

# 探討不同誘發因子對穀物培養樟芝生物活性成分之影響

高念華、柯文慶、謝昌衛

E-mail: 344715@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*)為台灣特有的藥用真菌，其子實體生長緩慢且稀少。近年來，牛樟芝已被證實具有治療肝病及其他如抗腫瘤、抗氧化、抗發炎等等功效。其活性成分主要以多醣體與三萜化合物為主，然而現今的栽培技術除牛樟木椴木栽培外其三萜類化合物含量只0.8%左右(相同重量下子實體約3%以上)，因此本實驗藉由不同的誘發因子於樟芝穀物培養中，誘發其三萜的生成並運用超音波輔助萃取搭配直交試驗探討最適化萃取條件。結果顯示在選用的中草藥誘發劑以靈芝效果最好，其三萜類化合物約 $1.13 \pm 0.01\%$ ，依次是萆薢(1.09%)厚朴(0.96%)，且靈芝在培養初期有最高的三萜轉換率(2.41)，在化學誘發劑方面以角鯊烯最好，其最高三萜含量與三萜轉換率分別為 $1.18 \pm 0.08\%$ 和2.55，其他因子方面，具有影響的分別為水分含量與通氣時間，短時間低溫處理影響並不顯著。在超音波輔助萃取方面，以時間(30、35、40、45 min)、酒精濃度(55、65、75、85%)、溫度(40、50、60、70)、超音波頻率(28、40、56、80 kHz)，經變異數(ANOVA)分析又以酒精濃度和萃取時間有顯著的影響( $p < 0.05$ )，透過實驗設計其最適化萃取點為A2B3C3D1(萃取時間35min、乙醇濃度75%、萃取溫度60、萃取頻率28 kHz)，其萃取量為總三萜量的93.83%，而時間只要35 min，與傳統浸泡和索氏萃取相比有大幅縮短時間萃取時間的現象，證明超音波萃取可有效縮短萃取時間提高萃取效益。

關鍵詞：樟芝、穀物培養、超音波萃取、三萜、誘發因子

## 目錄

封面內頁 簽名頁 中文摘要.....	iii	英文摘要.....	vii
iv 誌謝.....	vi	目錄.....	vii
xi 表目錄.....	xiii	1. 前言.....	1
1.2 文獻回顧.....	2	2.1 樟芝的介紹.....	2
2.2 樟芝活性成分.....	2	2.2.1 三萜類之介紹.....	4
2.2.1.1 三萜類之合成機制.....	4	2.2.1.2 樟芝中之三萜類.....	5
2.2.2 多醣體.....	7	2.2.2.1 多醣的分類.....	7
2.2.2.2 影響多醣活性的因素.....	10	2.2.2.3 牛樟芝多醣體.....	10
2.2.3 樟芝生理活性.....	11	2.3 樟芝培養方式.....	15
2.4 誘發劑.....	18	2.5 樟芝萃取.....	20
2.5 直交實驗設計.....	22	2.6 添加物對樟芝固態培養之影響.....	26
3. 材料與方法.....	25	3.1 實驗架構.....	28
3.2 實驗材料.....	30	3.2.1 樟芝菌株.....	30
3.2.2 實驗藥品.....	30	3.2.3 實驗儀器與設備.....	31
3.3 實驗方法.....	32	3.3.1 培養方法.....	32
3.3.1.1 試管斜面培養.....	32	3.3.1.2 培養皿平板培養.....	32
3.3.1.3 液態培養.....	32	3.3.2 誘發因子與穀物培養樟芝試驗方法.....	34
3.3.2.1 樟芝的水分含量試驗方法.....	34	3.3.2.2 添加物對穀物培養樟芝試驗方.....	34
3.3.2.3 低溫冷處理對穀物培養樟芝試驗方法.....	35	3.3.2.4 通氣時間點對穀物培養樟芝試驗方法.....	35
3.3.3 萃取實驗設計與方法.....	35	3.3.3.1 超音波輔助萃取條件探討.....	35
3.3.3.2 直交試驗法回應值、級差值(R值)計算與變異數分析.....	36	3.4 分析方法.....	36
3.4.1 菌絲分析流程.....	36	3.4.2 總三萜含量分析.....	37
3.4.3 總多醣濃度測定.....	37	3.4.4 粗三萜及多醣含量之生物轉換率.....	37
3.4.5 統計分析.....	37	4. 結果與討論.....	39
4.1 探討各培養因子對樟芝菌絲體粗三萜及多醣含量及其生物轉換率之影響.....	39	4.1.1 樟芝液態培養時間對菌絲濃度之影響.....	39
4.1.2 水分含量對樟芝菌絲體粗三萜及多醣濃度之影響.....	41	4.1.3 靈芝的添加對樟芝菌絲體粗三萜及多醣濃度之影響.....	43
4.1.4 厚朴的添加對樟芝菌絲體粗三萜及多醣濃度之影響.....	47	4.1.5 萆薢的添加對樟芝菌絲體粗三萜及多醣濃度之影響.....	51
4.1.6 幾丁聚醣的添加對樟芝菌絲體粗三萜及多醣濃度之影響.....	55	4.1.7 角鯊烯的添加對樟芝菌絲體粗三萜及多醣濃度之影響.....	59
4.1.8 低溫壓迫對樟芝菌絲體粗三萜及多醣濃度之影響.....	63	4.1.9 通氣對樟芝菌絲體粗三萜及多醣濃度之影響.....	63
4.2 探討超音波輔助萃取對穀物培養樟芝粉末之影響.....	67	4.2.1 超音波輔助萃取對樟芝穀物培養粗三萜萃取之邊界試驗.....	67
4.2.2 探討超音波輔助萃取樟芝穀物培養三萜最適條			

