

# 培養基組成與饋料控制對桑黃菌*Phellinus igniarius*胞外多醣體量產之影響

唐湊筑、柳源德、林芳儀

E-mail: 364877@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

桑黃*Phellinus igniarius*為寄生於桑樹上的橙黃色藥用真菌。桑黃含有豐富的多醣體，許多研究指出桑黃的多醣體具有抗腫瘤活性、抗癌、降血壓、降膽固醇和提高免疫力等療效。本研究使用*Phellinus igniarius*菌種先以搖瓶試驗探討不同碳、氮源對菌絲生質量、胞外多醣體產量之影響，再以5L發酵槽進行批次饋料式醱酵槽培養，探討培養條件對菌絲生質量、胞外多醣體產量之影響，更進一步評估胞內、外多醣體之抗氧化活性。結果顯示，以搖瓶試驗得出，桑黃菌的最適碳、氮源分別為葡萄糖及酵母萃取物，以葡萄糖作為碳源時菌絲生質量及胞外多醣體含量分別為11.29mg/mL及6.38mg/mL，而以酵母萃取物為氮源時分別可得產量為8.5mg/mL及0.81mg/mL。利用5L攪拌式發酵槽探討不同溫度及不同初始pH值對桑黃菌之影響，結果得出以25 對菌絲生質量及多醣體生產量較佳，於不同初始pH培養對桑黃菌菌絲生質量及胞外多醣體之影響，分別在pH 6及pH 5.5時有較佳的產量，各為11.00 mg/mL及7.21 mg/mL。在體外抗氧化活性中，清除DPPH試驗中，當胞內多醣體濃度為10mg/mL時，最高清除率可達86.9%；在還原力試驗中，當胞外多醣體濃度10mg/mL時，還原力吸光值可達1.57；在螯合亞鐵離子試驗中，當胞外多醣體濃度10mg/mL時，最高螯合率可達93.5%。

