

東海大學食品科學研究所

Graduate Institute of Food Science

TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組

Food Technology Section

碩士論文

Master Thesis

指導教授：閻立平 博士

Advisor : Lipyng Yan, Ph. D.

不同型式發酵槽深層培養桑黃菌 *Phellinus linteus* 生產

胞外多醣體之研究

Production of exopolysaccharide from submerged culture of

Phellinus linteus using different types of fermentors

研究生：吳子瑋 撰

Graduate Student : Tzu Wei Wu

中華民國九十八年十月

October, 2009

謝誌

承蒙恩師 閻立平博士於學生碩士班就讀的這段時間給予許多學習的機會以及指導，無論是在論文研究、功課學業或待人處世上皆對學生有莫大的啟發。此外亦提供了良好的實驗環境，並給予學生自由快樂的學習空間，於論文撰寫期間，感謝恩師細心的審閱與指正，使得論文可以順利的完成，恩師的鼓勵與教誨，學生會永遠謹記在心，特誌卷首，以表達由衷之謝意。

文稿初成，承蒙本研究所副教授 顏文義博士擔任學生碩士論文口試招集人，以及中興大學食品暨應用生物科技學系教授 陳錦樹博士與本系畢業目前任職於漢馨科技有限公司總經理的劉景文學長在百忙之中詳閱學生論文，並給予甚具價值的匡正與建議，使得本論文得以更臻周嚴，以助學生完成碩士學位口試，在此致上萬分的謝意。此外也感謝系上所有老師在學生的求學過程期間給予的幫助與教導，特別感謝 蔡正宗教授不吝的指導為學生解答實驗上的問題。

在學期間，感謝系辦公室 王琴助理、林宜君助教、李佩玲助教及茹婕學姐在研究所生涯中的協助。另外也感謝許多學長姐的關懷與指導，謝謝國晏學長在實驗上不遺餘力的教導，仁翔學長的互相砥礪切磋與照顧，美燕學姐的關愛與解惑；同窗好友附偉、心語、念穎、麗娟、敬義、琪雅、盈欣、慧文、敬哲、志剛及好友兼隊友的佳宏等；學弟妹韋任、百秀、展維、青蓉、彥葦、俊麟、建廷及雅馨等。感謝你們的協助與陪伴，使我的研究所生活充滿歡樂以及美好的回憶。

最後，謹將此論文獻給我摯愛的家人，由衷的感謝這多年來對我的支持、關心與疼愛，讓我有良好的生活可以無後顧之憂的專注於課業上，順利的完成學業，感謝您們辛苦栽培養育之恩。

吳子瑋 謹誌於
東海大學食品科學研究所
中華民國九十八年十一月

目 錄

摘 要.....	I
Abstract.....	III
壹、 前 言	1
貳、 文獻回顧	3
一、 桑黃菌 (<i>Phellinus linteus</i>) 簡介.....	3
(一) 桑黃菌分類、命名及分佈	3
(二) 桑黃菌生態習性	4
(三) 桑黃菌化學組成與相關之保健功能研究	6
(四) 桑黃菌之藥用開發與展望	14
二、 食藥用菇類多醣簡介.....	15
(一) 多醣體之結構	15
(二) β -D-glucan 之免疫活性.....	16
三、 食藥用菇類之深層培養.....	20
(一) 深層培養之定義	20
(二) 深層培養與傳統固態培養之差異	20
(三) 影響深層培養之因素	21
(四) 深層發酵之應用	24
參、 材料與方法	30

一、 試驗材料.....	30
(一) 試驗菌種	30
(二) 培養基	30
(三) 重要藥品	33
二、 試驗儀器.....	34
三、 試驗方法.....	36
(一) 試驗流程	36
(二) 菌種保存	37
(三) 菌種活化	37
(四) 種菌培養	37
(五) 種菌懸浮液之製作	37
(六) 平板培養基試驗	38
(七) 搖瓶試驗	38
(八) 發酵槽試驗	39
四、 分析方法.....	41
(一) 菌絲體乾重之測定	41
(二) pH 值之測定	41
(三) 胞外多醣體之測定	41
(四) 殘糖分析	42

(五) 發酵參數分析	42
(六) 多醣體分子量之測定	44
(七) 發酵液抑菌力之測定	45
(八) 發酵液抗氧化力之測定	45
(九) β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量之測定	49
(十) 統計分析	50
肆、 結果與討論	51
一、 平板培養基試驗	51
(一) 培養溫度及不同培養基對桑黃菌菌絲體生成之影響	51
二、 搖瓶試驗	61
(一) 碳源對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響	61
(二) 氮源對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響	63
(三) 生長因子對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響	65
(四) 無機鹽類對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響	67
(五) 培養基起始 pH 值對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響	69
(六) 碳氮比對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響	73
(七) 搖瓶培養時間對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響	75
三、 不同型式發酵槽培養試驗	78
(一) 胞外多醣體生成之影響	78

(二) 多醣體分子量之測定.....	87
四、 發酵液抑菌力之測定.....	91
五、 發酵液抗氧化力之測定	92
(一) DPPH 自由基清除能力測定.....	93
(二) 總抗氧化力測定.....	96
(三) 螯合亞鐵離子能力測定.....	99
(四) 還原力測定.....	102
六、 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量之測定.....	105
伍、 結論.....	107
陸、 參考文獻.....	110
柒、 附錄.....	125

表目錄

表一	桑黃菌粗多醣體中胺基酸和碳水化合物組成.....	7
表二	十五種菇菌多醣體對 Sarcoma 180 型腫瘤之抑制效果.....	12
表三	不同培養溫度及培養基對桑黃菌 PL02 於平板培養基上(培養 10 天) 菌絲生長之影響.....	57
表四	不同培養溫度及培養基對桑黃菌 PL03 於平板培養基上(培養 10 天) 菌絲生長之影響.....	58
表五	不同培養溫度及培養基對桑黃菌株於平板培養基上(培養 10 天) 菌絲生長速率之影響.....	59
表六	碳源對搖瓶培養之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響.....	62
表七	氮源對搖瓶培養之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響.....	64
表八	生長因子對搖瓶培養之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響.....	66
表九	無機鹽類對搖瓶培養之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響.....	68
表十	起始 pH 值 (4~8) 對搖瓶培養 (氮源為 peptone) 之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響.....	70

表十一	起始 pH 值 (4~8) 對搖瓶培養 (氮源為 yeast extract) 之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響	71
表十二	起始 pH 值 (5~6) 對搖瓶培養 (氮源為 yeast extract) 之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響	72
表十三	碳氮比對搖瓶培養之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響	74
表十四	桑黃菌 PL02 於搖瓶試驗及不同發酵槽培養時之發酵參數.....	85
表十五	膠體滲透層析法不同分子量多醣標準品 (α -D-葡聚糖) 之滯留時間	89
表十六	膠體滲透層析法測定四種不同發酵液之胞外多醣體分子量.....	90
表十七	搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽桑黃菌 PL02 發酵液甲醇萃取物 DPPH 自由基清除能力之 IC_{50}	95
表十八	搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽之桑黃菌 PL02 發酵液總抗氧化力之 IC_{50}	98
表十九	搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽之桑黃菌 PL02 發酵液螯合亞鐵離子能力之 IC_{50}	101
表二十	搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽之桑黃菌 PL02 發酵液還	

原力之 IC_{50} 104

表二十一 四種不同形式發酵液中胞外多醣體之 β -(1→3)-D-glucan 相對量.....106

圖目錄

圖一	桑黃菌之外觀形態。.....	5
圖二	桑黃免疫作用機制。.....	9
圖三	具抗腫瘤活性之 β -(1 \rightarrow 6)分支 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖結構。	17
圖四	X 射線衍射測定之 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖結晶結構。.....	18
圖五	香菇多醣 lentinan 對寄主所產生之免疫反應。.....	19
圖六	不同型式發酵槽之構造(a) 機械攪拌式，(b)氣泡式，(c)氣舉式.....	29
圖七	桑黃菌 PL02 於不同平板培養基之菌絲外觀 (30 $^{\circ}$ C/10 天)。	52
圖八	桑黃菌 PL03 於不同平板培養基之菌絲外觀 (30 $^{\circ}$ C/10 天)。	53
圖九	桑黃菌 PL02 與 PL03 於 25 及 35 $^{\circ}$ C 培養溫度下之菌絲外觀(培養 9 天)。	56
圖十	不同溫度培養期間對桑黃菌 PL02 於基礎培養基上菌絲生長情形。.....	60
圖十一	搖瓶培養期間桑黃菌 PL02 胞外多醣體、菌絲體、PH 值及殘糖量之變化。.....	77
圖十二	攪拌式發酵槽培養期間桑黃菌 PL02 胞外多醣體、菌絲體、PH 值及殘糖量之變化。.....	79
圖十三	氣泡式發酵槽培養期間桑黃菌 PL02 胞外多醣體、菌絲體、PH	

	值及殘糖量之變化。	80
圖十四	氣舉式發酵槽培養期間桑黃菌 PL02 胞外多醣體、菌絲體、pH 值、殘糖量及溶氧量之變化。	81
圖十五	三種發酵槽中桑黃菌 PL02 菌絲球形成之外觀(a) 攪拌式，(b) 氣泡式，(c)氣舉式。.....	84
圖十六	搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽桑黃菌 PL02 胞外多醣體分 子量膠體滲透層析法圖譜 (a) 搖瓶試驗，(b)攪拌式發酵槽， (c)氣泡式發酵槽，(d)氣舉式發酵槽。	91
圖十七	搖瓶試驗與三種不同形式發酵槽桑黃菌 PL02 發酵液甲醇萃 取物之 DPPH 自由基清除能力。	94
圖十八	搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽桑黃菌 PL02 發酵液之總抗 氧化力。	97
圖十九	搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽桑黃菌 PL02 發酵液之螯合 亞鐵離子能力。	100
圖二十	搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽桑黃菌 PL02 發酵液之還原 力。	103

附圖目錄

附圖一	酚硫酸法之葡萄糖標準曲線。.....	126
附圖二	果糖之 HPLC 殘糖檢量線。.....	127
附圖三	Ampicillin 對病原菌 <i>Bacillus cereus</i> 抑菌環之標準曲。.....	128
附圖四	Ampicillin 對病原菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 抑菌環之標準曲線。.....	129
附圖五	Ampicillin 對病原菌 <i>Escherichia coli</i> 抑菌環之標準曲線。.....	130
附圖六	Ampicillin 對病原菌 <i>Salmonella typhimurium</i> 抑菌環之標準曲線。.....	131
附圖七	Ampicillin 對病原菌 <i>Staphylococcus aureus</i> 抑菌環之標準曲線。.....	132
附圖八	Ampicillin 對病原菌 <i>Listeria monocytogenes</i> 抑菌環之標準曲線。.....	133
附圖九	多醣體分子量之標準曲線。.....	134
附圖十	搖瓶培養發酵液甲醇萃取物之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。.....	135
附圖十一	攪拌式發酵槽發酵液甲醇萃取物之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。.....	136

附圖十二	氣泡式發酵槽發酵液甲醇萃取物之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。.....	137
附圖十三	氣舉式發酵槽發酵液甲醇萃取物之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。.....	138
附圖十四	BHA 之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。.....	139
附圖十五	Ascorbic acid 之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。...	140
附圖十六	α -tocopherol 之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。.....	141
附圖十七	搖瓶培養發酵液之總抗氧化力標準曲線。.....	142
附圖十八	攪拌式發酵槽發酵液之總抗氧化力標準曲線。.....	143
附圖十九	氣泡式發酵槽發酵液之總抗氧化力標準曲線。.....	144
附圖二十	氣舉式發酵槽發酵液之總抗氧化力標準曲線。.....	145
附圖二十一	Trolox 之總抗氧化力標準曲線。.....	146
附圖二十二	培養發酵液之螯合亞鐵離子能力標準曲線。.....	147
附圖二十三	攪拌式發酵液之螯合亞鐵離子能力標準曲線。.....	148
附圖二十四	氣泡式發酵液之螯合亞鐵離子能力標準曲線。.....	149
附圖二十五	氣舉式發酵液之螯合亞鐵離子能力標準曲線。.....	150
附圖二十六	EDTA 之螯合亞鐵離子能力標準曲線。.....	151
附圖二十七	搖瓶培養發酵液之還原力標準曲線。.....	152
附圖二十八	攪拌式發酵槽發酵液之還原力標準曲線。.....	153

附圖二十九	氣泡式發酵槽發酵液之還原力標準曲線。	154
附圖三十	氣舉式發酵槽發酵液之還原力標準曲線。	155
附圖三十一	BHA 之還原力標準曲線。	156
附圖三十二	Ascorbic acid 之還原力標準曲線。	157
附圖三十三	α -tocopherol 之還原力標準曲線。	158
附圖三十四	測定 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量之 laminarin 標準曲	159
附圖三十五	搖瓶培養之對數生長期生長曲線測定桑黃菌 PL02 之比 生長速率 (μ)	160
附圖三十六	攪拌式發酵槽之對數生長期生長曲線測定桑黃菌 PL02 之比生長速率 (μ)	161
附圖三十七	氣泡式發酵槽之對數生長期生長曲線測定桑黃菌 PL02 之比生長速率 (μ)	162
附圖三十八	氣舉式發酵槽之對數生長期生長曲線測定桑黃菌 PL02 之比生長速率 (μ)	163

摘 要

桑黃 (*Phellinus linteus*) 為一種非常珍貴的食藥用菇類，許多研究指出桑黃的多醣體成分具有抗腫瘤、增強免疫活性、抗氧化、降血糖等生物活性功能，目前市場上亦開發出多種桑黃多醣之相關產品。因此本實驗選用桑黃菌為試驗菌種，探討深層培養條件及不同型式發酵槽對其胞外多醣體生成與發酵液之生物活性（抑菌力、抗氧化力、多醣體分子量及 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量）影響。

研究結果顯示，測定菌種中以 *Phellinus linteus* HS-050614D-02 於平板培養基（基礎培養基）之生長速率（0.76 cm/day）較佳，最適菌絲體與胞外多醣體生成之深層培養條件為：培養溫度為 30°C，最適碳源為 1% (w/v) fructose、最適氮源為 1% (w/v) yeast extract、添加 0.3% (w/v) 生長因子 corn steep liquor、最適無機鹽類為 0.1% (w/v) MgSO₄、培養液起始 pH 5.8 及碳氮比 1.0 (fructose / yeast extract, w/w)，以上最適條件之搖瓶培養可於培養第 12 天及第 8 天達到最高菌絲體及胞外多醣體產量（9.25 及 1.99 g/l），而分別為基礎培養基最高產量（3.44 及 0.58 g/l）之 2.69 及 3.44 倍。

發酵參數顯示攪拌式發酵槽具有最高之比生長速率 ($\mu = 0.62 \text{ day}^{-1}$) 及比多醣產率 ($Y_{p/x} = 61.51 \text{ mg/g}$)，而氣舉式發酵槽則具有最高之菌絲體生成速率 ($Q_x = 0.77 \text{ g/l/day}$) 及胞外多醣體生成速率 ($Q_p = 0.38 \text{ g/l/day}$)；多醣體產率 ($Y_{p/s}$) 及菌絲體產率 ($Y_{x/s}$) 則呈現氣舉式 > 氣泡式 > 攪拌式發酵槽之趨勢。

搖瓶試驗與三種不同發酵槽之發酵液所得胞外多醣體分子量皆相近（約 3000 Da），而氣舉式發酵槽所得胞外多醣體分子量 2797 Da 之部分其相對含量較高。

搖瓶試驗與三種不同發酵槽之發酵液抑菌力測定，結果顯示在所使用之六種病原菌測定菌株 (*Bacillus cereus* BCRC 10250, *Escherichia coli* BCRC 10239, *Listeria monocytogene* BCRC 14845, *Pseudomonas aeruginosa* BCRC 10261, *Staphylococcus aureus* BCRC 10451 and *Salmonella typhimurium* BCRC 10241) 上並沒有任何抑菌效果。

搖瓶試驗及三種不同發酵槽之發酵液抗氧化力測試中，以氣舉式發酵槽之發酵液在 DPPH 自由基清除能力 ($IC_{50} = 5.35 \text{ g/l}$)、總抗氧化力 ($IC_{50} = 2.04 \text{ g/l}$) 及還原力 ($IC_{50} = 3.12 \text{ g/l}$) 具有最佳之抗氧化活性。 β -(1→3)-D-glucan 相對含量之測定則以氣泡式及氣舉式發酵槽較高 (16.25 及 15.83 $\mu\text{g/ml LE}$; laminarin equivalent)。

綜上所述試驗結果，以胞外多醣體生成量、生成速率、產率發酵參數、抗氧化能力及 β -(1→3)-D-glucan 相對含量而言，皆以氣舉式發酵槽為較佳。因此，以具較低剪切力及較佳對流循環混合效果之氣舉式發酵槽培養桑黃菌，最能有效地將所消耗之果糖轉換成胞外多醣體與菌絲體，亦較攪拌式或氣泡式發酵槽有更高產量及較佳生物活性之胞外多醣體。

Abstract

Phellinus linteus is a precious medicinal mushroom. The exopolysaccharides (EPS) from *P. linteus* have been reported to possess important biological functions including anti-tumor, immuno-stimulating, hypoglycemic and antioxidative capacities. Accordingly, many kinds of *P. linteus*-related EPS products were developed as health foods in the market. A EPS-producing *P. linteus* was selected in this research to study the effect of submerged culturing condition and different types of fermentors on the production and bioactivity (molecular weight, relative β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan content, antimicrobial and antioxidative activities) of EPS by this strain.

Results showed that *Phellinus linteus* HS-050614D-02 had mycelial growth rate of 0.76 cm/day on basal medium agar. The factors for optimal submerged-culturing condition were : incubation temperature of 30°C, fructose at 1% (w/v), yeast extract at 1% (w/v), corn steep liquor at 0.3% (w/v), MgSO₄ at 0.1% (w/v), initial pH of 5.8 and a C/N ratio (fructose / yeast extract) of 1.0. Under this optimized culturing condition, maximal production of mycelial biomass (9.25 g/l) and EPS (1.99 g/l) were reached on the 12th day and 8th day, respectively, of incubation from shake flask culture and increased 2.69 and 3.44 times, respectively, as compared with those from basal medium .

Among the three types of fermentors, the stirred-tank fermentor showed the highest specific growth rate ($\mu = 0.62 \text{ day}^{-1}$) and specific product yield ($Y_{p/x} = 61.51 \text{ mg/g}$). The air lift fermentor showed the highest biomass formation rate ($Q_x = 0.77 \text{ g/l/day}$) and product formation rate ($Q_p = 0.39 \text{ g/l/day}$). As for

biomass yield ($Y_{x/s}$) and product yield ($Y_{p/s}$), results showed an increasing tendency of air lift fermentor > air bubble fermentor > stirred-tank fermentor.

Same molecular weight (~3000 Da) was found in EPS from the shake flask and three different types of fermentors. The EPS from culture of air lift fermentor had higher content of molecular weight of 2797 Da.

The EPS of *P. linteus* PL02 demonstrated no antibacterial activities against the six bacterial strains (*Bacillus cereus* BCRC 10250, *Escherichia coli* BCRC 10239, *Listeria monocytogene* BCRC 14845, *Pseudomonas aeruginosa* BCRC 10261, *Staphylococcus aureus* BCRC 10451 and *Salmonella typhimurium* BCRC 10241) tested.

Under same concentration (10 g/l), the fermented cultures from air lift fermentor showed the highest DPPH scavenging effect ($IC_{50} = 5.35$ g/l), total antioxidant capacity ($IC_{50} = 2.04$ g/l) and reducing power ($IC_{50} = 3.12$ g/l) respectively, among those from shake flask and three different types of fermentors. The EPS from air bubble and air lift fermentors also had higher relative β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan contents of 16.25 and 15.83 μ g/ml LE, respectively.

As mentioned above, using air lift fermentor, which has lower shearing force and better circulating effect as compared with stirred-tank and air bubble fermentors, could produce higher production of EPS from *Phellinus linteus* PL02 with better bioactivity.

壹、前言

近年來，隨著社會不斷的進步以及科技的日益發達，使得環境汙染也日趨嚴重，而在舒適的生活中也衍生出許多的文明病，其中以癌症最令人恐慌，亦為國人十大死因之榜首，加上高齡化時代的來臨，飲食型態的轉變，人們也愈來愈注重養生，相對的也開始注重保健食品的食用。因此，許多學者積極的尋找天然的抗癌成份，並有效的量產且開發成保健食品，亦是目前與未來之研究趨勢。其中以中藥以及食藥用菇類最被廣泛的探討。長久以來，人們便已經知道如何利用菇類 (mushrooms)，從野地採擷、人工馴化栽培、以至大量商業化生產，其早已成為廣受人們喜愛的食物來源。中國古代中藥典籍中早有記載部分菇類的子實體或是菌絲體可食用及應用於醫療用途，而近年來有關菇類生物活性物質於保健性食品或醫藥特用化學品之應用，已成為新興的研究重點。

本實驗所使用的桑黃菌種為 *Phellinus linteus* HS-050614D-02 及 *Phellinus linteus* HS-050614D-03。桑黃又稱桑黃菇、桑黃耳，為多年生真菌，主要寄生於桑樹、楊樹等闊葉樹上，子實體邊緣鮮豔的黃色為其特色之一；作為民間藥物上，桑黃被視為對止血、利尿、驅瘀血、鎮痛及月經不順等具有治療之效果，同時亦可用於健胃及止瀉 (羅，2008)。桑黃菌多種的生物活性成分中以多醣體具有很強的抗癌活性而受到國內外學者的重視，韓國學者針對桑黃子實體多醣進行研究，發現桑黃多醣不僅具有抗癌的活性，還具有免疫調節的功效 (Kim *et al.*, 2006)。目前食藥用菇的人工栽培大多以固態培養子實體為主，此法常受到環境 (溫度、水份、重金屬污染等)、時間 (培養時間較長)、空間 (需要較大的培養空間) 和天候等外界因素而影響產量，若以深層培養的方式培養不但可以改良上述之缺點，還能有效率控制菌體生長之最適

培養條件並可以獲得較高之生質與代謝物產量。

因此本研究嘗試以深層培養之方式培養桑黃菌菌絲體，並以不同型式發酵槽培養以提高桑黃菌胞外多醣體產量。主要的研究目的為 1.以三種平板培養基篩選最具活性之桑黃菌菌株與最適培養溫度；2.以搖瓶試驗決定最適深層培養之條件（碳源、氮源、生長因子、無機鹽類、培養液起始 pH 值及碳氮比等）；3.於最適培養條件下，比較三種型式發酵槽（攪拌式、氣泡式和氣舉式）深層培養對桑黃菌胞外多醣體產量之影響，並且測定其發酵液中之抑菌力、抗氧化力、多醣體分子量分佈及 β -(1→3)-D-glucan 相對含量等以決定最適培養之發酵槽種類。

貳、文獻回顧

一、桑黃菌 (*Phellinus linteus*) 簡介

桑黃別名桑黃菇、桑黃耳，為一種寄生於闊葉樹上的多年生菌類，亦是一種非常珍貴的藥用真菌。據『藥性論』記載：「桑黃性甘平、無毒、治血崩、血淋、脫肛瀉血、帶下、閉經」。另外在『神農本草經』亦指出桑黃為一種滋補強壯、扶正固本、延年益壽及鬆弛身心的珍貴藥材。目前國外特別是日本和韓國對其進行了廣泛的研究，因為其具有優良的抗腫瘤效果，而成為目前研究食藥用菇類抗腫瘤的焦點，同時桑黃幾乎無毒副作用，因此也是開發保健食品的重要原料之一（孫等，2005）。而桑黃菌生長緩慢，據說要長至直徑30 cm大小是需要花上二、三十年時間。桑木一旦被其寄生後會造成枯萎，所以以往在養蠶旺季時，都會遭到摘除的命運，也因其取得不易，加上難以人工栽培，故又被稱為「夢幻菇菌」（高木，2004）。

(一) 桑黃菌之分類、命名及分佈

桑黃菌在分類學上是屬於真菌界 (Fungi)、擔子菌門 (Basidiomycotina)、真正擔子菌綱 (Hymenomycetidae)、平滑臥孔菌目 (Aphylllophprales)、刺革菌科 (Hymenochaetaceae) (真野，2003)。桑黃菌原產於日本、東南亞、澳洲及北美地區等。在日本，因寄生於日本長崎男女群島之女島桑樹上，且形狀似瘤，故命名為女島瘤 (meshimakobu) (齊和楊，2004)。

不同的地區其桑黃品種也有所不同。在中國，桑黃大多為火木層孔菌或針層孔菌 *Phellinus igniarius* (池等，2001)，但戴 (2003) 認為中國桑黃屬鮑氏層孔菌 (*P. baumii* Pilat)；在韓國，桑黃則以裂蹄木層孔菌 *Phellinus linteus* 為主。目前對桑黃的研究集中在 *Phellinus igniarius* 和 *Phellinus linteus* 上，彼等之形態特徵簡述如下：

1、 火木層孔菌或針層孔菌 (*Phellinus igniarius*) (卯, 1999) :

子實體多年生，馬蹄形至扁半球形，木質，硬，菌蓋寬3~12 cm，初期有微細絨毛，淺褐色，以後光滑，變暗灰黑或黑色，老時龜裂，無皮殼，邊緣鈍圓，淺咖啡色，下側無子實層。菌肉深咖啡色，硬木質，管孔多層，與菌肉同色，老的管孔中充滿白色菌絲。孢子無色，光滑，近球形(4.5~6) μm \times (4~5) μm ，寄生於柳、樺、楊、花楸、山楂等闊葉樹的樹幹上(圖一- a)。

2、 裂蹄木層孔菌 (*Phellinus linteus*) (卯, 1999) :

子實體為多年生。菌蓋(2~10) cm \times (4~17) cm，厚1.5~7 cm，半圓形或馬蹄形，深烟色至黑色，初期有細絨毛，後變光滑和龜裂，硬而木質化，下側無子實層。菌肉淡黃色或淺咖啡色，厚2~7 mm。菌管同菌肉色相似，多層，但層次不明顯，老年的菌管層充滿白色菌絲，每層厚2~5 mm，管口同色，圓形。孢子(3.5~4.5) μm \times 3 μm ，黃褐色，光滑，近球形。寄生於楊、櫟、丁香、樺槭等樹木的枯木及立木和樹幹上(圖一- b)。

(二) 桑黃菌生態習性

桑黃生於闊葉樹的枯立木及立木上及樹幹上，依桑黃寄生的樹種不同作分類，分別有桑樹桑黃、楊樹桑黃、松樹桑黃、黑樺樹桑黃、暴麻子樹桑黃等(宋等, 2004)。但有學者認定，唯桑樹上的才是正品的桑黃，特點是顏色特別鮮黃，成蛋黃色，質較重(鄭等, 2005)。



(a)



(b)

圖一 桑黃菌之外觀形態。(a) *Phellinus igniarius* (b) *Phellinus linteus*。

Fig. 1 The morphology of (a) *Phellinus igniarius* and (b) *Phellinus linteus*.

(三) 桑黃菌化學組成與相關之保健功能研究

1、桑黃菌化學成分

桑黃菌絲體的主要化學成分為多醣，也是目前研究桑黃抗腫瘤作用的主要成分。經由研究報告顯示，桑黃多醣含有13.2%的蛋白質及82.5%的碳水化合物，其中6.8%的碳水化合物經由GC (gas chromatography) 分析證實此部份為葡萄糖醛酸 (glucuronic acid) (林，2005)。在胺基酸組成方面，桑黃粗多醣體中含有十多種胺基酸，其中以天門冬胺酸 (aspartic acid) 及麩氨醯胺基酸 (glutamic acid) 為主 (表一)。桑黃多醣除了含有葡萄糖外，還有半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖和岩藻糖 (fucose) 等，其中以在C-6有葡萄糖分枝之 β -1,3-葡聚糖的抗癌效果最好 (Kim *et al.*, 1994)。Lee和Cho (1995) 對*P. linteus* 菌絲體進行多醣之研究，發現其分子量從9,000到15,000 Da不等，主要成分為葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖，糖醛酸和胺基酸也被檢測到。

桑黃中還含有落葉松萆酸、脂肪酸、固醇類物質、三萜類 (triterpenoids)、芳香酸及甘胺酸等多種胺基酸，以及木糖氧化酶、尿酶、酯酶、過氧化氫酶等多種酶類。此外莫等人 (2003a) 從桑黃中分離出五種黃酮和二種香豆素類化合物。桑黃亦含有麥角固醇 (ergosterol) (劉等，1998) 及黑色素、酚類色素等 (莫等，2003b)。

表一 桑黃菌粗多醣體中胺基酸和碳水化合物組成

Table 1 The amino acids and carbohydrates composition of crude polysaccharide from *Phellinus linteus*.

種類	含量 (% , w/v)
Amino acid	
Aspartic acid	15.88
Threonine	6.57
Serine	7.84
Glutamic acid	11.73
Glycine	11.61
Alanine	5.17
Cystine	2.55
Valine	5.04
Methionine	2.68
Isoleucine	3.32
Leucine	3.38
Tyrosine	3.23
Phenylalanine	5.49
Histidine	1.59
Lysine	5.29
Arginine	9.63
Carbohydrate	
Maltose	8.13
Arabinose	25.05
Xylose	3.86
Mannose	26.45
Galactose	21.45
Glucose	15.04

(Hwang *et al.*, 2003a)

2、 桑黃的藥用功能

許多文獻指出，桑黃菌多醣體除具抗腫瘤活性外，尚有增強免疫力、保肝功能、抗菌、抗氧化、抗發炎、抗血管增生、降血糖與降血脂作用等生物功能。分述如下：

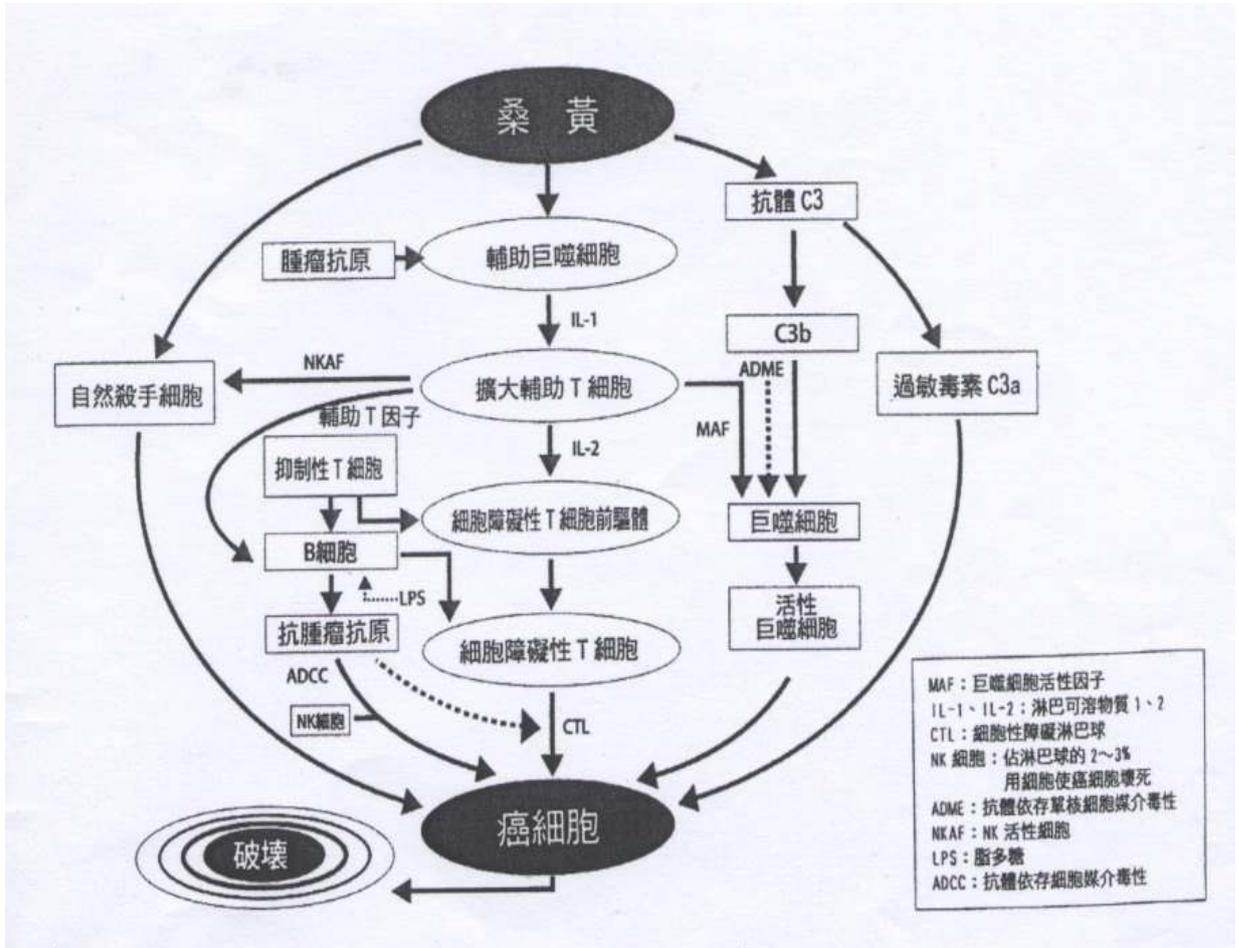
(1) 增強免疫力

桑黃菌的免疫作用流程如圖二所示。桑黃含有多種活性成分如醣類、多種酶類及蛋白聚醣等，在體外試驗中發現可誘導免疫細胞並增加其活性（張和胡，2002）。亦有研究指出以*P. linteus*的菌絲體胞外多醣體

（exopolysaccharide，EPS）進行免疫學實驗，發現EPS不僅能使T細胞增殖，而且對不同種類抗原的T細胞也具有增殖的作用，且發現毒殺型T淋巴細胞的毒殺能力在加入EPS後會大大提升（Kim *et al.*, 1996）。

張等人（2002a）研究指出桑黃具有誘生IFN- γ 的能力，能顯著增高小鼠血清中IFN- γ 的含量，有利於其發揮調節機體免疫力、抑制腫瘤細胞增殖的作用。此外，桑黃萃取物亦能夠經由TLR-2及TLR-4的路徑，使突觸細胞（Dendritic cell）趨於成熟，誘導Th1細胞分化，產生大量的IL-12與IFN- γ ，來達到抗腫瘤的效果（Kim *et al.*, 2004）。另外，桑黃萃取物也被發現可以活化腹腔巨噬細胞，促進腹腔巨噬細胞分泌一氧化氮（NO），透過NO分子來毒殺對NO敏感的B16黑色素癌細胞（Kim *et al.*, 2003a）。

實際上，大多數真菌多醣的抗腫瘤作用可作為生物反應調節劑，對宿主具有免疫調節的功能，而且對正常細胞幾乎沒有毒性。真菌多醣可透過多條途徑、多個層面對免疫系統發揮調節作用。許多免疫實驗證明，真菌的多醣不僅能刺激T淋巴細胞、B淋巴細胞、巨噬細胞和自然殺手細胞（NK）等免疫細胞，還能活化補體，促進細胞因子的生成，對免疫系統發揮多方面的調節作用（宋等，2004）。



圖二 桑黃免疫作用機制。

Fig. 2 The immunity mechanism by *Phellinus linteus*. (高木, 2004)

(2) 抗腫瘤活性

桑黃菌多醣體與其他食藥用菇類最大的不同，是其含有大量異質 β -D-葡聚糖。在日本金澤大學藥學部的研究指出桑黃多醣體經由口服有近九成的抗腫瘤活性（齊和楊，2004）。

桑黃菌可以提高人體巨噬細胞，NK細胞與T細胞的活性，以及具有強化B細胞產生抗體的能力（高木，2004）。表二為15種菇類多醣體對於Sarcoma 180型腫瘤的抑制效果，桑黃菌的抑制率高達87.5%以上。桑黃菌主要抑制癌細胞增殖的活性是來自其可誘導多種癌細胞凋亡，尤其對消化系統癌症（如肝癌、胃癌、小腸癌等）之癌細胞的毀滅誘導具有顯著的效果。Li等人（2004）亦發現桑黃萃取物，可誘導人類結腸癌細胞（SW480）凋亡，並且桑黃萃取物濃度越高，癌細胞凋亡的數量越多。而溫等人（2002）以小鼠移植性胃癌和S180腫瘤模式觀察桑黃等四種真菌萃取物的抗腫瘤作用，發現桑黃對小鼠胃癌的抑制率為43.09%，對S180肉瘤的抑制率為46.07%，因此桑黃的抗腫瘤作用在四種真菌中為最高的。

Han等人（2006）將植入B16F10黑色素瘤的實驗老鼠分成兩組，其中一組在移植癌細胞前7天開始注射桑黃，比較兩者的生存率。結果發現，桑黃注射組約有60%的老鼠在35天後仍存活，對照組則是在25天後全數死亡，此實驗證實桑黃具防癌效果。

目前對於桑黃抗腫瘤的重點都集中在桑黃多醣體上，其作用機制是藉由免疫調節間接抗癌。韓國有學者從*P. linteus*子實體中萃取出一種新型的分子量為73 kDa的多醣蛋白複合物PPC，其主要是由D-葡萄糖和D-甘露糖組成，胺基酸則主要為天門冬胺酸。PPC能夠選擇性地活化B細胞，T細胞則無效，另外，PPC還可刺激巨噬細胞產生NO，因此PPC可加速NO致敏的B16黑色素瘤細胞的細胞溶解，此外PPC還能上調NK細胞對YAC-1細胞的毒殺作用（Kim *et al.*,

2006)。還有由*P. linteus*中分離出分子量為15 kDa的PPC2多醣蛋白複合物，該PPC2能通過激活體內CD⁴⁺Th和CD⁸⁺T細胞來達到抗癌效果。此PPC的抗癌活性與其促進免疫器官的CD^{11c+} CD⁸⁺樹突細胞的成熟有關(Kim *et al.*, 2004c)。

(3) 保肝和抗肝纖維化作用

肝纖維化是肝臟纖維結締組織異常增生的一種病理狀態，大多數慢性肝病都伴有不同程度肝纖維化的發生。Kim等人(2004b)利用H₂O₂和galactosamine (GalN)誘導肝毒性，結果發現*P. linteus*菌絲體之甲醇萃取物能夠有效地保護肝臟細胞免於肝毒素的侵害，此甲醇萃取物再以不同溶劑萃取，結果顯示在乙酸乙酯區分物的保肝效果最佳。

桑黃能提高肝損傷大鼠的蛋白質合成能力，可顯著地降低血清胺基酸轉移酶和血清膠原的含量，且能降低血清IL-4含量並顯著提IFN- γ 的含量。此外，桑黃能改善肝纖維化大鼠血液動力學性能，提高肝臟的微循環，也是其抗肝纖維化的作用機制之一(張等，2002b)。

(4) 抗血管增生

抗血管增生治療是治療癌症的重要方式之一。Song等人(2003)指出，透過絨毛尿囊膜分析(chorioallantoic membrane assay, CAM)發現桑黃之乙醇萃取物具有抗血管新生的活性，並具有劑量效應。有學者認為抗血管增生活性可能與抗腫瘤活性有關，若要進一步證實應將活性成分從萃取物中分離純化出來，有可能會獲得一種新的抗血管增生物質。桑黃的抗血管增生作用將來或許有可能成為癌症治療的輔助性治療(張和黃，2007)。

表二 十五種菇類多醣體對 Sarcoma 180 型腫瘤之抑制效果

Table 2 The inhibitory effect of fifteen kinds of mushroom polysaccharide on Sarcoma 180 tumor cells.

