张百刚, 裴悦, 李群和, 等. 不同菌种发酵对桑葚多糖结构特征及生物活性的影响 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(15): 237−247. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090100

ZHANG Baigang, PEI Yue, LI Qunhe, et al. Effect of Fermentation Modification on the Structural Characteristics and Biological Activity of Mulberry Polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(15): 237−247. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090100

· 生物工程 ·

不同菌种发酵对桑葚多糖结构特征及生物活性的影响

张百刚[1], 裴　悦[1], 李群和[2], 周　环[2], 张玉娇[1], 金微微[2,*]

(1.兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730050;
2.温州市农科院温州市特色食品资源工程技术研究中心, 全省食用农产品资源挖掘与高值利用重点实验室, 浙江温州 325006)

摘　要: 目的: 探究植物乳杆菌（ATCC 14917）、酿酒酵母（ATCC 9763）和枯草芽孢杆菌（ATCC 9327）发酵对桑葚多糖的结构及生物活性的影响。方法: 采用超声辅助提取法获得三种发酵多糖（MFP-Z、MFP-N、MFP-K）与未发酵桑葚多糖（MFP），通过高效液相色谱、高效凝胶渗透色谱等方法对四种多糖进行结构表征，并评价其抗氧化、降血糖及免疫调节活性。结果: 三种发酵均提高了桑葚多糖的得率和总糖含量，改变了多糖的分子量与单糖组成，其中 MFP、MFP-N、MFP-Z 是由甘露糖、盐酸氨基葡萄糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖等 9 种单糖组成，各单糖相对摩尔比不同，MFP-K 除以上 9 种单糖，另检出氨基半乳糖盐酸盐；分子量结果显示植物乳杆菌发酵使桑葚多糖分子量上升，枯草芽孢杆菌和酿酒酵母发酵使其分子量降低。红外光谱显示发酵后桑葚多糖具有典型的多糖化合物吸收特征。四种桑葚多糖的综合抗氧化能力表现为 MFP-N>MFP-K>MFP-Z>MFP，降血糖能力表现为 MFP-N>MFP-Z>MFP-K>MFP。免疫调节方面，MFP-K 与 MFP-N 能显著激活巨噬细胞提高其吞噬活性，促进 NO、TNF-α 和 IL-6 的分泌。结论: 发酵可在不破坏多糖主要官能团的前提下调控多糖结构、改善其生物活性，且具有菌株特异性。本研究为天然植物多糖的高效改性提供了新策略，为桑葚多糖在功能食品、药品领域的开发提供了新思路。

关键词: 桑葚多糖, 发酵修饰, 免疫活性, 抗氧化, 降血糖

中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)15−0237−11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090100

本文网刊:

Effect of Fermentation Modification on the Structural Characteristics and Biological Activity of Mulberry Polysaccharides

ZHANG Baigang[1], PEI Yue[1], LI Qunhe[2], ZHOU Huan[2], ZHANG Yujiao[1], JIN Weiwei[2,*]

(1.College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;
2.Wenzhou Academy of Agricultural Sciences Wenzhou Characteristic Food Resources Engineering and Technology Research Center, Zhejiang Key Laboratory of Agri-food Resources and High-value Utilization, Wenzhou 325006, China)

Abstract: Objective: To investigate the effects of fermentation by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 14917), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), and *Bacillus subtilis* (ATCC 9327) on the structural characteristics and bioactivities of mulberry polysaccharides (MPs). Methods: Three fermented MPs (MFP-Z, MFP-N, MFP-K) and an unfermented control (MFP) were prepared using ultrasound-assisted extraction. Their structural features were characterized by high-performance liquid chromatography (HPLC) and high-performance gel permeation chromatography (HPGPC). The antioxidant, hypoglycemic and immunomodulatory activities were systematically evaluated *in vitro*. Results: Fermentation significantly increased the yield

收稿日期: 2025−09−10

基金项目: 温州市园艺植物育种重点实验室项目（ZD202003）。

作者简介: 张百刚（1981−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: zhangbaigang@163.com。

*** 通信作者:** 金微微（1982−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 果蔬采后生物学, E-mail: wwjin2003@163.com。

and total sugar content of MPs, while altering their molecular weights and monosaccharide compositions. MFP, MFP-N and MFP-Z consisted of nine monosaccharides (mannose, glucosamine hydrochloride, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, glucose, galactose, xylose, and arabinose) with distinct molar ratios. MFP-K additionally contained galactosamine hydrochloride. Fermentation with *L. plantarum* increased the molecular weight of MPs, whereas *B. subtilis* and *S. cerevisiae* fermentation reduced it. FT-IR spectroscopy confirmed that the major functional groups of MPs were retained after fermentation. For bioactivities, the overall antioxidant capacity followed the order MFP-N>MFP-K>MFP-Z>MFP, and the hypoglycemic activity ranked MFP-N>MFP-Z>MFP-K>MFP. Moreover, MFP-K and MFP-N markedly enhanced macrophage phagocytosis and stimulated the secretion of NO, TNF-*α*, and IL-6. Conclusion: Microbial fermentation can modulate the structure and enhance the bioactivities of mulberry polysaccharides in a strain-dependent manner without damaging the main functional groups. This study provides an effective strategy for the high-value utilization of mulberry polysaccharides in functional foods and pharmaceuticals.

Key words: mulberry polysaccharide; fermentation modification; immunological activity; antioxidant activity; hypoglycemic activity

桑葚为桑科桑属植物果实，在世界各地均有栽培，尤以欧洲、亚洲和非洲为多[1]。桑葚具有很高的营养价值和保健功能，享有“中华果圣”之美称，并于 1988 年被原国家卫生部列入“药食同源”目录[2]。其果实富含多种生物活性成分，主要包括多糖、多酚、黄酮、白藜芦醇、氨基酸、挥发油及生物碱等[3]。其中多糖作为由十个以上单糖分子通过糖苷键连接而成的天然大分子化合物，广泛存在于动植物、藻类、微生物中[4]。已有研究表明，桑葚多糖具有抗氧化[5]、抗肿瘤[6]、降血糖[7]、免疫调节[8] 等多种生物活性，因而成为近年来天然产物研究的热点之一。

大量研究表明，多糖的生物活性与其分子量、化学结构和构象有很大的关系[9]。然而，传统提取工艺如水提醇沉法所得的多糖常因分子量分布宽泛或活性基团掩蔽等问题，导致其生物活性未能充分释放，为突破这一局限，研究者提出了多糖分子修饰策略。目前常见的修饰方式包括化学修饰与物理修饰，这两类修饰方法虽可在不同程度上增强多糖的水溶性与生物活性，但物理修饰易破坏糖环完整性，而化学修饰可能带来有机溶剂的残留，对生物体产生一定的毒副作用。相较之下，发酵修饰多糖依托微生物在温和条件下的多酶协同与代谢调控，实现对天然多糖的结构重塑，并且工艺绿色环保，避免了化学试剂的潜在毒性。已有研究表明，发酵修饰会使植物多糖的分子量、单糖组成及其它结构发生改变，可以提升多糖的生物活性，例如，Tian 等[10] 利用益生菌 *Bacillus* sp. DU-106 发酵铁皮石斛茎部多糖，发现发酵后铁皮石斛多糖的分子量、单糖组成和分支情况发生改变，同时显著增强铁皮石斛多糖的免疫调节活性；Du 等[11] 通过复合益生菌（枯草芽孢杆菌、植物乳杆菌和酿酒酵母）对甘草进行发酵，引起了甘草叶片表面形态的变化，降低了甘草叶多糖的分子量，且发酵后甘草叶多糖具有更高的抗氧化活性；Wang 等[12] 通过酿酒酵母 CICC 32883 对山药多糖进行发酵，发酵后山药多糖的单糖组成发生改变，多糖分子量和多分散系数下降，抗氧化活性得到了提升。

目前对于发酵改性多糖的研究主要集中在单一菌种，多种菌种对比分析的研究相对较少，且通过微生物发酵改性桑葚多糖尚未见广泛报道。基于此，本研究选取了三种食品级安全菌株植物乳杆菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌，利用其差异化的代谢途径与酶系进行发酵修饰。对发酵前后的桑葚多糖进行初步结构表征和生物活性比较，旨在探讨微生物发酵对多糖结构重塑及功能增强的作用规律，为改良多糖结构与活性提供新思路，为桑葚多糖在食品和保健品中的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

