

GA的提取分离工艺优化及其体内抗氧化活性作用

刘 乔, 管晓辉, 黄翠菊, 夏 炎, 沈明浩*
(吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118)

摘 要: 目的: 探讨利用漆酶破壁结合超声波辅助法提取灵芝孢子粉中灵芝酸(ganoderma acid, GA)组分以及GA对D-半乳糖所致亚急性衰老小鼠的体内抗氧化活性的影响。方法: 利用正交试验将工艺条件优化; D-半乳糖连续皮下注射进行亚急性衰老小鼠造模, 建模同时, 以抗坏血酸为阳性对照组, GA设立高、中、低剂量组对衰老模型小鼠进行灌胃, 另设立空白对照组和模型对照组, 灌胃0.5%的羧甲基纤维素钠溶液(sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na), 每周测一次体质量, 6周后分别测所有小鼠血清、肝脏、脑组织的总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)活力、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量, 血清和脑组织的谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)活力、血清和肝脏的总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)值。结果: 得到最优工艺条件为料液比1:60、加酶量0.04 g/mL、超声3次、每次超声时间3 h, 在此工艺条件下得到GA的提取率为1.69%; GA可明显提高小鼠体内T-SOD、GSH-PX活力和T-AOC值, 降低MDA含量。结论: 得到GA的最佳提取工艺稳定可行; GA能显著提高衰老模型小鼠的体内抗氧化能力。

关键词: 漆酶; 灵芝酸; D-半乳糖; 衰老; 抗氧化

Optimized Extraction of Crude Ganoderic Acid from *Ganoderma lucidum* Spore and Antioxidant Effect *in Vivo*

LIU Qiao, GUAN Xiaohui, HUANG Cuiju, XIA Yan, SHEN Minghao*
(College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The extraction of ganoderma acid (GA) from *Ganoderma lucidum* spore was explored by the combined use of cell wall disruption with laccase and ultrasonic-assisted extraction. Besides, this study also examined the antioxidant effect of GA in subacute senile mice induced by D-galactose. Methods: The extraction process was optimized through orthogonal array experiments. A subacute senile mouse model was established by continuous subcutaneous injection of D-galactose into the nape of the neck. Using ascorbic acid as positive control group, the mice in the high, moderate and low dose groups were given GA by gavage, while those in the blank and model control groups were given 0.5% CMC-Na by gavage. Body weights of these mice were measured once a week for six weeks. After the experimental period, total superoxide dismutase (T-SOD), the levels of malondialdehyde (MDA) in the serum, liver and brain of mice, the activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) in the serum and brain, and total antioxidant capacity (T-AOC) in the serum and liver were determined. Results: The optimal conditions for GA extraction were determined as follows: solid/liquid ratio, 1:60; enzyme concentration, 0.04 g/mL; ultrasonic time, 3 h; and number of ultrasonic treatments, 3. Under these conditions, the maximum yield of GA of 1.69% was obtained. Conclusions: The optimized extraction process is stable and feasible. The GA extracted from *Ganoderma lucidum* spore could obviously improve T-SOD and GSH-Px activities as well as T-AOC capacity and reduce MDA content in mice. Together, these results implied the obvious anti-aging effects of the GA on subacute senile mice induced by D-galactose.

Key words: laccase; ganoderic acid; D-galactose; aging; antioxidant effect

中图分类号: Q949.91

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)24-0089-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201524015

我国东北三省有丰富的灵芝资源, 尤其以长白山灵芝孢子粉最为知名。灵芝孢子是灵芝的有性生殖细胞——担孢子, 具有灵芝的全部遗传活性物质, 其药用价值和保健作用日益受到重视^[1-2], 含有维生素、多糖、

生物碱、三萜等多种生物活性成分, 据测定其中多糖、多肽、三萜、氨基酸和蛋白质等活性物质的含量均是子实体的70倍以上^[3]。灵芝孢子具有坚硬的双层外壁结构, 其成分几丁质含量为52.08%~57.64%, 无机元素构

收稿日期: 2015-04-24

作者简介: 刘乔(1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品质量与安全评价。E-mail: liuq1216@163.com

*通信作者: 沈明浩(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品毒理与安全、胚胎毒理。E-mail: shenmh2003@163.com

