

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 靈芝與巴西洋菇發酵液之抗氧化活性及其對血脂與動脈硬化之影響(1/3)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2321-B-002-008-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

計畫主持人：孫璐西

計畫參與人員：簡永亮、鍾淳雁

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 6 月 8 日



## 一、摘要：

本研究為群體計畫「含豆科植物為基質之靈芝和巴西洋菇發酵液之保健食品研發」之子計畫，負責探討含豆科植物（如黑豆、黃耆）的基質所生產的靈芝與巴西洋菇發酵液之抗氧化活性及其對血脂調節與動脈硬化之影響。目前初步以體外試驗（包括「抑制 LDL 氧化」及「對 TGF- $\beta$  誘導肝氧化損傷之保護」）探討不同發酵條件下「靈芝-豆科」及「巴西洋菇-豆科」發酵液之抗氧化活性，並分析其異黃酮素含量。

本年度計畫（92 年 8 月迄今）之工作內容為分析七種不同發酵條件之「靈芝-豆科」與四種不同發酵條件「巴西洋菇-豆科」發酵液樣品，所得初步結果分為三部分：**(1) 對銅離子誘導之人類低密度脂蛋白 (LDL) 過氧化之抑制功效：**兩種菇類之各種發酵濾液樣品均以去除多醣處理之效果優於未去除多醣者，其中以添加黑豆 (50g/L) 與黃耆 (20g/L) 發酵 11 天之靈芝發酵濾液 (GL-92-10-22-be) 效果最佳；而使用不同溶劑萃取之靈芝與巴西洋菇菌絲體樣品，則以添加黑豆 (50g/L) 與黃耆 (20g/L) 發酵 11 天之靈芝 30°C 水草物 (GL-93-3-27、GL-93-3-27) 及未添加黑豆及黃耆之巴西洋菇甲醇萃出物 (AB-93-3-17) 效果較佳，且優於黑豆黃耆等原料萃出物之效果；而比較發酵條件中不同溫度與通氣量對此部分實驗之影響，分別以 30°C (GL-92-10-22-be) 及 0.25 vvm (93-3-27) 之效果較佳；**(2) 對 TGF- $\beta$  誘導之人類肝癌細胞株 (Hep3B) 氧化損傷之保護功效：**發酵濾液除了未添加豆科之靈芝樣品 (GL-92-12-17) 外，其餘各種樣品均以未去除多醣者效果優於去除者，其中以添加最高黑豆含量 (60g/L) 發酵 7 天之靈芝樣品 (GL-92-9-1-b) 效果最佳，而比較發酵條件中不同溫度與通氣量對靈芝樣品氧化損傷保護之影響，分別以 18°C (GL-92-11-6-b) 及 0.25 vvm (GL-93-3-27-b) 之效果較佳，且此兩條件均能產生較多  $\beta$ -1,3-D-glucan。此外，使用不同溶劑萃取兩種菇類之菌絲體樣品，亦以添加黑豆 (60g/L) 發酵 7 天之靈芝熱水草出物 (GL-92-9-1-mHW) 效果最佳，且優於不添加豆科之發酵樣品 (GL-92-12-17) 與黑豆黃耆等原料萃出物之效果；**(3) 分析「靈芝-豆科」及「巴西洋菇-豆科」發酵液之異黃酮素含量：**目前已建立好樣品中異黃酮素之 HPLC 分析條件及 11 種異黃酮素標準品之檢量線，並已分析原料黑豆及黃耆中總異黃酮素含量，分別為 4595.87 及 122.16  $\mu\text{g/g(dw)}$ ；測定不同發酵條件下發酵濾液及菌絲體甲醇及乙醇萃出物之異黃酮素含量，發酵濾液之異黃酮素含量均檢測不到（低於 95ppb），而靈芝菌絲體甲醇及乙醇萃出物之異黃酮素含量似乎有隨著發酵溫度升高而減少的趨勢 (GL-92-11-6 > GL-92-10-3 > GL-92-10-22)。

**關鍵詞：**靈芝、巴西洋菇、黑豆、黃耆、抗氧化、低密度脂蛋白、TGF- $\beta$

## 二、計畫緣由與目的

靈芝自古以來即為我國滋補強壯、延年益壽的珍貴藥用真菌。近年來已有許多關於靈芝保健功效的科學報導，包括抑制腫瘤、調節免疫、降血壓、抗血栓之形成、降低血脂及保護肝臟等 (Ukai *et al.*, 1983; Hikino *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 1999; 李, 2001)。其活性成分則包括多醣體、三萜類、固醇類、小分子蛋白質及有機鍍等 (Komoda *et al.*, 1989; Morigiwa *et al.*, 1986; Gan *et al.*, 1998; Su *et al.*, 1999)。

巴西洋菇 (*Agaricus blazei*) 為當今世界上可栽培的珍稀食用菇之一，原產於巴西、秘魯等美洲地區，目前已在日本、中國進行人工栽培，又名姬松茸、巴西蘑菇。巴西洋菇具有抗腫瘤、抗病毒、降血脂、降血壓、降血糖、保護肝功能及增強免疫力等多方面的保健功效，尤其是抗腫瘤效果被認為優於目前其他菇菌類 (水野 卓, 1997; Delmanto *et al.*, 2001; Menoli *et al.*, 2001)。其有效的生理活性成分包括多醣體、三萜類及固醇類等。巴西洋菇的人工栽培多以子實體為對象，產量低且品質不穩，以液態深層發酵生產巴西洋菇被認為是有效的生產方法。

豆科植物如黑豆或黃耆含有多醣、類黃酮、胺基酸、皂素、植物固醇及多種微量成分。「本草綱目」記載：「服食烏豆、令人長肌膚、益顏色、填筋骨、長氣力、補虛能食」，黑豆為黑皮種之大豆，亦含有大豆異黃酮為植物性激素，具有抗氧化、預防癌症及減緩婦女更年期症候群、預防骨質疏鬆及降低心血管疾病等功效 (楊等, 1999; 戴等, 1996)。有研究顯示黑豆因含有花青素故其抗氧化功效較黃豆為佳。黃耆是中草藥之上品，「神農本草經」謂其「排膿止痛、補虛」且「生用固表、無汗能發、有汗能止、灸用補中益氣、生血生肌」。黃耆中的有效成分包括有三萜類、皂苷類、多醣、大分子蛋白、類黃酮、胺基酸及微量元素等，具有許多藥理與生理功效，包括調節免疫、保肝、維護心血管系統、中樞神經鎮靜、鎮痛和促智作用及抗輻射與抗衰老作用等 (李等, 1992; 黃, 1994; 馬等, 1995; 王等, 1998; 蔡等, 1998)。