Name of Mushroom	Daily Dosage (mg/kg/day)	Total Recovery Rate (%)	Ranking of Total Recovery Rate	Anti-cancer Effects (%)	Ranking of Anti-cancer Effects
<i>Agaricus blazei</i>	10	100	1	100	1
<i>Grifola umbellata</i>	10	90.0	2	98.5	2
<i>Phellinus yuatsensis</i> (<i>Phellinus linteus</i>)	30	87.5	3	96.5	3
<i>Phellinus igniarius</i>	30	66.7	4	87.5	5
<i>Lenzites betulina</i>	30	57.1	5	70.2	12
<i>Tricholoma matsutake</i>	30	55.5	6	91.3	4
<i>Lentinus edodes</i>	30	54.5	7	80.7	8
<i>Coriolus versicolor</i>	30	50.0	8	77.5	10
<i>Pleurotus ostreatus</i>	30	45.5	9	75.3	11
<i>Elfringia applanata</i>	30	45.5	10	64.9	13
<i>Fomitopsis pinicola</i>	30	33.3	11	61.2	14
<i>Fomitopsis cytisina</i>	30	30.3	12	44.2	15
<i>Pholiota nameko</i>	30	30.0	13	86.5	6
<i>Flammulina velutipes</i>	30	30.0	14	31.1	7
<i>Ganoderma lucidum</i>	30	20.0	15	77.8	9

(水野與川合，1999)

(5) 抗氧化

Song等人(2003)利用桑黃菌子實體的70%酒精萃取物進行其抑制DPPH自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals)、脂質過氧化(lipid peroxidation, LPO)及黃嘌呤氧化酵素(xanthine oxidase)等抗氧化試驗,發現桑黃菌子實體萃取物濃度於10至300 µg/mL時,有最好的抗氧化效果。此外Shon等人

(2003)利用β-胡蘿蔔素-亞麻油酸模式(β-carotene-linoleate model)和活性氧反應產生系統來測定抗氧化作用和自由基清除能力,結果顯示桑黃(*P. baumii*) 甲醇及熱水萃取物的有80~90%的羥自由基、過氧化氫的清除率和抗氧化活性;另外,總酚化合物的含量以甲醇和熱水萃取為較佳,萃取率分別為33.3 mg/100 ml和20.7 mg/100 ml。Park等人(2001a)發現*Ganoderma lucidum*和*P. linteus*的熱水萃取物能夠活化抗氧化酵素觸酶(catalase)的活性,此酵素能將H₂O₂轉換成H₂O和O₂,而達到體內抗氧化的效果。

(6) 抗菌性

Hur等人(2004)採用浸提法提取桑黃菌子實體,得到甲醇、氯仿、正丁醇和水的萃取物,再分別以0.06%、0.008%、0.016%及0.026%(w/w)等濃度測試彼等對抗甲氧苯青黴素金黃色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)的最低抑菌濃度(minimal inhibitory concentration, MIC)。結果顯示,正丁醇萃取物效果最好(MIC: 63-125 µg/mL),而其抗菌原理還需進一步探討。

(7) 降血糖與降血脂作用

Kim等人(2001)以深層培養之桑黃菌(*P. linteus*),進行降血糖功效之評估,結果顯示桑黃多醣體可降低脲黴素誘導之糖尿病鼠

(streptozotocin-induced diabetic rats)其葡萄糖、總膽固醇與總三酸甘油酯的濃度,並可降低天冬胺酸轉氨酶(aspartate aminotransferase; AST)之活性。

另外，Hwang等人（2005）亦發現桑黃（*P. baumii*）胞外多醣體可降低豚黴素誘導之糖尿病鼠血清中葡萄糖含量，也可降低丙胺酸轉氨酶（alanine aminotransferase；ALT）與AST之活性。根據上述文獻，可知桑黃多醣具有良好的降血糖與降血脂之功效。

(8) 抗發炎

Kim 等人（2004）發現桑黃菌的正丁醇萃取物可以消除由巴豆油引起的小鼠耳朵水腫發炎，可以強烈抑制絨毛尿囊膜血管生成，並具有鎮痛效果。

(四) 桑黃菌之藥用開發與展望

菇類因低熱量、含特有的香味、鮮味和良好的口感且具有營養及藥用價值而大受歡迎（Breene, 1990；Sakagami *et al.*, 1991）。近年來的研究發現，啤酒酵母或食藥用菇類如靈芝、裂褶菌、冬蟲夏草、猴頭菇等之菌絲已被證實可增強人體免疫功能，提高自身的抗腫瘤能力（曲和浦，2004）。而桑黃因為生長緩慢，且尚未以人工成功栽培子實體的案例，因此更能突顯出桑黃的珍貴性。

桑黃的開發利用以韓國起步的較早，不僅將桑黃於製藥以及生產健康食品，更廣泛的運用到化妝品上，做為養顏美容、抗皺防老的活性成分之一，且並於1993正式核准桑黃製成的抗癌藥劑為醫藥用品（徐，2008）。而鄰近的日本也有許多桑黃的相關健康食品在市面上販售。

由於對桑黃的需求與日劇增，因此如何將桑黃菌種分離鑑定及培養，發展桑黃菌人工栽培的方法並探討培養條件，最後探索其有效的活性成分，且需進一步的純分離化該有效成份便成為往後重要的研究目標。

二、食藥用菇類多醣簡介

多醣體是由多數單糖類（葡萄糖、果糖等）結合而成的高分子有機物，與一般常見醣類（澱粉、糊精、肝醣）的分子結構不同。自1960年代開始，許多研究報告即發現多醣體具有良好的抗癌效果，然而每種多醣體的效用都不盡相同，這些多醣體各自擁有獨特的功效及對某種癌症的療效。多醣體為自然界中含量相當豐富的生物聚合物質，在微生物體中多醣體的存在形式分為三大類：

1. 胞內多醣（Intracellular polysaccharides）：主要提供微生物生長所需能量及碳源。
2. 結構多醣（Structure polysaccharides）：主要架構多醣菌體的基本形態。
3. 胞外多醣（Extracellular polysaccharides）：通常是附著於細胞外部的黏性物質。

池川等人（1968）從多孔菌科（Polyporaceae）、銳層孔菌科（Mucronoporaceae）以及食用菇類子實體的熱水萃取物，對Sarcoma 180等動物移植癌有明顯的抗腫瘤活性。此後研究也證實此萃取物為一種酸水解後僅生成D-葡萄糖的多醣類： β -D-葡聚糖（ β -D-glucan），其作用機制與以往的抗癌劑不同，是藉由提升人體免疫力來間接達到抗腫瘤效果。因此，菇類保健食品或醫藥市場的開發已經普遍的被各界看好，成為近幾年來新興的研究重點（水野和川合，1999）。

（一）多醣體之結構

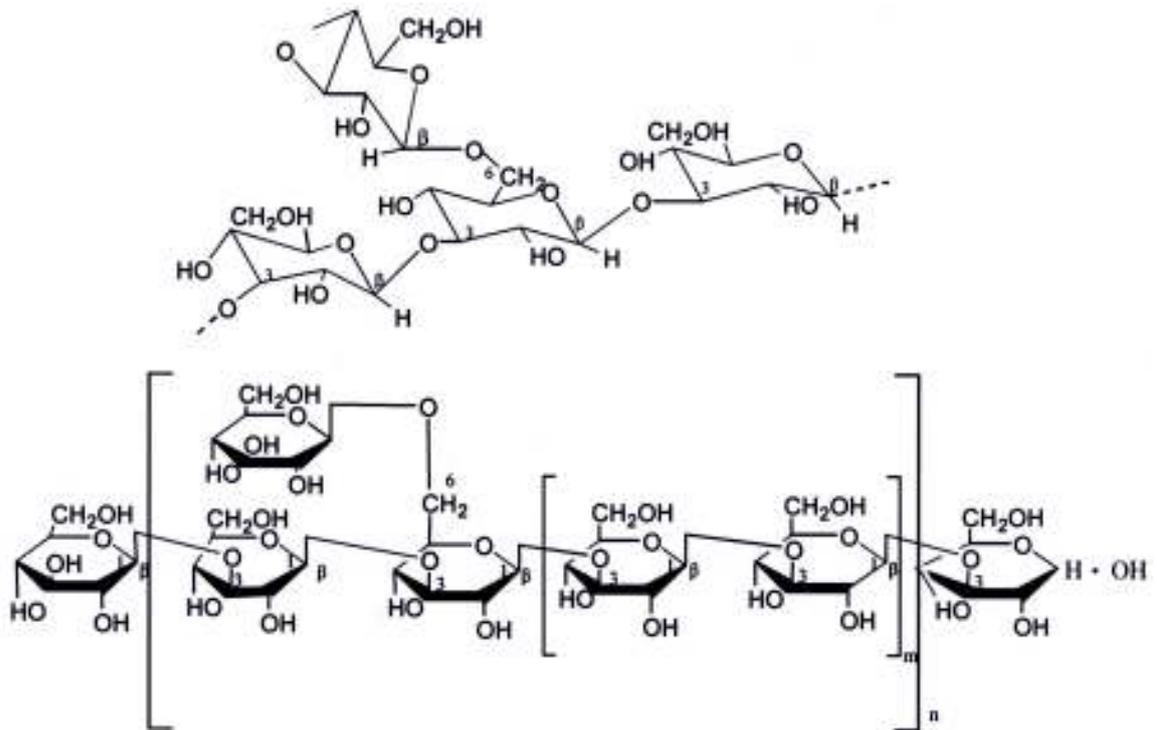
目前已經有很多的研究報告證實從數種食藥用菇（子實體、菌絲體）分離的多醣體，具有良好的免疫及生理活性，其中以 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan結構功效性最高，這些多醣體分子構造是以 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan為主鏈，沿著主鏈隨機分佈

β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan，如圖三所示（賴，2003）。此結構的多醣體主要來源為菇蕈類，其具高水溶性、分子量、分支度等特性且結構穩定性高，亦具最佳促進免疫生理活性之效果。此外另有研究發現 β -D-glucan 主鏈的鍵結形式、分支度多寡、分子量分佈與分子構形等差異皆會影響 β -D-glucan 活性表現（Sakagami *et al.*,1989）。而利用 X-射線繞射分析其立體結構結果，證實具活性的 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 為一三股右旋螺旋結構如圖四所示，此類型的結構可能是引發抗腫瘤作用的主要成因（水野與川合，1999）。

（二） β -D-glucan之免疫活性

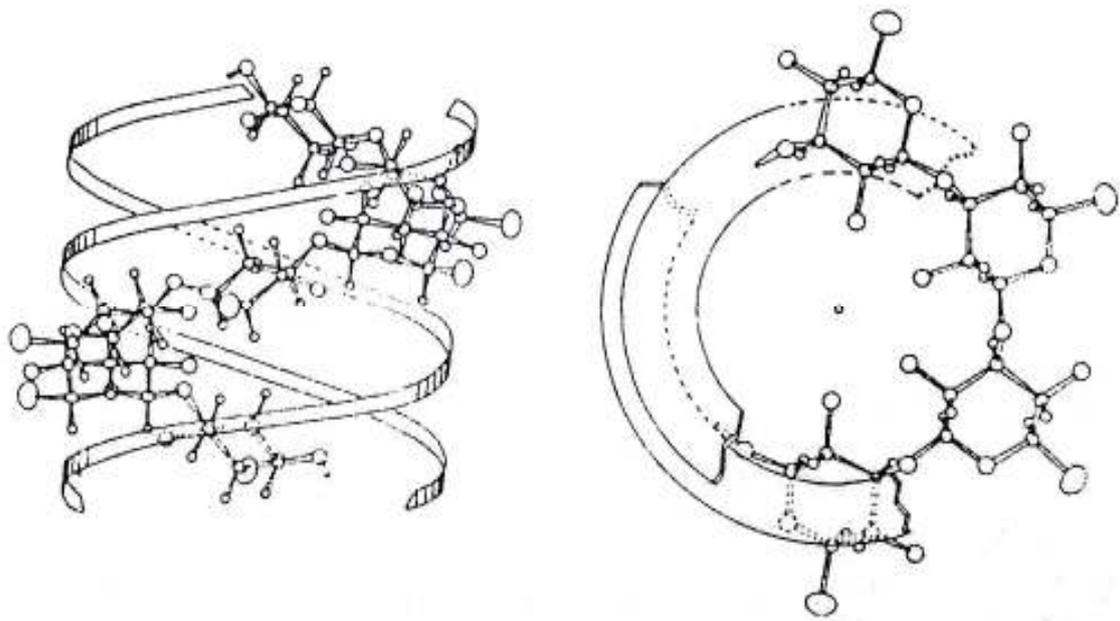
β -D-glucan主要的功用是恢復或是提高人體的免疫能力來達到抗腫瘤活性。這些免疫反應並不是針對特定的腫瘤細胞，而是經由 β -D-glucan透過刺激或是活化巨噬細胞、T淋巴細胞、B淋巴細胞以及自然殺手細胞等人體內多種免疫細胞，增強免疫功能進而達到抗腫瘤的效果（Mizuno, 1995）。

以香菇多醣lentinan對人體的免疫系統作用為例，lentinan能誘導巨噬細胞或是T細胞生產interleukin-1（IL-1）因子，促使未成熟的細胞殺傷性T前驅細胞、細胞管制輔助性T前驅細胞及NK細胞等成熟分化，增加寄主免疫擔當細胞的受體，提高其對IL-2、NK活性因子（NKAF）及巨噬細胞活化因子（MAF）等各種細胞激素的反應性，進而活化細胞殺傷性T細胞、NK細胞、細胞殺傷性巨噬細胞或延遲型過敏反應有關的細胞群，最後以特異性或非特異性殺傷破壞目標（水野與川合，1999）。以上免疫活性總結如圖五所示。



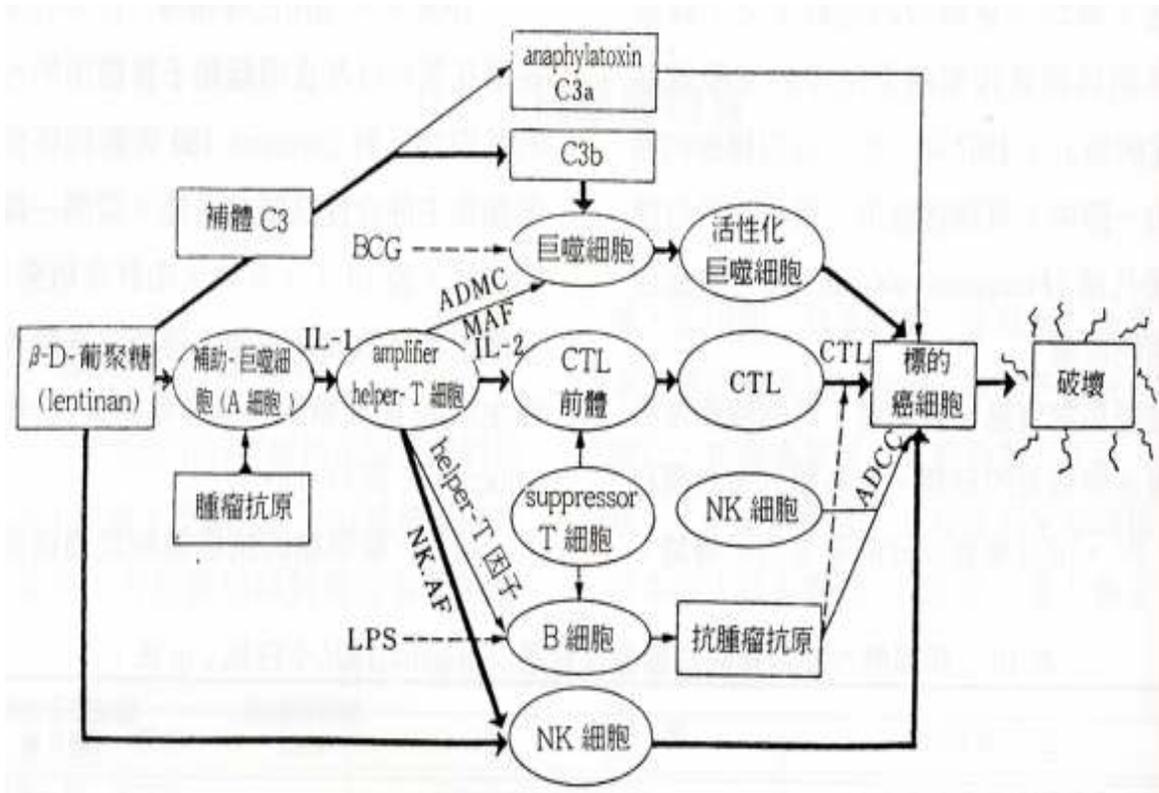
圖三 具抗腫瘤活性之 β -(1→6)分支 β -(1→3)-D-葡聚糖結構。

Fig. 3 Structure of anti-tumor portion of β -(1→3)-D-glucan with β -(1→6)-branching side chain. (水野與川合，1999)



圖四 X射線衍射測定之 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖結晶結構。

Fig. 4 The crystal structure of β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan by X-ray analysis.
(水野與川合，1999)



圖五 香菇多醣 lentinan 對寄主所產生之免疫反應。

Fig. 5 The immunity reaction in host by lentinan. (水野與川合，1999)

三、食藥用菇類之深層培養

食藥用菇類的深層培養 (submerged fermentation) 建立於抗生素的發酵技術基礎，1948 年由 Humfeld 首先利用此培養技術培養洋菇菌絲體。目的為減少生產成本，並在短時間內有效的提高生質 (biomass) 與代謝物 (metabolites) 的產量。王等人 (1998) 研究指出，大約有超過五成的食藥用菇類能在液態培養時產生二次代謝物，由發酵液中可直接回收並純化，使得食藥用菇類的深層培養更具經濟價值。

(一) 深層培養之定義

有別於一般的固態培養，所謂的深層培養是指在液態的環境下固定培養基的組成份，並且有效率的控制 pH 值、溫度、通氣量和攪拌 (或震盪) 速率等條件下，進行微生物的培養，以製造生質與其他的代謝物。食藥用菇類在深層培養的過程中最大的特色就是菇體不會產生孢子 (sporulation)，而是菌絲體會因為受到外力 (剪切力) 的作用而形成菌絲球 (pellets) 的形態 (鄭，2002)。

(二) 深層培養與傳統固態培養之差異

傳統固態培養是在開放的空間利用椴木、木屑等培養食藥用菇類的子實體，生長環境容易受到溫度、濕度、重金屬等外界環境因素的影響，且大部分菇類子實體的生長期都很漫長，過程中需消耗大量人力與培養空間。因此，若藉由深層培養的方式生產菇類菌絲體與代謝物，便可有效的控制其最適生長條件，降低人力、培養時間、培養空間等生產成本，也可以避免雜菌和重金屬等外界環境的污染，所以相較於傳統的固態培養，深層培養在食品工業上更具有其發展的空間與經濟價值 (王，2005)。

(三) 影響深層培養之因素

菇類深層培養時，需考慮到會影響培養環境的不同化學及物理因子。一般常見的有培養基之組成份、通氣量、攪拌速率、溫度、pH值等因素，以下介紹不同因素對發酵結果所產生的影響。

1、 碳源

碳源是菇類生長時之重要因子 (Kim *et al.*, 2003)，亦是構成菌絲細胞和代謝產物中碳基來源之營養物質。碳源對於微生物主要的作用是提供能源以及細胞的生合成，碳源不足易引起菌絲體衰老與自溶效應 (梁, 2001)。一般常用碳源有葡萄糖、果糖、蔗糖、麥芽糖以及乳糖等等，而不同的碳源也會影響菌體的生長與代謝物的生成。大部分的碳源皆可被菌體吸收代謝，用來提供產物產生所需的能量，例如提供多醣體合成的能量等 (游, 1995)。若使用不同的碳源也會使菌體產生之多醣體組成改變 (Kim *et al.*, 2003b)。

2、 氮源

氮源是微生物生長時必須的養分，會影響其合成蛋白質及代謝。在菇類的生長中氮源主要是提供蛋白質與核酸，但不會提供菌體能量，深層培養常用的氮源主要區分為有機氮源與無機氮源兩種。前者常見的如麩皮 (wheat bran)、尿素、氨基酸、麥芽萃取物、酵母萃取物 (yeast extract) 等；後者則是為一些銨鹽類、硝酸鹽類等。在有機氮源或無機氮源的選擇方面，尿素、蛋白質水解液及一些萃取物質在發酵時常廣泛的使用，而無機氮源中最常使用的是磷酸銨鹽類，因為它能在適合菇類菌絲生長的酸鹼值範圍 (pH 5~7) 中提供良好的緩衝效果 (黃, 1996)。相關文獻指出菇類在深層培養的過程中使用含有銨鹽 (NH_4^+) 的化合物有助於菌體的生成 (Litchfield *et al.*, 1967)。

3、 碳氮比

所謂的碳氮比是指培養基中總碳量和總氮量的比值，常以 C/N 表示。碳氮比為深層培養重要的因素，會影響菇類菌絲的生長速率、代謝產物的濃度和菌絲體中蛋白質和脂質的含量。研究結果指出一般常見的食用菇類最適合生長的碳氮比為 5~25 之間（黃，1996）。亦有研究結果顯示碳氮比為調控菌絲生長與產量的關鍵，一般真菌的碳氮比為 16~24 之間（王等，1998）。而碳氮比過高會使菌絲體中脂質含量提高，蛋白質的含量減少。

4、 無機鹽類

在深層培養中所含的微量無機鹽類，會影響微生物的生長與代謝功能，也會影響菇類的香味物質及菌絲體之胺基酸組成。Park 等人（2001）指出真菌在深層培養下添加適當的無機鹽類有助於菌絲體生長與多醣體等二次代謝物產生。菇類培養時常用的無機鹽類皆會含有磷、鎂、硫、鐵、鉀等元素，而無機鹽類的主要作用為：（1）構成細胞組成成份；（2）構成酵素的組成成份；（3）維持酵素作用；（4）調節新陳代謝。適當含量的 $ZnCl_2$ 、 $CuSO_4$ 及 NH_4^+ 等可促進菌絲之生長速率，過量則可能造成苦味物質的生成（黃，1996）。Kang 等人（1997）的研究指出添加 KH_2PO_4 與 $CaCl_2$ 可有效提高桑黃菌菌絲之生長。

5、 生長因子

生長因子可提供微生物生長時所需的微量有機化合物，可以有效的促進微生物的快速生長，一般常見的生長因子主要是維生素，例如：葉酸、維生素 B 群、維生素 C 與維生素 K 等，因為維生素在醣類分解的過程中為一重要的活化劑（activator）（黃，2001）；而玉米浸出液（corn steep liquor）、酵母萃取物富含維生素及其它微量營養素，能幫助菌絲體的生長速率，也常被當作生長因子來利用。另有些非離子性的介面活性劑（non-ionic surfactants）、

植物油、脂肪酸等，對於菌體的生長也有正面影響。

6、 溫度

微生物培養的過程中，培養溫度是一個非常重要的因子，因為溫度是影響酵素活性的重要因素，亦是影響菇類生長速率與多醣體生成的重要因素，一般菇類菌絲體的最適培養溫度範圍約為 22~28°C (Eyal, 1991)，而桑黃菌 (*P. linteus*) 菌絲的最適培養溫度為 25~30°C 之間 (Chi, 1996)。

菌絲體和多醣體的最適培養溫度也可能有不一致的現象產生，以巴西磨菇為例 (劉，2001) 時最適巴西磨菇菌絲體生成的溫度為 28°C；而最適巴西磨菇胞外多醣體生成的溫度為 30°C。

7、 起始 pH 值

培養液之起始 pH 值是影響微生物在液態培養環境中生長的重要因子，舉凡培養液的緩衝效應、氧化還原反應、代謝產物的生成和酵素的作用等均有很大的影響 (Forage *et al.*, 1985；Kim *et al.*, 2005；Margaritis and Zajic, 1978；Shu and Lung, 2004；Wang and McNeil, 1995)。Hwang 等人 (2003b) 指出最適桑黃菌 (*P. linteus*) 菌絲生長的起始 pH 值為 pH 5.0，而最適胞外多醣體生成的 pH 值則為 pH 4.0。也有相關文獻指出使用二階段調控 pH 值可以同時提高菌絲體與胞外多醣體的產量 (Lee *et al.*, 1999)。

8、 攪拌速率

菇類的發酵環境中，適當的攪拌主要是為了將菌種及培養液均勻混合，不僅能提高培養液中的溶氧量，亦有助於菌絲的生長及產物的生成。搖瓶培養時是利用震盪來達到攪拌混合的效果，而發酵槽則是利用攪拌葉片及通氣來達成。攪拌的過程中相對應的也會產生剪切力 (shear stress)，剪切力對菌絲體的型態有很大的影響。當攪拌速率越大，剪切力也越大，菌絲體則相對越小，黃麴菌 (*Aspergillus flavus*) 等菌種便是如此 (Metz and Kossen, 1977)，

有些擔子菌則只會在低攪拌速率下才會形成球狀的菌絲體，過高的攪拌速率可能會導致細胞破裂進而抑制菌絲的生長及產物的生成。Taurhesia 等人 (1994) 指出 *Sclerotium gluconicum* 之最高菌絲體與多醣體產量的攪拌速率各有不同，因此設計一個發酵系統而言，必須考量適當的攪拌速率。

9、通氣量

在菌體的代謝過程中，氧氣為末端反應的電子接受者，可以產生能量以提供細胞活性，同時也可以調節酵素之間的作用。因此，深層培養時通氣量的改變會直接影響培養基當中的溶氧量（dissolved oxygen，DO值），也會影響菌體的呼吸作用、酵素合成及代謝產物的生成(Forage *et al.*, 1985；Rau *et al.*, 1992)。此外，由於真菌於形成菌絲球後會增加氧氣傳送至菌絲球內部的困難度，以及於產生胞外多醣體的過程中，胞外多醣體有時只分泌在菌體細胞表面，因此適當通氣可以促進菌體細胞表面多醣的形成及分泌至發酵液中（鄭，2002）。氧氣供給不足則會造成菌體生長緩慢，甚至對菌體產生不可逆的傷害或死亡，也可能使菌體改變代謝的途徑。目前已有許多文獻指出在通氣量較小或是較為缺氧的環境下（DO值較低）有助於代謝物的產生，而較高的通氣量則有助於菌體的生成。也有文獻指出透過兩階段調空通氣量的方式，可以在培養前期增加通氣量使菌體大量生長，而培養後期則降低通氣量以促進代謝產物合成（Rau *et al.*, 1992）。

（四）深層發酵之應用

人類利用微生物來發酵並製造各種食品已經有非常久遠的歷史，但是一般傳統的發酵有很多缺點，如：容易被雜菌污染、無法有效控制培養的環境、產量與品質不穩定等，並不符合經濟效益上面的考量。因此，學者們發展出利用發酵槽（fermentor）培養的方式來改良傳統發酵的缺點，以達到提升產

品的產量和控制產品的品質。發酵槽培養也是目前食品工業上廣泛應用的深層培養方式。

1. 發酵槽之種類

目前常見的發酵槽大致上可依照其結構與特性分為三大類，分別為機械攪拌式（mechanical stirred-tank type）、氣泡式（air bubble type）以及氣舉式（air lift type）發酵槽。其特性及優缺點分述如下：

a. 機械攪拌式發酵槽

目前工業上最被廣泛使用為攪拌式發酵槽，其基本構造（圖六-a）槽體底部具有進氣管（air-inlet）及機械式攪拌葉片（impellers）；特性為藉由槽體內的機械攪拌使流體及氣泡均勻地散布在整個系統中，且具有較高的剪切力、高質傳能力與混合性質佳（Brauer, 1985）。化學工業上因為攪拌式發酵具有高剪切力的特性，所以適用於高黏度的流體系統中；而在發酵工業上，此類發酵槽經常被用來進行好氧性微生物的發酵程序。攪拌式發酵槽雖被廣泛使用但仍有下列缺點：

- (1) 攪拌翼快速運作時所產生的高剪切力，對菌絲體會造成一定程度的傷害，對微生物的生長型態、代謝機制、生長速率和產物產量等也會有很大的影響。
- (2) 機械攪拌在發酵過程中易產生熱量，對於培養的環境會造成影響。
- (3) 機械攪拌需要較高的動力成本，會提高生產時的總成本額。
- (4) 機械攪拌裝置設置在大型的發酵槽上會有其困難度。
- (5) 發酵槽中間的轉動軸可能會因為設計不良而造成雜菌污染的問題。

b. 氣泡式發酵槽

氣泡式發酵槽是發酵槽中構造最簡單的，由槽體內部主要結構（圖六-b）只有一個進氣管（air-inlet），特性為利用通入的氣體帶動整個培養的系統，以

混合固液氣三相（王和黃，2001）。此發酵槽的優點有：不具攪拌葉片，故不需要額外的動力成本，也不會造成機械性產熱；剪切力極低，對微生物的生長影響較小；槽體構造簡單及建造成本低。氣泡式發酵槽的特性較適合應用在生化工程上，尤其在近年來，動植物細胞培養為生物技術中研究的重點之一，氣泡式發酵槽具低剪力的特性極適合用來培養此類細胞。然而氣泡式發酵槽亦有其使用上之缺點：

- (1) 不易利用氣泡來達成固液氣三相的均勻混合，可能會造成混合不均影響微生物的生長。
- (2) 因為剪切力低，所以不適合應用在高黏度流體的系統，此外也易產生泡沫過多的問題。
- (3) 剪切力低容易造成菌體生長時體積過大，內部無法有效獲得養分而裂解。

c. 氣舉式發酵槽

氣舉式發酵槽的構造（圖六-c）可分為四個區域，由一個中空套筒（draft tube）將發酵槽內的流體分隔為空氣上升區（air-riser）和下降區（down-comer），再加上內管上方的氣-液分離區（disengagement zone）及底部進氣管（air-inlet）（王和黃，2001）。應用的原理是利用進氣管排出的空氣會由中空套筒內部的空氣上升區將流體透過產生的向上力從發酵槽底部帶動到發酵槽頂部，過程中流體本身具有較大的氣體滯留量，當流體到達上升區上層的氣液分離區時器體會向上逸出，之後流體再往下流入中空套筒外部的下降區中。流體則本身會因為上升、下降兩區之間的氣體滯留量及其密度影響而形成循環對流的效果，有利於固液氣三相的混合及熱傳。氣舉式發酵槽的主要缺點為：

- (1) 剪切力較低，所以不適合應用在高黏度的流體系統。
- (2) 在培養的過程中培養液液面不能低過中空套筒，否則無法產生液體對

流循環的效果。

- (3) 發酵槽內部因為構造較為複雜，容易使微生物附著在接縫處而影響實驗的測定。

2. 深層培養在食品工業上之應用

目前深層發酵在食品醱酵工業上已建立完備的技術，利用此方式所生產食藥用菇類的菌絲體及活性成分，在食品工業上有許多具潛力之應用方向，如作為蛋白質的新來源、食品添加物來源以及機能性食品保健成分的來源等 (Eyal, 1991)，下面就分別敘述其重點：

(1) 蛋白質的新來源

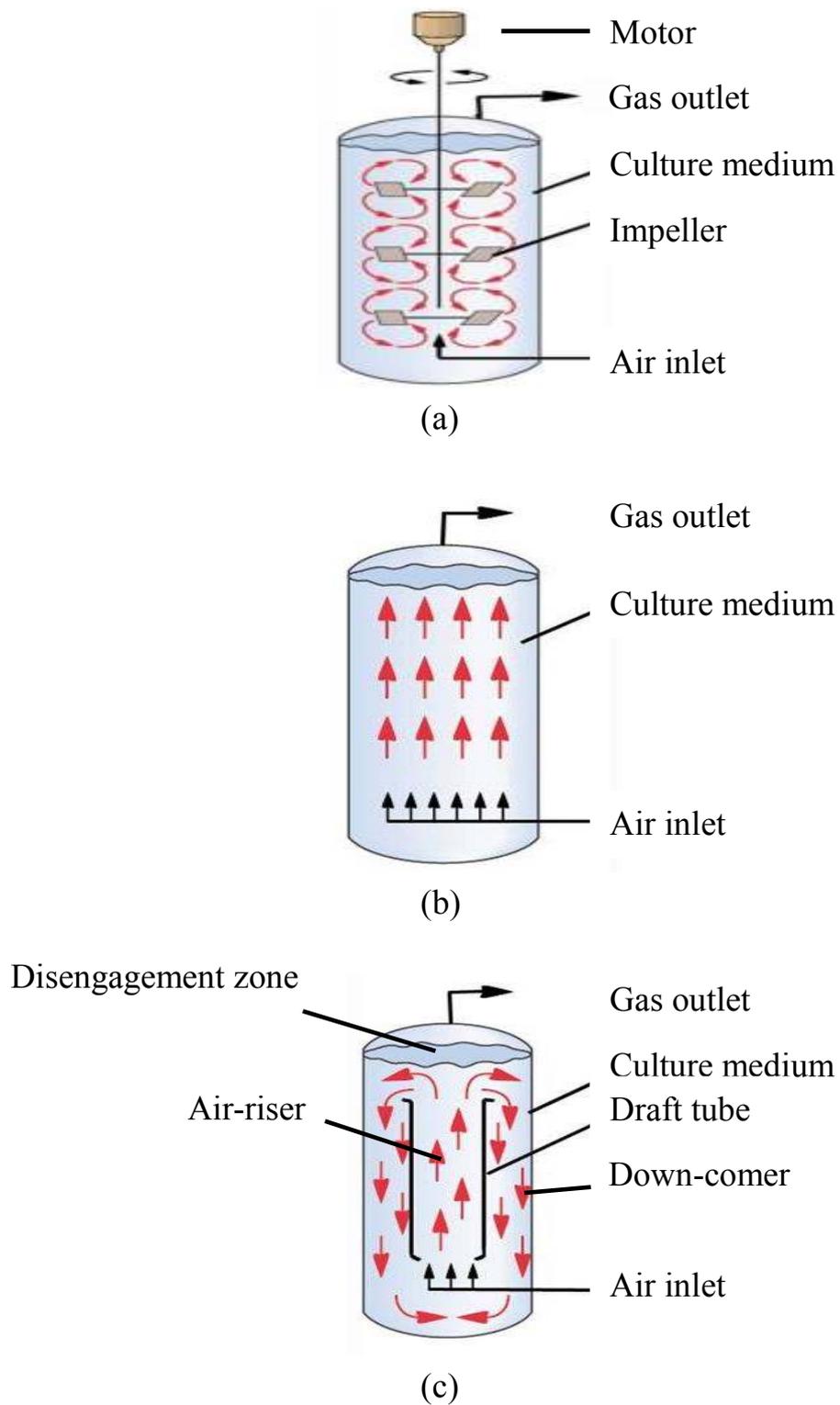
在現今地球上因為人口不斷的增加，加上耕地及食物來源有限的情況下，因此存在著糧食不足的問題，特別是在第三世界國家除了糧食問題之外亦嚴重缺乏蛋白質來源。因此，以微生物醱酵培養方式生產食用蛋白質的概念就應運而生。由於許多菇類原本就具可食性，因此就可以其菌絲體作為食用蛋白質的來源。自Humfeld (1948) 最早提出四孢蘑菇 (*Agaricus campestris*) 的菌絲體深層培養開始，許多學者便開始致力於此方面的研究。至目前為止，幾乎常見的20餘種食用菇都有過菌絲體深層培養的相關報導，有研究結果顯示，菇類菌絲體中蛋白質含量與脂質含量，都與子實體來源者差別不大。因此，就營養價值而言，菇類菌絲體也和其子實體一樣，都是很好的蛋白質來源。

(2) 食品添加物的來源

菇類在深層培養過程中，可以產生多種芳香物質成分，如醇類、酮類、酯類、內酯類 (lactones)、醛類及萜類 (terpenes) 等 (Gallois *et al.*, 1990)，這些代謝產物可作為天然香料配方的來源。

(3) 機能性食品保健成分的來源

菇類所含具生理活性成分中，最受重視的是子實體中的水溶性多醣體。研究顯示，由擔子菌產生之以 β -1,3-glucan為主鏈，於 β -1,6具側鏈之多醣體，在分子量分佈上有相當大的差異，而其所具有的生理活性亦有所別（杜等人，2002）。目前在日本已有香菇多醣、雲芝多醣及裂褶菌多醣等多醣產品在市面上市，作為抗癌藥品。以往菇類多醣體多半是由子實體萃取而得，來源十分有限。近來研究已知約有50%菇類於液態培養環境下可由菌絲體產生胞外多醣體，因此便可以直接由培養液中回收並純化所要的成分，再經由大規模的生產，以用作健康機能性產品中生理活性成分的來源，增進菇類之利用價值。



圖六 不同型式發酵槽之構造。(a) 機械攪拌式，(b) 氣泡式，(c) 氣舉式。

Fig. 6 Different types of fermentors. (a) mechanical stirred-tank type, (b) air bubble type, (c) air lift type.

參、材料與方法

一、試驗材料

(一) 試驗菌種

1. 桑黃菌種

由漢馨科技有限公司（台北縣，台灣）提供。

Phellinus linteus HS-050614D-02

Phellinus linteus HS-050614D-03

2. 測試抑菌能力菌種

購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心（新竹市，台灣）

Bacillus cereus BCRC 10250

Escherichia coli BCRC 10239

Listeria monocytogene BCRC 14845

Pseudomonas aeruginosa BCRC 10261

Staphylococcus aureus BCRC 10451

Salmonella typhimurium BCRC 10241

(二) 培養基

1. 真菌培養基

(1) Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato starch 4 g

Dextrose	20 g
Agar	15 g
Water	1000 ml
pH	5.62

(2) Yeast & Malt Agar (YMA)

Yeast extract	3g
Malt extract	3g
Peptone	5g
Dextrose	10 g
Agar	20 g
Water	1000 ml
pH	6.2

(3) 基礎培養基 (Basal medium)

Glucose	10 g
Peptone	5 g
KH ₂ PO ₄	3 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
Water	1000 ml
pH	5.6

固體基礎培養基為另加 1.8% agar 製成。

(4) 修飾培養基

Fructose	10 g
Yeast extract	10 g
KH ₂ PO ₄	3 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
Corn steep liquor	3 g
Water	1000 ml
pH	5.8

2. 細菌培養基

Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3g
Peptone	5g
Agar	15g
Water	1000 ml
pH	6.8

固體基礎培養基為另加 1.8% agar 製成。

(三) 重要藥品

1. 乳糖 (lactose)、麥芽糖 (maltose)、鹽酸 (hydrochloric acid)、氯化亞鐵 (ferrous chloride)、磷酸二氫鈉 (sodium dihydrogen phosphate)、氯化鈉 (sodium chloride)、氯化鉀 (potassium chloride)、氯化鈣 (calcium chloride) 等購自日本林純藥株式會社。
2. 磷酸二氫銨 (ammonium dihydrogen phosphate)、硫酸銨 (ammonium sulfate)、硝酸銨 (ammonium nitrate)、尿素 (urea)、磷酸氫二鈉 (di-sodium hydrogen phosphate) 等購自德國 Merck 公司。
3. 果糖 (fructose)、蛋白胨 (peptone)、酵母萃取物 (yeast extract)、洋菜粉 (agar) 等購自印度 Himedia 公司。
4. 澱粉 (starch soluble)、葡萄糖 (glucose)、硫酸鋅 (zinc sulfate heptahydrate) 購自德國 Riedel-de Haën 公司
5. 玉米浸漬液 (corn steep liquor)、木糖 (xylose)、抗壞血酸 (ascorbic acid)、噻胺 (thiamine)、核黃素 (riboflavin)、DPPH (α, α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl)、BHA (butylated hydroxyanisole)、BHT (butylated hydroxytoluene)、 α -tocopherol、三氯醋酸 (trichloroacetic)、Ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt)、EDTA (ethylenedinitrilo tetraacetic acid disodium salt dehydrate) 等購自美國 Sigma 公司。
6. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (magnesium sulphate-7-hydrate)、三氯化鐵 (ferric chloride) 購自日本島久藥品株式會社。
7. 鐵氰化鉀 (potassium ferricyanide) 購自日本片山試藥株式會社。
8. Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) 購自美國 Aldrich 公司。

9. 螢光染劑 Aniline blue 購自德國 Ferak 公司。
10. 抗生素 ampicillin 購自德國 Gerbu 公司。
11. 酚 (phenol)、硫酸 (sulfuric acid)、磷酸二氫鉀 (potassium phosphate, monobasic)、氫氧化鈉 (sodium hydroxide) 等購自台灣自聯工化學試藥。
12. 乙醇 (ethyl alcohol) 購自台灣菸酒公賣局。
13. 葉酸 (folic acid)、硫酸鐵 (ferric sulfate pentahydrate)、硫酸銅 (copper sulfate pentahydrate) 購自日本和光純藥工業株式會社。
14. 蔗糖 (sucrose)、氰甲烷 (acetonitrile)、甲醇 (methanol) 等購自美國 J. T. Baker 公司。

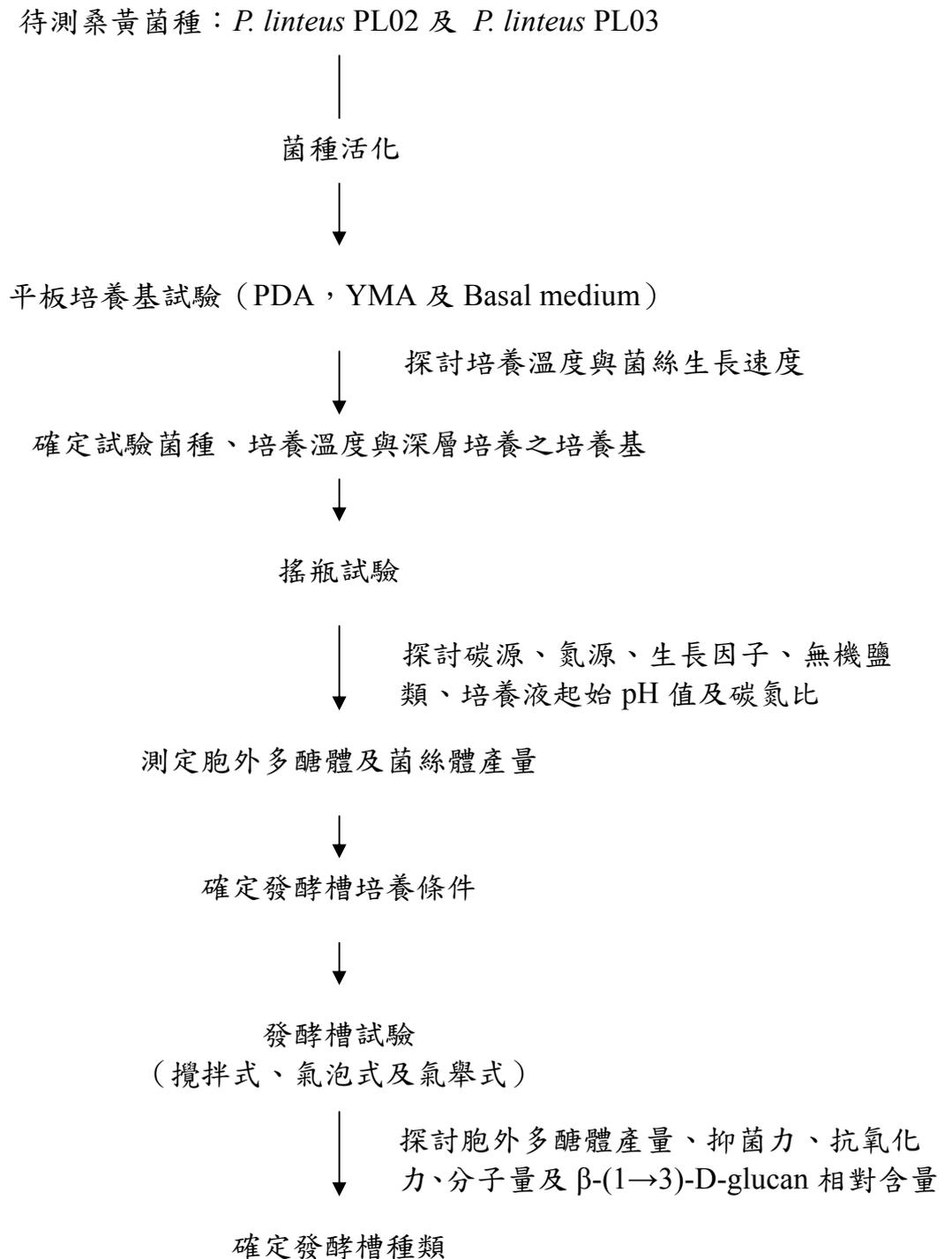
二、試驗儀器

1. 恆溫培養箱：FIRSTEK™ (Model-RI 100、Model-RI 150 及 Model-TG 5)，Firstek 公司，台灣。
2. 迴轉式振盪恆溫培養箱：FIRSTEK™ (Model-S302 R)，Firstek 公司，台灣。
3. 恆溫培養箱：TKS (Model-LTI 601)，KANSIN 公司，台灣。
4. 水平式無菌操作檯：Model-TH 420，造鑫公司，台灣。
5. 高溫高壓滅菌釜：Model-YTM A1，永大明儀器公司，台灣。
6. 直立式高溫高壓滅菌釜：Model-HL 340，HUXLEY 公司，台灣。
7. 桌上型高溫高壓滅菌釜：Model-YTM 230，永大明儀器公司，台灣。
8. 高效能液相層析儀：LC Pump (Model- L 6000)，Bischoff RI Detector (Model-8110)，Chromato-integrator (Model-D 2500)，日立儀器公司，日本。
9. 冷凍高速離心機：himac (Model- CR22G II)，日立儀器公司，日本。

10. 桌上型離心機：Model-CN 2200，HSIANGTAI 公司，台灣。
11. 桌上型離心機：Model- MIKRO 20，HETTICH 公司，德國。
12. 旋轉減壓濃縮機：Model-VV 2000，Heidolph 公司，德國。
13. 熱風乾燥機：Model-RHD 603，RISEN 公司，台灣。
14. 冷凍乾燥機：Model-FD 5N，EYELA 公司，日本。
15. 恆溫水浴槽：TKS (Model-KB 02)，KANSIN 公司，台灣。
16. 低溫循環水浴槽：TKS (Model-RCB 411P)，KANSIN 公司，台灣。
17. 分析天平：Model-AB104 S，METTLER TOLEDO 公司，瑞典。
18. pH meter：inolab (Model-Level 1)，W.T.W.公司，德國。
19. 送風幫浦：Model-Rocker 440，今日儀器公司，台灣。
20. 桌上型攪拌式及氣泡式發酵槽：Model-CMF 5，進基科技公司，台灣。
21. 桌上型氣舉式發酵槽：槽體 (Model-MG 1000V)，機座 (Model-MG 1000S)，PC 監控軟體 (Model-MGT SPC)，監控器 (Model-FC 1000) 微聚科技公司，台灣。
22. 分光光度計：Model-Spectrnic 601，MILTON ROY 公司，美國。
23. 螢光分光光度計：Model-F 1100，日立儀器公司，日本。
24. 統計分析軟體：SASTM R 9.1 (SAS Institute Inc, USA)。
25. 電腦繪圖軟體：Sigmaplot-scientific Graphing Software Version 2000 (Microsoft Inc, USA)。

三、試驗方法

(一) 試驗流程



(二) 菌種保存

參考 Martin (1964) 的方法。將培養於 PDA 平板培養基上之桑黃菌菌絲，於外緣部份以滅過菌的穿孔器（直徑 7 mm）挖取菌絲塊並接種至 PDA 斜面培養基上，於 25°C 培養 5~7 天至菌絲佈滿斜面，再倒入滅菌冷卻後之礦物油覆蓋斜面（超過最高斜面高度約 1 公分），置於 4°C 保存，此即為貯存菌種（stock culture）。每三個月活化並重複此步驟以確定菌種活性。

(三) 菌種活化

將貯存菌種內的礦物油移去後，以過火之接種環挑取適當菌絲塗抹在 PDA 平板培養基上，於 25°C 下培養至新生菌絲長出，再以滅過菌之穿孔器挖取外緣部分菌絲塊，移種於另一 PDA 平板基中央，於 25°C 培養 5 天後，重複以穿孔器取菌絲塊再移種一次即完成活化。

(四) 種菌培養

將活化後之菌絲，以滅過菌之穿孔器挖取 2 塊外緣部分的菌絲塊後，置入含 50 ml 基礎培養基之有溝三角錐瓶（250 ml）中，於 30°C 震盪培養（150 rpm）5 天，培養液中會形成直徑約為 1 cm 之菌絲球，此即為種菌（seed culture）。

(五) 種菌懸浮液之製作

參考鄭（2002）之方法。將震盪培養所得種菌（含培養液），以高速攪拌機打碎 5 次（20 秒/次），間隔時間為 10 秒，所得菌絲液即為種菌懸浮液。

將經過 5 天震盪培養（一級搖瓶）所得之種菌懸浮液接種（5%, v/v）移至 250 ml 有溝三角錐瓶（含 50 ml 基礎培養液），此即為二級搖瓶，爾後即以二級搖瓶進行各項搖瓶試驗。

(六) 平板培養基試驗

以滅過菌之穿孔器（直徑 7 mm）在完成菌種活化後的培養基上挖取相同大小之培養皿外緣部分菌絲塊，移種至測定之平板培養基中央依照不同測定條件進行培養，以直尺於每日量取其菌絲生長範圍之直徑（cm），測定菌絲生長速率。

平板培養試驗測定條件

(1) 測定菌種：*Phellinus linteus* HS-050614D-02（簡稱 PL02）

Phellinus linteus HS-050614D-03（簡稱 PL03）

(2) 平板培養基：選用 PDA、YMA 及基礎培養基進行測試。

(3) 培養溫度：以 20、25、30 及 35°C 四種不同溫度進行測試。

(七) 搖瓶試驗

以平板培養所得之最佳培養條件為搖瓶試驗之基礎培養條件，進行單因子變動試驗，即除探討因子變動外，其餘基礎培養條件維持不變。

1. 基礎培養條件（水野與川合，1999）

(1) 碳源：glucose（1.0%）

(2) 氮源：peptone（0.5%）

(3) 培養溫度：30°C

(4) 震盪速率：150 rpm

(5) 起始 pH：5.6

(6) 載液量：50 ml 培養液於 250 ml 有溝之三角錐瓶中。

(7) 培養時間：8 天

2. 變動培養條件

(1) 碳源：選用三種單醣（fructose, glucose, xylose）及三種雙醣（lactose, maltose, sucrose）進行測試，添加量均為 1%（w/v）。

