

低共熔溶剂提取灰树花多糖及其抗氧化活性分析

吴丹^{1,2}, 甘炳成^{1,2}, 赵金², 陈梦星^{1,2}, 伍一有^{1,2}, 李翔¹, 王涛^{2*}

(1. 成都大学食品与生物工程学院, 四川成都 610000)

(2. 中国农业科学院都市农业研究所, 成都农业科技中心, 四川成都 610213)

摘要: 为了实现灰树花多糖 (*Grifola Frondosa* Polysaccharide, GFP) 的高效利用, 该研究采用新型低共熔溶剂 (Deep Eutectic Solvent, DES) 提取 GFP 并优化其工艺条件, 进一步探究其抗氧化活性。以灰树花为原料, 从八种 DESs 中筛选出最优的多糖提取溶剂为 DES-2 (氯化胆碱-乙二醇)。在单因素试验的基础上, 采用正交试验设计优化 GFP 的提取工艺, 确定最佳提取工艺为 DES-2 含水率 10%、DES-2 摩尔比 1:1、液料比 80:1 (mL/g)、提取温度 60 ℃、提取时间 40 min。此条件下, GFP 得率为 30.25%, 是传统热水浸提法的 2.23 倍。抗氧化测试结果表明, 热水浸提法获得的灰树花多糖 (W-GFP) 清除 DPPH、ABTS⁺ 和 ·OH 自由基的 EC₅₀ 分别为 0.11、0.45 和 0.26 mg/mL, 而 DES 法获得的灰树花多糖 (D-GFP) 清除这三种自由基的 EC₅₀ 分别为 0.11、0.56 和 0.23 mg/mL。该研究表明 DES 提取 GFP 具有绿色、得率高的优势, 且获得的 GFP 具有较强的抗氧化活性, 为灰树花多糖功能食品的开发和利用提供理论依据。

关键词: 灰树花; 低共熔溶剂; 多糖提取; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2025)04-239-247

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.4.0247

Extraction of Polysaccharides from *Grifola frondosa* by Deep Eutectic Solvents and Analysis of Their Antioxidant Activities

WU Dan^{1,2}, GAN Bingcheng^{1,2}, ZHAO Jin², CHEN Mengxing^{1,2}, WU Yiyu^{1,2}, LI Xiang¹, WANG Tao^{2*}

(1.College of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610000, China)

(2.Institute of Urban Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chengdu Agricultural Science and Technology Center, Chengdu 610213, China)

Abstract: In order to realize the efficient utilization of *Grifola frondosa* Polysaccharide (GFP), a novel Deep Eutectic Solvent (DES) was used to extract GFP. The extraction conditions were optimized and the antioxidant activity of the GFP was investigated. *Grifola frondosa* was used as the raw material, DES-2 (choline chloride-ethylene glycol) was found as the optimal polysaccharide extraction solvent among the eight DESs after screening. On the basis of single factor experiments, the orthogonal experimental design was used to optimize the extraction conditions of GFP. The optimal extraction condition was determined as follows: DES-2 water content, 10%; DES-2 molar ratio, 1:1; liquid- to-material ratio, 80 mL/g; extraction

引文格式:

吴丹,甘炳成,赵金,等.低共熔溶剂提取灰树花多糖及其抗氧化活性分析[J].现代食品科技,2025,41(4):239-247.

WU Dan, GAN Bingcheng, ZHAO Jin, et al. Extraction of polysaccharides from *Grifola frondosa* by deep eutectic solvents and analysis of their antioxidant activities [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(4): 239-247.

收稿日期: 2024-03-01

基金项目: 四川省科技计划项目 (2021YJ0159); 国家成都农业科技中心地方财政专项 (NASC2022KR03); 中国农业科学院科技创新工程项目 (34-IUA-06)

作者简介: 吴丹 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 2387388242@qq.com

通讯作者: 王涛 (1985-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 食品功能成分提纯及生物活性研究, E-mail: wangtao03@caas.cn

temperature, 60 °C ; extraction time, 40 min. Under such conditions, the extraction yield of GFP was 30.25%, which was 2.23 times that of the traditional hot water extraction method. The results of antioxidant studies indicated that the polysaccharide extracted by hot water (W-GFP) had EC_{50} values of 0.11, 0.45 and 0.26 mg/mL in the DPPH, ABTS and $\cdot OH$ radical scavenging tests, respectively, whilst the *G. Frondosa* polysaccharides extracted by eutectic solvents (D-GFPs) had EC_{50} values of 0.11, 0.56 and 0.23 mg/mL, respectively . Therefore, this study showed that extraction of *G. Frondosa* by DES had the advantages of being green and having high yield, and the obtained GFPs exhibited relatively strong antioxidant activities, which provides a theoretical basis for the development and utilization of GFP functional foods.

