

行政院國家科學委員會專題研究計畫期中成果報告

靈芝多醣之分析與鑑定

Structure and properties of the glucans isolated from *Ganoderma lucidum*

計畫編號：NSC-90-2313-B-002-207

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：孫璐西 台灣大學食品科技研究所

共同主持人：呂廷璋 台灣大學食品科技研究所

參與研究人員：張毅偉 台灣大學食品科技研究所

一、中文摘要：

螢光染劑 aniline blue 是植物顯微鏡染色時常用的染劑，對 β -(1,3)-D-glucan (葡聚醣) 具有專一結合性質，本實驗利用此專一特性來檢測靈芝樣品中的 β -(1,3)-D-葡聚糖含量。除自行純化自靈芝 (*Ganoderma lucidum*) 之多醣 (GLPS) 外，也使用數種商業獲得的 β -(1,3)-D-葡聚糖：laminarin、lentinan 及 Krestin 進行分析，結果發現濃度與螢光強度間具有良好的線性關係，線性範圍在 0 至 50 μ g/ml 間。進一步檢測常用培養基組成分對本方法的影響，發現單純的培養基組成分，如葡萄糖、麥芽糖、糊精、澱粉對呈色沒有顯著影響，但複雜的組成如酵母、麥芽萃取物、peptone 或 potato dextrose broth，對於呈色有著不同程度的降低，然而可經由不含葡聚醣的培養基做調整背景值校正。所使用的靈芝多醣為由子實體以熱水萃出，經蛋白水解酵素去除蛋白質，澱粉葡萄糖酵素去除澱粉，以及用四級銨鹽沈降法去除帶負電的多醣後，經檢測不含 hexosamines、uronic acids 與蛋白質；單醣組成分析發現其主要構成成分為葡萄糖 (75%) 與半乳糖 (17%)，另有少量的阿拉伯糖 (5%) 和甘露糖 (3%)；以 ^{13}C -NMR 檢測，確認其主體多醣的結構為 β -(1,3)-D-glucan；以分子篩層析儀 (size exclusion chromatography) 結合多角度雷

射光散射儀 (multi angle laser light scatter) 檢測分子量的分佈，發現其主要部分的分子量約為 1.85×10^5 。另外，也從靈芝液態發酵液以上述純化步驟，萃取多醣，發現發酵所得多醣與由子實體所得多醣之化學結構與螢光反應性質相似，但有較高蛋白質含量。目前正進行其分子量分佈的測量。

關鍵字：靈芝、 β -(1,3)-D-葡聚糖、aniline blue、螢光光譜定量分析、多醣

Abstract

Aniline blue is a common carbohydrate dye used in light microscopic examination. It specifically binds to β -(1,3)-D-glucans. This study exerted this specificity to develop a quantitative fluorescence spectroscopic method to determine the content of β -(1,3)-D-glucans in a sample of *Ganoderma* spp. The glucans used in this study includes glucan isolated from *G. lucidum* fruiting body and three commercial available glucans, laminarin (from *Laminaria digitata*), lentinan (from *Lentinula edodes*), and Krestin (from *Trametes versicolor*). All of glucans examined reacted to aniline blue and showed a linear relationship between fluorescence intensity and glucan concentration in the range of 2 to 50 μ g/ml. Simple sugars and α -glucans, glucose, maltose, dextrin and starch, used, as growth

medium of mycelium fermentation did not interference with the determination. Other complex medium components, malt and yeast extract, peptone, and potato dextrose broth caused fluorescent intensity loss and the interference of the medium should be compensated, if those components were included in the examining system. The β -D-glucan isolated from fruiting body of *G. lucidum* was purified by using quaternary ammonia selective precipitation, protease, amyloglucosidase digestion, and alcohol precipitation. The major sugar component was glucose(75%) and galactose (17%) with small amount of arabinose (5%) and mannose(3%). The glucosidic linkage was β -D revealed by ^{13}C -NMR analysis. The molecular size distribution of major fraction was 1.85×10^5 measured by using size-exclusion chromatography equipped with multi-angle laser-light scatter detection. Glucan from *Ganoderma* mycelium fermentation was isolated with same extraction procedure. The chemical composition and fluorescent forming properties of both glucans were found to be identical. The determination of molecular size distribution of fermented glucan is still ongoing.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, β -D-glucan, aniline blue, fluorescence spectroscopy, polysaccharides

二、緣由與目的：

靈芝(*Ganoderma lucidum*)已知有多種生理活性[1-5]，其中抗腫瘤的活性主要來自其多醣。具抗腫瘤活性的靈芝多醣被證實為 β -D-葡聚糖，其主幹上具有多個由一個或兩個葡萄糖以 β -D 鍵結所構成的分支。分支程度對於抑制腫瘤的效果有決定性的影響：分支程度為主幹上

