

高若涵, 马楠, 杨明哲, 等. 燕麦非淀粉多糖发酵富集法工艺优化及其免疫刺激活性分析 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(10): 21–32.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024090061

GAO Ruohan, MA Nan, YANG Mingzhe, et al. Optimization of the Fermentation Enrichment Method for Oat Non-starch Polysaccharides and Study of Their Immunostimulatory Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(10): 21–32. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024090061

· 特邀主编专栏—植物基食品原料基础研究、前沿技术创新及其健康绿色产品开发 (客座主编:
于寒松、张健、李健) ·

燕麦非淀粉多糖发酵富集法工艺优化及其 免疫刺激活性分析

高若涵, 马楠, 杨明哲, 曹家宝, 王霞, 鹿保鑫*
(黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319)

摘要: 为提高燕麦非淀粉多糖 (ONSP) 的产率, 优化 ONSP 的提取工艺并探究其免疫活性。本研究采用微生物发酵辅助提取, 并利用单因素实验、响应面法优化了微生物发酵辅助提取燕麦非淀粉多糖 (ONSP1) 的提取工艺。利用傅里叶变换红外光谱 (FTIR)、气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 测定 ONSP 的结构, 同时对 ONSP 的免疫活性进行探究, 并与传统热水浸提法提取出的燕麦非淀粉多糖 (ONSP2) 进行比较。结果表明: ONSP1 的最佳提取工艺为接菌量 5%, 发酵温度 34 °C, 发酵时间 26 h, 此时 ONSP1 的产率为 8.60%±0.04%。ONSP1 和 ONSP2 均由葡萄糖、阿拉伯糖和木糖组成, 而 ONSP1 的阿拉伯糖和木糖含量显著高于 ONSP2 ($P<0.05$)。检测发现, 虽然 ONSP1 的分子量 (47.2 kDa) 显著低于 ONSP2 的分子量 (53.2 kDa), 但是 ONSP1 的 β -葡聚糖含量显著高于 ONSP2 ($P<0.05$)。并且 ONSP1 和 ONSP2 均能促进 RAW264.7 细胞增殖, ONSP1 表现出更强的免疫刺激活性。综上所述, 微生物发酵富集法得到的燕麦非淀粉多糖中 β -葡聚糖含量更高, 免疫刺激活性更强。本研究为进一步探究燕麦非淀粉多糖的结构特征、免疫刺激活性及其构效关系提供新的见解。

关键词: 燕麦非淀粉多糖, 微生物发酵, 工艺优化, 结构表征, 免疫刺激活性

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)10-0021-12

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024090061



本文网刊:

Optimization of the Fermentation Enrichment Method for Oat Non-starch Polysaccharides and Study of Their Immunostimulatory Activity

GAO Ruohan, MA Nan, YANG Mingzhe, CAO Jiabao, WANG Xia, LU Baoxin*

(College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: In order to enhance the yield of oat non-starch polysaccharide (ONSP), the extraction process was optimized and its immunological activity was investigated. This study employed microbial fermentation-assisted extraction, optimizing the process for oat non-starch polysaccharide (ONSP1) using a one-way response surface methodology. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were employed to determine the structural characteristics of ONSP. Additionally, the immunological activity of ONSP was investigated and compared with that of oat non-starch polysaccharide (ONSP2) extracted through the conventional hot water method. The results demonstrated that the optimal extraction process for ONSP1 was achieved with a 5% of the inoculum and fermentation at 34 °C for 26 h, resulting in a yield of ONSP1 at 8.60%±0.04%. Both ONSP1 and ONSP2 were composed of glucose, arabinose, and xylose, with the contents of arabinose and xylose of ONSP1 were significantly higher than those of ONSP2

收稿日期: 2024-09-05

基金项目: 国家重点研发计划项目“稻谷加工精准调控技术研究及营养平衡型开发与示范”(2021YFD2100902)。

作者简介: 高若涵 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: gaoruohan2000@126.com。

* 通信作者: 鹿保鑫 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工, E-mail: lubaoxin72@126.com。

($P<0.05$). Despite the lower molecular weight of ONSP1 (47.2 kDa) compared to ONSP2 (53.2 kDa), ONSP1 had a significantly higher β -glucan content ($P<0.05$). Furthermore, both ONSP1 and ONSP2 demonstrated the capacity to promote the proliferation of RAW264.7 cells, with ONSP1 exhibiting a more pronounced immune-stimulating activity. In conclusion, microbial fermentation enrichment resulted in oat non-starch polysaccharides with a higher β -glucan content and stronger immunostimulatory activity. This study provides new insights for further investigation into the bioimmunological activities and structural relationships of oat non-starch polysaccharides.

Key words: oat non-starch polysaccharides; microbial fermentation; process optimization; structural characterization; immunostimulatory activity

燕麦因其富含蛋白质、矿物质、维生素及可溶性膳食纤维,具有很高的营养价值,并且对人体健康有益,因此被广泛应用食品领域中^[1-2]。燕麦具有降低胆固醇、调节血糖、血脂水平和抗肿瘤等作用,长期食用可以缓解高血糖,预防心血管疾病^[3-6],因此在食品领域得到了广泛的应用。其中,燕麦非淀粉多糖被认为是燕麦的主要活性成分之一^[7]。燕麦非淀粉多糖主要是由各种单糖成分组成,包括葡萄糖、阿拉伯糖和甘露糖以及通过 β -1,3-键和 β -1,4-键连接而成的 β -葡聚糖^[8]。研究表明,燕麦非淀粉多糖具有降血糖、降血脂等作用^[9-10]。然而,目前燕麦非淀粉多糖的传统提取方法提取效率低,耗时长,提取出的燕麦多糖免疫活性较差,难以满足生产需求^[11]。因此,迫切需要寻找一种更高效,快速且提高燕麦多糖生物活性的提取方法。

微生物发酵辅助提取法作为一种新兴的提取技术,是利用微生物在发酵过程中产生的代谢物,可以轻易从植物细胞中释放出有效成分^[12]。微生物发酵辅助提取具有操作安全方便、反应条件温和、副产物无毒等优点,是提取多糖的一种高效环保的方法^[13]。研究表明,与传统提取方法相比,微生物发酵辅助提取法对多糖的提取率提高了 79.77%^[14]。微生物发酵辅助提取在提高多糖产率的同时,还极大地提高了有效成分的功能性,以满足商业产品的要求^[15]。Wang 等^[16]利用植物乳杆菌发酵提取五味子多糖,发现发酵提取的多糖表现出更好的肠道菌群调节能力。类似的研究发现,利用微生物发酵提取的多糖具有较好的免疫活性^[17]。Wang 等^[18]利用植物乳杆菌发酵提取绿尖秋葵多糖,结果表明发酵提取的多糖表现出优异的免疫调节活性。但是,目前关于微生物发酵辅助提取燕麦非淀粉多糖的研究却鲜有报道。

因此,本研究采用微生物发酵辅助提取燕麦非淀粉多糖,并对关键工艺参数进行优化。然后通过红外光谱、单糖组成和甲基化分析对所得的燕麦非淀粉多糖进行结构分析及免疫特性评价,并与热水浸提法所得的燕麦非淀粉多糖进行对比,以期开发燕麦非淀粉多糖功能性食品资源提供一种有前景的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

燕麦种子 青海西宁生物科技有限公司;高活

性干酵母、酿酒干酵母 安琪儿酵母有限公司;嗜热链球菌 郑州百益宝生物科技有限公司; β -葡聚糖标准品 纯度 75%,美国西格玛公司; β -葡聚糖检测试剂盒 爱尔兰 Megazyme 公司;RAW264.7 细胞 美国类型培养物保藏中心(ATCC);RPMI-1640 培养基、青霉素/链霉素和胎牛血清(FBS) 美国马兰兰州沃克斯维尔龙沙公司;耐高温 α -淀粉酶 (40000 U/g) 上海麦克林生化科技股份有限公司;抗体 圣克鲁斯生物技术公司;Griess 试剂盒 碧云天生物技术有限公司;DC 蛋白测定试剂盒 伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

FW100 型高速粉碎机 天津泰斯特仪器有限公司;LDZX-75L-I 型高压灭菌锅 上海申安医疗器械厂;DRP-9082 型恒温培养箱 上海培因实验仪器有限公司;HH-6 型恒温水浴锅 常州国华电器有限公司;DSH-50-10 型水分测定仪 上海平轩科学仪器有限公司;WQF-530A 型傅里叶红外光谱仪 北京北分瑞利分析仪器(集团)有限责任公司;TSKG 5000PW 色谱分析柱 东曹(上海)生物科技有限公司;Spectrostar nano 型酶标仪 德国 BMG LAB-TECH 公司;CytoFLEX 型流式细胞仪 贝克曼库尔特公司;MS-H-ProT 大龙 LCD 数控定时加热型磁力搅拌器 大龙兴创实验仪器(北京)股份公司;ME104 型电子分析天平 梅特勒托利多科技(中国)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 燕麦非淀粉多糖提取