件.....	73	4.2.2.1直交實驗設計中萃取時間對萃取率的影響.....	73	4.2.2.2直交實驗設計中乙醇濃度對萃取率的影響.....	73	4.2.2.3直交實驗設計中萃取溫度對萃取率的影響.....	74	4.2.2.4直交實驗設計中萃取頻率對萃取率的影響.....	74	4.2.2.5最適化萃取的條件.....	75	4.2.3超音波萃取與傳統萃取方法比較.....	75	5. 結論.....	82	參考文獻.....	83																																																																
圖 1 樟芝在生物學上的分類地位.....	3	圖 2 三?類物質合成路徑圖.....	6	圖 3 樟芝子實體中Ergostane型化合物.....	8	圖 4 樟芝子實體中Lanostane型化合物.....	12	圖 5 多醣體 -(1-3)- D-glucan的結構式(A) -(1-3)-D-glucan X-射線繞射圖(B).....	23	圖 7 第一部分實驗架構圖.....	28	圖 8 第二部分實驗架構圖.....	29	圖 9 液態培養期間樟芝菌絲體含量之變化.....	40	圖 10 水分含量對穀物培養樟芝固態醣與三?之影響.....	42	圖 11 添加靈芝對穀物培養樟芝三?濃度之影響.....	45	圖 12 靈芝對穀物培養樟芝中三?生物轉換率之影響.....	46	圖 13 厚朴對穀物培養樟芝中三?濃度之變化.....	49	圖 14 厚朴對穀物培養樟芝三?生物轉換率之影響.....	50	圖 15 荖藤葉對穀物培養樟芝中三?濃度之影響.....	53	圖 16 荖藤葉對穀物培養樟芝中三?生物轉換率之變.....	54	圖 17 幾丁聚醣對穀物培養樟芝中三?濃度之影響.....	57	圖 18 幾丁聚醣對穀物培養樟芝中三?生物轉換率變化.....	58	圖 19 角鯊烯對穀物培養樟芝中三?醣濃度之影響.....	61	圖 20 角鯊烯對穀物培養樟芝中三?生物轉換率之影響.....	62	圖 21 短時間低溫刺激對穀物培養樟芝三?之影響.....	65	圖 22 穀物培養樟芝期間通氣對三?與多醣之影響.....	66	圖 23 時間對樟芝穀物培養粉末萃取三?與多醣之影響.....	69	圖 24 固液比對樟芝穀物培養粉末萃取三?與多醣之影響.....	70	圖 25 乙醇濃度對樟芝穀物培養粉末萃取三?與多醣之影響.....	71	圖 26 溫度對樟芝穀物培養粉末萃取三?與多醣之影響.....	72	圖 27 直交試驗中4因子對樟芝固態培養粉末萃取之影響.....	79	表目錄 表 1 從牛樟芝分離多醣體分餾物質的特性.....	13	表 2 樟芝不同培養方式之比較.....	17	表 3 萃取技術之萃取性能比較.....	24	表 4 直交試驗表L16(44)直交表實驗配置.....	23	表 5 樟芝固態培養基組成.....	33	表 6 添加靈芝對穀物培養樟芝多醣含量及生物轉換率之影響.....	44	表 7 添加厚朴對穀物培養樟芝多醣含量及生物轉換之影響.....	48	表 8 添加荖藤葉對穀物培養樟芝多醣含量及生物轉換之影響.....	52	表 9 添加幾丁聚醣對穀物培養樟芝多醣含量及生物轉換率之影響.....	56	表 10 添加角鯊烯對穀物培養樟芝多醣含量及生物轉之影響.....	60	表 11 直交實驗設計中各因子與水準之定義.....	76	表 12 直交表L16(44)直交表實驗設計萃取實驗結果.....	77	表 13 直交試驗設計法-級差分析果.....	78	表 14 直交實驗設計三?類化合物萃取實驗之變異數分析.....	80	表 15 超音波萃取、索氏萃取與浸泡萃取比較.....	81

