

雲芝LH1之胞外低極性化合物機能性探討

蔡坤霖、楊博文

E-mail: 360576@mail.dyu.edu.tw

摘要

雲芝(*Coriolus versicolor*)是一種珍貴的藥用真菌，在東方已有相當久遠的使用歷史。其活性成分包含多醣體、皂甙、三萜、線萜等，具有增強免疫力、降血壓、降血糖、降血脂等功效。本論文以雲芝LH1胞外發酵液之乙醇沉澱上層液為研究材料，取其大分子(12-16 kDa以上)進行研究。經陰離子交換樹脂DEAE Sepharose CL-6B分離後獲得8個fraction，之後再各別進行成分及活性分析。結果顯示fraction 4具有最佳的清除DPPH自由基能力以及抑制 α -glucosidase能力。取離子交換層析後活性最佳之fraction 4，以大孔吸附樹脂HP 20分離後獲得7個fraction，各別進行成分及活性分析，並將此七個fraction進行HPLC-RI偵測器分子量分析。最後取抑制 α -glucosidase活性最佳之三個fraction，以Sephadex G-50層析，各別進行FT-IR分析及單醣分析。研究顯示，雲芝LH1胞外發酵液之乙醇沉澱上層液大分子具有優異的抗氧化活性及 α -glucosidase抑制能力，未來將可望發展於保健食品，使雲芝獲得更加完善的利用。

關鍵詞：雲芝、多醣、皂甙、三萜、 α -glucosidase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	12	2. 文獻回顧	22	2.1 雲芝的簡介	22	2.1.1 雲芝的型態及生長分布	22	2.1.2 雲芝活性成分簡介	32	2.1.2.1 多醣體	32	2.1.2.2 三萜類	8	2.1.2.3 腺苷	11	2.1.2.4 皂甙	12	2.2 分離純化技術介紹	13	2.2.1 離子交換層析法(Ion exchange chromatography, IEC)	13	2.2.2 大孔吸附樹脂(Macroporous absorption resin)	14	2.2.2.1 大孔吸附樹脂的吸附原理	16	2.2.2.2 大孔吸附樹脂的特性	16	2.2.2.3 影響大孔吸附樹脂的因素	17	2.2.3 膠體過濾樹脂(Gel resin)	18	2.3 分析原理	20	2.3.1 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)清除率分析	20	2.3.2 OH 基清除率分析	21	2.3.3 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)抑制之降血糖機制	21	2.4 抗氧化力及酵素抑制力評估	22	3. 材料與方法	23	3.1 實驗架構	23	3.2 實驗材料	24	3.2.1 化學藥品	24	3.2.2 儀器	25	3.2.3 樣品來源及前處理	25	3.3 實驗方法	26	3.3.1 陰離子交換樹脂DEAE Sepharose CL-6B 層析	26	3.3.1.1 前處理	26	3.3.1.2 試驗步驟	26	3.3.1.3 脫鹽	27	3.3.2 大孔吸附樹脂 HP 20層析	27	3.3.2.1 前處理	27	3.3.2.2 試驗步驟	28	3.3.3 成分分析	28	3.3.3.1 總醣	28	3.3.3.2 總蛋白質	29	3.3.3.3 總三萜	29	3.3.3.4 總多醣	29	3.3.4 活性分析	29	3.3.4.1 DPPH清除率	29	3.3.4.2 OH 基清除率	30	3.3.4.3 α -glucosidase抑制率	31	3.3.5 特性分析	31	3.3.5.1 分子量分析	31	3.3.5.2 單醣分析	32	4. 結果與討論	34	4.1 雲芝LH1發酵液乙醇沉澱上層液之固形物含量比較分析	34	4.2 雲芝LH1發酵液乙醇沉澱上層液之活性比較	36	4.3 DEAE Sepharose CL-6B陰離子交換層析	38	4.4 雲芝LH1胞外發酵液乙醇沉澱上層液之大分子(LH extracellular ethanol precipitation supernatants large molecule, LHESL)之成分及活性分析	40	4.5 HP 20大孔樹脂層析	43	4.6 雲芝LH1胞外發酵液乙醇沉澱上層液之大分子分餾液F4(LH extracellular ethanol precipitation supernatants large molecule fraction 4, LHESL-F4)之成分及活性分析	45	4.7 分子量分析	48	4.8 Sephadex G-50膠體過濾層析	51	4.9 FTIR	53	4.10 單醣分析	62	5. 結論	63	6. 參考文獻	65	圖1 雲芝子實體野生照	3	圖2 菌類三萜的分類	10	圖3 抗氧化劑與DPPH 自由基反應之機制	20	圖4 LH1發酵液乙醇沉澱上層液大分子之陰離子(DEAE Sepharose CL-6B)交換層析圖	39	圖5 LHESL-F4之HP 20大孔吸附層析圖	44	圖6 Dextran之HPLC標準曲線	49	圖7 分餾液F4-2-1、F4-4-1及F4-5-1之膠體過濾層析圖	52	圖8 熊果酸、齊墩果酸及羅漢果甜甙的結構	54	圖9 熊果酸、齊墩果酸及羅漢果甜甙的FTIR指紋圖譜	55	圖10 分餾液F4-2-1的FTIR指紋圖譜	56	圖11 分餾液F4-4-1的FTIR指紋圖譜	57	圖12 分餾液F4-5-1的FTIR指紋圖譜	58	表目錄		表1 雲芝LH1胞外發酵液乙醇沉澱上層液之成分比較	35	表2 雲芝LH1胞外發酵液活性分析	37	表3 雲芝LH1胞外發酵液之成分分析	41	表4 雲芝LH1發酵液乙醇沉澱上層液大分子分餾液活性分析	42	表5 雲芝LHESL-F4之成分分析	46	表6 雲芝LHESL-F4分餾液活性分析	47	表7 LHESL-F4分餾液F4-1至F4-7之分子量分析	50	表8 FTIR三萜皂甙之官能基	59	表9 FTIR偵測熊果酸、齊墩果酸及羅漢果甜甙之官能基	60	表10 FTIR偵測F4-2、F4-4及F4-5之官能基	61	表11 組成多醣之成分單醣	62

