

## 摘要

樟芝(*Antrodia cinnamomea*)為台灣特有的藥用菇類，主要的有效成分為多醣體、三萜類及總酚，三萜類的抗腫瘤功能仍是目前研究重點。本研究於樟芝液態培養中添加不同中草藥萃取液探討活性成分變化情形。在不同中草藥水萃液添加方面，添加薑黃水萃液第 34 天有最佳的粗三萜含量 37.52 mg/g D.W. 為 control 的 1.67 倍，總三萜產量 468.63 mg/L 為 control 的 1.66 倍。在不同濃度薑黃萃取液實驗結果發現，添加 4 ml 薑黃乙醇萃取液第 28 天有最大粗三萜含量可達 24.58 mg/g D.W. 為 control 的 1.26 倍，總三萜產量 331.72 mg/L 為 control 的 1.74 倍；總酚、類黃酮方面，一樣是添加 4 ml 薑黃乙醇萃取液第 28 天有最佳效果，49.92 mg/g D.W 和 17.46 mg/g D.W，分別是 control 的 5.06 和 3.52 倍。不同時間肉桂萃取液添加培養試驗中，在 20 天添加肉桂乙醇萃取液，第 28 天可達 32.99 mg/g D.W. 為 control 的 1.74 倍；在第 8 天添加肉桂乙醇萃取液，第 28 天時可達 312.87 mg/L 為 control 的 1.47 倍。總酚方面，在 20 天添加肉桂乙醇萃取液，28 天時可達 20.75 mg/g D.W. 為 control 的 2.23 倍。在 8 天添加肉桂乙醇萃取液，28 天取樣，類黃酮可達 7.98 mg/g D.W. 為 control 的 1.85 倍。研究結果及培養策略希望可供日後樟芝活性成分提升的參考。

關鍵字：樟芝、三萜類、液態培養、中草藥

## Abstract

*Antrodia cinnamomea* is an endemic medicinal mushroom in Taiwan. It is well known that the major effective components in this medical fungus are polysaccharides, flavonoids, phenols and triterpenoids. Anti-tumor is still the focus of current research in triterpenoids. In this research, different kinds of Chinese herb extracts were added into the media to investigate their effects on the formation of bioactive components of *A. cinnamomea* in submerged cultures.

The results reveal that when turmeric water extracts was added, the best crude triterpenoids content and the total crude triterpenoids content of 37.52 mg/g D.W. and 468.63 mg /L, respectively at the 34<sup>th</sup> day was obtained and was 1.67 times more than the control. Concerning the effects of different concentrations of turmeric extracts added into the media, the addition level of 4ml obtained the highest crude triterpenoids content of 24.58 mg/g D.W. at the 28<sup>th</sup> day which was 1.26 times of the control. The total crude triterpenoids content of 331.72 mg /L was 1.74 times of the control. The total phenol, flavonoid value 49.92 mg/g D.W and 17.46 mg/g D.W, respectively at the 28<sup>th</sup> day were 5.06 times and 3.52 times of the control. About addition cinnamon extracts timing, the addition at day 20 obtained the highest crude triterpenoids content of 32.99 mg/g D.W. at 28<sup>th</sup> day

and was 1.74 times more than the control. If cinnamon ethanol extracts was added at the 8<sup>th</sup> day, the total crude triterpenoids content reached to 312.87 mg /L and was 1.47 times of the control. The culture strategy of this study are expected to be used for the enhancement of bioactive components production in the submerged culture of *A. cinnamomea*.

**Key words:** *Antrodia cinnamomea*, triterpenoids, submerged cultures, Chinese herb.

## 目錄

摘要 .....	I
Abstract.....	II
目錄 .....	II
圖目錄 .....	VIII
表目錄 .....	XI
第一章 緒論 .....	1
1-1 前言 .....	1
1-2 研究動機與目的 .....	2
第二章 文獻回顧 .....	3
2-1 樟芝 .....	3
2-1-1 樟芝簡介 .....	3
2-1-2 樟芝的生理活性成分 .....	5
2-1-3 樟芝生理活性成分研究及應用 .....	10
2-2 中草藥 .....	12
2-2-1 黃耆(Astragalus) .....	15
2-2-2 薑黃(Turmeric) .....	16

2-2-3 八角(Star anise).....	17
2-2-4 肉桂(Cinnamon).....	18
2-2-5 花椒(Fagara) .....	19
2-3 特定中草藥成分簡介 .....	20
2-3-1 莽草酸.....	20
2-3-2 槲皮素 .....	20
<b>第三章 實驗材料與方法 .....</b>	<b>23</b>
3-1 實驗菌株 .....	23
3-2 實驗藥品 .....	23
3-3 實驗儀器與設備 .....	24
3-4 分析方法 .....	25
3-4-1 菌體濃度.....	25
3-4-2 殘餘澱粉含量測定.....	26
3-4-3 多醣濃度測定.....	26
3-4-4 胞內粗三萜含量測定.....	27
3-4-5 總酚類化合物含量測定.....	28
3-4-6 總類黃酮物質含量.....	28
3-4-7 HPLC 分析樟芝三萜類含量.....	29
3-5 實驗方法 .....	30

3-5-1 實驗架構.....	30
3-5-2 菌種斜面試管保存.....	30
3-5-3 培養皿平面培養與接菌活化.....	31
3-5-4 種菌的製備.....	31
3-5-5 中草藥水萃液製備.....	31
3-5-6 中草藥乙醇萃取液製備.....	32
3-5-7 不同中草藥水萃液添加培養試驗.....	32
3-5-8 不同濃度薑黃萃取液添加培養試驗.....	33
3-5-9 不同中草藥乙醇萃取液添加培養試驗.....	33
3-5-10 不同時間肉桂萃取液添加培養試驗.....	34
3-5-11 特定中草藥成分添加培養試驗.....	34
<b>第四章 結果與討論.....</b>	<b>35</b>
4-1 不同中草藥水萃液添加培養試驗.....	35
4-1-1 不同中草藥水萃液添加對樟芝菌絲生長影響.....	35
4-1-2 不同中草藥水萃液添加對樟芝菌絲體胞內多醣生成影響.....	42
4-1-3 不同中草藥水萃液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響.....	43
4-2 不同濃度薑黃萃取液添加培養試驗.....	47
4-2-1 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體生長影響.....	47
4-2-2 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體粗三萜生長影響.....	49

4-2-3 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體總酚生長影響.....	54
4-2-4 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體類黃酮生長影響.....	55
4-3 不同中草藥乙醇萃取液添加培養試驗.....	57
4-3-1 不同中草藥乙醇萃取液添加對樟芝菌絲體生長影響.....	57
4-3-2 不同中草藥乙醇萃取液添加對樟芝菌絲體粗三萜生長影響.....	59
4-4 不同時間肉桂萃取液添加培養試驗.....	62
4-4-1 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體生長影響.....	62
4-4-2 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體粗三萜生長影響.....	64
4-4-3 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體總酚生長影響.....	69
4-4-4 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體類黃酮生長影響.....	70
4-5 特定中草藥成分添加培養試驗.....	72
4-5-1 特定中草藥成分添加對樟芝菌絲體生長影響.....	72
4-5-2 特定中草藥成分添加對樟芝菌絲體粗三萜生長影響.....	74
第五章 結論與未來展望.....	77
5-1 結論.....	77
5-2 未來展望.....	79
參考文獻.....	80

## 圖目錄

圖 2-1 樟芝子實體 .....	4
圖 2-2 樟芝液態培養菌絲體 .....	4
圖 2-3 phenoxide anion 之共振結構 .....	8
圖 2-4 黃酮和異黃酮類化合物的母核結構 .....	9
圖 2-5 黃耆(Astragalus) .....	15
圖 2-6 薑黃(Turmeric) .....	16
圖 2-7 八角(Star anise) .....	17
圖 2-8 肉桂(Cinnamon) .....	18
圖 2-9 花椒(Fagara) .....	19
圖 2-10 天然物合成的三大路徑 .....	22
圖 3-5-1 實驗架構 .....	30
圖 4-1 無添加水萃液對樟芝菌絲生長之影響 .....	36
圖 4-2 添加八角水萃液對樟芝菌絲生長之影響 .....	37
圖 4-3 添加黃耆水萃液對樟芝菌絲生長之影響 .....	38
圖 4-4 添加肉桂水萃液對樟芝菌絲生長之影響 .....	39
圖 4-5 添加薑黃水萃液對樟芝菌絲生長影響 .....	40
圖 4-6 添加花椒水萃液對樟芝菌絲生長影響 .....	41

圖 4-7 不同中草藥水萃液添加對樟芝菌絲體胞內多醣生成影響 .....	42
圖 4-8 不同中草藥水萃液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響 .....	44
圖 4-9 不同中草藥水萃液添加對樟芝菌絲體總三萜生成影響 .....	45
圖 4-10 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體生成影響 .....	48
圖 4-11 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響 .....	49
圖 4-12 無添加樟芝液態培養三萜化合物 HPLC 圖 (第 28 天).....	50
圖 4-13 添加 4ml 薑黃乙醇萃取液樟芝液態培養三萜化合物 HPLC 圖	50
圖 4-14 添加 2ml 薑黃水萃液樟芝液態培養三萜化合物 HPLC 圖 ..	51
圖 4-15 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體總三萜生成影響 .....	53
圖 4-16 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體總酚生成影響 .....	54
圖 4-17 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體類黃酮生成影響 .....	55
圖 4-18 不同中藥乙醇萃取液添加對樟芝菌絲體生成影響 .....	58
圖 4-19 不同中藥乙醇萃取液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響 .....	59
圖 4-20 不同中藥乙醇萃取液添加對樟芝菌絲體總三萜生成影響 .....	60
圖 4-21 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體生成影響 .....	63
圖 4-22 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響 .....	64
圖 4-23 無添加樟芝液態培養三萜化合物 HPLC 圖 (第 28 天).....	65
圖 4-24 第 20 天添加 2ml 肉桂乙醇萃取液樟芝液態培養三萜化合物 HPLC 圖 .....	65

圖 4-25 第 20 天添加 2ml 肉桂水萃取液樟芝液態培養三萜化合物 HPLC 圖.....	66
圖 4-26 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體總三萜生成影響 .....	68
圖 4-27 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體總酚生成影響 .....	69
圖 4-28 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體類黃酮生成影響 .....	70
圖 4-29 特定中草藥成分添加對樟芝菌絲體生成影響 .....	73
圖 4-30 特定中草藥成分添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響 .....	74
圖 4-31 特定中草藥成分添加對樟芝菌絲體總三萜生成影響 .....	75

## 表目錄

表 3-1 實驗藥品清單 .....	23
表 3-2 實驗儀器與清單 .....	24
表 4-1 不同中草藥水萃液對樟芝菌絲體代謝產物的影響 .....	46
表 4-2 HPLC 分析 10 種三萜類含量(不同濃度薑黃萃取液添加培養試驗).....	51
表 4-3 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體代謝產物的影響 .....	56
表 4-4 不同中草藥乙醇萃取液添加對樟芝菌絲體代謝產物的影響 .....	61
表 4-5 HPLC 分析 10 種三萜類含量(不同時間肉桂萃取液添加培養試驗).....	66
表 4-6 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體代謝產物的影響 .....	71
表 4-7 特定中草藥成分添加對樟芝菌絲體代謝產物的影響 .....	76

# 第一章 緒論

## 1-1 前言

近年來，人們生活越來越好，開始對自己健康更為注意，對健康有益的保健食品更是日漸興起，其中又以食藥用菇之保健類食品最為注目，因為藥用菇類在中國已經使用了兩千多年之久，以往主要用來改善健康和長壽之用。近年來越來越多的學者研究菇類的生理活性成分及其藥理作用中，除有生體防疫(免疫增強)，疾病康復力等作用外，更對腫瘤有預防及改善的效果(水等, 1997)。樟芝是台灣特有的藥用真菌，於治療肝病、抗腫瘤、降血脂血糖方面頗負盛名。三萜類為樟芝重要的成分之一，越來越多研究發現：三萜類對肝腫瘤細胞株皆具有明顯的毒殺作用。三萜類能夠有效阻止癌細胞血管增生並且誘導癌細胞的死亡。但樟芝對宿主具有專一性，只生長在一般真菌無法生長的台灣本土特有一級木牛樟樹(*Cinnamomum kanehirae*)上，且牛樟木從去年開始列為交易管制，造成野生樟芝取得難度更為增加，使樟芝成為台灣市場目前價格最昂貴的野生真菌。本實驗藉由深層培養的方式，快速地獲得大量的菌絲體及其發酵產物，以取代不易取得的樟芝子實體。

## 1-2 研究動機與目的

本實驗利用三角瓶液態培養方式，分別在樟芝基礎培養基中添加不同中草藥萃取液，與樟芝進行發酵，依照實驗結果做不同實驗。選擇第 28 天到第 34 天效果最好的中草藥萃取液深入探討，改變其濃度，探討萃取液添加對菌絲體生長、生理活性成分的影響。至於對菌絲體有抑制效果的中草藥萃取液，則進行不同時間添加的培養，希望二次代謝產物的保護機制可提高樟芝的生理活性成分。最後則探討中草藥中哪些成分造成的影響。

## 第二章 文獻回顧

### 2-1 樟芝

#### 2-1-1 樟芝簡介

樟芝(*Antrodia cinnamomea*) 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。又稱牛樟芝、牛樟菇、樟菰，只生長在台灣國寶級保育樹種牛樟樹上，是台灣特有種真菌，又因牛樟木不可砍伐，買賣，因此更顯的樟芝的珍貴。在 1990 年，第一次發表正式學名時，因標本沾染了靈芝孢子而被誤發表為靈芝屬，被命名為 *Ganoderma comphoratum*(Zang and Su, 1990)。1995 年後，由張東柱等人針對樟芝子實體的型態，重新命名為 *Antrodia cinnamomea* (Chang and Chou, 1995)。在分類上屬於真菌界(Fungi)、擔子菌(Basidiomycota)、擔子菌亞門(Basidiomycotina)、同擔子菌綱(Homobasidiomycetes)、無褶菌目(Aphulphorales)、多孔菌科(Polyporaceae)、薄孔菌屬(*Antrodia*)(Chang and Chou, 1995)。牛樟芝的子實體(圖 2-1)為多年生，外形平伏，無柄，邊緣反卷，呈圓狀或不規則狀，與牛樟木接觸面緊且寬，菌肉分兩層，木栓化至木質化，表面散佈菌孔，每毫米 4~5 個，新鮮時表面呈橘紅色、橘褐色至淡肉桂色，老化時變成褚黑色。擔子柄棍棒狀， $12 \sim 14 \times 3.0 \sim 5.0 \mu\text{m}$ ，擔孢子

的型態為平滑無色之透明微彎柱形， $3.5\sim 5.0\times 1.5\sim 2\ \mu\text{m}$  (高, 1991；Chang & Chou, 1995)。



圖 2-1 樟芝子實體

(圖擷取自網路)

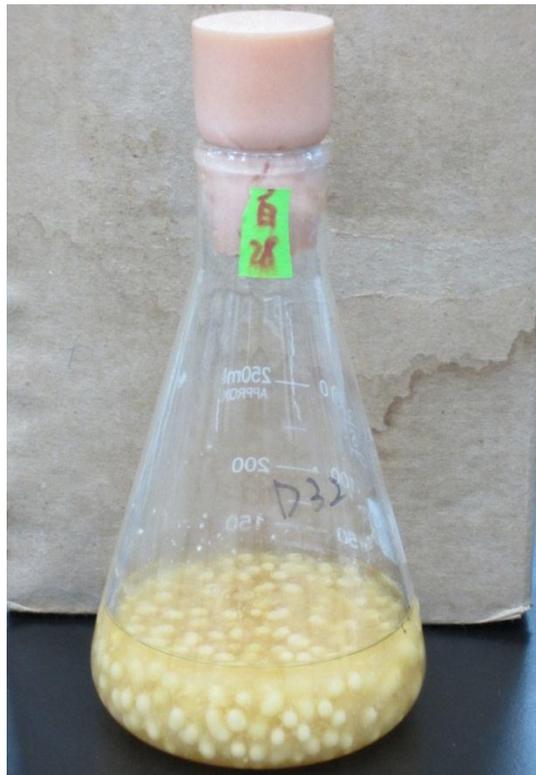


圖 2-2 樟芝液態培養菌絲體

## 2-1-2 樟芝的生理活性成分

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

### 2-1-2-1 萜類 (terpenoids)

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

萜類化合物一般難溶於水，易溶於親脂性的有機溶劑。低分子量和官能基少的萜類如半萜、倍萜、部分倍半萜，常溫下多呈液體，具有揮發性，能隨水蒸氣蒸餾如天然物萃取出各種精油。隨分子量及官能基增加，化合物的揮發性降低，熔、沸點提高，部分多官能基的倍半萜、二萜、三萜等，多為具有高沸點的液體或結晶固體(肖, 1989)。自從 Kubota 等人，於 1982 年首次從赤芝子實體中分離得到三萜化合物以來，截至目前為止，已經先後從赤芝子實體及孢子中分離鑑定出一百多種三萜類化學成份。三萜化合物是菇類的苦味來源，主要見於各種靈芝、猴頭菇及台灣特有的樟芝。

### 2-1-2-2 多醣體(polysaccharides)

多醣類是自然界中蘊藏豐富之生物聚合體(Biopolymer)。在微生物體中多醣依存在方式主要分為(1)胞內多醣(Intracellular polysaccharides)，此種形態多醣為提供微生物生長所需要的能量及碳源；(2)結構多醣(Structural polysaccharides)，此類多醣架構菌體基本形態如細胞壁；(3)胞外多醣(Extracellular polysaccharides)，為最常利用之多醣，為附著於細胞外部的黏性物質，但其亦可儲存細胞壁間隙。

目前有許多研究發現菇類純化的多醣體具有抗腫瘤作用，且均具有 $\beta$ -D-葡聚糖的結構。而樟芝所含 $\beta$ -D-葡聚糖抗癌活性之強弱與水溶性、分子量大小、支鏈分支度、形狀、與主鏈結合方式 $\beta$ -1,3 鍵結或 $\beta$ -1,6 鍵結以及結合之蛋白質與脂質等均有關。以 X-ray 繞射分析得知，這種以 $\beta$ -1,3 鍵結的 D-葡聚糖骨架呈現 3 股右旋之螺旋結構，可能是引發抗腫瘤作用的重要原因(水等, 1997)。黃鈴娟發現樟芝發酵濾液之多醣體經酸水解後，其中單醣組成以甘露糖、葡萄糖及木糖為主；而經水萃取及鹼萃取後之單醣則以葡萄糖及木糖為主，且無甘露糖存在。樟芝多醣體經膠體過濾層析後得知其皆含有大於 106 Da 之大分子，以核磁共振光譜判定多醣結構，可得知其具有 $\beta$ -D-葡聚糖的化學位移及紅外線光譜上具有醣類官能基之吸光特性(黃, 2000)。而李宛蓁根據 GPC 分析胞外多醣分子量，發現以固態培養的方式生成的多醣分子量遠高於液態培養時生成的多醣分子量(李, 2003)。范真綺在

多醣體成分之測定，不論以透析(透析膜 M.W. 3000)或酒精沉澱法分析，液態發酵之多醣含量多於固體栽培菌絲體。而經由膠體過濾層析分析發現，兩者皆有分子量百萬以上之多醣體，且透析後之分子量遠比酒精沈澱的分子量大(范, 2004)。謝如婷則發現添加微量元素於牛樟芝固態發酵產物中能改變菌絲體代謝物的含量及分佈，並可提昇其多醣含量、抗氧化能力及抑制腫瘤細胞的生長(謝, 2009)。

