

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

具有維護肝臟功能樟芝發酵液之深層培養及其作用機制之 探討(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2321-B-002-015-

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：沈立言

共同主持人：蔣丙煌

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 1 日

一、摘要：

本計畫擬探討不同發酵條件下樟芝 (*Antrodia camporata*) 發酵產物是否具有肝癌抑制活性，並進行三萜類化合物之分析，以瞭解三萜類化合物與肝癌抑制活性之相關性。由實驗結果可知不同發酵條件之樟芝菌絲體的乙醇萃取量約 21-46 g/100 g dry matter，而發酵濾液的乙醇萃取量約 14-40 g/100 g dry matter。利用已建立之快速篩選肝癌抑制活性平台評估樟芝樣品的肝癌抑制活性，結果發現不同主要碳源 (lactose 及 galactose) 發酵 1 與 2 週的樟芝菌絲體乙醇萃取物及發酵 2 與 3 週的發酵濾液乙醇萃取物都沒有肝癌抑制活性的表現；而不同主要碳源發酵 3 週及 4 週的菌絲體乙醇萃取物則有肝癌抑制活性(抑制率為 12-38%)，而以發酵 8 週的樟芝菌絲體乙醇萃取物的肝癌抑制的活性最好(抑制率為 74%)；且以 lactose 為發酵碳源的樣品之肝癌抑制活性略高於以 galactose 為發酵碳源的樣品。比對高效能液相層析圖譜後發現，不同發酵條件之樟芝發酵濾液之乙醇萃取物皆只有少量三萜類波峰存在；而以 lactose 為主要發酵碳源時，其發酵 3 及 4 週之樟芝菌絲體乙醇萃取物較以 galactose 為主要發酵碳源者的三萜類波峰數為多，此現象與肝癌抑制活性的趨勢相呼應。

關鍵詞：樟芝菌絲體、三萜類、乙醇萃取物、不同碳源

二、計畫緣由與目的

本計畫分成兩個子計劃(本年度為三年計畫的第一年)，子計畫一~利用深層培養生產具維護肝臟功能之樟芝發酵，子計畫二~樟芝發酵液肝臟保健功效之評估及其作用機制之探討。

過去幾年，樟芝之液態發酵生產研發主要由「食品工業發展研究所」與「葡萄王企業股份有限公司」兩個單位執行，學術界之研究亦由此二單位所提供發酵液為之。由於商業機密與專利權之維護，目前兩單位在發酵時採用之菌種、培養基組成、乃至於發酵條件均屬機密性資料，無從得知。雖然兩單位都有做相關的生理活性測試，然而，上述資料與發酵產物之功能性息息相關，對於發酵條件與生理活性間之關係並無較詳盡的文獻可供參考，因此應有更多研究投入此一領域，對樟芝長遠的發展至為重要。

近兩年來，在樟芝研究方面則有較多的功能性驗證研究。Huang 等人(1999)及 Song 等人(2002a)在樟芝發酵過濾液及菌絲體水萃取液抗氧化的實驗中，發現樟芝的抗氧化能力不亞於維生素 E 及抗氧化劑 BHA。另外中興大學食科系顏(2002)於報告中指出，以樟芝深層培養液萃取 6 種多醣體，針對 Chang liver cells 測試 H₂O₂ 誘導 DNA 氧化傷害之保護及修補能力，發現 6 種多醣體皆能顯著抑制 H₂O₂ 所誘發之 8-OHdG 氧化產物的產生 (p<0.05)。而 Song 等人(2002b)也發現樟芝發酵過濾液具有保護大鼠肝臟避免四氯化碳誘導之急性氧化傷害能力，並初步推測其活性成份應為多醣體、多酚類及三萜類化合物等成份。

國立台灣大學醫學院生化暨分子生物研究所張等人(2001)對樟芝菌絲體之甲醇萃取液對肝癌細胞株之研究指出，高濃度樟芝菌絲體之甲醇萃取液會促進肝癌細胞株 HepG2 的過氧化物生成，而低濃度的萃取液則會抑制肝癌細胞株 HepG2 的過氧化物生成。呂(2002)以含有樟芝萃取多醣(AC-PS)製備人類單核球細胞的條件培養基(MNC-CM)，發現可以抑制白血病細胞 U937 的增生，並且可以誘導 U937 細胞成為單核球巨噬細胞，另外口服或餵食樟芝多醣對於植入 Sarcoma 180 的 ICR 小鼠也有明顯抑制腫瘤生長效果，所以推測樟芝具有顯著的免疫提升機能，進而具有抑瘤的效果。

