张京良, 孙彦庆, 江晓路, 等. 灵芝菌丝体多糖提取工艺优化及其对 HSF 细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(10): 243−255. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040366

ZHANG Jingliang, SUN Yanqing, JIANG Xiaolu, et al. Optimization of Extraction Process of Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* Mycelium and Its Protective Effect Against Oxidative Damage in HSF Cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(10): 243−255. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040366

· 工艺技术 ·

灵芝菌丝体多糖提取工艺优化及其对 HSF 细胞氧化损伤的保护作用

张京良[1], 孙彦庆[2], 江晓路[1], 朱宗敏[2], 宗雯雯[1,*], 尚丽丽[2]
（1.中国海洋大学青岛海洋生物医药研究院, 山东青岛 266100;
2.青岛黛优佳生物科技有限公司, 山东青岛 266100）

摘　要: 为优化灵芝菌丝体多糖（*Ganoderma lucidum* mycelium polysaccharides，GLP）的提取工艺，探究其抗氧化性能及对皮肤细胞损伤的保护作用。本研究以灵芝 CZDG10 菌丝体为原料，采用单因素实验结合响应面试验优化了高压破碎联合复合酶法提取 GLP 的工艺条件，分析其抗氧化活性，并建立 H_2O_2 诱导的人皮肤成纤维细胞（Human skin fibroblasts，HSF）损伤模型，考察 GLP 在防护细胞损伤方面的作用效果。结果表明，GLP 的最佳提取条件为：破碎压力 100 MPa，料液比 1∶40 g/mL，复合酶添加量 2.40%、酶解温度 50.0 ℃，酶解 pH5.5，酶解时间 2.25 h，在此条件下 GLP 得率达到 9.69%±0.32%。GLP 主要由甘露糖、葡萄糖、半乳糖和岩藻糖组成，且能够有效清除 DPPH、OH 和 $ABTS^+$自由基，其 IC_{50} 值分别为 0.30、0.36 和 1.59 mg/mL，提示其具有良好的抗氧化能力。此外，在 H_2O_2 诱导的 HSF 细胞中，GLP 随浓度递增而显著提高细胞活力，1.0 mg/mL GLP 可使损伤的 HSF 细胞存活率提高 22.33%，经进一步分析发现 GLP 可通过上调细胞内超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase，SOD）和谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathione peroxidase，GSH-Px）活力，降低活性氧（Reactive oxygen species，ROS）和丙二醛（Malondialdehyde，MDA）含量，从而降低氧化应激损伤；同时，GLP 还能够通过降低细胞内基质金属蛋白酶-1（Matrix metalloproteinase-1，MMP-1）含量、促进 I 型胶原蛋白（Collagen I，Col I）的分泌，从而增加细胞内胶原蛋白的含量，维持细胞健康状态。因此，GLP 对 H_2O_2 诱导的 HSF 细胞损伤具有显著的保护作用，本研究将为灵芝菌丝体多糖的开发及应用提供理论依据。

关键词: 灵芝菌丝体多糖, 复合酶, 响应面, HSF 细胞, 抗氧化
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2026)10−0243−13
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040366
本文网刊:

Optimization of Extraction Process of Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* Mycelium and Its Protective Effect Against Oxidative Damage in HSF Cells

ZHANG Jingliang[1], SUN Yanqing[2], JIANG Xiaolu[1], ZHU Zongmin[2], ZONG Wenwen[1,*], SHANG Lili[2]
（1.Marine Biomedical Research Institute of Qingdao, Ocean University of China, Qingdao 266100, China;
2.Qingdao Drenergy Biotechnology Co., Ltd., Qingdao 266100, China）

Abstract: To optimize the extraction of *Ganoderma lucidum* mycelium polysaccharides (GLP) derived from the mycelium of *Ganoderma lucidum* CZDG10 and to explore its antioxidant properties and protective effect on skin cell damage. The extraction of GLP was optimized using a combination of single factor experiments and the response surface method, with high-pressure crushing assistance and compound enzyme treatment. The antioxidant activity of GLP was analyzed, and the

收稿日期: 2025−04−30
基金项目: 泰山产业领军人才工程专项（HYJK2021001）。
作者简介: 张京良（1985−）, 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 菌物资源挖掘及功能产品开发, E-mail: jlzhang1985@163.com。
*** 通信作者:** 宗雯雯（1993−）, 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 天然功效成分的研究与开发, E-mail: 17864272822@163.com。

injury model of human skin fibroblasts (HSF) induced by H_2O_2 was evaluated to assess the efficacy of GLP in preventing cell damage. The optimal extraction conditions of GLP included a crushing pressure of 100 MPa, solid-liquid ratio of 1∶40 g/mL, compound enzyme content of 2.40%, enzymatic temperature of 50.0 ℃, enzymatic pH of 5.5, and enzymatic reaction time of 2.25 h. Under these conditions, GLP was obtained in 9.69%±0.32% yield. GLP primarily comprised mannose, glucose, galactose, and fucose and effectively scavenged DPPH, OH, and $ABTS^+$ free radicals, with IC_{50} values of 0.30, 0.36, and 1.59 mg/mL, respectively, demonstrating its antioxidant capacity. Models of H_2O_2-induced HSF oxidative stress showed that GLP could improve the cell survival rate in a concentration-dependent manner and increase cell viability by 22.33% at a concentration of 1.0 mg/mL. GLP also up-regulated the activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in HSF cells under oxidative stress induced by H_2O_2 and reduced the content of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA), thereby reducing oxidative stress damage. In addition, GLP increased the content of collagen in HSF cells by reducing the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) content and promoting the secretion of collagen I in HSF cells, thereby maintaining the healthy state of the skin cells. Therefore, GLP exhibited a significant protective effect against H_2O_2-induced HSF cell damage. This study provides a theoretical basis for the development and application of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* mycelium.

Key words: *Ganoderma lucidum* mycelium polysaccharides (GLP); complex enzyme; response surface; HSF cell; antioxidant

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是我国传统扶正固本、滋补强壮的名贵药材,在我国具有悠久的食药用历史,《神农本草经》记载灵芝“补中益气、增智慧、好颜色、久食轻身不老、延年神仙”,目前国家卫生健康委员会已将灵芝纳入“药食同源”目录[1]。灵芝多糖是灵芝的主要活性成分,具有免疫调节[2]、抗肿瘤[3−4]、抗氧化[5−6]、抗炎[7]、降血糖[8]、调节肠道菌群[9]、护肝[10] 等多种生物活性。灵芝多糖主要来源于灵芝子实体、孢子粉和发酵菌丝体等材料。近年来,利用液体发酵菌丝体提取灵芝多糖,因生产周期短、提取率高、生产过程可控以及便于工业化生产等优势,逐渐受到广泛重视。

目前多糖的提取方法主要包括热水提取法[11−12]、微波辅助提取法[13]、超声辅助提取法[14]、酶提取法[15]等。经典的热水提取法操作方便简单,但存在提取时间长,能耗高,提取率低等问题;微波和超声辅助提取法可以快速高效提取灵芝多糖,但容易导致多糖结构破坏;酶法提取具有反应条件温和,提取率高,多糖结构完整,绿色环保等优点,已逐渐成为多糖提取的主要方法。但灵芝菌丝体细胞壁由几丁质、纤维素、半纤维素、灵芝多糖等结合构成,结构紧密稳定,导致多糖提取困难。近年来,通过不同提取方法联用提取多糖已成为提高多糖产量的有效策略[16−17],任洪飞等[18] 通过反复冻融联合热水浸提法提高了灵芝多糖的得率和抗氧化活性。高压破碎技术因其高效破坏细胞壁结构的能力,在多糖等活性成分提取中展现出显著优势[19];而生物酶能针对性地降解细胞壁多糖组分,进一步提高提取效率。因此,将高压破碎与酶法相结合,有望突破传统提取工艺的瓶颈,实现灵芝菌丝体多糖的高效绿色提取。

氧化应激是导致皮肤衰老、炎症及多种慢性疾病的重要因素。过氧化氢(Hydrogen peroxide, H_2O_2)作为常见的氧化应激诱导剂,可通过产生活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS)导致机体 DNA 损伤、脂质过氧化及细胞凋亡[20−21]。近年来,天然多糖对氧化应激的保护作用越来越受到研究人员的关注。已有研究表明,灵芝多糖具有良好的自由基清除能力[22],并能够有效降低细胞内活性氧的水平[23];此外,其还可以通过提高机体抗氧化酶活力,降低 MDA 水平,减轻机体氧化应激损伤[24−25]。目前,灵芝多糖的研究多集中于子实体多糖和肝损伤保护等方面,而灵芝菌丝体多糖对皮肤细胞损伤的保护作用鲜有报道。

鉴于此,本研究以灵芝 CZDG10 菌丝体为原料,在单因素实验的基础上,结合响应面设计优化高压破碎联合复合酶法提取灵芝菌丝体多糖(*Ganoderma lucidummycelium* polysacchar, GLP)的工艺条件,测定其抗氧化活性,并通过建立 H_2O_2 诱导人皮肤成纤维细胞(Human skin fibroblasts, HSF)损伤模型,探究灵芝菌丝体多糖抗氧化能力及对 HSF 细胞的保护作用,以期为灵芝菌丝体多糖的高值化利用和抗氧化、抗衰老产品的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

灵芝菌丝体　由灵芝菌株 CZDG10(CCTCC No: M 20241696)液体发酵,离心收集菌丝体,冷冻干燥制得;人皮肤成纤维细胞 HSF　厦门逸漠生物科技有限公司;纤维素酶(500 U/mg)、木聚糖酶(20 U/mg)、菠萝蛋白酶(600 U/mg)　南宁东恒华道生物科技有限责任公司;1,1- 二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)　美国 Sigma 公司;水杨酸、无水乙醇、甲醇、硫酸亚铁、30% 过氧化氢　分析纯,国药集团化学试剂有限公司;总蛋白定量测定试剂盒(BCA 法)、活性氧(Reactive oxygen species, ROS)测定试剂盒、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)测定试剂盒、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)测

