

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

藥用菇類菌絲體固態培養技術開發及其在樟芝培養之應用

(II)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2214-E-029-005-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：東海大學化學工程學系

計畫主持人：楊芳鏘

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 12 日

藥用菇類菌絲體固態培養技術開發及其在樟芝培養之應用 (II)

楊芳鏘 薛姿捐

東海大學化工系

國科會計畫編號 NSC-93-2214-E-029-005

8902774

摘要

本研究的重點著重於利用固態培養的方式進行樟芝(*Antrodia camphorate* BCRC 35396)菌絲體的培養，藉由改變不同的培養條件及添加物對樟芝菌絲體生長及抗氧化能力(捕捉 DPPH 自由基能力、總酚含量及抗氧化能力)之影響。由實驗結果得知以小薏仁當做固態培養基，初始含水量為 55%，在 25℃ 下培養 14 天，在菌體濃度方面添加牛樟木屑 0.3g、樟腦油 0.4ml，菌體濃度可達 0.90g(D.W.)/g substrate 及 0.98g (D.W.)/g substrate，約為未添加的 1.40 倍及 1.53 倍。在抗氧化能力方面，添加樟腦油及木屑其捕捉 DPPH 自由基能力約為未添加的 3.5 倍左右，添加初始液態培養基捕捉效果可達 70.54%。

關鍵字:樟芝 固態培養 抗氧化

1.前言

食藥用菇類在中國的應用已經有二千多年的歷史了，大部分為食用菇類，少部分則有毒。而其中諸如靈芝、樟芝、茯苓、豬苓、冬蟲夏草等已有明確的藥效記載。樟芝又稱牛樟芝、牛樟菇、樟窟內菇、紅樟芝、又被稱為台灣中的紅寶石，為台灣獨特珍貴的藥用真菌，屬真菌界、擔子菌門、擔子菌亞門、同擔子菌綱、無褶菌目、多孔菌科、薄孔菌屬(李, 2003)。

近年來已有許多文獻指出，樟芝的生理活性成分物質是以三萜類、固醇類及多醣體等的化合物為主，而從樟芝子實體及菌絲體所萃取出的多醣體也證實具有抗 B 型肝炎病毒的效果(Chin. et al., 2004)。且也被應用在治療腹痛、高血壓、皮膚癢及肝炎上。

此外在樟芝液態培養的發酵液與菌體的捕捉自由基的能力與多醣和蛋白質的比率有一定的關係，其中發酵液內含有總酚類及三萜類，使其具有高的抗氧化能力，且也有可能扮演著化學抑制劑的角色，防止自由基引起的疾病(Tuzz et al., 2002)。

2.材料與方法

2.1 菌株

本實驗所採用的菌株購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，為 *Antrodia camphorate* BCRC 35396。以 MALT EXTRACT AGAR (Glucose 2%、Malt extract 2%、Peptone 0.1%、Agar 2%)作為培養基，於 25℃ 下培養活化生長，置於 4℃ 下保存備用。

2.2 固態發酵培養

於 250ml 的三角錐形瓶內加入小薏仁 14 g 及 14 ml 的水，以 121℃、1.2 Kg/cm 的條件殺

菌 20 min，待其冷卻後接入液態種菌 10 ml，於 25℃ 的條件下培養 14 天，測量其菌體濃度、捕捉 DPPH 自由基能力及抗氧化能力。

2.3 菌體濃度測定

因固態培養菌絲體與培養基不易分離，所以採用測定葡萄糖胺的方法來測量菌體濃度。

取 0.4 g 乾燥後的樣品，加入 6.3 ml 72% 的 H₂SO₄ 於 25℃、130 rpm 下震盪 30 min 後，加入 100 ml 蒸餾水稀釋，再將溶液以 121℃、1.2 Kg/cm 的條件水解 2 小時，以 NaOH 中和至 pH 值為 7，再以葡萄糖胺比色法分析葡萄糖胺的含量。

2.4 葡萄糖胺比色法

取 1 ml sample 加入 1 ml 5% KHSO₄ 及 1 ml 5% NaNO₂ 反應 15min 後，加入 1 ml 12.5% NH₄SO₃NH₂ 搖晃 5 min，加入 1 ml 0.5% MBTH，反應 60min 後，再加入 1 ml 5% FeCl₃·6H₂O 反應 30 min，以分光光度計測其波長於 650 nm 之吸收值。

