

# 發酵雲芝菌LH1之機能性成分分離純化及鑑定

許文光、楊博文

E-mail: 374918@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

胞內多醣 (Intracellular polysaccharides, iP) 和胞外多醣 (extracellular polysaccharides, eP) 分別從雲芝菌 *Coriolus versicolor* LH1 菌絲體和發酵產物經分離與純化而獲得。iP 和 eP 分別分析其  $\alpha$ -葡萄糖??活性抑制、抗氧化能力以及化學組成。兩種多醣體 fractions (ePL-F6-2 和 iPL-F5-5-1) 分別經過微波輔助萃取、DEAE-Sepharose™ CL-6B 離子交換管柱層析、Diaion R HP20 大孔吸附管柱層析、以及 Sephadex™ G-50 膠體過濾管柱層析的分離及純化。分離純化後的區分所得之 ePL-F6-2 和 iPL-F5-5-1 主要成分為多醣體複合物。ePL-F6-2 和 iPL-F5-5-1 兩者皆具  $\alpha$ -葡萄糖??活性抑制作用, IC<sub>50</sub> 值, 分別為 0.9 mg/mL 和 0.8 mg/mL。具有最高抗氧化能力的多醣體 fraction 是 ePL-F6-2, 其 EC<sub>50</sub> 值為 0.2 mg/mL。  $\alpha$ -葡萄糖??活性抑制型態在 iPL-F5-5-1 作用之下為競爭型抑制, 這是由於  $\alpha$ -1,4-糖?鍵結的原因, 而 ePL-F6-2 的作用之下則為非競爭型抑制。本研究結果發現, 二階段分離和純化策略可以取代 Sevag 法從雲芝菌 LH1 菌絲體的 iP 和 eP 來取得純化的多醣體。而且根據  $\alpha$ -葡萄糖??活性抑制作用, ePL-F6-2 和 iPL-F5-5-1 將來可發展為治療糖尿病潛力的藥物。

