 在低浓度中表现出抑制 ADH 活性, 但其在中和高浓度表现出较好的激活 ADH 活性, 与其他三组相比有显著差异 ($P < 0.05$), 故选取 MFP300 研究其“量-效”关系, 如图 6b 所示。MFP300 对 ADH 的激活能力的 IC_{50} 为 $10.2646 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 这与文献报道的不同^[32], 这可能是提取和纯化工艺不同导致的。

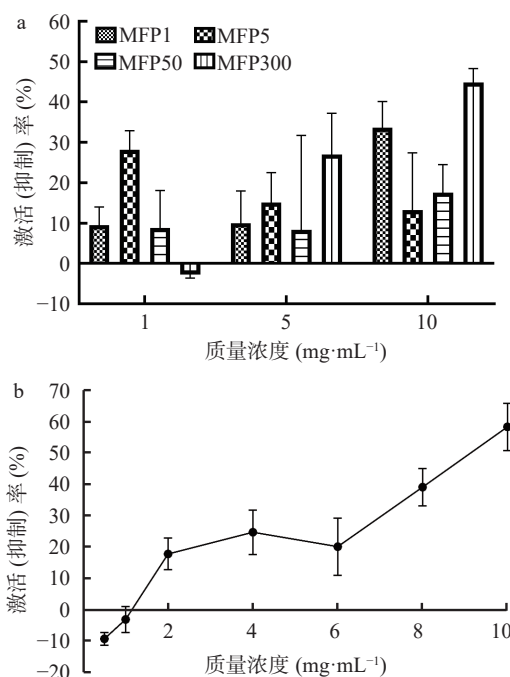


图6 不同分子量桑葚多糖的乙醇脱氢酶活性

Fig.6 Alcohol dehydrogenase activity of MFPs of different molecular weight

注: a: 不同分子量桑葚多糖的 ADH 活性筛选; b: MFP300 的 ADH 活性的“量-效”曲线。

3 讨论与结论

分子量是影响多糖生物活性的一个重要因素, 而不同来源的多糖产生生物活性的最佳分子量范围不同^[33]。朱晓冉等^[34]发现小分子量(分子量 $< 30 \text{ ku}$)的黑木耳多糖的抗氧化活性更好; Xu 等^[35]利用 H_2O_2 对黑加仑多糖进行降解, 得到 DBCP-1 ($1.3 \times 10^4 \text{ kDa}$) 和 DBCP-2 ($9.62 \times 10^3 \text{ kDa}$) 两种低分子量多糖, 并发现降解后的多糖比未降解的多糖有更好的 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性。

本实验采用 300、50、5 和 1 kDa 四种不同孔径超滤膜对桑葚多糖进行分级。不同分子量段多糖的主要成分有明显的不同, MFP1、MFP5、MFP50 和 MFP300 的总糖含量分别为 46.34%、68.45%、48.60% 和 66.32%, 糖醛酸含量分别为 3.34%、22.78%、16.11% 和 21.48%, 还原糖含量分别为 16.51%、6.03%、7.90% 和 6.67%。此外, 体外生物活性表明, MFP300 的抗氧化、抗过敏和 ADH 活性最好, 而 MFP1 的降血糖活性最好, 这表明分子量大小会影响桑葚多糖的生物

活性。综上所述,本实验利用不同孔径滤膜对桑葚提取液进行处理,多糖的主要化学成分和生物活性差异说明膜技术在桑葚多糖分级分离中的应用是有效的,为桑葚多糖的分级分离提供了一种新的思路,也为桑葚多糖的生物活性测定提供理论及实验基础。