輔仁大學食品營養所蔡等人(2002a)於「樟芝對於血糖及血脂質之影響-1」報告中指出，樟芝發酵液和菌絲體對高血糖鼠具有降低血糖之效果，故對於改善糖尿病具有正面的保健效果，但不同樟芝菌株所發酵而得之產品，其生理功能略有不同。蔡等人(2002b)另一篇報告「樟芝對於血糖及血脂質之影響-2」，發現樟芝發酵液和菌絲體對於高油脂飲食所誘發的高脂血症與氧化壓力皆具有保護功能。

在剛結束的 92 年度「保健食品研究開發」計畫成果發表會中，樟芝相關題目有 8 個，主要研究範疇集中在探討發酵條件、純化方法、成分鑑定以及功能評估四個領域。發酵條件、純化方法及成分鑑定多集中在甲醇萃取物或三萜(顏 2003：沈 2003：張 2003)，功能評估則以保肝功能為最主要研究方向(顏 2003：沈 2003：李 2003)。

雖然樟芝之子實體及菌絲體萃取物可能具有清除自由基及抗氧化能力、降低酒精所誘發之急慢性肝損傷、保護四氯化碳誘發之急慢性肝損傷、增強免疫力，以及抑制腫瘤細胞生長等功能，但目前價格昂貴的樟芝子實體由於環保因素禁止採收，再加上有效成分目前仍不清楚，因此在保健與醫藥產業應用上仍有相當程度的限制，也因此利用生物技術發酵生產樟芝具有極大的研究空間。

目前工業界大量生產樟芝之方式仍然以液態培養為主，但是在發酵乃至於後續加工製程中皆未能以適當的指標(biomarker)來確定產品的機能性與品質，目前也尚未有足夠研究證據訂定出適當的生物活性成份指標。同時，雖然已有上述研究初步證實樟芝發酵液具有保護肝臟功能，但是保肝功能與發酵條件之關連性尚未建立，對於樟芝發酵液之保肝成分也不清楚，以至於無法利用後續分離純化之加工步驟提升產品之生理功效，種種的問題均有待進一步研究探討。因此，本計畫之研究目的第一年：擬以不同條件同時監測發酵液之物化性質或成分之 pH 值，以找出肝癌抑制細胞生長活性為指標，找出樟芝適當之發酵條件。並建立快速篩選肝癌抑制活性平台，探討不同發酵條件下樟芝發酵液是否具有肝癌抑制活性，並進行三萜類化合物之分析，以瞭解三萜類化合物與肝癌抑制活性之相關性。並深入探討具有抑癌活性之發酵液對大白鼠正常初代肝細胞生理機能之影響。

三、材料與方法

(1) 實驗材料及樣品處理

1. 樟芝菌種活化

使用之菌株 *Antrodia camphorata* CCRC35716，購自生物資源保存暨研究中心（食品工業發展研究所，新竹），將其置於 PDA 培養基，30°C，待樟芝長滿後即繼代培養一次。將培養基成分以 glucose 2%、malt extract 2%、peptone 0.1%，以培養基 200 ml 置於 500 ml 三角瓶於 121°C 下進行滅菌 15 分鐘，冷卻後，將在 PDA 斜面培養的菌種接種至三角瓶中培養 4 週。

2. 樟芝發酵條件

將活化的樟芝發酵液以均質機打碎混合均勻，以 5 ml 活化液接種至含有 50 ml 培養基的 125 ml 三角瓶；以不同的碳源（galactose 及 lactose）。培養 1-4 週後進行活性成分萃取分離及細胞實驗。所生產之樟芝發酵樣品包括以 Lactose 及 galactose 為主要發酵碳源，發酵 1、2、3 及 4 週之樟芝菌絲體發酵液（表一）。

3. 樟芝樣品前處理

針對不同發酵條件之樟芝發酵產物（簡稱為「AC」），區分為發酵濾液（broth，簡稱為「b」）與菌絲體（mycelium，簡稱為「m」）等兩部分進行分析：

樟芝菌絲體乙醇萃取物：將所得到之樣品以六層紗布過濾，於 45 °C 下烘乾 48 小時，取 1 g 樣品，10 ml 乙醇萃取 24 小時，減壓濃縮後以 2 ml 甲醇回溶，以進行細胞實驗及三萜類化合物之分析。本文中 AC-EtOH-1w-m-lactose、AC-EtOH-2w-m-lactose、AC-EtOH-3w-m-lactose 及 AC-EtOH-4w-m-lactose 表示以 lactose 為主要發酵碳源，發酵 1、2、3 及 4 週之樟芝菌絲體乙醇萃取物；AC-EtOH-1w-m-galactose、AC-EtOH-2w-m-galactose、AC-EtOH-3w-m-galactose、AC-EtOH-4w-m-galactose 及 AC-EtOH-8w-m-galactose 表示以 galactose 為主要發酵碳源，發酵 1、2、3、4 及 8 週之樟芝菌絲體乙醇萃取物。

