

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

Master Thesis

指導教授：楊芳鏘教授

Advisor : Fan-Chiang Yang, Ph.D.

培養策略對樟芝菌絲體活性成分生成之影響

Effect of cultivation strategies on the production of
bioactive components in *Antrodia cinnamomea* cultures.

研究生：邱俊嘉 撰

Graduate student : Chun-Chia Chiu

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

摘要

樟芝(*Antrodia cinnamomea*)為台灣特有的藥用菇類，已知主要的有效成分為多醣體、三萜類及固醇類，其生理活性成分及功能仍是目前研究重點。本研究主要探討利用不同的培養策略對樟芝菌絲體活性成分生成之影響，在三角瓶液態培養方面，比較轉速變換、饋料批式營養源的添加、誘導子濃度的添加及溫度的變換。在固態發酵方面，測試不同培養基與誘導子添加做饋料批式培養。最後利用發酵槽進行轉速變換以及麥芽萃取物的添加。

在轉速變換的實驗中，三萜含量達到 31.38 mg/g D.W.，為控制組的 1.3 倍。在饋料批式實驗中，以添加蛋白胨(Peptone)為最佳，三萜含量達到 6.47 mg/g D.W.，為控制組的 2.2 倍。在誘導子添加的實驗中，添加幾丁寡糖濃度為 300 mg/L 時，三萜類含量達到 111.18 mg/g D.W.，為控制組的 2.7 倍。降低溫度的兩階段培養三萜含量達到 142.12 mg/g D.W.，為控制組的 3.5 倍。

在固態發酵培養實驗中，添加液態基礎培養基試驗之三萜類含量達到 16.04 mg/g D.W.，為控制組的 4.2 倍。在小米固態培養中分別添加幾丁寡糖和木質素，三萜類含量分別達到 9.69、4.54 mg/g D.W.，為控制組的 2.6、1.2 倍。

在發酵槽實驗中，提高轉速對發酵槽培養實驗中，發現發酵槽培養之三萜含量，在第 14 天達到 92.50 mg/g D.W.，為控制組的 3.9 倍。在麥芽萃取物的添加對發酵槽培養實驗中，發現發酵槽培養之三萜含量，在第 14 天達到 165.66 mg/g D.W.，為控制組的 7.1 倍。本研究結果證實利用不同培養基可以提高樟芝液態培養生理活性提供可行性之培養策略。

關鍵字:樟芝、三萜類、液態發酵培養、誘導子、固態培養

Abstract

Antrodia cinnamomea is an endemic medical mushroom in Taiwan. It is well known that the major effective components in this medical fungus are polysaccharides, triterpenoids and steroids. Since the amount of triterpenoids has been considered as an indicator of *Antrodia* product quality, how to enhance its contents by controlling the cultivating conditions deserves further study in detail. In this study the strategies used in liquid culture included: Shifting shaking rate in two-stage culture, fed-batch operation with adding different carbon or nitrogen source, adding different elicitor with various concentrations, shifting the cultivation temperature in two-stage culture. The strategies in solid state fermentation included: the additions of liquid culture media or elicitors. In addition, the strategies of rotation speed shifting and addition of malt extract were tested in a stirred tank bioreactor.

The test of shaking speed shifting showed that the content of crude triterpenoids reached the level of 31.38 mg / g D.W., which was 1.3 times more than the control. In the test of fed batch culture the content of crude triterpenoids rose to 6.47 mg / g D.W. with peptone addition, which was 2.2 times more than the control. When chitosan oligosaccharide of 300 mg/L was added, the crude triterpenoids content was enhanced to the level of 111.18 mg/g, and was 2.7 times more than the control. The addition of lignin of 100 mg/L, D.W. showed no much difference in the crude triterpenoids content. In the test of temperature shifting at two-stage culture, the content of crude triterpenoids reached 142.12 mg / g D.W., which was 3.5 times more than the control.

In solid-state fermentation, the content of crude triterpenoids could increase to 16.04 mg / g D.W. by adding basal liquid medium, which was 4.2 times more than the control. In the test of adding different elicitor to solid state culture, the concentration of crude triterpenoids reached to 9.69 mg / g D.W. with adding chitosan oligosaccharide, which were 2.6 times more than the control.

In two-stage cultures using a stirred tank bioreactor, the content of crude triterpenoids rose to 92.50 mg / g D.W. by shifting the rotation speed, which was 3.9 times more than the control. Moreover, adding malt extract could enhance crude triterpenoids content to 165.66 mg/g D.W., which was 7.1 times more than the control. This study demonstrates that some culture strategies could effectively improve the production of bioactive components in submerged cultures or solid state fermentation of *Antrodia cinnamomea*.

Keywords: *Antrodia cinnamomea*, triterpenoids, submerged culture, elicitor, solid-state fermentation, two-stage culture.

目錄

摘要.....	I
Abstract	II
目錄.....	I
圖目錄.....	IV
表目錄.....	I
第一章 緒論.....	1
1-1 前言.....	1
1-2 研究動機與目的.....	2
第二章 文獻回顧.....	3
2-1 樟芝分類與命名.....	3
2-1-1 樟芝的分類與命名.....	3
2-1-2 樟芝生理活性成分.....	5
2-1-2-1 胞內多醣 (polysaccharides)	5
2-1-2-2 三萜類 (triterpenoids)	7
2-1-2-3 Monacolin K.....	10
2-2 樟芝的培養方式.....	11
2-3 提升三萜含量之培養策略.....	15
2-3-1 饋料批次培養(Fed-batch culture).....	15
2-3-2 兩階段培養(Two-stage culture).....	15
2-3-3 誘導子或前驅物添加 (Addition of elicitor or precursor).....	16
2-3-3-1 添加誘導子之簡介.....	17
(一) 幾丁寡醣.....	17
(二) 木質素.....	18
第三章 實驗材料與方法.....	20
3-1 實驗菌株.....	20
3-2 實驗藥品.....	20
3-3 實驗儀器與設備.....	22
3-4 分析方法.....	23
3-4-1 菌體濃度.....	23
3-4-2 多醣濃度測定 (Chaplin and Kennedy,1994)	23
3-4-3 粗三萜含量測定(Tang and Zhong,2002)	24

3-4-4 HPLC 分析代謝產物三萜含量.....	25
3-4-5 HPLC 分析代謝產物 Monacolin K.....	27
3-5 實驗方法.....	28
3-5-1 實驗架構.....	28
3-5-2 樟芝菌種培養、保存與製備.....	29
3-5-2-1 菌種斜面試管保存.....	29
3-5-2-2 培養皿平面培養與接菌活化.....	29
3-5-2-3 種菌的製備.....	29
3-5-3 三角瓶液態震盪培養之試驗.....	30
3-5-3-1 低轉速變高轉速兩段式震盪培養對樟芝生理活性生成之影響.....	30
3-5-3-2 不同添加物對樟芝液態震盪培養生理活性生成之影響.....	30
3-5-3-3 不同誘導子添加濃度對樟芝液態培養生理活性生成之影響.....	31
3-5-3-4 高溫度變低溫度兩段式震盪培養對樟芝生理活性生成之影響.....	31
3-5-4 固態培養之試驗.....	32
3-5-4-1 液態培養基添加對樟芝固態培養生理活性生成之影響.....	32
3-5-4-2 不同的誘導子添加對固態培養生理活性生成之影響.....	32
3-5-4-3 不同的誘導子與液態培養基添加對樟芝固態培養生理活性生成之影響.....	33
3-5-5 發酵槽培養之試驗.....	34
3-5-5-1 高轉速變低轉速兩段式發酵槽培養生理活性生成之影響.....	34
3-5-5-2 低轉速變高轉速兩段式發酵槽培養生理活性生成之影響.....	34
3-5-5-3 麥芽萃取物再添加對發酵槽生理活性生成之影響.....	35
第四章 實驗結果與討論.....	36
4-1 三角瓶液態震盪培養之探討.....	36
4-1-1 三角瓶液態震盪培養之生長曲線.....	37
4-1-2 低轉速變高轉速兩段式震盪培養對樟芝生理活性成分生成之影響.....	38
4-1-3 高溫變低溫兩段式震盪培養對樟芝生理活性成分生成之影響.....	40
4-1-4 不同添加物對樟芝液態震盪培養生理活性成分生成之影響.....	42
4-1-5 不同誘導子添加濃度對樟芝液態培養生理活性成分生成之影響.....	44
(一)幾丁寡糖添加試驗.....	44
(二)木質素添加試驗.....	46
4-1-6 不同培養策略對樟芝液態培養 monacolin k 生成比較.....	48
4-2 固態培養之探討.....	50
4-2-1 液態培養基添加對樟芝固態培養生理活性成分生成之影響.....	51
4-2-2 不同的誘導子添加對固態培養生理活性成分生成之影響.....	53
4-2-3 不同的誘導子與液態培養基添加對樟芝固態培養生理活性生成之影響.....	55
4-2-4 不同培養策略對樟芝固態培養 monacolin k 生成比較.....	57

4-3 攪拌式發酵槽培養之試驗.....	58
4-3-1 攪拌式發酵槽培養之生長曲線.....	58
4-3-2 兩段式轉速控制發酵槽培養試驗.....	60
4-3-2-1 高轉速變低轉速兩段式培養生理活性成分生成之影響.....	60
4-3-2-2 低轉速變高轉速兩段式培養生理活性成分生成之影響.....	62
4-3-3 麥芽萃取物再添加對生理活性生成之影響.....	64
4-3-4 不同培養策略對樟芝培養 monacolin k 生成比較.....	66
4-4 不同培養策略對樟芝培養生理活性成分生成之影響.....	67
4-4-1 不同培養策略對樟芝液態培養活性成分生成之影響.....	67
4-4-2 不同培養策略對樟芝發酵槽產量生成之影響.....	69
4-5 HPLC 圖譜比較.....	70
第五章 結論與未來展望.....	75
5-1 結論.....	75
5-2 未來展望.....	77
參考文獻.....	78

圖目錄

圖 2-1 樟芝子實體圖(張益軒, 2001).....	4
圖 2-2 樟芝液態培養菌絲體圖.....	4
圖 2-3 β -1,3 葡聚糖(李宛蓁, 2003).....	6
圖 2-4 Monacolin K 的結構式.....	10
圖 2-5 攪拌式生物反應器.....	14
圖 2-6 氣舉式生物反應器.....	14
圖 2-7 幾丁寡糖結構式.....	18
圖 2-8 木質素單體的分子結構.....	19
圖 4-1 樟芝液態三角瓶培養.....	36
圖 4-2 三角瓶液態震盪培養之生長曲線.....	37
圖 4-3 低轉速變高轉速兩段式培養對樟芝菌絲體生理活性成分生成之影響.....	39
圖 4-4 不同添加物對樟芝菌絲體生理活性成分生成之影響.....	43
圖 4-5 幾丁寡糖添加對樟芝菌絲體生理活性成分生成之影響.....	45
圖 4-6 木質素添加對樟芝菌絲體生理活性成分生成之影響.....	47
圖 4-7 高溫變低溫兩段式培養對樟芝菌絲體生理活性生成之影響.....	41
圖 4-8 不同培養策略對樟芝液態培養 monacolin k 含量生成比較.....	49
圖 4-9 固態發酵培養側面圖.....	50
圖 4-10 固態發酵培養俯視圖.....	50
圖 4-11 液態培養基添加對樟芝固態培養生理活性成分生成之影響.....	52
圖 4-12 不同的誘導子添加對樟芝固態培養生理活性成分生成之影響.....	54
圖 4-13 不同的誘導子與液態培養基添加對樟芝固態培養生理活性生成之影響.....	56
圖 4-14 不同培養策略對樟芝固態培養 monacolin k 生成之比較.....	57
圖 4-15 攪拌式發酵槽外觀.....	58
圖 4-16 發酵槽培養之生長曲線.....	59
圖 4-17 發酵槽高轉速變低轉速兩段式培養對生理活性成分生成之影響.....	61
圖 4-18 發酵槽低轉速變高轉速兩段式培養對生理活性成分生成之影響.....	63
圖 4-19 發酵槽麥芽萃取物再添加對生理活性成分生成之影響.....	65
圖 4-20 不同培養策略對樟芝發酵槽培養 monacolin k 生成比較.....	66
圖 4-21 樟芝子實體 HPLC 分析圖譜.....	70
圖 4-22 搖瓶誘導子添加之 HPLC 分析圖譜.....	72
圖 4-23 發酵槽之 HPLC 分析圖譜.....	74

表目錄

表 2-1 樟芝子實體中所含三萜類 Ergostane 型化合物(張怡潔, 2003).....	9
表 2-2 樟芝子實體中所含三萜類 Lanostane 型化合物(Yang et al., 1996)	9
表 3-1 實驗藥品清單.....	20
表 3-2 實驗儀器清單.....	22
表 3-3 HPLC 移動相溶劑(粗三萜).....	26
表 3-4 乙醇萃取物的 HPLC 圖譜分析.....	26
表 3-3 HPLC 移動相溶劑(Monacolin K).....	27
表 4-1 不同培養策略對樟芝液態培養生成比較表	68
表 4-2 不同培養策略對樟芝發酵槽產量生成比較表	69

第一章 緒論

1-1 前言

近年來，對健康有著相當療效的天然食藥用菇之保健類食品受到全世界人們的注意，例如：靈芝、樟芝、巴西蘑菇等。其中樟芝(*Antrodia cinnamomea*)是台灣特有種的菇類，亦是目前最流行的保健藥用菇類，截至目前為止世界上僅發現於台灣。樟芝表現的生理特性中有著對生物體免疫增強、抗氧化及抑制腫瘤細胞增生等多種生理功能(水野卓，1997；Song and Yen, 2002；Hsiao et al., 2003)。而樟芝的甲醇萃取量高於靈芝 10 倍，嘗起來也比一般靈芝苦，預估其中的多氧化型類三萜及固醇類含量極為豐富(吳，1995)。而固態發酵培養，常利用未處理之原料或是天然廢棄物做為其培養之基質，而發酵後之產物往往能直接進行利用或是食用。其設備簡單且成本低廉為固態發酵之特點。在液態發酵培養中，也有培養成本低廉的特點，另外液態靜置培養中能形成菌絲層的情況，在許多文獻上也指出，靜置的培養方式對生理活性成分含量的生成有幫助。

近年來，利用誘導子處理植物培養細胞以促使細胞快速、大量合成目的二次代謝物(secondary metabolites)已被認為是提高植物細胞培養中次生代謝產物最有效的途徑之一。也是各國植物細胞培養的研究熱門重點。但是，將誘導子用於食藥用真菌特定活性成分的發酵培養研究仍然有待開發。誘導子應用於食藥用真菌的發酵培養，以提高二次代謝產物的產量，具有一定的理論依據和現實意義。

1-2 研究動機與目的

本實驗利用不同培養策略提升樟芝培養菌絲體三萜之含量，以三角瓶試驗不同培養策略，包括不同誘導子濃度的再添加、不同震盪轉速的變換、不同溫度的變換以及利用饋料批次添加不同的營養源，進而有效地提升樟芝菌絲體中二次代謝物（三萜類）產量的可行性。延續三角瓶所得之實驗結果，以發酵槽放大實驗進行相同的培養策略。

另一方面，以天然食用穀物-小米作為樟芝固態發酵之培養基質，添加不同的誘導子來培養，藉由誘導子(elicitor)的添加使得真菌產生防禦反應(defense response)，目的以提高生理活性成分含量之生成。

第二章 文獻回顧

2-1 樟芝分類與命名

2-1-1 樟芝的分類與命名

樟之又可稱為牛樟芝、牛樟菇、樟菇、陰陽對口菇等，但樟芝屬硬質多孔菌，因此使用芝的名稱比菇較為恰當(吳，1997)。樟之素有靈芝之王的美譽，其療效流傳很久，但他一直沒有科學名字，直到 1995 年才由 Chang & Chou 給他一個法定的名字，原名 *Antrodia cinnamomea*，後來經 Wu 等人(1997)加以修訂為 *Antrodia camphorate*。但在 2005 年，發現樟芝的寄主是牛樟並非樟樹，故張東柱等人根據國際植物命名法規 ICBN Article 9.12 (Greuter et al., 2000)，將 *Ganoderma comphoratum* 與 *Antrodia camphorata* 認定為混淆學名(nomen confusum)，且不再使用，並重新啟用 *Antrodia cinnamomea* 的學名。

樟芝 (*Antrodia cinnamomea*)，為台灣珍貴特有種真菌，從分類上來看屬於真菌界(Fungi)、擔子菌(Basidiomycota)、擔子菌亞門(Basidiomycotina)、同擔子菌綱(Homobasidiomycetes)、無褶菌目(Aphullophorales)、多孔菌科(Polyporaceae)、薄孔菌屬(*Antrodia*) (Chang and Chou, 1995)。

樟芝子實體為多年生、無柄、質硬，具有強烈冲鼻的樟樹香氣，老熟子實體含有高量精油，有驅蟲的作用。子實體在生長初期時為扁平狀，貼生在樹幹上，之後子實體生長前緣會略捲離樹幹翹起，外型成板狀或鍾狀，也有馬蹄型、塔狀

等，一般以板狀居多(廖，1998)。



圖 2-1 樟芝子實體圖(張，2001)

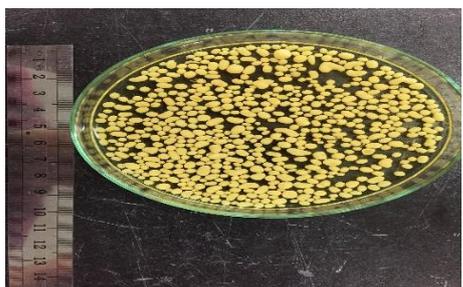


圖 2-2 樟芝液態培養菌絲體圖

2-1-2 樟芝生理活性成分

牛樟芝具有多醣體、多酚類化合物與指標性產物三萜類等活性成分。多醣體可提升免疫力，多酚類化合物可抗氧化、延緩老化，三萜類可促進癌細胞死亡，抑制肝癌細胞增值、修復肝臟並提升肝臟機能、抗發炎、降低血壓防止中風,調整血壓降血脂，雙向調節免疫等功能。

2-1-2-1 胞內多醣 (polysaccharides)

多醣體在許多藥用菇類的研究上一直是個重要的主題，已有許多研究發現菇類純化的多醣體具有抗腫瘤作用，且均具有 β -D-葡聚糖的結構。在微生物體中多醣依存在方式主要分為三類：

- (1)胞內多醣(Intracellular polysaccharides)，此種形態多醣為提供微生物生長所需要的能量及碳源。
- (2)結構多醣(Structural polysaccharides)，此類多醣架構菌體基本形態如細胞壁。
- (3)胞外多醣(Extracellular polysaccharides)為最常利用之多醣，附著於細胞外部的黏性物質，但其亦可儲存細胞壁間隙。

而樟芝所含 β -D-葡聚糖抗癌活性之強弱與水溶性、分子量大小、支鏈分支度、形狀、與主鏈結合方式 β -1,3 鍵結或 β -1,6 鍵結以及結合之蛋白質與脂質等均有關。以 X-ray 繞射分析得知，這種以 β -1,3 鍵結的 D-葡聚糖骨架呈現 3 股右旋之螺旋結構，可能是引發抗腫瘤作用的重要原因(水野卓等人，1997)。

李宛蓁根據 GPC 分析胞外多醣分子量，發現以固態培養的方式生成的多醣分子量遠高於液態培養時生成的多醣分子量 (李，2003)。范真綺在多醣體成分之測定，不論以透析(透析膜 M.W.3000)或酒精沉澱法分析，液態發酵之多醣含量優於固體栽培菌絲體(范，2004)。而利用樟木水萃液、薏仁水萃液、蕎麥水萃液來進行液態發酵培養，可使樟芝改變代謝途徑，提升胞內多醣含量(楊，2010)。

樟芝菌絲體胞內多醣具有 β -D-葡聚糖的結構(圖 2-3)，於醫療應用方面則具有抗腫瘤的效用。主要療效為抗 B 型肝炎病毒活性(anti-hepatitis B virus activity)，但不會對正常細胞有毒殺作用(cytotoxic effect)，在體內、外實驗中，雖無法毒殺白血病細胞(Leukemic cells)但可抑制增殖(李等人，2002)。胞外多醣為抗腫瘤、增強免疫力、降血壓及降血糖等，可被用於抗腫瘤藥劑(免疫力提升劑)，優點是幾乎無副作用，此外胞外多醣亦具有抗血管增生作用的化學特性及抗炎效應 (Cheng et al., 2005 ; Chen et al., 2007 ; Liu et al., 2007)。

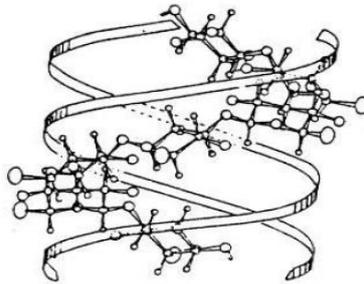


圖 2-3 β -1,3 葡聚糖(李，2003)

