

東海大學食品科學研究所
Graduate Institute of Food Science
TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組
Food Technology Section

碩士論文
Master Thesis

指導教授：閻立平 博士
Advisor : Lipyng Yan, Ph. D.

桑黃菌 *Phellinus igniarius* 固態與液態發酵萃取物生物活性
之比較

A comparative study on the bioactivity of extracts from solid-state
culture and submerged culture by *Phellinus igniarius*

研究生：潘韋任 撰
Graduate Student : Wei Jen Pan

中華民國一百年七月
July, 2011

謝誌

感謝恩師 閻立平博士於學生在研究所碩士班就讀的這段時間給予許多細心的指導與照顧，讓學生在論文研究、功課學業或待人處世上皆受益良多。此外亦提供了良好的實驗環境，給予學生自由快樂的學習空間，於論文撰寫期間，感謝恩師細心的審閱與指正，使得論文可以順利的完成，恩師的鼓勵與教誨，學生會永遠謹記在心，特誌卷首，以表達由衷之謝意。

文稿初成，承蒙本研究所教授 李根永博士擔任學生碩士論文口試召集人與本系畢業目前任職於漢馨科技有限公司總經理的劉景文學長撥冗審閱，並給予匡正與建議，使得學生的論文得以更臻周嚴，以助學生完成碩士學位口試，在此致上萬分的謝意。此外也感謝系上所有老師在學生求學過程期間給予的幫助與教導。

在學期間，感謝系辦公室 王琴助理、林宜君助教及李佩玲助教在研究所生涯中的幫忙與協助。另外也感謝許多學長姐的指導與鼓勵，謝謝國晏學長及子瑋學長在實驗上不遺餘力的教導，美燕學姐的關愛與解惑；同窗好友豪駿、怡樺、佑年、柏村、綱存、青蓉、勝智、百秀、展維、沂璉、永翰及昱成等；學弟妹俊麟、建廷、冠閔、佳玲、如裕、希奇、豐毓及哲宇等。感謝你們的協助與陪伴，使我的研究所生活充滿歡樂以及美好的回憶。

最後，謹將此論文獻給我摯愛的家人，由衷感謝多年來對我的支持關心與照顧，讓我可以無後顧之憂的專注於學業上，順利的完成學業，感謝您們栽培及養育之恩。

潘韋任 謹至於
東海大學食品科學研究所
中華民國一百年 七月

目 錄

摘 要	I
Abstract.....	III
壹、 前 言	1
貳、 文獻回顧	2
一、 桑黃菌簡介	2
(一) 桑黃菌之分類命名	2
(二) 桑黃之化學組成	6
(三) 桑黃之藥理研究	8
(四) 桑黃之藥用開發及展望	12
二、 食藥用菇類多醣簡介	13
(一) 多醣體之結構	13
(二) 多醣體之抗腫瘤活性	15
三、 固態發酵簡介	20
(一) 固態發酵之特點	20
(二) 固態發酵菌體量之測量	24
(三) 固態發酵之應用	26
參、 材料與方法	29

一、	試驗材料.....	29
(一)	試驗菌種.....	29
(二)	測試細胞株.....	29
(三)	固態培養基質.....	30
(四)	培養基.....	30
(五)	重要藥品.....	33
二、	試驗儀器.....	35
三、	試驗方法.....	37
(一)	試驗流程.....	37
(二)	菌種貯存.....	38
(三)	菌種活化.....	38
(四)	種菌培養.....	38
(五)	種菌懸浮液之製作.....	38
(六)	固態發酵.....	39
(七)	發酵槽試驗.....	40
(八)	抑制癌細胞生長能力（細胞存活率）測定.....	41
四、	分析方法.....	42
(一)	固態發酵生物質（biomass）含量之測定.....	42
(二)	pH 值之測定.....	44

(三) 固態培養多醣體產量之測定.....	44
(四) 多醣體分子量之測定.....	45
(五) 多醣體中 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量測定	46
(六) 抑菌能力之測定.....	47
(七) 抗氧化力之測定.....	49
(八) 抑制癌細胞生長能力 (細胞存活率) 測定.....	53
(九) 統計分析.....	55
肆、 結果與討論.....	56
一、 固態培養基種類試驗.....	56
二、 固態發酵培養條件試驗.....	61
(一) 培養溫度對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響.....	61
(二) 水添加量對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響.....	61
(三) 接菌量對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響.....	62
(四) 起始 pH 值對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響.....	66
(五) 碳源對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響.....	66
(六) 氮源對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響.....	67
(七) 生長因子對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響.....	68
(八) 無機鹽類對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響.....	73
(九) 培養時間對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響.....	73

三、	多醣體分子量之測定.....	77
四、	多醣體中 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量測定.....	82
五、	抑菌能力之測定.....	84
六、	抗氧化力之測定.....	85
	(一) DPPH 自由基清除能力測定.....	86
	(二) 總抗氧化能力測定.....	93
	(三) 螯合亞鐵離子能力測定.....	97
	(四) 還原力測定.....	101
七、	抑制癌細胞生長能力(細胞存活率)測定.....	105
	(一) 熱水萃取物對腫瘤細胞存活率之影響.....	105
	(二) 乙醇萃取物對腫瘤細胞存活率之影響.....	114
伍、	結論.....	121
陸、	參考文獻.....	124
柒、	附錄.....	139

表目錄

表一	桑黃菌粗多醣體中胺基酸和碳水化合物組成.....	7
表二	抗腫瘤活性食藥用菇多醣體之化學結構.....	16
表三	固態發酵與液態發酵特點的比較.....	23
表四	應用固態發酵生產酵素.....	28
表五	不同培養溫度對桑黃菌 (<i>Phellinus igniarius</i>) 於燕麥固態培養基生物質及多醣體產量之影響.....	63
表六	不同水添加量對桑黃菌 (<i>Phellinus igniarius</i>) 於燕麥固態培養基生物質及多醣體產量之影響.....	64
表七	不同接菌量對桑黃菌 (<i>Phellinus igniarius</i>) 於燕麥固態培養基生物質及多醣體產量之影響.....	65
表八	起始 pH 值 (4-8) 對桑黃菌 (<i>Phellinus igniarius</i>) 於燕麥固態培養基生物質及多醣體產量之影響.....	69
表九	碳源對桑黃菌 (<i>Phellinus igniarius</i>) 於燕麥固態培養基生物質及多醣體產量之影響.....	70
表十	氮源對桑黃菌 (<i>Phellinus igniarius</i>) 於燕麥固態培養基生物質及多醣體產量之影響.....	71
表十一	生長因子對桑黃菌 (<i>Phellinus igniarius</i>) 於燕麥固態培養基生物質及多醣體產量之影響.....	72

表十二	無機鹽類對桑黃菌 (<i>Phellinus igniarius</i>) 於燕麥固態培養基 生物質及多醣體產量之影響.....	75
表十三	膠體滲透層析法不同分子量多醣標準品 (α -D-葡聚糖) 之 滯留時間.....	79
表十四	膠體滲透層析法測定氣泡式發酵液、燕麥基質和桑黃燕麥 之多醣體分子量.....	80
表十五	氣泡式發酵槽發酵液、燕麥基質和桑黃燕麥中多醣之 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量.....	83
表十六	燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液粉末熱水及乙 醇萃取物 DPPH 自由基清除能力之 IC ₅₀	89
表十七	燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液粉末之熱水及 乙醇萃取率.....	90
表十八	燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽之發酵液粉末抗氧化 性質之 IC ₅₀ (熱水萃取物).....	91
表十九	燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽之發酵液粉末抗氧化 性質之 IC ₅₀ (乙醇萃取物).....	92
表二十	燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液粉末熱水及乙 醇萃取物總抗氧化能力之 IC ₅₀	96
表二十一	燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液粉末熱水及乙	

	醇萃取物螯合亞鐵能力之 IC ₅₀	100
表二十二	燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液粉末熱水及乙醇萃取物還原能力之 IC ₅₀	104
表二十三	燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽桑黃菌 PI 發酵液之熱水及乙醇萃取物（濃度為 1000μg/ml）對肺腺癌細胞（A-549）存活率之影響。.....	110
表二十四	燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽桑黃菌 PI 發酵液之熱水及乙醇萃取物（濃度為 1000μg/ml）對乳癌細胞（MCF-7）存活率之影響。.....	111
表二十五	燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽桑黃菌 PI 發酵液之熱水及乙醇萃取物（濃度為 1000μg/ml）對肝癌細胞（HepG2）存活率之影響。.....	112

圖目錄

圖一	桑黃菌之分類。.....	3
圖二	桑黃菌之外觀形態。.....	5
圖三	具抗腫瘤活性的 β -(1 \rightarrow 6)分支 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖結構。.....	14
圖四	X 射線衍射測定之 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖結晶結構。.....	14
圖五	香菇多醣 lentinan 對寄主所產生的免疫反應。.....	18
圖六	攝入 β -glucan 於小鼠免疫細胞之反應。.....	19
圖七	黃色水溶性之 MTT 經 MTT 去氫酶還原成紫色不溶性沉澱之 formazan 之化學反應.....	54
圖八	桑黃菌 (<i>Phellinus igniarius</i>) 於薏仁固態培養發酵期間 (30 °C /20 天) 生物質及最終 pH 之變化。.....	57
圖九	桑黃菌 (<i>Phellinus igniarius</i>) 於黑豆固態培養發酵期間 (30 °C /20 天) 生物質及最終 pH 之變化。.....	58
圖十	桑黃菌 (<i>Phellinus igniarius</i>) 於燕麥固態培養發酵期間 (30 °C /20 天) 生物質及最終 pH 之變化。.....	59
圖十一	桑黃菌 (<i>Phellinus igniarius</i>) 於燕麥固態培養發酵期間 (30 °C /20 天) 之菌絲體生長情形。.....	60
圖十二	桑黃菌 (<i>Phellinus igniarius</i>) 於燕麥固態培養發酵期間 (30 °C /20 天) 生物質、多醣體及最終 pH 之變化。.....	76

圖十三	桑黃菌 PI 發酵液、燕麥基質與桑黃燕麥多醣體膠體滲透層析之分子量圖譜(a) 氣泡式發酵槽(b) 燕麥基質(c) 桑黃燕麥..81
圖十四	燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液粉末熱水及乙醇萃取物 DPPH 自由基清除能力。.....88
圖十五	燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽桑黃菌 PI 發酵液熱水及乙醇萃取物之總抗氧化能力。.....95
圖十六	燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽桑黃菌 PI 發酵液熱水及乙醇萃取物之螯合亞鐵離子能力.....99
圖十七	燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽桑黃菌 PI 發酵液熱水及乙醇萃取物之還原能力。.....103
圖十八	不同濃度燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液之熱水萃取物對肺腺癌細胞 (A-549) 存活率之影響。.....107
圖十九	不同濃度燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液之熱水萃取物對乳癌細胞 (MCF-7) 存活率之影響。.....108
圖二十	不同濃度燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液之熱水萃取物對肝癌細胞 (HepG2) 存活率之影響。.....109
圖二十一	肺腺癌細胞(A-549)、乳癌細胞(MCF-7)及肝癌細胞(HepG2)經桑黃燕麥熱水萃取物處理(1000 μ g/ml, 5% CO ₂ /37 $^{\circ}$ C/48hr)後之細胞生長情形。.....113

圖二十二	不同濃度燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液之乙醇 萃取物對肺腺癌細胞 (A-549) 存活率之影響。.....	117
圖二十三	不同濃度燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液之乙醇 萃取物對乳癌細胞 (MCF-7) 存活率之影響。.....	118
圖二十四	不同濃度燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液之乙醇 萃取物對肝癌細胞 (HepG2) 存活率之影響。.....	119
圖二十五	肺腺癌細胞(A-549)、乳癌細胞(MCF-7)及肝癌細胞(HepG2) 經桑黃燕麥乙醇萃取物處理(1000 μ g/ml, 5% CO ₂ /37 $^{\circ}$ C/48hr) 後之細胞生長情形。.....	120

附圖目錄

附圖一	Elson-Morgan 法之葡萄糖胺標準曲線。.....	140
附圖二	菌絲體乾重之標準曲線。.....	141
附圖三	酚硫酸法之葡萄糖標準曲線。.....	142
附圖四	多醣分子量之標準曲線。.....	143
附圖五	測定 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量之 laminarin 標準曲。.....	144
附圖六	Ampicillin 對病原菌 <i>Bacillus cereus</i> 抑菌環之標準曲。.....	145
附圖七	Ampicillin 對病原菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 抑菌環之標準曲線。.....	146
附圖八	Ampicillin 對病原菌 <i>Escherichia coli</i> 抑菌環之標準曲。.....	147
附圖九	Ampicillin 對病原菌 <i>Salmonella typhimurium</i> 抑菌環之標準曲線。.....	148
附圖十	Ampicillin 對病原菌 <i>Staphylococcus aureus</i> 抑菌環之標準曲線。.....	149
附圖十一	Ampicillin 對病原菌 <i>Listeria monocytogenes</i> 抑菌環之標準曲線。.....	150
附圖十二	燕麥基質熱水萃取物之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。.....	151
附圖十三	燕麥基質乙醇萃取物之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。.....	

.....	152
附圖十四 桑黃燕麥熱水萃取物之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。153
附圖十五 桑黃燕麥乙醇萃取物之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。154
附圖十六 發酵液粉末熱水萃取物之 DPPH 自由基清除力標準曲線。155
附圖十七 發酵液粉末乙醇萃取物之 DPPH 自由基清除力標準曲線。156
附圖十八 BHA 之 DPPH 自由基清除力標準曲線。157
附圖十九 Ascorbic acid 之 DPPH 自由基清除力標準曲線。158
附圖二十 α -tocopherol 之 DPPH 自由基清除力標準曲線。159
附圖二十一 燕麥基質熱水萃取物之總抗氧化力標準曲線。160
附圖二十二 燕麥基質乙醇萃取物之總抗氧化力標準曲線。161
附圖二十三 桑黃燕麥熱水萃取物之總抗氧化力標準曲線。162
附圖二十四 桑黃燕麥乙醇萃取物之總抗氧化力標準曲線。163
附圖二十五 發酵液粉末熱水萃取物之總抗氧化力標準曲線。164
附圖二十六 發酵液粉末乙醇萃取物之總抗氧化力標準曲線。165
附圖二十七 Trolox 之總抗氧化力標準曲線。166
附圖二十八 燕麥基質熱水萃取物之螯合亞鐵離子能力標準曲線。	167
附圖二十九 燕麥基質乙醇萃取物之螯合亞鐵離子能力標準曲線。	168
附圖三十 桑黃燕麥熱水萃取物之螯合亞鐵離子能力標準曲線。	169

附圖三十一	桑黃燕麥乙醇萃取物之螯合亞鐵離子能力標準曲線。	170
附圖三十二	發酵液粉末熱水萃取物之螯合亞鐵離子能力標準曲線。	171
附圖三十三	發酵液粉末乙醇萃取物之螯合亞鐵離子能力標準曲線。	172
附圖三十四	EDTA 之螯合亞鐵離子標準曲線。	173
附圖三十五	燕麥基質熱水萃取物之還原力標準曲線。	174
附圖三十六	燕麥基質乙醇萃取物之還原力標準曲線。	175
附圖三十七	桑黃燕麥熱水萃取物之還原力標準曲線。	176
附圖三十八	桑黃燕麥乙醇萃取物之還原力標準曲線。	177
附圖三十九	發酵液粉末熱水萃取物之還原力標準曲線。	178
附圖四十	發酵液粉末乙醇萃取物之還原力標準曲線。	179
附圖四十一	BHA 之還原力標準曲線。	180
附圖四十二	Ascorbic acid 之還原力標準曲線。	181
附圖四十三	α -tocopherol 之還原力標準曲線。	182

摘要

本實驗選用桑黃菌為試驗菌種，以燕麥作為基質，利用固態培養方式製備出桑黃燕麥，探討固態培養條件對菌絲體及多醣體生成之影響，再針對燕麥基質、桑黃燕麥及氣泡式發酵槽發酵液之熱水及乙醇萃取物進行生物活性（抑菌力、抗氧化力及抑制癌細胞生長能力）之比較評估。

研究結果顯示，最適 *P. igniarius* PI 菌絲體及多醣體生成之固態培養條件為：培養溫度為 30°C，水添加量為 60% (v/w)，接菌量為 3ml，最適碳源為 1% (w/w) 之葡萄糖、最適氮源為 1% (w/w) 之酵母萃取物、最適生長因子為 0.3% (w/v) 之核黃素 (riboflavin)、最適無機鹽類為 0.1% (w/w) 之氯化鈉 (NaCl)，起始 pH 值 4.0，以上述最適固態培養條件，於第 16 天時可得菌絲體與多醣體產量（分別為 749.21 及 45.98mg/g），分別增加為基礎培養基最高產量（382.44 及 37.59 mg/g）之 1.96 及 1.22 倍。

燕麥基質、桑黃燕麥及氣泡式發酵槽發酵液三者之多醣體分子量分佈以桑黃燕麥最為複雜，且桑黃燕麥多醣體分子量 (2.4×10^4 Da) 為三者最高。 β -(1→3)-D-glucan 相對含量之測定亦以桑黃燕麥最高 (2.13 μ g/ml LE)。

燕麥基質、桑黃燕麥及氣泡式發酵槽發酵液之熱水及乙醇萃取物抑菌力測定結果顯示在所使用之六種病原菌測定菌株 (*Bacillus cereus* BCRC 10250, *Escherichia coli* BCRC 10239, *Listeria monocytogene* BCRC 14845, *Pseudomonas aeruginosa* BCRC 10261, *Staphylococcus aureus* BCRC 10451 and *Salmonella typhimurium* BCRC 10241) 上並沒有任何抑菌效果。

燕麥基質、桑黃燕麥及氣泡式發酵槽發酵液三者熱水及乙醇萃取物之抗氧化測試中，以桑黃燕麥熱水萃取物在 DPPH 自由基清除能力 (IC_{50} = 1.09 mg/ml)、總抗氧化能力 (IC_{50} = 0.66 mg/ml)、螯合亞鐵離子能力 (IC_{50} = 1.95 mg/ml) 及還原力 (IC_{50} = 1.10 mg/ml) 具有最佳之抗氧化活性。

燕麥基質、桑黃燕麥及氣泡式發酵槽發酵液之熱水萃取物的抑制癌細胞能力皆較乙醇萃取物為強。經桑黃燕麥熱水萃取物處理（1000 μ g/ml，5% CO₂/37 $^{\circ}$ C/48hr）後，肺腺癌細胞（A-549）、乳癌細胞（MCF-7）及肝癌細胞（HepG2）的存活率分別為 47.3，55.2 及 52.4%，皆顯著（P<0.05）低於其他測試組。

綜合上述結果，固態培養之桑黃燕麥較未發酵之燕麥基質及液態發酵液具更高的多醣體分子量及多醣體中 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量；其萃取物亦具更高之抗氧化力及抑制癌細胞生長能力等生物活性。萃取物中，以熱水萃取物較乙醇萃取物具較高之生物活性。

Abstract

Phellinus igniarius and oat granules were selected in this research to study the effect of solid-state culturing conditions on the production of polysaccharide and mycelial biomass, and to compare the bioactivity (antibacterial, antioxidant and antitumor activities) of extracts from solid-state culture and submerged culture by this strain.

Results showed that the optimal factors for solid-state culturing condition were: incubation temperature of 30°C, water supplementation of 60% (v/w), inoculum volume of 3ml, glucose at 1% (w/w), yeast extract at 1% (w/w), riboflavin at 0.3% (w/w), NaCl at 0.1% (w/w) and initial pH of 4.0. Under this optimized culturing condition, yields of mycelial biomass (749.21 mg/g) and polysaccharide (45.98 mg/g) obtained on the 16th day of incubation increased 1.96 and 1.22 times, respectively, as compared with those from basal medium.

Higher molecular weight (2.4×10^4 Da) and relative β -(1→3)-D-glucan contents (2.13 μ g/ml LE) of polysaccharide were estimated from *Phellinus*-fermented oat, as compared with those from oat substrate and submerged culture using air bubble fermentor.

Both hot-water and ethanolic extracts from oats substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture demonstrated no antibacterial activities against the six bacterial strains (*Bacillus cereus* BCRC 10250, *Escherichia coli* BCRC 10239, *Listeria monocytogene* BCRC 14845, *Pseudomonas aeruginosa* BCRC 10261, *Staphylococcus aureus* BCRC 10451 and *Salmonella typhimurium* BCRC 10241) tested.

The hot-water extract from *Phellinus*-fermented oat showed the highest DPPH scavenging effect ($IC_{50} = 1.09$ mg/ml), total antioxidant capacity ($IC_{50} = 0.66$ mg/ml), chelating ability on ferrous ion ($IC_{50} = 1.95$ mg/ml) and reducing power ($IC_{50} = 1.10$ mg/ml) among those from all extracts.

The hot-water extract from oats substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture had higher antitumor activity than that of the ethanolic extracts. After treated with hot-water extracts from *Phellinus*-fermented oat (1000 μ g/ml, 5% CO₂/37°C/48hr), viabilities of lung-cancer cells (A-549), breast-cancer cells (MCF-7) and liver-cancer cells (HepG2) were 47.3%, 55.2% and 52.4%, respectively, which were significantly ($P < 0.05$) lower than those of all other extracts.

In summary, *Phellinus*-fermented oat (solid-state culture) possessed polysaccharide with higher molecular weight and relative β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan contents than submerged culture and unfermented oat substrate. Extracts from *Phellinus*-fermented oat showed better bioactivity than those from submerged culture. Among the extracts, hot-water extract had higher bioactivity than ethanolic extracts.

壹、前言

本篇研究所使用的桑黃菌種（火木層孔菌 *Phellinus igniarius*, PI），為多年生蕈菌類。主要寄生於活桑樹上，外觀呈黑色瘤狀，質地堅硬，表面具有多層狀顏色，由於內側呈現鮮豔之黃色，所以稱之為桑黃。自古以來是用來止血、利尿、驅瘀血、鎮痛、及月經不順等，同時亦可用於健胃及止瀉；經由前人的研究證實，桑黃菌具有很強的抗氧化、抗突變、抗腫瘤及刺激免疫活性的能力。

目前桑黃的人工栽培大多以菌絲體培養為主，如深層培養（submerged culture），鮮少有桑黃固態發酵培養的相關資料，有文獻指出利用固態發酵技術培養所得的真菌菌絲體的二次代謝產物含量比液態發酵技術所得的含量還高（Robinson *et al.*, 2001）。因此，本論文以穀、豆類做為基質，接種桑黃菌進行固態發酵，主要的研究目的為 1. 探討三種固態培養基質（薏仁、黑豆及燕麥）30°C 溫度下培養 20 天之菌絲體生長情況，篩選出最適合桑黃菌生長之培養基質；2. 以篩選出之基質進行桑黃菌 PI 固態發酵，探討最適桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之固態培養條件（培養溫度、水添加量、接菌量、碳源、氮源、生長因子、無機鹽類、起始 pH 值等）；3. 針對最適固態培養條件下所製備之發酵產物、未發酵之基質及氣泡式發酵槽所得之發酵液，測定三者之多醣體分子量分佈及 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量，並對彼等之熱水及乙醇萃取物進行抑菌力、抗氧化活性及抑制癌細胞生長能力之比較評估。藉此希望可開發以桑黃菌 PI 固態發酵培養製備之保健食品。

貳、文獻回顧

一、桑黃菌簡介

桑黃又稱桑臣、桑耳、狢猴眼，是一種非常珍貴的藥用真菌。主要寄生於楊、柳、桃、白樺等闊葉樹上，會導致心材的白腐，為多年生蕈類（劉，1984）。傳統桑黃以子實體入藥，味微苦、能利五臟、排毒、止血、活血，民間常用來治療子宮出血、白帶、月經不順等婦女病，支氣管炎、氣喘、肺結核等呼吸系統疾病，胃痛、下痢等消化系統疾病，以及過度勞、淋巴腫瘤等（真野俊樹，2003）。桑黃之研究於二十世紀末在國內外逐漸興起，其中以日本和韓國之研究較為廣泛，桑黃具有良好的抗腫瘤功效，並且無任何毒性副作用，是目前國際公認做好的抗腫瘤大型真菌之一（楊，2006）。而桑黃菌生長緩慢，要長至直徑 30 cm 大小一般需要二、三十年時間。桑木一旦被其寄生後會造成枯萎，所以以往在養蠶旺季時，都會遭到摘除的命運，也因其取得不易，加上難以人工栽培，故又被稱為「夢幻菇蕈」（高木，2004）。

（一）桑黃菌之分類、命名

桑黃菌在分類學上是屬於真菌界（Fungi）、擔子菌門（Basidiomycotina）、真正擔子菌綱（Hymenomycetidae）、平滑臥孔菌目（Aphyllorphrales）、刺革菌科（Hymenochaetaceae）、火木層孔菌屬（*Phellinus*），分類表如圖一所示（真野，2003）。其主要分布於中國，如河北、山西、內蒙古、黑龍江、吉林等地（陳，2007）。於日本、東南亞、澳洲及北美等地區也有分布。在日本，因為寄生於日本長崎男女群島之女島桑樹上，且形狀似瘤，故命名為女島瘤（meshimakobu）（齊和楊，2004）。目前對桑黃的研究集中在 *Phellinus igniarius* 和 *Phellinus linteus* 上。彼等之形態特徵簡述如下：



圖一 桑黃菌之分類。

Fig. 1 Classification of *Phellinus spp.* (真野, 2003)

1. 火木層孔菌或針層孔菌 (*Phellinus igniarius*) (卯, 1999) :

子實體為多年生，呈馬蹄形至扁半球形，木質，硬，菌蓋寬3~12 cm，初期有微細絨毛，淺褐色，以後光滑，呈暗灰黑或黑色，老時龜裂，無皮殼，邊緣鈍圓，淺咖啡色，下側無子實層。菌肉深咖啡色，硬木質，管孔多層，與菌肉同色，老的管孔中充滿白色菌絲。孢子無色，光滑，近球形 (4.5~6) $\mu\text{m} \times (4\sim5) \mu\text{m}$ ，寄生於柳、樺、楊、花楸、山楂等闊葉樹的樹幹上 (圖二- (a))。

2. 裂蹄木層孔菌 (*Phellinus linteus*) (卯, 1999) :

子實體為多年生，菌蓋 (2~10) cm \times (4~17) cm，厚1.5~7 cm，半圓形或馬蹄形，深烟色至黑色，初期有細絨毛，後變光滑和龜裂，硬而木質化，下側無子實層。菌肉淡黃色或淺咖啡色，厚2~7 mm。菌管同菌肉色相似，多層，但層次不明顯，老年的菌管層充滿白色菌絲，每層厚2~5 mm，管口同色，圓形。孢子 (3.5~4.5) $\mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ ，黃褐色，光滑，近球形。寄生於楊、櫟、丁香、樺槭等樹木的枯木及立木和樹幹上 (圖二- (b))。



(a)



(b)

圖二 桑黃菌之外觀形態。(a) *Phellinus igniarius* (b) *Phellinus linteus*。
Fig. 2 The morphology of (a) *Phellinus igniarius* and (b) *Phellinus linteus*.

(二) 桑黃之化學組成

桑黃菌中的主要化學成分為多醣體，也是目前研究中桑黃抗腫瘤作用的主要成分。桑黃多醣體含有13.2%(w/w)的蛋白質、82.5%(w/w)的碳水化合物，其中6.8%(w/w)的碳水化合物為糖醛酸(uronic acid)，經由GC(gas chromatography)證實此部份為葡萄糖醛酸(glucuronic acid)。Song 等人(2009)從*P. linteus*菌絲體中分離純化得到一種多醣體，分子量約15300Da，其中含有阿拉伯糖(7%)、木糖(3.7%)、葡萄糖(21.1%)、半乳糖(24.1%)和甘露糖(44.2%)，其組成相較於其他菇類多醣複雜。Hwang 等人(2003)分析桑黃菌中胺基酸組成，發現桑黃含有多種胺基酸，其中以天門冬胺酸(aspartic acid)及麩氨醯胺基酸(glutamic acid)含量較高(表一)。

桑黃中含有落葉松萆酸、脂肪酸(主要為C₂₂、C₂₄的飽和脂肪酸)草酸等有機酸(中藥大辭典,1985)。另外具有三萜類、固醇類物質，以及木糖氧化酶、尿酶、酯酶、過氧化氫酶等多種酵素。此外，莫等人(2003)在*P. igniarius*中分離得到5種黃酮類化合物，包含柚皮素(4',5,7-三羥基二氫黃酮)、櫻花亭(4',5-二羥基-7-甲氧基二氫黃酮)、二氫茨非素(4',5,7-三羥基二氫黃酮醇)、7-甲氧基二氫茨非素(4',5-二羥基-7-甲氧基二氫黃酮醇)以及北美聖草素(3',4',5,7-四羥基二氫黃酮醇)；2種香豆素類化合物，包含香豆素(苯並吡喃-2-酮)和葎荂亭(7-羥基-6-甲氧基苯並吡喃-2-酮)。桑黃亦含有麥角固醇(ergosterol)(劉等,1998)及黑色素(Kurchenko *et al.*,1998)、酚類色素等(Kirk *et al.*,1975)。

表一 桑黃菌粗多醣體中胺基酸和碳水化合物組成

Table 1 The amino acid and carbohydrate composition of crude polysaccharide from *Phellinus linteus*.

種類	含量 (% , w/v)
Amino acid	
Aspartic acid	15.88
Threonine	6.57
Serine	7.84
Glutamic acid	11.73
Glycine	11.61
Alanine	5.17
Cystine	2.55
Valine	5.04
Methionine	2.68
Isoleucine	3.32
Leucine	3.38
Tyrosine	3.23
Phenylalanine	5.49
Histidine	1.59
Lysine	5.29
Arginine	9.63
Carbohydrate	
Maltose	8.13
Arabinose	25.05
Xylose	3.86
Mannose	26.45
Galactose	21.45
Glucose	15.04

(Hwang *et al.*, 2003a)

(三) 桑黃之藥理研究

1. 抗腫瘤作用

(1) 小分子產物的抗腫瘤功能

目前從桑黃中已經分離出三十幾種化合物，分別屬於萜類、固醇類、黃酮類 (flavonoids) 及香豆素 (coumarin)。目前較為積極進行抗腫瘤活性研究的只有 hispolon，該 hispolon 是 Chen 等人 (2006) 由 *P. linteus* 中萃取分離出的一種酚類衍生物，分子式為 $C_{12}H_4O_{11}$ ，hispolon 對於人表皮癌 KB 細胞的 IC_{50} 量為 $4.62 \mu\text{g/ml}$ ，並且當濃度提升到 $10 \mu\text{g/ml}$ 時，KB 細胞凋亡數量占 67.9%，Caspase-3 的活性提高 5.47 倍，且會誘導細胞酵素 C 的釋放。同時細胞型態及 DNA 片段分析也顯示 hispolon 可有效誘導 KB 細胞凋亡。

此外，除 hispolon 以外，對桑黃小分子產物的抗腫瘤活性主要是以桑黃萃取物來做研究，Shon 等人 (1999) 將 *P. linteus* 以熱水及正丁醇進行萃取，發現所得到之兩種萃取物皆無致突變性，但對於 NPD 和 NaN_3 直接誘導突變有顯著的抑制作用。Lim 等人 (2001) 將 *P. linteus* 以甲醇進行萃取，發現其萃取物對 B16-F10 黑色素瘤細胞基底膜入侵的抑制率達 67%。

研究顯示，萃取溶劑的不同也會影響桑黃的抗腫瘤活性。Ajith 等人 (2003) 研究 *Phellinus rimosus* (Berk) Pila 的乙酸乙酯、甲醇及水萃取物的抗腫瘤效果。結果顯示，乙酸乙酯及甲醇萃取物均具有較高體外抑制淋巴腹水癌和 Ehrlich 腹水癌，而水萃取物作用則不明顯。

(2) 多醣類物質的抗腫瘤功能

a. 增強免疫力間接抗癌：

從桑黃中分離出之多醣體主要為酸性多醣和蛋白聚醣，大多數並沒有直接抑癌功效，主要是通過免疫調節來抑制癌細胞的生長及轉移。研

究指出，體外試驗中可使T淋巴細胞活性增強3倍，B淋巴細胞活性增加129倍，巨噬細胞活性增加3~5倍，NK細胞活性增加2倍，由此可見桑黃能明顯增強免疫細胞活性，提高免疫力（張等，2002）。Kim等人（2006）從*P. linteus*中分離出一種分子量為73KDa的多醣蛋白複合物PPC，主要是由D-葡萄糖和D-甘露糖所組成，胺基酸主要為天門冬胺酸（aspartic acid）。PPC具有細胞特異性，其能夠有效促使B細胞增殖，但對T細胞無效。此外，PPC可促進巨噬細胞產生NO，實驗也證明PPC可加速NO致敏的B16黑色素瘤細胞的細胞溶解。此外PPC還能上調NK細胞對YAC-1細胞的毒殺作用。另外，從*P. linteus*中分離出一種分子量為15KDa的PPC2，該PPC2能通過激活體內CD⁴⁺ Th 和CD⁸⁺ T細胞來達到抗癌效果（Kim *et al.*,2004c）。

b. 腫瘤直接殺傷作用：

多醣體以阻斷細胞週期並誘導細胞凋亡的方式來直接導致腫瘤細胞的死亡，例如，桑黃(*P.linteus*)中的PBP具有抗SW4800人類直腸癌細胞增生的效果，其機制主要是藉由增加cytochrome c的釋放及降低訊號傳遞分子Bcl-2與cyclin B1的表達使細胞週期停滯在G2/M期，阻斷其細胞週期，以誘導細胞凋亡（Li *et al.*, 2004）。有學者發現桑黃在體外能直接誘生人外週單核球細胞（peripheral mononuclear cells；PMNCs）產生IFN- γ ，並在一定濃度範圍內隨桑黃濃度升高而使IFN- γ 濃度提高（張等，2002a）。而IFN- γ 有明顯的抗腫瘤活性，能抑制前癌基因表達，阻止腫瘤細胞從G0期進入G1期，抑制腫瘤細胞的增殖，因此這可能是桑黃的抑癌機制之一（鄭等，2005）。

2. 抗血管增生

抗血管增生是現今治療癌症重要的方式之一，Song等人（2003）指出，透過小雞胚胎絨毛尿囊膜分析（chorioallantoic membrane assay, CAM）發現桑黃之乙醇萃取物具有抗血管新生的活性，並具有劑量效應。張等人（2003）發現桑黃靈芝UE-1(由桑黃及靈芝中萃取的多醣體混合製成)可抑制體內Lewis肺癌的生長，其抑制率為31.3%。再以UE-1進行CAM試驗，結果顯示，當UE-1劑量為40mg/L具有明顯抑制血管新生的作用，並具有劑量效應。

3. 保肝抗肝纖維化功能

肝臟內有一種名叫肝星狀細胞（hepatic stellate cell, HSC），在肝損傷過程中，肝星狀細胞被刺激而活化，進而轉化為肌成纖維細胞，可產生大量細胞外基質，主要為膠原纖維，導致肝纖維化的形成，進而影響肝臟血液循環及血液與肝細胞的物質交換，加重肝細胞的損害。研究指出，抗脂質過氧化與調節發炎因子，是桑黃具有抗肝纖維化功能的作用機制。張等（2003），在以 CCl_4 誘導大鼠肝纖維化過程中，脂質過氧化為主要的肝損傷機制。根據研究，桑黃雖未能明顯減少肝組織脂質過氧化產物MDA的生成，但一定程度上提高SOD的活性，減少血清中活性氧（ $\text{O}_2^{++} \cdot \text{OH}$ ）含量，進而引起抗脂質過氧化作用。桑黃能提高肝損傷大鼠的蛋白質合成能力，可顯著地降低血清胺基酸轉移酶和血清膠原的含量，且能降低血清IL-4含量並顯著提高IFN- γ 的含量（張，2002）。IFN- γ 是一種肝纖維化抑制因子，其主要為直接抑制肝肝星狀細胞（HSC）增殖，或通過調節其他細胞因子，間接抑制HSC的激活，並能抑制膠原基因mRNA的表達，減少膠原合成。

4. 抗氧化

惡性腫瘤與腦血管疾病為95年國人十大死因第一與第二，並且根據流行病學研究顯示，癌症與心血管疾病等疾病和自由基及活性氧的產生有著密切的關係（Halliwell and Gutteridge, 1989）。自由基除會氧化細胞內外各種成分外，甚至還會影響細胞分裂導，造成細胞老化和凋亡，引發各種疾病（Conner and Grisham, 1996）。Shon等人（2003）利用β-胡蘿蔔素-亞麻油酸模（β-carotene-linoleatemodel）和活性氧反應產生系統來測定抗氧化作用和自由基清除能力，結果顯示桑黃（*P. baumii*）甲醇及熱水萃取物具有高抗氧化活性和羥自由基、過氧化氫及DPPH自由基（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals）的清除能力。Song等人（2003）利用桑黃菌子實體的70%酒精萃取物進行其抑制DPPH自由基（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals）、脂質過氧化（lipid peroxidation, LPO）及黃嘌呤氧化酵素（xanthine oxidase）等抗氧化試驗，發現桑黃菌子實體萃取物濃度於10至300 μg/mL時，有最好的抗氧化效果。

5. 抑菌性

Hur等人（2004）採用浸提法提取桑黃菌子實體，得到甲醇、氯仿、正丁醇和水的萃取物對具有甲氧苯青黴素抗性金黃色葡萄球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*）進行最低抑菌濃度（minimal inhibitory concentration, MIC）的測試。結果顯示，正丁醇萃取物效果最佳（MIC：63-125 μg/mL）。

6. 降血糖與降血脂功能

Kim等人（2001）用桑黃多醣餵食豚黴素誘導之糖尿病鼠

(streptozotocin induced diabetic rats)，結果顯示桑黃多醣可降低血糖、總膽固醇與總三酸甘油酯的濃度，並可降低天冬胺酸轉氨酶 (aspartate aminotransferase；AST) 之活性。此外，Hwang 等人 (2005) 亦發現桑黃 (*P. baumii*) 胞外多醣可降低利用STZ誘導之糖尿病鼠血清中葡萄糖及總三酸甘油酯含量，分別為52.3%和39.4%，並且也可降低丙胺酸轉氨酶 (alanine aminotransferase；ALT) 之活性，根據上述文獻，可知桑黃多醣具有良好的降血糖與降血脂之功效。

(四) 桑黃之藥用開發及展望

桑黃作為藥用真菌，開發時間較其他菇蕈類晚，市場需求量大，經濟效益高，根據日本國立癌症中心的研究，在眾多菇蕈類中，野生桑黃的腫瘤抑制率為目前第一名，但因桑黃數量稀少，成長非常緩慢，人工培養困難，比起已量產的其他菇蕈類，如靈芝、冬蟲夏草等，更顯得珍貴。

我國在桑黃的實際利用上比日本及韓國較晚，韓國自1980年起就以國家計畫研究開發桑黃，1993年更將桑黃列為醫藥品，日本將其當成健康食品正式進口販賣，使得桑黃的需求日益增加。

因此，桑黃菌種的分離鑑定與培養成為首要的工作；其次可進一步開展桑黃的人工栽培，探索菌種、菌齡以及培養條件的關係，並進行有效成分的鑑定(徐，2008)。在台灣方面，提出「桑黃栽培與液體發酵之功效性研究」、「桑黃固體培養栽培與液體發酵優良品系之篩選」等研究計畫，這些年在產業與學術的合作推廣下，已收到良好的成果。最後，因桑黃具有很強的抗癌、增強免疫力及抗氧化等作用，因此進一步分離純化該有效成份物質，使桑黃能夠應用於人類醫療保健事業之上。

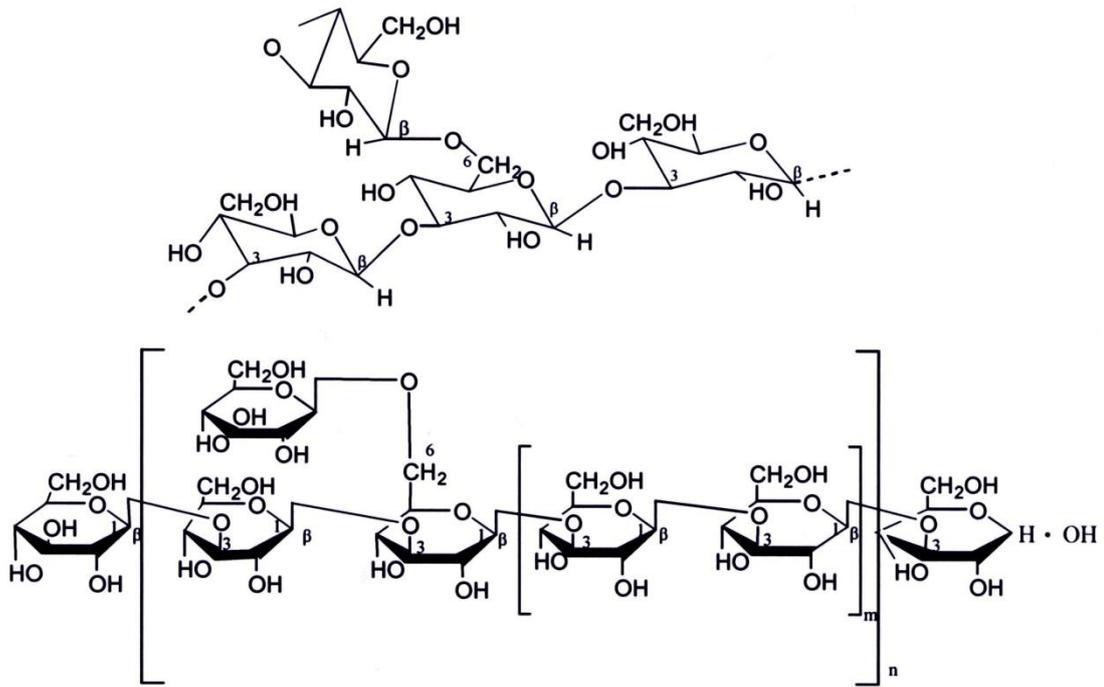
二、食藥用菇類多醣簡介

近年來食藥用菇一直是人類重要的食用及醫療資源，其中所含有之多醣體更具有抗腫瘤及調節免疫的功能。食藥用菇的多醣體含有豐富的幾丁質、半纖維素、 α 和 β -glucans、甘露聚醣、聚木糖和聚半乳糖(Bohn and BeMiller,1995)。這些多醣體不論是所組成醣的種類、化學鍵結的方式，或是分子量大小與性質方面，都會有所差異，同時也會因品種、培養方式及萃取方法的不同而有所差異。而微生物體中多醣體的存在形式可分為三大類(許，2004)：

1. 胞內多醣 (intracellular polysaccharides)：主要提供微生物生長所需能量及碳源。
2. 胞外多醣 (extracellular polysaccharides)：通常是附著於細胞外部的黏性物質。
3. 結構多醣 (structure polysaccharides)：主要架構微生物菌體的多醣基本形態。

(一) 多醣體之結構

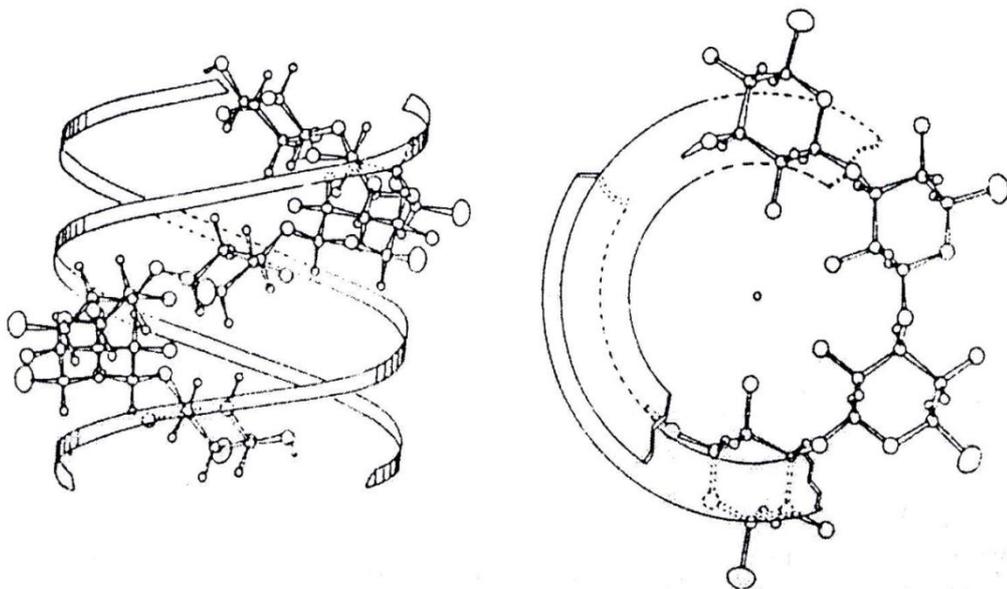
食藥用菇中證實具有抗腫瘤功能的多醣體種類繁多，這些多醣體的平均分子量約為5~2000 KDa之間 (Bohn and BeMiller, 1995)。現已證實多醣體中的 β - (1→3) -D-glucan結構為抗腫瘤的重要因素，這些多醣體的分
子結構是以 β - (1→3) -D-glucan為主鏈，沿著主鏈隨機分佈 β - (1→6) -D-glucan，如圖三所示 (賴，2003)。此外利用X-射線繞射分析其多醣體立體結構，結果得知 β - (1→3) -D-glucan會形成螺旋結構如圖四所示，可能是其具有抗腫瘤功效的主要成因 (水野與川合，1999)。



圖三 具抗腫瘤活性的 β -(1 \rightarrow 6)分支 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖結構。

Fig. 3 Structure of β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan with β -(1 \rightarrow 6)-branching side chain.

(水野與川合，1999)



圖四 X 射線衍射測定之 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖結晶結構。

Fig. 4 The crystal structure of β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan by X-ray analysis.

