

雲芝LH1之胞外低分子量多醣體生物活性探討

鄭元凱、楊博文

E-mail: 360549@mail.dyu.edu.tw

摘要

研究以本土新穎雲芝菌(*Coriolus Versicolor*) LH1菌絲體液態培養之低分子量多醣體進行抗氧化活性與 α -glucosidase活性抑制評估。雲芝菌LH1菌絲體液態培養液，經酒精沉澱、透析收集含低分子量多醣體混合物(分子量為12-16 kDa以下)、再經HP20大孔吸附樹脂分離後，即可獲得數個含低分子量多醣體混合物之fractions，接著分析清除DPPH自由基與清除OH \cdot 自由基能力評估其抗氧化活性能力，分析 α -glucosidase活性抑制評估人體腸道澱粉水解後之血糖調控機制，最後再以最佳的低分子量多醣體分餾液再進一步進行DEAE Sepharose CL-6B離子交換樹脂，以獲得最佳抗氧化與酵素抑制活性之低分子量多醣體分餾液。實驗結果顯示，雲芝菌LH1菌絲體液態培養液之低分子量多醣體混合物，經由HP20大孔吸附樹脂可獲得7個fractions，以清除DPPH自由基能力與清除OH \cdot 自由基能力等抗氧化分析以及 α -葡萄糖..活性抑制分析後，發現fraction-2(低分子量多醣體-F2)和fraction-5(低分子量多醣體-F5)的效果最好，再以DEAE Sepharose CL-6B離子交換樹脂層析後，以分液F2-4 α -glucosidase活性抑制效果最好，其IC50為1.54 mg/ml。

關鍵詞：雲芝；低分子量多醣；DPPH 自由基清除能力；清除OH \cdot 自由基能力； α -glucosidase 活性抑制

目錄

封面內頁 簽名頁 中文摘要.....	iii 英文摘要.....
..... iv 誌謝.....	v 目錄.....
..... vi 圖目錄.....	x 表目錄.....
..... xi 1.前言.....	1 2.文獻回
顧.....	2 2.1 雲芝(<i>Coriolus Versicolor</i>)的簡介..... 2 2.1.1 雲芝的
型態及生長分布.....	2 2.1.2 雲芝化學成分..... 6 2.1.3雲芝的液態培
養.....	6 2.2雲芝之活性成分介紹..... 7 2.2.1雲芝多
醣.....	7 2.2.2腺..... 7 2.2.3三.
類.....	8 2.2.3.1.類的單體..... 8 2.2.3.2菇類之.類的基本結
構.....	9 2.2.4 皂.簡介..... 11 -vii- 2.2.4.1皂甘結
構.....	13 2.2.4.2 三.類皂..... 18 2.3 雲芝功效成份介
紹.....	18 2.3.1線.(Adenosine)..... 18 2.3.2 多醣
體.....	19 2.3.3三.類..... 20 2.3.4
皂.....	21 2.4分離方法介紹..... 22 2.4.1離子交換層
析法.....	22 2.4.2 凝膠樹脂..... 24 2.4.3大孔樹
脂.....	25 2.4.3.1大孔吸附樹脂的吸附原理..... 27 2.4.3.2 大孔吸附樹脂的特
性.....	27 2.4.3.3 大孔吸附樹脂吸附的影響因素..... 28 2.5抗氧化活性之測定原
理.....	29 2.5.1 DPPH自由基清除能力..... 29 2.5.2 清除OH \cdot 自由基金
力.....	30 2.5.3 α -葡萄糖..(α -glucosidase)活性抑制之調控血 糖體外試
驗.....	30 2.6試驗方法..... 31 2.6.1研究目
的.....	31 2.6.2樣品預處理試驗..... 31 3.材料與方
法.....	32 3.1試驗流程圖..... 32 -viii- 3.2試驗
材料.....	34 3.3儀器設備..... 34 3.4. 化學試
藥.....	34 3.5分離用樹脂..... 35 3.6樣品前處
理.....	36 3.7 大孔樹脂層析..... 36 3.7.1樹脂前處
理.....	36 3.7.2 大孔樹脂層析條件分析..... 36 3.8離子交換樹脂層
析.....	37 3.8.1離子交換樹脂前處理..... 37 3.8.2離子交換樹脂層
析.....	37 3.9分析方法..... 38 4.結果與討論 42 4.1雲芝發酵
液低分子量多醣體製程與活性分析.....	42 4.2 HP20 大孔樹脂層析..... 44 4.3低分子多醣體
大孔吸附層析分餾液之活性分析(清除 DPPH自由基、清除OH \cdot 自由基及抑制 α -glucosidase)	46 4.4 DEAE Sepharose CL-6B
離子交換層析.....	49 4.5雲芝胞外低分子量多醣體分液F2、 F5之活性分析.... 52 4.6 分餾液F2、 F2-4、 F5經