(2) 氮源：選用三種有機氮源（peptone, yeast extract, urea）與三種無機氮源（ NH_4NO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ）等六種氮源進行測試，添加量均為 0.5%（w/v）

(3) 生長因子：選用 corn steep liquor（CSL），thiamine, riboflavin, folic acid 及 ascorbic acid 等 5 種生長促進物質進行測試，添加量均為 0.3%（w/v）。

(4) 無機鹽類：選用 MgSO_4 , NaCl , KCl , CaCl_2 , FeSO_4 , CuSO_4 及 ZnSO_4 等 7 種無機鹽類進行測試，添加量為 0.1%（w/v）及 0.01%（w/v）。

(5) 起始 pH：4.0~8.0

(6) 碳氮比：於（1）、（2）結果，選取固定之最佳碳源濃度（1% fructose），配合相對濃度之最佳氮源（yeast extract），探討碳氮比（C/N）為 1~30 之效應。

(八) 發酵槽試驗

1. 機械攪拌式發酵槽（mechanical stirred-tank fermentor）

(1) 培養溫度：30°C

(2) 攪拌葉片：六片標準式渦輪葉

(3) 攪拌速度：150 rpm

(4) 接種量：5% (v/v) 種菌懸浮液

(5) 通氣量：1 vvm

(6) 起始 pH：5.80

(7) 操作體積：3 L

2. 氣泡式發酵槽 (air bubble fermentor)

(1) 培養溫度：30°C

(2) 攪拌葉片：無

(3) 攪拌速度：無

(4) 接種量：5% (v/v) 種菌懸浮液

(5) 通氣量：1 vvm

(6) 起始 pH：5.80

(7) 操作體積：3 L

3. 氣舉式發酵槽 (air lift fermentor)

(1) 培養溫度：30°C

(2) 攪拌葉片：無

(3) 攪拌速度：無

(4) 接種量：5% (v/v) 種菌懸浮液

(5) 通氣量：1 vvm

(6) 起始 pH：5.80

(7) 操作體積：5 L

四、分析方法

(一) 菌絲體乾重之測定

參考鄭（2002）之方法。將發酵液以烘乾後之濾紙（No.2）進行抽氣過濾，再將濾紙上的菌絲體以蒸餾水沖洗三次後，將帶有菌絲體的濾紙於 60°C 之烘箱乾燥至恆重。所得重量扣除濾紙乾重即為菌絲體之乾重，單位以 g dry wt./l 培養液表示。

(二) pH 值之測定

使用 pH meter（inolab Level 1）直接測定發酵液之 pH 值。

(三) 胞外多醣體之測定

1. 胞外多醣體之萃取

參考王等人（1998）之方法，取發酵液 0.2 ml 與 95% 酒精混合（1：4, v/v），於 4°C 進行沉澱 24 h 後，離心（10000 rpm，15 min）取含胞外多醣之沉澱物，再以 75% 之酒精進行震盪沖洗及離心去除雜質，再將沉澱物置 60°C 烘箱中移除殘留的酒精，所得之乾燥物即為胞外多醣體。

2. 胞外多醣體之定量

參考 Dubois 等人（1956）之酚硫酸法（phenol-sulfuric acid method）

並加以修飾。將前述乾燥後之胞外多醣體加 1 ml 去離子水震盪復水並稀釋，再將此稀釋液取 1 ml 依序加入 0.5 ml 5% 酚溶液及 2.5 ml 98% 濃硫酸，混合後靜置 20 分鐘，再置於 25°C 水浴中 10 分鐘，測定混合液之 OD₄₉₀ 值並比對葡萄糖標準曲線（附圖一）後，即可得待測液中胞外多醣體之葡萄糖相等量 X (g/l)，換算成原培養液中胞外多醣體含量時，須將此一測定值乘以稀釋倍數及 0.9（李與賴，1976）

$$\text{胞外多醣體含量 (g/l)} = X \times \text{稀釋倍數} \times 0.9$$

(四) 殘糖分析

取發酵液於 4°C 下，經冷凍離心（10000 rpm，30 min）後，取其上清液經適當稀釋後，再以 0.2 μm 濾膜過濾，取 20 μl 濾液進行 HPLC 分析，分析條件如下：

分析管柱：Lichrospher 100 NH₂（5 μm），250 mm × 4 mm，為德國 Merck 公司之產品。

管柱溫度：室溫

移動相：氘甲烷：水 = 85：15（v/v）

流速：1 ml / min

幫浦：Hitachi model L-6000 pump

偵測器：Bischoff model 8110 RI detector

積分儀：Hitachi model D-2500 chromatointegrator

標準品：果糖之 retention time 約為 8.12 分鐘，其 HPLC 之殘糖檢量線如附圖二。

(五) 發酵參數分析

發酵參數 (fermentation parameters) :

1. 最大胞外多醣體生成量 (maximal production of exopolysaccharide, P_{\max})
於培養期間生成之最大胞外多醣體產量 (g/l)。
2. 最大菌絲體生成量 (maximal production of mycelial biomass, X_{\max})
於培養期間生成之最大菌絲體產量 (g/l)。
3. 最大菌絲體生成天數 (days, t)
於培養期間最高菌絲體產量之發酵天數。
4. 比生長速率 (specific growth rate, μ)
為菌體於對數生長期之生長曲線斜率 (day^{-1})。
$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / (t - t_0)$$
5. 胞外多醣體生成速率 (product formation rate, Q_p)
為平均每日之胞外多醣體之生成量 (g/l/day)。
$$Q_p = \text{最大胞外多醣體生成量} (P_{\max}) / \text{最大菌絲體生成天數} (t)$$
6. 菌絲體生成速率 (biomass formation rate, Q_x)
為平均每日之菌絲體之生成量 (g/l/day)。
$$Q_x = \text{最大菌絲體生成量} (X_{\max}) / \text{最大菌絲體生成天數} (t)$$
7. 比多醣產率 (specific product yield, $Y_{p/x}$)
為單位重量 (g) 菌絲體生成胞外多醣體之量 (mg/g)。
$$Y_{p/x} = \text{最大胞外多醣體生成量} (P_{\max}) / \text{最大菌絲體生成量} (X_{\max})$$
8. 多醣體產率 (product yield, $Y_{p/s}$)
為單位果糖消耗量 (g) 能轉換為胞外多醣體之量 (mg/g)。
$$Y_{p/s} = \text{最大胞外多醣體生成量} (P_{\max}) / \text{消耗果糖量} (\text{fructose, g})$$
9. 菌絲體產率 (biomass yield, $Y_{x/s}$)

為單位果糖消耗量 (g) 能轉換為菌絲體之量 (mg/g)。

$$Y_{x/s} = \text{最大菌絲體生成量 (X}_{\max}) / \text{消耗果糖量 (fructose, g)}$$

(六) 多醣體分子量之測定

參考呂等人 (2001) 之方法。多醣體分子量以膠體滲透層析 (gel permeation chromatography, GPC) 法進行分析。其固定相為孔徑大小相同的物質，可將移動相中不同分子量的物質經由其在固定相中所流動的路徑長短加以區分，大分子物質會因為難以進入孔徑內而隨著移動相在孔徑間隙流出，滯留時間短，較快被沖提出來；小分子物質則容易進入孔徑間隙，故滯留時間長，較慢被沖提出來，以達到分離不同分子量的效果，又稱為膠體過濾層析法 (gel filtration chromatography) 或分子排斥層析法 (size exclusion chromatography)。

取發酵液於 4°C 下，經冷凍離心 (10000 rpm, 30 min) 後，取其上清液經適當稀釋後，再以 0.2 μm 濾膜過濾，取 15 μl 濾液進行分子量分佈之分析，分析條件如下：

分析管柱：HSP gel™ AQ 4.0 6.0 × 150 mm column，為 Waters 公司之產品。

管柱溫度：45°C

移 動 相：去離子水

流 速：0.6 ml / min

幫 浦：Hitachi model L-6000 pump

偵 測 器：Bischoff model 8110 RI detector

積 分 儀：Hitachi model D-2500 chromatointegrator

標準品：pullulan（分子量 5900、11800、22800、47300、112000、212000、404000 及 788000 Daltons or Da，retention time 分別為 4.88、4.72、4.52、4.22、3.81、3.48、3.18 及 2.97 分鐘）標準曲線如附圖九。

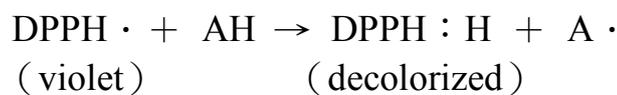
(七) 發酵液抑菌力之測定

採用 Kirby-Bauer 法 (Lim, 1998)。首先將培養好之待測菌液 (nutrient broth/37°C/2 days) 以傾倒法使菌液均勻分佈在 nutrient agar (NA) 平板培養基內，再將含有 10 µl 發酵液的圓形濾紙片 (直徑 0.55 cm) 平貼在培養基上，置入 37°C 培養 48 小時後，測定抑菌環直徑大小 (mm)，發酵液之抑菌力為經比對 ampicillin 抑菌濃度標準曲線 (附圖三~附圖八) 後換算為相等於 ampicillin 之抑菌濃度 (mg/l)。

(八) 發酵液抗氧化力之測定

1. α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基 (DPPH·) 清除能力測定

參考 Shimada 等人 (1992) 之方法。食物中的脂質在自行氧化的過程中會產生自由基而造成脂質的酸敗，常見的抗氧化物藉由提供氫 (hydrogen doner) 來清除脂質過氧化物自由基 (peroxyl radical)，實驗上常使用 DPPH· 來評估抗氧化物的供氫能力。DPPH· 之 methanol 溶液在 517 nm 下有較強的吸光值，被抗氧化物供氫還原時吸光值會降低，利用此一特性可推測出吸光值越低則代表該抗氧化物清除自由基能力越強。



步驟：

- (1) 取冷凍乾燥之發酵液粉末，以 1：20 (g/ml) 比例加入甲醇後，於 30°C 震盪 (100 rpm) 萃取 24 hr。
- (2) 離心 (4427 xg, 10 min) 後取上清液 (甲醇萃取液)，再加入適當甲醇配製成不同濃度 (2、4、6、8 及 10 g/l) 甲醇萃取液。
- (3) 於 1 ml 不同濃度發酵液粉末及標準品 (BHA、ascorbic acid 及 α -tocopherol) 的甲醇萃取液 (實驗組) 與純甲醇溶液 (對照組) 中再加入 1 ml 新鮮配製的 0.008% DPPH· 甲醇溶液。
- (4) 震盪均勻混合反應 30 分鐘後，測定混合液之 OD₅₁₇。

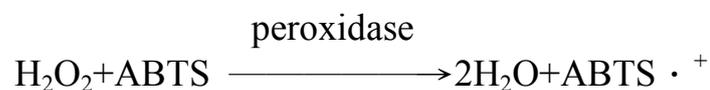
$$\text{DPPH 自由基清除率 (scavenging effect, \%)} = (\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100\%$$

清除率愈高，代表樣品抗氧化能力愈好。

實驗中以脂溶性抗氧化劑 BHA、 α -tocopherol 及 ascorbic acid 作為正對照組，附圖十四～附十六圖為彼等與 DPPH· 反應之標準曲線。未加樣品者為控制組，將所得實驗結果以 IC₅₀ (清除 50% DPPH 自由基所需之最低濃度) 表示。

2. 總抗氧化力測定

參考 Miller 等人 (1993) 及 Arnao 等人 (1996) 之方法。Horseradish peroxidase 會催化 H₂O₂ 及 ABTS 反應使 ABTS 上之一個電子進行轉移形成 ABTS·⁺。



ABTS·⁺為具穩定藍色之陽離子自由基，於波長 734 nm 下具有最大吸光值，加入抗氧化劑可提供電子還原 ABTS·⁺使其吸光值降低或消失，故可利用此一特性測試水溶性樣品清除自由基之能力。樣品與 ABTS·⁺自由基作用後，OD₇₃₄ 下降越多，則表示樣品對 ABTS·⁺自由基之清除能力越強，抗氧化力越強。

步驟：

- (1) 將 horseradish peroxidase、ABTS 與 H₂O₂ 混合均勻並調整三者之最後濃度分別為 4.4 unit/ml、100 μM 與 50 μM。
- (2) 於 30°C 下避光反應一小時，使其形成藍綠色穩定的 ABTS·⁺自由基反應試劑。
- (3) 取冷凍乾燥後之發酵液粉末配製成不同濃度 (2、4、6、8 及 10 g/l) 之待測液。
- (4) 加入 0.25 ml 待測液混合均勻後反應 10 分鐘，測定混合物之 OD₇₃₄。

$$\text{總抗氧化力 (total antioxidant capacity, \%)} = \left[\frac{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}})}{\text{OD}_{\text{control}}} \right] \times 100\%$$

實驗中以 trolox 為正對照組。附圖二十一為其與 ABTS·⁺自由基反應之標準曲線。未加樣品者為控制組，將所得實驗結果以 IC₅₀ (抑制 50% ABTS·⁺活性所需之最低濃度) 表示。

3. 螯合亞鐵離子能力測定

參考 Decker 等人 (1990) 之方法。金屬離子的促氧化作用經常是造成脂質過氧化的主要因素，藉由氧化還原反應 (redox cycle)，少量的金屬離子便可有效的產生自由基，並加速脂質氧化的進行；在多種金屬離

子中， Fe^{2+} 經常是最具影響力的助氧化劑，利用 Fe^{2+} 用與 ferrozine 的複合物在 562 nm 之呈色反應：



此產物在波長 562 nm 具有最大吸收值，當樣品螯合 Fe^{2+} 離子時則吸光值降低；因此吸光值愈低即表示樣品之抗氧化能力愈強。

步驟：

- (1) 取冷凍乾燥後之發酵液粉末配製成不同濃度 (2、4、6、8 及 10 g/l) 之待測液。
- (2) 取 1ml 待測液分別加入 3.7 ml 蒸餾水、0.1 ml 之 2 mM FeCl_2 及 0.2 ml 之 5 mM ferrozine。
- (3) 混合後室溫靜置反應 20 分鐘，測定混合液之 OD_{562} 。

$$\text{亞鐵離子螯合能力 (Ferrous ion chelating activity, \%)} = [(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}}] \times 100\%$$

實驗中以金屬螯合劑 EDTA 作為正對照組，附圖二十六為其與 Fe^{2+} 離子螯合反應之標準曲線。未加樣品者為控制組，將所得實驗結果以 IC_{50} (螯合 50% Fe^{2+} 離子所需之最低濃度) 表示。

4. 還原力測定

參考 Oyaizu (1986) 之方法，還原力是分析樣品將赤血鹽 (potassium ferricyanide) 中之 Fe^{3+} 還原為 Fe^{2+} 之亞鐵氰錯離子的能力，此亞鐵氰錯離子再與 Fe^{3+} 反應產生普魯士藍 (Prussian blue) 普魯士藍在波長 700 nm 下有最大吸收值，根據其吸收光值之高低，可評估樣品還原能力之強弱；

吸光值愈高表示樣品還原能力愈強。還原力在抗氧化表現上係為具有還原過氧化物 (peroxide) 之能力，進而達到抗氧化之效果。

步驟：

- (1) 取冷凍乾燥後之發酵液粉末配製成不同濃度 (2、4、6、8 及 10 g/l) 之待測液。
- (2) 取 0.5 ml 待測液分別加入 2.5 ml 之 0.2 M 磷酸鹽緩衝液 (pH 6.6) 及 2.5 ml 之 1% 鐵氰化鉀混合均勻。
- (3) 混合液於 50°C 水浴槽反應 20 分鐘。
- (4) 取 2.5 ml 10% 三氯醋酸加入混合液，使用離心 (3000 rpm，10 分鐘)。
- (5) 取 2.5 ml 上清液，加入 2.5 ml 蒸餾水及 2.5 ml 0.1% 三氯化鐵。
- (6) 震盪均勻混合反應後，測定混合液之 OD₇₀₀。

實驗中以抗氧化劑 BHA、ascorbic acid 及 α -tocopherol 作為正對照組，附圖三十一~附三十三圖為彼等還原力之標準曲線。未加樣品者為控制組，將所得實驗結果以 IC₅₀ (吸光值達到 0.5 所需之最低濃度) 表示。

(九) β -(1→3)-D-glucan 相對含量之測定

多醣中的 β -(1→3)-D-glucan 可利用螢光染劑 aniline blue 進行標定定量，早期 aniline blue 是用來檢測植物組織中的癒創多醣 (callose)，而後經鑑定其結構為 β -(1→3)-D-glucan，於是進而證實 aniline blue 對 β -(1→3)-D-glucan 的專一反應性。Aniline blue 螢光染劑中的成分 sirofluor(sodium

4,4'-[carbonylbis-(benzene-4, 1-diyl) bis(imino)] bisbenzene-sulphonate)與 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 結合後，在激發波長 (excitation wavelength) 395 nm、放射波長 (emission wavelength) 495 nm 螢光圖譜上會出現 aniline blue- β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 錯合物的螢光波峰，進而定量 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan (張，2003)。

步驟：

- (1) 將發酵液經冷凍濃縮機進行十倍濃縮。
- (2) 取濃縮液 1 ml，加入 0.3 N NaOH 定容至 3 ml 後攪拌 30 分鐘使其完全溶解。
- (3) 以 HCl 調整 pH 值至 11.50 ± 0.05 ，再加入 pH 11.50 之 0.05 M Na_2HPO_4 -NaOH 緩衝液 (內含 0.5 M NaCl) 定容至 10 ml。
- (4) 取 1 ml 溶液加入 0.1 ml 濃度 1 mg/ml 之 aniline blue，震盪混合均勻後靜置 2 小時。
- (5) 以螢光分光光度計進行檢測，激發波長為 395 nm，放射波長為 495 nm。

實驗中以海藻多醣 (laminarin) 為標準品，其標準檢量曲線如附圖三十四， β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量為每毫升海藻多醣當量 (laminarin equivalent; LE) 所含之 β -1,3-D-glucan 微克數 ($\mu\text{g/ml LE}$)。

(十) 統計分析

試驗所得資料以 SAS 統計套裝軟體 (SAS, 1996) 進行變方分析 (analysis of variance) 及差異性顯著分析 (Duncan's new multiple range test) 之統計分析法估計結果是否有顯著差異 ($P < 0.05$) (沈，1993)。

肆、結果與討論

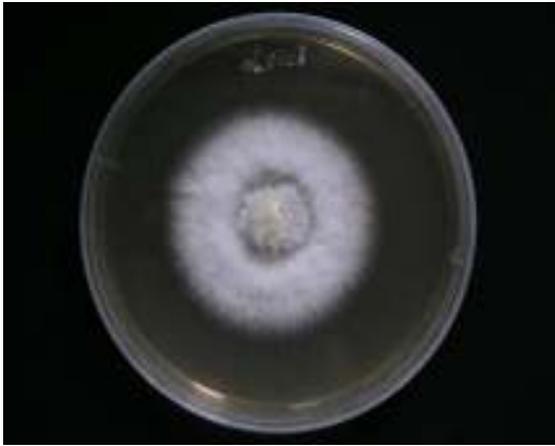
一、平板培養基試驗

本實驗的目的為探討兩種桑黃菌菌株於三種平板培養基（PDA、YMA 及基礎培養基）在不同溫度（20、25、30 及 35°C）下之菌絲體生長速率，以決定搖瓶試驗時所使用的菌種、培養基種類及培養溫度。

（一）培養溫度及不同培養基對桑黃菌菌絲體生成之影響

溫度對微生物的生長與基本代謝反應有著密切的關係，其控制並影響這些反應的進行，如生物體內的酵素活性、多醣體的合成速率與產量及其他的生物反應等；對於菌種的生長，平板培養基組成分的不同對微生物的生長也有影響。有研究指出一般液態培養真菌的溫度在 22~28°C 之間可獲得較好的生長速率與產量 (Eyal, 1991)；而曾等人 (2007) 的研究發現桑黃菌在 16~36°C 下皆能生長。故本實驗以四種不同培養溫度（20、25、30 及 35°C）與三種不同培養基（PDA、YMA 及基礎培養基）探討彼等對桑黃菌菌絲生長速率之影響。

兩株桑黃菌接種於平板培養基上之生長方式皆為自平板中央呈放射狀逐漸往周圍生長，不同菌株的菌絲所呈現的外觀及顏色略有不同，PL02 的外圍新生菌絲於三種平板培養基皆呈現白色（圖七），且外觀上較為稀疏，而接近中心點較為老化部分的菌絲顏色則為深褐色或黃褐色，菌絲生長較為密集。PL03 的菌絲於三種培養基則皆為黃色（圖八），外圍新生菌絲為白色或淡黃色外觀上較為鬆散，在中心點較為老化部分的菌絲顏色則為深黃色，且在中心點周圍的菌絲亦較為密集。



(a)



(b)



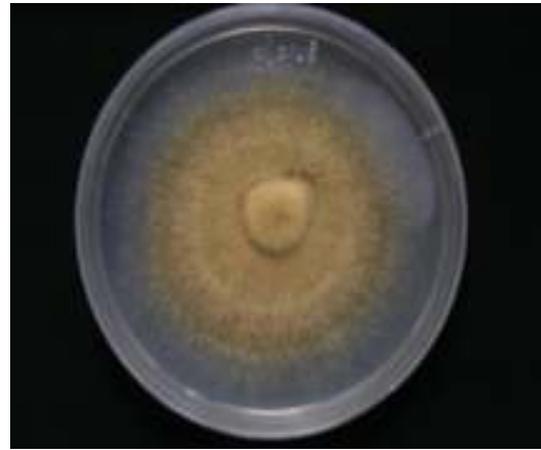
(c)

圖七 桑黃菌 PL02 於不同平板培養基之菌絲外觀 (30°C/10 天)。
(a) YMA, (b) PDA, (c) 基礎培養基。

Fig. 7 Mycelial growth of *P. linteus* PL02 on different agar plates (30°C/10 days).
(a) YMA, (b) PDA, (c) basal medium agar.



(a)



(b)



(c)

圖八 桑黃菌 PL03 於不同平板培養基之菌絲外觀 (30°C/10 天)。
(a) YMA, (b) PDA, (c) 基礎培養基。

Fig. 8 Mycelial growth of *P. linteus* PL03 on different agar plates (30°C/10 days).
(a) YMA, (b) PDA, (c) basal medium agar.

在觀察培養的過程中亦發現菌絲生長會受到因培養溫度的高低而有不同的排列情形，PL02 及 PL03 在較低之培養溫度（25°C）時菌絲體生長較差且菌絲體稀疏，而在較高之培養溫度（35°C）其菌絲體生長較茂密。此外，PL02 在以基礎培養基培養時較易形成環狀排列之外觀，而且在基礎培養基下以較低之溫度培養菌絲體易呈現黃色的性狀，在較高之溫度培養菌絲體則呈現白色；PL03 在以 PDA 培養時會形成環狀排列的菌絲，其會隨溫度的升高而失去環狀排列菌絲（圖九）。

根據結果顯示（表三～表五），所選擇之培養溫度與培養基大部分適合測試菌株菌絲的生長，其中以桑黃菌 PL02 於 30°C 培養溫度及基礎培養基（培養 10 天）可得最大之菌絲生長半徑（7.6 cm）且顯著（ $P < 0.05$ ）高於其他實驗組（表三），同時亦具有最高之菌絲生長速率（0.76 cm/day）（表五）。PL02 在培養溫度 30°C 時於三種培養基上均有最大之菌絲生長半徑（表三）。桑黃菌 PL03 於 30°C 培養溫度及 PDA 培養基（培養 10 天）可得最大之菌絲體生長半徑（7.0 cm）且顯著（ $P < 0.05$ ）高於其他實驗組（表四），但小於 PL02 於 30°C 培養溫度及基礎培養基培養 10 天時之菌絲生長半徑（7.6 cm）。桑黃菌 PL02 及 PL03 皆於較高之培養溫度（30°C~35°C vs. 20°C~25°C）具較高之菌絲體生長速率（表五）。當培養溫度上升時有助於桑黃菌 PL02 及 PL03 之菌絲生長，但至培養溫度到 35°C 時，大部分實驗結果顯示反而有抑制菌絲生長之現象（表五）。

結果（表五）亦顯示桑黃菌 PL02 之菌絲在基礎培養基與 YMA 上生長速率皆較 PDA 快，而桑黃菌 PL03 則在 PDA 上有較快之菌絲生長速率，在基礎培養基及 YMA 上之菌絲生長速率皆較低。由此可知不同培養基會影響桑黃菌株菌絲生長。PL02 於基礎培養基上有最快生長速率之原因可能為其除了提供桑黃菌於生長時所需之基本碳氮源外，更提供可促進桑黃菌菌絲生長之無機

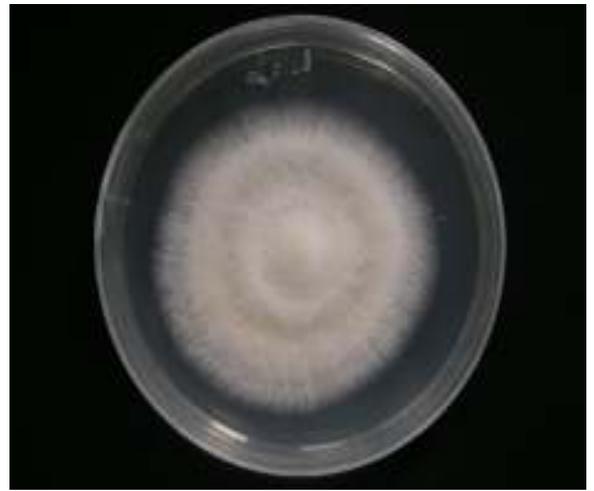
鹽類如 KH_2PO_4 、 MgSO_4 等。

圖十為桑黃菌株 PL02 在不同培養溫度於基礎培養基上菌絲生長情形，由圖中可知桑黃菌株 PL02 於 30°C 培養 11 天即可到最大之菌絲生長半徑（7.80 cm）。

相關研究指出桑黃菌在深層培養中，培養溫度為 30°C 時能到較高之菌絲體乾重與胞外多醣體（Hwang *et al.*, 2003b；Chi *et al.*, 1996），而徐（2008）研究亦指出桑黃菌固態發酵最適培養溫度為 30°C ，與本實驗結果之最適培養溫度（ 30°C ）相符。綜上所述，爾後的搖瓶試驗及發酵槽試驗皆選用桑黃菌株 PL02、 30°C 之培養溫度及液態基礎培養基。



(a)



(b)



(c)



(d)

圖九 桑黃菌 PL02 與 PL03 於 25°C 及 35°C 培養溫度下之菌絲外觀 (培養 9 天)。
(a) PL02 (basal medium agar/ 25°C), (b) PL02 (basal medium agar/ 35°C),
(c) PL03 (PDA/ 25°C), (d) PL03 (PDA/ 35°C)。

Fig. 9 Mycelial growth of *P. linteus* PL02 and *P. linteus* PL03 at 25°C and 35°C
(incubation time = 9 days) .

(a) PL02 (basal medium agar/ 25°C), (b) PL02 (basal medium agar/ 35°C),
(c) PL03 (PDA/ 25°C), (d) PL03 (PDA/ 35°C) .

表三 不同培養溫度及培養基對桑黃菌 PL02 於平板培養基上（培養 10 天）
菌絲生長之影響

Table 3 Effect of different incubation temperatures and media on mycelial growth
by *P.linteus* PL02 on agar plates incubated for 10 days.

Media	Incubation temperature (°C)			
	20	25	30	35
YMA	2.5±0.7* ^{ef}	2.9±0.5 ^{de}	5.4±0.7 ^b	4.7±1.3 ^{bc}
PDA	1.3±0.3 ^g	2.4±0.2 ^{efg}	5.3±1.5 ^b	3.9±0.6 ^{cd}
Basal	1.8±0.3 ^{fg}	4.2±1.1 ^{bc}	7.6±0.3 ^a	5.8±0.3 ^b

Values superscribed by different letters in the same row or column are significantly different (P<0.05).

*Diameter (cm) of mycelial growth on agar plate.

表四 不同培養溫度及培養基對桑黃菌 PL03 於平板培養基上（培養 10 天）
菌絲生長之影響

Table 4 Effect of different incubation temperatures and media on mycelial growth
by *P.linteus* PL03 on agar plates incubated for 10 days.

Media	Incubation temperature (°C)			
	20	25	30	35
YMA	0.1±0.1* ⁱ	0.8±0.3 ^h	1.4±0.2 ^g	2.3±0.2 ^f
PDA	2.6±0.3 ^e	5.4±0.2 ^b	7.0±0.1 ^a	5.4±0.2 ^b
Basal	0.9±0.1 ^h	1.5±0.2 ^g	3.3±0.4 ^d	3.9±0.1 ^c

Values superscribed by different letters in the same row or column are significantly different (P<0.05).

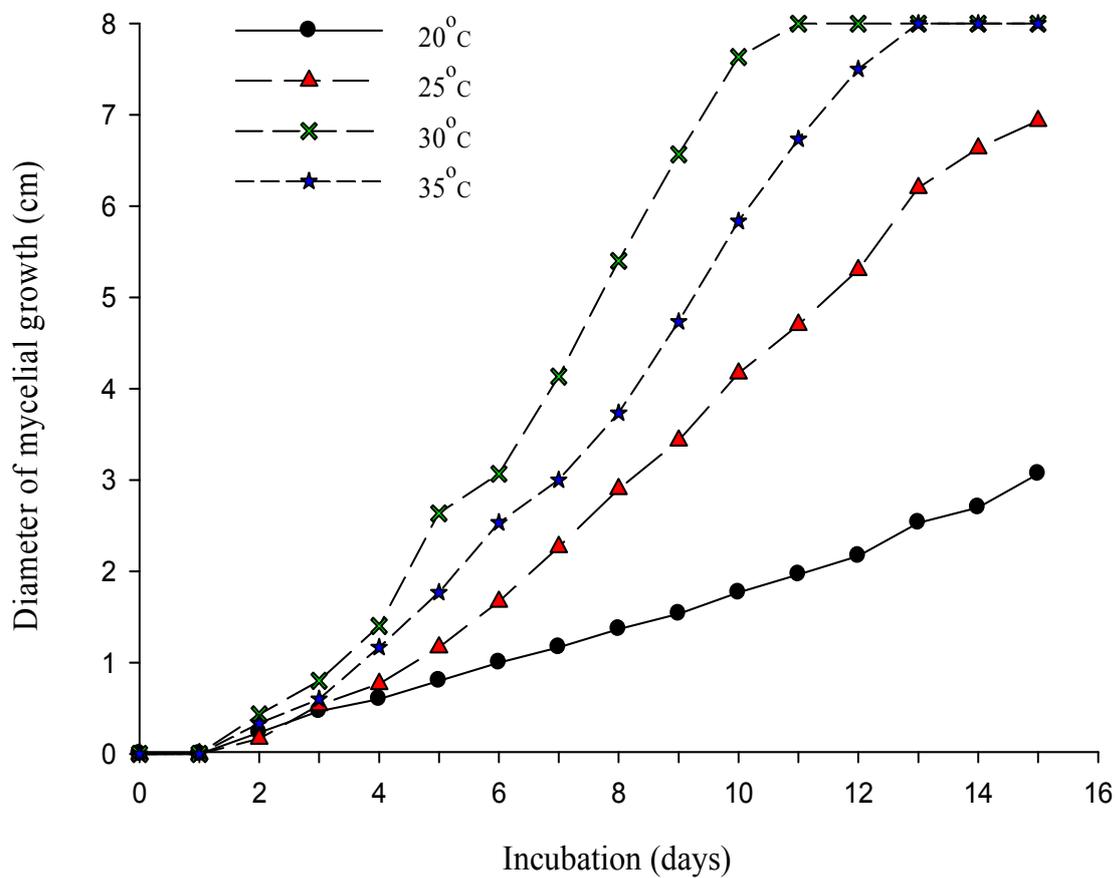
*Diameter (cm) of mycelial growth on agar plate.

表五 不同培養溫度及培養基對桑黃菌株於平板培養基上（培養 10 天）
菌絲生長速率之影響

Table 5 Effect of different incubation temperatures and media on mycelial growth rate by *Phellinus spp.* on agar plates incubated for 10 days.

Media	Growth rate* (cm/day)			
	20°C	25°C	30°C	35°C
YMA				
PL02	0.25	0.29	0.54	0.47
PL03	0.01	0.08	0.14	0.23
PDA				
PL02	0.13	0.24	0.53	0.39
PL03	0.26	0.53	0.70	0.51
Basal				
PL02	0.18	0.42	0.76	0.58
PL03	0.09	0.15	0.33	0.39

*Growth rate = (max. diameter of mycelial growth / 10 days).



圖十 不同溫度培養期間對桑黃菌 PL02 於基礎培養基上菌絲生長情形。
 Fig. 10 Mycelial growth by *P. linteus* PL02 on basal medium plate during incubation at different temperatures.

二、搖瓶試驗

本實驗目的為探討各項培養條件（碳源、氮源、生長因子、無機鹽類、培養液起始 pH 值及碳氮比等）對桑黃菌 *P. linteus* PL02 於搖瓶培養 (shake flask culture) 時菌絲體及胞外多醣體 (exopolysaccharide) 生成之影響；搖瓶所用之培養基為液態基礎培養基，採用單因子變動之實驗方法，培養時間為 8 天。

(一) 碳源對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響

碳源為菇類生長時能量的來源。本實驗嘗試添加三種單糖 (glucose、fructose、xylose) 及三種雙糖 (lactose、maltose、sucrose) 等六種糖類 (添加量為 1%，w/v) 探討彼等對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響。

結果 (表六) 顯示在所有實驗組中以添加葡萄糖 (對照組) 及果糖組之菌絲體產量較高，但葡萄糖與果糖兩組之菌絲體產量在統計上並無顯著差異，胞外多醣體產量的部分以果糖組具有最高之胞外多醣體產量 (0.69 g/l) 且顯著 ($P < 0.05$) 高於其他實驗組，另外所有實驗組之菌絲體及胞外多醣體產量亦顯著 ($P < 0.05$) 高於不添加碳源組。上述結果亦可得知，碳源為構成菌絲細胞重要的養分，添加碳源較不添加碳源能夠明顯提升菌絲體及胞外多醣體的產量。

此外，添加單糖組之菌絲體及胞外多醣體產量大多高於添加雙糖組 (除 xylose 組外)，而添加果糖組之培養基最終 pH 值 (pH 6.04) 亦為所有實驗組中之最低，推測原因為桑黃菌 PL02 會優先選用結構較簡單易吸收利用的單糖作為其碳源，並於優先利用果糖作為碳源時所產生之酸性物質所致。

表六 碳源對搖瓶培養之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響
 Table 6 Effect of carbon sources on mycelial biomass and exopolysaccharide production by *P. linteus* PL02 in shake flask culture.

Carbon sources (1.0%, w/v)	Mycelial dry weight (g/l)	Exopolysaccharide (g/l)	Final pH
Fructose	3.17±0.08 ^a	0.69±0.06 ^a	6.04±0.03 ^d
Xylose	1.74±0.04 ^b	0.47±0.04 ^c	6.20±0.01 ^c
Lactose	1.64±0.21 ^b	0.62±0.03 ^{ab}	6.46±0.08 ^b
Maltose	1.59±0.03 ^b	0.54±0.04 ^{bc}	6.49±0.06 ^b
Sucrose	1.21±0.07 ^c	0.46±0.05 ^c	6.61±0.05 ^a
Glucose (Control) *	3.44±0.31 ^a	0.58±0.06 ^b	6.05±0.04 ^d
No carbon sources**	0.61±0.04 ^d	0.33±0.02 ^d	4.89±0.02 ^e

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

*Basal medium with 1% (w/v) glucose as the major carbon source.

**Basal medium without glucose.

本實驗以果糖為生成桑黃菌菌絲體及胞外多醣體最佳碳源之結果與陳（2005）之報告相同，但亦有其他不同最適碳源的研究報告，如羅（2008）以葡萄糖為培養桑黃菌（*P. igniarius*）之最適碳源，傅等人（2007）以玉米澱粉（corn starch）為最適桑黃菌生長菌絲之碳源，Hwang 等人（2003b）培養桑黃菌則以山梨糖醇（sorbitol）為碳源可得最高菌絲體及多醣體產量。原因可能為不同菌株（strain）其利用糖類合成多醣體之性狀不盡相同，或是不同碳源會使菇類細胞產生二次代謝（secondary metabolism）的代謝物抑制效應（catabolic repression）所致（Kim *et al.*, 2003b）。

（二）氮源對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響

氮源對菌絲體與代謝物生成有非常大的影響。本實驗嘗試添加三種有機氮源（peptone、yeast extract、urea）與三種無機氮源（ NH_4NO_3 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ）等六種氮源（添加量為 0.5%，w/v）探討彼等對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響。

結果（表七）顯示在所有實驗組中以添加 yeast extract 組具有最高之菌絲體及胞外多醣體產量（4.12 及 0.62 g/l）且皆顯著（ $P < 0.05$ ）高於其他實驗組及對照組。所有實驗組之菌絲體及胞外多醣體產量大多高於不添加氮源組，而結果亦發現添加有機氮源組均較無機氮源組有利於菌絲體與胞外多醣體生成（除 urea 組外）。推測原因可能為有機氮源富含可以使菌體合成某些生長所需胺基酸的物質，而無機氮源因缺乏這些物質導致菌體在此液態培養環境下生長緩慢。由上述結果可得知，添加氮源會影響菌體的生長及代謝，添加有機氮源（yeast extract 及 peptone）亦能夠明顯提升菌絲體及胞外多醣體的產量。

表七 氮源對搖瓶培養之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響
 Table 7 Effect of nitrogen sources on mycelial biomass and exopolysaccharide production by *P. linteus* PL02 in shake flask culture.

Nitrogen sources (0.5%, w/v)	Mycelial dry weight (g/l)	Exopolysaccharide (g/l)	Final pH
Organic			
Yeast extract	4.12±0.28 ^a	0.62±0.07 ^a	5.75±0.03 ^d
Urea	0.83±0.22 ^c	0.22±0.02 ^c	8.60±0.01 ^a
Peptone(Control)*	3.67±0.11 ^b	0.51±0.06 ^b	5.99±0.04 ^c
Inorganic			
NH ₄ NO ₃	0.93±0.10 ^c	0.29±0.05 ^c	3.63±0.20 ^e
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.97±0.14 ^c	0.25±0.07 ^c	3.57±0.08 ^e
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.02±0.14 ^c	0.25±0.03 ^c	3.70±0.05 ^e
No nitrogen sources**	0.68±0.06 ^d	0.23±0.02 ^c	6.62±0.03 ^b

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

*Basal medium with 0.5% (w/v) peptone as the major nitrogen source.

**Basal medium without peptone.

此外，添加 yeast extract 組及 peptone（對照組）之最終 pH 值亦高於添加無機氮源組（表七）。原因可能為前者之起始 pH 值皆高於後者，且有機氮源具較佳之 pH 緩衝效果，可將 pH 值控制在一定之範圍內。添加 urea 組之菌絲體及胞外多醣體產量不佳，可能因為其最終 pH 值過高導致培養環境呈現鹼性而不利於菌體的生長與代謝。

Hwang 等人（2003a、2003b）利用搖瓶培養桑黃菌（*P. baumii*）時，發現以添加 yeast extract 為其氮源可獲得較高菌絲體與胞外多醣體產量，與本實驗結果之最適氮源（yeast extract）相符，而傅等人（2007）及羅（2008）之研究亦有相同的報告。另外文獻亦指出許多胺基酸相較於成分複雜的有機氮源更適合當作液態培養之氮源（Chi *et al.*, 1996）。

（三）生長因子對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響

本實驗添加 corn steep liquor、thiamine、riboflavin、folic acid 及 ascorbic acid 等五種生長因子（添加量為 0.3%，w/v）探討彼等對桑黃菌 PL02 胞外多醣生成之影響，對照組為不含生長因子之基礎培養基。

結果（表八）顯示，添加 corn steep liquor 組之菌絲體產量高於 riboflavin 與 folic acid 組亦顯著（ $P < 0.05$ ）高於對照組及其他實驗組，其胞外多醣產量則顯著（ $P < 0.05$ ）高於對照組及所有實驗組。另外結果也發現添加生長因子實驗組（除 thiamine 與 ascorbic acid 組外）之菌絲體及胞外多醣體產量皆高於無添加生長因子的對照組。Corn steep liquor 為玉米澱粉製造過程中的副產物，推測其不但可以當作氮源（陳，2005 和 Xu *et al.*, 2003），且富含維生素及其他微量營養素，能有效地促進菌絲體的生長速率（黃，1996）。由上述結果可得知，添加生長因子 corn steep liquor 可大幅的增加菌絲體及胞外多醣體的產量。

表八 生長因子對搖瓶培養之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響
 Table 8 Effect of growth factors on mycelial biomass and exopolysaccharide production by *P. linteus* PL02 in shake flask culture.

Growth factor (0.3%, w/v)	Mycelial dry weight (g/l)	Exopolysaccharide (g/l)	Final pH
Corn Steep Liquor	7.11±0.35 ^a	0.58±0.09 ^a	5.59±0.02 ^c
Thiamine	2.34±0.13 ^c	0.28±0.02 ^d	4.90±0.01 ^e
Riboflavin	6.30±1.04 ^a	0.47±0.05 ^b	5.76±0.13 ^b
Folic Acid	6.94±0.08 ^a	0.52±0.02 ^b	5.14±0.05 ^d
Ascorbic Acid	1.75±0.07 ^c	0.37±0.01 ^c	3.41±0.02 ^f
Control*	4.46±0.39 ^b	0.46±0.04 ^b	5.89±0.08 ^a

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

*Medium without any added growth factor.

徐 (1996) 指出 thiamine 適當濃度下可促進大多數藥用真菌生長。本實驗結果中 thiamine 與 ascorbic acid 實驗組之菌絲體與胞外多醣體產量顯著低於對照組，推測可能原因為添加量過高，影響培養環境之酸鹼度而出現抑制菌體生長及代謝的情形或是於滅菌過程中其成份受熱被破壞，亦有可能為桑黃菌對彼等添加之生長因子利用不大所致。

Hwang 等人 (2003a、2003b) 以 corn steep powder 培養桑黃菌可得最高菌絲體與胞外多醣體產量。亦有其他研究指出桑黃菌 (*P. igniarius*) 於搖瓶實驗培養基中添加 corn steep liquor 作為其生長因子時，可獲得較高菌絲體與胞外多醣體產量 (羅, 2008)。上述前人研究結果與本實驗結果之最適生長因子 (corn steep liquor) 相符

(四) 無機鹽類對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響

無機鹽類含微量金屬元素，適當添加可有助於菇類的生長與代謝 (Park *et al.*, 2001)。本實驗嘗試添加 $MgSO_4$ 、 $NaCl$ 、 KCl 、 $CaCl_2$ 、 $FeSO_4$ 、 $CuSO_4$ 及 $ZnSO_4$ 等七種無機鹽類探討彼等對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響。

結果 (表九) 顯示以添加 $NaCl$ 、 KCl 、 $FeSO_4$ 、 $MgSO_4$ (對照組) 及未添加無機鹽類組之菌絲體產量較高，然五組之間菌絲體產量在統計上並無顯著差異，表示添加無機鹽類對菌絲體產量無顯著增加之效果。胞外多醣體產量的部分則以 $MgSO_4$ (對照組) 之胞外多醣產量最高且顯著 ($P < 0.05$) 高於大部分實驗組及未添加無機鹽類組。所有添加無機鹽類實驗組 (除 $CaCl_2$ 組) 及對照組之胞外多醣體產量都較高於未添加無機鹽類組為高，表示適當添加無機鹽類可增加胞外多醣體產量。

表九 無機鹽類對搖瓶培養之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響
 Table 9 Effect of minerals on mycelial biomass and exopolysaccharide production by *P. linteus* PL02 in shake flask culture.

