

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號： NSC90-2311-B-009-001

執行期限： 90年08月01日至91年07月31日

主持人： 何小台 交通大學生物科技研究所

共同主持人：

計畫參與人員： 何其典 交通大學生物科技研究所

呂光洲 交通大學生物科技研究所

一、中文摘要

本論文的目的是以高密度發酵的方式，大量生產樟芝菌絲體，並瞭解在培養環境改變的情況下，對相關產物、機能性的影響。

研究的試驗菌株是 *Antrodia cinnamomea* CCRC35396，以傳統的一次一因子法配合回應曲面法（RSM），設計並分析樟芝高密度發酵的最適培養條件。先運用一階設計中的二水準因子設計法，將樟芝以搖瓶震盪實驗，探討培養液中碳源的濃度、氮源的濃度、無機鹽類、橄欖油、椰子汁、植物激素、起始 pH 值及轉速等因子，對樟芝菌絲體生長、發酵液終點 pH 值及多醣生成量的影響；再利用陡升路徑法、中心混成及二階設計，逐步定出最佳培養條件。

對 *Antrodia cinnamomea* CCRC35396 而言，在 500 mL 有溝槽的搖瓶培養中，裝 100 mL 培養液，以溫度 28 °C、轉速 50 r.p.m.、接種量 10 % 的固定條件下，先以一次一因子法固定起始 pH 值為 5，然後再由回應曲面法可得最佳培養環境為 Glucose 3.6788 %、Sucrose 6.734 %、Peptone 0.58 %、Olive Oil 500 λ 、Coconut Milk 10ml、Ion 0.03 %、2,4-D 0.5ppm，另由實驗可得最適化起始 pH 值為 4.5，若分兩段式轉速培養則可提升產量(前 7 天

100rpm，後 7 天 50rpm)。跟原培養條件相比，菌絲體產量已經有顯著的提高，由此可知，在尋找樟芝的最適生長條件上，回應曲面法具有良好的契合度。

關鍵詞：樟芝、高密度發酵、多醣、回應曲面法

Abstract

Antrodia cinnamomea is precious and rare fungus using for Chinese medicine. In the natural world, they are only found in *Cinnamomum kanehirai* Hay that protecting in Taiwan. The purpose of study is going to enhance production of Mycelium and analyze the Polysaccharide concentration in different conditions.

The strategy is to find out the optimum cultured condition of *Antrodia cinnamomea* CCRC35396 with one-factor-at-a-time method and experimental design (response surface methodology). Screening for carbon sources and nitrogen sources are tested by one-factor-at-a-time method. Then we can determine the concentration of nutrients by response surface methodology (RSM). RSM is a systemic manner of statistic and including three steps: the two-level factorial of first order, the path of steepest ascent and

the central composite design of second order.

The optimum cultured conditions of *Antrodia cinnamomea* CCRC35396 are Glucose 3.6788 %, Sucrose 6.734 %, Peptone 0.58 %, Olive Oil 500 λ , Coconut Milk 10mL, Ion 0.03 %, 2,4-D 0.5ppm, when culture in 500 mL Hinton flask containing 100 mL media, 28 °C, 50 r.p.m., initial pH 5. In our experiment we can demonstrate that the best initial pH 4.5. Our product will be increased if we use two stage submerge cultured (First seven days use 100rpm, Last seven days use 50rpm). Results of Mycelium concentrate and Polysaccharide concentrate are increased significantly.

