

第二章 文獻回顧

一、 茯苓簡介

1.植物型態

茯苓的子實體生於菌核上，菌核生長在沙質土壤，它是一年生，平伏貼生。管口面白色，後變淡褐色；管口多角形至不規則形，直徑0.5~2 毫米；菌管單層，長2~3 毫米，白色。菌肉白色至乳黃色，厚3~5 毫米。菌核無鎖狀聯合，有小囊狀體，孢子長橢圓形至圓柱形，平滑無色。常見的為其菌核體，多為不規則的塊狀、球狀、扁形、長圓形或長橢圓形等，大小不等，小者如拳，大者直徑達20~30 厘米，或更大。鮮時較軟，乾後便硬，表皮成瘤狀皺縮，表面褐色至紅褐色，乾後變為黑褐色。菌核內部粉粒狀，外層淡粉色，內部白色（中藥大辭典，1977）。

2.藥材形狀

非人工培養的茯苓呈現不規則的團塊狀，大小不一，表面棕褐色，有皺縮溝紋。外層多呈淡棕色，內層多呈白色，有的包有松根，體種質堅實，嚼之黏牙。飲片為方形或長方形塊片狀。（中藥大辭典，1977；顏，1997）。

3.生境分布

野生的茯苓菌核生長在砂質土壤、氣候涼爽、乾燥、向陽山坡上的馬尾松、黃山松、赤松、雲南松、黑松等松屬植物的根際，沿根蔓延，適處級結苓。一般土深在 50~80 厘米，海拔 700~1000 公尺，坡度 10~35 度，是結苓最好的環境條件（劉，1984）。

（一）命名

茯苓學名原為 (*Poria cocos*)，直到 1992 年 Wolf 發現它的有性世代，為紀念 Wolf，現則更名為 *Wolfiporia cocos* (Ainsworth et al,1973)。

（二）化學成分

茯苓已發表之機能性成分可分為多醣體、三萜類及其他類。

表一 茯苓之化學成分

Table 1 Chemical compositions of *Wolfiporia cocos*

機能性成分分類	化學成分
多醣體	β -pachyman (Kanayama et al.,1986)
三萜類	pachymic acid (Kanematsu et al.,1992)
	tumulolic acid (Kanematsu et al.,1992)
	polyporenic acid C (Tai et al et al.,1995a)
	3-epidehydrotumulolic acid (Tai et al.,1995b)

6 α -hydroxydehydropachymic acid C (Simes et al.,1969)

dehydrotrametenolic acid (Tai et al.,1995b)

6 α -hydroxydehydropachymic acid (Nukaya et al.,1996)

16 α -acetylpachymic acid (王等 , 1993)

eburicoic acid (Kanematsu et al.,1992)

25-hydroxy-3-epidehydrotumulolic acid (Tai et al.,1995a)

3-epidehydropachymic acid (Tai et al.,1995b)

3-*O*-acetyl-16 α -hydroxytrametenolic acid (Tai et al.,1995b)

16 α -hydroxytrametenolic acid (Simes et al.,1969)

trametenolic acid (Tai et al.,1993)

3-*O*-acetyl-16 α -hydroxydehydrotrametenolic acid
(Tai et al.,1995b)

16 α -hydroxydehydrotrametenolic acid
(Nukaya.,1996)

16 α - acetyl- dehydrotrametenolic acid (王等 ,
1993)

dehydroeburicoic acid (Tai et al.,1993)
dehydroeburiconic acid (Tai et al.,1995b)
dehydrotumulosic acid (Tai et al.,1995b)
dehydropachymic acid (Tai et al.,1992)
3 β -*p*-hydroxybenzoyldehydrotumulosic
(Yasukawa et al.,1998)
poricoic acid A (Tai et al .,1991)
poricoic acid AM (Tai et al.,1993)
poricoic acid C (Tai et al.,1993)
poricoic acid D (Tai et al.,1993)
poricoic acid DM (Tai et al.,1993)
poricoic acid F (Tai et al.,1995b)
poricoic acid E (Tai et al.,1995b)
poricoic acid BM (Tai et al.,1995b)
poricoic acid B (Tai et al.,1991)
poricoic acid G (Ukiya et al.,2002)
poricoic acid H (Ukiya et al.,2002)