由於「靈芝」和「巴西洋菇」兩科真菌型的保健功效與「豆科」者不同，但卻有互補功效。若以豆科植物如黑豆或黃耆為發酵基質之部分，生產靈芝及巴西洋菇之發酵液，於發酵過程中微生物的作用可能使抗氧化活性成分如異黃酮或其他類黃酮素的糖苷鍵被分解，成為較易被人體吸收的糖苷配基 (aglycone) 形式。多醣體亦可能經由發酵過程產生的酵素作用，使其降解為較小的分子，增加對水的溶解度與生物活性。此外，豆科植物所含的多醣與類黃酮素等多酚類抗氧化物是否會與靈芝或巴西洋菇中的抗氧化活性成分產生加乘效果，亦著實令我們感到興趣。因此，本子計畫擬針對「靈芝-豆科」與「巴西洋菇-豆科」之發酵液進行抗氧化活性之探討，而本年度主要探討不同發酵條件下「靈芝-豆科」及「巴西洋菇-豆科」發酵液之抗氧化活性體外試驗 (包括「抑制 LDL 氧化」及「對 TGF- $\beta$  誘導肝氧化損傷之保護」)，並分析發酵液中異黃酮素的含量。

### 三、材料與方法

#### (一) 實驗樣品與前處理

##### 1. 樣品：

- (1) 靈芝發酵濾液：由子計畫一（台灣大學食品科技研究所 蔣丙煌教授：利用含豆科植物為基質生產具生理機能之靈芝發酵液）提供。
- (2) 靈芝菌絲體：由子計畫一（台灣大學食品科技研究所 蔣丙煌教授：利用含豆科植物為基質生產具生理機能之靈芝發酵液）提供。
- (3) 巴西洋菇發酵濾液：由子計畫二（國立中央大學化學工程與材料系 徐敬衡副教授：建立以豆科植物為基質之高生物活性巴西洋菇發酵產程）提供。
- (4) 巴西洋菇菌絲體：由子計畫二（國立中央大學化學工程與材料系 徐敬衡副教授：建立以豆科植物為基質之高生物活性巴西洋菇發酵產程）提供。

##### 2. 樣品前處理

###### (1) 發酵濾液之冷凍乾燥

將子計畫一及二所提供之發酵濾液經 121°C 高溫高壓滅菌處理後，分別以 Whatman No.4、No.1 濾紙及 0.22 μm 濾膜抽氣過濾去除沈澱物，再經冷凍乾燥取得**發酵濾液凍乾物**。

###### (2) 發酵濾液之酒精沈澱（去多醣前處理）

發酵濾液經前述過濾處理後，以 71.25% 乙醇沈降多醣並去除之，所得濾液經冷凍乾燥得到**發酵濾液去多醣物**。

###### (3) 菌絲體甲醇、乙醇、水之 30°C 萃取物

以 1(g):20(mL) 菌絲體凍乾物與溶劑的比例於 30°C 萃取 24 小時得萃出液，經除去溶劑後得**萃出物**。

###### (4) 靈芝菌絲體熱水萃出物

此部分由子計畫一提供；以 1(g):5(mL) 菌絲體與水的比例於 95°C 萃取 3 小時得萃出液，經冷凍乾燥後得**熱水萃出物**。

註：於本子計畫中使用之標號說明如下：GL 表示靈芝、AB 表示巴西洋菇、數字代表獲得樣品之日期、b 為發酵濾液、be 為發酵濾液去多醣物、m 為菌絲體、M 為甲醇萃出物、E 為乙醇萃出物、HW 為熱水萃出物、W 為 30°C 水萃出物、BB 為黑豆、AM 為黃耆。

#### (二) 實驗方法

##### 1. 抑制銅離子誘導之人類低密度脂蛋白（LDL）過氧化

###### (1) 樣品製備

- A、發酵濾液凍乾物、發酵濾液去多醣物、菌絲體 30°C 水萃出物與熱水萃出物復溶於 10%乙醇（濃度為 1 mg/mL），保存於-20°C 冷凍櫃。
- B、菌絲體甲醇與乙醇萃出物溶於 10%乙醇（濃度為 1 mg/mL），保存於-20°C 冷凍櫃。

(2) 抑制銅離子誘導之人類 LDL 過氧化之測試方法

A、人類 LDL 之分離與鑑定

a. 以超高速離心分離 LDL

健康與飲食正常之成年男性經隔夜禁食(overnight fasting)後抽取血液 80mL，置入 37°C 烘箱中靜置 1.5 小時，再置入 4°C 冰箱中靜置 1 小時。於 4°C 下進行低速離心[3,000 rpm (1200 ×g), 15 min]以取得血清，吸取 25 mL 血清置入超高速離心管中，再加入 5 mL 生理食鹽水(145 mM,  $\rho = 1.006$  g/mL)，於 4°C 下進行超高速離心[45,000 rpm (152,000 ×g), 16 hr]。離心後吸取最上層 10 mL 呈乳白色的 VLDL+IDL 部份( $\rho < 1.019$  g/mL)，管內剩下的部份再加入 8 mL NaBr 溶液( $\rho = 1.22$  g/mL)與 4 mL NaBr 溶液( $\rho = 1.063$  g/mL)，混勻後於 4°C 下進行超高速離心[45k rpm (152,000 ×g), 20 hr]。離心後吸取最上層 6 mL 淡黃色之 LDL 部份( $\rho = 1.019$ -1.063 g/mL)。取得之 LDL 裝入塑膠離心管中，充氮氣後於 4°C 下避光保存備用，保存不超過 1 星期。

b. 利用電泳檢測 LDL 分離效果

b-1. 膠片之前處理

將已鑄膠完成之套裝 agarose gel (Sebia, France)取出並平放於 Hydrogel K20 applicator carrier 上，以無纖濾紙小心吸乾膠片表面與樣品槽中之水分。

b-2. 電泳

取 10  $\mu$ L serum、VLDL 與 LDL 分別至 applicator wells 內(2 分鐘內完成)，再將 applicator teeth 的保護部分折斷，把 applicator 放置於 applicator carrier 上，轉動切換鈕以使 applicator 上的 teethes 與膠片表面接觸 7.5 分鐘後，移走 applicator 並將膠片取出，以拱橋型架在電泳槽上，進行電泳 2 小時。操作條件如下：

電壓：50V

電流：11 mA

功率：5 W

時間：120 min.

