私立東海大學大學化學工程與材料工程研究所

Graduate Institute of Chemical and Materials Engineering

Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授: 楊芳鏘 博士

Advisor: Fan-Chiang Yang, Ph. D.

不同菇類菌絲體萃取物 ACE 抑制活性之探討

Effect of mycelial extracts from different mushroom on ACE inhibitor activity

研究生: 葉怡妏 撰

Graduate student : Yi-Wen Ye

中華民國 九十九 年 七 月

中文摘要

本研究探討四種食藥用菇類菌絲體（朱紅栓菌、靈芝、樟芝與雞腿蘑）萃取物的 ACE 抑制活性功能，期待以此開發出新的抗高血壓保健食品。本研究方法先是分別以深層培養與固態培養方式得到菌絲體，並製成不同溶劑之萃取物與酵素水解物，另外再探討朱紅栓菌與雞腿蘑之自體溶解反應，用以測定 ACE 抑制活性。研究結果顯示，當以深層發酵方式培養菌絲體時，四者皆是以冷水萃取物有較高的 ACE 抑制活性，分別為 69.4%、57.2%、26.8%與 15.2%，其 IC_{50} 則為 2.45、4.13、9.28 與 13.5 mg/ml；在固態培養方面，選用了薏仁、燕麥與蕎麥作為培養基質，再分別以冷水、甲醇和乙醇萃取菌絲體，其中以冷水萃取物抑制活性較高，而乙醇萃取物是無抑制活性，並且朱紅栓菌、靈芝與樟芝以薏仁為培養基質時有最高之抑制活性，雞腿蘑則是以燕麥培養時有最高之抑制活性。探討朱紅栓菌之自體溶解反應對抑制活性的影響，其最佳作用環境為溫度為 50℃、pH 4。另外以酵素水解方式探討其 ACE 抑制活性，選用 papain、bromelain 與 alcalase 水解朱紅栓菌菌絲體，結果顯示 alcalase 作用效果最佳，其抑制活性可達 82.3%。由以上結果得知，朱紅栓菌比其他三者有較高之 ACE 抑制活性，可作為日後開發保健食品之另一項新選擇。

關鍵字：菇類菌絲體、抗高血壓、ACE 抑制劑、朱紅栓菌

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of the extracts with different solvents and autolysis treatment of mycelia of medicinal mushroom (*P. cinnabarinus, G. lucidum, A. camphorate* and *C. cinereus*) on ACE inhibitory activity and expected to develop a new healthy food for regulating blood pressure. The mycelia were produced by submerged cultures or solid-state fermentation using different substrate. Based on the results, when cold water was used for extraction, higher ACE inhibitor activities were obtained, which were 69.4%、57.2%、26.8% and 15.2% for *P. cinnabarinus, G. lucidum, A. camphorate* and *C. cinereus*, respectively. Moreover, the IC_5 values were determined as 2.45、4.13、9.28 and 13.5 mg/ml. The maximum ACE inhibitor activity was obtained when the mycelium was extracted using water. The ethanol extract showed no ACE inhibitor activity. Pearl barley, oats and buckwheat were used as substrate for solid-state fermentation. When pearl barley was used as a substrate, the mycelium extracts of *P. cinnabarinus*, *A. camphorate* and *G. lucidum* had the higher inhibitor activity, however oats was a more suitable substrate for the culture of *C. cinereus*.. Concerning the autolysis of *P. cinnabarinus* , the optimum condition was determined to be a temperature equal to 50℃ and pH 4. When commercial proteases (papain, bromelain and alcalas) were employed for the mycelia hydrolysis of *P. cinnabrinus*n, alcalase was demonstrated to achieve the

highest ACE inhibitor activity of 82.3%.

Key words: mycelium of mushrooms、antihypertension、ACE inhibitor、*P. cinnabrinus*

目錄

中文摘要 I

Abstract II

目錄 IV

表目錄 VIII

圖目錄 IX

第一章 緒論 1

第二章 文獻回顧 3

2-1 菇類的簡介與生理活性功能 3

2-2 選用菇類介紹與菌絲體培養方式 6

2-2-1 樟芝之介紹 6

2-2-2 靈芝之介紹 7

2-2-3 朱紅栓菌之介紹 9

2-2-4 雞腿蘑之介紹 10

2-2-5 菇類菌絲體的培養方法 10

2-3 高血壓 13

2-3-1 高血壓的定義 13

2-3-2 高血壓的種類 14

2-3-3 高血壓的預防及治療 15

2-4 血管收縮素轉化酶(angiotensin converting enzyme, ACE).....18

2-4-1 簡介.....18

2-4-2 腎素-血管收縮素-醛固酮系統（Renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS）.....18

2-5 血管收縮素轉化酶抑制劑（Angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI）.....20

2-5-1 ACE 的抑制原理.....20

2-5-2 抑制劑的種類.....21

第三章 實驗材料與分析方法.....25

3-1 實驗菌株.....25

3-2 實驗藥品.....25

3-3 實驗儀器與設備.....27

3-4 培養基組成.....28

3-4-1 斜面與平面培養基.....28

3-4-2 液態培養基.....28

3-5 分析方法.....31

3-5-1 pH 的測定.....31

3-5-2 菌體濃度.....31

3-5-3 還原糖量測定.....31

3-5-4 幾丁質酵素活性測定.....31

3-5-5 胜肽含量測定.....32

3-5-6 血管收縮素轉化酶抑制活性測定.....32

3-6 實驗方法.....35

3-6-1 菌種培養與保存.....35

3-6-1-1 菌種斜面試管保存.....35

3-6-1-2 菌種平面培養皿培養與活化.....35

3-6-1-3 種菌的製備.....35

3-6-2 三角瓶液態培養.....36

3-6-3 固態培養.....36

3-6-4 膠態幾丁質的製備.....37

3-6-5 液態發酵菌絲體溶劑萃取物之製備.....37

3-6-6 固態發酵菌絲體溶劑萃取物之製備.....38

3-6-7 朱紅栓菌自體溶解試驗.....38

3-6-8 朱紅栓菌酵素萃取物之製備.....39

第四章 結果與討論.....40

4-1 液態發酵菌絲體溶劑萃取物對 ACE 抑制活性之影響.....40

4-1-1 不同濃度之冷水萃取物對 ACE 抑制活性之影響.....45

4-2 固態發酵菌絲體溶劑萃取物對 ACE 抑制活性之影響.....47

4-2-1 菌絲體甲醇萃取物對 ACE 抑制活性之影響.....47

4-2-2 菌絲體冷水萃取物對 ACE 抑制活性的影響.....53

4-3 朱紅栓菌菌絲體對 ACE 抑制活性之影響.....56

4-3-1 液態發酵菌絲體自體溶解反應對 ACE 抑制活性之影響.....56

4-3-2 酵素作用液態發酵菌絲體對 ACE 抑制活性之影響.....62

第五章 結論與未來展望.....66

5-1 結論.....66

5-2 未來展望.....67

參考文獻.....68

表目錄

表 2-1 靈芝之生理活性及其成分 8

表 2-3 改變生活型態方式用以預防或控制高血壓 15

表 3-1 雞腿蘑種菌與液態培養基組成 28

表 3-2 朱紅栓菌種菌液態培養基組成 29

表 3-3 朱紅栓菌液態培養基組成 29

表 3-4 靈芝液態培養基組成 30

表 3-5 樟芝種菌液態培養基組成 30

表 3-6 樟芝液態培養基組成 30

表 3-7 各酵素反應溫度及 pH 39

表 4-1 不同菇類之 IC_{50} 46

\

圖目錄

圖 2-1 腎素-血管收縮素-醛固酮系統中血管收縮素轉化酶之催化反應 19

圖 4-1 不同朱紅栓菌液態發酵菌絲體萃取物對ACE抑制活性與胜肽含量的影響 41

圖 4-2 不同靈芝液態發酵菌絲體萃取物對 ACE 抑制活性與胜肽含量的影響 ..42

圖 4-3 不同樟芝液態發酵菌絲體萃取物對 ACE 抑制活性與胜肽含量的影響 ..43

圖 4-4 不同雞腿蘑液態發酵菌絲體萃取物對 ACE 抑制活性與胜肽含量的影響 44

圖 4-5 液態發酵菌絲體冷水萃取物濃度對 ACE 抑制活性之影響 46

圖 4-6 朱紅栓菌固態發酵菌絲體甲醇萃取對 ACE 抑制活性的影響 49

圖 4-7 靈芝固態發酵菌絲體甲醇萃取對 ACE 抑制活性的影響 50

圖 4-8 樟芝固態發酵菌絲體甲醇萃取對 ACE 抑制活性的影響 51

圖 4-9 雞腿蘑固態發酵菌絲體甲醇萃取對 ACE 抑制活性的影響 52

圖 4-10 朱紅栓菌固態發酵菌絲體冷水萃取對 ACE 抑制活性的影響 54

圖 4-11 靈芝固態發酵菌絲體冷水萃取對 ACE 抑制活性的影響 54

圖 4-12 樟芝固態發酵菌絲體冷水萃取對 ACE 抑制活性的影響 55

圖 4-13 雞腿蘑固態發酵菌絲體冷水萃取對 ACE 抑制活性的影響 55

圖 4-14 朱紅栓菌液態發酵菌絲體培養時間對幾丁質酵素活性之影響 58

圖 4-15 不同 pH 對朱紅栓菌自體溶解之 ACE 抑制活性之影響 59

圖 4-16 不同溫度對朱紅栓菌自體溶解之 ACE 抑制活性之影響 60

圖 4-17 短時間對朱紅栓菌自體溶解之 ACE 抑制活性之影響 61

圖 4-18 長時間對朱紅栓菌自體溶解之 ACE 抑制活性之影響 61

圖 4-19 Papain 作用朱紅栓菌液態發酵菌絲體對 ACE 抑制活性之影響 63

圖 4-20 Bromelain 作用朱紅栓菌液態發酵菌絲體對 ACE 抑制活性之影響 64

圖 4-21 Alcalase 作用朱紅栓菌液態發酵菌絲體對 ACE 抑制活性之影響 65

第一章 緒論

高血壓已為開發中國家所盛行的慢性疾病之一，因其初期症狀不明顯往往容易被忽略，而有隱形殺手之稱。長期的高血壓會導致血管硬化、阻塞或破裂而造成中風，並會有心臟病變及腎臟病變等併發症，嚴重者可能因心肌梗塞而猝死。近年來，隨著國人飲食與生活習慣的改變，高血壓有年輕化的趨勢，所以平時就應該注意血壓的控制來維護自身健康。在臨床上的治療方式，大都以服用合成的抗高血壓藥物，如利尿劑、ACE 抑制劑等，但此類藥物通常會有咳嗽、過敏、味覺改變、皮膚紅疹等副作用。

血管收縮素轉化酶（angiotensin converting enzyme, ACE）存在於人體的肺、腎、腦等器官中，在血壓控制上扮演著重要的角色，它會將血管收縮素 I 轉化為具血管強力收縮活性的血管收縮素 II，使血壓上升。第一個血管收縮素轉化酶抑制劑（ACE inhibitor）從毒蛇血清中被分離存化而得後，陸續研發出不同的 ACE 抑制劑合成藥物，雖然合成的 ACE 抑制劑在抗高血壓方面具有良好的效果，但卻有不少的副作用。因此近年來學者開始嘗試從自然界中獲取 ACE 抑制劑，如植物蔬果、大豆、魚肉類等，其效果溫和，對人體不會有副作用。

食藥用菇類不僅營養價值高而且熱量極低，符合現代人對健康食品的需求，更有多項的生理活性功能，以達到不同的保健功效。中國傳統醫學使用食藥用菇類治療疾病上，在歷經長久的驗證與使用下已佔有一席之地，因此菇類可開發之市場除了生鮮食品市場外還有更具經濟價值之保健食品市場。

近來研究顯示食藥用菇類確實有抗癌作用，目前已知其主要成份為多醣體，其抗癌機制並不是針對特定的腫瘤細胞來作抑制，而是透過活化人體多種免疫細胞以達到抗腫瘤的效果（王，2007）。食藥用菇類除了多醣體外，還有許多其他物質具有良好的生理功效。本研究目的即是希望從食藥用菇類製備 ACE 抑制劑，達到抗高血壓的效果，以增加其市場經濟價值。並藉由不同的培養方式（固態與液態發酵）與萃取方法得到不同的菌絲體萃取物，比較其 ACE 抑制劑功效。

第二章 文獻回顧

2-1 菇類的簡介與生理活性功能

一般所稱菇者，係指菌類形成之有性生殖器官中，其形態大至可肉眼所見之子實體；能形成這種子實體的菌類，包含一部份的子囊菌與多數的擔子菌。目前世界上的菇類約有 140,000 種，至今約只有 10 %被開發命名（Wasser, 2002）。

國內食用及藥用菇消費量近些年來顯著提高，保守估計每人年消費量超過 3 公斤。在民眾健康意識抬頭以及食品衛生安全認知下，加上消費者對菇類膳食功能與生活機能的認同，都促進了菇類生鮮與保健食品市場的高度成長。

研究顯示食藥用菇類除了可作為營養素供給源（蛋白質、醣類、脂質、礦物質等）外，還有許多生理調節機能，如增強免疫力、抗腫瘤、抗老化、降血壓等功能，由食藥用菇菌種分離、培養、液體發酵、藥效成分萃取、藥理分析、毒性試驗與臨床研究，現今已發展出約二十種的商業化產品，例如：雲芝的多醣體－胜肽抗癌劑、香菇的多醣體保肝劑，猴頭菇製成的健胃整腸錠片、蜜環菌治頭痛眼花的藥劑、假蜜環菌製劑用於治療膽道急性感染、安絡小皮傘製劑用以醫治神經性疼痛、靈芝鎮靜劑，以及銀耳（白木耳）的抗放射線麻藥和蘑菇醫治肝炎、早期肝病變的藥物等（王，2007）。

菇類的第一級功能為其營養成分，菇類蛋白質含量高達 30~ 40 %，並含有 18 種人體所需之胺基酸，尤其是必須從外部攝取之胺基酸-離氨酸（lysine）含量特別高，且其脂質含量少，是熱量極低的食品。許多菇類因具有特殊香氣成分與烹

調後的良好的口感，是使其受到注目的第二級功能，例如松茸內含有松茸醇（matsutakeol）和桂皮酸甲酯（methylcinnamate）的香味成分，頗受日本人喜愛；香菇在烘乾的過程中，其中的香菇酸（lenthinic acid）會轉變為香菇精（lenthionin），是乾香菇特有香味的來源。而菇類能在今日受到重視最主要原因是因為其第三級功能-生理活性功能（王，2007）。由現代的分離與分析科技得知，菇類有許多生理活性成分，如多醣體（polysaccharide）、三萜類（triterpenoids）、蛋白質、固醇類（steroids）、核酸、超氧歧化酵素（superoxide dismutase）等，其生理活性功能如下：

1. 抗腫瘤

從菇類中萃取而得的抗腫瘤物質包含有：多醣體（polysaccharides, 例如β-D-葡聚醣及與蛋白質結合的葡聚醣）、三萜類（triterpene）、凝集素（agglutinin）、膳食纖維（dietaryfiber）等（Wasser and Weis, 1999）。β-D-葡聚醣的抗腫瘤機制是通過強化寄主的免疫機能，進而抑制腫瘤細胞的增殖或將其排除。分子量較高、分支度較低與水溶性較大的β-D-葡聚醣其抗腫瘤活性較高（Lindequist *et al*., 2005）。

2. 降血壓

Morigiwa 等人（1986）從靈芝的子實體以乙醇提取了 10 種三萜類，發現靈芝酸（ganoderic acid）能有效的抑制血管收縮素轉化酶（Angiotensin converting enzyme, ACE）活性，進而降低血壓。Lee 等人（2004）以冷水萃取金福菇

（*Tricholoma giganteum*）子實體得到 ACE 抑制胜肽，並將純化後的抑制劑以 1 mg/kg per rat 的劑量餵食原發性高血壓大鼠,2 小時後血壓由 193 mmHg 降至 157 mmHg，顯示有良好的抗高血壓效果。

3. 抗病毒

由香菇中萃取出的木質素可幫助受病毒感染的細胞減少病變的機率，也可有效的阻止或預防病毒感染。靈芝中的三萜類（如 ganoderiol、ganodermanontriol、ganoderic acid）據研究有抵抗人類 HIV-1 病毒的活性（Lindequist *et al*., 2005）。

4. 抗氧化

大多數菇類均含有超氧歧化酵素，是一種很好的自由基清除劑。Song 等人（1995）發現以 70%乙醇萃取桑黃（*Phellinus linteus*）子實體，其萃取物可抑制脂質過氧化(lipid peroxidation, LPO)，還有清除自由基 DPPH (2, 2-dipheny1-1-picrylhydrazy1)的作用。

5. 降膽固醇

攝取過高的膽固醇容易造成動脈硬化與中風等疾病，根據研究香菇子實體中的 eritadenine 成分有很好的降膽固醇效果。利用大鼠進行草菇子實體對膽固醇攝取實驗，經過餵食膽固醇食物四週後發現，另外有餵食草菇子實體之大鼠的血液中膽固醇濃度明顯低於對照組（Cheung, 1996）。

6. 增強免疫

Kim 等人（2004）研究顯示，桑黃萃取物可以活化腹腔巨噬細胞，促進其分

泌一氧化氮(NO)分子，以毒殺對一氧化氮敏感的 B16 黑色素細胞。隔年的實驗則發現，桑黃萃取物能經由 TLR-2 及 TLR-4 路徑，使樹狀細胞(dendritic cell) 趨於成熟，進一步誘導 Th1 細胞分化，產生大量的細胞激素(IL-1、IL-2)與干擾素(IFN-gamma)，達到抑制 MCA-102 肉瘤細胞生長的效果。因此認為桑黃萃取液可當作免疫活性物質(biological response modifier, BRM)，應用成熟的樹狀細胞合併治療癌症，來提高其辨識與攻擊癌細胞的能力。