(水野與川合，1999)

(二) 多醣體之抗腫瘤活性

構成多醣體的單醣種類、化學鍵結的方式，或是分子量大小的不同，對其生理活性皆會有影響，因此並非所有的多醣體都具有抗腫瘤的功能。表二為多種具抗腫瘤活性食藥用菇多醣體的糖苷鍵結類型、主鏈支鏈鍵結的型式和分子量。這些具抗癌功效的多醣所含有的單糖包括：glucose、galactose、mannose、xylose、arabinose、fucose、ribose 和 glucuronic acid，依照多醣體組成大致可分為下列四種（林，2006）：

1. Homoglucans：完全由葡萄糖組成，並具有不同鍵結型態所形成之直鏈或是分支型的多醣。
2. Heteroglucans：由葡萄糖做為多醣體的主鏈，支鏈為其他醣類。
3. Glycans：為非葡萄糖之其他種類單醣所組成的多醣體。
4. Heteroglycans：由 glycans 作為主鏈，鍵結非 glycans 的醣類作為支鏈。

近年來研究證實，以 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan為主鏈，支鏈為 β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan的多醣體其抗腫瘤的效果最佳，此外在某些食藥用菇類中也發現其多醣體會與蛋白質或胜肽進行鍵結形成polysaccharide–protein或polysaccharide–peptide complex，這樣的複合物有具有很高的抗癌活性(Cui and Chisti, 2003)。

食藥用菇多醣體對於腫瘤生長具有良好的抑制作用，其中包括肉瘤(S₁₈₀)、肉瘤(S₃₇)、Yoshida肉瘤和Lewis肺癌模式(Wasser and Weis, 1999)，其可能的抗腫瘤機制為：

1. Cancer preventing activity：

研究指出多醣體具有預防癌症發生的功能，一些種植食藥用菇類的菇農，例如日本的金針菇(*Flammulina velutipes*)和巴西的巴西蘑菇(*Agaricus blazei*)，菇農死於癌症的比例顯著低於正常族群約 40% (Ikekawa, 2001)。

表二 抗腫瘤活性食藥用菇多醣體之化學結構

Table 2 Chemical structures of antitumor mushroom polysaccharides

Polysaccharide	Types	Mushroom resoures	Main chain	Branch
Homoglucans	β -D-glucan	<i>Lentinus edodes</i>	β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan	β -(1 \rightarrow 6)
		<i>Schizophyllum commune</i>	β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan	β -(1 \rightarrow 6)
		<i>Grifola frondosa</i>	β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan	β -(1 \rightarrow 6)
	Linear β -D-glucan	<i>Auricularia auricula</i>	β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan	
		<i>Auricularia tabescents</i>	β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan	
Heteroglucans	β -D-glucan	<i>Agaricus blazei</i>	β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan	α -(1 \rightarrow 4) β -(1 \rightarrow 6)
	Xyloglcan	<i>Polyporus confluers</i>	Glucan	Xylose
	Arabinoglucan	<i>Ganoderma tsugae</i>	Glucan	Arabinose
	Riboglucan	<i>Agaricus blazei</i>	Glucan	Ribose
	Galactomannoglucan	<i>Hohenbuehelia serotina</i>	Glucan	Galactose and mannose
Glycan	Xylan	<i>Hericium erinaceus</i>	Xylan	Galactose and mannose
	Mannan	<i>Dictyophora indusiata</i>	α -(1 \rightarrow 3)-mannan	
Heteroglycan	Mannogalactofucan	<i>Grifola frondosa</i>	Fucan	Mannose and galactose
	Mannoglucoxylan	<i>Hericium erinaceus</i>	Xylose	Mannose and glucose
	Glucomannan	<i>Agaricus blazei</i>	β -(1 \rightarrow 3)-mannan	β -(1 \rightarrow 2)-glucan

(Zhang, 2002)

2. Immuno-enhancing activity :

多醣體並非直接作用殺死腫瘤細胞，而是利用增強活化宿主的免疫功能，從而抑制癌細胞的增生或將其排除，可歸類為一種生物反應調節劑，換言之，其不會對身體造成傷害性或額外的壓力，可幫助身體去適應環境中不同的壓力和產生非特異性的反應，進而幫助體內不同系統的啟動(Wasser, 2002)。

以香菇多醣 lentinan 對人體的免疫系統作用為例，lentinan 能從巨噬細胞或是 T 細胞誘導生產 interleukin-1 (IL-1) 因子，使未成熟的細胞殺傷性 T 前驅細胞、細胞管制輔助性 T 前驅細胞、自然殺手細胞 (NK) 等成熟分化，增加寄主免疫擔當細胞的受體，提高其對 IL-2、NK 活性因子 (NKAF)、巨噬細胞活化因子 (MAF) 等各種細胞激素的反應性、進而活化細胞殺傷性 T 細胞、NK 細胞、細胞殺傷性巨噬細胞或延遲型過敏反應有關的細胞群，最後以特異性或非特異性殺傷破壞目標 (水野與川合，1999)。以上免疫活性總結如圖五所示。

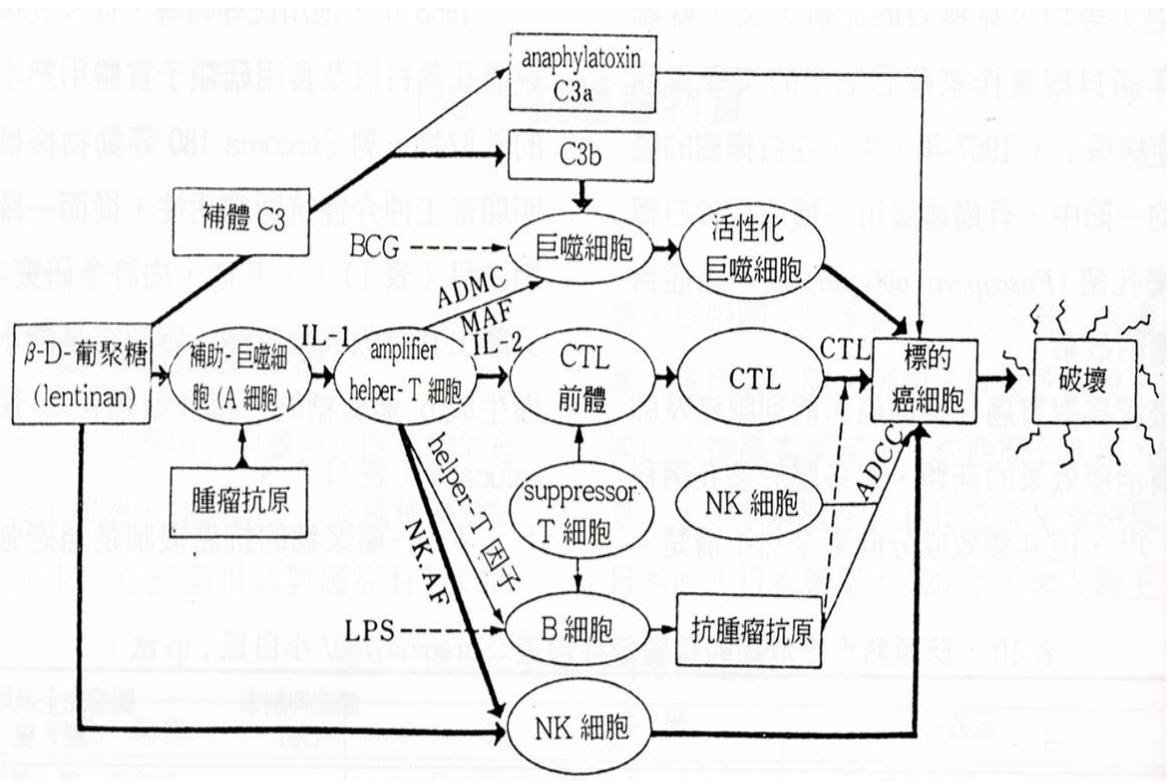
Cheung 等人(2004)餵食用螢光標記的 β -glucans 於 murine tumor models 的小鼠，探討其體內免疫反應之情況，其機制為粒細胞(granulocytes)上存在補體受體(CR3)，該受體具有兩個結合單元，其中一個為 iC3b 結合位，另一個為與 β -glucans 之結合位，稱作凝集素(lectin)結合位。當補體 C3 裂解形成 iC3b 時，iC3b 會黏附在腫瘤細胞上，形成 iC3b 調理之腫瘤細胞(iC3b-opsonized tumor cells)，此時粒細胞(granulocytes)通過的 CR3 上的 iC3b 結合位與 iC3b 調理之腫瘤細胞結合，但此時並不能殺死腫瘤細胞，只有當 CR3 的 lectin 結合位與 β -glucans 結合，在通過與 iC3b 調理之腫瘤細胞(iC3b-opsonized tumor cells)結合後才能殺死腫瘤細胞。Chan 等人(2009)將以上免疫活性總結如圖六所示。

另外， β -glucans 則是藉由巨噬細胞上的 Dectin-1 受體和 TLR- 2 /6 進入巨

噬細胞內，會形成內體(endosome)，再被降解為較小 β -glucans 片段，經血液運送至脾，淋巴結和骨髓，隨後釋放。

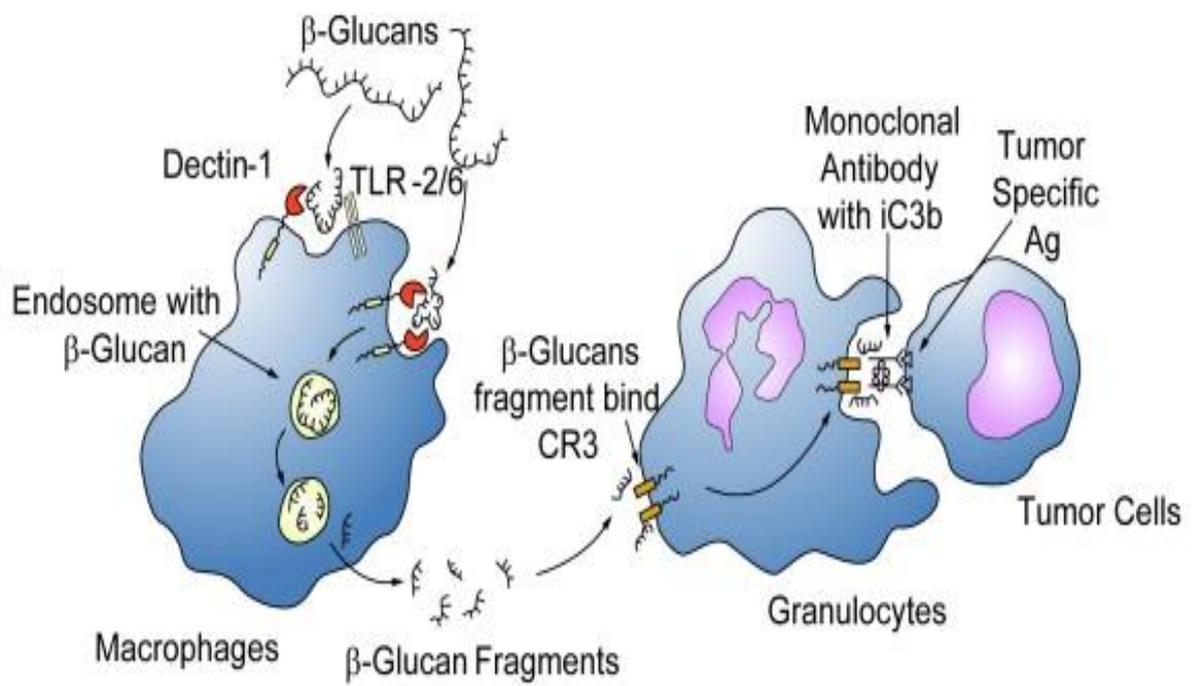
3. Direct tumor inhibition activity :

多醣體以阻斷細胞週期並誘導細胞凋亡的方式來直接導致腫瘤細胞的死亡，例如，Zaidman 等人 (2005) 在 *Pleurotus tuber-regium* 中分離出一種 carboxymethylated polysaccharides(CMPTR)，再以 CMPTR 處理 MCF-7 人類乳癌細胞，發現其會降低 cyclin D1、cyclin E 及 Bcl-2 的表現，並增加 Bax (促細胞凋亡蛋白)的表達，阻斷其細胞週期，達到抑制細胞增殖的效果。



圖五 香菇多醣 lentinan 對寄主所產生的免疫反應。

Fig. 5 The immunity reaction in host by lentinan. (水野與川合，1999)



圖六 攝入 β -glucan 於小鼠免疫細胞之反應。
 Fig. 6 The uptake and subsequent actions of β -glucan on immune cells.
 (Chan *et al.*, 2009)

三、固態發酵之簡介

固態發酵(solid-state fermentation)是指利用一些固態的營養基質，例如穀物或農產廢棄物，在較乾燥的環境下進行微生物的培養(Mitchelet and Lonsane, 1992)。相對於液態發酵而言，固態發酵的培養基質含水量較低，一般在40%~60%濕基，但含水量並非區分固態發酵或液態發酵的唯一標準。若是基質吸水性非常好，即使在含水量高的情況下(>70%)，液態水也不會以連續相存在，所以基質仍可呈現較好的固態特性。因此，固態發酵也可定義為微生物在幾乎沒有游離可流動水的培養基上生長之過程(許和胡，2009)。

(一) 固態發酵之特點

固態發酵常使用穀物或農產廢棄物等作為基質進行培養，此類固態基質並非完全緊密分佈在環境中，其顆粒間仍有空隙存在，因連續相為氣相，使基質的混合和擴散都較困難，容易導致溫度、基質濃度及產物濃度的梯度(Viniegra-Gonzalez, 1997)。在氧氣傳遞方面，基質顆粒的表面或其附近部份具有較佳的氧氣供給，因此微生物會經常攀附生長於基質表面或向內穿透生長。相對於液態深層培養(submerged fermentation)，因為水是連續相，在培養過程中不斷攪拌與通氣，微生物則懸浮沉浸在液體中生長，由此可發現微生物在固態與液態發酵中的生長環境與生長型態有很大的差異(羅和徐，2004)。

此外，微生物在利用固態基質時，會自然攀附或穿透固態基質，形成特殊的生長型態，這樣的生長過程和型態在液態深層培養中是不易發生的，對於某些微生物二次代謝物之生產，這種自然且完整發育的生長型態是極為重要的(Viniegra-Gonzalez *et al.*, 2003)。表三為固態與液態發酵特點之比較(Durand, 1988)。由於固態發酵的獨特性，引發了一些優點及缺點。而在工

業上對於固態或液態發酵之取捨需賴過程的成本及效率來判斷。以下為固態發酵之優缺點（Sato and Sudo, 1999；Durand, 2003；羅和徐，2004）：

固態發酵的優點：

1. 細菌受到低水活性的限制，因此固態發酵較不易受到細菌污染。
2. 低水份的培養環境對某些微生物的代謝產物產生有特別影響，在液態發酵中，微生物沉浸在液體中培養，較不利於此類代謝產物的產生。
3. 基質濃度高，相同量的基質於固態發酵較液態發酵所需的發酵設備體積較小，生產成本也較低，同時也可具有較高的體積產率。
4. 微生物利用空氣中的氧氣，降低了通氣的能量成本。空氣的供給與基質床的溫度可藉由強制通氣來控制。固態基質的表面積大，可促進熱傳送與氧氣和二氧化碳的氣體交換。
5. 若產物必需從固態發酵中萃取，只需要較少的溶劑與較低的回收成本。
6. 發酵殘餘物的處理非常簡單。因為發酵殘餘物的水含量很低，可將其乾燥後做為動物飼料或肥料。

固態發酵的缺點：

1. 基質床的攪拌非常困難。因此，菌體、養分、溫度、水含量容易分佈不均，造成基質床異質性的生理、物理、化學環境。這個複雜性使得過程控制非常困難。
2. 微生物呼吸或代謝產生熱使得溫度控制困難。通常強制通氣式控制培養溫度的唯一方法。
3. 菌體生長與其他發酵參數的快速測量困難。尚無有用的感測器可供直接測量菌體生長或其他之發酵參數。
4. 固態發酵過程中基質水含量較低，與液態發酵相較之下，其所能培養的微

生物種類受到較多限制。

5. 由於影響固態發酵高產率的因子還是未知數，培養策略完全是靠經驗與實驗結果。

表三 固態發酵與液態發酵特點的比較

Table 3 Comparative characteristic of solid-state fermentation and submerged fermentation .

項目	固態發酵	液態發酵
培養基	使用多種不易溶解的穀物或農業廢棄物，其成份不完全明確，基質濃度高，導致產物濃度高，故單位體積產率也較高	由多種純度高、化學成份明確的物質所組成，基質濃度低，故每單位體積產率較低。
水活性	具較低的水活性，因此雜菌不易生長	水活性高，許多微生物皆可生長，易被雜菌所污染
氧氣供給	空氣呈連續相，氧氣質傳速率較佳	氧氣不溶於水，氣相到液相的傳氧係數小
混合攪拌	傾向不攪拌或低度攪拌，以免破壞微生物特殊的生長型態	施以攪拌以達到培養環境的均勻性
溫度控制	代謝熱的移除較為困難，培養環境之溫控較難實施	培養環境之溫控較容易進行
參數控制	由於參數測定及菌體測量不易進行，發酵過程監控困難	許多參數檢測方法已實用，菌體檢測容易，發酵過程易自動控制
耗能	能源消耗較小	能源消耗較大
動力學研究	微生物動力學及傳導動力學研究不足	微生物動力學及傳導動力學研究充分，可應用於反應器的設計和放大

(Durand, 1988)

(二) 固態發酵菌體量之測量

固態發酵製程中使用固態基質造成不均勻的特性，使培養過程中發酵參數在監控上較困難，尤其是在菌體量的測量方面，因為真菌菌絲侵入固態基質內部生長，並且與基質緊密結合，導致菌體量的測量是極為不容易（羅和徐, 1988）。以下對固態發酵菌體量的測量方式進行介紹，主要可分為三大類（Durand *et al.*, 1999）：

1. 直接測量法

直接測量法包括了基質移除與細胞計數。Wei 等人（1981）利用半固態明膠培養基培養酵母菌（*Saccharomyces cerevisiae*），將溫度加熱到適當溫度使明膠溶解，利用離心將酵母菌與基質分離，即可得到酵母菌懸浮液。再利用分光光度計測量菌體濃度與吸光值之關係，即可得知菌體濃度。另外，Matcham 等人（1984）指出，可利用血球計數器估算菌絲長度，再由其直徑與密度爐絲菌體量的估算。

2. 通過菌體的代謝活動間接量測生物量

(1) 氧氣與二氧化碳代謝速率

微生物在代謝過程，進行呼吸作用消耗氧氣產生二氧化碳，因此可利用測定二氧化碳的釋放速率，來估算菌體的生成速率。Sugama 和 Okazaki(1979) 在培養 *Aspergillus oryzae* 過程中，利用 NaOH 溶液吸收氣相中的 CO₂，再以滴定的方式定量生成 CO₂，發現其與菌體間具有良好的線性關係。Narahara 等人（1982）利用紅外線二氧化碳分析儀測量 *Aspergillus oryzae* 在固態培養過程中 CO₂ 生成速率，結果顯示 CO₂ 生成速率和菌體的比生長速率呈現性關係。

(2) 胞外酵素

Wood(1979)指出固態培養洋菇(*A. bisporus*)所分泌的胞外漆酶(laccase)活性與菌絲量成正比關係長達70天，且這種關係不隨培養溫度及培養基的不同而變化。

3. 通過菌體組成份的含量間接量測生物量

若菌體組成份，如DNA、蛋白質、葡萄糖胺及麥角固醇等，其占菌體量的比例維持一定範圍，或對菌體不同生長階段其比例的改變已具有相當程度的了解，因此可藉此推估菌體量。

(1) 核酸

核酸在生物體中含量十分穩定。在代謝上也較穩定，不易被分解代謝。理論上核酸含量應與生物量具有良好的線性關係，但固態發酵所用之基質多為穀物或農產廢棄物，其中必定含有核酸。一般來說，穀物中所含之DNA較少，且微生物也會利用其DNA合成自身的DNA，因此大多數情況可忽略基質中之DNA。另一方式也可將未經發酵之基質以相同方式檢測出所含之DNA，做為空白組，在總核酸含量中扣除其數值（許和胡，2009）。

(2) 蛋白質和氮

菌體中含有一定量的蛋白質，因此蛋白質的增加可作為生長指標。Carrizalez等（1981）所述，微生物體的蛋白質含量通常與比生長速率有一定的比例關係。但若是基質中包含大量的蛋白質，在微生物生長的過程中，隨著基質的水解，蛋白質的產生將會影響菌體蛋白質的測量（Abdullah *et al.*, 1985）。

(3) 葡萄糖胺 (glucosamine)

幾丁質是真菌細胞壁的主要成分，幾丁質在酸性條件下可被分解為葡萄糖胺。植物的細胞壁中不含有幾丁質，且固態發酵所利用的基質都是植物。因此，可利用葡萄糖胺含量的測定，進行固態發酵中菌體量的估算(溫, 2005)。唐等人 (2006) 在猴頭菇 (*Hericium erinaceus*) 固態發酵過程中，利用 Elson-Morgan法測定發酵物中葡萄糖胺含量，發現其與菌體量之間具有良好的線性關係。

(4) 麥角固醇 (ergosterol)

麥角固醇是真菌中主要的固醇類物質，為細胞膜中的重要組成份。Matcham 等人 (1985) 培養 *A. bisporus* 過程中，進行葡萄糖胺和麥角固醇對比菌體的生長情況。結果得到了固態發酵中葡萄糖胺和麥角固醇與菌體間的線性關係。

(三) 固態發酵之應用

固態發酵可以用在生產許多微生物的代物，包括有機酸、具生物活性的物質、酵素及生物農藥等，其他像是環境復育、有害物質的生物分解及工業廢棄物中毒性成份的去除，也是固態發酵應用的延伸。

1. 代謝產物的生產

固態發酵生產的代謝物，包括 citric acid、lactic acid、fumaric acid 等有機酸，色素、維生素及一些香氣成份等 (Pandey et al., 2000)。另一類是具有生物活性的二次謝產物，這類物質通常在微生物具有完整之菌絲生長發育過程中才會產生，一般認為固態發酵有利於二次代謝物的產生。雖然目前大部分工業化生產接採用液態發酵，但固態發酵可提供不同的培養環境，有些微生

物在這樣的環境下，其代謝產物之產量反而更高，例如黴菌毒素、細菌內毒素、抗生素及免疫抑制藥物等（Pandey *et al.*, 2000）。

2. 酵素的生產

酵素的生產方法包括液態深層培養和固態發酵，以前者為主。但固態培養有許多優點，如動力消耗低、雜菌污染機率低、環境污染少、管理容易及單位體積產量較高等（許，2009）。工業上常生產的酶素有amylase、cellulase、pectinase、protease、lipase等，表四為利用固態發酵生產酶素的例子（Christi, 1999）。

3. 廢棄物處理及環境復育等

固態發酵也被應用在農業廢棄物中有毒物質的降解，例如樹薯皮中含有的氰酸與單寧酸成份，若不謹慎處理，將會造成環境污染。Ofuya和Obilor（1994）利用固態發酵處理樹薯皮，發現可去除95%以上的氰酸和42%以上的單寧酸。環境復育方面，例如含有農藥的廢棄物或被多氯聯苯污染的土地或的地下水，也可利用微生物來降解環境中的有害物質（Kastanek *et al.*, 1999）。

表四 應用固態發酵生產酵素

Table 4 Enzymes produced by solid -state fermentation.

Enzyme	Microorganisms
Amylase	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus megaterium</i>
Catalase	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Rhizopus niveus</i>
Cellulase	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma viridei</i> , <i>Trichoderma koningi</i> <i>Aspergillus ustus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Sporotrichum pulverulentum</i> , <i>Penicillium spinulosum</i> , <i>Penicillium</i> <i>capsulatum</i>
Chitinase	<i>Aspergillus niger</i>
Glucoamylase	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus</i> sp.
Invertase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus awamori</i>
Lactase	<i>Aspergillus oryzae</i>
Linamarase	<i>Aspergillus sydowi</i> , <i>Penicillium steckii</i>
Lipase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus luchuensis</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , <i>Penicillium candidum</i>
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus sojae</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Bassochlumys fulva</i> , <i>Penicillium expansum</i>
Phytase	<i>Aspergillus ficuum</i> , <i>Rhizopus oligosporus</i>
Protease	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Mucor</i> <i>dispersus</i>
Rennet	<i>Mucor pusillus</i> , <i>Mucor meihei</i> , <i>Rhizopus oligosporus</i>
Ribonuclease	<i>Aspergillus candidus</i>
Xylanase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Gibberella fujikuroi</i>

(Christi, 1999)

參、材料方法

一、試驗材料

(一) 試驗菌種

1. 桑黃菌種

Phellinus igniarius BCRC35308

購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心（新竹市，台灣）提供。

2. 測試抑菌能力菌種

Bacillus cereus BCRC 10250

Escherichia coli BCRC 10239

Listeria monocytogene BCRC 14845

Pseudomonas aeruginosa BCRC 10261

Staphylococcus aureus BCRC 10451

Salmonella typhimurium BCRC 10241

購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心（新竹市，台灣）提供。

(二) 測試細胞株

HepG2 (Human hepatoblastoma cell) BCRC 60025

MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cell) BCRC 60436

A-549 (Human lung carcinoma cell)

BCRC 60074

購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心（新竹市，台灣）提供。

(三) 固態培養基質

薏仁、黑豆及燕麥顆粒，購自台灣小糧口有限公司。

(四) 培養基

1. 真菌培養基

(1) Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato starch	4 g
Dextrose	20 g
Agar	15 g
Water	1000 ml
pH	5.62

(2) 基礎培養基 (Basal medium)

Glucose	10 g
Peptone	5 g
KH ₂ PO ₄	3 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g

Water	1000 ml
pH	5.6

固體基礎培養基為另加 1.8% agar 製成。

2. 細菌培養基

Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3g
Peptone	5g
Agar	15g
Water	1000 ml
pH	6.8

固體基礎培養基為另加 1.8% agar 製成。

3. 細胞培養基

(1) 肺腺癌 (A-549) 細胞培養基 (RPMI1640)

Medium component	Final conc.
L-glutamate	2mM
Non-essential amino acid	0.1mM
Sodium pyruvate	1 mM

Penicillin	1 mM
Fetal bovine serum	5%
Sodium bicarbonate	3.7g/L
Final vol	500ml

(2) 乳癌 (MCF-7) 細胞培養基 (RPMI1640)

Medium component	Final conc.
Sodium pyruvate	1mM
Penicillin	1 mM
Fetal bovine serum	10%
Sodium bicarbonate	3.7g/L
Final vol	500ml

(3) 肝癌 (HepG2) 細胞培養基 (DMEM / high glucose)

Medium component	Final conc.
L-glutamate	2mM

Sodium pyruvate	1mM
Penicillin	1 mM
Fetal bovine serum	10%
Sodium bicarbonate	3.7g/L
Final vol	500ml

(五) 重要藥品

1. 乳糖 (lactose)、鹽酸 (hydrochloric acid)、氯化亞鐵 (ferrous chloride)、磷酸二氫鈉 (sodium dihydrogen phosphate)、氯化鈉 (sodium chloride)、氯化鉀 (potassium chloride)、氯化鈣 (calcium chloride) 等購自日本林純藥株式會社。
2. 磷酸二氫銨 (ammonium dihydrogen phosphate)、硫酸銨 (ammonium sulfate)、硝酸銨 (ammonium nitrate)、尿素 (urea)、磷酸氫二鈉 (di-sodium hydrogen phosphate) 等購自德國 Merck 公司。
3. 果糖 (fructose)、蛋白胨 (peptone)、酵母萃取物 (yeast extract)、洋菜粉 (agar) 等購自印度 Himedia 公司。
4. 澱粉 (starch soluble)、葡萄糖 (glucose)、硫酸鋅 (zinc sulfate heptahydrate)、碳酸鈉 (sodium carbonate anhydrous) 購自德國 Riedel-de Haën 公司。
5. 玉米浸漬液 (corn steep liquor)、木糖 (xylose)、抗壞血酸 (ascorbic acid)、噻胺 (thiamin)、核黃素 (riboflavin)、DPPH (α, α -diphenyl- β -

- picryl-hydrazyl)、BHA (butylated hydroxyanisole)、BHT (butylated hydroxytoluene)、 α -tocopherol、三氯醋酸 (trichloroacetic)、Ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt)、EDTA (ethylenedinitrilo tetraacetic acid disodium salt dehydrate)、DMAB (ρ -dimethylaminobenzaldehyde)、 α -amylase、腺苷 (adenosine) 等購自美國 Sigma 公司。
6. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (magnesium sulphate-7-hydrate)、三氯化鐵 (ferric chloride) 購自日本島久藥品株式會社。
 7. 鐵氰化鉀 (potassium ferricyanide) 購自日本片山試藥株式會社。
 8. Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-teteramethylchroman-2-carboxylic Acid) 購自美國 Aldrich 公司。
 9. 葡萄糖 (glucose)、麥芽糖 (maltose)、螢光染劑 Aniline blue 購自德國 Ferak 公司。
 10. 抗生素 ampicillin 購自德國 Gerbu 公司。
 11. 酚 (phenol)、硫酸 (sulfuric acid)、磷酸二氫鉀 (potassium phosphate, Monobasic)、氫氧化鈉 (sodium hydroxide) 等購自台灣聯工化學試藥。
 12. 乙醇 (ethyl ethanol) 購自台灣菸酒公賣局。
 13. 硫酸鐵 (ferric sulfate pentahydrate)、硫酸銅 (copper sulfate pentahydrate) 購自日本和光純藥工業株式會社。
 14. 蔗糖 (sucrose)、氰甲烷 (acetonitrile)、甲醇 (methanol) 等購自美國 J. T. Baker 公司。
 15. Acetylacetone (2,4-Pentanedione) 購自英國 Alfa Aesar 公司。
 16. 透析膜 (WMCO 6000-8000) 購自比利時 Orange Scientific 公司。

17. 碳酸氫鈉 (Sodium bicarbonate) 購自日本 OSAKA 公司。
18. RPMI 1640(粉末)、DMEM / high glucose(粉末)、胎牛血清 (Fetal bovine serum)、Trypsin-EDTA、L-麩胺酸 (L-glutamate)、非必需胺基酸 (Non-essential amino acid)、丙酮酸鈉 (Sodium pyruvate) 購自美國 Gibco 公司。

二、試驗儀器

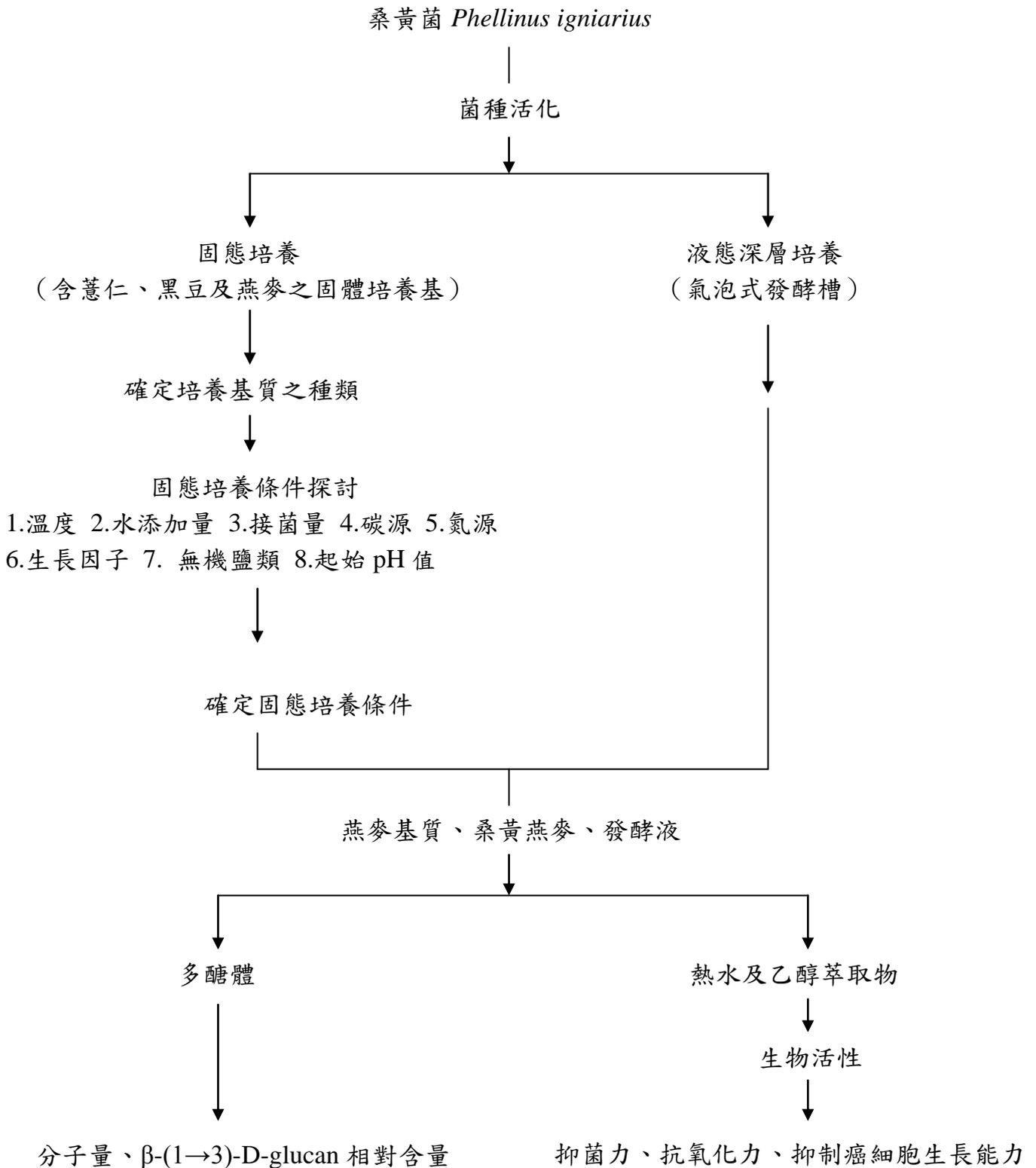
1. 恆溫培養箱: FIRSTEK™(Model-RI100、Model-RI150 及 Model-TG5); TKS (Model-LTI601), Firstek 公司, 台灣。
2. 高溫高壓滅菌釜: 永大明儀器公司, 台灣。
3. pH meter: inolab (Model-Level 1), W.T.W.公司, 德國。
4. 冷凍高速離心機: HITACHI (Model-himac CR22G II), 日立儀器公司, 日本。
5. 高效能液相層析儀: HITACHI (Model- L6000) pump, Bischoff RI Detector (Model-8110), UV-VIS Detector (Model-L-7420) HITACHI (Model-D2500) chromatointegrato 積分儀, 日立儀器公司, 日本。
6. 微電腦控制型離心機: Model-CN 2200, HSIANGTAI 公司, 台灣。
7. 熱風乾燥機: Model-RHD 603, RISEN 公司, 台灣。
8. 冷凍乾燥機: Model-Freeze dryer FD 5N, EYELA 公司, 日本。
9. 桌上型攪拌式及氣泡式發酵槽: Model-CMF 5L, 進基公司, 台灣。
10. 桌上型氣舉式發酵槽: MG1000S-7L, 百歐生技公司, 台灣。
11. 旋轉減壓濃縮機: Model-VV2000, Heidolph 公司, 德國。
12. 迴轉式振盪低溫恆溫培養箱: Model-S302R, Firstek 公司, 台灣。
13. 水平式無菌操作檯: Model-TW 14U, LIAN SHEN 公司, 台灣。
14. 桌上型離心機: HITACHI (Model- UNIVERSAL 32R), 日立儀器公

司，日本。

15. 恆溫水浴鍋：TKS (Model-KB-02)，KANSIN 公司，台灣。
16. 分析天平：Model-AB104 S，永力儀器公司，台灣。
17. 分光光度計：Model-Spectrnic 601，環保儀器公司，台灣。
18. 酵素免疫分析儀 ELISA reader (DYNEX MRXII microplate reader, USA)
19. 螢光分光光度計：HITACHI (Model-F-1100 Fluorescence Spectrophotometer)，日立儀器公司，日本。
20. 電腦分析軟體：SASTM R9.1 (SAS Institute Inc, USA)。
21. 電腦繪圖軟體：Sigmaplot-scientific Graphing Software Version 2000 (Microsoft Inc, USA)。

三、試驗方法

(一) 試驗流程



(二) 菌種保存

參考 Martin (1964) 的方法。將培養於 PDA 平板培養基上之桑黃菌菌絲，於外緣部份以滅過菌的穿孔器（直徑 7mm）挖取菌絲塊並接種至 PDA 斜面培養基上，於 25°C 培養 5~7 天至菌絲佈滿斜面，再倒入滅菌冷卻後之礦物油覆蓋斜面（超過最高斜面高度約 1 公分），置於 4°C 保存，此即為保存菌種（stock culture）。每三個月活化並重複此步驟以確定菌種活性。

(三) 菌種活化

將貯存菌種內的礦物油移去後，以過火之接種環挑取適當菌絲塗抹在 PDA 平板培養基上，於 25°C 下培養至新生菌絲長出，再以滅過菌之穿孔器挖取外緣部分菌絲塊，移種於另一 PDA 平板基中央，於 25°C 培養 5 天後，重複以穿孔器取菌絲塊再移種一次即完成活化。

(四) 種菌培養

將活化後之菌絲，以滅過菌之穿孔器挖取 2 塊外緣部分的菌絲塊後，置入含 50ml 基礎培養基之有溝三角錐瓶(250ml)中，於 30°C 震盪培養(150 rpm) 5 天，培養液中會形成直徑約為 1cm 之菌絲球，此即為種菌（seed culture）。

(五) 種菌懸浮液之製作

將震盪培養所得種菌(含培養液)，以高速攪拌機打碎 5 次(20 秒/次)，間隔時間為 10 秒，所得菌絲液即為種菌懸浮液，亦為而後固態發酵之接種源。

(六) 固態培養

取固態基質 5g 於 225ml 廣口瓶中加水浸泡 2 小時，置入滅菌釜中以 121°C，15 分鐘進行滅菌。等待冷卻後進行接菌，藉由分析葡萄糖胺 (glucosamine) 之含量，間接換算其生物質 (biomass) 含量，利用單因子變動試驗探討其最適條件。探討的因子包括：

- (1) 生長天數：0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 天，分析其生物質含量及 pH 值之變化情形。
- (2) 培養溫度：固態基質接入菌種後攪拌均勻，以 20°C、25°C、30°C 及 35°C 四種不同溫度進行測試。
- (3) 水添加量：固態基質分別加入 40%、50%、60% 及 70% (v/w) 的水量進行測試。
- (4) 接菌體積：分別接種 1ml、3ml 和 5ml 之種菌懸浮液至固態基質中進行測試。
- (5) 碳源：選用三種單醣 (fructose, glucose, xylose) 及三種雙醣 (lactose, maltose, sucrose) 進行測試，添加量均為 1% (w/w)。
- (6) 氮源：選用三種有機氮源 (peptone, yeast extract, urea) 與三種無機氮源 (NH_4NO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 等六種氮源進行測試，添加量均為 1% (w/w)。
- (7) 生長因子：選用 corn steep liquor (CSL), thiamine, riboflavin, 及 ascorbic acid 等 4 種生長促進物質進行測試，添加量均為 0.3% (w/w)。
- (8) 無機鹽類：選用 MgSO_4 , NaCl , KCl , CaCl_2 , FeSO_4 , CuSO_4 及 ZnSO_4 等

7 種無機鹽類進行測試，添加量為 0.1% (w/w)。

(9) 起始 pH : 4.0~8.0

(七) 發酵槽試驗

氣泡式發酵槽 (air bubble fermentor) :

1. 培養溫度 : 30°C
2. 攪拌葉片 : 無
3. 攪拌速度 : 無
4. 接種量 : 5% (v/v) 種菌懸浮液
5. 通氣量 : 1 vvm
6. 起始 pH : 5.80
7. 操作體積 : 3 L

培養基組成 :

Glucose	10 g
Yeast extract	10 g
KH ₂ PO ₄	3 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
Corn steep liquor	3 g
Water	1000 ml
pH	5.4

(八) 抑制癌細胞生長能力（細胞存活率）測定

(1) 試驗細胞株

人類肝癌細胞 (HepG2) Human hepatoblastoma cell

人類乳癌細胞 (MCF-7) Human breast adenocarcinoma cell

人類肺腺癌細胞 (A-549) Human lung carcinoma cell

(2) 細胞培養

將實驗細胞株 HpG2、MCF-7 及 A-549 分別培養於以 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)、RPMI (roswell park memorial institute) 及 RPMI (roswell park memorial institute) 為主的培養液，培養在 5% CO₂ 之 37°C 恆溫培養箱中，待細胞長至九分滿時，移去培養液，以 PBS (phosphate buffer saline) 清洗附著於培養皿上的細胞，加入 1.5ml 之 trypsin-EDTA 於 5% CO₂ 之 37°C 恆溫培養箱中反應 3~5 分鐘，使貼附於培養皿之細胞懸浮，再加入適量之培養液終止 trypsin-EDTA 反應，再依實驗需求不同，將細胞液平均分配到 4~6 盤含有新培養液的培養皿中，進行繼代培養。

(3) 實驗方法

將三種培養好之癌細胞細胞液，經由血球計數器計算細胞數目，將細胞數定量為 1×10^5 cells/ml，取 100 μ l/well 細胞懸浮液置入 96-well plate 中 (1×10^4 cells/well)，於 5% CO₂ 之 37°C 恆溫培養箱培養 24hr 後，加入 100 μ l/well 不同濃度的樣品（溶於培養基），培養於 5% CO₂ 之 37°C 恆溫培養箱 48hr。再以 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 比色法 (MTT assay) 分析不同樣品對於細胞存活率的影響。

四、分析方法

(一) 固態培養生物質 (biomass) 含量之測定

1. 桑黃發酵物樣品粉末之製備

將培養後之樣品放置於 60°C 烘箱中烘乾，並將其磨成粉末過篩 (40 mesh)，即可得固態樣品粉末。

2. 葡萄糖胺含量之測定

秤取 0.4g 固態樣品粉末與 5ml 72% H_2SO_4 ，置入三角錐瓶後，在 25°C、130 rpm 條件下反應 30min，再以 54ml RO 水稀釋，置入滅菌釜中 121°C 水解反應 2hr，再將含葡萄糖胺水解液以 10N 與 0.5N NaOH 中和至 pH=7。再以比色法 (colorimetric method) 分析葡萄糖胺的含量。

3. 葡萄糖胺比色法

採用 Elson-Morgan 法 (Elson and Morgan, 1933)，並參考唐等人 (2006) 之方法加以修飾。Elson-Morgan 法其測定原理是在一定的溫度下過量的乙醯丙酮 (acetylacetone) 鹼性溶液會將葡萄糖胺 2 號碳上的氨基乙醯化，形成帶有吡咯環的 N-乙醯衍生物，再與對二甲氨基苯甲醛 (*p*-dimethylaminobenzaldehyde) 在酸性乙醇溶液中縮合形成紫紅色物質。該縮合物於波長 525nm 下具有最大吸光值。

測定步驟：

取前述水解液 1ml 樣品加入 0.5ml 乙醯丙酮試劑，沸水浴加熱 25min，冷卻後加入 1ml 乙醇及 0.5ml 對二甲氨基苯甲醛試劑震盪混勻，再加入 2ml 乙醇，混合後置於 60°C 水浴反應 1hr，測定混合液之 OD_{525} 值，並比對葡萄糖胺標準曲線 (附圖一) 後，即可計算樣品中葡萄糖胺之含量。再經比

對菌絲體乾重對應葡萄糖胺含量之標準曲線（附圖二）即可得樣品中 biomass 之含量。

試劑配置：

(1) 鹼性乙醯丙酮溶液：取 3.5ml 乙醯丙酮，溶於 50ml 1.2M 的碳酸鈉溶液中，混合均勻，需現配現用。

(2) 酸性對二甲氨基苯甲醛溶液：取 1.33g 對二甲氨基苯甲醛，溶於 25ml 無水乙醇及 25ml 濃鹽酸的混合液中，以棕色瓶保存，需現配現用。

4. 葡萄糖胺標準曲線之測定

精確秤取葡萄糖胺 0.1g 溶於 10ml 蒸餾水中，取上述溶液 5ml 稀釋至 100ml 備用（500 μ g/ml）。再以此溶液逐步稀釋成不同濃度之葡萄糖胺標準液（10、20、30、40、50、60 及 70 μ g/ml），並且以不含葡萄糖胺之蒸餾水作為空白對照組。利用葡萄糖胺比色法測定混合液之 OD₅₂₅ 值即可得葡萄糖胺標準曲線。

5. 菌絲體冷凍乾燥粉末之製備

將種菌懸浮液接種（5%,v/v）至一 250ml 有溝三角錐瓶（含 50ml 修飾培養基）於 30°C 震盪培養（150 rpm）8 天，再將菌絲體培養液以濾紙（No.2）進行抽氣過濾，並以 RO 水清洗數次後，收集菌絲體進行冷凍乾燥處理之。

6. 菌絲體乾重對葡萄糖胺含量標準曲線之測定

精確秤取不同重量之冷凍乾燥之菌絲體（0.1、0.2、0.3、0.4 及 0.5 g）以前述方式進行酸水解可得含葡萄糖胺水解液，再利用葡萄糖胺比色法測定水解液中葡萄糖胺的含量，即可得菌絲體乾重對應葡萄糖胺含量之

標準曲線。

(二) pH 值之測定

稱取 0.2g 固態樣品粉末，加入 20ml RO 水，經旋渦萃取 30 秒後，使用 pH meter (inolab Level 1) 測定之。

(三) 固態培養多醣體產量之測定

1. 多醣體之萃取

秤取固態樣品粉末 1g，加入一定比例之 RO 水，置入滅菌釜中 121°C 加熱 1hr 後，離心 (15000 rpm, 10 min) 取其含基質中澱粉及菌絲多醣體之上清液做為樣品。再將所得樣品以澱粉酶 (α -amylase) 處理之，並且以碘液測定澱粉是否存在，再將不含澱粉之樣品取一定量以透析膜 (MWCO 6000-8000) 進行透析 24hr，再定量至一定體積後分析透析液中多醣體含量。

2. 多醣體之定量

參考 Dubois 等人 (1956) 之酚硫酸法 (phenol-sulfuric acid method) 並加以修飾。取前述 1ml 多醣體之透析稀釋液依序加入 0.5ml 5% 酚溶液及 2.5ml 98% 濃硫酸，混合後靜置 20 分鐘，再置於 25°C 水浴中 10 分鐘，測定混合液之 OD₄₉₀ 值並比對葡萄糖標準曲線 (附圖三) 後，即可得待測液中多醣體之葡萄糖相等量 X (mg/ml)，換算成透析液中多醣體含量時，須將此一測定值乘以稀釋倍數及 0.9 (李與賴，1976)。

多醣體含量 (mg/g) = X × 稀釋倍數 × 0.9 × (原多醣液體積/透析液體積)

3. 葡萄糖標準曲線之測定

精確秤取葡萄糖 0.1g 溶於 10ml 蒸餾水中，取上述溶液 5ml 稀釋至 100ml 備用 (0.5 mg/ml)。再以此溶液逐步稀釋成不同濃度之葡萄糖標準液 (0.01、0.02、0.04、0.06、0.08 及 0.1 mg/ml)，並且以不含葡萄糖之蒸餾水作為空白對照組，再利用酚硫酸法測定混合液之 OD₄₉₀ 值，即可得葡萄糖標準曲線。

(四) 多醣體分子量之測定

參考呂等人 (2001) 之方法。多醣體分子量以膠體滲透層析 (gel permeation chromatography, GPC) 法進行分析。其固定相為孔徑大小相同的物質，可將移動相中不同分子量的物質經由其在固定相中所流動的路徑長短加以區分，大分子物質會因為難以進入孔徑內而隨著移動相在孔徑間隙流出，滯留時間短，較快被沖提出來；小分子物質則容易進入孔徑間隙，故滯留時間長，較慢被沖提出來，以達到分離不同分子量的效果，又稱為膠體過濾層析法 (gel filtration chromatography) 或分子排斥層析法 (size exclusion chromatography)。

取前述多醣體之透析液或液態深層培養之發酵液，於 4°C 冷凍離心 (10000 rpm, 30 min) 後，取其上清液經適當稀釋後，再以 0.2µm 濾膜過濾，取 15µl 濾液進行分子量分佈之分析，分析條件如下：

分析管柱：PolySep-SEC-P 5000 300×7.80mm column，為 Phenomenex 公司之產品。

管柱溫度：40°C

移動相：去離子水

流 速：0.8ml / min

幫 浦：Hitachi model L-6000 pump

偵 測 器：Bischoff model 8110 RI detector

積 分 儀：Hitachi model D-2500 chromatointegrator

標 準 品：pullulan (分子量 48800、113000、210000、366000 及 805000 Dalton) 或 Da，retention time 分別為 11.40、10.84、10.31、9.71 及 9.00 分鐘) 標準曲線如附圖四。

(五) 多醣體中 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量測定

多醣中的 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 可利用螢光染劑 aniline blue 進行標定定量，早期 anilina blue 是用來檢測植物組織中的癒創多醣 (callose)，而後經鑑定其結構為 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan，於是進而證實 aniline blue 對 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 的專一反應性。Aniline blue 螢光染劑中的成分 sirofluor(sodium 4,4'-[carbonylbis-(benzene-4, 1-diyl) bis(imino)] bisbenzene-sulphonate) 與 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 結合後，在激發波長 (excitation wavelength) 395nm、放射波長 (emission wavelength) 495nm 螢光圖譜上會出現 aniline blue- β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 錯合物的螢光波峰，進而定量 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan (張，2003)。

測定步驟：

- (1) 取前述多醣體之透析液或液態培養發酵液進行冷凍乾燥，再以 RO 水定量至濃度 10 mg/ml 備用之。
- (2) 取樣品 1ml，加入 0.3N NaOH 定容至 3ml 後攪拌 30 分鐘使其完全溶解。

- (3) 以 HCl 調整 pH 值至 11.50 ± 0.05 ，再加入 pH11.50 之 0.05M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ 緩衝液（內含 0.5M NaCl）定容至 10ml。
- (4) 取 1ml 溶液加入 0.1ml 濃度 1mg/ml 之 aniline blue，震盪混合均勻後靜置 2 小時。
- (5) 以螢光分光光度計進行檢測，激發波長為 395nm，放射波長為 495nm。

實驗中以海藻多醣 (laminarin) 為標準品，其標準檢量曲線如附圖五， β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量為每毫升海藻多醣當量 (laminarin equivalent; LE) 所含之 β -1,3-D-glucan 微克數 ($\mu\text{g/ml LE}$)。

(六) 抑菌能力之測定

主要測試固態及液態發酵樣品之熱水與乙醇萃取物抑制不同病原細菌生長的能力。

1. 固態培養桑黃發酵物樣品粉末製備

將發酵培養後之樣品放置於 60°C 烘箱中烘乾，並將其磨成粉末過篩 (40 mesh)，即可得固態發酵樣品粉末。另用未發酵之固態基質，以相同步驟製備其乾燥樣品粉末。

2. 發酵液樣品粉末製備

將含菌絲體之發酵液以濾紙 (No.2) 進行抽氣過濾去除菌絲體，收集發酵液進行冷凍乾燥，即得液態發酵樣品粉末。

3. 萃取物製備

(1) 熱水萃取

取上述樣品粉末以 1:20 (g/ml) 比例加入 RO 水，以加熱攪拌器萃取，煮沸後開始計時 3 小時。冷卻後離心後收取上清液，將所得之沉澱物以相同條件再萃取一次，將兩次所收集之上清液進行冷凍乾燥。再以 RO 水定量至不同濃度 (2、4、6、8 及 10 mg/ml) 待測液備用。

(2) 乙醇萃取

取上述樣品粉末以 1:10 (g/ml) 比例加入乙醇，於 30°C，150rpm 震盪萃取 24 小時，經離心後收取上清液，將所得之沉澱物以相同條件再萃取一次，將兩次所收集之上清液以 40°C 減壓濃縮至乾，再以乙醇定量至不同濃度 (2、4、6、8 及 10 mg/ml) 待測液備用。

(3) 萃取率 (extraction yield) 計算

萃取率 (extraction yield, %) = [萃取物乾重 (w) / 樣品粉末重 (w)]
× 100%。

4. 測定步驟

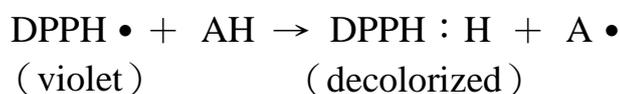
採用 Kirby-Bauer 法 (Lim, 1998)。首先將培養好之待測菌液 (nutrient broth/37°C/2days) 以傾倒法使菌液均勻發佈在 nutrient agar (NA) 平板培養基內，再將含有 10µl 待測液圓形濾紙片 (直徑 0.55 cm) 平貼在培養基上，置入 37°C 培養 48 小時後，測定抑菌環直徑大小 (mm)，待測菌液之抑菌力為經比對 ampicillin 抑菌濃度標準曲線 (附圖六~附圖十一) 後換算為相等於 ampicillin 之抑菌濃度 (mg/l)。

(七) 抗氧化力之測定

主要測定固態及液態發酵樣品之熱水及乙醇萃取物的抗氧化能力。固態及液態發酵樣品粉末及彼等熱水及乙醇萃取物之製備如前(六)-1、2、3所述。

1. α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基 (DPPH•) 之清除能力。

參考 Shimada 等人 (1992) 之方法。食物中的脂質在自行氧化的過程中會產生自由基而造成脂質的酸敗，常見的抗氧化物藉由提供氫 (hydrogen doner) 來清除脂質過氧化物自由基 (peroxyl radical)，實驗上常使用 DPPH• 來評估抗氧化物的供氫能力。DPPH• 之 methanol 溶液在 517nm 下有較強的吸光值，被抗氧化物供氫還原時吸光值會降低，利用此一特性可推測出吸光值越低則代表該抗氧化物清除自由基能力越強。



測定步驟：

- (1) 取 1ml 不同濃度之熱水、乙醇萃取物待測液及標準品 (BHA、ascorbic acid 及 α -tocopherol) 的甲醇溶液 (實驗組) 與純甲醇溶液 (對照組) 中再加入 1ml 新鮮配製的 0.008% DPPH 甲醇溶液。
- (2) 震盪均勻混合反應 30 分鐘後，測定混合液之 OD₅₁₇。

$$\text{DPPH 自由基清除率 (scavenging effect, \%)} = \left(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{control}} \right) \times 100\%$$

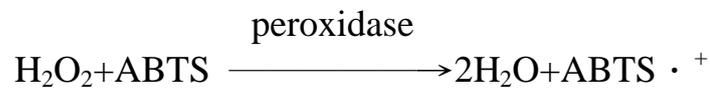
清除率愈高，代表樣品抗氧化能力愈好。

實驗中以脂溶性抗氧化劑 BHA、ascorbic acid 及 α -tocopherol 作為正

對照組，附圖十八~附二十圖為彼等與 DPPH· 反應之標準曲線。未加樣品者為控制組，將所得實驗結果以 IC₅₀（清除 50% DPPH 自由基所需之最低濃度）表示。

2. 總抗氧化力能力測定

參考 Miller 等人（1993）及 Arnao 等人（1996）之方法。Horseradish peroxidase 會催化 H₂O₂ 及 ABTS 反應使 ABTS 上之一個電子進行轉移形成 ABTS·⁺。