其他類

ergosterol (黃 , 1994)
histidine (黃 , 1994)

choline (黃, 1994)

lecithin (黃, 1994)

β -amyrin acetate (王等, 1993)

(三) 茯苓之藥理功用

(1) 抗腫瘤

由茯苓菌絲萃取出之多醣體，可抑制老鼠體內腫瘤細胞 sarcoma 180 生長，其中經酒精沉澱後，再經 DEAE-Saphadex A-25 之沖提液，餵食老鼠 60mg/kg/d，抑制率可達 99% (Kanayama et al.,1986)。茯苓中所含三萜類可抑制由 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 誘導老鼠耳朵腫瘤 (Kaminaga et al.,1996) 和 Epstein-Barr virus (非洲淋巴細胞腫瘤病毒) (Ukiya et al.,2002)。若一經感染乙型肝炎後會產生抗原及其抗體，其中以表面抗原為最早出現且測定較為方便，故常當作個體是否遭受乙型肝炎感染的指標，然而茯苓經正己烷、乙酸乙酯萃取液可降低 Hep A₂ (人類肝癌細胞株) 表現表面抗原為 40%、20%(黃,1996)。茯苓中所含多醣體可抑制老鼠體內腫瘤細胞 Sarcoma 180 生長 (in vivo)，20×10(mg/kg×day)抑制率可達 66.8%；也可抑制老鼠體內腫瘤細胞 HL-60、HepG2 生長 (in vitro)，200 μ g/ml 抑制率可超過 70%、25% (Jin et al.,2003)。將茯苓培養在含人類單細胞培養基中，15 μ g/ml 對 leukemic U937 細胞、leukemic HL-60 細胞抑

制生長率可達 87.3% (Chen et al., 2004)。在茯苓之多糖體的抗腫瘤活性方面，雖然抗腫瘤活性機制未明但，從茯苓所萃取的多糖體能活化免疫系統來增強防禦機制，此實驗證明從茯苓所萃取的多糖體能刺激巨噬細胞株 RAW264.7 產生免疫反應，透過活化 p38 激酶(p38 kinase)，表現誘導性一氧化氮合成酶(iNOS)，生成一氧化氮(NO)。巨噬細胞為防禦系統中重要的一員，當被活化時可抑制腫瘤細胞和微生物。而一氧化氮則是參與巨噬細胞的細胞溶解功能，當巨噬細胞受到刺激而活化，就會表現誘導性的一氧化氮合成酶，生成大量一氧化氮，使腫瘤細胞走向死亡，進而達到抑制腫瘤細胞的效果(Lee et al., 2003, 2004)。

(2) 止吐

由茯苓分離出的三萜類具止吐的功能 (Tai et al., 1995a)。

(3) 提升免疫力

茯苓不論是生藥或炮炙萃取液皆顯著促進細胞激素 IgA、IgM、IL-1、IL-6 和 IL- α 分泌的增加，但對 IgE 分泌則有顯著抑制效果，這可能有利於 IgE 所誘導之第一類過敏症狀（及立即性過敏）的病人的病情的控制(呂等，1994)。經搖瓶培養的茯苓菌絲對脾臟 T 細胞增生反應有明顯的促進作用 (黃，1996)。

(4) 抑制腎臟炎

茯苓多醣體可抑制老鼠急性腎臟炎 (Hattori et al.,1992)。

(5) 降血糖

受試者食用茯苓一周後，空腹血糖：受試前為 8.76 ± 2.04 mmol/L，受試後為 7.94 ± 1.45 mmol/L；餐後兩小時血糖：受試前為： 13.71 ± 2.49 mmol/L，受試後為： 11.69 ± 2.19 mmol/L，說明茯苓具有一定的降血糖效果 (蔡和沈，2001)。