關鍵詞: 胞內多醣體、胞外多醣體、  $\alpha$ -葡萄糖??、分離、純化

## 目錄

封面內頁	簽名頁	ii	中文摘要	iii	英文摘要	iv	誌謝	v	目錄	vi	圖目錄	xvii	表目錄	xviii	1.前言	1	2.研究目的	4	3.文獻回顧	6	3.1 藥用真菌-雲芝	6	3.2 雲芝多醣體	7	3.3 雲芝粗多醣體之製備	9	3.4 分離雲芝粗多醣體之技術	10	3.5 純化雲芝多醣之技術	11	3.6 游離蛋白質 (free proteins) 之化學變性	12	3.7 雲芝多醣體之單糖組成	13	3.8 雲芝多醣體的活性功效	15	3.9 血糖調控機制, 抑制 $\alpha$ -葡萄糖??活性	16	3.10 抗氧化活性, 清除 DPPH 自由基	18	4.試驗材料與方法	20	4.1 試驗材料與設備	20	4.1.1 材料與藥品	20	4.1.2 儀器設備	21	4.2 材料製備	22	4.2.1 培養雲芝 LH1 菌絲體	22	4.2.2 萃取雲芝 LH1 菌絲體胞內多醣體和野生雲芝子實體多醣體	23	4.3 雲芝 LH1 多醣體與野生雲芝子實體多醣體的沉澱粗多醣體製備與化學組成分析	24	4.3.1 粗多醣體的沉澱製備	24	4.3.2 化學組成分析	24	4.3.2.1 總醣 (多醣體) 分析 苯酚-硫酸法	24	4.3.2.1.1 原理	24	4.3.2.1.2 試劑製備	25	4.3.2.1.3 呈色反應過程	25	4.3.2.1.4 濃度計算	26	4.3.2.2 蛋白質分析 考馬斯亮藍 G-250 染色法	27	4.3.2.2.1 原理	27	4.3.2.2.2 試劑製備	27	4.3.2.2.3 呈色反應過程	27	4.3.2.2.4 濃度計算	28	4.3.2.3 總??分析 香草醛-冰醋酸比色法	29	4.3.2.3.1 原理	29	4.3.2.3.2 試劑製備	30	4.3.2.3.3 呈色反應過程	30	4.3.2.3.4 濃度計算	31	4.3.2.4 總多醣分析 Folin-Ciocalteu 比色法	32	4.3.2.4.1 原理	32	4.3.2.4.2 試劑製備	32	4.3.2.4.3 呈色反應過程	32	4.3.2.4.4 濃度計算	33	4.4 粗多醣體的分離純化前處理	34	4.4.1 粗多醣體的 Sevag 法去除蛋白質	34	4.4.2 粗多醣體的大小分子透析分離	35	4.5 粗多醣體之離子交換層析分離	35	4.5.1 離子交換樹脂前處理	35	4.5.1.1 DEAE-Sepharose™ CL-6B 離子交換樹脂均質化	35	4.5.1.2 DEAE-Sepharose™ CL-6B 離子交換樹脂脫氣	36	4.5.1.3 DEAE-Sepharose™ CL-6B 離子交換層析管製備與前處理	36	4.5.2 多醣體之 fractions 製備	37	4.5.3 離子交換層析分離分析	37	4.6 多醣體之大孔吸附層析分離	38	4.6.1 大孔吸附樹脂前處理	38	4.6.1.1 HP20 大孔吸附樹脂均質化	38	4.6.1.2 HP20 大孔吸附樹脂脫氣	38	4.6.1.3 HP20 大孔吸附層析管製備與前處理	38	4.6.2 多醣體之 fractions 製備	39	4.6.3 HP20 大孔吸附層析分離分析	40	4.7 多醣體之膠體過濾層析純化	40	4.7.1 膠體過濾樹脂前處理	40	4.7.1.1 Sephadex™ G-50 膠體過濾樹脂均質化	40	4.7.1.2 Sephadex™ G-50 膠體過濾樹脂脫氣	41	4.7.1.3 Sephadex™ G-50 膠體過濾層析管製備與前處理	41	4.7.2 純化多醣體 fractions	41	4.7.3 Sephadex™ G-50 膠體過濾層析純化分析	42	4.8 機能性評估	42	4.8.1 抑制 $\alpha$ -葡萄糖??活性分析	42	4.8.1.1 抑制 $\alpha$ -葡萄糖??活性原理	42	4.8.1.2 試劑製備	44	4.8.1.3 分析反應步驟	45	4.8.1.4 體外動力學模式評估抑制 $\alpha$ -葡萄糖??活性能力	46	4.8.2 抗氧化 (清除 DPPH) 自由基之效果	47	4.8.2.1 抗氧化 (清除 DPPH 自由基) 原理	47	4.8.2.2 試劑製備	48	4.8.2.3 分析反應步驟	48	4.8.2.4 體外動力學模式評估抗氧化 (清除 DPPH 自由基) 能力	49	4.9 分子量的測定	50	4.9.1 分子量的測定方法與條件	50	4.9.2 分子量的計算	51	4.10 單糖組成成分的分析	52	4.10.1 單糖組成成分的測定方法與條件	52	4.10.1.1 多醣體的水解	52	4.10.1.2 單糖的 PMP 衍生化反應	52	4.10.1.2.1 原理	52	4.10.1.2.2 試劑製備	53	4.10.1.2.3 單糖的 PMP 衍生化反應過程	54	4.10.1.3 單糖-PMP 的分析方法	54	4.10.2 單糖-PMP 的計算	55	4.10.2.1 甘露糖-PMP (Man-PMP) 濃度計算	55	4.10.2.2 葡萄糖-PMP (Glc-PMP) 濃度計算	56	4.10.2.3 半乳糖-PMP (Gla-PMP) 濃度計算	57	4.10.2.4 木糖-PMP (Xyl-PMP) 濃度計算	58	4.10.2.5 阿拉伯糖-PMP (Ara-PMP) 濃度計算	59	4.10.2.6 鼠李糖-PMP (Rha-PMP) 濃度計算	60	4.11 紅外線光譜分析	61	4.12 資料處理	62	5.結果與討論	63	5.1 不同雲芝粗多醣體之機能性和化學組成成分探討	63	5.1.1 抑制 $\alpha$ -葡萄糖??活性分析比較	63	5.1.2 抗氧化 (清除 DPPH 自由基) 能力分析比較	66	5.1.3 化學組成成分分析與比較	68	5.2 雲芝 LH1 粗多醣體管柱層析分離前探討	70	5.2.1 化學法分離純化粗多醣體	71	5.2.1.1 Sevag 試劑去除游離蛋白質	71	5.2.1.2 抑制 $\alpha$ -葡萄糖??活性分析比較	71	5.2.1.3 抗氧化 (清除 DPPH 自由基) 能力分析比較	73	5.2.1.4 化學組成成分分析與比較	75	5.2.2	
------	-----	----	------	-----	------	----	----	---	----	----	-----	------	-----	-------	------	---	--------	---	--------	---	-------------	---	-----------	---	---------------	---	-----------------	----	---------------	----	---------------------------------	----	----------------	----	----------------	----	----------------------------------	----	-------------------------	----	-----------	----	-------------	----	-------------	----	------------	----	----------	----	--------------------	----	------------------------------------	----	---	----	-----------------	----	--------------	----	----------------------------	----	--------------	----	----------------	----	------------------	----	----------------	----	-------------------------------	----	--------------	----	----------------	----	------------------	----	----------------	----	--------------------------	----	--------------	----	----------------	----	------------------	----	----------------	----	-----------------------------------	----	--------------	----	----------------	----	------------------	----	----------------	----	------------------	----	--------------------------	----	---------------------	----	-------------------	----	-----------------	----	---	----	--	----	---	----	-------------------------	----	------------------	----	------------------	----	-----------------	----	------------------------	----	-----------------------	----	----------------------------	----	-------------------------	----	-----------------------	----	------------------	----	-----------------	----	----------------------------------	----	---------------------------------	----	--------------------------------------	----	-----------------------	----	---------------------------------	----	-----------	----	------------------------------	----	--------------------------------	----	--------------	----	----------------	----	---	----	----------------------------	----	------------------------------	----	--------------	----	----------------	----	---------------------------------------	----	------------	----	-------------------	----	--------------	----	----------------	----	-----------------------	----	-----------------	----	------------------------	----	---------------	----	-----------------	----	----------------------------	----	-----------------------	----	-------------------	----	---------------------------------	----	---------------------------------	----	---------------------------------	----	--------------------------------	----	----------------------------------	----	---------------------------------	----	--------------	----	-----------	----	---------	----	---------------------------	----	--------------------------------	----	--------------------------------	----	-------------------	----	--------------------------	----	-------------------	----	-------------------------	----	----------------------------------	----	----------------------------------	----	---------------------	----	-------	--

