DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260626003
引用格式: 毛雪, 李博文, 关德辉, 等. 黑木耳多糖的制备纯化及降血糖功能研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(15): 179–187.
Mao Xue, Li Bowen, Guan Dehui, et al. Study on preparation, purification and hypoglycemic function of *Auricularia heimuer* polysaccharides [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(15): 178–187. (in Chinese with English abstract).

黑木耳多糖的制备纯化及降血糖功能研究

毛 雪[1], 李博文[1], 关德辉[2], 李 婷[1], 史天瑶[2], 于 冲[1*]

(1. 黑龙江省科学院微生物研究所, 哈尔滨 150010; 2. 东宁山友食用菌科技研发有限公司, 东宁 157299)

摘 要: 目的 从黑木耳中提取制备高活性降血糖多糖并评价其活性。**方法** 通过单因素与正交实验优化酶解工艺, 获得最佳 *α*-葡萄糖苷酶抑制活性。粗多糖经三氯甲-正丁醇脱蛋白法脱蛋白后, 依次通过二乙氨基乙基纤维素 52 阴离子交换填料柱和高分辨率丙烯葡聚糖凝胶 S-200 凝胶柱纯化, 得到精制黑木耳多糖组分(AAPS4s)。**结果** 在最佳工艺条件下, 粗多糖对 *α*-葡萄糖苷酶抑制率为 76.38%±0.94%。AAPS4s 多糖含量为 95.63%±1.46%, 对 *α*-葡萄糖苷酶和 *α*-淀粉酶的抑制率分别为 72.56%±2.12%和 41.90%±0.87, 抑制类型均为混合型; 对 1,1-二苯基-2-三硝基苯基自由基、羟基自由基和超氧阴离子的清除率最大值分别为 57.39%±0.73%、64.99%±2.65%和 38.41%±2.80%。**结论** 本研究成功获得活性明确的黑木耳多糖组分 AAPS4s, 该组分以混合型抑制模式调控消化酶活性发挥体外降糖作用, 并具备良好抗氧化活性, 为黑木耳降糖功能产品开发及产业化应用奠定基础。

关键词: 黑木耳; 多糖; 降血糖活性; 制备; 纯化
中图分类号: TS209 **文献识别码:** A **文章编号:** 2095–0381(2026)15–0179–09

Study on preparation, purification and hypoglycemic function of *Auricularia heimuer* polysaccharides

MAO Xue[1], LI Bo-Wen[1], GUAN De-Hui[2], LI Ting[1], SHI Tian-Yao[2], YU Chong[1*]

(1. *Institute of Microbiology Heilongjiang Academy of Sciences*, *Harbin* 150010, *China*; 2. *Dongning Shanyou Edible Fungi Science and Technology Research & Development Co*., *Ltd*., *Dongning* 157299, *China*)

ABSTRACT: Objective To extract and prepare highly active hypoglycemic polysaccharides from *Auricularia heimuer* and evaluate their activity. **Methods** The enzymatic hydrolysis process was optimized through single-factor and orthogonal experiments to obtain the optimal *α*-glucosidase inhibitory activity. After deproteinization of the crude polysaccharides used the trichloromethane-n-butanol method, the polysaccharides were purified successively through a diethylaminoethyl cellulose 52 anion exchange packing column and a high-resolution sephacryl S-200 gel column. The refined *Auricularia heimuer* polysaccharide component (AAPS4s) was obtained. **Results** Under the optimal conditions, the inhibition rate of crude polysaccharides on *α*-glucosidase was 76.38%±0.94%. The content of AAPS4s

收稿日期: 2026-06-26
基金项目: 2024 黑龙江省重大科技成果产业化项目(CG24037)
第一作者: 毛雪(1990—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为食药用菌精深加工。E-mail: mx45792027@163.com
***通信作者:** 于冲(1979—), 男, 硕士, 研究员, 主要研究方向为微生物源功能食品。E-mail: yuchong137@163.com

polysaccharide was 95.63%±1.46%, and the inhibitory rates against *α*-glucosidase and *α*-amylase were 72.56%±2.12% and 41.90%±0.87, respectively. The inhibitory type was mixed; the scavenging rates of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radicals, hydroxyl radicals and superoxide anions were 57.39%±0.73%, 64.99%±2.65% and 38.41%±2.80%, respectively. **Conclusion** This study successfully obtains the highly active *Auricularia heimuer* polysaccharide component AAPS4s with clear activity. This component regulates digestive enzyme activity in a mixed inhibitory mode to exert *in vitro* hypoglycemic effects and possesses good antioxidant activity, laying a foundation for the development and industrial application of *Auricularia heimuer* hypoglycemic functional products.

KEY WORDS: *Auricularia heimuer*; polysaccharide; hypoglycemic activity; preparation; purification

0 引 言

2 型糖尿病是全球高发的慢性代谢性疾病, 主要表现为胰岛素分泌不足或胰岛素抵抗[1]。长期依赖化学降糖药物易引发多种副作用, 开发安全无毒的天然降糖功能成分已成为糖尿病辅助防控的研究热点[2−4]。天然多糖可通过抑制糖代谢关键酶活性[5]、清除自由基[6]、缓解氧化应激[7]等途径调控血糖, 且生物相容性好、无明显毒副作用, 具备良好的研发与应用前景[7−8]。

黑木耳作为食药用真菌的重要代表, 具有较高的营养价值和功效作用[9]。黑木耳多糖是其主要功能性活性成分, 已被证实具有抗氧化、调节糖脂代谢、免疫调节等多种生物活性, 初步研究表明其具备潜在降血糖能力, 是天然降糖功能制品的优质开发原料[10−12]。目前国内外相关研究多集中于多糖常规提取工艺优化及抗氧化、降血脂等基础活性探究[13], 关于黑木耳多糖降血糖的研究仍存在明显短板。现有相关研究多以黑木耳粗多糖为研究对象, 仅开展初步降糖活性验证, 缺乏高效、靶向性强的酶解精制工艺体系, 难以分离制备高纯度、高降糖特异性的均一多糖组分; 同时鲜有研究系统阐明其对 *α*-淀粉酶、*α*-葡萄糖苷酶的抑制动力学机制, 其抗氧化与降血糖的协同作用机制尚不明确, 整体研究体系较为零散, 严重限制了黑木耳降糖多糖的深度开发与产业化应用[14−16]。