ABTS·⁺ 為具穩定藍色之陽離子自由基，於波長 734nm 下具有最大吸光值，加入抗氧化劑可提供電子還原 ABTS·⁺ 使其吸光值降低或消失，故可利用此一特性測試水溶性樣品清除自由基之能力。樣品與 ABTS·⁺ 自由基作用後，OD₇₃₄ 下降越多，則表示樣品對 ABTS·⁺ 自由基之清除能力越強，抗氧化力越強。

測定步驟：

- (1) 將 horseradish peroxidase、ABTS 與 H₂O₂ 混合均勻並調整三者之最後濃度分別為 4.4unit/ml、100μM 與 50μM。
- (2) 於 30°C 下避光反應一小時，使其形成藍綠色穩定的 ABTS·⁺ 自由基反應試劑。
- (3) 加入 0.25ml 不同濃度之熱水、乙醇萃取物待測液（2、4、6、8 及 10 mg/ml）及標準品（trolox）之乙醇溶液混合均勻後反應 10 分鐘，測定混合物之 OD₇₃₄。

$$\text{總抗氧化能力 (total antioxidant capacity, \%)} = [(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}}] \times 100\%$$

實驗中以 trolox 為正對照組。附圖二十七為其與 ABTS \cdot^+ 自由基反應之標準曲線。未加樣品者為控制組，將所得實驗結果以 IC₅₀ (抑制 50% ABTS \cdot^+ 活性所需之最低濃度) 表示。

3. 螯合亞鐵離子能力測定

參考 Decker 等人 (1990) 之方法。金屬離子的促氧化作用經常是造成脂質過氧化的主要因素，藉由氧化還原反應 (redox cycle)，少量的金屬離子便可有效的產生自由基，並加速脂質氧化的進行；在多種金屬離子中，Fe²⁺ 經常是最具影響力的助氧化劑，利用 Fe²⁺ 用與 ferrozine 的複合物在 562nm 之呈色反應：



此產物在波長 562nm 具有最大吸收值，當樣品螯合 Fe²⁺ 離子時則吸光值降低；因此吸光值愈低即表示樣品之抗氧化能力愈強。

測定步驟：

- (1) 取 1ml 不同濃度之熱水、乙醇萃取物待測液(2、4、6、8 及 10 mg/ml) 及標準品 (EDTA) 水溶液分別加入 3.7ml 蒸餾水、0.1ml 之 2mM FeCl₂ 及 0.2ml 之 5mM ferrozine。
- (2) 混合後室溫靜置反應 20 分鐘，測定混合液之 OD₅₆₂。

$$\text{亞鐵離子螯合率 (Ferrous ion chelating activity, \%)} = [(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}}] \times 100\%$$

實驗中以金屬螯合劑 EDTA 作為正對照組，附圖三十四為彼等與 Fe^{2+} 離子螯合反應之標準曲線。未加樣品者為控制組，將所得實驗結果以 IC_{50} （螯合 50% Fe^{2+} 離子所需之最低濃度）表示。

4. 還原力測定

參考 Oyaizu (1986) 之方法，還原力是分析樣品將赤血鹽 (potassium ferricyanide) 中之 Fe^{3+} 還原為 Fe^{2+} 之亞鐵氰錯離子的能力，此亞鐵氰錯離子再與 Fe^{3+} 反應產生普魯士藍 (Prussian blue) 普魯士藍在波長 700nm 下有最大吸收值，根據其吸收光值之高低，可評估樣品還原能力之強弱；吸光值愈高表示樣品還原能力愈強。還原力在抗氧化表現上係為具有還原過氧化物 (peroxide) 之能力，進而達到抗氧化之效果。

測定步驟：

- (1) 取 0.5ml 不同濃度之熱水、乙醇萃取物待測液 (2、4、6、8 及 10 mg/ml) 及標準品 (BHA、ascorbic acid 及 α -tocopherol) 的甲醇溶液分別加入 2.5ml 之 0.2M 磷酸鹽緩衝液 (pH 6.6) 及 2.5ml 之 1% 鐵氰化鉀混合均勻。
- (2) 混合液於 50°C 水浴槽反應 20 分鐘。
- (3) 取 2.5ml 10% 三氯醋酸加入混合液，使用離心 (3000 rpm，10 分鐘)。
- (4) 取 2.5ml 上清液，加入 2.5ml 蒸餾水及 2.5ml 0.1% 三氯化鐵。
- (5) 震盪均勻混合反應後，測定混合液之 OD_{700} 。

實驗中以抗氧化劑 BHA、ascorbic acid 及 α -tocopherol 作為正對照組，附圖四十一~附四十三圖為彼等還原力之標準曲線。未加樣品者為控制組，

將所得實驗結果以 IC₅₀ (吸光值達到 0.5 所需之最低濃度) 表示。

(八) 抑制癌細胞生長能力 (細胞存活率) 測定

主要測定固態及液態發酵樣品之熱水及乙醇萃取物，彼等抑制三種人類癌細胞 (肺腺癌、乳癌及肝癌) 生長之能力。固態及液態發酵樣品粉末及彼等熱水及乙醇萃取物之製備如前(六)-1、2、3 所述。此部分實驗將萃取物乾燥粉末以細胞培養液定量至不同濃度(100、250、500 及 1000 μ g/ml) 待測液。

MTT assay (Mosmann, 1983)

利用 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 黃色水溶性固體可被活細胞內粒線體中的 MTT 去氫酶(MTT dehydrogenase) 所代謝，將 tetrazolium ring 切斷，還原成紫色不溶性沉澱物 formazan(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-formazan) 堆積在細胞中 (圖七)，再以 DMSO (dimethyl sulfoxide) 將 formazan 溶出，formazan 在波長 590nm 有最大吸光值，再使用免疫酵素分析儀 (ELISA reader) 以 590nm 之波長測其吸光值。當吸光值越大表示存活的細胞越多。

測定步驟：

- (1) 將三種培養好之癌細胞細胞液，經由血球計數器計算細胞數目，將細胞數定量為 1×10^5 cells/ml，取 100 μ l/well 細胞懸浮液置入 96-well plate 中 (1×10^4 cells/well)，於 5% CO₂ 之 37°C 恆溫培養箱培養 24hr。
- (2) 於每一 well 中加入 100 μ l 不同濃度之萃取物待測液 (溶於培養

液) ，與癌細胞細胞液共同培養於 5% CO₂ 之 37°C 恆溫培養箱 48hr 。

(3) 以微量吸管移除 well 內萃取物待測液後，加入黃色 MTT 溶液(5mg / PBSml) ，置於 5% CO₂ 之 37°C 恆溫培反應 4hr 。

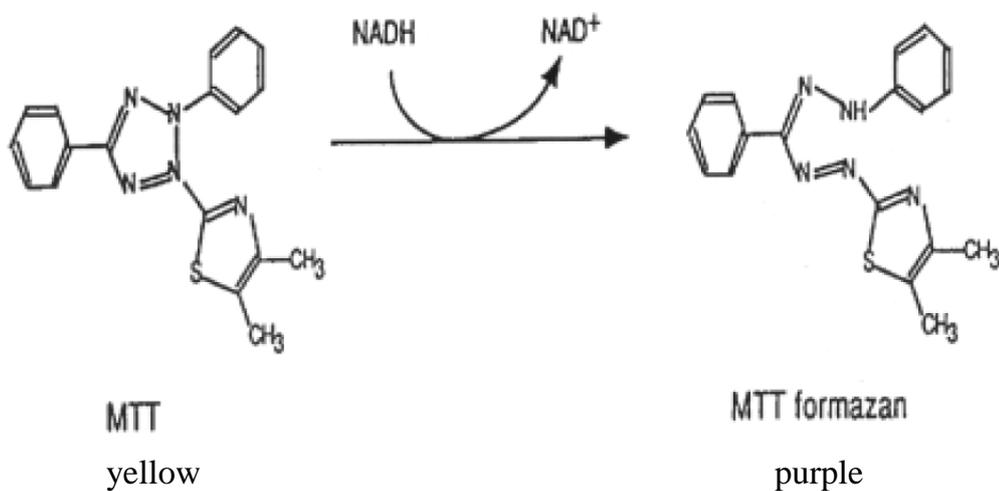
(4) 吸除上清液，再加入 100μl/well 的 DMSO 反應 20 分鐘，使紫色之 formazan 溶出。

(5) 用 ELISA reader 測定波長 590nm 之吸光值。推算其細胞存活率。

MTT assay 分析細胞存活率公式如下：

$$\text{細胞存活率 (cell viability, \%)} = (\text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100\%$$

細胞存活率越低，表示樣品抑制癌細胞生長之能力越強。



圖七 黃色水溶性之 MTT 經 MTT 去氫酶還原成紫色不溶性沉澱之 formazan 之化學反應

Fig.7 Formation of MTT formazan (purple) through reduction of MTT (yellow) by MTT dehydrogenase.

(九) 統計分析

試驗所得結果以平均值±標準偏差(Mean±SD)表示，試驗所得資料以 SAS 統計套裝軟體 (SAS, 1996) 進行變方分析 (analysis of variance) 及差異性顯著分析 (Duncan's new multiple range test) 之統計分析法估計結果是否有顯著差異 ($P < 0.05$)，並且使用 Student's t-test 來評估數據間的差異性。 $p < 0.01$ 時表示極顯著差異、 $p < 0.05$ 時表示達顯著差異， $p > 0.05$ 則表示為沒有顯著差異。(沈，1993)。

肆、結果與討論

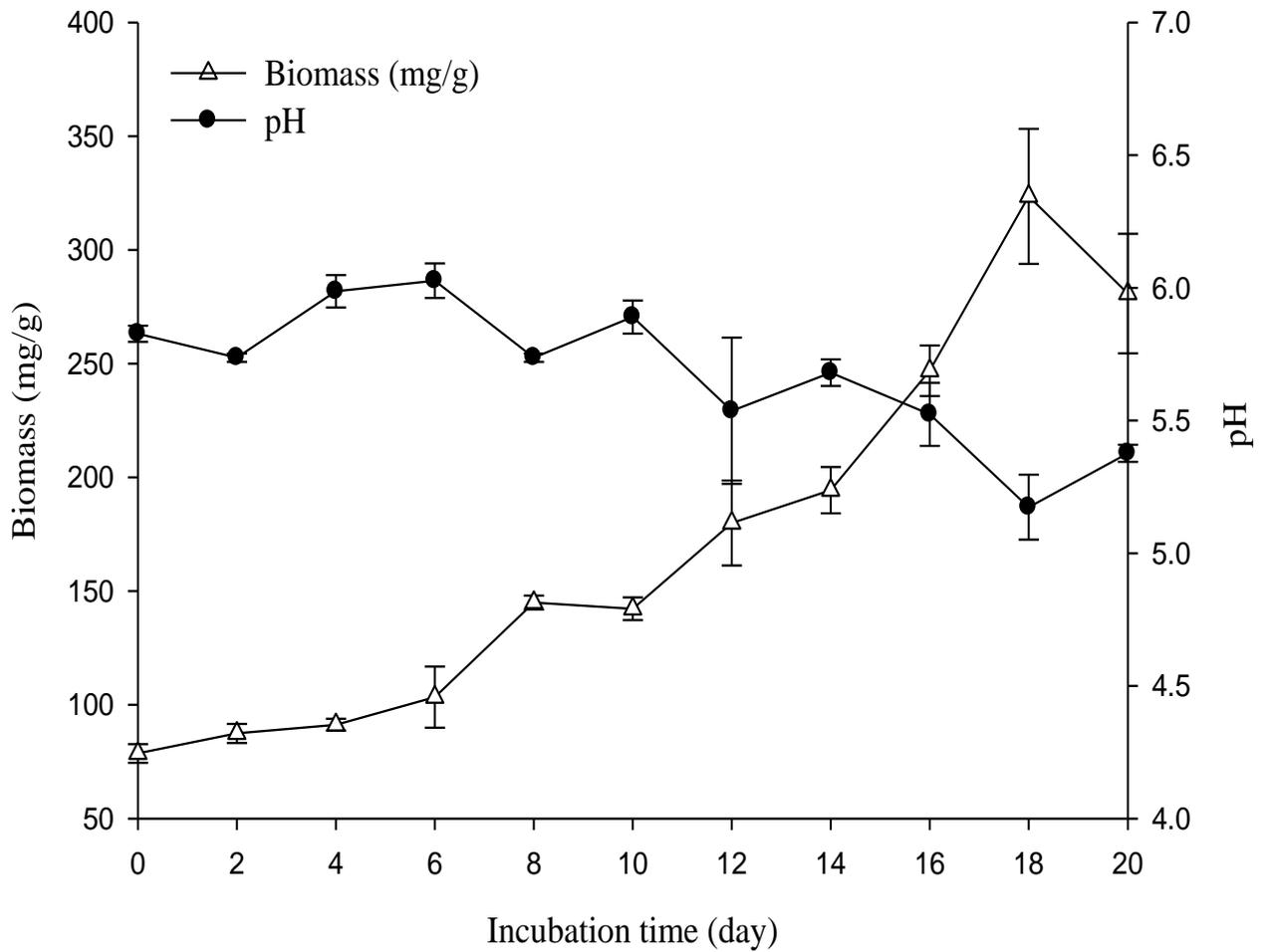
一、固態培養基種類試驗

本實驗的目的為探討桑黃菌 PI (*Phellinus igniarius*) 於三種天然穀物 (薏仁、黑豆及燕麥) 培養基 30°C 培養溫度下之菌絲體生長 (以 biomass 表示) 情況，以決定固態發酵培養條件試驗時所使用的培養基種類。

圖八及圖九分別為桑黃菌於薏仁及黑豆於培養基之生長曲線，結果顯示桑黃薏仁及桑黃黑豆在培養初期第 0-6 天時，桑黃菌絲體皆呈現緩慢生長的趨勢，在培養天數第 8 天後菌絲體明顯快速生長，薏仁及黑豆培養基之菌絲體含量分別可在第 18 天及第 14 天達最高之 323.54 mg/g 和 217.29 mg/g。圖十為桑黃菌於燕麥固態培養期間之生長曲線，結果顯示在培養初期第 0-4 天時，桑黃菌絲體呈現緩慢生長的趨勢，在培養天數第 6-12 天後菌絲體即有明顯快速生長之情形，就外觀來看，於培養第 8 天時菌絲體已經長滿整個培養皿，14-16 天菌絲體快速生長，開始有少量黃色菌絲的產生且顏色愈趨明顯 (圖十一)，而於第 16 天時可達最高之 421.93 mg/g 菌絲體產量 (圖十)。

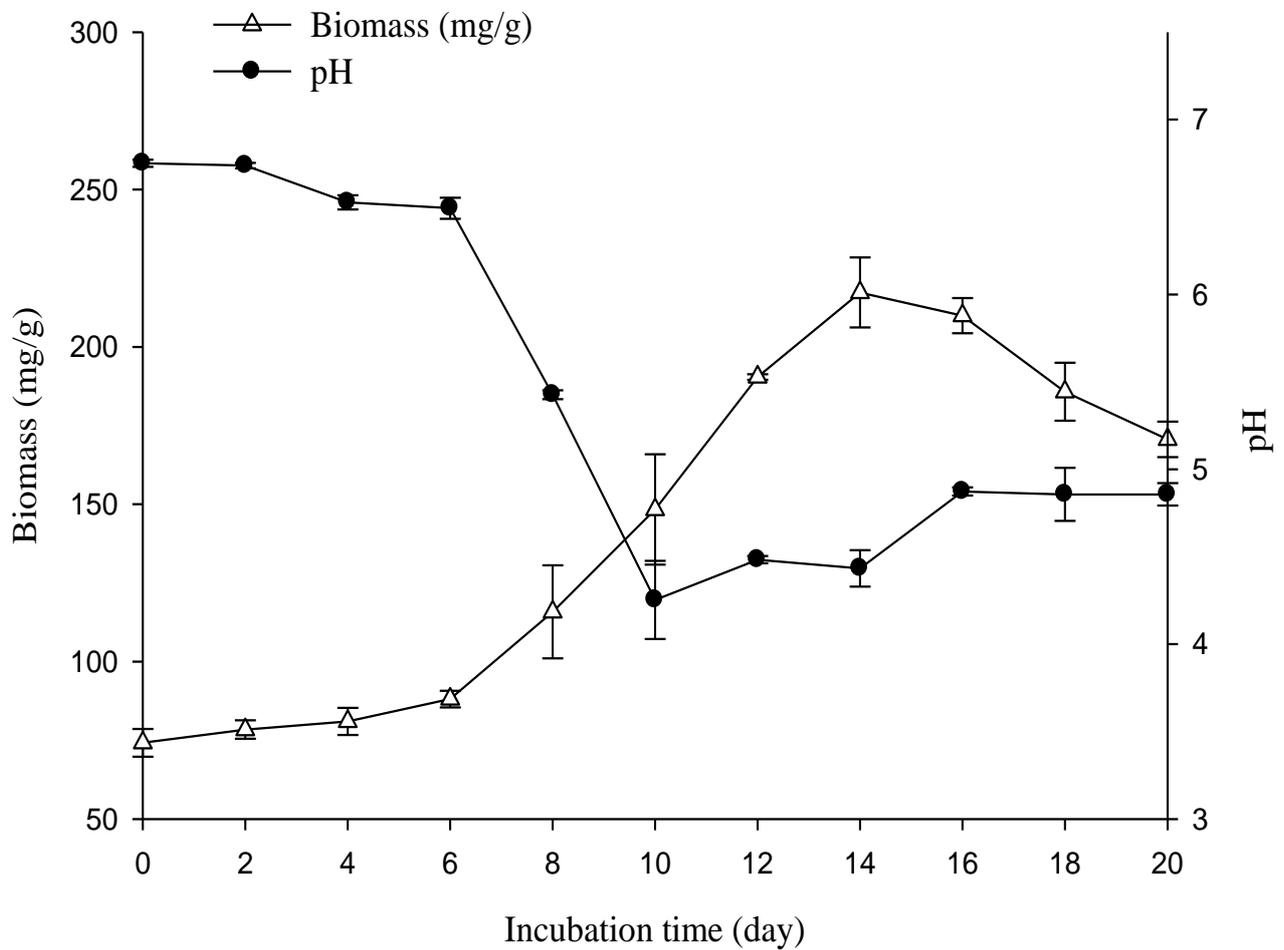
在最終 pH 值方面 (圖八、九、十)，上述三者之培養期間 pH 值的變化情形皆會隨著培養時間的增加而有逐漸下降的現象。此外，在達最高量菌絲體含量之培養天數時皆具有最低的 pH 值之趨勢 (圖八、九、十)，原因可能為菌體利用基質所含之氮源導致環境中 pH 值下降 (沈，2004)，而之後三者之 pH 值皆有逐漸上升的趨勢，可能原因為菌絲體在培養後期發生自體分解 (autolysis) 所導致的。

綜合上述結果，選定之後培養桑黃菌 *P. igniarius* 之固態基質為燕麥，而探討於不同培養條件下之桑黃燕麥之菌絲體、多醣體產量時，則選定培養第 16 天之桑黃燕麥。



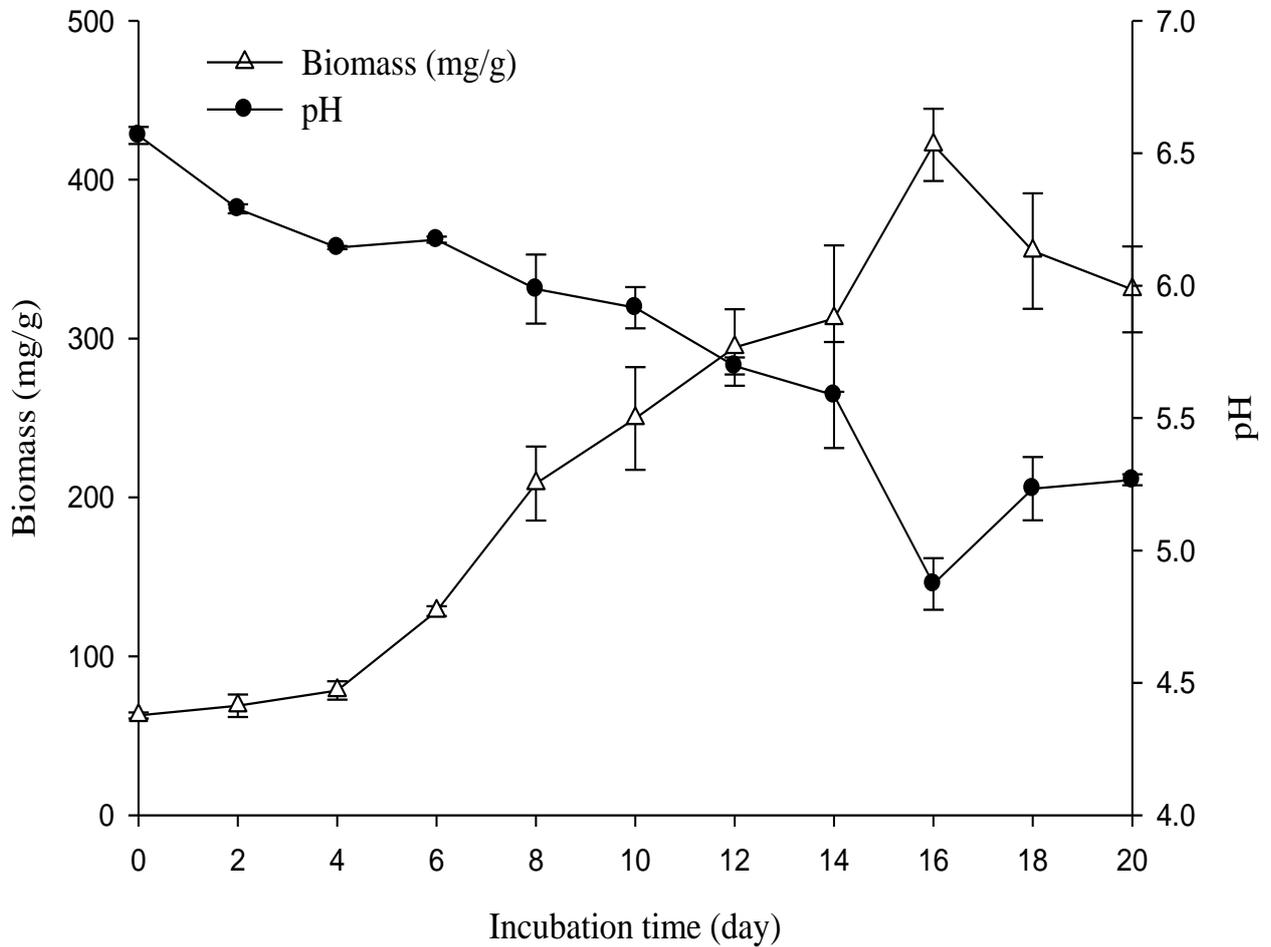
圖八 桑黃菌 (*Phellinus igniarius*) 於薏仁固態培養發酵期間 (30 °C /20 天) 生物質及最終 pH 之變化

Fig. 8 Changes of biomass and final pH during growth of *Phellinus igniarius* (30 °C / 20 days) on solid culture containing adlay.



圖九 桑黃菌 (*Phellinus igniarius*) 於黑豆固態培養發酵期間 (30 °C / 20 天) 生物質及最終 pH 之變化

Fig. 9 Changes of biomass and final pH during growth of *Phellinus igniarius* (30 °C / 20 days) on solid culture containing black soy bean.



圖十 桑黃菌 (*Phellinus igniarius*) 於燕麥固態培養發酵期間 (30 °C /20 天) 生物質及最終 pH 之變化

Fig. 10 Changes of biomass and final pH during growth of *Phellinus igniarius* (30 °C / 20 days) on solid culture containing oat.



(a) Day 0



(b) Day 4



(c) Day 8



(d) Day 16

圖十一 桑黃菌 (*Phellinus igniarius*) 於燕麥固態培養發酵期間 (30 °C / 20 天) 之菌絲體生長情形。(a) 第 0 天, (b) 第 4 天, (c) 第 8 天 (d) 第 16 天

Fig. 11 The mycelia growth during growth of *Phellinus igniarius* (30 °C / 20 days) on solid culture containing oat. (a) day 0, (b) day 4, (c) day 8, (d) day 16

二、 固態發酵培養條件試驗

(一) 培養溫度對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響

溫度會影響微生物的生長和代謝反應，如生物體內的酵素活性、多醣的合成速率與產量及其他的生物反應等。曾等人 (2007) 的研究發現桑黃菌在 16~36°C 下皆能生長。故本實驗以四種不同培養溫度 (20、25、30 及 35°C) 探討彼等對桑黃菌菌絲生長及多醣體產生之影響。

結果 (表五) 顯示，培養溫度由 20°C 升到 30°C 有助於菌絲體之生長，其中培養溫度 30°C 可得到最高量之生物質 (382.44 mg/g)，顯著 ($P < 0.05$) 高於其他實驗組。多醣體含量亦以培養溫度 30°C 為最高，可得 (37.59mg/ml) 且顯著 ($P < 0.05$) 高於其他實驗組。最終 pH 值亦以培養溫度 30°C 組顯著最低，推測原因為培養溫度 30°C 較有利菌絲體生長，在生長期間所代謝產生之酸性物質所導致。本實驗結果之最適培養溫度 (30°C) 與 Hwang 等人 (2003b) 指出桑黃菌的最適培養溫度為 30°C 相符。因此之後試驗皆以 30°C 作為培養溫度。

(二) 水添加量對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響

固態發酵過程中，基質的水份含量是一個很重要考量。典型固態發酵的水分含量在 30-80%，而真菌培養的基質含水量介於 40-80% 之間 (廖，2003)。

結果 (表六) 顯示，隨著水添加量的增加 (40%-60%) 有助於菌絲體的生長及多醣體的產生，其中以水添加量 60% 組可得最高之生物質及多醣體產量，分別為 (439.83 mg/g) 和 (47.14mg/g)，皆顯著 ($P < 0.05$) 高於其他組別。此結果與 Svagelj 等人 (2008) 利用 horizontal stirred tank reactor (HSSR) 進行固態發酵舞菇中發現，發酵過程中另外進行水份的添加，可增加生物質及多醣體的產量的結果相符合。這說明是適當水份添加有利於菌絲生長及多醣體的

產生。但當水添加量達70%時，其生物質產量（175.2 mg/g）及多醣體產量（30.59mg/g）反而下降。推測添加適當水份可溶解基質中的養分供菌體利用，且基質的孔隙中不會含有太多水份，可使菌絲較容易深入基質孔隙中生長，充分利用基質的養分，因此可得到較高的生物質含量（詹，2003）。然而若添加過量的水分，基質孔隙中含水量較高導致菌絲無法深入其中生長，再加上基質過於黏稠而使氣體的通透性不佳，使菌絲只能在基質表面，因此降低其生物質含量。

（三） 接菌量對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響

真菌菌種之生理特性、斜面年齡和接種源是發酵培養的重要因子（Glazebrook *et al.*, 1992）。本實驗探討添加不同接菌量（菌種懸浮液）對桑黃固態發酵培養之影響，探討接菌量分別為 1 ml、3 ml 及 5 ml。

結果(表七)顯示，接菌量 3ml(8%)組可得到最高之生物質產量為(471.99 mg/g)，但與接菌量 1ml (2.6%) 及 5ml (13.3%) 之間並無顯著差異。多醣體產量方面，雖是接菌量 1ml(2.6%)組可得到最高之多醣體產量(38.57 mg/g)，但與其他實驗組比較亦無顯著差異。最終 pH 值都維持在 4.5-4.6 間，且三組皆無顯著差異。由於過少的接菌量可能會導致菌絲分布難以均勻的分布在基質表面，因此選用 3ml 做為之後接菌量。

表五 不同培養溫度對桑黃菌 (*Phellinus igniarius*) 於燕麥固態培養基生物質及多醣體產量之影響

Table 5 Effect of different incubation temperatures on biomass and polysaccharide production by *Phellinus igniarius* on solid culture containing oats.

Temperature	Biomass (mg/g)	Polysaccharides(mg/g)	Final pH
35°C	286.03±12.72 ^{bc}	21.83±2.27 ^b	5.87±0.13 ^a
30°C	382.44±16.62 ^a	37.59±2.42 ^a	5.15±0.10 ^b
25°C	309.94±24.51 ^b	19.93±2.04 ^b	6.04±0.14 ^a
20°C	253.12±30.93 ^c	19.85±2.55 ^b	5.96±0.14 ^a

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Incubation time = 16 days.

表六 不同水添加量對桑黃菌 (*Phellinus igniarius*) 於燕麥固態培養基之生物質及多醣體之影響

Table 6 Effect of different water supplementation on biomass and polysaccharide production by *Phellinus igniarius* on solid culture containing oats.

Water supplementation	Biomass (mg/g)	Polysaccharides(mg/g)	Final pH
40%	244.92±34.03 ^c	23.01±4.86 ^c	5.76±0.04 ^a
50%	344.62±35.15 ^b	31.06±1.94 ^b	5.47±0.02 ^{ab}
60%	439.83±11.09 ^a	47.14±1.96 ^a	5.35±0.13 ^b
70%	175.20±17.85 ^d	30.59±2.56 ^b	5.67±0.28 ^a

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Incubation time = 16 days.

表七 不同接菌量對桑黃菌 (*Phellinus igniarius*) 於燕麥固態培養基之生物質及多醣體之影響

Table 7 Effect of different inoculum volume on biomass and polysaccharide production by *Phellinus igniarius* on solid culture containing oats.

Inoculum volume	Biomass (mg/g)	Polysaccharides(mg/g)	Final pH
1ml	459.00±15.05 ^a	38.57±3.02 ^b	5.62±0.05 ^b
3ml	471.99±30.48 ^a	36.48±6.82 ^b	5.61±0.03 ^b
5ml	467.68±22.75 ^a	36.9±3.1 ^b	5.58±0.1 ^b

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Incubation time = 16 days.

(四) 起始 pH 值對桑黃 PI 菌絲體及多醣體生成之影響

固態發酵時，基質的利用或代謝物的產生都會導致培養環境 pH 值的變化。若環境中 pH 值的變化過大，則有可能影響微生物的生長或產物的生成(沈，2004)。本實驗將基礎培養基起始 pH 值以 HCl 或 NaOH 調整為 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 (實驗組) 及不調整 pH 之對照組 (pH 5.6)。

結果(表八)顯示，無論起始 pH 值調整為多少，最終 pH 值皆維持在 5.4-5.7 之間，除了起始 pH7.0 實驗組具有較高的最終 pH 值 6.53，推測應為起始 pH7.0 時桑黃菌生長較差，所產生的代謝物也較少，再加上起始的 pH 較高，才會導致具有較高之最終 pH 值。另外，對照組及起始 pH 值為 4.0、5.0 及 6.0 之實驗組有較高之生物質含量，其中以 pH 值 6.0 組最高 (495.68mg/g)，但彼此間並無顯著差異。最高多醣體產量為起始 pH 值 4.0 組 (35.23mg/g) 且顯著 ($P < 0.05$) 高於其他實驗組及對照組。此結果與 Hwang 等人 (2003b) 在桑黃液態發酵培養中發現，起始 pH 值為 4 時具有最佳胞外多醣體產量的結果相符合。

(五) 碳源對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響

碳源是真菌最重要的營養，它不僅是碳水化合物和蛋白質的基本組成元素，同時又是重要的能量來源(徐，1997)。本實驗嘗試添加三種單糖 (glucose、fructose、xylose) 及三種雙糖 (lactose、maltose、sucrose) 等六種糖類 (添加量為 1%，w/w) 及不添加任何碳源的對照組，探討彼等對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響。

結果 (表九) 顯示，添加葡萄糖組具有最高生物質產量為 440.58mg/ml，但是與對照組及其他實驗組 (果糖組除外) 之間並沒有顯著差異。推測原因為葡萄糖為三種測試單糖中最優先被菌體利用者，且不若雙糖尚需水解後利

用，因此在發酵初期葡萄糖能夠立即的被桑黃菌吸收。多醣體產量的部分亦以葡萄糖組具有最高之多醣產量（35.92mg/ml）且顯著（ $P < 0.05$ ）高於其他實驗組。

此外，添加單糖組（fructose組除外）之菌絲體及多醣產量亦大多高於添加雙糖組，推測桑黃菌PI會優先選用單糖類作為其碳源。此次實驗以葡萄糖為生成桑黃菌菌絲體及多醣體最佳碳源之結果與李等人（2006）及羅（2008）之報告結果相同。但亦有其他不同最適碳源的研究報告，如楊和黃（2005）以蔗糖（sucrose）為最適桑黃菌生長菌絲之碳源，Hwang等人（2003b）培養桑黃菌則是以山梨糖醇（sorbitol）為碳源可得最高菌絲體及多醣產量。原因可能為不同菌株（strain）其利用糖類合成多醣之性狀不盡相同，或是不同碳源會使菇類細胞產生二次代謝（secondary metabolism）的代謝物抑制效應（catabolic repression）所致（Kim *et al.*, 2003b）。

最終pH值的部份，未添加碳源之控制組顯著（ $P < 0.05$ ）低於其他的實驗組。可能原因為桑黃菌PI於利用額外添加之碳源時產生之酸性物質所致。

（六） 氮源對桑黃菌PI菌絲體及多醣體生成之影響

氮源為微生物生長所必需的養分，是真菌合成蛋白質、核酸的必要原料，另對菌絲體與代謝物生成亦有非常大的影響。本實驗嘗試添加三種有機氮源（peptone、yeast extract、urea）與三種無機氮源（ NH_4NO_3 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ）等六種氮源（添加量為1%，w/w）探討彼等對桑黃菌PI菌絲體及多醣生成之影響。

結果（表十）顯示在所有實驗組中以yeast extract組（430.46mg/g）具顯著（ $P < 0.05$ ）最高之生物質產量，然與控制組（439.83mg/g）間無顯著的差異。此結果指出添加氮源（yeast extract組除外）反而會抑制菌絲體的生長。此結果

與羅（2008）和吳（2009）之報告不相符合。

多醣體產量部份亦以添加yeast extract組（47.50mg/g）顯著高於其他實驗組及控制組。推測原因可能氮源為培養環境中的限制因子，當氮源為限制因子的條件下，是最利於多醣體於發酵環境中產生，但若過高的氮源反而會抑制多醣的生成，進而轉向菌體生長之途徑（Roseiro *et al.*, 1993 ; Kang *et al.*, 2000）。

（七） 生長因子對桑黃菌PI菌絲體及多醣體生成之影響

本實驗添加corn steep liquor、thiamine、riboflavin及ascorbic acid等四種生長因子(添加量為0.3%, w/w)探討彼等對桑黃菌PI菌絲體及多醣生成之影響，對照組為不添加生長因子之固體培養基。

結果（表十一）顯示，添加riboflavin組（367.11mg/g）之生物質產量顯著高於其他實驗組及對照組，其多醣體產量（38.89mg/g）亦顯著高於其他實驗組（除corn steep liquor組外）及對照組。

徐（1996）指出生長因子thiamine在適當濃度下可促進大多數藥用真菌生長。本實驗結果中thiamine與ascorbic acid實驗組之菌絲體與胞外多醣體產量顯著低於對照組，推測可能因為添加量過高，影響培養環境之酸鹼度而出現抑制菌體生長及代謝的情形或是於滅菌過程中其成份受熱被破壞，亦有可能為桑黃菌對彼等添加之生長因子利用不大所致。

表八 起始 pH 值 (4-8) 對桑黃菌 (*Phellinus igniarius*) 於燕麥固態培養基之生物質及多醣體產量之影響

Table 8 Effect of initial pH (4-8) on biomass and polysaccharide production by *Phellinus igniarius* on solid culture containing oats.

Initial pH	Biomass (mg/g)	Polysaccharides(mg/g)	Final pH
4.0	458.65±20.67 ^a	35.23±1.61 ^a	5.41±0.06 ^c
5.0	479.41±0.85 ^a	26.25±2.39 ^b	5.74±0.15 ^b
6.0	495.68±17.49 ^a	26.28±1.25 ^b	5.62±0.01 ^b
7.0	272.52±0.87 ^c	15.87±2.22 ^c	6.53±0.16 ^a
8.0	318.01±7.95 ^b	26.16±1.93 ^b	5.72±0.16 ^b
Control*	484.51±31.8 ^a	27.14±1.76 ^b	5.79±0.04 ^b

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Incubation time = 16 days.

*Medium with an initial pH of 5.60.

表九 碳源對桑黃菌 (*Phellinus igniarius*) 於燕麥固態培養基之生物質及多醣體產量之影響

Table 9 Effect of carbon sources on biomass and polysaccharide production by *Phellinus igniarius* on solid culture containing oats.

Carbon source (1.0%, w/w)	Biomass (mg/g)	Polysaccharides(mg/g)	Final pH
Glucose	440.58±19.48 ^a	35.92±1.48 ^a	4.07±0.05 ^b
Fructose	364.11±22.26 ^b	27.66±1.24 ^{cd}	4.08±0.04 ^b
Xylose	423.34±29.86 ^a	30.24±3.49 ^{bc}	4.04±0.03 ^b
Lactose	422.59±3.18 ^a	24.38±0.89 ^d	4.09±0.08 ^b
Maltose	389.98±7.95 ^{ab}	28.08±3.21 ^d	4.07±0.05 ^b
Sucrose	419.59±36.98 ^a	25.16±0.8 ^d	4.03±0.09 ^b
Control *	422.59±19.61 ^a	31.18±1.97 ^b	5.17±0.05 ^a

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Incubation time = 16 days.

* Medium without any added carbon sources.

表十 氮源對桑黃菌 (*Phellinus igniarius*) 於燕麥固態培養基之生物質及多醣體產量之影響

Table 10 Effect of nitrogen sources on biomass and polysaccharide production by *Phellinus igniarius* on solid culture containing oats.

Nitrogen source (1.0%, w/w)	Biomass (mg/g)	Polysaccharides(mg/g)	Final pH
Organic			
Peptone	398.97±1.59 ^b	35.66±2.3 ^c	4.12±0.23 ^{bc}
Yeast extract	430.46±4.77 ^{ab}	47.50±1.18 ^a	3.90±0.04 ^{cd}
Urea	165.46±16.27 ^d	20.03±2.7 ^d	5.90±0.17 ^a
Inorganic			
(NH ₄) ₂ SO ₄	357.37±15.90 ^c	34.79±1.89 ^c	3.79±0.15 ^d
NH ₄ H ₂ PO ₄	352.87±6.36 ^c	41.98±0.35 ^b	3.76±0.05 ^d
NH ₄ NO ₃	358.49±38.05 ^c	40.82±0.35 ^b	3.71±0.06 ^d
Control *	439.83±11.09 ^a	32.29±0.95 ^c	4.35±0.13 ^b

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Incubation time = 16 days.

* Medium without any added nitrogen sources.

表十一 生長因子對桑黃菌 (*Phellinus igniarius*) 於燕麥固態培養基之生物質及多醣體產量之影響

Table 11 Effect of growth factors on biomass and polysaccharide production by *Phellinus igniarius* on solid culture containing oats.

Growth factor (0.3%, w/w)	Biomass (mg/g)	Polysaccharides(mg/g)	Final pH
Corn steep liquor	322.88±9.36 ^b	38.14±1.54 ^a	3.97±0.04 ^b
Thiamine	260.66±31.80 ^c	34.09±1.24 ^b	4.00±0.13 ^b
Riboflavin	367.11±14.28 ^a	38.89±2.48 ^a	3.92±0.02 ^b
Ascorbic acid	175.20±28.09 ^d	32.20±0.47 ^b	4.45±0.13 ^a
Control*	305.64±22.26 ^{bc}	33.17±0.89 ^b	4.48±0.06 ^a

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Incubation time = 16 days.

*Medium without any added growth factors.

(八) 無機鹽類對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響

無機鹽類含微量金屬元素，適當添加可有助於菇類的生長與代謝。本實驗嘗試添加 MgSO₄、NaCl、KCl、CaCl₂、FeSO₄、CuSO₄ 及 ZnSO₄ 等七種無機鹽類探討彼等對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之影響。

結果(表十二)顯示添加組中以 NaCl、KCl、ZnSO₄、MgSO₄ 之生物質產量皆顯著 ($P < 0.05$) 高於對照組，然彼此間無顯著差異，表示添加無機鹽類對菌絲體產量有顯著增加之效果。多醣體產量的部分則是以 NaCl 組之多醣含量最高且顯著 ($P < 0.05$) 高於其他實驗組及對照組。本實驗結果與林(2006)利用液態深層培養桑黃菌 (*P. linteus*) 中發現當氯化鈉添加濃度 0.1% 時，多醣產量可達最高之結果相同。推測原因為菌體本身的代謝行為因氯化鈉之添加而改變外，也有可能是因鹽類添加會造成培養環境之滲透壓改變，並且因 NaCl 為所有測試組中分子量最小的無機鹽類，因此在培養環境中添加相同量的無機鹽類尤以 NaCl 之濃度為最高且環境中滲透壓也為最高，更有利於菌體之胞內多醣釋出所致。

(九) 培養時間對桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之之影響

本實驗採用前述實驗(一)~(八)所得最適菌絲體及多醣體生成之培養條件，探討桑黃菌生成最大菌絲體及多醣體之固態培養時間。所用的固態培養基即為修飾固態培養基(水添加量 60%，接菌量 3ml，含 1% glucose, 1% yeast extract, 0.3% riboflavin 及 0.1% NaCl, 起始 pH 值 4.0)，培養溫度為 30°C。

圖十二為 20 天燕麥固態培養發酵期間生物質及多醣體產量、最終 pH 值變化情形。結果顯示，菌絲體與多醣體產量在培養初期皆會隨培養時間增加而升高，且分別於第 16 天及第 12 天時達最高，此後皆隨培養時間增加而逐漸下降。培養第 12 天後菌絲體產量增加速度減緩及多醣體產量開始下降，可

能原因為培養基內養分不足導致菌體死亡、自體分解或是轉而分解多醣養分所致。培養環境中 pH 值會隨著培養時間的增加而有下降的趨勢，尤其在菌絲體開始明顯快速生長（約 10-16 天後），pH 值隨之快速下降，原因可能菌體利用完碳源（葡萄糖）後轉而分解氮源產生酸性物質，而導致 pH 值下降。

本實驗培養第 16 天時所得之菌絲體與多醣體產量（分別為 749.21 及 45.98mg/g），亦超過所有前述實驗中之最高值，而分別為基礎培養基產量（分別為 382.44 mg/g 及 37.59 mg/g，表五）之 1.96 及 1.22 倍（資料未列）。此結果顯示以修飾培養基及相同的培養時間（16 天）可提高菌絲體與多醣體產量。

表十二 無機鹽類對桑黃菌 (*Phellinus igniarius*) 於燕麥固態培養基之生物質及多醣體產量之影響

Table 12 Effect of minerals on biomass and polysaccharide production by *Phellinus igniarius* on solid culture containing oats.

mineral*	Biomass (mg/g)	Polysaccharides(mg/g)	Final pH
NaCl	437.58±29.95 ^a	35.01±0.69 ^a	5.08±0.07 ^d
KCl	476.56±9.54 ^a	28.07±2.92 ^b	5.08±0.04 ^d
CaCl ₂	343.87±22.26 ^b	19.68±1.21 ^{c d}	5.53±0.07 ^b
FeSO ₄	262.91±10.31 ^c	20.90±1.60 ^c	5.38±0.06 ^c
CuSO ₄	349.50±33.39 ^b	18.54±2.31 ^{c d}	5.84±0.02 ^a
ZnSO ₄	464.19±14.31 ^a	28.98±0.80 ^b	5.35±0.12 ^c
MgSO ₄	437.20±7.95 ^a	16.72±1.87 ^d	5.6±0.06 ^b
Control**	374.23±20.67 ^b	29.58±2.87 ^b	5.58±0.08 ^b

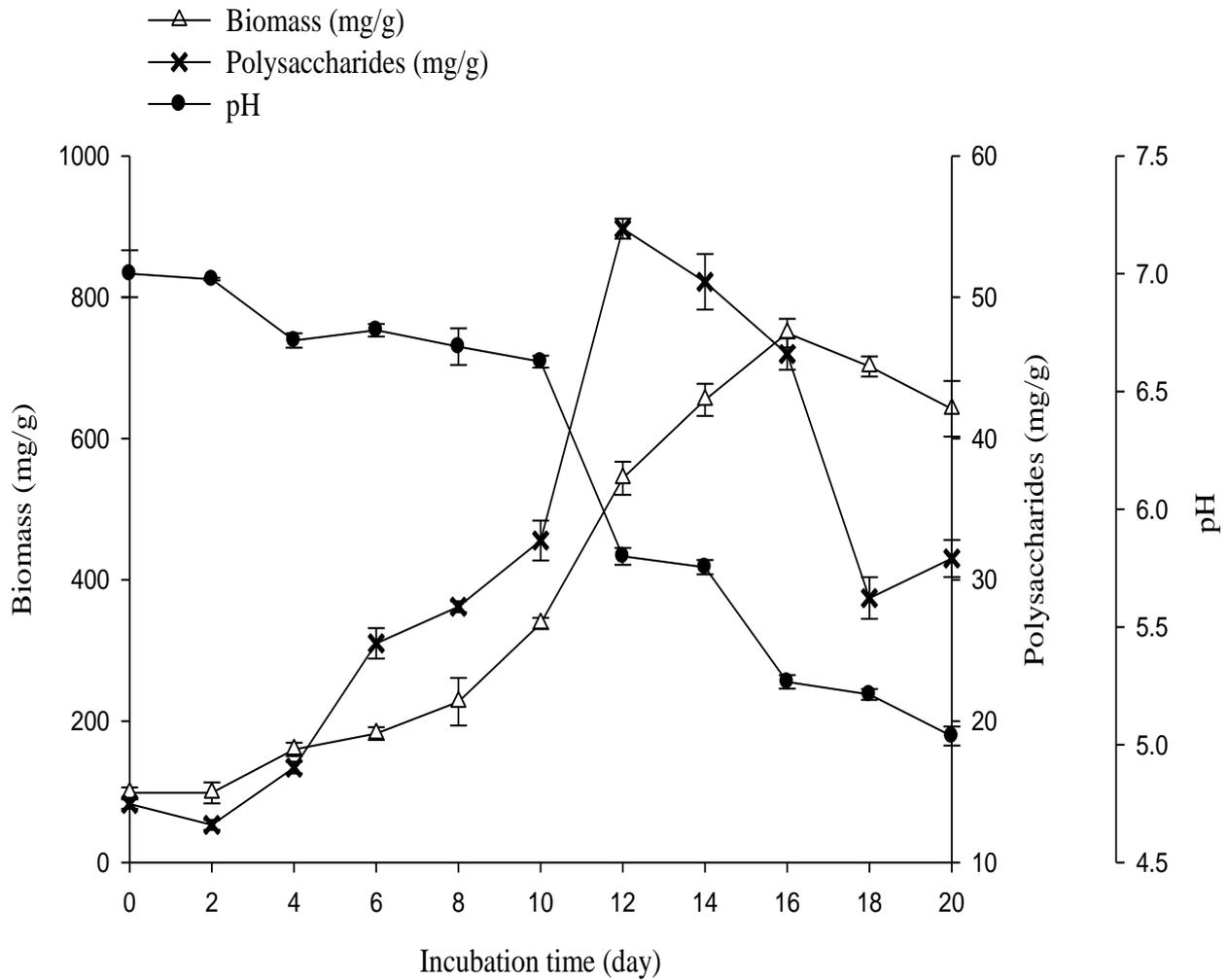
Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Incubation time = 16 days.

*Added at 0.1% (w/w) .

** Medium without any added minerals.



圖十二 桑黃菌 (*Phellinus igniarius*) 於燕麥固態培養發酵期間 (30 °C /20 天) 生物質、多醣體及最終 pH 之變化
 Fig. 12 Changes of biomass, polysaccharides and final pH during growth of *Phellinus igniarius* (30 °C / 20 days) on solid culture containing oat.

三、多醣體分子量之測定

本試驗為參考羅(2008)之報告，利用氣泡式發酵槽(air bubble fermentor)培養桑黃菌 PI，收取最高胞外多醣體生成時間(8天)之發酵液樣品。測定發酵液樣品、固態燕麥基質及固態發酵桑黃燕麥三種樣品中多醣分子量及分子量分佈情形。分子量的分析以高效能液相層析儀及膠體滲透層析管柱進行測定。表十三為不同分子量多醣標準品(α -D-葡聚糖，pullulan)之滯留時間。附圖四為多醣體(pullulan)分子量(48800、113000、210000、366000及805000 Da)之標準曲線。

結果(表十四)顯示發酵液、燕麥基質及桑黃燕麥之滯留時間分別為，12.71min、12.92min及12.10min時呈現主要波峰，比對多醣分子量標準曲線(附圖四)後得知彼等分子量分別約為 1.2×10^4 Da、 9.67×10^3 Da及 2.4×10^4 Da。各樣品多醣分子量圖譜如圖十四所示。

由多醣體分子量圖譜(圖十四)顯示，利用固態培養與液態深層培養桑黃菌 PI 所得多醣，彼等之間的分子量分布亦有不同，桑黃燕麥之多醣分佈比發酵液多了約 1.8×10^7 Da (retention time 6.29 min)、 7.6×10^4 Da (retention time 11.11 min)及 2.4×10^4 Da (retention time 12.10 min)等分子量較大的多醣，且桑黃燕麥多醣主要的分子量 2.4×10^4 Da大於發酵液多醣之 1.2×10^4 Da，(圖十三-a, c)，真菌多醣之分子量不同，其所具有的生理活性也有不同，例如分子量在3000~5000 Da之間具降血糖功能，在 1.0×10^4 ~ 1.0×10^6 Da之間者具抗發炎作用，在 3.0×10^4 Da以上具抗發炎及抗腫瘤作用，如香菇多醣、雲芝多醣及裂褶菌多醣等(黃，1998)。因此，本實驗於結果之桑黃多醣，其生理活性應與抗腫瘤有關。

比較桑黃燕麥與燕麥基質多醣，發現燕麥基質多醣分子量主要分布在

$9.6 \times 10^3 \text{ Da}$ (retention time 12.92 min) 且有少量的大分子多醣 (retention time 5.78 min 及 11.08 min)。經過桑黃菌 PI 發酵成桑黃燕麥後，原本存在燕麥分子量圖譜之波峰 (retention time 5.78 和 12.92 min) 消失，推測可能原因為菌體在生長期間會分解利用燕麥多醣體，此外桑黃燕麥之分子量圖譜中所出現的 $1.8 \times 10^7 \text{ Da}$ (retention time 6.29 min)、 $7.6 \times 10^4 \text{ Da}$ (retention time 11.11 min) 及 $2.4 \times 10^4 \text{ Da}$ (retention time 12.10 min) 等多醣體可能並不完全是由菌體所代謝產生，亦有可能為經菌體降解所殘餘之燕麥多醣體。由於多醣體之合成機制複雜，無法就此結果明確說明菌體是如何利用燕麥多醣代謝合成桑黃燕麥多醣體。往後應可利用氣相色層分析儀分析燕麥及桑黃燕麥知單醣組成，並且再以氣相層析質譜儀及傅立葉轉換紅外線光譜儀分析糖苷鍵的鍵結位置及構型 (康, 2003)。藉此更清楚了解燕麥多醣體與桑黃燕麥多醣體之間的關係，有助於更進一步了解以燕麥基質進行固態培養桑黃菌 PI 之多醣體合成方式。

表十三 膠體滲透層析法不同分子量多醣標準品 (α -D-葡聚糖) 之滯留時間

Table 13 Retention times of pullulan standards with different molecular weights by gel permeation chromatography.