1.2.1.1 燕麦预处理 将燕麦种子清洗后烘干,用高速粉碎机将其研磨至粉末状后过 100 目筛,供后续实验使用。

1.2.1.2 微生物发酵辅助提取法 根据 Wu 等^[19]的研究,称取 6 g 燕麦粉,加入 96 mL 蒸馏水,混合后高压灭菌(105 $^{\circ}\text{C}$, 20 min),并加入以 5% 燕麦粉质量的菌粉,在发酵温度 34 $^{\circ}\text{C}$ 中发酵 26 h。发酵后,将 pH 调至 6.0,并在燕麦发酵液中加入 0.06 g 耐高温 α -淀粉酶去除淀粉 30 min(水浴温度 95 $^{\circ}\text{C}$),直至碘检测表明燕麦发酵液中无淀粉。燕麦发酵液冷却至室温后,4000 r/min 离心 15 min 后取上清液,加入 3 倍体积的 95% 乙醇静置沉淀 12 h 后收集沉淀,将沉淀物烘干(30 $^{\circ}\text{C}$)后的燕麦非淀粉多糖为 ONSP1。

1.2.1.3 热水浸提法 采用 Climova 等^[20] 描述的方法,并进行优化。将 6 g 燕麦粉与 96 mL 蒸馏水混合后在 52 ℃ 水浴中搅拌 3 h,冷却至室温后将 pH 调至 6.0,并在样液中加入耐高温 α -淀粉酶(40000 U/g)去除淀粉 30 min(水浴温度 95 ℃),直至碘检测表明样液中无淀粉。然后与上述微生物发酵辅助提取法相同的步骤,得到燕麦非淀粉多糖为 ONSP2。

1.2.2 微生物发酵富集提取工艺优化

1.2.2.1 选择菌种及菌种复配比 本研究以燕麦全粉为发酵底物,菌种添加量为 5%(g/100 g),料液比为 1:16(g/mL),发酵时间为 26 h,发酵温度为 34 ℃。考察高活性干酵母(HADY)、酿酒干酵母(BY)和嗜热链球菌(ST)以及 HADY 和 ST 在 1:1、1:2、1:3、2:1 和 3:1(质量比)下的组合比例对 ONSP1 产率的影响,并与 ONSP2 产率进行对比。

1.2.2.2 单因素实验 以燕麦非淀粉多糖产率为指标,考察不同料液比(1:12、1:14、1:16、1:18 和 1:20 g/mL);接菌量(3%、4%、5%、6% 和 7%);发酵时间(22、24、26、28 和 30 h);发酵温度(30、32、34、36 和 38 ℃)对燕麦非淀粉多糖产率的影响,燕麦非淀粉多糖的产率按照以下公式计算:

$$\text{燕麦非淀粉多糖产率(\%)} = \frac{\text{燕麦非淀粉多糖质量}}{\text{燕麦粉质量}} \times 100$$

1.2.2.3 响应面优化 在单因素实验结果的基础上,利用响应面软件选择接菌量、发酵时间和发酵温度进行三因素三水平的 Box-Behnken Design(BBD)试验,以燕麦非淀粉多糖产率为响应值,因子和水平设计见表 1。

表 1 响应面因素和水平
Table 1 Factors and levels of response surface test

水平	因素		
	A发酵温度(℃)	B接菌量(%)	C发酵时间(h)
-1	32	4	24
0	34	5	26
1	36	6	28

1.2.3 理化性质 采用 DC 蛋白测定试剂盒和 Lowry 法^[21]、苯酚-硫酸法^[22]测定 ONSP1 和 ONSP2 的蛋白质、总碳水化合物含量。

燕麦非淀粉多糖使用水分测定仪测定其水分含量,具体步骤为称取 1.00 g 燕麦非淀粉多糖,放入测定盘中,温度 100 ℃ 干燥到恒重,记录其水分含量。

1.2.4 结构表征

1.2.4.1 红外光谱分析 取 5 mg 样品(ONSP1 和 ONSP2)与干燥溴化钾混合均匀,然后利用傅立叶变换红外光谱仪在 4000~400 cm^{-1} 波数范围内扫描压片。

1.2.4.2 分子量测定 参考 Pang 等^[23] 的方法测定

ONSP 的分子量。ONSP1 和 ONSP2 用蒸馏水溶解于 2.0 mg/mL 溶液中,利用高效尺寸筛析色谱法(HPSEC)测定分子量。色谱条件:色谱柱:TSKG 5000PW 分析柱(7.5×600 mm);流动相:0.15 mol/L NaNO_3 和 0.02% NaN_3 ;流速:0.4 mL/min;注射量:0.5 mL;检测器:折射率检测器(Waters, 2414)。利用 ASTRA 5.3 软件的计算燕麦非淀粉多糖的平均分子量(Mw)和回旋半径(Rg)。

1.2.4.3 单糖组成分析 根据 Galermo 等^[24] 概述的方法进行单糖测定。称取 3.0 mg 样品(ONSP1 和 ONSP2),加入 0.5 mL 4 mol/L 三氟乙酸,在 100 ℃ 下水解 6 h。冷却后,用 N_2 进行吹干。随后,加入 3 mg NaBD_4 还原 12 h,并加入 0.5 mL 乙酸酐进行乙酰化。最后,将衍生物注入配备 HP-5MS 毛细管的气相色谱-质谱联用(GC-MS)系统中进行分析,GC-MS 系统设定具体参数值:柱温 160 ℃;进样口温度 250 ℃;气相色谱柱流量 1.2 mL/min;离子源参数值 230;四级质量分析器参数值 150;辅助加热区 2 的温度 250 ℃。

1.2.4.4 甲基化分析 采用了 Ernst 等^[25] 描述的甲基化方法并进行改进。取 3.0 mg 样品(ONSP1 和 ONSP2)溶解在 0.5 mL DMSO 中,再将样品溶液加入 20 mg NaOH 过夜处理,随后加入碘甲烷进行甲基化反应 2.5 h,用氮气吹干,加入 0.5 mL 4 mol/L 三氟乙酸,在 100 ℃ 下水解 6 h。冷却后,用 N_2 进行吹干。随后,在室温中加入 3 mg NaBD_4 还原 12 h,并加入 0.5 mL 乙酸酐进行乙酰化。最后,将部分甲基化的糖醇乙酸酯注入配备 HP-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm)毛细管柱的 GC-MS 系统。使用氦气作为载气,GC-MS 系统设定具体参数值:柱温 160 ℃;进样口温度 250 ℃;气相色谱柱流量 1.2 mL/min;离子源参数值 230;四级质量分析器参数值 150;辅助加热区 2 的温度 250 ℃。

1.2.5 免疫活性测定

1.2.5.1 细胞增殖和一氧化氮(NO)生成试验 RAW264.7 巨噬细胞在含有 10%FBS、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养基中培养。然后,将 100 μL RAW264.7 细胞(1×10^6 cells/mL)接种至含有 10% FBS 的 RPMI 培养基的 96 孔板中进行细胞增殖实验。将不同浓度(100~300 $\mu\text{g/mL}$)的样品(ONSP1 和 ONSP2)或脂多糖(LPS, 2 $\mu\text{g/mL}$),在 5% CO_2 下与细胞培养 24 h。然后,在孔中加入 20 μL 水溶性四唑盐(WST-1)溶液,延长孵育 1 h。使用酶标仪在 450 nm 波长下测量光密度(OD),并使用下列公式计算细胞增殖活性:

$$\text{细胞增殖(\%)} = \frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \times 100$$

式中: A_c 为不添加燕麦非淀粉多糖组的吸光度; A_b 为只含有培养基组的吸光度; A_s 为不同浓度样品

组吸光度。

参考 Griess 试剂盒说明书^[26], 利用 Griess 试剂盒测定培养基中 NO 的产生量。以 NaNO_2 (1~200 $\mu\text{mol/L}$) 为标准, 计算巨噬细胞释放 NO 的量。

1.2.5.2 实时聚合酶链反应分析 将 1 mL RAW-264.7 细胞 (1×10^6 cells/mL) 接种到 24 孔板上, 在 5% 的 CO_2 下于 37 $^\circ\text{C}$ 培养不同浓度的 ONSP1 与 ONSP2 (100、200 和 300 $\mu\text{g/mL}$) 18 h。按照 Surayot 等^[27]报道的方法进行。LPS 处理的细胞 (2 $\mu\text{g/mL}$) 作为阳性对照。使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 并通过纳米光度计进行定量。使用 oligo(dT)20 引物和 Superscript III RT 构建 cDNA。使用 GoTaq Flexi DNA 聚合酶。表 2 中列出的特定引物进行 PCR 扩增。

