

東海大學食品科學研究所
Graduate Institute of Food Science
TUNGHAI UNIVERSITY



利用固定化雲芝(*Trametes versicolor*)菌體進行深層發酵生產多醣體

Production of polysaccharides by immobilized cells of
Trametes versicolor in submerged fermentation

研究生：鄭天成 撰

Graduate Student: Tian-Cheng Zheng

中華民國一〇一年十二月

December, 2012

謝 誌

誠摯感謝恩師 顏文義博士修業期間一路的指導，在研究上的疑惑總是能以小故事及親身經驗分享為我解答，且於論文內容審閱期間，更是不留餘力給予指正，使吾能夠成長、進步且獲益良多，特誌卷首，以表由衷謝意。

論文承蒙東海大學食品科學研究所 閻立平博士和弘光科技大學食品科學系 林聖敦博士審查通過，百忙中對論文悉心校改，多方面的提點並給予寶貴建議，使本文更臻週嚴，於此致萬分的謝意。

承蒙所內老師們在課業的細心指導，讓吾在求學期間對專業領域的認識更為專精；感謝莉娟、俞君、依紋、姿妤、老猴、怡樺、松鼠、展維、韋任等學長姐於實驗上的指導與幫忙；感謝同窗好友、佳伶、如裕、巧馨、怡慧、瀟菽、曜寬、希奇、俊麟、建廷實驗上的幫忙與鼓勵，感謝總是提供我各種資訊又常讓我麻煩的冠閔，感謝實驗室夥伴菁羽分擔大小事務，你們讓我的實驗室生活充滿色彩；感謝透抽、彥蘋、書平、敏純等學弟妹研究上的協助；感謝阿 G、庭儒兩位摯友願意和我分享心事，總是支持及關心我。

最要感謝的是我的家人，尤其是父母親在有形及無形上無悔的付出，讓我衣食無憂，外公、外婆對我的關心及打氣，哥哥、姐姐在生活上的協助與分享，在我遇到困難時都給了我前進的動力，讓我順利

完成學業。

在此將這份成長喜悅分享給我的親人及朋友們~

鄭天成 謹誌於

東海大學實品科學研究所

調理發酵食品研究室

中華民國一〇二年一月

摘要

雲芝(*Trametes versicolor*)具有抗腫瘤、抗癌、免疫調節及保肝的功效，其所萃取之多醣已被醫學界廣泛使用，雲芝菇體的人工栽培比較費時，本研究以液態發酵方法培養，並利用固定化菌體進行雲芝的菌絲體與多醣體的生產。

在含有 100 ml 培養基(3% glucose)之 250 ml 三角瓶中進行，以泡棉及菜瓜布為菌體固定化的載體 1 cm³ size，以 25°C、起始 pH 6.0 培養 10 天，結果以泡棉較利於菌絲體附著，其發酵液的胞外多醣(EPS)及胞內多醣(IPS)產量最高，分別可達 0.81 g/L 及 0.18 g/L；泡棉載體在培養基中不同的填充量(10%、15%、20%，載體體積/搖瓶體積 v/v)，以 10% 組的 EPS 及 IPS 產量最高，分別為 0.87 g/L 及 0.20 g/L；搖瓶轉數(100 rpm、150 rpm 以及 150-100 rpm 兩段)中，以 100 rpm 的 EPS 及 IPS 產量最高，分別有 0.87 g/L 及 0.18 g/L；在 100 ml 培養基，含 10% 載體(v/v)的搖瓶培養，每批發酵 5 天後更換新鮮培養基，此載體上的雲芝菌體可重複利用發酵 4 次，其發酵液中的懸浮菌體濃度最高平均為 8.85 g/L，EPS 及 IPS 最佳產量平均可維持在 0.64 g/L 及 0.20 g/L。

在 7L 泡柱式發酵槽培養中發現，利用 5L 培養基與 10%(v/v)載體，通氣量以 0.2vvm 最利於菌絲體附著於載體，接種後培養 7 天的發酵液可得懸浮菌體濃度 1.82 g/L、EPS 及 IPS 產量分別為 0.44 g/L

及 0.14 g/L，固定化的菌體可在發酵槽重複利用 3 次，且在每次更新的新鮮培養液中發酵 4 天。

Abstract

Trametes versicolor is a common polypore mushroom. Its polysaccharide extracts has been widely used for the medical therapy for treatment of cancer in China, Japan and some European countries. To overcome the time-consuming disadvantage of culturing fruiting body of *T. versicolor*, study was carried out to produce the mycelium and polysaccharides using submerged fermentation with immobilized cells.

The polypropylene foam and scrub sponge were used as carriers (1cm³ size 10%, carrier volume/medium volume v/v) for cell immobilization. They were cultured for 10 days in 25°C, initial pH 6.0 in 250ml erlenmeyer flasks containing 100 ml medium (3% glucose). The polypropylene foam is more conducive to mycelium attach. The extracellular polysaccharides (EPS) in fermentation broth and intracellular polysaccharides (IPS) production were 0.81 g/L and 0.18 g/L, respectively. The carrier load (10%, 15%, 20%, v/v) were tested. The 10% have the best yield, EPS and IPS were 0.87 g/L and 0.20 g/L, respectively. The shaker speed (100 rpm, 150 rpm ,150-100 rpm two-stage revolution) of flask incubator were compared. The 100 rpm have the best EPS and IPS production of 0.87 g/L and 0.18 g/L respectively. The immobilized cells in the shake flasks can be repeated use for 4 times, after replaced by fresh medium in each batch of 5 day fermentation. The highest production of suspension cell in the broth was 8.85 g/L, and the best production of EPS and IPS were 0.64 g/L and 0.20 g/L respectively.

The 7L bubble column fermentor study shown, the aeration rate 0.2

vvm were more conducive than 0.5 vvm for cells attach on the carrier (10% v/v) in the fermentor. The suspend cell concentration in fermentation broth was 1.82 g/L, production of EPS and IPS were 0.44 g/L and 0.14 g/L, respectively, in 7 day. The immobilized cells can be reused 3 times in fresh medium, and run for 4 days.

目 錄

摘 要.....	I
Abstract.....	III
第一章 緒論.....	1
一、前言.....	1
二、研究目的.....	2
第二章 文獻回顧.....	3
一、雲芝介紹.....	3
二、雲芝活性物質.....	6
(一) 雲芝多醣體.....	6
(二) 雲芝多醣生理活性.....	8
(三) 雲芝漆酶之應用.....	17
三、真菌液態培養.....	18
四、菌絲球形成與型態之影響因子.....	19
(一) 剪切力或攪拌速度.....	19
(二) 接菌量.....	21
(三) 通氣量.....	22
(四) 培養基組成份.....	22
(五) pH 值.....	23
(六) 二氧化碳濃度.....	23

(七) 生長速率.....	23
(八) 不同型式發酵槽.....	24
(九) 自體分解.....	24
(十) 礦物質載體的添加.....	24
五、菌體固定化簡介.....	25
(一) 固定化的定義.....	25
(二) 菌體固定化的方法.....	25
(三) 菌體固定化的優點.....	28
六、工業發酵的發酵槽.....	28
(一) 機械攪拌式發酵槽.....	31
(二) 氣動攪拌式發酵槽.....	31
第三章 材料與方法.....	34
一、試驗材料.....	34
(一) 試驗菌株.....	34
(二) 試驗藥品.....	34
(三) 培養基組成.....	35
二、儀器與設備.....	35
三、試驗方法.....	37
(一) 菌種保存.....	37

(二) 菌種活化.....	37
(三) 菌醃培養.....	38
(四) 載體前處理.....	38
(五) 搖瓶培養.....	38
(六) 發酵槽培養.....	39
四、分析方法.....	40
(一) 菌體乾重.....	40
(二) pH 值.....	40
(三) 殘糖量.....	40
(四) 粗多醣含量.....	41
(五) 多醣分子量測定.....	43
五、統計分析方法.....	43
第四章 結果與討論.....	44
一、搖瓶試驗.....	44
(一) 載體對雲芝培養之影響.....	44
(二) 不同載體裝載量對雲芝培養之影響.....	54
(三) 不同搖瓶轉數對雲芝培養之影響.....	60
(四) 以固定化雲芝菌體進行搖瓶試驗.....	64
二、雲芝的發酵槽生產.....	67

(一) 氣舉式發酵槽試驗.....	73
(二) 泡柱式發酵槽試驗.....	76
三、多醣體分子量分析.....	89
(一) 搖瓶培養之多醣體.....	89
(二) 發酵槽培養之多醣體.....	95
第五章 結論.....	99
一、搖瓶試驗.....	99
二、發酵槽試驗.....	99
三、多醣體分子量分析.....	100
第六章 參考文獻.....	101
第七章 附錄.....	111

表目錄

表 1-1 芝醣肽(Polysaccharide peptide, PSP)和雲芝素(Polysaccharide krestin, PSK)之胺基酸組成分析.....	7
表 1-2 各種絲狀真菌液態培養時,影響球狀菌絲體形成因子.....	20
表 1-3 不同發酵槽之優缺點.....	30
表 4-1 載體對雲芝菌胞外多醣、胞內多醣產量及分子量之影響.....	90
表 4-2 載體裝載量對雲芝菌胞外多醣、胞內多醣產量及分子量之影響.....	92
表 4-3 不同搖瓶轉數對雲芝菌胞外多醣、胞內多醣產量及分子量之影響.....	93
表 4-4 以搖瓶重複批次發酵固定化雲芝菌體對胞外多醣、胞內多醣產量及分子量之影響.....	94
表 4-5 以泡柱式發酵槽重複批次發酵固定化雲芝菌體對胞外多醣、胞內多醣產量及分子量之影響(固定化菌體發酵週期為 5 天).....	96
表 4-6 以泡柱式發酵槽重複批次發酵固定化雲芝菌體對胞外多醣、胞內多醣產量及分子量之影響(固定化菌體發酵週期為 4 天).....	97

圖目錄

圖 1-1 雲芝之子實體外觀.....	4
圖 1-2 已證實雲芝活性組成份的化學結構.....	9
圖 1-3 菇類蛋白多醣(proteoglycan)和多醣(β -glucan)增強免疫功能之 可能途徑.....	11
圖 1-4 β -D-葡聚醣系多醣體抗腫瘤之可能機制.....	13
圖 1-5 細胞固定化的分類圖.....	26
圖 1-6 各種常見之發酵槽.....	29
圖 1-7 攪拌器葉片形式.....	32
圖 4-1 雲芝菌接種於 PDA 培養皿之菌絲生長外觀.....	45
圖 4-2 以 PDB 培養基培養 6 天之雲芝菌絲球形態.....	45
圖 4-3 以泡棉作為載體培養雲芝之菌絲包覆情形.....	46
圖 4-4 兩種載體對雲芝菌發酵期間殘糖之影響.....	48
圖 4-5 兩種載體對雲芝菌發酵期間 pH 之影響.....	49
圖 4-6 兩種載體對雲芝菌發酵期間菌絲體生長之影響.....	50
圖 4-7 兩種載體對雲芝菌發酵期間胞外多醣之影響.....	51
圖 4-8 兩種載體對雲芝菌發酵期間胞內多醣之影響.....	52
圖 4-9 以菜瓜布作為載體培養雲芝之菌絲包覆情形.....	53
圖 4-10 載體裝載量對發酵期間菌絲體生長之變化.....	54

圖 4-11 載體裝載量對發酵期間殘糖之變化.....	55
圖 4-12 載體裝載量對發酵期間 pH 值之變化.....	56
圖 4-13 載體裝載量對發酵期間胞外多醣產量之變化.....	57
圖 4-14 載體裝載量對發酵期間胞內多醣產量之變化.....	58
圖 4-15 不同搖瓶轉數對發酵期間菌絲體生長之變化.....	61
圖 4-16 不同搖瓶轉數對發酵期間殘糖之變化.....	62
圖 4-17 不同搖瓶轉數對發酵期間 pH 值之變化.....	63
圖 4-18 不同搖瓶轉數對發酵期間胞外多醣產量之變化.....	65
圖 4-19 不同搖瓶轉數對發酵期間胞內多醣產量之變化.....	66
圖 4-20 固定化菌體重複批次發酵期間菌絲體生長之變化.....	68
圖 4-21 固定化菌體重複批次發酵期間殘糖之變化.....	69
圖 4-22 固定化菌體重複批次發酵期間 pH 值之變化.....	70
圖 4-23 固定化菌體重複批次發酵期間胞外多醣之變化.....	71
圖 4-24 固定化菌體重複批次發酵期間胞內多醣之變化.....	72
圖 4-25 氣舉式發酵槽內部改裝示意圖.....	74
圖 4-26 氣舉式發酵槽中雲芝菌絲附著在鐵絲網上之情形.....	75
圖 4-27 泡柱式發酵槽通氣量 0.5 vvm 發酵液中懸浮菌體之外 觀.....	75
圖 4-28 固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽重複批次發酵期間懸浮菌體	

	濃度之變化(每一批次 5 天).....	77
圖 4-29	固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽進行重覆批次發酵期間殘糖之變化(每一批次 5 天).....	79
圖 4-30	固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽進行重覆批次發酵期間 pH 之變化(每一批次 5 天).....	80
圖 4-31	固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽進行重覆批次發酵期間胞外多醣之變化(每一批次 5 天).....	81
圖 4-32	固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽進行重覆批次發酵各批次胞內多醣之產量(每一批次 5 天).....	82
圖 4-33	固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽重複批次發酵期間懸浮菌體濃度之變化(每一批次 4 天).....	83
圖 4-34	固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽重複批次發酵期間胞外多醣之變化(每一批次 4 天).....	84
圖 4-35	固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽重複批次發酵期間殘糖之變化(每一批次 4 天).....	86
圖 4-36	固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽重複批次發酵期間 pH 值之變化(每一批次 4 天).....	87
圖 4-37	固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽進行重覆批次發酵各批次胞內多醣之產量(每一批次 4 天).....	88

附圖目錄

附圖 1-1 二硝基水楊酸法之葡萄糖標準曲線.....	112
附圖 1-2 酚硫酸法之葡萄糖標準曲線.....	113
附圖 1-3 多醣分子量標準曲線.....	114

第一章 緒論

一、前言

隨著科技的發展與進步，環境汙染問題日益嚴重，競爭激烈的社會也導致許多文明病的產生，近來提倡回歸大自然的呼聲也日趨高漲，取自自然資源中的天然藥物將會更受到人們的青睞。真菌類藥物的藥用歷史悠久，在兩千年前的藥物本草《神農本草經》中有記載，是我國傳統藥物中的重要組成份，種類雖不多，但在歷史上和現代醫療事業中，都對我們的保健有重要作用(徐，1996)。然而人工栽培子實體至收成往往需要大量時間，因此近代利用液態發酵方式培養真菌，使用不同的培養基質並調控培養條件，可能促使其表現出與天然環境中生長的菇類，有著不同的生合成代謝途徑，進而從中提取各種不同的真菌多醣，開發出具有多樣性之生物活性物質，是未來進行保健食品與新藥研發的重要方向(王，2005)。

雲芝具有提高人體免疫系統功能的作用，可增強人體的抗病能力。目前，臨床上主要作為 B 型肝炎及消化系統、呼吸系統及子宮頸、乳腺等部位癌症的免疫療法用藥(徐，1996)。日本已研發出以熱水萃取菌絲體內的多醣為雲芝素(polysaccharide krestin，簡稱 PSK)，於 1977 年在市場銷售當作抗癌藥物和免疫調節劑使用，對人體無任何副作用，若輔以化學藥物與放射線治療，雲芝多醣能增加療效、預

防引起副作用、以及減輕疼痛和促進食慾等功效(Cui and Chisti, 2003)；大陸東北地區也研發生產雲芝醣肽(polysaccharide peptide，簡稱 PSP)，應用於治療白血症、肝炎和氣管癌等病症(Yang, 1997)。

近年來研究真菌之液態培養已相當普遍，每次生產均需要接種相當數量的菌醃，發酵結束之後，發酵液與菌絲體皆被取出，無法重複利用菌體，若使用固定化菌體方式生產則可改善。

二、研究目的

為了改善液態發酵菌體無法重複利用的問題，本試驗以固定化菌體的方式，先以三角瓶試驗培養雲芝菌體並挑選載體之最佳化條件，而後在發酵槽進行擴大培養，探討發酵設備和發酵週期對目標產物的影響，找出固定化雲芝菌體可以重複利用於發酵，生產菌絲體及多醣體之最佳生產條件。

第二章 文獻回顧

一、雲芝介紹

雲芝又名青芝、龍芝，其形態特徵很像天上的彩雲，故又稱做彩絨革蓋菌，別名彩紋雲芝、染色雲芝、多色雲芝，日本稱之為瓦茸(Kawaratake)，英文名稱之 Turkey tail 或 Cloud mushroom。學名為 *Trametes versicolor*，分類學上屬於擔子菌亞門(Basidiomycotina)、層菌綱(Hymenomycetes)、非褶菌目(Aphyllphorales)、多孔菌科(Polyporaceae)、栓菌屬(*Trametes*)(周和張，2005)。

雲芝子實體(圖 1-1)常在闊葉樹或針葉樹的枯木上群生，僅一季產生孢子，子實體顏色變異大，環生帶狀的革蓋卻是他最容易辨識的標記，毛絨絨的輪環將顏色不同的各區井然有序地隔開，是雲芝外表的最大特色(王等人，1998)。子實體一般小、無柄、部分平伏面反卷，菌蓋寬 1-8 cm，厚 0.1-0.3 cm，菌肉白色，形狀為半圓形至貝殼狀或扇形，往往相互連接在一起呈覆瓦狀排列，上覆細毛或絨毛，顏色變化多，由藍黑色到黃褐、暗褐色。子實體革質表面有細長絨毛和多種顏色組成的狹窄的同心環帶，絨毛常有絲絹光彩，邊緣完整或呈波浪狀，且此處的菌肉層較薄。子實體呈叢生狀鱗片，與古畫中層疊的雲朵及為相像，遂有「雲芝」的優雅名稱；其鱗片像屋瓦，日本稱之「瓦茸」(賴，2008；徐，1996)。



圖 1-1 雲芝之子實體外觀

Fig 1-1 The fruiting bodies of *T. versicolor*.

由於生長環境的不同，雲芝菌蓋表面的變化亦不同，據調查僅生長在吉林省長白山區的雲芝，就可以粗分為 14 類，在細微構造方面，這 14 種個型之間沒有明顯差異，分型的主要依據是蓋面上環帶的顏色及絨毛的長短、粗細等外部形態特徵。產生這些差異的原因主要是生態環境所產生的影響，如營養條件、溫度、水分等因素可以影響子實體的大小及厚薄、數量；而蓋面上的顏色的變化則由光線決定，如生長在林緣、林間空地等光照較強的雲芝，其蓋面顏色較深(藍黑型、藍黑色環帶型)，而生長在光線較弱了條件下，其蓋面顏色澤較淡(灰黃色、藍灰色、棕灰色各型)(徐，1996)。

東漢時期『神農本草經』對雲芝已有記載，當時癌症稱作“痛腫”，醫師會以雲芝來增強病人的抵抗力，治療癌症。明朝李時珍的『本草綱目』上記載雲芝有安神、益壽、利關節、堅筋骨、治耳聾，具有清熱、解毒、消炎、治療肺疾、保肝等功效。雲芝味道有輕微的甜味，在傳統中醫的使用上，雲芝被認為有散熱、解毒、增強體格、增強免疫功能。臨床上，雲芝被用在很多癌症、慢性肝炎、上呼吸道感染、泌尿道感染和消化道感染。近幾年，雲芝的萃取液在臨床前與臨床上都被證明具有很多的生物活性，包括刺激不同的免疫細胞的作用，及抑制癌細胞的生長，商業上已發展這些萃取物成為有效的口服用專利產品，在醫療上普遍用於癌症的治療。其主要功能如下：(一)

改善白血球的數量。(二) 刺激身體免疫系統。(三) 減輕治療癌症期間所產生之不適。(四) 舒緩化療藥物及放射療法所引致的不良作用。(五) 在治療後穩定病情，以及對病人的生活質素及存活率均有正面的幫助(賴，2008；徐，1996)。

二、雲芝活性物質

(一) 雲芝多醣體

雲芝多醣是以雲芝中提出的多醣，也可以利用液態培養技術，以雲芝菌絲體中提取醇析研製而成，中國以雲芝糖肽稱之(polysaccharide peptide 簡稱 PSP)，分子量約為 100 kDa(Ng, 1998)，日本以雲芝素(Krestin)稱之(polysaccharide Krestin 簡稱 PSK)，分子量約為 94 kDa (Tsukagoshi et al., 1984)，以 β -(1,6)、 β -(1,4)或 β -(1,4)、 β -(1,3)糖苷鍵構成主鏈，上有 β -(1,6)或 β -(1,3)結合的分枝(Ng, 1998)。雲芝糖肽易溶於熱水，難溶於冷水，不溶於甲醇、吡啶、苯、氯仿等有機溶劑(Hotta *et al.*, 1981)，PSP 與 PSK 相比較，在理化特性方面極為相似，但組成份上具有差異性(表 1-1)(吳等人, 1995)，主要是因為 PSK 的生產菌株為 CM-101 菌株，採用鹼提超濾工業生產；PSP 的生產菌株為雲芝 COV-1，用水提醇沉法提取，由於兩者在生產菌株和提取方法上不同，導致產品藥用成份和藥效不同(徐，1996；Jian and Yusuf, 2003)。PSP 及 PSK 兩者

表 1-1 雲芝醣肽(Polysaccharide peptide, PSP)和雲芝素

(Polysaccharide krestin, PSK)之胺基酸組成分析。

Table 1-1 The amino acid composition of polysaccharide peptide and polysaccharide krestin.