基于此, 本研究以黑木耳子实体为原料, 突破传统提取工艺的局限, 采用定向酶解技术有效保留多糖活性、富集降糖特异性组分, 相较于传统粗多糖研究更具靶向性与优越性。本研究系统探究精制多糖对 *α*-淀粉酶及 *α*-葡萄糖苷酶的抑制动力学特征及其体外抗氧化活性, 阐明其降糖与抗氧化的协同作用效果, 进一步完善了黑木耳多糖的体外降糖理论体系, 可为黑木耳降糖功能产品研发及资源高值化利用提供重要的实验依据与理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑木耳子实体(黑龙江省科学院微生物研究所栽培)。*α*-葡萄糖苷酶(4-nitrophenyl *β*-*D*-glucopyranoside, PNPG) (100 U/g)、对硝基苯基-*α*-*D*-吡喃葡萄糖苷、1,1-二苯基-2-三硝基苯基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)试剂、阿卡波糖、*α*-淀粉酶(5000 U/g)、二乙氨基乙基纤维素 52 (diethylaminoethyl cellulose 52, DEAE-52)、sephacryl S-200 HR 丙烯葡聚糖凝胶(上海源叶生物科技有限公司); 纤维素酶(60000 U/g)、果胶酶(7000 U/g)、木聚糖酶(25000 U/g)、糖化酶(43000 U/g)、复配蛋白酶(343000 U/g)、*β*-葡聚糖酶(161000 U/g)(南宁东恒华道生物科技有限责任公司); 正丁醇、氯仿、氯化钠(NaCl)、浓硫酸、盐酸、水杨酸、苯酚、碳酸钠、磷酸盐缓冲液、过氧化氢、邻苯三酚、三羟甲基氨基甲烷-盐酸(trihydroxymethylaminomethane-hydrochloric acid, Tris-HCl)缓冲液、硫酸亚铁、维生素 C (vitamin C, VC)、无水乙醇(分析纯, 中国医药集团有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司)。

1.2 仪器与设备

Infinite 200 多功能酶标仪(瑞士帝肯公司); Master-R 双级反渗透纯水/超纯水机(上海和泰仪器有限公司); ME204/02 电子天平[精度 0.001 g, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; CR21N 高速冷冻离心机(日本日立公司); XK 16/100 层析柱(美国 Cytiva 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 黑木耳降血糖多糖的制备

(1)酶解多糖单因素实验

将黑木耳多糖配成质量浓度 2 mg/mL 的多糖溶液, 分别在纤维素酶、*α*-淀粉酶、果胶酶、木聚糖酶、*β*-葡聚糖酶、木瓜蛋白酶、糖化酶的最适温度和最适 pH 下进行酶解, 总加酶量 100 U/mL, 酶解 60 min, 测定 *α*-葡萄糖苷酶抑制率, 确定最佳酶种类后进行单因素实验。固定配方参数为: 酶解温度: 50 ℃、酶解时间: 60 min、加酶量: 100 U/mL、酶解 pH 为 5.0。选择加酶量(50、100、150、200、250 U/mL)、酶解温度(40、45、50、55、60 ℃)、酶解时间(30、45、60、75 min)、酶解 pH (4.0、4.5、5.0、5.5、6.0)作为考察因素, 通过对比不同考察因素对 *α*-葡萄糖苷酶抑制率的影响, 确

定最佳单因素水平[17]。

(2)酶解多糖正交实验

以加酶量(*A*)、酶解温度(*B*)、酶解时间(*C*)、酶解 pH (*D*)为影响因素, 设计 4 因素 3 水平正交实验(表 1), 根据多糖得率指标确定多糖最佳水提条件。

表 1　正交实验因素水平表
Table 1　Factors and levels table of orthogonal

水平	因素			
	A(加酶量)/(U/mL)	*B*(酶解温度)/℃	*C*(酶解时间)/min	*D*(酶解 pH)
1	150	45	45	5.0
2	200	50	60	5.5
3	250	55	75	6.0

1.3.2　黑木耳降血糖多糖的分离纯化

将粗多糖配制成质量浓度 10 mg/mL 溶液, 加入 1/5 体积的赛瓦格试剂（Sevage，氯仿：正丁醇=4:1 混合液）进行蛋白脱除, 重复操作直至无明显沉淀生成[18]。将活化处理后的 DEAE-52 阴离子交换填料均匀装填于 1.6 cm ×100 cm 层析柱中备用。使用 AKTA go 系统, 以超纯水为流动相, 通过不同流速装柱并测定柱效。然后将质量浓度 10 mg/mL 黑木耳多糖组分(AAPS)溶液经超纯水配制、0.45 μm 水系滤膜过滤后, 取 20 mL 上样; 以 1 mL/min 的流速, 依次用 0、0.3、0.6、0.9 和 1.2 mol/L NaCl 溶液进行梯度洗脱, 按 8 mL/管收集洗脱液, 采用苯酚-硫酸法测定各管多糖含量, BCA 蛋白浓度测定试剂盒测蛋白含量。合并相应管号后, 经浓缩、透析、冻干处理, 称量计算收率并密封保存[19]。其中, 黑木耳多糖组分-4 (AAPS4)组分表现出主要降糖活性。进一步采用凝胶柱层析法, 将 AAPS4 组分在高分辨率丙烯葡聚糖凝胶 S-200 (sephacryl S-200 HR)凝胶柱纯化柱(1.6 cm×100 cm)上进行分离, 以 0.5 mL/min 恒速超纯水洗脱, 按 5 mL/管收集。通过测定 490 nm 处吸光度绘制洗脱曲线, 合并目标峰管收集液。合并液经 60 ℃减压浓缩后, 置于 3.5 kDa 透析袋中, 纯水透析 48 h, 冻干后称重计算得率, 密封保存[20]。