## 參考文獻

- 1.水野卓和川合正允著，賴慶亮譯。1997。菇類的化學，生化學。國立編譯館。
- 2.王元林、鄧敏銳。2005。東南亞檳榔文化探析。世界民族3:63-69。
- 3.王立青，江榮高，陳蕙芳。2005。厚樸酚與厚樸酚藥理作用的研究進展。中草藥。36(10): 1591-1593
- 4.王柏森。2008。樟芝(*Antrodia cinnamomea*)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。屏東。
- 5.王雅欣。2008。樟芝抗發炎活性成分及其研究。國立中興大學農藝學系碩士論文。台中。
- 6.王瑛、艷華、偉明。2010。中藥三?類化合物提取純化工藝的研究進展。黑龍江醫藥。23(2):226-228
- 7.安寶貞、黃德昌、王姻婷。2002。台灣荖葉與荖花病原菌之鑑定。植物病理學會刊。11(4):179-188。
- 8.朱自平、張明發。1997。厚朴的陣痛抗炎藥理作用。中草藥28(10):613-615。
- 9.朱建儒。2003。探討通氣量對於樟芝發酵生產生物鹼之影響，國立中央大學碩士論文。桃園。
- 10.朱海文。2005。牛樟之椴木培養之研究探討，朝陽科技大學應用化學系碩士論文，台中。
- 11.吳昇原。2002。牛樟抽出物對樟芝生長影響探討。國立台灣大學森林研究所碩士論文。台北。
- 12.吳德鵬。1995。樟芝微量成份的研究。國立台灣師範大學化學研究所碩士論文。台北。
- 13.李宛蕓。2003。樟芝菌絲體培養與生理活性成分生成之研究。東海大學化學工程研究所碩士論文。台中。
- 14.李思穎。2002。檳榔嚼塊對口腔上皮細胞轉錄因子NF- $\kappa$ B活性之調控。國立陽明大學口腔生物研究所碩士論文。台北。
- 15.李淑玲、許美智。2003。營養增補劑 - 靈芝之探討。大專體育(64):165-167。
- 16.肖崇厚和陳蘊如。1989。中藥化學。上海。科學技術出版社。323-360。
- 17.岳楓。2010。台灣宏寶石牛樟芝。商訊文化事業股份有限公司。台北。
- 18.林宏縵。2004。設計一種新型的直交例子群最佳化演算法。逢甲大學碩士論文。台中。
- 19.林志遠。2005。牛樟芝子實體形成之探討。國立東華大學生物技術研究所碩士論文。花蓮。
- 20.高曉薇。1992。台灣靈芝屬新種樟芝之三?類成分研究。台北醫學院天然醫學研究所碩士論文。台北。
- 21.張上鎮。2003。牛樟抽出成分的分離、鑑定對牛樟菇生長之影響。行政院農業委員會林務局委託研究計畫。國立台灣大學森林系。台北。
- 22.張東柱、邱文慧、華傑。1997。台灣木生性無褶菌培養彩色圖鑑(第二輯)。食品工業發展研究所。
- 23.

