

探討樟芝菌於福州杉椴木上子實體生長情形及其三之最適化萃取條件

陳頤安、柯文慶、謝昌衛

E-mail: 364876@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究主要利用福州杉(*China Fir*)椴木培養樟芝子實體(*Antrodia cinnamomea*)探討其生長情形，並分析生長於牛樟椴木及福州杉椴木上子實體之粗三?黴B清除DPPH能力及HPLC圖譜分析之差異，結果顯示，利用福州杉所培養出之子實體其粗三?黴t量為3.25%並且清除DPPH能力67.25% (0.01mg/ml)，相較於利用牛樟椴木培養之子實體粗三?黴t量為4.31%、清除DPPH能力72.31% (0.01mg/ml) 都要來的低，並由HPLC圖譜分析上顯示所內含的成分也有些許之差異性存在。為了將福州杉上所生長之子實體三?黴擢魑嚙[以純化，利用超音波輔助萃取，在不同的酒精濃度(%)、溫度()、固液比(g/ml)對三?黴孝悃?尸鈞薩v響，並由反應曲面法可得知其最適化萃取條件，分別為酒精濃度74.38%、溫度60.41、固液比1g/104.81ml 時可達到最佳萃取樟芝三?黴妙蘆G。並在分離萃取液中不同之三?黴 X物，利用分子模板技術將其三?黴擢驢A因此在選用squalene作為模板時，分離效果可達到68.47%，而利用18- -Glycyrrhetic acid作為模板時分離效果可達至85.31%，綜合結果顯示，人工培育方式亦可於福州杉上培育出樟芝子實體，並藉由分子模板技術，進行有效性成份之專一性分離，藉此提升樟芝子實體產量及其藥廠製藥之應用價值。

關鍵詞：福州杉、牛樟芝、超音波萃取、分子模板、粗三?