Keywords: *Antrodia cinnamomea*、High cell density fermentation、Polysaccharide、Response surface methodology (RSM)

二、緣由與目的

樟芝較受注意的成份有三帖類、多醣、抗氧化物質(多酚類、胡蘿蔔素)等。將樟芝子實體乾燥、磨粉,以95%酒精提取,從中分離出九種酸性三帖類(acidic triterpenoids)⁽¹⁾。吳德鵬等人⁽²⁾亦由甲醇萃取樟芝子實體之方法,得到十二種化合物,其中三種是三帖類、兩種是植物中常見的長鏈脂肪酸,由官振儀等人⁽³⁾的論文中,可以知道,三帖類有降血壓、抗組織胺釋放、毒殺肝癌細胞等作用。

很多中草藥,含有具機能性的多醣,這些具有生理活性的多醣通常在構造組成上有一定的特性,以組成分類,包括(1) β -D-glucan(葡聚醣),以 β -1-3-glucan為主鏈組成之重複單位,並配有某種比例的 β -1-6-glucan短側鏈;(2)heteroglycan(雜多醣);(3)chitin(幾丁質)(4)peptidoglycan等⁽¹⁾。以分子量分類,可大致分成三類,(1) 5×10^3 Da左右的多醣,可降血糖;(2) 1×10^4 至 100×10^4 Da,具消炎作用;(3) 3×10^4 Da,為抗腫瘤之主要部份。樟芝菌絲體濾液主要多醣分子量在 10^6 Da以上與 1.1×10^4 Da,菌絲體多

醣則在 10^6 Da以上與 7.6×10^5 Da,且在經由核磁共振、紅外線光譜及X光繞射分析判定,樟芝的多醣體亦含有 β -D-glucan之結構,但是關於此結構的分佈狀況、分離純化與藥理作用測試方面則仍有待研究⁽⁴⁾。

近幾年由於生化工程技術的進步,許多對健康有助益的菇菌類都藉著高密度發酵的培養方法,大量回收菌絲體與具有機能性的物質(如多醣體、三帖類、蛋白質等等),控制發酵中,通常會以錐形瓶探討菌種篩選和培養基組成最適化,本論文使用實驗設計中的回應區面系統,探討培養基的組成,對樟芝菌絲體發酵及多醣體生產的影響。

三、研究成果

壹、不同碳源種類的探討

不同碳源種類各2%,氮源均相同,以Peptone、Yeast extract各1%,起始pH值為5,10%接種量,50 r.p.m.震盪,28°C,培養14天,選用醣Glucose、Sucrose、Potato starch及Citrate,結果顯示(表一),Glucose是較好利用的碳源;但是在生產多醣上,Sucrose呈現較佳的影响力。Citrate雖然不利於生長,但是在單位菌乾重生產多醣的值,是最高的一組。

貳、不同氮源種類的探討

不同氮源種類各1%,碳源均同用Glucose 2%,起始pH值為5;10%接種量,50 r.p.m.震盪,28°C,培養14天,有機氮源使用動物性的Meat peptone、植物性的Soybean peptone、微生物的以Yeast extract無機氮源使用 NH_4Cl 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 。

氮源方面,有機來源遠比無機來源來得更有利於生長。但是就多醣生成量來說,使用無機氮源的組別明顯較高(表二),實驗結果發現植物性氮源對於菌絲體生長的影響較佳。

參、回應區面法

菌株：以 *Antrodia cinnamomea* Chang 35396 (TFRI 119) 為主

培養條件：依照回應區面法設計之組別，配製培養基與調整培養環境，固定起始 pH 值為 5，10% 接種量，轉速 50 r.p.m.，28 °C，培養 14 天，探討因子：Glucose、Sucrose、Soybean peptone

由結果顯示（表三及圖一），在組別 7（Glucose(3.6788%)、Sucrose(6.734%)、Peptone(0.58%)）的組成下，菌乾重最多，可以知道此培養條件在極點附近，所以將此點再當作新原點，設計接下來的二階試驗。將菌乾重為回應數值，以統計軟體計算方程式為：當以 A=Glucose、B=Sucrose、C=Peptone 時，可以得到 $Y = 526.82 - 38.40A^2 - 8.76A - 42.87B^2 + 7.23B - 47.77C^2 + 16.49C + 7.71AB - 6.34AC + 4.14BC$