Mineral*	Mycelial dry weight (g/l)	Exopolysaccharide (g/l)	Final pH
NaCl	3.79±0.23 ^a	0.47±0.03 ^{bc}	6.07±0.01 ^a
KCl	3.76±0.10 ^a	0.51±0.02 ^{ab}	6.04±0.06 ^a
CaCl ₂	1.85±0.26 ^c	0.41±0.07 ^c	5.85±0.03 ^b
FeSO ₄	3.61±0.17 ^a	0.47±0.03 ^{bc}	5.37±0.10 ^e
CuSO ₄	2.91±0.22 ^b	0.47±0.07 ^{bc}	5.54±0.05 ^d
ZnSO ₄	2.58±0.12 ^b	0.49±0.01 ^{ab}	5.71±0.06 ^c
MgSO ₄ (Control) **	3.87±0.02 ^a	0.55±0.01 ^a	5.81±0.07 ^b
No added mineral***	3.62±0.27 ^a	0.41±0.04 ^c	6.02±0.01 ^a

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

*Added at 0.1% (w/v) for MgSO₄、NaCl、KCl、CaCl₂ ; 0.01% (w/v) for FeSO₄、CuSO₄、ZnSO₄

**Basal medium with 0.1% (w/v) MgSO₄ as the major mineral.

***Basal medium without MgSO₄

Kang 等人 (1997) 指出添加 KH_2PO_4 與 CaCl_2 可有效提高桑黃菌菌絲之生長。本實驗結果中添加 CaCl_2 組之菌絲體及胞外多醣體產量分別顯著低於與無顯著差異於未添加無機鹽類組 (表九)，推測可能原因為滅菌過程 CaCl_2 產生沉澱物影響培養環境而不利菌體生成菌絲體及胞外多醣體。

徐 (2008) 以固態發酵培養桑黃菌所得桑黃米時，發現添加 MgSO_4 有顯著提升菌絲體生長的情形。蔡 (2008) 以添加 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 及 MgSO_4 為搖瓶培養桑黃菌 (*P. igniarius*) 之最適無機鹽類。上述研究結果與本實驗結果之最適無機鹽類 (MgSO_4) 相符

(五) 培養基起始 pH 值對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響

Choi 等人 (2000) 與 Kim 等人 (2000) 的研究指出桑黃菌的最適培養 pH 值範圍為 pH 5~7。故本實驗將基礎培養基起始 pH 值以 HCl 或 NaOH 調整為 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 (實驗組) 及不調整 pH 之對照組 (pH 5.6)，探討彼等對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響。

結果 (表十) 顯示，起始 pH 值為 7.0 及 8.0 實驗組之菌絲體產量高於其他實驗組及對照組；所有實驗組之胞外多醣體產量均顯著 ($P < 0.05$) 高於對照組，但所有實驗組之胞外多醣體產量並無顯著差異。故根據前述實驗的(二)結果，嘗試改用最適氮源 yeast extract 取代基礎培養基中之 peptone，並重複上述之實驗，此時不調整 pH 之對照組同樣為 pH 5.6。

改變氮源的結果 (表十一) 顯示，對照組及起始 pH 值為 6.0、7.0 及 8.0 之實驗組有較高之菌絲體產量，但彼此之間無顯著差異。對照組及起始 pH 值為 5.0 及 6.0 組則具有較高之胞外多醣體產量，彼此之間亦無顯著差異。因此為兼顧菌絲體產量及胞外多醣體產量之考量，之後實驗選取起始 pH 值為 5.0~6.0 之範圍 (即 5.0、5.2、5.4、5.6、5.8 和 6.0) 對桑黃菌 PL02 胞外多醣

表十 起始 pH 值 (4~8) 對搖瓶培養 (氮源為 peptone) 之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響

Table 10 Effect of initial pH (4~8) on mycelial biomass and exopolysaccharide production by *P. linteus* PL02 in shake flask culture. (peptone as the nitrogen source)

Initial pH	Mycelial dry weight (g/l)	Exopolysaccharide (g/l)	Final pH
4.0	2.67±0.41 ^b	0.42±0.02 ^a	4.67±0.08 ^f
5.0	2.54±0.27 ^b	0.44±0.04 ^a	5.72±0.02 ^e
6.0	4.01±0.51 ^a	0.42±0.03 ^a	6.16±0.05 ^c
7.0	4.52±0.80 ^a	0.45±0.02 ^a	6.79±0.02 ^b
8.0	5.16±0.99 ^a	0.44±0.02 ^a	6.99±0.06 ^a
Control*	4.08±0.28 ^a	0.37±0.01 ^b	6.02±0.02 ^d

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

*Basal medium with an initial pH of 5.60.

表十一 起始 pH 值(4~8)對搖瓶培養(氮源為 yeast extract)之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響

Table 11 Effect of initial pH (4~8) on mycelial biomass and exopolysaccharide production by *P. linteus* PL02 in shake flask culture. (yeast extract as the nitrogen source)

Initial pH	Mycelial dry weight (g/l)	Exopolysaccharide (g/l)	Final pH
4.0	3.30±0.77 ^b	0.76±0.07 ^c	4.48±0.08 ^f
5.0	3.46±0.76 ^b	0.91±0.01 ^a	5.08±0.11 ^e
6.0	5.63±0.68 ^a	0.86±0.05 ^{ab}	6.02±0.03 ^c
7.0	5.51±0.43 ^a	0.80±0.04 ^{bc}	6.77±0.03 ^b
8.0	4.95±0.18 ^a	0.76±0.03 ^c	7.15±0.02 ^a
Control*	5.48±0.64 ^a	0.87±0.01 ^{ab}	5.70±0.03 ^d

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

*medium composition : 1% (w/v) glucose, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.3% (w/v) KH_2PO_4 , 0.1% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and initial pH of 5.60.

表十二 起始 pH 值 (5~6) 對搖瓶培養 (氮源為 yeast extract) 之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響

Table 12 Effect of initial pH (5~6) on mycelial biomass and exopolysaccharide production by *P. linteus* PL02 in shake flask culture. (yeast extract as the nitrogen source)

Initial pH	Mycelial dry weight (g/l)	Exopolysaccharide (g/l)	Final pH
5.00	4.17±0.44 ^c	0.91±0.04 ^b	5.28±0.14 ^d
5.20	4.44±0.55 ^{b,c}	0.74±0.03 ^c	5.28±0.09 ^d
5.40	4.68±0.32 ^{abc}	0.91±0.07 ^b	5.51±0.04 ^c
5.80	5.21±0.36 ^{ab}	1.00±0.04 ^a	5.77±0.03 ^b
6.00	5.44±0.54 ^a	0.86±0.13 ^{bc}	5.96±0.02 ^a
Control*	4.66±0.24 ^{abc}	0.89±0.03 ^b	5.68±0.06 ^b

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

*medium component : 1% (w/v) glucose, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.3% (w/v) KH_2PO_4 , 0.1% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and initial pH of 5.60.

體生成之影響做進一步分析。結果（表十二）顯示起始 pH 5.8 組之胞外多醣體產量顯著（ $P < 0.05$ ）高於其他實驗組及對照組；最高菌絲體產量為起始 pH 值 6.0 組，但與起始 pH 5.8 組無顯著差異。

由上述結果可得知，當較高起始 pH 值為 5.8 時較有利於菌絲體及胞外多醣體之生成。Kim 等人（2001）和 Lee 等人（1995）指出最適桑黃菌胞外多醣體產生之起始 pH 值分別為 pH 5.0 與 pH 6~7。羅（2008）及蔡（2008）則指出桑黃菌(*P. igniarius*)胞外多醣體產生之起始 pH 值分別為 pH 5.4 與 pH 5。導致上述結果不同的原因可能為菌株不同所致。另外文獻指的研究發現改變液態培養之起始 pH 值會影響桑黃菌多醣體中單糖的組成，如培養環境隨著起始 pH 值從 pH 5.0 提高為 pH 9.0 時，其多醣體中葡萄糖之含量會從 90% 降低至 83%（Lee *et. al.*, 1995）。

（六）碳氮比對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響

培養基中碳氮養分比例對微生物之營養需求、微生物生長及代謝物的產生有相當大的影響，如高濃度的氮源會抑制代謝物之形成，轉而促進菌絲體的產生，使菌絲體生長過於旺盛，反而不利於代謝產物的累積；碳源不足又易導致菌體衰老與自溶（Seviour and Kristiansen, 1983）。因此適當之碳氮比例可控制培養環境，達到同時提高菌絲體及胞外多醣體生成之效果。

根據實驗（一）與（二）的結果，分別選取 fructose（1%，w/v，固定添加量）和 yeast extract 為碳源和氮源，將碳氮比調整為 1、5、10、15、20、25 及 30（w/w）探討彼等對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響。

表十三 碳氮比對搖瓶培養之桑黃菌 PL02 菌絲體及胞外多醣體產量之影響
 Table 13 Effect of C/N ratio on mycelial biomass and exopolysaccharide production by *P. linteus* PL02 in shake flask culture.

C/N ratio* (w/w)	Mycelial dry weight (g/l)	Exopolysaccharide (g/l)	Final pH
30	0.88±0.11 ^b	0.52±0.04 ^e	4.97±0.01 ^e
25	1.08±0.16 ^b	0.47±0.06 ^e	5.01±0.01 ^e
20	1.27±0.14 ^b	0.74±0.09 ^d	5.05±0.01 ^e
15	1.24±0.02 ^b	0.82±0.04 ^{cd}	5.16±0.09 ^d
10	0.92±0.02 ^b	0.85±0.03 ^{cd}	5.15±0.03 ^d
5	1.47±0.20 ^b	0.95±0.05 ^c	5.31±0.04 ^c
2	5.76±1.13 ^a	1.23±0.02 ^b	5.76±0.06 ^b
1	5.66±1.68 ^a	1.78±0.16 ^a	6.02±0.03 ^a

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

*C/N = fructose / yeast extract (w/w).

結果如表十三所示，當碳氮比為 1 時之胞外多醣體產量顯著 ($P < 0.05$) 高於其他實驗組，菌絲體產量亦以此比例時較高，但和碳氮比為 2 之間沒有顯著差異。結果亦發現當碳氮比逐漸升高時，菌絲體乾重與胞外多醣體產量皆逐漸有下降的趨勢，表示氮源不足會不利於菌絲體生長，進而影響胞外多醣體生成。培養液最終 pH 值會隨著碳氮比降低（氮濃度增加）而有升高的趨勢（表十三），推測原因為培養基之起始 pH 值會隨著氮源添加量增加而升高，亦有可能為菌體分解氮源釋出鹼性物質所致。

由此上述結果可以得知，最適碳氮比 ($C/N=1$) 下培養所得之胞外多醣體產量 (1.78 g/l) 為前述所有實驗 (一)~(五) 最高者，因此適當之碳氮比例有助於桑黃菌胞外多醣體生成。

曾等人 (2007) 和傅等人 (2007) 培養桑黃菌的研究則指出碳氮比分別為 20~25 和 24 時最適合菌絲體生長；與本實驗結果不同的可能原因為菌株不同或是碳氮比之定義不同或是所致。羅 (2008) 於搖瓶實驗培養桑黃菌 (*P. igniarius*) 最適生成菌絲體與胞外多醣體之碳氮比為 1，則與本實驗結果相符。

(七) 搖瓶培養時間對桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之影響

本實驗採用前述實驗 (一)~(六) 所得最適胞外多醣體生成之培養條件，探討桑黃菌生成最大胞外多醣體之搖瓶培養時間。所用的培養基即為修飾培養基 (含 1% fructose, 1% yeast extract, 0.3% corn steep liquor 及 0.1% $MgSO_4$, 起始 pH 值 5.8)，培養溫度為 30°C。

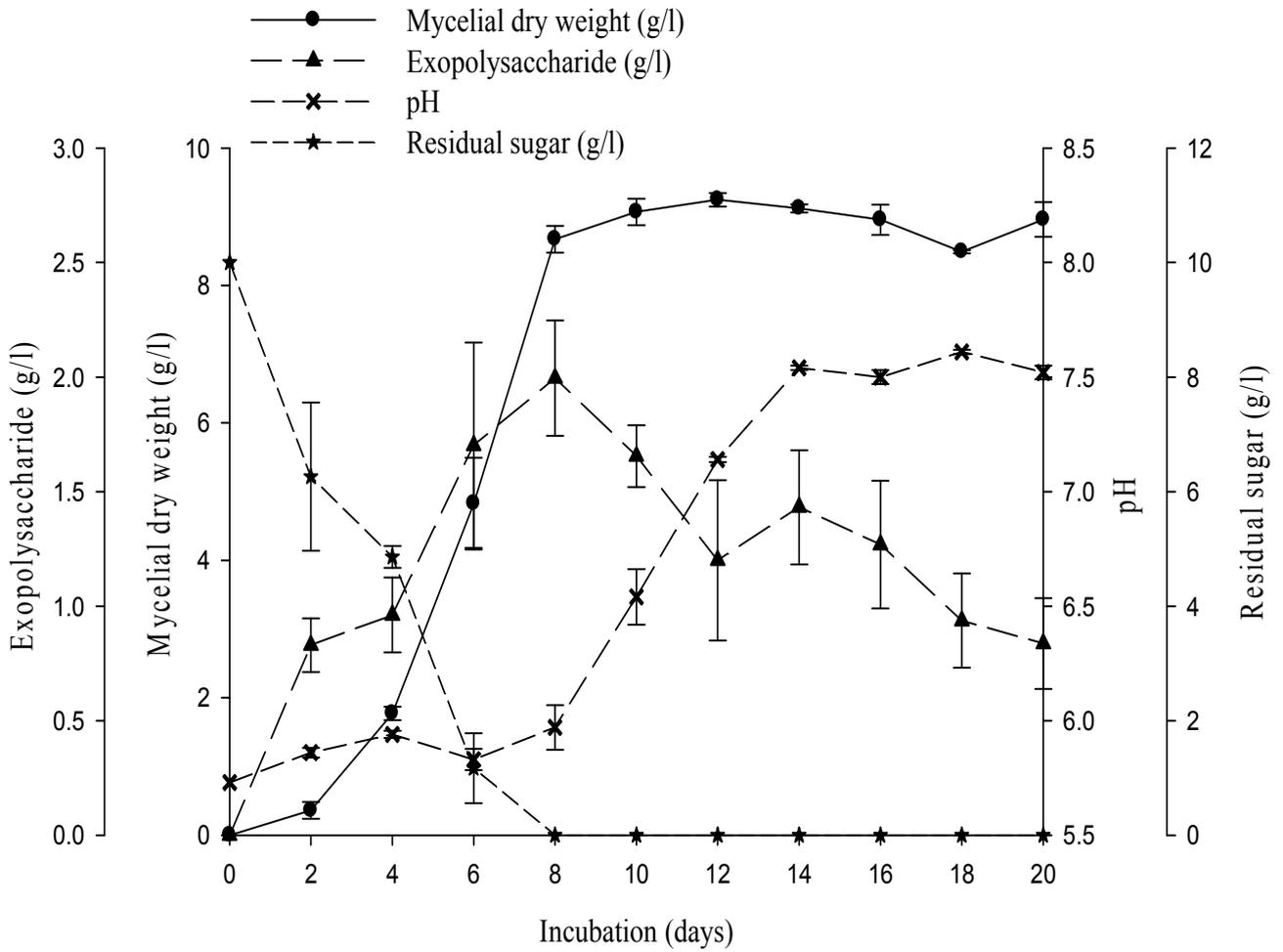
圖十一為 20 天培養期間搖瓶培養液中菌絲體乾重量、胞外多醣體產量、pH 值與殘糖 (主要為果糖) 之變化情形。結果顯示，菌絲體與胞外多醣體產量在培養初期皆會隨培養時間增加而升高，而分別於第 12 天及第 8 天時達最高量，此後皆隨培養時間增加而逐漸下降。

培養液 pH 值會隨著培養時間的增加而有升高的趨勢，尤其以殘糖量消後殆盡後（約 8 天後），pH 值隨之快速上升，原因可能菌體利用完碳源（果糖）後轉而分解氮源產生鹼性物質，也有可能為菌絲體在培養後期發生自體分解（autolysis）而導致 pH 值上升。

殘糖（主要測定果糖）量於胞外多醣體達到最高時（培養 8 天）消耗殆盡，表示培養初期桑黃菌 PL02 快速消耗糖類用於菌體生長及多醣之合成。培養 8 天後，菌絲體產量增加速度減緩及胞外多醣體產量開始下降，可能原因為培養基內養分不足導致菌體死亡、自體分解或是轉而分解多醣養分所致。

本實驗培養第 8 天時所得之菌絲體與胞外多醣體產量（分別為 8.67 及 1.99 g/l）亦超過所有前述實驗中（一）～（六）之最高值，而分別為基礎培養基產量（分別為 3.44 及 0.58 g/l，表六）之 2.52 及 3.44 倍（資料未列）。此結果顯示以修飾培養基及相同的培養時間（8 天）可提高菌絲體與胞外多醣體產量。考量使用發酵槽時增加培養時間可能會有提高菌絲體與胞外多醣體產量之經濟效應，因此爾後之發酵槽試驗培養時間均調整為 8 天以上，即採用 13 天之發酵槽培養時間。

羅（2008）研究報告指出桑黃菌（*P. igniarius*）於搖瓶培養時，亦於培養 8 天時有最高之菌絲體及胞外多醣體產量，分別為 9.39 及 1.93 g/l 與本實驗結果相似。蔡（2008）以搖瓶培養桑黃菌（*P. igniarius*）菌絲體和胞外多醣體產量則分別可達 10.6 及 0.29 g/l，與本實驗結果不同之原因可能為接菌量不同，亦有可能為培養基組成不同或是菌株不同所致。



圖十一 搖瓶培養期間桑黃菌 PL02 胞外多醣體、菌絲體、pH 值及殘糖量之變化。

Fig. 11 Changes of exopolysaccharide, mycelial biomass, pH and residual sugar by *P. linteus* PL02 during incubation in shake flask culture.

三、不同型式發酵槽培養試驗

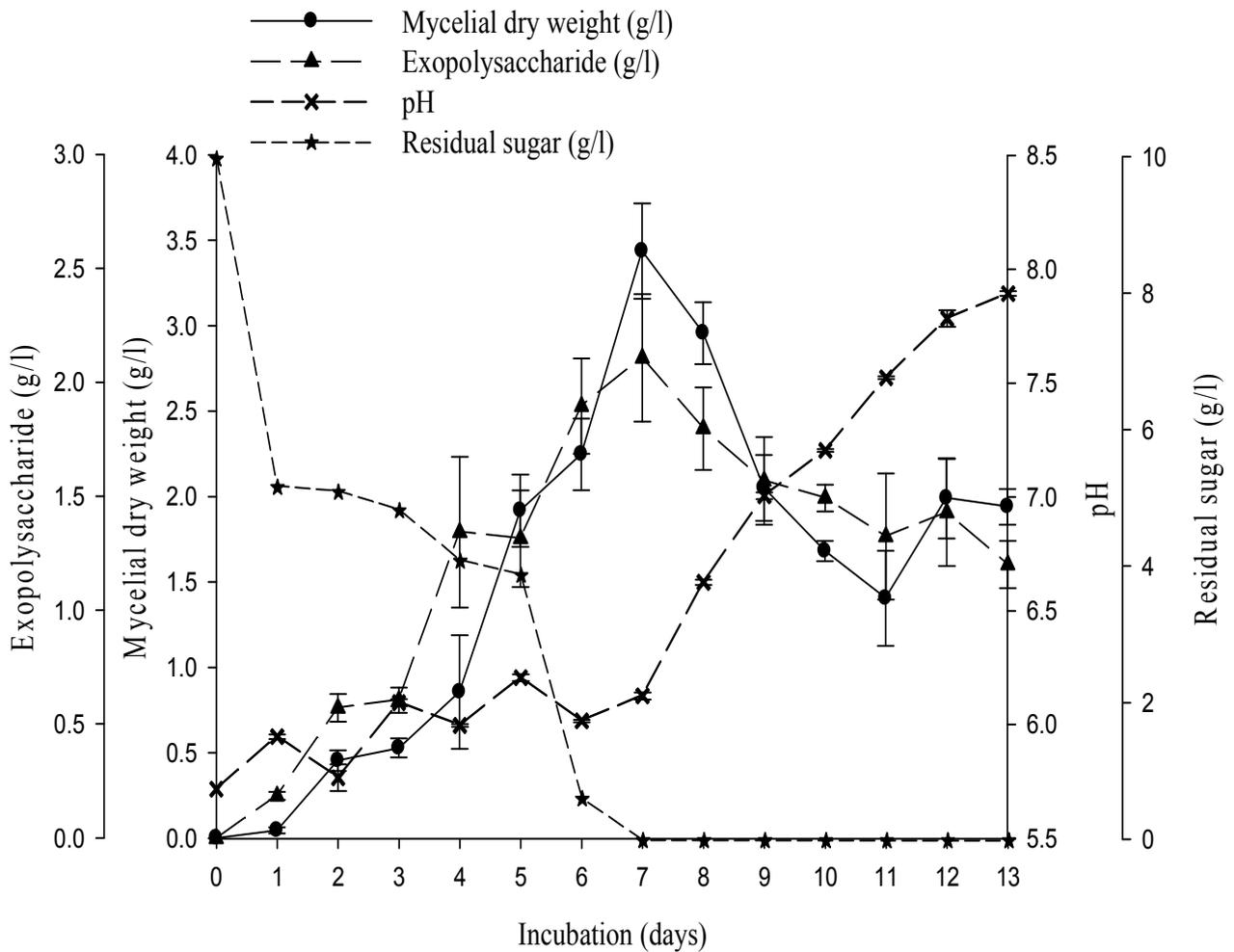
搖瓶試驗時，利用有溝三角錐瓶進行震盪培養以達到供應氧氣及攪拌（混合固-液-氣三相）之效果，但無法控制通氣量之多寡，而發酵槽所具有之通氣裝置可以增加發酵液之溶氧量及固定通入空氣之含量，攪拌裝置也可以提高攪拌混合的程度；桑黃菌為好氧性，於深層培養時會產生菌絲體，因此本部分之實驗為以搖瓶試驗所得之最適培養基（即修飾培養基）與培養條件（30℃，起始 pH 5.8，13 天培養時間），嘗試以三種不同型式發酵槽（攪拌式、氣泡式及氣舉式）進行桑黃菌之深層培養試驗，比較彼等對桑黃菌胞外多醣體量之產量、產生時間及多醣體分子量分佈之影響，另外測試彼等發酵液抑菌力、抗氧化力及 β -(1→3)-D-glucan 相對含量。

（一）胞外多醣體生成之影響

圖十二～圖十四分別為攪拌式、氣泡式及氣舉式發酵槽之發酵液於發酵期間胞外多醣體、菌絲體乾重、pH 值及殘糖（果糖）之變化情形，其中氣舉式發酵槽因具有溶氧電極（dissolved oxygen meter）可即時監控發酵液中之氧氣含量故加測定溶氧量（dissolved oxygen, DO）（圖十四）。

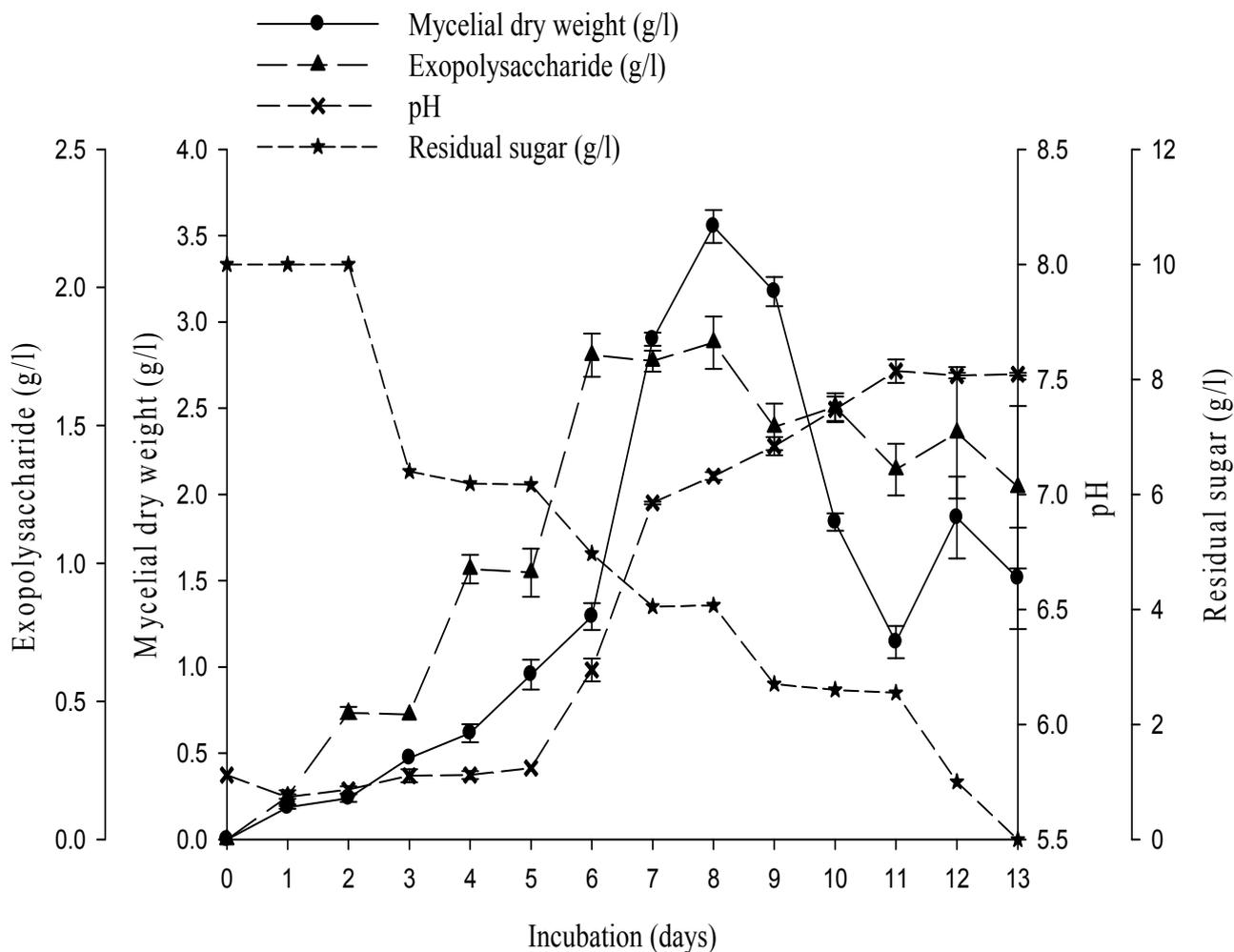
結果顯示三種發酵液中殘糖量皆隨發酵時間增加而減少，至發酵終了（第 13 天）前皆已消耗殆盡，而胞外多醣體及菌絲體產量則隨殘糖量之下降而增加，此結果與搖瓶試驗（圖十一）相同。推測原因為消耗之果糖為用於胞外多醣體之合成及菌絲體之生長，攪拌式發酵槽（圖十二）於果糖消耗殆盡（第 7 天）後，菌絲體及胞外多醣體產量亦隨之快速下降，原因可能為殘糖量消耗完畢之後菌體喪失能量來源使培養基內養分不足導致菌體死亡、自體分解或是轉而分解多醣養分所致。

三種發酵槽發酵液（圖十二～圖十四）之 pH 值在培養初期皆沒有明顯改



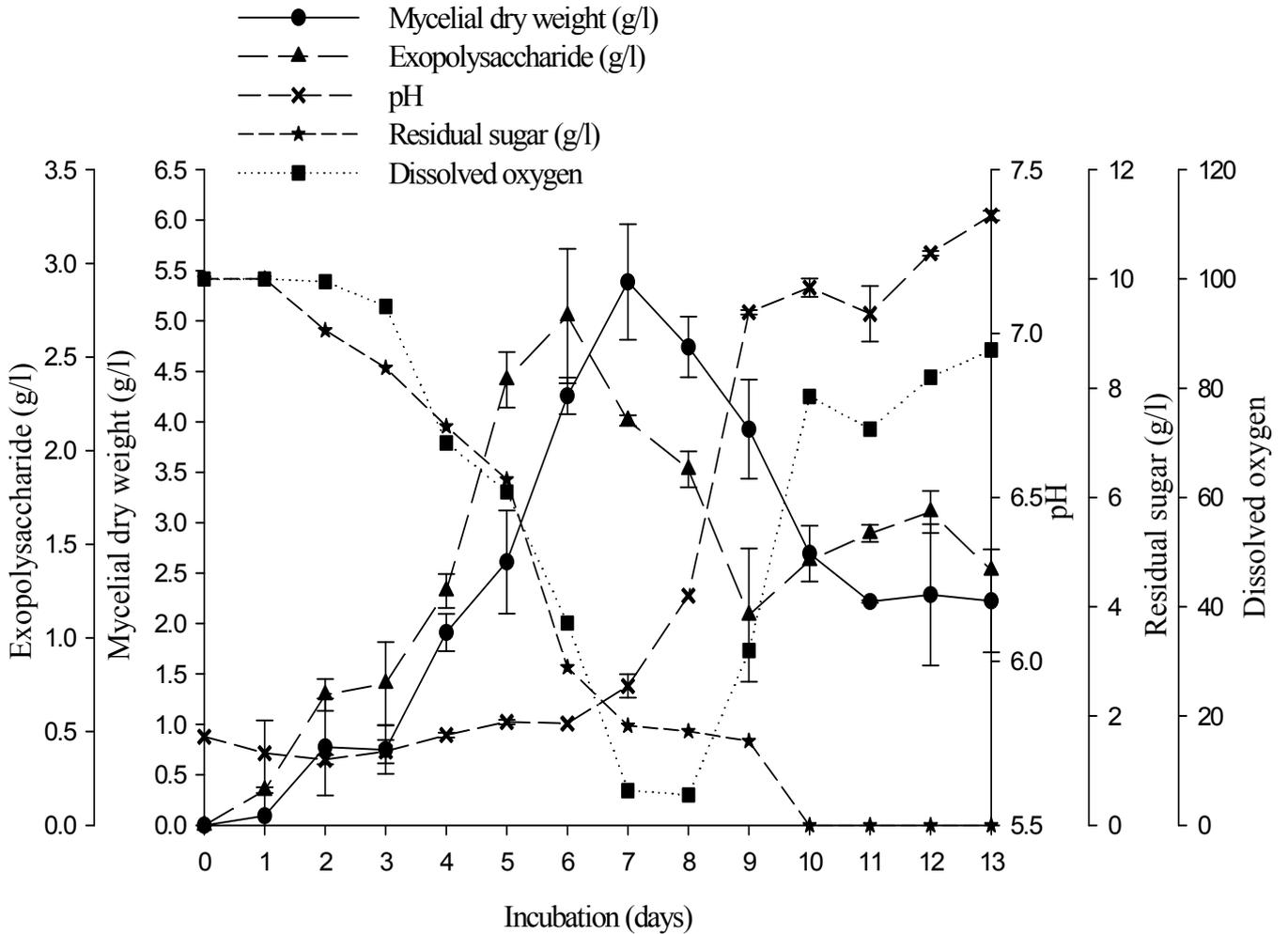
圖十二 攪拌式發酵槽培養期間桑黃菌 PL02 胞外多醣體、菌絲體、pH 值及殘糖量之變化。

Fig. 12 Changes of exopolysaccharide, mycelial biomass, pH and residual sugar by *P. linteus* PL02 during incubation in stirred-tank fermentor.



圖十三 氣泡式發酵槽培養期間桑黃菌 PL02 胞外多醣體、菌絲體、pH 值及殘糖量之變化。

Fig. 13 Changes of exopolysaccharide, mycelial biomass, pH and residual sugar by *P. linteus* PL02 during incubation in air bubble fermentor.



圖十四 氣舉式發酵槽培養期間桑黃菌 PL02 胞外多醣體、菌絲體、pH 值、殘糖量及溶氧量之變化。

Fig. 14 Changes of exopolysaccharide, mycelial biomass, pH, residual sugar and dissolved oxygen by *P. linteus* PL02 during incubation in air lift fermentor.

變，而隨著殘糖量下降，pH 值也逐漸上升，此結果與搖瓶試驗（圖十一）相似，推測原因為培養初期時碳源被分解利用後發酵液之 pH 值穩定保持在較偏酸的情況，當胞外多醣體及菌絲體達到最高量後，菌體仍然繼續生長加上發酵液內碳源含量不足因而消耗氮源以獲得能量，導致 pH 值逐漸上升。此現象與搖瓶試驗（圖十一）時相同。

三種發酵槽之最高胞外多醣體與菌絲體產量皆在培養後 6 至 8 天生成(圖十二~圖十四)，其中攪拌式發酵槽之最高胞外多醣體與菌絲體生成的培養時間皆為 7 天，氣泡式發酵槽皆為 8 天，氣舉式發酵槽則分別為 6 及 7 天。由於最高胞外多醣體與菌絲體產量之生成時間非常接近，表示胞外多醣體之產生與菌絲體的生長呈密切之正相關。此現象亦與搖瓶試驗（圖十一）時相同。

三種發酵槽之最大胞外多醣體與菌絲體生成時間（6~8 天，圖十二~圖十四）雖等於或短於搖瓶試驗（8 天及 12 天，圖十一），然氣泡式組之最高胞外多醣體（1.80 g/l）及所有三種發酵槽組之最高菌絲體產量（3.43~5.39 g/l）皆低於搖瓶試驗（分別為 1.99 及 9.25 g/l），三種發酵槽中攪拌式與氣舉式組之最高胞外多醣體產量（分別為 2.11 及 2.72 g/l）則高於搖瓶培養組（表十四），可能原因為發酵槽所使用之通氣量（1 vvm）過低造成發酵槽較搖瓶培養之氧氣及菌體質傳效果較差所致。亦有可能為本實驗所使用之發酵槽採樣口設計過小，不易採樣而造成測定上的誤差。

圖十四中氣舉式發酵槽之 DO 值於培養初期變化不大，表示菌體對氧氣之利用率很低，因此菌絲體生成亦較緩慢，而當 DO 值快速下降時（培養第 3 天後），殘糖量也隨之快速下降，表示此時菌體開始快速消耗氧氣與碳源而大量生成菌絲體與胞外多醣體，而於 DO 值幾乎消耗殆盡時（培養第 7 至 8 天），菌絲體及胞外多醣體產量亦已達到最高，表示菌體之生長與胞外多醣體的合成需要大量的氧氣與碳源，至培養後期時由於碳源幾乎完全消耗，菌絲體及

胞外多醣體產量開始下降，菌體不再大量消耗氧氣的情況下，DO 值又逐漸回升。

搖瓶試驗所生成之菌絲體因培養之錐形瓶底部具有一溝槽，導致菌絲之生長所受到之外力不均勻，而使菌絲體不完全形成球狀菌絲且菌絲球質地較為堅實（資料未列）。本實驗三種發酵槽所得之菌絲體外觀（圖十五）明顯較搖瓶試驗之菌絲體大且結構上亦較鬆散，原因可能為發酵槽所設定之通氣量不足，使菌體所受到之剪切力較搖瓶試驗為小，而導致形成較大較鬆散之球狀菌絲，此結果亦可能造成發酵槽在採樣時因菌絲體過大而產生菌絲體產量測定時之誤差；發酵槽所形成菌絲則因為受到均勻之外力影響，形成之菌絲皆為球狀；其中攪拌式發酵槽所形成之菌絲球較小且菌絲球表面分佈較少菌絲（圖十五-a），而氣泡式與氣舉式發酵槽所形成之菌絲球較大且表面會有較多突出之菌絲（圖十五-b 及 c），原因可能為剪切力不同所造成。

攪拌式、氣泡式及氣舉式發酵槽所得最高胞外多醣體生成量分別為 2.11、1.80 及 2.72 g/l；而三者之最高菌絲體生成量分別為 3.43、3.55 及 5.39 g/l（圖十二～圖十四）。導致氣舉式發酵槽具有最高菌絲體及胞外多醣體生成量之原因可能為其具較低的剪切力對菌絲體傷害較低所致，而槽體內的中空套筒能有效地將發酵槽中之固液氣三相均勻混合並使其對流循環亦有利於菌絲及胞外多醣體生成。攪拌式發酵槽因具有較大破壞菌絲體之剪切力，而使菌絲體產量最低。此結果與羅（2008）以攪拌式、氣泡式與氣舉式發酵槽培養桑黃菌（*P. igniarius*）之結果相同。氣泡式發酵槽具最低胞外多醣體生成之原因可能為單純使用通氣管通氣而使發酵槽中固液氣三相均勻混合效果較差，因此較不利於菌絲生長及多醣體之合成。本實驗結果之最大胞外多醣體產量（1.80~2.72 g/l）及生成時間（6~8 天），較 Hwang 等人（2003b）以攪拌式發酵槽（pH=4.0）培養桑黃菌時為低及短，原因可能為不同培養基及菌株所致。

表十四 桑黃菌 PL02 於搖瓶試驗及不同發酵槽培養時之發酵參數

Table 14 Fermentation parameters of shake flask culture and different batch cultures of fermentors by *P. linteus* PL02.

Cultures	P_{\max}^a	X_{\max}^b	μ^c	Q_p^d	Q_x^e	$Y_{p/x}^f$	$Y_{p/s}^g$	$Y_{x/s}^h$	t^i
	g/l	g/l	day ⁻¹	g/l/day		mg/g		day	
Shake flask culture	1.99	9.25	0.40	0.17	0.77	21.51	19.94	92.50	12
Stirred-tank fermentor	2.11	3.43	0.62	0.30	0.49	61.51	21.10	34.30	7
Air bubble fermentor	1.80	3.55	0.43	0.23	0.44	50.70	35.64	59.66	8
Air lift fermentor	2.72	5.39	0.59	0.38	0.77	50.46	38.26	65.89	7

a : maximal production of exopolysaccharide

c : specific growth rate

e : biomass formation rate= X_{\max} / t

g : product yield = $P_{\max} / \text{fructose, g}$

i : days to reach maximal biomass production

b : maximal production of biomass

d : product formation rate= P_{\max} / t

f : specific product yield= P_{\max} / X_{\max}

h : biomass yield= $X_{\max} / \text{fructose, g}$

表十四為將桑黃菌 PL02 於四種不同培養方式（搖瓶，攪拌式、氣泡式及氣舉式發酵槽）下各項發酵參數（fermentation parameters）之比較，結果顯示攪拌式及氣舉式發酵槽因具良好之溶氧及混合效果，皆可快速促進菌絲體的生成（ $t = 7$ days），因而具較高之比生長速率（分別為 $\mu = 0.62$ 及 $\mu = 0.59 \text{ day}^{-1}$ ）；氣舉式發酵槽則具有最高之菌絲體生成速率及胞外多醣體生成速率（分別為 $Q_x = 0.77 \text{ g/l/day}$ 及 $Q_p = 0.38 \text{ g/l/day}$ ）；氣泡式發酵槽可能因混合之效果較差，因此其比生長速率（ $\mu = 0.43 \text{ day}^{-1}$ ）、胞外多醣體生成速率（ $Q_p = 0.23 \text{ g/l/day}$ ）及菌絲體生成速率（ $Q_x = 0.44 \text{ g/l/day}$ ）均為三種發酵槽中最低者。

產率（yield）之發酵參數中，比多醣產率（ $Y_{p/x}$ ）以攪拌式發酵槽最高（ $Y_{p/x} = 61.51 \text{ mg/g}$ ），氣舉式發酵槽之比多醣產率（ $Y_{p/x}$ ）雖為三種發酵槽中之最低（ $Y_{p/x} = 50.46 \text{ mg/g}$ ），然具最高之多醣體產率（ $Y_{p/s}$ ）及菌絲體產率（ $Y_{x/s}$ ）；多醣體產率及菌絲體產率兩項發酵參數皆呈現氣舉式 > 氣泡式 > 攪拌式發酵槽之趨勢。此結果表示以氣舉式發酵槽培養時，桑黃菌最能有效將所消耗之果糖轉換成胞外多醣體與菌絲體。氣舉式發酵槽具較佳之產率發酵參數的可能原因為其具低剪切力及較佳對流混合之效果較適合桑黃菌 PL02 菌體生長而產生胞外多醣體所致。

本實驗各培養方式下之比生長速率（ μ ）為由菌體於對數生長期之生長曲線斜率求得（附錄圖三十五～圖三十八）。

本實驗結果與 Choi 和 Lee（2000）發現氣舉式發酵槽培養桑黃菌較攪拌式發酵槽能得到更高之菌絲體產量相同。Hwang 等人（2003a）指出桑黃菌於攪拌式發酵槽培養時有最高之胞外多醣體與菌絲體產量，分別為 5.3 及 10 g/l；羅（2008）則以氣泡式發酵槽為最佳培養桑黃菌（*P. igniarius*）生產菌絲體及胞外多醣體之發酵槽。上述二研究與本實驗結果不同之原因可能為培養基組成不同或是菌株不同所致。

(二) 多醣體分子量之測定

本試驗為採取前述搖瓶試驗及三種不同發酵槽於最高胞外多醣體生成時間之發酵液樣品，測定發酵液中胞外多醣體分子量及分子量分佈情形。分子量的分析以高效能液相層析儀及膠體滲透層析管柱進行測定。表十五為不同分子量多醣標準品 (α -D-葡聚糖，pullulan) 之滯留時間。附圖九為多醣體 (pullulan) 分子量 (5900、11800、22800、47300、112000、212000、404000 及 788000 Da) 之標準曲線。

結果 (圖十六) 發現四種不同之發酵液皆在滯留時間 5.46~5.62 鐘左右時有一明顯波峰產生，比對多醣分子量標準曲線 (附圖九) 後得知彼等分子量範圍為 2736~3878 Da。各發酵液胞外多醣體分子量大小經膠體滲透層析法測定結果如圖十六所示。

本結果顯示三種不同型式發酵槽之發酵液所得之胞外多醣體其分子量皆相近，表示在本研究之培養條件下，無論以何種發酵槽培養，所得之桑黃菌胞外多醣體皆具相近之分子量，而氣舉式發酵槽所得胞外多醣體分子量 2797 Da 之部分具最高波峰高度，表示其相對含量亦為較高。

菇類多醣體會受到多醣分支度、主鏈鍵結方式與側鏈基團影響而改變其分子排列結構，影響分子量之大小，因而具有不同之生理活性 (杜等人，2002)，如分子量在 3000~5000 Da 之間具降血糖功能，在 $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^6$ Da 之間者具抗發炎作用，在 3.0×10^4 Da 以上具抗發炎及抗腫瘤作用 (黃，1998)。

梁 (2008) 研究指出桑黃菌 (*P. linteus*) 菌絲體及發酵液之多醣體分子量大部分大於 2×10^6 Da。羅 (2008) 以桑黃菌 (*P. igniarius*) 經不同形式之發酵槽培養，所得之胞外多醣體分子量約為 4000 Da 左右。與本實驗結果不同之原因可能為實驗分析方法不同所致，而本實驗所得胞外多醣體 (分子量約為 3000 Da) 生理活性則可能與降血糖有關。

表十五 膠體滲透層析法不同分子量多醣標準品 (α -D-葡聚糖) 之滯留時間

Table 15 Retention times of pullulan standards with different molecular weights by gel permeation chromatography.

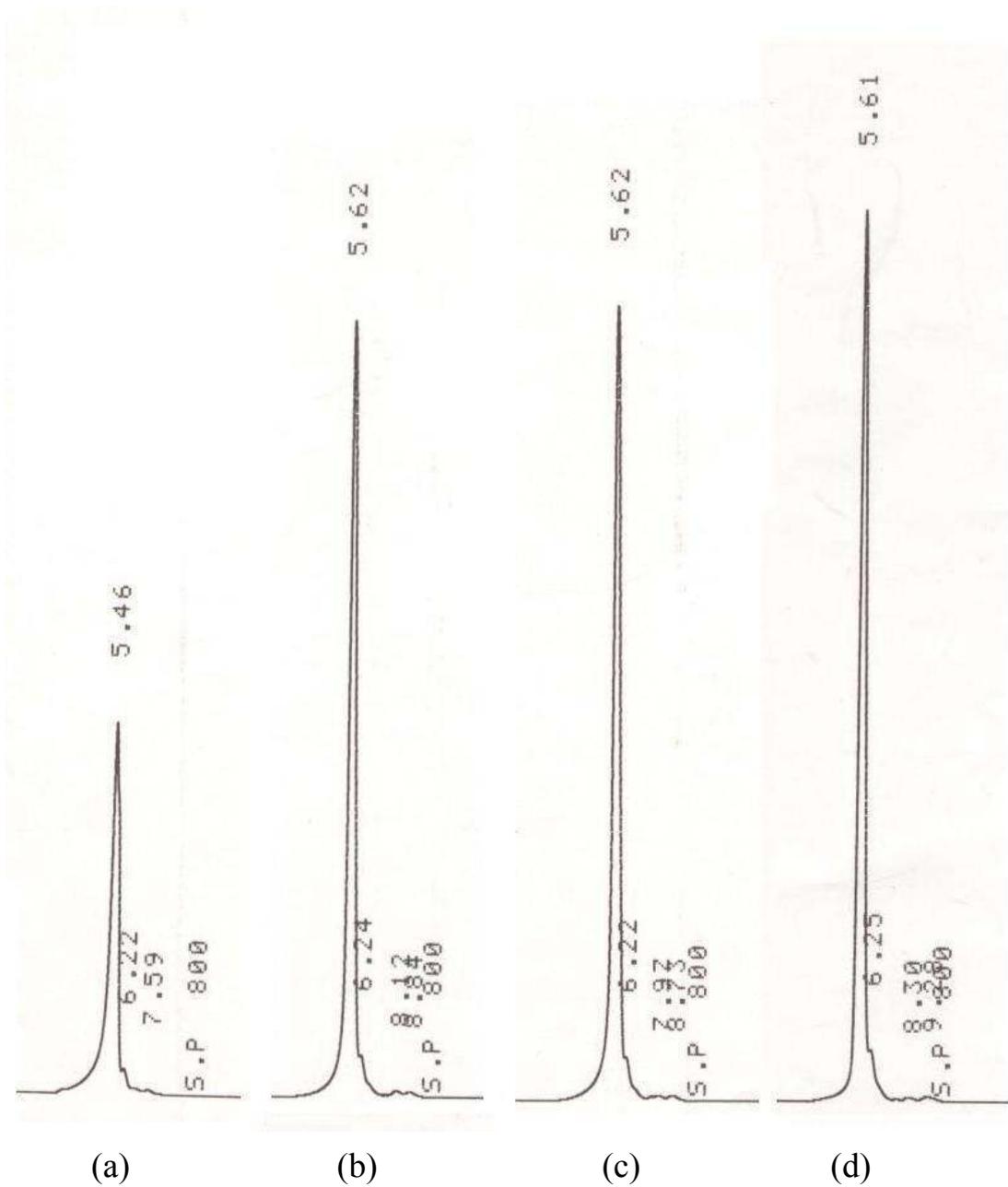
Molecular weight (Da)	Retention time (min)	Log M.W.*
5900	5.13	3.77
11800	4.96	4.07
22800	4.74	4.36
47300	4.38	4.67
112000	3.96	5.05
212000	3.62	5.33
404000	3.26	5.61
788000	3.01	5.90

* Log molecular weight

表十六 膠體滲透層析法測定四種不同發酵液中桑黃菌 PL02 胞外多醣體之分子量

Table 16 Estimation of molecular weights of exopolysaccharides from four different fermented cultures of *P. linteus* PL02 by gel permeation chromatography.