表 2 RT-PCR 中使用的引物序列
Table 2 Primers sequences used in RT-PCR

引物	引物序列
iNOS	5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'(forward)
	5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'(reverse)
IL-1 β	5'-ATGGCAACTATTCTGAACCTCAACT-3'(forward)
	5'-CAGGACAGGTATAGATTCTTTCTTT-3'(reverse)
IL-6	5'-TTCC TCTCTGCAAGAGACT-3'(forward)
	5'-TGTATCTCTCTGAAGGACT-3'(reverse)
IL-10	5'-TACCTGGTAGAAGTGATGCC-3'(forward)
	5'-CATCATGTATGCTTCTATGC-3'(reverse)
TNF- α	5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATC-3'(forward)
	5'-TACAGGCTTGTCACCTCGAATT-3'(reverse)

1.2.5.3 流式细胞术分析 使用 Eom 等^[28]的方法并稍加改动。将 300 $\mu\text{g/mL}$ 的 ONSP1 和 ONSP2 溶液处理 24 h 后的 RAW264.7 细胞, 用流式细胞术染色缓冲液洗涤, 然后与抗 CD40-APC (1C10) 和抗 CD11b (M1/70) 等特异性抗体在 4 $^\circ\text{C}$ 黑暗条件下孵育 30 min。使用 CytoFLEX 流式细胞仪进行分析, 并使用 CytExpert 2.3.0.84 软件分析数据。

1.3 数据处理

每个实验均一式三份, 结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。使用 SPSS 27.0 软件进行统计分析, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 评估组间的显著差异, 显著性阈值设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 发酵菌株及复配比确定

从图 1A 可以看出, 菌种发酵提取燕麦非淀粉多糖的效率显著高于传统热水浸提法 ($P < 0.05$)。这可能归因于微生物发酵过程中会分解燕麦中的大分子, 从而释放更多的燕麦非淀粉多糖。其中, 高活性干酵母菌 (HADY) 发酵得到了最高的燕麦非淀粉多糖产率 (3.05%), 这可能是因为 HADY 生长过程中消耗燕麦液中还原糖、蛋白质等营养物质进行生长, 同时微生物利用本身的酶系统分解碳水化合物, 进行去杂

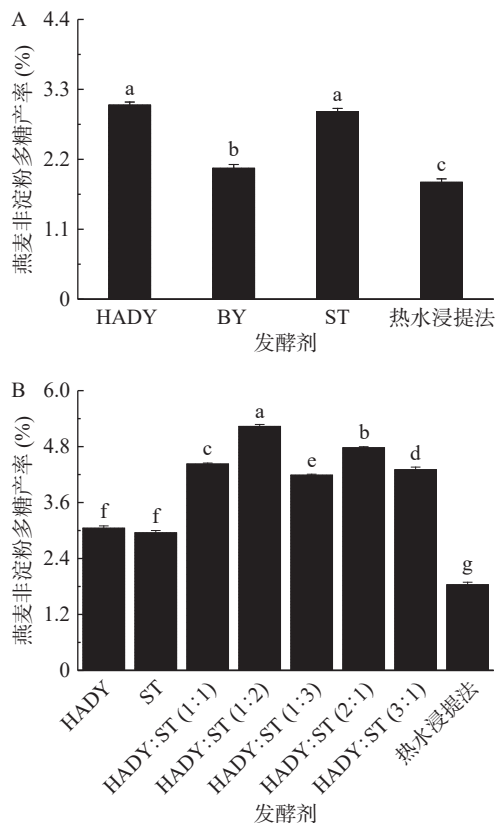


图 1 单菌发酵及混合菌株对燕麦非淀粉多糖产率的影响

Fig.1 Influence of various microbial strains and their respective combination ratios on the yield of ONSP

注: A-单菌发酵; B-混合菌株; 不同小写字母代表显著性差异, $P < 0.05$, 图 2、图 7 同; HADY: 高活性干酵母菌; BY: 酿酒干酵母菌; ST: 嗜热链球菌。

纯化^[29]。因此, 本研究选择 HADY 和嗜热链球菌 (ST) 进行后续实验。

不同菌种组合比例对燕麦非淀粉多糖的产率的影响不同, 如图 1B 所示。当 HADY 与 ST 的比例为 1:2 时, ONSP 的产率最高 (5.23%)。说明在该比例下, 燕麦发酵液中微生物的比例较为平衡, 菌种之间不存在竞争。然而, 当菌种比例较高时, 燕麦非淀粉多糖的产率却有所下降, 可能是由于发酵液中微生物密度过高, 导致营养不足^[14]。因此选用 HADY 与 ST 以 1:2 作为微生物富集燕麦非淀粉多糖的最佳组合。

2.2 微生物发酵富集工艺优化

2.2.1 单因素实验 为了提高燕麦非淀粉多糖的产率, 对料液比、发酵温度、接种量和发酵时间进行了单因素实验, 结果如图 2 所示。

不同料液比对燕麦非淀粉多糖产率的影响如图 2A 所示。燕麦非淀粉多糖的产率随料液比的增加呈现先升高后下降的趋势, 在料液比为 1:16 时达到最高, 为 4.54%。然而料液比的变化并没有显著影响燕麦非淀粉多糖的产率, 这表明料液比并不是影响燕麦非淀粉多糖产率的主要因素, 这与 Ma 等^[30]的研究结果保持一致。因此, 本研究选择燕麦非淀粉多糖产率较高的料液比 1:16 进行后续实验。

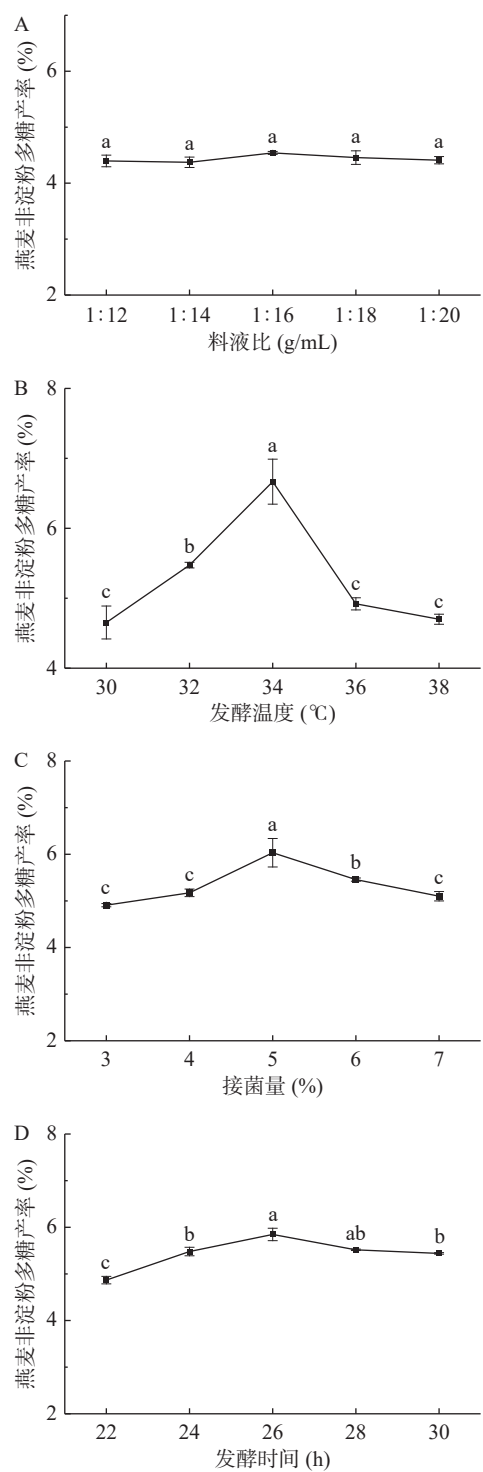


图2 料液比、发酵温度、接菌量及发酵时间对燕麦非淀粉多糖的影响

Fig.2 Effects of feed-to-liquid ratio, fermentation temperature, bacterial inoculum and fermentation time on non-starch polysaccharides of oats

微生物需合适的温度进行繁殖,当温度过低或过高时,影响微生物的酶生成活性和新陈代谢,抑制微生物的生长。从图 2B 中可以看出,发酵温度的变化对燕麦非淀粉多糖的产率具有显著影响($P<0.05$)。在超过 34 °C 时,燕麦非淀粉多糖的产率显著下降($P<0.05$)。Li 等^[31]的研究表明,菌种处在最适生长温度时具有最高的存活率,进而可以保证更好的发酵