### 2-1-2-3 酚類化合物(phenolic compounds)

酚類化合物又稱多酚(polyphenols)或總酚，是生物體內主要的二次代謝產物，化學的定義是指具有羥基(hydroxyl)附加到芳香族(圖 2-3)。研究報導指出酚類化合物具有良好的抗氧化、抗突變及抗腫瘤等特性，其中以具有苯環及雙鍵結構的多酚類抗氧化活性最強(Osawa, 1999)。酚類化合物是體內相當重要的成分之一，若多酚中有鄰位酚羥基極易被氧化，且對活性氧等自由基有較強的捕捉能力，使多酚具有很强的抗氧化性能力。

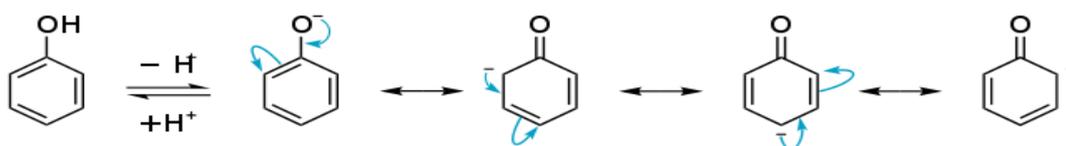


圖 2-3 phenoxide anion 之共振結構

#### 2-1-2-4 黃酮類化合物(Flavonoids)

黃酮類化合物又稱類黃酮。化學的定義是指基本母核為 2-苯基色原酮類化合物(圖 2-4)，現在則泛指兩個具有酚羥基的苯環通過中央三碳原子相互連接的一系列化合物。研究指出黃酮類化合物因其獨特的化學結構而對哺乳動物和其它類型的細胞具有許多重要的生理，生化作用。且具有高度的化學反應性能清除生物體內的自由基，有抗氧化作用，類黃酮藥理作用有抗癌，抗菌，抗病毒，抗炎症，抗過敏，抗糖尿病併發症等功能，且無毒無害，對人類的腫瘤，衰老，心血管病等退變性疾病的治療和預防有重要意義(延等, 2008)。

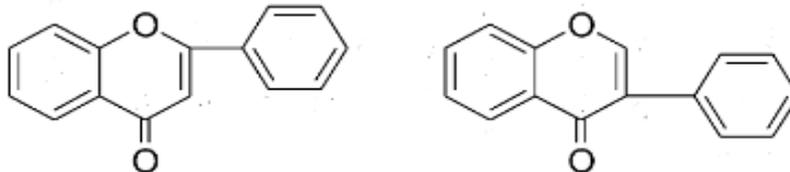


圖 2-4 黃酮和異黃酮類化合物的母核結構

### **2-1-3 樟芝生理活性成分研究及應用**

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

#### **2-1-3-1 抗腫瘤功效**

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

#### **2-1-3-2 抗發炎作用**

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

#### **2-1-3-3 抗氧化作用**

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

#### **2-1-3-4 提升免疫力**

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

胞的數量(Chen et al., 2008)。

#### **2-1-3-5 抑制病毒活性**

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

#### **2-1-3-6 抗菌能力**

牛樟芝子實體對於金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的生長有抑制功效(簡等, 1997)，對大腸桿菌(*Escherichia coli*)也有抑制效果(徐等, 2000)。

#### **2-1-3-7 降血糖能力**

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

## 2-2 中草藥

凡具有醫療和預防疾病作用的物質，統稱“藥物”在中醫理論指導下應用的天然藥物及其加工品來防治疾病的藥物，通稱“中藥”，古代稱之為“本草”。未經炮制的中藥習慣上稱“中藥材”，主要包括植物藥、動物藥和礦物藥三大類，其中以植物藥占極大多數，這些藥物經過簡單加工，未製得成品。研究中藥的來源、性狀、炮製、性能、配伍和應用為主要內容的科學，稱為“中藥學”。

所謂“生藥”通常只稱植物藥和動物藥，兼有生貨原藥之意，它與“藥材”的含意基本上是一致的。60年代以來，國際上對生藥學的研究範圍，有了較大的擴展。例如在研究對象方面：包括有藥用植物或藥用動物分離而得的有效成分純品、抗生素、激素、酶，並涉及致幻、致過敏、致畸形等有毒植物，以及農業殺蟲劑、除草劑等；在培養生產方面：包括植物生長調節劑、細胞組織培養、遺傳育種和突變品系；在化學成分方面：包括現代分析鑑定技術、生源學說、基礎代謝路徑及次生代謝物的起源、微生物轉化及在高等植物中的異常合成，比較植物化學中有關於化學成分作為分類學特徵，平行進行的多樣性，一般代謝產物的次生變異，代謝物的累積，遺傳學中的多倍體、化學種，人為的變異產物、突變、雜交等；在資源開發方面：重視海洋藥用生物的研究，並形成了“海洋生藥學”這一支的學科。生藥學已逐步擴展至應用植物化學，比較植物化學、生物化學、細胞生物學、植

物生理學、遺傳學等學科知識，來研討天然藥物的來源、分類、資源開發、生產、品質評鑑、生物合成、藥效藥理、毒性等內容(張, 2008)。

中藥材的性能主要包括四氣五味、升降浮沉、規經、補瀉等內容。

四氣五味就是指藥材的味性，包括藥材的藥性和滋味兩種含義。其中“性”又稱為“氣” 所以四氣五味也就是四性五味。性和味的作用既有區別也有聯繫。四氣：就是指寒、熱、溫、涼四種藥性。寒冷與溫熱就是對立的兩種藥性；寒與涼之間，溫與熱之間，是藥性相同而程度不同，溫次於熱，涼次於寒。藥性的寒、熱、溫、涼是藥材作用於人體發生的反應不斷總結歸納出來的。此外，尚有一些藥材的藥性較平和，稱為“平”性，非寒涼，也非溫熱，有微溫或微涼之性。因平性不獨成一氣，故一般乃稱“四氣”。五味：就是辛、甘、酸、苦、鹹五種藥味。辛味藥物，有發散、行氣、行血、潤養等作用。甘味藥物，有補益、和中、緩急等作用。酸味藥物，有收斂、固澀等作用。苦味藥物，有瀉火、燥濕、通瀉、下降等作用。鹹味藥物，有軟堅、散結、瀉下等作用。氣與味的關係是非常密切的。因為每一種藥材都具有氣和味，有氣同而味異，也有氣異而味同，即使是同性的藥材也有五味的差異，同味之藥材也各有四氣之不同。所以，藥材的氣與味不是孤立的，應統一認識，綜合應用(張, 2008)。

升、降、浮、沉是指藥材作用的趨向。所謂升是上升，降是下降，浮表示發散，沉表示泄利等作用。升與浮、沉與降，其趨向是類似的。凡升浮的

藥材多主上行而向外，有升陽、發表、散寒、催吐等作用；沉降的藥材則主下行而向內，有潛陽、降逆、清熱、滲濕、瀉下、收斂、平喘、止吐等作用。升、降、浮、沉主要取決於藥材的氣味和質地的輕重。凡味、辛、甘，氣溫熱的以及質鬆的藥材，大多主升浮；凡味酸、苦、鹹，氣寒涼以及子實質重的藥材，一般主沉降(張, 2008)。

補瀉也是中藥的重要性能，疾病除去陰陽寒熱之外，又有虛實之分，所謂“虛”是指精氣不足而產生的虛弱、退化等現象，“實”是指邪氣有餘而產生亢盛等病狀。所以，藥物的作用可歸納補瀉兩類。凡能扶助元氣、改善身體虛弱狀況，達到“強身”的藥物稱為補藥；能祛除病邪、平其亢盛者，並能通利大便的藥物稱為瀉藥(張, 2008)。

歸經是指藥材對機體某一部分的特殊選擇作用。每種藥材對機體的作用部位不同，凡某種藥材能治某經之病，及歸入某經之藥。歸經是以臟腑、經絡理論為基礎的，經絡能溝通人體內外表裏，在病變時，體表的疾病可影響到內臟，內臟的病變，也可反映到體表(張, 2008)。

綜上所述，在應用藥物時應將藥物的性味、升降浮沉、補瀉、歸經等性能有機地結合起來，避免顧此失彼，才能在治療上更好地發揮藥物的作用(張, 2008)。

### 2-2-1 黃耆(Astragalus)

黃耆補氣，黃耆是藥膳中最常用的中藥之一，所謂耆者，諸葯之長老，由此可見黃耆在中醫和藥膳上的重要。

黃耆外觀呈圓柱形，有的有分支，上端較粗，略扭曲，長 10~90 公分，直徑 1~3.5 公分，表面淡棕黃色至淡棕褐色，有不規則縱皺紋及橫長皮孔，栓皮易剝落，有時可見連結成網狀的纖維束，質硬而韌，不易折斷，斷面纖維性強，並顯粉性；橫切面形成層環明顯，皮部黃白色，約占半徑的 1/3，呈顯放射狀紋理及裂隙，木質部淡黃色，有菊花心，呈顯放射狀紋理及裂隙。氣微，味微甜，嚼之微有豆腥味(謝等, 2008)。

黃耆化學成分含有黃耆皂苷，乙醯黃耆皂苷，大豆皂苷，胡蘿蔔苷，刺芒柄花素，毛蕊異黃酮，熊竹素，香豆精，亞油酸，亞麻酸， $\beta$ -谷固醇，羽扇豆醇， $\gamma$ -氨基丁酸，黃耆多糖，甜菜鹼，膽鹼，胺基酸等(謝等, 2008)。

黃耆藥理活性有強心降血壓，保肝作用，增強生理代謝機能，增強免疫，抗炎作用，抗菌作用(謝等, 2008)。



圖 2-5 黃耆(Astragalus)

## 2-2-2 薑黃(Turmeric)

薑黃原產於熱帶的亞洲南部，2500 年前的古印度醫書，就已記載著它的用途，最先可能是用作染料或著色劑，後來才開始用做調味料及藥材。

薑黃外觀呈不規則卵圓柱形或紡錘型，彎曲，叉狀分枝，長 2~5 公分，直徑 1~3 公分，表面深黃棕色，粗糙，具縱皺紋，有葉痕之環節，圓形分支痕及鬚根痕；橫切面質堅實，不易折，斷面棕黃色，角質狀，有蠟樣光澤，內皮層明顯，維管束呈點狀。氣芬香，味苦辛(謝等, 2008)。

薑黃化學成分含有薑黃酮，芳香-黃酮酮，薑黃烯，薑黃素，對，對-二羥基二桂皮醯甲烷，即雙去甲基薑黃素，對-基桂皮醯阿魏醯基甲烷，即去甲氧基薑黃素，二氫薑黃素，薑黃新酮，薑黃酮醇， $\alpha$ -薑黃酮，大牻牛兒酮-13 醛，原莪朮二醇，莪朮雙環烯酮，去氫莪朮二酮，甜沒藥薑黃醇，莪朮烯醇，異原莪朮烯醇，莪朮奧酮二醇，原莪朮烯醇，表原莪朮烯醇，薑黃多糖(謝等, 2008)。

薑黃藥理活性有降血脂作用，抗癌作用，抗炎作用，抗菌作用，抗凝血作用，利膽作用，抗氧化作用，光敏感效應(謝等, 2008)。



圖 2-6 薑黃(Turmeric)

### 2-2-3 八角(Star anise)

八角是一種植物的果實，它的果殼似星狀，有八個角，因此中文名為八角。

八角在調味中扮演相當重要的角色，多用來去腥、增加香氣之用。

八角的聚合果約由 8 個(5-13 個)蓇葖果聚成，各分果近等大，放射狀排列於中軸上，蓇葖果長 1~2 公分，高 0.5~1 公分，外表面棕褐色或紅褐色，有不規則皺紋，頂端鈍或鈍尖，果皮較濃，上側多開裂成小艇形，內表面淡棕色，有光澤，每個蓇葖果含種子一粒，扁卵圓形，紅棕色或灰棕色，有光澤，果梗長 3~4 公分 彎曲，常脫落。氣芳香，味辛，甜(謝等, 2008)。

八角化學成分含有茴香醚，甲基胡椒酚，茴香醛，茴香酸，茴香酮，蒽烯，水芹烯，檸檬烯，桉葉素，黃樟醚，槲皮素，糖苷，山奈酚及其糖苷，莽草酸，咖啡醯奎寧酸，阿魏醯奎寧酸，4-(β-D- 呋喃葡萄糖氧基)-苯甲酸，羥基桂皮酸，羥基苯甲酸等(謝等, 2008)。

八角藥理活性有祛痰作用，促進腸胃蠕動，提升白血球，益菌作用(謝等, 2008)。



圖 2-7 八角(Star anise)

#### 2-2-4 肉桂(Cinnamon)

肉桂取自肉桂樹的樹皮，經過捲成條狀乾燥後製成，愈接近樹幹中心的樹皮所製成的肉桂品質愈高，具有止吐、發汗的功效。

肉桂外觀呈常綠喬木，樹皮灰褐色，老樹皮後可達 13 mm，一年生枝條圓柱形，當年生枝條略帶四棱形，葉互生，長卵形，格質，邊緣內捲，葉面深綠色有光澤，圓錐花序頂生或腋生，小花黃綠色，漿果狀核果倒卵形，暗紫色，外有宿存花被，花期 5~7 月。味辛甘，性熱。通常使用其樹皮(關, 2004)。

肉桂化學成分含有桂皮醛，乙酸桂皮酯，乙酸苯丙酯，桂皮酸，肉桂醇 D1，D2，o-甲氧基桂皮醛，香豆素，濃縮單寧酸，類黃酮素衍生物，黏膠質，丁香酚等(荷莉, 2008)。

肉桂藥理活性有降血糖作用，降血脂作用，抗菌作用，降壞膽固醇作用(荷莉, 2008)。



圖 2-8 肉桂(Cinnamon)

<http://www.bxgcw.net/yaopin/zyyy/20100122/8995.html>

### 2-2-5 花椒(Fagara)

花椒為芸香科灌木或小喬木植物花椒的果皮，於秋季採收。花椒氣味芳香，能促進唾液分泌，進而增加食欲，也能去除體內寒氣，對長期吃素造成的腹部冷痛、拉肚子，有良好的改善效果。

花椒樹高 3-7 m，莖幹通常有增大皮刺；花被片 4~8 個；雄花雄蕊 5~7 個，雌花心皮 3~4 個，稀 6~7 個，子房無柄。果球形，通常 2~3 個，紅色或紫紅色，密生疣狀凸起的油點。果實方面，花椒形狀球形，椒皮外表紅褐色，曬乾後呈黑色。有龜裂紋，頂端開裂。內含種子一粒，圓形，有光澤。味辛，性溫，小毒。

花椒化學成分含有檸檬烯，香葉醇，異茴香醚，水芹香烯，香草醇，枯醇，牻牛兒醇，甾醇，不飽和有機酸。

花椒藥理活性有降血壓作用，抗癌作用，抗菌作用，局部麻醉作用(孫, 2003)。



圖 2-9 花椒(Fagara)

## 2-3 特定中草藥成分簡介

### 2-3-1 莽草酸

莽草酸(shikimic acid)存在於木蘭科植物八角的乾燥果實中。莽草酸化學式 $C_7H_{10}O_5$ ，分子量 174.15 g/mol，水中溶解度：180 g/L，難溶於氯仿、苯、石油醚。莽草酸藥理作用：莽草酸有抗炎、鎮痛作用，是抗病毒和抗癌藥物的中間體，具有一定的刺激性。北京中醫藥大學藥理研究室發現莽草酸有明顯抗血栓形成作用，可抑制動、靜及腦血栓的形成。莽草酸最新應用是製造藥物“達菲”的重要原料，專家稱這是目前世界上對付禽流感的唯一武器(劉等, 2007)。

從圖 2-10 得知天然物合成三大路徑，實驗研究添加莽草酸，由莽草酸濃度上升，阻礙其合成路徑合成莽草酸，可能使較多 monosaccharides 往萜類合成路徑合成萜類化合物，提升三萜類產量。

### 2-3-2 槲皮素

槲皮素(querctin)係廣泛的分佈於植物界中含量最多之黃酮類化合物(flavonoid)。吾人日常食用之蔬菜、水果、中草藥等，均含槲皮素成分。黃酮類化合物為植物二次代謝產物(secondary metabolities)，槲皮素化學式 $C_{15}H_{10}O_7$ ，分子量 302.23 g/mol。脫水的槲皮素呈黃色結晶針狀，95~97 °C 即達無水狀態。槲皮素不溶於水，每公克槲皮素可溶於 290 ml 純酒精或 23

ml 沸騰酒精。類黃酮分子聚合物的主要作用機制為抗氧化作用。從而槲皮素的活性作用亦以抗氧化作用為主。抗氧化作用機制主要為清除氧自由基作用，其具抑制氧化酵素及抑制脂質過氧化作用。其他尚有抑制低密度膽固醇的氧化作用。其作用可能為保護維他命 E 在低密度膽固醇中不被氧化或使維他命 E 氧化再生。槲皮素與維生素 C (ascorbic acid) 共同作用時，槲皮素可降低皮膚神經血管構造之氧化傷害，並抑制麥胱甘肽(glutathione depletion) 缺失導致之神經傷害。近幾年之研究結果指出槲皮素具有多項有益人體健康之作用，包括預防心血管疾病，抗過敏性作用，預防白內障 (cataract)，抗病毒 (antiviral)及抗發炎 (anti-inflammatory) 等項作用。有關抗腫瘤之研究則進行中，並已獲得初步正面之實驗結果。其次，在醫療用途上以口服槲皮素製劑後，初步結果發現腸內之吸收率極低，約僅 2% 左右，因此如何增加在人體內之吸收效果的研究正積極進行中(張, 2004)。

從圖 2-10 得知天然物合成三大路徑，實驗研究添加槲皮素，由槲皮素濃度上升，阻礙其合成路徑合成槲皮素，可能使較多 acetic acid 往萜類合成路徑合成萜類化合物，提升三萜類產量。

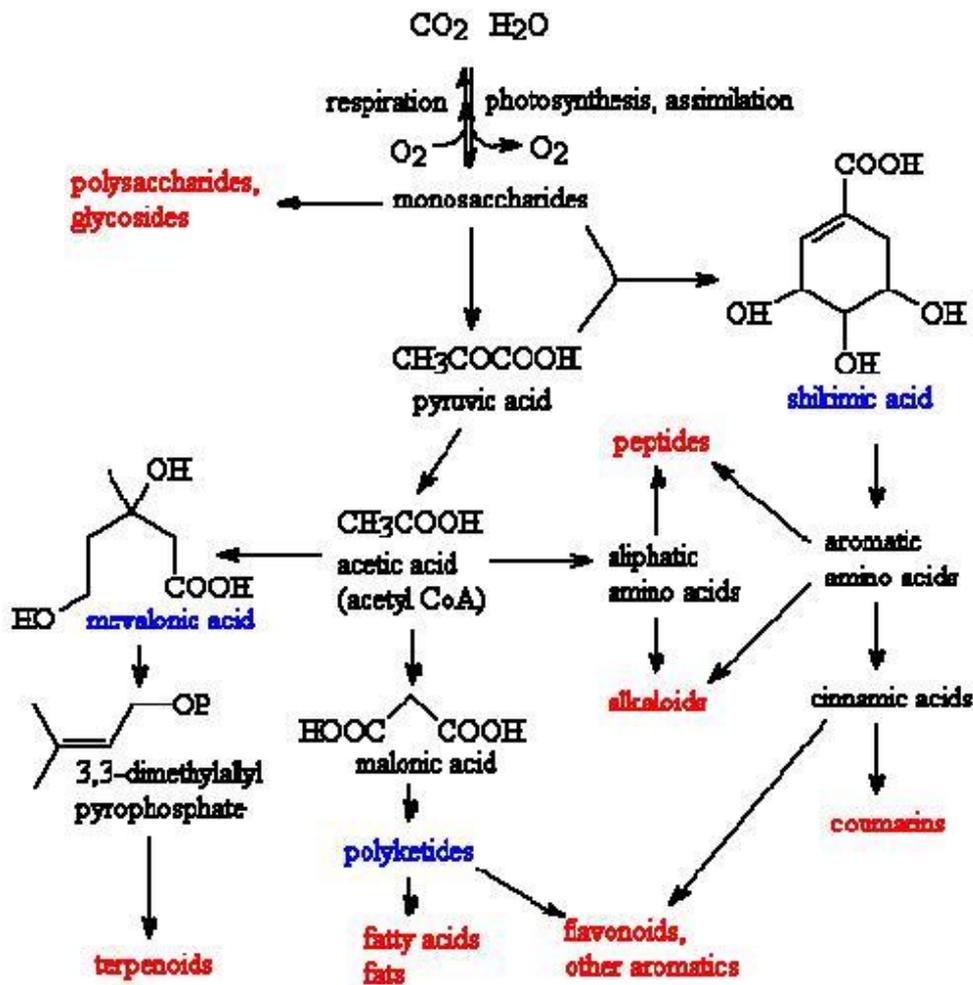


圖 2-10 天然物合成的三大路徑(林豔琪, 2006)