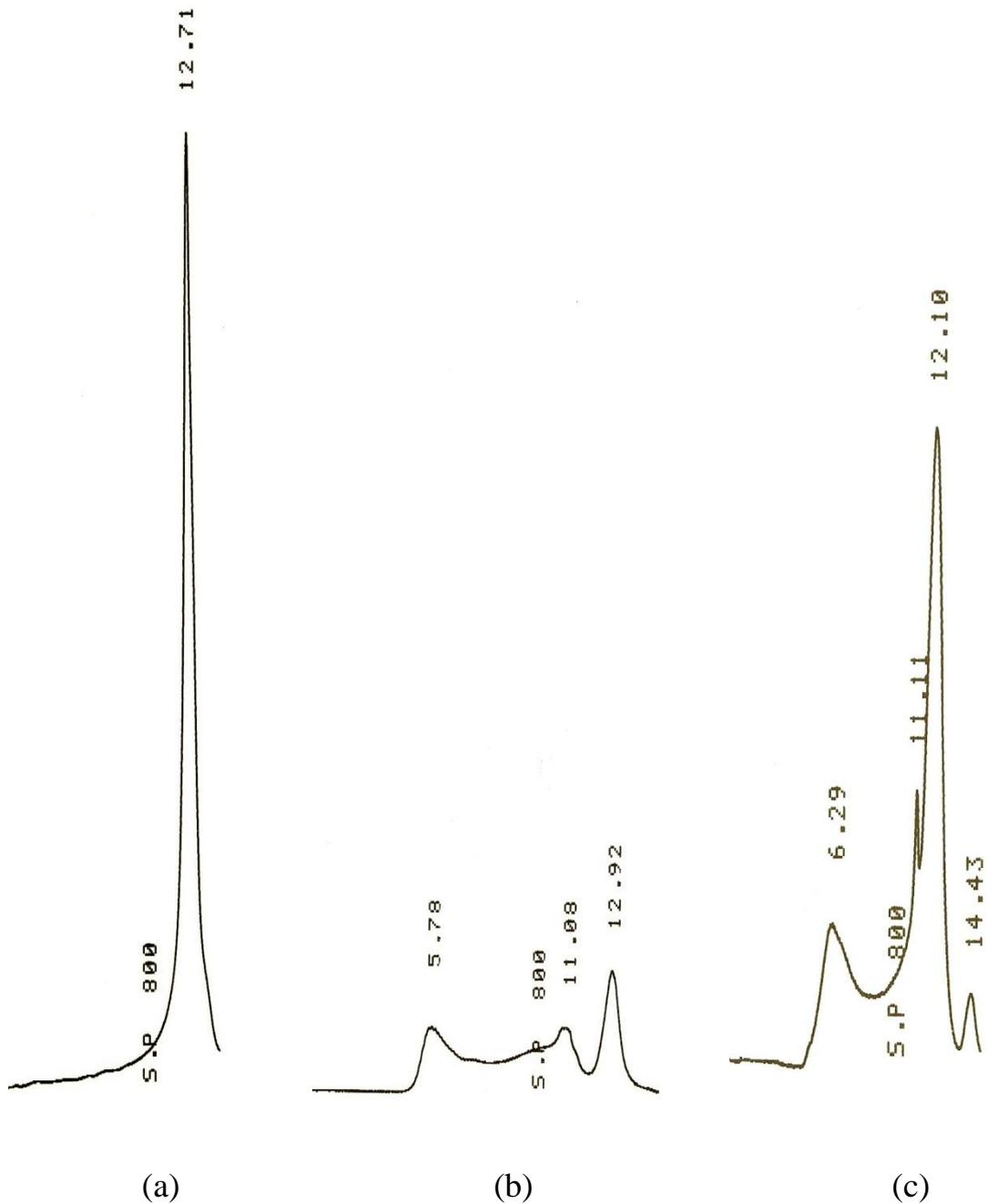
Molecular weight (Da)	Retention time (min)	Log M.W.*
48800	11.40	4.69
113000	10.84	5.05
210000	10.31	5.32
366000	9.71	5.56
805000	9.00	5.90

* Log molecular weight

表十四 膠體滲透層析法測定氣泡式發酵液、燕麥基質和桑黃燕麥之多醣體分子量

Table 14 Estimation of molecular weights of polysaccharides from *P. igniarius* PI in air bubble fermentor, oat and *Phellinus*-fermented oat by gel permeation chromatography.

Sample	Retention time (min)	Molecular weight (Da)
Air bubble fermentor	12.71	1.2×10^4
Oat substrate	12.92	9.67×10^3
<i>Phellinus</i> -fermented oat	12.10	2.4×10^4



圖十三 桑黃菌 PI 發酵液、燕麥基質與桑黃燕麥多醣體膠體滲透層析之分子量圖譜。(a) 氣泡式發酵槽，(b) 燕麥基質，(c) 桑黃燕麥

Fig. 13 Molecular weight chromatograms of polysaccharides from air bubble fermentor, oat substrate and *Phellinus*-fermented oat by gel permeation chromatography. (a) air bubble fermentor, (b) oat substrate, (c) *Phellinus*-fermented oat.

四、多醣體中 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量測定

Ko 和 Lin (2004) 指出多醣體中以 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 結構具有較佳之生理活性，可應用於宿主防禦物質之增強劑 (host defense potentiator or HDP)、抗腫瘤 (antitumor)、抗發炎 (anti-inflammatory) 及免疫誘苗 (immunostimulator)。Aniline blue 與菇類多醣體中之 β -(1 \rightarrow 3)鍵結在特定的環境下 (pH=11.50 內含 0.5M NaCl 之 0.05M Na₂HPO₄-NaOH 溶液) 會型成某種形式之錯合物，並在 UV 光照射下 (激發波長為 395nm，放射波長為 495nm) 產生黃色螢光。

本實驗則利用此一特性測定前述發酵液、燕麥基質及桑黃燕麥多醣中相對 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 的含量。結果 (表十五) 顯示以桑黃燕麥之多醣樣品中 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量 (2.13 μ g/ml LE) 顯著 (P<0.05) 高於發酵液之胞外多醣體 (1.32 μ g/ml LE) 與燕麥基質多醣組 (0.21 μ g/ml LE)。因此推測桑黃燕麥之多醣體應具較高之生理活性。

羅 (2008) 以氣泡式發酵槽培養桑黃菌 (*P. igniarius*) 所得之胞外多醣體之 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 含量為 1.92 μ g/ml LE，與本實驗結果 (2.13 μ g/ml LE) 相似。亦有報告指出以攪拌式發酵槽兩段式調控通氣量培養豬苓 (*Polyporus umbellatus*) 之最大 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 含量為 1.193 μ g/ml LE (李，2008)。

表十五 氣泡式發酵槽發酵液、燕麥基質和桑黃燕麥中多醣之 β -(1→3)-D-glucan 相對含量

Table 15 Relative β -(1→3)-D-glucan contents in polysaccharides from air bubble fermentor, oat substrate and *Phellinus*-fermented oat.

Sample	Fluorescence intensity	Laminarin equivalent (LE) ($\mu\text{g/ml}$)
Air bubble fermentor	156.424	1.32±0.09 ^b
Oat substrate	24.794	0.21±0.02 ^c
<i>Phellinus</i> -fermented oat	252.854	2.13±0.04 ^a

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Each value is expressed as mean \pm SD (n=3).

五、 抑菌能力之測定

許多真菌之代謝物具有抑制細菌生長或是可以破壞細菌菌體的作用，例如 *Chaetomium cochliodes* 產生 cochlinol、*Gliocladium virens* 產生 gliovirin、*Myrothecium verrucaria* 產生 verrucaridin 及 *Penicillium vermiculatum* 產生 vermistatin 等（梅谷和加藤，1990）。

本實驗為採取未經發酵之燕麥基質、固態發酵（12 天）所得之桑黃燕麥及氣泡式發酵槽最高胞外多醣生成天數（8 天）所得之發酵液，將彼等製備成乾燥樣品粉末後，再將樣品粉末之熱水及乙醇萃取物共六種樣品，對六株測試細菌（*Bacillus cereus*、*Escherichia coli*、*Listeria monocytogene*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Staphylococcus aureus* 及 *Salmonella typhimurium*）進行抑菌能力測定，六株測試細菌對不同濃度 ampicillin 產生抑菌環之標準曲線如附圖六～附圖十一所示。結果顯示燕麥基質、桑黃燕麥及發酵液樣品粉末之熱水或乙醇萃取物皆無抑菌效果（資料未列）。推測本實驗結果的原因可能為未使用其他有機溶劑萃取（甲醇、正丁醇、乙酸乙酯等）出樣品中有效之抑菌物質或是所實驗樣品中抑菌物質濃度過低所致。

陳（2005）以桑黃菌（*P. igniarius*）之發酵液、菌絲體、子實體和固體培養菌絲體之熱水和酒精萃取液處理 *Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus* supsp. *aureus*、*Pseudomonas aeruginosa* 等三株細菌，發現桑黃菌之發酵液及萃取液皆不具抗生物活性；羅（2008）發現桑黃菌（*P. igniarius*）及吳（2009）發現桑黃菌（*P. linteus*）發酵液對本實驗相同之六株細菌無抑菌效果。以上研究報告與本實驗結果相似。

六、 抗氧化力之測定

人體經由飲食、外在接觸或是在體內代謝過程中會產生活性氧族群 (reactive oxygen species) 及自由基 (free radicals)，一般正常狀態下身體的抗氧化系統會與自由基相抗衡，以維持正常生理狀況，當此平衡操到破壞時，活性氧族群與自由基就會攻擊細胞組織，氧化細胞內外多種成份，甚至影響到細胞分裂及生長發育造成細胞老化或者變異，引發各種疾病的發生。許多疾病與自由基有很大的相關性，然而生物體內有一套自我防護系統可以清除這些有害的自由基，例如：麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase)、觸酶 (catalase) 或是超氧歧化酶 (superoxide dismutase) 等酵素性抗氧化系統；另外抗氧化劑則是屬於非酵素性的抗氧化系統依其作用機制可分為自由基連鎖反應終止劑 (free radical terminator)、還原劑或氧清除劑 (reducing agents or oxygen scavenger) 及金屬螯合劑 (metal chelator) 等 (謝，2000)。目前科學已證實清除自由基對於細胞保護、疾病預防與衰老延緩等，具有顯著功效。因此控制體內自由基的生成或者有效清除以產生的自由基，成為現今醫藥界積極努力的方向，任何具有上述功能的成份或是物質，亦受到學界及業界的關注 (梁，2009)。

本實驗為測定前述五之燕麥基質、桑黃燕麥及發酵液乾燥粉末之熱水及乙醇萃取物共六種樣品之抗氧化力，包括 DPPH 自由基清除能力、總抗氧化能力、金屬螯合能力及還原力等。

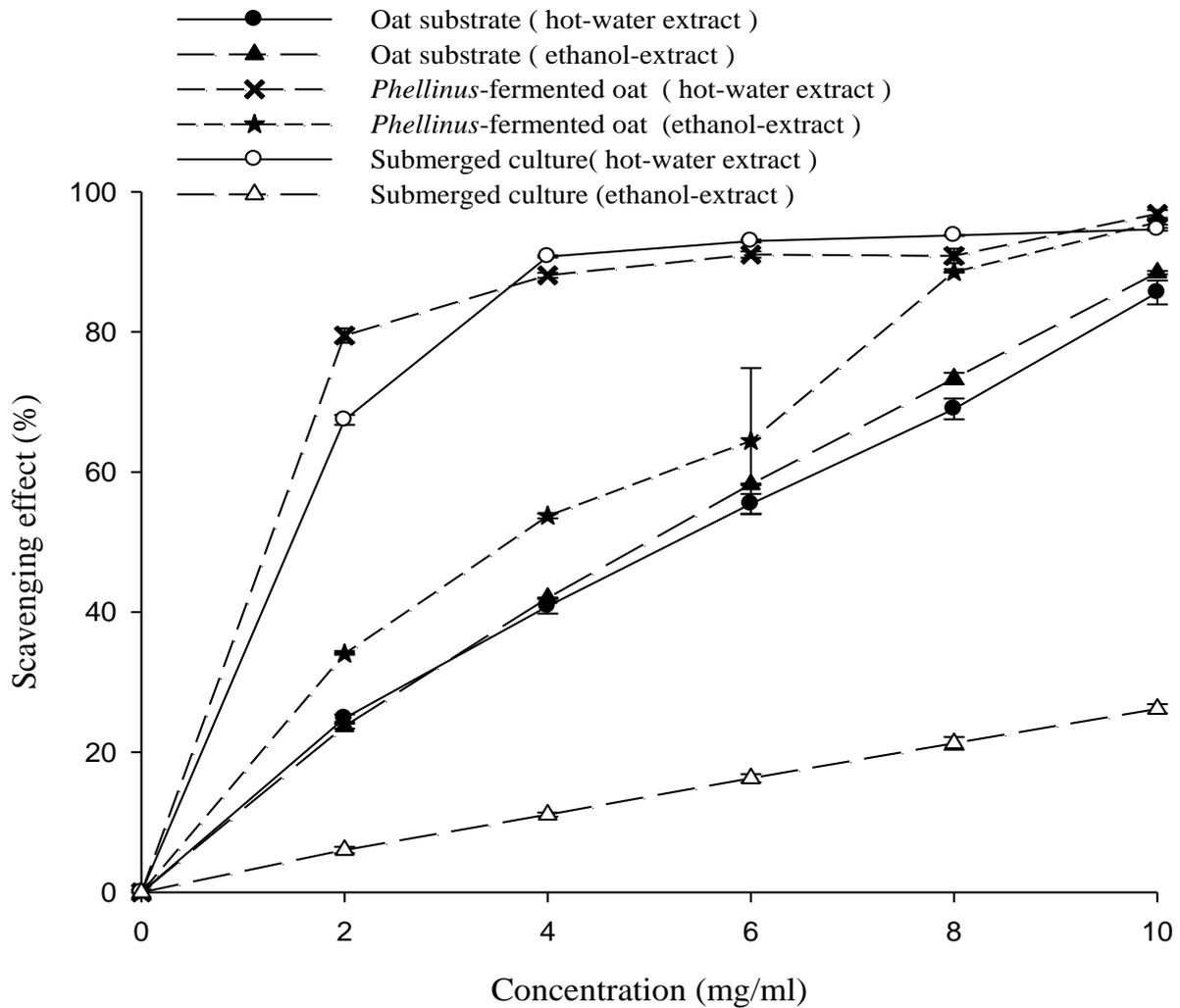
(一) DPPH 自由基清除能力測定

DPPH 自由基可接受抗氧化劑所提供之氮原子而被清除，並形成一穩定之分子，因此常被用以檢測抗氧化物的抗氧化活性 (Shimada *et al.*, 1992)。

結果 (圖十四) 顯示六種樣品 DPPH 自由基清除能力皆隨濃度之增加而升高，其中桑黃燕麥熱水萃取物在濃度 2 mg/ml 時，其 DPPH 自由基清除能力即可達 79.5%，而後隨濃度增加而逐漸趨於平緩，表示 DPPH 自由基清除能力已逐漸達到最大值。當濃度為 10 mg/ml 時，燕麥基質 (熱水萃取)、燕麥基質 (乙醇萃取)、桑黃燕麥 (熱水萃取)、桑黃燕麥 (乙醇萃取)、發酵液 (熱水萃取) 及發酵液 (乙醇萃取) 六組之自由基清除能力分別為 85.6、88.5、96.8、95.6、94.7 及 26.2% (圖十四)，其中以桑黃燕麥熱水萃物為最高，其 DPPH 自由基清除能力相當於濃度 19.88 μ g/ml 之 BHA (附圖十八)。

比較六種樣品 DPPH 自由基清除能力之 IC₅₀ (清除 50% DPPH 自由基所需之最低濃度)，亦發現以桑黃燕麥熱水萃物所需之濃度 (1.09 mg/ml) 顯著 (P<0.05) 最低 (表十六)。正對照組中則以 BHA 具最低之 IC₅₀ (9.85 \times 10⁻³ μ g/ml)；以上 IC₅₀ 值由線性回歸內插法測定之 (附圖十二~附圖十八)。因此可得知，經固態發酵接種桑黃菌 PI 後確實能提高燕麥基質的 DPPH 自由基清除能力，並且亦較發酵液組佳。Matsuda 等 (2001) 指出具 DPPH 自由基高清除率之化合物，酚基是不可缺少的官能基。因此推測利用固態發酵培養桑黃菌 PI 較液態發酵更能誘導其代謝產生出更多的酚類抗氧化物質。McCue 和 Shetty (2005) 利用固態發酵培養 *Lentinus edodes* 中發現總多酚之含量有增加的現象。表十六亦顯示，熱水萃取物之 DPPH 自由基清除能力皆較乙醇萃取物佳 (燕麥組除外)，推測應為熱水萃取物較乙醇萃取物含有較多的酚類抗氧化物質所致。若考慮熱水萃取率 (表十七) 換算成物料重，由於桑黃燕麥之熱水萃取率高 (63.95%)，因此僅需 1.70mg (1.09/0.6395) 粉末即可達到 IC₅₀

值所需的濃度，顯著 ($P < 0.05$) 低於燕麥基質組之 26.54 mg 及發酵液組之 2.79 mg (表十八)。若參考乙醇萃取率 (表十七)，桑黃燕麥只要 13.07 mg ($3.91/0.2991$) 遠低於燕麥基質組之 81.83 mg 及發酵液組之 85.20 mg (表十九)。



圖十四 燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液粉末熱水及乙醇萃取物 DPPH 自由基清除能力

Fig. 14 DPPH scavenging effect of hot-water extracts and ethanolic extracts from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor.

表十六 燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液粉末熱水及乙醇萃
取物 DPPH 自由基清除能力之 IC₅₀

Table 16 The IC₅₀ of DPPH scavenging effect of hot-water extracts and
ethanolic extracts from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and
submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor.

Samples	IC ₅₀ (mg/ml)*
Oat substrate (hot-water extract)	5.56±0.07 ^b
Oat substrate (ethanol-extract)	5.27±0.05 ^b
<i>Phellinus</i> -fermented oat (hot-water extract)	1.09±0.01 ^e
<i>Phellinus</i> -fermented oat (ethanol-extract)	3.91±0.30 ^c
Submerged culture (hot-water extract)	1.60±0.01 ^d
Submerged culture (ethanol-extract)	21.41±0.17 ^a
BHA (positive control)	9.85×10 ⁻³
Ascorbic acid (positive control)	10.36×10 ⁻³
α-tocopherol (positive control)	16.62×10 ⁻³

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

* The minimal concentration required to inhibit 50% activity of DPPH ·

表十七 燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液粉末之熱水及乙醇萃取率

Table 17 Extraction yield of hot-water extracts and ethanolic extracts from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor.

	Extraction (% dry weight)		
	Oat substrate	<i>Phellinus</i> -fermented oat	Submerged culture
Hot water	20.95±0.17 ^c	63.95±0.15 ^a	57.39±0.78 ^b
Ethanol	6.44±0.21 ^c	29.91±0.36 ^a	25.13±0.35 ^b

Values superscribed by different letters in the same row are significantly different (P<0.05). Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

表十 八 燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽之發酵液粉末抗氧化性質之 IC₅₀ (熱水萃取物)

Table 18 The IC₅₀ value of antioxidant properties of powders from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor. (hot-water extracts)

	IC ₅₀ value (powder mg/ml)			
	DPPH scavenging ability	Total antioxidant capacity	Chelating ability on ferrous ion	Reducing power
Oat substrate	26.54±0.33 ^a	8.21±0.06 ^a	14.80±1.21 ^b	29.74±0.21 ^a
<i>Phellinus</i> -fermented oat	1.70±0.01 ^c	1.03±0.01 ^c	3.05±0.02 ^c	1.72±0.01 ^c
Submerged culture	2.79±0.01 ^b	2.74±0.02 ^b	59.75±2.15 ^a	2.93±0.03 ^b

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

表十九 燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽之發酵液粉末抗氧化性質之 IC₅₀ (乙醇萃取物)

Table 19 The IC₅₀ value of antioxidant properties of powders from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor. (ethanol-extracts)

	IC ₅₀ value (powder mg/ml)			
	Scavenging ability on DPPH radicals	Total antioxidant capacity	Chelating ability on ferrous ion	Reducing power
Oat substrate	81.83±0.84 ^b	61.80±0.75 ^a	77.48±0.08 ^b	49.26±0.38 ^a
<i>Phellinus</i> -fermented oat	13.07±0.10 ^c	2.84±0.04 ^c	8.29±0.03 ^c	4.65±0.01 ^c
Submerged culture	85.20±0.68 ^a	6.88±0.05 ^b	98.37±3.69 ^a	22.28±0.09 ^b

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

(二) 總抗氧化能力測定

ABTS 會與 peroxidase 及 H_2O_2 反應形成藍綠色穩定之 $ABTS \cdot^+$ 陽離子自由基，加入抗氧化劑會減少 $ABTS \cdot^+$ 含量，使其在波長 734nm 下之吸光值降低。

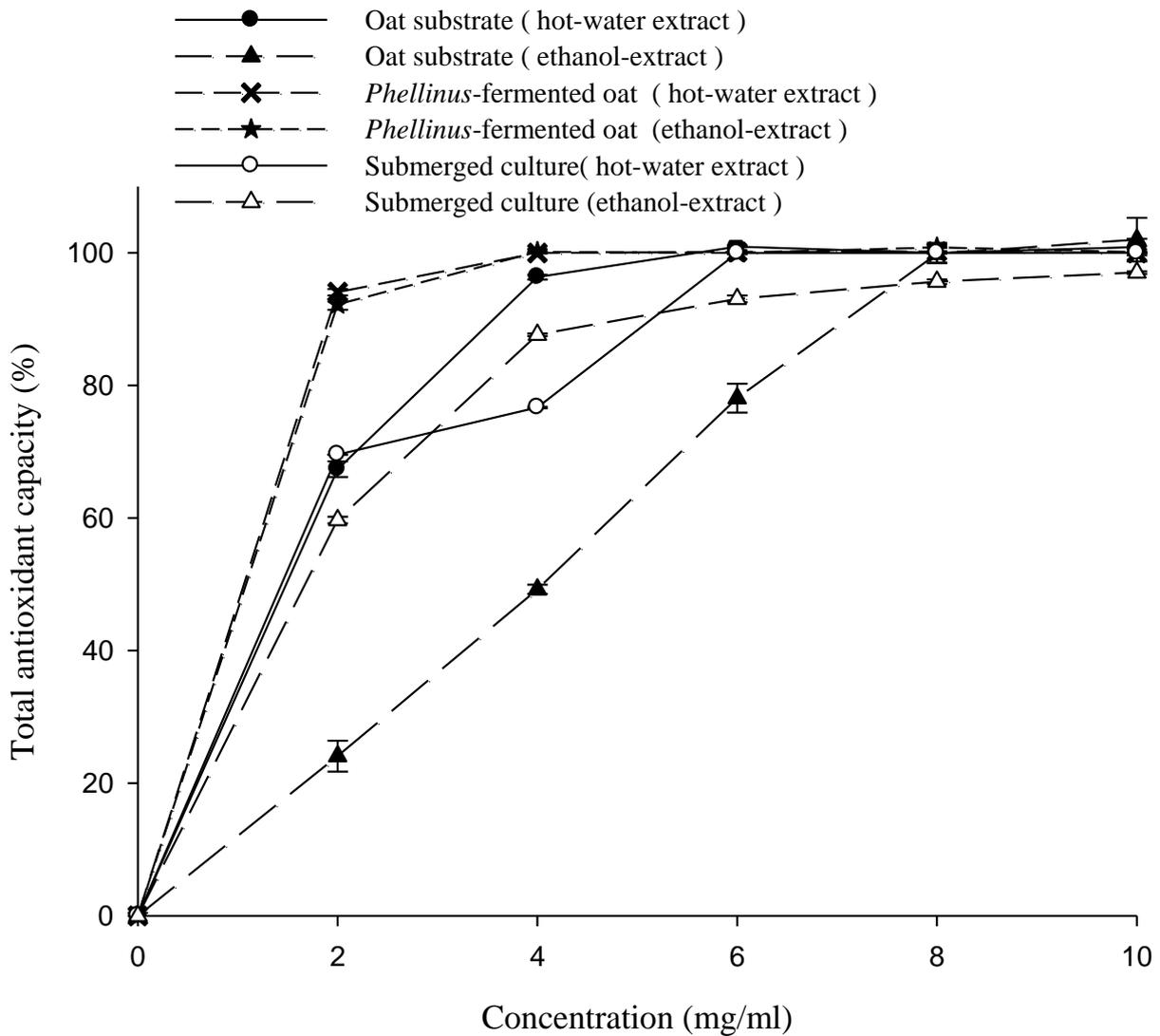
結果 (圖十五) 顯示六種樣品總抗氧化力皆隨濃度之增加而升高，桑黃燕麥熱水及乙醇萃取物的總抗氧化力在濃度 2 mg/ml 時，就可分別達到 94% 及 92.2%，而後隨濃度增加而逐漸趨於平緩，表示總抗氧化力已逐漸達到最大值。當濃度為 10 mg/ml 時，燕麥基質 (熱水萃取)、桑黃燕麥 (乙醇萃取)、桑黃燕麥 (熱水萃取)、桑黃燕麥 (乙醇萃取)、發酵液 (熱水萃取) 及發酵液 (乙醇萃取) 六組之總抗氧化力分別為 100.9、102、100、100.1、100 及 97%，由此可知六種樣品的總抗氧化力皆極佳。

換算為 IC_{50} (抑制 50% $ABTS \cdot^+$ 活性所需之最低濃度) 時，則以桑黃燕麥熱水及乙醇萃取物具有較低的 IC_{50} ，分別為 0.66 mg/ml 和 0.85 mg/ml 並且顯著 ($P < 0.05$) 低於其他實驗組，兩者之間又以桑黃燕麥熱水萃取物顯著 ($P < 0.05$) 低於桑黃燕麥乙醇萃取物 (表二十)。正對照組 (trolox) 之 IC_{50} 則為 $40.86 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ ；以上 IC_{50} 值由線性回歸內插法測定之 (附圖二十一~附圖二十七)。由此可知，經固態發酵接種桑黃菌 PI 後確實能提高燕麥的總抗氧化力，並且亦較發酵液組佳。

考慮熱水萃取率 (表十七)，桑黃燕麥熱水萃取物只需 1.03 mg (0.66/0.6395) 粉末即可達 IC_{50} ，並且顯著 ($P < 0.05$) 低於燕麥基質組之 8.21 mg 及發酵液組之 2.74 mg (表十八)。以乙醇萃取率 (表十七) 換算成物料重時，仍以桑黃燕麥之 2.84 mg (0.85/0.2991) 顯著 ($P < 0.05$) 低於燕麥基質之 61.80mg 及發酵液組之 6.88 mg (表十九)。

Lee 等人 (2007) 分析包含桑黃等多種不同真菌之有機溶劑萃取物，

得到三種具有抗氧化活性之物質，其清除 $\text{ABTS} \cdot ^+\text{陽離子}$ 自由基能力之 IC_{50} 介於 $1.8\sim 3.1 \mu\text{M}$ 之間。羅 (2008) 以氣泡式發酵槽培養桑黃菌 (*P. igniarius*) 所得發酵液對清除 $\text{ABTS} \cdot ^+\text{陽離子}$ 自由基能力之 IC_{50} 為 1.52 (g/l) 與本次實驗結果相近。



圖十五 燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽桑黃菌 *PI* 發酵液熱水及乙醇萃取出之總抗氧化能力

Fig. 15 Total antioxidant capacity on $ABTS \cdot ^+$ of hot-water extracts and ethanolic extracts from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture of *Pigniarus* using air bubble fermentor.

表二十 燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽之發酵液粉末熱水及乙醇萃
 萃取物總抗氧化能力之 IC₅₀

Table 20 The IC₅₀ of total antioxidant capacity on ABTS·⁺ of hot-water extracts and ethanolic extracts from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor.

Samples	IC ₅₀ (mg/ml)*
Oat substrate (hot-water extract)	1.72±0.01 ^b
Oat substrate (ethanol-extract)	3.98±0.05 ^a
<i>Phellinus</i> -fermented oat (hot-water extract)	0.66±0.01 ^e
<i>Phellinus</i> -fermented oat (ethanol-extract)	0.85±0.01 ^d
Submerged culture (hot-water extract)	1.57±0.01 ^c
Submerged culture (ethanol-extract)	1.73±0.01 ^b
Trolox (positive control)	40.86×10 ⁻³

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

* The minimal concentration required to inhibit 50% activity of ABTS·⁺.

(三) 螯和亞鐵離子能力測定

脂質氧化的起始反應除了可由自由基引發之外，還可由金屬離子引發，且只需要少量的金屬離子即可產生大量的自由基而加速脂質的氧化反應，進而對人體造成傷害 (Halliwell *et al.*, 1995)。其中鐵離子為對油脂氧化作用最具影響力之助氧化劑。

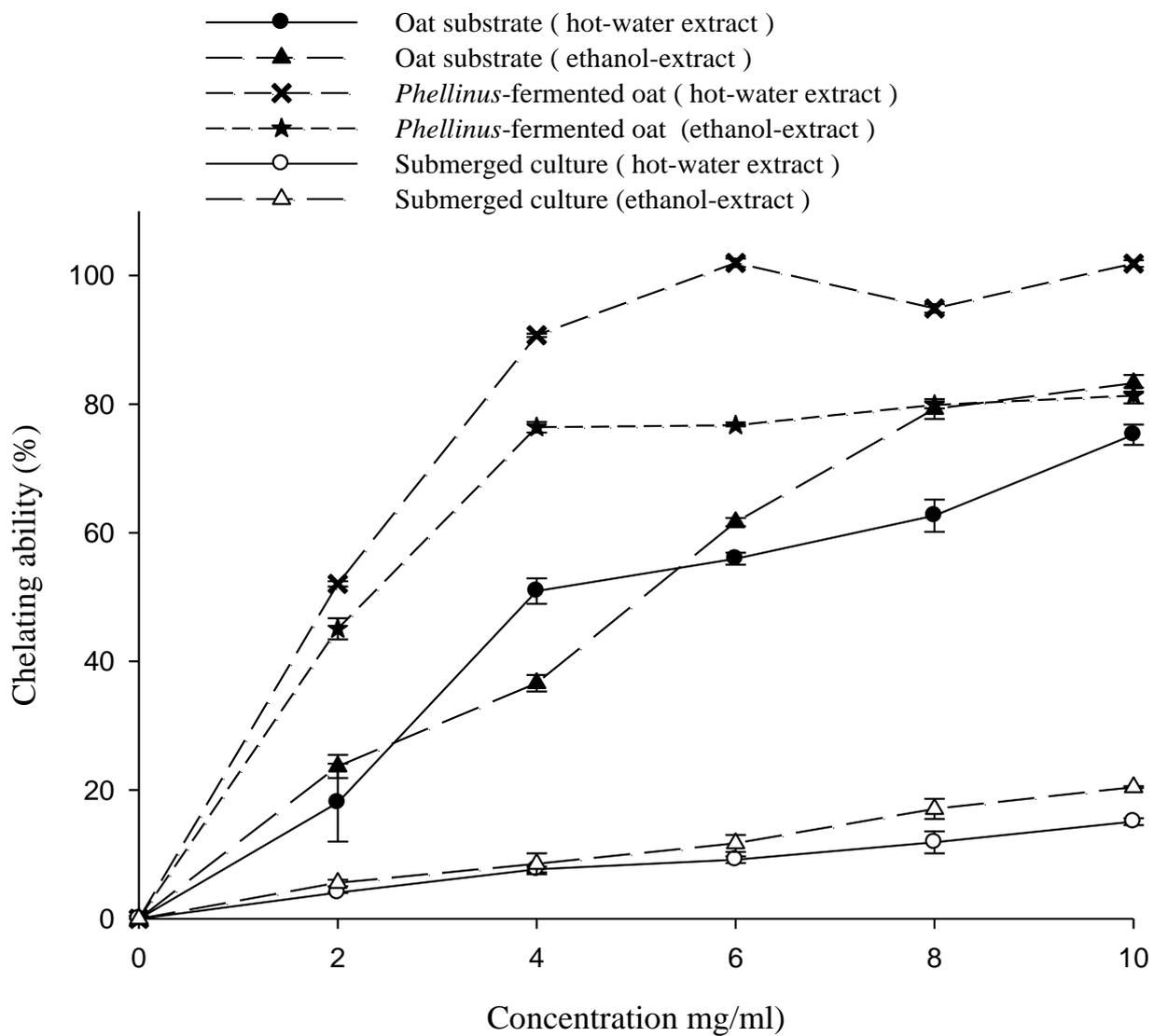
結果(圖十六)顯示六種樣品螯合亞鐵離子能力皆隨濃度之增加而升高，桑黃燕麥熱水及乙醇萃取物的螯合亞鐵離子能力在低濃度 2 mg/ml 時，可分別達到 52.0% 及 45.1%，而燕麥基質之熱水及乙醇萃取物則要濃度 6 mg/ml 時，其螯合能力才能達 50% 以上。當濃度 10 mg/ml 時，燕麥基質(熱水萃取物)、燕麥基質(乙醇萃取物)、桑黃燕麥(熱水萃取物)、桑黃燕麥(乙醇萃取物)、發酵液(熱水萃取物)及發酵液(乙醇萃取物)六組之螯合亞鐵離子能力分別為 75.2、83.2、101.9、81.3、15.1 及 20.5% (圖十六)，其中以桑黃燕麥熱水萃取物為最高，其螯合亞鐵離子能力相當於濃度 88.5 μ g/ml 之 EDTA (附圖三十四)。結果亦指出，桑黃菌利用氣泡式發酵槽所得之發酵液其螯合亞鐵離子能力較低，此結果與梁(2009)利用發酵液的熱水及乙醇萃取物進行螯合亞鐵離子能力之結果相符合。

若換算成 IC₅₀ (螯合 50% 亞鐵離子所需之最低濃度) 則以桑黃燕麥熱水及乙醇萃取物具有較低的 IC₅₀ 分別為 (1.95 mg/ml) 和 (2.48 mg/ml)，並且顯著 ($P < 0.05$) 低於其他實驗組，但彼等間並無顯著差異 (表二十一)。推測燕麥經桑黃菌 PI 發酵後含有更多能夠螯合亞鐵離子之結構，而發酵液與之相較之下含量則低許多。正對照組 (EDTA) 之 IC₅₀ 則為 41.02×10^{-3} mg/ml；以上 IC₅₀ 值由線性回歸內插法測定之 (附圖二十八~附圖三十四)。

若以熱水萃取率 (表十七) 換算物料，桑黃燕麥熱水萃取物要達到 IC₅₀ 所需濃度則僅需 3.05mg (1.95/0.6395) 之粉末，顯著 ($P < 0.05$) 低於燕麥基

質組之 14.80mg 及發酵液組之 59.75mg (表十八)。另外乙醇萃取率 (表十七) 部份，達到 IC_{50} 所需濃度亦以桑黃燕麥組之 8.29mg (2.48/0.2991) 顯著 ($P < 0.05$) 低於燕麥基質組及發酵液組 (表十九)。

徐 (2008) 以固態發酵桑黃菌所得桑黃蕙仁之熱水萃取物在濃度 10mg/ml 之亞鐵離子之螯合能力達 84.26%，較本實驗結果差，可能原因為菌種不同及所用穀物基質不同所致。蔡 (2007) 培養桑黃菌 (*P. igniarius*) 其醱酵產物萃取液對亞鐵離子之螯合能力 (IC_{50}) 為 1.71 mg/ml。與本實驗結果不同之原因可能是培養方式不同所致。



圖十六 燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽桑黃菌 *PI* 發酵液熱水及乙醇萃取出物之螯合亞鐵離子能力

Fig. 16 Ferrous ion chelating ability of hot-water extracts and ethanolic extracts from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor.

表二十一 燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽之發酵液粉末熱水及乙醇萃取物之螯合亞鐵能力之 IC₅₀

Table 21 The IC₅₀ of ferrous ion chelating ability of hot-water extracts and ethanolic extracts from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor.

Samples	IC ₅₀ (mg/ml)*
Oat substrate (hot-water extract)	3.10±0.25 ^d
Oat substrate (ethanol-extract)	4.99±0.04 ^c
<i>Phellinus</i> -fermented oat (hot-water extract)	1.95±0.01 ^e
<i>Phellinus</i> -fermented oat (ethanol-extract)	2.48±0.01 ^e
Submerged culture (hot-water extract)	34.29±1.24 ^a
Submerged culture (ethanol-extract)	24.72±0.93 ^b
EDTA (positive control)	41.02×10 ⁻³

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

* The minimal concentration required to chelate 50% activity of ferrous ion.

(四) 還原力測定

物質之還原力為將已氧化的物質還原，或將環境維持於傾向於還原狀態而不易進行氧化反應。具有還原力之物質可作為電子之提供者，與自由基的清除有很大的關係（蔡，2002）。

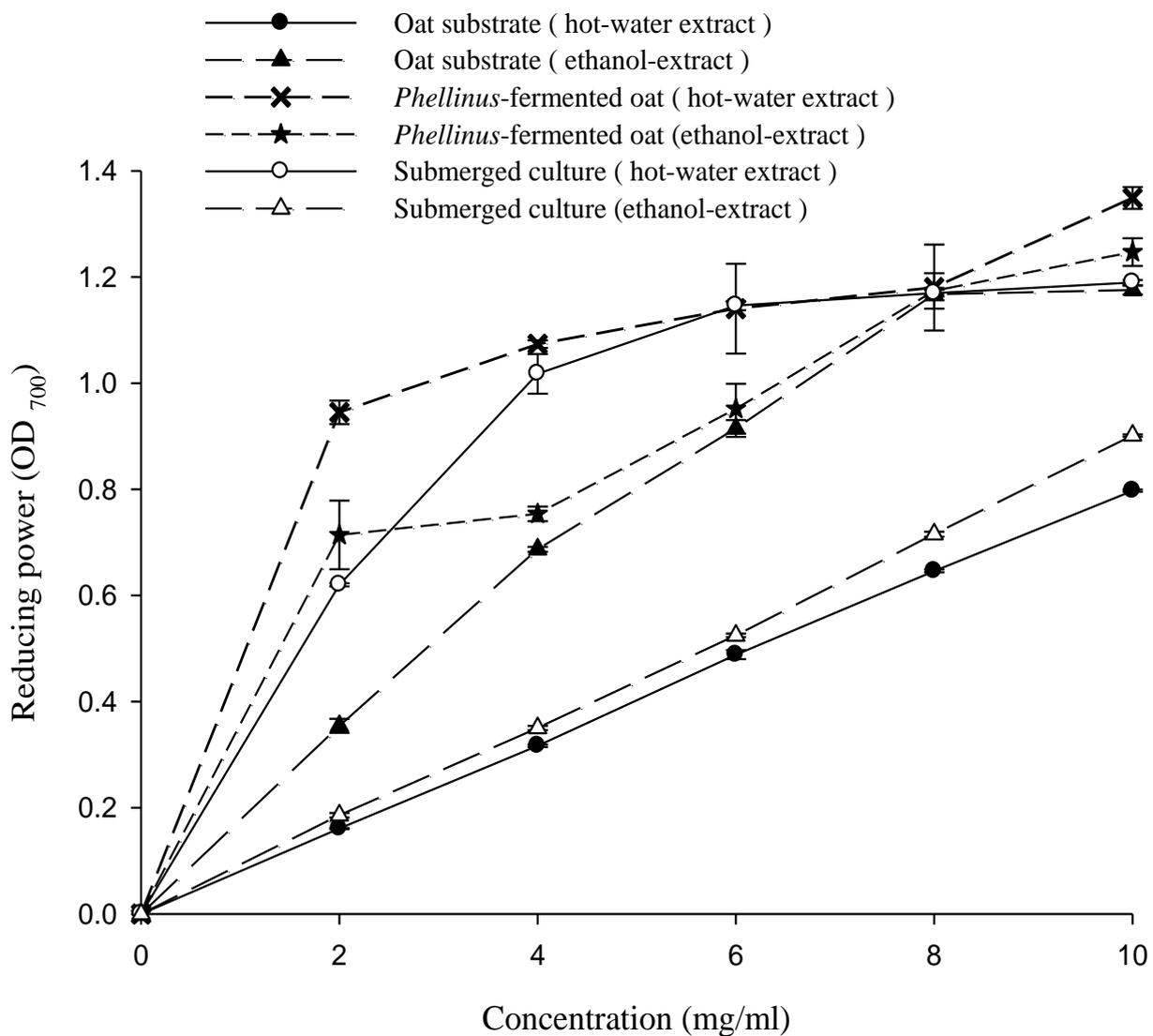
結果（圖十七）顯示六種樣品還原力皆隨濃度之增加而升高，桑黃燕麥熱水及乙醇萃取物的還原力在濃度 2 mg/ml 時，可分別達到 0.95 及 0.71，高於相同濃度其他實驗組別。燕麥基質熱水萃取物濃度 4mg/ml 及乙醇萃取物濃度 8mg/ml 時，彼等之還原力才會達 0.5 以上。當濃度 10 mg/ml 時，燕麥基質（熱水萃取）、燕麥基質（乙醇萃取）、桑黃燕麥（熱水萃取）、桑黃燕麥（乙醇萃取）、發酵液（熱水萃取）及發酵液（乙醇萃取）六組之還原力分別為 0.80、1.18、1.35、1.25、1.19 及 0.90（圖十七），其中以桑黃燕麥熱水草物為最高，其還原力相當於濃度 234.03 μ g/ml 之 ascorbic acid（附圖四十二）。

六種樣品還原力之 IC₅₀（吸光值達到 0.5 所需之最低濃度）亦以桑黃燕麥熱水草物 1.10mg/ml 顯著（P<0.05）最低（表二十二）。正對照組中則以 ascorbic acid 具有最低之 IC₅₀（11.91 $\times 10^{-3}$ mg/ml）；以上 IC₅₀ 值由線性回歸內插法測定之（附圖三十五~附圖四十三）。

以熱水草取率（表十七）換算物料，桑黃燕麥要達到 IC₅₀ 所需濃度則僅需 1.72mg（1.10/0.6395）之粉末，顯著（P<0.05）低於燕麥基質 29.74mg 及發酵液組 2.93mg（表十八）。另外乙醇萃取率（表十七）換算，要達到 IC₅₀ 所需濃度亦以桑黃燕麥之 4.65mg（1.39/0.2991）顯著（P<0.05）低於燕麥 49.22mg 及發酵液組 22.28mg（表十九）。

徐(2008)以固態發酵桑黃菌所得桑黃薏仁之熱水草取物在濃度 10 mg/ml 時還原力為 0.86（OD₇₀₀），較低於本實驗結果之 1.35，可能原因為菌種不同及所用穀物基質不同所致。整體而言熱水草取物比乙醇萃取物有較佳的還原

力（燕麥組除外）。Pitotti 等（1995）發現梅納反應產物之抗氧化性可能與其所含之還原酮具相關性，因此推測熱水萃物可能是因含有較多的還原酮成分，而能與自由基反應呈穩定狀態，進而終止自由基連鎖反應。



圖十七 燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽桑黃菌 *PI* 發酵液熱水及乙醇萃取出之還原能力

Fig. 17 Reducing power of hot-water extracts and ethanolic extracts from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture of *P.ignarius* using air bubble fermentor.

表二十二 燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽之發酵液熱水及乙醇萃
取物之還原能力之 IC₅₀

Table 22 The IC₅₀ of reducing power of hot water extract and ethanolic
extract from oat , *Phellinus*-fermented oat and submerged
culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor.

Samples	IC ₅₀ (mg/ml)*
Oat substrate (hot-water extract)	6.23±0.04 ^a
Oat substrate (ethanol-extract)	3.17±0.02 ^c
<i>Phellinus</i> -fermented oat (hot-water extract)	1.10±0.03 ^f
<i>Phellinus</i> -fermented oat (ethanol-extract)	1.39±0.01 ^e
Submerged culture (hot-water extract)	1.68±0.01 ^d
Submerged culture (ethanol-extract)	5.60±0.02 ^b
BHA (positive control)	31.94×10 ⁻³
Ascorbic acid (positive control)	11.91×10 ⁻³
α-tocopherol (positive control)	84.91×10 ⁻³

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).
Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

* The minimal concentration required to reach OD₇₀₀ of 0.5.