质量。结果表明,高温或低温均不适合 HADY 与 ST 的发酵,因此选用 34 °C 为最佳发酵温度。

燕麦非淀粉多糖的产率随着接菌量的增加呈现先升高再下降的趋势(图 2C),在 5% 时达到最高(6.03%),这与茆鑫等^[32]的研究结果保持一致。产率增加的原因可能是菌种数量增加导致微生物代谢活动增强,以及还原糖和蛋白质等营养物质的利用率提高。此外,复杂的酶系统在不消耗多糖的情况下分解碳水化合物,从而释放出更多的非淀粉多糖,最终提高了产率^[15]。然而,当接菌量超过 5% 时,燕麦非淀粉多糖的产率会显著下降。这种下降可能是由于菌落密度增加导致微生物之间对有限养分和空间的竞争加剧所致^[32]。因此,本研究的最佳接菌量为 5%。

不同发酵时间对燕麦非淀粉多糖产率的影响如图 2D 所示。燕麦非淀粉多糖的产率随着发酵时间的延长而提高,在 26 h 时达到拐点。26 h 后,燕麦非淀粉多糖的产率开始下降,可能是由于营养供应不足和燕麦非淀粉多糖的消耗大于产生量。因此,本研究选择发酵时间为 26 h。

根据单因素实验,当料液比为 1:16,接菌量为 5%,在 34 °C 下发酵 26 h 时,燕麦非淀粉多糖的产率最高。其中,发酵时间、接菌量和发酵温度对燕麦非淀粉多糖的产率有显著影响。因此,选择发酵温度(32、34 和 36 °C)、接菌量(4%、5% 和 6%)和发酵时间(24、26 和 28 h)进行响应面优化。

2.2.2 响应面试验优化 在单因素实验的基础上,采用响应面试验考察接菌量、发酵时间和发酵温度对燕麦非淀粉多糖产率的影响。结果如表 3 所示,方差分析如表 4 所示。模型的 F 值为 172.29, $P<0.0001$; $R^2=0.9955$; $R^2_{adj}=0.9897$,说明模型具有显著性。此外,失拟项不显著($P>0.05$),说明预测模型与回归方程实测值拟合较好。另外, A, C, A^2 , B^2 , C^2 为显著项,而 B, AB, AC, BC 表现出不显著。对响应面

表 3 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 3 Box-Behnken experimental design and results

试验号	A发酵温度	B接菌量	C发酵时间	燕麦非淀粉多糖产率(%)
1	-1	-1	0	7.39
2	1	-1	0	7.37
3	-1	1	0	7.21
4	1	1	0	7.35
5	-1	0	-1	7.11
6	1	0	-1	7.38
7	-1	0	1	7.37
8	1	0	1	7.43
9	0	-1	-1	7.32
10	0	1	-1	7.15
11	0	-1	1	7.34
12	0	1	1	7.41
13	0	0	0	8.59
14	0	0	0	8.71
15	0	0	0	8.63
16	0	0	0	8.52
17	0	0	0	8.66

表 4 响应面二次回归方程模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance of response surface quadratic regression equation models

变异来源	平方和	自由度	F值	P值	R ²	R ² _{adj}	显著性
回归模型	6.10	9	172.29	<0.0001	0.9955	0.9897	**
A	0.0253	1	6.43	0.0389			*
B	0.0113	1	2.86	0.1348			NS
C	0.0435	1	11.05	0.0127			*
AB	0.0064	1	1.63	0.2430			NS
AC	0.0110	1	2.80	0.1381			NS
BC	0.0144	1	3.66	0.0974			NS
A ²	1.71	1	434.36	<0.0001			**
B ²	1.81	1	458.55	<0.0001			**
C ²	1.85	1	469.11	<0.0001			**
残差	0.0276	7					
失拟项	0.0069	3	0.4433	0.7351			NS
误差项	0.0207	4					
总和	6.13	16					

注:表中“**”代表极显著性差异, $P<0.01$; “*”代表显著性差异, $P<0.05$; “NS”代表无显著性差异, $P>0.05$ 。

回归模型进行二次响应面回归分析,得到以下多元二次模型:

$$Y=8.62+0.06A-0.04B+0.07C+0.04AB-0.05AC+0.06BC-0.64A^2-0.66B^2-0.66C^2。$$

利用 Design-Expert 软件可以得出,燕麦非淀粉多糖的最佳提取工艺为接菌量 5.05%、在 34.08 °C 下发酵 25.92 h,此时预测燕麦非淀粉多糖的产率为 8.60%。根据实际操作进行修整,在接菌量 5.00%, 34.00 °C 下发酵 26.00 h,实际测定的燕麦非淀粉多糖的产率为 8.60%±0.04%。

2.3 理化性质结果分析

燕麦非淀粉多糖主要由碳水化合物、蛋白质和水组成。ONSP1 和 ONSP2 的总碳水化合物、蛋白质和含水量见表 5。据报道,多糖中的游离蛋白可能会干扰其结构和免疫刺激活性。使用微生物发酵富集后的 ONSP1 蛋白质含量显著降低($P<0.01$),说明微生物发酵辅助提取法对蛋白质的去除能力更强,微生物发酵后 ONSP1 的蛋白质含量也证明了微生物发酵辅助提取法的纯化效果。此外,ONSP1 和 ONSP2 中蛋白质含量的差异也对免疫刺激活性产生了影响,这与 Cao 等^[33]的研究结果一致,脱蛋白后的

表 5 ONSP1 和 ONSP2 的产率和化学成分

Table 5 Extraction yield and chemical composition of ONSP1 and ONSP2

指标	ONSP1	ONSP2	显著性
产率(%)	8.60±0.04	1.83±0.05	****
β-葡聚糖含量(%)	53.81±1.14	47.26±1.27	***
总碳水化合物含量(%)	76.90±2.38	83.17±4.26	*
蛋白质含量(%)	3.98±0.15	7.40±0.06	***
水分含量(%)	10.34±0.89	9.00±0.06	NS

注:表中“****”代表 $P<0.0001$; “***”代表 $P<0.001$; “**”代表 $P<0.01$; “*”代表 $P<0.05$; “NS”代表 $P>0.05$,表6同。

藜麦非淀粉多糖表现出更好的免疫刺激活性。

2.4 结构表征

2.4.1 红外光谱分析 如图 3 所示,红外光谱分析深入阐明了 ONSP1 和 ONSP2 中存在的官能团。光谱显示了表明多糖结构中各种官能团特征的独特吸收带。

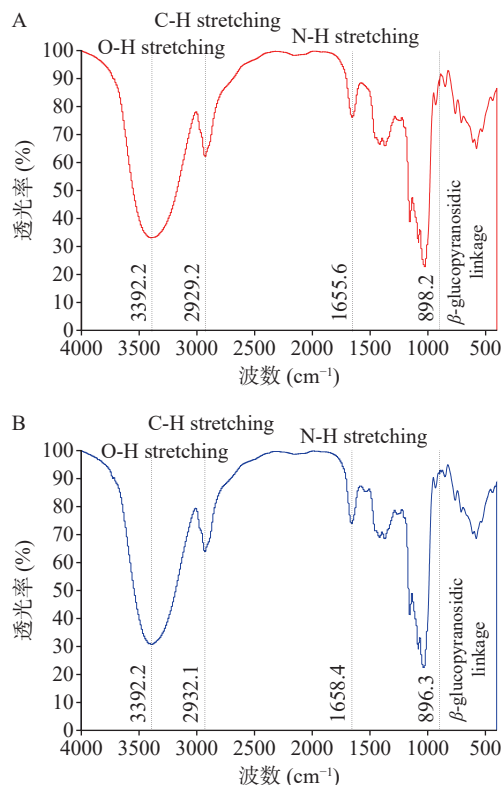


图 3 燕麦非淀粉多糖的红外光谱
Fig.3 Infrared spectra of ONSP
注: A-ONSP1; B-ONSP2。

在 3500~3100 cm^{-1} 范围内的 3434.22 cm^{-1} 和 3392.69 cm^{-1} 处观察到了宽而强的吸光带,表明多糖结构中存在羟基,这是多糖具有广泛氢键能力的标志^[34]。此外,位于 3000~2800 cm^{-1} 区域范围的 2893.01 cm^{-1} 和 2928.76 cm^{-1} 处的吸收峰分别归因于甲基和亚甲基的 C-H 伸展振动^[35]。在更具体的 1644~1658 cm^{-1} 区域, 1650.78 cm^{-1} 和 1654.24 cm^{-1} 处的微弱吸收带表明,β-D-葡聚糖样品中蛋白质含量较少,表明存在酰胺连接^[36]。跨度 1350~1000 cm^{-1} 的区域有 1158.64 cm^{-1} 、1154.31 cm^{-1} 、1080.13 cm^{-1} 、1030.68 cm^{-1} 和 1026.27 cm^{-1} 的吸收带,这些吸收带通常与 C-H 弯曲振动有关,进一步支持了燕麦非淀粉多糖结构^[37]。值得注意的是,1000~1074 cm^{-1} 区域突出显示了 1030.68 cm^{-1} 和 1026.27 cm^{-1} 处的吸收,证实了 ONSP1 和 ONSP2 中存在葡聚糖部分^[38]。此外,还在 895.98 cm^{-1} 处发现了 β-葡萄糖苷键的特征信号,从而证实了多糖中 β-吡喃葡萄糖结构。

