

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

Graduate Institute of Chemical and Materials Engineering

Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：楊芳鏘 博士

Advisor : Fan-Chiang Yang, Ph.D.

培養基添加物對靈芝菌絲體活性成分生成之影響

Effect of medium additives on the formation of bioactive components of  
*Ganoderma lucidum* mycelia

研究生：方 瑋 撰

Graduate student : Wei Fang

中華民國 100 年 7 月

July,2011

## 中文摘要

本研究主要目的在探討食用水果果皮添加於靈芝的液態培養與固態培養的可能性，及生理活性成份生成之影響，尋找最佳果皮種類與及最適添加量，同時，進行階段性培養以及添加萃取劑不同，尋找最適培養條件。

在液態培養方面，以添加 2ml 柳丁水萃液培養十三天之菌重與多醣分別為 10.67 g/L 與 1.50 g/L，而相對於控制組之菌重與多醣分別為 5.77 g/L 與 0.52 g/L，添加效果增加兩倍。研究發現果皮水萃液添加對靈芝酸生成並無太大幫助；果皮利用 95%乙醇萃取，於第 4 天添加的乙醇萃取物 10ml 培養十六天，則靈芝酸含量為 46.27mg/g D.W.，總多酚與類黃酮含量分別為 78.59 與 7.58mg/g D.W.，則相較於控制組靈芝酸含量達九倍、總多酚與類黃酮則分別達到十倍與四倍。

在固態培養方面，利用廢棄果皮乾燥後磨成粉末，果皮添加於大薏仁的固態培養基，發現以添加葡萄柚粉末培養三十六天之固態培養對靈芝酸含量為 17.29mg/g substrate，而未添加之固態基質對靈芝酸含量為 9.61mg/g substrate.，相較下添加果皮粉末其效果為控制組之兩倍。研究結果証實果皮萃取物或果皮添加可以有效提高靈芝生理活性成份。

關鍵字：靈芝、柑橘類果皮、*Ganoderma lucidum acid*

## Abstract

The main purpose of the study is to investigate the influence of the addition of fruit peel on the formation of bioactive components in the culture of *Ganoderma lucidum*. In addition, the effect of types of fruit peel and optimal addition amount were also determined.

The results indicate that in shake-flask cultures, the addition of orange water extract of 2 ml could effectively enhance the concentration of biomass and IPS to the levels of 10.67 g/L and 1.50 g/L, respectively at the 13<sup>th</sup> day. Compared with the control of 5.77 g/L and 0.52 g/L, there were two-folds increase. The results also demonstrate that the addition of peel water extract had no effect on the formation of ganoderic acid. Instead, if ethanol peel extract of 10 ml was added at the 4<sup>th</sup> day in a shake-flask culture, the level of ganoderic acid reached to the 46.27 mg/g D.W., total polyphenol and flavonoid at the 16<sup>th</sup> day rose to 78.59 and 7.58 mg/g D.W., respectively. Compared with the values of the control, the addition of ethanol peel extract was proved to effectively enhance the formation of ganoderic acid (9-folds increase), total polyphenol(10-folds increase) and flavonoid (4-folds increase).

In the tests of solid-state fermentation, the addition of grapefruit peel powder was demonstrated to increase the level of ganoderic acids from 9.61 mg/g substrate to 17.29 mg/g substrate and had a 2-folds increase. The study demonstrates that the addition of fruit peel extracts or fruit peel could effectively enhance the formation of bioactive components in the mycelia cultures of *Ganoderma lucidum*.

Key words: *Ganoderma lucidum* 、 citrus peel 、 *Ganoderma lucidum acid*

## 目錄

中文摘要.....	III
Abstract.....	IV
目錄.....	V
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XII
第一章 緒論.....	1
1-1 前言.....	1
1-2 研究目的.....	2
第二章 文獻回顧.....	3
2-1 靈芝簡介.....	3
2-1-1 靈芝的分類與介紹.....	3
2-1-2 靈芝的栽培方式.....	4
2-1-3 液態培養因子.....	6
2-1-3 靈芝的生理活性與藥理效果.....	11
2-2 固態發酵.....	14
2-2-1 固態發酵之優缺點.....	14
2-4 柑橘類果皮介紹.....	16

2-4-1 柑橘類果皮簡介.....	16
2-4-2 精油介紹:.....	17
2-4-2-1 植物精油來源.....	17
2-4-4 添加之果皮介紹.....	21
第三章 實驗材料與分析方法.....	25
3-1 實驗菌株及細胞株.....	25
3-2 實驗藥品.....	25
3-3 實驗儀器與設備.....	27
3-4 分析方法.....	28
3-4-1 pH 值測定.....	28
3-4-2 菌體 Biomass.....	28
3-4-3 葡萄糖濃度測定.....	28
3-4-4 多醣濃度測定.....	28
3-4-5 總酚類含量測定.....	29
3-4-6 胞內粗三萜含量測定.....	30
3-4-7 類黃酮含量測定.....	30
3-4-8 固態培養菌絲葡萄糖胺含量測定.....	31
3-4-9 葡萄糖胺比色法.....	31

3-5 實驗方法 .....	32
3-5-1 實驗架構 .....	32
3-5-2 靈芝菌種培養與保存 .....	33
3-5-2-1 菌種斜面試管保存 .....	33
3-5-2-2 培養皿平面培養與接菌活化 .....	34
3-5-2-3 種菌製備 .....	34
3-5-2-4 水萃液製備 .....	34
3-5-3 三角瓶液態培養試驗 .....	35
3-5-3-1 二階段培養濃度變化培養試驗 .....	35
3-5-3-2 添加酒精果皮萃取物濃度變化培養試驗 .....	36
3-5-4 三角瓶固態培養試驗 .....	36
3-5-5 靈芝胞內多醣萃取 .....	37
3-5-6 靈芝菌絲體甲醇萃取物之製備 .....	37
第四章 結果與討論 .....	38
4-1 靈芝三角瓶液態培養試驗 .....	38
4-1-2 添加檸檬水萃液 .....	42
4-1-3 添加葡萄柚水萃液 .....	46
4-1-4 添加柳丁水萃液 .....	50

4-1-5 添加金桔水萃液.....	54
4-1-6 添加紅柑水萃液.....	58
4-1-7 添加果皮水萃液之比較.....	62
4-2 添加果皮水萃液於最適天數做添加量變化.....	66
4-2-1 添加柳橙水萃液之添加量影響.....	66
4-3 不同添加時間與不同萃取溶劑之添加量影響.....	71
4-3-2 添加時間與添加性質不同對靈芝生理活性影響比較.....	80
4-4 靈芝三角瓶固態培養試驗.....	81
4-4-1 未添加誘導劑之固態培養.....	81
4-4-4 柳橙果皮添加之固態培養.....	87
4-4-5 金桔果皮添加之固態培養.....	89
4-4-5 紅柑果皮添加之固態培養.....	91
4-4-7 不同果皮對固態培養比較.....	93
4-4-8 葡萄柚濃度變化之影響.....	95
第五章 結論與未來展望.....	97
5-1 結論.....	97
5-2 未來展望.....	99
參考文獻.....	100

## 圖目錄

圖 2-1 野生靈芝子實體 .....	9
圖 2-2 靈芝液態培養 7 天形成之菌絲球 .....	10
圖 2-3 靈芝固態培養於錐形瓶內第 6 天之生長情形 .....	10
圖 2-4 異物二烯行程萜類化合物代謝途徑 .....	18
圖 3-1 液態實驗架構圖 .....	32
圖 3-2 固態實驗架構圖 .....	33
圖 4-1 基礎培養基之靈芝菌絲體生長趨勢圖 .....	39
圖 4-2 基礎培養基之靈芝菌絲體靈芝酸與多醣含量影響 .....	40
圖 4-3 基礎培養基之靈芝菌絲體總酚與類黃酮含量影響 .....	41
圖 4-4 添加檸檬水萃液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖 .....	43
圖 4-5 添加檸檬水萃液對靈芝菌絲體靈芝酸與多醣含量之影響 .....	44
圖 4-6 添加檸檬水萃液對靈芝菌絲體總酚與類黃酮含量之影響 .....	45
圖 4-7 添加葡萄柚水萃液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖 .....	47
圖 4-8 添加葡萄柚水萃液對靈芝菌絲體靈芝酸與多醣含量之影響 .....	48
圖 4-9 添加葡萄柚水萃液對靈芝菌絲體總酚與類黃酮含量之影響 .....	49
圖 4-10 添加柳橙水萃液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖 .....	51
圖 4-11 添加柳橙水萃液對靈芝菌絲體靈芝酸與多醣含量之影響 .....	52

圖 4-12 添加柳橙水萃液對靈芝液態培養總酚與類黃酮含量之影響 ..53	53
圖 4-13 添加金桔水萃液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖 .....55	55
圖 4-14 添加金桔水萃液對靈芝菌絲體靈芝酸與多醣含量之影響 .....56	56
圖 4-15 添加金桔水萃液對靈芝菌絲體總酚與類黃酮含量之影響 .....57	57
圖 4-16 添加紅柑水萃液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖 .....59	59
圖 4-17 添加紅柑水萃液對靈芝菌絲體靈芝酸與多醣含量之影響 .....60	60
圖 4-18 添加紅柑水萃液對靈芝菌絲體總酚與類黃酮含量之影響 .....61	61
圖 4-19 果皮水萃液添加於第 13 天時之生理活性成分 .....63	63
圖 4-20 果皮水萃液添加於第 7 天時對靈芝酸的影響 .....64	64
圖 4-21 柳橙水萃液添加量對靈芝菌絲體生理活性之影響 .....68	68
圖 4-22 柳橙水萃液添加量對靈芝菌絲體總多酚及類黃酮之影響 .....69	69
圖 4-23 為第 0 天添加乙醇萃取物培養 16 天時之菌量生長變化 .....73	73
圖 4-24 不同添加時間與添加劑性質之添加量對靈芝酸含量影響 .....74	74
圖 4-25 不同添加時間與添加劑性質之添加量對菌絲濃度影響 .....75	75
圖 4-26 不同添加時間與添加劑性質之添加量對單位胞內多醣影響 ..76	76
圖 4-27 不同添加時間與添加劑性質之添加量對胞外多醣影響 .....77	77
圖 4-28 不同添加時間與添加劑性質之添加量對總多酚影響 .....78	78
圖 4-29 不同添加時間與添加劑性質之添加量影響 .....79	79

圖 4-30 時間對靈芝固態發酵之生理活性影響 .....	82
圖 4-31 時間對靈芝固態發酵之類黃酮及總多酚影響 .....	82
圖 4-32 添加檸檬果皮對靈芝固態基質之生理活性影響 .....	84
圖 4-33 添加檸檬果皮對靈芝固態基質之類黃酮及總多酚之影響 .....	84
圖 4-34 添加葡萄柚果皮對靈芝固態基質之生理活性影響 .....	86
圖 4-35 添加葡萄柚果皮對靈芝固態基質之類黃酮及總多酚之影響 .....	86
圖 4-36 添加柳橙果皮對靈芝固態基質之生理活性影響 .....	88
圖 4-37 添加柳橙果皮對靈芝固態基質之類黃酮及總多酚之影響 .....	88
圖 4-38 添加金桔果皮對靈芝固態基質之生理活性影響 .....	90
圖 4-39 添加金桔果皮對靈芝固態基質之類黃酮及總多酚之影響 .....	90
圖 4-40 添加紅柑果皮對靈芝固態基質之生理活性影響 .....	92
圖 4-41 添加紅柑果皮對靈芝固態基質之類黃酮及總多酚之影響 .....	92
圖 4-42 不同果皮添加對靈芝酸生成之影響(第 36 天) .....	94
圖 4-43 葡萄柚果皮粉末添加量不同對靈芝生理活性影響 .....	96
圖 4-44 葡萄柚果皮添加量不同對靈芝類黃酮以及總多酚含量影響 .....	96

## 表目錄

表 2-1 靈芝的生理作用與藥理效果 .....	11
表 2-2 果皮所含有之化合物種類 .....	19
表 3-1 實驗藥品 .....	25
表 3-2 實驗儀器與設備 .....	27
表 4-1 不同果皮之液態發酵結果 .....	64
表 4-2 不同果皮添加對靈芝生理活性最大影響及最適天數 .....	65
表 4-3 柳橙水萃液添加量之影響(培養 13 天) .....	70
表 4-4 不同天數添加誘導劑及添加量對靈芝生理活性之影響 .....	80
表 4-5 不同果皮添加對靈芝生理活性及天數之影響 .....	94

# 第一章 緒論

## 1-1 前言

依行政院衛生署九十年到九十九年統計結果，國人之死因統計，惡性腫瘤(癌症)續居十大死因之首已長達二十九年，癌症著實成為國人頭號健康殺手，而根據九十九年死因統計指出，國人主要癌症死亡前三名分別為肺癌、肝癌、結腸直腸癌。近年人們對身體保健更為注重，各種保健食品更是炙手可熱，而在保健食品上或醫藥市場針對抗腫瘤的發展，成為日前研究的重點。因菇類已被證實對腫瘤有預防以及改善的效果(水野卓，1997)，故頗受各界看好。

柑橘類果皮因經由食用或加工完畢隨後則丟棄，近幾年，人們開始注重果皮廢棄物是否具有有效成分可被利用；酚類化合物為植物化學成分中最大族群，而酚類化合物中則又以類黃酮占最多；由於日前柑橘類果皮已被證實具有抗癌成分(王，2008)。得以發展出廢棄物果皮亦可回收再利用，使水果可發揮其最大效用。

自古以來，靈芝為珍貴的食藥用真菌，其主要原因是靈芝含有多種具有生物活性與療效的物質，如多醣體、三萜類、超氧歧化酶、生物鹼以及蛋白質等。許多藥物學方面的研究顯示出，靈芝多樣的萃取物具有保肝、降血脂、降血壓、提升免疫系統、抗過氧化和抗癌的功能，用治咳嗽、支氣管炎、關節炎等(林，1990)。

## 1-2 研究目的

柑橘類果皮為食用後則丟棄的廢棄物，日前柑橘類果皮已被證實由於柑橘類果皮萃取的 5-OH-HxMF 以及其他 PMFs，具有多種生物活性，抗癌性、抗發炎效應，抗腫瘤活性；PMFs 又容易被人體吸收進入血液循環系統，故柑橘類果汁已成為極重要的防癌劑之一。且從柑橘類果皮中找到抗癌成分，其含量比果肉多，可由此思考平時食用廢棄的果皮可回收再利用(王，2008)。本研究以柑橘類果皮做為誘導劑，進行靈芝固、液態發酵培養，探討是否能促使靈芝之生理活性(藥理特性)含量提升。

## 第二章 文獻回顧

### 2-1 靈芝簡介

#### 2-1-1 靈芝的分類與介紹

靈芝(Ling Zhi)在過去中國傳統觀念視為一種中藥材，具有肉眼可見之子實體型態。在漢方中，靈芝被認為具有強壯、補血、安定精神、利尿、補肝等功能(徐、謝,2001)。現代醫藥學界經過三十年的藥理研究結果確認靈芝的萃取物中，具有鎮靜、鎮痛、鎮咳、強心、保肝、降血壓、降血脂、降血糖、降膽固醇、抗過敏、抗發炎、抗腫瘤、抗病毒、抗氧化與免疫調節功能等的活性成分，而廣受各國的重視(許,2005)。

靈芝在溫帶、亞熱帶與熱帶地區皆有發現，由於分布地區廣泛，導致氣候與溫度的差異性和靈芝種類的分布有很大的關聯性，目前全世界被命名，且有紀錄的靈芝約有200種(許,1993)<sup>a</sup>，並陸續有新種被發現。在中國地區發現的種類接近116餘種(趙,2000)，而台灣則有17種(許,1993)<sup>a</sup>。常見的野生靈芝有八種，分別為台灣靈芝(*Ganoderma formosanum*)、樹舌靈芝(*G. applanatum*)、新日本靈芝(*G. neojaponicum*)、拱狀靈芝(*G. fornicatum*)、靈芝(*G. lucidum*)、熱帶靈芝(*G. tropicum*)、小孢子靈芝(*G. microsporum*)、松杉靈芝(*G. tsugae*)等(許,1993)<sup>b</sup>。人工栽培靈芝以赤芝(*G. lucidum*)或松杉靈芝(*G. tsugae*)最為普遍(王,1998)。

## 2-1-2 靈芝的栽培方式(詹，2003)

靈芝的來源可分為野生與人工栽培，其敘述如下：

(一) 野生靈芝：野生靈芝在台灣の平地及高海拔山區皆有分布，常常生於闊葉樹、針葉樹、相思樹及豆科植物，大部分為一年生の子實體。

(二) 人工栽培靈芝：有子實體栽培和菌絲體液態培養二種方法，分述如下：

### (1) 子實體栽培

目前已有大規模靈芝子實體培養，所使用的方法與菇類培養相似，即椴木或太空包培養，經過適當環境控制，2-3個月左右即可採收。即便如此，栽培時間仍是偏長，如能縮短培養時間，將可大幅增進經濟效益。栽培方法分述如下：

椴木栽培：將靈芝的生長菌絲種植在櫟木或枹木的枯木段上。

木屑培養瓶或太空包栽培：於廣口瓶或太空包中填裝木屑與生長培養基，將靈芝菌絲接入後塞上棉塞培養，在 30°C 栽培 70-90 天即可採收子實體。

### (2) 菌絲體液態培養(楊，2006)

所謂液態培養，一般是指使用固定組成的液態培養基，在控制適當的 pH、溫度以及通氣和攪拌(或震盪)的條件下，進行為生物的發酵培養，以製造生質 (biomass) 或其他代謝物 (metabolite)。培養流程如下：

菌種→試管斜面培養→三角瓶培養→發酵槽培養

從靈芝的生活史來看，靈芝菌體形態包含孢子、菌絲與子實體三部分，一般

認知，靈芝的療效都是子實體的利用，事實上靈芝的孢子與菌絲體的藥效近年來被大量研究與試驗，證實其亦有生產價值。工業界對於真菌的液態培養技術自從抗生素盤尼西林大規模生產以來，到現在已是一成熟的技術。如能利用液態培養，進行大量的靈芝菌絲體與胞外多醣的生產，將有助於靈芝的經濟利用。

菇類液態培養最大的特色在於發酵過程中並無孢子萌發期(sporulation)，所生產之菌絲體是以菌絲球(pellets)形式存在，菌絲球形成過程目前仍不完全清楚，一般被接受有兩種機制：凝聚及非凝聚菌絲球生成。凝聚作用主要分兩步驟，首先是孢子凝聚，接著是萌發孢子凝聚形成菌絲球。非凝聚作用則由單一孢子獨立萌發生成。孢子凝聚的初始階段被認為與表面的多醣相互鍵結有關係，但此結論是否為一普通的規則仍有待確認。菌絲體的生長是輻射狀向四周擴散，所以菌體呈現球形懸浮在培養液中，這也使得培養液中營養源及氧氣之傳送程度，較一般低等真菌或酵母菌的液態培養來得更為複雜化。

### 2-1-3 液態培養因子(楊，2006)

生化工程反應中，由於細胞內和細胞外因子相互作用影響的結果，使微生物能夠生長並產生代謝產物。細胞內因子包含微生物的繁殖及控制遺傳上的複製、轉錄和移轉。而細胞外因子包含物理因素和化學因素。物理因素主要由溫度、pH值、通氣與攪拌等所組成，而化學因素包含有使用到的營養因子，如：碳源、氮源等所組成。

#### 物理因素

##### (一) 溫度

據文獻顯示，靈芝生長溫度範圍為 25~37°C，其最佳溫度為 30°C 左右，愈偏向高溫其菌絲的產量越低。溫度過低菌絲生長顯著遲緩；高於 30°C 則菌絲易衰老，並可看到不少趨於自溶的菌絲，使發酵液顏色變深。最佳生長溫度依菌種而有差異(黃，1996)。

##### (二) pH 值

pH 值控制，在生產帶電性聚合物是一項重要因子，缺乏 pH 控制和不佳的培養基緩衝效果，會造成菌體停止生長與聚合作用生成停止。Litchfield(1967)指出蕈類菌絲在液態培養下，蕈類菌絲生長的 pH 值範圍很廣；由 Fang(2006)

研究結果發現，探討的靈芝生理活性不同，則 pH 值的控制也會不同。

### (三) 攪拌與通氣

以三角瓶做液態培養，可利用震盪方式增加培養基的溶氧量，而生物反應器經由通氣與攪拌，將氧氣及微生物所需之基質分散均勻，並促進質量及熱量傳遞之效率。在好氧性發酵系統之操作上，氧氣對於合成多醣高分子的組成物是必須的。溶氧供給必須能充分滿足微生物之生長需求，不致造成代謝或產物分泌之限制。

## 化學因素

### (一) 碳源

凡構成菌類細胞和生產代謝產物所需的碳基來源之營養物質均稱為碳源。碳源對微生物生長極重要，其主要作用為構成細胞物質和供給菌類所需的能源。但針對不同碳源對靈芝菌絲進行液態培養時，發現並非所有文獻皆有一致結果，如1983年張所做的研究，探討不同碳源對菌絲生長，結果顯示葡萄糖有較佳菌絲產率；1985年Sone等人曾使用多種碳源於靈芝液態培養，結果得到乳糖對菌絲生長最佳，其次是麥芽糖，而蔗糖所生成的菌絲量比葡萄糖所生成的菌絲量多。

### (二) 氮源

氮是構成菌類蛋白質和核酸的主要元素，一般而言，氮源不提供菌體所需能量，菌類所需的氮源種類如下：(1)無機氮源：如銨鹽與其他含氮的無機鹽類如氯化銨、磷酸二氫銨、硝酸鈉。(2)含氮的有機氮源：如豆餅粉、麩皮、胺基酸、

尿素、玉米浸出液等。

1967 年 Litchfield 等人整理前人結果得知，在蕈類液體培養過程中使用無機氮源，結果顯示含銨鹽( $\text{NH}_4^+$ )的化合物，對菌體生成有所助益。此外由 1996 年黃研究指出， $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  在靈芝菌體產量方面，均比其他無機氮源高。

### (一) 無機鹽類

蕈類液體培養之培養基中所含的無機鹽類，會影響到菇類香味物質及菌絲體之胺基酸組成。 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{CuSO}_4$  及  $\text{NH}_4^+$  等可促進菌絲之生長率。所使用的無機鹽類濃度需控制在足以供給菌絲所需，以防止苦味物質的生成。此外，磷在生物體內是構成蛋白質、磷脂體、磷酸脂等成分不可缺少的元素。進行靈芝液態培養時，其培養液中若缺少磷酸鹽，則菌體生長較差，所以培養液用磷酸鹽來構成緩衝系統是比較妥當。

### (二) 生長因子

有些微生物雖可在酵母萃取液、血清等天然培養基中生長，但不能在糖、胺基酸及無機鹽類等調製之合成培養基中生長，這是因為缺乏生長所需之微量有機化合物，這些生長必須物質，稱為生長因子。生長因子是維持蕈類生長所不可或缺的物質，一般常見的生長因子有葉酸、維他命  $\text{B}_{12}$ 、維他命  $\text{B}_6$ 、維他命  $\text{K}$  等。在靈芝培養中一般常見的生長因子為酵母萃出物。培養基中弱降低酵母萃出物用量，將使菌體生長較慢、糖類消耗變慢。

### (三) 碳氮比

就蕈類液態培養而言，碳氮比(C:N)是十分重要的控制因子，除了會影響到菌絲生長的效率及產量之外，也會影響到菌體中蛋白質和脂質的含量。一般碳氮比以 5:1 到 25:1 之範圍為宜。高於此值時，菌絲體脂質含量會過多而蛋白質含量會明顯下降，影響其營養值。



圖 2-1 野生靈芝子實體(圖擷自網路)



圖 2-2 靈芝液態培養 7 天形成之菌絲球



圖 2-3 靈芝固態培養於錐形瓶內第 6 天之生長情形

### 2-1-3 靈芝的生理活性與藥理效果

靈芝是珍貴的食藥用真菌，其主要原因是靈芝含有多種具有生物活性與療效的物質，如表 2-1 所示，並於下頁簡述主要藥理作用。

表 2-1 靈芝的生理作用與藥理效果(蔡，2008)

活性物質名稱	主要藥理活性	參考文獻
多醣體( Polysaccharide)	抗腫瘤、降低血糖、保肝 解毒、消炎	(Huie et al.,2004) (Sone et al.,1985)
三萜類(Triterpenoids)	抑制癌細胞、降低血壓、 抑制血小板凝集、抑制組 織胺釋放、抗過敏反應	(Huie et al.,2004) (Mahato et al.,1997)
超氧歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)	防止人體 DNA 受傷害 或致癌、老化、病變	(Alexotolus,1979)
免疫調節蛋白 (Immunomodulatory proteins)	促進末稍血液細胞增 殖、促使末稍淋巴球 (peripheral lymphocytes) 之增生	(林，1996)
蛋白多醣(Proteoglycan)	降血糖、加快受損細胞及 組織的修復和肝臟解毒 能力	(Hikino et al.,1985) (Wang et al., 2002)
有機鍺(Germanium)	緩和癌症末期痛感、促進 新陳代謝、防止老化、改 善體質、治療愛滋病	(劉，1990)
腺苷(Adenosine)	鎮靜、血管擴張、降溫、 鎮痛、抗缺氧、降低膽固 醇	(Misiki and Kututa,1981)
類固醇(Steroid)	抑制肝癌細胞活性、抑制 人體 PLC/PRF/5 細胞和 KB 細胞之作用	(劉，1990)
靈芝多醣幾丁質 (SACCHACHITIN)	皮膚組織再生、抑制青春 痘之細菌、抑制 tyrosinase 以及黑色素細胞之黑色 素產生	(蘇，2006) (Hung et al.,2001)

### (一)抗癌作用

在靈芝的藥理研究中;具抗癌及可增強免疫之靈芝多醣體為 $\beta$ 型之高分子多醣體(黃, 1989), 即必須具有 C-6 側枝, (1-3)- $\beta$ -D-glucoopyranosyl-(1-3)- $\alpha$ -D-glucoopyranosyl 之結構。如有 Polyol 基接(1 $\rightarrow$ 3)之連接體架之結構則可增加抗癌的效果 (王等人, 1998)。

靈芝多糖體之抗癌轉機可能由靈芝 $\beta$ 型( $\beta$ -(1-3)-glucan)刺激巨噬細胞, 活化巨噬細胞使其分泌細胞刺激素以及淋巴激素, 刺激靜態 T 細胞增殖, 誘導產生自然殺手細胞、毒殺性細胞與 LAK(Lymphokin actived killer cell)細胞等等一連串免疫增強反應, 並經由強化自然殺手細胞和巨噬細胞直接攻擊不正常的腫瘤細胞, 達到防癌、抗癌的效果(許, 2005、黃, 1989)。

目前已知靈芝多醣體並非是直接殺死或抑制癌細胞, 而是經由提高免疫力來間接表現其抗癌活性。

### (二)免疫作用

靈芝多醣體能抑制人類單核白血球增殖, 促使其分化成成熟之巨噬細胞, 具有吞噬及生成細胞質超氧化物功能。並能促進介白素(interleukin IL-2)生成, 顯著增強 T 淋巴細胞之活性, 具有提升免疫力, 改善體質功能(徐、謝, 2001)。