無論是其子實體萃取液或是菌絲體發酵液，近來的研究都發現了許多生理活性功能，它們分別可發展為免疫調節劑、自由基清除劑、生長促進劑、毛髮生長劑等，內容包羅萬象，可見這一類材料的應用空間極大，是很值得探討的。

2-2 選用菇類介紹與菌絲體培養方式

2-2-1 樟芝之介紹

樟芝（*Antrodia camphorate*）又稱牛樟芝、牛樟菇、樟菰等，只生長在台灣特有國寶級保育樹種-台灣牛樟樹上，為台灣特有真菌。其分類上屬於真菌界（Fungi）、擔子菌（Basidiomycota）、擔子菌亞門（Basidiomycotina）、同擔子菌綱（Homobasidiomycetes）、無摺菌目（Aphullophorales）、多孔菌科（Polyporaceae）、薄孔菌屬（Amtrodia）（黃，2000）。樟芝子實體屬多年生植物，於牛樟樹幹的中空內部長出，有強烈的黃樟香氣，外型為板狀或鐘狀且無柄，菇體表面孔狀，子實體之子實層表面鮮豔如鮭魚色，老熟後顏色漸淡轉為淡

橘色或黃色。

目前發現樟芝的機能性成分包括多醣體（polysaccharides）、三萜類（triterpenoids）、固醇酸（steroid acids）、固醇類（steroids）、倍半萜內酯（sesquiterpene lactone）等。多醣體以β-D-葡聚醣為主幹，被證實有抑制腫瘤的作用，三萜類則具有抗癌細胞生長、活化神經細胞等能力，為樟芝苦味的來源。

目前樟芝的有效成分與生理活性仍繼續被研究當中，有研究指出樟芝發酵液有改善四氯化碳誘發慢性肝炎的效果，以及抑制 dimethylnitrosamine 所引起的肝臟纖維化效果（郭，2002）。另有研究以固態栽培方式培養樟芝，其萃取物具有優於野生樟芝的抗氧化活性；抗乳癌、抗子宮頸癌、抗胃癌活性平均達 80%左右，也優於野生樟芝（陳等人，2001）。

2-2-2 靈芝之介紹

靈芝（*Ganoderma lucidum*）為中國醫學上珍貴的藥用真菌，在分類學上屬真菌界、無鞭毛菌門、擔子菌綱、無褶菌目、多孔菌科、靈芝屬，子實體具有光量表皮，擔孢子構造為卵形且具雙層細胞壁，內壁為黃褐色有疣狀突起，外壁較薄而透明，成熟的孢子頂端為截頭狀（詹，2003）。

表 2-1 靈芝之生理活性及其成分（Shiao, 2003）

Biological activity	Type of compound
Antitumor activities	Polysaccharides and triterpenoids
Hypoglycemic activity	Polysaccharides
Immunomodulation and stimulation	Polysaccharides of cytokine production
Immunomodulation	Protein (LZ-8)
Cytotoxicity to hepatoma cells	Triterpenoids
Hepato-protection	Triterpenoids
Inhibition of histamine release	Triterpenoids
Inhibition of cholesterol synthesis	Triterpenoids
Inhibition of protein farnesylation (Ras)	Triterpenoids
Stimulation of platelet aggregation	Triterpenoids
Inhibition of platelet aggregation	Adenosine/ Triterpenoids
Anti-HIV activity	Triterpenoids
Induction of apoptosis	Triterpenoids

台灣最早開發之藥用真菌應屬靈芝，中國藥典古籍更是將靈芝視為無毒沒有副作用之上品藥。近年科學研究及醫學臨床証明靈芝確有多種成分有益人體健康，包括多醣體、三萜類、核酸類、微量元素及其他有效成分，其中尤以多醣體更被確認為具有增強人體免疫功能及抗癌作用。另外靈芝尚有清血、解毒、益腎、保肝、整腸、強心、調壓、強壯、抗寒、消炎、止咳化痰、鎮痛、鎮靜等功能。

據研究靈芝多醣體之抗癌機制可能是由靈芝之多醣體刺激與活化巨噬細胞（macrophage）、T 細胞與自然殺戮細胞（NK cell），使其分泌 Cytokines，如

TNF-α、IFN-γ、IL-1β 等，增進人體免疫系統反應，以達到抗腫瘤的效果。

從靈芝提取出的三萜類如靈芝酸（ganoderic acid）據研究也有降低血糖、抗氧化、降低血壓、抗肝毒素等活性功能（Lindequist *et al*., 2005）。

2-2-3 朱紅栓菌之介紹

朱紅栓菌（*Pycnoporus cinnabarinus*）因其子實體為紅色或粉紅色，又稱朱砂菌或胭脂栓菌，為中國傳統醫學上藥用真菌的一種，在分類上屬真菌界、擔子菌、層菌綱、無褶菌目、多孔菌科、紅孔菌屬（Pycnoporus），其子實體有清熱、除濕、消炎、解毒、止血和抗癌作用。生長形態方面，子實體單生與群生皆有，菌蓋為半球型或扁平，初期為朱紅色，到後期則有褪色現象。

有研究顯示朱紅栓菌發酵液對大腸桿菌、李斯特菌有抑制生長的效果，且子實體熱水萃取物可對乳癌（MCF-7）、纖維肉瘤（HT-1018）細胞降低存活率分別達 60%與 70%左右（潘，2005）。周（2002）等人則以朱紅栓菌的多醣體做了免疫增強的研究，結果顯示對小鼠的免疫功能都有明顯的改善效果，它能增加小鼠免疫器官胸腺和脾臟的重量、促進 T 淋巴細胞的體外增殖與增強抗體生成的能力。

2-2-4 雞腿蘑之介紹

雞腿蘑（*Coprinus cinereus*）在分類學上屬真菌界、擔子菌、層菌綱、傘菌目、鬼傘科、鬼傘屬，生命週期短，成長為子實體後只會存活數天。鬼傘屬真菌有特殊的自溶現象，其原因為鬼傘屬菇類的菌摺類孢子不是同時成熟發散，而是由菌蓋邊緣往中央逐漸成熟，再加上圓錐型的菌蓋不利於孢子的發散，所以才會發展出如此獨特的模式。

鬼傘屬菇類多半無毒可食，其中的 *Coprinus comatus* 更被認定符合聯合國糧食組織與世界衛生組織所要求的集”天然、營養、保健”三種功能為一體的 16 種真稀食用菌之一。

研究指出雞腿菇具有益胃、降血糖、治療糖尿病等功效，其多醣能提高小鼠血清溶菌酶活性，故能提高和激活小鼠的非特選性免疫反應（李，2001）。王等人（2000）利用深層發酵方式獲得發酵液，並對四氧嘧啶誘發小白鼠糖尿病模型做了降血糖試驗；研究結果發現，其降血糖作用成效與顯效時間優於某些治療糖尿病的藥物，並證明其發酵液對於第 II 型糖尿病有顯著的療效。

2-2-5 菇類菌絲體的培養方法

根據統計，目前已知可食用之菇類約有 2,000 多種，其中 80 餘種可以人工化栽培，但只有 40 多種具有經濟價值，而已商業化栽培的約有 22 種。其中在子實體的栽種上，由於需消耗大量人力、栽培空間與設備，以及由接種到子實體

收成需長達數餘月的時間，因此在加強食藥用菇類的利用方面，另有液態深層發酵與固態發酵等方式以生產菇類菌絲體及其他有用之代謝產物及酵素。

1. 液態深層發酵

所謂的液態深層發酵，一般是指使用固定組成的液態培養基，在控制適當的 pH 值、溫度以及通氣和攪拌（或震盪）的條件下，進行微生物的發酵培養以製造生質（biomass）或其他代謝產物（metabolite）。

其最大特色在於發酵的過程中並無孢子萌發期（sporulation），所生產之菌絲體是以圓球狀物型式存在，懸浮於培養液中，稱菌絲球。這也使得培養液中的營養源及氧氣之傳送程度較一般低等真菌或酵素菌的液態培養來的更為複雜（黃，2001）。

2. 固態發酵

固態發酵即是使用固態基質當作營養來源，在低含水量的環境下進行微生物發酵與培養，並有利於酵素與二次代謝產物的生產（Robinson *et al*., 2001）。主要提供微生物生長過程所需的碳源、氮源與其他微量物質等，通常使用穀類物質或是農業廢棄物作為固態基質，依據菌株的特性不同，選擇適合的固態基質種類與前處理方式（如顆粒大小、蒸煮方法、含水量等）。

3. 固態發酵與深層發酵的不同點

（1） 固態發酵為微生物分布在表面上，基質不均勻且不易攪拌，容易使得細胞、養分、溫度和水含量分佈不規則，造成環境因素的控制較深層

發酵困難。

（2） 固態發酵水分需求較低，故少廢水產生。

（3） 深層發酵為液態培養基，固態發酵基質通常是天然物質，如穀類、大豆等，有時產物就是整個發酵基質。

（4） 細菌的生長受到低水活性的限制，因此固態發酵較不易受到污染

液態培養方式起源於二次世界大戰，把用來生產盤尼西林及其抗生素的發酵技術，應用於菌類的液態培養以生產菇類菌絲體，不受時間限制更可對生長條件加以控制；固態培養方式有時則可使微生物有更好的生長或以此生產更多之胞外酵素及二次代謝產物。本研究即以此兩種培養方式培養菇類菌絲體，探討其萃取物對 ACE 抑制活性之影響。

2-3 高血壓

根據統計在台灣四十歲以上的人當中，約有百分之二十的人會罹患高血壓，並因其初期症狀不明顯而容易被忽略，長期影響下容易產生中風、心肌梗塞、心臟衰竭、腦血管病變等併發症，為已開發中國家中盛行的慢性疾病。

2-3-1 高血壓的定義

根據世界衛生組織(World Health Organization , WHO)所公佈，高血壓的定義為正常成年人收縮壓(systolic blood pressure, SBP)高於或等於 140 mmHg 以及舒張壓(diastolic blood pressure, DBP)高於或等於 90 mmHg。

近來研究顯示，當血壓在正常值範圍內卻偏高 (120/ 80 mmHg 以上)的成年人，雖定義上未達高血壓標準，但日後演變成高血壓或有心血管疾病的危險性仍會增加。因此，美國國家高血壓委員會第七次會議報告中，將收縮壓 120 到 139 mmHg 以及舒張壓 80 到 89 mmHg 定義為高血壓前期 (prehypertension)(王，2010) 。

表 2-2 成年人高血壓的定義及分類標準（王，2010）

血壓分類	收縮壓 (SBP)	舒張壓 (DBP)
正常血壓 (Normal)	＜120 mmHg	＜80 mmHg
高血壓前期 (Prehypertension)	＜140 mmHg	＜90 mmHg
高血壓		
第一期	140-159 mmHg	90-99 mmHg
第二期	160-179 mmHg	100-109 mmHg
第三期	≧180 mmHg	≧110 mmHg

2-3-2 高血壓的種類

高血壓的類型大致可分為兩種：原發性高血壓(primary hypertension) 與續發性高血壓(secondary hypertension)。原發性高血壓又可稱為本態型高血壓(essential hypertension），超過 90%的患者屬於此類，目前尚未找出引發此疾病的特定原因，一般推測可能與生活習慣和遺傳有關，如家族性遺傳、鈉鹽攝取過量、運動量不足、飲酒過量、體重過重、心理壓力等(Yoshii *et al*., 2001；王，2010)。

續發性高血壓則是因為某種特定原因或疾病所引發，或是服用某種藥物，如腎臟疾病(腎動脈狹窄、腎囊腫、腎衰竭等)、內分泌分泌異常、主動脈狹窄、腫瘤、懷孕等因素。此種患者的高血壓是隨著疾病所產生的症狀，當其主要疾病消失，血壓即可恢復正常。

2-3-3 高血壓的預防及治療

研究顯示，收縮壓超過標準每增加 20 mmHg 或舒張壓每增加 10 mmHg，罹患心肌梗塞與中風的機率將增加兩倍（江，2010）。定期量測血壓為預防高血壓的首要方法，經由早期發現與適當的治療來降低發病率與死亡率。治療方法可分為藥物治療與非藥物治療。

1. 非藥物治療

非藥物治療是改變生活型態與習慣來達到預防與控制高血壓的目的，對象為輕度高血壓及老年性單純收縮性高血壓病患。

表 2-3 改變生活型態方式用以預防或控制高血壓（Silva *et al*., 2006）

Main Lifestyle Modifications
- Lose weight if overweight
- Limit alcohol in intake
- Increase aerobic physical activity
- Reduce sodium intake to no more than 100 mmol per day
- Maintain adequate intake of dietary calcium and magnesium for general health
- Stop smoking
- Reduce intake of dietary saturated fat and cholesterol for over cardiovascular health

2. 藥物治療

藥物治療使用對象為非輕度高血壓病患且屬於高危險群者，如有高血壓家族病史及心血管疾病者。非藥物治療大約可使血壓降 10 mmHg，最多不大於 20 mmHg，百分之九十的患者最終需要藥物治療（江，2010）。常見的高血壓藥物可分為五類（翁，2004）：

（1） 利尿劑（diuretics）：作用原理為刺激腎臟增加排尿量，使血液中鈉、鉀離子及水分加速排出。劑量需做適時的調整，否則易造成低血鈉、低血鉀、高血糖、膽固醇升高等副作用。

（2） 交感神經抑制劑： 作用原理為降低心臟 β-腎上腺素接收器活性，使得心肌收縮減弱，降低心臟排血量；也抑制腎素分泌，使血管收縮素 II 生成量減少。

（3） 鈣離子拮抗劑（calcium channel blockers）：為抑制鈣離子進入血管平滑肌與心肌細胞內，使平滑肌鬆弛降低血管阻力。可能造成下肢水腫、心悸、便秘等副作用。

（4） 血管收縮素轉化酶抑制劑（angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI）：ACEI 可抑制血管收縮素轉化酶（ACE）將血管收縮素 I 轉變為血管收縮素 II，並抑制其分解緩激素（bradykinin），進而減少血管週邊壓力達到降血壓的效果。少數病人使用後會有咳嗽、暈眩、皮膚起紅疹、味覺改變等副作用。

（5） 血管收縮素受器拮抗劑（angiotensin II receptor blocker, ARBs）：ARBs 主要對血管收縮素 II 之 AT_1 受體產生競爭性拮抗作用，進而阻斷血管收縮素 II 所誘發的生理活性作用，如血管收縮、醛固酮的分泌、交感神經活性增加等。副作用為頭暈、鼻塞等。

2-4 血管收縮素轉化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)

2-4-1 簡介

Angiotensin converting enzyme (ACE；peptidyl-dipeptidase A；EC 3.4.15.1)於 1950 年代中期由 Skeggs 等人所發現，其分子量為 140-160 kDa，為一種鋅金屬蛋白酵素(zinc metallopeptidase)，並藉由氯離子來使之活化(Li *et al*., 2004)。其廣泛的存在於各種器官與組織中，其中以肺的含量最多，其他如血管內皮組織、胰臟、腎臟、腸道的上皮組織及體液（血液、尿液、淋巴）等。

2-4-2 腎素-血管收縮素-醛固酮系統（Renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS）

RAAS 是體內調節血壓的重要系統之一，當血壓降低或血量減少時，腎臟中的近腎絲球細胞（juxtaglomerular cell）會分泌腎素（renin），其作用是將肝臟所產生的血管收縮素原（angiotensinogen）轉變為不具活性且由十個胺基酸組成的血管收縮素 I（angiotensin I），隨後再藉由 ACE 的作用，將原本血管收縮素 I 中 C 末端的 His-Leu 切斷，使其轉變為血管收縮素 II（angiotensin II）。血管收縮素 II 會使血管收縮並刺激腎上腺皮質內醛固酮（aldosterone）的合成與釋放，促進遠端小管中鈉離子與水的滯留，造成血壓上升。ACE 也會作用於緩激素（bradykinin）上，將其 C 末端上的 Phe-Arg 切斷，使之失活（Silva *et al*., 2006）。