2.5 捕捉 DPPH (α - α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 自由基能力的測定

取 4 ml 適當稀釋的樟芝甲醇萃取液及 MeOH(對照組)，加入 1 ml 新鮮配製的 1mM DPPH-MeOH，混合均勻反應 30 min，以分光光度計測其波長在 517 nm 的吸收值。

2.6 抗氧化活性的測定

取 0.2mL 經過適當稀釋的樟芝甲醇萃取液，加入 10mL pH=7 之 1/30M 的 phosphate buffer，MeOH 當做對照組。

加入 10mL Linoleic acid solution (Linoleic acid : MeOH=0.13 : 10)，再以二次蒸餾水定量至

25mL，加蓋密封置於 40 °C 的恆溫箱中。每隔 24hr 取出 0.2mL，再加入 9.4mL 75% MeOH、0.2mL 2×10^{-2} M FeCl₂ solution 及 0.2mL NH₄SCN solution 均勻混合。反應 3min 後，利用分光光度計測量其吸收波長在 500nm 的吸收值。

3. 結果與討論

3.1 不同初始 pH 值對樟芝菌絲生長及其抗氧化之影響

在菌體濃度方面，是以不調控 pH 值菌體濃度較高，可達 0.55g(D.W.)/g substrate，其餘 pH 值皆會抑制菌體的生長，在 Final pH 值，從圖 1 可看出其直接沒什麼太大的差異，由此也能證明固態發酵的基質確實是一個良好的緩衝劑。

在捕捉 DPPH 自由基及總酚含量方面，皆是以 pH 值 = 2 時效果最好，分別為 47.29% 及 8.03mg/g substrate (圖 2)。在抗氧化方面也是以 pH = 2 有明顯抑制亞麻油酸過氧化物的生成，尤其是在 36-48 小時效果最明顯(圖 3)。

3.2 不同初始含水量對樟芝菌絲生長及其抗氧化之影響

由圖 4 可發現含水量為 55% 時的菌體濃度最高，為 0.46g (D.W.)/g substrate，隨著含水量的增加菌體濃度逐漸減少。在捕捉 DPPH 自由基方面，則是以含水量為 34% 的捕捉能力最好，其次是含水量為 71%，捕捉能力分別為 91.99%、66.61%。總酚含量也與捕捉 DPPH 能力一樣(圖 5)。在抗氧化活性方面，以含水量為 34% 及 71% 效果較好，其抑制亞麻油酸過氧化物生成效果明顯高於其餘含水量，而其餘含水量的抗氧化活性相當(圖 6)。

3.3 添加樟腦油對樟芝菌絲生長及其抗氧化之影響

由圖 7 可看出，隨著添加樟腦油的量增加菌體濃度有隨之增加的趨勢，但增加幅度不大，其中添加 0.4ml 的樟腦油菌體濃度可高達 0.98g(D.W.)/g substrate。

圖 8 中指出，添加微量之樟腦油有助於樟芝菌絲甲醇萃出物捕捉 DPPH 自由基的能力，其捕捉能力皆可高達 93% 左右。在總酚含量方面，微量的添加樟腦油有利於樟芝菌絲生成總酚物質，隨添加量越多，總酚的含量越少，但捕捉 DPPH 自由基能力卻沒有因為總酚含量減少而降低，所以推測其與添加牛樟木屑一樣，隨著添加量的增加不利於總酚類物質之生成，但有利於其他捕捉 DPPH 自由基物質之生成。

在抗氧化能力方面(圖 9)，當添加 0.3ml 的

樟腦油時，有較明顯的抑制亞麻油酸過氧化物生成的效果。

3.4 添加牛樟木屑對樟芝菌絲生長及其抗氧化之影響

添加牛樟木屑有助於樟芝菌絲的生長，隨添加量之增加有抑制菌體生長之情形(圖 10)。

在捕捉 DPPH 自由基方面，凡是有添加牛樟木屑的條件下其捕捉 DPPH 自由基的能力皆很強，約在 90% 左右，其中以添加 1.5g 木屑培養稍低，捕捉能力為 82.92%。在總酚含量方面，微量的添加牛樟木屑有利於總酚的生成，添加木屑量越多總酚含量越少，呈現負相關性，但若與捕捉 DPPH 自由基能力比較的話，雖然添加量越多總酚類含量越少，但其捕捉能力也沒有因此降低，固猜測牛樟木屑添加有利於其他具有捕捉自由基能力之物質的生成(圖 11)。