1.3.3　体外降糖活性研究

(1) *α*-葡萄糖苷酶抑制实验

将 20 μL 多糖样品溶液与 40 μL PNPG 底物溶液混合, 于 37 ℃反应 10 min; 随后加入 10 μL *α*-葡萄糖苷酶溶液(1 U/mL), 继续在 37 ℃孵育 10 min; 最后加入 140 μL 碳酸钠溶液(0.1 mol/L)终止反应, 于 405 nm 波长下测定吸光度。以等体积阿卡波糖溶液代替多糖样品作为阳性对照, 以等体积磷酸盐缓冲液代替多糖样品作为空白对照[21]。抑制率计算如公式(1)所示。

$$抑制率/\%=(1-\frac{A_3-A_4}{A_1-A_2})\times 100\% \quad (1)$$

式中: A_1 为空白对照组吸光度; A_2 为空白对照背景组吸光度; A_3 为样品组吸光度; A_4 为样品背景组吸光度。

(2) *α*-淀粉酶抑制实验

将 100 μL 多糖样品溶液与 100 μL *α*-淀粉酶溶液混合, 于 37 ℃孵育 30 min; 后加入 200 μL 可溶性淀粉溶液, 37 ℃继续反应 10 min。取 100 μL 上述反应液, 加入 400 μL DNS 试剂, 沸水浴加热 5 min 后冷却, 于 540 nm 波长下测定吸光度。以阿卡波糖溶液为阳性对照, 以磷酸盐缓冲液代替多糖样品为空白对照, 并设置以磷酸盐缓冲液代替 *α*-淀粉酶的背景组[22]。抑制率按公式(1)计算。

(3)抑制动力学分析

本研究采用米氏动力学(Michaelis-Menten)方程结合双倒数作图法(Lineweaver-Burk), 分析精制黑木耳多糖组分(AAPS4s)对 *α*-葡萄糖苷酶和 *α*-淀粉酶的抑制动力学行为。在 *α*-葡萄糖苷酶抑制实验中, 反应体系包含不同质量浓度的 AAPS4s (0、1、2、3、4 mg/mL)与 PNPG 底物(0、1、2、3、4 mg/mL), 并加入 1 U/mL *α*-葡萄糖苷酶启动反应, 于 405 nm 波长下测定吸光度。在 *α*-淀粉酶抑制实验中, 体系包含 AAPS4s (质量浓度为 0、2、4 mg/mL)与不同质量浓度为淀粉溶液(0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL), 加入 0.5 U/mL *α*-淀粉酶进行反应, 于 540 nm 测定吸光度。通过测定各条件下反应初速度, 绘制酶动力学曲线, 拟合计算米氏常数(K_m)和最大反应速率(V_{max}), 并借助 Lineweaver-Burk 双倒数图进一步判断 AAPS4s 对两种酶的抑制类型及作用机制[23]。

1.3.4　体外抗氧化活性的测定

(1) DPPH 自由基清除率测定

向 10 mL 离心管中依次加入 2 mL 不同浓度的 AAPS4s 溶液与 2 mL 0.5 mmol/L 的 DPPH 自由基乙醇溶液, 混匀后避光反应 30 min, 于 517 nm 波长下测定其吸光度, 记为 A_a; 对照组以等体积无水乙醇代替 DPPH 溶液, 测定吸光度 A_b; 空白组以等体积无水乙醇代替 AAPS4s 溶液, 测定吸光度(A_0), 以 VC 作为阳性对照进行同步测定[24]。DPPH 自由基清除率计算如公式(2)所示。

$$DPPH\ 自由基清除率/\%=(1-\frac{A_a-A_b}{A_0})\times 100\% \quad (2)$$

(2)羟基自由基清除率测定

向 10 mL 离心管中依次加入 1 mL 不同质量浓度的 AAPS4s 溶液、1 mL 6 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液以及 1 mL 6 mmol/L 硫酸亚铁溶液, 混匀后加入 1 mL 3%过氧化氢溶液以启动反应。将混合体系于 37 ℃下避光孵育 30 min, 于 510 nm 波长处测定其吸光度, 记为 A_c; 对照组以 1 mL 去离子水替代过氧化氢溶液, 测定吸光度 A_d; 空白组以 1 mL 去离子水替代 AAPS4s 溶液, 测定吸光度 A_e, 以 VC 作为阳性对照进行同步实验。羟基自由基清除率按公式(3)计算。

$$羟基自由基清除率/\%=(1-\frac{A_c-A_d}{A_e})\times100\% \quad (3)$$

(3)超氧阴离子自由基清除能率测定

将 4.5 mL Tris-HCl 缓冲液(25 ℃ 预热)加入离心管，随后依次加入 1 mL 不同质量浓度的 AAPS4s 溶液和 0.4 mL 25 mmol/L 邻苯三酚溶液。将混合体系于 25 ℃水浴反应 4 min，加入 1 mL 8%的盐酸溶液终止反应，于 320 nm 波长下测定吸光度 A_f，对照组以去离子水替代邻苯三酚溶液，测定吸光度 A_g；空白组以去离子水替代 AAPS4s 溶液，测定吸光度 A_h。以 VC 作为阳性对照。超氧阴离子自由基清除率按公式(4)计算。

$$超氧阴离子自由基清除率/\%=(1-\frac{A_f-A_g}{A_h})\times100\% \quad (4)$$

1.4 数据分析

所有实验均重复 3 次，数据以平均值±标准偏差表示。采用 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行数据分析及绘图。多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 酶解多糖单因素实验结果分析