物理法分離純化粗多醣體 75 5.2.2.1 膜透析處理 75 5.2.2.2 抑制 -葡萄糖??活性分析比較 77 5.2.2.3 抗氧化 (清除DPPH自由基) 能力分析比較 80 5.2.2.4 化學組成成分分析與比較 84 5.3 雲芝菌LH1大分子粗多醣體管柱層析分離 87 5.3.1 CVLH1-ePL、CVLH1-iPL與CVLH1-eP-Sv之層析分離大分子粗多醣體之圖譜 87 5.3.2 雲芝菌LH1多醣體fractions抑制 -葡萄糖??活性分析比較 92 5.3.2.1 CVLH1-ePL多醣體fractions抑制 -葡萄糖??活性分析比較 92 5.3.2.2 CVLH1-iPL多醣體fractions抑制 -葡萄糖??活性分析比較 95 5.3.2.3 CVLH1-eP-Sv多醣體fractions抑制 -葡萄糖??活性分析比較 97 5.3.3 雲芝菌LH1多醣體fractions抗氧化作用分析比較 100 5.3.3.1 CVLH1-ePL多醣體fractions抗氧化作用分析比較 100 5.3.3.2 CVLH1-iPL多醣體fractions抗氧化作用分析比較 102 5.3.4 雲芝菌LH1多醣體fractions化學成分分析 105 5.3.4.1 CVLH1-ePL fractions之化學成分分析比較 105 5.3.4.2 CVLH1-iPL fractions之化學成分分析比較 108 5.4 CVLH1-ePL-F4、CVLH1-ePL-F6、CVLH1-iPL-F4與CVLH1-iPL-F5之第二階段層析分離 111 5.4.1 CVLH1-ePL-F4、CVLH1-ePL-F6、CVLH1-iPL-F4與CVLH1-iPL-F5之DiaionR HP20大孔吸附管柱層析分離結果 111 5.4.2 CVLH1-ePL-F4、CVLH1-ePL-F6、CVLH1-iPL-F4與CVLH1-iPL-F5之fractions抑制 -葡萄糖??活性分析比較 117 5.4.2.1 CVLH1-ePL-F4 fractions抑制 -葡萄糖??活性分析比較 118 5.4.2.2 CVLH1-ePL-F6 fractions抑制 -葡萄糖??活性分析比較 120 5.4.2.3 CVLH1-iPL-F4 fractions抑制 -葡萄糖??活性分析比較 123 5.4.2.4 CVLH1-iPL-F5 fractions抑制 -葡萄糖??活性分析比較 125 5.4.3 CVLH1-ePL-F4、CVLH1-ePL-F6、CVLH1-iPL-F4與CVLH1-iPL-F5之抗氧化 (清除DPPH自由基) 能力分析比較 128 5.4.3.1 CVLH1-ePL-F4 fractions抗氧化能力分析比較 128 5.4.3.2 CVLH1-ePL-F6 fractions抗氧化能力分析比較 130 5.4.3.3 CVLH1-iPL-F4 fractions抗氧化能力分析比較 133 5.4.3.4 CVLH1-iPL-F5 fractions抗氧化能力分析比較 135 5.4.4 CVLH1-ePL-F4、CVLH1-ePL-F6、CVLH1-iPL-F4與CVLH1-iPL-F5之化學成分分析比較 137 5.4.4.1 CVLH1-ePL-F4 fractions之化學成分分析 137 5.4.4.2 CVLH1-ePL-F6 fractions之化學成分分析 140 5.4.4.3 CVLH1-iPL-F4 fractions之化學成分分析 142 5.4.4.4 CVLH1-iPL-F5 fractions之化學成分分析 144 5.5 CVLH1-ePL-F6-2與CVLH1-iPL-F5之純化 146 5.5.1 CVLH1-ePL-F6-2與CVLH1-iPL-F5-5之SephadexTM G-50膠體過濾管柱層析純化多醣體之圖譜 146 5.5.2 CVLH1-iPL-F5-5-1抑制 -葡萄糖??活性分析比較 150 5.5.3 CVLH1-iPL-F5-5-1化學組成成分分析 152 5.6 體外酵素抑制劑的作用型態探討 154 5.6.1 CVLH1-ePL-F6-2之體外酵素抑制劑的作用型態探討 155 5.6.2 CVLH1-iPL-F5-5-1之體外酵素抑制劑的作用型態探討 156 5.7 分子量分析 158 5.8 單糖組成成分分析 162 5.9 CVLH1-ePL-F6-2與CVLH1-iPL-F5-5-1紅外光譜 (FTIR) 分析 164 6.結論 167 參考文獻 169 附錄 182 圖目錄 圖2.1 試驗設計 5 圖3.1 野生雲芝子實體 7 圖3.2 雲芝菌絲體胞內多醣經DEAE Sepharose CL-6B分離之層析圖譜 11 圖4.1 總醣標準曲線圖 26 圖4.2 蛋白質標準曲線 29 圖4.3 總三?標準曲線 31 圖4.4 總多醣標準曲線 33 圖4.5 -葡萄糖??水解機制 43 圖4.6 -葡萄糖??