

文章编号: 1006-3080(2026)03-0389-10

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20251027001

无柄灵芝子实体多糖的提取工艺优化及抗氧化活性研究

宋雨昕¹, 李蕊¹, 韩伟¹, 周帅², 冯娜²

(1. 华东理工大学药学院, 制药工程与过程化学教育部工程研究中心, 上海市新药设计重点实验室, 上海 200237; 2. 上海市农业科学院食用菌研究所, 国家食用菌工程技术研究中心, 上海 201403)

摘要:采用微波辅助提取方法,以无柄灵芝子实体的多糖含量为评价指标,通过单因素实验考察料液比(无柄灵芝 40 目(380 μm)粉末质量与去离子水体积之比, g/mL ,为表达简略,略去单位)等因素对多糖提取效果的影响;应用 Box-Behnken 响应面法,分析关键参数对多糖含量的影响规律并进行系统性优化。通过测定总还原能力和自由基清除率,研究最优工艺下提取物的体外抗氧化活性。结果表明:无柄灵芝多糖的最优提取条件为:料液比 1:30,微波功率 325 W,提取时间 9 min,浸润时间 30 min,提取 3 次,在该条件下,提取物中多糖含量(质量分数)可达 26.34%,与理论预测值基本一致,相对标准偏差(RSD)低于 0.4%。优化后的无柄灵芝多糖提取工艺操作简单、稳定性好,具有可行性,且提取物具有一定的体外抗氧化活性。该工艺展现出良好的开发潜力。

关键词:无柄灵芝;多糖;微波提取;Box-Behnken 响应面法;抗氧化

中图分类号:R284.2

文献标志码:A

灵芝属(*Ganoderma* spp.)为担子菌门、伞菌纲、多孔菌目、灵芝科,作为我国分布广泛的珍贵药用真菌^[1],其成分多样,包括蛋白质、多糖、萜类、甾类和有机酸等活性成分^[2],其主要成分灵芝多糖(*Ganoderma lucidum* Polysaccharide, GLP)具有较多样的生物活性,在降血糖、降血脂、抗氧化等方面具有潜在的药用价值^[3-5]。无柄灵芝(*Ganoderma sessile*)作为灵芝属的一个物种,虽然在品种鉴定、成分^[6-7]、栽培^[8]和材料应用^[9-10]方面已有研究,但有关其多糖成分的系统研究仍较鲜见。文献[11]揭示无柄灵芝有显著高于赤芝的多糖含量(为赤芝的 1.3 倍),其中野生无柄灵芝 CCMJ4912 的多糖含量(质量分数)达到 1.38%^[11];此外,无柄灵芝栽培菌株 FQ16 的子实体多糖质量浓度亦超过 10 mg/mL ^[12],提示无柄灵芝是一种更具开发潜力的高多糖灵芝新资源。

提取灵芝多糖的方法众多,传统方法有热水浸

提法^[13]和回流法^[14],两种方法虽然操作简单,但均需较长的提取时间和较高的提取温度,且多糖得率低。近年来发展的酸碱提取法^[15]、酶法^[16]、超声提取法^[17]可以有效提高多糖得率,但条件控制严格,易造成多糖的水解和糖苷键的断裂,影响多糖活性^[17]。相比之下,微波辅助提取法^[18]利用微波的热效应加速细胞内目标成分的浸出,高效、节能,对环境更加友好,可以在提高有效成分利用率的同时减少生产成本^[19],在中药材和天然产物提取领域应用广泛。

灵芝多糖作为一种天然的抗氧化剂,其活性机制主要通过增强抗氧化酶作用、清除自由基、减少脂质过氧化来展现^[20]。相较于多数合成抗氧化剂,灵芝多糖的肝毒性风险更低、生物安全性更高,优势显著。目前,抗氧化评价方法主要依托体内与体外两大体系^[21]。与需要构建生物模型的体内评价相比,体外评价方法体系简单、操作便捷,因而应用更广泛。

收稿日期: 2025-10-27

基金项目: 国家自然科学基金(82060645);上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科创字(2018)第 1-1 号]

作者简介: 宋雨昕(2000—),女,江苏人,硕士生,主要研究方向为中药活性成分的提取分离及纯化。E-mail: Y30231158@mail.ecust.edu.cn

通信联系人: 韩伟, E-mail: Whan@ecust.edu.cn

引用本文: 宋雨昕,李蕊,韩伟,等.无柄灵芝子实体多糖的提取工艺优化及抗氧化活性研究[J].华东理工大学学报(自然科学版),2026,52(3): 389-398.

Citation: SONG Yuxin, LI Rui, HAN Wei, et al. Optimization of the Extraction Process and Antioxidant Activity Study of Polysaccharides from *Ganoderma sessile* Fruiting Body[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2026, 52(3): 389-398.

然而,任何单一方法均存在局限性。为克服此问题,多种方法联用,同时创新性地引入单因素方差分析及事后检验进行数据分析^[22],可以精确鉴别不同浓度组间抗氧化活性的统计学差异,提供剂量效应关系的量化证据,显著提升评价的系统性与科学性。

鉴于无柄灵芝在多糖含量上的优势^[11-12, 23]和多糖领域的研究空白,有必要对其提取工艺进行优化,并进一步发掘其活性潜力。本文以无柄灵芝为研究对象,将多糖含量作为评价指标,采用微波辅助提取方法,结合 Plackett-Burman 实验和 Box-Behnken 响应面模型探索合适的提取条件。多方法联用并结合统计学分析提取物的体外抗氧化活性,旨在为灵芝新资源的开发和利用提供数据支持。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UV1901PC 型紫外-可见分光光度计,上海奥析科学仪器有限公司; BJ-300A 型粉碎机,拜杰科技有限公司; ER-692 型微波提取装置,中国电子器件工业总公司; TDZ5-WS 型离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; SB2000 型水浴锅,上海爱朗仪器有限公司; 梅特勒 AL104 型分析天平,北京莱博瑞杰科技有限公司。

1.2 材料

无柄灵芝菌株,采自美国佛罗里达州 Lettuce Lake Park,保藏于上海市农业科学院食用菌所,其子实体材料由上海市农业科学院周帅副研究员栽培提供;去离子水,华东理工大学自制。

分析级试剂:无水乙醇、浓硫酸、无水葡萄糖、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 国药集团化学试剂有限公司; 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS), 上海新铂化学技术有限公司; 蒽酮、L-抗坏血酸 (Vc), 上海源叶生物科技有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, 上海凌峰化学试剂有限公司; H_2O_2 、 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 上海泰坦科技股份有限公司; $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ 、 FeCl_3 , 上海麦克林生化科技有限公司。

