

Study of cultural methods on polysaccharide and ethanol extract product of *Antrrodia cinnamomea* (CCRC36716)

潘若芝、謝建元

E-mail: 9318497@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

The fruiting body of *Antrrodia cinnamomea* is well known in Taiwan by name niu-chang-chih or jang-jy. This fungus is know only in Taiwan and is restricted to *cinnamomum kanehirai* Hay. The basidiomes have been used for the treatment of food and drug intoxication, diarrhea, abdominal pain, hypertension, skin itching and cancer. The main purpose of this research was to study the effect of different cultivation conditions on the production of biomass, extracellular polysaccharide and triterpene in submerged culture. In this study 3%C.S.P as the nitrogen source the best cell concentration was found at 12.52g/L and 1% C.S.P as the nitrogen source the best triterpene production was found at 17mg/g-DW. Among the carbon sources 2% glucose had resulted in the highest intracellular polysaccharide concentration (49mg/g) after 10 day ' s cultivation. Addition of camphor oil or wood chips of *Cinnamomum kanehirae* could enhance the production of triterpenes. The addition of sunflower seed oil the exopolysaccharide concentration increases to 873mg/L after 10 day ' s cultivation. Increase the concentration of oxygen to 30% in a 5-L jar fermentation, the triterpene concentration was also found increase to 18mg/g-DW.

Keywords : *Antrrodia cinnamomea* ; polysaccharide ; triterpene

Table of Contents

封面內頁 簽名頁 授權書		iii 中文摘要
v 英文摘要		viii 誌謝
viii 目錄		viii 圖目錄
viii 第一章 前言		1 第二章 文獻回顧
2 2.1 樟芝之介紹		2 2.2 食藥用菇之生理活性物質 5 2.3
三帖類化合物	6 2.3.1 樟芝中之三帖類	7 2.4 樟中之多醣體
9 2.5 液態培養	12 2.5.1 高等蕈類深層培養	12 2.5.1.1 環
境因子對深層培養的影響	13 第三章 實驗材料與方法	17 3.1 實驗材料
17 3.1.1 試驗菌種	17 3.1.2 實驗藥品	17 3.1.3 實驗器材
	18 3.2 實驗方法	19 3.2.1 平板培養
19 3.2.2 液態菌?培養	19 3.2.3 基礎平板之試驗	20 3.2.3.1 不同氮源對A.
<i>cinnamomea</i> 固態培養基 生長直徑之試驗	20 3.2.4 樣品萃取試驗	21 3.2.4.1 不同萃取方法對於樟
芝三帖類之影響	21 3.2.5.1 不同濃度氮源	21 3.2.5.2 不同濃度碳源
22 3.2.5.3 不同碳源混合	22 3.2.5.4 時間變化	23 3.2.5.5 添加樟腦油
24 3.2.5.7 添加不同油脂	25 3.2.6 探討不同溶氧	24 3.2.5.6
添加牛樟木屑	27 3.3.1 菌體乾重測定	26 3.3 分析方法
法	27 3.3.2 pH測定	
27 3.3.3 胞外多醣分析	27 3.3.3.1 酚硫酸法	27 3.3.3.1.1 標準曲線製作步
驟	27 3.3.3.1.2 胞外多醣濃度測定	28 3.3.4 胞內多醣濃度測定
28 3.3.5 三帖分析	29 3.3.5.1 菇類菌絲體粉末製備	29 3.3.5.2 樣品萃取
29 3.3.5.3 三帖含量測定	30 3.3.5.4 三帖類化學結構之鑑定	30 第四章 結果與討論
32 4.1 基礎平板之試驗	32 4.1.1 不同氮源對A. <i>cinnamomea</i> 固態培養基生長 直徑之影	
響	34 4.2.1 不同萃取方法對於A. <i>cinnamomea</i> 三帖類之 影響	
34 4.3 液態搖瓶發酵	36 4.3.1 不同濃度氮源對樟芝菌絲體及其生理活性物	
質生成之影響	36 4.3.2 不同濃度碳源對樟芝菌絲體及其生理活性物 質生成之影響	44 4.3.3 不同
碳源混合對樟芝菌絲體及其生理活性物 質生成之影響	52 4.3.4 時間變化對樟芝菌絲體及其生理活性物 質生	
成之影響	55 4.3.5 添加樟腦油對樟芝菌絲體及其生理活性物 質 生成之影響	63 4.3.6 添加
木屑對樟芝菌絲體及其生理活性物 質生 成之影響	67 4.3.7 不同油脂類對樟芝菌絲體及其生理活性物 質 生	
成之影響	69 4.3.8 探討不同溶氧對A. <i>cinnamomea</i> 於發酵槽中 批次發酵之影響	76 4.3.9 三帖類化
學結構之鑑定	83 第五章 結論	96 參考文獻
		97 附錄一 營養源A成分表

