

東海大學化學工程與材料工程研究所

Graduate Institute of Chemical and Materials Engineering

Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：楊芳鏘 博士

Advisor : Fang-Chiang Yang, Ph.D.

中草藥添加對靈芝液態培養生理活性成分生成之影響

Effect of Chinese herb addition on the formation of bioactive components
in submerged cultures of *Ganoderma lucidum*

研究生：方凱平 撰

Graduate student : Kai-Ping Fang

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

謝誌

本論文之所以能順利完成，承蒙指導教授 楊芳鏘老師在研究所期間的辛勤指導，在研究生涯不遺餘力的教導我們，在日常的待人處事方面，也給予不少的意見，使我在研究所生涯中過得很充實。

感謝 顏宏偉老師給予的建議與指導，另外感謝 黃進發教授、林俊杰博士對本論文的細心審閱，讓我的論文能更加完善。

在研究所的求學期間非常感謝學姊馨怡、學長德威，同學昌宇、若凡、學妹于萱、方瑋、雅婷、學弟妹羽軒、家豪、志恆、偉誠、欣培、依嬛，以及實驗室其他學弟妹、及專題生們在實驗上的協助及鼓勵。另外也感謝女友昱禎在我遇到挫折時鼓勵我支持我。最後感謝我的家人，讓我無後顧之憂，給我很大的支持讓我完成這本論文。謝謝你們！

摘要

本研究主要目的在探討中草藥添加對於靈芝的液態培養生理活性成份生成之影響，尋找最佳中草藥種類與及最適添加量，同時，進行階段性培養，尋找最適培養條件。

由結果顯示，添加花椒濃縮液和薑黃濃縮液的效果較好。在菌重方面，花椒濃縮液培養十五天達到 8.19 g/L，為對照組的 1.20 倍；多醣方面，花椒濃縮液培養第六天達到 3.2 g/L，為對照組的 1.6 倍；靈芝酸方面，薑黃濃縮液培養在第十五天達到 14.33 (mg/g D.W.)，為對照組的 2.67 倍；總多酚方面，薑黃濃縮液培養在第六天達到 56.32(mg/g D.W.)，為對照組的 2.74 倍；類黃酮方面，在第十二天達到 4.59(mg/g D.W.)，為對照組的 3.08 倍。因為在靈芝生理活性的表現，花椒與薑黃明顯比其他三種中草藥高，故選用這兩種中草藥進行添加量變化實驗；又發現肉桂在第 0 天添加時，抑制了靈芝的生成，故對肉桂的添加時機進行探討，進行兩階段的培養，發現的確會提高靈芝生理活性。希望研究結果可供日後靈芝生理活性成分產量提升之參考。

關鍵字：靈芝、中草藥、花椒、薑黃、靈芝酸

Abstract

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

The results show that the addition of Fagara and Turmeric could give play to the great efficiency in this way, and biomass of Fagara reaches to 8.19 g/L at the 15th day, which is 1.20 times of the contro. The polysaccharide production of Fagara reaches to 3.2 g/L at the 6th day, and is 1.60 times more than the control. The content of ganoderic acid from Turmeric addition reaches to 14.33 (mg/g D.W.) at the 15th day, and is 2.67 times of the control. In addition, the total content of polyphenol reaches to 56.32 (mg/g D.W.) at the 6th day, which is 2.74 times of the control. The content of flavonoid reaches to 4.59 (mg/g D.W.) at the 12th day, and is 3.08 times of control group. The bioactive components in Fagara and Turmeric was proved to be much better than the other Chinese herbs. In contrast, adding cinnamon extract in the beginning of the culture could inhibit the formation of mycelia. Therefore, the addition timing of cinnamon extract was also investigated, which could effectively enhance the formation of bioactive components. The results of this study are expected to be useful for the enhancement of bioactive components production in the submerged culture of *Ganoderma lucidum*.

Key words: *Ganoderma lucidum* 、 Chinese herb 、 Fagara 、 Turmeric
Ganoderma lucidum acid

目錄

謝誌.....	I
摘要.....	II
Abstract.....	III
目錄.....	IV
表目錄.....	X
第一章 緒論.....	1
1-1 前言.....	1
1-2 研究目的.....	2
第二章 文獻回顧.....	3
2-1 靈芝簡介.....	3
2-1-1 靈芝的分類與介紹.....	3
2-1-2 靈芝的栽培方式.....	5
2-1-3 靈芝的生理活性與藥理效果.....	7
2-2 中草藥介紹.....	14
2-2-1 中草藥簡介.....	14
第三章 實驗材料與分析方法.....	21
3-1 實驗菌株及細胞株.....	21

3-2 實驗藥品	21
3-3 實驗儀器與設備	23
3-4 分析方法	24
3-4-1 pH 值測定	24
3-4-2 菌體(Biomass)	24
3-4-3 葡萄糖濃度測定	24
3-4-4 多醣濃度測定	24
3-4-5 總酚類含量測定	25
3-4-6 胞內粗三萜含量測定	26
3-4-7 類黃酮含量測定	26
3-5 實驗方法	27
3-5-1 實驗架構	27
3-5-2 靈芝菌種培養與保存	28
3-5-2-1 菌種斜面試管保存	28
3-5-2-2 培養皿平面培養與接菌活化	28
3-5-2-3 種菌製備	28
3-5-2-4 中草藥水萃濃縮液製備	29
3-5-3 三角瓶液態培養試驗	29
3-5-3-1 添加量變化試驗	30

3-5-4 靈芝胞內多醣萃取.....	30
3-5-5 靈芝菌絲體甲醇萃取物之製備.....	30
第四章 結果與討論.....	32
4-1 靈芝三角瓶液態培養試驗.....	32
4-1-2 添加八角濃縮液.....	35
4-1-3 添加黃耆濃縮液.....	38
4-1-4 添加薑黃濃縮液.....	41
4-1-5 添加花椒濃縮液.....	44
4-1-6 添加肉桂濃縮液.....	47
4-1-7 添加中草藥濃縮液之比較.....	50
4-2 添加中草藥濃縮液於最適天數做添加量變化.....	55
4-2-1 添加花椒濃縮液之添加量影響.....	55
4-2-2 添加薑黃濃縮液之添加量影響.....	64
4-3 添加時間變化對靈芝生理活性成份之影響.....	73
4-4 HPLC 和 GC 分析.....	81
第五章 結論與未來展望.....	87
5-1 結論.....	87
5-2 未來展望.....	89
參考文獻.....	90

圖目錄

圖 2-1 萜烯生物合成路徑.....	8
圖 2-2 天然物合成的三大路徑.....	10
圖 2-3 八角照片.....	15
圖 2-4 黃耆照片.....	16
圖 2-5 薑黃照片.....	17
圖 2-6 花椒照片.....	18
圖 2-7 肉桂照片.....	19
圖 3- 1 液態實驗架構圖.....	27
圖 4- 1 基礎培養基之靈芝菌絲體生長趨勢圖.....	33
圖 4- 2 基礎培養基靈芝酸、胞內多醣、總多酚、類黃酮產量.....	34
圖 4- 3 培養基添加八角濃縮液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖.....	36
圖 4- 4 培養基添加八角濃縮液靈芝酸、胞內多醣、總多酚、類黃酮產量...37	
圖 4- 5 培養基添加黃耆濃縮液液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖.....	39
圖 4- 6 培養基添加黃耆濃縮液靈芝酸、胞內多醣、總多酚、類黃酮產量...40	
圖 4- 7 培養基添加薑黃濃縮液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖.....	42
圖 4- 8 培養基添加薑黃濃縮液靈芝酸、胞內多醣、總多酚、類黃酮產量...43	
圖 4- 9 培養基添加花椒濃縮液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖.....	45
圖 4- 10 培養基添加花椒靈芝酸、胞內多醣、總多酚、類黃酮產量.....	46

圖 4-11 培養基添加肉桂濃縮液之對靈芝菌絲體之生長趨勢圖	48
圖 4-12 培養基添加肉桂之靈芝酸、胞內多醣、總多酚、類黃酮產量	49
圖 4-13 五種中草藥 Crude triterpenoid 含量比較	51
圖 4-14 五種中藥 Polysaccharide 含量比較	52
圖 4-15 五種中藥 Total phenol 含量比較	53
圖 4-16 五種中草藥 Flavonoids contents 比較.....	54
圖 4-17 添加花椒濃縮液 1ml、2ml、4ml、8ml、10ml，菌量生長變化.....	56
圖 4-18 不同濃度花椒濃縮液添加對靈芝菌絲體菌重之影響.....	57
圖 4-19 不同濃度花椒濃縮液添加對靈芝菌絲體胞外多醣生成之影響.....	58
圖 4-20 不同濃度花椒濃縮液添加對靈芝菌絲體胞內多醣生成之影響.....	59
圖 4-21 不同濃度花椒濃縮液添加對靈芝菌絲體靈芝酸生成之影響.....	61
圖 4-22 不同濃度花椒濃縮液添加對靈芝菌絲體總多酚生成之影響.....	62
圖 4-23 不同濃度花椒濃縮液添加對靈芝菌絲體類黃酮生成之影響.....	63
圖 4-24 添加薑黃濃縮液 1ml、2ml、4ml、8ml、10ml，菌量生長變化.....	65
圖 4-25 不同濃度薑黃濃縮液添加對靈芝菌絲體菌重之影響.....	66
圖 4-26 不同濃度薑黃濃縮液添加對靈芝菌絲體胞外多醣生成之影響.....	67
圖 4-27 不同濃度薑黃濃縮液添加對靈芝菌絲體胞內多醣生成之影響.....	68
圖 4-28 不同濃度薑黃濃縮液添加對靈芝菌絲體靈芝酸生成之影響.....	70
圖 4-29 不同濃度薑黃濃縮液添加對靈芝菌絲體總多酚生成之影響.....	71

圖 4-30 不同濃度薑黃濃縮液添加對靈芝菌絲體類黃酮生成之影響.....	72
圖 4-31 不同時間添加肉桂濃縮液對靈芝菌絲體菌重之影響.....	74
圖 4-32 不同時間添加肉桂濃縮液對胞外多醣之影響.....	75
圖 4-33 不同時間添加肉桂濃縮液對靈芝菌絲體胞內多醣之影響.....	77
圖 4-34 不同時間添加肉桂濃縮液對靈芝菌絲體靈芝酸生成之影響.....	78
圖 4-35 不同時間添加肉桂濃縮液對靈芝菌絲體總多酚生成之影響.....	79
圖 4-36 不同時間添加肉桂濃縮液對靈芝菌絲體類黃酮生成之影響.....	80
圖 4-37 添加花椒濃縮液第 12 天取樣之三萜類化合物 HPLC 圖譜.....	82
圖 4-38 市售之葡萄王靈芝王之三萜類化合物 HPLC 圖譜.....	82
圖 4-40 Structures of nine ganoderic acids 1~9 from <i>Ganderma tsugae</i>	83
圖 4-41 濃縮液、與培養液培養前後成分之變化.....	85
圖 4-42 Capillary gas chromatograms of the volatile components from the fruits of <i>Z. simulans</i> using steam distillation extraction	85

表目錄

表 2-1 靈芝的分類地位.....	4
表 2-2 靈芝的生理作用與藥理效果.....	11
表 3-1 實驗藥品.....	21
表 3-2 實驗儀器與設備.....	23
表 4-1 靈芝生理活性最大值及培養天數.....	50
表 4-2 Constituents of the Steam-Distilled Oil and Liquid Carbon Dioxide Extract from the Fruits of <i>Z. simulans</i>	86

第一章 緒論

1-1 前言

近年來隨著高齡人口的快速增長，以及生活習慣和環境品質的惡化，促使慢性病罹患率也日益增加，人們對身體保健更為注重，而崇尚自然及養生之保健食品更是炙手可熱，而在保健食品上或醫藥市場針對抗腫瘤的發展，成為日前研究的重點。因菇類已被證實對腫瘤有預防以及改善的效果(水野卓，1997)，故頗受各界看好。

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

靈芝代謝產物可能與中草藥的有效成分產生複方，如靈芝在添加中草藥的培養液中可能會加速或增加萜類的生成，使靈芝原有的效用得到增強的效果。

1-2 研究目的

萜類、多醣、及類黃酮具有多種生物活性，抗癌性、抗發炎效應、抗腫瘤活性。由於靈芝子實體的培養一般，需要 2~3 個月，從開始到採收相當費時，且野生靈芝不易取得，所以發展出類似以液態發酵培養生產多醣體、三萜類。

本實驗主要目的為：利用中草藥具有的萜類、多醣、及類黃酮化合物，進行靈芝液態深層培養。已探討添加中草藥是否能促使靈芝之生理活性含量提升。

第二章 文獻回顧

2-1 靈芝簡介

2-1-1 靈芝的分類與介紹

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

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

靈芝屬的分類地位及生活史

表 2-1 靈芝的分類地位為 (Alexopolus,1979)

血統分類	中文名稱	英文名稱
界	真菌界	Fungi
亞界	雙核亞界	Dikarya
門	擔子菌門	Basidiomycota
亞門	傘菌亞門	Agaricomycotina
綱	傘菌綱	Agaricomycetes
目	多孔菌目	Polyporales
科	靈芝科	Ganodermataceae
屬	靈芝屬	<i>Ganoderma</i>
種	靈芝	<i>G. lucidum</i>

2-1-2 靈芝的栽培方式(詹，2003)

靈芝的來源可分為野生與人工栽培，其敘述如下：

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

(二) 人工栽培靈芝：有子實體栽培和菌絲體液態培養二種方法，分述如下：

(1) 子實體栽培

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

椴木栽培：將靈芝的生長菌絲種植在櫟木或枹木的枯木段上。

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

(2) 菌絲體液態培養(楊，2006)

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

菌種→試管斜面培養→三角瓶培養→發酵槽培養

從靈芝的生活史來看，靈芝菌體形態包含孢子、菌絲與子實體三部分，一般

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

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

2-1-3 靈芝的生理活性與藥理效果

(1)三萜類(Triterpenoids)

靈芝子實體中的三萜類是強烈苦味來源，三萜類同時存在樟芝及猴頭菇中。靈芝三萜類苦味會依其品種、產地及生產條件而異，由成熟子實體萃取，有較多量三萜類(3~6%)，未成熟子實體內的三萜類不多，靈芝菌絲體靜態培養可分離約1~3%三萜類，搖瓶培養則含量極微，此外三萜類亦為靈芝開始有性繁殖(出菇)的必需物質(高，2000)。靈芝的三萜類最早由Kubota等於1982年從*G. lucidum*中發現，至今至少有一百一十九種由靈芝子實體、菌絲體、孢子中被鑑定出來。日本已將三萜類含量列為靈芝品質指標之一(高，2000)。靈芝三萜類為羊毛固烷(lanostane)之衍生物，微溶於水，可溶於乙醇及氯仿中，其可依碳數不同區分為三類，分別為C30的靈芝酸(ganoderic acid)類，C27的赤芝酸(lucidenic acid)類及C24的赤芝酮類(lucidone)(水野和川合，1997)。El-Mekkawy 等(1998)以甲醇萃取*G. lucidum*之子實體，得到ganoderiol F及ganodermanontriol，可以抑制愛滋病毒(HIV-1)生長及愛滋病毒之蛋白西每(HIV-1-protease)活性。此外，其等發現0.17~0.23 mM 濃度的ganoderic acid B，C1，H， α 和ganoderiol A、B等可抑制愛滋病毒蛋白西每 50 %活性。Min 等(1998)發現由*G. lucidum* 孢子中分離出新的三萜類lucidumol A及ganoderic acid B，證實在混合其他三萜類於20~90 mM 濃度下，可抑制愛滋病毒之蛋白酵素50%活性，進而抑制愛滋病毒擴張。(張，2001)

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分生物無法合成。萜類的分類法是根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為倍半萜(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)；含有八個異戊二烯單體稱為四萜(tetraterpenes)等(肖等人，1989)。

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，部份多官能基的倍半萜、二萜、三萜等，多為具有高沸點的液體或結晶固體。(李，2006)

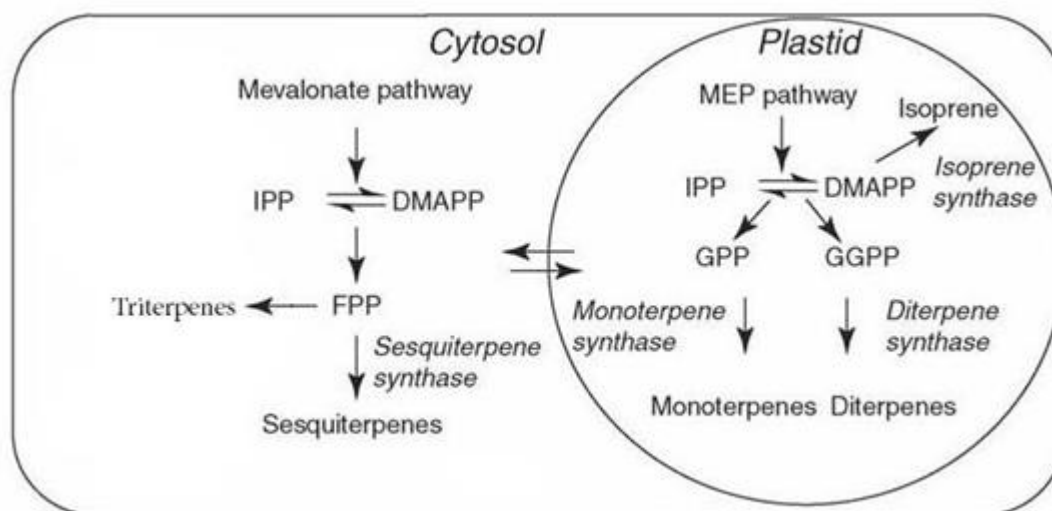


圖2-1 萜烯生物合成路徑(Dorothea Tholl，2006)

(2) 多醣體(Polysaccharide)

自然界中多醣體分佈很廣泛，如各類澱粉、纖維素、木質素。靈芝多醣可以熱水萃取子實體而得，所得水溶性多醣約在0.5%至1.5%之間，不同菌種間差異不大，此外，亦可由靈芝培養液中分離得靈芝菌體胞外多醣，多醣中含葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、半乳糖、鼠李糖、甘露糖等單糖，大多以 $\beta(1\rightarrow3)$ ， $\beta(1\rightarrow4)$ ，及 $\beta(1\rightarrow6)$ 鍵結，少數以 α 鍵結(Liang et al., 1995)，此與澱粉主要以 $\alpha(1\rightarrow4)$ 鍵結的結構不同。靈芝多醣的立體結構呈三股螺旋狀，並以氫鍵保持螺旋穩定，可溶於熱水中，不溶於高濃度乙醇中，故可利用95%乙醇使靈芝多醣沉澱。靈芝多醣分子量可由數千至數十萬(水野和川合，1997)。並非所有的靈芝多醣均有抗腫瘤效果，許多實驗顯示靈芝多醣的抗腫瘤效果，主要是以 $\beta(1\rightarrow3)$ 為骨架， $\beta(1\rightarrow6)$ 為側鏈之glucan 聚合物為主 (Miyazaki and Nishijima., 1981; Sone *et al.*, 1985; Hirohide *et al.*, 1985; 林，1992)，由於人體或老鼠中並沒有分解 β 鍵結多醣的酵素，故靈芝多醣抗腫瘤機制，至今並未完全明瞭。其中我們選用的中草藥中八角含有豐富的莽草酸(shikimic acid)，薑黃含有豐富的類黃酮(Flavonoids)，黃耆含有豐富的多醣(polysaccharides)，花椒和肉桂含有豐富的單萜類(monoterpenes)，由圖2-1、圖2-2 中，我們期望得到的產物是三萜(triterpenes)，我們試圖增加莽草酸(shikimic acid)、類黃酮(Flavonoids)、多醣(polysaccharides)、單萜類(monoterpenes)的濃度，期望反應能往三萜的方向進行，進而提高三萜的含量。

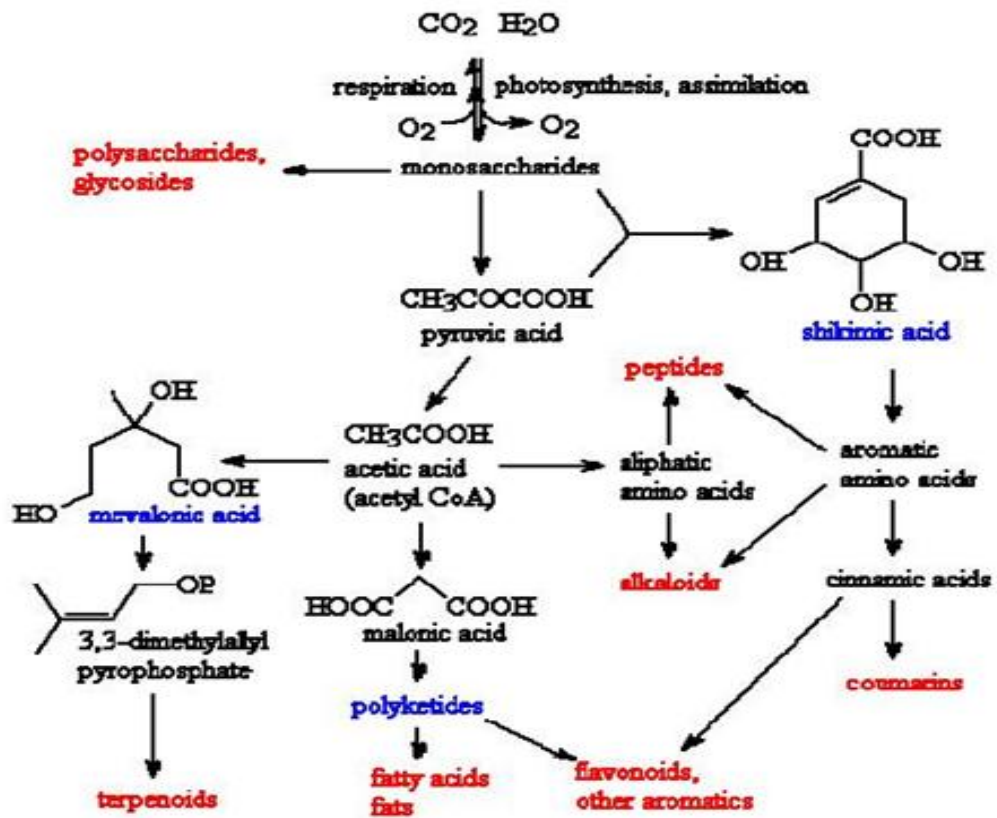


圖 2-2 天然物合成的三大路徑(林，2006)

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

表2- 2靈芝的生理作用與藥理效果(蔡，2008)