桑葚干果　产地浙江金华，经鉴定品种为无籽大十；植物乳杆菌（ATCC 14917）、酿酒酵母（ATCC 9763）、枯草芽孢杆菌（ATCC 9327）　规格均为冻干粉，美国菌种保藏中心；RAW264.7 细胞（小鼠单核巨噬细胞白血病细胞）　武汉普诺赛生命科技有限公司；D354-FD 大孔树脂　和成新材料科技有限公司；单糖标准品、*α*-淀粉酶（*α*-AMY, 100 U/mg）、*α*-葡萄糖苷酶（*α*-GLS, 50 U/mg）、对硝基苯基-*α*-D-吡喃葡萄糖苷（PNPG）　上海源叶有限公司；DMEM 高糖完全培养基（含 10%FBS）　武汉普诺赛生命科技有限公司；脂多糖（LPS）　上海麦克林生化科技股份有限公司；CCK8 试剂盒　美国 APE×BIO；中性红细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、NO 含量检测 Griess 试剂盒、肿瘤坏死因子-*α*（tumor necrosis factor-*α*, TNF-*α*）、白细胞介素-6（interleukin-6, IL-6）ELISA 试剂盒　北京索莱宝科技有限公司；正丁醇　分析纯，新乡市恒兴化学试剂有限公司；浓硫酸（优级纯）、三氯甲烷（分析纯）　浙江中兴化工试剂有限公司；苯酚　分析纯，广东光华科技股份有限公司；无水葡萄糖、牛血清蛋白、考马斯亮蓝 G250、间羟基联苯、DPPH、ABTS　分析纯，上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

UV-1800PC-DS2 紫外可见分光光度计　上海美谱达仪器有限公司；3-18KS 离心机　SIGMA 公司；R-215 旋转蒸发仪　瑞士 BUCHI 公司；SCIENTZ

-100FG 冷冻干燥机　宁波新芝设备有限公司; 戴安 U3000 高效液相色谱仪、Nicolet iZ-10 傅里叶变换红外光谱仪　Thermo 公司; LC-DCY-12GK 氮吹仪　上海力辰邦西仪器科技; Waters 2707 自动进样器、Waters2414 示差检测器、Waters 1515 高效液相色谱仪　美国 Waters Corporation; Ohpak SB-804 HQ、Ohpak SB-806M HQ 聚合物基质水溶性 SEC(GFC)色谱柱　日本 Shoko Science Co., Ltd.; 3503-2 无菌培养箱　美国 Sheldon Manufacturing; KQ 400SM 型超声清洗器　昆山市超声仪器有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　桑葚多糖的提取　取 500 g 桑葚于烘箱 65 ℃烘干 48 h, 然后粉碎, 将粉碎后的桑葚粉末加入三倍体积的 95% 乙醇, 70 ℃ 回流加热搅拌 3 h, 反复脱脂至上清液接近无色[13], 将脱脂后的桑葚样品置于烘箱 55 ℃, 50 min 烘干, 过 0.18 mm 筛网, 得桑葚粉末备用。参照王振伟[14] 的方法, 根据响应面法得出的最佳提取条件进行桑葚多糖的提取, 称取适量桑椹粉末按液料比 20 mL/g 加入去离子水常温浸泡过夜后超声提取, 提取温度 55 ℃, 超声功率 180 W, 时间 30 min, 频率 30 kHz, 提取结束后过滤取上清, 残渣再重复提取 1 次后合并滤液, 将滤液浓缩, 加入 4 倍体积无水乙醇, 充分搅拌后密封避光置于 4 ℃ 静置醇沉过夜, 于 3000 r/min 离心 10 min, 弃上清液收集沉淀得桑葚粗多糖。

1.2.2　粗多糖的初步纯化　采用 Sevag 法[15] 除蛋白, 向多糖溶液中加入其体积三分之一的 Sevag 溶液(正丁醇: 三氯甲烷=1∶4), 混匀反应 15 min, 于 6000 r/min 离心 10 min, 取最上层溶液, 重复以上操作, 直至两相间无乳白色絮状物为止, 之后用旋转蒸发仪去除残留的三氯甲烷。使用 D-354FD 大孔树脂对样品进行脱色处理, 取除蛋白后的多糖溶液 300 mL 上柱吸附, 流速为 2 mL/min, 纯水洗脱柱中残留多糖溶液, 流速为 2 mL/min, 收集洗脱液浓缩后转移至截留分子量 7000 Da 的透析袋内, 置于纯水中透析 48 h, 冷冻干燥得桑葚多糖 MFP。

1.2.3　发酵多糖的制备

1.2.3.1　菌种活化　根据菌种说明书配制三种菌所需的培养基, 分别称取 5.4 g MRS 肉汤培养基、2.5 g LB 培养基、5.0 g YPD 培养基, 100 mL 蒸馏水溶解, 121 ℃ 高压灭菌 20 min。4 ℃ 冷藏待用(MRS 用于植物乳杆菌, LB 用于枯草芽孢杆菌, YPD 用于酿酒酵母)。菌种复苏: 将在甘油中保存的菌种在 30 °C 水浴中快速解冻, 按接种量 4% 分别吸取菌液 400 μL 接种到相应的 10 mL 液体培养基中, 分别将植物乳杆菌置于 37 ℃ 恒温静置培养 24 h, 枯草芽孢杆菌和酿酒酵母于 30 ℃ 恒温静置培养 48 h, 以恢复菌种活性。

1.2.3.2　发酵培养　称取适量桑葚粉末按 20 mL/g 加入超纯水充分搅拌使其分散均匀, 121 ℃ 高压灭菌 20 min, 冷却至室温后, 按照 4% 的接菌量分别接种三种菌种, 将植物乳杆菌置于 37 ℃、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母于 30 ℃ 恒温培养 24 h。发酵后进行二次灭菌, 按 1.2.1 方法超声提取多糖, 经初步纯化得植物乳杆菌发酵后桑葚多糖(MFP-Z)、酿酒酵母发酵后桑葚多糖(MFP-N)、枯草芽孢杆菌发酵后桑葚多糖(MFP-K)。

1.2.4　四种多糖主要化学成分测定　采用硫酸-苯酚法测定样品的总糖含量[16]; 采用考马斯亮蓝法[17] 测定样品的蛋白质含量; 采用间羟基联苯法测定样品糖醛酸含量[18]; 多糖得率按以下公式计算:

$$\text{多糖得率}(\%) = \frac{m}{M} \times 100$$

式中: m 是冷冻干燥后桑葚多糖的质量(g); M 是桑葚粉末的质量(g)。

1.2.5　紫外光谱检测　配制 1 mg/mL 多糖样品溶液, 在 200~600 nm 波长范围内进行紫外扫描, 分析多糖纯度。

1.2.6　傅里叶变换红外光谱(FT-IR)分析　取冻干后的桑葚多糖样品, 按 1∶100 质量比与溴化钾充分研磨后, 压成半透明片, 在傅里叶变换红外光谱仪下扫描, 扫描波数范围 4000~400 cm^{-1}[19]。

1.2.7　分子量分布测定　准确称取多糖样品 5 mg, 向样品中加入 0.05 mol/L NaCl 溶液 1 mL, 配制成 5 mg/mL 供试样品溶液, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 然后将样品转置于 2 mL 进样瓶中备用。采用 HPGPC 法, 使用高效凝胶渗透色谱串联柱进行检测。色谱条件: 聚合物基质水溶性 SEC(GFC)色谱柱(8×300 mm)2 根串联, 流动相 0.05 mol/L NaCl 溶液, 流速 0.50 mL/min, 柱温 40 ℃, 进样量 30 μL, 洗脱时间 60 min。

1.2.8　单糖组成测定

1.2.8.1　标准品配制　依次称取鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、盐酸氨基葡萄糖、氨基半乳糖盐酸盐单糖各 5 mg, 岩藻糖 10 mg, 溶解后用容量瓶定容至 10 mL, 配制成标准品母液。再分别配制质量浓度梯度的标准溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜后装入进样瓶中。

1.2.8.2　样品前处理　取干净色谱瓶, 精确称量多糖样品 5 mg, 加入 1 mL 2 mol/L TFA 酸溶液, 121 ℃ 加热 2 h。通氮气, 吹干。加入 3 mL 甲醇清洗, 再吹干, 重复甲醇清洗 2~3 次。加入 1 mL 无菌水溶解, 转入色谱瓶中待测。

1.2.8.3　PMP 衍生化　取单糖标准品溶液或多糖水解液 0.2 mL 于具塞尖底离心管, 加入 0.2 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液, 0.5 mL 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液, 涡旋混匀后于 70 ℃ 水浴中反应 1 h, 反应完成后加 0.2 mL 0.5 mol/L 盐酸中和所加入的氢氧化钠,