2.4.2 单糖组成和分子量 标准品、ONSP1 和 ONSP2 的单糖组成如图 4A~图 4C 和表 6 所示。可以看出,ONSP1 和 ONSP2 均由葡萄糖、阿拉伯糖和

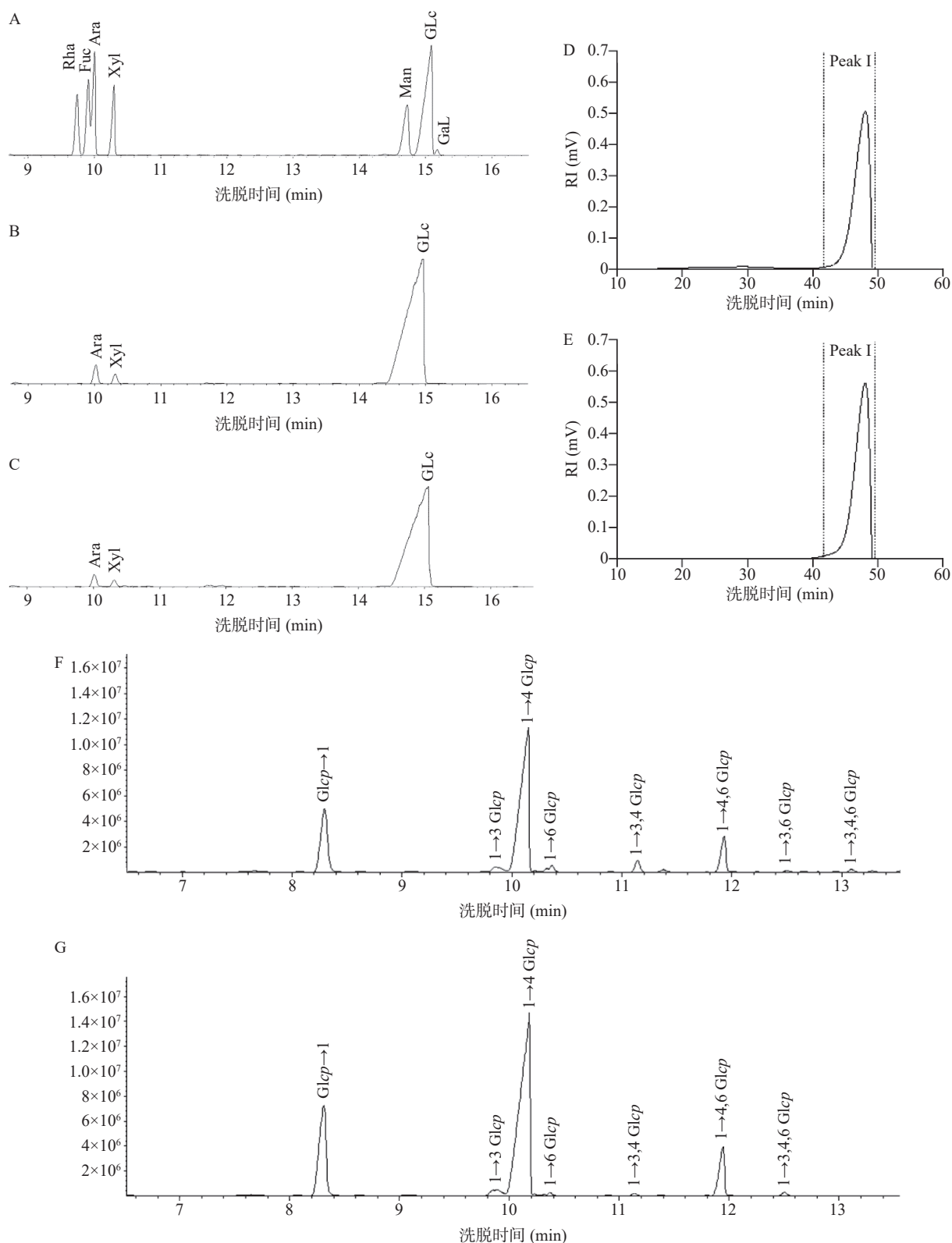


图 4 燕麦非淀粉多糖的单糖组成、分子量和链接模式

Fig.4 Monosaccharide composition, molecular weight, and linkage pattern of ONSP

注: A: 燕麦非淀粉多糖标准品单糖组成; B: ONSP1 单糖组成; C: ONSP2 单糖组成; D: ONSP1 分子量; E: ONSP2 分子量; F: ONSP1 连接方式; G: ONSP2 连接方式。

木糖组成。经过发酵的 ONSP1 中阿拉伯糖和木糖的含量有所提高, 葡萄糖含量略微下降。同时也有研究表明, 木糖与阿拉伯糖占比较高的多糖对 RAW264.7 细胞具有更强的免疫刺激活性^[39]。

多糖的分子量是影响多糖生物活性的重要因

素^[40]。采用多角度激光散射技术的高效粒径排除色谱(HPSEC)对传统热水浸提法和微生物发酵辅助提取法提取的 ONSP 的分子量分布进行了测定。ONSP 的分子量如图 4D~图 4E 和表 6 所示。ONSP1 和 ONSP2 的分子量分别为 47.2 kDa 和 53.2 kDa,

表 6 ONSP1 和 ONSP2 的单糖分析、分子量、回旋半径

Table 6 Monosaccharide analysis, average molecular weight, radius of gyration for gyration of ONSP1 and ONSP2

指标	ONSP1	ONSP2	显著性
阿拉伯糖(%)	4.43±0.35	3.15±0.25	NS
木糖(%)	2.23±0.25	1.34±0.21	NS
葡萄糖(%)	93.34±0.73	95.52±0.45	NS
分子量(kDa)	47.20±1.7	53.20±2.50	**
回旋半径(cm ³ /g)	66.60±1.20	71.60±1.80	**

这种差异可能因为 ONSP 的提取方法不同^[41]。同时,本研究表明,低分子量的 ONSP1 对 RAW264.7 细胞具有更强的免疫刺激活性,这与 AZMI 等^[42]的研究一致。此外,我们还计算了光谱回旋半径。ONSP1 的回旋半径值为 66.60±1.20 cm³/g, ONSP2 的回旋半径值为 71.60±1.80 cm³/g,由此可见,提取方式的改变会影响燕麦非淀粉多糖的分子量,进而影响其免疫刺激活性。

2.4.3 甲基化分析 ONSP 的甲基化分析结果如表 7 和图 4F~图 4G 所示。ONSP1 具有多种糖苷键,包括 1→Glc_p、1→3Glc_p、1→4Glc_p、1→6Glc_p、1→3,4Glc_p、1→4,6Glc_p、1→3,6Glc_p 和 1→3,4,6Glc_p,而与 ONSP1 相比,ONSP2 缺少 1,3,4,6→Glc_p 连接。研究表明,支链较多的多糖具有更强的免疫刺激活性^[43]。本研究的后续实验中也发现支链相对较多的 ONSP1 免疫活性强于 ONSP2。

表 7 ONSP1 和 ONSP2 的甲基化分析和糖苷键

Table 7 Methylation analysis and deduced glycosidic linkages of ONSP1 and ONSP2

洗脱时间(min)	糖苷键	ONSP1峰面积(%)	ONSP2峰面积(%)
8.30	1→Glc _p	22.52	23.32
9.85	1→3Glc _p	1.87	1.69
10.15	1→4Glc _p	61.85	64.26
10.37	1→6Glc _p	0.84	0.36
11.14	1→3,4Glc _p	2.84	0.43
11.93	1→4,6Glc _p	8.94	9.31
12.50	1→3,6Glc _p	0.42	0.63
13.09	1→3,4,6Glc _p	0.73	—

2.5 免疫活性

2.5.1 细胞增殖和一氧化氮(NO)生成试验 植物多糖可能通过促炎因子分泌、NO 分泌、NF-κB 信号通路、免疫系统路径调节机体炎症^[44]。巨噬细胞通常被认为是抵御宿主包括癌症在内的病原体的重要免疫细胞^[45]。本研究测定了 ONSP1 和 ONSP2 对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的免疫刺激作用。用不同浓度的 ONSP1 和 ONSP2 处理 RAW264.7 细胞 24 h,然后使用 WST-1 试验评估细胞增殖活性,并与 RPMI 进行比较,RAW264.7 细胞的增殖水平强于 RPMI 处理组。当浓度增加时,添加了 ONSP1 的细胞增殖活性呈上升趋势,而 ONSP2 呈下降趋势(图 5A)。此外,还测量了 RAW264.7 细胞在不同浓