胺基酸種類	PSP(%)	PSK(%)
甲硫胺酸	0.482	0.063
白胺酸	1.378	2.209
異白胺酸	0.933	1.122
酪胺酸	0.651	0.688
丙胺酸	1.265	1.898
苯丙胺酸	0.904	1.325
組胺酸	0.222	0.271
精胺酸	0.979	0.386
纈胺酸	1.052	1.733
天門冬胺酸	1.818	2.609
蘇胺酸	0.954	1.013
絲胺酸	0.980	0.995
穀胺酸	2.261	3.335
脯胺酸	0.803	1.285
甘胺酸	1.060	1.546
胱胺酸	0.233	/

(張等人，1998)

多醣含量 30~60%，蛋白質含量 10~30%，單糖組成有葡萄糖、甘露糖、半乳糖、木糖及岩藻糖等(尤等人, 2001)。雲芝胞外多醣(EPS)及胞內多醣(IPS)皆是良好的特異性免疫調節劑，能抑制人體肺癌、胃癌、白血病、淋巴癌細胞及腹水癌等多種癌細胞的增生(Chow *et al.*, 2003; Hsieh *et al.*, 2002)。由發酵液中提取的胞外多醣為不含肽的葡聚醣，含有 β -(1,3)主鏈和 β -(1,3)、 β -(1,6)為支鏈，D-葡萄糖含量佔 99.2%，分子量 200 kDa，其發酵液中還含有多肽、生物鹼、酚類、植物固醇類、二萜及三萜類(圖 1-2)化和物 18 種人體所需的胺基酸和維生素B₁、B₂、B₆及銅、鐵、鉀、鋅等多種人體所需的微量元素(徐, 1996)。

(二) 雲芝多醣生理活性

雲芝胞外及胞內多醣是良好的生物免疫調節劑(biological response modifier, BRM)，經過研究證實具有下列多種生理活性：

1. 提升免疫功能

雲芝多醣具有強免疫調節能力，經研究證實能提升白介素 2(IL-2)含量，促進人體周邊血球淋巴細胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)的介白素 6(IL-6)之表現，活化白血球細胞以增加 IL- α , γ 量至 2-4 倍(Lee *et al.*, 2006)。增強自然殺手細胞(natural killer cell, NK cell)活性促進胸腺與脾臟中的 T 細胞與前 T 細胞增生，以

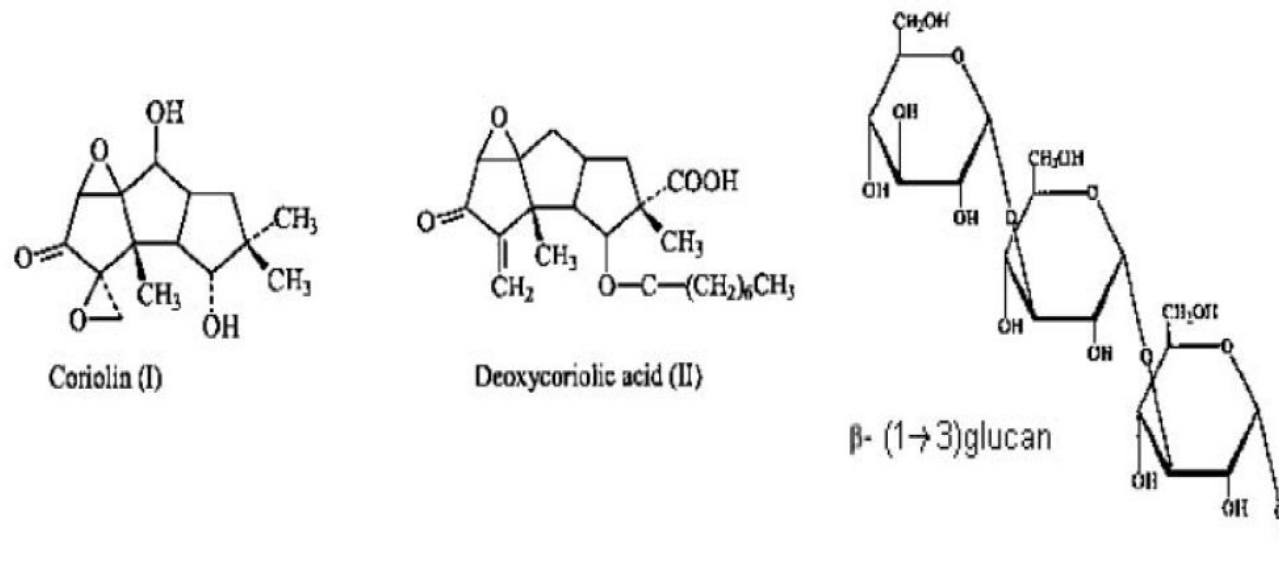


圖 1-2 已證實雲芝的活性組成份的化學結構(Chu *et al.*, 2002)。

Fig 1-2 The chemical structure of *T. versicolor* activity component.

及增加補體(C₃)合成和IgG產量，可大量提升噬菌細胞指數和網狀內皮系統的比率，使小鼠中血清溶血素(HC₅₀)、免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)溶斑形成細胞(plaque forming cell, PFC)數值增加，並促進PBL增生(圖 1-3)對於化療藥物造成的免疫抑制，雲芝多醣能有效對抗環磷醯胺(cyclophosphamide)造成白血球下降，且可縮短白血球細胞恢復時間，阻礙環磷醯胺對IL-2 和NK細胞造成的抑制作用，重建受到環磷醯胺抑制而引發延遲性過度敏感反應(Yang, 1997)。

癌變細胞在體內增殖與免疫功能下降有關，特別是與輔助性 T 細胞和抑制性 T 細胞的比例失常，NK 細胞和淋巴細胞轉化功能明顯降低等情況有直接的關係。實驗證實，將雲芝多醣與艾氏腹水癌細胞混合後，接種到瑞士小白鼠皮下時，能夠明顯起到抑制腫瘤細胞的作用；又將雲芝多醣、艾氏腹水癌細胞和豚鼠腹膜巨噬細胞混合，經體外培養一段時間後，再接種到小白鼠體內，雲芝多醣對腫瘤細胞的生長抑制率可達 80%~99.9%，且巨噬細胞活性有顯著增強(徐，1996)。

2. 抗腫瘤作用

PSK 能抑制肝腫瘤細胞 AH13 細胞能力，可使 B 細胞和 T 細胞增殖；可活化腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor, TNF)、干擾素

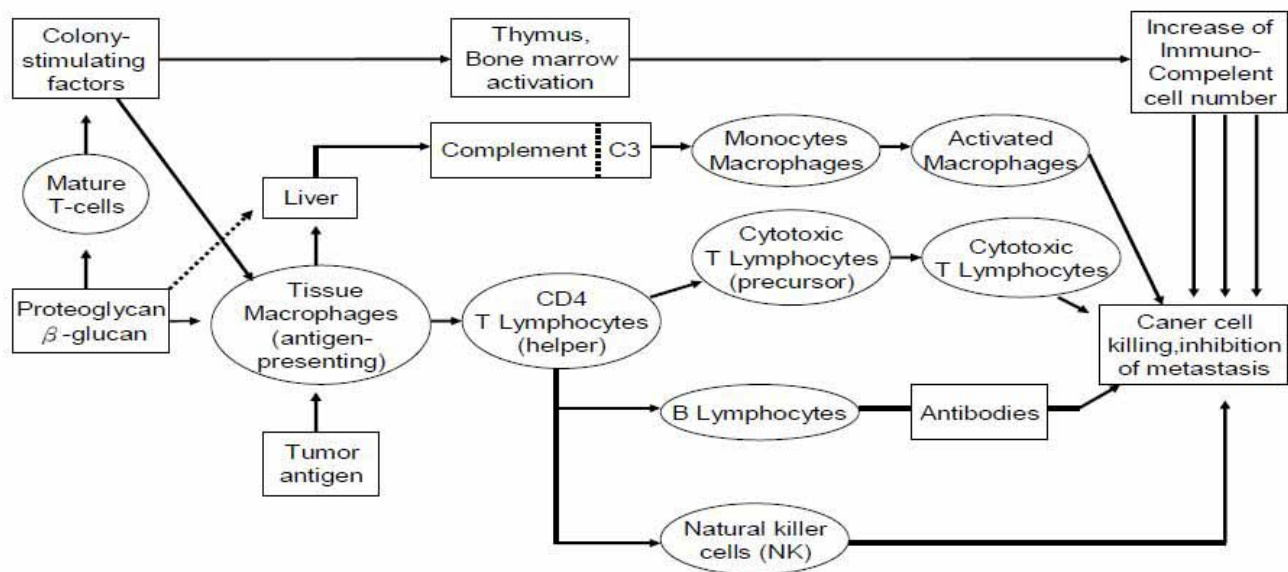


圖 1-3 菇類蛋白多醣(proteoglycan)和多醣(β -glucan)增強免疫功能之可能途徑(Modified from Chihara *et al.*, 1987)。

Fig 1-3 Mechanisms of proteoglycan and β -glucan enhanced immunity.

(IL- γ)、多形核白血球等因子，並經由活化過程抑制腫瘤細胞株生長；對肉瘤抑制率為 77.5%，腫瘤完全退縮率為 4/8；對於直腸癌、肺癌、胃癌、卵巢癌等患者均可提高存活率(Kikuchi *et al.*, 1988；Hayakawa *et al.*, 1993)。

PSP於動物體中能夠對抗腫瘤誘導的免疫抑制：抑制肉瘤小鼠的胸腺萎縮，對抗腹水癌細胞造成的肝臟膨脹，中和肉瘤小鼠對抗體造成的抑制效應，增加肉瘤小鼠的C₃補體數值(serum complement C₃) (Zhou *et al.*, 1988；Li *et al.*, 1990)。其抗腫瘤機制藉由提升免疫力、對腫瘤細胞進行毒殺作用、抑制腫瘤細胞DNA合成、誘導癌細胞走向程式死亡以及抗菌作用來達到抗腫瘤效果(圖 1-4)。

3. 抑制癌症細胞

PSK 有效抑制胃癌、食道癌、鼻咽癌、大腸癌、肺癌、血癌、乳癌等癌症。PSP 能抑制小鼠體中血癌細胞、骨髓瘤細胞、肝癌細胞、肺癌細胞生長。抑制人體肺癌細胞、大腸癌細胞、鼻咽癌細胞、胃癌細胞、肺腺癌細胞、單核白血病細胞人類淋巴瘤細胞生長，亦能夠使癌症細胞腫脹和染色體變異。而 PSP 在小鼠肉瘤細胞、血癌細胞、腹水癌細胞抑制效果方面優於 PSK(Parris, 2000)。

PSP 抗癌機制(Lee *et al.*, 2006)研究證實為(1)延遲細胞循環和

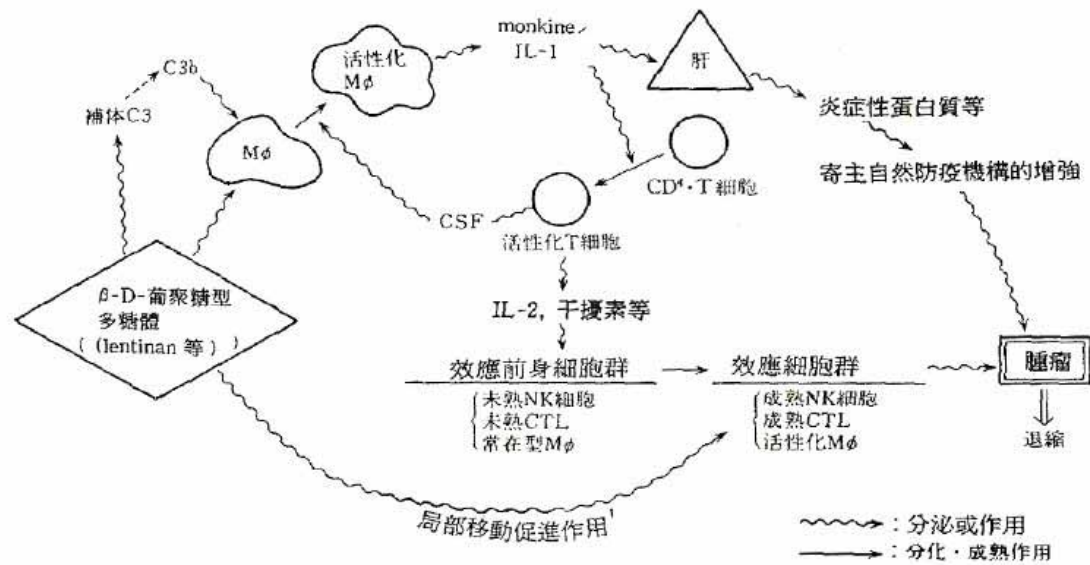


圖 1-4 β-D-葡聚糖系多醣體抗腫瘤之可能機制(水野和川合，1999)

IL-1：介白血細胞素；IL-2：細胞激素；Mφ：巨噬細胞。

Fig 1-4 Possible mechanisms of β-D-glucan antitumor.

IL-1：interleukin-1；IL-2：interleukin-2；Mφ：macrophage.

誘導細胞程式死亡達到阻止癌症細胞增殖。(2)抑制癌症細胞 DNA 和 RNA 的合成。(3)誘導癌症細胞染色體變異。(4)增進免疫功能。PSK 的抑瘤作用必須在相關抗原和抗原遞呈細胞共同存在下才能表現出來，PSK 本身作為相關抗原，在抗原遞呈細胞如脾細胞存在下，激活 T 細胞殺傷腫瘤細胞以及增生 TNF 達到腫瘤抑制作用。此外，PSK 能劑量依賴性促進一氧化氮(NO)合成 mRNA 在巨噬細胞中的表現並促進 NO 產生，推測此為 PSK 抗腫瘤作用之一。

4. 保肝作用

肝臟為代謝旺盛的高氧耗器官，其超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性很高(Marklund, 1984)，在一系列生物氧化過程中可產生超氧自由基，若自由基清除機制不健全，則可激發脂質過氧化連鎖反應導致肝臟損害。由文獻得知荷瘤小鼠(Tumor-bearing mice)肝臟 SOD 活性下降，而丙二醛(Malondialdehyde, MDA)則升高雲芝子實體多醣(*Coriolus versicolor* polysaccharide, CVP)服用 3 天，可提升 SOD 活性和降低 MDA 含量(魏等人 1996)。

大鼠腹腔注射 PSP，可降低 CCl₄ 中毒導致的麩丙酮酸轉氨酶(Glutarnic Pyruvic Transaminase, SGPT)值，減輕肝細胞中毒損害，使 D-氨基半乳糖致肝損害減輕且存活率提高，並對肝炎患者來

說，服用雲芝多醣可使其轉氨酶恢復正常(李，2003)。

雲芝多醣抑制肝毒素其作用機制為(1)直接毒素結合。(2)促進重建放射線照射後之小鼠的造血功能。(3)作用於肝臟還原態麩胱甘肽(reduced GSH)而達到止痛，與 GSH 結合形成異質物能促進處理活性物質與毒性物質的解毒作用(賴，2008)。

5. 抗病毒作用

PSP 多醣部分會與人類後天免疫缺乏第一型病毒(HIV-1)結合，而干擾 HIV-1 病毒無法與人體細胞(CD4 lymphocyte receptor)進行結合傷害人體，亦能於體外試驗中有效抑制 HIV-1 反轉錄酶(reverse transcriptase)活性(Collins and Ng, 1997)。

6. 鎮痛消炎作用

對於不同性質刺激如溫熱刺激(熱板法)、電刺激躁動的體表痛以及乙酸注射造成急性癌症性的內臟疼痛等均具有鎮痛作用。目前研究出其可能作用機制為激活腦下丘內側基質底部神經元，活化腦下丘在內的內源性疼痛系統而發揮鎮痛作用(張等人 2004)。

雲芝糖肽(PSP)能激活下丘腦內側基底部(MBH)的神經元(俞等人，1994)，因此以痛覺調制來說，PSP 可能激活包括下丘腦在內的內源性鎮痛系統而發揮鎮痛作用(滕等人，1996)。

7. 抗氧化(衰老)作用

抗氧化活性主要是提高SOD活性、降低LPO水平，以及提高GSH-Px活性，有效提高機體抵抗並避免活性氧損傷，達到保護基體作用。雲芝子體多醣(CVP)能有效地防止因腫瘤或輻射引起的SOD活性下降，活化錳超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)的作用更強(Wei *et al.*, 1996)。動物試驗結果能使大鼠肝內還原型麩胱甘肽(GSH)下降，氧化型麩胱甘肽(glutathione disulfide, GSSG)值則上升，結果使GSSG/GSH比率提升3倍。H₂O₂可在GSH-Px作用下動用GSG轉化成H₂O和GSSG，因此GSSG/GSH值上升，表示GSH-Px活性增強，促進H₂O₂清除(Yeung *et al.*, 1994)。PSK能誘導mRNA的表現，活化腹膜上巨噬細胞內的麩胱甘肽的過氧化酶(glutathione peroxidase, GPx)防止受到氧化傷害(Pang *et al.*, 2000)，避免受到叔丁基氫過氧化物(tert-butylhydroxide, TBH)導致的呼吸爆炸抑制。

抗衰老的可能機制為提高基體SOD活性和增強免疫功能，基體在正常代謝狀態下產生超氧自由基(O₂⁻·)和過氧化氫(H₂O₂)等具活性還原氧類物質對生物大分子起交聯作用，這些物質和生物膜磷脂的多種不飽和脂肪酸在有氧時發生連鎖反應，而生成脂類過氧化物，將會對細胞膜的流動性和功能造成嚴重影響(南和邵，2005)。

8. 抗動脈硬化作用

PSP 能降低吞噬細胞內脂質過氧化物(lipoperoxide, LPO)含量，且對 O-LDL 和叔丁基氫過氧化物(TBH)所引起之吞噬細胞粒線體膜有保護作用，避免受到脂質過氧化物損傷。此外 PSP 亦能增加吞噬細胞中硒谷胱甘肽過氧化酶(selenium dependent glutathione peroxidase, SeGSH-Px)mRNA 的含量，增強 SeGSH-Px 的基因表達，能有效提高機體抗氧化能力，防止脂質過氧化造成的損傷，降低動脈硬化斑塊的形成(婁等人 1995)。

9. 其他

PSP 能增進給予環磷醯胺 (cyclophosphamide)小鼠的食慾，亦能抑制小鼠中樞神經系統和降低自發(spontaneous)活性(Yang, 1997)，使小鼠在缺氧狀態下具有較高的缺氧耐受性，鎮定中樞神經系統，抑制血管新生(Ho *et al.*, 2004)以及抗貧血等作用。

(三) 雲芝漆酶之應用

漆酶(laccase)為一種廣泛分佈於白腐真菌中的木質素降解酶類，其能將酚類物質氧化變色。以雲芝等白腐真菌處理糖廠廢水結果顯示，雲芝菌對梅納反應色素、降解色素、焦糖色素及複雜酚類色素具有漂白作用(Guimaraes *et al.*, 1999)，因此雲芝不僅有藥用價值，對於治理環境污染也具有其發展空間。

三、真菌液態培養

由於使用固態培養菇類菌絲體所需要的時間較長，而且在培養過程中容易增加被雜菌汙染的機會，通常使用較高的菌配接菌量(10~30%)，但效果卻不一定比較好(王，2002)。而且菌絲常會糾結成球狀，當菌絲球增大，氧氣及養分的質傳效果亦會下降，因而對菌體的增殖和代謝物的產出有負面影響(張，2001)。

使用液態培養菌菇類時可以控制及改善上述狀況—液態培養又可稱為深層培養或深層發酵培養(submerged cultures)，此種培養方法是將微生物培養於液態培養基中，控制培養基的、pH、溫度、通氣量、攪拌速率等不同因子進行發酵培養，使菌絲生長繁殖，並累積具有生理活性的代謝產物。人工培養菌絲體能有效的控制為生物所需的條件，不但比人工栽培子實體培養週期短、成本較低廉、產量及品質都較穩定，因此液態培養菌絲體得以大量量產，而菌絲體也具有很高的營養與藥用價值，故近年來國內外利用液態深層培養靈芝、冬蟲夏草、巴西蘑菇等菇類菌絲體已經十分普遍，研究菌體最適生長條件，利用便宜的培養基或農產廢棄物等培養基質，不但大幅減低成本也提高生產率(賴，2008)。

採用液態發酵有以下幾種特點(張，2001；林，2002)：

(一) 減少對環境的衝擊，生產空間也較小。

- (二) 子實體培養耗時費力，大量培養菌絲體所需時間甚短。
- (三) 所得產物之藥理成分，與固態培養的產品相似。
- (四) 微生物需要的生長條件比較利於調控，可以提供較佳的質傳及熱傳效應。
- (五) 在生物反應器內，培養基中的基質、氧氣傳遞、以及生長時的溫度均能均勻分佈，對菌體的生長與代謝有利。

四、菌絲球形成與型態之影響因子

不同的菌絲體形態不僅會直接影響菌體生長、發酵液黏度、營養成分和氧氣的質傳效果，亦會間接影響到代謝產物的生成。影響菌絲球形成主要和菌種種類、菌種特性等因素有關，而菌絲球形態則和培養條件、培養基組成份等因素有相當大的關係(表 1-2)(楊和楊，2001；Metz and Kossen, 1977)。影響條件如下：

(一) 剪切力或攪拌速度

攪拌速率會影響攪拌葉片所產生的剪力大小，形成菌體和渦流、攪拌葉片或檔板間、以及菌體之間等三種作用力，以菌體和渦流之間作用力影響較大，對菌體細胞壁組成和結構會有影響。攪拌強度增加則菌體大小會減小，結構也較緊實。然而若攪拌速度過高所造成的剪切力過大，容易使菌體破裂抑制生長，此時菌體也會消耗環境中的碳源以維持細胞生長，並降低多醣的合成。

表 1-2 各種真菌液態培養時影響球狀菌絲體形成的因子

Table 1-2 Fungi mycelium pellets forming affect by submerged fermentation.

