

## 摘要

樟芝(*Antrodia cinnamomea*)為台灣特有的藥用菇類，已知主要的有效成分為多醣體、固醇類、總類黃酮物質、總多酚類及三萜類，其生理活性成分及功能仍是目前研究重點。本研究以添加不同柑橘類果皮的水萃液到液態發酵培養基，選擇效果最佳之果皮水萃液改變其濃度，以及改變果皮水萃液添加時間，探討是否對樟芝菌絲體之生理活性成分產生影響。由結果顯示，添加檸檬水萃液對生理活性成分含量的有提升的作用，其胞內多醣含量在第 8 天時可達到 230.77 mg/g D.W.，為對照組的 1.87 倍；粗三萜及總三萜產量，在第 20 天時可達 20.42 mg/g D.W.及 28.29 mg/100 ml，為對照組的 2.23 倍及 3.90 倍；在類黃酮方面，在第 28 天時可達 3.22 mg/g D.W.，為對照組的 1.07 倍。而檸檬水萃液濃度方面，以添加 10 ml為最佳，粗三萜及總三萜產量，在第 28 天時可達 29.53 mg/g D.W及 41.79 mg/100 ml，為對照組的 2.75 倍及 5.40 倍。在改變果皮水萃液添加時間培養方面，在 12 天添加 10ml檸檬水萃液時，其類黃酮及總酚含量皆在第 28 天達到最大值，分別為 4.63 mg/g D.W.及 22.01 mg/g D.W.，為對照組的 2.60 倍及 2.05 倍。研究結果希望可供日後樟芝生理活性成分產量提升的參考。

**關鍵字：**樟芝、多醣、三萜、類黃酮

## Abstract

*Antrodia cinnamomea* is an endemic medical mushroom in Taiwan. It is well known that the major effective components in this medical fungus are polysaccharides, steroids, flavonoids, phenols and triterpenoids. The bioactive and efficacy of *A. cinnamomea* are still the main focus in many researches. In this research different kinds of citrus peel's water extracts were added into the media to investigate their effects on the formation of bioactive components of *A. cinnamomea* in shake-flask cultures. The most effective kind and the optimal concentration of citrus peel's water extracts were determined. Moreover, addition timing was also studied. The results showed that lemon peel's water extract could effectively increase bioactive components. The intracellular polysaccharide value reached to 230.77 mg/g D.W. at 8 day. The crude triterpenoid and total crude triterpenoid were 20.42 mg/g D.W. and 28.29 mg/100 ml, respectively at the 20<sup>th</sup> day. The flavonoid value was 3.22 mg/g D.W. at the 28<sup>th</sup> day. Concerning the effects of different concentrations of lemon peel's water extract, the optimal concentration was determined to be around 10ml. The crude triterpenoid and total crude triterpenoid could reach to 29.53 mg/g D.W and 41.79 mg/100 ml respectively at the 28<sup>th</sup> day. About addition timing, the day 12 for the addition of 10 ml lemon peel's water extract were recommended and the flavonoid and total phenol rose to 4.63 mg/g D.W. and

22.01 mg/g D.W., respectively at the 28<sup>th</sup> day. The results of this study are expected to be used for the enhancement of bioactive components production in the submerged culture of *A. cinnamomea*.

**Key words:** *Antrodia cinnamomea*, intracellular polysaccharide, crude triterpenoid, flavonoid.

## 目錄

|                          |     |
|--------------------------|-----|
| 摘要.....                  | III |
| Abstract .....           | IV  |
| 目錄.....                  | VI  |
| 圖目錄.....                 | X   |
| 表目錄.....                 | XII |
| 第一章 緒論.....              | 1   |
| 1-1 前言.....              | 1   |
| 1-2 研究動機與目的.....         | 2   |
| 第二章 文獻回顧.....            | 3   |
| 2-1 樟芝.....              | 3   |
| 2-1-1 樟芝簡介.....          | 3   |
| 2-1-2 樟芝的生理活性成分.....     | 5   |
| 2-1-3 樟芝生理活性成分研究及應用..... | 9   |
| 2-1-4 影響發酵的因子.....       | 11  |
| 2-2 柑橘類水果.....           | 14  |
| 2-2-1 檸檬(Lemon) .....    | 14  |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 2-2-2 柚子(Pomelo) .....     | 16 |
| 2-2-3 柳橙(Orange).....      | 17 |
| 2-2-4 葡萄柚(Grapefruit)..... | 18 |
| 2-3 精油簡介.....              | 19 |
| 2-3-1 精油萃取方法.....          | 20 |
| 2-3-2 精油的功用.....           | 20 |
| 第三章 實驗材料與方法.....           | 22 |
| 3-1 實驗菌株.....              | 22 |
| 3-2 實驗藥品.....              | 22 |
| 3-3 實驗儀器與設備.....           | 23 |
| 3-4 分析方法.....              | 24 |
| 3-4-1 菌體濃度.....            | 24 |
| 3-4-2 殘餘澱粉含量測定.....        | 24 |
| 3-4-3 多醣濃度測定.....          | 25 |
| 3-4-4 胞內粗三萜含量測定.....       | 26 |
| 3-4-5 總多酚類化合物含量測定.....     | 26 |
| 3-4-6 總類黃酮物質含量.....        | 27 |
| 3-5 實驗方法.....              | 28 |

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| 3-5-1 實驗架構.....                      | 28 |
| 3-5-2 菌種斜面試管保存.....                  | 28 |
| 3-5-3 培養皿平面培養與接菌活化.....              | 29 |
| 3-5-4 種菌的製備.....                     | 29 |
| 3-5-5 水萃液製備.....                     | 29 |
| 3-5-6 樟芝菌絲體甲醇萃取物之製備.....             | 30 |
| 3-5-7 不同果皮水萃液添加培養試驗.....             | 30 |
| 3-5-8 不同濃度果皮水萃液添加培養試驗.....           | 31 |
| 3-5-9 不同時間添加果皮水萃液培養試驗.....           | 31 |
| 第四章 結果與討論.....                       | 32 |
| 4-1 不同果皮水萃液添加培養試驗.....               | 32 |
| 4-1-1 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲生長影響.....        | 32 |
| 4-1-2 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體胞內多醣生成影響.....   | 38 |
| 4-1-3 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響.....    | 41 |
| 4-1-4 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體類黃酮生成影響.....    | 44 |
| 4-1-5 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體總酚生成影響.....     | 45 |
| 4-2 不同濃度果皮水萃液添加培養試驗.....             | 48 |
| 4-2-1 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體胞內多醣生成影響..... | 48 |

|  |    |
|--|----|
| 4-2-2 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響.....    | 51 |
| 4-2-3 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體總酚及類黃酮含量生成影響... | 54 |
| 4-3 不同時間添加檸檬水萃液培養試驗.....               | 58 |
| 4-3-1 不同時間添加檸檬水萃液對樟芝菌絲體粗三萜生成影響.....    | 58 |
| 4-3-2 不同時間添加檸檬水萃液對樟芝菌絲體類黃酮含量生成影響.....  | 61 |
| 4-3-3 不同時間添加對樟芝菌絲體總酚含量生成影響.....        | 62 |
| 第五章 結論與未來展望.....                       | 63 |
| 5-1 結論.....                            | 63 |
| 5-2 未來展望.....                          | 65 |
| 參考文獻.....                              | 66 |

## 圖目錄

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| 圖 1-1 樟芝平板培養.....                    | 4  |
| 圖 1-2 樟芝液態培養菌絲球.....                 | 4  |
| 圖 2-1 檸檬.....                        | 15 |
| 圖 2-2 柚子.....                        | 17 |
| 圖 2-3 柳丁.....                        | 18 |
| 圖 2-4 葡萄柚.....                       | 19 |
| 圖 3-1 實驗架構.....                      | 28 |
| 圖 4-1 樟芝菌絲體三角瓶培養基礎試驗.....            | 33 |
| 圖 4-2 添加柚子水萃液對樟芝菌絲生長之影響.....         | 34 |
| 圖 4-3 添加檸檬水萃液對樟芝菌絲生長之影響.....         | 35 |
| 圖 4-4 添加柳丁水萃液對樟芝菌絲生長之影響.....         | 36 |
| 圖 4-5 添加葡萄柚水萃液對樟芝菌絲生長影響.....         | 37 |
| 圖 4-6 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體胞內多醣生成影響 .....  | 39 |
| 圖 4-7 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體總胞內多醣生成影響 ..... | 40 |
| 圖 4-8 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響 .....   | 42 |
| 圖 4-9 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體總三萜生成影響 .....   | 43 |

|  |    |
|--|----|
| 圖 4- 10 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體類黃酮生成影響 .....           | 44 |
| 圖 4- 11 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體總酚生成影響.....             | 46 |
| 圖 4- 12 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體胞內多醣生成影響 .....        | 49 |
| 圖 4- 13 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體總胞內多醣生成影響 .....       | 50 |
| 圖 4- 14 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響 .....         | 52 |
| 圖 4- 15 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體總三萜生成影響 .....         | 53 |
| 圖 4- 16 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體類黃酮含量生成影響 .....       | 55 |
| 圖 4- 17 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體總酚含量生成影響 .....        | 56 |
| 圖 4- 18 不同時間添加 10 ml檸檬水萃液對樟芝菌絲體粗三萜生成影響 .....   | 59 |
| 圖 4- 19 不同時間添加 10 ml檸檬水萃液對樟芝菌絲體總三萜生成影響 .....   | 60 |
| 圖 4- 20 不同時間添加 10 ml檸檬水萃液對樟芝菌絲體類黃酮含量生成影響 ..... | 61 |
| 圖 4- 21 不同時間添加 10 ml檸檬水萃液對樟芝菌絲體總酚含量生成影響 .....  | 62 |

## 表目錄

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 表 3-1 實驗藥品清單.....           | 22 |
| 表 3-2 實驗儀器與清單.....          | 23 |
| 表 4-1 不同果皮之樟芝液態培養動力學參數..... | 47 |
| 表 4-2 不同檸檬水萃液濃度之動力學參數.....  | 57 |

# 第一章 緒論

## 1-1 前言

台灣柑橘類種類很多，主要用途為鮮食，但果皮除了整粒加工之外，其使用率非常少，故殘餘的廢棄果皮量很多。近年來柑橘類果皮的再利用逐漸受到重視，主要原因是柑橘類果皮中，果膠物質含量高，為萃取果膠最佳原料(Changet al., 2003)；精油含量高，除用於芳香療法(Aromatherapy)，精油中主要成分檸檬烯(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；含有類黃酮素為維他命 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。

在講求健康的時代裡，對健康有著相當功效的保健食品日漸興起，其中又以食藥用菇之保健類食品最為矚目。因為自古以來即作為藥物應用，而且在菇類表現的生理特性(藥理作用)中，除有生體防疫(免疫增強)，疾病康復力等作用外，更對腫瘤有預防及改善的效果(水野卓, 1997)。由吳德鵬的試驗發現，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, 1995)。在化合物中，氧官能基團對於產生的苦味，擔任重要的角色，其能穿透及吸收至感受器膜以及化合物的疏水性部份，對產生苦味均有重要的功能。

目前有許多研究顯示樟芝(*Antrodia camphorata*)具有抗氧化、保肝、增強

免疫力、抗腫瘤、預防心血管疾病及降血壓等功能，但樟芝對宿主具有專一性，只生長於台灣特有的牛樟樹樹幹中，不易採收，故藉由深層液態培養的方式，快速地獲得大量的菌絲體及其發酵產物，以取代不易取得的樟芝子實體。

## 1-2 研究動機與目的

本實驗利用三角瓶液態培養方式，分別在樟芝基礎培養基中添加不同果皮水萃液，與樟芝進行發酵，之後選擇效果最好的果皮水萃液，並改變水萃液濃度，探討水萃液對菌絲體生長、生理活性成分的影響，選出最佳條件，再進行不同時間添加水萃液的培養，希望能提高發酵產物的生理活性。

## 第二章 文獻回顧

### 2-1 樟芝

#### 2-1-1 樟芝簡介

樟芝(*Antrodia cinnamomea*)又稱為牛樟芝、牛樟菇、樟菰，只生長在台灣國寶級保育樹種牛樟樹上，是台灣特有種真菌，因此十分珍貴。最早被原住民發現具有解宿醉、解毒、治療腹痛、改善肝病等效果。在1990年，第一次發表正式學名時，因標本沾染了靈芝孢子而被誤發表為靈芝屬，被命名為 *Ganoderma comphoratum*(Zang and Su, 1990)。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)。

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(Aphullophorales)、多孔菌科(Polyporaceae)、薄孔菌屬(*Antrodia*)(Chang and Chou, 1995)。

牛樟芝的子實體為多年生，外形平伏，無柄，邊緣反卷，呈圓狀或不規則狀，與牛樟木接觸面緊且寬，菌肉分兩層，木栓化至木質化，表面散佈菌孔，每毫米4~5個，新鮮時表面呈橘紅色、橘褐色至淡肉桂色，老化時變成

褚黑色。擔子柄棍棒狀， $12\sim 14\times 3.0\sim 5.0\ \mu\text{m}$ ，擔孢子的型態為平滑無色之透明微彎柱形， $3.5\sim 5.0\times 1.5\sim 2\ \mu\text{m}$  (高, 1991；Chang & Chou, 1995)。



圖 1-1 樟芝平板培養

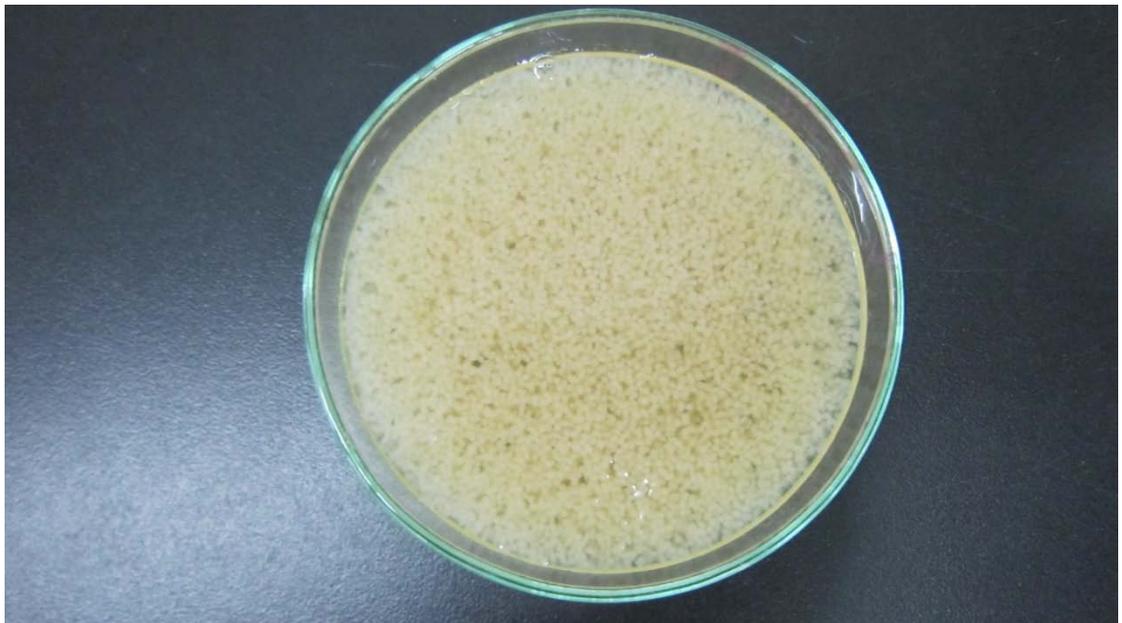


圖 1-2 樟芝液態培養菌絲球

## 2-1-2 樟芝的生理活性成分

樟芝的活性成分，包含多醣體、三萜類化合物、超氧歧化酵素、腺苷、蛋白質、維生素、凝集素、固醇類、木質素、血壓穩定素(高, 1992)。主要是以多醣體(polysaccharides)及三萜類化合物(triterpenoids)和固醇類(steroids)為主。

### 2-1-2-1 多醣體(polysaccharides)

多醣類是自然界中蘊藏豐富之生物聚合體(Biopolymer)。在微生物體中多醣依存在方式主要分為(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醱及碳源；(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。

目前有許多研究發現菇類純化的多醣體具有抗腫瘤作用，且均具有 $\beta$ -D-葡聚糖的結構。而樟芝所含 $\beta$ -D-葡聚糖抗癌活性之強弱與水溶性、分子量大小、支鏈分支度、形狀、與主鏈結合方式 $\beta$ -1,3 鍵結或 $\beta$ -1,6 鍵結以及結合之蛋白質與脂質等均有關。以 X-ray 繞射分析得知，這種以 $\beta$ -1,3 鍵結的 D-葡聚糖骨架呈現 3 股右旋之螺旋結構，可能是引發抗腫瘤作用的重要原因(水