### b-3. 染色

電泳完成後，將膠片置於 80°C 烘箱中進行乾燥 20 分鐘，取出放入 Sudan black staining solution (ethanol : Sudan black stock solution : d.d.H<sub>2</sub>O = 80 : 1 : 70, v/v/v) 中染色 15 分鐘後，放入 destaining solution (ethanol : d.d.H<sub>2</sub>O = 90:110, v/v) 中退染 5 分鐘，再放入 wash solution (4 mL wash stock solution 定量至 250 mL) 中 1 分鐘，最後將膠片置於 80°C 烘箱中進行乾燥 20 分鐘，以保存夾於室溫下保存。

### c. LDL 透析

將適量 LDL 放入透析膜 (size: 24/32, M.W. = 12000-14000 Da, 三光純藥公司) 內，兩端以棉線綁緊並以透析夾固定，並勿使膜內殘存空氣，放入含有欲透析之 LDL 100 倍體積之磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffered-saline; PBS) (125 mM NaCl, 5 mM phosphate, pH 7.4) 中，將瓶子裝滿緩衝液或充氮氣，於 4°C 下避光攪動，先透析 2.5 hr 後更換新的 PBS，再於 3 hr 後更換一次 PBS，共透析 16-24 小時。

### d. 膽固醇濃度之測定 (Richmond *et al.*, 1973)

取透析完畢之 LDL，採用酵素法 (enzymatic CHOD-PAP method)，以 Merck 公司生產之 cholesterol enzymatic kit 測定膽固醇濃度。其原理為利用 cholesterol esterase 將膽固醇酯水解成膽固醇，再利用 cholesterol oxidase 氧化膽固醇以產生過氧化氫，而由 peroxidase 催化可將 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與 4-aminoantipyrine 及 phenol 反應產生 quinonimine 的紅色物質以呈色。以膽固醇標準液 (200 mg/dL) 製作標準曲線，分別取 0、5、10、20、25 μL 加入 1 mL 反應液 (依照 cholesterol kit 之說明書配製) 中，混合均勻後室溫下靜置 10 分鐘，測定 500 nm 下之吸光值，並作成校正曲線。取透析後之 LDL 10 μL 加入 1 mL 反應液，由其 500 nm 下之吸光值配合校正曲線可換算得膽固醇濃度。

### B、抑制銅離子誘導之人類 LDL 過氧化反應 (Puhl *et al.*, 1994)

首先取 100 μL 之 LDL (150 μg/mL，以 PBS 稀釋)，置於 96 孔之石英盤中，加入 10 μL 測試液 (最終濃度為 20 μg/mL 之測試樣品與 0.5 μg/mL 之 trolox)，再加入 130 μL 之 PBS 及 10 μL 之 125 μM Cu<sup>2+</sup> (以 CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O 調配)，銅離子最終濃度為 5 μM。震盪混合均勻後，靜置於室溫下進行 LDL 氧化反應。每 15 分鐘測定一次 232 nm 之吸光值。氧化遲滯期 (lag phase) 之計算方式為，將 LDL 氧化曲線之增殖期 (propagation phase) 最大斜率之切線與起始吸光

值橫軸之交叉點所得之時間(單位為分鐘),即為氧化遲滯時間(lag time)。抗氧化效果以各處理組之氧化遲滯期與 trolox 之氧化遲滯期的比值(Relative potency)表示,其值越高表示抗氧化效果越好。

## 2. 對 TGF- $\beta$ 誘導之人類肝癌細胞株(Hep3B)氧化損傷之保護

### (1) 樣品製備

A、發酵濾液凍乾物、發酵濾液去多醣物、菌絲體 30°C 水萃出物與熱水萃出物復溶於去離子水(濃度為 100 mg/mL),以 0.22  $\mu$ m 過濾膜過濾除菌後保存於-20°C 冷凍櫃。

B、菌絲體甲醇與乙醇萃出物溶於乙醇(濃度為 10 mg/mL),以 0.22  $\mu$ m 過濾膜過濾除菌後保存於-20°C 冷凍櫃。

### (2) 細胞培養

人類肝癌細胞株(Hep 3B)以 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培養於 37°C、5%CO<sub>2</sub> 之二氧化碳培養箱中,進行繼代培養後種入 96 孔培養盤,每孔加入 200  $\mu$ L 之培養液含 5 $\times$ 10<sup>3</sup> 個細胞,培養 24 小時後吸掉培養液,再加入含有 2 ng/mL TGF- $\beta$  之不含血清培養液與 100  $\mu$ g/mL 測試樣品(200  $\mu$ L/well)繼續培養 48 小時後,以 MTT assay 測試細胞存活率並計算測試樣品對氧化損傷的回復效果。

## 3. 異黃酮素含量之分析

### (1) 樣品前處理

冷凍乾燥樣品粉末精稱 1.0 g 放入 50 ml 離心管中,加入 10 ml 80% 甲醇及 1 mg fluorescein (內標),在進行 HPLC 分析之前樣品先經過 0.45  $\mu$ m 膜過濾。

### (2) 高效能液相層析條件

#### A、分離管柱

HyPURITY C18 逆相層析管柱(美國 Thermo 公司),管柱粒徑為 5 $\mu$ m,尺寸為 250  $\times$ 4.6 mm。

#### B、操作條件

移動相:acetonitrile 在 0.1% (v/v) acetic acid 水溶液中,0-20 分鐘由 12% 增加至 16%,20-42 分鐘由 16% 增加至 18%,42-45 分鐘由 18% 增加至 22%,45-50 分鐘由 22% 增加至 32%,50-55 分鐘維持 32%,55-60 分鐘由 32% 增加至 45%。