Key words: *Grifola frondosa*; deep eutectic solvents; polysaccharide extraction; antioxidant activity

灰树花 (*Grifola frondosa*) 属担子菌亚门 (Basidiomycota)、层菌纲 (Hymenomycetes)、无隔担子菌亚纲 (Holobasidiomycetidae)、非褶菌目 (Aphyllphorales)、多孔菌科 (Polyporaceae)、树花菌属 (*Grifola*)。作为一种食药两用真菌^[1], 灰树花富含多糖、甾体、多酚、生物碱、蛋白质等多种活性物质^[2], 具有抗肿瘤、增强免疫、抗病毒、降血糖、调节肠道菌群、抗氧化和抑菌等生物功能^[3]。近年来, 灰树花因营养和药用价值高, 逐渐成为研究热点。

灰树花子实体最主要的生物活性成分是多糖, 具有降血糖、免疫调节、抗肿瘤等功效^[4]。灰树花多糖的提取方法主要有热水提取法^[5]、超声或微波辅助提取法^[6,7]、酸碱提取法^[8]、酶提取法^[9]、超临界 CO_2 提取法^[10]等。水提法耗时长、得率较低。超声或微波辅助提取法需借助专业仪器, 不利于大规模提取^[11]。酸碱提取法易破坏多糖的糖苷键和空间结构^[12]。酶法提取中, 酶的价格较高且易失活^[13]。超临界 CO_2 提取法仅适合提取低极性小分子, 不适合提取多糖等高级性大分子, 且得率较低^[14]。低共熔溶剂 (Deep Eutectic Solvent, DES) 是一种有机溶剂和离子液体的潜在替代溶剂, 由两种或两种以上氢键供体和受体以一定摩尔比组成^[15], 具有熔点低、挥发性低、可降解、无毒环保等优点^[16]。Chen 等^[17]采用氯化胆碱 / 乙二醇 DES 快速同时提取卷丹茎中的酚酸和多糖, 得率比热水提取提高 36%。张景等^[18]采用 4 种提取方法提取羊肚菌多糖, 得出氯化胆碱 / 尿素型 DES 提取的多糖得率较高。

目前文献中尚无低共熔溶剂提取灰树花多糖的报道。本研究采用低共熔溶剂提取灰树花多糖, 通过单因素和正交试验进行工艺优化, 并评价灰树花多糖的抗氧化活性, 为灰树花多糖功能产品的开发和应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

灰树花, 购自庆元菇香食品有限公司; 氯化胆碱 (纯度 99%)、甜菜碱 (纯度 99%)、尿素 (纯度 $\geq 99\%$)、乙二醇 (纯度 $\geq 99.5\%$)、甘油 (纯度 $\geq 99.7\%$)、无水乙醇 (纯度 99.80%), 均购自泰坦科技探索平台; 1,4-丁二醇 (纯度 $\geq 99\%$)、硫酸亚铁七水合物 ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), 均购自阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 浓硫酸, 购自成都市科隆化学有限公司; 苯酚, 购自成都金山化学试剂有限公司; D (+) - 无水葡萄糖、DPPH (1,1-二苯基-2-苦基肼) 和 ABTS (2,2-联氨基双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐, 均购自北京索莱宝科技有限公司; 3,5-二硝基水杨酸和过硫酸钾, 均购自上海麦克林生化科技有限公司; 过氧化氢, 购自惠州市湘盛工贸有限公司。

1.2 主要仪器设备

WGLL-125BE 电热鼓风干燥箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; FW177 中草药粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; ME204102 (CD) 电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; WP-UP-LH-20S 理化分析性超纯水机, 四川沃特尔水处理设备有限公司; WT100-3 恒温水浴槽, 杭州米欧仪器有限公司; V2 漩涡混匀仪, 上海一恒科技有限公司; RCT basic 加热磁力搅拌器, 艾卡 (广州) 仪器设备有限公司; TGL-1650 高速冷冻离心机, 四川蜀科仪器有限公司; SparkTECAN 酶标仪, 帝肯上海实验器材有限公司; B15-10NDA0002 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

表 1 DES的组成
Table 1 Composition of the DES

编号	组成	HBA	HBD	摩尔比	含水率/%
DES-1	氯化胆碱-尿素		尿素	1:2	30
DES-2	氯化胆碱-乙二醇		乙二醇	1:2	30
DES-3	氯化胆碱-1,4-丁二醇	氯化胆碱	1,4-丁二醇	1:2	30
DES-4	氯化胆碱-甘油		甘油	1:2	30
DES-5	甜菜碱-尿素		尿素	1:2	30
DES-6	甜菜碱-乙二醇		乙二醇	1:2	30
DES-7	甜菜碱-1,4-丁二醇	甜菜碱	1,4-丁二醇	1:2	30
DES-8	甜菜碱-甘油		甘油	1:2	30

1.3 实验方法

1.3.1 样品预处理及DES的制备

灰树花子实体于 45 ℃ 烘干，粉碎机粉碎后，通过 60 目筛得到灰树花粉末并抽真空密封保存。氢键受体（Hydrogen Bond Acceptor, HBA）（氯化胆碱、甜菜碱）和氢键供体（Hydrogen Bond Donor, HBD）（尿素、乙二醇、1,4-丁二醇、甘油）按摩尔比 1:2 混合，含水率为 30%，在 80 ℃ 下磁力搅拌，直至形成均匀透明的液体。冷却至室温后密封在玻璃容器中备用^[19]。DES 的编号及组成如表 1 所示。

1.3.2 灰树花多糖粗提液制备

DES 提取法：取 0.1 g 灰树花粉末于 10 mL 离心管中，按 40:1（V/m），加入含水率为 30% 的 DES 混合均匀。充分浸泡后在 50 ℃ 下水浴加热 30 min，在 2 311×g 的条件下离心 10 min，将上清液取出并记录上清液体积，即得 D-GFP 粗提液。参照 Xiao 等^[20]的方法，配制 0.5 mol/L 的氯化胆碱、甜菜碱水溶液。