野卓等, 1997)。

黃鈴娟發現樟芝發酵濾液之多醣體經酸水解後，其中性單醣組成以甘露糖、葡萄糖及木糖為主；而經水萃取及鹼萃取後之單醣則以葡萄糖及木糖為主，且無甘露糖存在。樟芝多醣體經膠體過濾層析後得知其皆含有大於 106 Da 之大分子，以核磁共振光譜判定多醣結構，可得知其具有  $\beta$ -D-葡聚糖的化學位移及紅外線光譜上具有醣類官能基之吸光特性(黃, 2000)。而李宛蓁根據 GPC 分析胞外多醣分子量，發現以固態培養的方式生成的多醣分子量遠高於液態培養時生成的多醣分子量(李, 2003)。范真綺在多醣體成分之測定，不論以透析(透析膜 M.W. 3000)或酒精沉澱法分析，液態發酵之多醣含量優於固體栽培菌絲體。而經由膠體過濾層析分析發現，兩者皆有分子量百萬以上之多醣體，且透析後之分子量遠比酒精沈澱的分子量大(范, 2004)。謝如婷則發現添加微量元素於牛樟芝固態發酵產物中能改變菌絲體代謝物的含量及分佈，並可提昇其多醣含量、抗氧化能力及抑制腫瘤細胞的生長(謝, 2009)。

### 2-1-2-2 三萜類化合物(triterpenoids)

萜類(terpene)化合物是由碳氫化合物或脂質代謝而產生，以異戊二烯為單體聚合而成的化合物。萜類化合物的形成起源於生物代謝的最基本物質-葡萄糖，葡萄糖首先在酵素的作用下形成醋酸，三分子醋酸經生物合成產生

甲戊二羧酸(mevalonic acid)，經過脫羧、脫水、異構化形成Dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP)分子，化學組成通式為 $(C_5H_8)_n$ ，隨著分子中碳環數目增加，氫原子比例相對減少。

萜類普遍存在於植物界與真菌界，在動物界為數甚少。萜類的主要分類法是依據分子中包含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);含有五個異戊二烯單體稱為二倍萜(sesterpenes);含有六個異戊二烯單體稱為三萜(triterpenes);含有八個異戊二烯單體稱為四萜(tetraterpenes)等。

萜類化合物一般均難溶於水，易溶於親脂性的有機溶劑。低分子量和含官能基少的萜類，常溫下多呈液體或低熔點的固體，具有揮發性，能隨水蒸氣蒸餾，如單萜和部分倍半萜。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。

單萜類為由 2 個異戊二烯單位組合而成的  $C_{10}$  化合物，大部分來自高等植物，近十年來，亦有多種單萜類於藻類、海底微生物及昆蟲體中被發現。其結構可依其環狀之結構分為三組：開環單萜類(Acyclic monoterpeneoids)、單環萜類(Monocyclic monoterpeneoids)以及雙環萜類(Bicyclic monoterpeneoids)，而 Dey 等人於 1991 年時指出單萜類可依據結構式中骨架之

不同及當時所發現數種新化合物，分成 38 種結構。其中，非環狀單萜類中有 Myrcane 等，單環單萜類的-Menthane 和 Iridane 等，及雙環單萜類的Thujane、Carane、Pinane<sup>910</sup>和 Bornane 之骨架為經常出現的化合物。而有些單萜化合物如 Furanoid 和 Pyranoid 則為 Myrcane 骨架與氧結合而得(Dey and Harborne, 1991)。

倍半萜類為由 3 個異戊二烯單位組合而成的具 15 個碳素(C<sub>15</sub>)的化合物，出現於許多不同有機體中，確定骨架的結構式已超過 100 種，並已有數千種之化合物被分離及確認。最近二十年，因分析技術的進步，利用新穎的光譜分析方法，更可鑑定出許多倍半萜類化合物。其結構於化學分類上，與單萜類相似，依據環狀結構可分成四類：開環倍半萜(Acyclic sesquiterpenoids)，單環倍半萜 (Monocyclicsesquiterpenoids)，雙環倍半萜 (Bicyclic sesquiterpenoids)，及 Sesquiterpenoids lactones (Harborne, 1973)，而四類中較為常見的構造有：開環倍半萜中 Farnesol 及 Nerolidol 等；單環倍半萜中  $\gamma$ -Bisabolene 及 Abscisic acid 等；雙環倍半萜中  $\alpha$ -Cadinene、 $\beta$ -Selinene 及  $\beta$ -Eudesmol、Caryophyllene 等；Sesquiterpenoids lactones 中 Xanthinin、Santonin 等。

三萜類是樟芝成分中最早被研究的活性物質，研究證實具有抑制組織氨釋放、抑制癌細胞生長、預防過敏、保肝、促進血小板凝集、降血脂等功效(劉,1990)。1995 年時 Cherng 等人即發現，樟芝子實體萃取物中含有三種新

的以 ergostane 為骨架的 antcin A、antcin B、antcin C (Cherng et al., 1995)。

其中 antcin A 可抑制小鼠血癌，antcin B 可抗副交感神經(Anticholinergic)和血清素(Antiserotonin)的作用。

目前所發現的牛樟芝子實體中所含有之多氧化型的三萜類及固醇類，可能是造成其強力苦味之主要成分(吳, 1995)，而樟芝的甲醇萃取物含量為靈芝含量的十倍(Cherng et al., 1996)，這也是為何樟芝比靈芝更苦的原因。李根據 HPLC 三萜分析，發現液態培養的三萜成分和固態培養不盡相同，在固態培養方面，以小薏仁為基礎培養基，添加微量牛樟樹木屑，在起始含水量 56.06%、25°C 下培養 14 天，能有效增加三萜的含量及種類(李, 2003)。

### **2-1-3 樟芝生理活性成分研究及應用**

目前許多研究顯示，樟芝具有廣泛的生物活性，如保肝作用、抗病毒、抗菌、抗癌活性、降血脂、抑制血管新生、抗氧化及抗發炎能力等(Liu et al., 2007；Ao et al., 2009)

#### **2-1-3-1 抗腫瘤功效**

樟芝有抑制多種癌細胞生長之功效，透過調控胞週期(Cell cycle)使癌細胞增生受到抑制，樟芝可以抑制乳癌、前列腺癌亦有文獻指出能抑制膀胱癌，肝癌(Hseu et al., 2008a)。

### 2-1-3-2 抗發炎作用

樟芝可抑制一氧化氮(NO)、腫瘤壞死因子-(TNF-)、介白素-12 (IL-12) 來達到抗發炎的功效 (Rao et al, 2007)。

### 2-1-3-3 抗氧化作用

樟芝萃取液具有超氧歧化酶(SOD)可以清除穩定型自由基-AAPH、DDPH 的作用(Hseu et al, 2008b)。

### 2-1-3-4 提升免疫力

樟芝的多醣體成份具有提升免疫力的作用，研究證實可增加干擾素 (Interferon-gamma；IFN-gamma)、腫瘤壞死因子(Tumor necrosis factor-alpha；TNF-alpha)與樹突細胞(Dendritic cells)、巨噬細胞(Macrophages)及脾臟 B 細胞的數量(Chen et al, 2008)。

### 2-1-3-5 抑制病毒活性

樟芝的多醣體可以抑制 B 型肝炎抗原的活性 (Lee et al, 2002)。

### 2-1-3-6 抗菌能力

牛樟芝子實體對於金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及鬚癬小芽癬菌的生長有抑制功效(簡等,1997)，對大腸桿菌(*Escherichia coli*)也有抑制效果(徐等,

2000)。

### **2-1-3-7 降血糖能力**

牛樟芝發酵液或菌絲體具有降血糖功效，在進行口服葡萄糖耐受性測試時，發現可降低葡萄糖及胰島素的濃度(嚴, 2001)。

### **2-1-4 影響發酵的因子**

發酵環境中，需要考量物理化學因素的影響，一般常見的有培養基之影響、攪拌速率、溫度、pH 值、黏度與溶氧值等因素，以下介紹物理化學因子可能對發酵結果所產生的影響。

#### **2-1-4-1 培養基組成**

一般來說，大部份碳源應該皆可被真菌吸收代謝以提供能量，並用來支持菌體生長與代謝物的生成。氮是構成葷類蛋白質與核酸的主要元素，更是形成生物鹼的要素，一般氮源並不提供能量，氮源可分為無機氮源與有機氮源兩種，前者如銨鹽、硝酸鹽等，後者如麩皮、酵母萃取物、胺基酸等。所謂的碳氮比是指培養基中總含碳量和總含氮量的比值，通常以 C/N 表示。碳氮比除了會影響到菌絲生長的快慢，也會影響菌體內蛋白質與脂質的含量，一般菌體生長的過程中約有 50%的碳源組成爲菌體細胞成份，另外的 50%是提供呼吸需要的能量來源，所以 C/N 以 5:1 至 25:1 之範圍爲宜。反之，碳

氮的比值如果太小則會有延長菌體生長期的缺點(黃,1996)。

#### **2-1-4-2 攪拌速率**

一般攪拌式發酵槽中，攪拌速率的大小是決定溶氧量的操作條件之一，適當地提高攪拌速率，不但能提高發酵液的溶氧量，還有助於菌絲生長以及產物的生成。但是過高的攪拌速率，其剪切力也將對菌體造成負面的影響，不但會抑制菌絲的生長及產物的生成，甚至造成細胞破裂。對於不同的菌種，最適當的攪拌速率也不一樣，因此在一個發酵工程上，考量適當的攪拌速率是必須的，為此可以改變操作條件，以達到最高的生產效率。

#### **2-1-4-3 溫度**

微生物對生長環境中的溫度很敏感，大部分的微生物適合在溫度範圍為 20 至 40°C 生長。然而每種微生物都有其生長所能承受的最低溫度、最適溫度及最高溫度。例如靈芝菌絲生長及的最適溫度範圍為 30-35°C，因此選擇適合菌體生長的溫度是很重要的(Yang and Liao,1998)。

#### **2-1-4-4 pH 值**

一般在發酵的環境中，pH 值不但會影響微生物生長，另外 pH 值的變化也會對副產物酸類物質、營養源的消耗、氧化還原反應與培養液的緩衝效果造成很大的影響。曾有文獻指出營養源的消耗與有機酸的生成會因為受到 pH

值的變動而影響到細胞膜的功能、細胞的型態與結構、鹽類在培養液的溶解度、受質的離子狀態、不同營養物質的消耗情形及代謝產物等(Forage et al., 1985)。不同微生物有其最適合生長的 pH 值範圍，而真菌類特別對低 pH 值有其特殊的容忍度，以最適合菌絲生長的 pH 值範圍分布在 4 到 7 之間。

#### **2-1-4-5 黏度**

真菌菌絲經過液態培養分泌於胞外的高黏度多醣，往往是造成液態發酵形態改變的變因之一，多醣產生造成發酵液體黏稠，使發酵環境的供氧速率、攪拌效果及營養物與細胞間的輸送速率受到限制，導致抑制代謝物抑或產物的生成(Chain et al., 1966)。

#### **2-1-4-6 溶氧值**

當耗氧菌內進行氧化反應，氧氣為代謝反應中的終端電子接受者，以產生能量供細胞活性的作用。在代謝過程有眾多酵素的參與，因此氧氣也有調節酵素之間的協調作用。因此，發酵環境中溶氧值的改變通常造成呼吸速率、酵素合成及代謝產物的生成(Forage et al., 1985)(Rau et al., 1992)。在植物細胞培養時，增加培養基之溶氧值 18 至 50 % 便有助於生物鹼的生成，但欲一直保持溶氧值而提高通氣量則反而會因剪切力過大而對細胞產生傷害(Roberts, 1998)。

## 2-2 柑橘類水果

柑橘類水果的果皮中，果膠物質含量高，為萃取果膠最佳原料 (Chang et al.)，且精油 (Essential oil) 含量高，除了用於芳香療法 (Aromatherapy) 以外，精油中主要成分檸檬烯 (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。而類黃酮素為維他命 P，含於柑橘皮內，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。因此果皮的再利用，近年來非常受到重視，除了精油萃取之外，還可以提高農業廢棄物的利用率。

柑橘類果皮油胞層含有大量精油，成分主要為酯類、醇類、醛類、酮類、碳氫化合物及其他化合物，其中碳氫化合物以檸檬烯含量為精油總量的 70% 以上 (高, 1991；廖, 1998)。

### 2-2-1 檸檬 (Lemon)

植物科屬：芸香科 (Rutaceae)，柑橘屬 (Citrus)。性味歸經：味酸甘、性平，入肝、胃經。有化痰止咳，生津，健脾的功效。氣味描述：自然、舒適清新的新鮮檸檬香氣，略帶微酸的香韻。精油色澤顯現：淡黃至淡綠色。化學分類 (屬性)：單萜類烯類  $C_{10}H_{16}$ ，主要由 (右旋-檸檬烯) 所組成。

檸檬高約 3-5 公尺，樹姿較開張，小枝多針刺，嫩梢常呈紫紅色，葉柄短，翼葉不明顯，花白色帶紫(花瓣上部白色，下部紅紫色)，略有香味，單生或 3~6 朵成總狀花序。檸檬果皮黃綠色有光澤，橢圓形或倒卵形，頂部有乳頭狀突起，油胞大而明顯凹入(新鮮果皮油胞中有具特殊香味的檸檬油)，皮不易剝離，味酸，瓢瓣 8~12，不易分離。種子卵圓形，多為單胚。

化學組成：(66%) 右旋檸檬烯 $C_{10}H_{16}$ ，(11%) $\beta$ -蒎烯 $C_{10}H_{16}$ ，(9%) $\gamma$ -松油烯 $C_{10}H_{16}$ ，(1.8%)檜烯 $C_{10}H_{16}$ ，(1.7%) $\alpha$ -蒎烯  $C_{10}H_{16}$ ，(1.5%)月桂烯 $C_{10}H_{16}$ ，(1.2%)香葉醛( $\alpha$ -檸檬醛) $C_{10}H_{16}O$ ，(0.7%)橙花醛( $\beta$ -檸檬醛) $C_{10}H_{16}O$ ，(0.6%)乙酸橙花酯  $C_{12}H_{20}O_2$ ，(0.5%) $\beta$ -沒藥烯 $C_{15}H_{24}$ ，(0.5%)乙酸香葉酯 $C_{12}H_{20}O_2$ 。



圖 2- 1 檸檬

(圖擷取自網路)

## 2-2-2 柚子(Pomelo)

植物科屬：芸香科(Rutaceae)，柑橘亞族(Citrinae)，柑橘屬(Citrus)，本屬全球植物登入系統約 631 個種類(包含亞種、異種、變異種、培育轉變而來之植物品種)。性味歸經：苦，酸，微寒，無毒。入脾、胃、肝三經。入手太陰肺經。氣味描述：令人愉悅宜人的和風柑橘香味(介於葡萄柚和橘子之間)，微苦中帶柑橘花的清香，但不易對不同的香味進行分門別類劃分，要準確地形容一種香味也並不太容易，因為精油的化學成份總是很複雜的。精油色澤顯現：淺黃色液體。化學分類(屬性)：單萜類烯類 $C_{10}H_{16}$ 主要由(檸檬烯、 $\gamma$ -松油烯、 $\alpha$  &  $\beta$ -水芹烯)所組成。

柚子為常綠小喬木，樹冠似傘，外形壯觀。樹型較其他柑桔為大(最高可達約 2~4 公尺)，枝細長，有長棘針，通常樹條下垂，新梢、幼葉帶細絨毛(柚子的葉似柑、橘，但葉柄具有寬翅)。柚果皮的分泌腔含有儲油細胞，葉也具有透明油腺點，在商業上可提取柚皮油與柚葉油產品，柚子也可適合做開發柚香農產品(果醬、蜜餞、柚茶、柚酒、柚蜜、柚醋、柚鹽、炒柚飯、柚香魚)等，並且應用於醫藥中間體、化妝製品、居家清潔、芳香添加劑等使用。

化學組成：(64%)檸檬烯 $C_{10}H_{16}$ 、(12%) $\gamma$ -松油烯 $C_{10}H_{16}$ 、(5%) $\beta$ -水芹烯 $C_{10}H_{16}$ 、(3%)月桂烯 $C_{10}H_{16}$ 、(2.8%)沉香醇 $C_{10}H_{18}O$ 、(2.5%) $\alpha$ -蒎烯 $C_{10}H_{16}$ 、(2%)雙環大牻牛兒烯 $C_{15}H_{24}$ 、(1%)反式- $\beta$ -金合歡烯 $C_{15}H_{24}$ 、(1%) $\beta$ -蒎烯