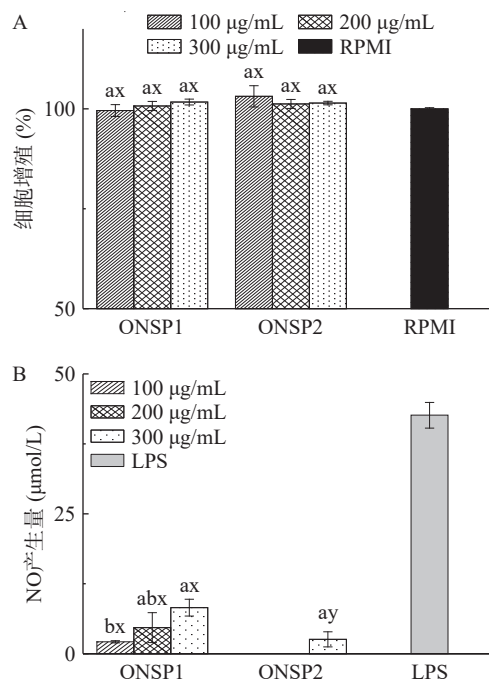


图 5 ONSP1 和 ONSP2 的细胞增殖和一氧化氮(NO)产生
Fig.5 Cell proliferation and nitric oxide production (NO) of ONSP1 and ONSP2

注: A: 细胞增殖; B: NO 产生量; 字母 x 和 y 表示不同样本处理间的显著差异 ($P < 0.05$), 字母 a 和 b 表示不同样品浓度之间显著性差异 ($P < 0.05$), 图 6 同。

度的 ONSP1 和 ONSP2 处理过程中产生的一氧化氮。一氧化氮(NO)是受刺激的巨噬细胞产生的一种分子,它对病原体和癌细胞具有强大的细胞毒性作用,是参与调节各种生理过程的细胞内信使^[46]。本研究结果显示,ONSP1 的 NO 量与剂量呈正相关,到 300 µg/mL 时 NO 产生量为 8.23 µmol/L。ONSP2 仅在 300 µg/mL 时有 NO 产生,表明 ONSP1 更有效增强 RAW264.7 细胞的刺激,且在测试浓度下对细胞无毒性影响。与 ONSP2 相比,用 ONSP1 处理 RAW264.7 细胞会产生更多的 NO,这表明 ONSP1 具有更强的免疫刺激活性(图 5B)。

2.5.2 iNOS 和细胞因子的表达 在巨噬细胞介导的免疫反应领域,诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在一氧化氮(NO)的生物合成中发挥着关键作用,而 NO 是宿主防御机制中的一种关键效应分子^[47]。iNOS 的基因表达与各种细胞因子一样,是巨噬细胞活化和炎症反应的证明^[48]。本研究利用实时 PCR 分析,定量评估了用 ONSP1 和 ONSP2 处理 RAW264.7 细胞后 iNOS 和一系列细胞因子(包括 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-10)的 mRNA 表达水平。结果显示,在浓度为 300 µg/mL 的 ONSP1 处理组中,iNOS 的表达显著上调,超过了在 ONSP2 处理组中观察到的水平 ($P < 0.05$)。iNOS 基因表达的增强与观察到的 NO 生成的增加相一致,从而确立了 iNOS 活性与受刺激的 RAW264.7 细胞中 NO 合成之间的直接相关性^[49]。此外,用 300 µg/mL ONSP1 处理后,促炎细

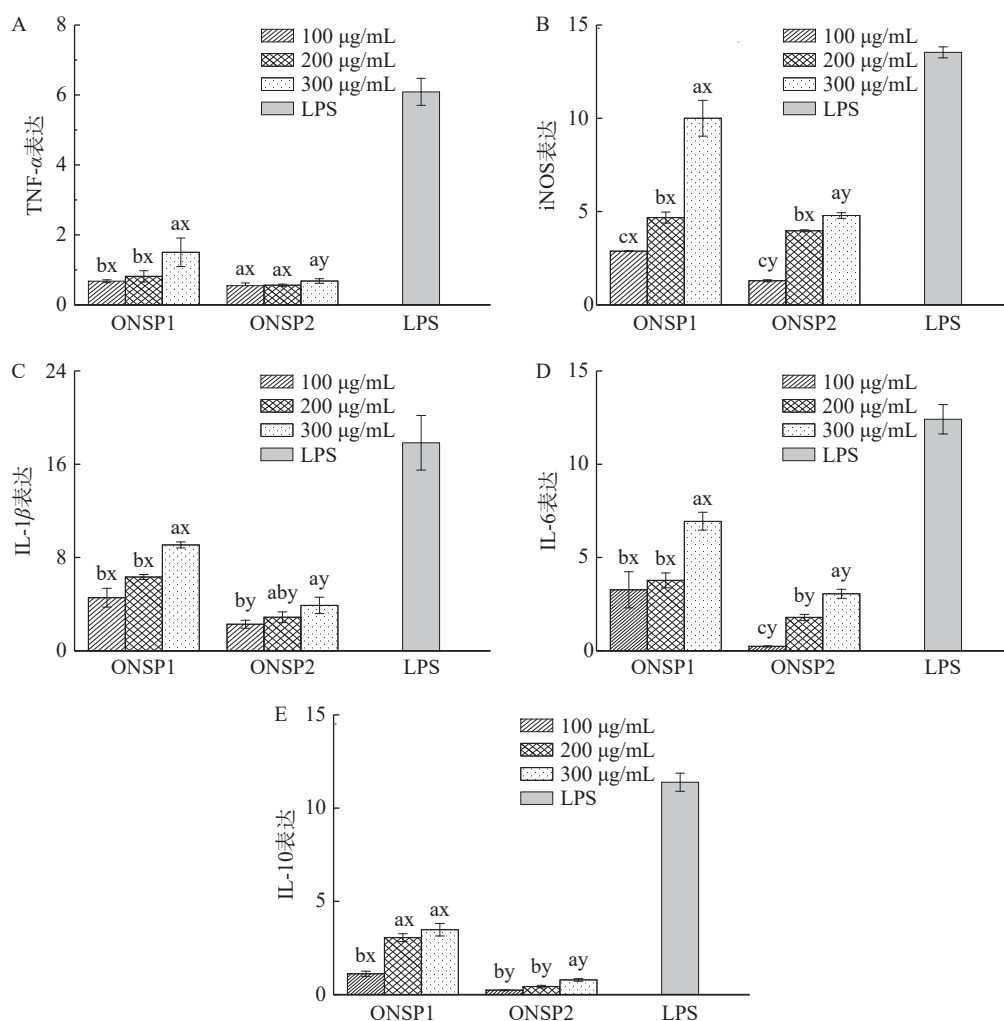


图 6 ONSP1 和 ONSP2 的细胞因子表达的差异

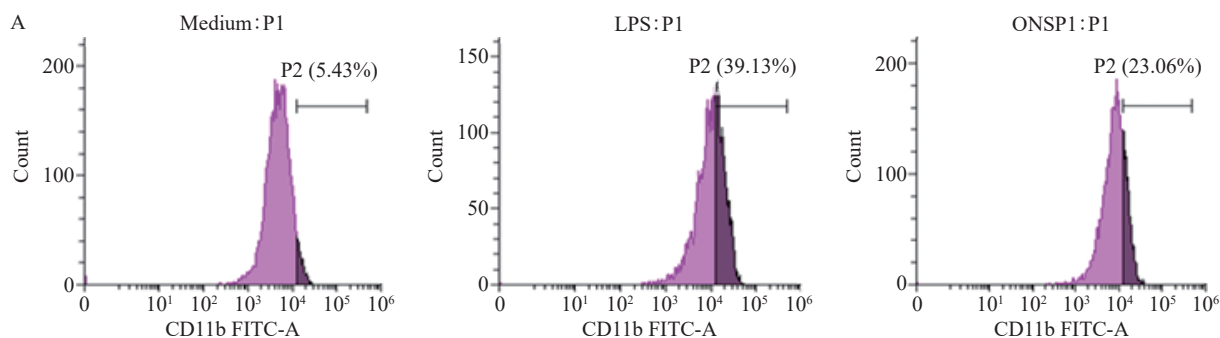
Fig.6 Differences of expression of cytokines between ONSP1 and ONSP2

胞因子(TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6)和抗炎细胞因子(IL-10)的 mRNA 表达明显升高,这表明促炎反应很强,同时还有一种内在的调节机制来抑制炎症(图 6A~图 6E)。促炎细胞因子的大量诱导强调了这些分子在协调抵御传染性病原体 and 异常细胞方面的重要作用。相反,IL-10 的上调则表明反调节途径被激活,旨在减轻未受控制的炎症反应可能造成的组织损伤^[50]。总之,这些研究结果证明了通过菌种联用发酵提取的 ONSP1 在通过上调 iNOS 和细胞因子基因表达来增强 NO 的产生,从而增强 RAW264.7 巨噬细胞的活化方面具有较好的免疫刺激能力。ONSP1 和 ONSP2 的差别表明提取方法对 ONSP 的免疫刺

