

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

指導教授：楊芳鏘 博士

Advisor : Fan-Chiang Yang, Ph.D.

固態發酵培養基組成對於樟芝菌絲體活性成份生成之影響

Effect of medium composition on the fermentation of Bioactive Compositions in solid state

fermentation of *Antrodia cinnamomea*

研究生：王皓緯 撰

Graduate student : Hao-wei Wang

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

中文摘要

近年來，真菌發酵產物與其菇類子實體，其藥理與生理活性成份受到重視。其中以台灣獨有的真菌-櫟 (*Antrodia cinnamomea*) 更是學術研究重點之一。實驗利用添加物，刺激樟芝菌絲體提升二代謝產物含量。結果發現，在添加金桔皮乾燥粉末 1 g/瓶 培養 28天 後分析發酵物基質(Substrate)得知粗三萜含量增加 63.84% ，其次為葡萄柚皮粉末 與 柚子皮粉末 24.46% 與 19.47%。改變添加濃度變化得知，金桔在 2 g/瓶 可以達到最高的粗三萜含量 32.55 mg/g sub.。將金桔果皮經過水淬取後將水淬取液與殘渣添加進行培養後試驗，得知水淬取與淬取殘渣都可以在第28天提升葡萄糖胺含量，而金桔果皮則會低於控制組；結果顯示三種培養的粗三萜含量都高於控制組，但是總多酚含量和總類黃酮含量則低於控制組。為了探討粗三萜生成機制和總多酚的相關性，選取了本身萜類較少而總多酚含量與柑橘果皮相同的果皮做添加，結果顯示葡萄果皮添加 1 g/瓶 在第 28天葡萄糖胺含量與粗三萜類含量皆高於控制組而達到 3.84 mg/g sub.與 28.07 mg/g sub.。實驗結果皆證實使用天然物添加，對於樟芝菌絲體提高代謝產物是有十分明顯的影響與效果。

關鍵字:樟芝、蕎麥、果皮、三萜

Abstract

In recent years many medicinal mushrooms have been well-known to contain various physiological components with bioactive functions. *Antrodia cinnamomea* is an endemic medical mushroom in Taiwan and their major effective components are polysaccharides, steroids and triterpenoids. However, the fact that the fruiting body grow extremely slow make it difficult to be used very popularly.

The aim of this research was to investigate the feasibility of enhancing the production of bioactive components by adding fruit peels into the media for solid-state fermentation of *Antrodia cinnamomea*. The results show that peel powder made from kumquat, grapefruit, pemole could increase triterpenoid content in mycelia by 63.84%, 26.46% and 19.47%, respectively. In addition, crude triterpenoid concentration reaches to 32.55 mg/g sub at the concentration of 2g kumquat /peck. When different kinds of kumquat extract(kumquat peel, water extract, kumquat pomace, control) were added and compared, the addition of water extract and kumquat pomace were found to be beneficial to the production of crude triterpenoid and glucosamine at the 28 day. In contrast kumquat peel showed some inhibitory effect on the formation of glucosamine. It is interesting to note that all kind additives had a negative effect on the production of total phenol and flavonoids. In order to investigate the biotransformation mechanism, grape and apple peel, whose fruit peels contain less amounts of

terpenoids, were added into the media for SSF. The results reveal that the addition of grape peel could also enhance the formation of crude triterpenoid, which reached to 28.07 mg/g sub at the 28 day. This study demonstrates that the formation of bioactive components in the mycelia of *Antrodia cinnamomea* could be enhanced by adding fruit peel into the media.

Key words: Antrodia cinnamomea, buckwheat, citrus, metabolites

目錄

中文摘要	III
目錄	VI
表目錄	X
圖目錄	XI
第一章 緒論	1
1-1 前言	1
1-2 研究動機與目的	2
第二章 文獻回顧	3
2.1 菇類與真菌簡介	3
2.2 真菌次代謝產物	4
2.3 樟芝	5
2.3.1 樟芝的分類	5
2.3.2 樟芝的命名	5
2.3.3 樟芝生理活性成份	6
2.3.4 樟芝的培養方法	11

2.3.5	添加物對於樟芝菌體生長代謝的影響.....	14
2.4	固態發酵	16
2.4.1	固態發酵概述.....	16
2.4.2	固態發酵培養特點：.....	17
2.4.3	固態發酵之優缺點.....	18
2.4.4	固態發酵培養重要參數.....	19
2.5	蕎麥	21
2.5.1	蕎麥的介紹.....	21
2.5.2	蕎麥的生理活性成份與應用.....	21
2.6	柑橘類果皮與葡萄、蘋果果皮.....	24
2.6.1	柑橘類果皮與葡萄、蘋果果皮概述.....	24
2.6.2	柑橘類果皮與葡萄、蘋果果皮的生理活性成份與應用.....	24
第三章	實驗架構、方法與材料.....	27
3.1	實驗架構	27
3.2	實驗方法	31
3.2.1	添加物處理.....	31
3.2.2	不同蕎麥基質對於樟芝菌絲體生成粗三萜的影響.....	31

3.2.3	不同果皮添加對樟芝菌絲體代謝產物的影響.....	31
3.2.4	不同濃度添加對於樟芝菌絲體代謝產物的影響.....	32
3.2.5	金桔水淬液對於樟芝菌絲體代謝產物的影響.....	33
3.2.6	果皮總多酚對於樟芝菌絲體代謝產物的影響.....	33
3.3	菌種培養與保存.....	35
3.3.1	樟芝菌株.....	35
3.3.2	菌種培養與保存.....	35
3.4	培養皿平面培養與接菌活化.....	35
3.4.1	種瓶的製備.....	36
3.4.2	三角瓶固態培養試驗.....	36
3.5	實驗藥品和儀器.....	38
3.5.1	實驗藥品.....	38
3.5.2	實驗儀器與設備.....	40
3.6	樣品分析	41
3.6.1	樣品甲醇萃取液.....	41
3.6.2	固態發酵菌絲菌體濃度測定.....	41
3.6.3	三萜之分析.....	42
3.6.4	總多酚分析.....	43

3.6.5	總類黃酮分析.....	43
第四章	實驗結果與討論.....	44
3.1	不同蕎麥基質對於樟芝菌絲體代謝產物的影響.....	44
3.2	不同添加物對樟芝菌絲體代謝產物的影響.....	50
3.3	不同濃度對於樟芝菌絲體代謝產物的影響.....	55
3.4	金桔水萃液對樟芝菌絲體代謝產物的影響.....	58
4.5	果皮總多酚對樟芝菌絲體代謝產物的影響.....	63
結論	68
未來展望	69
參考文獻	70

表目錄

表 2-1 從真菌次級代謝物開發新藥優勢.....	4
表 2-2 蕎麥種實成份平均值及其與其他作物種實成份間之比較.....	22
表 2-3 蕎麥粉之蛋白質含量與利用率及與其他作物和食品之比較.....	22
表 3-1 實驗藥品清單.....	38
表 3-2 實驗儀器清單.....	40
表 4-1 不同苦蕎麥基質對於樟芝菌絲體發酵的影響.....	49
表 4-2 不同種添加物對樟芝菌絲體代謝產物的影響.....	54
表 4-3 不同濃度添加物對樟芝菌絲體代謝產物的影響.....	57
表 4-4 金桔水淬液對樟芝菌絲體代謝產物的影響.....	62
表 4-5 果皮總多酚對樟芝菌絲體代謝產物的影響.....	67

圖目錄

圖 2-1 天然物合成的三大路徑(圖A)(林豔琪，2006).....	7
圖 2-2 萜烯生物合成途徑(圖B)(Dorothea Tholl，2006).....	8
圖 2-3 使用平板培養基培養樟芝菌絲體.....	13
圖 2-4 段木培養基培養樟芝菌絲體.....	13
圖 2-5 氣舉式發酵槽培養.....	13
圖 3-1 實驗架構圖.....	28
圖 3-2 代謝路徑圖.....	30
圖 4-1 樟芝菌絲體在有殼苦蕎麥為基質的代謝產物變化.....	46
圖 4-2 不同苦蕎麥基質對於樟芝菌絲體產粗三萜的影響.....	46
圖 4-3 使用磨粉無芯蕎麥殼後培養 28 天後培養狀況.....	47
圖 4-4 使用無芯蕎麥殼培養 28 天後培養狀況.....	47
圖 4-5 使用有殼蕎麥粉末培養第 28 天.....	48
圖 4-6 使用無殼蕎麥培養第 28 天.....	48
圖 4-7 使用台產普通蕎麥培養第 28 天.....	48
圖 4-8 金桔粉末對樟芝菌絲體產生有效物質的影響.....	52
圖 4-9 檸檬粉末對樟芝菌絲體產生有效物質的影響.....	52
圖 4-10 葡萄柚粉末對樟芝菌絲體產生有效物質的影響.....	53

圖 4-11 柚子粉末對樟芝菌絲體產生有效物質的影響	53
圖 4-12 柳丁粉末對樟芝菌絲體產生有效物質的影響	54
圖 4-13 使用金桔粉末濃度變化觀察樟芝培養第 24 天情形	57
圖 4-15 不同金桔萃取成份對樟芝菌絲體產生葡萄糖胺的影響	60
圖 4-16 不同金桔萃取成份對樟芝菌絲體產生粗三萜類的影響	60
圖 4-17 不同金桔萃取成份對樟芝菌絲體產生總類黃酮類的影響	61
圖 4-18 不同金桔萃取成份對樟芝菌絲體產生總多酚類的影響	61
圖 4-19 蘋果與葡萄果皮添加對於樟芝菌絲體生產葡萄糖胺之影響 ...	65
圖 4-20 蘋果與葡萄果皮添加對於樟芝菌絲體生產粗三萜類之影響	65
圖 4-21 蘋果與葡萄果皮添加對於樟芝菌絲體生產總多酚之影響	66
圖 4-22 蘋果與葡萄果皮添加對於樟芝菌絲體生產總類黃酮之影響	66

第一章 緒論

1-1 前言

近年來，對健康有著相當療效的天然食藥用菇之保健類食品受到全世界人們的注意，例如靈芝、裂褶菌、樟芝、巴西蘑菇等。其中樟芝在民間盛傳樟芝的功效頗多，多數和保護肝臟、提神、清涼解毒、抗腫瘤等有關(陳書豪，2007)。除有生體防疫(免疫增強)、抗氧化、抑制腫瘤細胞增生與疾病康復力等多種生理功能(Hsiao et al.，2003；Song and Yen，2002；水野卓，1997)。且樟芝的甲醇萃取量高於靈芝10倍，且樟芝嚐起來也比一般靈芝苦，預估其中的多氧化型類三萜及固醇類含量極豐富(吳德鵬，1995)。但樟芝對宿主具有專一性，只生長在一般真菌無法生長的台灣本土特有的老舊腐壞牛樟(*Cinnamomum kanehirae* Hayata)樹幹涵洞內壁，不易被人採收，故民間視若珍寶，為台灣市場目前價格最昂貴的野生真菌。

固態發酵，常利用未處理之原料或是農產食料廢棄物做為發酵之基質，而發酵後之產物往往能直接進行利用或食用。設備簡單且成本低廉為固態發酵之特點，因此在工業及食品業上固態發酵之例子多不可數。而利用微生物轉化農作物及其廢渣，不僅能提高它們的營養價值，更著重於生物能量的保存、固態廢棄物處理及生產二次代謝產物的應用上，相對能減少對環境之污染。

1-2 研究動機與目的

根據文獻，本研究以非主流食用穀物-蕎麥作為樟芝固態發酵之培養基質，配合天然物添加且接種樟芝菌絲體進行共同發酵，目的以提高發酵產物的生理活性成份。培養後收集固態發酵物，分析菌絲體葡糖糖胺含量當作菌絲體參考值，與發酵物中粗三萜含量、總多酚含量、總類黃酮含量等代謝成份的變化，並根據文獻與實驗結果討其代謝物質的變化。期望取代傳統使用昂貴的國寶牛樟木做為基質的培養法，並改善長期培養的缺點，期望增進樟芝藥用價值及提供一個保健醫療上的新方向。

第二章 文獻回顧

2.1 菇類與真菌簡介

真菌的種類繁多，屬於不具有葉綠素及維管束屬於異營性生物。真菌界分成四個門，分別為：接合菌門、子囊門、擔子菌門和不完全菌門。子囊菌門和擔子菌門屬於高等真菌，而菇類泛指真菌形成的具有型態大至肉眼可見的子實體(fruit body)為真菌的有性生殖器官；具這類的菌類多數為擔子菌(Basidiomycota)，亦包含部分子囊菌(Ascomycota)。研究指出擔子菌是一種進化上出現較晚的一種真菌，因容易分解的有機物已被先住的菌佔有，所以只能利用較難分解的有機物或與樹根結成共生關係而生存下來，因此擔子菌有類似高等植物化合物的合成與代謝路徑（水野卓，1997）。

全球發現的菇類約14000種，其中可食用的菇類約有50%(Lull et al., 2005)，目前被成功栽培且具經濟效益的約35種左右，因此尚有許多菇類仍具有開發的空間。菇類的風味獨特，口感佳，適合烹調成各種料理，例如國人喜愛的香菇、金針菇，受日本人喜愛的松茸，西方國家常食用的洋菇等，均因為風味獨特而受到各民族的喜愛(林雅慧，2008)。

2.2 真菌次級代謝產物優勢

真菌類於液態發酵培養時，其主要的目的通常為生產真菌的初級代謝物如多醣體等。然而藉由太空包或固態發酵的培育方法，通常可獲得較多的真菌的次級代謝物。由真菌次級代謝物篩檢得到藥理活性成份，其機率遠高於以高等植物天然物為篩檢源，因此也是真菌開發藥物研究方面受到重視的原因。在結構上，種類多樣的真菌次級代謝物，同樣意謂著可能有較廣泛且值得開發的生物醫藥方面的潛力。真菌次級代謝物易於誘導產生，可作為大規模的生產藥物手段，真菌次級代謝物可藉由發酵生產，因此可不受季節或是地理環境的因素限制，如表2-1所示 (李名訓，2006)。

表 2- 1 從真菌次級代謝物開發新藥優勢

The promising drug discovered from fungus secondary metabolites.

- 1、真菌次級代謝物種類多，且結構變化大
 - 2、真菌次級代謝物有較寬而未知且值得開發的生物醫藥活性
 - 3、真菌次級代謝物可藉由發酵而迅速大量生產
 - 4、較植物次級代謝物基因調控的高難度而言，真菌次級代謝物易於誘導產生
-

(王聲遠、蕭明熙，2001)

2.3 樟芝

2.3.1 樟芝的分類

樟芝 (*Antrodia cinnamomea*) 又名牛樟芝、牛樟菇、樟菰、紅樟菇...等，因為它只生長在台灣特有的國寶級保育樹種牛樟樹上，是台灣特有種真菌。在分類上屬於真菌界(Fungi)、擔子菌(Basidiomycota)、擔子菌亞門(Basidiomycotina)、同擔子菌綱(Homobasidiomycetes)、無褶菌目(Aphulphorales)、多孔菌科(Polyporaceae)、薄孔菌屬。

2.3.2 樟芝的命名

第一次發表時，因標本汙染而被誤發表為靈芝屬，將其命名為 *Ganoderma comphoratum*。於 1995 年後，由張東柱等人針對樟芝子實體的型態，重新命名為 *Antrodia cinnamomea* (Chang and Chou, 1995)。到了 1997 年時，為了避免造成誤解，因此學名被合併為 *Antrodia camphorata*，此為 *Antrodia cinnamomea* 的同義名。至今牛樟芝正式命名仍然經過許多波折和爭議，目前財團法人食品工業發展研究所中的生物資源保存及研究中心(BCRC)於 2010 年採用 *Antrodia cinnamomea* 為牛樟芝學名，而在同年 MycoBank (世界上具權威性的真菌資料庫銀行)專家 Dr.Joost Sralpers 依照國際植物命名法規研究後正名牛樟芝為 *Taiwanofungus camphorates*(*Antrodia cinnamomea*、*Ganoderma comphoratum* 與 *Antrodia camphorate* 皆為同意名)(引述牛樟芝學術論壇提供資料)。

2.3.3 樟芝生理活性成份

樟芝有許多的生理活性成份，本身具有強烈的苦味，原住民同胞摘取此物作為解酒醒腦之物，甚至患有重症的原住民於服食樟芝之後，該重症竟然不藥而癒，此後樟芝的功效即廣被流傳。而牛樟芝成份中的三萜類化合物 (triterpenoids)、多醣體 (polysaccharides)、超氧歧化酶 (superoxide dismutase: SOD)、腺苷 (adenosine)、蛋白質 (含免疫蛋白)、菸鹼酸、麥角固醇 (ergosterol)、微量元素 (如鈣、磷、鋅)、核酸、凝集素、氨基酸、固醇類、血壓穩定物質 (allothoia acid) 與生物鹼等成份，都在近數十年來被研究證實 (Song and Yen, 2002; 王伯徽等人, 2002; 朱建儒, 2003)。在最新方面於2010年5月19號，馬偕研究團隊陳裕仁先生、張東柱先生與周正仁先生費時六年，將野生牛樟芝萃取分離的「去氫硫色多孔菌酸化合物」命名為「馬偕一號」MMH01，將其作用於治療胰臟癌與急性骨髓性白血病有良好成果，將開發為新穎的抗癌藥物。因此，為瞭解樟芝複雜的代謝產物之間的關係和其合成機制，選擇有效率且能切入核心的實驗，天然物代謝與合成的路徑圖成為重要的知識和工具，圖2-1為林豔琪在2006年整理出來的天然物合成三大代謝路徑圖。