$C_{10}H_{16}$ 、(1%)  $\alpha$ -水芹烯 $C_{10}H_{16}$ 、(0.7%)異松油烯  $C_{10}H_{16}$ 、(0.6%)對-繖花烴  
 $C_{10}H_{14}$ 、(0.5%)檜烯 $C_{10}H_{16}$ 。



圖 2- 2 柚子  
(圖擷取自網路)

### 2-2-3 柳橙(Orange)

植物科屬：芸香科(Rutaceae)，柑橘屬(Citrus)，本屬全球植物登入系統約 631 個種類(包含、亞種、多樣性異種、培育轉變而來之植物品種)。全球芸香科約有 150(屬)、1500(種)，分佈南北緯 35 度內。性味歸經：橙汁性微涼，味甘、酸。橙皮性味，甘苦、而溫。《入手太陰肺經》。氣味描述：新鮮橙香味。精油色澤顯現：黃橙到深橙液體。化學分類(屬性)：單萜烯類 $C_{10}H_{16}$ 主要由(右旋-檸檬烯)所組成。

橙為常綠小喬木，高達4~6公尺。枝細長，有長棘針。葉互生；橢圓形或卵狀橢圓形，長3~3.5公分，寬約3公分，先端尖，微凹，基部圓形或圓楔形，葉緣有淺波狀鈍鋸齒或全緣，葉脈不顯著；葉柄有闊翼。花單一，腋

生，中等大；萼綠色，5 裂；花瓣 5，白色，稍連合成筒狀；花盤環形。果實略呈扁圓形，徑 4~7 公分，果柄細，萼宿存；果皮粗糙，有皺紋，熟時黃色，易剝離，濃約 0.4 公分，芳香；瓢囊 10 瓣，腎形，中柱小而充實，果肉及果汁淡黃色，味甚酸。種子約 20 顆，卵形而大，子葉白色，單胚。

化學組成：(92%)右旋-檸檬烯  $C_{10}H_{16}$ ，(3.3%)月桂烯 $C_{10}H_{16}$ ，(1%) $\alpha$ -蒎烯 $C_{10}H_{16}$ ，(0.5%)沉香醇 $C_{10}H_{18}O$ 。



圖 2-3 柳橙

(圖擷取自網路)

#### 2-2-4 葡萄柚(Grapefruit)

植物科屬：芸香科(Rutaceae)，柑橘屬(Citrus)，本屬全球植物登入系統約 631 個種類(包含、亞種、多樣性異種、培育轉變而來之植物品種)。全球芸香科約有 150(屬)、1500(種)，分佈南北緯 35 度內。性味歸經：性寒，味甘酸；入肺、脾經。氣味描述：清新微甜的柑桔味。精油色澤顯現：黃色至橙色。化學分類(屬性)：單萜類烯類 $C_{10}H_{16}$ ，主要由(右旋-檸檬烯)所組成。

葡萄柚樹冠圓形，枝條橫走下垂，葉大全緣，卵圓形，不具絨毛，葉翼

顯著，但不與本葉交疊，濃綠有光澤，葉肉厚，花白色，單生或簇生為總狀花序，果實球型至扁球型常簇生成串，狀似葡萄，故名葡萄柚。

化學組成：(93%)右旋-檸檬烯  $C_{10}H_{16}$ ，(1.7%)月桂烯  $C_{10}H_{16}$ ，(1.2%)檜烯  $C_{10}H_{16}$ ，(0.65%)沉香醇氧化物  $C_{10}H_{18}O_2$ ，(0.5%)圓柚酮  $C_{15}H_{22}O$ 。



圖 2- 4 葡萄柚

(圖擷取自網路)

### 2-3 精油簡介

精油(Essential oils)也稱為芳香油，普遍存在於植物的各個部位，通常貯存於植物之油腺(Oil glands)、腺毛(Glandular hair)、或溶於樹脂而充填於植物體的空洞之中；故精油可分佈於植物體的各個部位，如根、心材、皮、葉、花及果等。這些精油並非單一化合物，而是由松烯(萜，terpenes)或其衍生物之混合物所組成(劉, 1992)。

因本身為具獨特氣味的揮發性物質，常為吸引外物或抵抗侵害之利器；一般而言，其沸點大致介於  $70^{\circ}C$  至  $350^{\circ}C$  之間，常溫下，大多呈液態，比

重約在 0.7 至 1.07 之間，常以油狀浮在水面上，故習慣上將這些混合物稱為精油(張等,1998)。另外，也有人認為精油是一種從植物中萃取出來的芳香分子，而這些芳香分子具有易揮發的特性，因為是將植物中的精華囊括在其中，所以也稱之為「香華」。

### 2-3-1 精油萃取方法

精油萃取方法常見的有：水蒸餾法(Water distillation)、水蒸氣蒸餾法(Steam distillation)、有機溶劑萃取法(Organic solvent extraction)、冷吸法(Enfleurage)、壓榨法(Expression)、超臨界流體香精油萃取法(Supercritical fluid extraction, SFE)及微波抽取法(Microwave oven extraction)等(張等, 1998)。

### 2-3-2 精油的功用

#### 2-3-2-1 淨化空氣及抑菌

精油對植物本身來說，是一道預防外來病菌入侵的防線，因此經由萃取的過程，仍具殺菌效果。如一般人熟知的大蒜油(Garlic oils)，對於沙門氏桿菌(*Salmonella sp.*)及金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等，均有不錯的殺菌效果(Benkeblia, 2004)，且精油中某些成分之特殊氣味，可吸附或分解臭味，進而具有淨化空氣的功用。

### 2-3-2-2 增強免疫功能

植物精油除了提供對抗細菌入侵人體的屏障之外，有些精油甚至具有提升免疫力的功用，例如土肉桂葉部精油含有抗發炎活性成分，可以有效的抑制由 LPS 誘發產生的 proIL-1 $\beta$  蛋白質濃度(Chao et al.,2005)；此外，有些植物精油具抗氧化活性，有捕捉自由基能力(Singh et al., 2005)。

### 2-3-2-3 天然的防腐特性

一些有含特殊氣味的木材，因含許多特殊精油成分，故能有效抑制腐朽菌的生長，例如台灣本土樹種中的台灣肖楠的心材精油，對於木材腐朽菌具有不錯的抑制效果(張等,2005)。

### 第三章 實驗材料與方法

#### 3-1 實驗菌株

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

#### 3-2 實驗藥品

表 3- 1 實驗藥品清單

| 藥品名稱                             | 廠牌    |
|----------------------------------|-------|
| Corn starch                      | 日正    |
| YM Broth                         | DIFCO |
| Peptone                          | DIFCO |
| Malt extract                     | MERCK |
| Methanol                         | ECHO  |
| 99.5% Ethanol                    | ECHO  |
| Folin-Ciocalteu's phenol reagent | SIGMA |

|                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| Gallic acid                           | SIGMA |
| Chloroform                            | TEDIA |
| AlCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O | ECHO  |
| CH <sub>3</sub> COOK                  | ECHO  |

### 3-3 實驗儀器與設備

表 3-2 實驗儀器與清單

| 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 |
| 桌上型微量離心機        | MCD2000       | HSIANGTAI  |
| 烘箱              | LO-150        | 台灣亮盛       |
| 冷凍乾燥機           | CT-110        | 丹麥 HETO    |
| 斜立式真空減壓濃縮<br>裝置 | N-1000        | 日本 EYELA   |
| 數位水浴加熱槽         | SB-1000       | 日本 EYELA   |

### 3-4 分析方法

#### 3-4-1 菌體濃度

取適當培養發酵液，以 100 mesh 篩網過濾，過濾後的菌絲體再以蒸餾水沖洗數次，利用冷凍乾燥機乾燥菌絲體，乾燥後所測得的為菌體乾重量。

#### 3-4-2 殘餘澱粉含量測定

採用 starch-iodine 的分析方式，配製 iodine reagent (5 mM I<sub>2</sub> + 50 mM KI)，及配製 10 g/L 水溶性澱粉濃度，以磁石加熱攪拌器加熱溫度為 100°C 下沸騰 5~10 分鐘後，再稀釋成 1、0.5、0.33、0.25、0.2、0.17、0.14、0.1 g/L 濃度，

各取 0.4 ml 體積，加入 0.2 ml 1M HCl 與 0.4 ml H<sub>2</sub>O，再加入 1 ml iodine reagent，反應完畢，總體積為 2 ml，以分光光度計在波長為 580 nm 測定其光學密度 (Optical density, O.D.)，利用所測量 O.D. 值作出標準曲線。

取 1 ml 發酵液在 9000 rpm 離心 10 分鐘後，取 0.4 ml 稀釋發酵液，加入 0.2 ml 1 M HCl 使酵素失活與 0.4 ml H<sub>2</sub>O，再加入 1 ml iodine reagent 反應完畢後，以分光光度計在波長為 580 nm 量測 O.D. 值，再依標準曲線定出澱粉濃度 (g/L)。

### 3-4-3 多醣濃度測定

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

標準品為 D(+)-glucose，其濃度範圍為 0.01~0.2 mg/ml。取經冷凍乾燥後之菌絲體 100 mg 粉末加入 10ml 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，並將樣品稀釋，取適當稀釋過後之樣品溶液 2 ml，加入 1 ml 5% 酚溶液混合，再加入 5 ml 濃硫酸，於抽風櫃靜置 10 分鐘，之後於 25°C 恆溫水槽水浴反應 15 分鐘，待呈色穩定後，以分光光度計測其在波長 490 nm 下之吸光值。對照葡萄糖標準品濃度與吸光值標準曲線，即可求得多醣濃度。

#### 3-4-4 胞內粗三萜含量測定

取乾菌絲 100mg，加入 50% 乙醇 3ml 萃取 12 小時，過濾萃取液，將殘渣再加入 50% 乙醇 3ml 萃取 12 小時，收集濾液共 6ml 減壓濃縮至乾，將乾燥物加 3ml 水回溶並加入 3ml 氯仿萃取 30 分鐘，取下層液體加入 3ml  $\text{NaHCO}_3$  震盪 30 分鐘，之後調整液體 pH 至 3 以下，取下層液體減壓濃縮至乾，加入 2ml 95% 乙醇，在波長 245nm 下測其吸光值。

#### 3-4-5 總多酚類化合物含量測定

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。

取 0.3 ml 的甲醇萃取液，加入 6 ml 2% 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ，均勻混和反應 2 分鐘之後再後加入 0.3 ml 50% Folin-Clocalteu's phenol reagent 反應 30 分鐘，在 730 nm 測其吸光值。由已知濃度的標準沒食子酸(Gallic acid)檢量線，計算總酚類的含量。(Salatino and Woisky, 1998)

#### 3-4-6 總類黃酮物質含量

利用甲醇萃取樟芝菌絲體，目的為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分效果。(鄭等人, 2009)

取 0.5 ml 的甲醇萃取液，依序加入 1.5 ml 的 95 % 乙醇、0.1 ml 的 10 %  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 ml 的 1 M 醋酸鉀( $\text{CH}_3\text{COOK}$ )、2.8 ml 的去離子水，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)

### 3-5 實驗方法

#### 3-5-1 實驗架構

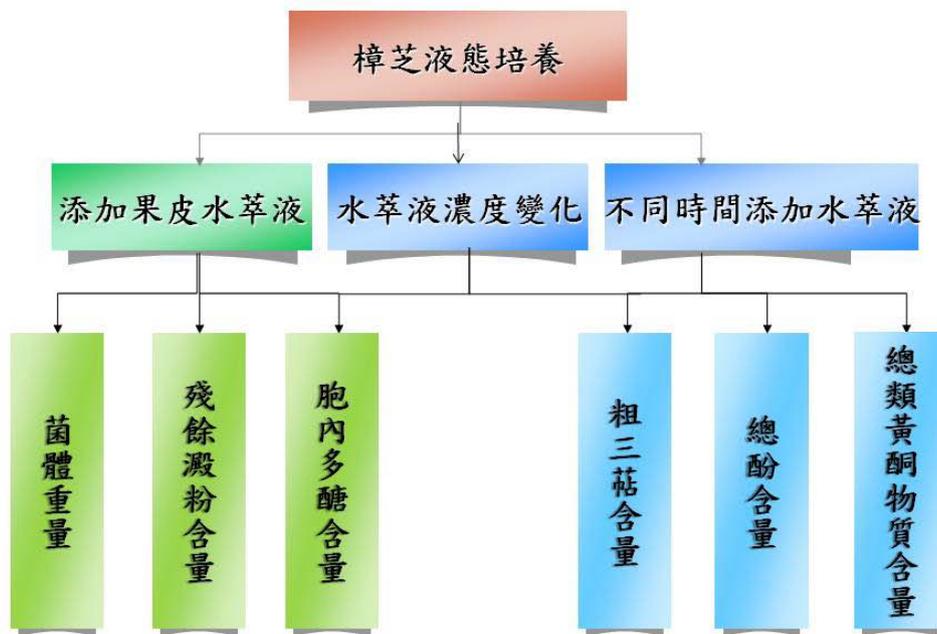


圖 3-1 實驗架構

#### 3-5-2 菌種斜面試管保存

本實驗以試管斜面保存菌種。配製 Malt extract 2%、Glucose 2%、Peptone 0.1%、Agar 2% 作為斜面培養基，接菌時取一白金鈎，過火焰燒至通紅三次後，將樟芝菌種刮取小塊移植至空白斜面試管，標示清楚後放入 25°C 培養箱培養，待其長滿後放入 4°C 冰箱保存備用。

### 3-5-3 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。

### 3-5-4 種菌的製備

本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 0.1N HCl 及 0.1N NaOH 將培養基 pH 值調整為 5。培養基滅菌過後，取長滿樟芝菌絲之平面培養皿，用鋁片製成的切割器切 4 個單位的菌絲塊(每塊單位面積 0.5 cm × 0.5 cm)，以白金鈎將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 7 天做為種菌。

### 3-5-5 水萃液製備

將秤重 50g 的果皮(檸檬果皮、柚子果皮、柳丁果皮、葡萄柚果皮)加入 1 L 的水，煮沸 3 個小時，用 100 mesh 篩網過濾，再利用真空減壓濃縮裝置濃縮 10 倍取得水萃液。

### 3-5-6 樟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 6000 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。

### 3-5-7 不同果皮水萃液添加培養試驗

樟芝三角瓶液態培養所採用之培養基，係為本實驗室於先前研究中以回應曲面法(RSM)所探討出來的最佳培養組成(黃，2001)，以玉米澱粉(corn starch)為碳源，氮源則是採用 YM Broth，其組成為：Corn starch 4.78%、YM Broth 3.19%，添加不同萃取液(檸檬水萃液、柚子水萃液、柳丁水萃液、葡萄柚水萃液)，並利用 0.1N HCl 及 0.1N NaOH 將培養基 pH 值調整為 5.54。

將基礎培養基培養 7 天後的種菌，以滅過菌的均質機(polytron)攪碎菌絲球，並以 10% 的接菌量接至每個三角瓶，然後放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 8、12、16、20、24、28 天，收集菌絲體，經冷凍乾燥磨粉後，進行粗三萜含量、總多酚含量、總類黃酮物質含量等測試。

### 3-5-8 不同濃度果皮水萃液添加培養試驗

上述實驗中，以玉米澱粉(corn starch)為碳源，氮源則是採用 YM Broth，其組成為：Corn starch 4.78%、YM Broth 3.19%，選用效果最佳的果皮水萃液，改變其添加濃度(1 ml、2 ml、4 ml、8 ml、10 ml、20 ml)。

將基礎培養基培養 7 天後的種菌，以滅過菌的均質機(polytron)攪碎菌絲球，並以 10% 的接菌量接至每個三角瓶，然後放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 8、12、16、20、24、28 天，收集菌絲體，經冷凍乾燥磨粉後，進行粗三萜含量、總多酚含量、總類黃酮物質含量等測試。

### 3-5-9 不同時間添加果皮水萃液培養試驗

選用上述實驗中，效果最佳的果皮水萃液，及使用效果最佳之濃度，改變其水萃液添加天數。

將基礎培養基培養 7 天後的種菌，以滅過菌的均質機(polytron)攪碎菌絲球，並以 10% 的接菌量接至每個三角瓶，放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養至 28 天，並在第 12 天添加檸檬水萃液，收集菌絲體，經冷凍乾燥磨粉後，進行粗三萜含量、總多酚含量、總類黃酮物質含量等測試。