而抗氧化能力是以添加 1.5g 的牛樟木屑效果最明顯，在 72 小時前其抑制亞麻油酸過氧化物的生成約達 50%(圖 12)。

3.5 添加不同初始液態培養基比例對樟芝菌絲生長及其抗氧化之影響

當初始液態培養基比例為 35.71% 時樟芝菌體生長狀況較好，菌體濃度可達 0.70 g(D.W.)/g substrate，隨著液態培養基比例的增加，其環境越不適合樟芝菌絲體的生長，當比例為 100% 時菌體濃度為 0.53 g(D.W.)/g substrate(圖 13)，推測為當液態培養基比例增加培養基添加的水溶液濃度越高，導致水活性因子越低越不利於樟芝菌絲體的生長。

在捕捉 DPPH 自由基實驗中，當液態培養基比例為 100% 時，其捕捉能力可高達 70.54%。總酚含量則隨著初始液態培養基比例的增加而增加，在比例為 0% 及 100% 時總酚含量分別為 8.21 mg/g substrate 及 9.86 mg/g substrate(圖 14)。

由圖 15 可得知，添加比例越高抑制亞麻油酸化合物生成的效果越好，添加 35.71% 時其抗氧化能力與添加 0% 的效果差不多，與捕捉 DPPH 自由基能力結果相似。

4. 結論

pH 值對菌體濃度影響不大，在抗氧化方面 pH 值為 2 時有不錯的抗氧化效果及較多的總酚含量。含水量為 55% 較適合菌體之生長，在較低或較高含水量環境較有利於生成有效成分。

添加牛樟木屑、樟腦油皆有助於菌體濃度及抗氧化的提升。添加適當比例液態培養基有利於菌體之生長，抗氧化及總酚含量隨添加比

例越高效果越好。

5. 參考文獻

1. 李宛蓁, "樟芝菌絲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, 台中, 台灣, 2003。
2. Chin-Hang Shu, Ming-Yeou Lung, "Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch culture", *Process Biochemistry*, 39(2004)931-937。
3. Tuzz-Ying Song, Gow-Chin Yen, "Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture", *Agricultural and food chemistry*, 50(2002)3322-3327。