張家祥。2008。不同中草藥或精油於樟芝固態栽培菌絲體之生物活性成分的影響。私立大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。

24.張圓笙和周正俊。1981。萜藤對於Aspergillus parasiticus, Aspergillus niger 和 Mucormucedo 孢子發芽之影響。中國農業化學會誌。19(1):99-107 25.淺井一彥。1969。教學和醫學。日本。26.郭淑卿。2003。樟芝發酵液對大鼠肝纖維化及胃腸功能之改善作用。中國醫藥學院中國藥學研究所碩士論文，台中。27.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博士論文。桃園。28.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所碩士論文。台中。29.黃鈴娟。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，台中。30.黃賢剛、全永亮、管斌、胡勇。2010。黑木耳多醣研究進展。糧油食品科技。18(1):47-54 31.楊合、詹梅。2004。材料加工過程實驗建模方法。西北工業。西安。32.楊耀銘。2009。牛樟汁讓生命更豐富。巨煒股份有限公司。台北 33.楊騰緯。2008。樟芝培養之研究探討。私利朝陽科技大學生物技術研究所碩士論文。台中 34.維德。1984。現代蘑菇栽培學。輕工業出版社。北京 35.劉景仁。2007。探討誘發劑及兩階段培養對樟芝深層發酵三萜類及抗癌作用之影響。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。台北。36.劉俊仁。2003。中草藥抗癌機制研究:(壹)黃芩素及黃芩對血管新生作用之影響及其機制探討;(貳)樟芝活性多醣體之生物活性分析及其經由免疫調節抑制腫瘤生長之研究，國立臺灣大學生物化學暨分子生物學研究所博士論文，新北市。37.劉英俊和江金追。1990。微生物應用工業。中央圖書出版。

38.潘若芝。2004。不同培養方式對樟芝多醣及乙醇抽出物生產之研究。私立大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。39.賴慶亮。1997。菇的化學、生化學。國立編譯館13:374。40.薛姿涓。2005。培養條件對樟芝菌絲固態培養之影響。東海大學化學工程學系碩士論文。台中。41.顏正華 編著。1994a。中藥學(上)。第320-323頁。知音出版社。台北，台灣。42.顏正華 編著。1994b。中藥學(下)。第678-679頁。知音出版社。台北，台灣。43.蘇朝墩。1990。產品穩健設計-田口品質工程方法的介紹與應用。中華民國品質學會。台北。44.偉祺。2008。不同萃取方法對段木及醱酵培養牛樟芝活性成分產量分析之研究。私立大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。

