娄丽芳, 李晋, 张耀磊. 超声辅助双水相提取知母多糖工艺优化、结构表征及其免疫调节活性分析 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(14): 225−234. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050239
LOU Lifang, LI Jin, ZHANG Yaolei. Process Optimization, Structural Characterization, and Immunomodulatory Activity of Ultrasound-assisted Aqueous Two-phase Extraction of *Anemarrhena asphodeloides* Polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(14): 225−234. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050239

·工艺技术·

超声辅助双水相提取知母多糖工艺优化、结构表征及其免疫调节活性分析

娄丽芳[1], 李　晋[1], 张耀磊[1,2]
（1.郑州铁路职业技术学院药学院, 河南郑州 451460;
2.河南省铁路食品安全管理工程技术研究中心, 河南郑州 451460）

摘　要: 本研究旨在优化超声辅助双水相提取知母多糖（*Anemarrhena asphodeloides* polysaccharide，AAPs）工艺，并采用不同柱色谱技术分离纯化知母粗多糖，获得均一多糖馏分（AAPs-1-SG），并对其结构进行表征。在此基础上，通过 MTT 法测定 AAPs-1-SG 对 RAW264.7 细胞活力的影响；利用中性红法评价 AAPs-1-SG 对 RAW264.7 细胞的吞噬活性的影响。探究 AAPs-1-SG 对 RAW264.7 细胞中 NO、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平的影响。结果表明，超声辅助双水相提取 AAPs 工艺参数为：硫酸铵质量分数 24%、超声功率 400 W、乙醇体积分数 45% 和料液比 1∶20 g/mL，AAPs 得率为 12.17%±0.25%。紫外光谱扫描发现 AAPs-1-SG 不含蛋白和核酸；红外光谱发现 AAPs-1-SG 具有典型的多糖红外吸收特性，具有 α 型和 β 型糖苷键；AAPs-1-SG 主要由 Glc、Ara 和 Man 组成，其分子量为 11298 Da；AAPs-1-SG 经扫描电镜和原子力显微镜观察发现 AAPs-1-SG 呈不规则片状和孔状结构。此外，AAPs-1-SG 可显著增加 RAW264.7 细胞活力、吞噬活性及提高 NO、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平（P<0.05），进一步揭示 AAPs-1-SG 具有较好的免疫调节活性。研究结果为天然多糖高效提取提供重要的方式，也为知母多糖开发和利用提供重要参考。

关键词: 知母多糖, 超声辅助双水相提取, 工艺优化, 结构表征, 免疫活性
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2026)14−0225−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050239
本文网刊:

Process Optimization, Structural Characterization, and Immunomodulatory Activity of Ultrasound-assisted Aqueous Two-phase Extraction of *Anemarrhena asphodeloides* Polysaccharides

LOU Lifang[1], LI Jin[1], ZHANG Yaolei[1,2]
（1.School of Pharmacy, Zhengzhou Railway Vocational & Technical College, Zhengzhou 451460, China;
2.Henan Railway Food Safety Management Engineering Technology Research Center, Zhengzhou 451460, China）

Abstract: This study aimed to optimize the ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction (UATPE) process of *Anemarrhena asphodeloides* polysaccharide (AAPs), separate and purify the crude AAPs by different column chromatography techniques to obtain a uniform polysaccharide fraction (AAPs-1-SG), and characterize its structure. The effect of AAPs-1-SG on the viability of RAW264.7 cells was determined by the MTT method. The neutral red method was used to evaluate the effect of AAPs-1-SG on the phagocytic activity of RAW264.7 cells, and the effects of AAPs-1-SG on the levels of NO, IL-1β, IL-6 and TNF-α in RAW264.7 cells were investigated. The results showed that the process parameters of UATPE polysaccharide from *Anemarrhena asphodeloides* were obtained as follows: Ammonium sulfate mass fraction of 24%, ultrasonic power of 400 W, ethanol volume fraction of 45%, and solid-to-liquid ratio of 1∶20 g/mL, and the yield of AAPs

收稿日期: 2025−05−26
基金项目: 河南省高等学校重点科研项目（24B550025）; 河南省医学教育研究项目（WJLX2024220）。
作者简介: 娄丽芳（1987−）, 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 代谢生理与代谢性疾病的机制, E-mail: LiFangLou87@163.com。

was 12.17%±0.25%. Ultraviolet spectral scanning revealed that AAPs-1-SG had no proteins or nucleic acids. FT-IR showed that AAPs-1-SG exhibited typical infrared absorption characteristics of polysaccharides and possessed α and β types glycosidic bonds. AAPs-1-SG was mainly composed of Glc, Ara, and Man, and its molecular weight was 11298 Da. Scanning electron microscopy and atomic force microscopy observed that AAPs-1-SG presented irregular sheet-like and porous structures. In addition, AAPs-1-SG could markedly increase the viability and phagocytic activity of RAW264.7 cells, and significantly improve the levels of NO, IL-1β, IL-6, and TNF-α (P<0.05), further revealing that AAPs-1-SG had better immunomodulatory activity. The findings can provide an important method for the efficient extraction of natural polysaccharides and also offer significant references for the development and utilization of AAPs.

Key words: *Anemarrhena asphodeloides* polysaccharides; ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction; process optimization; structural characterization; immunomodulatory activity

知母(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)为百合科多年生草本植物,是传统中医常用的清热泻火、滋阴润燥药,其主要活性成分包括多糖、皂苷、黄酮等[1−2]。近年来,知母多糖(*Anemarrhena asphodeloides* polysaccharide, AAPs)因其显著的生物活性和良好的生物相容性备受关注。大量研究表明 AAPs 具有免疫调节、抗氧化、抗肿瘤、降血糖、调节肠道菌群等多种药理作用,其生物活性与结构特征密切相关[3−4]。然而,目前对 AAPs 的研究多集中于药理活性,其提取效率低、结构解析不完善等问题限制进一步开发与应用。因此,建立高效、环保的提取方法、阐明其结构特征,对推动 AAPs 的深度开发和利用具有重要意义。

目前,AAPs 的提取方法主要包括热水浸提法、酸碱辅助提取法、酶解法及微波辅助提取法等[5]。热水浸提法操作简单,但存在提取效率低、耗时长、能耗高等问题,且高温可能导致多糖结构降解[6];酸碱辅助提取法虽能提高得率,但强酸或强碱环境易破坏多糖的糖苷键,影响其生物活性[7];酶解法条件温和、选择性高,但酶成本较高,且酶解产物复杂,后续纯化难度大[8]。近年来,超声辅助提取技术因其空化效应可有效破坏植物细胞壁,提高传质效率,被广泛应用于多糖提取,但其单独使用时仍存在选择性不足、提取物杂质较多等问题[9]。在纯化方面,传统方法主要依赖乙醇沉淀结合 Sevage 法脱蛋白,再经 DEAE 纤维素柱或凝胶色谱分离[10]。然而,乙醇沉淀法回收率较低,且有机溶剂用量大,不符合绿色化学发展趋势;Sevage 法虽能有效去除蛋白质,但需多次重复操作,过程繁琐;柱层析法虽纯化效果好,但耗时较长,且规模化生产成本较高。双水相提取(Aqueous two-phase extraction, ATPE)作为一种新兴的绿色分离技术,通过两相体系的选择性分配,可实现多糖的高效富集和初步纯化,具有操作简便、条件温和、环境友好等优势[11−12]。目前,双水相体系在 AAPs 提取纯化中的应用研究较少,其最佳双水相体系组成尚不明确。因此,开发超声辅助双水相提取技术,优化工艺参数,解析 AAPs 结构特征,这已成为当前研究的关键问题。因此,在优化提取工艺的同时,需通过高效凝胶排阻色谱(High performance gel permeation chromatography, HPGPC)、红外光谱(Fourier transform infrared, FT-IR)、核磁共振等技术全面表征多糖结构,并结合体外细胞模型评价其免疫调节活性,以期明确“提取-结构-活性”三者之间的内在联系,这为高效开发和利用知母多糖提供重要参考。