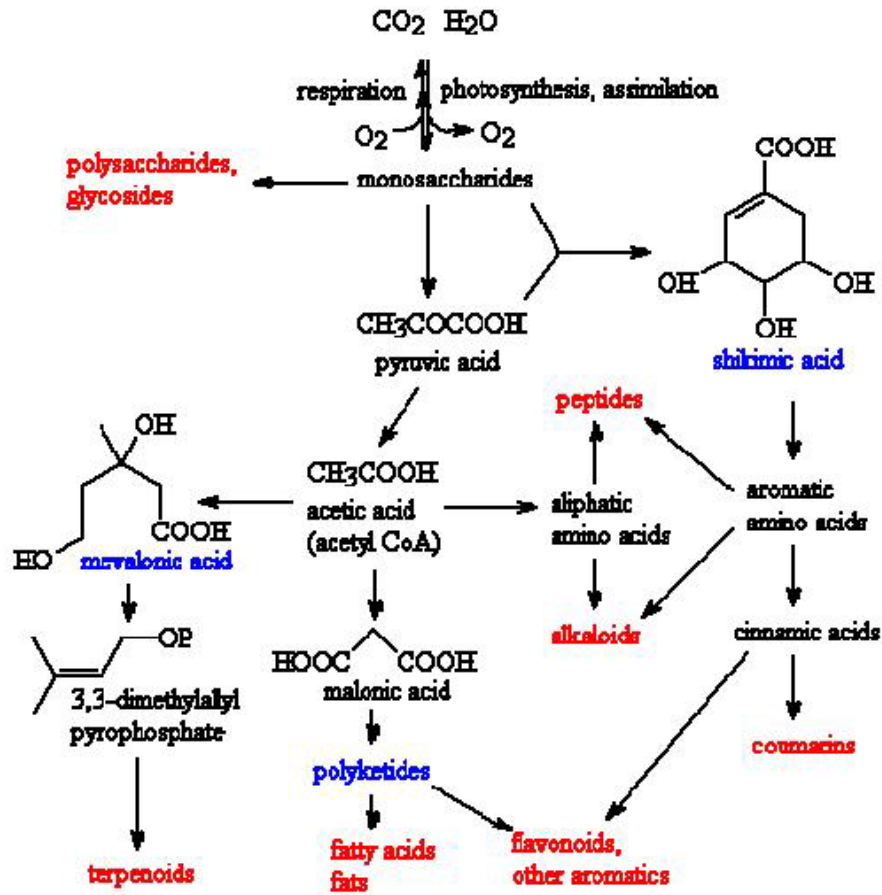


圖 2-1 天然物合成的三大路徑(圖 A)(林豔琪，2006)

萜類 (terpenoids)

萜類普遍存在於植物界與真菌界，在動物界為數甚少甚至部份生物無法代謝合成。萜類的分類法是依據分子中異戊二烯單體數目分類的，含有兩個異戊二烯單體稱為單萜(monoterpene);含有三個異戊二烯單體稱倍半萜(sesquiterpenes);含有四個異戊二烯單體稱為雙萜(diterpenes);含有六個異戊二烯單體稱為三萜(triterpenes);而八個異戊二烯單體稱為四萜(tetraterpenes)等。

萜類化合物一般難溶於水，易溶於親脂性的有機溶劑。低分子量和官能基少的萜類如半萜、倍萜、部分倍半萜，常溫下多呈液體，具有揮發性，能隨水蒸氣蒸餾如天然物萃取出各種精油。隨分子量及官能基增加，化合物的揮發性降低，熔、沸點提高，部分多官能基的倍半萜、二萜、三萜等，多為具有高沸點的液體或結晶固體（肖崇厚等人，1989）。自從Kubota等人，於1982年首次從赤芝子實體中分離得到三萜化合物以來，截至目前為止，已經先後從赤芝子實體及孢子中分離鑑定出一百多種三萜類化學成份。三萜化合物是菇類的苦味來源，主要見於各種靈芝、猴頭菇及台灣特有的樟芝。報告指出，從靈芝分離得到的三萜類中靈芝酸 ganoderic acid R、T-Z在體外試驗具有抑制肝癌細胞增殖作用，又 ganoderic acid A、B、C₁、C₂ 具有抑制大鼠肥胖細胞游離組織胺(histamine)的作用，ganoderic acid B、C₂ 有抑制血管緊張素(antitensin)轉化酵素的活性。(水野卓，1997)

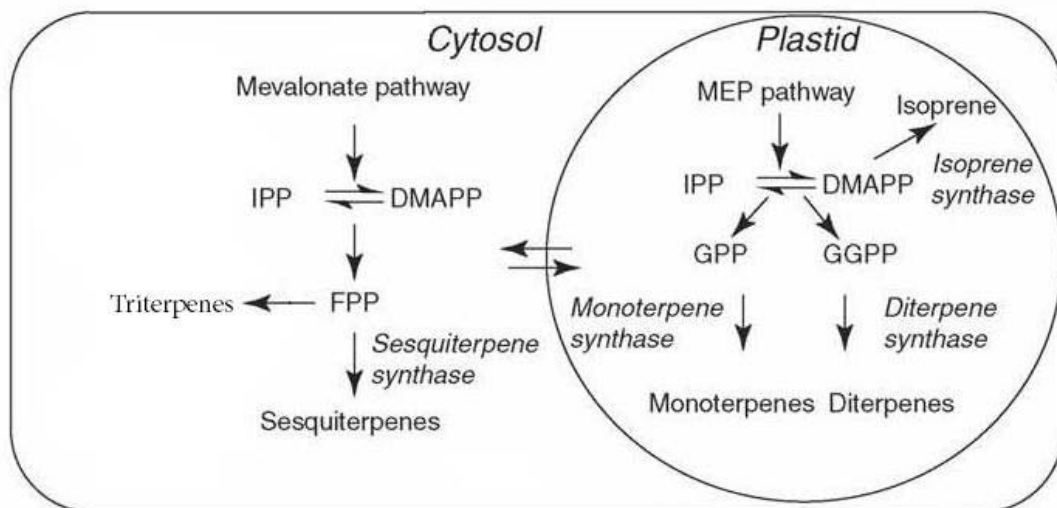


圖 2-2 植物萜烯生物合成途徑(圖 B)(Dorothea Tholl , 2006)

多醣體 (polysaccharides)

多醣類是自然界中蘊藏豐富之生物聚合體(Biopolymer)，可簡單分為單糖、雙糖及多醣，目前微生物多醣的來源絕大部份由細菌類所生成，少部份為黴菌。由於多醣的發酵液粘度極高，這會使溶氧和質傳效果變差，若所使用菌種為黴菌，則發酵液粘度將變得更高。多醣發酵液在低濃度下尚為牛頓流體，但在高濃度下即呈現非牛頓流體性質，因而使其流力行為更形複雜(陳書豪，2007)。在微生物體中多醣依存在方式主要分為以下三種：

(1)胞內多醣 (Intracellular polysaccharides)：此種形態多醣為提供微

生物生長所需要的能量及碳源。

(2)結構多醣 (Structural polysaccharides)：此類多醣架構菌體基本形態

如細胞壁。

(3)胞外多醣 (Extracellular polysaccharides)：為最常利用之多醣，

為附著於細胞外部的黏性物質，但其亦可儲存細胞壁間隙。

抗氧化功效

樟芝子實體與菌絲體之甲醇萃取物皆具有很強的抗氧化性質，推測與牛樟芝的天然抗氧化成份有關，如多酚類、 α -生育醇、抗壞血酸、類黃酮及 β 胡蘿蔔素有關，且抗氧化能力隨著甲醇萃取物濃度的增加而有上升的趨勢(黃鈴娟，2000)。而有研究指出樟芝甲醇萃物中抗氧化物含量多寡依序為維生素 E、總多

酚、抗壞血酸及 β 胡蘿蔔素(Mau et al. , 2004)。將樟芝菌絲體經 γ 射線照過後，
可提高其甲醇萃取物之抗氧化能力(Huang and Mau , 2007)。

2.3.4 樟芝的培養方法

野生樟芝數量稀少且價格昂貴，所以濫砍盜採的情形嚴重，在台灣早已被列入保育類植物，因此目前多以人工栽培為主要來源。但牛樟(*Cinnamomum kanehirae* Hay.)本為台灣保育類樹木，禁止買賣、盜採。且近幾年來政府下令停售牛樟木藉以打擊盜採，在原物料和野生樟芝雙方面都被限制的情況下，人工培養牛樟芝的價錢日漸攀升。數十年來，學術界與業界皆投入大量人力、物力研究樟芝的人工栽培，卻始終無法成功突破。而常見的商業化的培養方法主要分為固態和液態兩大類，因產品需求目的不同而有不同的方式做培養。

固態培養:

A. 段木栽培：以樟芝原本的宿主—牛樟木為主要培養基，將菌種接種在經過高溫滅菌的段木上，但因為牛樟段木為台灣法律限制的國寶木，不易取得且等待出菇的時間較長，約需2-3年之久，但因成份和功效和天然野生牛樟芝近似，雖然成本高耗費時間長而無法被取代，業界正積極尋找能替代段木的方法。

B. 太空包：早期許多菇類的栽培多以段木栽培，但是段木取得不易，成本較高，需較多的人工成本。初期業界曾嘗試使用天然物做培養，但容易受其他雜菌及昆蟲的汙染，造成產量低，品質不佳，後來發展以太空包的方式栽培，方便管理，僅需以木屑及米糠等為營養來源，成本較低，且大部分的菇類生長都比段木栽培好，因此；目前大多數的菇類栽培都以太空包方式栽培。而在樟芝

的子實體培育上通常經由平板或是液態與太空包的方式培育大量菌絲體，再將菌絲體接種於牛樟段木。但較少的商業化產品標榜使用太空包培育樟芝菌絲體與子實體。

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

液態培養：

液態培養(深層發酵):是指使用固定組成之液態培養基，在控制適當的pH 值、溫度以及通氣量和攪拌速率的條件下，使用培養液進行微生物的培養，以製造菌體與其他的代謝產物。此種培養方法已受到業界使用而大規模的培養，但深層培養出的樟芝菌絲體與子實體已被證實雖然有類似功效產生，但是本身含有的二次代謝物質萜類卻有不同的含量和成份，而部份必須由子實體才能萃取而出。

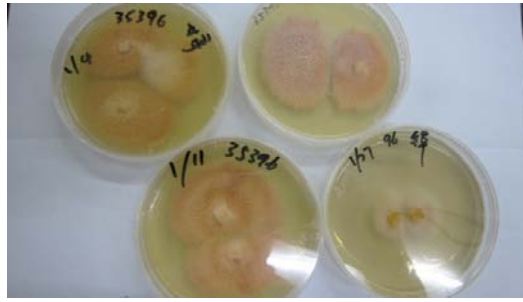


圖 2-3 使用平板培養基培養樟芝菌絲體

(菌種:BCRC 35396，菌種於控制於 25°C 使用實驗 3-2 平版培養條件於 2 月 5 號拍攝)



圖 2-4 段木培養基培養樟芝菌絲體

菌種:BCRC 35396，菌種於控制 CO₂ 濃度為 1%培養六個月(朱海文，2005)



圖 2-5 氣舉式發酵槽培養

(陳書豪，2006)

2.3.5 添加物對於樟芝菌體生長代謝的影響

一般來說，樟芝菌絲體於培養基培養時，所需的時間約為30-35天，而段木培養更高達半年或一年，唯有液態發酵菌絲體生長速度快只需七到兩周。而分析研究成份與文獻得知，液態發酵菌絲體產物中，唯有胞內外多醣體與初階代謝產物含量較高，但是二次代謝產物如三萜含量低且種類少。為了縮短其培養時間及增加菌絲代謝產物，使用添加物影響樟芝菌絲體成長並改善代謝效率的方法，成為研究目標之一。如簡秋源等人在1997年時曾將一些天然抽出物與樟腦的結晶物溶入液態培養基中，結果顯示菌絲生長趨勢比對照組(未添加樟腦結晶)生長來的更佳。之後，學者廖英明於1998年時亦曾將精油（10 g 樟木屑乾重的抽出液）加入培養基中進行樟芝菌絲的培養，添加量為 0.02% 時，菌絲的生長最好，而高於 0.2% 時，反而不利菌絲的生長。而同樣具有促進效果的成份，有些僅需低濃度就有促進的效果產生，濃度過高反而有負面的效果，如 Geraniol、Citronellol、*l* - Linalool與Eugenol；有些需高濃度才有促進效果，如Safrole；*p*-Cymene 對牛樟芝生長有抑制作用；遍存於樟屬的d - Camphor 對樟芝亦有促進的效果；牛樟含量較高的4 - Terpinenol對牛樟芝的生長無助益，太高反有害。文獻證明單獨的界面活性劑 Tween 20 的添加則有抑制菌絲生長的傾向，太高濃度的樟樹精油對牛樟芝菌絲生長呈現抑制性，而樟腦油添加濃度在 0.6% (v/v) 以上時也可明顯觀察到這種抑制現象，甚至比負控制組還來得低 (林志遠, 2005)。

樟芝菌絲體逾液態培養時，分別添加0.1% 與0.3% 不同濃度之樟腦結晶，可幫助菌絲體成長（簡秋源等人，1997）。張家祥(2007)則在添加靈芝20 g/L固態培養30天時有高達37.61 mg/g，九層塔、厚朴和紫蘇也皆能有效提升三萜類之濃度。

2.4 固態發酵

2.4.1 固態發酵概述

固態發酵是微生物培養的一種方式，使用固態物質當作基質，讓微生物生長在上面。與液態深層發酵相比，使用固態發酵培養，微生物有時能有良好的生長情形，也可產生較大量的胞外酵素，或其他代謝產物。雖然一些傳統食物與酒精飲料早已經應用在工業化生產，但近年來固態發酵的應用已經被擴展到製藥工業與生化產業上。儘管固態發酵能產生高產量酵素或其他代謝產物的原因尚在未知階段，但固態發酵技術進一步的研究與進展在未來已經是指日可待。因為獨特的產物特性，它逐漸發展為新形的生物科技。1960年，許多火雞因攝取了黃麴毒素而死亡，此種毒素是由*Aspergillus flavus* 黴菌生長在花生粉上生產的。Hesseltine 發現大量的毒素皆是藉由固態發酵才能生產的，在液態深層發酵是無法生產的，這使固態發酵引起許多注意。工業規模固態發酵發展到以酵素與檸檬酸的生產。現今，固態發酵工業之利用擴展到堆肥、菇類培養與其他食物的生產，如：麵包、乳酪。如固態發酵有獨特特性與限制，胞外水解酵素與其他代謝產物有時會藉由固態發酵生產較大量的產物。雖然原因不是很清楚，但此特性對固態發酵的應用很重要。Martinez 等人研究指出以麥桿固態發酵培養菌絲所產生的酵素分子量與 PI 值與液態發酵不同。近年來，Ishida 等人研究指出以不同培養方法培養 *A. oryzae* 生產不同形式的葡萄糖澱粉酵素。(陳書豪，2006；Sato and Sudo，1999)

2.4.2 固態發酵培養特點：

固態發酵和液態發酵最明顯的特點就在於無法攪拌，而這個決定性的特點也就分隔出固液態發酵兩種培養環境的特性。以下是固態發酵培養的特點整理：

- (1) 固態發酵中微生物分佈在固體表面，生長與產物生成也主要表面進行。基質不易攪拌均勻。因此培養環境為不均勻的。
- (2) 固態基質的水分含量一般都非常低，必需依基質的物理性質與化學性質而定。而空氣要均勻通過基質很困難，通常會發生”渠道”效應。
- (3) 由於菌體的新陳代謝與生長產生熱，提高了基質的溫度，造成水分的流失。此現象使得固態發酵的控制更具挑戰性。
- (4) 固態發酵的基質通常是天然物質，如：穀類、大豆、農業的生物量、固體廢棄物等。有時產物是整個發酵基質，如傳統性食品：miso、natto、tempeh。
- (5) 一般使用在固態發酵的微生物為黴菌，固態發酵中，黴菌的菌絲型態與液態深層發酵之菌絲型態不同。這兩種菌絲有不同的生理活性，複雜的控制過程。
- (6) 對基質床進行攪拌非常困難，某些產物的活性對剪應力非常敏感，所以培養一般是靜態的，除了轉鼓反應器與流體化床發酵槽。

由於這些固態發酵的獨特性質引發了一些優點與缺點：以工業化生產胞外酵素包括、細胞酵素、果膠酵素等，使用了固態發酵或液態深層發酵。(Sato and Sudo, 1999)

2.4.3 固態發酵之優缺點

固態和液態發酵這兩種方法，其取舍需仰賴過程的成本與效率來決定，因此必需知道這兩種方法的優點與缺點並評估目的與經濟價值，審慎選擇發酵種類以達目標。以下是參考陳書豪(2006)所整理固態發酵優點：