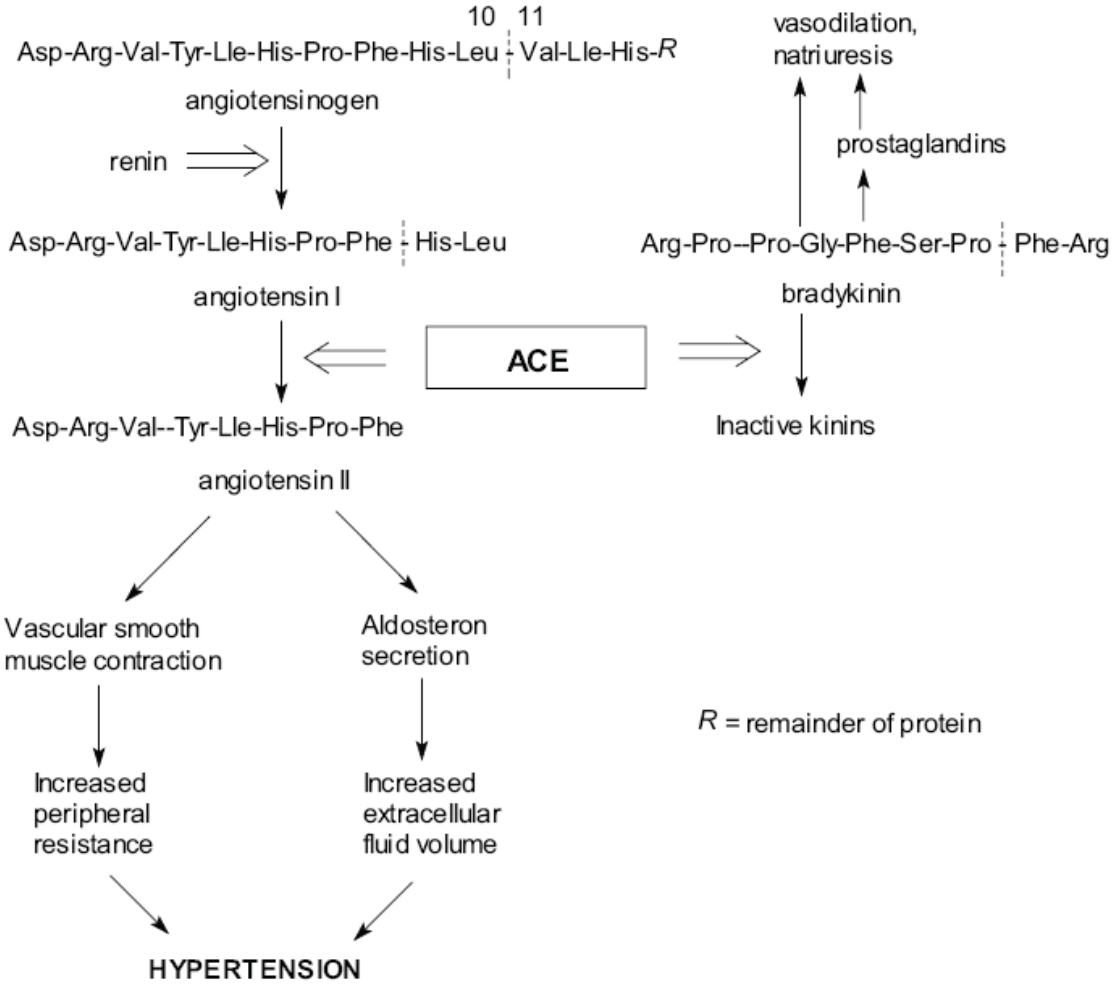


圖 2-1 腎素-血管收縮素-醛固酮系統中血管收縮素轉化酶之催化反應（Silva *et al*., 2006）

2-5 血管收縮素轉化酶抑制劑（Angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI）

2-5-1 ACE 的抑制原理

ACE 經由遺傳工程的研究發現，它擁有兩個具有活性的作用位置，分別名為 N-domain 與 C-domain，這兩個活性區域具有幾個相同的功能特性，只是對不同受質的親和力有所差異（Corvol *et al.*, 1995）。所謂的 ACEI 就是與酵素的活性區親和力較強的競爭性物質，且其對 ACE 的親和度比血管收縮素 I 和緩激素強，也不易自與 ACE 的結合區釋放，因此可有效的產生抑制作用。具有 ACE 抑制效果的成分主要是食物中的蛋白質經過酵素分解後所產生的短鏈胜肽，其鏈長多半在 2-14 個胺基酸。Cheung 等於 1980 年對這類胜肽的特性做了系統性的歸納，得到以幾個重點：

1. ACE 抑制胜肽的羧端（C-terminal）胺基酸是此抑制物與 ACE 活性作用部位（active site）結合的關鍵。具有抑制 ACE 的胜肽其末端的胺基酸皆為芳香族的胺基酸（aromatic amino acid）或亞胺酸類（imino acid）的 proline。
2. 氮端（N-terminal）最具活性的是具有分岔支鏈的疏水性胺基酸。相反地，如 N-terminal 為 proline，則反而會使活性降低。

2-5-2 抑制劑的種類

ACEI 自從毒蛇血清中發現後，許多研究開始於 ACEI 的合成與製備。ACEI 除了可經由人工合成製成藥物外，近年來積極從天然食材中獲取 ACEI，其作用效果溫和，較不會有副作用。以下就這二種類型做說明：

1. 藥物

ACEI 自 1977 年 captopril（Capoten®）被發展出來後，至今已有二十年的歷史，而陸續研發出的 ACEI 也有十多種，除了可應用於高血壓的治療外，近來也被證實可應用於鬱血性心衰竭（congestive heart failure, CHF）與急性心肌梗塞（Post-myocardial infarction, Post-MI）後，降低死亡率，將藥物依藥物動力學性質可分為以下幾類（廖，1998）：

（1） Captopril-like：藥物本身即具有活性在體內由肝臟代謝，此型代表藥物為 Captopril，原型藥物與代謝物皆經由腎臟排出，為最早被發展出的 ACEI 用藥。

（2） 先驅藥（prodrug）：這類的藥物由於在腸胃道上吸收不佳，而作成較易吸收的酯化型態，市面上的 ACE 抑制劑多屬此類，代表藥物為 Enalapril。此類藥物必須藉由肝臟去酯化轉為活性代謝物後才有作用，代謝物再由腎臟排出（Guthrie, 1993）。

（3） 水溶性 ACEI：藥物本身有活性，沒有進一步的代謝過程。大部分由腎小球過濾排出，不吸收部分由糞便排出，代表藥物為 Lisinopril（Arzubiaga,

1992）。

4. 天然食物

一般認為，合成藥物會對人體產生不良的影響，如咳嗽、味覺改變、皮膚紅疹等，因此近來嘗試於動、植物等天然食物中取得 ACEI（Choi *et al*., 2000）。

（1） 動物來源

a. 卵白蛋白：雞蛋蛋白中約含有 10.5%的蛋白質，為典型的球狀蛋白質，且多數為醣蛋白（glycoportein），這些蛋白質包括卵白蛋白（ovalbumin）、卵運鐵蛋白（conalbumin）、卵類黏蛋白（ovomucoid）等，其中卵白蛋白經胰凝乳蛋白酶或胃蛋白酶作用後具有強化免疫功能、抑制血管收縮素轉化酶活性、低過敏性、良好消化性等作用（蔡，2008）。

b. 酪蛋白（casein）：Bellamy 等人（1993）將 trypsin 水解酪蛋白之水解物，提供給正常血壓及輕度高血壓自願者每日服用 10 g/ 2 次，持續服用 4 周，顯示可降低血壓 4.4 及 6.6mmHg，不會改變高血壓患者的心跳速率。

c. 牛血漿蛋白：將牛血漿（bovine plasma）分別以 20%及 60%的乙醇沉澱處理後得球蛋白（globulin）與白蛋白（albumin），再以各種蛋白酶水解，其中以 alcalase 水解白蛋白的抑制 ACE 效果最好（IC_{50} = 0.56 mg/ml）。再經由超過濾膜過濾其水解物（MW cut-off 10000, 3000, 1000），IC_{50} 值升至 0.12 mg/ml（Hyun and Shin, 2000）。

d. 魚肉蛋白：將沙丁魚肉以胃蛋白酶水解作用 20 小時後，以胃部插管方式

餵食原發性高血壓大鼠（spontaneously hypertensive rats, SHR），在餵食 3 小時後血壓下降效果最為明顯（Ukeda *et al*., 1992）。Astawan 等人（1995）分別添加 15%及 25%的 NaCl 浸漬鮪魚，製成鹹魚乾，經過 pepsin 水解後發現，添加 25% 的 NaCl 其 ACE 抑制效果較好。另外，儲存 3 個月後的鮪魚其抑制活性也比儲存 6 個月的佳。

e. 雞肉蛋白：雞肉之蛋白質利用嗜熱菌蛋白酶及胃蛋白酶水解時，對 ACE 有較高的抑制效果，其 IC_{50} 值分別為 45.0 及 45.3 μg/ml，在動物實驗方面，靜脈注射比短期或長期餵食 SHR 具有較明顯的降血壓效果（Fujita *et al*., 2000）。

（2） 植物來源

a. 藻類：裙帶菜(wakame)內含 15%的蛋白質，在亞洲地區為非常普遍的食物，其熱水萃取物具有 ACE 抑制活性與抗高血壓的效果，並將分離純化後的胜肽(Tyr-His, Phe-Tyr or Ile-Tyr)化學合成後，以 10 mg/day/kg 的劑量經胃部插管餵食 SHR，其 SPB 約下降 40~ 45 mmHg，DPBm 下降約 20~ 30 mmHg (Suetsuna *et al.*, 2004)。

b. 大豆蛋白：將大豆蛋白以 5 種不同蛋白質酶（alcalase、flavourzyme、trypsin、chymotrypsin、pepsin）水解後，以 alcalase 的 ACE 抑制效果最佳，再以 10 kDa 過濾膜過濾水解液，其 IC_{50} 可由 0.688 下降至 0.078 mg protein/ml（Chiang *et al.*, 2005）。

c. 菇蕈類：Choi 等人(2000)從 10 種不同菇類子實體萃取物中，篩選出有較佳 ACE 抑制活性者，其中以 *Grifola frondosa* (舞菇)之冷水萃取物效果最佳（58.7%），IC_{50} 值達 0.95 mg/ml。Liu 等人(2007)比較野生樟芝與固態發酵樟芝的 ACE 抑制活性，發現固態發酵樟芝的甲純萃取物抑制活性較高（IC_{50}= 0.175 mg/ml），餵食 SHR 後的血壓下降效果也較佳，故可作為日後發展保健食品的另一方向。

d. 玉米醇溶蛋白（α-zein）：其為玉米胚乳中主要成分，以 thermolysin 水解得到 14 種 ACEI，當以 Leu-Arg-Pro（其 IC_{50} 為 0.27 μM）注射 SHR 時，血壓可降 15 mmHg（Miyoshi *et al.*, 1991）。

第三章 實驗材料與分析方法

3-1 實驗菌株

本研究菌株分別為 *Pycnoporus cinnabarinus* BCRC36234、*Antrodia camphorate* BCRC35396、*Ganoderma lucidum* BCRC36123、*Coprinus cinereus* BCRC36099，皆購自食品工業發展研究所生物資源保存研究中心。

3-2 實驗藥品

藥品名稱	來源
Glucose	華興化學
Corn starch	日正
Yeast extract	Difco
Potato dextrose agar	Difco
Peptone	Difco
Malt extract	MERCK
Sucrose	SHOWA
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	SHOWA
Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)	SHOWA
Sodium hydroxide (NaOH)	SHOWA

Maguesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	聯工化學
Angiotensin converting enzyme (ACE, from rabbit lung)	Sigma
Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL)	Sigma
Hippruic acid (HA)	Sigma
Trifluoroacetic acid (TFA)	Sigma
Sodium tetraborate	Sigma
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma
β-mercaptoethanol	Sigma
Papain	嘉年生化
Bromelain	嘉年生化
O-phthaldehyde (OPA)	東京化成工業
洋薏仁（pearl barley）	茂喜食品
蕎麥仁（buckwheat）	茂喜食品
燕麥粒（oat）	茂喜食品

3-3 實驗儀器與設備

儀器設備	型號	廠牌
pH meter	Cyberscan pH510	美國 EUTHCH
分光光度計	GENESYS UV10	美國 Thermo
超純水製造機	Simplicity	美國 Millipore
高效液相層析儀	HP1100	美國 Agilent
電磁加熱攪拌機	C-MAG HS7	德國 IKA
高壓滅菌釜	HI-340	台灣宏霖
無菌操作台	JW-4N	台灣亮盛
試管震盪機	MSI minishaker	德國 IKA
迴轉式震盪培養箱	LUS-150	台灣亮盛
往復式震盪恆溫水槽	OSI-500	台灣健鑫
冷凍乾燥機	CT-110	丹麥 HETO
高真空油壓式幫浦	PASCAL 2010 C1	法國 ALCATEL
高速離心機	Universal-32R	德國 Hettich
微量離心機	MCD-2000	德國 Hettich
細胞均質機	PT-MR2100	瑞士 KINEMATICA
層析管柱	Luna C18	美國 Phenomenex

3-4 培養基組成

3-4-1 斜面與平面培養基

朱紅栓菌、靈芝、雞腿蘑：Potato Dextrose Agar（PDA）3.9 %

樟芝：Malt extract 2 %、Glucose 2 %、Peptone 2 %、Agar 2 %

3-4-2 液態培養基

表 3-1 雞腿蘑種菌與液態培養基組成（陳，2006）

藥品名稱	組成比例
Glucose	2 %
Yeast extract	0.3 %
$NH_4H_2PO_4$	0.134 %
K_2HPO_4	0.05 %
KH_2PO_4	0.05 %
$MgSO_4$	0.05 %

培養條件：25℃、pH 7、100 rpm

表 3-2 朱紅栓菌種菌液態培養基組成（Ohtakara *et al*, 1986）

藥品名稱	組成比例
Sucrose	4 %
Peptone	2 %
Yeast extract	1 %
KH_2PO_4	0.5 %
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05 %

培養條件：30℃、pH 5.5、100 rpm

表 3-3 朱紅栓菌液態培養基組成（Ohtakara *et al*, 1986）

藥品名稱	組成比例
Glucose	2 %
Peptone	3 %
Yeast extract	0.5 %
$(NH_4)_2SO_4$	1 %
KH_2PO_4	0.5 %
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05 %

培養條件：30℃、pH 5.5、100 rpm

表 3-4 靈芝液態培養基組成（楊，2006）

藥品名稱	組成比例
Glucose	20.0 %
Yeast extract	3.0 %
KH_2PO_4	1.0 %
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 %

培養條件：30℃、pH 4、100 rpm

表 3-5 樟芝種菌液態培養基組成（黃，2001）

藥品名稱	組成比例
Glucose	2 %
Malt extract	2 %
Peptone	0.1 %

培養條件：25℃、pH 5、100 rpm

表 3-6 樟芝液態培養基組成（黃，2001）

藥品名稱	組成比例
Corn starch	4.78 %
YM Broth	3.19 %

培養條件：25℃、pH 5.54、100 rpm

3-5 分析方法

3-5-1 pH 的測定

使用 SUNTEX pH meter 測定。

3-5-2 菌體濃度

將液態發酵後之菌絲體以抽氣過濾裝置過濾去除發酵液，並將過濾後的菌絲體和已知重量的濾紙一同置於 60℃烘箱內烘乾，烘乾後測量其重量。

3-5-3 還原糖量測定

取 1 ml 以去離子水定倍數稀釋的上清液加入 1 ml 之 DNS 試劑，於 100℃下反應 10 分鐘，反應結束後待其冷卻至室溫，並於波長 540 nm 測量其吸收值。還原糖標準品為 N-乙醯葡萄糖胺。

DNS 試劑：

3, 5-Dinitrosalicyclic acid	10 g/L
Potassium sodium tartrate	300 g/L
NaOH	16 g/L

3-5-4 幾丁質酵素活性測定

取 1 ml 之上清液加入 1 ml 之膠態幾丁質緩衝液（1 %膠態幾丁質溶於 0.1 M

醋酸鈉中，pH 4.5），於 40℃、120 rpm 下反應 30 分鐘，之後以 9000 rpm 離心 5 分鐘並吸取 1 ml 之上清液加入 1 ml 的 DNS 試劑，於 100℃下反應 10 分鐘，反應結束後待其冷卻至室溫。於波長 540 nm 下測其吸收值，以計算出反應前後還原糖變化量。定義於 40℃下，每分鐘可產生 1 μmole 還原糖之酵素量為一酵素活性單位（U）。

3-5-5 胜肽含量測定（Church *et al*., 1983）

以 *o* -Phthaldialehyde 溶液測定樣品中的胜肽含量。取 50 μl 的樣品溶液於石英管中，並加入 2 ml 的 OPA 溶液，充分混合均勻後，靜置 2 分鐘，再以分光光度計測其於波長 340 nm 下的吸收值。

OPA 溶液的製備：

100 mM Sodium tetraborate	25 ml
20 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)	2.5 ml
OPA (40 mg 的 OPA 溶於 1 ml 的甲醇)	1 ml
β-mercaptoethanol	100 μl

將上述藥品混合均勻並加水定量至 50 ml

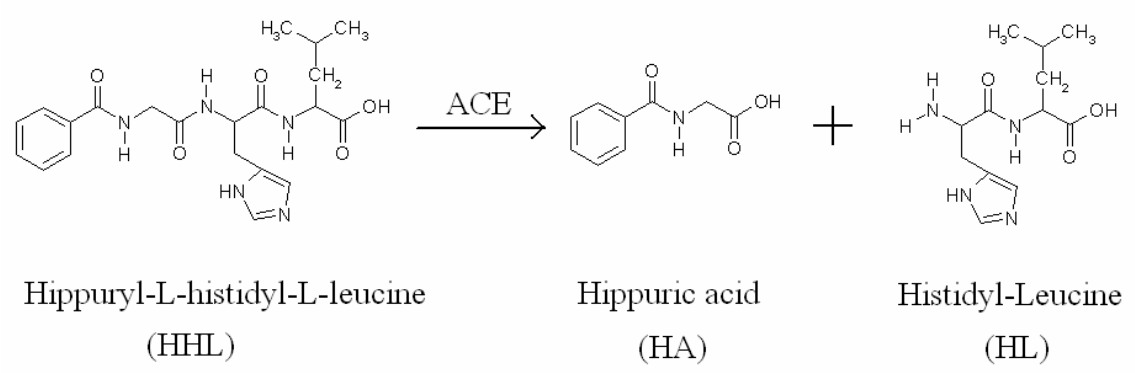
3-5-6 血管收縮素轉化酶抑制活性測定

本實驗採用高效能液相層析儀 (High performance liquid chromatography,

HPLC)測定血管收縮素轉化酶（ACE）抑制劑之活性。

（1） 測定原理

根據 Cushman and Cheung (1971) 的測定方法以 HHL (Hippuryl-L-histidyl-L-leucine)作為 ACE 的受質，二者作用後會產生馬尿酸（Hippuric acid）與雙胜肽（HL），此刻若有 ACE 抑制劑存在，則將會與受質同時競爭酵素 ACE 之活性部位位置，因此 HA 與 HL 二者的生成量均會減少。藉此利用 HPLC 測定於波長 228 nm 下，ACE 抑制劑添加前後的 HA 於單位時間內生成量變化，以分析 ACE 抑制劑之活性。