加氯仿 1 mL 涡旋萃取 3 次除去多余的 PMP, 弃去氯仿层后, 取 0.3 mL 加水定容至 1 mL。

1.2.8.4 色谱方法 Thermo U3000 液相色谱系统, 色谱柱为 Agilent ZORBAX EclipseXDB-C_{18}(4.6×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈∶磷酸盐缓冲液(磷酸二氢钾 12 g/L, 2 mol/L NaOH 调整 pH 至 6.8)梯度洗脱, 乙腈和磷酸盐缓冲液的体积比为 17∶83, 流速为 0.8 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 250 nm, 进样量 10 μL, 洗脱时间 75 min。

1.2.8.5 标准曲线的绘制 采用外标法定量, 通过配制不同浓度标样来制定标准曲线, 各单糖物质的量比利用标准曲线外标法计算。

1.2.9 抗氧化活性测定

1.2.9.1 DPPH 自由基清除能力测定 参考 Yu 等[20]的实验方法测定 DPPH 自由基清除能力。分别配制浓度梯度为 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mg/mL 四种桑葚多糖样品溶液。吸取 1 mL 不同浓度桑葚多糖样品溶液与 1 mL DPPH 溶液(0.2 mol/L), 漩涡仪振荡混匀。室温避光反应 30 min, 以 V_C 为阳性对照。测定其在 517 nm 波长下的吸光度。实验重复测定三次, DPPH 自由基清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_3}\right)\times 100$$

式中: A_1 为样品溶液与 DPPH 溶液的混合溶液的吸光度; A_2 为样品溶液与无水乙醇的混合溶液的吸光度; A_3 为无水乙醇与 DPPH 溶液的混合溶液的吸光度。

1.2.9.2 $ABTS^+$自由基清除力测定 参考黄媛媛[21]的方法并稍作修改进行测定。分别配制浓度梯度为 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mg/mL 四种桑葚多糖样品溶液。吸取 0.4 mL 不同浓度桑葚多糖样品溶液与 3 mL $ABTS^+$自由基溶液, 漩涡仪振荡混匀。室温避光反应 30 min, 以 V_C 为阳性对照。测定其在 723 nm 波长下的吸光度。重复测定三次, $ABTS^+$自由基清除率计算公式如下:

$$ABTS^+\text{自由基清除率}(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_3}\right)\times 100$$

式中: A_1 为样品溶液与 ABTS 溶液的混合溶液的吸光度; A_2 为样品溶液与超纯水的混合溶液的吸光度; A_3 为超纯水与 ABTS 溶液的混合溶液的吸光度。

1.2.10 降血糖活性测定

1.2.10.1 *a*-葡萄糖苷酶抑制率测定 参考 Gu 等[22]方法并稍作修改, 测定*a*-葡萄糖苷酶抑制率, 用 PBS 缓冲液(pH6.8)分别配制浓度梯度为 0.5、1、2、4、8 mg/mL 的四种桑葚多糖样品溶液, 以阿卡波糖为阳性对照, 吸取 50 μL 不同浓度桑葚多糖样品溶液与 100 μL *a*-葡萄糖苷酶溶液(1.5 U/mL), 漩涡仪混匀, 37 ℃ 下孵育 20 min, 再加入 100 μL PNPG, 继续在 37 ℃ 下孵育 10 min, 最后加入 1 mL Na_2CO_3 溶液(1 mol/L)终止反应。测定其在 400 nm 波长下的吸光度。实验重复三次, *a*-葡萄糖苷酶抑制率计算公式如下:

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率}(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_3}\right)\times 100$$

式中: A_1 为样品溶液和 PNPG、*a*-葡萄糖苷酶的混合溶液吸光度, A_2 为 PBS 缓冲液替换酶液的吸光度; A_3 为 PBS 缓冲液替换样品溶液的吸光度。

1.2.10.2 *a*-淀粉酶抑制率测定 参照陈春[23]的方法并稍作修改, 测定*a*-淀粉酶抑制率, 用 PBS 缓冲液(pH6.8)分别配制浓度梯度为 0.5、1、2、4、8 mg/mL 的四种桑葚多糖样品溶液, 以阿卡波糖为阳性对照, 吸取 500 μL 不同浓度桑葚多糖样品溶液与 500 μL *a*-淀粉酶溶液(2 U/mL), 漩涡仪混匀。37 ℃ 下孵育 10 min, 再加入 500 μL 1%(w/v)可溶性淀粉溶液, 继续在 37 ℃ 下孵育 10 min, 最后加入 1 mL DNS 溶液并煮沸 5 min 以终止反应。冷却至室温后用超纯水定容至 10 mL, 测定其在 520 nm 波长下的吸光度。实验重复三次, *a*-淀粉酶抑制率计算公式如下:

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制率}(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_3}\right)\times 100$$

式中: A_1 为样品溶液和*a*-淀粉酶、淀粉溶液的混合溶液吸光度, A_2 为 PBS 缓冲液替换酶液的吸光度; A_3 为 PBS 缓冲液替换样品溶液的吸光度。

1.2.11 免疫调节活性测定

1.2.11.1 四种多糖对 RAW264.7 细胞增殖活性影响 采用 CCK-8 法[24]分析四种桑葚多糖对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖活性的影响。取对数生长期的 RAW264.7 细胞以(1×10^5 个, 100 μL/孔)接种于 96 孔板中, 置于细胞培养箱中连续培养 24 h(培养条件: 37 ℃、5% CO_2)。设置空白对照组(100 μL DMEM 完全培养基), 阳性组(1 μg/mL LPS), 试验组即分别加入系列浓度的四种多糖样品溶液(终浓度分别为 50、200、400、600、800 μg/mL), 另设置一个没有细胞的孔为纯空白组, 每组 3 个复孔。继续培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK8, 于培养箱继续培养 1 h, 于 450 nm 处测定吸光度。细胞增殖活性计算公式如下:

$$\text{细胞增殖活性}(\%)=\frac{A_1-A_3}{A_2-A_3}\times 100$$

式中: A_1 为试验组吸光度; A_2 为空白对照组吸光度; A_3 为纯空白组吸光度。

1.2.11.2 四种多糖对 RAW264.7 细胞的吞噬活性影响 采用中性红法检测四种桑葚多糖对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞吞噬活性的影响, 按照 1.2.11.1 进行细胞处理及分组, 继续培养 24 h 后, 弃去旧培养基, 用 PBS 缓冲液洗涤两次, 每孔加入 200 μL 新培

养液及 20 μL 中性红溶液，于培养箱孵育 2 h 后弃去培养液，用 PBS 缓冲液洗涤，每孔加入 200 μL 中性红裂解液，于摇床室温裂解 10 min。于 540 nm 处测定吸光度。相对吞噬率计算公式如下：

$$\text{相对吞噬率}(\%)) = \frac{A_1}{A_2} \times 100$$

式中：A_1 为试验组吸光度；A_2 为空白组对照组吸光度。

1.2.11.3　四种多糖对 RAW264.7 细胞免疫因子分泌影响　通过 Griess 法和 ELISA 法分别测定四种桑葚多糖对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的 NO 和 TNF-α、IL-6 分泌水平。按照 1.2.11.1 进行细胞处理及分组，继续培养 24 h 后，分别收集各组细胞培养物的上清液。用 Griess 试剂按照说明书要求检测培养液中的 NO 含量，用 ELISA 试剂盒按照说明书要求检测培养液中的 TNF-α 和 IL-6 含量。

1.3　数据处理

所有实验均重复 3 次，结果用平均值±标准偏差表示，使用 Excel 2016 和 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析，使用 Origin Pro 2021 软件作图，$P<0.05$ 表示具有显著性差异。

2　结果与分析

2.1　四种多糖主要化学成分分析

如表 1 所示，四种桑葚多糖的多糖得率由高到低依次是 MFP-N>MFP-K>MFP-Z>MFP；其次相比于 MFP，MFP-N、MFP-K、MFP-Z 的总糖含量均显著提升（$P<0.05$），分别提高了 31.03%、27.69%、21.25%；此外三种发酵后多糖的糖醛酸含量均高于未发酵多糖，其中 MFP-K 的糖醛酸含量最高达到 47.88%±0.37%，说明发酵不仅提升了桑葚多糖的得率以及总糖含量，还会引起其糖醛酸含量的变化；四种多糖的蛋白质含量均低于 2%，表明通过 Sevag 法除蛋白的效果良好，多糖中仅含少量蛋白质，不影响后续的结构及活性测定。

表 1　四种桑葚多糖的多糖得率、总糖含量、蛋白含量及糖醛酸含量

Table 1　Polysaccharide yield, total sugar content, protein content and uronic acid content of the four mulberry polysaccharides