热水浸提法：取 0.1 g 灰树花粉末于 10 mL 离心管中，按液料比 40:1（mL/g），加入纯水混合均匀。充分浸泡后在 85 ℃ 下水浴加热 30 min，在 2 311×g 的条件下离心 10 min，将上清液取出并记录上清液体积，即得 W-GFP 粗提液。

1.3.3 灰树花多糖含量测定

参照许盈盈等^[21]的方法，灰树花多糖含量采用苯酚-硫酸法进行测定，计算多糖得率。将葡萄糖标准品放置烘箱中，于 105 ℃ 烘干至恒重，配制质量浓度为 0.1 mg/mL 的葡萄糖标准液。分别配制质量浓度为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/mL 的葡萄糖

标准体系以及空白对照，加蒸馏水补至 0.1 mL，分别加入 6% 苯酚溶液 0.1 mL、浓硫酸 0.5 mL 将试管盖盖上，涡旋混匀，室温静置 10 min。每管取 0.2 mL 于 96 孔板中，在 490 nm 下，用酶标仪测定 OD 值并绘制葡萄糖标准曲线。以葡萄糖标准品质量浓度（mg/mL）为横坐标、OD 值为纵坐标，得标准曲线方程 $y=6.882\ 6x+0.122\ 7$ ，相关系数 $R^2=0.992$ 。取 0.1 mL 样液进行以上操作，所有样品进行 3 个以上平行实验，并重复测定 3 次。灰树花多糖得率计算公式如下^[22]：

$$P=\frac{C\times V\times D}{M\times 1000}\times 100\%$$
 (1)

式中：
P——灰树花多糖得率，%；
C——回归方程计算得到灰树花多糖质量浓度，mg/mL；
V——提取液的体积，mL；
D——稀释倍数；
M——灰树花粉末质量，g。

1.3.4 单因素试验

筛选灰树花多糖得率最高的低共熔溶剂（DES）进行单因素试验，考察 DES 的含水率（10%、20%、30%、40%、50%）、摩尔比（1:1、1:2、1:3、1:4、1:5）、液料比（40:1、50:1、60:1、70:1、80:1，mL/g）、提取温度（40、50、60、70、80 ℃）、提取时间（20、30、40、50、60 min）对多糖得率的影响。

1.3.5 正交试验优化设计

基于单因素试验结果，以 A 含水率（%）、B 摩尔比、C 液料比（mL/g）为考察对象，用 $L_{16}(4^3)$ 进行正交实验并分析，得出灰树花多糖提取的最佳工艺

条件和得率。正交试验因素设计水平如表 2 所示。

表 2 正交试验因素水平设计

Table 2 Orthogonal test factor level design			
水平	因素		
	A 含水率/%	B 摩尔比	C 液料比(mL/g)
1	10	1: 1	50:1
2	20	1: 2	60:1
3	30	1: 3	70:1
4	40	1: 4	80:1

1.3.6 灰树花多糖抗氧化活性测定

1.3.6.1 DPPH 自由基清除活性测定

参照 Zhang 等^[23]的方法略有改动，用无水乙醇配制 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液，将 W-GFP 和 D-GFP 分别配制成质量浓度为 0.05、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 mg/mL 的溶液。依次加入 150 μL DPPH 溶液和样液，充分混匀，避光静置 30 min，在 517 nm 处测定吸光度，计算公式如下：

$$X=(1-\frac{A_1-A_2}{A_0})\times100\%$$

式中：

X——DPPH 自由基清除率，%；

A₀——空白组的吸光值（蒸馏水代替多糖溶液）；

A₁——样品组的吸光值；

A₂——对照组的吸光值（无水乙醇代替 DPPH 溶液）。

1.3.6.2 ABTS 自由基清除活性测定

参照 He 等^[24]的方法稍作改动，分别配制 7 mmol/L ABTS 溶液和 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液。将 ABTS 溶液和过硫酸钾溶液按 1:1 混合，用蒸馏水稀释，测得吸光值为 0.7±0.02，作为 ABTS 工作液。将 W-GFP 和 D-GFP 分别配制成质量浓度为 0.05、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 mg/mL 的溶液，分别移取 150 μL 灰树花多糖溶液和 ABTS 工作液于 EP 管，避光反应 6 min 后在 734 nm 波长下测定吸光度，计算公式如下：

$$Y=(1-\frac{A_1-A_2}{A_0})\times100\%$$

式中：

Y——ABTS⁺ 自由基清除率，%；

A₀——空白组的吸光值（蒸馏水代替多糖溶液）；

A₁——样品组的吸光值；

A₂——对照组的吸光值（蒸馏水代替 ABTS 溶液）。

1.3.6.3 羟基自由基清除活性测定

参照许盈盈等^[21]的方法稍作改动，用蒸馏水

配制 6 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液，用无水乙醇配制 6 mmol/L 的水杨酸－乙醇溶液。移取 100 μL 30% H₂O₂ 溶于蒸馏水中配制成 0.1% 的 H₂O₂ 溶液。将 W-GFP 和 D-GFP 分别配制成质量浓度为 0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、3 mg/mL 的溶液，分别移取 50 μL FeSO₄ 溶液、50 μL 水杨酸－乙醇溶液、100 μL 样液、50 μL H₂O₂ 溶液，37 ℃ 水浴 30 min，于 510 nm 测定吸光度，计算公式如下：

$$Z=(1-\frac{A_1-A_2}{A_0})\times100\%$$

式中：

Z——OH 自由基清除率，%；

A₀——空白组的吸光值（蒸馏水代替多糖溶液）；

A₁——样品组的吸光值；

A₂——对照组的吸光值（蒸馏水代替 H₂O₂ 溶液）。

1.4 数据统计与分析

采用 IBM SPSS statistics 26 处理相关数据，Origin 2021 软件进行作图，通过正交设计助手 V3.1 和 Minitab 软件进行正交实验设计和方差分析。本实验数据以平均值 ± 标准偏差（SD）表示。采用单因素方差分析评估显著性，P 值为 0.05 作为显著性的阈值。