（2） 測定方法

將 ACE 溶於 0.1M 的硼酸鈉（$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$）緩衝溶液中(pH 8.3，內含有 0.4 M 的 NaCl)，濃度為 60 mU/ml。將 HHL 溶於相同緩衝液中，濃度為 5 mM，二者皆置於 4℃下冷藏保存。

取 90 μl 的 HHL 溶液與 10 μl 的樣品均勻混合後，將其置於 37℃恆溫水

浴下預熱 5 分鐘，之後再加入 30 μl 的 ACE 溶液，亦在 37℃水浴下反應 30 分鐘。反應結束添加 130 μl 濃度為 0.1 %的 TFA（Trifluoroacetic acid）溶液終止 ACE 反應。

Percent activity of inhibition（%）=（A－B）/ A × 100%

A = 未加樣品之 HA 波峰高度

B = 添加樣品之 HA 波峰高度

（3） 高效能液相層析之分析條件

HPLC 分離條件使用 Wu and Ding（2002）之分析條件。實驗使用之分離管柱為 Luna C18 (5 μm，4×250 mm)；移動相為甲醇：水＝1：1 (v/v，包含 0.1% 的 TFA)；流速：0.8 ml/min；偵測波長：228 nm；樣品注射量：20 μl

3-6 實驗方法

3-6-1 菌種培養與保存

3-6-1-1 菌種斜面試管保存

將培養基充分攪拌加熱，使其完全溶解，再取適量倒入玻璃試管中，於121℃、1.2 kg/cm^{2}條件下，以滅菌釜滅菌 20 分鐘。滅菌完成後，傾斜放置於無菌操作台內待其冷卻凝固，完成斜面培養基之製備。取一白金鉤並以酒精燈燒至通紅三次後，將自生物資源保存及研究中心所購得之菌株，鉤取一小塊置於空白的斜面培養基上，標示清楚日期與菌種名稱後放入 25℃培養箱下培養，待菌絲長滿斜面後取出，並保存於 4℃冰箱內完成菌種保存步驟。

3-6-1-2 菌種平面培養皿培養與活化

將培養基充分攪拌加熱，使其完全溶解，於 121℃、1.2 kg/cm^{2}條件下，以滅菌釜滅菌 20 分鐘，滅菌完成後置於無菌操作台內，趁熱時取適量倒入培養皿中待其冷卻凝固，完成平面培養基之製備。取一白金鉤並以酒精燈燒至通紅三次後，將斜面試管中所生長之菌絲，鉤取一小塊置於空白的平面培養基中央，標示清楚日期與菌種名稱後放入 25℃的迴轉式恆溫培養箱下活化培養。

3-6-1-3 種菌的製備

本實驗分別以表 3-1、2、4、5 為液態種菌培養基。將 250 ml 的三角錐形瓶

內加入 100 ml 的液態培養基，於 121℃、1.2 kg/cm^2 條件下，以滅菌釜滅菌 20 分鐘，並將滅菌完成之液態培養基置於無菌操作台內冷卻。待其冷卻至室溫後，取一長滿菌絲之平面培養皿，以鋁製切割器切取 4 個單位的菌絲塊（每塊面積為 0.5 cm × 0.5 cm），並將菌絲塊接入其中，標示清楚日期與菌種名稱後放入迴轉式恆溫培養箱，於各個培養條件下培養，完成種菌的製備。

3-6-2 三角瓶液態培養

本實驗以表 3-1、3、4、6 為液態培養基。將 250 ml 的三角錐形瓶內加入 100 ml 的液態培養基，於 121℃、1.2 kg/cm^2 條件下，以滅菌釜滅菌 20 分鐘，並將滅菌完成之液態培養基置於無菌操作台內冷卻。待其冷卻至室溫後，將培養 7 天後的種菌，以滅菌過後的高速均質機（11000 rpm）打碎菌絲，取 5 %（樟芝 10 %）的接菌量接入裝有 100 ml 液態培養基的三角錐形瓶中，標示清楚日期與菌種名稱後放入迴轉式恆溫培養箱，於各個培養條件下培養。

3-6-3 固態培養

本實驗分別以薏仁（pearl barley）、燕麥（oat）、蕎麥（buckwheat）為固態培養基基質。取 14 g 的固態培養基質加入等量的水，於 121℃、1.2 kg/cm^2 條件下，以滅菌釜滅菌 20 分鐘，滅菌後置於無菌操作台內冷卻。待其冷卻至室溫後，將培養 7 天後的種菌，以滅菌過後的高速均質機（11000 rpm）打碎菌絲，

取 5 %（樟芝 10 %）的接菌量接入裝有固態培養基的三角錐形瓶中，標示清楚日期與菌種名稱後放入迴轉式恆溫培養箱，於各個培養條件下培養。

3-6-4 膠態幾丁質的製備

取 20 g 的 Chitin powder 加入 200 ml 的 12N HCl，以隔水加熱的方式於 40 ℃下攪拌 20 分鐘。將溶液倒入 5 L 純水中，攪拌後置於 4℃冰箱中靜置至隔天。將溶液之上清液倒出留下沉澱物後，加入 5 L 純水並攪拌，再放入冰箱中靜置 6 小時，重複此步驟 2-3 次後，將 pH 調整為 7。以 3000 rpm 離心 5 分鐘後收集沉澱物，並計算膠態幾丁質之濃度，滅菌後置於 4℃下保存。

3-6-5 液態發酵菌絲體溶劑萃取物之製備

將液態發酵菌絲體以 100 mesh 的篩網過濾取出並用去離子水清洗 2 至 3 次，將水分瀝乾後裝入 50 ml 之樣品瓶中，置於 -20℃下冷凍後以冷凍乾燥機進行乾燥處理。

取 1 g 的冷凍乾燥後的菌絲體分別加入 100 ml 的去離子水、甲醇、乙醇溶劑進行萃取。熱水萃取為於 100℃下反應 150 分鐘；冷水、甲醇、乙醇萃取為於 30℃、120 rpm 震盪萃取 15 小時。萃取結束後，以 9000 rpm 離心 10 分鐘，取 1 ml 上清液進行冷凍乾燥後再以 1 ml 的水回溶備用。

3-6-6 固態發酵菌絲體溶劑萃取物之製備

將以固態發酵培養菌體連同培養基質一同取出，置於 50℃烘箱內，烘乾後磨成粉備用。

取 1 g 的樣品加入 10 ml 的水、甲醇與乙醇溶劑，於 30℃、120 rpm 震盪萃取 24 小時。萃取結束後，以 6000 rpm 離心 10 分鐘，取 1 ml 的上清液濃縮至乾燥製成菌絲體萃取物，再以 1 ml 的水回溶備用。

3-6-7 朱紅栓菌自體溶解試驗

（1）不同 pH 值

將朱紅栓菌液態發酵培養 6 天的菌絲體以 100 mesh 的篩網過濾取出，加入 100 ml 其 pH 分別為 3、4、5、6 的去離水中，再以滅菌過後的高速均質機（11000 rpm）打碎菌絲，放入 40℃的恆溫水槽，震盪速率為 100 rpm，進行反應 24 小時。反應結束後以 9000 rpm 離心 10 分鐘，取其上清液保存備用。

（2）不同溫度

將朱紅栓菌液態發酵培養 6 天的菌絲體以 100 mesh 的篩網過濾取出，加入 100 ml 、pH 為 3 與 4 的去離子水中，再以滅菌過後的高速均質機（11000 rpm）打碎菌絲，放入 40℃、50℃、60℃的恆溫水槽，震盪速率為 100 rpm，進行反應 24 小時。反應結束後以 9000 rpm 離心 10 分鐘，取其上清液保存備用。

3-6-8 朱紅栓菌酵素萃取物之製備

將朱紅栓菌液態發酵菌絲體以 100 mesh 的篩網過濾取出，用去離子水清洗 2 至 3 次，將水分瀝乾後裝入 50 ml 之樣品瓶中，置於 -20℃下冷凍後以冷凍乾燥機進行乾燥處理。

取 1 g 的冷凍乾燥後的菌絲體加入 100 ml 的去離子水，再加入 1%的酵素，以 0.1 N HCl 及 0.1N NaOH 調整至各酵素所需之 pH，並於各個反應溫度下，於第 0、1、2、4、6 小時取樣。取樣後以沸水作用 10 分鐘使酵素失活，再以 9000 rpm 離心 10 分鐘，取其上清液保存備用。

表 3-7 各酵素反應溫度及 pH

酵素	pH	溫度
Papain	6.2	50
Bromelain	6.0	45
Alcalase	7.5	55

第四章 結果與討論

4-1 液態發酵菌絲體溶劑萃取物對 ACE 抑制活性之影響

本實驗選用了四種食藥用菇類的液態發酵菌絲體，以冷水、熱水、甲醇及乙醇萃取以作 ACE 抑制活性測定，分別為朱紅栓菌、靈芝、樟芝與雞腿蘑。

由圖 4-1 可知，朱紅栓菌以冷水萃取物有最高之 ACE 抑制活性為 69.4%，其次為熱水、乙醇與甲醇萃取物，並且其抑制活性隨著胜肽含量的增加而增加，推測其有效成分可能為胜肽。在靈芝（圖 4-2）、樟芝（圖 4-3）與雞腿蘑（圖 4-4）的部分，以冷水為溶劑的菌絲體萃取物，其 ACE 抑制活性最高，分別為 57.2%、26.8%與 15.2%；而熱水與甲醇萃取物的 ACE 抑制活性明顯低很多，皆在 5%以下，顯示萃取物當中的 ACE 抑制劑含量非常稀少，其中靈芝與樟芝其抑制活性並不隨著胜肽含量而有所變動，因此可推測其有效成分並不完全為胜肽，可能尚有文獻所示之三萜類所影響。

文獻指出靈芝子實體之乙醇萃取物中有抑制 ACE 活性成分存在。Morigiwa 等人從靈芝子實體中提取出 10 種三萜類，發現靈芝酸（ganoderic acid）有 ACE 抑制活性。本實驗利用液態發酵的方式生產食藥用菇類菌絲體，相較於人工栽培的菇類子實體，不僅可節省人力與空間，更可以縮短栽培與收成時間，達到降低成本的目的，且從實驗結果可知，朱紅栓菌菌絲體的 ACE 抑制活性較靈芝高，可作為日後發展保健食品的另一項新選擇。

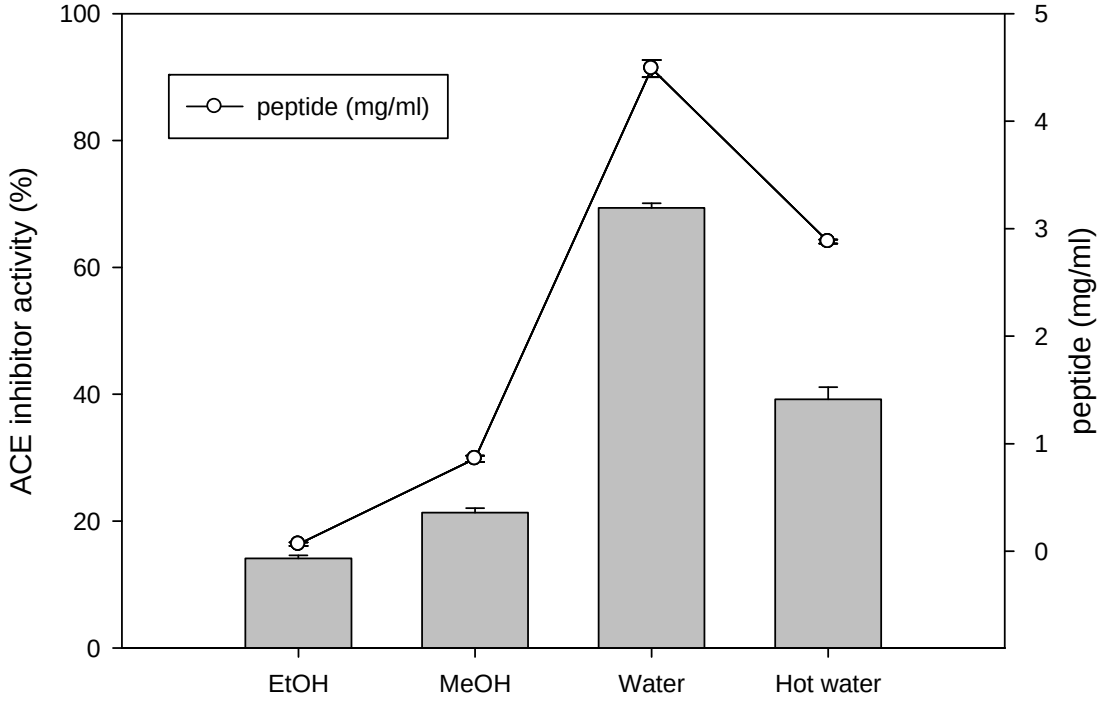


圖 4-1 不同朱紅栓菌液態發酵菌絲體萃取物對ACE抑制活性與胜肽含量的影響

培養條件：

（1） 液態培養基：Glucose (2.0%)、Peptone (3.0%)、Yeast extract (0.5%)、$(NH_4)_2SO_4$ (1.0%)、KH_2PO_4 (0.5%)、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.05%)

（2） 接菌量為 5%

（3） 培養溫度 30℃，初始 pH 5.5，培養 7 天

樣品為取 1 ml 之萃取液經冷凍乾燥後再以 1 ml 的水回溶之萃取物溶液

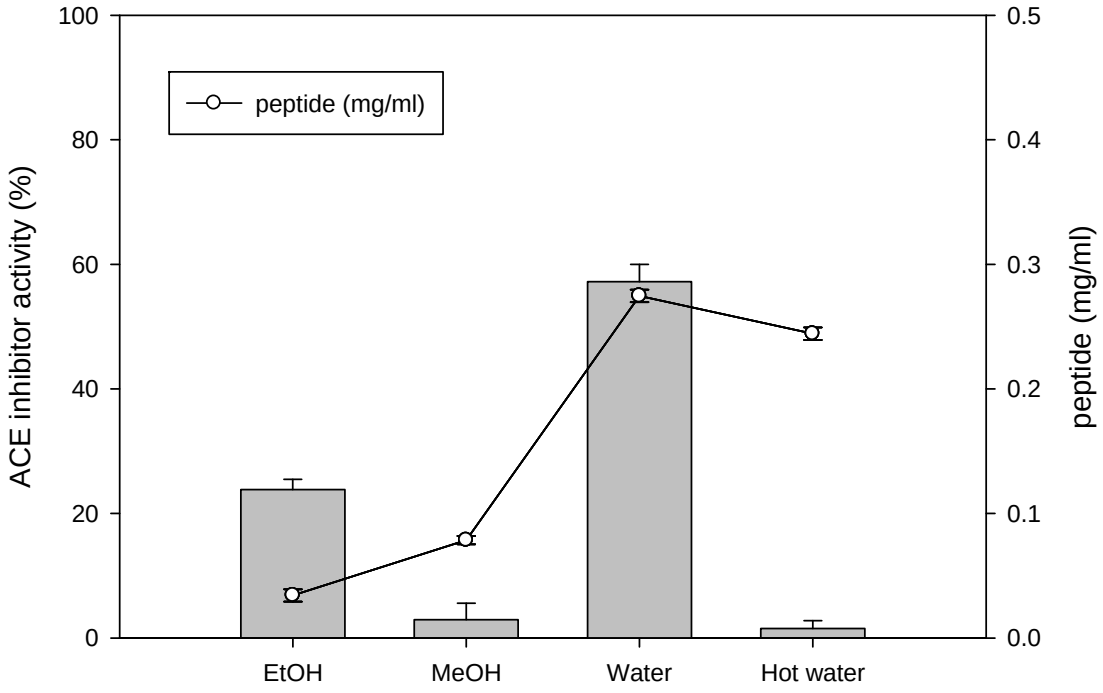


圖 4-2 不同靈芝液態發酵菌絲體萃取物對 ACE 抑制活性與胜肽含量的影響

培養條件：

（1） 液態培養基：Glucose (20%)、Yeast extract (3.0%)、KH_2PO_4 (1.0%)、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5%)

（2） 接菌量為 5%

（3） 培養溫度 30℃，初始 pH 4，培養 7 天

樣品為取 1 ml 之萃取液經冷凍乾燥後再以 1 ml 的水回溶之萃取物溶液

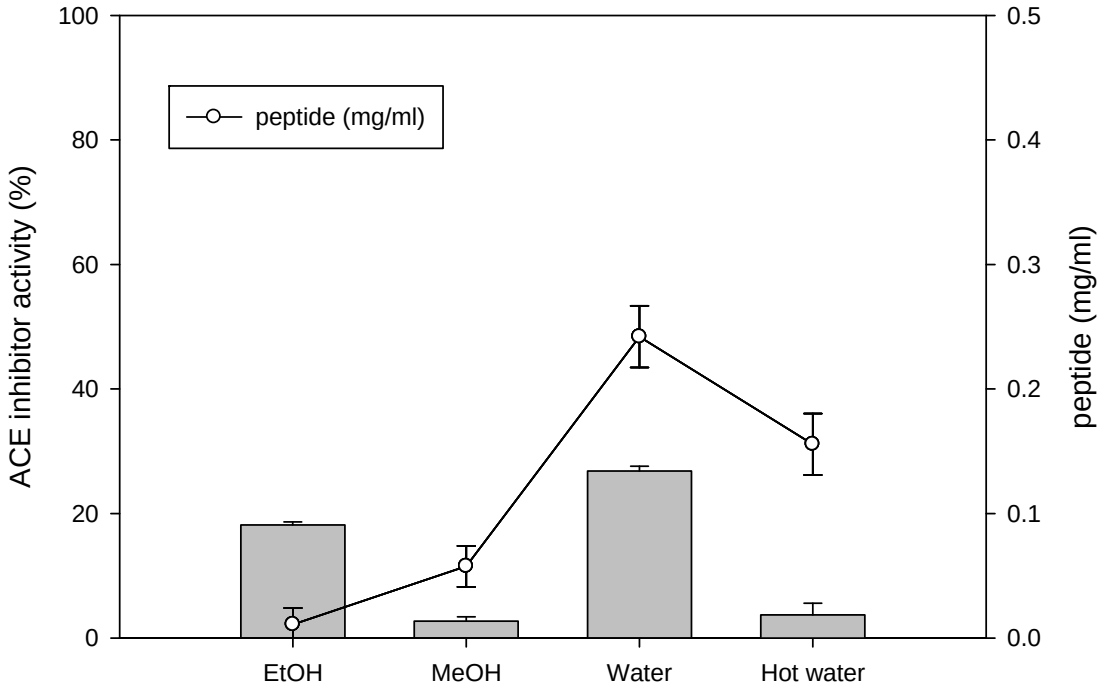


圖 4-3 不同樟芝液態發酵菌絲體萃取物對 ACE 抑制活性與胜肽含量的影響

培養條件：

（1） 液態培養基：Corn starch (4.78%)、YM Broth (3.19%)