本研究以知母为原料,采用超声辅助双水相系统提取 AAPs,通过单因素实验结合正交试验优化硫酸铵质量分数、乙醇体积分数、超声功率、料液比关键参数,建立高效、低耗的提取工艺;进一步通过分级纯化(DEAE-52 纤维素柱和 Sephadex G-100 凝胶柱)获得均一性多糖组分(AAPs-1-S),并采用紫外光谱(Ultraviolet-visible, UV)、FT-IR、HPGPC、气相色谱-质谱联用(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)等技术表征其结构,并通过 RAW264.7 细胞评价其免疫调节活性。本文研究结果旨在为 AAPs 的深度开发和利用提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

知母 安徽协和成药业有限公司;DEAE-52 纤维素和 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶 石家庄盛平工业科技有限公司;硫酸铵、氯化钠 分析纯,兰州朗博精细化工试剂有限公司;氢氧化钠、苯酚、浓硫酸 分析纯,天津华岐试剂有限公司;3500 Da 透析袋 北京艾文生物试剂有限公司;RAW264.7 细胞 北京协和细胞库;脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS) 上海源叶生物科技有限公司;NO(ml059000)、IL-1β(ml106733)、IL-6(ml064292)、TNF-α(ml059784)测定试剂盒 上海酶联生物科技有限公司。

CP-2 超声波提取仪 昆山舒美机械设备有限公司;SNE-3200M 台式扫描电镜 深圳市武训科技有限公司;RE-3002 旋转蒸发仪 郑州凯瑞仪器设备有限公司;TU-1901 双光束红外分光光度计 青岛精诚仪器仪表有限公司;7230G 紫外分光光度计 上海百利仪器设备有限公司;KL05R 离心机 上海沃信仪器设备有限公司;VF-600 真空冷冻干燥机 北京瑞科仪器有限公司;SE-2200 高效凝胶排阻色谱 浙江福立分析仪器有限公司;Flex-Axiom 原子力显微镜 纳瑟(上海)纳米科技有限公司;Heracell 240i CO_2 培养箱 赛默飞世尔科技公司;HBS-

1096A 全自动酶标仪　南京德铁生物科技有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　AAPs 制备　在预实验的基础上，称取 5 g 知母粉末样品置于 200 mL 锥形瓶中，然后加入 150 mL 双水相体系（无水乙醇∶硫酸铵∶水=3∶2∶5，V/W/V），充分搅拌，随后置于超声提取仪中进行超声辅助提取，提取结束后，将提取液置于分液漏斗中，待提取液完全分层后，收集下层的提取液进行离心（8000 r/min，20 min），收集上清液，然后置于真空冷冻干燥机中将其冻干，最终获得粗 AAPs。

1.2.2　AAPs 得率测定　依据 Tan 等[13] 的方法测定 AAPs 得率，具体如下：分别取 0、0.1、0.2、0.3、0.4 mL 的 0.1 mg/mL 的 D-无水葡萄糖标准品于 5 mL 的试管，随后加入去离子水将其补至 0.5 mL，充分混匀，再加入 0.5 mL 5% 苯酚溶液和 2.5 mL 浓硫酸，沸水浴反应 30 min 后，在波长 490 nm 处测定样品吸光值。以样品吸光度和葡萄糖标准品浓度分别为纵坐标和横坐标，构建标准方程：Y=0.0082X+0.1075，R^2=0.9998。该方程在 0~100 μg/mL 葡萄糖质量浓度范围内具有较好的线性关系。将 AAPs（10 mg）配制成 0.1 mg/mL 的待测样品溶液，取 0.5 mL 待测样品加入 0.5 mL 5% 苯酚溶液和 2.5 mL 浓硫酸沸水浴反应 30 min，冷却后测定样品吸光度，按式（1）计算粗 AAPs 得率（Y）。

$$Y=\frac{C\times V}{m}\times 1000\times 100 \qquad 式（1）$$

式中：Y 为粗 AAPs 得率（%），C 为质量浓度（μg/mL），V 为样品总体积（mL），m 为粗 AAPs 质量（mg）。

1.2.3　单因素实验　称取 5.0 g 知母样品作为提取对象，考察硫酸铵质量分数、乙醇体积分数、超声功率和料液比对 AAPs 得率的影响。

1.2.3.1　硫酸铵质量分数对 AAPs 得率的影响　固定乙醇体积分数、超声功率和料液比分别为 45%、300 W 和 1∶20 g/mL，探究硫酸铵质量分数 16%、18%、20%、22%、24% 对 AAPs得率的影响。

1.2.3.2　乙醇体积分数对 AAPs 得率的影响　固定硫酸铵质量分数、超声功率和料液比分别为 20%、300 W 和 1∶20 g/mL，探究乙醇体积分数 35%、40%、45%、50%、55% 对 AAPs 得率的影响。

1.2.3.3　超声功率对 AAPs 得率的影响　固定硫酸铵质量分数、乙醇体积分数和料液比分别为 20%、45% 和 1∶20 g/mL，探究超声功率 100、200、300、400、500 W 对 AAPs 得率的影响。

1.2.3.4　料液比对 AAPs 得率的影响　固定硫酸铵质量分数、乙醇体积分数和超声功率分别为 20%、45% 和 300 W，探究料液比 1∶10、1∶15、1∶20、1∶25、1∶30 g/mL 对 AAPs 得率的影响。

1.2.4　正交试验设计　在单因素实验的基础上，以 AAPs 得率为指标。对本研究三个主要因素（硫酸铵质量分数、乙醇体积分数和超声功率）进行 3 因素 3 水平正交试验，优化超声辅助双水相提取 AAPs 工艺，正交试验设计如表 1 所示。

表 1　正交试验设计

Table 1　Orthogonal experimental design

水平	试验因素		
	A: 硫酸铵质量分数（%）	B: 乙醇体积分数（%）	C: 超声功率（W）
1	20	35	300
2	22	40	400
3	24	45	500

1.2.5　AAPs 的纯化　首先利用无水乙醇醇沉粗 AAPs，然后通过 Sevage 法去除粗 AAPs 中的蛋白质，最后利用透析袋（截留分子量为 3500 Da）连续透析 72 h，待透析结束后，将其离心（8000 r/min，15 min）以获得上清液，随后采用真空冷冻干燥机将其冻干。将冻干的样品配制成质量浓度为 20 mg/mL 的样品溶液。将 1 mL 样品首先通过预处理好的 DEAE-52 纤维素色谱柱（2.6 cm×20 cm），然后用蒸馏水平衡层析柱，再利用蒸馏水和不同浓度的 NaCl 溶液（0、0.1、0.2、0.4 mol/L NaCl）进行分步洗脱，按照每管 5 mL 收集不同多糖馏分，并利用苯酚-硫酸法在波长 490 nm 处测定样品的吸光度，绘制洗脱曲线，最终收集得到两种多糖馏分（AAPs-1 和 AAPs-2）。随后将主要馏分（AAPs-1）再通过 Sephadex G-100 柱（1.6 cm×40 cm）进一步纯化，采用同样方式收集馏分（AAPs-1-SG）和检测其吸光度，绘制洗脱曲线，然后通过不同方式对 AAPs-1-SG 进行结构表征。