與基質作用Lineweaver – Burk 雙倒數圖 47 圖4.7 分子量標準曲線 51 圖4.8 單糖與PMP試劑的衍生化反應機制 53 圖4.9 甘露糖-PMP標準曲線 56 圖4.10 葡萄糖-PMP標準曲線 57 圖4.11 半乳糖-PMP標準曲線 58 圖4.12 木糖-PMP標準曲線 59 圖4.13 阿拉伯-PMP糖標準曲線 60 圖4.14 鼠李糖-PMP標準曲線 61 圖5.1 CVLH1-ePL之DEAE SepharoseTM CL-6B管柱層析圖譜 89 圖5.2 CVLH1-iPL之DEAE SepharoseTM CL-6B管柱層析圖譜 90 圖5.3 CVLH1-eP-SV之DEAE SepharoseTM CL-6B管柱層析圖譜 91 圖5.4 CVLH1-ePL-F4之DiaionR HP20大孔吸附管柱層析圖譜 112 圖5.5 CVLH1-ePL-F6之DiaionR HP20大孔吸附管柱層析圖譜 113 圖5.6 CVLH1-iPL-F4之DiaionR HP20大孔吸附管柱層析圖譜 114 圖5.7 CVLH1-iPL-F5之DiaionR HP20大孔吸附管柱層析圖譜 115 圖5.8 CVLH1-ePL-F6-2之SephadexTM G-50膠體過濾管柱層析圖譜 148 圖5.9 CVLH1-ePL-F5-5之SephadexTM G-50膠體過濾管柱層析圖譜 149 圖5.10 CVLH1-ePL-F6-2的Lineweaver-Burk非競爭型抑制酵素圖 156 圖5.11 CVLH1-iPL-F5-5-1的Lineweaver-Burk競爭型抑制圖 157 圖5.12 CVLH1-ePL-F6-2的HPGPC層析指紋圖譜 160 圖5.13 CVLH1-iPL-F5-5-1的HPGPC層析指紋圖譜 161 圖5.14 雲芝多醣體之FTIR光圖譜 166 表目錄 表3.1 不同製程生產雲芝多醣之單糖組成成分一覽表 15 表5.1 不同雲芝粗多醣體之抑制 -葡萄糖??活性能力比較 65 表5.2 不同雲芝粗多醣體之抗氧化 (清除DPPH自由基) 能力比較 67 表5.3 不同雲芝粗多醣體的化學組成成分分析比較 69 表5.4 CVLH1-eP經與未經Sevag法處理後之抑制 -葡萄糖??活性能力比較 72 表5.5 CVLH1-eP經與未經Sevag法處理後之抗氧化 (清除DPPH自由基) 能力比較 74 表5.6 CVLH1-eP經與未經Sevag法處理後之化學組成成分分析比較 76 表5.7 雲芝粗多醣體透析後之抑制 -葡萄糖??活性能力比較 78 表5.8 雲芝粗多醣體透析後之抗氧化 (清除DPPH自由基) 能力比較 81 表5.9 雲芝粗多醣體透析後的化學組成成分分析比較 85 表5.10 CVLH1-ePL fractions之抑制 -葡萄糖??活性能力比較 93 表5.11 CVLH1-iPL fractions之抑制 -葡萄糖??活性能力比較 96 表5.12 CVLH1-EP-Sv fractions之抑制 -葡萄糖??活性能力比較 98 表5.13 CVLH1-ePL fractions之抗氧化 (清除DPPH自由基) 能力比較 101 表5.14 CVLH1-iPL fractions之抗氧化 (清除DPPH自由基) 能力比較 103 表5.15 CVLH1-ePL fractions的化學組成成分分析比較 106 表5.16 CVLH1-iPL fractions的化學組成成分分析比較 109 表5.17 CVLH1-ePL-F4 fractions之抑制 -葡萄糖??活性能力比較 119 表5.18 CVLH1-ePL-F6 fractions之抑制 -葡萄糖??活性能力比較 121 表5.19 CVLH1-ePL-F4-5和CVLH1-ePL-F6-2的抑制 -葡萄糖??活性效力變方分析表 122 表5.20 CVLH1-iPL-F4 fractions之抑制 -葡萄糖??活性能力比較 124 表5.21 CVLH1-iPL-F5 fractions之抑制 -葡萄糖??活性能力比較 126 表5.22 CVLH1-iPL-F4-7和CVLH1-iPL-F5-5的抑制 -葡萄糖??活性效力變方分析表 127 表5.23 CVLH1-ePL-F4 fractions之抗氧化 (清除DPPH自由基) 能力比較 129 表5.24 CVLH1-ePL-F6 fractions之抗氧化 (清除DPPH自由基) 能力比較 131 表5.25 CVLH1-ePL-F4-2和CVLH1-ePL-F6-2的抗氧化效力變方分析表 132 表5.26 CVLH1-iPL-F4 fractions之抗氧化 (清除DPPH自由基) 能力比較 134 表5.27 CVLH1-iPL-F5 fractions之抗氧化 (清除DPPH自由基) 能力比較 136 表5.28 CVLH1-ePL-F4 fractions的化學組成成分分析比較 138 表5.29 CVLH1-ePL-F6 fractions的化學組成成分分析比較 141 表5.30 CVLH1-iPL-F4 fractions的化學組成成分分析比較 143 表5.31 CVLH1-iPL-F5 fractions的化學組成成分分析比較 145