Cultures	Retention time (min)	Molecular weight (Da)
Shake flask	5.46	3878
Stirred-tank fermentor	5.62	2736
Air bubble fermentor	5.62	2736
Air lift fermentor	5.61	2797



圖十六 搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽桑黃菌 PL02 胞外多醣體分子量圖譜。(a) 搖瓶試驗，(b) 攪拌式發酵槽，(c) 氣泡式發酵槽，(d) 氣舉式發酵槽。

Fig. 16 Molecular weight chromatograms of exopolysaccharides from *P. linteus* PL02 in shake flask and three different types of fermentors by gel permeation chromatography. (a) shake flask, (b) stirred-tank type, (c) air bubble type, (d) air lift type.

四、發酵液抑菌力之測定

許多真菌之代謝物具有抑制細菌生長或是可以破壞細菌菌體的作用，例如 *Chaetomium cochliodes* 產生 cochlinol、*Gliocladium virens* 產生 gliovirin、*Myrothecium verrucaria* 產生 verrucaridin 及 *Penicillium vermiculatum* 產生 vermistatin 等（梅谷和加藤，1990）。

本實驗為採取前述搖瓶試驗及三種不同發酵槽於最高胞外多醣體生成時間之發酵液樣品，對六株測試細菌（*Bacillus cereus*、*Escherichia coli*、*Listeria monocytogene*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Staphylococcus aureus* 及 *Salmonella typhimurium*）進行抑菌能力測定，六株測試細菌對不同濃度 ampicillin 產生抑菌環之標準曲線如附圖三～附圖八所示。結果顯示不論何種形式所產生之發酵液在原液及濃縮十倍發酵液皆無抑菌效果（資料未列）。推測本實驗結果的原因為未使用有機或是熱水萃取等方式萃取出發酵液中有效之抑菌物質或是所實驗之發酵液中抑菌物質濃度過低所致。

陳（2005）以桑黃菌（*P. igniarius*）之發酵液、菌絲體、子實體和固體培養菌絲體之熱水和酒精萃取液處理 *Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus*、*Pseudomonas aeruginosa* 等三株細菌，發現桑黃菌之發酵液及萃取液皆不具抗生物活性；羅（2008）亦發現桑黃菌（*P. igniarius*）發酵液對本實驗相同之六株細菌無抑菌效果。以上研究報告與本實驗結果相似。

五、發酵液抗氧化力之測定

人體會經由飲食、外在接觸或是體內所進行生理反應的過程中產生活性氧族群 (reactive oxygen species) 和自由基 (free radicals)，此類物質會造成脂質過氧化作用 (lipid peroxidation) 導致細胞甚至器官的病變或是死亡。人體內有一套自我防護的系統可以清除有害的物質，如：超氧歧化酶 (superoxide dismutase) 或是觸酶 (catalase) 等，而抗氧化劑則是屬於非酵素性的抗氧化防禦系統，依其作用機制可分為自由基連鎖反應終止劑 (free radical terminator)、還原劑或氧清除劑 (reducing agents or oxygen scavenger) 及金屬螯合劑 (metal chelator) 等 (謝，2000)。目前已證實清除自由基對於細胞保護、疾病預防與衰老延緩等，具有顯著的作用，而使得控制體內自由基的成份或是有效清除已產生之自由基，成為目前醫藥界積極努力的方向；任何具有上述功能的成份或是物質，亦受到學界及業界的關注 (梁，2009)。

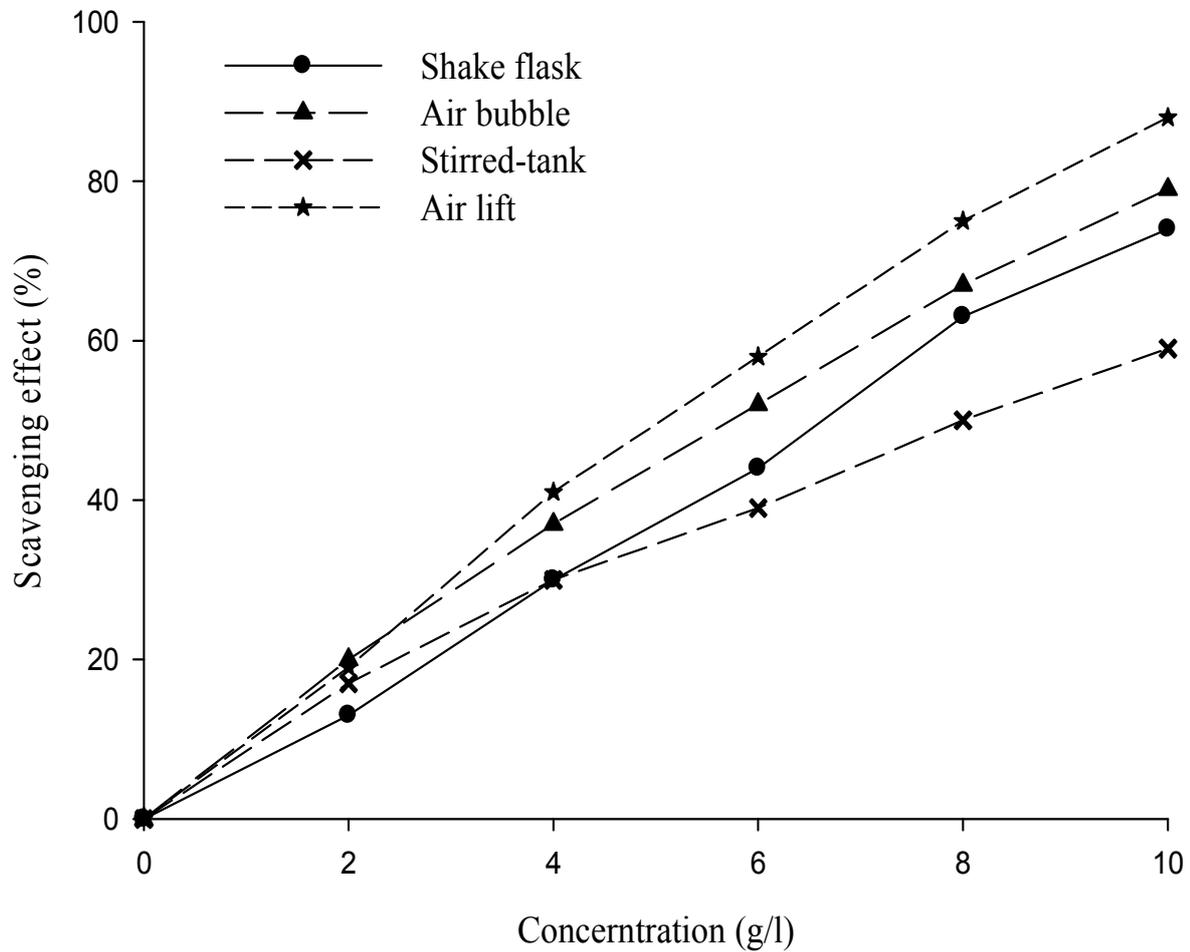
本實驗收集搖瓶試驗及三種不同發酵槽於最高胞外多醣體生成天數所得之發酵液或其發酵液萃取物，測定彼等之抗氧化力包括 DPPH 自由基清除能力、總抗氧化力、螯合亞鐵離子能力及還原力。

(一) DPPH 自由基清除能力測定

DPPH 自由基可接受抗氧化劑所提供之氫原子而被清除並形成一穩定之分子，因此常被用以檢測抗氧化物之抗氧化活性 (Shimada *et al.*, 1992)。

結果 (圖十七) 顯示四種發酵液甲醇萃取物之自由基清除能力皆隨濃度之增加而升高，當濃度為 10 g/l 時，搖瓶培養、氣泡式、攪拌式及氣舉式發酵槽四組之自由基清除能力分別為 73.6、78.5、58.8 及 88.0%，其中以氣舉式發酵槽組最高，其 DPPH 自由基清除能力相當於濃度 13.22 mg/l 之 α -tocopherol (附圖十六)。比較四種發酵液甲醇萃取物 DPPH 自由基清除能力之 IC_{50} (清除 50% DPPH 自由基所需之最低濃度)，亦發現以氣舉式發酵液所需之濃度 (5.35 g/l) 顯著 ($P < 0.05$) 最低 (表十七)。正對照組中則以 α -tocopherol 具最低之 IC_{50} (7.31×10^{-3} g/l)；以上 IC_{50} 值由線性回歸內插法測定之 (附圖十~附圖十六)。

羅 (2008) 以攪拌式發酵槽培養桑黃菌 (*P. igniarius*) 所得發酵液之甲醇萃取物在濃度 10 g/l 時具有 84.29% 之 DPPH 自由基清除能力。王 (2008) 發現桑黃 (*P. linteus*) 萃取物對 DPPH 自由基清除能力 (SE_{50}) 為 98.1 μ g/ml。陳 (2005) 以桑黃菌 (*P. igniarius*) 子實體、固體培養菌絲體、液體發酵之菌絲體熱水萃取液濃度為 33.3 mg/ml 時有較佳的清除 DPPH 自由基清除能力。與本實驗結果不同之原因可能為菌株不同或是萃取方式不同所致。



圖十七 搖瓶試驗與三種不同形式發酵槽桑黃菌 PL02 發酵液甲醇萃取物之 DPPH 自由基清除能力。

Fig. 17 Scavenging effect of methanolic extract from *P. linteus* PL02 on DPPH radicals using shake flask and three different types of fermentors.

表十七 搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽桑黃菌 PL02 發酵液甲醇萃
物 DPPH 自由基清除能力之 IC₅₀

Table 17 The IC₅₀ of scavenging effect of methanolic extract from *P. linteus* PL02 on DPPH radicals using shake flask and three different types of fermentors.

Samples	IC ₅₀ (g/l)*
Shake flask	6.66±0.04 ^b
Stirred-tank fermentor	8.13±0.02 ^a
Air bubble fermentor	5.96±0.15 ^c
Air lift fermentor	5.35±0.04 ^d
BHA (positive control)	1.58×10 ⁻²
Ascorbic acid (positive control)	1.63×10 ⁻²
α-tocopherol (positive control)	7.31×10 ⁻³

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

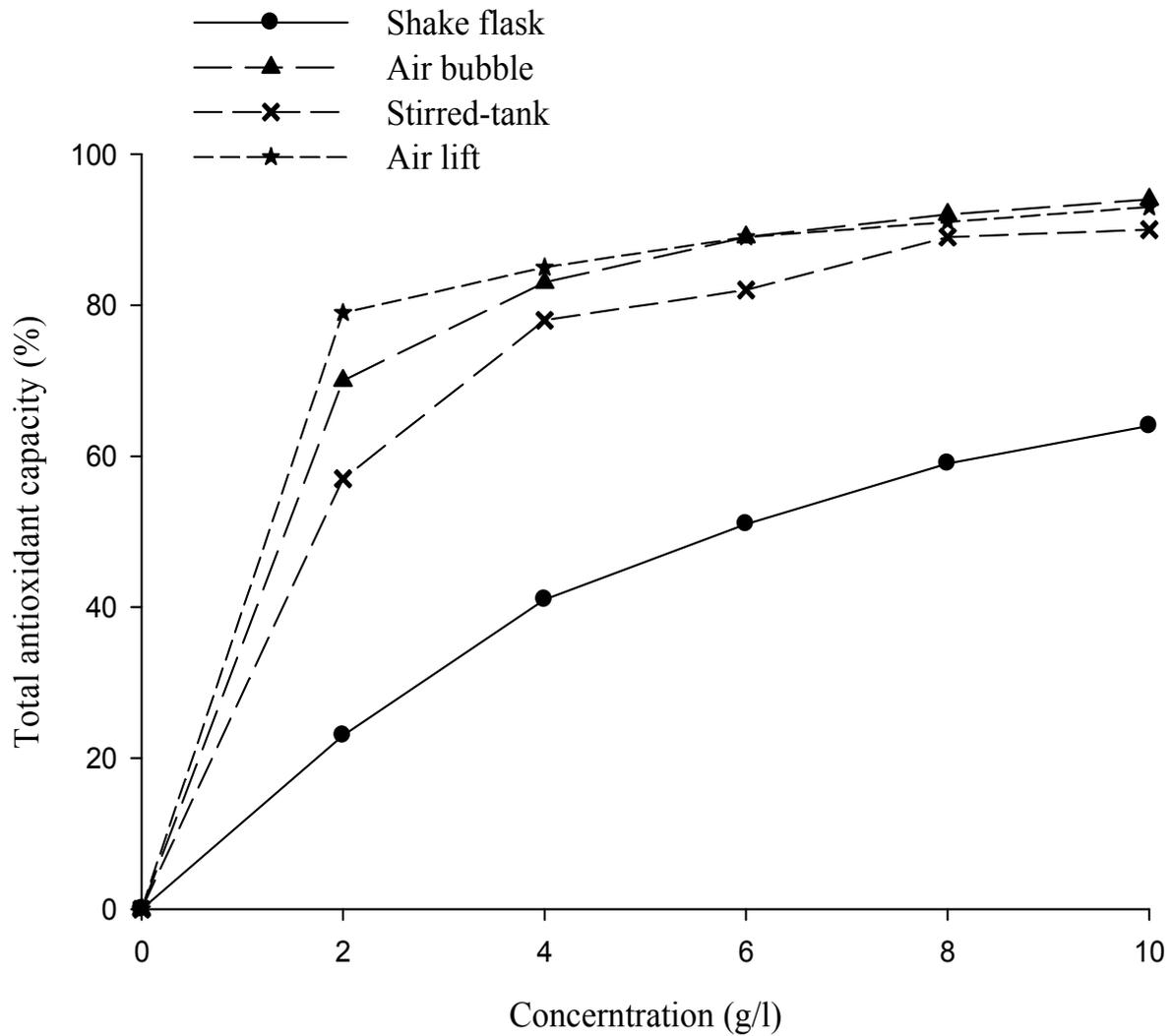
* The minimal concentration required to inhibit 50% activity of DPPH · .

(二) 總抗氧化力測定

ABTS 會與 peroxidase 及 H_2O_2 反應形成藍綠色穩定之 $ABTS \cdot^+$ 陽離子自由基，加入抗氧化劑會減少 $ABTS \cdot^+$ 含量，使其在波長 734 nm 下之吸光值降低。

結果（圖十八）顯示四種發酵液之總抗氧化力皆隨濃度增加而升高，至濃度超過 4 g/l 後逐漸趨於平緩。濃度為 10 g/l 時，搖瓶培養、氣泡式、攪拌式及氣舉式發酵槽四組之總抗氧化力分別為 64.1、93.9、90.4 及 92.6%，其中以氣舉式發酵槽之發酵液組具有較高之總抗氧化力，其總抗氧化力相當於濃度 93.15 mg/l 之 trolox（附圖二十一）。四種發酵液總抗氧化力之 IC_{50} （抑制 50% $ABTS \cdot^+$ 活性所需之最低濃度）則以氣舉式發酵槽組（2.04 g/l）顯著（ $P < 0.05$ ）低於其他實驗組（表十八）。正對照組（trolox）之 IC_{50} 則為 4.93×10^{-2} g/l；以上 IC_{50} 值由線性回歸內插法測定之（附圖十七~附圖二十一）。

Lee 等人（2007）分析包含桑黃等多種不同真菌之有機溶劑萃取物，得到三種具有抗氧化活性之物質，其清除 $ABTS \cdot^+$ 陽離子自由基能力之 IC_{50} 介於 1.8~3.1 μM 之間。羅（2008）以氣泡式發酵槽培養桑黃菌（*P. igniarius*）所得發酵液對清除 $ABTS \cdot^+$ 陽離子自由基能力之 IC_{50} 為 1.52 (g/l)。黃（2008）指出桑黃中草藥複方飲品具有良好的清除 DPPH 自由基清除能力及清除 $ABTS \cdot^+$ 之能力。與本實驗結果不同之原因可能為菌株不同或是萃取方式不同所致。



圖十八 搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽桑黃菌 PL02 發酵液之總抗氧化力。
 Fig. 18 Total antioxidant capacity on ABTS · ⁺ from fermented cultures of *P. linteus* PL02 using shake flask and three different types of fermentors.

表十八 搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽之桑黃菌 PL02 發酵液總抗氧化力之 IC₅₀

Table 18 The IC₅₀ of total antioxidant capacity on ABTS ·⁺ radicals from fermented cultures of *P. linteus* PL02 using shake flask and three different types of fermentors.

Samples	IC ₅₀ (g/l)*
Shake flask	6.08±0.06 ^a
Stirred-tank fermentor	2.90±0.07 ^b
Air bubble fermentor	2.34±0.07 ^c
Air lift fermentor	2.04±0.08 ^d
Trolox (positive control)	4.93×10 ⁻²

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

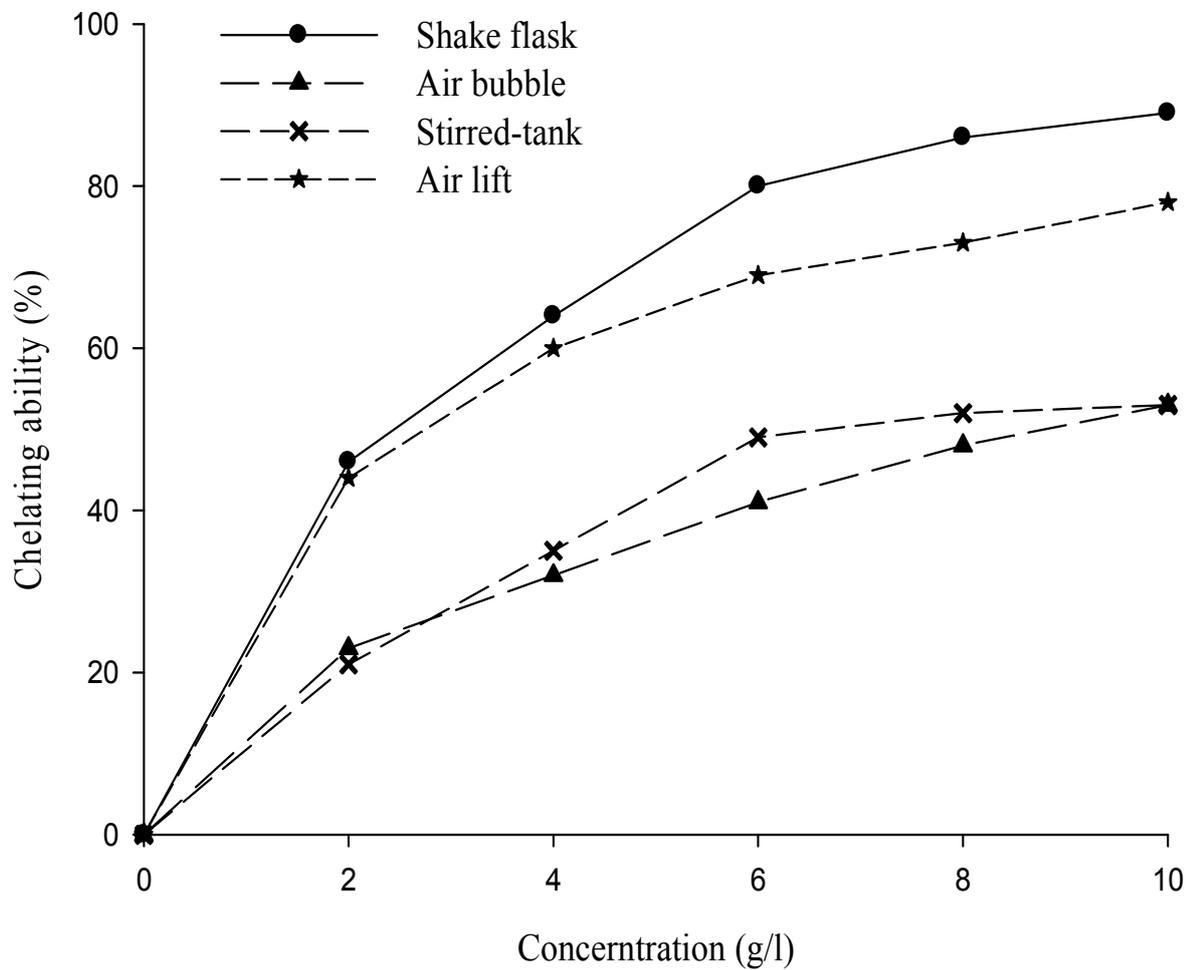
* The minimal concentration required to inhibit 50% activity of ABTS ·⁺.

(三) 螯合亞鐵離子能力測定

脂質氧化的起始反應除了可由自由基引發之外，還可由金屬離子引發，且只需要少量的金屬離子即可產生大量的自由基而加速脂質的氧化反應，進而對人體造成傷害 (Halliwell *et al.*, 1995)。其中鐵離子為對油脂氧化作用最具影響力之助氧化劑。

結果 (圖十九) 顯示四種發酵液之螯合亞鐵離子能力皆隨濃度增加而升高，其中以搖瓶試驗及氣舉式發酵槽之發酵液組具有較高之螯合亞鐵離子能力，但隨濃度增加而逐漸趨於平緩，表示螯合亞鐵離子能力已達到最大值。濃度為 10 g/l 時，搖瓶培養、氣泡式、攪拌式及氣舉式發酵槽四組之螯合亞鐵離子能力分別為 88.8、53.0、53.1 及 77.8%，搖瓶試驗發酵液組之螯合亞鐵離子能力與濃度 71.58 mg/l 之 EDTA 相當 (附圖二十六)。四種發酵液螯合亞鐵離子能力之 IC_{50} (螯合 50% Fe^{2+} 離子所需之最低濃度) 以搖瓶試驗之發酵液組 (3.50 g/l) 顯著 ($P < 0.05$) 低於其他實驗組 (表十九)。正對照組 (EDTA) 之 IC_{50} 則為 3.89×10^{-2} g/l；以上 IC_{50} 值由線性回歸內插法測定之 (附圖二十二~附圖二十六)。

徐 (2008) 以固態發酵桑黃菌所得桑黃蕙仁之熱水萃取物在濃度 10 g/l 時具有 84.26% 之亞鐵離子之螯合能力，但是其熱水萃取物在濃度 20 g/l 時亞鐵離子之螯合能力則增加到 100.0%。蔡 (2007) 培養桑黃菌 (*P. igniarius*) 其醱酵產物萃取液對亞鐵離子之螯合能力 (EC_{50}) 為 1.71 mg/ml。與本實驗結果不同之原因可能為菌株不同或是培養方式不同所致。



圖十九 搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽桑黃菌 PL02 發酵液之螯合亞鐵離子能力。

Fig. 19 Chelating ability on ferrous ion from fermented cultures of *P. linteus* PL02 using shake flask and three different types of fermentors.

表十九 搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽之桑黃菌 PL02 發酵液螯合亞鐵離子能力之 IC₅₀

Table 19 The IC₅₀ of chelating ability on ferrous ion from fermented cultures of *P. linteus* PL02 using shake flask and three different types of fermentors.

Samples	IC ₅₀ (g/l)*
Shake flask	3.50±0.06 ^d
Stirred-tank fermentor	6.82±0.11 ^b
Air bubble fermentor	8.44±0.07 ^a
Air lift fermentor	4.41±0.05 ^c
EDTA (positive control)	3.89×10 ⁻²

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

* The minimal concentration required to chelate 50% activity of ferrous ion.

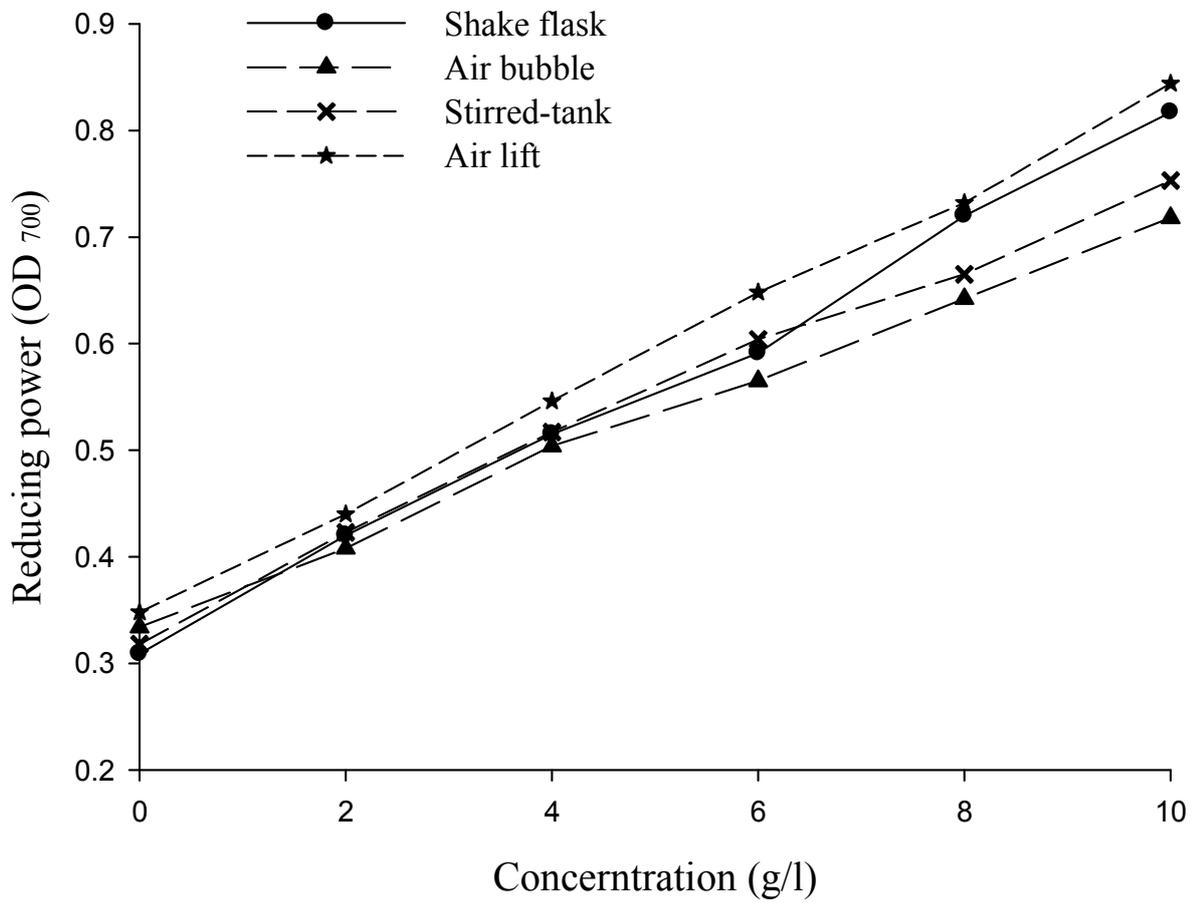
(四) 還原力測定

所謂的還原性質是將已氧化的物質還原，或是將環境維持在一個傾向於還原的狀態，便不易進行氧化反應。而本身具有還原力者可作為電子之提供者，與自由基的清除有很大的關係（蔡，2002）。

結果（圖二十）顯示四種發酵液之還原力皆隨濃度增加而升高，濃度為 10 g/l 時，搖瓶培養、氣泡式、攪拌式及氣舉式發酵槽四組之還原力（OD₇₀₀）分別為 0.817、0.718、0.753 及 0.844，其中以氣舉式發酵槽組具有最高之還原力，其原還力與濃度 62.91 mg/l 之 BHA 相當（附圖三十一）。四種發酵液還原力之 IC₅₀（吸光值達到 0.5 所需之最低濃度）亦以氣舉式發酵槽組（3.12 g/l）顯著（P<0.05）最低（表二十）。正對照組中則以 BHA 則具有最低之 IC₅₀（ 3.60×10^{-2} g/l）；以上 IC₅₀ 值由線性回歸內插法測定之（附圖二十七~附圖三十三）。

徐（2008）以固態發酵桑黃菌所得桑黃蕙仁之熱水萃取物在濃度 10 g/l 時還原力為 0.86（OD₇₀₀）。蔡（2007）培養桑黃菌（*P. igniarius*）以其醱酵產物萃取液還原力之 EC₅₀ 為 3.38 mg/ml。與本實驗結果不同之原因可能為菌株不同或是培養方式不同所致。

由上述實驗可以發現，比較搖瓶試驗及三種不同發酵槽之發酵液或其發酵液萃取物抗氧化力，在四種抗氧化力測試中（除螯合亞鐵離子能力外），以氣舉式發酵槽發酵液組具有最佳之抗氧化能力。推測桑黃菌 PL02 以氣舉式發酵槽培養時，較易產生具有抗氧化作用的物質。而桑黃菌發酵液具有很好之抗氧化性質，可以考慮做為天然之抗氧化劑，亦可用來做為保健食品之素材，幫助人體減少每日所受之氧化傷害。



圖二十 搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽桑黃菌 PL02 發酵液之還原力。
 Fig. 20 Reducing power of fermented cultures from *P. linteus* PL02 using shake flask and three different types of fermentors.

表二十 搖瓶試驗與三種不同型式發酵槽之桑黃菌 PL02 發酵液還原力之 IC₅₀

Table 20 The IC₅₀ of reducing power of fermented cultures from *P. linteus* PL02 using shake flask and three different types of fermentors.

Samples	IC ₅₀ (g/l)*
Shake flask	3.77±0.01 ^{ab}
Stirred-tank fermentor	3.91±0.01 ^{ab}
Air bubble fermentor	4.26±0.02 ^a
Air lift fermentor	3.12±0.01 ^b
BHA (positive control)	3.60×10 ⁻²
Ascorbic acid (positive control)	7.83×10 ⁻²
α-tocopherol (positive control)	5.42×10 ⁻²

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

* The minimal concentration required to reach OD₇₀₀ of 0.5.

六、 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量之測定

多醣體中以 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 結構具有較佳之功效性，其可用於宿主防禦物質之增強劑 (host defense potentiator or HDP)、抗腫瘤 (antitumor)、抗發炎 (anti-inflammatory) 及免疫誘苗 (immunostimulator) 等 (Ko and Lin, 2004)。Aniline blue 與菇類多醣體中之 β -(1 \rightarrow 3)鍵結在特定的環境下 (pH 11.50 之 0.05 M Na_2HPO_4 -NaOH 溶液，內含 0.5 M NaCl) 會形成某種形式之錯合物，並在 UV 光照射下 (激發波長為 395 nm，放射波長為 495 nm) 產生黃色螢光。

本實驗則利用此一特性測定搖瓶試驗及三種不同發酵槽於最高胞外多醣體生成天數所得之發酵液樣品中胞外多醣體相對 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 的含量。結果 (表二十一) 顯示以氣泡式及氣舉式發酵槽發酵液組之胞外多醣體中 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量 (16.25 及 15.83 $\mu\text{g/ml LE}$) 顯著 ($P < 0.05$) 高於其他兩組。因此推測氣泡式及氣舉式發酵槽所得之胞外多醣體應具較高之生理活性。

李 (2007) 分別在攪拌式及氣舉式發酵槽培養舞菇 (*Grifola frondosa*) 所得之胞外多醣體之 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 含量為 111.90 及 40.14 $\mu\text{g/ml LE}$ 。而羅 (2008) 以氣泡式發酵槽培養桑黃菌 (*P. igniarius*) 所得之胞外多醣體之 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 含量為 1.92 $\mu\text{g/ml LE}$ 。亦有報告指出以攪拌式發酵槽兩段式調控通氣量培養豬苓 (*Polyporus umbellatus*) 之最大 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 含量為 1.193 $\mu\text{g/ml LE}$ (李, 2008)。與本實驗結果不同之原因可能為菌株不同或是培養方式不同所致。

表二十一 四種不同形式發酵液中胞外多醣體之 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量

Table 21 Relative β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan contents in exopolysaccharides from different kinds of fermented cultures.

Cultures	Laminarin equivalent (LE) (μ g/ml)
Shake flask	11.18 \pm 1.90 ^b
Stirred-tank fermentor	10.97 \pm 0.05 ^b
Air bubble fermentor	16.25 \pm 0.08 ^a
Air lift fermentor	15.83 \pm 0.38 ^a

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different (P<0.05).

伍、結論

一、平板培養基試驗

兩種桑黃菌 (PL02 及 PL03) 於三種平板培養基 (PDA、YMA 及基礎培養基) 及不同培養溫度 (20、25、30 及 35°C) 下之菌絲體生長速率, 以桑黃菌 PL02 於含有 peptone 及無機鹽類 KH_2PO_4 及 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 之基礎培養基及在 30°C 下具有最快的菌絲生長速率 (0.76 cm/day)。

二、搖瓶試驗

- 1、最適桑黃菌 PL02 胞外多醣體生成之培養條件 (修飾培養基): 最適碳源為 fructose (1.0%, v/v)、最適氮源為 yeast extract (1.0%, v/v)、生長因子為 corn steep liquor (0.3%, v/v)、最適無機鹽類為 MgSO_4 (0.1%, v/v) 培養起始 pH 值為 5.8, 碳氮比調整為 1 (w/w)。
- 2、以最適條件進行培養時間 20 天之搖瓶培養, 於培養第 12 天及第 8 天時可得最高之菌絲體及胞外多醣體產量 (9.25 及 1.99 g/l), 分別增加為基礎培養基最高產量 (3.44 及 0.58 g/l) 之 2.69 及 3.44 倍。

三、不同型式發酵槽培養試驗

- 1、由於培養條件之改善, 以發酵槽培養可較搖瓶培養縮短最大胞外多醣體與菌絲體生成時間 (6~8 天 vs. 8 及 12 天)。
- 2、最大胞外多醣體與菌絲體生成時間非常接近, 表示兩者之生成呈密切之正相關性。
- 3、攪拌式發酵槽雖具最高之比生長速率 ($\mu = 0.62 \text{ day}^{-1}$), 然氣舉式發酵槽具最高之胞外多醣體生成速率 ($Q_p = 0.38 \text{ g/l/day}$) 與菌絲體生成速率 (Q_x)

= 0.77 g/l/day)，而氣舉式發酵槽較攪拌式發酵槽具較低剪切力及較佳槽內對流循環之混合效果，較適合菌體生長而產生胞外多醣體。

- 4、攪拌式發酵槽具有最高之比多醣產率 ($Y_{p/x} = 61.51 \text{ mg/g}$)，表示以攪拌式發酵槽培養時，桑黃菌之單位重量菌絲體能生成最多之胞外多醣體。
- 5、多醣產率 ($Y_{p/s}$) 及菌絲體產率 ($Y_{x/s}$) 亦呈現氣舉式>氣泡式>攪拌式發酵槽之趨勢，表示以氣舉式發酵槽培養最能有效地將所消耗之果糖轉換成胞外多醣體與菌絲體。

四、多醣體分子量之測定

- 1、搖瓶試驗及三種不同發酵槽之發酵液所得之胞外多醣體其分子量 (2736~3878 Da) 皆相近，表示無論以何種形式培養所得之胞外多醣體皆具相似之分子量，其生理活性應與降血糖有關。
- 2、氣舉式發酵槽所得胞外多醣體分子量 2797 Da 之部分，其相對含量較高。

五、發酵液抑菌力之測定

搖瓶試驗及三種不同發酵槽之發酵液原液與十倍濃縮液對於六株測試病原菌皆無明顯之抑菌效果。

六、發酵液抗氧化力之測定

搖瓶試驗及三種不同發酵槽之發酵液，在相同濃度 (10 g/l) 時以氣舉式發酵槽具最佳之抗氧化能力，其在 DPPH 自由基清除能力、總抗氧化力及還原力之 IC_{50} 值 (分別為 5.35、2.04 及 3.12 g/l) 皆顯著 ($P < 0.05$) 低於其他測試組。然其螯合亞鐵離子能力 ($IC_{50} = 4.41 \text{ g/l}$) 僅高於搖瓶組 ($IC_{50} = 3.50 \text{ g/l}$)。

七、 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量之測定

搖瓶試驗及三種不同發酵槽發酵液之胞外多醣體，以氣泡式及氣舉式發酵槽可得較高 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量（16.25 及 15.83 $\mu\text{g/ml LE}$ ），故彼等胞外多醣體之生理活性亦較高。

綜合上述，三種發酵槽中以氣舉式發酵槽具較高之胞外多醣體生成量、生成速率及產率發酵參數，亦具較佳抗氧化能力及 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量；生成胞外多醣體之分子量則三者皆相近。因此，以具較低剪切力及較佳槽內對流循環混合效果之氣舉式發酵槽培養，會較氣泡式或攪拌式發酵槽能有更高產量及較佳機能性之桑黃菌 PL02 胞外多醣體。

陸、參考文獻

- 王伯徹。2005。菇類應用研發與產業推動。食品工業 37(5)：1~9。
- 王伯徹、陳啟楨。1994。常見食藥用菇類介紹。食品工業發展研究所 新竹 台灣。
- 王伯徹、陳啟楨、華傑。1998。食藥用菇類的培養與應用。食品工業發展研究所報告 M-87-019：187。
- 王培銘、黃定國。2001。氣動攪拌式發酵槽。食品工業 33(11)：13~26。
- 王淑芬。2008。桑黃萃取物抑制血管栓塞之研究。私立元培科技大學生物技術研究所碩士論文。
- 水野卓、川合正允 編著；賴慶亮 譯。1999。菇類的化學生化學。國立編譯館 台北 台灣。
- 卯曉嵐。1999。中國大型真菌。鄭州：河南科學技術出版社。477~479。
- 池玉杰，潘學仁。2001。7種木層孔菌屬真菌的培養特性。菌物系統。20：378~380。
- 曲曉華，浦冠勤。2004。桑黃的研究與應用。江蘇蠶業。1：18~19。
- 李微萱。2007。液態培養條件對舞菇 (*Grifola frondosa*) 菌絲體及多醣體生產的影響。私立東海大學食品科學系研究所碩士論文。
- 李佳安。2006。桑黃固體栽培及其生物活性之探討。私立南台科技大學生物科技研究所碩士論文。
- 李婉瑜。2008。起始 pH 與通氣量對深層培養豬苓 (*Polyporus umbellatus*)

- 菌絲體生長及多醣體生產之影響。私立東海大學食品科學系研究所碩士論文。
- 宋力，孫培龍，郭彬彬，魏紅福，陳靈杰。2004。桑黃的研究進展。中國食用菌。24：7~10。
- 杜巍、李元瑞、袁靜。2002。食藥用菌多醣生物活性結構的關係。中國食用菌 21(2)：28~30。
- 呂淑芳、宮昭雲、傅偉光。2001。靈芝中之水溶性粗多醣分析方法之研究。台灣農業化學與食品科學 39(2)：153~161。
- 沈葆聖。1993。SAS 統計軟體與資料分析。滄海書局 台中 台灣。
- 林怡君。2005。探討添加氯化鈉和供氧量對桑黃生產多醣體之影響。國立中央大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。
- 周柏甫。2001。探討菌體型態對於裂褶菌多醣體生產之影響。國立中央大學化學工程研究所碩士論文。
- 梅谷獻二，加藤肇。1990。農業有用微生物。養賢株式會社。
- 胡琦桂。1994。真菌球狀菌絲體生長之探討。科學與技術 26(9)：37~45。
- 高木繁。2004。桑黃。青春出版社。台灣。
- 真野俊樹。2003。天然桑黃抗癌・增強免疫力。安立出版社。台灣。
- 徐錦堂。1996。中國藥用真菌學。北京醫科大學、中國協和醫科大學聯合出版社。
- 徐佳莉。2008。以固態發酵製備桑黃薏仁與桑黃米產品及其呈味性質與生理活性。國立中興大學食品暨應用生物科技學系研究所碩士論

文。

陳啟禎。1998。菇類二次代謝物質及其利用。食品工業 35(5)：1~11。

陳品儒。2005。桑黃菌種生物活性之初步探討。私立南台科技大學生物科技研究所碩士論文。

蔡淑瑤。2002。靈芝與柳松菇抗氧化性質和其對腫瘤細胞之毒性及柳松菇之抗致突變性質。國立中興大學食品暨應用生物科技學系研究所碩士論文。

蔡介中。2007。桑黃醱酵產物及其抗氧化特性研究。私立明新科技大學化學工程研究所碩士論文。

蔡鎧懋。2008。液態發酵培養基組成對桑黃生產胞外多醣之影響。私立南台科技大學生物科技研究所碩士論文。

張毅偉。2003。靈芝中具 β -(1 \rightarrow 6)分支之(1 \rightarrow 3)- β -D-聚葡萄糖之性質與檢測。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。

張萬國，胡晉紅。2002。桑黃預防大鼠肝纖維化作用的實驗研究。藥學服務與研究。2：82~86。

張萬國，胡晉紅，蔡溱。2002a。桑黃增強人外周血單個核細胞產生 γ -干擾素的研究。基層中藥雜誌。16：5~6。

張萬國，胡晉紅，蔡溱。2002b。桑黃對實驗性肝纖維化大鼠血液動力學的影響。解放軍要學學報。18：341-342。

張春風，黃瑞海。2007。珍稀藥用菌桑黃的藥理作用。特產研究。1：68~70。

- 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。
- 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。
- 韓永萍、何江川、繆剛。2006。姬松茸子實體多醣的分子量分布研究。河北農業大學 29(3)：91~94。
- 溫克，陳勁，李紅，黛文丸，李敬軒，楊世杰。2002。桑黃等四種抗癌藥物抗癌活性比較。吉林大學學報（醫學版）。28：247~249。
- 梁峙。2001。食用菌深層液體發酵參數控制之研究。食品科學 22(1)：38~41。
- 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。
- 奧山 哲、堀江壽人。1980。茨大農學術報告 28(1)。
- 傅海慶、陳紹軍、駱文燦、陳漢清、林河通。2007。桑黃液體發酵培養基研究。中國食品學報 7(3)：58~63。
- 游英欽。1995。以搖瓶振盪及小型發酵槽培養，探討培養基組成及物理化學因子對於靈芝多醣生成及生長形態變化之影響。國立交通大學生物科技研究所碩士論文。
- 黃仁彰。1998。食藥用菇類保健食品之研發。食藥用菇類的培養與應用。食品工業發展研究所 新竹 台灣。
- 黃家樑。1997。液態培養生產靈芝菌絲體與靈芝多醣之研究。私立東海

- 大學化學工程研究所碩士論文。
- 黃惠琴。2001。樟芝菌絲體深層培養之研究。私立東海大學化學工程研究所碩士論文。
- 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。
- 黃千芳。2008。桑黃飲品及納豆激酶產品之開發。國立嘉義大學食品科學系研究所碩士論文。
- 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 4：6~8。
- 鄭立軍，王清，季俊虬，沈業壽。2005。藥用真菌—桑黃的研究進展。現代中藥研究與實踐。19：61~64。
- 鄭萬禎。2002。利用批式發酵生產巴西洋菇菌絲體及胞外多醣之研究。國立中興大學食品暨應用生物科技學系研究所碩士論文。
- 楊全、李艷輝、嚴寒靜、王琦。2004。藥用真菌桑黃液體發酵工藝的研究。廣東藥學院學報 20(3)：212~220。
- 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。
- 劉勝宇。2001。探討培養溫度對巴西蘑菇液態發酵之影響。國立中央大學化學工程與材料工程研究所博士論文。
- 齊藤隆、楊耀銘。2004。我們的抗癌完全勝利宣言-20種蘑菇複合菌絲體超水溶性、超抗癌作用、超強免疫調節。亞洲商務管理出版社。

台灣。

孫淑靜，江玉姬，朱虎，謝寶貴。2005。藥用真菌桑黃的研究現狀。藥物生物技術。12：138~140。

戴玉成。2003。藥用擔子菌—鮑氏層孔菌（桑黃）的新認識。中草藥。34：94。

謝秋蘭。2000。杜仲水萃取物抗氧化機能性之研究。國立中興大學食品暨應用生物科技學系研究所博士論文。

賴進此。2003。菇類活性物質的分離及其應用。食品工業 35(5)：2~10。

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。

蕭美玲。2007。深層培養條件與不同型式發酵槽對巴西蘑菇 *Agaricus blazei Murrill* 胞外多醣體生成之影響。私立東海大學食品科學系研究所碩士論文。

Alexopoulos, C. J. and C. W. Mims. 1979. Introductory mycology. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY. USA.