### 第三章 實驗材料與方法

#### 3-1 實驗菌株

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

#### 3-2 實驗藥品

表 3-1 實驗藥品清單

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

Gallic acid	SIGMA
Chloroform	TEDIA
AlCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	ECHO
CH <sub>3</sub> COOK	ECHO
Quercetin	ACROS
Shikimic acid	Alfa Asear

### 3-3 實驗儀器與設備

表 3-2 實驗儀器與清單

儀器設備	型號	廠牌
pH meter	pH - 206	Lutron
電磁加熱攪拌機	C-MAG HS7	德國 IKA
高壓滅菌釜	HI-340	台灣宏霖
無菌操作台	JW-4N	台灣亮盛
試管振盪器	MSI minishaker	德國 IKA
迴轉式震盪培養箱	LUS-150	台灣亮盛
往復式震盪恆溫水槽	OSI-500	台灣健鑫

分光光度計	GENESYS UV10	美國 Thermo
微電腦蒸餾水製造機	WSC044	英國 FISTREEM
超純水製造機	Simplicity	美國 Millipore
超音波震盪機	5210	美國 BRANSON
高速中型離心機	Universal-32R	德國 Hettich
桌上型微量離心機	MCD2000	HSIANGTAI
烘箱	LO-150	台灣亮盛
冷凍乾燥機	CT-110	丹麥 HETO
斜立式真空減壓濃縮裝置	N-1000	日本 EYELA
數位水浴加熱槽	SB-1000	日本 EYELA

---

### 3-4 分析方法

#### 3-4-1 菌體濃度

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

### 3-4-2 殘餘澱粉含量測定

採用 starch-iodine 的分析方式，配製 iodine reagent (5 mM I<sub>2</sub>+ 50 mM KI)，及配製 10 g/L 水溶性澱粉濃度，以磁石加熱攪拌器加熱溫度為 100 °C 下沸騰 5~10 分鐘後，再稀釋成 1、0.5、0.33、0.25、0.2、0.17、0.14、0.1 g/L 濃度，各取 0.4 ml 體積，加入 0.2 ml 1M HCl 與 0.4 ml H<sub>2</sub>O，再加入 1 ml iodine reagent，反應完畢，總體積為 2 ml，以分光光度計在波長為 580 nm 測定其光學密度 (Optical density, O.D.)，利用所測量 O.D.值作出標準曲線。

取 1 ml 發酵液在 8000 rpm 離心 10 分鐘後，取 0.4 ml 稀釋發酵液，加入 0.2 ml 1 M HCl 使酵素失活與 0.4 ml H<sub>2</sub>O，再加入 1 ml iodine reagent 反應完畢後，以分光光度計在波長為 580 nm 量測 O.D.值，再依標準曲線定出澱粉濃度 (g/L)。

### 3-4-3 多醣濃度測定

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

標準品為 D(+)-glucose，其濃度範圍為 0.01~0.2 mg/ml。取經冷凍乾燥

後之菌絲體 100 mg 粉末加入 10ml 蒸餾水，置於滅菌釜(121 °C，1.2 Kg/cm<sup>2</sup>) 滅菌 20 分鐘，重複兩次，再以 8000 rpm，離心 10 分鐘，收集上清液即為胞內多醣粗萃液。將胞內多醣粗萃液與 95 % 酒精以體積比 1:4 之比例混合，於 4 °C 冰箱中靜置 24 小時以沉澱多醣體。多醣體完全沉澱後，以 8000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，將沉澱物烘乾。將此沉澱物加入 1N NaOH 2 ml 回溶，並將樣品稀釋，取適當稀釋過後之樣品溶液 2 ml，加入 1 ml 5% 酚溶液混合，再加入 5 ml 濃硫酸，於抽風櫃靜置 10 分鐘，之後於 25 °C 恆溫水槽水浴反應 15 分鐘，待呈色穩定後，以分光光度計測其在波長 490 nm 下之吸光值。對照葡萄糖標準品濃度與吸光值標準曲線，即可求得多醣濃度。

#### 3-4-4 胞內粗三萜含量測定

取乾菌絲 100 mg，加入 50 % 乙醇 3 ml 震盪 30 分鐘，過濾萃取液，將殘渣再加入 50 % 乙醇 3 ml 震盪 30 分鐘，收集濾液共 6 ml 減壓濃縮至乾，將乾燥物加 3 ml 水回溶並加入 3 ml 氯仿萃取 30 分鐘，取下層液體加入 3 ml NaHCO<sub>3</sub> 震盪 30 分鐘，之後調整液體 pH 至 2~3 以下，取下層液體減壓濃縮至乾，加入 2 ml 95 % 乙醇，在波長 245 nm 下測其吸光值。由熊果酸(ursolic acid)標準曲線換算萃取液中粗三萜類物質含量，單位為 mg/mL (陳, 2006)。

### 3-4-5 總酚類化合物含量測定

利用酚類化合物，在鹼性的環境下能與 Folin-Clocalteu's phenol 試劑形成可溶性的藍色化合物，在 730 nm 有最多的吸收值，吸收值越大，表示酚類化合物越多，以 Gallic acid 為標曲線，對照樣品的酚類化合物含量多寡。

取乾菌絲 100 mg，加入 99.9 % 乙醇 10 ml 震盪 30 分鐘，離心後取 0.2 ml 的甲醇萃取液，加入 4 ml 2 % 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ，均勻混和反應 2 分鐘之後再後加入 0.2 ml 50 % Folin-Clocalteu's phenol reagent 反應 30 分鐘，在 730 nm 測其吸光值。由已知濃度的標準沒食子酸(Gallic acid)檢量線，計算總酚類的含量，單位為 mg/mL (Salatino and Woisky, 1998)。

### 3-4-6 總類黃酮物質含量

利用甲醇萃取樟芝菌絲體，目的為求出發酵物中類黃酮含量，依此藉由此含量可瞭解發酵物抗氧化活性與生理活性成分效果。(鄭等, 2009)。

取乾菌絲 100 mg，加入 99.9 % 乙醇 10 ml 震盪 30 分鐘，離心後取 0.5 ml 的甲醇萃取液，依序加入 1.5 ml 的 95 % 乙醇、0.1 ml 的 10 %  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 ml 的 1 M  $\text{CH}_3\text{COOK}$ 、2.8 ml 的去離子水，混合均勻後於室溫下靜置 40 分鐘後，測定波長 415 nm 之吸光值，由槲皮素(Quercetin)標準曲線換算萃取液中總類黃酮物質含量，單位為 mg/mL (Nagy and Grancai, 1996)。

### 3-4-7 HPLC 分析樟芝三萜類含量

取乾菌絲(或子實體)200 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2~3之間，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8000 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)。

### 3-5 實驗方法

#### 3-5-1 實驗架構

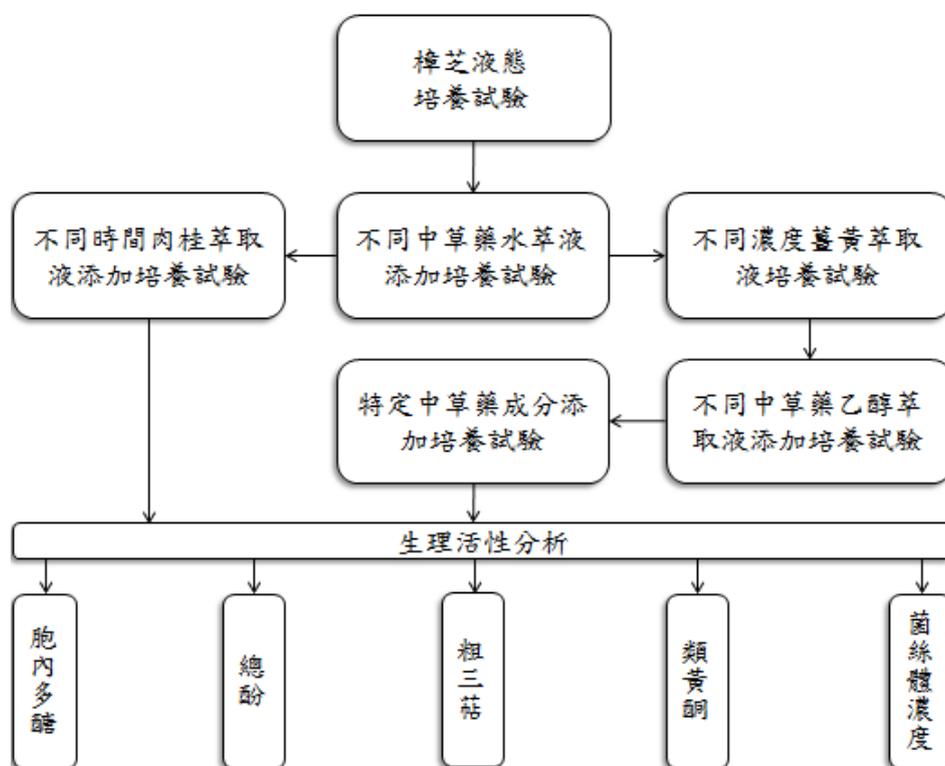


圖 3-5-1 實驗架構

#### 3-5-2 菌種斜面試管保存

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

### 3-5-3 培養皿平面培養與接菌活化

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

### 3-5-4 種菌的製備

本實驗種菌所採用的液態培養基為食品工業發展研究所提供之基礎培養基配方，其組成成份為：Malt extract 2%、Glucose 2%、Peptone 0.1%，並利用 0.1 N HCl 及 0.1 N NaOH 將培養基 pH 值調整為 5。培養基滅菌過後，取長滿樟芝菌絲之平面培養皿，用鋁片製成的切割器切 4 個單位的菌絲塊(每塊單位面積 0.5 cm × 0.5 cm)，以白金鈎將菌絲塊接入液態培養基中，並置於 25 °C 迴轉恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 14 天做為種菌。

### 3-5-5 中草藥水萃液製備

將秤重 50 g 的中草藥(黃耆、薑黃、肉桂、八角、花椒)加入 1 L 的水，煮沸 3 個小時，用 100 mesh 篩網過濾，再利用真空減壓濃縮裝置濃縮 10 倍取得水萃液。中草藥購自明通中藥行。

### 3-5-6 中草藥乙醇萃取液製備

將秤重 50 g 的中草藥(黃耆、薑黃、肉桂、八角、花椒)加入 1 L 95 % 乙醇，放在 50 °C 恆溫水槽，靜置 24 小時，用 100 mesh 篩網過濾，再利用真空減壓濃縮裝置濃縮 10 倍取得乙醇萃取液。中草藥購自明通中藥行。使用 95 % 乙醇，原因是購入的乙醇即是 95 % 食用級酒精。

### 3-5-7 不同中草藥水萃液添加培養試驗

樟芝三角瓶液態培養所採用之培養基，係為本實驗室於先前研究中以回應曲面法(RSM)所探討出來的最佳培養組成(黃, 2001)，以玉米澱粉(corn starch)為碳源，氮源則是採用 YM Broth，其組成為：Corn starch 4.78 %、YM Broth 3.19 %、中草藥水萃液(黃耆、薑黃、肉桂、八角、花椒水萃液) 2 %。將基礎培養基培養 14 天後的種菌，以滅過菌的均質機(polytron)攪碎菌絲球，並以 10 % 的接菌量接至不同培養基三角瓶，然後放入 25 °C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 8、14、20、28、34 天，收集菌絲體，經冷凍乾燥磨粉後，進行粗三萜含量、胞內多醣含量等測試。

### 3-5-8 不同濃度薑黃萃取液添加培養試驗

上述實驗中，選用 3-5-7 實驗中第 28 天到第 34 天粗三萜上升最高的中草藥萃取液深入探討。樟芝三角瓶液態培養，採用之培養基以玉米澱粉(corn starch)為碳源，氮源則是採用 YM Broth，其組成為：Corn starch 4.78 %、YM Broth 3.19 % (黃, 2001)，薑黃萃取液添加濃度(1 %、2 %、4 %)。將基礎培養基培養 14 天後的種菌，以滅過菌的均質機(polytron)攪碎菌絲球，並以 10 % 的接菌量接至不同培養基三角瓶，然後放入 25 °C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 28 天，收集菌絲體，經冷凍乾燥磨粉後，進行粗三萜含量、總多酚含量、總類黃酮物質含量等測試。

### 3-5-9 不同中草藥乙醇萃取液添加培養試驗

樟芝三角瓶液態培養所採用之培養基，以玉米澱粉(corn starch)為碳源，氮源則是採用 YM Broth，其組成為：Corn starch 4.78 %、YM Broth 3.19 % (黃, 2001)、中草藥乙醇萃取液(黃耆、八角、花椒、肉桂乙醇萃取液) 2 %。將基礎培養基培養 14 天後的種菌，以滅過菌的均質機(polytron)攪碎菌絲球，並以 10 % 的接菌量接至不同培養基三角瓶，然後放入 25°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 28 天，收集菌絲體，經冷凍乾燥磨粉後，進行粗三萜含量測試。

### 3-5-10 不同時間肉桂萃取液添加培養試驗

上述實驗中，選用 3-5-7 實驗中對菌絲體抑制效果最大的中草藥萃取液。樟芝三角瓶液態培養，玉米澱粉(corn starch)為碳源，氮源則是採用 YM Broth，其組成為：Corn starch 4.78 %、YM Broth 3.19 % (黃, 2001)。將基礎培養基培養 14 天後的種菌，以滅過菌的均質機(polytron)攪碎菌絲球，並以 10 % 的接菌量接至每個三角瓶，放入 25 °C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 28 天，在第 8、14、20 天添加 2 ml 肉桂萃取液，收集菌絲體，經冷凍乾燥磨粉後，進行粗三萜含量、總多酚含量、總類黃酮物質含量等測試。

### 3-5-11 特定中草藥成分添加培養試驗

樟芝三角瓶液態培養所採用之培養基，以玉米澱粉(corn starch)為碳源，氮源則是採用 YM Broth，其組成為：Corn starch 4.78 %、YM Broth 3.19 % (黃, 2001)、Quercetin 0.1 g 或 Shikimic acid 0.03 g，配置完後拿去滅菌。將基礎培養基培養 14 天後的種菌，以滅過菌的均質機(polytron)攪碎菌絲球，並以 10% 的接菌量接至不同培養基三角瓶，然後放入 25 °C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 28 天，收集菌絲體，經冷凍乾燥磨粉後，進行粗三萜含量含量測試。

## 第四章 結果與討論

### 4-1 不同中草藥水萃液添加培養試驗

本實驗利用三角瓶液態培養方式，在樟芝液態培養基中加入 2 ml 中草藥水萃液，分別是添加八角水萃液、黃耆水萃液、肉桂水萃液、薑黃水萃液、花椒水萃液，然後跟無添加的液態樟芝培養比較，觀察添加不同中草藥水萃液後，對菌絲體生長、生理活性成分生成的影響。

#### 4-1-1 不同中草藥水萃液添加對樟芝菌絲生長影響

樟芝本身生長緩慢，而我們使用的碳源又是不可溶性的玉米澱粉，使得三角瓶內培養基呈現濃稠狀且生長狀態不明顯，第 8 天大部分澱粉被消耗完，故選擇從生長開始的第 8 天進行各項分析。但為避免測菌絲體受到玉米澱粉影響，以及生理活性成分受中草藥水萃液影響，所以菌絲體以蒸餾水清洗乾淨，再進行冷凍乾燥

由圖 4-1 顯示，無添加任何水萃液的樟芝發酵液，從 0 天到第 8 天期間澱粉消耗速度非常快，幾乎已經消耗完畢。0 天到 14 天是菌絲體的生長期，菌絲體生長非常快速，而胞內多醣在 0 天到第 8 天生長非常快速並達到最大值，胞內多醣含量為 212.26 mg/g D.W.，但從第 8 天候，胞內多醣含量持續下降，推測是由於澱粉消耗完畢，菌絲體生長改消耗胞內多醣。第 20 天開

始菌絲體含量逐漸下降，應該是培養基裡的碳源不足以供菌體生長，又由於碳源不足，造成樟芝菌體自體溶解產生胞內多醣供樟芝使用，造成菌絲體和胞內多醣含量再度上升。而三萜類為二次代謝產物，故在 14 天後菌絲體開始平穩後開始上升，並在第 34 天達到最大值，粗三萜含量為 22.46 mg/g

D.W.。

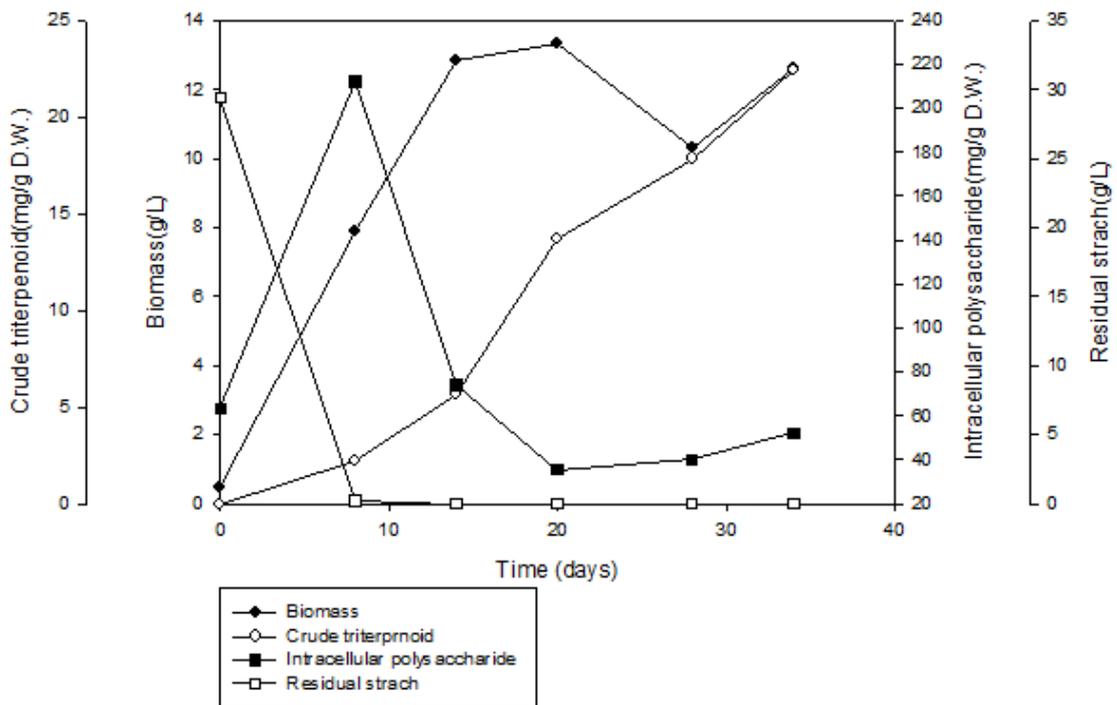


圖 4-1 無添加水萃液對樟芝菌絲生長之影響

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

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm，初始 pH 6.15

由圖 4-2 顯示，在樟芝液態培養中添加八角水萃液，從 0 天到第 8 天時，澱粉消耗速度非常快，幾乎消耗完畢。菌絲體在 14 天時達到最大值，含量為 15.71 g/L。胞內多醣含量跟對照組一樣在第 8 天達到最大值，為 223.26 mg/g D.W.。而三萜方面，則是在第 34 天達到最大值，粗三萜含量為 30.64 mg/g D.W.。