樟芝發酵濾液乙醇萃取物：樣品以六層紗布過濾後之濾液，於 45 °C 下烘乾 48 小時，取 1 g 樣品，10 ml 乙醇萃取 24 小時，減壓濃縮後以 2 ml 甲醇回溶，以進行細胞實驗及三萜類化合物之分析。本文中 AC-EtOH-2w-b-lactose、AC-EtOH-3w-b-lactose 及 AC-EtOH-4w-b-lactose 表示以 lactose 為主要發酵碳源，發酵 2、3 及 4 週之樟芝發酵濾液乙醇萃取物；AC-EtOH-2w-b-galactose、AC-EtOH-3w-b-galactose 及 AC-EtOH-4w-b-galactose 表示以 galactose 為主要發酵碳源，

發酵 2、3 及 4 週之樟芝發酵濾液乙醇萃取物。

(2) 研究方法

1. 快速篩選樟芝菌絲體發酵液之肝癌抑制活性：

Lovastatin 是一種 HMG-CoA reductase 抑制劑，為臨床上之降膽固醇藥物，可應用於抑制癌細胞生長之探討，其作用可抑制人類肝癌細胞 Hep3B 內 Mevalonate-demanding pathway，使肝癌細胞處於較無 Lovastatin 處理時更接近細胞凋亡，此時若介入具有抑制癌細胞生長之樣品，則可促使肝癌細胞凋亡。故藉由 Lovastatin 的作用可提高肝癌細胞對該樣品之敏感度，以 MTT 測細胞存活率可快速獲知該樣品是否具抑制癌細胞之活性；本研究計畫以此一細胞模式快速篩選不同發酵條件下具較佳肝癌抑制活性之樟芝菌絲體發酵液。

參考洪（2000）的方法，Hep 3B 細胞以 1×10^4 cells/100 μ L/well 的細胞密度種植於 96-well microplate 中，以 cDMEM 培養 24 小時之後，更換新的無血清之 DMEM，並加入 10 μ M Lovastatin，於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恆溫培養箱中培養 24 或 48 小時後移去，並以 PBS（100 μ L/well）洗兩次，之後再加入新的無血清之 DMEM，且加入不同濃度的樟芝發酵液，於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恆溫培養箱中繼續培養另外的 48 小時之後，以 MTT 測細胞存活率。

2. 三萜類化合物分析：

參考 Chyr and Shiao（1991）之分析方法，分析條件如下：

分析管柱：Cosmosil C18

UV-VIS 檢測器：Hitachi L-7420

檢測波長：243 nm

移動相：Eluent A：methanol / acetic acid（100 / 0.5）

Eluent B：methanol / water / acetic acid（80 / 20 / 0.5）

Gradient eluent：started with 80% methanol, increased linearly to 84% methanol in 15 min, to 86% in a further 15 min, to 88% in 10 min, to 94% in a further 10 min and finally to 100% in 20 min.

流速：0.7 ml/min

四、執行進度及成果

1. 樟芝樣品之前處理

樟芝發酵樣品固形物含量如表二所示，菌絲體的固形物含量約 4.47-7.17 g/100 g wet weight，而發酵液的固形物含量約 1.76-3.75 g/100 g wet weight。

在乙醇萃取量方面，菌絲體的乙醇萃取量約 21-46 g/100 g dry matter，而發酵濾液的乙醇萃取量約 14-40 g/100 g dry matter，由表二結果發現以 galactose 為樟芝發酵碳源的菌絲體乙醇萃取量於第二週及第三週時均較高於以 lactose 為樟芝發酵碳源的乙醇萃取量。

2. 篩選具肝癌抑制活性之樟芝發酵樣品

利用前次報告中所確認之抑制肝癌快速篩選平台，初步評估不同發酵條件樟芝樣品的肝癌抑制活性，如圖一所示，樣品的處理濃度為 100 $\mu\text{g/ml}$ ，結果發現第一及二週樣品的 AC-EtOH-1w-m 及 AC-EtOH-2w-m 都沒有肝癌抑制活性的表現；而第三及四週樣品的 AC-EtOH-3w-m 及 AC-EtOH-4w-m 則有肝癌抑制活性（抑制率為 12-38%）；且以 lactose 為發酵碳源的樣品之肝癌抑制活性較佳於以 galactose 為發酵碳源的樣品，但沒有顯著性差異；而以發酵 8 週的樟芝菌絲體乙醇萃取物(AC-EtOH-8w-m-galactose)的肝癌抑制的活性最好（抑制率為 74%， IC_{50} 為 66.5 $\mu\text{g/ml}$ ）（圖一及表三），由以上的結果可初步判斷，樟芝發酵的時間至少要 4-8 週才有較明顯的肝癌抑制活性。另外，探討以 galactose 為發酵碳源之樟芝樣品，於不同發酵時間下乙醇萃取量與肝癌抑制活性的變化情形(如圖二所示)，發現發酵 4-8 週後之乙醇萃取量並沒有增加的趨勢，而肝癌抑制活性於 8 週時達最佳的抑制活性，此現象表示乙醇萃取量的變化並不會影響樟芝樣品的肝癌抑制活性。