定试剂盒　南京建成生物工程研究所；人 I 型胶原蛋白（Collagen I, Col I）酶联免疫试剂盒、人基质金属蛋白酶-1（Matrix metalloprpteinase-1, MMP-1）酶联免疫试剂盒　上海酶联生物科技有限公司。

Scientz-207A 高压细胞破碎机　宁波新芝生物科技股份有限公司；HWS24 型电热恒温水浴锅　上海一恒科学仪器有限公司；PH2700 型酸度计　美国 EUTECH 公司；Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent Eclipse XDB-C_{18} 色谱柱　美国安捷伦公司；Nicolet iS10 傅里叶红外光谱仪　美国赛默飞世尔科技公司；TSKgel GMPWXL 色谱柱　日本 Tosoh 公司；TECAN Infinite E Plex 型酶标仪　上海帝肯贸易有限公司；HF90 型二氧化碳培养箱　力康仪器有限公司；HCB-900V 型超净台　青岛海尔生物医疗有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　灵芝菌丝体多糖提取工艺　将冻干的灵芝菌丝体粉碎，过 60 目筛，收集菌丝体粉末。称取灵芝菌丝体粉末 10 g，以 1∶40 g/mL 的料液比加入纯化水，置高压细胞破碎机破碎 5 min，加入 2.0% 的复合酶（纤维素酶∶木聚糖酶∶菠萝蛋白酶=3∶2∶1），调 pH6.0，在 45 ℃ 下酶解 2 h，酶解结束后，90 ℃ 灭酶 60 min。酶提取液在 10000 r/min 离心 10 min 取上清，并减压浓缩至原体积的 1/5，加入 3 倍体积 95% 乙醇，4 ℃ 静置 12 h 后，10000 r/min 离心 10 min 收集沉淀，将沉淀溶解于等体积的纯化水，用 Sevag 法除蛋白 3 次，上清液加入 3 倍体积 95% 乙醇，4 ℃ 静置 12 h 后，10000 r/min 离心 10 min 收集沉淀，依次用无水乙醇、丙酮洗涤沉淀，冷冻干燥得 GLP。

1.2.2　单因素实验　按 1.2.1 的提取方法，将料液比 1∶40 g/mL、破碎压力 80 MPa，复合酶添加量 2.0%、酶解温度 45 ℃、酶解 pH6.0、酶解时间 2 h 设置为实验基本条件，以 GLP 得率为指标进行单因素实验。分别考察破碎压力（0、60、80、100、120、140 MPa），料液比（1∶20、1∶30、1∶40、1∶50、1∶60 g/mL），复合酶添加量（0、1%、2%、4%、6%），酶解温度（40、45、50、55、60 ℃），酶解 pH（4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0）及酶解时间（1、2、3、4、5、6 h）对 GLP 得率的影响。

1.2.3　响应面试验　在单因素实验筛选的基础上，根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理，以复合酶添加量（A）、酶解温度（B）、酶解 pH（C）和酶解时间（D）为因素，以 GLP 得率为响应值，设计 4 因素 3 水平的响应面试验，确定最优提取条件。试验因素及水平设计见表 1。

表 1　响应面试验设计因素与水平

Table 1　Factors and levels of response surface experiment

水平	因素			
	A复合酶添加量(%)	B酶解温度(℃)	C酶解pH	D酶解时间(h)
−1	1	45	5.0	1
0	2	50	5.5	2
1	3	55	6.0	3

1.2.4　GLP 得率的计算

1.2.4.1　标准曲线的制作　采用苯酚-硫酸法[26] 以无水葡萄糖为标准品制作标准曲线。称取适量无水葡萄糖配制成 0.1 mg/mL 的标准溶液。分别吸取标准溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 至干燥试管，加水定容至 1.0 mL，依次加入 1 mL 5% 苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸，立即混匀，室温静置 20 min，于 490 nm 处测定样品吸光度。以葡萄糖浓度为横坐标，吸光值为纵坐标，得标准曲线回归方程：y=14.764x−0.0031（R^2=0.9998）。

1.2.4.2　GLP 的测定及得率的计算　将不同条件下得到的 GLP 用水配制成一定浓度的溶液，按葡萄糖标准溶液处理方法处理待测样品，并根据标准曲线方程计算 GLP 浓度，按照公式（1）计算 GLP 得率：

$$\text{GLP得率}(\%)=\frac{C\times V\times N}{M}\times 100 \qquad \text{式（1）}$$

式中：C 表示根据吸光值计算出的 GLP 溶液质量浓度，mg/mL；V 表示 GLP 溶液体积，mL；N 表示溶液稀释倍数；M 表示灵芝菌丝体取样量，mg。

1.2.5　GLP 结构表征

1.2.5.1　分子量测定　采用高效液相凝胶色谱法（HPGPC）[27] 测定 GLP 的相对分子质量分布，并使用不同分子量的葡萄糖标准品绘制标准曲线。以出峰时间为横坐标，分子量对数值为纵坐标拟合得到的标准曲线为：y=−0.519062x+13.2595（R^2=0.9993）。色谱条件：色谱柱为 TSKgel GMPWXL 柱，流动相为 0.1 mol/L 硫酸钠溶液，流速 0.5 mL/min，柱温 35 ℃，进样量 20 μL。

1.2.5.2　单糖组成分析　采用 PMP 柱前衍生 HPLC 法[28] 测定 GLP 的单糖组成。色谱条件：色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C_{18} 柱，流动相为乙腈−50 mmol/L 磷酸盐缓冲液（17∶83，体积比）（pH6.9），流速 1.0 mL/min，检测波长 245 nm，柱温 25 ℃，进样量 10 μL。

1.2.5.3　傅里叶红外光谱分析　将干燥至恒重的 GLP 样品和光谱级 KBr 以 1∶100 的比例于玛瑙研钵中混合研磨，压制成片在 4000~500 cm^{-1} 波数范围内进行红外光谱（FTIR）扫描。

1.2.6　GLP 抗氧化活性分析

1.2.6.1　DPPH 自由基清除率测定　参照吴梦思等[29] 的方法并稍作修改，将 2 mL 样品溶液和 2 mL 0.2 mmol/L DPPH 甲醇溶液混匀，于黑暗条件下室温反应 30 min 后，在 517 nm 处测定吸光值。按照公式（2）计算 DPPH 自由基清除率：

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_0}{A_2}\right)\times 100 \qquad \text{式（2）}$$

式中：A_1 表示样品组的吸光值；A_0 表示以甲醇代替 DPPH 甲醇溶液的吸光值；A_2 表示以蒸馏水代替样品溶液的吸光值。

1.2.6.2 ·OH 清除率测定 参照王国霞等[30]的方法并稍作修改，向 1 mL 样品溶液中依次加入 1 mL 9 mmol/L $FeSO_4$ 溶液和 1 mL 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液，混合均匀后，加入 1 mL 8 mmol/L H_2O_2 溶液，37 ℃ 保温 30 min 后，在 510 nm 处测定吸光值。按照公式(3)计算·OH 清除率：

$$\text{·OH清除率}(\%)=\left(1-\frac{B_1-B_0}{B_2}\right)\times 100 \quad \text{式（3）}$$

式中：B_1 表示样品组的吸光值；B_0 表示以蒸馏水代替 H_2O_2 工作液的吸光值；B_2 表示以蒸馏水代替样品溶液的吸光值。

1.2.6.3 $ABTS^+$自由基清除率测定 参照张婷阳等[31]的方法并稍作修改，制备 ABTS 储备液避光放置 12~16 h 后，将 ABTS 储备液用蒸馏水稀释成在 734 nm 下吸光度为 0.70±0.002，即得 ABTS 工作液。将 0.4 mL 样品溶液与 3.6 mL ABTS 工作液混合均匀，室温下避光静置 5 min，在 734 nm 处测定吸光值。按照公式(4)计算 $ABTS^+$自由基清除率：

$$ABTS^+\text{自由基清除率}(\%)=\left(1-\frac{C_1-C_0}{C_2}\right)\times 100 \quad \text{式（4）}$$

式中：C_1 表示样品组的吸光值；C_0 表示以蒸馏水代替 ABTS 溶液的吸光值；C_2 表示以蒸馏水代替样品溶液的吸光值。

1.2.7 GLP 对 H_2O_2 诱导 HSF 细胞损伤的保护作用研究

1.2.7.1 细胞培养 将 HSF 细胞复苏后，用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 完全培养基于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养，当细胞融合度约 80% 时进行传代培养。

1.2.7.2 GLP 对 HSF 细胞毒性测定 以 MTT 比色法[32]检测细胞活力。取对数生长期的细胞，按 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中，接种量 100 μL，培养 24 h 后弃去上清液，每孔加入含不同浓度(0、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL)GLP 的新鲜 DMEM 培养基，并放回培养箱继续培养 24 h。药物作用结束后，向每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液，孵育 4 h 后弃上清液，向各孔中加入 150 μL DMSO 溶液，振荡 10 min 充分溶解，酶标仪测定 490 nm 处吸光值，按照公式(5)计算细胞活力(%)。

$$\text{细胞相对活力}(\%)=\frac{T_i-T_0}{T_1-T_0}\times 100 \quad \text{式（5）}$$

式中：T_i 为样品组在 490 nm 处的吸光值；T_1 为对照组在 490 nm 处的吸光值；T_0 为空白组在 490 nm 处的吸光值。

1.2.7.3 H_2O_2 诱导 HSF 细胞损伤模型的建立 取对数生长期的 HSF 细胞，按 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中，接种量 100 μL，培养 24 h 后弃去上清液，加入含不同浓度(0、50、100、200、400、600、800 μmol/L)H_2O_2 溶液的新鲜 DMEM 培养基处理 HSF 细胞 4 h，按 1.2.7.2 的方法测定细胞活性。