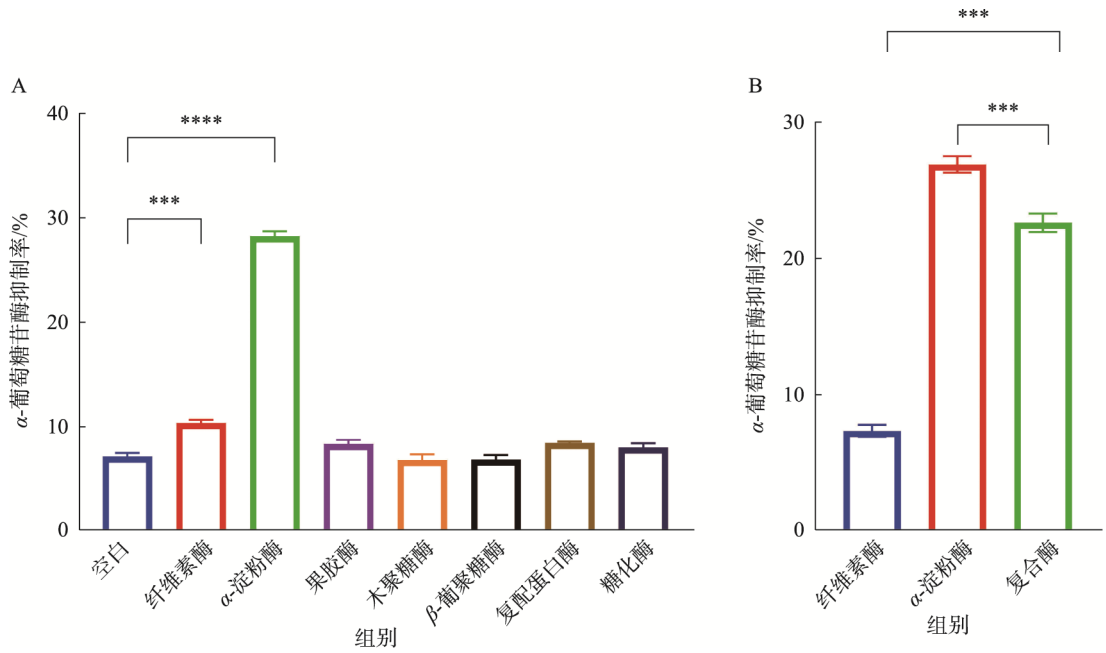
2.1.1 酶种类筛选

7 种酶对黑木耳多糖的 α-葡萄糖苷酶抑制率如图 1A 所示，不同酶对黑木耳多糖的酶切位点以及作用方式的不同，所得到的多糖片段对 α-葡萄糖苷酶抑制率存在显著差异，纤维素酶和淀粉酶显著提高了黑木耳多糖的 α-葡萄糖苷酶抑制率，因此选择纤维素酶和淀粉酶进行组合实验。

组合酶黑木耳多糖对 α-葡萄糖苷酶抑制率的影响如图 1B 所示，组合酶相较于纤维素酶显著提高了黑木耳多糖的 α-葡萄糖苷酶抑制率，但低于淀粉酶的效果，可能原因是组合酶对黑木耳多糖的酶解作用过度，导致黑木耳多糖中抑制 α-葡萄糖苷酶的活性位点遭到破坏，使其生物活性降低[25]。综上，选择淀粉酶进行后续实验。

2.1.2 酶解条件对 α-葡萄糖苷酶抑制率的影响

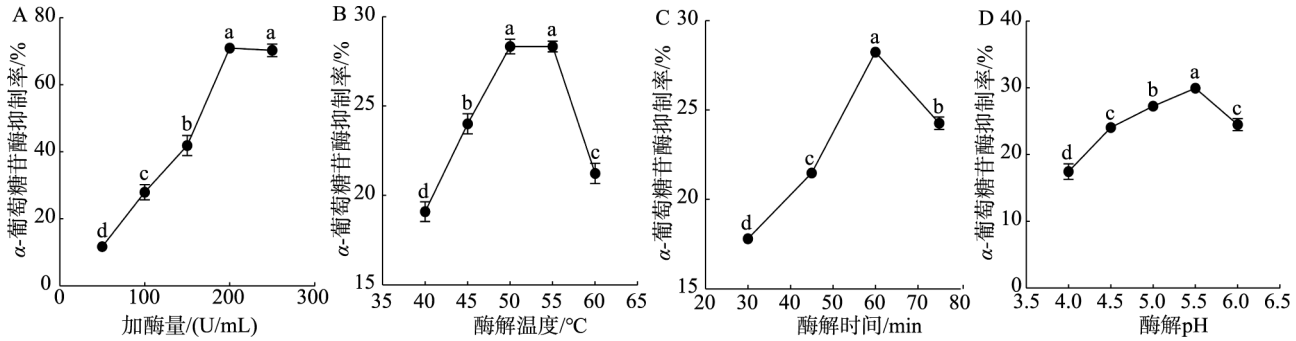
加酶量、酶解温度、酶解时间及酶解 pH 均对黑木耳多糖的 α-葡萄糖苷酶抑制率产生显著影响(图 2)。其中，加酶量为 200 U/mL 时抑制率达最大值 70.92%±1.41%，酶降解糖链暴露活性位点，过量则会破坏活性位点；酶解温度 50 ℃时抑制率最高 28.33%±0.42%，40~50 ℃酶活力随温度升高而增强，酶分子吸收能量并增强其热运动，使其酶活力逐渐增加，超 50 ℃酶结构改变致酶解不完全；酶解时间 60 min 时抑制率达 28.24%±0.28%，酶解时间的延长使黑木耳多糖糖链降解，多糖分子量不断减小，使多糖具有更好的 α-葡萄糖苷酶抑制效果，过长酶解会破坏多糖活性结构；酶解 pH 5.5 时抑制率最大 29.94%±0.66%，可能的原因是酶解 pH 影响了酶的空间构象。综上，后续正交实验选择加酶量 150、200、250 U/mL，酶解温度 45、50、55 ℃，酶解时间 45、60、75 min，酶解 pH 5.0、5.5、6.0 为实验水平。



注：***表示差异强极显著(P<0.001)。

图 1 酶种类筛选

Fig.1 Screening of enzyme types



注: 不同小写字母代表组间存在显著性差异(P<0.05), 图 3、5、7 同。

图 2　酶解条件对 α-葡萄糖苷酶抑制率的影响

Fig.2　Effects of enzymatic hydrolysis conditions on the α-glucosidase inhibition rate

2.1.3　酶解多糖正交实验结果分析

酶解多糖正交实验结果如表 2 所示, 按照极差大小, 影响 α-葡萄糖苷酶抑制率因素顺序为: $A>B>D>C$, 即加酶量、酶解温度、酶解 pH 和酶解时间对黑木耳多糖的 α-葡萄糖苷酶抑制率的影响依次减小。