激活性调节特性的关键影响,可以看出,使用微生物发酵富集的 ONSP1 具有更强的免疫刺激活性。

2.5.3 流式细胞术分析 本研究采用流式细胞术评估了 ONSP1 和 ONSP2(300 $\mu\text{g/mL}$)处理 RAW264.7 巨噬细胞 24 h 后,巨噬细胞表面生物标志物 CD11b 和 CD40 的表达情况。之所以选择这些生物标志物,是因为它们在免疫反应调节中具有公认的作用:CD11b 是巨噬细胞活化的生物标志物,广泛存在于包括粒细胞和自然杀伤细胞在内的各种免疫细胞中;CD40 是一种调控分子,已知可通过 T 细胞活化增强 IL-2 和 TNF- α 的分泌^[51]。

流式细胞分析显示了这些生物标志物的不同表



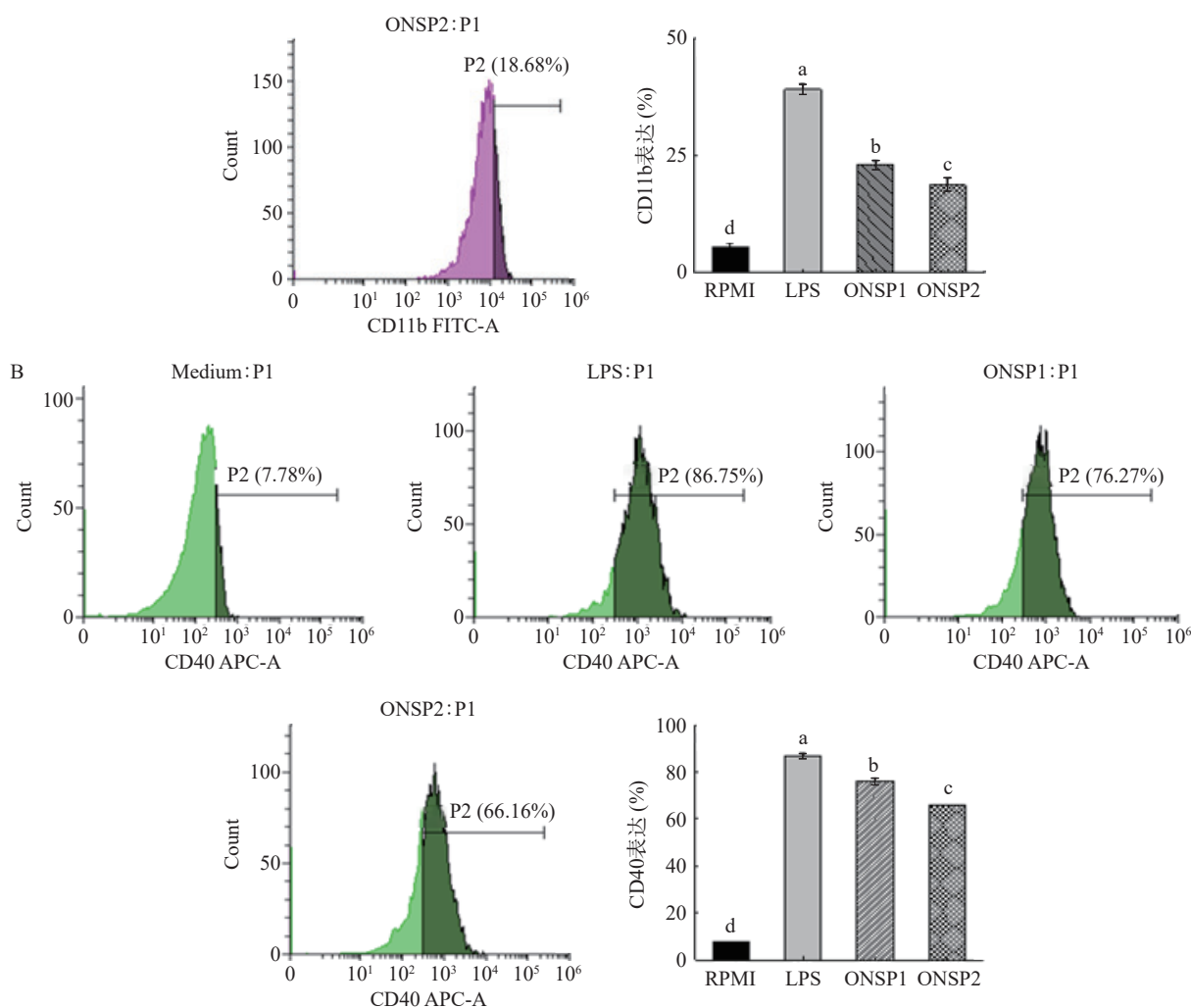


图7 ONSP1和ONSP2处理24 h后CD11b和CD40在RAW264.7细胞中的表达水平

Fig.7 Expression levels of CD11b and CD40 on RAW 264.7 cells after 24 h of treatment with ONSP1 and ONSP2

注: A: CD11b 表达; B: CD40 表达。

达模式。具体来说,ONSP2的CD11b和CD40的表达水平分别为18.68%和66.16%。如图7所示,ONSP1的CD11b和CD40表达水平分别达到23.06%和76.27%,显著提高了这些生物标志物的表达水平($P<0.05$)。ONSP1的免疫调节功效与阳性对照脂多糖(LPS)的功效相同,突出其强大的刺激能力。

巨噬细胞活化伴随着CD11b和CD40表达的升高,本研究的发现证实了这一观点,即巨噬细胞活化会导致这些生物标志物的增加。之前的研究阐明,黄芪多糖能显著提高CD40的表达,并提高包括IL-1 β 、IL-6、IL-10和TNF- α 的一系列炎症细胞因子的表达,进一步肯定了多糖诱导的巨噬细胞活化在协调炎症反应中的关键作用^[52]。通过比较ONSP1和ONSP2对CD11b和CD40影响,可以发现ONSP1的免疫刺激效果更好。

3 结论

本研究所用高活性干酵母菌和嗜热链球菌按照1:2的比例组合发酵辅助提取燕麦非淀粉多糖的最佳参数为接菌量5.00%,发酵温度34.00℃,发酵时

间26.00 h。与传统热水浸提法(ONSP2)相比,微生物发酵辅助提取法(ONSP1)得到的燕麦非淀粉多糖产率显著提高($P<0.05$)。同时,ONSP1的分子量相对较低,且具有较低的碳水化合物和蛋白质含量、较高的阿拉伯糖和木糖含量,分支链更多。此外,我们发现ONSP1和ONSP2均能刺激RAW264.7细胞的产生NO,但ONSP1表现出更强的免疫刺激活性。然而,本研究只在体外对ONSP免疫活性进行探究,在生物体内ONSP是否具有免疫活性还有待于进一步研究,但这些发现仍为研究ONSP的结构特性和对免疫刺激活性的影响提供了有价值的见解。

© The Author(s) 2025. 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] HU H, LIN H, XIAO L, et al. Impact of native form oat β -glucan on the physical and starch digestive properties of whole oat bread[J]. *Foods*, 2022, 11(17): 2622.