样品类别	多糖得率（%）	总糖含量（%）	蛋白质含量（%）	糖醛酸含量（%）
MFP	3.65±0.68^{d}	33.98±0.83^{c}	1.43±0.19^{a}	13.93±0.16^{d}
MFP-N	4.79±0.56^{a}	65.01±0.61^{a}	0.21±0.01^{a}	42.50±0.28^{c}
MFP-K	4.60±0.46^{b}	61.67±0.62^{a}	0.71±0.16^{a}	47.88±0.37^{a}
MFP-Z	4.09±0.71^{c}	55.23±0.97^{b}	0.96±0.29^{a}	46.51±0.41^{b}

注：同一列不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。

2.2　紫外光谱分析

由图 1 可以看出 MFP、MFP-N、MFP-K、MFP-Z 的紫外吸收光谱在 260 nm 处没有吸收峰，说明四种多糖不含核酸类物质；在 280 nm 处有微弱的吸收峰，说明四种桑葚多糖含有微量蛋白质。

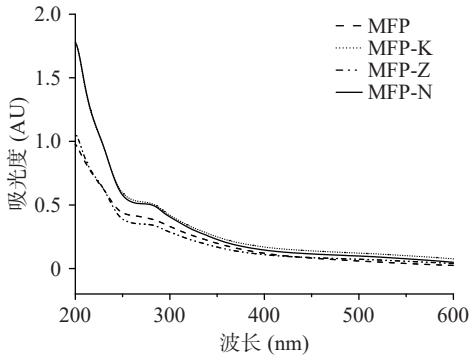


图 1　四种桑葚多糖的紫外光谱

Fig.1　UV spectrum of four mulberry polysaccharides

2.3　傅里叶变换红外光谱（FT-IR）分析

四种桑葚多糖的红外光谱结果如图 2 所示，四种多糖在 3410、2930、1733、1613、1421、1072、894、816 cm^{-1} 左右均具有吸收峰。其中 3410 cm^{-1} 处有宽而强的吸收峰归属于多糖分子中 O-H 伸缩振动[25]，表明四种桑葚多糖样品中存在羟基（-OH）基团；2930 cm^{-1} 处的吸收峰为 C-H 伸缩振动[26]；在 1700 cm^{-1} 附近的吸收峰表明糖醛酸的存在[27]，提示桑葚多糖中存在糖醛酸；1613、1421 cm^{-1} 左右出现吸收峰，被证实为末端糖残基或糖醛酸中的羰基 C=O 振动和 C-O 伸缩振动[25]；1072 cm^{-1} 左右出现的强吸收峰来源于 C-O-C 和 C-O-H 键的伸缩振动，是吡喃糖的特征峰[28]；894 cm^{-1} 处的吸收峰可鉴定为 β-型糖苷键的变形振动[29]，表明多糖主链以 β-构型连接；816 cm^{-1} 处吸收峰可能来源于甘露糖或半乳糖的 α-构型环振动。

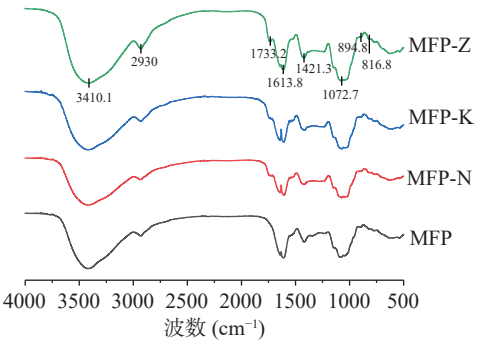


图 2　四种桑葚多糖的红外光谱图

Fig.2　Infrared spectrum of four mulberry polysaccharides

以上结果表明发酵并未改变桑葚多糖的主体结构，四种桑葚多糖均具有典型的多糖化合物吸收特征，为含 β-糖苷键的酸性多糖。与之相符，屈雅宁等[30]在通过干酪乳杆菌发酵豆粉粗多糖的研究中，亦发现发酵后豆粉粗多糖的红外光谱上含典型的多糖化合物吸收特征。

2.4　分子量分布分析

如表 2 和图 3 所示，MFP 由三个组分所构成，据峰面积加权 Mw 为 239.5 kDa，Mn 为 163.1 kDa；多分散性指数为 1.47，为中等分散体系；MFP-N 仅有一

表 2 四种桑葚多糖的分子量分布结果

Table 2 Results of molecular weight distribution of four mulberry polysaccharides

样品名称	保留时间(min)	Mp(Da)	Mw(Da)	Mn(Da)	峰面积占比(%)	多分散性指数(Mw/Mn)
MFP	25.999	831691	1030344	715189	18.62	1.44
	31.705	74517	84201	53205	55.54	1.58
	38.429	2128	3851	1393	25.84	2.76
MFP-N	33.068	40552	109959	10328	100	10.65
MFP-K	31.77	72416	93688	55912	65.52	1.68
	35.097	15085	8394	3921	34.48	2.14
MFP-Z	31.366	86246	316240	50468	88.84	6.27
	37.48	3918	3018	2126	11.16	1.42

个组分, Mw 为 109.959 kDa, Mn 为 10.328 kDa; 多分散性指数为 10.65, 分布显著变宽; MFP-K 由两个组分组成, 据峰面积加权 Mw 为 64.28 kDa, Mn 为 37 kDa, 多分散性指数为 1.69; 相较 MFP, Mw 明显降低而分散度仅小幅上升; MFP-Z 由两个组分组成, 据峰面积加权 Mw 为 281.3 kDa, Mn 为 45.1 kDa, 多分散性指数为 6.24, 提示存在高分子量长尾或潜在聚集体导致的宽分散。

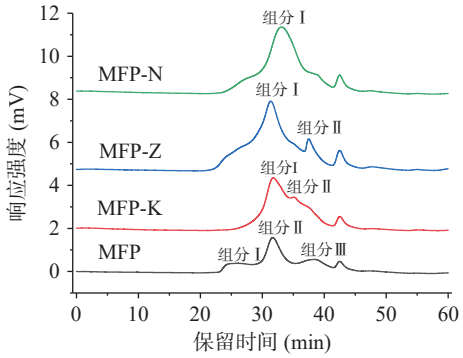


图 3 四种桑葚多糖的分子量分布

Fig.3 Molecular weight distribution of four mulberry polysaccharides

总体而言四种多糖的 Mw 顺序为: MFP-Z> MFP>MFP-N>MFP-K; 分散度为: MFP-N>MFP-Z> MFP-K>MFP。对比三种菌种发酵对桑葚多糖分子量的影响, 发现枯草芽孢杆菌与酿酒酵母发酵降低了桑葚多糖的分子量, 而植物乳杆菌发酵使其分子量增加。另外, 相比之下 MFP-K 是三种发酵后多糖中多分散性指数最低的, 说明其均一性最好。由此可见, 不同菌种发酵处理对桑葚多糖的分子量分布产生了特异性影响。有研究对比了发酵前后多糖的链接方式和 NMR 谱图, 推测发酵主要是通过“断裂多糖链”来改变分子量的[31]。Pei 等[32] 通过鼠李糖乳杆菌和酿酒酵母发酵蓝靛果, 发现两种发酵后蓝靛果多糖的分子量均低于未发酵蓝靛果多糖。孙圆等[33] 利用灰树花对糠麸进行发酵, 发现相比未发酵糠麸多糖, 发酵后糠麸多糖其分子量从 10.77 kDa 提高至 24.07 kDa。上述研究亦证实了并非所有发酵都会使多糖的分子量降低, 发酵对多糖分子量的调控具有菌株特异性。

2.5 单糖组成分析

如表 3 和图 4 所示, MFP、MFP-N、MFP-Z 是由相同的 9 种单糖组成的, 分别是甘露糖、盐酸氨基葡萄糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖, 而 MFP-K 除了以上 9 种单糖外还检测出了少量的氨基半乳糖盐酸盐。四种多糖的单糖比例各不相同, 存在显著差异, 其中 MFP-N 中占比较高的单糖是鼠李糖 23.255%、半乳糖 18.730%、半乳糖醛酸 16.848%, MFP-K 中占比较高的单糖是半乳糖 27.796%、阿拉伯糖 19.517%、

表 3 四种桑葚多糖的单糖组成及摩尔百分比(%)

Table 3 Monosaccharide composition and molar percentage of the four mulberry polysaccharides (%)