### (三)降血壓作用

主要為 lanostane 類之衍生物及某些三萜類化合物，可以抑制 Angiotensin converting enzyme 而達到降血壓之目的。另外三萜類化合物亦具 Cytotoxic 作用及抑制 Histamine 釋放的功能，而此即靈芝的苦味來源(王等人，1998)。

### (四)降血糖與血脂作用

主要為多醣體 glucan 之結構化合物，除具降血糖之功能外，亦具有抗發炎作用(Hikino et al., 1985)。另外  $\beta$ -glucan 結構則具有降血脂作用，能不同程度的降低血清膽固醇、甘油三酯和  $\beta$ -酯蛋白(林，1996)。

### (五)保肝與治療肝炎

對肝受損之動物，靈芝能降低血清中麩丙酮酸轉胺酶(Serum Glutamic Pyruvic Transaminase；SGPT)，具有消炎解毒作用，可促進肝細胞活化再生(Furue,1987)。赤芝中 ganoderic acid A 可抑制血清中  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶( $\beta$ -glucuronidase)濃度，具有保肝作用。

### (六)抗病毒作用

赤芝子實體萃取之 ganoderic acid  $\alpha$ 、ganoderiol F 及 ganodermanotriol 與赤芝孢子所含 ganoderic acid  $\beta$ 、lucidumol B、ganodermanondiol、ganodermanotriol 及 ganoleucidic acid A 等成份具有抑制人類免疫不全病毒 HIV-1 活性(徐、謝，2001)。

## 2-2 固態發酵

固態發酵製成是利用一些固態之營養基質，不僅提供微生物所需營養(碳源、氮源、無機鹽、水及其他營養物)，還做為細胞的固定物，基質在固態發酵中具有獨特的作用，它影響微生物發酵過程的質傳、熱傳及微生物代謝功能。在較乾燥之環境下培養微生物，而微生物在利用固態營養基質時，會以自然攀附或穿透固態基質等方式生長，形成一特殊生長型態，此種生長型態對於某些微生物之二次代謝產物生產是極為重要 (Viniegra-Gonzalez et al., 2003)。

### 2-2-1 固態發酵之優缺點

固態發酵即微生物分佈在固體表面，而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。固態基質的水分含量一般都非常低，故填充容積比液態深層發酵高，又因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，必需依基質的物理性質與化學性質而定，但微生物呼吸或代謝產生熱使得溫度控制非常困難。因為固態基質床的熱傳導係數非常低，通常強制通氣是控制培養溫度的唯一方法。

微生物被限制在低水含量的基質上生長，有利於黴菌或其他菌絲真菌生長，對細菌則不利於生長，因此固態發酵較不易受到細菌污染；對於高水分含量的培養基而言，穩定通氣通過基質床很困難，通常會發生渠道效應微生物利用空氣中

的氧氣，降低了通氣的能量成本；而空氣的供給與基質床的溫度可藉由強制通氣來控制，由於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。

固態基質床直接進行攪拌非常困難，造成基質床異質性的生理、物理、化學環境不均勻，因此使得細胞、養分、溫度、水含量分佈不規則，這個複雜性使得過程控制非常困難。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。對於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。目前仍然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(Sato and Sudo, 1999)。

## 2-4 柑橘類果皮介紹

### 2-4-1 柑橘類果皮簡介

近年來柑橘類果皮的再利用非常受到重視，由文獻(蔡，2005)指出柑橘類果皮中含有：

#### (一) 果膠物質

由植物、水果、或果皮中萃取出多醣類物質；大致可分為果膠原質、果膠酯酸、果膠酸，而水果中的果膠則為果膠原質，為非水溶性。由於果皮中含有較高的果膠物質，可在人體內能黏附重金屬離子，清除體內毒素及促進小腸蠕動，降低血清膽固醇含量。(Rouseff and Nagy, 1994)

#### (二) 精油

除了具有芳香療法之外，精油中主要成分為檸檬烯(Limonene)具有預防癌症，抑制癌細胞蔓延，包括紫外線引起的皮膚癌及乳癌。

#### (三) 類黃酮

又為維生素 P，含在柑橘果皮中，對人體主要機能包括抗氧化、抗癌、抗發炎及降低血管疾病的功能。

#### (四) 配醣體

碳水化合物之一種，其組成是單醣或寡糖的半縮醛羥基與另一分子中的羥基、氨基或硫羥基等失水而產生水合物。一個配醣體可分為兩部分，一是糖的殘基(糖

去掉半縮醛羥基)，另一是配基(非糖部分)。具有有鎮咳、利尿、防腐、消炎等作用，也是知名的「阿斯匹林」的來源。

#### 2-4-2 精油介紹:

柑橘類果皮油胞層中含有大量精油，成分主要醇類、酯類、醛類、酮類以及碳氫化合物。其中碳氫化合物以檸檬烯含量佔精油70%以上(高,1991、廖,1998)。

##### 2-4-2-1 植物精油來源(Wildwood, 2004)

葉綠素+H<sub>2</sub>O+CO<sub>2</sub>+光→葡萄糖→酵素分解→異戊二烯(Isoprene,IPP)

由異戊二烯衍生出萜烯(如單萜烯、倍半萜烯、雙萜烯等)，幾乎所有的精油成分都由此衍生而來。

萜烯類由異戊二烯單體(Isoprene，分子式 C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)組合而成，異戊二烯本身呈直鍊構造，稱為脂肪烴(aliphatic)或非環狀烴(acyclic)。每個異戊二烯形成一個單位，稱為單體(monomer)以某幾個特定單位建構成精油萜烯成分。

所有的萜類化合物皆有一個共同的前體 IPP (isopentenyl diphosphate)，而 IPP 與 IPP 異構酶作用下形成 DMAPP(dimethylallyl diphosphate)，而 IPP 和 DMAPP 在異戊烯基轉移酶得作用下形成 GPP、FPP 和 GGPP。這些非環化的中間體在萜類化合酶作用下，形成各種閉環的萜類物質。通常單萜來自於 GPP、倍半萜來自於 FPP 而雙萜來自於 GGPP，故萜類合成酶通常也被稱環化酶(龔，2010)。而植物產生異戊二烯形成萜類化合物的代謝途徑為下：

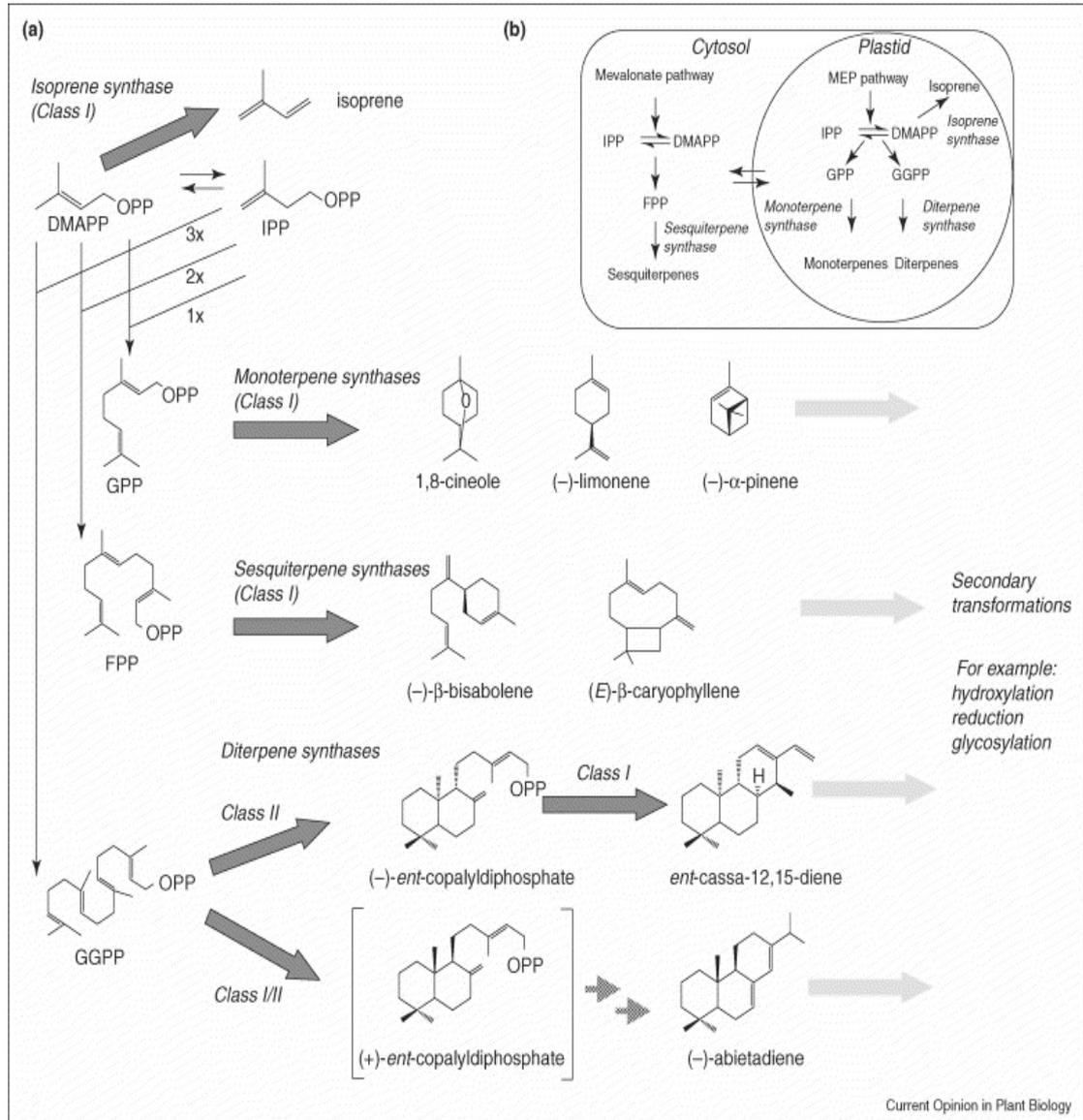


圖 2-4 異物二烯形成萜類化合物代謝途徑(Dorothea Tholl,2006)

表 2-2 果皮所含有之化合物種類

碳氫化合物	含氧碳氫化合物
單萜烯(monoterpene): 2 個異戊二烯	醇類
倍半萜烯(sesquiterpene):3 個異戊二烯	酚類
雙萜烯(diterpene): 4 個異戊二烯	醛類
	酮類
	酯類

#### (一)單萜烯(monoterpene)

由兩個異戊二烯連接而成，分子式  $C_{10}H_{16}$ ，幾乎所有的精油皆含有此成分。

以柑橘類所含的單萜烯類其物理療效有防腐、殺菌、抗過濾性病毒。除了佛手柑之外，柑橘類精油單含有高濃度的萜烯，尤其是右旋檸檬烯(D-lemonene)。

#### (二)倍半萜烯(sesquiterpene)

sesqui 是多半個之意，倍半萜烯分子式是由三個異戊二烯構成  $C_{15}H_{24}$ 。

#### (三)雙萜烯(diterpene)

是由兩個單萜烯即四個異戊二烯建構而成，分子量  $C_{20}H_{32}$ 。由於雙萜烯分子量過大，並不常在一般精油見到，一般蘊藏在樹脂類，樟腦精油中絕大多是雙萜烯化合物，其沸點為  $177\sim 178^{\circ}C$ 。

#### (四)酸(Acid)

為有機物，大部分為水溶性，是很好的抗炎物質具有鎮靜效果因為是弱酸，通常被用來治療皮膚問題。

#### (五)醇類(Alcohols)

最常見為單萜烯醇，具有抗菌效果且能增加免疫力。醇類又分倍半萜烯醇以及雙萜烯醇。

#### (六)醛類(Aldehydes)

安撫中樞神經、抗炎療效不錯。醛類分為:檸檬醛、香茅 醛、水茴香醛、洋茴香醛以及肉桂醛。

#### (七)酯類(Esters)

為精油香氣味主要來源。可以抗炎、抗痙攣以及平撫神經系統，因此分子的溫和特質，所以較不刺激也不傷害皮膚，是很安全的化學成分。

#### (八)酮類(Ketone)

羰基(carbonyl group)與兩個碳基結合的化合物總稱，植物的酮多是脂肪族酮以及含有芳香基的芳香族酮，存在於油脂氧化生成物中，大部分具有特異氣味以及毒性。低量的酮對人體甚有幫助，例如具有殺菌功能。有些酮的作用強烈且有毒性，所以含酮的植物通常都不做精油萃取，以免造成危險。

## 2-4-4 添加之果皮介紹(Sellar,2001)

### 2-4-4-1 葡萄柚 (Grapefruit)

葡萄柚(學名：*Citrus paradise*)，是芸香科(Rutaceae)柑橘屬的一種亞熱帶植物。果實長數十個簇成穗，形狀似葡萄，故名。其樹木通常高度為 5-6 米，最高可達 13-15 米；葉子狹長為深綠色、花為四瓣白花、果實為扁球形，直徑 10-15cm，果皮為黃橙色，其味道甜且清新、略有衝鼻的氣味。品種不同其顏色也有區別，包括白色、粉紅和紅色。而通常萃取其為精油的部位以果皮為主。而其果皮的化學成分主要有醇類(牻牛兒醇、荳蔻油醇)、醛類(檸檬醛)、萜烴類(檸檬烯、松油萜)。

葡萄柚精油具有抗菌、開胃、利尿、消毒、使病理現象消散、補身，對中樞神經系統有平衡的作用，因此可以穩定沮喪的情緒，亦做為淋巴腺的刺激劑，滋養組織細胞，可有效控制身體多餘的水分，對肥胖症和水分滯留能發揮效果，同時具有利尿特性也能改善蜂窩組織炎，因能淨化腎臟和脈管系統(血液、淋巴)。

### 2-4-4-2 檸檬( Lemon)

檸檬(學名：*Citrus limonum*)，是芸香科(Rutaceae)柑橘屬的一種。為常綠灌木或小喬木，枝上有刺，橢圓形葉，線形葉翼，嫩葉為紫紅色，花為白色帶紫，略有香味，單生或 3-6 朵成總狀花序；其果實為橢圓形柑果，果肉極酸；味道具有柑橘類的香氣，新鮮而強勁。而通常萃取其為精油的部位以果皮為主，果皮化學成分為醇類(荳蔻油醇)、醛類(檸檬醛、香茅醛)、萜烴類(檸檬烯、松油萜、楊梅

烯、樟烯、水茴香萜)。

檸檬精油具有抗硬化、抗壞血、抗神經痛、抗風濕、抗菌、收斂、利尿、消毒、除胃腸脹氣、促進結疤、退燒、止血、降血糖、降血壓的作用，對循環系統有絕佳的幫助，使血流暢通，因而降低靜脈曲張部位之壓力，通常用於降低血壓，可恢復紅血球的活力，減輕貧血現象，同時刺激白血球，進而活絡免疫系統，幫助身體抵抗傳染性疾病。藉著去除老死細胞使暗沉的肌膚明亮，改善破裂的微血管，對油膩的髮膚有淨化功效。

#### 2-4-4-3 金桔 (Kumquat)

金桔(學名：*Citrus madurensis*)，為芸香科(Rutaceae)柑橘屬的一種。《本草綱目》：「此橘生時青盧色，黃熟則如金，故有金橘、盧橘之名。」是著名的觀果植物。為常綠灌木；單身複葉，葉翼狹，白色花單生，芳香，通常五齒，每年開花3~5次。果實小，多為橢圓形，有光澤，秋末冬初開始成熟。樹較耐寒、耐旱抗病力強；其氣味具有細緻優雅的甜味，且有獨特的柑橘皮還帶點少許的花香。而通常萃取其為精油的部位以果皮為主，果皮含的化學成分為醇類(牻牛兒醇)、醛類(檸檬醛、香茅醛)、萜烴類(檸檬烯)。

金桔精油具有抗痙攣、利膽、促進細胞再生、利消化、柔軟肌膚、鎮靜、補身等功效，桔油是溫和精油，孕婦、孩童皆可使用。具有刺激肝臟、調節代謝的功能，以及促進膽汁分泌、加速脂肪分解的功能。

#### 2-4-4-4 柳橙( Orange)

柳橙(學名:*Citrus sinensis*)，為芸香科(Rutaceae)柑橘屬的一種，亦稱為柳橙、甜橙、黃果、金環、柳丁。在臺灣，橙經常都被叫作柳丁，其實應寫成「柳橙」，此乃因閩南語中「丁」、「橙」同音而誤寫至今橙是一種柑果，它其實是一種人類種植了很久的混合品種——它本來是柚子(*Citrus maxima*)與橘子(*Citrus reticulata*)的雜交品種，起源於東南亞；其形態常綠小喬木，高 3-8m。圓形樹冠，葉片呈橢圓或卵圓形，有波狀鋸齒。白色花朵，花期 4 月；果實卵圓形，皮表面光滑，不易剝離。根據品種不同，果實成熟期有所不同，一般多在冬季成熟。喜歡光照，溫暖環境，需水量較大。人工種植多選擇熱帶/亞熱帶季風、地中海氣候,丘陵、低山或江河湖沿岸地區。其在生物學的角度，我們日常所吃的甜橙其實亦是一個變種原來的品種應該是酸橙，甜橙是酸橙在華南的變種；其氣味具有清新強烈的柑橘香。橙皮有時用來作為裝飾，也可從橙皮及橙花中提取出精油。橙皮也可作為中藥材，如《滇南本草》記載：「黃果皮化痰定喘，止咳嗽，下氣消痰，功甚於廣陳皮；補胃和中，力不及廣陳皮。主降氣寬中，破老痰結痰固如膠者。」 某些種類的臍橙也可作為觀賞果樹來種植。而通常萃取其為精油的部位以果皮為主，果皮含的化學成分為醇類(橙花醇)、醛類(檸檬醛)、萜烴類(檸檬烯)、酯類(胺基苯甲酸甲酯)。

柳橙精油具有抗菌、利胃、祛腸胃脹氣、利消化、抗沮喪、鎮靜、補身等功效，能刺激膽汁分泌、幫助消化脂肪、促進食慾、幫助身體吸收維他命 C，藉此

抵抗病毒感染，對感冒、支氣管炎、發燒的狀態均有助益，亦可幫助膠原生成，對身體組織的生長與修復有決定性的影響，且能有效紓解肌肉疼痛，因為可促進發汗，可幫助阻塞的皮膚排出毒素，能有效改善乾燥皮膚、皺紋及濕疹，是相當優異的護膚油。

#### 2-4-4-5 紅柑(Tangerine)

紅柑(學名: *Citrus reticulata*)，為芸香科(Rutaceae)的一種，依據 1967 年 Hodgson 氏及 1981 年 Ziegler 氏等之記載得知，為世界柑橘大師施溫格氏(Swingle)於 1913 年，以寬皮柑與甜橙雜交選育出之桔橙類(tangor)；為常綠小喬木，樹型呈叢狀，葉互生，葉片中小型，闊披針形，葉緣鈍鋸齒，葉面、葉背平滑革質；花中小形白色，具芳香味；其果實堅實，扁圓型，果基與果頂部平坦，果徑約 7~8cm，果皮薄光滑，橙黃色，較不易剝皮。果肉柔軟多汁，深橙色。而通常萃取其為精油的部位以果皮為主，果皮含的化學成分為醇類(香茅醇、芫荽油醇)、醛類(檸檬醛)、萜烴類(檸檬烯)、倍半萜(杜松萜烯)。

紅柑精油具有抗菌、抗痙攣、刺激表皮細胞再生、利胃、補身等功效，其醫療作用與甜橙、桔多所重疊，三者對消化系統都有良好的效果，能處理各種腸胃問題，如脹氣、腹瀉、便秘，還能刺激膽汁流動，以分解脂肪。是血管系統的補藥，特別是為循環方面，可滋養末梢血管的動脈與靜脈，因此可活化疲憊疼痛的四肢(陳，1999)。

### 第三章 實驗材料與分析方法

#### 3-1 實驗菌株及細胞株

本實驗所採用之菌株為靈芝屬之赤靈芝 *Ganoderma lucidum* (BCRC36123)，係購自新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，菌株以生物資源中心所建議之 PDA 做為斜面培養基，接菌完畢後於 30°C 培養箱生長，之後置於 4°C 冰箱中保存備用，每 2 個月更新一次。

#### 3-2 實驗藥品

本研究所使用藥品名稱規格如表 3-1 所示：

表 3-1 實驗藥品

藥品名稱	廠牌	規格
Glucose	華興化學有限公司	for cultivation
D-(+)-glucose	SIGMA	for standard curve
Yeast extract	DIFCO	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	SHOWA	試藥特級
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	聯工化學試藥	EP 級
Potato dextrose agar (PDA)	DIFCO	
NaOH	SHOWA	EP 級
HCl	林純藥工業株式會社	試藥 1 級
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	SHOWA	昭和 1 級
Folin & Ciocalteus phenol reagent	德國 Merck 公司	

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	SHOWA	試藥特級
95% Ethanol	景明	
99% Ethanol	景明	
Phenol Methanol	林 純藥工業株 式會社 ECHO	試藥 1 級
$\text{KHSO}_4$	林 純藥工業株 式會社 ECHO	試藥 1 級
$\text{NH}_4\text{OSO}_3\text{NH}_2$	林 純藥工業株 式會社 ECHO	試藥 1 級
$\text{NaNO}_2$	SHOWA	試藥特級
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	SHOWA	試藥特級
3-Methyl-2benzothiazolinone hydrazone hydrochloride hydrate(MBTH)	Alfa Aesar	
$\text{CH}_3\text{COOK}$	SHOWA	昭和 1 級
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	SHOWA	昭和 1 級

---

### 3-3 實驗儀器與設備

本研究所使用實驗儀器與設備如表 3-2 所示：

表 3-2 實驗儀器與設備

儀器設備名稱	廠牌	規格型號
桌上型 pH-mV-°C 酸鹼度計	美國 EUTECH 公司	Cyberscan pH 510
電磁加熱攪拌器	德國 IKA 公司	C-MAG HS7
無塵無菌操作台	台灣亮盛公司	JW-4N
高壓滅菌釜	台灣宏霖儀器公司	HL-340
試管震盪機	德國 IKA 公司	MSI minishaker
迴轉式震盪培養箱	台灣健鑫儀器	OSI-500
往復式震盪恆溫水槽	台灣健鑫儀器	SB-302
均質乳化機 (polytron)	德國 IKA 公司	ULTRA-TURRAX T25
高速中型離心機	德國 HETTICH 公司	Universal-32R
高速冷凍離心機	日本 SANYO	HARRIER18/80
紫外光-可見光譜儀	美國 Thermo 公司	GENESYS UV10
微電腦蒸餾水製造機	英國 FISTREEM 公司	WSC044
超純水製造機	美國 MILLIPORE 公司	Simplicity
超音波震盪機	美國 BRANSON 公司	5210
葡萄糖分析儀	YSI	2300 STAT
冷凍乾燥機	丹麥 HETO	CT-110
烘箱	台灣日升	DV-452
斜立式旋轉蒸發器	日本 EYELA	N-1000
數位水浴槽	日本 EYELA	SB-1000

### 3-4 分析方法

#### 3-4-1 pH 值測定

使用 SUNTEX pH meter 測其 pH 值。

#### 3-4-2 菌體 Biomass

取培養發酵液，以 100mesh 篩網過濾，再以蒸餾水沖洗菌體 3-5 次，之後將過濾後的菌體冷凍乾燥抽乾後，即可測量其菌體乾重量。

#### 3-4-3 葡萄糖濃度測定

吸取適量的發酵過濾液，經適當稀釋後，再利用 YSI 2300stat 測定 glucose。

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

##### 酚-硫酸比色法(Phenol-sulfuric acid assay)

##### 1.測定原理

利用許多醣類具有的還原能力：單醣、寡糖、多醣與它們的衍生物，包括二甲醚自由基團或具有還原能力的基團，其與酚及濃硫酸作用時會反應生成橙黃色溶液，再以分光光度計測量其在可見光 490 nm 波長的吸光值。

##### 2.標準曲線製作

標準品為 D(+)-glucose，配製其濃度範圍為 0.01~0.2mg/ml，並以蒸餾水做為空白對照組。

(1) 取以上溶液 2 ml 置於試管中，各加入 1 ml 濃度 5% 酚溶液，並於 10-20

分鐘內各加入 5 ml 濃度 95.5%濃硫酸溶液，均勻混合後靜置 10 分鐘。

(2) 放入 25°C 恆溫水槽水浴反應 15 分鐘，待呈色穩定後，以分光光度計測

其在波長 490 nm 下之吸光值，即可繪出糖濃度與吸光值關係圖。

### 3. 樣品分析

(1) 將多醣回溶於同體積(發酵液)的蒸餾水中，離心後取上清液，用適量的

蒸餾水加以稀釋。

(2) 取以上經稀釋的多醣溶液 2ml 置於試管中，加入 1ml 濃度 5% 酚溶液，

並於 10-20 分鐘內各加入 5ml 濃度 95.5%濃硫酸溶液，均勻混合後靜置

10 分鐘。

(3) 放入 25°C 恆溫水槽水浴反應 15 分鐘，待呈色穩定後，以分光光度計測

其在波長 490 nm 下之吸光值，對照標準曲線即可求得樣品的多醣濃度。

#### 3-4-5 總酚類含量測定(Determination of Total Phenolics)

利用酚類化合物，在鹼性的環境下能與 Folin-Ciocalteu'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。

總酚類含量測定係採 Folin-Ciocalteu 法(Wang,2006)。取 0.3 ml 甲醇萃取液，加入 6 ml 2%的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ，混合均勻反應 2 分鐘。再加入 0.3 ml 50%的 Folin-Ciocalteus reagent，混合均勻反應 30 分鐘。以分光光度計測其在 730 nm 下的吸光值。再由

已知濃度的標準 Gallic acid 檢量線即可算出每克樣品中所含熊果酸當量 Gallic acid equivalent(GAE)，得知總酚含量。

#### 3-4-6 胞內粗三萜含量測定

由(Tang and Zhong, 2002)與(Chen,Xie and Gong 2007)之方法做結合，則可使萃取時間縮短。取乾菌絲 100 mg，加入 50%乙醇 3 ml 利用超音波震盪法震盪 30 min，過濾萃取液，將殘渣再加入 50%乙醇 3 ml 震盪 30 min，收集濾液共 6 ml 減壓濃縮至乾，將乾燥物加 3 ml 水回溶並加入 3 ml 氯仿萃取 30 分鐘，取下層液體加入 3 ml  $\text{NaHCO}_3$  震盪 30 min，之後以 1N HCl 及 1N NaOH 調整液體 pH 至 3 以下，取下層液體減壓濃縮至乾，加入 2 ml 95%乙醇，在波長 245 nm 下測其吸光值。

#### 3-4-7 類黃酮含量測定

利用三氯化鋁與黃酮類化合物作用後，生成黃酮的鋁絡物，為黃色。黃色的深淺與黃酮含量成一定比例關係。

取萃取液 0.5 mL，依序加入 1.5 mL 之 95 % 乙醇、0.1 mL 之 10 %  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 mL 之 1 M  $\text{CH}_3\text{COOK}$ 、2.8 mL 之去離子水，混合均勻後於室溫下靜置 40 分鐘後，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類黃酮物質含量，單位為 mg/mL (Nagy and Grancai,1996)。

### 3-4-8 固態培養菌絲葡萄糖胺含量測定

將乾燥的菌體 0.25 克與 3 ml 72% $H_2SO_4$  在 25°C、130 rpm 的恆溫水槽中反應 30 min，再以 27 ml 蒸餾水稀釋，將水解液以 121°C 殺菌 2 hr，再將水解液以 10M 與 0.5M NaOH 中和到 PH=7。最後，再以比色法(colorimetric method)分析葡萄糖胺含量。