2 实验方法

2.1 灵芝多糖含量的测定

2.1.1 测定方法的选择 目前应用最为广泛的多糖含量测定方法为蒽酮-硫酸法和苯酚-硫酸法。相比

苯酚-硫酸法,蒽酮-硫酸法线性范围更宽、重现性更好、影响因素更少^[24],且苯酚是一种致癌物,毒性大,使用安全性低。作为更安全有效的测定方法,蒽酮-硫酸法早在 1948 年即被报道用于碳水化合物的测定,在 2020 版《中国药典》中被作为灵芝多糖的含量测定方法,规定灵芝多糖以无水葡萄糖 ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 计,其含量(质量分数)不得少于 0.90%,《保健食品原料目录破壁灵芝孢子粉》亦以同法作出相同标准规定^[25]。因此,本文采用蒽酮-硫酸法测定灵芝多糖的含量。针对该方法在测定时易形成浑浊的问题,前期实验表明,通过适当稀释样品浓度可有效解决,实验结果准确、稳定。

2.1.2 葡萄糖标准溶液的制备 精确称取葡萄糖标准品 100 mg,放入 100 mL 容量瓶中,加去离子水定容,摇匀,取出适量溶液,加水稀释制得质量浓度为 0.25 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。

2.1.3 显色剂的制备 精确称取适量蒽酮标准品,加入质量分数为 80% 的硫酸溶液,配制质量浓度为 1 mg/mL 的蒽酮-硫酸溶液,现配现用。

2.1.4 葡萄糖标准曲线的绘制 精确吸取葡萄糖标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,分别置于 25 mL 比色管中,各加水至 2.0 mL,迅速加入 2.1.3 节配制的蒽酮-硫酸溶液,摇匀,置于冰水中,全部加完后,先在沸水浴中放置 10 min,然后转入冰水中,冷却至室温,取出,以去离子水为空白对照。取比色皿,先用去离子水润洗,再用待测液润洗 2~3 次,按照紫外-可见分光光度法(中国药典通则 0401),于 625 nm 波长处测定吸光度(A)。以 A 为纵坐标,质量浓度(c , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程 $A = 0.0181c + 0.051$,相关系数 $R^2 = 0.9995$ 。曲线具有良好的线性关系,回归效果显著。

2.1.5 供试品溶液的制备 灵芝子实体用粉碎机粗碎,室温下浸泡在适量体积分数为 90% 的乙醇溶液中 2~3 d,过滤后收集残渣阴干。将待处理样品置于 50 °C 的烘箱内,充分烘干,以确保干燥。称取适量干燥后的药材,使用粉碎机将其粉碎处理,收集通过 40 目(380 μm)筛网的细粉,干燥保存以备后续使用。精确称取 1 g 灵芝粉末,转移至三颈烧瓶中,按预定比例加去离子水,使灵芝粉末充分浸泡。设置合适的微波参数进行微波提取,结束后收集提取液,过滤得上清液,浓缩、冻干,得提取物粉末。称取一定质量的提取物,加适量去离子水溶解,得到供试品溶液。

2.1.6 多糖含量的测定 取适量的供试品溶液,置于 25 mL 比色管中,按照 2.1.4 节操作,通过葡萄糖标准

曲线计算得到样品提取物的多糖质量浓度, 则所得多糖质量分数为:

$$w = \frac{cKV}{m \times 10^6} \times 100\%$$

(1)

式中, K 为稀释倍数; V 为溶液体积 (mL); m 为提取物质量 (g)。

2.1.7 精密度实验 精确吸取一定体积的供试品溶液, 按 2.1.4 节方法连续测定吸光度值 6 次, 计算得到相对标准偏差(RSD)为 0.12%, 表明仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性实验 精确吸取一定体积的供试品溶液 6 份, 分别在 0、1、4、8、10、12 h 按 2.1.4 节方法测定吸光度值, 计算得到 RSD 为 1.12%, 表明仪器在 12 h 内稳定性良好。

2.1.9 重复性实验 重复制备 6 份相同的供试品溶液, 按 2.1.4 节方法测定吸光度值, 计算得到 RSD 为 0.94%, 表明该方法重复性好。

2.1.10 加样回收率实验 精确吸取一定体积的供试品溶液, 平行制备 6 份, 分别加入 2.1.2 节制备的葡萄糖标准溶液 0.1 mL, 按 2.1.4 节方法测定吸光度值, 计算得到 RSD 为 2.06%, 表明该方法回收率良好。

2.2 单因素提取实验

为系统评估提取功率、提取时间、浸润时间、提取次数以及料液比(无柄灵芝 40 目(380 μm)粉末质量与去离子水体积之比, g/mL。为表达简略, 下文省去单位)等各因素对提取物多糖含量的影响, 采用单因素实验设计, 每个因素设置 4~5 个水平, 每个实验均平行重复 3 次, 从而明确各因素对提取效果的影响趋势, 并提高实验结果的可靠性与重复性。

2.3 Plackett-Burman 设计实验

在单因素实验中, 由于无柄灵芝各个因素的实验结果均有效, 为进一步确定显著影响因素, 减少后续优化实验的复杂性, 在 Design-Expert 13 软件中进行 Plackett-Burman 设计, 对单因素实验中的料液比(A , g/mL)、提取功率(B , W)、提取时间(C , min)、浸润时间(D , min)、提取次数(E)各选取两个水平(1, -1), 共进行 12 组实验, 每组实验平行重复 3 次, 以多糖含量为响应值进行考察, 各因素水平见表 1。

2.4 Box-Behnken 响应面实验

综合单因素实验和 Plackett-Burman 设计结果, 无柄灵芝实验选择提取时间 (C)、浸润时间 (D) 和提取次数 (E) 为响应面模型的自变量, 固定料液比为 1 : 30、提取功率 325 W。以多糖含量为响应值, 导入 Design-Expert 13 软件进行三因素三水平共 17 组 ($n=3$) 实验的 Box-Behnken 设计, 以优化提取工艺, 软件根据响应值结果自动进行 F 检验以分析模型整体

表 1 无柄灵芝的 Plackett-Burman 设计因素水平表
Table 1 Factor levels of Plackett-Burman design for *G. sessile*

Level	Factor				
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>
-1	1 : 20	195	1	20	1
1	1 : 40	455	9	40	3