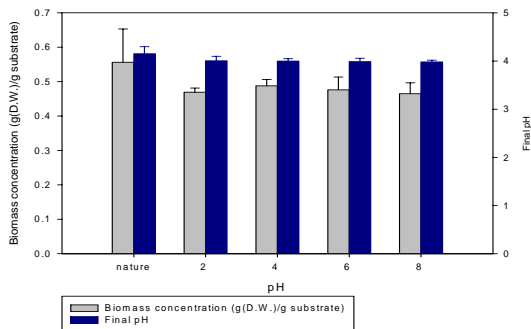


圖 1 不同初始 pH 值對樟芝菌絲生長之影響

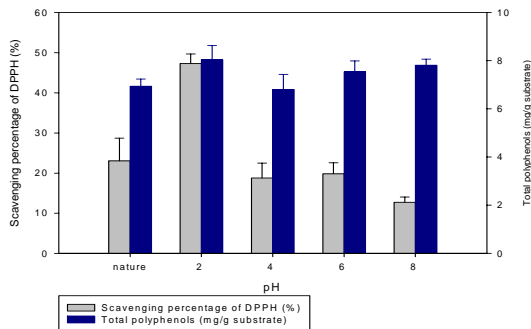


圖 2 不同初始 pH 值對樟芝菌絲捕捉 DPPH 自由基能力及總酚含量影響

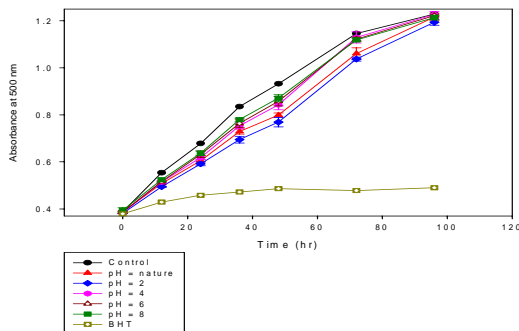


圖 3 不同初始 pH 值對樟芝菌絲抗氧化能力影響

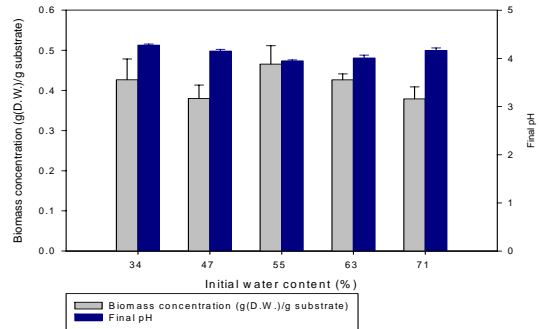


圖 4 不同初始含水量對樟芝菌絲生長之影響

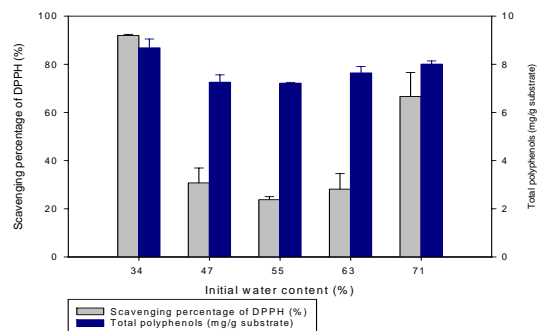


圖 5 不同初始含水量對樟芝菌絲捕捉 DPPH 自由基能力及其總酚含量之影響

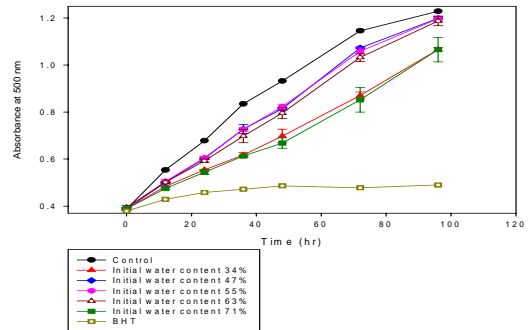


圖 6 不同初始含水量對樟芝菌絲抗氧化能力之影響

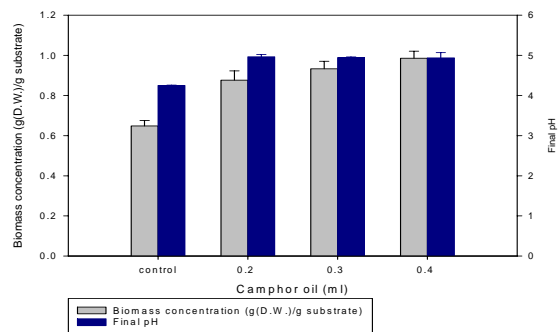


圖 7 添加樟腦油對樟芝菌絲生長之影響

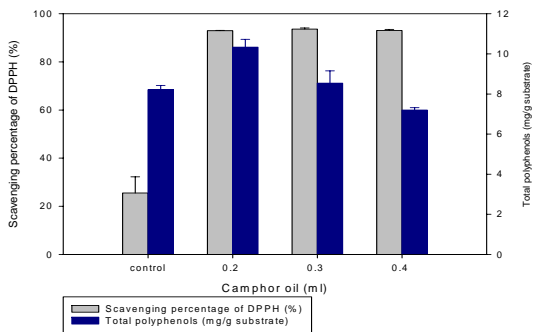


