

東海大學化學工程與材料工程研究所

博士論文

指導教授：楊芳鏘 博士

柑橘類果皮添加對樟芝代謝

生理活性物質之影響

Effect of citrus peel addition on the formation of bioactive  
metabolites of *Antrodia cinnamomea*

研究生：馬德威 撰

中華民國 一零一 年 六 月

June, 2012



# 博士學位論文口試委員會審定書

化學工程研究所 馬德威 君所提供之論文

柑橘類果皮添加對樟芝代謝生理活性物質之影響

經本委員會審定通過，特此證明。

論文口試委員會

委員：

楊景時

顏志偉

顧鈞松

林俊杰

唐振祺

王敏賢

指導教授：

楊景時

中華民國 101 年 6 月 12 日



## 中文摘要

樟芝已廣泛應用在台灣傳統醫藥，主要有效成份來自於大分子的多醣體、小分子的三萜類化合物、半萜內酯化合物及固醇類，樟芝的生理活性成分及功能仍是目前研究重點。除多醣體外，近年來最受重視的生理活性物質就是三萜類。本研究目的為評估樟芝深層培養添加柑橘類果皮精油及樟芝平板式固態培養添加柑橘類果皮粉末提高生理活性代謝產物的可行性。

兩階段溶氧培養(在第21天靜置)對樟芝菌絲體三萜類代謝有良好的促進功效，在培養28天後三萜類含量達22.30 mg/g DW，為控制組(10.48 mg/g DW)的2.13倍。橘子果皮精油添加對樟芝菌絲體形成生理活性代謝產物促進效果最佳，在第7天添加橘子果皮精油4% (v/v)，三萜類含量和產量達到最高值，為117.17 mg/g DW和1417.77 mg/L，分別為控制組的11倍及14倍。檸檬烯為柑橘類果皮精油促進樟芝菌絲體生成三萜類的重要成分之一，檸檬烯進入細胞的質體內，抑制MCC路徑的單萜類生成，改由MVA路徑合成三萜類。

蕎麥平板式固態培養，菌絲體只能在基質表面上成長，因此取樣時可以將菌絲體與基質分離，完整分析菌絲體生理活性。葡萄柚果皮粉末添加能有效提升生理活性代謝物產量，當添加4 g/plate葡萄柚果皮粉末時，第30天三萜類的含量與產量分別為47.10 mg/g DW和166.68 mg/plate，為控制組(9.66 mg/g DW和32.26 mg/plate)的4.88倍與5.17倍。此外由HPLC圖譜中，發現經添加葡萄柚果皮粉末平板式固態培養的樟芝，含有代表子實體形成有關的5種麥角甾烷三萜類(ergostanes:

antcins C and K, and zhankuic acids A, B, and C), 因此可以證明, 此種培養在短時間(30天)所得到的三萜類化合物與野生樟芝子實體成份大致相同, 換句話說, 此培養得到的應該為樟芝子實體。

關鍵字：樟芝、三萜類、平板式固態培養、柑橘類果皮、檸檬烯

## Abstract

Basidiomes of *Antrodia cinnamomea* are used as a traditional medicine in Taiwan. Bioactive compounds found in *A. cinnamomea* include: polysaccharide, triterpenoids, sesquiterpene lactone, and steroids. The bioactivity and efficacy of *A. cinnamomea* are still the main focus in many researches. In addition to polysaccharide, triterpenoids have recently been considered as the most biologically active components. The aim of this study was to evaluate the feasibility of adding citrus peel extract in the submerged culture or adding citrus peel powder on the plate solid state culture of *A. cinnamomea* to enhance the formation of bioactive metabolites.

A two-stage fermentation process was proposed to enhance triterpenoids content by combining the conventional shake-flask fermentation (on the 21<sup>th</sup> day) with static culture (on the 7<sup>th</sup> day). The content of triterpenoids rose from 10.48 mg/g DW of the control to 22.30 mg/g DW on the 28<sup>th</sup> day. Adding tangerine peel extract was the most effective way to enhance bioactive metabolite production. With an addition of 4% (v/v) on the seventh day, the content and production of triterpenoids were 117.17 mg/g DW and 1417.77 mg/L, which were 10-fold and 13-fold higher than the control, respectively, on the 28<sup>th</sup> day. Limonene was an important ingredient of citrus peel extract to enhance the formation of triterpenoids in the submerged culture of *A. cinnamomea*. When limonene entered the mitochondria, MCC pathway was inhibited

which synthesizes monoterpenes in the mitochondria. Thus MVA pathway was then enhanced to synthesize triterpenes in the cytoplasm.

Mycelia of the plate solid state culture only grew on the substrate surface so that it was easy to separate mycelia from the substrate surface. Grapefruit was the most effective element in enhancing bioactive metabolite production. With an addition of 4 g powder/plate, the content and production of triterpenoids rose from 9.66 mg/g DW and 32.26 mg/plate of the control to 47.10 mg/g DW and 166.68 mg/plate, respectively, on the 30<sup>th</sup> day. Moreover, this study also demonstrates that the plate solid state culture with an additional grapefruit powder of *A. cinnamomea* could contain the 5 ergostanes (antcins C and K, and zhankuic acids A, B, and C). The production of ergostanes is related to basidiomatal formation of *A. cinnamomea*. This result indicates that mycelia of this culture could be basidiomes of *A. cinnamomea*.

Keywords: *Antrodia cinnamomea*; triterpenoids; plate solid state culture; citrus peel; limonene



## 謝誌

當年考入博士班，小犬詩哲也入小學，一直以為可以先兒子一步畢業，但詩哲去年已從國小畢業！

在生命裏受益最多及成長最豐的七年博士研究所生涯中，承蒙恩師 楊芳鏘教授孜孜不倦的指導及啟發，不斷的提供新構想及新資訊以開拓我的視野與培養解決事情的能力。老師在研究治學上的認真態度及待人處世的圓融，讓我如沐春風，著實在課業及生活上有了莫大的進步，師恩浩蕩，無以回報。

文稿初成，復蒙 顏宏偉教授、顧野松教授、盧錫祺教授、王敏盈教授及林俊杰博士於百忙中撥冗詳閱、指正疏漏，並給予本論文諸多諸多寶貴意見，使論文得以更加完善，學生獲益良多，特誌卷首，敬申感謝之意。

研究期間，感謝本系諸位師長之教誨與指導，尤其 顏宏偉教授亦師亦友的協助，感激不盡，銘記於心。同時感謝學弟妹于萱、雅婷、嘉麟、證雄、瑞真、岳廷、亞翰、立東、冠億、芳鈺、雯芳、翌晨、皓緯、博遠、鳳堯、啟倫、明哲、少猷、嘉隆、瑞均、宣銘、秀玲、馨怡、若凡、凱平、怡奴、志昇、靖涵、方瑋、羽軒、嘉豪、志恆、偉誠、欣培，在實驗上的協助，使實驗能夠順利完成，特致上最深的謝意。

感謝我最親愛與尊敬的父母的栽培與養育，更感謝妻子乃菁這七年來的陪伴與鼓勵，並在求學的過程中給予莫大的包容與支持，讓我得以追求自己的理想完成學業，謹以此一切的榮耀與你們共享。



## 目錄

中文摘要.....	I
Abstract.....	III
謝誌.....	V
目錄.....	VII
表目錄.....	XIII
圖目錄.....	XV
第一章 緒論.....	1
1-1 前言.....	1
1-2 樟芝的介紹.....	2
1-2-1 樟芝之命名.....	2
1-2-2 樟芝的分類地位.....	3
1-3 樟芝生理活性成分.....	5
1-3-1 多醣體.....	5
1-3-2 三萜類.....	7
1-3-3 總多酚.....	10
第二章 樟芝兩階段深層培養.....	13
2-1 前言.....	13
2-1-1 物理因素.....	14

2-1-2 化學因素 .....	16
2-1-3 深層培養樟芝菌絲體功效 .....	18
2-2 實驗材料與方法 .....	19
2-2-1 實驗藥品 .....	20
2-2-2 實驗儀器與設備 .....	21
2-2-3 實驗方法 .....	22
2-2-3-1 菌種斜面試管保存 .....	22
2-2-3-2 培養皿平面培養 .....	23
2-2-3-3 種菌的製備 .....	23
2-2-3-4 三角瓶液態基礎培養試驗 .....	23
2-2-3-5 兩階段培養溶氧變化試驗 .....	24
2-2-3-6 兩階段培養溫度變化培養試驗 .....	25
2-2-3-7 兩階段培養 pH 變化培養試驗 .....	25
2-2-4 分析方法 .....	26
2-2-4-1 菌體濃度 .....	26
2-2-4-2 pH 值測定 .....	26
2-2-4-3 澱粉分析方法 .....	26
2-2-4-4 胞內總多酚含量測定 .....	27
2-2-4-5 胞內多醣濃度測定 .....	27

2-2-4-6 胞內三萜類含量測定 .....	28
2-3 實驗結果與討論 .....	29
2-3-1 樟芝液態基礎培養試驗 .....	29
2-3-2 樟芝液態兩階段培養試驗 .....	31
2-4 結論 .....	36
第三章 柑橘類果皮精油添加之樟芝深層培養 .....	39
3-1 前言 .....	39
3-1-1 萜類合成機制 .....	39
3-1-2 柑橘類果皮精油 .....	44
3-1-3 樟芝深層培養產三萜類 .....	46
3-2 實驗材料與方法 .....	47
3-2-1 實驗藥品 .....	47
3-2-2 實驗儀器與設備 .....	48
3-2-3 實驗方法 .....	48
3-2-3-1 果皮精油製作及品質管控 .....	49
3-2-3-2 不同時間添加各種果皮精油培養試驗 .....	49
3-2-3-3 不同濃度橘子果皮精油添加培養試驗 .....	50
3-2-4 分析方法 .....	50
3-3 實驗結果與討論 .....	51

3-3-1 不同時間添加各種果皮精油培養試驗.....	52
3-3-2 不同濃度橘子果皮精油添加培養試驗.....	58
3-3-3 果皮萃取液添加培養發酵動力參數之比較.....	62
3-3-4 樟芝菌絲體深層培養與野生樟芝子實體三萜類 HPLC 圖比較....	64
3-4 結論.....	66
第四章 單萜類添加之樟芝深層培養.....	67
4-1 前言.....	67
4-1-1 乙醇效應.....	67
4-1-2 柑橘類果皮單萜類簡介.....	69
4-2 實驗材料與方法.....	74
4-2-1 實驗藥品.....	74
4-2-2 實驗儀器與設備.....	74
4-2-3 實驗方法.....	75
4-2-3-1 不同時間添加乙醇液態培養.....	75
4-2-3-2 檸檬烯乙醇溶液與水溶液添加深層培養.....	75
4-2-3-3 不同單萜類添加深層培養.....	76
4-2-3-4 發酵液中檸檬烯濃度變化.....	76
4-2-4 分析方法.....	77
4-3 實驗結果與討論.....	78

4-3-1 檸檬烯乙醇溶液與水溶液添加深層培養.....	78
4-3-2 不同單萜類添加液態培養.....	83
4-3-3 發酵液中檸檬烯濃度變化.....	89
4-4 結論.....	90
第五章 柑橘類果皮粉末添加之樟芝平板式固態培養.....	93
5-1 前言.....	93
5-1-1 固態培養之優缺點.....	93
5-1-2 固態發酵之應用.....	95
5-1-3 柑橘類果皮性質與成份.....	95
5-1-4 樟芝平板式固態培養.....	96
5-2 實驗材料與方法.....	99
5-2-1 實驗藥品.....	99
5-2-2 實驗儀器與設備.....	100
5-2-3 實驗方法.....	100
5-2-3-1 乾燥果皮粉末製作.....	101
5-2-3-2 平板式固態培養基礎試驗.....	101
5-2-3-3 添加不同果皮粉末平板式固態培養.....	101
5-2-3-4 添加不同重量葡萄柚果皮粉末平板式固態培養.....	102
5-2-4 分析方法.....	102

5-2-4-1 菌體濃度 .....	103
5-2-4-2 HPLC 分析代謝產物三萜類含量 .....	103
5-3 實驗結果與討論 .....	104
5-3-1 平板式固態培養基礎試驗 .....	105
5-3-2 添加不同果皮粉末平板式固態培養 .....	107
5-3-3 添加不同重量葡萄柚果皮粉末平板式固態培養 .....	109
5-3-4 果皮粉末添加平板式固態培養發酵動力參數 .....	112
5-3-5 樟芝平板式固態培養與野生樟芝子實體三萜類 HPLC 圖比較 ..	114
5-4 結論 .....	115
第六章 結論與未來展望 .....	117
6-1 結論 .....	117
6-2 未來展望 .....	118
參考文獻 .....	119
附錄 .....	133



## 表目錄

表 1-1	樟芝子實體中所含三萜類 Ergostane 型化合物.....	9
表 1-2	樟芝子實體中所含三萜類 Lanostane 型化合物.....	10
表 2-1	靈芝液態培養產靈芝酸文獻整理.....	16
表 2-2	實驗藥品清單.....	20
表 2-3	實驗儀器清單.....	21
表 3-1	常見幾種柑橘皮精油之含量及主要成分.....	45
表 3-2	樟芝液態培養產三萜類文獻整理.....	47
表 3-3	新增實驗藥品清單.....	48
表 3-4	新增實驗儀器清單.....	48
表 3-5	不同果皮精油添加之樟芝液態培養動力學參數.....	63
表 3-6	不同濃度橘子果皮精油添加之樟芝液態培養動力學參數.....	63
表 3-7	樟芝深層培養三萜類主要滯留時間的 HPLC 圖譜面積比較.....	66
表 4-1	常見幾種柑橘皮精油之含量及主要成分.....	73
表 4-2	新增實驗藥品清單.....	74
表 4-3	新增實驗儀器清單.....	74
表 5-1	柑橘類果皮物理性質.....	96
表 5-2	烘乾後果皮成份比例.....	96
表 5-3	新增實驗藥品清單.....	100

表 5-4	新增實驗儀器清單 .....	100
表 5-5	不同果皮粉末添加之樟芝平板式固態培養動力學參數 .....	113
表 5-6	不同重量葡萄柚果皮粉末添加之樟芝平板式固態培養動力學參數 .....	113

## 圖目錄

圖 1-1	樟芝子實體 .....	3
圖 1-2	樟芝平板培養 .....	4
圖 1-3	樟芝液態培養之菌絲球 .....	4
圖 1-4	樟芝固態培養 .....	4
圖 2-1	樟芝菌絲體基礎培養生長曲線及生理活性產物 .....	30
圖 2-2	不同天數靜置對樟芝菌絲體生長曲線及生理活性物質代謝影響 .....	33
圖 2-3	第 21 天改變溫度對菌絲體合成總多酚的影響 .....	35
圖 2-4	第 21 天改變溫度對菌絲體合成三萜類的影響 .....	35
圖 2-5	第 21 天改變 pH 值對菌絲體合成總多酚影響 .....	37
圖 2-6	第 21 天改變 pH 值對菌絲體合成三萜類影響 .....	37
圖 3-1	萜類合成路徑 .....	43
圖 3-2	第 7 天添加 2% (v/v) 橘子精油樟芝菌絲體生長曲線及生理活性產物 ....	54
圖 3-3	不同時間添加 2% (v/v) 橘子果皮精油對樟芝菌絲體代謝影響 .....	55
圖 3-4	各種果皮精油(2% (v/v) 添加對樟芝菌絲體總多酚之比較 .....	56
圖 3-5	各種果皮精油(2% (v/v)) 添加對樟芝菌絲體三萜類之比較 .....	57
圖 3-6	橘子果皮精油添加量對樟芝菌絲體總多酚影響 .....	60
圖 3-7	橘子果皮精油添加量對樟芝菌絲體三萜類影響 .....	61
圖 3-8	樟芝深層培養三萜類化合物 HPLC 圖譜 .....	65

圖 4-1	柑橘類果皮精油中常見單萜類的結構式 .....	70
圖 4-2	微生物轉化檸檬烯途徑 .....	72
圖 4-3	不同時間添加乙醇對樟芝菌絲體代謝影響 .....	80
圖 4-4	檸檬烯溶液添加對樟芝菌絲體合成總多酚影響 .....	81
圖 4-5	檸檬烯溶液添加對樟芝菌絲體合成三萜類影響 .....	82
圖 4-6	不同單萜類乙醇溶液添加對樟芝菌體濃度 .....	85
圖 4-7	不同單萜類乙醇溶液添加對樟芝合成總多酚之影響 .....	86
圖 4-8	不同單萜類乙醇溶液添加對樟芝合成三萜類之影響 .....	87
圖 4-9	第 7 天添加單萜類乙醇溶液後發酵液之 GC 圖譜.....	88
圖 4-10	檸檬烯乙醇溶液添加之樟芝生長曲線、生理活性產物及檸檬烯含量 ...	92
圖 5-1	人工栽培子實體 .....	98
圖 5-2	平板式固態培養 .....	104
圖 5-3	樟芝平板式固態培養菌絲體生長曲線及生理活性物質代謝 .....	106
圖 5-4	不同果皮粉末(2 g)添加對樟芝平板式固態培養之影響.....	108
圖 5-5	不同葡萄柚果皮粉末添加量對樟芝菌絲體代謝影響 .....	111
圖 5-6	三萜類化合物 HPLC 圖譜 .....	116

# 第一章 緒論

自古以來菇類即被開發為食物，廣為世界各地食用，而菇類提取物(煎劑、萃取劑)被廣泛的應用在民間草藥、中藥等方面。近年來，人們日漸對健康更加注意，對健康有著療效的保健食品更是炙手可熱，其中又以食藥用菇之保健類食品最受注目。菇類的藥理作用中，除有增強免疫，疾病康復力等作用外，更對腫瘤有預防及改善的效果。

## 1-1 前言

根據行政院衛生署資料(2012 年)，癌症連 30 年居台灣十大死因之首，台灣癌症基金會、台北醫學大學最近證實，三萜類能夠阻斷癌細胞血管新生、誘導癌細胞凋亡，因而可加強化療、放療等正統癌症治療的療效。

近幾年，萜類受到廣泛的重視，透過萜類生理功能的研究，發現各種生理活性物質，萜類不但可做為營養食物，也具有增強身體健康和藥用功效。樟芝是台灣特有的食藥用真菌，以具有良好抗腫瘤及護肝能力聞名。但樟芝對宿主具有專一性，只生長在一般真菌無法生長的台灣特有國寶級保育樹種牛樟樹(*Cinnamomum kanehirae*)上，且樟芝著生在牛樟樹幹涵洞內壁，不易為人所採收，故民間視若珍寶，為台灣市場目前價格最昂貴的台灣特有種野生真菌。

## 1-2 樟芝的介紹

樟芝是台灣享譽世界的國寶級菇類，菇體初生時呈現鮮豔血紅或橙紅色，故有『台灣紅寶石』之稱，正式學名為樟薄孔菌 *Antrodia cinnamomea*，又名牛樟芝、牛樟菇、樟菰、紅樟菇...等(張東柱、周文能，2005)。

台灣原住民是樟芝最早的使用者。對於樟芝的療效，早期傳說原住民因特有的飲酒文化，飲酒過多導致肝病變，但在喝過樟芝的烹煮液之後，肝病竟不藥而癒，身強體健，且解酒效果一流，因此原住民將樟芝奉為上品(陳啟楨等，2001)。

### 1-2-1 樟芝之命名

樟芝正式學名出現於 1990 年，第一次發表時，因標本沾染了靈芝孢子而被誤發表為靈芝屬，將其命名為 *Ganoderma camphoratum*。張東柱等人於 1995 年，針對樟芝子實體外觀、氣味、生長速度及孢子顯微鏡結構等進行研究，重新命名為 *Antrodia cinnamomea*，之後此兩種學名被證明代表同一種真菌，因而學名被合併為 *Antrodia camphorata*，而 *Antrodia cinnamomea* 被當作是同義名(Chang and Chou, 1995; Wu et al., 1997)。Wu 等人於 2004 年時將樟芝學名更改為 *Taiwanofungus camphoratus*，這是因為經由 LSU rDNA 序列分析結果，顯示 *Taiwanofungus camphoratus* 與 *Antrodia* 及 *Antrodiella* 的親緣性並不接近，認為樟芝不應屬於薄孔菌屬(*Antrodia*)，將其歸類在新屬-台芝屬(*Taiwanofungus*) (Wu et

al., 2004) 之中。但在 2005 年，又發現了一個問題，樟芝的寄主是牛樟並非樟樹，不該以樟樹的種名當作是樟芝的種名，故張東柱等人根據國際植物命名法規 ICBN Article 9.12 (Greuter et al., 2000)，將 *Ganoderma comphoratum* 與 *Antrodia camphorata* 認為混淆學名(*nomen confusum*)，且不再使用，並重新啟用 *Antrodia cinnamomea* 的學名。

### 1-2-2 樟芝的分類地位

樟芝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)。

樟芝子實體(圖1-1)含有高量精油散發出微微清香，屬多年生且無柄，菌蓋呈半圓形，直徑10~20 × 3~8 厘米，厚2~2.5 厘米 (張益軒，2001)。樟芝菌絲體平板培養、液態培養菌絲球及固態培養結果如圖1-2、圖1-3和圖1-4(林馨怡，2008、楊于萱，2010)。

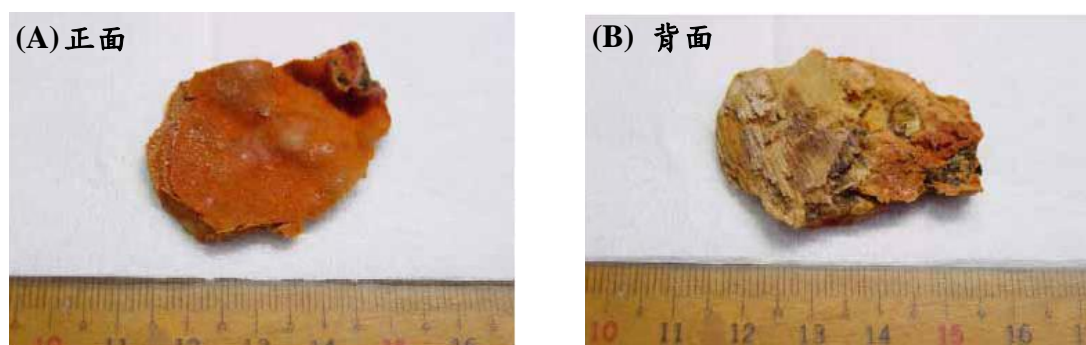


圖 1-1 樟芝子實體(張益軒，2001)



圖 1-2 樟芝平板培養(楊于萱，2010)



圖 1-3 樟芝液態培養之菌絲球(林馨怡，2008)



圖 1-4 樟芝固態培養 (楊于萱，2010)



### 1-3 樟芝生理活性成分

傳統上樟芝被作為治療的中草藥，民間相傳具有治療食物中毒、腹瀉、腹痛、癌症、糖尿病、高血壓、肝硬化、尿毒症、尿蛋白過高、以及解毒、消炎、解酒、保肝、抗老化等功效。而樟芝主要生物活性成分多來自於大分子的多醣體 (polysaccharides)、小分子的三萜類化合物 (triterpenoids) 及固醇類化合物 (steroids)，其中多醣體可提升人體免疫力及抑制 B 型肝炎病毒，三萜類與抗癌、保肝有關，固醇類則具消炎效果。近年許多研究顯示，樟芝具有極佳抗氧化能力及抑制腫瘤細胞增生等多種生理功能 (Hsiao et al., 2003; Lee et al., 2002; Song and Yen, 2002)。

#### 1-3-1 多醣體

所謂多醣體，是由單醣聚合而成，這些多醣類在構成醣的種類、化學結合方式、分子大小與性質分面都會有差異，同時也會因品種或抽出方法不同而有所差異。一直以來，藥用菇類的多醣體是許多研究的重要主題，許多研究發現菇類純化後的多醣體具有抗腫瘤作用，且均具有 $\beta$ -D-葡聚醣的結構。

目前這些菇類菌體所含多醣體，常被視為制癌劑的原料。菇類多醣體大多由 $\beta$ -1,3-glucan鍵結主鏈及 $\beta$ -1,6-glucan鍵結支鏈所組成，而不同來源的多醣體，會造成重複結構的分支度及聚合度的不同。而樟芝所含 $\beta$ -D-葡聚醣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。可從X-ray繞射分析中知道，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(水野卓和川合正允，1997)。

多醣體的生理活性可依其分子量大小區隔為三類，分子量在 $3\sim 5\times 10^3$  Da 具有降血糖的功能；在 $1\sim 10\times 10^4$  Da 具有消炎的功效；在 $3\times 10^4$  Da 以上即具有抗腫瘤的療效，且分子量越大效果越佳。而根據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。樟芝採用液態發酵時，發酵液中的多醣(胞外多醣)分子量為 $1.1\sim 100\times 10^4$  Da，而菌絲體的多醣(胞內多醣)分子量為 $7.6\sim 10\times 10^5$  Da (李宛蓁，2003)。

菇類多醣體主要功用：(1) 傳遞細胞間訊息，尤其是免疫細胞間活性傳遞。(2) 活化體內巨噬細胞進行吞食作用，亦會引發補體活化反應。(3) 增強參與效應細胞(effector)活化的間白血球素interleukin(IL-1,IL-2)及干擾素(IFN- $\gamma$ )等的產生。(4) 增強寄主免疫機能而抑制癌細胞增殖或將其排除。從研究報告發現，多醣體並非對癌細胞直接作用，而是透過人體免疫力的提升來抑制癌細胞，如活化巨噬細胞、T細胞、自然殺手細胞(NK)等效應細胞，並促進抗體的產生。因此即使長期大量使用菇類多醣體，安全性頗高，可以和外科療法、化學療法等合併使用(Yang et al., 2009)。

樟芝菌絲體具療效成分主要為多醣體，包括胞外多醣(發酵液萃取)及胞內多醣(菌絲體萃取)。胞外多醣的療效主要為抗腫瘤、增強免疫力、降血壓及降血糖

等，可被用於抗腫瘤藥劑(免疫力提升劑)，優點是幾乎無副作用；胞內多醣的療效為抗B型肝炎病毒活性(anti-hepatitis B virus activity)，但不會對正常細胞有毒殺作用(cytotoxic effect)，在體內及體外實驗中，無法毒殺但可抑制白血病細胞(leukemic cells)的增殖。另外樟芝菌絲體的胞內多醣也具有抗血管增生作用的化學特性和抗炎效應(Chen et al., 2007; Cheng et al., 2005; Lee et al., 2002; Liu et al., 2007)。

### 1-3-2 三萜類

萜類(terpene)是由碳氫化合物或脂質代謝而產生，以異戊二烯為單體之化合物，分子組成通式 $(C_5H_8)_n$ ，普遍存於植物界的化合物，在動物界為數甚少。萜類的主要分類法是依據分子中異戊二烯單體數目，將含有兩個異戊二烯為單萜(monoterpene)；含有三個異戊二烯單體為倍半萜(sesquiterpene)；含有四個異戊二烯單體為雙萜(diterpene)；含有五個異戊二烯單體為二倍半萜(sesterpene)；含有六個異戊二烯單體為三萜(triterpene)。

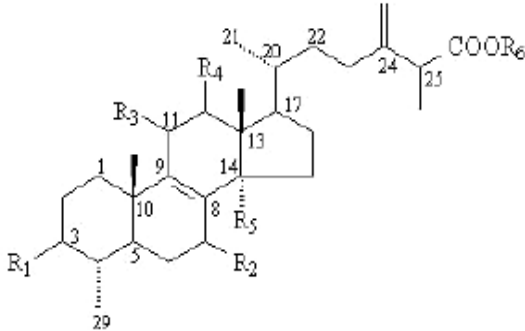
單萜和倍半萜多以萜烴或簡單含氧衍生物的形式存在於植物揮發油中，自然界常見的單萜存在於檸檬、橘子，而薄荷油中薄荷醇(萜醇)亦屬於單萜，玫瑰花油及其他植物中三萜醇(farnesal)屬於倍半萜。維生素A則屬於雙萜。鯊烯(squalene)為存在魚油中三萜，是少數存在動物之脂肪中的萜類。中藥中常用的人參、甘草、地榆等均含三萜，其藥理作用在臨床上效果是很顯著的(肖崇厚、陳蘊如，1989)。

過去樟芝三萜類化合物研究大都集中在化學成分分析和結構式建立，樟芝的子實體成份經過分析，發現大多為倍半萜類、三萜類、固醇類、酚類及二酚類等化合物(Chiang et al., 1995)。這些從樟芝子實體純化出來的三萜類化合物主要區分為兩大類型，分別為Ergostane(麥角甾烷三萜類)型與Lanostane(羊毛甾烷三萜類)型，其結構分別如表1-1 (張怡潔，2003)及表1-2 (Yang et al., 1996)所示。在1995年時由Cherng和Chiang從樟芝子實體萃取物中發現三種以Ergostane型為骨架之三萜類化合物：Antcin A、Antcin B、Antcin C (Cherng and Chiang, 1995)。到了1996年時，Cherng和Chiang再度發現4種新的三萜類化合物：Antcin E、Antcin F、methyl antcinate G和methyl antcinate H (Cherng et al., 1996)。而Yang等人則在同年發現了兩種以Ergostane型為骨架的新化合物：Zhankuic acid D、Zhankuic acid E。以及三種以Lanostane型為骨架的新化合物：15 $\alpha$ -acetyl-dehydrosulphurenic acid、dehydroeburicoic acid、dehydrasulphurenic acid (Yang et al., 1996)。

經研究指出，樟芝子實體確實含有獨特的三萜類化合物，其中Antcin A經藥理研究證實具有抑制老鼠血癌細胞毒素的活性，而Antcin B則具有抗副交感神經作用及抗血清素活性(Cherng and Chiang, 1995)。經初步藥理研究發現，zhankuic acids A和C 對P-388小鼠白血病細胞毒性，IC<sub>50</sub>值為1.8和5.4  $\mu$ g/ml (Chen and Yang, 1995)。Yeh從樟芝子實體分離出8種三萜類化合物，其評估對各種癌症細胞抑制效果，發現以3種ergostane型(Methyl antcinate B、Zhankuic acid A和Zhankuic acid C)的三萜類化合物所顯示的細胞毒性最強，可誘導大腸癌細胞、肝

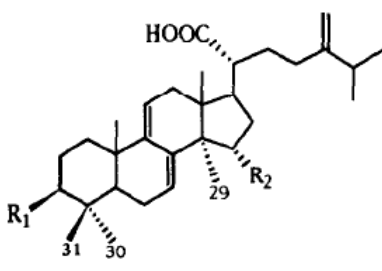
癌細胞、乳房癌細胞及肺癌細胞凋亡，IC<sub>50</sub>值為22.3-75.0 μM之間，但對正常細胞(MCF10A及HS68)則沒有傷害(Yeh et al., 2009)。

表 1-1 樟芝子實體中所含三萜類 Ergostane 型化合物(張怡潔，2003)

						
Compound name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
Antcin A	= O	H <sub>2</sub>	= O	H <sub>2</sub>	H	H
Antcin B (Zhankuic acid A)	= O	= O	= O	H <sub>2</sub>	H	H
Antcin C	= O	β-OH	= O	H <sub>2</sub>	H	H
Antcin D (Zhankuic acid F)	= O	= O	= O	H <sub>2</sub>	OH	H
Antcin E	= O	H <sub>2</sub>	= O	H <sub>2</sub>	---	H Δ <sup>14</sup>
Antcin F	= O	β-OH	= O	H <sub>2</sub>	--	H Δ <sup>14</sup>
Antcin G	= O	α-OAc	= O	H <sub>2</sub>	H	H
Antcin H (Zhankuic acid C)	α-OH	= O	= O	α-OH	H	H
Antcin I (Zhankuic acid B)	α-OH	= O	= O	H <sub>2</sub>	H	H
Methyl antcinate A	= O	H <sub>2</sub>	= O	H <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>
Methyl antcinate B	= O	= O	= O	H <sub>2</sub>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Methyl antcinate G	= O	α-OAc	= O	H <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>
Methyl antcinate H	α-OH	= O	= O	α-OH	H	CH <sub>3</sub>
Zhankuic acid E	α-OH	= O	= O	α-OH	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

Methyl antcinate A = Methyl-4α-methylergost-8,24(28)-dien-3,11-dione-26-oate  
Methyl antcinate B = Methyl-4α-methylergost-8,24(28)-dien-3,7,11-trione-26-oate  
Methyl antcinate B = Zhankuic acid D

表 1-2 樟芝子實體中所含三萜類 Lanostane 型化合物(Yang et al., 1996)

		
Compound name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
15 $\alpha$ -acetyl-dehydrosulphurenic acid	OH	OAc
Dehydroeburicoic acid	OH	H
Dehydrasulphurenic acid	OH	OH

### 1-3-3 總多酚

多酚類化合物是指天然分子結構中，苯環上含有數個羥基(-OH)的化合物總稱，包括單寧酸 (tannins)、木質素 (lignins) 及黃酮類化合物 (flavonoids) 等。其幾乎存在於所有的陸上植物，在生物體內具有防禦紫外線傷害、調節生長機能、抵抗細菌與病蟲害與抑制植物體過氧化反應等功能。多酚類化合物種類很多，可將多酚類進一步分成單元體多酚 (monomer polyphenol) 及聚合體多酚 (polymer polyphenol)。其生成路徑主要是由醣解作用及五碳醣代謝路徑合成莽草酸 (shikimic acid)，再經由莽草酸路徑 (shikimic acid pathway) 生成肉桂酸 (cinnamic acid)，進而生成多酚類化合物(朱燕華，1995)。

流行病學研究顯示，飲食中提高蔬果類的攝取量可有效降低許多由氧化所引起的疾病發生率，當每日從水果和蔬菜中攝取一克以上多酚化合物，將具有抑制

人體基因突變和致癌發生的效果(Tanaka et al., 1998)。天然多酚類化合物具有抗氧化活性，可終止自由基引起的油脂過氧化反應，在穩定脂質氧化上扮演著重要角色，故在生物體中具有非常好的防禦系統來保護生物體受到活性氧引起之氧化壓力所帶來的傷害。同時可以抑制壞膽固醇氧化，因此被認為是對抗心血管疾病的高手。並且低濃度下可延緩食品或生物體中碳水化合物、脂質及DNA等基質被氧化，故被視為重要的天然抗氧化劑(Shahidi and Wanasundara, 1992; Yen et al., 1993)。絲狀真菌是二次代謝生理活性物質的主要來源，在樟芝菌絲體水萃液的抗氧化研究中，發現其總多酚具有強烈抗氧化能力及自由基掃除活性，為樟芝菌絲體中主要抗氧化成分(Song and Yen, 2002)。

多酚類在抗癌的效果上，也有不錯的表現。癌症研究領域上分為兩大主要方向。首先為抗癌能力的研究，篩選或研發具專一性誘導癌細胞進行細胞凋亡(apoptosis)作用的藥物，而此藥物對正常細胞無毒性或低毒性。天然植物多酚類化合物被證實，在對正常細胞沒有細胞毒性的藥物濃度下，可以成功的誘導多種癌細胞進行細胞凋亡，因而有抑制癌細胞生長的良好功效(Mariadason et al., 2000; Wenzel et al., 2000)。其次是針對癌症預防的研究，主要是朝向如何利用天然藥物來預防或降低癌症的發生。TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate)是很強的細胞癌化促進劑，利用致癌劑TPA誘導細胞進行癌化作用，同時觀察天然物對此癌化作用的影響程度，是現今化學預防藥物篩選常用的研究模式。在TPA所誘導之癌化作用上，

天然多酚類化合物已被證明確實可以有效的抑制癌化作用進行(Chen et al., 1999; Liang et al., 1999)。



## 第二章 樟芝兩階段深層培養

由前述可知，樟芝獨特的三萜類化合物具有非常好的療效，但三萜類在樟芝菌絲體中含量卻不高。本實驗主要結合搖瓶與靜置兩階段菌絲體培養，經由改變兩階段溶氧，提升菌絲體三萜類含量。並探討溫度與 pH 值兩階段遷移培養效果，進而了解樟芝生長與二次產物代謝時的環境差異。

### 2-1 前言

深層(液態)培養(submerged fermentation)，一般是指使用固定組成之液態培養基，在適當的pH值、溫度、通氣及攪拌(或震盪)的控制條件下，進行微生物的發酵培養，以製造生質(biomass)或其他代謝物(metabolite)。

菇類的深層培養最大特色是發酵過程中並無孢子萌發期(sporulation)，菌絲體因為凝聚糾結成球狀物並向四周輻射狀擴散生長，以球形懸浮在培養液體中，此稱菌絲球(pellets)。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。而菌絲體在不同培養條件下可產生直徑1~20 mm不同的菌絲球，一般而言，搖瓶培養無攪拌葉片，菌絲體所受剪切應力較小，菌絲球不易被打散，所產生的菌絲體會較發酵槽的大。