Factor	Fungus
乳糖誘發菌絲球形成	<i>Acremonium diospyri</i>
菌絲球大小與密度與初始磷酸鹽濃度有關	<i>Asperigillus awamori</i>
添加 EDTA、CDTA 和 DTPA 會形成顆粒小表面平滑的菌絲球，取代原先顆粒較大結構鬆散的菌絲球	<i>Asperigillus niger</i>
孢子的凝聚有利菌絲球生成	
低濃度孢子接菌液有利菌絲球生成	
極低的葡萄糖濃度有利菌絲球生成	
低濃度孢子接菌液有利菌絲球生成	<i>Asperigillus oryzae</i>
低濃度孢子接菌液有利菌絲球生成	<i>Caldariomyces fumago</i>
降低硝酸銨濃度有利形成顆粒小、結構緻密、表面光滑的菌絲球	<i>Myrothecium verrucaria</i>
添加 100 mg/L Troton N-101 有利菌絲球生長	<i>Neurospora crassa</i>
低濃度孢子接菌液有利菌絲球生成	<i>Penicillium chysogenum</i>
低濃度孢子接菌液生成緻密的菌絲球，高濃度孢子接菌液生成鬆散的菌絲球	<i>Penicillium patulum</i>
在 peptone 濃度為 1-5 g/L 會形成菌絲球	<i>Rhizopus arrhizus</i>
添加 Carbopol 會減低菌絲球大小	<i>Asperigillus niger</i>

(楊和楊，2001)

在過去數多真菌研究中當菌絲形態為緊密菌絲球，會有較高的菌絲及多醣產量(Bae *et al.*, 2001 ; Park *et al.*, 2002 ; Sinha *et al.*, 2001)；然而亦有相反的研究結果顯示，以高鬆散似羽毛狀的菌絲形態，具有較高的菌絲體、多醣體產量(Lee *et al.*, 2004)以及花生四烯酸(Arachidonic acid)產量(Park *et al.*, 1999)。

(二) 接菌量

菌體的形態與大小及其當時的物理狀態，都會影響到菌體於發酵槽內的生長形態，低接菌量適合菌絲球的生成，高接菌量則適合菌絲生長，推測主要原因乃因高接菌量下，發酵初期菌絲體會因菌量濃度過高而相互作用，因此不利菌絲球的形成。但是在 *Aspergillus* 和 *Aspergillus nidulans* 中任何孢子接種濃度菌體皆會形成菌絲球(Metz and Kossen, 1977)。相反地，接菌量對於 *Ganoderma lucidum* (CCGMC 5.616) (Fang *et al.*, 2002)產二及代謝產物的研究中指出，以低接菌量(70 mg DW/L)發酵培養所形成的菌絲球較大(> 1.6 mm)，多醣產量少；高接菌量(670 mg DW/L)培養成的菌絲球粒徑較小(< 1.2 mm)，多醣體產量最多，此乃因為菌絲球中心營養份的限制而造成代謝產物的產量有不同的影響。

(三) 通氣量

根據文獻指出，在通氣量較低或缺氧的狀態下有助於代謝產物的生成；而在通氣量較高的狀態下則有助於菌體的生長。亦有利用兩階段(two-stage)的控制方式(Rau *et al.*, 1992)，發酵前期增加通氣量使菌體大量生長，於後期降低通氣量以促進代謝產物的生成。

(四) 培養基組成份

氮源的種類與濃度不僅對菌體生長與代謝產物造成影響，亦會影響菌體形態。文獻中以不同氮源與濃度培養 *Moruerella alpina*，結果發現菌絲體在不同氮源下有呈現絲狀和菌絲球兩種形態，推測可能與培養基整體的碳氮比相關(Park *et al.*, 1999)。在高氮源濃度(100-500 mmol NH_4NO_3)下，產生較多平滑的菌絲球；而低氮源濃度(1-5 mmol)下則呈現鬆散的結構(胡，1994)。碳源的濃度亦會影響菌體的大小形態和代謝產物的產出。利用不同碳源濃度培養，*Paecilomyces japonica* (Sinha *et al.*, 2001)，菌絲球粒徑大小隨著碳源濃度增加(20 g/L增加到 60 g/L)而增加，以 40 g/L sucrose 下培養所得粒徑最大為 2.19 mm，菌絲乾重與胞外產物均有最高產量。但是在培養 *Ganoderma lucidum* 試驗(Fang and Zhong, 2002)中發現，glucose 濃度增加(20 g/L增加到 65 g/L)

則菌絲球粒徑大於 1.6 mm 數量減少，小於 1.2 mm 的菌絲球數量增加，推測此現象乃因粒徑大小受到碳源濃度不同而造成滲透壓差異的影響(Zhang *et al.*, 1995)，菌絲乾重、胞內多醣及靈芝酸則在 glucose 50 g/L 下有最高產量。

(五) pH 值

pH 值的高低對微生物生長形態和代謝產物的生成皆具有影響，pH 值的變化對於代謝副產物如酸類物質、營養源的消耗、氧化還原反應及培養液的緩衝效果造成很大的影響。

(六) 二氧化碳濃度

在高二氧化碳環境下常出現不規則的菌絲形態，培養基中二氧化碳濃度增加時，菌絲膨脹狀況也會增加，此原因可能為二氧化碳改變了菌體形態，影響到細胞膜輸送性質而改變代謝途徑。

(七) 生長速率

在培養 *Penicillium chrysogenu* 過程中發現，若培養初期有較大量的懸浮菌絲體存在，則形成菌絲球的比例會隨著生長速率增加而增加，可能原因為較高的生長速率會促使更短、更多分支的菌絲產生，使得菌絲體間相互作用較少，而容易產生菌絲球的結構(Metz and Kossen, 1997)。

(八) 不同型式發酵槽

攪拌式發酵槽藉由機械攪拌作用，可將氣泡打散而均勻分佈於發酵槽中，利用轉數大小可以控制菌絲球顆粒大小而達到所需菌體大小，但剪切力卻會造成菌體細胞結構的破壞。氣舉式發酵槽具有循環迴路，因此有比氣柱式發酵槽佳的循環效果，且剪切力較攪拌式發酵槽低，故可利用不同發酵槽之特性得到所欲求得的菌體大小及形態。

(九) 自體分解

在 *Penicillium chrysogenum* 及 *Aspergillus nidulans* 的培養過程中發現，缺乏營養份時菌絲球會有自我分解現象發生(Metz and Kossen, 1977)。北冬蟲夏草(Park et al., 2002)在低通氣量下培養因為溶氧快速消耗而造成自體分解；於高通氣量下則因高溶氧量提供菌體快速的消耗基質生長而造成自體分解。

(十) 礦物質載體的添加

培養基中的固體或半固體成份，於培養過程中會有利於絲狀真菌的纏繞，形成菌絲球。利用添加礦物質可以使得菌絲體形成羽毛狀的形態，增加質傳效率，而有利於代謝產物的生成。

五、菌體固定化簡介

(一) 固定化的定義

固定化(Immobilization)指利用人工技術，以物理或是化學方式將生物觸媒(biocatalyst)的移動性(mobility)加以限制此處的生物觸媒可泛指細胞及酵素(Scott, 1987)。

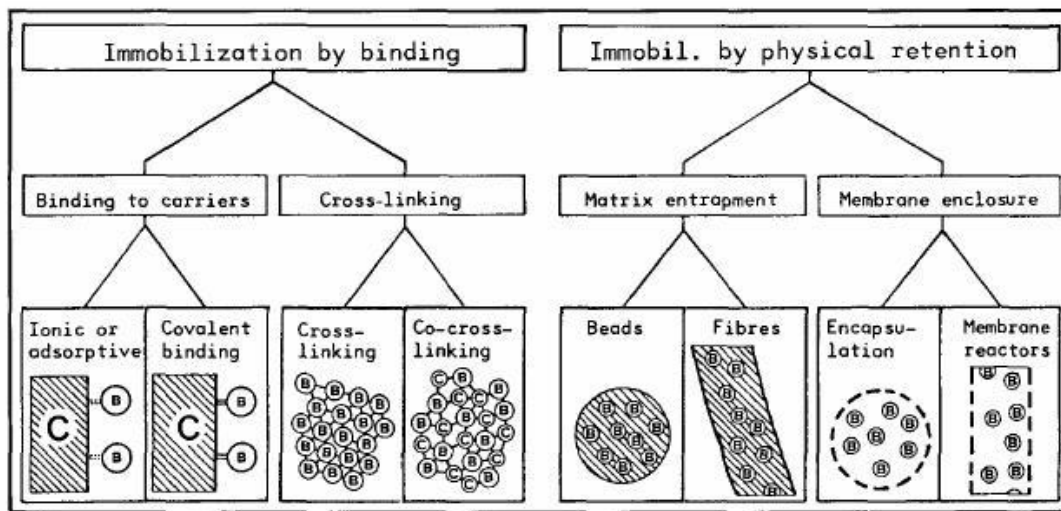
限制菌體細胞的移動性，可藉由聚集並限制細胞於固體支持物(載體)上來達成，近二十多年來被廣泛地應用於工業上固定化細胞及酵素(Gerbsch and Buchholz, 1995)。

(二) 菌體固定化的方法(圖 1-5)

細胞固定化方法依其鍵結方式的不同而分為以下四大類：細胞交聯法(Cross-linking)、附著載體法(Binding to carrier)、膠體包埋法(Matrix entrapment)、薄膜包覆法(Membrane enclosure)

1. 交聯法(Cross-linking)

在無載體的存在下，利用反應劑以物理或化學方法將細胞彼此附著在一起。細菌的細胞壁由肽聚糖(Peptidoglycan)聚合而成，糖與糖間以肽鍵相接並含有自由胺基，可利用醛類化合物，如乙二醛(Glyoxal)或戊二醛(Glutaraldehyde)作為交聯劑，與細胞壁生成亞胺(Imine)(Fried, 1995)完成化學鍵結。交聯法的結構穩定性佳，但缺點是常造成細胞結構改變而降低活性。



C : carrier B : biocatalyst (cell/enzyme)

圖 1-5 細胞固定化的分類圖(Lu *et al.*, 1996 ; Winfried H., 1988)

Fig 1-5 Various types of immobilized cell.

2. 附著載體法(Binding to carrier)

此方法的原理是利用細胞與非水溶性載體間的物理吸附、離子鍵結或化學鍵結作用，將細胞固定於載體上。附著載體法依其鍵結力不同又細分為吸附法(Adsorption)、離子鍵結法(Ionic binding)、共價鍵結法(Covalent binding)，各詳述如下(洪，2004)：

吸附法(Adsorption)：為一種最簡單的固定化方法，其主要原理是藉由物理的作用力附著在載體上，像是親疏水性、氫鍵或是凡德瓦力…等。由於吸附的結合力很弱，故菌體細胞容易受到溶液中溫度、基質濃度的影響而導致脫落。

離子鍵結法(Ionic binding)：細胞藉由自然附著(attachment)或靜電吸引力(Electrostatic attraction)吸附於載體表面，形成一生物膜(Bio-film)其鍵結力較吸附法強但是仍需選擇適當的離子濃度 pH 值…等以避免菌體自行脫落。

共價鍵結法(Covalent binding)：藉由化學方法使細胞與載體表面產生化學鍵結，此種方法往往造成細胞失活或是死亡，因此在固定化的過程中需要較嚴格的條件。

3. 膠體包埋法(Matrix entrapment)

利用高分子聚合物在凝膠時，將細胞包埋在由分子鏈交錯而成的網狀結構內部，此網狀結構的孔徑必須適當，可同時防止被包埋

的細胞逃脫，和允許基質與產物的擴散。此凝膠的高分子結構外型，一般較常用的是顆粒狀與纖維狀。

4. 薄膜包覆法(Membrane enclosure)

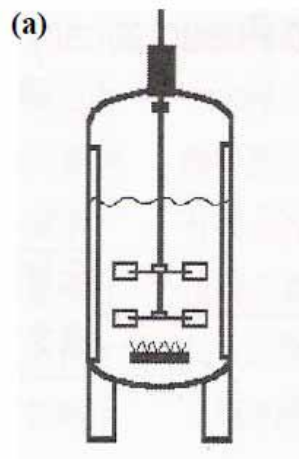
藉由外層的高分子膜限制菌體的活動，內部為液態環境，菌體則懸浮在水溶液環境中，可提供菌體足夠的生長空間(Yoo *et al.*, 1996)，但缺點是機械性質極差。

(三) 菌體固定化的優點

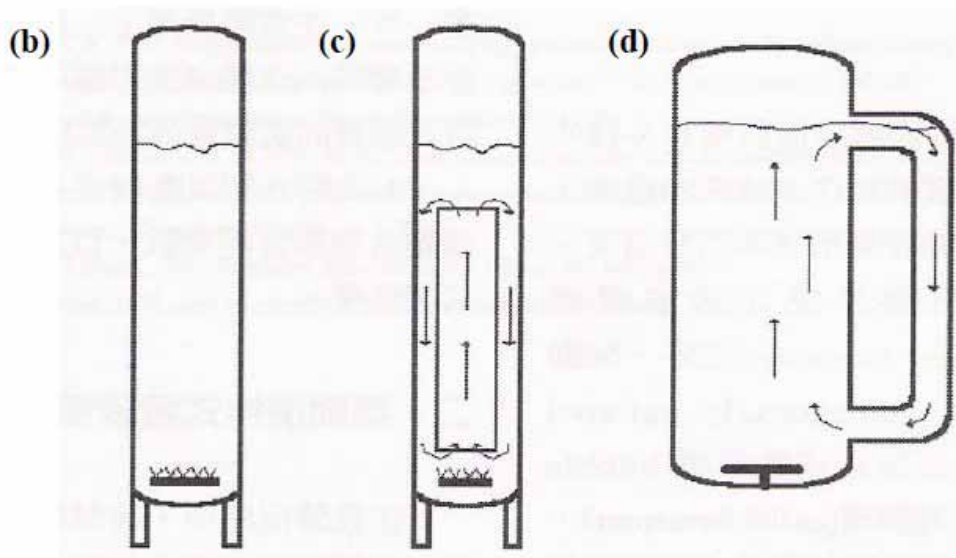
1. 已固定化的菌體或酵素可重複使用，免除了菌體再生長的階段，可節省成本。
2. 菌體固定化系統可維持培養環境中高濃度的菌體，可提高反應速率而縮短反應時間。
3. 所生成的產物含菌量低，有利於之後分離程序的進行。

六、工業發酵的發酵槽

利用生物特性進行相關生化反應的裝置稱為生化反應器(Bioreactor)或發酵槽(Fermentor)。隨著生物技術的發展，利用發酵技術生產具生理活性的代謝產物，所利用的微生物從細菌、酵母菌、絲狀真菌到動植物細胞，面對多樣性的微生物及其生長形態與特性，目前除了傳統機械攪拌式發酵槽(Mechanically stirred tank fermentor)之



Mechanically agitated fermentor



Pneumatically agitated fermentor

圖 1-6 各種常見之發酵槽(Chisti, 1989)。(a) 機械攪拌式；(b) 泡柱

式；(c) 氣舉式(內環式)；(d) 氣舉式(外環式)。

Fig 1-6 The common types of fermentors. (a) Mechanically agitated fermentor ; (b) Bubble column fermentor ; (c) Airlift fermentor (internal loop) ; (d) Airlift fermentor (external loop) .

表 1-3 不同發酵槽之優缺點。

Table 1-3 Characteristics of different fermentors.

	優 點	缺 點
攪拌式發酵槽	<ol style="list-style-type: none"> 1. 混合效果佳 2. 適合高黏度培養液 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 產生額外熱量 2. 過高的剪切力 3. 成本過高
泡柱式發酵槽 (又名氣泡塔式)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 結構簡單 2. 成本低 3. 剪切力較低 4. 無機械性產熱 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 混合效果差 2. 不適合高黏度系統
氣舉式發酵槽	<ol style="list-style-type: none"> 1. 導流效果好 2. 較低剪切力 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 氧氣質傳較差 2. 不適合高黏度系統

(董，2001)

外，尚有氣動攪拌發酵槽(Pneumatically agitated fermentor)如泡柱式發酵槽(Bubble column fermentor)和氣舉式發酵槽(Air-lift fermentor)等不同型式之發酵槽逐漸被開發利用(圖 1-6、表 1-3)(王和黃，2001)。

(一) 機械攪拌式發酵槽(Mechanically stirred tank fermentor)

機械攪拌式發酵槽的攪拌速度和攪拌葉片(圖 1-7)決定混合的效能，為了達到良好的混合效能，發酵槽設計槽高(H)與內徑(D)之比例(H/D 值)通常在 2~3 左右。此種發酵槽在培養過程中，攪拌葉片會將通入槽內的氣泡擊碎，使氣泡均勻散佈在發酵液中，液氣介面變薄而增加溶氧量；也能夠有效地混合營養基質與微生物，避免因菌絲體聚集而影響質傳效果降低。具有攪拌與通氣分離使用之彈性、混合能力強及適用於高黏度系統等優點，但硬體成本高、能量消耗高，且會有剪切力傷害細胞等缺點。

(二) 氣動攪拌式發酵槽(Pneumatically agitated fermentor)

氣動攪拌式發酵槽的 H/D 值通常大於 3，甚至有些會大於 10，故外觀呈高塔狀，與機械攪拌式發酵槽的外觀不同。此類發酵槽的優點是在機械構造較簡單、無機械性產熱且低剪切力破壞，但在混合與氧氣質傳效能較差，氣泡問題嚴重，且有規模放大與操作的問題。

1. 泡柱式發酵槽(Bubble column fermentor)

此類型發酵槽是氣動攪拌式發酵槽中構造設計最簡單者，僅由槽

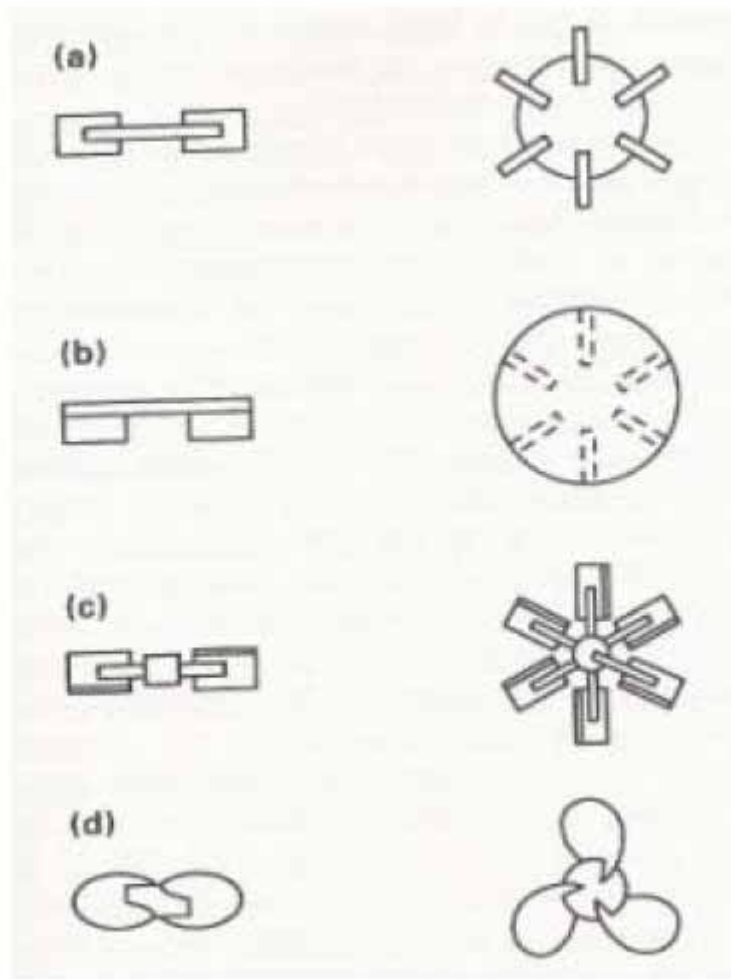


圖 1-7 攪拌器葉片形式：(a) disc turbine；(b) vaned disc；(c) open turbine, variable pitch；(d) marine propeller (Solomons, 1969)。

塔和氣體分散器裝置所構成。運作方式乃通入槽體的氣體，藉由氣體分散器使氣泡均勻混於發酵液中並帶動液體混合。

2. 氣舉式發酵槽(Air-lift fermentor)

一種改良式的氣柱式發酵槽，主要是比氣柱式發酵槽內增加一個導流管(Draft tube)裝置，導流管可以使槽內的流體狀態分隔成進氣區域的上升流動區(Rise)，與非進氣區域的下降流動區(Downcomer)。由於進氣區域的流體有較高的氣體佔有率(Gas holdup)，使這個區域的流體密度低於非進氣區域的流體密度，因而造成流體自然的循環流動。

第三章 材料與方法

一、試驗材料

(一) 試驗菌株

本試驗菌株為 *Trametes versicolor* (Linnaeus : Fries) Pilat. (BCRC 37118), 購自新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。

(二) 試驗藥品

1. 3,5-dinitrosalicylic acid 購自西班牙 Panreac Química S.A.U. 公司。
2. D-(+)-glucose 購自美國 Sigma 公司。
3. Corn steep liquor 由豐年豐和公司贈送。
4. Yeast extract、Malt extract、Potato dextrose agar (PDA)、Potato dextrose broth (PDB) 等微生物級藥品購自印度 Himedia 公司。
5. K_2HPO_4 和光一級試藥購自日本和光純藥工業株式會社。
6. Potassium sodium tartrate、 KH_2PO_4 、NaOH、Phenol、 H_2SO_4 等試藥一級購自台灣聯工化學廠股份有限公司。
7. 藥用酒精購自景明化工公司(95%)。
8. 消泡劑 KM-72S 購自信越化學工業株式會社。

(三) 培養基組成

1. 斜面培養基：Potato dextrose agar (PDA slant)
2. 平面培養基：Potato dextrose agar (PDA plate)
3. 菌醃培養基：Potato dextrose broth (PDB)
4. 搖瓶培養基：Glucose 30 g/L、Yeast extract 3 g/L、Malt extract 3 g/L、Corn steep liquor 45 g/L、 K_2HPO_4 0.1 g/L、 KH_2PO_4 0.1 g/L。
5. 發酵槽培養基：Glucose 30 g/L、Yeast extract 3 g/L、Malt extract 3 g/L、Corn steep liquor 45 g/L、 K_2HPO_4 0.1 g/L、 KH_2PO_4 0.1 g/L、消泡劑 0.165 g/L。

二、儀器與設備

1. pH meter (SP-2200，上泰儀器股份有限公司，Taiwan)。
2. 分光光度計(Spectronic 20 Genesys, model 4001, 大成儀器，USA)。
3. 蒸氣直立式滅菌釜(Huxleyhl-340，永大明儀器，Taiwan)。
4. 蒸氣臥式滅菌釜(永大明儀器，Taiwan)。
5. 恆溫培養箱(Firstek, model：RI-150，一升科技，Taiwan)。
6. 迴轉式震盪培養箱(Firstek, model：S302R，一升科技，Taiwan)。
7. 烘箱(熱風循環乾燥箱，光勝儀器製造所，Taiwan)。

8. 均質機(Oster regency)。
9. 桌上型高速離心機(EBA 12, Hettich, Germany)。
10. 超音波震盪器(Power sonic 405, Hwashin Technol. Seoul, Korea)。
11. 低溫冷凝循環器(EBCA-20PTS, 豪曉精密有限公司, Taiwan)。
12. 氣舉式發酵槽(air-lift fermentor, 7L, 台灣頂生儀器): 總體積 7L 容許運載量最高至 6L 本試驗運作體積為 5L; 內裝有導流管(內徑 7.5 cm, 壁厚 2 mm, 高度 20 cm)。
13. 靜態恆溫水浴槽(Firstek model: B-101, 一升科技, Taiwan)。
14. 低溫冷凝循環器(Firstek model: B401L, 一升科技, Taiwan)。
15. 空氣幫浦(ORSO AMP 5000, 艾瑪特有限公司, Taiwan)。
16. 無塵無菌操作台(海天科學股份有限公司, Taiwan)。
17. 多醣分子量分析:
 - 液相層析幫浦: HITACHI, L-6000 Pump。
 - GPC 管柱: PolySep-SEC-P 4000。
 - 偵測器: BISCHOFF RI-DETECTOR 8110。
 - 積分儀: Chromatocoder 21。

三、試驗方法

取雲芝菌種接種於 PDA 培養皿(plate)中，以 25°C 活化 7 天後，取 4 單位菌絲塊於含有 100mL PDB 培養液的 250 mL 三角瓶中，震盪培養 6 天(25°C, 100 rpm)，養成的菌醃以均質機均質 30 秒，取 5% (v/v) 菌醃量接種至搖瓶或發酵槽中進行各種試驗條件的培養，定時進行取樣分析，各條件均進行三重複試驗。將取出的發酵液以濾紙(Whatman No.4, 孔徑大小為 20-25 μm)進行抽氣過濾得到菌絲體及發酵濾液，菌絲體進行菌絲乾重、胞內多醣及分子量測定；發酵濾液則測定發酵液 pH 值、殘糖量、胞外多醣及分子量測定。

(一) 菌種保存

將購自菌種中心的雲芝菌，由原始的 PDA slant 中取菌絲劃線於新配製的 PDA slant 上，於 25°C 下生長 3 天至有菌絲生成，之後加入甘油覆蓋過培養基面，移至 4°C 保存備用。

(二) 菌種活化

將保存雲芝菌的 PDA slant 中之甘油倒出，利用接種環取適量菌絲劃線於 PDA plate 上，在 25°C 下培養 6 天進行一次菌醃活化；二次活化則以直徑 6 mm 之玻璃滴管從長滿菌絲之 PDA plate 上切取菌絲塊(本試驗以一個直徑 6 mm 之菌絲塊定義為 1 單位)，接種於新的 PDA plate 上，於 25°C 下生長 6 天。

(三) 菌醃培養

將已二次活化的 PDA plate 上取 4 單位菌絲塊，接種於含有 100 ml PDB 培養液的 250 ml 三角瓶中，以 25°C 轉速 150 rpm 條件下震盪培養 6 天。培養完成之菌醃以均質機打碎混合，即可分別接種於搖瓶與發酵槽中進行試驗。

