

第三章 實驗材料與分析方法

3.1 菌株

本研究樟芝菌種係購自食品工業發展研究所生物資源中心，編號(BCRC35396)。

3.2 實驗藥品

實驗藥品列於 Table 3.1

Table 3.1 實驗藥品(按字數順序排列)

藥品名稱	廠牌	附註
Alcohol	台灣公賣局	
Bacto Agar	DIFCO	
Corn Starch		
1,1-DIPHENYL-2-PICRYL-HYDRAZYL	SIGMA	
Folin – Ciocalteu agent	SIGMA	
Gallic acid	SIGMA	
Hydrochloric Acid	聯工	EP 級
Iron(II)Chloride Tetrahydrate	ACROS	
Lionleic acid	SIGMA	
Malt Extract	DIFCO	
Methyl Alcohol	TEDIA	HPLC 級
Peptone	DIFCO	
Yeast Extract	DIFCO	
YM Broth	DIFCO	

Sodium carbonate		
Sodium Hydroxide	聯工	

3.3 實驗儀器與設備

實驗儀器與設備列於 Table 3.2

儀器設備	廠牌	附註
pH 電極	CyberScan Bench	PH500
無塵無菌操作台	LIAN SHEN	
殺菌釜	HUXLEY	HL-340
電磁攪拌器	CORNING	Stirrer/Heater
烘箱	RISEN	DV-452
分光光度計	HITACHI	U-2001
試管振盪器	Thermolyne	37600 Mixer
恆溫震盪培養箱	TKS	OSI-500
均質機	Osterixer	
離心機	HITACHI	O5P-21
低溫冷凍循環水槽	LIGHT	EBCA-20PT
蠕動幫浦	Cole-Parmer	
空氣壓縮機	Furnas	
冷凍乾燥機	Heto	
高真空油式幫浦	Alcatel	
高速離心機	HITACHI	O5P-21
二次蒸餾水機	MILLIPORE	

超音波震盪機	BRANSON	5210
--------	---------	------

3.4 實驗方法

3.4.1 試管斜面培養

- (1) 以 Malt extract 2%、Glucose 2%、Peptone 0.1%、Agar 2% 之比例混和均勻溶於蒸餾水中作為斜面培養基，以磁石攪拌並加熱使其完全溶解。
- (2) 以每支試管 8c.c. 的量，趁熱將培養基裝入試管中。
- (3) 用矽膠塞將試管瓶口塞緊，再以錫箔紙包裹棉塞，放入滅菌釜中，滅菌 20 分鐘(操作壓力 1.2Kg/cm^2 ，溫度為 120°C)。
- (4) 滅菌後，將試管傾斜置於無菌無塵操作台中，使其冷卻凝固後備用。
- (5) 將白金鈎以 75% 酒精噴灑滅菌並置入無菌無塵操作台中，打開無菌無塵操作台送風裝置，再以紫外光滅菌 20 分鐘。
- (6) 關閉紫外光。
- (7) 準備已長有樟芝菌絲的斜面培養試管與空白斜面各一支，將試管頸部過火焰滅菌。
- (8) 將白金鈎過火焰燒至通紅三次後，刮取樟芝菌絲移植至空白試管的斜面上，再以矽膠塞將試管瓶口塞緊，置於 25°C 恆溫箱中靜置活化培養。

3.4.2 培養皿平面培養

- (1) 以 Malt extract 2%、Glucose 2%、Peptone 0.1%、Agar 2% 之比例混和均勻溶於蒸餾水中作為培養基，以磁石攪拌並加熱使其完全溶解。
- (2) 用矽膠塞將錐形瓶口塞緊，再以錫箔紙包裹矽膠塞，放入滅菌釜中，滅菌 20 分鐘(操作壓力 1.2Kg/cm^2 ，溫度為 120°C)。
- (3) 取數個空白培養皿置入無菌無塵操作台中，再以紫外光滅菌 20 分鐘以上。
- (4) 關閉紫外光。