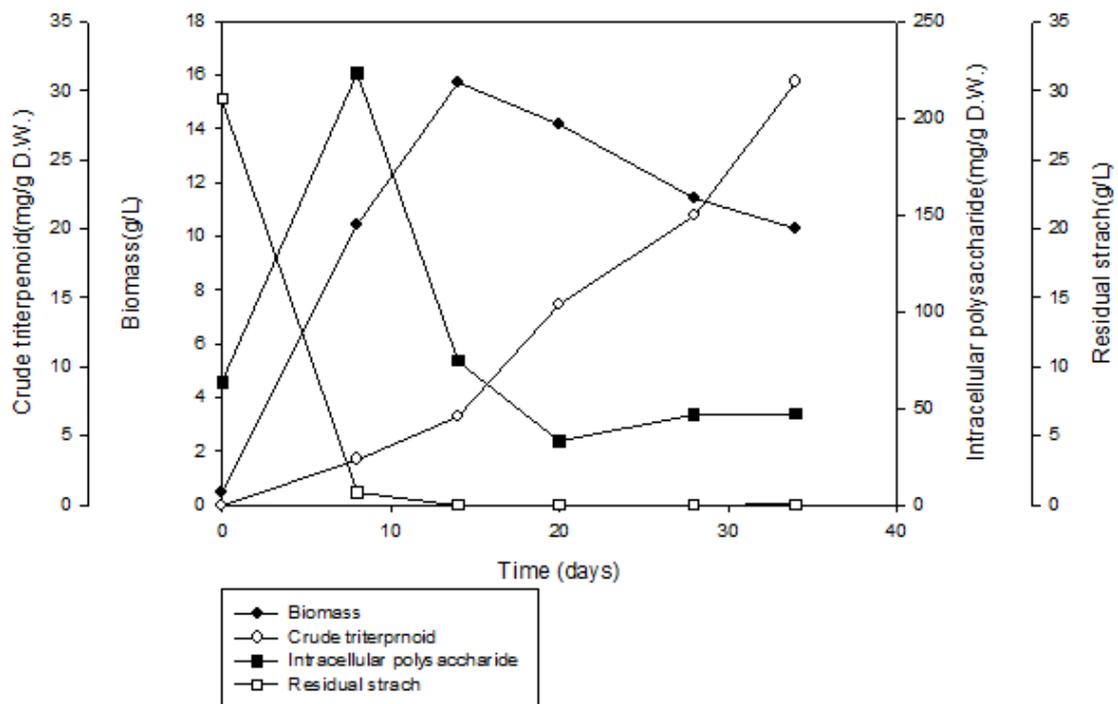


圖 4-2 添加八角水萃液對樟芝菌絲生長之影響

培養基成份： Corn starch (4.78 %)， YM broth (3.19 %)， 八角水萃液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm，初始 pH 5.19

由圖 4-3 顯示，在樟芝液態培養中添加黃耆水萃液，從 0 天到第 8 天時，幾乎消耗完畢。菌絲體在 0 天到 8 天時快速生長，其平穩期較其他中草藥水萃液早開始，從第 8 天開始後緩慢生長，第 20 天時達到最大值，菌絲體含量為 14.01 g/L。胞內多醣由於其進入平穩期較快，故在第 8 天達到最大值，但較其他水萃液低，為 196.21 mg/g D.W.。而粗三萜方面，則是在第 34 天達到最大值，三萜含量為 33.15 mg/g D.W.。

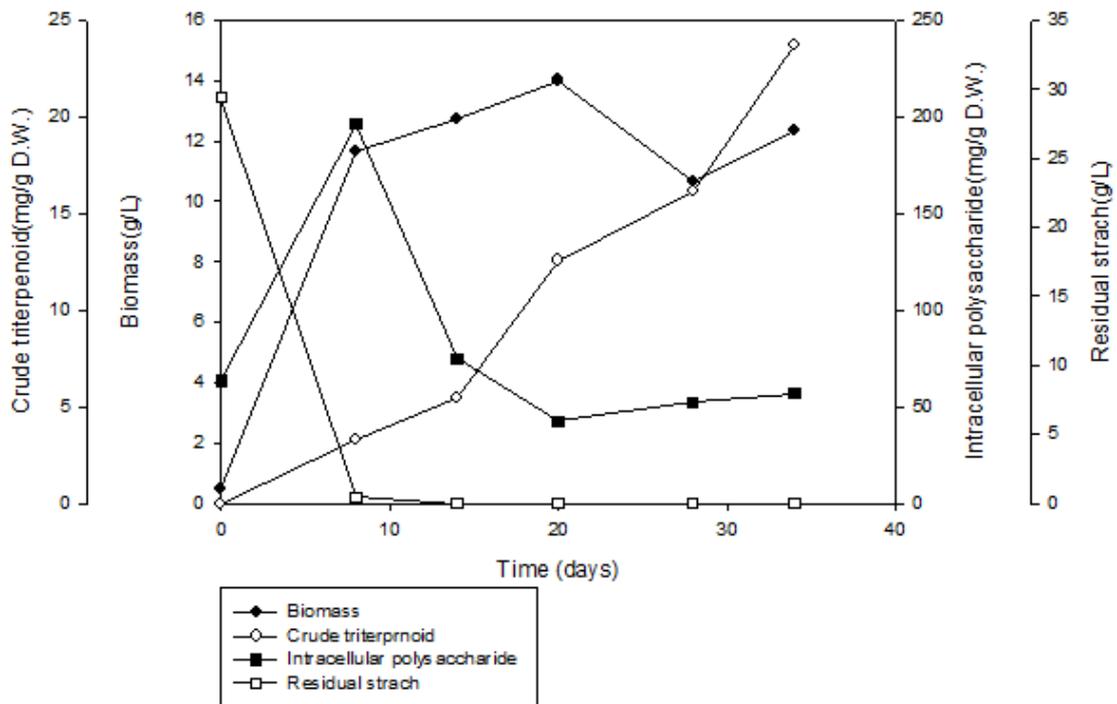


圖 4-3 添加黃耆水萃液對樟芝菌絲生長之影響

培養基成份：Corn starch (4.78 %)，YM broth (3.19 %)，黃耆水萃液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm，初始 pH 6.09

由圖 4-4 顯示，在樟芝液態培養中添加肉桂水萃液，從 0 天到第 8 天時，澱粉消耗速度非常快，幾乎消耗完畢。菌絲體方面在 8、14、20、28 天均是添加不同中草藥水萃液中最小的，可以看出肉桂水萃液有明顯的抑制菌絲體生產之現象。胞內多醣含量跟對照組一樣在第 8 天達到最大值，為 225.25 mg/g D.W.。而粗三萜方面，則是在第 34 天達到最大值，粗三萜含量為 30.98 mg/g D.W.。

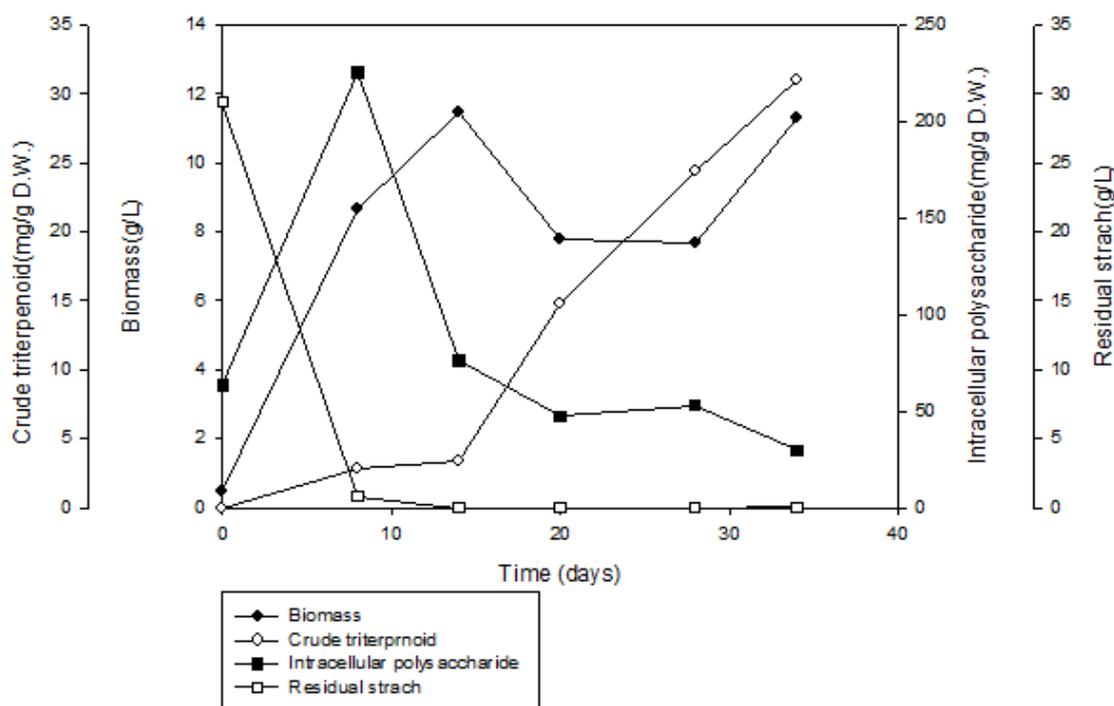


圖 4-4 添加肉桂水萃液對樟芝菌絲生長之影響

培養基成份：Corn starch (4.78 %)，YM broth (3.19 %)，肉桂水萃液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm，初始 pH 6.12

由圖 4-5 顯示，在樟芝液態培養中添加薑黃水萃液，從 0 天到第 8 天時，澱粉消耗速度非常快，幾乎消耗完畢。菌絲體在 0 天到 8 天時快速生長，從第 8 天開始後緩慢生長，第 20 天時達到最大值，菌絲體含量為 14.36 g/L。胞內多醣含量在第 8 天達到最大值，為 210.46 mg/g D.W.。而粗三萜方面，第 28 天到 34 天有大幅度的上升，並在 34 天達到最大值，粗三萜含量為 37.52 mg/g D.W.，可做為我們深入研究的方向。

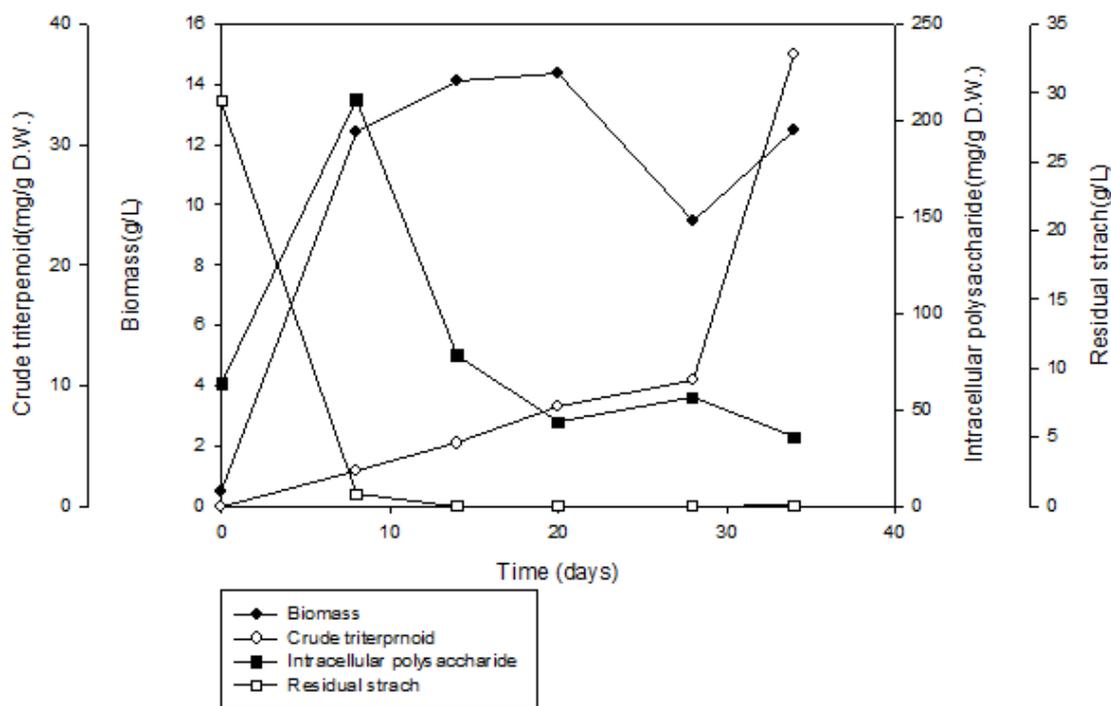


圖 4-5 添加薑黃水萃液對樟芝菌絲生長影響

培養基成份：Corn starch (4.78 %)，YM broth (3.19 %)，薑黃水萃液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm，初始 pH 5.21

由圖 4-6 顯示，在樟芝液態培養中添加花椒水萃液，從 0 天到第 8 天時，澱粉消耗速度非常快，澱粉含量幾乎消耗完畢。菌絲體在 0 天到 14 天時快速生長，從第 14 天開始後緩慢生長，第 20 天時達到最大值，菌絲體含量為 14.99 g/L。胞內多醣含量在第 8 天達到最大值，為 249.56 mg/g D.W.。而粗三萜方面，則是在第 34 天達到最大值，粗三萜含量為 22.92 mg/g D.W.。

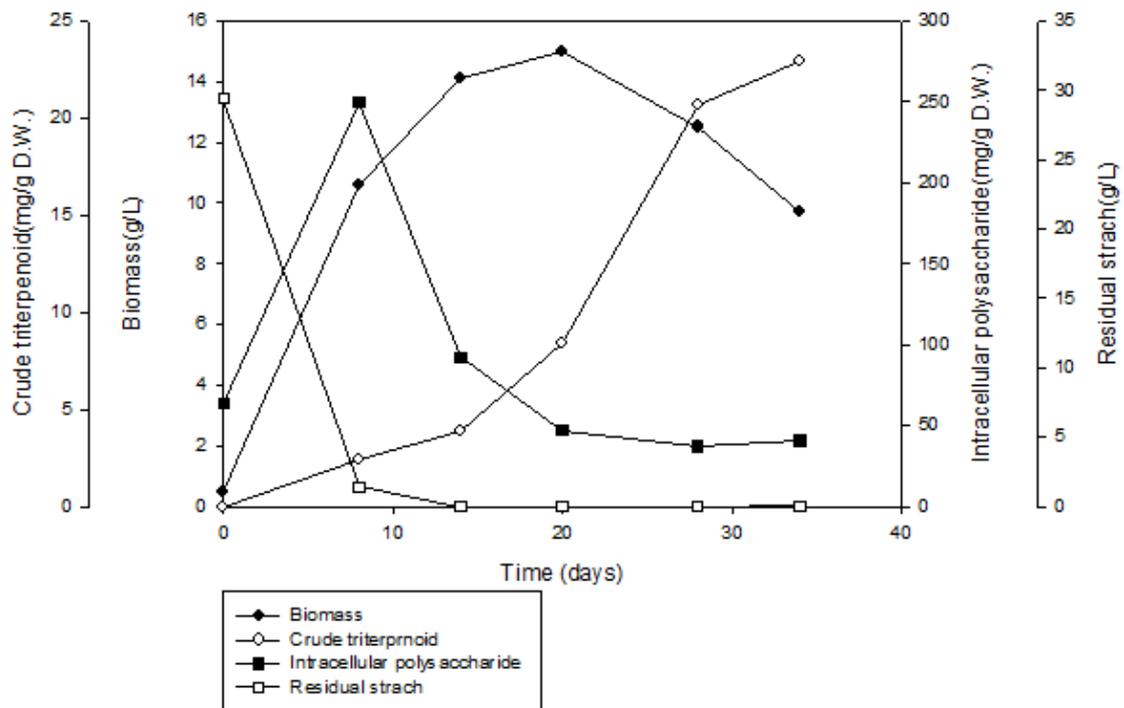


圖 4-6 添加花椒水萃液對樟芝菌絲生長影響

培養基成份：Corn starch (4.78 %)，YM broth (3.19 %)，薑黃水萃液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm，初始 pH 5.94

#### 4-1-2 不同中草藥水萃液添加對樟芝菌絲體胞內多醣生成影響

由圖 4-1 到圖 4-6 得知，胞內多醣含量均在第 8 天達到最大值，第 8 天以後培養基裡的碳源不夠讓所有樟芝菌絲體使用，細胞開始自體溶解產生較易吸收利用的小分子醣類，造成胞內多醣含量逐漸下降。在圖 4-7 中可發現，添加花椒水萃液有最明顯促進胞內多醣的生成，每克乾菌絲體中含有 249.56 毫克的胞內多醣為 control 的 1.18 倍。

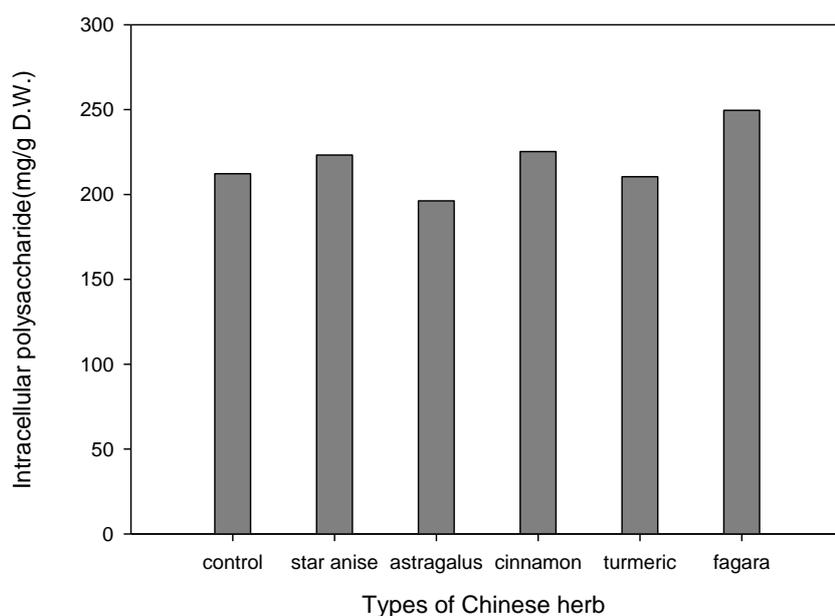


圖 4-7 不同中草藥水萃液添加對樟芝菌絲體胞內多醣生成影響(第 8 天)

培養基成份：Corn starch (4.78 %)，YM broth (3.19 %)，中草藥水萃液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

#### 4-1-3 不同中草藥水萃液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響

三萜類為樟芝二次代謝產物，二次代謝產物通常和平穩期開始穩定上升，培養初期含量極低。研究發現(李, 2003)，三萜的種類隨著培養時間的增長而增加且趨複雜。由圖 4-1 到圖 4-6 發現，粗三萜含量都在第 34 天時達到最大值，但以單位時間三萜成長量來比較，發現有些中草藥 28 天跟 34 天差不多，因此選用第 28 天及第 34 天的菌絲體，探討菌絲體粗三萜含量的影響。