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

(一)抗癌作用

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

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

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

(二)免疫作用

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

(三)降血壓作用

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

(四)降血糖與血脂作用

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

(五)保肝與治療肝炎

對肝受損之動物，靈芝能降低血清中麩丙酮酸轉胺酶(Serum Glutamic Pyruvic Transaminase；SGPT)，具有消炎解毒作用，可促進肝細胞活化再生(Furue,1987)。赤芝中 ganoderic acid A 可抑制血清中 β -葡萄糖醛酸酶(β -glucuronidase)濃度，具有保肝作用。(徐、謝，2001)

(六)抗病毒作用

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

2-2 中草藥介紹

2-2-1 中草藥簡介

中草藥，在中國歷史淵遠流長，從神農嘗百草開始使用中草藥，就跟中國人息息相關，不論是在醫療上，飲食上都密不可分，中國五千年歷史中對於草藥的書籍更是不勝枚舉，可以說是祖先留給我們最好的遺產之一。

中藥按其性能和功效，可分為上、中、下三品。「上藥 120 種為君，主養命以應天，無毒，多服久服不傷人，欲輕身益氣，不老延年者，本上經。中藥 120 種為臣，主養性以應人，無毒有毒，斟酌其宜，欲遏病補虛羸者，本中經。下藥 125 種為佐使，主治病以應地，多毒不可久服，欲除寒熱邪氣，破積聚愈疾者，本下經。」(鄭，1996)

故中藥的使用須視其病症及輕重而定，應當遵從醫師指示來服用，否則後果不堪設想。中醫因各種藥材的藥性不同，以「四氣五味」稱之。屬陰的寒、涼、屬陽的溫、熱、中間的平，稱之四氣，熱病用寒涼的藥，寒涼的病用熱性的藥治療；五味係辛、酸、甘、苦、鹹，「據中醫的說法：辛有散、酸有收、甘有緩、苦有堅、鹹有柔、淡味有利濕之用。」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。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。(張等人，2008)

2-2-2 添加之中草藥介紹

2-2-2-1 八角簡介



圖2-3 八角照片

八角（學名：*Illicium verum*），又稱茴香、八角茴香、大料和大茴香，是八角茴香目八角茴香科八角屬的一种植物。其同名的乾燥果實是中國菜和東南亞地區烹飪的調味料之一。為生長在濕潤、溫暖半陰環境中的常綠喬木，高可至 20 米。主要分布於中國大陸南方。樹皮灰色至紅褐色。橢圓形全緣單葉，披針形生長，葉為革質，短柄，長 6-12 厘米，寬 2-5 厘米，上表面可見透明油點。春秋兩季開花。花單生於葉腋部。有 3 片黃綠色萼片；6-9 片花被，呈粉紅至深紅色。果實在秋冬季採摘，乾燥後呈紅棕色或黃棕色。氣味芳香而甜。揮發油的重要成分包括茴香醚(Anethole)、黃樟醚(Safrole)、茴香醛(Anisaldehyde)和茴香酮(Anisylacetone)。所含的莽草酸是製造抗病毒藥物奧司他韋 (Oseltamivir) 的合成原料之一。該藥物特別用於流感的防治。但未經提煉的八角本身並無類似作用。

（關，2004）

2-2-2-2 黃耆簡介



圖2-4 黃耆照片

黃耆，(學名：*Astragalus membranaceus*)，又稱北芪或北耆，常用中藥之一，為豆科植物蒙古黃芪或膜莢黃芪的根。主產於中國的內蒙古、山西、黑龍江等地。春秋兩季採挖，出去鬚根幾根頭，曬乾，切片，生用或蜜炙用。主要是製成飲片，調劑於中藥方劑中。現代也用黃耆提取物製成工業製劑，口服或靜脈滴注。

黃耆成分主要有苷類、多糖、黃酮、胺基酸及一些微量元素。黃耆能促進機體代謝、抗疲勞、促進血清和肝臟蛋白質的更新；有明顯的利尿作用，能消除試驗性腎炎尿蛋白；能改善貧血動物現象；能升高低血糖降低高血糖；能興奮呼吸；能增強和調節機體免疫功能，可提高機體的抗病能力；對流感病毒等多種病毒所致細胞病變有輕度抑制作用，對流感病毒感染小鼠有保護作用；有較廣泛的抗菌作用；黃耆在細胞培養中，能使細胞數明顯增多，細胞生長旺盛，壽命延長；能增強心肌收縮力，保護心血管系統，抗心律失常，擴張冠狀動脈和外周血管，降

低血壓，能降低血小板粘附力，從而一定程度上減少血栓形成，此外還有降血脂、抗衰老、抗缺氧、抗輻射、保肝等作用。（謝，2008）

2-2-2-3 薑黃簡介



圖2-5 薑黃照片

薑黃(學名：*Curcuma longa*)又稱黃薑，為薑科薑黃屬植物，在一些亞洲國家稱作 turmeric 或 kunyit。本品呈不規則卵圓形、圓柱形或紡錘形，常彎曲，有的具短叉狀分枝，長 2~5cm，直徑 1~3cm。表面深黃色，粗糙，有皺縮紋理和明顯環節，並有圓形分枝痕及鬚根痕。質堅實，不易折斷，斷面棕黃色至金黃色，角質樣，有蠟樣光澤，內皮層環紋明顯，維管束呈點狀散開。其根莖所磨成的深黃色粉末為咖哩的主要香料之一，也用在南洋料理，嚐起來味苦而辛，帶點土味。薑黃的成分主要有薑黃素(curcumin)，其 3%~5%的揮發性油脂中，主要還含有倍半萜類，像是其 α -薑黃酮(alpha-turmerone)和 β -薑黃酮(beta-turmerone)，以及芳

香薑黃酮 (arturmerone)、gamma-亞特蘭斯柏酮 (gamma-atlantone)、薑烯 (zingiberene)以及薑黃多醣(utonan)。根據中醫典籍記載，薑黃屬於祛瘀活血藥，其性味辛、苦、溫，歸肝、脾二經，功效為通經止痛、破血行氣，主治癥瘕血塊、月經不通、腹中氣脹、胸腹痛、風痺臂痛、撲損瘀血等症，薑黃也認為是芳香健胃利膽劑，兼有止血、祛風、通經、鎮痛作用，也可用於腸胃炎、黃疸、腹痛，胃痛等症。；外用為粉末塗佈，也可治療膿腫創傷、降血脂作用、抗癌作用、抗氧化作用，由此可知，薑黃在抗發炎上扮演相當重要的角色。(謝，2008)

2-2-2-4 花椒簡介



圖2-6 花椒照片

花椒 (學名：Zanthoxylum)，又稱秦椒、川椒或山椒。是芸香科灌木或喬木花椒樹的果實。花椒樹屬落葉灌木，高 3-7m，莖幹通常有增大皮刺；枝灰色或褐灰有細小的皮孔及略斜向上生的皮刺；當年生小枝被短柔毛。奇數羽狀複葉，葉軸邊緣有狹翅；小葉 5-11 個，紙質，卵形或卵狀長圓形，無柄或近無柄，長

1.5-7cm，寬 1-3cm，先端尖或微凹，基部近圓形，邊緣有細鋸齒，表面中脈基部兩側常被一簇褐色長柔毛，無針刺。花期 3-5 月，果期 7-9 月。花椒含有檸檬烯、香葉醇、異茴香醚、花椒油烯、水芹香烯、香草醇等等揮發性物質，具有獨特濃烈香氣。花椒在中藥上也有一定的作用，花椒果皮可作為調味料，並可提取芳香油，又可入藥，種子可食用，又可加工製作肥皂，作為調味料，花椒果及種子可除各種肉類的腥氣；促進唾液分泌，增加食慾，花椒亦可浸制酒。作中醫食療，花椒果性味辛、溫，有小毒，可使血管擴張，從而起到降低血壓的作用；服花椒水能去除寄生蟲；有芳香健胃、溫中散寒、除濕止痛、殺蟲解毒、止癢解腥的功效。(曲，2009)

2-2-2-5 肉桂簡介



圖2-7 肉桂照片

肉桂（學名：*Cinnamomum cassia*），又名玉桂、牡桂，為樟科常綠喬木。肉桂成分主要含有桂皮醛(cinnamaldehyde)、醋酸桂皮脂 (cinnamylacetate)、桂皮

醇(cinnamyl alcohol)、o-甲氧基桂皮醛(o-methoxycinnamaldehyde)、香豆素、濃縮單寧酸 (condensed tannins)、類黃酮素衍生物以及黏膠值。肉桂植物各部，如其樹皮、枝、葉、果、花梗都可提取芳香油或桂油，用於食品、飲料、香煙及醫藥，但常用作香料、化妝品、日用品的香精。肉桂大多為人工栽培，且以種子繁殖為主，這樣可使其後代保持親本的特性，以獲得枝下較高的樹幹，有利於剝取桂皮，因此在生產上很少用無性繁殖方法培育苗木種植。多於秋季剝取，曬去栓皮、陰乾。因剝取部位及品質的不同而加工成多種規格，常見的有企邊桂、板桂、油板桂、桂通等。肉桂各部位又可分別用於醫藥，樹皮也就是人們常說的桂皮，為中國傳統名貴中藥材，也作調味品，有驅風健胃、活血祛瘀、散寒止痛之效；樹枝則能發汗驅風，通經脈。(曲，2009)

第三章 實驗材料與分析方法

3-1 實驗菌株及細胞株

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

3-2 實驗藥品

本研究所使用藥品名稱規格如表 3-1 所示：

表3-1 實驗藥品

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

Na_2CO_3	SHOWA	試藥特級
95% Ethanol	景明	
99% Ethanol	景明	
Phenol	林純藥工業株式會社 ECHO	試藥 1 級
CH_3COOK	SHOWA	昭和 1 級
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	SHOWA	昭和 1 級

3-3 實驗儀器與設備

本研究所使用實驗儀器與設備如表 3-2 所示：

表3-2 實驗儀器與設備

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

3-4 分析方法

3-4-1 pH 值測定

使用 SUNTEX pH meter 測其 pH 值。

3-4-2 菌體(Biomass)

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

3-4-3 葡萄糖濃度測定

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

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

酚-硫酸比色法(Phenol-sulfuric acid assay)

1. 測定原理

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

2. 標準曲線製作

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

- (1) 取以上溶液 2 ml 置於試管中，各加入 1 ml 濃度 5% 酚溶液，並於 10-20 分鐘內各加入 5 ml 濃度 95.5% 濃硫酸溶液，均勻混合後靜置 10 分鐘。
- (2) 放入 25°C 恆溫水槽水浴反應 15 分鐘，待呈色穩定後，以分光光度計測其在波長 490 nm 下之吸光值，即可繪出糖濃度與吸光值關係圖。

3. 樣品分析

- (1) 將多醣回溶於同體積(發酵液)的蒸餾水中，離心後取上清液，用適量的蒸餾水加以稀釋。
- (2) 取以上經稀釋的多醣溶液 2ml 置於試管中，加入 1ml 濃度 5% 酚溶液，並於 10-20 分鐘內各加入 5ml 濃度 95.5% 濃硫酸溶液，均勻混合後靜置 10 分鐘。
- (3) 放入 25°C 恆溫水槽水浴反應 15 分鐘，待呈色穩定後，以分光光度計測其在波長 490 nm 下之吸光值，對照標準曲線即可求得樣品的多醣濃度。

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

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

總酚類含量測定係採 Folin-Ciocalteu 法(Wang, 2006)。取 0.3 ml 甲醇萃取液，加入 6 ml 2% 的 Na_2CO_3 ，混合均勻反應 2 分鐘。再加入 0.3 ml 50% 的 Folin-Ciocalteus

reagent，混合均勻反應 30 分鐘。以分光光度計測其在 730 nm 下的吸光值。再由已知濃度的標準 Gallic acid 檢量線即可算出每克樣品中所含沒食子酸當量 Gallic acid equivalent (GAE)，得知總酚含量。

3-4-6 胞內粗三萜含量測定

參考 Tang and Zhong (2002)與 Chen, Xie and Gong (2007)之方法做結合，則可使萃取時間縮短。取乾菌絲 100 mg，加入 50% 乙醇 3 ml 利用超音波震盪法震盪 30 min，過濾萃取液，將殘渣再加入 50% 乙醇 3 ml 震盪 30 min，收集濾液共 6 ml 減壓濃縮至乾，將乾燥物加 3 ml 水回溶並加入 3 ml 氯仿萃取 30 分鐘，取下層液體加入 3 ml NaHCO₃ 震盪 30 min，之後以 1N HCl 及 1N NaOH 調整液體 pH 至 3 以下，取下層液體減壓濃縮至乾，加入 2 ml 95% 乙醇，在波長 245 nm 下測其吸光值。

3-4-7 類黃酮含量測定

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

取萃取液 0.5 mL，依序加入 1.5 mL 之 95 % 乙醇、0.1 mL 之 10 % AlCl₃ · 6H₂O、0.1 mL 之 1 M CH₃COOK、2.8 mL 之去離子水，混合均勻後於室溫下靜置 40 分鐘後，測定波長 415 nm 之吸光值，由槲皮素 (Quercetin) 標準曲線換算萃取液中總類黃酮物質含量，單位為 mg/mL (Nagy and Grancai,1996)。

3-5 實驗方法

3-5-1 實驗架構

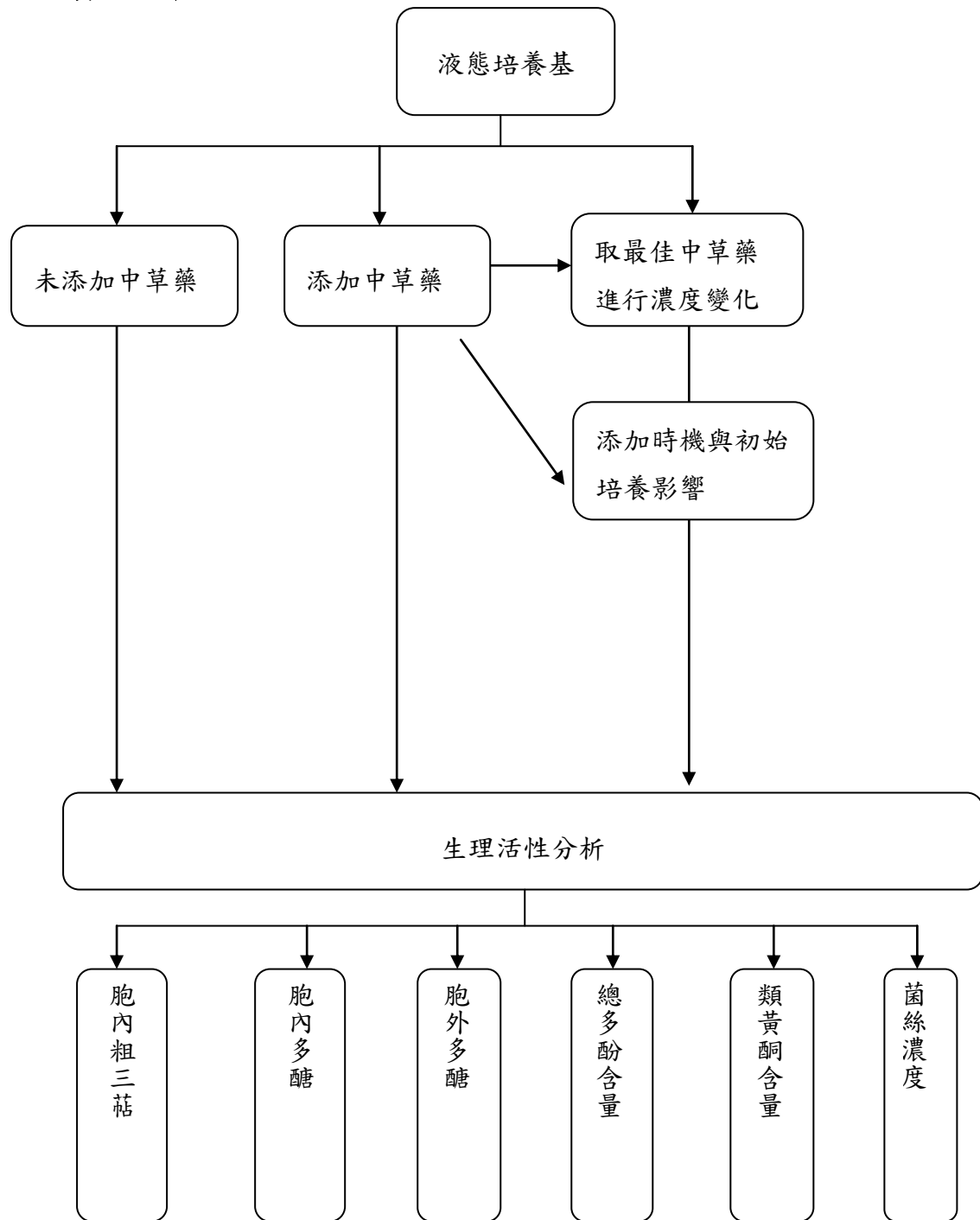


圖3-1液態實驗架構圖

3-5-2 靈芝菌種培養與保存

3-5-2-1 菌種斜面試管保存

本實驗以試管斜面保存菌種。配製 39 g/l 濃度的 PDA (Potato Dextrose Agar) 作為斜面培養基，滅菌後，置於無塵無菌操作檯中，待 PDA 冷卻硬化，將靈芝菌種接種於試管斜面培養基上，於 30°C 培養七天後，放入 4°C 冰箱中保存備用，約二個月更新一次。

3-5-2-2 培養皿平面培養與接菌活化

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

3-5-2-3 種菌製備

本實驗研究所採用的液態培養基成份如下：Yeast extract 3.0 g/l、Glucose 20.0 g/l、 KH_2PO_4 1.0 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l，並利用 0.1N HCl，將液態培養基之 pH 調整為 4。

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

3-5-2-4 中草藥水萃濃縮液製備

將秤重 50 g 的基質(八角、黃耆、薑黃、花椒、肉桂)，購自於明通中藥行，加入 1 L 的水，煮沸 3 個小時，用 100 mesh 篩網過濾後，以真空濃縮器於 60°C 下減壓濃縮為 10 倍之中草藥水萃液，取出濃縮液於 4°C 冷藏備用。

3-5-2-5 乙醇萃取物製備

將秤重 50 g 的基質(八角、黃耆、薑黃、花椒、肉桂)加入 1 L 的 95% 酒精，以超音波震盪萃取 2 小時，靜置一天，用 100 mesh 篩網過濾後，真空濃縮器於 60°C 下減壓濃縮為 10 倍之中草藥水萃液，取出濃縮液於 4°C 冷藏備用。

3-5-3 三角瓶液態培養試驗

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

3-5-3-1 添加量變化試驗

此試驗之主要目的，為探討添加誘導劑之時間的不同，對靈芝有效成分生成之影響。培養條件為，使用 250 ml 三角瓶，培養溫度為 30°C。試驗方法，配製 100 ml 液態培養基，並利用 0.1 N HCl 和 0.1 N NaOH，將液態培養基之 pH 調整為 4，倒入 250 ml 三角瓶中，添加中草藥水萃液 1、2、4、8、10 ml 各自添加至 100 ml 液態培養基，對靈芝有效成份之探討。

3-5-4 靈芝胞內多醣萃取

取經冷凍乾燥後之菌絲體與烘乾之固態發酵物 100 mg 粉末加入 10 ml 蒸餾水，置於滅菌釜(121°C，1.2 Kg/cm²)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。將此沉澱物加入二次蒸餾水回溶，並將樣品經適度稀釋後，以酚-硫酸法測定其胞內多醣濃度。

3-5-5 靈芝菌絲體甲醇萃取物之製備

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

4°C 備用。

第四章 結果與討論

4-1 靈芝三角瓶液態培養試驗

此實驗之目的是為了探討在菌體培養過程中，添加的誘導劑對菌體生長及有效成份之影響。本研究選用 Yeast extract 3.0 g/l、Glucose 20.0 g/l、 KH_2PO_4 1.0 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l 做為液態培養基，分別添加五種不同的中草藥濃縮液，分別是八角、薑黃、黃耆、花椒、肉桂，與靈芝進行液態發酵培養試驗，觀察在添加不同中草藥濃縮液對靈芝生理活性成分的影響。

4-1-1 基礎培養基之培養

由圖 4-1 顯示，培養時間為 15 天，菌體濃度到 12 天為最大值，此時為碳源的葡萄糖則隨時間遞減，胞外多醣含量到第 6 天為最高，再隨時間下降，而 pH 值為依時間緩慢的遞減。

由圖 4-2 顯示，以整體三萜含量以及整體多醣濃度探討，靈芝酸含量在第 12 天達到最大值 5.40 mg/g D.W.，然後下降。到第 9 天時，靈芝液態整體胞內多糖含量達到最大值 283.15 mg/g D.W.，然後再下降，到第 15 天再微微上升至 152.05 mg/g D.W.。靈芝液態發酵的總多酚則在第 9 天達到最大值 23.75 mg/g D.W.，之後開始下降至第 15 天時為 6.86 mg/g D.W.；類黃酮的部份在第 6 天達到最大值 1.58 mg/g D.W.，之後開始下降至第 15 天時為最低。

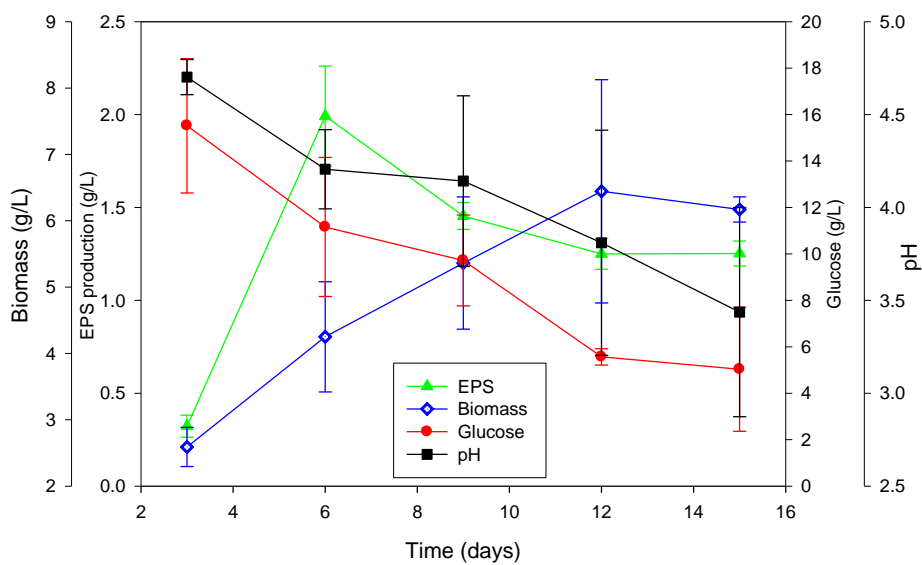


圖 4-1 基礎培養基之靈芝菌絲體生長趨勢圖

培養條件：基礎培養基

初始 pH4

接種量 5% (v/v)