- (5) 培養基滅菌後，將錐形瓶置入無菌無塵操作台中，趁熱以每個 45c.c.的
量倒入培養皿中。待培養基冷卻凝固後備用。
- (6) 將白金鈎以 75%酒精噴灑滅菌並置入無菌無塵操作台中，打開無菌無塵
操作台送風裝置，再以紫外光滅菌 20 分鐘。
- (7) 關閉紫外光。
- (8) 準備已長有樟芝菌絲的斜面培養試管與空白培養皿各一個，將試管頸部
過火焰滅菌。
- (9) 將白金鈎過火焰燒至通紅三次後，刮取樟芝菌絲移植至空白培養皿的表
面上，再用止水膠帶將蓋子封口封住，置於 25°C 恆溫箱中靜置活化培養。

3.4.3 液態種菌培養

於 250ml 三角瓶中，裝液態培養基 100ml (Malt extract 2%、Glucose 2%、
Peptone 0.1%)，調整 pH 值為 5，取活化後菌種 1cm²，接於培養液中，。置
於 25°C 恆溫培養箱，以轉速 100rpm 培養 7 天做為液態種菌。

3.4.4 探討不同添加物對樟芝菌絲生長及抗氧化活性生成之影響

於 250ml 三角瓶中，裝液態培養基 100ml (Corn Starch 4.78%、YM Broth
3.19%)，分別添加不同濃度(0.1%、0.5%、1%、5%、10%)的橄欖油、葡萄
籽油、花生油、沙拉油、乳化劑(tween20、tween85)、消泡劑(ppg)，並調整
pH 值為 5.54。接液態種菌 10%，置於 25°C 恆溫培養箱，以轉速 100rpm 培
養 14 天後收菌，並測其菌絲乾重、掃除 DPPH 自由基活性、抗氧化能力及
總多酚含量。

3.4.5 探討靜置及不同振盪培養方式之表面通氣效應對樟芝菌絲生長及抗 氧化活性生成之影響

取 250ml 無凹槽三角瓶及 250ml 有凹槽三角瓶，分別裝液態培養基 100ml、50ml(Corn Starch 4.78%、YM Broth 3.19%)，調整 pH 值為 5.54。接液態種菌 10%，於 25°C 下，分別探討靜置、恆溫箱振盪培養(轉速 100rpm)、水浴往復式恆溫振盪培養(轉速 100rpm)，培養 14 天後收菌，並測其菌絲乾重、掃除 DPPH 自由基活性、抗氧化能力及總多酚含量。

3.4.6 探討不同碳氮比對樟芝菌絲生長及抗氧化活性生成之影響

於 250ml 三角瓶中，裝 100ml 培養液，以 Corn Starch 為碳源，在不同濃度下(5%、3%、1%)分別以碳氮比(50:1、25:1、12.5:1、6.25:1、3.13:1、1.63:1、0.78:1、0.39:1)，加入不同濃度之 YM Broth，並調整 pH 值為 5.54，接液態種菌 10%，置於 25°C 恆溫培養箱，以轉速 100rpm 培養 14 天後收菌，並測其菌絲乾重、掃除 DPPH 自由基活性、抗氧化能力及總多酚含量。

3-5 分析方法

3.5.1 pH 值測定

使用 pH meter 測定發酵液之 pH 值。

3.5.2 菌體濃度測定

將培養後之發酵液以 100mesh 篩網過濾，以蒸餾水沖洗菌體 3-5 次，置入樣品瓶，冷凍乾燥除去水分至恆重，菌體濃度單位為 g/100ml。

3.5.3 甲醇萃出物製備

- 1.取冷凍乾燥後之菌體，以固定倍數之甲醇於 30℃，100rpm 下萃取一天。
- 2.分離出甲醇萃出液。
- 3.將甲醇萃出液以冷凍乾燥濃縮至全乾，即得甲醇萃出物。

3.5.4 掃除 DPPH 自由基活性測定

取 4ml 稀釋之樟芝甲醇萃出物及 MeOH (對照組)，加入 1ml 新鮮配製之 1mM DPPH-MeOH 溶液。均勻混合後反應 30 分鐘，以光譜分析儀檢測 517nm 下之吸收值⁽³⁷⁾⁽³⁹⁾。

掃除 DPPH 自由基活性 = $(A_{517\text{nm}(\text{control})} - A_{517\text{nm}(\text{sample})}) \times 100\% / A_{517\text{nm}(\text{control})}$

