

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：1

計畫名稱：以醱酵技術大量生產有功能性的牛樟芝胞外多醣體應用
於抗老化化妝品

執行期間：97年1月1日至97年12月31日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：呂敏勇

子計畫主持人：

中華民國 98 年 02 月 27 日

目 錄

一、研究摘要	-----	2
二、簡介	-----	4
三、研究材料與方法	-----	9
四、結果與討論	-----	13
五、結論	-----	19
六、參考文獻	-----	20

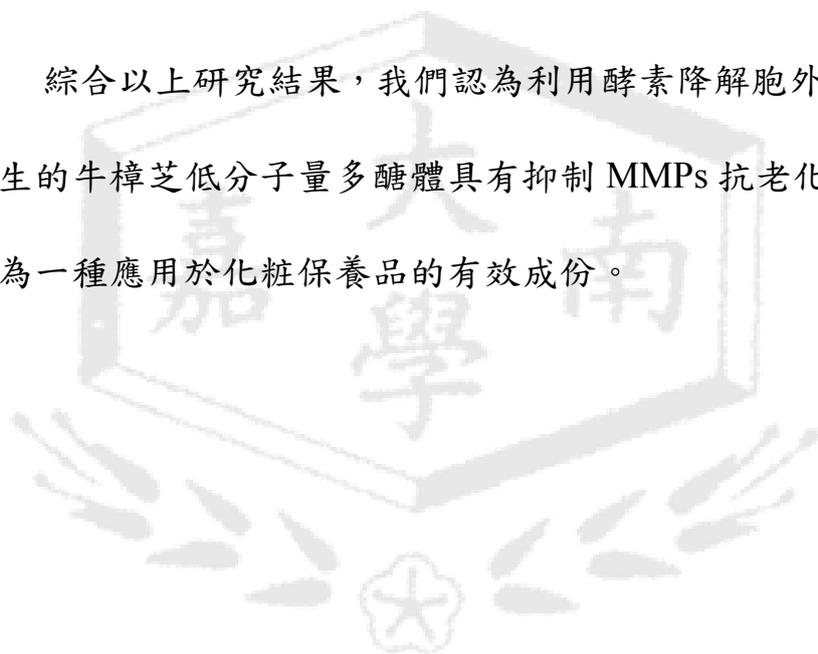
一、研究摘要

樟芝(*Taiwanofungus camphoratus*)是台灣特有的一種藥用菇類，已知主要的有效成份為多醣體以及三萜類。近期我們發現小分子量(小於 30,000 Da)的樟芝菌絲體深層培養的胞外多醣體具有抑制基質金屬蛋白酶 (Matrix Metalloproteinases, MMPs) 的活性。因此，本研究利用醣類水解酵素降解樟芝菌絲體深層培養中所含有的大分子量胞外多醣體，使之成為較低分子量的多醣體，且在總多醣中增加具有抑制 MMPs 功效的小分子量多醣體。藉由本研究我們找出最佳的醣類水解酵素降解大分子量多醣體的反應條件，產生具有抑制 MMPs 功效的小分子量多醣體，可作為抗老化化妝品的有效性成分。

本研究將樟芝菌絲體深層培養中所含有的大分子量胞外多醣體，於 40°C 下以 40 units/ml endo- β -1,3-glucanase 降解 6 小時，可得到小分子量胞外多醣體，且這些胞外多醣體之分子量約小於 31,542 Da。這些小分子量多醣體再應用於抑制 3T3 纖維母細胞所分泌之 MMPs，並藉由 gelatin-based zymography 進行 MMP-2 及 MMP-9 之活性分析。我們發現小分子量多醣體在濃度於 500 μ g/ml 之劑量下，處理 3T3 纖維母細胞培養液，可以抑制細胞培養液中所含 pro-MMP-2、MMP-2 及 MMP-9 之活性。

本研究繼續擴大至 5 公升醱酵槽培養，乾菌體量及胞外多醣量分別可增加至 27.8 g/L 及 6.9 g/L，將這不同深層培養的胞外多醣體，也利用醣類水解酵素降解為小分子量多醣體，並且評估抑制 MMP-2 及 MMP-9 活性之能力。經實驗結果顯示，所產生的小分子量多醣體亦具有顯著的抑制 pro-MMP-2、MMP-2 及 MMP-9 活性之能力。