在圖 4-8 中，第 28 天時，添加肉桂水萃液的粗三萜含量高於對照組和添加其他中草藥水萃液，可達 24.34 mg/g D.W.，而在第 34 天時，添加薑黃水萃液有最高的粗三萜含量，可達 37.52 mg/g D.W.，推測這兩種中草藥水萃液中成分對樟芝粗三萜有影響作用。

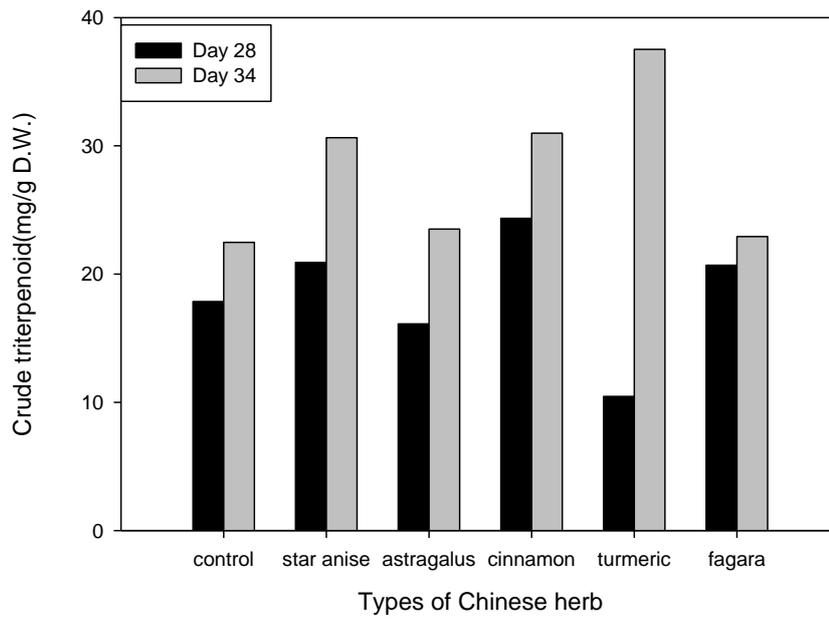


圖 4-8 不同中草藥水萃液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響(第 28、34 天)

培養基成份：Corn starch (4.78 %)，YM broth (3.19 %)，中草藥水萃液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

為了把菌絲體對樟芝菌絲粗三萜的影響考慮進去，圖 4-9 將其換算成總粗三萜產量來表示，即每個樟芝液態培養搖瓶中能生成的粗三萜產量。在圖 4-9 中，可以發現第 28 天時，添加花椒水萃液的總粗三萜產量最高，推測其原因是因為添加花椒水萃液會減緩樟芝生長速率使其自體溶解後的多糖使用較緩慢，也造成其自體溶解速率較慢，使其在第 28 天有最大的菌絲體並造成有最大的總粗三萜產量 258.58 mg/L；在第 34 天時添加薑黃水萃液有最高總粗三萜產量 468.63 mg/L，其原因薑黃水萃液中成分對樟芝粗三萜有影響作用，而菌絲體又剛好進入第二次生長。

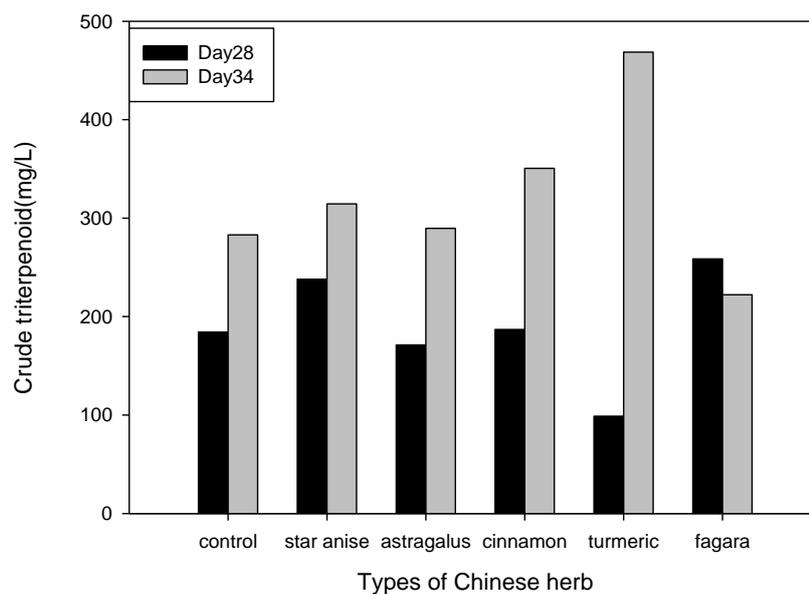


圖 4-9 不同中草藥水萃液添加對樟芝菌絲體總三萜生成影響(第 28、34 天)

培養基成份：Corn starch (4.78 %)，YM broth (3.19 %)，中草藥水萃液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

從表 4-1 看出添加八角水萃液有最大的菌重 15.71 g/L，並有最快的生長速率 1.12 g/L·day。粗三萜方面，添加薑黃水萃液有最多的粗三萜含量 37.52 mg/g，和總粗三萜產量 468.63 mg/L。胞內多醣則是添加花椒水萃液有最好的效果，最大總胞內多醣產量和最大胞內多醣含量分別是 2.64 g/L 和 249.59 mg/g。我們可針對不同的樟芝生理活性成分做不同中草藥水萃液添加培養實驗。

表 4-1 不同中草藥水萃液對樟芝菌絲體代謝產物的影響

Item	$\mu$	Xmax	Yx/s	P1max	P2max	Yp1/x	Yp2/x
Control	0.67	13.33	0.45	283.00	1.68	22.47	212.26
Star anise	1.12	15.71	0.53	314.45	2.32	30.64	223.26
Astragalus	0.70	14.01	0.48	289.72	2.28	23.52	196.21
Cinnamon	0.82	11.45	0.39	350.60	1.95	30.98	225.25
Turmeric	0.72	14.36	0.49	468.63	2.61	37.52	210.46
Fagara	0.75	14.99	0.51	222.27	2.64	22.93	249.59

$\mu$ ：生長速率(g/L·day)

Xmax：最大菌重(g/L)，Xmax 分別取自第 20、14、20、14、20、20 天

Yx/s：單位碳源產生菌種(g/g)，Yx/s 分別取自第 20、14、20、14、20、20 天

P1max：最大總粗三萜產量(mg/L)，P1max 皆取自第 34 天

P2max：最大總胞內多醣產量(g/L)，P2max 皆取自第 8 天

Yp1/x：最大粗三萜含量(mg/g)，Yp1/x 皆取自第 34 天

Yp2/x：最大胞內多醣含量(mg/g)，Yp2/x 皆取自第 8 天

## 4-2 不同濃度薑黃萃取液添加培養試驗

由圖 4-8 顯示，在樟芝液態培養中添加薑黃水萃液，從 28 天到第 34 天時，粗三萜含量大幅上升，推測薑黃水萃液中成分造成其影響。試著改變薑黃萃取溶劑和濃度，期許第 28 天粗三萜大幅上升。實驗利用三角瓶液態培養方式，在樟芝液態培養基中分別加入 1、2、4 ml 薑黃水萃液或薑黃乙醇萃取液，第 28 天取樣，跟無添加的液態樟芝培養比較菌絲體生長、生理活性成分的影響。

### 4-2-1 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體生長影響

由圖 4-10 顯示，使用不同萃取溶劑，薑黃萃取成分不同，在樟芝液態培養中添加薑黃水萃液，會抑制其菌絲體；添加薑黃乙醇萃取液，則促進菌絲體生長，並延緩其自體溶解速率。其中又以添加 2 ml 薑黃乙醇萃取液，有最大菌絲體含量 13.73 g/L。推測薑黃乙醇萃取液對菌絲體生成有影響。

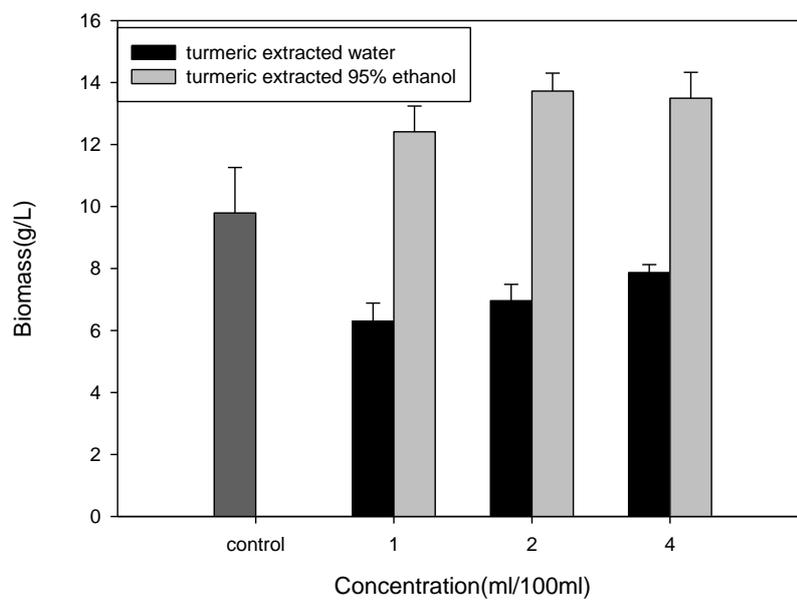


圖 4-10 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體生成影響(第 28 天)

培養基成份： Corn starch (4.78 %)， YM broth (3.19 %)， 薑黃萃取液

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

#### 4-2-2 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體粗三萜生長影響

由圖 4-11 顯示，在樟芝液態培養中添加薑黃水萃液，會抑制樟芝粗三萜生成；添加薑黃乙醇萃取液，則促進樟芝粗三萜生長。其中又以添加 4 ml 薑黃乙醇萃取液，有最大粗三萜含量 24.577 mg/g D.W. 為 control 的 1.26 倍。推測是因為 4 ml 薑黃乙醇萃取液使其菌絲體生長較多，自體溶解速率降低，故擁有較多菌絲體代謝二次代謝產物，粗三萜含量亦較高。

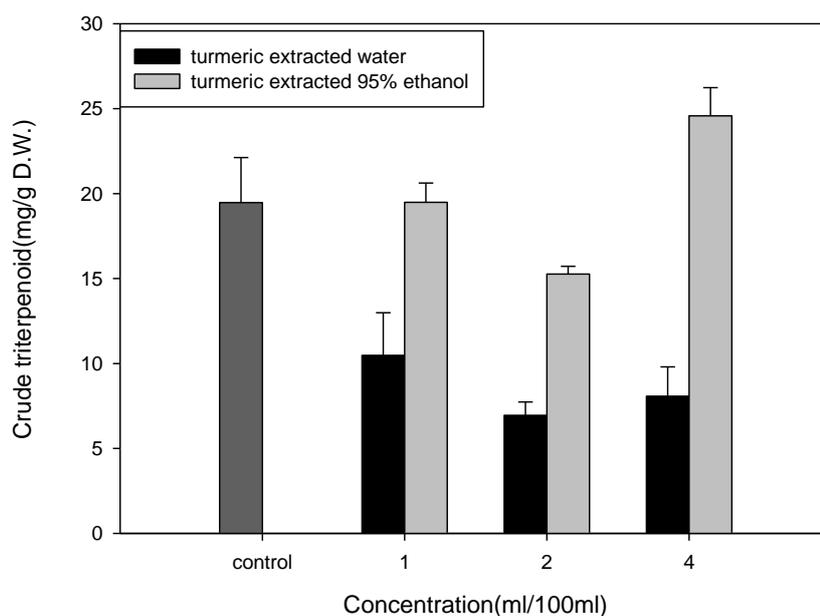
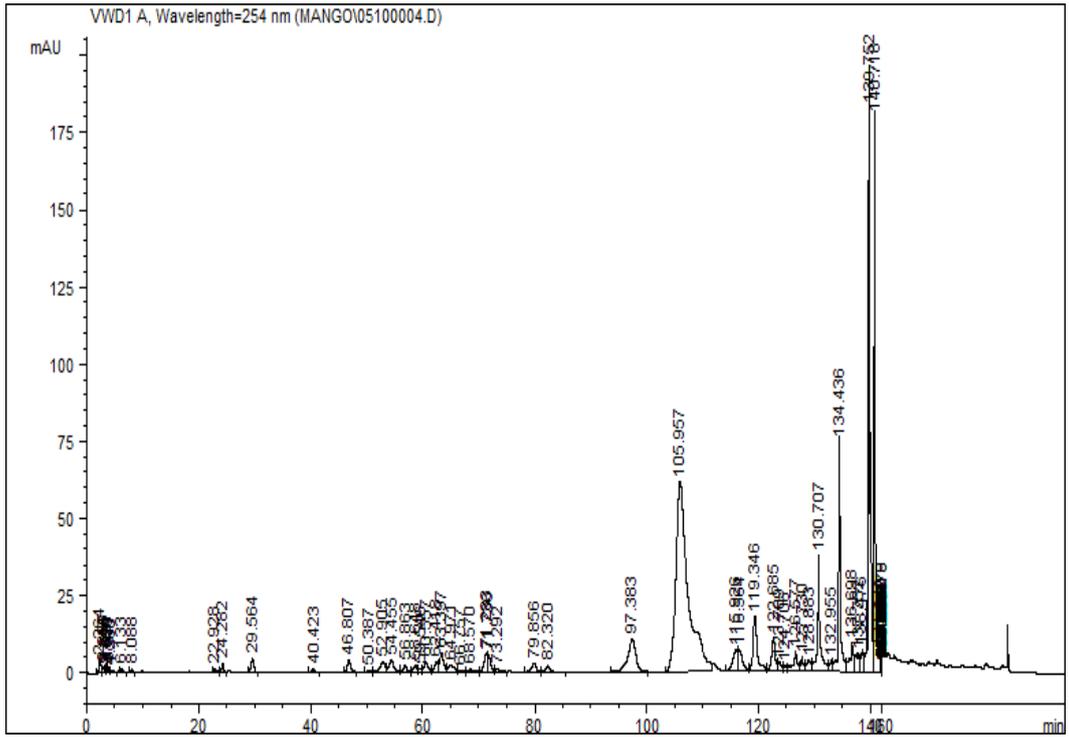


圖 4-11 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響(第 28 天)

培養基成份： Corn starch (4.78 %)， YM broth (3.19 %)， 薑黃萃取液

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm



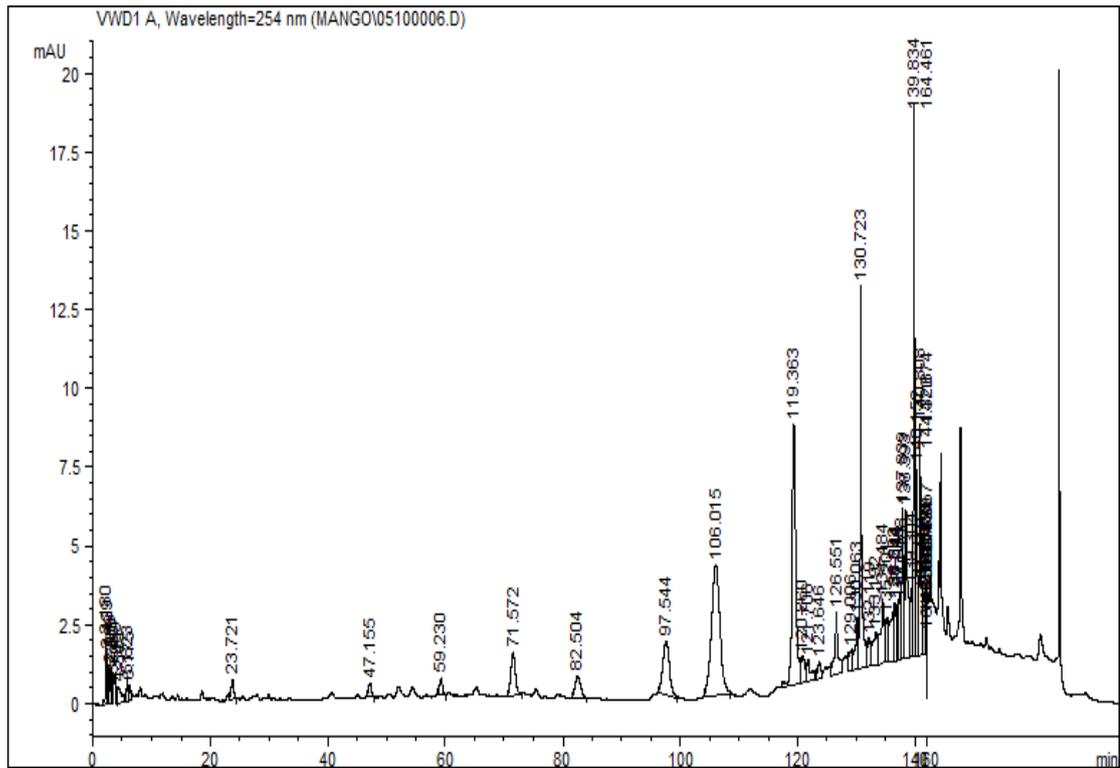


圖 4-14 添加 2ml 薑黃水萃取液樟芝液態培養三萜化合物 HPLC 圖 (第 28 天)

表 4-2 HPLC 分析 10 種三萜類含量(不同濃度薑黃萃取液添加培養試驗)

Item	#1	#2	#3	#4	#5
圖 4-12	292.52	38.66	-	-	168.47
圖 4-13	94.84	435.79	64.79	-	43.65
圖 4-14	-	17.51	-	-	-
Item	#6	#7	#8	#9	#10
圖 4-12	186.12	-	199.34	2615.21	-
圖 4-13	-	-	753.92	461.96	113.85
圖 4-14	-	-	147.39	119.35	-

#1, antcin C; #2, antcin K; #3, zhankuic acid A; #4, zhankuic acid B; #5, zhankuic acid C; #6, sulphurenic acid; #7, dehydrosulphurenic acid; #8, eburicoic acid; #9, dehydroeburicoic acid; #10, 4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole ;

單位：mAU

由於樟芝三萜類目前沒有標準品，只能從我們分析出的樟芝子實體 HPLC 圖對照文獻(張等, 2011)，得到 10 種三萜類的 retention time，從 retention time 整理圖 4-12、4-13、4-14 得到表 4-2，從表 4-2 中得知添加 4ml 薑黃乙醇萃取液對三萜類(antcin K、zhankuic acid A、eburicoic acid、4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxiole)有增加的效果，證明粗三萜含量的增加。而添加 2 ml 薑黃水萃液對三萜類(antcin C、sulphurenic acid)有明顯抑制效果，證明粗三萜含量的被抑制生長。

為了把菌絲體對樟芝菌絲粗三萜的影響考慮進去，將其換算成總粗三萜產量表示，即每個樟芝液態培養搖瓶中能生成的粗三萜產量。在圖 4-15 中，樟芝液態培養中添加 4 ml 薑黃乙醇萃取液總粗三萜產量最高，總粗三萜產量 331.19 mg/L 為 control 的 1.74 倍。