參考文獻

- 1.水野卓，川合正允。1997。菇類的化學，生化學。賴慶亮譯，國立編譯館。
- 2.王嘉麒。2008。枸杞中類黃酮素、多醣體與類胡蘿蔔素的製備及抗氧化活性評估。輔仁大學食品科學系。
- 3.巫熒撰。2009。綠藻水解物對 α -葡萄糖苷酶與 α -澱粉酶之抑制與活性物質的純化。海洋大學食品科學系。
- 4.李名訓。2006。樟芝栽培之研究。國立嘉義大學農學院林業暨自然資源研究所。
- 5.李宛蓁。2003。樟芝菌絲體培養與生理活性成分生成之研究。東海大學化學工程研究所。
- 6.沈雍智。2005。探討羧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研究所。
- 7.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。8.林敬二，林宗義。1994。儀器分析第四版(上冊)。第278頁。美亞書版股份有限公司。台北，台灣。9.南鳳仙，邵偉。2005。雲芝多醣對小鼠抗衰老作用的研究。寧夏大學學報。26(3):264-267。10.紀宏，高春，高恒瑩。2004。HPLC法測定人胎盤片原料中腺?含量。中國藥品標準05(5):49-51。11.徐錦堂。1996。中國藥用真菌學。第475-495頁。北京醫科大學中國協和醫科聯合出版社。12.婁寧，陳瓊，周玫。1995。雲芝多醣對實驗性動脈僵樣硬化家兔脂質過氧化傷害的保護作用。第一軍醫大學學報。15(2):107-110。13.張玉英，龔珊，張惠琴。2004。雲芝醣?鎮痛抗炎作用的實驗研究。蘇州大學學報(醫學版)。24(5):652-653。14.陳俞臻。2011。雲芝LH-1的皂?分離純化與活性成分研究。大葉大學生物產業科技學系。15.陳書豪。2006。探討樟芝的溫度變化對液態發酵與固態發酵生產三?類與多醣體之影響。國立中央大學化學工程與材料工程研究所。16.彭維榮。2006。樟芝保護肺細胞及預防動脈硬化機制探討。朝陽科技大學應用化學系。17.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。18.黃思齊。2011。發酵產程擴大化及不同培養基對雲芝胞外醣?化學特性之影響。大葉大學生物產業科技學系。19.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。20.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。21.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。22.楊筱冬，呂淑芳，陳孟堂，傅偉光。2006。利用HPLC分析食藥用菇類中腺?之方法研究。台灣農業化學與食品科學44(5):339-344。23.賴佩君。2008。雲芝(*Trametes versicolor*)在不同發酵槽及不同培養條件對菌絲體及多醣體之影響。東海大學食品科學系。24.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。25.謝昆霖。2007。番木瓜果實水萃物之抗氧化能力研究。靜宜大學食品營養學系。26.蘇慶華。1991。靈芝之分類學及收理活性物質。北醫學報20:1-16。27.Collins, R. A. and Ng, T. B. 1997. Polysaccharopeptide from *Coriolus versicolor* has potential for use against human immunodeficiency virus type 1 infection. *Life Sci.* 60:PL383-387. 28.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. 29.Duduku, K., Rosalam S. and Rajesh, N. 2010. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing.* 157:17. 30.Ge, Q. 1987. A rapid method for the idernaification of polysaccharide-peptide of *Coriolus versicolor* PSP and PSK. *J. of Shanghai Teachers University.* 16(3):38-46. 31.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. 32.Hawksworth, P. M. K., Sutton, B.C. and Pegler, D. N.. 1996. *Dictionary of the Fungi. Fungal Genetics and Biology.* 20(173). 33.Ho, J. C. K., Konerding, M. A., Gaumann, A., Groth M. and Liu, W. K. 2004. Fungal polysaccharopeptide inhibits tumor angiogenesis and tumor growth in mice. *Life Sci.* 75:1343-1356. 34.Jie, L. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology.* 49:57-68. 35.Kikuchi, T., Kizawa, I., Oomori, K., Iwano, I., Kita, T. and Kato, K. 1988. Effects of PSK on interleukin-2 production by peripheral lymphocytes of patients with advanced ovarian carcinoma during chemotherapy. *Jpn. J. Cancer Res.* 79:125-130. 36.Lee, C. L., Yang, X. and Wan, J. M. F. 2006. The culture duration affects the immunomodulatory and anticancer effect of polysaccharide derived from *Coriolus versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 38:14-21. 37.Li, X. M., Wang, J. F., Xhu, P. P., Ge, J. B. and Yang, S. X. 1990. Immune enbancement of a polysaccharides peptides isolated from *Coriolus versicolor*. *Acta Pharm Sinica.