参考文献

- [1] 余永建. 桑葚果醋液态深层发酵工艺的研究[J]. 中国酿造, 2010(11): 175-177. [YU Y J. Submerged fermentation technology of mulberry vinegar[J]. China Brewing, 2010(11): 175-177.]
- [2] 王杏. 桑葚多糖分子结构修饰与其对小鼠化学性肝损伤保护作用的研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2018. [WANG X. Study on the molecular structure modification of *Mori fructus* polysaccharides and its hepatoprotective activity on chemical liver injury in mice[D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2018.]
- [3] 李变丽, 陈华国, 赵超, 等. 桑葚多糖对辐射性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 食品科学, 2022, 43(1): 135-141. [LI B L, CHEN H G, ZHAO C, et al. Protective effect of *Mori fructus* polysaccharide on liver injury induced by cadmium in mice[J]. Food Science, 2022, 43(1): 135-141.]
- [4] BIAN L, CHEN H, ZHOU X. Untargeted lipidomics analysis of *Mori fructus* polysaccharide on acute alcoholic liver injury in mice using ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap-high resolution mass spectrometry[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 97: 107521.
- [5] 谭西, 周欣, 陈华国. 植物多糖构效关系研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4104-4109. [TAN X, ZHOU X, CHEN H G. Structure-activity relationship of plant polysaccharides[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(21): 4104-4109.]
- [6] CHEN H, XIAO R, ZHOU X. Study on the extraction, purification, partial chemical characterization and anti-alcohol liver injury activity of *Mori fructus* polysaccharides[J]. New Journal of Chemistry, 2020, 44(46): 20060-20070.
- [7] 刘颖, 张金莲, 邓亚玲, 等. 黄芪多糖提取、分离纯化及其药理作用研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2021(36): 6035-6038. [LIU Y, ZHANG J L, DENG Y L, et al. Research progress on extraction, separation, purification and pharmacological action of *Astragalus* polysaccharides[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021(36): 6035-6038.]
- [8] 蔡铭, 邢浩永, 徐靖, 等. 基于膜技术的灵芝粗多糖分级分离及抗氧化活性比较[J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 29-35. [CAI M, XING H Y, XU J, et al. Fractionation and antioxidant of crude polysaccharide from *Ganoderma lucidum* based on membrane technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(10): 29-35.]
- [9] 崔婷婷, 袁长胜, 邓小丽, 等. 不同分子量锁阳多糖体外抗氧化活性的研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28: 1315-1317. [CUI T T, YUAN C S, DENG X L, et al. In vitro antioxidant activity of lockjaw polysaccharides with different molecular weights[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2017, 28: 1315-1317.]
- [10] YU-HAO D, CHUN C, QIANG H, et al. Study on a novel spherical polysaccharide from *Fructus mori* with good antioxidant activity[J]. Carbohydr Polym, 2021, 256: 117516.
- [11] WANG P P, HUANG Q, CHEN C, et al. The chemical structure and biological activities of a novel polysaccharide obtained from *Fructus mori* and its zinc derivative[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 54: 64-73.
- [12] TAN X, CHEN H, ZHOU X. Study on the activity of *Mori fructus* polysaccharides and its derivatives against acute alcoholic liver injury in mice[J]. Journal of Carbohydrate Chemistry, 2020, 39(9): 450-471.
- [13] 谭西. 桑葚多糖低浓度乙醇分级纯化、分子修饰及抗急性酒精性肝损伤活性研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2019. [TAN X. Study on fractional purification with low concentration alcohol, molecular modification of *Mori fructus* polysaccharides and its anti-acute alcoholic liver injury activity[D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2019.]
- [14] 王倩, 吴啟南, 许一鸣, 等. 响应面法优化茭苳多糖脱蛋白工艺[J]. 食品工业科技, 2018, 39(18): 149-155. [WANG Q, WU Q N, XU Y M, et al. Optimization of deproteinized process from *Euryale petioles* and pedicel polysaccharide by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(18): 149-155.]
- [15] 王文平, 郭祀远, 李琳, 等. 野木瓜多糖中糖醛酸含量测定[J]. 食品科技, 2007: 84-86. [WANG W P, GUO S Y, LI L, et al. Determination of uronic acids in polysaccharides from *Stanuntonia chinensis*[J]. Food Science and Technology, 2007: 84-86.]
- [16] 李环, 陆佳平, 王登进. DNS 法测定山楂片中还原糖含量的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(18): 75-77. [LI H, LU J P, WANG D J. Study on determination of reducing sugar from haw flakes with DNS colorimetry method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(18): 75-77.]
- [17] ZHANG Z, ZHANG Y, LIU H, et al. A water-soluble selenium-enriched polysaccharide produced by *Pleurotus ostreatus*: Purification, characterization, antioxidant and antitumor activities in vitro[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 168: 356-370.
- [18] 田又敏. 桑葚醇提物工艺优化、生物活性及速溶精粉制备研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2021. [TIAN Y M. Study on process optimization, bioactivity and preparation of instant fine powder of mulberry alcohol extract[D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2021.]
- [19] 龙晓珊. 发酵桑葚的降血糖功效评价及其作用机制研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018. [LONG X S. Study on the hypoglycemic effect and its mechanism of fermented mulberry[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018.]
- [20] CHEN S, CHEN H, TIAN J, et al. Chemical modification, antioxidant and alpha-amylase inhibitory activities of corn silk polysaccharides[J]. Carbohydr Polym, 2013, 98(1): 428-437.
- [21] 易晓敏. 猴头菇多糖的分离纯化、表征及其功能活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017. [YI X M. Isolation, purification, structural characterization and functional activity of *Hericium erinaceus* polysaccharide[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017.]
- [22] 邓青芳. 桑葚抗酒精性肝损伤药效作用及其物质基础研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2015. [DENG Q F. Pharmacodynamics and material basis studies of *Fructus mori* against ethanol-induced

