

The effect of additives on the production of secondary metabolites and antioxidant properties on gra

謝啟弘、梁志欽、何偉真

E-mail: 344712@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

Owing to the wild fruiting body is very rare and expensive, some researchers are developing artificial cultivation of *Antrodia cinnamomea* fruiting bodies using woodblocks of *Cinnamomum kanehirae* Hayata to meet the demands of tests for physiological function and markets. However, the supply of *A. cinnamomea* fruiting bodies is unable to meet the demand. The aim of this research is to explore the effect of different additive on the production of secondary metabolites and antioxidant properties of *A. cinnamomea* by grain solid-state culture. The cultures were under various conditions, and at a period of 30 or 45 days. Grains of *Coix lacryma-jobi*, wheat, and pearl barley were used as basic medium respectively. The highest yield of polysaccharide and triterpenes produced by *A. cinnamomea* cultured on *Coix* medium were 23.01 mg/ml and 10.63 %, respectively. At 45 day, the highest yield of polysaccharide derived from *A. cinnamomea* cultured on pearl barley and wheat medium were 60.80 and 31.48 mg/ml, respectively. And thighest yield of triterpenes derived from *A. cinnamomea* cultured on pearl barley and wheat medium were 10.11 and 0.05 %, respectively. Culturing at 30 for 60 days, the highest yield of polysaccharide and triterpenes obtained on wheat and pearl barley media of *A. cinnamomea* were 64.12 mg/ml and 17.59 %, respectively. For different additives on culturing *A. cinnamomea*, the highest polysaccharide yield was 68.66 mg/ml when 0.5 % (w/w) CaCl_2 was added to pearl barley medium at 30 day of culture. And the highest triterpenes obtained was 16.65 %, which was produced at 60 day by *A. cinnamomea* when 0.5 % (w/w) chitosan was used as additive in pearl barley medium. When Chinese medicinal herbs were added to culture media, the highest polysaccharide yielded 70.90 mg/ml on wheat medium with 1 % (w/w) *Magnolia officinalis* at 15 day. And the highest triterpenes produced was 33.72 % on pearl barley medium supplemented with 1 % (w/w) *Perilla frutescens* at 30 day culture of *A. cinnamomea*. The highest scavenging ability on DPPH radical of methanolic vi extract (10 mg/ml) was 95.47 % obtained from culturing *A. cinnamomea* on *Coix* medium added with 0.5% (w/w) *Ocimum basilicum* at 15 day. The highest chelating capability on ferrous ions of methanolic extract (20 mg/ml) was 95.75% derived from adding 0.5 % (w/w) chitosan on wheat medium for culturing *A. cinnamomea* 60 days. And the highest reducing powers of methanolic extract (10 mg/ml) was 2.957 yielded from *A. cinnamomea* when culturing on pearl barley medium added with 0.5% (w/w) *Piper betle* at 60 day.

Keywords : *Antrodia cinnamomea*, grain solid-state culture, polysaccharide, triterpenoid, antioxidant property

Table of Contents

中文摘要.....	iii	英文摘
要.....	v	誌
謝.....	vii	目
錄.....	ix	圖目
錄.....	xii	表目
錄.....	xv	第一章 前
言.....	1	第二章 文獻回
顧.....	4	第一節 樟芝概
述.....	4	一、樟芝的分
類.....	4	二、樟芝的形態特
徵.....	4	三、樟芝的生物活性成
分.....	5	(一) 三?
類.....	6	(二) 多醣
體.....	9	第二節 自由
基.....	11	一、自由基的種
類.....	11	二、自由基來源與疾病
關.....	16	第三節 抗氧化
力.....	19	一、清除 , -Diphenyl- -picrylhydrazyl(DPPH) 自由基能