3. 樟芝乙醇萃取物之三萜類化合物之分析並探討其與肝癌抑制活性之關係

樟芝樣品前處理後參考 Chyr and Shiao (1991) 之三萜類分析方法，其高效能液相層析圖譜如圖四及圖五所示，比對其波峰型態後發現，樟芝發酵濾液之乙醇萃取物皆只有少量三萜類之波峰存在（圖五），而在樟芝菌絲體之乙醇萃取物方面，AC-EtOH-1w-m-lactose（圖四（A））、AC-EtOH-1w-m-galactose（圖四（B））、AC-EtOH-2w-m-lactose（圖四（C））及 AC-EtOH-2w-m-galactose（圖四（D））的三萜類波峰稀少且較偏屬於極性成分；AC-EtOH-3w-m-lactose（圖四（E））及 AC-EtOH-4w-m-lactose（圖四（G））的三萜類波峰數皆較多於 AC-EtOH-4w-m-galactose（圖四（F））及 AC-EtOH-3w-m-galactose（圖四（H）），尤其是第 4 週的 AC-EtOH-4w-m-lactose（圖四（G））有較多且明顯的三萜類之波峰，此現象與肝癌抑制活性的趨勢相呼應。

另外分析不同發酵條件之樟芝發酵菌絲體的 HPLC 波峰面積與肝癌抑制活性之間的關係，選擇 11 個較具代表性的波峰，利用 SAS 統計分析軟體，分別計算各波峰面

積與有 lovastatin 處理之 Hep3B 存活率之相關係數 (Pearson Correlation Coefficients)，如表四所示，結果只有 Peak4 (11.9 min) 及 Peak10 (54.1 min) 之相關係數小於-0.7，表示此兩個波峰之成分與細胞存活率所呈現之負相關程度最大，故初步將這兩個波峰之活性成分作為活性指標。

五、計畫成果自評：

本計畫已進一步完成部分第一年之研究工作，針對計畫進度，綜合評估如下：

1. 本研究已完成建立快速篩選肝癌抑制活性平台，並以此篩選平台評估不同發酵條件之樟芝菌絲體及發酵濾液乙醇萃取物之肝癌抑制活性。
2. 完成樟芝菌絲體及發酵濾液乙醇萃取物之三萜類化合物分析。
3. 未來需對兩個初步可作為活性指標之活性成分進行 LC-MS 鑑定分析。
4. 未來需針對較具有肝癌抑制活性之樟芝發酵樣品，探討其對正常初代肝細胞之影響。