七、 抑制癌細胞生長能力（細胞存活率）試驗

本實驗為測定前述五之燕麥基質、桑黃燕麥及發酵液乾燥粉末之熱水及乙醇萃取物共六種樣品的抑制癌細胞生長能力，測定之癌細胞有肺腺癌細胞（A-549）、乳癌細胞（MCF-7）及肝癌細胞（HepG2）。樣品抑制癌細胞能力以癌細胞經過樣品處理（5% CO₂/37°C/48hr）後之細胞存活率（cell viability, %）表示，抑制能力越強，細胞存活率越低。

（一） 熱水萃取物對腫瘤細胞存活率之影響

結果（圖十八、十九、二十）顯示肺腺癌細胞、乳癌細胞及肝癌細胞之細胞存活率皆隨燕麥基質、桑黃燕麥或是發酵液組添加濃度之增加而降低。

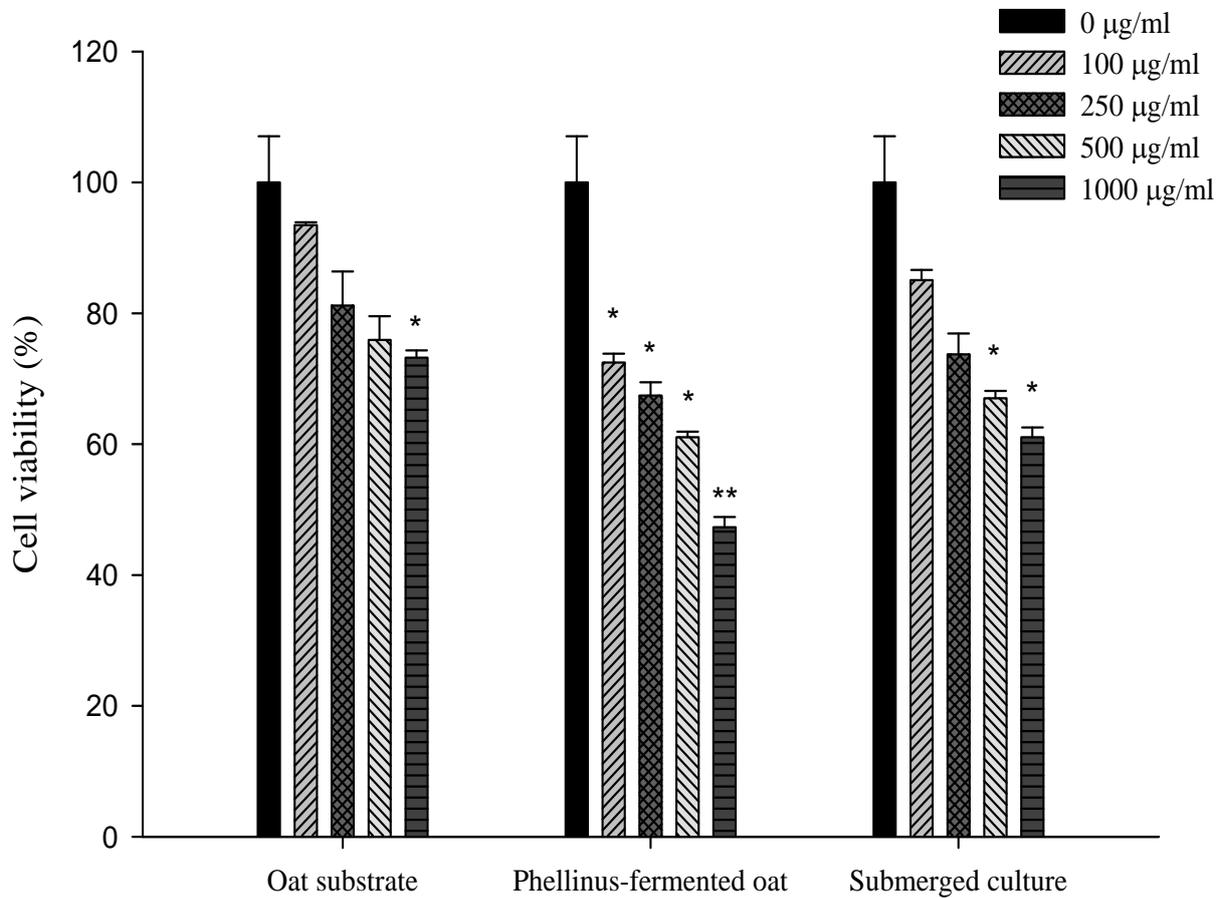
圖十八顯示肺腺癌細胞在經低濃度（100~250µg/ml）燕麥基質及發酵液組處理後，細胞存活率與未添加樣品之對照組間無顯著差異；然而桑黃燕麥組於添加濃度 100µg/ml 時，肺腺癌細胞存活率就降低到 72.5% 且顯著（ $P < 0.05$ ）低於對照組，添加濃度為 1000µg/ml 時，細胞存活率（47.3%）更可極顯著（ $P < 0.01$ ）低於對照組。當經濃度為 1000µg/ml 之燕麥基質、桑黃燕麥及發酵液處理後，肺腺癌細胞的存活率分別為 73.2%、47.3% 及 61.0%，其中以桑黃燕麥組的肺腺癌細胞存活率顯著（ $P < 0.05$ ）低於其他兩組與對照組（表二十三）。

圖十九顯示燕麥基質組在測試之濃度範圍（100~1000µg/ml）無顯著抑制癌細胞生長之能力，發酵液組則須在濃度 1000µg/ml 時，方可顯著（ $P < 0.05$ ）抑制癌細胞生長。反觀桑黃燕麥組在低添加濃度 100µg/ml 時就可使乳癌細胞存活率降至 76.5% 且顯著（ $P < 0.05$ ）低於對照組，濃度提高至 1000µg/ml 時，細胞存活率更降至 55.2% 且極顯著（ $P < 0.01$ ）低於對照組。經濃度為 1000µg/ml 之燕麥基質、桑黃燕麥及發酵液組處理後，乳癌細胞存活率分別為 80.8%、55.2% 及 73.2%，其中亦以桑黃燕麥組的乳癌細胞存活率顯著低於（ $P < 0.05$ ）

其他兩組與對照組（表二十四）。

圖二十顯示發酵液組在測試之濃度範圍（100~1000 $\mu\text{g/ml}$ ）無顯著（ $P < 0.05$ ）抑制癌細胞生長之能力。燕麥基質組則須在濃度 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，方可顯著（ $P < 0.05$ ）抑制肝癌細胞生長。桑黃燕麥組在添加濃度 500 $\mu\text{g/ml}$ 時，細胞存活率為 75.9%，顯著（ $P < 0.05$ ）低於對照組，濃度提高為 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，細胞存活率為 52.4%，極顯著（ $P < 0.01$ ）低於對照組。經濃度為 1000 $\mu\text{g/ml}$ 之燕麥基質、桑黃燕麥及發酵液組處理後，肝癌細胞存活率分別為 81.9%、52.4%及 86.3%，其中仍以桑黃燕麥組顯著低於（ $P < 0.05$ ）其他兩組與對照組（表二十五）。

由上述結果可知，在熱水萃取物方面，未經發酵之燕麥本身就具有抑制癌細胞的功效，尤其表現於肺腺癌細胞（A-549）（圖十八）。推測燕麥中本身就含有 $\beta\text{-glucans}$ ，因此才會使其具有少許的抑制癌細胞功效。此外，經固態發酵所得之桑黃燕麥可大幅提升其抑制癌細胞的能力，尤其於添加低濃度（100 $\mu\text{g/ml}$ ）時，即可顯著抑制肺腺癌及乳癌細胞之生長（圖十八，十九）。圖二十一顯示桑黃燕麥熱水萃取物在濃度 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，抑制肺腺癌、乳癌及肝癌細胞生長之情形，各處理組之細胞數與對照組相比較有明顯的減少，其中以抑制肺腺癌細胞之生長能力最強（圖二十一-（b））。在濃度 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，桑黃燕麥組對 3 種癌細胞抑制能力皆顯著（ $P < 0.05$ ）高於燕麥基質、發酵液及對照組（表二十三~二十五）。李等人（2006）採用 MTT 試驗研究桑黃固態發酵多糖（PISPS）對乳癌細胞（MCF-7）及肝癌細胞（HepG2）細胞存活率為 40.92%和 44.61%，較本實驗結果之 55.2%乳癌細胞 52.4%為佳，推測可能因本實驗所使用的樣品為粗萃物，有效成份濃度不足所導致（表二十四，二十五）。



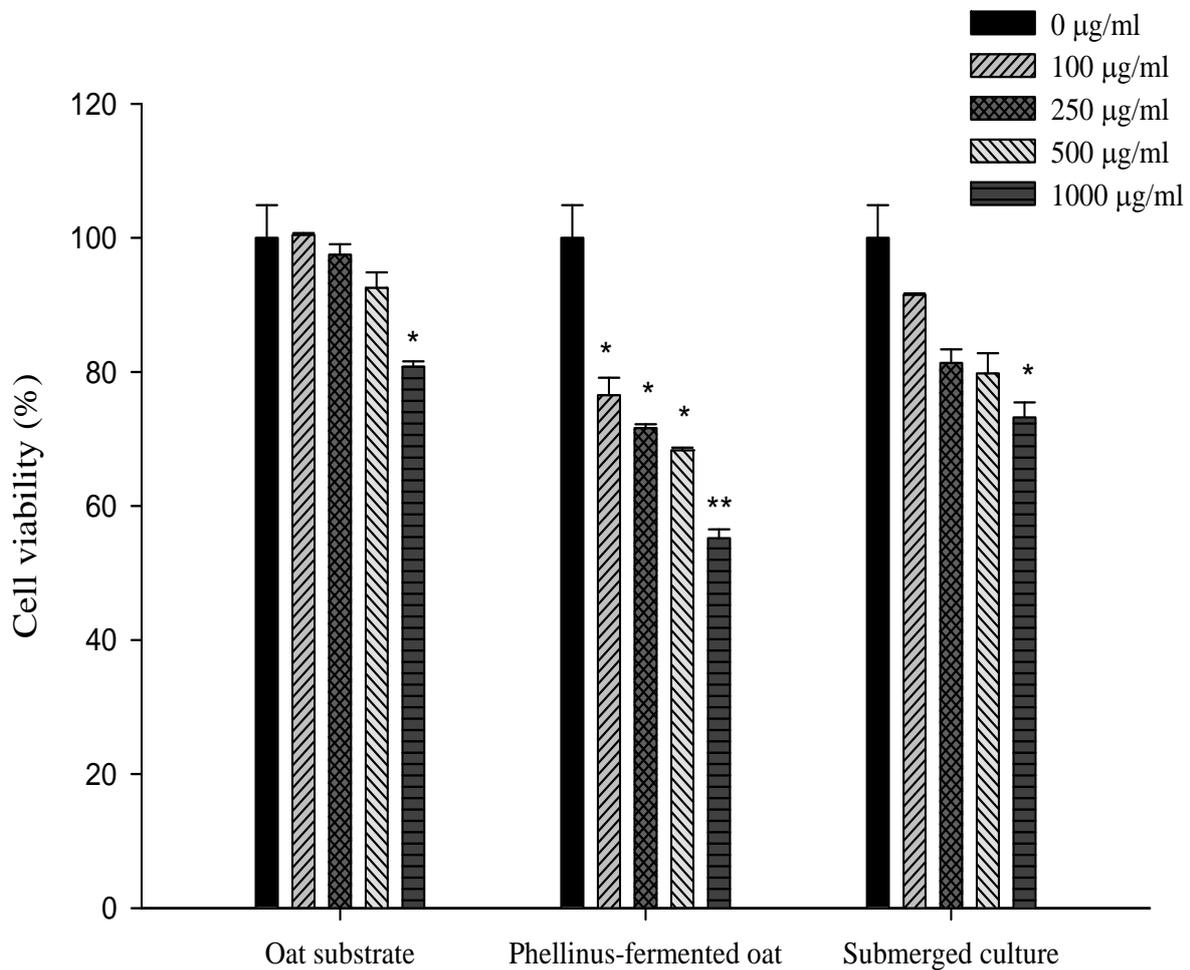
圖十八 不同濃度燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液之熱水萃取物對肺腺癌細胞 (A-549) 存活率之影響

Fig. 18 Cell viability of A-549 cells treated with various concentrations of hot-water extracts from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture of *Pigniarus* using air bubble fermentor.

Each value is expressed as mean \pm SD (n=3).

*Significantly different from control (P<0.05).

**Significantly different from control (P<0.01).



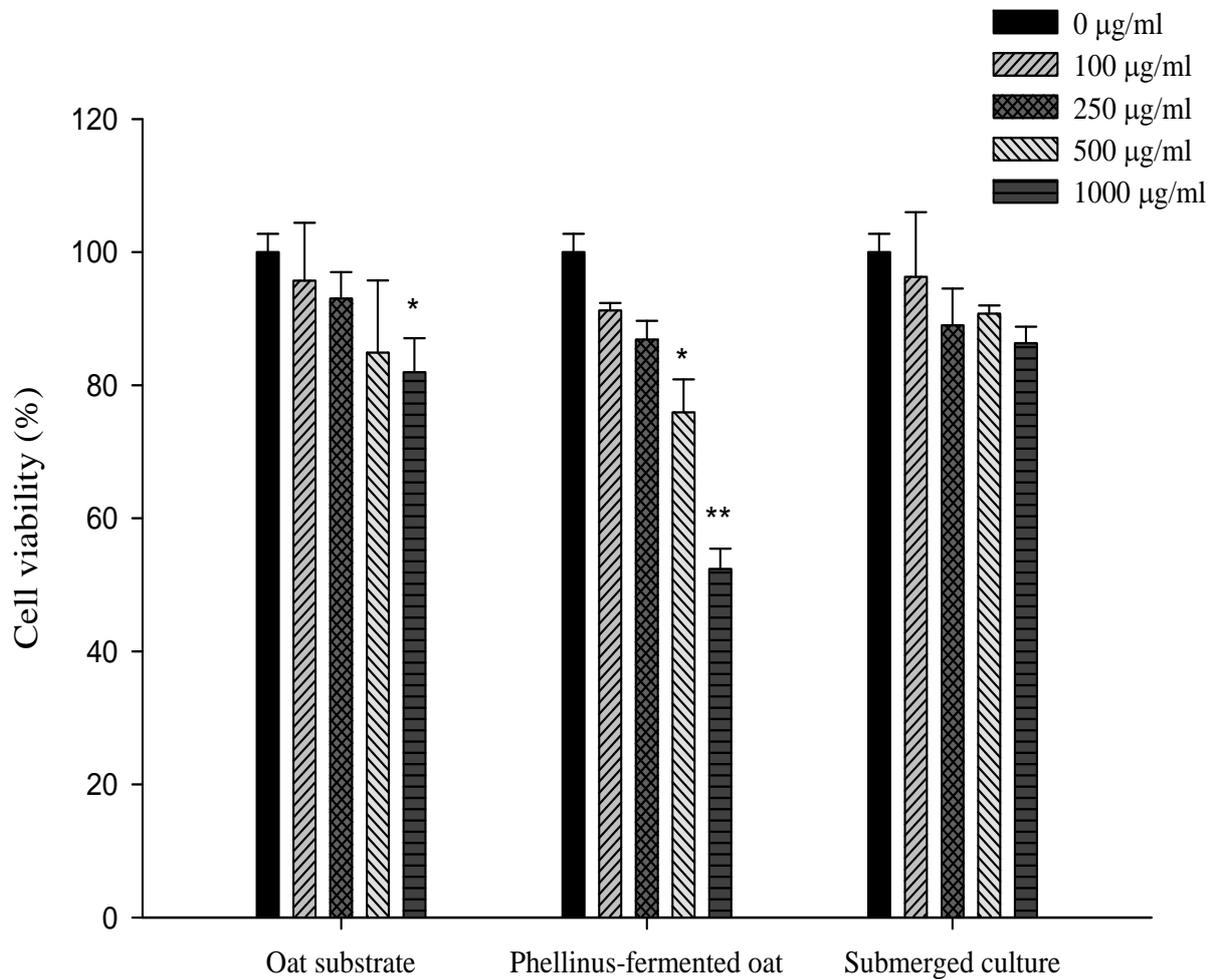
圖十九 不同濃度燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液之熱水萃取物對乳癌細胞 (MCF-7) 存活率之影響

Fig. 19 Cell viability of MCF-7 cells treated with various concentrations of hot-water extracts from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor.

Each value is expressed as mean \pm SD (n=3).

*Significantly different from control (P<0.05).

**Significantly different from control (P<0.01).



圖二十 不同濃度燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液之熱水萃作物對肝癌細胞（HepG2）存活率之影響

Fig. 20 Cell viability of HepG2 cells treated with various concentrations of hot-water extracts from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor.

Each value is expressed as mean \pm SD (n=3).

*Significantly different from control (P<0.05).

**Significantly different from control (P<0.01).

表二十三 燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽桑黃菌 *PI* 發酵液之熱水及乙醇萃取出(濃度為 1000 μ g/ml)對肺腺癌細胞(A-549)存活率之影響

Table 23 Cell viability of A-549 cells treated with hot-water extracts and ethanol-extracts (1000 μ g/ml) from oat substrate , *Phellinus*-fermented and submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor.

Sample	Cell viability (%)
Oat substrate (hot-water extract)	73.2 \pm 1.13 ^b
Oat substrate (ethanol-extract)	93.5 \pm 1.11 ^a
<i>Phellinus</i> -fermented oat (hot-water extract)	47.3 \pm 1.53 ^d
<i>Phellinus</i> -fermented oat (ethanol-extract)	63.2 \pm 2.36 ^c
Submerged culture (hot-water extract)	61.0 \pm 1.50 ^c
Submerged culture (ethanol-extract)	76.2 \pm 1.02 ^b
Control *	100.0 \pm 7.03 ^a

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05). Each value is expressed as mean \pm SD (n=3).

* Medium without any added sample.

表二十四 燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽桑黃菌 *PI* 發酵液之熱水及乙醇萃取出物(濃度為 1000 μ g/ml)對乳癌細胞(MCF-7)存活率之影響

Table 24 Cell viability of MCF-7 cells treated with hot-water extracts and ethanol-extracts (1000 μ g/ml) from oat substrate, *Phellinus*-fermented and submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor.

Sample	Cell viability (%)
Oat substrate (hot-water extract)	80.8 \pm 0.80 ^b
Oat substrate (ethanol-extract)	95.9 \pm 4.27 ^a
<i>Phellinus</i> -fermented oat (hot-water extract)	55.2 \pm 1.31 ^d
<i>Phellinus</i> -fermented oat (ethanol-extract)	72.5 \pm 1.13 ^c
Submerged culture (hot-water extract)	73.2 \pm 2.22 ^{bc}
Submerged culture (ethanol-extract)	70.7 \pm 1.98 ^c
Control *	100.0 \pm 4.88 ^a

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05). Each value is expressed as mean \pm SD (n=3).

* Medium without any added sample.

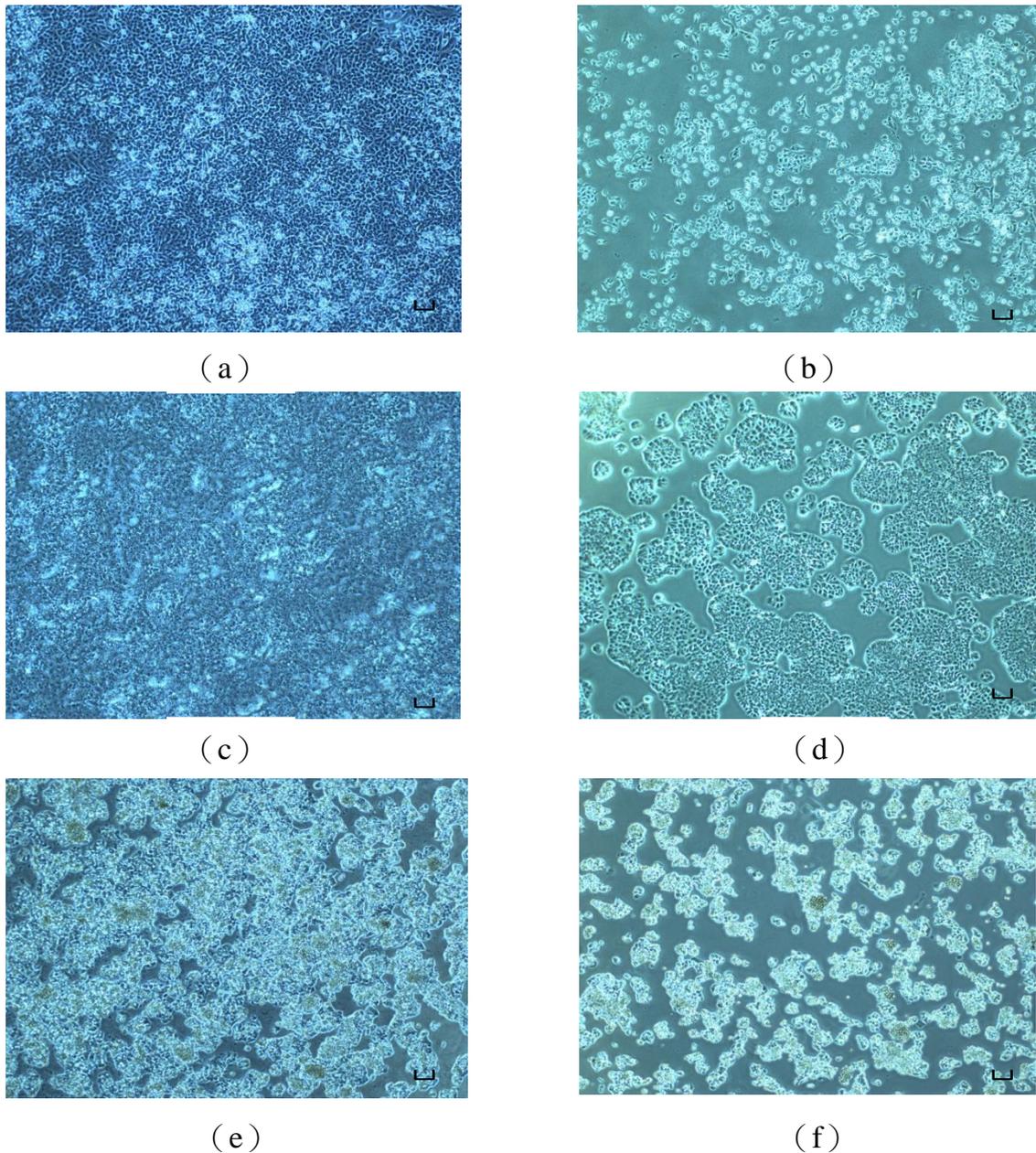
表二十五 燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽桑黃菌 *Phellinus* 發酵液之熱水及乙醇萃取出物 (濃度為 1000 μ g/ml) 對肝癌細胞 (HepG2) 存活率之影響

Table 25 Cell viability of HepG2 cells treated with hot-water extracts and ethanol-extracts (1000 μ g/ml) from oat substrate *Phellinus*-fermented and submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor.

Sample	Cell viability (%)
Oat substrate (hot-water extract)	81.9 \pm 5.12 ^b
Oat substrate (ethanol-extract)	83.7 \pm 1.76 ^b
<i>Phellinus</i> -fermented oat (hot-water extract)	52.4 \pm 3.04 ^c
<i>Phellinus</i> -fermented oat (ethanol-extract)	79.9 \pm 1.74 ^b
Submerged culture (hot-water extract)	86.3 \pm 2.48 ^b
Submerged culture (ethanol-extract)	86.0 \pm 1.71 ^b
Control *	100.0 \pm 2.75 ^a

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05). Each value is expressed as mean \pm SD (n=3).

* Medium without any added sample.



圖二十一 肺腺癌細胞 (A-549)、乳癌細胞 (MCF-7) 及肝癌細胞 (HepG2) 經桑黃燕麥熱水萃取物處理 (1000µg/ml, 5% CO₂/37°C/48hr) 後之細胞生長情形 (a) 正常 A-549 細胞株, (b) 處理後 A-549 細胞株, (c) 正常 MCF-7 細胞株, (d) 處理後 MCF-7 細胞株, (e) 正常 HepG2 細胞株, (f) 處理後 HepG2 細胞株
 □ 為 100µm

Fig. 21 Inhibitory effect of hot-water extracts (1000µg/ml, 5% CO₂/37°C/48hr) from *Phellinus*-fermented oat on growth of A-549, MCF-7 and HepG2 cells.
 (a) normal A-549 cells, (b) treated A-549 cells, (c) normal MCF-7 cells, (d) treated MCF-7 cells, (e) normal HepG2 cells, (f) treated HepG2 cells
 □ is 100µm

(二) 乙醇萃取物對腫瘤細胞存活率之影響

結果(圖二十二、二十三、二十四)顯示肺腺癌細胞(A-549)、乳癌細胞(MCF-7)及肝癌細胞(HepG2)之存活率皆隨燕麥基質、桑黃燕麥或是發酵液組添加濃度之增加而降低。其中燕麥基質組在測試濃度範圍

(100~1000 μ g/ml)時,三株癌細胞的存活率都仍然高達80%以上,且與未添加樣品之對照組相比皆無顯著差異,表示燕麥基質乙醇萃物對於這三株癌細胞之抑制生長效果不佳。

圖二十二顯示肺腺癌細胞在桑黃燕麥組添加濃度500 μ g/ml及1000 μ g/ml時,存活率即可降至為65.8%及63.2%皆顯著低於未添加樣品之對照組。而發酵液組在濃度100 μ g/ml~500 μ g/ml時,肺腺癌細胞存活率與對照組間無顯著($P < 0.05$)差異,添加濃度提高至1000 μ g/ml時,存活率(76.2%)才顯著($P < 0.05$)低於對照組。經濃度為1000 μ g/ml之燕麥基質、桑黃燕麥及發酵液組處理後,肺腺癌細胞存活率分別為93.5%、63.2%及76.2%,其中以桑黃燕麥組的肺腺癌細胞存活率顯著($P < 0.05$)低於其他兩組與對照組(表二十三)。

圖二十三顯示乳癌細胞在桑黃燕麥組添加濃度250 μ g/ml時,雖然顯著($P < 0.05$)低於對照組但其存活率能達(85.0%)。當濃度提升至1000 μ g/ml時,存活率72.5%顯著($P < 0.05$)低於對照組。發酵液組則在添加濃度為500 μ g/ml~1000 μ g/ml時,乳癌細胞存活率才會顯著($P < 0.05$)低於對照組。經濃度為1000 μ g/ml之燕麥基質、桑黃燕麥及發酵液組處理後,乳癌細胞存活率分別為95.9%、72.5%及70.7%,其中以桑黃燕麥及發酵液組的乳癌細胞存活率顯著($P < 0.05$)低於燕麥基質與對照組,但彼等間並無顯著差異(表二十四)。

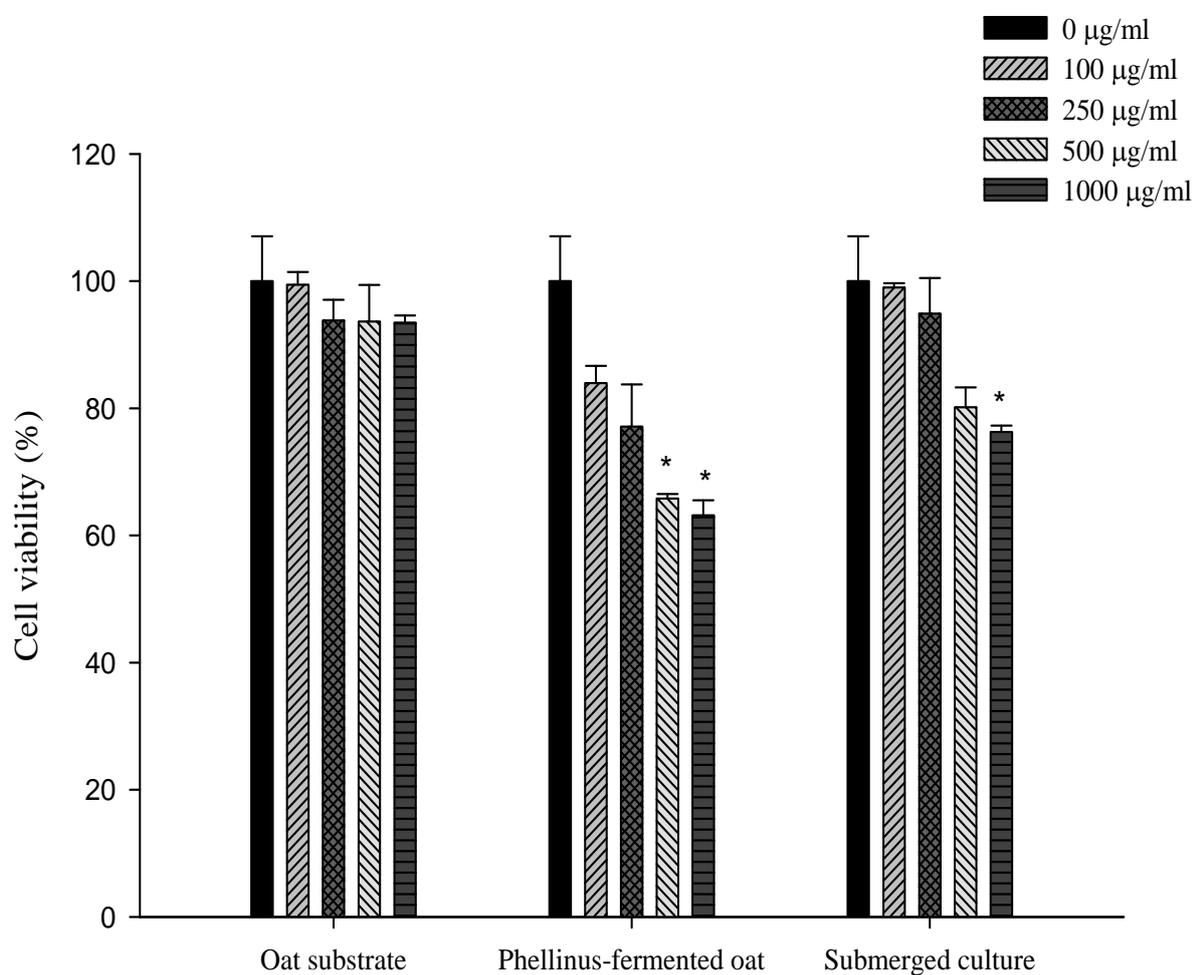
圖二十四顯示肝癌細胞在桑黃燕麥組添加濃度100 μ g/ml~250 μ g/ml時,存活率仍高達90%以上,但提高濃度至500 μ g/ml~1000 μ g/ml時,肝癌細胞的存活率皆顯著($P < 0.05$)低於對照組,但依然具有80%以上。發酵液組在測試

濃度 (100~1000 $\mu\text{g/ml}$) 範圍時，肝癌細胞的存活率仍高達 85% 以上，表示發酵液乙醇萃物抑制肝癌細胞之效果不佳。經添加濃度為 1000 $\mu\text{g/ml}$ 之燕麥基質、桑黃燕麥及發酵液組處理後，肝癌細胞存活率分別為 83.7%、79.9% 及 86.0% 皆顯著 ($P < 0.05$) 低於對照組，但彼等間並無顯著 ($P < 0.05$) 差異 (表二十五)。

由上述結果得知，在乙醇萃取物方面，燕麥基質組對三株癌細胞抑制效果很差。此外，經固態發酵所得之桑黃燕麥其抑制癌細胞的能力亦有提高的現象，尤其於添加高濃度 (1000 $\mu\text{g/ml}$) 桑黃燕麥乙醇萃取物時，可以更有效抑制三種測試癌細胞之生長，圖二十五所示為桑黃燕麥乙醇萃取物在濃度 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，抑制肺腺癌、乳癌及肝癌細胞生長情形，各處理組之細胞數皆較對照組有減少之現象，但減少之程度不若桑黃燕麥熱水萃取物 (圖二十一)，其中仍以抑制肺腺癌細胞之生長能力較強 (圖二十五- (b))。在濃度 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，桑黃燕麥組僅對肺腺癌細胞抑制能力顯著 ($P < 0.05$) 高於燕麥基質、發酵液及對照組 (表二十三~二十五)。

上述結果 (表二十三~二十五) 亦顯示燕麥基質、桑黃燕麥及發酵液組之熱水萃取物之抑制癌細胞生長能力高於乙醇萃取物。此外，對肺腺癌、乳癌及肝癌細胞的抑制效果皆以桑黃燕麥熱水萃取物為最佳，細胞抑制率分別為 52.7%、44.8% 及 47.6%。由結果亦可得知，利用固態發酵方式培養桑黃菌 PI 比液態深層培養更具有良好的癌細胞抑制作用。原因可能為利用固態發酵所得之多醣體具有較大之分子量並且所含之相對 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 的含量亦較豐富，因此桑黃燕麥之抑癌效果較發酵液佳。但由於本次實驗所測得之多醣體分子量大多為 $2.4 \times 10^4 \text{Da}$ ，只有少部分為 $1.8 \times 10^7 \text{Da}$ 、 $7.6 \times 10^4 \text{Da}$ ，參考黃 (1998) 研究指出，多醣體分子量在 $3.0 \times 10^4 \text{Da}$ 以上才可能具抗發炎及抗腫瘤作用，因此推測可能還有除多醣體以外之其他因素使桑黃燕麥具有較佳抑癌效果，例如固態發酵較

液態發酵容易代謝產生小分子物質，如 hispolon（酚類衍生物）、genistein 等。有研究指出由桑黃菌（*P. linteus*）中所分離出的 hispolon，可誘導人類表皮癌 KB 細胞的凋亡（Chen *et al.*, 2006）。genistein 本來常見於豆科植物中，近年來亦從金針菇所分離出（Kang *et al.*, 2003）。有研究指出 genistein 在肝癌細胞（HepG2）中會調控 Cdc2 激酶的活性，導致細胞週期 G2/M 的停滯，達到抑制癌細胞生長的功效（Chang *et al.*, 2004）。



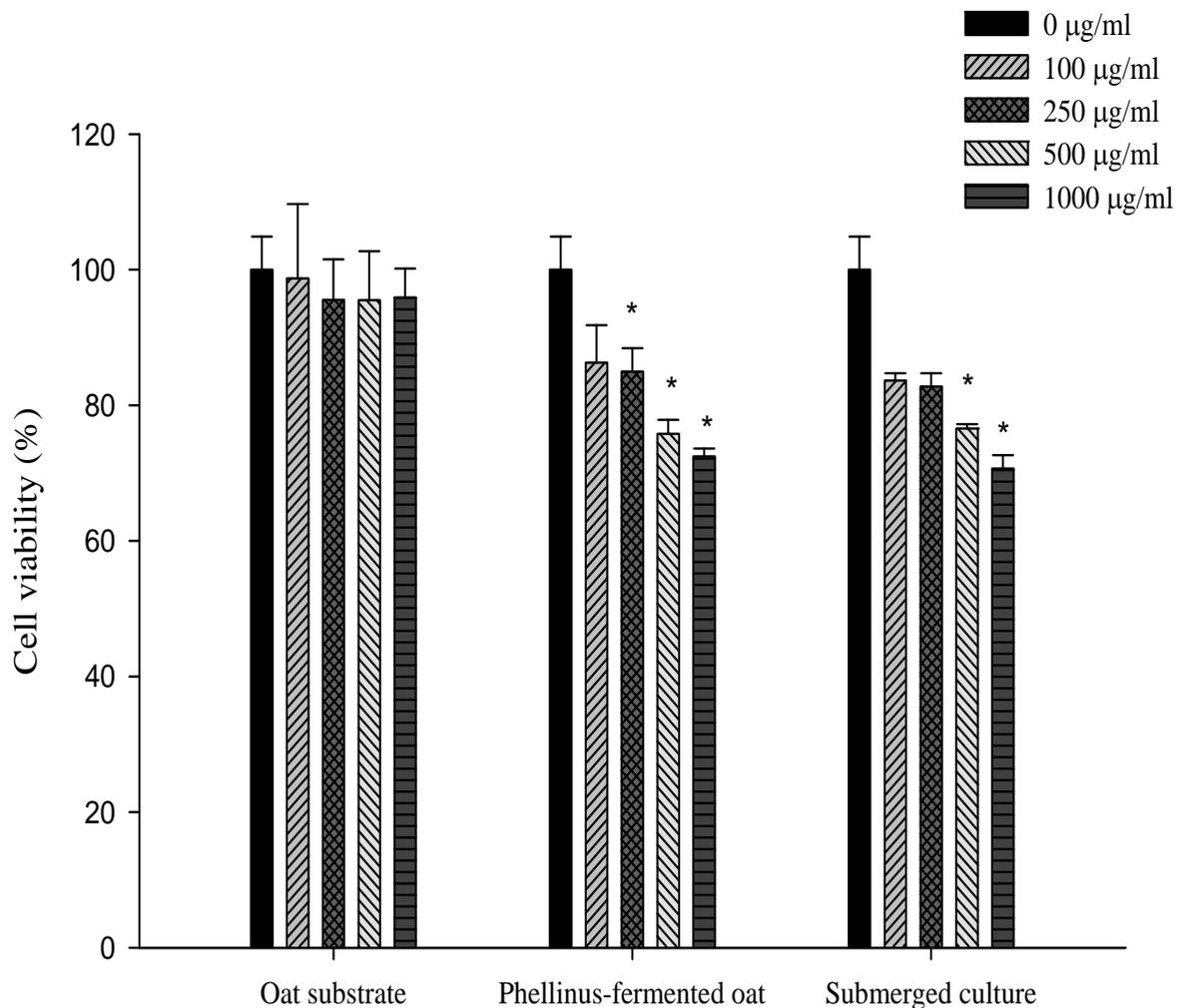
圖二十二 不同濃度燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液之乙醇萃取物對肺腺癌細胞 (A-549) 存活率之影響

Fig. 22 Cell viability of A-549 cells treated with various concentrations of ethanol-extracts from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor.

Each value is expressed as mean \pm SD (n=3).

*Significantly different from control (P<0.05).

**Significantly different from control (P<0.01).



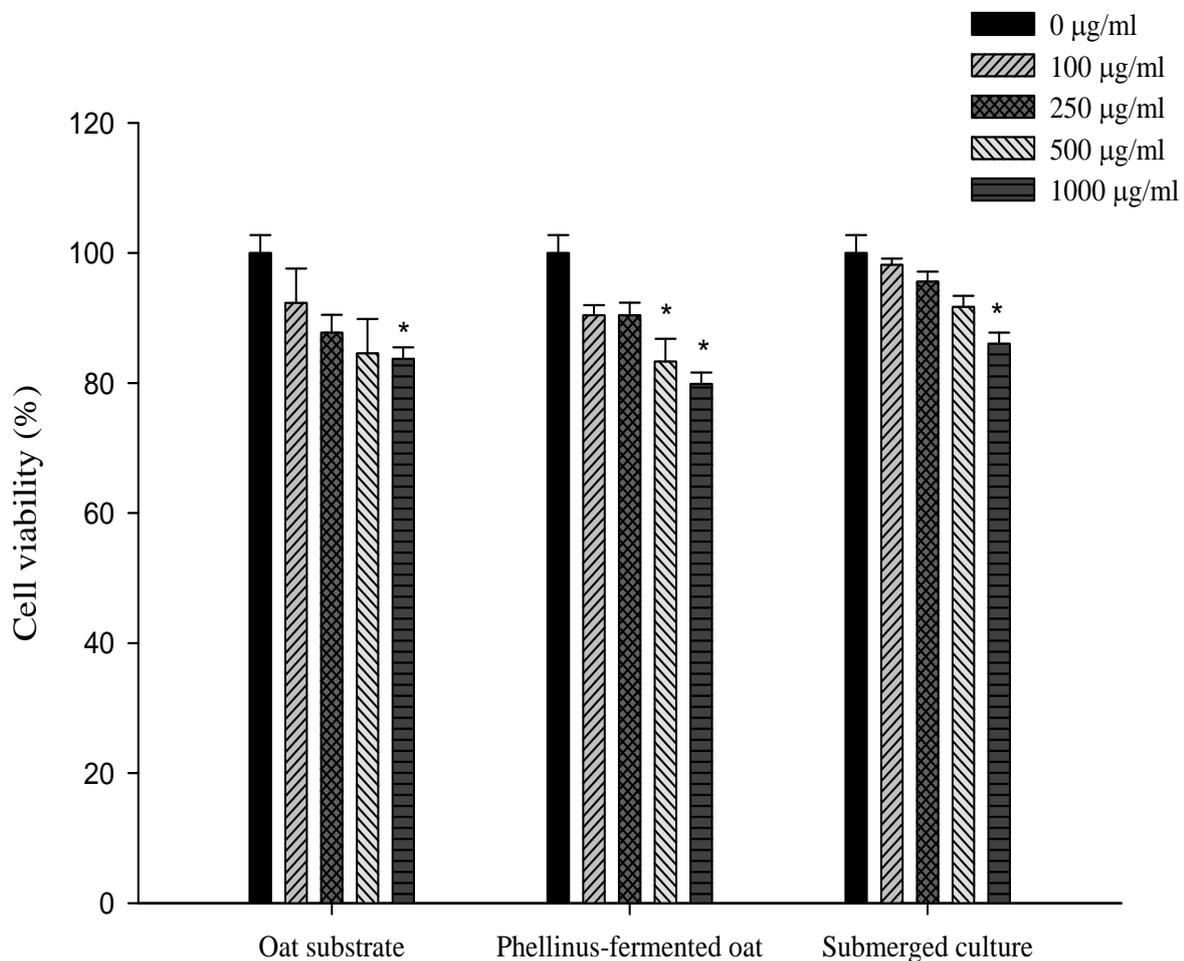
圖二十三 不同濃度燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液之乙醇萃
取物對乳癌細胞 (MCF-7) 存活率之影響

Fig. 23 Cell viability of MCF-7 cells treated with various concentrations of ethanol-extracts from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor.

Each value is expressed as mean \pm SD (n=3).

*Significantly different from control (P<0.05).

**Significantly different from control (P<0.01).



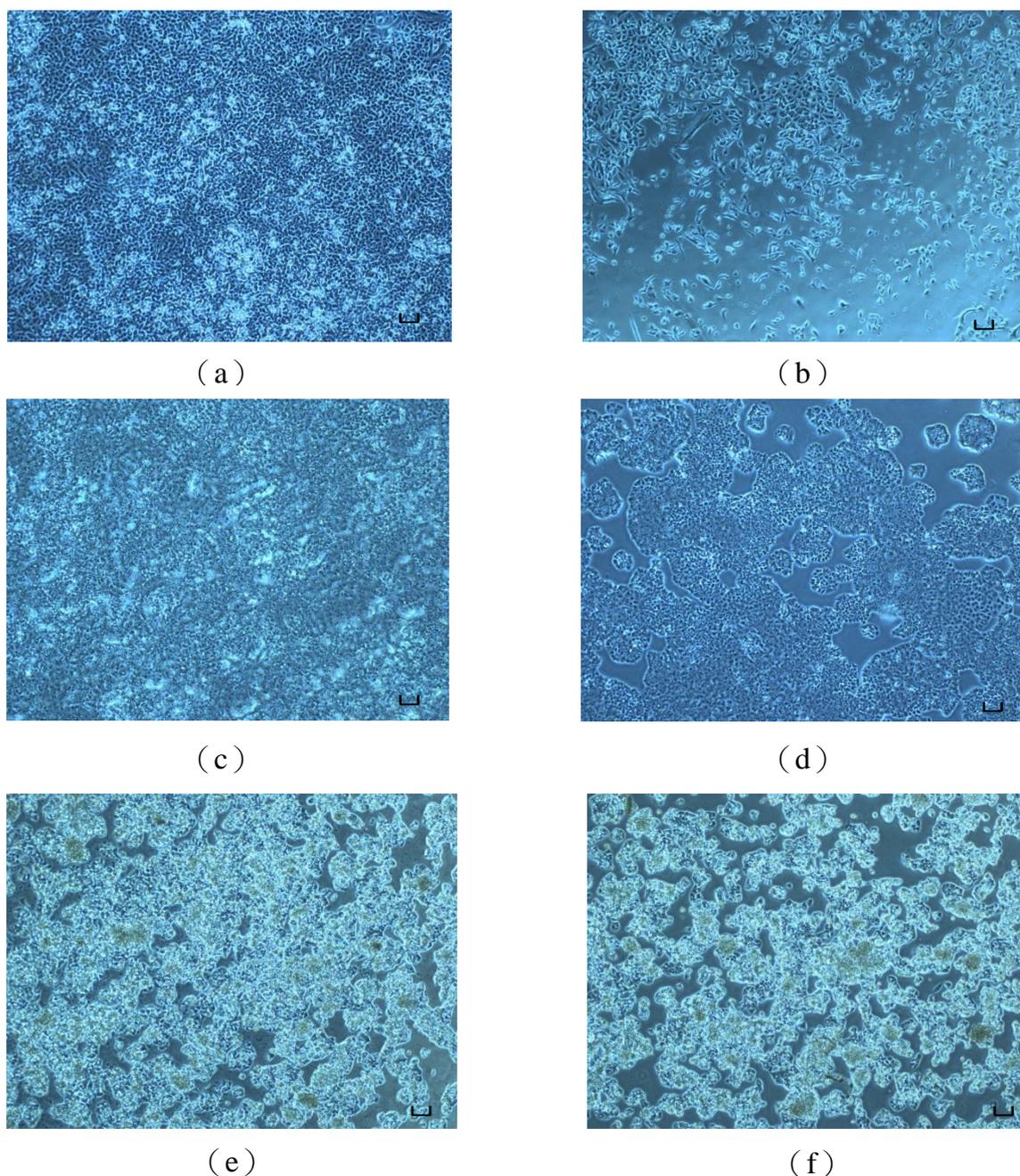
圖二十四 不同濃度燕麥基質、桑黃燕麥和氣泡式發酵槽發酵液之乙醇萃
取物對肝癌細胞 (HepG2) 存活率之影響

Fig. 24 Cell viability of HepG2 cells treated with various concentrations of ethanol-extracts from oat substrate, *Phellinus*-fermented oat and submerged culture of *P.igniarius* using air bubble fermentor.

Each value is expressed as mean \pm SD (n=3).

*Significantly different from control (P<0.05).

**Significantly different from control (P<0.01).



圖二十五 肺腺癌細胞 (A-549)、乳癌細胞 (MCF-7) 及肝癌細胞 (HepG2) 經桑黃燕麥乙醇萃取物處理 (1000 μ g/ml, 5% CO₂/37°C/48hr) 後之細胞生長情形 (a) 正常 A-549 細胞株, (b) 處理後 A-549 細胞株, (c) 正常 MCF-7 細胞株, (d) 處理後 MCF-7 細胞株, (e) 正常 HepG2 細胞株, (f) 處理後 HepG2 細胞株
 □ 為 100 μ m

Fig. 25 Inhibitory effect of ethanol-extracts (1000 μ g/ml, 5% CO₂/37°C/48hr) from *Phellinus*-fermented oat on growth of A-549, MCF-7 and HepG2 cells.
 (a) normal A-549 cells, (b) treated A-549 cells, (c) normal MCF-7 cells, (d) treated MCF-7 cells, (e) normal HepG2 cells, (f) treated HepG2 cells
 □ is 100 μ m

伍、結論

一、固態培養基試驗

桑黃菌 PI 於三種天然穀物培養基（薏仁、黑豆及燕麥）30°C 溫度下培養 20 天之菌絲體生長情況，以決定固態發酵培養條件試驗時所使用的培養基種類，結果顯示，最適合培養桑黃菌 *P. igniarius* 之固態基質為燕麥，菌絲體產量在第 16 天時可達最高之 421.93 mg/g。

二、固態發酵培養條件試驗

1. 最適桑黃菌 PI 菌絲體及多醣體生成之固態培養條件（修飾固態培養基）：水添加量 60%，接菌量 3ml，含 1% glucose，1% yeast extract，0.3% riboflavin 及 0.1% NaCl，起始 pH 值 4.0，培養溫度為 30°C。

2. 以最適條件進行培養時間 20 天之固態培養，於培養第 12 天及第 16 天時可分別具有最高多醣體（54.85 mg/g）與菌絲體（749.21 mg/g）產量，第 16 天時所得之菌絲體與多醣體產量（分別為 749.21 及 45.98mg/g），分別增加為基礎培養基最高產量（382.44 mg/g 及 37.59 mg/g）之 1.96 及 1.22 倍。

三、多醣體分子量之測定

1. 桑黃燕麥多醣之主要分子量（ 2.4×10^4 Da）大於發酵液多醣分子量（ 1.2×10^4 Da），亦比發酵液多醣多了約 1.8×10^7 Da、 7.6×10^4 Da 及 2.4×10^4 Da 等分子量較大的多醣，因此，固態發酵桑黃菌 PI 生成之桑黃多醣較發酵液多醣具有抗腫瘤功效。

2. 燕麥基質經過桑黃菌 PI 發酵成桑黃燕麥後，原本存在燕麥分子量圖譜之波峰（retention time 5.78 和 12.92 min）消失，推測可能原因為菌體在生長期間會分解利用燕麥多醣體，此外桑黃燕麥之分子量圖譜中所出現的 $1.8 \times$

10^7 Da (retention time 6.29 min)、 7.6×10^4 Da (retention time 11.11 min) 及 2.4×10^4 Da (retention time 12.10 min) 等多醣體可能並不完全是由菌體所代謝產生，亦有可能為經菌體降解所殘餘之燕麥多醣體。

四、 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量測定

燕麥基質多醣、桑黃燕麥多醣及氣泡式發酵槽發酵液之胞外多醣中，以桑黃燕麥多醣可得較高 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量 (2.13 μ g/ml LE)，故桑黃燕麥多醣之生理活性亦較高。

五、抑菌力測定

燕麥基質、桑黃燕麥及氣泡式發酵槽最高胞外多醣生成天數所得發酵液之熱水及乙醇萃取物對於六株測試病原菌皆無明顯之抑菌效果。

六、抗氧化力之測定

燕麥基質、桑黃燕麥及氣泡式發酵槽發酵液乾燥粉末之熱水及乙醇萃取物，在相同濃度 (10 mg/ml) 時以桑黃燕麥熱水萃取物具最佳之抗氧化能力，其在 DPPH 自由基清除能力、總抗氧化力、螯合亞鐵離子能力及還原力之 IC_{50} 值分別為 1.09、0.66、1.95 及 1.10mg/ml 皆顯著 ($P < 0.05$) 低於其他測試組。

七、抑制癌細胞生長能力 (細胞存活率) 試驗

細胞存活率試驗中無論是燕麥基質、桑黃燕麥或發酵液組之熱水萃取物的抑制癌細胞能力皆較乙醇萃取物來為強，其中以桑黃燕麥熱水萃取物對三

株癌細胞 (A-549、MCF-7 及 HepG2) 的抑制效果為最佳，細胞存活率 (47.3、55.2 及 52.4%) 皆顯著 ($P < 0.05$) 低於其他測試組。由結果可得知，利用固態培養所得桑黃菌發酵產物比液態深層培養所得者具更強之抑制癌細胞生長能力。

陸、參考文獻

水野卓、川合正允 編著；賴慶亮 譯。1999。菇類的化學生化學。國立編譯館 台北 台灣。

卯曉嵐。1999。中國大型真菌。鄭州：河南科學技術出版社。477~479。

江蘇新醫學院。1985。中藥大辭典。上海科學技術出版社。上海。

呂偉立。2006。DNA 型式碳水化合物抗原之生物偵測器的開發及應用。國立中央大學化學研究所碩士論文。

呂淑芳、宮昭雲、傅偉光。2001。靈芝中之水溶性粗多醣分析方法之研究。台灣農業化學與食品科學39(2)：153~161。

李宜明，沈業壽，季俊虯，鄭立軍。2006。桑黃菌質多糖的固態發酵及其抗氧化作用。合肥工業大學學報(自然科學版)。29(12)：1580~1583。

李宜明，沈業壽，季俊虯，鄭立軍。桑黃菌質多糖體外抑瘤及抗環磷醯胺致突變的作用。中國科學技術大學學報。36(7)：700~703。

李婉瑜。2008。起始 pH 與通氣量對深層培養豬苓(*Polyporus umbellatus*) 菌絲體生長及多醣體生產之影響。私立東海大學食品科學系研究所碩士論文。

- 沈育維。2004。固態發酵的測量與監控。食品工業 36(10):17~24。
- 沈葆聖。1993。SAS 統計軟體與資料分析。滄海書局 台中 台灣。
- 林怡君。2006。探討添加氯化鈉和供氧量對桑黃生產多醣體之影響。國立中央大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。
- 胡文彬，馬海樂，周存山。2006。桑黃菌液體發酵培養基及發酵條件研究。中國食用菌。25(3):49~51。
- 唐玉玲，溫魯，李芬。2006。猴頭菌絲體中氨基葡萄糖的測定。時珍國醫國藥。17(12):2428~2429。
- 徐佳莉。2008。以固態發酵製備桑黃薏仁與桑黃米產品及其呈味性質與生理活性。國立中興大學食品暨應用生物科技學系研究所碩士論文。
- 徐錦堂。1996。中國藥用真菌學。北京醫科大學、中國協和醫科大學聯合出版社。
- 高木繁。2004。桑黃。青春出版社。台灣。
- 康名慰。2003。香菇菌種之胞外水溶性多醣體分析。國立交通大學生物科技研究所碩士論文。
- 張海英，何旭，楊旭芳，李敬軒，李航。2010。桑黃靈芝UE-1對腫瘤生長及血管新生的抑制作用。腫瘤防治研究。37(4):369~372。
- 張萬國，胡晉紅，蔡溱。2002。桑黃誘生 γ -干擾素與抗肝纖維化。中醫

- 藥學報。30(6)：22~24。
- 張萬國，胡晉紅，蔡溱。2002。桑黃抗大鼠肝纖維化與抗脂質過氧化。
中成藥，(4)：281~283。
- 張萬國，胡晉紅，蔡溱。2002a。桑黃增強人外周血單個核細胞產生 γ -
干擾素的研究。基層中藥雜誌。16：5~6。
- 張萬國，胡晉紅，蔡溱。2003。桑黃對四氯化碳致大鼠肝損傷的保護作
用。中國藥房。14(5)：267~268。
- 張毅偉。2003。靈芝中具 β -(1 \rightarrow 6)分支之(1 \rightarrow 3)- β -D-聚葡萄糖之性質與
檢測。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。
- 梁志弘。2009。桑黃之液態培養及其生理活性。國立中興大學食品暨應
用生物科技學系研究所博士論文。
- 梅谷獻二，加藤肇。1990。農業有用微生物。養賢株式會社。
- 許淳鈞。2004。探討培養基組成對巴西蘑菇發酵生產活性多醣及對其特性
之影響。國立中央大學化學工程與材料工程研究所博士論文。
- 許贛榮，胡文鋒。2009。固態發酵原理、設備與應用。化學工業出版社。
北京。
- 陳品儒。2005。桑黃菌種生物活性之初步探討。私立南台科技大學生物
科技研究所碩士論文。
- 陳柳萌，肖婧，張誠。桑黃菌的研究進展。2007。19(5)：88~90江西農

業學報。

陳峰，蔡衛民。1998。γ-干擾素抗肝纖維化的研究進展。中西醫結合肝病雜誌。8(2)：112。

陳啟禎。1998。菇類二次代謝物質及其利用。食品工業 35(5)：1~11。

曾念開、王秋穎、蘇明聲、王懷凱。2007。營養及環境因素對鮑氏針層孔菌菌絲生長的影響。食用菌 4：6~8。

黃仁彰。1998。食藥用菇類保健食品之研發。食藥用菇類的培養與應用。食品工業發展研究所 新竹 台灣。

奧山 哲、堀江壽人。1980。茨大農學術報告 28(1)。

楊全，胡旭光，王琦，王文全。2006。藥用真菌桑黃菌絲多醣體抗腫瘤作用的研究。中國中藥雜誌。31(20)：1713~1715。

楊菁，黃大斌。碳源和氮源對桑黃菌絲(*Phellinus linteus*)生長的影響。中國食用菌。24(4)：31~32。

溫魯。2005。用穀物培養食用菌來生產功能食品[J]。食品科學。26(9)：574。

詹宏偉。2003。不同培養方式對靈芝菌絲體抗氧化活性成分與多醣體生成之影響。東海大學化學工程學系碩士論文。

廖仁宏。2003。固態培養生產靈芝菌絲體之研究。東海大學化學工程學

系碩士論文。

齊藤隆、楊耀銘。2004。我們的抗癌完全勝利宣言-20種蘑菇複合菌絲體超水溶性、超抗癌作用、超強免疫調節。亞洲商務管理出版社。台灣。

劉波。1984。中國藥用真菌。山西人民出版社。太原。

劉金榮，江發壽，李艷，洪成林，曹永翔，趙文斌。1998。藥用真菌桑黃甾類成分的提取和鑑定。農墾醫學。20：141。

蔡介中。2007。桑黃醱酵產物及其抗氧化特性研究。私立明新科技大學化學工程研究所碩士論文。

蔡淑瑤。2002。靈芝與柳松菇抗氧化性質和其對腫瘤細胞之毒性及柳松菇之抗致突變性質。國立中興大學食品暨應用生物科技學系研究所碩士論文。

鄭立軍，王清，李俊虬，沈業壽。2005。藥用真菌—桑黃的研究進展。現代中藥研究與實踐。19：61~64。

賴進此。2003。菇類活性物質的分離及其應用。食品工業 35(5)：2~10。

謝秋蘭。2000。杜仲水萃取物抗氧化機能性之研究。國立中興大學食品暨應用生物科技學系研究所博士論文。

羅國仁，余立文。2004。固態發酵製程的開發與應用。食品工業。36(10)：2~9。

龔慧敏。2006。小公英萃取物之生物活性分析。元培科學技術院影像醫學研究所碩士論文。

Abdullah, A.L., R.P. Tengerdy, V.G. Murphy.1985. Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw. *Biotechnol Bioeng.* 27 : 20-7.