(四) 載體前處理

將泡棉及菜瓜布分別裁切至適當大小(本試驗泡棉裁切為 1 cm³、菜瓜布裁切後約為 1×1×0.9 cm)，分別定義為 1 單位，以清水反覆清洗，再以 RO 水潤洗一次後將水濾乾，最後置於烘箱烘乾備用。

(五) 搖瓶培養

配製搖瓶培養基，並以 NaOH_(aq) 將 pH 值調至 6.0，分別進行以下試驗：

1. 載體適性

在含有 100 ml 培養基之 250 ml 三角瓶中，各別加入 10 單位泡棉及菜瓜布，以 121°C、20 min 條件滅菌，待冷卻後接種菌醃 5 ml，培養觀察雲芝菌絲體在兩種載體的附著情形、菌絲生長和多醣體產量。

2. 載體裝載量

承上試驗，在含有 100 ml 培養基之 250 ml 三角瓶中，各別加

入 10%、15%及 20%培養基體積單位(v/v)載體，滅菌後接種菌醃 5 ml，培養觀察雲芝菌絲生長情形和多醣體產量。

3. 搖瓶轉數

承上試驗，在含有 100 ml 培養基之 250 ml 三角瓶中，各別加入最佳之載體及其最適單位數量，滅菌後接種菌醃 5 ml，培養期間在振盪培養箱的轉速分別以全程 100 rpm、全程 150 rpm 及起始 150 rpm 四天後改成 100 rpm 的兩階段調控(two-stage)試驗，培養觀察雲芝菌絲體在振盪轉速對載體的附著情形、菌絲生長和多醣體產量。

4. 搖瓶使用固定化方法重覆批次培養雲芝菌之最佳化條件

根據前述試驗將最佳化條件整合，第一批定為 Run 0，為菌體附著的固定化菌體發酵培養 8 天，保留著菌絲體的載體保留在瓶中，將懸浮菌體及培養液倒出，加入 100 ml 新鮮培養基繼續培養定為 Run 1，之後皆為每 5 天替換一次新鮮培養液(Run2 and Run 3)，觀察測量雲芝菌絲體在培養期間的菌絲體和多醣體的產量。

(六) 發酵槽培養

雲芝的發酵槽培養，利用氣舉式及泡柱式兩種利用氣體帶動發酵液流動的發酵槽，探討雲芝固定化培養的菌絲體、胞外多醣及胞內多醣產量之生產最佳條件。

1. 氣舉發酵槽試驗

將處理過的泡綿(size 1 cm³, 10% v/v)置於導流管內側，以鐵絲網將導流管上下端封鎖固定，並安裝於氣舉式發酵槽內，在 7 L 氣舉式發酵槽內加入 5 L 發酵槽培養基，以 121°C、21 min 條件滅菌，待冷卻後接種均質的菌醃 250 ml，接種量為 5% (v/v)。

2. 泡柱式發酵槽試驗

其操作與氣舉式發酵槽相似，唯其未安裝導流管，藉由槽底氣泡的上升，帶動固定化菌體的載體在槽體內自由流動，每批培養完成後將發酵液與懸浮菌體取出，再添加 4 L 新鮮發酵槽培養基進入發酵槽內，進行後續的發酵。

四、分析方法

(一) 菌體乾重

取定量發酵液，利用 4 號濾紙過濾取菌絲體，再以 RO 水沖洗數次，置於 70°C 烘箱中烘乾至恆重。

(二) pH 值

利用 pH meter 測定發酵濾液的 pH 值。

(三) 殘糖量

本試驗利用修正過後的二硝基水楊酸法(Dinitrosalicylic acid, DNS)(Miller, 1959)測定殘糖量，其原理為利用還原糖(本試驗為葡萄

糖)的還原力，使鹼性溶液中黃色之雙硝基水楊酸(DNS；3,5-dinitro-salicylic acid)還原成深色之 3-氨基,5-硝基水楊酸，其產物安定，且在 575 nm 有最大吸光值。實驗步驟為將發酵濾液稀釋至適當濃度，取出 1 ml 樣品於玻璃試管中並加入 1 ml D 液震盪混合(空白組以 1 ml RO 水取代樣品)，於 100°C 水浴中作用 15 分鐘後取出，添加 0.5 ml C 液以穩定顏色，最後以 25°C 下水浴 10 分鐘冷卻，所得紅棕色氨基化合物於分光光度計 575 nm 下可測得其吸光值，將吸光值代入葡萄糖標準曲線公式可求得殘糖含量。

A 液：1% 3,5-dinitrosalicylic acid、0.2% Phenol、1% NaOH。

B 液：0.05%Na₂SO₄。

C 液：40% Potassium sodium tartrate。

D 液：99%A 液+1%B 液(實驗前配製)。

(四) 粗多醣含量

採用修正過的酚硫酸法(Phenol-sulfuric acid method) (Dubois *et al.*,1956)來測定胞外及胞內多醣含量，其原理為多醣在硫酸的作用下先水解成單糖，並迅速脫水生成糖醛衍生物，再與酚生成橙黃色化合物，可偵測其在 490 nm 下吸光值。實驗步驟為將酒精沉澱萃取出的粗多醣樣品烘乾，加入 RO 水以超音波震盪氣復溶並做適當的稀釋，取 1ml 樣品(空白組以 1 ml RO 水取代樣品)添加 0.5 ml 5%酚震盪混

合，再添加 2.5 ml 98%濃硫酸震盪混合後靜置 10 分鐘，此時樣品脫水分解生成呋喃醛並與酚反應呈色，最後以 25°C 水浴 10 分鐘冷卻，所得橙黃色化合物於分光光度計 490 nm 下可測得其吸光值，將吸光值代入葡萄糖標準曲線公式可求得粗多醣含量。

1. 胞外多醣萃取

將發酵液經過濾紙(Whatman No.4)過濾後，所得濾液取 1 mL 以酒精(95%，4v/v)沉澱 24 h，進行離心(5000 rpm，20 min)分離除去上清液，再進行第二次酒精沉澱並再次離心除去上清液，置於烘箱(75)進行烘乾，烘乾之樣品加入 2 mL RO 水進行震盪混合復溶，即得水溶性胞外多醣。

2. 胞內多醣萃取(熱水萃取)

取適量烘乾之菌絲體，添加 100 倍重量比的 RO 水，以滅菌釜熱萃取(121 ，20 min)，將熱萃液冷卻後離心，取上清液 1 mL 以酒精(95%，4v/v)沉澱 24 h，進行離心(5000 rpm，20 min)分離除去上清液，再進行第二次酒精沉澱並再次離心除去上清液，置於烘箱(75)進行烘乾，烘乾之樣品加入 2 mL RO 水進行震盪混合復溶，即得水溶性胞內多醣。

(五) 多醣分子量測定

利用膠體滲透層析法(Gel Permeation Chromatography, GPC)，以分子大小做辨識分離，分離管柱中含有難溶性聚合物做成的多孔性珠子(beads)，由於樣品大分子無法進入孔隙中，故通過管柱時會走珠子間的空隙，會比小分子快速通過管柱，因此利用 RI 偵測器測定樣品和標準品在管柱中的滯留時間進行比較，即可推測分子量大小。

樣品製備：將發酵濾液及菌絲體熱水萃取液分別進行酒精沉澱，可得胞外多醣及胞內多醣樣品，以 RO 水充分復溶後使用 0.22 μ L 微濾膜過濾，進行膠體滲透層析法分析。

GPC 操作條件如下：分析管柱移動相採用去離子水(流速 0.8 mL/min)，管柱之保存液為 30% Methyl alcohol, anhydrous(以去離子水配製並 degas overnight)，多醣標準品：Dextran (MW 6000、10000、21700、48800、113000、210000、366000、805000Da)，液相層析幫浦：HITACHI, L-6000 Pump，偵測器：BISCHOFF RI-DETECTOR 8110，積分儀：Chromatocoder 21。

五、統計分析方法

試驗所得之三重複數據採用 SAS 系統(windows 9.0)，以 ANOVA 變方分析、Duncans's test 處理各均值間的比較，顯著水準為 0.05 ($P<0.05$)，所得結果以平均值和其標準偏差 (Mean \pm SD)表示。

第四章 結果與討論

一、搖瓶試驗

本試驗的目的為研究雲芝菌固定化之載體適性、載體在液態培養基的裝載量差異及搖瓶轉速的條件，探討其對於雲芝生產菌絲體及多醣體之影響，進而找出雲芝菌體重複利用發酵的理想條件。

搖瓶試驗前先進行菌種活化(圖 4-1)，於PDA plate上進行劃線培養並二次活化，長出的雲芝菌落，活化後的菌種再轉接於三角瓶中進行菌醃培養(圖 4-2)。搖瓶試驗之基礎培養基組成為 30 g/L glucose、3 g/L yeast extract、3 g/L malt extract、45 g/L corn steep liquor、0.1 g/L KH_2PO_4 、0.1 g/L K_2HPO_4 ，起始pH值以 $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ 調整至 6.0 (賴，2008)。

(一) 載體對雲芝培養之影響

本試驗利用泡棉(Polypropylene foam)和菜瓜布(Scrub sponge)兩種載體(蘇，2010)，分別置入三角瓶後培養觀察雲芝菌絲體在兩種載體的附著情形、菌絲生長情形和多醣體產量。

1. 以泡棉作為載體培養雲芝時(圖 4-3)，隨著菌絲體生長菌絲逐漸包覆泡棉，培養約 3、4 天後，雲芝菌絲體呈現偏黃乳白色，被菌絲包覆的泡棉直徑約 1.8 cm，每顆載體間互相獨立，菌絲體包覆載體後表面呈平滑狀，附著的菌絲體有緻密感，多數菌絲體皆附著於泡棉上，培養液中僅有少量懸浮菌絲體。雲芝菌體利用碳源生

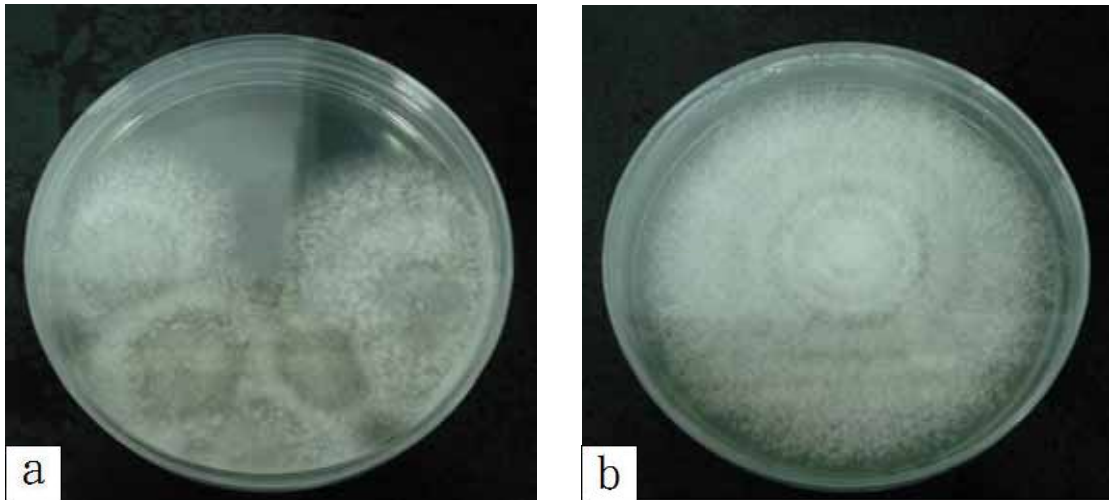


圖 4-1 雲芝菌接種於 PDA 培養皿之菌絲生長外觀。(a) 菌種活化 6 天；(b) 二次活化。

Fig 4-1 The mycelia growth of *T. versicolor* on PDA plate.

(a) 6 days after activation ; (b) 6 days after subculture.



圖 4-2 以 PDB 培養基培養 6 天之雲芝菌絲球形態。

Fig 4-2 The mycelial mass of *T. versicolor* after 6 days of growth in PDB medium.

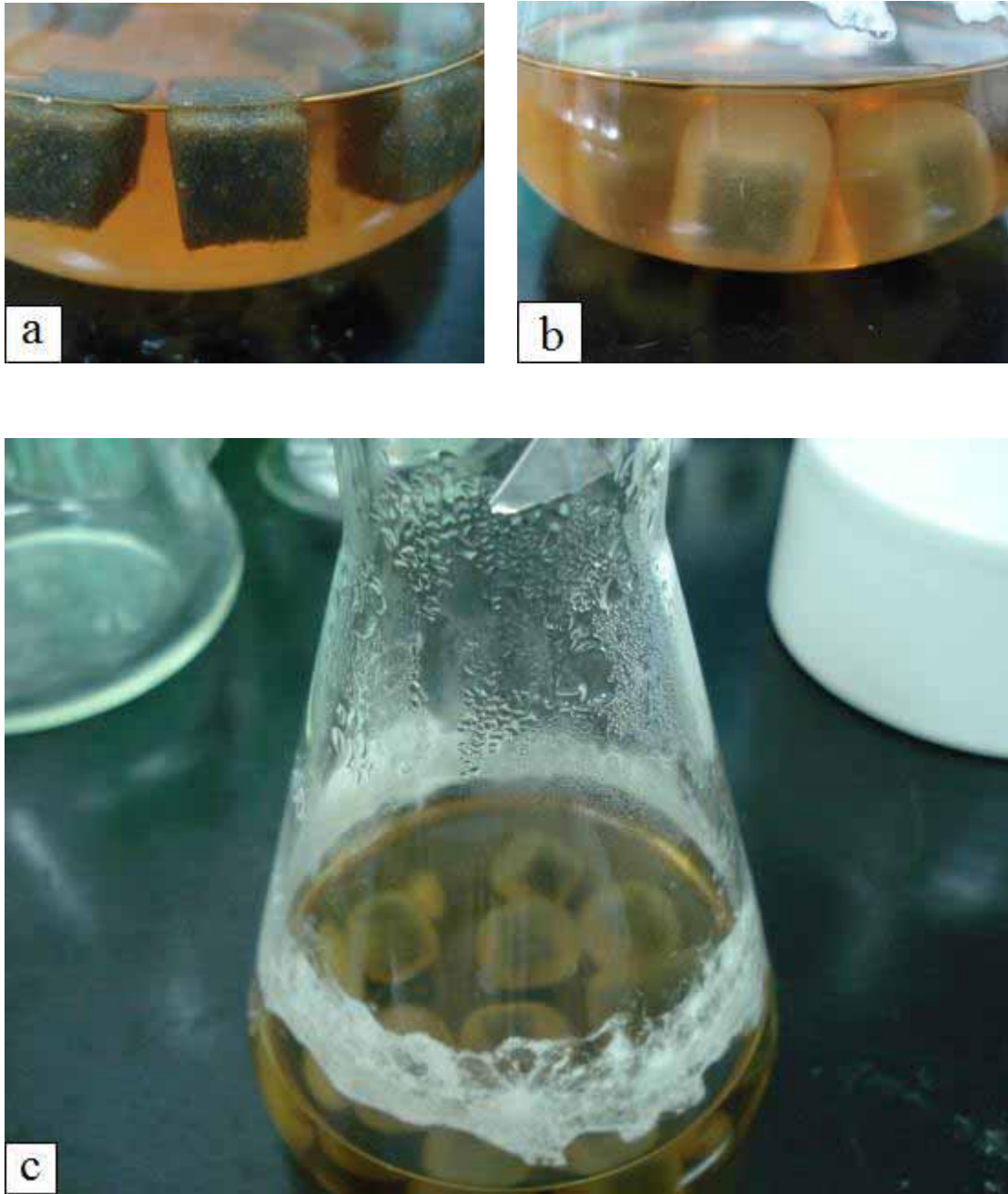


圖 4-3 以泡棉作為載體培養雲芝之菌絲包覆情形。(a) 培養 0 天泡棉之外觀；(b) 培養 10 天泡棉之外觀；(c) 泡棉載體搖瓶培養外觀。

Fig 4-3 The mycelium attachment on polypropylene foam carrier of culture *T. versicolor*. (a) culture day 0; (b) culture day 10; (c) culture in shake flasks.

長，並產生酸性代謝產物，使得發酵液 pH 值下降(圖 4-4、4-5)。雲芝發酵 4 天開始快速生長，第 10 天懸浮菌體含量(圖 4-6)可達到 9.75 g/L，胞外多醣含量(圖 4-7) 0.812 g/L，相較低於其他文獻(楊，2006；賴，2008)之懸浮菌體含量 16.00 g/L 及胞外多醣產量 2.65 g/L，本實驗較有產量差異，推測為置入載體的間接影響，或者為培養基配方差異所造成之結果，胞內多醣含量(圖 4-8)在發酵第 8 天有最大值 0.182 g/L，8 天後胞內多醣產量開始下降，推估可能為雲芝菌絲體生長快速，導致菌體中心的營養限制(胡，1994)，菌體開始分泌 glucanase 使多醣分解，而造成產量降低(McNeil *et al.*, 1998；Stewart *et al.*, 2002)。

2. 以菜瓜布作為載體培養雲芝時(圖 4-9)，菌絲體由菜瓜布表面開始生長，雲芝菌絲體呈現乳白色偏黃，菌體包覆載體後表面為平滑狀，附著的菌絲較為鬆散，發酵中期被菌絲包覆的載體直徑約 2.0 cm，發酵後期菌絲體產量提高，大量的菌絲體逐漸將載體與載體相互連結，10 單位載體與菌絲形成一整塊，最終菌絲體超出液面形成純白色菌絲體，較不利於爾後重複批次試驗載體與菌絲體之分離。雲芝菌絲體生長消耗碳源(圖 4-4)，第 4 天開始快速生長，第 9 天菌絲體含量(圖 4-6)可達到最大值 4.91 g/L，之後菌絲體含量有些微下降，推測為菌體對數生長末期，碳源供應不足而發生

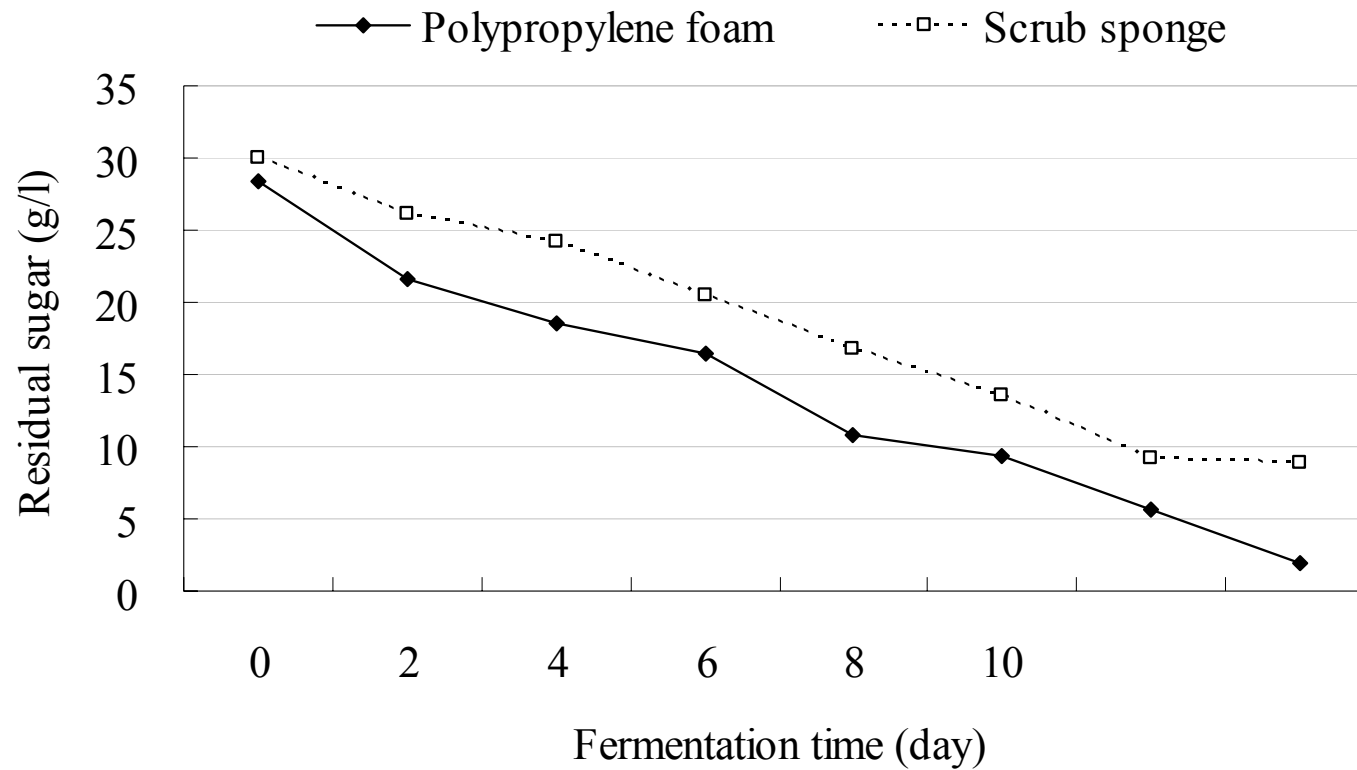


圖 4-4 兩種載體對雲芝菌發酵期間殘糖之影響。

Fig 4-4 Effect of carrier types on residual sugar content of culture of *T. versicolor* during fermentation.

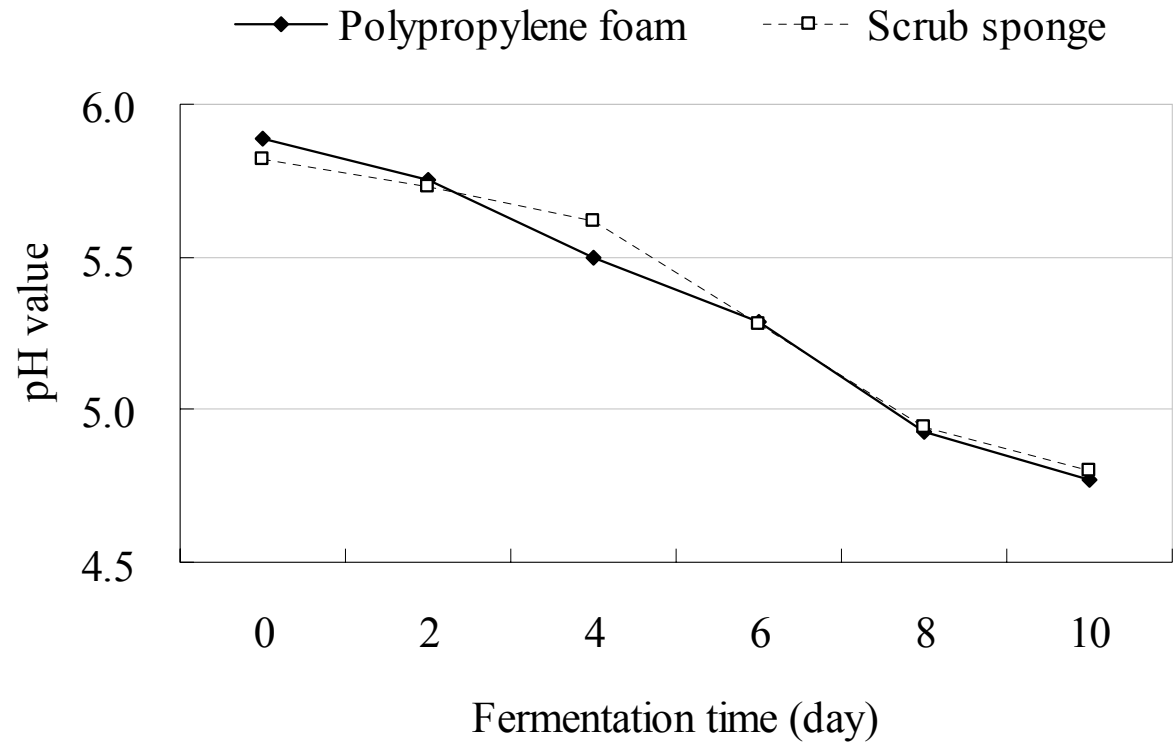


圖 4-5 兩種載體對雲芝菌發酵期間 pH 之影響。

Fig 4-5 Effect of carrier types on pH of culture of *T. versicolor* during fermentation.