2 结果与分析

2.1 低共熔溶剂和提取条件的确定

2.1.1 DES 类型对灰树花多糖得率的影响

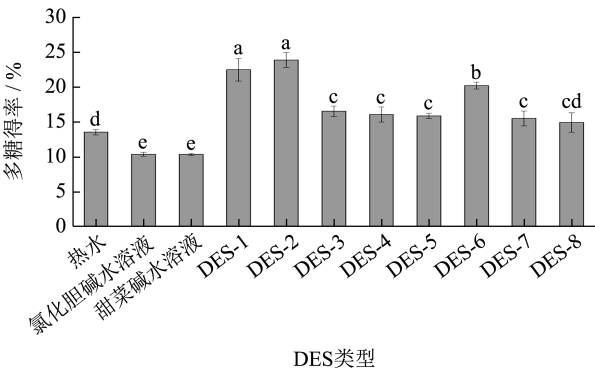


图 1 DES 类型对灰树花多糖得率的影响

Fig.1 Effect of DESs type on extraction yields of polysaccharides from *Grifola frondosa*

注：不同小写字母表示具有显著差异（P<0.05）。下同。

分别探讨热水浸提、氯化胆碱水溶液、甜菜碱水溶液以及 8 种 DESs 对灰树花多糖得率的影响，

如图1所示。DES提取多糖的效率均显著高于热水、氯化胆碱及甜菜碱水溶液 ($P < 0.05$)，这是因为DES和目标化合物之间的氢键相互作用。DES溶液中，DES-2的多糖得率最高 (23.89%)，可能是因为DES-2与多糖存在静电相互作用且氢键结合能力更强，乙二醇的羟基分支少，空间位阻小^[25]。因此，确定DES-2提取灰树花多糖。

2.1.2 DES-2含水率对灰树花多糖得率的影响

含水率会影响DES的粘度，从而影响灰树花多糖在提取液中的传质效率，结果如图2所示。DES-2溶剂含水率在10%~20%时，多糖得率逐渐增加，当含水率为20%时达到最大值23.48%。含水率过低会使DES-2溶剂更黏稠，导致提取不充分。合适的含水率能增加多糖得率，而含水率在20%~40%时，多糖得率逐渐降低。一方面，随着含水率的增加，DES溶剂粘度降低，增加传质效率，从而提高得率；另一方面，过量的水会破坏氢键网络^[26]，减弱多糖与DES的相互作用，从而降低得率。因此，选择含水率为20%进行正交试验。

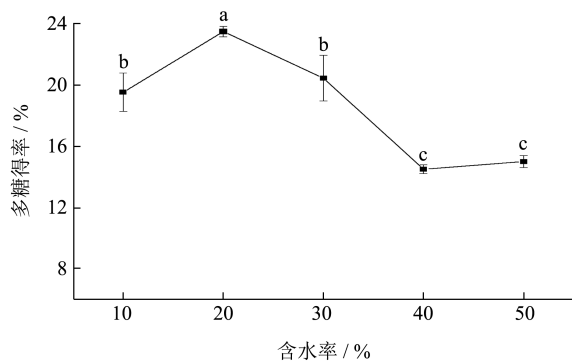


图2 DES-2含水率对灰树花多糖得率的影响

Fig.2 Effect of DES-2 moisture contents on extraction yields of polysaccharides from *Grifola frondosa*

2.1.3 DES-2摩尔比对灰树花多糖得率的影响

图3显示了摩尔比对灰树花多糖得率的影响。DES-2溶剂摩尔比在1:3时达到最大值25.82%，随后开始出现下降趋势。这是因为随着乙二醇含量的初始增加，DES-2的黏度降低，导致目标化合物的扩散传质增加^[27]。但随着乙二醇含量的进一步增加，氯化胆碱与目标化合物之间的氢键作用减弱，不利于目标化合物的萃取^[28]。选择合适的摩尔比，可以降低共熔点^[29]，并提高得率。因此，选择摩尔比为1:3进行正交试验。

2.1.4 液料比对灰树花多糖得率的影响

液料比对灰树花多糖得率的影响如图4所示，

液料比在40:1~70:1 (mL/g) 时，灰树花多糖得率随DES溶剂量的增加而上升。液料比在70:1 (mL/g) 时，多糖得率达到最大值33.47%，达到传质平衡，有利于提取目标化合物。在80:1 (mL/g) 时，曲线直线下降，可能是因为较大的DES用量会减弱多糖与DES之间的分子间相互作用^[30]，导致得率降低。因此，选择液料比为70:1 (mL/g) 进行正交试验。