溫度 30°C

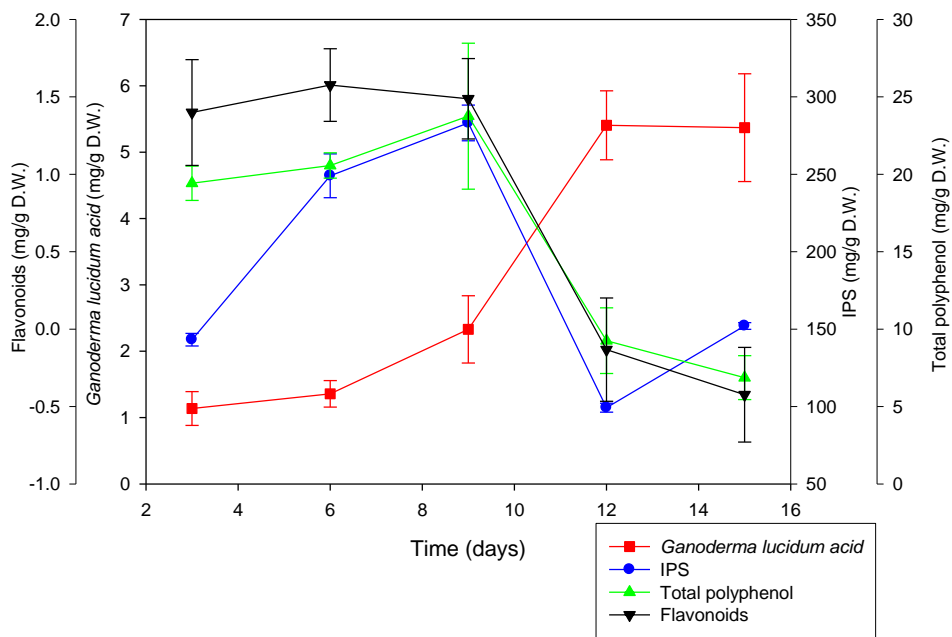


圖 4-2 基礎培養基靈芝酸、胞內多醣、總多酚、類黃酮產量

培養條件：基礎培養基

初始 pH4

接種量 5% (v/v)

溫度 30°C

4-1-2 添加八角濃縮液

由圖 4-3 顯示，添加八角濃縮液進行靈芝液態培養的生長趨勢圖，菌絲濃度從第 3 天到第 12 天急速上升，而葡萄糖殘量則為下降，此時菌體分解掉葡萄糖促使菌絲濃度生長；第 12 天至第 15 天菌絲濃度開始趨於平緩，pH 值則是依天數逐漸下降；第 3 天到第 6 天胞外多醣開始上升，第 6 天之後開始下降，然後開始趨於平緩，葡萄糖殘量則由第 3 天開始依序下降，當到第 6 天時則胞外多醣與第 15 天時菌絲濃度達到最大值，分別為 2.15 g/L 與 6.03 g/L。由圖 4-4 顯示，在第 3 天到第 9 天靈芝酸並沒有太大的改變，與控制組含量差不多，到第 12 天時則達到最大值為 8.02 mg/g D.W.，推測使用八角濃縮液在初期會抑制靈芝酸生成；在第 3 天至第 9 天整體多醣含量則呈現上升的趨勢，而在第 15 天時，因菌絲濃度達到最大值，而使整體胞內多醣含量又上升至 119.59 mg/g D.W.。由圖 4-4 顯示，總多酚含量在第 6 天含量為最大值 28.09 mg/g D.W.，接著，隨時間增加而下降；類黃酮含量則在第 3 天到第 9 天幾乎持平，第 12 天上升達最大值 3.71 mg/g D.W.。

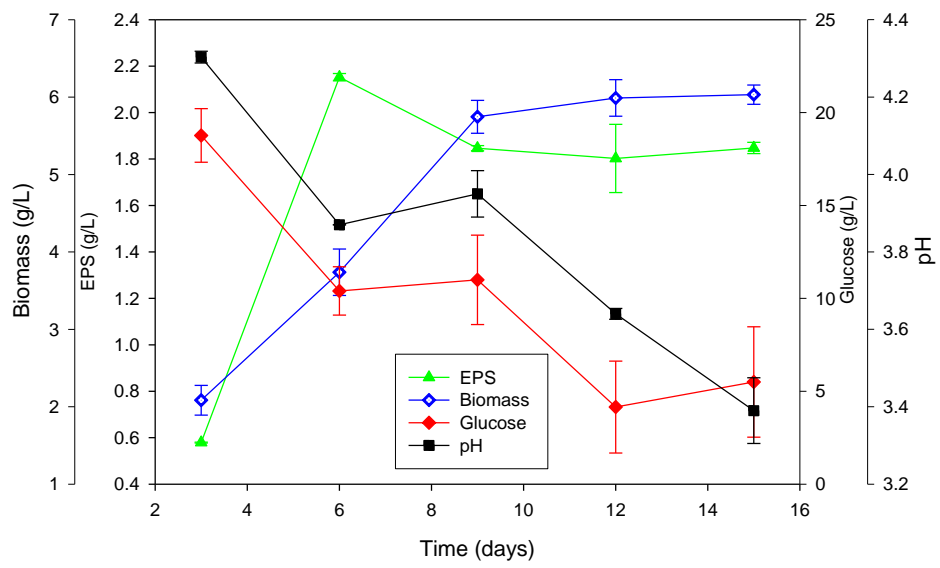


圖 4-3 培養基添加八角濃縮液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 八角濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

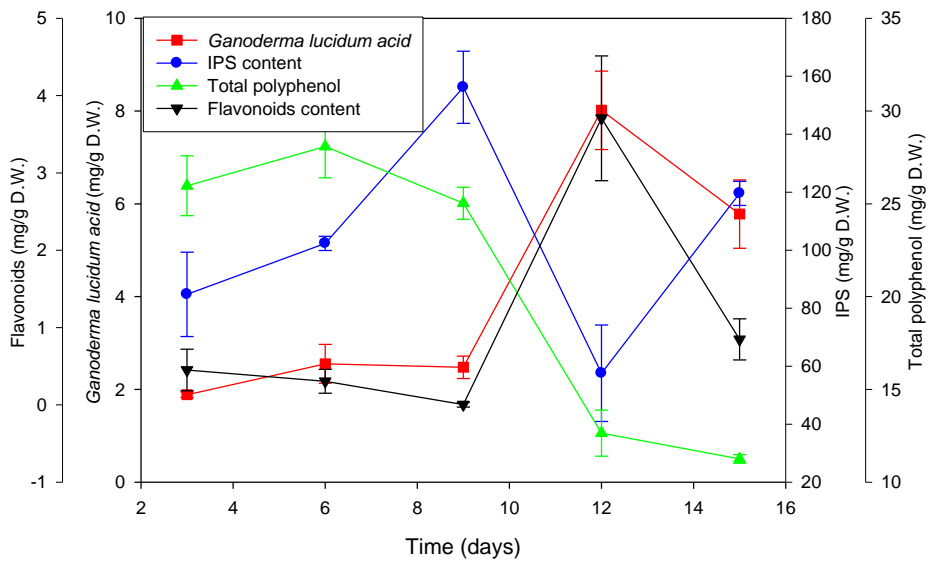


圖 4-4 培養基添加八角濃縮液靈芝酸、胞內多醣、總多酚、類黃

酮產量

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 八角濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

4-1-3 添加黃耆濃縮液

由圖 4-5 顯示，添加黃耆濃縮液進行靈芝液態培養的生長趨勢圖，菌絲濃度從第 3 天到第 12 天呈現鋸齒狀的上升，而葡萄糖殘量則為下降，此時菌體分解掉葡萄糖促使菌絲濃度生長；第 12 天至第 15 天菌絲濃度開始趨於平緩，pH 值則是依天數逐漸下降；第 3 天胞外多醣最高，推測是一開始測到黃耆本身之多醣，第 6 天到第 9 天開始上升，第 9 天之後開始下降，然後開始趨於平緩，葡萄糖殘量則由第 3 天開始依序下降，當到第 9 天時則胞外多醣與第 15 天時菌絲濃度達到最大值，分別為 2.50 g/L 與 6.06 g/L。由圖 4-6 顯示，在第 3 天到第 12 天靈芝酸緩慢上升，到第 12 天時則達到最大值為 6.64 mg/g D.W.；在第 3 天至第 15 天整體多醣含量則呈現上升的趨勢，而在第 15 天時，因菌絲濃度達到最大值，而使整體胞內多醣含量上升至 145.86 mg/g D.W.。由圖 4-6 顯示，總多酚含量在第 9 天含量為最大值 14.59 mg/g D.W.，接著，隨時間增加而下降；類黃酮含量則在第 3 天到第 12 天上升，到第 12 天上升達最大值 0.75 mg/g D.W.。

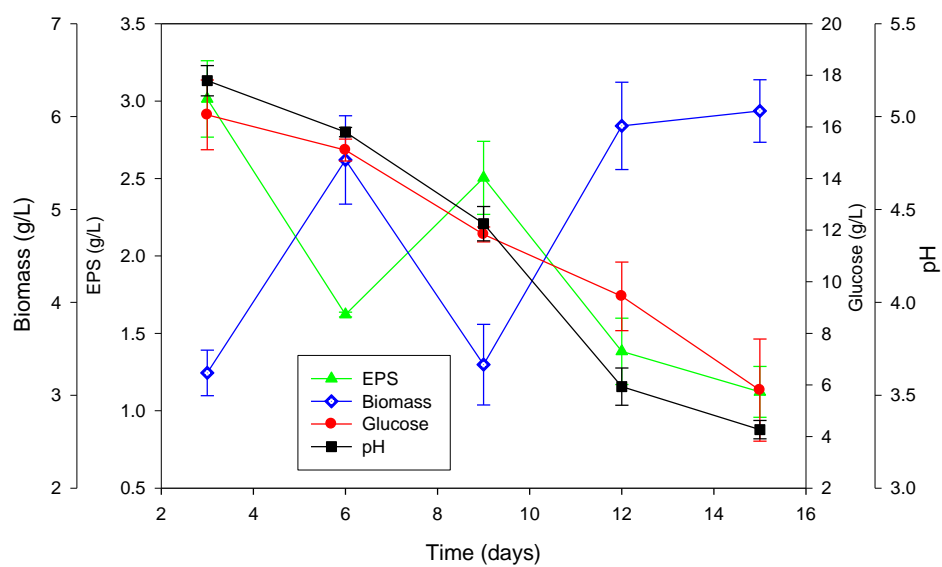


圖 4-5 培養基添加黃耆濃縮液液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 黃耆濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

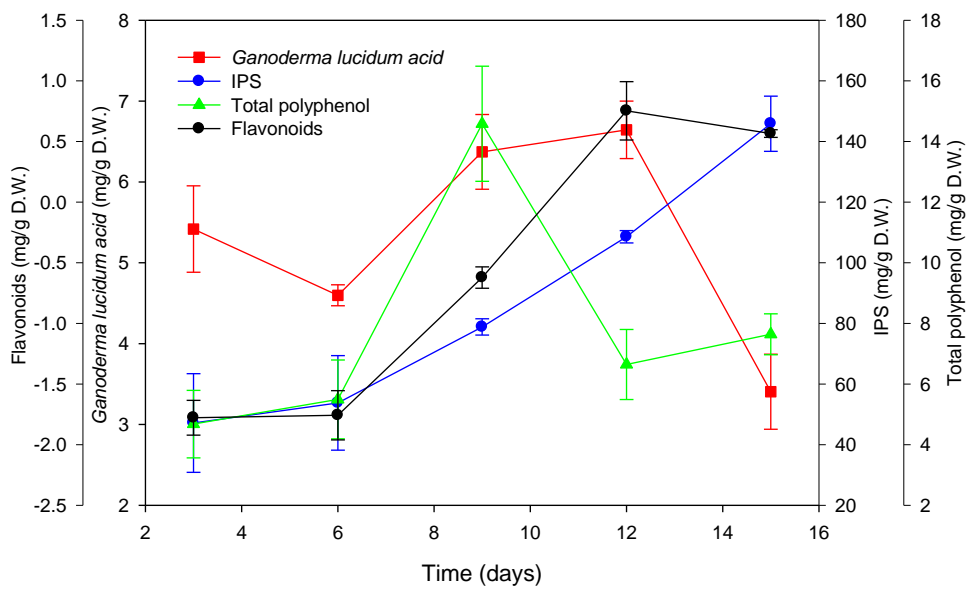


圖 4-6 培養基添加黃耆濃縮液靈芝酸、胞內多醣、總多酚、類黃

酮產量

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 黃耆濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

4-1-4 添加薑黃濃縮液

由圖 4-7 顯示，添加薑黃濃縮液進行靈芝液態培養的生長趨勢圖，菌絲濃度從第 3 天到第 6 天急速上升，而葡萄糖殘量則為下降，到第 15 天再上升；菌體分解掉葡萄糖促使菌絲濃度生長；第 6 天至第 15 天菌絲濃度開始趨於平緩，pH 值則是到第 9 天才開始下降；第 3 天胞外多醣最高，推測是一開始測到薑黃本身之多醣，第 6 天到第 9 天開始上升，第 9 天之後開始下降，然後開始趨於平緩，葡萄糖殘量則由第 3 天開始依序下降，當到第 9 天時則胞外多醣與第 6 天時菌絲濃度達到最大值，分別為 1.59 g/L 與 5.35 g/L。由圖 4-8 顯示，在第 3 天到第 15 天靈芝酸上升，到第 15 天時則達到最大值為 14.33 mg/g D.W.；在第 3 天至第 9 天整體多醣含量則呈現上升的趨勢，而在第 9 天時，胞內多醣含量為 97.652 mg/g D.W.。由圖 4-8 顯示，總多酚含量在第 6 天含量為最大值 28.16 mg/g D.W.，接著，隨時間增加而下降；類黃酮含量則在第 6 天到第 12 天上升，到第 12 天上升達最大值 1.78 mg/g D.W.，第 3 天雖比第 12 天高，但推測測到之多醣大多為薑黃本身所擁有的。

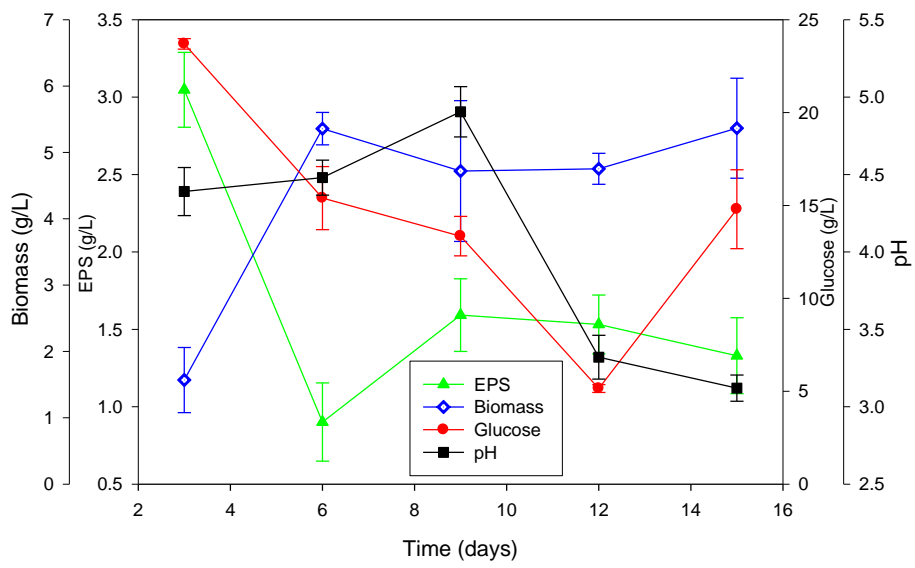


圖 4-7 培養基添加薑黃濃縮液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 薑黃濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

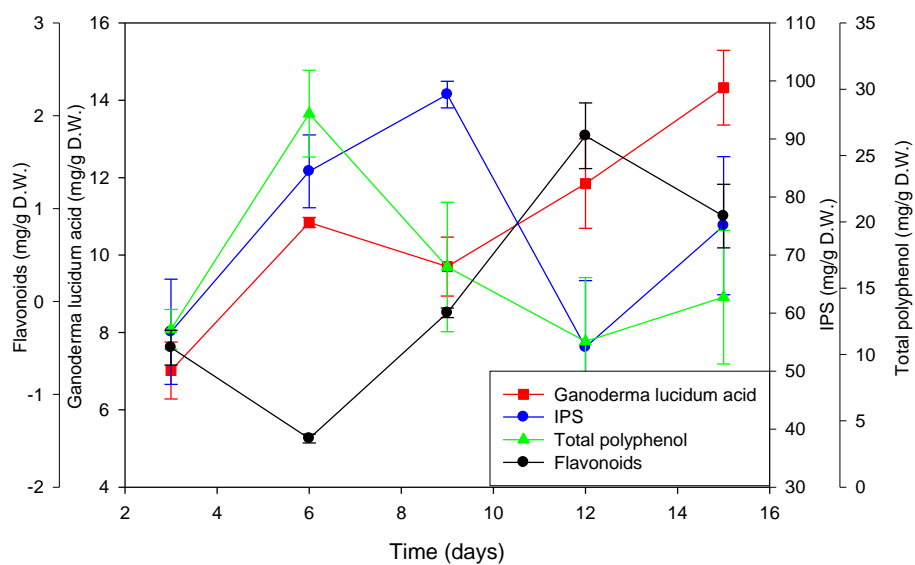


圖 4-8 培養基添加薑黃濃縮液靈芝酸、胞內多醣、總多酚、類黃

酮產量

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 薑黃濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

4-1-5 添加花椒濃縮液

由圖 4-9 顯示，添加花椒濃縮液進行靈芝液態培養的生長趨勢圖，菌絲濃度從第 3 天到第 15 天呈現上升的狀態，而葡萄糖殘量則為下降，此時菌體分解掉葡萄糖促使菌絲濃度生長；第 12 天至第 15 天菌絲濃度開始趨於平緩，pH 值則是依天數逐漸下降；胞外多醣第 3 天到第 6 天開始上升，第 6 天之後開始下降，葡萄糖殘量則由第 3 天開始依序下降，當到第 6 天時則胞外多醣與第 15 天時菌絲濃度達到最大值，分別為 3.20 g/L 與 8.19 g/L。由圖 4-10 顯示，在第 3 天到第 12 天靈芝酸上升，到第 12 天時則達到最大值為 12.37 mg/g D.W.；在第 3 天至第 6 天整體多醣含量則呈現上升的趨勢，而在第 15 天時，因菌絲濃度達到最大值，而使整體胞內多醣含量又上升至 148.98 mg/g D.W.。由圖 4-10 顯示，總多酚含量在第 3 天含量為最大值 36.17 mg/g D.W.，接著，隨時間增加而下降，推測花椒濃縮液會抑制總多酚的生成；類黃酮含量則在第 3 天到第 12 天上升，到第 12 天上升達最大值 0.31 mg/g D.W.。

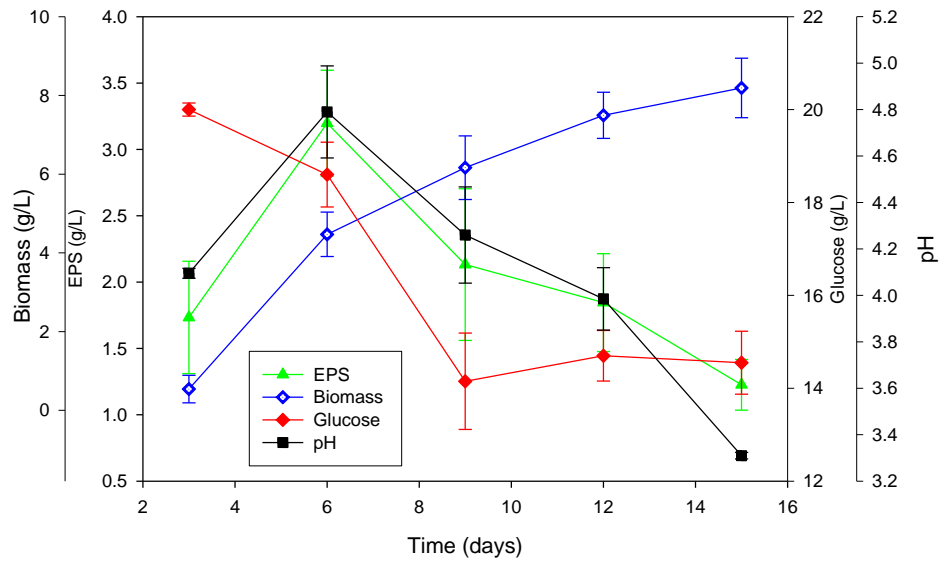


圖 4-9 培養基添加花椒濃縮液對靈芝菌絲體之生長趨勢圖

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 花椒濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

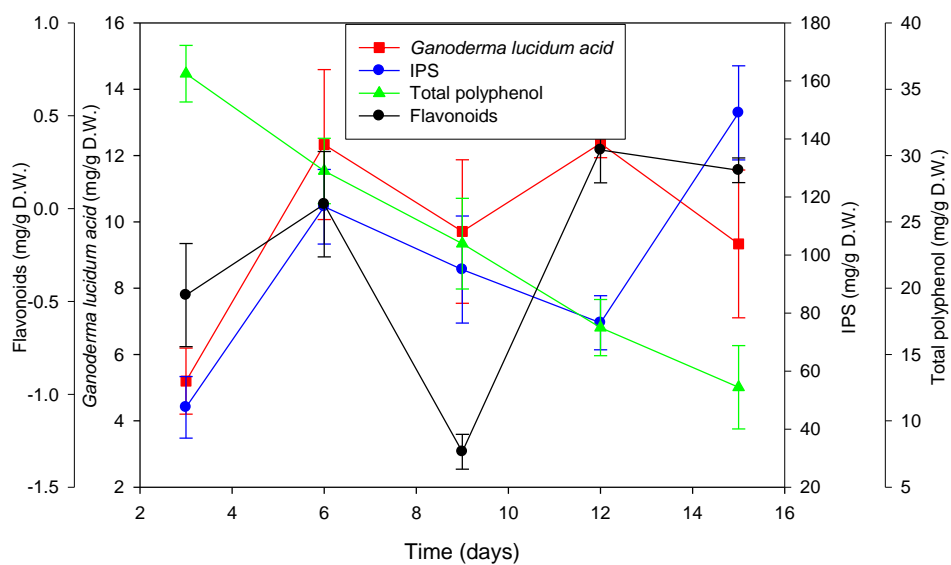


圖 4-10 培養基添加花椒濃縮液液靈芝酸、胞內多醣、總多酚、類黃酮產量

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 花椒濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