- hepatic injury[D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2015.]
- [23] 钱燕芳, 石晨莹, 陈贵堂. 桑葚多糖超声提取、脱色工艺优化及其抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(16): 201–210. [QIAN Y F, SHI C Y, CHEN G T. Optimization of ultrasound-assisted extraction and decolorization process of polysaccharides from *Mori fructus* and its antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(16): 201–210.]
- [24] DENG Q, ZHOU X, CHEN H. Optimization of enzyme assisted extraction of *Fructus mori* polysaccharides and its activities on antioxidant and alcohol dehydrogenase[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 111: 775–782.
- [25] 刘淑贞, 周文果, 叶伟建, 等. 活性多糖的生物活性及构效关系研究进展[J]. 食品研究与开发, 2017(38): 211–218. [LIU S Z, ZHOU W G, YE W J, et al. Research advance on biological activity and structure-activity relationships of bioactive polysaccharide[J]. Food Research and Development, 2017(38): 211–218.]
- [26] SU Y, LI L. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from four auriculariales[J]. Carbohydr Polym, 2020, 229: 115407.
- [27] 李小蓉, 张拴. 海带中岩藻多糖的抗衰老活性及构效关系研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(15): 117–121. [LI X R, ZHANG S. Study on the effect of anti-aging and structure-function relationship of fucoidan from kelp[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(15): 117–121.]
- [28] 朱延胜, 魏明, 钱森和, 等. 紫山药多酚分离纯化及其对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(16): 182–187. [ZHU Y S, WEI M, QIAN S H, et al. Purification and α -glucosidase inhibitory activity of polyphenols from purple yam[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(16): 182–187.]
- [29] ZHANG J Q, 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 Funct, 2019, 10(1): 410–421.
- [30] DUAN W X, YANG X H, ZHANG H F, et al. Chemical structure, hypoglycemic activity, and mechanism of action of selenium polysaccharides[J]. Biol Trace Elem Res, 2022(200): 4404–4418.
- [31] 雷文平, 周辉, 陈绮, 等. 具有透明质酸酶抑制活性益生菌的体外筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 151–157. [LEI W P, ZHOU H, CHEN Q, et al. Screening and identification of probiotics with hyaluronidase inhibitory activity *in vitro*[J]. Food Science, 2021, 42(2): 151–157.]
- [32] 肖瑞希. 弱极性分级醇沉桑葚多糖结构表征及其抗急性酒精性肝损伤作用研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2019. [XIAO R X. Study on structural characterization of *Mori fructus* polysaccharides by graded alcohol precipitated with weak polarity and its anti acute-alcoholic liver injury effect[D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2019.]
- [33] 杨玉洁, 刘静宜, 谭艳, 等. 多糖降血糖活性构效关系及作用机制研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 355–363. [YANG Y J, LIU J Y, TAN Y, et al. Progress in understanding the structure-activity relationship and hypoglycemic mechanism of polysaccharides[J]. Food Science, 2021, 42(23): 355–363.]
- [34] 朱晓冉, 徐颖, 李德海, 等. 酸碱性和分子量对木耳多糖抗氧化活性及相关性的影响[J]. 现代食品科技, 2018, 34(3): 59–67. [ZHU X R, XU Y, LI D H, et al. Correlation of the antioxidant activity and of polysaccharides from *Auricularia auricula* with its molecular weight and extracting agent[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(3): 59–67.]
- [35] XU Y, NIU X, LIU N, et al. Characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of degraded polysaccharides from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) fruits[J]. Food Chem, 2018, 243: 26–35.