显著性、模型项显著性、失拟项和拟合优度。每个因素均设计高 (1)、中 (0)、低 (-1) 3 个水平, 各因素变量水平见表 2。

表 2 无柄灵芝的 Box-Behnken 设计因素水平表
Table 2 Factor levels of Box-Behnken design for *G. sessile*

Level	Factor		
	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>
-1	1	20	1
0	5	30	2
1	9	40	3

2.5 体外抗氧化活性实验

灵芝中的多糖成分是其展现抗氧化活性的主要物质基础。本研究通过响应面设计优化, 确定了无柄灵芝多糖在微波辅助提取法下的最佳工艺参数。在此基础上, 参考相关灵芝多糖体外抗氧化活性研究的浓度设置^[26-27]并结合预实验结果, 将所得提取物配制成质量浓度依次为 1.5、1.2、1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05 mg/mL 的样品溶液, 考察其体外抗氧化活性。该质量浓度范围旨在覆盖可能的活性变化区间, 并进一步探究高质量浓度条件下的活性表现。实验以 Vc 作为阳性对照, 质量浓度设置与样品一致。

2.5.1 总还原力测定 参照 Zhao 等^[28] 的实验方法并稍作修改, 配制磷酸盐缓冲液(PBS), 以及质量分数分别为 1%、10% 和 0.1% 的铁氰化钾溶液、三氯乙酸溶液和三氯化铁溶液, 于 700 nm 波长处分别测定其吸光度值。总还原力实验结果以吸光度值表示。

2.5.2 DPPH 自由基清除能力测定 参照 Du 等^[29] 的实验方法, 配制 DPPH 溶液。于 517 nm 波长处测定各样品吸光度值, 实验结果按式(2)计算。

$$SA_1 = \frac{A_0 - A_i + A_j}{A_0} \times 100\%$$

(2)

其中, SA_1 为 DPPH 自由基清除率, A_i 为样品组吸光度值, A_j 为无水乙醇代替 DPPH 溶液的吸光度值, A_0 为去离子水代替样品的吸光度值。

2.5.3 ABTS 自由基清除能力测定 参照陈杰等^[30]

的实验方法。配制浓度为 7.4 mmol/L 的 ABTS 溶液和 2.6 mmol/L 的过硫酸钾溶液,等体积混合,避光静置 12~16 h 后用无水乙醇稀释 50 倍,使溶液在 734 nm 波长处的吸光度值为 (0.70 ± 0.02) ,得到 ABTS 工作液。于 734 nm 波长处测定各样品的吸光度值,实验结果按式(3)计算。

$$SA_2 = \frac{A_0 - A_i + A_j}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

其中, SA_2 为 ABTS 自由基清除率, A_i 为样品组吸光度值, A_j 为去离子水代替 ABTS 工作液的吸光度值, A_0 为去离子水代替样品的吸光度值。

2.5.4 羟自由基清除能力测定 参照 Xue 等^[31]的实验方法配制亚硫酸铁溶液、 H_2O_2 溶液和水杨酸溶液。于 510 nm 波长处测定各样品吸光度值,实验结果按式(4)计算。

$$SA_3 = \frac{A_0 - A_i + A_j}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

其中, SA_3 为羟自由基清除率, A_i 为样品组吸光度值, A_j 为去离子水代替 H_2O_2 溶液的吸光度值, A_0 为去离子水代替样品的吸光度值。

2.5.5 统计学分析 采用 IBM SPSS Statistics 27 软件对多糖样品在不同浓度下测得的多项自由基清除率和总还原力数据进行单因素方差分析及事后检验,组间多重比较采用 Tukey HSD 检验。该方法是 t 检验用于多组比较时的逻辑扩展,通过一次整体性检验合理避免多次 t 检验带来的误差膨胀问题,有效控制整体错误率,是方差分析显著后进行的经过严格校正的多重 t 检验^[30]。当 $P < 0.05$ 时,表明实验结果具备统计学显著性差异。

3 结果与分析

3.1 单因素实验结果

3.1.1 提取功率 按 2.1.5 节方法进行微波提取,考察微波功率对多糖质量分数的影响,结果如图 1 所示。

由图 1 可知,随着提取时微波功率的升高,多糖质量分数呈现先上升后下降的趋势,在 325 W 处达到峰值。由于微波的热效应原理,微波功率和提取时的温度相互关联,随着微波功率增加,体系温度也逐渐升高,溶剂的表面张力和黏度降低,为多糖的溶解创造了有利条件;当微波功率超过 325 W 时,体系回流愈发强烈,但体系温度过高会导致多糖降解造成质量分数降低。综上,选择提取功率为 325 W 进行后续实验。

3.1.2 料液比 按 2.1.5 节方法进行微波提取,考察

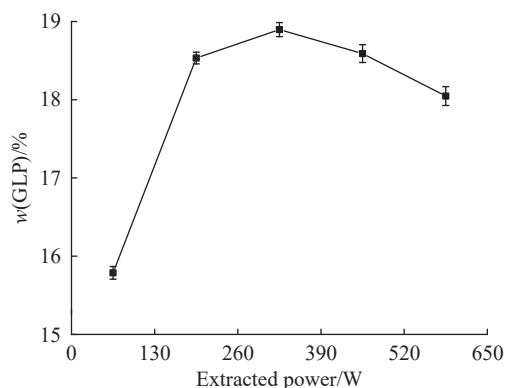


图 1 无柄灵芝在不同提取功率下的多糖质量分数 ($n=3$)

Fig. 1 Polysaccharide mass fraction of *G. sessile* under different extraction powers ($n=3$)

料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50)对多糖质量分数的影响,结果如图 2 所示。随着料液比递增,多糖质量分数先上升,达到峰值后再下降,且在料液比为 1:30 时达到峰值。由于无柄灵芝的质地坚硬,在料液比为 1:10 时渗透到细胞内部的溶剂过少,不利于传质过程,多糖溶解不完全;同时,溶剂量过少时提取液较为黏稠,在转移和抽滤过程中易产生损耗。随着料液比增加,溶剂与灵芝粉末的接触面积增大,溶剂不断渗入内部,传质效率提高,故多糖质量分数上升。但过高的料液比也会导致其他非目标成分的溶出增加,不利于后续的分离纯化操作,同时增加溶剂消耗。结合经济环保的原则,选择适中的料液比,即 1:30 进行后续实验。