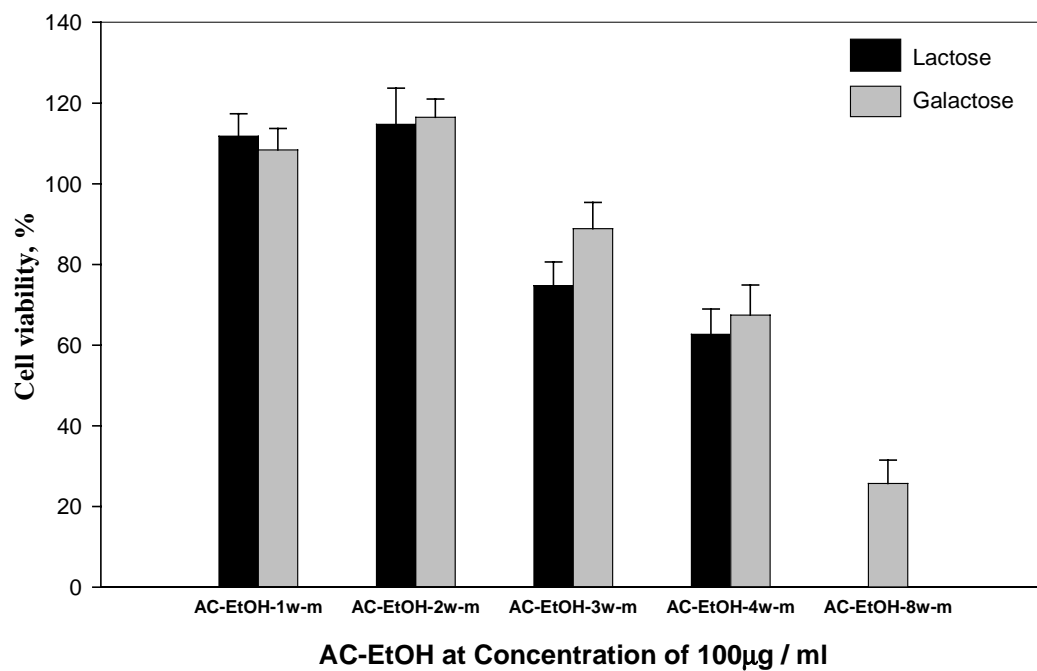
表一、以 lactose 及 galactose 為樟芝發酵碳源之發酵條件

Samples	Fermentation condition						
	Carbon source (g/L)	Malt extract (g/L)	Peptone (g/L)	Temp (°C)	pH	Agitation (rpm)	Fermentation time (day)
AC-1w-galactose					3.79		7
AC-2w-galactose					3.26		14
AC-3w-galactose	Galactose 20	20	1	22	3.18	100	21
AC-4w-galactose					2.93		28
AC-8w-galactose					3.13		56
AC-1w-lactose					3.84		7
AC-2w-lactose	Lactose 20	20	1	22	3.31	100	14
AC-3w-lactose					3.05		21
AC-4w-lactose					2.97		28

表二、樟芝菌絲體及發酵濾液之固形物含量及乙醇萃取量

Sample*	Solid content (g/100 g wet weight)	Yield of ethanol extract (g/100 g dry matter)
AC-1week		
lactose-mycelium	6.84	29.5
lactose-broth	-	-
galactose-mycelium	7.14	21.2
galactose-broth	-	-
AC-2week		
lactose-mycelium	7.17	25.3
lactose-broth	3.75	14.9
galactose-mycelium	7.11	37.6
galactose-broth	3.71	40.2
AC-3week		
lactose-mycelium	4.47	21.1
lactose-broth	2.50	14.4
galactose-mycelium	5.40	46.1
galactose-broth	3.18	30.8
AC-4week		
lactose-mycelium	5.02	15.2
lactose-broth	1.76	15.4
galactose-mycelium	5.23	17.3
galactose-broth	2.08	25.3
AC-8week		
galactose-mycelium	5.13	12.3
galactose-broth	3.81	14.5

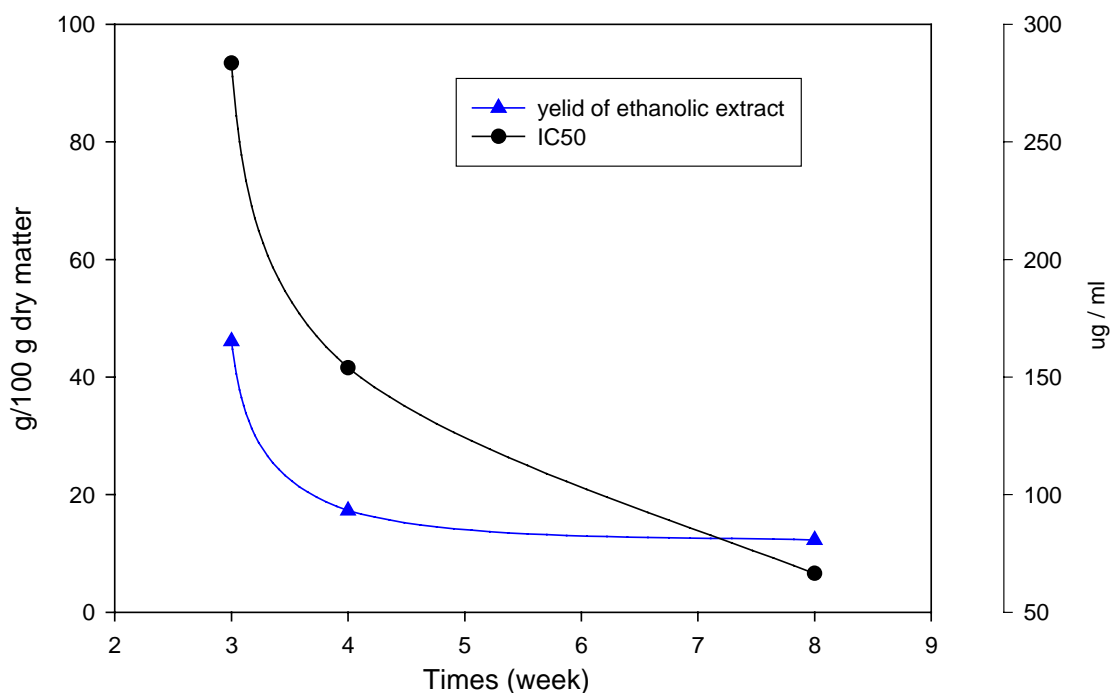
* lactose-mycelium、galactose-mycelium、lactose-broth 及 galactose-broth 分別表示以 lactose 及 galactose 為主要發酵碳源之菌絲體與發酵濾液