Ajith, T.A., K.K. Janardhanan. 2003. Cytotoxic and antitumor active of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat . *Journal of Ethnopharmacology.* 84(2-3): 157-162.

Bohn, J. A. and J. N. BeMiller. 1995. (1→3)-β-D-glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers.* 28, 3-14.

Chang, K. L., M. L. Kung, N. H. Chow and S. J. Su. 2004. Genistein arrests hepatoma cells at G2/M phase: involvement of ATM activation and upregulation of p21^{waf/cip1} and Wee1. *Biochem. Pharmacol.* 67: 717-726.

Chen, W., F. Y. He, Y. Q. Li. 2006. The apoptosis effect of hispolon from *Phellinus liteus* (Berkeley&Curtis) Teng on human epidermoid KB cells. *J. Ethnopharmacol.* 105 (1-2): 280-285

Christi, Y. 1999.Solid substrate fermentation, enzyme production, food enrichment, in : M. C. Flickinger, S. W. Drew (Eds.), *Encyclopedia of Bioprocess Technology : Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, Wiley, New York, 5 : 2446-2462.

Conner, E. M. and M. B. Grisham. 1996. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition.* 12: 274-277.

Cui, J. and Y. Chisti. 2003. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*:

physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances*. 21, 109-122.

Decker, E. A. and B. Welch. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.* 38, 647-677.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28 (3): 350-356.

Durand ,A., C. Vergoignan and C. Desgranges. 1999. Biomass estimation in solid state fermentation. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 35: 200-205

Durand, A. 2003. Bioreactor designs for solid state fermentation. *J. Biochem. Eng.* 13: 113-125.

Durand, A., D. A. Chereau. 1998. New Pilot Reactor for Solid State Fermentation. Application to the Protein Enrichment of Sugar Beet Pulp. *Biotechnology and Bioengineering.* 31 : 476-486.

Elson, L. A. and W. T. J. Morgan. 1933. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *J. Biochem.* 27:1824-1828.

Glazebrook, M. A., L. C. Vining and R. L. White. 1992. Growth morphology of *Streptomyces akiyoshiensis* in submerged culture: influence of pH, inoculum, and nutrients. *Can. J. Microbiol.* 38: 98-103.

Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1989. Free radicals, aging and disease. In "Free Radicals in Biology and Medicine". Clarendon Press, Oxford. pp. 484-487.

- Halliwell, B., M. A. Murcia, S. Chirico and O. I. Aruoma. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo : what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 7-20.
- Hong, F., J. Yan, J. T. Baran, D. J. Allendorf, R. D. Hansen, G. R. Ostroff , P. X. Xing, N. K. Cheung and G. D. Ross. 2004. Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J. Immunol.* 173:797-806.
- Hur, J. M., C. H. Yang, S. H. Han, S. H. Lee, Y. O. You, J. C. Park and K. J. Kim. 2004. Antibacterial effect of *Phellinus linteus* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia.* 75(6): 603-605.
- Hwang, H. J., S. W. Kim, C. P. Xu, J. W. Choi and J. W. Yun. 2003b. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 309-319.
- Hwang, H. J., S. W. Kim, C. P. Xu, J. W. Choi and J. W. Yun. 2003a. Production and molecular characteristics of four groups of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus gilvus*. *J. Appl. Microbiol.* 94: 708-719.
- Hwang, H. J., S. W. Kim, J. M. Lim, J. H. Joo, H. O. Kim, H. M. Kim and J. W. Yun. 2005. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 76: 3069-3080.
- Ikekawa, T. 2001. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in

health care. *International Journal Medical Mushrooms*.

3:291-298. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1: 31-51.

Kang, A., Y. Wang, L. Harvey, M. and B. McNeil. 2000. Effect of air flow rate on scleroglucan synthesis by *Sclerotium glaucanicum* in an airlift bioreactor with an internal loop. *Bioprocess Engineering*. 23: 69-74.

Kang, J., H. Q. Wang and R. Y. Chen. 2003. Studies on the constituents of the mycelia produced from fermented culture of *Flammulina velutipes* (W. curt.: Fr.) Singer (Agaricomycetidae). *Int. J. Med. Mushroom*. 5: 391-396.

Kastanek, F., K. Demmerova, J. Pazlarova, J. Burkhard and Y.

Maleterova .1999. Biodegradation of polychlorinated biphenyls and volatile chlorinated hydrocarbons on contaminated soils and ground water in field condition. *Int. Biodeter. Biodegr*. 44 : 39-47.

Kim, D. H., B. K. Yang, S. C. Jeong, J. B. Park, S. P. Cho, S. Das, J. W. Yun and C. H. Song. 2001. Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*. *Biotechnol. Lett*. 23: 513-517.

Kim, G. Y., J. Y. Lee and J.O. Lee. 2006. Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide–protrin complex extracted from *Phellinus linteus* . *Biotechnol. Biochem*, 70(5) : 1218-1226.

Kim, G. Y., W. K. Oh, B. C. Shin, Y. I. Shin, Y. C. Park, S. C. Ahn, J. D. Lee, Y. S. Bae, J. Y. Kwak and Park, Y. M. 2004c. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* inhibits tumor growth through mechanisms leading to

an activation of CD11c⁺ CD8⁺ DC and type I helper T cell-dominant immune state. FEBS Lett. 576: 391-400.

Kim, S. W., H. J. Hwang, C. P. Xu, J. M. Sung, J. W. Choi and J. W. Yun.

2003b. Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. J. Appl. Microbiol. 94: 120-126.

Kirk, T. K., L. F. Lorenz and M. J. Larsen.1975. Partial characterization of a phenolic pigment from sporocarps of *Phellinus igniarius* .

Phytochemistry. 14 (1) : 281-284.

Ko, Y. T. and Y. L. Lin. 2004. 1,3- β -glucan quantification by a fluorescence microassay and analysis of its distribution in foods. J. Agric. Food Chem. 52: 3313-3318.

Kurchenko, V. P., V. V. Senchuk, N. V. Gayrilenko. 1998. Comparative characteristics of melanin pigments of *Phellinus igniarius* and *Inonotus* sp. Macromycetes. Khimiya Biologiya Geografiya. 3 : 22-26.

Lee, I. K. and B. S. Yun. 2007. Highly oxygenated and unsaturated metabolites providing a diversity of hispidin class antioxidants in the medicinal mushrooms *Inonotus* and *Phellinus*. Bioorg. Med. Chem. 15: 3309-3314.

Li, G., D. Kim, T. Kim and B. Park. 2004. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells. Cancer Letters. 216: 175-181.

Lim, D. 1998. Microbiology. 2nd Ed. Pp. 132-133. WCB/Mcgraw-Hill, New

York, NY. USA.

Lim, J.S., S. H. Kim, J. S. Park. 2001. Anti-tumor Activity of the fruitbody extract of basidiomycete, *Phellinus linteus*. The journal of microbiology. 39(2) : 121-125

Martin, S. M. 1964. Conservation of microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 18: 1-16.

Matcham, S. E., B. R. Jordan and D. A. Wood. 1985. Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 108-112.

Matcham, S.E., B. R. Jordan, B. J. B. Wood. 1984. Methods for assessment of fungal growth on solid substrates. In : Microbiological Methods for Environmental Biotechnology, ed Grainger JM, Lynch JM. Academic Press, New York. pp. 5-18.

Matsuda, H., T. Morikawa, I. Toguchida, J. Y. Park, S. Harima and M. Yoshikawa. 2001. Antioxidant constituents from rhubarb: Structural requirements of stilbenes for the activity and structures of two new anthraquinone glucosides. Bioorg. Med. Chem. 9: 41-50.

McCue, P. P. and K. Shetty. 2005. Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using Kefir cultures. Process Biochemistry. 40: 1791–1797.

Miller, N. J., C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan and A. Milner. 1993. A novel method for measuring antioxidant status in premature neonates. Clin. Sci. 84: 407-412.

- Mitchell, D.A. and B.K. Lonsane. 1992. Definition, characteristics and potential. In : H. W. Doelle, D. A. Mitchell and C. E. Rolz (eds.) Solid substrate cultivation, Elsevier Science Publisher, London.
- MO, S. Y., Y. C. YANG, J. G. SHI. 2003. Studies on chemical constituents of *Phellinus igniarius*. China J Chin Mater Med. 28 (4) : 339-341.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colourimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. Journal of Immunological Methods. 65: 55-63.
- Narahara, H., Y. Koyama, T. Yoshida, P. Atthasampunna, H. Taguchi. 1982. Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. J. Ferment Technol. 62 : 453-459.
- Ofuya, C.O. and S. N. Obilor. 1994. The effects of solid state fermentation on the toxic components of cassava peel. Process Biochem. 29 : 25-28.
- Oyaizu, M. 1986. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 35: 771-775.
- Pandey, A., C. R. Soccol and D. A. Mitchell. 2000. New developments in solid state fermentation. Part I. Bioprocesses and products, Process Biochem. 35 : 1153-1169.
- Pitotti, A., B. E. Elizalde and M. Anese. 1995. Effect of caramelization and maillard reaction products on peroxidase activity. J. Food Biochem. 18: 445-457.
- Robinson, T., D. Singh and P. Nigam. 2001. Solid-state fermentation : a

promising microbial technology for secondary metabolite production.
Appl. Microbiol Biotechnol. 55: 284-289.

Roseiro, C. J., F. M. Girio, A. Kara and M. T. Amaral-Collaco. 1993. Kinetic and metabolic effects of nitrogen, magnesium and sulphur restriction in *Xanthomonas campestris* batch cultures. Journal of Applied Bacteriology. 75: 381-386.

Sato, K. and S. Sudo. 1999. Small-scale solid-state fermentations. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology (2nd edn.). 61-79.

Shimada, K., K. Fujikawa, K. Yahara and T. Nakamura. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agric. Food Chem. 40: 945-948.

Shon, M.Y., T. H. Kim and N. J. Sung. 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extract. Food Chem. 82: 593-597.

Shon, Y. H., J. S. Lee, H. W. Lee, J. W. Kim, J. K. Lim, C. H. Kim and K. S. Nam. 1999. Antimutagenicity of *Phellinus linteus* in *Salmonella typhimurium*. The journal of microbiology. 37(3) :136-140

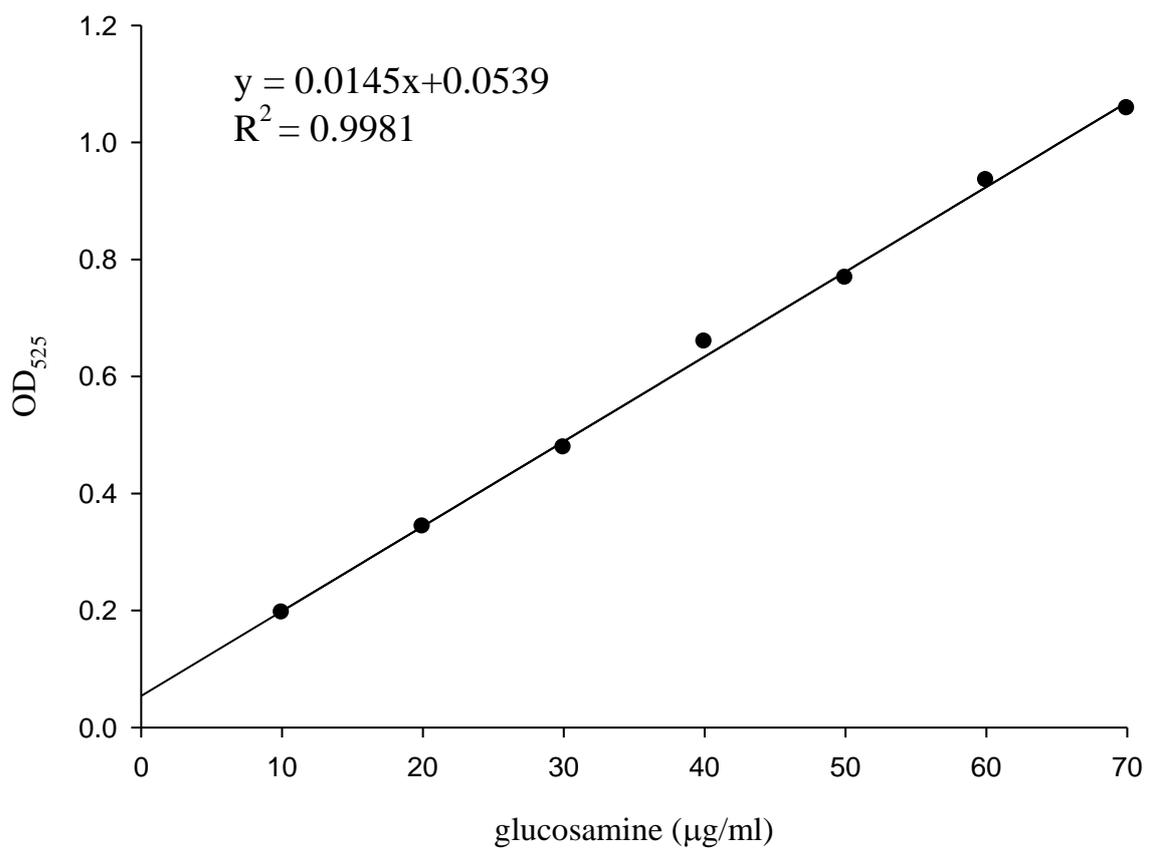
Song, K.S., S. M. Cho, J. H. Lee. 1995. B- lymphocyte- stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 43(12) : 2105.

Song, Y. S., S. H. Kim, J. H. Sa, C. Jin, C. J. Lim and E. H. Park. 2003. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. J. Ethnopharmacol. 88(1): 113-116.

- Sugama, S., N. Okazaki. 1979. Growth estimation of *Aspergillus oryzae* cultured on solid media. J. Ferm Technol. 57 : 480-12.
- Svagej, M., M. Berovic, B. Boh, A. Menard, S. Simcic and B. Wraber. 2008. Solid-state cultivation of *Grifola frondosa* (Dicks: Fr) S.F. Gray biomass and immunostimulatory effects of fungal intra- and extracellular beta-polysaccharides. New Biotechnology. 25:150-156.
- Viniegra-Gonzalez, G. Solid state fermentation: Definition, characteristics limitation and monitoring. Edited by Roussos, S., B. K. Lonsane, M. Raimbault, G. Viniegra-Gonzalez. 1997. Advances in Solid state Fermentation. London : Kluwer Academic Publishers. 5-22.
- Viniegra-Gonzalez, G., E. Favela-Torres, C. N. Aguilar, S. J. Romero-Gomez, G. Diaz-Godinez and C. Augur. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. Biochemical Engineering . 13 : 157-167.
- Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology. 10: 13-32.
- Wasser, S. P. and A. L. Weis. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushroom: current perspective. International Journal of Medicinal Mushrooms. 1: 31-51.
- Wei, C.J., R.D. Tanner and J. Woodward. 1981. Elucidating the transition between submerged culture and solid-state baker's yeast fermentations. Biotechnol Bioeng Symp. 11 : 541-553.

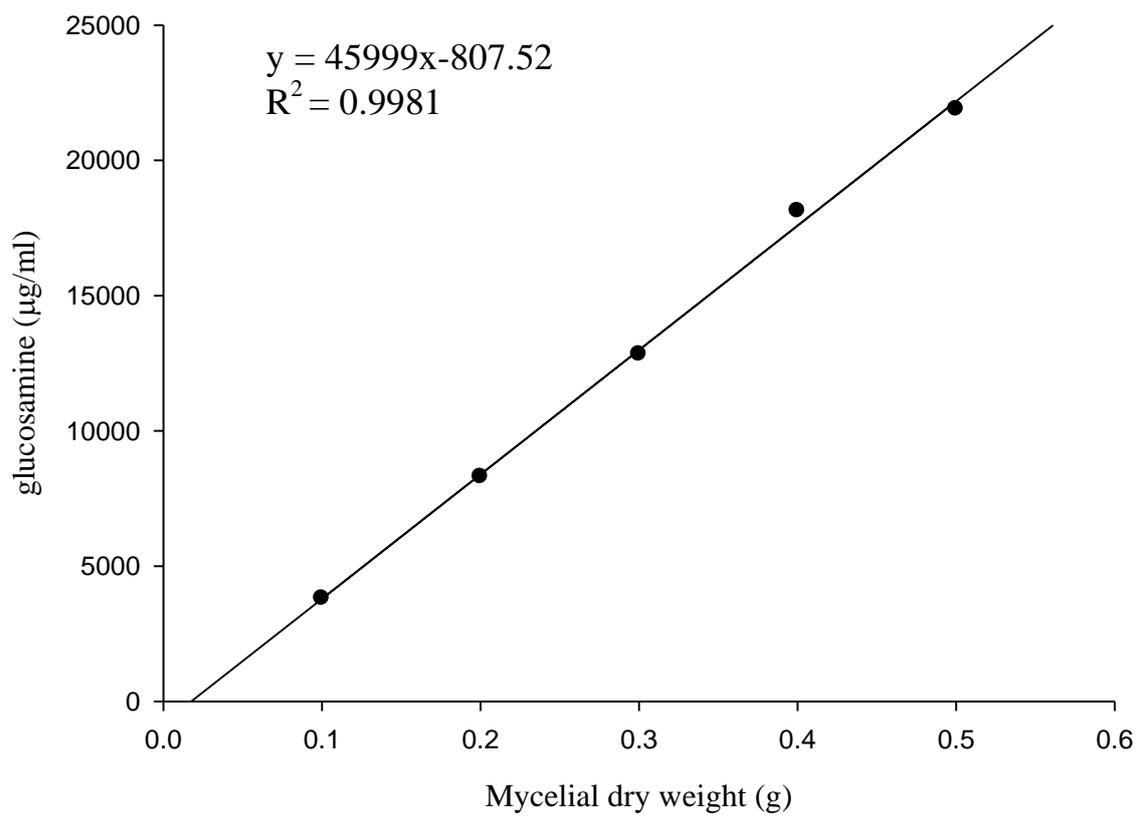
- Wood, D. A. 1979. A method for estimating biomass of *Agaricus bisporus* in a solid substrate, composted wheat straw. *Biotechnol. Lett.* 1: 255-260.
- Yan, J., V. Vetvicka, Y. Xia, A. Coxon, M. Carroll, T. Mayadas and G. Ross .1999. β -glucan, a "specific" biologic response modifier that uses antibodies to target tumors for cytotoxic recognition by leukocyte complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J. Immunol.* 163(6) : 3045-52.
- Zaidman, B. Z., M. Yassin, J. Mahajna and S. P. Wasser. 2005. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2: 1-24.
- Zhang , M., S.W. Cui, P. C. K. Cheung, Q. Wang.2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology .* 18: 4-19.

柒、附錄



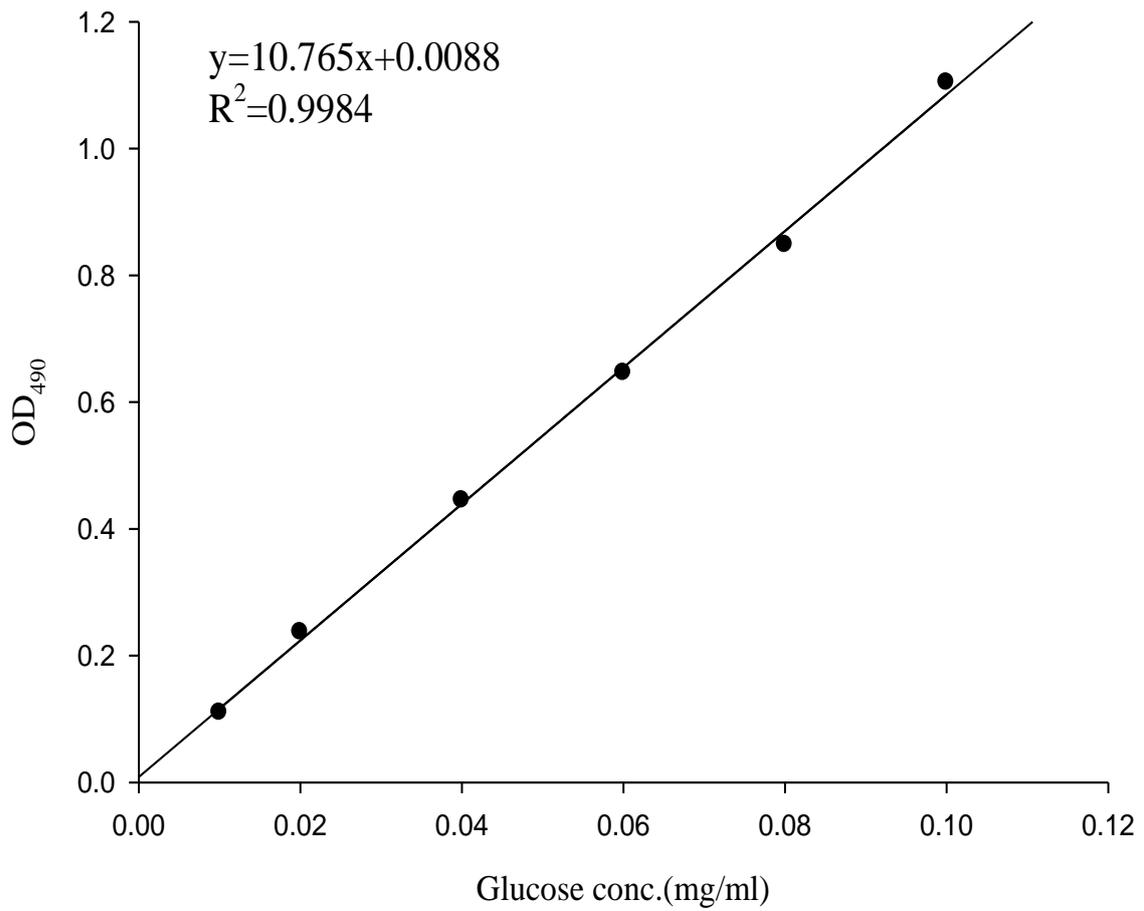
附圖一 Elson-Morgan 法之葡萄糖胺標準曲線。

Appendix Fig.1 Glucosamine standard curve of Elson-Morgan method.



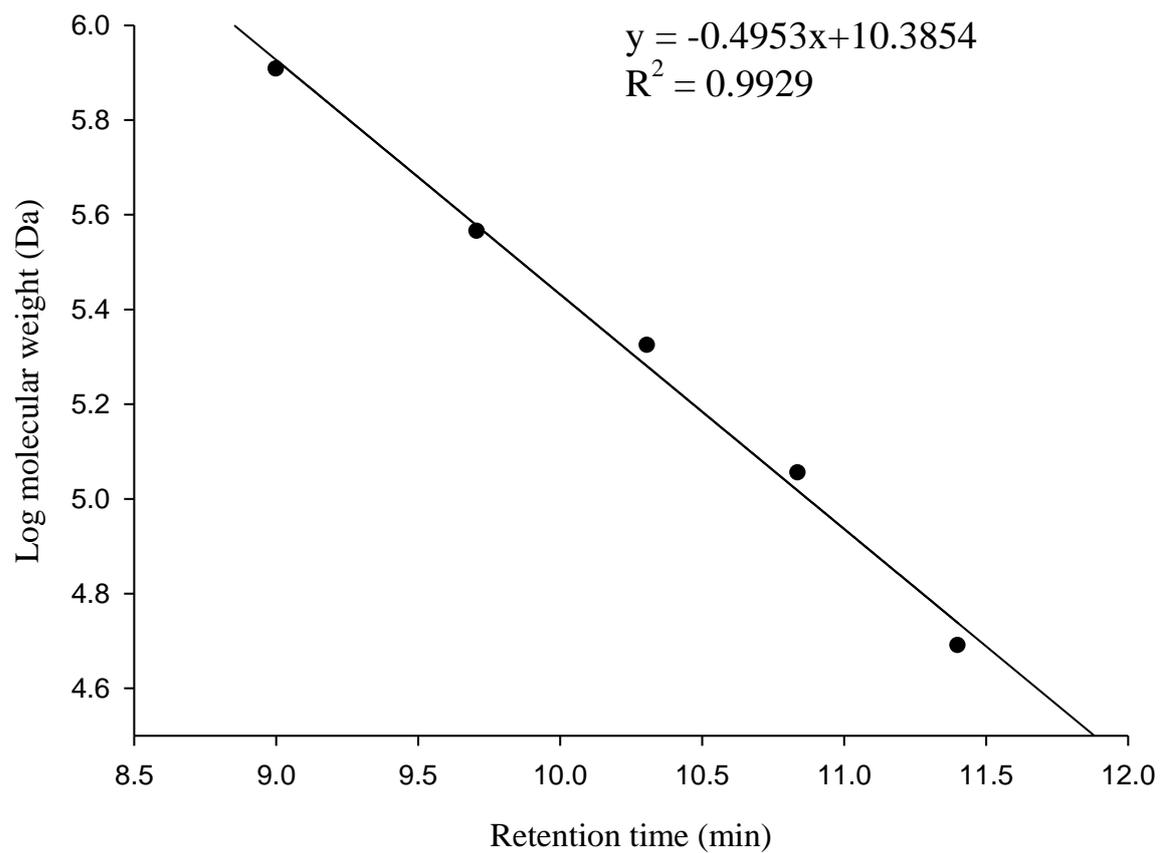
附圖二 菌絲體乾重對應葡萄糖胺含量之標準曲線。

Appendix Fig.2 Standard curve of mycelial dry weight corresponding to glucosamine content.



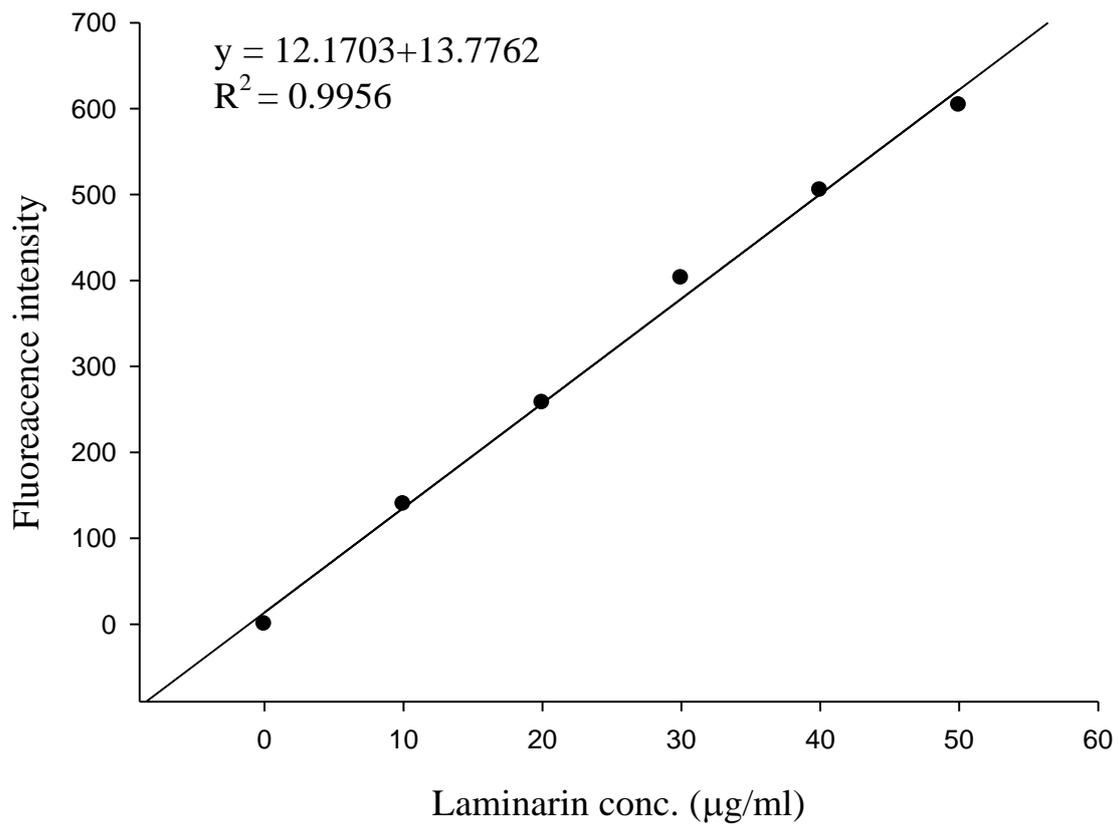
附圖三 酚硫酸法之葡萄糖標準曲線。

Appendix Fig.3 Glucose standard curve by phenol-sulfuric acid method.



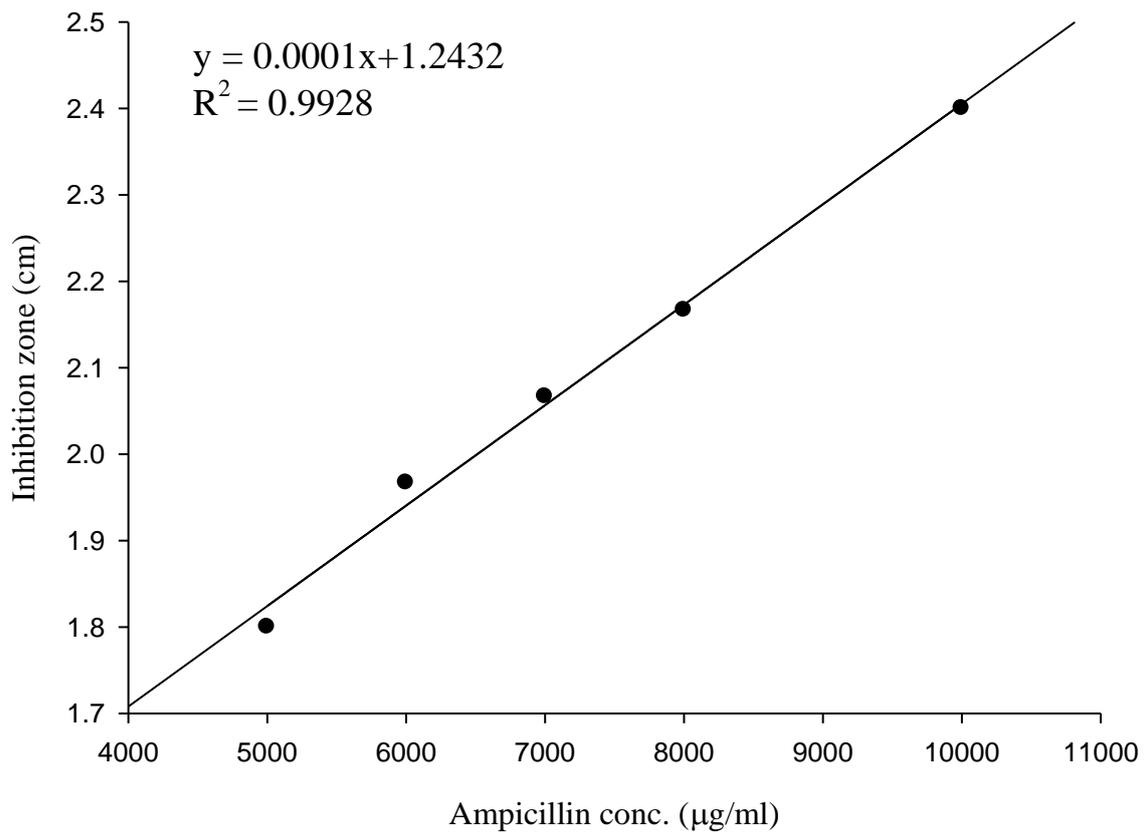
附圖四 多醣分子量之標準曲線。

Appendix Fig. 4 Molecular weight standard curve of polysaccharide.

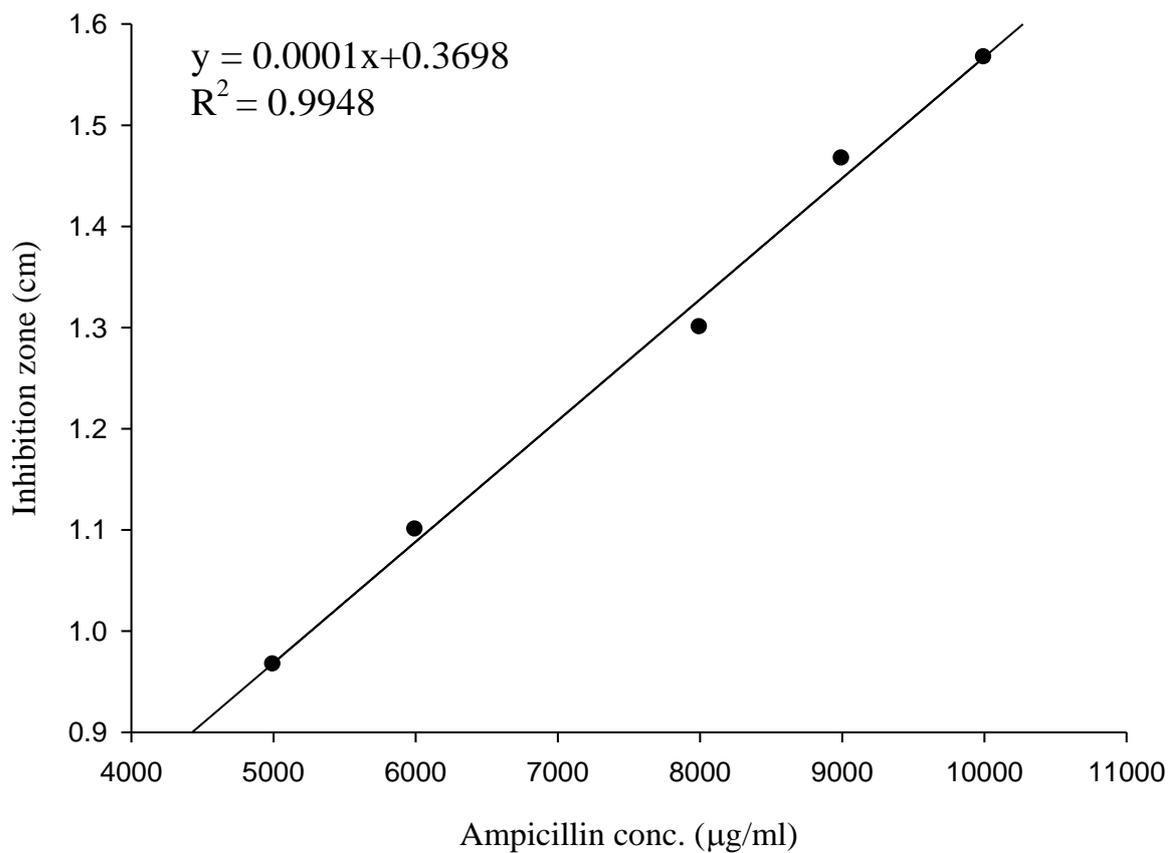


附圖五 測定 β -(1→3)-D-glucan 相對含量之 laminarin 標準曲線。

Appendix Fig. 5 Standard curve of laminarin to estimate relative content of β -(1→3)-D-glucan.

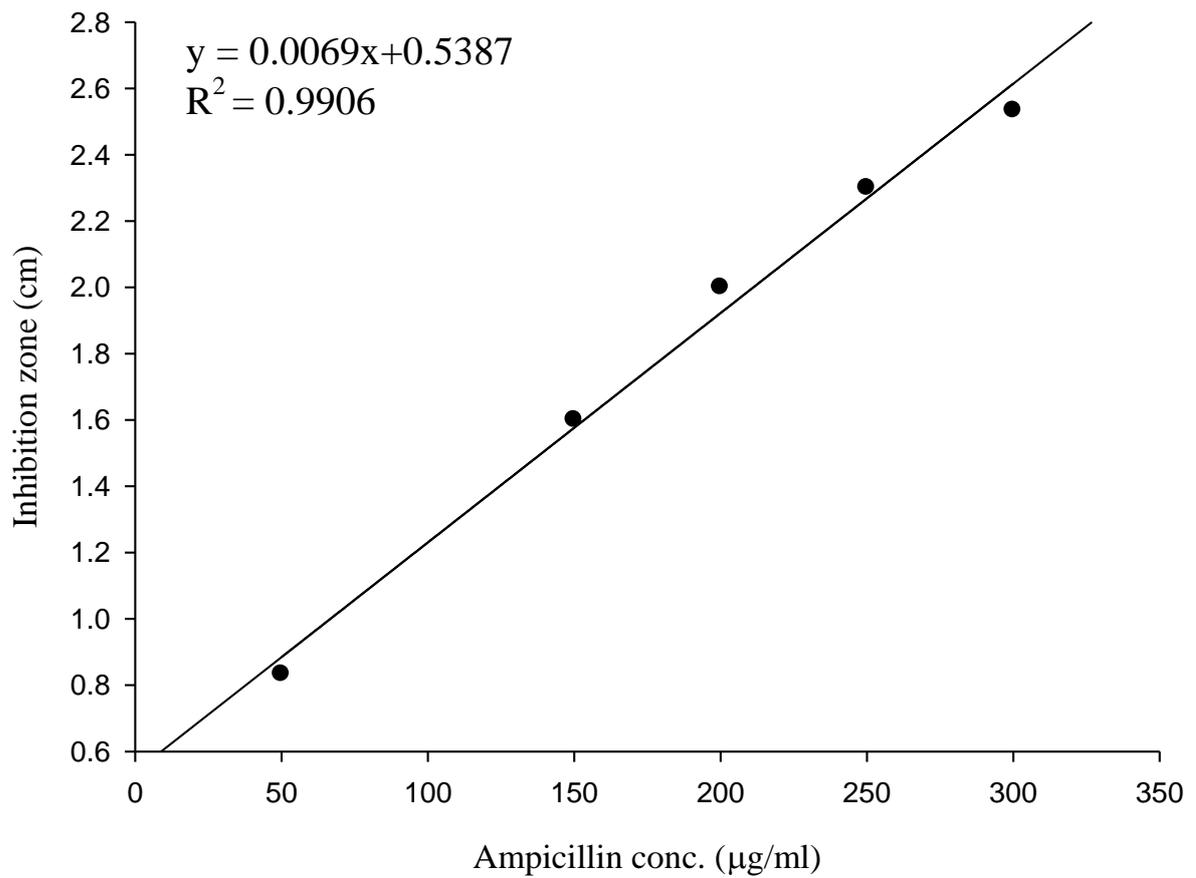


附圖六 Ampicillin 對病原菌 *Bacillus cereus* (BCRC 10250) 抑菌
 環之標準曲線。
 Appendix Fig. 6 Standard curve of inhibition zone of *Bacillus cereus* by
 ampicillin.



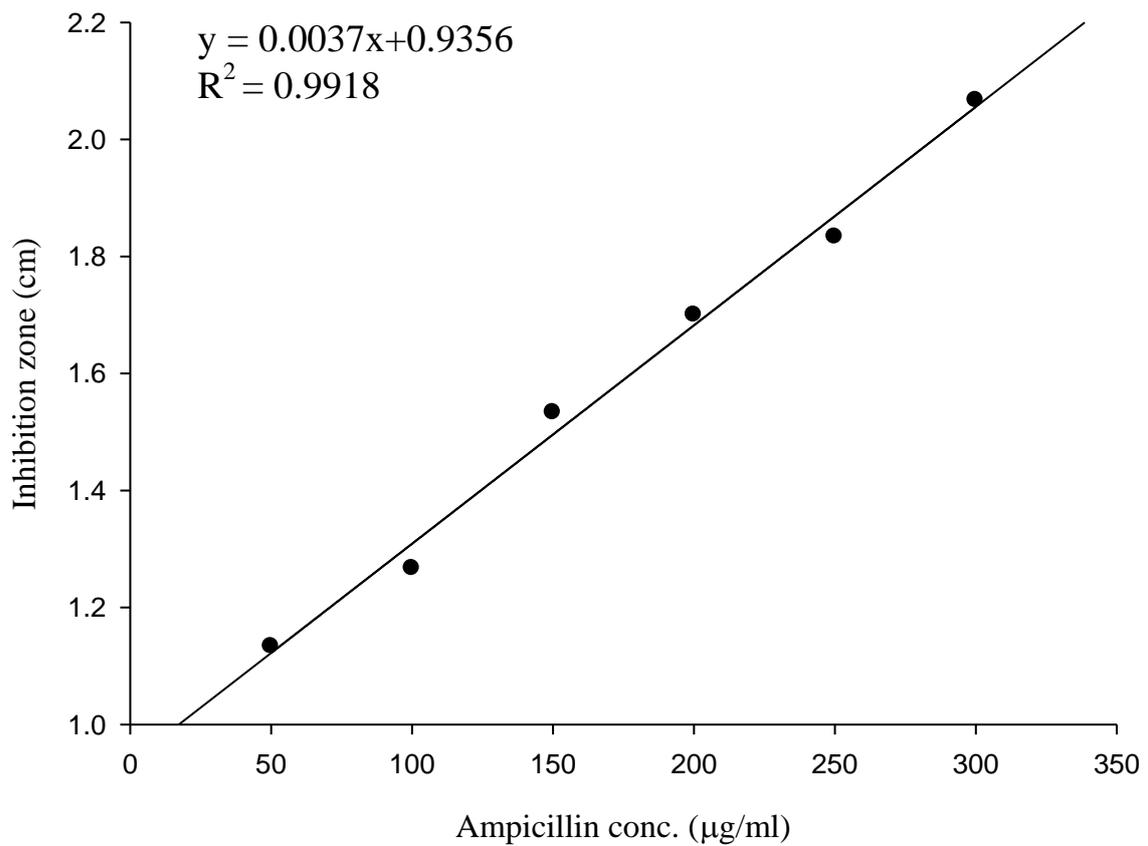
附圖七 Ampicillin 對病原菌 *Pseudomonas aeruginosa* (BCRC 10261) 抑菌環之標準曲線。

Appendix Fig. 7 Standard curve of inhibition zone of *Pseudomonas aeruginosa* by ampicillin.



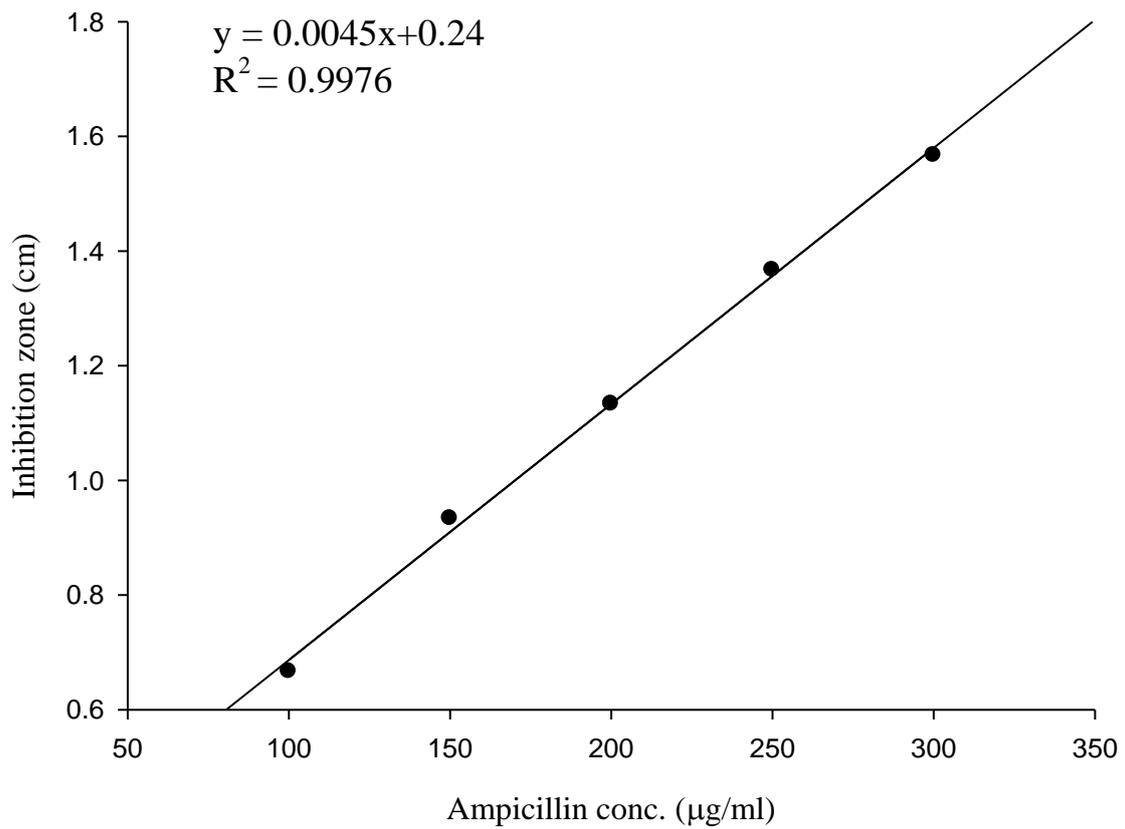
附圖九 Ampicillin 對病原菌 *Salmonella typhimurium*(BCRC 10241) 抑菌環之標準曲線。

Appendix Fig. 9 Standard curve of inhibition zone of *Salmonella typhimurium* by ampicillin.



附圖十 Ampicillin 對病原菌 *Staphylococcus aureus* (BCRC 10451) 抑菌環之標準曲線。

Appendix Fig. 10 Standard curve of inhibition zone of *Staphylococcus aureus* by ampicillin.

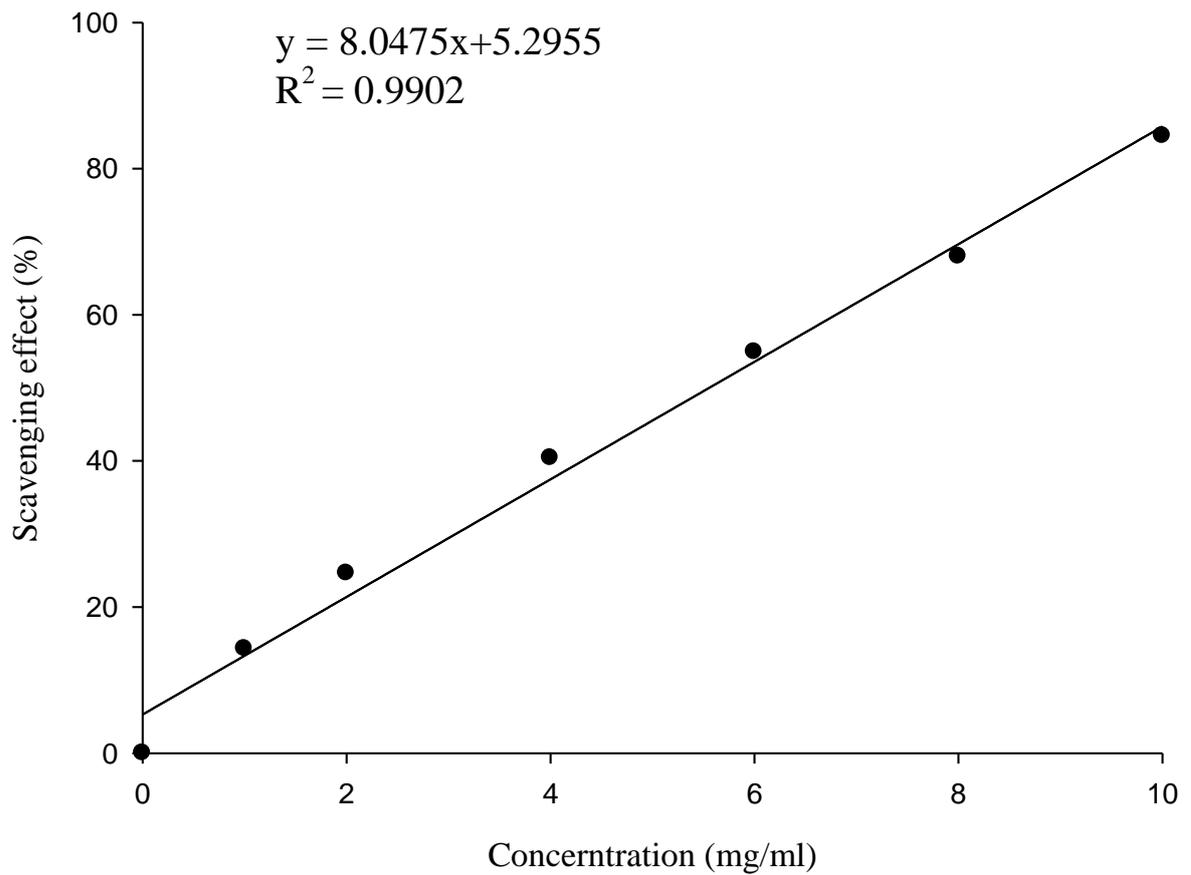


附圖十一

Ampicillin 對病原菌 *Listeria monocytogenes*(BCRC 14854)
抑菌環之標準曲線。

Appendix Fig. 11

Standard curve of inhibition zone of *Listeria monocytogenes*
by ampicillin.