成以Si (19.01%)、Ca (24.31%)为主,硅和钙掺入几丁质使得孢壁更加结实坚硬,且耐酸碱,极难氧化分解^[4],因此未破壁的灵芝孢子中的有效物质不易于提取,限制人体对其有效物质的消化吸收^[5],朱江等^[6]曾采用复合酶酶解方法来生产破壁灵芝孢子粉,破壁率高。

Kutoba等^[7]在1982年首次从灵芝的子实体中分离得到三萜类灵芝酸(ganoderma acid, GA) A和GAB, 1988年从灵芝属中分离得到103种三萜类新化合物,曾祥丽等^[8]曾报道灵芝中含有122种三萜类成分,其中最主要的是GA 37种。

小鼠衰老模型的建立方法包括胸腺摘除法、臭氧致衰老法、Y射线照射法以及半乳糖注射法等,D-半乳糖注射法最为常用,D-半乳糖可以在正常质量浓度代谢,但在高质量浓度时它可以在半乳糖氧化酶的催化条件下转化为醛糖和氢过氧化物,导致超氧化物阴离子自由基和氧自由基的生成,破坏机体抗氧化防御系统。现代药理研究表明,灵芝三萜类化合物具有保肝调脂^[9-10]、抗肿瘤^[11]、抗HIV-1及HIV-1蛋白酶活性^[12]、诱导CNE2细胞凋亡^[13]、抗氧化和抑制组织胺释放等作用^[14],刘晓珍等^[15]证实了黑灵芝中的三萜成分有着较强的体外抗氧化活性,但作为三萜化合物的GA的体内抗氧化活性还鲜有相关的报导。为了对GA组分开展进一步的研究,本研究采用漆酶酶解及超声波技术结合的方法来从未破壁的灵芝孢子粉中提取粗GA,利用正交试验将工艺条件优化,并对灵芝孢子粉中GA粗提物的体内抗氧化活性做了更深一步的探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

未破壁灵芝孢子粉 长白山特产商贸城丰茂山珍;漆酶(食品级,4 000 U/g)、羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na)(食品级) 上海申光食用化学品有限公司;抗坏血酸、D-半乳糖、无水乙醇、三氯甲烷、冰醋酸、香草醛、高氯酸、齐墩果酸标准品、磷酸二氢钠、碳酸氢钠、柠檬酸、氢氧化钠、浓盐酸及分离用有机溶剂均为国产分析纯;总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)试剂盒、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)值试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物歧化酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)试剂盒 南京建成生物工程公司。

1.2 仪器与设备

WD-2102型自动酶标仪 北京市六一仪器厂;N-1001D-WA型旋转蒸发仪 东京理化器械株式会社;GL-20G-II高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;

超纯水系统 法国Millapore公司;DZF-6050型真空干燥箱 上海光谱仪器有限公司;KQ-250B型超声波清洗器 东京理化器械株式会社;酸度计 梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 GA组分的提取及制备

称取一定质量灵芝孢子粉,加入适量漆酶和pH 6的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,在70℃条件下破壁1 h,灭酶、干燥,加入98%乙醇溶液为溶剂超声提取,抽滤得滤液,45℃减压浓缩得棕黄色固油混合物,混合物复溶于100 mL的CHCl₃中,用饱和NaHCO₃溶液(CHCl₃-NaHCO₃体积比为1:1)萃取3次,取NaHCO₃溶层,用6 mol/L盐酸酸化至pH 3~5后用等量CHCl₃再萃取3次,合并CHCl₃层,减压浓缩干燥得黄色粗GA组分^[16]。灌胃时将其溶于0.5% CMC-Na制成悬浮液。用无水乙醇定容至10 mL待测。

1.3.2 GA提取率的测定

1.3.2.1 标准曲线的制作^[17]

用无水乙醇将齐墩果酸标品制成0.018 6 mg/mL质量浓度的标准溶液,分别取0.0、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL的样液于具塞试管中80℃水浴挥干,分别加入现配的5%香草醛-冰醋酸溶液0.2 mL、高氯酸1.2 mL,70℃水浴保温反应15 min,流水冷却至室温,分别加入3.6 mL的乙酸乙酯,振荡后静置15 min,550 nm波长条件下用紫外-可见分光光度计测其吸光度。以齐墩果酸质量浓度(X, mg/mL)为横坐标,测得的吸光度(A)为纵坐标绘制成标准曲线,得出线性方程为 $A=47.377X+0.0035$, $R^2=0.9989$ 。