關鍵詞：桑黃菌、饋料批次發酵、抗氧化

## 目錄

目錄封面內頁	簽名頁	中文摘要	iii	英文摘要	iv	誌謝	vi	目錄	vii	圖目錄	x	表目錄	xii																																																																																												
1. 前言	1.2. 文獻回顧	2.2.1 桑黃簡介	2.2.2 桑黃之生理活性	3.2.2.1 桑黃菌化學成分	3.2.2.2 抑菌作用	4.2.2.3 降血糖及降血脂	4.2.2.4 抗發炎	5.2.2.5 增強人體的自然免疫力	5.2.2.6 對癌症有抑制及預防的效果	6.2.2.7 抗氧化能力	7.2.3 液態發酵影響因子	7.2.3.1 液態發酵	7.2.3.2 碳源	8.2.3.3 氮源	8.2.3.4 無機鹽類	8.2.3.5 溫度	9.2.3.6 pH值	9.3. 材料與方法	10.3.1 試驗菌株	10.3.2 菌株保存	10.3.3 菌種培養	10.3.4 搖瓶培養試驗	11.3.4.1 碳源對桑黃菌的影響	11.3.4.2 氮源對桑黃菌的影響	12.3.5 5L 發酵槽批次式與批次饋料式液態發酵生產條件之探討	12.3.5.1 不同溫度之影響	12.3.5.2 不同初始pH值之影響	12.3.5.3 不同饋料濃度培養之影響	13.3.6 分析方法	13.3.6.1 胞外多醣體之萃取	13.3.6.2 胞內多醣體之萃取	14.3.6.3 多醣體含量測定	14.3.6.4 殘糖分析	14.3.6.5 抑菌活性測定	15.3.7 抗氧化活性之分析	16.3.7.1 還原力之測定	17.3.7.2 亞鐵離子螯合能力	17.3.7.3 DPPH 自由基清除能力	18.3.8 傅立葉紅外線光譜儀(FTIR)圖譜分析	18.4. 結果與討論	19.4.1 搖瓶試驗	19.4.1.1 碳源種類對生質量及EPS之影響	19.4.1.2 氮源對桑黃菌之影響	19.4.2 5L 發酵槽批次式液態發酵	20.4.2.1 碳源種類對生質量及EPS之影響	20.4.2.2 不同初始pH值對菌絲與胞外多醣體之	27.4.2.3 不同饋料濃度培養之影響	35.4.3 發酵液與萃取液對不同菌株之抑菌能力試驗	39.4.4 抗氧化能力試驗	44.4.4.1 DPPH清除能力	44.4.4.2 亞鐵離子螯合能力	45.4.4.3 還原力	46.4.5 傅立葉紅外線光譜儀(FTIR)圖譜分析	46.5. 結論	52. 參考文獻	53. 圖目錄	圖4.1 不同碳源對桑黃菌產生菌絲體與胞外多醣體之影響	22	圖4.2 不同氮源對桑黃菌產生菌絲體與胞外多醣體之影響	26	圖4.3 培養於25 對桑黃菌產生菌絲體與胞外多醣體之影響	27	圖4.4 培養於28 對桑黃菌產生菌絲體與胞外多醣體之影響	28	圖4.5 培養於30 對桑黃菌產生菌絲體與胞外多醣體之影響	29	圖4.6 初始 pH4 於五公升發酵槽培養7天對桑黃菌之影響	31	圖4.7 初始 pH4.5 於五公升發酵槽培養7天對桑黃菌之影響	32	圖4.8 初始 pH5 於五公升發酵槽培養7天對桑黃菌之影響	33	圖4.9 初始 pH5.5 於五公升發酵槽培養7天對桑黃菌之影響	34	圖4.10 初始 pH6 於五公升發酵槽培養7天對桑黃菌之影響	32	圖4.11 不同初始 pH 於五公升發酵槽培養對桑黃菌之菌絲體生物質量之變化	36	圖4.12 不同初始 pH 於五公升發酵槽培養對桑黃菌之胞外多醣體之變化	37	圖4.13 饋入2%之葡萄糖溶液於5L發酵槽培養7天對桑黃菌之胞外多醣體之變化	38	圖4.14 饋入1%之葡萄糖溶液於5L發酵槽培養7天對桑黃菌之胞外多醣體之變化	40	圖4.15 饋入不同濃度溶液於5 L 發酵槽培養對桑黃菌之菌絲體生物質量及胞外多醣體之比較	41	圖4.16 以發酵液與胞內、外多醣體對抑制致病菌生長之影響	43	圖4.17 多醣體與菌絲甲醇萃取液對清除DPPH能力之影響	52	圖4.18 多醣體與菌絲甲醇萃取液對螯合亞鐵離子能力之影響	53	圖4.19 多醣體與菌絲甲醇萃取液對還原力能力之影響	54	圖4.20 -1,3-Glucan 與桑黃菌多醣體之FTIR 圖譜分析	55	表目錄	表 3.1 液態培養基組成	11	表 4.1 桑黃菌發酵液最低抑菌濃度	41	表 4.2 桑黃菌胞內多醣體最低抑菌濃度	42	表 4.3 桑黃菌胞外多醣體最低抑菌濃度	43

## 參考文獻

參考文獻 1.丁偉。2007。桑黃菌生物學特性研究。青島農業大學。碩士論文。 2.王欽博。2011。桑黃抗氧化活性成分的篩選及其分離純化。上海師範大學生命與環境科學學院。碩士論文。 3.回晶、李輝、朱春玉、李其久、胡鳳慶。2009。桑黃子實體與菌絲體營養成分的比較分析。Special Wild Economic Animal and Plant Research。2:59-61。 4.何丹、範雪嬌、楊鳴鳴、所起鳳、杜文婷、劉戟。2011。洋蔥