* 11:542-545. 38.Lin, C. L., Wang, C. C., Chang, S. C., Stephen Inbaraj, B., Chen, B. H.. 2009. Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from *Lycium barbarum* Linnaeus. *International Journal of Biological Macromolecules* 45: 146-151. 39.Milgate, J. and Roberts, D. C. K. 1995. The nutritional and biological significance of saponins. *Nutritiom Research.* 15:1223-1249. 40.Moor, G. E., Gerner, R. E. and Franklin, H. A. 1967. Culture of Normal Human Leukocytes. *J. Amer. Med. Assn.* 199:519. 41.Oleszek, W. A. 2002. Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A.* 967:147-162. 42.Roginsky, V. and Lissi, E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92:235-254. 43.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. 44.Simona, C. and Simona, C. 2005. Qualitative and quantitative aspects in analysis of Ginseng Pharmaceuticals using vibrational spectroscopy. *Romanian Biophys.* 15(1-4):61-66. 45.Sitki, C. B., Kariptas, E., Nihal, Y. A. 2007. Isolation of saponin from dried roots of *Gypsophila simonii* Hub. *Mor. Pakistan journal of biological sciences* 10(11):1944-1946. 46.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. 47.Suheyla, K. and Huseyin, A. 2002. New Triterpenic Saponins from *Cephalaria transsylvanica*. *Turk Chem.* 26:947-954. 48.Thomas, M. J. 1995. The role of free radicals and antioxidants: How do weknow that they are working ? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 21-39. 49.Ting, L., Jianwen, Liu., Xiaodong, Z. and Guang, J. 2007. Antidiabetic activity of lipophilic (-)-epigallocatechin-3-gallate derivative under its role of α -glucosidase inhibition. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 61:91-96. 50.Turner, W. B. and Aldridge, D. C. 1983. *Fungal Metabolites* . P.304-365. Academic Press, New York, USA. 51.Ueno, S., Yoshikumi, C., Hirose, F., Omura., Wada, T. and Fujii, T. 1980. Method of producing nitrogen-containing polysaccharides. US Patent 4,202,969. 52.Xiao Feng, X., Jin Hui, Z., Li Ming, W., Liang Hu, F. and Jing ,Z. 2009. HPLC determination of adenosine in royal jelly. *Food Chemistry* 115:715-719. 53.Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. and Terao, J. 1998. HPLC method forevaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 62(6), 1201-1204. 54.Yan, X., Rivero-Huguest Mario E., Brianna Huianna Hughesm H. and William Marshall D. 2008. Isolation of the sweet components from *Siraitia grosvenorii*, *Food Chemistry* 107:1022-1028. 55.Yang, Q. Y. 1997. Yun Zhi polysaccharopeptide(PSP) and the general aspects of its research. *Fung Sci.* 12:1-8. 56.Yang, Q. Y., Yong, S. C. and Yang, X. T. 1987. The physio-chemical characteristics of the polysaccharide-peptide(PSP) of *Coriolus versicolor* (Yun-Zhi). In Report on the Polysaccharide-peptide(PSP) of *Coriolus versicolor*, pp, 1-6, Landford Press, China. 57.Zhou, J. X., Li, X. Y. and Shen, X. T. 1988. The antitumor and immunomodulating activity of PSP in mice. *J.*

