

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNCS9503

計畫名稱：綠藻之 Beta-1,3-葡萄聚醣在化妝品上的應用

執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

計畫主持人：呂昆霖



中華民國 96 年 2 月 27 日

摘要

多醣體是屬於天然來源的物質，一般來自真菌、菇類、靈芝等來源最多。而這些多醣體一般使用在抗腫瘤及免疫刺激方面有很多相關研究。Glucan的葡萄糖單位包含有支鏈和直鏈，藉由1,3、1,4和1,6醣苷鍵結，結構上有 α 或 β 的形式。一般 β -Glucan有1,3鍵結是比其其他鍵結形式更有效刺激巨噬細胞的活性。而本實驗以小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 為材料，從小球藻萃取出的多醣體之含量約為 13.48 mg/mL，在抗氧化能力方面為添加 0.8 mg/mL 小球藻的多醣體即可抑制 80% 氧化率。

關鍵字：小球藻、多醣體、抗氧化。



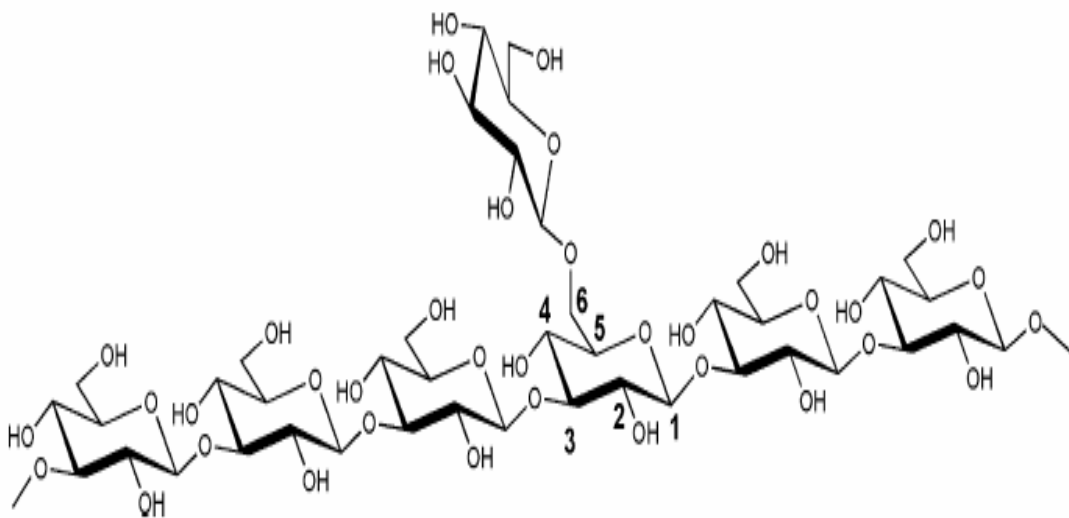
研究計畫內容：

前言

多醣類是一種重要的生物聚合物， β -D-glucan是以 β -1,3主鍵結和 β -1,6側鍵結的葡萄糖聚合物(如下圖)。一般普遍存在於很多細菌、真菌、磨菇、藻類和一些高等植物。多醣類主要會被以起注意是因為具有一些生物活性和藥物特性，像是免疫刺激、抗發炎、抗菌、抗傳染、抗濾過性、抗癌、降低膽固醇、放射線的保護及傷口癒合等活性(1)。 $1,3\text{-}\beta\text{-D-glucan}$ 活性作用的機制還不是很清楚，有可能是與特殊的分子結構，藉由分子量、支鏈及螺旋構形的影響。

從細菌、真菌、磨菇、藻類和一些高等植物不同來源的 $1,3\text{-}\beta\text{-glucan}$ 會有不同的鍵結方式及特性也會不一樣。 $Glucan$ 的葡萄糖單位包含有支鏈和直鏈，藉由1,3、1,4和1,6糖苷鍵結，結構上有 α 或 β 的形式。一般 $\beta\text{-Glucan}$ 有1,3鍵結是比其其他鍵結形式更有效刺激巨噬細胞的活性。 $\beta\text{-Glucan}$ 可以刺激巨噬細胞的活化，在實驗室以及臨床上的研究已經被證實。但 $\beta\text{-Glucan}$ 是如何刺激巨噬細胞產生活性免疫反應的機制還不是很清楚。不過有可能是因為 $\beta\text{-glucan}$ 的螺旋分子結構，可能與巨噬細胞膜上一些受體結合有關。