45.Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K., & Sussman, A. S., 1973. A taxonomic review with keys: Ascomycetes and fungi imperfecti. Academic Press. Inc. p.621. New York and London. 46.Cares, M.G., Vargas, Y., Gaete, L., Sainz, J., & Alarcon, J., 2010. Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from Quillaja Saponaria Molina. Physics Procedia. 3(1):169-178 47.Chan, Y. Y., Chang, C. S., Chien, L. H., & Wu, T. F., 2010. Apoptotic effects of a high performance liquid chromatography (HPLC) fraction of Antrodia camphorata mycelia are mediated by down-regulation of the expressions of four tumor-related genes in human non-small cell lung carcinoma A549 cell. J Ethnopharmacol.127(3): 652-661 48.Chang, T. T., & Chou, W. N., 1995. A. cinnamomea sp. novel on Cinnamomum kanehirai in Taiwan. Mycol. Res. 99: 756-758. 49.Chen, Q. H., Fu, M. L., Liu, J., Zhang, H. F., He, G. Q. & Ruan, H., 2009. Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of betulin from white birch bark using response surface methodology. Ultrason Sonochem. 16(5): 599-604 50.Cherng, I. H., Wu, D. P., & Chiang, H. C., 1996. Triterpenoids from A. cinnamomea. Phytochem. 41(1):263-267. 51.Cherng, I. W., & Chiang, H. C., 1995. Three new triterpenoids from Antrodia camphorata. J Nat Prod. 58:365-371. 52.Chiang, H. C., Wu, D. P., Cherng, I. H., & Ueng, C. H. A., 1995. Sesquiterpene lactone, phenyl and biphenyl compounds from A. cinnamomea. Phytochem. 39(3):613-616. 53.Chiang, H. C., Wu, D. P., Cherng, I. H., & Ueng, C. H. A., 1995. Sesquiterpene lactone, phenyl and biphenyl compounds from A. cinnamomea. Phytochem. 39(3):613-616. 54.Chibata, I., Okumura, K., Takeyama, S., & Kotera, K., 1969. Experientia Food Science 25:1237. 55.Cossuta, D., Simandi, B., Vagi, E., Hohmann, J., Prechl, A., Lemberkovics, E., Kery, L. A., & Keve, T., 2008. Supercritical fluid extraction of Vitex agnus castus fruit. Journal Supercritical Fluids. 47(2): 188-194 56.Dong, J., Liu, Y., Liang, Z. & Wang, W., 2010. Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from Salvia miltiorrhiza root. Ultrason Sonochem. 17(1):61-65 57.Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C., & Pegler, D. N., 1999. Dictionary of the fungi. International Mycological Institute. Taiwan. 58.Hseu YC., Chang WC., Hseu YT., Lee CY., Yech YJ., Chen PC., Chen JY. & Yang HL., 2002. Protection of oxidative damage by aqueous extract from Antrodia camphorata mycelia in normal human erythrocytes. Life Sciences 71 (4): 469-82. 59.Lee, I. H., Chen, C. T., Chen, H. C., Hsu, W. C., & Lu, M. K., 2002. Sugar flux in response to carbohydrate-feeding of cultured Antrodia camphorata, a recently described medicinal fungus in Taiwan. J. Chinese Med. 13(1):21-31. 60.Lee, I. H., Huang, R. L., Chen, C. T., Chen, H. C., Hsu, W. C. & Lu, M. K., 2002. Antrodia camphorata polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. Fems Microbiol Lett. 209(1): 61-65 61.Leung, Y. W., & Wang, Y., 2001. An orthogonal genetic algorithm with quantization for global numerical optimization, IEEE Trans. Evol Comput. 15(1): 41-53, 2001. 62.Li, J., Zu, Y. G., Fu, Y. J., Yang, Y. C., Li, S. M., Li, Z. N. & Wink, M., 2010. Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (Xanthoceras sorbifolia Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. Innov Food Sci Emerg. 11(4): 637-643 63.Li, Yan-qun, & Zhang, Ke-chang. 2003 The effect of 12 kinds of chinese traditional medicines on submerged cultivation of gano derma lucidum. Food and Fermentation Industries. 29(3):38-40. 64.Lin, E. S., & Chen, Y. H., 2007. Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of Antrodia cinnamomea using complex media. Bioresource Technol. 98(13):2511-2517. 65.Lin, S. C., Chang, J., Deng, T. S., 2009. Enzymatic hot pressurized fluids extraction of polyphenolics from Pinus taiwanensis and Pinus morrissonicola. J Taiwan Inst Chem E. 40(2): 136-142 66.Liu DZb, Liang YC, Lin SY, Lin YS, Wu WC, Hou WC, Su CH. 2007. Antihypertensive activities of a solid-state culture of Taiwanofungus camphorates (Chang-Chih) in spontaneously hypertensive rats. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 71 (1): 23-30. 67.Lu, Z. M., Tao W. Y., Xu, H. Y., Ao, Z. H. & Zheng, H., 2008. Quantitative analysis of triterpenoids from Antrodia camphorata in submerged culture. Chinese Traditional Patent Medicine. 30(3):402-405 68.Maggio, A.E. De & Lott, J.A., 1964. Application of ultrasound for increasing alkaloid yield from datura. J Pharm Sci. 53:495. 69.Margaret E. Love, J.F. Smith, Phyllis E. Randle, 1983. The effect of insulated covers on mushroom compost-stack temperatures. Sci Hortic-Amsterdam. 20(1):53-59 70.Masuda A., Akiyama S., Kuwano M., 1982. Potentiation of antifungal effect of amphotericin B by squalene, an intermediate for sterol biosynthesis. J J Antibiot. 35(2):230-240 71.Mizuno T., 1995. Bioactive biomolecules of mushrooms: Food fruction and medicinal effect of