Arnao, M. B., A. Cano, J. Hernandez-Ruiz, F. Carcia-Canovas and M. Acosta. 1996. Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of 2,2'-azino-bis (3-ethylbiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase : a new approach for determining total antioxidant status of food. Anal. Biochem. 236: 255-261.

Brauer, H. 1985. Stirred Vessel Reactors. Biotechnology, Vol. 2, Chap.19, Pp.

395-444. Weinheim, New York. 395-444.

Breene, W. M. 1990. Nutritional and medical value of specialty mushrooms. J. Food Prot. 53: 883-894.

Chang, S. T. and P. G. Miles. 2004. Mushrooms 2nd Ed. Pp. 2. CRC Press, New York, NY. USA.

Chang, S. T. and P. G. Miles. 1991. Recent trends in world production of cultivated mushrooms. Mushroom J. 503: 15-18.

Chi, J. H., T. M. Ha, Y. H. Kim and Y. D. Rho. 1996. Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. Korean J. Mycol. 24: 214-222.

Choi, K.H. and C. W. Lee. 2000. Submerged culture of *Phellinus linteus* in a stirred tank fermentor and an airlift fermentor. J. Korean Inst. Chem. Eng. 38: 310-315.

Decker, E. A. and B. Welch. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. J. Agric. Food Chem., 38: 647-677.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem. 28 (3): 350-356.

Eyal, J. 1991. Mushroom mycelium growth in submerged culture-potential food applications. Biotechnology and Food Ingeredints, ed. Goldberg, I. and Williams, R., Van Nostrand Reinhold, New York. 31-64

Feustel, I. C. and H. Humfeld. 1946. A new laboratory fermenter for Yeast production investigations. J. Bacteriol. 52(2): 229-235.

- Forage, R. G., D. E. F. Harrison and D. E. Pitt. 1985. Effect of environment on microbial activity. *Compr. Biotechnol.* 1: 253-279.
- Gallois, A. Gross, B. Langlois, D. Spinnler, H. E. and P. Brunerie. 1990. Influence of culture conditions on production of flavor compounds by 29 ligninolytic Basidiomycetes. *Mycol. Res.* 94(4): 494-504.
- Halliwell, B., M. A. Murcia, S. Chirico and O. I. Aruoma. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo : what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 7-20.
- Han, S. B., C. W. Lee, J. S. Kang, Y. D. Yoon, K. H. Lee, K. Lee, S. K. Park and H. M. Kim. 2006. Acidic polysaccharide From *Phellinus linteus* inhibits melanoma cell metastasis by blocking cell adhesion and invasion. *Int. Immunopharmacol.* 6(4): 697-702.
- Hikino, H., C. Konno, Y. Mirin and T. Hayashi. 185 Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Medica.* 4: 339-340.
- Hur, J. M., C. H. Yang, S. H. Han, S. H. Lee, Y. O. You, J. C. Park and K. J. Kim. 2004. Antibacterial effect of *Phellinus linteus* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia.* 75(6): 603-605.
- Hwang, H. J., S. W., Kim, J. M. Lim, J. H. Joo, H. O. Kim, H. M. Kim and J. W. Yun. 2005. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 76: 3069-3080.
- Hwang, H. J., S. W., Kim, C. P. Xu, J. W. Choi and J. W. Yun. 2003a.

Production and molecular characteristics of four groups of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus gilvus*. J. Appl. Microbiol. 94: 708-719.

Hwang, H. J., S. W. Kim, C. P. Xu, J. W. Choi and J. W. Yun. 2003b. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. Enzyme Microb. Technol. 33: 309-319.

Humfeld, H. 1948. The production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in submerged culture. Sci. 107: 373.

Humfeld, H. 1947. An improved laboratory-scale fermenter for submerged culture investigations. J. Bacteriol. 54(6): 89-696.

Kang, T. S., D. G. Lee and S. Y. Lee. 1997. Isolation and mycelial cultivation submerged of *Phellinus spp.* Korean J. Mycol. 25: 57-267.

Kiho, T., J. Hui, A. Yamane and S. Ukai. 1993. Polysaccharides in fungi. XXXII. Hypoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharide from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis*. Biol. Pharm. Bull. 16: 1291-1293.

Kim, G. Y., J. Y. Lee, J. O. Lee, C. H. Ryu, B. T. Choi, Y. K., Jeong, K. W. Lee, S. C. Jeong and Y. H. Choi. 2006. Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinus linteus*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70: 1218-1226.

Kim, G. Y., W. K. Oh, B. C. Shin, Y. I. Shin, Y. C. Park, S. C. Ahn, J. D. Lee,

- Y. S. Bae, J. Y. Kwak and Y. M. Park. 2004c. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* inhibits tumor growth through mechanisms leading to an activation of CD11c⁺ CD8⁺ DC and type I helper T cell-dominant immune state. FEBS Lett. 576: 391-400.
- Kim, G. Y., Y. H. Oh and Y. M. Park. 2003a. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* induces nitric oxide-mediated tumoricidal activity of macrophages through protein tyrosine kinase and protein kinase C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 309(2): 399-407.
- Kim, S. W., H. J. Hwang, C. P. Xu, J. M. Sung, J. W. Choi and J. W. Yun. 2003b. Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. J. Appl. Microbiol. 94: 120-126.
- Kim J. L., H. K. Kwon, G. T. Chun, K. J. Kim and K. K. Lee. 2000. Studies on cultural characteristics for high density fermentation of *Phellinus linteus* WI-001. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 105-110.
- Kim, D. H., B. K. Yang, S. C. Jeong, J. B. Park, S. B. Cho, S. Das, J. W. Yun and C. H. Song. 2001. Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*. Biotechnol. Lett. 23: 513-517.
- Kim, H. M., S. B. Han, G. T. Oh, Y. H. Kim, D. H. Hong, N. D. Hong and Yoo, I. D. 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. Int. J. Immunopharmac. 18: 259-303.
- Kim, H. O., J. M. Lim, J. H. Joo, S. W. Kim, H. J. Hwang, J. W. Choi and J.

- W. Yun. 2005. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresour. Technol.* 96: 1175-1182.
- Kim, S. H., H. S. Lee, S. Lee, J. Cho, K. Ze, J. Sung and Y. C. Kim. 2004b. Mycelial culture of *Phellinus linteus* protects primary cultured rat hepatocytes against hepatotoxins. *J. Ethnopharmacol.* 95: 367-372.
- Kim, Y. S., K. S. Park, H. K. Park and S. W. Kim. 1994. Compositional sugar analysis of antitumor polysaccharides by high performance liquid chromatography and gas chromatography. *Arch. Pharm. Res.* 17: 337-342.
- Kim, S. H., Y. S. Song, S. K. Kim, B. C. Kim, C. J. Lim and E. H. Park. 2004. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. *J. Ethnopharmacol.* 93(1): 141-146.
- Ko, Y. T. and Y. L. Lin. 2004. 1,3- β -glucan quantification by a fluorescence microassay and analysis of its distribution in foods. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3313-3318.
- Lee, J. H., S. M. Cho, K. S. Ko and I. D. Yoo. 1995. Effect of cultural condition on polysaccharide production and its monosaccharide composition in *Phellinus linteus*. *Korean J. Mycol.* 23: 325-331.
- Lee, K. M., S. Y. Lee and H. Y. Lee. 1999. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermenter. *J. Biosci. Bioeng.* 88: 646-650.

- Lee, B. C., J. T. Bae, H. B. Pyo, T. B. Choe, S. W. Kim, H. J. Hwang and J. W. Yun. 2004. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme Microb. Technol.* 35: 369-376.
- Lee, I. K. and B. S. Yun. 2007. Highly oxygenated and unsaturated metabolites providing a diversity of hispidin class antioxidants in the medicinal mushrooms *Inonotus* and *Phellinus*. *Bioorg. Med. Chem.* 15: 3309-3314.
- Li, G., D. H. Kim, T. D. Kim, B.J. Park, H. D. Park, J. I. Park, M. K. Na, H. C. Kim, N. D. Hong, K. Lim, B. D. Hwang and W. H. Yoon. 2004. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 216(2): 175-181.
- Li, X., L. L. Jiao, X. Zhang, W. M. Tian, S. Chen and L. P. Zhang. 2008. Anti-tumor and immunomodulating activities of proteoglycans from mycelium of *Phellinus igniarius* and culture medium. *Int. immunopharmacol.* 8: 909-915.
- Lim, D. 1998. *Microbiology*. 2nd Ed. Pp. 132-133. WCB/Mcgraw-Hill, New York, NY. USA.
- Litchfield, J. H. 1967. Submerged Culture of Mushroom Mycelium. In : *Microbiology Technology*, Peppler, H. J. Ed. Pp. 107-144, Reinhold Publishing Corporation, New York, NY. USA.
- Martin, S. M. 1964. Conservation of microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 18: 1-16.

- Miller, N. J., C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan and A. Milner. 1993. A novel method for measuring antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84: 407-412.
- Margaritis, A. and J. E. Zajic. 1978. Biotechnology Review-mixing, mass transfer, and scale-up of polysaccharide fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 2: 939-1001.
- Metz, B. and N. W. F. Kossen. 1977. The growth of molds in the form of pellets : Literature review. *Biotechnol. Bioeng.* 19: 781-799.
- Mizuno, T. 1995. Bioactive biomolecules of mushrooms: Food function and medicinal effect. *Food Rev. Int.* 11: 151-161.
- Morigiwa, A., K. Kitabatake, Y. Fujimoto and N. Ikekawa. 1986. Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull* 34(7): 3025-3028.
- Oyaizu, M. 1986. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 35: 771-775.
- Park, J., B. R. Lee, L. H. Jin, C. K. Kim, K. S. Choi, J. H. Bahn, K. S. Lee, H. Y. Kwon, H. W. Chang, N. I. Baek, E. H. Lee, J. H. Kang, S. W. Cho and S. Y. Choi. 2001a. The stimulatory effect of *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus* on the antioxidant enzyme catalase. *J. Biochem. Mol. Biol.* 34: 144-149.
- Park, J. P., S. W. Kim, H. J. Hwang and J. W. Yun. 2001. Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and

exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. Lett. Appl. Microbiol. 33: 6-81.

Rau, U., E. Gura, E. Olszewski and F. Wagner. 1992. Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. J. Ind. Microbiol. 9: 19-26.

Sakagami, H., M. Ikeda and K. Konno. 1989. Stimulation of tumor necrosis factor-induced human myelogenous leukemic cell differentiation by high molecular weight PSK subfraction. Biochem. Biophys. Res. Commun. 162: 597-603.

Sakagami, H., T. Aoki, A. Simpson and S. Tanum. 1991. Induction of immunopotential activity by a protein-bound polysaccharide, PSK. Anticancer Res. 11: 993-1000.

Seviour, R. J. and B. Kristiansen. 1983. Effect of ammonium ion concentration on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17: 178-181.

Shimada, K., K. Fujikawa, K. Yahara and T. Nakamura. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agric. Food Chem. 40: 945-948.

Shon, M. Y., T. H. Kim and N. J. Sung. 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. Food Chem. 82: 593-597.

Shu, C. H. and M. Y. Lung. 2004. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia*

camphorata in batch cultures. *Process Biochem.* 39(8): 931-937.

Song, Y. S., S. H. Kim, J. H. Sa, C. Jin, C. J. Lim and E. H. Park. 2003.

Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. *J. Ethnopharmacol.* 88(1): 113-116.

Song, K. S., S. M. Cho, J. H. Lee, H. M. Kim, S. B. Han, K. S. Ko and I. D.

Yoo. 1995. B-lymphocyte-stimulating polysaccharides from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.* 43(12): 2105-2108.

Taurhesia, S. and B. McNeil. 1994. Physicochemical factors affecting the

formation of the biological response modifier scleroglucan. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 59: 157-163.

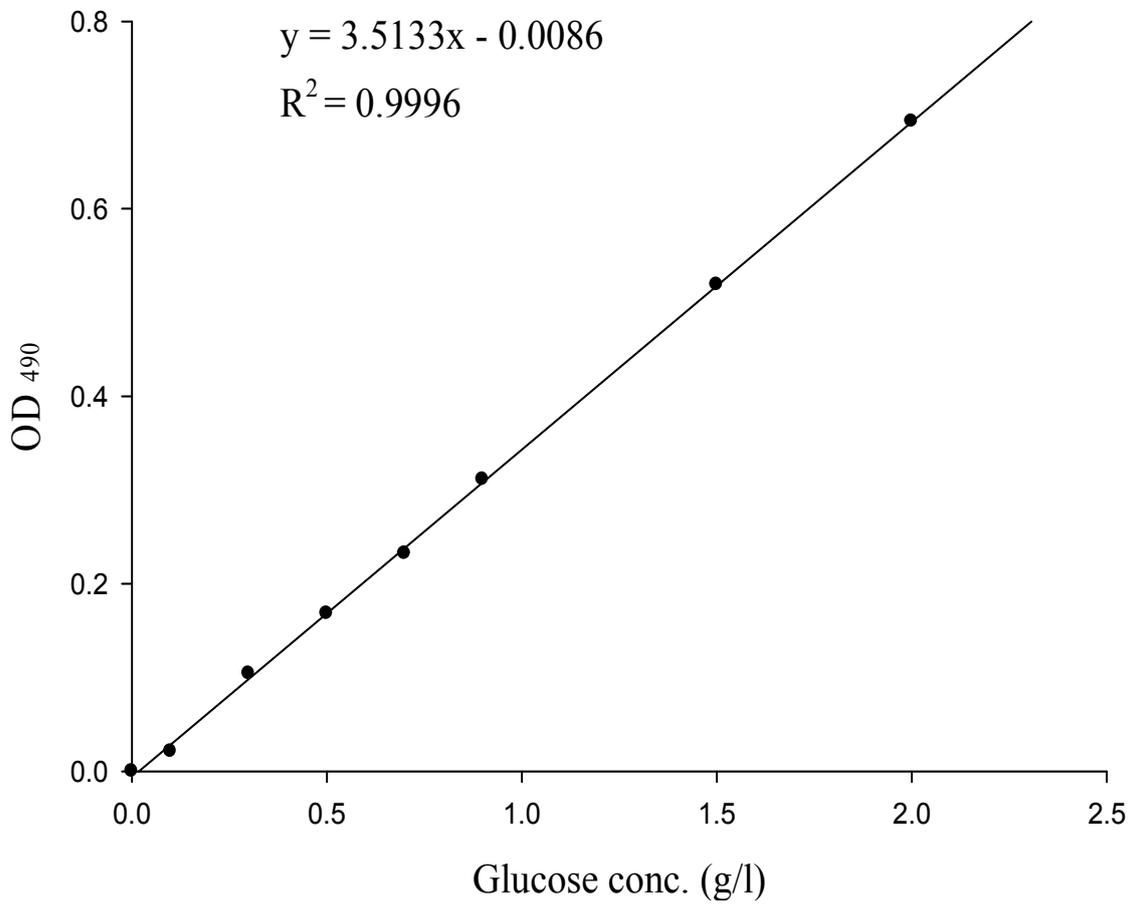
Wang, Y. and B. McNeil. 1995. Effect of temperature on scleroglucan

synthesis and organic acid production by *Sclerotium glaucanicum*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 17: 893-899.

Xu, C. P., S. W. Kim, H. J. Hwang, J. W. Choi and J. W. Yun. 2003.

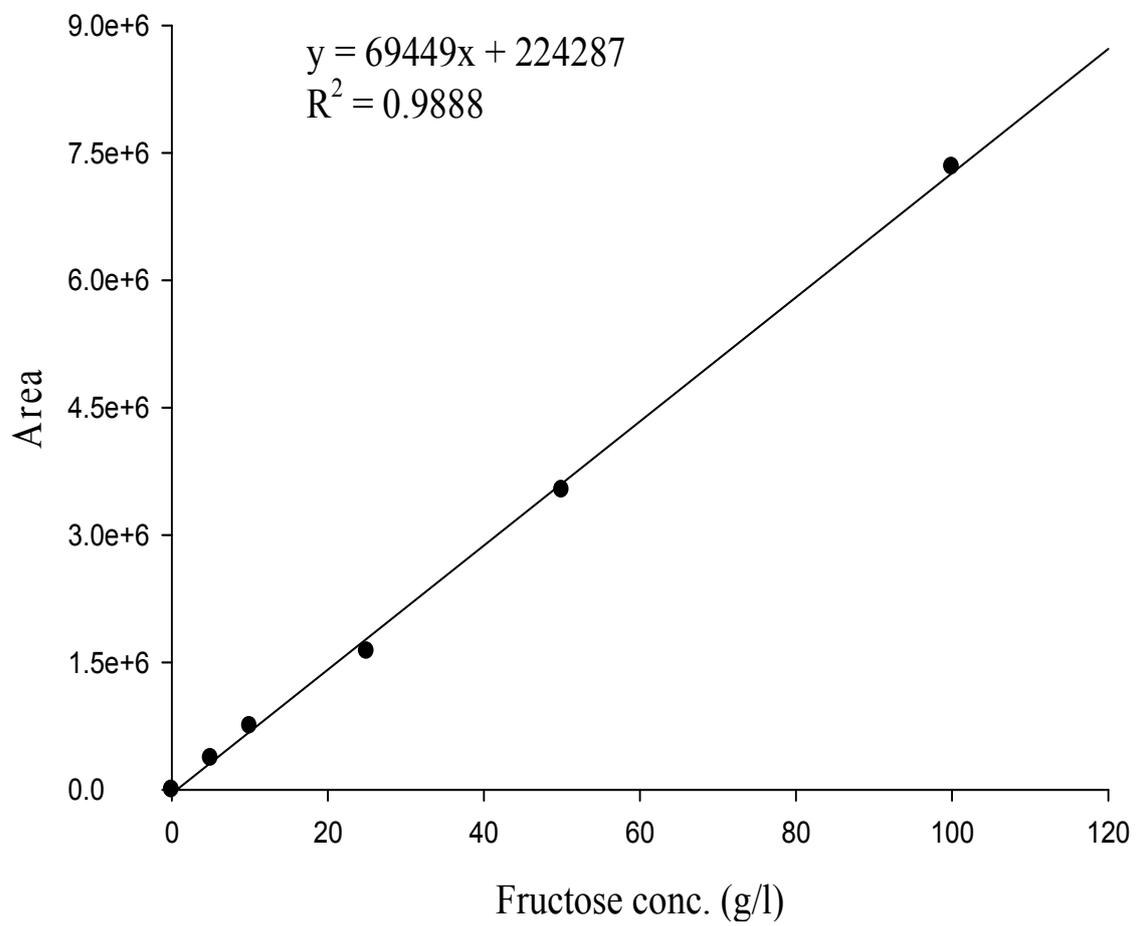
Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. *Process Biochem.* 38: 1025-1030.

柒、附錄



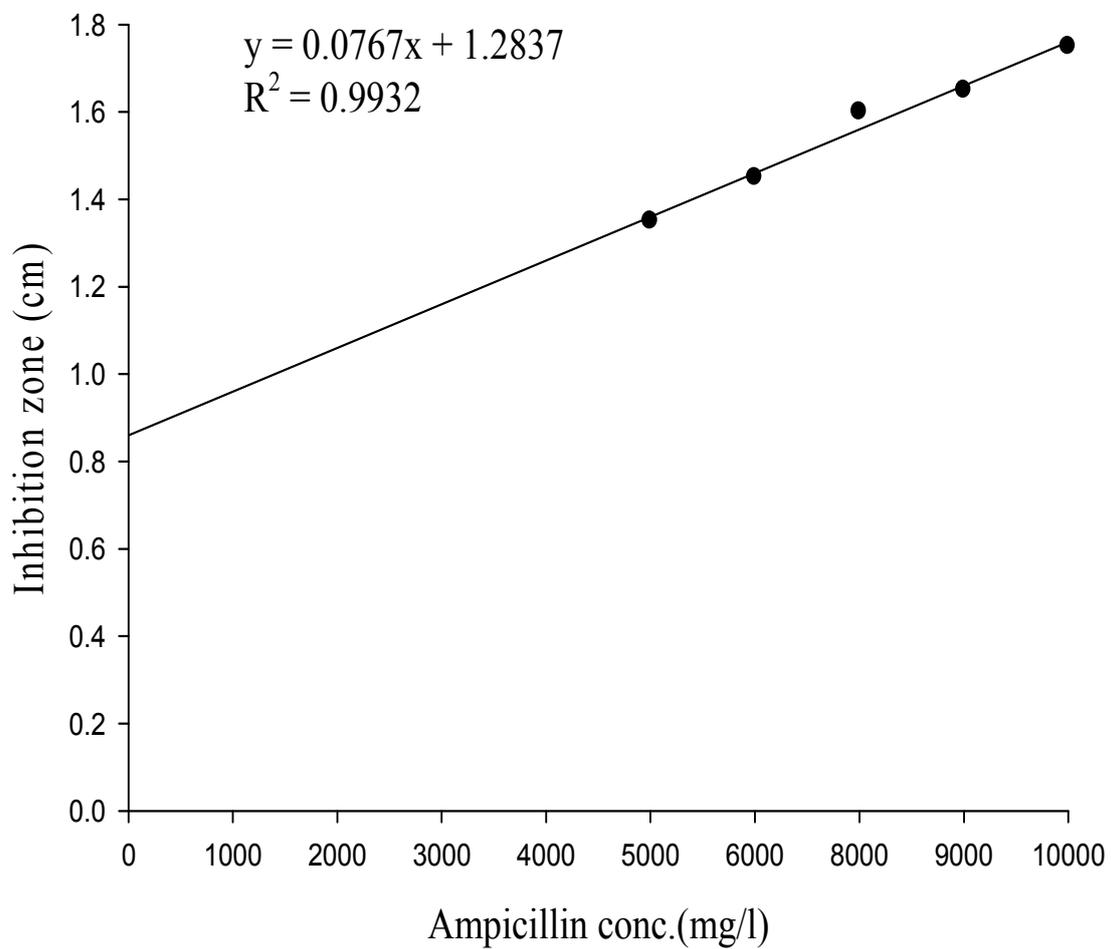
附圖一 酚硫酸法之葡萄糖標準曲線。

Appendix Fig.1 Glucose standard curve of phenol-sulfuric acid method.



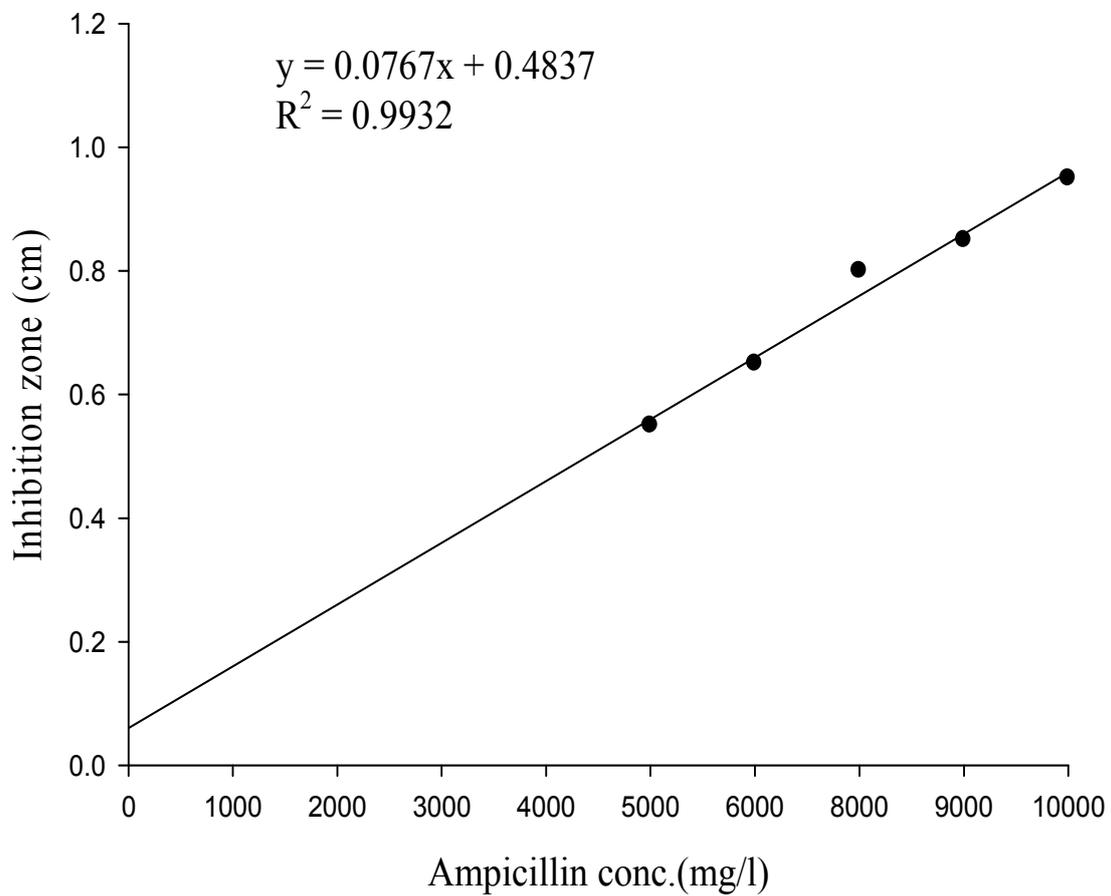
附圖二 果糖之 HPLC 殘糖檢量線。

Appendix Fig. 2 The calibration curve of fructose analysis by HPLC.



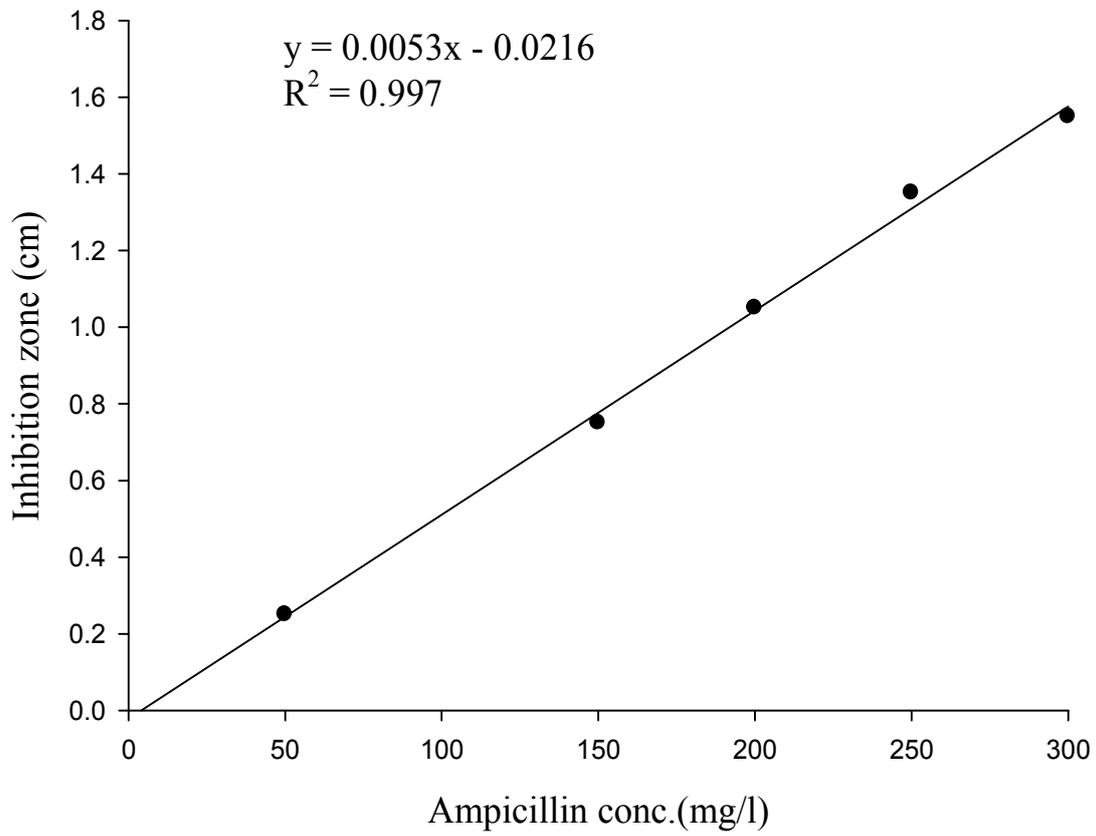
附圖三 Ampicillin 對病原菌 *Bacillus cereus* 抑菌環之標準曲線。

Appendix Fig. 3 Standard curve of inhibition zone of *Bacillus cereus* by ampicillin.



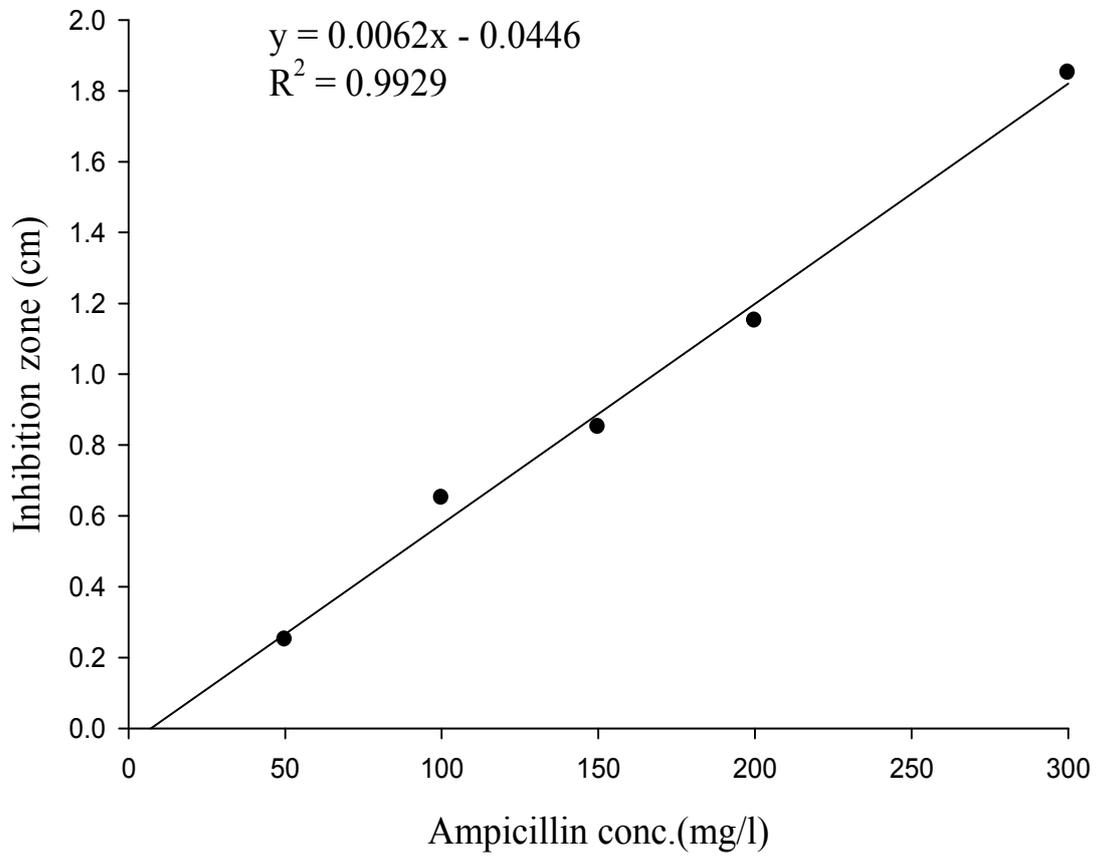
附圖四 Ampicillin 對病原菌 *Pseudomonas aeruginosa* 抑菌環之標準曲線。

Appendix Fig. 4 Standard curve of inhibition zone of *Pseudomonas aeruginosa* by ampicillin.



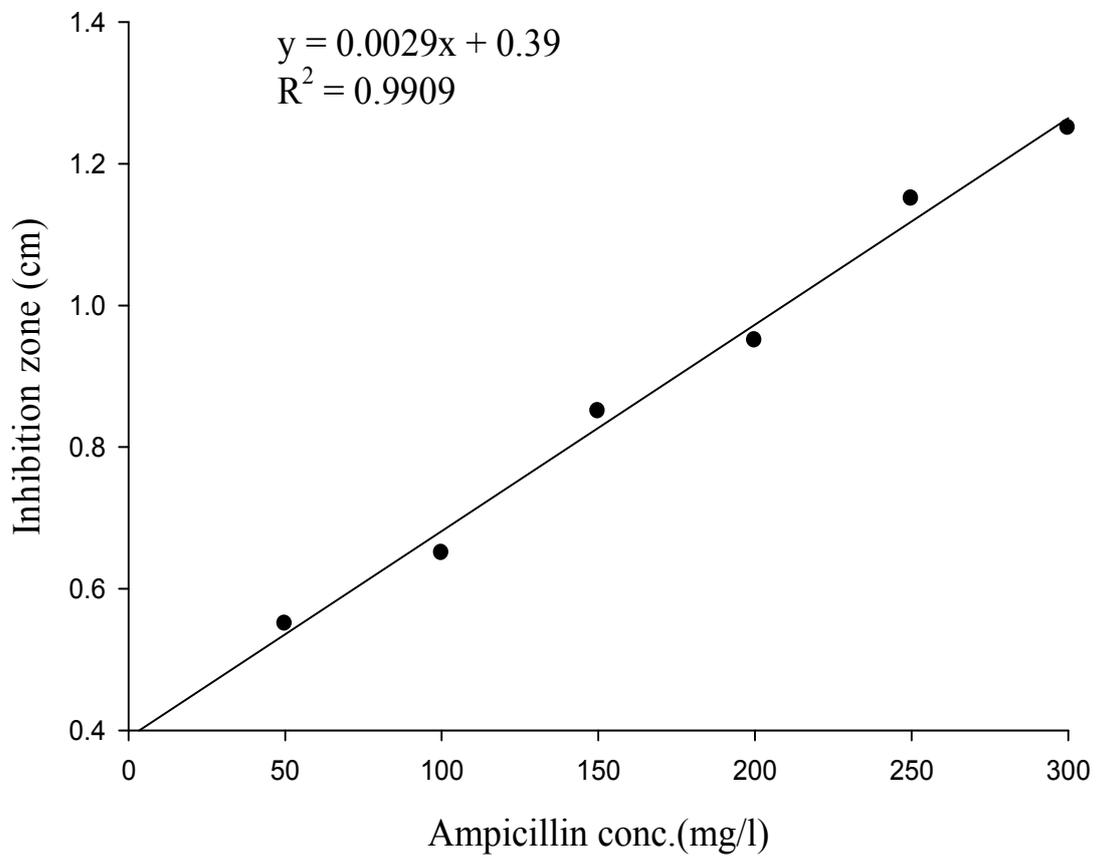
附圖五 Ampicillin 對病原菌 *Escherichia coli* 抑菌環之標準曲線。

Appendix Fig. 5 Standard curve of inhibition zone of *Escherichia coli* by ampicillin.



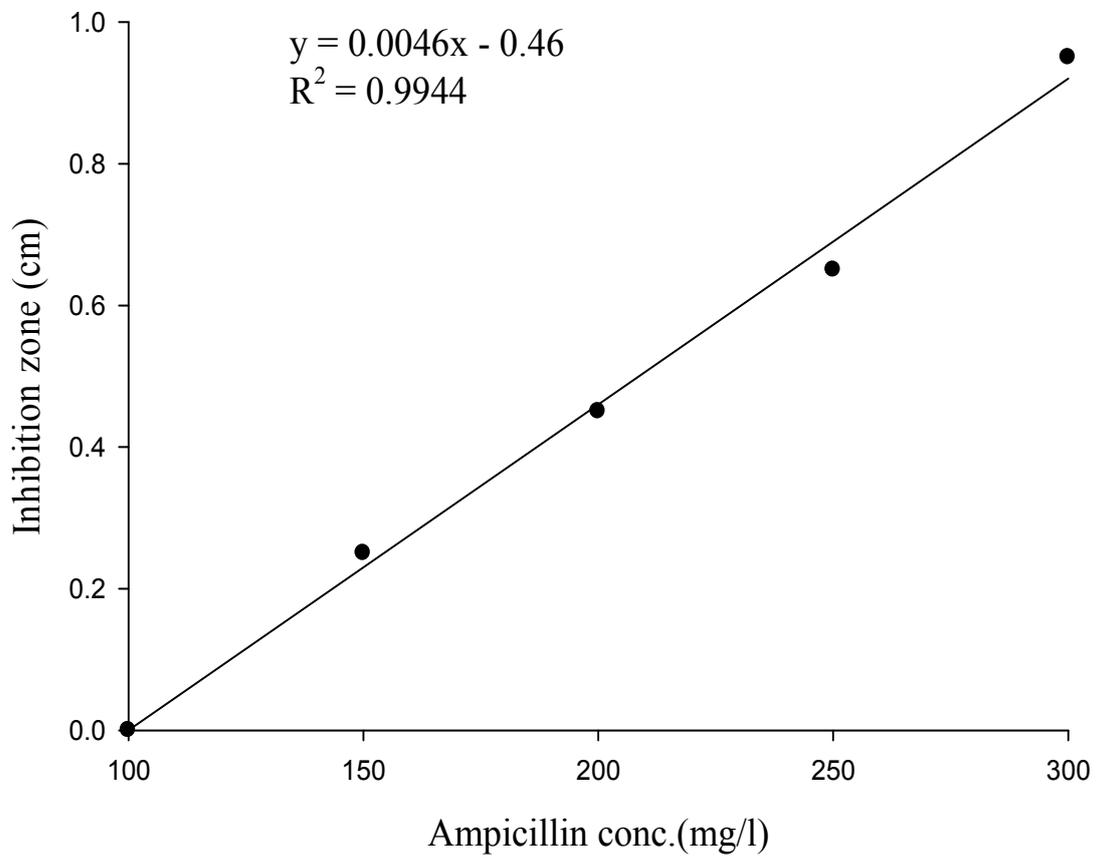
附圖六 Ampicillin 對病原菌 *Salmonella typhimurium* 抑菌環之標準曲線。

Appendix Fig. 6 Standard curve of inhibition zone of *Salmonella typhimurium* by ampicillin.



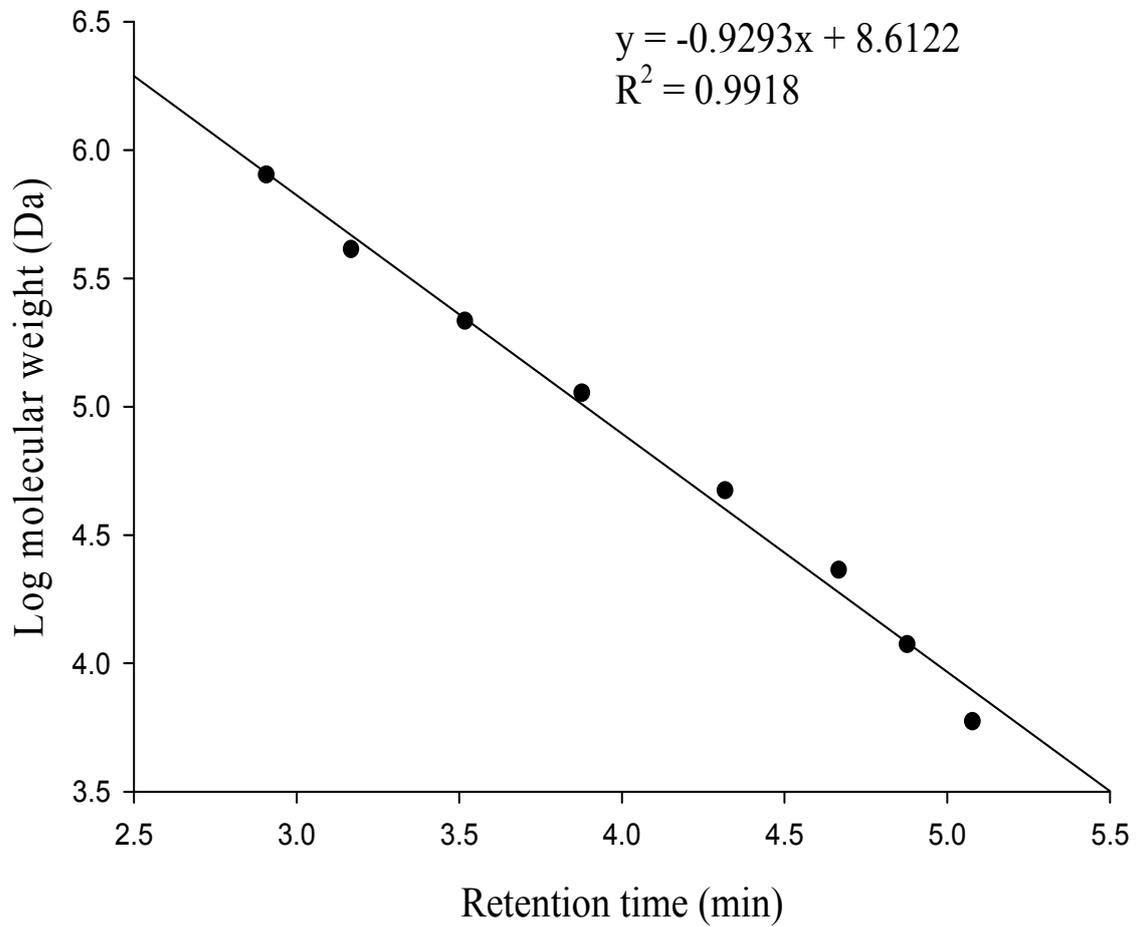
附圖七 Ampicillin 對病原菌 *Staphylococcus aureus* 抑菌環之標準曲線。

Appendix Fig. 7 Standard curve of inhibition zone of *Staphylococcus aureus* by ampicillin.



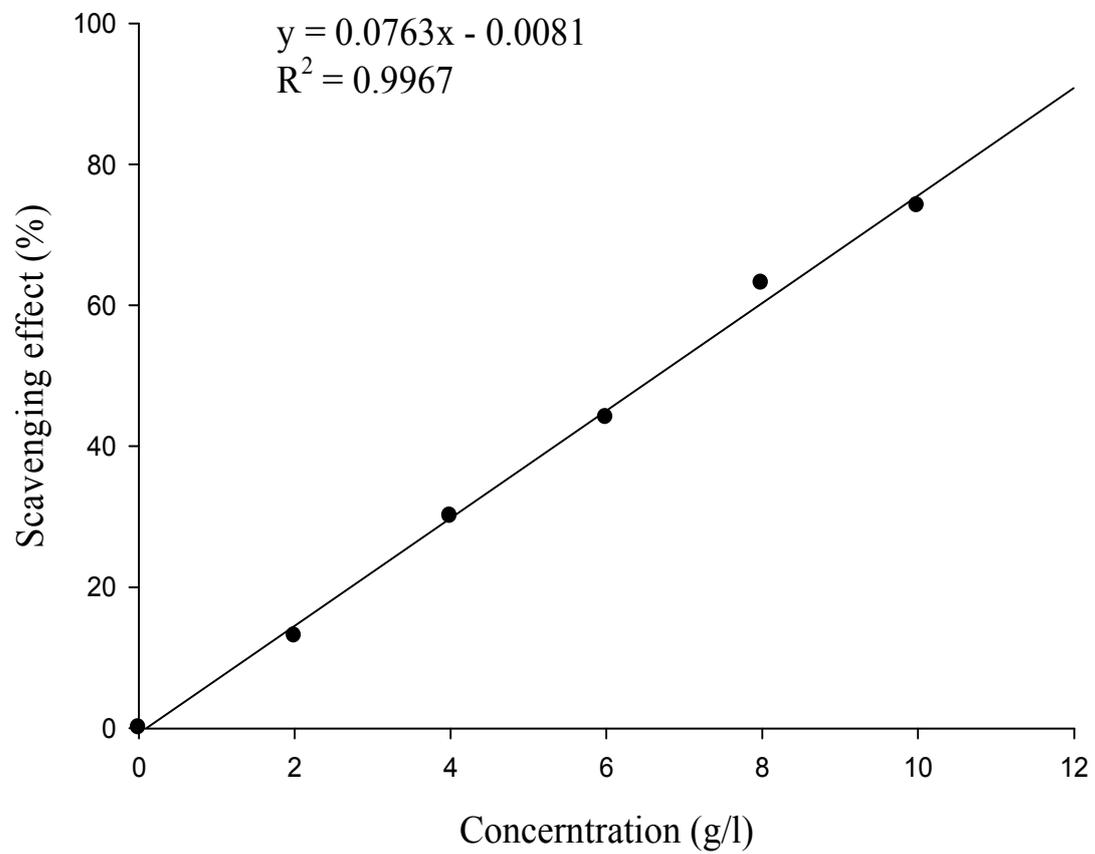
附圖八 Ampicillin 對病原菌 *Listeria monocytogenes* 抑菌環之標準曲線。

Appendix Fig. 8 Standard curve of inhibition zone of *Listeria monocytogenes* by ampicillin.