表5.32 CVLH1-iPL-F5-5 fractions之抑制 -葡萄糖??活性能力比較 150 表5.33 CVLH1-ePL-F6-2和CVLH1-iPL-F5-5-1的抑制 -葡萄糖??活性效力變方分析表 151 表5.34 CVLH1-iPL-F5-5 fractions的化學組成分析比較 153 表5.35 多醣體fractions的單糖組成成分 163

## 參考文獻

- 1.丁湖廣。2004。雲芝的特性及人工栽培技術。特種經濟動植物7:39。
- 2.于騰飛，劉屏。2009。天然藥物中抗氧化成分研究進展。中國中醫藥信息雜誌16(7):106-109。
- 3.王欣榮，孫敏，何壁梅。2005。 -葡萄糖??抑制劑HW10產生菌的研究。生物技術15(2):39-41。
- 4.王藝，王長海，劉春輝，許志良。2007。耐海水蘆薈粗多醣中游離蛋白的去除。煙臺大學學報(自然科學與工程版) 20(4):269-272。
- 5.王翼，張旭。2009。 -葡萄糖??抑制劑的研究進展。海峽藥學21(9):4-6。
- 6.尤蓉，余曉斌。2003。雲芝菌絲體多醣的分離純化研究。天然產物研究與開發15(1):29-31。
- 7.尤蓉，余曉斌。2005。雲芝胞內多醣CVP-II的分離與初步鑑定。華南師範大學學報(自然科學版) 1:82-85。
- 8.文鏡，賀素華，楊育穎，唐秀華。2004。保健食品清除自由基作用的體外測定方法和原理。食品科學25(11):190-195。
- 9.文鏡，賀素華，張博成，楊劍鋒，常平，郭豫。2005。紅景天提取物清除O<sup>2-</sup>和OH的體外實驗研究。食品科學26(2):219-223。
- 10.牛曉暉，紀鳳蘭，張偉，徐惠波，孫曉波，楊世榮。2004。雲芝多醣藥理作用研究進展。中國科技核心期刊2:57-60。
- 11.井澤良，劉興華，關文強。2006。真菌寡聚醣單糖組成(HPLC)分析及誘導抗病活性初步研究。食品研究與開發27(1):53-56。
- 12.安志強，孫新順，喬文慶。2010。考馬斯亮藍法測定青黴素發酵液中可溶性蛋白質含量。河北化工33(9):60-61。
- 13.朱成傑，趙昆，王桂芳，趙立勳，韓燕星，蔣建東。2010。天然多醣在體外抗甲型流感病毒作用的普遍性。中國抗生素雜誌35(12):919-923。
- 14.李憲瑾，范曉，韓麗君。2002。海藻提取物中 -葡萄糖??抑制劑的初步篩選。中國海洋藥物雜誌86(2):8-11。
- 15.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。
- 16.余曉斌，繆靜，胡衛珍，陳坤，濮文林。2005。液態發酵法生產雲芝胞內糖?。食品與發酵工業1:46-50。
- 17.余曉斌，胡衛珍，濮文林。2006。液態發酵法生產雲芝胞內糖?。食品與生物技術學報25(1):65-69。
- 18.祁永青，刁治民，劉濤。2008。藥用真菌雲芝的研究概況。青海草業17(3):26-29。
- 19.林德祥，邱巨香，陳葉明。2005。正交試驗法優選雲芝多醣醇沉工藝的研究。南京中醫藥大學學報21(5):328-330。
- 20.林怡君。2006。探討添加氯化鈉和供氧量對桑黃生產多醣體之影響:30。國立中央大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。國立中央大學。
- 21.林雪，賈敬芬，黃琳娟，王仲孚。2006。RP-HPLC用於蘆薈多醣的單糖組成研究。食品科學27(4):192-195。
- 22.林桂蘭，許學書，連丈思。2006。食用菇多醣提取物體外抗氧化性能研究。華東理工大學學報(自然科學版)32(3):278-281,317。
- 23.林芳儀，王懿丞，陳南吟，張基郁，徐泰浩。2009。半枝蓮萃取液對雲芝胞外多醣?產量、化學特性及免疫活性之影響。科學與工程技術期刊5(4):31-40。
- 24.周靜華，李芬，汪祖芳。2006。大理百合中多醣的提取與總糖含量的測定。臨床和實驗醫學雜誌5(6):735。
- 25.周鴻立，楊曉紅，李春華，董衛權，吳德恒，張正榮。2010。玉米須多醣sevag法脫蛋白的方法研究。安徽農業科學38(28):15517-15521。
- 26.周曾同，張水龍，趙亦非，金芝貴，楊慶堯。2001。雲芝精華(PSP)防治口腔白斑癌變的臨床研究。臨床口腔醫學雜誌17(2):133。