表 2　正交实验结果

Table 2　Result of orthogonal experimental

因素	A(加酶量)/(U/ml)	B(酶解温度)/℃	C(酶解时间)/min	D(酶解 pH)	α-葡萄糖苷酶抑制率/%
1	1	1	1	1	10.14
2	1	2	2	2	32.09
3	1	3	3	3	22.60
4	2	1	2	3	50.86
5	2	2	3	1	65.29
6	2	3	1	2	72.76
7	3	1	3	2	35.90
8	3	2	1	3	46.40
9	3	3	2	1	51.01
K_1	64.83	96.90	128.31	126.45	
K_2	188.91	143.79	133.95	139.74	
K_3	133.32	146.37	124.8	120.87	
k_1	21.61	32.30	42.77	42.15	
k_2	62.97	47.93	44.65	46.58	
k_3	44.44	48.79	41.60	40.29	
R	41.36	16.49	3.05	6.29	

酶解多糖正交实验方差分析结果如表 3 所示, 加酶量和酶解温度对 α-葡萄糖苷酶抑制率具有显著性影响(P<0.05 或 P<0.001)。从正交实验分析结果可知, 多糖得率最优因素组合为 $A_2B_3C_2D_2$, 即酶解多糖最佳条件为: 加酶量 200 U/mL, 酶解温度为 55 ℃, 酶解时间为 60 min, 酶解 pH 为 5.5。在此条件下做 3 组平行验证实验, 黑木耳 α-葡萄糖苷酶抑制率为 76.38%±0.94%。

表 3　方差分析结果

Table 3　Results of variance analysis

因素	平方和	自由度	均方	F	显著性
A(加酶量)/(U/ml)	3523.4	2	1761.70	43.00	**
B(酶解温度)/℃	412.3	2	206.10	5.03	*
C(酶解时间)/min	3.7	2	1.85	0.05	
D(酶解 pH)	60.2	2	30.10	0.73	
误差	81.9	2	40.95		

注: *表示该因素对实验指标影响显著, P<0.05; **表示该因素对实验指标影响极显著, P<0.01。

2.2　黑木耳多糖纯化

2.2.1　DEAE-52 纤维素柱层析及组分筛选

采用 Sevage 法脱蛋白 4 次效果最佳, 此时的蛋白清除率为 60.08%±0.80%, 多糖保留率为 62.99%±1.40%。AAPS 经纤维素 DEAE-52 层析柱纯化, 结果如图 3 所示, 共得到 4 个单一洗脱峰, 依次为水洗脱组分命名为 AAPS1、0.2 mol/L NaCl 洗脱组分命名为 AAPS2、0.6 mol/L NaCl 洗脱组分命名为 AAPS3 和 0.8 mol/L NaCl 洗脱组分命名为 AAPS4。收集各洗脱组分后, 经浓缩后, 离子水透析 48 h, 期间不定期换水, 冷冻干燥处理后, 测定各组分多糖纯度并计算得率, 结果如表 4。

为统一活性评价标准, 本研究将 4 种多糖组分统一配置为质量浓度 2 mg/mL 的样品溶液, 进行 α-葡萄糖苷酶抑制活性检测, 结果如图 3B 所示。α-葡萄糖苷酶抑制率最高的组分为 AAPS4, 抑制率为 76.35%±1.73%。选择 AAPS4 进行后续实验。

2.2.2　Sephacryl S-200 HR 凝胶柱层析

AAPS4 经 Sephacryl S-200 HR 凝胶柱层析进一步纯化, 洗脱结果如图 4 所示。洗脱过程中连续收集 10~25 号洗脱管, 合并峰值区间洗脱液后透析、浓缩、冻干, 最终获得 AAPS4s, 该组分呈现均匀对称的单一洗脱

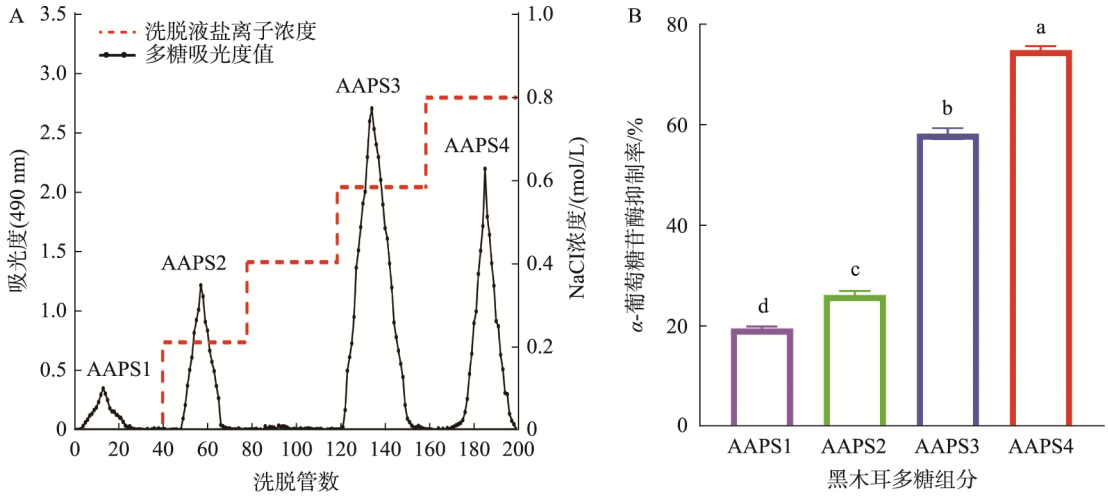


图 3 DEAE-52 纤维素柱洗脱曲线(A)和洗脱组分的体外降血糖活性(B)

Fig.3 Elution curve of DEAE-52 cellulose column (A) and *in vitro* hypoglycemic activity of elution fractions (B)

表 4 DEAE-52 柱层析各多糖组分得率、纯度结果

Table 4 Results of yield and purity of polysaccharide fractions separated by DEAE-52 column chromatography

分离多糖组分	合并管号/管	多糖得率/%	多糖纯度/%
AAPS1	10~22	18.24	78.35
AAPS2	28~40	15.68	81.62
AAPS3	45~58	12.35	85.19
AAPS4	62~75	21.76	89.43