1.2.7.4 GLP 对 H_2O_2 诱导损伤的 HSF 细胞存活率测定 取对数生长期的 HSF 细胞，按 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中，接种量 100 μL，培养 24 h 后弃去上清液，将细胞分为空白对照组(CK)、模型组(CM)、阳性组(V_C)和样品组(GLP)。空白对照组和模型组加入新鲜 DMEM 培养基，样品组分别加入含不同浓度 GLP 的新鲜 DMEM 培养基，阳性组加入含 200 μmol/L 抗坏血酸的新鲜 DMEM 培养基，孵育 24 h 后，除空白对照组外，各组均加入 H_2O_2 孵育 4 h，按 1.2.7.2 的方法测定细胞活性。

1.2.7.5 HSF 细胞 ROS 水平测定 取对数生长期的 HSF 细胞，按 1.2×10^6 个/孔的密度接种于 6 孔板中，接种量 2.5 mL，并按 1.2.7.4 进行细胞分组处理及培养。处理结束后以 PBS 清洗细胞，加入终浓度 10 μmol/L 的 DCFH-DA 工作液 0.5 mL，37 ℃ 下避光孵育 30 min 后，按照 ROS 检测试剂盒说明书的方法，使用多功能酶标仪在 525 nm 发射波长(488 nm 激发波长)下检测荧光 DCF 强度。

1.2.7.6 HSF 细胞抗氧化指标测定 取对数生长期的 HSF 细胞按 1.2×10^6 个/孔的密度接种于 6 孔板中，接种量 2.5 mL，并按 1.2.7.4 进行细胞分组及培养。处理结束后收集细胞，加入裂解液，将裂解后的细胞悬液以 BCA 法测定蛋白浓度，随后按照试剂盒说明书的方法测定细胞内 SOD、GSH-Px 活力和 MDA 含量。

1.2.7.7 HSF 细胞胶原蛋白分泌测定 取对数生长期的 HSF 细胞按 1.2×10^6 个/孔的密度接种于 6 孔板中，接种量 2.5 mL，并按 1.2.7.4 进行细胞分组及培养。处理结束后取细胞培养上清液，于 4 ℃、1000 r/min 离心 15 min，取上清液利用酶联免疫检测试剂盒，通过 ELISA 法测定各组 HSF 细胞分泌的 Col I 和 MMP-1 含量。

1.3 数据处理

采用 Design Expert 8.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析和绘图，组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)，$P<0.05$ 差异具有统计学意义。每组实验进行 3 次重复，测定结果数据均用平均值±方差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

本研究考察了破碎压力、料液比、复合酶添加量、酶解温度、酶解 pH 和酶解时间 6 个因素对 GLP 提取的影响。如图 1A 所示，GLP 得率随破碎压力的升高先迅速增加，后略有下降。在压力为

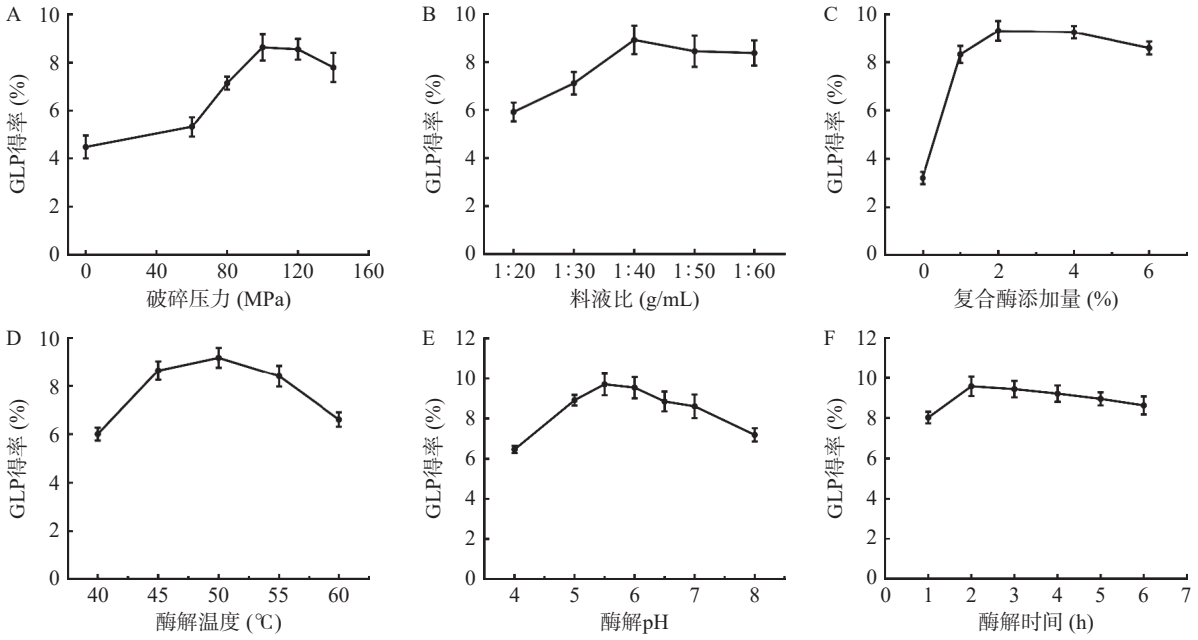


图 1　破碎压力(A)、料液比(B)、复合酶添加量(C)、酶解温度(D)、酶解 pH(E)和酶解时间(F)对 GLP 得率的影响

Fig.1　Effects of crushing pressure (A), solid-liquid ratio (B), compound enzyme addition amount (C), enzymolysis temperature (D), enzymolysis pH (E), enzymolysis time (F) on yield of GLP

100 MPa 时，得率最高为 8.63%，是未高压破壁的 1.92 倍。这可能是在一定压力范围内，高压所产生的剪切力、撞击作用及空化效应等使细胞瞬间破碎并膨胀，加速了多糖物质的溶出，有效提高 GLP 得率，但压力过高，会造成多糖结构的破坏反而使得率降低[19]。

如图 1B 所示，GLP 得率随着料液比的增大而逐渐升高，当料液比为 1∶40 时，GLP 得率达到峰值 8.92%，而后趋于平缓并略有降低。随着溶剂体积的增加，细胞内外多糖浓度差逐渐增大，从而加速了多糖的扩散与溶出[11]，但过高的料液比会加剧杂质溶出影响多糖提取。

如图 1C 所示，随着复合酶添加量的增多，GLP 得率呈现先逐渐上升后缓慢下降的趋势，加酶量为 2% 时，多糖得率达到峰值 9.31%。研究表明复合酶可以有效分解灵芝细胞壁，有利于生物活性多糖的溶出从而提高多糖得率[33]。因此随着复合酶添加量的增大，细胞壁被高效酶解使 GLP 得率不断增加，复合酶添加量为 2% 时酶与底物的结合将近饱和，多糖得率最高，继续增加可能由于多糖的过度降解导致 GLP 得率降低。

如图 1D 所示，在 40~60 ℃ 范围内，GLP 得率随着温度的升高先上升后逐渐降低，50 ℃ 时多糖得率达到最大值 9.18%。表明该温度下复合酶分解灵芝菌丝体细胞壁的效果最佳，促进 GLP 释放，但当温度过高时，复合酶的活力降低影响酶解效果，导致多糖得率下降[34]。丁霄霄等[33] 研究了利用复合酶法提取灵芝多糖的最适酶解温度，发现 50 ℃ 最佳，与本研究结果一致。

如图 1E 所示，pH 从 4.0 升至 5.5 时，GLP 得率从 6.46% 升高至 9.72%，当 pH 高于 5.5 时，多糖得率逐渐下降，表明复合酶在 pH 为 5.5 时，酶活力最强，有利于 GLP 溶出。而 pH 过高或过低会影响酶活性中心的构象，进而影响酶与底物的特异性结合和酶活力，使 GLP 得率降低[35]。

如图 1F 所示，在酶解时间 1~2 h，随着时间延长，酶与底物充分接触，促进有效成分溶出，GLP 得率逐渐上升，在 2 h 达到最高值 9.56%，继续增加酶解时间 GLP 得率反而下降，这可能是由于过度的提取会破坏多糖结构，使多糖含量降低[36]。

根据以上单因素结果分析，破碎压力 100 MPa、料液比 1∶40 g/mL、复合酶添加量 2%、酶解温度 50 ℃、酶解 pH5.5、酶解时间 2 h 为 GLP 多糖的最佳提取条件。考虑到过高的破碎压力和料液比会显著提高设备性能要求及能源消耗，不利于工业化生产，因此本研究在固定破碎压力 100 MPa 和料液比 1∶40 g/mL 的基础上，选取复合酶添加量、酶解温度、酶解 pH、酶解时间四个因素进一步进行响应面优化分析。

2.2　响应面试验结果

2.2.1　模型拟合　在单因素实验的基础上，对提取工艺的主要条件进行优化，Box-Behnken 设计方案及试验结果见表 2。采用 Design-Expert 8.0 软件对试验结果进行多元回归分析，建立 GLP 得率(Y)对复合酶添加量(A)、酶解温度(B)、酶解 pH(C)和酶解时间(D)的多元二次回归模型，得到回归方程：

$$Y=9.64+0.56A-0.21B+0.22C+0.47D+0.31AB-0.0075AC+0.31AD-0.32BC+0.025BD+0.28CD-0.46A^2-0.80B^2-0.35C^2-0.77D^2$$

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Design and results of response surface experiment