綜合以上研究結果，我們認為利用酵素降解胞外多醣體所產生的牛樟芝低分子量多醣體具有抑制 MMPs 抗老化能力，可視為一種應用於化粧保養品的有效成份。



二、簡介

皮膚的老化過程主要由兩種原因所造成，一種為自然老化或稱內在老化(intrinsic senescence)，此現象是與生俱來的，由基因所控管；另一種老化為外在老化(extrinsic senescence)，由外在環境因子所造成，例如陽光中紫外線；內在老化無法或很難被人為改變，但外在老化卻可被人為所避免。皮膚老化的過程主要因為表皮層角質細胞(epidermal keratinocytes)及真皮層纖維母細胞(dermal fibroblasts)的增生減緩，造成皮膚內真皮層(dermis)細胞外基質的大分子成份(macromolecular components of the extracellular matrix) [包括膠原蛋白(collagens)、彈性素(elastins)、勝糖(proteoglycans)、葡萄糖胺糖(glycosaminoglycans; hyaluronan屬於此類)及結構性糖蛋白(structural glycoproteins)]的改變，進而導致皮膚的皺縮、厚度變薄、暗沉、彈性降低及保濕性降低等種種的老化現象(1, 2, 3, 4, 5, 6)。膠原蛋白是人類皮膚真皮層細胞外間質(extracellular matrix)的主要大分子成份(約佔 70%)，其主要的功能是維持真皮層的穩固及對抗外來的壓力，其中type I (85%)、type III (15%)與type V (5%)膠原蛋白則是真皮層細胞外基質內主要的膠原蛋白(6)；但隨著年齡的增加或外在環境因子(例如：UV irradiation與抽煙)的影響，真皮層細

胞外基質內的基質金屬螯合蛋白酶(matrix metalloproteinases ; MMP)的活性也隨著增加，這些種類眾多的基質金屬蛋白酶的活性增加將造成真皮層細胞外基質內大部份的大分子成份被分解，進而引起皺縮、厚度變薄等皮膚的老化現象(1, 2, 3, 4, 5, 7, 8)。其中基質金屬蛋白酶-1 [matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)，是一種鋅離子依賴性的內切性胜肽酶(Zn^{2+} -dependent endopeptidase)；也是一種間質性的膠原蛋白酶(interstitial collagenase)，可以導致皮膚真皮層細胞外基質內的膠原蛋白被初步分解成高分子量的膠原蛋白片段(high molecular weight collagen fragments)，而後基質金屬蛋白酶-2 [matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)，是一種明膠酶A (gelatinase A)]以及基質金屬蛋白酶-9 [matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)，是一種明膠酶B (gelatinase B)]，這兩種基質金屬蛋白酶再將上述的高分子量的膠原蛋白片段進一步破壞而瓦解(9, 10, 11)；另一方面，這些由膠原蛋白被基質金屬蛋白酶-1 初步分解而形成的高分子量的膠原蛋白片段存在於真皮層細胞外基質會抑制新膠原蛋白的合成，也會引起真皮層細胞外間質內膠原蛋白的補充不足(12)。所以在真皮層細胞外基質內，基質金屬蛋白酶-1 的蛋白質及活性表現量是一種皮膚老化現象的指標；當然，

type I、type III 與 type V 膠原蛋白在真皮層細胞外基質內的含量與合成也是另一個說明皮膚真皮是否老化的因子。

應用多醣體抑制基質金屬蛋白酶之研究有以下的研究結果：南台科技大學曾君貴(2004)指出，繡球菌 (*Sparassis crispa*) 發酵液之多醣體處理 HT-1080 細胞後，對 MMP-2 與 MMP-9 的分泌具有抑制之效果，且對於 MMP-2 與 MMP-9 的 mRNA 表現量，亦有相同之結果(13)。南台科技大學謝詠荃(2006)指出，白木耳菌株(T. sp. CCJ00933、T. fuciformis CCJ00960)液態發酵液以酒精萃取之粗多醣，可有效地減少 MMP (matrix metalloprotease) 分解明膠之活性及抑制 MMPs 基因轉錄(14)。國立臺灣大學李奇翰(2000)指出，靈芝多醣體以腹腔注射方式注入倉鼠中，經實驗證時多醣體可抑制 DMBA 所誘導的腫瘤生成。且發現施打多醣體可使細胞內 MMP-9 的活性下降，猜測與降低癌細胞侵襲能力有關(15)。嘉南藥理科技大學賴宜甄(2006)指出，以酒精萃取重綠葉馬尾藻之多醣體，在 0.5 mg/ml 劑量下對於 3T3 纖維母細胞所分泌之 MMP-2，有顯著地抑制性，且可減緩膠原蛋白之破壞，對皮膚具有抗老化之能力(16)。國立中興大學李炫璋(2002)指出，以熱水萃取之樟芝菌絲體，發現在 10 mg/mL 劑量下對於 SK-Hep-1 肝癌細胞株所分泌的 MMP-2 及 MMP-9，有顯著地抑