1.3.2.2 GA提取率及粗提物纯度计算

将提取出的粗GA组分用无水乙醇定容至10 mL,精确吸取一定体积的样液于具塞试管中作为反应样液,参照1.3.2.1节中标曲中的操作方法进行反应并测定吸光度A,GA提取率(Y)及GA粗提物纯度(P)计算如式(1)、(2)所示:

$$Y/\% = \frac{X \times V \times N}{M} \times 100 \quad (1)$$

$$P/\% = \frac{X \times V \times N}{m} \times 100 \quad (2)$$

式中:X为反应样品质量浓度/(mg/mL);V为反应体系的体积,5 mL;N为定容的体积与反应样液之比;M为称取孢子粉质量/mg;m为GA粗提物质量/mg。

1.3.3 GA提取工艺优化设计

1.3.3.1 单因素试验设计

在其他条件相同的条件下,即取1 g孢子粉、20 mL pH 7的缓冲液、70℃条件下酶解1 h,干燥后分别考察加酶量(0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 g/mL)、超

声时间(1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 h)、超声次数(1、2、3、4、5)、料液比(1:30、1:40、1:50、1:60、1:70 (g/mL)) 4个单因素对GA提取率的影响,其他萃取条件同1.3.1节。

1.3.3.2 正交试验设计

以GA提取率作为衡量指标,在单因素试验的基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计研究加酶量、超声时间、超声次数和料液比4个因素对GA提取率的影响,确定最优提取工艺条件。各因素及水平设计见表1。

表1 正交试验因素与水平设计

Table 1 Factors and their coded levels used in orthogonal array design

水平	因素			
	A加酶量/(g/mL)	B超声时间/h	C超声次数	D料液比(g/mL)
1	0.03	2.0	1	1:50
2	0.04	2.5	2	1:60
3	0.05	3.0	3	1:70

1.3.4 动物分组及造模

空调动物房内温度18~22℃,自然光照。健康的昆明种小鼠60只(体质量(22±2)g),雌雄各半,适应性饲养1周后,随机分为6组(正常对照组,模型对照组,阳性对照组,GA给药低、中、高剂量组),每组10只,分笼饲养,自由采食和饮水。正常对照组和模型对照组灌服0.5%的CMC-Na;VC阳性对照组按照100 mg/(kg·d)的剂量灌胃;GA给药低、中、高剂量组分别按照50、100、200 mg/(kg·d)的剂量灌胃。除正常对照组外,其余各组小鼠在灌胃的同时颈部皮下注射D-半乳糖200 mg/(kg·d),D-半乳糖溶液以灭过菌的生理盐水配制,正常对照组注射生理盐水,以上各组灌胃和注射剂量均按0.1 mL/10 g标准操作^[18]。每日灌服、注射1次,连续6周。每周称体质量1次,按体质量再调整灌胃量和注射量。

1.3.5 组织样品的制备

实验小鼠在末次给药后,禁食1 d,称体质量,摘取眼球采血,分离血清。将小鼠脊椎脱臼处死,迅速取出全脑、肝组织,用4℃生理盐水冲净表面残血,滤纸吸干水分,称质量,脑组织和肝组织快速制成匀浆液。取0.2~1.0 g小鼠组织块,在预冷的生理盐水中漂洗,除去血液,用滤纸拭干。称质量后放入匀浆器,添加9倍质量的预冷生理盐水制成10%的组织匀浆液,同理分别制成1%和0.25%的组织匀浆液。

1.4 数据分析

动物实验所有实验数据均采用PASW Statistics 18软件进行统计分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示;显著性分析为单向方差分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 加酶量对提取率的影响