目錄

封面內頁 簽名頁 中文摘要iii 英文摘要iv 誌謝v 目錄vi 圖目錄ix 表目錄xi 1.前言1 2.文獻回顧2 2.1牛樟芝介紹2 2.1.1牛樟芝基本概述2 2.1.2牛樟芝分類3 2.1.3牛樟芝子實體4 2.2牛樟芝生理活性成分7 2.2.1牛樟芝三?黴?O7 2.2.2三?黴?艾z活性10 2.3牛樟芝藥用價值10 2.4其他活性成分12 2.4.1超氧歧化??SOD)12 2.4.2核酸類13 2.5牛樟芝人工培養13 2.6椴木栽培14 2.7福州杉14 2.8不同萃取方式15 2.8.1熱迴流萃取15 2.8.2微波輔助萃取15 2.8.3超臨界流體萃取17 2.8.4超音波萃取17 2.9分子模板之簡介18 3.材料與方法20 3.1材料與試藥20 3.2儀器20 3.3實驗方法21 3.3.1實驗流程21 3.3.2菌種培養21 3.3.2.1試管斜面培養21 3.3.2.2培養皿平板培養21 3.3.2.3液態培養23 3.3.3樟芝椴木培育24 3.3.4樟芝子實體生物活性檢測24 3.3.4.1三?黴? X物含量分析24 3.3.4.2HPLC分析條件24 3.3.4.3清除DPPH能力探討26 3.4最適化超音波萃取條件探討26 3.5統計分析29 3.6分子模板29 3.6.1分子模板製備30 4.1椴木栽培35 4.1.1福州杉與牛樟椴木生長情形35 4.1.2生長差異性35 4.1.3三?黴t量差異42 4.1.4清除 -diphenyl- -picrylhydrazyl (DPPH)能力42 4.1.5HPLC分析兩者差異43 4.2不同萃取條件之比較44 4.2.1不同濃度乙醇萃取之差異44 4.2.2清除DPPH能力50 4.2.3HPLC分析50 4.3超音波萃取最適化條件60 4.4分子模板分離三?黴 X物61 5.結論71 參考文獻72 圖目錄 圖1、樟芝在生物學上的分類地位 6 圖2、樟芝子實體中Ergostane型化合物8 圖3、樟芝子實體中Lanostane型化合物9 圖4、分子模板示意圖 19 圖5、超音波輔助萃取裝置22 圖6、實驗流程圖25 圖7、椴木栽培模組27 圖8、最適化萃取實驗流程圖31 圖9、分子模板製備流程圖34 圖10、一個月後牛樟椴木上樟芝菌生長情形36 圖11、一個月後福州杉椴木上樟芝菌生長情形37 圖12、三個月後牛樟椴木上樟芝菌生長情形38 圖13、三個月後福州杉椴木上樟芝菌生長情形39 圖14、六個月後牛樟椴木上樟芝菌生長情形40 圖15、六個月後福州杉椴木上樟芝菌生長情形41 圖16、牛樟芝與福州杉子實體總三?黴調?5 圖17、清除DPPH能力比較(A)牛樟芝子實體(B)福州杉子實體46 圖18、野生牛樟芝子實體HPLC圖譜分析47 圖19、乙醇萃取牛樟椴木栽培之子實體HPLC圖譜分析48 圖20、乙醇萃取福州杉椴木栽培之子實體HPLC圖譜分析49 圖21、不同濃度萃取溶劑及不同萃取時間樟芝萃取液顏色變化51 圖22、不同萃取方式於不同時間點總三?黴巫雉?3 圖23、一次萃取後子實體三?黴t量54 圖24、不同濃度之萃取溶劑清除DPPH能力55 圖25、利用熱水分別萃取10、30、60 min之萃取液HPLC分析圖譜(紅)10min(黑)30min(藍)60min56 圖26、利用50%乙醇分別萃取10、30、60 min之萃取液HPLC分析圖譜(紅)10min(黑)30min(藍)60min57 圖27、利用95%乙醇分別萃取10、30、60 min之萃取液HPLC分析圖譜(紅)10min(黑)30min(藍)60min58 圖28、熱水萃(紅)、50% 乙醇(黑)及95%乙醇(藍)之萃取60min後萃取液HPLC圖譜分析59 圖29、萃取樟芝子實之三?黴t量實驗值與觀測值比較模型63 圖30、固定酒精濃度50%條件下固液比與溫度對樟芝三?黴悃?v響之反應曲面圖64 圖31、固定溫度50 條件下固液比與酒精濃度對樟芝三?黴悃?v響之反應曲面圖65 圖32、固定固液比1/100 (g/ml)條件下酒精濃度與溫度對樟芝三?黴悃?v響之反應曲面圖66 圖33、不同分子模板之專一性吸附率探討69 表目錄 表1、牛樟樹分布劃分 5 表2、牛樟芝培育方法及其差異性比較16 表3、HPLC分析條件28 表4、三階層三變數之實驗設計反應參數32 表5、三階層三變數之Box-behnken實驗設計33 表6、不同萃取溶劑及萃取時間之Lab值52 表7、三階層三變因對於樟芝子實體萃取三?黴t量之影響62 表8、三階層三變因條件下最佳萃取條件68 表9、不同分子模板在樟芝萃取液中之吸附效果70