制性，猜測與高量多醣體有關(17)。南台科技大學盧祉彤(2003)也證實樟芝萃取液對抑制HT-1080細胞分泌之MMP-2與MMP-9是有抑制的(18)。嘉南藥理科技大學鄭懿芳碩士論文指出，以酒精萃取樟芝醱酵液之多醣體，在0.5 mg/ml劑量下對於3T3纖維母細胞所分泌之MMP-2及MMP-9，有顯著地抑制性，且具有刺激纖維母細胞增生膠原蛋白之能力(19)。

多醣體在化粧品上的應用 β -1,3或 β -1,6-glucan之主要功能有提高肌膚免疫力、清除自由基、活化細胞、抗過敏、抗發炎及增強肌膚抗紫外線能力。且將葡聚醣添加於保養霜中可促進纖維母細胞的增生及膠原蛋白的合成，減少皺紋的產生並賦予肌膚良好之彈性(20)。樟芝之多醣體具有抑制基質金屬蛋白酶之活性，有效減緩膠原蛋白之破壞，因此可作為抗老化保養品之應用(19)。幾丁聚醣之化學結構是葡萄糖胺以 β -1,4方式鍵結而成之高分子聚合物。幾丁質與幾丁聚醣具有良好的保濕性、增黏性、成膜性，分散性、防靜電、減少摩擦、、、等特性，所以在化粧品工業中大量用於髮型定型劑、護髮劑、護膚劑、潤濕劑、香皂等。玻尿酸之化學結構是由Glucuronic Acid和N-Acetyl Glucosamine聚合而成，由於其吸水性強被視為極佳之天然保濕劑，目前玻尿酸最主要的來源是由雞冠萃取或由微生物

物發酵而來。

根據本實驗室先前研究結果顯示，以不同酒精濃度下萃取樟芝胞外多醣體，其中以 33%酒精濃度下萃取之胞外多醣體，分子量介於 120,000~450,000 Da，具有顯著性抑制 MMP-9 之能力。而 50~75%酒精濃度下萃取之胞外多醣體，分子量介於 3,000~30,000 Da，具有顯著性抑制 MMP-2 之能力；且以 0.5 mg/ml 之劑量下，處理纖維母細胞 4~8 小時，與控制組之對照下，發現膠原蛋白之累積量可增加 38% (19)。

因此本研究以液態深層培養方式，量產樟芝胞外多醣體為最大量，並利用醣類水解酵素降解樟芝深層醱酵培養後之含有大分子量胞外多醣體，使其成為具有抑制基質金屬蛋白酶之酵素活性的功能性多醣體。我們預期樟芝小分子量胞外多醣體，可達到抑制基質金屬蛋白酶活性之能力，使其功效之原料可開發運用於抗老化保養品中；且本研究也將有助於健康食品開發業者，將其樟芝醱酵後之培養液再加以利用，不僅可達到物盡其用，亦可開創另一商機。

三、研究材料與方法

1. 纖維母細胞的培養與處理：

老鼠 3T3 纖維母細胞(mouse 3T3 fibroblasts)培養於含 10%胎牛血清(fetal calf serum, Hyclone)及 2.5%小牛血清(bovine calf serum, Hyclone)之Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)培養基並加入 3.7% (w/v)的碳酸氫鈉，0.03% (w/v)的麩氨酸(L-glutamine)，每毫升含 100 單位的 penicillin及 100 毫克streptomycin等抗生素，在 37°C，10% CO₂ 培養箱培養，一般接種 1 x 10⁶ cells 於 75 cm²之培養皿，每三至四天進行繼代培養並換以新鮮培養基。取約第十代細胞進行樟芝菌絲體胞外多醣體之處理實驗。