4-1-6 添加肉桂濃縮液

由圖 4-11 顯示，添加肉桂濃縮液進行靈芝液態培養的生長趨勢圖，菌絲濃度第 3 天至第 6 天完全沒有長，菌絲呈現死亡的狀態，第 9 天開始有菌絲出現，到 15 天達最高，而葡萄糖殘量則為下降，pH 值則是逐漸上升至第 12 天下降；胞外多醣第 3 天之後開始下降，葡萄糖殘量則由第 3 天開始依序下降，第 3 天時則胞外多醣與第 15 天時菌絲濃度達到最大值，分別為 2.24 g/L 與 1.64 g/L。由圖 4-12 顯示，在第 9 天到第 15 天靈芝酸上升，到第 15 天時則達到最大值為 8.98 mg/g D.W.；在第 9 天至第 15 天整體多醣含量則呈現上升的趨勢，而在第 15 天時，因菌絲濃度達到最大值，而使整體胞內多醣含量上升至 56.73 mg/g D.W.。由圖 4-12 顯示，總多酚含量在第 15 天含量為最大值 10.49 mg/g D.W.；類黃酮含量則在第 9 天到第 15 天下降。

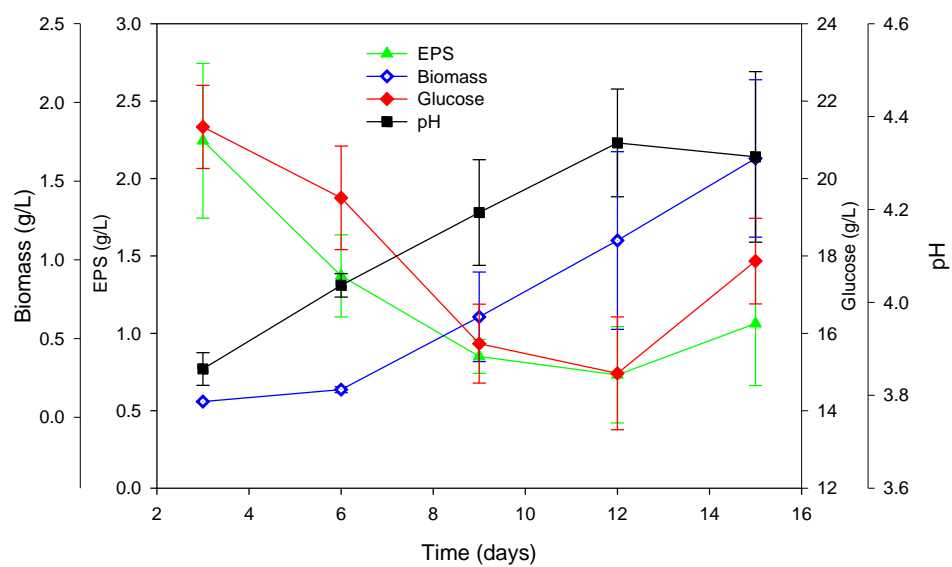


圖 4-11 培養基添加肉桂濃縮液之對靈芝菌絲體之生長趨勢圖

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 肉桂濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

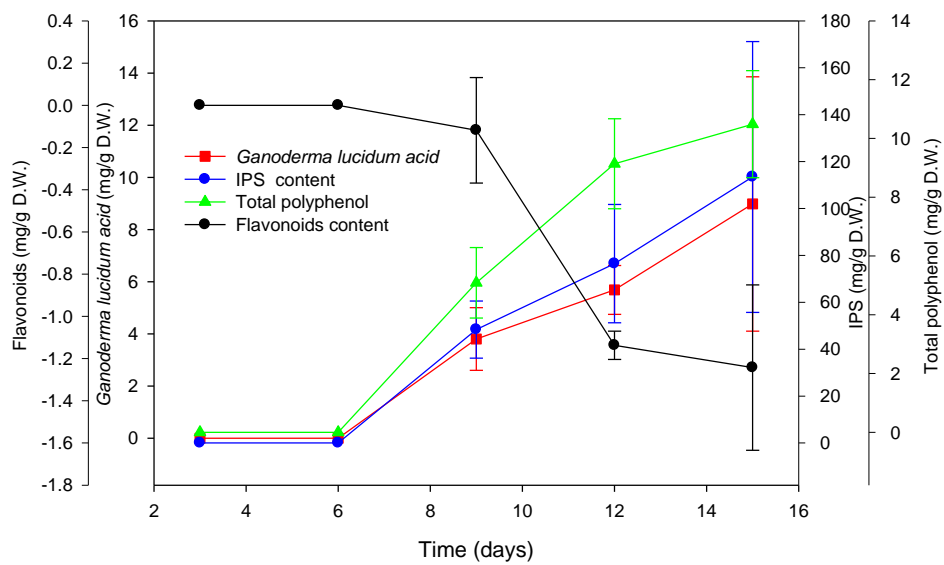


圖 4-12 培養基添加肉桂濃縮液之靈芝酸、胞內多醣、總多酚、

類黃酮產量

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 肉桂濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

4-1-7 添加中草藥濃縮液之比較

由前面添加的中草藥添加物做最適當比較，則大部分在 12 天會有最大值，由表 4-1，以花椒濃縮液在第 12 天時，相較於其他中草藥添加效果較來的。胞外多醣產量方面，花椒在第 6 天有最大值，達到 3.20 g/L；胞內多醣含量，以空白組第 9 天為最高，達到 283.15 mg/g D.W.；胞內多醣產量也是空白組第 9 天為最高，達到 1.52 g/L；靈芝酸含量方面，薑黃在第 15 天有最大值，達到 14.33 mg/gD.W.；總多酚含量最高出現在薑黃第 6 天，達到 56.32 mg/gD.W.；類黃酮含量薑黃在第 12 天有最大值，達到 4.59 mg/gD.W.。

綜合以上結果，故將選用薑黃以及花椒做添加量變化，探討不同濃度添加對靈芝生理活性生成之影響

* 註：表4-1為靈芝生理活性最大值及 培養天數

	Bioma ss (g/L)	IPS (mg/g D.W.)	IPS (g/L)	EPS (g/L)	G.A (mg/g D.W.)	Total polyphenol (mg/gD.W.)	Flavonoids (mg/gD.W.)
Control	6.44 (D12)	283.15 (D9)	1.52 (D9)	1.99 (D6)	5.40 (D12)	23.75 (D9)	1.57 (D6)
Star anise 八角	6.03 (D15)	156.20 (D9)	0.90 (D9)	2.15 (D6)	8.02 (D12)	28.09 (D6)	3.7 (D12)
Astragalus 黃耆	6.06 (D15)	145.86 (D15)	0.88 (D15)	3.01 (D3)	6.64 (D12)	14.59 (D3)	0.75 (D12)
Turmeric 薑黃	5.36 (D15)	97.65 (D9)	0.46 (D9)	3.04 (D3)	14.33 (D15)	56.32 (D6)	4.59 (D12)
Fagara 花椒	8.19 (D15)	148.99 (D15)	1.22 (D15)	3.20 (D6)	12.37 (D 12)	36.17 (D3)	0.32 (D 12)
Cinnamon 肉桂	1.6 (D15)	113.46 (D15)	0.19 (D15)	2.24 (D3)	8.98 (D 15)	10.49 (D15)	-0.12 (D9)

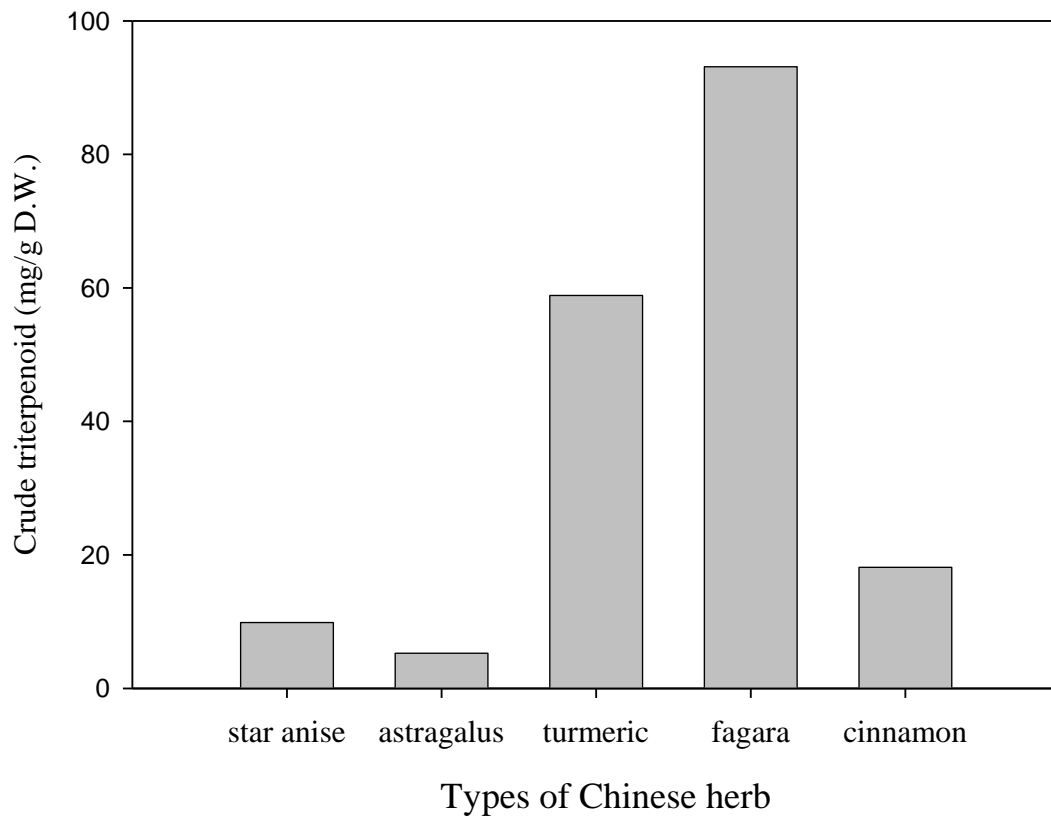


圖 4-13 五種中草藥Crude triterpenoid含量比較

取中草藥各100mg，其餘依照胞內粗三萜含量測定法，量測各中草藥的三萜含量

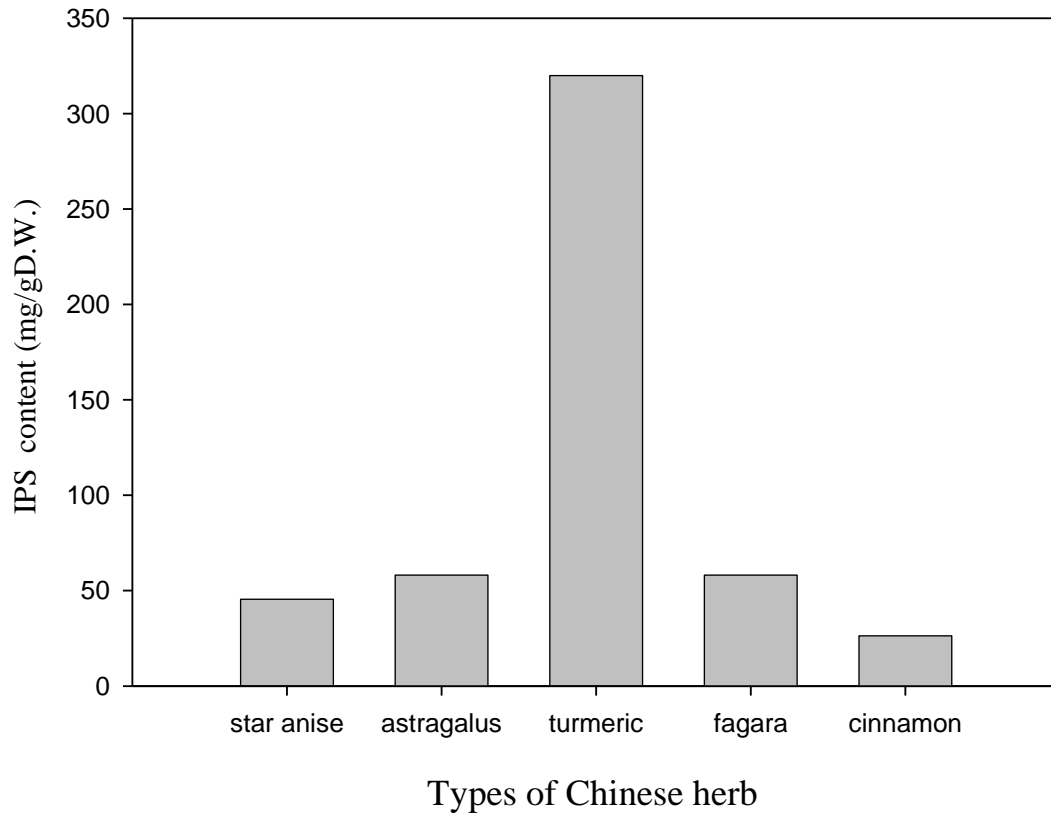


圖 4-14 五種中藥IPS 含量比較

取中草藥各 100mg，進行胞內多醣萃取，再以酚-硫酸法測定各中草藥多醣含量

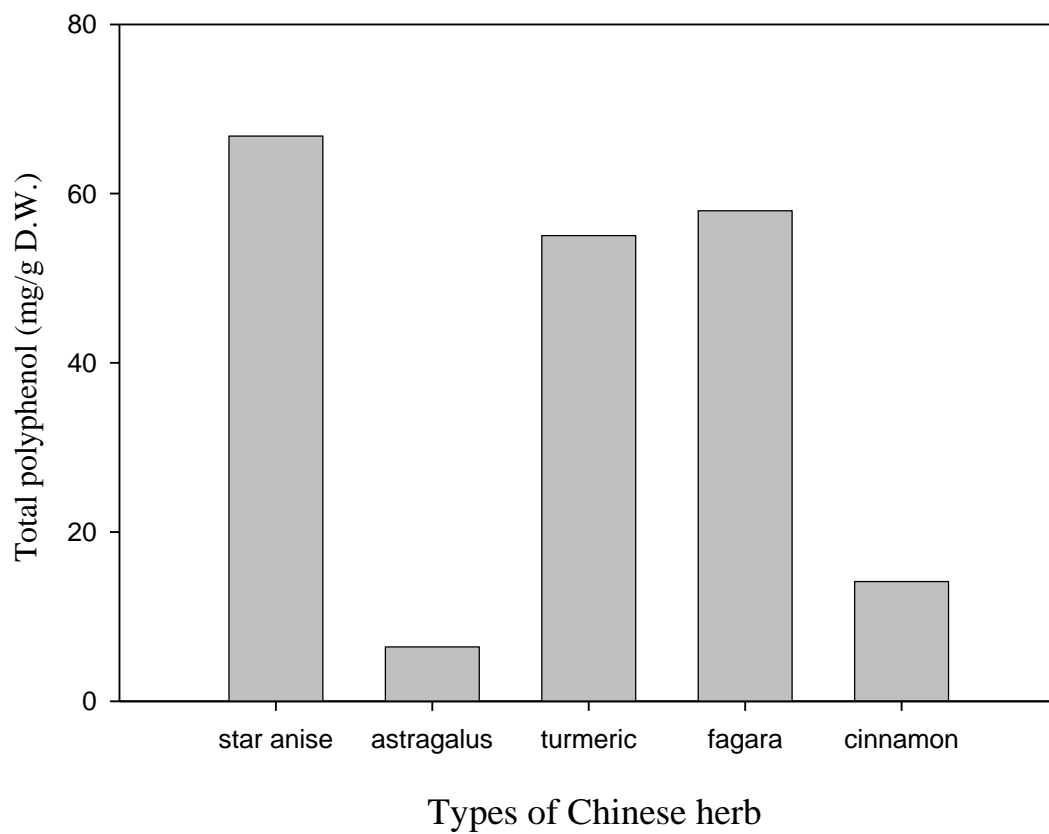


圖 4-15 五種中藥 Total polyphenol 含量比較

取1g的中草藥，加入10ml的甲醇，製成甲醇萃取液，之後依造總多酚含量測定法

測量中草藥之總多酚含量

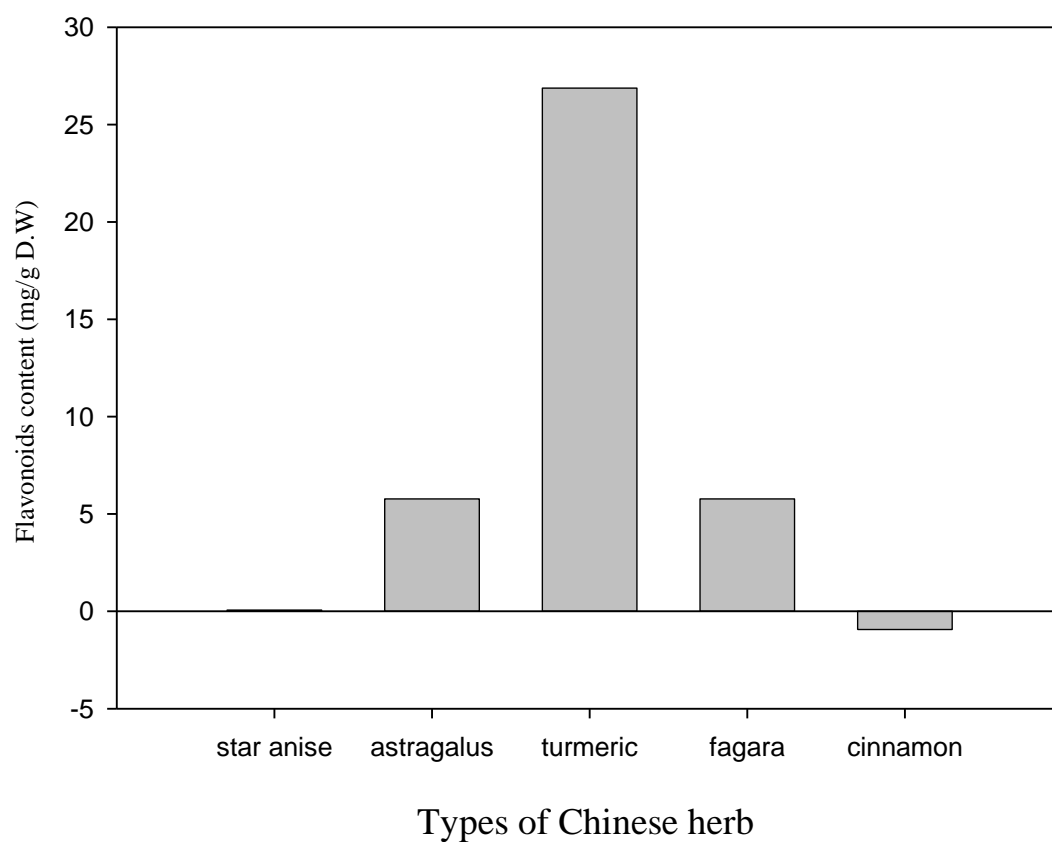


圖 4-16 五種中草藥Flavonoids contents比較

取1g的中草藥，加入10ml的甲醇，製成甲醇萃取液，之後依造類黃酮含量測定法

測量中草藥之類黃酮含量

4-2 添加中草藥濃縮液於最適天數做添加量變化

4-2-1 添加花椒濃縮液之添加量影響

由圖 4-10 結果，添加花椒濃縮液於第 12 天時，菌絲濃度、胞內外多醣、總多酚、類黃酮皆有很好的效果。故選用花椒濃縮液當添加劑，分別在靈芝基礎培養基中加入不同濃度的水萃液，以未添加任何水萃液為對照組，其他則以添加 1 ml、2 ml、4 ml、8 ml、10 ml 的水萃液為實驗組，搖瓶總體積為 100 ml，而此實驗的目的在探討添加量不同則對靈芝生長、生理活性之影響。

由圖 4-18 顯示，添加的含量越多則菌體重量以及生理活性並未達到最好的效果；添加 4ml 花椒濃縮液之菌體重量為最高，添加 8 ml 及添加 10 ml 花椒濃縮液之葡萄糖幾乎沒有消耗，故菌體重量相對較低，從圖 4-17 也可以明顯看出添加 8 ml 及添加 10 ml 幾乎沒有菌絲球的生成；由圖 4-19 結果顯示，胞外多醣含量以添加 2 ml 花椒濃縮液為最高，達到 1.85 g/L，隨著濃縮液濃度的上升，胞外多醣含量逐漸下降。

