

桑叶多糖提取工艺优化及体外抗氧化活性研究

吴 均 杨碧文 赵 珮 马婧秋 王晓静 黄 越

(重庆市蚕业科学技术研究院, 重庆 400700)

摘要: [目的] 优化低共熔溶剂提取桑叶多糖工艺, 并评价桑叶多糖的体外抗氧化活性。[方法] 以秋桑叶粉末为原料, 采用超声—复合酶辅助低共熔溶剂提取桑叶多糖, 以多糖得率为指标, 筛选低共熔溶剂的最优组合, 并测定桑叶多糖的 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基和羟自由基清除能力。[结果] 最佳提取工艺条件为氯化胆碱—苹果酸摩尔比 1:4、低共熔溶剂含水量 44%、液料比 40:1 (mL/g)、复合酶添加量 3%、超声功率 350 W、超声时间 40 min, 此时桑叶多糖得率为 (10.20±0.05)%; 当桑叶多糖质量浓度为 0.08 mg/L 时, 其 DPPH 自由基清除率为 67.46%; 当桑叶多糖质量浓度为 0.8 mg/L 时, 其 ABTS⁺ 自由基、羟自由基清除率分别为 87.19%, 93.44%。[结论] 采用超声—复合酶辅助低共熔溶剂提取的桑叶多糖不仅提取率较高且具有良好的体外抗氧化能力。

关键词: 桑叶多糖; 低共熔溶剂; 超声酶辅助提取; 响应面; 抗氧化活性

Optimization of extraction process of polysaccharides from mulberry leaves and determination of the antioxidant activity *in vitro*

WU Jun YANG Biwen ZHAO Pei MA Jingqiu WANG Xiaojing HUANG Yue

(Chongqing Sericulture Science and Technology Research Institute, Chongqing 400700, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to optimize the extraction process of polysaccharides from mulberry leaves using deep eutectic solvents (DES) and assess their antioxidant properties. [Methods] Autumn mulberry leaf powder was used as the raw material, and ultrasonic-assisted extraction with complex enzymes facilitated the process. The composition of DES and the extraction conditions were optimized using Box-Behnken response surface methodology, with polysaccharide yield as the primary indicator. Antioxidant activity was evaluated by measuring the scavenging abilities of against DPPH radicals, ABTS⁺ radicals, and hydroxyl radicals. [Results] The optimal extraction conditions were as follows: a choline chloride/malic acid molar ratio of 1:4, water content 44%, liquid-solid ratio of 40:1 (mL/g), enzyme dosage of 3%, ultrasonic power of 350 W, and ultrasonic time 40 min. Under these conditions, the yield of mulberry leaf polysaccharides was (10.20±0.05)%. The polysaccharides demonstrated significant antioxidant activity, with a DPPH radical scavenging rate of 67.46% at 0.08 mg/mL and ABTS⁺ and hydroxyl radical scavenging rates of 87.19% and 93.44%, respectively, at 0.8 mg/mL. [Conclusion] The ultrasonic-complex enzyme-assisted DES extraction method proved efficient, yielding high amounts of polysaccharides with strong antioxidant properties. These findings support the potential use of mulberry leaf polysaccharides in food and health-related applications.

Keywords: mulberry leaf polysaccharides; deep eutectic solvent; ultrasonic-enzyme-assisted extraction; response surface; antioxidant activity

桑叶是桑科植物桑 (*Morus alba* L.) 的干燥叶片, 已于 2002 年列入药食同源目录^[1-2], 具有疏散风热、清肺润燥、清肝明目、镇咳祛痰等功效。桑叶活性成分包括多酚类、多糖类、黄酮类、生物碱类、蛋白质类、脂类、维生素、微量元素等^[3], 其中多糖是桑叶中最重要的活性成分之一。桑

叶多糖 (MLP) 具有降血糖^[4]、抗氧化^[5]、降血脂^[6]、抗炎^[7]、增强机体免疫^[8]等功效。

目前, 多糖的提取方法主要包括传统有机溶剂提取、热水浸提、微波辅助提取和超声波辅助提取等方法^[9-10], 此类方法存在提取率低、设备要求高、过程不环保、耗时

基金项目: 重庆市科研院所绩效激励引导专项 (编号: cstc2022xj100013); 重庆市北碚区科技人才与自主创新专项 (编号: 2024-21)

通信作者: 黄越 (1994—), 女, 重庆市蚕业科学技术研究院工程师, 硕士。E-mail: huangyuecn@163.com

收稿日期: 2024-05-20 **改回日期:** 2024-11-04

长等缺点^[11-12]。超声辅助酶提取法被广泛应用于植物天然活性成分提取中,酶可以在极短时间内将细胞壁中的果胶、纤维素、半纤维素等成分彻底分解,而超声波空化效应可加快酶促反应速度,打破传统酶水解的局限,从而使活性物质得以完全暴露于溶剂中。低共熔溶剂(deep eutectic solvent, DES)是由2种或几种氢受体和氢供体混合形成的透明液体状的共晶混合物^[13-14],能通过氢键作用更好地渗透到植物细胞中,快速溶解出活性成分,且因其具有绿色、易获得、易制备、易降解、低毒性、高效率、低价格等优点^[15-17],被广泛用于植物多糖、多酚、黄酮、生物碱等天然活性成分的提取^[18-22]。将超声、酶和低共熔溶剂相结合可以减少提取时间,提高植物中活性物质的提取效率,但将该方法应用于桑叶多糖的提取研究尚未见报道。研究拟以桑叶粉为原料,采用超声—复合酶—低共熔溶剂法,利用 Box-Behnken 响应面试验优化桑叶多糖提取工艺,通过 DPPH 自由基、ABTS 自由基和羟自由基清除能力评价桑叶多糖的体外抗氧化能力,以期桑资源的综合利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桑叶:于重庆市蚕业科学技术研究院桑园采摘;