2-1-2-2 三萜類 (triterpenoids)

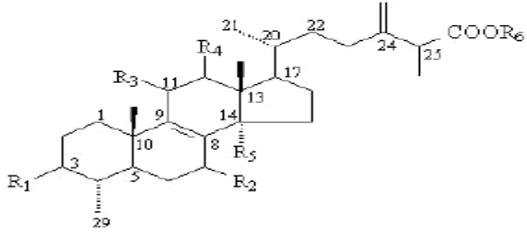
萜類(terpene)是由碳氫化合物或脂質代謝而產生，以異戊二烯為單體之化合物，分子組成通式 $(C_5H_8)_n$ 。萜類是普遍存於植物界的化合物，在動物界為數甚少，萜類的分類主要是依據所包含的異戊二烯的單體數目，將含有兩個異戊二烯單體稱為單萜(monoterpene)，於自然界常存在檸檬、椴柑、薄荷中；含有三個異戊二烯的單體稱倍半萜(sesquiterpene)，於自然界存在玫瑰花中；含有四個異戊二烯單體稱為雙萜(dieterpene)，存在於維生素 A 中；含有五個異戊二烯的單體稱為二倍半萜(sesterpene)；含有六個異戊二烯單體稱為三萜(triterpene)，存在於人參、甘草、地榆中(肖和陳，1989、李，2003)。

三萜類為牛樟芝重要的化學成份之一，也是牛樟芝萃取物中苦味成份的來源(吳，1995)。從實驗證實三萜類其療效可抑制肝癌細胞增殖作用，和多醣體同樣扮演著抗腫瘤活性調節之重要角色(王和黃，2002)。還具有抗發炎、抗過敏、降低膽固醇的作用(水野和川合，1999)。三萜類亦能有效地抑制 Angiotensin converting enzyme (ACE) 的活性之效用，進而降低血壓(黃，2004)。

經研究指出，樟芝子實體含有的獨特三萜類化合物中，Antcin A 經藥理研究證實具有抑制老鼠血癌細胞毒素的活性，而 Antcin B 則具有抗副交感神經作用及抗血清素活性(Cherng and Chiang, 1995)。經初步藥理研究發現，zhankuic acids A 和 C 對 P-388 小鼠白血病細胞毒性， IC_{50} 值為 1.8 和 5.4 $\mu\text{g/ml}$ (Chen and Yang, 1995)。Yeh 從樟芝子實體分離出 8 種三萜類化合物，其評估對各種癌症細胞抑

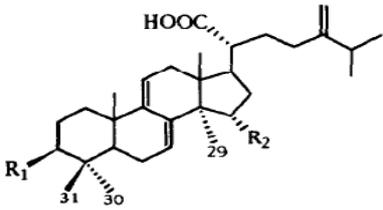
制效果，發現以 3 種 ergostane 型(Methyl antcinatate B、Zhankuic acid A 和 Zhankuic acid C)的三萜類化合物所顯示的細胞毒性最強，可誘導大腸癌細胞、肝癌細胞、乳房癌細胞及肺癌細胞凋亡，IC₅₀ 值為 22.3-75.0 μM 之間，但對正常細胞(MCF10A 及 HS68)則沒有傷害(Yeh et al., 2009)。

表 2-1 樟芝子實體中所含三萜類 Ergostane 型化合物(張怡潔，2003)

						
Compound name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Antcin A	=O	H ₂	=O	H ₂	H	H
Antcin B (Zhankuic acid A)	=O	=O	=O	H ₂	H	H
Antcin C	=O	β-OH	=O	H ₂	H	H
Antcin D (Zhankuic acid F)	=O	=O	=O	H ₂	OH	H
Antcin E	=O	H ₂	=O	H ₂	---	H Δ ¹⁴
Antcin F	=O	β-OH	=O	H ₂	--	H Δ ¹⁴
Antcin G	=O	α-OAc	=O	H ₂	H	H
Antcin H (Zhankuic acid C)	α-OH	=O	=O	α-OH	H	H
Antcin I (Zhankuic acid B)	α-OH	=O	=O	H ₂	H	H
Methyl antcin A	=O	H ₂	=O	H ₂	H	CH ₃
Methyl antcin B	=O	=O	=O	H ₂	H	CH ₂ CH ₃
Methyl antcin G	=O	α-OAc	=O	H ₂	H	CH ₃
Methyl antcin H	α-OH	=O	=O	α-OH	H	CH ₃
Zhankuic acid E	α-OH	=O	=O	α-OH	H	CH ₂ CH ₃

Methyl antcin A = Methyl-4α-methylergost-8,24(28)-dien-3,11-dione-26-oate
 Methyl antcin B = Methyl-4α-methylergost-8,24(28)-dien-3,7,11-trione-26-oate
 Methyl antcin B = Zhankuic acid D

表 2-2 樟芝子實體中所含三萜類 Lanostane 型化合物(Yang et al., 1996)

		
Compound name	R ₁	R ₂
15α-acetyl-dehydrosulphurenic acid	OH	OAc
Dehydroeburicoic acid	OH	H
Dehydrosulphurenic acid	OH	OH

2-1-2-3 Monacolin K

Monacolin K 最早是于 1979 年由日本学者远藤章教授在红色红曲菌中发现的，其對羧甲戊二醯輔酶 A (HMG-CoA) 還原酶具有強的競爭性抑制作用，從而有效地、特異性地抑制膽固醇的合成。這類物質濃度達到 0.001 $\mu\text{g/mL}$ ~ 0.005 $\mu\text{g/mL}$ 時就能抑制膽固醇的合成。(王等人，2012)

Monacolin K 的結構式見圖 2-4。1980 年，美国人 Alberts 等人發現了相似的 HMG-CoA(3-羥基-3-甲基-戊二醯基-輔酶 A 還原酶)抑制物质，即洛伐他汀 (Lovastatin)，後證實與 Monacolin K 為同一種物質。Monacolin K 通過與甲基二羧基戊酸的競爭能有效抑制膽固醇生物合成中的關鍵酶 HMG-CoA 的活性，從而能調節人體內異常血脂，有很強的降低膽固醇的作用，其對膽固醇有特異的降低作用。(馬等人，2016)

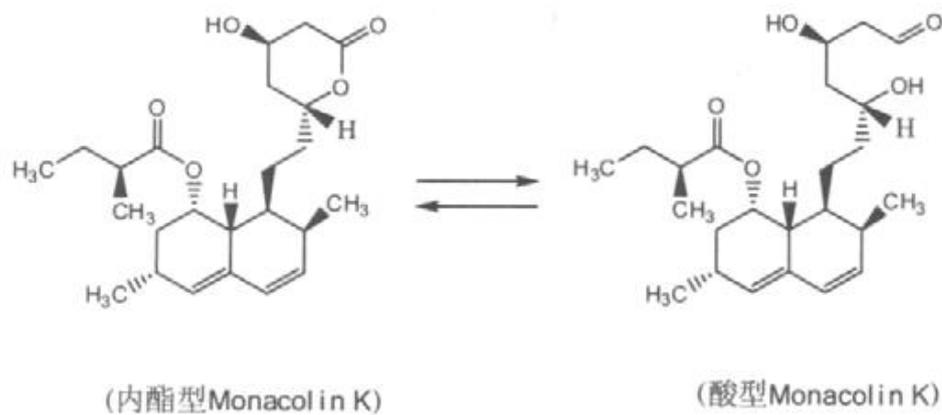


圖 2-4 Monacolin K 的結構式

2-2 樟芝的培養方式

野生樟芝數量稀少且價格昂貴，所以濫砍盜採的情形嚴重，在台灣早已被列入保育類植物，因此目前多以人工栽培的方式為主要來源。但牛樟(*Cinnamomum kanehirae* Hay.)本為台灣保育類樹木，禁止買賣、盜採。在原物料和野生樟芝雙方面都被限制的情況下，人工培養牛樟芝的價錢日漸攀升。而常見商業化的培養方法主要分為固態和液態兩大類，因產品需求的不同而用不同的方式做培養。

1.段木栽培:以樟芝原本的宿主-牛樟木為主要培養基，利用段木為培養基栽培牛樟芝，優點是能獲得與野生子實體一模一樣的成份，特別是特有的三萜類苦味成份，四季生長速度較一致且穩定，約需 2-3 年之久。利用段木栽培生產牛樟芝的優點，更在於能取代野生牛樟芝，避免野生牛樟芝過度被採擷而導致牛樟樹受破壞之危機。

2.固態培養: 使用固態培養時，為生物能有很好的生長情形，也可產生較多的胞外酵素或其他代謝產物(李, 2003)。研究指出，利用特殊培養基配方及環控條件，經過兩個半月成功以固體栽培方式培育出與野生樟芝類似的三萜類成份，並具有良好的抗氧化與抗癌等之生物活性(陳等人, 2001；林, 2008)。因此許多研究皆以改變培養基質去促進牛樟芝生理活性物質產量的增加，甚至使用松杉靈芝為基質進行樟芝子實體固態發酵培養去增加樟芝粗三萜含量(楊凱竹, 2008)。

3.液態培養: 液體深層培養技術及現代發酵工業起源於 1945 年青黴素的大量生

產，生化工程也因此應運而生，其中關鍵技術包括：種菌培養、培養基製備與殺菌、空氣過濾、通氣與攪拌、生物反應器設計與操作及規模放大等。液體培養通常需要能量進行攪拌和供應氧氣。然而，攪拌也帶來發酵液均勻混合的效益，並且可以透過線上感測器進行培養過程的監測與控制。生產程序經由篩選最佳菌種，結合適當的培養基組成與環境因子控制，進行菌體生長與目標產物生成。其中培養基組成主要考量包括：碳源種類與濃度、氮源種類與濃度、無機鹽類、生長因子及維生素。環境因子有：溫度、pH 值、攪拌與通氣等。液體培養允許最佳化及標準化條件下操作，生產具有高價值的菌絲體和生理活性成份。雖然培養後的分離程序，需要去除大量水分。但是與固態發酵相比，產物的分離純化相對容易進行(Yang,2017)。而發酵槽培養:常見的深層液態培養有機械攪拌式發酵槽(Stirred Tank Reactor,STR)以及氣體攪拌式發酵槽(Pneumatically Agitated Fermentor, PAF)。在發酵工業上，目前以攪拌式發酵槽(高度與內徑小於 3)最為廣泛使用，此種發酵槽乃是利用機械攪拌方式以提高發酵槽之質傳效果，增加發酵液中的溶氧量，去營造出一個適合好氣性微生物生長的環境(吳，2000)。典型的攪拌式發酵槽有一個攪拌翼組及片檔板所構成的攪拌系統，所需的空氣通常由槽底之氣體分散器(Sparger)通入槽中，藉由攪拌翼的旋轉與檔板的配合使氣泡及流體均勻分布於發酵槽中，故其具有高氣液質傳的能力，以及流體混合佳的特性(Brauer,1985)。在發酵工業上，此類反應器為常被用來進行微生物的培養。

深層培養最常見的問題是，絲狀菌的菌絲體容易受到發酵槽攪拌作用的影響。因

為典型的 STR 葉片轉動所形成的剪切力不利於菌絲體的生成，而氣體帶動攪拌的發酵槽，應該對菌絲體比較沒有傷害(吳，1994)。氣體攪拌式發酵方面，一般而言，傳統的氣舉式反應器所指的乃是內管式的反應器。此類型的反應器主要是由一個實壁內管將反應器內的流體分隔為上升區和下降區兩部分，在加上內管上方的氣液分離區及底部基底(Base)兩部份，總共可分成四個區域。由於氣舉式反應器的氣體分散器大都是位於流體上升區的底部，所以在上升區中的氣體量通常會比下降區來的多，結果因為兩區的流體總密度不同而導致流體循環流動(Joshi et al.,1990)。上升區中的流體向上流動，具有較大的氣體滯流量，當流體到達上升區的頂部後，即進入氣液分離區，根據不同的設計，氣體溢出的程度會有所不同；部分流體向下流入下降區中，而下降區中的流體主要是朝下方流動。此一流體循環流動的現象與反應器氣液分離區的大小及上、下兩區截面積比有著密切的關西(Chisyi,1989；Wu and Wu, 1990)，對於氣液固三相的混合及熱傳也有相當大的幫助(Weiland and Onken, 1981)。

對氣舉式反應器而言，流體之循環流動為其一大特色，然而其設計上最重要的課題則為提高反應器之氧氣傳送係數，以符合高菌體濃度之培養需求，但是此種發酵槽對高密度培養卻有槽內攪拌混合效果不足的顧慮，真菌在液態培養過程中，菌絲體會聚集形成團塊菌絲球(Pellet)，且培養基黏度會增加，造成氧氣傳遞困難，所以在液態發酵中，菌絲生長與代謝產物的多醣生成會和震盪速率或攪拌方式息息相關(邱和劉，1995)。以三角瓶進行液態培養時，可用三角瓶的震盪方

式或是迴轉速度來增加培養基中的溶氧量，而生物反應器(或稱為發酵槽)則經由通氣或攪拌、將氧氣以及微生物所需要的基質分配均勻，並促進質傳或熱傳的效率。當發酵槽轉速過低，菌絲易形成球體而不能與培養基充分接觸，而攪拌的轉速太高會造成漩渦，使菌絲附著於擾流板或發酵槽壁上(黃，2000)。

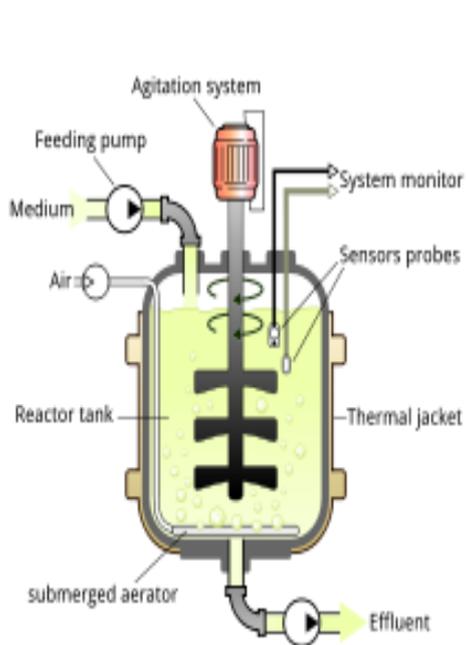


圖 2-5 攪拌式生物反應器

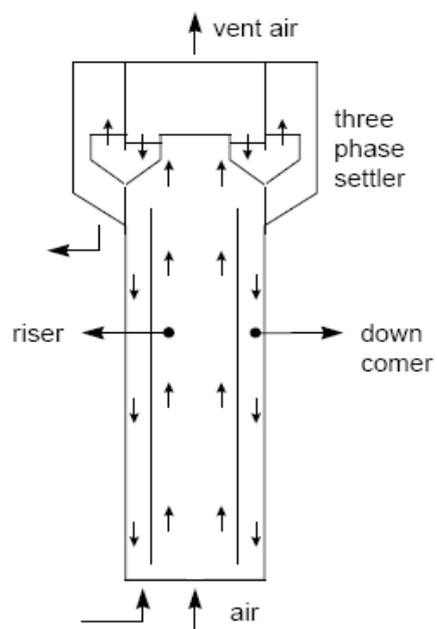


圖 2-6 氣舉式生物反應器

2-3 提升三萜含量之培養策略

固態發酵需要幾個月時間完成子實體生長，然而，液體培養在較佳的營養成分與環境條件控制下，菌絲體生長較快速，因此在數周內即可完成一個批次的培養操作。樟芝在液態培養菌絲體中二次代謝產物的三萜類種類與濃度明顯較固態培養少。如何藉由培養成分、環境因子變化與培養策略，提升液體培養菌絲體中生理活性物質的種類與濃度，一直是許多學者的研究重點。以下介紹幾種常用生物反應器饋料批次操作及新是培養策略。

2-3-1 饋料批次培養(Fed-batch culture)

饋料批次培養是一個介於批次及連續式之間的操作，饋料批次前段操作與批次培養相同，營養成分大量消耗而菌絲體快速生長。在營養基質消耗殆盡時，新鮮培養基隨即以間斷或連續的方式加入發酵槽中，直到達到最高細胞密度、最高產物濃度或是發酵槽液體體積達到飽和。提高菌體或代謝產物濃度是許多研究最主要的目的。菌體生長與目標產物生成所須營養成分可能完全不同，此時饋料批次操作策略可以改為控制前後兩階段在兩種不同的營養基質狀態下培養，前期先將菌體濃度提高後期再進行二次代謝產物生成。因此依目標產物的差異，選擇不同的饋料策略。

2-3-2 兩階段培養(Two-stage culture)

兩階段培養基本概念是針對二次代謝產物生產而提出的操作策略，基本意義

是利用第一階段針對菌體生長進行營養或環境因子調控，等到生長達到對數期後段，即將進入穩定期時，改變關鍵環境因子，誘發二次代謝產物大量生成。兩階段培養控制策略，可以在批次培養進行或結合饋料批次操作一起進行。Fang and Zhong (2002)利用三角搖瓶做液態發酵培養，當作第一階段菌絲體生成的前期培養，而後再以三角瓶或其他容器做第二階段的靜置培養，發現可得到靈芝酸(ganoderic acid)含量達 20.90 g D.W/L，觀察其中的細胞型態變化，得知多醣體的消耗率下降，而在第二階段靜置培養的測得的靈芝酸含量增加 1.36 倍，測得含量達 3.19 mg/mg D.W。振盪培養轉換靜置培養的策略有助於在培養時，葡萄糖的消耗率較低、萜類化合物的產量提高和種類增多，兩階段培養也利於在中間做培養策略的變化。結果證實次級代謝產物的合成與菌體型態有關聯性。

2-3-3 誘導子或前驅物添加 (Addition of elicitor or precursor)

在植物抗病作用中，誘導子(elicitor) 是指能夠激發或誘導植物寄主產生防禦反應的因子。利用誘導子添加策略促使細胞快速、大量合成目的二次代謝物，已被認為是促進植物細胞培養二次代謝產物生成最有效的途徑之一。台大食科所蔣丙煌教授和劉景仁針對樟芝深層培養系統，選擇幾丁聚醣、氯化鈣及組合法(幾丁聚醣+氯化鈣)等誘發劑，探討其對三萜類生產的影響。由研究結果得知，雙網狀導管氣舉式發酵槽與第八天饋料批式發酵分別可獲得菌絲體濃度高達 15.8

與 12.9 g/L。另外，在誘發劑實驗得知，以 100 mg/L 幾丁聚醣處理樟芝發酵液，不但菌體生長狀況較良好之外，尚可獲得最高總三萜類產量(1144 mg/L)。然而，因組合法嚴重影響樟芝之細胞膜通透性，使得其細胞漸失活性，故不利於長期培養，但可使樟芝在短時間即釋放出胞內三萜類。另外，結果顯示氯化鈣處理則不適合短期應用於誘發三萜類之合成(Liu et al., 2012)。由結果得知 100mg/L 為最佳添加濃度，本研究以此結果為準，在近一步延伸出本次研究之實驗架構。

2-3-3-1 添加誘導子之簡介

(一) 幾丁寡醣

幾丁寡醣也叫殼聚寡醣，也稱殼寡醣，學名為 β -1,4-寡糖-葡萄糖胺，是把幾丁聚醣透過特別的生物酶技術加工而得到的一種全新的產品，其為水溶性較好、功能作用大、生物活性高的低分子量產品。它擁有幾丁聚醣所不具有的較高溶解度和容易被生物體吸收等諸多更加優秀的特點，其作用為幾丁聚醣 14 倍。

透過無數研究發現到幾丁寡醣有提高免疫，抑制癌腫細胞生長，促進肝脾抗體形成，促進鈣及礦物質的吸收，增殖雙歧桿菌、乳酸菌等人體有益菌群，降血脂、降血壓、降血糖、調節膽固醇，減肥，預防成人疾病等功效，可將這些特性使用於醫藥、功能性食品等領域。

幾丁寡醣還可誘導出植物的抗病性，對多種真菌、細菌和病毒產生免疫和殺滅作用，對小麥花葉病、棉花黃萎病、水稻稻瘟病、番茄晚疫病等病害具有良好的防治作用，藉此研發出生物農藥、生長調節劑和肥料等產品。