由Sephadex G50 column 純化.....	57	4.7 分餾液F2、F2-4、F5 分子量分析.....	60	4.8 分餾液F2、F2-4、F5單醣成分分析.....	66	4.9 分餾液F2、F2-4、F5 紫外光全波長掃描.....	67	-ix- 4.10 FTIR分析.....	69	5.結
論.....	72	參考文獻.....	73							

參考文獻

1. 刁治民、魏克家、吳保鋒。2006。食用菌學。青海人民出版社: 591-593。
2. 王伯徹、陳啟楨、華傑。1998。食藥用菇類的培養與應用。財團法人食品工業發展研究所。第 M87-019 號, 187 頁。
3. 王伯徹。1990。藥用真菌系列報導(八)雲芝。食品工業。22(10):59-62。
4. 卯曉嵐。1989。中國的食用和藥用大型真菌。微生物學通報16:290-297。
5. 李俊峰。2003。雲芝的生物學特徵:藥理作用及應用前景。安徽農業科學。31(3):509-510。
6. 李建武、余瑞元、陳麗蓉。1997。生物化學實驗原理與方法。第59-93頁。藝軒圖書出版社。台北, 臺灣。
7. 巫熒撰。2009。綠藻水解物對 -葡萄糖..與 -澱粉.之抑制與活性物質的純化。海洋大學食品科學系。
8. 呂淑芳。2002。靈芝之機能性與其分析方法。食品工業。-70- 34(11):3-10。
9. 吳國榮、程光宇、陳勝藍、鄒玉珍。1995。液態雲芝蛋白多醣的分離及其鑑定。南京師大學報18(1):88~93。
10. 肖崇厚、陳蘊如。1989。中藥化學。第323-360頁。上海科學技術出版社。上海, 中國。
11. 沈雅智。2005。探討麩胺酸的添加對於液態發酵生產松杉靈芝 菌多醣體和靈芝酸之研究。國立中央大學化學工程與材料工程 -74- 所。
12. 陳俞臻。2011。雲芝LH-1的皂.分離純化與活性成份研究。大葉大學生物產業科技所。
13. 馮杏儀。2010。大孔吸附樹脂在環境科學中的應用。華南師範大學。2-5。
14. 黃鈺中。2010。雲芝子實體多醣分離純化及其抗氧化能力分析之研究。大葉大學生物產業科技學系。
15. 黃慧琪、張麗杰。2009。皂素的生物活性與化學成分之探討。化學。67(1)1-12。
16. 黃健政。2005。油/水乳化系統中多酚化合物對兩價鐵離子的螯合作用與抗氧化能力的表現。行政院國家科學委員會專題研究計畫。21-22。
17. 程光宇、吳國榮、鄒玉珍、陳勝藍。1998。深層培養雲芝菌絲體蛋白多醣體的提取及性質。植物資源與環境7(4):19~23。
18. 楊士賢。2006。引響雲芝菌絲體與多醣體批次饋料發酵產程控制參數因子之探討:116。大葉大學碩士論文。台灣。
19. 劉國凌、寧正祥、郭紅輝。2010。苦瓜果實中多醣的分離純化及性質分析。食品科學。
20. 戴郁軌、朱凱俊。1982。真菌名詞辭典。第2467頁。名山出版社。台北, 臺灣。
21. Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K. and Sussman, A. S. 1973. Vol.IVA. A Taxonomic Review with Keys: Ascomycetes and Fungi Imperfecti. Academic Press, Inc. The Fungi. p. 621. New York.
22. Cheng G-Y WG-R, Zhou Y-Z, cheng S-L. 1998. Extaction and characterization -75- of proteoglycan from the mycelium of Polysictus versicolor(L.) Fr. by submerged culture .Zhiwu Ziyuan Yu Huanjing. 7(4):19-23.
23. Cherng, I. H. and Chiang, H. C. 1995. Three new triterpenoids from Antrodia cinnamomea. J. Natural Products. 58:365-371.
24. Cherng, I. H., Wu, DP. and Chiang, H. C. 1996. Triterpenoids from Antrodia cinnamomea. Phytochemistry. 41:263-267.
25. Cuixian Yang., Ning He., Xueping Ling., Meiling Ye., Chenxiao Zhang., Wenyao Shao., Chuanyi Yao., ZhiyuanWang., Qingbiao Li. 2008. The isolation and characterization of polysaccharides from longan pulp
26. Dai, Y. Y., Chuang C. H., Tsai, C. C., Sio, H. M., Huang, S. C., Chen, J. C., and Hu, M. L. 2003. The protection of Antrodia camphorata against acute hepatotoxicity of alcohol in rats. J of Food and Drug Anal. 11:177-185.
27. Duduku K., Rosalam S., and Rajesh N. 2010. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food and Bioproducts Processing.157:17.
28. Gang-Liang Huang, Man-Xi Liu and Xin-Ya Mei., 2004. Synthesis, (1-3)-b-D-glucanase-binding ability, and phytoalexin elicitor activity of a mixture of 3,4-epoxybutyl(1-3)-b-Doligoglucosides. 1453 – 1457.
29. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. and Aruoma, O. I. 1987. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Anal. Biochem. 165: 215-219.
30. H. X. WANG., Ng TB , Liu WK , Ooi VEC , and Chang ST. 1996. Polysaccharide—Peptide complexes from the cultured mycelia of the mushroom Coriolus versicolor and their culture medium activate mouse lymphocytes and macrophages the International Journal of Biochemistry & Cell Biology.(5):601-607.
31. Hostettmann K, Marston A. 1995. Saponins. New York: Cambridge University Press. p.548. -76- 32.
32. Jian, C. and Yusuf, C. 2003. Polysaccharopeptides of Coriolus versicolor: Ohysiological activity, uses, and production. Biotechnology Advances 21:109-122
33. Jean-Paul, V., Lynn, H., Aede de, G., Harry, G. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry68:275-297.
34. Jie Xiao., Jian Sun., Lingyun Yao., Qingsheng Zhao., Liwei Wang., Xiaodong Wang., Xiaofan Yuan., Bing Zhao. 2012. Physicochemical characteristics of ultrasonic extracted polysaccharides from cordyceps cephalosporium mycelia.
35. Keji, T., Ruixin N., Longjun J., Quansheng C. 2009. Anti-athletic fatigue activity of saponins (Ginsenosides) from American ginseng (Panax quinquefolium L.) . African Journal of Pharmacy and Pharmacology.3(6):301-306.
36. Liyan Zhao., Yanhong Dong., Guitang Chen., Qihui Hua., 2010. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from Ganoderma lucidum.
37. Milgate, J. and Roberts, D. C. K. 1995. The nutritional and Biological significance of saponins. Nutrition Research.15:1223-1249
38. Moor, G. E, Gerner, RE, and Franklin, H. A. 1967. Culture of Normal Human Leukocytes. J. Amer. Med. Assn. 199:519.
39. Ng TB., and Chan WY. 1997. Polysaccharopeptide from the mushroom Coriolus versicolor possesses analgesic activity but dose not produce adverse effects on female reproductive or embryonic development in mice General Pharmacology: The Vascular System. 29(2):269-273.
40. Oleszek, W. A. 2006. Chromatographic determination of plant saponins. Journal of Chromatography A . 967:147-162.
41. Rau U, Kuenz A, Wray, Nimtz M, Wrenger J and Cicek H. 2009. production and structural analysis of the polysaccharide secreted by Trametes (Coriolus) versicolor ATCC 200801 . Applied Microbiology and Biotechnology.81(5):827-837.
42. Sadeq Hassan Al-Sheraji., Amin Ismail., Mohd Yazid Manap., Shuhaimi Mustafa., Rokiah Mohd Yusof., Fouad Abdulrahman Hassan. 2012. Purification, -77- characterization and antioxidant activity of polysaccharides extracted from the fibrous pulp of Mangifera pajang fruits.
43. Sandula J, Kogan G, Kancurakova M, and machova E. 1999. Microbial (1??)-[beta]—glucans ,their preparation, Characterization and immunomodulatory activity .Carbohydrate Polymers.38(3):247-253.
44. Shobana, S., Sreerama, Y. N. and