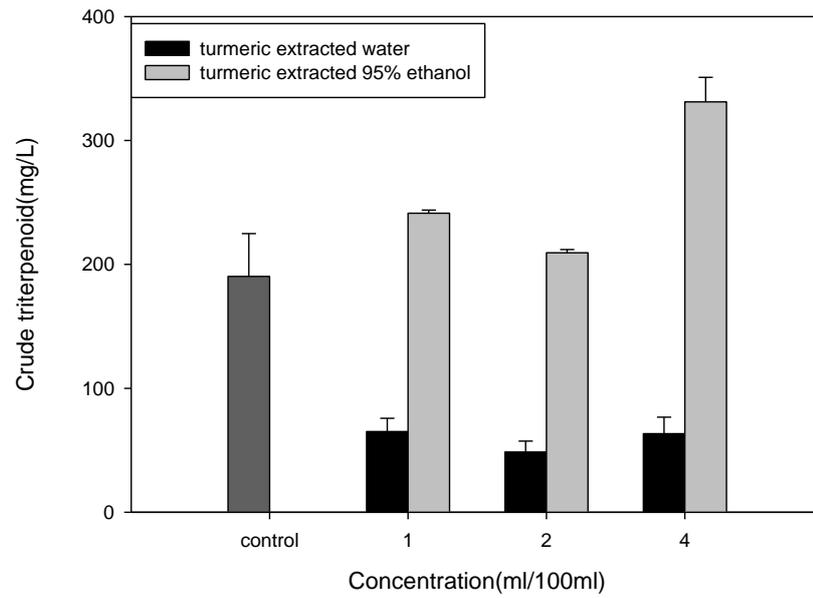


圖 4-15 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體總三萜生成影響(第 28 天)

培養基成份： Corn starch (4.78 % )， YM broth (3.19 % )， 薑黃萃取液

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

### 4-2-3 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體總酚生長影響

由圖 4-16 顯示，在樟芝液態培養中添加薑黃水萃取液，會抑制樟芝總酚生成；添加薑黃乙醇萃取液，則促進樟芝總酚生長。其中添加 4 ml 薑黃乙醇萃取液，總酚有大幅度的提升，含量 49.92 mg/g D.W. 為 control 的 5.08 倍。總酚同是樟芝二次代謝產物，故跟粗三萜含量上升有同樣原因。

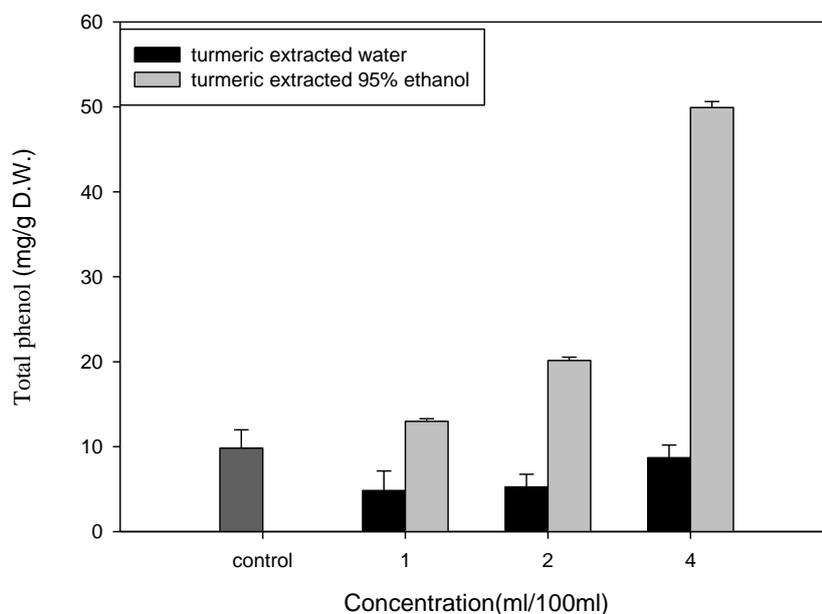


圖 4-16 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體總酚生成影響(第 28 天)

培養基成份： Corn starch (4.78 %)， YM broth (3.19 %)， 薑黃萃取液

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

#### 4-2-4 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體類黃酮生長影響

由圖 4-17 顯示，在樟芝液態培養中添加薑黃水萃取液、薑黃乙醇萃取液，均能促進樟芝類黃酮生長。其中添加 4 ml 薑黃乙醇萃取液，有最大含量的類黃酮，17.46 mg/g D.W. 為 control 的 3.52 倍。推測薑黃水萃取液中成分對類黃酮有促進生成，使其在菌絲體自體溶解速率較快，菌絲體較少，代謝量較少的同時還有高於 control 的含量。

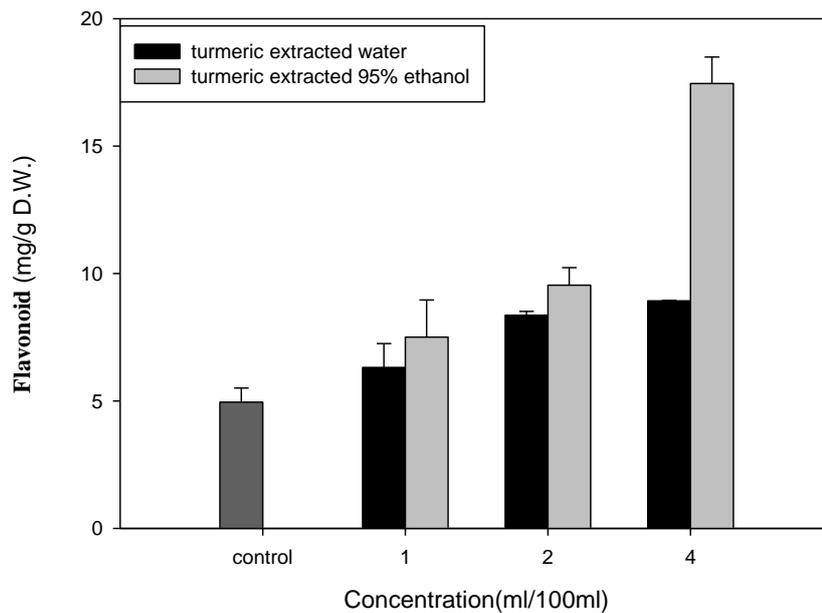


圖 4-17 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體類黃酮生成影響(第 28 天)

培養基成份：Corn starch (4.78 %)，YM broth (3.19 %)，薑黃萃取液

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

從表 4-3 知道添加薑黃乙醇萃取液促進樟芝菌絲體生長並降低其自體溶解速率。添加 2 ml 薑黃乙醇萃取液有最大的菌重 13.73 g/L。並有最快的生長速率 0.49 g/L · day。粗三萜方面，添加 4 ml 薑黃乙醇萃取液有最多的粗三萜含量 24.58 mg/g，和總粗三萜產量 331.72 mg/L。總酚、類黃酮皆是添加 4 ml 薑黃乙醇萃取液有最好的效果，分別是 49.92 mg/g 和 17.46 mg/g。我們可試著增加薑黃乙醇萃取液濃度和增加萃取液濃縮倍數，達到我們當初期望的第 34 天添加 2 ml 薑黃水萃液第 34 天的粗三萜產量。

表 4-3 不同濃度薑黃萃取液添加對樟芝菌絲體代謝產物的影響(第 28 天)

Item	$\mu$	X	Yx/s	P1	Yp1/x	Yp2/x	Yp3/x
Control	0.35	9.79	0.33	190.72	19.47	9.83	4.96
添加 1 ml 薑黃水萃液	0.23	6.30	0.21	66.03	10.48	4.83	6.32
添加 1 ml 薑黃乙醇萃取液	0.44	12.41	0.42	241.90	19.49	12.97	7.50
添加 2 ml 薑黃水萃液	0.25	6.96	0.24	48.36	6.95	5.25	8.36
添加 2 ml 薑黃乙醇萃取液	0.49	13.73	0.47	209.50	15.26	20.14	9.54
添加 4 ml 薑黃水萃液	0.28	7.87	0.27	63.52	8.07	8.70	8.93
添加 4 ml 薑黃乙醇萃取液	0.48	13.50	0.46	331.72	24.58	49.92	17.46

$\mu$ ：生長速率(g/L · day)，X：菌重(g/L)，Yx/s：單位碳源產生菌種(g/g)

P1：總粗三萜產量(mg/L)，Yp1/x：粗三萜含量(mg/g)

Yp2/x：總酚含量(mg/g)，Yp3/x：類黃酮含量(mg/g)

### 4-3 不同中草藥乙醇萃取液添加培養試驗

由圖 4-11 顯示，在樟芝液態培養中添加薑黃乙醇萃取液對粗三萜的生成有較佳的效果，故利用三角瓶液態培養方式，在樟芝液態培養基中加入 2 ml 中草藥乙醇萃取液，分別是添加八角、黃耆、花椒乙醇萃取液，然後跟無添加的液態樟芝培養比較，觀察添加不同中草藥乙醇萃取液後，第 28 天對菌絲體生長、粗三萜的影響。

#### 4-3-1 不同中草藥乙醇萃取液添加對樟芝菌絲體生長影響

由圖 4-18 顯示，在樟芝液態培養中，第 0 天添加八角乙醇萃取液，第 28 天時達到最大值，菌絲體含量為 10.51 g/L 為 control 的 1.25 倍。八角乙醇萃取液可促進樟芝菌絲體生長。

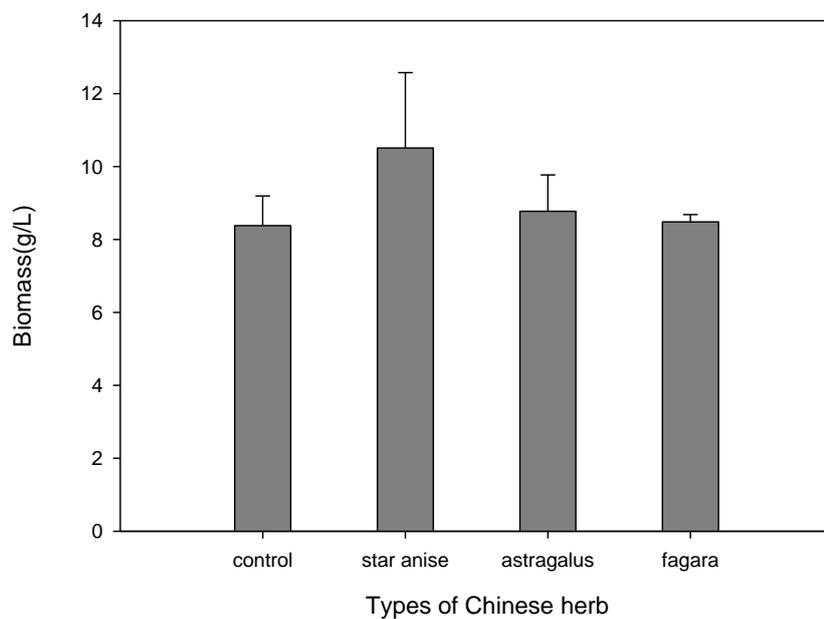


圖 4-18 不同中藥乙醇萃取液添加對樟芝菌絲體生成影響(第 28 天)

培養基成份： Corn starch (4.78 %)， YM broth (3.19 %)， 中草藥乙醇萃取液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

#### 4-3-2 不同中草藥乙醇萃取液添加對樟芝菌絲體粗三萜生長影響

由圖 4-19 顯示，在樟芝液態培養中添加八角、黃耆、花椒乙醇萃取液，均會促進樟芝粗三萜生長。其中又以添加 2 ml 黃耆乙醇萃取液，有最大粗三萜含量 19.81 mg/g D.W. 為 control 的 1.52 倍。推測是因為黃耆乙醇萃取液中成份促進樟芝粗三萜生成。

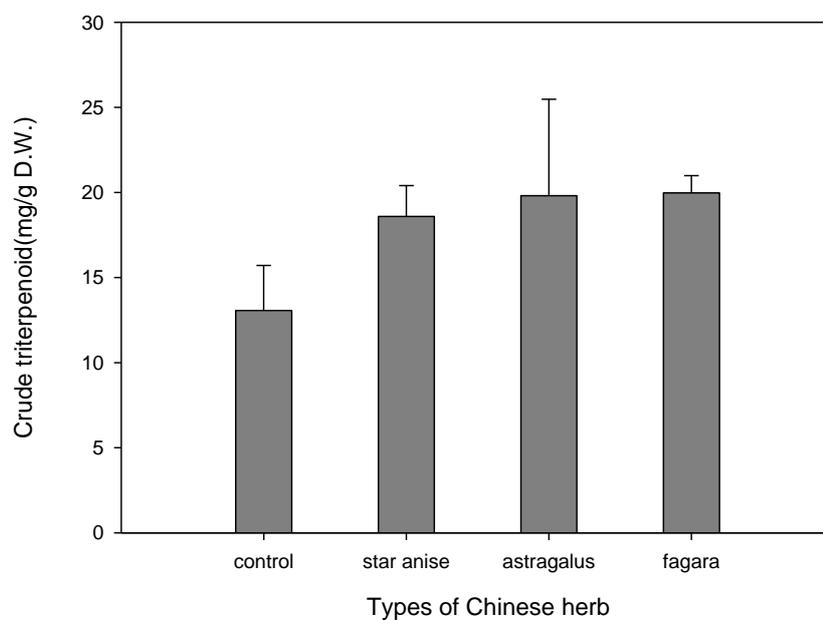


圖 4-19 不同中藥乙醇萃取液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響(第 28 天)

培養基成份：Corn starch (4.78 %)，YM broth (3.19 %)，中草藥乙醇萃取液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

為了把菌絲體對樟芝菌絲粗三萜的影響考慮進去，將其換算成總粗三萜產量來表示，即每個樟芝液態培養搖瓶中能生成的粗三萜產量。在圖 4-20 中，可以發現第 28 天時，添加八角乙醇萃取液的總粗三萜產量最高，其原因是因為添加八角乙醇萃取液會刺激菌絲體生長，並使自體溶解速率較緩慢，另一方面八角乙醇萃取液也增加粗三萜含量，使其在第 28 天有最大的總粗三萜產量 197.23 mg/L 為 control 的 1.78 倍。

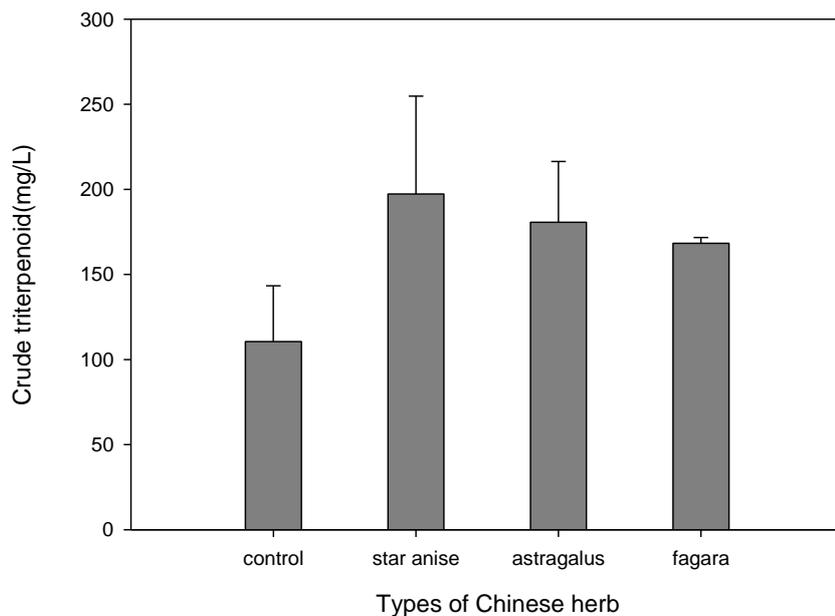


圖 4-20 不同中藥乙醇萃取液添加對樟芝菌絲體總三萜生成影響(第 28 天)

培養基成份： Corn starch (4.78 %)， YM broth (3.19 %)， 中草藥乙醇萃取液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

從表 4-1、4-4 知道添加八角萃取液皆促進樟芝菌絲體生長，添加 2 ml 八角乙醇萃取液有最大的菌重 10.51 g/L。並有最快的生長速率 0.38 g/L·day。粗三萜方面，添加 2 ml 花椒乙醇萃取液有最多的粗三萜含量 19.70 mg/g。總粗三萜產量則是八角乙醇萃取液較高 197.23 mg/L，原因是其粗三萜含量不低，菌絲體重量較高，總粗三萜產量亦較高。從實驗中我們猜測促進粗三萜含量成分，並試著去做特定中草藥成分添加樟芝液態培養實驗。

表 4-4 不同中草藥乙醇萃取液添加對樟芝菌絲體代謝產物的影響(第 28 天)

Item	$\mu$	X	Yx/s	P1	Yp1/x
Control	0.30	8.38	0.29	110.51	13.06
Star anise	0.38	10.51	0.36	197.23	18.59
Astragalus	0.31	8.77	0.30	180.63	19.81
Fagara	0.30	8.48	0.29	168.30	19.97

$\mu$ ：生長速率(g/L·day)，X：菌重(g/L)，Yx/s：單位碳源產生菌種(g/g)  
P1：總粗三萜產量(mg/L)，Yp1/x：粗三萜含量(mg/g)

#### 4-4 不同時間肉桂萃取液添加培養試驗

由圖 4-4 顯示，在樟芝液態培養中添加肉桂水萃液，可明顯發現菌絲體生長被抑制。添加肉桂乙醇萃取液實驗中，菌絲體到第 8 天完全沒生長，應是肉桂萃取液對樟芝有明顯抑制現象。試著改變添加時間，改變樟芝成長後生長環境，樟芝為了適應新環境可能產生較多的二次代謝產物。實驗利用三角瓶液態培養方式，第 8、14、20 天在樟芝液態培養基中加入 2 ml 肉桂水萃液或肉桂乙醇萃取液，第 28 天取樣，跟無添加的液態樟芝培養比較菌絲體生長、生理活性成分的影響。

##### 4-4-1 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體生長影響

由圖 4-21 顯示，第 0 天添加肉桂水萃液對菌絲體有抑制現象，第 8、14、20 天添加肉桂水萃液反增加其菌絲體生長，其中以第 20 天添加肉桂水萃液，有最大菌絲體含量 11.92 g/L 為 control 的 1.26 倍。推測是因為菌絲體成長後對環境適應力較強，較差的環境反刺激其生長，使其菌絲體上升。第 8、14 天添加肉桂乙醇萃取液有相同效果。第 20 天添加肉桂乙醇萃取液有抑制現象，原因是第 20 天樟芝進入衰弱期，對環境適應能力開始降低，而肉桂乙醇萃取液本身抑制效果高於肉桂水萃液，抑制效果超過樟芝可適應範圍，故被抑制。

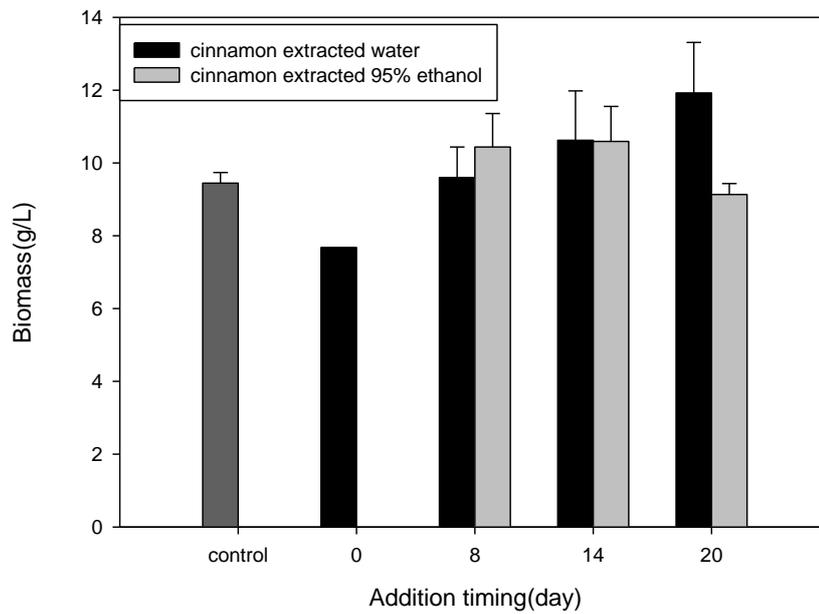


圖 4-21 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體生成影響(第 28 天)