皮膚的老化與皺紋產生，可藉由ECGF(epidermal cell growth factor)的產生增加膠原蛋白和彈力蛋白，來改善皮膚外觀並且減少細紋和皺紋的現象。一般人的皮膚可能受到環境的損害，包括陽光輻射的傷害、灰塵等以及個人保養不當像是使用一些鹼性的肥皂或酸性太強的化妝品和生活習慣不良都會引起皮膚的損害，而降低皮膚的防禦及免疫能力。因此 $1,3\text{-}\beta\text{-D-glucan}$ 這類的物可以提升皮膚的防禦能力(2)(3)。



1,3- β -glucan有1,6分枝鍵結的化學結構

研究動機

小球藻組成成分中對人體有益為含有胺基酸、胜肽、維生素、醣類及核酸。其中更含有綠藻成長因子“綠藻精”(CGF; Chlorella Growth Factor)，CGF為水溶液萃取物。有很多文研究報告指出口服或注射CGF有促進生長、健康、刺激免疫系統以防感染及抗癌等效果。其中特別是含有令人注目的生物活性物質糖蛋白、多醣體以及核酸等物質。具有增強人體免疫功能、防止病毒增殖、抑制癌細胞增生、抑制血糖血壓上升，降低膽固醇含量，排除體內毒素，迅速修復損傷等功能。因此本研究從小球藻*C. pyrenoidosa*中萃取純化多醣體“1,3- β -glucan”，是否能開發出更具活性的多醣體以及在化妝品上的運用，如：抗氧化活性、抗菌活性、保濕等效果。由於一般普遍多醣體大多數來自於細菌、真菌、菇類、在這方面已經很多文獻探討過，而大部分所純化出的多醣體使用在免疫刺激、抗腫瘤是相當多的。但本研究會是針對多醣體在皮膚上的作用以及在化妝品上的應用潛力來進行評估。

材料與方法

一、小球藻多醣體1,3- β -Glucan之萃取

1、小球藻培養：

本實驗所使用的培養基，於121°C、1.5 atm下滅菌20分鐘並冷卻後，得到藻類培養基。將培養基到入適當玻璃容器，以接種環自斜面培養基取適量藻體接種，接上CO₂與空氣混合，進行培養在32°C，日夜循環照光14小時；黑暗10小時。所有容器、器材都必須是無菌狀態下才能進行培養。

2、多醣體萃取製備

取0.5 g新鮮小球藻，添加10 ml 蒸餾水，用陶瓷面板加熱攪拌器均勻加熱煮沸 1 小時。冷卻後，將液體至於15 ml的離心管，轉速設定為1409 xg，離心15分鐘，以移除大多數的藻類及雜質。取其上層液，置於冷凍乾燥中，約凍乾三天，以獲得黃褐色的粉末，此為小球藻水溶液粗萃取物。將這些小球藻粗萃取物粉末加入10 ml的10%三氯醋酸（trichloroacetic acid，簡稱TAC）於30 ml 的塑膠螺蓋圓底離心管中，置於4°C冰箱，1小時後，再將其以超高速冷凍離心機，轉速1118 xg，離心30分鐘，以去除懸浮之蛋白質顆粒。取上層液，注入透析膜（15 cm 2.5 cm）內，置於含有3公升蒸餾水的燒杯中，再4°C下，透析24小時。最後，將透析液再置於冷凍乾燥機乾燥3天，以獲得粗多醣體粉末。