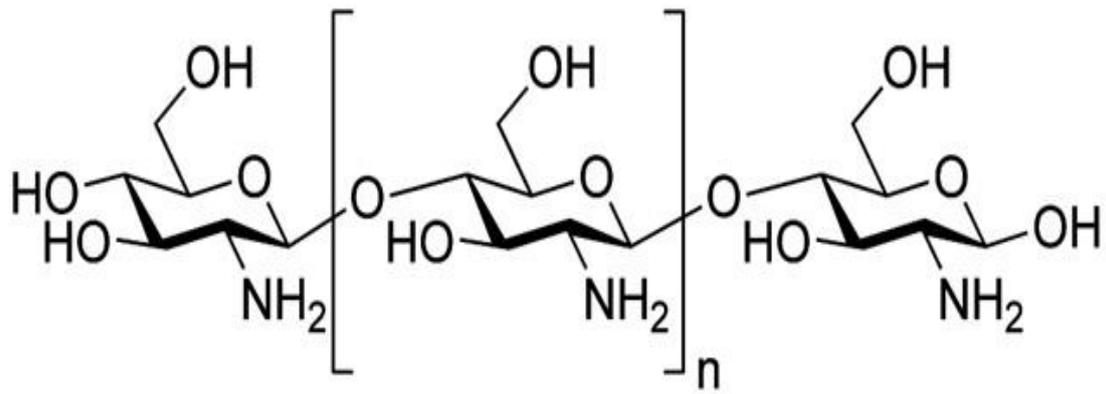


圖 2-7 幾丁寡醣結構式

(二) 木質素

木質素是由四種醇單體（對香豆醇、松柏醇、5-羥基松柏醇、芥子醇）所組成的一種複雜酚類聚合物，其是構成植物細胞壁的眾多成分之一，可以使細胞產生相連的作用。其在植物組織中具有增強細胞壁及黏合纖維的作用。其組成與性質比較繁雜，並擁有極強的活性。不能被動物所消化，在土壤中可以被轉化為腐殖質。透過簡單定義木質素理解到，可以認為木質素是對羥基肉桂醇類的酶脫氫聚合物。它具備一定量的甲氧基，並有某些特性反應。

依照單體不同，可將木質素分類成 3 種類型：由紫丁香基丙烷結構單體聚合而成的紫丁香基木質素（syringyl lignin，S-木質素），由愈創木基丙烷結構單體聚合而成的愈創木基木質素（guajacyl lignin，G-木質素）和由對-羥基苯基丙烷結構單體聚合而成的對-羥基苯基木質素（hydroxy-phenyl lignin，H-木質素），木質素填充於纖維素構架中是為了加強植物體的機械強度，利於輸導組織的水分運

輸和抵抗不良外界環境的傷害。木質素的構造與多酚有很多相似之處，故此，木質素與多酚之關係應相當密切。

由於木質素之分子結構中擁有芳香基、酚羥基、醇羥基、碳基共扼雙鍵等活性基團，因此可以進行氧化、還原、水解、醇解、酸解甲氧基、梭基、光解、酞化、磺化、烷基化、鹵化、硝化、縮聚或接枝共聚等眾多化學反應。看到亞硫酸鹽法生產紙漿的過程中，正是由於亞硫酸鹽溶液與木粉中的原本木質素髮生了磺化反應，引進了磺酸基，使親水性質加強，而後這種木質素磺酸鹽在酸性蒸煮液中更進一步產生了水解反應，使與木質素結合著的半纖維素發生解聚，從而使木質素磺酸鹽化為沉澱溶解出來，也造就了木質素、纖維素與半纖維素的分離，得到了紙漿，同時也使木質素的被單獨應用在其他方面成為了可能。

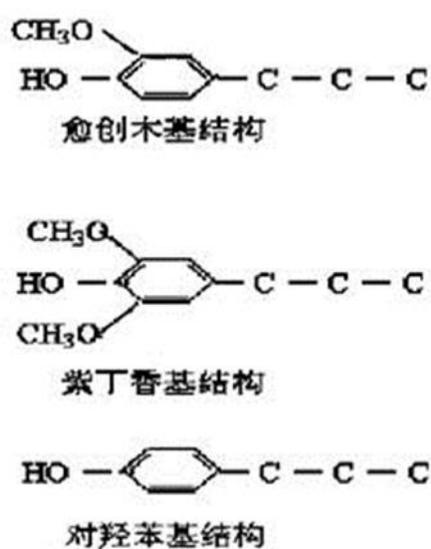


圖 2-8 木質素單體的分子結構

第三章 實驗材料與方法

3-1 實驗菌株

本實驗所採用的樟芝菌株為 *Antrodia cinnamomea*(BCRC 35396)係購自食品工業發展研究所生物資源中心，菌株以生資中心所提供之配方(Glucose 2 %，Malt extract 2 %，Peptone 0.1 %，Agar 2 %)做為斜面培養基，在 25°C 培養箱生長，之後置於 4°C 冰箱中保存。

3-2 實驗藥品

表 3-1 實驗藥品清單

藥品名稱	廠牌
Phenol	SHOWA
Malt extract	MERCK
Methanol	ECHO
99.5% Ethanol	ECHO
Folin-ciocalteu's phenol reagent	SIGMA
Potato Dextrose Agar	BD
Chloroform	TEDIA
Sodium carbonate	SHOWA

Sodium hydrogen carbonate	SHOWA
Agar	BD
Peptone	BD
KI	KANTO
I ₂	Alfa Aesar ‘
99.5% Sulfuric acid	Scharlau
D(+)-glucose	SIGMA
幾丁寡糖	山東纖熙堂
木質素	First Chemical
NaOH	SHOWA
HCl	AENCORE
Gallic acid	SIGMA

3-3 實驗儀器與設備

表 3-2 實驗儀器清單

儀器設備	型號	廠牌
pH meter	pH-206	Lutron
電磁加熱攪拌機	C-MAG HS7	德國 IKA
高壓滅菌釜	HL-340	台灣宏霖
無菌操作台	JW-4N	台灣亮盛
迴轉式震盪培養箱	LUS-150	台灣亮盛
分光光度計	GENESYS UV10	美國 Thermo
電子天平	BJ100M	Precisa
微電腦蒸餾水製造機	WSC044	英國 FISTREEM
超純水製造機	Simplicity	美國 Millipore
超音波震盪機	5210	美國 BRANSON
高速中型離心機	Universal-32R	德國 Hettich
桌上型微量離心機	MCD2000	HSIANGTAI
烘箱	LO-150	台灣亮盛
冷凍乾燥機	CT-110	丹麥 HETO
高真空油壓式幫浦	PASCAL 2010 C1	法國 ALCATEL

均質機	PT-2100	KINEMATICA
研磨機	RT-02A	榮聰精密科技

3-4 分析方法

3-4-1 菌體濃度

取液態發酵培養後之發酵液，使用 100 mesh 篩網過濾，過濾後的菌絲體再以蒸餾水沖洗數次，接著利用冷凍乾燥機乾燥菌絲體，乾燥後秤重後記錄菌體乾重量，隨後磨成粉末待檢測其他活性成分含量。

取出固態培養後之基質和表面上的菌絲體，以基質混和菌絲體為樣品做直接取樣，另外單以菌絲體表層為樣品做分層取樣，利用 60°C 烘箱使樣品乾燥，隨後磨成粉末待檢測其他活性成分含量。

3-4-2 多醣濃度測定 (Chaplin and Kennedy,1994)

以酚-硫酸法 (Phenol-sulfuric acid assay) 檢測多醣體含量，利用多醣類具有的還原能力：單醣、寡醣、多醣與它們的衍生物，包括二甲醚自由基團或具有還原能力的基團，其與酚及濃硫酸作用時會產生成黃色的橙色反應，再以分光光度計測量其在可見光 490 nm 波長的吸光值。

秤重取經冷凍乾燥後之菌絲體 100 mg 粉末加入 10 ml 蒸餾水，置於滅菌釜

(121°C, 1.2 Kg/cm²)滅菌 20 分鐘，重複兩次，再以 8000 rpm 離心 10 分鐘，收集上清液即為胞內多醣粗萃液；而胞外多醣則為發酵液直接以 8000 rpm 離心即為胞外多醣粗萃液。將胞內、外多醣粗萃液與 95 %酒精以體積比 1:4 之比例混合，於 4°C 冰箱中靜置 24 小時以沉澱多醣體，再以 8000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，將沉澱物烘乾，烘乾後加入 2ml 之 1 N NaOH 回溶沉澱物即為樣品。

標準品為 D(+)-glucose，其濃度範圍為 0.01~0.2 mg/ml。取適當稀釋後標準品與樣品溶液 2 ml，加入 1 ml 5% 酚溶液混合，再加入 5 ml 濃硫酸，於抽風櫃靜置 10 分鐘，之後於 25°C 恆溫水槽水浴反應 15 分鐘，待呈色穩定後，以分光光度計測其在波長 490 nm 下之吸光值。對照葡萄糖標準品濃度與吸光值標準曲線，計算出多醣濃度。

3-4-3 粗三萜含量測定(Tang and Zhong,2002)

秤取乾菌體粉末 100mg，加入 50%乙醇 3ml 萃取 12 小時，過濾收集萃取液，將殘渣再加入 50%乙醇 3ml 萃取 12 小時，收集濾液共 6 ml 減壓濃縮至乾，將乾燥物加 3 ml 的水回溶並加入 3 ml 氯仿萃取 30 分鐘，取下層液體加入 3 ml NaHCO₃ 震盪 30 分鐘，接著調整液體 pH 至 2.75~2.85 之間，取下層液體減壓濃縮至乾，加入 2 ml 95%乙醇，在波長 245 nm 下測其吸光值。

3-4-4 HPLC 分析代謝產物三萜含量

取乾菌絲 100 mg，加入 50%乙醇 3ml 萃取 12 小時，過濾收集萃取液，將殘渣再加入 50%乙醇 3 ml 萃取 12 小時，收集濾液共 6 ml 減壓濃縮至乾，將乾燥物加 3 ml 的水回溶並加入 3 ml 氯仿萃取 30 分鐘，取下層液體加入 3 ml NaHCO_3 震盪 30 分鐘，接著調整液體 pH 至 2.75 ~ 2.85 之間，取下層液體減壓濃縮至乾，加入 2ml 95%乙醇，以 6000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液以 0.2 μm 濾膜過濾後，進行 HPLC 之分析。

利用高效能液相層析儀(high performance liquid chromatography, HPLC)對樟芝乙醇萃取液進行定性與定量之分析，使用 LunaC18(5 μm , 4×250 mm)之液相層析管柱，移動相溶劑 A: H_2O + 0.05 % TFA (Trifluoroacetic Acid) 和 B: ACN + 0.05 % TFA，依照表之組成進行線性梯度流洗，液相層析管柱溫度為 35 °C，流速為 1 ml/min，樣品注射量 10 μL ，UV detector 波長 210 nm 或 254 nm(CNS 牛樟芝子實體標準案，2012)。

表 3-3 HPLC 移動相溶劑(粗三萜)

Time	H ₂ O + 0.05 % TFA	ACN + 0.05 % TFA
0	70	30
40	50	50
60	50	50
80	0	100
120	0	100

表 3-4 乙醇萃取物的 HPLC 圖譜分析

三萜類化合物指紋圖譜	出峰時間(± 10 %)
Antcin K	19.59 min ~ 20.43 min
Antcin C	41.67 min ~ 43.12 min
Zhankuic acid C	44.20 min ~ 45.07 min
Antcin B	63.06 min ~ 64.11 min
Antcin A	73.94 min ~ 74.12 min

3-4-5 HPLC 分析代謝產物 Monacolin K

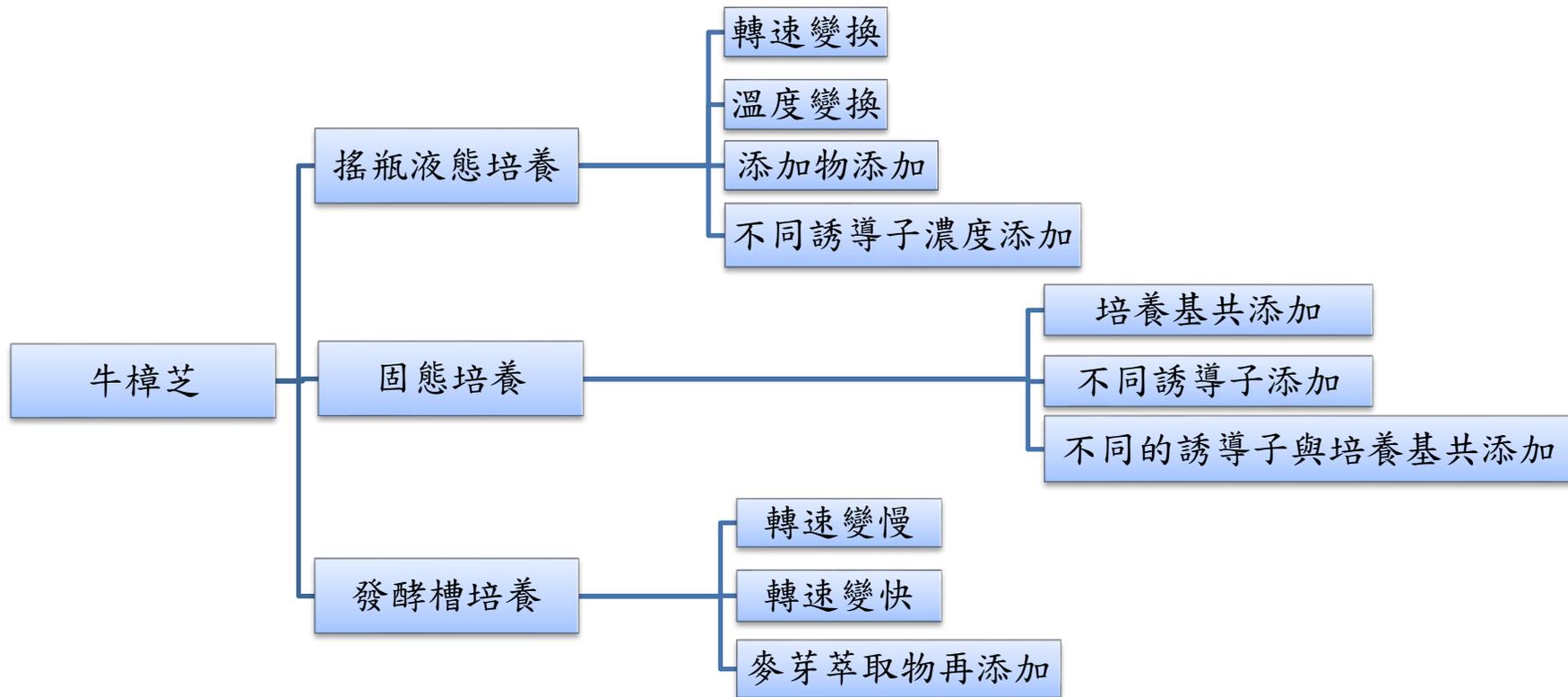
取 1 g 樣品粉末加入 5 ml ethyl acetate，於 70°C 水浴中以超音波振盪萃取 1.5 小時後離心 (7000 rpm) 10 分鐘取 1 ml 上清液，置於抽氣櫃中使其揮發至乾，再以相同體積之 acetonitrile 溶解。用 membrane filter (0.22 µm pore size，Chrom Tech) 過濾，再利用高效能液相層析儀 (Alginat,1100 Series) 分析。

表 3-3 HPLC 移動相溶劑(Monacolin K)

Time	Acetonitrile (%)	0.1% phosphoric acid (%)
0	55	45
20	100	0
25	100	0
30	55	45

3-5 實驗方法

3-5-1 實驗架構



3-5-2 樟芝菌種培養、保存與製備

3-5-2-1 菌種斜面試管保存

本實驗以試管斜面保存菌種。配製 Malt extract 2%、Glucose 2%、Peptone 0.1%、Agar 2%作為斜面培養基，使用白金鈎將樟芝菌種刮取小塊移植至空白斜面試管，標示日期編號後放入 25°C 培養箱培養，待其長滿後放入 4°C 冰箱保存備用。

3-5-2-2 培養皿平面培養與接菌活化

以 Malt extract 2%、Glucose 2%、Peptone 0.1%、Agar 2%作為培養皿平面培養基，接菌時取長有樟芝菌絲之斜面菌種，以白金鈎刮取一小塊移至空白培養皿中央，之後放入 25°C 培養箱中靜置活化培養。

3-5-2-3 種菌的製備

本實驗種菌以 Malt extract 2%、Glucose 2%、Peptone 0.1%作為的液態培養基。培養基滅菌過後，取長滿樟芝菌絲之平面培養皿，用鋁片製成的切割器切 4 個單位的菌絲塊（每塊單位面積 0.5 cm×0.5 cm），以白金鈎將 4 塊菌絲塊接入 100 ml 液態培養基於 250 ml 之三角錐瓶，以滅過菌的均質機 (polytron) 對菌絲塊攪碎作物理性破壞來培養，並置於 25°C 迴轉恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 14 天做為種菌。

3-5-3 三角瓶液態震盪培養之試驗

本實驗之液態發酵培養，使用菌株為 *Antrodia cinnamomea* (BCRC 35396)，以培養 14 天後的種菌來做後續的液態發酵培養，並探討液態培養的方式對菌體型態和生理活成份含量之影響。

3-5-3-1 低轉速變高轉速兩段式震盪培養對樟芝生理活性生成之影響

根據前述種菌製備步驟後，將種菌取出再以滅過菌之均質機對其菌球做攪碎的動作，並接入 10 ml 的接菌量至 100 ml 的培養液中，放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 14 天，從第 15 天開始以轉速 180 rpm 培養 14 天，總共培養 28 天，收集菌絲體及發酵液，探討菌絲生長、菌體型態、菌體濃度及生理活性成分含量之影響。

3-5-3-2 不同添加物對樟芝液態震盪培養生理活性生成之影響

根據前述種菌製備步驟後，將種菌取出再以滅過菌之均質機對其菌球做攪碎的動作，並接入 10 ml 的接菌量至 100 ml 的培養液中，放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 14 天。利用饋料批次概念(Fed-batch) 將各種添加物加入培養 14 天的種菌，做為合成生理活性成份之觸發因子，所使用的添加物分別為麥芽萃取物(ME) 2g/20ml、蛋白胨(Peptone) 2g/20 ml、葡萄糖(C₆H₁₂O₆) 2g/20ml 以及麥芽萃取物(ME)/葡萄糖(C₆H₁₂O₆)/ 蛋白胨(Peptone)各以 2g、2g、0.1g/20ml，個別以少量體積、高濃度的添加液做添加，置於 25°C 迴轉式恆溫培

養箱，以轉速 100 rpm 培養 14 天，總共培養 28 天，收集菌絲體及發酵液，探討菌絲生長、菌體型態、菌體濃度及生理活性成分含量之影響。

3-5-3-3 不同誘導子添加濃度對樟芝液態培養生理活性生成之影響

根據前述種菌製備步驟後，將種菌取出再以滅過菌之均質機對其菌球做攪碎的動作，並接入 10 ml 的接菌量至 100 ml 的培養液中，放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 14 天，接著分別添加幾丁寡糖和木質素為誘導子，添加濃度設定為 100、200、300、400、500 mg/L 以及 25、50、100、200、300 mg/L，五個不同濃度的添加，將兩種誘導子配成相應濃度之溶液並滅菌後，取 20 ml 溶液，將其添入先前培養之三角瓶中，置於 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 14 天，總共培養 28 天，收集菌絲體及發酵液，探討菌絲生長、菌體型態、菌體濃度及生理活性成分含量之影響。

3-5-3-4 高溫度變低溫度兩段式震盪培養對樟芝生理活性生成之影響

根據前述種菌製備步驟後，將種菌取出再以滅過菌之均質機對其菌球做攪碎的動作，並接入 10 ml 的接菌量至 100ml 的培養液中，放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 14 天，從第 15 天開始將迴轉式恆溫培養箱的溫度變換成 15°C，培養 14 天，總共培養 28 天，收集菌絲體及發酵液，探討菌絲生長、菌體型態、菌體濃度及生理活性成分含量之影響。

3-5-4 固態培養之試驗

本實驗之固態發酵培養，使用菌株為 *Antrodia cinnamomea*(BCRC 35396)，固態培養基成份使用小米為基底，小米含多種維生素、氨基酸、脂肪、纖維素和碳水化合物，營養價值非常高，可作為菌絲體生長的營養源，並且調控固態培養基質濕度、培養溫度、接種菌量和培養時間等重要參數，做為後續固態培養試驗之探討。

3-5-4-1 液態培養基添加對樟芝固態培養生理活性生成之影響

取 50g 小米為固態培養基的基底，所使用的添加培養基為麥芽萃取物(ME)/葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)/ 蛋白胨(Peptone)各以 2g、2g、0.1g/40 ml，將基底與培養基拿去滅菌，冷卻後，將種菌以均質機攪碎菌絲球，並接入 10 ml 的種菌量至固態培養基中，置於 25°C 可避光的控溫培養箱中，培養 28 天，取出樣品後，將有樟芝菌絲生長之固態培養基切割下來，約占總基底的 70%，收集固態培養之樣品，與不添加培養基之控制組做比較，探討有無添加培養基之影響。

3-5-4-2 不同的誘導子添加對固態培養生理活性生成之影響

取 50 g 小米為固態培養基的基底，經滅菌、冷卻後，將種菌以均質機攪碎菌絲球，並接入 10 ml 的種菌量至固態培養基中，置於 25°C 可避光的控溫培養箱中，培養 14 天後取出，接著分別添加幾丁寡糖、木質素為誘導子，濃度分別設定在 300、100 mg/L，將兩種誘導子配成相應濃度之溶液並滅菌後，取 40ml 溶