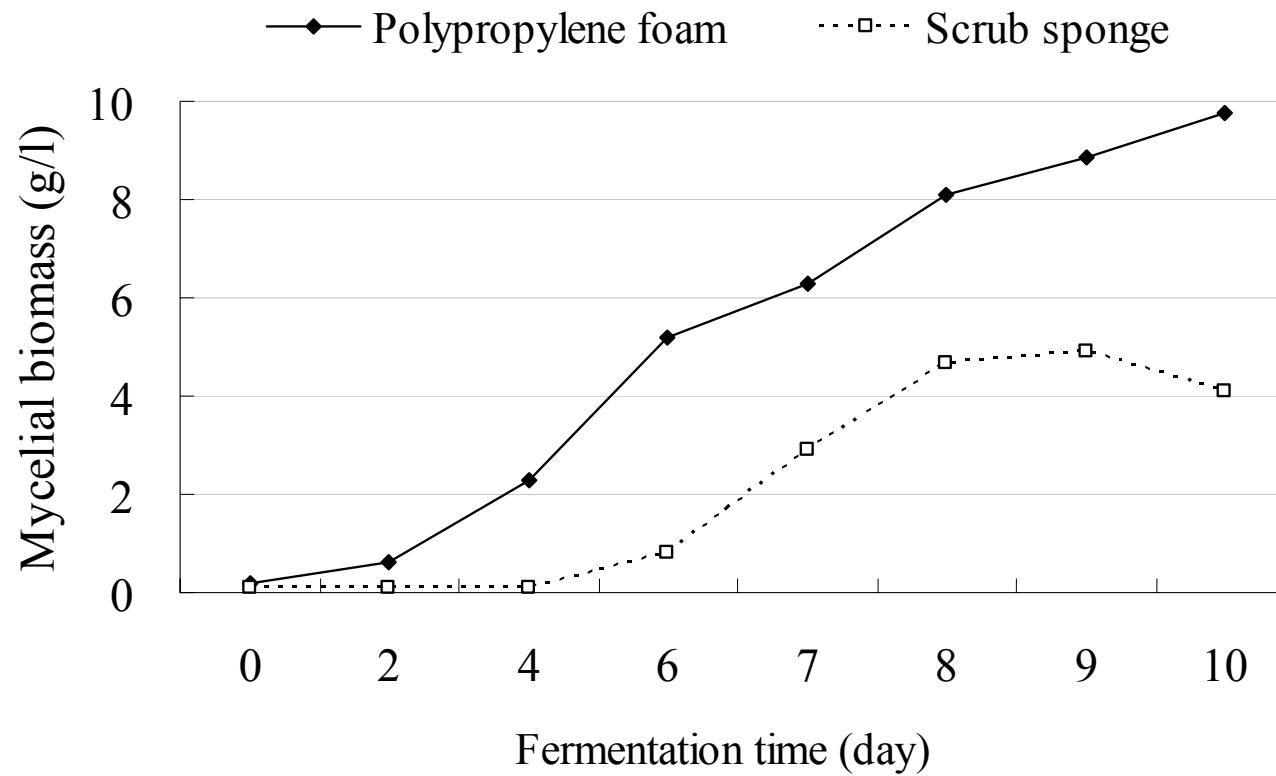


圖 4-6 兩種載體對雲芝菌發酵期間菌絲體生長之影響。

Fig 4-6 Effect of carrier types on the production of mycelium biomass from *T. versicolor* during fermentation.

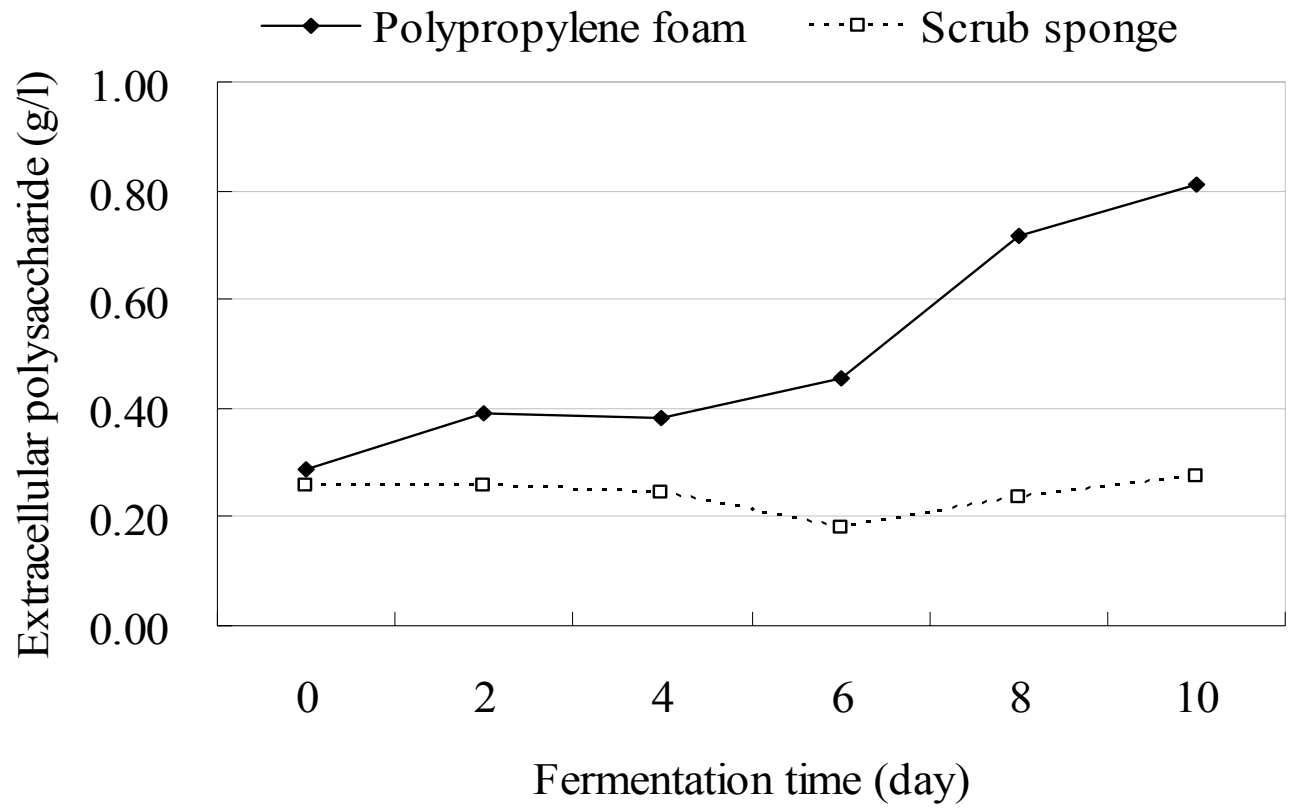


圖 4-7 兩種載體對雲芝菌發酵期間胞外多醣之影響。

Fig 4-7 Effect of carrier types on production of extracellular polysaccharides from *T. versicolor* during fermentation.

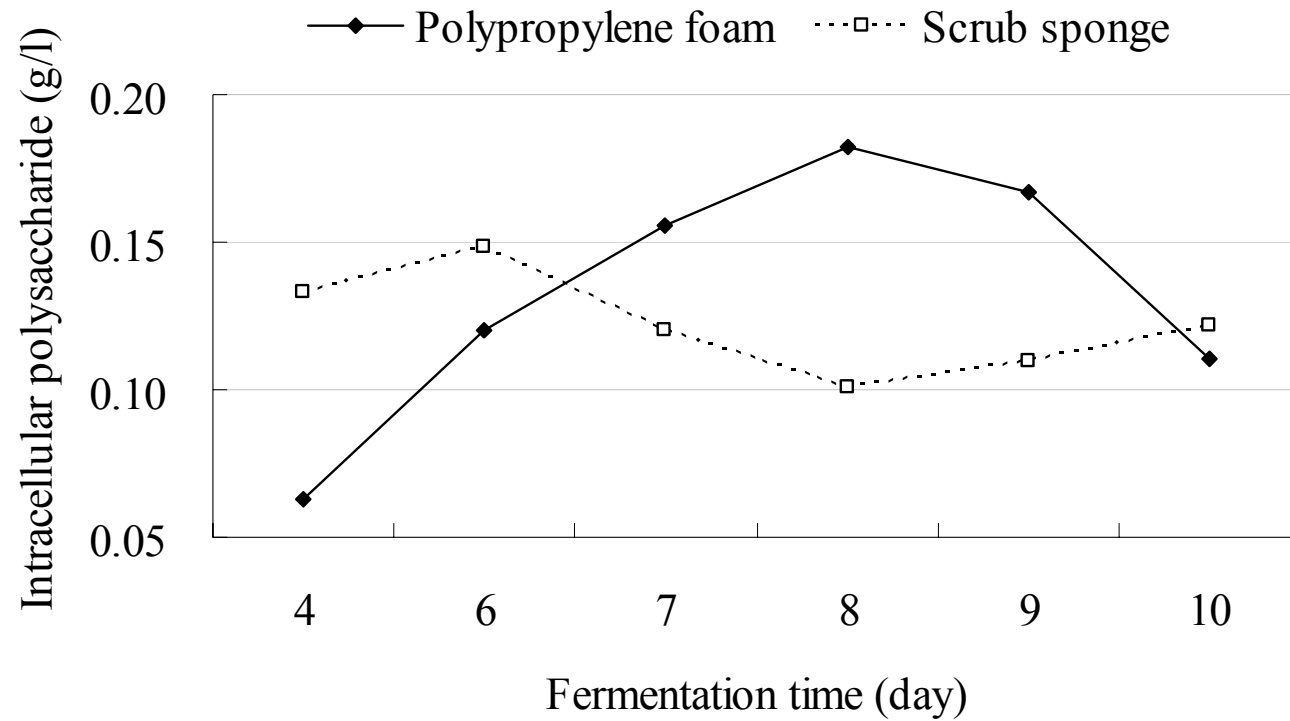


圖 4-8 兩種載體對雲芝菌發酵期間胞內多醣之影響。

Fig 4-8 Effect of carrier types on production of intracellular polysaccharides from *T. versicolor* during fermentation.

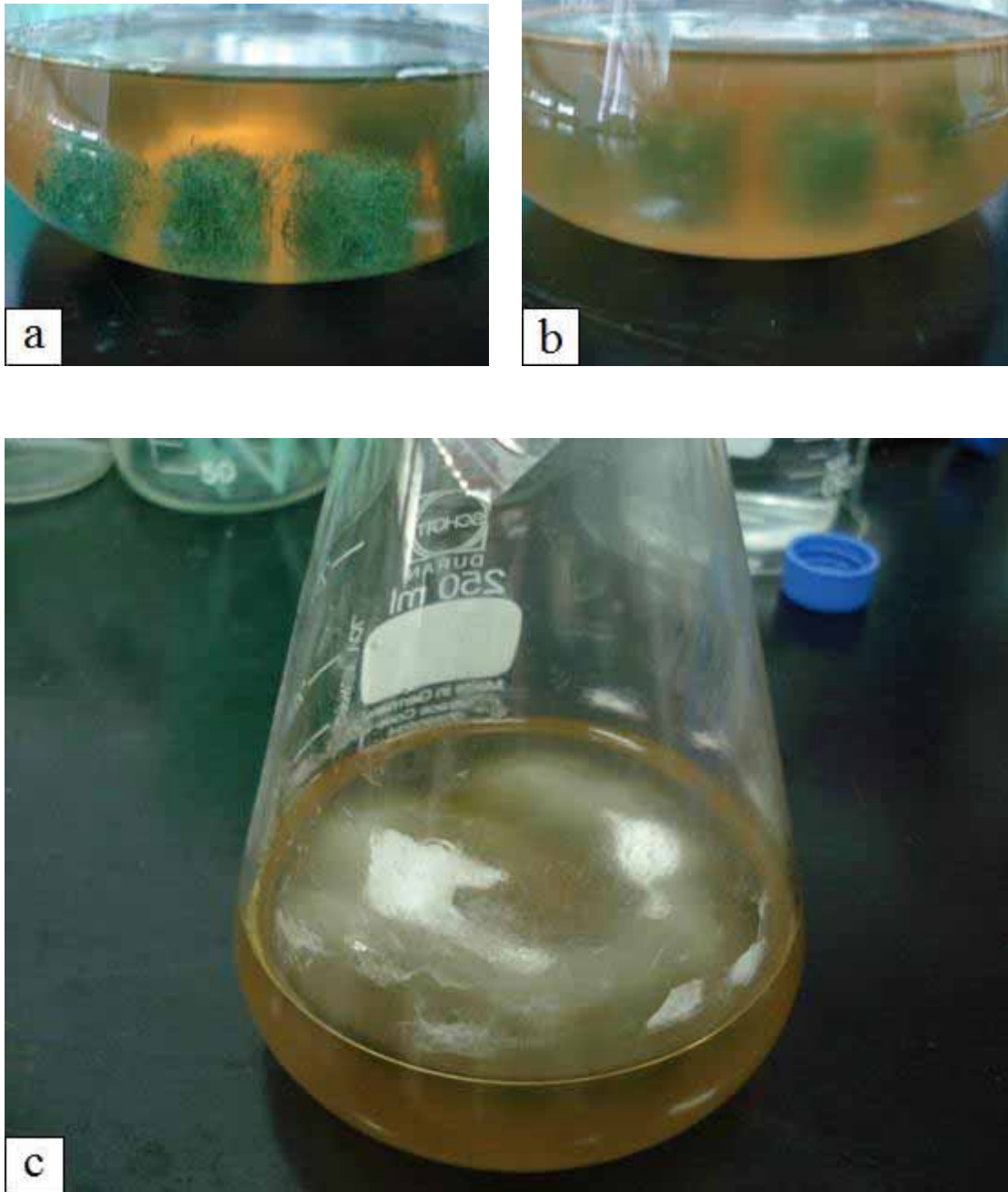


圖 4-9 以菜瓜布作為載體培養雲芝之菌絲包覆情形。(a) 培養 0 天菜瓜布之外觀；(b) 培養 10 天菜瓜布之外觀；(c) 菜瓜布載體搖瓶培養外觀。

Fig 4-9 The mycelium attachment on scrub sponge carrier of culture *T. versicolor*. (a) culture day 0; (b) culture day 10; (c) culture in shake flasks.

自體分解(Stewart *et al.*, 2002)的狀況，造成菌體細胞壁破裂而菌絲體產量減少。培養期間，在菜瓜布載體的雲芝最高胞外多醣產量(圖 4-7)為 0.275 g/L，低於以泡棉載體的 0.812 g/L；最高胞內多醣含量(圖 4-8)為 0.148 g/L，低於泡棉之多醣體產量 0.182 g/L，推估菜瓜布可能較不易於菌絲體附著，造成菌絲體鬆散不夠緻密，在有限空間內彼此碰撞磨擦造成機械剪力，可能造成菌絲體拉扯或斷裂，干擾菌絲體正常生長，進而使胞內及胞外多醣產量偏低。

(二) 不同載體裝載量對雲芝培養之影響

根據上述試驗結果，以泡棉作為進一步實驗，在含有 100 ml 培養基的 250 ml 三角瓶中分別加入 10%、15% 及 20% 培養基體積單位(v/v)之 1 cm^3 大小載體，探討搖瓶中載體比例對於雲芝菌絲體及多醣體產量之影響。培養 10 天後，10% 體積單位載體的組別菌絲體可有最高產量 9.75 g/L (圖 4-10)，15% 及 20% 體積單位載體的組別菌絲體最佳產量僅 6.15 g/L，推測是加入的載體過量，彼此碰撞造成機械剪力，相互碰撞可能將已附著於載體的菌絲體剝落，使菌絲球無法順利生長，10% 載體的菌絲體則可持續增加，菌體生長持續消耗碳源，使得殘糖濃度下降(圖 4-11)，並產生酸性代謝物使得發酵液 pH 值下降(圖 4-12)。胞外多醣產量(圖 4-13)約在第 9 天可得到最大值 0.870 g/L，胞內多醣產量(圖 4-14)約在第 8 天可得到最大值 0.199 g/L，在

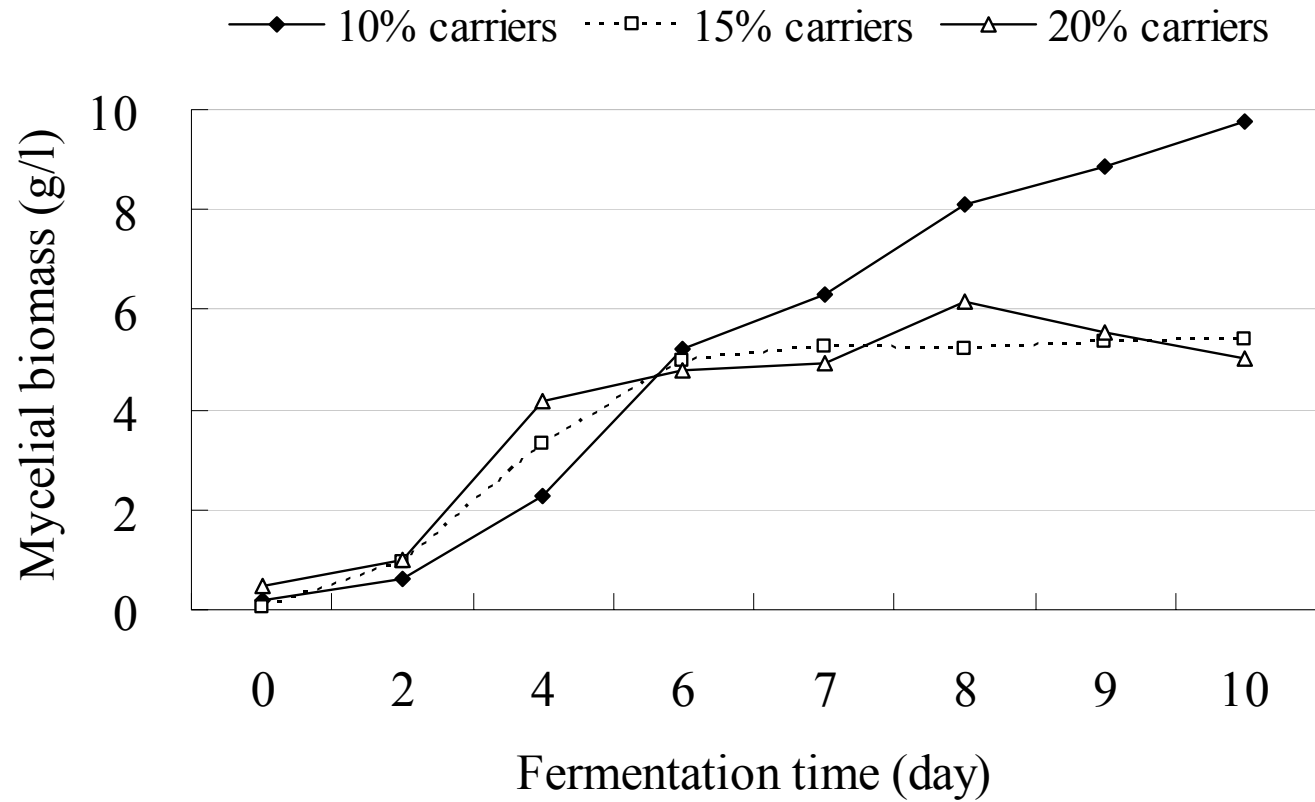


圖 4-10 載體裝載量對發酵期間菌絲體生長之變化。

Fig 4-10 Effect of carrier loads on the production of mycelium biomass from *T. versicolor* during fermentation.

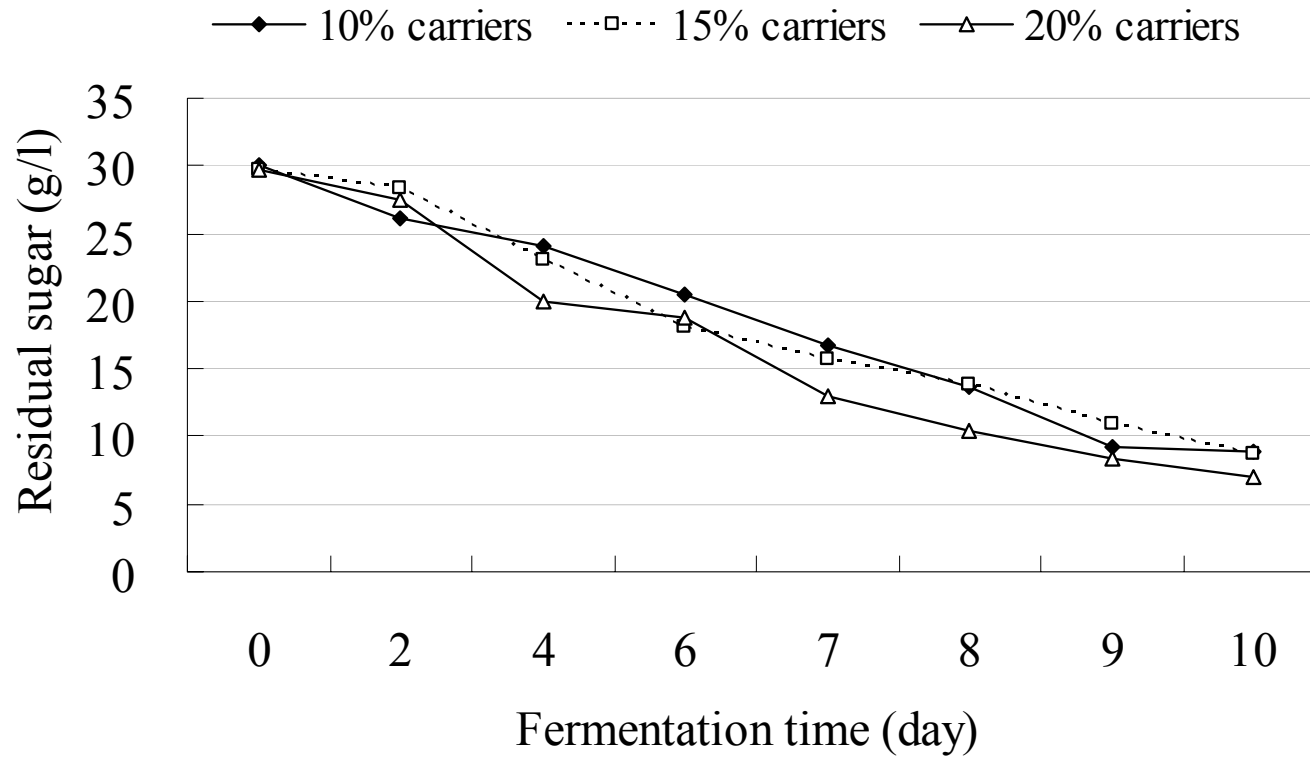


圖 4-11 載體裝載量對發酵期間殘糖之變化。

Fig 4-11 Effect of carrier loads on residual sugar content of culture of *T. versicolor* during fermentation.