### 3-4-9 葡萄糖胺比色法

將 1 ml sample 加入 1 ml 5% $KHSO_4$  與 1 ml 5% $NaNO_2$ ，放置並偶爾搖晃 15min，確保去胺反應完全；加入 1 ml 12.5% $NH_4OSO_3NH_2$ ，以移走過多的亞硝酸，並搖晃 5 min；接著加入 1 ml 0.5%MBTH，100°C 水浴反應 10 min；最後加入 1 ml 0.5% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ，反應 30 min。將上述反應後之樣品以分光光度計於 650 nm 波長測吸光值。由已知濃度之標準葡萄糖胺檢量線，計算所含葡萄糖胺含量(Tsuji et al.,1969)(Ride&Drysdale,1972)(Tomaselli et al.,2001)。

註:Blank 吸收值則以 1 ml 水溶液替代 1 ml sample 做反應，扣除基質之影響。

### 3-5 實驗方法

#### 3-5-1 實驗架構

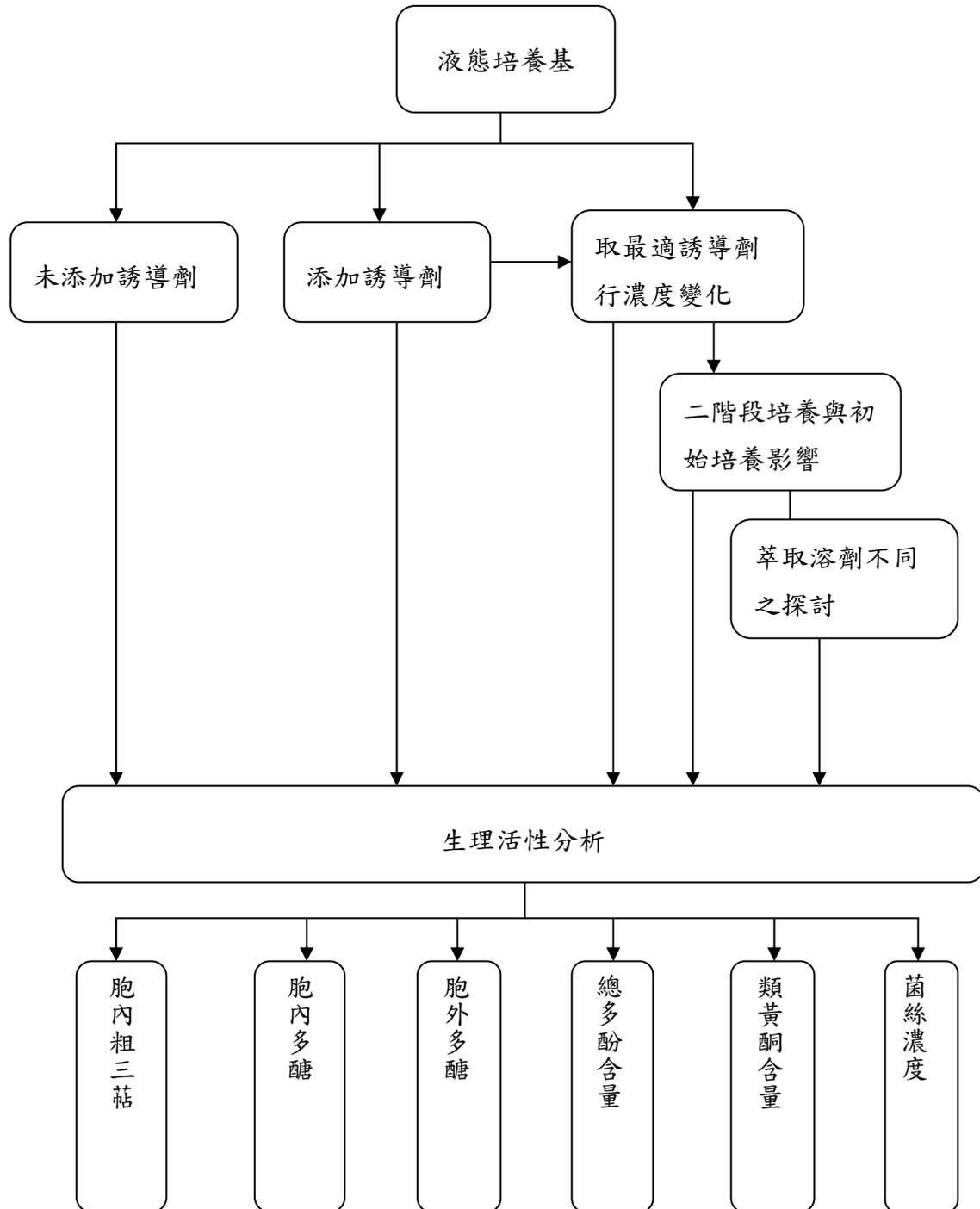


圖 3-1 液態實驗架構圖

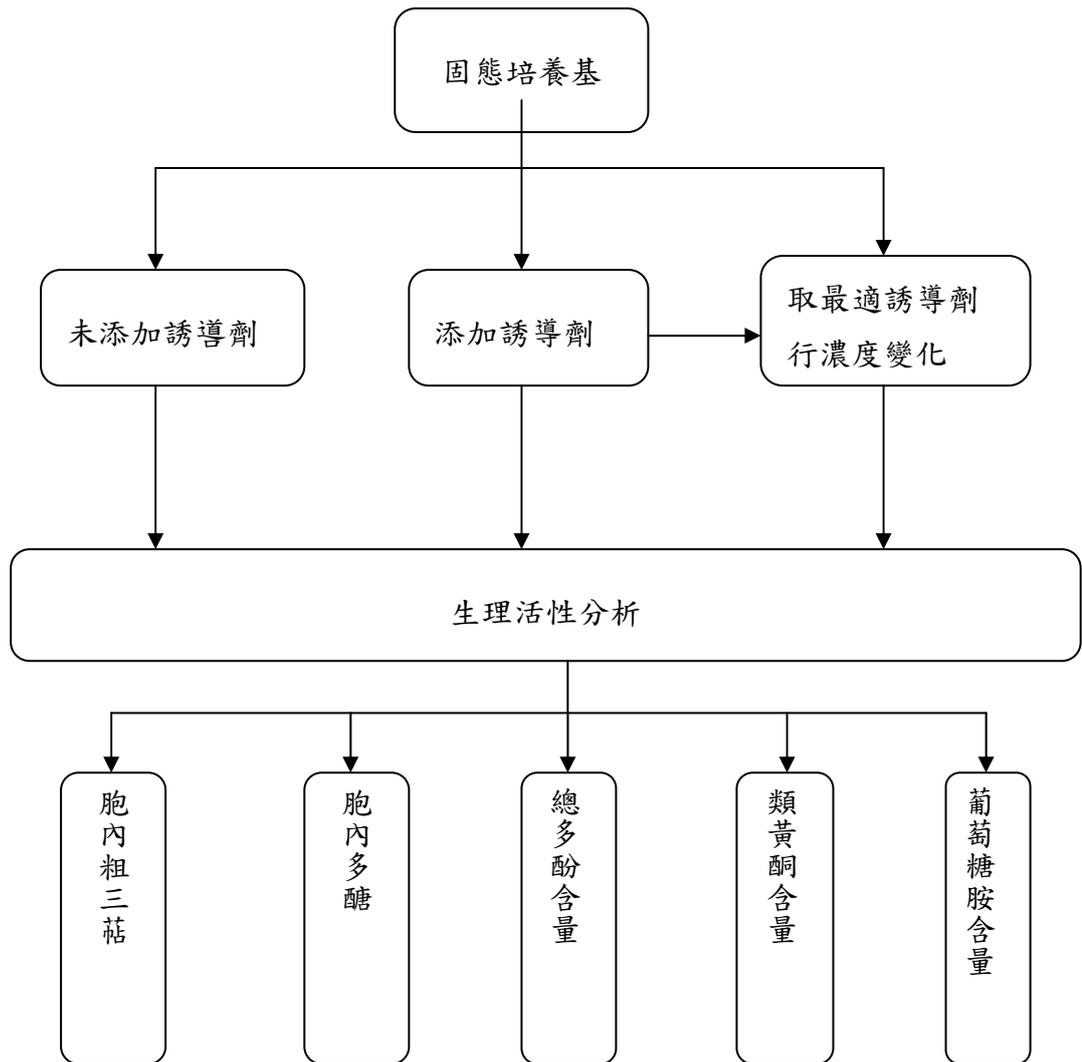


圖 3-2 固態實驗架構圖

### 3-5-2 靈芝菌種培養與保存

#### 3-5-2-1 菌種斜面試管保存

本實驗以試管斜面保存菌種。配製 39 g/l 濃度的 PDA (Potato Dextrose Agar) 作為斜面培養基，滅菌後，置於無塵無菌操作檯中，待 PDA 冷卻硬化，將靈芝菌種接種於試管斜面培養基上，於 30°C 培養七天後，放入 4°C 冰箱中保存備用，

約二個月更新一次。

### 3-5-2-2 培養皿平面培養與接菌活化

配製 39 g/l 濃度的 PDA 作為培養皿平面培養基，接菌時取一已長有靈芝菌絲之斜面菌種，以白金鈎刮取一小塊移至空白培養皿中央，之後放入 30°C 培養箱中靜置活化培養。

### 3-5-2-3 種菌製備

本實驗研究所採用的液態培養基成份如下：Yeast extract 3.0 g/l、Glucose 20.0 g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/l、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/l，並利用 0.1N HCl，將液態培養基之 pH 調整為 4。

裝於 250 ml 三角瓶的培養基經滅菌過後，取已經生長活化之平面培養菌絲，以自製菌絲切割器切成四個單位菌絲塊(0.5cm×0.5cm)，以白金鈎將菌絲塊接入液態基礎培養基中，並置於 30°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100rpm 培養 7 天做為種菌。

### 3-5-2-4 水萃液製備

將秤重 50 g 的基質(柳丁果皮、檸檬果皮、葡萄柚果皮、金桔果皮、茂谷柑果皮)加入 1 L 的水，煮沸 3 個小時，用 100 mesh 篩網過濾後，以真空濃縮器於 60°C 下減壓濃縮為 10 倍之果皮水萃液，取出濃縮液於 4°C 冷藏備用。

### 3-5-2-5 乙醇萃取物製備

將秤重 50 g 的基質(柳丁果皮、檸檬果皮、葡萄柚果皮、金桔果皮、茂谷柑果皮)加入 1 L 的 95%酒精，以超音波震盪萃取 2 小時，靜置一天，用 100 mesh 篩網過濾後，真空濃縮器於 60°C 下減壓濃縮為 10 倍之果皮水萃液，取出濃縮液於 4°C 冷藏備用。

### 3-5-3 三角瓶液態培養試驗

此試驗之主要目的，為探討不同培養天數，及添加果皮水萃液對靈芝有效成分生成之影響。培養條件為，使用 250 ml 三角瓶，其總操作體積為 100 ml，培養溫度為 30°C。試驗方法，配置 98 ml 液態培養基，並利用 0.1 N HCl 和 0.1 N NaOH，將液態培養基之 pH 調整為 4，倒入 250 ml 三角瓶中，添加果皮水萃液 2 ml，使總體積達到 100 ml，用矽膠塞將錐形瓶口塞緊，至直立式滅菌釜在 120°C 滅菌 20 分鐘後，放置於無菌操作台，冷卻至室溫。之後，把三角瓶前培養的種菌，利用滅過菌的均質機(polytron)攪碎菌絲球 10 秒後，取 5 ml 的接菌量接種於 250 ml 三角瓶中，於 100 rpm、30°C 迴轉式恆溫培養箱中培養，記錄 pH、菌體濃度、葡萄糖濃度。

#### 3-5-3-1 二階段培養濃度變化培養試驗

此試驗之主要目的，為探討添加誘導劑之時間的不同，對靈芝有效成分生成之影響。培養條件為，使用 250 ml 三角瓶，培養溫度為 30°C。試驗方法，配置

100 ml 液態培養基，並利用 0.1 N HCl 和 0.1 N NaOH，將液態培養基之 pH 調整為 4，倒入 250 ml 三角瓶中，添加果皮水萃液 1、2、4、8、10 ml 各自添加至 100 ml 液態培養基，做第 0 天添加以及第 4 天添加誘導劑，對靈芝有效成份之探討。

### **3-5-3-2 添加酒精果皮萃取物濃度變化培養試驗**

此試驗之主要目的，為探討添加誘導劑之時間以及果皮萃取方式不同，對靈芝有效成分生成之影響。培養條件為，使用 250 ml 三角瓶，培養溫度為 30°C。試驗方法，配置 100 ml 液態培養基，並利用 0.1 N HCl 和 0.1 N NaOH，將液態培養基之 pH 調整為 4，倒入 250 ml 三角瓶中，添加酒精果皮萃取物 1、2、4、8、10 ml 各自添加至 100 ml 液態培養基，同時做第 0 天添加以及第 4 天添加誘導劑，對靈芝有效成份之探討。

### **3-5-4 三角瓶固態培養試驗**

此試驗之主要目的，為探討固態培養與液態培養，兩種不同型態之菌絲體對靈芝有效生理活性之影響。固態培養基之基質分別為大薏仁 15 g，加入蒸餾水 25 ml，料水比為 3：5。固態培養基殺菌後，將培養 7 天之液態種菌以均質機打碎，吸取 5 ml 均質液，接入固態基礎培養基中。之後將其置於 30°C 迴轉式恆溫培養箱中培養。

### 3-5-5 靈芝胞內多醣萃取

取經冷凍乾燥後之菌絲體與烘乾之固態發酵物 100 mg 粉末加入 10 ml 蒸餾水，置於滅菌釜(121°C，1.2 Kg/cm<sup>2</sup>)滅菌 20 分鐘，重複兩次，再以 8000rpm，離心 10 分鐘，收集上清液即為胞內多醣粗萃液。

將胞內多醣粗萃液與 95 %酒精以體積比 1：4 之比例混合，於 4°C 冰箱中靜置 24 小時以沉澱多醣體。多醣體完全沉澱後，以 8000rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，將沉澱物烘乾。將此沉澱物加入二次蒸餾水回溶，並將樣品經適度稀釋後，以酚-硫酸法測定其胞內多醣濃度。

### 3-5-6 靈芝菌絲體甲醇萃取物之製備

取冷凍乾燥後之液態菌絲體與烘乾之固態發酵物，以固定倍數之甲醇於 50°C，130 rpm 下萃取一天，以 8000 rpm 離心 10 分鐘，所得的甲醇萃取液以冷凍乾燥的方式濃縮至全乾，再以甲醇定容成一定濃度，將所得的萃取物儲存於 4 °C 備用。

## 第四章 結果與討論

### 4-1 靈芝三角瓶液態培養試驗

此實驗之目的是為了探討在菌體培養過程中，添加的誘導劑對菌體生長及有效成份之影響。本研究選用 Yeast extract 3.0 g/l、Glucose 20.0 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/l 做為液態培養基，分別添加五種不同的果皮水萃液誘導劑，分別是檸檬、葡萄柚、柳丁、金桔、紅柑，與靈芝進行液態發酵培養試驗，觀察不同果皮水萃液做為誘導劑添加對靈芝生理活性成分含量影響。

#### 4-1-1 基礎培養基之培養

由圖 4-1 顯示，培養時間為 15 天，菌體濃度隨時間上升至第 7 天後為最大值此時為碳源的葡萄糖含量則有明顯的變化。在第 9 天時推測產生菌體自溶現象此時葡萄糖含量略微回升，胞外多醣含量亦上升而菌絲體濃度卻下降。

由圖 4-2 顯示，以整體三萜含量以及整體多醣濃度探討，靈芝酸含量在第 7 天時達到最大值 0.039 g/L，第 7 天之後到第 11 天則下降，第 11 天到第 13 天則略回升至 0.032 g/L。到第 9 天時，靈芝液態整體胞內多醣含量達到最大值 0.523 g/L，因在第 7 天菌絲濃度含量最高，依整體胞內多醣來看，則比第 9 天的整體胞內多醣略低為 0.513 g/L。從第 9 天到第 11 天迅速下降，第 11 天之後則回升至 0.521 g/L。由圖 4-3 顯示，靈芝液態發酵的總多酚則在第 5 天即達到最大值 7.50mg/g D.W.之後則開始下降至第 7 天時為最低點 6.320 mg/g D.W.，第 7 天到

第 13 天則隨時間增加而增加；類黃酮的部分則在前半段並無太大的趨勢，且含量低到第 15 天達到最大值  $1800 \mu\text{g/g D.W.}$ 。

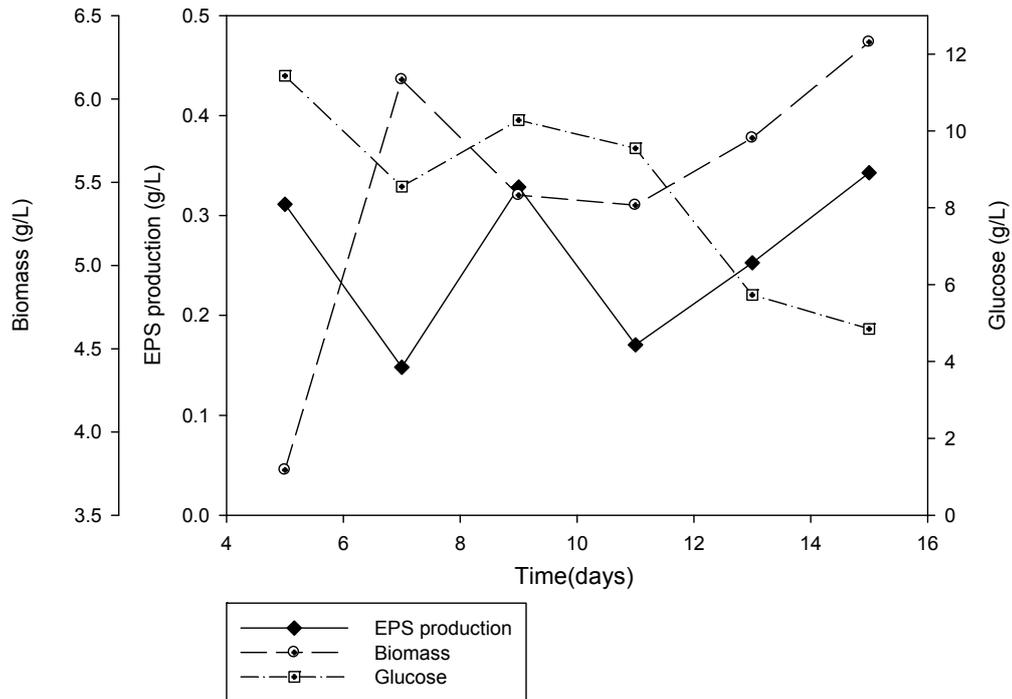


圖 4-1 基礎培養基之靈芝菌絲體生長趨勢圖

培養條件：基礎培養基

初始 pH4

接種量 5% (v/v)

溫度  $30^{\circ}\text{C}$

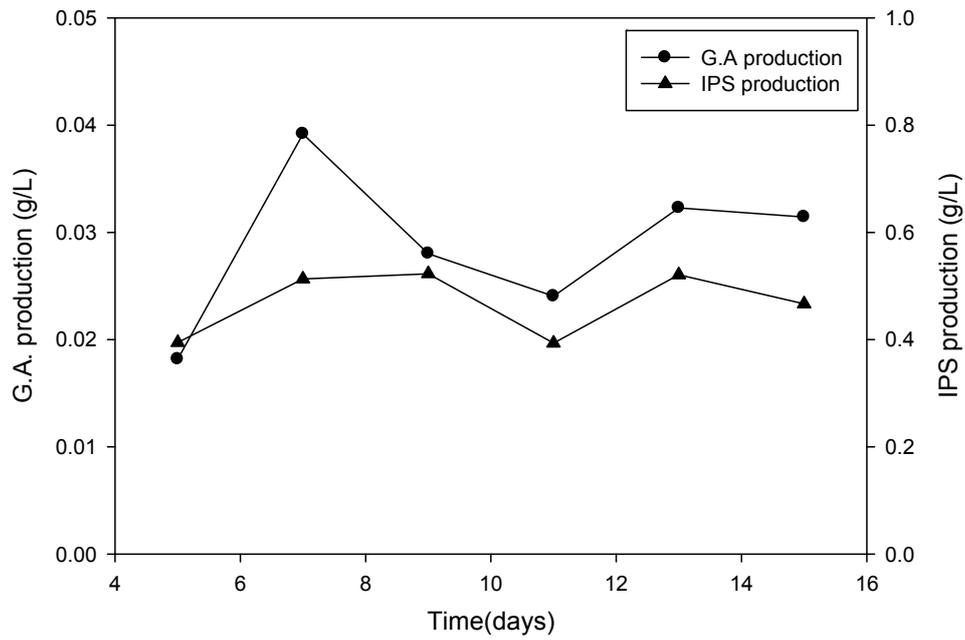


圖 4-2 基礎培養基之靈芝菌絲體靈芝酸與多醣含量影響

培養條件：基礎培養基

初始 pH4

接種量 5% (v/v)

溫度 30°C

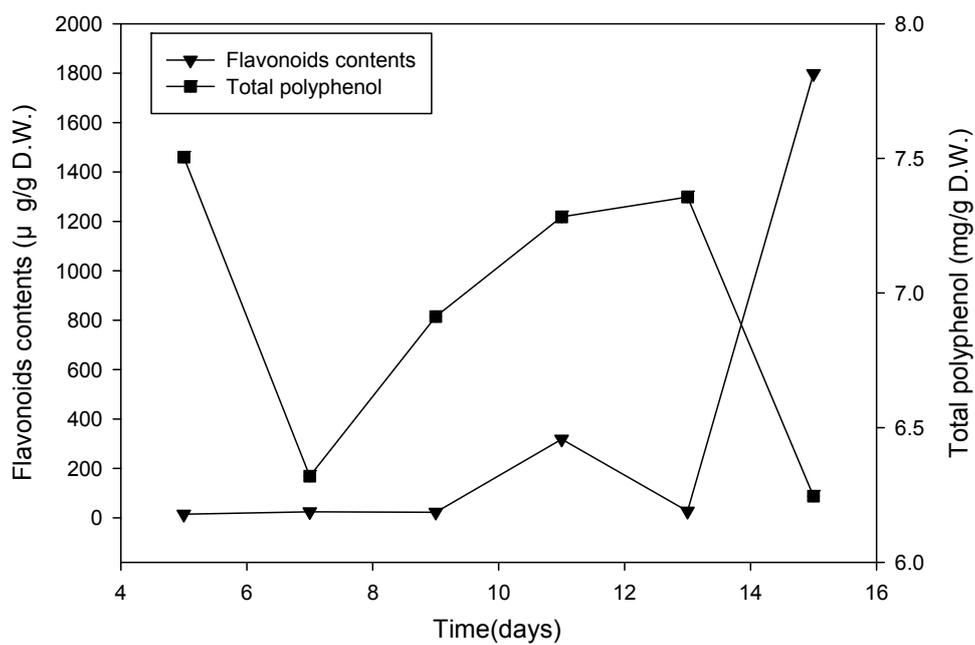


圖 4-3 基礎培養基之靈芝菌絲體總酚與類黃酮含量影響

培養條件：基礎培養基

初始 pH4

接種量 5% (v/v)

溫度 30°C

#### 4-1-2 添加檸檬水萃液

由圖 4-4 顯示，添加檸檬水萃液進行靈芝液態培養的生長趨勢圖，菌絲濃度從第 5 天到第 7 天上升，而葡萄糖殘量則為下降，此時菌體分解掉葡萄糖促使菌絲濃度生長；第 7 天至第 9 天菌絲濃度迅速下降，第 9 天之後胞內多醣則開始上升，葡萄糖殘量則由第 9 天之後開始下降，第 11 天到第 13 天時又上升，當到第 15 天時則胞外多醣與菌絲濃度達到最大值，分別為 0.46 g/L 與 7.02 g/L。由圖 4-5 顯示，在第 5 天到第 13 天靈芝酸並沒有太大的改變，反而比控制組還來的較低，到第 15 天時則達到最大值為 0.053 g/L，推測使用檸檬水萃液在初期會抑制靈芝酸生成；在第 9 天至第 15 天整體多醣含量則呈現大略上升的趨勢，而在第 15 天時，因菌絲濃度達到最大值，而使整體多醣含量達到最大值 0.268 g/L。由圖 4-6 顯示，總多酚含量在第 7 天含量為最大值 8.32 mg/g D.W.，接著，隨時間增加而下降，第 11 天之後則約略上升；類黃酮含量則在第 7 天到第 11 天上升達最大值 3.34  $\mu$ g/g D.W.。