- 27.邵偉，郝泗城，孫建華。2000。雲芝多醣對肝腹水小鼠生存期和腹水中癌細胞的動態影響。醫藥工業16(6):26-28。
- 28.吳凱南，林輝，孔令泉，劉勝春，張震寰。2001。雲芝胞內多醣抑制腫瘤血管生成和移植性乳腺癌生長的實驗研究。中華普通外科雜誌16(2):124。
- 29.金衛東，王青壯，范貴增，熊大維，黃曉萍，任新明。2005。液態發酵生產雲芝糖?。江蘇食品與發酵3:4-7。
- 30.委寧，馬剛，汪道峰，朱志蔚，蘇全冠，方翼。2007。雲芝多醣B對血管緊張素I誘導的巨噬細胞膜醣胺聚醣和細胞內穀胱甘?含量變化的影響。南方醫科大學學報27(12):1824-1826。
- 31.胡旺平，李雪梅，李立中，化長林。2003。雲芝多醣對應激大鼠學習記憶障礙的影響。中國中醫藥科技10(1):32-33。
- 32.胡衛珍，余曉斌，繆靜。2005。不同雲芝菌株獲得雲芝胞內多醣比較。食品與生物技術學報24(5):60-63。
- 33.胡衛珍，沈偉橋，余曉斌。2007。雲芝糖?的液態發酵研究。食品科技5:139-142。
- 34.祝亞平。2006。雲芝糖?配合化療對卵巢和子宮體癌患者免疫功能及生活品質的影響。中國臨床康復10(47):212-214。
- 35.徐林峰，沈忠明，殷建偉。2001。五味子中提取 -葡萄糖??抑制劑的研究。中國生化藥物雜誌22(3):127-129。
- 36.徐大剛，楊楊，楊惠珍，王莉。2003。雲芝糖?和靈芝抗小鼠弓形蟲感染的實驗觀察。中國人獸共患病雜誌19(4):45-53。
- 37.徐法傑，韓少良，徐勇超。2003。III期胃癌術後輔助免疫化療的療效觀察。中國腫瘤臨床與康復10(1):47-50。
- 38.夏泉，劉鋼，葛朝亮，許杜娟。2007。Sevag法去除黃?粗多醣中蛋白質成分的研究。安徽醫藥11(12):1069-1071。
- 39.馬海萍，鄭少松，鐘志勇，阮豔娟，周靜文，謝超敏，李崇。2007。食(藥)用菌抗疲勞作用實驗研究。中國食用菌26(5):34-36。
- 40.陳海生，廖時萱，張學森。1996。野生雲芝兩種糖?的基本結構測定。第二軍醫大學學報17(1):83-84。
- 41.陳海生，梁榮能，徐一新。2000。野生雲芝中水溶性多醣的分離鑑定。解放軍藥學學報16(5):268-270。
- 42.陳振興，葉嫫嫫，朱惠，林凌，李雙官，徐裕青，林建峰。2001。複方殼聚糖對消化功能的影響。海峽藥學13(4):24-25。
- 43.陳偉，林新華，黃麗英，羅紅斌，陳俊。2005。蘆薈多醣中游離蛋白去除的分光光度法。光譜實驗室22(1):113-115。
- 44.陳奕，謝明勇，弓曉峰。2006。黑靈芝提取物清除DPPH自由基的作用。天然產物研究與開發18:917-921。
- 45.陳建男。2007。啤酒花抗氧化成分之研究:114。大同大學生物工程研究所碩士論文。大同大學。
- 46.陳克克。2008。高效液相色譜法分析地瓜兒多醣的單糖組成。食品科技33(11):262-265。
- 47.陳丹紅。2009。HPLC法同時測定雞腿菇水解液中單糖及多醣的研究。分析測試學報28(12):1464-1467。
- 48.陳良宇，鄭建璋，王志玄，林志璋，張云力，李瑞玲，游欣，梁致遠。2012。鹼催化對Folin-Ciocalteu試劑檢測總多酚含量的影響。銘傳大學生物學學報4(1):10-19。
- 49.黃常江，蔡恕一，劉俊波。2000。雲芝糖?膠囊配合化療治療中晚期肺癌的臨床療效觀察。醫學文選 19(6):871-872。
- 50.黃秀香，袁霞，林翠梧，陳麗芬。2007。分光光度法測定毛老虎莖中三?酸的總含量。時珍國醫國藥18(2):297-298。
- 51.殷偉平，龔珊，蔣星紅，顧振綸。2002。雲芝糖?的鎮痛作用及其機理的初步分析。中成藥24(1):41-43。
- 52.陸建良，梁月榮，張凌雲。2002。考馬斯亮藍法在茶湯中可溶性蛋白質含量分析中的應用和改良。茶葉28(2):89-93。
- 53.許杜娟，夏泉，劉鋼，王培培。2008。高效液相法測定黃?中性多醣的單糖組成。中國實驗方劑學雜誌14(9):4-6。
- 54.郭金龍，陳有君，孫國琴，郭九峰，王蘊華，朱曉清，聶奇森。2008。苯酚-硫酸法測定杏鮑菇多醣方法的研究。食品科