单糖	MFP	MFP-N	MFP-K	MFP-Z
甘露糖	4.321	3.298	3.263	2.796
盐酸氨基葡萄糖	1.199	1.107	1.652	0.746
鼠李糖	24.174	23.255	10.169	27.654
葡萄糖醛酸	7.998	7.590	7.146	7.710
半乳糖醛酸	9.926	16.848	16.090	18.806
氨基半乳糖盐酸盐	–	–	0.620	–
葡萄糖	12.408	12.704	12.142	6.047
半乳糖	18.271	18.730	27.796	19.094
木糖	1.666	1.508	1.604	1.388
阿拉伯糖	20.038	14.960	19.517	15.759
岩藻糖	–	–	–	–

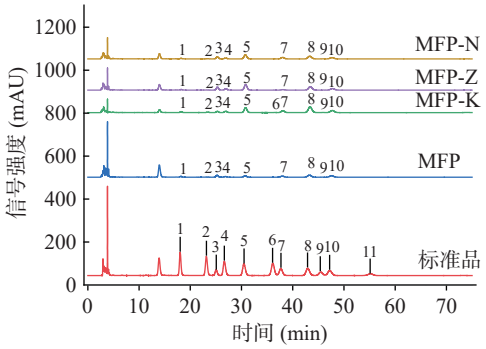


图 4 四种桑葚多糖的单糖组成

Fig.4 Monosaccharide composition of four mulberry polysaccharides

注: 1-甘露糖; 2-盐酸氨基葡萄糖; 3-鼠李糖; 4-葡萄糖醛酸; 5-半乳糖醛酸; 6-氨基半乳糖盐酸盐; 7-葡萄糖; 8-半乳糖; 9-木糖; 10-阿拉伯糖; 11-岩藻糖。

半乳糖醛酸 16.090%，MFP-Z 中占比较高的单糖是鼠李糖 27.654%、半乳糖 19.094%、半乳糖醛酸 18.806%，MFP 中占比较高的单糖是鼠李糖 24.174%、阿拉伯糖 20.038%、半乳糖 18.271%。

结果表明 MFP 以中性糖为主，酸性糖半乳糖醛酸仅占 9.926%，相比于 MFP，发酵后的三种多糖半乳糖醛酸的占比均显著提升。原因可能是微生物在发酵过程中分泌的果胶酶类如果胶裂解酶、多聚半乳糖醛酸酶，将桑葚细胞壁中原有的果胶类物质降解，释放出更多的半乳糖醛酸，使其在多糖组分中的相对含量增加。张志红[34] 在研究芦笋多糖时，发现发酵改变了芦笋多糖的单糖组成，降低了中性糖的含量，增加了葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸的含量，这与本研究得出的结果相似。

另外在解析发酵后多糖的单糖组成变化时，需考虑发酵菌体自身多糖的潜在贡献。酿酒酵母细胞壁富含以甘露糖为主要成分的甘露聚糖[35]；枯草芽孢杆菌的细胞壁以含有氨基葡萄糖的肽聚糖为特征[36]；而植物乳杆菌能合成以葡萄糖、半乳糖等为主要单糖的胞外多糖[37]。在本研究中，发酵后样品 MFP-N、MFP-K、MFP-Z 的甘露糖与氨基葡萄糖含量均未出现明显升高，同时，MFP-Z 中葡萄糖含量的显著下降也与植物乳杆菌引入葡聚糖类胞外多糖的预期趋势相反。这些数据表明，在本实验采用的发酵与纯化工艺下，菌体自身多糖的引入对最终产物组成的影响程度较低，观察到的单糖组成变化主要源于微生物酶系对桑葚多糖结构的特异性修饰。但由于发酵过程与多糖结构的复杂性，目前对于发酵过程中是否存在菌种自身多糖混入这一疑问，相关报道仍较为有限，有待进一步深入探讨。

2.6　抗氧化活性分析

2.6.1　DPPH 自由基清除能力　如图 5 所示，在实验设置的浓度范围内，四种桑葚多糖对 DPPH 自由基均有一定的清除能力，清除活性均呈现浓度依赖性。EC_{50} 值指达到最大效应的 50% 时所需的样品浓度，

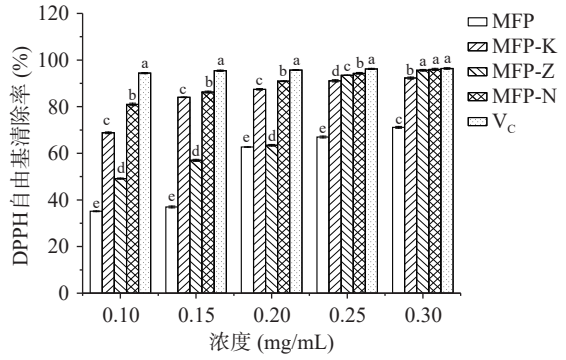


图 5　四种桑葚多糖的 DPPH 自由基清除能力

Fig.5　DPPH radical scavenging activity of four types of mulberry polysaccharides

注：不同小写字母表示相同浓度下不同样品有显著性差异（P<0.05），图 6~图 7 同。

EC_{50} 值越小代表抗氧化活性越强，经计算得知 MFP-N、MFP-K、MFP-Z、MFP 与 V_C 的 EC_{50} 值依次是 0.039、0.058、0.110、0.163、0.0003 mg/mL，可以看出三种发酵后桑葚多糖 DPPH 自由基清除能力均明显高于未发酵多糖。有研究发现发酵可使多糖分子量下降、溶解性提高，暴露还原端与羟基位点，进而提升对 DPPH 自由基的清除能力，这是多糖类抗氧化活性在发酵后常增强的直接原因之一[38−39]，而本研究中枯草芽孢杆菌和酿酒酵母发酵均引起桑葚的多糖分子量下降，且由 EC_{50} 值可以看出 MFP-N 和 MFP-K 表现出的清除活性最优，故推测低分子量多糖具有较强的提供电子或者氢原子能力进而提升了多糖的抗氧化活性。

2.6.2　$ABTS^+$自由基清除能力　如图 6 所示，四种桑葚多糖对 $ABTS^+$自由基的清除率随着多糖浓度的增加而不断增加。在浓度为 0.25 mg/mL 时，三种发酵后多糖的清除率趋于稳定，MFP-N、MFP-K 的 $ABTS^+$自由基清除率较高，分别达到了 96.33%±0.50%、94.42%±0.30%，MFP-Z 的清除率相对较低为 79.55%±0.36%。MFP-N、MFP-K、MFP-Z、MFP 与 V_C 的 EC_{50} 值分别是 0.102、0.127、0.183、0.298、0.015 mg/mL。其中 MFP 的 $ABTS^+$自由基清除率最低，在浓度 0.3 mg/mL 时仅为 66.79%，显著低于阳性对照 V_C 与三种发酵后多糖（P<0.05）。逄梦玉等[40] 也发现发酵提高了桑黄多糖的 $ABTS^+$自由基清除率，综合提升了其抗氧化能力。

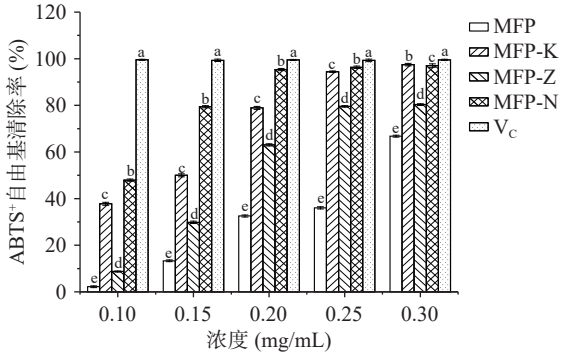


图 6　四种桑葚多糖的 $ABTS^+$自由基清除能力

Fig.6　$ABTS^+$ radical scavenging activity of four types of mulberry polysaccharides

2.7　降血糖活性分析

如图 7 所示，四种桑葚多糖对*a*-葡萄糖苷酶和*a*-淀粉酶均有明显的抑制能力，且呈现出明显的剂量依赖性抑制，随着多糖浓度的增加抑制能力随之提升，在浓度为 8 mg/mL 时抑制率达到最高。其中 MFP-N 对*a*-葡萄糖苷酶的抑制效果最好，抑制率达到了 84.94%±0.82%，显著高于其他三种多糖（P<0.05），其次是 MFP-Z（83.09%±0.59%）、MFP-K（63.01%±0.60%）、MFP（56.73%±0.71%）。IC_{50} 是指半数抑制浓度，即抑制率达到 50% 时的样品浓度，IC_{50} 值越低说明多糖对酶的抑制效果越好，经计算得四种桑葚多