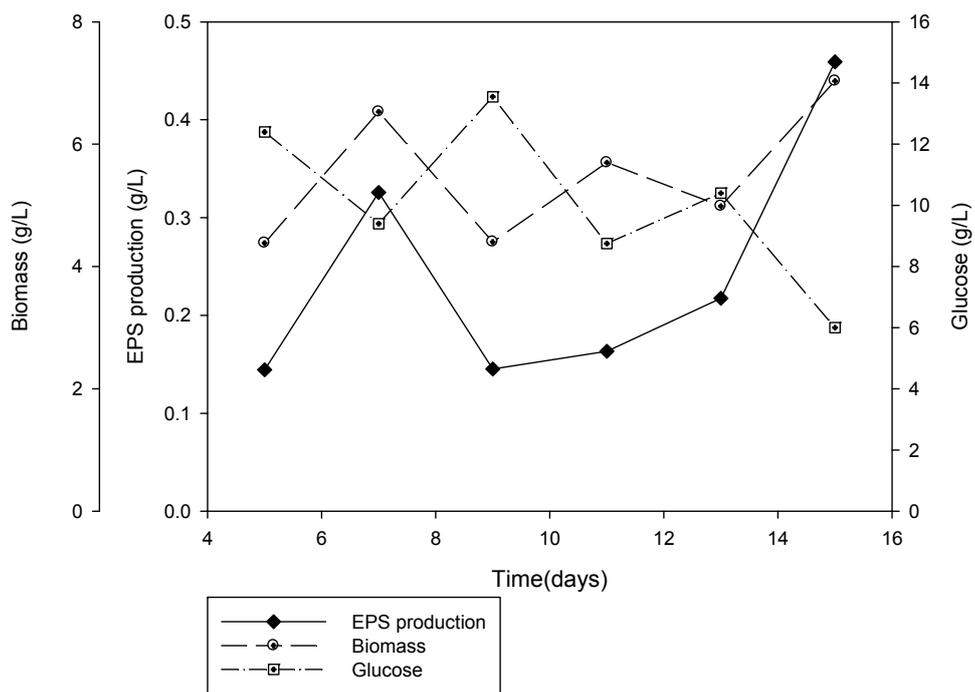


圖 4-4 添加檸檬水萃液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖

培養條件：基礎培養基+2ml 檸檬水萃液

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

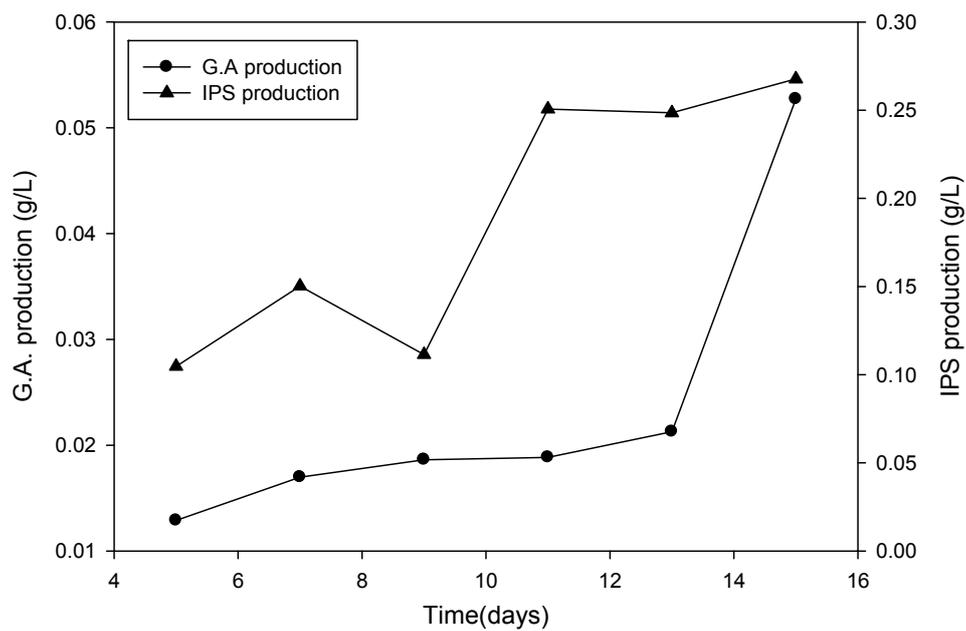


圖 4-5 添加檸檬水萃液對靈芝菌絲體靈芝酸與多醣含量之影響

培養條件：基礎培養基+2 ml 檸檬水萃液

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

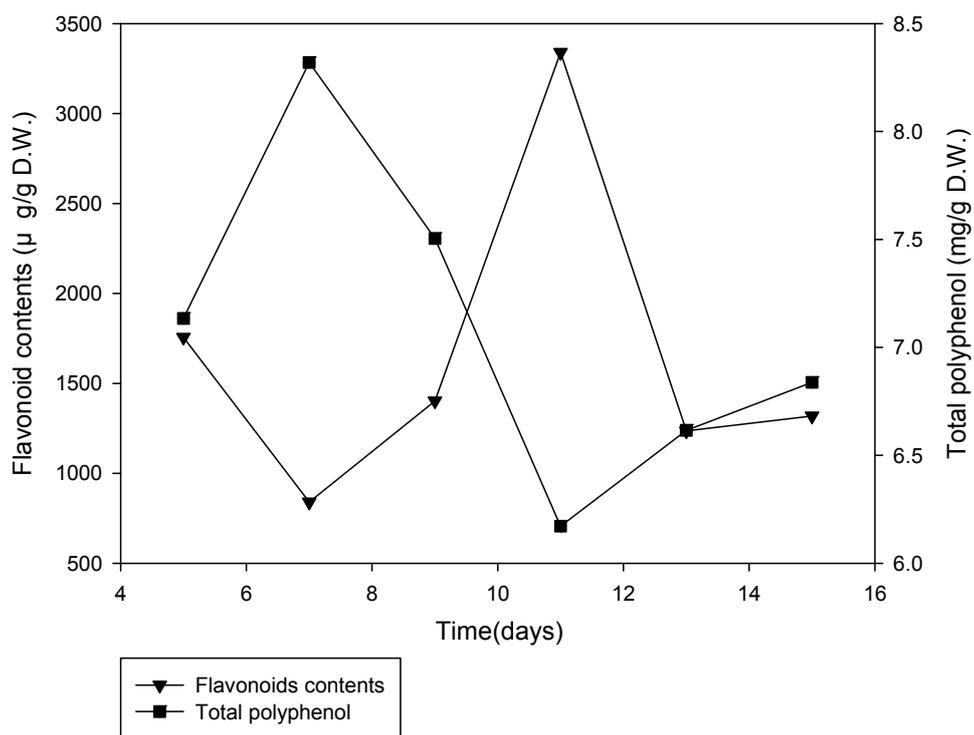


圖 4-6 添加檸檬水萃液對靈芝菌絲體總酚與類黃酮含量之影響

培養條件：基礎培養基+2 ml 檸檬水萃液

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

#### 4-1-3 添加葡萄柚水萃液

由圖 4-7 顯示，菌絲濃度在第 9 天時達到最大值 0.53 g/L，第 9 天到第 11 天菌絲濃度則下降，而胞外多醣則上升；第 11 天至第 13 天菌絲濃度則回升，胞外多醣則開始下降。由圖 4-8 顯示，整體靈芝酸因在第 9 天時菌絲濃度達到最大值，故此時整體靈芝酸濃度最高為 0.033 mg/L，第 9 天到第 11 天時整體靈芝酸亦略受菌絲濃度影響，在第 11 天到第 13 天時則回升；整體多醣則在第 7 天到第 11 天開始上升，第 11 天到第 13 天則又迅速下降。由圖 4-9 顯示，總多酚以及類黃酮含量則在第 7 天為最大值，分別為 11.80 mg/g D.W.、2070  $\mu$ g/g D.W.，第 7 天之後則大約隨時間增加而下降，而類黃酮含量則在第 13 天到第 15 天回升至 1881  $\mu$ g/g D.W.。

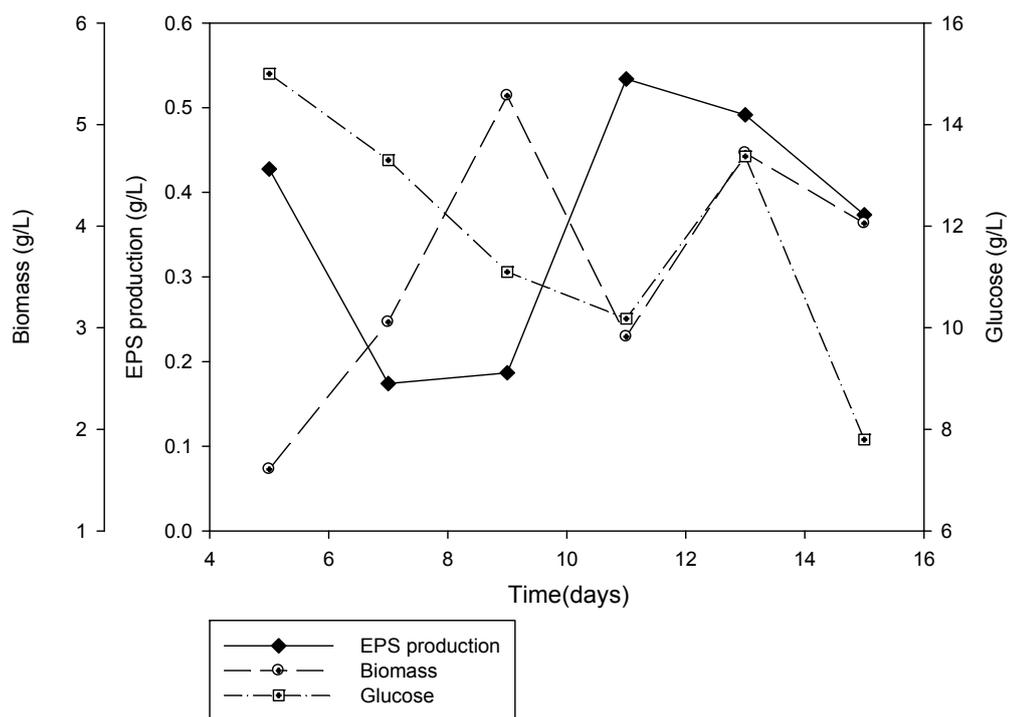


圖 4-7 添加葡萄柚水萃液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖

培養條件：基礎培養基+2 ml 葡萄柚水萃液

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

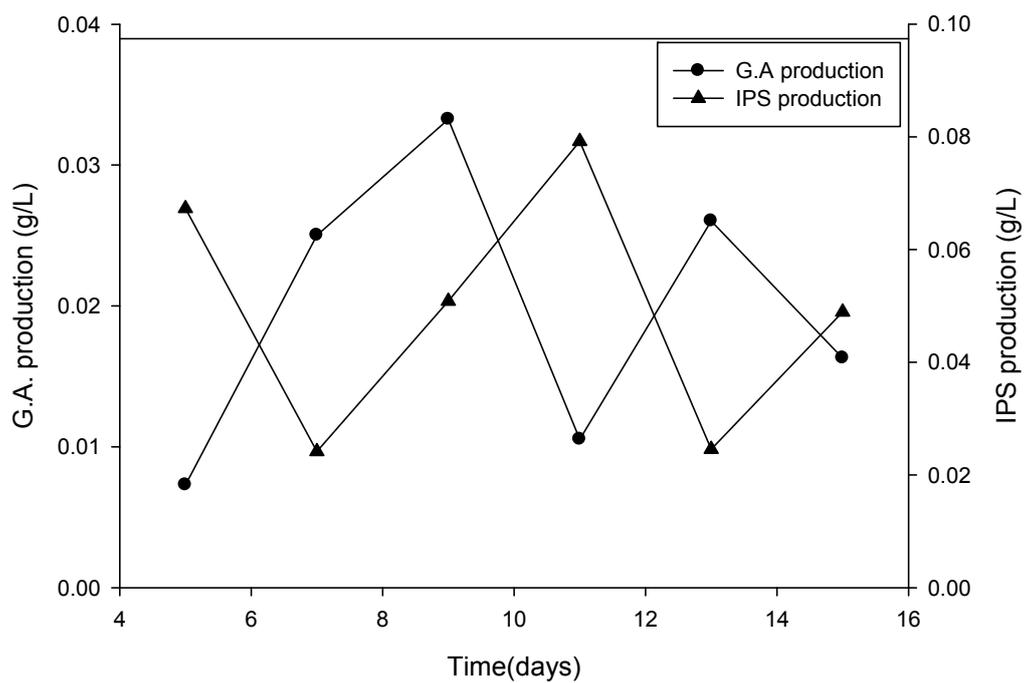


圖 4-8 添加葡萄柚水萃液對靈芝菌絲體靈芝酸與多醣含量之影響

培養條件：基礎培養基+2 ml 葡萄柚水萃液

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

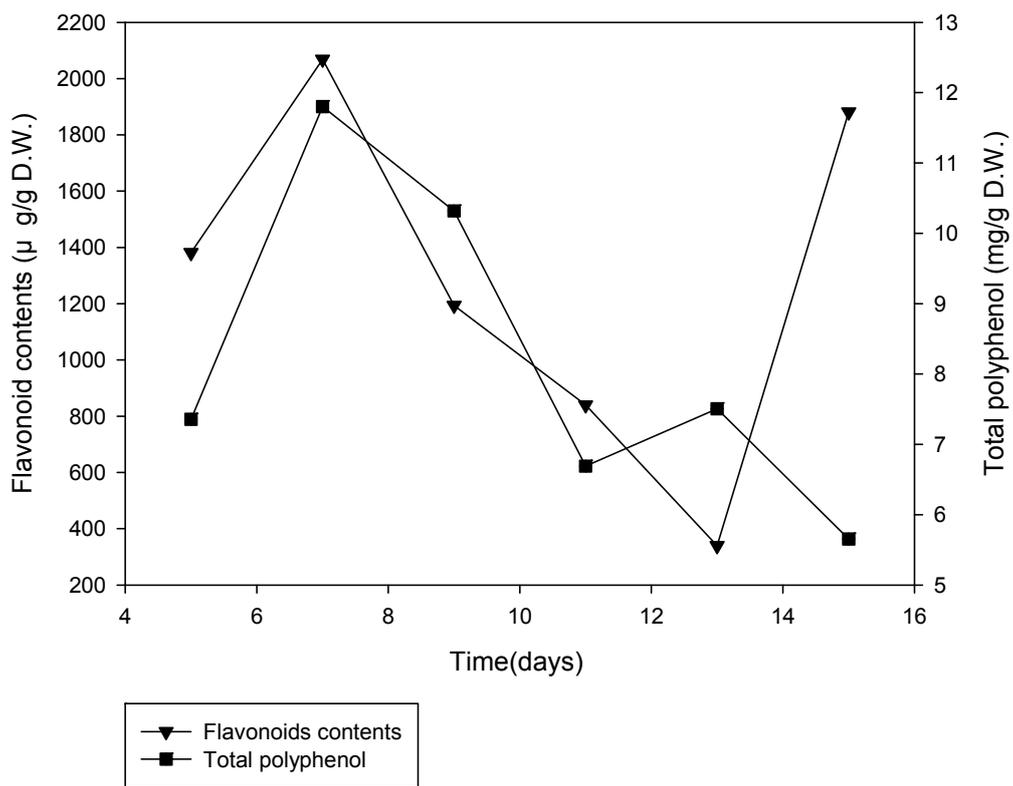


圖 4-9 添加葡萄柚水萃液對靈芝菌絲體總酚與類黃酮含量之影響

培養條件：基礎培養基+2 ml 葡萄柚水萃液

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

#### 4-1-4 添加柳丁水萃液

由圖 4-10 顯示，添加柳丁水萃對液態靈芝培養之影響，可看到菌絲濃度在第 7 天到第 9 天有略微上升，同時，胞外多醣亦上升；而到第 11 天到第 13 天胞外多醣以及菌絲濃度達到最大值，分別為 1.14 g/L、10.67 g/L。

由圖 4-11 顯示，整體靈芝酸與整體多醣則在第 11 天到第 13 天上升，因第 13 天產生最大的菌絲濃度在，同時在此時整體靈芝酸與整體多醣含量則為最大值，其值分別為 0.04 g/L、1.50 g/L。由圖 4-12 顯示，總多酚以及類黃酮含量在第 5 天到第 7 天皆上升；而在第 9 天到第 13 天則可達到最大值，12.79 mg/g D.W.、1756.25  $\mu$ g/g D.W.。由圖 4-12 可看出添加柳丁水萃液之總多酚以及類黃酮含量成正比現象。

添加柳丁水萃液對菌絲濃度、胞外多醣、整體靈芝酸含量、整體胞內多醣含量、總多酚以及類黃酮皆在第 13 天時可達到最好的效果。

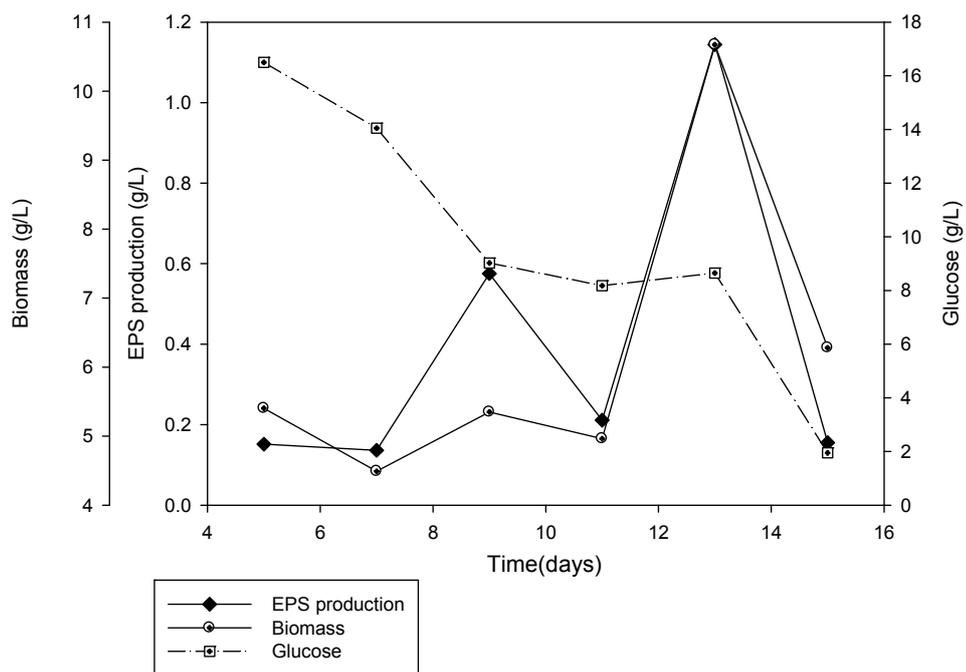


圖 4-10 添加柳橙水萃液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖

培養條件：基礎培養基+2 ml 柳橙水萃液

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

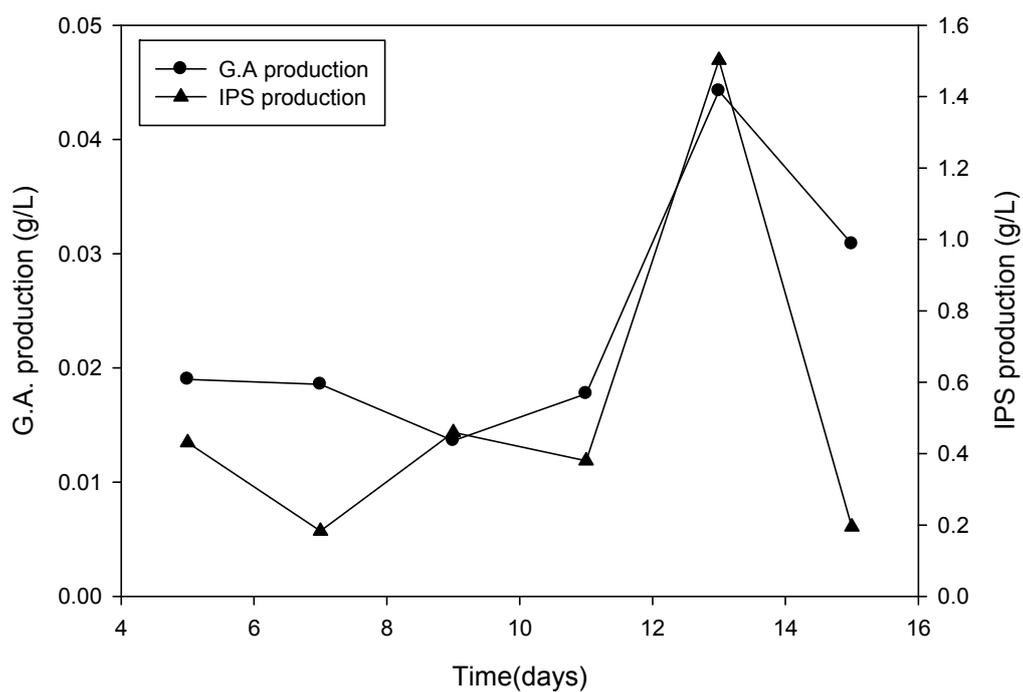


圖 4- 11 添加柳橙水萃液對靈芝菌絲體靈芝酸與多醣含量之影響

培養條件：基礎培養基+2 ml 柳橙水萃液

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

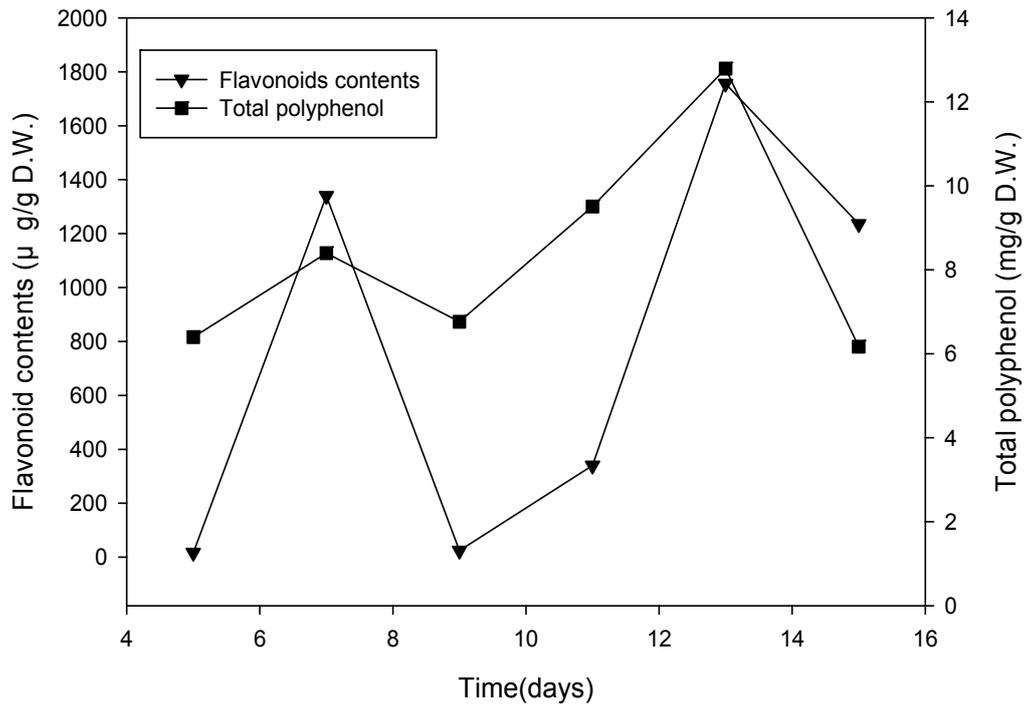


圖 4- 12 添加柳橙水萃液對靈芝液態培養總酚與類黃酮含量之影響

培養條件：基礎培養基+2 ml 柳橙水萃液

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

#### 4-1-5 添加金桔水萃液

由圖 4-13 顯示，菌絲濃度在第 5 天到第 9 天生長情況上升，到第 9 天時達到最大值 7.64 g/L，隨之在第 9 天到第 11 天則下降，到 13 天時則又回升；胞外多醣則在第 5 天到第 7 天上升，第 9 天至第 11 天則幾乎沒有變化，同時葡萄糖含量變化量並無太大變化；第 11 天之後葡萄糖又進行代謝而使胞外多醣在第 13 天時達到最大值 0.67g/L，菌絲濃度亦在第 13 天時回升。由圖 4-14 顯示，整體靈芝酸與整體胞內多醣在第 9 天時達到最大值，分別為 0.022 g/L 與 0.517 g/L，隨後則下降；第 11 天到第 13 天則又回升，由此圖可看出整體靈芝酸與整體胞內多醣成正比的現象。由圖 4-15 顯示，總多酚在第 11 天到第 13 天時急速上升，到第 15 天時則達到最大值 13.50 mg/g D.W.；類黃酮在第 5 天到第 13 天並沒有太大的變化，但第 13 天到第 15 天時則急速上升達到最大值 6277.08  $\mu$ g/g D.W.。

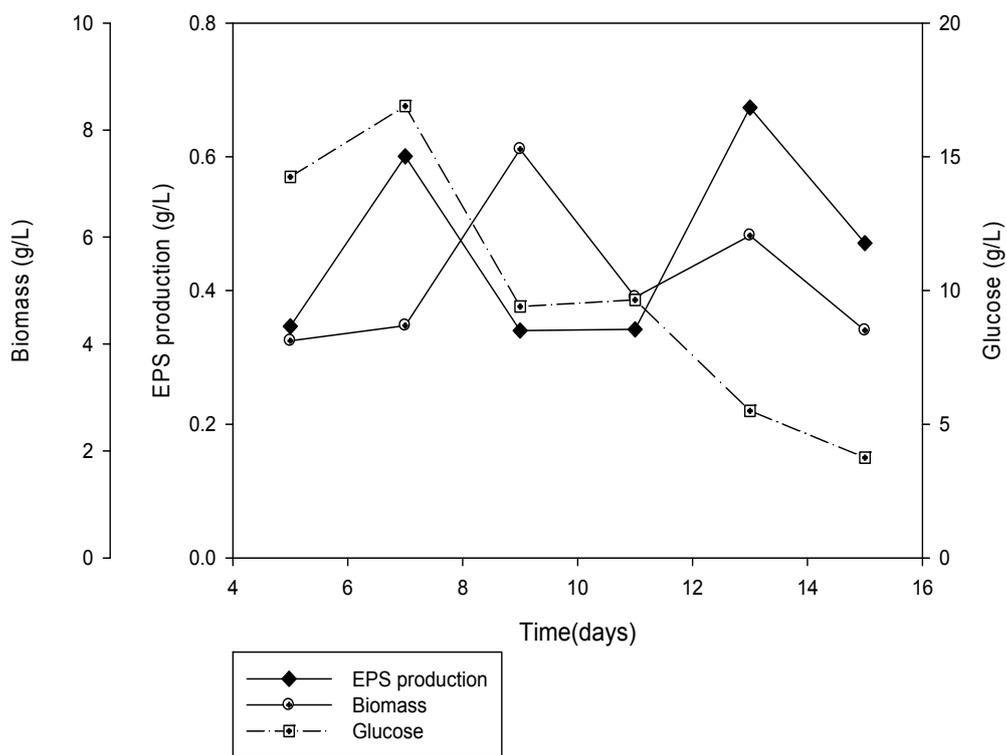


圖 4-13 添加金桔水萃液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖

培養條件：基礎培養基+2 ml 金桔水萃液

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

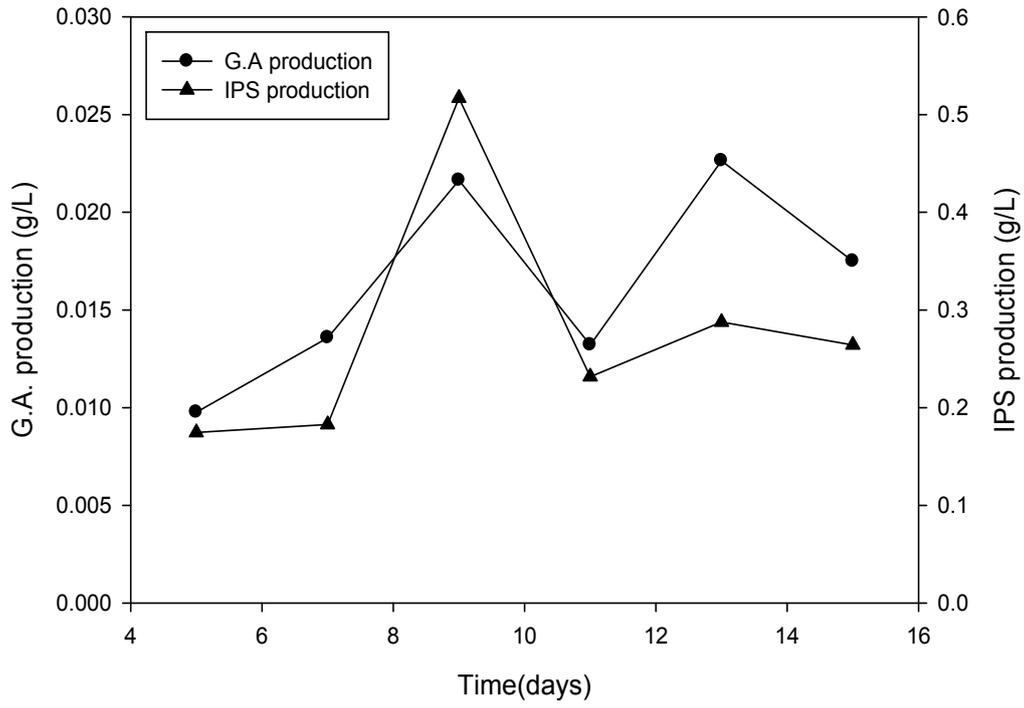


圖 4-14 添加金桔水萃液對靈芝菌絲體靈芝酸與多醣含量之影響

培養條件：基礎培養基+2 ml 金桔水萃液

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

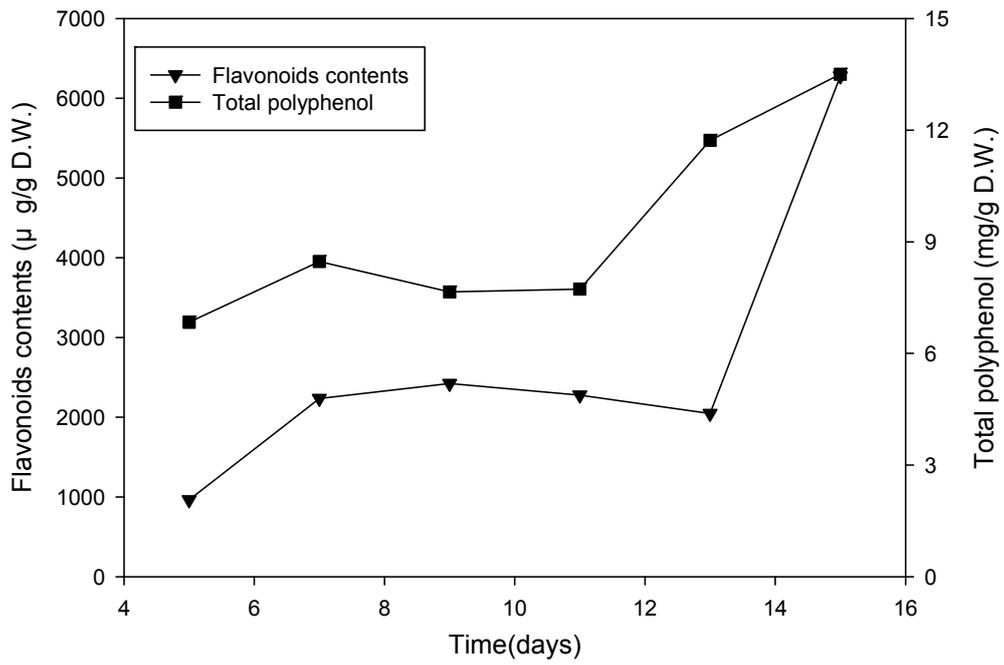


圖 4-15 添加金桔水萃液對靈芝菌絲體總酚與類黃酮含量之影響

培養條件：基礎培養基+2 ml 金桔水萃液

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

#### 4-1-6 添加紅柑水萃液

由圖 4-16 顯示，菌絲濃度在第 7 天到第 9 天時上升，而此時的胞外多醣濃度亦上升在第 9 天達到最大值 0.52 g/L；菌絲濃度與胞外多醣在第 9 天到第 11 天時同時下降；而到了第 11 天到第 13 天時則使菌絲濃度達到最大值 5.56 g/L，此時胞外多醣也回升。由圖 4-17 顯示，整體靈芝酸在第 7 天到第 9 天時上升，而此時整體多醣的生長趨勢則較為平緩，整體靈芝酸與整體胞內多醣含量在第 13 天時達到最大值，分別為 0.028 g/L 與 0.216 g/L。由圖 4-18 顯示，總多酚含量在第 5 天到第 7 天下降，此時類黃酮含量在第 5 天即達到最大值 3381.25  $\mu$ g/g D.W.，到第 7 天亦明顯有下降的趨勢；總多酚含量則在第 9 天達到最大值 10.10 mg/g D.W.；總多酚以及類黃酮含量從第 7 天到第 13 天的變化趨勢則略為相同。