## 第四章 結果與討論

### 4-1 不同果皮水萃液添加培養試驗

此實驗利用三角瓶液態培養方式，分別在樟芝基礎培養基中加入 2 ml 果皮水萃液，以純水為對照組，其它則以柚子水萃液、檸檬水萃液、柳丁水萃液、葡萄柚水萃液為實驗組，觀察在添加不同水萃液時，對菌絲體生長、生理活性成分的影響。

#### 4-1-1 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲生長影響

因為樟芝生長緩慢，開始培養的前幾天，看不出明顯變化，再加上碳源為不可溶性的玉米澱粉，培養基會呈現濃稠狀，故選擇從生長開始的第 8 天，測量各項分析。第 8 天玉米澱粉已經被大量消化，培養液大致上為澄清液體，但避免測定菌絲體濃度時受到玉米澱粉的干擾，菌絲體先以蒸餾水清洗乾淨，再進行冷凍乾燥，每 4 天測量一次，到第 28 天為止。

由圖 4-1 顯示，無添加任何水萃液的樟芝發酵液，從 0 天到第 8 天時，澱粉消耗速度非常快，到 12 天時，澱粉含量幾乎已經消耗完畢。在菌絲體及胞內多醣方面，0 天到第 8 天生長非常快速，且第 8 天達到最大值，菌絲體濃度為 11.96 g D.W./L，胞內多醣含量為 123.56mg/g D.W.。但從第 8 天到 20 天時，菌絲體濃度逐漸下降，推測可能是培養基裡的養分不足以供菌體生長，

但是三萜量卻逐漸上升，並在第 20 天達到最大值，粗三萜含量為 10.92mg/g

D.W.。

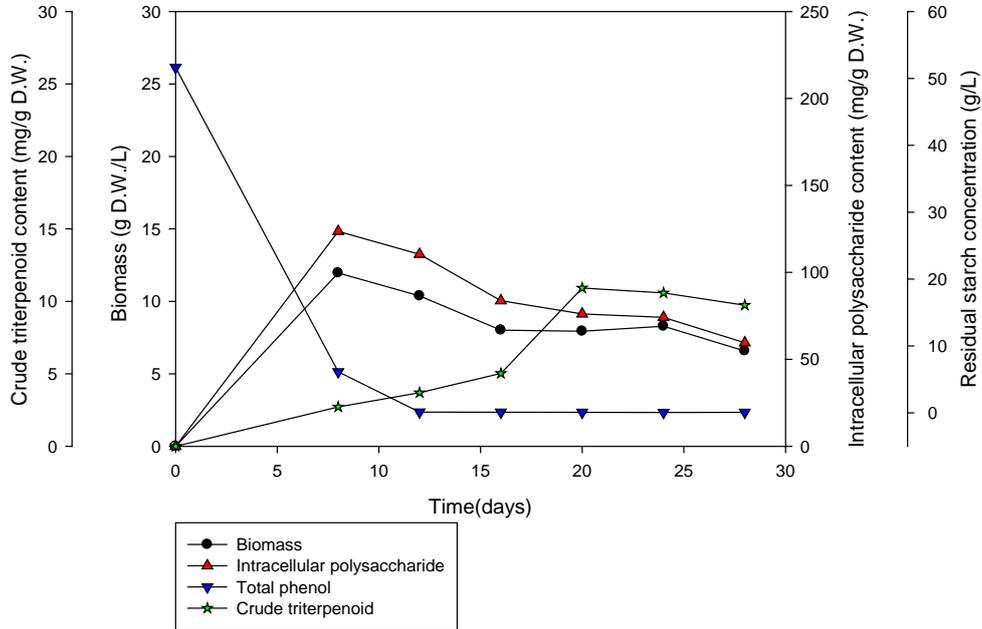


圖 4- 1 樟芝菌絲體三角瓶培養基礎試驗

培養基成份： Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，純水

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

由圖 4-2 顯示，添加柚子水萃液的樟芝發酵液，從 0 天到第 8 天時，澱粉消耗速度非常快，到第 16 天時，澱粉含量才消耗完畢。菌絲體在 24 天時達到最大值，菌絲體濃度為 23.11 g D.W./L。胞內多醣含量在 0 天到 8 天時迅速增加，且在第 8 天達到最大值，為 173.31 mg/g D.W.。而粗三萜方面，則是在第 28 天達到最大值，粗三萜含量為 16.28 mg/g D.W.。

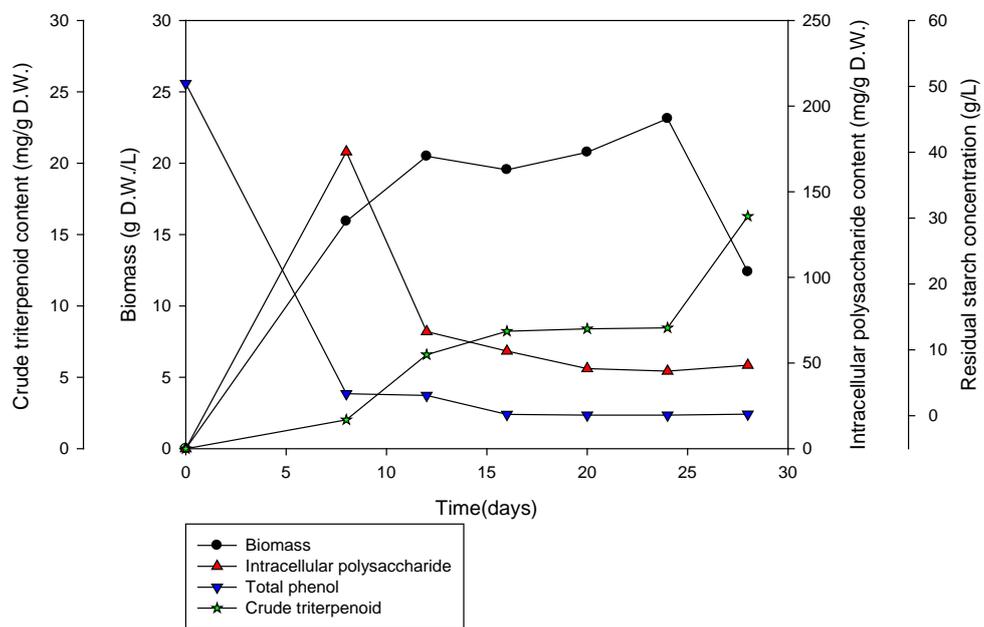


圖 4-2 添加柚子水萃液對樟芝菌絲生長之影響

培養基成份： Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，柚子水萃液(2ml)

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

由圖 4-3 顯示，添加檸檬水萃液的樟芝發酵液，從 0 天到第 8 天時，澱粉消耗速度非常快，到第 16 天時，澱粉含量幾乎消耗完畢。菌絲體在 12 天時達到最大值，菌絲體濃度為 24.62 g D.W./L。胞內多醣含量在 0 天到 8 天時迅速增加，且在第 8 天達到最大值，為 230.77 mg/g D.W.。而粗三萜方面，則是在第 20 天達到最大值，粗三萜含量為 24.92 mg/g D.W.。

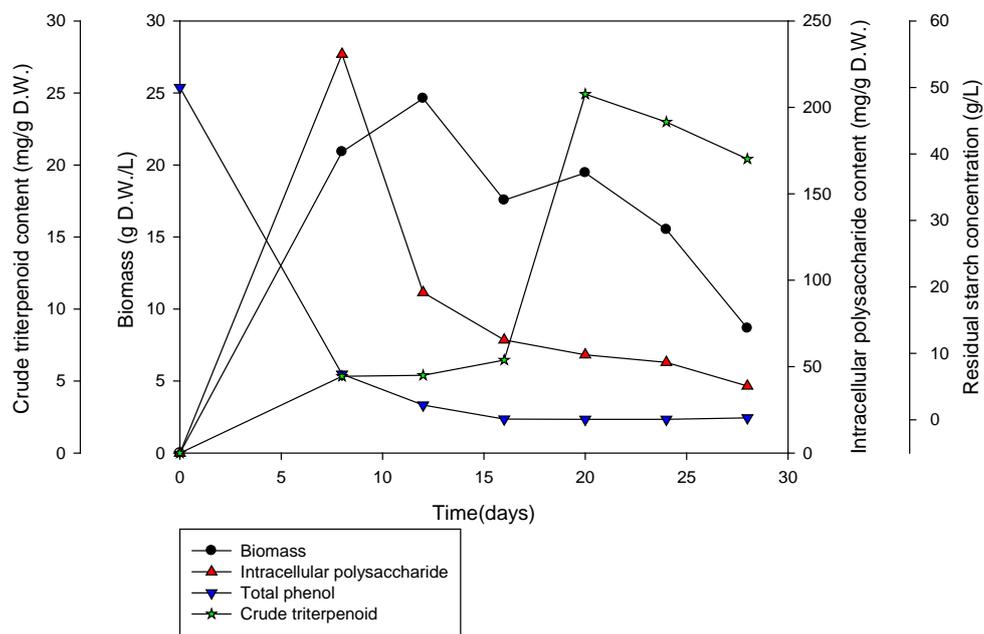


圖 4-3 添加檸檬水萃液對樟芝菌絲生長之影響

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，檸檬水萃液(2ml)

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

由圖 4-4 顯示，添加柳丁水萃液的樟芝發酵液，從 0 天到第 8 天時，澱粉消耗速度非常快，到第 12 天時，澱粉含量幾乎消耗完畢。而菌絲體在 12 天時達到最大值，菌絲體濃度為 15.36 D.W.g/L。胞內多醣含量在 0 天到 8 天時迅速增加，且在第 8 天達到最大值，為 194.77 mg/g D.W.。而粗三萜方面，則是在第 28 天達到最大值，粗三萜含量為 16.78 mg/g D.W.。

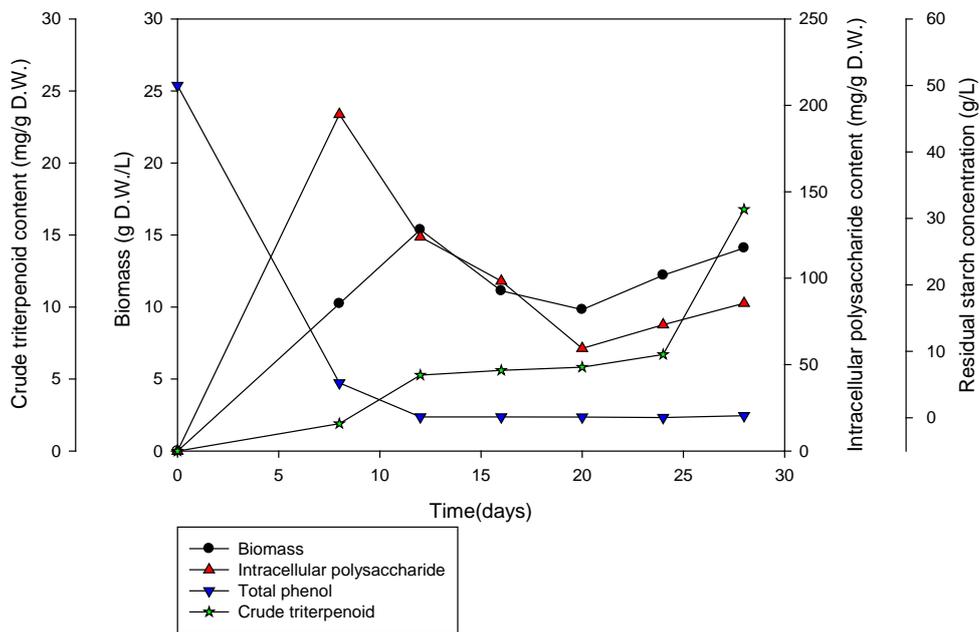


圖 4-4 添加柳丁水萃液對樟芝菌絲生長之影響

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，柳丁水萃液(2ml)

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

由圖 4-5 顯示，添加葡萄柚水萃液的樟芝發酵液，從 0 天到第 8 天時，澱粉消耗速度非常快，到第 12 天時，澱粉含量幾乎消耗完畢。菌絲體在 12 天時達到最大值，菌絲體濃度為 19.99 D.W.g/L。胞內多醣含量在 0 天到 8 天時迅速增加，且在第 8 天達到最大值，為 102.80 mg/g D.W.。而粗三萜方面，則是在第 28 天達到最大值，粗三萜含量為 10.62 mg/g D.W.。

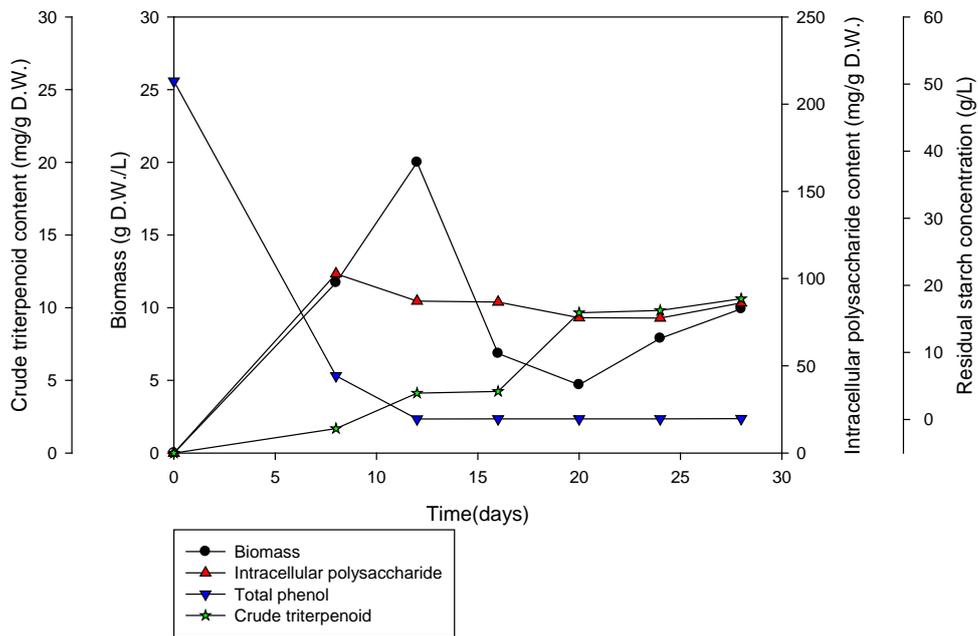


圖 4-5 添加葡萄柚水萃液對樟芝菌絲生長影響

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，葡萄柚水萃液(2ml)

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

#### 4-1-2 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體胞內多醣生成影響

由圖 4-1 到圖 4-5 得知，胞內多醣含量均在第 8 天達到最大值，隨著培養時間增加，當培養基裡的碳源消耗殆盡時，細胞開始生成水解酵素分解菌絲體，且產生較易吸收利用的小分子醣類，所以胞內多醣含量逐漸下降。在圖 4-6 及圖 4-7 中可發現，除了添加葡萄柚水萃液有抑制胞內多醣及總胞內多醣生成作用之外，其餘果皮水萃液皆可使樟芝改變其代謝途徑，促進胞內多醣的生成，其中以添加檸檬水萃液培養含量最高，胞內多醣含量為 230.77 mg/g D.W.，而總胞內多醣產量可達到 482.61 mg/100 ml。

王(2007)的研究指出，在搖瓶實驗中以 corn starch(3%)和 peptone(0.5%)為培養基時，可得到最多之胞內多醣其含量為 0.22 mg/ml；在 5 公升的攪拌式發酵槽實驗中，進行不同的攪拌及通氣培養條件，以全程維持在 100 rpm,1.0 vvm 的生產效果最佳，其胞內多醣含量為 0.28 mg/ml。