（2） 接菌量為 10%

（3） 培養溫度 25℃，初始 pH 5.54，培養 28 天

樣品為取 1 ml 之萃取液經冷凍乾燥後再以 1 ml 的水回溶之萃取物溶液

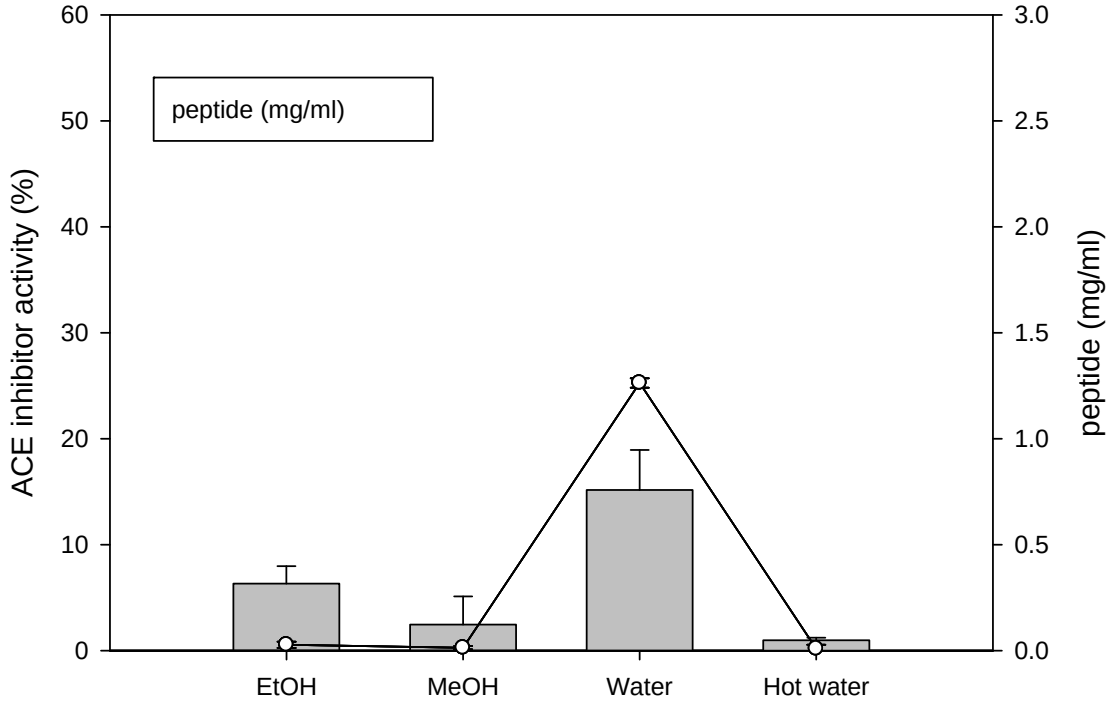


圖 4-4 不同雞腿蘑液態發酵菌絲體萃取物對 ACE 抑制活性與胜肽含量的影響

培養條件：

（1） 液態培養基：Glucose (2%)、Yeast extract (0.3%)、$NH_4H_2PO_4$ (0.134%)、K_2HPO_4 (0.05%)、KH_2PO_4 (0.05%)、$MgSO_4$(0.05%)

（2） 接菌量為 5%

（3） 培養溫度 25℃，初始 pH 7，培養 7 天

樣品為取 1 ml 之萃取液經冷凍乾燥後再以 1 ml 的水回溶之萃取物溶液

4-1-1 不同濃度之冷水萃取物對 ACE 抑制活性之影響

由 4-1 實驗結果得知，朱紅栓菌、靈芝、樟芝與雞腿蘑皆以冷水萃取物有較高的 ACE 抑制活性後，將其比較不同濃度之冷水萃取物對 ACE 抑制活性之影響。由圖 4-5 可知，朱紅栓菌在濃度 0.84 至 7 mg/ml 時抑制活性急速上升達 76.4%，10.5 mg/ml 後抑制活性趨於平緩，可達 80%以上，其 IC_{50} 為 2.54 mg/ml。靈芝則是在濃度 12 mg/ml 以上時，ACE 抑制活性才會趨於平緩，約達 75%，其 IC_{50} 為 4.13 mg/ml。樟芝在濃度為 3 至 15 mg/ml 時其抑制活性呈線性關係，最高達 66.6%，其 IC_{50} 為 9.28 mg/ml。雞腿蘑則在濃度為 4.8 至 16 mg/ml 時，抑制活性呈線性關係，最高達 54.4%，其 IC_{50} 為 13.5 mg/ml。

Lee 等人（2004）選用了數種食用菇類子實體，分別以甲醇、乙醇和冷水萃取，製成 ACE 抑制劑，其皆以冷水萃取物抑制活性較高，包含：金福菇（*Tricholoma giganteum*）：61.3%；金針菇（*Flammulin velutipes*）：32.9.0%；洋菇（*Agaricus bisporus*）：27.3%；伏苓（*Poria cocos*）：34.0%，以金福菇的 ACE 抑制劑活性最高（IC_{50}：0.47 mg）。以上 ACE 抑制活性分析方法為：以 HHL 為受質加入 ACE 與 ACE 抑制劑反應後，以乙酸乙脂震盪萃取 HA，再取其上清液將其濃縮至乾後以硼酸鈉緩衝液回溶，測其於波長 228 nm 下之吸收值。雖然菇類之 ACE 抑制劑的 ACE 抑制效果較 captopril 藥物弱，但其可為每日食用之食物來源，且有結果顯示，金福菇的抑制劑經腸胃道蛋白酶作用後其效果仍穩定，且無副作用與細胞毒性，可使用於健康食品上作為預防高血壓之用。

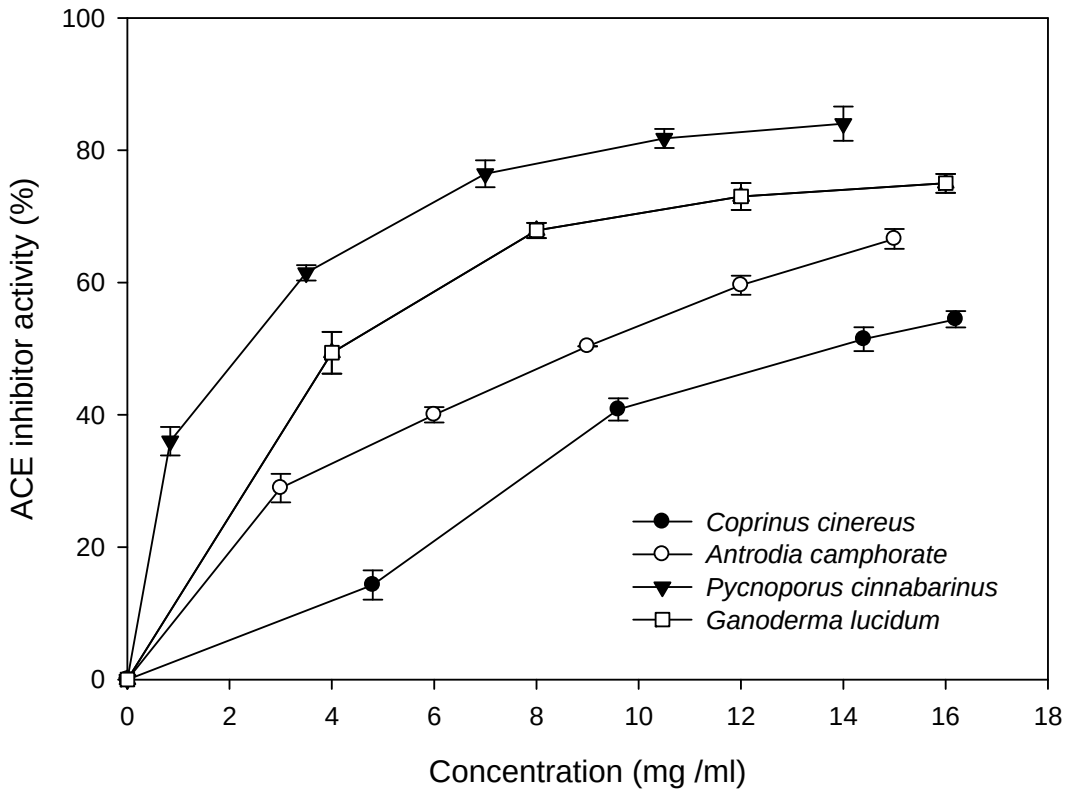


圖 4-5 液態發酵菌絲體冷水萃取物濃度對 ACE 抑制活性之影響

表 4-1 不同菇類之 IC_{50}

Scientific name	IC_{50}（mg/ml）
Pycnoporus cinnabarinus	2.54
Ganoderma lucidum	4.13
Antrodia camphorate	9.28
Coprinus cinereus	13.5

4-2 固態發酵菌絲體溶劑萃取物對 ACE 抑制活性之影響

固態發酵是使用固態物質當作基質的微生物培養方式，與液態深層發酵相比，微生物有時能有更好的生長情形，或是產生更多的胞外酵素與代謝產物。固態培養的最大問題即為如何將菌絲體與基質分開，故本實驗選用市面上常見之可食用穀類作為各菌種固態培養之營養源，如此一來發酵廢棄物可作為動物飼料或肥料，以增加本實驗之附加價值。本實驗探討分別以薏仁、燕麥和蕎麥三種穀類為固態培養基時，其發酵菌絲體之冷水、甲醇與乙醇萃取物對 ACE 抑制活性之影響。將三種穀類不進行菌體發酵，滅菌後直接作 ACE 抑制活性測定，則只有蕎麥有 ACE 抑制活性（17.2%），其餘二者則無。

實驗結果以冷水與甲醇萃取物才有 ACE 抑制活性，乙醇萃取物並無測定到抑制活性，故以下以冷水與甲醇萃取物來分別做說明。

4-2-1 菌絲體甲醇萃取物對 ACE 抑制活性之影響

由圖 4-6 可知當朱紅栓菌以薏仁為固態基質培養時，有較高的 ACE 抑制活性（50.85%），其次為燕麥與蕎麥。在培養時間之影響方面，培養時間較長反而無法產生較多抑制 ACE 的二次代謝產物。

在靈芝固態培養方面（圖 4-7），也是以薏仁為培養基質時有較高的 ACE 抑制活性（32.1%），但在以蕎麥與燕麥培養方面，二者差異不大。在培養時間上，以培養 7 天之菌絲體有較高之抑制活性。

樟芝因為在固態培養上生長較為緩慢，故取培養 16 天與 28 天之菌絲體做為比較。實驗結果顯示（圖 4-8），樟芝與朱紅栓菌和靈芝相同，以薏仁為固態基質時較有較高的 ACE 抑制活性，但在利用蕎麥為基質培養時，其養分較無法被樟芝所利用，使其生長期拉長，故 ACE 抑制活性在第 28 天時比第 16 天時有較大值。

由圖 4-9 可知，雞腿蘑較其他三種菇類不同，其 ACE 抑制活性隨著培養時間增加而增加，且當以燕麥為培養基質時 ACE 抑制活性有最大值，達 74.8%，也較其他三者高。可能原因為雞腿蘑可充分吸收基質之養分與設定之環境條件適合其生長，所生長之菌絲體較其他菌種多，故可分泌較多有 ACE 抑制活性之二次代謝產物。顯示雞腿蘑以固態發酵方式培養才能產生較多有抑制 ACE 活性的二次代謝產物。