培養基成份： Corn starch (4.78 %)， YM broth (3.19 %)， 肉桂萃取液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

#### 4-4-2 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體粗三萜生長影響

由圖 4-22 顯示，在樟芝液態培養中添加肉桂萃取液，皆會增加粗三萜生成，添加肉桂乙醇萃取液效果較佳於肉桂水萃液，第 20 天添加肉桂乙醇萃取液，第 28 天有最高粗三萜含量 32.991 mg/g D.W.為 control 的 1.74 倍。推測原因是因為抑制效果超過樟芝可適應範圍，樟芝為了適應環境，代謝二次代謝產物到達極限，粗三萜含量跟著上升。

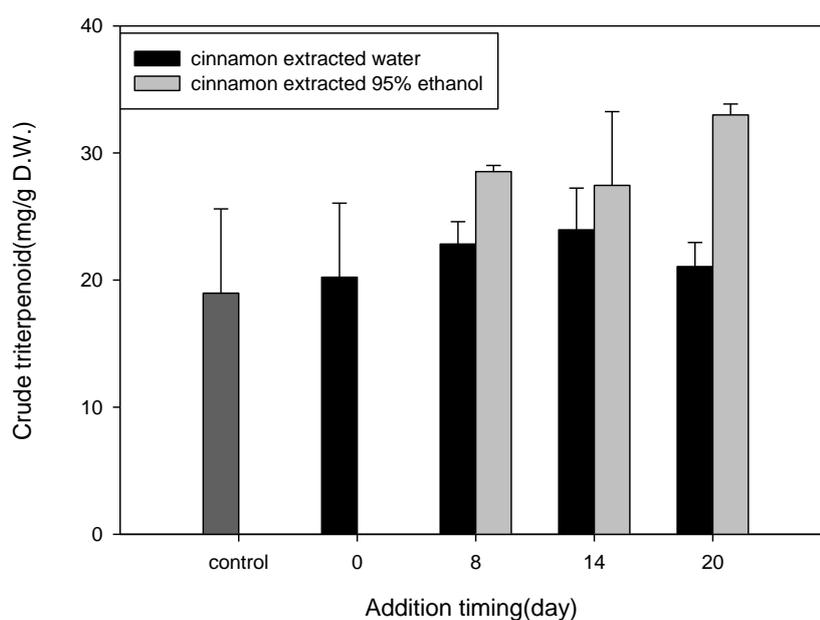


圖 4-22 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響(第 28 天)

培養基成份：Corn starch (4.78 %)，YM broth (3.19 %)，肉桂萃取液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

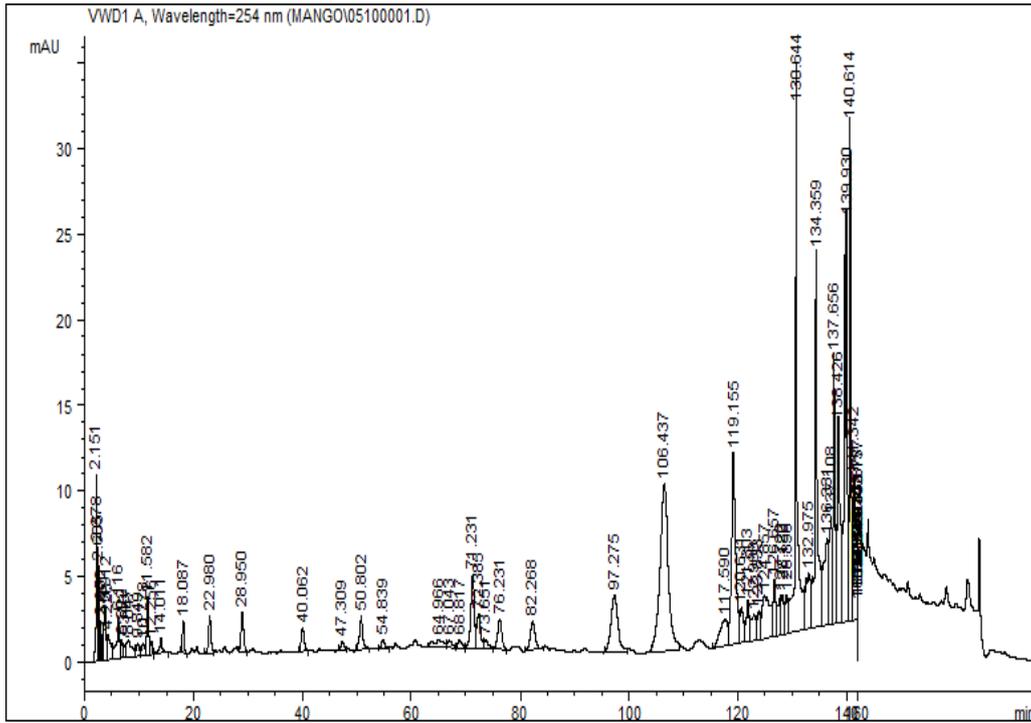


圖 4-23 無添加樟芝液態培養三萜化合物 HPLC 圖 (第 28 天)

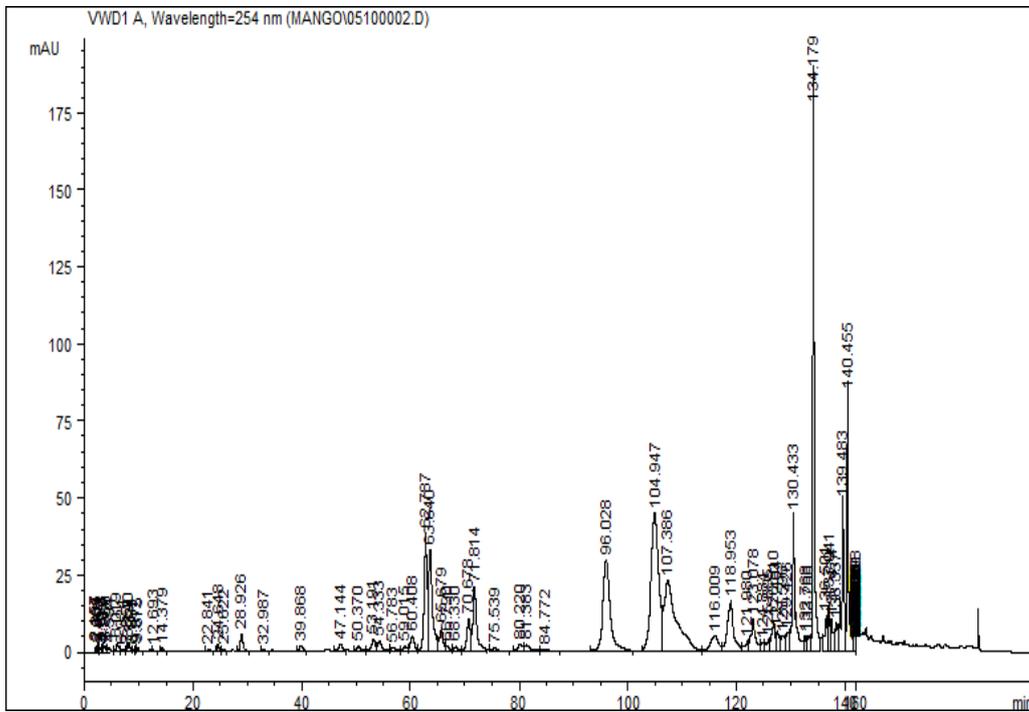


圖 4-24 第 20 天添加 2ml 肉桂乙醇萃取液樟芝液態培養三萜化合物 HPLC 圖(第 28 天)

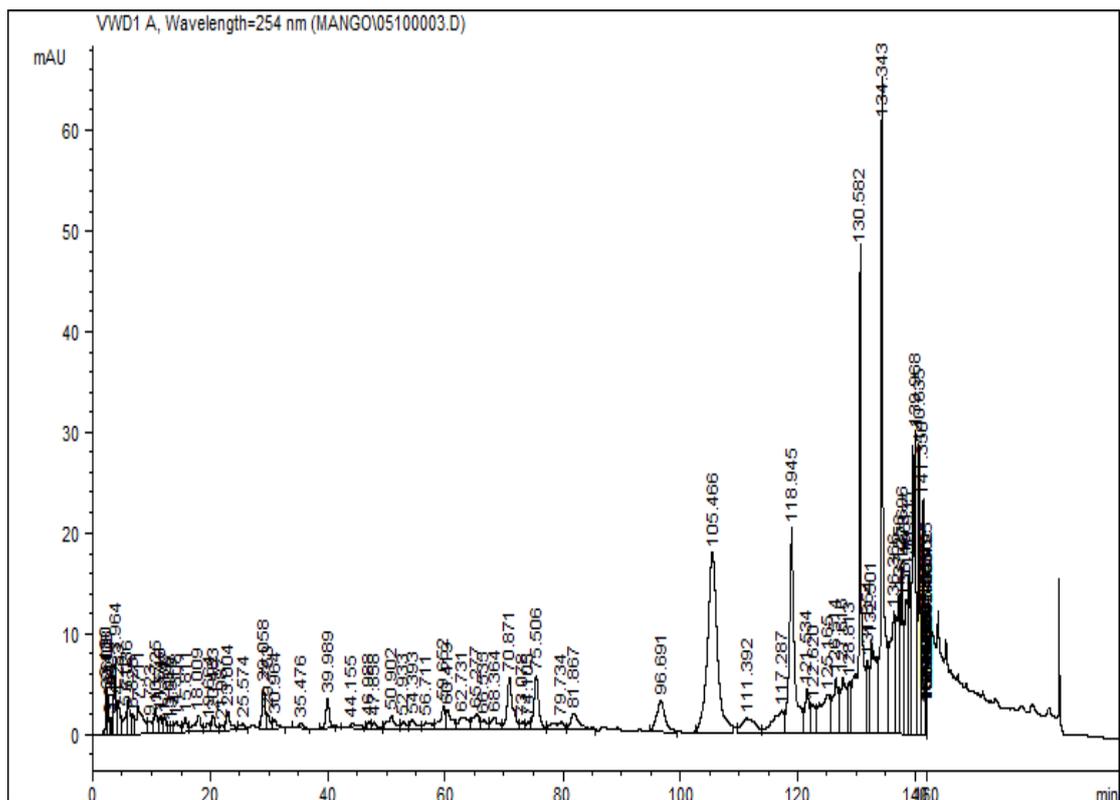


圖 4-25 第 20 天添加 2ml 肉桂水萃液樟芝液態培養三萜化合物 HPLC 圖(第 28 天)

表 4-5 HPLC 分析 10 種三萜類含量(不同時間肉桂萃取液添加培養試驗)

Item	#1	#2	#3	#4	#5
圖 4-23	-	68.96	-	-	57.79
圖 4-24	1568.08	18.05	2718.89	-	370.59
圖 4-25	124.20	89.61	298.92	-	113.43
Item	#6	#7	#8	#9	#10
圖 4-23	-	-	310.86	531.20	-
圖 4-24	136.78	-	691.89	1451.35	15.55
圖 4-25	94.41	-	635.36	1362.26	-

#1, antcin C; #2, antcin K; #3, zhankuic acid A; #4,zhankuic acid B; #5, zhankuic acid C; #6, sulphurenic acid; #7, dehydrosulphurenic acid; #8,eburicoic acid;#9, dehydroeburicoic acid; #10, 4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxiole ;  
單位：mAU

由於樟芝三萜類目前沒有標準品，只能從我們分析出的樟芝子實體 HPLC 圖對照文獻(張等, 2011)，得到 10 種三萜類的 retention time，從 retention time 整理圖 4-23、4-24、4-25 得到表 4-5，從表 4-5 中得知第 20 天添加 2 ml 肉桂乙醇萃取液對三萜類(antcin C、zhankuic acid A、zhankuic acid C、sulphurenic acid、eburicoic acid、dehydroeburicoic acid、4,7-dimethoxy-5-methyl-1,3-benzodioxole)有顯著增加的效果，證明粗三萜含量的增加。而第 20 天添加 4 ml 肉桂水萃液對三萜類(antcin C、antcin K、zhankuic acid A、zhankuic acid C、sulphurenic acid、eburicoic acid、dehydroeburicoic acid)也有促進生長效果，證明樟芝受到外在環境的刺激，會有自我保護的機制，產生不同的三萜類。

為了把菌絲體對樟芝菌絲粗三萜的影響考慮進去，將其換算成總粗三萜產量來表示，即每個樟芝液態培養搖瓶中能生成的粗三萜產量。在圖 4-26 中，樟芝液態培養中第 8 天添加肉桂乙醇萃取液總粗三萜產量最高，總粗三萜產量 312.87 mg/L 為 control 的 1.47 倍。原因是第 20 天添加肉桂乙醇萃取液，雖然有最佳的粗三萜含量，但其菌絲體較少。而第 8 天添加肉桂乙醇萃取液刺激菌絲體生長，同時也代謝一定量的二次代謝產物，故有最大的總粗三萜產量。

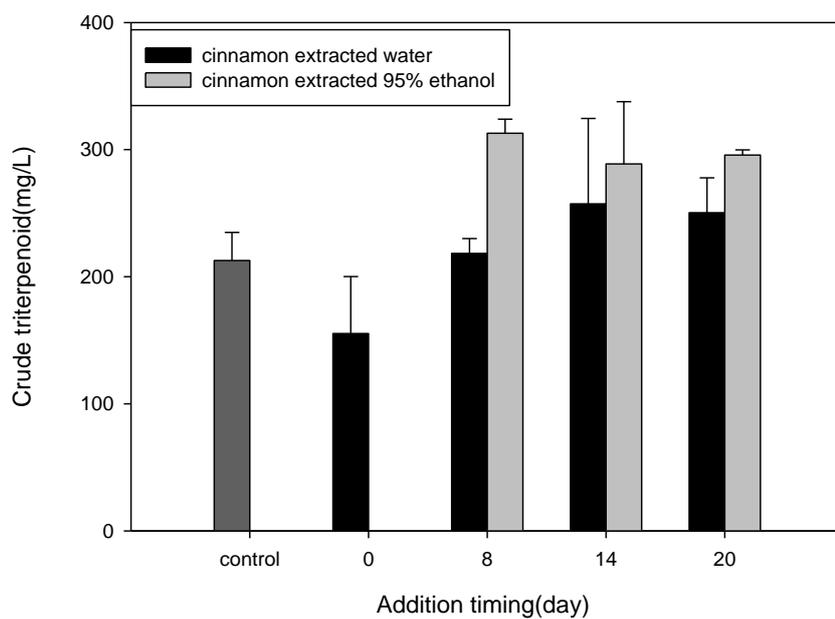


圖 4-26 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體總三萜生成影響(第 28 天)

培養基成份： Corn starch (4.78 %)， YM broth (3.19 %)， 肉桂萃取液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

#### 4-4-3 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體總酚生長影響

由圖 4-27 顯示，在樟芝液態培養中添加肉桂水萃取液、肉桂乙醇萃取液，均能促進樟芝總酚生長。其中第 20 天添加肉桂乙醇萃取液，有最大含量的總酚，20.75 mg/g D.W. 為 control 的 2.23 倍。推測樟芝適應新環境也會產生總酚，使其總酚含量上升。

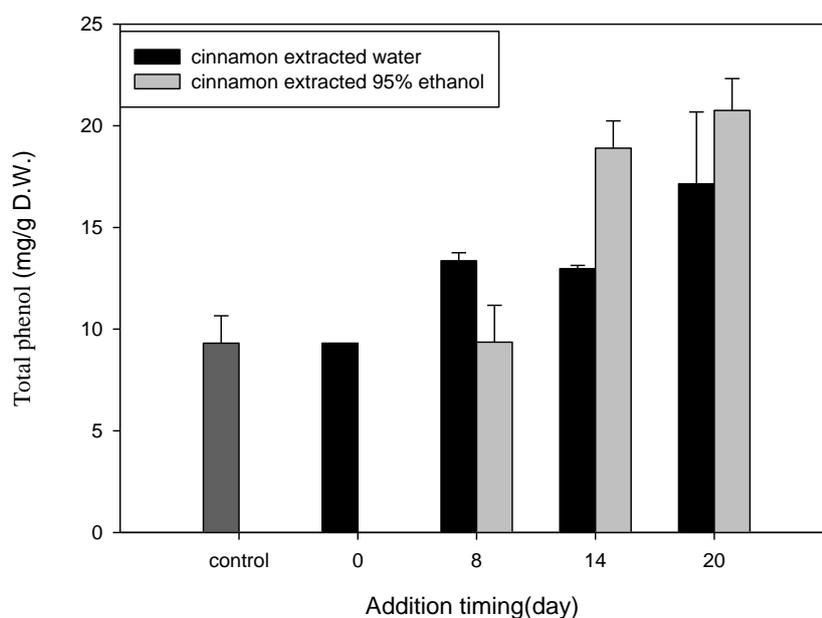


圖 4-27 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體總酚生成影響(第 28 天)

培養基成份：Corn starch (4.78 %)，YM broth (3.19 %)，肉桂萃取液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

#### 4-4-4 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體類黃酮生長影響

由圖 4-28 顯示，第 8 天添加肉桂乙醇萃取液，有最大含量的類黃酮 7.98 mg/g D.W. 為 control 的 1.85 倍。推測第 8 天添加肉桂萃取液，剛好改變其代謝路徑使其產生較多的類黃酮而不是總酚，使其類黃酮含量上升。

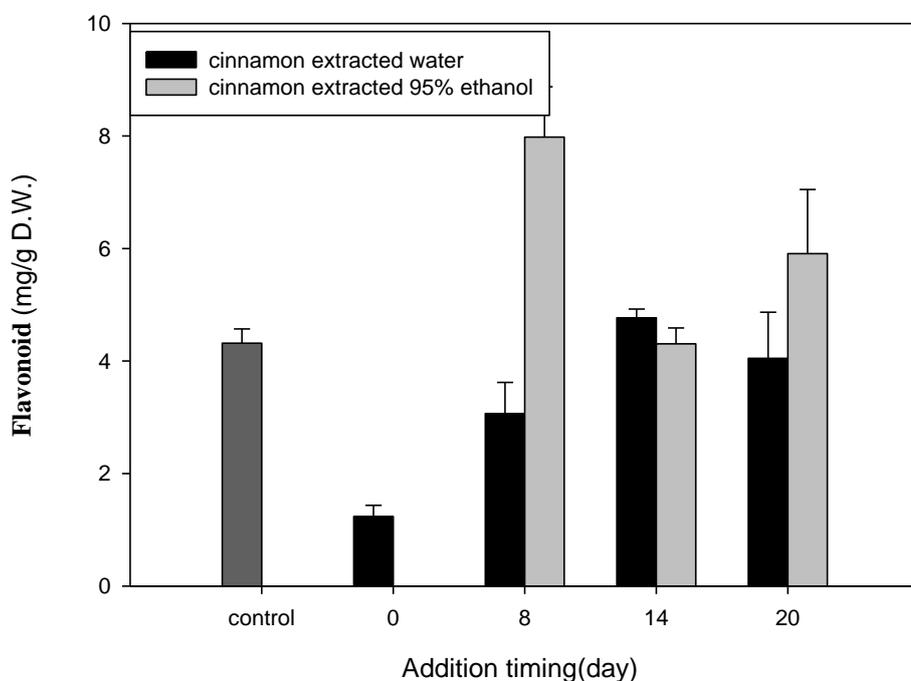


圖 4-28 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體類黃酮生成影響(第 28 天)

培養基成份： Corn starch (4.78 %)， YM broth (3.19 %)， 肉桂萃取液(2 %)