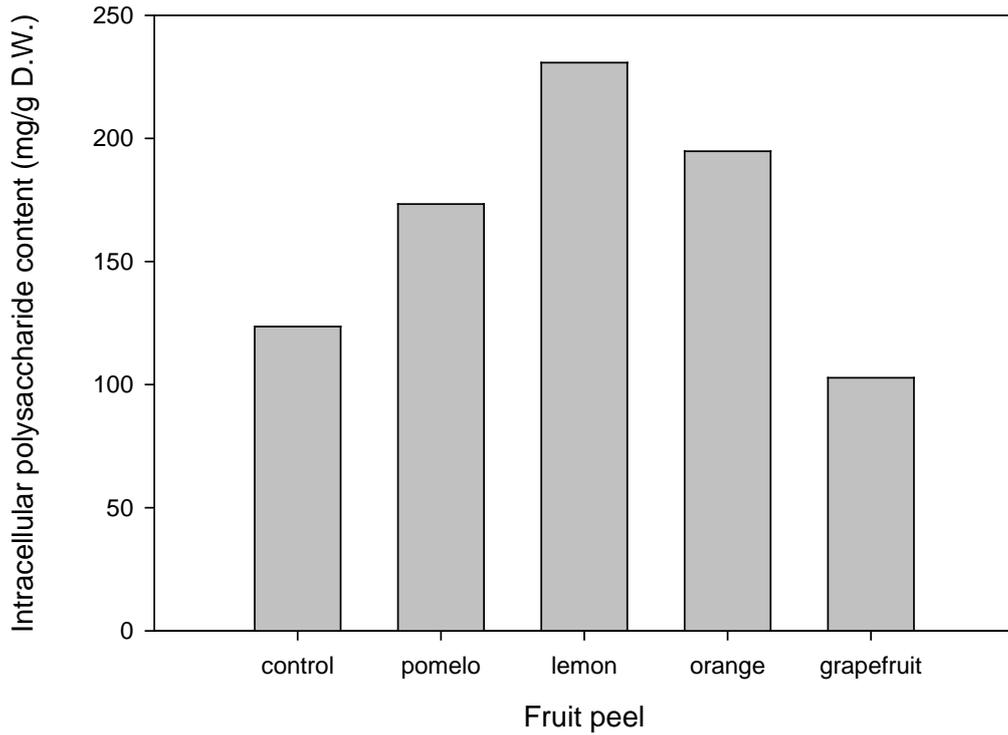


圖 4-6 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體胞內多醣生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 8 天之菌絲體)

培養基成份： Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，2 ml 之果皮水萃液

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

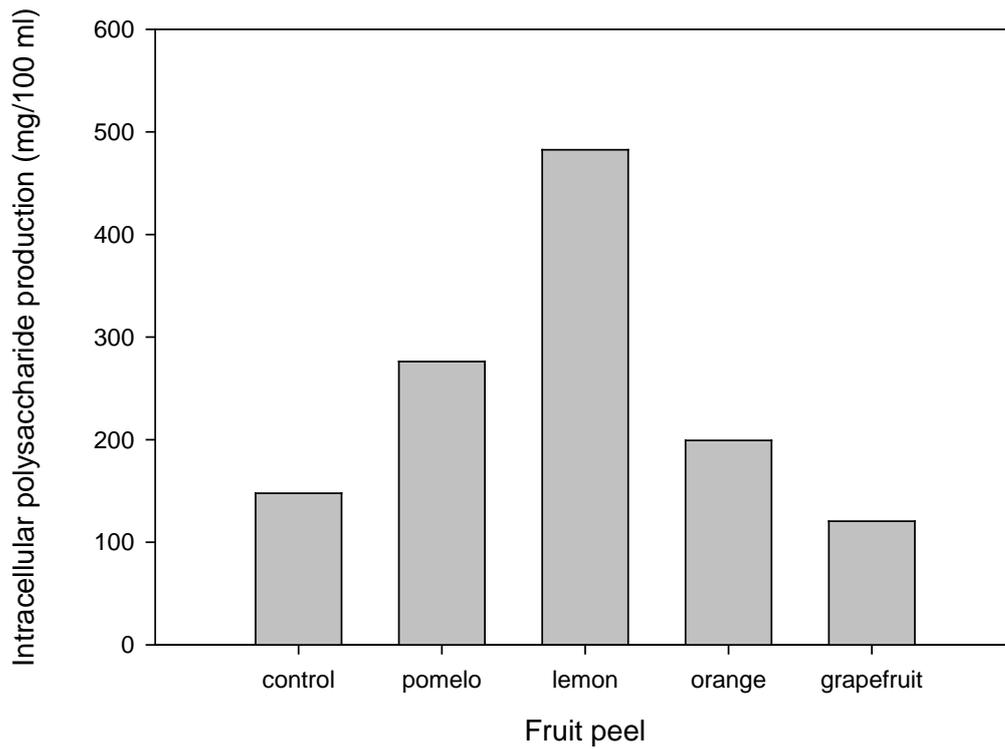


圖 4-7 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體總胞內多醣生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 8 天之菌絲體)

培養基成份： Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，2 ml 之果皮水萃液

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

#### 4-1-3 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響

三萜類為樟芝二次代謝產物，在培養初期幾乎看不到三萜的產生。李(2003)的研究發現，三萜的種類隨著培養時間的增長日趨複雜，且含量也隨著培養時間的增長而增加。由圖 4-1 到圖 4-5 發現，對照組菌絲體粗三萜含量在第 20 天時達到最大值，而添加果皮水萃液分別在第 20 天及第 28 天時達到最大值，因此選用第 20 天及第 28 天的菌絲體，探討菌絲體粗三萜含量的影響。

在圖 4-8 中，第 20 天時，添加檸檬水萃液的粗三萜含量可達 24.92 mg/g D.W.，為對照組的 2.28 倍，其餘果皮水萃液都有延遲生長現象，導致粗三萜代謝時間延後，而在第 28 天時，除了葡萄柚水萃液有抑制作用之外，其餘果皮水萃液都有促進粗三萜含量的生成，其中以添加檸檬水萃液的粗三萜含量為最高，可達 20.42 mg/g D.W.。

為了比較添加水萃液對樟芝菌絲粗三萜含量生成的影響，將其換算成總粗三萜產量來表示，即每個樟芝液態培養搖瓶中的粗三萜產量。在圖 4-9 中，發現第 20 天時，添加柚子及檸檬水萃液能促進總粗三萜的生成，其中以添加檸檬水萃液達到最大值，總粗三萜產量為 28.29 mg/100 ml，為對照組的 3.94 倍。但在 28 天時，則以添加柳丁水萃液有最大值，總粗三萜產量為 23.64 mg/100 ml，而添加檸檬水萃液為次高，其總粗三萜產量有 22.89 mg/100 ml。

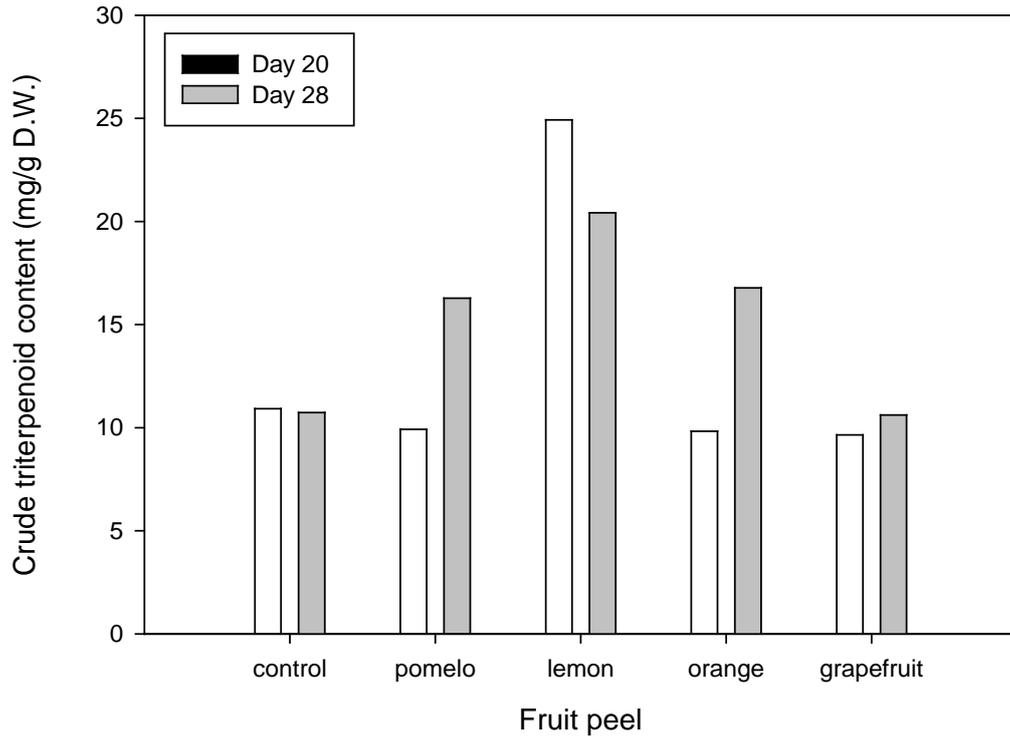


圖 4-8 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 20、28 天之菌絲體)

培養基成份： Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，2 ml 之果皮水萃液

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

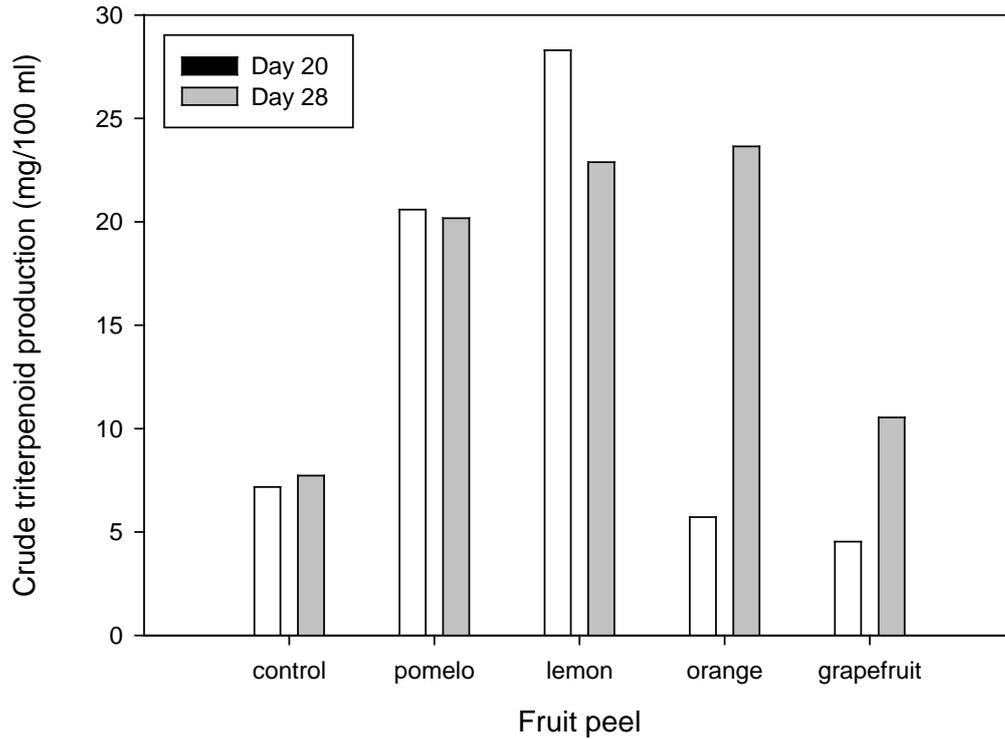


圖 4-9 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體總三萜生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 20、28 天之菌絲體)

培養基成份： Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，2 ml 之果皮水萃液

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

#### 4-1-4 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體類黃酮生成影響

由於類黃酮物質為樟芝後期代謝產物，故選用第 28 天的菌絲體，探討類黃酮物質的影響。圖 4-10 中可發現，樟芝本身的類黃酮含量為 3.02 mg/g D.W.，而添加檸檬水萃液，類黃酮含量可提升到 3.22 mg/g D.W.；但添加柚子、柳丁、葡萄柚水萃液卻對類黃酮生成有抑制作用，推測檸檬果皮中的成分，可促進類黃酮的生成。

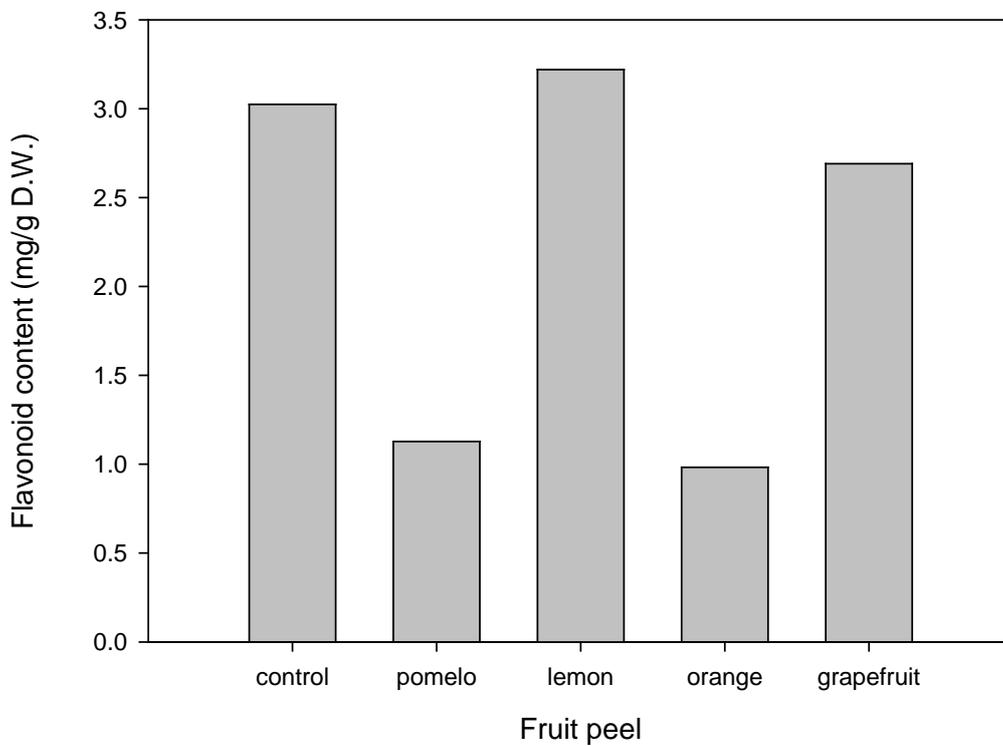


圖 4-10 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體類黃酮生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 28 天之菌絲體)

培養基成份： Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，2 ml 之果皮水萃液

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

#### 4-1-5 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體總酚生成影響

研究報導指出酚類化合物具有良好的抗氧化、抗突變及抗腫瘤等特性，其中以具有苯環及雙鍵結構的多酚類抗氧化活性最強(Osawa,1999)；本實驗利用 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 可與酚類化合物 OH 基反應之原理，測定四種不同水萃液添加之菌絲體甲醇萃取物總酚類化合物含量，以不同濃度的 gallic acid 做成檢量線，樣品中總酚類化合物的含量由檢量線換算其相當的 gallic acid 之含量，單位以每克菌絲體乾重含 gallic acid 之當量毫克數表示。

由圖 4-11 發現，添加四種果皮水萃液，均能促進總酚類化合物的生成。在 20 天時，以添加柚子水萃液的總酚含量達到最高，為 22.60 mg/g D.W.；而添加檸檬水萃液為次高，總酚含量有 19.20 mg/g D.W.。在 28 天時，添加柳丁及葡萄柚水萃液的總酚含量差不多，分別為 19.86 mg/g D.W.及 19.46 mg/g D.W.，而添加檸檬水萃液為最低，只有 12.49 mg/g D.W.。

對照圖 4-1 到圖 4-5 的菌絲體濃度，可發現從 20 天到 28 天時，對照組及添加柚子、檸檬水萃液的菌絲體濃度減少，其總酚含量亦減少；反之，添加柳丁及葡萄柚水萃液的菌絲體含量增加，其總酚含量亦增加，可推測出菌絲體含量跟總酚含量成一正比關係。

在表 4-1 中，可發現柑橘類果皮水萃液對樟芝菌絲體生長具有良好的促

進功效，由其以添加檸檬果皮水萃液在第 12 天時達到最高，菌絲體濃度可達 24.62 g/L。而在粗三萜產量方面，也是以添加檸檬果皮水萃液達到最高，在第 20 天時可達 282.9 mg/L，為對照組的 3.5 倍；在胞內多醣產量皆在第 8 天達到最大值，仍以添加檸檬水萃液為最佳，可達 4822 mg/L，為對照組的 3.2 倍。其他動力學參數皆有類似的趨勢，得知添加檸檬水萃液，可達到較佳的效果。