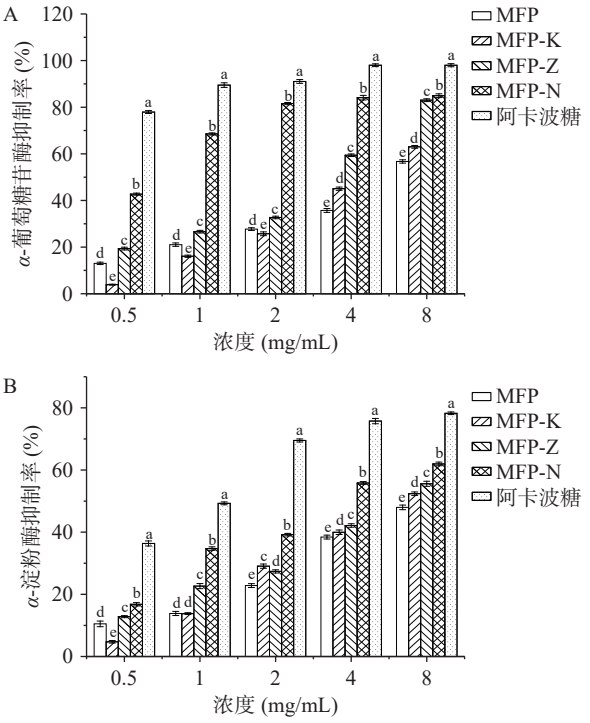


图 7 四种桑葚多糖对*α*-葡萄糖苷酶(A)、*α*-淀粉酶(B)的抑制能力

Fig.7 Inhibitory effects of four kinds of mulberry polysaccharides on *α*-glucosidase (A) and *α*-amylase (B)

糖的 IC_{50} 值由低到高依次为 MFP-N(0.49 mg/mL)、MFP-Z(2.62 mg/mL)、MFP-K(4.86 mg/mL)、MFP(6.76 mg/mL)。

在*α*-淀粉酶抑制实验中,当多糖浓度为 8 mg/mL 时,MFP-N、MFP-K、MFP-Z 的抑制率相比于 MFP(47.97%±0.73%),分别提升至 61.95%±0.58%、52.38%±0.55%、55.56%±0.81%;四种多糖的 IC_{50} 值由低到高依次为 MFP-N(3.4 mg/mL)、MFP-Z(6.16 mg/mL)、MFP-K(6.34 mg/mL)、MFP(8.37 mg/mL),可以看出 MFP-N 的抑制效果最佳,明显高于 MFP-Z、MFP-K、MFP。

综上,四种桑葚多糖具有良好的降血糖活性,微生物发酵显著提升了桑葚多糖的降血糖能力。MFP-N 的降糖能力最好,可能是由于酿酒酵母在发酵过程中释放的淀粉酶、半乳糖苷酶使多糖主链糖苷键水解,使其含有较高的总糖含量,可以暴露较多的活性位点,被认为具有较高的降糖活性[21]。

2.8 免疫调节活性

2.8.1 MFP、MFP-N、MFP-K、MFP-Z 对 RAW264.7 细胞增殖的影响 实验采用 CCK8 法测定 MFP、MFP-N、MFP-K、MFP-Z 在不同浓度下(50、200、400、600、800 μg/mL)对 RAW264.7 细胞增殖活性的影响,以确定合适的实验浓度。结果如图 8 所示,与空白对照组(Control)相比,MFP、MFP-N、MFP-K、MFP-Z 在 50~800 μg/mL 浓度范围内对 RAW264.7 细胞均具显著的促增殖作用(P<0.05),且在浓度为 400 μg/mL 时增殖活性均达到了极显著水平(P<0.001)。当浓度达到 800 μg/mL 时,四种多糖对 RAW264.7 细胞的增殖率均有所下降,但仍高于空白对照。

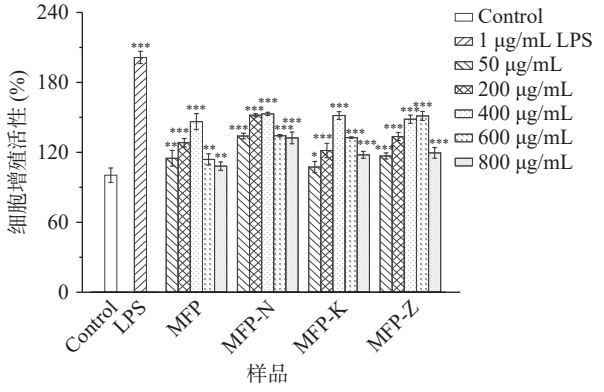


图 8 四种桑葚多糖对 RAW264.7 细胞的增殖活性影响

Fig.8 Effects of four mulberry polysaccharides on the cell proliferation activity of RAW264.7

注:与 Control 组相比,ns 表示 P>0.05;*表示 P<0.05;**表示 P<0.01;***表示 P<0.001,图 9~图 10 同。

结果表明,四种桑葚多糖对 RAW264.7 细胞均无毒性,为方便后续研究选用 50~400 μg/mL 的浓度测定多糖对 RAW264.7 细胞的吞噬活性、NO 释放能力及炎症因子释放活性。

2.8.2 MFP、MFP-N、MFP-K、MFP-Z 对 RAW264.7 细胞的吞噬活性影响 巨噬细胞作为重要的免疫调节细胞,在维持免疫系统平衡和防御入侵病原体方面发挥着至关重要的作用[41]。吞噬活性的增强代表了巨噬细胞功能的提升,反映出免疫系统受到激活。因此,通过检测巨噬细胞的吞噬活性,可以评价外源性多糖对机体先天免疫反应的调节作用。结果如图 9 所示,与空白对照组相比,四种多糖在 50~400 μg/mL 的浓度范围内均表现出不同程度的免疫增强作用,且呈现出浓度依赖性递增趋势,四种桑葚多糖均能在不同程度上提高 RAW264.7 细胞的吞噬活性,其中 MFP-K、MFP-Z、MFP-N 的增强作用在 200 μg/mL 时达到极显著水平(P<0.001),而 MFP 在 400 μg/mL

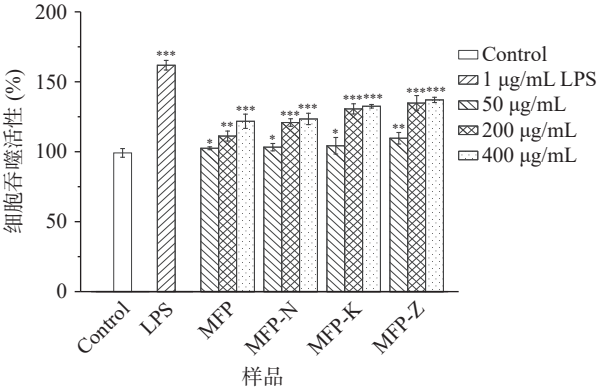


图 9 四种桑葚多糖对 RAW264.7 细胞的吞噬活性影响

Fig.9 Effects of four mulberry polysaccharides on phagocytosis activity of RAW264.7 cells

时达到极显著水平（P<0.001）。以上结果表明，桑葚多糖具有明显的免疫调节潜力，且发酵后多糖对 RAW264.7 细胞的免疫调节作用优于未发酵多糖。

2.8.3　MFP、MFP-N、MFP-K、MFP-Z 对 RAW264.7 细胞分泌免疫因子影响　NO、TNF-α、IL-6 是巨噬细胞在受到刺激后产生的典型炎症和免疫因子，在调节炎症和免疫机制过程中具有重要作用[42]。因此，检测巨噬细胞 RAW264.7 分泌 NO、TNF-α 和 IL-6 的水平，可用于评价外源性多糖的免疫增强和免疫调节潜力。如图 10 所示，与空白对照组相比，四种桑葚多糖均能不同程度地促进 RAW264.7 细胞分泌 NO、TNF-α 和 IL-6，且具有浓度依赖性。当多糖浓度达到 400 μg/mL 时促进作用达到最佳，其中分泌 NO 效果最好的是 MFP-K 达到了 26.40 μmol/L，接近 LPS 组的 37.62 μmol/L，而 MFP-Z 的增强作用相对较弱为 17.30 μmol/L。在 TNF-α 分泌方面，四种多糖均极显著提高了 RAW264.7 细胞分泌 TNF-α 水平（P<0.001），其中 MFP-N、MFP-K、MFP-Z 在 400 μg/mL 时分别达到 904.98、924.02 和 907.80 pg/mL，MFP 的促进作用仅略低于其他三种发酵后多糖；IL-6 分泌方面，在多糖浓度为 50 μg/mL 时 MFP 与 Control 组相比无显著差异（P>0.05），但在多糖浓度达到 400 μg/mL 时，四种桑葚多糖均显示出较强的促免疫因子分泌作用，与 Control 组相比差异极显著（P<0.001）。