峰，无杂峰拖尾现象。sephacryl S-200 HR 凝胶柱可依据分子量差异实现多糖分级分离，该均一单峰特征表明凝胶层析可有效去除样品中的色素、杂蛋白及分子量不均一的多糖片段，成功获得分子量均一的均一多糖组分。经苯酚-硫酸法与 BCA 法检测可知，AAPS4s 的多糖纯度可达 95.63±1.46%，且样品中未检出蛋白质残留，多糖纯化效果良好。获得的高纯度、分子量均一的 AAPS4s 可最大程度规避杂质干扰，保证后续体外降血糖、抗氧化及酶动力学实验结果的准确性与可靠性。

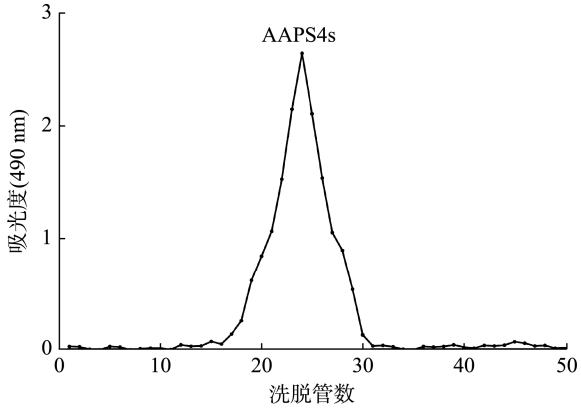


图 4 sephacryl S-200 HR 柱层析洗脱曲线

Fig.4 Elution curve of sephacryl S-200 HR column chromatography

2.2.3 体外降糖活性结果分析

AAPS4s 体外降血糖活性结果如图 5 所示，AAPS4s 对 α-葡萄糖苷酶抑制率和 α-淀粉酶抑制率均随浓度增加呈现上升后趋于平缓的趋势，当 AAPS4s 质量浓度为 2 mg/mL 时达到了 α-葡萄糖苷酶抑制率最大值，为 72.56%±2.12%，当 AAPS4s 质量浓度为 4 mg/mL 时达到了 α-淀粉酶抑制率最大值，为 41.90%±0.87%。证明 AAPS4s 有很好的体外降血糖活性。

2.2.4 抑制动力学结果分析

采用 Michaelis-Menten 方程和 Lineweaver-Burk 双倒数作图法分析了 AAPS4s 的抑制动力学，结果见图 6。图 6A 显示，不同抑制剂浓度下的拟合直线在第一象限交汇。随着 AAPS4s 浓度增加，直线在横轴(1/[*s*])上的截距左移(表观 K_m 增大)，且斜率呈浓度依赖性增加，同时最大反应速率(V_{max})发生改变。此动力学特征表明，AAPS4s 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用为混合型抑制。同理，图 6B 中直线交汇于第二象限，证实 AAPS4s 对 α-淀粉酶的抑制同样表现为混合型模式。表明 AAPS4s 可同时竞争酶活性中心、改变酶空间构象，兼具竞争与非竞争抑制特征[26]。相较于单一抑制方式，该混合型抑制效应不易被高底物浓度逆转，降糖作用更为稳定，可同步抑制淀粉与寡糖的水解进程、有效缓解餐后高血糖，进一步从酶动力学层面阐明了 AAPS4s 的降糖作用机制[27]。

2.3 体外抗氧化结果分析

氧化应激介导的胰岛损伤、胰岛素抵抗是高血糖恶化的关键病理环节，多糖的自由基清除活性可从细胞保护层面辅助阐释其降糖潜力[28–29]。为完善 AAPS4s 降糖相关活性的综合评价体系，本研究检测其体外抗氧化能力，结果如图 7 所示。AAPS4s 对 3 类自由基的清除能力排序为：羟基自由基大于 DPPH 自由基大于超氧阴离子自由基，这一差异可能源于不同自由基的反应活性和 AAPS4s 的作用靶

点多样性[30]。AAPS4s 对 3 类自由基的清除效率均随浓度增加呈先快速上升后趋于平缓的趋势, 在 2 mg/mL 时达到了 DPPH 自由基清除率最大值 57.39%±0.73%; 在 3 mg/mL 时达到了羟基自由基清除率最大值 64.99%±2.65%, 在 4 mg/mL 时达到了超氧阴离子自由基清除率最大值 38.41%±2.80%, 证明 AAPS4s 有很好的体外抗氧化活性。