學29(12):555-558。55.梁大勇,黃芳,趙晨,于朋,秦丹,宋愛榮。2012。桑黃粗多醣除蛋白及抗腫瘤活性。生物加工過程10(3):56-60。

56.張勁松,韓煒璋,潘迎捷。2001。雲芝子實體多醣(CVP)化學結構的研究III。菌物系統20(4):531-535。57.張?,鄒巧根,宋?,吳如金。2001。雲芝醣?的單糖組成分析。中國藥科大學學報32(2):137-140。58.張玉英,龔珊,張惠琴。2004。雲芝糖?鎮痛抗炎作用的實驗研究。蘇州大學學報(醫學版)24(5):652-653。59.張偉,曾園山,陳穗君。2005。靈芝孢子及雲芝對大鼠脊髓受損傷運動神經元存活的影响。解剖學研究27(3):161-175。60.張峰源,張松,曾劍鋒,羅煒杰。2007。雲芝、靈芝和柱狀田頭菇胞外多醣對果蠅壽命的影響。生命科學研究11(2):130-133。61.張志國,陳錦屏,邵秀芝,王成忠。2007。紅棗核類黃酮清除DPPH 自由基活性研究。食品科學28(2):67-70。62.張宏,徐惠波,丁濤,溫富春,張殿文,孫曉波。2008。雲芝多醣的藥理作用研究。長春中醫藥大學學報24(1):24-25。63.張秀峰,崔文明。2009。雲芝多醣的體外抗微生物活性研究。飼草與飼料9:64-65。64.張蘭,程珊影,李夏蘭,方柏山。2010。高效液相色譜測定麥糟水解液中單糖和有機酸。華僑大學學報(自然科學版)31(2):187-191。65.張永彬,範玉華,畢彩豐。2011。考馬斯法測定棉籽蛋白發酵液中蛋白質含量。河南化工28(9-10下):46-49。66.張梅梅,魏志文,劉玉冰,趙豔霞,鄭維發。2011。Folin-Ciocalteu 比色法測定樺褐孔菌多醣的條件優化。菌物學報30(2):295-304。67.曾淑君,沈寶蓮。1994。複方雲芝糖?對裸鼠人鼻咽癌抗癌作用的研究。中藥藥理與臨床10(5):35-37。68.曾淑君,沈寶蓮,文良珍。1995。雲芝糖?對裸鼠人肺腺癌抗癌作用的研究。中國藥理學通報11(1):46-49。69.彭長連,陳少薇,林植芳,林桂珠。2000。用清除有機自由基DPPH法評價植物抗氧化能力。生物化學與生物物理進展27(6):658-661。70.鄒巧根,朱玲,王偉,相秉仁。2003。雲芝醣?的研究進展。中成藥25(7):578-580。71.鄒巧根,王偉,宋?,相秉仁。2004。雲芝糖?的結構組成分析。中國藥科大學學報35(4):371-373。72.楊曉彤,糜可,馮慧琴,吳予塵,楊慶堯。2000。不同雲芝菌株及提取工藝所得結合蛋白多醣的分析比較。中國醫藥工業雜誌31(12):545-548。73.雷鵬程,洪純,魚聰,孫設宗。2006。雲芝多醣藥理作用的研究進展。微量元素與健康研究23(2):53-55。74.賈淑珍,王成忠,于功明。2008。香菇多醣脫蛋白工藝的研究。中國釀造5:24-26。75.趙仁邦,劉孟軍,葛微,崔同,劉衛華。2004。高效液相色譜法測定棗中的糖類物質。食品科學28(5):138-142。76.趙海運,王慶奎,邢克智,呂寶剛,吳蓉。2009。黃?多醣除蛋白質方法與條件優化。天津農學院學報16(4):5-8。77.鞏麗虹,李孟全,徐紅納,石秀梅,常希文,金秀東。2010。咳爾康口服液中多醣脫蛋白方法研究。安徽醫藥14(6):635-636。78.鄭元凱。2012。雲芝LH1之胞外低分子量多醣體生物活性探討。大葉大學生物產業科技學系碩士班碩士論文。大葉大學。79.劉燕,林瑞超,李波。2001。雲芝多醣抗腫瘤作用研究進展。中成藥23(10):755-757。80.劉金慶,張松,楊小兵,李嫻,汪道雄。2006。5種珍稀食藥用真菌活性提取物對果蠅壽命影響的研究。生命科學研究10(2):166-171。81.翟志武,李成文,韓春英,賀廣斌。2003。雲芝糖?研究進展。山東醫藥工業22(1):30-31。82.錢強,陸震鳴,許泓瑜。2010。高壓均質法提取雲芝胞內糖?。食用菌3:67-68。83.羅義,劉伊麗,陳瑗,查道剛,黃曉波,劉儉。2002。雲芝多醣防止缺血再灌注心肌早期損傷。中國動脈硬化雜誌10(2):125-128。84.羅金花。2008。微波輔助萃取百合多醣的工藝研究。宜春學院學報30(4):25-26。85.嚴偉,祝亞平,孫廷慰。2000。化療並用雲芝糖?對卵巢和子宮體癌患者免疫功能和生活品質的影響。上海師範大學學報(自然科學版)29(2):75-78。86.騰海豔,張旭,王博,周義發。2007。單色雲芝多醣的結構研究。中國藥學雜誌42(14):1059-1062。87. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254。88. Chen, X., Jin, J., Tang, J., Wang, Z., Wang, J., Jin, L., Lu, J. 2011. Extraction, purification, characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the root of *Ophiopogon japonicus*. Carbohydrate Polymers 83: 749 - 754。89. Chen, X., Zhong, H. Y., Zeng, J. H. and Ge, J. 2008. The pharmacological effect of polysaccharides from *Lentinus edodes* on the oxidative status and expression of VCAM-1 mRNA of thoracic aorta endothelial cell in high-fat-diet rats. Carbohydrate Polymers 74: 445-450。90. Cotellet, N., Bernier, J., Cateau, J., Pommery, J., Wallet, J. and Gaydou, W. M. 1996. Antioxidant properties of hydroxy-flavones, Free Radical Biology & Medicine 20(1):35-43。91. Cui, J., Li, Z. and Hong, X. 2000. Bio-antioxidants with ill therapy. Journal of Tsinghua University (Science and Technology) 40(6): 9-2。92. Cui, Y., Kim, D. S. and Park, K. C. 2005. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. Journal of Ethnopharmacology 96: 79-85。93. Emberger, G. 2008. Fungi growing on wood. Messiah College. [http://www.messiah.edu/Oakes/fungi on wood/index.htm](http://www.messiah.edu/Oakes/fungi%20on%20wood/index.htm)。94. Gaxiola, G., Cuzon, G., Garcia, T., Taboada, G., Brito, R. and Chimal, M. E. 2005. Factorial effects of salinity, dietary carbohydrate and moult cycle on digestive carbohydrates and hexokinases in *Litopenaeus vannamei*. Comparative Biochemistry and Physiology 140: 29-39。95. Guo, L. P., Jiang, T. F., Lv, Z. H. and Wang, Y. H. 2010. Screening  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from traditional Chinese drugs by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 53: 1250-1253。96. Jin, M., Zhao, K., Huang, Q., Xu, C. and Shang, P. 2012. Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: A review. Carbohydrate Polymers 89: 713-722。97. Kim, M. J., Lee, S. B., Lee, H. S., Lee, S. Y., Baek, J. S., Kim, D., Moon, T. W., Robyt, J. F. and Park, K. H. 1999. Comparative study of the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase, and cyclomalto-dextrin glucanotransferase by Acarbose, Isoacarbose, and Acarviosine-Glucose. Archives of Biochemistry and Biophysics 371(2): 277-283。98. Kim, S. D. 2013.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitor from *Buthus martensi* Karsch. Food Chemistry 136:297-300。99. Kimura, A. Lee, J. H., Lee, I. S., Lee, H. S., Park, K. H., Chiba, S. and Kim, D. 2004. Two potent competitive inhibitors discriminating  $\alpha$ -glucosidase family I from family II. Carbohydrate Research 339: 1035-1040。100. Krishnaiah, D., Sarbatly, R. and Nithyanandam, R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food and Bioprocess Processing 89: 217-233。101. Lee, S. S., He, S. and Withers, S. G. 2001. Identification of the catalytic nucleophile of the Family 31  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus niger* via trapping of a 5-fluoroglycosyl - enzyme intermediate. Biochemical Society J. 359: 381-386。102. Li, X. M. and Xu, L. Z. 1987. Comparison of anti-cancer effect of two polysaccharopeptide from *Coriolus versicolor* in vitro. Acta Academiae Medicinae Shanghai 14(5): 326-329。103. Lin, F. Y., Lai, Y. K., Yu, H. C., Chen, N. Y., Chang, C. Y., Lo, H. C. and Hsu, T. H. 2008. Effects of *Lycium barbarum* extract on production and immunomodulatory activity of the extracellular polysaccharopeptides from submerged fermentation culture of *Coriolus versicolor*. Food Chemistry 110: 446-453。104. Liu, C. H., Yen, M. H.,