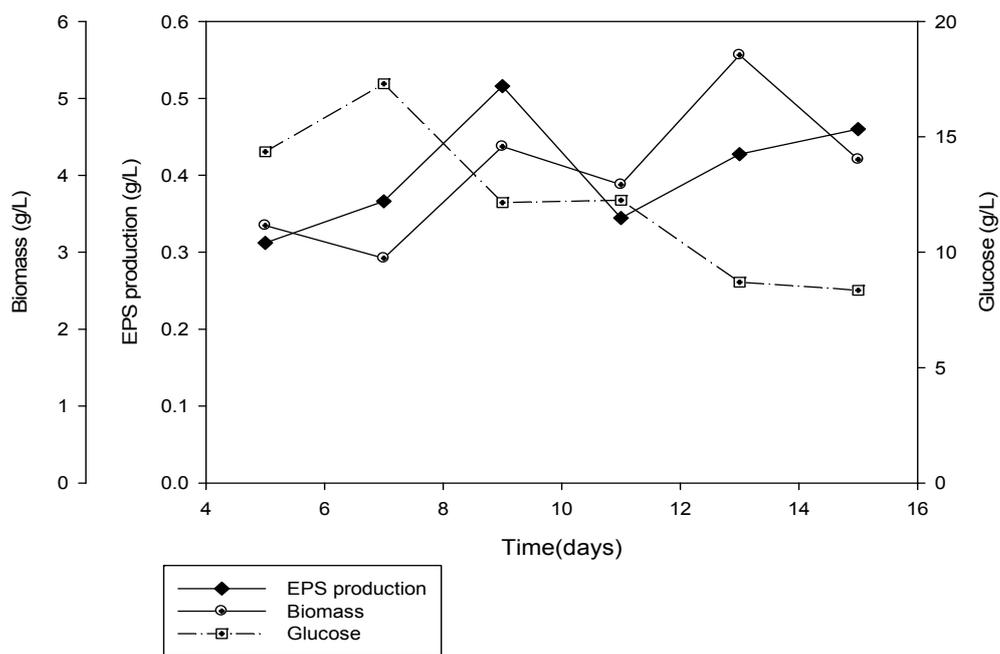


圖 4-16 添加紅柑水萃液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖

培養條件：基礎培養基+2 ml 紅柑水萃液

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

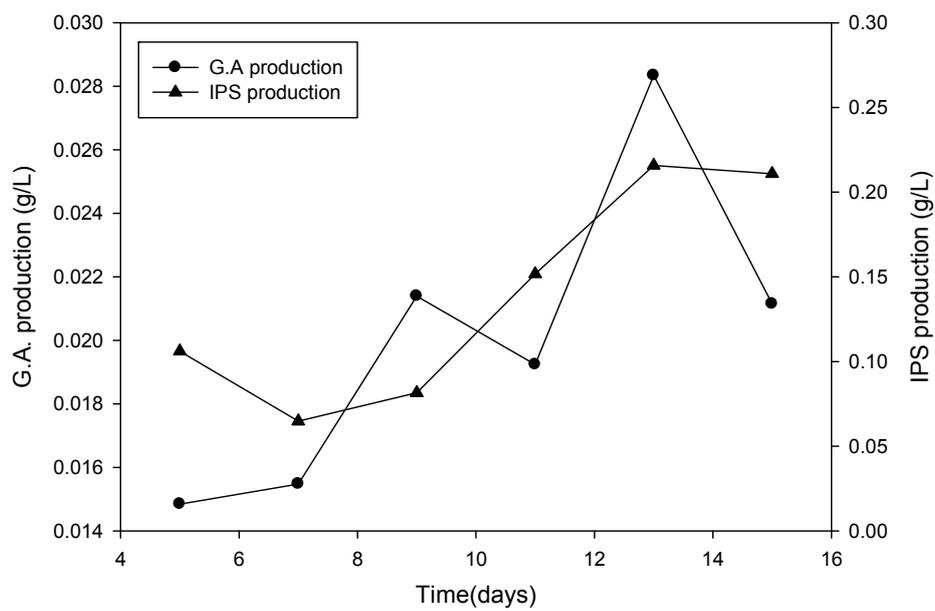


圖 4-17 添加紅柑水萃液對靈芝菌絲體靈芝酸與多醣含量之影響

培養條件：基礎培養基+2 ml 紅柑水萃液

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

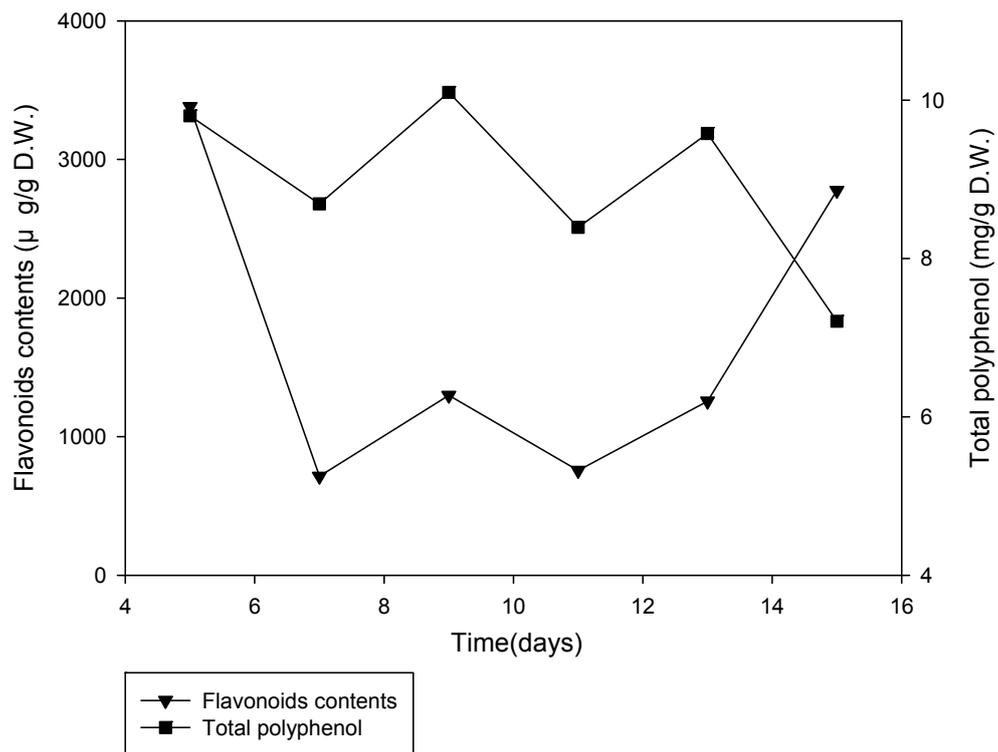


圖 4-18 添加紅柑水萃液對靈芝菌絲體總酚與類黃酮含量之影響

培養條件：基礎培養基+2 ml 紅柑水萃液

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

#### 4-1-7 添加果皮水萃液之比較

由前面添加的果皮添加物做最適當比較，則大部分在 13 天會有最大值，由圖 4-19，以柳橙水萃液在第 13 天時，相較於其他果皮添加效果較來的好的。

由表 4-1，菌體轉化率  $Y_{x/s}$  為 0.940 g/g、多醣轉化率  $Y_{p2/s}$  為 0.132 g/g，從產物生產率  $Y_{p2/x}$  為 0.141 g/g；由表 4-2，可發現添加柳橙水萃液可將菌絲濃度提升至 68.3%、多醣產率提升至 3 倍以上。可發現柳橙水萃液對菌絲轉化率、多醣轉化率、產物生產率以及比生長速率皆有很好的效果，同時達到胞外多醣、菌絲濃度、整體胞內多醣可達到最大值。

由表 4-1 可知，利用水萃液進行靈芝酸轉化率  $Y_{p1/s}$ 、靈芝酸生產率  $Y_{p1/x}$  則效果皆與基礎培養基之效果相差不大。由圖 4-20 及表 4-2 顯示，若探討單位靈芝酸產生的含量，則以第 7 天時，葡萄柚含量最高，但因與基礎培養所呈現得結果相差不大，且其他果皮大部分具有抑制靈芝酸生長的效果，則可知添加水萃液並不會促使靈芝酸生成。由(沈，2005)(余，2006)結果與本研究可知，添加物並非皆對靈芝酸與多醣生成有幫助，其生物量亦相較於添加中草藥之效果來的好的(劉，2008)，由本研究結果添加柑橘類果皮水萃液確實可使靈芝多醣含量上升。

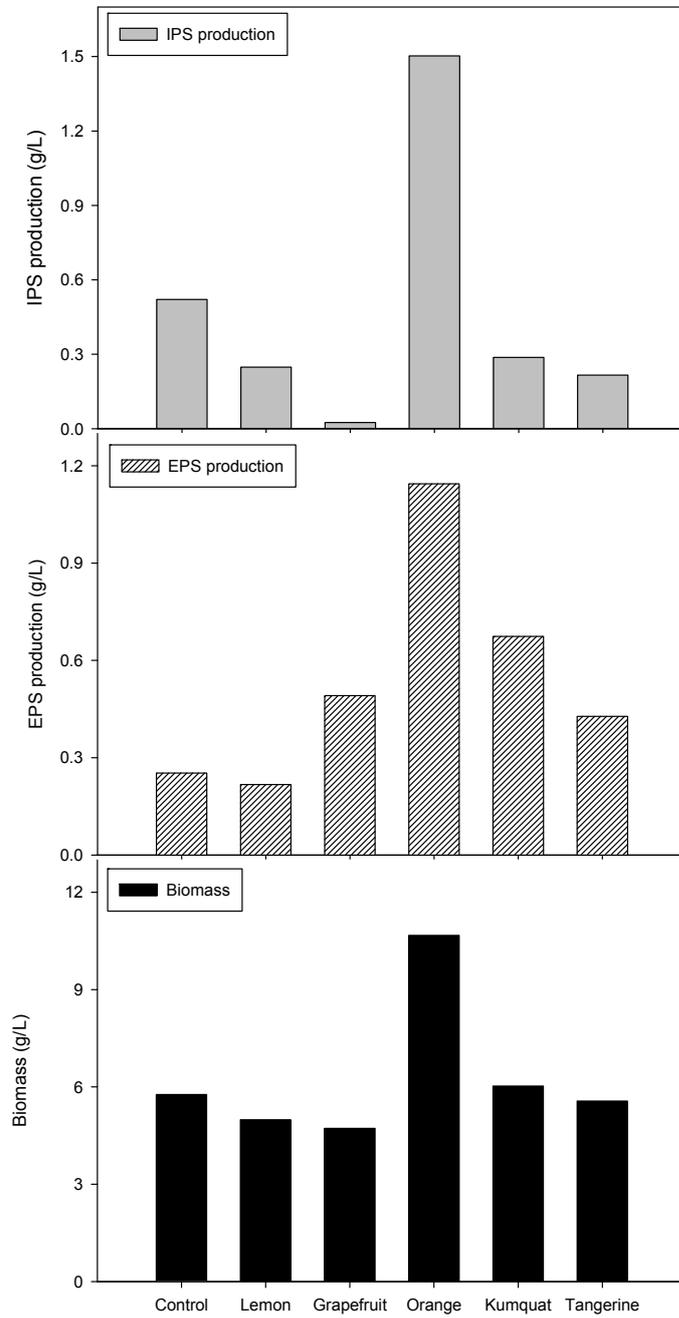


圖 4-19 果皮水萃液添加於第 13 天時之生理活性成分

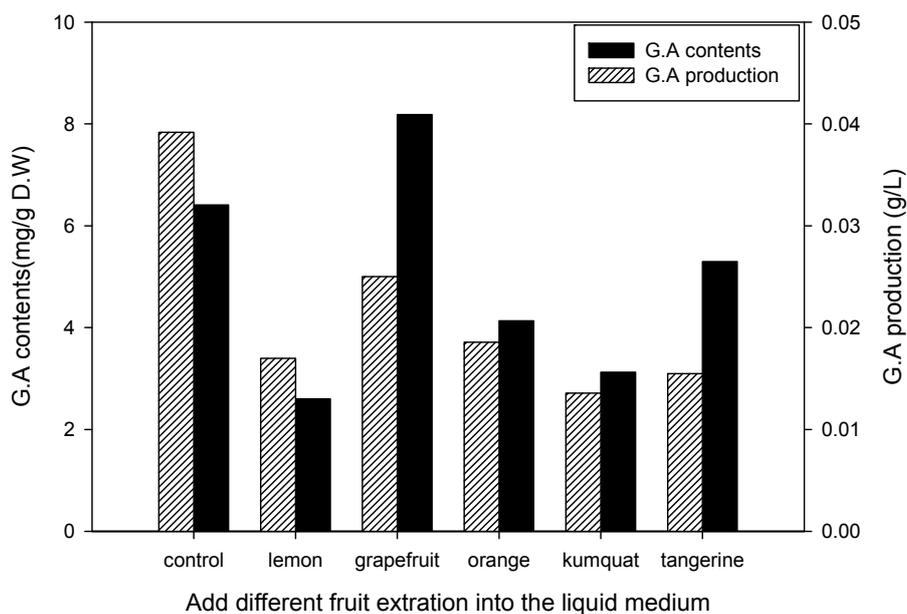


圖 4-20 果皮水萃液添加於第 7 天時對靈芝酸的影響

表 4-1 不同果皮之液態發酵結果

果皮種類	$\mu$	Xmax	P1max	P2max	Yp1/s	Yp2/s	Yp1/x	Yp2/x	Yx/s
Control	0.254	6.341	0.039	0.520	0.003	0.054	0.006	0.096	0.418
Lemon	0.314	7.032	0.053	0.268	0.004	0.019	0.007	0.038	0.501
Grapefruit	0.087	5.284	0.033	0.079	0.004	0.008	0.006	0.027	0.593
Orange	0.398	10.674	0.044	1.502	0.004	0.132	0.004	0.141	0.940
Kumquat	0.281	7.642	0.023	0.517	0.002	0.049	0.007	0.068	0.721
Tangerine	0.206	5.564	0.028	0.216	0.003	0.019	0.005	0.038	0.492

P1max：最大靈芝酸(*ganoderma lucidum acid*)濃度(g/L)

P2max：最大多醣體(polysaccharide)濃度(g/L)

Xmax：最大菌重(g/L)

$\mu$ ：比生長速率( $\text{day}^{-1}$ )

表 4-2 不同果皮添加對靈芝生理活性最大影響及最適天數

種類 \ 產物	Biomass (g/L)	IPS (mg/g D.W.)	IPS (g/L)	EPS (g/L)
Control	6.34(day15)	104.65(day5)	0.52(day9)	0.33(day9)
Lemon	7.03(day15)	49.83(day11)	0.27(day15)	0.46(day15)
Orange	10.67(day13)	140.76(day13)	1.50(day13)	1.14(day13)
Kumquat	7.64(day9)	47.71(day13)	0.52(day9)	0.67(day13)
Grapefruit	5.28(day7)	41.85(day5)	0.08(day11)	0.53(day11)
Tangerine	5.56(day13)	50.15(day13)	0.22(day13)	0.52(day9)

種類 \ 產物	G.A (mg/g D.W.)	Phenol (mg/g D.W.)	Flavonoids (mg/g D.W.)
Control	6.41(day7)	7.50(day5)	1.80(day15)
Lemon	7.50(day15)	8.34(day7)	3.34(day11)
Orange	4.91(day15)	12.79(day13)	1.76(day13)
Kumquat	4.11(day15)	13.51(day15)	6.28(day15)
Grapefruit	8.18(day7)	11.8(day7)	2.07(day7)
Tangerine	5.30(day7)	10.10(day9)	3.39(day5)

註：表 4-2 為靈芝生理活性最大值及培養天數

## 4-2 添加果皮水萃液於最適天數做添加量變化

### 4-2-1 添加柳橙水萃液之添加量影響

由圖 4-19、表 4-1 與表 4-2 結果，添加柳橙水萃液於第 13 天時，菌絲濃度、胞內外多醣、總多酚、類黃酮皆有很好的效果。而此實驗的目的為探討添加量不同則對靈芝生理活性之影響。

由圖 4-21 顯示，添加的含量越多則菌絲濃度以及整體胞內多醣之生產量效果並未達到最好的效果；添加 1ml 柳橙水萃液之菌絲濃度為其他添加量的最大值，因所含的菌絲濃度為最高，故整體多醣相對也為最高。而添加 2ml 柳橙水萃液之菌絲濃度雖然較添加 1 ml 的低，但單位菌絲多醣所產生的含量較高，因此，整體而言，整體胞內多醣含量略比添加 1 ml 的低。而到添加 4 ml 時菌絲濃度與整體胞內多醣含量為最低；添加 8 ml 與 10 ml 果皮水萃液使菌體以及整體胞內多醣略回升；胞外多醣隨時間增加而增加，推測因為添加的水萃液含量相對較高，則造成發酵液殘有大量的多醣類物質，且葡萄糖殘量也約略隨添加量增加而上升。

由表 4-3 亦可證實，添加低量的柳橙水萃液確實可使多醣含量提升，同時可促使菌絲生成，亦可由(沈，2005)、(余，2006)可證實，低濃度的添加量，確實可使靈芝生理活性略為提升。

由圖 4-22 顯示，總多酚含量則為添加 1ml 時達到最大值 18.27mg/g D.W.，而隨添加量增加則總多酚含量下降；但添加 8ml 時則總多酚含量為 17.84 mg/g D.W.，而添加至 10ml 時總多酚含量略較 8ml 低；類黃酮則隨添加量增加而約略上升，添加量為 4ml 時為最大值 4.11 mg/g D.W.；添加 8ml 與 10ml 的類黃酮含量比低量 1ml 與 2ml 的添加效果較好。

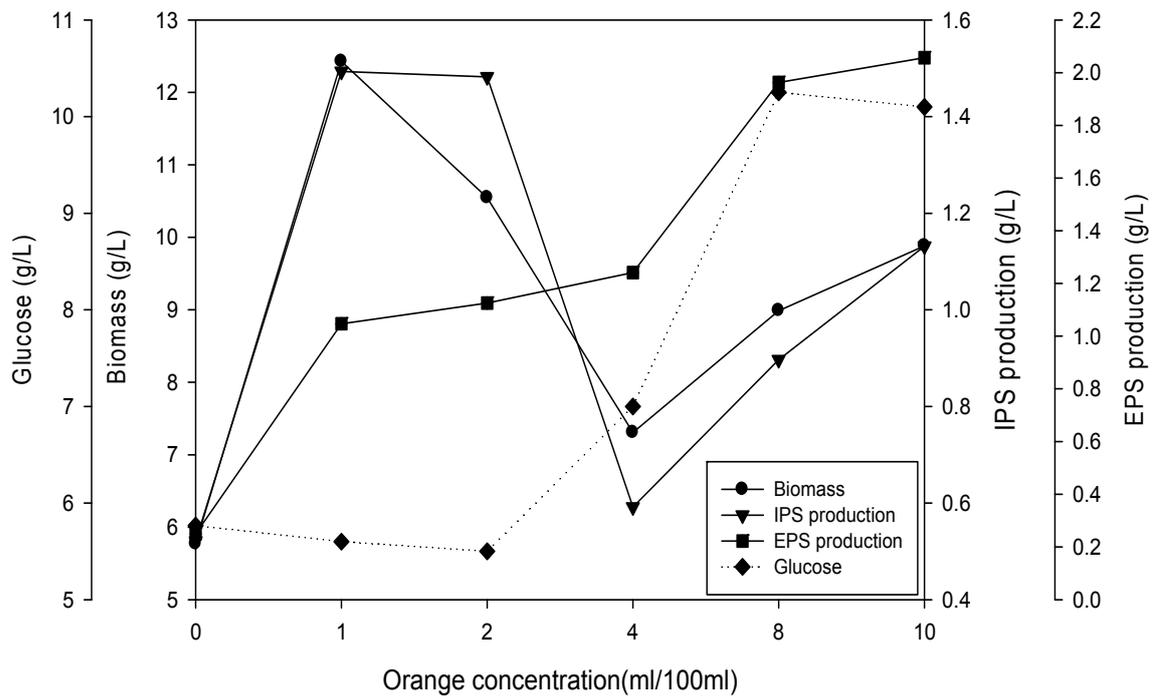


圖 4-21 柳橙水萃液添加量對靈芝菌絲體生理活性之影響

培養條件：基礎培養基+不同柳橙水萃液之添加量

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

培養天數 13 天

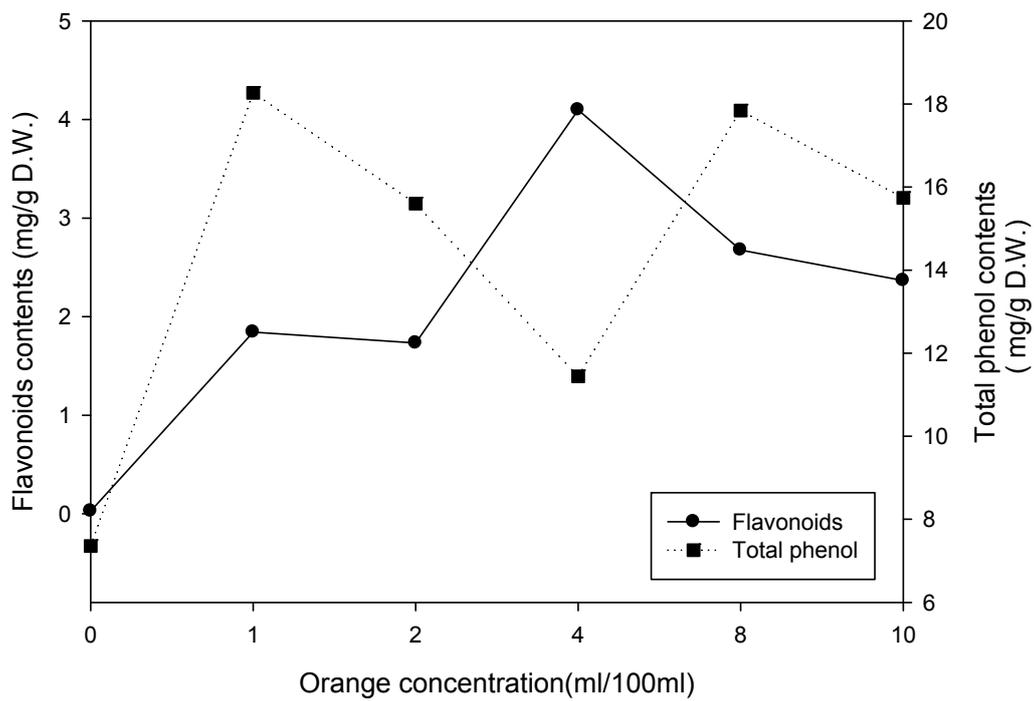


圖 4-22 柳橙水萃液添加量對靈芝菌絲體總多酚及類黃酮之影響

培養條件：基礎培養基+不同柳橙水萃液之添加量

接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

培養天數 13 天

表 4-3 柳橙水萃液添加量之影響(培養 13 天)

添加量	Xmax	P2max	Yp2/s	Yp2/x	Yx/s
0	5.770	0.521	0.037	0.090	0.405
1	12.428	1.494	0.104	0.120	0.863
2	10.546	1.482	0.102	0.141	0.727
4	7.306	0.592	0.046	0.081	0.562
8	8.988	0.897	0.092	0.101	0.922
10	9.884	1.132	0.114	0.115	0.998

P2max:最大多醣體(polysaccharide)濃度(g/L)

Xmax:最大菌重(g/L)

### 4-3 不同添加時間與不同萃取溶劑之添加量影響

由圖 4-20 顯示，添加葡萄柚水萃液對靈芝酸生成效果較來的好的，但因與基礎培養基的靈芝酸含量效果並無太大差別；實驗目的則探討利用添加誘導劑時間不同和添加誘導劑的性質不同進行添加量之影響。

由圖 4-23，乙醇對真菌具有抑制和殺滅的效果，將原體積 100 ml 之培養基於第 0 天添加 8 ml 與 10 ml 乙醇萃取物，則產生抑制反應，故並無菌體生長。