氯化胆碱:分析纯,上海源叶生物科技有限公司;

苯酚、维生素 C、ABTS、DPPH 等:分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;

纤维素酶:10 万 U/g,上海麦克林生化科技有限公司;

葡萄糖、木瓜蛋白酶:80 万 U/g,北京索莱宝科技有限公司;

羟自由基清除能力测试盒:苏州梦犀生物医药科技有限公司。

1.2 仪器与设备

磁力搅拌水浴锅:H CJ-4D 型,常州朗越仪器制造有限公司;

台式高速冷冻离心机:GX16R 型,湖南恒诺仪器设备有限公司;

紫外分光光度计:UV-1800 型,上海翱艺仪器有限公司;

超纯水机:WP-UP-YJ-40 型,四川沃特水处理设备有限公司;

超声波清洗机:SB25-12DTD 型,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品预处理 10 月底采摘桑叶,清洗,晾干,50 °C 烘箱烘干,粉碎后过 100 目筛,于 -18 °C 冷冻贮藏。

1.3.2 桑叶多糖得率测定 采用苯酚—硫酸法^[23],得标准曲线方程为 $Y=8.666 7X-0.003 8$, $R^2=0.999 1$,按

式(1)计算多糖得率。

$$R = \frac{c \times v \times n}{m} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R ——桑叶多糖得率,%;

c ——多糖质量浓度,mg/mL;

v ——样品定容体积,mL;

n ——样品稀释倍数;

m ——桑叶粉质量,g。

1.3.3 低共熔溶剂的制备 参照白冰瑶等^[24]的方法,按表 1 进行制备。

表 1 DES 的种类

Table 1 Types of low eutectic solvents

编号	化合物	氢供体	氢受体	摩尔比
DES-1	氯化胆碱—丙三醇	氯化胆碱	丙三醇	1:1
DES-2	氯化胆碱—乙醇	氯化胆碱	乙醇	1:1
DES-3	氯化胆碱—苹果酸	氯化胆碱	苹果酸	1:1
DES-4	氯化胆碱—柠檬酸	氯化胆碱	柠檬酸	1:1
DES-5	氯化胆碱—(1-4-丁二醇)	氯化胆碱	1-4-丁二醇	1:1
DES-6	氯化胆碱—乙二醇	氯化胆碱	乙二醇	1:1
DES-7	氯化胆碱—尿素	氯化胆碱	尿素	1:1

1.3.4 低共熔溶剂的筛选 取 1.000 g 桑叶粉于 250 mL 锥形瓶中,按液料比 40:1 (mL/g) 加入含水量为 35% 的 DES,加入 3% 复合酶($m_{\text{纤维素酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}=2:1$),混匀,封口,50 °C 酶解 2 h,以超声功率 360 W 超声 40 min,10 000 r/min 离心 20 min,取上清液,加入 5 倍体积的无水乙醇于 4 °C 冰箱醇沉 24 h,离心后去上清液,用无水乙醇洗涤沉淀 4 次,离心,沉淀溶解并定容,测定 MLP 得率。

1.3.5 单因素试验 取 1.000 g 桑叶粉于锥形瓶中,考察各因素对 MLP 得率的影响,包括 DES 摩尔比(1:1,1:2,1:3,1:4,1:5)、液料比[30:1,35:1,40:1,45:1,50:1 (mL/g)]、DES 含水量(30%,35%,40%,45%,50%)、复合酶添加量(1%,2%,3%,4%,5%)、超声时间(20,30,40,50,60 min)、超声功率(240,300,360,420,480 W)。

1.3.6 响应面试验 在单因素试验的基础上,以 DES 含水量、液料比、超声功率和超声时间为因素,以 MLP 得率为响应值,进行四因素三水平的 Box-Behnken 响应面试验,优化桑叶多糖提取工艺。

1.3.7 抗氧化活性测定

(1) DPPH 自由基清除能力:配制不同质量浓度的桑叶多糖溶液,分别取 2.0 mL 样品加入 2.0 mL DPPH 溶液中,均质后室温避光反应 30 min,测定 517 nm 处吸光度,以无水乙醇代替 DPPH 溶液为样品对照,以无水乙醇代替样品为空白对照,按式(2)计算 DPPH 自由基清除率^[25]。

$$S = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

S——自由基清除率, %;

A₁——加入样品的吸光度;

A₂——样品对照的吸光度;

A₀——空白对照的吸光度。

(2) ABTS⁺自由基清除能力: 配制不同质量浓度的桑叶多糖溶液, 分别取 0.2 mL 样品加入 6.0 mL ABTS 溶液中, 均质后室温避光反应 6 min, 测定 734 nm 处吸光度, 以纯水代替 ABTS 溶液为样品对照, 以纯水代替样品为空白对照, 按式(2)计算 ABTS⁺自由基清除率^[26]。