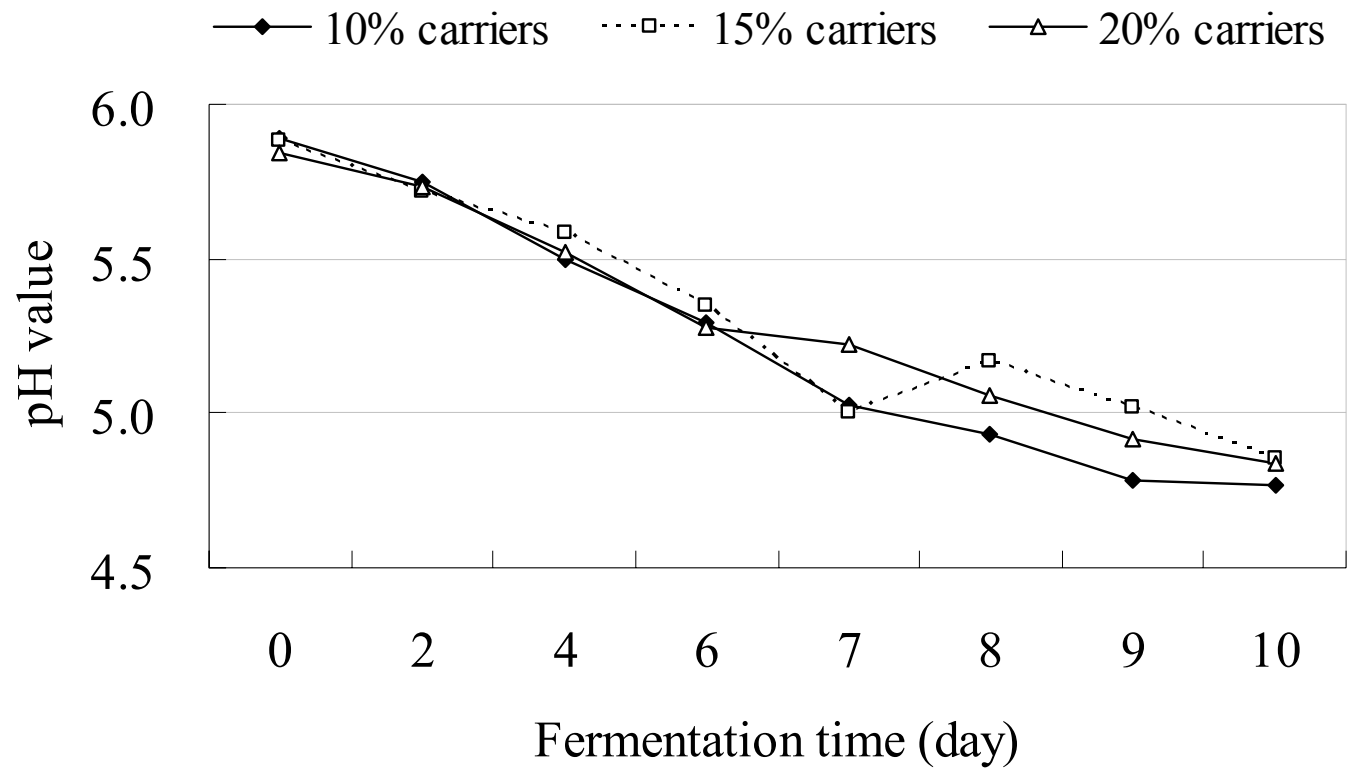


圖 4-12 載體裝載量對發酵期間 pH 值之變化。

Fig 4-12 Effect of carrier loads on pH of culture of *T. versicolor* during fermentation.

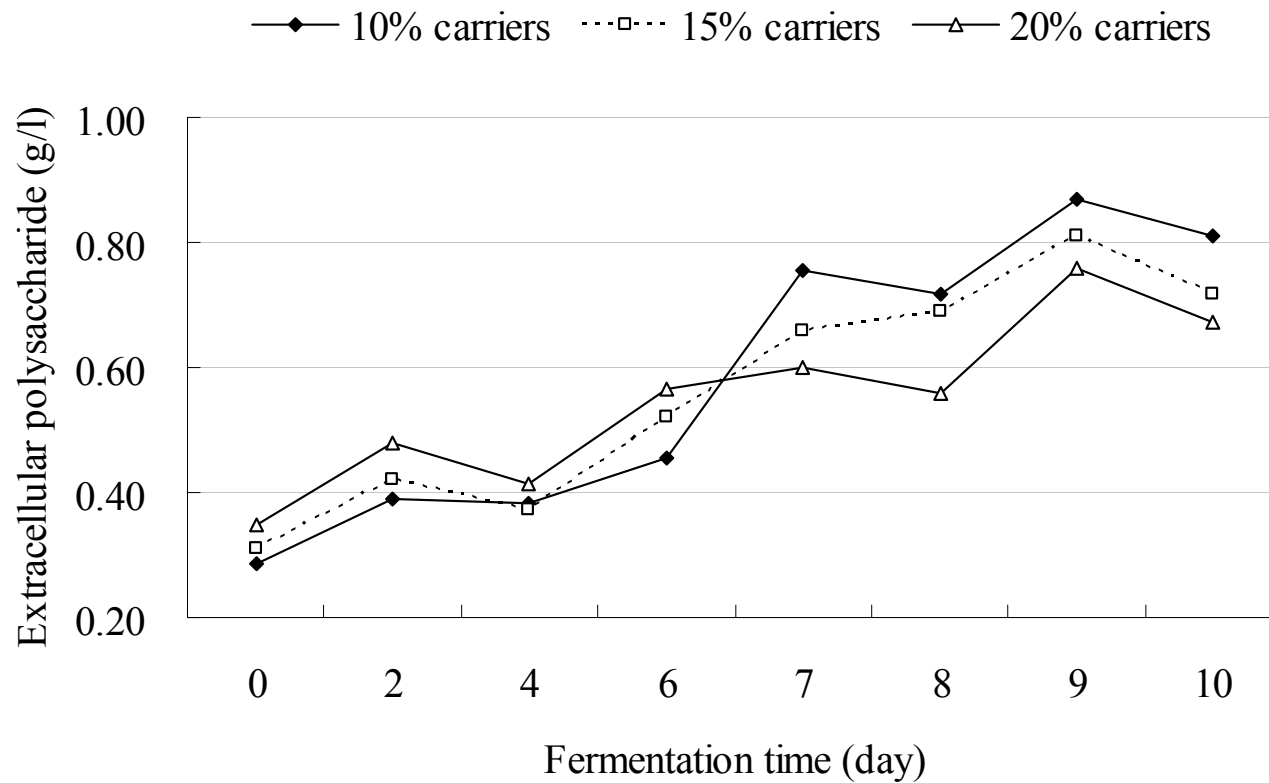


圖 4-13 載體裝載量對發酵期間胞外多醣產量之變化。

Fig 4-13 Effect of carrier loads on production extracellular polysaccharides from *T. versicolor* during fermentation.

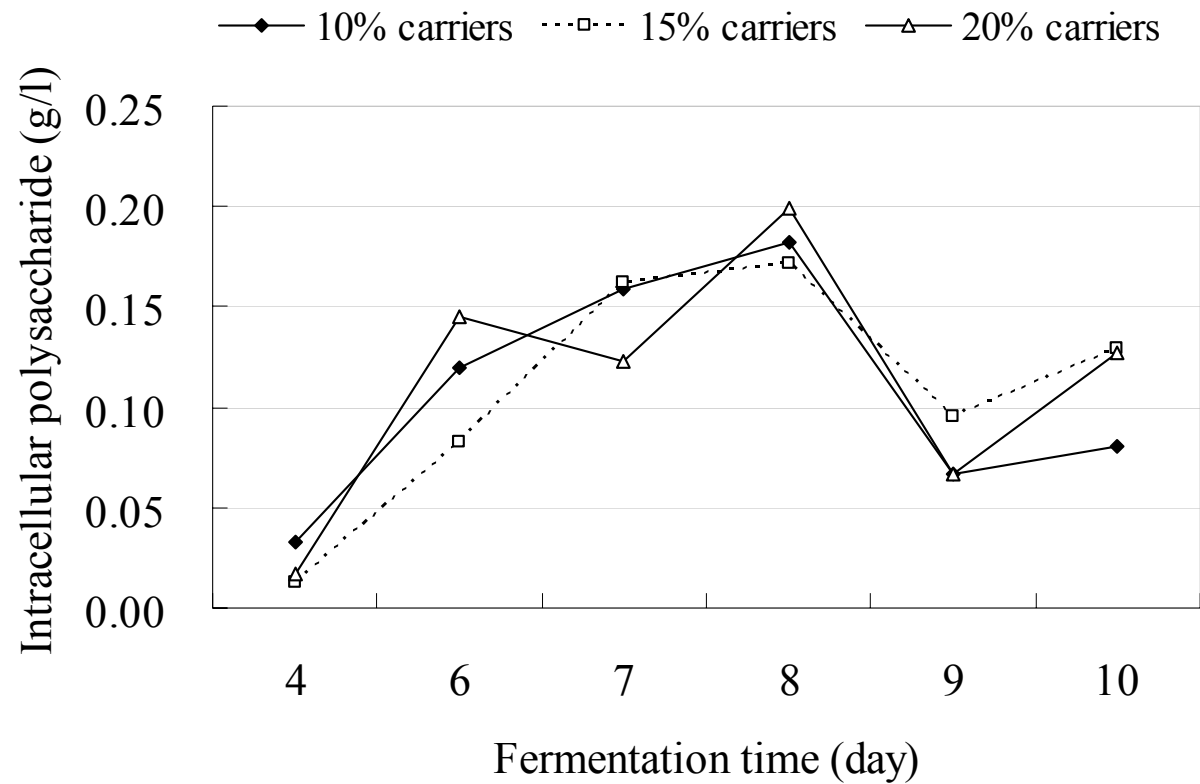


圖 4-14 載體裝載量對發酵期間胞內多醣產量之變化。

Fig 4-14 Effect of carrier loads on production intracellular polysaccharides from *T. versicolor* during fermentation.

胞外多醣及胞內多醣產量方面各組別間則無顯著差異($P < 0.05$)，比較菌絲體、胞外及胞內多糖產量，後續實驗以 10% 體積單位載體進行。

(三) 不同搖瓶轉數對雲芝培養之影響

根據上述結果，本試驗以 10% 體積的載體作進一步的搖瓶試驗，觀察固定化菌體對於雲芝菌絲體及多醣體產量之影響。根據文獻(Rau *et al.*, 1992)，高通氣量能夠增加菌體比生長速率，降低 EPS 產率，菌體在氧供應受限的環境下會延緩菌體生長而增加多醣體的產量，由文獻(賴，2008)結果指出，氣舉式發酵槽培養雲芝時，較高的通氣量(1 vvm)可以促使菌體生長，而較低的通氣量(0.5 vvm)可促進胞外及胞內多醣生產，因搖瓶試驗的搖瓶轉數會影響培養液之溶氧，因此本試驗分別調控 100 rpm、150 rpm、150-100 rpm 兩階段調控等三種不同搖瓶轉速來探討。結果顯示，發酵培養約 4 天後雲芝菌體進入快速生長期，100 rpm 及 150-100 rpm 的組別在第 10 天分別可以得到 9.75 g/L 及 6.59 g/L 的懸浮菌體乾重(圖 4-15)，而調控 150 rpm 組別的最大懸浮菌體乾重為 2.51 g/L，菌體產量低於前兩者，推測搖瓶固定化菌體試驗，較高的(150 rpm)搖瓶轉數雖然可以增加溶氧量，但相對造成載體之間碰撞，機械剪力會增加，而影響了菌體正常生長及產量。由圖 4-16 可知菌體產量最佳之 100 rpm 組，其碳源消耗速率較快，生長產生酸性代謝物使得 pH 下降速率也較快(圖 4-17)。各組約在第

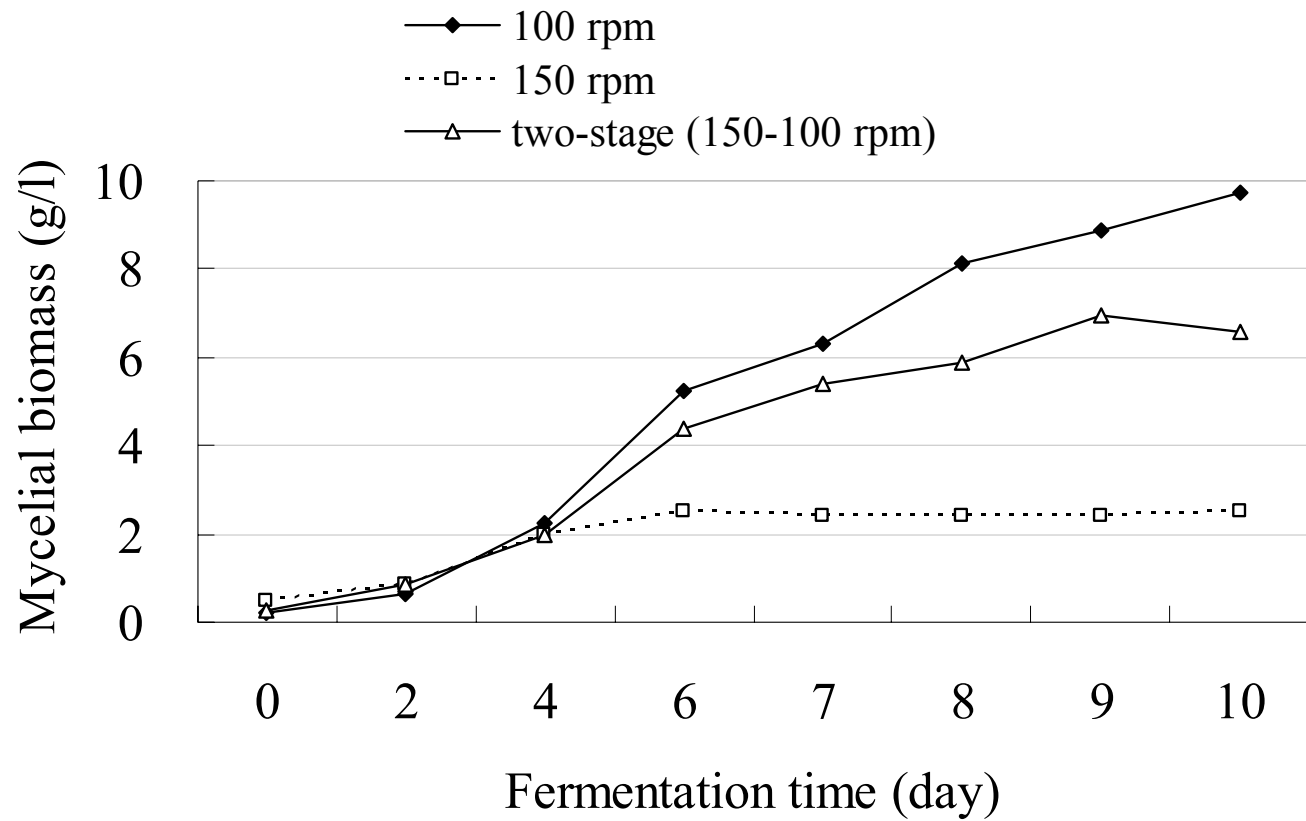


圖 4-15 不同搖瓶轉數對發酵期間菌絲體生長之變化。

Fig 4-15 Effect of shaker speeds on the production of mycelium biomass from *T. versicolor* during fermentation.

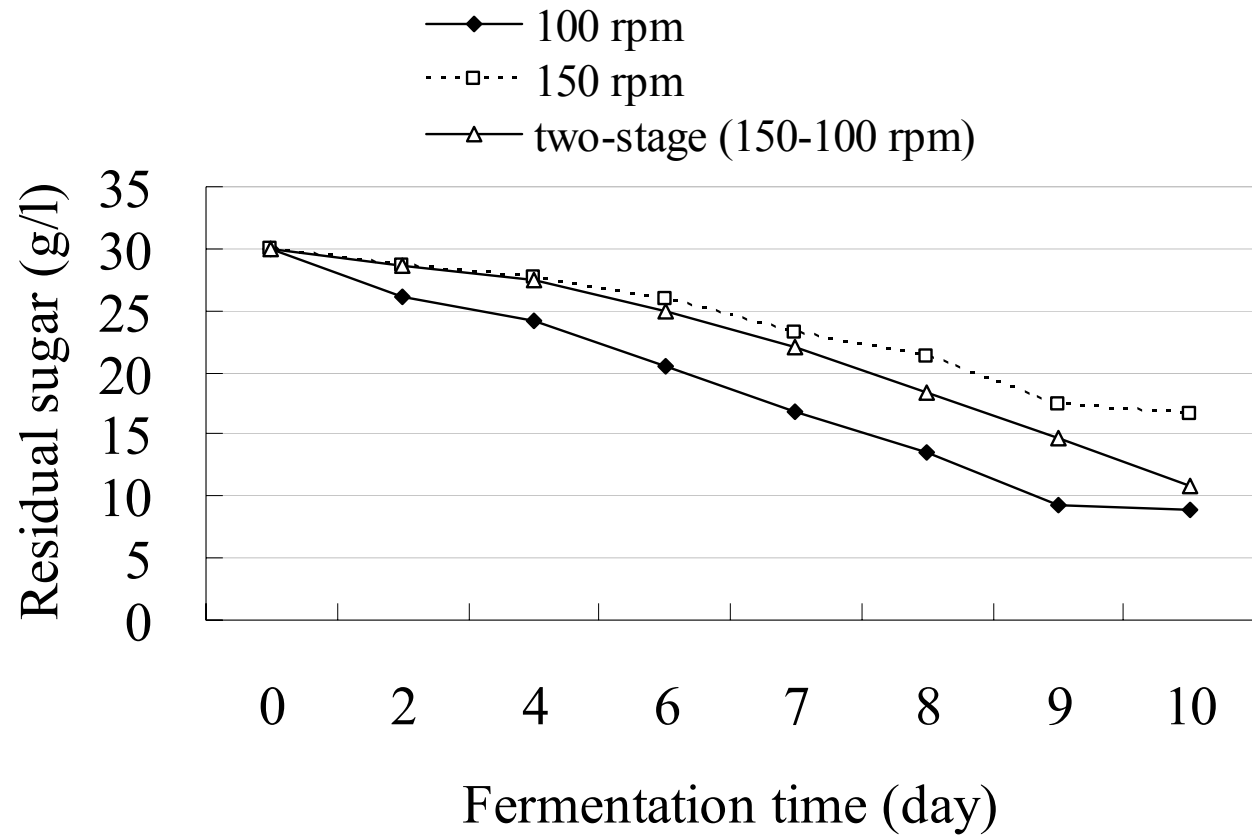


圖 4-16 不同搖瓶轉數對發酵期間殘糖之變化。

Fig 4-16 Effect of shaker speeds on residual sugar content of culture of *T. versicolor* during fermentation.

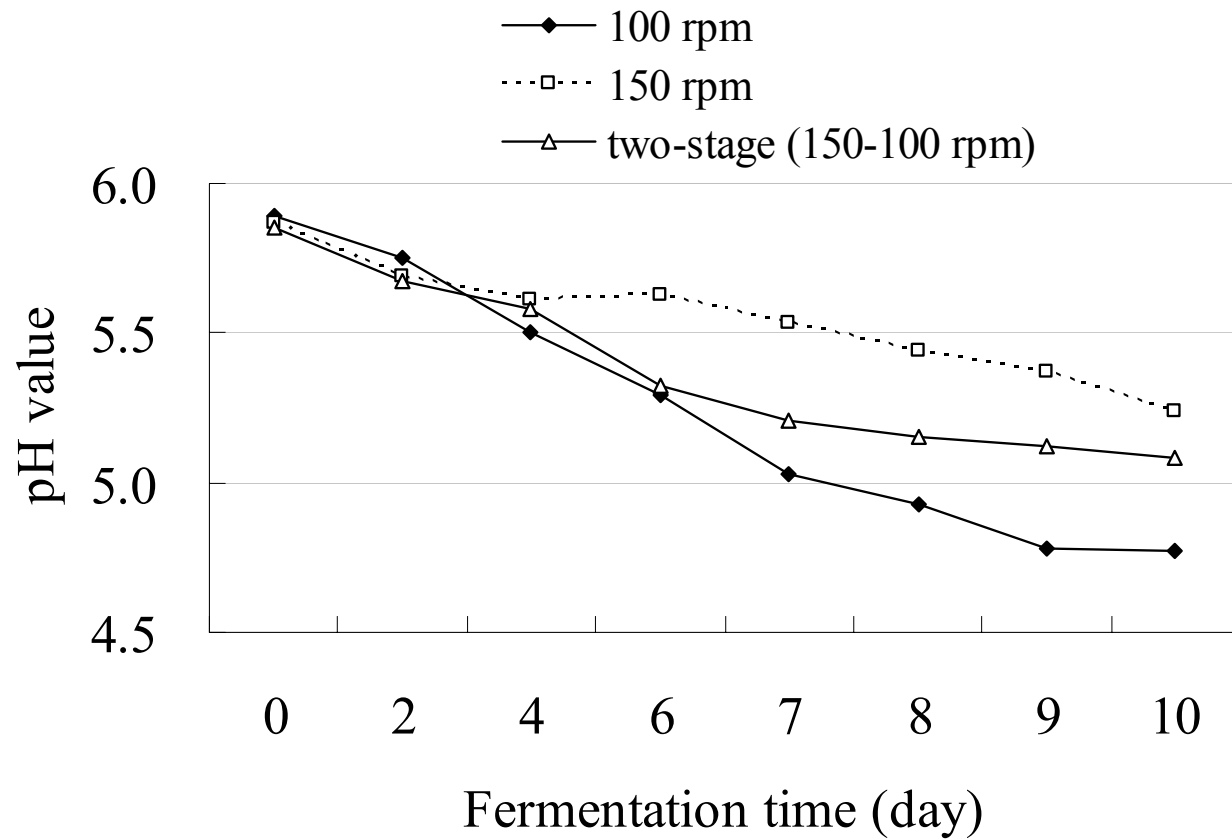


圖 4-17 不同搖瓶轉數對發酵期間 pH 值之變化。

Fig 4-17 Effect of shaker speeds on pH of culture of *T. versicolor* during fermentation.