- (1) 因為細菌的生長受到低水活性的限制，因此固態發酵較不易受到污染。
- (2) 固態發酵的填充容積比液態深層發酵高，因為固態發酵水含量低。
- (3) 如果產物必需從固態發酵中來萃取，只需要較少的溶劑與較低的回收成本。
- (4) 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，可將之乾燥做為動物飼料或肥料。

然而相對於液態發酵，缺發均勻性的攪拌就容易造成各種參數影響和變數，如溫度、水分與通氣量等等；在這些不均勻的條件影響下，固態發酵的缺點也顯而易見，以下次整理出來固態發酵的缺點：

- (1) 固體基質床的攪拌非常困難，造成基質床生理、物理、化學環境不均勻。
- (2) 微生物呼吸或代謝產生熱使得溫度控制非常困難。
- (3) 菌體生長與其它發酵參數的快速測量非常困難。
- (4) 微生物被限制在低水含量的基質上生長，較適合黴菌或其他菌絲真菌。
- (5) 目前缺少有效的方法可用來分析發酵的狀況，連續操作與自動化非常困難。
- (6) 由於固態發酵高產率的影響因子間的交互作用相當複雜。

2.4.4 固態發酵培養重要參數

(1) 水分含量、濕度(Moisture)

在固態發酵過程，基質的水分含量是一個很重要的考量。水分含量中的自由水明顯的依固態基質的本質而有不同。甚至許多固態發酵是在少許或是沒有自由水的情形下操作的。高水分含量會造成基質分子聚集在一起、通氣不良，或是缺氧環境。蒸汽處理過的米，是一種常見的基質，當水分含量超過30-35%(w/w)時會變的黏稠。最適水分的選擇取決於微生物與基質本身。對一般真菌而言，最適水分介於40%與80%之間。對於相同微生物而言，生長在不同基質，最適水分含量會明顯不同。大部分固態發酵的低水分環境較有利於酵母菌與真菌的生長。除了影響生長，水活性還會影響產物的生成。對某些例子而言，菌體生長與產物生成的水活性不同，最適水活性會依攪拌速率與培養溫度而不同。此外，發酵過程中，產物生成與基質水解皆會導致水活性改變。發酵過程中，常利用通入潮濕的空氣或間歇性的噴灑水來控制水活性，通入飽和氣體通常被使用來增加基質的水含量。通入氣體的相對濕度通常為60-80%。理想上，為了避免從未接菌基質流失或增加水分，必需將通入的氣體與基質的水活性一致。實際上，發酵會產生水分，為了達到蒸發冷卻，通入的氣體必需稍微乾於基質。通入氣體的溫度和濕度藉由空調系統來控制，溫度和濕度感測器可提供需要的數據，冷空氣藉由噴灑水或乾淨的蒸汽來調整濕度，或是提高溫度降低濕度到所需的值(賀士紅，2000)(Shuler and Kargi，1992)(Chisti，1999)。

(2) 溫度(Temperature)

固態發酵最大菌體濃度比典型的液態發酵(40-50 kg/m³)還低，但因為固態發酵只有少許的水，因此，每單位質量發酵物所產生熱量會使溫度會快速上升，因為固態發酵只有少許水能吸收熱量(平均單位熱容量遠低於水的)。因此，大規模發酵的溫度很難控制。代謝熱的移除有時變成最主要的限制，特別對於熱傳導困難的多孔性發酵物。發酵過程的溫度控制幾乎都是藉由蒸發冷卻的方法。因此，較乾的空氣提供較好的冷卻效果。控制空氣溫度，有時間歇性的噴灑冷卻水可防止基質脫水。對於大量堆積的基質而言，間歇性的攪拌可幫助熱移除。因此對於最佳生長期的菌體培養，溫度梯度問題的解決還是相當困難(Chisti, 1999)。

(3) pH

對於固態發酵而言，通常都沒有pH的控制。對於某些無菌過程，都將初始pH調到4或以下，可防止細菌污染。酵母菌與真菌通常都可以忍受較酸的環境。此外，大部分的基質都是很有效的緩衝劑，可防止發酵過程中pH劇烈變化。對於富含蛋白質的基質，特別是蛋白去氫作用很微小的基質，都是很好的緩衝劑。可使用尿素與硫酸氫結合當作氮源來維持基質的pH的穩定。富含蛋白質或胺基酸的基質中，去氫反應會造成pH上升。發酵過程中pH穩定，對某些發酵很重要。酵素與某些二次代謝產物的穩定性會受pH的影響，即使產生速率不受pH影響，但因為產物被破壞，所以總產率會下降。以 *Aspergillus niger* 培養在富含葡萄糖的糖莖甘蔗渣上生產pectinases，曾顯示類似的結果 (Chisti, 1999)。

2.5 蕎麥

2.5.1 蕎麥的介紹

蕎麥在世界各國均屬非重要糧食作物(minor crop)，主要栽培地區為歐亞溫帶地區。雖然近年來栽培面積顯著減少，但在俄羅斯、烏克蘭、波蘭與日本等國家仍屬重要作物之一。根據聯合國世界糧食組織(FAO)1998年統計資料，全球蕎麥栽培面積有2,733,437 ha，年產量2,676,836 tons，單位面積產量每公頃介於249~2,333 kg之間，平均1,055 kg/ha。主要消費國家為日本，除自產外每年尚自國外進口約十萬公噸的蕎麥；主要出口國家則為中國大陸、加拿大、美國及澳洲。由於蕎麥種實含優良營養價之蛋白質，具完備而平衡的必須氨基酸。因此，在尼泊爾山區、中國西南山區少數民族與東歐部份國家，為重要糧食作物之一。但由於蕎麥粉缺乏筋性，故必須與麵粉按比例混合，始能加工製成各類食品，如日本著名之蕎麥麵(soba)。在1860年代拓荒時期美國東北與中北部各州曾廣為栽培，以蕎麥種實做為家畜飼料及磨粉製餅作為早餐食品(Marshall,1982)。此外，蕎麥可作為蜜源作物，每英畝產量約40~60 kg，蕎麥蜜呈暗褐色，並具特殊氣味(Joshi,1995)。

2.5.2 蕎麥的生理活性成份與應用

近年來，利用天然食品作為機能性或保健食品在歐美先進國家已蔚為風潮，蕎麥種實富含蛋白質具高生物價(Biological value)含蛋白質與平衡的氨基酸組成份(Javornik,1983, Sure,1995)。蕎麥種實中蛋白質含量約13.5%。蛋白質利用值(NPU%；net protein utilization scores)為74%，高於小麥粉(47%)、玉米(42%)、糙

米(70%)，低於雞蛋(94%)見表2-3。脂肪含量平均約7.4%，主要為palmitic, oleic 和 linolenic acid 三種脂肪酸；碳水化合物72.9%，主要成份為澱粉 (Pomeranz,1983,1972)；鉀114 mg，鐵13.2 mg，磷282 mg(表2-2)。維他命B1與B2，分別為0.46 mg/100 g、0.11 mg/100 g。維他命E含量介於0.4-0.5 mg/100g(Javornik,1983；Yang,1992)。

表 2- 2 蕎麥種實成份平均值及其與其他作物種實成份間之比較

Name of food grains	Food energy	Moisture	Protein	Fat	Calcium	Iron	Phosphorus
		%	g	g	mg	mg	mg
Buckwheat	335	11.0	13.5	7.4	114	13.2	282
Amaranth	391	9.3	15.3	7.1	490	22.4	453
Maize	355	12.0	9.2	3.9	20	3.5	256
Rye	334	11.0	12.1	1.7	38	--	376
Wheat	333	12.0	13.3	2.0	41	10.5	372

Source: USDA data; Citations in Joshi and Rana (1995).

表 2- 3 蕎麥粉之蛋白質含量與利用率及與其他作物和食品之比較

Food	PC	NPU
	%	%
Buckwheat flour	12	74
Wheat Flour	10	47
Maize	10	42
Brown rice	7	70
Chicken egg	12	94
Beff	20	67
Chicken	18	65

Source: Citations in Namai (1992).張隆仁，1999)

2.5.3 苦蕎麥與普通蕎麥

蕎麥最常見的栽培種有二，一為普通種(common buckwheat) *F. esculentum* monch，其主要栽培見於中國、日本、東南亞、東印度、美國、歐洲及非洲等國，臺灣栽培之品種屬於普通種；另一為韃靼種(Tatarybuckwheat) *F. tataricum* Gartner，主要栽培於西伯利亞、中國東北、中國南部、蒙古、印度及鄰近各國、南韓、部分北韓地區、加拿大及美國北部等地區(曾勝雄，1991)。因為韃靼種蕎麥的粉末具有苦味，故被稱之為「苦蕎麥」，相形之下普通種被稱為「甜蕎麥」(曾勝雄，2004)。由分析結果獲知，韃靼種蕎麥種仁中蛋白質、脂肪及灰分含量比普通種蕎麥高出37.7%、10.7%及26.8%，澱粉含量較普通種蕎麥減少7.1%，且芸香苷及槲皮素含量比普通種蕎麥高出8.3倍及7.2倍。其鉀、鎂、鐵及錳含量比普通種蕎麥增加35.5%、32.8%、16.0%及17.2%，頗適合開發成保健食品(曾勝雄，2004)。芸香苷對血管具有擴張及強化作用。槲皮素具抗氧化作用，對於微血管破裂具有修補作用，故為高血壓患者之簡便食療品。

2.6 柑橘類果皮與葡萄、蘋果果皮

2.6.1 柑橘類果皮與葡萄、蘋果果皮概述

台灣種植柑橘種類很多，以鮮食為主要用途。新鮮水果經加工製成果汁及果醬等產品後，常常留下大量廢棄物包括果皮、種籽及果肉等。柑橘果皮曬乾為中藥的青皮及陳皮、取柚子果皮內層做成蜜餞、柚子及葡萄柚取出肉後內包中草藥做成羅漢果或八仙果、檸檬切片醃漬乾燥泡茶飲用、或浸泡食用醋製成檸檬醋等，但使用量非常少，故所剩廢棄殘留量很多(蔡榮哲，2005)。

本草綱目記載：「柑橘，其味甘者入肺，酸者聚痰、止咳、消渴、開胃、除胸中膈氣。」工作緊張繁重的上班族多吃柑橘類，能使精神鬆弛，減少壓力；而常吃脂肪食物或長期吸菸喝酒的人，也能起到消解作用。柳橙在本草綱目及散史傳之記載：主要的藥理機制包括：行氣健脾，祛痰平喘；另外對於擴張冠狀動脈，降低膽固醇，促進膽汁排出等臨床功能。(陳俊仁，2008)

2.6.2 柑橘類果皮與葡萄、蘋果果皮的生理活性成份與應用

近年來柑橘果皮的再利用非常受到重視，主要原因為柑橘類果皮中含有：

- (1) 果膠物質含量高為萃取果膠最佳原料 (Chang et al.)。
- (2) 精油 (Essential oil) 也稱為芳香油，通常存在植物的油腺或腺毛中，有些則溶於樹脂而填塞於植物體的空腔中，這些精油並非單一化合物，而是由松烯

(帖, terpenes) 或其衍生物之混合物所組成 (劉賢祥, 1992)。精油一般只溶於有機溶劑不溶於水, 在常溫下是液體, 冷卻後則可析出結晶, 因此, 亦稱為「腦」, 例如樟腦及薄荷腦等。精油除做為香料外, 亦可作為強心劑、驅蟲劑、興奮劑等, 另外在活血、止痛、化癥及治療酸痛等亦具有相當的療效 (李勉民, 1995)。精油萃取的技術經過長期的發展已有顯著的改進。常見的方法有(一)油萃法 (enfleurage);(二)水蒸氣蒸餾法 (steam distillation); (三)溶劑萃取法 (solvent extraction); (四)冷壓法 (expression)及(五)超臨界二氧化碳萃取法 (supercritical fluid carbon dioxide) 等 (葉安義等人, 1992)。精油中主要成份檸檬烯 (Limonene) 具有預防癌症, 抑制癌細胞蔓延, 包括紫外線所引起的皮膚癌及乳癌。精油為良好的抑菌劑, 如真菌、桿菌類等, 對於蒼蠅、德國蟑螂及對危害穀類作物之象蟲有擊昏及致死效能, 且能影響蟲卵及蟲蛹。(陳吉村, 2003)

- (3) 酚類化合物是植物體內主要的二次代謝產物, 化學上的定義為結構中帶有一個或數個OH 基的芳香環及其延伸物。根據碳骨架結構分類, 主要可分為含量較多的酚酸類 (phenolic acid)、類黃酮 (flavonoid) 和含量較少的二苯乙烯 (stilbene) 和木聚糖 (lignan)。物具有特殊的生物活性如抗氧化作用及清除自由基的能力 (Medina, 1999; Lopes, 1999; 吳明穎, 2009)。
- (4) 類黃酮素為維他命 P, 1935 年匈牙利籍科學家艾伯特·聖喬其 (Albert Szent-Györgyi), 從檸檬皮中分離出一種類黃酮化合物, 稱之為「檸檬素」

(citrin)。研究發現，這種物質有強化血管壁的作用，效果比純維生素 C 更好。聖喬其認為，他又發現了一種人體不可缺少的維生素，於是把檸檬素改名為「維生素 P」。對人體主要機能包括抗氧化、抗癌、抗發炎及降低血管疾病等功能。類黃酮可在水果，蔬菜，堅果類，可可，茶以及酒中發現；類黃酮也是提供這些蔬果顏色的來源，所以它也為植物色素的一種 (Kandaswaani, 1994)。除了具有優異的抗氧化能力以外，許多研究顯示它在抗病毒、抗發炎、抗過敏或抗致癌物也都有很好的效果(Torel et al., 1986)，例如屬黃酮醇 (flavon-3-ols) 之槲皮素 (quercetin) 具有很強的抗氧化性，茶葉中含量豐富的黃烷(flavan-3-ols)也有極高的抗氧化力(Rice-Evans et al., 1997)。

第三章 實驗架構、方法與材料

3.1 實驗架構

實驗架構以樟芝(BCRC 35396)做為菌種做培養，目標提高樟芝菌絲體代謝產物-三萜類化合物質。根據楊于萱(2010)的研究指出，使用蕎麥當做基質可以在樟芝固態發酵的情況下，有最好的粗三萜含量，其次是燕麥、小麥及薏仁；用蕎麥做為固態培養基質，尋找足以取代牛樟木段木培養的添加物；經由圖 A(圖 2-1 天然物合成的三大徑圖)認為天然物代謝物質，基本上都從單糖類吸收分解成碳源後進入代謝路徑，再進入不同的代謝路徑如:酚酮類代謝路徑、萜類代謝路徑或多醣體的代謝路徑等，從圖 B(圖 2-2 萜烯生物合成途徑)配合文獻討論，認為藉由添加低分子量的萜類化合物質，可以促進或是刺激高分子量的萜類產生。因此添加物尋找總類黃酮與總多酚較高且半萜與倍萜較高的柑橘類果皮做添加，測試不同種類與變化濃度後，並使用水淬處理添加物分析成份變化。經由結果與文獻討論認為酚酮類化合物對於樟芝菌絲體培養影響較大，因此使用酚類添加物含量較高但粗萜類含量較低的葡萄與蘋果果皮做添加，並分析結果並討論。

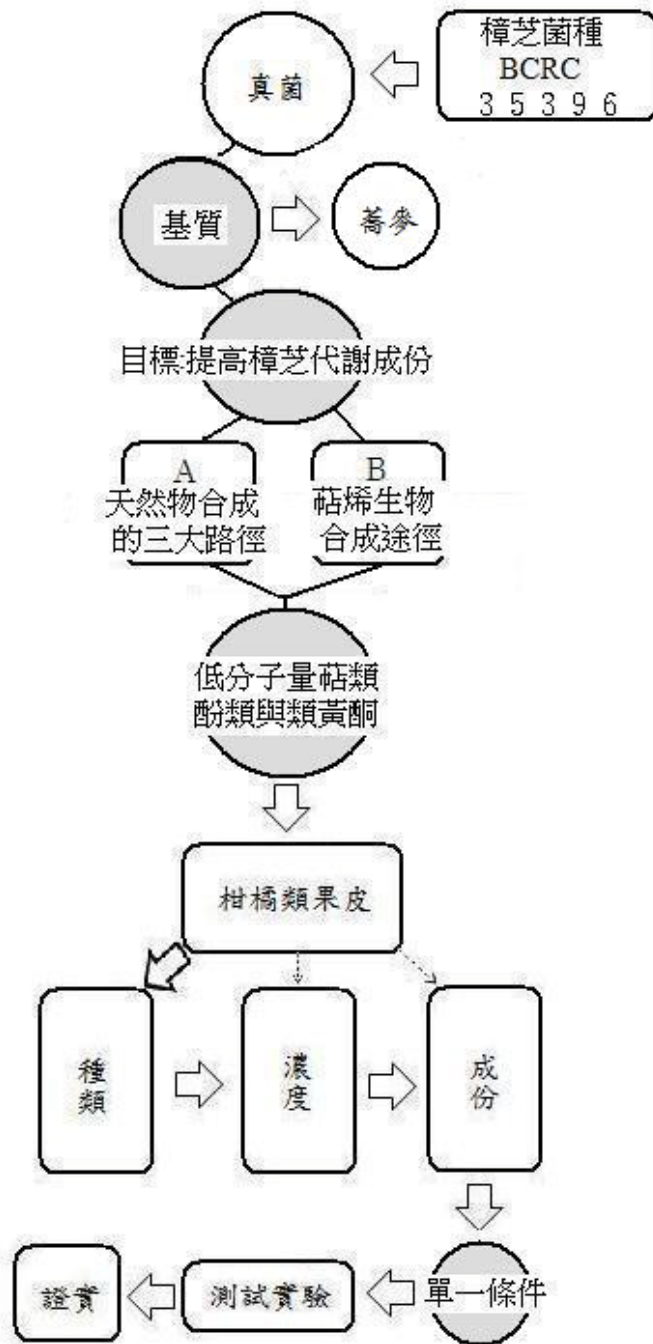


圖 3-1 實驗架構圖

(圖中 A 為圖 2-1，天然物合成的三大路徑； B 為圖 2-2，萜烯生物合成途徑)