液，將其添入先前培養之固態培養基中，置於 25°C 可避光的控溫培養箱中，培養 14 天，總共培養 28 天，取出樣品後，將有樟芝菌絲生長之固態培養基切割下來，約占總基底的 70%，收集固態培養之樣品，與不添加之控制組做比較，探討不同的誘導子添加對固態培養之影響。

3-5-4-3 不同的誘導子與液態培養基添加對樟芝固態培養生理活性生成之影響

取 50 g 小米為固態培養基的基底，所使用的添加培養基為麥芽萃取物(ME)/ 葡萄糖(C₆H₁₂O₆)/ 蛋白胨(Peptone)各以 2 g、2 g、0.1 g/40 ml，將基底與培養基拿去滅菌，冷卻後，將種菌以均質機攪碎菌絲球，並接入 10 ml 的種菌量至固態培養基中，置於 25°C 可避光的控溫培養箱中，培養 14 天後取出，接著分別添加幾丁寡糖、木質素為誘導子，濃度分別設定在 300、100 mg/L，將兩種誘導子配成相應濃度之溶液並滅菌後，取 40 ml 溶液，將其添入先前培養之固態培養基中，置於 25°C 可避光的控溫培養箱中，培養 14 天，總共培養 28 天，取出樣品後，將有樟芝菌絲生長之固態培養基切割下來，約占總基底的 70%，收集固態培養之樣品，與添加培養基做比較，探討不同的誘導子添加對固態培養之影響。

3-5-5 發酵槽培養之試驗

本實驗採用 5 L 攪拌式生物反應器，工作體積為 3 L，通氣量設定在 1 vvm。將整個槽體移入直立式高壓滅菌釜中，以 121°C、20 mins 殺菌，待殺菌冷卻置 70°C 左右取出，等待至 30°C 左右，將 300 ml 菌種接種至以滅菌的 3L 液態培養基之 5 L 攪拌式發酵槽中，控制槽體溫度在 25°C，並將轉速設定為 100 rpm 進行培養，收集菌絲體及發酵液，探討菌絲生長、菌體型態、菌體濃度及生理活性成分含量之影響。

3-5-5-1 高轉速變低轉速兩段式發酵槽培養生理活性生成之影響

根據前述發酵槽培養之設定，將 300 ml 菌種接種至已滅菌的 3L 液態培養基之 5 L 攪拌式發酵槽中，控制槽體溫度在 25°C，並將轉速設定為 100 rpm 培養 7 天，從第 8 天開始，轉速設為 30 rpm 培養 7 天，總共培養 14 天，取樣時間點分別為 4、7、10、12、14 天，收集菌絲體及發酵液，探討菌絲生長、菌體型態、菌體濃度及生理活性成分含量之影響。

3-5-5-2 低轉速變高轉速兩段式發酵槽培養生理活性生成之影響

根據前述發酵槽培養之設定，將 300 ml 菌種接種至已滅菌的 3 L 液態培養基之 5L 攪拌式發酵槽中，控制槽體溫度在 25°C，並將轉速設定為 50 rpm 培養 7 天，從第 8 天開始，轉速設為 100 rpm 培養 7 天，總共培養 14 天，取樣時間點分別為 4、7、10、12、14 天，收集菌絲體及發酵液，探討菌絲生長、菌體型態、

菌體濃度及生理活性成分含量之影響。

3-5-5-3 麥芽萃取物再添加對發酵槽生理活性生成之影響

根據前述發酵槽培養之設定，將 300 ml 菌種接種至已滅菌的 3 L 液態培養基之 5 L 攪拌式發酵槽中，控制槽體溫度在 25°C，並將轉速設定為 100 rpm 培養 7 天，在第 8 天，利用饋料批次概念(Fed-batch) 將麥芽萃取物(ME)加入培養 7 天的攪拌式發酵槽中，添加濃度設定為 20 g/L，將添加物配成相應濃度之溶液並滅菌後，取 200 ml 溶液，添加至攪拌式發酵槽中，以轉速 100 rpm 培養 7 天，總共培養 14 天，取樣時間點分別為 4、7、10、12、14 天，收集菌絲體及發酵液，探討菌絲生長、菌體型態、菌體濃度及生理活性成分含量之影響。

第四章 實驗結果與討論

4-1 三角瓶液態震盪培養之探討

此實驗目的在於三角瓶液態培養方式，將樟芝菌絲體基於基礎培養基中，改變培養策略，觀察在不同培養條件下，對菌絲體生長、生理活性成分的影響，其中採用的培養策略有四種，分別是轉速變換的試驗、不同添加物添加的試驗、不同誘導子濃度添加的試驗以及溫度變換的試驗。

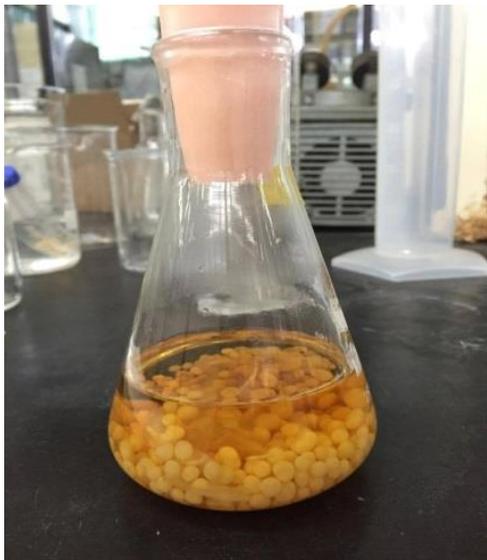


圖 4-1 樟芝液態三角瓶培養

4-1-1 三角瓶液態震盪培養之生長曲線

由圖 4-2 顯示，初期碳源被快速消耗，菌絲體快速的生長，於第 15 天達最大值(6.2905 g/L)，隨著培養時間的增加，胞內多醣持續代謝，至第 21 天胞內多醣代謝開始平緩，於第 28 天達到最大值(23.01 mg/g D.W.)，而二次代謝產物三萜類，隨著時間的增加持續代謝，於第 28 天達到最大值(2.9476 mg/g D.W.)。

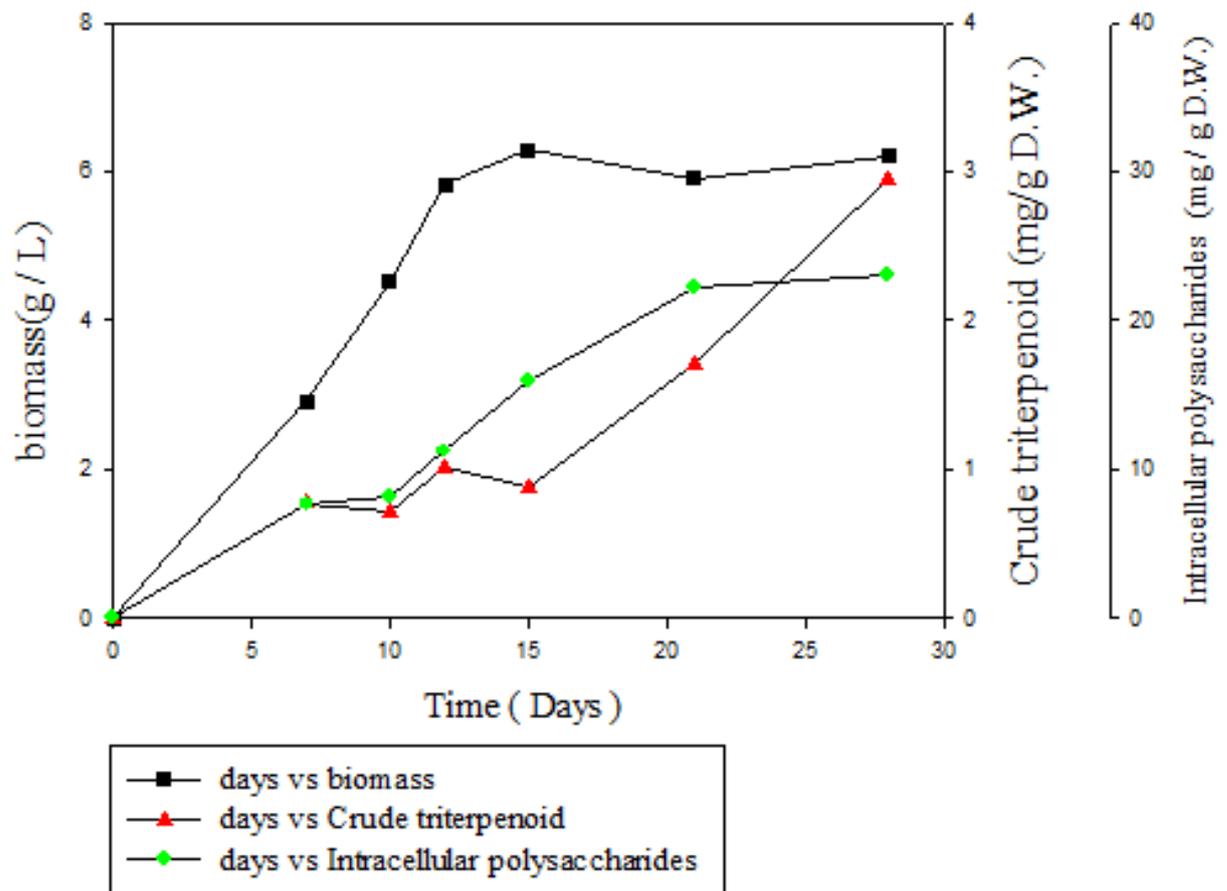


圖 4-2 三角瓶液態震盪培養之生長曲線

基礎培養基成分: Glucose 2 g、Malt extract 2 g、Peptone 0.1 g、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、轉速 100 rpm、溫度 25°C

取樣時間: 7、10、12、15、21、28 天

4-1-2 低轉速變高轉速兩段式震盪培養對樟芝生理活性成分生成之影響

根據研究文獻指出利用氧氣限制和溫度轉換策略可以提高三萜類化合物的產量(劉等人, 2012)。由圖 4-3(A)顯示, 轉速變換後的三角瓶液態培養之菌體濃度達到 7.20 g/L; 圖 4-3(B)顯示, 三萜含量達到 31.38 mg/g D.W.; 圖 4-3(C)顯示, 胞內多醣含量達到 13.66 mg/g D.W.。推測透過轉速的提升, 樟芝菌絲球結構更為緊密, 使菌體濃度因轉速提高而增大, 而由於氧氣的傳送無法有效的傳送至內部, 進而刺激二次代謝產物三萜類之生成。

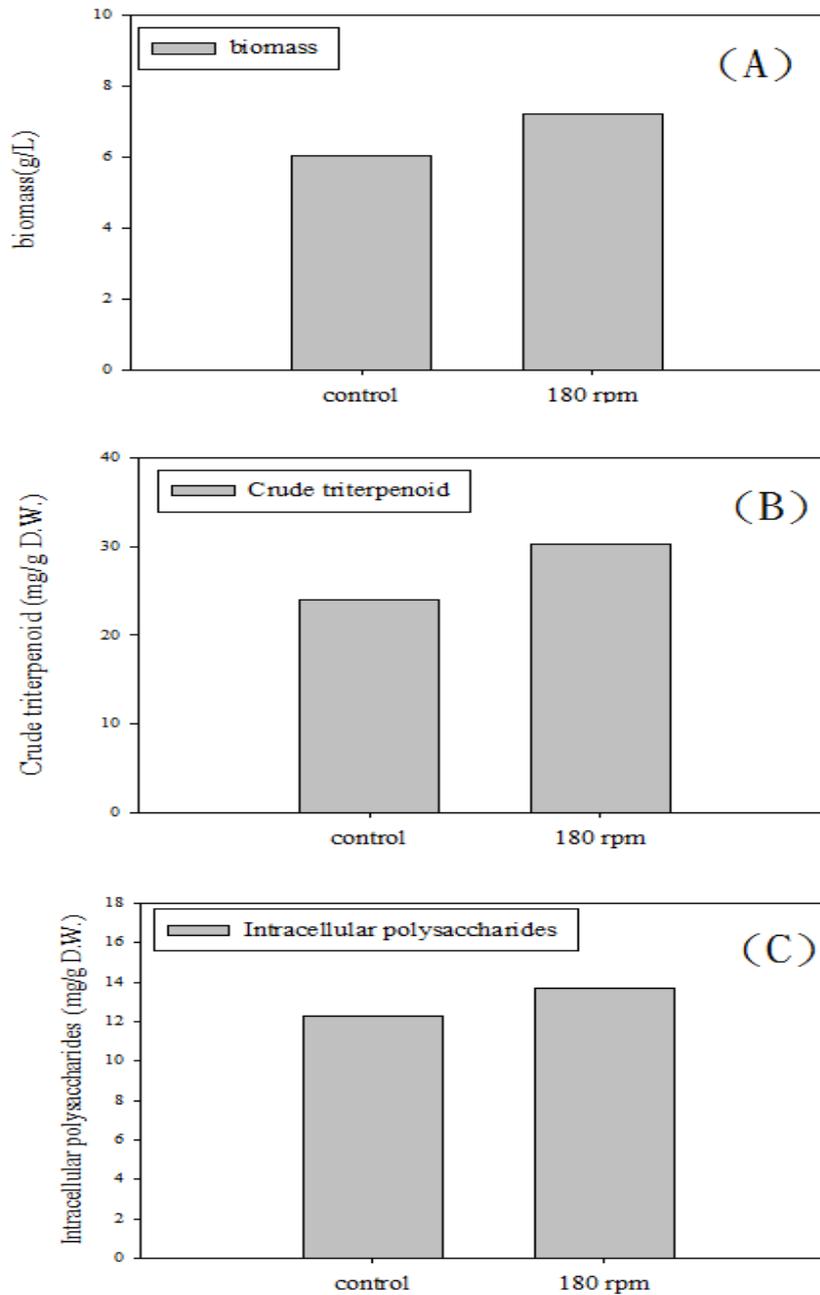


圖 4-3 低轉速變高轉速兩段式培養對樟芝菌絲體生理活性成分生成之影響

(A)菌體濃度(B)三萜類含量(C)胞內多醣含量

培養基成分: Glucose 2 g、Malt extract 2 g、Peptone 0.1 g、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、溫度 25°C、轉速 100 rpm 培養 14 天後, 以轉速 180rpm

培養 14 天

培養時間: 28 天

4-1-3 高溫變低溫兩段式震盪培養對樟芝生理活性成分生成之影響

根據研究文獻指出利用氧氣限制和溫度轉換策略可以提高三萜類化合物的產量(劉等人, 2012)。由圖 4-7(A)得知, 菌體濃度達到 6.41 g/L, 為控制組的 1.1 倍; 圖 4-7(B)得知三萜含量達到 142.12 mg/g D.W., 為控制組的 2.9 倍; 圖 4-7(C)得知胞內多醣含量達到 23.88 mg/g D.W. 為控制組的 1.5 倍, 推測在較低的溫度環境下, 菌體的生理活性受到抑制, 促使二次代謝產物三萜類之生成。

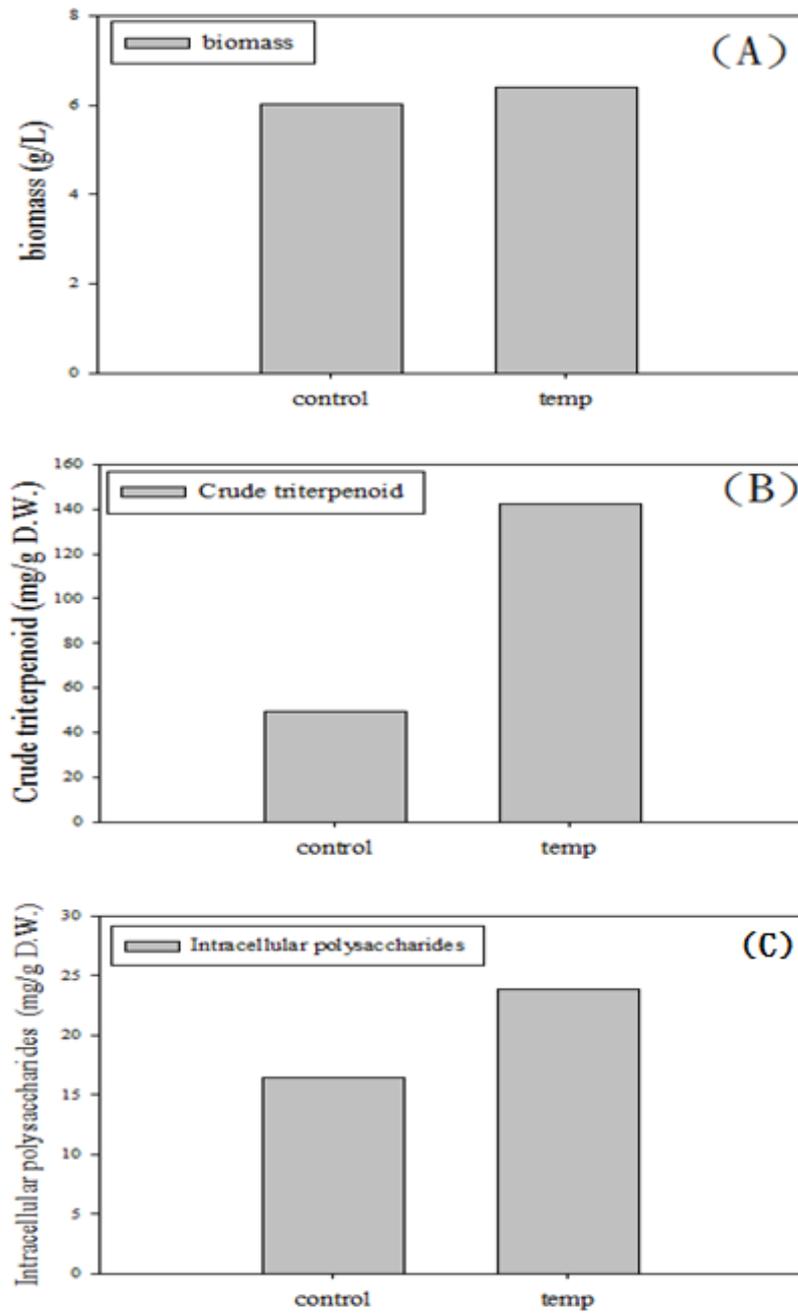


圖 4-7 高溫變低溫兩段式培養對樟芝菌絲體生理活性生成之影響

(A)菌體濃度(B)三萜類含量(C)胞內多醣含量

培養基成分: Glucose 2 g、Malt extract 2 g、Peptone 0.1 g、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、溫度 25°C 培養 14 天後, 以溫度 15°C 培養 14 天、轉速 100 rpm

培養時間: 28 天

4-1-4 不同添加物對樟芝液態震盪培養生理活性成分生成之影響

由圖 4-4(A)得知，在菌體濃度部分，以添加 basal medium 為最佳，菌體濃度達到 10.93 g/L，為控制組的 1.8 倍；圖 4-4(B)得知在三萜含量部分，以添加蛋白胨(Peptone)為最佳，三萜含量達到 6.47 mg/g D.W.，為控制組的 2.2 倍；圖 4-4(C)得知在胞內多醣部分，以添加 basal medium 為最佳，胞內多醣含量達到 23.10 mg/g D.W.，但仍然相較於控制組含量低。從結果得知，四種添加物對菌體濃度都有幫助，但添加 basal medium 對三萜類有降低的現象，推測 basal medium 的添加促使菌體持續生長，提供菌體生長的養分，延後二次代謝產物三萜類之生成時間。