9 天出現最大胞外多醣產量(圖 4-18)，分別為 100 rpm 組 0.870 g/L、150-100 rpm 組 0.716 g/L、150 rpm 組 0.506 g/L，第 8 天出現最大胞內多醣產量(圖 4-19)，其分別為 100 rpm 組 0.182 g/L、150-100 rpm 組 0.158 g/L、150 rpm 組 0.124 g/L，由數據觀察可知，150 rpm 的胞外及胞內多醣產量皆顯著($P < 0.05$)低於其他組別，推測較高的搖瓶轉數造成菌體含量降低，間接影響多醣產量的減少，100 rpm 組別在此試驗中，雲芝菌絲體含量及多醣產量方面皆較其他組別優異，隨後固定化試驗採用 100 rpm 做為試驗條件。

(四) 以固定化雲芝菌體進行搖瓶試驗

由先前試驗結果觀察(圖 4-15、4-18、4-19)，發酵第 8 天可得到懸浮菌體乾重 8.12 g/L，最佳的胞外多醣及胞內多醣產量，分別為 0.717 g/L 及 0.182 g/L，8 天之後的胞內多醣含量會有下降的趨勢，因此固定化試驗之替換新培養基的時機為第 8 天，其後發酵的菌絲體已附著於載體稱為“著菌”，發酵週期由第一批發酵 8 天(Run 0)，固定化菌體重複利用時，發酵皆為 5 天一週期。隨著各批次發酵的進行由 Run 1 到 Run 4，泡棉載體周圍所包覆的菌體也有逐漸累積的現象，由原先(Run 0)直徑 1.8 cm 變成後期(Run 4)的直徑 2.6 cm，另外，由於生長空間的限制，增大的載體間碰撞機率有增加的趨勢，且在三角瓶中移動性下降，推估會使得質傳效果降低，造成最後(Day 28) 菌

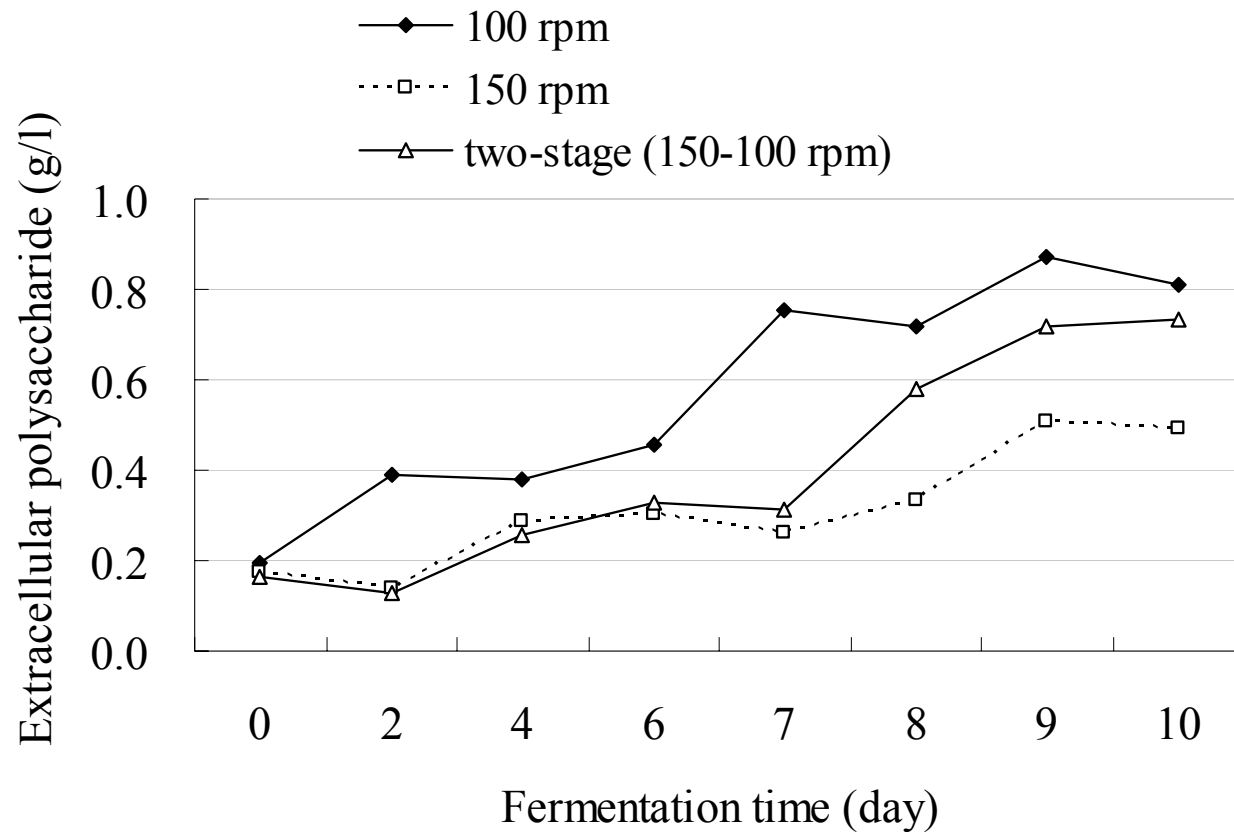


圖 4-18 不同搖瓶轉數對發酵期間胞外多醣產量之變化。

Fig 4-18 Effect of shaker speeds on production extracellular polysaccharides from *T. versicolor* during fermentation.

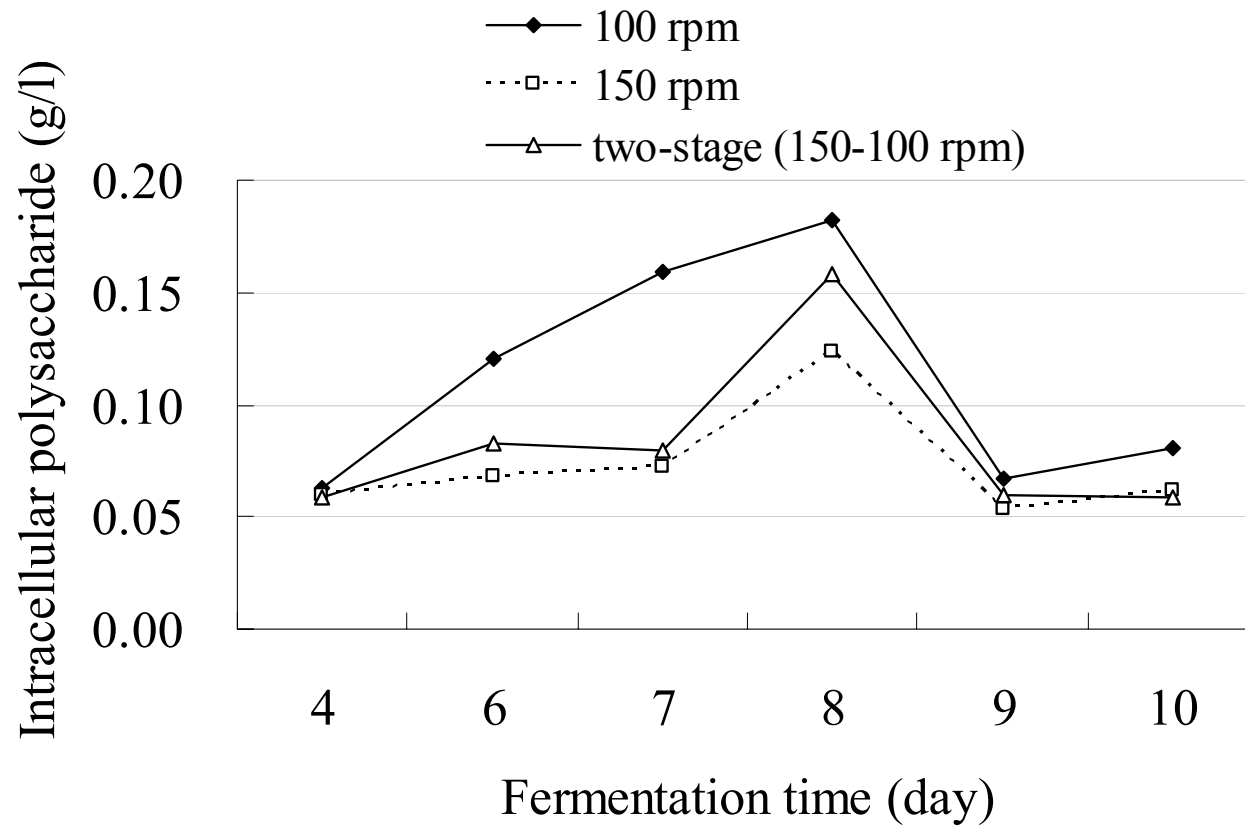


圖 4-19 不同搖瓶轉數對發酵期間胞內多醣產量之變化。

Fig 4-19 Effect of shaker speeds on production intracellular polysaccharides from *T. versicolor* during fermentation.

體產量(圖 4-20)開始下降。著菌完成的載體可以有效省去菌體的再生長階段，此實驗中可重複利用 4 次。由圖 4-21、4-22 可知，替換新鮮培養液後，會使得發酵環境中還原糖濃度上升至 22.83 g/L，pH 值也回到 5.74，但與首批發酵之殘糖與 pH 起始值有所差距，推估為載體中吸有原始發酵液，其與新發酵液互相混合所得的結果。在發酵期間最佳胞外多醣(圖 4-23)及胞內多醣產量(圖 4-24)方面皆可維持平均 0.639 g/L 及 0.204 g/L 的產率。

二、雲芝的發酵槽生產

根據文獻(張，2003；劉，2004；蕭，2007；賴，2008)比較各種發酵槽之培養結果，機械攪拌式發酵槽相較於其他種類之發酵槽具有較高之剪切力，對於發酵後期之菌絲球有不良之影響，也可能干擾菌絲體附著於載體，故本發酵槽的培養使用剪切力較小之氣舉式發酵槽及泡柱式發酵槽，進行固定化菌體試驗以生產雲芝菌絲體及多醣體。

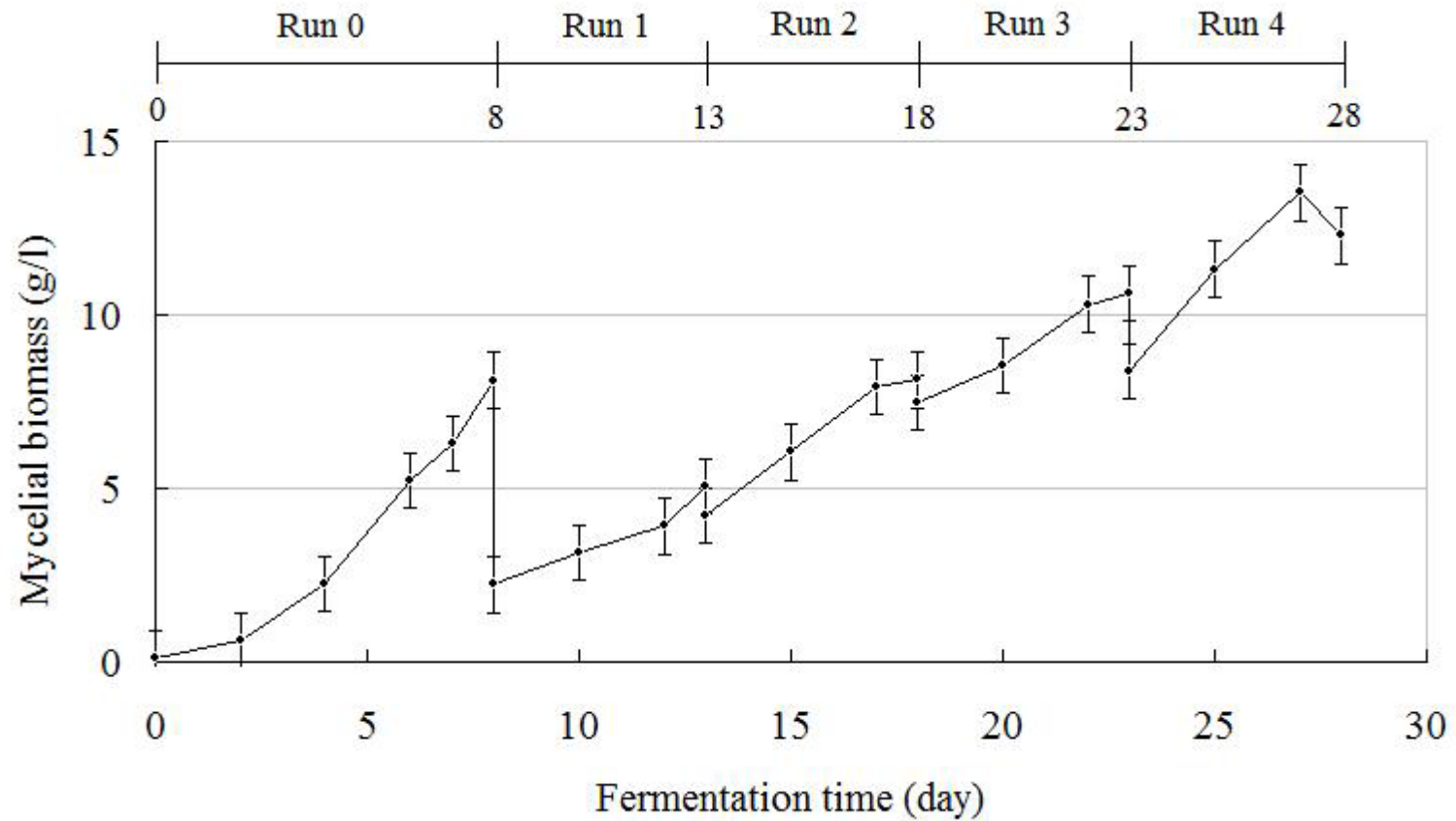


圖 4-20 固定化菌體重複批次發酵期間菌絲體生長之變化。

Fig 4-20 Production of mycelium biomass from repeated-batch fermentation with immobilized *T. versicolor* cells.

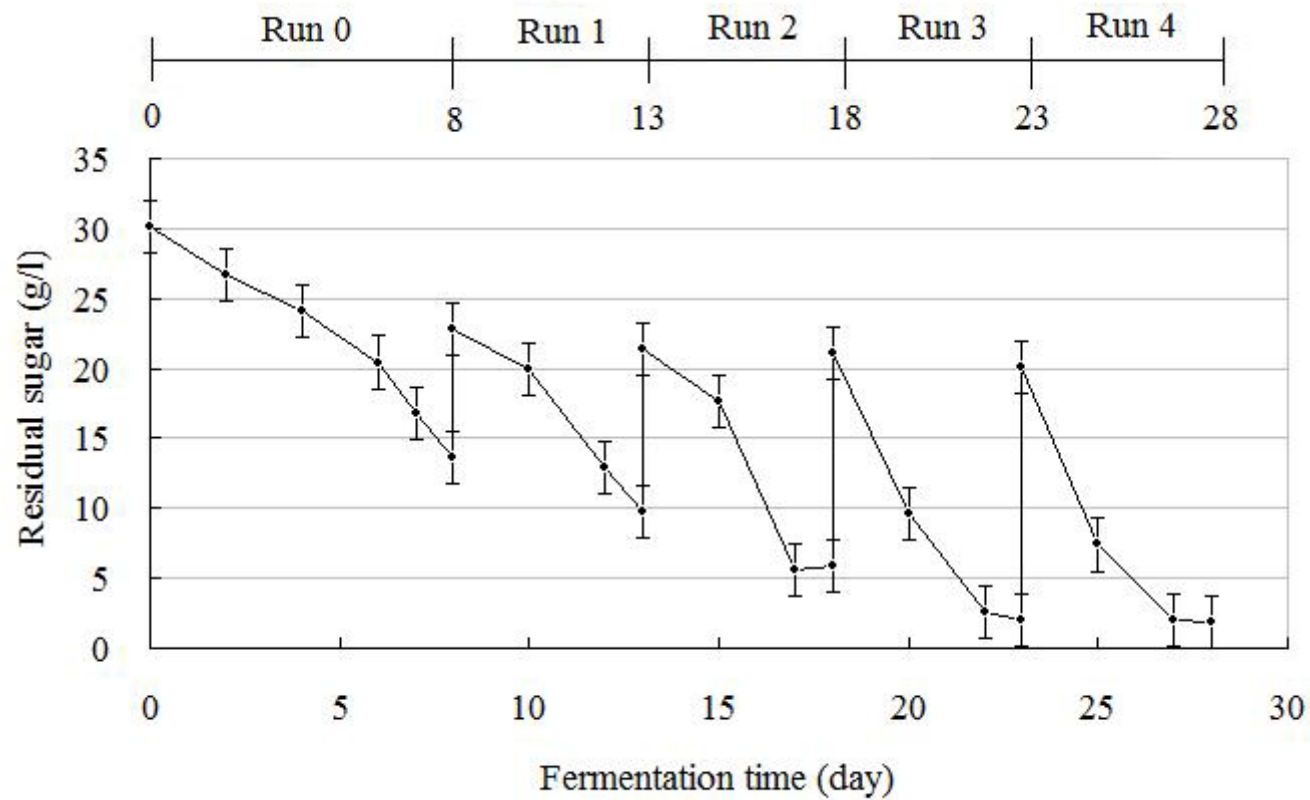


圖 4-21 固定化菌體重複批次發酵期間殘糖之變化。

Fig 4-21 The residual sugar of culture at repeated-batch fermentation with immobilized *T. versicolor* cells.

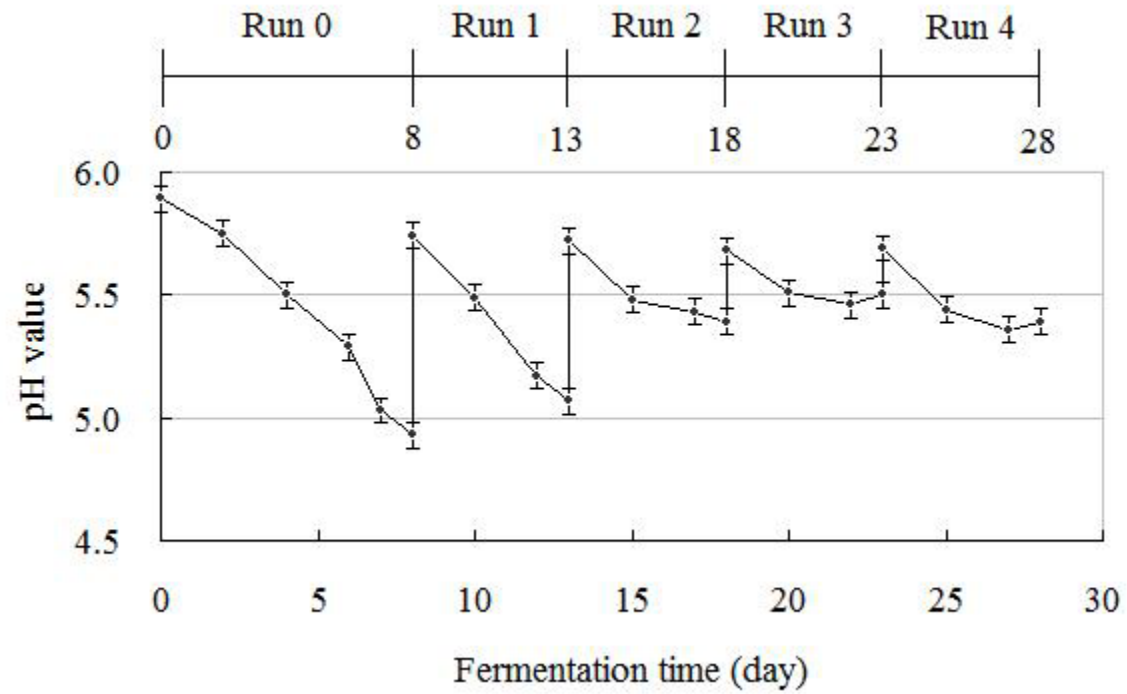


圖 4-22 固定化菌體重複批次發酵期間 pH 值之變化。

Fig 4-22 The pH of culture at repeated-batch fermentation with immobilized *T. versicolor* cells.

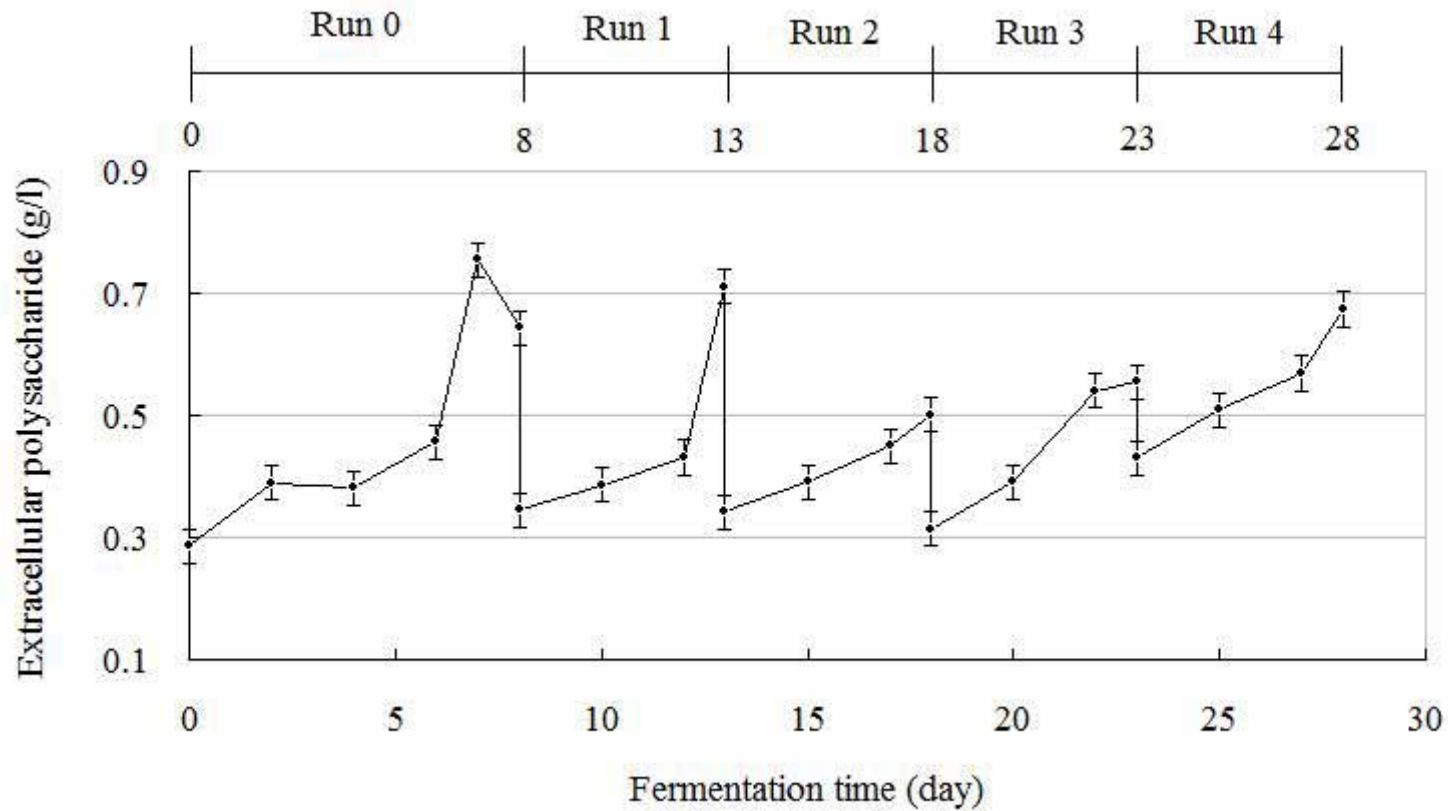


圖 4-23 固定化菌體重複批次發酵期間胞外多醣之變化。

Fig 4-23 Production of extracellular polysaccharides from repeated-batch fermentation with immobilized *T. versicolor* cells.