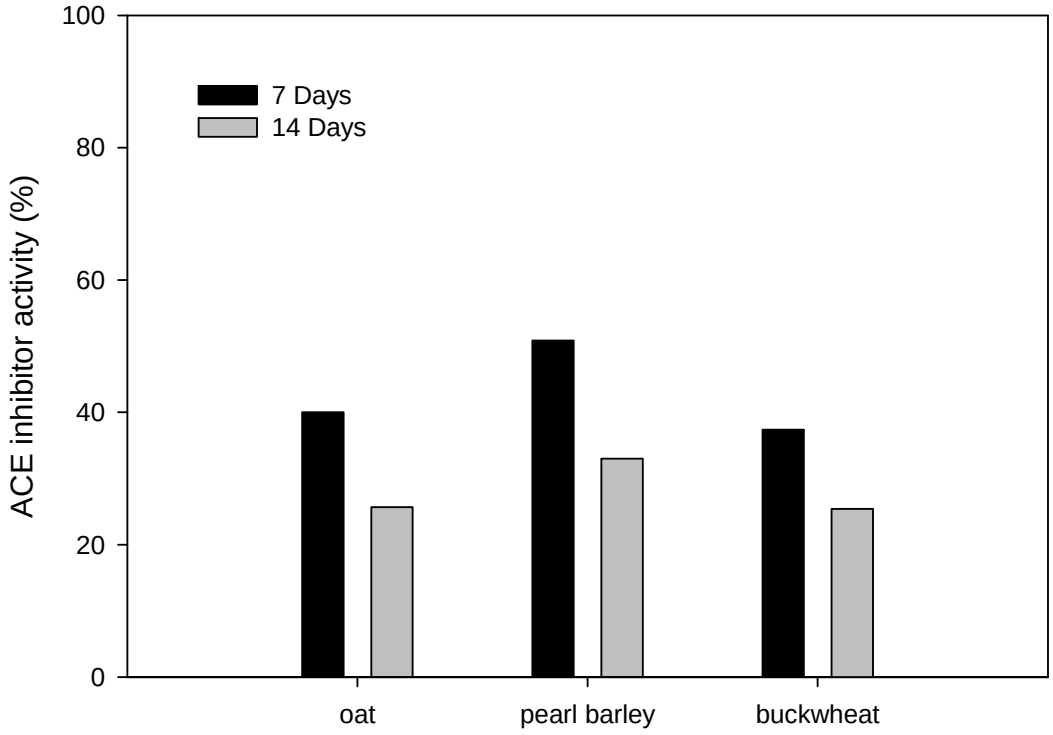


圖 4-6 朱紅栓菌固態發酵菌絲體甲醇萃取對 ACE 抑制活性的影響

培養條件：

（1） 固態基質分別為 14 g 的燕麥、薏仁、蕎麥與等量的水

（2） 接菌量為 5%

（3） 培養溫度 30℃，培養 7 天與 14 天

樣品為取 1 ml 之萃取液經濃縮乾燥後再以 1 ml 的水回溶之萃取物溶液

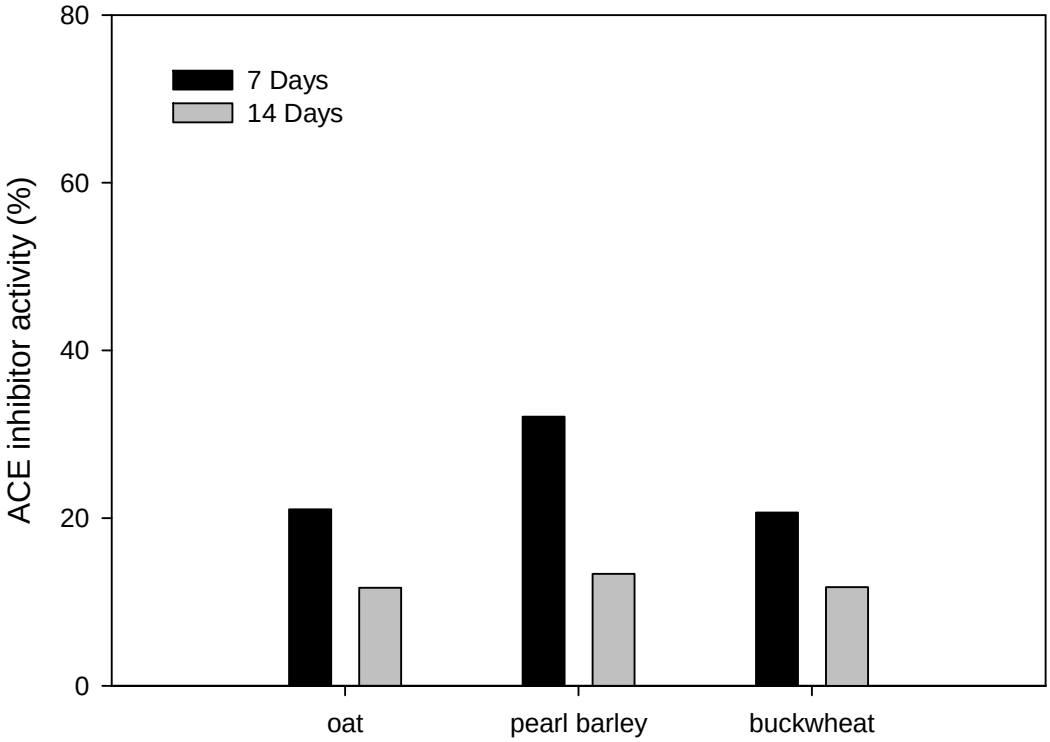


圖 4-7 靈芝固態發酵菌絲體甲醇萃取對 ACE 抑制活性的影響

培養條件：

（1） 固態基質分別為 14 g 的燕麥、薏仁、蕎麥與等量的水

（2） 接菌量為 5%

（3） 培養溫度 30℃，培養 7 天與 14 天

樣品為取 1 ml 之萃取液經濃縮乾燥後再以 1 ml 的水回溶之萃取物溶液

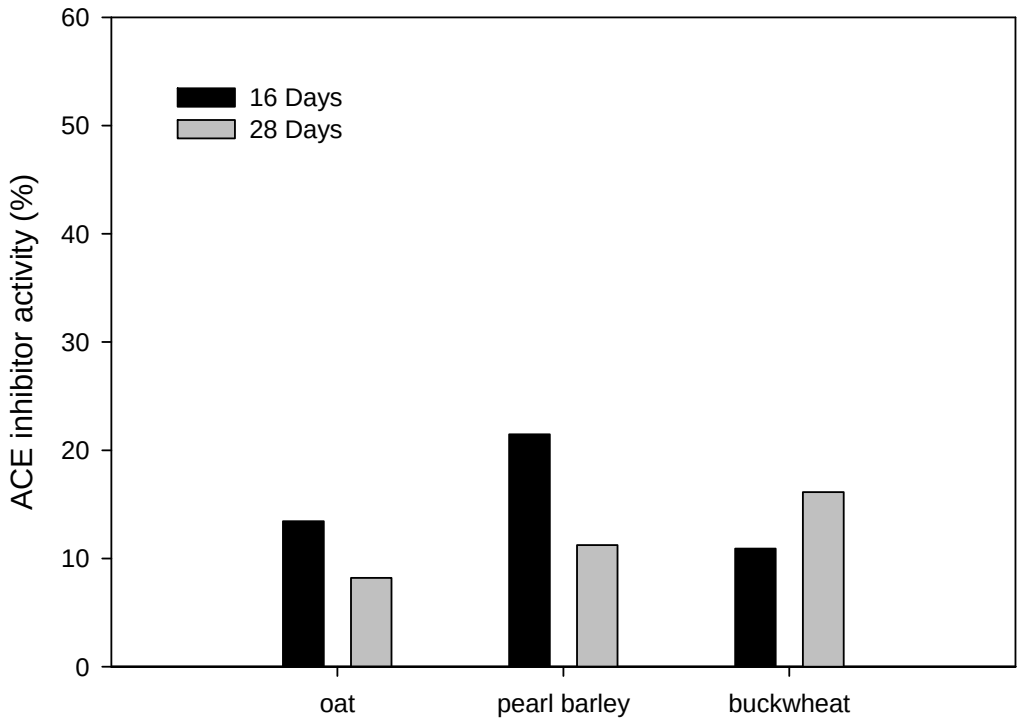


圖 4-8 樟芝固態發酵菌絲體甲醇萃取對 ACE 抑制活性的影響

培養條件：

（1） 固態基質分別為 14 g 的燕麥、薏仁、蕎麥與等量的水

（2） 接菌量為 10%

（3） 培養溫度 25℃，培養 16 天與 28 天

樣品為取 1 ml 之萃取液經濃縮乾燥後再以 1 ml 的水回溶之萃取物溶液

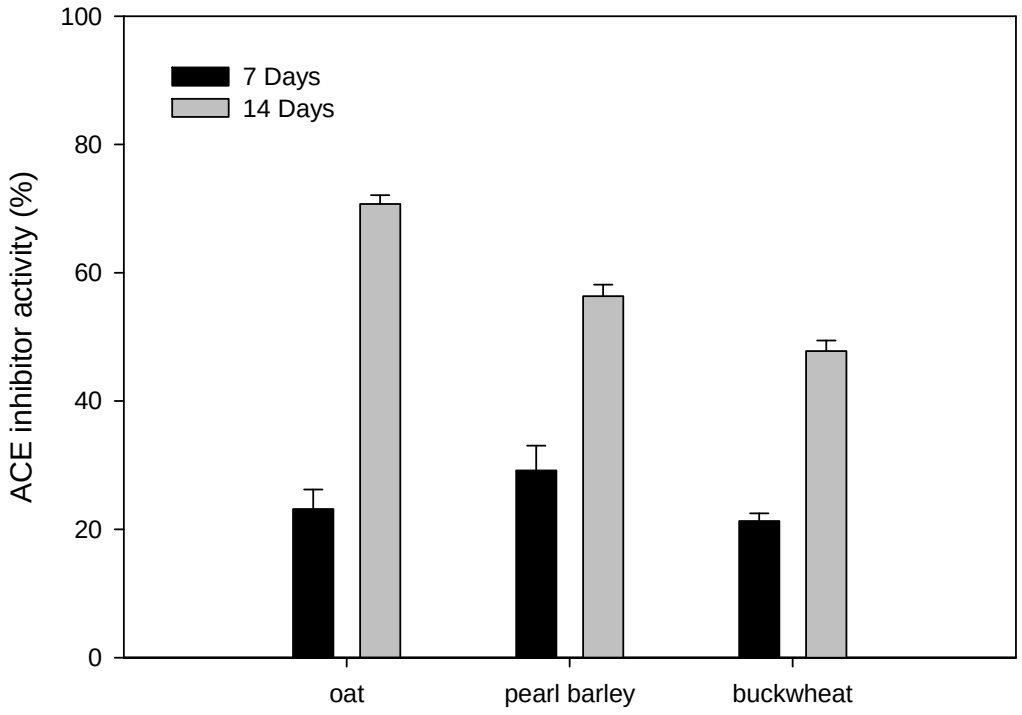


圖 4-9 雞腿蘑固態發酵菌絲體甲醇萃取對 ACE 抑制活性的影響

培養條件：

（1） 固態基質分別為 14 g 的燕麥、薏仁、蕎麥與等量的水

（2） 接菌量為 5%

（3） 培養溫度 25℃，培養 7 天與 14 天

樣品為取 1 ml 之萃取液經濃縮乾燥後再以 1 ml 的水回溶之萃取物溶液

4-2-2 菌絲體冷水萃取物對 ACE 抑制活性的影響

研究結果顯示，四種菇類皆以水（30℃）為溶劑萃取時，較以甲醇為溶劑萃取時，可得到較高的 ACE 抑制活性。朱紅栓菌（圖 4-10）與靈芝（圖 4-11）以薏仁為固態基質時其 ACE 抑制活性有最大值（分別為 85.41%與 43.4%），且並不因培養天數的增加而產生較多的 ACE 抑制物，ACE 抑制活性反而降低。但與甲醇萃取相比，在培養至 7 天與 14 天時，二者之間的 ACE 抑制活性差異較小。

在樟芝固態培養方面（圖 4-12），冷水萃取一樣較甲醇萃取有良好的 ACE 抑制活性，但在以蕎麥為固態培養基質時有最高的 ACE 抑制活性，為 38.4%。雞腿蘑（圖 4-13）則是以燕麥為固態基質時有最高的 ACE 抑制活性（74.8%），並隨著培養時間的增加而提高其 ACE 抑制活性，顯示以冷水當溶劑較能萃取出有抑制 ACE 之物質。

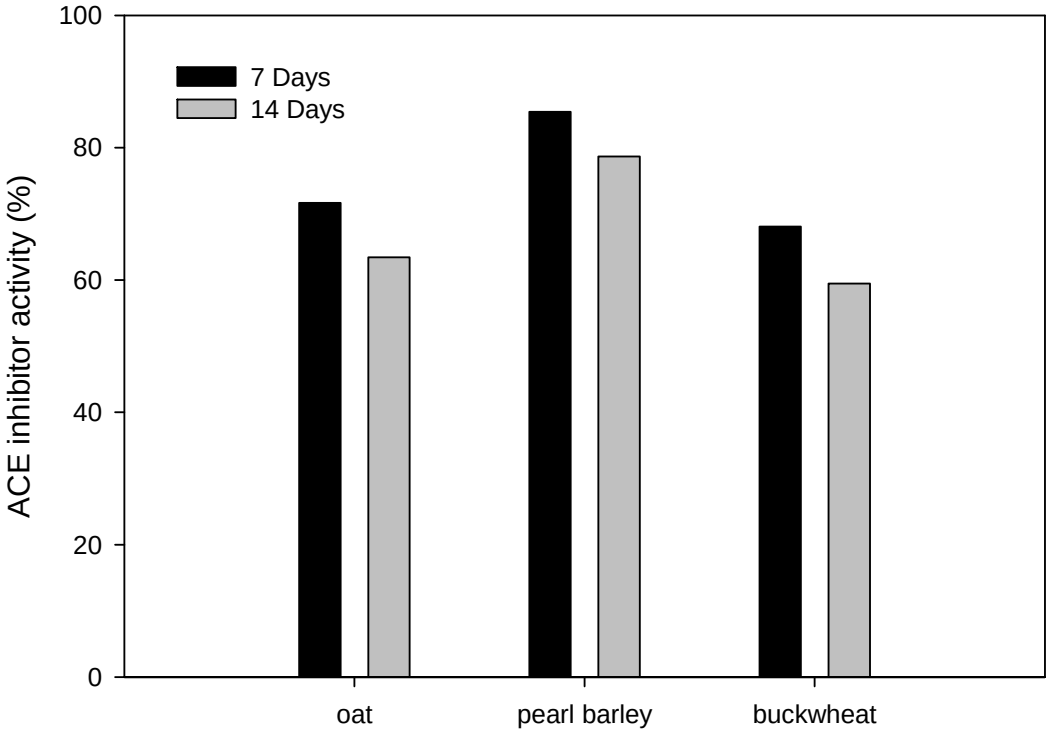


圖 4-10 朱紅栓菌固態發酵菌絲體冷水萃取對 ACE 抑制活性的影響

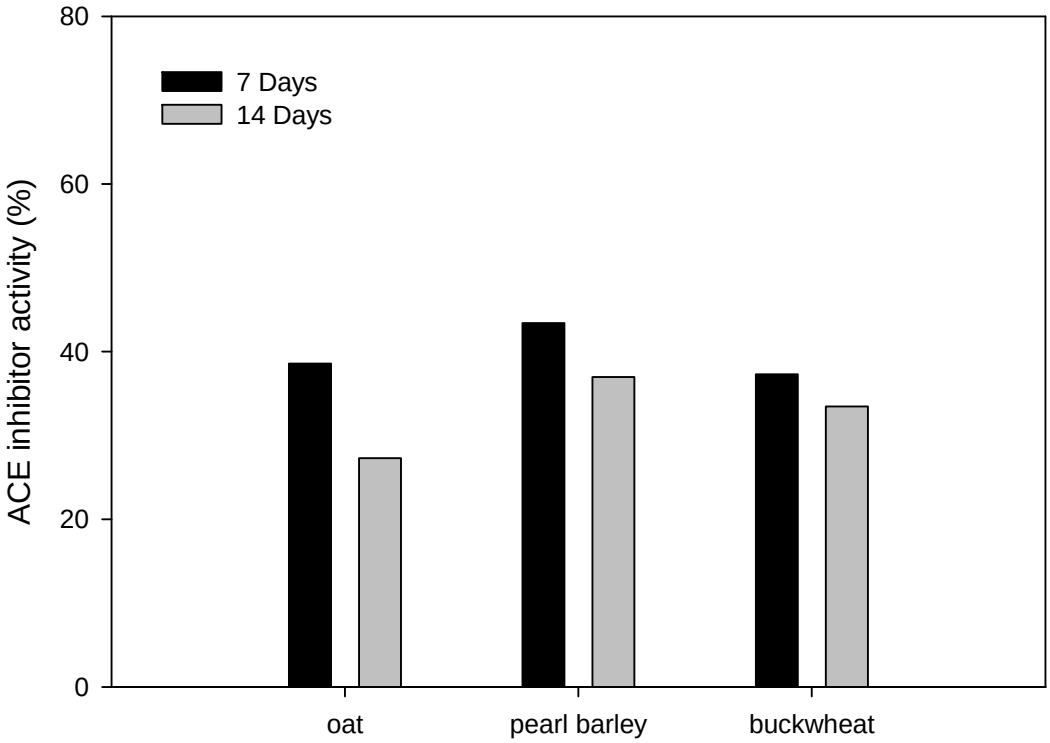


圖 4-11 靈芝固態發酵菌絲體冷水萃取對 ACE 抑制活性的影響

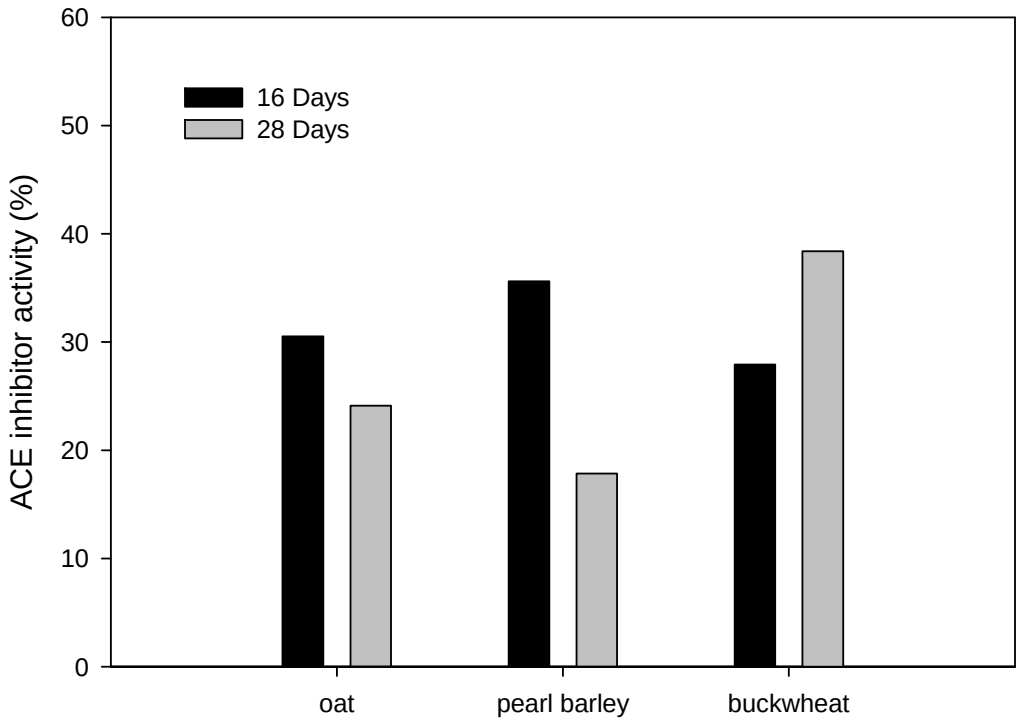


圖 4-12 樟芝固態發酵菌絲體冷水萃取對 ACE 抑制活性的影響

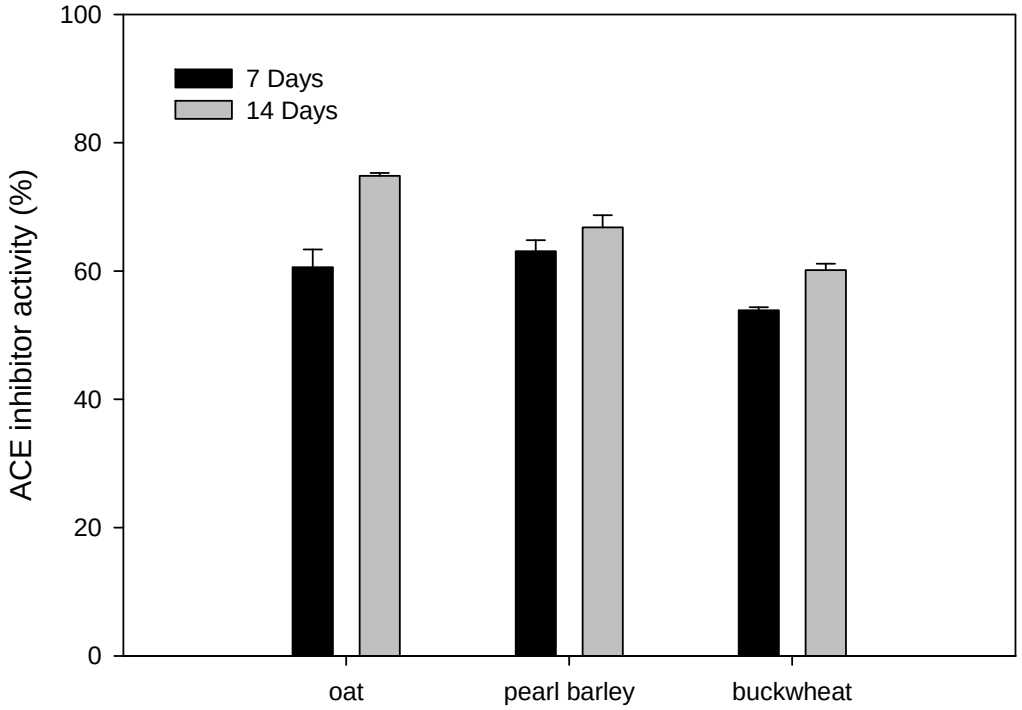


圖 4-13 雞腿蘑固態發酵菌絲體冷水萃取對 ACE 抑制活性的影響

4-3 朱紅栓菌菌絲體對 ACE 抑制活性之影響

4-3-1 液態發酵菌絲體自體溶解反應對 ACE 抑制活性之影響

幾丁質為真菌細胞壁之主要成份，因此在菌體發生自體溶解反應時，幾丁質分解酵素會對細胞壁上的幾丁質進行分解，造成細胞破裂釋放出胞內物質，或是使幾丁質分解成幾丁寡糖。由圖 4-14 可知，菌體在第 6 天時幾丁質酵素活性最高，以利於菌體的自體溶解反應，因此選擇培養 6 天的菌體來做後續的自體溶解實驗。