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所碩士論文。台中。6.王瑛、艷華、偉明。2010。藥三?衛? X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。台灣茗葉與茗花病原菌之鑑定。植物病理學會刊。11(4):179-188。8.朱海文。2005。牛樟芝椴木培養之研究探討。朝陽科技大學應用化學系所碩士論文。台中。9.何其典。2002。以回應曲面法探討樟芝高密度發酵。國立交通大學生物科技研究所碩士論文。新竹。10.李宛蓁。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。11.李思穎。2002。檳榔嚼塊對口腔上皮細胞轉錄因子NF-kB活性之調控。國立陽明大學口腔生物研究所碩士論文。台北。12.李淑玲、許美智。2003。營養增補劑 - 靈芝之探討。大專體育(64):165-167。13.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。14.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。15.高郁婷。2004。牛樟抽出物及精油對樟芝菌絲及子實體生長之影響。國立台灣大學環境暨資源學研究所碩士論文。台北。16.程一華。1994。樟芝之成分研究。國立台灣師範大學化學研究所碩士論文。台北。17.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。18.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。19.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。20.淺井一彥。1969。教學和醫學。日本。21.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?衛?P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。22.陳清農、陳勁初、張基煌、喬長誠。1999。樟芝揮發性成分之研究。中華民國食品科學技術學會第二十九次會員大會論文摘要。台灣。23.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。24.黃惟敏。1999。樟芝微量成分的研究()。靜宜大學應用化學研究所碩士論文。台中。25.楊耀銘。2009。牛樟芝讓生命更豐富。巨樟股份有限公司。台北。26.楊騰緯。2008。樟芝培養之研究探討。私立朝陽科技大學生物技術研究所碩士論文。台中。27.劉景仁。2007。探討誘發劑及兩階段培養對樟芝深層發酵三?衛?嶼縱蠶@用之影響。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。台北。28.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。29.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。30.?軀殮R。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。31.藤田安二。1952。及 之近似種的、成分的、分佈的，進化的諸關係。Botanical Magazine。65, 245-250。日本。32.藤田安二。1967。精油成分 見 屬 分類 系統。Botanical Magazine。80, 261-271。日本。33.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. 34.B erengere Claude, Philippe Morin, Michel Lafosse, Anne-Sophie Belmont, Karsten Haupt., 2008. Selective solid-phase extraction of a triterpene acid from a plant extract by molecularly imprinted polymer. Talanta 75 :344 – 350. 35.Cares, M.G., Vargas, Y., Gaete, L., Sainz, J., Alarc?曝, J., 2010. Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from *Quillaja Saponaria* Molina. Physics Procedia. 3(1):169-178. 36.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. 37.Chang, T. T., Chou, W. N., 1995. A. *cinnamomea* sp. novel on *Cinnamomum kanehirai* in Taiwan. Mycol. Res. 99: 756-758. 38.Chang., et. al., 2010. united states Patent application publication. US 2010/0304495 A1. 39.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. Ultrasonics Sonochemistry. 16(5): 599-604. 40.Cherng, I.H., Wu, D.P., Chiang, H. C., 1996. Triterpenoids from *A. cinnamomea*. Phytochem. 41(1):263-267. 41.Cherng, I.W., Chiang, H.C., 1995. Three new triterpenoids from *Antrodia camphorata*. J. Nat. Prod. 58:365-371. 42.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. 43.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. 44.Chibata, I., Okumura, K., Takeyama, S., Kotera, K., 1969. Experientia. Food science 25:1237. 45.Cossuta, D., Sim?鴨di, B., V?鬚i, E., Hohmann, J., Prechl, A., Lemberkovics, ??, K?臆y, L ??, Keve, T., 2008. Supercritical fluid extraction of *Vitex agnus castus* fruit. The Journal of Supercritical Fluids. 47(2): 188-194. 46.Dong, J., Liu, Y., Liang, Z., Wang, W., 2010. Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. Ultrasonics Sonochemistry. 17(1):61-65. 47.Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C., & Pegler, D. N., 1999. Dictionary of the fungi. International Mycological Institute. Taiwan. 48.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. 49.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. 50.Leung, Y.W., Wang, Y., 2001. An orthogonal genetic algorithm with quantization for global numerical optimization, IEEE Trans. Evolutionary Computation 15 (1): 41-53, 2001. 51.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. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 11(4): 637-643. 52.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. 53.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. 54.Lin, S.C., Chang,

J., Deng, T.S., 2009. Enzymatic hot pressurized fluids extraction of polyphenolics from *Pinus taiwanensis* and *Pinus morrisonicola*. *J taiwan inst chem e.* 40(2): 136-142. 55.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. 56.Maggio, A.E.De., Lott, J.A., 1964. Application of ultrasound for increasing alkaloid yield from *datura*. *J. Pharm. Sci.* 53:495. 57.Margaret, E.L., Smith, J.F., Randle, P.E., 1983. The effect of insulated covers on mushroom compost-stack temperatures. *Scientia Horticulturae.* 20(1):53-59. 58.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. 59.M. Song, T.J., Hang, Y., Wang, L. Jiang, X.L., Wu, Z., Zhang, J., Shen, I., Zhang, J., 2006. *Anal.* 40: 190 – 196. 60.Park, S. H., 1996. *Robust Design and Analysis for Quality Engineering.* Chapman & Hall. 61.Phadke, M.D., 1989. *Quality Engineering Using Robust Design.* Englewood Cliffs, NJ:Prentice-Hall. 62.Phillips, D.R., Rasbery, Jeanne M., Bartel, B., Matsuda, Seiichi P.T., 2008. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Curr opin plant biol.* 9(3):305-314. 63.Reddy, L. Harivardhan., Couvreur, Patrick, 2009. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 61(15): 1412-1426. 64.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. 65.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 Biochemistry.* 41:1129 – 1135. 66.Vinatoru, Mircea, 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason sonochem.* 8(3):303-313. 67.V. Andrisano, D. Bonazzi, V. Cavrini, *J. Pharm. Biomed.,*1995. *Anal.* 13 (1995) 597 – 605. 68.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. 69.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. 70.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. 71.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. 72.Zhao, J., Davis, Lawrence C., Verpoorte R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol adv.* 23(4):283-333. 73.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.