2. 纖維母細胞生長的分析(MTT assay)：

細胞培養於含 10%胎牛血清及 2.5%小牛血清 DMEM 培養基，取約 5000 cells/well 分別加入於 96-well microtiter plate，再以不同濃度的樟芝菌絲體胞外多醣體處理細胞，於 37 °C 培養 4 天，再加入 0.2% 的 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 50 µl/well)，於 37°C再培養 4 天，產生 formazan，formazan 的製造量可作為細胞生存能力的指標，再利用

dimethyl sulfoxide 將 formazan 溶出，以 microplate reader 於 570 nm 的波長下讀出吸光值，代表細胞生長的情形。

3. 樟芝菌絲體的深層培養：

樟芝菌株(AC0623)由本實驗室從樟芝子實體篩選而獲得的菌株，其培養條件如下：培養基含有 2%葡萄糖、0.5%酵母抽出物、0.5%蛋白胨、0.3%硫酸銨、0.3%硫酸鎂、0.3%磷酸二氫鉀、0.05%檸檬酸，pH 4.5，接入的菌量(含培養液)為 1/20，120 rpm，於 28°C 培養，約 12 天可獲得樟芝菌絲體培養液。

4. 樟芝菌絲體深層培養之胞外多糖體的濃度分析：

多糖體的濃度以硫酸-苯酚法測定。以 Phenol-sulfuric acid assay 檢測多醣體含量，以葡萄糖濃度為 0.4 mg/ml 做為標準品。取 1 ml 樣品溶液，加入 0.5 ml 5 % Phenol 溶液混合，快速沖入 2.5 ml 濃硫酸，靜置 30 分鐘，呈色穩定後，於波長 485 nm 下測吸光值。對照葡萄糖標準品濃度與吸光值標準曲線，求得多醣體含量。

5. 基質金屬蛋白酶(MMPs)的 zymography 分析：

收集有處理或無處理(控制組)小分子膠原蛋白胜肽之纖

維母細胞的胞外培養基，收集的胞外培養基經 Centricon 10 (Millipore)的濃縮(約 100 倍濃縮)，其蛋白質濃度以 Bio-Rad protein determination assay kit 測量，取約相同量(10 µg)的蛋白質，於 10%的 Tris-Glycine gels (with 0.1% 膠原蛋白)進行 non-denaturing 的蛋白質電泳分析，電泳完成後，於室溫、緩和搖擺振盪的情形下，電泳膠片以 2.5%的 Triton X-100 處理 30 分鐘以恢復蛋白質的活性，電泳膠片再與 developing buffer (Bio-Rad) 於室溫下先反應 30 分鐘，然後於 37°C 下再反應至少 24 小時，反應完成後，電泳膠片以 0.1%的 Coomassie blue (in 9.2% acetic acid and 45.4% methanol) 於室溫下染色 20 分鐘，然後以 9.2% acetic acid 與 45.4% methanol 清洗 10 分鐘，重複 2 次，最後以 10% acetic acid 與 10% methanol 清洗至基質金屬蛋白酶的蛋白質 bands 出現，即完成活性分析步驟。

6. 樟芝菌絲體深層培養之胞外多醣體的降解反應：

購買適當的多醣體水解酵素(ex: cellulose, glucanase, xylanase, galactanase, mannanase)，以供應廠商提供的反應酵素量、反應溫度及反應 pH 值為反應參考條件，加入適當量的樟芝菌絲體深層培養之胞外多醣體，在不同的反應時間終止酵素的反應，再提高溫度破壞酵素的活性。降解後的多糖