Malleshi, N. G. 2009. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seedcoat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreaticamylase. *Food Chemistry* 115: 1268 – 1273.

45. Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E., and Misaki, A. 1985. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* 49:2641-2645.

46. Ting, L., Jianwen, Liu., Xiaodong, Z., Guang, J. 2007. Antidiabetic activity of lipophilic (-)-epigallocatechin-3-gallate derivative under its role of α -glucosidase inhibition. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 61:91-96.

47. Turner, W. B. and Aldridge, D. C. 1983. *Fungal Metabolites II*. p.304-365. Academic Press, New York, USA.

48. Wang HX, Ng TB, Liu WK, Ooi VEC, and Chang ST. 1996. Polysaccharide—peptide complexes from the culture mycelia of the mushroom *Coriolus versicolor* and their culture medium activate mouse lymphocytes and macrophages. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 28(5):601-607.

49. Willians, W. B., Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens-Wissenschaften Technol.* 28: 25-30.

50. Xiao Feng, X., Jin Hui, Z., Li Ming, W., Liang Hu, F., Jing Z. 2009. HPLC determination of adenosine in royal jelly. *Food Chemistry* 115:715-719. -78- 51.

Yamaguchi., T., Takamura, H., Matoba, T., Terao, J. 1998. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62(6),1201-1204.

52. Yang QY, Zhang, Y. F. 1993. A. Protein bound polysaccharide-PSP. In *Proceedings of PSP International Symposium* (Edited by Yang, Q. Y. and Kwok, C. Y.) 23-34. Fundan University Press, Shanghai, China.

53. Ying Shi., Jianchun Sheng., Fangmei Yang., Qihui Hu. 2007. Purification and identification of polysaccharide derived from *Chlorella pyrenoidosa*.

54. Yuanfeng Wang., Lan Yu., Jiachen Zhang., Jianbo Xiao., Xinlin Wei. 2010. Study on the purification and characterization of a polysaccharide conjugate from tea flowers