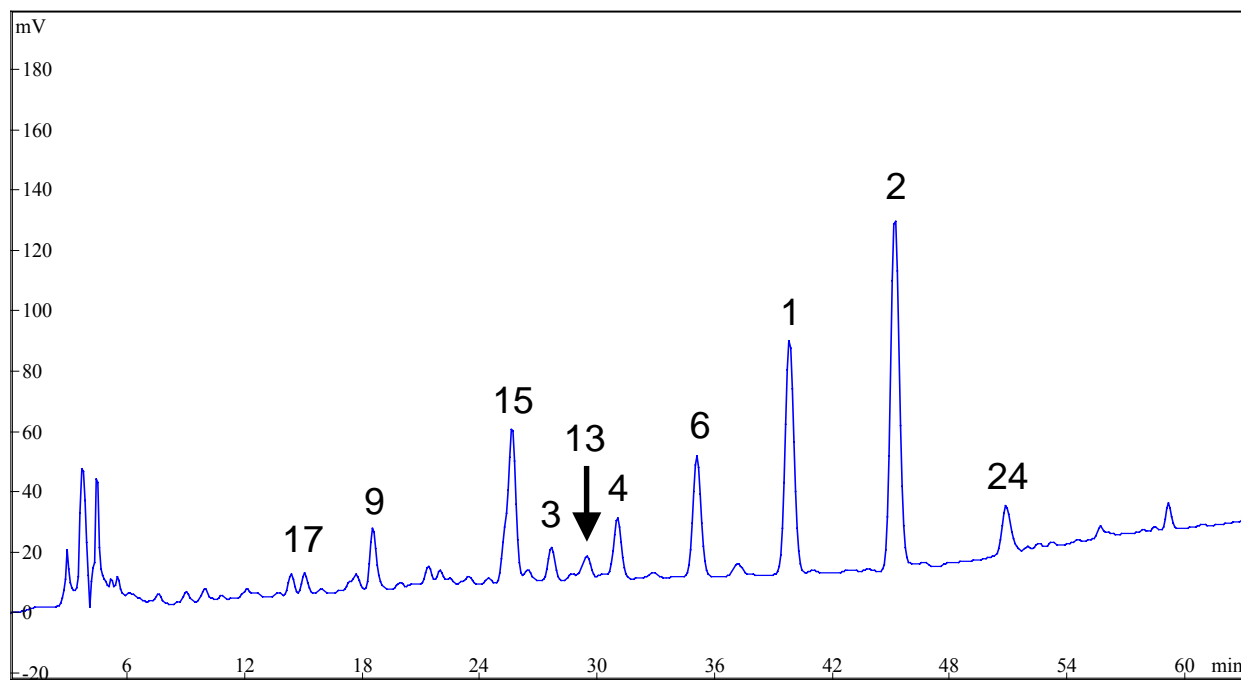
圖一、不同發酵條件樟芝乙醇萃取物對 Lovastatin 處理 48 小時後之 Hep3B 生存力之影響