- [2] WANG X, LI L, YUAN G, et al. Interleukin (IL)-22 in common carp (*Cyprinus carpio* L.): Immune modulation, antibacterial defense, and activation of the JAK-STAT signaling pathway[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 131: 796–808.
- [3] ZHANG J, WEN C, CHEN M, et al. Antioxidant activities of *Sagittaria sagittifolia* L. polysaccharides with subcritical water extraction[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 134: 172–179.
- [4] ZHANG J, WEN C, GU J, et al. Effects of subcritical water extraction microenvironment on the structure and biological activities of polysaccharides from *Lentinus edodes*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 123: 1002–1011.
- [5] LIU Y, SUN Y, HUANG G. Preparation and antioxidant activities of important traditional plant polysaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 111: 780–786.
- [6] ZHANG J, WEN C, QIN W, et al. Ultrasonic-enhanced subcritical water extraction of polysaccharides by two steps and its characterization from *Lentinus edodes*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 118: 2269–2277.
- [7] LI D, CHEN M, MENG X, et al. Extraction, purification, structural characteristics, bioactivity and potential applications of polysaccharides from *Avena sativa* L: A review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 265: 130891.
- [8] KOVITVADHI A, CHUNDANG P, TIRAWAT-TANAWANICH C, et al. Effects of dietary supplementation with different levels and molecular weights of fungal β -glucan on performances, health and meat quality in broilers[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2019, 32(10): 1548–1557.
- [9] JANSSEN F, WOUTERS A G B, MEEUS Y, et al. The role of non-starch polysaccharides in determining the air-water interfacial properties of wheat, rye, and oat dough liquor constituents[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 105: 105771.
- [10] TIAN L, SCHOLTE J, SCHEURINK A J W, et al. Effect of oat and soybean rich in distinct non-starch polysaccharides on fermentation, appetite regulation and fat accumulation in rat[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 140: 515–521.
- [11] AKTAS-AKYILDIZ E, SIBAKOV J, NAPPA M, et al. Extraction of soluble β -glucan from oat and barley fractions: Process efficiency and dispersion stability[J]. *Journal of Cereal Science*, 2018, 81: 60–68.
- [12] HUSSAIN A, BOSE S, WANG J H, et al. Fermentation, a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines[J]. *Food Research International*, 2016, 81: 1–16.
- [13] PESSÔA M G, VESPERMANN K A C, PAULINO B N, et al. Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(2): 319–339.
- [14] SUN W, LABRECHE F, KOU X H, et al. Efficient extraction, physiochemical, rheological properties, and antioxidant activities of polysaccharides from *Armeniaca vulgaris* Lam[J]. *Process Biochemistry*, 2022, 118: 360–369.
- [15] YUAN S, XU C, XIA J, et al. Extraction of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* by fermentation with response surface methodology[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(12): 6660–6669.
- [16] WANG Q, HAO L, ZHANG A, et al. Extraction and characterization of polysaccharides from *Schisandra sphenanthera* fruit by *Lactobacillus plantarum* CICC 23121-assisted fermentation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 259: 129135.
- [17] WANG H, WANG J, MUJUMDAR A S, et al. Effects of postharvest ripening on physicochemical properties, microstructure, cell wall polysaccharides contents (pectin, hemicellulose, cellulose) and nanostructure of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 118: 106808.
- [18] WANG X, HU K, CHEN Y, 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.
- [19] WU J, JIN S, WU S, et al. Effect of filamentous fungi fermentation on the extractability and physicochemical properties of β -glucan in oat bran[J]. *Food Chemistry*, 2018, 254: 122–128.
- [20] CLIMOVA A, IBRAHIM M N G, SALAMAHINA A, et al. Application of extracted β -glucan from oat for β -carotene encapsulation[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 58(7): 2641–2650.
- [21] PONOMAREVA S A, GOLOVCHENKO V V, PATOVA O A, et al. Comparative analysis of the spectrophotometric methods of the protein amount determination in the pectic polysaccharide samples[J]. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2015, 41(2): 133–139.
- [22] YUE F, ZHANG J, XU J, et al. Effects of monosaccharide composition on quantitative analysis of total sugar content by phenol-sulfuric acid method[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 963318.
- [23] PANG X, WANG H, GUAN C, et al. Impact of molecular weight variations in dendrobium officinale polysaccharides on antioxidant activity and anti-obesity in caenorhabditis elegans[J]. *Foods*, 2024, 13(7): 1040.
- [24] GALERMO A G, NANDITA E, BARBOZA M, et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry approach for determining glycosidic linkages[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(21): 13073–13080.
- [25] ERNST L, WERNER A, WEFERS D. Influence of ultrasonication and hydrolysis conditions in methylation analysis of bacterial homoexopolysaccharides[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 308: 120643.
- [26] YELITHAO K, SURAYOT U, LEE C, et al. Studies on structural properties and immune-enhancing activities of glycomanans from *Schizophyllum commune* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 218: 37–45.
- [27] SURAYOT U, HUN L J, KANONGNUCH C, et al. Structural characterization of sulfated arabinans extracted from *Cladophora glomerata* Kützinger and their macrophage activation[J]. *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, 80(5): 972–982.
- [28] EOM S J, KIM T W, KIM S, et al. Immune-enhancing effects of polysaccharide extract of by-products of Korean liquor fermented by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 188: 245–252.
- [29] WANG Z, SUN Q, FANG J, et al. The anti-aging activity of *Lycium barbarum* polysaccharide extracted by yeast fermentation: *In vivo* and *in vitro* studies[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 209: 2032–2041.
- [30] MA N, LI R, YOU S, et al. Fermentation enrichment, structural characterization and immunostimulatory effects of β -glucan from Quinoa[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 267: 131162.
- [31] LI L, WANG L, FAN W, et al. The application of fermentation technology in traditional chinese medicine: A review[J]. *The*

American Journal of Chinese Medicine, 2020, 48(4): 899–921.

[32] 茆鑫, 郑剑斌, 李广耀, 等. 响应曲面法优化刺五加-五味子混菌发酵工艺的研究[J]. 食品科技, 2023, 48(9): 57–64. [MAO X, ZHENG J B, LI G Y, et al. Response surface methodology for optimizing the fermentation process of *acanthopanax senticosus* and *schisandra chinensis* with mixed bacteria[J]. *Food Science and Technology*, 2023, 48(9): 57–64.]

[33] CAO R A, MA N, SUBRAMANIAN P, et al. Structural elucidation and immunostimulatory activities of quinoa non-starch polysaccharide before and after deproteinization[J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2021, 30(6): 11–13.

[34] 高泽鑫. 苏云金芽孢杆菌的多糖发酵、结构解析及其功能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2024. [GAO Z X. Study on polysaccharide fermentation, structural elucidation and function of *Bacillus thuringiensis*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2024.]

[35] CAO R A, MA N, PALANISAMY S, et al. Structural elucidation and immunostimulatory activities of quinoa non-starch polysaccharide before and after deproteinization[J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2022, 30(6): 2291–2303.

[36] XIE J, REN Y, XIAO Y, et al. Interactions between tapioca starch and *Mesona chinensis* polysaccharide: Effects of urea and NaCl[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 111: 106268.

[37] PÉREZ-BASSART Z, FABRA M J, MARTÍNEZ-ABAD A, et al. Compositional differences of β -glucan-rich extracts from three relevant mushrooms obtained through a sequential extraction protocol[J]. *Food Chemistry*, 2023, 402: 134207.

[38] LIU H, LI Y, YOU M, et al. Comparison of physicochemical properties of β -glucans extracted from hull-less barley bran by different methods[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 182: 1192–1199.

[39] ZHAO Y, WANG N, PANG S F, et al. In-situ micro-FTIR spectroscopic observation on the hydration process of *Poria cocos*[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2016, 164: 61–66.

[40] CHEN J, LI L, ZHOU X, et al. Structural characterization and α -glucosidase inhibitory activity of polysaccharides extracted from Chinese traditional medicine *Huidouba*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 815–819.

[41] SRINIVASAN A, EKAMBARAM S P, PERUMAL S S, et al. Chemical characterization and immunostimulatory activity of phenolic acid bound arabinoxylans derived from foxtail and barnyard millets[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(2): e13116.

[42] AZMI A F M N, MUSTAFA S, HASHIM D M D, et al. Prebiotic activity of polysaccharides extracted from *Gigantochloa Levis* (Buluh beting) shoots[J]. *Molecules*, 2012, 17(2): 1635–1651.

[43] LEE J, LI C, SURAYOT U, et al. Molecular structures, chemical properties and biological activities of polysaccharide from *Smilax glabra* rhizome[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 1726–1733.

[44] YANG B, ZHAO M, SHI J, et al. Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp[J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(2): 685–690.

[45] SINGH R, DE S, BELKHEIR A. *Avena sativa* (Oat), a potential nutraceutical and therapeutic agent: An overview[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2013, 53(2): 126–144.

[46] HOU C, CHEN L, YANG L, et al. An insight into anti-inflammatory effects of natural polysaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 153: 248–255.

[47] TAKAHASHI S, SAKAMAKI M, FERDOUSI F, et al. Ethanol extract of *aurantiochytrium mangrovei* 18w-13a strain possesses anti-inflammatory effects on murine macrophage RAW264 cells[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1205.

[48] SOOMRO S, MESAİK M A, SHAHEEN F, et al. Inhibitory effects of myrtucommuacetalone 1 (MCA-1) from myrtus communis on inflammatory response in mouse macrophages[J]. *Molecules*, 2019, 25(1): 13.

[49] WANG T, LUO S, QIN H, et al. Hsp90 inhibition renders iNOS aggregation and the clearance of iNOS aggregates by proteasomes requires SPSB2[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 117: 90–98.

[50] KORYTOWSKI W, BAZAK J, FAHEY J, et al. Beneficial effects of inhibiting iNOS activity versus iNOS transcription in anti-tumor photodynamic therapy[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 120: S155.

[51] ARAMSANGTIENCHAI P, RAKSACHUE W, PECHROJ S, et al. The immunomodulatory activity of levan in RAW264.7 macrophage varies with its molecular weights[J]. *Food Bioscience*, 2023, 53: 102721.

[52] WANG X, STORSLEY J, THANDAPILLY S J, et al. Effects of processing, cultivar, and environment on the physicochemical properties of oat β -glucan[J]. *Cereal Chemistry*, 2016, 93(4): 402–408.