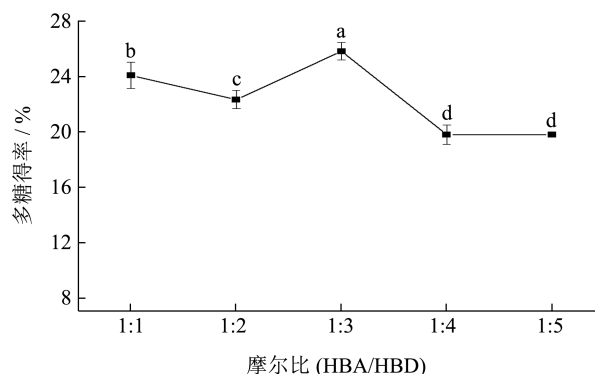


图3 DES-2摩尔比对灰树花多糖得率的影响

Fig.3 Effect of DES-2 molar ratios on extraction yields of polysaccharides from *Grifola frondosa*

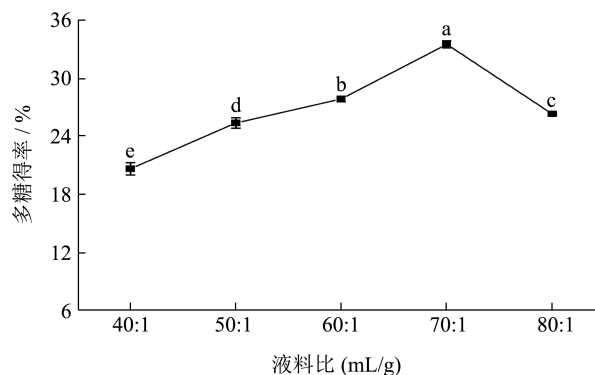


图4 液料比对灰树花多糖得率的影响

Fig.4 Effect of liquid-solid ratios on extraction yields of polysaccharides from *Grifola frondosa*

2.1.5 提取温度对灰树花多糖得率的影响

提取温度对灰树花多糖得率的影响如图5所示，提取温度在40~60℃时，温度升高，灰树花多糖得率逐渐增加。提取温度为60℃时，多糖得率达到最大值31.81%。这是因为温度升高，会使溶剂的粘度和界面张力降低，加速目标化合物与原料的解离。因此，传质过程得到加强，提高得率^[31]。在70℃时，多糖得率开始下降。可能是因为温度过高使多糖的结构发生了改变^[32]，导致得率下降。而80℃时出现上升趋势，该温度下的得率和最佳提取温度得率相差不到1%。总体来说，提取温度对得率的影响较小。考虑到节约能源，选择60℃为最佳提取温度。

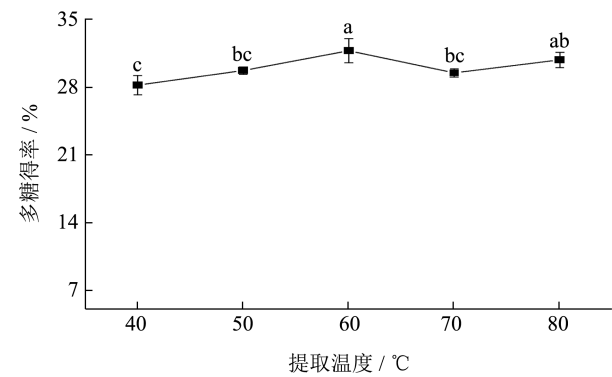


图 5 提取温度对灰树花多糖得率的影响

Fig.5 Effect of extraction temperatures on extraction yields of polysaccharides from *Grifola frondosa*

2.1.6 提取时间对灰树花多糖得率的影响

提取时间对灰树花多糖得率的影响如图 6 所示。提取时间的整个变化曲线图趋于平缓。提取时间在 20~40 min 时，灰树花多糖得率随时间的延长而增加。在 40 min 时，多糖得率达到最大值 31.49%。这归因于在一定提取时间内可以提高多糖的溶出速率，提高得率^[33]。在 40~60 min 时，随着时间增加，灰树花多糖的得率反而下降，可能是由于提取时间过长，多糖分子与溶剂或其他溶出分子持续在 60 °C 相互作用，使部分多糖的结构遭到破坏^[34]，导致得率降低。这说明提取时间过长，不利于灰树花多糖的提取。因此，最佳提取时间为 40 min。

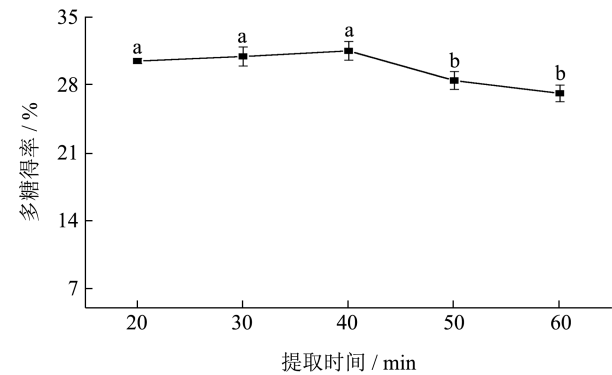


图 6 提取时间对灰树花多糖得率的影响

Fig.6 Effect of extraction times on extraction yields of polysaccharides from *Grifola frondosa*

2.2 正交试验结果与分析

通过表 3 正交实验级差分析，在所选择的试验水平内，因素主次顺序为 A>C>B。含水率对灰树花多糖的提取影响最大，其次是液料比，最后是摩尔比。A1B1C4 为最佳提取工艺。即提取工艺参数为含水率 10%、摩尔比 1:1、液料比 80:1 (mL/g)。