(3) 羟自由基清除能力: 按羟自由基清除能力试剂盒说明书进行测定。

1.3.8 数据处理 每个试验重复 3 次, 采用 Excel 软件进行数据分析, 采用 Design-Expert12 软件进行响应面分析, 采用 Origin9.0 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 DES 的筛选

由图 1 可知, DES 对桑叶多糖得率影响较大, 其中 DES-3 的 MLP 得率明显高于其他 6 种, 可能是因为 DES-3 较其他 6 种 DES 的极性更强, 分散度更高, 且其极性与 MLP 的接近, 因此, 选择 DES-3(氯化胆碱-苹果酸)作为 MLP 的提取溶剂。

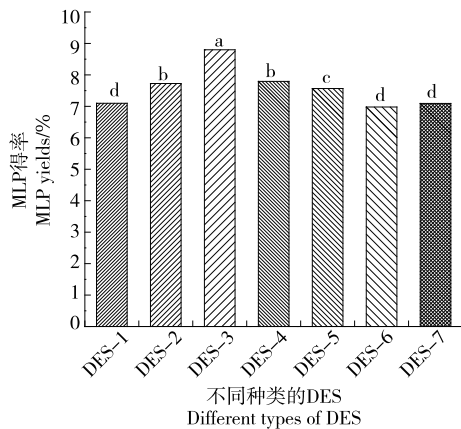


图 1 不同种类的 DES 对 MLP 得率的影响

Figure 1 Effects of different eutectic solvents on the yield of MLP

2.2 单因素试验

2.2.1 DES 摩尔比对 MLP 得率的影响 由图 2 可知, 当 DES 摩尔比为 1:4 时, MLP 得率达到最大值。随着 DES 摩尔比的增加, MLP 得率增加, 苹果酸比例越大, DES 黏度越低, 越有利于 MLP 在溶剂中进行扩散, 当 DES 摩尔

比 > 1:4 时, MLP 得率逐渐减小, 此时 DES 极性逐渐减小, MLP 与 DES 的相互作用削弱, MLP 溶解度下降。因此, 选择 DES 摩尔比为 1:4。

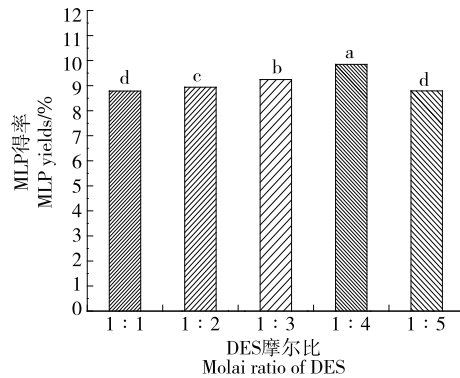


图 2 DES 摩尔比对 MLP 得率的影响

Figure 2 Effects of DES molar ratio on the yield of MLP

2.2.2 液料比对 MLP 得率的影响 由图 3 可知, MLP 得率先增加后降低, 当液料比为 40:1 (mL/g) 时, MLP 得率达到最大值。液料比增加, 桑叶粉与 DES 的接触面积增加, 促进了溶质与溶剂的结合, 而液料比过大, 过多的 DES 使得液料之间相互作用削弱, 不利于 MLP 提取。因此, 选择液料比为 40:1 (mL/g) 进行响应面试验。

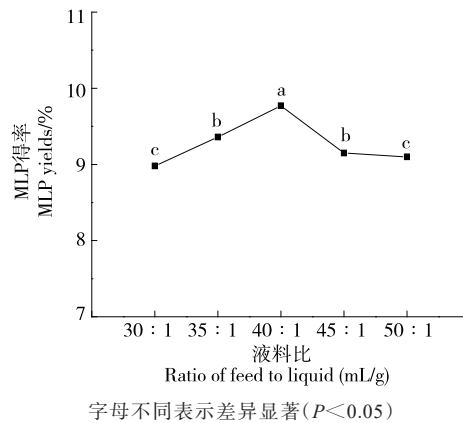


图 3 液料比对 MLP 得率的影响

Figure 3 Effects of liquid to material ratio on the yield of MLP

2.2.3 DES 含水量对 MLP 得率的影响 由图 4 可知, MLP 得率先增加后降低, 当氯化胆碱-苹果酸中含水量为 45% 时, MLP 得率达到最大值。当 DES 含水量 < 45% 时, 提取溶剂的黏度随 DES 含水量的增加而降低, 有利于 MLP 溶出; 当 DES 含水量 > 45% 时, 水分子破坏了氯化胆碱-苹果酸-桑叶多糖之间的相互作用^[27]。因此, 选择 DES 含水量为 45% 进行响应面试验。

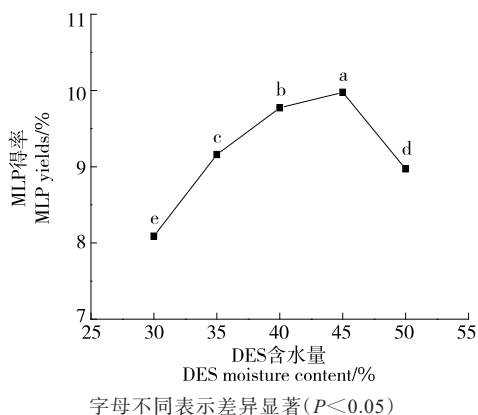


图4 DES含水量对MLP得率的影响

Figure 4 Effects of DES moisture content on the yield of MLP

2.2.4 复合酶添加量对MLP得率的影响 由图5可知, MLP得率先增加后降低,当复合酶添加量为3%时,MLP得率达到最大值。添加复合酶,桑叶细胞壁被破坏,促进了MLP溶出与扩散,MLP提取量增加,而复合酶添加量过大,多糖结构被破坏降解,MLP提取量下降。因此,选择复合酶添加量为3%。