1.2.6　结构表征

1.2.6.1　分子量测定　采用 Xue 等[14] 描述的采用高效凝胶排阻色谱（HPSEC）法测定 AAPs-1-SG 分子量，并略微修改。本研究设定柱温、进样量、流动相质量浓度和流速分别为 40 ℃、20 μL、0.2 mol/L NaCl 和 0.6 mL/min。选取 6 种葡聚糖标准品作为标准品，以分子量 1、5、10、25、50、500 kDa 来绘制标准方程，并以保留时间（T_R）为横坐标和分子量对数（lgMw）为纵坐标，通过 Origin 软件拟合获得回归方程。同时在相同条件下，将 AAPs-1-SG 样品进行相同分析，获得 T_R，将其代入到回归方程中，即可获得 AAPs-1-SG 的分子量。

1.2.6.2　单糖组成测定　采用桑雨梅[15] 的方法测定 AAPs-1-SG 中的单糖组成，并略微修改。具体操作如下：配制标准品溶液：准确称取阿拉伯糖（Ara）、葡萄糖（Glu）、甘露糖（Man）、半乳糖（Gal）、木糖（Xyl）和岩藻糖（Fuc）标准品，利用水配制成一系列浓度梯度为 0.5、1、5、10、20 和 30 μg/mL 的混合标准溶液；样品前处理：将适量 AAPs-1-SG 置于色谱瓶中，加入 1 mL 浓度为 2 mol/L 的三氟乙酸（TFA）溶液，

于 121 ℃ 恒温水浴中进行 2 h 的酸水解反应，水解完成后通入氮气吹干溶剂，并用 99.99% 甲醇进行三次循环清洗去除残留 TFA。最后，加水溶解样品移至样品瓶中待测。

1.2.6.3 UV 测定 将 AAPs-1-SG 溶解于去离子水中，配制成质量浓度为 1.0 mg/mL 的溶液。以去离子水为参比，在 200~400 nm 波长范围内进行紫外光谱扫描，分析其紫外吸收特性。

1.2.6.4 FT-IR 测定 精确称量经干燥处理的 AAPs-1-SG 样品置于玛瑙研钵内进行研磨分散，随后按照 KBr 粉末与 AAPs-1-SG 样品的质量比 300∶1(g/g) 加入 KBr，通过研磨混合至均匀粉末状态，进行压片。将制备好的样品置于红外光谱仪中，在 4000~400 cm^{-1} 波数范围内对 AAPs-1-SG 样品进行红外光谱扫描，分辨率为 4 cm^{-1}，扫描 64 次，分析其官能团信息。

1.2.6.5 扫描电镜(Scanning electron microscopy, SEM)分析 在 SEM 样品台座表面均匀涂抹导电胶，取适量干燥后的 AAPs-1-SG 样品粉末分散于胶表面，通过轻敲台座基底使样品均匀附着，最后采用洗耳球垂直于台座表面吹拂，去除松散未固定的多余颗粒，确保样品表面清洁度满足成像要求。最后，将处理后 AAPs-1-SG 样品置于真空镀膜仪中进行溅射镀金处理 2 min，以增强导电性能并减少表面电荷积累，并置于真空环境下进行形貌观察与图像采集。

1.2.6.6 原子力显微镜(Atomic force microscopy, AFM)分析 采用 AFM 观察冻干后的 AAPs-1-SG 样品的表观形貌。具体操作步骤如下：将冻干后的 AAPs-1-SG 样品制备成质量浓度为2 μg/mL 样品溶液，然后通过 0.22 μm 膜，随后取10 μL AAPs-1-SG 样品溶液均匀滴在云母片表面，自然晾干，利用 Multimode 8 模块观察 AAPs-1-SG 样品的形态。

1.2.7 免疫活性

1.2.7.1 细胞活力测定 通过 MTT 法评价 RAW 264.7 细胞活力。选取对数 RAW264.7 细胞(100 μL/孔，2×10^5 个/mL)接种至 96 孔板中，置于37 ℃、5% CO_2 培养箱中，培养 24 h 后，吸弃培养基，后向每孔中加入 100 μL 不同质量浓度(0、5、10、20、40 μg/mL)AAPs-1-SG 的培养基。其中，0 μg/mL AAPs-1-SG 的培养基为对照组，不含 RAW264.7 细胞的培养基为空白对照，参考王歆彤[5] 的方法，以 LPS(1 μg/mL)的培养基为阳性对照组，每组为 6 个复孔进行重复实验，待培养 24 h 后，再向空白组、对照组和实验组中加入 100 μL MTT 溶液，37 ℃ 避光培养 4 h，随后再向每孔中加入 100 μL DMSO，充分振荡，然后静置 15 min，随后利用全自动酶标仪在波长 490 nm 处测定每孔的吸光度，依据式(2)计算 RAW264.7 细胞活力。

$$细胞活力(\%)=\frac{A_{样品}-A_{空白}}{A_{对照}-A_{空白}}\times100 \quad 式（2）$$

1.2.7.2 细胞吞噬活性测定 本实验利用中性红法评价 RAW264.7 细胞的吞噬活性。具体实验步骤如下：首先按照 1.2.7.1 方式进行细胞分组，参考王歆彤[5]的方法选取 LPS 剂量，并增加阳性对照组(1 μg/mL 的 LPS 处理 RAW264.7 细胞)，待处理结束后，向每个孔中加入(100 μL, 0.1%)中性红染液，在 37 ℃ 培养 4 h，然后采用缓冲液 PBS 洗涤 3 次，随后再向每孔中加入 100 μL 醇酸裂解液。通过全自动酶标仪在波长 540 nm 处测定每孔吸光度，按照式(3)计算 RAW264.7 细胞的吞噬活性。

$$RAW264.7细胞中性红吞噬率(\%)=\frac{A_{样品}-A_{空白}}{A_{对照}-A_{空白}}\times100 \quad 式（3）$$

1.2.7.3 NO 和细胞因子测定 利用试剂盒说明书测定 AAPs-1-SG 对 RAW264.7 细胞中 NO 和细胞因子(IL-1β、IL-6、TNF-α)分泌水平的影响。

1.3 数据处理

本研究中单因素和正交试验均重复三次，采用 Origin 9.0 软件绘图，并利用 SPSS 20.0 统计学软件对数据进行统计分析，结果以平均值±标准差表示，$P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果分析

2.1.1 硫酸铵质量分数对 AAPs 得率的影响 硫酸铵质量分数可显著影响 AAPs 得率。因此，本研究探究硫酸铵质量分数对 AAPs 得率的影响，其结果如图 1A 所示。由图 1A 可知，硫酸铵质量分数低于 22% 时，随硫酸铵质量分数增加 AAPs 得率显著增加($P<0.05$)。这可能是由于随硫酸铵质量分数增加，双水相下相中溶解多糖能力增加，进而增加其提取率[16]。然而，当硫酸铵质量分数超过 22%，进一步增加硫酸铵质量分数，反而显著降低 AAPs 得率($P<0.05$)。这可能归因于高浓度硫酸铵会诱导 AAPs 与盐形成复合沉淀，导致 AAPs 在盐相中的有效浓度降低，进而导致 AAPs 得率下降[17]。该研究结果与 Xue 等[14] 利用超声辅助双水相提取百合多糖的结果一致，多糖得率也随硫酸铵质量分数增加而显著降低($P<0.05$)。基于上述分析，选定 20%、22% 和 24% 三个硫酸铵质量分数水平进行正交试验。

2.1.2 乙醇体积分数对 AAPs 得率的影响 乙醇体积分数对双水相体系至关重要，同时也在一定程度上影响 AAPs 得率。因此，本研究选择乙醇体积分数作为重要因素，探究其对 AAPs 得率的影响，其结果如图 1B 所示。由图 1B 可知，当乙醇体积分数在 35%~45% 范围内，随乙醇体积分数增加 AAPs 得率呈现显著增加的趋势($P<0.05$)。这种现象主要归因于乙醇体积分数增加有利于提高有机相中多糖分子