流速：1.4 mL/min

樣品注入量：20  $\mu$ L

分離管柱溫度：25 $^{\circ}$ C

檢測器 (UV-Vis) 波長：254 nm

### (3) 標準曲線之繪製

#### A、標準溶液製備

Fluorescein (內標, 溶於 80 % 甲醇) 濃度為 1.0 mg/mL。11 種異黃酮素標準品, genistein(購自美國 sigma 公司)、genistin、daidzein、daidzin、glycitein、glycitin(購自日本 Wako 公司)、malonyldaidzin、malonylglycitin (購自日本 Fujicco 公司)、malonylgenistin、acetylgenistin 及 acetylglycitin(購自美國 LC Laboratories 公司), 以上標準品分別以 80 % 甲醇序列稀釋成 50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0.78125、0.390625、0.1953125 及 0.09765625  $\mu$ g/mL, 並分別加入內標使各標準溶液中含 fluorescein 10  $\mu$ g/mL。

#### B、標準曲線

取 20  $\mu$ L 上述標準溶液進行 HPLC 分析, 以各異黃酮素之尖峰面積對 fluorescein 之尖峰面積的比率 ( $A/A_i$ ) 為縱軸, 注射量中所含各異黃酮素與 fluorescein 之重量比 ( $W/W_i$ ) 為橫軸, 分別做各標準曲線。

## 四、執行進度及成果

### (一) 抑制銅離子誘導之人類低密度脂蛋白 (LDL) 過氧化

以密度梯度超高速離心所分離之 LDL, 可藉由 agarose gel 電泳之檢測得知其是否摻雜其他脂蛋白, 由圖一之 agarose gel 電泳結果, 顯示血清(第一行、第七行)可分離出三個區帶, 由上至下分別為 HDL、VLDL 與 LDL。由 VLDL(第二、三行)可看到一個明顯的區帶與前後顏色甚淡的區帶, 顯示其為一些分子性質相近的脂蛋白所形成。LDL(第四、五、六行)則有一個較明顯且顏色極深的區帶, 顯示所分離得到之 LDL(密度  $\rho=1.019-1.063$  g/mL)濃度很高, 且幾乎沒有其他脂蛋白之摻雜, 故本實驗室所建立之方法確實可以分離出高純度 LDL, 本實驗則是以所取得的高純度 LDL 來進行銅離子誘導 LDL 氧化之體外實驗。

銅離子誘導人類 LDL 過氧化反應結果如圖二所示, 氧化過程中遲滯期 (lag time) 的時間長短可作為 LDL 氧化敏感性的指標, 故各處理組(濃度均為 20  $\mu$ g/mL)之氧化遲滯期與正控制組 trolox(濃度為 0.5  $\mu$ g/mL)之氧化遲滯期的比值 (Relative potency) 越高, 表示其抗氧化效果越好。

在發酵濾液方面, 無論靈芝或巴西洋菇發酵濾液, 去除多醣者, 其抑制 LDL

過氧化能力均有較佳的趨勢；推測可能是在去除多醣後，相同的樣品濃度下具抗氧化效果的成分相對提高，以致去除多醣的發酵濾液有較好的抗氧化效果。靈芝發酵濾液在不同的發酵溫度下，以黑豆與黃耆比例於 5:2 之培養基、通氣量 0.75 vvm、轉速 50 rpm 下發酵 11 天，溫度為 30°C 時 (GL-92-10-22)，其抑制 LDL 過氧化能力優於 18°C (GL-92-11-6) 與 24°C (GL-92-10-3)；而於不同通氣量下，則是以黑豆與黃耆比例於 5:2 之培養基、24°C、轉速 50 rpm 下發酵 11 天，通氣量為 0.25 vvm 時 (GL-93-3-27)，其抑制 LDL 過氧化能力優於 0.5 vvm (GL-93-3-16) 與 0.75 vvm (GL-92-10-3)。巴西洋菇發酵濾液，在目前的發酵條件比較下，則是沒有顯著的差異。

在菌絲體萃出物方面，靈芝菌絲體萃出物部分以 30°C 水萃效果最佳，甲醇及乙醇萃出物效果明顯較差；黑豆與黃耆比例於 5:2 之培養基、24°C、轉速 50 rpm 下發酵 11 天，當通氣量降為 0.25 vvm (GL-93-3-27) 及 0.5 vvm (GL-93-3-16) 時，其水萃物抑制 LDL 過氧化能力優於 0.75 vvm (GL-92-10-3)。巴西洋菇菌絲體萃出物部分，則以巴西菇農之菌株，未添加黑豆及黃耆發酵 45 天之菌絲體 (AB-93-3-17)，其甲醇及乙醇萃出物之抑制 LDL 過氧化能力均較前幾次發酵之菌絲體萃出物佳。

未添加豆科植物當發酵基質的靈芝樣品，其抑制 LDL 氧化效果較差；巴西洋菇則沒有明顯差異。整體而言，各樣品發酵濾液部分以 GL-92-10-22 去除多醣物效果最佳；而各菌絲體萃出物部分則以 GL-93-3-27、GL-93-3-27 的 30°C 水萃物及 AB-93-3-17 甲醇萃出物效果較佳。此外，在本研究中所建立的異黃酮素分析條件下，無論是否去除多醣，發酵濾液中的異黃酮素含量均小於 95 ppb (檢測極限)，而在靈芝發酵濾液去除多醣物 GL-92-10-22 卻有最佳之抗氧化效果，故推測影響本實驗之活性成分可能來自其他抗氧化物質。