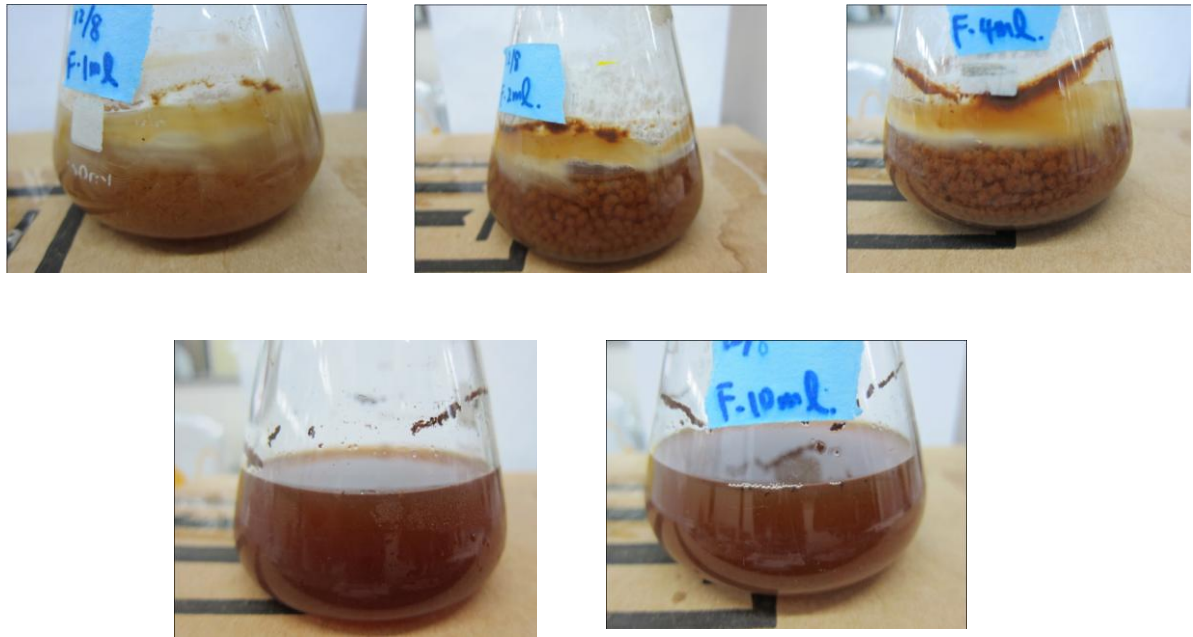


圖 4-17 添加花椒濃縮液1 ml、2 ml、4 ml、8 ml、10 ml，第12天取樣，菌量生

長變化

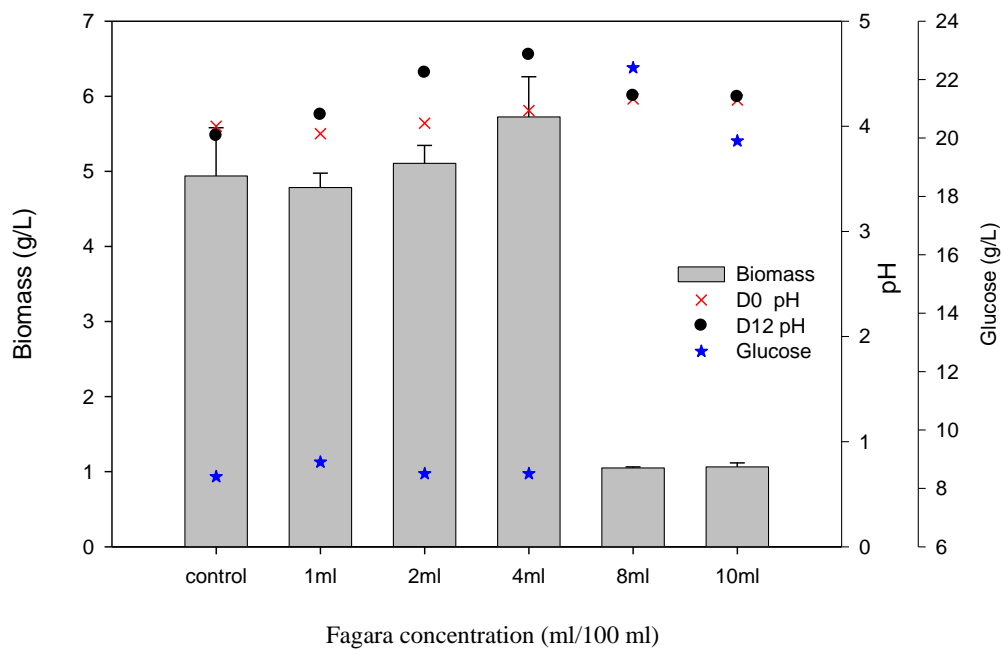


圖 4-18 不同濃度花椒濃縮液添加對靈芝菌絲體菌重之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 12 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 1、2、4、8、10 ml 花椒濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

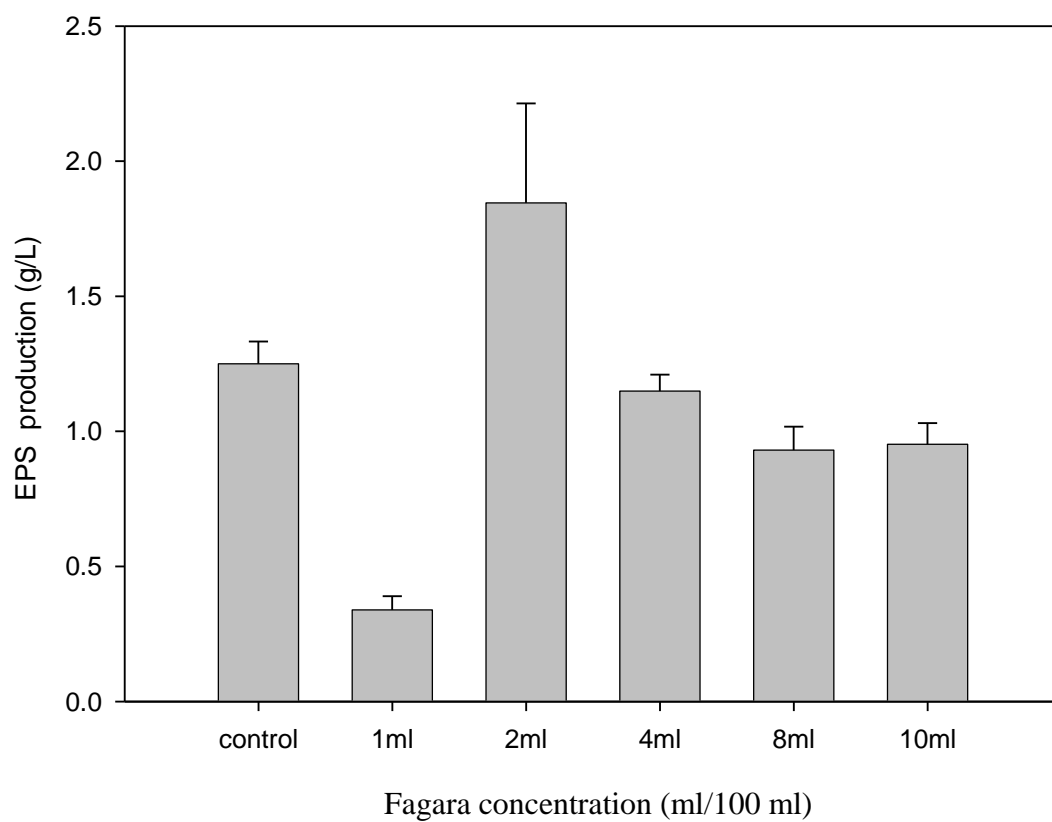


圖 4-19 不同濃度花椒濃縮液添加對靈芝菌絲體胞外多醣生成之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 12 天之發酵液)

培養條件：基礎培養基 + 1、2、4、8、10 ml 花椒濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

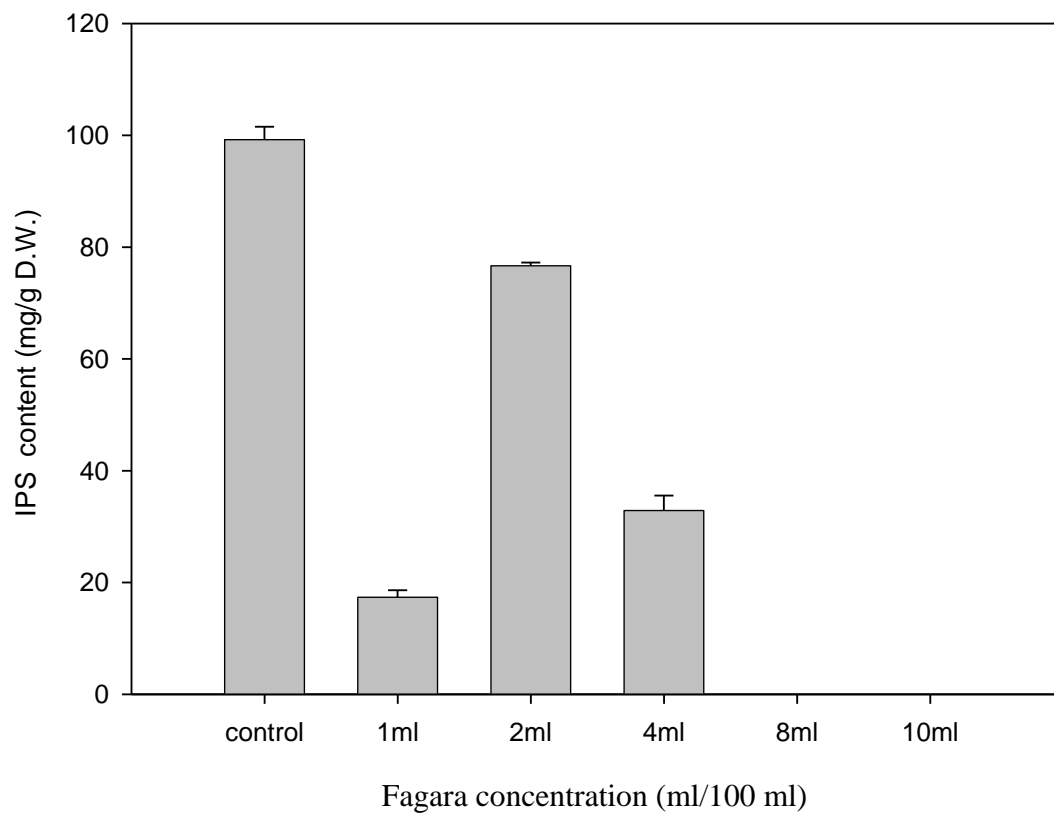


圖 4-20 不同濃度花椒濃縮液添加對靈芝菌絲體胞內多醣生成之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 12 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 1、2、4、8、10 ml 花椒濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

由圖 4-20 結果,胞內多醣含量也是以添加 2ml 花椒濃縮液為最高,達到 76.67 mg/g D.W., 添加 8 ml 及 10 ml 花椒濃縮液由於菌體幾乎沒有生長,所以無法測胞內多醣含量。推測因為添加的水萃液含量相對較高,則造成發酵液殘有大量的多醣類物質,且葡萄糖殘量也約隨添加量增加而上升。在圖 4-21 中,添加 1 ml、2 ml、4 ml 的花椒濃縮液靈芝酸含量逐漸上升,以添加 4ml 花椒濃縮液之靈芝酸含量為最高,達到 16.94 mg/g D.W., 而添加 8 ml、10 ml 花椒濃縮液的部分,因為產生抑制效果,沒有菌絲的生成。總多酚的方面,由圖 4-21 顯示,添加 1 ml、2 ml、4 ml 的花椒濃縮液總多酚含量逐漸上升,添加 4 ml 花椒濃縮液之總多酚含量為最高,達到 18.62 mg/g D.W., 類黃酮的部份,圖 4-22 顯示,添加 2 ml 的花椒濃縮液含量達到最高,達到 0.45 mg/g D.W., 添加 4 ml 花椒濃縮液的類黃酮含量又降至 0.37 mg/g D.W.。

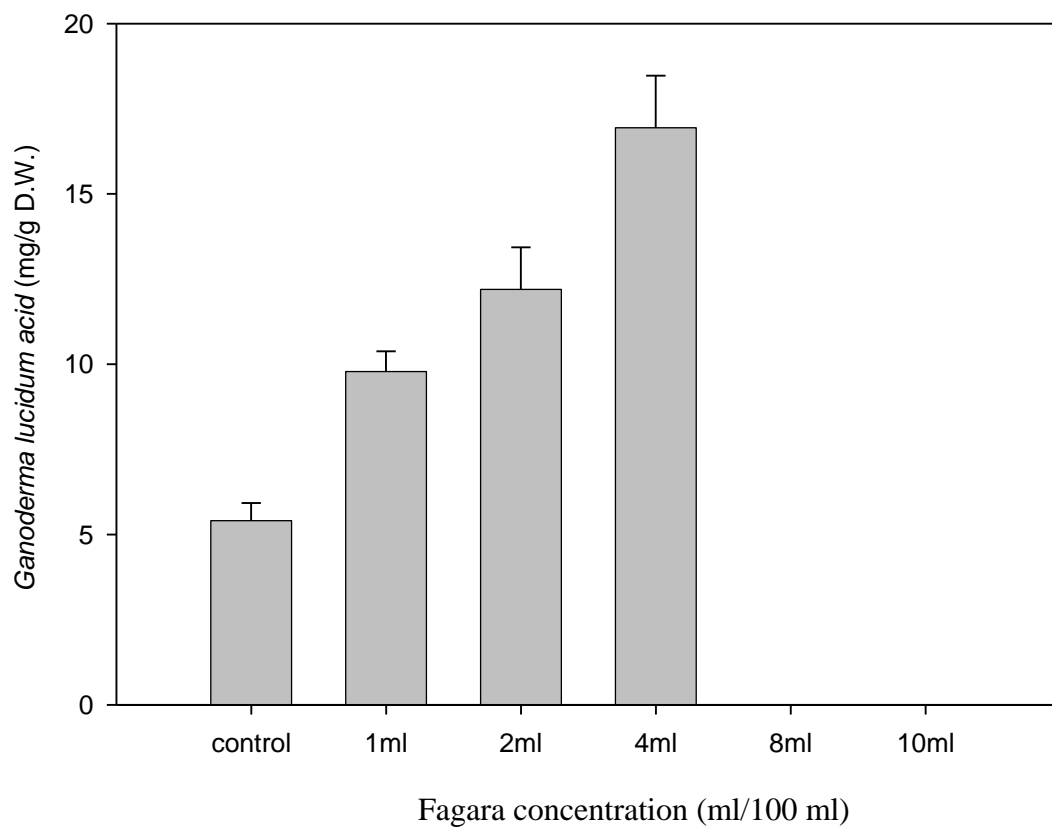


圖 4-21 不同濃度花椒濃縮液添加對靈芝菌絲體靈芝酸生成之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 12 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 1、2、4、8、10 ml 花椒濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

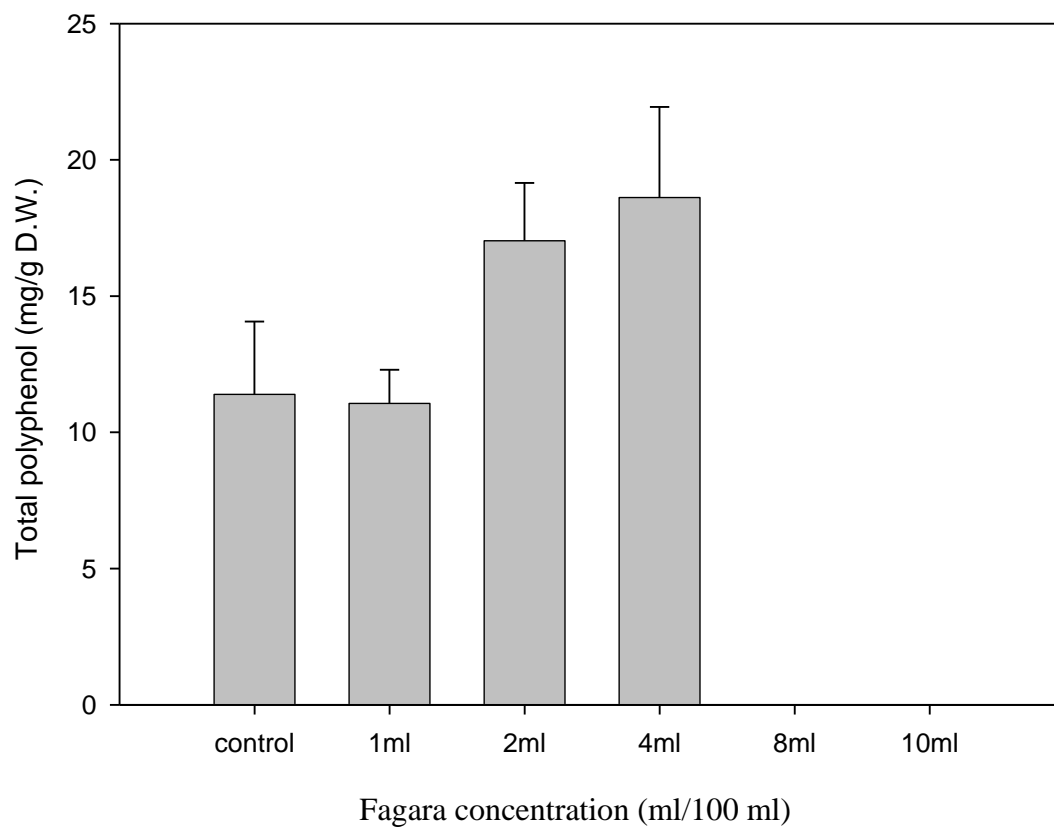


圖 4-22 不同濃度花椒濃縮液添加對靈芝菌絲體總多酚生成之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 12 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 1、2、4、8、10 ml 花椒濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

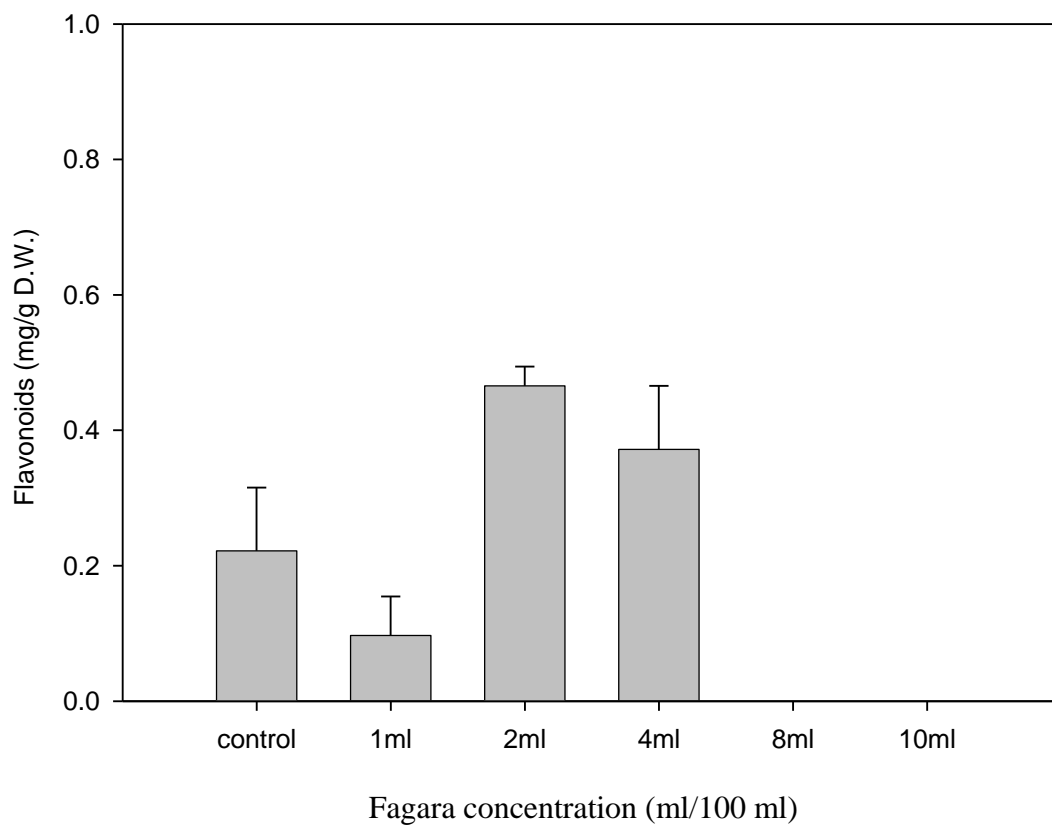


圖 4-23 不同濃度花椒濃縮液添加對靈芝菌絲體類黃酮生成之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 12 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 1、2、4、8、10 ml 花椒濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

4-2-2 添加薑黃濃縮液之添加量影響

由圖 4-8 結果，添加薑黃濃縮液於第 12 天時，菌絲濃度、胞外多醣、靈芝酸、類黃酮皆有很好的效果。故選用薑黃濃縮液當添加劑，分別在靈芝基礎培養基中加入不同濃度的水萃液，以未添加任何水萃液為對照組，其他則以添加 1 ml、2 ml、4 ml、8 ml、10 ml 的水萃液為實驗組，搖瓶總體積為 100 ml，而此實驗的目的在探討添加量不同則對靈芝生長、生理活性之影響。

由圖 4-25 顯示，添加的含量越多則菌體重量以及生理活性並未達到最好的效果；添加 1 ml 薑黃濃縮液之菌體重量為最高，添加 8 ml 及添加 10 ml 薑黃濃縮液之葡萄糖幾乎沒有消耗，故菌體重量相對較低，由圖 4-24 也可以明顯觀察到，添加 8 ml 及添加 10 ml 薑黃濃縮液根本沒有長出菌絲球，此結果與花椒相似；由圖 4-28 結果顯示，胞外多醣含量隨著濃度上升，以添加 8 ml 薑黃濃縮液為最高，達到 3.02 g/L，隨著濃縮液濃度上升到 10 ml，胞外多醣含量又下降至 1.67 g/L。

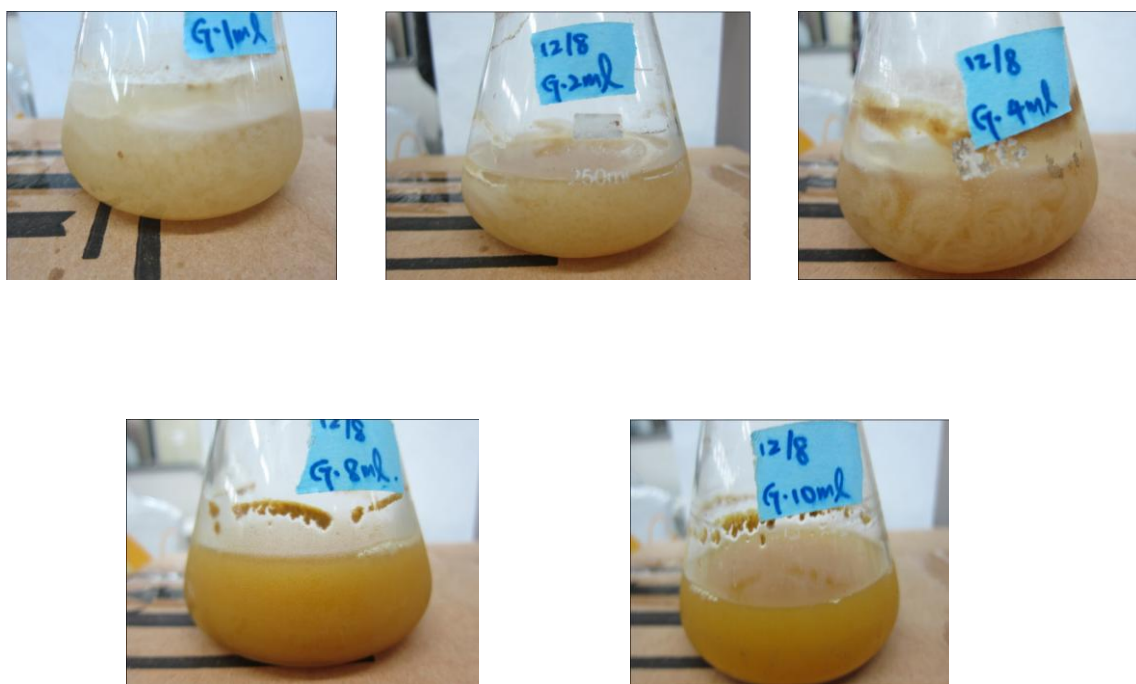


圖 4-24 添加薑黃濃縮液1 ml、2 ml、4 ml、8 ml、10 ml，第12天取樣，菌量生

長變化

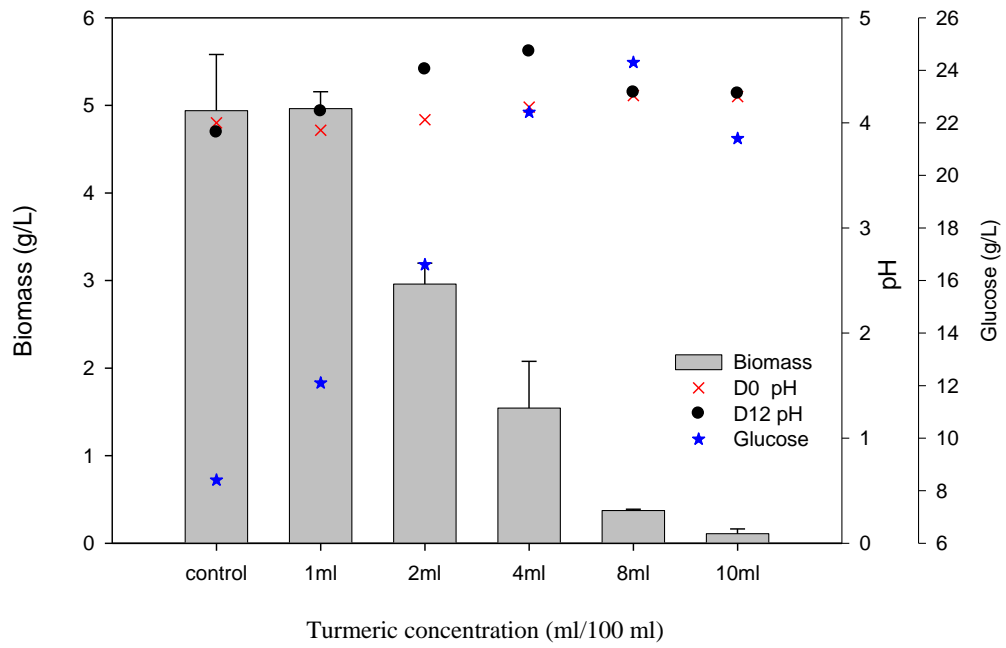


圖 4-25 不同濃度薑黃濃縮液添加對靈芝菌絲體菌重之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 12 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 1、2、4、8、10 ml 薑黃濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