二、多醣體含量之測試

多醣體濃度的測試是使用苯酚—硫酸法（Phenol-sulfuric acid assay）。當醣類遇到強酸時，結構式上的羥基與酚結合，會產生橘黃色液體，因此，可用比色法（吸光值）檢測其多醣體的濃度。首先配置已知葡萄糖標準溶液：0、25、50、75、100及125mg/ml。然後，各取1ml不同濃度的葡萄糖標準溶液，先分別加入0.5ml的5%酚，再立刻加入2.5ml硫酸。將這些液體靜置10—20分鐘，使用試管攪拌均勻搖晃，待反應完全，顏色呈色穩定的橘黃色液體後，再以分光光度計測

其吸光值（波長490nm）。同樣地，將萃取自小球藻多醣體粉末，添加400ml的蒸餾水，以相同方式測吸光值，對照標準溶液之迴歸曲線公式，以推算其醣類濃度（4）（6）。

三、 β -D-glucan分析

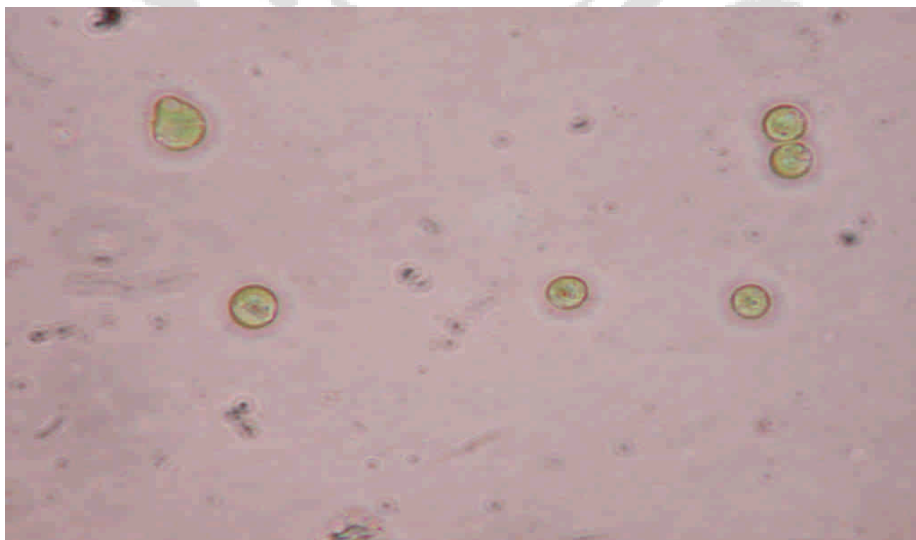
Aniline Blue Assay (螢光法)：

標準曲線的建立，取1.25mg的標準品laminarin (Sigma) 溶於3ml 0.3N的NaOH中攪拌30min使完全溶解，再加入1N HCl調整pH至11.5的50mM Na_2HPO_4 - NaOH緩衝液（含0.5 M NaCl）定容至10ml；再稀釋不同濃度的標準品（50、40、30、20、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）。每個濃度各取3ml，加入0.2ml濃度1mg/ml的aniline blue (Ferak) 試劑。混合均勻後靜置2小時；進行螢光強度的檢測（激發波長395 nm；放射波長495 nm）製作成迴歸曲線。樣品檢測同樣地將樣品溶於3ml NaOH中，攪拌30min使完全水合溶解，再加入1N HCl調整pH至11.5的50mM Na_2HPO_4 - NaOH緩衝液（含0.5 M NaCl）定容至10ml，取3ml，加入0.2ml濃度1mg/ml的aniline blue試劑。混合均勻後靜置2小時，進行螢光強度的檢測；對照標準溶液之迴歸曲線公式，以推算 β -D-glucan濃度（5）。

四、總抗氧化能力的評估：TEAC 法

取8.8 U/mL peroxidase及75 mM ABTS 溶液，再加入60 mM H_2O_2 混合均勻，6分鐘後產生安定藍綠色之 ABTS^+ 陽離子自由基，隨即加入不同濃度的trolox標準品或樣品10 mL，測734 nm之吸收光值，作成trolox 檢量線，樣品則藉檢量線換算其相當濃度。