在生化反應的過程中，因為細胞內和細胞外因子相互作用影響的結果，使得微生物能夠生長並產生代謝物。細胞內因子包括微生物的繁殖及一些遺傳上複製、轉錄和移轉的控制機構。而細胞外因子包括物理因素和化學因素，其中物理

因素主要是由溫度、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，例如：碳源、氮源等所構成(楊芳鏘、楊明哲，2001)。

### 2-1-1 物理因素

蕈類菌絲體液體培養溫度在22~28°C時，可以獲得較好的生長速率與產量。針對樟芝生長而言，根據黃惠琴研究，最佳生長溫度為25°C，低溫時菌絲生長顯得遲緩，高溫時菌絲體顏色較深，菌絲球密度較低(黃惠琴，2001)。發酵槽樟芝液態培養，控制在不同溫度(24~32°C)下，雖然適合菌體生長，但菌體重量差異不小；就三萜類而言，顯示低的溫度(24°C)對三萜類的生長有促進的作用(陳書豪，2006)。

一般而言，蕈類菌絲生長的pH值範圍很廣，根據Yang等人研究，樟芝菌絲體對初始pH值有相當大的生存範圍(pH值2 ~ 8)，但在低或高pH值時菌體成長效果很差，而以pH值5時效果最好(Yang et al., 2003)。在不同起始pH值的靈芝培養，從初始pH值6.5逐步降低到pH值3.5，將導致菌體濃度由17.3降至13.8g/L，但產生較高的胞外多糖和胞內多糖，在初始pH值5.5時，靈芝酸(三萜類)將有較高含量12.5 mg/g DW，而產量則是pH值 6.5的207.9 mg/L較高(Fang and Zhong, 2002a)。Tang等人利用發酵槽進行靈芝pH值兩階段培養，先控制pH值在3.0培養四天，然後改變pH值(3.0、4.5和5.5)再持續培養，結果顯示將第二階段pH值控制在4.5時，有較高靈芝酸含量與產量(321.6 g/L) (Tang et al., 2009)。由上述得知，

菌體合成三萜類之最佳pH值，與菌體成長最佳pH值明顯不同。而且兩階段培養，第二階段pH值控制在酸的環境(pH值4.5)，菌體將有較高三萜類含量。

液體培養之優越性乃決定於培養狀態是否能維持其均勻特性。以三角瓶液體培養時，可用振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要的基質分配均勻，並促進質量及熱量傳遞之效率。在樟芝搖瓶培養中，較高的表面通氧有利於樟芝菌體生長，但表面通氧量過多並不利於樟芝菌體生長，因為過度震盪造成劇烈擾動，不利於菌絲球形成及菌體生長(黃惠琴，2001)。在不同溶氧下的靈芝培養，菌體生長與累積靈芝酸的結果將不同，高溶氧狀況下，菌體生長較快但靈芝酸累積低；但若要合成靈芝酸，則以低溶氧量較佳，但菌體生長將較慢。Tang和Zhong利用發酵槽培養靈芝，將溶氧分別控制在10%和25%飽和溶氧，發現在25%高溶氧時，菌體濃度可達14.7 g/L，而靈芝酸含量為32.2 mg/g DW；而在10%低溶氧時，菌體濃度僅有4.8 g/L，但靈芝酸含量高達43.9 mg/g DW (Tang and Zhong, 2003)。Shih發現樟芝菌體生長和累積三萜類與上述結果相似(Shih et al., 2006)。Fang and Zhong使用三角瓶進行兩階段溶氧靈芝培養，先進行傳統搖瓶培養四天，讓菌絲體快速成長，然後接著靜置培養，讓菌體產生靈芝酸，成功的將靈芝酸含量由控制組的13.6 mg/g DW提升至31.9 mg/g DW，因此大幅提升靈芝酸產量(Fang and Zhong, 2002b)。Tang等人利用發酵槽進行兩階段溶氧靈芝培養，先控制在25%飽和溶氧培養，然後在不同時間(4、6、8和10天)，改變成10%飽和溶氧再持續培養，結果發現在第6天改變溶氧，有較高

靈芝酸含量與產量(487.1 g/L)。最後Tang等人結合fed-batch、pH-shift和DOT-shift策略，進行兩階段發酵槽靈芝培養，成功將靈芝酸產量提升到754.6 g/L (Tang et al., 2009)。上述靈芝液態培養產靈芝酸文獻整理如表2-1。

表 2-1 靈芝液態培養產靈芝酸文獻整理

培養特色	靈芝酸含量 (mg/g DW)	靈芝酸產量 (mg/L)	培養天數 (day)	備 註
改變初始 pH 值	12.5 (pH 值 5.5)	207.9 (pH 值 6.5)	8	Fang and Zhong, 2002a
pH 值兩階段培養(pH 3 四天、再 pH 4.5)		321.6	10	Tang et al., 2009
10% 溶氧發酵槽靈芝 培養	43.9		9	Tang and Zhong, 2003
兩階段溶氧(搖瓶培 養四天後靜置)	31.9		12	Fang and Zhong, 2002b
溶氧兩階段培養 (25% 六天再 10%)		487.1	12	Tang et al., 2009
fed-batch、pH-shift 和 DOT-shift 策略		754.6	12	Tang et al., 2009

### 2-1-2 化學因素

凡是構成蕈類細胞和生產代謝產物所需的碳基來源營養物質均稱為碳源。碳源對於微生物生長很重要，其主要作用為構成細胞物質和供給菌種所需能源。Yang等人針對不同碳源對樟芝菌絲進行液態培養，發現以玉米粉為碳源時可得最大菌體濃度，高於葡萄糖、蔗糖及馬鈴薯澱粉碳源，且其菌絲球呈現小而密的

顆粒(Yang et al., 2003)。Shih等人針對不同碳源(乳糖、蔗糖、麥芽糖、果糖和葡萄糖)對樟芝菌絲進行液態培養，以葡萄糖(4%)為碳源菌體濃度最高，但多醣體相對低；胞外多醣則以乳糖、蔗糖為碳源時最高，但菌體濃度卻很低；三萜類含量則以低葡萄糖濃度(2%)時較高，此狀況下菌體濃度卻不高(Shih et al., 2006)。

氮是構成菌類蛋白質和核酸的主要元素，一般而言，氮源並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：例如銨鹽與其他含氮的無機鹽類如氯化銨、磷酸二氫銨、硝酸鈉等。(2) 有機氮源：例如豆餅粉、麩皮、胺基酸、尿素、玉米萃出液等。Yang等人針對不同氮源(酵母萃出物、YM Broth、黃豆粉、麥芽萃出物和磷酸二氫銨)對樟芝菌絲進行液態培養時，發現以黃豆粉為氮源培養時可得最大菌體濃度(Yang et al., 2003)。2006年Shih等人針對不同氮源(酵母萃出物、玉米粉和麥芽萃出物)對樟芝菌絲進行液態培養，以3%玉米粉為氮源時菌體濃度最高，但多醣體並不高；胞外多醣則以3%酵母萃出物為氮源時最高，但菌體濃度卻很低；三萜類濃度則以3%玉米粉濃度時較高(Shih et al., 2006)。

菌類進行液態培養時，在培養基中加入一些非離子型界面活性劑、油類與脂肪酸等物質，將會刺激菌絲的生長速率。Stasinopoulos and Seviour利用 *Acremonium persicinum* 產生多醣時，在發酵過程中加入消泡劑(如polypropyl glycol 2025等)或者在培養基裡添加蔬菜油或脂肪酸等，除了可達到消泡的目的外，還能夠對多醣體產量造成影響(Stasinopoulos and Seviour, 1990)。柯銀府等人

由脂肪酸添加靈芝培養中得知，油酸(oleic acid)、棕櫚酸(palmitic acid)與界面活性劑(Tween 60和Tween 80)似乎能夠刺激靈芝菌體生長與多醣的生成，而硬脂酸(stearic acid)對產生靈芝多醣有抑制作用(柯銀府等人，1998)。2006年Shih等人針對不同植物油類(大豆油、橄欖油、椰子油、葵花油和花生油)對樟芝菌絲進行液態培養時，以1%大豆油添加時菌體濃度最高；胞外多醣則以0.5%花生油添加時最高；而植物油均強烈抑制三萜類產生(Shih et al., 2006)。

碳氮比在蕈類液體培養是重要的控制因子，不但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。一般而言，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，蛋白質含量會明顯下降而影響營養價值。

無機鹽類，則會影響到菇類香味物質及菌絲體之胺基酸組成。如 $ZnCl_2$ 、 $CuSO_4$ 及 $NH_4^+$ 等可促進菌絲之生長速率。磷在生物體內是構成蛋白質、磷脂體、磷酸脂等成分可缺少的元素。在糖份分解的過程中，維生素為重要賦活劑(activator)。硫對於菌體構成成分或菌體生理作用扮演重要的關鍵。生長因子是維持蕈類生長所不可缺少的物質，一般常見的生長因子有葉酸、維他命 $B_{12}$ 、維他命 $B_6$ 、維他命K等(Papagianni, 2004)。

### 2-1-3 深層培養樟芝菌絲體功效

Hseu針對樟芝抗腫瘤功效進行一系列研究，證實深層發酵樟芝菌絲體

具抗腫瘤功效。樟芝菌絲體對體外培養的人類乳腺上皮細胞癌(MDA-MB-231)，具有誘導細胞凋亡功效，經樟芝治療的接種老鼠與對照組相比，能有效地延緩腫瘤的發病率與MDA-MB-231細胞增生，進而減少腫瘤的負擔；老鼠經樟芝治療後，腫瘤組織切片經組織學檢查，證實具有抑制增殖(cyclin D1和PCNA)和誘導細胞凋亡(Bcl-2和TUNEL)；另外樟芝在MCF-7乳腺癌細胞的生長抑制和誘導凋亡，也均有良好效果(Hseu et al., 2008; Yang et al., 2006; Yang et al., 2011)。而這些抗腫瘤功效的主要成份，認為來自樟芝液態發酵過程中，代謝產生的生理活性物質多醣體、總多酚和三萜類。

由上述文獻可知，樟芝菌體成長與生成二次代謝產物所需環境不同。本實驗希望藉由樟芝兩階段菌絲體的深層培養，先進行最佳菌體成長(較高溶氧、溫度和適當pH值)，待菌體濃度達到高濃度後，改變成進行合成三萜類環境(較低溶氧、溫度和適當pH值)，進而提昇樟芝三萜類含量，並探討樟芝生長與二次產物代謝時的環境差異。

## 2-2 實驗材料與方法

實驗所採用的樟芝菌株為 *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℃培養箱生長，之後置於4℃冰箱中保存。

### 2-2-1 實驗藥品

本研究使用藥品列於表 2-2。

表 2-2 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
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	ECHO
$\text{CH}_3\text{COOK}$	ECHO
Phenol	聯工
99.5% Sulfuric acid	Scharlau



I <sub>2</sub>	KANTO
KI	KANTO
D(+)-glucose	SIGMA
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	SHOWA
NaHCO <sub>3</sub>	SHOWA
水溶性澱粉	Riedel-deHaën
Agar	BD

### 2-2-2 實驗儀器與設備

本研究主要儀器與設備列於表 2-3。

表 2-3 實驗儀器清單

儀器設備	型號	廠牌
pH meter	Cyberscan pH510	美國 EUTECH
電磁加熱攪拌機	C-MAG HS7	德國 IKA
高壓滅菌釜	HI-340	台灣宏霖
無菌操作台	JW-4N	台灣亮盛
試管振盪器	MSI minishaker	德國 IKA
迴轉式震盪培養箱	LUS-150	台灣亮盛

往復式震盪恆溫水槽	OSI-500	台灣健鑫
分光光度計	GENESYS UV10	美國 Thermo
微電腦蒸餾水製造機	WSC044	英國 FISTREEM
超純水製造機	Simplicity	美國 Millipore
超音波震盪機	5210	美國 BRANSON
高速中型離心機	Universal-32R	德國 Hettich
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
均質機(polytron)	PT-2100	KINEMATICA

### 2-2-3 實驗方法

本研究之菌種培養、保存與實驗步驟敘述如下。

#### 2-2-3-1 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% 為斜面培養基，添加去離子水混合均勻後，置入滅菌釜殺菌 20 分鐘。滅菌完成，取出放入無塵無菌操作台，倒入試管中，傾斜放置待其冷卻備用。接菌時，取一白金鉤過火焰，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。

#### 2-2-3-2 培養皿平面培養

樟芝培養皿平面培養基和斜面培養基配方相同，滅菌完成後，取出放入無塵無菌操作台，倒入培養皿中待其冷卻備用。接菌時，取一已長有樟芝菌絲之斜面菌種，以滅菌白金鈎刮取一小塊移至空白培養皿中央，放入 25°C 培養箱中靜置活化培養。

#### 2-2-3-3 種菌的製備

本實驗種菌所採用的液態培養基組成成份為：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，使用滅菌後鋁片切割器切出 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內含 100 ml 液態培養基的 250 ml 三角瓶中。接菌完成後，置於 25°C 迴轉恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 10 天。

#### 2-2-3-4 三角瓶液態基礎培養試驗

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 (黃惠琴, 2001), 以玉米澱粉(corn starch)為碳源, 氮源則是採用 YM Broth, 其組成為 4.78%的玉米澱粉、3.19%的 YM Broth, 添加去離子水混合, 並利用 0.1N HCl 及 0.1N NaOH, 將培養基 pH 值調整為 5.54。

將培養 10 天後的種菌, 經滅菌的均質機(polytron)攪碎菌絲球, 並以 10%的接菌量加至 6 個內含 100 ml 液態培養基的 250 ml 三角瓶中, 放入 25°C迴轉式恆溫培養箱, 以轉速 100 rpm 培養, 在 7、14、17、19、21、28 天各取樣一瓶, 經過濾收集菌絲體, 經冷凍乾燥後測量菌體乾重, 待磨粉後進行三萜類含量、總多酚含量、胞內多醣含量等測試。重複實驗三次。

#### 2-2-3-5 兩階段培養溶氧變化試驗

此實驗目的為探討靜置培養造成溶氧改變對樟芝代謝有效成分之影響。兩階段培養為結合搖瓶與靜置的培養方法, 將培養 10 天後的種菌, 經滅菌的均質機攪碎菌絲球, 並以 10%的接菌量加至 19 個內含 100 ml 液態培養基的 250 ml 三角瓶中, 然後放入 25°C迴轉式恆溫培養箱, 以轉速 100 rpm 培養。第 7 天取樣 1 瓶及取 3 瓶靜置於培養箱中; 第 14 天取樣 2 瓶(含靜置 1 瓶)及取 4 瓶靜置; 第 17 天取樣 2 瓶(含靜置 1 瓶)及取 3 瓶靜置; 第 19 天取樣 3 瓶(含靜置 2 瓶)及取 2 瓶靜置; 第 21 天取樣 5 瓶(含靜置 4 瓶)及取 1 瓶靜置; 第 28 天取樣 6 瓶(含靜置 5 瓶)。取樣後過濾收集菌絲體, 經冷凍乾燥測量菌體乾重, 待磨粉後進行

三萜類含量、總多酚含量、胞內多醣含量等測試。重複實驗三次。

#### 2-2-3-6 兩階段培養溫度變化培養試驗

此實驗目的為探討兩階段溫度改變對樟芝代謝產物之影響。將培養 10 天後的種菌，經滅菌的均質機攪碎菌絲球，並以 10% 的接菌量加至 4 個內含 100 ml 液態培養基的 250 ml 三角瓶中，然後放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養。第 21 天改變培養溫度，進行四種不同溫度培養(15°C、20°C、25°C、30°C)，第 28 天取樣，取樣後過濾收集菌絲體，經冷凍乾燥測量菌體乾重，待磨粉後進行三萜類含量、總多酚含量、胞內多醣含量等測試。重複實驗三次。

#### 2-2-3-7 兩階段培養 pH 變化培養試驗

此實驗目的為探討兩階段 pH 值改變對樟芝代謝產物之影響。在第一階段培養，將培養 10 天後的種菌，經滅菌的均質機攪碎菌絲球，以 10% 的接菌量加至 4 個內含 100 ml 液態培養基的 250 ml 三角瓶中，放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養培養 21 天，最後 pH 值降為 4。第二階段培養時，改變培養 pH 值，進行四種不同 pH 值培養(3、4、5、6，其中 pH 值 4 為控制組)，再培養七天後取樣(共 28 天)，取樣後過濾收集菌絲體，經冷凍乾燥測量菌體乾重，待磨粉後進行三萜類含量、總多酚含量、胞內多醣含量等測試。重複實驗三次。

## 2-2-4 分析方法

### 2-2-4-1 菌體濃度

取適當液態培養發酵液，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。

### 2-2-4-2 pH 值測定

以 pH meter 量測培養發酵液之 pH 值。

### 2-2-4-3 澱粉分析方法

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 OD 值作出標準檢量線(附錄一)。

取 1 ml 發酵液在 8000 rpm 離心 5 分鐘後，取 0.4 ml 稀釋發酵液，加入 0.2 ml 1 M HCl 及 0.4 ml H<sub>2</sub>O 使酵素失活，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，再依標準檢量線定出澱粉濃度(g/L)。

#### 2-2-4-4 胞內總多酚含量測定

酚類化合物在鹼性的環境下能與Folin-Clocalteu's phenol 試劑形成可溶性的藍色化合物，在730 nm有最大的吸收值，吸收值越大，表其中所含的酚類化合物越多，以Gallic acid為標準檢量線(附錄二)，對照樣品中的酚類化合物含量多寡 (Singleton et al., 1965)。

取菌絲體，以固定倍數(1:20)之甲醇於50 °C，130 rpm的恆溫水槽內萃取十二小時，接著以8000 rpm離心5分鐘，所得上清液即為甲醇萃取液。取0.3 ml的甲醇萃取液，加入6 ml 2%的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>，均勻混和反應2分鐘之後再後加入0.3ml 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Gallic acid 檢量線，計算總酚類的含量。

#### 2-2-4-5 胞內多醣濃度測定

酚-硫酸法 (Phenol-sulfuric acid assay) 檢測多醣體含量，係利用許多多醣體具有的還原能力：單醣、寡醣、多醣與它們的衍生物，包括二甲醚自由基團或具有還原能力的基團，其與酚及濃硫酸作用時會生成黃色的呈色反應，之後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

計測量其在波長 490 nm 下之吸光值，利用所測量 OD 值作出標準檢量線(附錄三)。對照葡萄糖標準品濃度與吸光值標準檢量線，即可求得多醣濃度 (Chaplin and Kennedy, 1994)。

取乾菌絲體 100 mg 粉末，加入 10 ml 蒸餾水，放入滅菌釜滅菌四十分鐘，再以 8000 rpm，離心 5 分鐘，收集之上清液即為胞內多醣粗萃取液。將胞內多醣粗萃取液與 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 8000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，將沉澱物烘乾。將此沉澱物加入氫氧化鈉回溶，並將樣品經適度稀釋後，以酚-硫酸法測定其胞內多醣濃度。

#### 2-2-4-6 胞內三萜類含量測定

依 Tsujikura 等人三萜類含量測定實驗方法修改(Tsujikura et al., 1992)，以 ursolic acid 為標準品，計算三萜類含量的標準檢量線如附錄四。

取乾菌絲 100 mg，加入 50% 的乙醇 3 ml 萃取 12 小時，以超音波震盪萃取 30 分鐘，萃完後以 8000 rpm 離心 5 分鐘，取出上清液，將殘渣再加入 50% 的乙醇 3 ml 萃取 12 小時，重複上述動作，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 氯仿以超音波震盪萃取 30 分鐘，取下層液體加入 3 ml 5% 的  $\text{NaHCO}_3$ ，並以超音波震盪萃取 30 分鐘，之後調整液體 pH 值至 3 以下，取下層液體減壓濃縮至乾，加入 2 ml 乙醇，在波長 245 nm 下測其吸光值。



## 2-3 實驗結果與討論

本研究在初始pH值5.54、25°C和100 rpm環境下，進行樟芝菌絲體液態培養，觀察菌絲體生長情形及生理活性物質代謝。由於菌絲體生長緩慢，培養初期無明顯變化，而且碳源為不可溶性玉米澱粉，培養基呈現濃稠狀，直至培養7天時，澱粉已大量消化，發酵液才轉為澄清，故選擇從第7天開始測量各項數據。

### 2-3-1 樟芝液態基礎培養試驗

圖2-1是樟芝液態基礎實驗的菌絲體成長曲線與代謝產物累積圖，發現胞內多醣為生長連動產物(growth-associated product)，初期澱粉消耗迅速，樟芝菌絲體在第14天成長至最大值(12.53 g DW/L)，同時也合成累積出最多胞內多醣(153.74 mg/g DW)。但14天後澱粉消耗完畢，在無外部碳源提供菌絲體生長，細胞開始生成水解酵素分解胞內多醣，產生較易被菌體吸收利用之小分子醣類，維持基本新陳代謝，故培養14天後菌絲體胞內多醣含量迅速下降，但菌體濃度僅緩慢下降，並無大量死亡之跡象。

另一方面，總多酚和三萜類化合物似乎為混合型生長連動產物(mixed-growth-associated products)，前14天總多酚含量隨菌體濃度增加而增加，在14天後總多酚含量趨於平緩震盪，第28天時總多酚含量達到5.95 mg/g DW。三萜類含量在培養前期亦隨著菌體濃度增加而增加，但當14天後菌體濃度逐漸下降時，二次代謝產物三萜類卻持續上升，培養第28天後達10.48 mg/g DW。

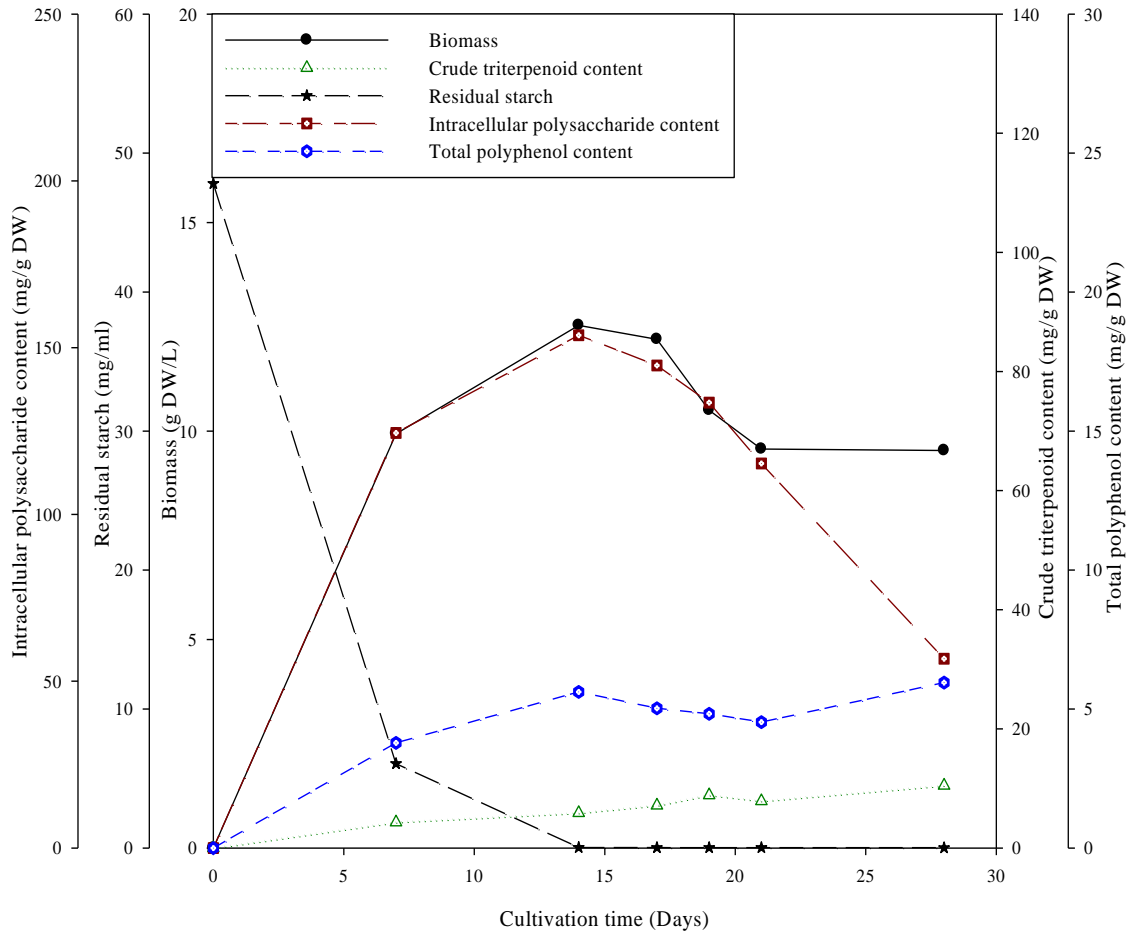


圖 2-1 樟芝菌絲體基礎培養生長曲線及生理活性產物

培養基成份：Corn starch (4.78%)、YM broth (3.19%)。

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

### 2-3-2 樟芝液態兩階段培養試驗

一般而言，菌體成長與二次代謝所需的環境是不同的，樟芝菌絲體在成長過程若累積過多萜類，將會阻礙樟芝菌絲體生長。因此透過兩階段培養，先進行最佳菌體成長，待菌體濃度達高濃度後，再改變環境讓樟芝菌絲體進行二次代謝，提昇樟芝三萜類含量。

樟芝液態基礎培養為控制組，而在培養不同天數後開始靜置的搖瓶為實驗組。由圖 2-2(A)發現，菌體在前 14 天於成長期，生長活力較旺盛，需要大量氧氣維持生長，一旦開始靜置後，面臨溶氧量大幅下降，菌體為了適應環境改變，必須改變其生長代謝途徑，造成菌體濃度大幅下降。但當菌體處於衰退期(decline phase)，生長速率已經小於死亡速率，需氧量降低，開始靜置後，面臨溶氧量大幅下降，雖然也改變其生長代謝途徑，但對菌絲體濃度並無太大影響，此與控制組趨勢相同。若觀察菌絲體形狀，控制組的菌絲球呈現小顆圓球狀，經靜置後的菌絲球較大且呈現橢圓球狀，乃因溶氧量不足，使菌絲球的生長不良，大顆菌絲球無法繼續分裂形成小顆粒的菌絲球，因此顯示太早靜置對菌絲體成長不利。

控制組的胞內多醣含量在第 14 天取樣時為最大值(153.74 mg/g DW)，之後隨著培養時間的增加而呈現下降的趨勢。由圖 2-2(B)顯示，所有經過靜置後的胞內多醣都呈現下降的趨勢，在培養前期第 7 天靜置，雖然發酵液中仍有碳源，但當溶氧量大幅下降，菌體也無法繼續成長，無法再繼續累積胞內多醣，所以胞內多醣含量與菌絲體均呈現下降趨勢。而第 14 天靜置時，碳源消耗完畢，無外部

碳源供給菌體基礎代謝，必須分解胞內多醣產生較易菌體吸收利用之小分子醣類維持基礎代謝，因此胞內多醣含量與菌絲體濃度均呈現下降趨勢，後期菌絲體濃度下降較緩，所以胞內多糖下降較緩和。

由圖 2-2(C)顯示，培養後開始靜置的總多酚含量先隨靜置天數增加而下降，然後在靜置培養後期時又緩慢上升。第 7 天開始靜置，溶氧量大幅降低，菌體成長受到抑制，同時合成總多酚也受到抑制，含量雖有增加但較控制組低蠻多的，14 天後總多酚含量持平震盪。其他靜置時間實驗結果與控制組有相同的趨勢，可推斷後期靜置對菌體合成總多酚沒有影響。其中在第 21 天靜置，第 28 天取樣時有較大總多酚含量為 6.21 mg/g DW (控制組為 5.95 mg/g DW)。

觀察圖 2-2(D)發現，在培養前期(前 14 天)靜置，菌絲體從搖瓶培養改變成靜置培養初期，因環境改變使菌絲體代謝路徑改變，菌體生成三萜類停頓，使三萜類含量下降，待菌絲體適應靜置培養環境後，代謝三萜類化合物能力提升，使三萜類含量增加。而在培養後期(14 天後)靜置時，因菌絲體已大量老化，合成三萜類的含量增加，又因將培養環境移至溶氧量少的靜置培養，在生長環境惡劣下，會促進樟芝菌絲體生產較多的二次代謝產物。在前期靜置的菌絲體三萜類含量均較控制組低，在後期靜置的三萜類在第 28 天取樣時可以達到趨近於控制組的值。其中在搖瓶培養到第 21 天取出靜置到第 28 天取樣，三萜類含量為最大值(22.30 mg/g DW)，為控制組(10.48 mg/g DW) 的 2.13 倍，故第 21 天時取出靜置，第 28 天取樣有最好的效果。

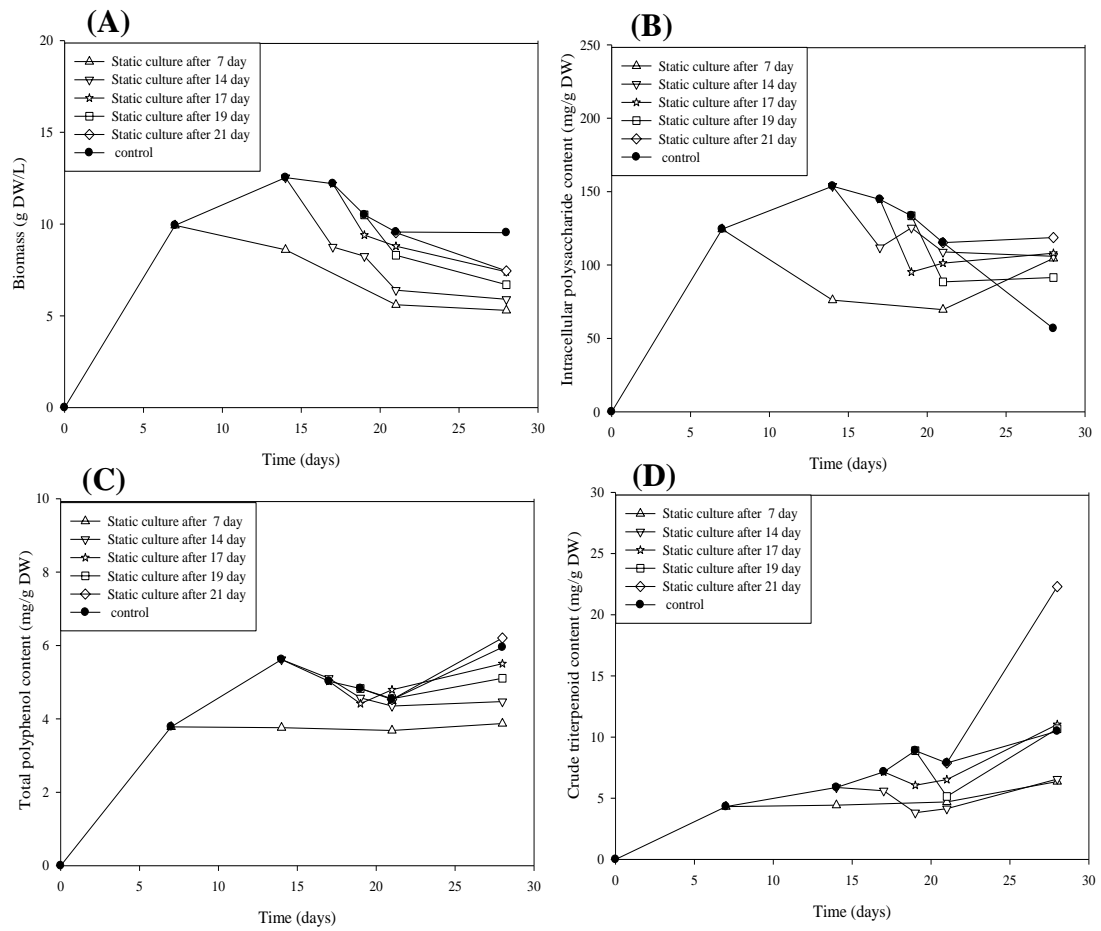


圖 2-2 不同天數靜置對樟芝菌絲體生長曲線及生理活性物質代謝影響

培養基成份：Corn starch (4.78%)、YM broth (3.19%)。

培養條件：接菌量 10%、初始 pH 值 5.54、培養溫度 25°C、轉速 100 rpm、靜置。

由兩階段溶氧培養實驗，發現在培養前期改變培養環境，會對三萜類生成造成抑制，而在第 21 天改變培養環境，則對三萜類生成具有大幅促進效果。因此，兩階段溫度培養及兩階段 pH 值培養，均選擇在第 21 天改變培養環境。

由圖 2-3 顯示，第二階段溫度過低(15°C)，菌絲體總多酚含量將下降至 5 mg/g DW 以下，而溫度過高(30°C)，菌絲體總多酚含量更下降至 3.60 mg/g DW，而 20°C 時菌絲體總多酚含量(6.48 mg/g DW)似乎和 25°C 控制組(5.95 mg/g DW)差不多(經過學生 t 測試(Students-t test)， $p > 0.05$ )，表示兩個溫度間菌絲體總多酚含量並無重大差異。

過去文獻指出，降低溫度可促使樟芝菌絲體合成較多的三萜類。由圖 2-4 同樣可發現菌絲體三萜類含量，隨著第二階段溫度降低而提升至 13.23 mg/g DW (20°C)，比控制組約高 26%。但若第二階段溫度繼續降溫至 15°C，菌絲體三萜類含量將下降至 5.45 mg/g DW。換言之，樟芝菌絲體生成三萜類的最佳溫度應該為 20°C 左右。

由上述可知，溫度會影響菌絲體總多酚合成，過高或過低的溫度均有礙於總多酚的生成，但 20~25°C 對菌絲體總多酚含量並無太大影響，就兩階段培養而言，溫度改變並無法提升樟芝菌絲體總多酚含量。在三萜類部分，則顯示低溫有助於菌絲體三萜類生成，但太低溫則有礙於三萜類生成，兩階段溫度培養對樟芝菌絲體三萜類含量有影響，但提升幅度並不像兩階段溶氧培養那樣大。

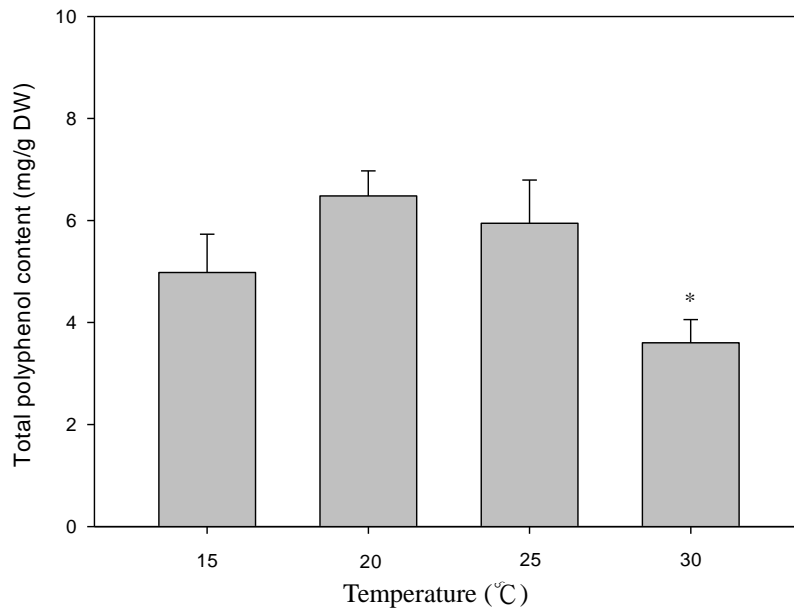


圖 2-3 第 21 天改變溫度對菌絲體合成總多酚的影響(\* $p < 0.05$  與控制組 25°C 比)

培養基成份：Corn starch (4.78%)、YM broth (3.19%)。

培養條件：接菌量 10%、初始 pH 值 5.54、初始培養溫度 25°C、轉速 100 rpm。

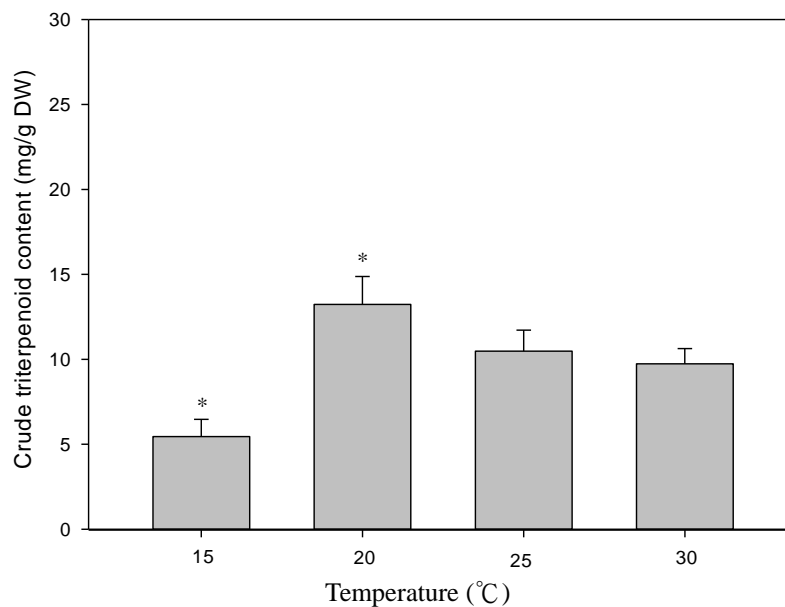


圖 2-4 第 21 天改變溫度對菌絲體合成三萜類的影響(\* $p < 0.05$  與控制組 25°C 比)