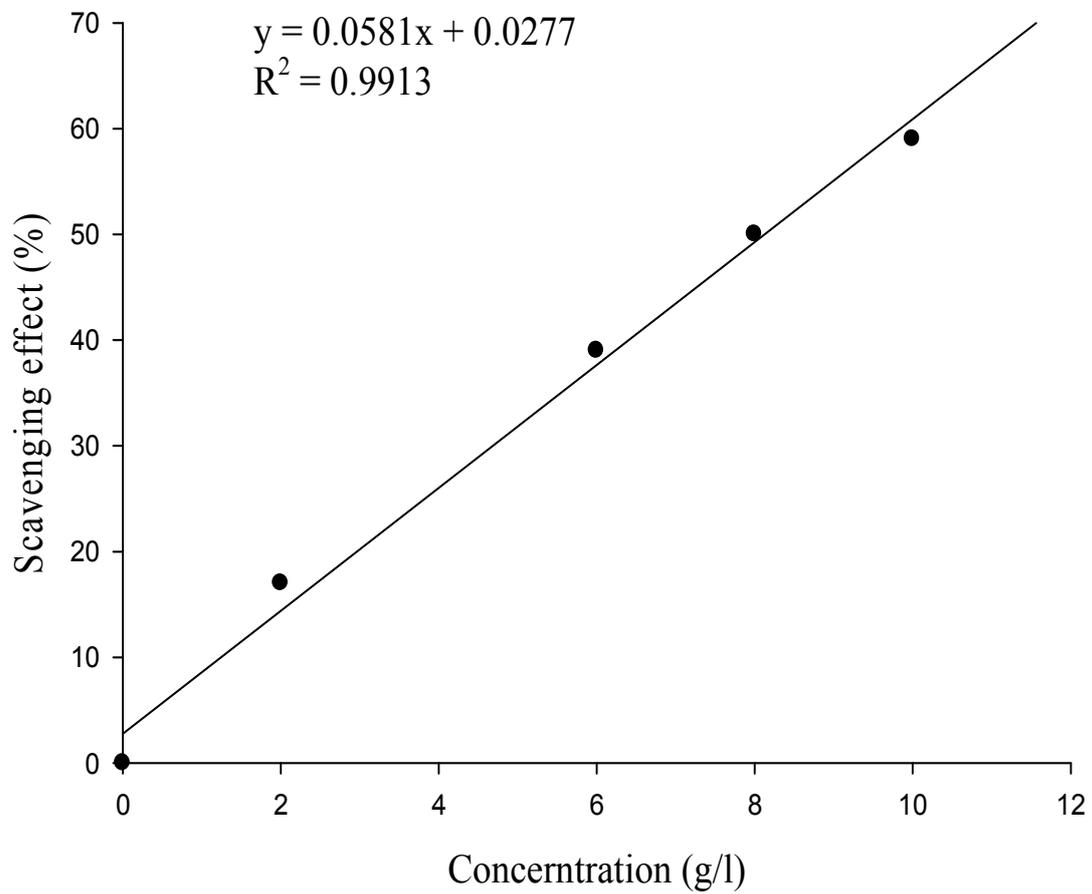
附圖九 多醣體分子量之標準曲線。

Appendix Fig. 9 Molecular weight standard curve of polysaccharide.



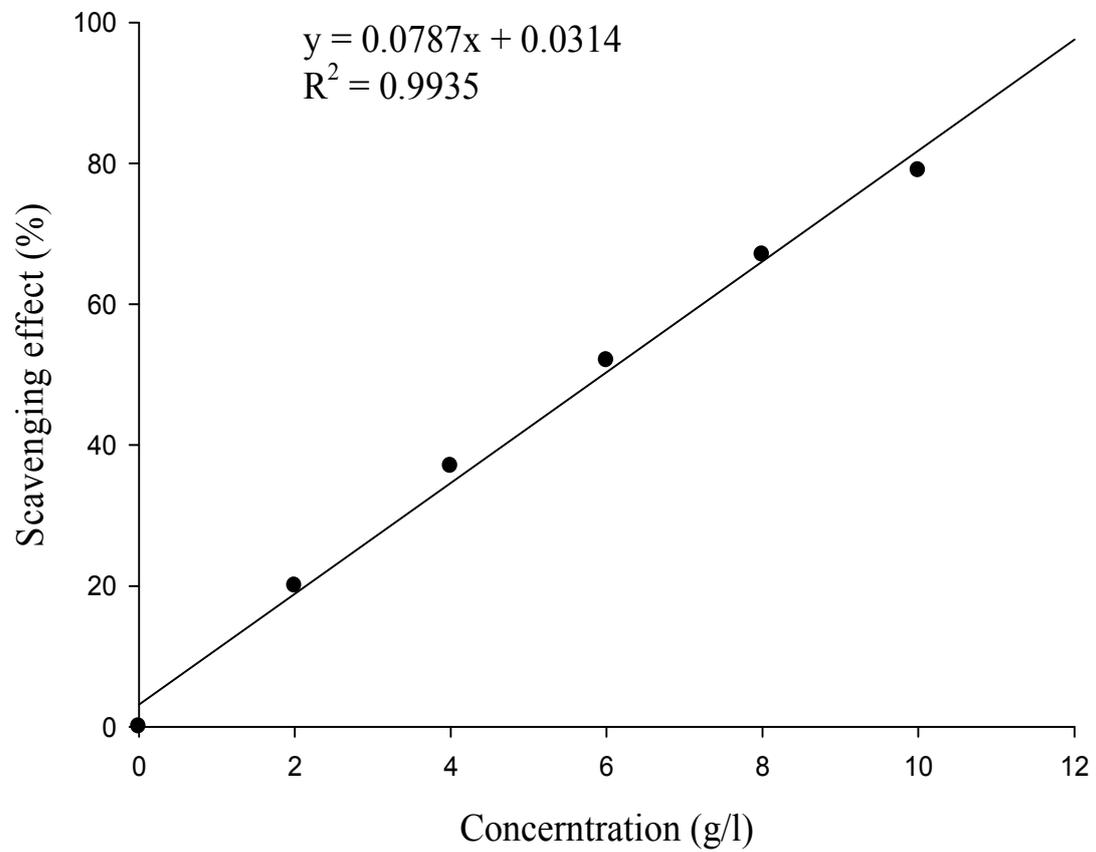
附圖十 搖瓶培養發酵液甲醇萃取物之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。

Appendix Fig. 10 Standard curve of DPPH · scavenging effect by methanolic extract from shake flask.



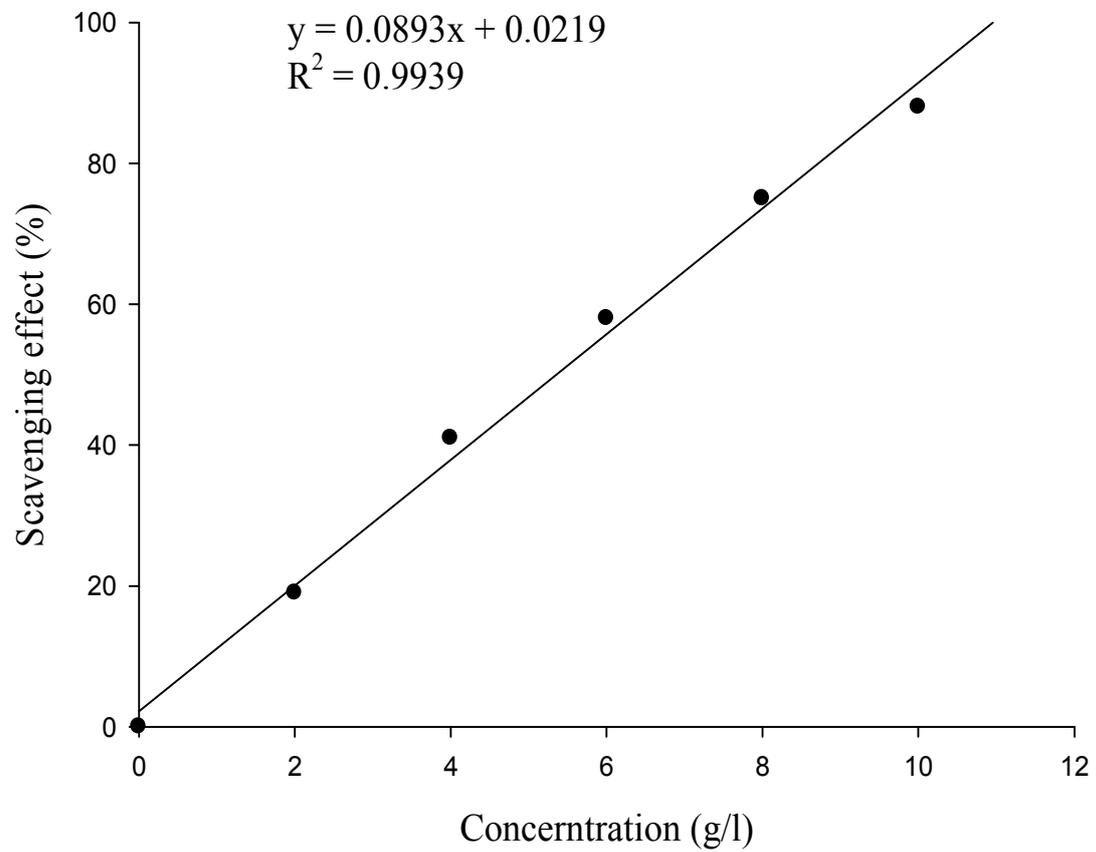
附圖十一 攪拌式發酵槽發酵液甲醇萃取物之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。

Appendix Fig. 11 Standard curve of DPPH · scavenging effect by methanolic extract from stirred-tank fermentor.



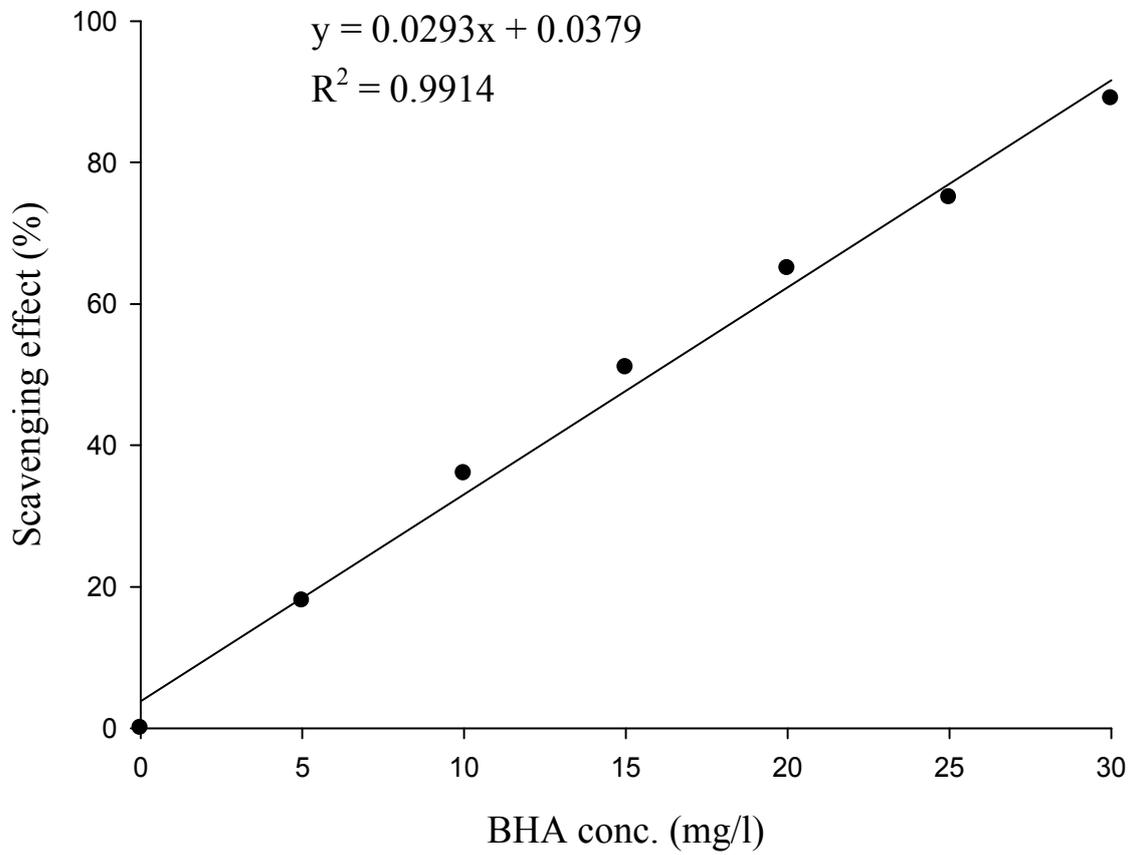
附圖十二 氣泡式發酵槽發酵液甲醇萃取物之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。

Appendix Fig. 12 Standard curve of DPPH · scavenging effect by methanolic extract from air bubble fermentor.



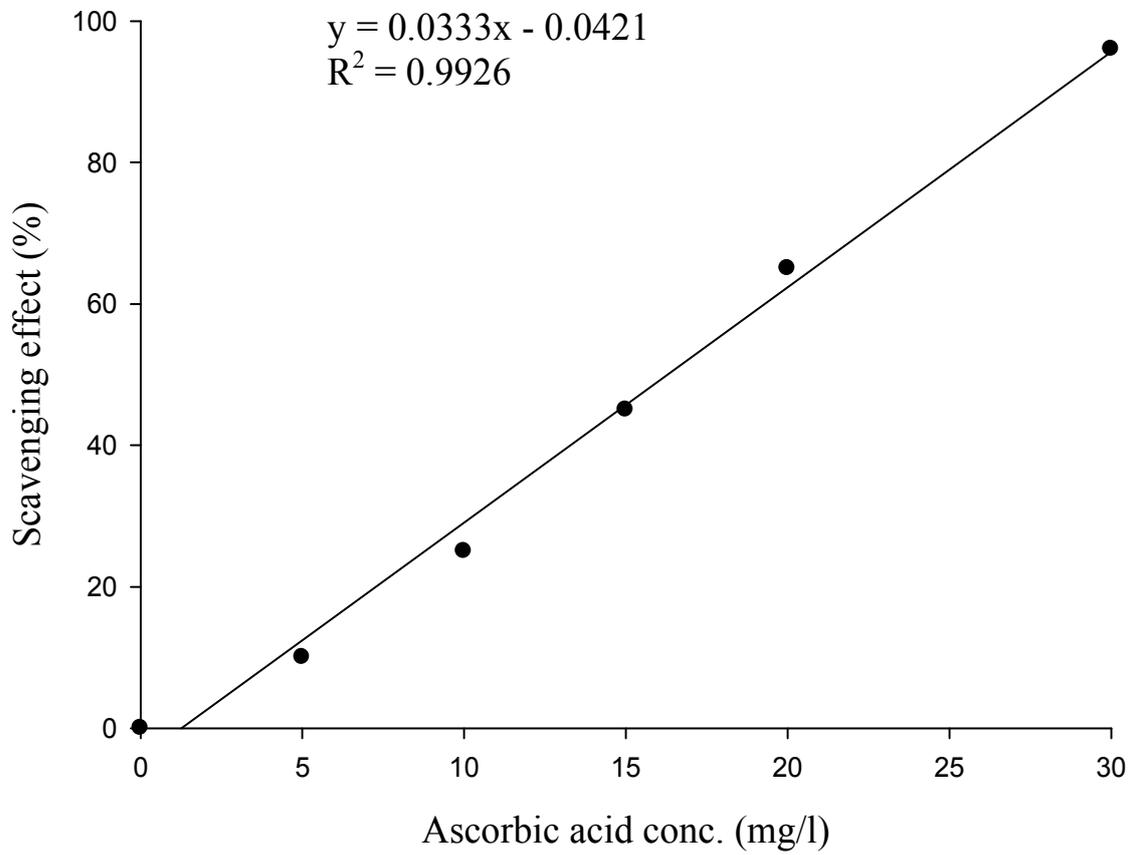
附圖十三 氣舉式發酵槽發酵液甲醇萃取物之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。

Appendix Fig. 13 Standard curve of DPPH · scavenging effect by methanolic extract from air lift fermentor.



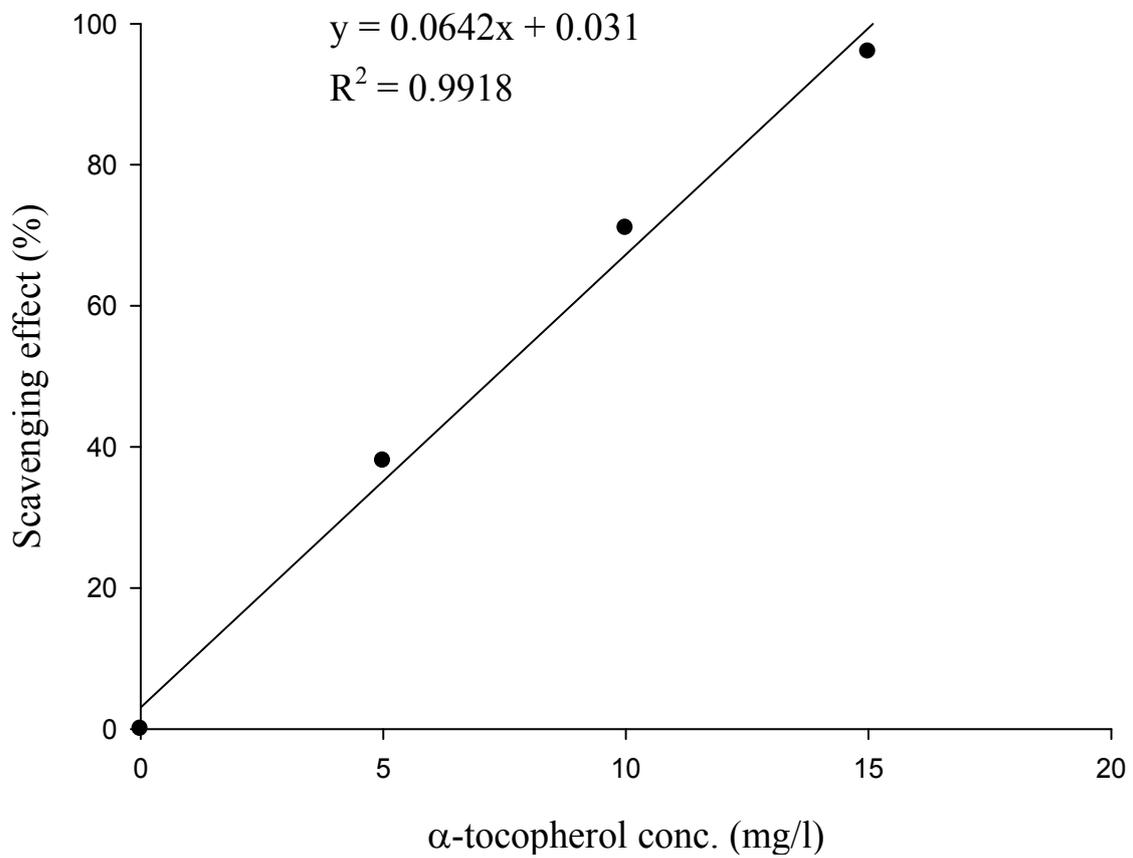
附圖十四 BHA 之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。

Appendix Fig. 14 Standard curve of DPPH · scavenging effect by BHA.



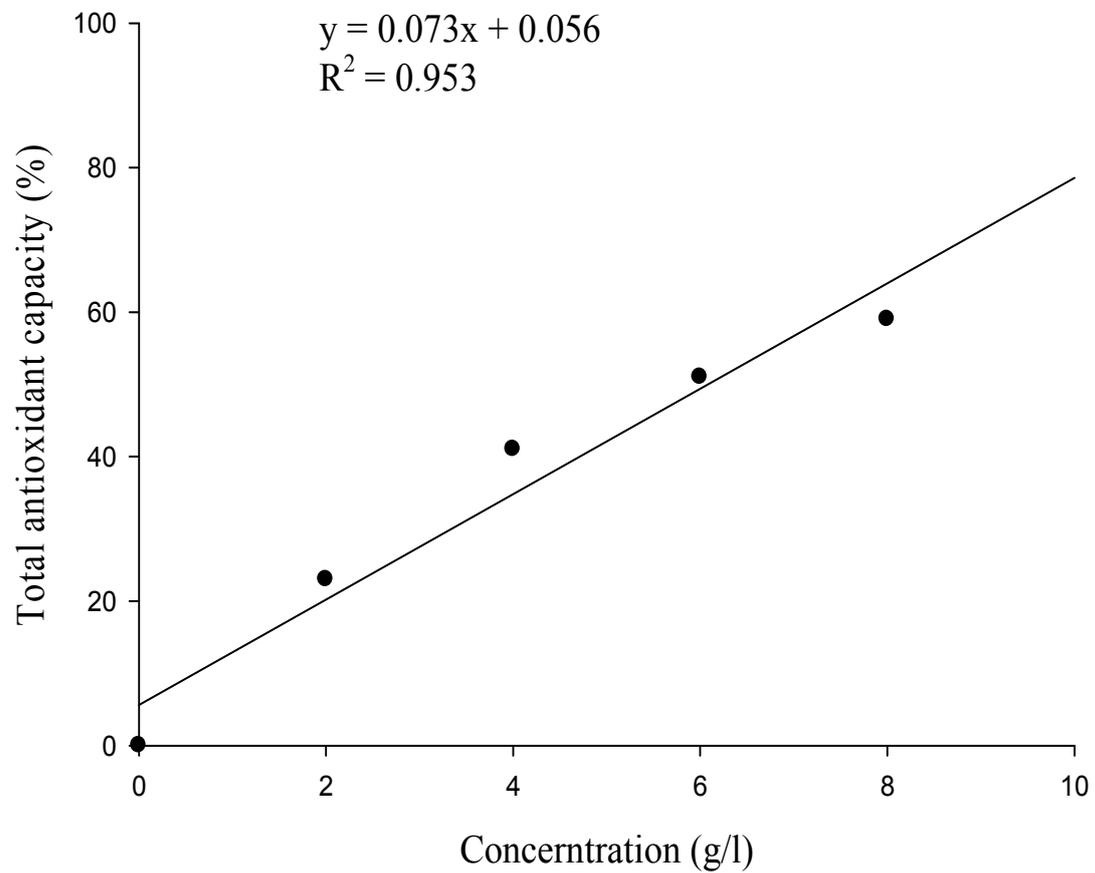
附圖十五 Ascorbic acid 之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。

Appendix Fig. 15 Standard curve of DPPH · scavenging effect by ascorbic acid.



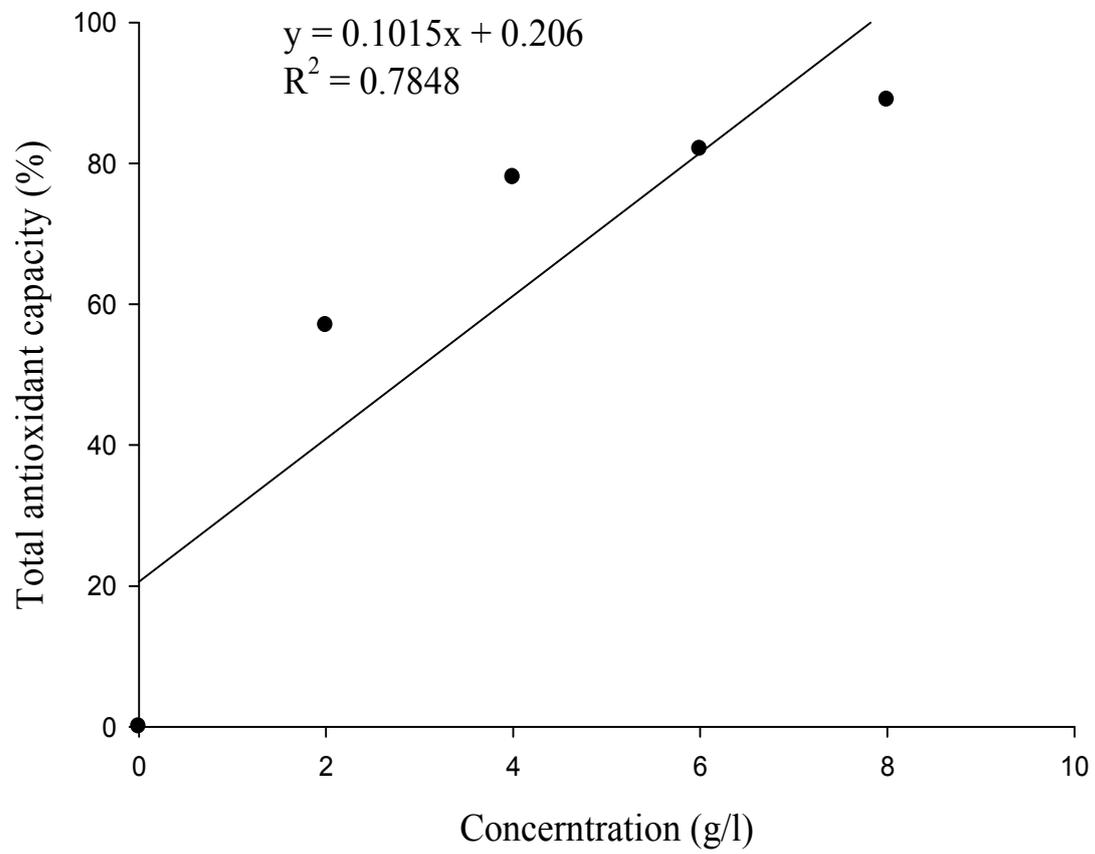
附圖十六 α-tocopherol 之 DPPH 自由基清除能力標準曲線。

Appendix Fig. 16 Standard curve of DPPH · scavenging effect by α-tocopherol.



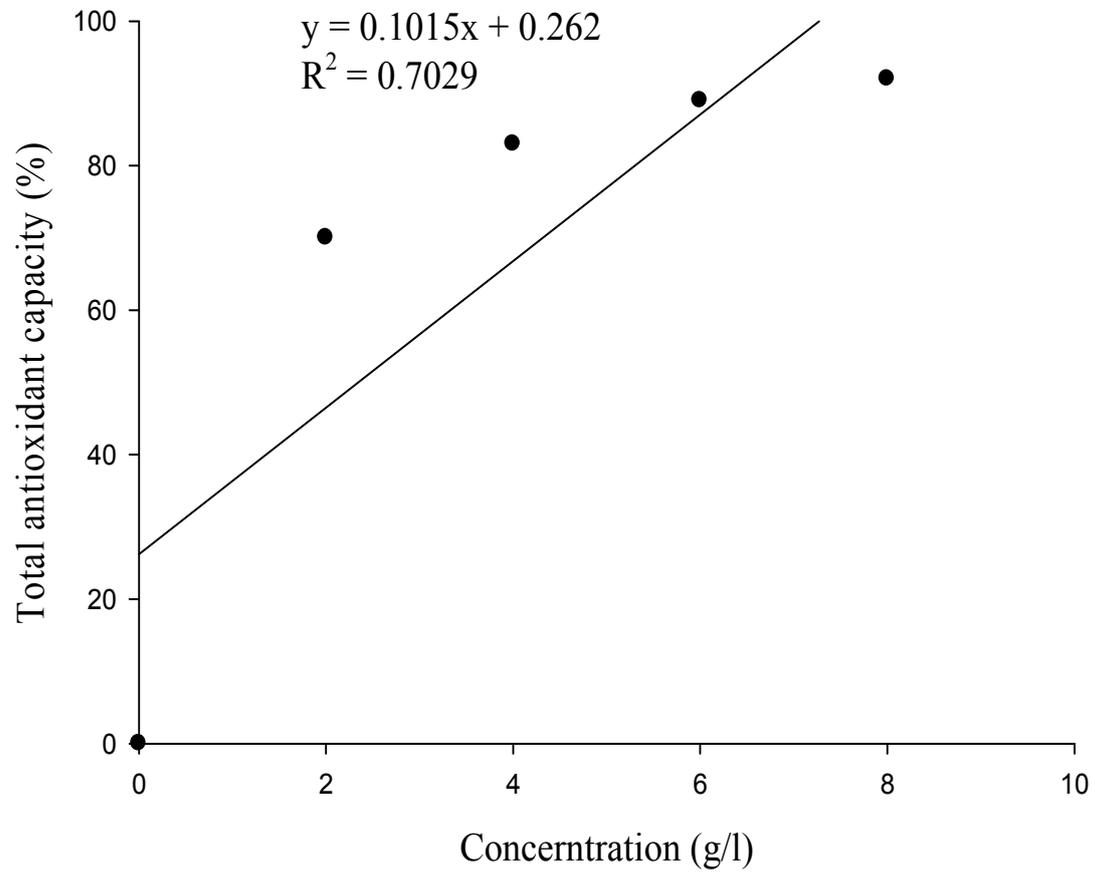
附圖十七 搖瓶培養發酵液之總抗氧化力標準曲線。

Appendix Fig. 17 Standard curve of total antioxidant capacity by fermented culture from shake flask.



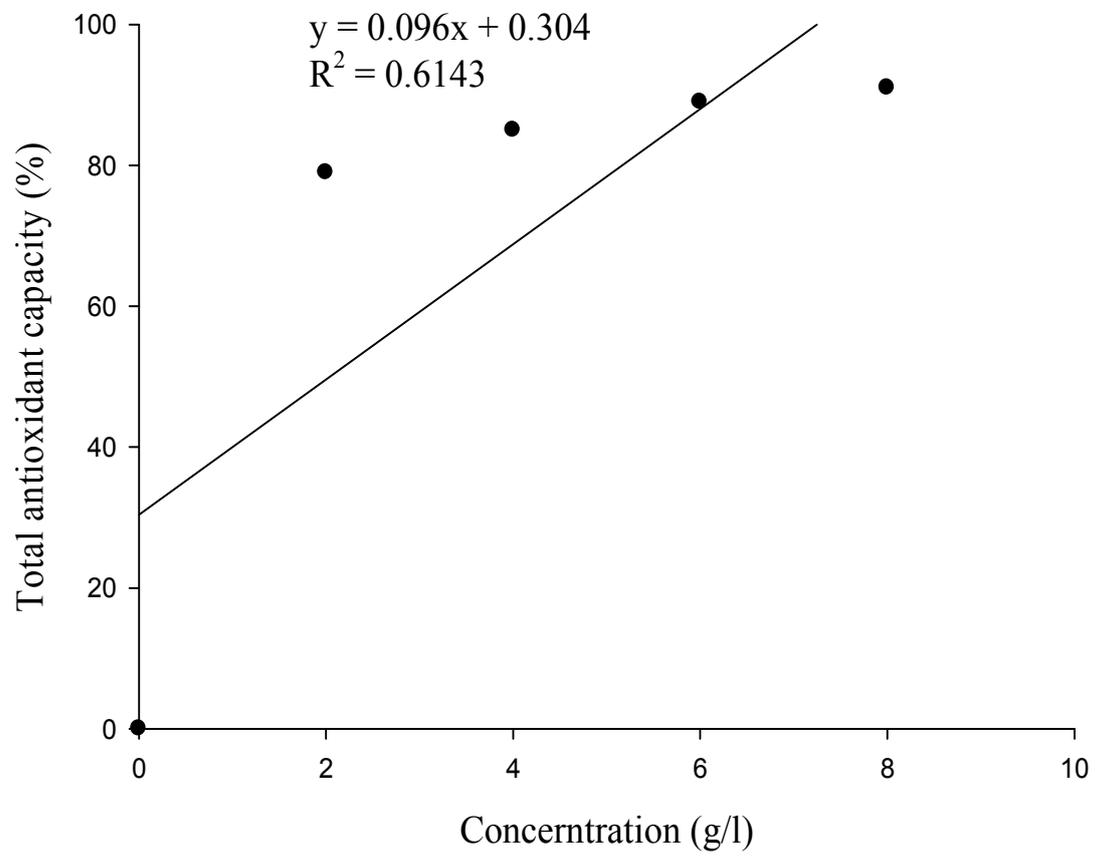
附圖十八 攪拌式發酵槽發酵液之總抗氧化力標準曲線。

Appendix Fig. 18 Standard curve of total antioxidant capacity by fermented culture from stirred-tank fermentor.



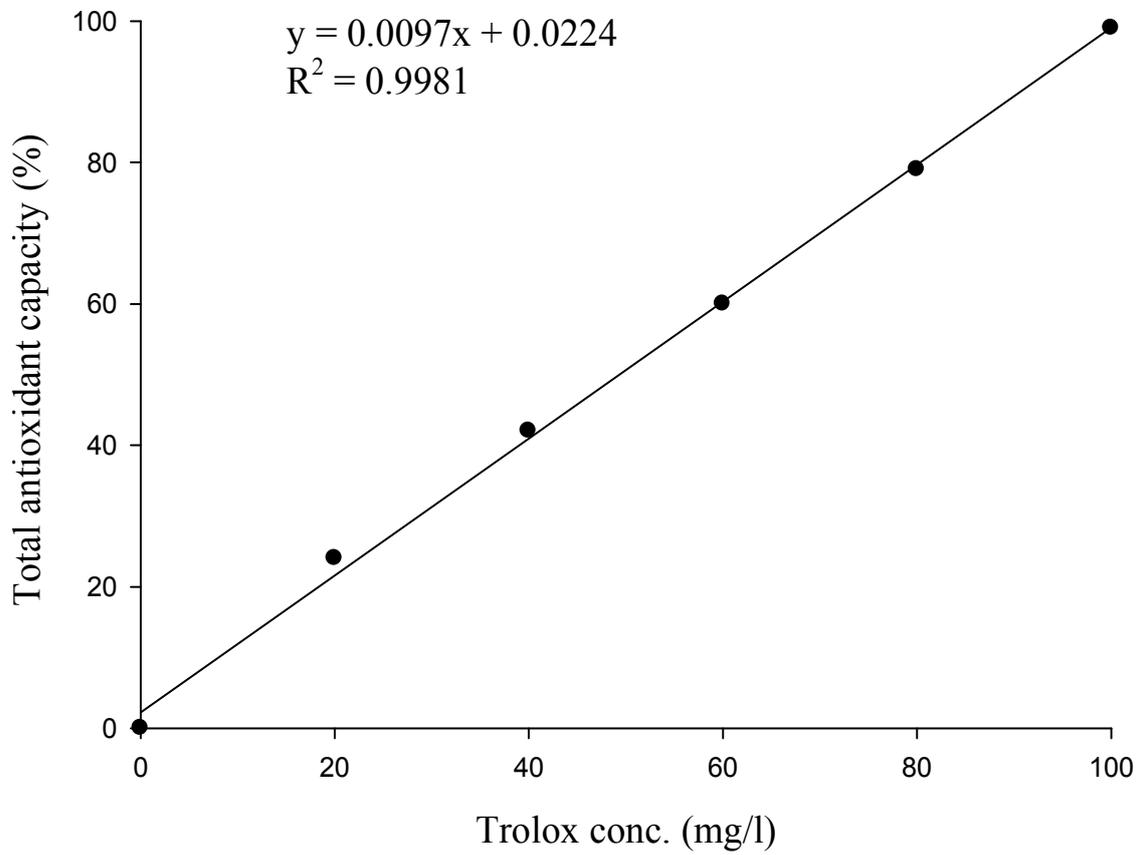
附圖十九 氣泡式發酵槽發酵液之總抗氧化力標準曲線。

Appendix Fig. 19 Standard curve of total antioxidant capacity by fermented culture from air bubble fermentor.



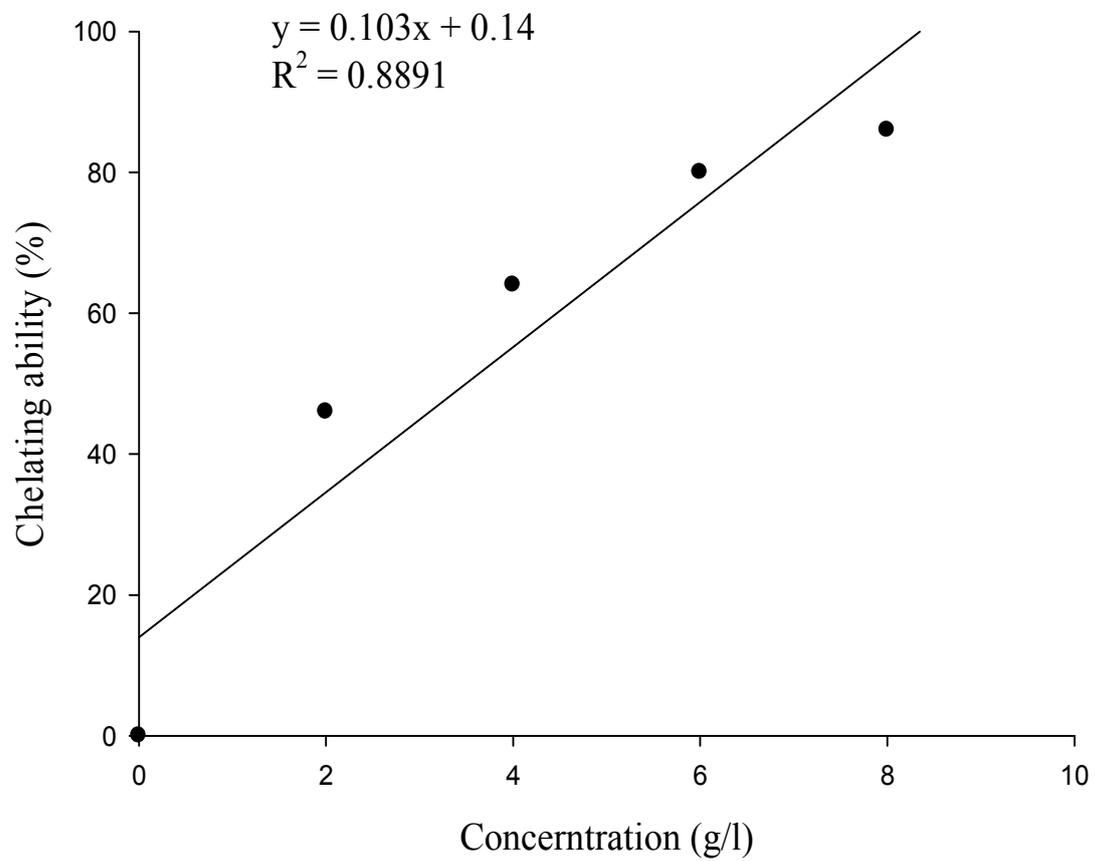
附圖二十 氣舉式發酵槽發酵液之總抗氧化力標準曲線。

Appendix Fig. 20 Standard curve of total antioxidant capacity by fermented culture from air lift fermentor.



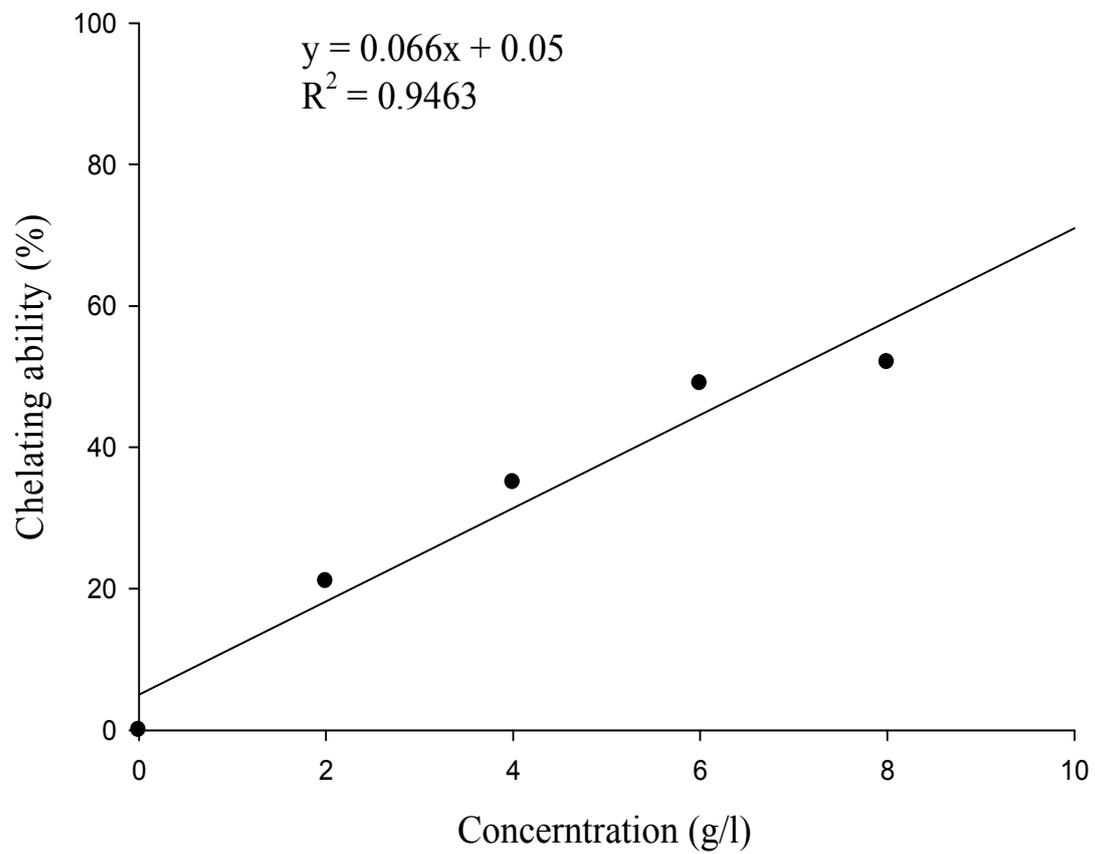
附圖二十一 Trolox 之總抗氧化力標準曲線。

Appendix Fig. 21 Standard curve of total antioxidant capacity by Trolox.



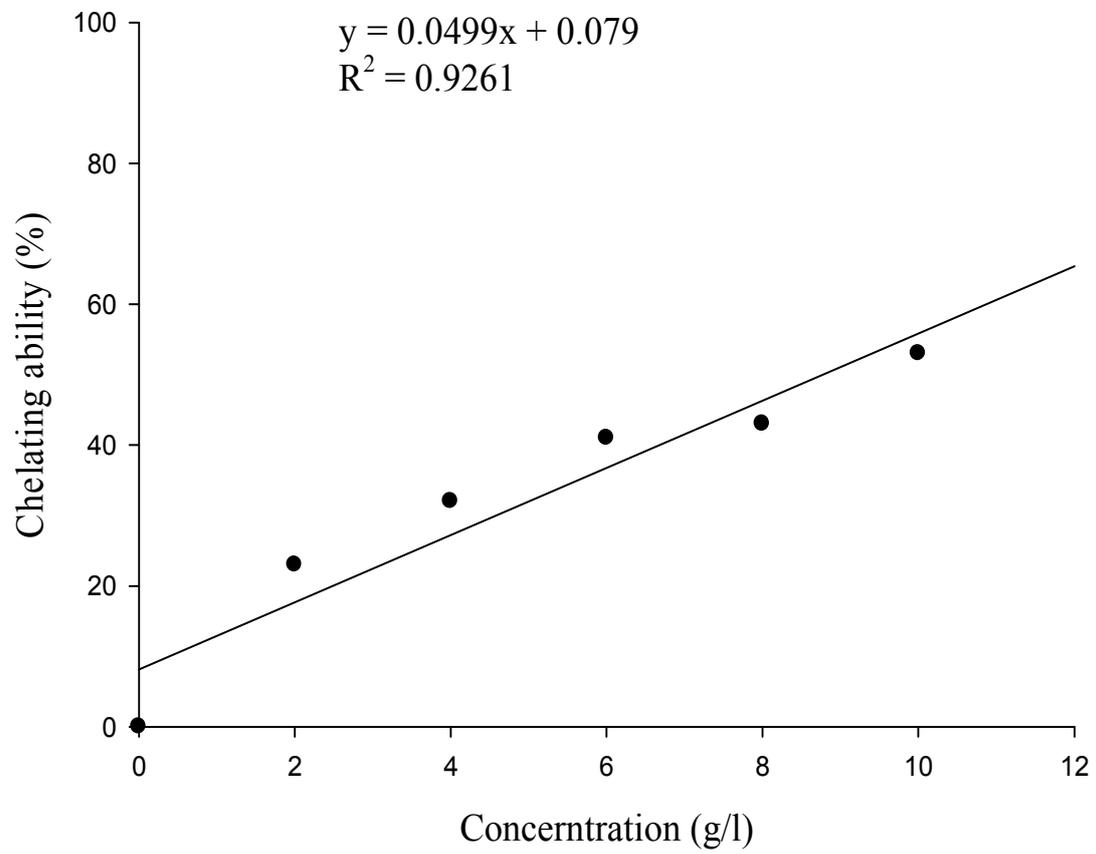
附圖二十二 搖瓶培養發酵液之螯合亞鐵離子能力標準曲線。

Appendix Fig. 22 Standard curve of chelating ability on ferrous ion by fermented culture from shake flask.