經過實驗結果後發現酚類化合物與粗萜類化合物在代謝過程中可能有互相影響的效果存在，因此整理文獻後得由圖3-2代謝路徑圖(Dorothea, 2006; Richard, 2001; Dubey et al, 2003; 郝宏蕾等人, 2002; 龔治等人, 2010)，從文獻中對於代謝路徑的解說得知在代謝途徑中總類黃酮屬於總多酚類化合物的一種，而柑橘類果皮中總多酚通常是總類黃酮含量的八到十倍(鄭富元等人, 2010)。萜類則經由葡萄糖代謝後經由acetyl CoA 進入MVA pathway路徑，或由glycolytic pathway代謝成Pyruvate和中間產物G-3-P進入MEP pathway代謝成萜類。總多酚與類黃酮則經由Shikimic acid pathway莽草酸途徑產生，因此推測對於樟芝菌絲體代謝產物而言總類黃酮、總多酚類的添加物是會抑制本身菌絲體代謝生成，並促進粗三萜產生的兩種不同代謝路徑產物，希望能藉由實驗來應證此推測結果。

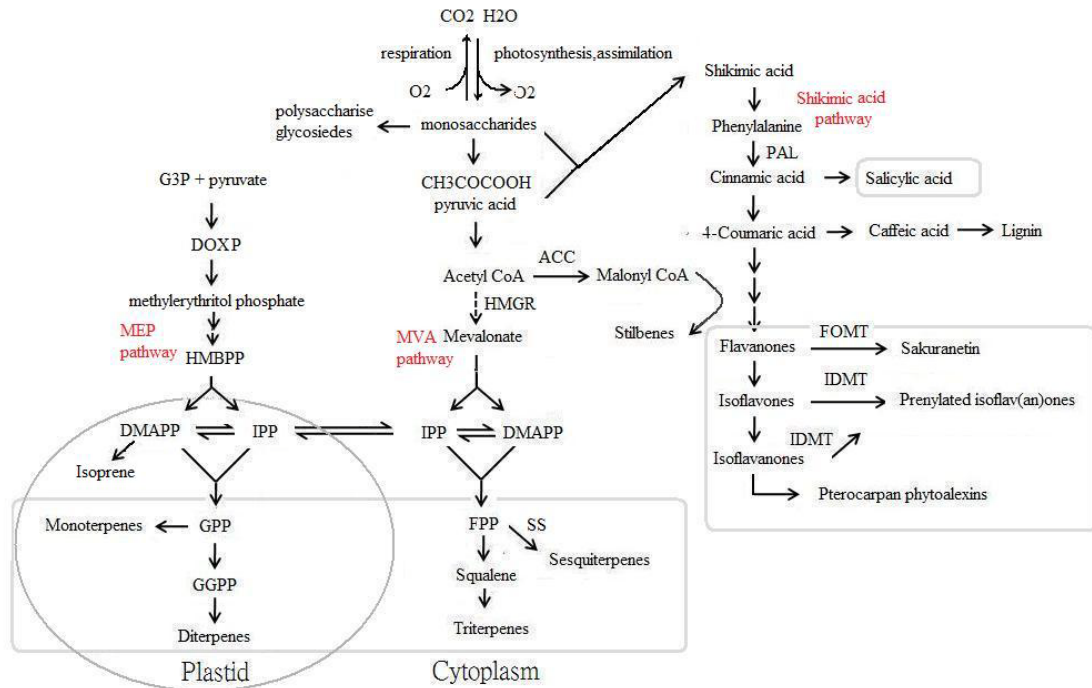


圖 3- 2 代謝路徑圖

(Dorothea, 2006; Richard, 2001; Dubey et al, 2003 々 郝宏蕾等人, 2002; 龔治等人, 2010)
 (ACC, acetyl CoA carboxylase; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; DOXP, 1-Deoxy-D-Xlulose-5-P;
 DXPS, 1-deoxy-xylulose 5-phosphate synthase; FOMT, flavanone 7-O-methyltransferase;
 FPP, farnesyl diphosphate; GPP, geranyl diphosphate; G-3-P, Glyceraldehyde-3-phosphate;
 GGPP, geranylgeranyl diphosphate; HMBPP, 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate;
 HMGR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase; IDMT, isoflavone or isoflavanone dimethylallyl
 transferase; IPP, isopentenyl diphosphate; MEP pathway, methylerythritol phosphate pathway;
 PAL, L-phenylalanine ammonia-lyase; SS, sesquiterpene synthase; 葡萄糖經由代謝路徑產生 Acetyl
 CoA, 進入 mevalonate pathway 代謝成倍半萜與三萜類, 而另外一邊經過 Pyruvate 和 G-3-P 合成
 DOXP 進入 MEP pathway 進而代謝成半萜、單萜與二倍萜類化合物。)

3.2 實驗方法

3.2.1 添加物處理

取柑橘類果皮，柳丁、葡萄柚、柚子、金桔、檸檬五種經榨汁後的食物廢棄果皮，不分離果皮內部殘渣和果肉與果籽的情況下，使用 60°C 烘箱烘乾 48 小時；而葡萄與蘋果果皮同柑橘類果皮處理方法。烘乾使用磨粉機將果皮磨成粉末，使用封口袋與乾燥包保存樣品避免空氣接觸，冷藏 4°C 備用。

3.2.2 不同蕎麥基質對於樟芝菌絲體生成粗三萜的影響

目的： 使用不同蕎麥培養樟芝菌絲體培養後分析樣品含量，尋找最適合樟芝菌絲體的蕎麥基質。

方法： 使用有殼苦蕎麥、無殼苦蕎麥、無芯苦蕎麥殼、台灣產蕎麥四種基質各 28 克倒入 250ml 三角錐形瓶中做培養基質，並調整含水量 45% 後滅菌；使用種瓶培養 14 天後接菌量 10%，溫度 25°C 培養 16、20、24、28 天，取樣後分析粗萜類變化。並將基質添加牛樟芝粉末後觀察培養後差異，討論是否添加牛樟木粉末後對於樟芝菌絲體不同差異的影響，並使用固定基質重量與含水量做為培養條件。

3.2.3 不同果皮添加對樟芝菌絲體代謝產物的影響

目的： 使用各種柑橘果皮，目的以添加低分子量的萜類和總多酚類、總類黃酮類含量較高的天然物，以影響代謝路徑的方法影響樟芝菌絲體代謝物質

產量。

方法：以各種食用後果皮如：檸檬、柚子、葡萄柚、金桔與柳丁果皮經過烘乾處理，每瓶添加一克後使用有殼蕎麥當作培養基的 250ml 三角錐形瓶中，調整含水量 45%，並滅菌等待冷卻，使用種瓶培養 14 天後接菌量 10%，溫度 25°C 培養 16、20、24、28 天，取樣後分析代謝成份變化。

3.2.4 不同濃度添加對於樟芝菌絲體代謝產物的影響

目的：使用實驗結果採用金桔、柚子與葡萄柚果皮三種添加效果最好的果皮，調整濃度後添加培養，試從結果找出金桔果皮對於樟芝菌絲體的抑制濃度和影響，找出最適合添加的果皮濃度。

方法：使用金桔、柚子與葡萄柚果皮烘乾後添加到以有殼蕎麥做為培養基的 250ml 三角錐形瓶中，培養狀況最好的金桔使用 0.5g、1g、2g、4g、8g、12g 六種添加量做培養，柚子和葡萄柚果皮則使用 0.5g、1g、2g 三種量添加量做培養，調整含水量到 45%，使用種瓶培養 14 天後接菌量 10%，溫度 25°C 培養 16、20、24、28 天，取樣後分析代謝成份變化。並以同樣條件使用無添加、1g、2g、4g、8g、12g，培養後觀察菌絲體培養結果做參考。

3.2.5 金桔水淬液對於樟芝菌絲體代謝產物的影響

目的： 將添加效果最好的金桔果皮經由水淬處理後做為添加組，培養測試不同成份對於樟芝菌絲體培養後代謝產物的影響。

方法： 將烘乾後的金桔果皮粉末添加 10ml 蒸餾水，經過超音破震盪 60min 萃取，離心取上清液添加入固態培養瓶中，並調整含水量調整到 45% 做為水淬液組(Water extract); 將殘渣取出後當作添加物並調整含水量為 45% 做為水不易溶組(Kumquat pomace)，配上空白無添加組(Control)與添加 1 克金桔果皮粉末(Kumquat powder)兩種，分別當做控制組和對照組。四組皆使用有殼蕎麥當作培養基的 250ml 三角錐形瓶中，調整含水量 45%，並滅菌等待冷卻，使用種瓶培養 14 天後接菌量 10%，溫度 25°C 培養 16、20、24、28 天，取樣後分析代謝成份變化。並將金桔組與控制組從 0 天開始在 0、4、8、12、16、20、24、28 取樣並分析觀察初期添加物對於樟芝菌絲體的影響。

3.2.6 果皮總多酚對於樟芝菌絲體代謝產物的影響

目的： 經過實驗發現總多酚類與總類黃酮類有可能對於樟芝菌絲體代謝產生粗三萜類有影響，因此尋找粗萜類較少而總多酚類與總類黃酮類含量較高的果皮做為添加物，培養後分析樟芝菌絲體代謝產物的影響

方法： 經由文獻和分析結果顯示葡萄果皮與蘋果果皮符合實驗目的，因此使用

蘋果與葡萄果皮烘乾後磨粉做添加物，使用有殼蕎麥當作培養基的
250ml 三角錐形瓶中，調整含水量 45%，並滅菌等待冷卻，使用種瓶培
養 14 天後接菌量 10%，溫度 25°C 培養 0、4、8、12、16、20、24、28
天，取樣後分析代謝成份變化。

3.3 菌種培養與保存

3.3.1 樟芝菌株

本實驗使用樟芝菌株為 *Antrodia cinnamomea* (BCRC 35396)，購自食品工業發展研究所生物資源保存中心(Bioresource Collection and Research Center)，菌株以生資中心所提供之配方(Glucose 2% , Malt extract 2% , Peptone 0.1% , Agar 2%) 做為斜面培養基，在 25 °C 培養箱生長至適當程度後，之後置於 4 °C 冰箱中保存。

3.3.2 菌種培養與保存

本實驗以試管斜面保存菌種。配製 Malt extract 2% 、Glucose 2% 、Peptone 0.1% 、Agar 2% 作為斜面培養基，接菌時取一白金鈎，將樟芝菌種刮取小塊移植至斜面試管，標示後放入 25°C 培養箱培養，待其長滿後放入 4°C 冰箱保存備用。

3.4 培養皿平面培養與接菌活化

以 Malt extract 2% 、Glucose 2% 、Peptone 0.1% 、Agar 2% 作為培養皿平面培養基，接菌時取一已長有樟芝菌絲之斜面菌種，以白金鈎刮取一小塊移至空白培養皿中央，之後放入 25°C 培養箱中靜置活化培養。

3.4.1 種瓶的製備

實驗種菌所採用的液態培養基為食品工業發展研究所提供之基礎培養基配方，其組成成份為Malt extract 2%、Glucose 2%、Peptone 0.1% 並利用0.1 N HCl 及0.1 N NaOH 將培養基 pH 值調整為 5。

培養基滅菌過後，取生長 30 至 35 天的樟芝菌絲之平面培養皿，用鋁片製成的切割器切 4 個單位的菌絲塊（每塊單位面積 0.5 cm × 0.5 cm），以白金鉤將菌絲塊接入液態培養基中，並置於 25°C 迴轉恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 14 天做為種菌。

3.4.2 三角瓶固態培養試驗

樟芝三角瓶固態培養所採用之培養基，為本實驗室於先前研究中所探討出來的最佳穀物蕎麥（楊，2010），在 250 ml 三角瓶內分別加入 28g 代殼苦蕎麥做為培養基，並控制其水份含量為 45%，經過滅菌後冷卻至室溫即可接菌。

將基礎培養基培養 14 天後的種菌，以 polytron 均質機打碎菌絲體後，接種量為 10 ml 接至固態培養基進行培養。接菌後置入 25°C 恆溫培養箱中，培養到目標天數後收集發酵物，以 60°C 烘箱烘乾 48 小時後磨粉並使用封口袋與乾燥包隔絕空氣與溼氣並冷藏於 4°C 保存備用。

實驗認為樟芝的生長速率比液態發酵來得緩慢，且使用穀物當作培養基的情況下，菌絲會同時從表面和內部開始生長，培養開始的前幾天皆無法肉眼發現有

明顯變化，所以選擇從生長第 16 天開始測量各種成份，往後則是每 4 天取樣一次至第二十八天為止。

3.5 實驗藥品和儀器

3.5.1 實驗藥品

表 3-1 實驗藥品清單

藥品名稱	廠牌
Corn starch	日正
YM Broth	DIFCO
Peptone	DIFCO
Malt extract	MERCK
Methanol	ECHO
99.5% Ethanol	ECHO
Folin-ciocalteu'phenol reagent	SIGMA
Gallic acid	SIGMA
Chloroform	TEDIA
3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone-hydrochloride hydrate	SHOWA
97%	
Ammonium amido sulfate	SHOWA
Iron(III) chloride hexahydrate	SHOWA

Sulfuric acid scharlu	SHOWA
Potassium Bisulfate	SHOWA
Sodium ritrite	SHOWA
Sodium hydrogen carbonate	SHOWA
Sodium carbonate	SHOWA
Aluminium(III)chloride hexahydrate	SHOWA

3.5.2 實驗儀器與設備

表 3-2 實驗儀器清單

儀器設備	型號	廠牌
pH meter	Cyberscan pH510	美國 EUTECH
電磁加熱攪拌機	C-MAG HS7	德國 IKA
高壓滅菌釜	HI-340	台灣宏霖
無菌操作台	JW-4N	台灣亮盛
試管振盪器	MSI minishaker	德國 IKA
迴轉式震盪培養箱	LUS-150	台灣亮盛
往復式震盪恆溫水槽	OSI-500	台灣健鑫
分光光度計	GENESYS UV10	美國 Thermo
微電腦蒸餾水製造機	WSC044	英國 FISTREEM
超純水製造機	Simplicity	美國 Millipore
超音波震盪機	5210	美國 BRANSON
高速中型離心機	Universal-32R	德國 Hettich
烘箱	LO-150	台灣亮盛

3.6 樣品分析

3.6.1 樣品甲醇萃取液

取樣品粉末 100mg，加入 10ml 甲醇震盪 30 分鐘，使用 8000rpm 10min 離心取上清液保存在 4°C 冰箱，及為甲醇萃取物。

3.6.2 固態發酵菌絲菌體濃度測定

在本實驗參考 Tsuji and Hoshino(1969)與陳書豪(2007)使用的葡萄糖胺 (glucosamine)分析方法，但會同時分析到苦蕎麥有殼基質本身和樟芝菌絲體本身產生的葡萄糖胺產量，而基質本身的葡萄糖胺含量約為 2.9 g/g sub.；因此無法精確的分離菌絲體和基質本身的葡萄糖胺，但經實驗證明基質葡萄糖胺含量不隨時間所變動，因此可將葡萄糖胺的變化視為樟芝本身代謝生成量和樟芝菌絲體分解苦蕎麥基質之影響。

Part.1 酸水解處理

- 將 0.3g 樣品和 3ml 72 % H₂SO₄ 在 25 °C、130rpm 的反應 30min。
- 再以 27ml 蒸餾水稀釋，將水解液在 121°C 加熱 2hr。
- 再將水解液以 10M 與 0.1M NaOH 中和到 pH=7，使用葡萄糖胺比色法。

Part.2 葡萄糖胺比色法

- 各別入 1ml sample 和 5% KHSO₄ 與 5% NaNO₂，搖晃 15min，確保去

氮反應完全。

- 加入 1ml 12.5% $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$ ，以移走過多的亞硝酸，並搖晃 5min。
- 加入 1ml 0.5% MBTH，熱水煮沸 10 分鐘。
- 加入 1ml 0.5% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，反應 30min。