力之測定.....	19 二、螯合亞鐵離子.....	19 三
、還原力.....	20 四、總抗氧化	
力.....	20 五、清除超氧陰離子能力測	
定.....	21 第四節 固態發酵培	
養.....	22 一、固態發酵培養基	
質.....	22 二、添加物對樟芝發酵培養之影	
響.....	23 第三章 材料方	
法.....	26 第一節 實驗材	
料.....	26 一、菌	
株.....	26 二、藥	
品.....	26 第二節 實驗方	
法.....	27 一、菌種保存與活	
化.....	27 二、液態菌種製	
備.....	27 三、不同穀物固態培	
養.....	28 四、總多醣含量測	
定.....	28 五、三?類含量測	
定.....	29 六、抗氧化力測	
定.....	30 七、統計分	
析.....	32 第四章 結果與討	
論.....	33 第一節 總多醣含量測	
定.....	33 一、薏仁添加不同添加物及在不同溫度進行樟芝固態培養之總	
多糖含量.....	33 二、裸麥添加不同添加物及在不同溫度進行樟芝固態培養之總多糖	
含.....	37 三、小麥添加不同添加物及在不同溫度進行樟芝固態培養之總多糖含	
量.....	41 第二節 三?類含量測定.....	45 一、薏
仁添加不同添加物及在不同溫度進行樟芝固態培養之三?類類含量.....	45 二、裸麥添加不同添加	
物及在不同溫度進行樟芝固態培養之三?類含量.....	47 三、小麥添加不同添加物及在不同溫度進	
行樟芝固態培養之三?類含量.....	49 第三節 抗氧化力測	
定.....	52 一、清除 DPPH 自由基能	
力.....	52 二、螯合亞鐵離子能力測	
定.....	62 三、還原力測	
定.....	71 第五章 結	
論.....	81 參考文	
獻.....	83 附	
錄.....	90 圖目錄 圖 1、牛樟芝之顯微特徵	
.....	5 圖 2、從樟芝子實體分離出的三?類化合物	
.....	7 圖 3、從樟芝子實體分離出的三?類化合物	
.....	8 圖 4、使用X-射線繞射分析 -1,3-D-葡聚醣三股螺旋結晶構形	
.....	10 圖 5、主要的活性氧種類。.....	12 圖
6、哺乳類動物細胞中氧和氮自由基產物及其他反應種類。.....	14 圖 7、脂質過氧化過程	
.....	15 圖 8、組織損害引起氧化壓力的原因(A)及氧化壓力對人類疾	
病的關係(B)。.....	17 圖 9、實驗架構圖。.....	25
圖 10、樟芝於不同溫度及添加物的薏仁培養基培養 60 天其發酵物甲醇萃取液濃度 10 mg/ml 的清除 DPPH 自由基能力		
.....	53 圖 11、樟芝於不同溫度及添加物的裸麥培養基培養 60 天其發酵物甲醇萃取液濃度 10 mg/ml 的清除 DPPH 自由	
基能力。.....	54 圖 12、樟芝於不同溫度及添加物的小麥培養基培養 60 天其發酵物甲醇萃取液濃度 10 mg/ml 的清除	
DPPH 自由基能力。.....	55 圖 13、25 下樟芝於添加不同中草藥的薏仁培養基培養 60 天其發酵物甲醇萃取液濃度 10	
mg/ml 的清除 DPPH 自由基能力。.....	57 圖 14、25 下樟芝於添加不同中草藥的裸麥培養基培養 60 天其發酵物甲醇萃	
取液濃度 10 mg/ml 的清 DPPH 自由基能力。.....	58 圖 15、25 下樟芝於添加不同中草藥的小麥培養基培養 60 天其發酵物甲	
醇萃取液濃度 10 mg/ml 的清除 DPPH 自由基能力。.....	60 圖 16、樟芝於不同溫度及添加物的薏仁培養基培養 60 天其發酵	
物甲醇萃取液濃度 10 mg/ml 的螯合亞鐵離子能力。.....	63 圖 17、樟芝於不同溫度及添加物的裸麥培養基培養 60 天其	
發酵物甲醇萃取液濃度 10 mg/ml 的螯合亞鐵離子能力。.....	64 圖 18、樟芝於不同溫度及添加物的小麥培養基培養 60	
天其發酵物甲醇萃取液濃度 10 mg/ml 的螯合亞鐵離子能力。.....	65 圖 19、25 下樟芝於添加不同中草藥的薏仁培養基	
培養 60 天其發酵物甲醇萃取液濃度 10 mg/ml 的螯合亞鐵離子能力。.....	67 圖 20、25 下樟芝於添加不同中草藥的裸麥	
培養基培養 60 天其發酵物甲醇萃取液濃度 10 mg/ml 的螯合亞鐵離子能力。.....	68 圖 21、25 下樟芝於添加不同中草藥	