Tsang, S. F., Gan, K. H., Hsu, H. Y. and Lin, C. N. 2010. Antioxidant triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. *Food Chemistry* 118: 751-756.

105.Liu, Z. F., Zeng, G. M., Zhong, H., Yuan, X. Z., Jiang, L. L., Fu, H. Y., Ma, X.L. and Zhang, J.C. 2011. Effect of saponins on cell surface properties of *Penicillium simplicissimum*: Performance on adsorption of cadmium (II). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 86: 364-369.

106.Lu, F., Li, B., Suo, X. M. and Li, B. 2010. Research advances in hypoglycemic activity of edible fungi. *Food Research and Development* 31(2): 189-192.

107.Lv, Y., Yang, X. B., Zhao, Y., Ruan, Y., Yang, Y. and Wang Z. Z. 2009. Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection. *Food Chemistry* 112: 742-746.

108.Mbanya, J. C., Gan, D. and Allgot, B. 2006. *Diabetes Atlas*. 3rd edition. International Diabetes Federation, in Belgium.

109.Melo, E. B., Silveira Gomes, A. and Carvalho, I. 2006. - and -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron* 62: 10277-10302.

110.Qian, Z. M., Xu, M.F. and Tang, P.L. 1997. Polysaccharide peptide (PSP) restores immunosuppression induced by cyclophosphamide in rats. *The American Journal of Chinese Medicine* 25(1): 27-35.

111.Ren, B. Z., Dai, R. Z. and Li, B. B. 1993. Influence of PSP on immune function of tumor patients. *Chinese-German Journal of Clinical Oncology* 20(5): 348-349.

112.Sekkal, M., Dincqb, V., Legrandb, P. and Huvenneb, J. P. 1995. Investigation of the glycosidic linkages in several oligosaccharides using FTIR and FT Raman spectroscopies. *Journal of Molecular Structure* 349: 349-352.

113.Seo, W. D., Kim, J. H., Kang, J. E., Ryu, H. W., Curtis-Long, M. J., Lee, H. S., Yang, M. S. and Park, K. H. 2005. Sulfonamide chalcone as a new class of -glucosidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15: 5514-5516

114.Steenvoorden, D. P. T. and Beijersbergen van Henegouwen, G. M. J. 1997. New Trends in Photobiology (Invited review) The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 41:1-10.

115.Sun, R., Fang, J. M., Goodwin, A., Lawther, J. M. and Bolton, A. J. 1998. Fractionation and characterization of polysaccharides from abaca fibre. *Carbohydrate Polymers* 37(4): 351-359.

116.Suo, J. X., Sun, S. Q. and Wang, W. Q. 2010. Application of FTIR spectroscopy to the identification of *Glycyrrhiza Uralensis* Fisch. *Spectroscopy and Spectral Analysis* 30(5): 1218-1223.

117.Wang, B. C., Chen, C. J. and Hua, J. 1998. Cultivation and Application of Edible and Medicinal Mushrooms. p. 150. Food Industry Research and Development Institute. Hsinchu. Taiwan.

118.Wang, C. C., Chang, S. C. and Chen, B. H. 2009. Chromatographic determination of polysaccharides in *Lycium barbarum* Linnaeus. *Food Chemistry* 116: 595-603.

119.Wang, Y. and Chang, H. 2009. Research progress of -glucosidase inhibitors. *Journal of Strait Pharmaceutical* 21(9): 4-6.

120.Wu, Q. P., Xiao, C., Yang, X. B. and Zhang, J. 2009. Hypoglycemic effects of components extracted from edible and medicinal fungi and their mechanisms of action. *Acta Edulis Fungi* 16(3): 80-86.

121.Yang, C. X., He, N., Ling, X. P., Ye, M. L., Zhang, C. X., Shao, W. Y., Yao, C. Y., Wang, Z. Y. and Li, Q. B. 2008. The isolation and characterization of polysaccharides from longan pulp. *Separation and Purification Technology* 63: 226-230.

122.Zhang, X., Yu, L., Bi, H., Li, X., Ni, W., Han, H., Li, N., Wang, B., Zhou, Y. and Tai, G. 2009. Total fractionation and characterization of the water-soluble polysaccharides isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Carbohydrate Polymers* 77: 544-552.