每 2.5 到 5 個葡萄糖帶有一個分支時，其抗腫瘤的活性最強，分支度太多或過少，其活性皆會明顯下降[6]。

靈芝在保健食品中的需求量年年增加，市面上靈芝相關產品越來越多。靈芝原料的主要生產方法有子實體(fruiting body)栽植及菌絲體(mycelium)液態培養兩種，不同方式所得到的成分不盡相同。目前常以水溶性多醣量作為液態培養生產多醣的指標，對於具有活性的 β -D-葡聚糖生成量幾乎沒有有效的檢控方法，本實驗以具專一性的螢光染劑設計出一套分析靈芝 β -D-葡聚糖的簡易方法，並比較靈芝子實體與菌絲體培養液所得葡聚糖的差別。

三、材料與方法：

螢光呈色反應：取適量多醣溶於 0.3N NaOH 中，待其溶解完全後，再用 1N HCl 調整 pH 至 11.50 並定容。取 2.0ml 的多醣溶液加入 0.2ml 的 aniline blue (1mg/ml) 試劑，充分混勻，靜置 2 小時後，檢測其螢光值(發射波長 395 nm，放 射波長 495 nm)。

單醣組成分析：取適量靈芝多醣溶於 2N 的三氟醋酸中，置入 100 烘箱進行 8 小時的水解，經過充分水洗脫酸後，以高效能液態層析進行單醣組成分的檢測，使用管柱為 CARBOSep CHO-682 (Transgenomic, NE, USA)，管柱溫度為 80 °C，流洗液為去離子水，流速為 0.4 ml/min。

NMR 多醣結構分析：將適量靈芝多醣溶於 $\text{MeSO}_d6\text{-D}_2\text{O}$ (6 : 1, v/v) 的混合溶劑中，之後進行 ^1H 與 ^{13}C -NMR 的檢測，所用的機型為 Bruker DMX-600 NMR spectrometer，實驗條件依 Kim 等所描述 [7]。

靈芝多醣萃取與純化：將靈芝發酵液加入 4 倍體積 95% 的酒精，將其中所含的粗多醣沈澱出來，經 protease 去除蛋白質，glucosamylase 去除澱粉，以及用四級銨鹽沈降法去除帶負電的多醣後，得到純

化的多醣。之後進行 hexosamine 與 uronic acid 的檢測，以檢查有無雜物污染，並以 Folin-Lowry method 檢測其蛋白質含量。

四、結果與討論：

本年度的研究重點在利用靈芝子實體熱水抽出多醣的物化特性，建立一套靈芝 β -(1-3)-D-葡聚糖的定量分析方法，以應用在越來越普遍的液態發酵培養技術上。另一方面，也對靈芝液態發酵液中的靈芝多醣進行進一步的結構鑑定。

植物顯微鏡螢光染劑 aniline blue 中含有一個次要的組成分 sodium carbonylbis (4-(phenyleneamino) benzenesulfonate)[8]，原本只具有微弱的螢光性質，但在與 β -(1-3)-D-葡聚糖結合後，在激發波長 395nm、發射波長 495nm 會具有最大的螢光強度[9]，本實驗即利用此專一結合性質來定量分析 β -(1-3)-D-葡聚糖。以數種商業獲得的 β -(1-3)-D-葡聚糖：laminarin、lentinan、PSK 與自行純化自靈芝 (*Ganoderma lucidum*) 之多醣 (GLPS) 製備不同濃度與 aniline blue 反應，發現濃度與螢光強度間具有良好的線性關係，線性範圍在 0 至 50 μ g/ml 間。不同 β -(1-3)-D-葡聚糖濃度對螢光強度的回歸線斜率也有所不同，這表示主體結構雖然都是 β -(1-3)-D-葡聚糖，但分子量、分枝度或其他因素的不同可能會影響其螢光呈色。

近來應用液態發酵技術培養靈芝有越來越多的趨勢，故進一步檢測常用培養基組成分如：glucose, maltose, dextrin, starch, yeast extract, malt extract, peptone, potato dextrose broth (PDB) 對 aniline blue 呈色所產生的干擾情形，結果發現不同的培養基組成分對於 aniline blue assay 有著不同程度的影響。單純的培養基組成分，如葡萄糖、麥芽糖、糊精、澱粉對呈色沒有顯著影響，但複雜的組成如酵母或麥芽萃取物、peptone、potato dextrose broth，對於呈色有著不同程度的降低，因此若用此法檢測發酵液中的 β -(1-3)-D-葡聚糖

含量時，必須注意來自培養基本身的干擾，得經由不含葡聚糖的培養基做調整背景值校正之。

由靈芝子實體所得的純化多醣利用三氟醋酸進行水解，充分水洗脫酸後，進行單醣組成的高效液相層析分析。結果發現其構成組成分為葡萄糖 75%、半乳糖 17%、阿拉伯糖 5% 與甘露糖 3%，此構成成分相對含量多寡關係與文獻[6]一致。

將靈芝子實體所得的純化多醣進行 $^1\text{H-NMR}$ 與 $^{13}\text{C-NMR}$ 光譜的檢測，比對 laminarin、curdlan 與 lentinan 等標準品的圖譜，發現其主要結構同為 β -(1-3)-D-葡聚糖。根據文獻[7]指出，若是樣品純度足夠，則可由 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜計算其分枝度，由靈芝子實體所得的純化多醣純度仍不足以判斷其分枝度，於是將利用透析或分子篩管柱層析再進一步提高純度，以利分枝度的判斷。