2.3 最佳提取工艺验证

在最佳工艺条件〔含水率 10%，摩尔比 1:1，液料比 80:1 (mL/g)，提取温度 60 °C，提取时间 40 min〕下进行验证实验，该条件下测得多糖得率为 30.25%，RSD=5.76% (n=3)。表明数据精确可靠，该工艺稳定可行。与传统的热水浸提法 (13.54%) 相比，低共熔溶剂提取灰树花多糖得率提高了 123%。目前，文献暂无低共熔溶剂提取灰树花多糖的报道，但已有低共熔溶剂提取其他食药菌的相关报道。例如，谢苗等^[11]采用低共熔溶剂法制备灵芝多糖，得率比热水浸提法提高了 83.33%。

表 3 L ₁₆ (4 ³)正交试验结果				
Table 3 L ₁₆ (4 ³) Orthogonal test results				
试验序号	A 含水率 /%	B 摩尔比	C 液料比 (mL/g)	得率/%
1	1	1	1	26.90 ± 2.21
2	1	2	2	32.92 ± 2.60
3	1	3	3	29.81 ± 2.11
4	1	4	4	32.88 ± 1.87
5	2	1	2	23.51 ± 1.89
6	2	2	1	26.33 ± 1.29
7	2	3	4	23.89 ± 4.36
8	2	4	3	24.25 ± 0.03
9	3	1	3	30.27 ± 4.29
10	3	2	4	27.33 ± 3.36
11	3	3	1	20.57 ± 1.83
12	3	4	2	24.47 ± 1.56
13	4	1	4	26.25 ± 1.25
14	4	2	3	20.27 ± 0.69
15	4	3	2	15.35 ± 0.65
16	4	4	1	15.68 ± 1.10
K ₁	30.63	26.73	22.36	
K ₂	24.50	26.71	24.06	
K ₃	25.66	22.40	26.15	
K ₄	19.38	24.31	27.59	
R	11.25	4.33	5.22	
因素主次	I	III	II	
最优水平	A1	B1	C4	

表 4 正交试验方差分析							
Table 4 Analysis of variance for orthogonal trials							
来源	离均差平方和	自由度	均方	$F_{\text{临界值}}$	F	P	显著性
含水率	255.75	3	85.250	4.760	11.83	0.006	**
摩尔比	52.54	3	17.512	4.760	2.43	0.163	
液料比	363.39	3	21.128	4.760	2.93	0.122	
误差	43.24	6	7.207				
总计	414.91	15					

注:** 差异极显著, $P<0.01$; * 差异显著, $0.01<P<0.05$ 。

2.4 抗氧化活性分析

每种抗氧化活性体外评价方法均具有其局限性,不能全面评价多糖的抗氧化能力。因此,采用3种方法(DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基、羟基自由基清除)来综合分析 DES 提取法和热水浸提法提取的灰树花多糖的体外抗氧化活性。

2.4.1 DPPH自由基清除率

由图 7 可知,灰树花多糖质量浓度越高,DPPH 自由基清除率越高,表明清除能力与剂量呈正相关。在本试验中,GFP 质量浓度最大为 1.0 mg/mL,此时 D-GFP 和 W-GFP 的 DPPH 清除率分别为 92.10% 和 87.47%,且无显著性差异 ($P>0.05$)。经计算,W-GFP 和 D-GFP 清除 DPPH 自由基的 EC_{50} 都为 0.11 mg/mL。结果表明,两种方法提取的 GFP 均具有较强的 DPPH 清除活性。

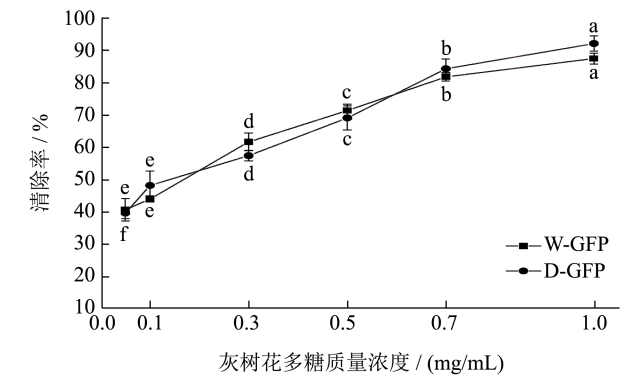


图 7 灰树花多糖对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.7 DPPH radical scavenging activity by *Grifola frondosa* polysaccharides

2.4.2 ABTS⁺自由基清除率

如图 8 所示,不同质量浓度灰树花多糖对 ABTS⁺ 自由基的清除作用呈浓度依赖性,清除率随质量浓度增加而增加^[35]。在 1 mg/mL 时,W-GFP 和 D-GFP 的 ABTS⁺ 清除率分别达到 75.07% 和 68.39%,无显著性差异。经计算,W-GFP 和 D-GFP

清除 ABTS⁺ 自由基 EC_{50} 值分别为 0.45 mg/mL 和 0.56 mg/mL。由此可知,W-GFP 和 D-GFP 具有相当的 ABTS⁺ 清除活性。