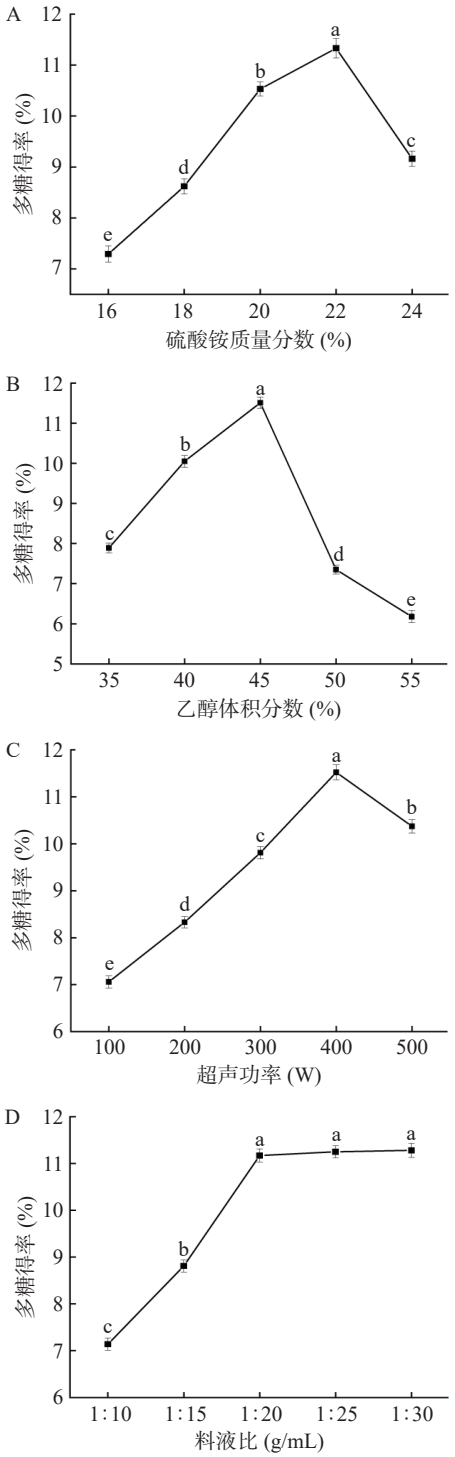


图 1　单因素对 AAPs 得率的影响

Fig.1　Effect of single factor on AAPs yield

注：A：硫酸铵质量分数；B：乙醇体积分数；C：超声功率；D：料液比；不同字母表示具有显著性差异 $P<0.05$，图 5、图 6 同。

的溶解度及传质系数，促进多糖向下相中迁移，进而提高 AAPs 得率[18]。然而，当乙醇体积分数超过 45% 并提升至 55% 时，随乙醇体积分数增加 AAPs 得率呈现显著下降趋势（$P<0.05$）。这一方面可能是由于高乙醇体积分数引发硫酸铵盐与多糖的共沉淀效应[14]；另一方面高乙醇体积分数可促进醇溶性杂质的溶解，进而降低 AAPs 得率[19]。基于上述分析，选择 35%、40% 和 45% 三个乙醇体积分数水平做后续的正交试验。

2.1.3　超声功率对 AAPs 得率的影响　超声功率作为超声辅助双水相提取知母多糖最重要的实验因素之一。因此，本研究探究超声功率对 AAPs 得率的影响，其结果如图 1C 所示。由图 1C 可知，当超声功率在 100~400 W 范围内，随超声功率增加 AAPs 得率呈显著增加的趋势（$P<0.05$）。这种现象主要归因于超声功率增加有利于增强其空化效应，高频声波产生的空化泡崩塌可有效破坏知母细胞壁的物理屏障，提高细胞内多糖分子的传质阻力系数，进而提高 AAPs 得率[20]。继续增加超声功率，AAPs 得率呈显著降低的趋势（$P<0.05$）。这可能是由于高超声功率会引发较强的机械剪切力及热效应，导致多糖糖苷键被破坏，并发生降解，进而导致 AAPs 得率降低[14]。基于上述分析，选择 300、400 及 500 W 作为超声功率的三个水平进行后续的正交试验。

2.1.4　料液比对 AAPs 得率的影响　料液比也在一定程度上影响 AAPs 得率。因此，本研究选择料液比作为影响 AAPs 得率的重要因素进行单因素实验，其结果如图 1D 所示。由图 1D 可知，当料液比 1∶10、1∶15、1∶20 g/mL 三个水平下，随料液比增加 AAPs 得率呈显著增加的趋势（$P<0.05$）。这主要是由于随着料液比增加 AAPs 细胞内外的多糖浓度差较大，可进一步促进多糖由内向外扩散，进而增加 AAPs 得率[21]。当料液比大于 1∶20 g/mL 时，进一步增加料液比，AAPs 得率无显著变化（$P>0.05$）。该研究结果与田艳花等[22] 采用微波辅助双水相提取百合多糖的结果一致。基于上述分析，本研究最终选择 1∶20 g/mL 作为最优料液比。

2.2　正交试验结果分析

超声辅助双水相提取 AAPs 的正交试验结果如

表 2　正交试验结果

Table 2　Results of orthogonal experiment

实验号	A 硫酸铵质量分数	B 乙醇体积分数	C 超声功率	AAPs得率(%)
1	1	1	1	10.16±0.28
2	1	2	2	11.28±0.31
3	1	3	3	10.95±0.25
4	2	2	3	10.01±0.29
5	2	3	1	11.42±0.33
6	2	1	2	9.83±0.21
7	3	3	2	11.38±0.19
8	3	1	3	11.24±0.23
9	3	2	1	10.80±0.27
K_1	32.39	31.23	32.38	
K_2	31.26	32.09	32.49	
K_3	33.42	33.75	32.20	
k_1	10.797	10.410	10.793	
k_2	10.420	10.697	10.830	
k_3	11.140	11.250	10.733	
R	0.720	0.840	0.097	

表 2 所示。由表 2 可知，超声功率、硫酸铵质量分数和乙醇体积分数极差分别为 0.097、0.720 和 0.840，进一步表明这三个因素对 AAPs 的影响主次为：乙醇体积分数(B)>硫酸铵质量分数(A)>超声功率(C)，最优水平组合为 $A_3B_3C_2$，即 A：24%、B：45%、C：400 W 和料液比 1∶20 g/mL 为最优水平。本研究利用优化得到的最优参数进行 3 次重复试验，最终 AAPs 得率为 12.17%±0.25%，说明正交试验可优化超声辅助双水相提取 AAPs。

2.3 AAPs 纯化分析

本研究首先采用 DEAE-52 纤维素树脂对在最优工艺下获得的 AAPs 粗提物进行分离纯化，其结果如图 2A。由图 2A 可知，本试验通过梯度洗脱成功制备两个多糖馏分分别为 AAPs-1(纯水洗脱馏分)和 AAPs-2(0.1 mol/L NaCl 洗脱馏分)。其中 AAPs-1为中性多糖，且含量高于 AAPs-2。因此，本研究选择主要馏分(AAPs-1)进一步采用 Sephadex-G100 葡聚糖凝胶柱分离纯化，其结果见图 2B。由图 2B 可知，AAPs-1 经 Sephadex-G100 葡聚糖凝胶柱分离纯化后最终获得单一的对称峰，进一步说明 AAPs-1-SG 为均一多糖馏分，后续采用不同方式对其进行结构表征。