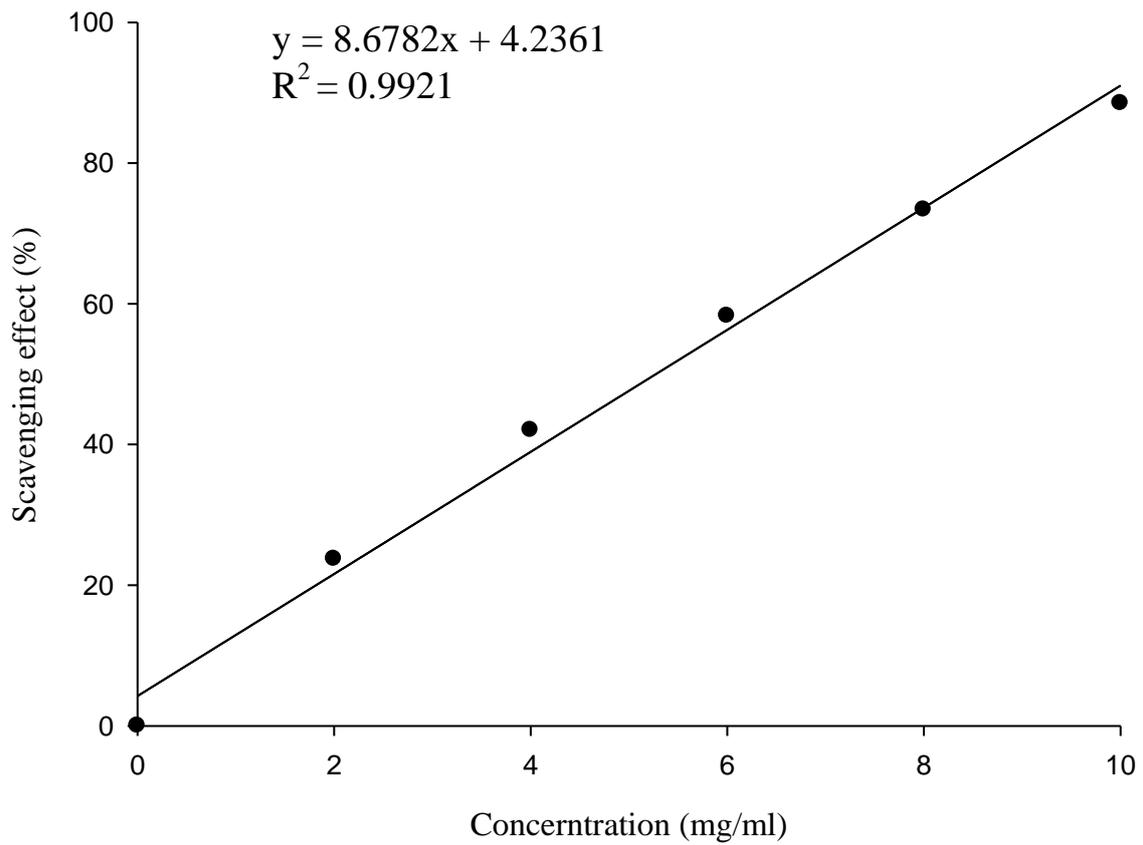


附圖十二

燕麥基質熱水萃取物之 DPPH 自由基清除力標準曲線。

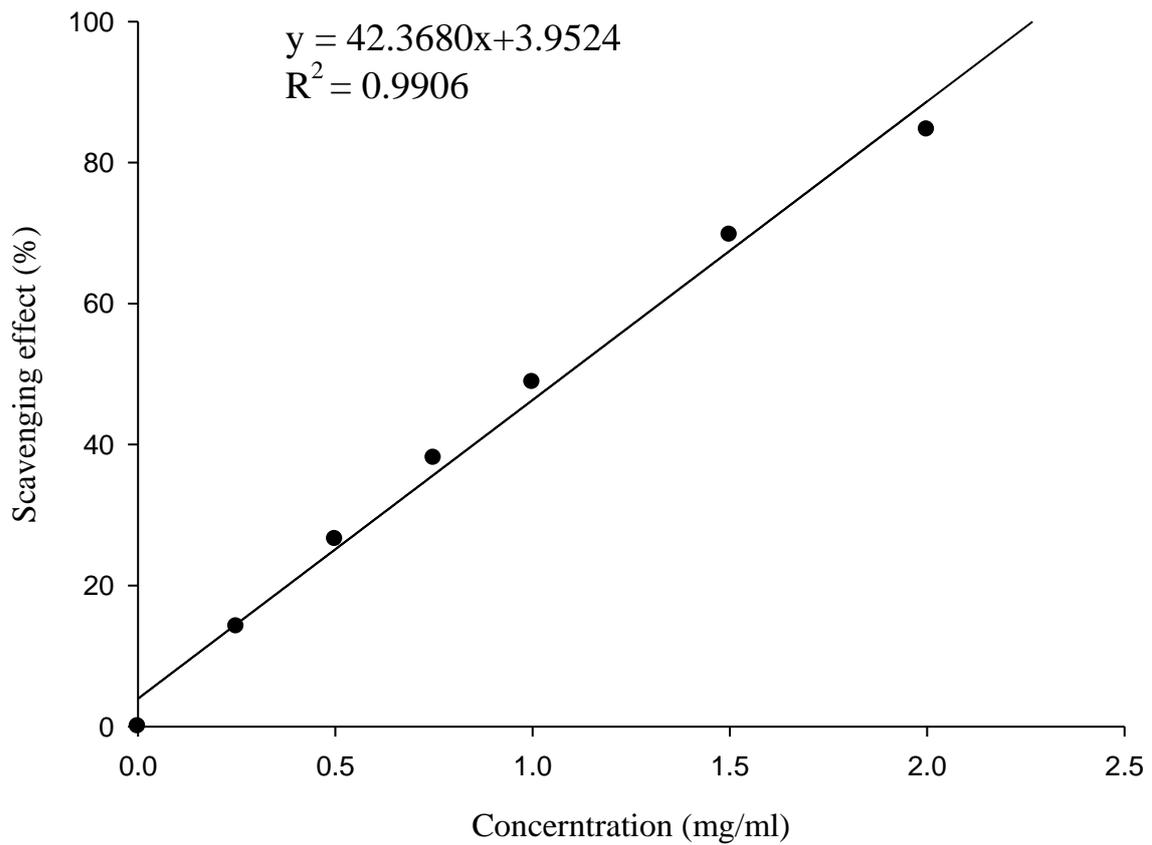
Appendix Fig. 12

Standard curve of DPPH · scavenging effect by hot-water extracts from oat substrate.



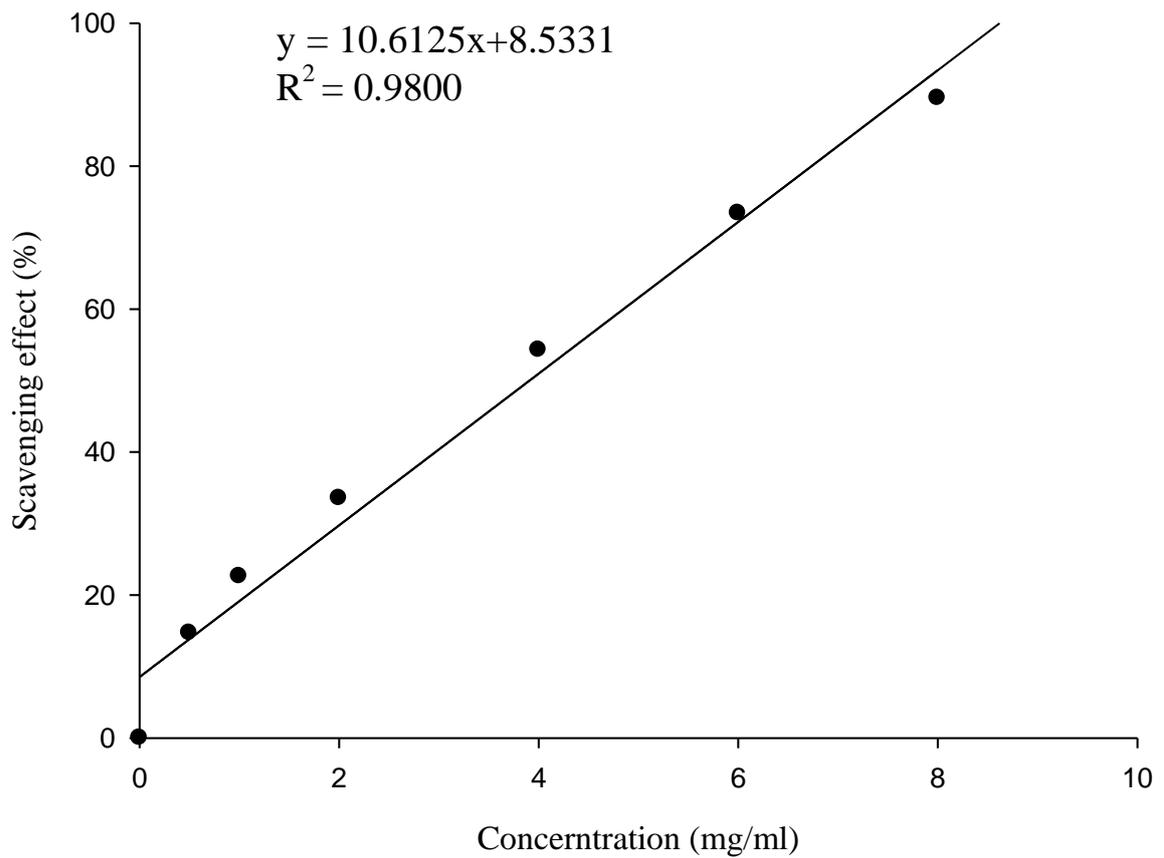
附圖十三 燕麥基質乙醇萃取物之 DPPH 自由基清除力標準曲線。

Appendix Fig. 13 Standard curve of DPPH · scavenging effect by ethanolic extracts from oat substrate.



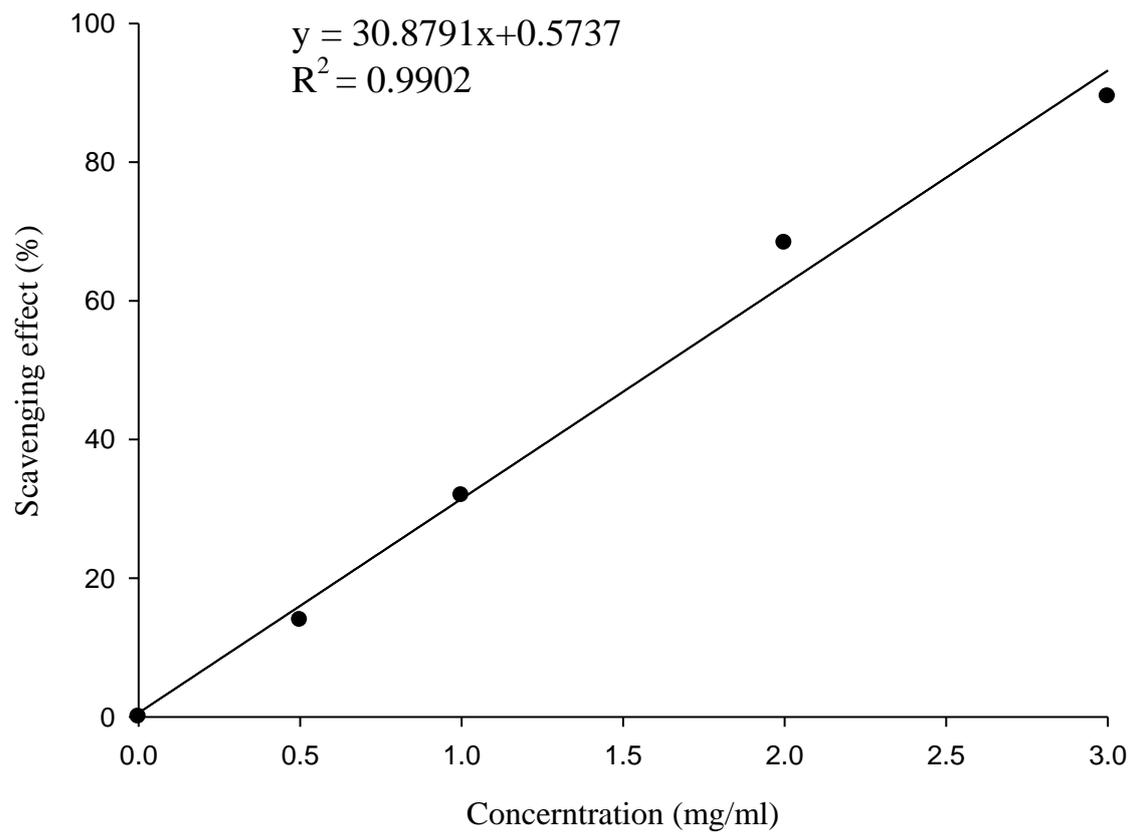
附圖十四 桑黃燕麥熱水萃取物之 DPPH 自由基清除力標準曲線。

Appendix Fig. 14 Standard curve of DPPH · scavenging effect by hot-water extracts from *Phellinus*-fermented oat.



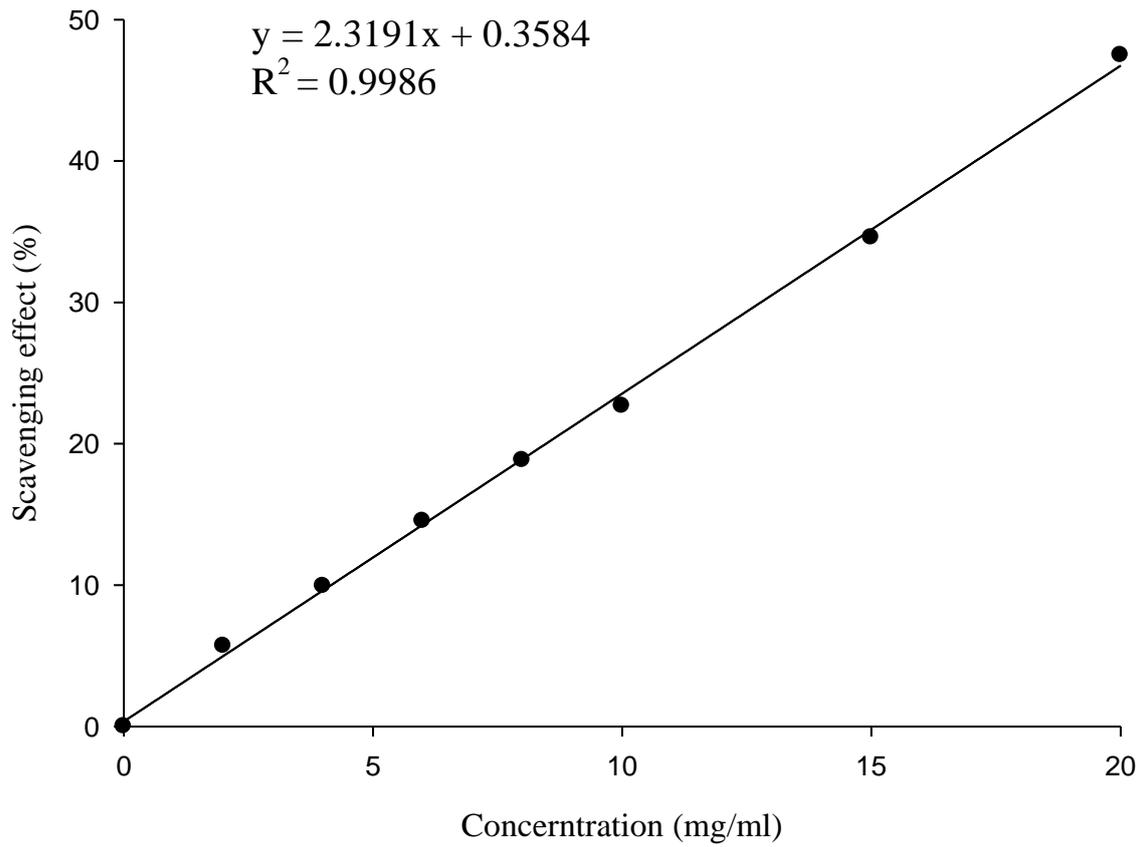
附圖十五 桑黃燕麥乙醇萃取物之 DPPH 自由基清除力標準曲線。

Appendix Fig. 15 Standard curve of DPPH · scavenging effect by ethanolic extracts from *Phellinus*-fermented oat.



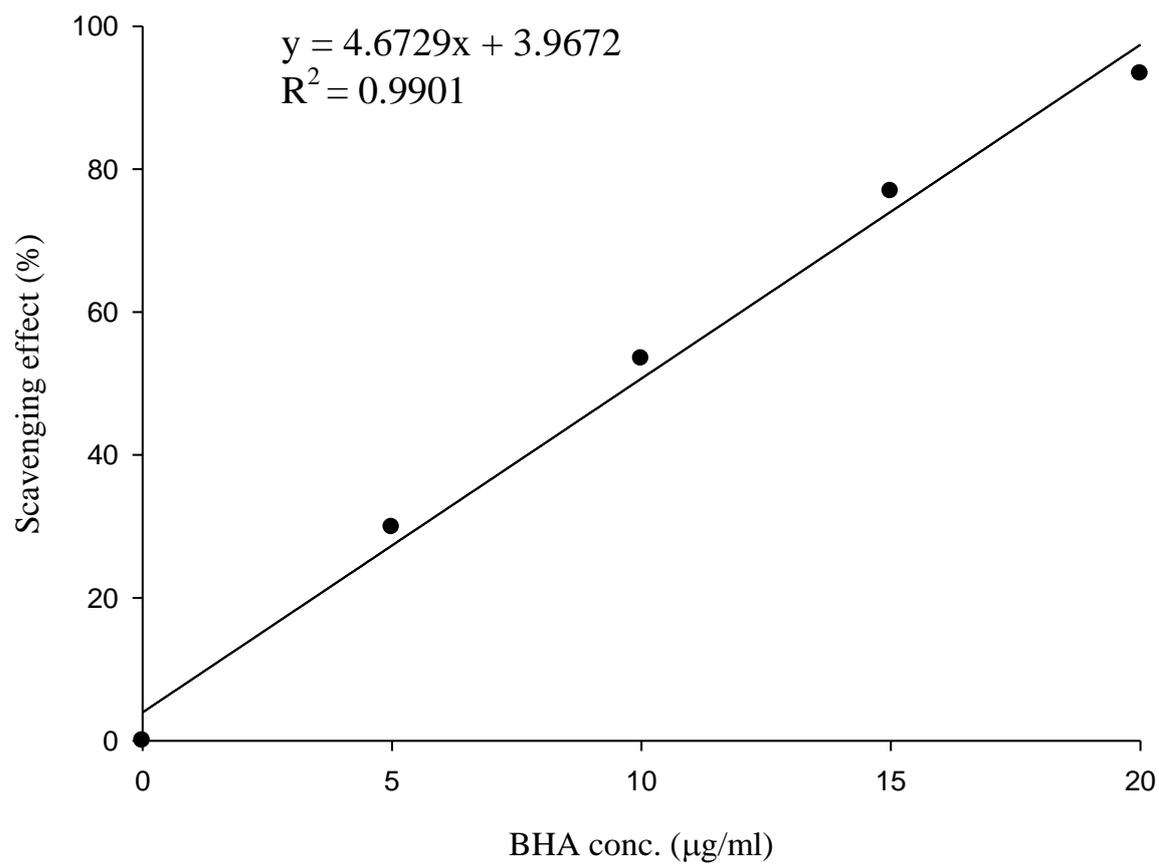
附圖十六 發酵液粉末熱水萃取物之 DPPH 自由基清除力標準曲線。

Appendix Fig. 16 Standard curve of DPPH · scavenging effect by hot-water extracts from submerged culture powder.



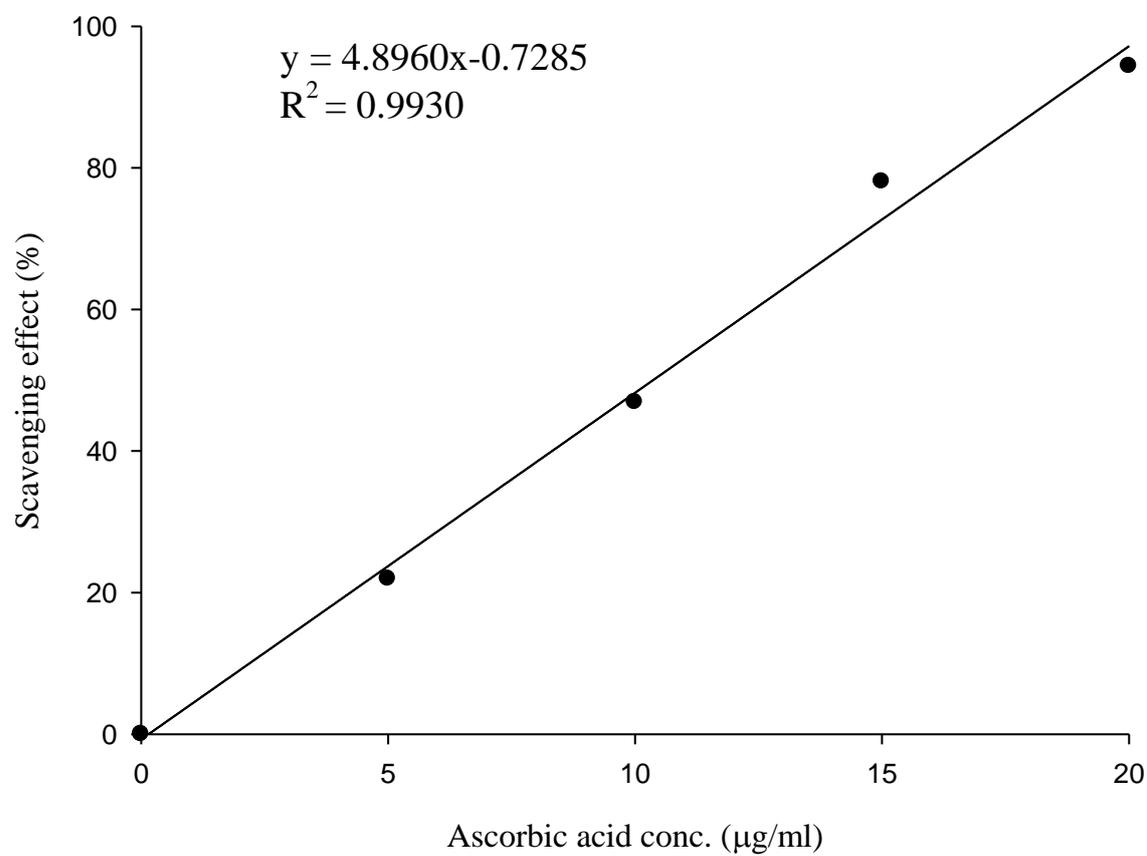
附圖十七 發酵液粉末乙醇萃取物之 DPPH 自由基清除力標準曲線。

Appendix Fig. 17 Standard curve of DPPH · scavenging effect by ethanolic extracts from submerged culture powder.



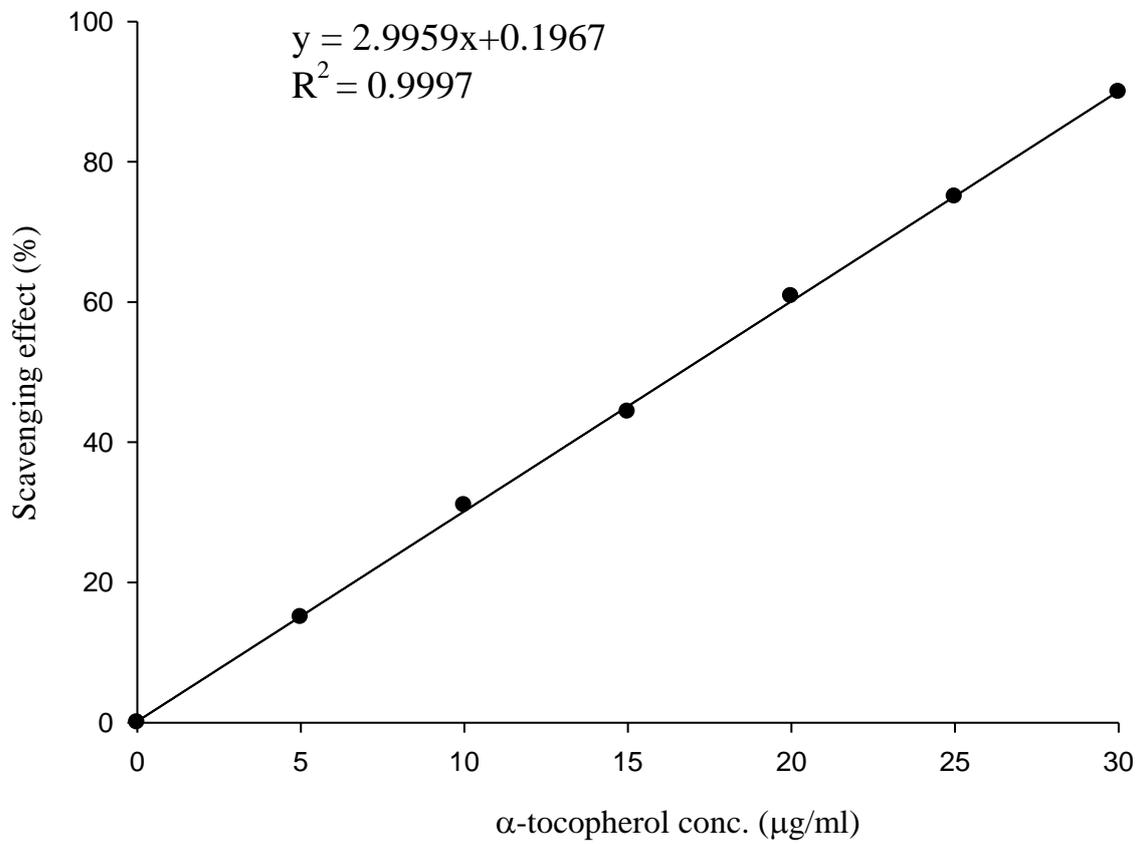
附圖十八 BHA 之 DPPH 自由基清除力標準曲線。

Appendix Fig. 18 Standard curve of DPPH · scavenging effect by BHA.



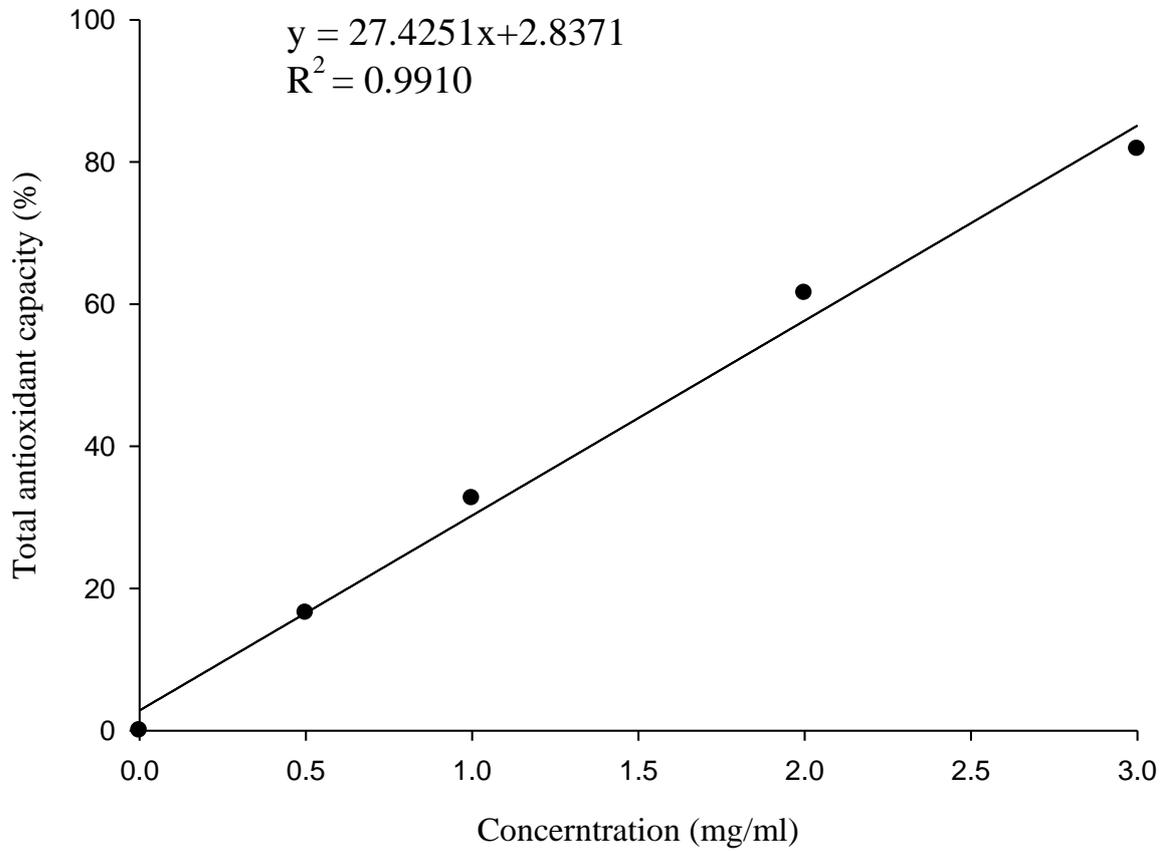
附圖十九 Ascorbic acid 之 DPPH 自由基清除力標準曲線。

Appendix Fig. 19 Standard curve of DPPH · scavenging effect by ascorbic acid.



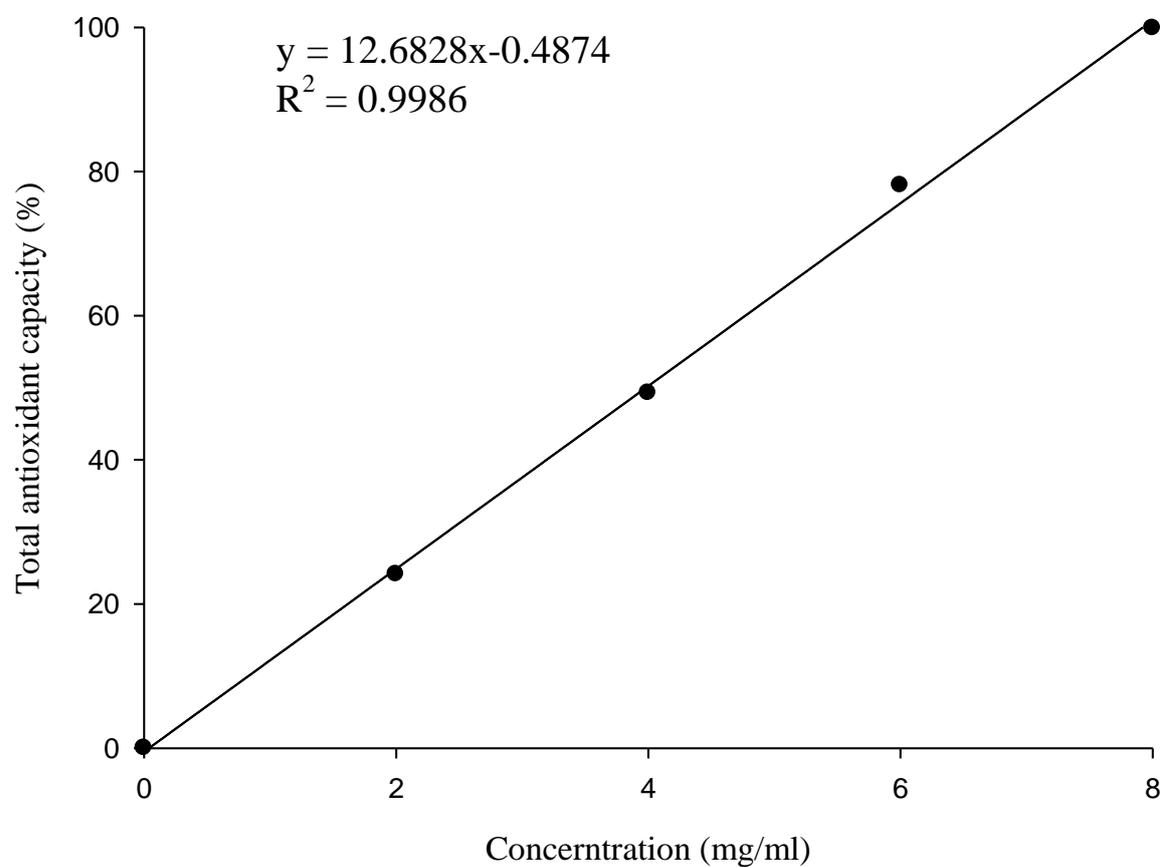
附圖二十 α-tocopherol 之 DPPH 自由基清除力標準曲線。

Appendix Fig. 20 Standard curve of DPPH · scavenging effect by α-tocopherol.



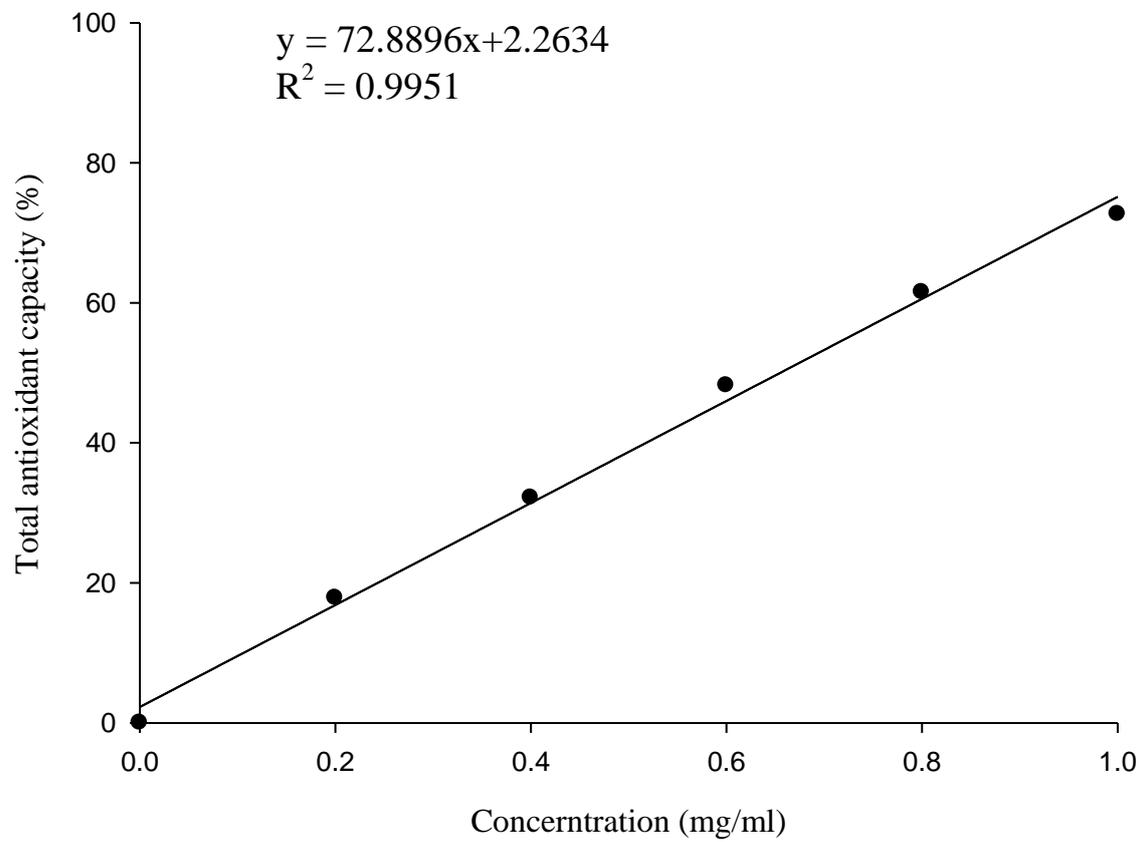
附圖二十一 燕麥基質熱水萃取物之總抗氧化能力標準曲線。

Appendix Fig. 21 Standard curve of total antioxidant capacity by hot-water extracts from oat substrate.



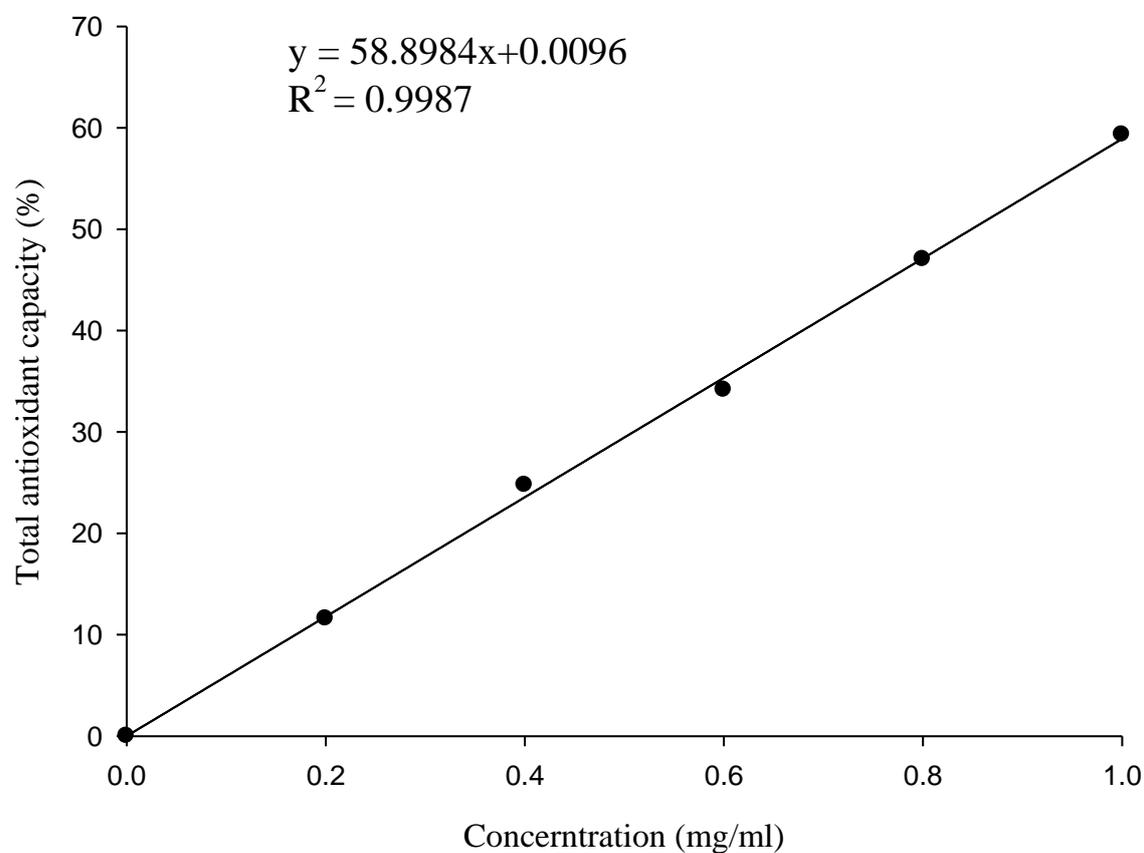
附圖二十二 燕麥基質乙醇萃取物之總抗氧化能力標準曲線。

Appendix Fig. 22 Standard curve of total antioxidant capacity by ethanolic extracts from oat substrate.



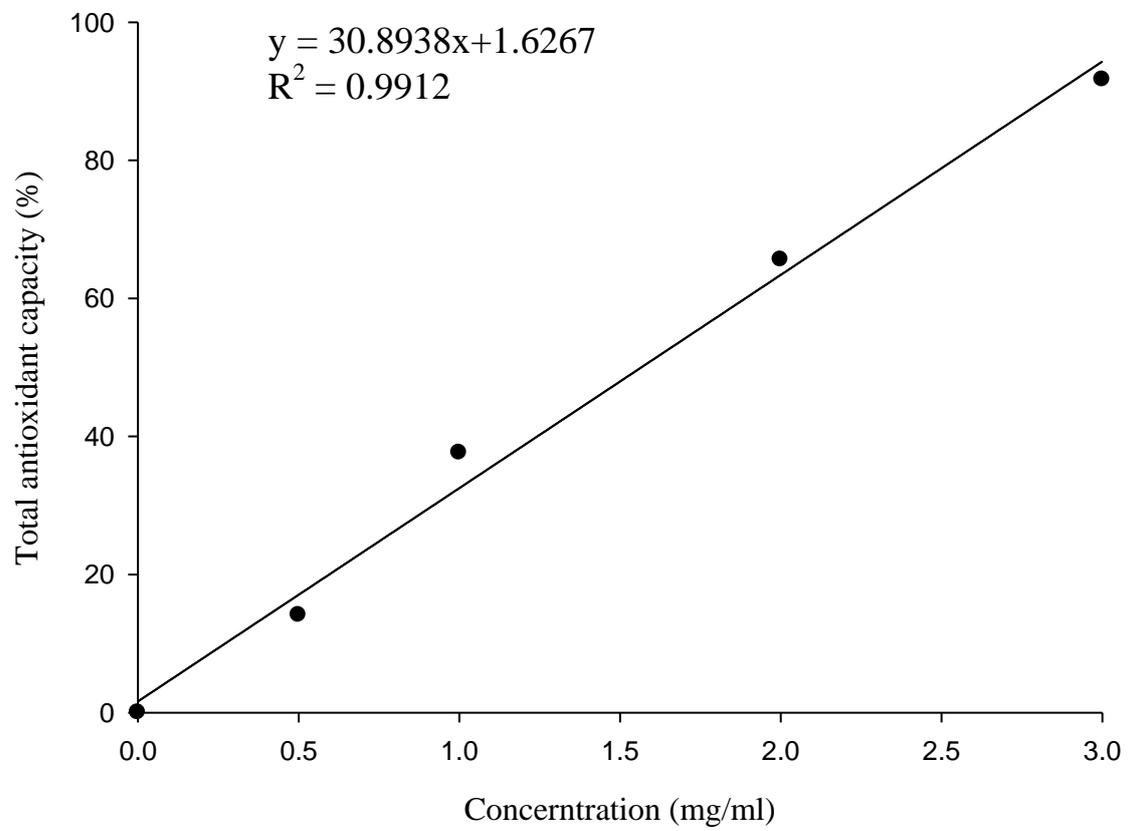
附圖二十三 桑黃燕麥熱水萃提取物之總抗氧化能力標準曲線。

Appendix Fig. 23 Standard curve of total antioxidant capacity by hot-water extracts from *Phellinus*-fermented oat.



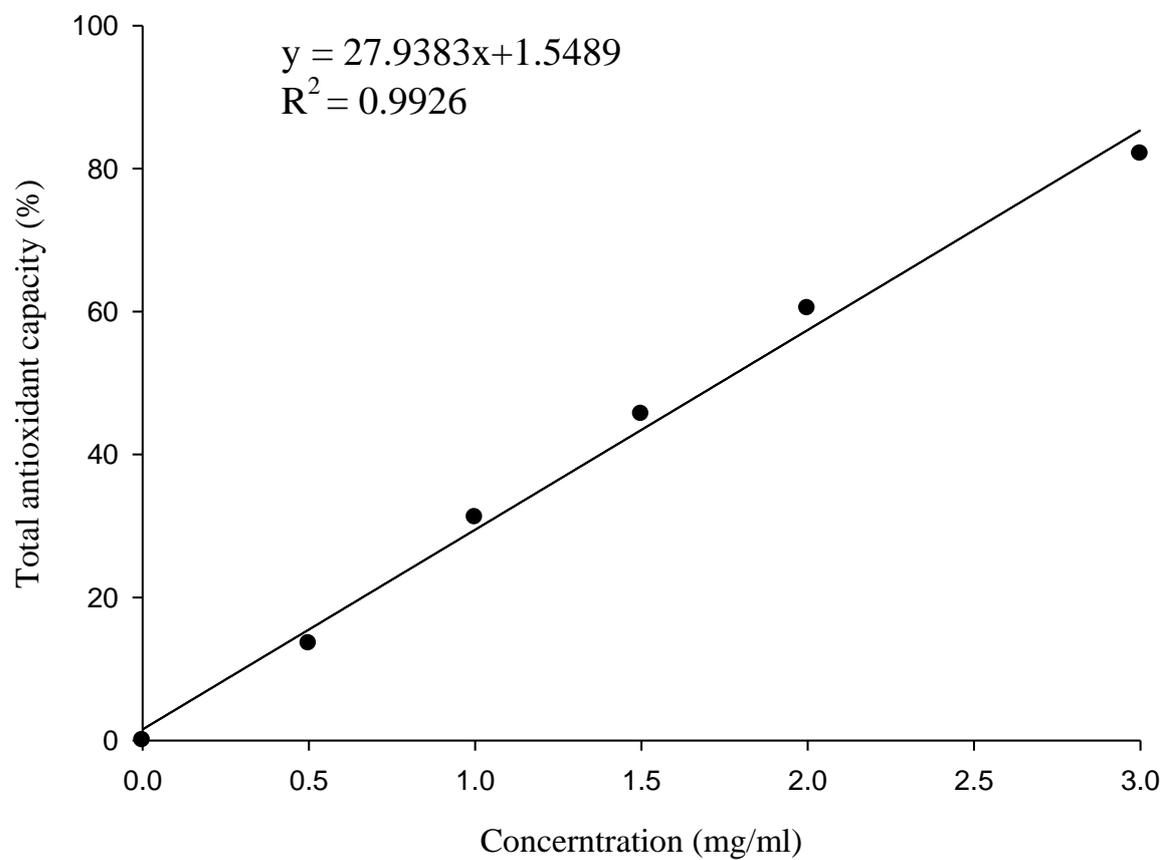
附圖二十四 桑黃燕麥乙醇萃取物之總抗氧化能力標準曲線。

Appendix Fig. 24 Standard curve of total antioxidant capacity by ethanolic extracts from *Phellinus*-fermented oat.



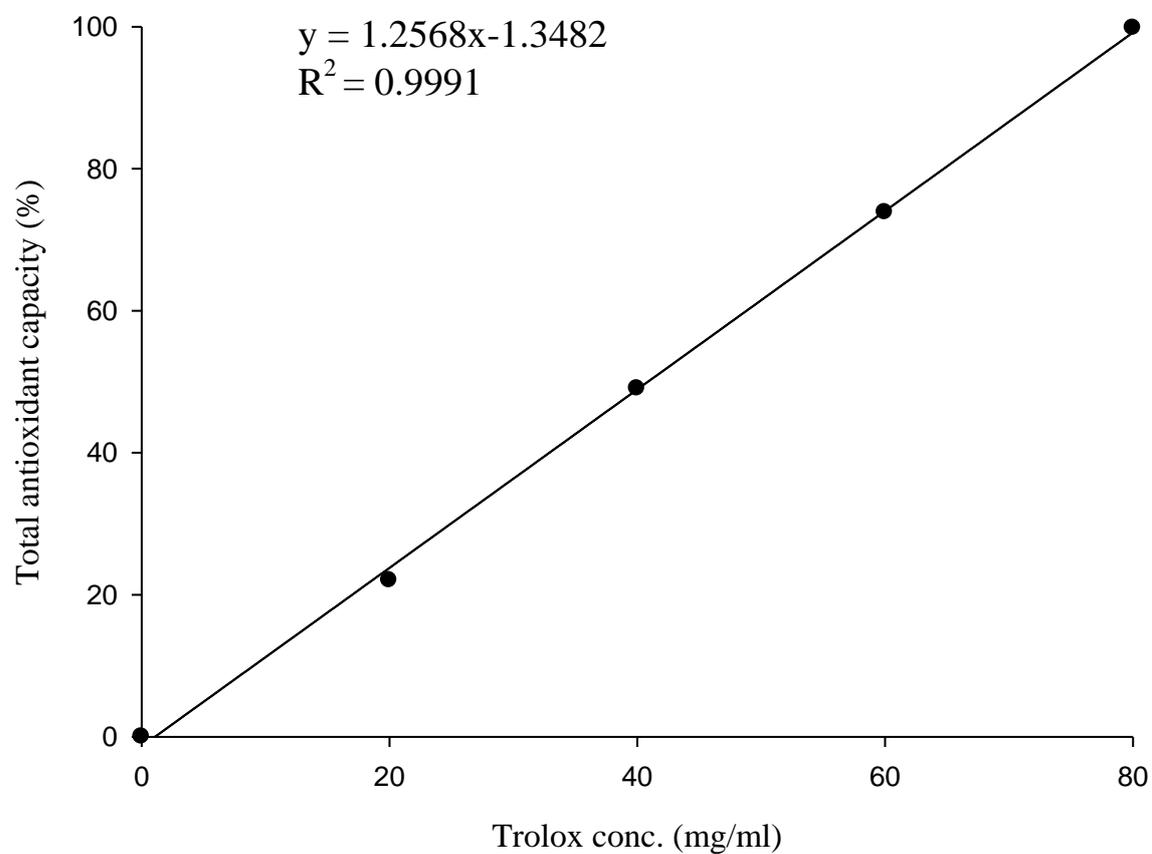
附圖二十五 發酵液粉末熱水萃取物之總抗氧化能力標準曲線。

Appendix Fig. 25 Standard curve of total antioxidant capacity by hot-water extracts from submerged culture powder.



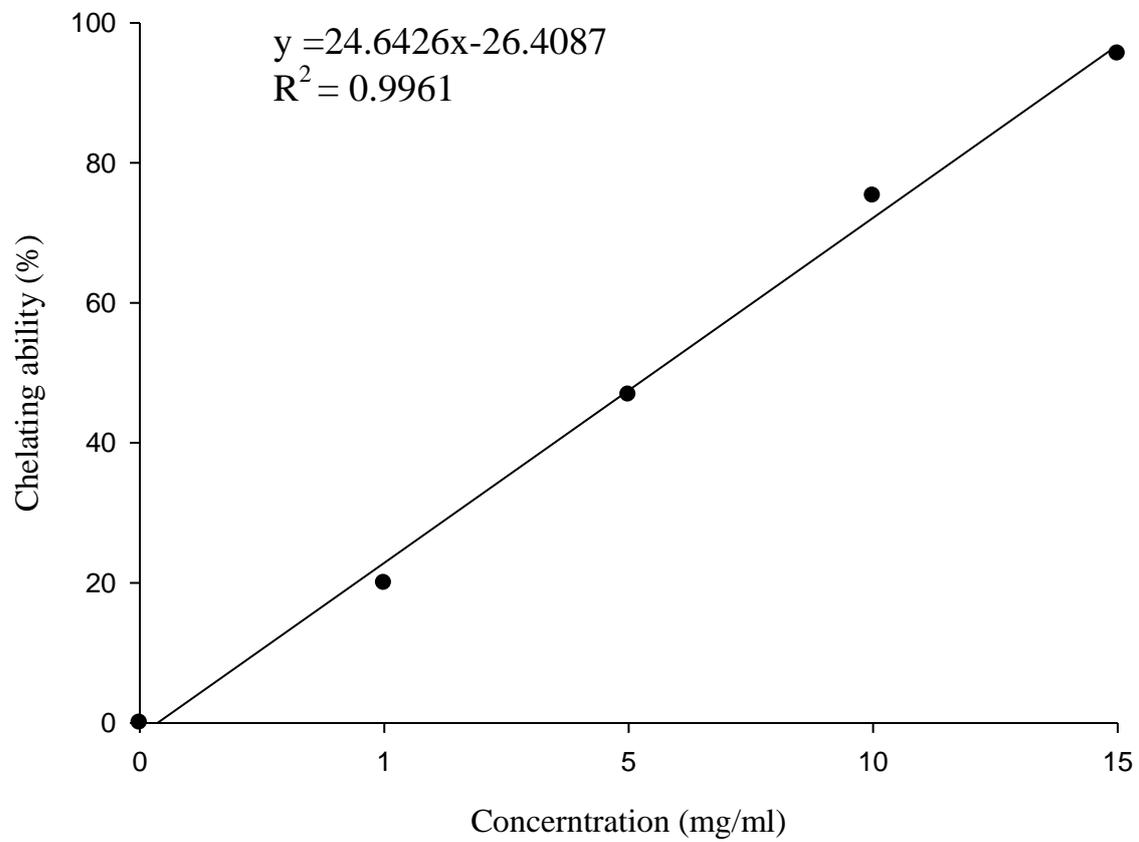
附圖二十六 發酵液粉末乙醇萃取物之總抗氧化能力標準曲線。

Appendix Fig. 26 Standard curve of total antioxidant capacity by ethanolic extracts from submerged culture powder.