為了找出更適合的作用環境以提高 ACE 抑制活性，先將作用溫度設定為 40℃，改變其 pH 值為 3、4、5、6。由圖 4-15 可知，朱紅栓菌在酸性（pH 3、4）的作用環境下，可釋放出較多有抑制 ACE 效果之物質，其抑制活性分別為 57.3%與 54.8%。

測得朱紅栓菌在 pH 3、4 時有較高的 ACE 抑制活性後，進一步探討在酸性環境下，不同溫度對 ACE 抑制活性的影響。由圖 4-16 可知，在 pH 3 時，溫度對 ACE 抑制活性並無明顯的差異，約在 60%上下；在 pH 4 時，於 50℃下有最高的 ACE 抑制活性（71.9%），結果顯示 pH 對菌體自溶並釋放出 ACE 抑制物的影響較大。

由於 pH 4、50℃時，其 ACE 抑制活性最高，故以此來分別探討在長時間（48 小時）與短時間（10 小時）反應中對 ACE 抑制活性的影響。在短時間的反應中，由圖 4-17 可知，在反應 2 小時後 ACE 抑制活性開始趨於平緩並在第 6 小時有最

大值，抑制活性達 72.2%。在長時間反應方面（圖 4-18），抑制活性在 24 小時後達最大值，隨後開始隨著反應時間的增加而下降。

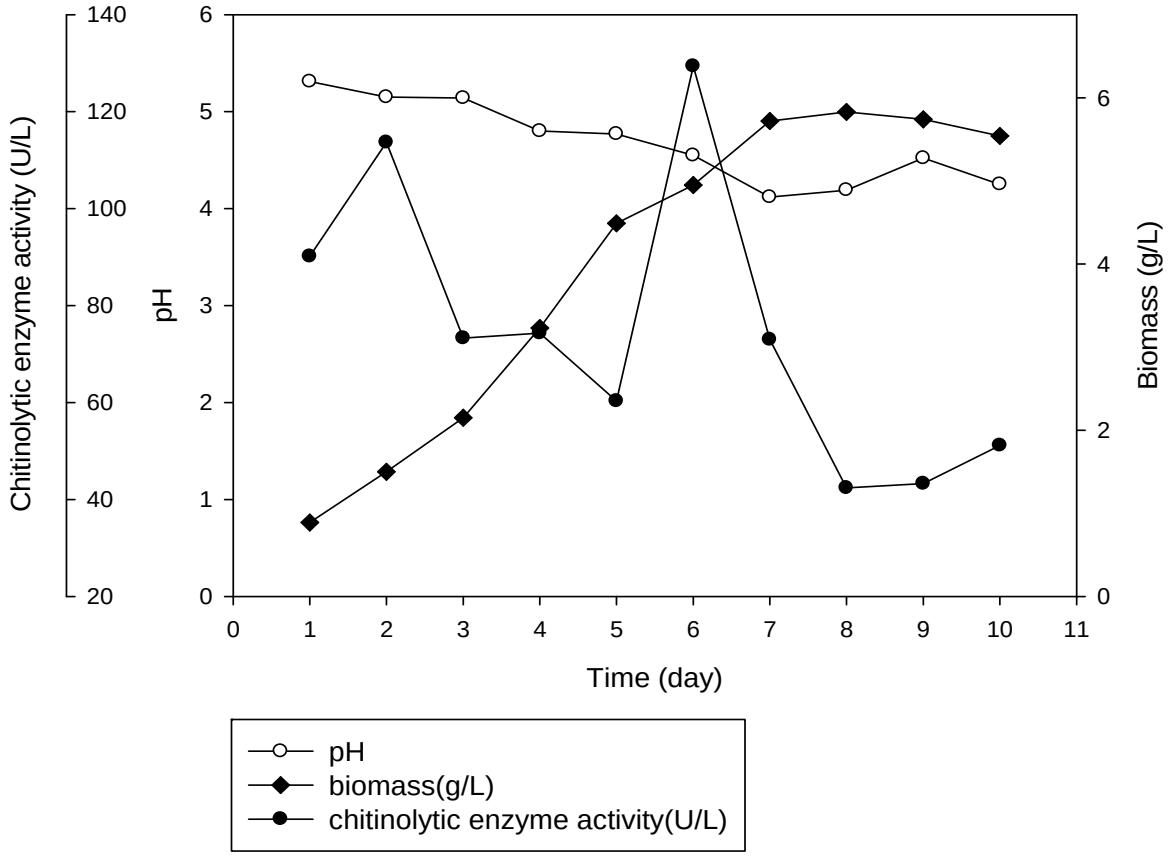


圖 4-14 朱紅栓菌液態發酵菌絲體培養時間對幾丁質酵素活性之影響

培養條件：

（1） 液態培養基：Glucose (2.0%)、Peptone (3.0%)、Yeast extract (0.5%)、

$(NH_4)_2SO_4$ (1.0%)、KH_2PO_4 (0.5%)、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.05%)

（2） 接菌量為 5%

（3） 培養溫度 30℃，初始 pH 5.5，培養 10 天

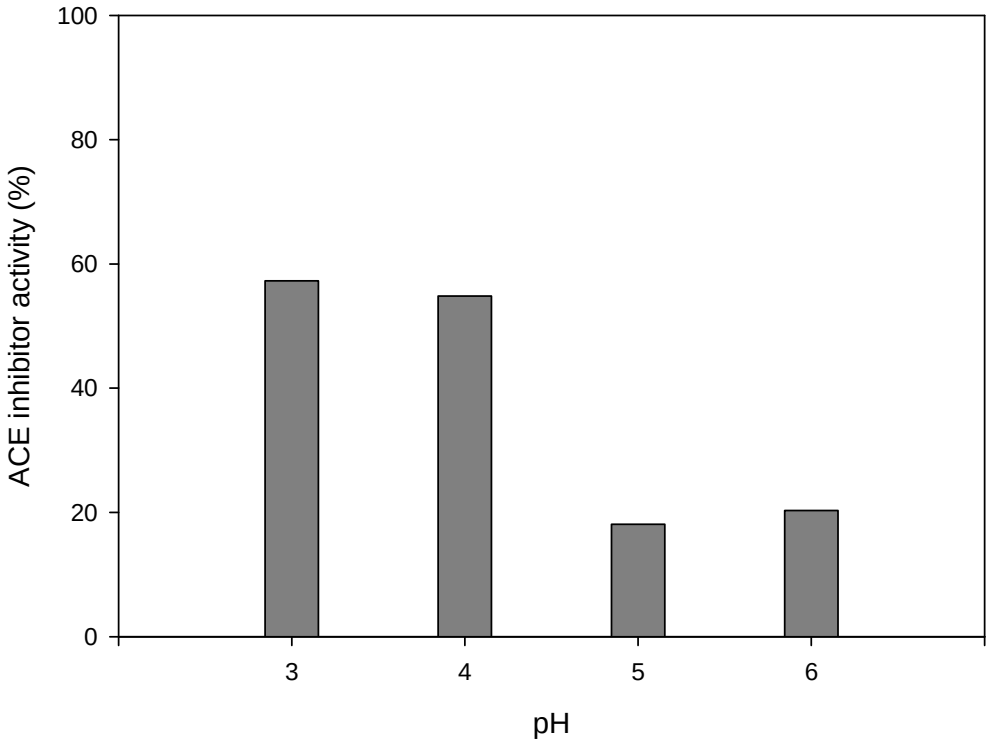


圖 4-15 不同 pH 對朱紅栓菌自體溶解之 ACE 抑制活性之影響

作用條件：

（1） 溫度 40℃

（2） pH 3、4、5、6

（3） 作用時間 24 小時

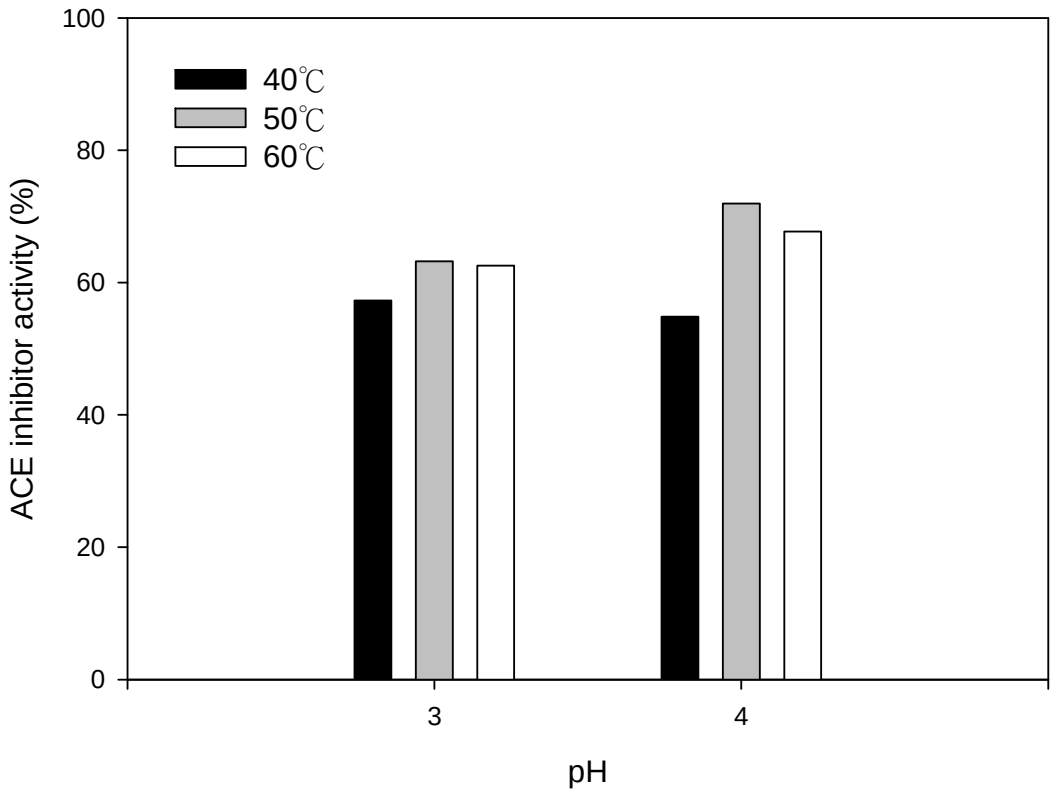


圖 4-16 不同溫度對朱紅栓菌自體溶解之 ACE 抑制活性之影響

作用條件：

（1） 溫度 40℃、50℃、60℃

（2） pH 3、4

（3） 作用時間 24 小時

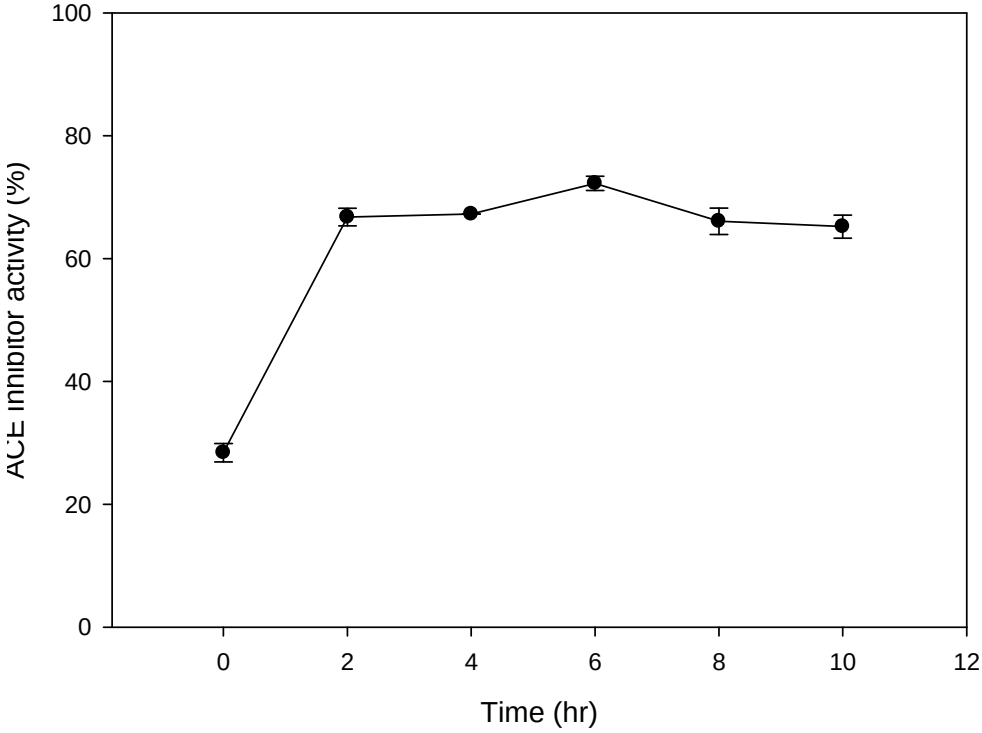


圖 4-17 短時間對朱紅栓菌自體溶解之 ACE 抑制活性之影響

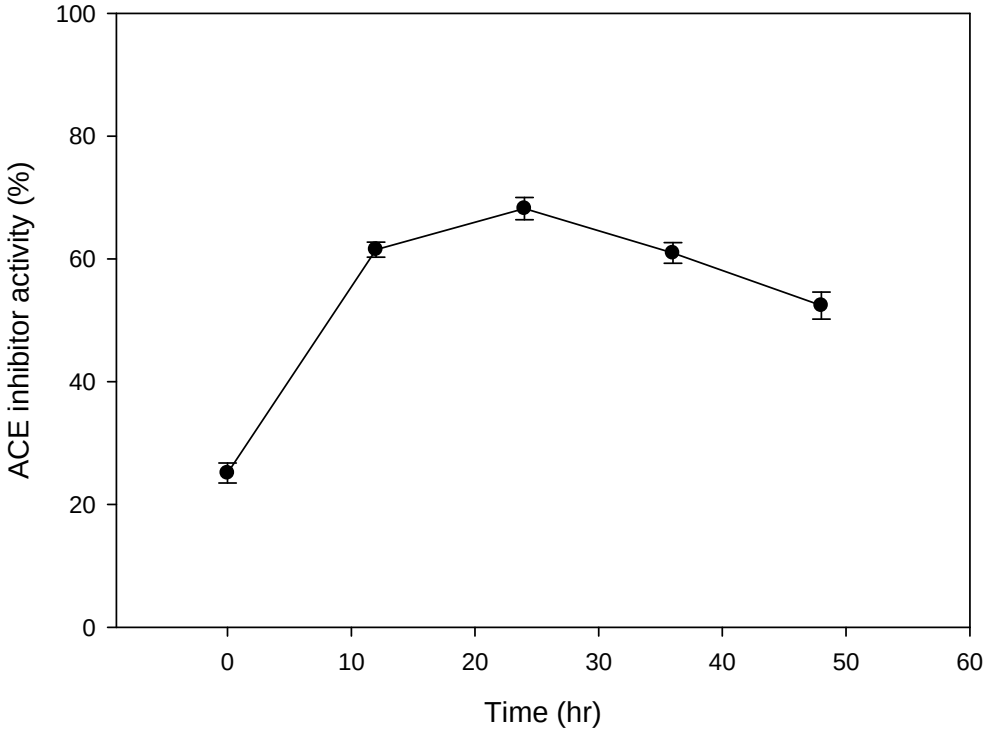


圖 4-18 長時間對朱紅栓菌自體溶解之 ACE 抑制活性之影響

4-3-2 酵素作用液態發酵菌絲體對 ACE 抑制活性之影響

在酵素水解實驗中，添加 1%的酵素為基準，並在 0、1、2、4、6 小時下取樣進行 ACE 抑制活性分析。本實驗選用三種酵素（papain、bromelain、alcalase）對菌絲體進行水解作用，由圖 4-19 顯示，以 alcalase 作用 2 小時後的抑制效果最好（82.25%），但隨後卻隨著作用時間的增加，其抑制活性逐漸下降。Papain（圖 4-17）作用速度較為緩慢，前 1 個小時沒有作用效果，約在作用 4 小時候才能有最大的 ACE 抑制活性。Bromelain（圖 4-19）在 1 小後酵素作用趨於和緩，約皆在 75%上下，且並不因作用時間增長而下降其抑制活性。