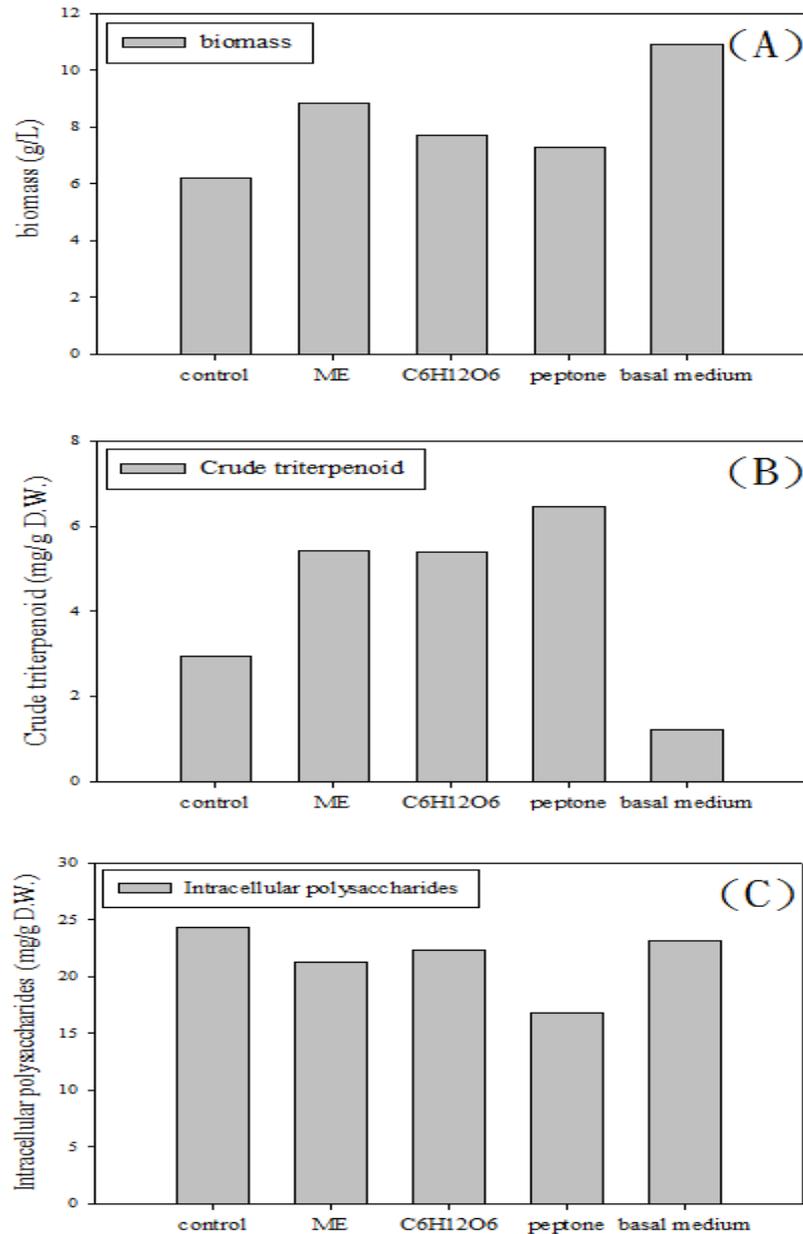


圖 4-4 不同添加物對樟芝菌絲體生理活性成分生成之影響

(A)菌體濃度(B)三萜類含量(C)胞內多醣含量

培養基成分: Glucose 2 g、Malt extract 2 g、Peptone 0.1 g、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、轉速 100 rpm、溫度 25°C

添加物: 麥芽萃取物(ME) 2g/20ml、蛋白胨(Peptone) 2g/20ml、葡萄糖(C₆H₁₂O₆) 2g/20ml 以及 basal medium/20ml, 第 14 天添加

培養時間: 28 天

4-1-5 不同誘導子添加濃度對樟芝液態培養生理活性成分生成之影響

(一)幾丁寡糖添加試驗

由圖 4-5(A)得知，在菌體濃度部分，可以觀察到對菌體濃度皆有不佳的影響，其中以添加幾丁寡糖濃度為 100 mg/L 效果最差，添加濃度為 200 mg/L 為最佳，但仍然較控制組低，推測當幾丁寡糖為誘導子時，對於菌體濃度並無誘導作用；圖 4-5(B)得知在三萜含量部分，幾丁寡糖的添加濃度為 300 mg/L 時，二次代謝產物三萜類為最大值，添加濃度為 500 mg/L 時，效果最差，推測為添加濃度過量，造成三萜類的生成被抑制；圖 4-5(C)得知在胞內多醣部分，添加幾丁寡糖濃度 100 mg/L 效果最差，添加濃度為 500 mg/L 為最佳，但仍然較控制組低，推測當幾丁寡糖為誘導子時，對於胞內多醣產生了抑制的效果。

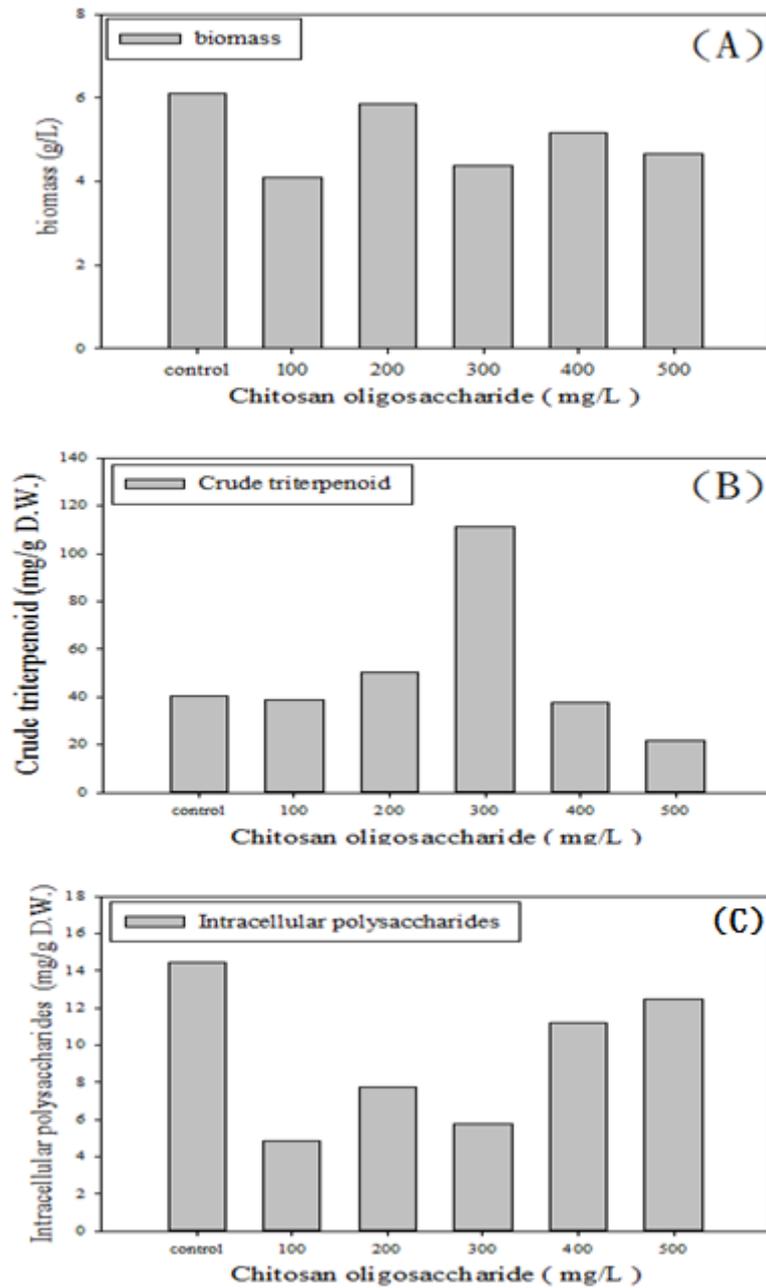


圖 4-5 幾丁寡糖添加對樟芝菌絲體生理活性成分生成之影響

(A)菌體濃度(B)三萜類含量(C)胞內多醣含量

培養基成分: Glucose 2 g、Malt extract 2 g、Peptone 0.1 g、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、轉速 100 rpm、溫度 25°C

誘導子濃度:幾丁寡糖(100、200、300、400、500 mg/L), 第 14 天添加

培養時間: 28 天

(二)木質素添加試驗

由圖 4-6(A)得知，在菌體濃度部分，可以觀察到對菌體濃度的生成皆有不佳的現象，添加濃度在 200 mg/L 時，有最大菌體濃度，但仍然較控制組低，推測是木質素作為誘導子，對菌體產生抑制作用，使菌體濃度下降。圖 4-6(B)得知在三萜類部分，可以觀察到添加 100 mg/L 效果最佳，對其他濃度均有抑制作用，推測添加濃度為 25、50 mg/L 過於稀薄，不足以產生誘導作用，使得產量下降。圖 4-6(C)得知在胞內多醣部分，可以觀察到添加濃度為 100 mg/L 抑制效果最大，使得胞內多醣含量下降，而添加濃度為 200 mg/L 時，對胞內多醣效果最佳。

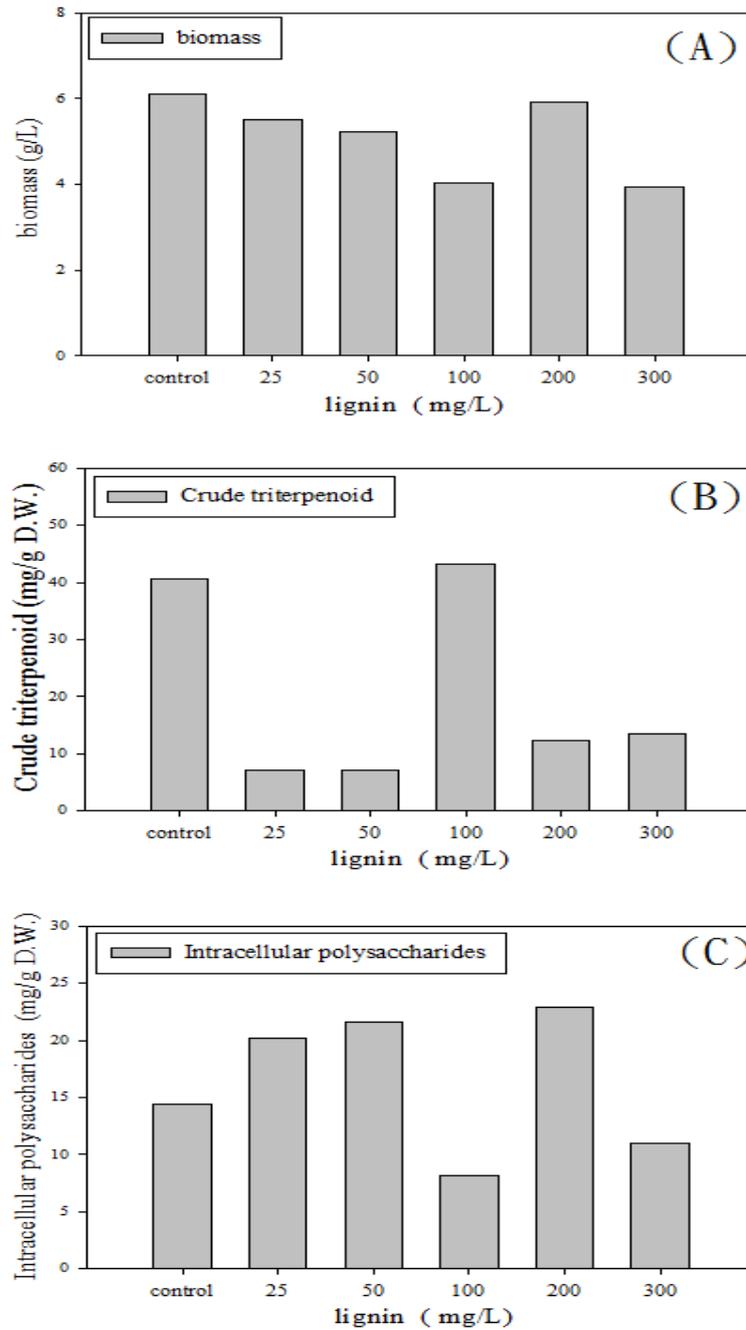


圖 4-6 木質素添加對樟芝菌絲體生理活性成分生成之影響

(A)菌體濃度(B)三萜類含量(C)胞內多醣含量

培養基成分: Glucose 2 g、Malt extract 2 g、Peptone 0.1 g、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、轉速 100 rpm、溫度 25°C

誘導子濃度:木質素(25、50、100、200、300 mg/L)，第 14 天添加

培養時間: 28 天

4-1-6 不同培養策略對樟芝液態培養 monacolin k 生成比較

根據文獻指出，分析蛹蟲草菌絲體 monacolin k 含量達到 56.37 ug/g D.W.，而雲芝 monacolin k 含量達到 3.01 ug/g D.W.(林等人，2013)。由圖 4-8 顯示，本實驗以不同培養策略對樟芝液態培養 monacolin k 均有達到提升的效果，其中以降低溫度培養試驗最佳，其 monacolin k 含量從 3.37 ug/g D.W.提升至 34.99 ug/g D.W.，為控制組的 10.4 倍，根據文獻指出，發現產 Monacolin K 的菌株，培養溫度在 25°C 以下時，可積累較多的 Monacolin K; 溫度超過 25°C, Monacolin K 產量則大幅下降(丘等人，2007)，由此文獻可與本實驗相印證。

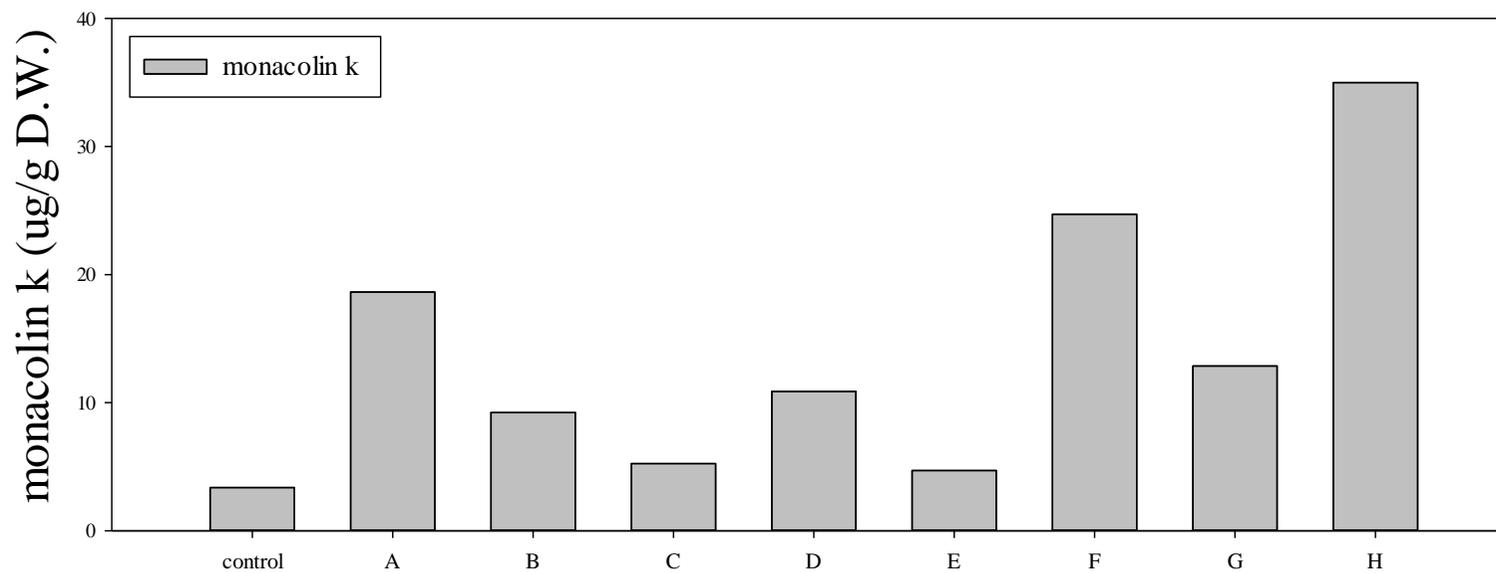


圖 4-8 不同培養策略對樟芝液態培養 monacolin k 含量生成比較

改變的策略: (A)低轉速變高轉速; (B)添加 ME; (C)添加葡萄糖; (D)添加蛋白凍; (E)添加 basal medium; (F)添加幾丁寡糖 300 mg/L;

(G)添加木質素 300 mg/L; (H)高溫變低溫

改變策略時間:第 14 天

總共培養時間:28 天

4-2 固態培養之探討

研究指出牛樟芝的培養，使用固態發酵培養的主要目的，是其生成的生理活性成分最接近野生牛樟芝的活性成分，而對固態發酵培養，培養的時間被視為其培養的重要參數之一。(林等人， 2011) 本實驗之固態發酵培養，使用菌株為 *Antrodia cinnamomea* (BCRC 35396)，固態培養基成份使用小米為基底。

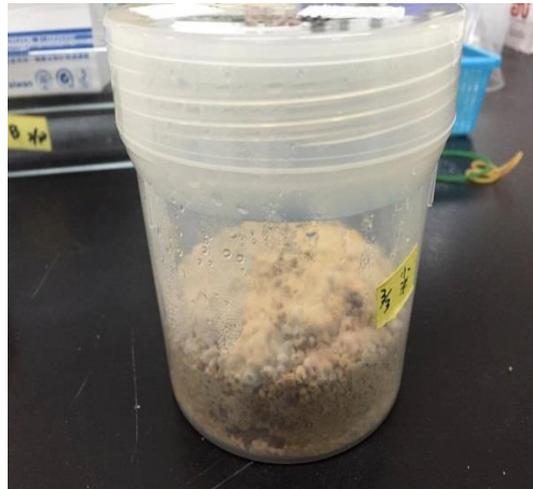


圖 4-9 固態發酵培養側面圖



圖 4-10 固態發酵培養俯視圖

4-2-1 液態培養基添加對樟芝固態培養生理活性成分生成之影響

由圖 4-11(A)得知，液態培養基添加對樟芝固態培養三萜類含量達到 16.04 mg/g D.W.，為控制組的 4.2 倍；圖 4-11(B)得知胞內多醣含量達到 934.85 mg/g D.W.，為控制組的 7.2 倍。由以上數據得知，液態培養基添加有助於樟芝固態培養三萜類、胞內多醣之生成，推測液態培養基提供了樟芝菌體所需的養分，進而促進樟芝菌體大量生成胞內多醣和三萜類。

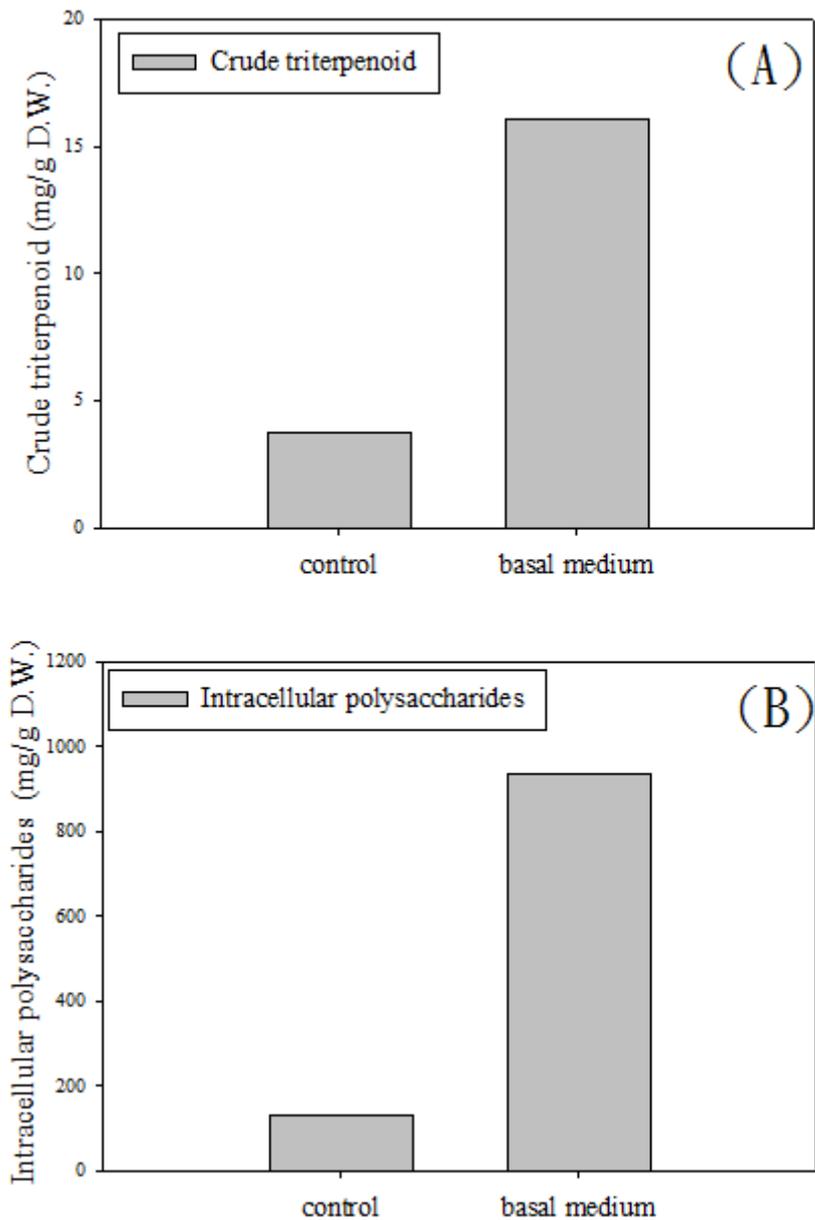


圖 4-11 液態培養基添加對樟芝固態培養生理活性成分生成之影響

(A)三萜類含量(B)胞內多醣含量

培養基成分:小米 50g

培養條件:接菌量 10%、溫度 25°C

添加物: basal medium/40 ml, 第 1 天添加

培養時間: 28 天

4-2-2 不同的誘導子添加對固態培養生理活性成分生成之影響

根據第 4-1-4 章，不同誘導子濃度添加對樟芝液態培養試驗得知，添加幾丁寡糖、木質素濃度設定在 300mg/L、100mg/L 有最大的三萜類含量，由此數據設定為固態培養誘導子添加的濃度。由圖 4-12(A)得知，於小米固態培養中添加幾丁寡糖，三萜類含量達到 9.7 mg/g D.W.；圖 4-12(B)得知胞內多醣含量達到 1033.70 mg/g D.W.。由以上數據得知，小米固態培養分別添加幾丁寡糖與木質素有助於樟芝固態培養三萜類、胞內多醣之生成，其中以添加幾丁寡糖效果最為明顯，推測添加幾丁寡糖對樟芝生理活性成分達到誘導的作用。