## (二) 對 TGF- $\beta$ 誘導之人類肝癌細胞株 (Hep3B) 氧化損傷之保護

以子計畫一、二所提供之發酵濾液進行氧化損傷保護功效之試驗結果如圖三、圖四所示，其中回復率 (recovery ratio(%)) 越高，表示其抗氧化效果越好。

以發酵濾液而言，靈芝部分除 GL-92-12-17 (未添加豆科) 外，發酵濾液經去除多醣後效果均有降低的趨勢，其中以 GL-92-9-1-b 最佳，其次依序為 GL-92-11-6-b、GL-92-10-22-b、GL-92-11-6-be、GL-92-10-22-be、GL-93-3-27-b、GL-92-10-3-b、GL-92-10-3-be、GL-93-3-16-b、GL-92-9-1-be、GL-92-12-17-be、GL-92-12-17-b，顯示添加豆科於培養基有助提升樣品氧化損傷的保護效果，且添加豆科的發酵濾液中可能有些可被 71.25% 乙醇沈降的物質參與作用，導致發酵濾液去除多醣後效果降低。此外，與子計畫一所提供之發酵條件及分析結果相較，以黑豆與黃耆比例於 5:2 之培養基、通氣量 0.75 vvm、轉速 50 rpm 下發酵 11 天討論不同溫度之影響，發現當溫度為 18°C (GL-92-11-6) 的氧化損傷保護效果優於 24°C (GL-92-10-3) 與 30°C (GL-92-10-22)，且於 18°C 下的培養可產出較高量的  $\beta$ -1,3-D-glucan；而以黑豆與黃耆比例於 5:2 之培養基、24°C、轉速 50 rpm 下發酵

11 天討論不同通氣量之影響，發現當通氣量為 0.25 vvm 時 (GL-93-3-27) 的氧化損傷保護效果優於 0.5 vvm (GL-93-3-16) 與 0.75 vvm (GL-92-10-3)，且於 0.25 vvm 下的培養亦可產出較高量的  $\beta$ -1,3-D-glucan；顯示有利於生產  $\beta$ -1,3-D-glucan 的發酵條件可能有助於提升氧化損傷之保護效果。巴西洋菇部分則以 AB-92-10-6-b (未添加豆科) 效果最佳，其次依序為 AB-92-12-15-b、AB-93-3-10-b、AB-92-10-6-be、AB-92-12-15-be、AB-93-3-17-b、AB-93-3-10-be，發現保護效果有隨黑豆含量增加而降低的趨勢，顯示可能巴西洋菇本身即具有某些保護氧化損傷之物質；其中利用不同來源之巴西洋菇菌株，結果發現以 ATCC 76739 菌株發酵 (AB-92-10-6、AB-92-12-15、AB-93-3-10) 之氧化損傷保護效果優於巴西菇農之菌株 (AB-93-3-17)。

以菌絲體而言，靈芝部分除 GL-92-10-3 外，其餘效果均以熱水萃出物較佳，而除 GL-92-10-3 外，效果均有乙醇萃出物 > 甲醇萃出物之趨勢；巴西洋菇部分，其效果均有 30°C 水萃物 > 乙醇萃出物 > 甲醇萃出物之趨勢。

對黃耆與黑豆而言，其效果亦有乙醇萃出物 > 甲醇萃出物之趨勢。

在此部分實驗中，部分醇萃物在高劑量 (100  $\mu$ g/mL) 處理下氧化損傷之保護效果呈現負值，推測可能是使用濃度不當造成細胞死亡，因此未來擬降低劑量以找出各樣品之有效濃度。

### (三) 異黃酮素含量之分析

異黃酮含量分析之條件參考 Murphy 等 (1997) 之分析條件再加以修飾，以溶劑 A (acetonitrile) 及溶劑 B (0.1 % 醋酸之水溶液) 進行梯度之分析，分析條件為：0-20 分鐘 A 由 12 % 增加至 16 %，20-42 分鐘維持 16 %，42-45 分鐘由 16 % 增加至 33 %，45-65 分鐘由 33 % 增加至 35 %。其分析結果如圖五，本分析條件可分離出 12 種異黃酮素，圖五中標示 1-13 分別為 12 種異黃酮素，daidzin、glycitin、genistin、malonyldaidzin、malonylglycitin、acetyldaidzin、acetylglycitin、malonylgenistin、daidzein、glycitein、acetylgenistin、genistein 及內標準品 (fluorescein)，目前已完成 11 種異黃酮標準品檢量線；並分析原料黑豆及黃耆之異黃酮素種類及含量，黑豆中含有 daidzin、glycitin、genistin、malonyldaidzin、malonylglycitin、acetylglycitin、daidzein 及 genistein 共 4.596  $\mu$ g/g(dw)，黃耆則含有 malonyldaidzin 0.122  $\mu$ g/g(dw)，測定不同發酵條件下發酵濾液及菌絲體甲醇及乙醇萃出物之異黃酮素含量，結果如表三所示，發酵濾液之異黃酮素含量均檢測不到 (低於 95ppb)，而菌絲體甲醇及乙醇萃出物之異黃酮素含量似乎有隨著發酵溫度升高而減少的趨勢 (GL-92-11-6 > GL-92-10-3 > GL-92-10-22)；在相同發酵溫度下，通氣量在 0.5 vvm (GL-93-3-16) 時有較高的異黃酮素含量。

## 五、計畫成果自評：

本計畫目前已完成之部分內容如下：

- 壹、已建立快速篩選「抑制銅離子誘導之人類低密度脂蛋白 (LDL) 過氧化之能力」之方法。

- 貳、已建立「對 TGF- $\beta$  誘導之人類肝癌細胞株 (Hep3B) 氧化損傷之保護能力」之技術平台。
- 參、已建立以高效能液相層析分析樣品中異黃酮含量之條件及 11 種異黃酮素標準品之檢量線。目前正在積極分析各種樣品之異黃酮素含量。
- 肆、已測定與分析由子計畫一、二所提供之不同發酵條件之樣品。