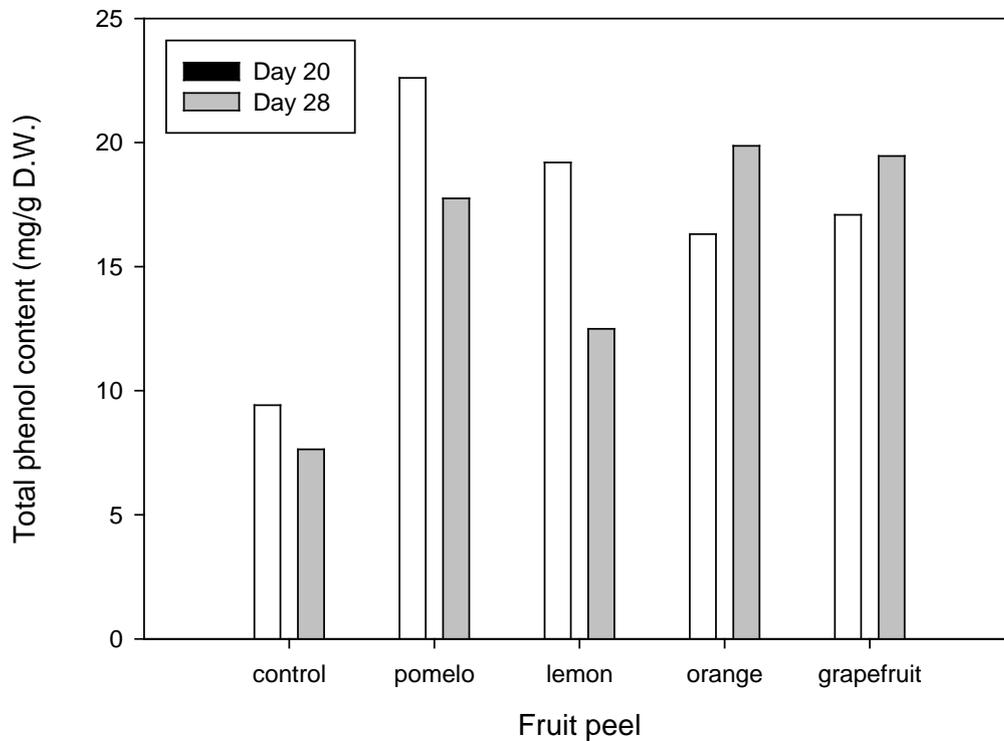


圖 4- 11 不同果皮水萃液添加對樟芝菌絲體總酚生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 20、28 天之菌絲體)

培養基成份： Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，2 ml 之果皮水萃液

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

表 4- 1 不同果皮之樟芝液態培養動力學參數

| 果皮         | $\mu$<br>(day <sup>-1</sup> ) | $X_{max}$<br>(g/L) | $P1_{max}$<br>(mg/L) | $P2_{max}$<br>(mg/L) | $Y_{p1/s}$<br>(mg/g) | $Y_{p2/s}$<br>(mg/g) | $Y_{p1/x}$<br>(mg/g) | $Y_{p2/x}$<br>(mg/g) | $Y_{x/s}$<br>(g/g) |
|------------|-------------------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| Control    | 0.17                          | 11.96              | 86.7                 | 1478                 | 1.55                 | 3.42                 | 10.92                | 123.6                | 0.27               |
| Pomelo     | 0.12                          | 23.12              | 205.9                | 2761                 | 4.13                 | 6.00                 | 9.92                 | 173.3                | 0.46               |
| Lemon      | 0.11                          | 24.62              | 282.9                | 4824                 | 5.67                 | 11.13                | 24.92                | 230.8                | 0.52               |
| Orange     | 0.14                          | 15.36              | 236.4                | 1993                 | 4.76                 | 4.47                 | 16.78                | 195.0                | 0.31               |
| Grapefruit | 0.15                          | 19.99              | 105.3                | 1205                 | 2.11                 | 2.76                 | 10.62                | 102.8                | 0.40               |

$X_{max}$ ：最大菌重，分別取自於第 8、24、12、12 和 12 天

$P1_{max}$ ：最大三萜產量，分別取自於第 20、20、20、28 和 28 天

$P2_{max}$ ：最大胞內多醣產量，皆取自於第 8 天

## 4-2 不同濃度果皮水萃液添加培養試驗

由 4-1 的實驗結果可得知，添加檸檬水萃液的效果為最佳，其粗三萜含量、總粗三萜產量、胞內多醣含量、類黃酮含量都比添加其他水萃液來的多。故選用檸檬水萃液當添加劑，分別在樟芝基礎培養基中加入不同濃度的水萃液，以未添加任何水萃液為對照組，其它則以添加 1 ml、2 ml、4 ml、8 ml、10 ml、20 ml 的水萃液為實驗組，搖瓶總體積為 100 ml，觀察在添加不同濃度檸檬水萃液時，對菌絲體生長、生理活性成分的影響。

### 4-2-1 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體胞內多醣生成影響

依實驗 4-1 的結果可知，胞內多醣含量在第 8 天時達到最大值，故選用第 8 天的菌絲體探討添加不同濃度的檸檬水萃液胞內多醣的影響。由圖 4-12 及圖 4-13 發現，添加 1 ml 檸檬水萃液時，可增加胞內多醣含量，當檸檬水萃液提升到 2 ml 時，可得到最多的胞內多醣，其含量為 230.77 mg/g D.W.，而總胞內多醣可達 482.61 mg/100 ml，但隨著水萃液濃度上升，胞內多醣含量逐漸下降。

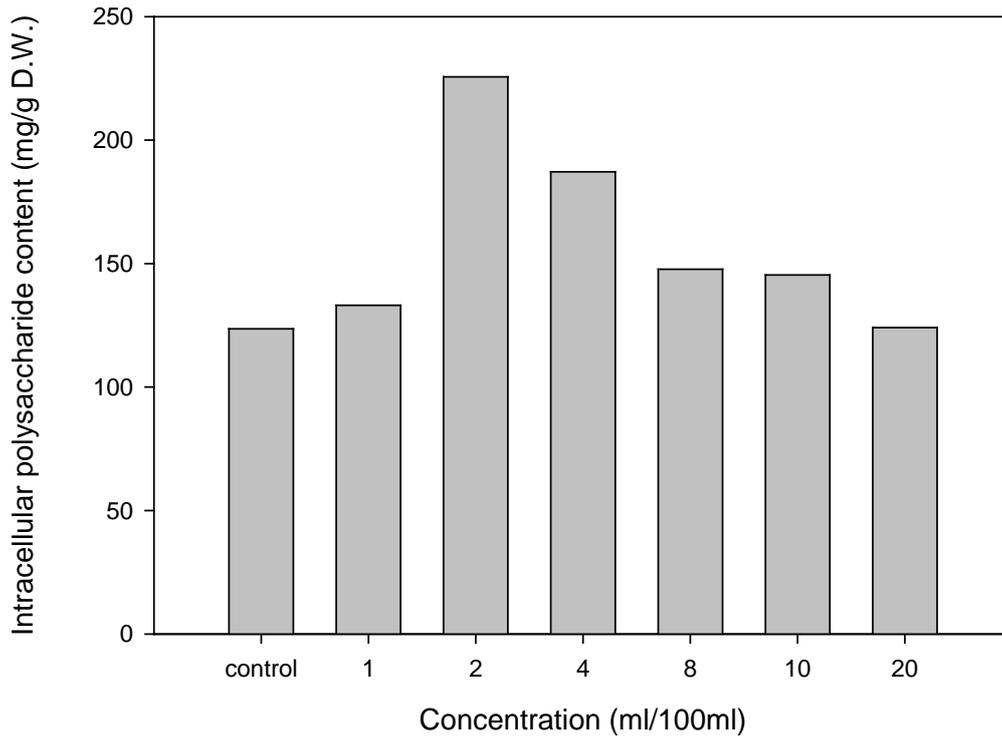


圖 4-12 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體胞內多醣生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 8 天之菌絲體)

培養基成份： Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，檸檬水萃液

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

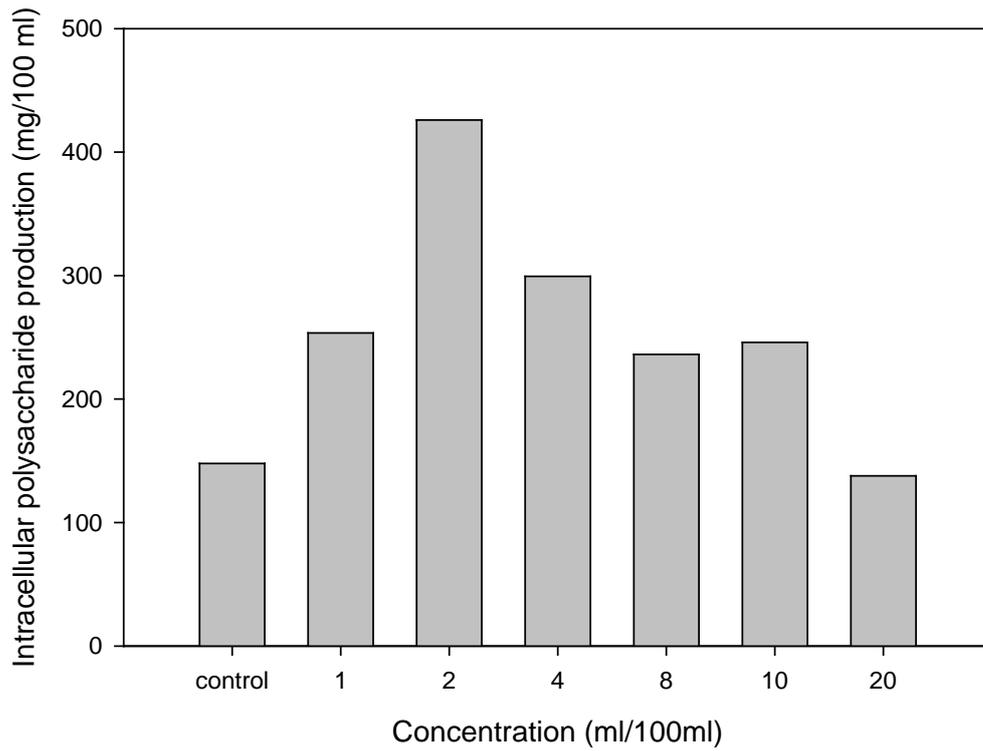


圖 4-13 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體總胞內多醣生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 8 天之菌絲體)

培養基成份： Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，檸檬水萃液

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

#### 4-2-2 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體粗三 萜生成影響

在圖 4-14 中，可發現在 20 天時，添加檸檬水萃液能促進粗三萜生成，且水萃液濃度提升到 2 ml 時，粗三萜含量達到最大值，為 24.92 mg/g D.W.，隨著水萃液濃度增加，粗三萜含量有逐漸減少的趨勢。但在 28 天時，隨著水萃液濃度增加，粗三萜含量有逐漸增加的趨勢，且在水萃液濃度為 10 ml 時達到最大值，粗三萜含量為 29.53 mg/g D.W.，而水萃液濃度增加到 10 ml 以上時，粗三萜含量反而下降。

在圖 4-15 中，可發現在 20 天時，添加 2 ml 水萃液時，總粗三萜產量達到最大值，為 28.29 mg/100 ml，隨著水萃液濃度增加，總粗三萜產量有逐漸減少的趨勢。但在 28 天時，隨著水萃液濃度增加，總粗三萜產量有逐漸增加的趨勢，且在水萃液濃度為 10 ml 時達到最大值，總粗三萜產量為 41.79 mg/100 ml，當水萃液濃度增加到 10 ml 以上時，總三萜產量反而下降。

由圖 4-14 及圖 4-15 中，可推測在添加的水萃液在低濃度時較不會影響粗三萜生成，隨著水萃液濃度變高，樟芝需要較長時間適應，故粗三萜含量要到第 28 天才會達到最大值，但當水萃液濃度超過 10 ml 時，粗三萜含量反而減少，亦可推測水萃液濃度太高時，不利於樟芝粗三萜的生成。

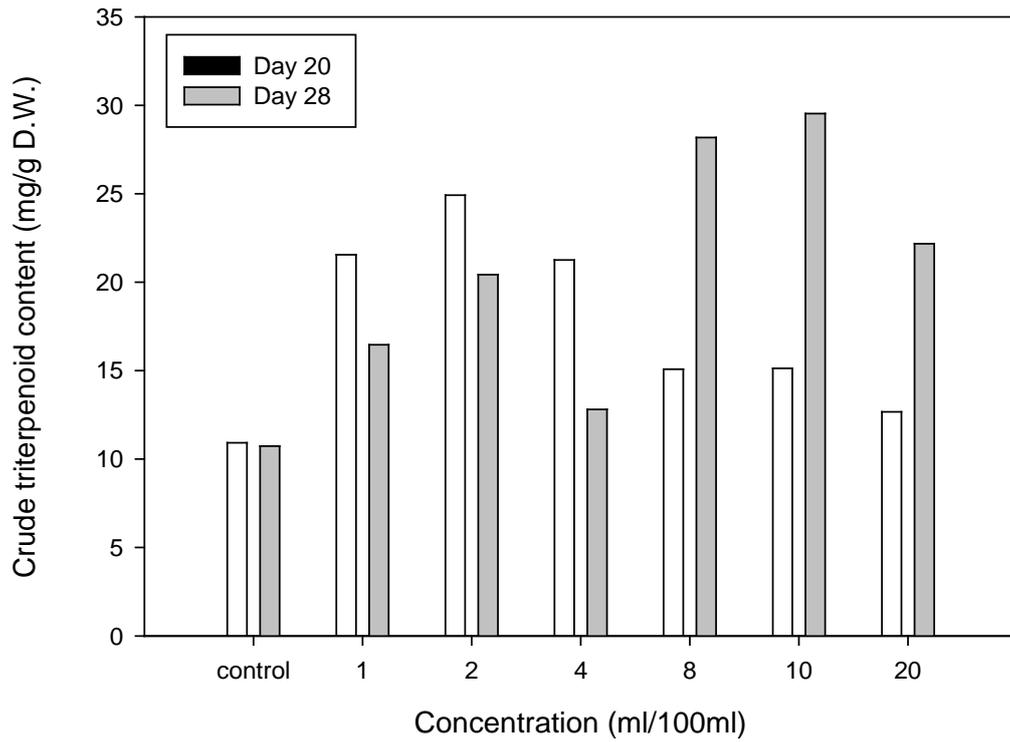


圖 4-14 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 20、28 天之菌絲體)

培養基成份： Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，檸檬水萃液

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

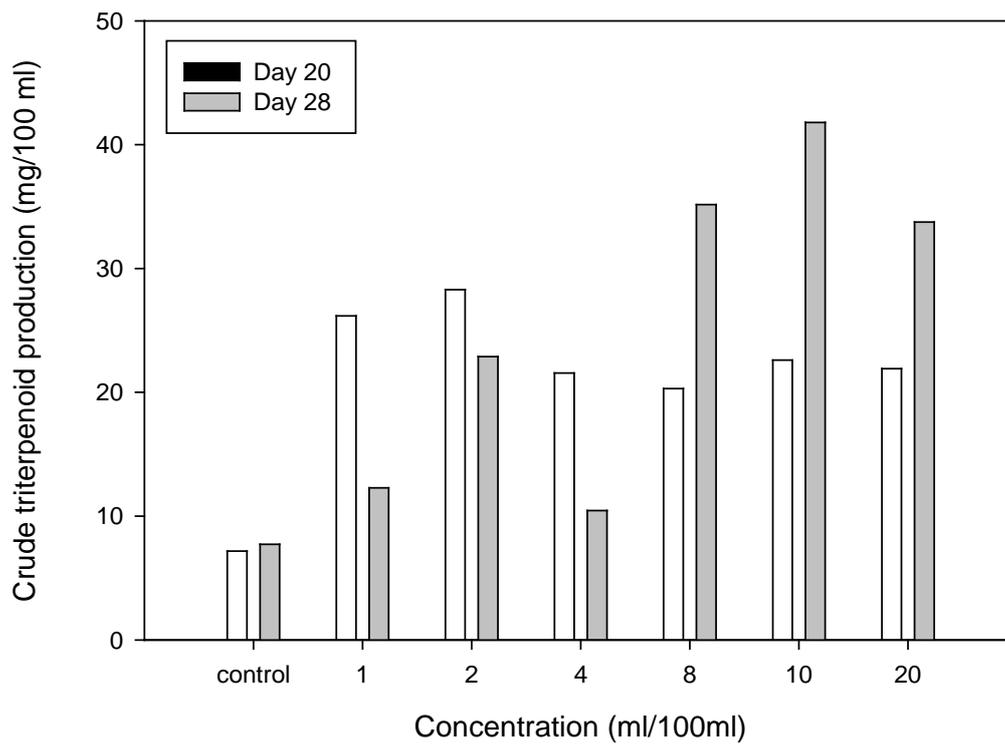


圖 4- 15 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體總三萜生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 20、28 天之菌絲體)

培養基成份： Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，檸檬水萃液

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

#### 4-2-3 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體總酚及類黃酮含量生成影響

由於類黃酮含量在第 28 天時達到最大值，故選用第 28 天之菌絲體，探討類黃酮及總酚含量生成的影響。由圖 4-16 中顯示，添加濃度 1 ml 到 8 ml 時，類黃酮含量沒有很大的變化，但添加到 10 ml 時，類黃酮含量增加許多，為 6.04 mg/g D.W.，且水萃液濃度在 10 ml 以上時，類黃酮含量趨於穩定。