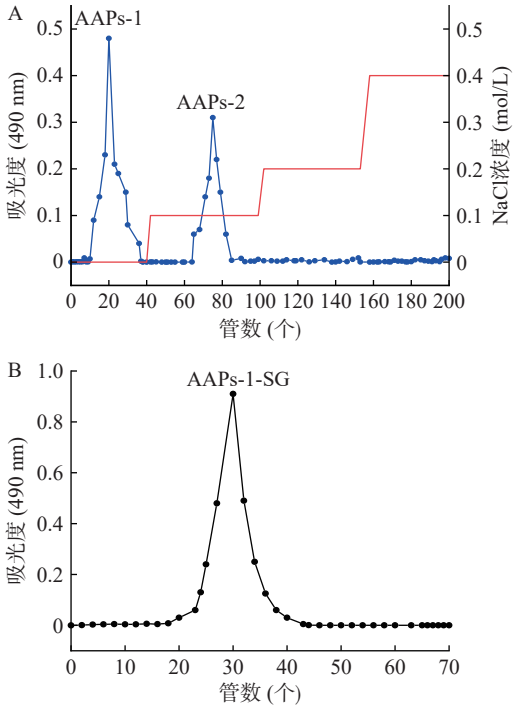


图 2 不同柱色谱的洗脱曲线

Fig.2 Elution curves of different column chromatograms

注：A：粗 AAPs 经 DEAE-52 纯化；B：AAPs-1 经 Sephadex-G100 纯化。

2.4 AAPs-1-SG 结构表征

2.4.1 分子量分析 多糖分子量是决定其理化特性与生物功能活性的关键参数。本研究采用 HPSEC 法对 AAPs-1-SG 进行分子量测定，其结果如图 3A 所示。由图 3A 可知，以保留时间(T_R)为横坐标，并以分子量对数(lgMw)为纵坐标，进行线性拟合，所得方程为 lgMw=5.945−0.215T_R(R^2=0.9926)。将 AAPs-1-SG 样品在相同色谱条件下进行分析，AAPs-1-SG 特征峰保留时间为 8.8 min，通过方程计算得到 AAPs-1-SG 的分子量 11298 Da。陈君诚[2] 通过分级醇沉和 DEAE-52 柱层析分离纯化获得的中性多糖馏分(AABP-1B)的分子量为 105 kDa，显著高于 AAPs-1-SG 的分子量。这可能是由于多糖纯化方式和来源不同所导致。

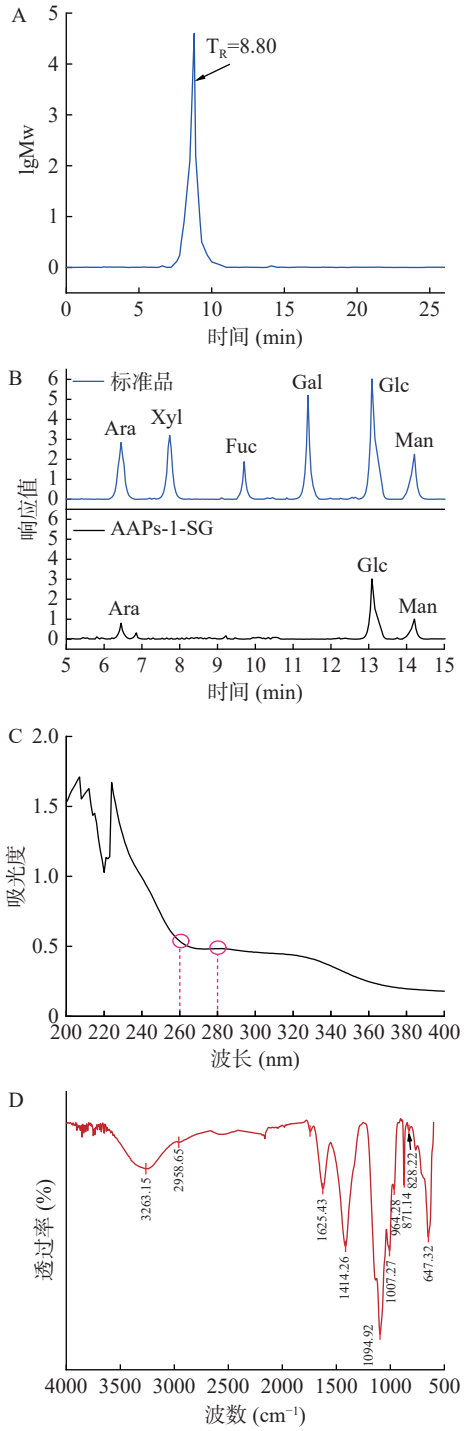


图 3 AAPs-1-SG 的结构表征

Fig.3 Structural characterization of AAPs-1-SG

注：A：分子量；B：单糖组成；C：UV 光谱；D：FT-IR 光谱。

2.4.2　单糖组成分析　采用离子色谱法结合电化学检测器分析 AAPs-1-SG 的单糖组成，其结果如图 3B 所示。由图 3B 可知，AAPs-1-SG 是由阿拉伯糖（Ara）、葡萄糖（Glc）和甘露糖（Man）组成，其中 Glc 占比最大，其次是 Man 和 Ara。表明 AAPs-1-SG 是一种主要以 Glc 为主的杂多糖。该结果与陈君诚[2] 通过分级醇沉和 DEAE-52 柱层析分离纯化获得的中性多糖馏分（AABP-1B）由 Man、Glc、Gal、GalA、Ara 和 Rha 组成的结果存在一定的差异。这可能归因于知母多糖的来源和提取/纯化方式不同所造成的。

2.4.3　紫外分析　本实验采用紫外光谱仪在波长 200~400 nm 范围内对 AAPs-1-SG 进行紫外光谱扫描，其结果如图 3C 所示。由图 3 可知，AAPs-1-SG 样品在 260 nm 和 280 nm 处无特征紫外吸收峰，进一步表明 AAPs-1-SG 不含有核酸和蛋白质，也证实粗 AAPs 经 DEAE-52 和 Sephadex G-100 柱色谱技术的纯化效果较好。

2.4.4　FT-IR 分析　FT-IR 光谱是一种能够有效表征多糖分子中官能团类型、糖苷键连接方式及糖环构型的光谱分析技术。本研究采用该技术对纯化后的 AAPs-1-SG 样品进行红外光谱扫描，结果见图 3D。由图 3D 可知，AAPs-1-SG 样品在 3263 cm^{-1} 处出现强而宽吸收峰。该吸收峰主要是由 AAPs-1-SG 样品中 O-H 基团的伸缩振动引起[23]。AAPs-1-SG 样品在 2958 cm^{-1} 处也出现明显的吸收峰，这可能是由于 AAPs-1-SG 样品糖环结构中 C-H 化学键的伸缩振动引起[24]。此外，AAPs-1-SG 样品在 1414 cm^{-1} 和 1625 cm^{-1} 处也出现特征峰，该峰是分别是由于 AAPs-1-SG 样品中 C=O 双键的伸缩振动和-COOH 伸缩振动引起[25]。AAPs-1-SG 样品在 828 cm^{-1}、871 cm^{-1} 和 964 cm^{-1} 处均出现特征吸收峰，表明 AAPs-1-SG 样品主链含有 α-型和 β-型糖苷键[26]。

2.4.5　SEM 分析　多糖的表面微观形貌特征与其性质密切相关。因此，本研究利用 SEM 在 1000×和 2000×放大倍数下观察 AAPs-1-SG 样品的微观结构，其结果如图 4A 和图 4B 可知，AAPs-1-SG 呈不规则片状和棒状结构，且表面呈现多孔状和不规则的凸起结构。在 2000×高倍放大倍率下，AAPs-1-SG 也呈现不同孔径的孔状和球形结构，且表面平滑。综上分析发现 AAPs-1-SG 结构复杂，这可能是由于 AAPs-1-SG 具有复杂的糖链结构和分支结构，使其结构复杂，进而有助于发挥其生物活性。此外，AAPs-1-SG 在形态上的差异可源于多糖的分子量、单糖组成及空间结构等多种因素的综合影响[4]。