四、結論與展望

近年來，具有保健機能性的食品，愈來愈受社會大眾重視與喜愛，而以市場佔有率來看，食藥用菇菌類產品（如靈芝、冬蟲夏草、巴西蘑菇等）更屬其中之佼佼者。通常這些菇菌類在培養上需要較長的時間，所以希望以生化工程、製程放大的手段生產菌絲體，達到產業規模。目前雖然對於食藥用菇之有效成份尚有許多不明之處，但只要我們努力研究，相信必能加以闡明與利用，製成各種保健品或醫療產品，進而增進人體健康造福人群。

樟芝為本土保育級菇菌類，因為量少、難以培養而彌足珍貴；雖然日前已經有成功培養出子實體的報導，但是培養需要數月，且收成重量、有效成份等亦有待評估，所以利用生物反應器大量生產菌絲體，仍是可以考量的方式之一。

在傳統的生化工程中，以一次一因子法（One factor at a time）探討培養最佳條件，此方法與回應曲面法優缺互現（整理於表 2-9），若是搭配使用，相信能節省許多時間、人力和金錢；回應曲面法已經被部份的生化工程界運用，在提高許多菌體培養或其二次代謝物產率上，呈現良好的契合度。

在本論文中，主要是以回應曲面法尋求培養最適化，並針對樟芝的多醣、菌乾重作分析，希望在大量生產的同時，亦能監控樟芝相關保健成份與能力。雖然菌體量的最適化條件與多醣量條件並不吻合，但是在研究中亦發現有些添加物與較低的起始 pH 值可以增加多醣的產量，是否可以利用這些物質添加或藉由控制 pH 值梯度，使菌體在生長的同時亦大量生產多醣，則有待印證。

事實上，產業界使用的培養組成通常成份複雜，此類物質雖然便宜，但在實驗探討時卻造成干擾，使結果難以判讀；所以本研究中為了探討粗多醣生成量與菌乾重測試，並不採用一般產業界的培養組成，雖然對許多真菌類的培養上，使用這類營養來源的生長狀況會較單純物質來得好。

五、參考文獻

1. 楊書威(1990)：中藥樟菇活性成份之研究。碩士論文，台灣大學藥學研究所，台北，台灣。
2. 吳德鵬(1995)：樟芝之微量成份研究。碩士論文，台灣師範大學化學研究所，台北，台灣。
3. 官振儀(1998)：利用酒糟水於靈芝液體培養之研究。碩士論文，東海大學化學工程學系，台中，台灣。
4. 黃鈴娟(2000)：樟芝與姬松茸之抗氧化性質及其多醣組成分析。碩士論文，中興大學食品科學系，台中，台灣。
- 5.

表一：菌種 35396 的碳源篩選

組別	菌乾重 (mg/100 mL 發酵液)	多醣量 (mg/100 mL 發酵液)	終點 pH 值
Glucose	387	44.69	4.88
Sucrose	263.3	54.47	4.82
Potato starch	303.9	121.95	4.49
Citrate	103.3	32.47	4.58