(6) 抗發炎

茯苓中所含的三萜類可抑制由 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 誘導的發炎 (Nukaya et al,1996；Kaminaga et al,1996；Cuellar et al,1997；Yasukawa et al,1998)。

(7) 抗氧化

茯苓在抗氧化測試的結果：茯苓菌核可抑制由 FeCl_2 -ascorbic acid 誘導的老鼠肝細胞的脂肪過氧化，利用 Thiobarbituric acid test，其 $\text{IC}_{50} = 4.22$ mg/ml；另一方面，茯苓菌核可抑制過氧化離子生成，利用 Cytochrome C test，其 $\text{IC}_{50} = 2.03$ mg/ml；Xanthine oxidase 將 Xanthine 轉化成 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Uric acid}$ 的過程，會生成過氧化離子，茯苓菌核可抑制 Xanthine oxidase 的活性，其 $\text{IC}_{50} = 2.90$ mg/ml (Kaminaga et al,1996)。

(四) 商品化與未來應用潛力

與一般藥用菇類液體培養流程相似，茯苓菌絲體之液態培養，以能達成穩定產量為目標。且可透過控制液態發酵條件，如：培養基組成、通氣量、pH、攪拌速度等，來控制發酵液中二次代謝產物之組成份，及菌絲體的生長，再透過劑形設計可經茯苓發酵產品進一步商品化。如：添加其他賦形劑與安定劑等製成口服液劑；或將發酵產品經真空濃縮、噴霧乾燥等步驟後製成粉劑、膠囊、錠劑等類型（宋等，2003）。

二、 茯苓之人工培養

茯苓之人工培養分室外與室內培養，室外培養是種植於沙質土壤裡，室內培養即液態培養。

（一） 室外培養

影響茯苓人工栽培的環境因子有溫度、溼度、酸鹼度、光線和氧氣等，茲分述如下：

（1）溫度：茯苓的菌絲體在 10~35°C 之間均可以生長，而最佳生長溫度則在 25~28°C 之間，這個溫度範圍也是培養菌種時常使用的。當溫度高達 35°C 時，菌絲體容易衰老；20°C 以下，則菌絲體生長遲緩。

（2）溼度：50~60% 的土壤含水量，可滿足茯苓對水分的要求，同

時亦可滿足茯苓對氧氣的需求。為提供此一條件，在選擇栽培場時，除了應注意土質外，尚須注意一定的坡度，才能兼顧排水與通氣的目的。

(3) 酸鹼度：茯苓中分解纖維素的酵素系統，在酸性的條件下才具有活性，所以 pH4~6 之酸性土壤中才適合茯苓之生長與發育。因此應監測栽培場土壤的酸鹼度。

(4) 光線：陽光充足、溫度較高、對於嗜溫性之茯苓的生長有益；隨著溫度的上升，土壤的水分逐漸蒸發，因之通氣良好，會更有利於好氣性之茯苓的生長。所以一般茯苓栽培場要求向陽，有較多光線直接照射。

(5) 氧氣：茯苓乃好氣性腐生真菌，因此，在栽培時除了注意去除積水之外，選擇含砂量達 70% 左右的土壤，其通氣性和保水性都屬恰當（宋等，2003）。

(二) 液態培養

液態培養又可稱作深層培養或深層發酵培養(Submerged cultures)，所謂液態培養是將微生物培養於液體培養基裡，控制培養基的 pH 值、溫度、通氣量、攪拌，進行微生物發酵培養，使菌絲生長、繁殖，並累積有用的微生物代謝物質。人工液態培養的好處是對微生物生長所需的條件能夠有效的控制，近年來國內外已有利用液體深層發酵來培養靈芝菌絲體以十分普遍。此法可大量培養菌絲體，且