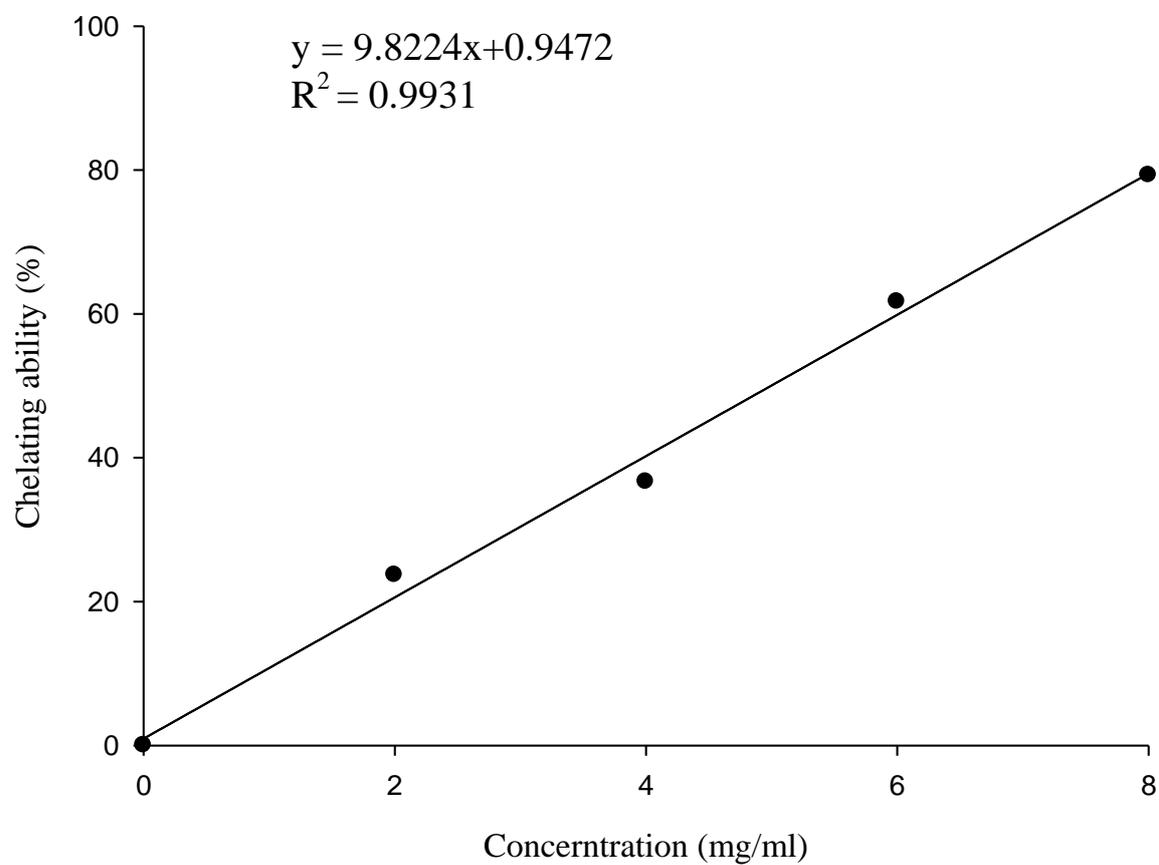
附圖二十七 Trolox 之總抗氧化力標準曲線。

Appendix Fig. 27 Standard curve of total antioxidant capacity by Trolox.



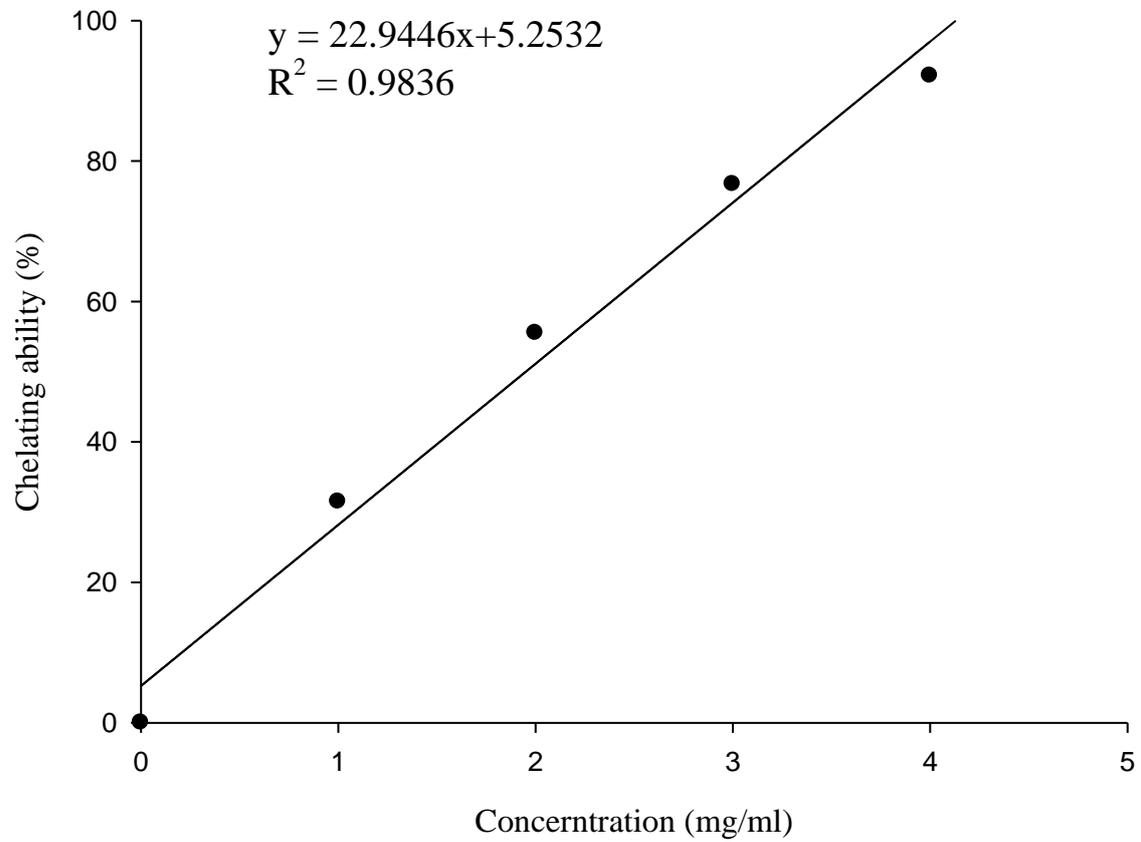
附圖二十八 燕麥基質熱水萃取物之螯合亞鐵離子能力標準曲線。

Appendix Fig. 28 Standard curve of chelating ability on ferrous ion by hot-water extracts from oat substrate.



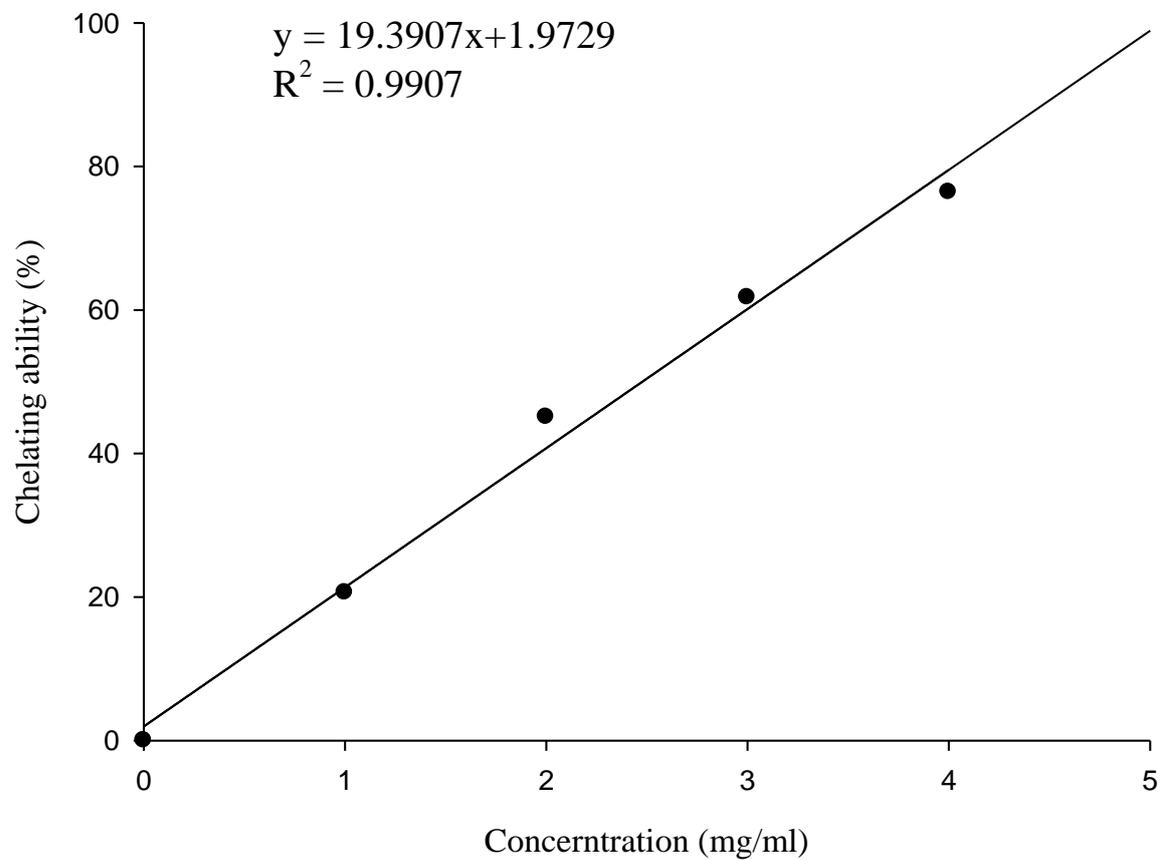
附圖二十九 燕麥基質乙醇萃取物之螯合亞鐵離子能力標準曲線。

Appendix Fig. 29 Standard curve of chelating ability on ferrous ion by ethanolic extracts from oat substrate.



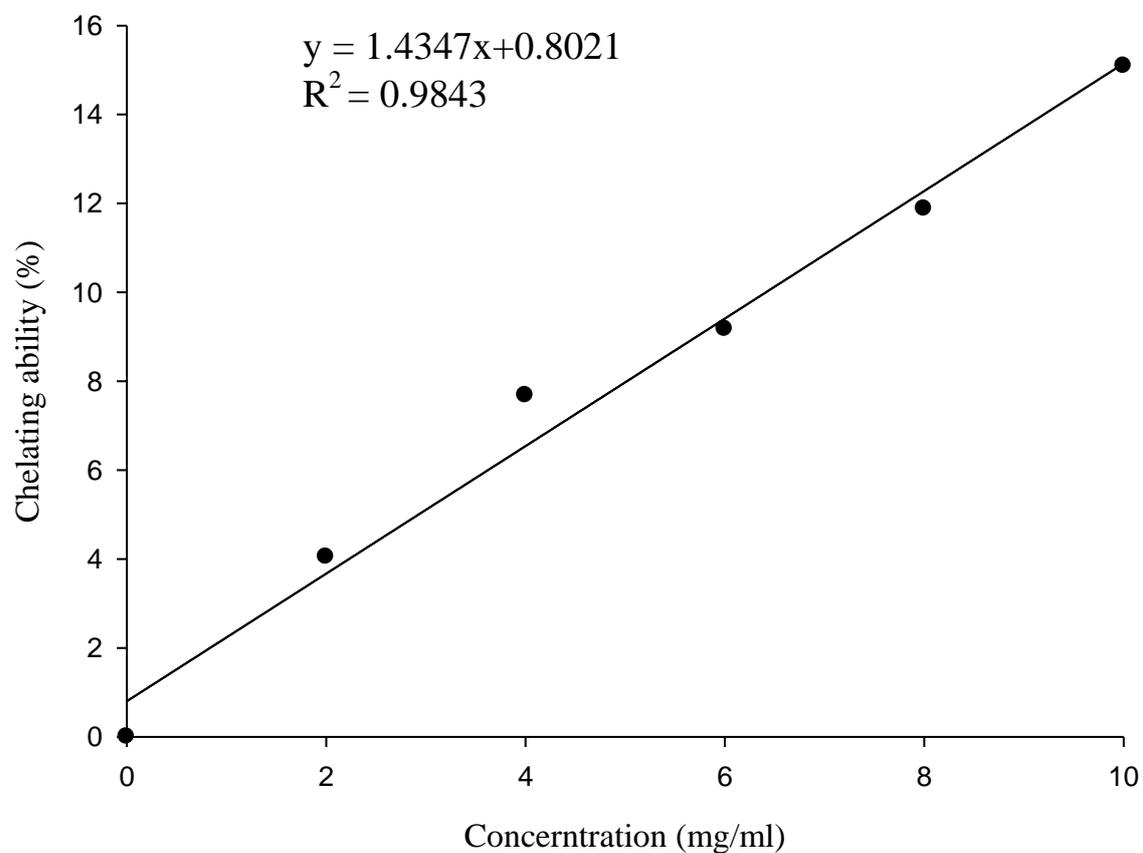
附圖三十 桑黃燕麥熱水萃取物之螯合亞鐵離子能力標準曲線。

Appendix Fig. 30 Standard curve of chelating ability on ferrous ion by hot-water extracts from *Phellinus*-fermented oat.



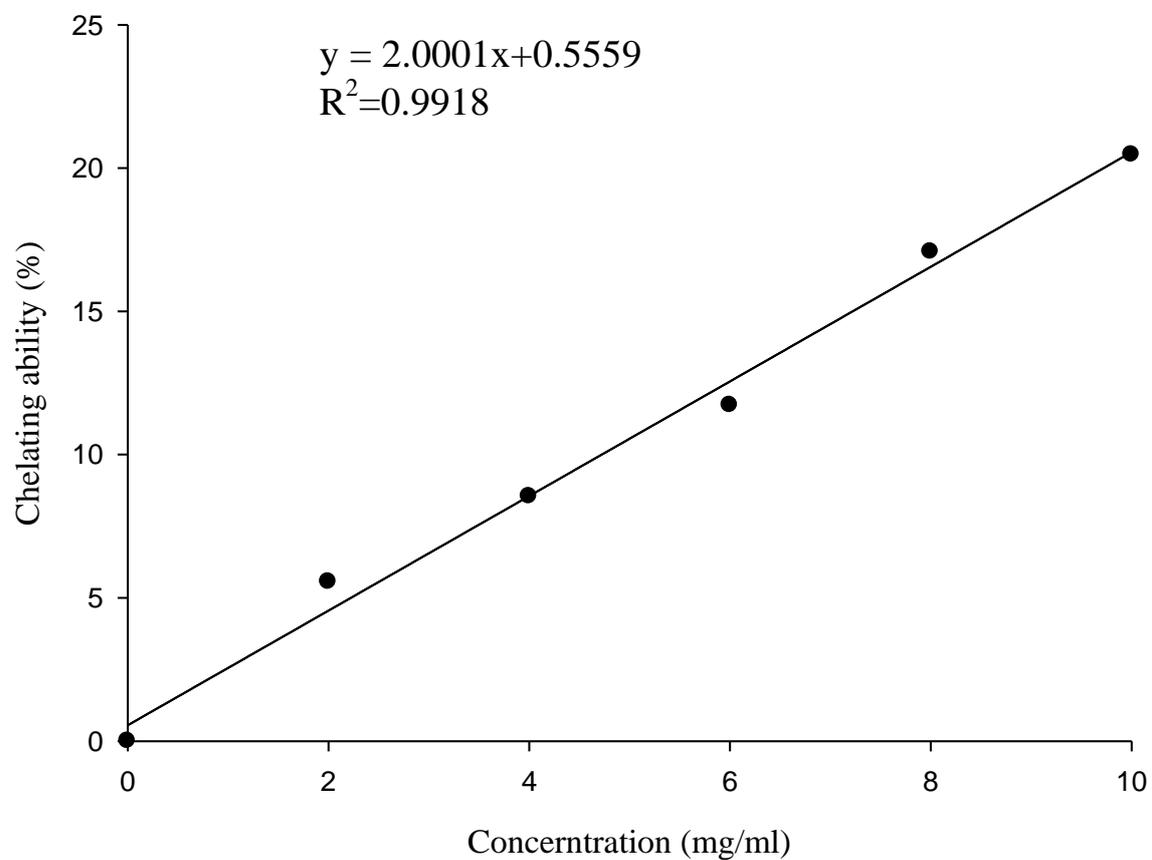
附圖三十一 桑黃燕麥乙醇萃取物之螯合亞鐵離子能力標準曲線。

Appendix Fig. 31 Standard curve of chelating ability on ferrous ion by ethanolic extracts from *Phellinus*-fermented oat.



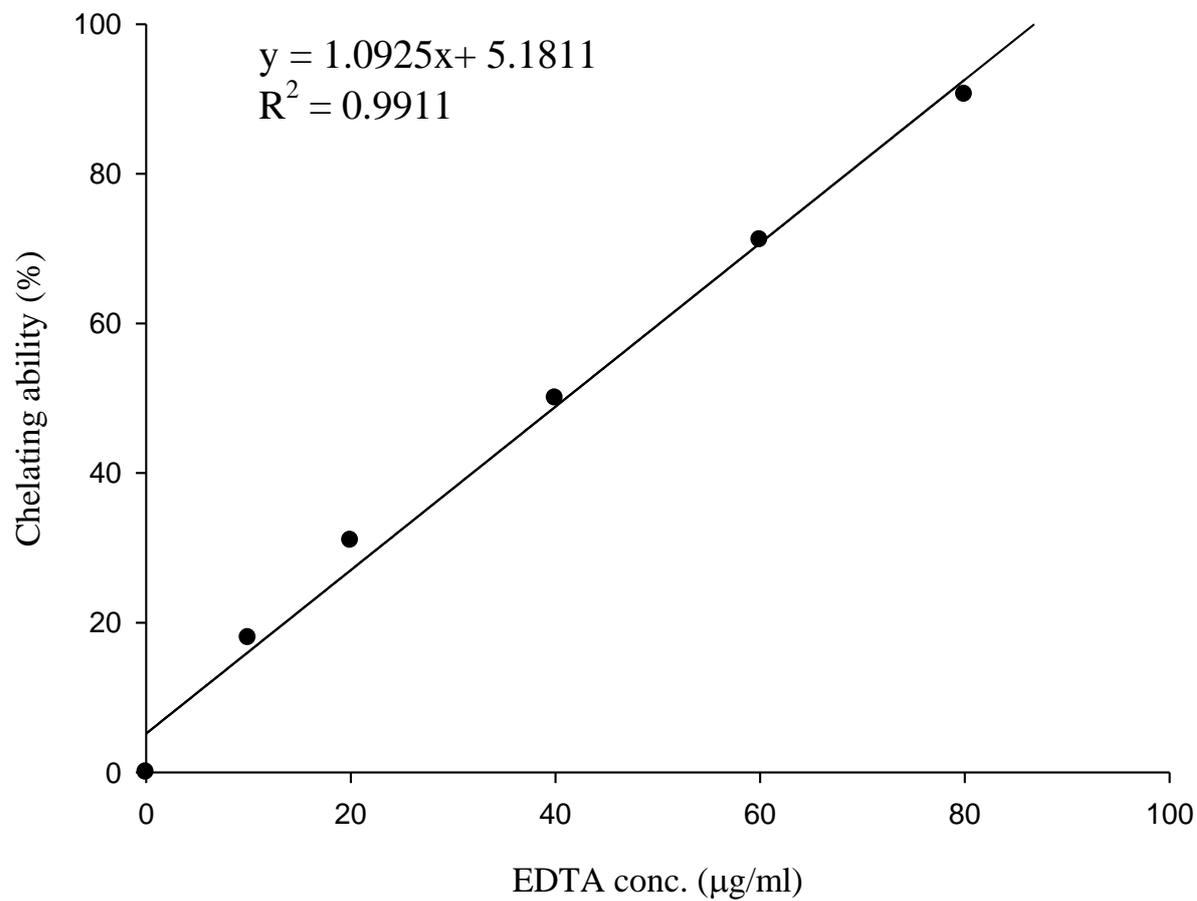
附圖三十二 發酵液粉末熱水萃取物之螯合亞鐵離子能力標準曲線。

Appendix Fig. 32 Standard curve of chelating ability on ferrous ion by hot-water extracts from submerged culture powder.



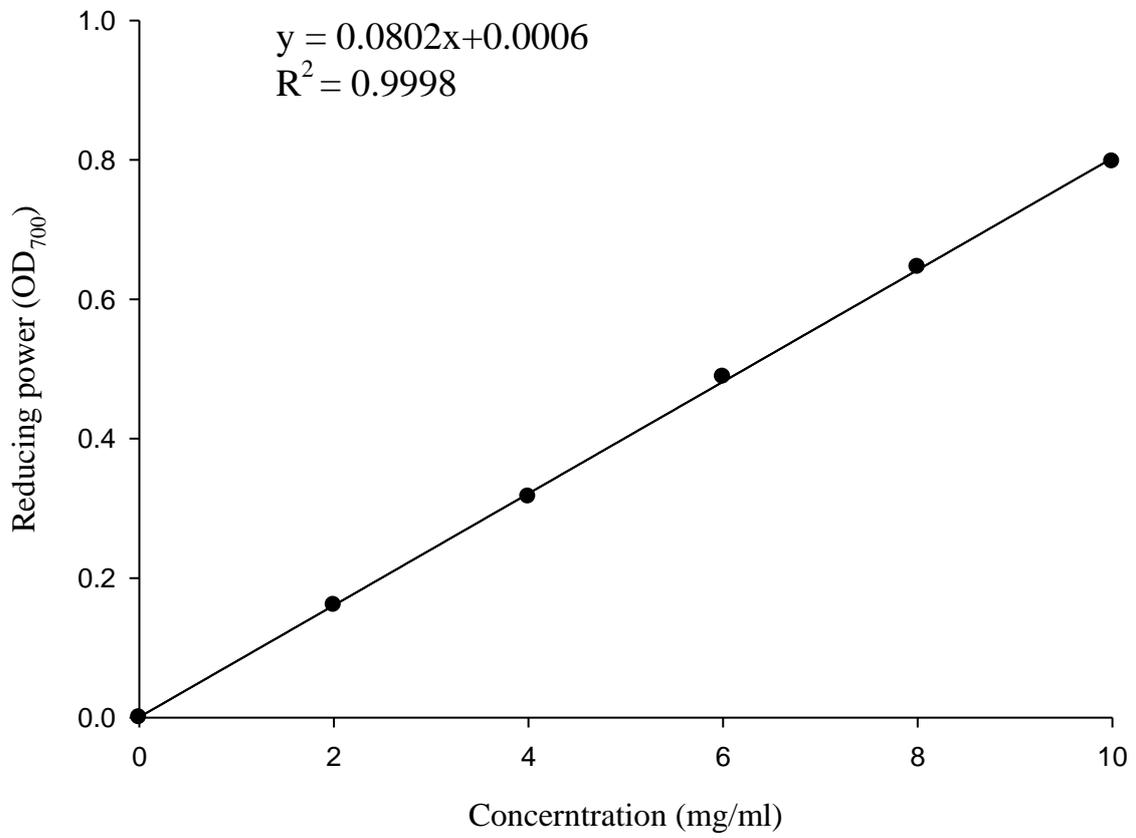
附圖三十三 發酵液粉末乙醇萃取物之螯合亞鐵離子能力標準曲線。

Appendix Fig. 33 Standard curve of chelating ability on ferrous ion by ethanolic extracts from submerged culture powder.



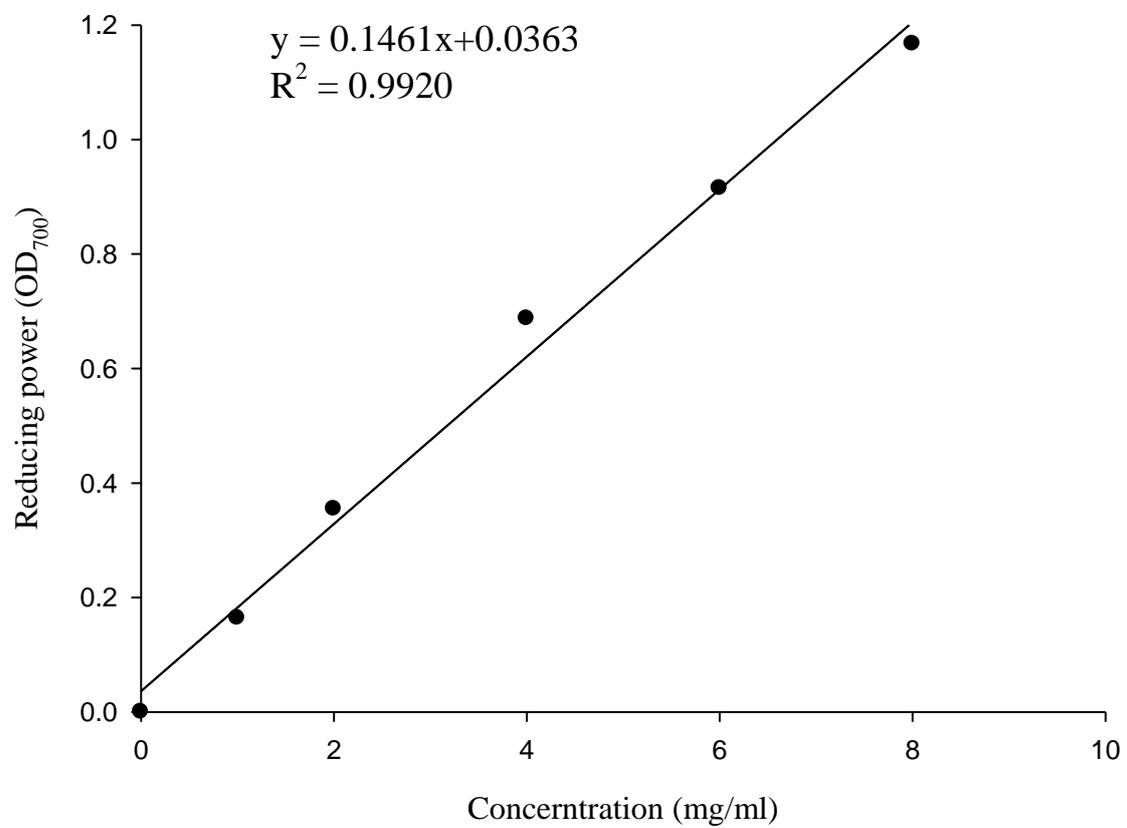
附圖三十四 EDTA 之螯合亞鐵離子標準曲線。

Appendix Fig. 34 Standard curve of metal chelating ability by EDTA.



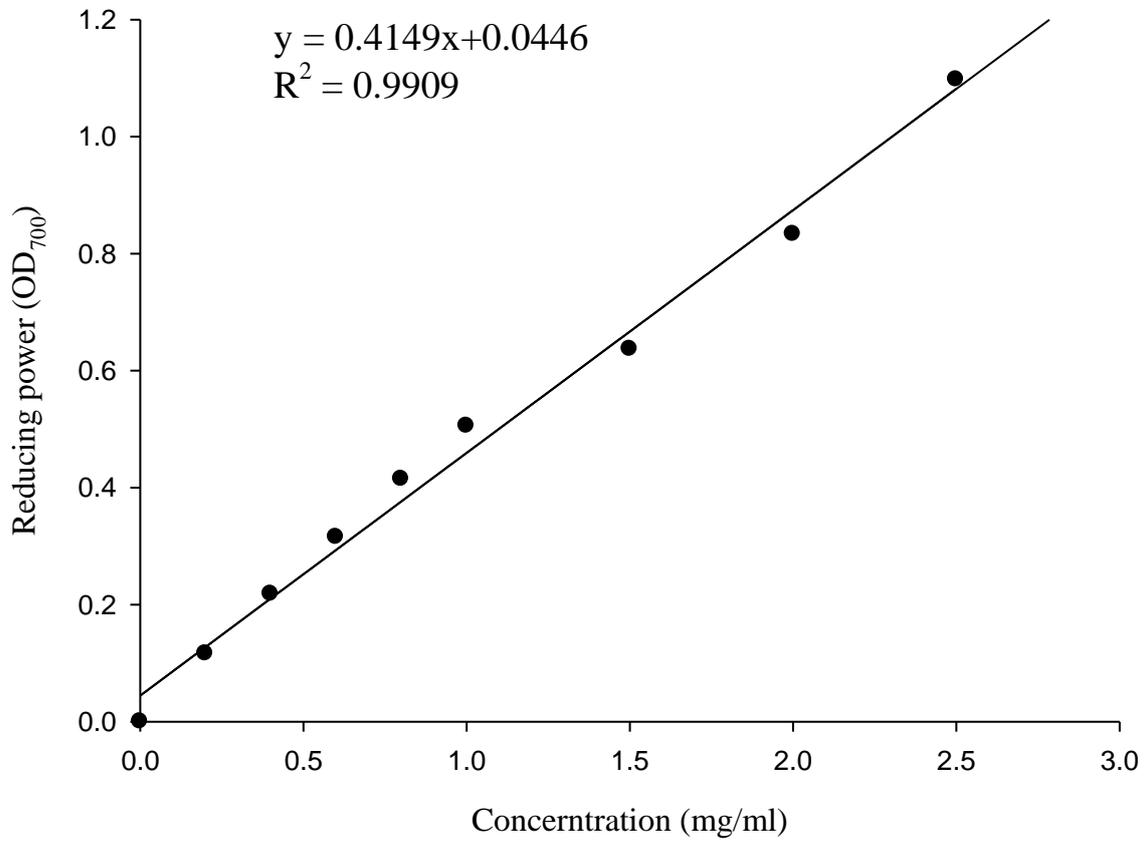
附圖三十五 燕麥基質熱水萃取物之還原力標準曲線。

Appendix Fig. 35 Standard curve of reducing power by hot-water extracts from oat substrate.



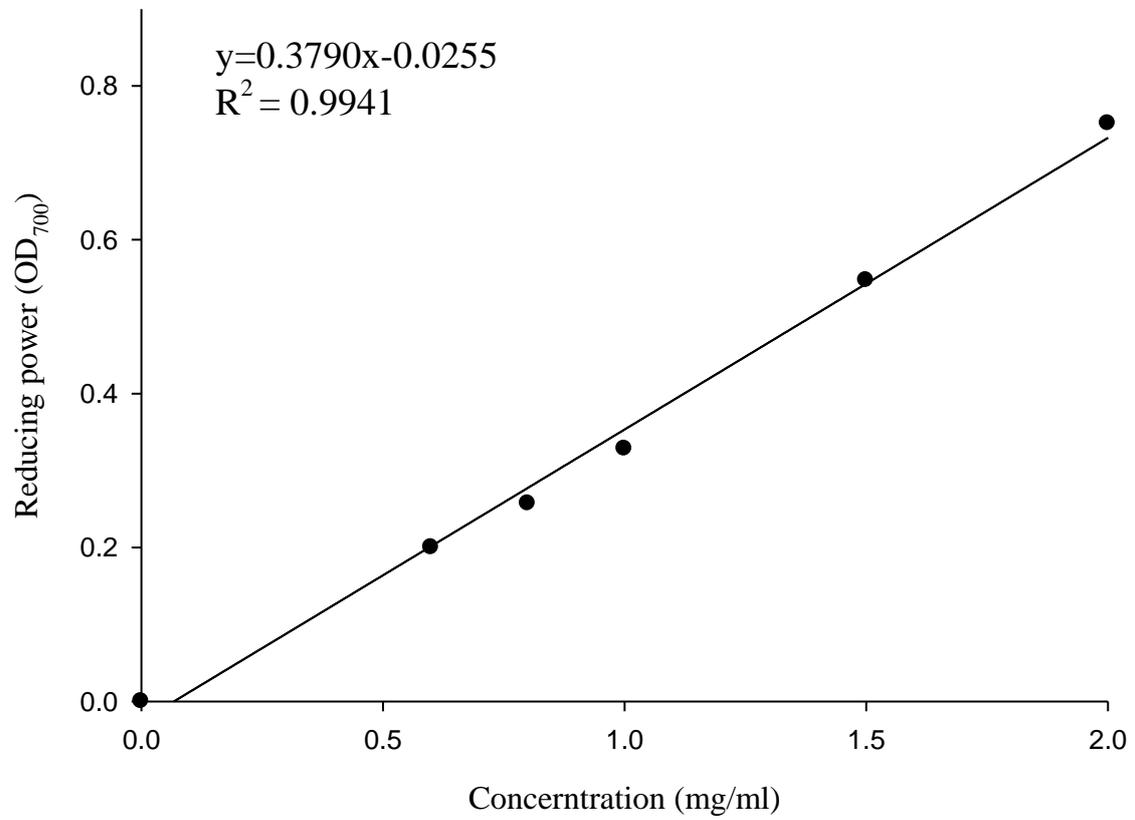
附圖三十六 燕麥基質乙醇萃取物之還原力標準曲線。

Appendix Fig. 36 Standard curve of reducing power by ethanolic extracts from oat substrate.



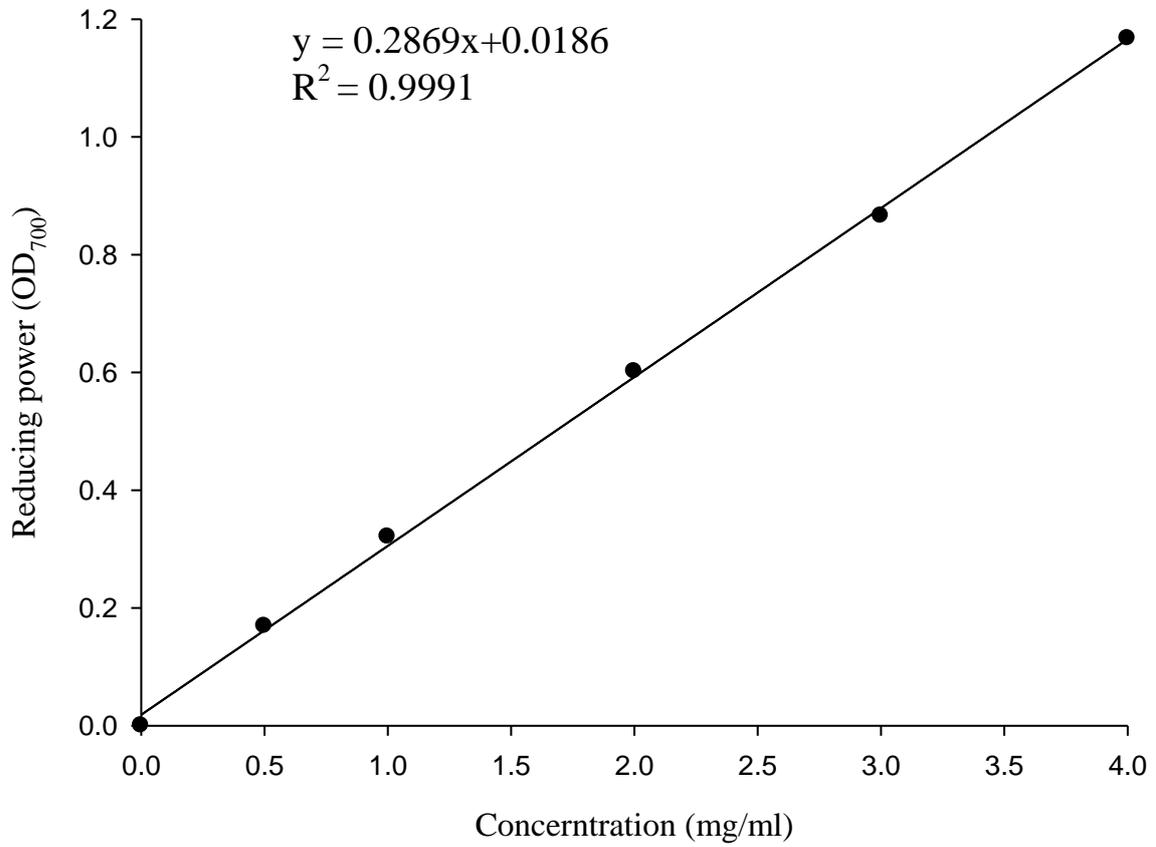
附圖三十七 桑黃燕麥熱水萃取物之還原力標準曲線。

Appendix Fig. 37 Standard curve of reducing power by hot-water extract from *Phellinus*-fermented oat.



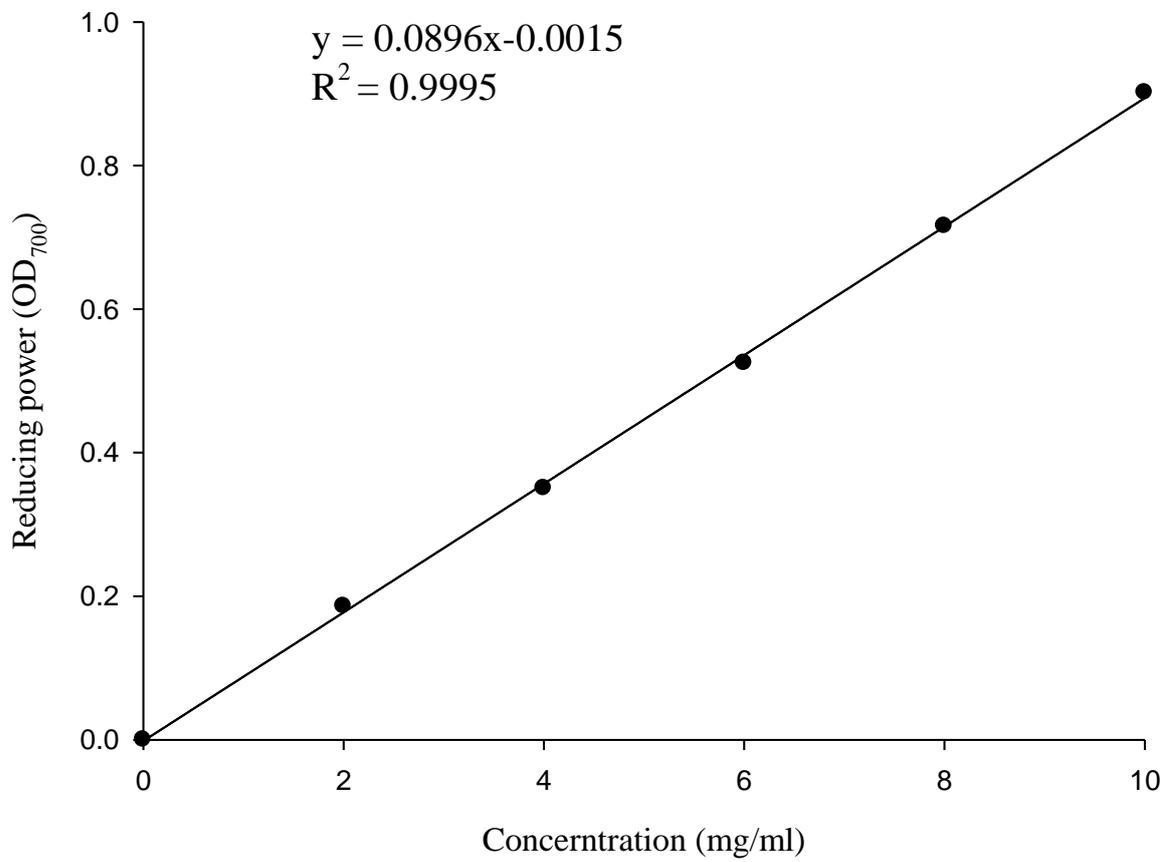
附圖三十八 桑黃燕麥乙醇萃取物之還原力標準曲線。

Appendix Fig. 38 Standard curve of reducing power by ethanolic extracts from *Phellinus*-fermented oat.



附圖三十九 發酵液粉末熱水萃取物之還原力標準曲線。

Appendix Fig. 39 Standard curve of reducing power by hot-water extracts from submerged culture powder.

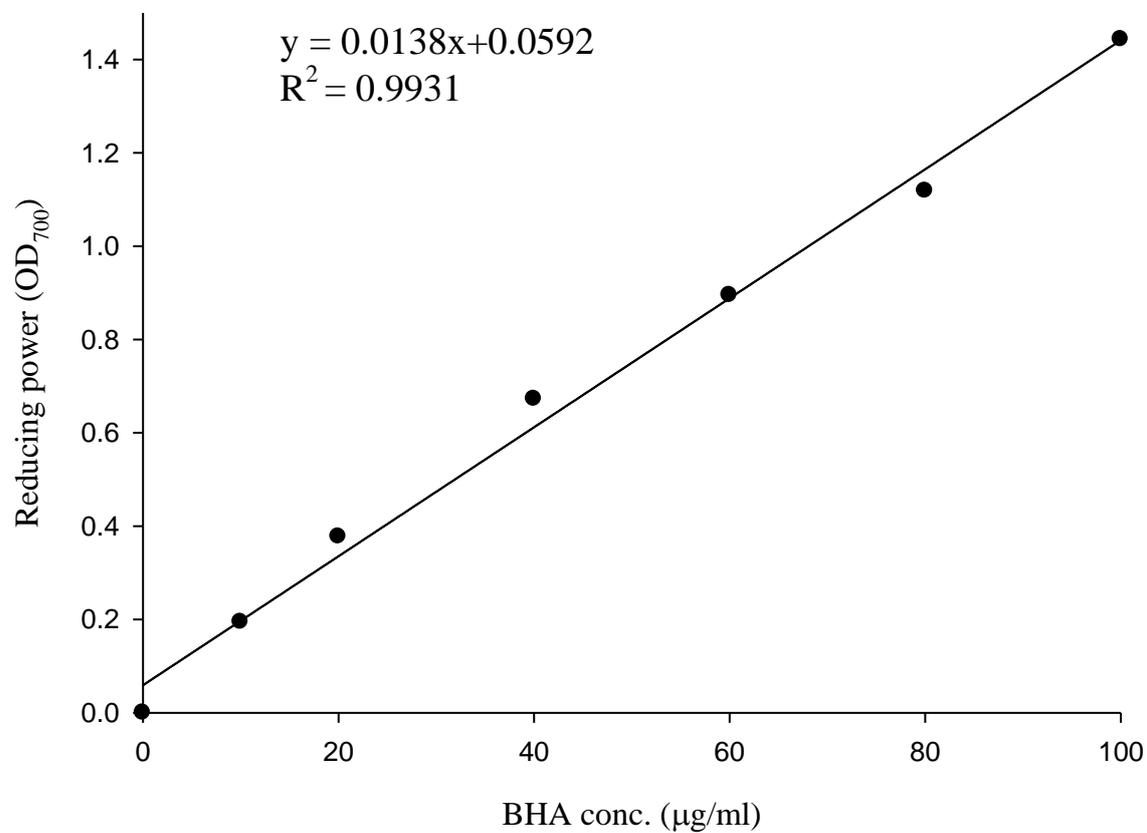


附圖四十

發酵液粉末乙醇萃取物之還原力標準曲線。

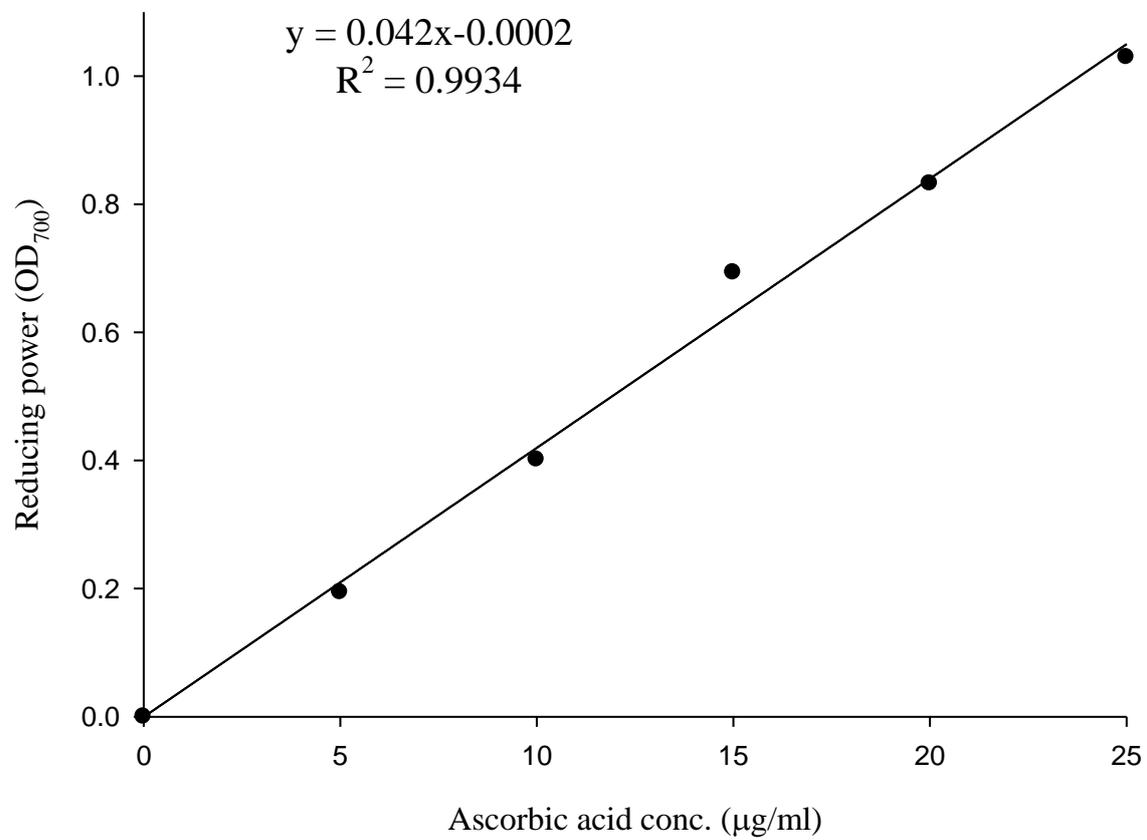
Appendix Fig. 40

Standard curve of reducing power by ethanolic extracts from submerged culture powder.



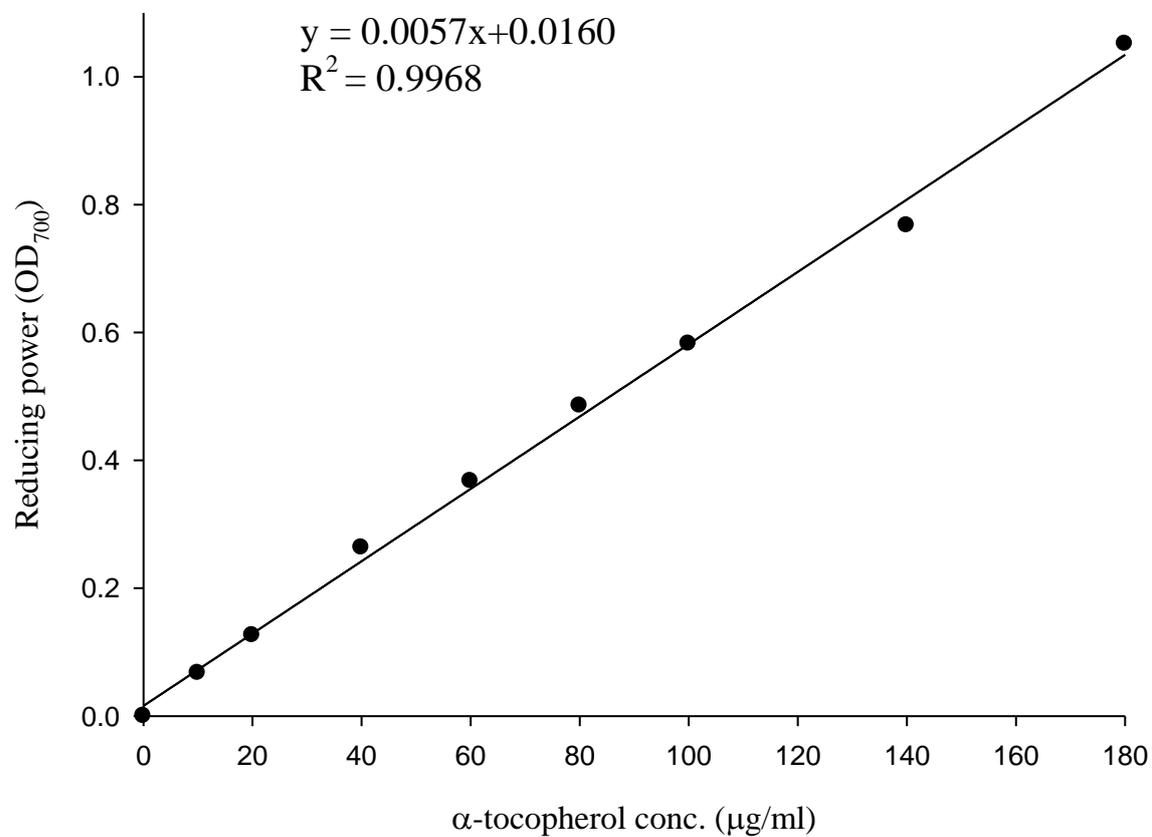
附圖四十一 BHA 之還原力標準曲線。

Appendix Fig. 41 Standard curve of reducing power by BHA.



附圖四十二 Ascorbic acid 之還原力標準曲線。

Appendix Fig. 42 Standard curve of reducing power by ascorbic acid.



附圖四十三 α-tocopherol 之還原力標準曲線。

Appendix Fig. 43 Standard curve of reducing power by α-tocopherol.