結果與討論



圖一 小球藻的外觀



圖二 呈棉絮般灰色粉末的小球藻多醣體，刻度 = 1 cm

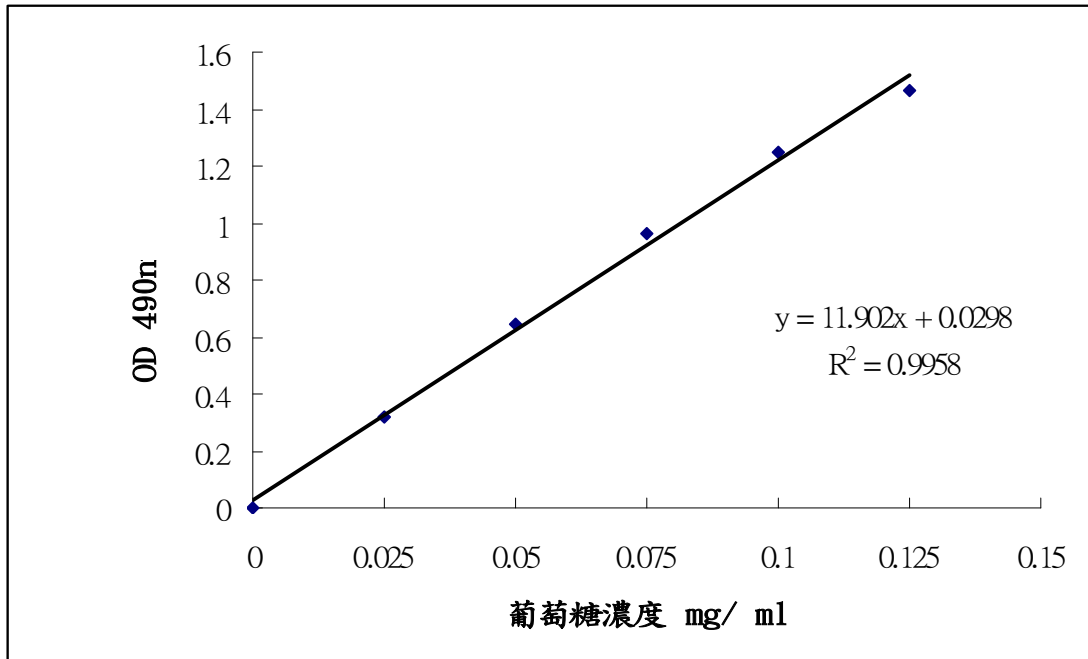
一、總多醣體含量之檢測

實驗測量小球藻多醣體的含量是利用苯酚硫酸法，測量的原理是根據糖分子在酸性環境下，其結構式上的羥基與酚會有橘黃色的呈色反應，本實驗採用葡萄糖作為苯酚硫酸法的標準品。結果得到的總多醣體之含量約為13.48 mg/mL。