的小麥培養基培養 60 天其發酵物甲醇萃取液濃度 10 mg/ml 的螯合亞鐵離子能力。.....70 圖 22、樟芝於不同溫度及添加物的薏仁培養基培養 60 天其發酵物甲醇萃取液濃度 10 mg/ml 的還原力。.....72 圖 23、樟芝於不同溫度及添加物的裸麥培養基培養 60 天其發酵物甲醇萃取液濃度 10 mg/ml 的還原力。.....73 圖 24、樟芝於不同溫度及添加物的小麥培養基培養 60 天其發酵物甲醇萃取液濃度 10 mg/ml 的還原力。.....74 圖 25、25 下樟芝於添加不同中草藥的薏仁培養基培養 60 天其發酵物甲醇萃取液濃度 10 mg/ml 的還原力。.....76 圖 26、25 下樟芝於添加不同中草藥的裸麥培養基培養 60 天其發酵物甲醇萃取液濃度 10 mg/ml 的還原力。.....77 圖 27、25 下樟芝於添加不同中草藥的小麥培養基培養 60 天其發酵物甲醇萃取液濃度 10 mg/ml 的還原力。.....78 表目錄表一、氧化對人體的可能的傷害.....18 表二、不同溫度下薏仁培養樟芝多醣產量的變化.....34 表三、25 下薏仁添加不同添加物培養樟芝多醣產量的變化.....35 表四、25 下薏仁添加不同比例中草藥培養樟芝多醣產量的變化.....36 表五、在不同溫度下裸麥培養樟芝多醣產量的.....38 表六、25 下裸麥添加不同添加物培養樟芝多醣產量的變化.....39 表七、25 下裸麥添加不同比例中草藥培養樟芝多醣產量的變化.....40 表八、在不同溫度下小麥培養樟芝多醣產量的變化.....42 表九、25 下小麥添加不同添加物培養樟芝多醣產量的變化.....43 表十、25 下小麥添加不同比例中草藥培養樟芝多醣產量的變化.....44 表十一、薏仁添加不同添加物及不同溫度下培養樟芝三?類含量的變化.....46 表十二、裸麥添加不同添加物及在不同溫度下培養樟芝三?類含量的變化.....48 表十三、小麥添加不同添加物及在不同溫度下培養樟芝三?類含量的變化.....51