總黃酮透過血腦屏障抑制腦膠質瘤的作用研究。中藥藥理與臨床 24(3):84-87。5.吳子璋。2009。不同型式發酵槽深層培養桑黃菌 *Phellinus linteus* 生產胞外多醣之研究。東海大學食品科學研究所。碩士論文。6.宋柳微、張佩。2010。桑黃多醣對免疫細胞調節作用研究進展。中國現代醫生。48(12):23-24。7.李宜明、沈業壽、季俊虯。2006。桑黃菌質多醣體外抑癌及抗環磷醯胺致突變的作用。中國科學技術大學學報。36(7):700-703。8.周長文、王芳、陶淑玲。2010。藥用植物桑黃抑制高血糖症的研究。荷澤醫學專科學校學報。22(1):1-2。9.孟慶龍、潘景芝、陳麗、王琦。2011。桑黃胞內及胞外多醣抗癌作用的研究。時珍國醫國藥。22(5):1130-1132。10.孟慶龍、潘景芝、陳麗、王琦。2011。桑黃發酵產物的抑菌作用。食品科學 32(3):56-59。11.姜明、劉岩、王偉功、趙桂雲。2010。不同pH值和培養基對桑黃菌絲生長的影響。食用菌學報。8:192-194。12.胡金霞、楊焱、張勁松、唐慶九、劉豔芳、都瑞霞、馮娜。2009。桑黃醇提物抗氧化和保護神經細胞損傷的研究。上海農業學報25(2):58-61。13.孫錦秀、戈延茹、夏國華、王曉芳。2011。不同來源桑黃子實體總黃酮含量的比較。中外健康文摘。8(15):144。14.張益鳴。2008。培養pH對液態發酵生產桑黃多醣體之影響及其抗氧化特性之研究。明新科技大學。碩士論文。15.張萬國、胡晉紅、蔡濤。2002。桑黃增強人外周血單個核細胞產生干擾素的研究。基層中藥雜誌。16(3):5-6。16.梁志弘。2009。桑黃之液態培養及其生理活性。國立中興大學食品暨應用生物科技學系研究所。博士論文。17.梁佳、孫夢伊、張騰、裴浩宏、張萌萌、范桂枝。2011。響應曲面法優化桑黃菌絲體中 $\beta$ -D-葡聚糖提取工藝。中國農學通報。27(10):235-238。18.莫順燕、楊永春、石建功。2003a。桑黃化學成分研究。中國中藥雜誌。28:339-341。19.莫順燕、楊永春、石建功。2003b。桑黃黃酮A和B的分離與合成。化學學報。61:1161。20.陳欣、龔蘭、劉冠卉。2010。食用真菌多醣提取條件的優化及其還原力的比較。食品科學。31(14):140-144。21.陳奕廷。2005。探討 pH 值和通氣量對 *Penicillium brevicompactum* 生產 *Mycophenolic acid* 之影響。國立中央大學化學工程與材料工程研究所。碩士論文。22.陳建男。2007。啤酒花抗氧化成分之研究。私立大同大學生物工程研究所。碩士論文。23.傅海慶、陳紹軍、駱文燦、陳漢清、林河通。2007。桑黃菌液體發酵培養研究。中國食品學報。3(7):58-63。24.曾念開、王秋穎、蘇明聲、王懷凱。2007。營養及環境因素對鮑氏針層孔菌菌絲生長的影響。食用菌學報。4:6~8。25.黃麗娜。1996。食用菇菌絲體深層培養在食品工業上的應用。食品工業。28(9):20~26。26.翟瓊、馮月飛。2011。真菌桑黃的研究進展。華章。(6):280。27.趙瀾、張紅鋒。桑黃粗多醣對腫瘤細胞增殖及轉移相關能力的抑制作用。2008。東華師範大學學報。2:78-84。28.劉金榮、江發壽、李艷、洪成林、曹永翔、趙文斌。1998。藥用真菌桑黃甾類成分的提取和鑑定。農墾醫學。20:141。29.劉豔芳、楊焱、賈葳、張勁松、唐九慶、唐傳紅。2006。藥用真菌桑黃總黃酮測定方法研究。食用菌學報。13(2):45-48。30.龍明有。2006。桑黃發酵生產多醣體及發酵產物抗氧化特性研究。明新科技大學化學工程系。碩士論文。31.謝江甯、宋素芬、李香、徐秀泉。2012。桑黃總 $\beta$ -D-葡聚糖 $\beta$ -D-葡聚糖-抗腦膠質瘤U251活性。中國實驗方劑學雜誌18(5):24~26。32.羅國晏。2008。深層培養條件及發酵槽種類對桑黃菌 *Phellinus igniarius* 胞外多醣體產量及生物活性之影響。私立東海大學食品科學系研究所。碩士論文。33. Brown, G. D., and Gordon, S. 2003. Fungal  $\beta$ -glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 19(3):311 – 315。34. Chi, J. H., T. M. Ha., Y. H. Kim., Y. D. Rho., 1996. Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Korean Journal of Medical Mycology*. 24:214-222。35. Guo. X., Zou. X., Sun. M., 2010. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary characterization of polysaccharides from *Phellinus igniarius*. *Carbohydrate Polymers*. 80:344-349。36. Hwang. H. J., Kim. S. W., Lim. J. M., Joo. J. H., Kim. H. O., Kim. H. M., Yun. J. W., 2005. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*. 76:3069-3080。37. Kim. B. C., Choi. J. W., Hong. H. Y., Lee. S. A., Hong. S., Park. E. H., Kim. S. J., Lim. C. J., 2006. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of mushroom *Phellinus linteus* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 106:364 – 371。38. Kim. G. Y., Roh. S. I., Park. S. K., Ahn. S. C., Oh. Y. H., Lee. J. D., Park. Y. M., 2003. Alleviation of Experimental Septic Shock in Mice by Acidic Polysaccharide Isolated from the Medicinal Mushroom *Phellinus linteus*. *Biol Pharm Bull*. 