圖 8 添加樟腦油對樟芝菌絲捕捉 DPPH 自由基能力及總酚含量之影響

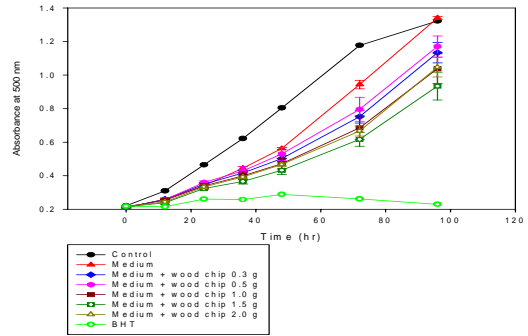


圖 12 添加牛樟木屑對樟芝菌絲抗氧化能力之影響

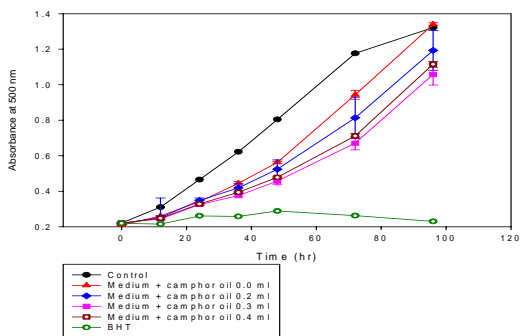


圖 9 添加樟腦油對樟芝菌絲抗氧化能力之影響

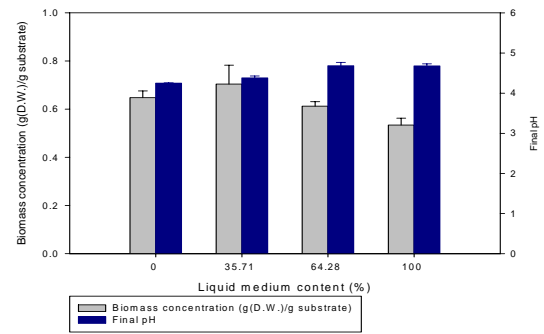


圖 13 添加不同初始液態培養基比例對樟芝菌絲生長之影響

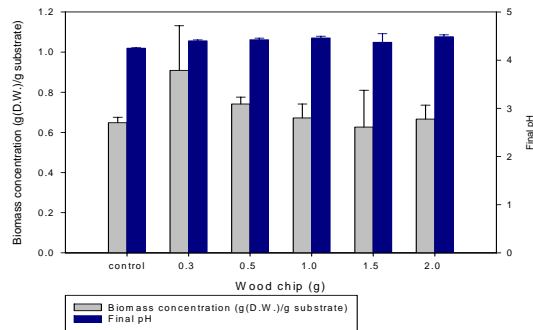


圖 10 添加牛樟木屑對樟芝菌絲生長之影響

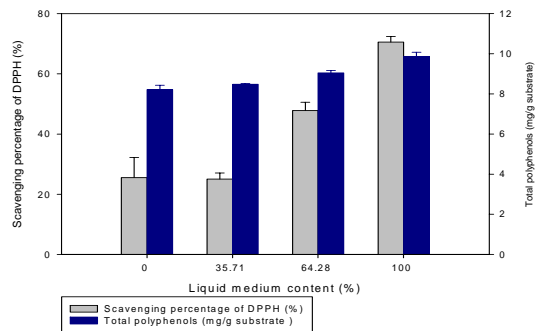


圖 14 添加不同初始液態培養基比例對樟芝菌絲捕捉 DPPH 自由基能力及總酚含量之影響

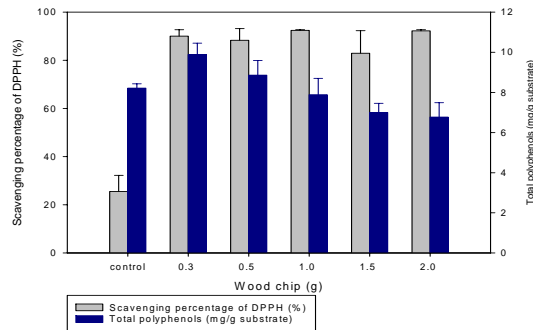


圖 11 添加牛樟木屑對樟芝菌絲捕捉 DPPH 自由基能力及總酚含量之影響

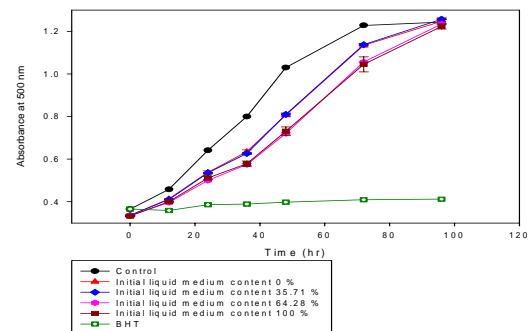


圖 15 添加不同初始液態培養基比例對樟芝菌絲抗氧化能力影響