培養基成份：Corn starch (4.78%)、YM broth (3.19%)。

培養條件：接菌量 10%、初始 pH 值 5.54、初始培養溫度 25°C、轉速 100 rpm。

由圖 2-5 顯示，兩階段 pH 值培養對總多酚的影響，與兩階段溫度培養結果相似，過高或過低的 pH 值均有礙於總多酚的生成。第二階段 pH 值過低(3.0)，菌絲體總多酚含量將下降至 3.85 mg/g DW，而 pH 值過高(6.0)，菌絲體總多酚含量更下降至 3.51 mg/g DW，而 pH 值 5.0 的菌絲體總多酚含量(5.57 mg/g DW)似乎和 pH 值 4.0 控制組(5.95 mg/g DW)差不多，表示兩個 pH 值間菌絲體總多酚含量並無重大差異。由上述可知，兩階段 pH 值培養對菌絲體總多酚含量提升並無影響。

由圖 2-6 發現，控制組(pH 值 4.0)菌絲體三萜類含量較高，第二階段 pH 值調高，會大幅降低菌絲體三萜類含量，兩階段 pH 值培養對菌絲體三萜類含量並無提升效果。

## 2-4 結論

兩階段溶氧培養(第21天靜置)對樟芝菌絲體三萜類合成有良好的促進功效；但對總多酚合成則沒有促進效果。由兩階段溫度培養，發現降低溫度確實有助於樟芝菌絲體三萜類合成，但溫度過低則有反效果；過高或過低的溫度均有礙於總多酚的生成，但20~25°C對菌絲體總多酚含量並無太大影響。而在兩階段pH值培養，則發現調高pH值，會造成樟芝菌絲體三萜類含量大幅下降。總而言之，溶氧量為兩階段培養影響樟芝菌絲體合成三萜類的最大物理因子。



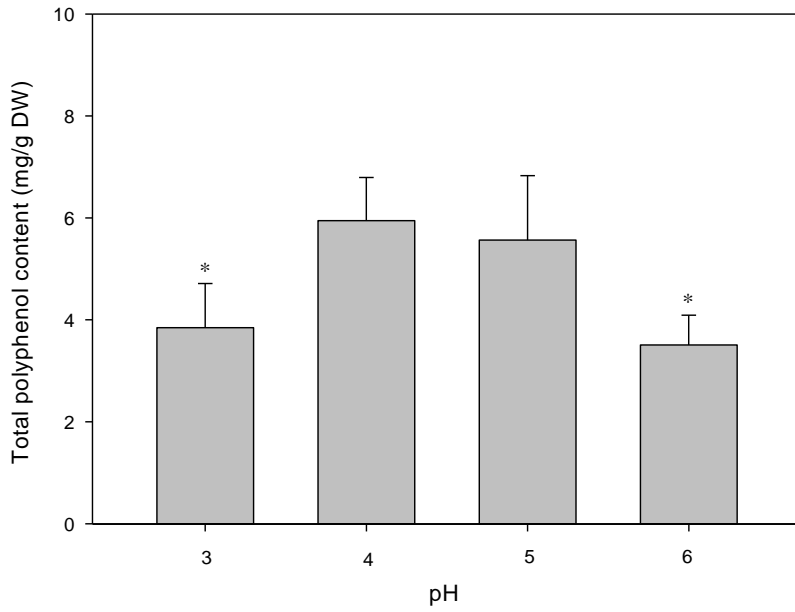


圖 2-5 第 21 天改變 pH 值對菌絲體合成總多酚影響(\* $p < 0.05$  與控制組 pH 4 比)

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

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

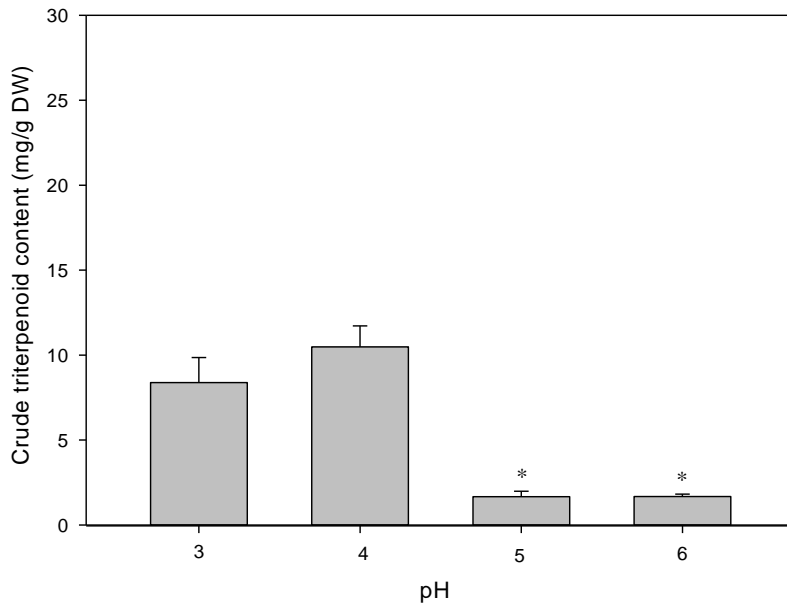


圖 2-6 第 21 天改變 pH 值對菌絲體合成三萜類影響(\* $p < 0.05$  與控制組 pH 4 比)

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

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



## 第三章 柑橘類果皮精油添加之樟芝深層培養

牛樟樹主要生長在台灣的中低海拔山區，因為樹形粗狀堅實，所以被稱為「牛」樟。牛樟樹皮具有非常濃郁的香氣，萜類化合物含量相當多，是雕刻的最佳材料。柑橘類果皮精油也具有濃濃香氣，並存有大量低分子量萜類化合物(單萜類為主)，適合擔任影響因子改變樟芝菌絲體代謝。

因此本實驗利用樟芝菌絲體的深層培養，透過兩階段培養的方式，先進行最佳菌體成長，待菌體濃度達到高濃度後，添加柑橘類果皮精油，抑制樟芝菌絲體 non-MVA 路徑代謝，進而有效地提升樟芝菌絲體中二次代謝物（三萜類）之產量。

### 3-1 前言

樟芝為目前台灣市場價格最昂貴的野生真菌(高達數十萬元/台斤)。雖然已成功地人工培育出樟芝子實體，但樟芝子實體生長極為緩慢且品質難以控制，沒有足夠數量作為藥物廣泛使用。因此，利用深層培養或固態培養，在有限空間、更短時間及不易污染的潛在優勢，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，以創造更大的經濟效應(Shih et al., 2006)。

#### 3-1-1 萜類合成機制

萜類化合物一般難溶於水，易溶於親脂性有機溶劑中，單萜和部份倍半萜等

低分子量萜類，常溫時多呈液體或低熔點的固體，具揮發性，能隨水蒸氣蒸餾而餾出。但隨著分子量增加，如部份多功能基的倍半萜、二萜、三萜等，化合物的揮發性將會降低，溶、沸點提高，成為具有高沸點的液體或結晶固體。這些萜類化合物的分子中大多包含雙鍵、共軛雙鍵、異丙烯基等，由於各種相似的結構部分和共同的表現，有助於波譜鑑定，並可利用這些表現的共同化學反應，提供各種化學方法對萜類成份進行分離純化(肖崇厚、陳蘊如，1989)。

在萜類化學的研究過程中，曾以為異戊二烯是萜類化合物在植物體中形成的單體，例如檸檬烯的蒸氣經氮氣稀釋後，均能獲得高產率的異戊二烯，反之將異戊二烯加熱到 280°C 時，兩個異戊二烯透過 Diels-Alder 反應聚合成單萜。但更多研究指出，在植物的代謝過程中很難找到異戊二烯，因此，把萜類化合物的碳架結構分成若干個異戊二烯構成的方法，只能做為對萜類化合物的結構和分類的一種識別法，不能代表萜類的生成路徑。

最初以為萜類的代謝路徑(圖 3-1)，只有 MVA 路徑(mevalonic acid pathway)，醋酸鹽經乙醯輔酶 A 作用，合成甲羥戊酸(mevalonic acid)，再經酵素催化作用成 IPP (isopentenyl diphosphate)，部分 IPP 再轉換成其同分異構物 DMAPP (dimethylallyl diphosphate)，然後兩者頭尾相接反應生成 GPP (geranyl diphosphate)，GPP 再與 IPP 反應生成 FPP (farnesyl diphosphate)，最後經酵素作用合成倍半萜或由兩個 FPP 合成鯊烯。

1990 年代後期，non-MVA 路徑的萜類生成陸續被發現，由植物及 eubacteria

發現 MEP 路徑(methylerythritol phosphate pathway)。此路徑以葡萄糖轉換成的 G3P (Glyceraldehyde-3-phosphate)和丙酮酸(pyruvate)為反應物，經由 MEP 路徑生成 HMBPP (1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate)，在酵素作用下生成 IPP 或其同分異構物 DMAPP，然後兩者頭尾相接反應生成 GPP，再轉換成單萜類，或兩個 GPP 合成 GGPP (geranylgeranyl diphosphate)，再轉換成二萜類(diterpenes)。並且證實 MEP 路徑在植物葉綠體反應，與 MVA 路徑在細胞質中反應是不同的，生成產物也不同(Tholl, 2006)。

Disch and Rohmer 研究發現真菌並無 MEP 路徑，但真菌可利用葡萄糖，經乙醯輔酶 A 作用，一樣可生成 IPP 或 DMAPP，並且利用同位素(<sup>13</sup>C)發現此路徑的 IPP 和 MVA 路徑的 IPP，可互相反應生成萜類(Disch and Rohmer, 1998)。2005 年證實酵母菌粒線體(mitochondrion)中還有一條白氨酸代謝路徑(leucine catabolism pathway)，由白氨酸開始反應，合成甲羥戊酸，再經酵素催化作用成 IPP 或 DMAPP，其餘與 MEP 路徑相同，稱為 MCC (3-methylcrotonyl-CoA carboxylase)路徑(Carrau et al., 2005)。

從各種同位素追蹤研究指出，不同路徑生成的 IPP 並非絕對獨立的存在。IPP 是不同路徑的共同中間體，也就是交匯處，因為兩條路徑所產生的 IPP 可以穿過質體膜為對方所用，相互合作生成各種萜類衍生物。在 *Matricaria recutita* 的合成研究表明，高等植物可由不同路徑同時產生 IPP，並且相互合作提供單體，合成倍半萜和二萜類化合物(Adam and Zapp, 1998)。甚至一些學者證實，當抑制固

醇生成，將同時刺激真菌生成萜類，乃是因為累積了過多的固醇前體，進而轉換生成萜類之故(Ratledge and Evans, 1989)。

三萜類的重要性是其鏈狀成員鯊烯為固醇的前體(圖 3-1)，在植物體內生成 sitosterane，在動物體內生成 cholestane，在真菌則生成獨有的麥角甾烷三萜類(ergostanes)，也就是樟芝子實體最特殊，並最具療效的三萜類(Summons et al., 2006)。

在動物或植物體裡，膽固醇(cholesterol)和羊毛脂醇(lanosterol)在生理或生化方面均扮演著非常重要的角色。研究證實膽固醇和羊毛脂醇分別是動物和植物經由鯊烯生成固醇(sterol)途徑中的中間產物。在此生成途徑中，這些三萜類廣泛存在於生物體中，對於生物演化上佔有很重要的地位。由於膽固醇是細胞膜的重要組成物質，若樟芝所含的氧化型三萜類在合成膽固醇的過程中，有抑制或加速的作用，對於癌細胞生長分裂會有很重大的影響(肖崇厚、陳蘊如，1989、Manitto and Sammes, 1981)。

樟芝本身或其抽出物具有苦味，在子實體中發現含有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。而樟芝的甲醇萃取物是靈芝萃取物的十倍，這也是為何樟芝比靈芝更苦的原因(Cherng et al., 1996)。根據李宛蓁 HPLC 三萜類分析，發現液態培養的三萜類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，發現經添加微量牛樟樹木屑誘導，能有效增加三萜的含量及種類(李宛蓁，2003)。

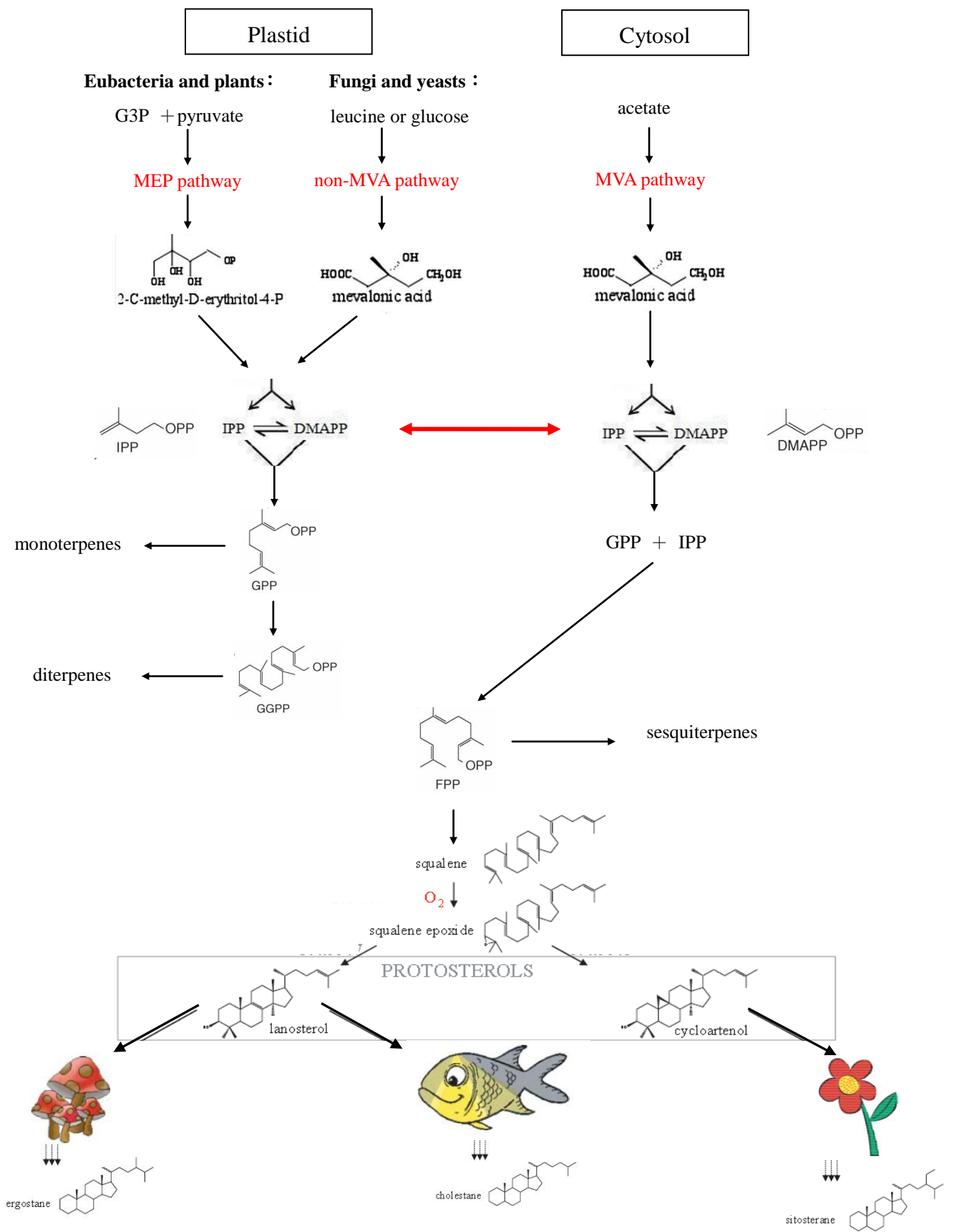


圖 3-1 萜類合成路徑(Carrau et al., 2005; Disch and Rohmer, 1998; Summones et al., 2006; Tholl, 2006)

### 3-1-2 柑橘類果皮精油

台灣柑橘種植種類很多，以鮮食為主要用途，柑橘類果皮曬乾後為中藥的青皮及陳皮、柚子及葡萄柚取出肉後內包中草藥做成羅漢果或八仙果、檸檬切片醃漬乾燥泡茶飲用等，但使用量很少。柑橘類果皮中含有大量的果膠物質、精油(essential oil)、類黃酮素(flavonoid)及維生素P等，因此近年柑橘果皮的再利用受到重視，如精油萃取及各種橘皮加工。如此可提高農業廢棄物利用率，並且增加附加價值(蔡榮哲，2005)。

精油通常存在植物的油腺或腺毛中，有些則溶於樹脂而填塞於植物體的空腔中，這些精油並非單一化合物，而是由萜類或其衍生物之混合物所組成。精油一般只溶於有機溶劑但不溶於水，常溫下是液體，冷卻後則可結晶析出，亦稱為「腦」，例如樟腦及薄荷腦等。精油除做為香料外，亦可作為強心劑、驅蟲劑、興奮劑等，另外在活血、止痛、化瘀及治療酸痛等亦具有相當的療效。

椴柑又名橘子、凸柑、柑仔等，原產地印度，芸香科柑橘屬，常綠灌木或小喬木，枝條細小而密生，無刺。果實為柑果，扁圓球形，成熟時橙黃色。果皮萃取液經氣相層析質譜儀分析後，成分包括有d-檸檬烯(d-limonene)、1-甲基-1,4-環己二烯、佛手柑油烯、松油烯(terpinene)等萜類成分(賈德翠等人，2009)。

文旦，屬芸香科，為常綠中喬木，原產於中國華南，於清朝乾隆53年由黃權氏從廣東引進台灣種植。文旦果皮萃取液透過氣相層析質譜儀分析後，發現有超過12種以上的化合物存在，包括有檸檬烯、 $\alpha$ -蒎烯( $\alpha$ -pinene)、 $\beta$ -蒎烯和酚等化合



物(陳吉村、陳哲民，2003)。

柳橙，俗稱柳丁，芸香科柑橘類，柳橙原產廣東省新會縣，台灣栽培之柳橙為1930年代由廣東引進者，1960年代才在嘉南地區大量栽培(范念慈，2001)。柳橙精油含有單萜類及倍半萜類化合物，主要成份為檸檬烯，其次含有少量蒎烯、松油烯、芳樟醇(linalool)等(陳俊仁，2009)。

檸檬，芸香科柑橘屬，常綠灌木或小喬木，高約3-5公尺，枝上有刺，果實為橢圓形柑果，黃色或紅色而有光澤，皮薄，果肉極酸。檸檬精油主要成份為檸檬烯，其次含有少量蒎烯、松油烯、檜烯、月桂烯等。

總體而言，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，其中以檸檬烯含量為精油總量的70%以上(廖信昌，1998，如表3-1)。

表 3-1 常見幾種柑橘皮精油之含量及主要成分(廖信昌，1998)

種類	含量 (%)	成分 (精油量的百分比)				
		$\alpha$ -蒎烯	檸檬烯	香葉烯	芳樟醇	其他
桶柑	1.14	0.53	96.53	1.15	0.65	1.14
椪柑	1.29	1.12	86.47	0.84	3.84	0.73
檸檬	1.27	11.18	72.80	1.77	0.21	14.04
柳橙	1.09	1.98	94.74	1.71	0.34	1.23
麻豆文旦	1.01	0.54	95.85	1.94	0.07	1.60
葡萄柚	0.96	0.57	94.99	2.07	0.11	2.26
海梨柑	0.85	0.27	92.92	1.67	1.21	3.93

### 3-1-3 樟芝深層培養產三萜類

樟芝液態培養產三萜類文獻整理如表 3-2 所示。2006 年 Shih 等人，利用一次一因子法，找出最佳碳源為 2% 葡萄糖和氮源 3% 玉米粉，其可得到最高的三萜類含量 31.0 mg/g DW，但是菌重只有 6.96 g/L，使得三萜類產量為 215.8 mg/L (Shih et al., 2006)。

同年 Chang 等人，利用台灣南部六龜山區所採集之樟芝子實體，經分離與純化後之樟芝菌株(AC0623)，利用回應曲面法(RSM)探討菌絲體液態培養最適條件，以提高菌體與三萜類的產量。結果指出，搖瓶液態培養於 28°C，起始 pH 值 5.5 及攪拌速率 105 rpm 下，菌體乾重與三萜類成分分別可增至 3.2% (w/w) 及 31.8 mg/g (Chang et al., 2006)。

2011 年賀元川等人，使用均勻設計法(Uniform Design)法，得到三萜類最佳培養基配方為：1 L 培養液中玉米澱粉 20 g、麩皮 20 g、硫酸鎂 1.85 g、初始 pH 值 3.0、培養 16 天，三萜類含量在最優培養條件下高達 60.4 mg/g DW，但是菌重只有 5.39 g/L，三萜類產量為 325.0 mg/L (賀元川等，2011)。

同年莊雅婷，利用添加柑橘類果皮水萃液促進三萜類生成，發現添加 10% (v/v) 檸檬果皮水萃液於搖瓶液態培養，三萜類含量可達 29.5 mg/g DW，三萜類產量為 417.9 mg/L (莊雅婷，2011)。

同年 Lu 等人，採用兩種最適化方法，回應曲面法及類神經網路法，可在 10 天得最大萜類產量 64.8 mg/L，此與基因演算法(genetic algorithm)模擬結果相同 (Lu et al., 2011)。

由上述可知，柑橘類果皮精油中含有豐富的萜類，尤其以單萜類為最多。而IPP可以穿過質體膜作為不同路徑生成萜類的前體。所以本實驗希望透過柑橘類果皮精油添加，抑制樟芝菌絲體質體內單萜類生成，改變代謝路徑，達到增產樟芝三萜類的目的。

表 3-2 樟芝液態培養產三萜類文獻整理

培養特色	三萜類含量 (mg/g DW)	三萜類產量 (mg/L)	培養天數 (day)	備註
一次一因子法	31.0	215.8	14	Shih et al., 2006
RSM, 菌株 AC0623	31.8		7	Chang et al., 2006
Uniform design	60.4	325.0	16	賀元川等, 2011
加檸檬果皮水萃液	29.5	417.9	28	莊雅婷, 2011
RSM, ANN-GA		64.8	10	Lu et al., 2011

### 3-2 實驗材料與方法

本實驗所採用的樟芝菌株及基礎培養與 2-2 節相同。

#### 3-2-1 實驗藥品

本實驗柑橘類水果固定購買自愛買量販店，其中橘子品種為椪柑(Citrus

poonensis)，產地為台中縣。新增藥品如表 3-3，其餘藥品與 2-2-1 節相同。

表 3-3 新增實驗藥品清單

藥品名稱	廠牌
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	ECHO
Acetone	ECHO
Acetonitrile (CH <sub>3</sub> CN)	ECHO

### 3-2-2 實驗儀器與設備

本實驗新增儀器與設備如表 3-4，其餘所採用的儀器及設備與 2-2-2 節相同。

表 3-4 新增實驗儀器清單

儀器設備	型號	廠牌
斜立式真空減壓濃縮裝置	N-1000	日本 EYELA
數位水浴加熱槽	SB-1000	日本 EYELA
高效液相層析儀	HP1100	美國 Agilent
高效液相層析管柱	Luna C18	美國 Phenomenex

### 3-2-3 實驗方法

新增實驗方法如下所述，基礎培養與 2-2-3 節相同。

### 3-2-3-1 果皮精油製作及品質管控

將市集收集的果皮洗淨，除去內部果肉，並剪成小碎塊。秤取果皮重量，以果皮重量(克):乙醇體積(毫升)=1:2 製備萃取液，置入超音波震盪機震盪 30 分鐘後，靜置萃取一天。以布式漏斗過濾萃取液，將過濾液置入旋轉濃縮機濃縮。秤取濃縮液重量，以濃縮液重量(克):乙醇體積(毫升)=1:2 的比例回溶，果皮精油製作完成後置入 4°C 冰箱保存備用。

為確保每次實驗所使用之果皮精油品質相同，以分光光度計進行全波長掃描，掃描圖譜如附錄五。

### 3-2-3-2 不同時間添加各種果皮精油培養試驗

實驗目的為探討各種果皮精油添加對樟芝代謝有效成分之影響。將培養 10 天後的種菌，經滅菌均質機攪碎菌絲球，並以 10% 的接菌量加至 10 個內含 100 ml 液態培養基的 250 ml 三角瓶中，然後放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養。第 7 天取樣 1 瓶，並各添加 2% (v/v) 柚子果皮精油於 3 瓶液態培養基中；第 14 天取樣 2 瓶(含無添加及第 7 天添加柚子果皮精油各 1 瓶)，並添加 2% (v/v) 柚子精油於 2 瓶無添加之液態培養基中；第 21 天取樣 3 瓶(含無添加及第 7、14 天添加柚子果皮精油各 1 瓶)，並添加 2% (v/v) 柚子果皮精油於 1 瓶無添加液

態培養基中；第 28 天取樣 4 瓶(含無添加及第 7、14、21 天添加柚子果皮精油各 1 瓶)。取樣後菌絲體經冷凍乾燥測量菌體乾重，待磨粉後進行三萜類含量、總多酚含量、胞內多醣含量等測試。

再依次更改果皮精油為檸檬果皮精油、柳丁果皮精油、橘子果皮精油，重複上述實驗。

### 3-2-3-3 不同濃度橘子果皮精油添加培養試驗

實驗目的為探討添加不同濃度橘子果皮精油對樟芝代謝有效成分之影響。將培養 10 天後的種菌，經滅菌均質機攪碎菌絲球後，並以 10% 的接菌量加至 6 個內含 100 ml 液態培養基的 250 ml 三角瓶中，然後放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養。選用 3-2-3-2 節實驗效果最佳的策略(具最高三萜類含量)，即第 7 天添加果皮精油，並於第 28 天取樣，進行六種不同濃度橘子果皮精油添加(1、2、3、4、5、8% (v/v))培養。取樣後菌絲體經冷凍乾燥後測量菌體乾重，待磨粉後進行三萜類含量、總多酚含量、胞內多醣含量等測試。重複實驗三次。

### 3-2-4 分析方法

本實驗新增分析方法為 HPLC 分析三萜類含量，其餘所採用的分析方法與 2-2-4 節相同。

取乾樟芝菌絲(或子實體) 100 mg，加入 3 ml 50% 的乙醇萃取 12 小時，並以超

音波震盪萃取30分鐘。萃取完後以8000 rpm離心5分鐘，取出上清液，將殘渣再加入3 ml 50%的乙醇萃取12小時，並重複以上動作，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氯仿以超音波震盪萃取30分鐘，取下層液體加入3 ml 5%的NaHCO<sub>3</sub>，並以超音波震盪萃取30分鐘，之後調整液體pH值至3以下，取下層液體減壓濃縮至乾。加入2 ml乙醇，將實驗所得之樟芝乙醇萃取液，以6000 rpm離心10分鐘，取上清液以0.2 μm濾膜過濾後，以HPLC分析。

利用高效能液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC)對樟芝乙醇萃取液進行定性與定量之分析，使用Luna C18(5 μm, 4×250 mm)之液相層析管柱，移動相溶劑A (0.0085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)和B (acetonitrile)，依照下列組成：0-65 min、30-47% B，65-110 min、47-47% B，110-140 min、47-100% B，140-160 min、100-100% B，160-165 min、100-30% B，165-175 min、30-30% B，進行線性梯度流洗，液相層析管柱溫度為30°C，流速為1 ml/min，樣品注射量20 μL，UV detector波長210 nm (Chang et al., 2010)。

### 3-3 實驗結果與討論

乙醇與純果皮精油均有抑菌效果，不適宜開始培養時添加。曾經嘗試第0天添加果皮精油與菌絲體同時培養，但發現菌體受乙醇及純果皮精油強烈抑制無法生長。又因樟芝菌絲體生長緩慢，所以選擇7、14、21天添加各種柑橘類果皮精油進行實驗。

### 3-3-1 不同時間添加各種果皮精油培養試驗

培養第 7 天時，將 2% (v/v) 橘子果皮精油加入 100 ml 樟芝液態發酵液中，其菌絲體生長曲線及生理活性物質代謝變化如圖 3-2。發現橘子果皮精油會抑制菌絲體成長，但可大幅提升菌絲體二次代謝產物(總多酚及三萜類)含量。

當第 7 天添加橘子果皮精油後，將使菌絲體處於惡劣環境，但菌體正處於指數生長期(exponential phase)，生長活力旺盛，而且尚有碳源(澱粉)，因此菌體濃度先持平 7 天然後緩慢下降，胞內多醣一樣先持平 7 天然後迅速下降。從圖 3-2 發現兩者變化趨勢完全相同，可推斷添加 2% (v/v) 橘子果皮精油並不會造成菌絲體大量死亡，只是抑制菌絲體成長，並改變代謝路徑，因此在 7~14 天合成大量二次代謝產物(總多酚及三萜類)。隨著菌絲體適應環境，第 14 天後碳源消耗完畢，又開始消耗胞內多醣，二次代謝產物累積速率減緩。但隨著菌絲體老化，二次代謝產物又再一次迅速累積，於第 28 天達到最高，最後隨著菌體死亡，二次代謝產物累積量逐漸下滑(總多酚及三萜類含量在第 28、35、42 天分別為 23.52、20.79、17.28 mg/g DW 及 102.80、73.28、86.15 mg/g DW)。

由圖 3-3 可明顯發現，不同時間添加橘子果皮精油，對樟芝菌絲體的影響是不同的。在菌體濃度方面，第 7、14 天添加橘子果皮精油的結果與控制組第 28 天的差不多，而第 21 天添加會造成菌體濃度下降。而胞內多醣方面，則以第 14 天添加橘子果皮精油的結果最佳。二次代謝產物(總多酚和三萜類)均以第 7 天添加橘子果皮精油的結果最佳。



實驗發現(如圖 3-4(A))，添加各種果皮精油皆能促進總多酚化合物生成。尤其在第 7 天添加果皮精油後總多酚含量大幅上升，柚子精油於培養第 21 天時會獲得最高總多酚含量，其餘精油皆於培養第 28 天時會得到最高總多酚含量。添加柚子、檸檬、柳丁及橘子果皮精油後，最大總多酚含量可達 15.35、15.56、14.13 和 23.52 mg/g DW，分別為控制組(5.95 mg/g DW)的 2.58、2.62、2.37 和 3.95 倍，其中添加橘子果皮精油效果最佳。由圖 3-4(B)可知，添加橘子果皮精油所獲得總多酚產量最高為 224.39 mg/L。其次為柚子果皮精油，產量為 152.30 mg/L。再者為檸檬果皮精油，其總多酚產量為 157.16 mg/L。添加柳果皮精油總多酚產量最低，為 128.57 mg/L。綜觀上述結果，以橘子果皮精油添加，促使總多酚化合物生成效用最佳。

由圖 3-5(A)發現，不同果皮精油對樟芝菌絲體合成三萜類的促進效果差別很大。其中柚子及橘子果皮精油添加後可促進三萜類含量大幅提升，又以第 7 天添加培養 28 天後，最大三萜類含量達到 52.38 及 102.80 mg/g DW，分別為控制組(10.48 mg/g DW)的 5.00 和 9.81 倍。而柳丁果皮精油添加後，起初會抑制三萜類化合物之生成，但隨著培養時間之增長，其三萜類含量亦會提高，最高值為 16.27 mg/g DW。由此可知，柳丁果皮精油不能大幅刺激三萜類化合物之生成。由圖 3-5(A)可明顯看出檸檬果皮精油不會增進三萜類生成。而在三萜類產量部份，由圖 3-5(B)發現仍然以橘子果皮精油添加效果最佳。

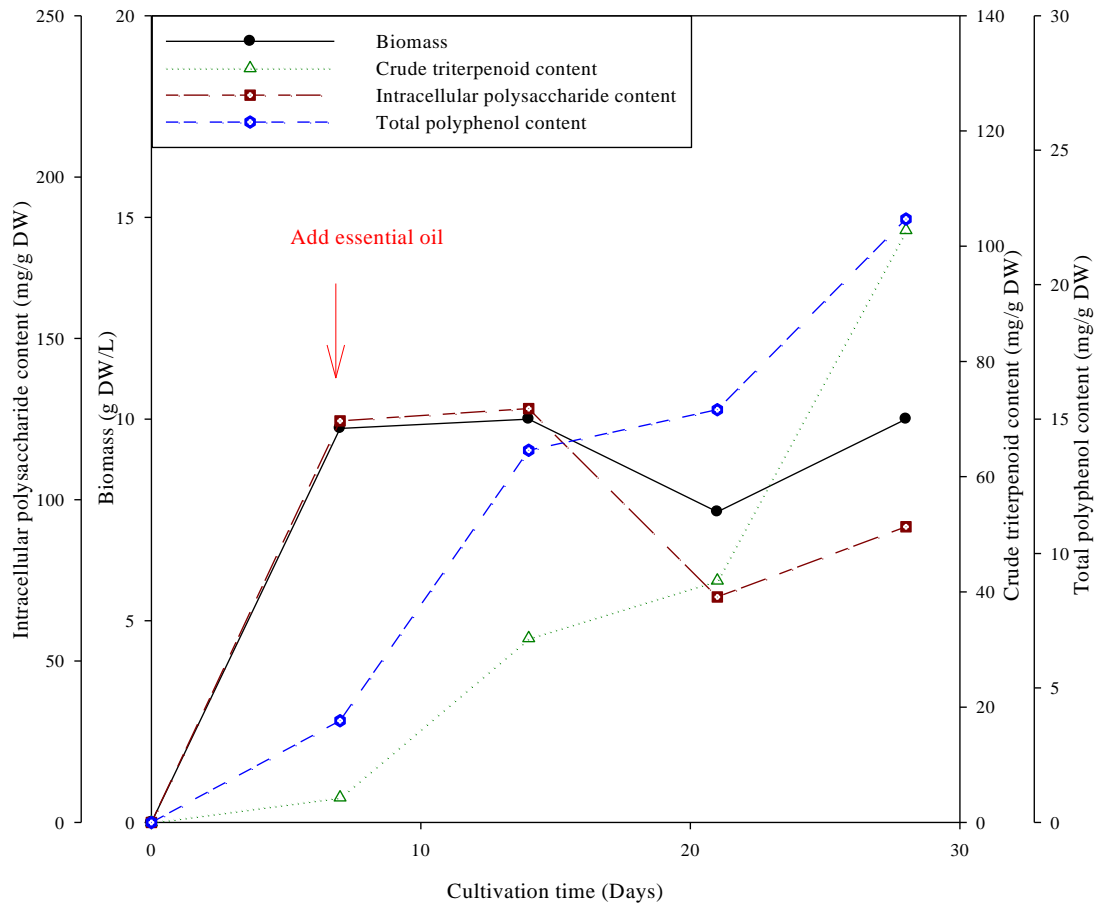


圖 3-2 第 7 天添加 2% (v/v) 橘子精油樟芝菌絲體生長曲線及生理活性產物

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，蒸餾水。

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

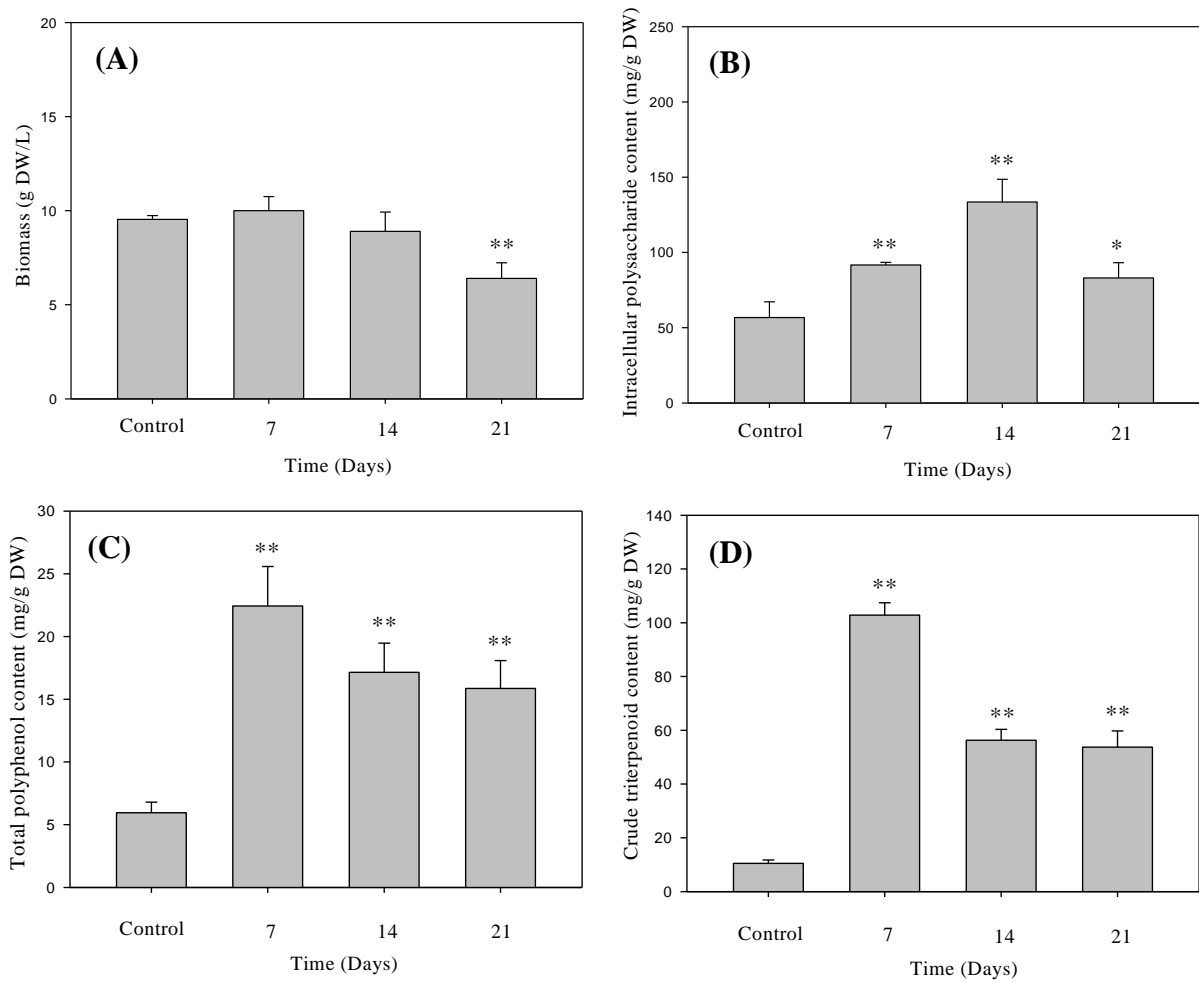


圖 3-3 不同時間添加 2% (v/v)橘子果皮精油對樟芝菌絲體代謝影響 (A)菌體濃度；(B)胞內多醣含量；(C)總多酚含量；(D)三萜類含量（皆取自培養第 28 天）。