## 六、參考文獻：

- 水野 卓、川合正允。1997。菇類的化學.生化學。國立編譯館。297-303。
- 王浴生、鄧文龍、薛春生。1998。中藥藥理與應用。人民衛生出版社，北京。p982-1004。
- 李奇翰。2001。靈芝抗癌效果之研究。國立台灣大學醫學院醫事技術學研究所碩士論文。
- 李儀奎、姜名瑛。1992。中藥藥理學。中國中醫出版社，北京。p184-187。
- 馬清均、王淑玲。1995。常用中藥現代研究與臨床。天津科技翻譯出版公司，天津。p556-564。
- 黃泰康。1994。常用中藥成分與藥理手冊。中國中醫出版社，北京。p1574-1579。
- 楊棋明、楊智旭、趙壁欲。1999。市售黑豆與黃豆抗氧化力之灰預測比較。中華民國營養學會雜誌。24: 201-214。
- 蔡永敏、任玉識、王梨等。1998。最新中藥藥理與臨床應用。華夏出版社，北京。p429-432。
- 戴文禎、胡雪萍、趙璧玉。1996。黑豆的抗氧化物質含量。中華民國營養學會雜誌。21: 216。
- Delmanto RD, de Lima PL, Sugui MM, da Eira AF, Salvadori DM, Speit G, Ribeiro LR. 2001. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutat Res* 496(1-2): 15-21.
- Gan KH, Fann YF, Hsu SH, Kuo KW, Lin CN. 1998. Mediation of the cytotoxicity of Lanostanoids and steroids of *Ganoderma tsuaga* through apoptosis and cell cycle.
- Hikino H, Ishiyama M, Suzuki Y, Konne C. 1989. Mechanisms of hypoglycemic activity of ganoderan B: a glycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Medica* 55(5): 423-428.
- Kim DH, Shim SB, Kim NJ and Jang IS. 1999. Beta-glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. *Biol Pharm Bull* 22: 162-4.
- Komoda M, Shimiza M, Sonoda Y, Sato Y. 1989. Ganoderic acid and its derivative as cholesterol synthesis inhibitors. *Chem Pharm Bull* 37: 531-533.
- Menoli RC, Mantovani MS, Ribeiro LR, Speit G, Jordao BQ. 2001. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. *Mutat Res* 496(1-2): 5-13.
- Morigiwa A, Kitabatake K, Fujimoto Y, Ikekawa N. 1986. Angiotensin converting

- enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. Chem Pharm Bull 34: 3025-3028.
- Murphy PA, Song T, Buseman G, Barua K. 1997. Isoflavones in soy-based infant formulas. J Agric Food Chem 45: 4635-4638.
- Puhl H, Waeg G, Esterbauer H. 1994. Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. Meth Enz 233: 425-441.
- Richmond W. 1973. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia sp.* and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. Cline Chem 19: 1350-1356.
- Su CY, Shiao MS, Wang CT. 1999. Differential effects of ganodermic acid S on the thromboxane A<sub>2</sub>-signaling pathways in human platelets. Biochem Pharmacol 58: 587-595.
- Ukai S, Kiho T, Haro C, Kuruma I, Tanaka Y. 1983. Anti-inflammatory effect of the polysaccharides from fruit bodies of several fungi. J Pharmacobiodyn 6: 983-990.

表一、「靈芝-豆科」發酵液之發酵條件（由子計畫一提供）

Table 1. Fermentation conditions of the fermentation broth produced by using black bean and *Astragalus membranaceus* as part of the liquid fermentation medium of *Ganoderma lucidum*.

*Sample (BCRC 36123)	Fermentation conditions							
	BB	AM	Glucose	Temp	pH	Agitation	Aeration	Fermentation time
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(°C)		(rpm)	(vvm)	(day)
GL-92-9-1	60	-	20	24	5.68	50	0.5	7
GL-92-10-3	50	20	20	24	6.00	50	0.75	11
GL-92-10-22	50	20	20	30	5.94	50	0.75	11
GL-92-11-6	50	20	20	18	6.06	50	0.75	11
GL-92-12-17	-	-	20	18	3.5	100	1.25	11
GL-93-3-16	50	20	20	24	5.5	50	0.5	11
GL-93-3-27	50	20	20	24	5.45	50	0.25	11

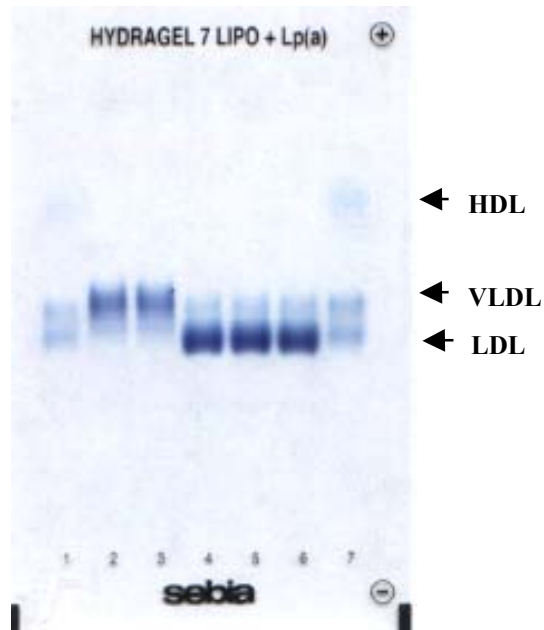
\*Sample code: GL represents the fermentation broth of *Ganoderma lucidum* ; the numbers represent the date when the samples were obtained; BB represents black bean; AM represents *Astragalus membranaceus*.

表二、巴西洋菇發酵液之發酵條件（由子計畫二提供）

Table 2. Fermentation conditions of the fermentation broth produced by using black bean and *Astragalus membranaceus* as part of the liquid fermentation medium of *Agaricus blazei*.

*Sample	Fermentation conditions							
	BB	AM	Glucose	Temp	pH	Agitation	Aeration	Fermentation time
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(°C)		(rpm)	(vvm)	(day)
AB-92-10-6 (ATCC 76739)	-	-	10	28	4.0±0.1	250	0.05	30
AB-92-12-15 (ATCC 76739)	8	-	10	28	4.0±0.1	250	0.05	25
AB-93-3-10 (ATCC 76739)	20	-	10	28	4.0±0.1	250	0.05	40
AB-93-3-17 (Brazil)	-	-	10	28	4.0±0.1	250	0.05	45

\*Sample code: AB represents the fermentation broth of *Agaricus blazei* ; the number represents the date when the samples were obtained; BB represents black bean; AM represents *Astragalus membranaceus*.