體進行細胞處理反應，以分析其生理活性，並進一步測定其分子量的分佈，以尋找樟芝菌絲體深層培養之胞外多醣體分子量降解的最佳反應條件。

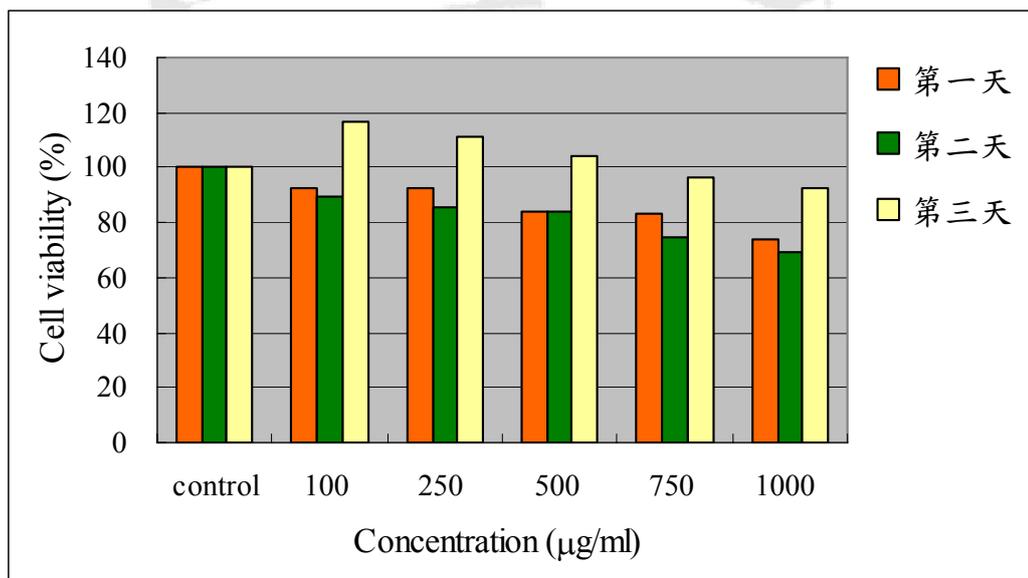


四、結果與討論

1. 細胞存活率試驗

根據本試驗先前研究證明，樟芝深層醱酵培養液，於 50% 酒精萃取下之胞外多醣體，經 40 units/ml endo- β -1,3-glucanase 在 pH 4.5、40°C 之條件下降解六小時，可得到小分子量之多醣體。故本實驗將進一步分析，其樟芝小分子量多醣體之基質金屬蛋白酶活性抑制，試驗前須先瞭解其小分子量多醣體是否將造成纖維母細胞之毒殺作用，故以 MTT assay 來評估 3T3 纖維母細胞之存活率，避免高劑量使用所造成細胞凋亡之現象。經試驗結果顯示(圖一)，樟芝小分子量之胞外多醣體於 100~1000 μ g/ml 之劑量下處理 3T3 纖維母細胞，經 24、48、72 小時後發現，於 750~1000 μ g/ml 劑量以上，處理 3T3 纖維母細胞於第 24、48 小時，將使纖維母細胞存活率下降至 80% 以下；而以 100~500 μ g/ml 樟芝小分子量之胞外多醣體的劑量，處理 3T3 纖維母細胞 24、48 小時，將使纖維母細胞存活率維持至 80% 以上。因此本試驗將以 100~500 μ g/ml 樟芝小分子量之胞外多醣體劑量，作為日後處理纖維母細胞之安全劑量。而當樟芝小分子量之胞外多醣體，處理 3T3 纖維母細胞至第 72 小時，與控制組相較下，發現於 100~500 μ g/ml 之低濃度劑量下，有顯著性刺激纖維母細胞

增生之情形。根據文獻指出，50~75%酒精萃取之樟芝胞外多醣體，屬於介於 1,000~30,000 Da 之小分子量多醣體，且於 500 $\mu\text{g/ml}$ 劑量下處理纖維母細胞，分別在 8、24、48 小時後膠原蛋白分別可增加 32、30、25%。因此本試驗認為，樟芝小分子量之胞外多醣體可能具有刺激纖維母細胞增生之能力。