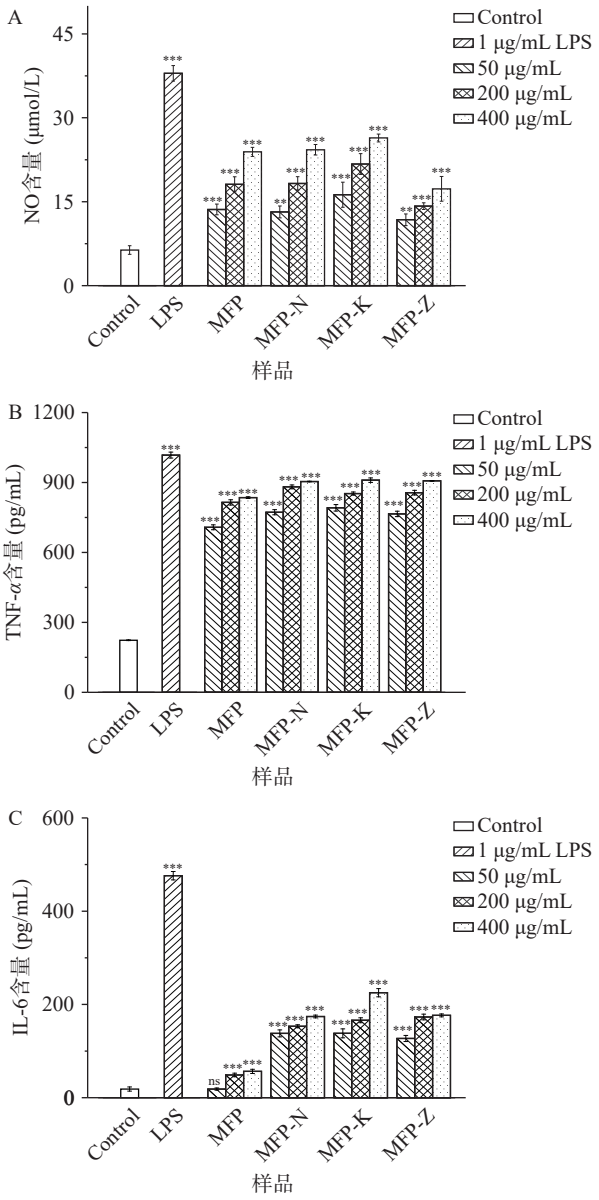


图 10　四种桑葚多糖对 RAW264.7 细胞 NO 含量（A）、TNF-α含量（B）、IL-6 含量（C）影响

Fig.10　Effects of four kinds of mulberry polysaccharides on NO content (A), TNF-α content (B), and IL-6 content (C) in RAW264.7 cells

综合分析表明，四种桑葚多糖均以剂量依赖性方式促进 RAW264.7 细胞 NO、TNF-α 与 IL-6 分泌，且发酵组整体强于未发酵组，尤其 MFP-K、MFP-N 表现最为突出。这一模式与 Wang 等[43] 发现乳酸菌发酵秋葵多糖后免疫因子分泌能力增强的报道相符，与 Choi 等[44] 发现发酵后诺丽果多糖在细胞与小鼠体内同时提升了 NO、IL-1β、IL-6、TNF-α 的结果一致；且上述研究共同指向两个结构线索：发酵降低了多糖的分子量，使更多活性位点暴露及发酵后多糖糖醛酸等酸性基团富集更有利于巨噬细胞免疫激活，这与本研究中的发现相匹配。

3　结论

本研究采用酿酒酵母、枯草芽孢杆菌与植物乳杆菌对桑葚多糖进行发酵修饰，与未发酵多糖相比，三种发酵均显著提高了桑葚多糖的得率及总糖含量，红外光谱结果表明发酵并没有破坏桑葚多糖主要官能团，仍保留了多糖的特征吸收峰；发酵对多糖分子量的影响具有菌株特异性，MFP-K、MFP-N 使多糖分子量下降，MFP-Z 则使多糖分子量上升；另外发酵改变了桑葚多糖的单糖组成摩尔比，发酵后的三种桑葚多糖半乳糖醛酸含量均显著增加。体外活性实验显示出桑葚多糖具有良好的抗氧化活性、降血糖及免疫调节活性，且发酵显著提升了桑葚多糖的生物活性。不同菌种对比来看，植物乳杆菌在发酵中的关键代谢产物是有机酸，通过酸解作用释放桑葚中的果胶，成为提高半乳糖醛酸比例最显著的菌种；枯草芽孢杆菌因具有复杂的多功能酶系如淀粉酶类、纤维素酶类以及多种糖苷酶，酶解能力远优于另外两种菌，这也是其能降解桑葚多糖的复杂结构使其分子量大幅下降的原因；而酿酒酵母分泌的酶类以碳水化合物代谢相关酶为主，故推测其可部分水解多糖主链糖苷键，提升桑葚多糖的总糖含量进而表现出最优的抗氧化活性和降血糖活性。尽管对于发酵改变多糖结构和生物活性的理解已有所进展，但要全面揭示不同菌种发酵对多糖修饰原理，还需通过进一步的实验定性定量分析发酵液中的小分子代谢产物、酶类及活性物质，明确菌株代谢产物的种类及功能贡献。总体来说，发酵是一种可行的多糖修饰方法，且修饰作用具有菌株特异性，可用于定向改变多糖的分子量及单

糖组成，提高多糖的生物活性。研究结果为天然植物多糖的高效改性提供了新策略，为桑葚多糖的应用提供了新思路，尤其为开发天然抗氧化剂、降血糖及免疫调节功能食品提供了实验依据。

© 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] CHEN C, YOU L J, ABBASI A M, et al. Characterization of polysaccharide fractions in mulberry fruit and assessment of their antioxidant and hypoglycemic activities *in vitro*[J]. Food & Function, 2016, 7(1): 530−539.

[2] 陈春华, 唐炜, 殷军艺, 等. 桑葚多糖结构特征和生物活性研究进展[J]. 中国食品学报, 2022, 22(5): 367−382. [CHEN Chunhua, TANG Wei, YIN Junyi, et al. Research progress on structure characteristics and biological activity of polysaccharide from *Fructus Mori*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(5): 367−382.]

[3] 李瑶, 李文林, 杨丽丽, 等. 桑椹在心血管疾病领域的药效实验研究现状分析与思考[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(13): 3055−3062. [LI Yao, LI Wenlin, YANG Lili, et al. Status analysis and thinking on experimental study on efficacy of Mori Fructus in treatment of cardiovascular diseases[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(13): 3055−3062.]

[4] YU Yue, SHEN Mingyue, SONG Qianqian, et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 183: 91−101.

[5] FENG Shiling, TANG Min, JIANG Zhengfeng, et al. Optimization of extraction process, structure characterization, and antioxidant activity of polysaccharides from different parts of *Camellia oleifera* Abel[J]. Foods, 2022, 11(20): 3185.

[6] LIU Liqiao, LI Mingzhu, YU Mulan, et al. Natural polysaccharides exhibit anti-tumor activity by targeting gut microbiota[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 743−751.

[7] SHI Yan, SI Dun, CHEN Donghong, et al. Bioactive compounds from *Polygonatum* genus as anti-diabetic agents with future perspectives[J]. Food Chemistry, 2023, 408: 135183.

[8] YANG Xiaolong, WEI Siqing, LU Xiaoming, et al. A neutral polysaccharide with a triple helix structure from ginger: Characterization and immunomodulatory activity[J]. Food Chemistry, 2021, 350: 129261.

[9] ZHANG Jixian, WEN Chaoting, ZHANG Haihui, et al. Review of isolation, structural properties, chain conformation, and bioactivities of *Psyllium* polysaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 139: 409−420.

[10] TIAN Wenni, DAI Liwei, LU Siming, et al. Effect of *Bacillus* sp. DU-106 fermentation on *Dendrobium officinale* polysaccharide: Structure and immunoregulatory activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 1034−1042.

[11] DU Juan, WANG Yuan, LI Xia, et al. Physicochemical properties, structure, growth-promoting and antioxidant activities of *Glycyrrhiza* leaf polysaccharides modified by fermentation[J]. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2025, 12: 8.

[12] WANG Zichao, ZHENG Yi, LAI Ziru, et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* CICC 32883 fermentation on the structural features and antioxidant protection effect of Chinese yam polysaccharide[J]. Foods, 2025, 14(4): 564.

[13] JIN Weiwei, ZHOU Huan, ZHAO Haijun, et al. Isolation, *in vitro* antioxidant capacity, hypoglycemic activity and immunoactivity evaluation of polysaccharides from *Coriandrum sativum* L[J]. Antioxidants, 2025, 14(2): 149.