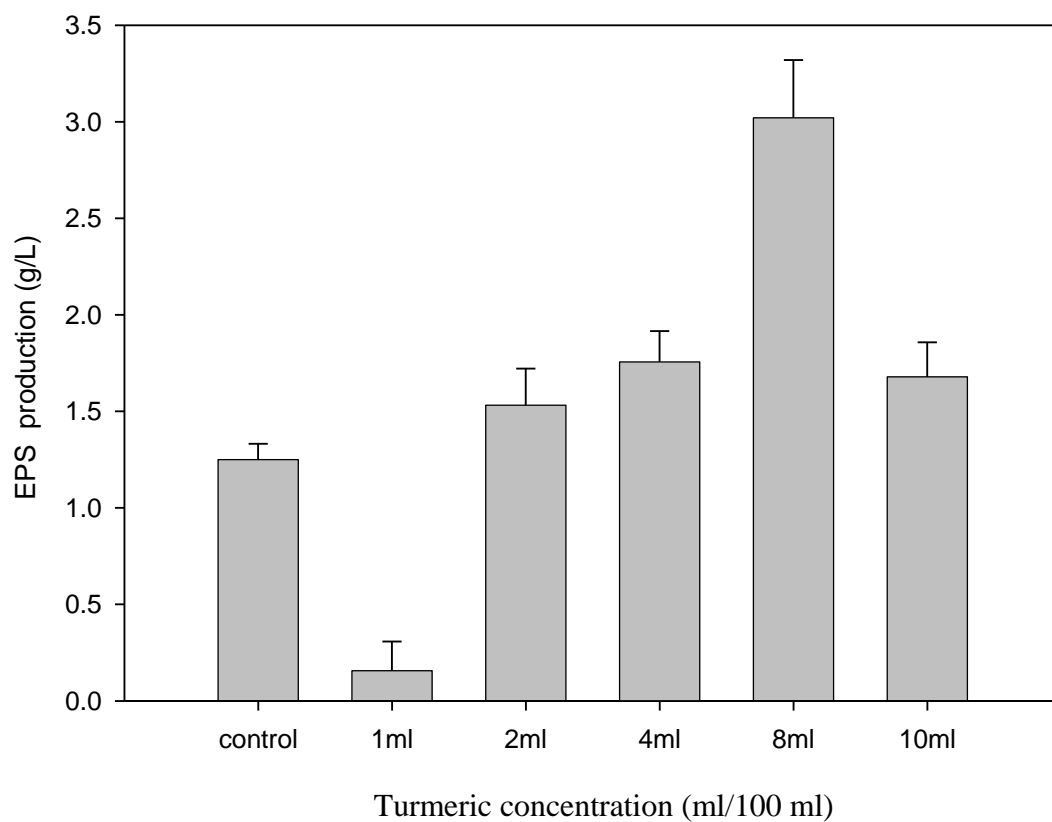


圖 4-26 不同濃度薑黃濃縮液添加對靈芝菌絲體胞外多醣生成之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 12 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 1、2、4、8、10 ml 薑黃濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

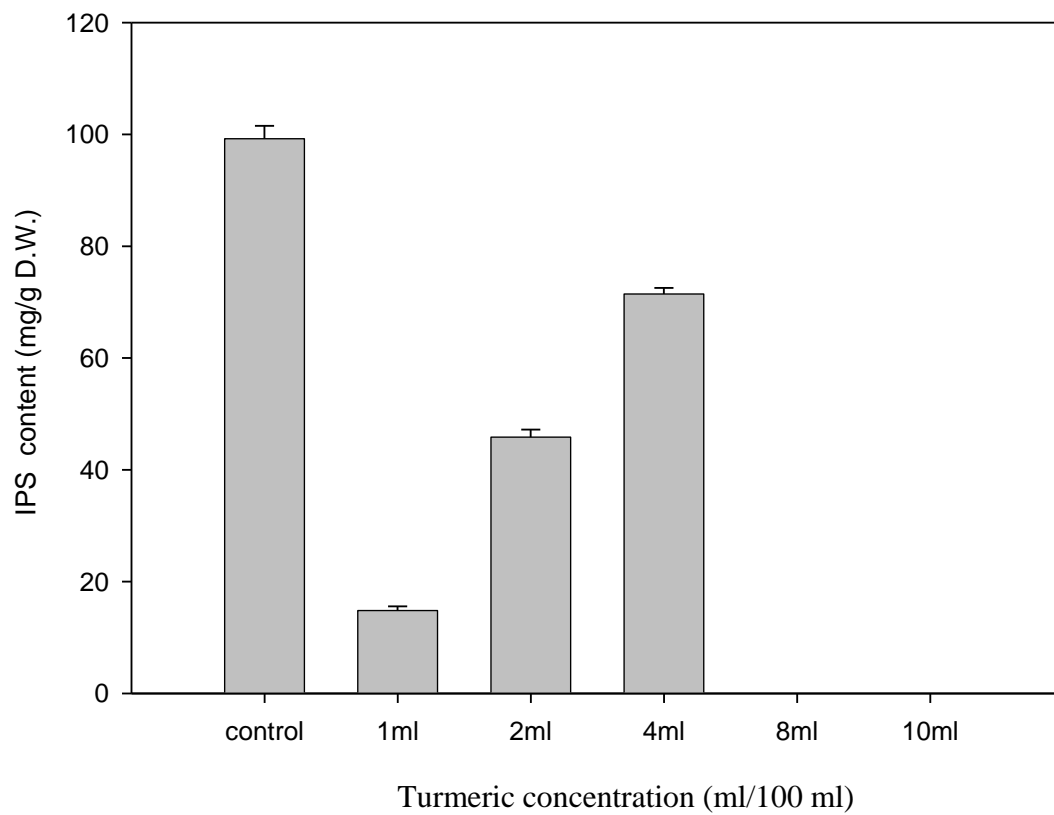


圖 4-27 不同濃度薑黃濃縮液添加對靈芝菌絲體胞內多醣生成之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 12 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 1、2、4、8、10 ml 薑黃濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

由圖 4-27 結果，胞內多醣含量隨濃度上升而增加，以添加 4 ml 薑黃濃縮液為最高，達到 71.44 mg/g D.W.，添加 8 ml 及 10 ml 薑黃濃縮液由於菌體幾乎沒有生長，所以無法測胞內多醣含量，推測因為添加的水萃液含量相對較高，則造成發酵液殘有大量的多醣類物質，且葡萄糖殘量也約略隨添加量增加而上升。在圖 4-28 中，添加 1 ml、2 ml 的薑黃濃縮液靈芝酸含量逐漸上升，添加 2 ml 薑黃濃縮液之靈芝酸含量達最高，達到 14.85 mg/g D.W.，添加 4 ml 薑黃濃縮液之靈芝酸含量又降至 4.62 mg/g D.W.，而添加 8 ml、10 ml 薑黃濃縮液的部分，因為產生抑制效果，沒有菌絲的生成。總多酚的方面，由圖 4-29 顯示，添加 1 ml、2 ml 的薑黃濃縮液總多酚含量逐漸上升，添加 2 ml 薑黃濃縮液之總多酚含量為最高，達到 37.06 mg/g D.W.，添加 4 ml 薑黃濃縮液之總多酚含量又降至 25.28 mg/g D.W.，類黃酮的部份，圖 4-30 顯示，添加 1 ml、2 ml、4 ml 的薑黃濃縮液類黃酮含量逐漸上升，而添加 4 ml 薑黃濃縮液之類黃酮含量達到最高，達到 0.91 mg/g D.W.。

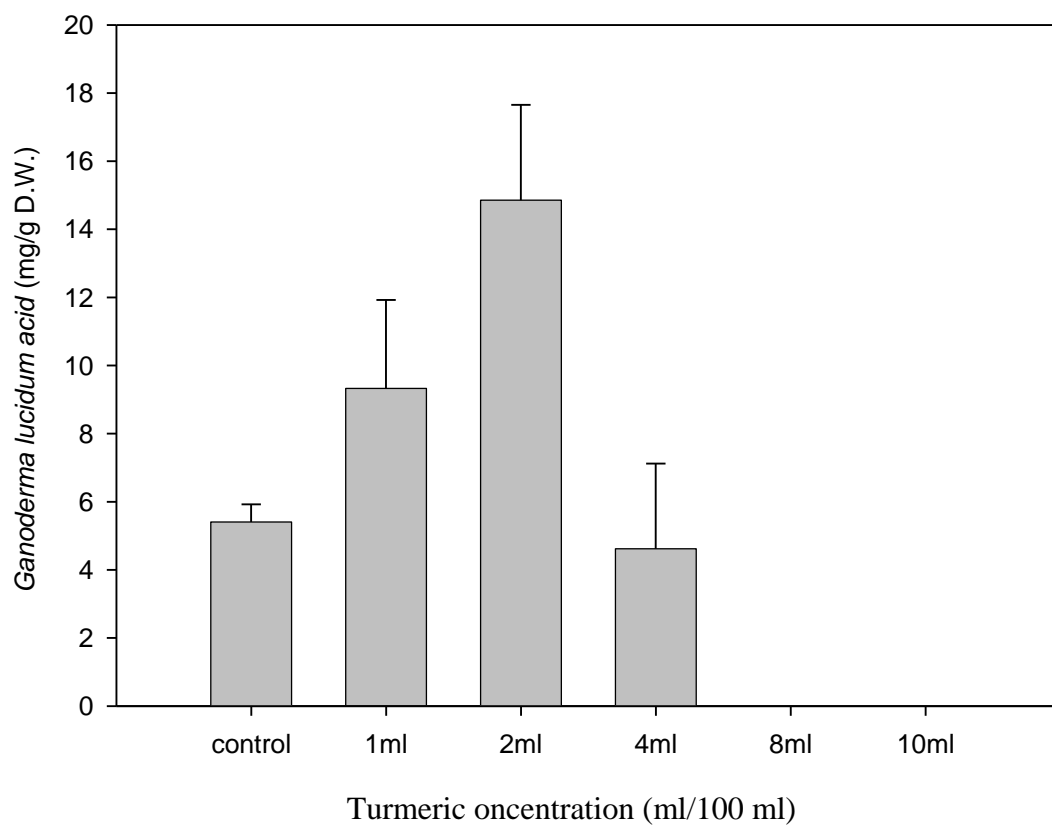


圖 4-28 不同濃度薑黃濃縮液添加對靈芝菌絲體靈芝酸生成之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 12 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 1、2、4、8、10 ml 薑黃濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

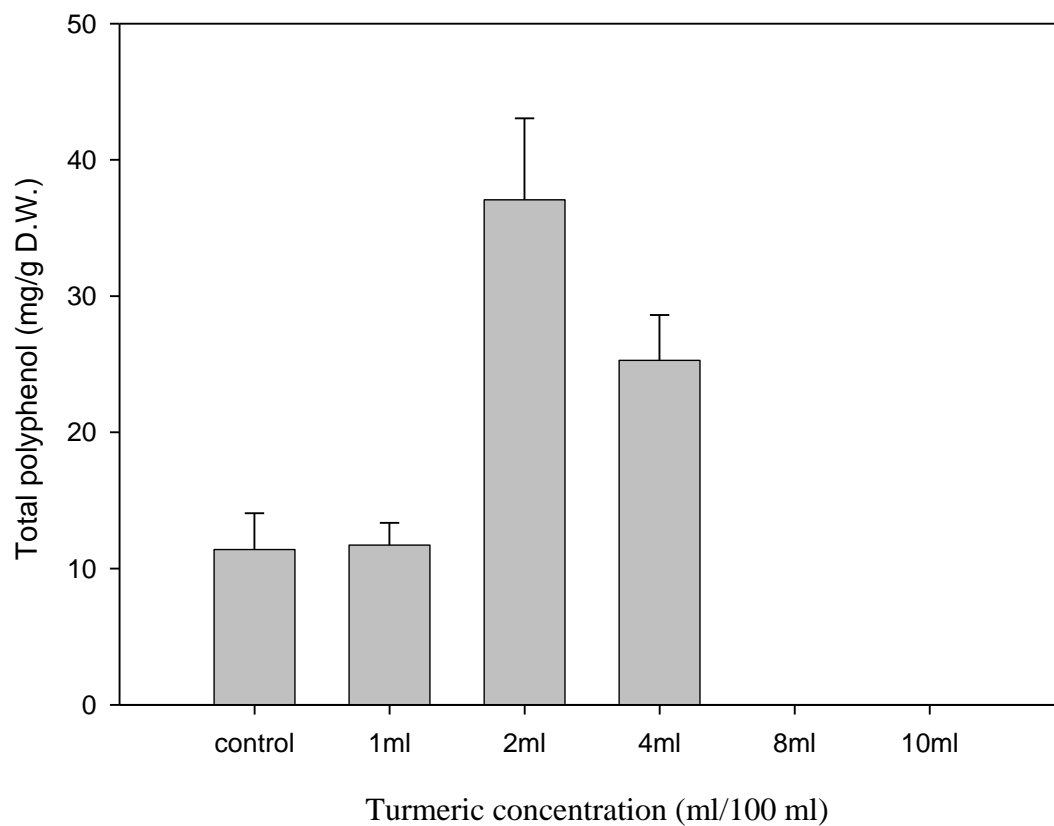


圖 4-29 不同濃度薑黃濃縮液添加對靈芝菌絲體總多酚生成之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 12 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 1、2、4、8、10 ml 薑黃濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

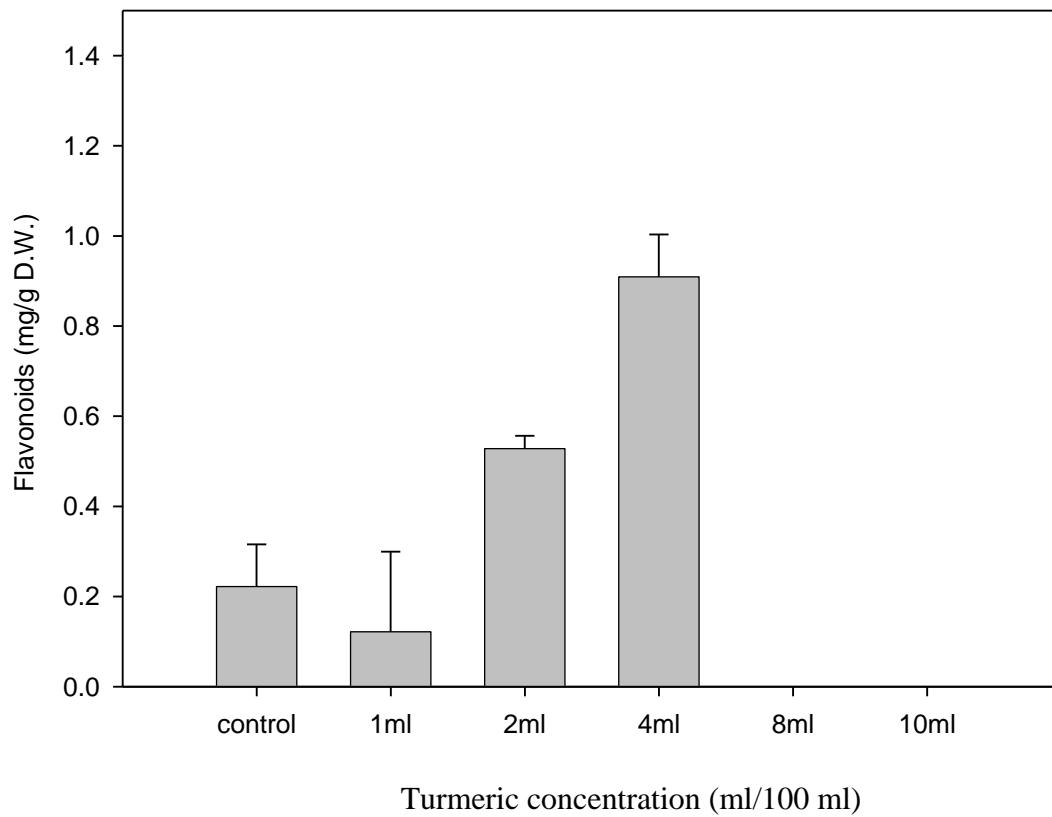


圖 4-30 不同濃度薑黃濃縮液添加對靈芝菌絲體類黃酮生成之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 12 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 1、2、4、8、10 ml 薑黃濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

4-3 添加時間變化對靈芝生理活性成份之影響

由圖 4-11 可以發現，添加肉桂濃縮液的靈芝菌絲體在前 6 天都沒有生長，一直到了第 9 天開始才開始生長，主要是想探討如果先讓菌絲生長到一定程度，再加入誘導劑，是否會提高靈芝酸及多醣的產量。

由圖 4-31 顯示，靈芝在第 3 天添加 2 ml 肉桂濃縮液，菌體重量在第 15 天達到最大值，達到 7.84 g/L，第 6 天、9 天、12 天添加 2 ml 肉桂濃縮液之菌體重量則逐漸降低，此結果與第 0 天就添加肉桂濃縮液，菌絲重量有顯著的提升。胞外多醣產量則以第 12 天添加肉桂濃縮液，在第 15 天取樣為最高，達到 0.97 g/L，但仍略低於控制組，推測肉桂仍會抑制靈芝菌絲的生長，因為葡萄糖的殘量仍很高，菌絲都沒消耗到葡萄糖。

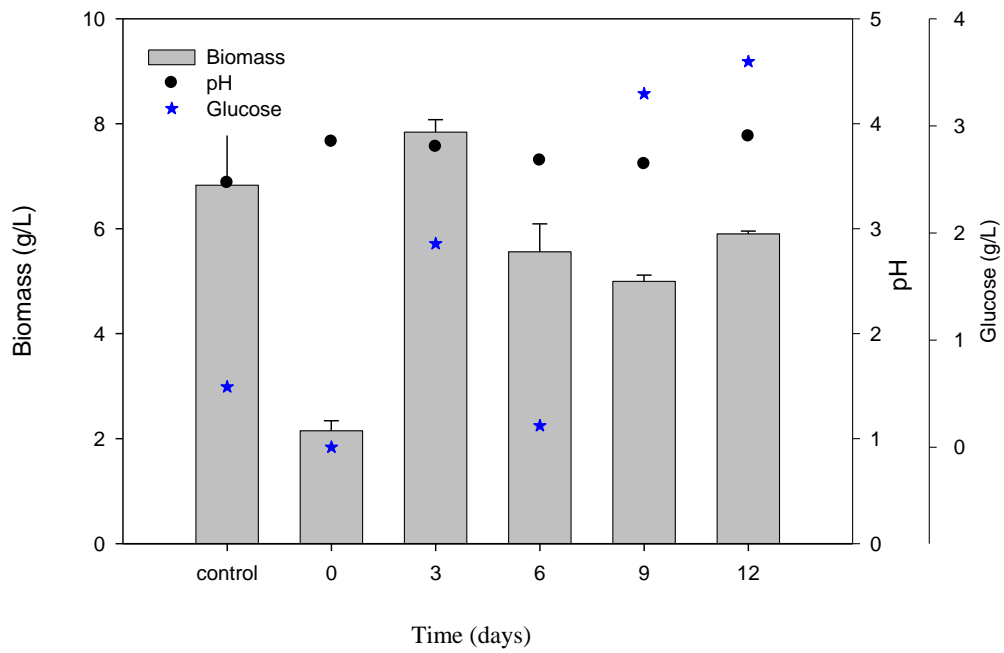


圖 4-31 不同時間添加肉桂濃縮液對靈芝菌絲體菌重之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 15 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 肉桂濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