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

從表 4-6 知道第 20 天添加肉桂乙醇萃取有最大的菌重 11.92 g/L。並有較快的生長速率 0.43 g/L·day。粗三萜方面，由於樟芝自我保護機制，第 20 天添加 2 ml 肉桂乙醇萃取液有最多的粗三萜含量 32.99 mg/g。第 8 天添加肉桂萃取液有較高總粗三萜產量 312.87 mg/L。總酚則是第 20 天添加 2 ml 肉桂乙醇萃取液有最好的效果，20.75 mg/g。第 8 天添加肉桂乙醇萃取液使類黃酮上升，總酚卻較少，推測可能原因是代謝路徑的改變。我們可試著用相同策略，用不同變因改變樟芝生長環境，使其三萜類代謝更多更多樣。

表 4-6 不同時間肉桂萃取液添加對樟芝菌絲體代謝產物的影響(第 28 天)

Item	$\mu$	X	Yx/s	P1	Yp1/x	Yp2/x	Yp3/x
Control	0.34	9.44	0.32	212.75	18.98	9.31	4.32
第 0 天添加肉桂水萃液	0.27	7.68	0.26	155.30	20.22	9.31	1.24
第 8 天添加肉桂水萃液	0.34	9.60	0.33	218.41	22.83	13.36	3.07
第 8 天添加肉桂乙萃液	0.37	10.44	0.36	312.87	28.54	9.36	7.98
第 14 天添加肉桂水萃液	0.38	10.62	0.36	257.40	23.96	12.97	4.77
第 14 天添加肉桂乙萃液	0.38	10.59	0.36	288.70	27.45	18.90	4.31
第 20 天添加肉桂水萃液	0.43	11.92	0.41	250.31	21.07	17.14	4.05
第 20 天添加肉桂乙萃液	0.33	9.13	0.31	295.72	32.99	20.75	5.91

$\mu$ ：生長速率(g/L·day)，X：菌重(g/L)，Yx/s：單位碳源產生菌種(g/g)

P1：總粗三萜產量(mg/L)，Yp1/x：粗三萜含量(mg/g)

Yp2/x：總酚含量(mg/g)，Yp3/x：類黃酮含量(mg/g)

## 4-5 特定中草藥成分添加培養試驗

由圖 4-11、4-19 顯示，在樟芝液態培養中添加薑黃、八角乙醇萃取液，均促進粗三萜生長，推測薑黃、八角乙醇萃取液中成分促進粗三萜生成，其中薑黃相較於其他中草藥乙醇萃取液有較多的黃酮類化合物，八角相較於其他中草藥乙醇萃取液則有較多的莽草酸。本實驗第 0 天添加槲皮素、莽草酸，跟無添加的液態樟芝培養比較，第 28 天菌絲體生長、粗三萜的影響。

### 4-5-1 特定中草藥成分添加對樟芝菌絲體生長影響

由圖 4-29 顯示，在樟芝液態培養中，第 0 天添加槲皮素、莽草酸，對樟芝菌絲體成長較不明顯，添加槲皮素菌絲體含量為 9.11 g/L 為 control 的 1.09 倍。推測這兩種成分跟菌絲體生長無關。

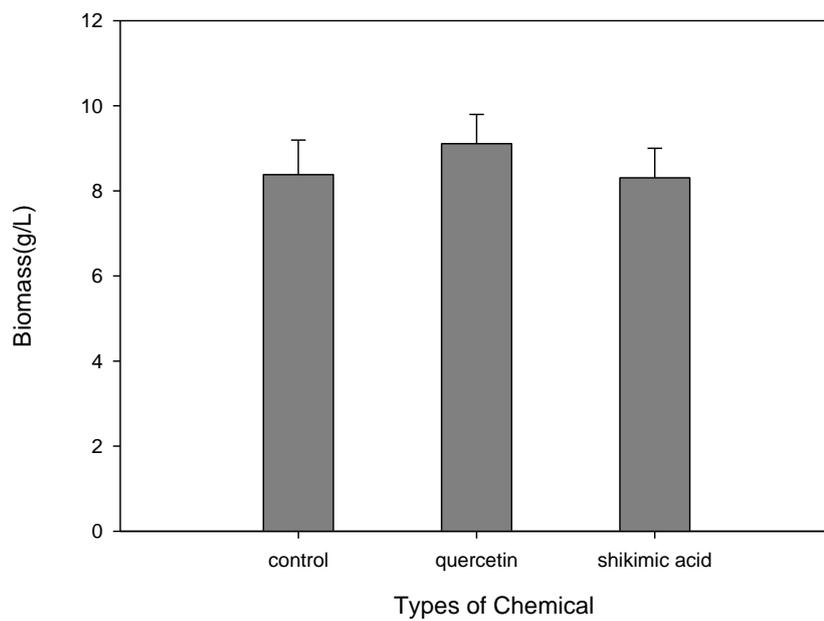


圖 4-29 特定中草藥成分添加對樟芝菌絲體生成影響(第 28 天)

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

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

#### 4-5-2 特定中草藥成分添加對樟芝菌絲體粗三萜生長影響

由圖 4-30 顯示，在樟芝液態培養中添加槲皮素、莽草酸，皆會增加粗三萜生成，第 0 天添加莽草酸，第 28 天有最高粗三萜含量 17.85 mg/g D.W. 為 control 的 1.37 倍。推測原因是因為莽草酸濃度上升，莽草酸路徑受阻礙，故往三萜方向合成，粗三萜含量跟著上升。可試著提高莽草酸濃度看粗三萜是否上升，達到我們的期望值。

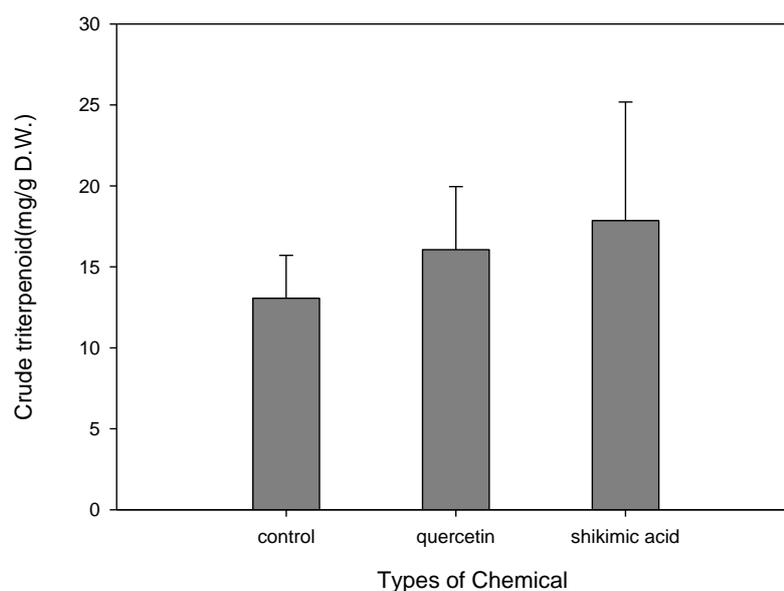


圖 4-30 特定中草藥成分添加對樟芝菌絲體粗三萜生成影響(第 28 天)

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

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

為了把菌絲體對樟芝菌絲粗三萜的影響考慮進去，將其換算成總粗三萜產量來表示，即每個樟芝液態培養搖瓶中能生成的粗三萜產量。在圖 4-31 中，樟芝液態培養中第 0 天添加莽草酸，總粗三萜產量含量 152.46 mg/L 為 control 的 1.38 倍。原因跟粗三萜含量上升相同。

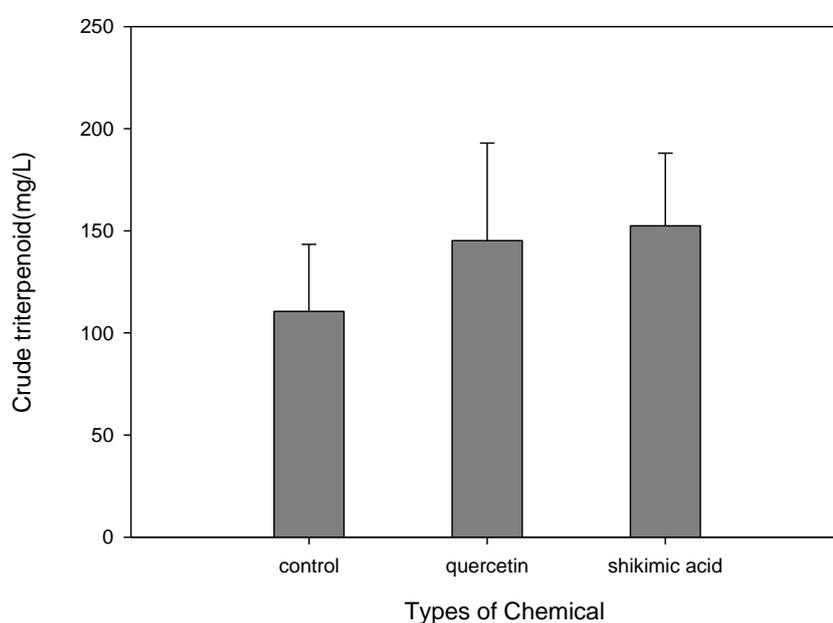


圖 4-31 特定中草藥成分添加對樟芝菌絲體總三萜生成影響(第 28 天)

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

培養條件：接菌量 10 %，培養溫度 25°C，轉速 100 rpm

從表 4-7 知道添加槲皮素跟莽草酸皆會促進粗三萜生長，添加莽草酸有較多的粗三萜含量和總粗三萜產量，17.85 mg/g 和 152.45 mg/L，原因是代謝路徑的阻礙。實驗並沒有達到預期，推測是添加量太少。可試著提升添加莽草酸跟槲皮素達到我們的期望。

表 4-7 特定中草藥成分添加對樟芝菌絲體代謝產物的影響(第 28 天)

Item	$\mu$	X	Yx/s	P1	Yp1/x
Control	0.30	8.38	0.29	110.51	13.06
Quercetin	0.33	9.11	0.31	145.21	16.06
Shikimic acid	0.30	8.31	0.28	152.45	17.85

$\mu$ ：生長速率(g/L·day)，X：菌重(g/L)，Yx/s：單位碳源產生菌種(g/g)  
P1：總粗三萜產量(mg/L)，Yp1/x：粗三萜含量(mg/g)

## 第五章 結論與未來展望

### 5-1 結論

本研究以不同中草藥水萃液、不同濃度薑黃萃取液、不同中草藥乙醇萃取液、不同時間肉桂萃取液、特定中草藥成分添加培養試驗，探討樟芝菌絲體及其生理活性成分影響。根據這些實驗可得到以下結果：

在添加不同中草藥萃取液研究中發現，添加八角水萃液有最大菌絲體 15.71 g/L；添加花椒水萃液胞內多醣含量最高，在第 8 天時可達到 249.59 mg/g D.W.；粗三萜方面，添加薑黃水萃液培養第 34 天有最大的粗三萜含量和總三萜產量，37.52 mg/g D.W.和 468.83 mg/L。綜合以上數據，針對樟芝生理活性成分粗三萜，做不同濃度薑黃萃取培養試驗液。

由不同濃度薑黃萃取液實驗結果發現，添加 4 ml 薑黃乙醇萃取第 28 天有最大粗三萜含量和總三萜產量，可達 24.58 mg/g D.W.和 331.72 mg/L；總酚、類黃酮方面，一樣是添加 4 ml 薑黃乙醇萃取液第 28 天有最佳效果，49.92 mg/g D.W 和 17.46 mg/g D.W。從以上數據發現中草藥乙醇萃取液有不錯的效果，故做不同中草藥乙醇萃取液培養試驗。

由不同中草藥乙醇萃取液培養實驗結果發現，添加八角乙醇萃取液有較高的菌絲體和總三萜產量，10.51 g/L 和 197.23 mg/L；粗三萜含量則是添加花椒乙醇萃取液有最好的效果 19.97 mg/g D.W。

在不同時間肉桂萃取液添加培養試驗發現，粗三萜、總酚方面，皆是第 20 天添加肉桂乙醇萃取液第 28 天有最大的粗三萜含量 32.99 mg/g D.W.和總酚含量 20.75 mg/g D.W；總三萜產量，則是第 8 天添加肉桂乙醇萃取液最高 312.81 mg/L；類黃酮同樣第 8 天添加肉桂乙醇萃取液最佳 7.98 mg/g D.W。綜合上敘實驗挑出對樟芝粗三萜有促進的中草藥成分，做特定中草藥成分添加培養試驗。

在特定中草藥成分添加培養的實驗中，發現添加槲皮素跟莽草酸對粗三萜含量都有促進效果，16.06 mg/g D.W 和 17.85 mg/g D.W；總三萜產量則是 145.21 mg/L 和 152.45 mg/L。

## 5-2 未來展望

不同濃度薑黃萃取液培養實驗中發現還有上升的可能性，可試著增加添加薑黃萃取液濃度和薑黃萃取液的濃縮倍數提升我們粗三萜含量。不同時間肉桂萃取液添加培養試驗中，發現改變環境可能使樟芝為了適應環境，產生不同三萜類和粗三萜量的提高，可試著用相同培養策略看是否有更好效果。特定中草藥成分添加培養試驗中，粗三萜上升的幅度不如預期，推測是濃度不夠造成，可試著提高類黃酮跟莽草酸的濃度達到我們的預期。

未來可繼續探討中草藥促進樟芝生理活性物質生成的有效成分。在粗三萜方面，已測出不同單一三萜類，但這些三萜類的功用卻還不清楚，可試著研究單一三萜類藥理性，針對這些效果較顯著的三萜類做更針對得添加培養。

本實驗由於發現添加中草藥乙醇萃取液都有不錯的效果，工業上發展可試著跟中藥行或藥廠合作把廢棄的中草藥殘渣浸泡在乙醇一定時間，去除乙醇，添加在樟芝培養中，添加中草藥萃取液可使樟芝生長更好，又因中草藥本身即可被攝取，故較無安全性問題。

## 參考文獻

- 水野卓、川合正允，賴慶亮譯(1997)。 菇類的化學，生化學。 台北市：國立編譯館。
- 王柏森(2007)。 樟芝固態發酵培養產物之成分分析與抗氧化活性之研究。 國立屏東科技大學生物科技研究所碩士論文。
- 王皓緯(2011)。 固態發酵培養基組成對於樟芝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。
- 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。
- 吳德鵬(1995)。 樟芝微量成分的研究。 國立台灣師範大學化學研究所碩士論文。
- 李宛蓁(2003)。 樟芝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。
- 肖崇厚、陳蘊如(1989)。 中藥化學。 上海科學技術出版社。
- 延璽、劉會青、鄧永青、任占華(2008)。 黃酮類化合物生理活性及合成研究發展。 *Chinese Journal of Organic Chemistry* 28(9)。
- 林雅慧(2007)。 以固體中藥渣培養樟芝及蟲草作為治療人類肝癌及肺癌的動物模式之研究。 南台科技大學生物科技系碩士論文。
- 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。
- 林豔琪(2005)。 樟芝固態培植體之成份分析及功能性評估。 南台科技大學生物科技系碩士論文。
- 施玉蘭(2009)。 不同栽培方法對牛樟芝菌絲生長之影響。 國立屏東科技大學熱帶農業暨國際合作系碩士學位論文。

范真綺(2004)。樟芝固態栽培與液態發酵菌絲體之成分及其生物活性之研究。南台科技大學化學工程系碩士論文。

徐敬衡、文榮輝、賴秋梅、翁偉恆(2000)。利深層發酵生產樟芝菌絲體及抗菌研究。第15屆全國技術及職業教育研討會論文集。

高曉薇(1992)。臺灣靈芝屬新種樟芝之三萜類成分研究。臺北醫學院天然物醫物研究所碩士論文。

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。

張東柱、王武榮、周正仁(2011)。利用幾種化學成分區別牛樟芝的菌絲體與子實體。台灣林業科學 26(2)：125-33。

張隆仁(2004)。槲皮素。台中區農業專訊第34期。

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。

荷莉·費努(2008)。藥草療效全書。商周出版。

莊雅婷(2011)。培養基添加物對張之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。

陳藝文(2003)。培養條件對樟芝菌絲體生長與抗氧化成分生成之影響。私立東海大學化學工程研究所碩士論文。

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。

黃鈴娟(2000)。芝與姬松茸之抗氧化性質及多醣組成。國立中興大學食品科學研究所碩士論文。

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

劉永友、廖曉峰(2007)。莽草酸的研究進展。Chemical Industry Times 3(3)。

劉國柱(1990)。現代科學看靈芝。雙利實業有限公司。

劉賢祥(1992)。植物生理學。財團法人徐氏基金會。

謝文聰、童承福、郭昭麟(2008)。輕鬆認識中藥。中國醫藥大學。

謝如婷(2009)。微量元素對牛樟芝發酵物生理活性與抗氧化活性影響之探討。南台科技大學生物科技研究所碩士論文。

簡秋源、姜宏哲、陳淑真(1997)。牛樟菇培養性狀及其三帖類成分分析之研究。林業叢刊第 72 號。

關培生(2004)。香料調味大全。萬里機構·萬里書店。

嚴貴榮(2001)。樟芝對 SZT 誘發高血糖鼠血醣調節與抗氧化之影響。輔仁大學食品營養學系碩士論文。

<http://www.lubody.com/21.html>(2012.03)

<http://www.bxgcw.net/yaopin/zyyy/20100122/8995.html> (2012.03)

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

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

Chang W.C., Lee D.O., Chan. W.K. (2003), Concentration and purification of soluble pectin from mandarin peels using crossflow microfiltration system, *Carbohydrate Polymers* 54: 21-26

- Chang T.T., Chou W.N. (1995), *Antrodia cinnemomea* sp. nov. on *Cinnamomum Kanehirai* in Taiwan, *Mycological Research* 99: 756-758
- Chao L.K., Hua K.F., Hsu H.Y., Cheng S.S., Liu J.Y., Chang S.T. (2005), Study on the anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(18): 7274-7278
- Chen Y.J., Cheng P.C., Lin C.N., Liao H.F., Chen Y.Y., Chen C.C., Lee K.M. (2008), Polysaccharides from *Antrodia camphorata* mycelia extracts possess immunomodulatory activity and inhibits infection of *Schistosoma mansoni*, *International Immunopharmacology* 8(3): 458-467
- Cherng I.H., Chiang H.C. (1995), Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*, *Journal of Natural Products* 58: 1655-1661
- Cherng I.H., Wu D.P., Chiang H.C. (1996), Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*, *Phytochemistry* 41(1): 263-267
- Harborne J.B. (1973), *Phytochemical methods*, Academic Press, London: 89-105
- Hseu Y.C., Chen S.C., Chen H.C., Liao J.W., Yang H.L. (2008a), *Antrodia camphorata* inhibits proliferation of human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*, *Food and Chemical Toxicology* 46(8): 2680-2688
- Hseu Y.C., Chen S.C., Yech Y.J., Wang L, Yang H.L. (2008b), Antioxidant activity of *Antrodia camphorata* on free radical-induced endothelial cell damage, *Journal of Ethnopharmacology* 118(2): 237-245
- Lee I.H., Huang R.L., Chen C.T., Chen H.C., Hsu W.C., Lu M.K. (2002), *Antrodia camphorate* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects, *FEMS Microbiology Letters* 209(1): 63-67

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

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

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

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

Salatino A., Woisky R. (1998), Analysis of propolis : some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37: 99-105

Singh G., Maurya S., Catalan C., Lampasona M.P. (2005), Studies on essential oils, chemical, antifungal, antioxidant and sprout suppressant studies on ginger essential oil and its oleoresin, *Flavour and Fragrance Journal* 20(1): 1-6

Wang Y.C., Chuang Y.C., Ku Y.H. (2007), Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food Chemistry* 102: 1163-1171