[14] 王振伟. 响应面法优化桑椹多糖提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 饲料研究, 2022, 45(21): 87−92. [WANG Zhenwei. Optimization of extraction technology and antioxidant activity of *Fructus Mori* polysaccharide by response surface method[J]. Feed Research, 2022, 45(21): 87−92.]

[15] YANG Bing, LUO Yuxin, SANG Yaxin, et al. Isolation, purification, structural characterization, and hypoglycemic activity assessment of polysaccharides from *Hovenia dulcis* (Guai Zao)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 208: 1106−1115.

[16] JI Xiaolong, HOU Chunyan, YAN Yizhe, et al. Comparison of structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 149: 1008−1018.

[17] JOHNSON J A, LOTT H A. Standardization of the Coomassie Blue method for cerebrospinal fluid proteins[J]. Clinical Chemistry, 1978, 24(11): 1931−1933.

[18] 王慧, 王岸娜, 董赵微, 等. 香菇多糖金属离子对其结构和体内抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2025, 46(7): 119−124. [WANG Hui, WANG Anna, DONG Zhaowei, et al. Effects of removal of metal ions bound to lentinan on its structure and *in vivo* antioxidant activity[J]. Food Science, 2025, 46(7): 119−124.]

[19] 李智聪, 李俊, 熊晓萱, 等. 酸/碱提取菠萝蜜果丝多糖及其结构、生物活性的影响[J]. 食品工业科技, 2025, 46(23): 70−80. [LI Zhicong, LI Jun, XIONG Xiaoxuan, et al. Effect of acid/alkali extraction of polysaccharides from jackfruit filum and its structure and biological activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(23): 70−80.]

[20] YU Jinyi, HU Zhongyue, YAN Enzhao, et al. Structure modification and bioactivity improvement of crude polysaccharides extracted from white hyacinth beans after fermentation by different bacteria[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2025, 15(14): 20963−20977.

[21] 黄媛媛. 桑葚多糖的提取、分离纯化、结构表征及生物活性研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2023. [HUANG Yuanyuan. Study on extraction, purification, structural characterization, and biological activity of polysaccharides from Mori Fructus[D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2023.]

[22] GU Shuangshuang, SUN Huiqing, ZHANG Xiaoling, et al. Structural characterization and inhibitions on *α*-glucosidase and *α*-amylase of alkali-extracted water-soluble polysaccharide from *Annona squamosa* residue[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 166: 730−740.

[23] 陈春. 桑葚多糖的结构鉴定、活性评价及其体外消化酵解[D]. 广州: 华南理工大学, 2018. [CHEN Chun. Structural identification, biological activities evaluation, digestion and fermentation *in vitro* of polysaccharides from *Fructus Mori*[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.]

[24] 张巧铃, 蒋小华, 张洁, 等. 罗汉果干果多糖的分离纯化、结构表征及其体外免疫调节活性[J]. 食品科学, 2025, 46(4): 10−20. [ZHANG Qiaoling, JIANG Xiaohua, ZHANG Jie, et al. Isolation,

purification and structural characterization of polysaccharides from dried *Siraitia grosuenorii* fruits and their immunodulatory activity *in vitro*[J]. Food Science, 2025, 46(4): 10−20.]
[25] HU Tenggen, ZHU Weilin, YU Yuanshan, et al. The variation on structure and immunomodulatory activity of polysaccharide during the longan pulp fermentation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 222: 599−609.
[26] WANG Kaijie, GUO Juntong, CHENG Junxia, et al. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from spent *Lentinus edodes* substrate: Process optimization, precipitation, structural characterization and antioxidant activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 191: 1038−1045.
[27] 赵洋. 植物乳杆菌 ATCC-14917 发酵对灵芝孢子粉多糖结构及抗氧化活性的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2022. [ZHAO Yang. Effects of lactiplantibacillus plantarum ATCC-14917 fermentation on polysaccharide structure and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* spore powder[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2022.]
[28] 杨倩, 何舒婷, 孟东, 等. 粗根荨麻不同部位多糖的提取及其对巨噬细胞的调节作用[J]. 食品工业科技, 2023, 44(15): 392−400. [YANG Qian, HE Shuting, MENG Dong, et al. Composition and immune regulatory effect of polysaccharides extracted from different parts of *Urtica macrorrhiza* Hand.-Mazz.[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(15): 392−400.]
[29] LIANG Jingjing, ZHANG Meina, LI Xiaohan, et al. Structure and immunomodulatory activity of *Lentinus edodes* polysaccharides modified by probiotic fermentation[J]. Food Science and Human Wellness, 2024, 13(1): 421−433.
[30] 屈雅宁, 许梦粤, 李慧, 等. 干酪乳杆菌发酵豆粉粗多糖结构特征与抗氧化活性[J]. 中国食品学报, 2024, 24(8): 112−121. [QU Yaning, XU Mengyue, LI Hui, et al. Structural characteristics and antioxidant activities of crude polysaccharides from fermented bean flour by *Lactobacillus casei*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(8): 112−121.]
[31] WAN Yujun, HONG Tao, SHI Huifang, et al. Probiotic fermentation modifies the structures of pectic polysaccharides from carrot pulp[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 251: 117116.
[32] PEI Fangyi, CAO Xinbo, WANG Xuemeng, et al. Structural characteristics and bioactivities of polysaccharides from blue honeysuckle after probiotic fermentation[J]. LWT, 2022, 165: 113764.
[33] 孙圆, 郑越, 安晓萍, 等. 灰树花发酵对糠麸多糖的理化特性和抗氧化活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(23): 202−212. [SUN Yuan, ZHENG Yue, AN Xiaoping, et al. Effects of *Grifola frondosa* fermentation on physicochemical properties and antioxidant activities of bran polysaccharides[J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(23): 202−212.]
[34] 张志红. 植物乳杆菌 NCU116 发酵对芦笋多糖组分的理化性质及改善环磷酰胺化疗损伤的影响研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2020. [ZHANG Zhihong. Effect of *Lactobacillus plantarum* NCU116 fermentation on the physicochemical properties and immunoregulatory activity of *Asparagus officinalis* polysaccharides[D]. Nanchang: Nanchang University, 2020.]
[35] ORLEAN P. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall[J]. Genetics, 2012, 192(3): 775−818.
[36] VOLLMER W, BLANOT D, de PEDRO M A. Peptidoglycan structure and architecture[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(2): 149−167.
[37] BADEL S, BERNARDI T, MICHAUD P. New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(1): 54−66.
[38] LIU Shuai, HU Jielun, ZHONG Yadong, et al. A review: Effects of microbial fermentation on the structure and bioactivity of polysaccharides in plant-based foods[J]. Food Chemistry, 2024, 440: 137453.
[39] QUE Yunxiang, ZHANG Yao, LIANG Fengxiang, et al. Structural characterization, antioxidant activity, and fermentation characteristics of *Flammulina velutipes* residue polysaccharide degraded by ultrasonic assisted H_2O_2-V_C technique[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2024, 111: 107085.
[40] 逄梦玉, 隋昕怡, 刘丹, 等. 酿酒酵母发酵法制备桑黄多糖工艺优化及其结构表征和抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2025, 37(1): 85−94. [PANG Mengyu, SUI Xinyi, LIU Dan, et al. Process optimization, structural characterization, and antioxidant activity of *Sanghuangporus sanghuang* polysaccharides prepared by *Saccharomyces cerevisiae* fermentation[J]. Natural Product Research and Development, 2025, 37(1): 85−94.]
[41] 李康瑗, 王嘉炜, 陈立平, 等. 酪蛋白磷酸肽-硒螯合物结构表征、体外免疫和抗炎活性分析[J]. 食品科学, 2025, 46(18): 25−35. [LI Kangyuan, WANG Jiawei, CHEN Liping, et al. Structural characterization, *in vitro* immunodulatory and anti-inflammatory activity of selenium-chelating casein phosphopeptide[J]. Food Science, 2025, 46(18): 25−35.]
[42] AHN S, SIDDIQI M H, NOH H Y, et al. Anti-inflammatory activity of ginsenosides in LPS-stimulated RAW 264.7 cells[J]. Science Bulletin, 2015, 60(8): 773−784.
[43] WANG Xingjie, HU Kaidi, CHEN Yuan, et al. Effect of *Lactiplantibacillus plantarum* fermentation on the physicochemical, antioxidant activity and immunomodulatory ability of polysaccharides from Lvjian okra[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 257: 128649.
[44] CHOI S I, LA I J, HAN X G, et al. Immunomodulatory effect of polysaccharide from fermented *Morinda citrifolia* L. (noni) on RAW 264.7 macrophage and Balb/c mice[J]. Foods, 2022, 11(13): 1925.