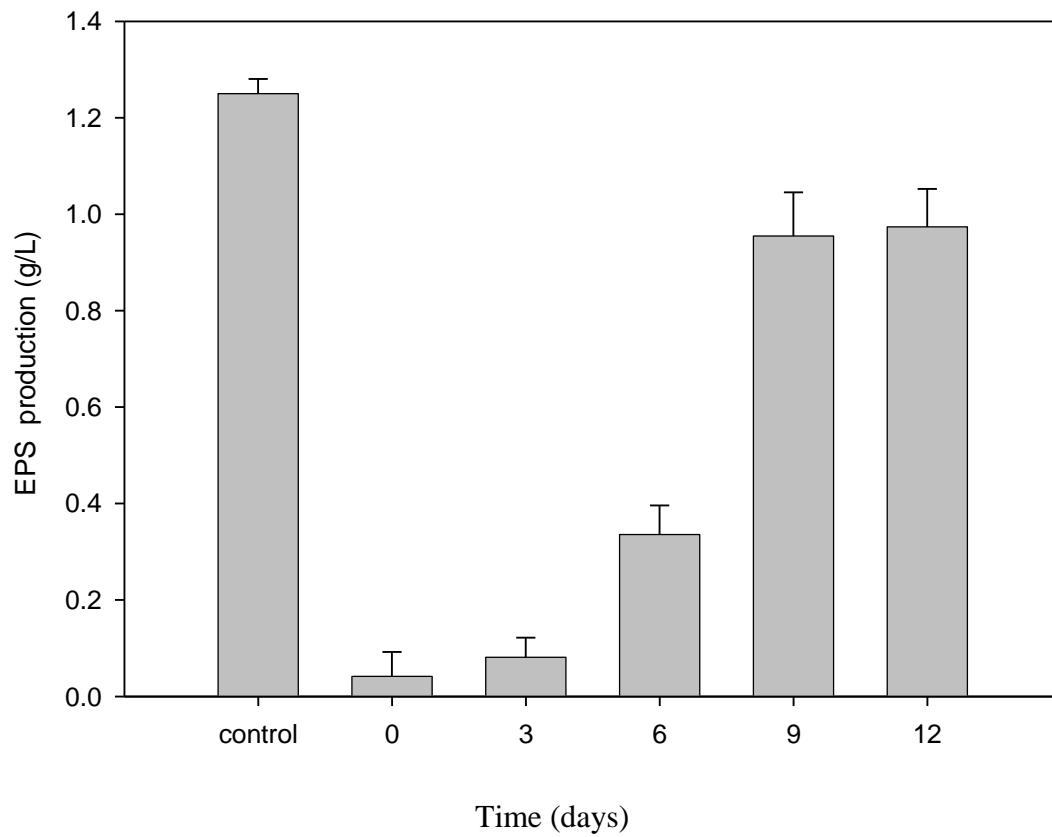


圖 4-32 不同時間添加肉桂濃縮液對胞外多醣之影響

(發酵液取自培養第 15 天之發酵液)

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 肉桂濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

由圖 4-33 顯示，胞內多醣含量方面，第 0 天添加肉桂濃縮液到第 3 天添加肉桂濃縮液呈現上升的趨勢，第 3 天添加達到最高值 164.85 mg/g D.W.，第 6 天、第 9 天、第 12 天添加又逐漸下降；靈芝酸含量方面，由圖 4-30 顯示，第 3 天添加至第 12 天添加為逐漸上升，第 12 天達到最高為 9.53 mg/g D.W.；總多酚方面，由圖 4-35 顯示，第 0 天添加逐漸上升至第 9 天添加，第 9 天添加達到最高，為 27.06 mg/g D.W.，第 12 天添加又下降至 10.62 mg/g D.W.；類黃酮方面，由圖 4-36 顯示，逐漸上升至第 6 天添加達到最高，類黃酮含量為 0.41 mg/g D.W.。

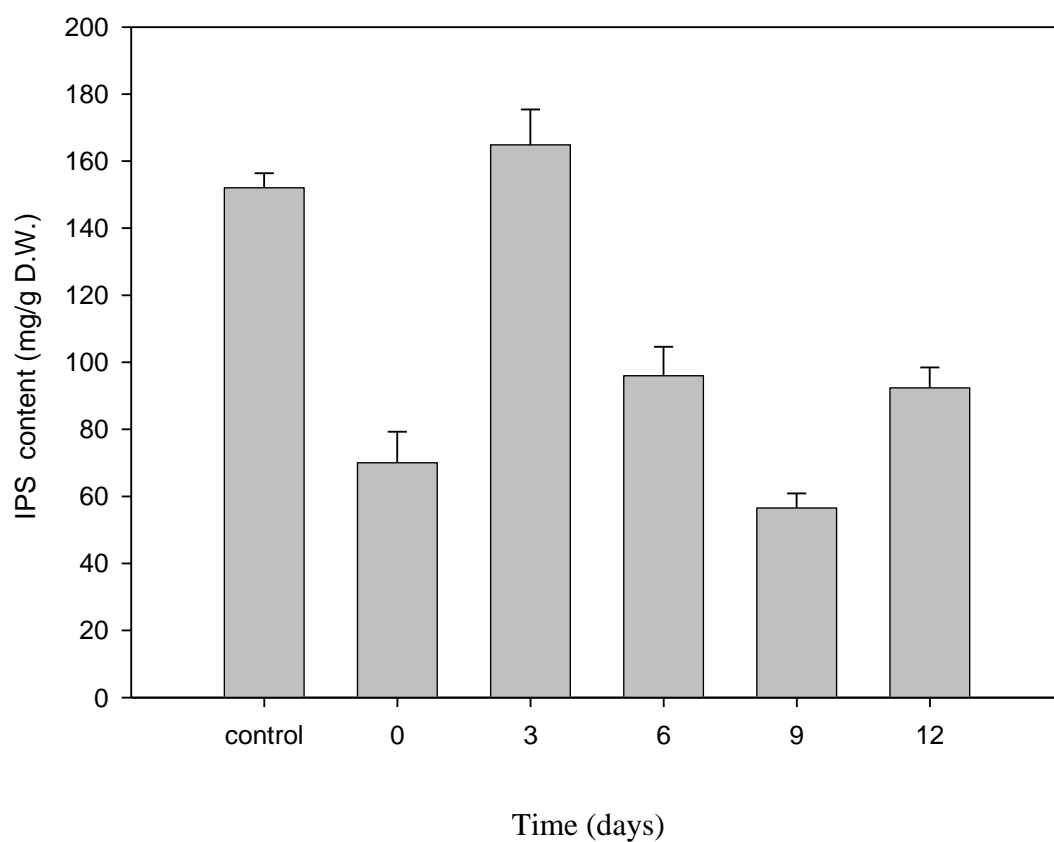


圖 4-33 不同時間添加肉桂濃縮液對靈芝菌絲體胞內多醣之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 15 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 肉桂濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

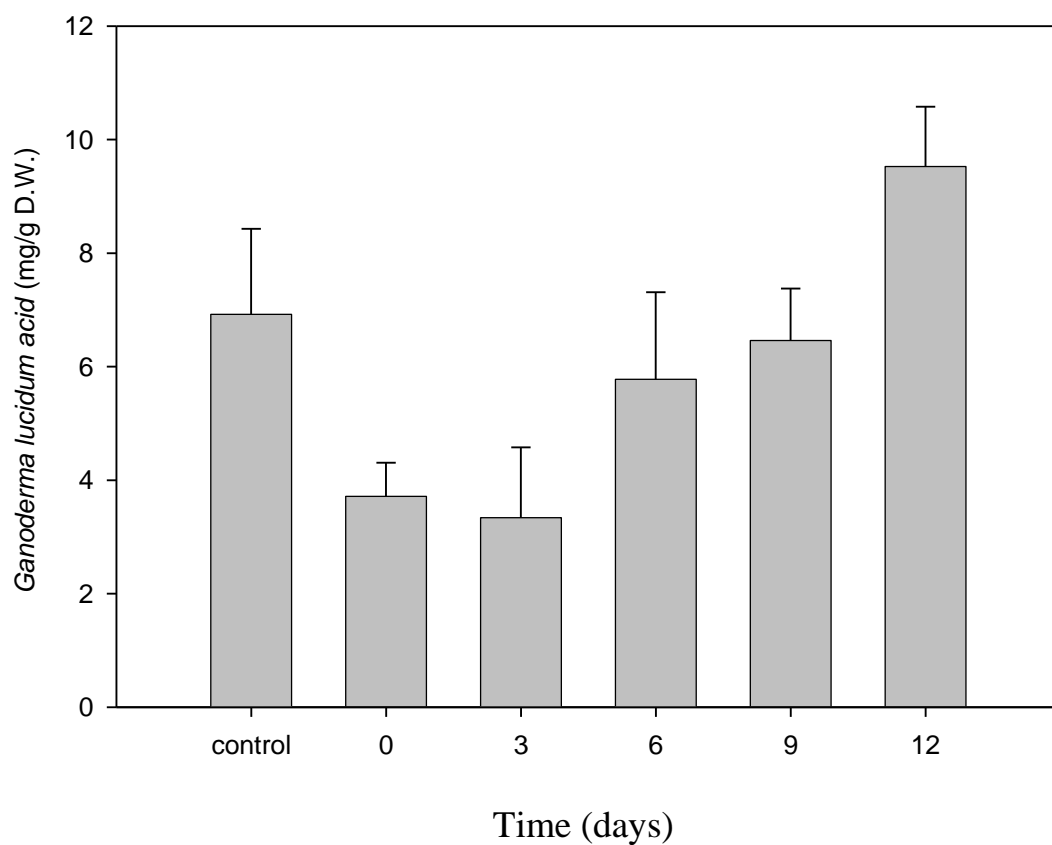


圖 4-34 不同時間添加肉桂濃縮液對靈芝菌絲體靈芝酸生成之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 15 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 肉桂濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

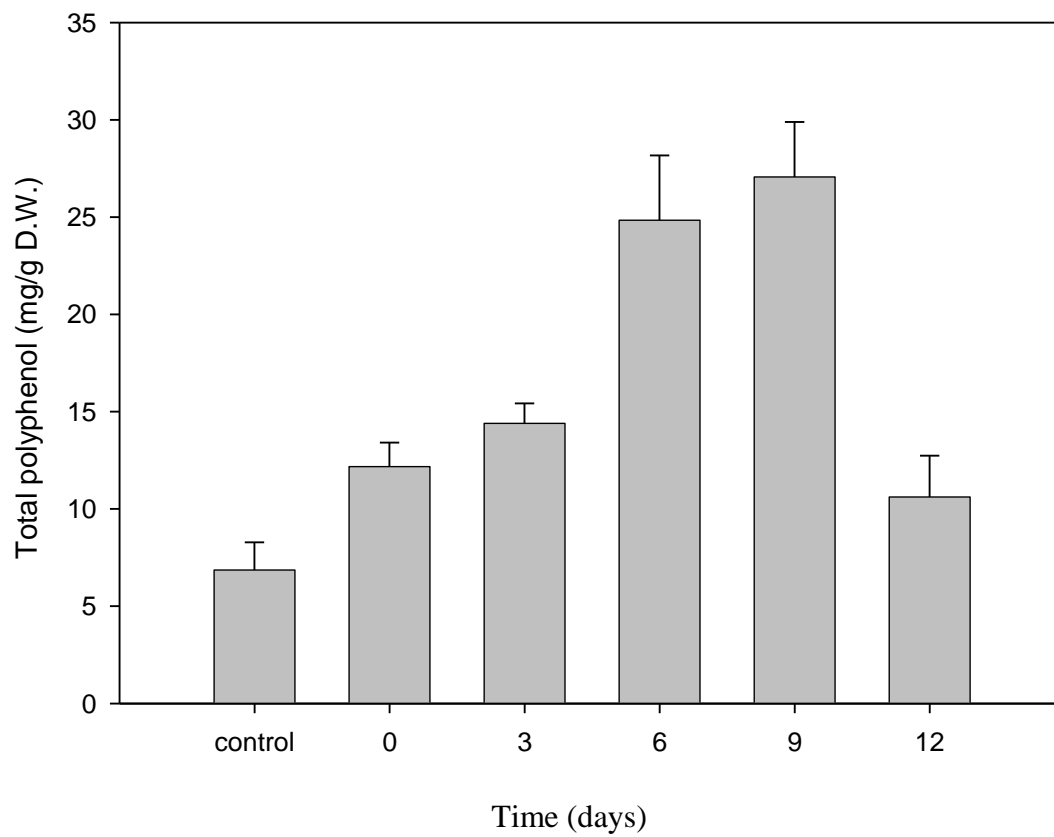


圖 4-35 不同時間添加肉桂濃縮液對靈芝菌絲體總多酚生成之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 15 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 肉桂濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

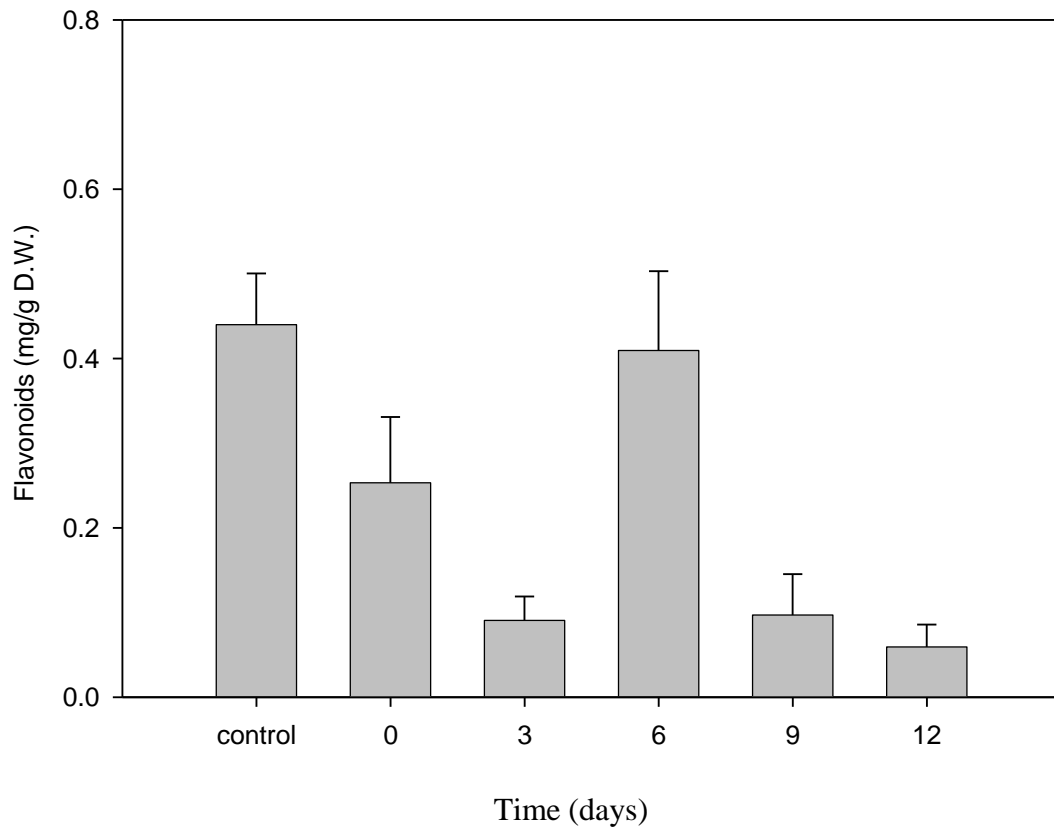


圖 4-36 不同時間添加肉桂濃縮液對靈芝菌絲體類黃酮生成之影響

(靈芝菌絲體取自培養第 15 天之菌絲體)

培養條件：基礎培養基 + 2 ml 肉桂濃縮液

接種量 5% (v/v) 溫度 30°C

❖ 4-4 HPLC 和 GC 分析

三萜類化合物為靈芝最重要成分之一，其醫療效用已被證實。為了要確認添加花椒培養之靈芝菌絲體與野生靈芝子實體、市售之靈芝相關保健食品成分是否有相同之處，我們與文獻中之圖譜比較，比較大概的滯留時間中是否有 peak 的出現，圖 4-37 中，大約在 22 分鐘的這支 peak，對照文獻的資料，猜測有可能是 ganoderic acid (C) 3，由於我們無法確認成分為何，只能粗略地從圖譜中 peak 的出現與滯留時間中圖譜面積的增減來推測，添加花椒培養之靈芝菌絲體與市售之靈芝保健食品含有類似的成分組成。

偵測波長：252 nm

移動相：acetonitrile：2% acetic acid = 1：4 (A) and 1：2 (B)

梯度：0 to 5 min，A：100%； 20 to 40 min， A：30%；40 to 80 min，B：100%

流速：0.8 mL/min

總分析時間：80 min

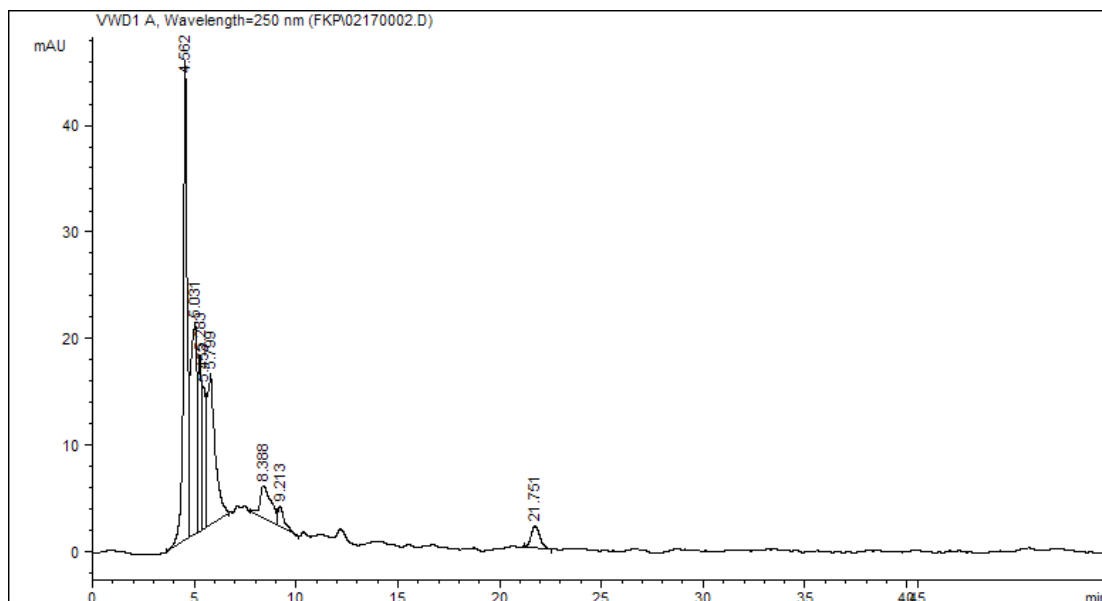


圖 4-37 添加花椒濃縮液第12天取樣之三萜類化合物HPLC圖譜

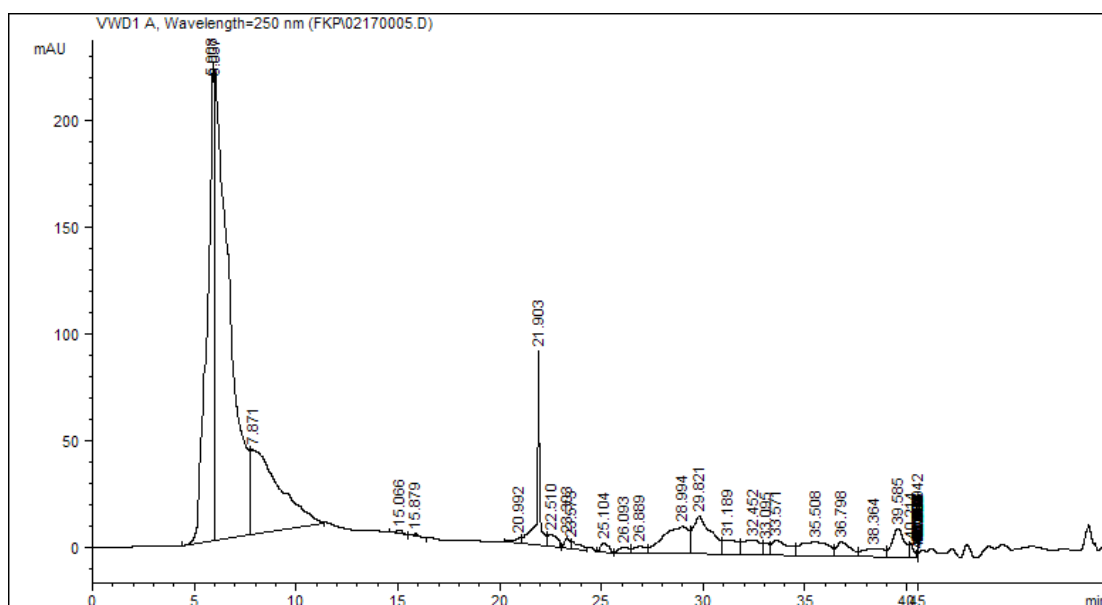


圖 4-38 市售之葡萄王靈芝王之三萜類化合物HPLC圖譜

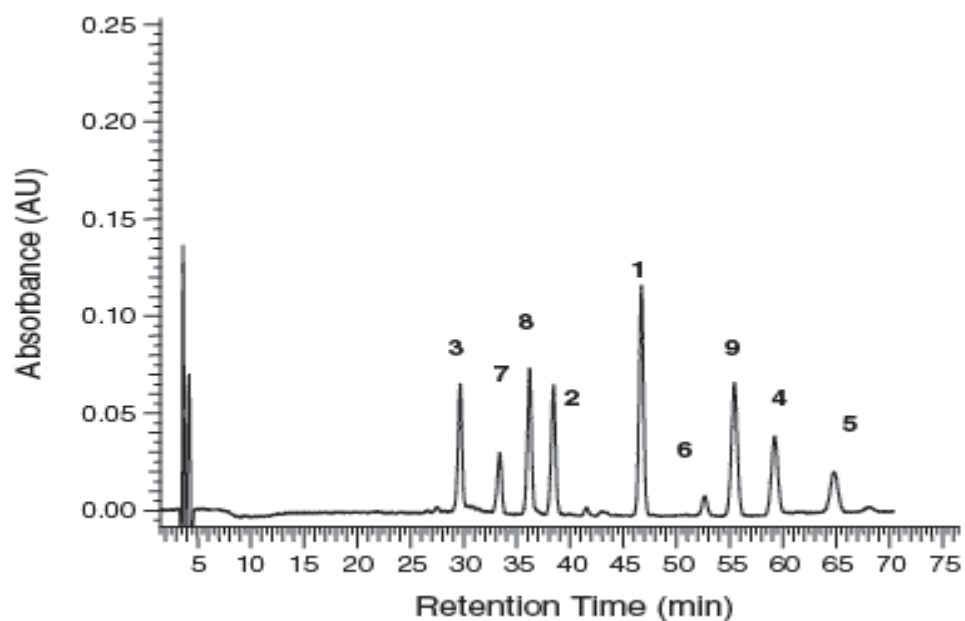


圖 4- 39 Reverse-phase HPLC chromatogram of ganoderic acid A(1) , B(2) , C(3) ,
D(4) , E(5) , C5(6) , C6(7) , G(8) , D(9) (Chen et al., 2002)