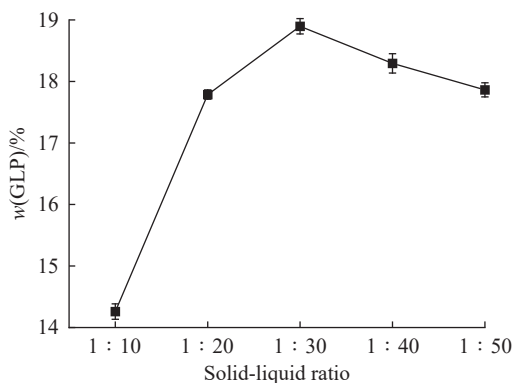


图 2 无柄灵芝在不同料液比下的多糖质量分数 ($n=3$)

Fig. 2 Polysaccharide mass fraction of *G. sessile* under different solid-liquid ratios ($n=3$)

3.1.3 提取时间 按 2.1.5 节方法进行微波提取,考察提取时间(1、5、9、13、17 min)对多糖含量的影响,结果如图 3 所示。随着提取时间的增加,多糖质量分数快速提高而后趋于平缓。基于微波提取机制,初期时体系的快速升温促进了有效物质的溶解,因而多糖质量分数显著提高。持续增大加热时间,其他杂质成分溶解增加,由于多糖和这些成分的黏

性特质,使其在物料表面造成堵塞,阻碍了有效成分向溶液内的扩散,多糖的溶出趋近饱和。同时提取时间的增加会导致体系温度过高,造成多糖结构降解、活性降低等负面影响,因而多糖质量分数增加缓慢甚至可能下降。从高效节能的角度出发,提取时间不宜过长,故选择 5 min 作为无柄灵芝的提取时间。

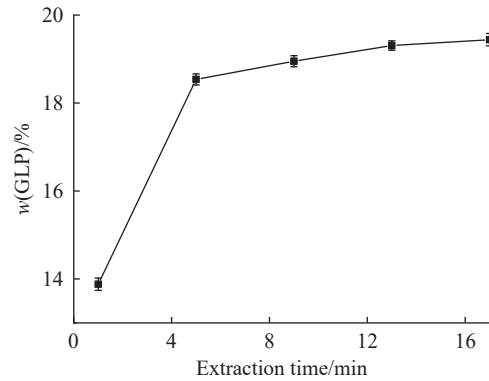


图 3 无柄灵芝在不同提取时间下的多糖质量分数 ($n=3$)
Fig. 3 Polysaccharide mass fraction of *G. sessile* under different extraction time ($n=3$)

3.1.4 浸润时间 按 2.1.5 节方法进行微波提取,考察浸润时间(0、10、20、30、40 min)对多糖质量分数的影响,结果如图 4 所示。可以看出,多糖质量分数随着浸润时间的增加,呈现抛物线状变化,且浸润时相比不浸润时多糖的溶出明显增加。多糖在浸润初期质量分数增高,这主要是因为延长了浸润渗透阶段的时间,软化了药材,药材的细胞结构被打开,有利于有效成分的溶解和扩散。但是,过长的浸润时间也会造成杂质成分的溶出,同时加速有效成分的分解和流失,影响药效。综上,选择浸润时间为 30 min。

3.1.5 提取次数 按 2.1.5 节方法进行微波提取,考察提取次数对多糖质量分数的影响,结果如图 5 所示。随着提取次数的增加,多糖质量分数明显提升。当提取次数增加至 3 次和 4 次时,多糖质量分数

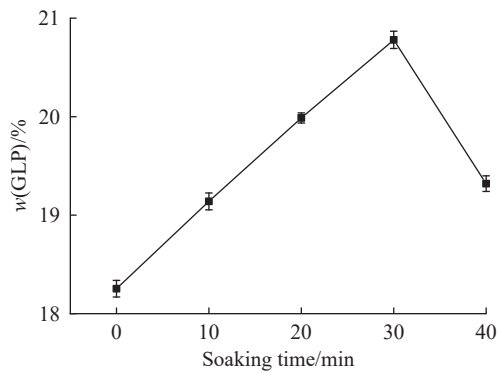


图 4 无柄灵芝在不同浸润时间下的多糖质量分数 ($n=3$)
Fig. 4 Polysaccharide mass fraction of *G. sessile* under different soaking time($n=3$)

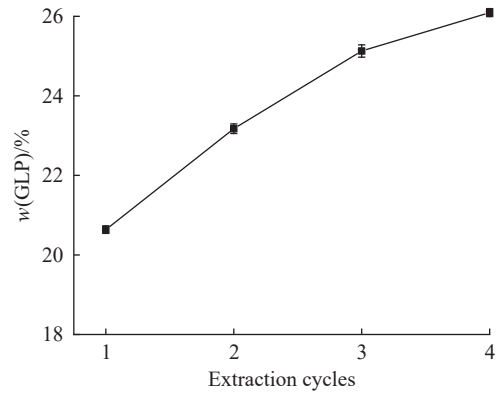


图 5 无柄灵芝在不同提取次数下的多糖质量分数 ($n=3$)
Fig. 5 Polysaccharide mass fraction of *G. sessile* under different extraction cycles ($n=3$)

的增加幅度越来越小,当提取次数为 2 时,多糖质量分数为 4 次提取总质量分数的 88%。因此,考虑到绿色节能,选择 2 次进行后续实验。

3.2 Plackett-Burman 实验

3.2.1 设计与结果 以料液比(A)、提取功率(B)、提取时间(C)、浸润时间(D)、提取次数(E)为变量,以多糖质量分数为响应值进行 Plackett-Burman 实验,结果见表 3。

表 3 Plackett-Burman 实验设计及结果 ($n=3$)						
Table 3 Design and results of Plackett-Burman experiment ($n=3$)						
No.	A	B	C	D	E	w(GLP)/%
1	-1	-1	1	-1	1	25.62
2	1	1	1	-1	-1	21.96
3	-1	-1	-1	1	-1	15.81
4	1	-1	1	1	-1	20.51
5	1	-1	1	1	1	22.16
6	-1	1	-1	1	1	18.09
7	1	-1	-1	-1	1	17.08
8	1	1	-1	1	1	17.75
9	-1	1	1	1	-1	22.13
10	-1	1	1	-1	1	25.31
11	-1	-1	-1	-1	-1	16.25
12	1	1	-1	-1	-1	17.10

3.2.2 回归分析和显著性检验 对表 3 中的数据进行回归分析和显著性检验,结果见表 4。利用 Design-Expert 13 软件,以综合评分多糖质量分数(Y)为响应值,得到回归方程为: $Y=20.35-0.055\ 42A+0.409\ 2B+3.34C-0.572\ 5D+1.02E$, 相关系数 $R^2=0.9805$,表明该回归方程模型的拟合度良好,回归方