所需時間甚短，又有下列幾項優點：

1. 菌絲體生長快速且生長週期短：由於液態培養可將通氣量、溫度、酸鹼度等設備，控制在最佳培養條件，於短時間內增殖大量菌絲體和具有生理活性的代謝產物。
2. 工廠化生產、無季節性：食用菌液態培養於發酵設備中，不受季節性的限制，而人工培養往往需要很大個培養空間，生長條件難以控制，受季節影響很大。

然而，真菌菌種發酵技術仍然有待深入研發與改進。利用液體發酵培養，雖然可以縮短食用真菌類的培養時間，但是如何控制菌絲體的生產、如何有效控制生產出有用的二次代謝物(如抗腫瘤物質或降血糖物質)、如何有效的分離出有效的成分，以及有效成分的產品差異如何，技術與品質的控制都是必須克服的問題，這樣才能提升食用真菌類產品品質而有助於人體健康。

以下分別就液態培養中影響茯苓產量與工業化生產的關鍵問題加以介紹。

1. 碳源

碳源對於微生物生長極為重要，主要作用為構成細胞物質和供給菌體生長所需要的能源。王等（2002）的茯苓發液體發酵研究中，使用 2.5% 葡萄糖，產能為 30 克濕重/100ml。李等（2001）經實驗

設計法得最佳化的培養基，使用 3% 葡萄糖和 3% 蔗糖，可得菌絲乾重 10g/L。林(2002)進行茯苓液體發酵培養，結果顯示於初始 pH3.0，5% 葡萄糖可獲得最高的菌絲產量；而在初始 pH4.0，5% 葡萄糖，則可提高胞外多醣生成量。Nomoto 等人(1994)發表茯苓液體培養方法之專利，宣稱高菌絲體生成之最適培養基組成是使用 0.5% 葡萄糖。

2. 氮源

氮是微生物構成蛋白質和核酸的主要元素，氮源的種類及多寡會對真菌的菌絲體型態有很大的影響，高濃度氮源培養菌體能產生較多平滑的菌絲球，低濃度的氮源會產生較鬆散的菌絲(胡，1994)。王等(2002)的茯苓液體發酵研究中，使用 0.5% 玉米粉，0.5% 豆餅粉，0.3% 酵母膏，產能為 30 克濕重/100ml。李等(2001)食品工業經實驗設計法得最佳化的培養基，使用 1.5% 玉米漿、0.1% 氯化銨，可得菌絲乾重 10g/L。林(2002)進行茯苓液體發酵培養，結果顯示於初始 pH3.0，1% 氮源可得最高菌絲量；而在初始 pH4.0，1% 氮源，則可提高胞外多醣生成量。Nomoto(1994)食品工業發表茯苓液體培養方法之專利，宣稱高菌絲體生成之最是培養基組成是使用 0.8% 麥芽抽出物，0.03% 玉米浸漬液，0.5 乾酵母，0.3% 硫酸銨。

3. 無機鹽類

蕈類進行液態培養時，在培養基中加入的無機鹽類，如磷酸二氫鉀、硫酸鎂、氯化鈣等，會影響菌絲體產量、香味物質及胺基酸組成，可促進菌絲生長速率，還能夠對多醣的產量造成影響，但當培養基中所含的無基鹽類濃度過高時，則容易產生苦味成分(林，2002)。培養基所添加的無基鹽類含有磷、鎂、硫、鐵或鉀等元素，對菌體生長與代謝生長之作用有：(1)構成細胞組成(2)構成酵素的組成成分(3)維持酵素的作用(4)調節新陳代謝(吳，2003)。

4. 油類及脂肪酸

在培養基中加入油類或脂肪酸，可刺激菌絲的生長速率，亦能夠對多醣的產量造成影響(Yang et al.,2000)。文獻指出\利用脂肪酸及植物油作為 *C.militaris* 培養之最適條件的探討，發現添加 2% 葵花油培養 *C.militaris* 菌絲體所得之胞外生物聚合物(exo-biopolymer)最高可達 7.5g/l，添加 4% 橄欖油所得之菌絲體為 19g/l 產量最高。在培養基中添加植物油及脂肪酸，除可達到消泡的目的外，還能夠對菌絲體及胞外聚合物產量造成影響(Park et al.,2002)。可能油脂在菌體表面形成油膜，改變培養基質及菌體間營養物質傳遞，間接改變菌體吸收及代謝能力(Yang et al.,2000)。