將上述反應後之樣品以分光光度計於 650nm 波長測光值。

由 N-acetyl glucosamine 標準曲線換算萃取液中物質含量，單位為 g/mL

3.6.3 三萜之分析

利用三萜對於有機溶劑與水有不同溶解度的現象，使用不同階段溶液淬取與分離雜質，目的淬取出發酵物中粗三萜類的含量(參考 Tang and Zhong,2002)。

1. 取乾燥樣品 100mg，加入 50% 乙醇 3ml 超音波震盪萃取 30 分鐘，
2. 使用 8000rpm 10min 離心取上清液，
3. 將殘渣再加入 50% 乙醇 3ml 超音波震盪萃取 30 分鐘後取上清液，
4. 合併上清液共 6ml 烘乾，
5. 將乾燥物加 3ml 水回溶並加入 3ml 99.99% 氯仿萃取 30 分鐘，
6. 取下層液體加入 3ml 5% NaHCO_3 震盪 30 分鐘，
7. 調整液體 pH 至 3 以下，取下層液體減壓濃縮至乾，加入 2ml 95% 乙醇，
8. 在波長 245nm 下測其吸光值。

由 ganoderic acid 標準曲線換算萃取液中粗三萜類物質含量，單位為 mg/mL。

3.6.4 總多酚分析

利用酚類化合物，在鹼性的環境下能與Folin-Clocalteu's phenol 試劑形成可溶性的藍色化合物，在730 nm 有最多的吸收值，吸收值越大，表其中所含的酚類化合物越多，以Gallic acid為標曲線，對照樣品中的酚類化合物含量多寡。(鄭富元等人,2009；楊，2010)

1. 取0.3 ml的 98% 甲醇萃取液，
2. 加入6 ml 2% 的 Na_2CO_3 ，均勻混和反應2分鐘之後
3. 再後加入0.3ml 50% Folin-Clocalteu's phenol reagent反應30分鐘，
4. 在730 nm 測其吸光值。

由Gallic acid標準曲線換算萃取液中總多酚類物質含量，單位為mg/mL。

3.6.5 總類黃酮分析

利用甲醇淬取樟芝菌絲體發酵物，目的將求出發酵物中類黃酮含量，依此藉由此含量可瞭解發酵物抗氧化活性與生理活性成份效果。(鄭富元等人,2009)

1. 取萃取液(甲醇: 樣品粉末 10ml : 0.1g 震盪 30 分鐘) 0.5 mL，
2. 加入 1.5 mL 之 95 % 乙醇、0.1 mL 之 10 % $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 、
3. 0.1 mL 之 1 M 醋酸鉀 (CH_3COOK)、2.8 mL 之去離子水，
4. 混合均勻後於室溫下靜置 40 分鐘後，
5. 測定波長 415 nm 之吸光值。

由槲皮素 (Quercetin) 標準曲線換算萃取液中總黃酮物質含量，單位為 mg/mL。

第四章 實驗結果與討論

4.1 不同蕎麥基質對於樟芝菌絲體代謝產物的影響

實驗結果發現，有殼苦蕎麥在無添加物的情況下樟芝菌絲體產生粗三萜的含量達 18.03 mg/g sub.，而無殼苦蕎麥粗三萜含量只有 1.95 mg/g sub；添加牛樟木粉末後有殼苦蕎麥提升到 31.64 mg/g sub.但無殼苦蕎麥只提升到 9.04 mg/g sub。結果顯示在適合樟芝菌絲體的基質時，添加物質的效果也會明顯提升。

根據實驗結果得圖 4-1，得知樟芝菌絲體在第 20 天前快速生長，但是在 20 天後葡萄糖胺成份開始下降；這種培養時出現先高後低的現象，推測是因為蕎麥接菌前會經過滅菌的步驟，此步驟會同時促使蕎麥粒吸水膨脹撐破蕎麥殼並軟化蕎麥殼與蕎麥仁，使得其澱粉與殼中纖維素更容易被分解利用。因蕎麥基質本身含有一定的葡萄糖胺含量，且研究發現基質葡萄糖胺含量在 28 天內幾乎不隨時間變化。因此可以將 0 天以後的葡萄糖胺含量變化，視為樟芝菌絲體代謝產生的量與分解基質的變化質。

經由實驗圖4-5、圖4-6與圖4-7，發現牛樟芝菌絲體明顯對於有殼苦蕎麥有較高的適應性，無殼蕎麥培養狀況較差，而台灣產無殼蕎麥則無法順利成長且容易汙染。由圖4-3 與 圖 4-4使用無芯的苦蕎麥空殼當作培養基的情況下，發現牛樟芝菌絲體幾乎無法生長，因此研究認為只使用殼做培養基的情況下，第一時間無直接可利用的碳源和養分，樟芝菌絲體生長狀況不佳，因此無法將殼分解成可

利用養分。從圖4-2，得知使用有殼蕎麥和無殼蕎麥兩種基質，將樟芝菌絲體培養後三萜產量較高的有殼蕎麥做樟木粉添加，效果比無殼蕎麥添加牛樟木粉好。根據此實驗結果，比較文獻得知，韃靼種蕎麥(苦蕎麥)除芸香苷及槲皮素含量比普通種蕎麥增加8.3倍及7.2倍外，鉀、鎂、鐵、錳及鋅之含量亦比普通種蕎麥增加 35.5%、32.8%、16.0%、17.2% 及 2.7% (曾勝雄，2004)，推測都有可能是促進樟芝菌絲體生長的原因之一。但經由文獻結果顯示菌絲生長以及子實體發育之間，並未有正比的關係(高郁婷，2004)，因此必須配合分析粗三萜量才可證實在添加劑的影響方面是否有確實增加樟芝菌絲體產生三萜總量。而根據施玉蘭(2009)的實驗結果中發現，使用糙米與麥粒兩種不同基質配合牛樟木屑浸出液培養樟芝菌絲體，生長狀況較佳的糙米機質添加牛樟木屑浸出液後，也比以麥粒為基質添加浸出液有更好的效果，因此都證明使用較適合樟芝菌絲體成長的基質，有助於添加物影響的實驗。

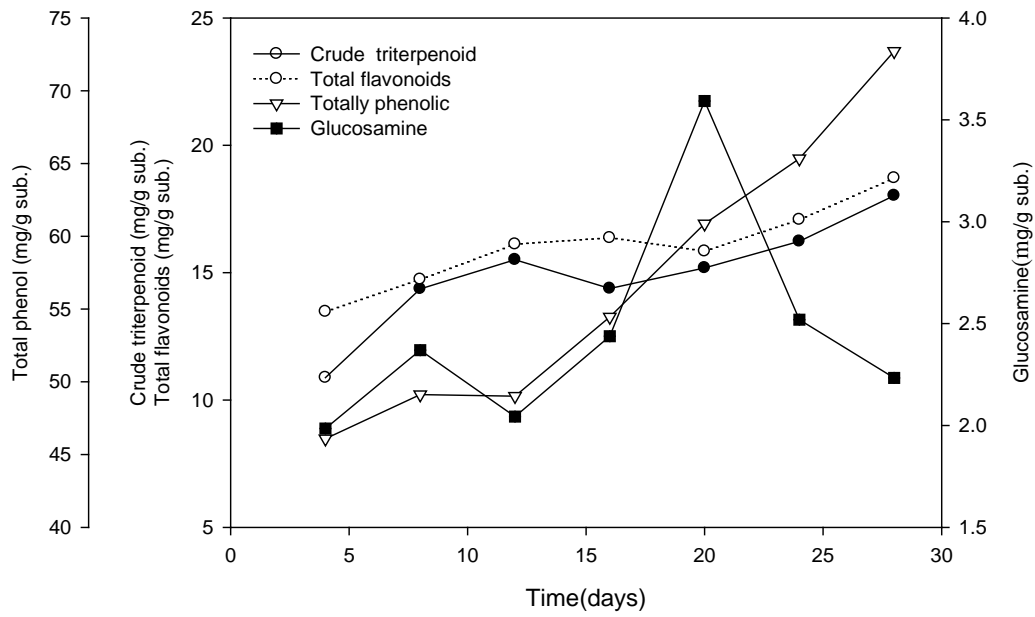


圖 4-1 樟芝菌絲體在有殼苦蕎麥為基質的代謝產物變化

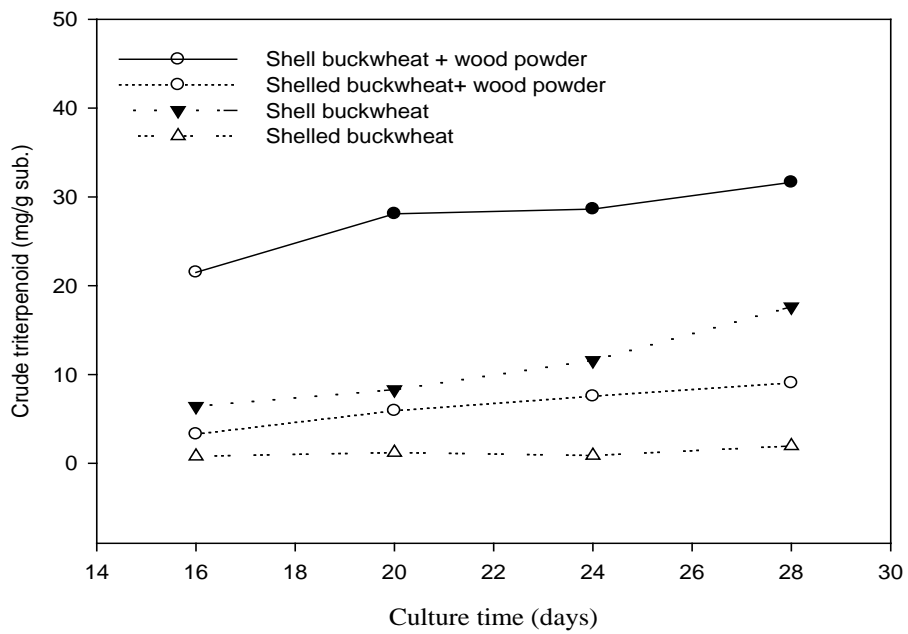


圖 4-2 不同苦蕎麥基質對於樟芝菌絲體產粗三萜的影響

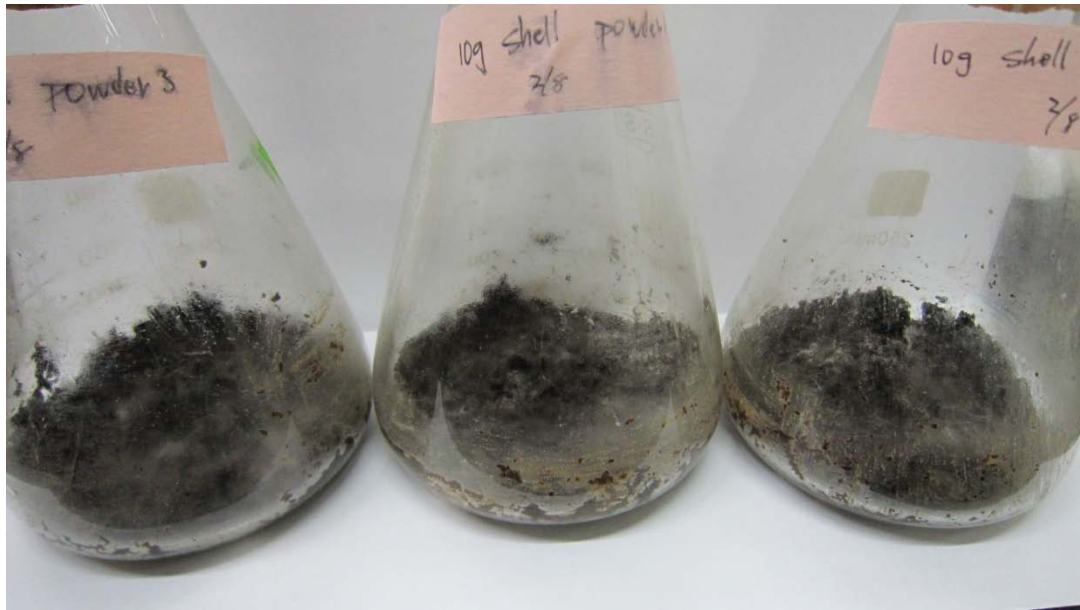


圖 4-3 使用磨粉無芯蕎麥殼後培養 28 天後培養狀況

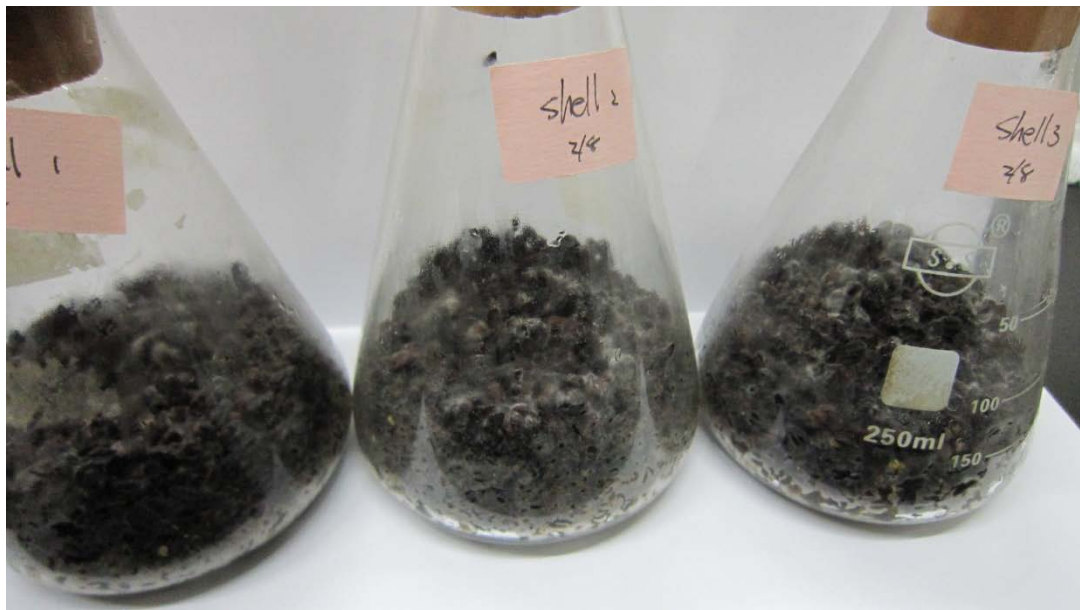


圖 4-4 使用無芯蕎麥殼培養 28 天後培養狀況



圖 4-5 使用有殼蕎麥粉末培養第 28 天

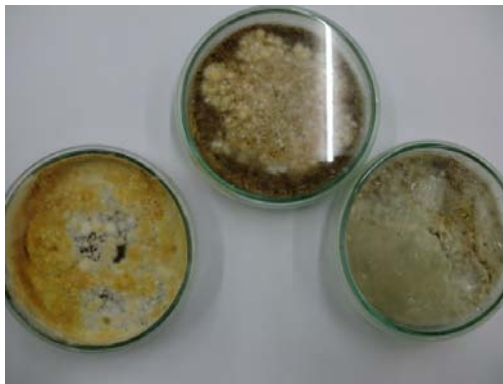


圖 4-6 使用無殼蕎麥培養第 28 天



圖 4-7 使用台產普通蕎麥培養第 28 天

表 4-1 不同苦蕎麥基質對於樟芝菌絲體發酵的影響

Items		Max.Crude Triterpenoid (mg/g sub.)
	Shell+ wood powder	31.64
Buckwheat	shelled+ wood powder	9.04
	Shell	18.03
	Shelled	1.95

*使用 250ml 錐形瓶，蕎麥基質重 28g 並調整含水量 45% 滅菌後冷卻至室溫；樟芝菌種取自生物資源保存中心，編號 BCRC35396，培養 14 天後均質，每瓶接菌量 10% 於 25°C 恆溫培養箱培 28 天。樟木粉末添加 1g，採用廠商提供牛樟木(*Cinnamomum kanehirae Hayata*)粉末。

4.2 不同添加物對樟芝菌絲體代謝產物的影響

實驗採用柑橘類果皮金桔、葡萄柚、柚子、柳丁、檸檬果皮烘乾後磨粉，每瓶添加 1 g 添加物，培養 16、20、24、28 天後取出樣品烘乾作分析實驗。實驗結果發現葡糖糖胺在第 20 天都出現最大值，產量最高前三者為檸檬、柳丁、柚子，分別為 3.77、3.61 和 3.17 mg/g sub.而超過 20 天後葡萄糖胺含量開始下降。而樟芝代謝產物粗三萜類都是持續上升在第 28 天有最高值，金桔添加達 28.86 mg/g sub.，而葡萄柚和柚子則有 22.80 和 21.54 mg/g sub.的含量。比較無添加結果發現不論添加何種果皮都會降低總多酚和總類黃酮兩種代謝產物含量，根據結果顯示到金桔、葡萄和柳橙三種添加培養的總類黃酮含量隨著天數逐漸增加，而柚子和檸檬則是在第 20 天與第 16 有最高總類黃酮含量。總多酚含量則是除了葡萄柚添加在 20 天有最高值 57.72 mg/g sub.外，其餘都是在 28 天出現最高值。

由圖 4-8 到 4-12 得知葡萄糖胺在添加葡萄柚、柚子、葡萄柚三種粉末對於樣品葡萄糖胺總量在 16 到 28 天的情況下都有抑制作用產生。在粗三萜的分析結果得知，五種添加物都對樟芝菌絲體產生的粗三萜總量有幫助，金桔、葡萄柚、柚子甚至含有 60.1%、26.5%、19.5% 的增益效果。可以明確得知，柑橘果皮添加物對於樟芝菌絲體發酵苦蕎麥產生粗三萜類是有效的方法。但是相對於總多酚類和總類黃酮兩種成份，不論何種添加物都有減少趨勢。對於本次實驗結果，推測可能為兩種情況；一種是柑橘類添加物對於類黃酮和總多酚類產生有抑制現象，因此使用樟芝菌絲體發酵固態苦蕎麥基質的情況下，添加柑橘類果皮粉末會抑制