表 4 Plackett-Burman 实验方差分析

Table 4 Plackett-Burman experimental variance analysis						
Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	P value	Significant
Model	127.81	5	25.56	60.36	< 0.000 1	**
A	3.69	1	3.69	8.7	0.025 6	*
B	2.01	1	2.01	4.74	0.072 2	
C	105.67	1	105.67	249.55	< 0.000 1	**
D	3.93	1	3.93	9.29	0.022 6	*
E	12.51	1	12.51	29.53	0.001 6	**
Residual	2.54	6	0.423 5			
Total deviation	130.35	11				

**Extremely significant($P<0.01$);*Significant($P<0.05$); DF—Degree of freedom

程具有代表性。由表 4 可知,该模型极显著($P<0.01$),提取时间(C)和提取次数(E)对多糖质量分数的影响极显著($P<0.01$),料液比(A)、浸润时间(D)对多糖质量分数的影响显著($0.01<P<0.05$),提取功率(B)对多糖质量分数的影响无显著性差异($P>0.05$)。为降低后续优化的复杂性,节约实验资源,故选择影响最具显著性的 3 个因素,即提取时间、提取次数和浸润时间作为后续响应面模型的考察因素。

3.3 Box-Behnken 响应面实验结果

3.3.1 模型设计与结果 以提取时间(A)、浸润时间(B)和提取次数(C)为响应面模型的自变量,多糖质量分数为响应值,运用 Box-Behnken 实验设计(共进行 17 组实验),方案及结果见表 5。

3.3.2 响应面模型分析 利用 Design-Expert 13 软件,建立了多糖含量(Y)与自变量间的多元回归拟合方程为: $Y = 23.34 + 2.69A + 0.075 0B + 2.02C - 0.867 5AB + 0.375 0AC + 0.602 5BC - 1.22A^2 - 0.820 0B^2 - 0.732 5C^2$, 实验方差分析结果见表 6。该模型 $P<0.000 1$,说明该回归方程模型差异极显著;模型失拟项 $P=0.913 6>0.05$,差异不显著;模型相关系数 $R^2=0.984 0$,决定系数 $R^2_{adj}=0.963 7$ (R^2 与 R^2_{adj} 的值为 Design-Expert 13 软件基于回归模型的方差分析自动计算得出),说明模型拟合良好,误差较小,可解释 96.37%的响应值变化^[31]。分析各因素在表中的 P 值,可知各因素对多糖质量分数的影响顺序依次为:提取时间(A)>提取次数(C)>浸润时间(B)。该模型可对相应的多糖质量分数进行预测。

根据 Design-Expert 13 分析获得回归模型的曲面图和等高线图,可借助直观的形式,明确呈现出不

表 5 Box-Behnken 实验设计方案及结果 ($n=3$)

Table 5 Box-Behnken experimental design and results ($n=3$)				
No.	A	B	C	w(GLP)/%
1	-1	-1	0	17.56
2	1	-1	0	24.97
3	-1	1	0	19.36
4	1	1	0	23.30
5	-1	0	-1	17.22
6	1	0	-1	21.55
7	-1	0	1	20.47
8	1	0	1	26.30
9	0	-1	-1	20.24
10	0	1	-1	19.27
11	0	-1	1	23.10
12	0	1	1	24.54
13	0	0	0	22.62
14	0	0	0	23.00
15	0	0	0	23.26
16	0	0	0	23.55
17	0	0	0	24.27

表 6 Box-Behnken 实验方差分析

Table 6 Variance analysis of Box-Behnken experimental results						
Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	P value	Significant
Model	108.05	9	12.01	48.22	< 0.000 1	Significant
A	57.84	1	57.84	232.27	< 0.000 1	**
B	0.045	1	0.045	0.180 7	0.683 5	
C	32.52	1	32.52	130.61	< 0.000 1	**
AB	3.01	1	3.01	12.09	0.010 3	*
AC	0.562 5	1	0.562 5	2.26	0.176 5	
BC	1.45	1	1.45	5.83	0.046 4	*
A ²	6.29	1	6.29	25.27	0.001 5	**
B ²	2.83	1	2.83	11.37	0.011 9	*
C ²	2.26	1	2.26	9.07	0.019 6	*
Residual	1.74	7	0.249			
Lack of fit	0.193 6	3	0.064 5	0.166 6	0.913 6	Not significant
Pure error	1.55	4	0.387 3			
Cor total	109.8	16				

**Extremely significant($P<0.01$);*Significant($P<0.05$); DF—Degree of freedom

同因素对响应值的影响力度, 还有各因素彼此间交互作用的具体状况, 曲面越陡峭, 因素间的交互作用越显著^[32]。如图 6~7 所示, 在无柄灵芝所构建的模型中, 交互项 AB 、 AC 以及 BC 的响应曲面图皆表现出明显的陡峭特征, 说明因素间交互作用对多糖提取的影响较大。分析图 7 等高线图, 均呈现椭圆形, 其中 AC 项的等高线图分布较为稀疏, 这表明其交互作用相对较弱; 而 AB 和 BC 交互项交互作用较为突出,

对无柄灵芝的提取效果有着显著的影响。这与表 6 的方差分析结果一致($P_{AC}=0.1765>0.05$, $P_{AB}=0.0103<0.05$, $P_{BC}=0.0464<0.05$)。由于多糖质量分数随各因素变化呈现近似抛物线的变化趋势, 存在最高点, 代表因素能在实验范围内相互组合使多糖质量分数达到最大。因此, 可以通过该响应面模型合理预测并确定微波提取多糖的最优工艺参数。

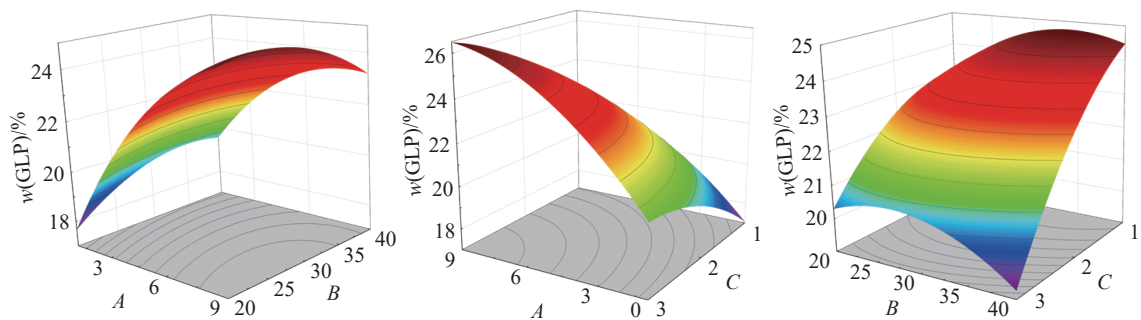


图 6 各因素交互作用对无柄灵芝多糖质量分数影响的响应面图

Fig. 6 Response surface plot of the effects of various factor interactions on the polysaccharide mass fraction of *G. sessile*