表二：菌種 35396 的氮源篩選

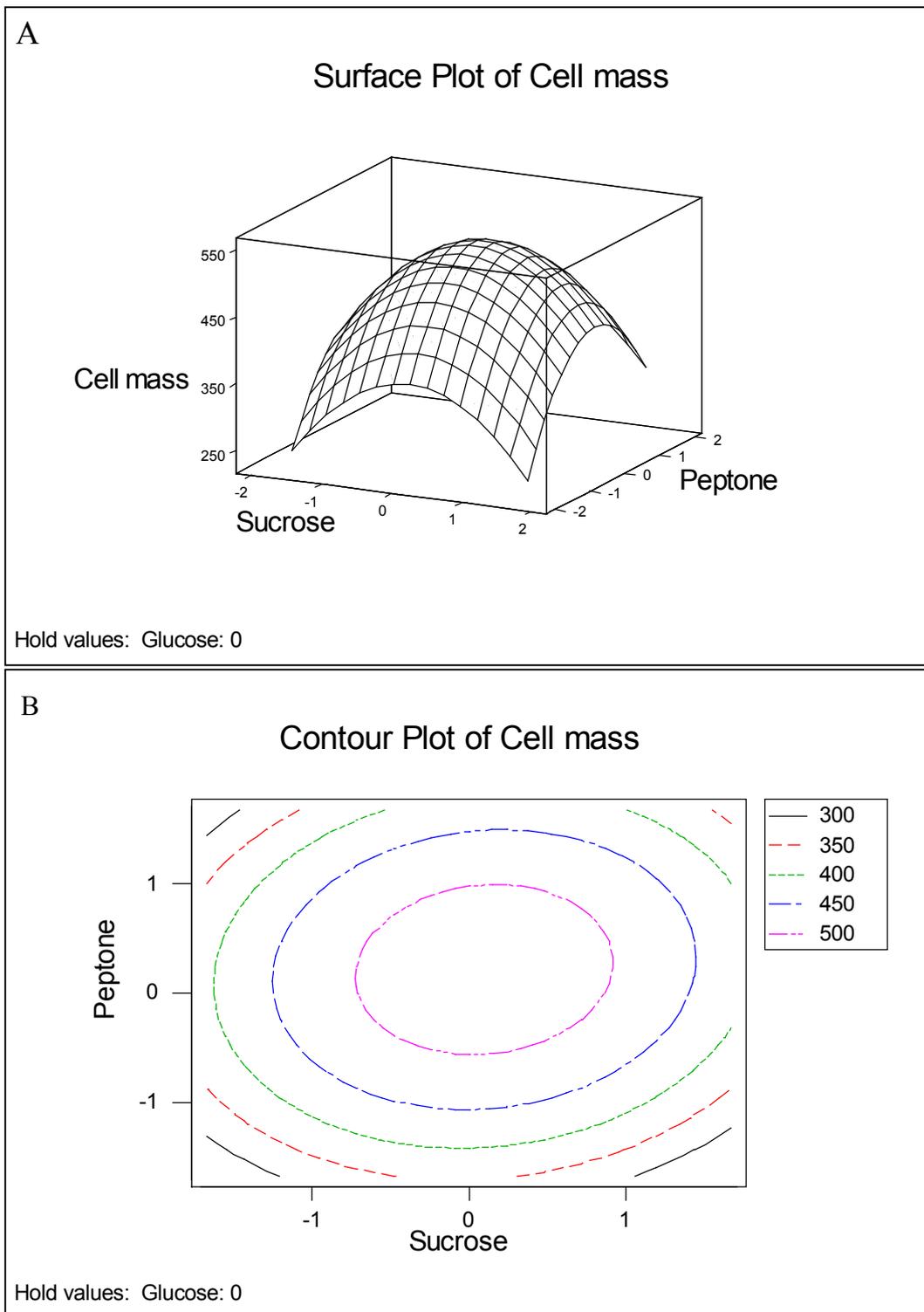
組別	菌乾重 (mg/100 mL 發酵液)	多醣量 (mg/100 mL 發酵液)	終點 pH 值
Meat peptone	284	37.83	4.12
Soybean peptone	489	23.62	4.08
Yeast extract	444.3	36.32	4.21
NH ₄ Cl	72.5	58.83	4.75
NH ₄ H ₂ PO ₄	73.4	52.09	4.83
(NH ₄) ₂ HPO ₄	81.5	38.38	4.83

表三：菌絲乾重與終點 pH 值。

菌株：*Antrodia cinnamomea* Chang 35396 (TFRI 119)

培養條件：起始 pH 值 5、10% 接種量，轉速 50 r.p.m.，28°C，培養 14 天

組別	菌乾重 (mg/100mL 發酵液)	終點 pH 值
1	113.27	4.5
2	256.50	4.71
3	298.93	4.75
4	303.63	4.85
5	320.27	4.97
6	349.14	4.95
7	518.97	5.01
8	444.2	4.74
9	248.12	4.87



圖一：Sucrose 與 Peptone 對菌乾重的二階曲面圖 (A) 等高線圖 (B)