REFERENCES

1. 水野卓和川合正允, 1997. 菇類的化學, 生化學。國立編譯館。
2. 何公瑞, 2008. 以固態發酵製備高麥角硫因之杏鮑菇類及其呈味性質與生理活性。國立中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。
3. 利文耀, 2007. 發酵蔬果飲品之製備及其機能性評估。大葉大學生物產業科技系碩士論文。
4. 吳彩平, 2006. 以固態發酵製備樟芝米及其品質與抗氧化性質。國立中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。
5. 吳?曄、梁志欽, 2005. *Antrodia camphorata* 洋薏仁固態發酵萃取物之抑菌作用。台灣農業化學與食品科學 43(4):295-303。
6. 吳德鵬, 1995. 樟芝微量成分的研究。台灣師範大學化學研究所碩士論文。
7. 吳聲華、周文能、王也珍, 2002. 臺灣高等真菌-子囊菌與擔子菌的認識。國立自然科學博物館。
8. 李一宏, 2003. 樟芝菌絲體之培養及其多醣體抗乙型肝炎病毒活性評估。中國醫藥學院中國藥學研究所博士論文。
9. 李宛蕓, 2003. 樟芝菌絲體培養與生理活性成分生成之研究。東海大學化工所碩士論文。
10. 李順來, 2009. 台灣國寶牛樟芝。世茂出版有限公司。
11. 林永浩, 2004. 樟芝之牛樟樹宿主專一性。食品工業 36(5):57-71。
12. 林雅慧, 2008. 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
13. 施玉蘭, 2008. 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所碩士論文。
14. 徐佳莉, 2007. 以固態發酵製備桑黃薏仁與桑黃米產品及其呈味性質與生理活性。國立中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。
15. 晏文潔、李家璞和杜平, 2000. 類黃酮抗氧化力與其結構之關係。台灣農業化學與食品科學 38(1):80-88。
16. 張家祥, 2007. 不同中草藥或精油的樟芝固態栽培菌絲體之生物活性成分的影響。大葉大學生物產業科技系碩士論文。
17. 湯朝棟, 2010. 研究白樟芝菌種鑑定與栽培。南台科技大學生物科技系碩士論文。
18. 黃婉莉, 2007. 香杉芝之培養及其生理活性與抗氧化性質。國立中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。
19. 楊于萱, 2010. 培養條件對樟芝菌絲體抗氧化及抗腫瘤能力之影響。東海大學化學工程與材料工程學系碩士論文。
20. 郭惠菁, 2005. 以固態發酵製備蟲草米及其品質與抗氧化性質。國立中興大學食品科學系碩士論文。
21. 陳勁初, 2007. 樟芝功能性及安全性研究。國立清華大學生命科學系博士論文。
22. 陳淑德、林秀芸、賴裕順、鄭永祥, 2008. 冬蟲夏草薏仁發酵物抗氧化活性及對巨噬細胞功能之影響。台灣農業化學與食品科學 46(6):223-233。
23. 黃玲娟, 2000. 樟芝與姬松茸之抗氧化性質及其多醣組成分析。國立中興大學食品科學系碩士論文。
24. 臧穆、蘇慶華, 1990. 我國台灣產靈芝屬新種-樟芝(型態、定名)。雲南植物研究 12:395-396。
25. 劉英俊、江金追, 1990. 微生物應用工業。中央圖書出版社。
26. 劉景仁, 2007. 探討誘發劑及兩階段培養對樟芝深層發酵三?類及抗癌作用之影響。臺灣大學食品科技研究所碩士論文。
27. 蔡雁暉, 2002. 樟芝深層培養液及其多醣體之抗氧化特性。國立中興大學食品科學研究所碩士論文。
28. 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系碩士論文。
29. 謝岳峰, 2007. 以幾丁聚醣培養樟芝菌絲體生產葡萄糖胺與抗氧化之研究。國立屏東科技大學生物機電工程系所碩士論文。
30. 謝昆霖, 2007. 番木瓜果實水萃取物之抗氧化能力研究。靜宜大學食品營養學系碩士論文。
31. Ahsan, H., Ali A., and Ali R., 2003. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical & Experimental Immunology* 131:398-404.
32. Ao, Z.H., Xua, Z.H., Lub, Z.M., Xua, H.Y., Zhang, X.M., and Dou, W.F., 2009. *Niuchangchih* (*Antrodia camphorata*) and its potential in treating liver diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 121:194 – 212.
33. Bartosz, G., 2003. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Commensts Toxicol* 9:5-21.
34. Chang, C.Y., Huang, Z.N., Yu, H.H., Chang, L.H., Li, S.L., Chen, Y.P., Lee, K.Y. and Chuu, J.J., 2008. The adjuvant effects of *Antrodia camphorata* extracts combined with anti-tumor agents on multidrug resistant human hepatoma cells. *Journal of Ethnopharmacology* 118:387 – 395.
35. Chang, T.T. and Chou, W.N., 1995. *Antrodia cinnamomea* sp. nov. on *Cinnamomum kanehirai* in Taiwan. *Mycological Research* 99