圖三 苯酚—硫酸法測定小球藻多醣體含量之呈色現象

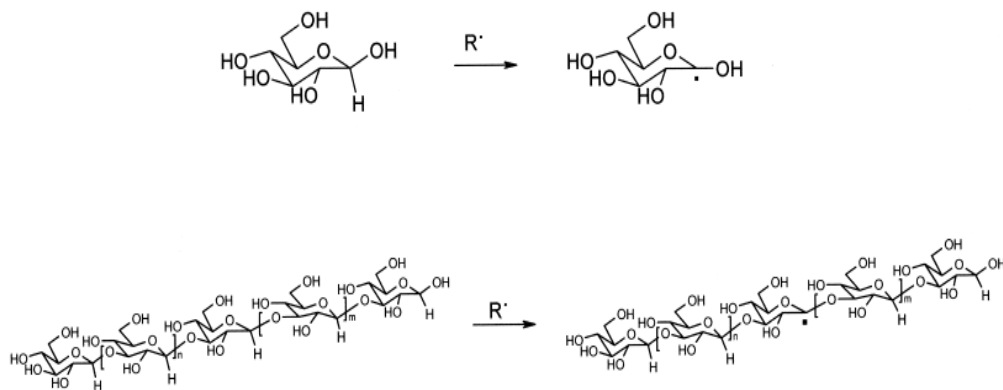
苯酚硫酸法



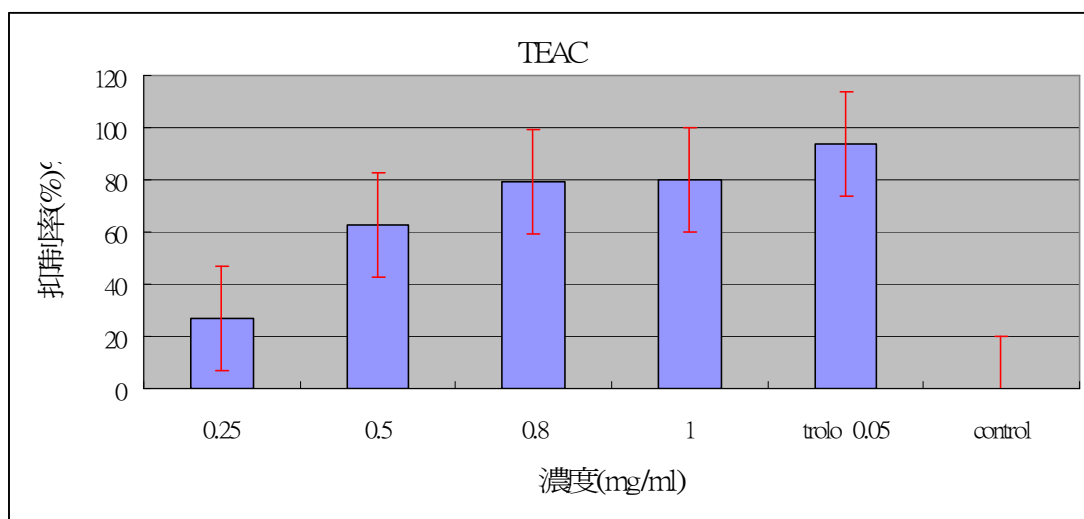
綠藻總多醣體	多醣體濃度(mg/mL)
水溶液	13.48

二、總抗氧化活性之評估

目前碳水化合物聚合物和單醣這類的物質為什麼會有抗氧化的功效，其機制還不是很清楚。不過推測有可能是單醣或多醣會提供出氫離子，而達到掃除自由基的作用，因此可以用來當抗氧化劑使用。以 0.05 mg/mL trolox 為正控制組，無菌水為負控制組，在總抗氧化能力方面為添加 0.25 mg/mL 和 0.5 mg/mL 小球藻的多醣體，分別約有 25% 與 60% 之抗氧化能力，添加 0.8 mg/mL 小球藻的多醣體即可抑制 80% 氧化率。



圖四、單醣或多醣的抗氧化機制



圖五、總抗氧化能力之評估

參考文獻

1. Kogan, G. (2000) 1→3,1→6-β-D-Glucan of yeasts and fungi and their biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry*. 23: 107-152.
2. Kim, M.S., Park, K.M., Chang, I.S., Kang, H.H., Sim, Y.C. (2000) β-(1,6)-branched β-(1,3)-glucan in skin care. *Cosmet Toil*. 115(7) : 79-86.
3. Mansell, P.W.A. (1994) Polysaccharides in skin care. *Cosmet Toil*. 109(9) : 67-72.
4. 彭子倩 (2005) 光度、溫度及鹽度對於螺旋藻多醣體 (膠質) 之影響 台灣海洋大學 水產養殖學系研究碩士論文。
5. 張志強 徐競衡 (第七屆生化工程研討會論文集) 探討有機溶劑前處理對熱水萃取猴頭菇多糖之回收率及抗腫瘤活性之影響 國立中央大學化學工程與材料工程學系
6. 鄭懿芳 (2004) 樟芝菌絲體培養之胞外多醣體應用於抗老化化妝品成分之研究 嘉南藥理科技大學 生物科技研究所碩士論文。