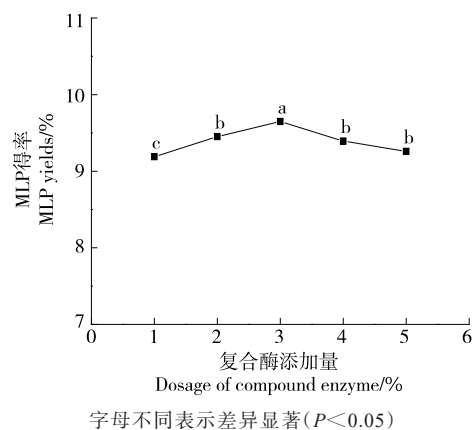


图5 复合酶添加量对MLP得率的影响

Figure 5 Effects of enzyme dosage on the yield of MLP

2.2.5 超声时间对MLP得率的影响 由图6可知,MLP得率先增加后降低,当超声时间为40 min时,MLP得率达到最大值。当超声时间<40 min时,超声作用有利于MLP溶出;当超声时间>40 min时,多糖已全部溶出,长时间的超声作用会使部分糖苷键发生断裂,MLP得率下降。因此,选择超声时间为40 min进行响应面试验。

2.2.6 超声功率对MLP得率的影响 由图7可知,MLP得率先增加后降低,当超声功率为360 W时,MLP得率达到最大值,可能是因为超声功率增加,DES空化效应增

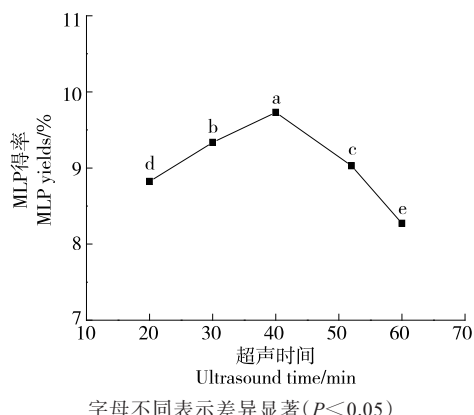


图6 超声时间对MLP得率的影响

Figure 6 Effects of ultrasound time on the yield of MLP

大,MLP不断被释放而得率增加,但超声功率过大,空化作用进一步加强导致大量其他物质溶出,抑制了MLP的释放且发生降解^[28]。因此,选择超声功率为360 W进行响应面试验。

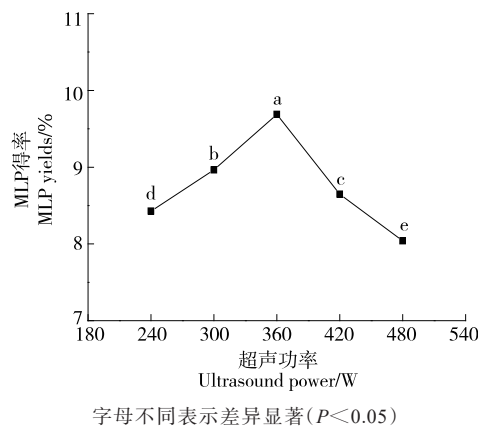


图7 超声功率对MLP得率的影响

Figure 7 Effects of ultrasound power on the yield of MLP

2.3 响应面试验

2.3.1 响应面优化试验设计及结果 在单因素试验结果的基础上,以DES含水量、液料比、超声功率和超声时间为因素,MLP得率为响应值进行响应面优化试验。响应面试验因素水平见表2,试验设计及结果见表3。

表2 响应面试验因素与水平

水平	A DES含水量/%	B 液料比 (mL/g)	C 超声功率/W	D 超声时间/min
-1	40	35:1	300	30
0	45	40:1	360	40
1	50	45:1	420	50

表 3 响应面正交试验设计及结果

Table 3 Results of Box-Behnken

试验号	A	B	C	D	桑叶多糖得率/%
1	-1	0	1	0	9.161±0.014
2	0	-1	-1	0	8.893±0.028
3	0	-1	0	1	9.281±0.033
4	1	0	0	1	9.126±0.041
5	1	0	-1	0	9.068±0.034
6	1	1	0	0	9.035±0.022
7	0	0	0	0	10.222±0.034
8	0	0	0	0	10.301±0.016
9	0	1	0	1	9.116±0.043
10	0	0	1	1	9.102±0.027
11	0	-1	1	0	9.133±0.039
12	0	1	-1	0	9.565±0.043
13	0	0	1	-1	9.051±0.025
14	0	0	-1	-1	9.199±0.037
15	1	-1	0	0	8.644±0.056
16	0	0	0	0	10.233±0.077
17	-1	1	0	0	9.164±0.052
18	1	0	0	-1	8.742±0.084
19	-1	0	0	1	9.296±0.055
20	1	0	1	0	8.702±0.049
21	0	-1	0	-1	8.996±0.064
22	-1	-1	0	0	9.353±0.043
23	-1	0	0	-1	9.416±0.013
24	0	0	-1	1	9.441±0.082
25	0	0	0	0	10.267±0.042
26	-1	0	-1	0	9.399±0.051
27	0	0	0	0	10.264±0.053
28	0	1	1	0	8.719±0.047
29	0	1	0	-1	9.226±0.057