(b): 756-758. 36. Chang, T.T. and Chou, W.N., 2004. *Antrodia cinnamomea* reconsidered and *A. salmonea* sp. nov. on *Cunninghamia konishii* in Taiwan. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 45: 347-352. 37. Chen, T.I., Chen, C.C., Lin, T.W. Tsai, Y.T., and Nam, M.K., 2011. A 90-day subchronic toxicological assessment of *Antrodia cinnamomea* in Sprague – Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology* 49:429 – 433. 38. Chen, Y.C., Ho, H.O., Su, C.H., and Sheu, M.T., 2010. Anticancer effects of Taiwanofungus camphoratus extracts, isolated compounds and its combinational use. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2(6):274-281. 39. Cherng, I.H. and Chiang, H.C., 1995. Three new triterpenoid from *Antrodia cinnamomea*. *Journal of Natural Products* 58: 365-371. 40. Cherng, I.H., Wu, D.P., and Chiang, H.C., 1996. Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *Phytochemistry* 41(l):269-267. 41. Decker, E.A. and Welch, B., 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38:674. 42. Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C., and Almeida, L.M., 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of biochemistry and biophysics* 315:161-169. 43. Fang, Y.Z., Yang, S., and Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18:872-879. 44. Gutteridge, J.M.C. and Halliwell, B., 2010. Antioxidants: molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393:561 – 564. 45. Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews* 52:253-265. 46. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1998. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press 548-549. New York. 47. Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico S., and Aruoma, O.I., 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Sciences Nutrition* 35:7-20. 48. Huang, L.C., Huang, S.J., Chen, C.C., and. Mau, J.L., 1999. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata*. *Proceedings of 3rd International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, 275-283. 49. Jacob, R.A., 1994. Nutrition, health and antioxidants. *Inform* 5: 1271-1275. 50. Kuo, M.C., Chang, C.Y., Cheng, T.L., and Wu, M.J., 2008. Immunomodulatory effect of *Antrodia camphorata* mycelia and culture filtrate. *Journal of Ethnopharmacology* 120:196 – 203. 51. Lin C.H. and Chang C.Y., 2005. Textural change and antioxidant properties of broccoli under different cooking treatments. *Food Chemistry* 90:9 – 15. 52. Liu J.J., Huang, T.S., Hsu, M.L., Chen, C.C., Lin, W.S., Lu F.J., and Chang, W.H., 2004. Antitumor effects of the partially purified polysaccharides from *Antrodia camphorata* and the mechanism of its action. *Toxicology and Applied Pharmacology* 201:186-193. 53. Mizuno, T., 1999. The extraction and development of antitumoractive polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medical Mushrooms* 1: 9-29. 54. Nes, W.D. and Zhou, X., 2002. Triterpenoids: higher. *Encyclopedia of Life Sciences* 12:1-13. 55. Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307-315. 56. Phuong, D.T., Ma, C.M., Hattori, M., and Jin, J.S., 2009. Inhibitory Effects of Antrodins A – E from *Antrodia cinnamomea* and Their Metabolites on Hepatitis C Virus Protease. *Phytotherapy Research* 23:582 – 584. 57. Robak, J. and Gryglewski, I.R., 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology* 37: 837-841. 58. Shih, I.L., Pan, K., and Hsieh, C., 2006. Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *A. cinnamomea*. *Process Biochemistry* 41:1129 – 1135. 59. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., and Nakamura, T., 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:945-948. 60. Skaper, S.D., Fabris, M., Ferrari, V., Carbonare, M.D., and Leon, A., 1997. Quercetin Protects Cutaneous Tissue-Associated Cell Types Including Sensory Neurons From Oxidative Stress Induced By Glutathione Depletion: Cooperative Effects of Ascorbic Acid. *Free Radical Biology and Medicine* 22(4):669 – 678. 61. Tang, Y.J., and Zhong, J.J., 2003. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme Microbial Technology* 32:478-84. 62. Urso, M.L. and Clarkson, P.M., 2003. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189: 41-54. 63. Williams, W.B., Cuvelier, M.E., and Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and technology* 28(1): 25-30. 64. Wu, S.H., Ryvardeen L., and Chang, T.T., 1997. *Antrodia camphorata* ("niu-chang-chih") new combination of a medical fungus in Taiwan. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 38:273-275. 65. Yang, C.M., Zhou, Y.J., Wang, R.J., and Hu, M.L., 2009. Anti-angiogenic effects and mechanisms of polysaccharides from *Antrodia cinnamomea* with different molecular weights. *Journal of Ethnopharmacology* 123:407 – 412. 66. Yang, H.L., Kuo, Y.H., Tsai, C.T., Huang, Y.T., Chen, S.C., Chang, H.W., Lin, E., Lin, W.H., and Hseu, Y.C., 2011. Anti-metastatic activities of *Antrodia camphorata* against human breast cancer cells mediated through suppression of the MAPK signaling pathway. *Food and Chemical Toxicology* 49:290 – 298. 67. Yang, S.W., Shen, Y.C., and Chen, C.H., 1996. Steroids and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea*-a fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. *Phytochemistry* 41(5):1389-1392. 68. Yu, T.W. and Ong C.N., 1999. Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid): rationale, application, and limitation. *Analytical biochemistry* 275:217-223.