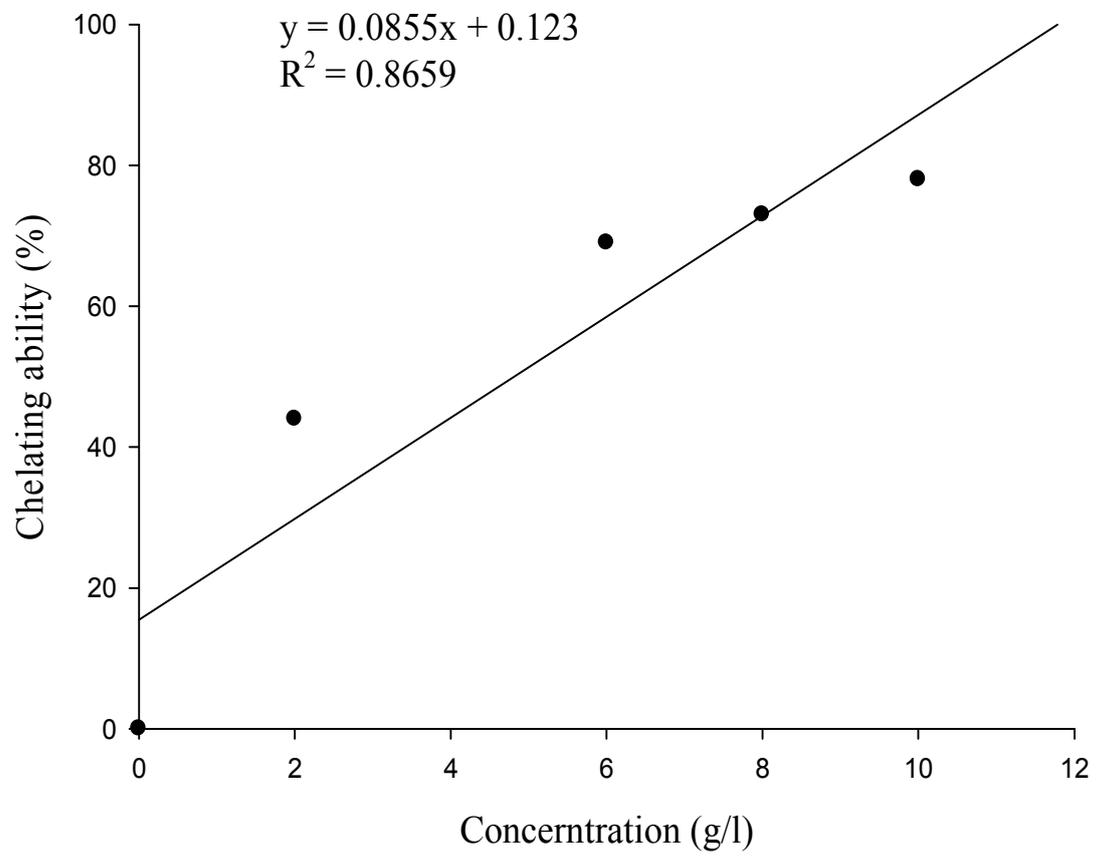
附圖二十三 攪拌式發酵液之螯合亞鐵離子能力標準曲線。

Appendix Fig. 23 Standard curve of chelating ability on ferrous ion by fermented culture from stirred-tank fermentor.



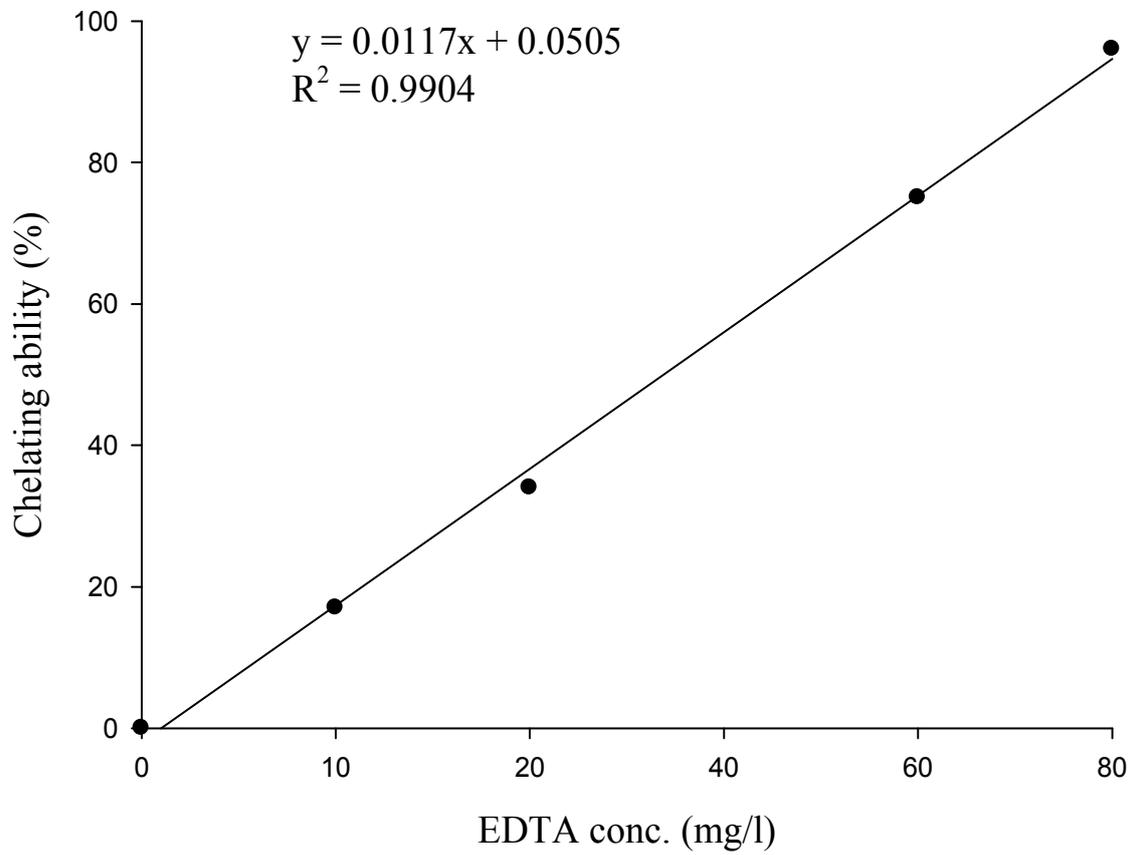
附圖二十四 氣泡式發酵液之螯合亞鐵離子能力標準曲線。

Appendix Fig. 24 Standard curve of chelating ability on ferrous ion by fermented culture from air bubble fermentor.



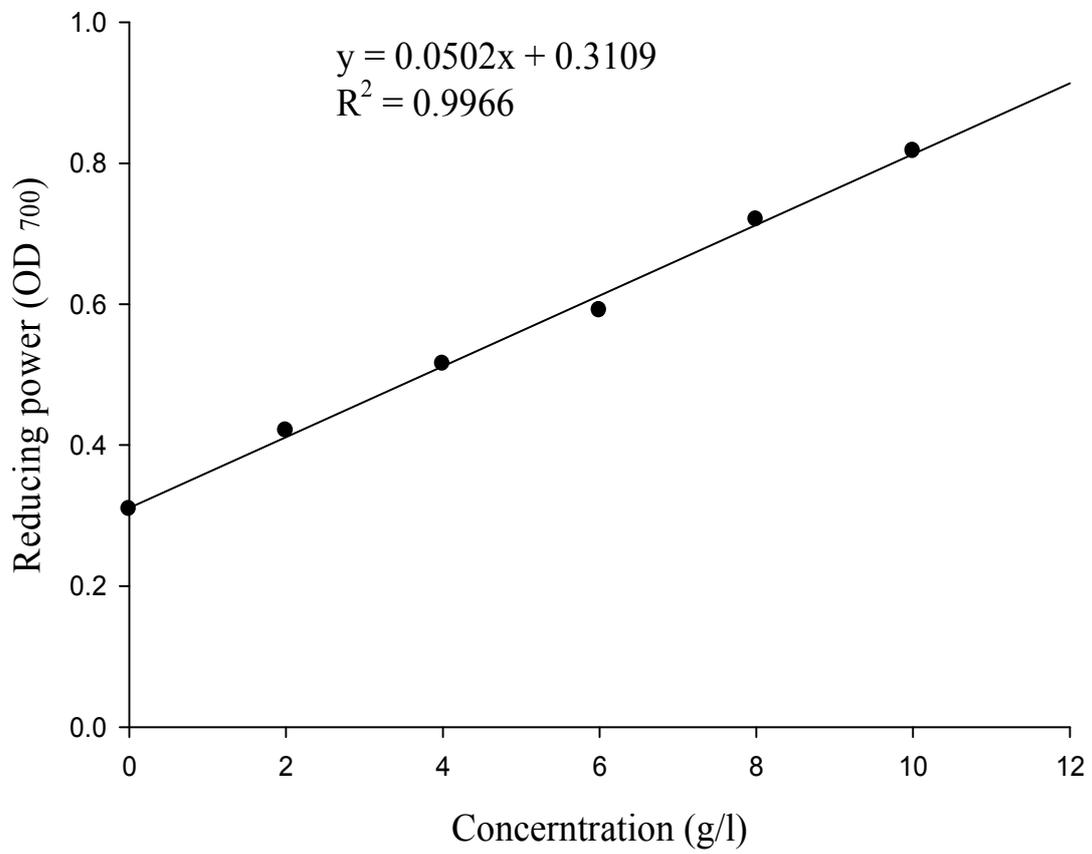
附圖二十五 氣舉式發酵液之螯合亞鐵離子能力標準曲線。

Appendix Fig. 25 Standard curve of chelating ability on ferrous ion by fermented culture from air lift fermentor.



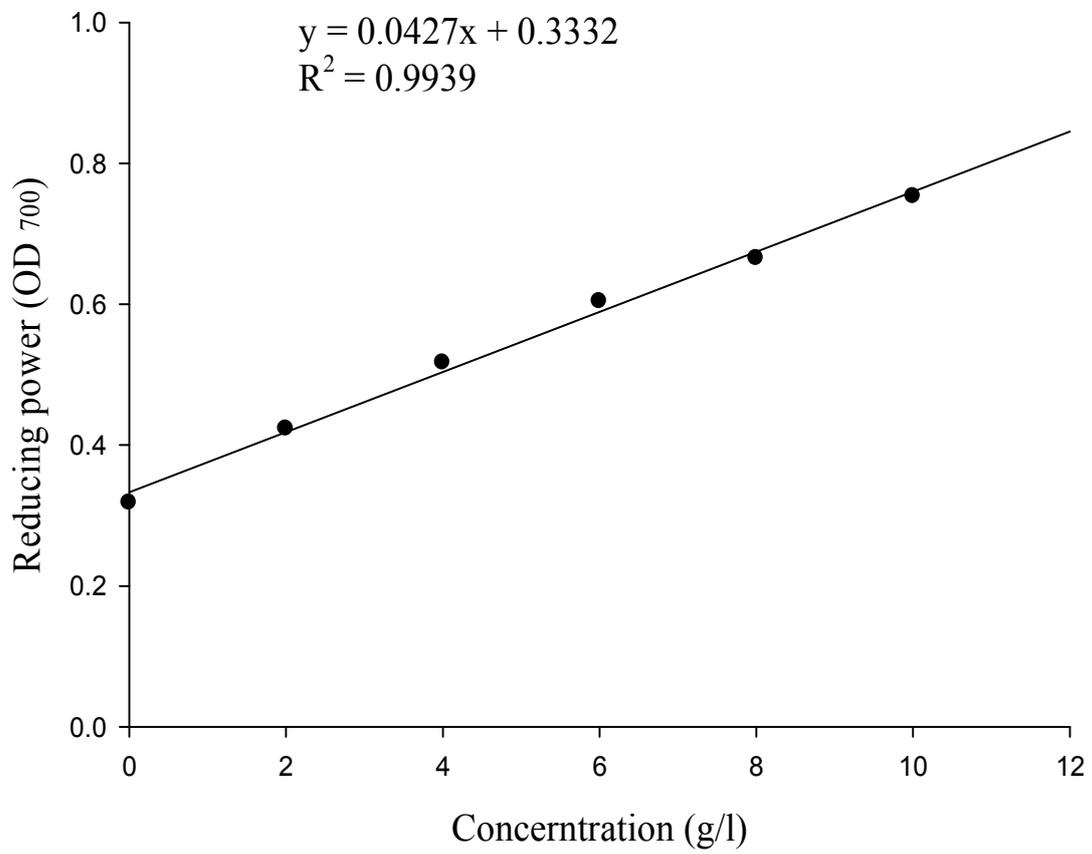
附圖二十六 EDTA 之螯合亞鐵離子能力標準曲線。

Appendix Fig. 26 Standard curve of metal chelating ability by EDTA.



附圖二十七 搖瓶培養發酵液之還原力標準曲線。

Appendix Fig. 27 Standard curve of Reducing power by fermented culture from shake flask.

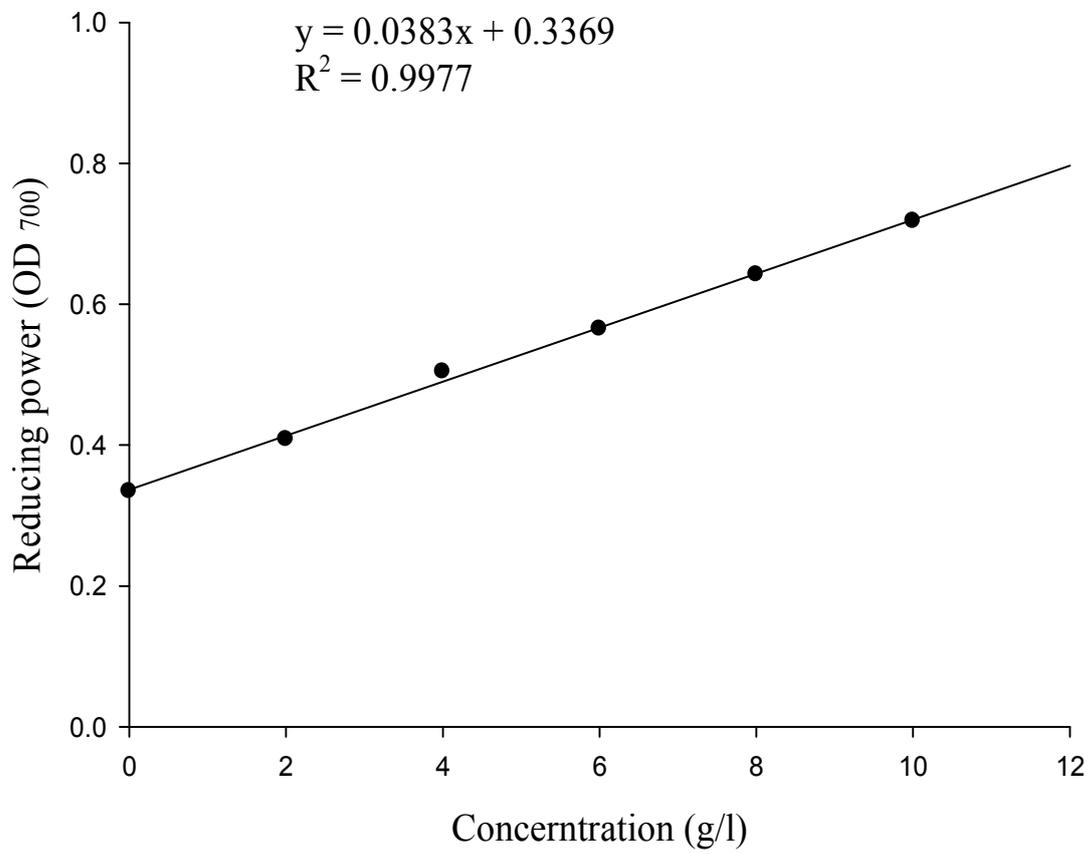


附圖二十八

攪拌式發酵槽發酵液之還原力標準曲線。

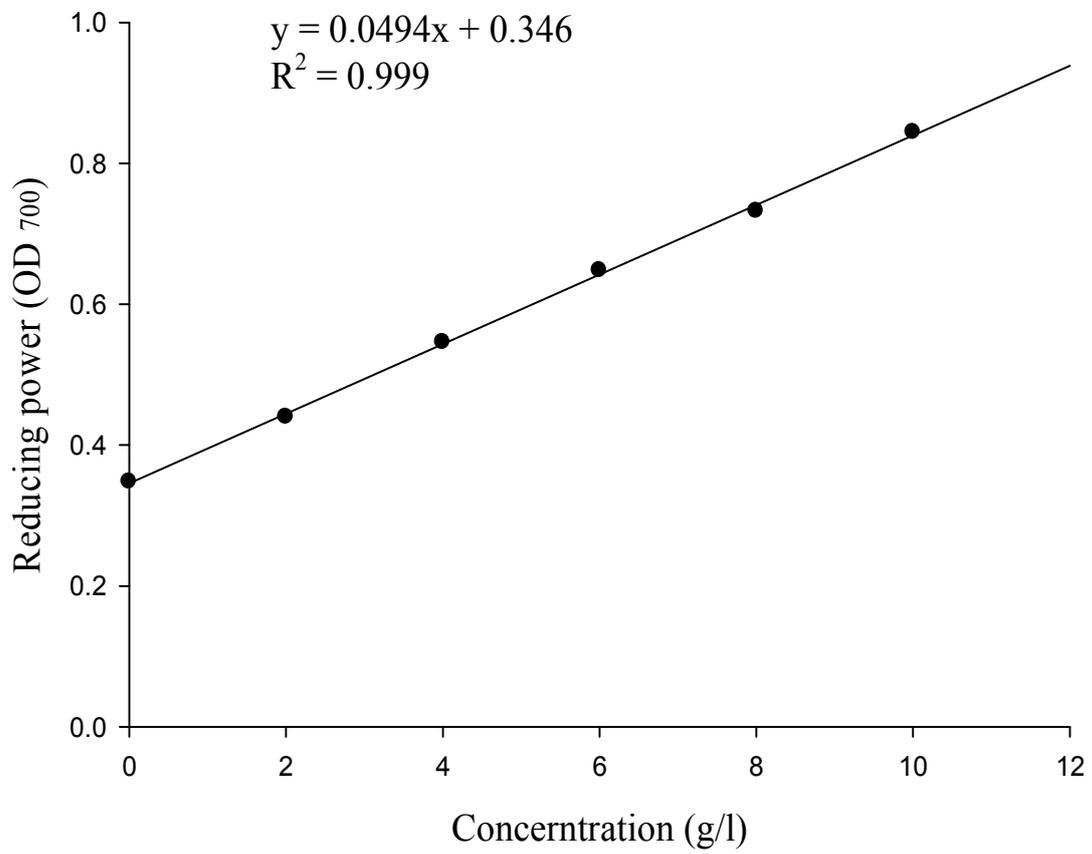
Appendix Fig. 28

Standard curve of Reducing power by fermented culture from stirred-tank fermentor.



附圖二十九 氣泡式發酵槽發酵液之還原力標準曲線。

Appendix Fig. 29 Standard curve of Reducing power by fermented culture from air bubble fermentor.

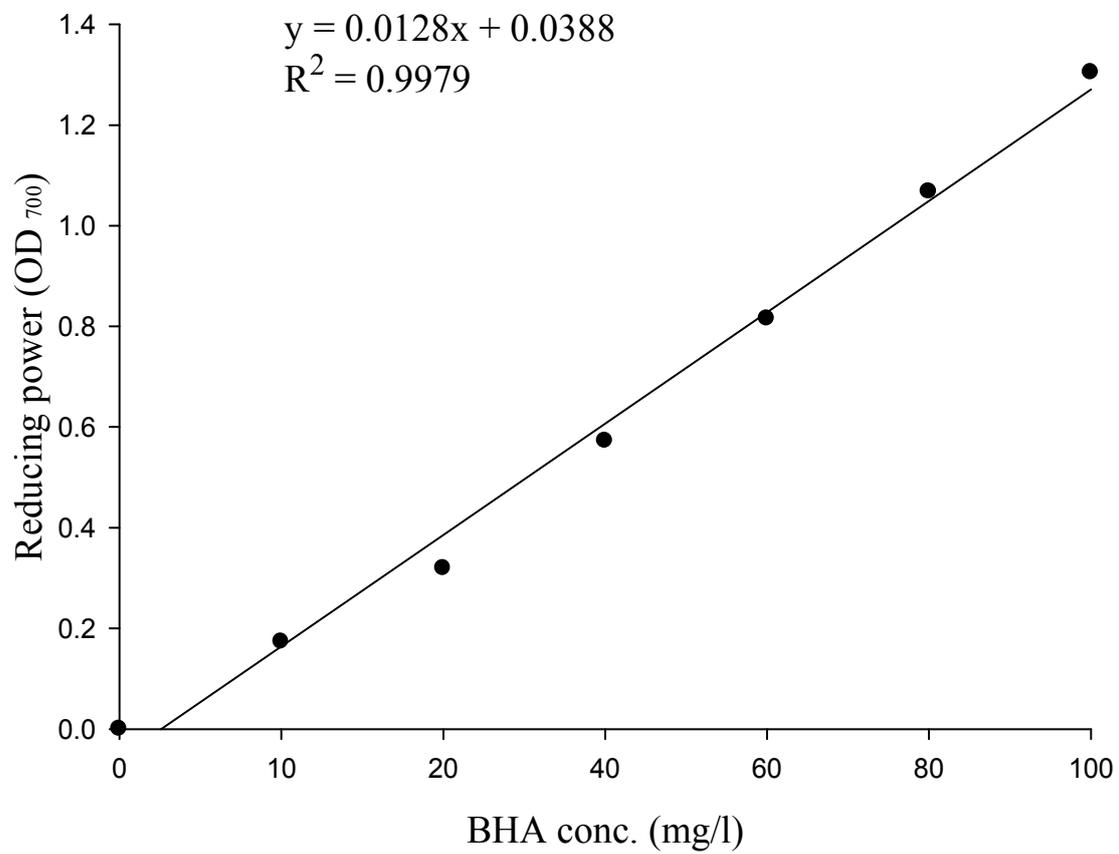


附圖三十

氣舉式發酵槽發酵液之還原力標準曲線。

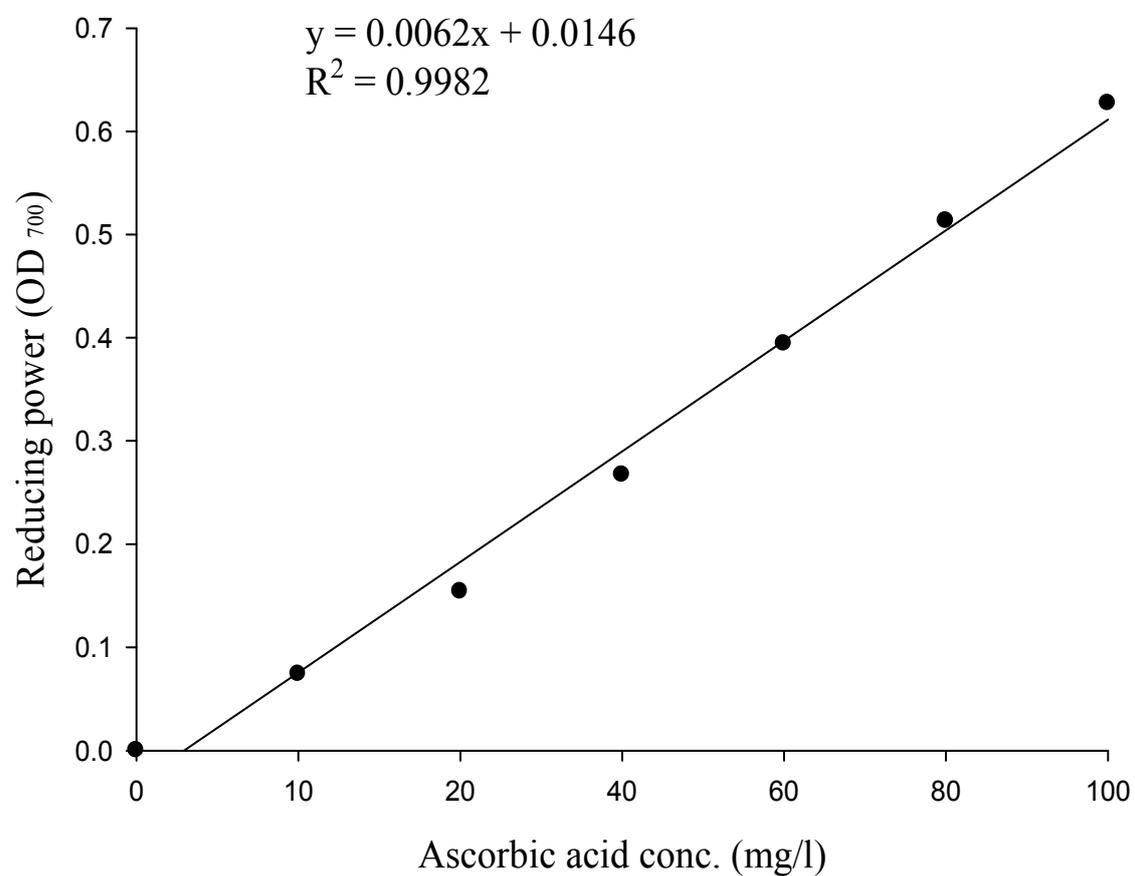
Appendix Fig. 30

Standard curve of Reducing power by fermented culture from air lift fermentor.



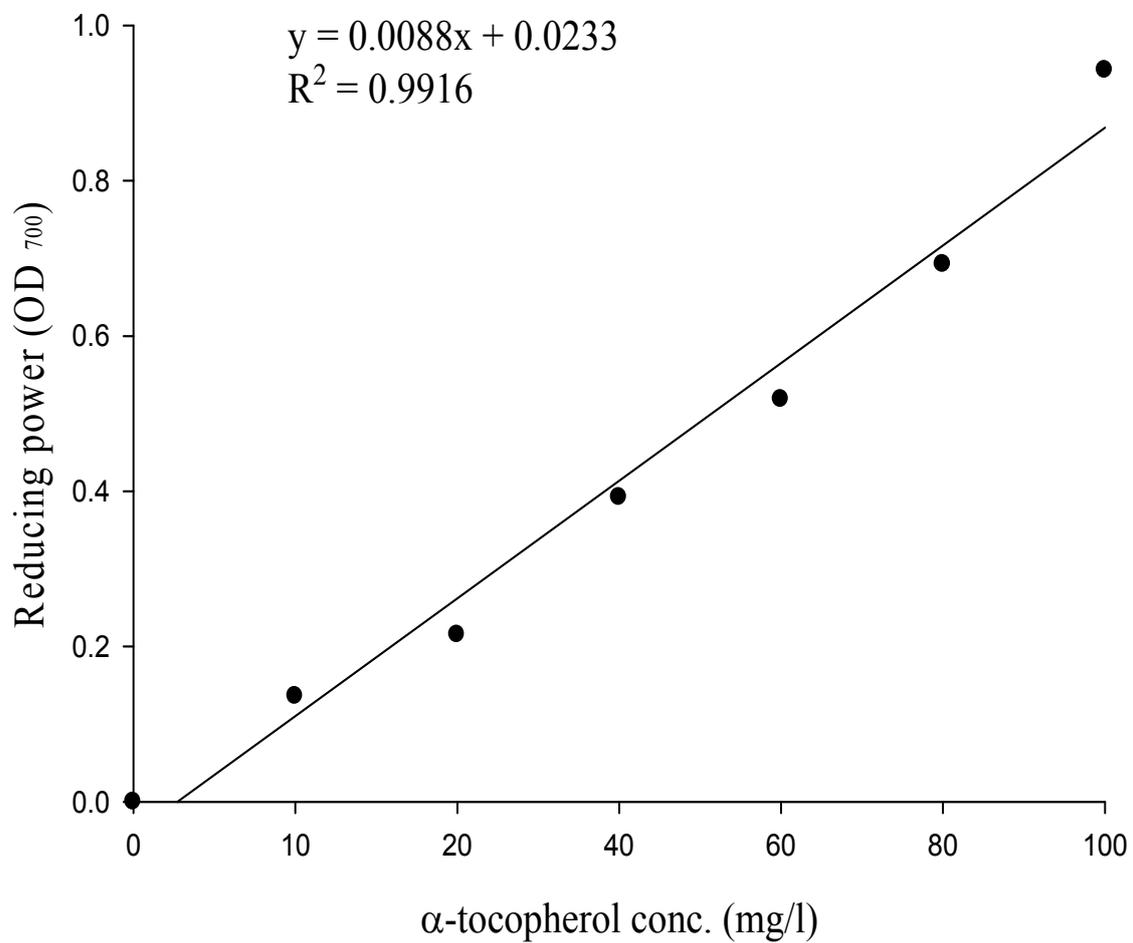
附圖三十一 BHA 之還原力標準曲線。

Appendix Fig. 31 Standard curve of reducing power by BHA.



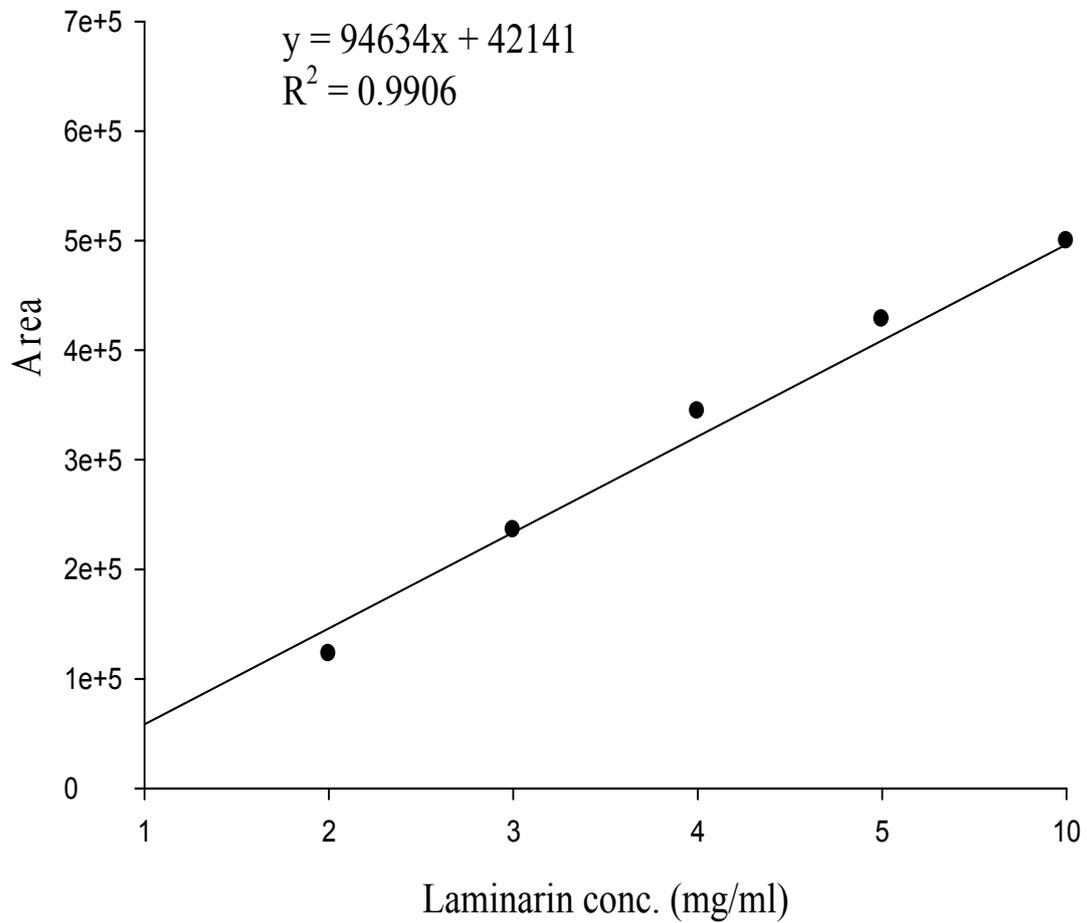
附圖三十二 Ascorbic acid 之還原力標準曲線。

Appendix Fig. 32 Standard curve of reducing power by ascorbic acid.



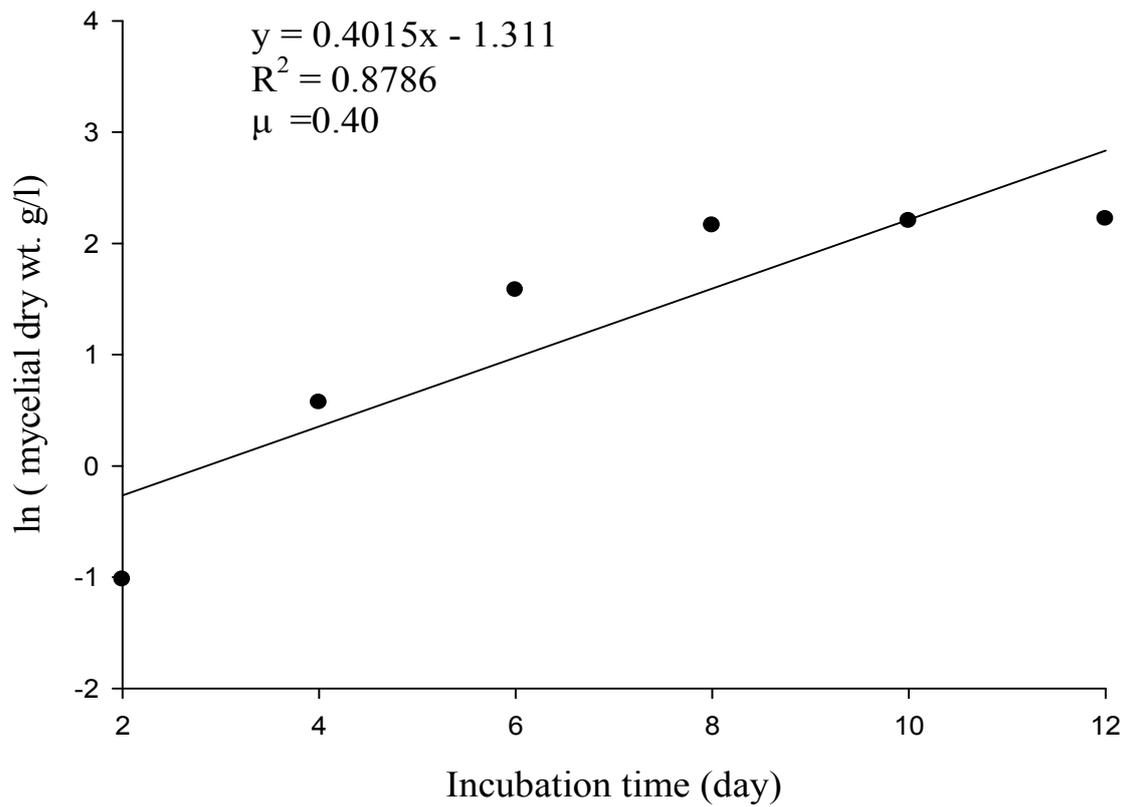
附圖三十三 α-tocopherol 之還原力標準曲線。

Appendix Fig. 33 Standard curve of reducing power by α-tocopherol.



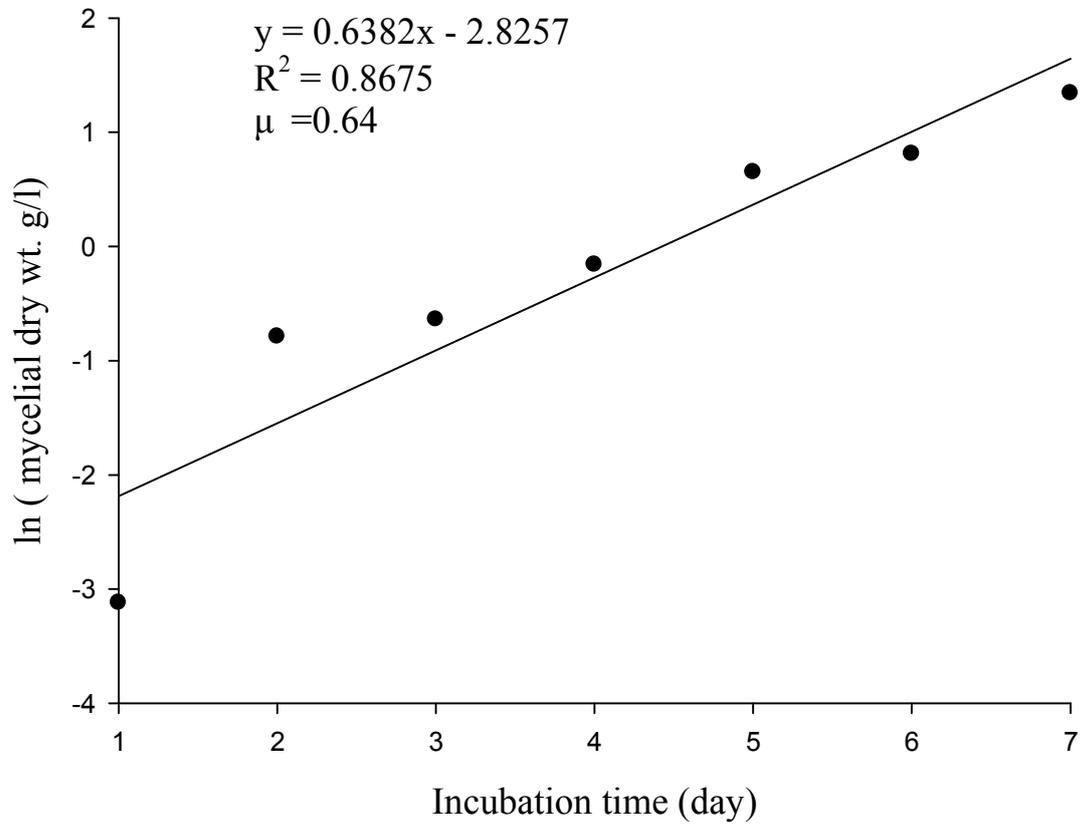
附圖三十四 測定 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 相對含量之 laminarin 標準曲線。

Appendix Fig. 34 Standard curve of laminarin to estimate relative content of β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan.



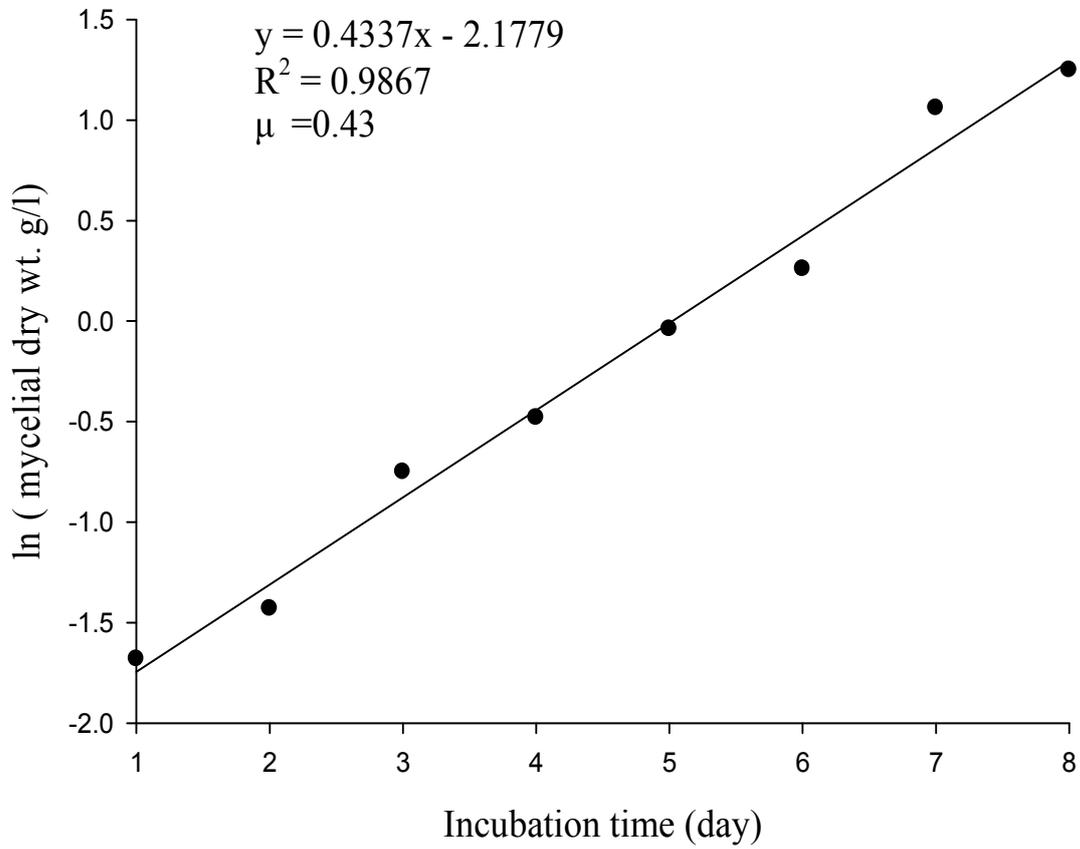
附圖三十五 搖瓶培養之對數生長期生長曲線測定桑黃菌 PL02 之比生長速率 (μ)。

Appendix Fig. 35 Estimation of specific growth rate (μ) from growth curve of exponential phase of *P. linteus* PL02 in shake flask.



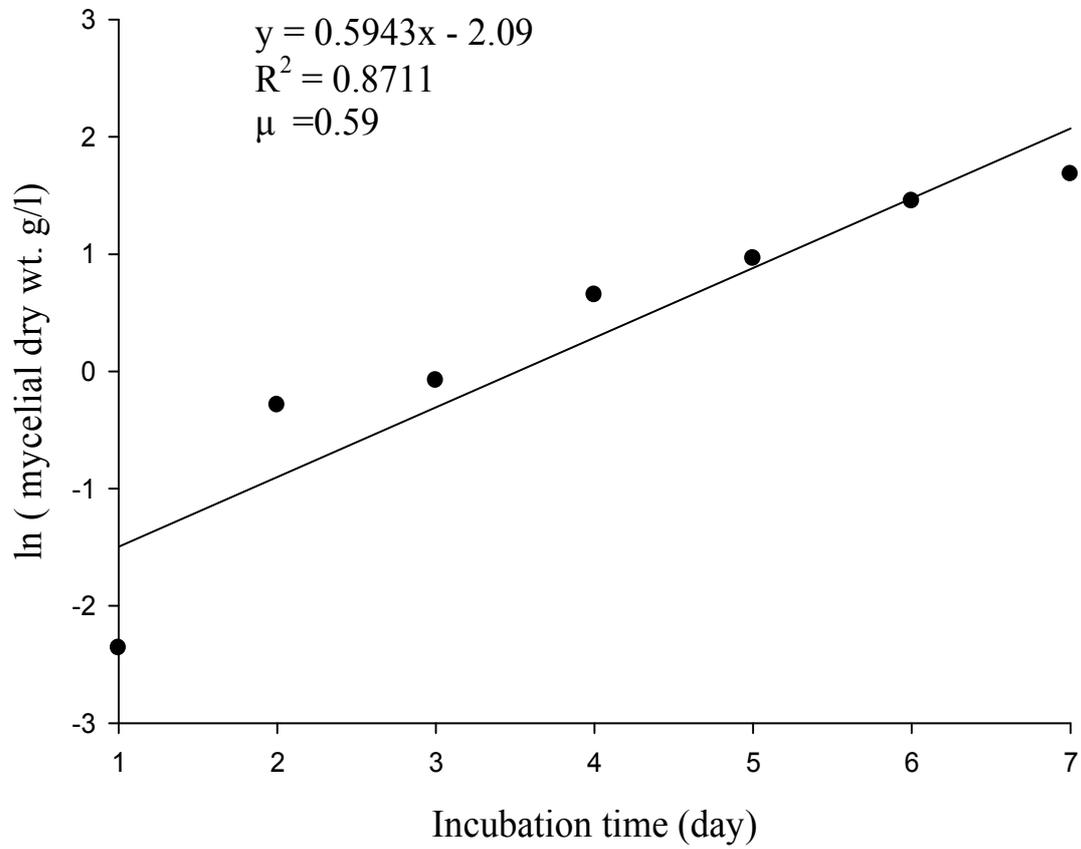
附圖三十六 攪拌式發酵槽之對數生長期生長曲線測定桑黃菌 PL02 之比生長速率 (μ)。

Appendix Fig. 36 Estimation of specific growth rate (μ) from growth curve of exponential phase of *P. linteus* PL02 in stirred-tank fermentor.



附圖三十七 氣泡式發酵槽之對數生長期生長曲線測定桑黃菌 PL02 之比生長速率 (μ)。

Appendix Fig. 37 Estimation of specific growth rate (μ) from growth curve of exponential phase of *P. linteus* PL02 in air bubble fermentor.



附圖三十八 氣舉式發酵槽之對數生長期生長曲線測定桑黃菌 PL02 之比生長速率 (μ)。

Appendix Fig. 38 Estimation of specific growth rate (μ) from growth curve of exponential phase of *P. linteus* PL02 in air lift fermentor.