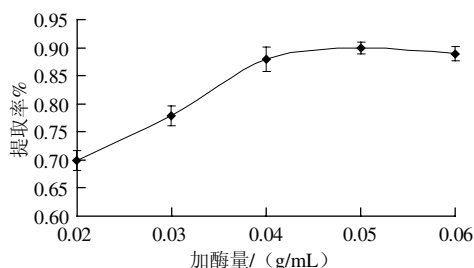


图1 加酶量对提取率影响

Fig.1 Effect of enzyme concentration on the extraction yield of GA

由图1可以看出,随着加酶量的增加,底物与酶接触机会不断增加^[19],使GA从胞壁中溶出来的几率增大,从而使提取率也逐渐增加,在加酶量达到0.04 g/mL时提取率达最高,继续增加漆酶质量浓度对提取率影响不大,酶与底物结合几乎达到饱和,甚至有可能分解或破坏有效物质结构^[20],提取率趋于平缓甚至缓慢下降,从节省材料等方面考虑,加酶量的考察范围定为0.03~0.05 g/mL。

2.1.2 超声时间对提取率的影响

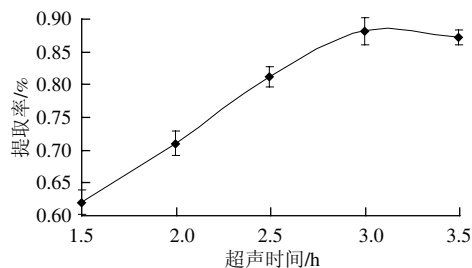


图2 超声时间对提取率的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic time on the extraction yield of GA

由图2可以看出,GA提取率随着超声时间的延长而增大,当时间达到3 h时提取率达到最高,继续延长超声时间,提取率开始缓慢下降,可能是超声时间过长会破坏溶入介质内的GA的物质结构^[21],降解物质结构影响提取率^[22],由此可以看出超声时间的最佳范围为2.5~3.5 h。

2.1.3 超声次数对提取率的影响

由图3可以看出,GA提取率随着超声次数的增加而逐渐增加,当超声2次后提取率的增加趋于平缓,有效物质的溶出较为完全,细胞内外溶液质量浓度达到动态平衡^[23],再增加提取次数时,提取率的增加幅度不大且耗时较长,因此超声次数的范围确定为1~3。

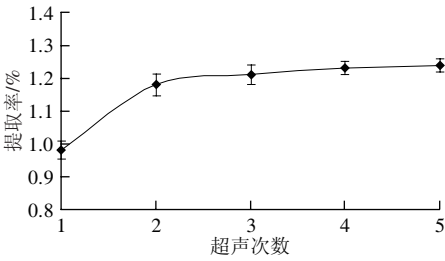


图3 超声次数对提取率的影响
Fig.3 Effect of number of ultrasonic treatments on the extraction yield of GA

2.1.4 料液比对提取率的影响

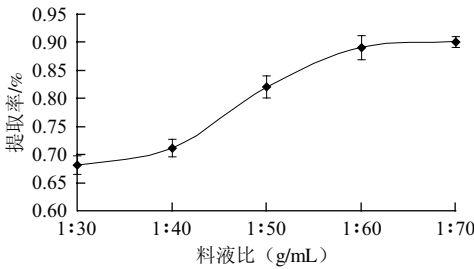


图4 料液比对提取率的影响
Fig.4 Effect of ratio of solid to liquid on the extraction yield of GA

由图4得知，GA的提取率随着溶剂用量的增加而增加，通过增加溶剂进入细胞增加提取率，当料液比达到1:60时达到最大，继续增大溶剂用量时，提取率变化不大或许已达到饱和^[24]，从节约溶剂角度考虑，料液比最佳范围选择为1:50~1:70。

2.2 正交试验结果与最优组合的确定

表2 正交试验结果与极差分析					
Table 2 Orthogonal array design with range analysis of experimental results					
试验号	A加酶量	B超声时间	C超声次数	D料液比	GA提取率/%
1	1	1	1	1	0.62
2	1	2	2	2	1.29
3	1	3	3	3	1.41
4	2	1	2	3	0.96
5	2	2	3	1	1.37
6	2	3	1	2	1.25
7	3	1	3	2	1.26
8	3	2	1	3	0.99
9	3	3	2	1	1.23
K ₁	3.32	2.84	2.86	3.22	
K ₂	3.58	3.65	3.48	3.80	
K ₃	3.48	3.89	4.04	3.36	
k ₁	1.11	0.95	0.95	1.07	
k ₂	1.19	1.22	1.16	1.27	
k ₃	1.16	1.30	1.35	1.12	
R	0.08	0.35	0.40	0.20	