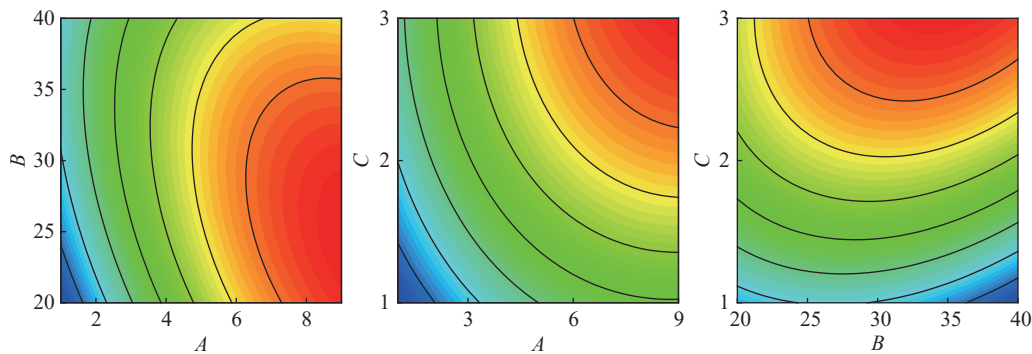


图 7 各因素交互作用对无柄灵芝多糖质量分数影响的等高线图

Fig. 7 Contour plots of the effects of various factor interactions on the polysaccharide mass fraction of *G. sessile*

3.3.3 验证工艺 利用 Design-Expert 13 软件分析预测, 将多糖质量分数的最大值设定为响应目标, 得无柄灵芝多糖的最佳提取工艺条件为: 提取时间 9 min, 浸润时间 30 min, 提取次数 3 次。按以上参数进行 3 次平行验证实验, 结果见表 7。在验证实验中, 无柄灵芝多糖质量分数的平均值为 26.34%, RSD 为 0.33%。实验值与理论预测值接近, 表明该模型预测性良好, 该提取工艺稳定、重复性好, 相较于文献 [33-34], 操作便捷、多糖质量分数高, 证明该方法用于无柄灵芝多糖提取的可行性。

3.4 体外抗氧化活性实验结果

对表 8 和图 8 所示的实验结果进行分析, 灵芝多糖提取物的总还原力, 以及对 DPPH $\cdot$ 、ABTS $\cdot^+$ 和 $\cdot$ OH 清除率均随提取物质量浓度的升高而显著增大,

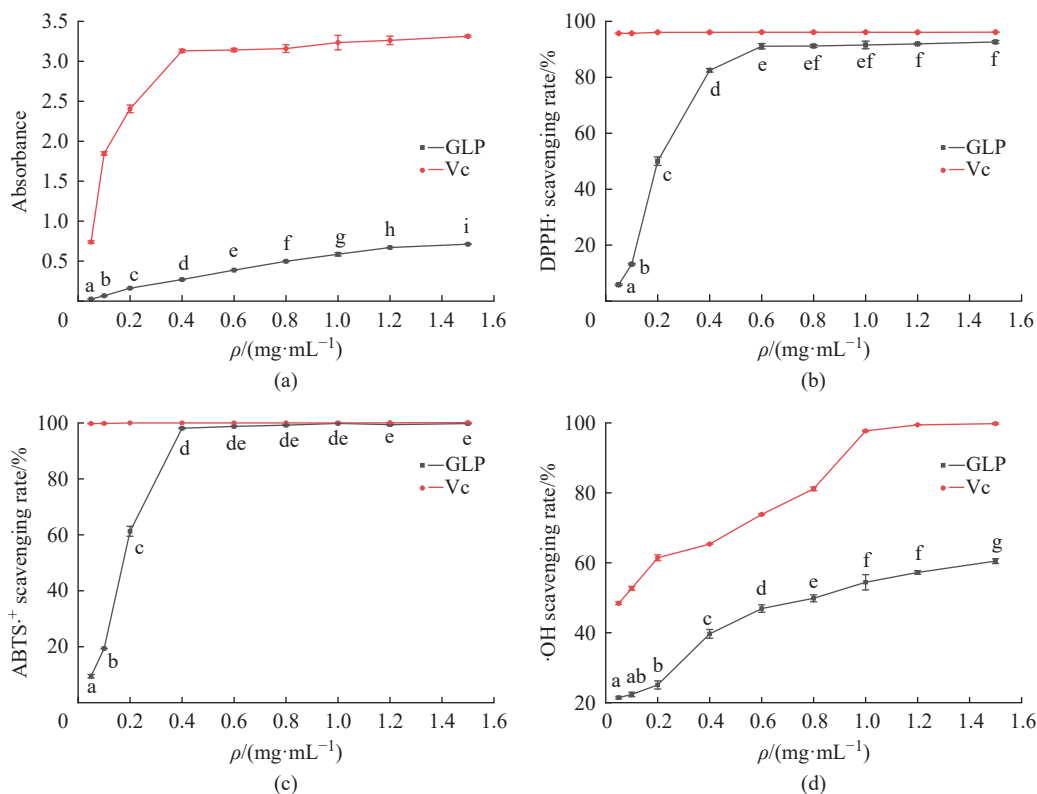
表 7 无柄灵芝微波提取工艺验证结果
Table 7 Verification results of microwave extraction process of *G. sessile*

w/%				RSD/%
1	2	3	Average	
26.25	26.41	26.37	26.34	0.33

表 8 单因素方差分析结果
Table 8 One-way ANOVA results

Indicator	DF	F value	P value	Significant
Total reducing capacity	(8,18)	3 179.572	< 0.001	**
DPPH $\cdot$ scavenging rate	(8,18)	5 613.514	< 0.001	**
ABTS $\cdot^+$ scavenging rate	(8,18)	10 096.431	< 0.001	**
$\cdot$ OH scavenging rate	(8,18)	588.901	< 0.001	**