由圖 4-24 顯示，進行第 4 天添加乙醇萃取物之單位菌體靈芝酸含量效果最好，且靈芝酸成分隨濃度增加而上升，添加 10 ml 則有最大值 46.27 mg/g D.W.；而第 0 天添加乙醇萃取物 4 ml 則比添加水萃液效果略好，因而水萃液在第 0 天添加以及第 4 天添加進行培養，對靈芝三酸生成並無太大效果，且行水萃液添加量不同進行探討，亦未有太大的差別。由圖 4-25 顯示，菌絲濃度則以水萃液添加較高，因乙醇具有抑制真菌生長之影響，故第 4 天添加之培養對菌絲濃度效果較不佳，而第 0 天添加則在 8 ml 與 10 ml 完全抑制菌體生長；而在添加小於 4 ml 水萃液的添加量則以第 0 天添加菌絲濃度效果較佳；若要行高濃度培養則以第 4 天添加效果較佳。由圖 4-26 顯示，單位菌體多醣亦受乙醇影響，則第 0 天添加以及第 4 天添加之乙醇萃取物效果並未比第 0 天添加與第 4 天添加水萃液效果來的佳。由圖 4-27 顯示，胞外多醣則以第 4 天添加之乙醇萃取物效果為最好，而第 4 天添加水萃液效果則為其次，推測因為菌體生長至第 4 天，而添加進去成為

促使靈芝生長之誘導劑，而萃取出來之有效成分並未讓靈芝菌體快速代謝掉，故所測得的胞外多醣含量較第 0 天添加之效果較好；又第 0 天添加乙醇萃取物之胞外多醣含量也較添加水萃液效果來的高。由圖 4-28 顯示，總多醣含量皆以添加乙醇萃取物效果較好，又以第 4 天添加乙醇萃取物效果最佳；而水萃液效果與添加時間無關，效果並無太大差別。由圖 4-29 顯示，類黃酮含量則以第 4 天添加之乙醇萃取物效果為最好，而第 4 天添加水萃液效果則為其次；第 0 天添加乙醇萃取物之胞外多醣含量也較添加水萃液效果來的高。

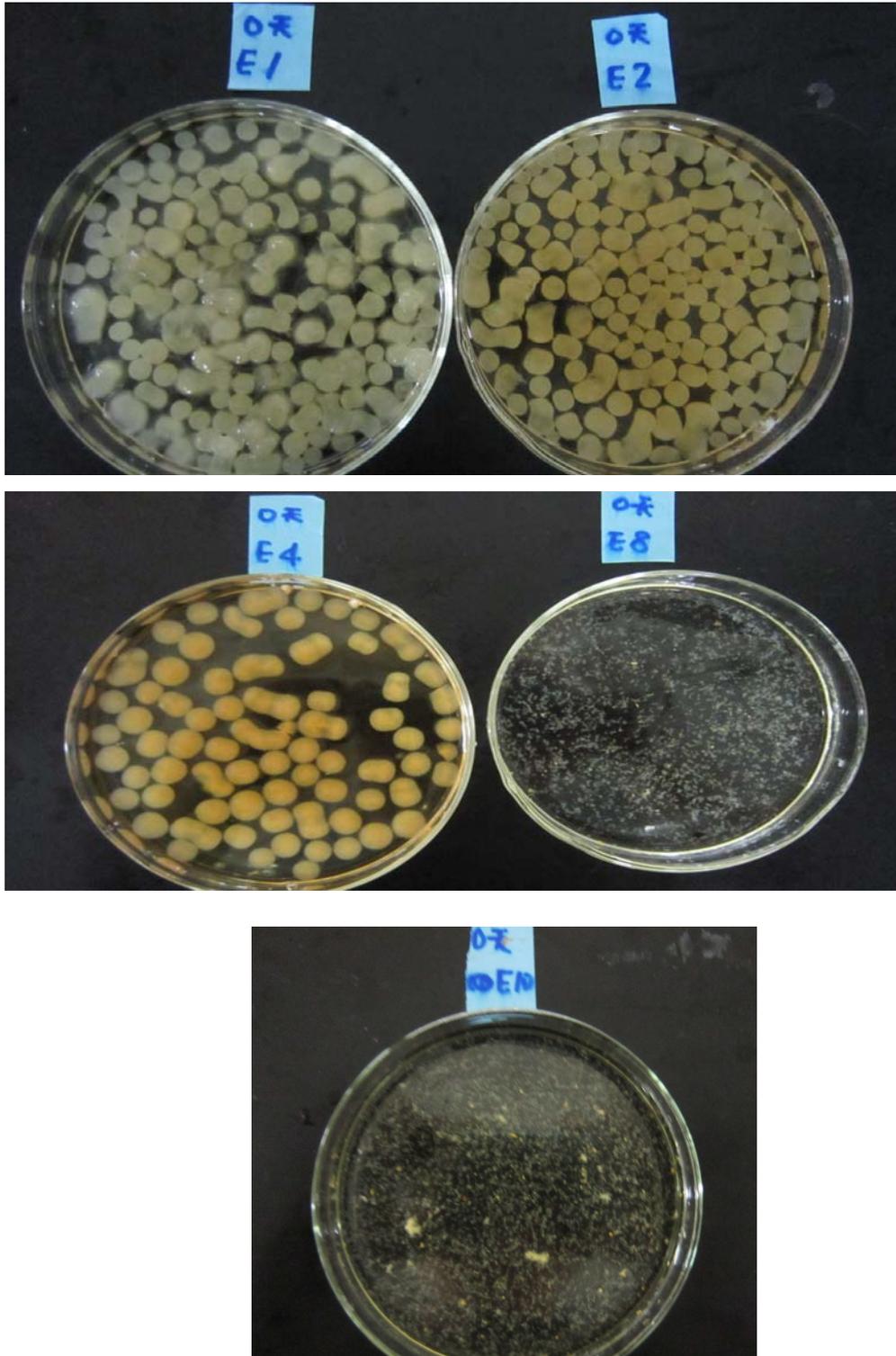


圖 4-23 為第 0 天添加乙醇萃取物培養 16 天時之菌量生長變化

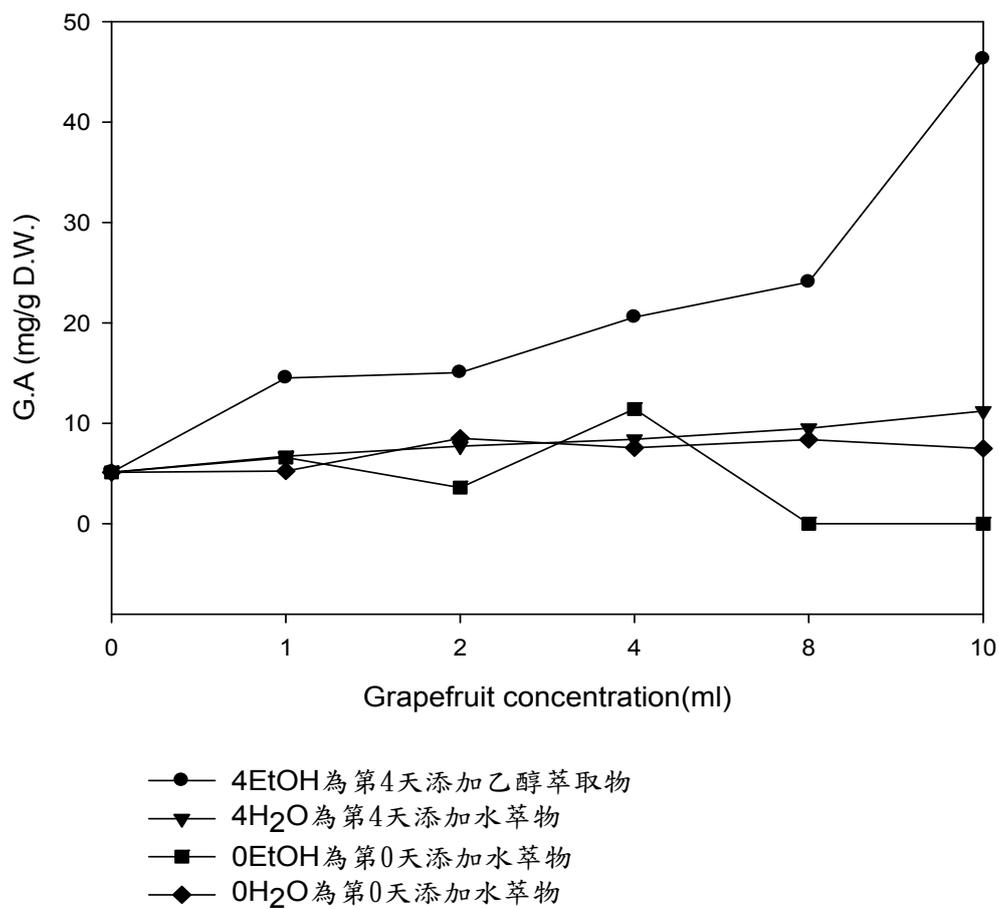


圖 4-24 不同添加時間與添加劑性質之添加量對靈芝酸含量影響

培養條件:基礎培養基+不同添加量之誘導劑

接菌量接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

培養天數 16 天

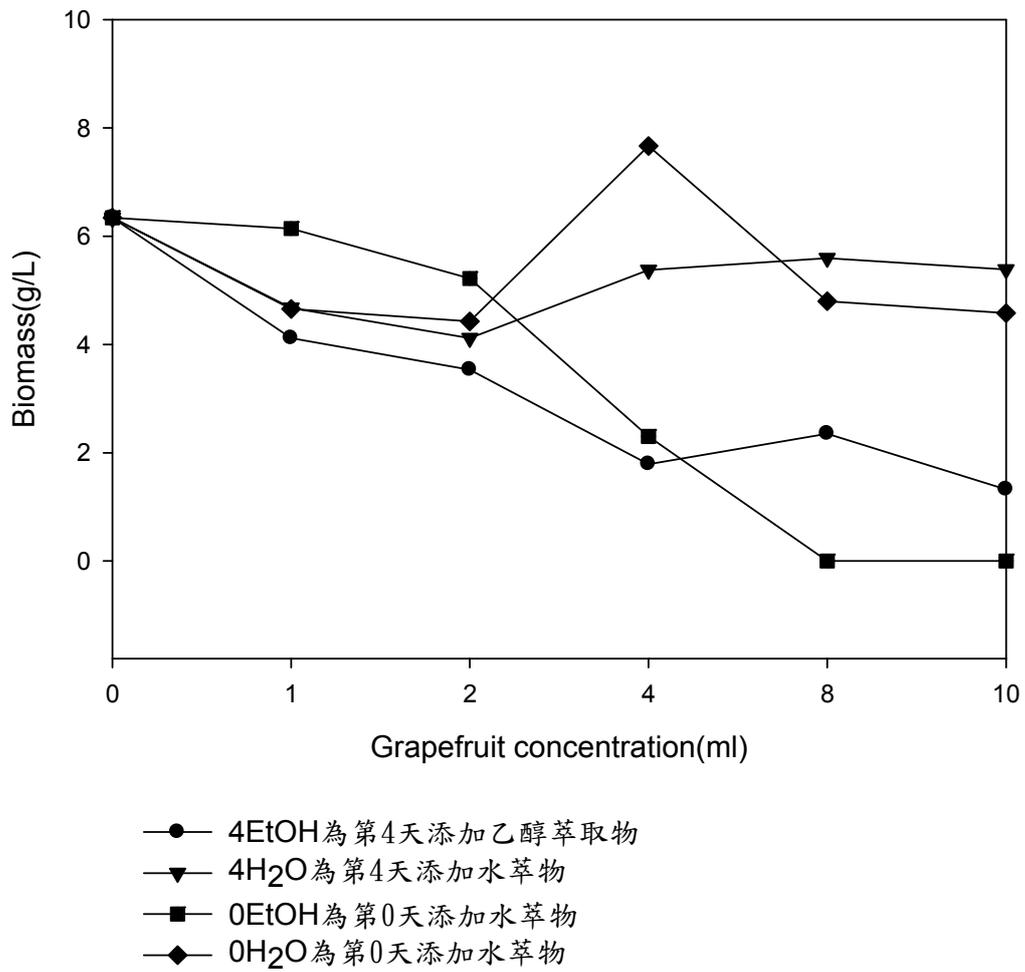


圖 4-25 不同添加時間與添加劑性質之添加量對菌絲濃度影響

培養條件:基礎培養基+不同添加量之誘導劑

接菌量接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

培養天數 16 天

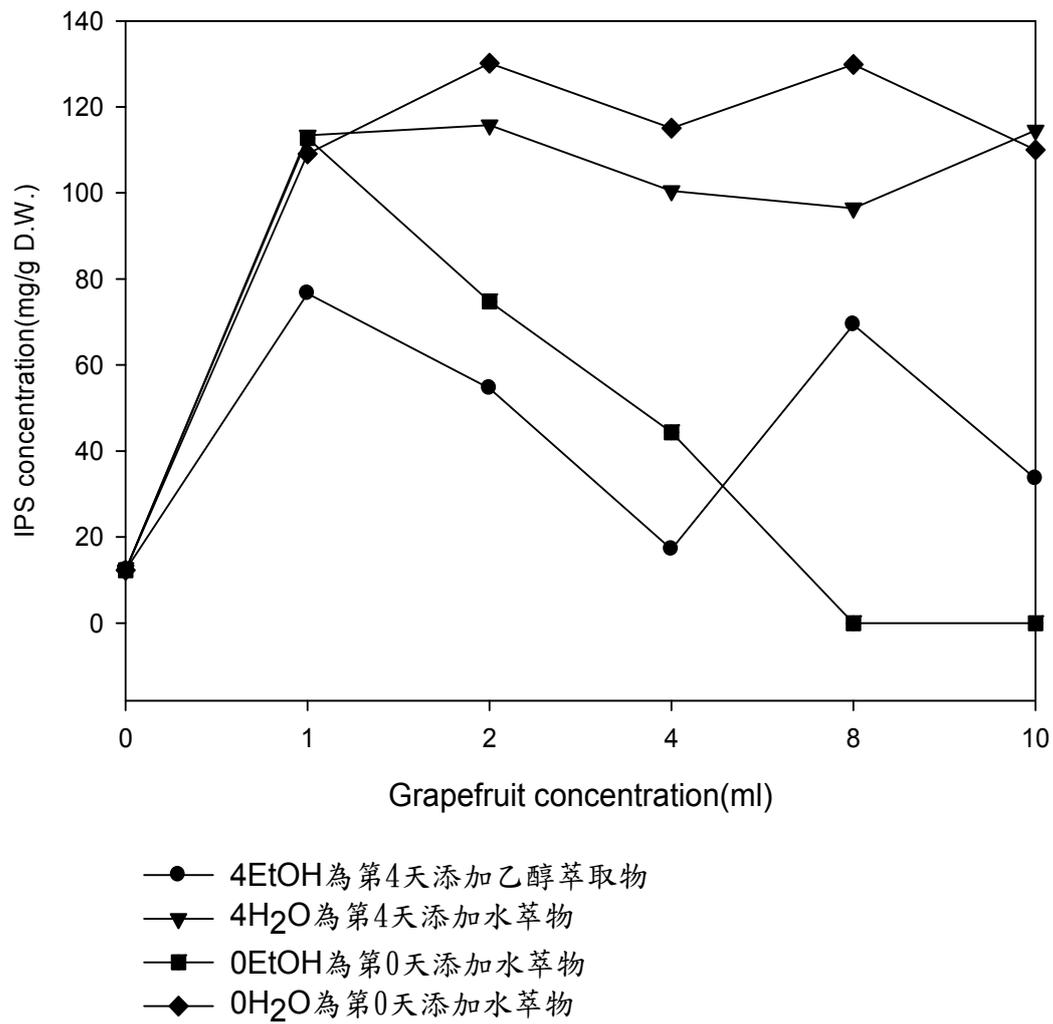


圖 4-26 不同添加時間與添加劑性質之添加量對單位胞內多醣影響

培養條件:基礎培養基+不同添加量之誘導劑

接菌量接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

培養天數 16 天

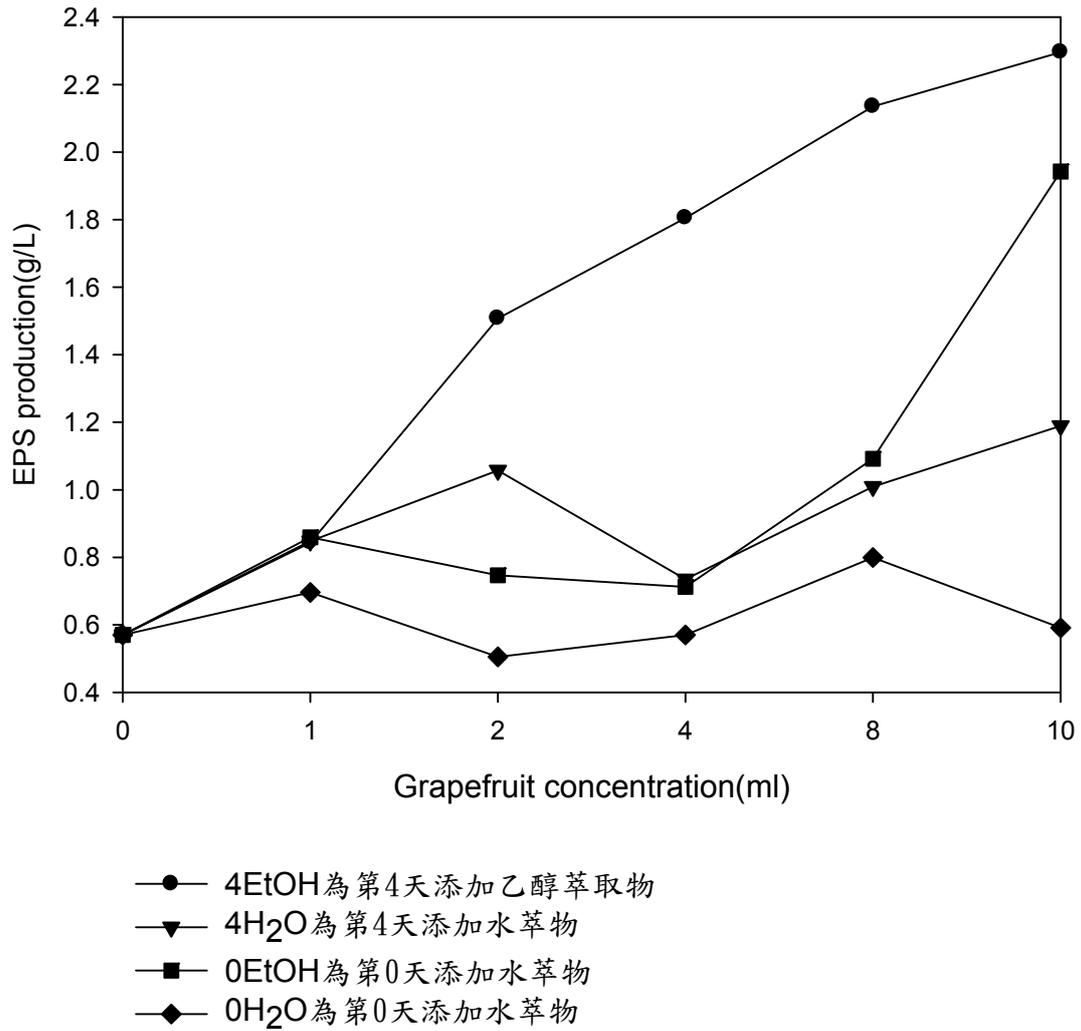


圖 4-27 不同添加時間與添加劑性質之添加量對胞外多醣影響

培養條件:基礎培養基+不同添加量之誘導劑

接菌量接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

培養天數 16 天

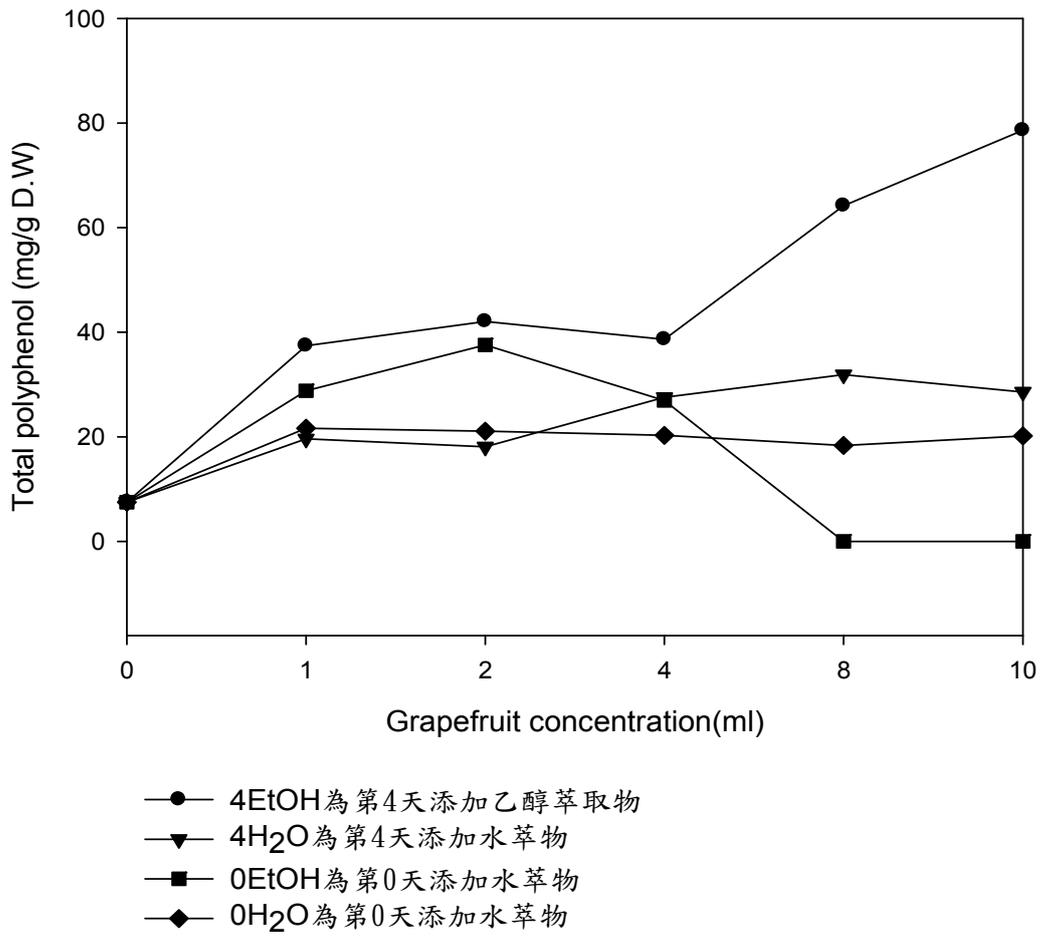


圖 4-28 不同添加時間與添加劑性質之添加量對總多酚影響

培養條件:基礎培養基+不同添加量之誘導劑

接菌量接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

培養天數 16 天

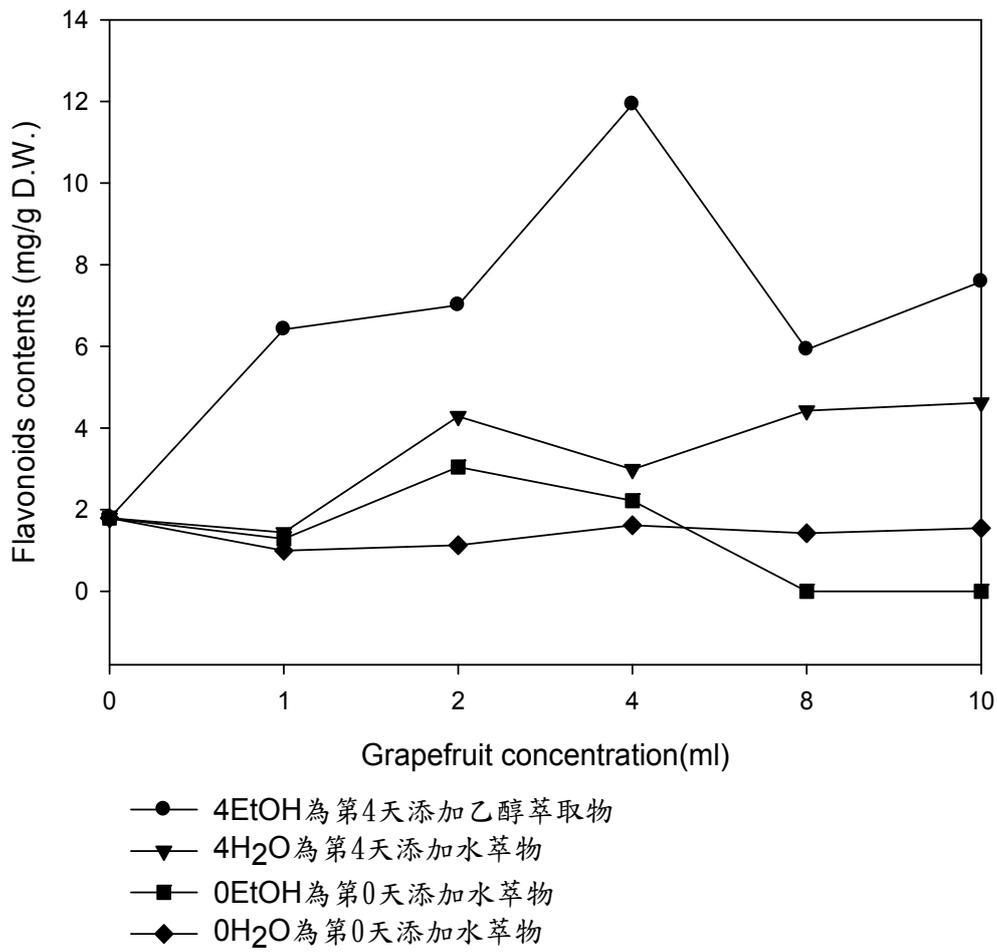


圖 4-29 不同添加時間與添加劑性質之添加量影響

培養條件:基礎培養基+不同添加量之誘導劑

接菌量接種量 5% (v/v)      溫度 30°C

培養天數 16 天

#### 4-3-2 添加時間與添加性質不同對靈芝生理活性影響比較

由表 4-4 可得知，以第 4 天添加乙醇萃取物效果為佳，可看出利用此添加時間，則有效的提升靈芝酸含量、胞外多醣、總多酚以及類黃酮含量，且於第 4 天添加 10ml 乙醇萃取物，靈芝酸含量生長到 46.27mg/g D.W.，為控制組的 9 倍，且胞外多醣、總多酚以及類黃酮含量比添加水萃液效果較佳。而以水萃液進行添加時間不同的探討，可發現其靈芝酸含量並未相差太多，但胞內多醣以及菌絲重並未受到抑制生長。於第 4 天添加 10ml 乙醇萃取物則並未產生抑制生長的現象，但第 0 天添加乙醇萃取則在高濃度時則抑制生長，故在此並無菌量生長，無法測得其生理活性。而以水萃液進行培養則可看到菌絲濃度隨濃度增加而上升。