由圖 4-17 中顯示，隨著水萃液濃度的增加，總酚含量亦增加，但在添加 10 ml 水萃液以上時，其總酚產量趨於穩定值，添加 20 ml 在第 28 時達到最大值，總酚含量為 36.09 mg/g D.W.，且總酚含量將近為類黃酮含量的 6 倍。Wang (2007)同樣指出萃取液之總多酚含量遠高於總類黃酮含量，與本實驗結果相似。

由表 4-2 可得知，不同濃度檸檬果皮水萃液添加對樟芝菌絲體生長均具有良好的促進功效。其中添加 4 ml 及 8 ml 檸檬果皮水萃液，均可將樟芝菌絲體濃度提升至 25.80 g/L 及 25.94 g/L。在最大粗三萜產量、含量方面，則以添加 10 ml 檸檬水萃液時達到最大值，其值分別為 417.9 mg/L 及 29.53 mg/g D.W.，較對照組提升近 3.8 倍及 1.7 倍。Shih(2006)改變碳、氮源營養成分對樟芝菌絲體深層培養，探討活性代謝產物生成的影響，發現利用葡萄糖為碳源及玉米糖漿粉(corn steep powder)為氮源，可得最大三萜類含量 31 mg/g D.W.(Shih et al., 2006)，與本研究最佳三萜類含量 29.53 mg/g D.W.相近，但此

時本研究菌絲體濃度可達 14.2 g D.W./L，因此可得較高之三萜產量。

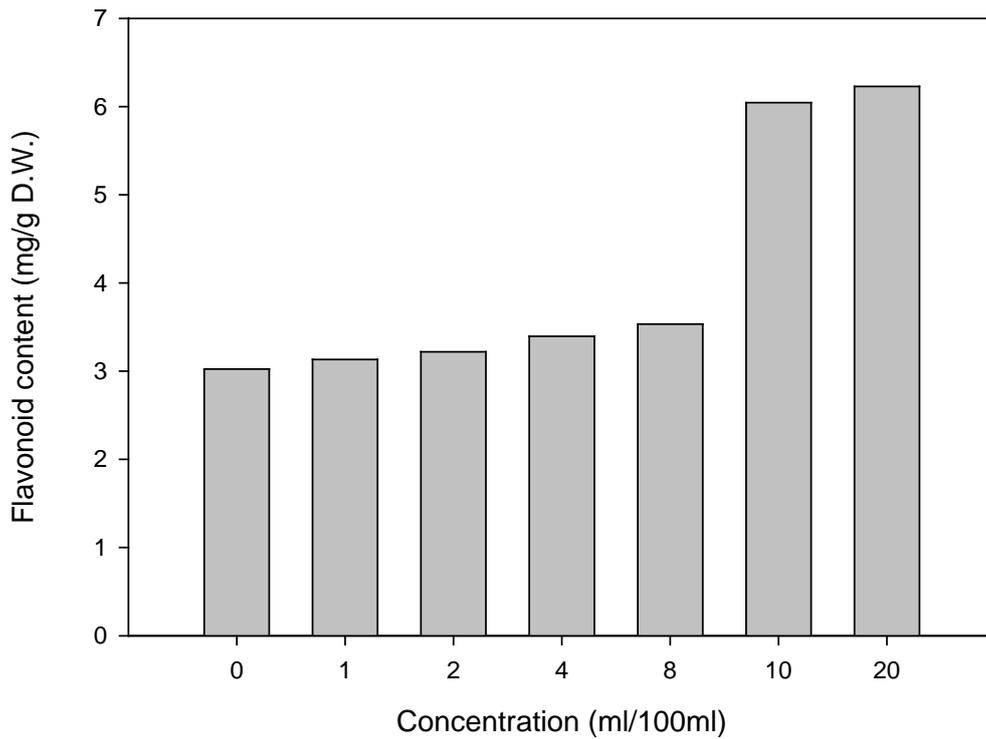


圖 4-16 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體類黃酮含量生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 28 天之菌絲體)

培養基成份： Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，檸檬水萃液

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

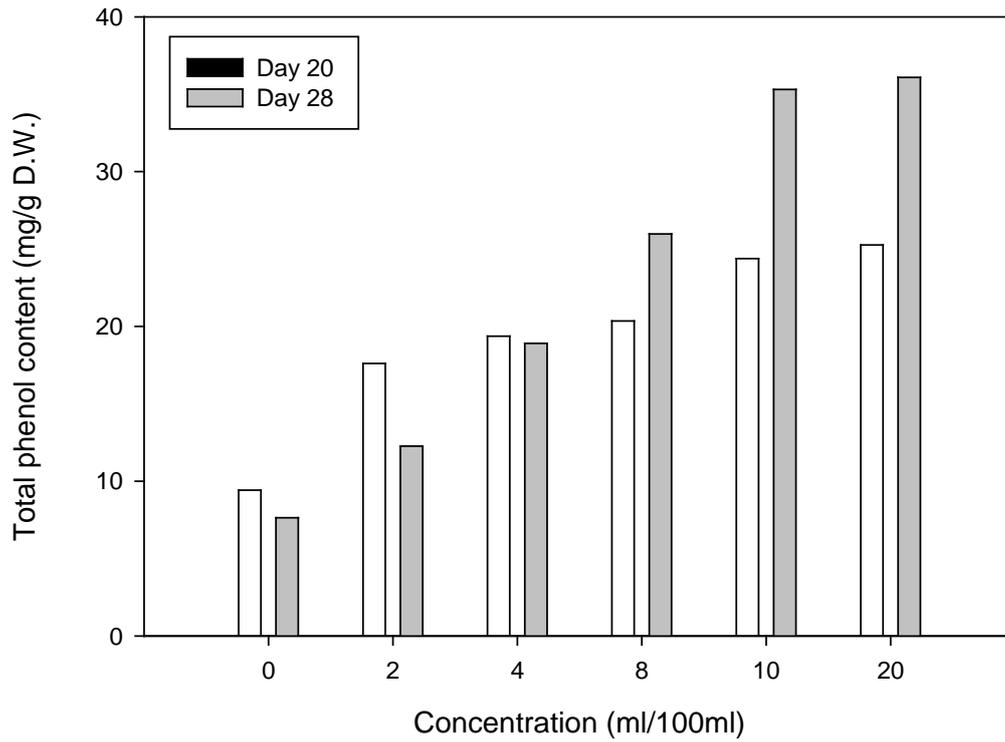


圖 4-17 不同濃度檸檬水萃液添加對樟芝菌絲體總酚含量生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 28 天之菌絲體)

培養基成份： Corn starch (4.78%)， YM broth (3.19%)， 檸檬水萃液

培養條件：接菌量 10%， 初始 pH 5.54， 培養溫度 25°C， 轉速 100 rpm

表 4-2 不同檸檬水萃液濃度之動力學參數

| 濃度      | $X_{\max}$ | $P1_{\max}$ | $P2_{\max}$ | $Y_{p1/s}$ | $Y_{p2/s}$ | $Y_{p1/x}$ | $Y_{p2/x}$ | $Y_{x/s}$ |
|---------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-----------|
|         | (g/L)      | (mg/L)      | (mg/L)      | (mg/g)     | (mg/g)     | (mg/g)     | (mg/g)     | (g/g)     |
| control | 11.96      | 86.7        | 1478        | 1.55       | 3.42       | 10.92      | 123.6      | 0.27      |
| 1       | 12.14      | 261.8       | 2535        | 5.25       | 5.62       | 21.55      | 133.1      | 0.24      |
| 2       | 24.62      | 282.9       | 4824        | 5.67       | 11.1       | 24.92      | 230.8      | 0.52      |
| 4       | 25.80      | 215.5       | 2994        | 4.32       | 7.41       | 21.25      | 187.2      | 0.53      |
| 8       | 25.94      | 351.7       | 2362        | 7.08       | 6.08       | 28.17      | 147.7      | 0.52      |
| 10      | 24.94      | 417.9       | 2460        | 8.39       | 6.32       | 29.53      | 145.4      | 0.50      |
| 20      | 23.67      | 337.5       | 1379        | 6.77       | 3.52       | 22.18      | 124.1      | 0.47      |

$X_{\max}$ ：最大菌重，分別取自於第 8、20、12、12、16、24 和 24 天

$P1_{\max}$ ：最大三萜產量，分別取自於第 20、20、20、28、28、28 和 28 天

$P2_{\max}$ ：最大胞內多醣產量，皆取自於第 8 天

### 4-3 不同時間添加檸檬水萃液培養試驗

由實驗 4-1 及 4-2 的結果得知，添加檸檬水萃液於樟芝液態培養，可促進其胞內多醣、粗三萜、類黃酮、總酚等生理活性物質含量的生成。其胞內多醣含量在第 8 天時，以添加 2 ml 水萃液的效果最佳；而粗三萜含量，則是以添加 10 ml 水萃液，在第 28 天時達到最大值；類黃酮及總酚則是以添加 20 ml 水萃液，在第 28 天時達到最大值。

本實驗目的為促進樟芝三萜含量的生成，且添加 10 ml 及 20 ml 檸檬水萃液時，類黃酮及總酚含量並沒有太大差別，故採用不同時間添加 10 ml 檸檬水萃液的方式。由於胞內多醣在第 8 天含量達到最高，且澱粉在第 12 天時大量被消耗，在不影響胞內多醣生成的情況下，選擇在第 12 天添加 10 ml 的檸檬水萃液於樟芝液態培養，總體積為 110 ml，探討其生理活性的影響。

#### 4-3-1 不同時間添加檸檬水萃液對樟芝菌絲體粗三萜生成影響

由圖 4-18 顯示，樟芝在第 0 天添加 10 ml 檸檬水萃液，粗三萜含量在第 28 天達到最大值，為 20.76 mg/g D.W.；而在第 12 天添加水萃液時，粗三萜含量在第 28 天達到最大值，為 14.36 mg/g D.W.。

由圖 4-19 顯示，樟芝在第 0 天添加 10 ml 檸檬水萃液，總三萜含量在第 28 天達到最大值，為 29.66 mg/100 ml.；而在第 12 天添加水萃液時，其第 20

及 28 天的總三萜含量差不多，分別為 10.74 mg/100 ml 及 10.98 mg/100 ml。

由圖 4-18 及圖 4-19 得知，在第 12 天添加水萃液，促進三萜含量生成的效果很低，推測為第 12 天到第 20、28 天的天數間隔太少，樟芝還無法適應水萃液的濃度，故三萜含量比第 0 天添加還要低。

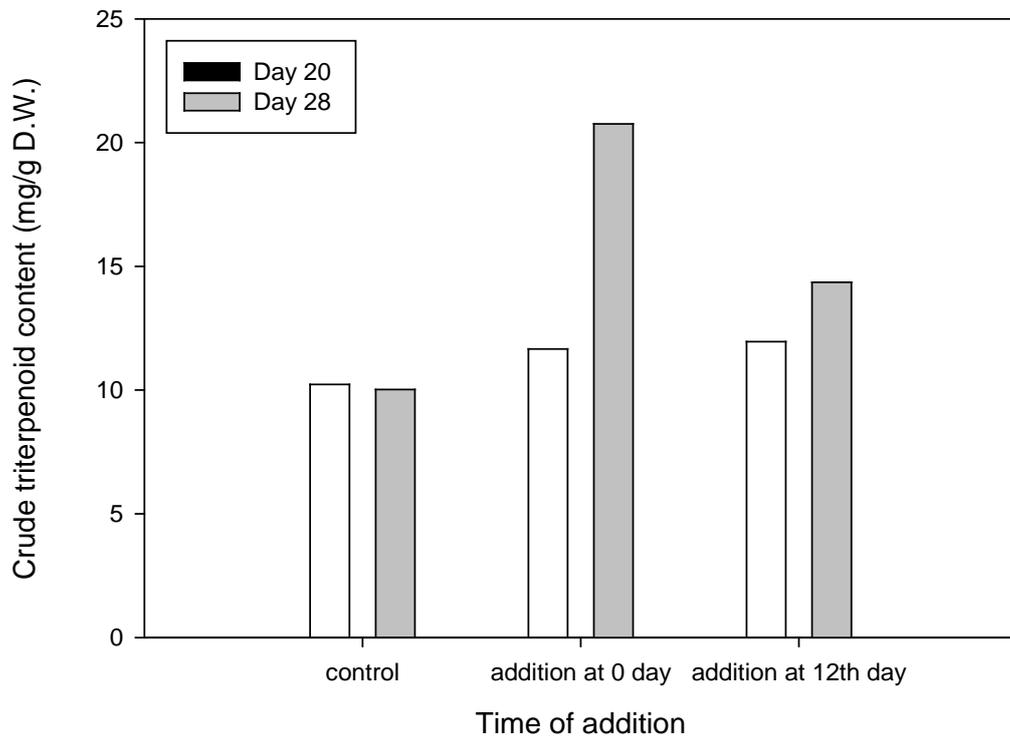


圖 4-18 不同時間添加 10 ml 檸檬水萃液對樟芝菌絲體粗三萜生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 20、28 天之菌絲體)

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，10 ml 檸檬水萃液

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

總體積：110 ml

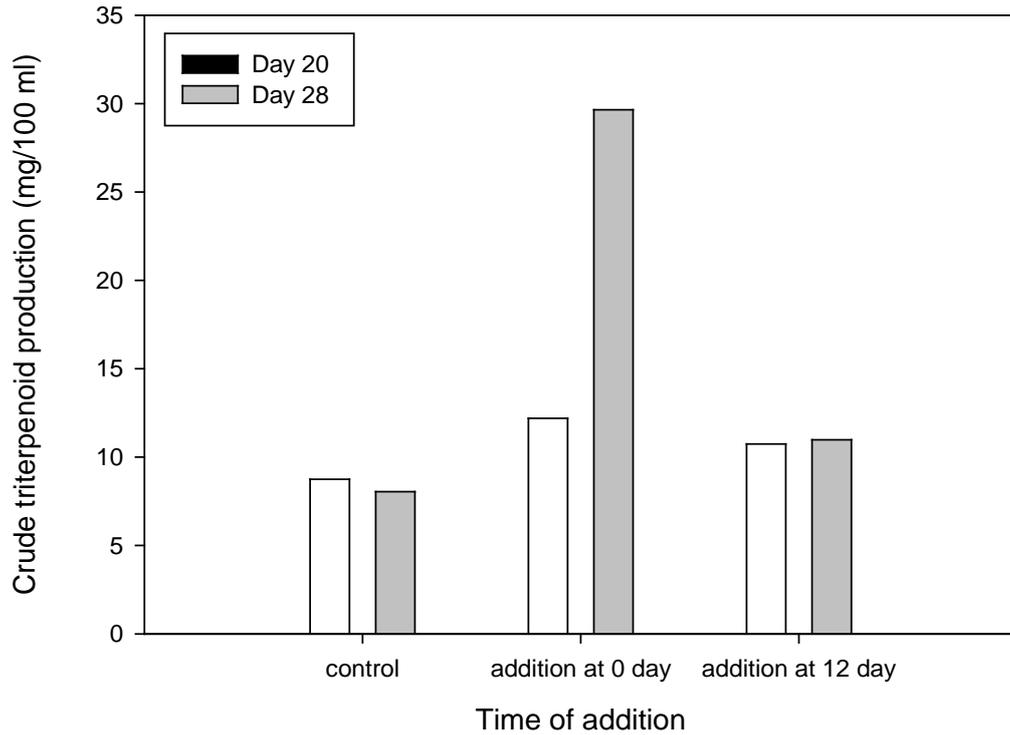


圖 4- 19 不同時間添加 10 ml 檸檬水萃液對樟芝菌絲體總三萜生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 20、28 天之菌絲體)

培養基成份： Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，10 ml 檸檬水萃液

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

總體積：110 ml

#### 4-3-2 不同時間添加檸檬水萃液對樟芝菌絲體類黃酮含量生成影響

由圖 4-20 顯示，樟芝在第 0 天添加 10 ml 檸檬水萃液，類黃酮含量在第 28 天達到最大值，為 2.49 mg/g D.W.；而在第 12 天添加水萃液時，類黃酮含量在第 28 天達到最大值，為 4.63 mg/g D.W.。由圖可知，在第 12 天添加水萃液，可促進類黃酮含量的生成，且在第 28 天時，第 12 天添加的類黃酮含量將近為第 0 天添加類黃酮含量的兩倍。