樟芝菌絲體產生類黃酮和酚類。第二種情況，推測柑橘類果皮添加物可以促使樟芝菌絲體吸收並分解類酚類和類黃酮產生別種二次代謝產物。

由表4-2可以得知本次柑橘類果皮粉末添加實驗，以每瓶 1 g 的添加量培養結果，以添加金桔果皮粉末有最高粗三萜含量 28.86 mg /g sub.與總類黃酮含量 16.92 mg /g sub.，而柳丁有最高的總多酚含量 66.98 mg /g sub.。比較實驗結果認為，其中三種柑橘類果皮葡萄柚、柚子和金桔對於樟芝菌絲體產生三萜有較佳的效果。配合牛樟木粉末的對應實驗結果明顯發現柑橘果皮添加物對於樟芝菌絲體生長有影響，且會有抑制濃度的產生，因此將測試各種添加物並且測試抑制濃度。

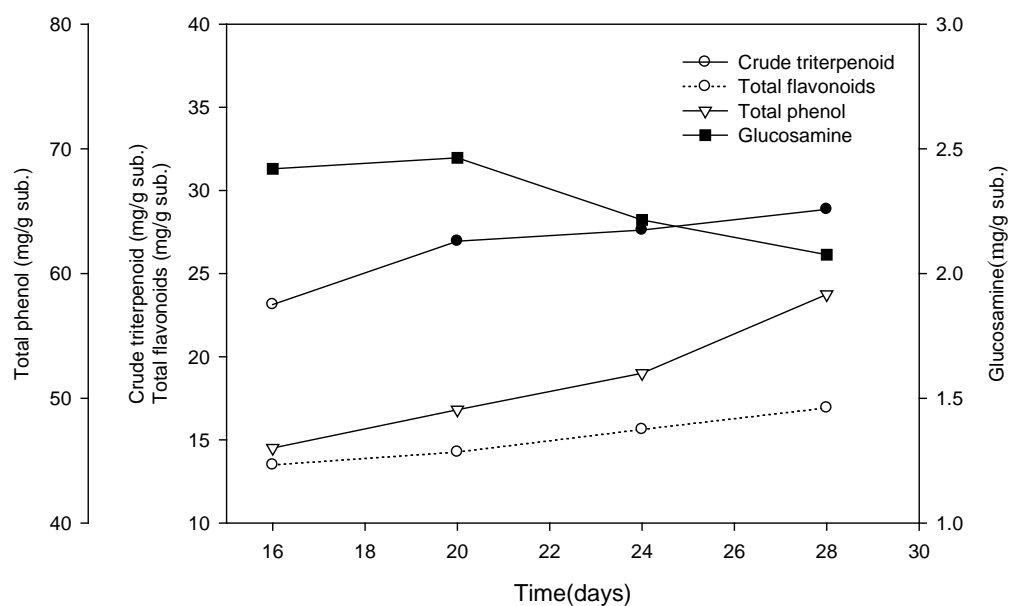


圖 4-8 金桔粉末對樟芝菌絲體產生有效物質的影響

*使用 1g 金橘果皮粉末添加入 28g 苦蕎麥基質後，調整含水率 45% 接菌培養後分析樣品。

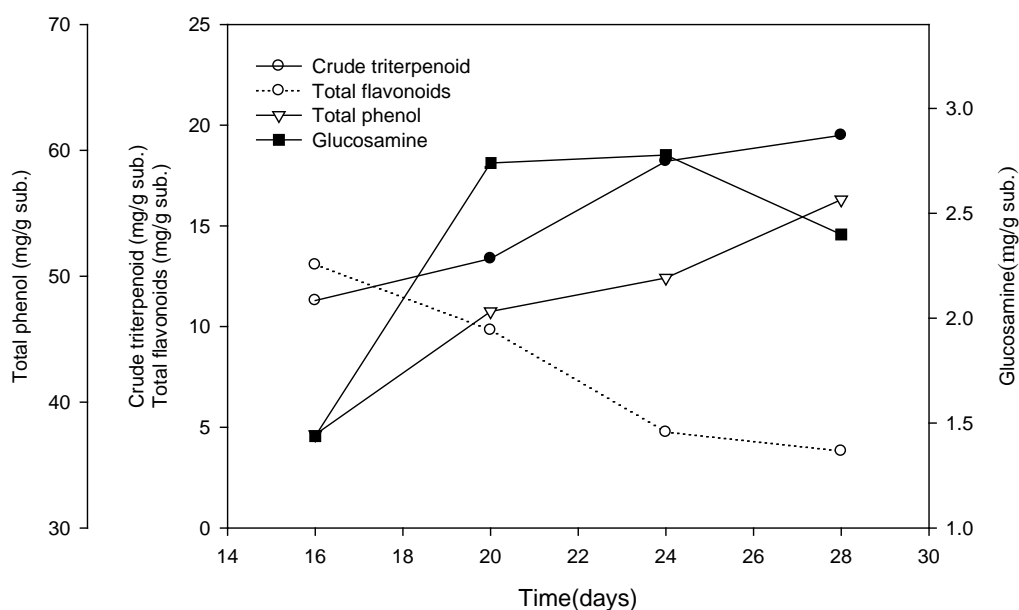


圖 4-9 檸檬粉末對樟芝菌絲體產生有效物質的影響

*使用 1g 檸檬果皮粉末添加入 28g 苦蕎麥基質後，調整含水率 45% 接菌培養後分析樣品。

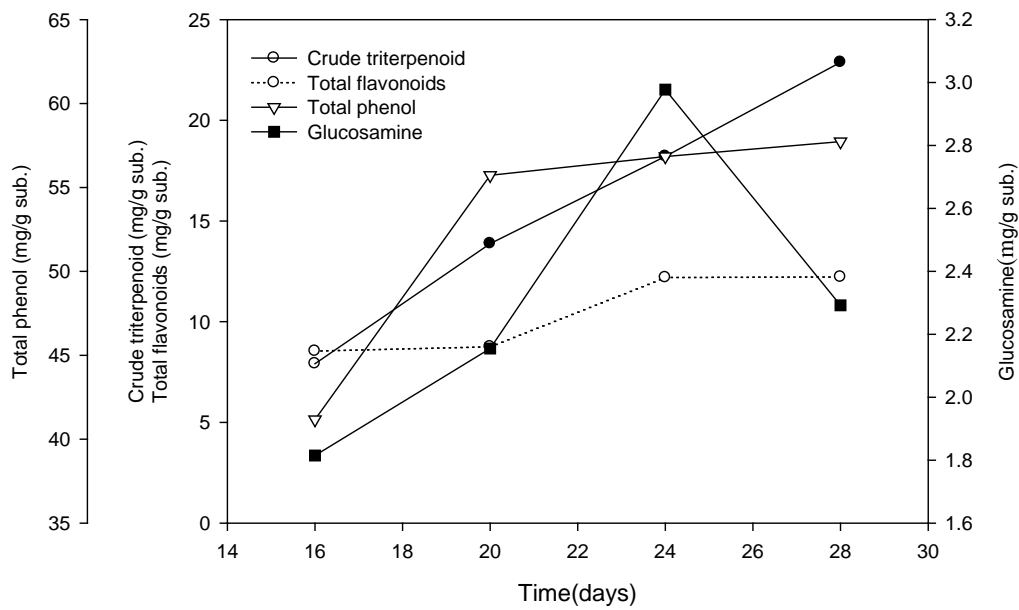


圖 4-10 葡萄柚粉末對樟芝菌絲體產生有效物質的影響

*使用 1g 葡萄柚果皮粉末添加入 28g 苦蕎麥基質後，調整含水率 45% 接菌培養後分析樣品。

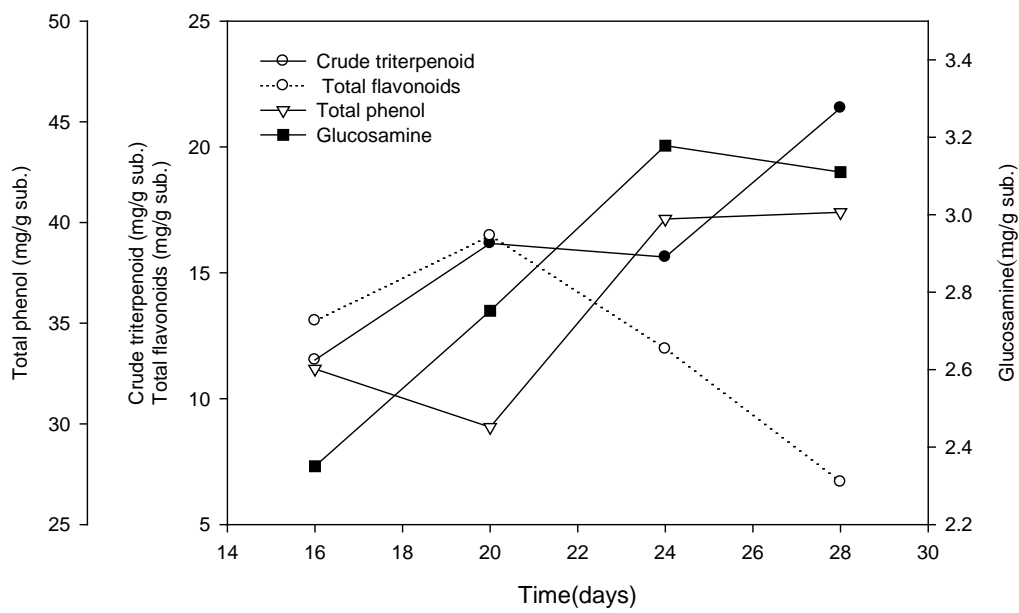


圖 4-11 柚子粉末對樟芝菌絲體產生有效物質的影響

*使用 1g 柚子果皮粉末添加入 28g 苦蕎麥基質後，調整含水率 45% 接菌培養後分析樣品。

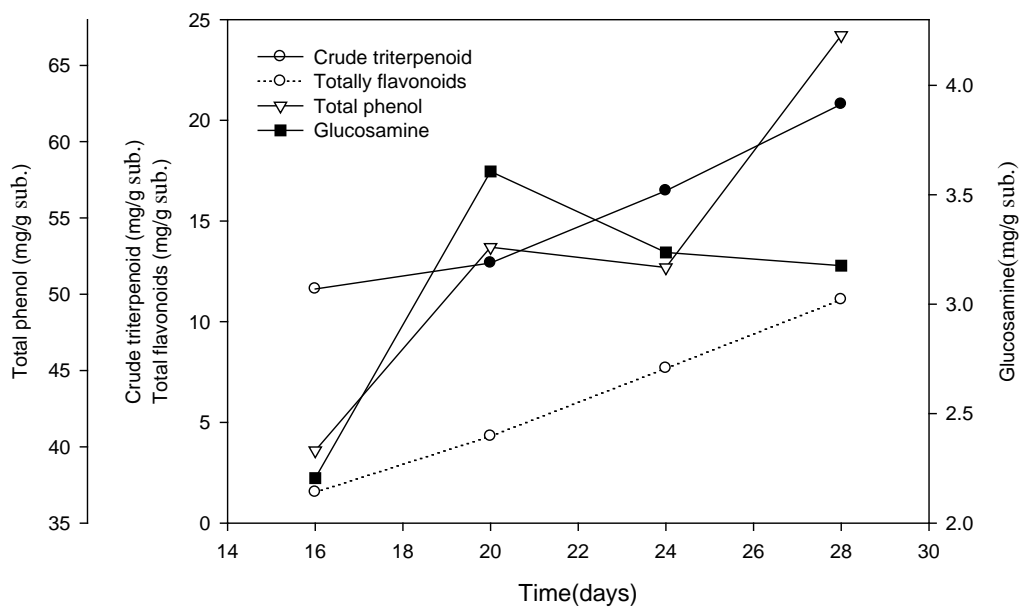


圖 4-12 柳丁粉末對樟芝菌絲體產生有效物質的影響

*使用 1g 柳丁果皮粉末添加入 28g 苦蕎麥基質後，調整含水率 45% 接菌培養後分析樣品。

表 4-2 不同種添加物對樟芝菌絲體代謝產物的影響

Items	Max. Glucosamine (mg/g sub.)	Max. Crude triterpenoid (mg/g sub.)	Max. Total phenol (mg/g sub.)	Max. Total Flavonoids (mg/g sub.)
Control	3.59	18.03	72.71	18.71
Kumquat	2.46	28.86(60.1%)	56.11	16.55
Grapefruit	2.97 ^c	22.80(26.5%)	57.72	12.31
Pemole	3.17 ^c	21.54(19.5%)	40.50	16.47 ^b
Orange	3.61	20.79(15.3%)	66.98	11.10
Lemon	3.77	19.50(8.2%)	56.09	13.07 ^a

菌絲體固態培養使用 250ml 錐形瓶，蕎麥基質重 28g 並調整含水量 45% 滅菌後冷卻至室溫；菌種取自生物資源保存中心，編號 BCRC35396，培養 14 天後均質，每瓶接菌量 10% 於 25°C 恆溫培養箱培。Max. Glucosamine 取樣自第 20 天，其餘成份分析取樣自第 28 天，a 樣品取自第 16 天發酵物。b 樣品取自第 20 天發酵物。c 樣品取自第 24 天發酵物。

4.3 不同濃度對於樟芝菌絲體代謝產物的影響

實驗採取第二節實驗結果粗三萜和葡萄糖胺含量較高的柑橘粉末，葡萄柚、柚子、金桔三種果皮做 0.5、1、2 g/瓶 三種濃度做變化，分析培養後發現當濃度提升到 2 g/瓶 時金桔組的葡萄糖胺含量和粗三萜含量都持續在上升達 2.88 mg/g sub.和 32.55 mg/g sub.，而葡萄柚添加雖然在 2 g/瓶 葡糖糖胺高達 4.42 mg/g sub. 但是三萜在 1 g/瓶 出現高值 22.88 mg /g sub.便開始下降；比較柚子組雖然在添加 2 g/瓶 粗三萜含量達最高值 24.98 mg /g sub.，但是葡萄糖胺含量在 2 g/瓶下降到 2.56 mg /g sub.。因此就實驗結果決定使用金桔做高濃度測試尋找最有效添加濃度，發現使用金桔添加 2 g/瓶 有最好的效果，而高於 2 g/瓶 的樟芝菌絲體葡萄糖胺和粗三萜含量都明顯下降，因此不利於商品化與開發。

經實驗結果整理成表 4-3，得知在三種柑橘類果皮添加的情況下，金桔粉末在 2 g/瓶 都有最高葡萄糖胺含量和粗三萜含量，並且在第 28 天成長趨勢尚未平緩，所以認為金桔粉末在五種柑橘類粉末添加的實驗中，是最合適的添加劑。因此實驗使用金桔粉末添加劑為參考基準，做 0.5、1、2、4、8、12 g/瓶六種濃度變化，試求金桔粉末對菌絲體固態培養的抑制濃度。圖 4-13 為不同添加濃度下樟芝菌絲體在固態培養後第 24 天的發酵產物，左到右上到下為 0、1、2、4、8、12 g/瓶 六種濃度，圖中黑色部分為苦蕎麥基質，白色部分為牛樟芝菌絲體，比較後可以看出菌絲體生長狀況隨著金桔果皮含量提高而有減少的情況發生，尤其在 8 g/瓶 濃度以上牛樟芝菌絲體幾乎無法生長。

文獻指出在添加牛樟精油 25°C 培養三周的情況下在添加達 3000ppm 有最高生長半徑，而超過 3000 則隨濃度下降；但是在有添加牛樟精油的情況下菌絲體較為鮮紅有類似累子實體的狀況產生(吳昇源等人，2003；高郁婷，2004；李明訓，2006)。因此可以得知樟芝菌絲體在生長過程中雖然可以藉由添加物調控生長狀況與代謝產物，但是不同添加物會出現不同含量的抑制濃度，都需要經由實驗測試才能瞭解其適合的含量。

表 4-3 不同濃度添加物對樟芝菌絲體代謝產物的影響

Items	Concentration /瓶	Glucosamin (mg / sub.)	Crude triterpenoid (mg /g sub.)	Total phenol (mg /g sub.)	Total Flavonoids (mg /g sub.)
Comtral	0g	3.59	18.03	72.71	18.71
Grapefruit	0.5 g	3.17	17.88(-0.8%)	52.16	17.89
	1 g	2.97	22.80(26.5%)	57.72	17.75
	2 g	4.42	17.86(-0.9%)	48.38	17.25
Pemole	0.5 g	4.55	20.64(14.5%)	48.50	18.03
	1 g	3.17	21.54(19.5%)	40.50	17.11
	2 g	2.56	24.98(38.5%)	38.28	17.09
Kumquat	0.5 g	1.29	22.73(26.1%)	52.60	18.03
	1 g	2.46	28.86(60.1%)	54.06	16.55
	2 g	2.88	32.55(80.5%)	52.50	16.65
	4 g	1.40	22.68(25.8%)	53.16	17.04
	8 g	1.33	10.17(-43.6%)	51.3	14.45
	12 g	0.83	12.22(-32.2%)	51.88	15.04