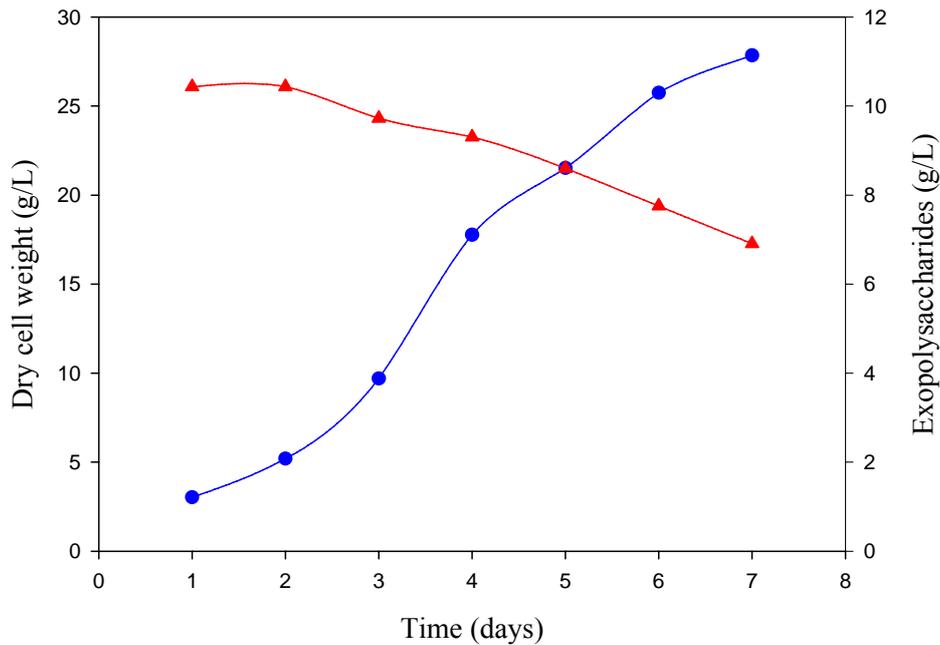


圖一、以 100~1000 $\mu\text{g/ml}$ 樟芝小分子量之胞外多醣體，進行纖維母細胞之存活率試驗分析。

2. 皮膚抗老化效果評估：基質金屬蛋白酶(MMPs)的活性抑制分析

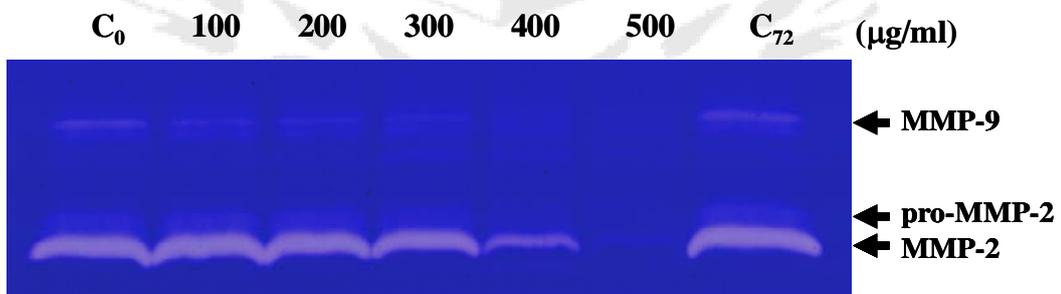
根據 *Taiwanofungus camphoratus* AC0623 於 5 公升醱酵槽培養菌體量與胞外多醣量之生長趨勢圖所示(圖二)，樟芝深層醱酵培養會隨著天數之增加乾菌體產量也隨之增加，而胞外多醣之產量則隨之降低。且於第七天收槽後，樟芝乾菌體量為 27.8 g/l，已達至目前工業量產之規模；胞外多醣產量為 6.9 g/l，相較於目前國內學者研究樟芝胞外多醣體產量中，本試驗為最高產量之研究。因此本試驗進一步分析，樟芝胞外多醣體對於抑制基質金屬蛋白酶之能力，首先將 0~50 %酒精沉澱後之樟芝大分子量胞外多醣體，以 40 units/ml 之 endo- β -1,3-glucanase 添加量，於 pH 4.5、40°C 之條件下進行酵素六小時降解反應。經實驗結果顯示(圖三)，將樟芝小分子量之胞外多醣體，以 100~500 μ g/ml 劑量處理於含有 MMPs 之細胞培養液中，發現其樟芝小分子量之多醣體會隨著劑量之增加，有顯著性抑制 MMPs 之活性能力，且於 400~500 μ g/ml 劑量下時，對於 pro-MMP-2、MMP-2 及 MMP-9 有顯著性抑制效果，而 500 μ g/ml 劑量下時，對於 pro-MMP-2 已達至完全抑制之成效。為此本試驗將以 500 μ g/ml 劑量的樟芝小分子量之多醣體，依不同的時間點來處理含有

MMPs 之細胞培養液，並加以探討其樟芝小分子量之多醣體對於抑制 MMPs 之確效性時間。根據實驗結果顯示(圖四)，以 500 $\mu\text{g/ml}$ 的樟芝小分子量之多醣體處理 3T3 纖維母細胞培養液，於第 24 小時開始對於 pro-MMP-2、MMP-2 與 MMP-9 已有顯著性之減少之趨勢；且於第 48、72 小時較為有顯著性之抑制。此外，我們將以同劑量之樟芝小分子量胞外多醣體，與 3T3 纖維母細胞共同培養 72 小時，探討其小分子量胞外多醣體對於 3T3 纖維母細胞分泌 MMPs 之抑制能力，經實驗結果顯示(圖五)，以 100~500 $\mu\text{g/ml}$ 的樟芝小分子量之胞外多醣體，於 500 $\mu\text{g/ml}$ 之劑量對於 pro-MMP-2、MMP-2 與 MMP-9 有顯著性之抑制。由以上之結果顯示，將樟芝深層醱酵培養放大至 5-L 之生產量，不僅對於樟芝乾菌體與胞外多醣體之生產量，有顯著性增加，且對於樟芝小分子量胞外多醣體對於基質金屬蛋白酶之抑制能力，也有顯著性抑制之能力。因此本試驗成功發展出樟芝菌絲體及樟芝醱酵液上之量產與有效性活性物質之開發研究。