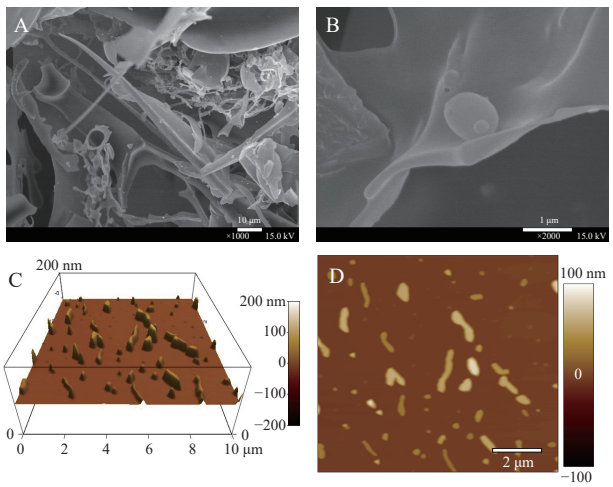


图 4　AAPs-1-SG 的微观结构

Fig.4　Microstructure of AAPs-1-SG

注：A 和 B：SEM；C 和 D：AFM。

2.4.6　AFM 分析　目前，AFM 被广泛用于解析多糖的形貌、聚集态、分子链构象及力学性质。本研究采用 AFM 观察 AAPs-1-SG 的表面形貌，其结果如图 4C 和图 4D 所示。由图 4C 可知，AAPs-1-SG 表面呈现不规则状凸起。此外，AAPs-1-SG 的 2D 平面图出现大量斑点。这可能是由于 AAPs-1-SG 分子链上的羟基提供了强大的分子间和分子内相互作用力，使得多糖链能够相互聚集或与水分子产生紧密结合，进而呈现不规则的形状[14]。这种差异上很可能与其较低的分子量密切相关，因为较小的分子量往往使得分子构象更为紧凑[27]。这与 AAPs-1-SG 的 SEM 结果一致，进一步证实 AAPs-1-SG 呈不规则的微观结构。

2.5　免疫活性

2.5.1　AAPs-1-SG 对 RAW264.7 细胞活力的影响　MTT 法测定 AAPs-1-SG 对 RAW264.7 细胞活力的

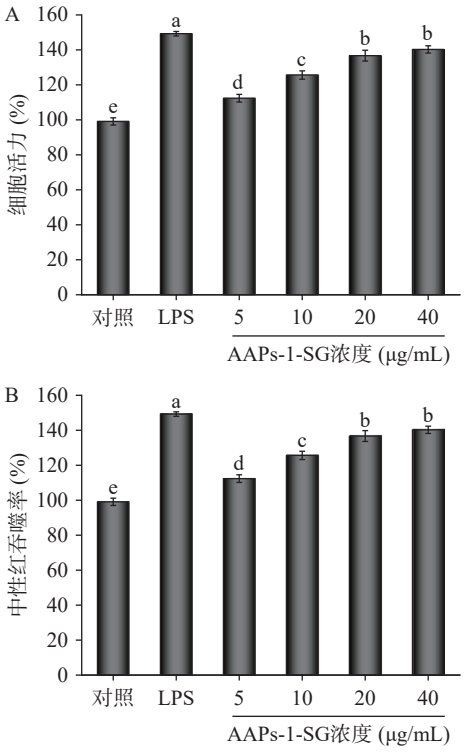


图 5　不同浓度 AAPs-1-SG 对 RAW264.7 细胞活力（A）和吞噬活性（B）的影响

Fig.5　Effects of different concentrations of APS-1-SG on the viability (A) and phagocytic activity (B) of RAW264.7 cells

影响，其结果如图 5A 所示。与对照组（0 μg/mL AAPs-1-SG）相比，LPS 组的 RAW264.7 细胞活力显著增加（P<0.05），低剂量（5 μg/mL）AAPs-1-SG 干预组中 RAW264.7 细胞活力提高 13.28%，高剂量（40 μg/mL）AAPs-1-SG 干预组中 RAW264.7 细胞活力提高 41.17%。进一步表明 AAPs-1-SG 在浓度范围为 5~40 μg/mL 时对 RAW264.7 细胞无毒副作用。因此，根据本实验的结果选择 AAPs-1-SG 的浓度范围为 5~40 μg/mL 进行后续的实验。

2.5.2 AAPs-1-SG 对 RAW264.7 细胞吞噬活性的影响 巨噬细胞的吞噬能力作为天然免疫系统中的关键吞噬因子，能够吞噬病原微生物。AAPs-1-SG 对 RAW264.7 细胞吞噬活性的影响可通过评估 RAW264.7 细胞摄入中性红的数量来评价，其结果如图 5B 所示。由图 5B 可知，与对照组（0 μg/mL AAPs-1-SG）相比，当 AAPs-1-SG 浓度在 5~20 μg/mL 范围内，随 AAPs-1-SG 浓度增加，AAPs-1-SG 对 RAW264.7 细胞的吞噬率显著增加（P<0.05），且呈剂量依赖性，进一步表明 AAPs-1-SG 可激活 RAW264.7 细胞，并增强其吞噬活性，进而提高其免疫活性。该研究结果与 Xue 等[28] 探究纯化后的玉米须酸性多糖馏分对 RAW264.7 细胞吞噬活性的影响一致。

2.5.3 AAPs-1-SG 对 RAW264.7 细胞 NO 和细胞因子的影响 NO 作为 RAW264.7 细胞免疫应答过程中释放的信号传导分子，对肿瘤细胞和病毒微生物具有较好的毒性作用[29]。因此，本研究采用试剂盒测定 AAPs-1-SG 对 RAW264.7 细胞 NO 和细胞因子的影响，其结果如图 6A 所示。与空白对照组（0 μg/mL AAPs-1-SG）相比，AAPs-1-SG 能显著刺激 RAW264.7 细胞分泌 NO，且呈剂量依赖关系（P<0.05）（图 6A），进一步表明 AAPs-1-SG 具有较强的免疫刺激作用。

巨噬细胞分泌多种细胞因子，如 IL-1β、IL-6 和 TNF-α，这些细胞因子是评估生物活性成分免疫调节活性的重要因子[30]。其中，IL-1β 被认为是关键的炎症介质之一。大量研究表明天然多糖通过调节 IL-1β 的分泌可以增强免疫活性[28]。IL-6 是一种多效性细胞因子，在免疫调节、炎症反应、造血及代谢中发挥核心作用。其与免疫活性的关系复杂，具有双向调控特性，既可促进炎症和免疫激活，也可参与免疫抑制和组织修复[31]。TNF-α 是一种核心促炎细胞因子，由活化的巨噬细胞、T 细胞、NK 细胞及肥大细胞等产生，在免疫调节、炎症反应、细胞凋亡及组织稳态中发挥多效性作用[32]。因此，本研究通过测定 RAW264.7 细胞内 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平来评估 AAPs-1-SG 的免疫调节活性，其结果如图 6B~图 6D 所示。由图 6B~图 6D 可知，与对照组（0 μg/mL AAPs-1-SG）相比，AAPs-1-SG（5~40 μg/mL）处理 RAW264.7 细胞，AAPs-1-SG 可显著增加