**Extremely significant($P<0.01$);*Significant($P<0.05$); DF—Degree of freedom



*Data points marked with the same letter are not significantly different ($P \geq 0.05$), while those labeled with different letters are significantly different ($P < 0.05$, Tukey's HSD test)

图 8 体外抗氧化物活性实验结果 ($n=3$)

Fig. 8 Results of *in vitro* antioxidant activity experiments ($n=3$)

质量浓度依赖性强。单因素方差分析结果表明, 四项指标在提取物不同质量浓度处理组间的差异均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。Tukey's HSD 多重比较证实, 在提取物测试质量浓度范围 (0.05~1.5 mg/mL) 内, 绝大多数相邻质量浓度组间的活性提升均具有统计学显著性 ($P < 0.05$)^[35-36], 进一步严格验证了随提取物质量浓度升高, 体外抗氧化活性显著增大的结论。具体而言, 在低质量浓度范围 (0.05~0.4 mg/mL), 活性升高速度开始加快; 随着提取物质量浓度增加, 活性升高速度虽然逐渐变慢, 但在统计上仍持续产生显著差异。

Vc 作为阳性对照, 在较低质量浓度时已展现极强的活性, 并随着质量浓度增加, 活性很快上升, 在考察范围内其活性始终高于样品溶液。在较低质量浓度时, 提取物对 DPPH· 和 ABTS·⁺ 的清除能力低于 Vc, 但当质量浓度超过 0.4 mg/mL 时, 提取物的清除能力逐渐趋近于 Vc, 并在实验范围的最高质量浓度 (1.5 mg/mL) 处清除率均超过 90%, 与 Vc 的最终活性水平趋近。对于总还原力和 ·OH 清除能力, 提取物的表现虽在整个质量浓度范围内均显著低于 Vc, 但其自身仍呈现出明确的剂量-效应正相关性: 总还原力在所有实验质量浓度梯度间均存在显著性差异 ($P <$

0.05), 而 ·OH 清除率在提取物质量浓度大于 0.2 mg/mL 时亦开始持续显著上升 ($P < 0.05$), 这表明该提取物确实具备显著的总还原力及清除羟自由基的潜力。

综上所述, 结合严格的统计学分析, 在该工艺下所得的无柄灵芝提取物具有一定的体外抗氧化活性, 其活性随提取物质量浓度增加而显著增强, 并对 DPPH· 和 ABTS·⁺ 展现出与 Vc 接近的高清除潜力。

4 结 论

(1) 通过单因素、Plackett-Burman 设计、Box-Behnken 响应面优化实验对微波法辅助提取无柄灵芝子实体多糖的工艺条件进行优化, 得到最优工艺参数为: 料液比 1 : 30, 微波功率 325 W, 提取时间 9 min, 浸润 30 min, 提取 3 次。该条件下多糖质量分数达到最高 (26.34%), 与预测值相近, RSD 值小于 0.4%, 说明本实验方法合理、可行性高、模型稳定, 适用于无柄灵芝多糖的提取优化。

(2) 研究最优工艺下所获提取物的体外抗氧化活性。通过测定总还原能力、DPPH· 清除率、ABTS·⁺ 清除率以及 ·OH 清除率并综合评价, 认为在上述提取工艺下, 提取物具有一定的抗氧化活性, 该多糖具有

实际应用价值和多糖新资源开发潜力。

参考文献:

- [1] 崔宝凯, 潘新华, 潘峰, 等. 中国灵芝属真菌的多样性与资源[J]. 菌物学报, 2023, 42(1): 170-178.
- [2] 陈伟, 马飞, 张琳, 等. 灵芝有效成分提取及药理活性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(8): 147-149, 202.
- [3] SWALLAH M S, BONDZIE-QUAYE P, WU Y, *et al.* Therapeutic potential and nutritional significance of *Ganoderma lucidum*: Comprehensive review from 2010 to 2022[J]. Food & Function, 2023, 14(4): 1812-1838.
- [4] SHI M, ZHANG Z, YANG Y. Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP)[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 95(1): 200-206.
- [5] WANG P Y, ZHU X L, LIN Z B. Antitumor and immunomodulatory effects of polysaccharides from broken-spore of *Ganoderma lucidum*[J]. Frontiers in Pharmacology, 2012, 3: 135.
- [6] 钟梓杰, 李雪玲, 胡文锋, 等. 树灵芝 (*Ganoderma sessile*, SCAU-My1) 菌丝体液态发酵条件优化以及菌丝体复合材料制备[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(22): 278-285.
- [7] 刘莉莹, 王洪庆, 刘超, 等. 树灵芝中三萜类成分及其保肝作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(4): 584-589.
- [8] NUSSBAUM N, REPOND N, GANDIA A, *et al.* Mycelial growth of wood fungus *Ganoderma sessile* in porous scaffolds[J]. Materials Today Bio, 2025, 35: 102282.
- [9] FLORES-RÁBAGO K M, RIVERA-MENDOZA D, VILCHIS-NESTOR A R, *et al.* Antibacterial activity of biosynthesized copper oxide nanoparticles (CuONPs) using *Ganoderma sessile*[J]. Antibiotics, 2023, 12(8): 1251.
- [10] HÝSEK Š, JOZÍFEK M, PETŘEŽELA B, *et al.* Artificial neural network prediction of mechanical properties in mycelium-based biocomposites[J]. Polymers, 2025, 17(18): 2506.
- [11] 郑壮, 吕文涛, 孙慧颖, 等. 无柄灵芝活性成分分析及综合性评价[J/OL]. 菌物研究, (2025-08-13) [2025-12-26]. <https://link.cnki.net/urlid/22.1352.S.20250813.1341.002>.
- [12] 周凤龙, 梁雅婷, 严香丽, 等. 种间原生质体融合选育高活性成分的灵芝新菌株[J]. 菌物学报, 2025, 44(10): 34-48.
- [13] ZHENG S, ZHANG W, LIU S. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides and triterpenoids from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* and evaluation of their *in vitro* antioxidant capacities[J]. PLOS One, 2020, 15(12): e0244749.
- [14] PAN K, JIANG Q, LIU G, *et al.* Optimization extraction of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its immunity and antioxidant activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 55: 301-306.
- [15] HUANG S Q, LI J W, WANG Z, *et al.* Optimization of alkaline extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their effect on immune function in mice[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2010, 15(5): 3694-3708.
- [16] CHEN B J, LIU Y, YANG K, *et al.* Amylase-assisted extraction alters nutritional and physicochemical properties of polysaccharides and saponins isolated from *Ganoderma* spp.[J]. Food Chemistry: X, 2023, 20: 100913.
- [17] KANG Q, CHEN S, LI S, *et al.* Comparison on characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by ultrasound and conventional extraction[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 124: 1137-1144.
- [18] 董文宾, 王世鹏. 微波法辅提灵芝多糖及体外抗氧化研究[J]. 陕西科技大学学报(自然科学版), 2015, 33(5): 115-119.
- [19] 李强. 微波技术在中药加工中的应用进展[J]. 中国药物经济学, 2025, 20(7): 108-110, 120.
- [20] CHEN R, LIU Z, ZHAO J, *et al.* Antioxidant and immunobiological activity of water-soluble polysaccharide fractions purified from *Acanthopanax senticosu*[J]. Food Chemistry, 2011, 127(2): 434-440.
- [21] 刘松, 董晓芳, 佟建明. 多糖提取和抗氧化活性评价方法的研究现状和进展[J]. 动物营养学报, 2016, 28(11): 3391-3399.
- [22] 倪峰. 单因素方差分析在煤样均匀性检验中的应用[J]. 煤炭加工与综合利用, 2022(6): 81-83, 88.
- [23] VICECONTE F R, DIAZ M L, SORESI D S, *et al.* *Ganoderma sessile* is a fast polysaccharide producer among *Ganoderma* species[J]. Mycologia, 2021, 113(3): 513-524.
- [24] 郭晓蕾, 朱思潮, 翟旭峰, 等. 硫酸蒽酮法与硫酸苯酚法测定灵芝多糖含量比较[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(9): 2000-2002.
- [25] 袁堃, 吴子威, 赵娜娜, 等. 灵芝多糖提取方法及含量测定的研究进展[J]. 菌物研究, 2025, 23(1): 1-8.
- [26] 颜瑞辰, 洪允炬, 李悦, 等. 响应面法优化灵芝多糖提取工艺及其抗氧化活性[J]. 菌物研究, 2024, 22(4): 378-386.
- [27] 李晓涵, 边文娟, 乔雪莹, 等. 响应面法优化赤灵芝多糖的提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 中国药理学杂志, 2025, 60(9): 949-955.
- [28] ZHAO C, LI X, MIAO J, *et al.* The effect of different extraction techniques on property and bioactivity of polysaccharides from *dioscorea hemsleyi*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 102: 847-856.
- [29] DU X, MU H, ZHOU S, *et al.* Chemical analysis and antioxidant activity of polysaccharides extracted from *inonotus obliquus sclerotia*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 62: 691-696.
- [30] 陈杰, 董扬, 鲁吉珂, 等. 3种不同产地灵芝子实体粗多糖体外抗氧化活性比较研究[J]. 食品工业科技, 2016(21):