\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  與控制組比

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，蒸餾水。

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

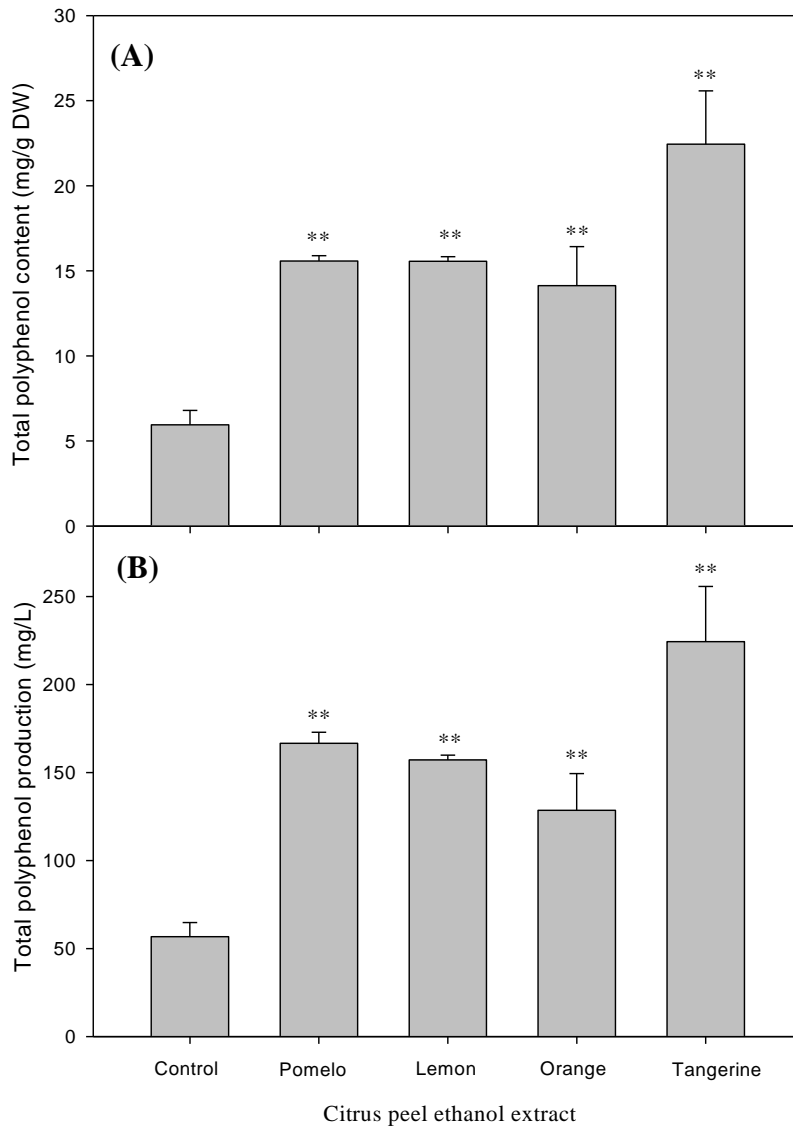


圖 3-4 各種果皮精油(2% (v/v)添加對樟芝菌絲體總多酚之比較(A)含量；(B)產量（添加柚子精油取自培養第 21 天，其於皆取自培養第 28 天）。\*\*  $p < 0.01$  與控制組比

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，蒸餾水。

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

樟芝菌絲體培養第七天時加入各種精油 2% (v/v)。

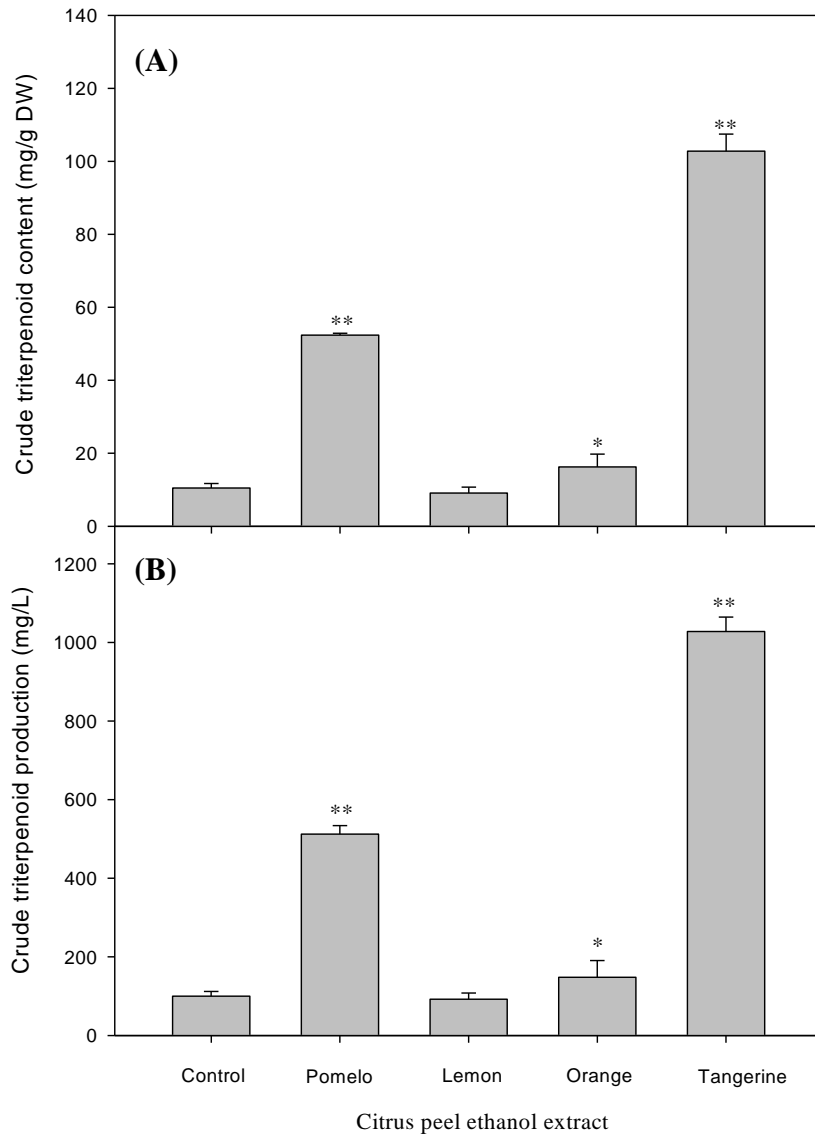


圖 3-5 各種果皮精油(2% (v/v))添加對樟芝菌絲體三萜類之比較(A)含量；(B)產量（皆取自菌絲體培養第 28 天）。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  與控制組比

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，蒸餾水。

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

樟芝菌絲體培養第七天時加入各種精油 2% (v/v)。

### 3-3-2 不同濃度橘子果皮精油添加培養試驗

由上述實驗結果得知，培養第七天添加橘子果皮精油後，第 28 天時樟芝菌絲體三萜類、總多酚化合物的含量、產量均可達到最高值。因此在第七天添加不同量的橘子果皮精油(1、2、3、4、5、8% (v/v))於發酵液中，研究其對二次代謝產物(總多酚及三萜類)的影響，進而決定橘子果皮精油最佳添加濃度。

由圖 3-6(A)發現，橘子果皮精油添加量 1~5% (v/v)時，均可大幅增加樟芝菌絲體總多酚含量，均為控制組的 4 倍左右。同時也可發現，添加量的增加，對總多酚含量促進效果不大。當添加量增加到 8% (v/v)，總多酚含量反而降低。並且由圖得知，若要得到最高的總多酚含量，添加量不宜過多，在此實驗中添加量達 5% (v/v)時，此時促進總多酚化合物之生成效用最佳，其含量為 23.42 mg/g DW。就產量而言，如圖 3-6(B)所示，添加 4% (v/v)、5% (v/v)橘子精油，效果相當，可促使總多酚產量達到最高，產量分別為 251.56 mg/L 及 252.90 mg/L。

添加不同量橘子果皮精油對樟芝菌絲體形成三萜類的影響如圖 3-7 所示。當橘子果皮精油添加量小於 4% (v/v)時，三萜類含量隨著添加量增加而逐漸增加，並且在添加量為 4% (v/v)時，三萜類含量達到最高值(117.17 mg/g DW)。但若橘子果皮精油添加量超過 4% (v/v)後，此時三萜類含量隨著添加量增加反而大幅下降。產量方面(圖 3-7(B))，添加量為 4% (v/v)時，三萜類產量將高達 1417.77 mg/L。

各種柑橘類果皮精油的成分複雜且不同，因此對樟芝菌絲體代謝影響也完全不同。但由文獻(表 3-1)可發現，柑橘類果皮精油中均含有高檸檬烯成份，因此

推斷單萜類檸檬烯為促進樟芝菌絲體合成三萜類的重要成份之一。而檸檬果皮精油的檸檬烯較少，其他單萜類成分(蒎烯)較高，可能就是造成沒有促進三萜類生成功效的原因。但其他微量成分的影響則尚無法得知。

一般而言，當乙醇濃度低於 5 % 時，不會對菌體產生嚴重傷害；但超過 5 % 時，便會抑制生長、降低水活性、新陳代謝終止等現象產生(Dantigny, et al., 2005)。在不同濃度橘子果皮精油添加培養也有同樣的結果，以總多酚而言，添加 5% 內的橘子果皮精油(乙醇 < 5 % )，對總多酚均有良好促進效果，但增加至 8% 時，促進效果大幅降低，原因為乙醇濃度過高所致。菌絲體合成三萜類也有類似效應。關於乙醇對樟芝菌絲體生長代謝的影響，將在第四章作更進一步的探討。

柑橘類果皮精油存有大量低分子量萜類化合物，主要為單萜類，也含有少量的倍半萜、二萜類。當柑橘類果皮精油加入發酵液後，菌體將精油吸收入細胞內，使得細胞內單萜類濃度大幅提高，抑制菌體 non-MVA 路徑生成單萜類及其前體(GPP)，於是粒線體內累積了過多的 IPP 及 DMAPP，接著過量的 IPP 及 DMAPP 將穿越粒線體膜，進入細胞質中與 MVA 路徑的 GPP 作用生成 FPP，然後兩個 FPP 又合成三萜類。

因此柑橘類果皮精油適合擔任影響因子，抑制真菌 non-MVA 路徑，降低單萜類生成，促使真菌由 MVA 路徑代謝，提升樟芝菌絲體中二次代謝物(三萜類)之含量。至於不同單萜類影響是否相同？單萜類是否進入代謝路徑中？將於下一步實驗中驗證。

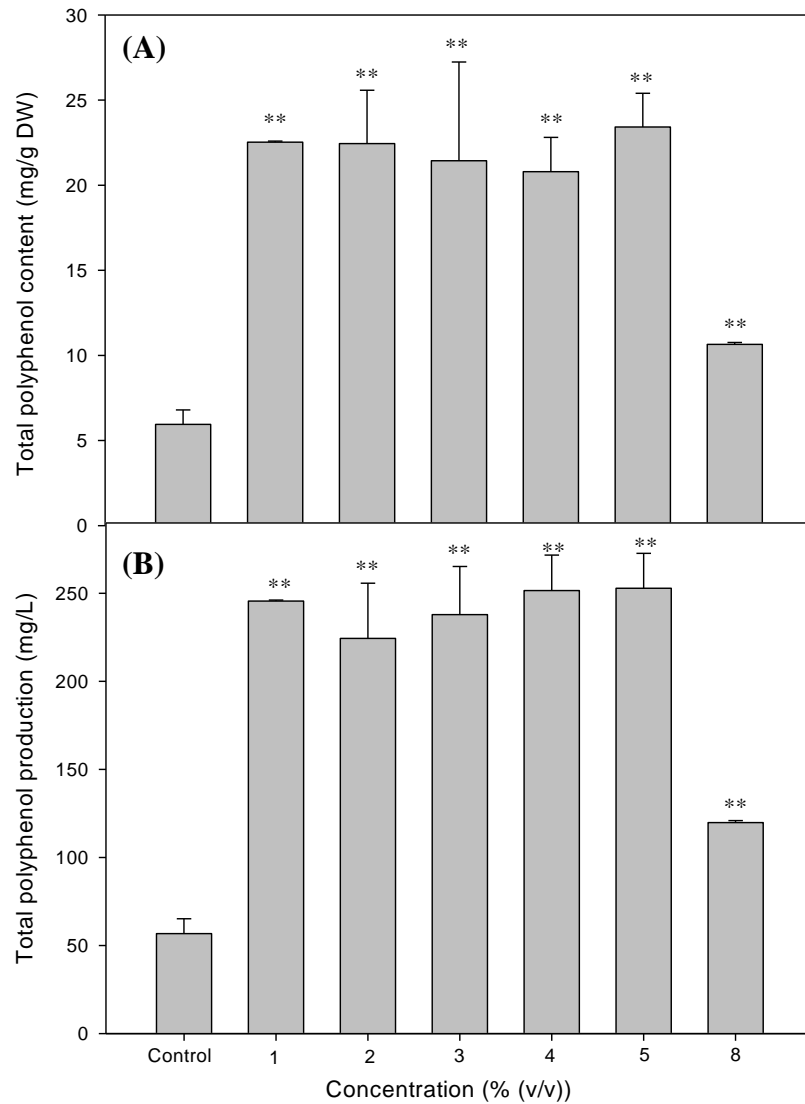


圖 3-6 橘子果皮精油添加量對樟芝菌絲體總多酚影響 (A)含量；(B)產量。\*\* p < 0.01 與控制組比

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，蒸餾水。

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

樟芝菌絲體培養第七天時加入不同量的橘子果皮精油。



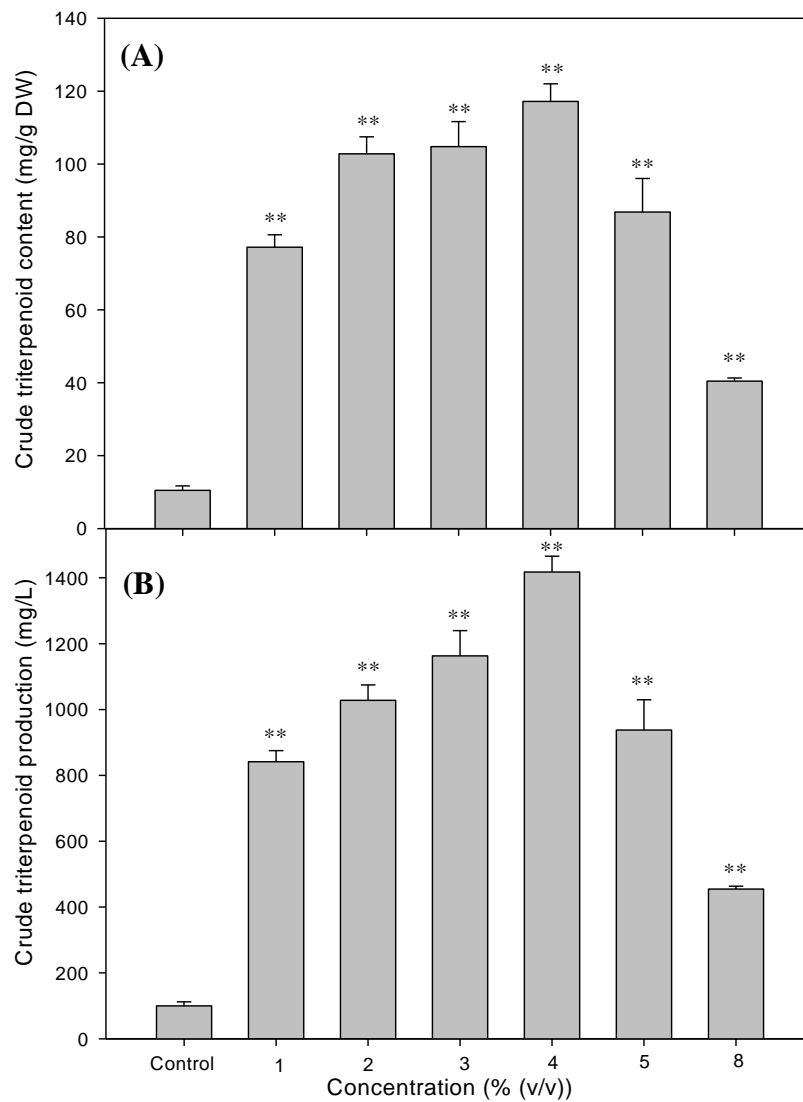


圖 3-7 橘子果皮精油添加量對樟芝菌絲體三萜類影響 (A)含量；(B)產量。\*\* p < 0.01 與控制組比

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，蒸餾水。

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

樟芝菌絲體培養第七天時加入不同量的橘子果皮精油。

### 3-3-3 果皮萃取液添加培養發酵動力參數之比較

樟芝液態培養動力學參數經計算整理成表 3-5、3-6。柑橘類果皮精油添加明顯影響菌絲體生長與新陳代謝，從表 3-5 了解，柑橘類果皮精油添加均會抑制菌絲體胞內多醣累積，尤其以檸檬果皮精油最嚴重。由表 3-5 可發現，所有的柑橘類果皮精油添加均會增進總多酚累積，其中以第 7 天添加 2% (v/v) 橘子果皮精油能有效的將總多酚產量及產率由 56.7 mg/L、2.03 mg/L day (控制組) 分別提升至 224.4 mg/L、8.01 mg/L day，均約增為四倍。而最佳總多酚產率為添加橘子果皮精油 5% (v/v) 的 9.03 mg/L day (如表 3-6)，為控制組產率的 4.5 倍。

表 3-5 的結果指出，除檸檬果皮精油外，其他果皮精油均有促進樟芝菌絲體生成三萜類能力，其中柚子及橘子果皮精油可將三萜類產量從 99.9 mg/L (控制組) 分別提升至 512.2 mg/L 及 1028.2 mg/L，約增加為 5.1 及 10.3 倍。而橘子果皮精油在不同濃度的添加，由表 3-6 可發現，第 7 天添加 4% (v/v) 橘子果皮精油能有效的將三萜類產率由 3.57 mg/L day (控制組) 提升至 50.64 mg/L day，增加為 14.2 倍。這個結果明顯指出，適時添加適量的橘子果皮精油，可大幅提升樟芝菌絲體二次代謝產物的生成。

跟過去文獻相比(表3-2)，本實驗樟芝菌絲體最高三萜類含量117.17 mg/g DW，高於過去的文獻研究結果。而在三萜類產量部分，本實驗1417.8 mg/L也高於過去的文獻研究結果。此表示添加橘子果皮精油，對樟芝深層培養產三萜類，有非常佳的效果，具開發量產的潛力。

表 3-5 不同果皮精油添加之樟芝液態培養動力學參數

Peel kind	Intracellular polysaccharides (IPS) (P1)				Total polyphenol (P2)				Triterpenoid (P3)			
	P1 <sub>max</sub>	Q <sub>P1</sub>	Y <sub>P1/s</sub>	t	P2 <sub>max</sub>	Q <sub>P2</sub>	Y <sub>P2/s</sub>	t	P3 <sub>max</sub>	Q <sub>P3</sub>	Y <sub>P3/s</sub>	t
	(mg/L)	(mg/L day)	(g/g)	(day)	(mg/L)	(mg/L day)	(mg/g)	(day)	(mg/L)	(mg/L day)	(mg/g)	(day)
Control	1926.9	137.64	40.31	14	56.7	2.03	1.19	28	99.9	3.57	2.09	28
Pomelo	746.4	35.54	15.62	21(14)	152.3	7.25	3.19	21(7)	512.2	18.29	10.72	28(7)
Lemon	563.3	20.12	11.78	28(14)	157.2	5.61	3.29	28(7)	92.1	3.29	1.93	28(7)
Orange	1369.2	65.20	28.64	21(14)	128.6	4.59	2.69	28(7)	148.1	5.29	3.10	28(7)
Tangerine	1188.3	42.44	24.86	28(14)	224.4	8.01	4.69	28(7)	1028.2	36.72	21.51	28(7)

( ) : Add peel essential oils time

表 3-6 不同濃度橘子果皮精油添加之樟芝液態培養動力學參數

Concentration of tangerine peel extract	Total polyphenol (P1)				Triterpenoid (P2)			
	P1 <sub>max</sub>	Q <sub>P1</sub>	Y <sub>p1/s</sub>	t	P2 <sub>max</sub>	Q <sub>P2</sub>	Y <sub>p2/s</sub>	t
	(mg/L)	(mg/L day)	(mg/g)	(day)	(mg/L)	(mg/L day)	(mg/g)	(day)
Control	56.7	2.03	1.19	28	99.9	3.57	2.09	28
1% (v/v)	245.6	8.77	5.14	28(7)	841.3	30.05	17.60	28(7)
2% (v/v)	224.4	8.01	4.69	28(7)	1028.2	36.72	21.51	28(7)
3% (v/v)	237.9	8.50	4.98	28(7)	1162.8	41.53	24.33	28(7)
4% (v/v)	251.6	8.99	5.26	28(7)	1417.8	50.64	29.66	28(7)
5% (v/v)	252.9	9.03	5.29	28(7)	937.8	33.49	19.62	28(7)
8% (v/v)	119.8	4.28	2.51	28(7)	454.8	16.24	9.51	28(7)

( ) : Add peel essential oils time

### 3-3-4 樟芝菌絲體深層培養與野生樟芝子實體三萜類 HPLC 圖比較

三萜類化合物為樟芝最重要成分之一，其醫療效用已被證實。實驗得知添加橘子果皮精油 4% (v/v)，可大幅提高樟芝菌絲體三萜類含量十多倍，但並無法了解主要增加的三萜類為何。因此藉由高效能液相層析儀分析，進一步探討增加的三萜類種類。

圖 3-8 (A)為野生樟芝子實體之 HPLC 圖譜，圖上標示為 Chang 利用樟芝子實體分離的 10 種三萜類化合物(Chang et al., 2011)。由圖 3-8 (B)基礎培養控制組與圖 3-8 (C)添加 4% (v/v)橘子果皮精油培養之 HPLC 圖譜，可明顯發現，加入橘子果皮精油培養後，可促使三萜類種類大幅增加，對照標示成分，則由 5 種提升至 7 種。

而在三萜類含量部分，可發現第 24、32、37、42、53、68、71 以及 139 分鐘，峰的面積明顯增加，其中又以 32 分鐘出現的面積增為 31 倍為最大、其次為 42 分鐘的 25 倍及 37 分鐘的 20 倍(如表 3-7)，這三種三萜類含量均以大幅度倍數增加。而這八支滯留時間的 HPLC 圖譜面積總合為控制組 10.8 倍，與利用 Tsujikura 等人三萜類含量測定法的 11.2 倍差不多。因此再次驗證橘子果皮精油，含有促進部分三萜類含量大幅提升的成分。

添加橘子果皮精油 HPLC 圖譜中，出現了部分與子實體相同的峰。我們進一步推測，柑橘類果皮具有促進生成樟芝子實體三萜類之功效，因此後續實驗將研究“柑橘類果皮粉末添加在樟芝平板式固態培養”，並進行驗證。

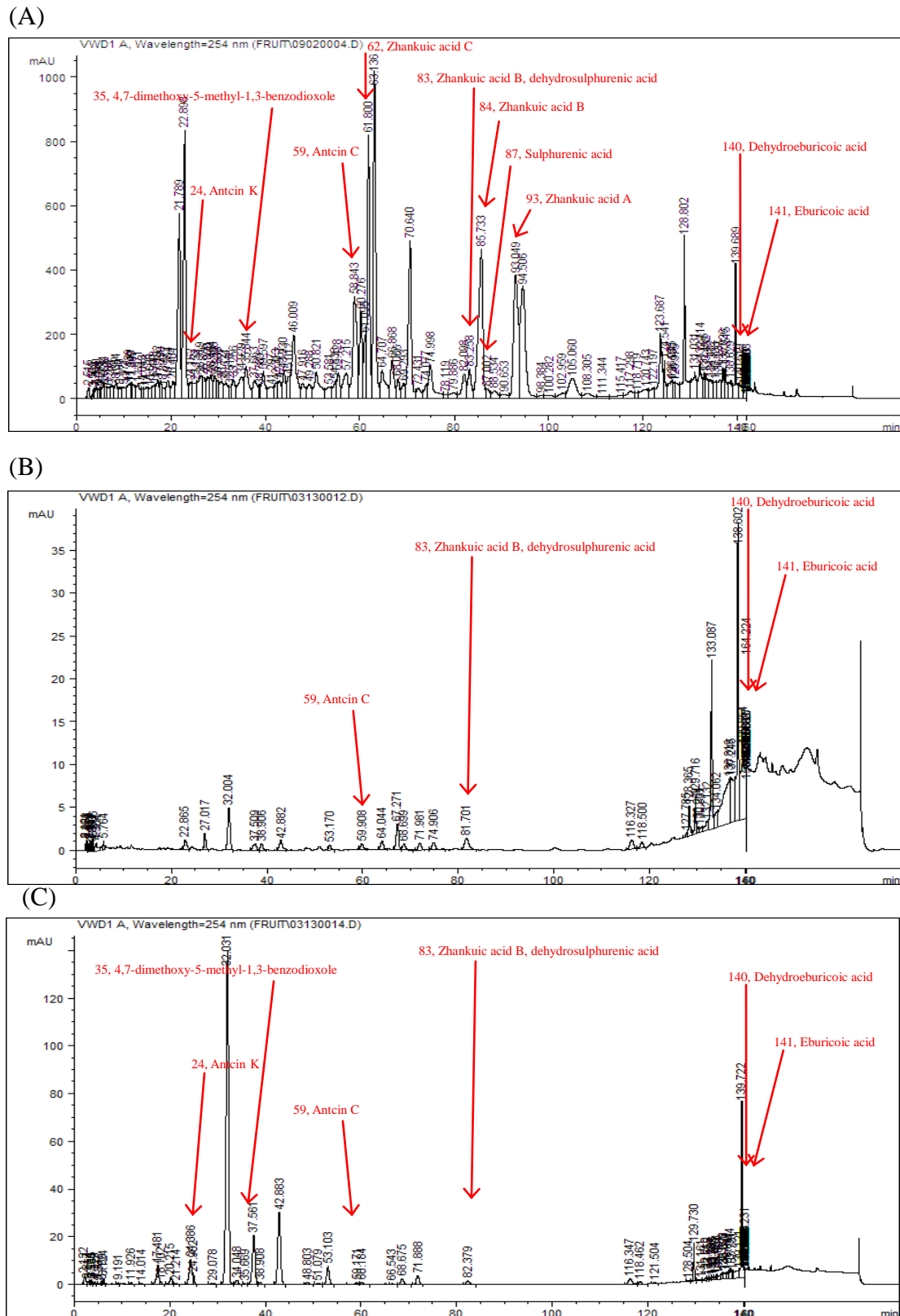


圖 3-8 樟芝深層培養三萜類化合物 HPLC 圖譜 (A) 野生樟芝子實體；(B) 基礎深層培養；(C) 添加 4% (v/v) 橘子果皮精油深層培養

表 3-7 樟芝深層培養三萜類主要滯留時間的 HPLC 圖譜面積比較

滯留時間 (min)	基礎深層培 養面積	添加 4% (v/v)橘 子果皮精油面積	倍數	備註
24	42	388	9.2	
32	162	5021	31	
37	39	802	20.6	
42	47	1187	25.3	
53	23	328	14.3	
68	28	112	4.0	
71	33	148	4.5	
139	472	1116	2.4	
	846	9102	10.8	總和

### 3-4 結論

由上得知，若要同時獲得高總多酚、三萜類化合物產量，其最適添加量為 4% (v/v)橘子果皮精油。當橘子果皮精油添加量過高時，反而會抑制菌絲體生長和生理活性成分生成，原因在於為過高添加量時，也代表著過高乙醇及過高果皮精油濃度，對真菌有強烈抑制、甚至殺滅的效果，使其菌絲體濃度下降並且延緩生成總多酚類、三萜類化合物，導致含量以及產量較低。

柑橘類果皮精油對樟芝菌絲體生長及胞內多醣均有抑制效果；但對總多酚合成均有良好的促進功效。在三萜類合成方面，柚子及橘子果皮精油能大幅促進樟芝菌絲體三萜類含量。無論樟芝菌絲體總多酚或三萜類的含量、產量及產率，均以添加橘子果皮精油效果最佳。

## 第四章 單萜類添加之樟芝深層培養

橘子果皮精油添加對樟芝二次代謝產物確實有大幅提升功效，因此希望更進一步了解其主要有效成分，但是橘子果皮精油成分複雜，各項物質達 200 多種，主要成份為單萜類。

基於實驗成果及文獻，本實驗選用三種單萜類並結合有無酒精添加，透過兩階段培養的方式進行樟芝菌絲體培養，進而了解單萜類與二次代謝產物之關係。

### 4-1 前言

高濃度乙醇或單萜類精油代表著一種極端的環境，類似於極端酸鹼值(過高或過低的 pH 值)或極端溫度，對微生物生存、成長有著極大的影響。所以許多微生物為了在不利的極端環境中生存下去，必須表現出一種不同於平時的特殊細胞機制(cellular mechanism)以回應在各種各樣的環境因素上的變化。

微生物若要生存在這有害變動中，必須以一個有效的細胞質膜來維護菌體內部的正常運作(Ingram, 1986)。這種利用細胞機構改變來適應各種環境因子的變化，在特殊環境下扮演著重要的角色，例如利用更改脂肪酸和脂質的組成，改變細胞膜構造，來保持細胞內部功能正常運作(Miquel, et al., 1993)。

#### 4-1-1 乙醇效應

乙醇是一種造成微生物成長減緩的抑制劑，當乙醇濃度在 5 - 12% (v/v)範圍

時，便可明顯觀察到微生物成長被抑制(Dantigny, et al., 2005; Ibeas and Jimenez, 1997)。Hallsworth 指出，乙醇在細胞上有非專一性的物理化學效應，如降低水活性、造成新陳代謝終止、甚至發生細胞自體溶解。過去在化合物降低水活性的實驗中，因為乙醇的低分子量(46 Dalton)，使得在相同重量時，乙醇降低水活性能力是僅次於食鹽，遠高於蔗糖、山梨糖醇、葡萄糖、甘油等添加物，因此甚至當乙醇濃度低於 5% 時，因為合併培養基中其他化合物的效應，也會對菌體生長及新陳代謝造成影響 (Hallworth, 1998)。

乙醇毒性的主要目標是細胞膜，如同許多其它有機溶劑一般，他們抑制細胞生長是因為他們優先分隔細胞膜，擾亂非特異滲透性細胞障礙的完整性。因此釀酒酵母菌特別能由不同的機制適應酒精毒性，其重點就是修改的細胞膜脂質。乙醇另一個重大影響在與水形成氫鍵，影響鍵結水分子，並且取代水分子網路上的氫鍵，從而降低脂雙層(bilayers)轉變溫度，使得細胞膜的流動性增加，有時導致新陳代謝活性停止，可能造成細胞自體溶解發生。由上述可知乙醇會造成低水活性的水壓力、妨礙含水化合物內部或之間的氫鍵形成，最後干擾酵素和細胞膜的結構及功能(Heipiepera, et al., 2000)。

Da Silva 等人利用乙醇添加改變真菌(*Mucor fragilis*)的生理和形態，並誘導菌體提高合成  $\gamma$ -linolenic acid 的含量，在研究中發現 5% 和 2% 乙醇脈衝式加入，可誘使菌絲形態改變，並產生節孢子(arthrospore)；若降低濃度為 1% 乙醇脈衝式加入，並不會立即改變生長，但會誘使菌絲形態改變，導致菌絲球中心自溶，但



可使  $\gamma$ -linolenic acid 產量增加至 11% (Da Silva, et al., 2003)。另外 Laoteng 等人，針對在含乙醇環境下，真菌菌絲體生長及合成脂肪酸(fatty acid)的反應，也有類似的反應，添加 5% 乙醇會抑制菌體生長；添加 1~3% 乙醇時，真菌菌絲體的濃度與 UFA/STA 比值(未飽和/飽和脂肪酸)，與添加 5% 乙醇時相比，則沒有太大改變(Laoteng, et al., 2008)。由上可知，低濃度乙醇添加可以小幅度的改變真菌生理與形態，只要運用得宜將可合成我們所需之產物。

#### 4-1-2 柑橘類果皮單萜類簡介

精油廣泛用於化妝品、藥物和食品。其組成複雜，超過 200 種自然植物成分，主要包含萜類和其氧化物、顏料、蠟、樹脂和黃酮類化合物的複雜混合物。萜類化合物佔果皮精油重量 80~98%，為不飽和化合物，容易分解，避免接觸熱、光和氧氣(Diaz, et al., 2005)。

柑橘類果皮精油組成物多以烯類、醇類、醛類等有機物質為主，經比對後發現大多數的精油中皆含有萜類及其含氧衍生物，所謂的萜類物質是指以異戊二烯單體組合而成之化合物，根據組成碳數多寡又可分成：(1) 單萜類：結構含碳數為 10，例如  $\alpha$ -pinene， $\beta$ -pinene，camphene，sabinene，thujene，d-limonene，terpinolene， $\alpha$ -terpinene， $\gamma$ -terpinene，myrcene 等。其中較常見柑橘類果皮精油單萜類的結構式如圖 4-1 所示(Smith, et al., 2001)。(2) 倍半萜類：結構含碳數為 15，例如  $\alpha$ -cedrene， $\alpha$ -copaene，logifolene， $\alpha$ -humulene 等。

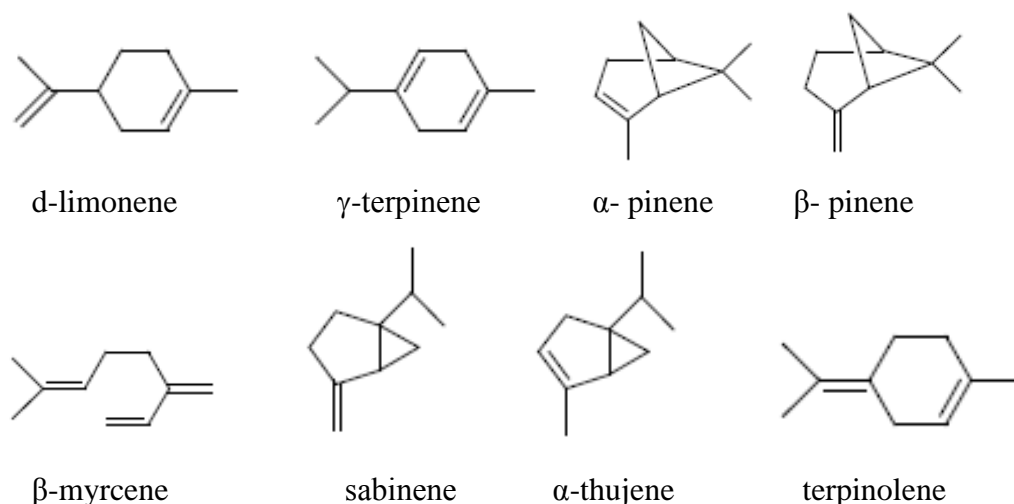


圖 4-1 柑橘類果皮精油中常見單萜類的結構式(Smith, et al., 2001)