5. pH

根據文獻指出在液態培養蕈類菌絲時，蕈類菌絲生長的 pH 值範圍很廣，最適 pH 值範圍為 5 到 7，但隨著菌種的不同會有不同

的最適生長 pH 值(Yang et al.,1989)。林 (2002) 進行茯苓液體發酵培養，結果顯示於初始 pH3.0，可得最高菌絲量；而在初始 pH4.0，則可提高胞外多醣生成量。Catley(1980)提出 *Aureobasidium pullulans* 和 pH 值互動關係的模式，在較高的 pH 值時，葡萄糖主要用來供應生物質量(biomass)的產生，只有在較後階段且低 pH 值時，多醣的合成才會發生。

培養基中，pH 起始值的不同可能會對真菌產生下列影響：

- (1)影響細胞膜的作用
- (2)影響酵素活性
- (3)改變培養基中離子的狀態
- (4)攝取營養的改變
- (5)生物代謝產物的改變

6. 攪拌、振盪與通氣

真菌在液態培養過程中，菌絲會聚集形成團塊菌絲球，且培養基黏度會增加，造成氧氣傳遞困難，所以在液態發酵中利用振盪、通氣或攪拌將培養基、氧氣及微生物均勻混合，以增加質傳或熱傳的效率(Park et al.,2002)。以發酵槽進行液態培養時，當轉速過低，菌絲易形成球體而不能與培養基充分接觸，而攪拌的轉速太高會造成漩渦，使菌絲附著於導流板或發酵槽壁上(Jeongseok et al.,1999)。

7. 饋料培養

饋料培養(Fed-batch culture)是一種類似傳統批式培養的操作方式，在發酵過程中，新鮮的培養基以連續或間歇的方式加入於發酵槽中，以維持細胞生長或誘導產物之生成 (Roukass and Kyriakides,1998)。其優點(1)可增加產量，特別對於生長相關的產物特別明顯(2)在產生二級代謝物的系統中，在停滯期時提供足夠的基質維持菌體生長，可代謝更多的非生長相關產物，例如青黴素(3)解決基質在高濃度產生的基質抑制問題(4)降低發酵液黏度(McNeil and Harvey,1990)。

饋料批式培養的進料策略隨系統不同而有多種的變化，以下列出幾種近年來較常被人使用的進料策略：

(1)以溶氧值 DO 為指標

在好氣性的發酵系統中，由於氧氣在水中的溶解度很低，正常溫度下約 8 ppm，因此需要不斷的通入空氣，以供細胞之需求。在發酵槽中養分消耗殆盡時，細胞生長停止，此時溶氧值會急速上升，如果在此時饋料，溶氧值又會因細胞生長而馬上下降。但此法並不適合於複合培養基的發酵中，因為當主要碳源消耗殆盡時，細胞會利用有機氮源繼續生長，使得溶氧值的上升並不明顯(吳，2003)。

(2)以 pH 為指標

在使用複合培養基的發酵液中，當主要碳源消耗完時，細胞會利用氮源繼續生長，此時溶氧量的變化並不明顯，但是，發酵液之 pH 值卻會明顯上升。這是因為當細胞代謝有機氮源時，會以氨離子的形式釋放出氮(Robbins and Taylor,1989)。

(3)以葡萄糖的消耗決定進料

利用感測器線上測定葡萄糖濃度，以饋料批式培養的方式來維持葡萄糖濃度(Kim *et al.*,1994)。

(4)以 CO₂ 釋放速率為指標

CO₂ 釋放速率約和碳源的消耗數速率成比率關係，因此，若以質譜儀上量測發酵槽出口氣體中 CO₂ 的濃度，下降至設定值時可開始饋料，並經由數學模式求得細胞生長速率(楊，1994)。