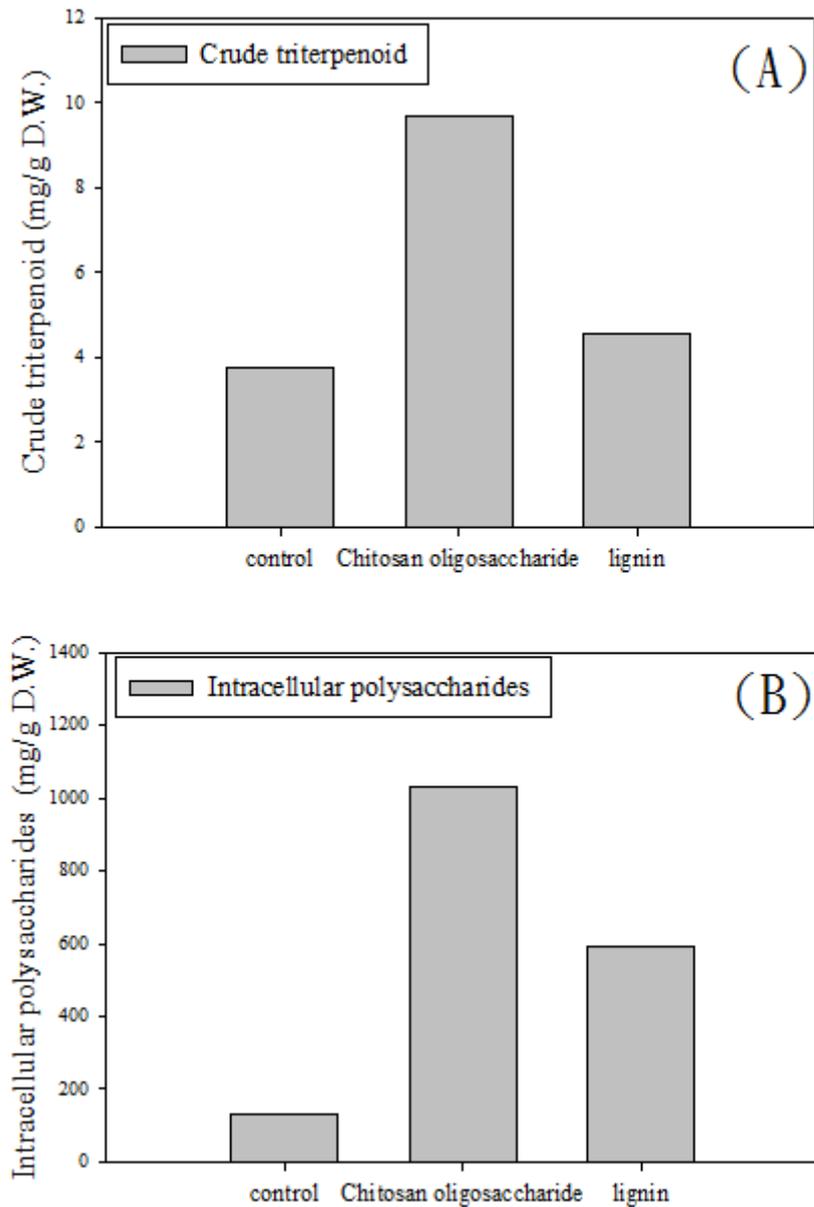


圖 4-12 不同的誘導子添加對樟芝固態培養生理活性成分生成之影響

(A)三萜類含量(B)胞內多醣含量

培養基成分: 小米 50g

培養條件: 接菌量 10%、溫度 25°C

添加物濃度: 幾丁寡糖 300 mg/L、木質素 100 mg/L, 第 14 天添加

培養時間: 28 天

4-2-3 不同的誘導子與液態培養基添加對樟芝固態培養生理活性生成之影響

根據第 4-1-4 章，不同誘導子濃度添加對樟芝液態培養試驗得知，添加幾丁寡糖、木質素濃度設定在 300mg/L、100mg/L 有最大的三萜類含量，由此數據設定為固態培養誘導子添加的濃度。由圖 4-13(A)得知，添加液態培養基與幾丁寡糖對樟芝三萜類有誘導作用，使三萜類含量由 3.78 mg/g D.W. 上升至 28.37 mg/g D.W.，呈現倍數的成長，推測樟芝在固態發酵培養時，會隨著時間的增加而消耗胞內多醣，作為菌絲體進行二次代謝產物所需要的碳源，而添加培養基與木質素部分，由圖 4-13(B)可知，胞內多醣含量達到 1013.50 mg/g D.W.，推測於固態培養中添加木質素，對樟芝菌絲體產生了抑制現象，二次代謝時間延後，菌絲體胞內多醣大量生成。

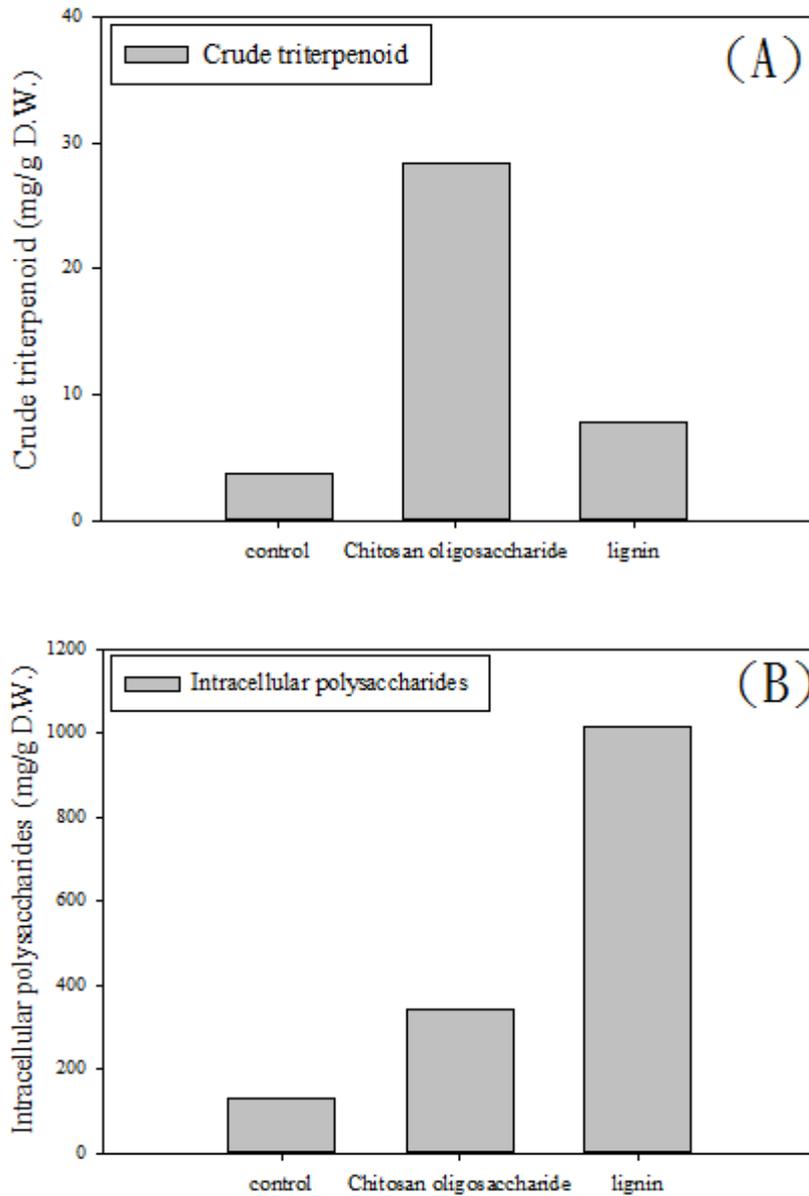


圖 4-13 不同的誘導子與液態培養基添加對樟芝固態培養生理活性生成之影響

(A)三萜類含量(B)胞內多醣含量

培養基成分: 小米 50g、麥芽萃取物(ME)/葡萄糖(C₆H₁₂O₆)/ 蛋白胨(Peptone)各以 2g、2g、0.1g/40ml

培養條件: 接菌量 10%、溫度 25°C

添加物濃度: 幾丁寡糖 300 mg/L、木質素 100 mg/L, 第 14 天添加

培養時間: 28 天

4-2-4 不同培養策略對樟芝固態培養 monacolin k 生成比較

由圖 4-14 顯示，添加 basal medium、basal medium 與(幾丁寡糖、木質素)共添加均有利於 monacolin k 之生成，推測 basal medium 提供菌體生長之所需，而添加誘導子對 monacolin k 達到誘導作用(參考圖 4-5)。

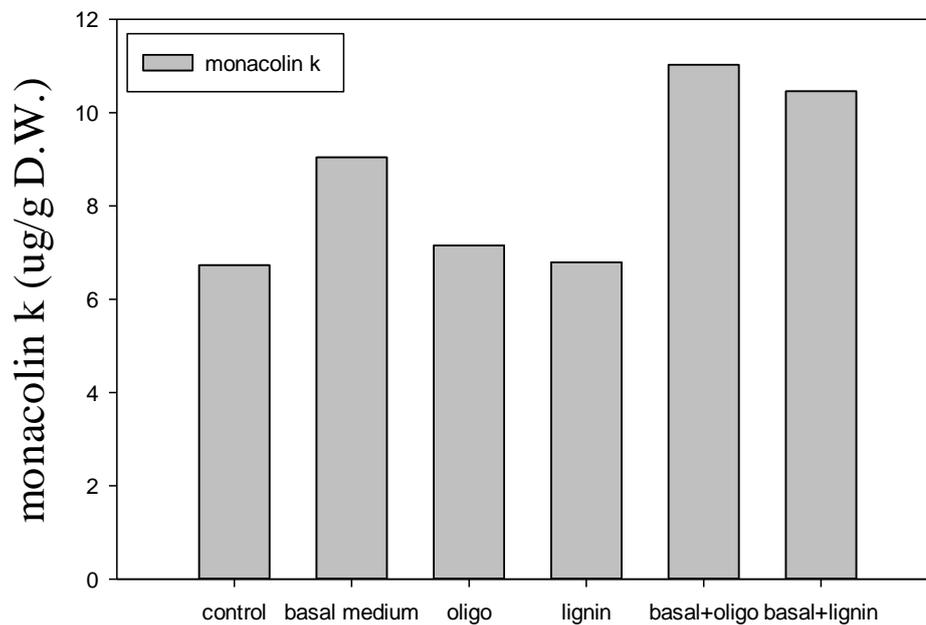


圖 4-14 不同培養策略對樟芝固態培養 monacolin k 生成之比較

培養基成分: 小米 50g

培養條件: 接菌量 10%、溫度 25°C

添加物濃度: basal medium/40 ml、幾丁寡糖 300 mg/L、木質素 300 mg/L

添加時間: 第 14 天添加

培養時間: 28 天

4-3 攪拌式發酵槽培養之試驗

4-3-1 攪拌式發酵槽培養之生長曲線



圖 4-15 攪拌式發酵槽外觀

由圖 4-16 得知，初期碳源被快速消耗，菌絲體快速的生長，於第 12 天達最大值，隨著培養時間的增加，胞內多醣於第 10 天達到最大值，推測達第 10 天時碳源已消耗殆盡，無法供給碳源給菌絲體生長，菌絲體開始分解胞內多醣，產生易被菌體吸收利用的小分子醣類，維持基本代謝，促使二次代謝產物三萜類於第 12 天有明顯的成長，於第 14 天達到最大值。

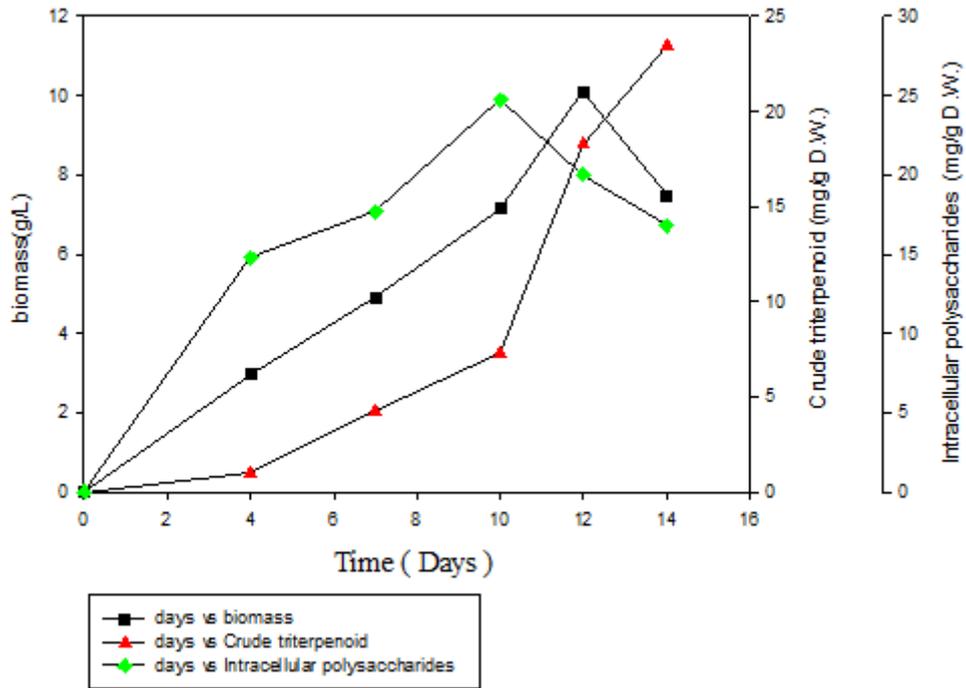


圖 4-16 發酵槽培養之生長曲線

培養基成分: Glucose 2 g/100 ml、Malt extract 2 g/100 ml、Peptone 0.1 g/100 ml、

水 3000 ml

培養條件: 接菌量 10%、轉速 100 rpm、溫度 25 °C

取樣時間: 4、7、10、12、14 天

4-3-2 兩段式轉速控制發酵槽培養試驗

4-3-2-1 高轉速變低轉速兩段式培養生理活性成分生成之影響

根據研究文獻指出利用氧氣限制和溫度轉換策略可以提高三萜類化合物的產量(劉等人, 2012)。由圖 4-17(A)(B)(C)得知, 本實驗在第 7 天降低轉速, 發現發酵槽於第 7 天以後, 菌體濃度持續下降, 推測菌絲球產生了凝結現象, 菌球內部接收氧氣傳送受阻, 使菌體無法有效生長, 使菌體濃度下降, 導致三萜類、胞內多醣於第 10 天到第 12 天的生成降低, 而菌體濃度在培養後期持續下降, 進而刺激二次代謝產物三萜類於第 14 天達到最大值。

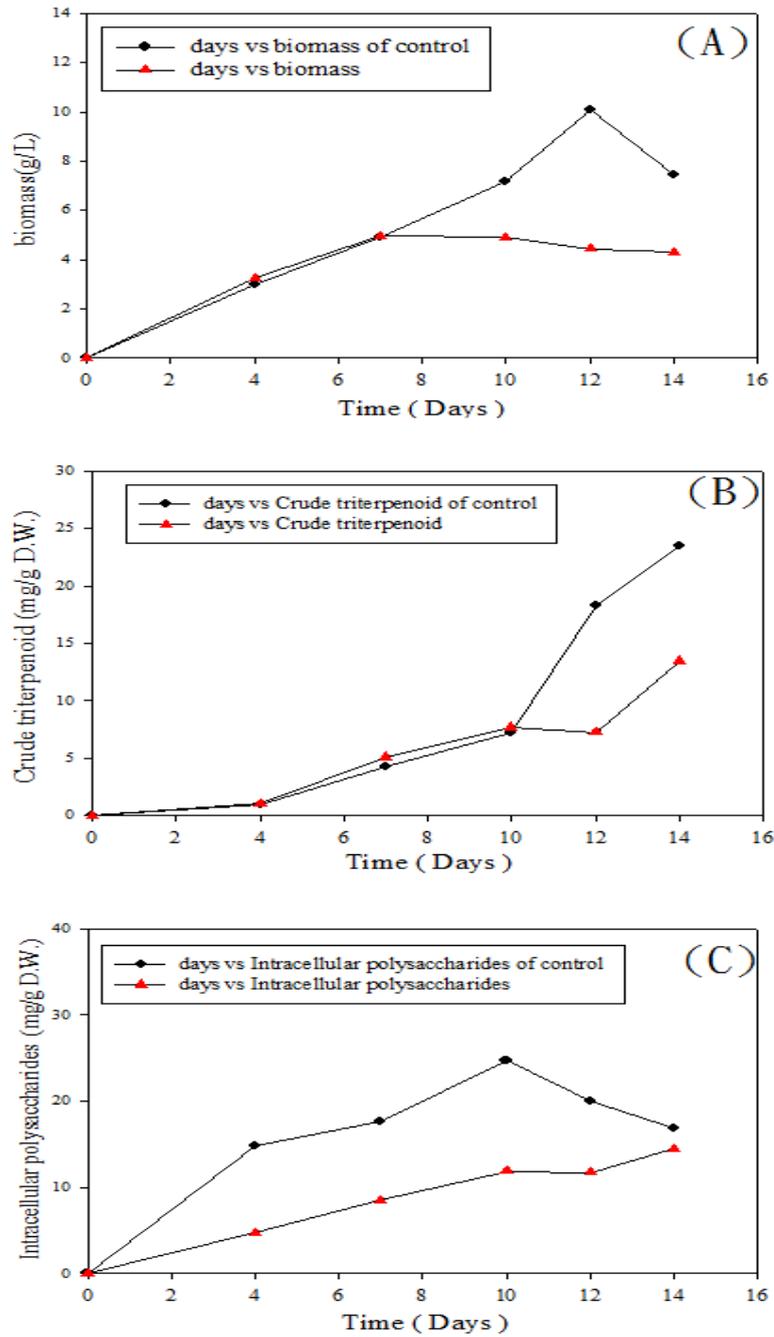


圖 4-17 發酵槽高轉速變低轉速兩段式培養對生理活性成分生成之影響

(A)菌體濃度(B)三萜類含量(C)胞內多醣含量

培養基成分: basal medium/100 ml、水 3000 ml

培養條件: 接菌量 10%、溫度 25°C、轉速 100 rpm 培養 7 天後, 再以 30 rpm 培養 7 天

取樣時間: 4、7、10、12、14 天

4-3-2-2 低轉速變高轉速兩段式培養生理活性成分生成之影響

實驗目的主要是利用轉速提高，使菌體表面結構較為緊密，將增大氧氣傳送的梯度，刺激樟之二次代謝產物三萜類含量之生成。由圖 4-18(A)(B)(C)顯示，本實驗於第 7 天提高轉速，發現發酵槽之菌絲體於第 7 天以後受到較大的剪切力，使樟芝菌絲球結構更為緊密，氧氣的傳送無法有效的傳送至內部，導致菌體濃度在第 10 天下降，進而影響到胞內多醣的生成，使得胞內多醣代謝停滯，進而刺激二次代謝產物三萜類生成，於第 14 天達到最大值。