根据 Design-Expert 8.0.6.1 对数据进行分析,得到 MLP 提取量的预测回归方程:

$$Y=10.26-0.21A+0.044B-0.14C+0.061D+0.15AB-0.032AC+0.13AD-0.27BC-0.099BD-0.048CD-0.61A^2-0.61B^2-0.57C^2-0.50D^2.$$

2.3.2 响应面方差分析 由表 4 可知,模型 $P<0.01$,极显著;失拟项 $P>0.05$,不显著,说明未知因素对试验结果干扰较小。 $R^2=0.9979, R_{Adj}^2=0.9958$,说明模型预测值与实测值较吻合。除了交互项 AC 对 MLP 得率影响不显著,其他交互项及一次项、二次项对 MLP 得率的影响极显著 ($P<0.01$)。根据 F 值可知,影响 MLP 得率的各因素顺序为 DES 含水量>超声功率>超声时间>液料比。

响应曲面图可以直观地看出各因素对 MLP 得率的影

表 4 方差分析[†]

Table 4 Analysis of variance

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	6.750 0	14	0.482 1	479.19	<0.000 1**
A	0.509 2	1	0.509 2	506.18	<0.000 1**
B	0.023 0	1	0.023 0	22.83	0.000 3**
C	0.240 0	1	0.240 0	238.55	<0.000 1**
D	0.044 7	1	0.044 7	44.38	<0.000 1**
AB	0.084 1	1	0.084 1	83.60	<0.000 1**
AC	0.004 1	1	0.004 1	4.07	0.063 2
AD	0.063 5	1	0.063 5	63.12	<0.000 1**
BC	0.294 8	1	0.294 8	293.08	<0.000 1**
BD	0.039 0	1	0.039 0	38.77	<0.000 1**
CD	0.009 1	1	0.009 1	9.07	0.009 3**
A ²	2.400 0	1	2.400 0	2 385.67	<0.000 1**
B ²	2.380 0	1	2.380 0	2 367.07	<0.000 1**
C ²	2.090 0	1	2.090 0	2 075.82	<0.000 1**
D ²	1.610 0	1	1.610 0	1 596.03	<0.000 1**
残差	0.014 1	14	0.001 0		
失拟项	0.010 2	10	0.001 0	1.05	0.526 2
净误差	0.003 9	4	0.001 0		
总离差	6.760 0	28			

[†] *表示差异显著 ($P<0.05$); **表示差异极显著 ($P<0.01$); $R^2=0.9979, R_{Adj}^2=0.9958$ 。

响,曲面坡度越陡,两个因素交互作用对 MLP 得率的影响越大;反之,曲面坡度越缓,两个因素交互作用对 MLP 得率的影响越小^[29-30]。由图 8 可知,AB、AC、BC、BD、CD 的响应曲面坡度较陡,说明其交互作用对 MLP 得率影响显著 ($P<0.05$)。

通过软件预测得出 MLP 的最佳提取工艺条件为 DES 含水量 44.22%、液料比 40.22:1 (mL/g)、超声功率 352 W、超声时间 40.43 min,此时 MLP 得率为 10.29%;根据实际情况,将最佳提取工艺条件调整为 DES 含水量 44%、液料比 40:1 (mL/g)、超声功率 350 W、超声时间 40 min,测得 MLP 得率为 (10.20±0.05)%,与预测值较吻合,说明优化得到的工艺条件可靠。

2.4 抗氧化能力分析

2.4.1 DPPH 自由基清除率 由图 9 可知,MLP 对 DPPH 自由基清除率随着质量浓度的增加不断增加,其清除能力低于维生素 C 和 Trolox。当样品质量浓度为 0.08 mg/mL 时,MLP、维生素 C 和 Trolox 对 DPPH 自由基的清除率分别为 67.46%、98.09%、98.11%,经线性拟合得到 MLP 对 DPPH 自由基清除率的 IC_{50} 为 0.056 mg/mL,表明 MLP 具有一定的 DPPH 自由基清除能力,且与样品质量浓度呈量效关系。