圖二、*Taiwanofungus camphoratus* AC0623 於 5-L 醱酵槽培養菌體量與胞外多醣量之生成趨勢圖。

***Taiwanofungus camphoratus* exopolysaccharides**

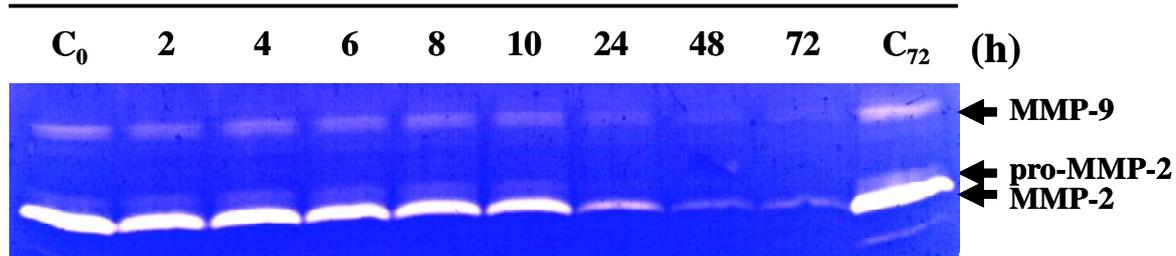


圖三、5-L 醱酵培養樟芝胞外多醣體，經 40 units/ml 酵素量降解六小時後，以 100~500 μg/ml 之劑量處理 3T3 細胞培養液，培養 72 小時後，進行 MMP-2 與 MMP-9 之活性分析。

C: 代表未加入樟芝小分子量之胞外多醣體，並放置 0 小時。

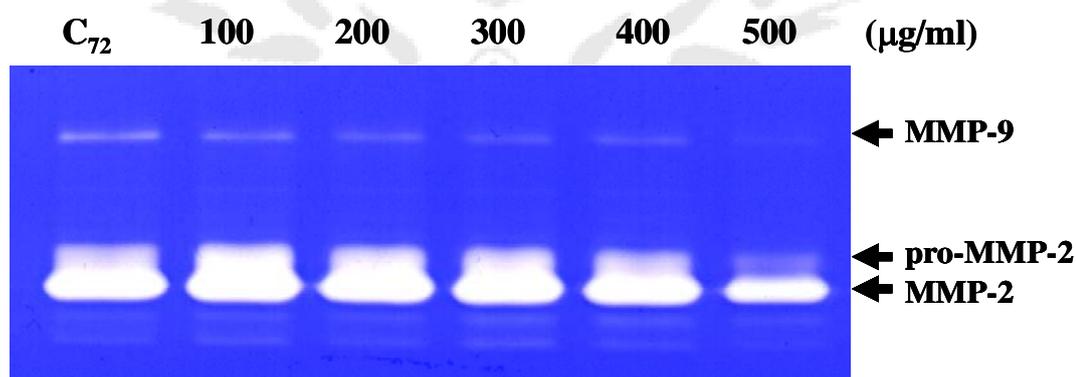
C₇₂: 代表未加入樟芝小分子量之胞外多醣體與 3T3 細胞培養液，共同培養 72 小時。

Taiwanofungus camphoratus exopolysaccharides



圖四、5-L 醱酵培養樟芝胞外多醣體，經 40 units/ml 酵素量降解六小時後，以 500µg/ml 樟芝小分子量之胞外多醣體處理 3T3 細胞培養液，培養 0~72 小時，進行 MMP-2 與 MMP-9 之活性分析。
C：代表未加入樟芝小分子量之胞外多醣體，並放置 0 小時。
C₇₂：代表未加入樟芝小分子量之胞外多醣體與 3T3 細胞培養液，共同培養 72 小時。