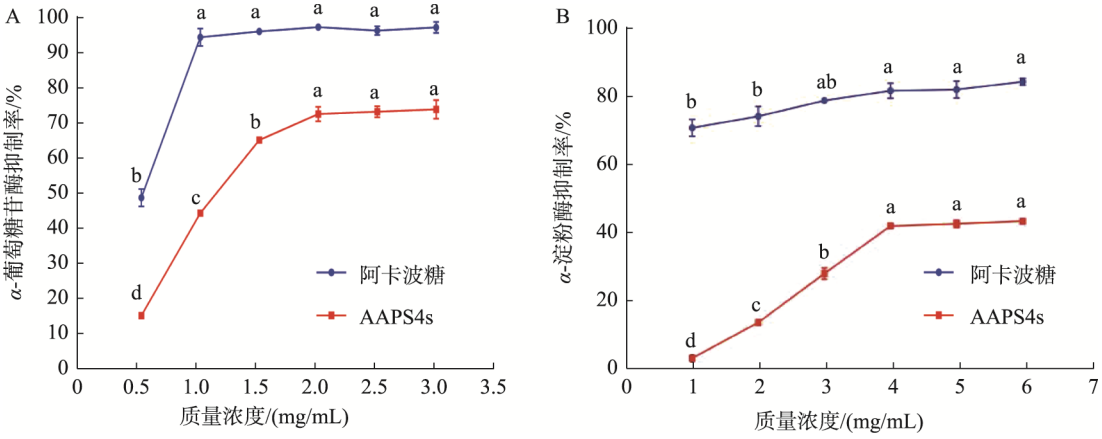


图 5　AAPS4s 体外降血糖活性

Fig.5　*In vitro* hypoglycemic activity of AAPS4s

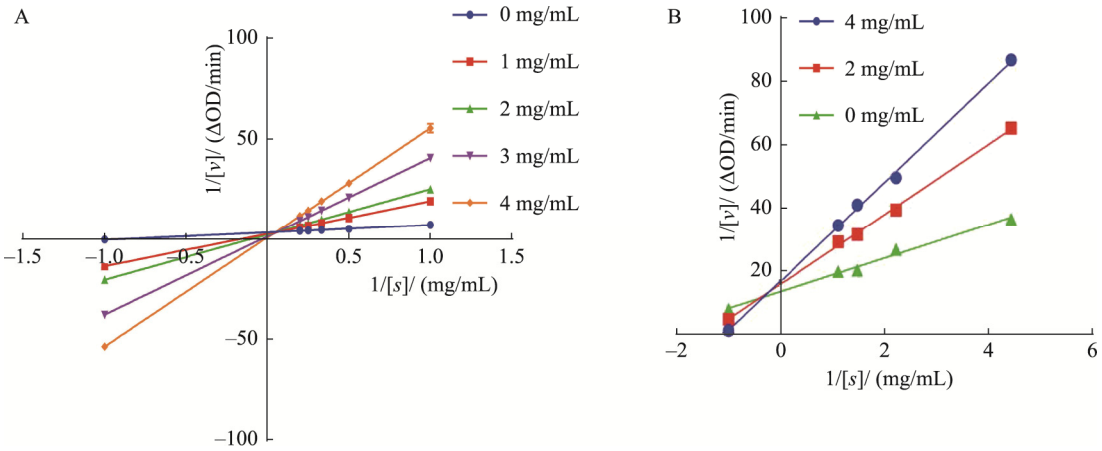


图 6　抑制动力学结果

Fig.6　Results of inhibition kinetics

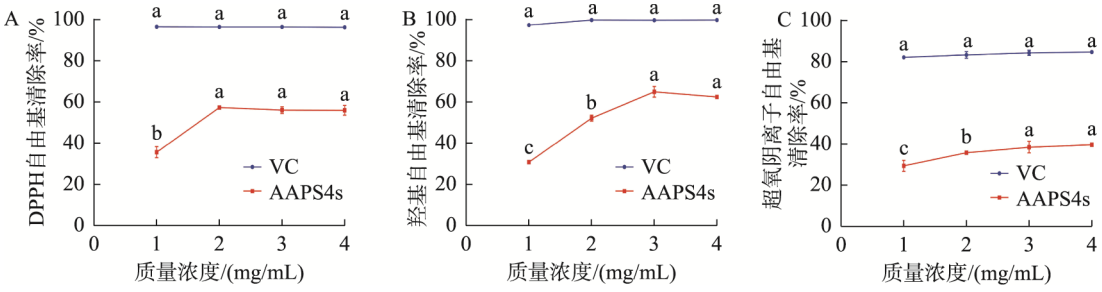


图 7　AAPS4s 体外抗氧化结果

Fig.7　*In vitro* antioxidant results of AAPS4s

3　结　论

本研究针对当前黑木耳降糖多糖研究多依赖传统提取工艺、粗多糖研究特异性差、酶学效应研究不够深入且缺乏系统性动力学分析等不足, 开展了定向酶解优化、多糖精制及活性效应探究的系统性研究。本研究优化所得酶解工艺制备得到的粗多糖的降糖酶抑制活性显著优于常规提取工艺。相较于传统提取工艺, 本研究采用多酶筛选结

合定向提取技术，可有效保护多糖活性结构、高效富集降糖活性组分，解决了传统工艺靶向性弱、活性组分利用率低的技术问题；同时通过多级柱层析纯化获得纯度达95.63%±1.46%的高纯度均一多糖 AAPS4s，规避了粗多糖成分混杂、活性干扰强的缺陷。同时，本研究明确 AAPS4s 对 *α*-淀粉酶与 *α*-葡萄糖苷酶呈混合型抑制特征，抑制率分别可达 41.90%±0.87%与 72.56%±2.12%，对多种自由基具有良好清除能力，证实其可通过抑制碳水化合物降解、缓解氧化应激的双重协同途径发挥降糖作用。

综上所述，本研究成功优化获得黑木耳多糖高效定向制备工艺，筛选得到高纯度、高活性的均一降糖多糖组分 AAPS4s，明确了其优异的体外降糖酶抑制活性与抗氧化协同作用效果。研究突破了传统黑木耳多糖降糖研究的技术局限，弥补了相关研究内容不完善的问题，进一步丰富了黑木耳多糖体外降糖的研究体系，可为黑木耳资源高值化精深加工、天然降糖功能性食品的精准开发与产业化应用提供重要的实验依据与理论支撑。

参考文献

[1] Ogurtsova K, Guariguata L, Barengo N C, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021 [J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2022, 183: 109118.

[2] Robinson G N, Pickering R J. Melanocortins and their potential for the treatment, prevention and amelioration of complications of diabetes [J]. Diabetology, 2024, 5(1): 69–84.

[3] Lima J E B F, Moreira N C S, Sakamoto-Hojo E T. Mechanisms underlying the pathophysiology of type 2 diabetes: from risk factors to oxidative stress, metabolic dysfunction, and hyperglycemia [J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2022, 874: 503437.

[4] Lovegrove A, Edwards C H, De Noni I, et al. Role of polysaccharides in food, digestion, and health [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(2): 237–253.

[5] Rasouli H, Hosseini-Ghazvini S M, Adibi H, et al. Differential *α*-amylase/*α*-glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes [J]. Food & Function, 2017, 8(5): 1942–1954.

[6] 王晴, 洪叶, 柳振宇, 等. 甘草多糖的抗氧化及降血糖作用研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(1): 398–404.
Wang Qing, Hong Ye, Liu Zhenyu, et al. Study on antioxidant and hypoglycemic effects of licorice polysaccharides [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(1): 398–404.

[7] You Sufang, Zheng Jingyi, Chen Yuping, et al. Research progress on the mechanism of beta-cell apoptosis in type 2 diabetes mellitus [J]. Frontiers in Endocrinology, 2022, 13: 976465.

[8] Ji Xiaolong, Guo Jianhang, Cao Tengzheng, et al. Review on mechanisms and structure-activity relationship of hypoglycemic effects of polysaccharides from natural resources [J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(6): 1969–1980.