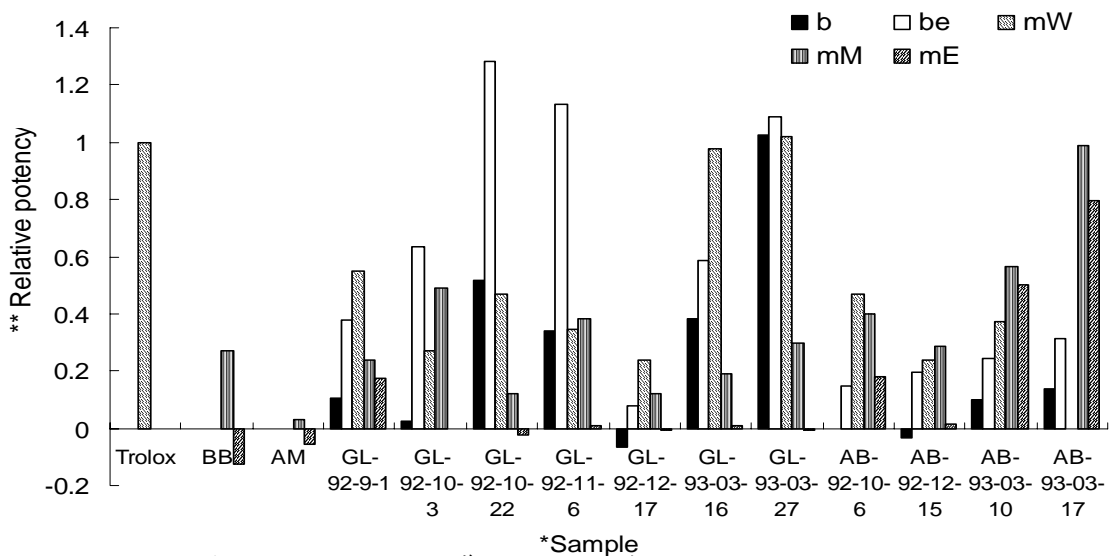
圖一、血清、極低密度脂蛋白與低密度脂蛋白之電泳圖。

Figure. 1. The agarose gel electrophoresis of human serum, VLDL and LDL

Lane 1 and 7 : serum from healthy adult

Lane 2 and 3 : human VLDL

Lane 4, 5 and 6 : human LDL

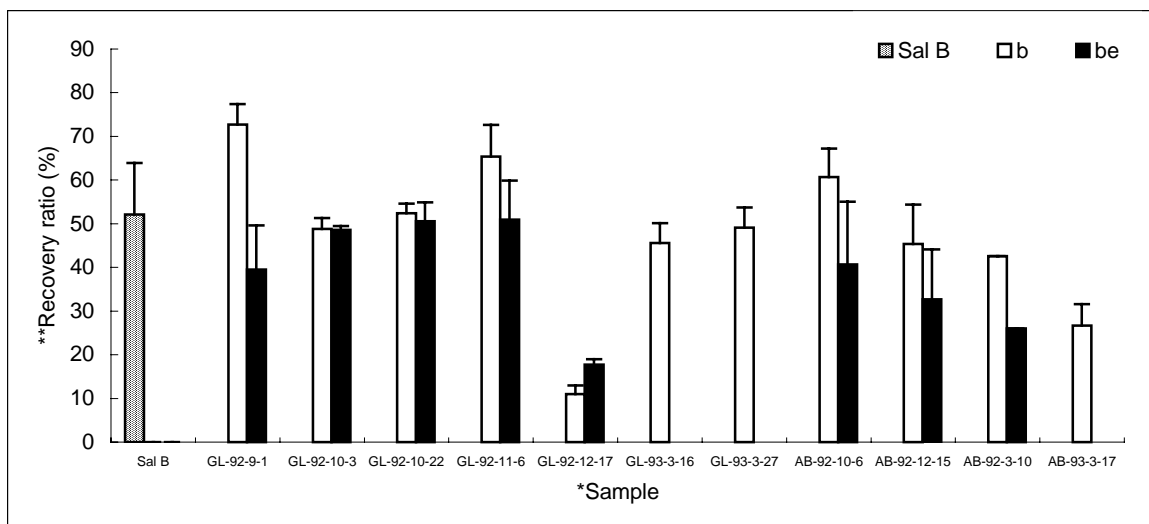


圖二、不同樣品抑制銅離子誘導人類 LDL 氧化之效果

Figure 2. Effect of samples with different treatments in the inhibition of  $\text{Cu}^{2+}$ -induced LDL oxidation.

\*Sample code: GL represents *Ganoderma lucidum* ; AB represents *Agaricus blazei* ; the number represents the date when the samples were obtained; BB represents black bean; AM represents *Astragali membranaceu*; b represents broth; be represents broth after removing the 71.25% ethanol precipitate; mHW represents mycelia hot water extract; mW represents mycelia water extract at 30°C; mM represents mycelia methanol extract; mE represents mycelia ethanol extract. Sample concentration was 20µg/mL.

\*\*Relative potency was defined as prolongation of lag phase(  $T_{lag}$ ) as compared to trolox (0.5 µg/mL).  $T_{lag}$  was the difference in lag phase(min) between the control and various samples.

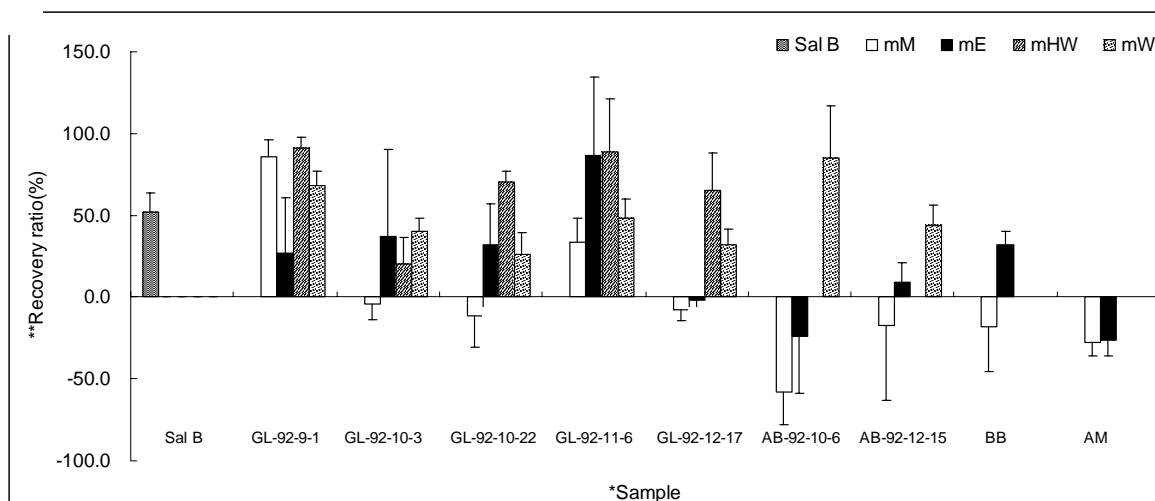


圖三、不同發酵濾液及其去除多醣物對 TGF-β 誘導之氧化損傷保護效果

Figure 3. Recovery ratios of different broths and broths removal of polysaccharides.