实验号	A复合酶添加量	B酶解温度	C酶解pH	D酶解时间	GLP得率(%)
1	−1	−1	0	0	8.25
2	1	−1	0	0	8.86
3	−1	1	0	0	7.29
4	1	1	0	0	9.16
5	0	0	−1	−1	7.88
6	0	0	1	−1	7.95
7	0	0	−1	1	8.57
8	0	0	1	1	9.75
9	−1	0	0	−1	7.85
10	1	0	0	−1	7.90
11	−1	0	0	1	8.25
12	1	0	0	1	9.55
13	0	−1	−1	0	8.25
14	0	1	−1	0	8.23
15	0	−1	1	0	9.35
16	0	1	1	0	8.05
17	−1	0	−1	0	8.02
18	1	0	−1	0	9.46
19	−1	0	1	0	8.25
20	1	0	1	0	9.66
21	0	−1	0	−1	7.98
22	0	1	0	−1	7.65
23	0	−1	0	1	8.49
24	0	1	0	1	8.26
25	0	0	0	0	9.81
26	0	0	0	0	9.58
27	0	0	0	0	9.43
28	0	0	0	0	9.72
29	0	0	0	0	9.67

2.2.2 方差分析 模型的方差分析结果如表 3 所示。由表可知，模型 $P<0.0001$，说明该回归模型的显著性极高，失拟项不显著（$P>0.05$），表明该方程能充分反映实际情况。模型相关系数 $R^2=0.9517$，$R^2_{adj}=0.9035$，表明模型能够解释 90.35% 响应值的变化，回归模型拟合度较好，可以用于预测分析酶解提取 GLP 的工艺结果。基于 F 值可以确定各因素对 GLP 得率的影响顺序为：复合酶添加量>酶解时间>酶解 pH>酶解温度，该模型中 A、B、C、D、A^2、B^2、C^2、D^2 对结果的影响极显著（$P<0.01$），交互项 AB、AD、BC、CD 对结果的影响显著（$P<0.05$）。

表 3 响应面回归模型方差分析结果

Table 3 ANOVA results of response surface quadratic polynomial models

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	16.02	14	1.14	19.72	<0.0001	**
A	3.72	1	3.72	64.08	<0.0001	**
B	0.54	1	0.54	9.26	0.0088	**
C	0.56	1	0.56	9.71	0.0076	**
D	2.67	1	2.67	46.00	<0.0001	**
AB	0.40	1	0.40	6.84	0.0204	*
AC	2.250×10^{-4}	1	2.250×10^{-4}	38.77×10^{-4}	0.9512	
AD	0.39	1	0.39	6.73	0.0212	*
BC	0.41	1	0.41	7.06	0.0188	*
BD	2.500×10^{-3}	1	2.500×10^{-3}	0.043	0.8386	
CD	0.31	1	0.31	5.31	0.0371	*
A^2	1.39	1	1.39	23.97	0.0002	**
B^2	4.13	1	4.13	71.19	<0.0001	**
C^2	4.13	1	4.13	71.19	<0.0001	**
D^2	3.80	1	3.80	65.51	<0.0001	**
残差	0.81	14	0.058			
失拟项	0.73	10	0.073	3.47	0.1207	
纯误差	0.084	4	0.021			
总变异	16.83	28				

注：*$P<0.05$差异显著；**$P<0.01$差异极显著。

基于二次回归模型绘制四个因素交互作用的响应面曲线图（图 2），响应面及等高线形状可以反映交互作用强弱，响应面的坡度较为陡峭且等高线呈椭圆形则代表两因素的交互作用较强。由图 2 可以看出，复合酶添加量与酶解温度、复合酶添加量与酶解时间、酶解温度与酶解 pH、酶解 pH 与酶解时间的

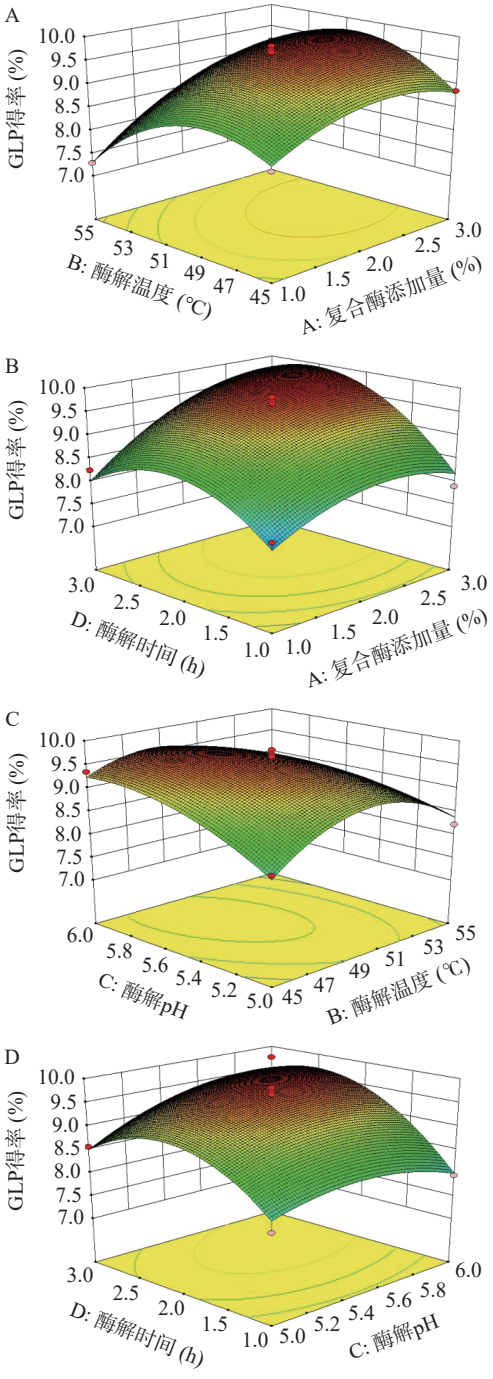


图 2 交互作用的响应面曲线

Fig.2 Response surface curves of the interactions

等高线接近椭圆形，交互作用显著，与显著性分析结果一致。

2.2.3　验证实验　根据上述模型，在破碎压力 100 MPa、料液比 1∶40 条件下，GLP 的最佳提取工艺条件为：复合酶添加量 2.40%、酶解温度 49.73 ℃，酶解 pH5.48，酶解时间 2.25 h，最大理论 GLP 得率为 9.88%。结合实际可操作性，调整提取条件为：复合酶添加量 2.40%、酶解温度 50.0 ℃，酶解 pH5.5，酶解时间 2.25 h，在此条件下进行验证实验，3 次平行实验 GLP 得率的平均值为 9.69%±0.32%，与预测值相近，表明该模型拟合性良好，预测准确。

2.3　GLP 初级结构表征

2.3.1　相对分子量及多糖含量　对 GLP 的多糖含量和相对分子质量分布进行分析，结果见表 4，GLP 的多糖含量为 70.54%，计算得到 GLP 的重均分子量 Mw 为 2.197×10^4 Da。

表 4　GLP 的重均分子量及单糖组成

Table 4　Weight average molecular weight and monosaccharide composition of GLP

样品	多糖含量（%）	重均分子量（Da）	单糖组成(mol%)			
			甘露糖	葡萄糖	半乳糖	岩藻糖
GLP	70.54	2.197×10^4	14.32	56.17	19.91	9.60

2.3.2　单糖组成　GLP 的单糖组成分析结果表明，GLP 主要由甘露糖、葡萄糖、半乳糖和岩藻糖组成，物质的量比为 1.49∶5.85∶2.07∶1.0（表 4），其中葡萄糖为主要成分，这与目前杨亚萍等[37] 报道的结果基本一致，但单糖组成的摩尔比存在差异，可能与不同的提取方法有关。

2.3.3　红外光谱　GLP 的红外光谱结果如图 3 所示，GLP 在 3391.83 cm^{-1} 处出现的较宽的吸收峰为 O-H 的伸缩振动引起，表明有羟基的存在；2931.63 cm^{-1} 处较窄的吸收峰为 C-H 的伸缩振动峰，这两类吸收峰均为多糖的特征吸收峰[38]；在 1669.98 cm^{-1} 处的吸收峰是由于多糖结合水引起或 C=O 的伸缩振动峰；1327.58 cm^{-1} 为 C-H 的振动峰；1250~950 cm^{-1} 之间较强的峰是吡喃环糖苷键伸缩振动引起；在 500~900 cm^{-1} 处有吸收峰表明多糖结构存在吡喃糖骨架[39]。因此，红外光谱显示 GLP 具有多糖的特征性吸收峰，为吡喃型多糖。

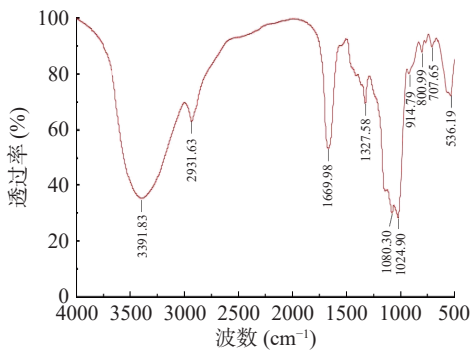


图 3　GLP 的红外光谱图

Fig.3　FT-IR spectrum of GLP

2.4　GLP 抗氧化活性分析

以 DPPH 自由基、·OH 和 $ABTS^+$ 自由基清除能力评估 GLP 体外抗氧化能力，并以 V_C 为阳性对照，结果见图 4。GLP 对 3 种自由基均具有较好的清除能力，且呈现明显的浓度依赖趋势。在浓度为 1.0 mg/mL 时，GLP 对 DPPH 自由基和·OH 的清除率均达到最大，分别为 93.76%±0.47% 和 91.75%±1.07%（图 4A~图 4B），IC_{50} 值分别为 0.30 和 0.36 mg/mL。GLP 对 $ABTS^+$ 自由基的清除效果相对较弱，在浓度为 2.5 mg/mL 时，清除率为 77.87%±1.19%（图 4C），IC_{50} 值为 1.59 mg/mL。陈瑞荣等[40] 通过热水浸提法提取的灵芝菌丝粗多糖清除 DPPH 自由