菌絲體固態培養使用 250ml 錐形瓶，基質重 28g 含水量 45%滅菌後冷卻至室溫；種瓶培養 14 天後均質，每瓶接菌量 10%於 25°C 恆溫培養箱培養。Glucosamin 取樣自第 20 天，Crude triterpenoid、Total phenol、Total Flavonoids 三種代謝物質都取樣自第 28 天。



圖 4-13 使用金桔粉末濃度變化觀察樟芝培養第 24 天情形

4.4 金桔水萃液對樟芝菌絲體代謝產物的影響

經由實驗發現控制組在第 20 天有最高葡萄糖胺含量 3.59 mg/g sub. 水淬液組或是水不易溶組在 20 天以後葡萄糖胺含量都比控制組高。比較粗三萜含量的結果發現水不易溶組在第 28 天有最高含量 31.51，其餘依序是金桔組 28.86、水淬液 22.33 與控制組 18.03 mg/g sub.，結果都比無添加的情況有更高的粗三萜含量。在類黃酮的分析方面水淬液和水不易溶組在第 24 天出現最高值 18.98 和 18.83 mg/g sub.，控制組和金桔組則在第 28 天出現最高值。比較總多酚含量則觀察到添加過後第 28 天含量明顯都比控制組低，依序是控制組 72.71 mg/g sub.、水不易溶組 66.75 mg/g sub.、水淬液 63.68 mg/g sub. 與金桔組 58.33 mg/g sub.。

經由實驗證實添加金桔粉末對樟芝菌絲體產生葡糖糖胺有抑制作用，而 20 天後水淬液和水不易溶組對樟芝菌絲體影響較低，推測因為水淬液和水不易溶組皆由 1 g 金桔粉末所萃取出，因而兩種添加物不論何種成份都有一定程度的稀釋作用，所以對樟芝菌絲體的抑制情況較為緩和。由圖 4-15 觀察到在持續培養超過 16 天後金桔添加物的葡萄糖胺含量有較穩定的趨勢從圖 4-15 與圖 4-16 推測金桔水淬液中成份可以幫助菌絲體生長並增加三萜生成量，而金桔粉末與水淬液殘渣雖然無法明顯提高樟芝菌絲體葡萄糖胺含量但卻可以提高菌絲體三萜含量，因此可以得知金桔添加物是有效可以提高樟芝菌絲體粗三萜含量的添加劑。

觀察圖 4-17 與圖 4-18 發現雖然在添加含有金桔果皮的影响下，經過數天培養後三種添加物的總多酚含量和總類黃酮含量皆低於控制組。而水淬液與水淬殘渣

總類黃酮含量在第24天上升到最高值並開始下降，配合圖4-15葡糖糖胺分析結果，

認為對於菌絲體產生類黃酮和產生葡萄糖胺有互相抑制的關係。

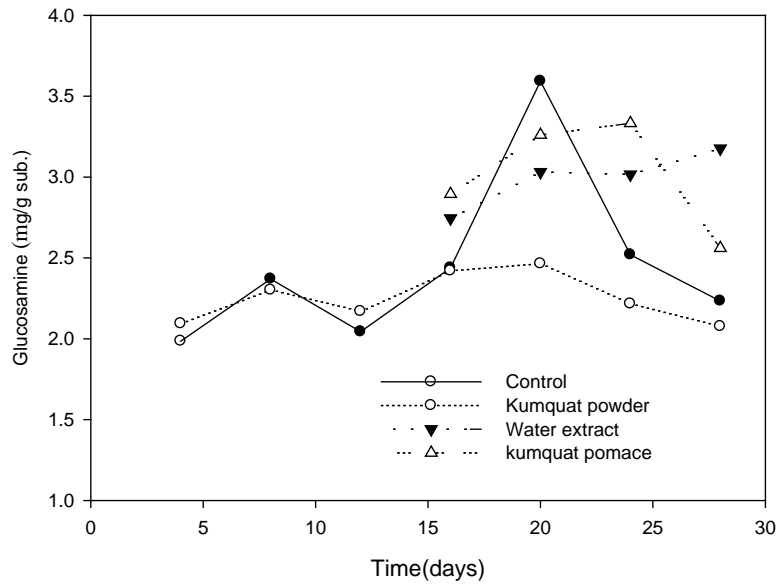


圖 4-14 不同金桔萃取成份對樟芝菌絲體產生葡萄糖胺的影響

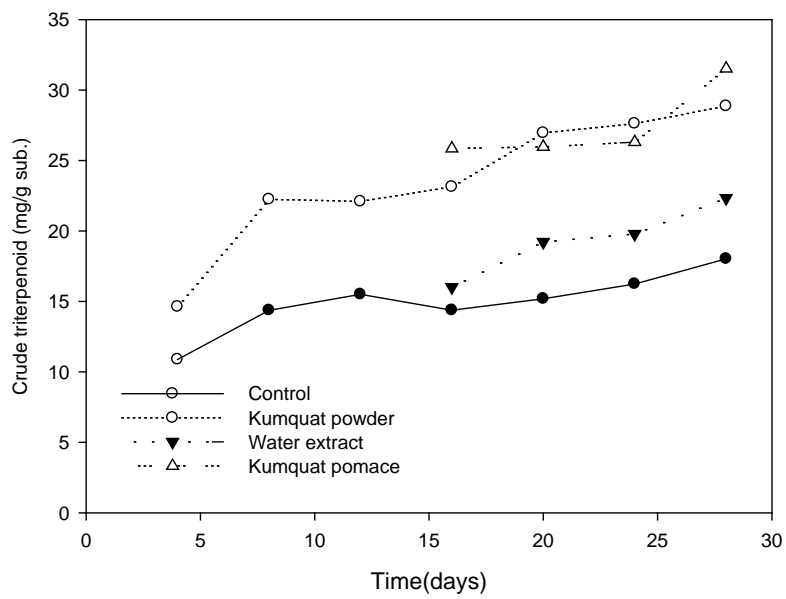


圖 4-15 不同金桔萃取成份對樟芝菌絲體產生粗三萜類的影響

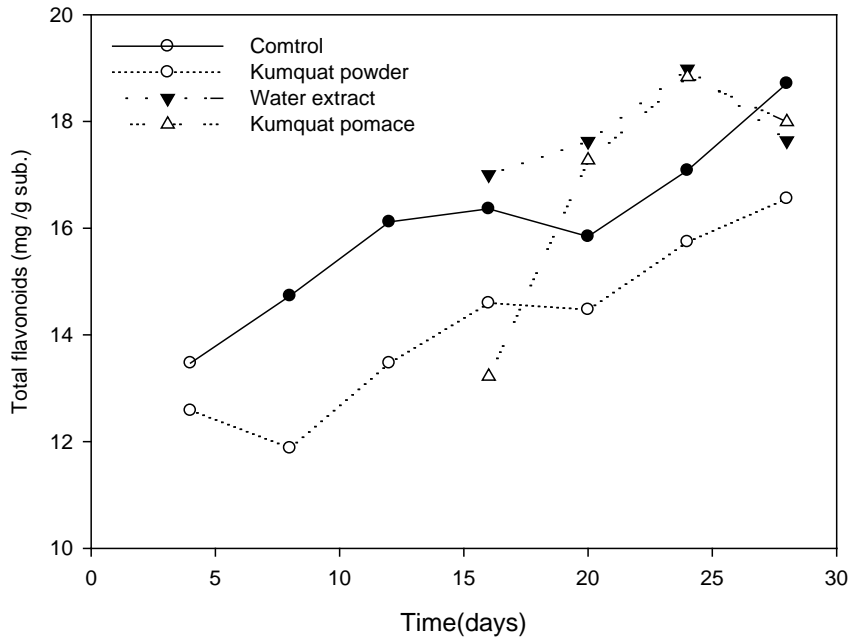


圖 4-16 不同金桔萃取成份對樟芝菌絲體產生總類黃酮類的影響

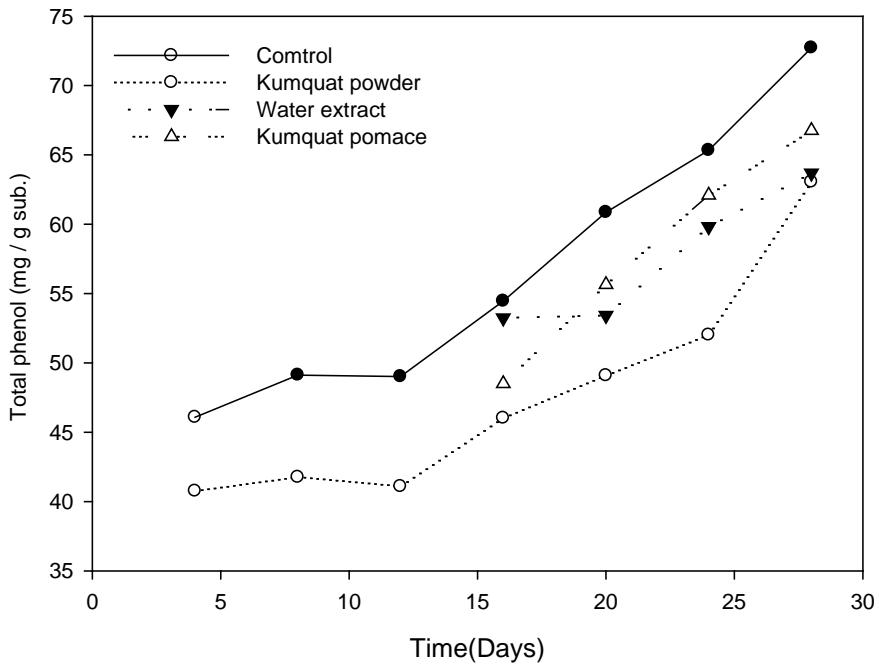


圖 4-17 不同金桔萃取成份對樟芝菌絲體產生總多酚類的影響

表 4-4 金桔水淬液對樟芝菌絲體代謝產物的影響

Items	Max. Glucosamin (mg/g sub.)	Max.Crude triterpenoid (mg/g sub.)	Max.Total phenol (mg/g sub.)	Max.Total Flavonoids (mg/g sub.)
Control	3.59	18.03	72.71	18.71
Kumquat powder	2.46	28.86(60.1%)	58.33	16.55
Water extract	3.03	22.33(23.8%)	63.68	17.64
Kumquat pomace	3.26	31.51(74.8%)	66.75	17.99

菌絲體固態培養使用 250 ml 錐形瓶，苦蕎麥基質重 28 g 並調整含水量 45%滅菌後冷卻至室溫；樟芝菌種取自生物資源保存中心，編號 BCRC35396，培養 14 天後均質，每瓶接菌量 10%於 25°C 恆溫培養箱培。Max. Glucosamin 取樣自第 20 天，Crude triterpenoid、Total phenol、Total Flavonoids 皆取樣自第 28 天。

4.5 果皮總多酚對樟芝菌絲體代謝產物的影響

分析顯示金桔果皮粉末約有 6.9 mg/g sub.的粗三萜含量，而蘋果與葡萄果皮約有 2.8 與 0.86 mg/g sub.的粗三萜含量；總多酚和總類黃酮則有相似濃度，金桔果皮含量約為 12.8 mg/g sub.葡萄和蘋果皮約為 13.20 和 12.22 mg/g sub.；而總多酚含量金桔、葡萄和蘋果皮分別為 35.30、34.63 與 36.19 mg/g sub.。整體而言是非常適合當作測試的添加物，以探討總多酚類是否對於樟芝菌絲體固態的培養效果。因此如同柑橘果皮相同的處理流程，將葡萄與蘋果果皮取下後烘乾 48 小時磨成粉末，添加進固態培養基內持續培養。

從圖 4-19 比較兩種添加物，雖在 20 天前沒有比控制組還高的葡萄糖胺含量產生，但依據圖 4-20 現象認為果皮多酚添加物有抑制樟芝菌絲體生長的作用而提高粗三萜類產物，比較控制組與葡萄、蘋果添加可以得知對於後期產生粗三萜類有明顯的效果。但是根據圖 4-21 與 4-22 兩張總多酚與總類黃酮的圖卻沒有因為添加而明顯抑制產生，經過測試實驗添加過 Gallic acid 與 Quercetin 在濃度控制的情況下添加後培養，不論是菌重與三萜含量都低於標準組許多，因此是何種添加物與如何運作抑制都還需要實驗與證實，但是經過天然物添加以達促進樟芝菌絲體的目的來說，實驗成果卻依然十分豐碩。

研究認為樟芝菌絲體成長與酚類化合物相關。因此，根據吳昇原(2002)研究中指出牛樟經樟芝腐朽後，抽出成份含量明顯增加，而總多酚類抽出物含量減少；且施勝雄 (2010)提到樟芝粗萃取物中環狀結構化合物則所佔比例不高，推測類

黃酮類在菌絲中含量不高；因此認為酚酮類化合物因為菌絲體產生或是樟芝菌絲體分解基質後產生而出；根據黃學聰(2008)的研究中發現於接種初期樟芝會分泌草酸協助其侵入，造成木材 PH 值降低；配合一些文獻對於樟芝酵素的研究提到，沈雍智(2005)樟芝被發現含有 amylase、cellulose、laccase 等可以分解木材中複雜物質以供應生長所需的碳、氧及無機鹽；且吳孟學(2009)提到樟芝屬於褐腐型真菌的一種，卻具有 laccase 漆氧化酶的活性，一種含銅的多酚氧化酵素，在 PH 3 的情況下有最高活性，而此酵素會分解纖維素，藉由分泌的過氧化氫和木頭裡的亞鐵離子 (Fe(II)) 去氧化、斷裂糖複合物，因而開放底物讓更多的水解作用產生 (趙、David Moore；laccase; EC 1.10.3.2)。而從張玉明(2003)在野生樟芝生長環境下，大部分之養分 (尤其是氮) 是收藏在枯死植物的軀幹中 (被木質素及相關酚類有機物鍵結，而不易移動)，因而就必須分解木質素來得到養分。因此根據實驗結果與文獻整理後所得資料，認為酚酮類雖然會抑制菌絲體成長，但是對於樟芝菌絲體影響較小，且酚酮類化合物對於樟芝菌絲體中的酵素卻是有益的成份。因此綜合以上得知，酚類化合物雖然會抑制樟芝菌絲體生長且抑制雜菌產生，但添加柑橘類果皮或是葡萄等水果果皮等酚酮類含量較高的天然物，可以造成樟芝菌絲體生長環境的優勢地位，一方面造成固態發酵環境偏酸容易讓菌絲體分解難分解的纖維素和木質宿，且其中所含的酚酮類化合物對於樟芝菌絲體則是有效的添加成份，對於樟芝菌絲體代謝產生三萜有幫助。