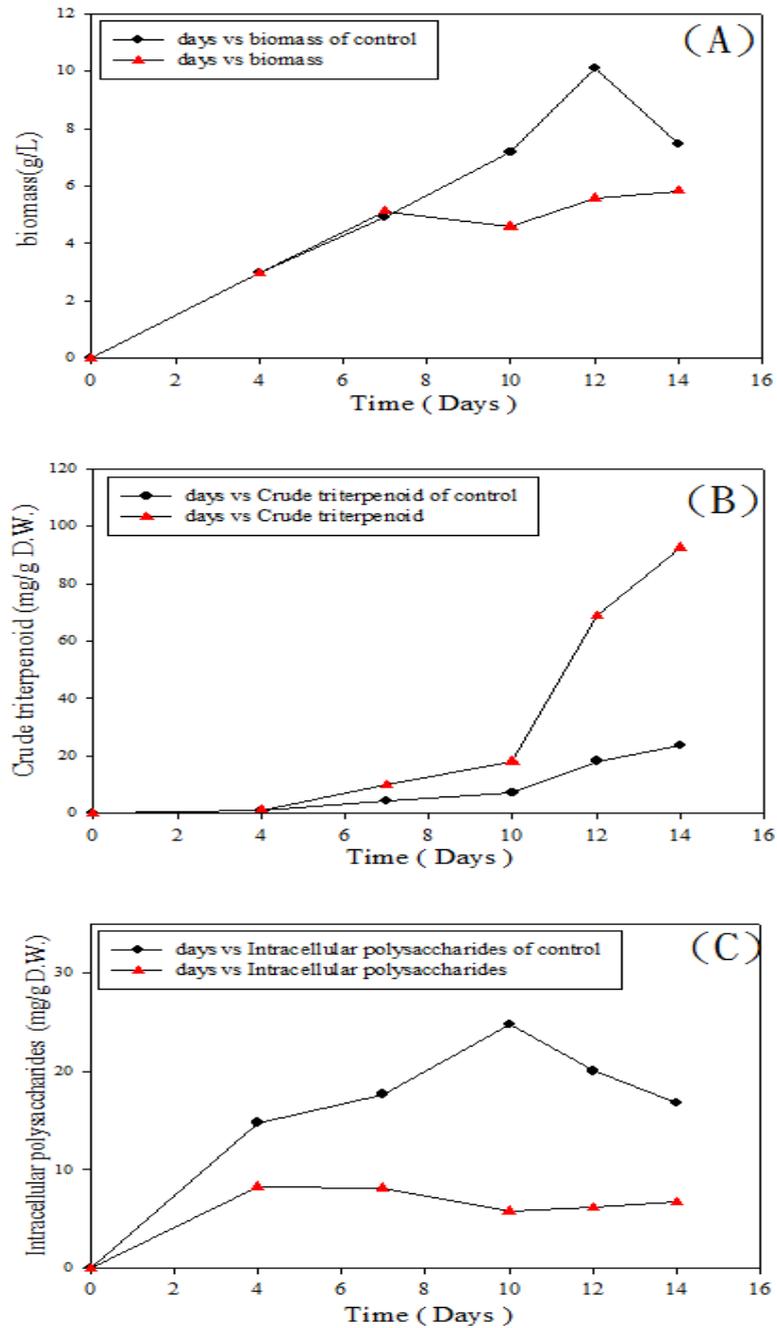


圖 4-18 發酵槽低轉速變高轉速兩段式培養對生理活性成分生成之影響

(A)菌體濃度(B)三萜類含量(C)胞內多醣含量

培養基成分:basal medium/100 ml、水 3000 ml

培養條件：接菌量 10%、溫度 25°C、轉速 50 rpm 培養 7 天後，再以 100 rpm 培養 7 天

取樣時間: 4、7、10、12、14 天

4-3-3 麥芽萃取物再添加對生理活性生成之影響

由圖 4-19(A)(B)(C)顯示，第 4 天到第 7 天，由於發酵槽之營養源消耗殆盡，進而導致菌體開始消耗胞內多醣，提供菌體生長所需，導致胞內多醣下降，而本實驗在第 7 天添加麥芽萃取物(ME)，補充了發酵槽已消耗殆盡之營養源，進而提供菌體生長，使得菌體濃度、胞內多醣含量持續上升，三萜類含量第 10 天到第 12 天大量生成，第 14 天達到最大值。由本試驗結果可之，藉由麥芽萃取物(ME)的添加，提升了菌體二次代謝產物三萜類的代謝量。

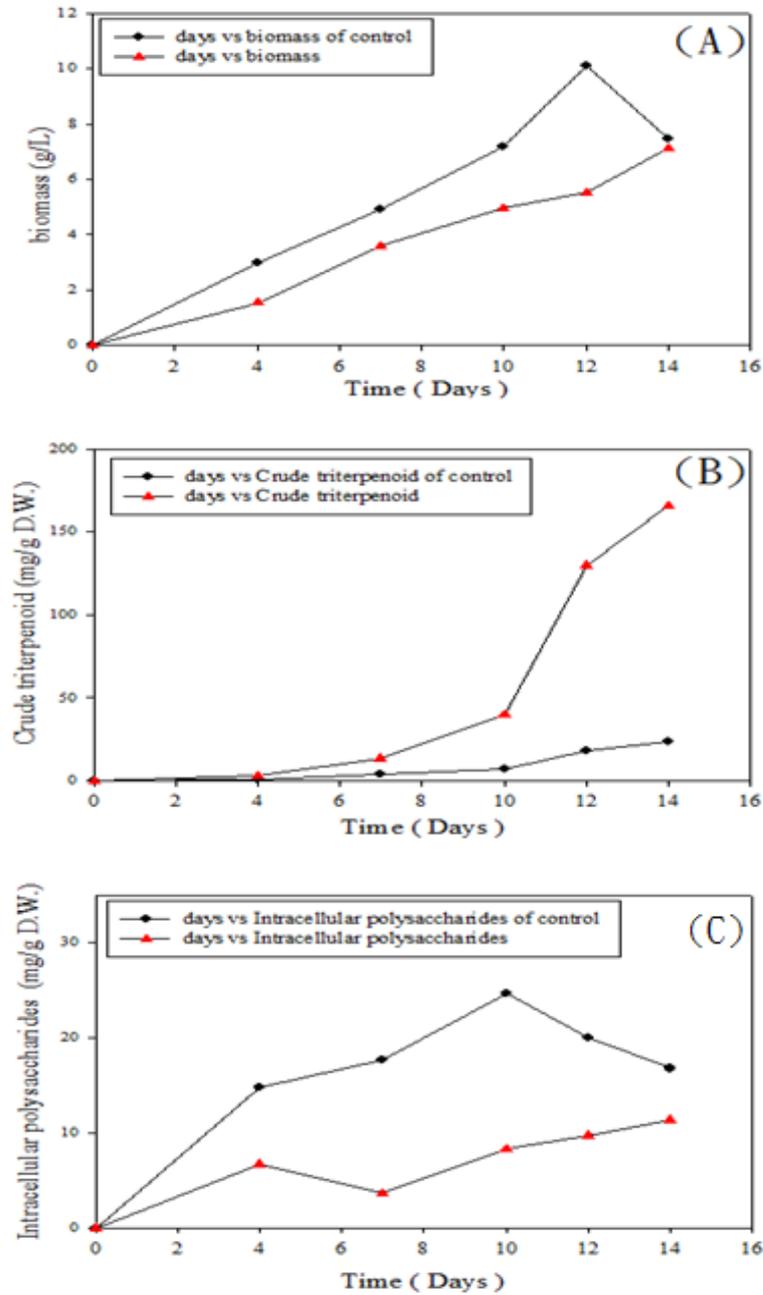


圖 4-19 發酵槽麥芽萃取物再添加對生理活性成分生成之影響

(A)菌體濃度(B)三萜類含量(C)胞內多醣含量

培養基成分: basal medium/100 ml、水 3000 ml

培養條件: 接菌量 10%、溫度 25°C、轉速 100 rpm

添加物濃度: 麥芽萃取物(ME) 20 g/L

取樣時間: 4、7、10、12、14 天

4-3-4 不同培養策略對樟芝培養 monacolin k 生成比較

由圖 4-20 顯示，本實驗提供三種培養策略，均有利於 monacolin k 之代謝，其中以添加麥芽萃取物(ME)效果最佳，monacolin k 含量從 9.90 ug/g D.W. 提升至 27.05 ug/g D.W.，推測是於第 7 天添加麥芽萃取物(ME)，補充了發酵槽已消耗殆盡之營養源，進而提供菌體生長，促使 monacolin k 持續代謝。

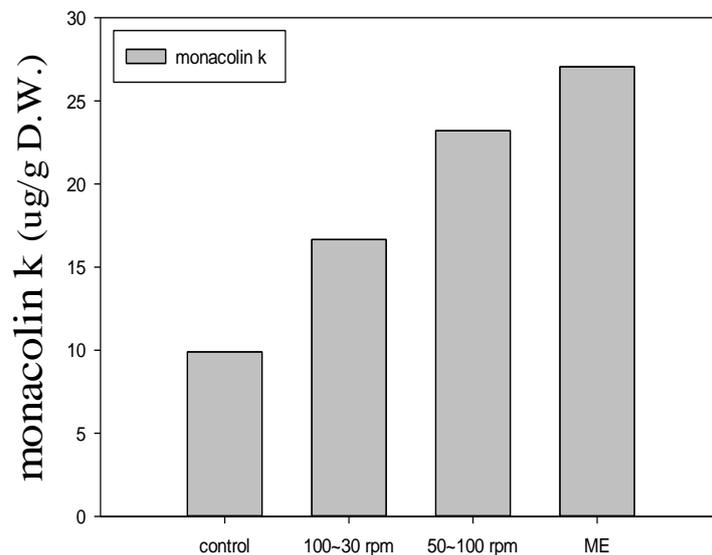


圖 4-20 不同培養策略對樟芝發酵槽培養 monacolin k 生成比較

培養基成分: basal medium/100 ml、水 3000 ml

培養條件: 接菌量 10%、溫度 25°C、轉速 100 rpm

取樣時間: 14 天

4-4 不同培養策略對樟芝培養生理活性成分生成之影響

4-4-1 不同培養策略對樟芝液態培養活性成分生成之影響

由表 4-1 得知，在三萜類產量部分，根據文獻添加橘子果皮精油對樟芝三萜類產量生成最佳，由 94.32 mg/L 提升至 1028.0 mg/L，而本研究提出了三種培養策略，所得結果均有利於三萜類產量之生成，其中以高溫變低溫試驗為最佳，由 296.15 mg/L 提升至 907.20 mg/L；在胞內多醣部分，文獻中添加橘子果皮精油對樟芝胞內多醣產量由 548.80 mg/L 提升至 862.40 mg/L，為控制組的 1.6 倍，而本研究提出了三種培養策略，其中添加幾丁寡糖對胞內多醣產量產生了抑制的現象，推測是添加誘導子幾丁寡糖抑制了樟芝菌體生長，使菌體無法有效的代謝胞內多醣成分。

表 4-1 不同培養策略對樟芝液態培養生成比較表

培養策略 (三角瓶培養)	控制組 三菇產量 (mg/L)	三菇類 產量 (mg/L)	控制組 胞內多醣 產量 (mg/L)	胞內多醣 產量 (mg/L)	來源
添加 橘子果皮精油	94.32	1028.0	548.80	862.40	Ma et al.4 , 2014
添加單菇類 (檸檬稀乙醇 溶液)	97.59	233.97	533.50	352.60	Ma et al. , 2014
添加幾丁寡糖 (300 mg/L)	9.87	26.74	21.33	24.39	林輝恩 , 2016
添加幾丁寡糖 (300 mg/L)	247.92	485.28	88.11	25.265	本研究
低轉速 變高轉速	144.09	207.84	74.02	89.461	本研究
高溫變低溫	296.15	907.20	98.68	151.95	本研究

4-4-2 不同培養策略對樟芝發酵槽產量生成之影響

表 4-2 為發酵槽放大實驗培養，本研究提出了三種培養策略，由結果得知，高轉速變低轉速不利於樟芝三萜產量生成，推測菌絲球產生了凝結現象，菌球內部接收氧氣傳送受阻，使菌體無法有效生長，菌體濃度和三萜類含量均產生抑制的現象；其中以添加 ME 為最佳，三萜類產量由 175.38 mg/L 提升至 1178.10 mg/L，為控制組的 6.7 倍，相較於表 4-1 本研究的高溫變低溫實驗，最終產量為控制組的 3.1 倍，由此可以得知發酵槽放大實驗有利於產量之生成。

表 4-2 不同培養策略對樟芝發酵槽產量生成比較表

培養策略 (發酵槽培養)	控制組 三萜產量 (mg/L)	三萜類 產量 (mg/L)	控制組 胞內多醣產量 (mg/L)	胞內多醣 產量 (mg/L)	來源
高轉速變低轉速	175.38	58.00	125.35	62.04	本研究
低轉速變高轉速	175.38	539.17	125.35	38.99	本研究
添加 ME	175.38	1178.10	125.35	80.92	本研究

4-5 HPLC 圖譜比較

藉由 HPLC 液相層析分析儀，初步檢測在固態培養及液態靜置培養中，生理活性成份之種類，圖 4-21 顯示為樟芝子實體之 HPLC 圖譜，比較表 3-4 圖譜分析，可以看出幾個比較明顯的峰值與之對照，例如：Antcin A、Antcin B、Antcin C、Antcin K、Zhankuic acid C 等，實驗樣品圖譜則以此為標準進行對照。

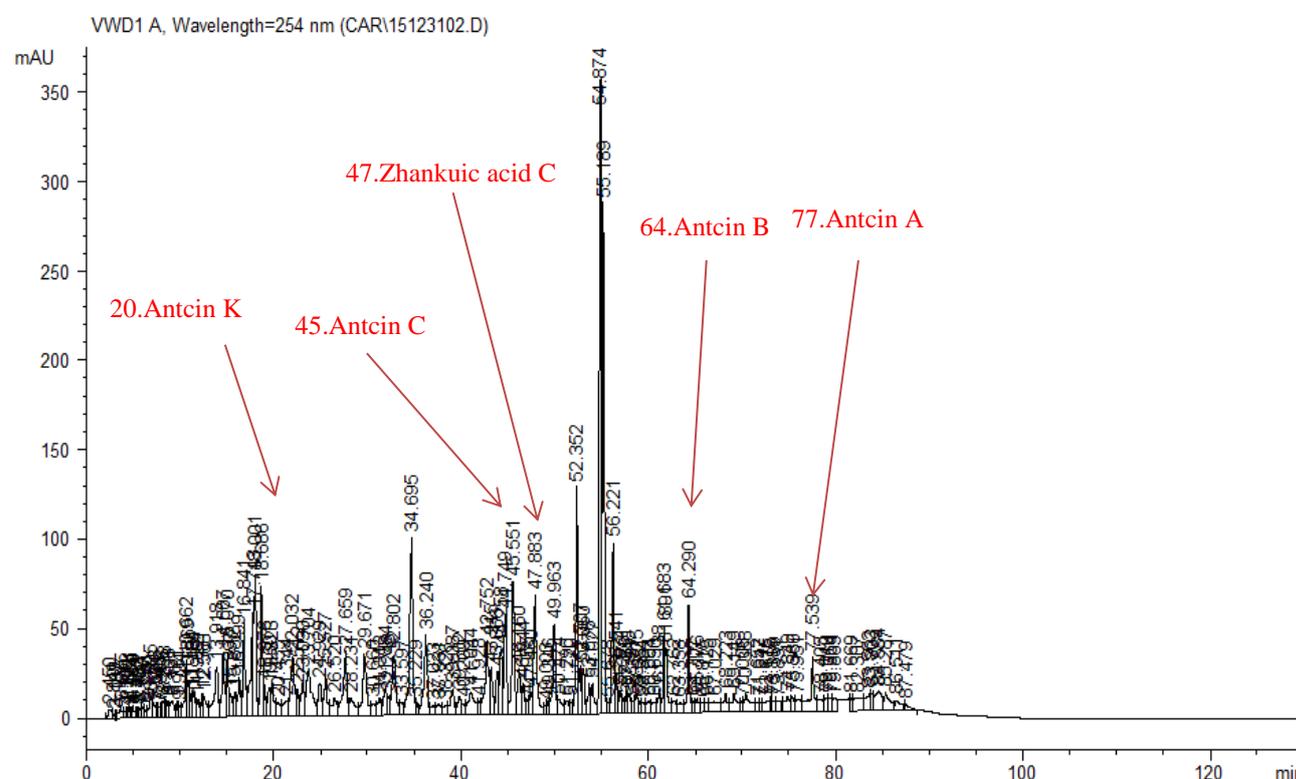
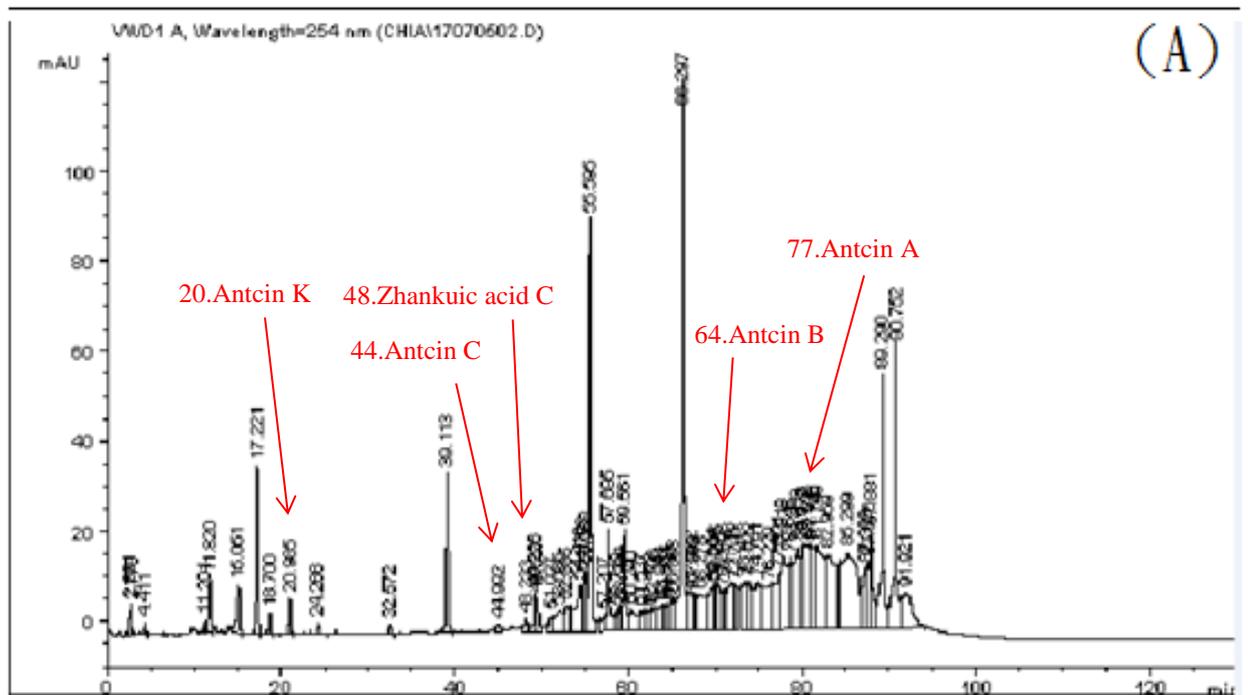


圖 4-21 樟芝子實體三萜類之 HPLC 分析圖譜

本實驗利用誘導子的再添加，刺激二次代謝產物三萜類的生成，圖 4-22(B) 顯示添加幾丁寡糖，根據樟芝子實體 HPLC 之分析圖譜，推測所測得成分包含 Antcin K、Antcin C、Zhankuic acid C、Antcin B、Antcin A。圖 4-22(C)顯示添加木質素，根據樟芝子實體 HPLC 之分析圖譜，推測所測得成分包含 Antcin K、Antcin B、Antcin A。