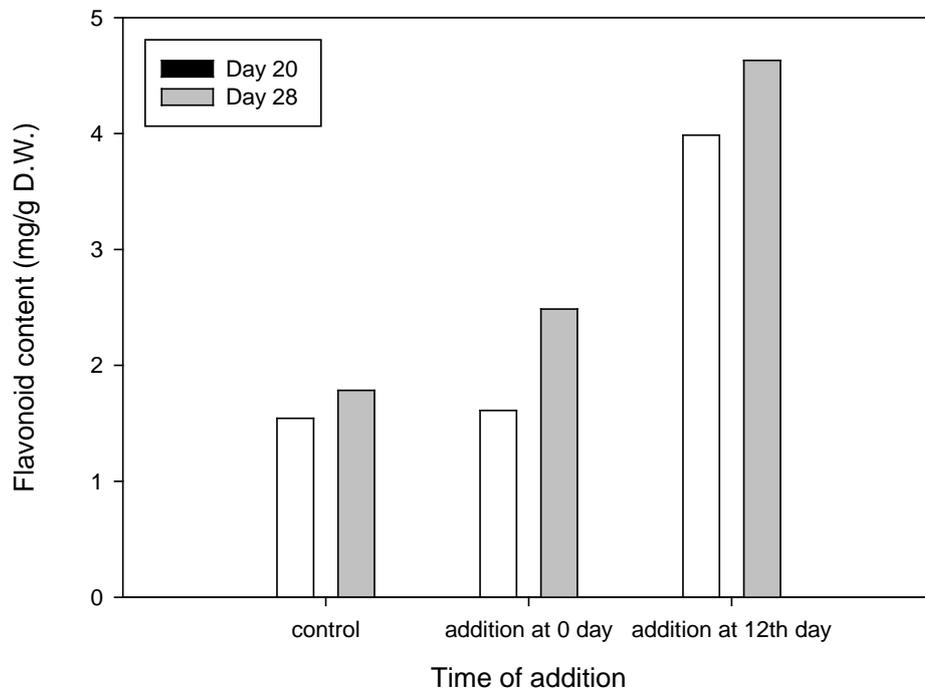


圖 4-20 不同時間添加 10 ml 檸檬水萃液對樟芝菌絲體類黃酮含量生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 20、28 天之菌絲體)

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，10 ml 檸檬水萃液

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

總體積：110 ml

### 4-3-3 不同時間添加對樟芝菌絲體總酚含量生成影響

由圖 4-21 顯示，樟芝在第 0 天添加 10 ml 檸檬水萃液，總酚含量在第 28 天達到最大值，為 21.57 mg/g D.W.；而在第 12 天添加水萃液時，總酚含量在第 28 天達到最大值，為 22.01 mg/g D.W.。由圖可知，在第 12 天添加水萃液，可促進總酚含量的生成，但效果不是非常明顯，第 28 天的總酚含量只差了 0.44 mg/g D.W.而已。

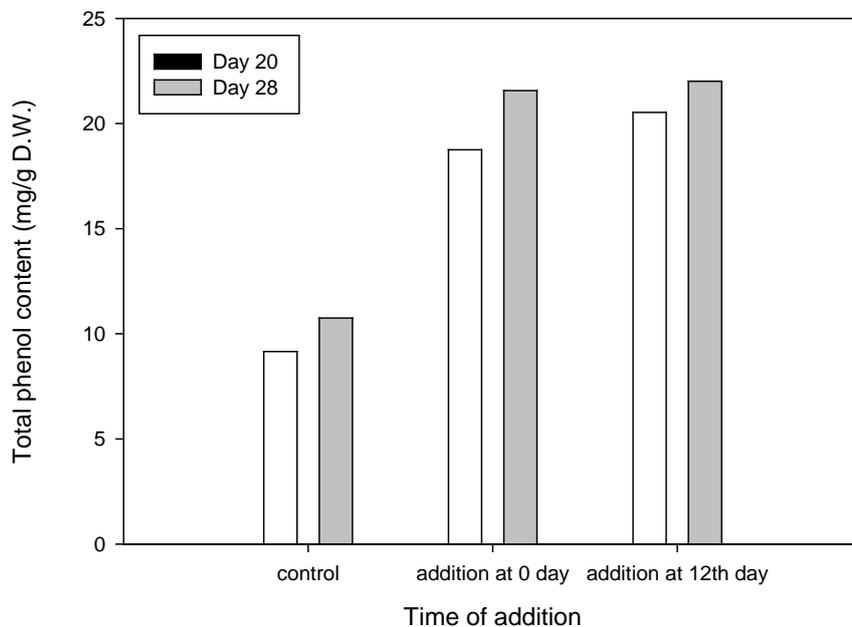


圖 4- 21 不同時間添加 10 ml 檸檬水萃液對樟芝菌絲體總酚含量生成影響

(樟芝菌絲體取自培養第 20、28 天之菌絲體)

培養基成份： Corn starch (4.78%)， YM broth (3.19%)， 10 ml 檸檬水萃液

培養條件：接菌量 10%，初始 pH 5.54，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

總體積：110 ml

## 第五章 結論與未來展望

### 5-1 結論

本研究以添加不同果皮水萃液、改變果皮水萃液濃度、不同時間添加檸檬水萃液培養試驗，探討樟芝菌絲體粗三萜、胞內多醣、類黃酮及總酚含量的影響。根據以上實驗觀察到的結果，可得到以下結果：

在添加不同果皮水萃液研究中發現，添加檸檬水萃液培養的菌絲體胞內多醣含量最高，在第 8 天時可達到 230.77 mg/g D.W.；在第 20 及 28 天時，添加檸檬水萃液培養的菌絲體粗三萜含量為最高，可達 24.92 mg/g D.W.及 20.42 mg/g D.W.；在總三萜方面，仍以添加檸檬水萃液培養的菌絲體總粗三萜產量為最高，第 20 天時可達 28.29 mg/100 ml；在類黃酮方面，以添加檸檬水萃液培養的菌絲體類黃酮含量為最高，在第 28 天時可達 3.22 mg/g D.W.；而總酚方面，則是以添加柚子水萃液培養的菌絲體總酚含量最高，在 20 天時可達到 22.60 mg/g D.W.。綜合以上數據，可發現添加檸檬水萃液培養的效果為最佳，故選用檸檬水萃液來進行不同水萃液濃度變化的實驗。

由添加不同濃度檸檬水萃液實驗結果發現，添加 2 ml 檸檬水萃液培養的菌絲體胞內多醣含量最高，在第 8 天時可達 230.77 mg/g D.W.；在第 20 天時，添加 2 ml 檸檬水萃液培養的菌絲體粗三萜含量為最高，可達 24.92 mg/g D.W.，在第 28 天時，則為添加 10 ml 檸檬水萃液培養的菌絲體粗三萜含量最高，達

到 29.53 mg/g D.W.；總三萜方面，在第 20 天時，添加 2 ml 檸檬水萃液培養的菌絲體總三萜含量為最高，可達 28.29 mg/g D.W.，在第 28 天時，則為添加 10 ml 檸檬水萃液培養的菌絲體總三萜含量最高，達到 41.79 mg/100 ml；在總酚及類黃酮含量方面，皆以添加 20 ml 檸檬水萃液培養的含量最高，分別為 36.09 mg/g D.W.及 6.04 mg/g D.W.，且總酚含量將近為類黃酮含量的 6 倍。綜合以上結果，欲使粗三萜含量的效果最佳，則選用添加 10ml 檸檬水萃液，當作不同時間添加培養的最佳條件。

在不同時間添加檸檬水萃液培養的實驗中，發現第 12 天添加 10 ml 檸檬水萃液，對粗三萜及總三萜含量生成的效果並不顯著；類黃酮方面，第 12 天添加 10 ml 檸檬水萃液時，在第 28 天達到最大值，為 4.63 mg/g D.W.，且類黃酮含量將近為第 0 天添加 10 ml 檸檬水萃液的兩倍；在第 12 天添加 10 ml 檸檬水萃液時，其總酚含量在第 28 天達到最大值，為 22.01 mg/g D.W.。綜合上述結果，推測第 12 天到第 28 天的天數間隔太少，樟芝還無法適應水萃液的濃度，故促進粗三萜含量生成的效果並不顯著。

## 5-2 未來展望

本實驗添加柑橘類果皮，只探討不同種類水果及其濃度變化對樟芝菌絲體生理活性成分之影響，未來可朝向不同的果皮精油萃取方式，或選擇單一種類水果但不同產地及不同品種，看看是否有不同影響，且進一步分析柑橘類水果中促進樟芝生理活性物質生成的有效成分。在粗三萜方面，只測其總量並未對單一三萜分別進行討論，故可將其分離並進行化合物的鑑定。在不同時間添加培養方面，本實驗只做了第 12 天添加之培養，未來可針對不同添加天數及濃度進行更深入的探討，試圖找出促進生理活性成分生成的最佳條件。

## 參考文獻

- 水野卓、川合正允，賴慶亮譯(1997)。 菇類的化學，生化學。 台北市：國立編譯館。
- 吳德鵬(1995)。 樟芝微量成分的研究。 國立台灣師範大學化學研究所碩士論文。
- 高曉薇 (1992)。 臺灣靈芝屬新種樟芝之三萜類成分研究。 臺北醫學院天然物醫物研究所碩士論文。
- 黃鈴娟(2000)。 樟芝與姬松茸之抗氧化性質及多醣組成。 國立中興大學食品科學研究所碩士論文。
- 李宛蓁(2003)。 樟菌絲體培養與生理活性成分生成之研究。 私立東海大學化學工程研究所碩士論文。
- 范真綺(2004)。 樟芝固態栽培與液態發酵菌絲體之成分及其生物活性之研究。 南台科技大學化學工程系碩士論文。
- 謝如婷(2009)。 微量元素對牛樟芝發酵物生理活性與抗氧化活性影響之探討。 南台科技大學生物科技研究所碩士論文。
- 劉國柱(1990)。 現代科學看靈芝。 雙利實業有限公司。
- 簡秋源、姜宏哲、陳淑真(1997)。 牛樟菇培養性狀及其三萜類成分分析之研究。 林業叢刊第 72 號。
- 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茵研究。 第 15 屆全國技術及職業教育研討會論文集。
- 嚴貴榮(2001)。 樟芝對 SZT 誘發高血糖鼠血醣調節與抗氧化之影響。 輔仁大學食品營養學系碩士論文。
- 黃賜源(1996)。 靈芝液態培養及氣舉式生化反應器應用之研究。 私立東海大學化學工程研究所碩士論文。

- 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。
- 劉賢祥(1992)。植物生理學。財團法人徐氏基金會。
- 張上鎮、王升陽(1998)。來自台灣森林之芳香維他命。台灣林業 24(3):33-37
- 鄭富元、陳怡兆、陳文賢(2010)。台灣國產柳橙皮甲醇萃取物之成分分析與抗氧化性研究。稻江學報第四卷第二期。
- 王柏森(2007)。樟芝(*Antrodia cinnamomea*)固態發酵培養產物之成分分析與抗氧化活性之研究。國立屏東科技大學生物科技研究所碩士論文。
- 張惠婷、吳季玲、張上鎮(2005)。台灣肖楠精油與抽出物之抗真菌與抗細菌活性評估。中華林學季刊 38(1):119-126。

[http://meii.zcom.tw/meii222/product\\_info.php?cPath=21\\_31&products\\_id=470](http://meii.zcom.tw/meii222/product_info.php?cPath=21_31&products_id=470)(2010.06)

[http://meii.zcom.tw/meii222/product\\_info.php?cPath=21\\_31&products\\_id=74](http://meii.zcom.tw/meii222/product_info.php?cPath=21_31&products_id=74)(2010.06)

[http://meii.zcom.tw/meii222/product\\_info.php?cPath=21\\_31&products\\_id=73](http://meii.zcom.tw/meii222/product_info.php?cPath=21_31&products_id=73)(2010.06)

[http://meii.zcom.tw/meii222/product\\_info.php?cPath=21\\_31&products\\_id=71](http://meii.zcom.tw/meii222/product_info.php?cPath=21_31&products_id=71)(2012.06)

Ao Z.H., Xu Z.H., Lub Z.M., Xu H.Y., Zhang X.M., Dou W.F. (2009), *Niuchangchih (Antrodia camphorata)* and its potential in treating liver diseases, *Journal of Ethnopharmacology* 121 (2):194-212

Benkeblia N. (2004), Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*), *Food Science and Technology* 37(2):263-268

- Chain E.B., Gualandi G., Morisi G. (1966), Aeration studies. IV. Aeration condition in 3000-liter submerged fermentation with various microorganisms, *Biotechnology and Bioengineering* 8: 595-619.
- Chang W.C., Lee D.O., Chan. W.K. (2003), Concentration and purification of soluble pectin from mandarin peels using crossflow microfiltration system, *Carbohydrate Polymers* 54:21-26
- Chang T.T. Chou W.N. (1995), *Antrodia cinnamomea* sp. nov. on *Cinnamomum Kanehirai* in Taiwan, *Mycological Research* 99:756-758
- Chao L.K., Hua K.F., Hsu H.Y., Cheng S.S., Liu J.Y., Chang S.T. (2005), Study on the anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(18):7274-7278
- Chen Y.J., Cheng P.C., Lin C.N., Liao H.F., Chen Y.Y., Chen C.C., Lee K.M. (2008), Polysaccharides from *Antrodia camphorata* mycelia extracts possess immunomodulatory activity and inhibits infection of *Schistosoma mansoni*, *International immunopharmacology* 8(3):458-467
- Cherng I.H., Chiang H.C. (1995), Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*, *Journal of Natural Products* 58:1655-1661
- Cherng I.H., Wu D.P., Chiang H.C. (1996), Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*, *Phytochemistry* 41(1):263-267
- Dey, P.M., Harborne J.B. (1991), *Methods in plant biochemistry* Vol.7. Terpenoids. (Charlwood, B. V., Banthorpe D. V. Eds.), Academic Press, New York: 1-185
- Forage R.G., Harrison D.E.F., Pitt D.E. (1985), Effect of environment on microbial activity, *Comprehensive Biotechnology* 1: 253-279.
- Harborne, J.B. (1973), *Phytochemical methods*, Academic Press, London: 89-105

Hseu Y.C., Chen S.C., Chen H.C., Liao J.W., Yang H.L.(2008a),*Antrodia camphorata* inhibits proliferation of human breast cancer cells in *vitro* and in *vivo*, Food and Chemical Toxicology

Hseu Y.C., Chen S.C., Yech Y.J., Wang L, Yang H.L.(2008b),Antioxidant activity of *Antrodia camphorata* on free radical-induced endothelial cell damage,Journal of Ethnopharmacology

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

Liu D.Z., Liang H.J., Chen C.H., Su C.H., Lee T.H., Huang C.T., Hou W.C., Lin S.Y., Zhong W.B., Lin P.J., Hung L.F., Liang Y.C.(2007),Comparative anti-inflammatory characterization of wild fruiting body, liquid-state fermentation,and solid-state culture of *Taiwanofungus camphoratus* in microglia and the mechanism, Journal of Ethnopharmacology 113 : 45-53

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

Osawa T.(1999),Protective role of dietary polyphenols in oxidative stress, Mechanisms of Ageing and Development 111 :133-139

Rao Y.K., Fang S.H., Tzeng Y.M.(2007),Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of *Antrodia camphorata*, *Cordyceps sinensis*, and *Cinnamomum osmophloeum* bark extracts. Journal of Ethnopharmacology 114(1):78-85

Rau U., Gura E., Olszewski E., Wagner F. (1992), Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing, Journal of Industrial Microbiology 9: 19-26

Roberts M. F. (1998), Production of Alkaloids in Plant Cell Culture, ALKALOIDS Biochemistry, Ecology, and Medicinal Application, Plenum press, New York 7: 167-169

- Salatino A., Woisky R.(1998), Analysis of propolis : some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37: 99-105
- Shih I.L., Pan K, Hsieh C (2006), Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelia growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea* , *Process Biochemistry* 41 :1129-1135
- Singh G., Maurya S., Catalan C., Lampasona M.P.(2005), Studies on essential oils, chemical, antifungal, antioxidant and sprout suppressant studies on ginger essential oil and its oleoresin, *Flavour and Fragrance Journal* 20(1):1-6
- Wang Y.C., Chuang Y.C., Ku Y.H.(2007), Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food Chemistry* 102:1163-1171
- Yang F. C., Liao C. B. (1998), The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures, *Process Biochemistry* 33:547-553
- Zang M. and Su Q.(1990), *Ganoderma comphoratum*, a new taxon in genus *Ganoderma* from Taiwan, China. *Acta Botanica Yunnanica* 12:395-396