[9] 黄莎, 李伟荣, 林芳, 等. 黑木耳营养和生物活性成分及其提取工艺研究进展[J]. 中国食用菌, 2021, 40(10): 7–12.
Huang Sha, Li Weirong, Lin Fang, et al. Research advance on nutrients, bioactivity and extraction technology of *Auricularia* auricular [J]. Edible Fungi of China, 2021, 40(10): 7–12.

[10] Yu Te, Wu Qiong, Liang Bin, et al. The current state and future prospects of *Auricularia auricula's* polysaccharide processing technology portfolio [J]. Molecules, 2023, 28(2): 582.

[11] Zhang Tingting, Zhao Wenying, Xie Beizhen, et al. Effects of *Auricularia auricula* and its polysaccharide on diet-induced hyperlipidemia rats by modulating gut microbiota [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 72: 104038.

[12] Chen Nana, Zhang Hao, Zong Xin, et al. Polysaccharides from *Auricularia auricula*: preparation, structural features and biological activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 247: 116750.

[13] 吴均, 杨碧文, 赵珮, 等. 桑叶多糖提取工艺优化及体外抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2024, 40(12): 170–177.
Wu Jun, Yang Biwen, Zhao Pei, et al. Optimization of extraction process and in vitro antioxidant activity of mulberry leaf polysaccharides [J]. Food & Machinery, 2024, 40(12): 170–177.

[14] Shi Qianwen, Li Xiangyu, He Jiyuan, et al. Effects of *Auricularia auricula*-judae (Bull.) Quél. polysaccharide acid hydrolysate on glucose metabolism in diabetic mice under oxidative stress [J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155485.

[15] Lu Aoxue, Yu Mengen, Shen Meng, et al. Preparation of the *Auricularia* auricular polysaccharides simulated hydrolysates and their hypoglycaemic effect [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 1139–1145.

[16] Islam T, Xu Baojun, Bian Zhaoxiang. Anti-inflammatory and gut microbiota regulatory effects of ultrasonic degraded polysaccharides from *Auricularia auricula*-judae in DSS-induced colitis mice [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2025, 117: 107339.

[17] 张峰, 谢全灵, 余志强, 等. 珊瑚藻多糖酶法提取工艺优化及其在卷烟中的应用[J]. 中国烟草科学, 2021, 42(6): 79–85.
Zhang Feng, Xie Quanling, Yu Zhiqiang, et al. Optimization of enzymatic extraction process of coralline polysaccharides and its application in cigarette [J]. Chinese Tobacco Science, 2021, 42(6): 79–85.

[18] 陈艳君, 程君悦, 朱利未, 等. 不同方法黄精多糖脱蛋白工艺及其抗氧化性研究[J]. 广东化工, 2023, 50(23): 9–11.
Chen Yanjun, Cheng Junyue, Zhu Liwei, et al. Study on different methods of deproteinization of *Polygonatum* sibiricum polysaccharide and its antioxidant activity [J]. Guangdong Chemical Industry, 2023, 50(23): 9–11.

[19] 赵建成, 刘慧燕, 方海田. 骏枣多糖的分离纯化、结构表征及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 71–78.
Zhao Jiancheng, Liu Huiyan, Fang Haitian. Study on isolation, purification, structure characterization and antioxidant activity of polysaccharide from zizyphusjujubacv. Junzao [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(23): 71–78.

[20] 何琴芳, 萨仁高娃, 成日青, 等. 玫瑰多糖化学成分及药理作用的研究

进展[J]. 华西药学杂志, 2024, 39(5): 617–620.
He Qinfang, Sa Rengaowa, Cheng Riqing, et al. Research progress on the components and pharmacological effects of *Rosa rugosa* polysaccharides [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2024, 39(5): 617–620.

[21] Yuan Qin, Lin Shang, Fu Yuan, et al. Effects of extraction methods on the physicochemical characteristics and biological activities of polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus*) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 127: 178–186.

[22] Lin Shang, Guo Huan, Lu Min, et al. Correlations of molecular weights of *β*-glucans from Qingke (Tibetan hulless barley) to their multiple bioactivities [J]. Molecules, 2018, 23(7): 1710.

[23] Martinez-Gonzalez A I, Díaz-Sánchez Á G, de la Rosa L A, et al. Inhibition of *α*-amylase by flavonoids: structure activity relationship (SAR) [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019, 206: 437–447.

[24] Zhao Ming, Huang Huiyan, Li Bowen, et al. Preparation of *Auricularia auricula*-derived immune modulators and alleviation of cyclophosphamide-induced immune suppression and intestinal microbiota dysbiosis in mice [J]. Life, 2025, 15(8): 1236.

[25] 钟文豪, 黎尔纳, 杨琼, 等. 高益生活性桑叶低聚糖的制备工艺优化及功能研究[J]. 南方农业学报, 2024, 55(12): 3676–3685.
Zhong Wenhao, Li Erna, Yang Qiong, et al. Optimization of preparation process and functional study of high-bioactivity mulberry leaf oligosaccharides [J]. Journal of Southern Agriculture, 2024, 55(12): 3676–3685.

[26] Xue Hongkun, Hao Zitong, Gao Yuchao, et al. Research progress on the hypoglycemic activity and mechanisms of natural polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 252: 126199.

[27] He Liying, Li Yong, Niu Shuqi, et al. Polysaccharides from natural resource: ameliorate type 2 diabetes mellitus *via* regulation of oxidative stress network [J]. Frontiers in Pharmacology, 2023, 14: 1184572.

[28] 王博, 张悦, 吕丹桐, 等. 植物多糖降血糖机制的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2026, 32(5): 104–108.
Wang Bo, Zhang Yue, Lyu Dantong, et al. Research progress on the hypoglycemic mechanism of plant polysaccharides [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2026, 32(5): 104–108.

[29] 赵明, 杜婉嘉, 李婷, 等. 黑木耳多糖、多肽稳定性及功能特性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(11): 103–112.
Zhao Ming, Du Wanjia, Li Ting, et al. Research on the stability and functional characteristics of polysaccharides and peptides from *Auricularia auricula* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(11): 103–112.

[30] Olszowy M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 144: 135–143.

(责任编辑: 曹岱琳　安香玉)