3.5.5 抗氧化活性測定

抗氧化活性測定以抑制油質之過氧化為指標。取 4ml 的亞麻油酸乳化液，及 0.02ml 樣品萃取液於褐色瓶中，均勻混合後於 40°C 恆溫水槽靜置。隔 24 小時取樣品 0.1ml，依序加入 9.7ml 75% 甲醇溶液(v/v)、0.1ml 30% 硫氰酸銨(NH₄SCN)及 0.1ml 20Mm 氯化亞鐵(FeCl₂ · 4H₂O)，震盪均勻後反應 3 分鐘，使用分光儀檢測 500nm 吸光值，實驗中以甲醇為對照組。⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾

抗氧化活性 = $(A_{500\text{nm}(\text{control})} - A_{500\text{nm}(\text{sample})}) \times 100\% / A_{500\text{nm}(\text{control})}$

3.5.6 總酚含量測定⁽³³⁾⁽³⁴⁾

取甲醇萃出液 0.3ml 加入飽和 Na₂CO₃ 溶液 6ml，混合均勻後放置 2 分鐘，再加入 50% Folin-ciocalteu/s reagent，混合均勻放置 30 分鐘後，使用分光儀檢測 730nm 吸光值，由 gallic acid 的標準曲線計算樣品總酚類化合物含量。其檢量線如 Fig3.1

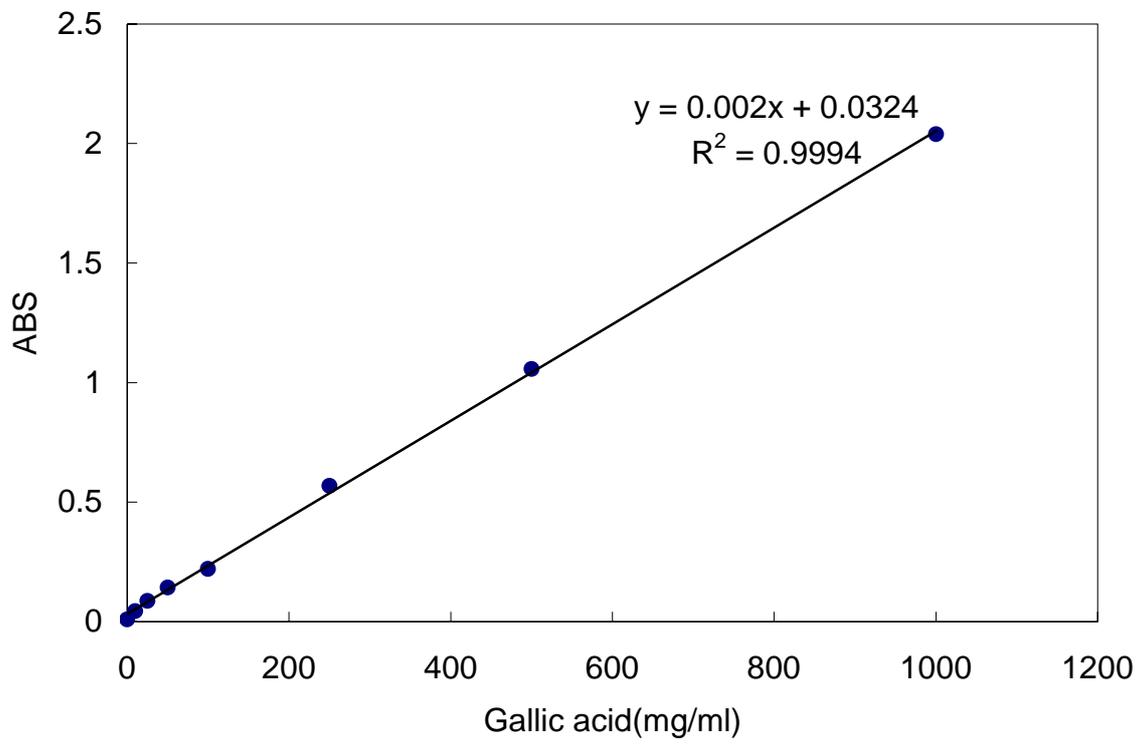


Fig3.1 多酚檢量線