靈芝發酵液加入 4 倍體積 95% 的酒精，粗多醣即沈降出來，經 protease 去除蛋白質，glucosamylase 去除澱粉，以及用四級鉍鹽沈降法去除帶負電的多醣後，得到純化的多醣。進行 hexosamine 與 uronic acid 的檢測，分別作為子實體細胞壁多醣（幾丁質）污染的指標及其他可溶性多醣污染的指標，發現該多醣幾乎不含 hexosamine 與 uronic acid。但利用 Folin-Lowry method，發現其含有 6% 的蛋白質，比由靈芝子實體所得的多醣要來的高。

五、計畫成果自評：

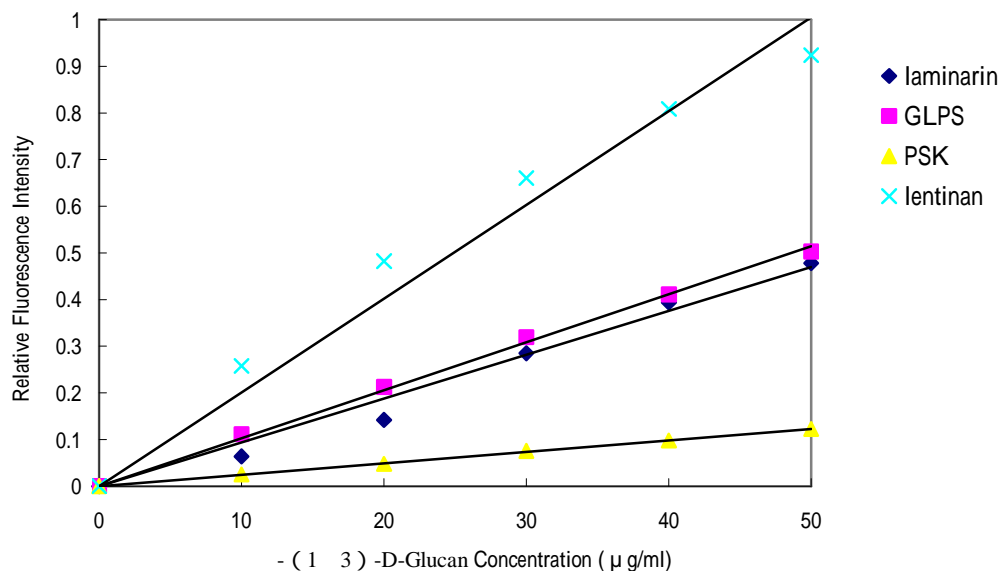
本研究已利用萃取純化自靈芝子實體的靈芝多醣 (GLPS) 建立了一套針對 β -(1-3)-D-葡聚糖的定量方法—aniline blue assay，此法可用來檢測菌菇類產品中此葡聚糖含量，或於液態培養發酵液中監控此葡聚糖的生成量，免除單純「總多醣量」的表示而無法分辨 β -(1-3)-D-葡聚糖生成與菌絲增生的缺點。

六、參考文獻：

1. 閔三弟。1996。真菌的藥用價值。實用菌學報 3 : 55-64。
2. 鄭惠華、董一致和董大成。1985。人工栽培之靈芝 *Ganoderma lucidum* 萃取物之抗腫瘤作用 (2) : 口服靈芝萃取液對 S-180 肉瘤生長之抑制作用。中華民國癌症醫學會雜誌 1 : 12-16。
3. 劉柯俊、黃雪芳、蘇慶華和董大成。1989。口服靈芝多醣體之吸收 : ICR 老鼠口服標誌碳 14 靈芝培養液之研究。中華民國癌症醫學會雜誌 5 : 22-30。
4. Hikino, H., Ishiyama, M., Suzuki, Y., and Konne, C. 1989. Mechanisms of hypoglycemic activity of ganoderan B: aglycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med.* 55: 423-428.
5. Ukai, S., Kiho, T., Haro, C., Kuruma, I., and Tanaka, Y. 1983. Anti-inflammatory effect of the polysaccharides from fruit bodies of several; fungi. *J. Pharmacobio-Dyn.* 6: 983-990.
6. 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.* 59: 2641-2653.

7. Kim, Y. T., Kim, E. H., Cheong, C., Williams, D. L., Kim, C. W., and Lim, S. T. 2000. Structural characterization of β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 328: 331-341.
8. Thistlethwaite, P., Porter, I., and Evans, N. 1986. Photophysics of the aniline blue fluorophore: a fluorescent probe showing specificity toward β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan. *J. Phys. Chem.* 90: 5058-5063.
9. Wood, P. J., and Fulcher, R. G. 1984. Specific interaction of aniline blue with β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan. *Carbohydr. Polym.* 4: 49-72.



圖一、不同 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖的 aniline blue assay 檢量線