2.4.2 ABTS⁺ 自由基清除率 由图 10 可知,MLP 对

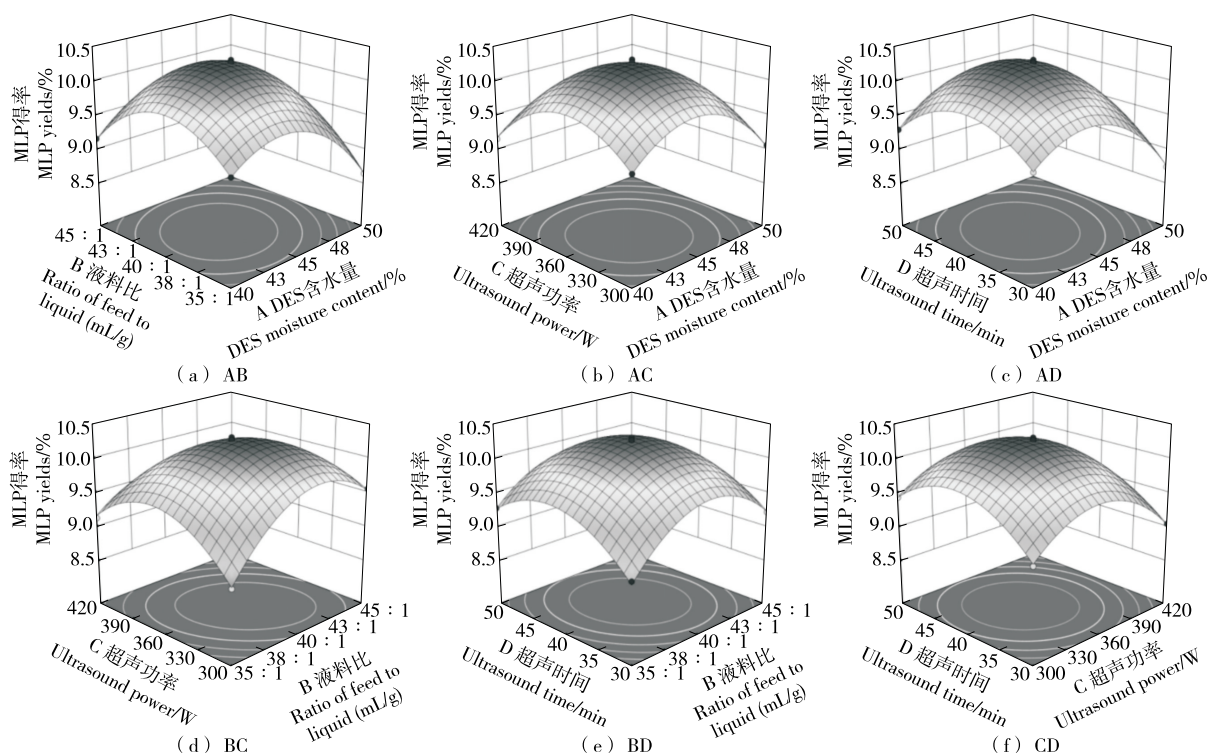


图8 各因素交互作用对MLP得率的影响

Figure 8 Effects of interaction of various factors on the yield of MLP

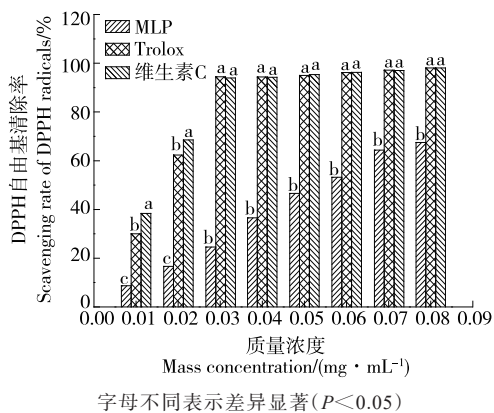


图9 不同质量浓度MLP、Trolox和维生素C对DPPH自由基的清除能力

Figure 9 Scavenging rate of DPPH radical by different concentration of MLP, Trolox and V_C

ABTS⁺自由基清除率随着质量浓度的增加不断增加,其清除能力低于维生素C和Trolox。当样品质量浓度为0.8 mg/mL时,MLP、维生素C和Trolox对ABTS⁺自由基的清除率分别为87.19%,99.99%,99.79%,经线性拟合得到MLP对ABTS⁺自由基清除率的IC₅₀为0.454 mg/mL,表明MLP具有较好的ABTS⁺自由基清除能力,且与样品质量浓度呈量效关系。

2.4.3 羟自由基清除率 由图11可知,MLP、Trolox和维

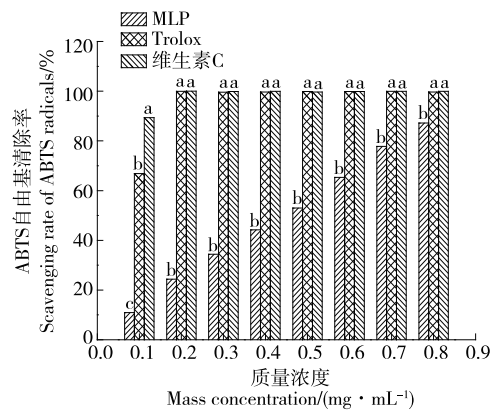
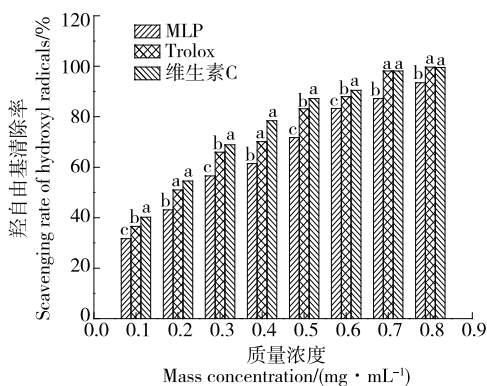


图10 不同质量浓度MLP、Trolox和维生素C对ABTS⁺自由基的清除能力

Figure 10 Scavenging rate of ABTS free radical by different concentration of MLP, Trolox and V_C

生素C对羟自由基清除率随着质量浓度的增加而增加;MLP的羟自由基清除率显著低于维生素C和Trolox。当样品质量浓度为0.8 mg/mL时,MLP、维生素C和Trolox对羟自由基的清除率分别为93.44%,99.53%,99.68%,经线性拟合得到MLP对羟自由基清除率的IC₅₀为0.260 mg/mL,表明MLP具有较好的羟自由基清除能力,且与样品质量浓度呈量效关系。