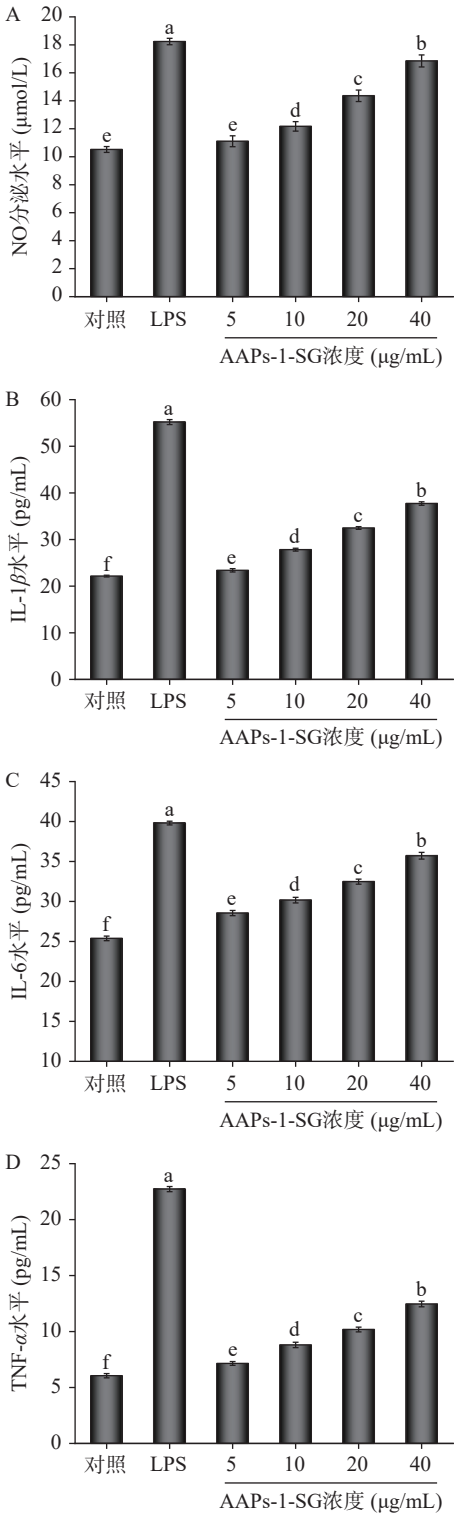


图 6 不同浓度 AAPs-1-SG 对 RAW264.7 细胞分泌 NO（A）、IL-1β（B）、IL-6（C）和 TNF-α（D）水平的影响

Fig.6 Effects of different concentrations of AAPs-1-SG on the secretion levels of NO (A), IL-1β (B), IL-6 (C), and TNF-α (D) in RAW264.7 cells

RAW264.7 细胞分泌 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平（P<0.05），进一步表明 AAPs-1-SG 具有较好的免疫调节活性。因此，AAPs-1-SG 可用作天然免疫增强剂，用于功能性食品、药物和保健品的开发中。

多糖的免疫活性与分子量与单糖组成等密切相关[33−34]，而且具有高 Glc 和 Man 的多糖较易与巨噬

细胞甘露糖受体结合，进一步激活免疫应答反应[35]。此外，多糖的分子量也影响其免疫活性[36]。这也解释了 AAPs-1-SG 具有较高免疫增强活性的原因。此外，通过 FT-IR 也证实 AAPs-1-SG 具有 α 型和 β 型糖苷键，这也是其具有较好免疫活性的重要原因[37]。值得注意的是，当多糖分子量>10 kDa 时，较大的分子量提供更多抗原表位（B 细胞表位和 T 细胞表位），能有效激活 B 细胞和 T 细胞，引发体液免疫和细胞免疫[38]。本研究通过 HPGPC 测得 AAPs-1-SG 分子量为 11298 Da，这也是 AAPs-1-SG 具有较高免疫增强活性的原因。

3　结论

本研究获得最优的超声酶辅助双水相提取 AAPs 工艺参数为：硫酸铵质量分数 24%、超声功率 400 W、乙醇体积分数 45% 和料液比 1∶20 g/mL，AAPs 得率为 12.17%±0.25%。利用不同柱色谱技术最终获得均一的多糖馏分（AAPs-1-SG），其主要由 Glc、Ara 和 Man 组成，分子量为 11298 Da。此外，AAPs-1-SG 中不含蛋白和核酸，具有 α 型和 β 型糖苷键，并呈不规则片状和孔状结构。AAPs-1-SG 可增加 RAW264.7 细胞活力和提高其吞噬活性。此外，AAPs-1-SG 可增加 NO、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平，进一步表明 AAPs-1-SG 具有较好的免疫调节活性。本研究仅仅局限于对 AAPs-1-SG 的初级结构进行表征，也未对其免疫调节的分子机制进行探究。后续可通过甲基化和核磁进一步明确 AAPs-1-SG 结构，并利用蛋白质组学和代谢组学等手段继续深入分析其免疫调节的分子机制，并结合体内实验进一步验证 AAPs-1-SG 的有效性。

© 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] 王歆彤，李朋月，吴兰芳，等. 知母多糖复合酶提取工艺优化及其免疫活性[J]. 食品工业科技，2022，43(11)：218−227. [WANG Y T, LI P Y, WU L F, et al. Optimization of multi-enzymatic extraction of polysaccharide from *Anemarrhena asphodeloides* bunge and its immunomodulatory activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(11): 218−227.]

[2] 陈君诚. 知母多糖的结构鉴定、降血糖机制及其对肠道菌群的影响[D]. 广州：华南理工大学，2021. [CHEN J C. Structural identification and hypoglycemic activity of polysaccharides from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge and their effect on gut microflora[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.]

[3] 侯红瑞，陈玲，孙国勇，等. 知母多糖对链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠的降血糖作用[J]. 食品工业科技，2018，39(12)：69−72,78. [HOU H R, CHEN L, SUN G Y, et al. Hypoglycemic effect of polysaccharide from *Anemarrhena asphodeloides* in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(12): 69−72,78.]

[4] CAO Rongan, JI Ruixue, TABARSA M, et al. Purification, characterization and immunostimulatory effects of polysaccharides from *Anemarrhena asphodeloides* rhizomes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 172: 550−559.

[5] 王歆彤. 不同提取方法对知母多糖结构及其免疫活性的影响[D]. 石家庄：河北中医学院，2022. [WANG Y T. The effects of different extraction methods on the structure and immune activity of *Anemarrhena* polysaccharides[D]. Shijiazhuang: Hebei University of Chinese Medicine, 2022.]

[6] 李炳辉. 知母多糖的提取分离及其活性探讨[D]. 广州：华南理工大学，2011. [LI B H. Extraction, separation and activity discussion of *Anemarrhena* polysaccharides[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011.]

[7] 王艺涵，吴琴，迟原龙，等. 酸碱法和酶法辅助提取银耳粗多糖的特性研究[J]. 食品科技，2019，44(4)：200−204. [WANG Y H, WU Q, CHI Y L, et al. Study on the characteristics of extracting crude polysaccharides from *Tremella fuciformis* by acid-base method and enzymatic method[J]. Food Technology, 2019, 44(4): 200−204.]

[8] 王俊龙，蔺永刚，时文盼，等. 大球盖菇多糖的酶辅助离子液体提取、结构表征及生物活性[J]. 精细化工，2025，42(2)：388−401. [WANG J L, LAN Y G, SHI W P, et al. Enzyme-assisted ionic liquid extraction, structural characterization and biological activity of polysaccharides from *Lentinula edodes*[J]. Fine Chemicals, 2025, 42(2): 388−401.]

[9] 马思远，李慕怡，黎明. 扛板归多糖超声辅助酶法提取工艺优化及对运动性疲劳的影响[J]. 食品与发酵科技，2025，61(2)：25−33. [MA S Y, LI M Y, LI M, et al. Optimization of the ultrasound-assisted enzymatic extraction process of polysaccharides from the shoulder plate and its influence on exercise-induced fatigue[J]. Food Fermentation Technology, 2025, 61(2): 25−33.]