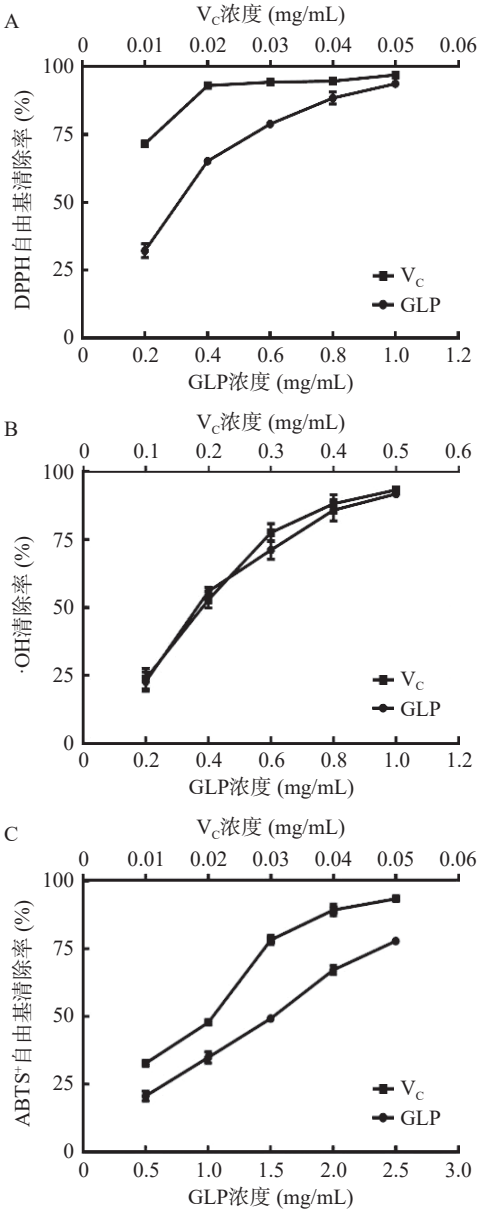


图 4　GLP 对 DPPH 自由基（A）、·OH（B）和 $ABTS^+$ 自由基（C）的清除作用

Fig.4　Scavenging effects of GLP on DPPH radical (A), hydroxyl radical (B) and $ABTS^+$ radical (C)

基的 IC_{50} 值为 0.47 mg/mL。聂健等[41] 报道灵芝子实体多糖对 DPPH 自由基和·OH 的 IC_{50} 值分别为 0.67 和 0.46 mg/mL, 与上述报道相比, GLP 具有较强的体外抗氧化能力, 特别是对 DPPH 自由基和·OH。

2.5 GLP 对 HSF 细胞氧化损伤的保护作用分析

2.5.1 GLP 对 HSF 细胞毒性评价 质量浓度 0.125~4.0 mg/mL 的 GLP 处理 HSF 细胞 24 h 后, 采用 MTT 法检测其对细胞存活率的影响, 结果如图 5A 所示。随着样品浓度的增加, HSF 细胞存活率逐渐下降, 当 GLP 浓度小于 2.0 mg/mL 时, 细胞存活率均大于 90%, 且与空白对照组之间无统计学差异(P>0.05); 当样品浓度升高到 4.0 mg/mL 时, 细胞活力显著下降至 83.28%±7.21%(P<0.05), 表明样品在 0.125~2.0 mg/mL 浓度范围内对 HSF 细胞的增殖无明显抑制作用。因此, 在后续实验过程中, 选定小于 2.0 mg/mL 的浓度作为 GLP 受试浓度。

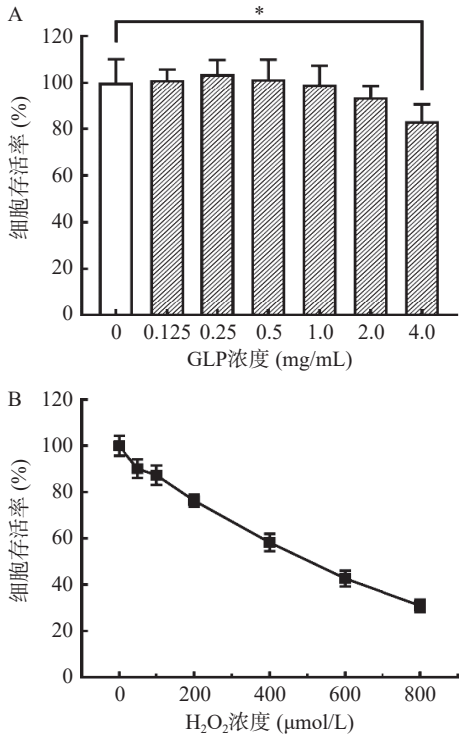


图 5 不同浓度 GLP(A)和 H_2O_2(B)对 HSF 细胞活力的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of GLP (A) and H_2O_2 (B) on the viability of HSF cells

注: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001, 图 6~图 8 同。

2.5.2 H_2O_2 诱导 HSF 细胞损伤模型的建立 H_2O_2 是生物体内最常见的活性氧分子, 它几乎可以从所有氧化应激来源中产生, 外源 H_2O_2 由于其高膜透性可以进入细胞并诱导细胞损伤[26]。本文研究了 H_2O_2 在 0~800 μmol/L 浓度下对 HSF 细胞的细胞毒性, 由图 5B 可知, 随着 H_2O_2 浓度的增大, 细胞活力逐渐降低, 当 H_2O_2 浓度为 400 μmol/L 时, 细胞存活率降低至 58.19%±3.76%, 此时细胞浓度接近半数抑制浓度, 且与空白对照组差异显著。因此, 后续实验中选用 400 μmol/L H_2O_2 作为 HSF 细胞的损伤浓度。

2.5.3 GLP 对 H_2O_2 诱导 HSF 细胞存活率的影响 GLP 对 H_2O_2 诱导损伤 HSF 细胞的保护作用如图 6 所示。HSF 细胞经 H_2O_2 处理后, 细胞活力降至 56.33%±3.60%, 与 CK 组相比差异极显著(P<0.0001), 提示建模成功。经 V_C 和 GLP 预处理的 HSF 细胞活力较 CM 组均明显提高, 且与 GLP 浓度呈正相关趋势, 其中 0.5 和 1.0 mg/mL 的 GLP 作用细胞, 细胞存活率分别为 73.19%±7.04%(P<0.01)和 78.66%±5.63%(P<0.001), 较 CM 组显著提高并已接近于 V_C 的作用效果。这一结果证实了灵芝多糖对皮肤细胞的保护作用, 殳叶婷等[42] 以 0.3125~1.25 mg/mL 的灵芝多糖预处理细胞后, 使 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞存活率极显著提高(P<0.01); 同时, 研究表明灵芝多糖可保护 HSF 免受 H_2O_2 诱导的细胞毒性, 使细胞死亡率降低 22.05%[43], 与本研究结果一致。结果表明 GLP 对氧化应激损伤的 HSF 细胞具有显著的保护作用。

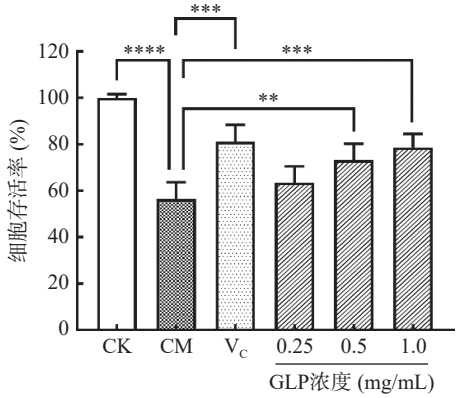


图 6 不同浓度 GLP 对 H_2O_2 诱导 HSF 细胞活力的影响

Fig.6 Effects of different concentrations of GLP on the viabilities of HSF cells induced by H_2O_2

2.5.4 GLP 对 H_2O_2 诱导的 HSF 细胞抗氧化指标的影响 ROS 是一系列分子氧衍生物的总称, 在细胞的许多生理过程中作为信号分子发挥着重要作用, 但过量的 ROS 在细胞内积累会引起氧化应激, 破坏生物大分子诱发炎症、癌症、肝损伤和异常衰老等疾病[44]。因此, 细胞 ROS 的水平可以直观反映细胞的氧化损伤程度。结果见图 7A, 在本研究中, H_2O_2 诱导 HSF 细胞使细胞内 ROS 水平显著升高(P<0.0001)。质量浓度 0.25~1.0 mg/mL 的 GLP 均可显著降低 H_2O_2 诱导损伤后 HSF 细胞的 ROS 水平(P<0.01), 并呈现浓度依赖性。Zeng 等[45] 以 UVB 诱导 HSF 细胞建立皮肤衰老模型, 发现灵芝多糖能够显著降低细胞内 ROS 水平, 提高细胞存活率进而抑制氧化应激, 与本试验结果相似。结果表明, GLP 可以通过降低 HSF 细胞 ROS 含量, 从而减缓 ROS 过多导致的氧化损伤。