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 11 不同质量浓度 MLP、Trolox 和维生素 C 对羟自由基的清除能力

Figure 11 Scavenging rate of hydroxyl radical by different concentration of MLP, Trolox and V_c

3 结论

超声—复合酶辅助低共熔溶剂提取桑叶多糖的最佳工艺条件为氯化胆碱—苹果酸摩尔比 1:4、液料比 40:1 (mL/g)、低共熔溶剂含水量 44%、复合酶 ($m_{\text{纤维素酶}} : m_{\text{果胶酶}} = 2:1$) 添加量 3%、超声时间 40 min、超声功率 350 W, 在此工艺条件下, 桑叶多糖得率为 $(10.20 \pm 0.05)\%$ 。桑叶多糖具有体外抗氧化能力, 且与样品质量浓度呈明显的量效关系。综上, 采用超声—复合酶辅助低共熔溶剂提取的桑叶多糖具有较好的抗氧化能力, 后续可进一步探究其多糖物质组成、不同多糖组分抗氧化活性与其结构的关系。

参考文献

[1] 郑钦华. 超声波辅助酶法提取桑叶黄酮类化合物及其抗氧化活性的研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2023: 12.
ZHENG Q H. Extraction of mulberry leaf flavonoids by ultrasound-assisted enzymatic method and its antioxidant activity[D]. Jilin: Jilin University, 2023: 12.

[2] 鲁腾辉. 桑叶醇提物提取工艺优化及在肉保鲜中的应用[D]. 吉林: 吉林化工学院, 2021: 1.
LU T H. Ethanol extract from *Morus alba* L. leaves: optimization of the extraction process and its application in chilled pork preservation[D]. Jilin: Jilin Institute of Chemical Technology, 2021: 1.

[3] 崔晓鹏. 发酵桑叶关键技术优化及对肉羊抗氧化与脂肪代谢调控机制研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2023: 4-5.
CUI X P. Optimization of key technology of fermented mulberry leaves and its regulation mechanism of antioxidant and lipid metabolism in mutton sheep[D]. Xianyang: Northwest A & F University, 2023: 4-5.

[4] 胡润锋, 李浚哲, 李鹏飞, 等. 桑叶多糖结构特征及其对 α -葡

萄糖苷酶活性的抑制作用[J]. 林业工程学报, 2022, 7(6): 100-106.

HU R F, LI J Z, LI P F, et al. Study on the structure of mulberry leaf polysaccharide and its inhibitory activity of α -glucosidase [J]. Journal of Forestry Engineering, 2022, 7(6): 100-106.

[5] 胡润锋, 李浚哲, 李鹏飞, 等. 响应面法优化硒化桑叶多糖的制备工艺及其体外抗氧化活性[J]. 中南林业科技大学学报, 2022, 42(8): 148-157.
HU R F, LI J Z, LI P F, et al. Optimization of selenized mulberry leaf polysaccharides preparation by response surface methodology and determination of the antioxidant activity *in vitro*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2022, 42(8): 148-157.

[6] 师英春, 廖森泰, 杨琼, 等. 桑叶多酚、多糖及其复配物的体外模拟消化特性、降糖降脂和促益生菌增殖活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(8): 128-137.
SHI Y C, LIAO S T, YANG Q, et al. Study on simulated digestive characteristics *in vitro*, hypoglycemic/ hypolipidemic and probiotic proliferation activities of polyphenols, polysaccharides from mulberry leaves and their compounds[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2023, 14(8): 128-137.

[7] WANG Y, SHAO S, GUO C, et al. The homogenous polysaccharide SY01-23 purified from leaf of *Morus alba* L. has bioactivity on human gut *Bacteroides ovatus* and *Bacteroides cellulosilyticus*[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 158: 698-707.

[8] CHEN X L, SHENG Z C, QIU S L, et al. Purification, characterization and *in vitro* and *in vivo* immune enhancement of polysaccharides from mulberry leaves[J]. PLoS One, 2019, 14: 208.

[9] 吴禹践. 桑叶天然产物提取工艺优化及生物活性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2022: 3.
WU Y J. Study on extraction process optimization and bioactivity of natural products from mulberry leaves[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2022: 3.

[10] WANG W L, TAN J Q, NIMA L, et al. Polysaccharides from fungi: a review on their extraction, purification, structural features, and biological activities[J]. Food Chemistry: X, 2022, 15: 100414.

[11] 司洲, 陈昊翔, 樊梓鸾. 五味子多糖提取、结构特征及生物活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(3): 1-9.
SI Z, CHEN H X, FAN Z L. Progress on the extraction, structure characterization and bioactivity of *Schisandra chinensis* polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(3): 1-9.

[12] TANG W, LIU D, YIN J Y, et al. Consecutive and progressive purification of food-derived natural polysaccharide: based on material, extraction process and crude polysaccharide[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 99: 76-87.