\* Cells ( $5 \times 10^3$ /well) were seeded in complete DMEM on 96 well culture plate for 24 hrs. Subsequently, cells were incubated in serum-free DMEM containing 2 ng/mL TGF  $\beta$  and treated with 100  $\mu$ g/mL of extracts of Chinese herbal medicine for 48 hrs. Cell viability was determined by using the MTT assay. Sample code are the same as shown in Figure 2. Sal B represents salvanolic acid as a positive control. Sample concentration was 100  $\mu$ g/mL.

\*\* Recovery ratio (%) =  $100 \times (A-B)/A$   
 A = 100-(cell viability of TGF treatment)  
 B = 100-(cell viability of TGF and sample treatments)



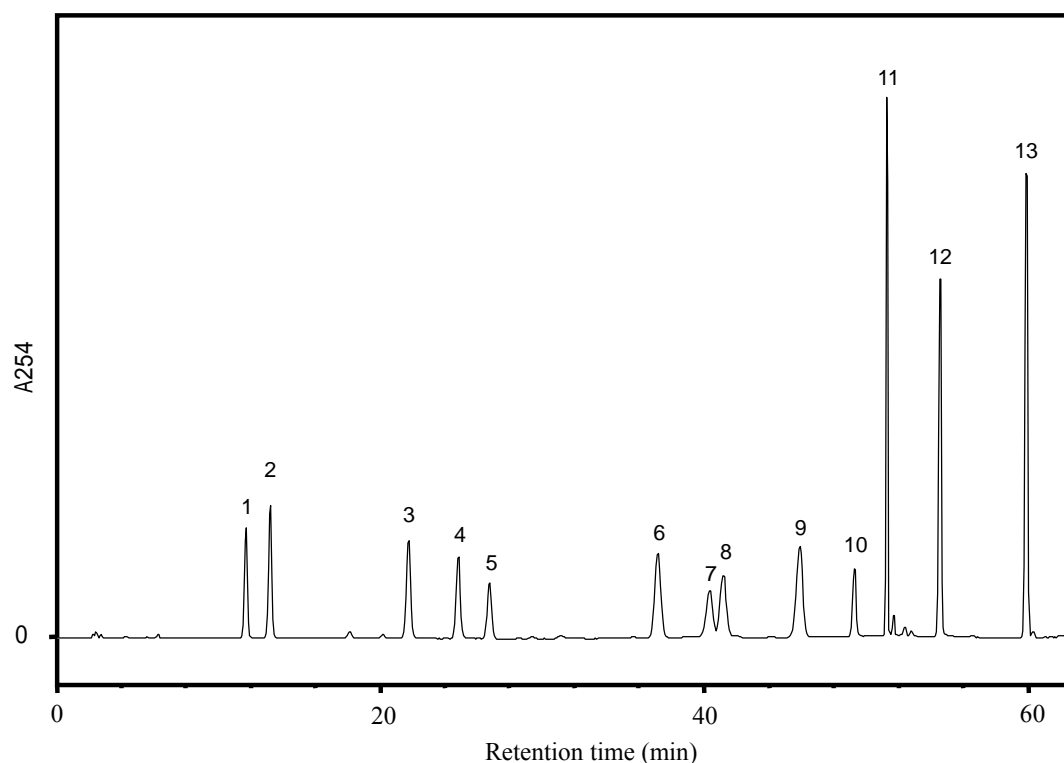
圖四、不同菌絲體萃出物對 TGF-β 誘導之氧化損傷保護效果

Figure 4. Recovery ratios of different mycelia extracts.

\* Cells ( $5 \times 10^3$ /well) were seeded in complete DMEM on 96 well culture plate for 24 hrs. Subsequently, cells were incubated in serum-free DMEM containing 2 ng/mL TGF  $\beta$  and treated with 100  $\mu$ g/mL of extracts of Chinese herbal medicine for 48 hrs. Cell viability was determined by using the MTT assay. Sample code are the same as shown in Figure 2. Sal B represents salvanolic acid as a positive control. Sample concentration was 100  $\mu$ g/mL.

\*\* Recovery ratio (%) =  $100 \times (A-B)/A$   
 A = 100-(cell viability of TGF treatment)  
 B = 100-(cell viability of TGF and sample treatments)





圖五、異黃酮標準品之高效能液相層析圖

Figure 5. HPLC chromatogram of isoflavone standards.

Peak 1: daidzin, peak 2: glycitin, peak 3: genistin, peak 4: malonyldaidzin, peak 5: malonyglycitin, peak 6: acetyldaidzin, peak 7: acetylglycitin, peak 8: malonylgenistin, peak 9: daidzein, peak 10: glycitein, peak 11: acetylgenistin, peak 12: genistein, peak 13: fluorescein.(Internal Standard).

表三、不同樣品中異黃酮素含量

Table 1. The isoflavone contents of samples with different treatments

Sample	Broth ( $\mu\text{g/g}$ )	Broth removal of polysaccharide ( $\mu\text{g/g}$ )	Mycelia methanol extract ( $\mu\text{g/g}$ )	Mycelia ethanol extract ( $\mu\text{g/g}$ )
GL-92-9-1	nd**	nd	-	-
GL-92-10-3	nd	nd	1.63	1.46
GL-92-10-22	nd	nd	0.61	0.66
GL-92-11-6	nd	nd	1.96	2.60
GL-92-12-17	nd	nd	nd	nd
GL-93-3-16	-***	-	2.48	2.14
GL-93-3-27	-	-	0.94	0.90
AB-92-10-6	nd	nd	nd	nd
AB-92-12-15	nd	nd	0.038	0.047
BB*	4595.87( $\mu\text{g/g}$ )			
AM*	122.16 ( $\mu\text{g/g}$ )			

\* BB represents black bean; AM represents *Astragali membranaceu*

\*\* Detection limit = 95 ppb.

\*\*\* - represents the sample is being analyzed.