表三、不同發酵條件樟芝菌絲體乙醇萃取物對 Hep 3B 生存力之影響

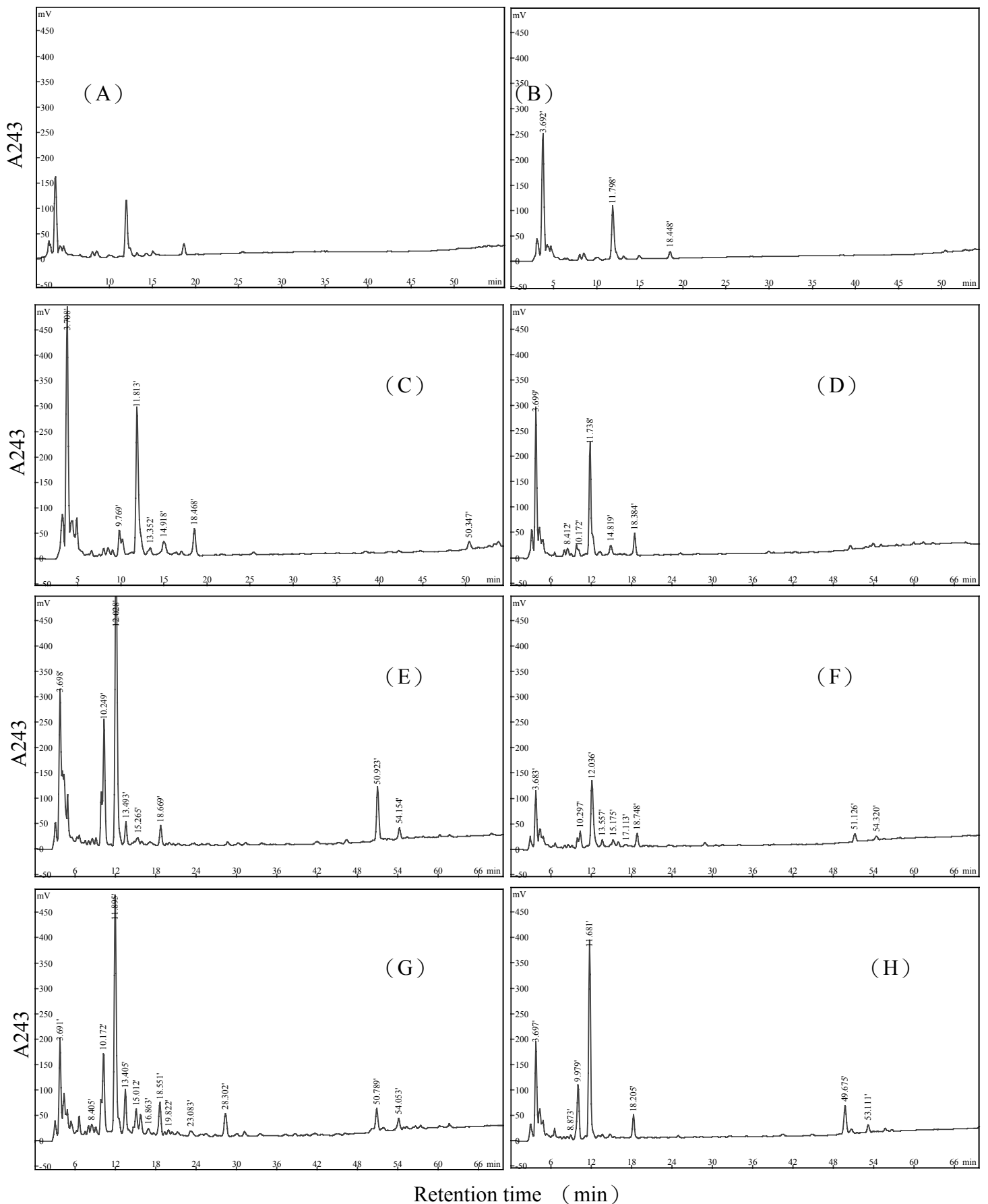
Samples	IC ₅₀ (µg / ml)
AC-3w-EtOH-m-lactose	231.2
AC-3w-EtOH-m-galactose	283.5
AC-4w-EtOH-m-lactose	123.7
AC-4w-EtOH-m-galactose	154.0
AC-8w-EtOH-m-galactose	66.5