Taiwanofungus camphoratus exopolysaccharides



圖五、5-L 醱酵培養樟芝胞外多醣體，經 40 units/ml 酵素量降解六小時後，以 100~500 µg/ml 之劑量處理 3T3 細胞，共同培養 72 小時後，進行 MMP-2 與 MMP-9 之分泌抑制分析。
C₇₂：代表未加入樟芝小分子量之胞外多醣體與 3T3 細胞共同培養 72 小時。

五、結論

本實驗成功利用樟芝深層醱酵後之胞外多醣體，配合酵素降解使之成為具有功能性之胞外多醣體。由於MMPs會導致真皮層細胞外基質內的膠原蛋白（collagens）被分解，造成皮膚產生皺紋、鬆弛、失去光澤、彈性降低、角質代謝遲緩等問題出現。因此本研究利用酵素降解後，所產生的樟芝小分子量之胞外多醣體，於500 µg/ml 劑量之下，能有效抑制pro-MMP-2、MMP-2及MMP-9之活性，顯示小分子量之功能性多醣體，確實具有抑制MMPs活性之能力，未來可作為抗老化化粧品之有效性成分。且本試驗所建立之酵素降解多醣體之製成平台，能有效大量收取樟芝醱酵液，將其可運用並開發為化妝原料，並且也成功結合化粧品與中草藥之開發應用，未來不僅在保健食品及化粧品工業上，對於量產樟芝菌絲體及樟芝醱酵液上，皆能有完善的生理活性物質之製程發展。

六、參考文獻

1. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. 2002. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol.* 138 (11): 1462-1470.
2. Jenkins G. 2002. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech Ageing Dev.* 123 (7): 801-810.
3. Trautinger F. 2001. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol.* 26 (7): 573-577.
4. Wlaschek M, Tantcheva-Poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schuller J, Scharffetter-Kochanek K. 2001. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B.* 63 (1-3): 41-51.
5. Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, Meewes C, Wlaschek M. 2000. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol.* 35 (3): 307-316.
6. Robert L. 2001. Extracellular matrix and aging: a review of mechanisms and interventions. *Cosmetics & Toiletries.* 116 (1): 61-70.
7. Kennedy C, Bastiaens MT, Bajdik CD, Willemze R, Westendorp RG, Bouwes Bavinck JN. 2003. Effect of smoking and sun on

- the aging skin. *J Invest Dermatol.* 120 (4): 548-554.
8. Yin L, Morita A, Tsuji T. 2001. Skin aging induced by ultraviolet exposure and tobacco smoking: evidence from epidemiological and molecular studies. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 17 (4): 178-183.
 9. Kähäri VM, Saarialho-Kere U. 1997. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol.* 6: 199-213.
 10. Woessner JF Jr. 1998. The matrix metalloproteinase family, in *Matrix Metalloproteinases*, WC Parks and RP Mecham, eds, San Diego, California: Academic Press. pp 1-14.
 11. Thibodeau A. 2000. Metalloproteinase inhibitors. *Cosmetics & Toiletries.* 115 (11): 75-82.
 12. Varani J, Perone P, Fligiel SE, Fisher GJ, Voorhees JJ. 2002. Inhibition of type I procollagen production in photodamage: correlation between presence of high molecular weight collagen fragments and reduced procollagen synthesis. *J Invest Dermatol.* 119 (1): 122-129.
 13. 曾君貴。繡球菌生理活性之研究。南台科技大學生物科技系碩士論文。2004。
 14. 謝詠荃。建立真菌材料於化粧品之功效篩選技術。南台科技大學生物科技系碩士論文。2006。

15. 李奇翰。靈芝抗癌效果之研究。國立臺灣大學醫事技術學研究所碩士論文。2000。
16. 賴宜甄。藻類多醣體應用於化粧品之抗老化分析。嘉南藥理科技大學化粧品科技研究所碩士論文。2006。
17. 李炫璋。牛樟芝菌絲體之體內保肝功能評估及其熱水萃物在體外對基質金屬蛋白水解酶活性之影響。國立中興大學食品科學系碩士論文。2003。
18. 盧祉彤。牛樟芝菌絲體對腫瘤細胞的影響。南台科技大學生物科技系碩士論文。2003。
19. 鄭懿芳。樟芝菌絲體培養之胞外多醣體應用於抗老化化粧品成份之研究。嘉南藥理科技大學生物科技研究所碩士論文。2005。
20. 謝曉環。由麵包酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 純化 β -(1,3)/(1,6)-glucan 之研究。國立高雄應用大學化學工程系碩士論文。2004。