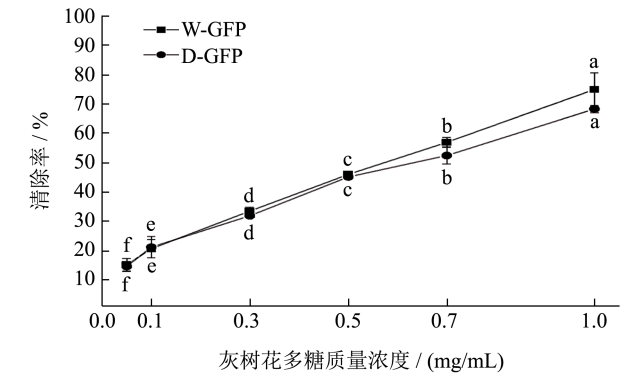


图 8 灰树花多糖对 ABTS⁺ 自由基的清除能力

Fig.8 ABTS⁺ radical scavenging activity by *Grifola frondosa* polysaccharides

2.4.3 ·OH清除率

羟基自由基(·OH)是一种非常活泼的自由基,具有强氧化能力,几乎可以氧化所有有机物。由图 9 可知,W-GFP 和 D-GFP 都能清除羟基自由基,且清除能力随着多糖质量浓度的增加而增加,表明清除能力与剂量呈正相关。在本试验中,多糖质量浓度为 3.0 mg/mL 时,W-GFP 和 D-GFP 的 ·OH 清除率分别为 70.20% 和 79.01%。经计算,W-GFP 和 D-GFP 清除 ·OH 的 EC_{50} 值分别为 0.26 mg/mL 和 0.23 mg/mL。由此可知,D-GFP 和 W-GFP 均具有较好的 ·OH 清除活性,其抗氧化活性相当。

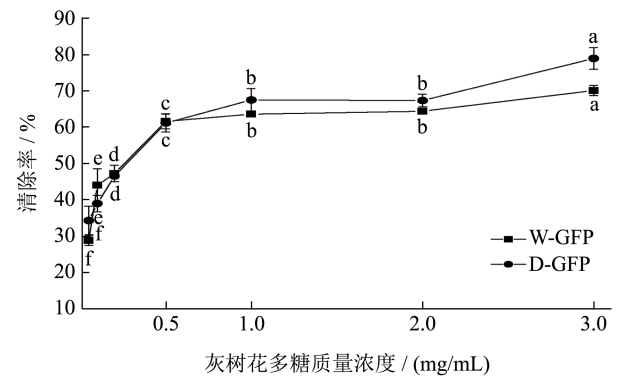


图 9 灰树花多糖对 ·OH 的清除能力

Fig.9 ·OH scavenging activity by *Grifola frondosa* polysaccharides

注:不同的小写字母表示样品间有显著差异 ($P<0.05$)。

通过上述 3 种方法发现,DES 和热水浸提法得到的多糖均具有较好的抗氧化活性,且它们的抗氧化活性相当。据文献报道,采用低共熔溶剂提取的

灵芝多糖也具有一定的抗氧化活性,且剂量活性呈正相关^[11],与本文研究结果相似。

3 结论

以灰树花得率为指标,从不同溶剂中筛选出最优溶剂为 DES-2 (氯化胆碱-乙二醇)。采用氯化胆碱-乙二醇型 DES 提取灰树花多糖,考察了单因素(含水率、摩尔比、液料比、提取温度、提取时间)对得率的影响。由单因素试验可知,含水率、摩尔比和液料比对多糖得率的影响较为显著,因此采用正交试验法优化这三个因素,得出最佳的工艺优化参数是 DES-2 含水率 10%、DES-2 摩尔比 1:1、液料比 80:1 (mL/g)。最后,采用最佳工艺参数优化提取灰树花多糖,得率为 30.25%。与传统的热水浸提法(13.54%)相比,提高了 123%。抗氧化活性测定得出,D-GFP 清除 DPPH、ABTS⁺ 和 OH 自由基的 EC₅₀ 值分别为 0.11、0.56 和 0.23 mg/mL,而 W-GFP 清除这三种自由基的 EC₅₀ 值分别为 0.11、0.45 和 0.26 mg/mL。结果表明,两种方法提取的 GFP 均具有较强的抗氧化活性,且它们的抗氧化活性相当。因此,DES 可以高效提取 GFP,且获得的 GFP 具有较强的抗氧化活性。本研究可为灰树花多糖的高效提取、功能食品的开发和利用提供参考。