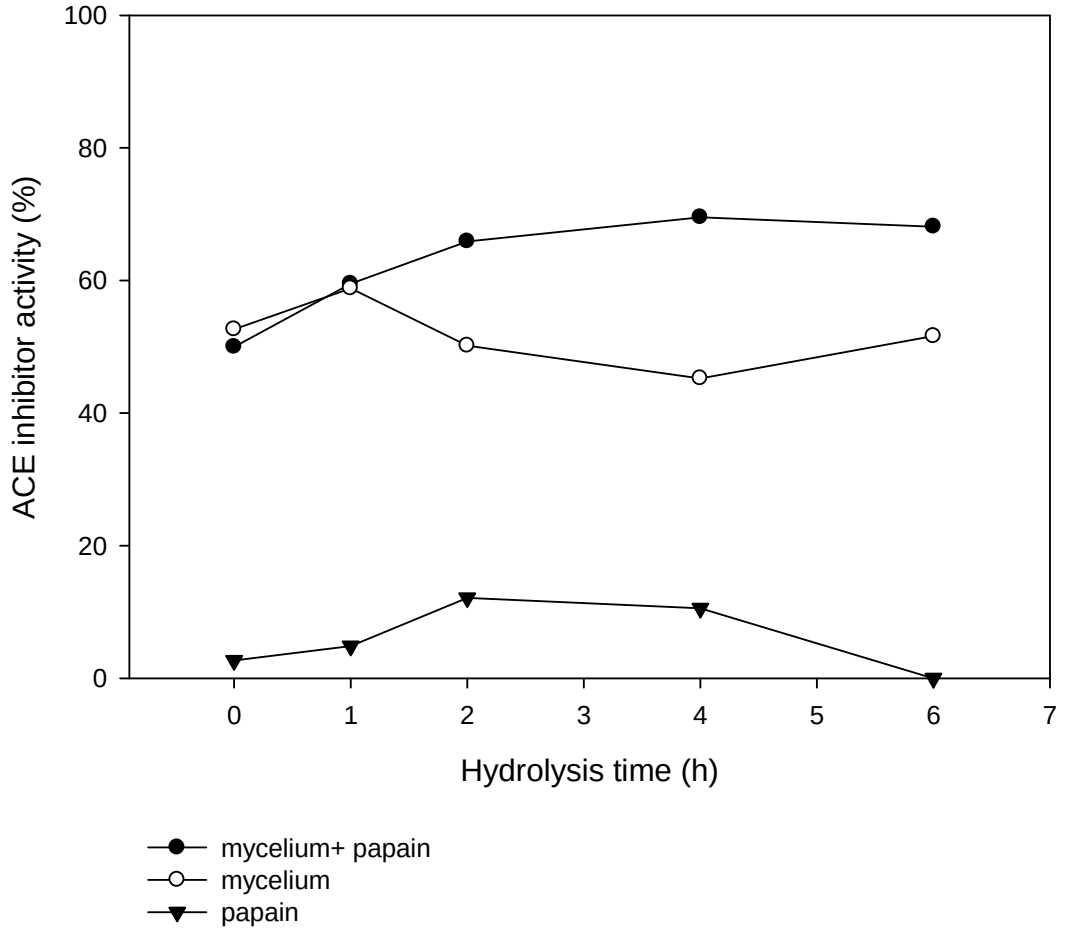


圖 4-19 Papain 作用朱紅栓菌液態發酵菌絲體對 ACE 抑制活性之影響

作用條件：

溫度 50℃、pH 6.2

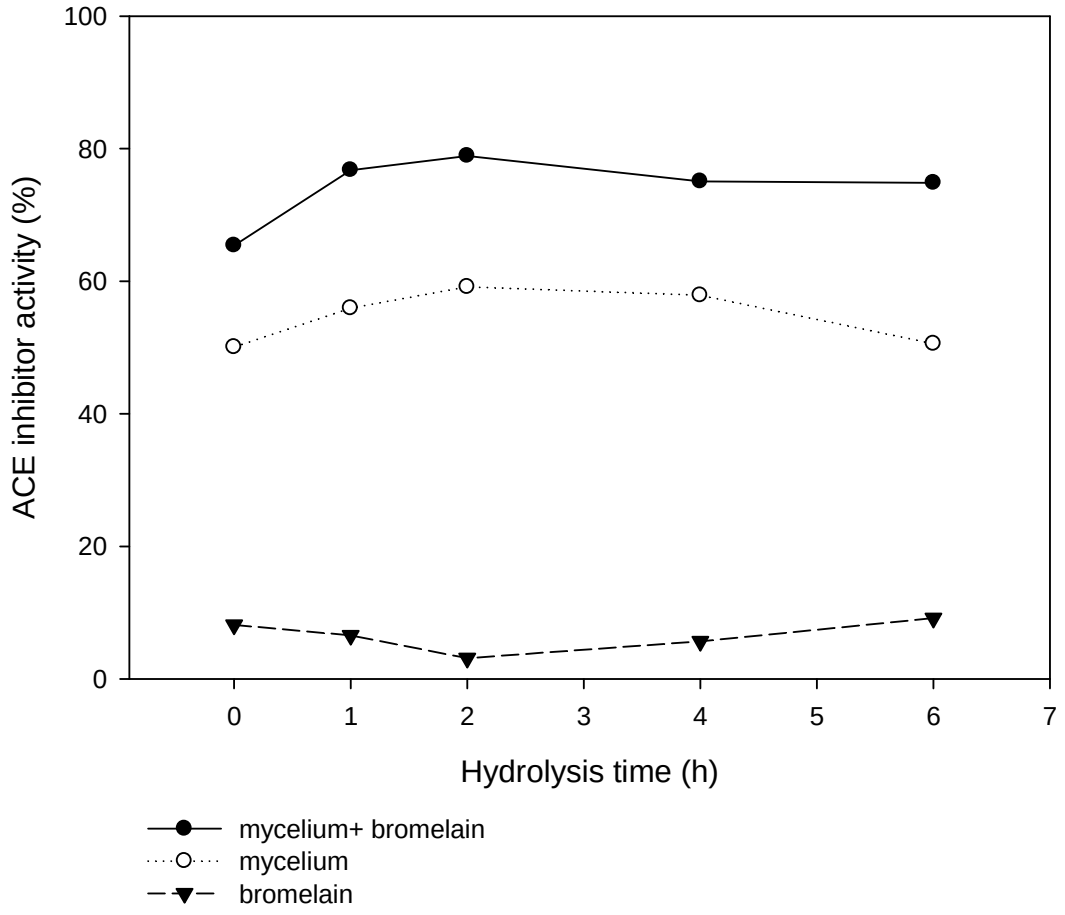


圖 4-20 Bromelain 作用朱紅栓菌液態發酵菌絲體對 ACE 抑制活性之影響

作用條件：

溫度 45℃、pH 6

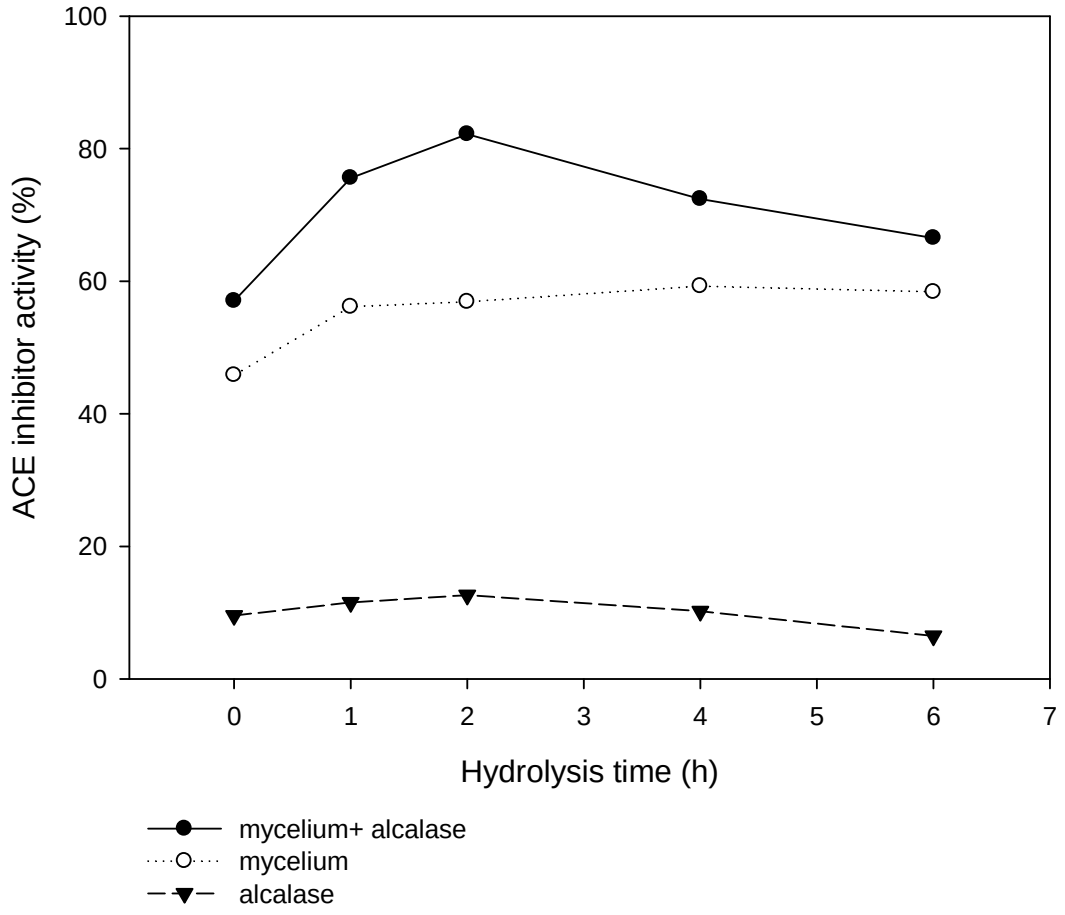


圖 4-21 Alcalase 作用朱紅栓菌液態發酵菌絲體對 ACE 抑制活性之影響

作用條件：

溫度 55℃、pH 7.5

第五章 結論與未來展望

5-1 結論

本研究主要是探討朱紅栓菌、靈芝、樟芝和雞腿蘑這四種食藥用菇類以深層培養與固態培養的方式所生產之菌絲體萃取物對 ACE 抑制活性之影響。

1. 液態發酵菌絲體：將菌絲體分為以溶劑萃取與朱紅栓菌的酵素萃取和自體溶解反應，以作 ACE 抑制活性之測定。在各個菇類的溶劑萃取物當中，以朱紅栓菌之冷水萃取物的 ACE 抑制活性最高，為 69.4%，且當萃取物濃度達 10.5 mg/ml 時，抑制活性開始趨於平緩，可達 80%以上。其次為靈芝（57.2%）與樟芝（26.8%），雞腿蘑之萃取物抑制活性最低，其濃度需 13.5 mg/ml 抑制活性才達 50%。在分析胜肽與抑制活性關係上，朱紅栓菌的胜肽含量是與抑制活性成正比的，推測其有效成份可能為胜肽，而在樟芝與靈芝上並無發現此種關係，可能如文獻上所示成分為三萜類。在朱紅栓菌的酵素水解與自體溶解反應中，發現以 alcalase 水解其菌絲體可得到最佳之抑制活性，而自體反應中最佳作用環境為 pH 4、50℃，其抑制活性可達 71.9%。
2. 固態培養菌絲體：本研究分別以薏仁、燕麥與蕎麥作為培養基質，再用以製成不同溶劑萃取物。朱紅栓菌與靈芝以薏仁為基質之冷水萃取物有最大之抑制活性，且朱紅栓菌之抑制活性約為靈芝的兩倍，顯示朱紅栓菌不管以液態還是固態培養皆有良好的 ACE 抑制活性。雞腿蘑則是以燕麥為基質時有最大

之抑制活性，且因為雞腿磨之液態培養菌絲體萃取物的抑制活性皆不高，若以固態培養的方式，其抑制活性皆可提升至 60%以上，並大於靈芝與樟芝，顯示雞腿蘑要以固態培養方式才能得到較大之抑制活性。

5-2 未來展望

本研究顯示，朱紅栓菌菌絲體有著良好 ACE 抑制活性，未來可嘗試開發其他食藥用菇類，如巴西蘑菇、金針菇、蟲草、香菇等找出更具抑制活性之菌種。並可將萃取出之 ACE 抑制劑作細胞毒害測試或經胃腸道酵素之消化模擬試驗，測試其經人體消化道的分解酵素作用後是否仍能保持抑制 ACE 的活性。未來可進而進行動物實驗，將 ACE 抑制劑餵食源發性高血壓大鼠（SHR），驗證此抑制劑在動物體內亦有具抗高血壓效果，故能應用於食品添加或日常食用上，當作溫和、天然、不具副作用之降高血壓保健食品。

參考文獻

王伯徹（2007）。菇類多樣化的產品市場。食品工業，39（5）

王宗道（2010）。高血壓會怎樣。健康世界，291：17-20

王玉萍、李翔太（2000）。富鉻雞腿蘑發酵液急性毒性和降血糖作用的初步研究。東山大學學報，35（1）：117-120

江晨恩（2010）。高血壓的藥物治療。健康世界，291：21-23

李師鵬、安利國、張红梅（2001）。雞腿蘑多醣對昆明小鼠血清溶菌酶活性影響的研究。中國食用菌，20（4）：36-37

翁千惠（2004）。利用酵素水解明膠及卵白蛋白製被抗高血壓胜肽。東海大學食品科學研究所碩士論文。

郭淑卿（2002）。樟芝發酵液對大鼠肝臟纖維化及腸胃功能之改善作用。中國醫藥學院中國藥學研究所碩士論文。

陳啟楨、蘇慶華、藍明煌（2001）。樟芝固態栽培及其生理活性研究。*Fung. Sci.*, 16（1, 2）：65-72

楊明哲（2006）。控制菌體型態對於靈芝液態培養之影響。東海大學化學工程研究所博士論文。

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。

黃玲娟（2000）。樟芝與雞松茸之抗氧化性質及多醣組成。中興大學食品科學研究所碩士論文

詹宏偉（2003）。不同培養方式對靈芝菌絲體生理活性成分生成之影響。東海大學化學工程研究所碩士論文。

潘威仁（2005）。朱紅栓菌生物活性探討。南台科技大學生物科技研究所碩士論文。

廖麗香、吳佳蓉（1998）。血管收縮素轉換酶抑制劑。台灣醫學，2（5）：566-574.

蔡政融、葉政霖、蔡震壽（2008）。胜肽生理活性介紹及於食品中之應用。化工技術，16（1）：106-121

Arzubiaga C. and Beck N. A.（1992） Lisinopril, a new angioteinsin converting enzyme inhibitor. *Am. J. Med. Sci.*, 303（5）：340-344

Astawan M., Wahyuni M.,Yasuhara T., Yamada K., Tadokoro T., Maekawa A.（1995）Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59：425-429

Cheung, H. S., Wang F. L., Ondetti M. A., Sabo E. F., Cushman D. W.（1980） Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, 255（2）：401- 407

Cheung, P. C. K.（1996）Dietary fiber content and composition of some cultivated edible mushroom fruiting bodies and mycelia. *J. Agric. Food Chem.*, 44：468-471

Chiang W. D., Tsou M. J., Tsai Z. Y., Tsai T. C.（2006）Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and producted by using membrane reactor. *Food Chem.*, 98：725-732

Choi H.S., Cho H.Y., Yang H.C., Ra K.S., Suh H.J.（2000）Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa. Food Res. Int.*, 34：177-82

Corvol P., Ewilliams T. A., Soubrier F.（1995）Peptidyl dipeptidease A：angiotensin I-converting enzyme. *Methods Enzymol*. 248:283-305.

Fujita H., Yokoyama K., Yoshikawa M.（2000）Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food protein. *J. of Food Sci.*, 65（4）：564-569

Guthrie R.（1993）Fosinopril：an overview. *The Am. of Car.*, 72（20）：22-24

Hyun C.K. and Shin H.K.（2000）Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochem.*,

36：65-71

Kim S. H., Lee H. S., Lee S., Cho J., Ze K., Sung J. Kim Y. C. （2004）Mycelial culture of *Phellinus linteus* protectsprimary cultured rat hepatocytes against hepatotoxins. *J. Ethnopharmacol.*, 95：367-372.

Lee D. H., Kim J. S., Choi Y. J., Lee J. S.（2004）Isolation and characterization of a novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides*, 25：621-627

Li G. H. , Le G. W., Shi Y. H., Sundar Shresthaa（2004）Angiotensin I– converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Res.*, 24：469-486

Liu D. Z., Liang Y.C., Lin S.Y., Lin Y.S., Wu W.C., Hou W.C., Su C.H.（2007）Antihypertensive activities of a solid-state culture of *Taiwanofungus camphoratus*（Chang-Chin）in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71（1）：23-30

Miyoshi S., Ishikawa H., Kaneko T., Fukui F., Tanaka H., Maruyama S.（1991）Strctures and activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors in an α-zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, 55：1313-1318

Morigiwa A., Kitabatake K., Fujimoto Y., Ikekawa N.（1986）Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.*, 34 ：3025-3028

Ohtakara A., Yoshida M., Murakami M., Izumi T.（1986）Purification and chararcterizatation of β-N-acetylhexosaminidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Agric. Biol. Chem.*, 45（1）：239-247

Robinson T., Singh D., Nigam P.（2001）Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 55：284-289

Shiao M. S.（2003）Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *The Chem. Record*, 3：172-180

Silva S., Emidio V.L. Cunha, Maria F.V. Souza, Reinaldo N. Almeida, Isac A. Medeiros（2006）Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme（ACE）.A review between 1980-2000. *Brazilian J. of Pharm.*, 16（3）：421-446

Song, K. S., Cho, S. M., Lee, J. H., Kim, H. M., Han, S. B., Ko, K. S. Yoo, I. D. (1995) B-lymphocyte stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.*, 43：2105-2108.

Suetsuna K., Maekawa K., Jiun-Rong C.（2004）Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. of Nutritional Biochem.*, 15：267–272

Ukeda H., Osajima H., Matsufuji T., Matsui T., Osajima Y.,（1992）Peptides from peptic hydrolyzate of heated sardine meat that inhibitory angiotensin I-converting enzyme. *Nippon. King. Kaiho.*., 66：25-29

Wasser S. P. and Weis A. L.（1999）Medicinal properties of substances occurring in higher basidomycetes mushrooms: current perspectives (review). *Intern. J. Med. Mushrooms.*, 1：31-62

Wasser S. P.（2002）Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60：258-274

Wu J. P. and Ding X. L.（2002）Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide. *Food Res. Int.* 35：367-375

Yoshii H. Tachi N., Ohba R., Salamura O., Takeyma H. Itani T.（2001）
Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Comp. Biochem. Physiol.*, 128：27-33