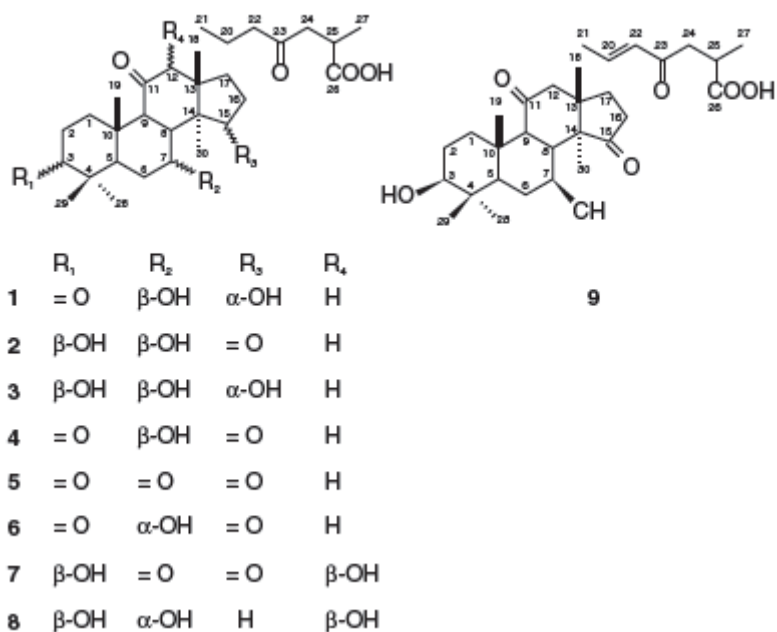


圖 4- 40 Structures of nine ganoderic acids 1~9 from *Ganderma tsugae*

(Chen et al., 2002)

由於想確認我們所添加的添加劑，在添加前後對靈芝培養液的變化，是否會因為添加劑的關係，改變培養液的成分，也間接確認添加劑是否有進入到發酵液裡面，故作了 GC 的測試。毛細管柱為 SEG BP20(25 m×0.22 mm×0.25 μm)，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；運送氣體為氮氣，流量為 1.5 ml/min。注射體積為 0.2 μL。

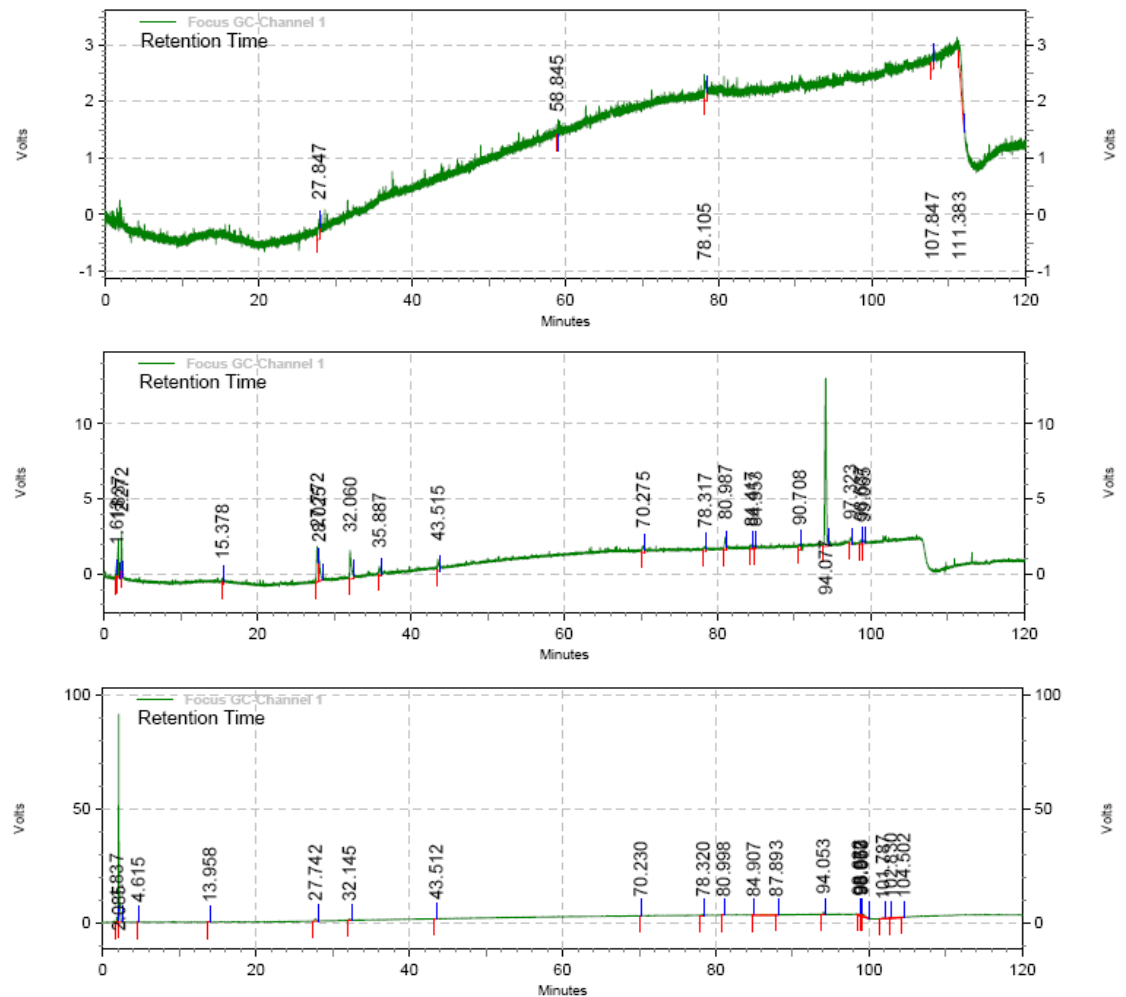


圖4-41 濃縮液、與培養液培養前後成分之變化

(a) 花椒濃縮液之 GC 圖譜 (b) 第 0 天培養基添加花椒濃縮液滅菌完之圖譜

(c) 培養基添加花椒濃縮液第 12 天取樣之發酵液圖譜

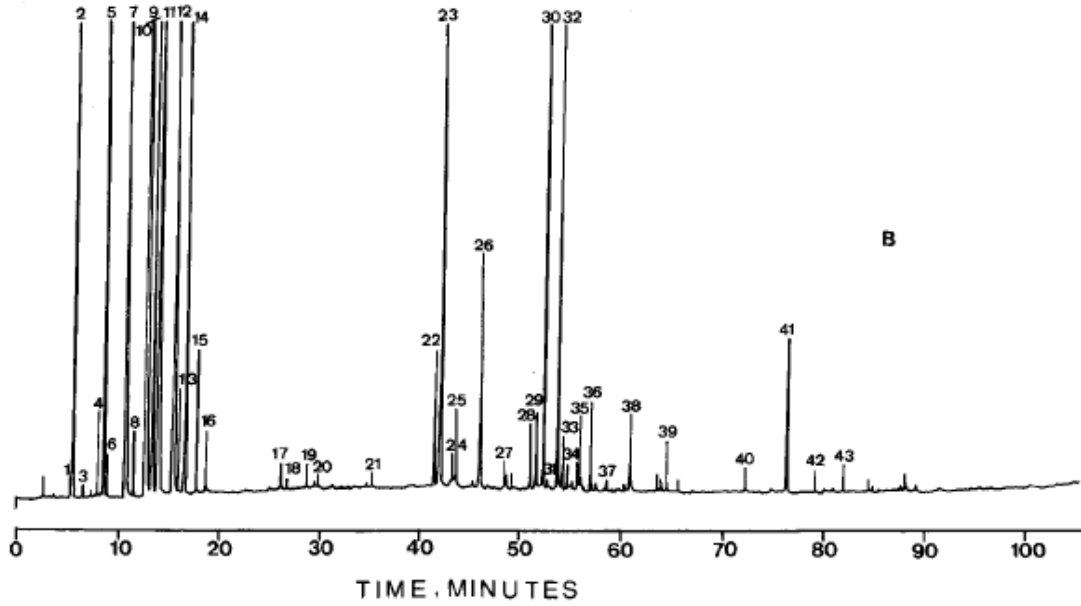


圖 4- 42 Capillary gas chromatograms of the volatile components from the fruits of *Z.*

simulans using steam distillation extraction (Chyau et al.,1996)

表4-2 Constituents of the Steam-Distilled Oil and Liquid Carbon Dioxide Extract from the Fruits of *Z. simulans* (Chyau et al.,1996)

peak no. ^a	compound	Kovats index ^b	peak area ^c (%)		MW	CI ^d [M + H] ⁺	mode of identification ^e
			A	B			
1	isobutyl acetate	1012		0.03	116		GC, EI
2	α -pinene	1017	2.70	4.16	136	137	GC, EI, CI
3	camphene	1057	0.13	0.04	136	137	GC, EI, CI
4	β -pinene	1103	0.21	0.27	136	137	GC, EI, CI
5	sabinene	1114	1.71	1.60	136	137	GC, EI, CI
6	isoamyl acetate	1118		0.11	130		GC, EI
7	β -myrcene	1153	9.39	11.98	136	137	GC, EI, CI
8	α -terpinene	1167		0.23	136	137	GC, EI, CI
9	limonene	1192	18.66	18.61	136	137	GC, EI, CI
10	β -phellandrene	1201	5.75	6.87	136	137	GC, EI, CI
11	1,8-cineole	1210	10.50	14.23	154	155	GC, EI, CI
12	(<i>Z</i>)- β -ocimene	1228	12.74	15.42	136	137	GC, EI, CI
13	γ -terpinene	1234	0.08	0.37	136	137	GC, EI, CI
14	(<i>E</i>)- β -ocimene	1242	3.94	6.13	136	137	GC, EI, CI
15	<i>p</i> -cymene	1258	0.76	0.53	134	135	GC, EI, CI
16	terpinolene	1270	0.04	0.24	136	137	GC, EI, CI
17	(<i>Z</i>)-3-tridecen-1-yne	1363	0.03	0.11	178		GC, EI
18	heptyl acetate	1392	0.03	0.12	158	159	GC, EI, CI
19	2-methyl-2-heptenal	1393	0.07	0.09	126		GC, EI
20	3,4-dimethyl-2,4,6-octatriene	1408		0.15	136		GC, EI
21	(<i>E</i>)-sabinene hydrate	1473	0.28	0.18	154		GC, EI
22	linalyl acetate	1553	3.51	0.52	196		GC, EI
23	linalool	1559	4.76	5.90	154	155	GC, EI, CI
24	<i>n</i> -octanol	1573	0.12	0.17	130		GC, EI
25	linalyl formate	1579	0.96	0.35	182		GC, EI
26	4-terpineol	1610	0.13	0.93	154		GC, EI
27	β -caryophyllene	1642	0.18	0.16	204	205	GC, EI, CI
28	sabina ketone	1675	0.38	0.32	138		GC, EI
29	α -humulene	1684	0.54	0.41	204	205	GC, EI, CI
30	α -terpineol	1693	4.95	2.65	154		GC, EI
31	3-thujen-2-ol	1707	0.11	0.15	152		GC, EI
32	α -terpinyl acetate	1712	2.69	2.62	196		GC, EI
33	germacrene D	1720	0.22	0.26	204	205	GC, EI, CI
34	neryl acetate	1727	0.08	0.13	196		GC, EI
35	zingiberene	1743	0.69	0.32	204	205	GC, EI, CI
36	geranyl acetate	1758	0.31	0.34	196		GC, EI
37	δ -cadinene	1773		0.11	204	205	GC, EI, CI
38	allethrolone	1814	0.68	0.39	152		GC, EI
39	geraniol	1868	0.08	0.21	154		GC, EI
40	sesquiterpene alcohol	1986	0.47	0.11	220		GC, EI
41	farnesol ^f	2054	2.01	0.58	222		GC, EI
42	elemol	2098	0.40	0.10	222		GC, EI
43	spathulenol	2145	0.57	0.12	220		GC, EI

第五章 結論與未來展望

5-1 結論

本研究主要探討添加不同中草藥添加對靈芝液態培養之發酵產物與菌絲體萃取物對靈芝生理活性成分之影響。

在中草藥種類變化的實驗中，發現花椒和薑黃對於靈芝液態培養菌絲體的生理活性成分優於八角、黃耆、肉桂。添加 2ml 花椒濃縮液培養 15 天之菌重達到 8.19 (g/L)，相對於控制組培養第 12 天菌重為 6.44(g/L)，添加效果增加 1.27 倍；但是胞內多醣的部分，最高是控制組培養第 9 天的 283.15 mg/g D.W.，比 5 種中草藥添加都要來的高；但胞外多醣的部份，最高為添加 2ml 花椒濃縮液培養第 6 天的 3.20 (g/L)，相對於控制組培養第 9 天的 1.99 (g/L)，添加效果增加 1.61 倍；在靈芝酸含量、總多酚含量、類黃酮含量部份、都是以添加 2ml 薑黃濃縮液效果最好，分別是第 15 天的 14.33 mg/g D.W.、第 6 天的 56.32 mg/g D.W.以及第 12 天的 4.59 mg/g D.W.，相對於控制組靈芝酸含量、總多酚含量、類黃酮含量，分別為第 12 天的 5.40 mg/g D.W.、第 9 天的 23.75 mg/g D.W.以及第 6 天的 1.57 mg/g D.W.，添加效果分別提高了 2.65 倍、2.37 倍與 2.92 倍。故選用花椒與薑化進行添加量變化的實驗。

在添加量變化實驗中，發現在添加 8ml 以上之中草藥，不管是花椒還是薑黃，對於靈芝的生長都產生抑制的效果，菌絲幾乎沒有生長，只剩下中草藥的殘

渣。在花椒添加量變化的部份，添加 1 ml、2 ml、4 ml 的菌重，以添加 4ml 之薑黃濃縮液為最高，達到 5.73 (g/L)，不過三者與控制組並沒有太大的落差。但添加量增加並不會使多醣成分增加；靈芝酸與總多酚的部份，隨著添加量增加到 4 ml，含量依序上升，8 ml 與 10 ml 添加，因為抑制了菌絲的生長，沒有菌絲可測量。在薑黃添加量變化的部份，低量的添加反而刺激菌絲的生長，添加 1 ml 薑黃濃縮液菌重達到 4.96 (g/L)，添加 2 ml 以及 4 ml 依序下降，8 ml 及 10 ml 的添加跟花椒一樣，完全抑制了菌絲的生長；胞內多醣的部分，以添加 4 ml 為最高，但仍低於控制組，此結果與種類變化實驗相符合。靈芝酸與總多酚都以添加 2 ml 為最高。

肉桂濃縮液添加時機改變的實驗中，靈芝在第 3 天添加 2 ml 肉桂濃縮液，菌重在第 15 天達到最大值，達到 7.84 g/L，第 6 天、9 天、12 天添加 2 ml 肉桂濃縮液之菌重則逐漸降低，此結果與第 0 天就添加肉桂濃縮液，菌重有顯著的提升。胞外多醣產量的部份，以第 12 天添加肉桂濃縮液，在第 15 天取樣為最高，達到 0.97 g/L，但仍略低於控制組，跟第 0 天添加，在第 15 天取樣相比則是差不多的，值為 1.06 g/L，推測肉桂仍會抑制靈芝菌絲的生長，因為葡萄糖的殘量仍很高；胞內多醣含量方面，第 3 天添加肉桂濃縮液在第 15 天取樣達到最高值 164.85 mg/g D.W.，比第 0 天添加，在第 15 天取樣的 56.73 mg/g D.W.，高出了約 3 倍；靈芝酸含量在第 12 天添加肉桂濃縮液在第 15 天取樣達到最高值 9.53 mg/g D.W.，比第 0 天添加，在第 15 天取樣的 3.71 mg/g D.W.，高出了 2.57 倍。由以

上結果得知，先讓菌絲生長之後再加入肉桂濃縮液，的確有助於靈芝生理活性的提升。

5-2 未來展望

本實驗所用之萃取劑只有水，往後可以探討以其他有機溶劑進行萃取，是否能提高靈芝之生理活性，例如八角含有多量的 Shikimic acid，但文獻指出 Shikimic acid 需用醇類才能將其萃取出。而本研究大部份針對靈芝酸含量提升，則對萃取劑、添加時間點、抗氧化活性或其他活性並沒有做深入的探討，同時必須探討中草藥中何種成份影響靈芝生理活性，本研究對於中草藥的成分並沒有做深入的分析，以上幾點可供往後繼續研究之參考。

參考文獻

- Holly Phaneuf(石美倫譯)(2008)。藥草療效全書。商周出版，台北市。
- 方瑋 (2011)。培養基添加物對靈芝菌絲體活性成分生成之影響。東海大學化學工程研究所碩士論文。
- 水野卓、合川正允(賴慶亮譯) (1997)。菇類的化學、生化學。國立編譯館。
- 王伯徹、陳啟楨、華傑 (1998)。食藥用菇類的培養與應用。財團法人食品工業發展研究所。
- 曲黎敏 (2009)。中藥材食療事典，106、131。萬里機構·得利書局，香港。
- 李名訓 (2006)。樟芝栽培之研究。嘉義大學農學院林業暨自然資源研究所碩士論文。
- 沈雍智 (2005)。探討麩胺酸的添加對於液態發酵生產松杉靈芝菌多醣體和靈芝酸之研究。國立中央大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。
- 肖崇厚、陳蘊如 (1989)。中藥化學，323-360。科學技術出版社，上海。
- 林志彬 (1992) 靈芝多醣的免疫藥理研究及其意義。北京醫科大學學報，24(4):271~274。
- 林榮耀 (1996)。靈芝及菇類等真菌類免疫調節蛋白質之研究及探討其臨床應用性。生命科學簡訊 10(2)，2 - 5。
- 林俊清 (1990)。生藥的解說-靈芝的介紹。藥學雜誌，6，104-111。

- 林艷琪 (2005)。樟芝固態培植體之成分分析及功能性評估。南台科技大學生物科技系研究所碩士論文。
- 施佳琳 (2005)。中草藥發酵產物之功能性評估。南台科技大學生物技術研究所碩士論文。
- 徐泰浩、謝建元 (2001)。靈芝生物活性成分與生物活性之療養品觀。
(Bioindustry)12(2), 117 - 135。
- 高益槐 (2000) 世紀奇草話靈芝。元氣齋出版社，台北市。
- 張永勳、何玉玲、黃世勳 (2008)。中藥學概論，33-35。文興出版，台中市。
- 張明堯 (2001)。液態培養生產靈芝菌絲體與靈芝多醣最適化之研究。國立台灣海洋大學食品科學研究所碩士論文。
- 許瑞祥 (2005)。靈芝在生技領域研發的新趨勢。農業生技產業季刊第三期，
37 - 44。
- 許瑞祥 (1993)。靈芝概論。萬年出版社，台中市。
- 許瑞祥 (1993)^b。靈芝屬菌珠鑑定系統之研究。臺灣大學農業化學研究所博士論文。
- 傅世桓 (2002)。中醫大百科全書。遠流出版，台北市。
- 黃雪芬、劉柯俊、管育慧、董光世、蘇慶華、董大成 (1989)。口服靈芝菌絲培養液之抗癌人工轉移作用。中華癌醫學會誌 5(1)，10-15。

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

楊曉彤、李緒全、糜可、周月琴、於小明、楊慶堯 (2005)。一種同時測定9個PMP衍生化單糖的改良HPLC方法及其在靈芝菌絲體多醣組成分析中的應用。第七屆海峽兩岸真菌學學術研討會論文集55 - 62。

詹宏偉 (2003)。不同培養方式對靈芝菌絲體抗氧化活性成分與多醣體生成之影響。東海大學化學工程研究所碩士論文。

趙繼鼎，張小青 (2000)。中國真菌誌 18，27-143。科學出版社，北京。

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

鄭佩香 (1996)。古今中藥集成。大眾書局，台南市。

謝文聰 (2008)。輕鬆認識中藥，1-2，279-280。中國醫藥大學，台中市。

謝曉惠 (2004)。中草藥發酵產物對抑制腫瘤細胞之功能性評估。南台科技大學生物技術研究所碩士論文。

關培生 (2004)。香料調味大全，102-103。萬里書店，香港。

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

Carmen W.,Xin D. (2004). Chromatographic and electrophoretic methods for *Lingzhi* pharmacologically active components. *Journal of Chromatography B*, 812 ,

241–257.

Chen DH. (1999). Chemotaxonomy of Triterpenoid Pattern of HPLC of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 1999,46,47-5.

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

Chen Y., Yan Y., Xie MY., Nie SP., Liu W., Gong XF., Wang YX. (2008). Development of a chromatographic fingerprint for the chloroform extracts of *Ganoderma lucidum* by HPLC and LC–MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47 (2008) 469–477.

Chyau CC., Mau JL., Wu CM. (1996) . Characteristics of the Steam-Distilled Oil and Carbon Dioxide Extract of *Zanthoxylum simulans* Fruits, *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 1096-1099.

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

Dorothea Tholl. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological

Fang QH., Tang YJ., Zhong JJ. (2002). Significance of inoculation density control in

- production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, 37,1375-1379.
- Fang QH., Zhong JJ. (2002). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—*ganoderic acid* and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal*, 10,61-65.
- Furue H.(1987). Biological characteristics and clinical effect of sizofilan(SPG).*Drugs of Today*,23(6),335-346.
- Gao J.L., Leung S.Y., Wang Y.T., Lai C.M., Li S.P., Hu L.F., Lu G.H., Jiang Z.H., Yu Z.L. (2007). Qualitative and quantitative analyses of nucleosides and nucleobases in *Ganoderma* spp. by HPLC–DAD-MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44,807–811.
- Gustavo VG., Ernesto FT., Cristobal Noe A , Sergio de Jesus RG., Gerardo D G, and Christopher A. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13,157-167.
- Hikino H., Lomnno C., Mirin Y. (1985). Isolation and hypoglycemic activity of *Ganoderans A and B*, glycans of *Ganoderan lucidum* fruit bodies. *Planta Medica*, 4, 339-340.
- Hung-Cheh Chiang, Shih-Chang Chu. (1991). Studies on the Constituents of *Gandarma lucidum*, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 1991,38,71-76.
- Investigation of Water Soluble Polysaccharide GFb of Fermented

- Liang Z. (1995). Isolation, Purification and Structural Comparison
- Litchfield J.H. (1967). Submerged Culture of Mushroom Mycelium. *Microbiol Technology, ed. Peppler, H.J., Reinhold Publishing Corporation, USA, 107-144.*
- Misiki A., Kututa M. (1981). Studies in interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides. *Carbohydrate Research, 92, 115-129.*
- Miyazaki, T., Nishijima, M. (1981) .Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin 29, 3611-3616.*
- Nagy, M., Grancai, D. (1996). Colorimetric determination of flavanones in propolis. *Pharmazie, 51, 100-101*
- Ride, J.P., Drysdale, R.B. (1972). A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiol Plant Pathol, 2, 7-15.*
- Shi XM., Zhang JS., Tang QJ., Yang Y., Hao RX., Pan YJ. (2008). Fingerprint analysis of Lingzhi (*Ganoderma*) strains by high-performance liquid chromatography coupled with chemometric methods. *World J Microbiol Biotechnol.*
- Zhao J., Zhang XQ., Li SP., Yang FQ., Wang YT., Ye WC. (2006). Quality evaluation of *Ganoderma* through simultaneous determination of nine triterpenes and sterols using pressurized liquid extraction and high performance liquid

chromatography, *WILEY Inter Sciencr*, J. Sep. Sci. 2006, 29, 2609 – 2615.