天然檸檬烯資源豐富，300多種植物中都含有它。其沸點為 $177^{\circ}\text{C}$ ，密度0.860；橙紅、橙黃色或無色澄清液體，具有特異香氣；溶於乙醇和大多數非揮發性油；微溶於甘油，不溶於水和丙二醇。在柑橘類果皮精油中含量較高，價格便宜，近幾十年來，以檸檬烯為原料的新產品研究開發一直受到關注，文獻報導了微生物能夠對檸檬烯進行生物轉化，得到產品在化妝品、食品、醫藥、有機合成等領域有重要應用價值(Van Der Werf, et al., 1999)。

$\gamma$ -松油烯為廣泛分佈的次要成分的精油，存在於胡荽油、檸檬油、百里香油等精油中，不溶於水，溶於乙醇、乙醚等有機溶劑中。其沸點為 $183^{\circ}\text{C}$ ，密度0.849；無色至微黃色液體，具檸檬、柑橘和松木氣息。 $\gamma$ -松油烯具有清除DPPH自由基及抑制低密度脂蛋白氧化的生理功能(Nhu-Trang, et al., 2006)。

$\beta$ -蒎烯是雙環單萜類化合物，松脂的重要組成部分，也存在許多其他針葉樹的樹脂，以及非針葉植物。沸點  $165^{\circ}\text{C}$ ，密度 0.865；無色至淡黃色液體；不溶

于水，溶於乙醇，幾乎不溶於丙二醇、甘油。 $\beta$ -蒎烯的主要工業用途為熱裂解成月桂烯，作為合成開鏈萜的原料。以  $\beta$ -蒎烯為原料，已生產出多種香料和維生素 A、維生素 E 等(Lu, et al., 2002)。

檸檬烯微生物轉化，是由 1966 年印度科學家發表細菌(*Pseudomonad*)對檸檬烯轉化開始。20 世紀 90 年代後期，許多學者研究微生物轉化檸檬烯途徑，至 2010 年底，被研究過對檸檬烯轉化的菌株中，以真菌(23 株)和細菌(20 株)為主，酵母菌僅 2 株，微藻和藍細菌各一株(李厚金、藍文健，2011)。圖 4-2 是目前瞭解的檸檬烯微生物轉化途徑，主要有五種，其他研究仍在進行當中(Van Der Werf, et al., 1999)。

Caccioni 研究各種果皮精油抗菌效果，分析柑橘類果皮精油成份如表 4-1。柳丁(A1~A6及AM)果皮精油成份，除檸檬烯含量佔 90% 以上及月桂烯 2% 左右外，其餘含量均很少。橘子(M1)果皮精油成分中，大部分為檸檬烯，約佔 73%，其次為  $\gamma$ -松油烯( $\gamma$ -terpinene)，約為 17%，剩下的成分均不高， $\alpha$ -蒎烯、 $\beta$ -蒎烯及月桂烯大約各佔 1% 多。葡萄柚(P1~P2)果皮精油成份，除檸檬烯含量佔 93% 以上及月桂烯 2% 左右外，其餘含量均很少。檸檬(L1~L3)果皮精油中檸檬烯含量較低(60~70%)，但相對的  $\beta$ -蒎烯及  $\gamma$ -松油烯成分較高(各約 10% 左右)。枳橙(CZ及CY)果皮精油中檸檬烯含量較低(65~72%)，月桂烯大約佔 7%，其餘含量均在 3% 以下(Caccioni, et al., 1998)。

橘子果皮精油添加對二次代謝產物有最佳促進效果，且 Caccioni 研究知其精

油成分中檸檬烯為主要成份， $\gamma$ -松油烯為第二多。另外在柑橘類果皮精油添加實驗中，只有檸檬果皮精油沒有促進三萜類生成功效，而其成分最多者仍為檸檬烯，第二多成分為 $\beta$ -蒎烯。

乙醇為果皮精油中的溶劑，由前述得知，低濃度乙醇為促使菌體代謝途徑改變的重要因子。因此本實驗選擇檸檬烯、 $\gamma$ -松油烯及 $\beta$ -蒎烯並結合有無酒精添加，進一步探討各種單萜類對二次代謝產物(總多酚和三萜類)的合成影響。

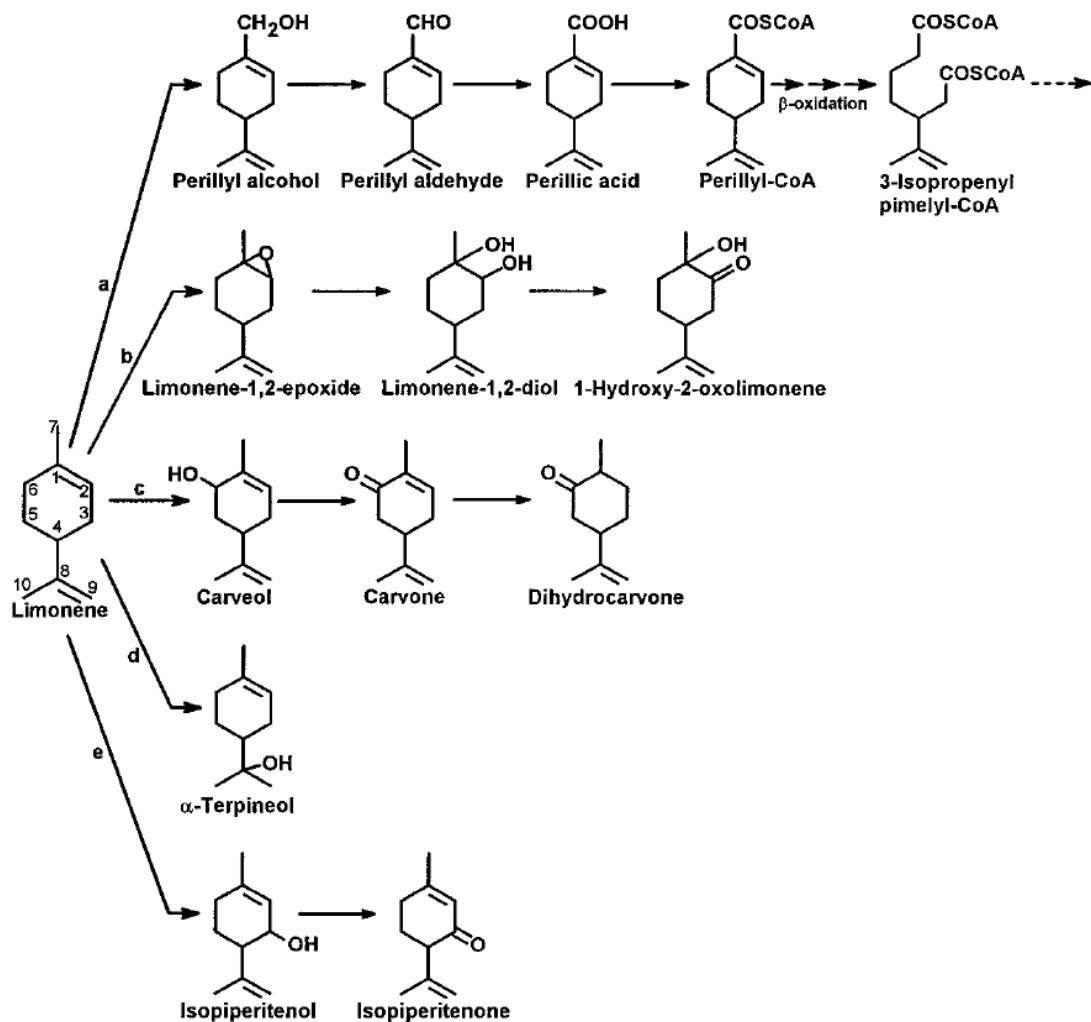


圖 4-2 微生物轉化檸檬烯途徑 (Van Der Werf, et al., 1999)。

表 4-1 常見幾種柑橘皮精油之含量及主要成分(Caccioni, et al., 1998)

Chemical composition of Citrus essential oils <sup>a</sup>															
Compound	A1	A2	A3	A4	A5	A6	AM	M1	P1	P2	L1	L2	L3	CZ	CY
α-Thujene	t	t	t	0.01	t	t	t	0.64	t	t	0.36	0.27	0.43	0.23	0.23
α-Pinene <sup>b</sup>	0.50	0.45	0.42	0.41	0.53	0.48	0.40	1.78	0.51	0.52	1.54	1.27	2.27	0.87	0.88
Camphene <sup>b</sup>	t	t	t	t	t	t	t	0.02	t	t	0.05	0.05	0.10	0.03	0.03
Sabinene <sup>b</sup>	0.27	0.54	0.13	0.83	0.43	0.34	0.08	0.17	0.54	0.54	1.52	0.93	19.52	0.51	0.56
β-Pinene <sup>b</sup>	0.04	0.04	t	0.06	0.04	0.03	0.33	1.41	0.07	0.07	9.42	8.34	–	2.16	1.37
Octanal <sup>b</sup>	0.29	0.46	0.34	0.53	0.37	0.09	0.08	0.06	0.58	0.34	0.06	0.06	0.07	1.40	0.99
Myrcene <sup>b</sup>	1.98	1.85	1.81	1.74	1.87	1.82	1.88	1.71	1.81	1.86	1.52	1.44	1.39	7.59	7.35
α-Phellandrene <sup>b</sup>	0.05	0.06	0.03	0.05	0.04	0.05	0.02	0.07	0.05	0.07	0.04	0.05	0.06	2.76	2.57
3-Carene <sup>b</sup>	–	0.22	0.05	0.13	0.03	0.22	0.01	t	–	–	t	t	t	t	t
α-Terpinene <sup>b</sup>	0.30	–	–	–	–	–	–	0.24	0.04	0.03	0.19	0.30	0.12	0.18	–
β-Phellandrene <sup>b</sup>	–	0.06	t	0.07	0.03	0.20	–	0.52	–	0.18	–	–	–	–	0.14
p-Cimene <sup>b</sup>	t	t	t	t	t	t	–	0.23	–	0.18	0.42	0.17	0.34	t	t
Limonene <sup>b</sup>	94.81	92.48	95.29	91.14	94.95	94.95	94.27	72.71	93.59	93.70	71.06	69.38	60.20	65.39	71.63
(Z)-β-Ocimene	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	0.02	0.04	–	0.05	0.03
(E)-β-Ocimene	0.02	0.05	0.01	0.05	0.03	0.01	0.23	0.02	0.29	0.21	0.07	0.07	0.15	1.78	1.12
γ-Terpinene <sup>b</sup>	0.02	0.09	0.04	0.18	0.06	0.04	0.02	17.17	0.07	0.08	8.06	8.44	9.45	0.20	0.10
Octanol <sup>b</sup>	0.07	0.21	0.18	0.24	0.12	0.03	0.33	0.03	0.14	0.14	0.01	0.04	0.06	0.20	0.13
cis-Linalol oxide	–	–	–	–	–	–	t	–	–	–	–	–	–	–	–
trans-Linalol oxide	–	–	–	–	–	–	0.05	–	0.23	0.21	–	–	–	–	0.06
Terpinolene <sup>b</sup>	0.07	0.01	0.02	0.06	0.03	0.05	0.02	0.82	0.02	0.02	0.39	0.47	0.52	0.10	0.05
Nonanal <sup>b</sup>	0.07	0.05	0.03	0.05	0.05	t	–	0.02	0.06	0.05	0.12	0.10	0.13	–	–
Linalol <sup>b</sup>	0.61	1.54	0.90	2.56	0.41	0.82	0.78	0.16	0.25	0.20	0.18	0.48	0.26	0.46	0.27
Citronellal <sup>b</sup>	0.06	0.03	0.02	0.04	0.03	0.02	–	0.02	–	–	0.08	0.07	0.04	0.04	0.03
iso-Pulegol	–	–	–	–	–	–	–	–	0.06	0.05	–	–	–	–	–
Nonanol <sup>b</sup>	–	–	–	–	–	–	–	–	t	t	–	–	–	–	–
Terpinene-4-ol <sup>b</sup>	0.08	0.24	0.06	0.31	0.15	0.10	0.06	0.27	0.17	0.18	0.34	0.67	0.60	0.55	0.23
α-Terpineol <sup>b</sup>	0.12	0.25	0.15	0.25	0.12	0.13	0.26	0.37	0.14	0.15	0.41	0.86	0.70	0.42	0.21
Decanal <sup>b</sup>	0.11	0.17	0.12	0.20	0.26	0.14	0.11	0.11	0.26	0.26	0.03	0.03	0.05	–	–
Carveol <sup>b</sup>	–	–	–	–	–	–	–	–	0.05	0.05	–	–	–	–	–
Octyl acetate <sup>b</sup>	–	–	–	–	–	–	0.05	–	–	–	–	–	–	–	–
Nerol <sup>b</sup>	0.05	0.09	0.04	0.12	0.01	0.03	0.06	0.07	0.02	0.03	0.17	0.86	0.40	0.08	0.07
Neral <sup>b</sup>	0.14	0.12	0.04	0.18	0.07	0.08	0.03	t	0.06	0.05	0.90	0.85	0.38	–	–
Geraniol <sup>b</sup>	0.02	0.08	0.03	0.09	0.01	0.01	0.11	0.03	0.01	0.02	0.18	1.05	0.35	0.03	0.02
Perillaldehyde <sup>b</sup>	–	–	–	–	–	–	0.03	–	–	–	–	–	–	–	–
Geranial <sup>b</sup>	0.18	0.15	0.07	0.23	0.10	0.10	0.11	0.08	0.10	0.07	1.23	1.08	0.56	–	–
Decanol <sup>b</sup>	–	–	–	–	–	–	0.05	–	0.01	0.02	–	–	–	–	–
Thymol <sup>b</sup>	–	–	–	–	–	–	–	0.02	–	–	–	–	–	–	–
Citronellyl acetate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.02	0.05	0.02	–	–
Terpinyl acetate	–	–	–	–	–	–	0.03	–	0.01	t	–	–	–	0.15	0.16
Neryl acetate	–	–	–	–	–	–	0.04	–	t	0.01	0.31	0.44	0.21	–	–
Geranyl acetate	–	–	–	–	–	–	–	–	0.05	0.06	0.23	0.45	0.45	–	–
Me-N-Me-anthranilate	–	–	–	–	–	–	–	0.46	–	–	–	–	–	–	–
α-Copaene <sup>b</sup>	–	–	–	–	–	–	–	–	0.04	0.04	–	–	–	0.03	0.02
α-Elemene	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2.14	2.20
Dodecanal <sup>b</sup>	–	–	–	–	–	–	0.01	–	0.02	0.02	–	–	–	–	–
Decyl acetate	–	–	–	–	–	–	0.02	–	t	t	–	–	–	–	–
β-Bergamotene	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.09	0.08
β-Caryophyllene <sup>b</sup>	0.01	0.04	t	0.02	0.03	t	0.07	0.06	0.18	0.17	0.19	0.15	0.13	0.52	1.60
trans-α-Bergamotene	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.17	0.28	0.23	0.15	0.15
α-Humulene <sup>b</sup>	–	–	–	–	–	–	–	0.02	0.02	0.02	0.01	0.03	0.02	0.34	0.37
2-Dodecenal <sup>c</sup>	–	–	–	–	–	–	–	–	0.03	0.02	–	–	–	–	–
(E)-β-Farnesene	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2.60	2.12
β-Cubebene	–	–	–	–	–	–	0.05	–	–	–	–	–	–	0.06	0.30
β-Bisabolene	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.23	0.47	0.36	–	–
Aristolene	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.14	0.09
(E)-Nerolidol <sup>b</sup>	–	–	–	–	–	–	0.07	–	–	–	–	–	–	0.09	0.05
α-Asarone	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.15	0.05
Cadinol <sup>c</sup>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.18	0.10
β-Sinensal	–	0.03	t	0.05	–	t	–	–	–	–	–	–	–	2.00	1.30
α-Sinensal	–	0.02	t	0.05	–	t	–	0.16	–	–	–	–	–	–	–
Nootkatone	–	–	–	–	–	–	–	–	0.13	0.07	–	–	–	–	–

<sup>a</sup>Compounds are listed according to the elution order on HP-1 column, and values (area percent) represent averages of three determinations (t = trace < 0.01%). A1 = *C. sinensis* cv. Washington Navel; A2 = *C. sinensis* cv. Sanguinello; A3 = *C. sinensis* cv. Tarocco; A4 = *C. sinensis* cv. Moro; A5 = *C. sinensis* cv. Valencia Late; A6 = *C. sinensis* cv. Ovale; AM = *C. aurantium*; M1 = *C. deliciosa* cv. Avana; P1 = *C. Paradisi* cv. Marsh Seedless; P2 = *C. paradisi* cv. Red Blush; L1, L2, L3 = *C. limon* cv. Femminello (November, February, June); CZ = *C. sinensis* x *Poncirus trifoliata* – Carrizo Citrange; TY = *C. sinensis* x *Poncirus trifoliata* – Troyer Citrange.

<sup>b</sup>Co-injection with authentic sample.

<sup>c</sup>Correct isomer not identified.

## 4-2 實驗材料與方法

本實驗所採用的樟芝菌株及基礎培養與 2-2 節相同。

### 4-2-1 實驗藥品

本實驗新增使用藥品如表 4-2，其餘所採用的藥品與 2-2-1 節相同。

表 4-2 新增實驗藥品清單

藥品名稱	廠牌
limonene	TCI
$\beta$ -pinene	TCI
$\gamma$ -terpinene	TCI
N <sub>2</sub>	晒輝
H <sub>2</sub>	晒輝
Air	晒輝

### 4-2-2 實驗儀器與設備

本實驗新增儀器與設備如表 4-3，其餘所採用的儀器及設備與 2-2-2 節相同。

表 4-3 新增實驗儀器清單

儀器設備	型號	廠牌
------	----	----

氣相層析儀	Focus GC	Thermo
氣相層析管柱	BP20	SEG

#### 4-2-3 實驗方法

新增實驗方法如下所述，基礎培養與 2-2-3 節相同。

##### 4-2-3-1 不同時間添加乙醇液態培養

本實驗目的為探討乙醇添加對樟芝代謝有效成分之影響。將培養 10 天後的種菌，經滅菌均質機攪碎菌絲球，並以 10% 的接菌量加至 10 個內含 100 ml 液態培養基的 250 ml 三角瓶中，然後放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養。第 7 天取樣 1 瓶，並各添加 2% (v/v) 乙醇於 3 瓶液態培養基中；第 14 天取樣 2 瓶(含無添加及第 7 天添加乙醇各 1 瓶)，並添加 2% (v/v) 乙醇於 2 瓶無添加之液態培養基中；第 21 天取樣 3 瓶(含無添加及第 7、14 天添加乙醇各 1 瓶)，並添加 2% (v/v) 乙醇於 1 瓶無添加液態培養基中；第 28 天取樣 4 瓶(含無添加及第 7、14、21 天添加乙醇各 1 瓶)。取樣後菌絲體經冷凍乾燥測量菌體乾重，待磨粉後進行三萜類含量、總多酚含量、胞內多醣含量等測試。重複實驗三次。

##### 4-2-3-2 檸檬烯乙醇溶液與水溶液添加深層培養

本實驗目的為探討檸檬烯乙醇溶液與水溶液添加對樟芝代謝有效成分之影

響。將培養 10 天後的種菌，經滅菌均質機攪碎菌絲球，並以 10% 的接菌量加至 2 個內含 100 ml 液態培養基的 250 ml 三角瓶中，然後放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養。第 7 天添加 2.0% (v/v) 檸檬烯乙醇溶液(1:1 體積比)於 1 瓶液態培養基中，另 1 瓶添加 2.0% (v/v) 檸檬烯水溶液(1:1 體積比)，第 28 天取樣。取樣後菌絲體經冷凍乾燥測量菌體乾重，待磨粉後進行三萜類含量、總多酚含量、胞內多醣含量等測試。重複實驗三次。

#### 4-2-3-3 不同單萜類添加深層培養

本實驗目的為探討不同單萜類乙醇溶液添加對樟芝代謝有效成分之影響。將培養 10 天後的種菌，經滅菌均質機攪碎菌絲球，並以 10% 的接菌量加至 1 個內含 100 ml 液態培養基的 250 ml 三角瓶中，然後放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養。第 7 天添加 2.0% (v/v) 檸檬烯乙醇溶液(1:1 體積比)於液態培養基中，第 28 天取樣。添加檸檬烯乙醇溶液後及取樣後之發酵液進行 GC 分析；取樣後菌絲體經冷凍乾燥測量菌體乾重，待磨粉後進行三萜類含量、總多酚含量、胞內多醣含量等測試。重複實驗三次。

更改單萜類添加為 $\gamma$ -松油烯、 $\beta$ -蒎烯。重複上述實驗。

#### 4-2-3-4 發酵液中檸檬烯濃度變化

本實驗目的為探討檸檬烯濃度在發酵液中變化。將培養 10 天後的種菌，經



滅菌均質機攪碎菌絲球，並以 10% 的接菌量加至 3 個內含 100 ml 液態培養基的 250 ml 三角瓶中，然後放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養。第 7 天分別添加 2.0% (v/v) 檸檬烯乙醇溶液(1:1 體積比)於液態培養基中，第 14、21、28 天取樣。添加後及取樣後發酵液進行 GC 分析；取樣後菌絲體經冷凍乾燥測量菌體乾重，待磨粉後進行三萜類含量、總多酚含量、胞內多醣含量等測試。重複實驗三次。

#### 4-2-4 分析方法

本實驗新增分析方法為 GC 分析單萜類含量，其餘所採用的分析方法與 2-2-4 節相同。

吸取試樣 1ml 並以 8000 rpm 轉速離心 5 分鐘，取上清液依一定的比例，以 99.5% 的酒精稀釋。將稀釋好的試樣以 0.2  $\mu\text{m}$  濾膜過濾後，利用氣相層析儀 (Thermo model Focus GC series) 分析。毛細管柱為 SEG BP20 (25 m $\times$ 0.22 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ )，起始溫度 50°C，維持 10 min 後以 1.5°C/min 之速率升溫至 200°C，維持 10 min；注射孔 (injector) 溫度 250°C；偵測器為火焰離子偵測器 (FID detector) 溫度 250°C；運送氣體 (carrier gas) 為氮氣 (nitrogen)，流量 25 ml/min；注射上清液體積為 1  $\mu\text{l}$  (Chyau et al., 1996)。

利用檸檬烯標準品，測量波峰面積和檸檬烯濃度作圖，獲得檸檬烯檢量線如附錄六。

### 4-3 實驗結果與討論

同樣的乙醇與單萜類均有抑菌效果，不適宜開始培養時添加。也嘗試第 0 天添加酒精與菌絲體同時培養，但發現菌體受乙醇強烈抑制無法生長。又因橘子果皮精油添加實驗，在第 7 天添加有最佳的效果，所以選擇第 7 天添加各種單萜類乙醇溶液進行實驗。

#### 4-3-1 檸檬烯乙醇溶液與水溶液添加深層培養

不同時間添加 2% (v/v)乙醇的影響實驗中，發現愈早添加乙醇對菌體抑制越強。由圖 4-3(A)可知，一旦加入乙醇，菌體濃度均會開始下降，因此乙醇添加確實會抑制樟芝生長。但相較於柑橘果皮精油添加，乙醇抑制效果卻較弱，表示果皮精油中尚有其他成分同時在抑制樟芝菌體生長，此成分推測為精油的主要成分單萜類。胞內多醣與菌體是生長連動的，因此添加乙醇同時造成胞內多醣大幅下降(圖 4-3(B))。第七天添加乙醇，會抑制樟芝菌絲體生成三萜類。但晚期添加乙醇，確實具有提升二次代謝產物(總多酚和三萜類)的功效(圖 4-3(C)、(D))。

柑橘類果皮精油中最主要成分檸檬烯，因為柑橘類果皮不同，檸檬烯約佔總成分的 60%~95%(Caccioni, et al., 1998)，因此首先選擇檸檬烯進行第七天添加實驗。由圖 4-4 可明顯發現添加 2% (v/v)檸檬烯水溶液，對總多酚合成幾乎沒有影響，但添加檸檬烯乙醇溶液 2% (v/v)時，總多酚含量在第 28 天時可提升至 10.30 mg/g DW 為控制組的 1.73 倍。而在三萜類部份，可由圖 4-5 發現添加 2% (v/v)

檸檬烯水溶液，對三萜類合成也是幾乎沒有影響。但是添加檸檬烯乙醇溶液 2% (v/v)時，三萜類含量卻大幅提升至 33.93 mg/g DW 為控制組的 3.24 倍，產量也有 240.05 mg/L DW 為控制組的 2.40 倍。

綜合上述結果，可了解檸檬烯和乙醇各自會抑制菌體生長，而且第 7 天添加乙醇會抑制樟芝菌絲體合成三萜類生成。但是若當檸檬烯及乙醇同時作用於樟芝菌絲體時，卻有促進三萜類生成效果。

基本上，過量檸檬烯對樟芝菌絲體而言是有害的，因此菌體避免讓大量檸檬烯進入細胞膜內。所以單純添加檸檬烯時，大量檸檬烯仍留在發酵液中，並未進入細胞內，對代謝路徑沒有太大影響，自然沒有促進三萜類生成效果。

而在添加檸檬烯乙醇溶液時，乙醇改變菌絲體細胞膜結構，擾亂細胞滲透性障礙的完整性，因此檸檬烯能大量迅速進入細胞膜內，再進一步穿透質體膜進入質體(粒線體)。所以粒線體內的檸檬烯濃度大幅提高，開始抑制菌體的 MCC 路徑，減少單萜類及其前體(GPP)生成，然後粒線體內將累積過多的 IPP 及 DMAPP，過量的 IPP 及 DMAPP 將穿越粒線體膜，進入細胞質中與 MVA 路徑的 GPP 作用生成 FPP，然後兩個 FPP 又合成三萜類。

檸檬烯乙醇溶液添加，改變了樟芝菌絲體的萜類代謝路徑，進而提高菌體三萜類含量，故可證實檸檬烯為柑橘類果皮精油促進樟芝菌絲體生成三萜類的重要成分之一。

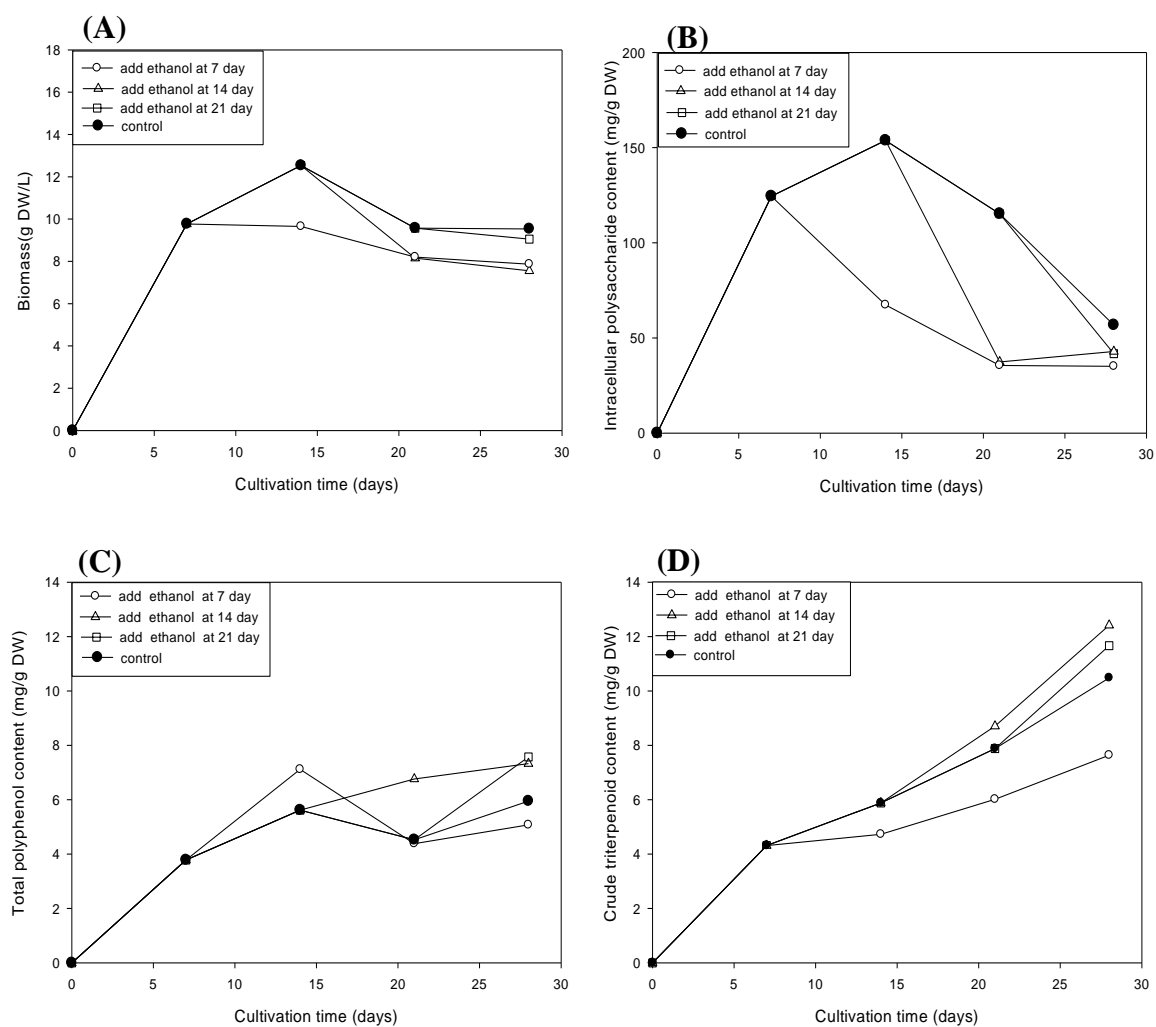


圖 4-3 不同時間添加乙醇對樟芝菌絲體代謝影響 (A)菌體濃度；(B)胞內多醣含量；(C)總多酚含量；(D)三萜類含量（皆取自培養第 28 天）

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，蒸餾水。

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

添加 2% (v/v)乙醇。

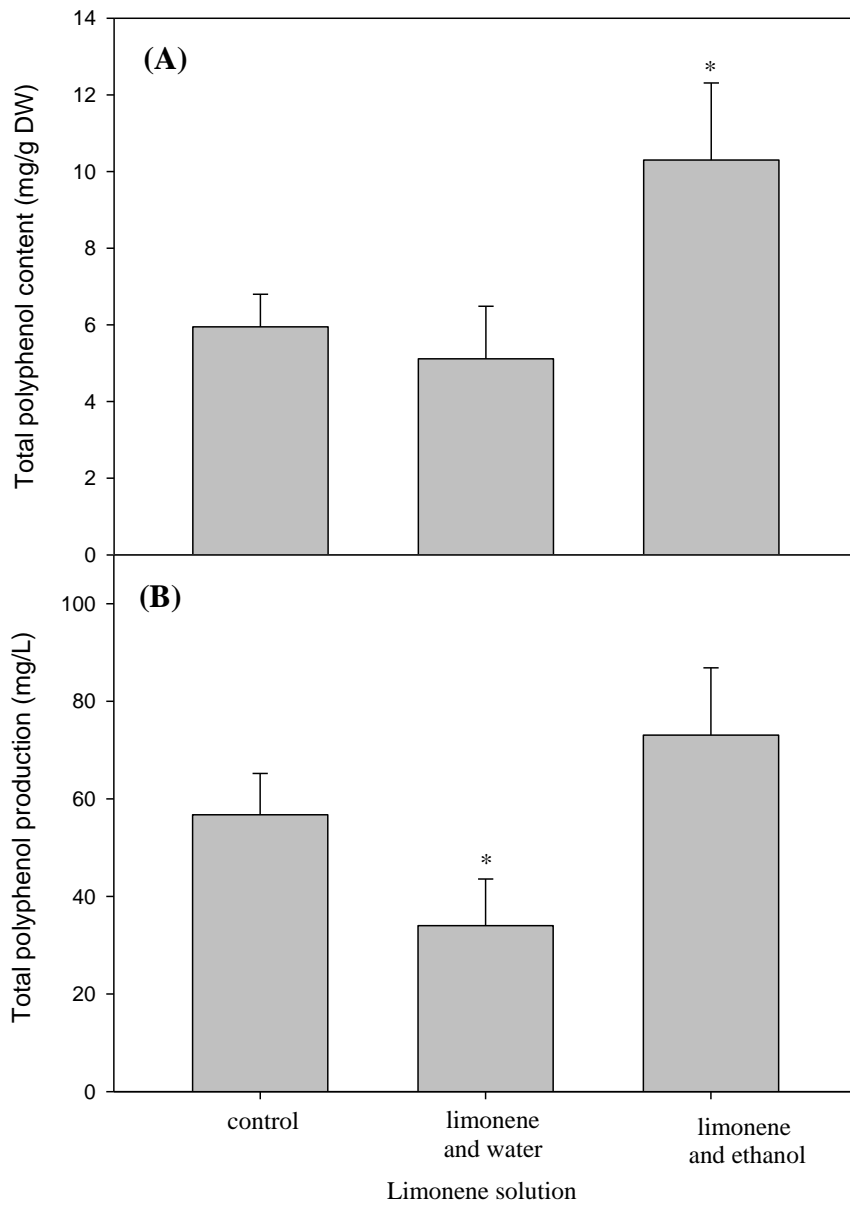


圖 4-4 檸檬烯溶液添加對樟芝菌絲體合成總多酚影響 (A)含量；(B)產量(皆取自培養第 28 天)。\* $p < 0.05$  與控制組比

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，蒸餾水。

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

菌絲體培養第七天時加入檸檬烯、蒸餾水各 1% (v/v)或檸檬烯、乙醇各 1% (v/v)。

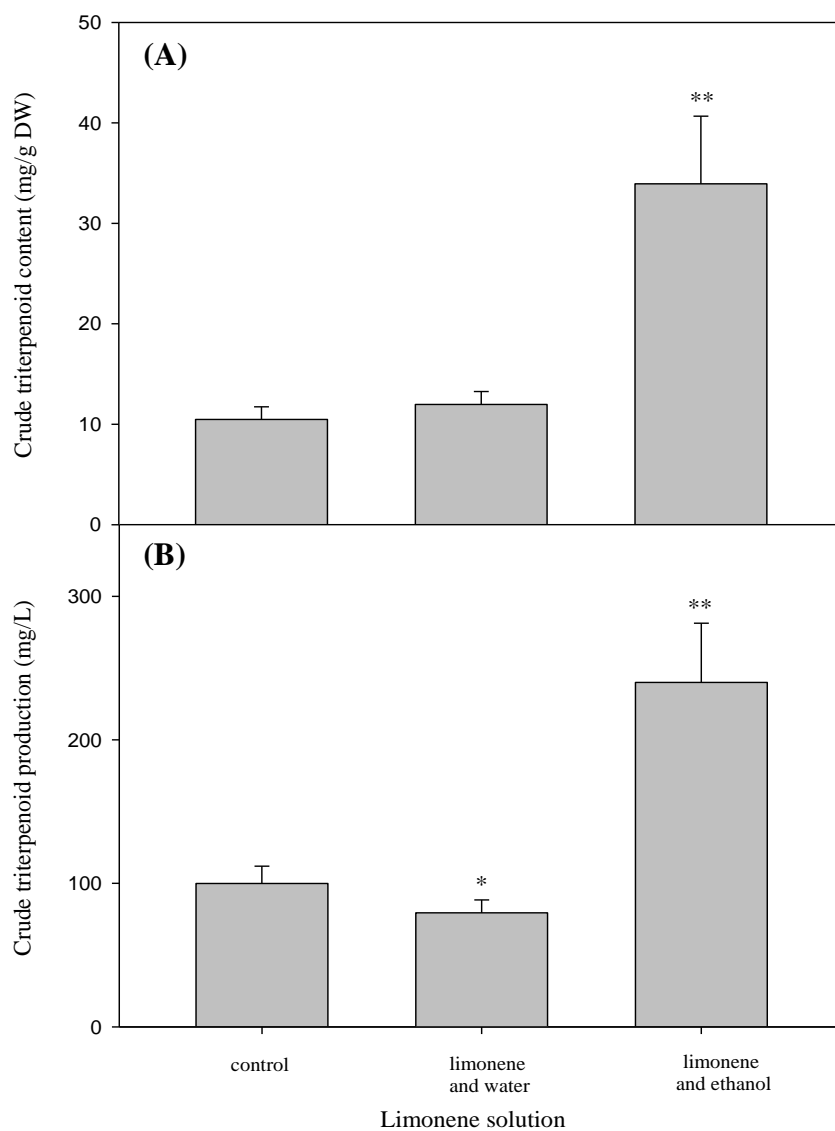


圖 4-5 檸檬烯溶液添加對樟芝菌絲體合成三萜類影響 (A)含量;(B)產量 (皆取自培養第 28 天)。 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$  與控制組比