参考文献

- [1] 吴智艳,闫训友.灰树花生理活性物质的研究进展[J].食用菌,2006,6:1-2.
- [2] COHEN N, COHEN J, ASATIANI M D, et al. Chemical composition and nutritional and medicinal value of fruit bodies and submerged cultured mycelia of culinary-medicinal higher basidiomycetes mushrooms [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2014, 16: 273-291.
- [3] 熊雯宇,何君强,戴婉真,等.灰树花功效成分及其生物活性研究进展[J].食品与机械,2022,38(8):234-240.
- [4] 陈沛,刘会平,孙娜新,等.灰树花多糖的分离纯化及其体外抗肿瘤活性[J].现代食品科技,2018,34(6):107-114.
- [5] 郑亚凤,谢宝贵,徐培雄,等.正交法优化三种灰树花多糖提取工艺[J].食用菌,2008,5:55-57,4.
- [6] 安金双,王迪,马士淇,等.响应面法优化灰树花中多糖超声波提取工艺的研究[J].食品研究与开发,2008,29(6):11-15.
- [7] 唐小俊,池建伟,何焕清,等.微波辅助提取灰树花多糖工艺研究[J].天然产物研究与开发,2006,5:841-845.
- [8] XIONG X, ZHAO L, CHEN Y, et al. Effects of alkali treatment and subsequent acidic extraction on the properties of soybean soluble polysaccharides [J]. Food and Bioprocess Technology, 2015, 94: 239-247.
- [9] 陈石良,孙震,谷文英,等.灰树花深层发酵菌丝体多糖的酶法提取及其抗肿瘤作用[J].无锡轻工大学学报,2000,4:336-339,353.
- [10] ZHAO H K, WEI X Y, XIE Y M. Supercritical CO₂ extraction, structural analysis and bioactivity of polysaccharide from *Grifola frondosa* [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 102: 104067.
- [11] 谢苗,元小妮,张鑫,等.低共熔溶剂提取灵芝多糖的工艺优化及抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2022,43(5):123-129.
- [12] 刘伟,王晓雨,周玉溪,等.低共熔溶剂在植物多糖提取中的应用研究进展[J].食品工业科技,2023,44(24):1-11.
- [13] 娜日苏.天然植物多糖提取工艺及研究进展[J].赤峰学院学报(自然科学版),2022,38(9):29-34.
- [14] WANG W, TAN J, 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.
- [15] FLORINDO C, BRANCO L C, MARRUCHO I M. Quest for green-solvent design: from hydrophilic to hydrophobic (deep) eutectic solvents [J]. ChemSusChem, 2019, 12(8): 1549-1559.
- [16] DHEYAB A S, ABU BAKAR M F, ALO M, et al. Deep eutectic solvents (DESs) as green extraction media of beneficial bioactive phytochemicals [J]. Separations, 2021, 8(10): 176-200.
- [17] CHEN L, YANG Y Y, ZHOU R, et al. The extraction of phenolic acids and polysaccharides from *Lilium lancifolium* thunb. using a deep eutectic solvent [J]. Analytical Methods, 2021, 13(10): 1226-1231.
- [18] 张景.羊肚菌多糖的提取分离、结构表征及抗氧化研究[D].聊城:聊城大学,2023.
- [19] RASHID R, WANI S M, MANZOOR S, et al. Green extraction of bioactive compounds from apple pomace by ultrasound assisted natural deep eutectic solvent extraction: optimisation, comparison and bioactivity [J]. Food Chemistry, 2023, 398: 133871.
- [20] XIAO Z, LIU M, BI W, et al. Ionic liquid as hydrogen bond acceptor in the extraction of nutritional natural products [J]. Food Chemistry, 2023, 412: 135589.
- [21] 许盈盈.灰树花多糖的提取、分离纯化、表征及生物活性的研究[D].杭州:浙江工商大学,2022.
- [22] 熊苏慧,夏伯候,雷思敏,等.基于低共熔溶剂提取千斤拔多糖[J].湖南中医药大学学报,2018,38(9):1003-1008.
- [23] ZHANG M, LI Y, SHUAI X, et al. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from macadamia (*Macadamia integrifolia*) green peel: purification, identification and antioxidant activities [J]. LWT, 2023,

- 189: 115552.
- [24] HE S, YAN J, CHEN L, et al. Structure and *in vitro* antioxidant and immunomodulatory activity of a glucan from the leaves of *Cyclocarya paliurus* [J]. Journal of Functional Foods, 2024, 113: 106016.
- [25] 黄秀红,刘丽辰,阮怿航,等.响应面优化低共熔溶剂提取乌龙茶多糖的研究[J].食品研究与开发,2020,41(11):96-103.
- [26] 曾朝喜.天然低共熔溶剂理化性质及其在脂肪酶催化转化应用中的研究[D].广州:华南理工大学,2016.
- [27] LE N T, HOANG N T, NGUYEN T P D, et al. Extraction of curcumin from turmeric residue (*Curcuma longa* L.) using deep eutectic solvents and surfactant solvents [J]. Analytical Methods, 2022, 14(8): 850-858.
- [28] MANKAR A R, PANDEY A, PANT K K. Microwave-assisted extraction of lignin from coconut coir using deep eutectic solvents and its valorization to aromatics [J]. Bioresource Technology, 2022, 345: 126528.
- [29] 张欢欢,刘玉婷,李戎,等.新型低共熔溶剂的制备、表征及物性研究[J].化学通报,2015,78(1):73-79.
- [30] 米佳,杨雪莲,禄璐,等.枸杞蜂花粉多糖超声波提取工艺优化及抗氧化活性分析[J].食品科学技术学报,2020,38(1):97-103.
- [31] RUESGAS-RAMON M, FIGUEROA-ESPINOZA M C, DURAND E. Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: overview, challenges, and opportunities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(18): 3591-3601.
- [32] 何瑞阳,王锋,苏小军,等.玉竹多糖低共熔溶剂提取工艺优化及其抗氧化和抗糖基化活性研究[J].食品与发酵工业,2022,48(8):190-198.
- [33] 冯康琳.荷叶多糖的提取条件优化、结构表征、体外活性评价及其消化酵解特性的研究[D].雅安:四川农业大学,2022.
- [34] ZHANG R, YANG X, LIU Y, et al. Investigation of natural deep eutectic solvent for the extraction of crude polysaccharide from *Polygonatum kingianum* and influence of metal elements on its immunomodulatory effects [J]. Talanta, 2024, 271: 125721.
- [35] 石曾卉,刘丽阳,洪慧丽,等.山芹菜多糖的分离纯化、结构分析及抗氧化活性比较[J].现代食品科技,2022,38(10):124-132.