[10] 朱芙蓉，程忠，唐颖彤，等. 金花茶多糖的提取纯化、结构及生物活性研究进展[J]. 食品与机械，2025，41(3)：228−235. [ZHU F R, CHENG Z, TANG Y T, et al. Research progress on the extraction, purification, structure and biological activity of *Camellia nitidissima* polysaccharides[J]. Food & Machinery, 2025, 41(3): 228−235.]

[11] 张桂娟，张茹，孙爱霞，等. 鸡腿堇菜粗多糖超声辅助双水相提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 保鲜与加工，2025，25(4)：78−85,96. [ZHANG G J, ZHANG R, SUN A X, et al. Optimization of ultrasound-assisted double aqueous phase extraction process and study on antioxidant activity of crude polysaccharides from violet chicken legs[J]. Preservation Process, 2025, 25(4): 78−85,96.]

[12] HU Jinxia, LIU Jianfei, HUANG Xinyi, et al. Efficient extraction of polysaccharides from *Lycium barbarum* L. by aqueous two-phase system combined with tissue-smashing extraction[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 184: 115036.

[13] TAN Jiaqi, CUI Pengshan, GE Shaoqin, et al. Ultrasound assisted aqueous two-phase extraction of polysaccharides from *Cornus officinalis* fruit: Modeling, optimization, purification, and characterization[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 84: 105966.

[14] XUE Hongkun, XU Jiaqi, ZHANG Jinling, et al. Modeling, optimization, purification, and characterization of polysaccharides from *Lilium lancifolium* Thunb[J]. Lwt, 2022, 162: 113491.

[15] 桑雨梅. 杭菊多糖提取、分离纯化、结构表征及降糖活性研究[D]. 保定：河北大学，2024. [SANG Y M. Study on the extraction, separation and purification, structural characterization and hypoglycemic activity of Hangzhou chrysanthemum polysaccharides[D]. Baoding: Hebei University, 2024.]

[16] TIAN Yanhua, LUO Aiguo, YANG Zhaoyan, et al. Ultra-

sound assisted aqueous two-phase extraction of polysaccharides from *Ophiopogon japonicus*: Process optimization, structure characterization, and antioxidant activity[J]. Starch-Stä rke, 2024, 76(9−10): 2400026.

[17] SANG Yumei, HAO Zitong, DAI Shasha, et al. Optimization of aqueous two-phase extraction of polysaccharides from hawthorn by response surface methodology coupled with genetic algorithm and its antioxidant activity[J]. Starch-Stä rke, 2023, 75(11−12): 2300094.

[18] ZHENG Yi, LI Shiying, LI Chuang, et al. Aqueous two-phase extraction, antioxidant and renal protective effects of polysaccharides from spores of *Cordyceps cicadae*[J]. Processes, 2022, 10(2): 348.

[19] YANG Yu, LI Miao, SUN Jingwen, et al. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of polysaccharides from *Hippophae rhamnoide* L: Modeling, characterization and hypoglycemic activity[J]. International Journal of Biological Macromole cules, 2024, 254: 127626.

[20] LIU Junwen, BAI Jingwen, SHAO Chuntian, et al. Optimization of ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction of polysaccharides from seabuckthorn fruits using response methodology, physicochemical characterization and bioactivities[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2023, 103(6): 3168−3183.

[21] 赖玲, 杨潇, 尹琳, 等. 纳溪特早茶‘乌牛早’茶多糖提取纯化及免疫活性研究[J]. 食品工业科技, 2025, 46(6): 231−241. [LAI L, YANG X, YIN L, et al. extraction, purification and immune activity of polysaccharide from Naxi Wuniu tea[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(6): 231−241.]

[22] 田艳花, 杨兆艳, 罗爱国, 等. 微波辅助双水相提取百合多糖的工艺优化及其结构表征[J]. 食品工业科技, 2023, 44(21): 227−233. [TIAN Y H, YANG Z Y, LUO A G, et al. Process optimization and structural characterization of microwave-assisted dual-aqueous phase extraction of lily polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(21): 227−233.]

[23] ZHANG Hui, LI Chenchen, LAI P F H, et al. Fractionation, chemical characterization and immunostimulatory activity of *β*-glucan and galactoglucan from *Russula vinosa* Lindblad[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 256: 117559.

[24] PENG Yanqi, ZHANG Zhenghan, CHEN Weiyan, et al. Structural characterization, *α*-glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of neutral polysaccharide from apricot (*Armeniaca* Sibirica L. Lam) kernels[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 238: 124109.

[25] GUO Huijing, ZHANG Weida, JIANG Ying, et al. Physicochemical, structural, and biological properties of polysaccharides from dandelion[J]. Molecules, 2019, 24(8): 1485.

[26] WANG Yinping, GUO Mingruo. Purification and structural characterization of polysaccharides isolated from *Auricularia cornea* var. Li[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 230: 115680.

[27] KONG Lingshan, YU Ling, FENG Tao, et al. Physicochemical characterization of the polysaccharide from *Bletilla striata*: Effect of drying method[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 125: 1−8.

[28] XUE Hongkun, WANG Wenli, WU Jiping, et al. Ultrasound assisted aqueous two-phase extraction of polysaccharides from corn stigma: Process optimization, structure characterization, and immunomodulatory activity[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2024, 91: 103531.

[29] 牛甜, 杨帅, 段宏伟, 等. 菊粉对巨噬细胞 RAW 264.7 免疫活性的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2025, 37(1): 10−17. [NIU T, YANG S, DUAN H W, et al. Effect of inulin on the immune activity of RAW264.7 macrophages[J]. Natural Product Research and Development, 2025, 37(1): 10−17.]

[30] YANG Yahui, LAI Ziru, HU Xilei, et al. Structural characterization and combined immunomodulatory activity of fermented Chinese yam polysaccharides with probiotics[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 307: 142290.

[31] CHEN Ye, LI Pei, HUANG Wenyi, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide isolated from *Bifidobacterium adolescentis*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 304: 140747.

[32] LI Yaozu, ZHONG Cheng, KRAITHONG S, et al. Insights into a novel exopolysaccharide from *Mariana* Trench-derived *Aspergillus versicolor* SCAU214: Structure and immune activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 308: 142660.

[33] 厉晓, 龚婕, 丁婵, 等. 茯苓多糖的结构、活性及其构效关系研究进展[J]. 中草药, 2025, 56(1): 305−317. [LI X, GONG J, DING C, et al. Research progress on structures, activities of *Wolfiporia hoelen* polysaccharides and its structure-activity relationship[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2025, 56(1): 305−317.]

[34] YAO Lumeng, ZHU Lili, CHEN Changlun, et al. A systematic review on polysaccharides from fermented *Cordyceps sinensis*: A dvances in the preparation, structural characterization, bioactivities, structure-activity relationships[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 282: 137275.

[35] TANG Jun, HE Zihan, ZHANG Baohui, et al. Structural properties, bioactivities, structure-activity relationships and bio-applications of polysaccharides from *Auricularia auricula*: A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 280: 135941.

[36] FU Junjie, CHANG Cong, REN Jinyang, et al. The structure characterization of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* and the structure-activity relationship with immune-regulation on THP-1 cells[J]. Chemistry & Biodiversity, 2025, 22(3): e202401167.

[37] CHEN Shujun, QIN Fang, YANG Ying, et al. Extraction, purification, structural characterization, and bioactivities of the genus *Schisandra* polysaccharides: A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 262: 130257.

[38] 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.