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，蒸餾水。

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

菌絲體培養第七天時加入檸檬烯、蒸餾水各 1% (v/v)或檸檬烯、乙醇各 1% (v/v)。

#### 4-3-2 不同單萜類添加液態培養

在第 7 天添加單萜類(檸檬烯、 $\gamma$ -松油烯及  $\beta$ -蒎烯)乙醇溶液 2% (v/v)實驗，由圖 4-6 可發現，在檸檬烯乙醇溶液添加部分，菌體生長受到抑制，菌重僅 7.09 g/L，為控制組的 74%。但反觀添加  $\gamma$ -松油烯及  $\beta$ -蒎烯乙醇溶液，對菌體生長毫無影響，與控制組菌重幾乎相同。

由圖 4-7 明顯發現，三種單萜類乙醇溶液添加對樟芝二次代謝產物影響完全不同，檸檬烯乙醇溶液添加後，具有大幅提升樟芝菌體總多酚含量的能力(為控制組的 1.73 倍)。 $\gamma$ -松油烯乙醇溶液和  $\beta$ -蒎烯乙醇溶液添加後，對總多酚合成幾乎無影響。

在三萜類部分(圖 4-8)，單萜類乙醇溶液添加結果與總多酚相似，檸檬烯乙醇溶液添加，可大幅提升樟芝三萜類含量(為控制組的 3.24 倍)。 $\gamma$ -松油烯乙醇溶液添加後，對樟芝三萜類含量沒有影響。而  $\beta$ -蒎烯乙醇溶液添加則抑制三萜類的生成。

由上述結果可知，並非任一種單萜類都具有提升二次代謝產物的能力，應該是與單萜類結構有關，檸檬烯和  $\gamma$ -松油烯均為單環單萜類化合物，而  $\beta$ -蒎烯是雙環單萜類化合物。 $\beta$ -蒎烯與單萜類前體 GPP 的結構差異大，因此較不能抑制前體 GPP 生成，然後前體 GPP 又轉成其他單萜類，粒線體中並無累積 IPP 和 DMAPP，所以對三萜類生成沒有促進效果。檸檬烯和  $\gamma$ -松油烯只有雙鍵位置不同，檸檬烯的雙鍵一個在環上，另一在環外。 $\gamma$ -松油烯兩個雙鍵均在環上。因此

推測檸檬烯和  $\gamma$ -松油烯增進三萜類效果的差異，應該是雙鍵的位置不同所致，但是確實代謝反應機構目前尚不清楚。

由文獻中發現，檸檬果皮精油中檸檬烯含量較其它柑橘類果皮精油低(50~70%)，但相對的  $\beta$ -蒎烯成分較高(10%左右) (Ahmad, et al., 1998; Caccioni, et al., 1998)。因此可了解，過去實驗發現柑橘類果皮精油幾乎都有提升三萜類生成的效果，唯獨檸檬果皮精油沒有增進三萜類生成，其原因就是檸檬烯含量較低，而  $\beta$ -蒎烯含量又過高的關係。

添加單萜類乙醇溶液後之發酵液，利用 GC 監測檸檬烯、 $\gamma$ -松油烯及  $\beta$ -蒎烯的濃度。第七天分別添加各種單萜類乙醇溶液後取樣，使用 GC 分析，發現添加檸檬烯、 $\gamma$ -松油烯及  $\beta$ -蒎烯乙醇溶液，個別 GC 圖譜分別在 7.617 分、10.447 分及 4.303 分中出現大峰(peak)，經比對標準品 GC 圖譜，分別為檸檬烯、 $\gamma$ -松油烯及  $\beta$ -蒎烯(如圖 4-9(A)、(B)及(C))。而在培養第 28 天取樣，在 GC 圖譜上則無大峰出現，此代表無論是檸檬烯、 $\gamma$ -松油烯及  $\beta$ -蒎烯均已被樟芝菌絲體吸收代謝(如圖 4-9(D)、(E)及(F))。

雖然檸檬烯乙醇溶液添加，三萜類含量大幅提升為 3.3 倍，但與橘子果皮精油添加，三萜類含量大幅提升為 10 倍的效果相比，仍有不足，且菌重更低。因此推測橘子果皮精油中尚有其他微量成分能提升三萜類生成，而且是各成分間特殊比例關係的相互作用，才促使樟芝菌絲體三萜類含量大幅提升。



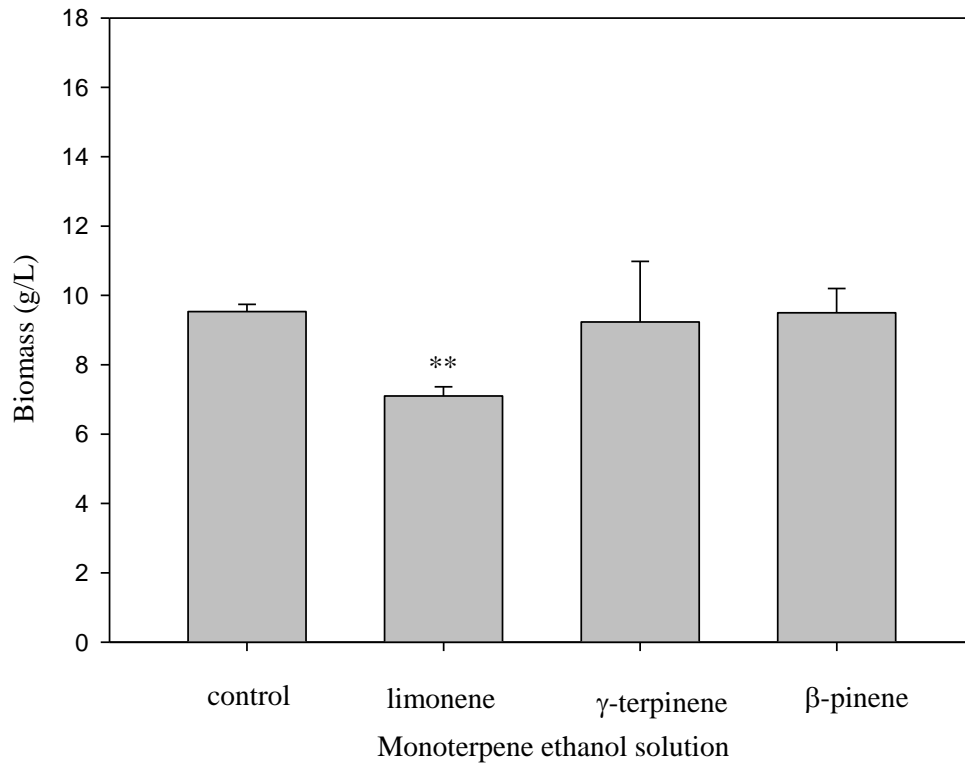


圖 4-6 不同單萜類乙醇溶液添加對樟芝菌體濃度(皆取自培養第 28 天)。\*\*  $p < 0.01$  與控制組比

0.01 與控制組比

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，蒸餾水。

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

菌絲體培養第七天時加入單萜類、乙醇各 1% (v/v)。

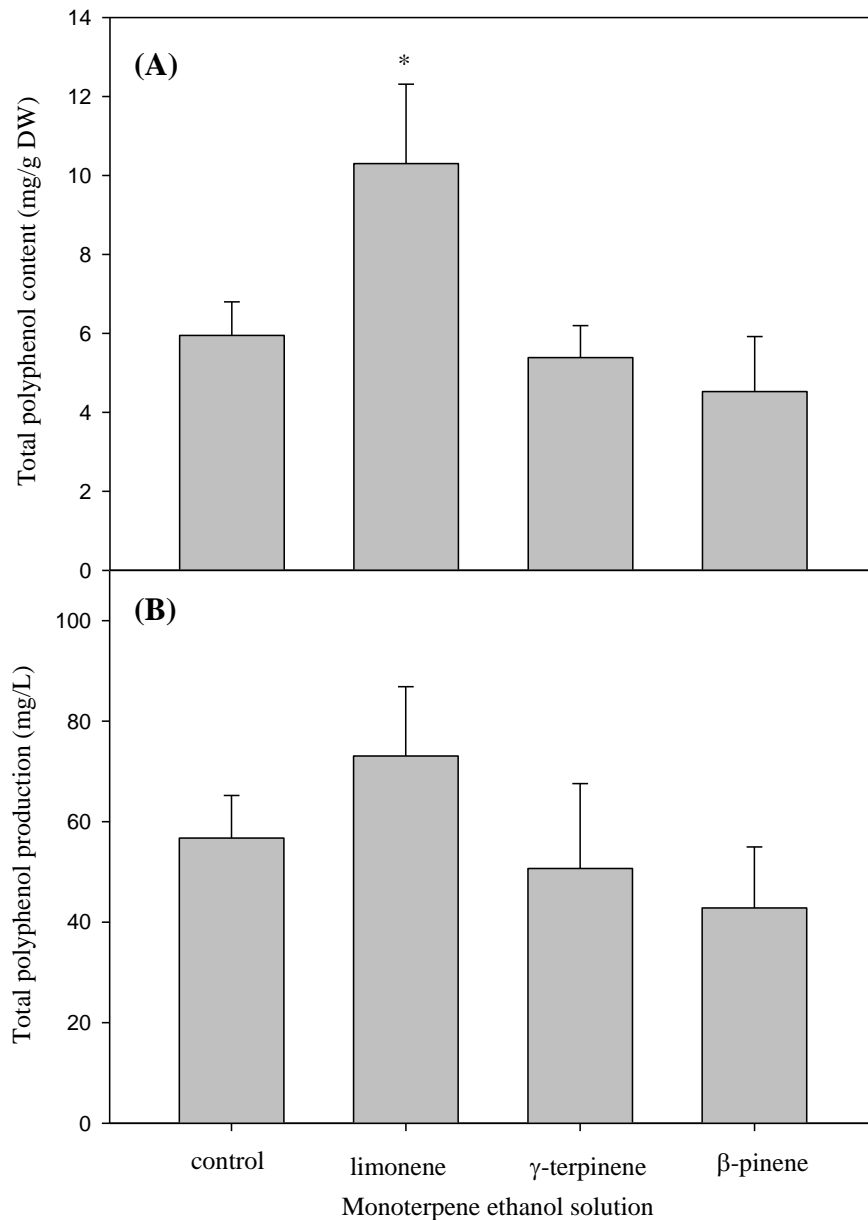


圖 4-7 不同單萜類乙醇溶液添加對樟芝合成總多酚之影響 (A)含量；(B)產量

(皆取自培養第 28 天)。\*  $p < 0.05$  與控制組比

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，蒸餾水。

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

菌絲體培養第七天時加入單萜類、乙醇各 1% (v/v)。

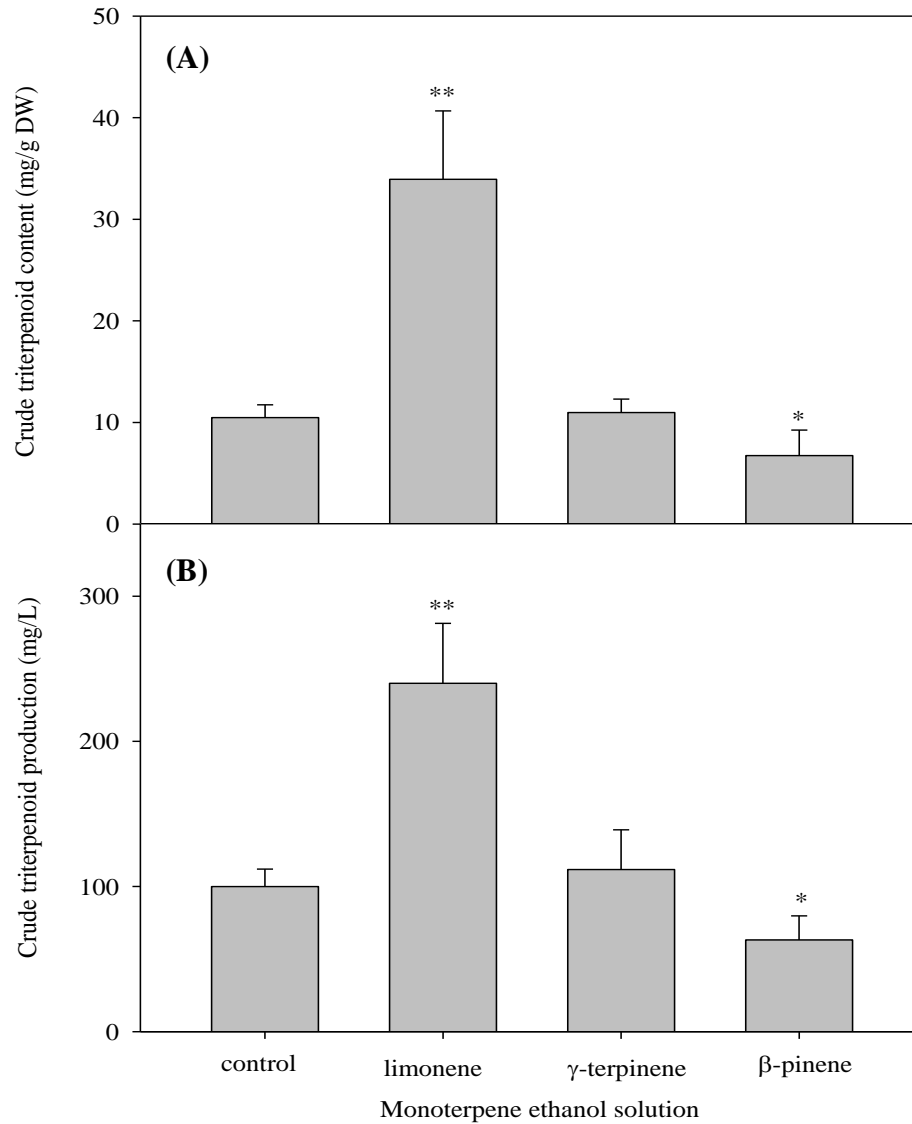


圖 4-8 不同單萜類乙醇溶液添加對樟芝合成三萜類之影響 (A)含量；(B)產量

(皆取自培養第 28 天)。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  與控制組比

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，蒸餾水。

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

菌絲體培養第七天時加入單萜類、乙醇各 1% (v/v)。

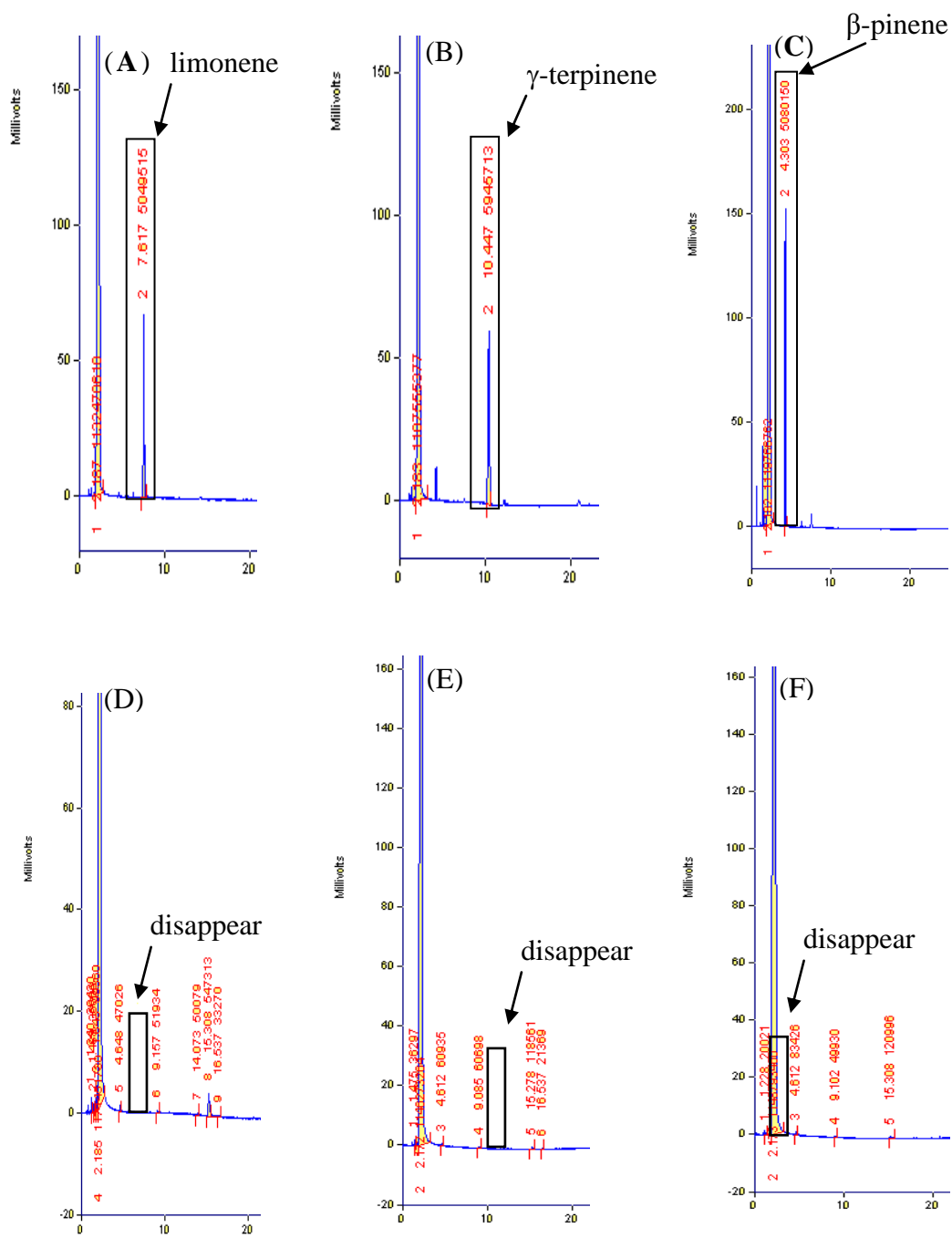


圖 4-9 第 7 天添加單萜類乙醇溶液後發酵液之 GC 圖譜 (A)檸檬烯；(B)  $\gamma$ -松油烯；(C) $\beta$ -蒎烯(添加後馬上取樣)。(D)檸檬烯；(E)  $\gamma$ -松油烯；(F) $\beta$ -蒎烯(取自培養第 28 天)。

### 4-3-3 發酵液中檸檬烯濃度變化

經過 7 天培養後，將檸檬烯乙醇溶液 2% (v/v) 加入 100 ml 樟芝液態發酵液中，其菌絲體生長曲線及生理活性物質代謝變化如圖 4-10。發現檸檬烯乙醇溶液對菌體的抑制與橘子果皮精油相似，第 7 天添加後，菌體濃度持平 7 天，然後再下降。但在胞內多醣部分則不同，添加檸檬烯乙醇溶液後，胞內多醣濃度迅速下降，並無持平的現象發生，原因為橘子果皮精油的其他微量成分，會影響樟芝菌絲體的代謝，使得胞內多醣濃度持平 7 天。菌絲體二次代謝產物(總多酚及三萜類)含量的提升，也與橘子果皮精油相似，只是提升倍率較小。

另外檸檬烯濃度部分，第 7 天添加後，發酵液中的檸檬烯濃度急速下降，很快的在發酵液中只剩下極低的濃度。代表著檸檬烯可能迅速穿過細胞膜，進入細胞內，並且進入樟芝菌絲體的新陳代謝中，經轉化形成其他產物，惟有如此才能不斷降低細胞內檸檬烯濃度，讓發酵液中檸檬烯持續擴散進入細胞內，發酵液中檸檬烯濃度才會極低。故推斷檸檬烯確實具有改變代謝路徑的效果。

萜類生成的影響因子可能為防禦活化劑(defense activator)、誘導劑(elicitor)和前驅物(precursor)。近 40000 種萜類化合物現在已被確認，可提供植物和微生物防禦敵人的攻擊、吸引昆蟲傳受花粉及訊息。一般而言，當植物受到攻擊時，產生大量萜類做為化學武器，攻擊敵人，當不利狀況解除時，新陳代謝再恢復成正常。但就本研究而言，單萜類(檸檬烯)添加後 7 天，發酵液中就幾乎沒有檸檬烯的存在，但三萜類含量仍然持續攀升，所以影響因子不為防禦活化劑。

本實驗添加檸檬烯乙醇溶液後，大量檸檬烯可能迅速進入細胞中，在 7~14 天階段，細胞質體內的檸檬烯抑制單萜類生成，改變代謝路徑，扮演著誘導劑的功能。隨著時間檸檬烯轉化成其他產品，檸檬烯含量降至很低，但三萜類含量仍然持續上升，因此在培養後期，檸檬烯應該不只是擔任誘導劑的角色。

前驅物進入新陳代謝系統轉化成前體，再反應生成產物，因此前驅物含量會持續降低。第 14 天後發酵液中幾乎沒有檸檬烯存在，可能已被轉換成其他產物，推測部分檸檬烯經酵素作用轉換成單萜類前體 GPP 或與 IPP 作用生成 FPP，然後穿出质體膜，再由 MVP 路徑合成三萜類，所以才能在培養後期，沒有檸檬烯作用下持續增加三萜類的含量。不過此檸檬烯代謝路徑尚無文獻證實，確實反應機構尚不清楚。

#### 4-4 結論

乙醇改變細胞膜結構，檸檬烯才能大量進入細胞內，進一步穿過質體膜進入質體，抑制質體的 MCC 路徑，改變樟芝菌絲體的萜類代謝路徑，進而提高菌體三萜類含量，此證實檸檬烯為柑橘類果皮精油促進樟芝菌絲體生成三萜類的重要成分之一。

每種單萜類對樟芝菌絲體代謝影響不同，應該是與單萜類結構有關，檸檬烯乙醇溶液對樟芝菌絲體二次代謝產物(總多酚、三萜類)有促進功效。檸檬果皮精油中  $\beta$ -蒎烯成分較高，而  $\beta$ -蒎烯會抑制三萜類生成，造成檸檬果皮精油沒有增

進三萜類生成的功效。

第 7 天添加檸檬烯乙醇溶液後，檸檬烯可能進入細胞中，穿透質體膜，在質體內抑制單萜類生成，改變代謝路徑，扮演著誘導劑的功能。第 14 天後推測部分檸檬烯可能進入新陳代謝系統轉化成單萜類的前體，然後穿出質體膜，在細胞質中經 MVP 路徑合成三萜類，扮演著前驅物的角色。

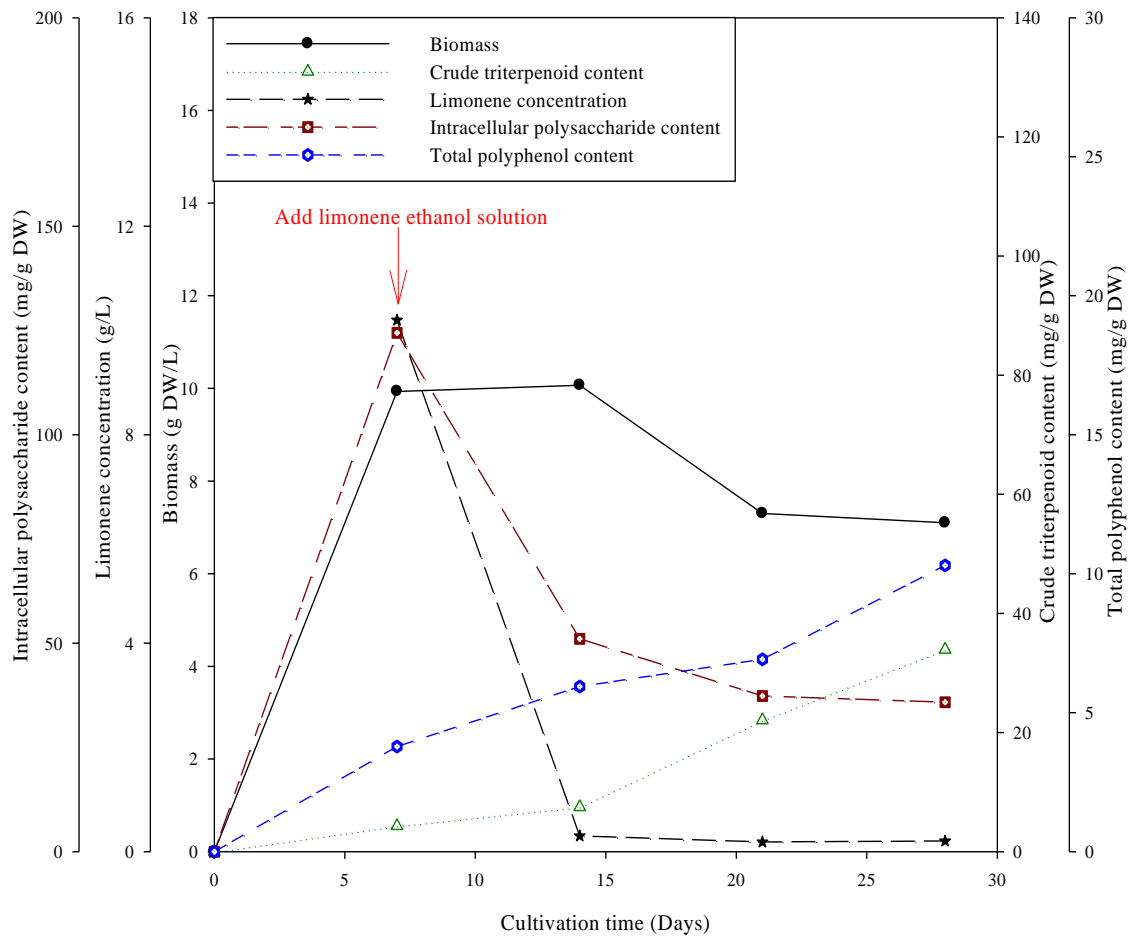


圖 4-10 檸檬烯乙醇溶液添加之樟芝生長曲線、生理活性產物及檸檬烯含量

培養基成份：Corn starch (4.78%)，YM broth (3.19%)，蒸餾水。

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

菌絲體培養第七天時加入檸檬烯、乙醇各 1% (v/v)。



## 第五章 柑橘類果皮粉末添加之樟芝平板式固態培養

利用天然培養基蕎麥及柑橘類果皮粉末，加入蒸餾水揉成麵糰，平鋪在玻璃培養皿中，於25°C環境下進行樟芝平板式固態培養，觀察樟芝菌絲體生長情形及生理活性物質代謝，研究柑橘類果皮對樟芝二次代謝產物的影響。

### 5-1 前言

菇類傳統栽培是採用固態培養，常見的方式為段木栽培、太空包栽培及機械自動化控溫栽培等。而菇類育種主要在研發符合市場需求之高產量、高品質菌株，傳統育種方法有自然篩選及誘導突變，此外還有交配反應(mating reaction)、菌絲融合(anastomosis)、原生質體融合(protoplast fusion)及分子遺傳技術的基因重組(gene cloning)等。但由於固態培養從接種到子實體收成需長達數月的時間成本，而且鮮菇採收的保存、運輸及加工等投資，都有其技術的限制(王伯徹, 2005)。

#### 5-1-1 固態培養之優缺點

固態培養是指在水分含量極低的環境下，利用固態營養基質供微生物生長。微生物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)。

固態培養是傳統而自然的栽培方式，雖然受到很多技術的限制及時間成本較

高，但固態發酵仍然有不少優點：(1) 固態發酵的填充容積比液態深層發酵高，因為固態發酵水含量低，節省操作空間和降低成本。(2) 因為細菌的生長受到低水活性的限制，固態發酵較不易受到細菌污染。(3) 如果產物需要從固態發酵中萃取，只需要較少的溶劑與較低的回收成本。(4) 微生物利用空氣中的氧氣，降低了通氣的能量成本。(5) 可針對各種產物特性，發展成各種不同的固態發酵結構體。另外，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，可乾燥後做為動物飼料或肥料(Shuler and Kargi, 2002)。

但液態培養過程為固定組成之勻相系統，可有效控制pH值、溫度、溶氧及攪拌等條件。而固態培養過程卻包含固、液及氣三相的非勻相系統，其複雜的質傳與熱傳，使得整體發酵過程的量測與監控較為困難。整體固態發酵過程有下列缺點：(1) 固體基質床的攪拌非常困難，造成基質床異質性的生理、物理、化學環境不均勻，因此細胞、養分、溫度、水含量分佈不規則，這個複雜性使得發酵過程控制非常困難。(2) 微生物新陳代謝與生長會產生熱，而固態基質床的熱傳導係數非常低，使得溫度控制非常困難。通常僅能靠強制通氣作為培養溫度控制的方法。(3) 快速測量菌體生長與其它發酵參數非常困難，尚無有用的感測器可供直接測量。(4) 微生物被限制在低水含量的基質生長。黴菌或其他絲狀真菌最適合，細菌則不適合生長。(5) 因為目前仍缺乏有效方法進行線上發酵狀況分析，因此連續操作與自動化非常困難。(6) 由於固態發酵高產率的影響因子間的交互作用相當複雜，培養策略通常是依靠經驗與實驗結果(Sato and Sudo, 1999)。

### 5-1-2 固態發酵之應用

固態發酵廣泛應用於東、西方食品製程上，如製造醬油或味噌過程中所需的原料米麴，另外如納豆、起司、紅麴、天貝等產品均是利用固態發酵法進行生產。在農業應用方面，利用豬糞和稻草為基質，接種高溫放線菌進行固態發酵製作堆肥，或利用蔗渣為基質，生產單細胞蛋白質(SCP)及蛋白質強化飼料。

生產工業酵素方面，較常見的纖維水解酵素、蛋白質水解酵素和澱粉水解酵素等皆可利用固態發酵法進行大量生產。2005年Dahiya等人使用*Enterobacter* sp. NRG4固體發酵生產幾丁質酵素時，利用回應曲面實驗設計法找出最佳培養條件，使得幾丁質酵素產物從原來616 U/g增加到1475 U/g (Dahiya et al. 2005)。2005年Botella等人使用葡萄果皮渣作為固態基質，利用*Aspergillus awamori*為菌種進行發酵生產水解酵素(Botella et al., 2005)。Kunamneni等人利用米糠、麩皮、麥桿等農業廢棄物接入耐熱性真菌*Thermomyces lanuginosus*發酵，可生產出amylase活性達534 U/g (Kunamneni et al., 2005)。

### 5-1-3 柑橘類果皮性質與成份

柑橘類果實的構造上分為外果皮、中果皮與內果皮三部分。外果皮為果實最外層，包括色素層(flavedo)和油胞層的部分。中果皮即白色的絨層(albedo)部分。內果皮為可逐瓣分離的瓢囊，即果肉。一般所稱之果皮包括中果皮與外果皮，兩者間無明顯的界線。

Chafer 等人研究柑橘類果皮顯微結構及真空浸漬效應，整理柑橘類果皮物理性質如表 5-1。顯示檸檬和葡萄柚果皮含水量稍大，橘子果皮的可溶性固形物含量及密度較高，檸檬、柳丁和葡萄柚果皮的孔隙度差不多，葡萄柚果皮厚度及中果皮比例最高(Chafer et al., 2003)。

烘乾後柑橘類果皮成份中(如表 5-2)，果膠成分含量最多，其中橘子果皮的果膠成分高達 60%；其次為半纖維素及纖維素；蛋白質、色素和脂肪含量不高，因種類不同而有差異(賴怡伶，2008)。

表 5-1 柑橘類果皮物理性質(Chafer et al., 2003)

	Water mass fraction $x_w$	Soluble solid mass fraction $x_s$	Density sample $\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	Porosity $\epsilon$	Thickness (cm)	Ratio a/p <sup>a</sup> (%)
Grapefruit	0.793 (0.009)	0.163 (0.013)	0.714 (0.025)	0.36 (0.02)	0.67 (0.12)	81
Mandarin	0.724 (0.003)	0.207 (0.011)	0.894 (0.009)	0.24 (0.05)	0.29 (0.04)	33
Orange	0.748 (0.012)	0.141 (0.005)	0.80 (0.03)	0.33 (0.02)	0.54 (0.09)	59
Lemon	0.804 (0.002)	0.115 (0.006)	0.716 (0.012)	0.37 (0.06)	0.56 (0.08)	68

<sup>a</sup> a/p, ratio between albedo thickness and total peel thickness.