由表2可以看出，各因素对指标影响的主次次序为C>B>D>A；直观观察得出最优组合为A₂B₃C₃D₂，

即加酶量0.04 g/mL、超声时间3 h、超声3次、料液比1:60 (g/mL)，在此组合条件下验证实验3次取平均值，得出GA提取率为1.69%。测得粗提物GA纯度为62.74%，杂质多为盐。

2.3 GA对小鼠的抗氧化作用

2.3.1 GA对亚急性衰老模型小鼠血清中各指标影响

表3 GA对亚急性衰老小鼠血清中T-SOD活力、MDA含量和GSH-PX活力的影响 (n=10)
Table 3 Effect of GA on the contents of SOD, MDA and GSH-PX in serum of subacute aging mice (n=10)

组别	T-SOD活力/(U/mL)	MDA含量/(nmol/mL)	GSH-PX活力/(U/mL)
空白对照组	67.90±2.77**	10.05±1.37**	518.48±41.93**
模型对照组	61.18±0.73	16.84±2.91	310.84±36.21
阳性对照组	67.99±1.08**	12.02±1.56**	418.53±27.03**
GA低剂量组	68.51±1.85**	12.32±1.17*	391.65±33.09*
GA中剂量组	68.09±1.53**	10.32±0.82**	540.17±43.24**
GA高剂量组	66.89±0.37**	8.08±1.01**	548.29±52.31**

注：*与模型对照组比较，有显著性差异 (P<0.05)；**与模型对照组比较，有极显著性差异 (P<0.01)。下同。

由表3可以看出，模型组中小鼠血清中的T-SOD活力、GSH-PX活力与空白组小鼠相比明显下降，MDA含量显著升高，差异极显著 (P<0.01)，说明亚急性衰老模型小鼠建模成功；而与模型对照组相比，GA和VC可显著增加D-半乳糖所致亚急性衰老小鼠血清中的T-SOD活力和GSH-PX活力，降低脂质过氧化物MDA含量，差异均为显著 (P<0.05) 或极显著 (P<0.01)，其中GA中剂量组和高剂量组中3个指标结果与空白组结果接近，说明GA对小鼠血清中T-SOD活力、MDA含量和GSH-PX活力有着显著影响。

2.3.2 GA对亚急性衰老模型小鼠肝脏中各指标影响

表4 GA对亚急性衰老小鼠肝脏中T-SOD活力、MDA含量和T-AOC值的影响 (n=10)
Table 4 Effect of GA on MDA content, SOD activity and T-AOC value in liver of subacute aging mice (n=10)

组别	T-SOD活力/(U/mg)	MDA含量/(nmol/mL)	T-AOC值/(U/mg)
空白对照组	30.59±0.78*	1.22±0.10	3.63±0.86**
模型对照组	23.05±1.56	1.50±0.38	1.85±0.07
阳性对照组	37.57±2.29**	0.93±0.11**	3.75±0.45**
GA低剂量组	27.87±2.87	1.33±0.06	2.62±0.24
GA中剂量组	33.62±4.49**	0.97±0.10**	2.37±0.52
GA高剂量组	30.81±3.87**	0.76±0.03**	3.04±0.90*

表4显示，与空白对照组相比，衰老模型小鼠肝脏中的T-SOD活力和T-AOC值明显降低，MDA含量增加，阳性对照组和GA各剂量组与模型组相比T-SOD活力与T-AOC值有不同程度的增加，MDA含量不同程度的降低，其中GA中、高剂量组中T-SOD活力明显增加，MDA含量明显降低，差异均为极显著 (P<0.01)；GA高剂

量组中T-AOC值与模型组相比显著增加;说明GA对小鼠肝脏中T-SOD活力、MDA含量和T-AOC值影响显著。

2.3.3 GA对亚急性衰老模型小鼠脑组织中各指标影响

表5 GA对亚急性衰老小鼠脑组织中T-SOD活力、MDA含量、GSH-PX活力和T-AOC值的影响 (n=10)

Table 5 Effect of GA on SOD activity, MDA content and T-AOC value in brain of subacute aging mice (n = 10)