细胞有一个内源性抗氧化系统, 通过产生多种酶促抗氧化剂来控制活性氧的产生和扩散。SOD、GSH-Px 等抗氧化酶可以通过中和细胞内的自由基

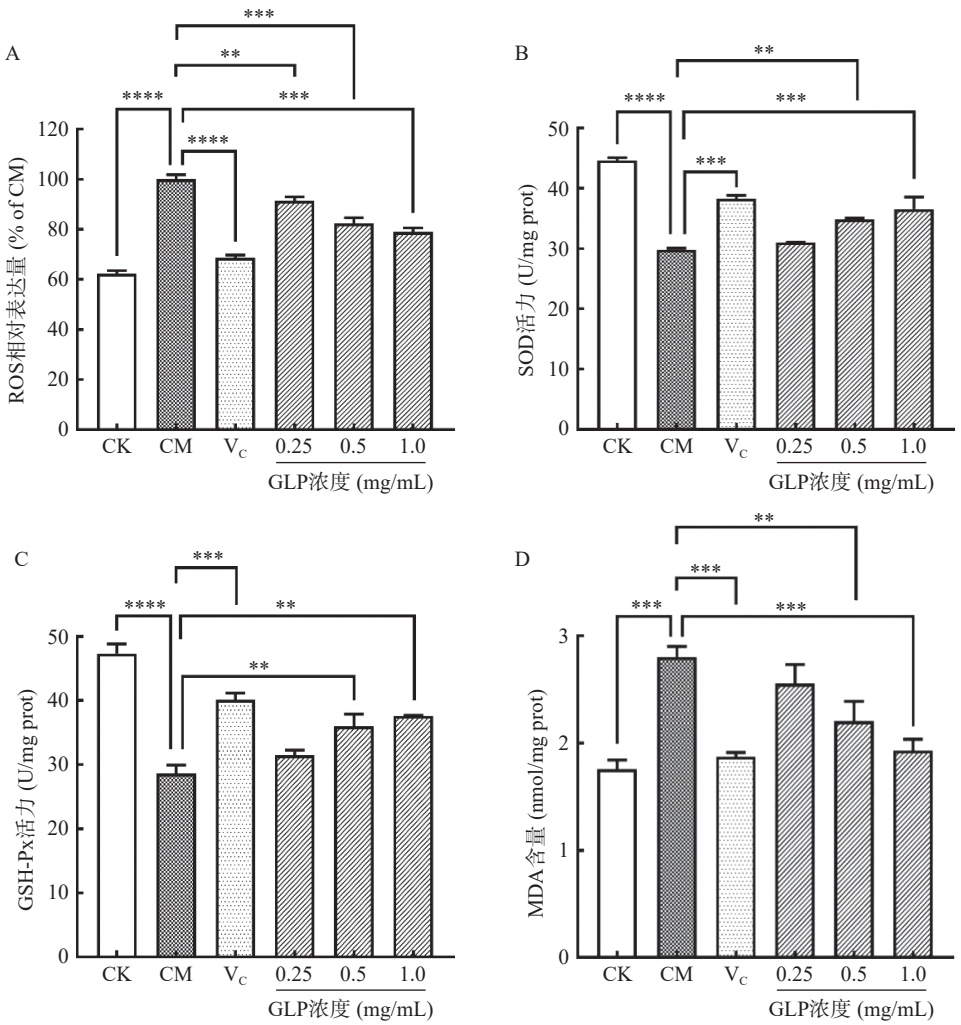


图 7　不同浓度 GLP 对 H_2O_2 诱导 HSF 细胞氧化应激因子的影响

Fig.7　Effects of different concentrations of GLP on oxidative stress factors in HSF cells induced by H_2O_2

注：A. ROS 含量；B. SOD 活力；C. GSH-Px 活力；D. MDA 含量。

和 ROS，维持细胞稳态并抵御氧化损伤[46]。MDA 是脂质过氧化反应的产物，其含量可反映机体组织和细胞的损伤程度[47]。GLP 对 H_2O_2 诱导的 HSF 细胞内 SOD、GSH-Px 活力和 MDA 含量的影响见图 7B、图 7C 和图 7D，H_2O_2 处理细胞后，引起 HSF 氧化损伤，SOD 和 GSH-Px 活力均极显著降低（P<0.0001），质量浓度 0.25、0.5、1.0 mg/mL 的 GLP 处理后，SOD 和 GSH-Px 活力均有所提高，并呈现一定的剂量依赖性，且质量浓度 1.0 mg/mL GLP 使细胞 SOD 和 GSH-Px 活力分别提高至 36.54±2.83 U/mg prot（P<0.001）和 37.61±0.62 U/mg prot（P<0.01），接近 V_C 的保护效果。H_2O_2 氧化损伤 HSF 会导致细胞脂质过氧化加剧，细胞内 MDA 含量显著升高（P<0.001），达到 CK 组的 1.59 倍（图 7D）。与 CM 组相比，质量浓度 0.50~1.0 mg/mL GLP 均能显著降低 MDA 含量，分别降至 2.20±0.19 nmol/mg prot（P<0.01）和 1.93±0.11 nmol/mg prot（P<0.001）。张佳婵等[48] 报道了灵芝菌丝体多糖可以上调细胞抗氧化酶水平，降低氧化损伤 HSF 细胞的 MDA 积累。此外，谢韶琼等[49] 研究发现灵芝多糖可减少 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞内丙二醛沉积，增加抗氧化酶活性，从而达到延缓衰老的作用。本研究表明 GLP 可以通过激活细胞内 SOD、GSH-Px 等抗氧化酶并减少 MDA 等过氧化物的产生来清除细胞 ROS，有效恢复氧化应激细胞的抗氧化能力，保护细胞免受氧化损伤危害，具有良好的抗氧化损伤功效。

2.5.5　GLP 对 H_2O_2 诱导的 HSF 细胞胶原蛋白分泌的影响　细胞衰老过程中会产生大量的活性氧，形成氧化应激进而引起细胞损伤。同时，过量的 ROS 还通过激活一系列信号通路，导致皮肤基质中金属蛋白酶（Matrix Metalloproteinase，MMP）表达增加，加速细胞基质和胶原蛋白的降解，当正常胶原的降解和异常胶原纤维碎片的积累增加时，成纤维细胞的增殖受到抑制，导致胶原合成减少从而引起皮肤粗糙、褶皱、失去弹性等衰老现象形成[50]。Col I 是皮肤中含量最多的胶原，在维持皮肤真皮层的结构和强度方面起主要作用[51]，而 MMP-1 能够特异性降解 Col I，调控其动态平衡过程[52]。

GLP 对 H_2O_2 诱导的 HSF 细胞中 Col I 和 MMP-1 含量的影响如图 8 所示。与正常细胞相比，H_2O_2

处理后 HSF 细胞中 Col I 含量极显著降低（$P<0.0001$），仅为正常细胞的 55.36%，说明氧化损伤会使皮肤细胞中 Col I 分泌减少，但在 0.5、1.0 mg/mL GLP 和 V_C 的保护作用下，Col I 含量均明显上升，与模型组相比，分别提高了 29.84%、35.16% 和 61.03%（图 8A）；由图 8B 可知，模型组 MMP-1 含量较 CK 组极显著升高（$P<0.0001$），而 GLP 和 V_C 预处理均能显著降低 H_2O_2 诱导损伤后细胞中 MMP-1 表达水平（$P<0.05$），且 GLP 浓度为 1.0 mg/mL 时，对 MMP-1 的抑制率已达到 40.45%，抑制效果强于 V_C。结果表明，GLP 能够抑制 H_2O_2 诱导的 HSF 细胞中 MMP-1 的表达，并促进 Col I 蛋白的分泌，从而增加细胞胶原蛋白的含量。因此，GLP 可能通过抑制细胞外基质降解保护皮肤健康状态，具有良好的抗衰老功效。

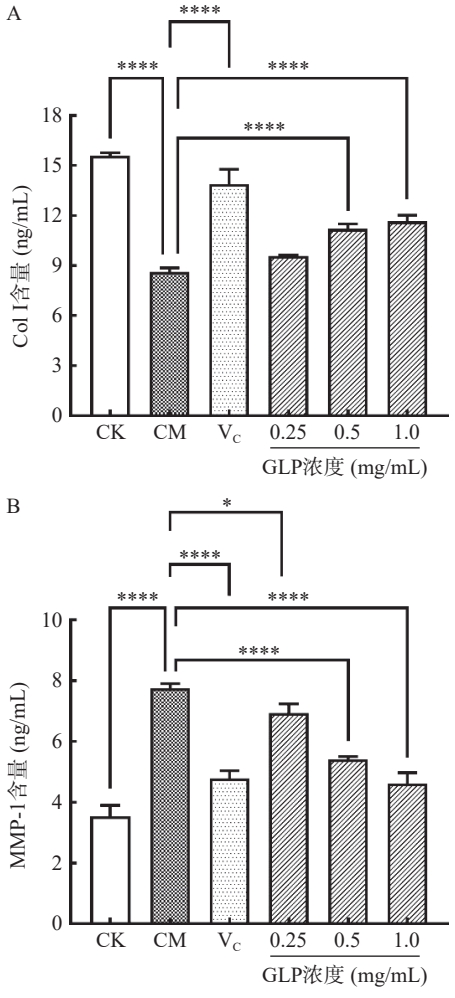


图 8 不同浓度 GLP 对 H_2O_2 诱导 HSF 细胞 Col I（A）和 MMP-1（B）含量的影响

Fig.8 Effects of different concentrations of GLP on Col I (A) and MMP-1 (B) contents in HSF cells induced by H_2O_2