圖二、於不同發酵時間下樟芝樣品乙醇萃取量與肝癌抑制活性的變化情形

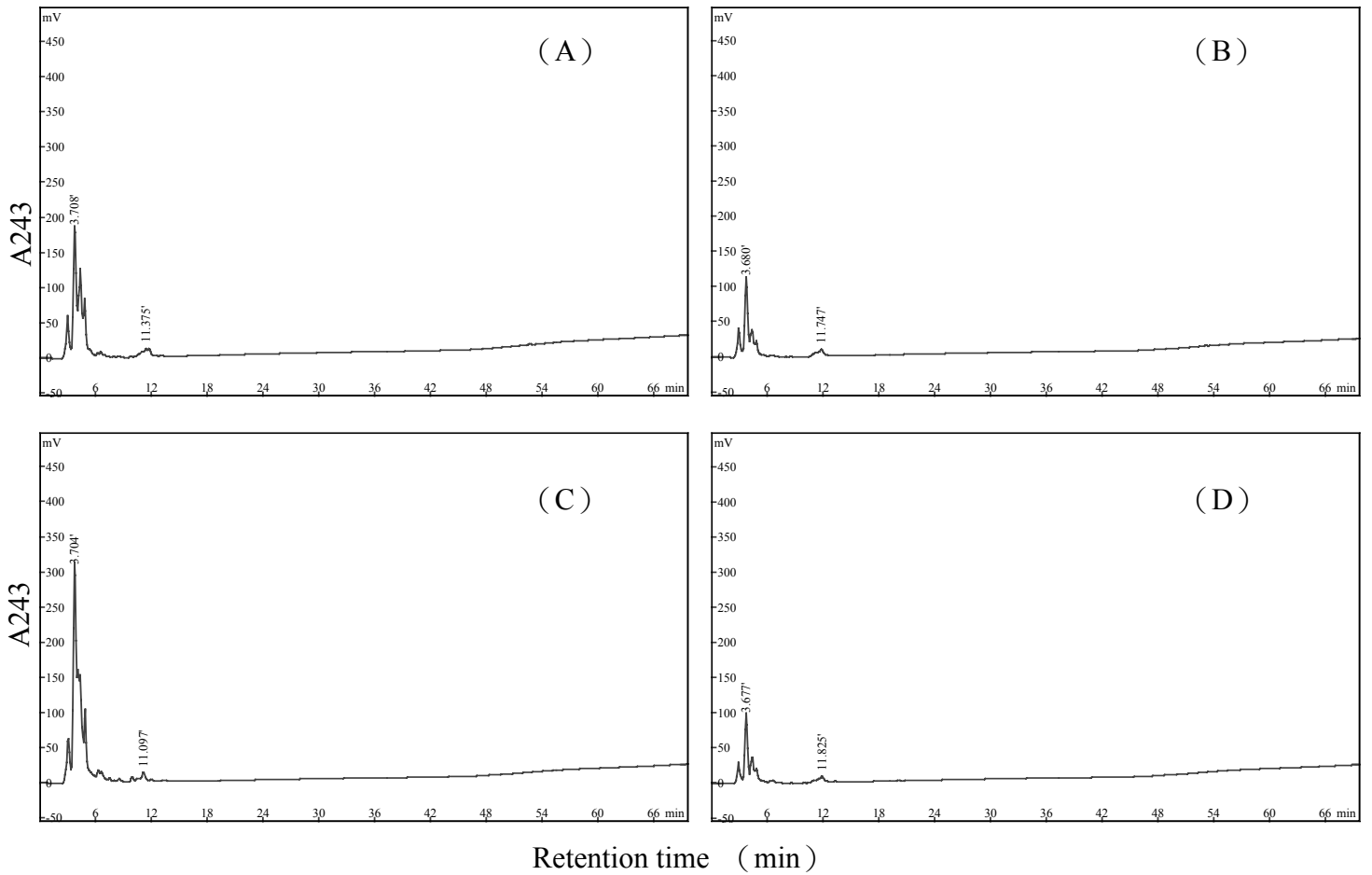


圖三、參考 Chyr and Shiao 於 1991 所發表之三萜類化合物分析方法，以相同樣品（靈芝 strain TP-1 菌絲體甲醇萃取物）所得之 HPLC 圖譜



圖四、不同發酵條件樟芝菌絲體乙醇萃取物之高效能液相層析圖譜

分析樣品濃度為 20000 ppm。 (A) AC-EtOH-1w-m-lactose, (B) AC-EtOH-1w-m-galactose, (C) AC-EtOH-2w-m-lactose, (D) AC-EtOH-2w-m-galactose, (E) AC-EtOH-3w-m-lactose, (F) AC-EtOH-3w-m-galactose, (G) AC-EtOH-4w-m-lactose, (H) AC-EtOH-4w-m-galactose



圖五、不同發酵條件樟芝發酵濾液乙醇萃取物之高效能液相層析圖譜

分析樣品濃度為 20000 ppm。 (A) AC-EtOH-2w-b-lactose, (B) AC-EtOH-2w-b-galactose, (C) AC-EtOH-3w-b-lactose, (D) AC-EtOH-3w-b-galactose

表四、不同樟芝發酵產物之 HPLC 分析波峰面積與 Hep 3B 之存活率關係

Samples	Hep3B Cell viability %	Peak Retention time (min)	Peak area									
			1	2	4	5	6	9	13	15	17	24
			18.6	50.3	14.9	9.8	15.3	8.5	13.4	11.9	3.7	54.1
AC-1w-EtOH-m-lactose	114.74	-	-	-	-	-	1254965	-	-	-	-	
AC-1w-EtOH-m-galactose	108.39	-	-	-	-	-	1331601	-	-	-	-	
AC-2w-EtOH-m-lactose	114.76	-	-	-	-	-	1927327	-	-	-	5762435	
AC-2w-EtOH-m-galactose	116.47	-	-	-	-	-	1621176	-	-	-	-	
AC-3w-EtOH-m-lactose	74.69	-	-	-	-	-	1398760	-	-	1400609	5503752	
AC-3w-EtOH-m-galactose	88.88	-	-	-	-	-	1217716	-	-	-	5194516	
AC-4w-EtOH-m-lactose	62.63	-	-	-	1233541	-	2772748	2026607	-	2251081	6086328	
AC-4w-EtOH-m-galactose	67.37	-	-	-	-	-	1218943	-	-	-	1711181	
AC-8w-EtOH-m-galactose	26.0	3556672	1318526	11800783	1615616	5274258	4091370	4297705	4141598	2284462	4909228	
Pearson Correlation Coefficients		-0.725	-0.725	-0.725	-0.797	-0.725	-0.723	-0.816	-0.725	-0.811	-0.514	