26(10):1418—1423。39. Ko, Y. T. and Y. L. Lin. 2004.  $\beta$ -D-glucan quantification by a fluorescence microassay and analysis of its distribution in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:3313-3318。40. Liu. Q. N., Liu. R. S., Wang. Y. H., Mi. Z. Y., Li. D. S., Zhong. J. J., Tang. Y. J., 2009. Fed-batch fermentation of *Tuber melanosporum* for the hyperproduction of mycelia and bioactive Tuber polysaccharides. *Bioresource Technology*. 100:3644-3649。41. Luo. J., Liu. J., Ke. C., Qiao. D., Ye. H., Sun. Y., Zeng. X., 2009. Optimization of medium composition for the production of exopolysaccharides from *Phellinus baumii* Pilat in submerged culture and the immuno-stimulating activity of exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 78:409 – 415。42. Mantovani. M. S., Bellini. M. F., Angeli. J. P. F., Oliveira. R. J., Silva. A. F., Ribeiro. L. R., 2008.  $\beta$ -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research*. 658:154 – 161。43. Novak. M., Vetvicka. V., 2009. Glucans as Biological Response Modifiers. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. 9:67-75。44. Papinutti. L., 2010. Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. *Bioresource Technology*. 101:1941 – 1946。45. Sheng. J., Yu. F., Xin. Z., Zhao. L., Zhu. X., Hu. Q. 2007. Preparation, identification and their antitumor activities in vitro of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. *Food Chemistry*. 105:533 – 539。46. Shih. I. L., Chou. B. W., Chen. C. C., Wu. J. Y., Hsieh. C., 2008. Study of mycelial growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Grifola frondosa*. *Bioresource Technology*. 99:785-793。47. Song. T. Y., Lin. H. C., Yang. N. C., Hu. M. L., 2008. Antiproliferative and antimetastatic effects of the ethanolic extract of *Phellinus igniarius* (Linnaeus: Fries) Quelet. *Journal of Ethnopharmacology*. 115:50 – 56。48. Dinis. T. C. P., Madeira. V. M. C., Almeida. L. M., 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys*. 315(1):161-9。49. Wang, Y. J., Yao, S. J., Guan, Y. X., Wu, T. X., Kennedy, J. F., 2005. A novel process for preparation of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan sulphate by a heterogeneous reaction and its structural elucidation. *Carbohydrate Polymers*. 59(1): 93-99。50. Xu. W., Zhang. F., Luo. Y., Maa. L., Kou. X., Huang. K., 2009. Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum*. *Carbohydrate Research*. 344:217 – 222。51. Zou. X., Sun. M., Guo. X., 2006. Quantitative response of cell growth and polysaccharide

biosynthesis by the medicinal mushroom *Phellinus linteus* to NaCl in the medium. *Microbiology and Biotechnology*. 22:1129 – 1133.