- 100-104.
- [31] XUE C H, FANG Y, LIN H, *et al.* Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2001, 13: 67-70.
- [32] 韩伟, 刘婷, 蒋佳丽, 等. 松露的炮制及总多糖提取工艺优化 [J]. *南京工业大学学报 (自然科学版)*, 2024, 46(5): 584-592.
- [33] 宋佳敏, 王鸿飞, 孙朦, 等. 响应面法优化金蝉花多糖提取工艺及抗氧化活性分析 [J]. *食品科学*, 2018, 39(4): 275-281.
- [34] 罗向婷, 李卓书, 张涛, 等. 灵芝多糖微波辅助提取工艺优化及抗氧化活性研究 [J]. *吉林化工学院学报*, 2024, 41(11): 1-6.
- [35] RIAZ K, YASMEEN T, ATTIA K A, *et al.* Phytotoxic effects of polystyrene microplastics on growth morphology, photosynthesis, gaseous exchange and oxidative stress of wheat vary with concentration and shape[J]. *Toxics*, 2025, 13(1): 57.
- [36] 侯文华, 孙龙龙, 马英, 等. 草地贪夜蛾幼虫对四种刺激物质的味觉感受和取食选择 [J]. *昆虫学报*, 2020, 63(5): 545-557.

Optimization of the Extraction Process and Antioxidant Activity Study of Polysaccharides from *Ganoderma sessile* Fruiting Body

SONG Yuxin¹, LI Rui¹, HAN Wei¹, ZHOU Shuai², FENG Na²

(1. Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, Engineering Research Center of Pharmaceutical Process Chemistry, Ministry of Education, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. National Engineering Research Center of Edible Fungi, Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

Abstract: To explore and expand new resources of *Ganoderma lucidum* polysaccharides, *Ganoderma sessile* was selected as the research object, given that it remains under-researched and rich in active ingredients with high contents. A microwave-assisted extraction method was adopted, with the polysaccharide content of *Ganoderma sessile* fruiting bodies serving as the evaluation index. Single-factor experiments were carried out to investigate the effects of five variables, including solid-to-liquid ratio(Ratio of powder mass of *Ganoderma sessile* 40 mesh to volume of deionized water) , microwave power, extraction time, soaking time, and extraction cycles on the extraction efficiency of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. The Plackett-Burman experimental design was conducted to screen out three dominant influencing factors: Extraction time, soaking time and extraction cycles. On this basis, a three-factor and three-level regression model was established via Box-Behnken response surface methodology, so as to analyze the effects of key parameters on polysaccharide content and achieve systematic process optimization. With vitamin C solution set as the positive control, the *in vitro* antioxidant capacity of polysaccharides prepared under optimized conditions was evaluated. The antioxidant indicators involved total reducing power, as well as DPPH, ABTS and hydroxyl radical scavenging rates within a certain concentration range. The results showed that the optimal extraction conditions for polysaccharides from *Ganoderma sessile* fruiting bodies were as follows: Solid-to-liquid ratio of 1:30 g/mL, microwave power of 325 W, extraction time of 9 min, soaking time of 30 min, and three extraction cycles. Under these conditions, the polysaccharide content(mass fraction) reached 26.34%, which was consistent with the predicted value, with a relative standard deviation(RSD) lower than 0.4%. The optimized extraction process for *Ganoderma sessile* polysaccharides features simple operation, favorable stability and excellent applicability. Meanwhile, the extracted polysaccharides presented potent *in vitro* antioxidant activity, which endows them with promising development and application prospects.

Key words: *Ganoderma sessile*; polysaccharide; microwave extraction; Box-Behnken response surface method; antioxidant

(责任编辑: 张欣)