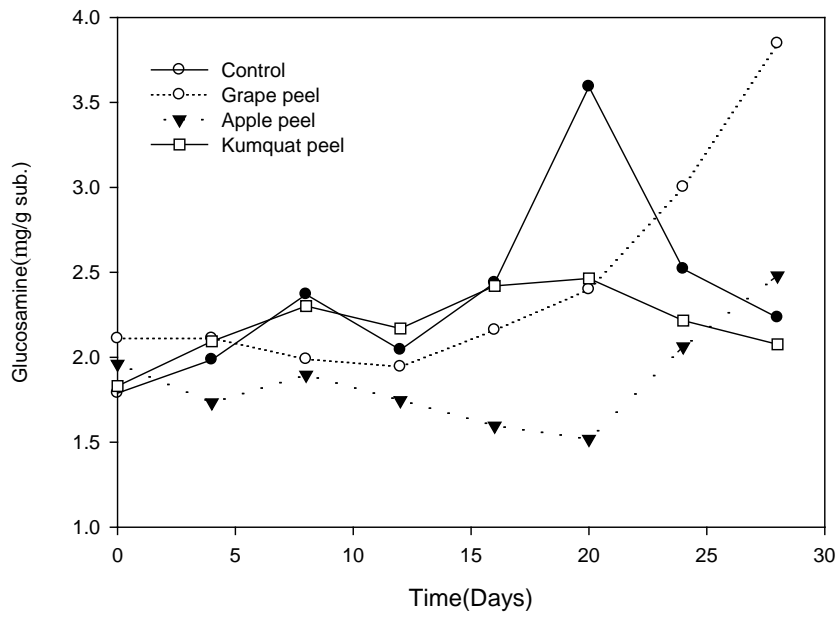


圖 4-18 蘋果與葡萄果皮添加對於樟芝菌絲體生產葡萄糖胺之影響

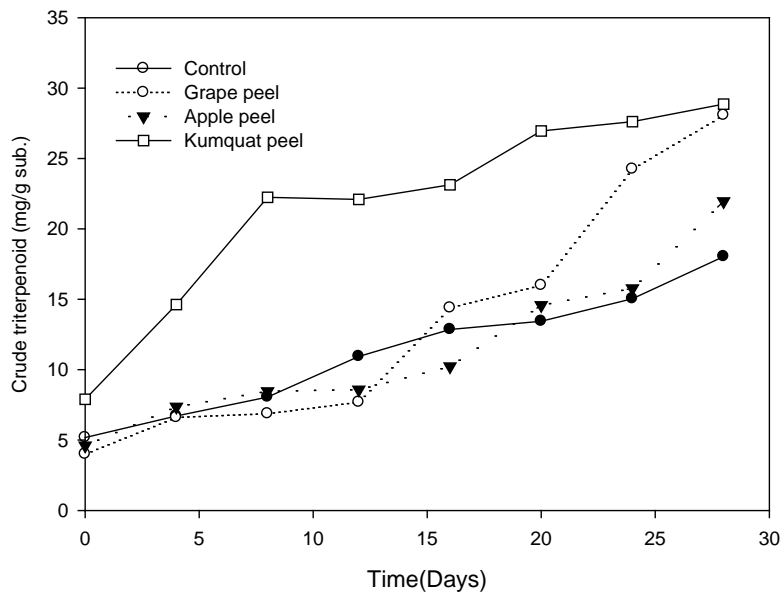


圖 4-19 蘋果與葡萄果皮添加對於樟芝菌絲體生產粗三萜類之影響

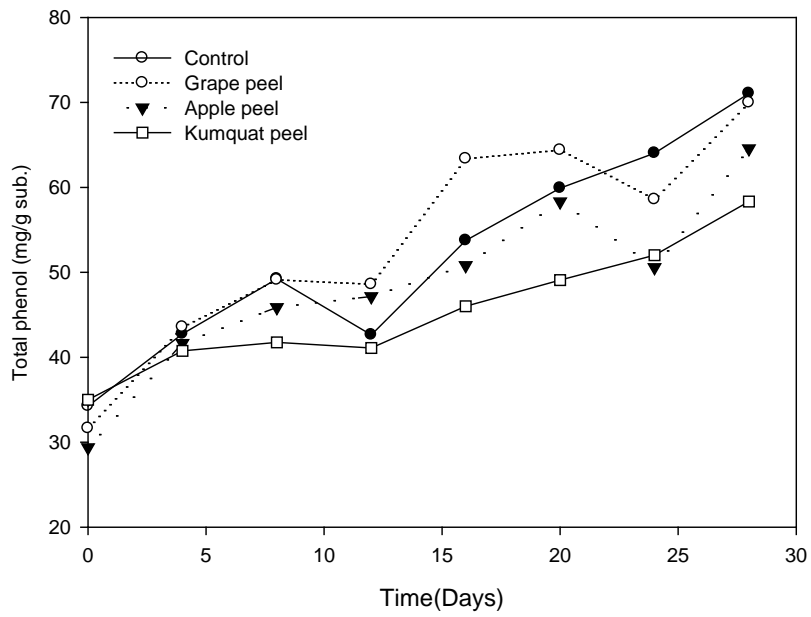


圖 4-20 蘋果與葡萄果皮添加對於樟芝菌絲體生產總多酚之影響

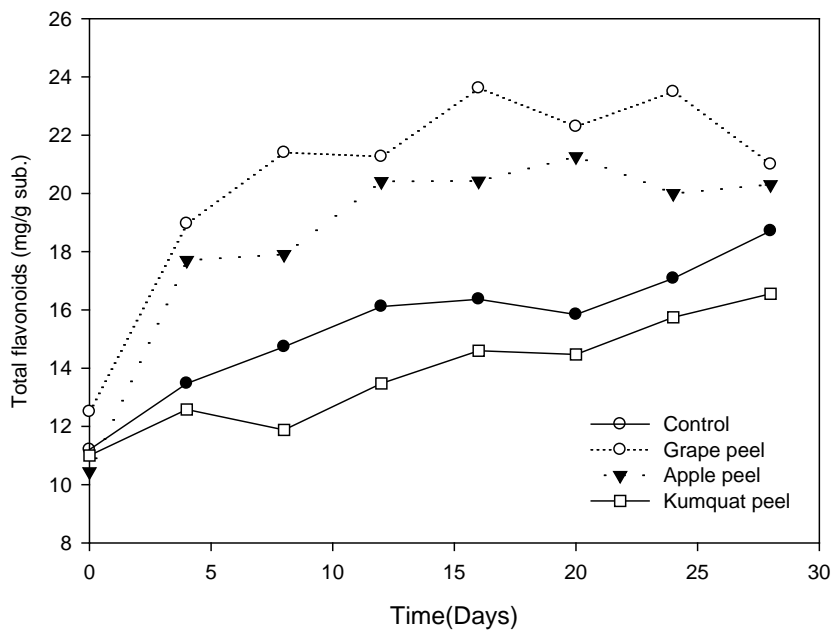


圖 4-21 蘋果與葡萄果皮添加對於樟芝菌絲體生產總類黃酮之影響

表 4-5 果皮總多酚對樟芝菌絲體代謝產物的影響

Items	Max. Glucosamin (mg/g sub.)	Max.Crude triterpenoid (mg/g sub.)	Max.Total phenol (mg/g sub.)	Max.Total Flavonoids (mg/g sub.)
Control	3.59	18.03	71.04	18.71
Kumquat	2.46	28.86(60.1%)	58.33	16.55
Grape peel	2.40	28.07(55.7%)	69.96	21.07
Apple peel	1.52	21.96(21.8%)	64.56	20.30

菌絲體固態培養使用 250ml 錐形瓶，蕎麥基質重 28g 並調整含水量 45% 滅菌後冷卻至室溫，樟芝菌種取自生物資源保存中心，編號 BCRC35396，培養 14 天後均質，每瓶接菌量 10% 於 25°C 恆溫培養箱培。Max. Glucosamin 取樣第 20 天，Crude triterpenoid、Total phenol、Total Flavonoids 皆取自第 28 天。

結論

實驗發現在使用蕎麥為基質的情況下，添加牛樟木粉後有殼蕎麥在第 28 天可以產生較高的粗三萜類 31.64 mg/g sub.。因此使用有殼蕎麥做基質培養添加柑橘類果皮，發現添加 1g 金桔果皮培養 28 天可以高達 28.86 mg/g sub 其次是葡萄柚與柚子，22.80 與 21.54mg/g sub.。使用此三種柑橘類果皮做濃度變化發現金桔果皮在 2g/瓶 的含量時，有最高葡萄糖胺含量 2.88mg/g sub.與粗三萜含量 32.55 mg/g sub.；但是總多酚含量和總類黃酮含量皆比控制組低，實驗認為金桔果皮內物同的成份對於樟芝菌絲體代謝產物會有不同的影響。因此使用水淬取處理金桔果皮後做添加發現水不易溶組在第 28 天有最高三萜含量 31.51mg/g sub.，其次是金桔粉末、水淬液與控制組，從實驗結果發現柑橘添加物對於樟芝菌絲體粗三萜產量有提升的效果，但是對於類黃酮與總多酚含量卻會受到抑制。同時發現添加葡萄皮與蘋果皮對於樟芝菌絲體代謝生成物粗三萜也有明顯的增加，但是酚類化合物成份趨勢卻不明顯。根據實驗結果可以證實添加物對於樟芝菌絲體代謝產物會有明顯的影響，並發現柑橘類果皮與葡萄、蘋果果皮對於樟芝菌絲體代謝產物都是有效的添加物，可以明顯提升樟芝發酵物有效物質成份。

未來展望

經由實驗可證明添加物可以有效改變樟芝菌絲體成長狀況，在短期培養增加樟芝菌絲體生成粗三萜的成效上面十分明顯。但是根據文獻指出使用牛樟段木培養到四到六個月後，實驗結果粗三萜含量可以破 100 mg/g sub.，雖然學生使用蕎麥短期培養產率高且效果出色，但目前實驗僅討論到第 28 天，依舊有很大幅度可以進步的空間。希望能藉由本實驗的經驗和結果，未來找出能促使菌絲體出菇現象的條件，將大大提升使用添加物替代牛樟木的可能性。經由文獻和實驗結果得知添加物粗三萜含量對於樟芝菌絲體代謝並無相關，但確切的作用機制依然缺乏文獻和實驗證明。希望未來能藉由本實驗做為開端去瞭解總多酚類對於樟芝菌絲體的作用機制和影響。

參考文獻

Chisti, Y. (1999) Solid substrate fermentation, Enzyme production, Food enrichment, biocatal biotransformation. 2446-2462

Chang, T. T., Chou, W. N. (1995) *Antrodia cinnamomea* sp. nov. on *Cinnamomum Kanehirai* in Taiwan. *mycological research* 99:756-758

Dorothea Tholl, (2006), Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*. 2-4

Dubey, V. S., Bhalla, R., Luthra, R. (2003) An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biosciences in Indian Academy of Sciences* 28(5):637-646

Hsiao, G., Shen, M. Y., Shen, K. H., Lan, M. H., Wu, L. Y., Chou, D. S., Lin, C. H., Su, C. H., Shen, J. R. (2003), Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry abstract*

Joshi, B. D., Rana, R. S. (1995) Buckwheat (*Fagopyrium esculentum*). *Cereal and Pseudocereals*, Vol. 2:85-172

Javornik, B. (1983) Nutritional quality and composition of buckwheat proteins (*Fagopyrum esculentum Moench*). *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)* Volume 30, Numbers 3-4

Kandaswaani, C., Middleton, E. (1994) Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Advanced Experimental Medizinsche Biology* 336: 351-376

Lull, C., Wichers, H. J., Savelkoul, H. F. (2005) Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. 2:63-80

Marshall, H., Pomeranz, G. Y. (1982) Buckwheat: Description, breeding, production and utilization. 64

Pomeranz, Y. (1983) Buckwheat: Structure, composition, and utilization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 213-218

Pomeranz, Y., Robbins, G.S. (1972.) Amino acid composition of buckwheat. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology. Food Chemistry

Richard, A. Dixon (2001) Natural products and plant disease resistance.. Plant Biology Division, Samuel Roberts Noble Foundation. 244-245

Rice-Evans, C., Miller, N., and Paganga, G., (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Sci. 24: 152-159

Sato, K., Sudo, S. (1999) Small-Scale Solid – State Fermentations. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2:61-79

Shuler, M.L., Kargi, F., (1992) Operating considerations for bioreactors for suspension and immobilized cultures, Bioprocess and Biosystems Engineering 262-265.

Song, T.Y., Yen, G.C. (2002) Antioxidant properties of *Antrodia camphorate* in submerged culture. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology. Food Chemistry 50:3322-3327

Tang, Y.J., Zhong, J.J. (2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. Methods in Enzymology 31: 20–28.

Tsuji, A., Kinoshita, T., Hoshino, M. (1969). Analytical chemical studies on amino sugars. Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. chem pharm bull. 11

Yang, K., Lu, D. (1992) The quality appraisal of buckwheat germplasm resources in china. 801-809

水野卓和川合正允著，賴慶亮譯(1997)。菇類的化學。國立編譯館。

肖崇厚和陳蘊如(1989)。中藥化學。上海科學技術出版社。

王伯徹和黃仁彰(2002)。靈芝與樟芝之研發與市場面面觀。食品工業：35(5)

王聲遠、蕭明熙(2001)。開發真菌次級代謝物為醫藥品。Fungal Science：16

- 賀世紅(2000)。分對靈芝菌絲體和子實體的影響。中國食用菌：19(5)。
- 廖英明(1998)。菇類中的許不了一樟芝。農業世界雜誌：176，76-79
- 張隆仁(1999)。蕎麥的二次代謝產物芸香苷。臺中區農業改良場研究彙報：64
- 簡秋源、姜宏哲、陳淑真(1997)。牛樟菇培養性狀及其三帖類成份分析之研究。林業叢刊：72，113-137。
- 郝宏蕾，朱旭芬，曾云中(2002)。類異戊二烯的生物合成及調控。浙江大學學報(寫於生命科學版)：28(2)。
- 廖英明(1998)。鮮銷香菇。桃園區農業專訊：26。
- 蔡榮哲(2005)。柑橘類果皮加工利用。台灣柑橘產業發展研討會專刊。249-259。
- 徐敬衡、文榮輝、賴秋梅、翁偉恆(2000)。利深層發酵生產樟芝菌絲體及抗菌研究。第15屆全國技術及職業教育研討會論文集。
- 陳啟楨、蘇慶華、藍明煌(2001)。樟芝固體栽培其生物活性研究。中華真菌學會會刊。
- 陳吉村、陳哲民(2003)。花蓮地區文旦果皮精油含量變化之研究。花蓮區研究彙報：21，49-58。
- 龔治、李典漢、張真(2010)。針葉樹菇類合成酶研究進展。中國林業科學:46(1)，123-129。
- 劉賢祥 1992 植物生理學 財團法人徐氏基金會。
- 鄭富元、陳怡兆、陳文賢 (2010)。台灣國產柳橙皮甲醇萃取物之成份分析與抗氧化性研究。稻江學報:4(2)，1-12。
- 郎桂常、何玲玲(1989)苦蕎的化學成份和營養特性。中國蕎麥科學研究論文集：203-205。

- 張玉明(2003)。菌根真菌與植生復育探討。大葉學報第十二卷第一期:103-114。
- 張光宇(1989)涼山苦蕎開發研究初報。中國蕎麥科學研究論文集:210-211。
- 曾勝雄(1991)大粒型蕎麥栽培技術之探討。臺中區農業改良場研究彙報:1-9。
- 曾勝雄、張正英、蘇慧美(2004)。蕎麥組成份及保健成份分析。臺中區農業改良場研究彙報：82，61-69。
- 曾勝雄(2004)。韃靼種蕎麥栽培技術之探討。臺中區農業改良場研究彙報：82，43-50。
- 葉安義、王伯玲(1992)不同萃取方法對所得大蒜精油成份之影響。食品科學：19，108-116。
- 李勉民(1995)常見藥草圖說。讀者文摘遠東有限公司:45-47。
- 張家祥(2007)。不同中草藥或精油於樟芝固態栽培菌絲體之生物活性成份的影響。大葉大學生物產業科技學系碩士論文摘要。
- 黃學聰(2002)。樟芝與靈芝木質分解酵素基因之選殖與表現。國立台灣大學植物病理與微生物學研究所博士論文摘要。
- 沈雍智(2005)。探討麩胺酸的添加對於液態發酵生產松杉靈芝菌多醣體和靈芝酸之研究。國立中央大學化學工程與材料工程研究所碩士摘要。
- 黃學聰(2008)。樟芝與靈芝木質分解酵素基因之選殖與表現。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文摘要。
- 吳孟璇(2009)。樟芝漆氧化酶基因之分子生物學研究。嘉南藥理科技大學生物科技系暨研究所碩士論文摘要。
- 吳德鵬(1995)。樟芝微量成份的研究。台灣師範大學化學研究所碩士論文摘要。
- 吳昇原(2002)。牛樟抽出物對樟芝生長影響之探討。國立臺灣大學森林學研究所碩士論文摘要。

施勝雄(2010)。牛樟芝之類黃酮類化合物相關基因選殖及其特性分析。臺灣大學植物病理與微生物學研究所學位論文摘要。

楊凱竹(2008)。以松杉靈芝為基質進行固態培養樟芝子實體之探討。國立東華大學生物技術研究所碩士論文摘要。

陳書豪(2007)。探討樟芝的溫度變化對液態發酵與固態發酵生產三萜類與多醣體之影響。國立中央大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。1-30。

陳俊仁(2008)。柳橙有效成份之提取及應用。國立成功大學化學研究所碩士論文：12。

楊于萱(2010)。培養條件對樟芝菌絲體抗氧化活性及抗腫瘤能力之影響。私立東海大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。

劉昌峰(2000)探討不同培養基組成對光合菌 *Rhodobacter sphaeroides* 生產 CoenzymeQ10 之研究。中央大學化學工程學研究所碩士論文。

黃惠琴(2001)。樟芝菌絲體深層培養之研究。東海大學化學工程研究所碩士論文。

黃鈴娟(2000)。樟芝與姬松茸之抗氧化性質及其多醣組成份析。國立中興大學食品科學系碩士論文：148。

吳明穎(2009)。金桔、檸檬與葡萄果渣纖維的理化特性及其應用之研究。大仁科技大學食品科技系碩士論文：23-32。

李宛蓁(2003)。樟芝菌絲體培養與生理活性成份生成之研究。私立東海大學化學工程研究所碩士論文。

李名訓(2006)。樟芝栽培之研究。國立嘉義大學農學院林業暨自然資源研究所碩士論文：4-14。

林志遠(2005)。牛樟芝子實體形成之探討。國立東華大學生物技術研究所碩士論文：4-64。

林雅慧(2007)。以固體中藥渣培養樟芝及蟲草作為治療人類肝癌及肺癌的動物模式之研究。南台科技大學生物科技系碩士論文：2-16。

林志成(2004)。探討通氣量對於樟芝發酵生產與純化脂解酵素之研究。國立中央大學化學工程與材料工程研究所碩士論文：1-6。

林豔琪(2005)。樟芝固態培植體之成份分析及功能性評估。南台科技大學生物科技系碩士論文：5。

朱建儒(2003)。探討通氣量於樟芝發酵生產生物鹼之影響。國立中央大學化學工程與材料工程系碩士論文：5-7。

朱海文(2005)。牛樟芝椴木培養之研究探討。朝陽科技大學應用化學系：6-61。

施玉蘭(2009)。不同栽培方法對牛樟芝菌絲生長之影響。國立屏東科技大學熱帶農業暨國際合作系碩士學位論文：3-43。

牛樟芝學術論壇。<http://www.twantrodia.com/tw/about.php?id=10>