三、發酵槽之簡介

凡是利用生物特性進行相關生化反應的裝置，都可以稱為生化反應器(Bioreactor)或是發酵槽(Fermentor)。在發酵工程上，選擇一個優良的發酵槽是微生物培養重要的一環，因此發酵槽的設計與應用是一個相當重要的課題。對於微生物培養而言，不同菌種生長所需的環境與條件皆有所不同，所以在設計發酵槽的時候，我們必須針對個別系統進行考慮，提供較佳的質量與熱傳，使基質、氧氣的傳遞、以及溫度的維持都能均勻分佈在發酵槽內，如此菌體才能在良好的環境下生

長或生產特定產物(吳，2000)。

為了使微生物擁有一個較適合生長的环境，人類不斷地研究開發新的生化反應器。這些反應器可小至 50 毫升之實驗用搖瓶，大至好幾噸之工業級發酵槽(邱和劉，1995)，從早期簡單使用型的搖瓶，乃至一些特殊用途的發酵槽，例如：攪拌槽(stirred tank)、氣泡塔(bubble column)、改良式氣泡塔(modified bubble column)等(Wu et al.,2001)。每一種生化反應器之結構，各有其特別適合的應用範圍及優缺點，雖相關的研究文獻雖多，但在培養絲狀菌(如：樟芝、靈芝、紅麴、冬蟲夏草)的培養上，並沒有針對不同特性之發酵槽做比較，因此將攪拌式及氣舉式兩種發酵槽做一介紹。

(一)攪拌式發酵槽 (Stirred tank fermentor)

在發酵工業化上，目前以攪拌式發酵槽(高度與內徑比小於 3)最為廣泛使用。機械攪拌方式可提高發酵槽之質傳效果，增加發酵液中的溶氧量，營造出一個適合好氣性微生物生長的环境(吳，2000)。攪拌式發酵槽應用的對象，從早期利用黴菌生產抗生素或有機酸、培養酵母以生產單細胞蛋白或乙醇；到近期利用植物細胞組織培養技術，生產高價值的二次代謝物等。因此，這一類型的發酵槽，已成為近代生化工程史上反應器的代表。

(二)氣舉式發酵槽 (Airlift fermentor)

改良式發酵槽大都是在外形或內部結構上加以修改，其中以1955年Lefrancois所提出的氣舉式發酵槽最受重視(吳，2000)。氣舉式發酵槽主要結構是在槽體裝置一個導流管(draft tube)，加裝導流管後，槽內液體便被區隔為進氣區域的上升流動區(riser)與非進氣區域的下降流動區(downcomer)(Kawagoe et al.,1997)。進氣區域有的流體有較高的氣體佔有率，使得這個區域的流體密度低於非進氣區域的流體密度，由於流體密度上的差異，造成流體自然的循環流動(王等人，2001)。

(三) 氣泡塔式發酵槽 (Bubble column fermentor)

除了攪拌式發酵槽之外，氣泡塔式發酵槽(高度/內徑比 >3)在發酵工程上之應用亦十分廣泛。

在操做上，氣泡塔式發酵槽借氣體分散氣直接將空氣由槽底通入，產生的氣泡具有傳遞氧氣以供生物細胞所需之功效，藉其流動並能達達到攪拌之效用，使各相間充分混何。由於此型發酵槽不具攪拌翼，因此動力成本低，再加上其低剪力、無機械性產熱、構造簡單即建設成本低等優點，使其在發酵工程應用上極具潛力。尤其在近十年來，動物細胞培養之迅速發展，使具低減力特性之氣泡塔發酵槽應用更為廣泛。然而。氣泡塔在氣液質傳及流體混何特性上的表現並無法令人滿意，同時也亦產生泡沫過多的問題(吳，2000)。