[13] 冯思敏, 廖伟先, 潘杰峰, 等. 铁皮石斛多糖的低共熔溶剂提

- 取工艺优化[J]. 食品工业科技, 2024, 45(3): 218-225.
- FENG S M, LIAO W X, PAN J F, et al. Optimization of deep eutectic solvent extraction process of polysaccharides from *Dendrobium officinale*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(3): 218-225.
- [14] 许令侠, 梁喆, 孙建中, 等. 低共熔溶剂辅助酶法高效合成香草酸的工艺研究[J]. 中国调味品, 2024, 49(2): 178-185.
- XU L X, LIANG Z, SUN J Z, et al. Study on process of efficient synthesis of vanillic acid using deep eutectic solvent-assisted enzymatic method[J]. China Condiment, 2024, 49(2): 178-185.
- [15] ZANNOU O, KOCA I, ALDAWOUD T M S, et al. Recovery and stabilization of anthocyanins and phenolic antioxidants of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) with hydrophilic deep eutectic solvents[J]. Molecules, 2020, 25(16): 3 715.
- [16] LANJEKAR K J, RATHOD V K. Green extraction of glycyrrhizic acid from *Glycyrrhiza glabra* using choline chloride based natural deep eutectic solvents (NADESs) [J]. Process Biochemistry, 2021, 102: 22-32.
- [17] 孙悦, 何莲芝, 苏卓文, 等. 超声辅助低共熔溶剂提取甘草多糖的研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(2): 84-91.
- SUN Y, HE L Z, SU Z W, et al. Ultrasonic-assisted eutectic solvent extraction of *Glycyrrhiza* polysaccharide[J]. Food Research and Development, 2021, 42(2): 84-91.
- [18] JING Y, JIANG Y Z, HUI N T, et al. Effect of deep eutectic solvent extraction on *Auricularia auricula* polysaccharide solubilization and antioxidant potential[J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2023, 34: 101-166.
- [19] OZTURK B, PARKINSON C, GONZALEZ-MIQUEL M. Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents[J]. Separation and Purification Technology, 2018, 206(1): 1-13.
- [20] MANSUR A R, SONG N E, JANG H W, et al. Optimizing the ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids in common buckwheat sprouts[J]. Food Chem, 2019, 293: 438-445.
- [21] TORRES-VEGA J, GOMEZ-ALONSO S, PEREZ-NAVARRO J, et al. Green extraction of alkaloids and polyphenols from *Peumusboldus* leaves with natural deep eutectic solvents and profiling by HPLC-PDA-IT-MS/MS and HPLC-QTOF-MS/MS [J]. Plants, 2020, 9(2): 242.
- [22] HERNANDES-AGUIRRE O A, MURO C, HERNANDESACOSTA E, et al. Extraction and stabilization of betalains from beetroot (*Beta vulgaris*) wastes using deep eutectic solvents[J]. Molecules, 2021, 26(21): 6 342.
- [23] 于秋菊, 孙科, 耿凤英. 超声辅助低共熔溶剂提取桑黄多糖及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(5): 81-88, 105.
- YU Q J, SUN K, GENG F Y. Ultrasound-assisted deep eutectic solvent-based extraction of polysaccharides from *Phellinus igniarius* and its antioxidant activities[J]. Food Research and Development, 2023, 44(5): 81-88, 105.
- [24] 白冰瑶, 李泉岑, 马欣悦, 等. 响应面法优化超声辅助低共熔溶剂提取红枣多糖工艺[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(18): 122-129.
- BAI B Y, LI Q C, MA X Y, et al. Optimization of ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of polysaccharides from jujube[J]. Food Research and Development, 2022, 43(18): 122-129.
- [25] CHEN X, LIANG L, HAN C. Borate suppresses the scavenging activity of gallic acid and plant polyphenol extracts on DPPH radical: a potential interference to DPPH assay[J]. LWT, 2020, 131: 109769.
- [26] 杨鑫鑫, 黄雨洋, 衣程远, 等. 不同品种大豆多酚含量与其抗氧化性的关系研究[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(11): 86-91.
- YANG X X, HUANG Y Y, YI C Y, et al. Relationship between polyphenol content and antioxidant activity of different soybean varieties[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2022, 37(11): 86-91.
- [27] 张喜峰, 王鑫鑫, 张青婷, 等. 温敏性低共熔溶剂双水相萃取分离油用牡丹籽粕多糖[J]. 中国油脂, 2020, 45(12): 93-99.
- ZHANG X F, WANG X X, ZHANG Q T, et al. Extraction of polysaccharides from oil peony seed meal using a thermosensitive deep eutectic solvents-aqueous two-phase system[J]. China Oils and Fats, 2020, 45(12): 93-99.
- [28] 郑燕菲, 韦凤, 庞光沃, 等. 单性木兰叶多糖的超声辅助提取工艺及稳定性研究[J]. 中国调味品, 2023, 48(12): 188-192.
- ZHENG Y F, WEI F, PANG G W, et al. Study on ultrasonic-assisted extraction technology and stability of polysaccharides from leaves of *Magnolia kwangsiensis* Figlar & Noot[J]. China Condiment, 2023, 48(12): 188-192.
- [29] 牛牧青, 徐婉婷, 龙丽芳, 等. 响应面法优化栗蘑多糖提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 中国调味品, 2024, 49(1): 183-188.
- NIU M Q, XU W T, LONG L F, et al. Optimization of extraction process of polysaccharides from *Grifola frondosa* by response surface methodology and study on their antioxidant activity[J]. China Condiment, 2024, 49(1): 183-188.
- [30] 罗兰心, 张静, 刘洋, 等. 响应面法优化酶法提取宁红茶多糖工艺[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(2): 66-72.
- LUO L X, ZHANG J, LIU Y, et al. Optimization of enzymatic extraction of tea polysaccharides from Ninghong black tea by response surface methodology[J]. Food Research and Development, 2023, 44(2): 66-72.