品Ginsenoside-RC濃度檢量線 105 附錄五 口試問題

106 圖目錄 圖2.1 樟芝子實體萃取物中發現

新的三帖類化合物 10 圖2.2 樟芝子實體萃取物中發現新的三帖類化合物 11 圖4.1 樟芝菌絲體在不同氮源之固態培養皿上之生長曲線 33 圖4.2 不同方式萃取A. *cinnamomea*之HPLC層析圖 35 圖4.3 不同氮源對樟芝三帖成分生成之影響 42 圖4.4 不同氮源對樟芝三帖含量生成之影響 43 圖4.5 不同碳源對樟芝三帖成分生成之影響 49 圖4.6 不同濃度之碳源對樟芝三帖含量生成之影響 50 圖4.7 不同碳源混合對樟芝三帖總量生成之影響 54 圖4.8 以不同濃度氮源探討時間變化對樟芝菌絲體生成之影響 56 圖4.9 以不同濃度氮源探討時間變化對樟芝菌多醣生成之影響 57 圖4.10 以0.5% C.S.P為氮源探討時間變化對樟芝菌三帖生成之影響 59 圖4.11 以1.0% C.S.P為氮源探討時間變化對樟芝菌三帖生成之影響 60 圖4.12 以1.5% C.S.P為氮源探討時間變化對樟芝菌三帖生成之影響 61 圖4.13 不同濃度氮源之樟芝三帖含量生長曲線 62 圖4.14 添加物對樟芝菌三帖生成之影響 65 圖4.15 添加物對樟芝三帖含量生成之影響 66 圖4.16 添加不同油脂對樟芝菌三帖生成之影響 74 圖4.17 不同濃度之油脂對樟芝三帖總量生成之影響 75 圖4.18 以批次發酵探討不同溶氧對樟芝菌體生長之影響 77 圖4.19 以批次發酵探討不同溶氧對樟芝菌產生多醣之影響 78 圖4.20 以批次發酵探討21% O₂對樟芝菌三帖生成之影響 80 圖4.21 以批次發酵探討30% O₂對樟芝菌三帖生成之影響 81 圖4.22 以批次發酵探討不同溶氧對樟芝三帖含量之影響 82 圖4.23 子實體及菌絲體經HPLC分析之圖譜 84 圖4.24 子實體peak 1(滯留時間66min)之質譜 85 圖4.25 子實體peak 2(滯留時間68min)之質譜 86 圖4.26 子實體peak 3(滯留時間70min)之質譜 87 圖4.27 子實體peak 4(滯留時間76min)之質譜 88 圖4.28 子實體peak 5(滯留時間80min)之質譜 89 圖4.29 菌絲體 component A之質譜 90 圖4.30 菌絲體 component B之質譜 91 圖4.31 菌絲體 component C之質譜 92 圖4.32 子實體peak 1之核磁共振光譜 93 圖4.33 子實體peak 2之核磁共振光譜 94 圖4.34 子實體peak 3之核磁共振光譜 95 表目錄 表4.1 不同氮源培養10天對A. *cinnamomea*菌體生成之影響 37 表4.2 不同氮源培養14天對A. *cinnamomea*菌體生成之影響 38 表4.3 不同氮源對樟芝菌發酵液呈色及pH之影響 39 表4.4 不同碳源培養10天對A. *cinnamomea*菌體生成之影響 45 表4.5 不同碳源培養14天對A. *cinnamomea*菌體生成之影響 46 表4.6 不同碳源混合培養10及14天對A. *cinnamomea*菌體生成之影響 53 表4.7 添加樟腦油培養10及14天對A. *cinnamomea*菌體生成之影響 64 表4.8 添加牛樟木屑培養10及14天對A. *cinnamomea*菌體生成之影響 68 表4.9 不同油脂培養10天對A. *cinnamomea*菌體生成之影響 70 表4.10 不同油脂培養14天對A. *cinnamomea*菌體生成之影響 71