表 4-4 不同天數添加誘導劑及添加量對靈芝生理活性之影響

	Control	H <sub>2</sub> O(0day)	EtOH(0day)	H <sub>2</sub> O(4day)	EtOH(4day)
G.A(mg/gD.W.)	5.11	8.51(2)	11.43(4)	11.23(10)	46.27(10)
IPS(mg/gD.W.)	12.28	130.15(2)	112.78(1)	115.76(2)	76.63(1)
Biomass(g/L)	6.34	7.67(4)	6.14(1)	5.60(8)	4.12(1)
EPS(g/L)	0.57	0.80(8)	1.94(10)	1.19(10)	2.31(10)
phenol(mg/gD.W.)	7.50	21.64(1)	37.57(2)	31.88(8)	78.59(10)
Flavonoids(mg/gD.W.)	1.79	1.62(4)	3.04(2)	4.62(10)	7.52(10)

培養條件：第 0 天添加誘導劑與第 4 天添加誘導劑

註：表 4-4 為靈芝生理活性最大值及添加量

#### 4-4 靈芝三角瓶固態培養試驗

本研究選用大薏仁做為固態培養基分別添加五種不同的果皮誘導劑，分別是檸檬、葡萄柚、柳丁、金桔、紅柑，與靈芝進行固態發酵，探討不同果皮誘導劑對靈芝生理活性成分含量影響。固態基質除了提供菌體生長所必須之營養物質，將靈芝培養在固態基質上，可利用藥食用真菌強大的分解代謝能力，不僅可對天然物中的纖維、醣類、蛋白等營養物質加以利用，而且在代謝過程中可能對其中一些成分(如類黃酮、總多酚等)進行轉化與修飾，從而提高有效成分的比例與效果。

##### 4-4-1 未添加誘導劑之固態培養

結果如圖 4-30 顯示，以薏仁為基質，培養 36 天，其靈芝酸與菌重隨時間增加而上升，而靈芝酸在第 30 天達到 11.77 mg/g substrate，菌重依時間增加而上升，但第 36 天與第 30 天的菌重差異性並相差不大，但多醣含量隨時間增加而減少，推測靈芝隨時間代謝固態基質含有的營養成分，並在第 30 天時已達到二次代謝產物靈芝酸的最高含量。

由圖 4-31 顯示，總酚以及類黃酮含量大致隨時間增加而增加，而第 30 天時，總酚以及類黃酮達到最大含量分別為 13.99 mg/g substrate 及 5.78 mg/g substrate。說明了當到了第 30 天其靈芝酸及總酚、類黃酮可達到最大值。

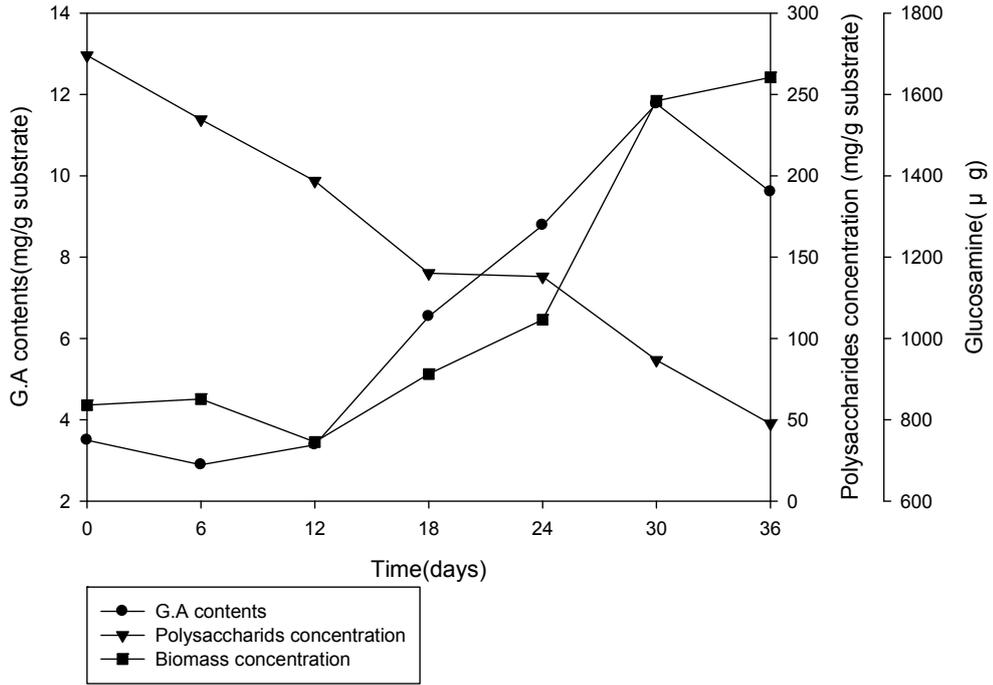


圖 4-30 時間對靈芝固態發酵之生理活性影響

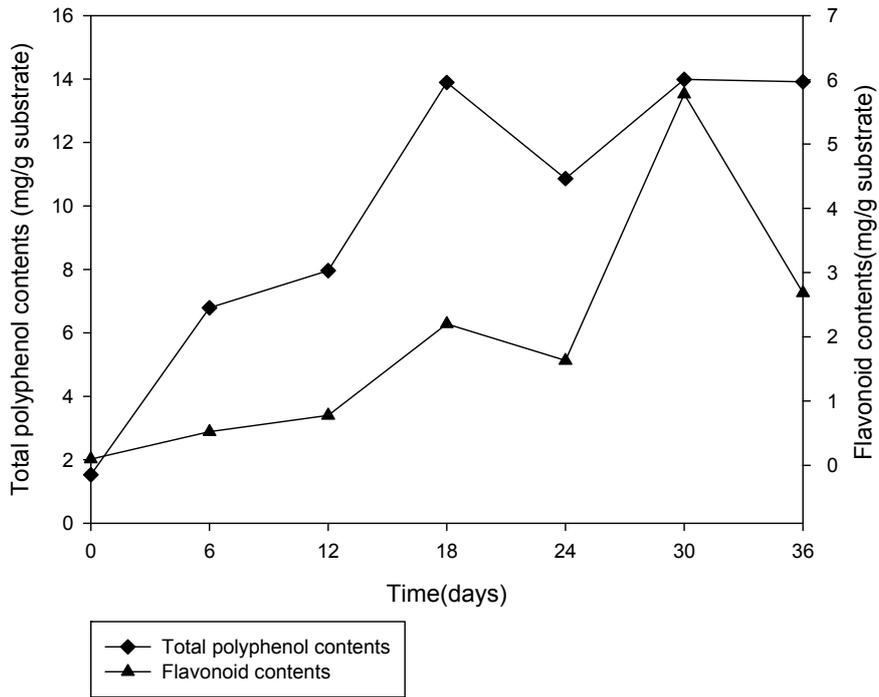


圖 4-31 時間對靈芝固態發酵之類黃酮及總多酚影響

以上培養條件：固態基質(大薏仁) 接菌量 5% (v/v)  
培養天數 36 天

#### 4-4-2 檸檬果皮添加之固態培養

結果由圖 4-32 顯示，因為檸檬皮本身具有萜類化合物與固態基質做結合，靈芝酸含量隨時間增加而增加，推測因果皮成分添加使得原本醣類較高的固態基質受到影響，菌體分解基質開始生長到第 6 天多醣有很明顯的變化，而由葡萄糖胺含量來看雖然比未添加含量較低，推測當菌體開始分解含有葡萄糖胺的基質時，菌體已代謝掉基質的養分進行生長，形成菌體與基質的葡萄糖胺含量無法做區分。而到第 12 天時，葡萄糖胺含量與多醣含量同時降低，到第 18 天時回升，推測靈芝在這時已幾近分解掉固態基質，開始進行菌體自溶現象，使得多醣含量達到最大值 355.44 mg/g substrate，而菌體繼續吸收養分生長至第 30 天，而此時靈芝酸含量隨時間上升中，且在第 36 天時會形成紅棕色的培養基。

由圖 4-4 顯示，總多酚與類黃酮含量隨時間增加而上升，總酚含量在第 36 天達到 14.67 mg/g substrate，類黃酮含量則在第 30 天達到 5.92 mg/g substrate。

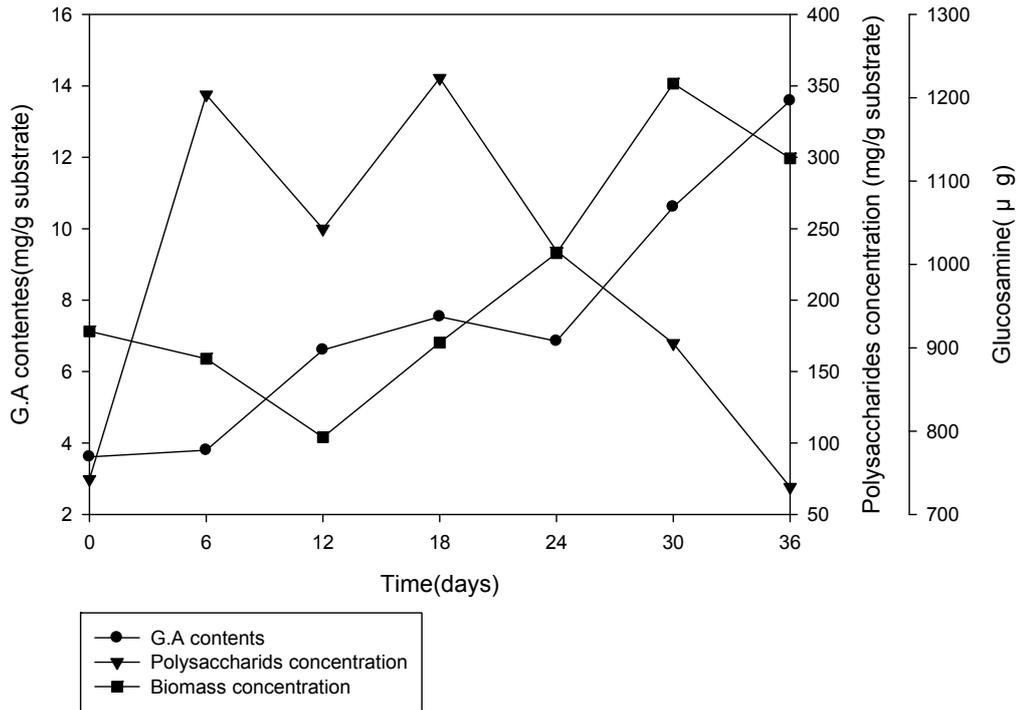


圖 4-32 添加檸檬果皮對靈芝固態基質之生理活性影響

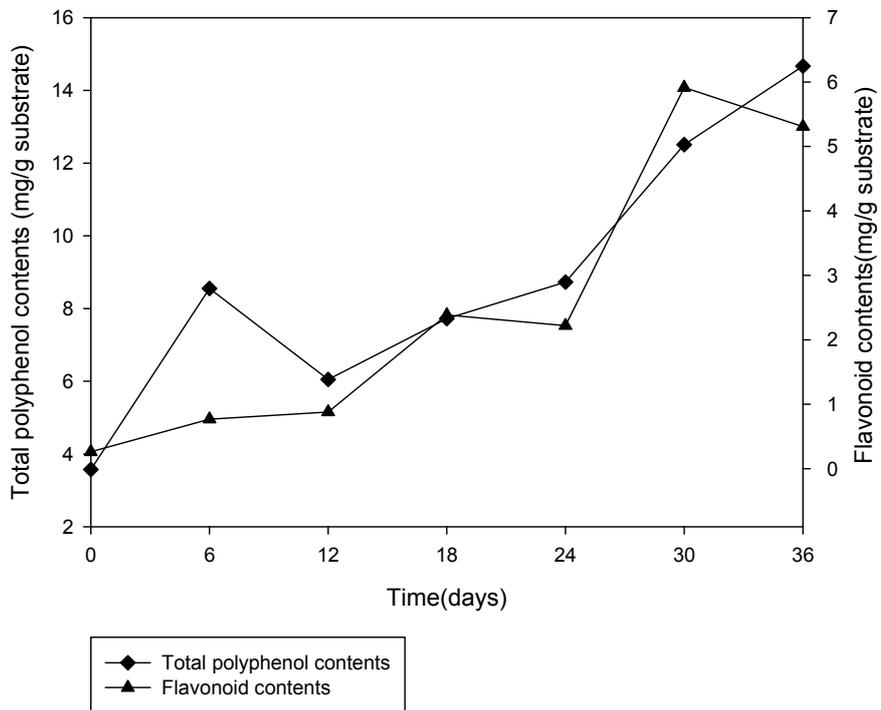


圖 4-33 添加檸檬果皮對靈芝固態基質之類黃酮及總多酚之影響

以上培養條件：固態基質(大薏仁)+1 g 檸檬果皮粉  
接菌量 5% (v/v) 培養天數 36 天

#### 4-4-3 葡萄柚果皮添加之固態培養

由圖 4-34 顯示，靈芝酸含量隨時間增加而增加，推測因果皮成分添加使得原本醣類較高的固態基質受到影響，菌體分解基質開始生長到第 6 天多醣有很明顯的變化，而從第 12 天到第 18 天葡萄糖胺含量下降，多醣含量回升；第 24 到第 36 天，靈芝酸與菌量皆繼續生長，而到第 36 天生長情形與檸檬添加劑相同，且靈芝酸含量達到最大值 17.29 mg/g substrate，具有紅棕色的固態培養基與二次代謝產物的液態分泌物產生。由圖 4-35 顯示，總多酚與類黃酮含量隨時間增加而上升，總酚含量在第 36 天達到 13.10 mg/g substrate，類黃酮含量則在第 30 天達到 7.22 mg/g substrate。

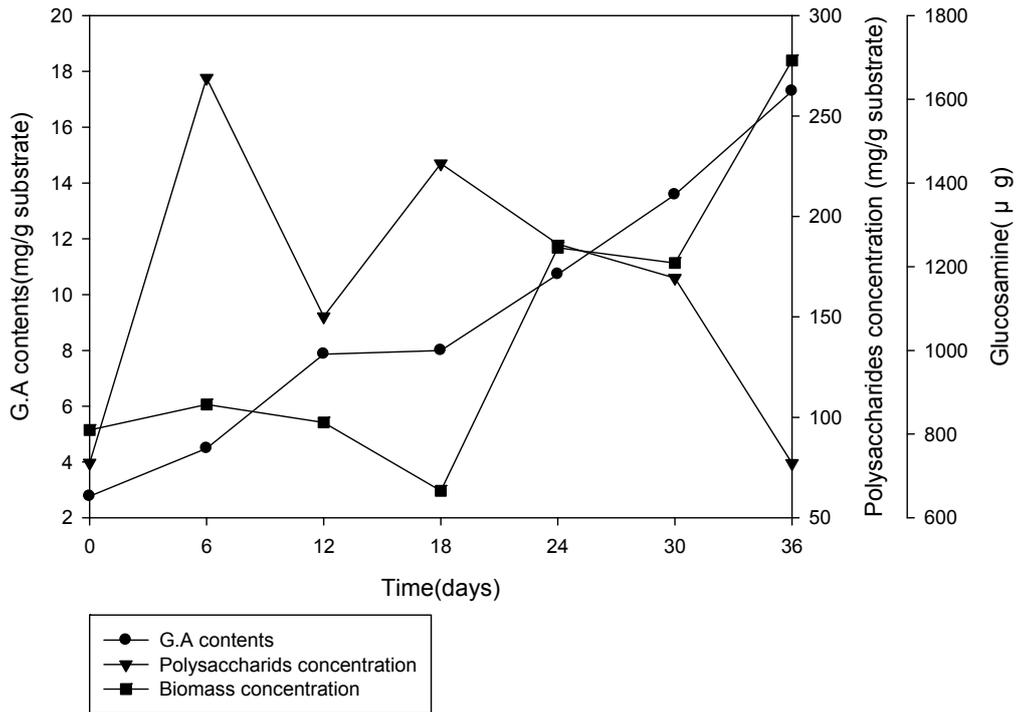


圖 4-34 添加葡萄柚果皮對靈芝固態基質之生理活性影響

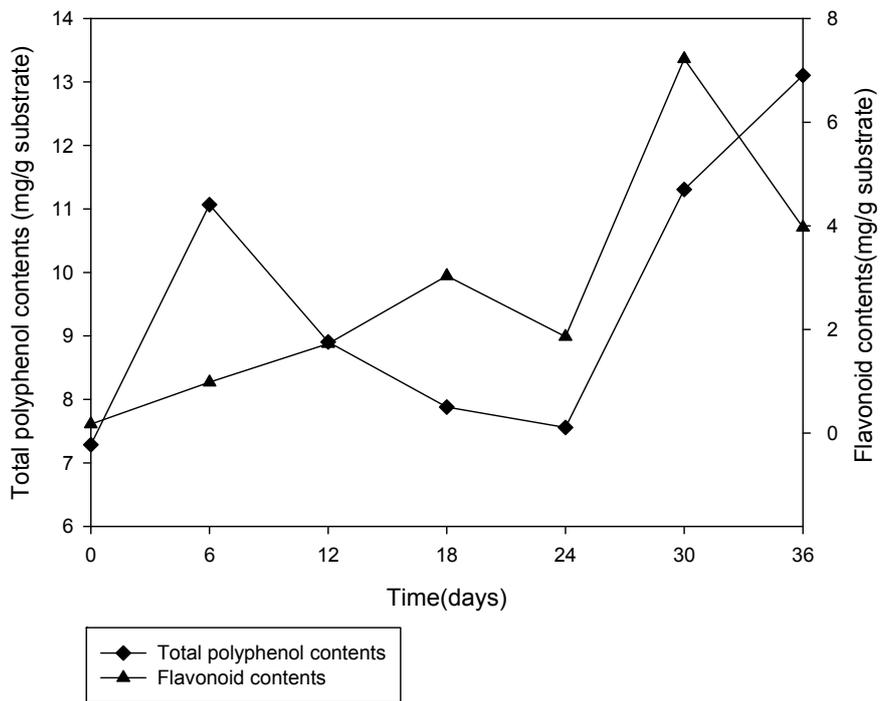


圖 4-35 添加葡萄柚果皮對靈芝固態基質之類黃酮及總多酚之影響

以上培養條件：固態基質(大薏仁)+1 g 葡萄柚果皮粉  
 接菌量 5% (v/v) 培養天數 36 天

#### 4-4-4 柳橙果皮添加之固態培養

結果由圖 4-36 顯示，以柳橙果皮粉末為固態培養基之誘導劑，培養 36 天；其靈芝酸與葡萄糖胺隨時間增加而上升，而靈芝酸在第 30 天達到最大值 11.16 mg/g substrate，葡萄糖胺含量隨時間增加而上升，菌體分解基質開始生長到第 6 天多醣達到 311.08 mg/g substrate，而此時葡萄糖胺含量極速下降，推測菌體此時快速分解固態基質原有的養分，進而生長菌體，並在第 30 天時達到葡萄糖胺含量與二次代謝產物靈芝酸的最高含量。由圖 4-37 顯示，總多酚與類黃酮含量大略隨時間增加而上升，在第 30 天時即達到最大值，分別為 25.49 mg/g substrate 及 6.75 mg/g substrate。

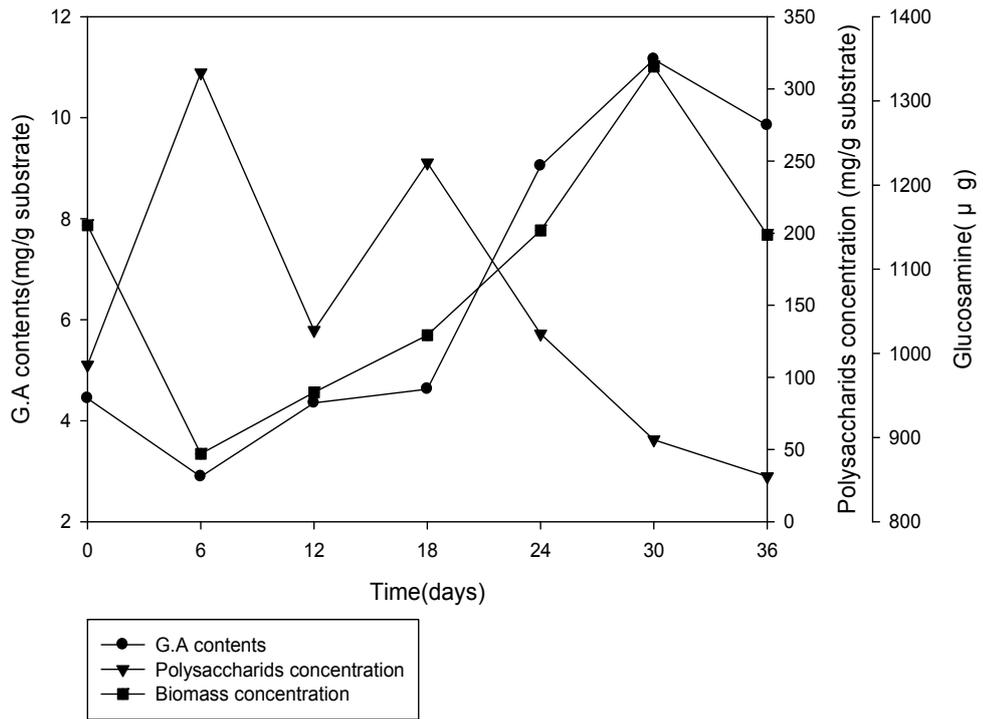


圖 4-36 添加柳橙果皮對靈芝固態基質之生理活性影響

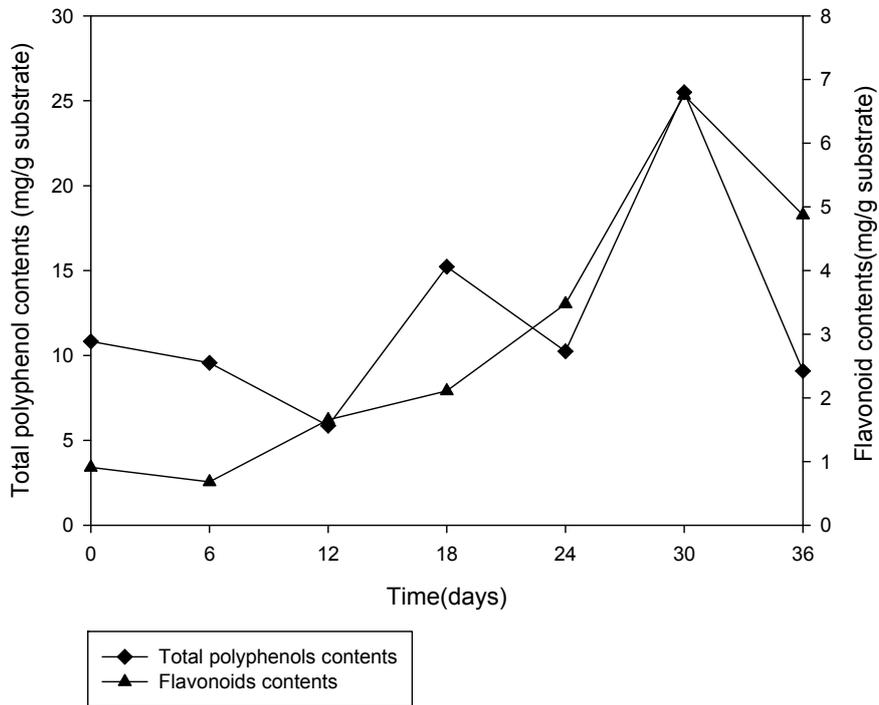


圖 4-37 添加柳橙果皮對靈芝固態基質之類黃酮及總多酚之影響

以上培養條件：固態基質(大薏仁)+1 g 柳橙果皮粉  
接菌量 5% (v/v) 培養天數 36 天

#### 4-4-5 金桔果皮添加之固態培養

結果由圖 4-38 顯示，以金桔果皮粉末為固態培養基之誘導劑，培養 36 天，而金桔本身聚有的萜類化合物含量比添加菌量的培養基較來的高，形成固態基質提供給靈芝的養分，促使靈芝在第 6 天時進行一次代謝產物多醣與菌重含量達到最大值，而多醣則隨時間增加而開始下降，而葡萄糖胺含量則在第 12 天到第 18 天上升，第 18 天到第 24 天則又下降；而第 24 天到第 30 天葡萄糖胺含量則又回升，而由未添加的固態基值可看出粗三萜含量為最高，而添加菌量使既有的粗三萜含量降低，可知添加金桔粉末可能會抑制靈芝粗三萜含量生長。由圖 4-39 結果顯示，總多酚與類黃酮大致隨時間增加而上升，但添加金桔果皮粉末的固態培養基之總多酚與類黃酮呈現反比的趨勢。

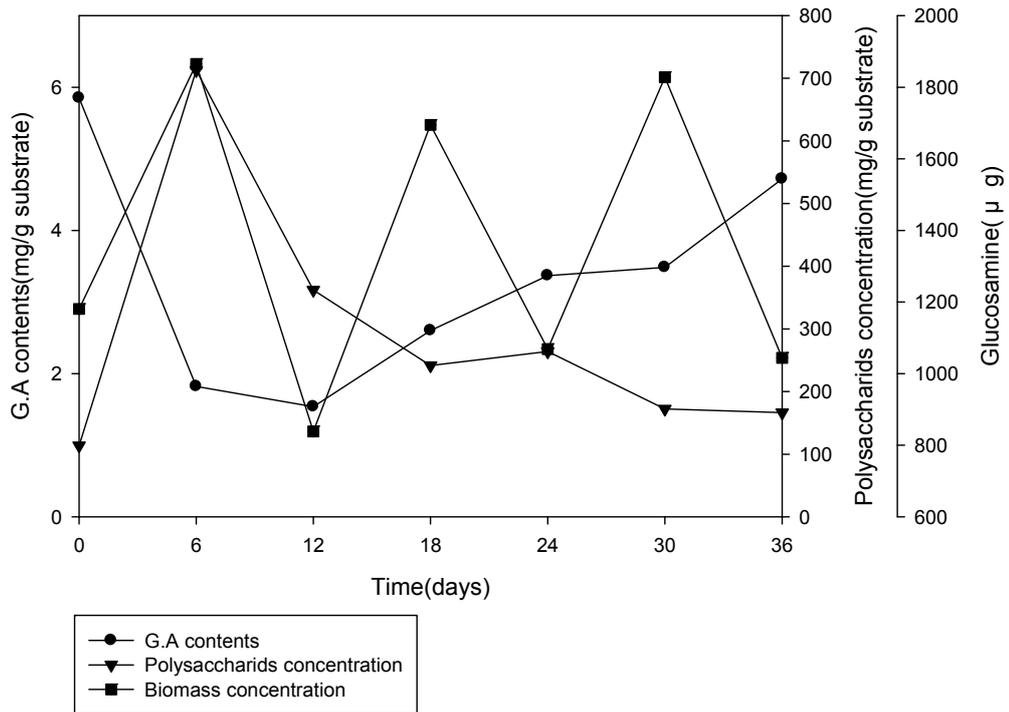


圖 4-38 添加金桔果皮對靈芝固態基質之生理活性影響

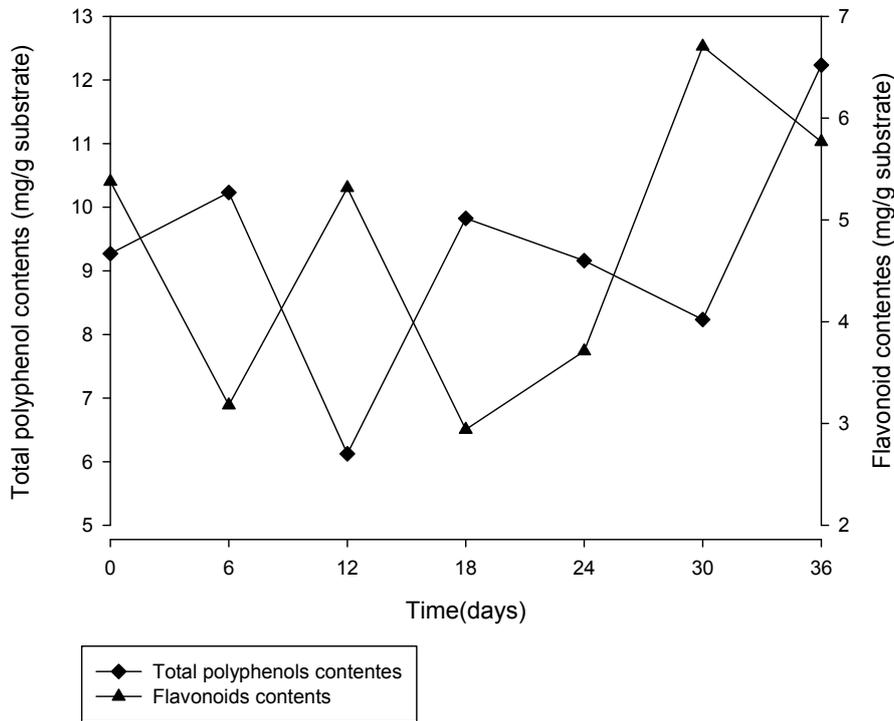


圖 4-39 添加金桔果皮對靈芝固態基質之類黃酮及總多酚之影響

以上培養條件：固態基質(大薏仁)+1 g 金桔果皮粉  
 接菌量 5% (v/v) 培養天數 36 天

#### 4-4-5 紅柑果皮添加之固態培養

結果由圖 4-40 顯示，以紅柑果皮粉末為固態培養基之誘導劑，培養 36 天，第 6 天時即達到多醣含量最大值 456.34 mg/g substrate，得知菌體分解固態培養基質促使菌體達到一次代謝產物，而添加紅柑果皮粉末的固態基質，所含的原有醣類較其他果皮來的低，而一開始葡萄糖胺含量並未太多，在培養的過程中葡萄糖胺的變化量相差並不大，到 30 天時才達到最大值，而第 6 到第 12 天之間靈芝酸含量下降，由第 12 天到第 24 天靈芝酸隨時間增加而上升，到第 24 天靈芝酸含量達到 6.45 mg/g substrate，由此可知添加紅柑果皮粉末對靈芝酸生長以及葡萄糖胺含量多寡並沒有太大的幫助。由圖 4-41 顯示，到第 30 天，總多酚含量達到最大值 19.75 mg/g substrate，類黃酮則到第 36 天達到最大值 4.41 mg/g substrate，由此得知總多酚以及類黃酮含量隨時間增加而上升。