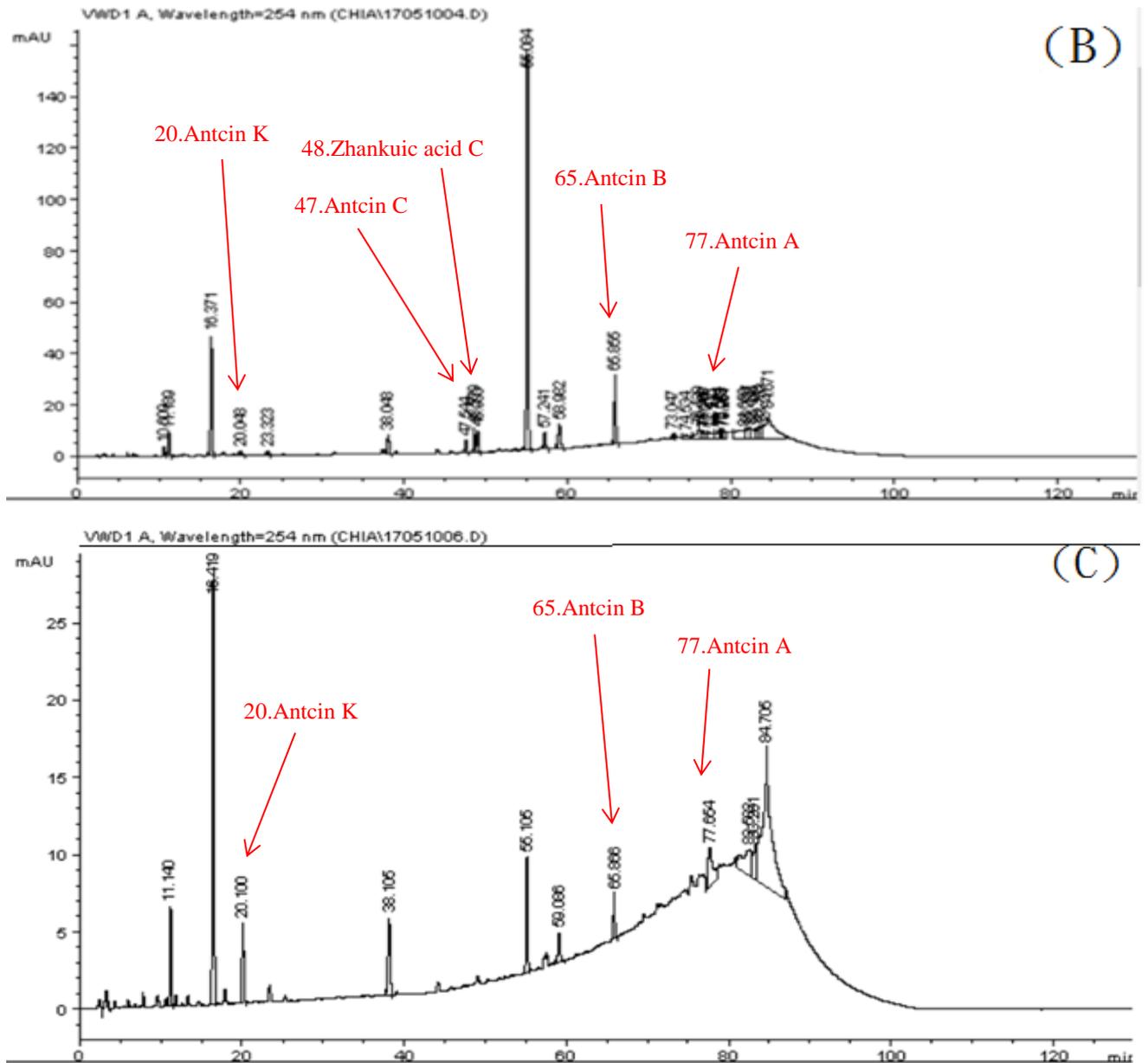
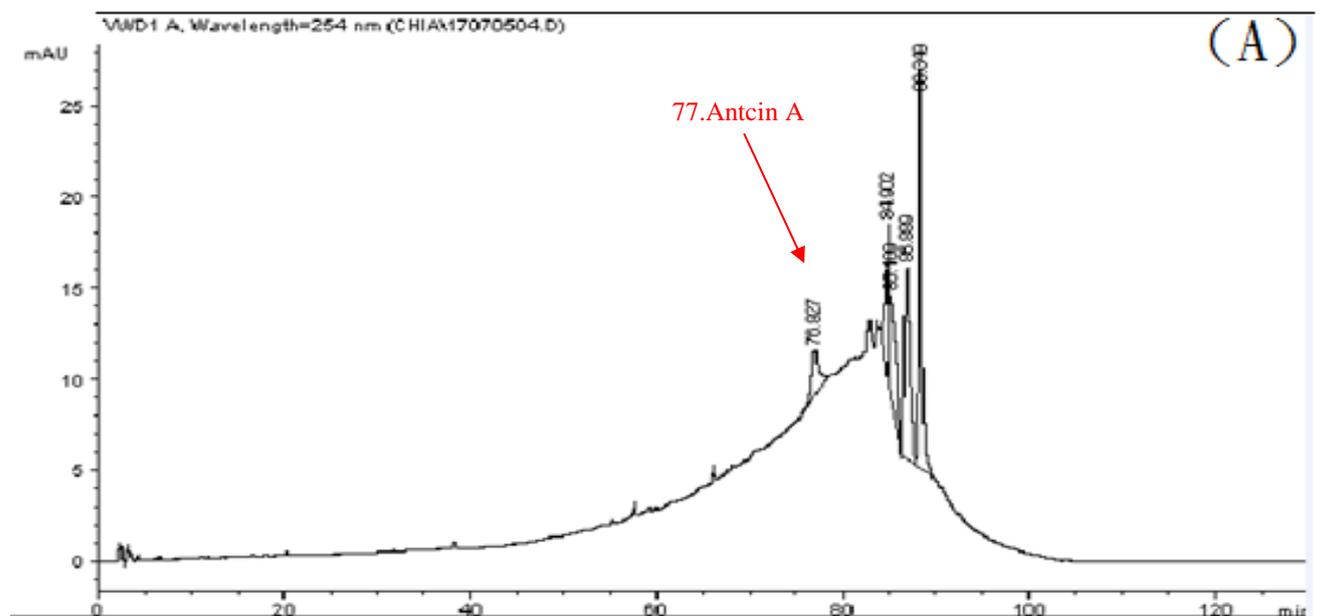


圖 4-22 搖瓶誘導子添加培養樟芝菌絲體三萜類之 HPLC 分析圖譜

(A)控制組(14 天) (B)幾丁寡糖添加(14 天) (C)木質素添加(14 天)

本實驗利用發酵槽培養，分別對發酵槽採提高轉速與麥芽萃取物再添加的策略。由圖 4-23(B)得知，本實驗採用發酵槽提高轉速，根據樟芝子實體 HPLC 之分析圖譜，推測所測得成分包含 Antcin C、Antcin B、Antcin A，相較於控制組新增加了兩種成分。由圖 4-23(C)得知，本實驗採用麥芽萃取物得再添加，根據樟芝子實體 HPLC 之分析圖譜，推測所測得成分包含 Antcin C、Zhankuic acid C、Antcin B、Antcin A，相較於控制組新增加了三種成分。



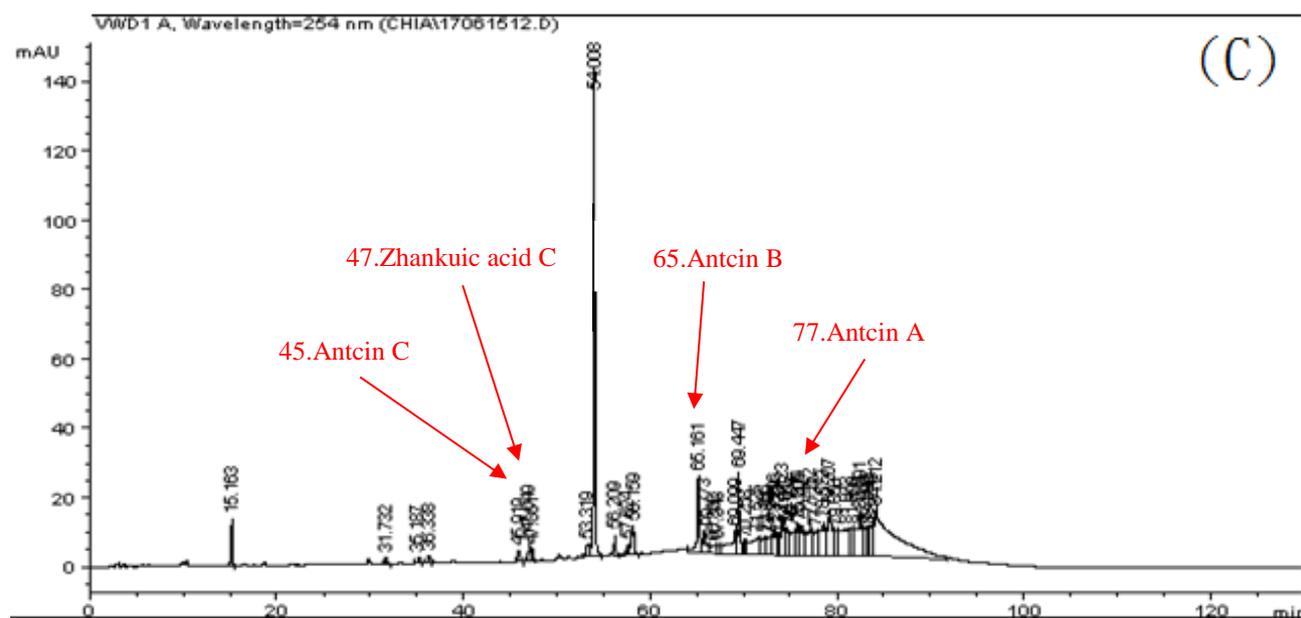
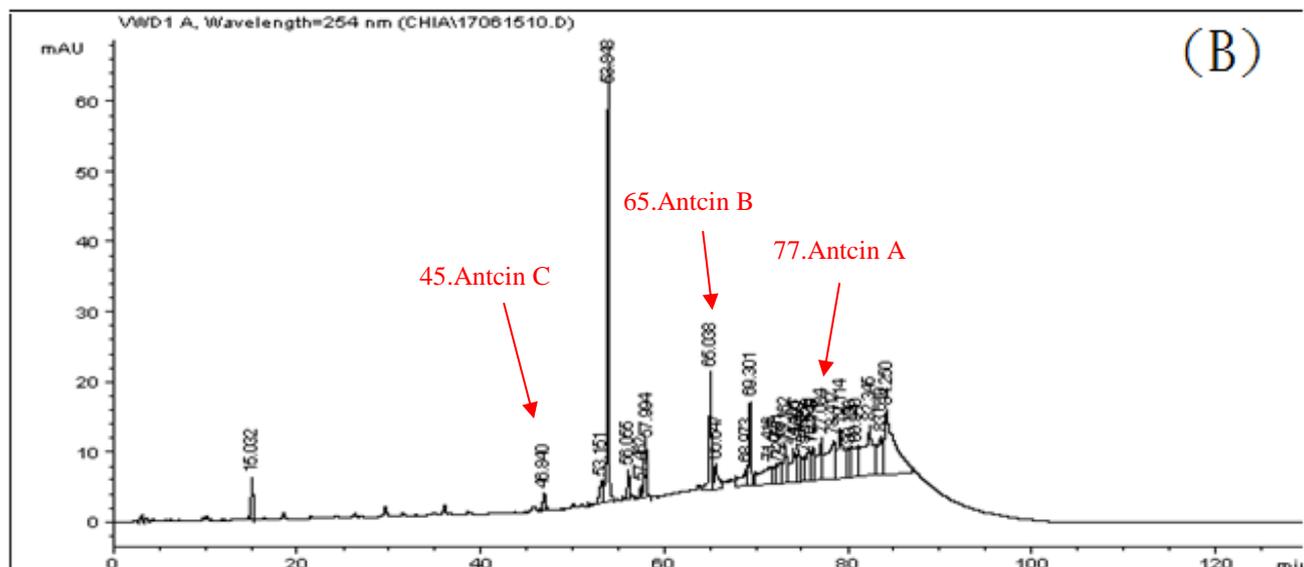


圖 4-23 發酵槽培養樟芝菌絲體三萜類之 HPLC 分析圖譜

(A)控制組(14 天) (B)低轉速換高轉速(14 天) (C)ME 添加(14 天)

第五章 結論與未來展望

5-1 結論

本實驗探討不同的培養策略對樟芝菌絲體活性成分生成之影響，利用液態發酵培養、固態培養及發酵槽培養，分別在培養中加入各種觸發因子和環境因子，對其培養方式菌體型態之影響，分析各培養條件之生理活性成分。

1.液態發酵培養:

本實驗目的在於三角瓶液態培養方式，將樟芝菌絲體基於基礎培養基中，改變培養策略，分別是轉速變換的試驗、不同添加物添加的試驗、不同誘導子濃度添加的試驗以及溫度變換的試驗，其中以降低溫度後的三角瓶液態培養為最佳，三萜類含量達到 142.12 mg/g D.W.，為控制組的 3.5 倍，胞內多醣含量達到 23.88 mg/g D.W.，為控制組的 1.7 倍，monacolin k 含量達到 34.99 μ g/g D.W.，為控制組的 10.4 倍。

2.固態培養:

本實驗使用樟芝做固態培養，以小米為基底，培養基為液態基底，分別添加幾丁寡糖、木質素為誘導子做培養試驗，在三萜類部分中，以樟芝固態與液態培養基中添加幾丁寡糖為最佳，三萜類含量達到 28.37 mg/g D.W.，為控制組的 7.5 倍；在胞內多醣部分中，以小米固態培養中添加幾丁寡糖為最佳，胞內多醣含量達到 1033.70 mg/g D.W.，為控制組的 8.0 倍；在 monacolin k 部分中，以小米固

態與培養基共添加中添加幾丁寡糖為最佳，momacolin k 含量達到 11.03 $\mu\text{g/g D.W.}$ ，為控制組的 1.6 倍。

3. 發酵槽培養:

本實驗目的在於發酵槽培養方式，將樟芝菌絲體基於基礎培養基中，改變培養策略，分別是降低轉速的試驗、提高轉速的試驗及麥芽萃取物再添加的試驗，其中以麥芽萃取物再添加對發酵槽培養為最佳，三萜含量達到 165.66 mg/g D.W. ，為控制組的 7.1 倍；monacolin k 含量達到 27.05 $\mu\text{g/g D.W.}$ ，為控制組的 2.3 倍。

5-2 未來展望

藉由本實驗之結果討論，在搖瓶液態發酵方面，未來可以藉由溫度變換下，搭配誘導子的添加，刺激二次代謝產物之生成。在發酵槽方面，可以藉由本實驗之搖瓶數據做參考，做誘導子的添加及溫度變換的培養試驗，作為放大培養策略之參考。另外，在樟芝生理活性成分中，未來可以添加 Antroquinonol 分析方法，Antroquinonol 具有顯著的抗癌活性，並且它對於肝癌細胞與正常細胞有選擇性，目前已進入 FDA 二期臨床實驗，是具有優良前景的抗癌化合物。

參考文獻

水野卓、川合正允、賴慶亮譯(1997)。菇類的化學，生化學。台北市：國立編譯館。409。

王皓緯 (2011)。固態發酵培養基組成對於樟芝菌絲體活性成分生成之影響。東海大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。

王雅欣 (2008)。樟芝抗發炎活性成分及其研究。國立中興大學農藝學系所碩士論文。

王淵龍，夏永軍，侯建平、任婧 (2012)。紅曲菌液態發酵產品 Monacolin K 的現狀及展望。食品工業，33(10)

王馨晨 (2007)。液態培養條件對樟芝菌絲體及多醣體之影響。東海大學食品科學研究所碩士論文。

丘振宇、王亞琴、羅立新、楊麗霞(2007)。Monacolin K 的生產研究。食品科技，8。

江柏政 (2009)。天然物經由調控胞內訊息傳遞而抑制前列腺癌與肝癌之機轉探討。國立台灣大學藥學研究所學位論文。

李宛蓁 (2003)。樟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碩士論文。

吳介人(2014)。探討牛樟芝在液態中與酵母菌共培養並利用兩階段式操作以增加

- 三萜產量。國立中央大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。
- 吳德鵬 (1995)。樟芝微量成分的研究。國立台灣師範大學化學研究所碩士論文。
- 范真綺 (2004)。樟芝固態栽培與液態發酵菌絲體之成分及其生物活性之研究。
南台科技大學化學工程系碩士論文。
- 馬德威 (2012)。柑橘類果皮添加對樟芝代謝生理活性物質之影響。東海大學化學工程與材料工程研究所博士論文。
- 張益軒 (2001)。牛樟芝分子生物鑑定系統之研究。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
- 張東柱、周文能 (2005)。野菇入門。台北，遠流出版公司。
- 陳啟楨、蘇慶華、藍明煌(2001)。樟芝固態栽培及其生物活性之研究。中華真菌學會會刊，16:65-72。
- 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萜類與多醣體之影響。國立中央大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。
- 黃惠琴(2001)。樟芝菌絲體深層培養之研究。東海大學化學工程研究所碩士論文。
- 黃鈴娟 (2000)。樟芝與姬松茸之抗氧化性質及多醣組成。國立中興大學食品科學研究所碩士論文。
- 黃惠君 (2004)。實用藥菇的營養與藥用價值。食品工業，36(5):25-32。
- 馬帥、邵穎、談文詩、陳濤 (2016)。紅曲菌發酵豆漿生產 Monacolin K 的研究。

生物工程，37(21)。

楊于萱 (2010)。培養條件對樟芝菌絲體抗氧化活性及抗腫瘤能力之影響。東海

大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。

楊芳鏘、楊明哲(2001)。菌絲狀真菌之深層培養技術。化工技術，9：176-189。

楊芳鏘 (2017)。藥用菇類液體培養基本原理與提高活性成分生成之培養策略。

農業生技產業期刊，49。

劉景仁(2007)。探討誘發劑及兩階段培養對樟芝深層發酵三萜類及抗癌作用之影

響。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。

謝如婷 (2009)。微量元素對牛樟芝發酵物生理活性與抗氧化活性影響之探討。

南台科技大學生物科技研究所碩士論文。

Chang T.T., Chou W.N. (1995), *Antrodia cinnamomea* sp. Nov. on *Cinnamomum*

Kanehirai in Taiwan, *Mycological Research*, 99, pp. 756- 758.

Chang T.T., Chou W.N. (2004), *Antrodia cinnamomea* sp. Nov. on *Cunninghamia*

konishii in Taiwan, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45, pp. 347-352.

Chen Y.J., Cheng P.C., Lin C.N., Liao H.F., Chen Y.Y., Chen C.C., Lee

K.M. (2008), Polysaccharides from *Antrodia camphorata* mycelia extracts

possess immunomodulator activity and inhibits infection of *schistosoma*

mansoni, *International immunopharmacology*, 8(3), pp. 458- 467.

Liu Ching-Jen, Chiang Chien-Chi, Chiang Been-Huang (2012), The elicited two-stage

submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* for enhancing triterpenoids production and antitumor activity. *Biochemical Engineering Journal* , 64 , pp. 48 - 54.

Fang Q.H., Zhong J.J. (2002), Effect of initial pH on production of ganoderic Acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*, *Process Biochemistry*, 37, pp. 769-774.

Lee I.H., Huang R.L., Chen C.T., Chen H.C., Hsu W.C., Lu M.K.(2002), *Antrodia camphorate* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects, *FEMS Microbiology Letters* , 209(1), pp. 63-67.

Li H.J., Zhang D.H., Han L.L., YuX. , Zhao P., LiT., Zhong J.J, Xu J.W. (2015), Further improvement in ganoderic acid production in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* by integrating nitrogen limitation and calciumion addition. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, pp. 75–80.

Ma T-W, Lai Y. T, Yang F-C (2014), Enhanced production of triterpenoid in submerged cultures of *Antrodia cinnamomea* with the addition of citrus peel extract. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 37(11), pp. 2251-2261.

Ma T-W, Lai, Y T, Chen L-T, Yang F- C. (2016), The cultivation strategy of enhancing triterpenoid production in submerged cultures of *Antrodia cinnamomea* by adding monoterpenes. *Journal of the Taiwan Institute of*

Chemical Engineers, 58, pp. 210-218.

Lin Shin-Yi, Chen Yu-Kai, Yu Hui-Tzu, Gayane S. Barseghyan, Mikheil D. Asatiani,

Solomon P. Wasser, Jeng-Leun Mau (2013), Comparative Study of Contents of Several Bioactive Components in Fruiting Bodies and Mycelia of Culinary-Medicinal Mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 15(3), pp. 315 – 323.

Singleton V.L., Rossi J.A. (1965), Colorimetry of total phenolics with

Phosphomolybic - phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, pp. 144-158.

Tang Y.J., Zhong J.J. (2002), Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for

hyper production of polysaccharide and ganoderic acid, *Enzyme and Microbial Technology*, 31, pp. 20-28.

Wu S.H., Chang T.T. (1997), *Antrodia camphorata*, new combination of a medicinal

fungus in Taiwan, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 38, pp. 273-275.

Wei Z.H., Liu L.L., Guo X.F., Li Y.J., Hou B.C., Fan Q.L., Wang K.X., Luo Y.D.,

Zhong J.J.(2015), Sucrose fed-batch strategy enhanced biomass, polysaccharide and ganoderic acids production in fermentation of *Ganoderma lucidum* *Bioprocess and Biosystems Engineering*, pp, 37–44.

Xu Y.N., Zhong J.J. (2012), Impacts of calcium signal transduction on the

fermentation production of antitumor ganoderic acids by medicinal mushroom

Ganoderma lucidum, *Biotechnology Advances*, 30 ,pp. 1301 – 1308.

Yang F.C., Huang H.C., Yang M.J. (2003), The influence of environmental conditions on the mycelial growth of *Antrodia cinnamomea* in submerged cultures, *Enzyme and Microbial Technology*, 33, pp. 395–402.

Yang F.C., Ma T.W., Lee Y.H. (2013), Reuse of citrus peel to enhance the formation of bioactive metabolite-triterpenoid in solid-state fermentation of *A.cinnamomea*, *Biochemical Engineering Journal*, 78, pp. 59–66.

Zhang W.X., Zhong J.J. (2010), Effect of oxygen concentration in gas phase on sporulation and individual ganoderic acids accumulation in liquid static culture of *Ganoderma lucidum*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol 109, pp. 37–40.

Zhao W., Xu J.W., Zhong J.J. (2011), Enhanced production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under nitrogen-limiting conditions *Bioresource Technology*, pp.8185 – 8190.