mushroom fungi. *Food Reviews International* 11 (1): 7-21. 72. Park, S. H., 1996. *Robust Design and Analysis for Quality Engineering*. Chapman & Hall, U.K. 73. Phadke, M. D., 1989. *Quality Engineering Using Robust Design*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall. 74. Phillips, Dereth R., Rasbery, Jeanne M., Bartel, B., & Matsuda, Seiichi PT., 2008. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Curr Opin Plant Biol* . 9(3):305-314 75. Reddy, L. Harivardhan & Couvreur, Patrick, 2009. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Adv Drug Deliver Rev*. 61(15): 1412-1426 76. Senthil Kumar, K.J., Chu, F. H., Hsieh, H. W., Liao, J. W., Li, W. H., Lin, J. C. C., Shaw, J. F., Wang, S. Y., 2011. Antroquinonol from ethanolic extract of mycelium of *Antrodia cinnamomea* protects hepatic cells from ethanol-induced oxidative stress through Nrf-2 activation. *J Ethnopharmacol*. 136(1):168-177 77. Shih, I. L., Pan, K. & 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 Biochem*. 41:1129 – 1135. 78. Vinatoru, Mircea, 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem*. 8(3):303-313 79. Yang, F. C., Huang, H. C., Yang, M. J., 2003. The influence of environmental conditions on the mycelial growth of *Antrodia cinnamomea* in submerged cultures. *Enzyme Microb Tech*. 33(4): 395-402. 80. Yang, S. W., Shen, Y. C., & Chen, C. H., 1996. Steroids and triterpenoids of *A. cinnamomea*—A fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*. *Phytochem*. 41(5):1389-1392. 81. Young, D. S., Chiang, H. C., & Liu, L. K., 1998. Identification of bioactive components in *A. cinnamomea* by MS/MS via EI ionization. *J Chinese Chem Soc*. 45:123-129. 82. Zhang, H. F., Yang, X. H., Zhao, L. D., & Wang, Y., 2009. Ultrasonic-assisted extraction of epimedin C from fresh leaves of *Epimedium* and extraction mechanism. *Innov Food Sci Emerg*. 10:54-60 83. Zhao, J., Davis, Lawrence C. & Verpoorte R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*. 23(4):283-333 84. Zong-Hua Ao, Zheng-Hong Xu, Zhen-Ming Lu, Hong-Yu Xu, Xiao-Mei Zhang, Wen-Fang Dou, 2009. *Niuchangchih* (*Antrodia camphorata*) and its potential in treating liver diseases. *J Ethnopharmacology*. 121:194-212