表 5-2 烘乾後果皮成份比例(賴怡伶，2008)

	色素、脂肪	果膠	蛋白質	半纖維素	纖維素
橘子果皮	6.50%	60.33%	4.83%	20.08%	8.25%
檸檬果皮	9.33%	33.87%	13.93%	28.52%	14.35%
香蕉果皮	12.23%	28.43%	24.70%	31.01%	3.62%

#### 5-1-4 樟芝平板式固態培養

樟芝子實體為台灣獨特的傳統中藥，目前市場對樟芝需求度高，但樟芝只

寄生於牛樟樹中空的內壁上，因此為了取得樟芝，牛樟樹不斷遭不肖業者盜砍、挖空或縱火(有人相信牛樟樹根部燒過後更易出菇)，山林常見大面積的嚴重摧殘，使得牛樟樹越來越稀少，野生樟芝子實體也越來越困難被發現。因此學界和業界均積極在實驗室中，開發培養樟芝子實體技術，但各家廠商均將配方視為商業機密或申請專利保護，而且研究幾乎都集中在洋菜膠培養基上，對於其他天然培養基少有著墨。

一般認為牛樟樹具有特殊成份，樟芝必須在牛樟木上才會生成子實體，因此大量非法砍伐國寶級牛樟樹培養樟芝。但張東柱和王武榮研究指出，牛樟木材精油具有促進樟芝菌絲體生長功效，並且抑制其它競爭真菌，有助於樟芝在牛樟木材上建立群落，然而，樟芝出菇時，牛樟精油並非必要成份(Chang and Wang, 2008)。

陳啟楨等人以不含牛樟樹的特殊培養基配方，在適當環境條件控制，加快樟芝生長速度，並誘使種菌在洋菜培養基上行子實體的發育成長。利用此特殊培養基的組成加以修正後，以固體人工栽培方式培養，經過兩個半月後，成功地培育出與野生樟芝相近之三萜類成份及有效的生物活性(陳啟楨等，2001)，但其對於培養基成分並未做說明。

張東柱和王武榮將高雄與嘉義兩地區採集的野生樟芝子實體，利用單孢純化培養，取出這兩個品系的單孢子，將這兩個單核系統的單孢子進行雜交培養。經配對而成 130 株雙核菌株進行培養實驗，只有一個雙核菌株於 45 天，在 PDA 和

MEA 培養基上形成子實體，子實體呈現多孔的現象(圖 5-1)。經顯微鏡觀察到子實體層產生擔子與擔孢子，證實不需要牛樟木材也可以生成樟芝子實體(Chang and Wang, 2005)。但此人工培育出的樟芝子實體非常輕薄，產量也相當的低。

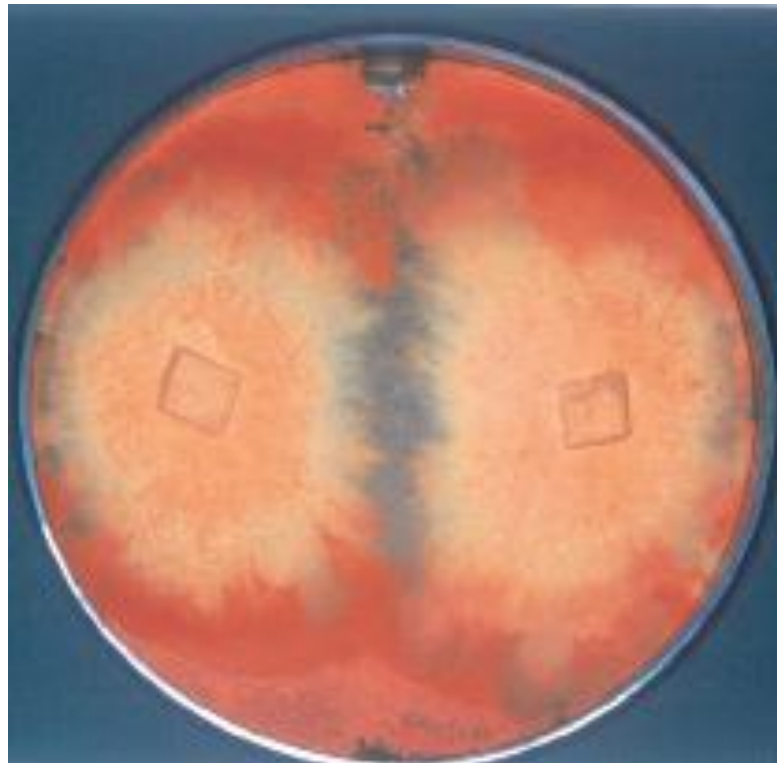


圖 5-1 人工栽培子實體(Chang and Wang, 2005)

Lin 等人觀察到樟芝子實體的形成，受到溼度與空氣品質的影響。也發現物理機械性的刮傷處理，可誘導洋菜膠培養基上的菌絲體產生子實體，此子實體甲醇萃取物經 HPLC 圖譜分析，其內容物的組成和未刮傷處理的不同，但非常類似野生的樟芝子實體 HPLC 圖譜(Lin et al., 2006)。但刮傷處理產生子實體的生成現象並不穩定，子實體更加輕薄，而且產量也更低。

朱祐頡透過營養源的遞減方式，造成樟芝生長逆境，促進子實體的生成，實驗生成之子實體以甲醇萃取，經 HPLC 分析確認具有野生樟芝子實體特有成分。其中以 Strain B 營養源遞減實驗時，在 50% MEA 培養基的出菇情形最為穩定，培養八週後可以穩定長出樟芝子實體，但實驗室其他菌株尚未找到可以穩定出菇之方式(朱祐頡，2008)。換言之，即使同為樟芝，每種樟芝菌株面臨生長逆境時的生長形態都可能不同。

綜合上述文獻資料，歸納出三個結論。首先，樟芝出菇時，並非一定要有牛樟木；其次，培養基需高緻密度，樟芝菌絲體無法長入培養基中，只能在培養基表面成長，如 PDA 和 MEA 等洋菜培養基；最後，環境惡劣下(機械性刮傷、營養不足或有害成分過多等)，可促使樟芝出菇。基於上述理由，本研究利用蕎麥麵糰的高緻密性及柑橘類果皮的高精油成份，尋找適合的天然培養基配方，提高活性代謝產物，刺激樟芝子實體生成。

## **5-2 實驗材料與方法**

本實驗所採用的樟芝菌株及基礎培養與 2-2 節相同。

### **5-2-1 實驗藥品**

本實驗新增使用藥品如表 5-3，其餘所採用的藥品與 2-2-1 節相同。

表 5-3 新增實驗藥品清單

藥品名稱	廠牌
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	ECHO
Acetone	ECHO
Acetonitrile (CH <sub>3</sub> CN)	ECHO
蕎麥	超賀特級穀坊

### 5-2-2 實驗儀器與設備

本實驗新增儀器與設備如表 5-4，其餘所採用的儀器及設備與 2-2-2 節相同。

表 5-4 新增實驗儀器清單

儀器設備	型號	廠牌
粉碎機	RT-02A	台灣榮聰
高效液相層析儀	HP1100	美國 Agilent
高效液相層析管柱	Luna C18	美國 Phenomenex

### 5-2-3 實驗方法

新增實驗方法如下所述，基礎培養與 2-2-3 節相同。



### 5-2-3-1 乾燥果皮粉末製作

為了控制實驗濕度的一致性，並且避免固態發酵樣品濕度過高，因此本實驗採用乾燥果皮粉末直接添加。將固定飲料店獲取的新鮮果皮洗淨，然後將果皮剪碎並放入烘箱烘乾，以粉碎機將烘乾果皮打碎成粉末狀，放置在 4°C 的冰箱保存備用。

### 5-2-3-2 平板式固態培養基礎試驗

以粉碎機將蕎麥打成粉末狀，取 28 g 蕎麥粉末，添加 40% 蒸餾水揉成麵糰狀，鋪平放入玻璃培養皿中作為培養基，將培養基放入滅菌釜中滅菌，滅菌 20 分鐘。培養 10 天的液態種菌，利用滅菌均質機打碎，並將種菌接至滅菌培養基上，每個培養基接菌量皆為 10 ml。在培養第 15、20、25、30、35 天取樣，收集菌絲體並放入烘箱烘乾，測量菌絲體乾重。利用粉碎機打碎烘乾菌絲體以利保存，將打碎的菌絲體進行三萜類含量、總多酚、胞內多醣及 HPLC 三萜類成份的分析。重複實驗三次。

### 5-2-3-3 添加不同果皮粉末平板式固態培養

實驗目的為探討各種果皮粉末添加對樟芝代謝有效成分之影響。取 28 g 蕎麥粉末及 2 g 乾燥葡萄柚果皮粉末，添加 40% 蒸餾水揉成麵糰狀，鋪平放入玻璃培養皿中作為培養基，將培養基放入滅菌釜中滅菌，滅菌 20 分鐘。培養 10 天的

液態種菌利用滅菌的均質機打碎，並將種菌接至滅菌培養基上，每個培養基接菌量皆為 10 ml。在培養第 30 天取樣，收集菌絲體並放入烘箱烘乾，測量菌絲體乾重。利用粉碎機將烘乾的菌絲體打碎以利保存。將打碎的菌絲體進行三萜類含量、總多酚、胞內多醣的分析。重複實驗三次。

依次更改乾燥果皮粉末為檸檬果皮粉末、柳丁果皮粉末、橘子果皮粉末。重複上述實驗。

#### 5-2-3-4 添加不同重量葡萄柚果皮粉末平板式固態培養

本實驗目的為探討葡萄柚果皮粉末添加量對樟芝代謝有效成分之影響。取 28 g 蕎麥粉末及各種克數(0.5 g、1 g、2 g、4 g、8 g)乾燥葡萄柚果皮粉末，添加 40% 蒸餾水揉成麵糰狀，鋪平放入玻璃培養皿中作為培養基，將配好的培養基放入滅菌釜中滅菌，滅菌 20 分鐘。培養 10 天的液態種菌，利用滅菌的均質機打碎，並將種菌接至滅菌培養基上，每個培養基接菌量皆為 10 ml。在培養第 30 天取樣，收集菌絲體並放入烘箱烘乾，測量菌絲體乾重。利用粉碎機將烘乾的菌絲體打碎以利保存。將打碎的菌絲體進行三萜類含量、總多酚、胞內多醣及 HPLC 三萜類成份的分析。重複實驗三次。

#### 5-2-4 分析方法

本實驗新增分析方法如下所述，其餘所採用的分析方法與 2-2-4 節相同。

#### 5-2-4-1 菌體濃度

將平板式固態培養菌絲體，利用刮取方式將其從基質上分離，置入烘箱烘至恆重，乾燥後所測得的為菌體乾重量，將其磨粉並放入4°C的冰箱中以利保存。

#### 5-2-4-2 HPLC 分析代謝產物三萜類含量

取乾燥樟芝菌絲(或子實體)100 mg，加入3 ml 50%的乙醇萃取12小時，並以超音波震盪萃取30分鐘。萃取完後以8000 rpm離心5分鐘，取出上清液，將殘渣再加入3 ml 50%的乙醇萃取12小時，並重複以上動作，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氯仿以超音波震盪萃取30分鐘，取下層液體加入3 ml 5%的NaHCO<sub>3</sub>，並以超音波震盪萃取30分鐘，之後調整液體pH值至3以下，取下層液體減壓濃縮至乾。加入2 ml乙醇，將實驗所得之樟芝乙醇萃取液，以6000 rpm離心10分鐘，取上清液以0.2 μm濾膜過濾後，以HPLC分析。

利用高效能液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC)對樟芝乙醇萃取液進行定性與定量之分析，使用Luna C18(5 μm, 4×250 mm)之液相層析管柱，移動相溶劑A (0.0085% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)和B (acetonitrile)，依照下列組成：0-65 min、30-47% B，65-110 min、47-47% B，110-140 min、47-100% B，140-160 min、100-100% B，160-165 min、100-30% B，165-175 min、30-30% B，進行線性梯度流洗，液相層析管柱溫度為30°C，流速為1 ml/min，樣品注射量20 μL，UV detector

波長210 nm (Chang et al., 2010)。

### 5-3 實驗結果與討論

平板式固態培養有別於傳統的三角瓶固態培養，因為蕎麥粉與水混合後，形成緻密度高之麵糰，樟芝菌絲體不易往下生長，只能在基質表面上成長，因此取樣時可以將菌絲體與基質分離(如圖5-2)，完整分析菌絲體生理活性，而非分析菌絲體與基質的混合物。

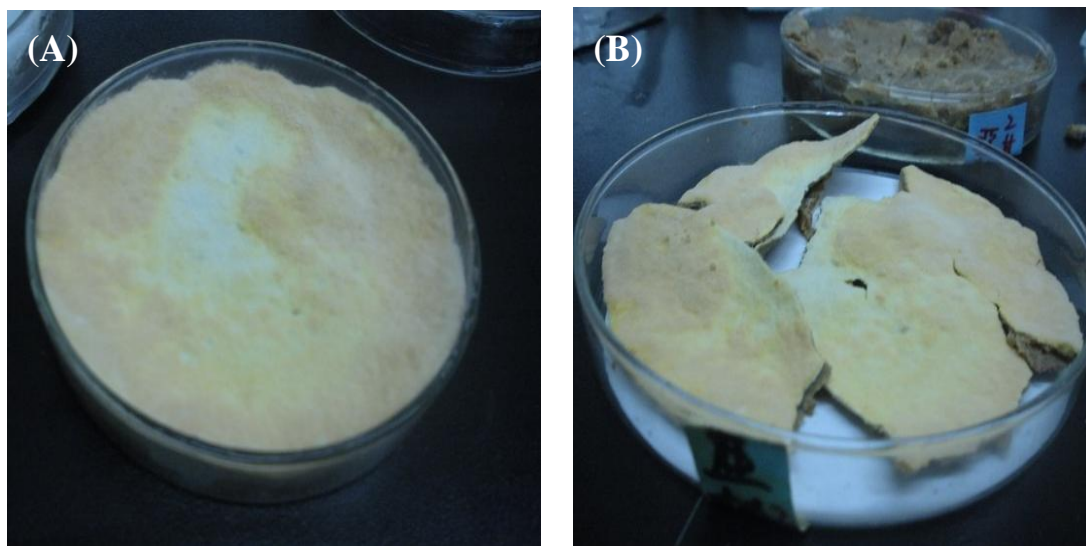


圖 5-2 平板式固態培養 (A) 取樣前；(B)取樣後

培養基成份：蕎麥粉(28 g)，葡萄柚果皮粉末(4 g)，蒸餾水(40%)。

培養條件：接菌量 10 ml，培養溫度 25°C。

### 5-3-1 平板式固態培養基礎試驗

樟芝在培養初期先長出白色的菌絲體，且在白色菌絲體下會形成一層墨綠色物質，可視為樟芝菌絲體與基質的邊界層。培養一段時間後，白色菌絲體會慢慢長滿整個平板表面，再繼續培養一段時間，白色菌絲體會慢慢翻紅再變成褐色，此時菌絲體將有較高的三萜類含量。

由圖5-3得知，樟芝菌絲體的重量於第30天時最高(3.34 g/plate)，然後趨於平緩。胞內多醣為代謝產物，與菌絲體生長有關，在菌絲體生長初期便會大量累積，在培養第20天的胞內多醣含量(157.38 mg/g DW)為最高，然後胞內多醣含量開始緩慢下滑。此乃因為蕎麥培養基緻密度高，菌絲體無法深入培養基生長，僅能在培養基表面緩慢吸收養分，再者菌體進入指數生長期，成長快速，需要大量養份，使得碳、氮源不再充足，因此個別菌絲體不再累積胞內多醣，甚至將其代謝成為養分提供菌體生長，但若就產量而言，胞內多醣產量一直增加至第30天才達最高值(420.95 mg/plate)。

三萜類與總多酚化合物為二次代謝產物，均於成長後期大量產生，因此培養30天後三萜類含量趨於平緩震盪，第30天有較高三萜類含量(9.66 mg/g DW)及產量(32.26 mg/plate)。而總多酚含量在培養20天後趨於平緩震盪，第30天也有高總多酚含量(9.43 mg/g DW)及產量(31.47 mg/plate)。

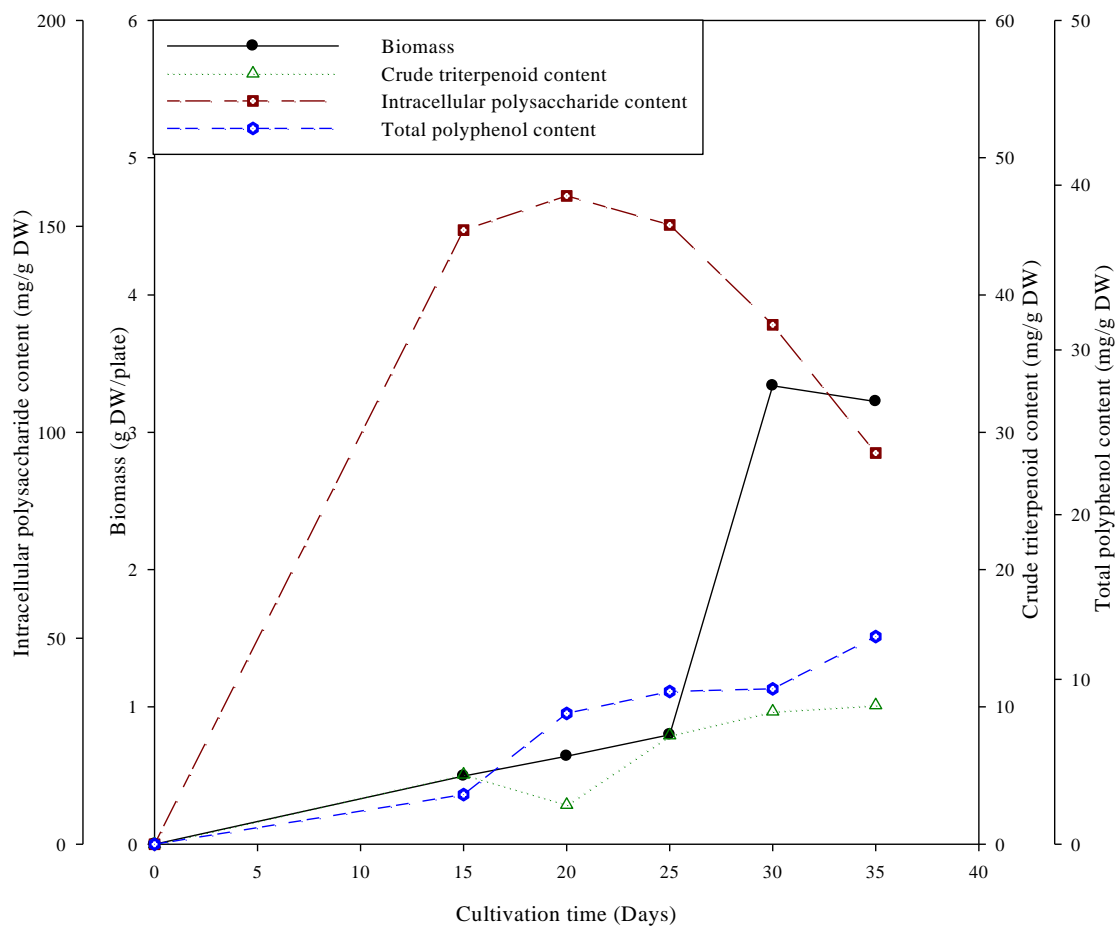


圖 5-3 樟芝平板式固態培養菌絲體生長曲線及生理活性物質代謝

培養基成份：蕎麥粉(28 g)，蒸餾水(40%)。

培養條件：接菌量 10 ml，培養溫度 25°C。

### 5-3-2 添加不同果皮粉末平板式固態培養

由圖 5-4(A)發現，不同柑橘類果皮粉末(2 g/plate)添加對樟芝成長影響不同。

由圖 5-4(B)得知，添加檸檬、柳丁及橘子果皮粉末的胞內多醣含量與培養 30 天控制組差距不大，但是添加葡萄柚果皮粉末培養的胞內多醣含量(86.42 mg/g DW)遠小於控制組(126.10 mg/g DW)，乃是因為樟芝菌絲體較其他組先老化，合成出較多的二次代謝產物(三萜類與總多酚)，消耗許多胞內多醣做為養份，故使得胞內多醣含量大幅降低。

由圖 5-4(C)可以看出，總多酚含量以添加葡萄柚果皮粉末效果最佳(21.76 mg/g DW)，為控制組(9.43 mg/g DW)的 2.31 倍，其次為添加檸檬(18.19 mg/g DW)、柳丁(12.85 mg/g DW)及橘子果皮粉末(9.67 mg/g DW)。以上可以看出，柑橘類果皮粉末對樟芝菌絲體，均具促進總多酚生成功效。

然而由圖 5-4(D)發現，添加葡萄柚果皮粉末的菌絲體，在培養到第 30 天時三萜類含量最高(36.16 mg/g DW)，為控制組(9.66 mg/g DW)的 3.74 倍。添加葡萄柚果皮粉末培養的菌絲體重量雖然很少，但三萜類含量卻最高，乃是因為二次代謝產物往往對於菌絲體本身具有毒性，故這些三萜類化合物亦加速年輕菌絲體逐漸老化，並迫使合成出更多的三萜類化合物，所以其三萜類含量為最高。整體而言，柑橘類果皮粉末對樟芝平板式固態培養，均具有促進樟芝菌絲體合成三萜類之功效，而又以添加葡萄柚果皮粉末效果最佳。

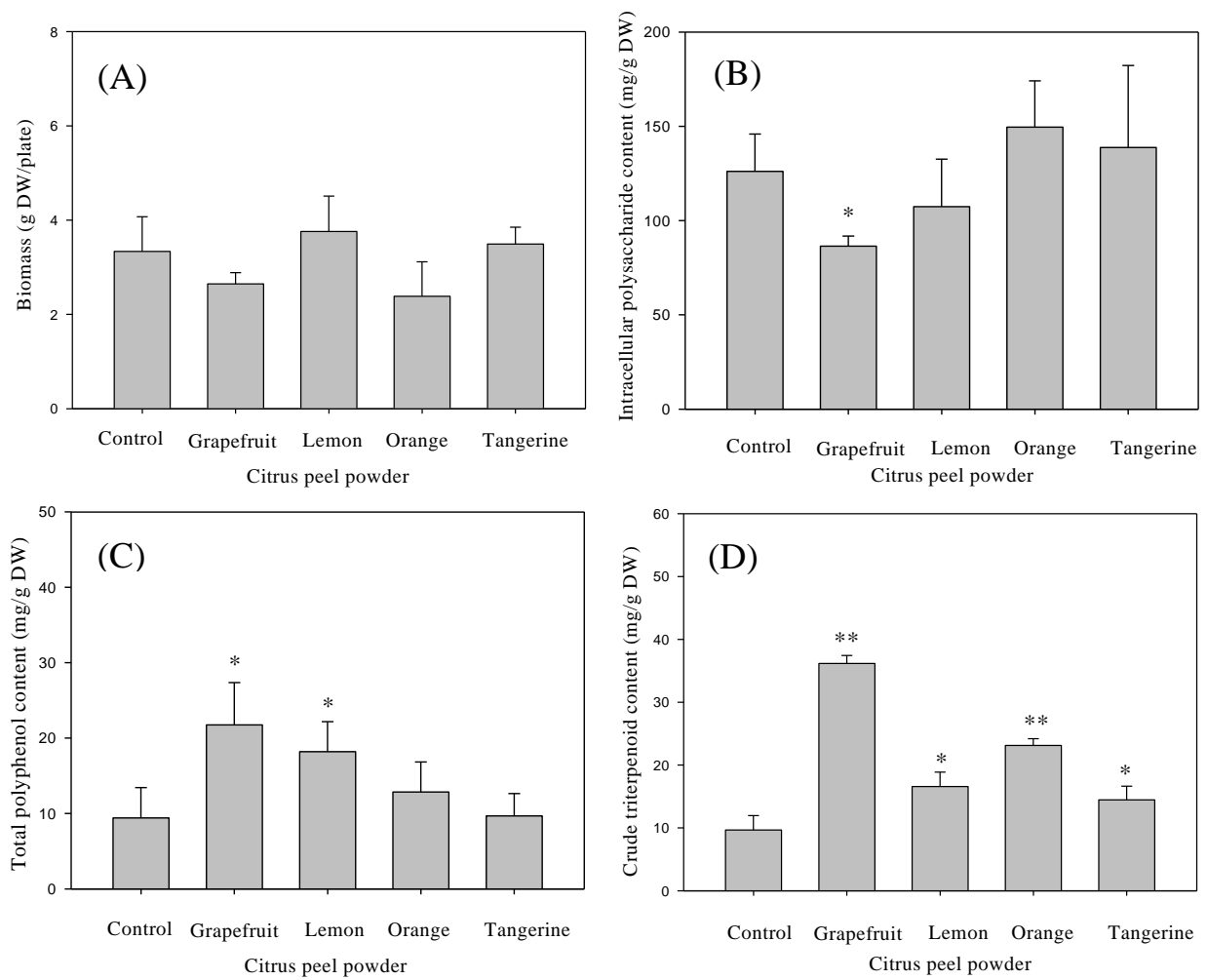


圖 5-4 不同果皮粉末(2 g)添加對樟芝平板式固態培養之影響 (A)菌體濃度；(B)胞內多醣含量；(C)總多酚含量；(D)三萜類含量(樟芝菌絲體取自培養第 30 天)。

\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  與控制組比

培養基成份：蕎麥粉(28 g)，果皮粉末(2 g)，蒸餾水(40%)。

培養條件：接菌量 10 ml，培養溫度 25°C。



### 5-3-3 添加不同重量葡萄柚果皮粉末平板式固態培養

觀察圖 5-5(A)得知，當葡萄柚果皮粉末添加低量時，有助於樟芝菌絲體成長。添加 0.5 g/plate、1 g/plate 葡萄柚果皮粉末時，菌重分別為 5.15 g/plate、4.41 g/plate，均高於控制組的 3.34 g/plate，約提升 54%、32%。但當葡萄柚果皮粉末添加量增大時，反而抑制樟芝菌絲體成長，添加 2 g/plate 葡萄柚果皮粉末時，菌重為 2.65 g/plate 低於控制組。但添加量增大時(4 g/plate 葡萄柚果皮粉末)，菌重又與控制組差不多(3.54 g/plate)。但添加量再增大為 8 g/plate 葡萄柚果皮粉末時，菌重卻又增為 6.07 g/plate。

而在胞內多醣部分(如圖 5-5(B))，添加葡萄柚果皮粉末的含量均小於控制組，此結果與三萜類含量剛好完全相反，主要原因為胞內多醣與菌絲體生長有關，在菌絲體生長初期便會大量累積，而到後期樟芝菌絲體老化，合成出較多的二次代謝產物(三萜類與總多酚)，消耗許多胞內多醣作為養分做為養份，故使得胞內多醣含量大幅降低。

由圖 5-5(C)發現，總多酚與三萜類含量有類似的趨勢。隨著葡萄柚果皮粉末添加量增加而增加，添加 4 g/plate 時總多酚含量達到最高，其值為 24.11 mg/g DW，為控制組含量(9.43 mg/g DW)的 2.56 倍。然而，將總多酚含量換算成產量時，由於受到菌重的影響，添加 8 g 葡萄柚果皮粉末的總多酚含量也很高，故其總多酚產量為 110.07 mg/plate，而控制組僅只有 31.47 mg/plate，總多酚產量為控制組的 3.50 倍。

但在三萜類合成部份，則與菌重有完全不同的趨勢(如圖 5-5(D))。低量添加葡萄柚果皮粉末時，樟芝菌絲體三萜類含量相當低，如 0.5 g/plate、1 g/plate 葡萄柚果皮粉末添加時，三萜類含量分別為 4.27 mg/g DW、15.48 mg/g DW。而當葡萄柚果皮粉末添加量增大時，三萜類含量也隨之增加。在 2 g/plate、4 g/plate 葡萄柚果皮粉末添加時，三萜類含量分別為 36.16 mg/g DW、47.10 mg/g DW，為控制組的 3.74 倍、4.88 倍。但添加量再增大為 8 g/plate 葡萄柚果皮粉末時，三萜類含量卻又降為 18.67 mg/g DW。

上述結果說明，葡萄柚果皮粉末具有協助菌絲體生長的養分(應該是果膠)，微量添加時可促進菌體生長增加菌體重量。但葡萄柚果皮粉末同時也具有促進三萜類生成的物質(應該是萜類化合物)，所以當添加量增加時，改變了菌體成長環境，甚至改變了菌體的代謝路徑，導致菌體重量下降、三萜類含量增加的結果。過去許多探討二次代謝產物的文獻，也認為適合菌絲體成長的環境並不適合三萜類生成，而適合三萜類生成的環境通常會抑制菌絲體生長。

另就添加量增大為 8 g/plate 葡萄柚果皮粉末的狀況，探究原因，應該為培養基組成(8 g 葡萄柚粉末和 28 g 蕎麥粉末)已經改變所致，樟芝菌絲體生長的碳源及氮源，來自即蕎麥的比例已儼然下降，大量使用果皮的養份，破壞了蕎麥培養基的緻密性，故菌絲體生長緩慢，所以雖然培養到了第 30 天，菌絲體仍尚未老化，只處於生長期，因此菌重較重，但三萜類含量較少。

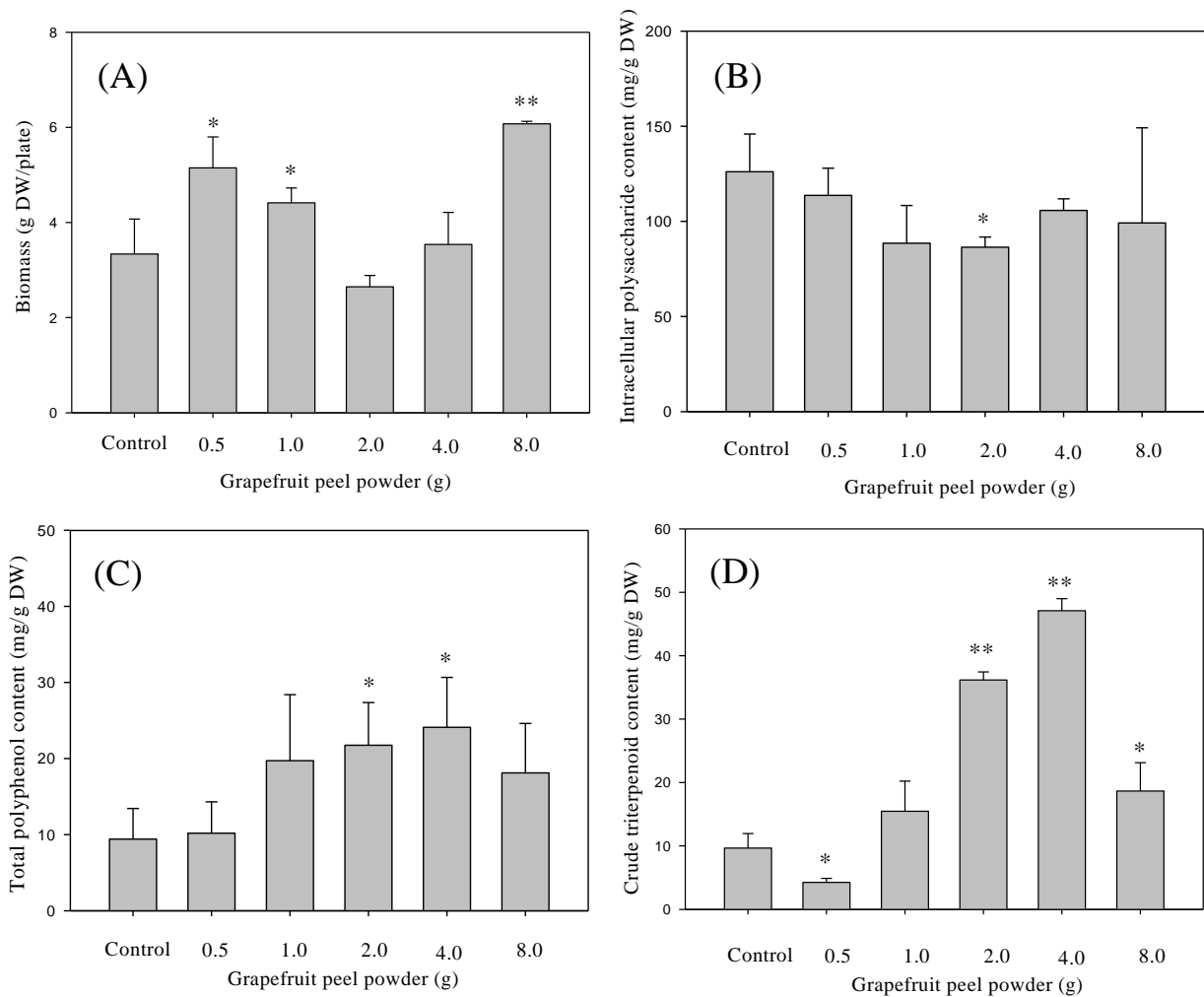


圖 5-5 不同葡萄柚果皮粉末添加量對樟芝菌絲體代謝影響 (A)菌體濃度；(B)胞內多醣含量；(C)總多酚含量；(D)三萜類含量 (樟芝菌絲體取自培養第 30 天)。

\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  與控制組比

培養基成份：蕎麥粉(28 g)，葡萄柚果皮粉末，蒸餾水(40%)。

培養條件：接菌量 10 ml，培養溫度 25°C。

### 5-3-4 果皮粉末添加平板式固態培養發酵動力參數

樟芝固態培養動力學參數經計算整理成表 5-5、5-6。柑橘類果皮粉末添加明顯的影響菌絲體生長與新陳代謝，從表 5-5 的結果可了解，檸檬、橘子果皮粉末具有少許增進菌體成長的功效，葡萄柚、柳丁果皮粉末均會抑制菌體成長，但相對的可促使樟芝菌體合成高含量的三萜類。若觀察三萜類產量，發現添加柑橘類果皮粉末均可增加三萜類產量，尤其以添加葡萄柚果皮粉末的三萜類產量最高(95.74 mg)，為控制組(32.26 mg)的 2.97 倍。總多酚產量則以添加檸檬果皮粉末最高(68.37 mg)，為控制組(31.47 mg)的 2.17 倍，其次為添加葡萄柚果皮粉末的 57.60 mg，為控制組的 1.83 倍。而在胞內多醣產量上，則以添加橘子果皮粉末最佳(484.51 mg)，但其三萜類及總多酚產量均不佳，另外添加葡萄柚果皮粉末的胞內多醣產量為最少，胞內多醣應該已被菌體代謝，轉而生成二次代謝產物(三萜類及總多酚)。

表 5-6 的結果指出，三萜類的產量以添加 4 g/plate 葡萄柚果皮粉末的效果最佳，產量為 166.68 mg/plate，而產率 5.56 mg/day 為控制組的 5.15 倍。總多酚的產量則是添加 8 g/plate 葡萄柚果皮粉末的效果最佳，產量與產率分別為 110.07 mg 和 3.67 mg/day，為控制組的 3.50 倍。在胞內多醣產量部份，發現僅有添加 0.5 g/plate 及 8 g/plate 葡萄柚果皮粉末時具有增進效果，而以 8 g/plate 葡萄柚果皮粉末最佳，產量與產率分別為 602.27 mg 和 20.08 mg/day，為控制組的 1.43 倍。

表 5-5 不同果皮粉末添加之樟芝平板式固態培養動力學參數

Peel kind	Biomass			Triterpenoid (P1)			Total polyphenol (P2)			Intracellular polysaccharides (IPS) (P3)		
	X <sub>max</sub> (g)	Q <sub>x</sub> (mg/day)	Y <sub>x/s</sub> (g/g)	P1 <sub>max</sub> (mg)	Q <sub>P1</sub> (mg/day)	Y <sub>P1/s</sub> (mg/g)	P2 <sub>max</sub> (mg)	Q <sub>P2</sub> (mg/day)	Y <sub>P2/s</sub> (mg/g)	P3 <sub>max</sub> (mg)	Q <sub>P3</sub> (mg/day)	Y <sub>P3/s</sub> (mg/g)
Control	3.34	0.11	0.12	32.26	1.08	1.15	31.47	1.05	1.12	420.95	14.03	15.03
Grapefruit	2.65	0.09	0.09	95.74	3.19	3.42	57.60	1.92	2.06	228.82	7.63	8.17
Lemon	3.76	0.13	0.13	62.34	2.08	2.23	68.37	2.28	2.44	403.54	13.45	14.41
Orange	2.38	0.08	0.09	55.14	1.84	1.97	30.63	1.02	1.09	356.64	11.89	12.74
Tangerine	3.49	0.12	0.12	50.49	1.68	1.80	33.78	1.13	1.21	484.51	16.15	17.30

\* Per plate.

表 5-6 不同重量葡萄柚果皮粉末添加之樟芝平板式固態培養動力學參數

Weight of grapefruit peel powder	Biomass			Triterpenoid (P1)			Total polyphenol (P2)			Intracellular polysaccharides (IPS) (P3)		
	X <sub>max</sub> (g)	Q <sub>x</sub> (mg/day)	Y <sub>x/s</sub> (g/g)	P1 <sub>max</sub> (mg)	Q <sub>P1</sub> (mg/day)	Y <sub>P1/s</sub> (mg/g)	P2 <sub>max</sub> (mg)	Q <sub>P2</sub> (mg/day)	Y <sub>P2/s</sub> (mg/g)	P3 <sub>max</sub> (mg)	Q <sub>P3</sub> (mg/day)	Y <sub>P3/s</sub> (mg/g)
Control	3.34	0.11	0.12	32.26	1.08	1.15	31.47	1.05	1.12	420.95	14.03	15.03
0.5 g	5.15	0.17	0.18	21.95	0.73	0.78	52.42	1.75	1.87	584.97	19.50	20.89
1 g	4.41	0.15	0.16	68.32	2.28	2.44	87.00	2.90	3.11	390.70	13.02	13.95
2 g	2.65	0.09	0.09	95.74	3.19	3.42	57.60	1.92	2.06	228.82	7.63	8.17
4 g	3.54	0.12	0.13	166.68	5.56	5.95	85.30	2.84	3.05	374.27	12.48	13.37
8 g	6.07	0.20	0.22	113.47	3.78	4.05	110.07	3.67	3.93	602.27	20.08	21.51

\* Per plate.