3 结论

本研究采用高压破碎联合复合酶法提取灵芝菌丝体多糖，通过单因素实验研究了破碎压力、料液比、复合酶添加量、酶解温度、酶解 pH 和酶解时间对 GLP 得率的影响，并在此基础上采用响应面设计对 GLP 提取工艺进行优化，最佳提取条件为：破碎压力 100 MPa，料液比 1∶40 g/mL，复合酶添加量 2.40%，酶解温度 50.0 ℃，酶解 pH5.5，酶解时间2.25 h，在此条件下，GLP 得率达到 9.69%±0.32%，较现有文献报道的灵芝多糖得率（2.71%~6.10%）[11,26,53] 提高了 1.58~3.57 倍。推测其潜在机理，可能是由于该提取工艺首先利用高压作用强力破坏灵芝细胞壁结构，促进细胞内有效成分溶出，为酶解创造有利条件[19]；进而通过复合酶精准靶向降解关键组分：纤维素酶和木聚糖酶高效解聚纤维素糖骨架[36]，菠萝蛋白酶降解交联蛋白辅助多糖释放。三种酶协同作用，与高压破碎预处理效果相互促进，对灵芝坚固细胞壁进行深度、高效瓦解，显著提升灵芝多糖得率。该多糖主要由甘露糖、葡萄糖、半乳糖和岩藻糖组成，重均分子量 Mw 为 2.197×10^4 Da。抗氧化实验表明 GLP 可以有效清除 DPPH 自由基、·OH 和 $ABTS^+$ 自由基，其 IC_{50} 值分别为 0.30、0.36 和 1.59 mg/mL，展现出良好的抗氧化能力；细胞实验表明 GLP 对 H_2O_2 诱导的 HSF 细胞氧化损伤具有保护作用，其可通过提高细胞 SOD、GSH-Px 抗氧化酶活力，减少 ROS 含量，降低细胞脂质氧化水平，从而有效恢复氧化应激细胞的抗氧化能力；同时 GLP 能够缓解 H_2O_2 诱导的 HSF 细胞胶原蛋白和基质的降解，增加 Col I 含量，有助于延缓细胞衰老。为 GLP 在抗氧化、抗衰老功能性食品及护肤品中的应用提供支撑。后续将对 GLP 进一步纯化、对其结构、构效关系及作用机制进行深入探索，以期为 GLP 的开发应用提供扎实的理论基础。

© 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] 国家卫生健康委员会，国家市场监督管理总局. 关于党参等 9 种新增按照传统既是食品又是中药材的物质公告：2023 年第 9 号［EB/OL］.（2023-11-09）［2025-04-22］. http://www.nhc.gov.cn/sps/s7892/202311/f0d6ef3033b54333a882e3d009ff49bf.shtml.［National Health Commission, State Administration for Market Regulation. Announcement on 9 newly added substances that are both food and traditional chinese medicinal materials, including codonopsis pilosula: No. 9, 2023［EB/OL］.（2023-11-09）［2025-04-22］.］

[2] ZHANG Shulei, PANG Guibin, CHEN Chao, et al. Effective cancer immunotherapy by *Ganoderma lucidum* polysaccharide-gold nanocomposites through dendritic cell activation and memory T cell response[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 205: 192−202.

[3] GUO Cuiling, GUO Dandan, FANG Liu, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharide modulates gut microbiota and immune cell function to inhibit inflammation and tumorigenesis in colon[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 267: 118231.

[4] LI Guoli, TANG Jiafeng, TAN Wenli, et al. The anti-hepatocellular carcinoma effects of polysaccharides from *Ganoderma lu-*

cidum by regulating macrophage polarization *via* the MAPK/NF-κB signaling pathway[J]. Food & Function, 2023, 14(7): 3155−3168.
[5] 刘养山, 张景, 任洪飞, 等. 冠县灵芝多糖的分离纯化、结构表征及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(12): 81−89. [LIU Yangshan, ZHANG Jing, REN Hongfei, et al. Extraction, purification, structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from the fruiting body of Guanxian *Ganoderma lucidum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(12): 81−89.]
[6] ZHANG Nan, HAN Zhongming, ZHANG Rui, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides ameliorate acetaminophen-induced acute liver injury by inhibiting oxidative stress and apoptosis along the Nrf2 pathway[J]. Nutrients, 2024, 16(12): 1859.
[7] XU Zhongheng, SU Xiao, YANG Geng, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides protect against sepsis-induced cardiac dysfunction by activating SIRT1[J]. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2022, 74(1): 124−130.
[8] JIAO Jiaqi, YONG Tianqiao, HUANG Longhua, et al. A *Ganoderma lucidum* polysaccharide F31 alleviates hyperglycemia through kidney protection and adipocyte apoptosis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 226: 1178−1191.
[9] SANG Tingting, GUO Chengjie, GUO Dandan, et al. Suppression of obesity and inflammation by polysaccharide from sporoderm-broken spore of *Ganoderma lucidum* via gut microbiota regulation[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 256: 117594.
[10] GUO Weiling, LIU Wenkun, LIANG Peng, et al. High molecular weight polysaccharides from *Ganoderma lucidum* attenuates inflammatory responses, gut microbiota, and liver metabolomic in lipopolysaccharide-induced liver injury mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 287: 138400.
[11] 赵婷婷, 戴映笛, 舒昉, 等. 灵芝菌丝体多糖提取工艺优化及其对慢性酒精肝损伤的保护作用[J]. 食品工业科技, 2023, 44(5): 388−396. [ZHAO Tingting, DAI Yingdi, SHU Fang, et al. Optimization of extraction technology of polysaccharides from *Ganoderma* Lingzhi *Mycelium* and its protective effect on alcoholic liver injury[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(5): 388−396.]
[12] LUO Hongjian, ZHANG Yukun, WANG Saizhen, et al. Structural characterization and anti-oxidative activity for a glycopeptide from *Ganoderma lucidum* fruiting body[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 261: 129793.
[13] QIN Xiu, MA Guanhua, LIU Liping, et al. Microwave-assisted degradation of β-D-glucan from *Ganoderma lucidum* and the structural and immunoregulatory properties of oligosaccharide fractions[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 220: 1197−1211.
[14] CHEN Tiqiang, KAN Yongjun, YANG Chi, et al. Bioactivities and molecular characterizations of the polysaccharide(s) from ultrasonic-circulating extracts of Lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (*Agaricomycetes*)[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2020, 22(5): 455−466.
[15] CHEN Bojie, LIU Yang, YANG Ke, et al. Amylase-assisted extraction alters nutritional and physicochemical properties of polysaccharides and saponins isolated from *Ganoderma* spp[J]. Food Chemistry, 2023, 20: 100913.
[16] LI Jiaxin, MIAO Yuzhi, GUO Caifu, et al. Ultrasound combined mechanical wall-breaking extraction of new *Ganoderma leucocontextum* polysaccharides and their application as a structural and functional improver in set fat-free goat yogurt production[J]. Food Chemistry, 2025, 468: 142374.
[17] DO D T, LAM D H, NGUYEN T, et al. Utilization of response surface methodology in optimization of polysaccharides extraction from Vietnamese red *Ganoderma lucidum* by ultrasound-assisted enzymatic method and examination of bioactivities of the extract[J]. The Scientific World Journal, 2021, 2021(1): 7594092.
[18] 任洪飞, 逄梦玉, 隋昕怡, 等. 反复冻融法制备灵芝多糖工艺优化、结构表征及抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(8): 11−20. [REN Hongfei, PANG Mengyu, SUI Xinyi, et al. Repeated freeze-thaw extraction optimization, structural features and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(8): 11−20.]
[19] 梁万年, 李海池, 钟超, 等. 黄芪多糖高压破碎提取工艺优化及体外抗氧化活性研究[J]. 中国药业, 2022, 31(11): 28−32. [LIANG Wannian, LI Haichi, ZHONG Chao, et al. Optimization of high-pressure crushing extraction process of *Astragalus* polysaccharides and study of its *in vitro* antioxidant activity[J]. China Pharmaceuticals, 2022, 31(11): 28−32.]
[20] KAMMEYER A, LUITEN R M. Oxidation events and skinaging[J]. Ageing Research Reviews, 2015, 21: 16−29.
[21] KIM S Y, KIM E A, KIM Y S, et al. Protective effects of polysaccharides from *Psidium guajava* leaves against oxidative stresses[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 804−811.
[22] 吴杨洋, 周妍汝, 刘春燕, 等. 灵芝多糖提取工艺优化及抗氧化活性的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(14): 4636−4642. [WU Yangyang, ZHOU Yanru, LIU Chunyan, et al. Study on the optimization of extraction technology and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(14): 4636−4642.]
[23] XING Zheng, ZHANG Chunchen, ZHAO Chen, et al. Targeting oxidative stress using tri-needle electrospray engineered *Ganoderma lucidum* polysaccharide-loaded porous yolk-shell particles[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, 125: 64−73.
[24] XU Yu, ZHANG Xuan, YAN Xiaohui, et al. Characterization, hypolipidemic and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Ganoderma lucidum*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 706−716.
[25] ZHANG Yiwen, FENG Yanbo, WANG Wenshuai, et al. Characterization and hepatoprotections of *Ganoderma lucidum* polysaccharides against multiple organ dysfunction syndrome in mice[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021(1): 9703682.
[26] 李曹龙, 吴汐柔, 王晓爽, 等. 灵芝子实体多糖提取工艺优化及对哮喘小鼠改善作用[J]. 中国酿造, 2024, 43(11): 119−124. [LI Caolong, WU Xirou, WANG Xiaoshuang, et al. Optimization of extraction process of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* fruit body and improving effect on asthmatic mice[J]. China Brewing, 2024, 43(11): 119−124.]
[27] 刘静, 周帅, 李德顺, 等. 五种食用菌多糖结构特征及其体外激活 Dectin-1 受体活性比较[J]. 食用菌学报, 2021, 28(5): 87−95. [LIU Jing, ZHOU Shuai, LI Deshun, et al. Characterization and dectin-1 activation activity of polysaccharides from fruiting bodies of five edible fungi[J]. Acta Edulis Fungi, 2021, 28(5): 87−95.]