REFERENCES

1. 丁懷謙 (2000) 食藥用菇多醣體之免疫生理活性。食品工業。32(5):28-42。
2. 水野卓、川合正允 (賴慶堂譯) (1997) 菇類的化學、生化學。國立編譯館。
3. 王伯徹 (2000a) 具開發潛力之食藥用菇介紹。食品工業。30:1-36。
4. 王伯徹 (2000b) 食藥用菇保健食品之開發。食品工業。32(5):18-27。
5. 肖崇厚、陳蘊如 (1989) 中藥化學。上海科學技術出版社。
6. 李宛蓁 (2003) 樟芝菌絲體培養與生理活性成分生成之研究。東海大學化學工程學系。
7. 呂振富 (2002) 菇菌類在營養保健食品上之發展近況。醫檢會報第3期。
8. 林俊清 (1990) 生藥的解說 - 靈芝的介紹。藥學介紹。6 (3) :104-111。
9. 吳國偉 (2003) 以饋料批次發酵進行蟲草菌(CCRC36412)多醣生產之研究。大葉大學食品工程學系碩士論文。
10. 周碧溫 (2003) 以饋料批次發酵對舞菇多醣生產之探討。大葉大學食品工程學系碩士論文。
11. 高曉微 (1991) 台灣靈芝屬新種樟芝之三帖類成分研究。台北醫學院天然物醫學研究所碩士論文。
12. 陳勁初、呂鋒洲 (2001) 靈芝之王 台灣靈芝。元氣齋出版。
13. 陸文樑、林忠平、林志彬 (1992) 靈芝的科學應用。渡假出版社。
14. 黃家樑 (1997) 液態培養生產靈芝菌絲體與靈芝多醣之研究。東海大學學工程研究所碩士論文。
15. 張東柱 (1983) 台灣數種靈芝生物學上之研究。台灣大學植病所碩士論文。
16. 張淑芬 (2001) 食藥用菇類搖瓶液體培養條件之探討。食品工業。33(7):39-46。
17. 張德玉 (2002) 培養條件對靈芝菌絲體超氧歧化? (SOD) 生成之影響。東海大學化學工程研究所碩士論文。
18. 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。
19. 劉峻汶 (1996) 靈芝液體培養及多醣生成之研究。東海大學化學工程研究所碩士論文。
20. 劉波 (1984) 中國藥用真菌。山西人民出版社。
21. 臧穆、蘇慶華 (1990) 我國台灣產靈芝屬 - 新種 - 樟芝。雲南植物研究。12:395-396。
22. Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K., and Sussman, A. S. (1973) The fungi. Vol. IVB. A Taxonomic Review with Keys: Basidiomycetes and Lower Fungi. Academic Press, Inc. New York. 504.
23. Cherng, I. H. and Chiang, H. C. (1995) Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. J. Natural Products, 58(3),365-371.
24. Cherng, I. H., Wu, D. P. and Chiang, H. C. (1996) Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. Phytochemistry, 41(1),263-267.
25. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Reber, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28(3):350-356.
26. Eyal, J. (1991) Mushroom mycelium growth in submerged culture - potential food applications. Biotechnology and Food Ingredients. ed. Goldberg, I. And Williams, R., Van Nostrand Reinhold. New York, 31-64.
27. Ghosh, A. K. and Sengupta, S. (1982) Influence of some growth factors on the production of mushroom mycelium in submerged culture. Journal of Food Science and Technology, 19(2),57-60.
28. Jong, S. C. and Birmingham, J. M. (1993) Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom. Advances in Applied Microbiology. 39:153-184.
29. Litchfield, J. H. (1967) Submerged culture of mushroom mycelium. In : Microbiol Technology (Pepler, H. J., ed),Reinhold, New York, 107-144.
30. Mizuno, T., Nishitoba, T., Saito, H. and Kawagishi, H. (1995) Antitumor-active substances from mushroom. Food Review International. 11:23-61.
31. Mizuno, T., Wang, G., Zhang, J., Kawagishi, H., Nishitoba, T., and Li, J. Reishi, (1995) *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medical effects. Food Reviews International. 11:151-166.
32. Morigiwa, A., Kitabatake, K., Fujimoto, Y., and Ikekawa, N. (1986) Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 34:3025-3028.
33. Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A., (1985) Structure

and antitumor of the polysaccharide isolated from fruiting body and growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agricultural and Biology Chemistry*, 49(9):2641 - 2653. 34. Wasser, S. P. and Weis, A. L. (1999) Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushroom: a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*. 19:65-96. 35. 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. 36. Yang, F. C., Ke, Y. F. and Kuo, S. S. (2002) Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 27,295-301.