组别	T-SOD活力/ (U/mg)	MDA含量/ (nmol/mL)	GSH-PX活力/ (U/mg)	T-AOC值/ (U/mg)
空白对照组	37.47±4.27**	1.16±0.07	1 194.55±194.66**	3.23±0.65**
模型对照组	19.10±2.59	1.28±0.03	515.26±82.65	1.98±0.12
阳性对照组	36.77±5.02**	0.90±0.18*	847.84±52.40*	3.03±0.16**
GA低剂量组	26.12±3.08*	1.11±0.35	739.88±52.34	2.80±0.30*
GA中剂量组	31.85±4.18**	1.01±0.15	1 193.97±102.53**	3.46±0.37**
GA高剂量组	30.55±0.88**	0.79±0.13**	1 123.61±224.67**	3.29±0.12**

由表5可知,低、中、高剂量的GA可明显提高亚急性衰老小鼠脑组织中T-SOD活力、GSH-PX活力、T-AOC值,降低大脑中MDA含量,其中GA中剂量组和高剂量组中T-SOD活力、GSH-PX活力和T-AOC值增加极显著,GA高剂量组降低MDA含量能力与VC阳性对照组接近,与模型对照组相比差异极显著($P<0.01$)。

3 讨论

D-半乳糖建立衰老动物模型最为常见^[25],D-半乳糖是一种营养成分,在正常质量浓度时可以被代谢,但超过一定质量浓度时机体细胞内半乳糖质量浓度升高,在醛糖还原酶催化条件下转化为半乳糖醇,由于这种物质不能被进一步代谢而堆积在细胞内影响渗透压,引起细胞肿胀代谢紊乱,影响机体内的抗氧化酶活性。T-SOD活力和GSH-PX活力高低代表着机体清除氧自由基的能力大小,MDA含量代表着机体受自由基攻击的严重程度^[26],T-AOC值代表总抗氧化能力。本研究中,在小鼠连续42 d注射半乳糖溶液后,T-SOD活力、GSH-PX活力、T-AOC值下降,MDA含量显著降低,与秦红兵等^[27]研究结果基本一致,说明衰老模型造模成功。

本研究通过GA各剂量组来考察GA对衰老模型小鼠体内的各抗氧化酶和脂质过氧化物的影响,与模型组比,GA各剂量组可以不同程度地增加小鼠体内T-SOD活力、GSH-PX活力、T-AOC值,降低MDA含量,其中血清中的MDA含量、GSH-PX活力,肝脏和脑组织中的MDA含量与GA剂量呈正相关,而T-SOD活力与T-AOC值在血清和组织中虽不与剂量呈正相关性,但各剂量组的结果与模型组相比差异比较明显,尤其是中、高剂量组多为显著或极显著,且中剂量组和高剂量组之间差异不大,可能是由于当功能因子到达一定剂量时,对机体内的

的各个抗氧化酶的作用逐渐趋于痕量,且小鼠之间个体差异较大,操作过程中可能存在少量偏差,综合各个指标结果,证实了GA具有良好的抗氧化效果;本实验用酶解和超声结合的方法从未破壁的灵芝孢子粉中提取GA,粗提物经测定纯度为62.74%,GA占主要成分,杂质主要为萃取过程中产生的盐类,在抗氧化过程中GA起主要作用;而纯化后的GA是否会有更好的抗氧化效果还有待进一步研究。

3 结论

通过正交试验确定了灵芝孢子粉中GA组分的提取分离最优工艺条件,即加酶量0.04 mg/mL、超声时间3 h、超声3次、料液比1:60(g/mL),在此组合条件下得出GA提取率可达1.69%,与初始工艺相比提取率提高了1.72倍。

抗氧化实验表明,灵芝孢子粉中的GA组分能够明显提高小鼠血清、肝脏和脑组织中的T-SOD活力、GSH-PX活力和T-AOC值,降低脂质过氧化物MDA含量,表明GA具有良好的抗氧化效果。

参考文献:

- [1] 倪伟锋. 灵芝破壁孢子粉破壁率测定技术和质量安全评价的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2008.
- [2] 陈惠. 灵芝与灵芝孢子的保健作用[J]. 农业工程技术: 农产品加工业, 2008, 5(5): 41-42.
- [3] 李明焱, 何晓. 灵芝孢子粉功能主治的探讨[C]//浙江省中医药学会肿瘤分会, 浙江省抗癌协会中医肿瘤专委会学术年会暨省级继续教育学习班文集, 2013.
- [4] 马晶晶. 高速离心剪切粉碎对灵芝孢子粉破壁及特性的影响[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2006.
- [5] 王卫霄, 吕艳茹, 姚苗苗, 等. 灵芝孢子粉抗肿瘤活性的研究进展[J]. 河北医药, 2015, 37(1): 105-108.
- [6] 朱江, 梅跃明, 李玉龙, 等. 灵芝孢子粉的生产工艺研究[J]. 江西食品工业, 2006, 7(4): 29.
- [7] KUBOTA T, ASAKA Y, MIURA I, et al. Structures of ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (FR.) KARST.[J]. Helvetica Chimica Acta, 1982, 65(2): 611-619.
- [8] 曾祥丽, 包海鹰. 灵芝三萜类成分与药理学研究进展[J]. 菌物研究, 2004, 2(1): 68-77.
- [9] XU Junwei, ZHAO Wei, ZHONG Jianjiang. Biotechnological production and application of ganoderic acids[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(2): 457-466.
- [10] 鲍琛, 李莉. 灵芝三萜对小鼠非酒精性脂肪肝的治疗作用[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(2): 148-151.
- [11] WANG Jian, YANG Yuanshuai, WANG Gang, et al. A computational study on the anticancer mechanism of ganoderic acids[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2012, 29(11): 887-891.
- [12] LIN S B, LI C H, LEE S S, et al. Triterpene-enriched extracts from *ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-Phase cell cycle arrest[J]. Life Sciences, 2003, 72(21): 2381-2390.
- [13] 黄秀旺, 张学鹏, 刘锋, 等. 灵芝三萜组分GLE诱导CNE2细胞凋亡与线粒体途径的关系[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(11): 867-869.

- [14] BOH B, BEROVIC M, ZHANG J, et al. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds[J]. *Biotechnology Annual Review*, 2007, 13(7): 265-301.
- [15] 刘晓珍, 聂少平, 李文娟, 等. 黑灵芝中性提取物三萜含量测定及抗氧化作用研究[J]. *南昌大学学报: 工科版*, 2011, 33(4): 332-337.
- [16] 李承范. 野生与种植灵芝中灵芝酸和总黄酮的提取及其含量测定[J]. *延边大学学报: 自然科学版*, 2013, 39(4): 269-272.
- [17] 弓晓峰, 谢明勇, 陈奕. 黑灵芝中三萜及其皂苷类化合物总量的光度测定[J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18(5): 825-829.
- [18] 徐红艳, 刘富国, 于阳阳, 等. 东北山核桃仁油对D-半乳糖衰老小鼠抗氧化能力的影响[J]. *食品科学*, 2012, 33(7): 266-269.
- [19] 付丽丽, 李洪莉, 侯聚敏, 等. 超声波协同纤维素酶法提取灵芝多糖的工艺研究[J]. *农业机械*, 2012, 28(15): 118-121.
- [20] 岳金玫. 攀枝花块菌多糖的提取、纯化及抗氧化活性研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.
- [21] 萨茹丽. 沙葱黄酮提取工艺优化、结构鉴定及其相关生物活性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.
- [22] ZHENG Yi, LI Yong, WANG Weidong. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and *in vitro* antioxidant activities of polysaccharides from *Trametes orientalis*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 111: 315-323.
- [23] 孟繁磊, 陈瑞战, 张敏, 等. 刺五加多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(10): 168-174.
- [24] 令博, 王捷, 吴洪斌, 等. 葡萄皮渣多酚超声波辅助提取工艺响应面法优化及抗氧化活性研究[J]. *食品科学*, 2011, 32(18): 24-29.
- [25] 雷鸣, 朱祖健. D-半乳糖致衰老的研究进展[J]. *解剖科学进展*, 2011, 17(1): 83-85.
- [26] 高璐, 王滢, 饶胜其, 等. 葡萄籽原花青素提取物对衰老模型小鼠抗氧化作用[J]. *食品科学*, 2014, 35(23): 253-256. doi: 10.7506/spkx1002-6630-201423049.
- [27] 秦红兵, 杨朝晖, 范忆江, 等. D-半乳糖诱导衰老小鼠模型的建立与评价[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(7): 1275-1278.