［28］ 宗雯雯, 沈照鹏, 卜义明, 等. 蛹虫草多糖单糖组成的方法学研究[J]. 菌物学报, 2018, 37(3): 395−404. ［ZONG Wenwen, SHEN Zhaopeng, BU Yiming, et al. Methodological study on the monosaccharide composition of polysaccharides in *Cordyceps militaris*[J]. Mycosystema, 2018, 37(3): 395−404.］
［29］ 吴梦思, 金建宇, 尚书游, 等. 卷丹百合黄酮提取物抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(15): 163−169. ［WU Mengsi, JIN Jianyu, SHANG Shuyou, et al. Study on antioxidant activity of *Lilium lancifolium* Thunb flavonoid extrac[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(15): 163−169.］
［30］ 王国霞, 牛祎琳, 牛富婷, 等. 不同提取方法对密银花多糖理化性质及抗氧化活性的影响[J]. 食品工业科技, 2024, 45(24): 196−203. ［WANG Guoxia, NIU Yilin, NIU Futing, et al. Effects of different extraction methods on physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharides from *Lonicerae japonicae Flos*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(24): 196−203.］
［31］ 张婷阳, 张伶, 蒋雨秦, 等. 玫瑰花渣多糖提取工艺优化及体外抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2025, 46(2): 192−199. ［ZHANG Tingyang, ZHANG Ling, JIANG Yuqin, et al. Optimization of polysaccharide extraction process from *Rosa rugosa* residue and analysis of its antioxidant activity *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(2): 192−199.］
［32］ 韩婕珺, 洪铮怡, 龚天贵, 等. 牡丹籽乙醇提取物对 UVB 诱导 HaCaT 细胞光老化的保护作用及机制研究[J]. 食品工业科技, 2024, 45(15): 351−359. ［HAN Jiejun, HONG Zhengyi, GONG Tiangui, et al. Protective effect and mechanism of *Paeonia suffruticosa* seed ethanol extract on photoaging of HaCaT cells induced by UVB[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(15): 351−359.］
［33］ 丁霄霄, 李凤伟, 商曰玲, 等. 灵芝多糖的复合酶法提取工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(5): 34−39,53. ［DING Xiaoxiao, LI Fengwei, SHANG Yueling, et al. Optimization of extraction technology of *Ganoderma lucidum* polysaccharide by enzyme complex[J]. Food Research and Development, 2020, 41(5): 34−39,53.］
［34］ 刘养山, 逄梦玉, 张景, 等. 水-酶联合法制备灵芝多糖及其抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(9): 292−302. ［LIU Yangshan, PANG Mengyu, ZHANG Jing, et al. Preparation of *Ganoderma lucidum* polysaccharides by water-enzyme combination method and their antioxidant activity[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(9): 292−302.］
［35］ 丁霄霄, 李凤伟, 余晓红. 响应面法优化复合酶提取灵芝总三萜工艺[J]. 食品工业, 2018, 39(8): 40−44. ［DING Xiaoxiao, LI Fengwei, YU Xiaohong. Optimization of complex enzyme extraction technology of total triterpenoids from *Ganoderma lucidum* by response surface methodology[J]. The Food Industry, 2018, 39(8): 40−44.］
［36］ 张会佳, 侯相竹, 张涵, 等. 黄芪多糖复合酶提取工艺优化及其 *α*-葡萄糖苷酶抑制活性[J]. 食品工业科技, 2024, 45(17): 181−189. ［ZHANG Huijia, HOU Xiangzhu, ZHANG Han, et al. Optimization of complex enzyme extraction process of *Astragalus* polysaccharides and its *α*-glucosidase inhibitory activities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(17): 181−189.］
［37］ 杨亚萍, 吕亚辉, 刘飞祥, 等. 灵芝菌丝体硒多糖结构表征、抗氧化活性及对小鼠运动疲劳的影响[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(6): 109−118. ［YANG Yaping, LÜ Yahui, LIU Feixiang, et al. Structure characterization, antioxidant activity and effects of selenium polysaccharide from *Ganoderma lucidum mycelium* on exercise fatigue in mice[J]. China Food Additives, 2023, 34(6): 109−118.］
［38］ 王文帅. 灵芝菌丝体多糖的结构表征及其改善血脂紊乱的相关机制探究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2023. ［WANG Wenshuai. Structural characterization and mechanism on improving dyslipidemia of mycelia polysaccharides from *Ganoderma lucidum*[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2023.］
［39］ 任洪飞. 灵芝多糖提取纯化、结构解析及抗氧化活性研究[D]. 聊城: 聊城大学, 2024. ［REN Hongfei. Study on extraction, purification, structure elucidation and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*[D]. Liaocheng: Liaocheng University, 2024.］
［40］ 陈瑞荣, 平兆华, 陈骏佳, 等. 灵芝栽培菌丝多糖的提取优化、表征和生物活性分析[J]. 食品科技, 2019, 44(9): 204−208,215. ［CHEN Ruirong, PING Zhaohua, CHEN Junjia, et al. Extraction optimization, characterization and bioactivity analysis of polysaccharide from cultivated Mycelium of spent *Ganoderma* substrate[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(9): 204−208, 215.］
［41］ 聂健, 杨水莲, 陈嘉博, 等. 灵芝子实体多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 农业工程, 2024, 14(7): 104−110. ［NIE Jian, YANG Shuilian, CHEN Jiabo, et al. Extraction process optimization of *Ganoderma lucidum* fruiting bodies polysaccharide and its antioxidant activity[J]. Agricultural Engineering, 2024, 14(7): 104−110.］
［42］ 殳叶婷, 高洁, 彭文潇, 等. 灵芝多糖的抗氧化作用研究[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(4): 504−508. ［SHU Yeting, GAO Jie, PENG Wenxiao, et al. Study on antioxidation of *Ganoderma lucidum* polysaccharide[J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2020, 36(4): 504−508.］
［43］ 王冰心, 钟铭, 卢颖裕, 等. 不同多糖配伍对 H_2O_2 诱导的皮肤细胞老化的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2019, 35(9): 57−66, 146. ［WANG Bingxin, ZHONG Ming, LU Yingyu, et al. Inhibition of different polysaccharides on H_2O_2-induced skin cell aging[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(9): 57−66,146.］
［44］ DUNAWAY S, ODIN R, ZHOU Linli, et al. Natural antioxidants: Multiple mechanisms to protect skin from solar radiation[J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9: 392.
［45］ ZENG Qinghai, ZHOU Fang, LEI Li, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides protect fibroblasts against UVB-induced photoaging[J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 15(1): 111−116.
［46］ MARKIEWICZ E, IDOWU O C. DNA damage in human skin and the capacities of natural compounds to modulate the bystander signalling[J]. Open Biology, 2019, 9(12): 190208.
［47］ ZHANG Chen, ZHANG Lan, LIU Hui, et al. Antioxidation, anti-hyperglycaemia and renoprotective effects of extracellular polysaccharides from *Pleurotus eryngii* SI-04[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111: 219−228.
［48］ 张佳婵, 邵卿, 王倩, 等. 灵芝菌丝体多糖对人皮肤成纤维细胞氧化应激损伤的防护机制[J]. 食品科学, 2020, 41(13): 174−183. ［ZHANG Jiachan, SHAO Qing, WANG Qian, et al. Extraction and purification of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and mechanistic study of their protective effect against oxidative stress injury in human skin fibroblast cells[J]. Food Science, 2020,

41(13)：174−183.］

［49］谢韶琼, 廖万清. 灵芝多糖对角质形成细胞氧化应激性损伤的保护作用[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2006, 20(2)：77−79.［XIE Shaoqiong, LIAO Wanqing. *Ganoderma* polysaccharides and H_2O_2-induced kerotinocytes oxidative stress[J]. The Chinese Journal of Dermatovenereology, 2006, 20(2)：77−79.］

［50］NATARAJAN V T, GANJU P, RAMKUMAR A, et al. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation[J]. Nature Chemical Biology, 2014, 10(7)：542−551.

［51］孙斌, 肖瀛, 俞苓, 等. 氧化三甲胺对皮肤成纤维细胞氧化损伤作用的影响及 V_C 对其干预作用[J]. 食品科学, 2024, 45(11)：152−162.［SUN Bin, XIAO Ying, YU Ling, et al. Oxidative damage caused by trimethylamine oxide to human skin fibroblasts and protective effect of vitamin C against it[J]. Food Science, 2024, 45(11)：152−162.］

［52］崔力文, 张加玲. 黑咖啡提取物对人皮肤成纤维细胞胶原蛋白及衰老相关基因的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(3)：710−714.［CUI Liwen, ZHANG Jialing. Effects of black coffee extract on collagen and aging related genes in human skin fibroblasts cell[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(3)：710−714.］

［53］石佳, 冯杰, 刘利平, 等. 液态发酵灵芝菌丝体多糖提取工艺的优化及其理化特征的分析[J]. 菌物学报, 2024, 43(7)：111−123.［SHI Jia, FENG Jie, LIU Liping, et al. Optimization of extraction and physicochemical characteristics analysis of polysaccharides from liquid fermentation mycelia of *Ganoderma* lingzhi[J]. Mycosystema, 2024, 43(7)：111−123.］