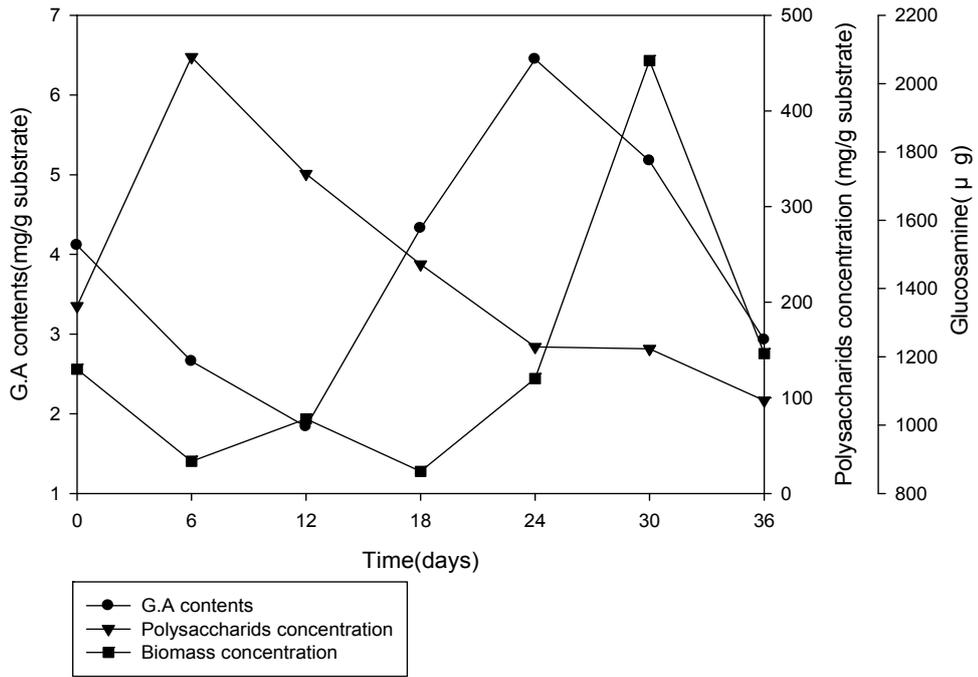


圖 4-40 添加紅柑果皮對靈芝固態基質之生理活性影響

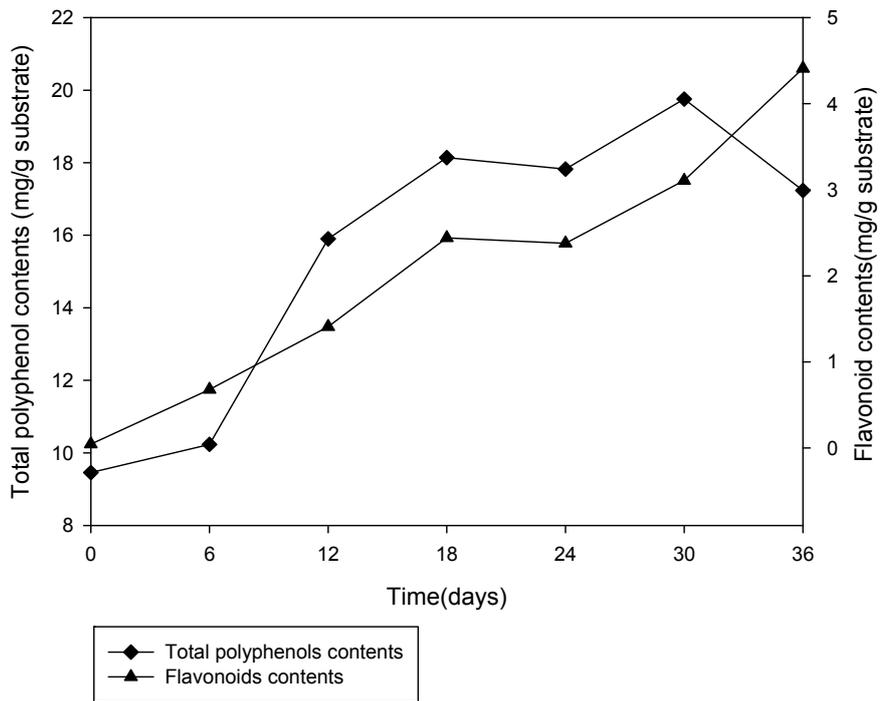


圖 4-41 添加紅柑果皮對靈芝固態基質之類黃酮及總多酚之影響

以上培養條件：固態基質(大蕙仁)+1 g 紅柑果皮粉  
接菌量 5% (v/v) 培養天數 36 天

#### 4-4-7 不同果皮對固態培養比較

由表 4-5 及圖 4-42 顯示，以靈芝酸做為探討，在第 36 天時，添加葡萄柚果皮之固態培養基的靈芝酸含量為達到最大值 17.29 mg/g substrate，而添加金桔與紅柑的靈芝酸含量卻比未添加果皮粉末的控制組較低，由圖 4-38 與圖 4-39 可看出未添加菌量的金桔類黃酮含量較其他果皮來的較高，推測有可能金桔某些物質抑制了靈芝酸的生長。由表 4-5 顯示，以總多酚以及類黃酮做比較，普遍在第 30 天時達到最大值，以添加葡萄柚果皮的固態成分類黃酮含量最高 7.22 mg/g substrate，但以二者提升量來說，則以添加柳橙效果最好，總多酚含量 25.5 mg/g substrate，類黃酮含量 6.75 mg/g substrate，可同時提升總多酚以及類黃酮含量，而對生產靈芝酸效果不大的添加金桔與紅柑果皮粉末的固態基質，則在此有別於其他果皮類，添加金桔果皮粉末可促使產生類黃酮，而添加紅柑粉末則促使產生總多酚含量。

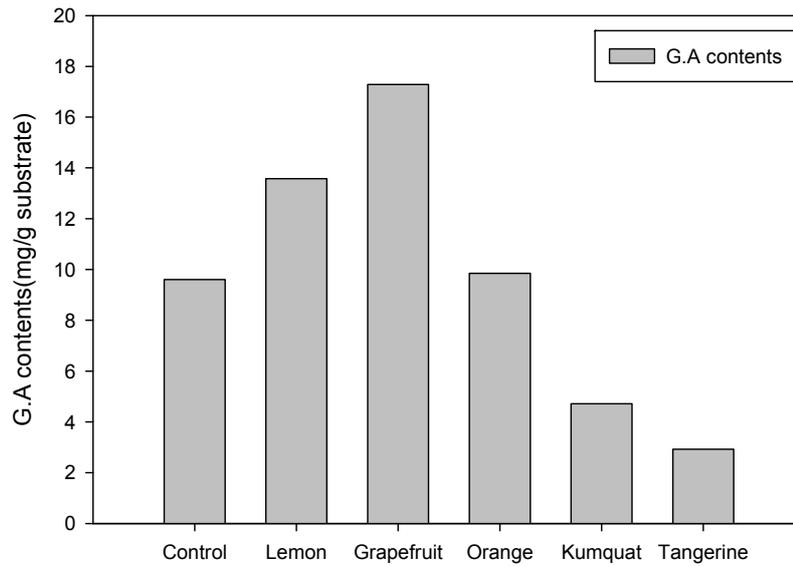


圖 4-42 不同果皮添加對靈芝酸生成之影響(第 36 天)

表 4-5 不同果皮添加對靈芝生理活性及培養天數之影響

產物 種類	G.A <sup>a</sup>	Glucosamine <sup>b</sup>	Phenol <sup>c</sup>	Flavonoids <sup>d</sup>
Control	11.77(day30)	1.64(day36)	13.99(day30)	5.78(day30)
Lemon	13.58(day36)	1.22(day30)	14.67(day36)	5.92(day30)
Orange	11.16(day30)	1.34 (day30)	25.50(day30)	6.75(day30)
Kumquat	4.72(day36)	1.87(day6)	12.23(day36)	6.71(day30)
Grapefruit	17.29(day36)	1.69 (day36)	13.10(day36)	7.22(day30)
Tangerine	6.45(day24)	2.07(day30)	19.75(day30)	4.41(day36)

註：表 4-5 為靈芝生理活性最大值及培養天數，單位 mg/g substrate

#### 4-4-8 葡萄柚濃度變化之影響

由上列實驗結果顯示，添加葡萄柚粉末之固態基質，到第 36 天時靈芝酸可達到最大值，為探討靈芝酸變化量，則以葡萄柚粉末進行添加含量多寡對靈芝酸生長之影響，添加的粉末量則以 1、2、4、8、10 g 進行固態添加果皮粉末含量多寡之探討。由圖 4-43，添加克數越多則促使生產靈芝酸含量降低，而多醣含量隨克數增加而上升，添加 8、10 g 的固態基質多糖含量較其他來的高，推測靈芝因受到抑制而使生長緩慢，故在第 36 天時才行一次代謝反應生成多醣；而以葡萄糖胺做探討，在此測得的可能為果皮本身具有的營養成分，而添加 2、4 g 的葡萄糖胺含量較低，推測靈芝因受到抑制在第 36 天時才分解代謝掉大部分的固態基質，正要開始進行二次代謝反應，而添加克數為 8、10 g 的固態基質多醣因正進行一次代謝，固態培養基並尚未完全分解，所測得的葡萄糖胺含量相對也較高。由圖 4-44，總多酚及類黃酮含量隨葡萄柚粉末添加克數增加而下降，添加 1 g 的總多酚以及類黃酮受靈芝代謝幾乎完全的影響，則測得的結果相較添加克數高的效果來的好。從圖 4-43 與 4-44 顯示，添加的克數越多越抑制靈芝生長的速度。

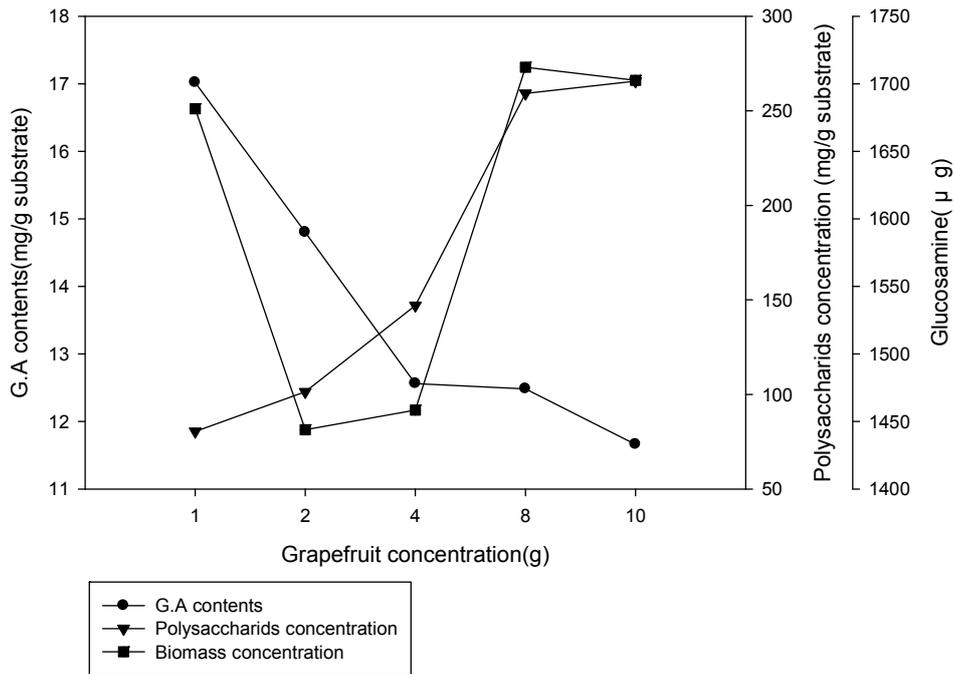


圖 4-43 葡萄柚果皮粉末添加量不同對靈芝生理活性影響

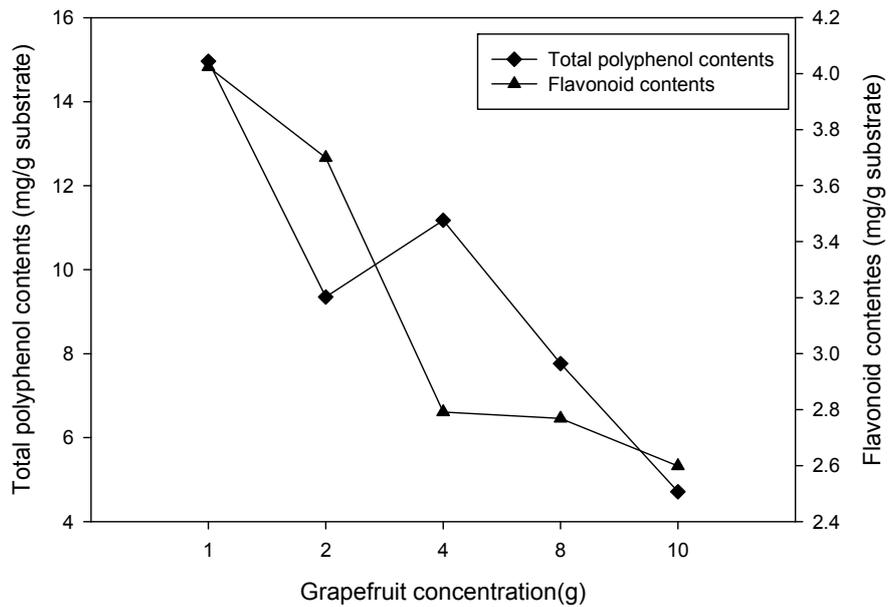


圖 4-44 葡萄柚果皮添加量不同對靈芝類黃酮以及總多酚含量影響

以上培養條件：固態基質(大薏仁)+ 1、2、4、8、10 g 葡萄柚果皮粉  
接菌量 5% (v/v) 培養天數 36 天

## 第五章 結論與未來展望

### 5-1 結論

本研究主要探討添加不同誘導劑對靈芝液態培養之發酵產物與菌絲體萃取物，以及固態培養之發酵產物的萃取物對生理活性之影響。

在前面討論中，在液態培養方面，以添加 2 ml 柳橙水萃液培養十三天之菌重與多醣分別為 10.67 g/L 與 1.50 g/L，而相對於控制組之菌重與多醣分別為 5.77 g/L 與 0.52 g/L，添加效果增加兩倍；對於菌絲濃度以及多醣部分確實有很大的效用，因果皮本身就具有多醣的成分，利用水萃液添加確實可使多醣成分含量提高；但添加量增加卻並不會使多醣成分增加，反而添加低量的誘導劑效果較佳。研究發現：果皮水萃液添加對靈芝酸生成並無太大幫助。而為探討靈芝液態培養使靈芝酸含量提升，做了添加時間不同以及添加的誘導劑不同做為探討；其時間點則分為培養初期與培養至第 4 天添加誘導劑的差別，同時間亦做以乙醇萃取果皮與果皮水萃液添加，對靈芝生理活性之影響。而由結果可看出於第 4 天添加乙醇萃取物確實可刺激靈芝有效成分生長，但菌絲濃度則受到抑制，胞內多醣含量亦受影響；乙醇作為抑制劑，將造成微生物成長減緩，如在 5~12% 乙醇濃度(v/v) 範圍時，可明顯觀察到微生物成長被抑制(Dantigny *et al.*, 2005;Ibeas *et al.*, 1997) ，則在第 0 添加乙醇萃取物時可發現，添加至 4 ml 確實可以令菌體產生生長，但菌絲濃度並不高，添加大於 8 ml 時則完全抑制生長。而以水萃液進行探討，添

加量多少以及添加的時間點皆對靈芝酸生成並無太大幫助，但對菌絲濃度以及胞內多醣含量較添加乙醇萃取物之效果來的佳；且於第 4 天添加的乙醇萃取物 10 ml 培養十六天，則靈芝酸含量為 46.27 mg/g D.W.，總多酚與類黃酮含量分別為 78.59 與 7.58 mg/g D.W.，則相較於控制組靈芝酸含量 5.11 g/L、總多酚與類黃酮則分別為 7.5 mg/g D.W.與 1.79 mg/g D.W.。研究結果顯示果皮乙醇萃取物提昇靈芝酸含量達九倍，總多酚以及類黃酮達四倍以上。

固態培養方面採用大薏仁做培養基質，添加乾燥後果皮磨成的粉當做誘導劑，結果以添加葡萄柚粉末對靈芝酸效用較佳，發現以添加葡萄柚粉末培養三十六天之固態培養對靈芝酸含量為 17.29 mg/g substrate，而未添加之固態基質對靈芝酸含量為 9.61 mg/g substrate.，相較下添加果皮粉末其效果為控制組之兩倍。研究結果証實果皮萃取物或果皮添加可以有效提高靈芝生理活性成份。但行添加量變化進行培養，發現添加低量的誘導劑可使靈芝分解代謝較快，靈芝酸含量在同一天時相對較高。

由固液態結果可發現，誘導劑添加量變多，則並無法使生理活性提高，反而低量的添加，能夠刺激靈芝產生有效的生理活性成分。

## 5-2 未來展望

本研究利用廢棄柑橘類果皮添加是否能有效提高靈芝之有效生理活性，可針對進行培養的果皮種類、產地來源及控制每批果皮之有效成份是否相同，值得進一步探討。且須探討萃取劑是否會隨放置時間增加而有所變化，以及如何保存控制萃取劑之成分，以下次利用。而本研究大部份針對靈芝酸含量提升，則對萃取劑、添加時間點、抗氧化活性或其他活性做探討，同時必須探討果皮中何種成份影響靈芝生理活性。而利用添加誘導劑不同之時間點以及萃取方式有待後續研究之效用。

## 參考文獻

水野卓、合川正允(賴慶亮譯)(1997)。菇類的化學、生化學。國立編譯館。

王應然(2008、2007)。柑橘類果皮抗癌功效與回收利用。中央社新聞。

林俊清(1990)。生藥的解說-靈芝的介紹，藥學雜誌 6，101-111

徐泰浩、謝建元(2001)。靈芝生物活性成分與生物活性之療養品觀。生物產業 (Bioindustry)12(2)，117-135。

許瑞祥(2005)。靈芝在生技領域研發的新趨勢。農業生技產業季刊第三期，37-44。

許瑞祥(1993)<sup>a</sup>。靈芝概論。萬年出版社。

許瑞祥(1993)<sup>b</sup>。靈芝屬菌珠鑑定系統之研究。臺灣大學農業化學研究所博士論文。

趙繼鼎，張小青(2000)。中國真菌誌 18，27-143。

王伯徽、陳啟楨、華傑(1998)。食藥用菇類的培養與應用。財團法人食品工業發展研究所。

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。東海大學化學工程研究所碩士論文。

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

黃賜源(1996)。靈芝液態培養之研究。東海大學化學工程研究所碩士論文。

張東柱(1983)。台灣數種靈芝生物學上之研究。台灣大學植病所碩士論文。

蔡秀玲(2008)。利用靈芝菌絲體培養生成美白成分之研究。東海大學化學工程研究所博士論文。

林榮耀(1996)。靈芝及菇類等真菌類免疫調節蛋白質之研究及探討其臨床應用性。生命科學簡訊 10(2)，2-5。

劉國柱(1990)。現代科學看靈芝。雙利實業公司。台北市。

蘇慶華(2006)。靈芝子實體之完全利用—三帖類、多醣及幾丁質。全球華人 Ganoderma 研討會。

黃雪芬、劉柯俊、管育慧、董光世、蘇慶華、董大成(1989)。口服靈芝菌絲培養液之抗癌人工轉移作用。中華癌醫學會誌 5(1)，10-15。

黃美月(1989)。皮膚與美容。民生報社。台北市。

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 249-257。

高碧穗(1991)。柑橘屬精油香氣成分之探討。食品工業 26(9)，46-57。

廖信昌(1998)。柑橘精油應用於環衛害蟲之防除。農業世界 178，60-64。

龔治、李典謨、張真(2010)。針葉樹萜類合成酶研究進展。林業科學 1001-7488 (2010) 01-0123-08。

陳溪潭(1999)。茂谷柑栽培管理。台南區農業改良場技術專刊 88-2。

余志堅、陳傳紅、高凌飛、包水明、李榮同(2006)。5種中草藥水提取液對靈芝三萜含量的影響。時珍國醫國藥，第17卷第9期，1645-1646。

鄭富元、陳怡兆、陳文賢(2010)。台灣國產柳橙皮甲醇萃取之成分分析與抗氧化性研究，稻江學報第4卷第2期，1-12。

劉媛、丁重陽、章克昌、石貴陽(2008)。10種中藥對靈芝液體發酵的影響。食品與生物技術學報第27卷第2期，123-126。

周雅燕(2010)。乙醇添加對雞腿磨菌絲體代謝幾丁質酶之探討。東海大學化學工程研究所專題研究計畫。

陳書豪(2006)。探討樟芝的溫度變化對液態發酵與固態發酵生產三萜類與多醣體之影響。國立中央大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。

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論文。

王伯徽，華傑。(1991)靈芝培養彩色圖誌。新竹食品工業研究所。

Chrissie Wildwood 著、牛爾譯(2004)。芳療聖經。商周出版社。台北市。

Melissa Studio 著、卓芷聿審訂(2006)。精油全書。商周出版社。台北市。

Wanda Sellar 著、溫佑君譯(2001)。芳香療法精油寶典。世茂出版社。台北縣。

Alexotolus C. J., Mims C. W. (1979) .Introductory mycology.*John Wiley and Sons, Inc. New York.*

Chen Y, Xie MY, Gong XF.(2007).Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *Food Engineering*,81,162-170.

Chaplin MF, Kennedy JF. (1994).Carbohydrate analysis-a practical approach. *Oxford University Press Inc.*

Carmen W. Huie, Xin Di (2004)Chromatographic and electrophoretic methods for *Lingzhi* pharmacologically active components. *Journal of Chromatography B*, 812 , 241 – 257

Dantigny,P.Guilmart,F.Radoi,M.Bensoussan,andM.Zwietering.(2005).Modelling the effect of ethanol on growth rate of food spoilage moulds. *Food Microbiology*,. 261-269.

Furue H.(1987),Biological characteristics and clinical effect of sizofilan(SPG).*Drugs of Today*,23(6),335-346,.

Fang QH., Tang YJ., Zhong JJ. (2002).Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*,37,1375-1379.

Fang QH., Zhong JJ.(2002). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganodericacid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal*, 10,61-65.

Gustavo VG., Ernesto FT., Cristobal Noe A , Sergio de Jesus RG. , Gerardo D G., and Christopher A. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 157-167.

Hikino H., Lomnno C., Mirin Y.(1985) .Isollation and hypoglycemic activity of *Ganoderans A and B*, glycans of *Ganoderan lucidum* fruit bodies. *Planta Med*, 4, 339-340.

Litchfield J.H.(1967).Submerged Culture of Mushroom Mycelium. *Microbiol Technology,ed.Peppler,H.J.,Reinhold Publishing Corporation,USA,107-144.*

Misiki A., Kututa M. (1981).Studies in interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 92, 115-129.

Nagy M., Grancai, D. (1996). Colorimetric determination of flavanones in propolis.*Pharmazie*, 51,100-101

Ride J.P.,Drysdale R.B.(1972).A rapid method for the chemical estimation of

filamentous fungi in plant tissue. *Physiol Plant Pathol*, 2, 7-15.

Rouseff R., Nagy S. (1994). Health and nutrition benefits of citrus fruits components. *Food Technol.* 48(11), 125-139.

Sato K, Sudo S. (1999). Small Scale Solid State Fermentations. *Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2, 61-63

Sone Y., Okuda R., Wada N., Kishida E., Misaki A. (1985) .Structure and antitumor activities of the polysaccharide isolated from fruiting body and growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agriculture and Biology Chemistry*, 49(9), 2641-2653.

Tsuji A., Kinoshita T., Hoshino M.(1969).Analytical chemical studies on amino sugar.II.Determination of hexosamines using 3-methyl-2benzothiazolinone hydrazone hydrochloride. *chem.Pharm.Bull.*, 17, 1505-1510.

Tomaselli S.C., Vergoingnan C., Feron G., Durand A.(2001).Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of cunning hamella elegans grown in solid state cultivation condition. *Biochemical Engineering Journal* , 7, 1-5.

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

hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 31,20-28.

Tholl D,(2006).Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* ,9,297–304.

Wang K.H., Lin R.D., Hsu F.L., Huang Y.H., Chang H.C., Huang C.Y., Lee M.H.(2006). Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 353–359.

Zhu LW., Zhong JJ , Tang YJ.(2008). Significance of fungal elicitors on the production of ganoderic acid and Ganoderma polysaccharides by the submerged culture of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* ,43,1359–1370.