### 5-3-5 樟芝平板式固態培養與野生樟芝子實體三萜類 HPLC 圖比較

Chang利用樟芝子實體分離的10種化合物，5種麥角甾烷三萜類(ergostanes: antcins C and K, and zhankuic acids A, B, and C)、4種羊毛甾烷三萜類(lanostanes: sulphurenic acid, dehydrosulphurenic acid, eburicoic acid, and dehydroeburicoic acid)，和1種單苯基類(monophenyl: 4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole)當標準成分，比較天然樟芝子實體與菌絲體，和人工培養子實體與菌絲體的成分差異。發現無論天然或人工培養樟芝子實體，均可檢測出上述10種化合物，然而，天然、人工固態與液態培養之菌絲體，只能產生上述4種羊毛甾烷三萜類和1種單苯基類化合物，無法產生5種麥角甾烷三萜類。此顯示樟芝產生麥角甾烷三萜類與子實體形成有關，但與子實體生長的基質無關(Chang et al., 2011)。

圖 5-6 (A)、(B)和(C)分別為野生樟芝子實體、純蕎麥和添加 4 g/plate 葡萄柚果皮粉末平板式固態培養的三萜類化合物 HPLC 圖譜。由圖 5-6 (A)可以看出，野生樟芝子實體可檢測出上述 10 種三萜類。

在圖 5-6 (B)的 HPLC 圖譜裡，這 10 種三萜類僅找到 5 種，但有 3 種麥角甾烷三萜類存在 HPLC 圖譜中，推測 5 種麥角甾烷三萜類應該均存在，但是含量實在太低，所以無法檢出。

由圖 5-6 (C)HPLC 圖譜可明顯發現，透過添加 4 g/plate 葡萄柚果皮粉末平板式固態培養，三萜類種類變得更多，含量也大幅的提升，因此證明此種培養方式確實可大幅提升樟芝有效三萜類成份。而且這 10 種三萜類幾乎皆可以找到(除了

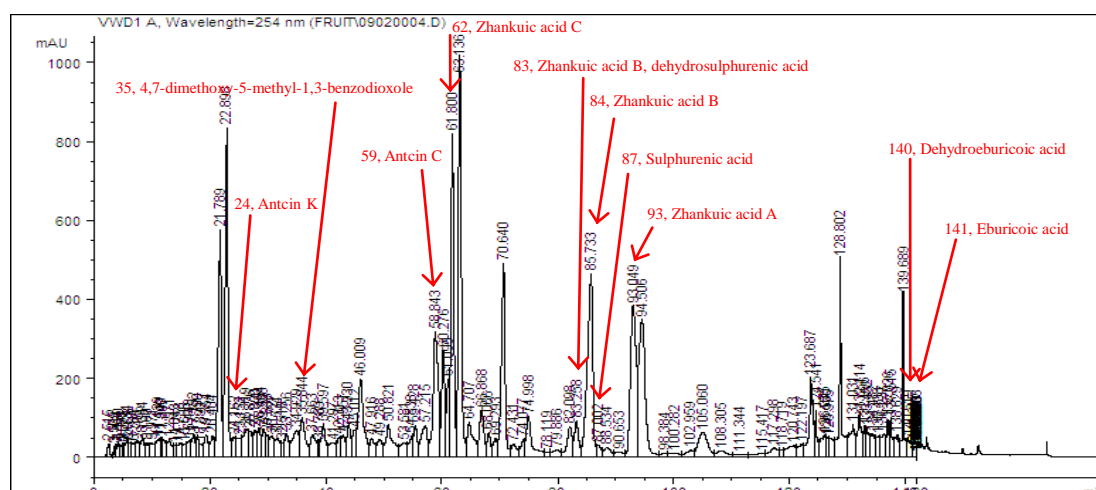
Sulphurenic acid), 尤其是代表子實體形成有關的 5 種麥角甾烷三萜類均存在 HPLC 圖譜中。因此可以證明, 葡萄柚果皮粉末添加的樟芝平板式固態培養, 在短時間(30 天)所得到的三萜類化合物與野生樟芝子實體大致相同, 換句話說, 此培養得到的應該為樟芝子實體。

#### 5-4 結論

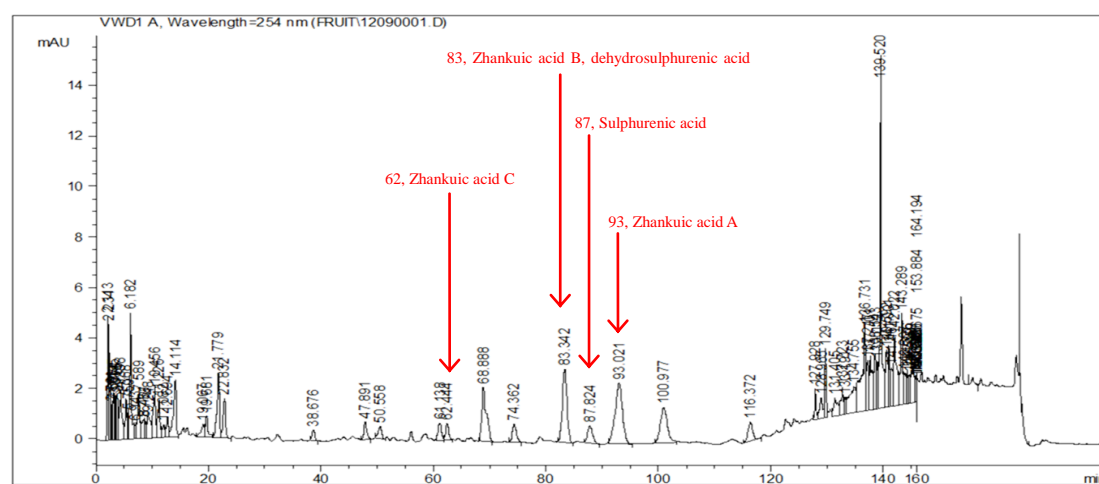
利用樟芝平板式固態培養, 將菌絲體與基質分離後, 可以完整分析菌絲體生理活性, 而非菌絲體與基質的混合物。柑橘類果皮粉末對樟芝平板式固態培養, 均具有促進樟芝菌絲體合成三萜類及總多酚之功效, 又以添加葡萄柚果皮粉末效果最佳。由 HPLC 圖譜得知, 添加葡萄柚果皮粉末的樟芝平板式固態培養, 第 30 天所得之三萜類成份與野生樟芝子實體之三萜類成份大致相同, 而且確實可大幅提升樟芝有效三萜類成份。

液態和平板式固態兩種培養方式, 最佳二次代謝產物(三萜類及總多酚)含量, 分別來自於添加橘子果皮精油及葡萄柚果皮粉末。其原因在於液態培養的添加成分來自果皮精油(單萜類為主), 並無果膠、纖維素等成份, 而平板式固態培養添加成分為乾燥果皮粉末, 卻是以果膠、纖維素等成份為主, 所以造成這兩種培養方式最佳化的添加果皮種類不同。

(A)



(B)



(C)

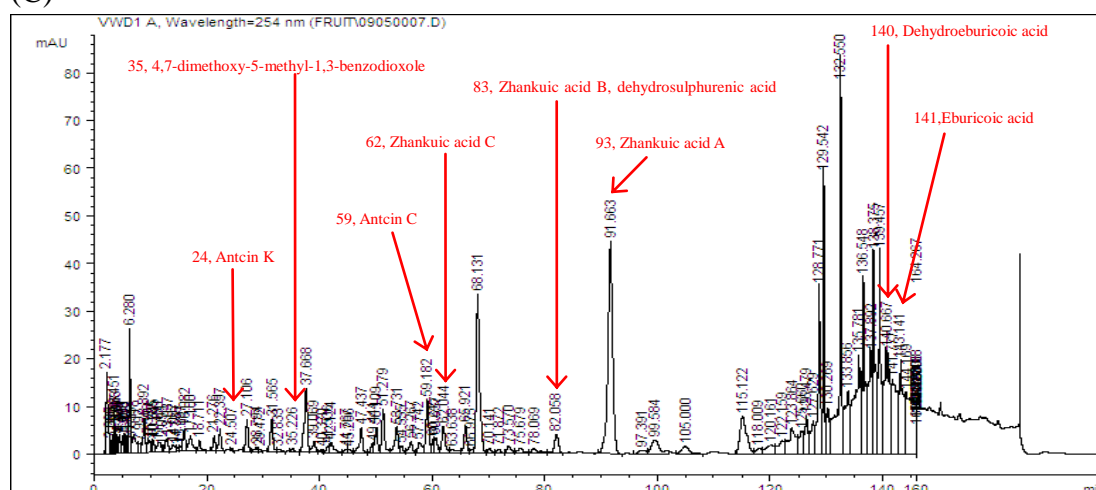


圖 5-6 三萜類化合物 HPLC 圖譜 (A) 野生樟芝子實體；(B) 蕎麥平板式固態培養；(C) 添加 4 g 葡萄柚果皮粉末蕎麥平板式固態培養



## 第六章 結論與未來展望

本研究以兩階段改變培養環境、不同時間添加柑橘類果皮精油、添加不同單萜類乙醇溶液深層培養及柑橘類果皮粉末添加平板式固態培養試驗，探討對樟芝菌絲體合成胞內多醣、三萜類及總多酚的影響。

### 6-1 結論

兩階段靜置培養促使樟芝菌絲體大幅提升三萜類代謝產物含量。培養前期改變成靜置培養，雖然溶氧量降低，但菌絲體生長活力旺盛，並不會大量合成三萜類；培養後期靜置時，菌絲體已大量老化，三萜類含量增加，又因將培養環境移至溶氧量少的靜置培養，更促進樟芝菌絲體生產較多三萜類。

柑橘類果皮精油添加明顯影響菌絲體生長與新陳代謝。添加柑橘類果皮精油，均會抑制菌絲體生長和胞內多醣累積，尤其以檸檬果皮精油最嚴重。但柑橘類果皮精油添加，對總多酚合成均有良好的促進功效；無論樟芝菌絲體總多酚或三萜類的含量、產量及產率，均以添加橘子果皮精油效果最佳。

檸檬烯為柑橘類果皮精油促進樟芝菌絲體生成三萜類的重要成分。乙醇改變細胞膜結構，檸檬烯進入細胞質體內，改變樟芝菌絲體的萜類代謝路徑，進而提高菌體三萜類含量。每種單萜類對樟芝菌絲體代謝影響不同，應該是與單萜類結構有關。

添加葡萄柚果皮粉末的樟芝平板式固態培養，所得之三萜類成份與野生樟

芝子實體之三萜類成份大致相同。樟芝平板式固態培養，菌絲體可與基質分離，分析完整菌絲體生理活性。柑橘類果皮粉末對樟芝平板式固態培養，均具有促進樟芝菌絲體合成三萜類及總多酚之功效，又以添加葡萄柚果皮粉末效果最佳。

## 6-2 未來展望

本研究確定柑橘類果皮精油添加液態培養及柑橘類果皮粉末添加平板式固態培養，對樟芝菌絲體可大幅促進二次代謝產物生成，但尚未做最佳化探討。因此未來可利用RSM法進行最佳化實驗，增加樟芝菌絲體總多酚或三萜類的含量及產量。

目前只證實檸檬烯為柑橘類果皮精油促進樟芝菌絲體生成三萜類的重要成分，未來可朝向進一步分析柑橘類果皮中其他促進生理活性物質的有效成分，並探討各種有效成份的配比關係。

現在僅推測檸檬烯進入細胞質體內抑制單萜類生成，改變代謝路徑，促進三萜類生成，但實際代謝反應機構尚不清楚。因此未來應該更進一步瞭解代謝路徑，證明檸檬烯乙醇溶液促進三萜類生成原因。

## 參考文獻

- 王伯徽 (2005)。菇類的應用研發與產業推動。食品工業，37：頁 3-5。
- 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。
- 朱祐頡 (2008)。人工培養基栽培之樟芝的分子定性。國立東華大學生物技術研究所碩士論文。
- 朱燕華 (1995)。類黃酮之介紹。食品月刊，30：頁 1-5。
- 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。
- 李厚金、藍文健 (2011)。天然單萜檸檬烯的微生物轉化。化學進展，23：頁 2318-2325。
- 肖崇厚、陳蘊如 (1989)。中藥化學。上海：科學技術出版社。頁 323-360。
- 林馨怡 (2008)。樟芝液態培養應用於抗老化化妝品之研究。私立東海大學化學工程研究所碩士論文。
- 柯銀府、郭尚鑫、楊芳鏘 (1998)。脂肪酸添加對靈芝液體培養之影響，第三屆生化工程研討會論文集。頁 121-124。
- 范念慈 (2001)。果樹。台北市：東大圖書公司。
- 莊雅婷 (2011)。培養基添加物對樟芝液態發酵菌絲體活性成分生成之影響。私立東海大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。

- 陳吉村、陳哲民 (2003)。花蓮地區文旦果皮精油含量變化之研究。花蓮區研究彙報，21：頁 49-58。
- 陳俊仁 (2009)。柳橙有效成分之提取及應用。國立成功大學化學研究所碩士論文。
- 陳啟楨、蘇慶華、藍明煌 (2001)。樟芝固體栽培及其生物活性之研究。中華真菌學會會刊，16：頁 65-72。
- 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。
- 張東柱、周文能 (2005)。野菇入門。台北：遠流出版公司。
- 張怡潔 (2003)。樟屬植物之牛樟芝菌絲體生長促進因子。台北醫學大學生藥學研究所碩士論文。
- 張益軒 (2001)。牛樟芝分子生物鑑定系統之研究。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
- 黃惠琴 (2001)。樟芝菌絲體深層培養之研究。私立東海大學化學工程研究所碩士論文。
- 賀元川、蒲薔、何開澤、譚健、李靜、趙宗杰 (2011)。均勻設計法優化樟芝產三萜類液體發酵條件。應用與環境生物學報，17，頁：901-906。
- 楊于萱 (2010)。培養條件對樟芝菌絲體抗氧化活性及抗腫瘤能力之影響。私立東海大學化學工程研究所碩士論文。
- 楊芳鏘、楊明哲 (2001)。菌絲狀真菌之深層培養技術。化工技術，9，頁：176-189。

賈德翠、涂洪強、王仁才、胡玲、卜范文 (2009)。椴柑果皮精油成分的 GC-MS 分析。湖南農業科學，2，頁：105-107。

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

蔡榮哲 (2005)。柑橘類果皮加工利用。台灣柑橘產業發展研討會，頁：249-257。

賴怡伶 (2008)。含纖維素之生物吸附劑對重金屬吸附之研究。國立中央大學環境工程研究所碩士論文。

Adam KP, Zapp J. (1998), Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes, *Phytochemistry*, 48, pp. 953-959.

Ahmad MM, Rehman SU, Anjum FM, Bajwa EE. (2006), Comparative physical examination of various citrus peel essential oils, *International Journal of agriculture and biology*, 8 pp. 186-190.

Botella C, Ory I, Webb C, Blandino A. (2005), Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace, *Biochemical Engineering Journal*, 26, pp. 100-106.

Caccioni DRL, Guizzardi M, Biondi DM, Renda A, Ruberto G. (1998), Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*, *International Journal of Food Microbiology*, 43 pp. 73-79.

Carrau FM, Medina K, Boido E, Farina L, Gaggero C, Dellacassa E, Versini G,

- Henschke PA. (2005), De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts, *FEMS Microbiology Letters*, 243, pp. 107-115.
- Chafer M, Gonzalez-Martinez C, Chiralt A, Fito P. (2003), Microstructure and vacuum impregnation response of citrus peels, *Food Research International*, 36, pp. 35-41.
- Chang CY, Lee CL, Pan TM. (2006), Statistical optimization of medium components for the production of *Antrodia cinnamomea* AC0623 in submerged cultures, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, pp. 654-661.
- Chang TT, Chou WN. (1995), *Antrodia cinnamomea* sp. Nov. on *Cinnamomum Kanehirai* in Taiwan, *Mycological Research*, 99, pp. 756-758.
- Chang TT, Wang WR. (2005), Basidiomatal formation of *Antrodia cinnamomea* on artificial agar media, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46, pp. 151-154.
- Chang TT, Wang WR. (2008), The role of four essential oils on mycelial growth and basidiomatal formation of *Antrodia cinnamomea*, *Taiwan Journal of Forest Science*, 23, pp. 105-110.
- Chang TT, Wang WR, Chou CJ. (2010), Method for determining fruiting body and mycelium of *Antrodia cinnamomea* and *Antrodia aslmonea*, US Patent, US2010/0304495.
- Chang TT, Wang WR, Chou CJ. (2011), Differentiation of mycelia and basidiomes of

- Antrodia cinnamomea* using certain chemical components, *Taiwan Journal of Forest Science*, 26, pp. 125-133.
- Chaplin MF, Kennedy JF. (1994), Carbohydrate analysis-a practical approach, *Oxford University Press Inc.*
- Chen CC, Liu YW, Ker YB, Wu YY, Lai EY, Chyau CC, Hseu TH, Peng RY. (2007), Chemical characterization and anti-inflammatory effect of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *antrodia camphorata* mycelia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 5007-5012.
- Chen CH, Yang SW. (1995), New steroid acids from *Antrodia cinnamomea*, a fungal parasite of *Cinnamomum micranthum*, *Journal of Natural Products*, 58, pp. 1655-1661.
- Chen YC, Liang YC, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. (1999), Inhibition of TPA induced protein kinase C and transcription activator protein-1 binding activities by theaflavin-3, 3'-diagalate from black tea in NIH3T3 cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, pp. 1416-1421.
- Cheng JJ, Huang NK, Chang TT, Wang DL, Lu MK. (2005), Study for anti-angiogenic activities of polysaccharides isolated from *Antrodia cinnamomea* in endothelial cells, *Life Sciences*, 76, pp. 3029-3042.
- Cherng IH, Chiang HC. (1995), Three new triterpenoids form *Antrodia cinnamomea*,

*Journal of Natural Products*, 58, pp. 365-371.

Cherng IH, Wu DP, Chiang HC. (1996), Triterpenoids form *Antrodia cinnamomea*,

*Phytochemistry*, 41, pp. 263-267.

Chiang HC, Wu DP, Cherng IW, Ueng CH. (1995), A sesquiterpene lactone, phenyl

and biphenyl compounds from *Antrodia cinnamomea*, *phytochemistry*, 39, pp.

613-616.

Chyau CC, Mau JL, Wu CM. (1996), Characteristics of the steam-distilled oil and

carbon dioxide extract of *Zanthoxylum simulans* fruits, *Journal of Agricultural*

*and Food Chemistry*, 44, pp. 1096-1099.

Dahiya N, Tewari R, Tiwar RP, Hoondal GS. (2005), Chitinase production in

solid-state fermentation by *Enterobacter* sp. NRG4 using statistical

experimental design, *Cueeent Microbiology*, 51, pp. 222–228.

Da Silva TL, Pinheiro HM, Roseiro JC. (2003), Stress-induced morphological and

physiological changes in  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mucor fragilis* in batch

and continuous cultures, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, pp. 880-888.

Dantigny P, Guilmart A, Radoi F, Bensoussan M, Zwietering M. (2005), Modelling the

effect of ethanol on growth rate of food spoilage moulds, *International Journal*

*of Food Microbiology*, 98, pp. 261-269.

Diaz S, Espinosa S, Brignole EA. (2005), Citrus peel oil deterpenation with



- supercritical fluids: optimal process and solvent cycle design, *The Journal of Supercritical Fluids*, 35, pp. 49-61.
- Disch A, Rohmer M. (1998), On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate /pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts, *FEMS Microbiology Letters*, 168, pp. 201-208.
- Fang QH, Zhong JJ. (2002a), Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*, *Process Biochemistry*, 37, pp. 769-774.
- Fang QH, Zhong JJ. (2002b), Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*, *Biotechnology Progress*, 18, pp. 51-54.
- Greuter W, McNeill J, Barrie FR, Burdet HM, Demoulin V, Filgueiras TS, Nicolson DH, Silva PC, Skog JE, Trehane P, Turland NJ, Hawksworth DL. (2000), International code of botanical nomenclature (St Louis Code), Regnum Vegetabile 138, Konigstein: Koelts Scientific Books.
- Hallworth JE. (1998), Ethanol-induced water stress in yeast, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85, pp. 125-137.
- Heipiepera HJ, Iskenb S, Sali M. (2000), Ethanol tolerance and membrane fatty acid adaptation in adh multiple and null mutants of *Kluyveromyces lactis*, *Research*

*in Microbiology, 151, pp. 777-784.*

Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, Wu LY, Chou DS, Lin CH, Su CH, Sheu JR.

(2003), Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, pp. 3302-3308.*

Hseu YC, Chen CS, Chen HC, Liao JW, Yang HL. (2008), *Antrodia camphorata*

inhibits proliferation of human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology, 46, pp. 2680-2688.*

Ibeas JI, Jimenez J. (1997), Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharo-*

*myces* flocc yeasts, *Applied and Environmental Microbiology, 63, pp. 7-12.*

Ingram LO. (1986), Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane, *Trends*

*in Biotechnology, 40, pp. 40-44.*

Kunamneni A, Permaul K, Singh S. (2005), Amylase production in solid state

fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*, *Journal of Bioscience Bioengineering, 2, pp. 168-171.*

Laoteng K, Jitsue S, Dandusitapunth Y. (2008), Ethanol-induced changes in expression

profiles of cell growth, fatty acid and desaturase genes of *Mucor rouxii*, *Fungal Genetics and Biology, 45, pp. 61-67.*

Lee IH, Huang RL, Chen CT, Chen HC, Hsu WC, Lu MK. (2002), *Antrodia*

*camphorata* polysaccharides exhibit antihepatitis B virus effects, *FEMS*

*Microbiol. Letters*, 209, pp. 63-67.

Liang YC, Chen YC, Lin YL, Lin-Shiau SY, Lin JK. (1999), Inhibition of EGF kinase activity by theaflavin-3, 3'-digallate from black tea. *Carcinogen*, 20, pp. 733-736.

Lin JY, Wu TZ, Chou JC. (2006), *In vitro* induction of fruiting body in *Antrodia cinnamomea* - a medicinally important fungus, *Botanical Studies*, 47, pp. 267-272.

Liu DZ, Liang HJ, Chen CH, Su CH, Lee TH, Huang CT, Hou WC, Lin SY, Zhong WB, Lin PJ, Hung LF, Liang YC. (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, pp. 45-53.

Lu S, Xu R, Jia JW, Pang J, Matsuda SPT, Chen XY. (2002), Cloning and functional characterization of a  $\beta$ -pinene synthase from *Artemisia annua* that shows a circadian pattern of expression, *Plant Physiology*, 130, pp. 477-486.

Lu ZM, Lei JY, Xu HY, Shi JS, Xu ZH. (2011), Optimization of fermentation medium for triterpenoids production from *Antrodia camphorata* ATCC 200183 using artificial intelligence-based techniques, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, pp. 371-379.

- Manitto P, Sammes PG. (1981), Biosynthesis of natural products. Wiley, New York.
- Mariadason JM, Corner GA, Augenlicht LH. (2000), Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac and curcumin and implication for chemoprevention of colon cancer, *Cancer Research*, 60, pp. 4561-4572.
- Miquel M, James D, Dooner H, Browse J. (1993), Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for low temperature survival, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90, pp. 6208-6212.
- Nhu-Trang TT, Casabianca H, Grenier-Loustalot MF. (2006), Deuterium/hydrogen ratio analysis of thymol, carvacrol,  $\gamma$ -terpinene and *p*-cymene in thyme, savory and oregano essential oils by gas chromatography-pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1132, pp. 219-227.
- Papagianni M. (2004), Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia process, *Biotechnology Advances*, 22, pp. 189-259.
- Ratledge C, Evans CT. (1989), The Yeasts: metabolism and physiology of yeasts, *Academic Press*, 3, pp. 367-455.
- Sato K, Sudo S. (1999), Small-scale solid-state fermentations, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2, pp. 61-63.

- Shahidi F, Wanasundara PKJPD. (1992), Phenolic antioxidants, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, pp. 67-103.
- Shih IL, 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, pp. 1129-1135.
- Shuler ML, Kargi F. (2002), Bioprocess engineering basic concepts. , Prentice Hall PTR.
- Singleton VL, Rossi JA. (1965), Colorimetry of total phenolics with phosphomolybic -phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, pp. 144-158.
- Smith DC, Forland S, Bachanos E, Matejka M, Barrett V. (2001), Qualitative analysis of citrus fruit extracts by GC/MS: an undergraduate experiment, *Chemical Educator*, 6, pp. 28-31.
- Song TY, Yen GC. (2002), Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 3322-3327.
- Stasinopoulos SJ, Seviour RJ. (1990), Stimulation of exopolysaccharide production in the fungus *Acremonium pericinum* with fatty acids, *Biotechnology and*

*Bioengineering*, 36, pp. 78-782.

Summons RE, Bradley AS, Jahnke LL, Waldbauer JR. (2006), Steroids, triterpenoids and molecular oxygen, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 361, pp. 951-968.

Tanaka M, Kuei CW, Nagashima Y, Taguchi T. (1998), Application of antioxidative maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, pp. 1409-1414.

Tang YJ, Zhang W, Zhong JJ. (2009), Performance analyses of a pH-shift and DOT-shift integrated fed-batch fermentation process for the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*, *Bioresource Technology*, 100, pp. 1852-1859.

Tang YJ, Zhong JJ. (2003), Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, pp. 478-484.

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

Tsujikura Y, Higuchi T, Miyamoto Y, Sato S. (1992), Manufacture of ganoderic acid by fermentation of *Ganoderma lucidum*, *Japanese Kokai Tokkyo Koho*, JP04304890.

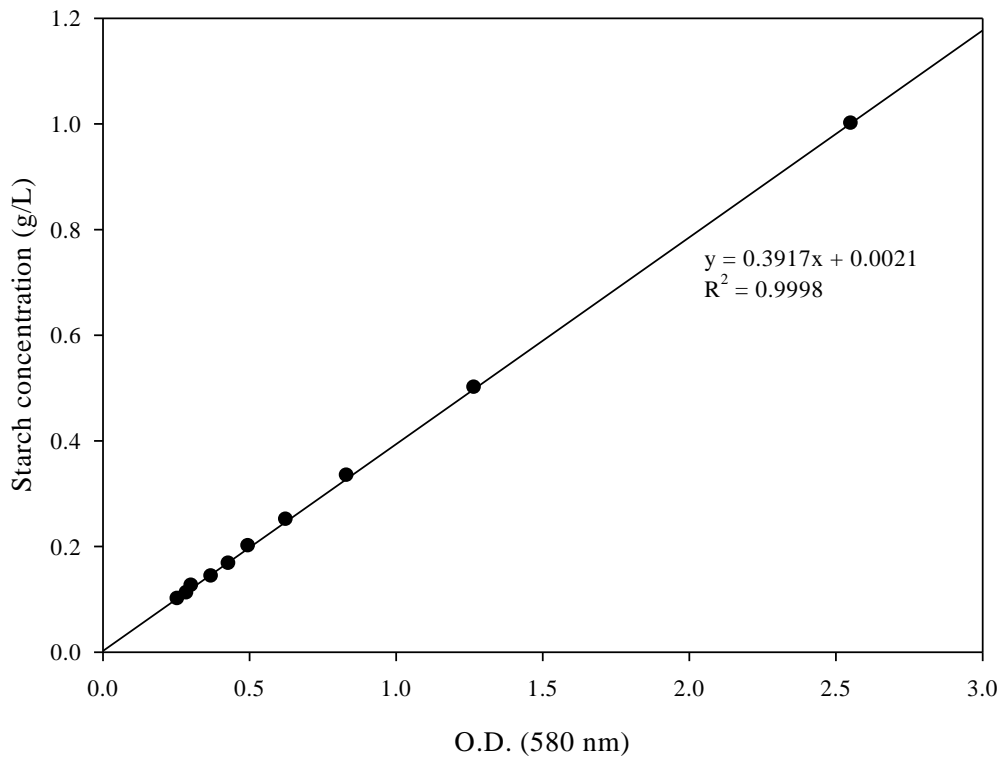
- Van Der Werf MJ, Swarts HJ, De Bont JAM. (1999), *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene, *Applied and environmental microbiology*, 65, pp. 2092-2102.
- Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gómez SJ, Díaz-Godínez G, Augur C. (2003), Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems, *Biochemical Engineering Journal*, 13, pp. 157-167.
- Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. (2000), Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Research*, 60, pp. 3823-3831.
- Wu SH, Leif R, Chang TT. (1997), *Antrodia camphorata* (“niu-chang-chih”), new combination of a medicinal fungus in Taiwan, *Botanical Bulletin Academia Sinica*, 38, pp. 273-275.
- Wu SH, Yu ZH, Dai YC, Chen CT, Su CH, Chen LC, Hsu WC, Hwang GY. (2004), *Taiwanofungus*, a polypore new genus, *Fungal Science*, 19, pp. 109-116.
- Yang CM, Zhou YJ, Wang RJ, Hu ML. (2009), Anti-angiogenic effects and mechanisms of polysaccharides from *Antrodia cinnamomea* with different molecular weights, *Journal of Ethnopharmacology*, 123, pp. 407-412.
- Yang HL, Chen CS, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Chen CC, Hseu TH, Kuo CT, Hseu

- YC. (2006), Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by antrodia camphorate, *Cancer Letters*, 231, pp. 215-227.
- Yang HL, Kuo YH, Tsai CT, Huang YT, Chen CS, Chang WH, Lin E, Lin WH, Hseu YC. (2011), Anti-metastatic activities of *Antrodia camphorata* against human breast cancer cells mediated through suppression of the MAPK signaling pathway, *Food and Chemical Toxicology*, 49, pp. 290-298.
- Yang SW, Shen YC, Chen CH. (1996), Steroids and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea*-A fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*, *Phytochemistry*, 41, pp. 1389-1392.
- Yang, F.C., Huang, H.C., Yang, M.J. (2003), The influence of environmental conditions on the mycelial growth of *Antrodia cinnamomea* in submerged cultures, *Enzyme and Microbial Technology*, 33, pp. 395-402.
- Yeh CT, Rao YK, Yao CJ, Yeh CF, Li CH, Chuang SE, Luong JHT, Lai GM, Tzeng YM. (2009), Cytotoxic triterpenes from *Antrodia camphorata* and their mode of action in HT-29 human colon cancer cells, *Cancer Letters*, 285, pp. 73-79.
- Yen GC, Duh PD, Tsai CL. (1993), Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, pp. 67-70.

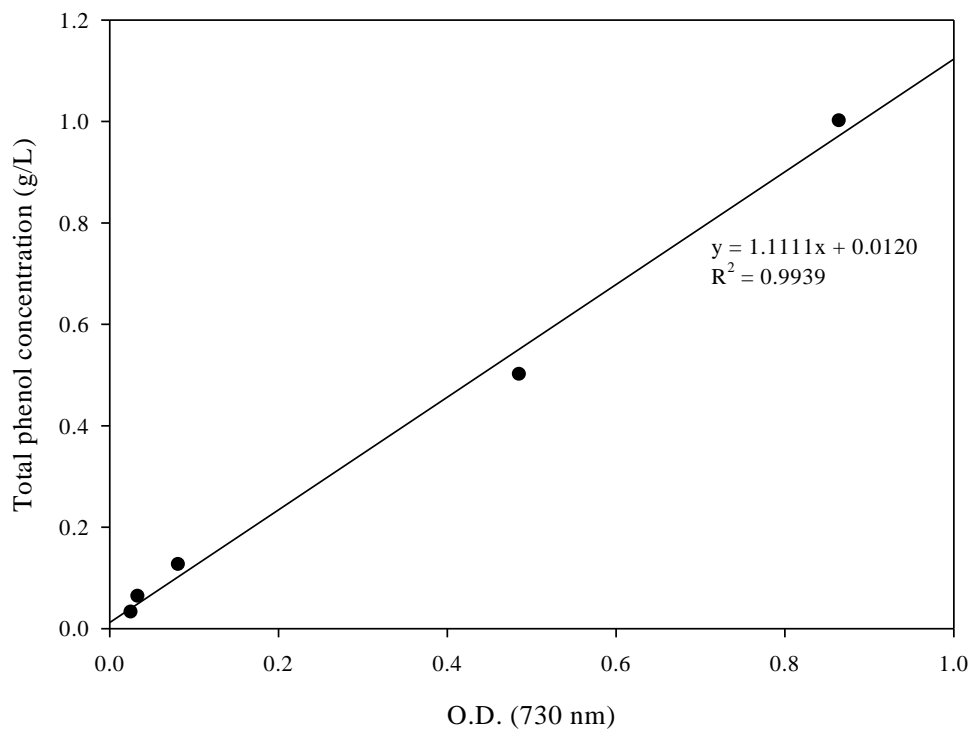


# 附錄

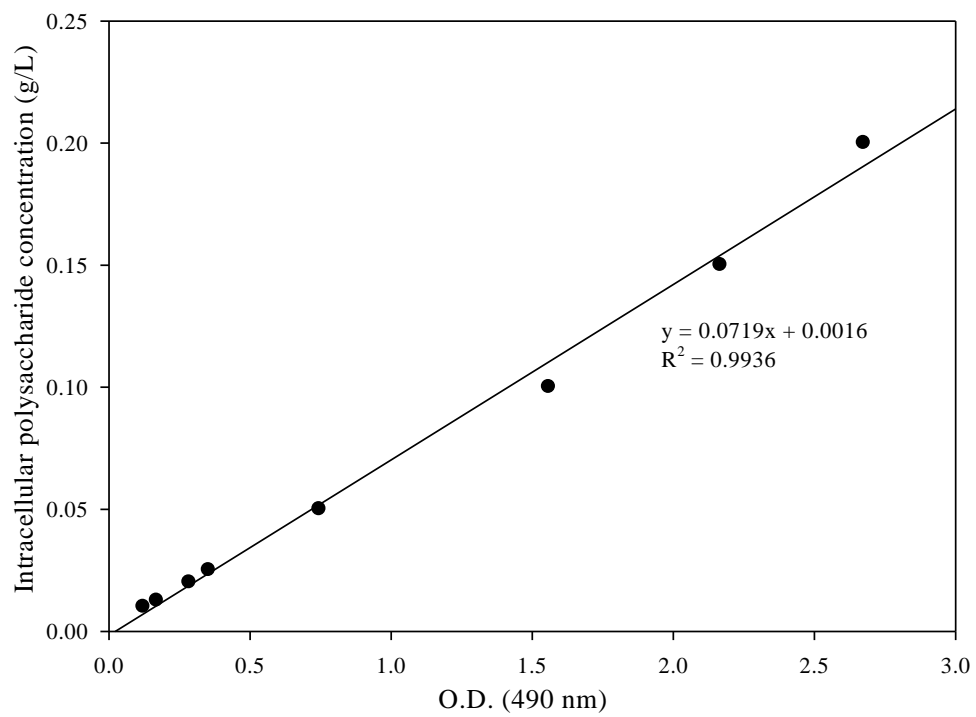
## 附錄一：澱粉檢量線



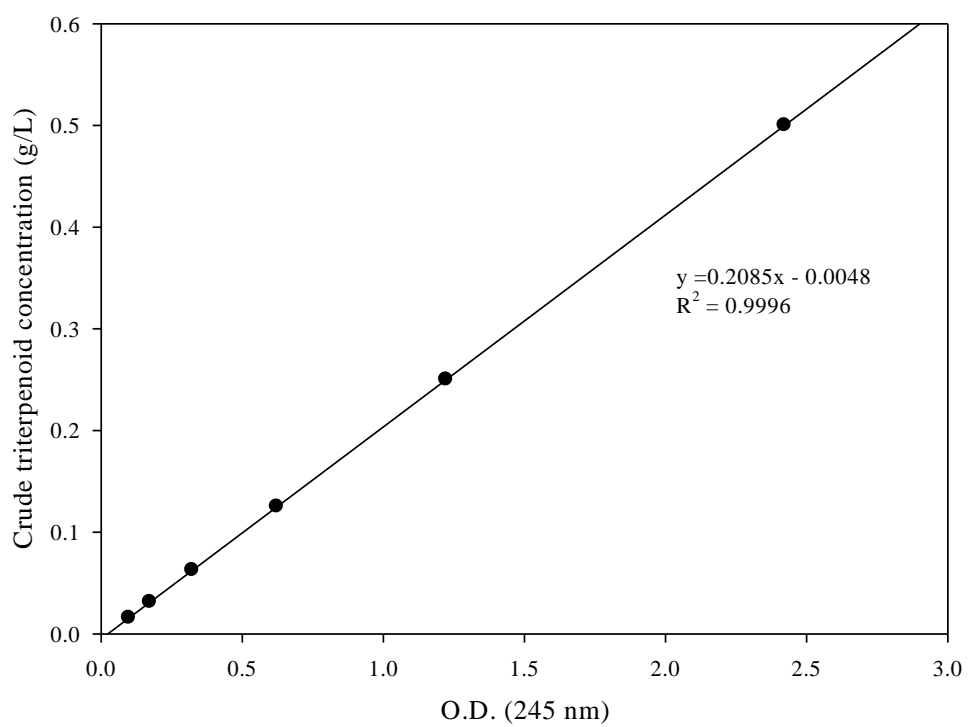
## 附錄二：總多酚檢量線



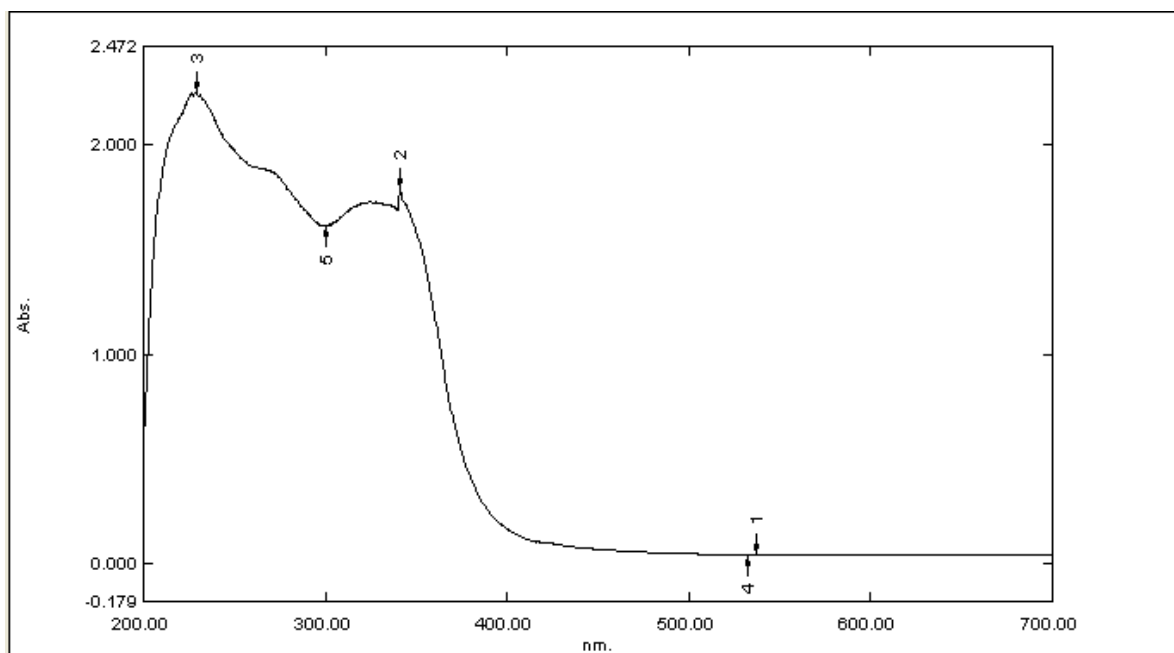
### 附錄三：胞內多醣檢量線



#### 附錄四：三萜類檢量線



### 附錄五:精油掃描圖譜



### 附錄六：檸檬烯檢量線