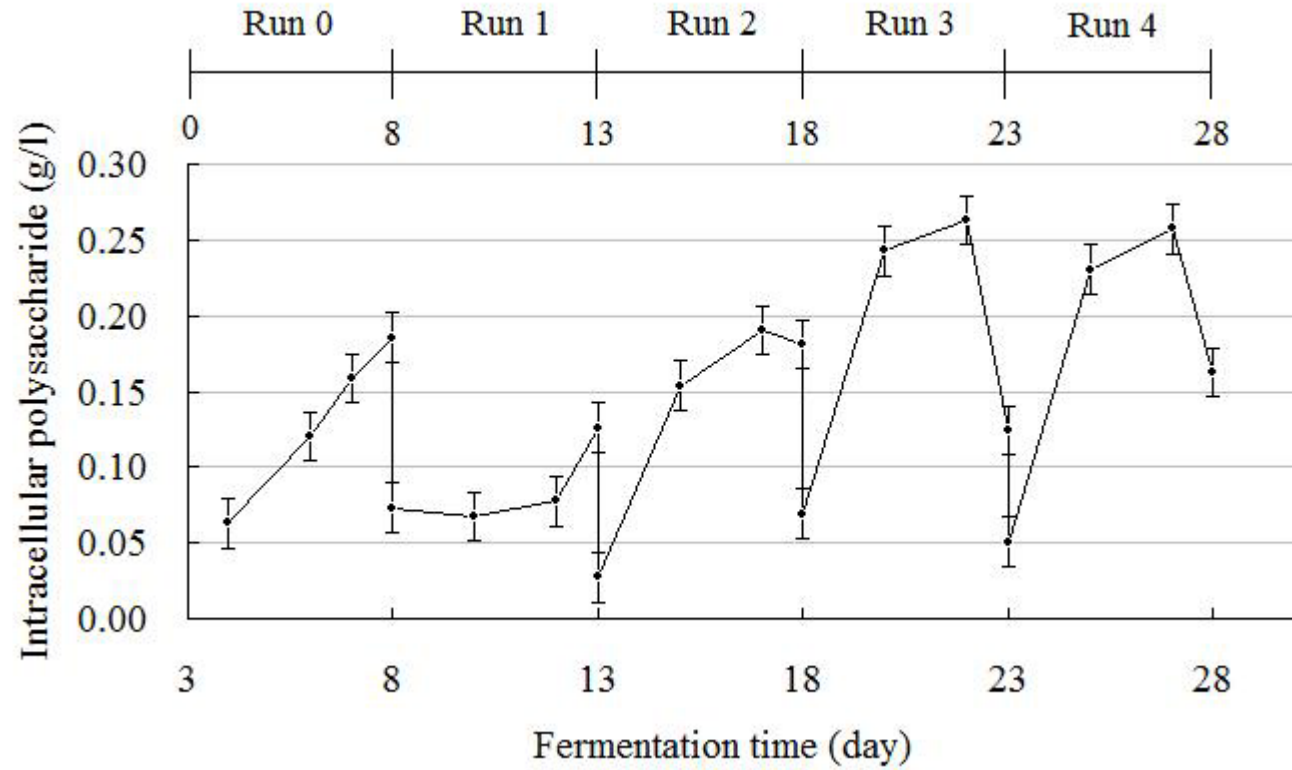


圖 4-24 固定化菌體重複批次發酵期間胞內多醣之變化。

Fig 4-24 Production of intracellular polysaccharides from repeated-batch fermentation with immobilized *T. versicolor* cells.

(一) 氣舉式發酵槽試驗

氣舉式發酵槽試驗通氣量為 0.5 vvm，培養液起始 pH 值 6.0，培養溫度 25 。根據文獻(林, 2005)之結果，發酵槽內流動之載體顆粒，在菌體生長後的發酵後期，可能會相互沾黏或者卡在導流管外壁及發酵槽體內壁之間，無法在槽內繼續進行循環流動，可能降低質傳效果，因此本試驗將槽體內部加以修改(圖 4-25)，將發酵槽內部之導流管上下兩端開口加裝鐵絲網，把載體放置於其中進行發酵，以限制泡棉載體不要在發酵槽中隨著發酵液循環流動，各種質傳只被侷限在導流管中，由通氣環上升的氣體進入導流管中，增加泡棉與通入空氣的接觸時間，菌體的分泌物則在槽體中循環。培養 3、4 天後菌體開始快速生長，培養液中懸浮菌體開始有阻塞在鐵絲網的孔隙中的情形，或者直接附著於鐵絲網生長，最後菌體長滿整個鐵絲網(圖 4-26)，原先氣體的上升流動方向逐漸無法順利通過，通入之空氣開始轉由導流管外側與發酵槽體內側之空間流動，造成氣體在槽體中不規則上升，無法保持原先的穩定對流，遂降低了與所有菌體的質傳效率，其發酵完成之後菌絲體附著在鐵絲網上不利菌體的收集，也可能造成發酵產物的損失，因此氣舉式發酵槽利用於本雲芝固定化菌體有較多技術上的問題需克服。

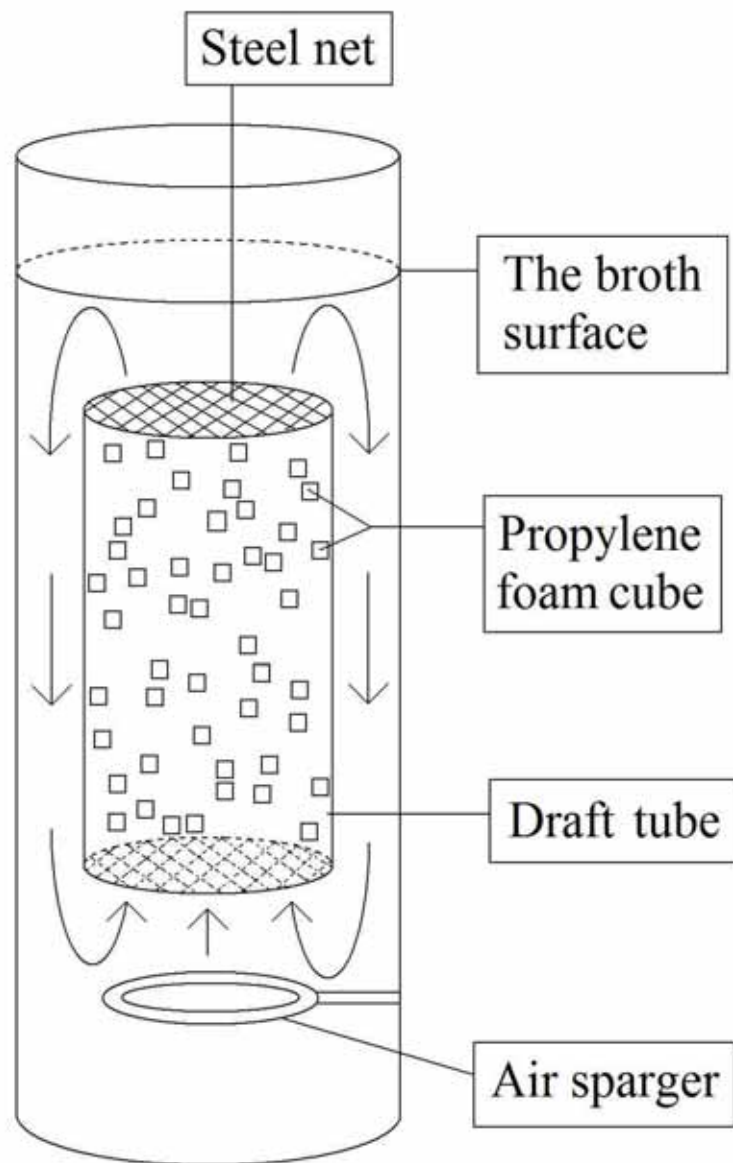


圖 4-25 氣舉式發酵槽內部改裝示意圖。

Fig 4-25 The modified draft tube in air-lift fermentor with carriers inside.



圖 4-26 氣舉式發酵槽中雲芝菌絲附著在鐵絲網上之情形。

Fig 4-26 *T. versicolor* mycelia aggregated on the top of steel net in air-lift fermentor.



圖 4-27 泡柱式發酵槽通氣量 0.5 vvm 發酵液中懸浮菌體之外觀。

Fig 4-27 *T. versicolor* mycelia flaked from the carrier and suspended in the broth in bubble column fermentor with aeration 0.5 vvm.

(二) 泡柱式發酵槽試驗

為了改善氣舉式發酵槽的缺點，本試驗使用無導流管之泡柱式發酵槽。發酵條件為通氣量 0.5 vvm，培養液起始 pH 6.0，培養溫度 25 °。試驗採用讓載體自由懸浮的方式進行，槽體接種約 3、4 天之後菌絲體開始包覆在發酵液中的泡棉載體，發酵液中有部分較大之片狀或條狀懸浮菌體(圖 4-27)，依其形態外觀推測應是從原先已包覆的泡棉上剝落之菌體，由於通氣量太大造成機械剪力，且在發酵後期雲芝發酵液黏度漸增，較高的通氣量易在槽體發酵液面形成較多的氣泡，使得部分菌體開始生長於液面上之發酵槽體內壁，初期試驗中氣泡產生過量使發酵液隨著氣泡由排氣孔排出，造成產量的流失。根據上述結果考慮通氣能使泡棉載體自由飄浮循環且不使菌脫落，通氣量 0.2 vvm，菌體在發酵槽固定化“著菌”培養 8 天(Run 0)，爾後替換新鮮培養液由於載體已被菌絲體包覆，第二批(Run 1)與第三批(Run 2)發酵為每 5 天，替換新鮮培養液繼續發酵，以節省發酵週期增加產物之產率。發酵過程中發酵液的懸浮菌絲球顏色為白色偏淡黃，外觀呈結構緊密的平滑圓球狀，直徑大小約 2.5 mm。產量方面，第一批(Run 0)培養約 4 天後雲芝菌體開始快速生長(圖 4-28)，培養第 8 天可得到最大懸浮菌體乾重 3.91 g/L，第二批(Run 1)與第三批(Run 2)替換新鮮培養基後，約 2 天菌體開始快速生長，且第 5 天即有最大懸浮菌體乾重。

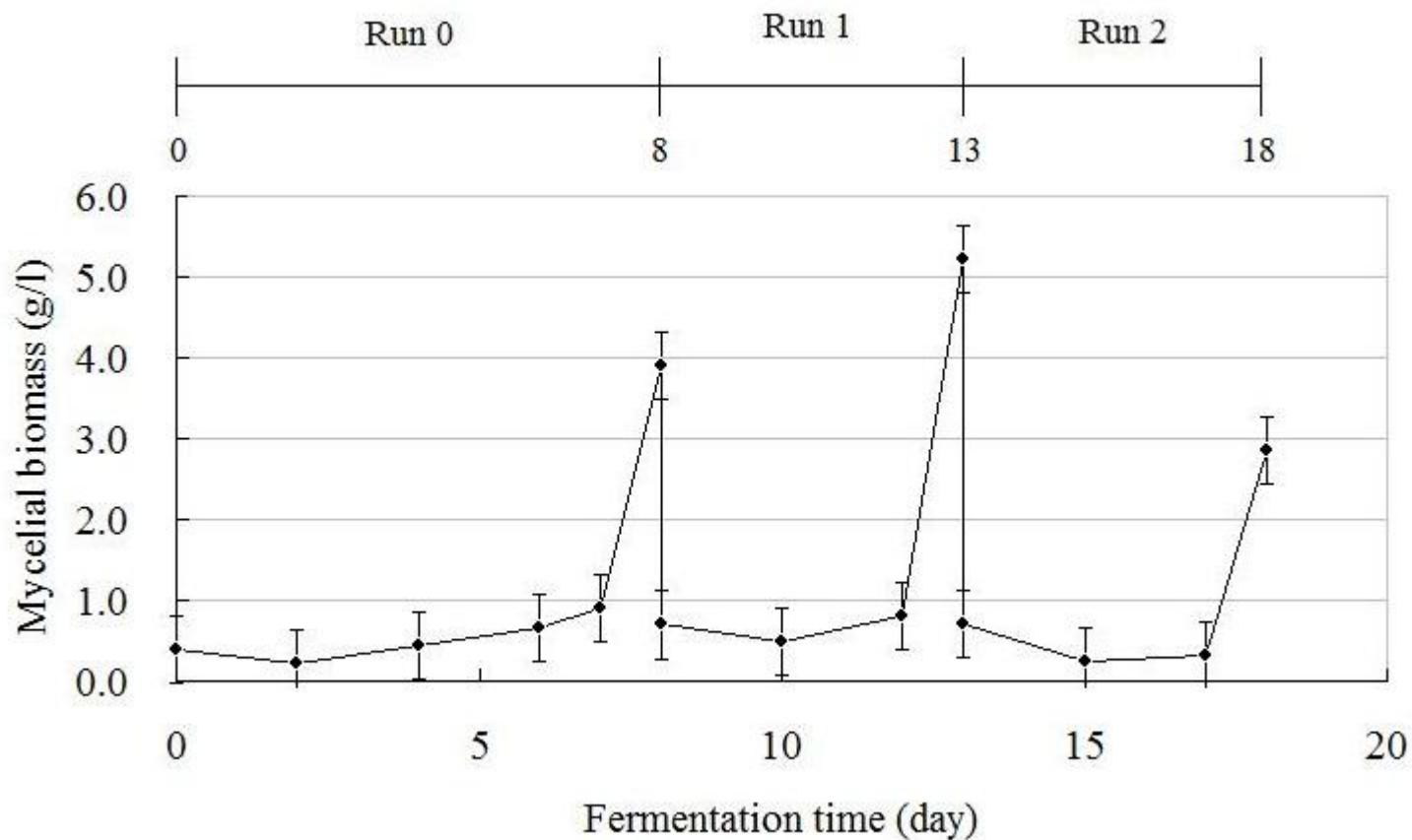


圖 4-28 固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽重複批次發酵期間懸浮菌體濃度之變化(每一批次 5 天)。

Fig 4-28 Production of mycelium biomass from repeated-batch fermentation with immobilized *T. versicolor* cells in the bubble column fermentor (Each batch run for 5 days).

還原糖利用在第一批(Run 0)發酵培養完成著菌後，第二批(Run 1)與第三批(Run 2) (圖 4-29)也相較於第一批(Run 0)來得快速，培養第 5 天僅剩 2.23 g/L 還原糖含量，另外替換新鮮培養基之發酵液還原糖含量，皆相較第一批(Run 0)起始濃度低之現象，推估為第一批(Run 0)泡棉中吸有原始完成發酵之培養液，加入新鮮培養液互相混合造成之結果，pH 值也與殘糖的變化有相似情形(圖 4-30)。第一批(Run 0)胞外多醣含量(圖 4-31)第 6 天有最大值 0.731 g/L，發酵末期開始有下降的趨勢，應該為發酵後期碳源減少，雲芝快速生長而導致菌絲球中心質傳不佳(胡, 1994)，轉為利用胞外多醣作為碳源，而造成產量降低(McNeil *et al.*, 1998；Stewart *et al.*, 2002)，第二批(Run 1)與第三批(Run 2)約在第 4 天可有最大胞外多醣產量，且達最大產量後也有前述之產量下降趨勢，胞內多醣含量(圖 4-32)方面，第一批(Run 0)至第三批(Run 2)皆可維持在 0.116 g/L 以上。此外，根據上述結果希望減少發酵後期胞外多醣被菌體利用的情形，之後試驗將每一個發酵週期減少 1 天，希望對於胞外及胞內多醣的累積有提升效果。此次試驗由於將發酵週期縮短，在懸浮菌體乾重(圖 4-33)產量方面較前次泡柱式發酵槽試驗來的低，平均最佳懸浮菌體乾重僅 2.00 g/L。在胞外多醣產量(圖 4-34)方面，則隨著發酵時間進行有逐漸上升的趨勢，推估為完成發酵之培養液被吸收在泡棉載體的內部，其所含之胞外多醣與下一批新鮮發酵

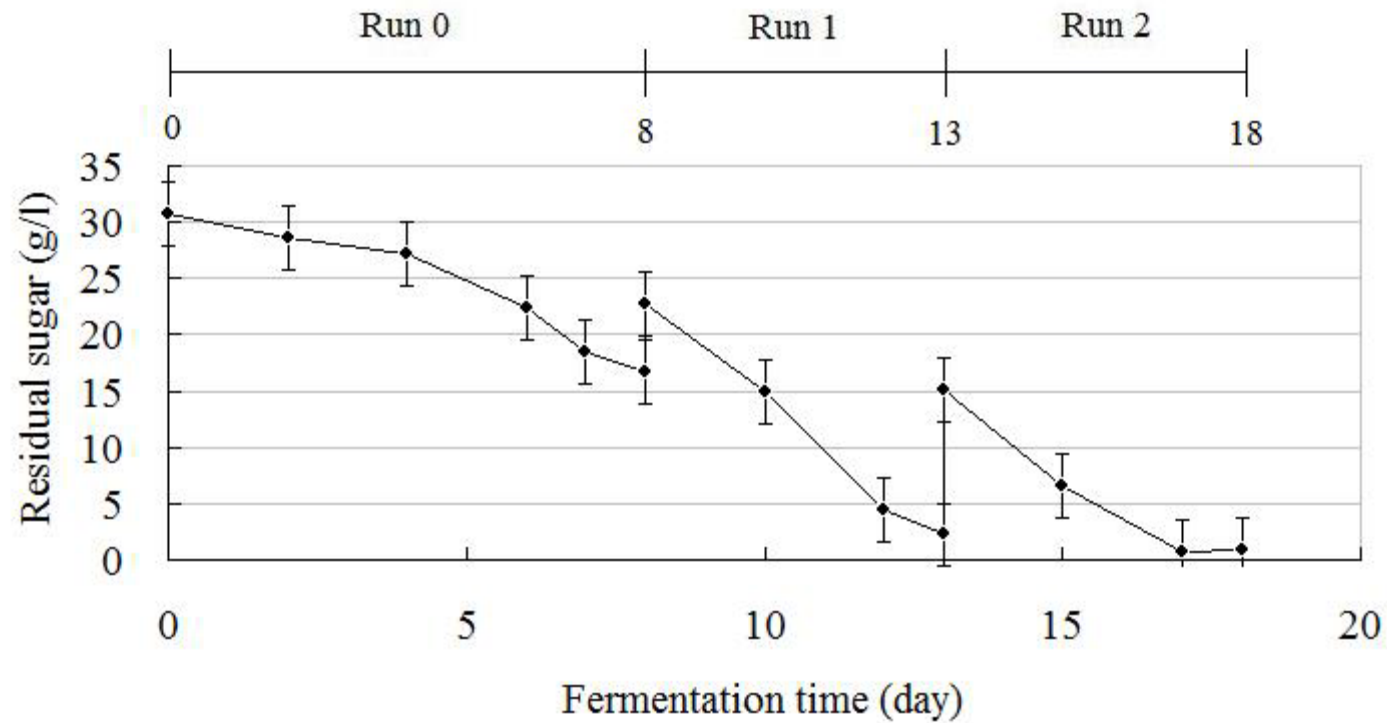


圖 4-29 固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽進行重覆批次發酵期間殘糖之變化(每一批次 5 天)。

Fig 4-29 The residual sugar of culture at repeated-batch fermentation with immobilized *T. versicolor* cells in the bubble column fermentor (Each batch run for 5 days).

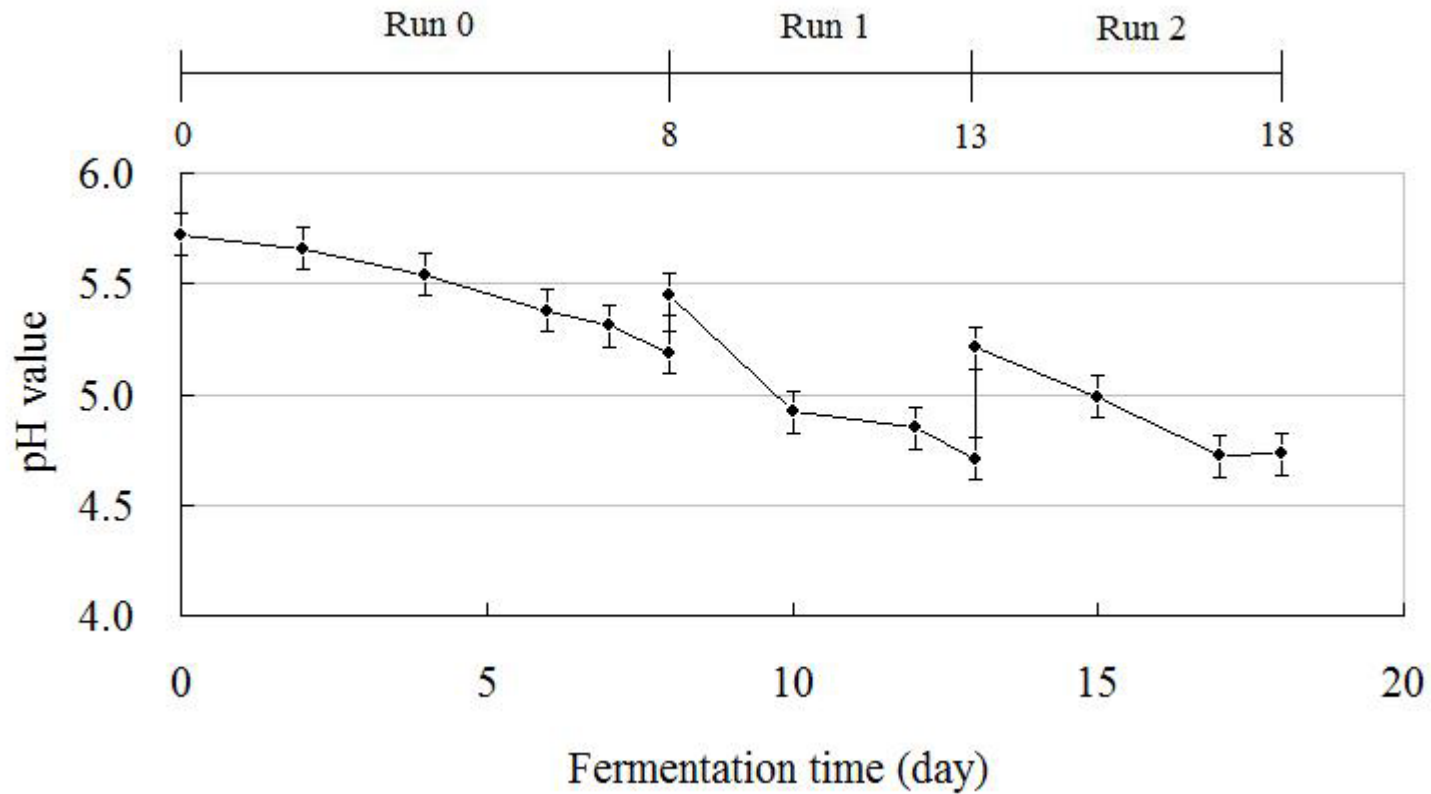


圖 4-30 固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽進行重覆批次發酵期間 pH 之變化(每一批次 5 天)。

Fig 4-30 The pH of culture at repeated-batch fermentation with immobilized *T. versicolor* cells in the bubble column fermentor (Each batch run for 5 days).

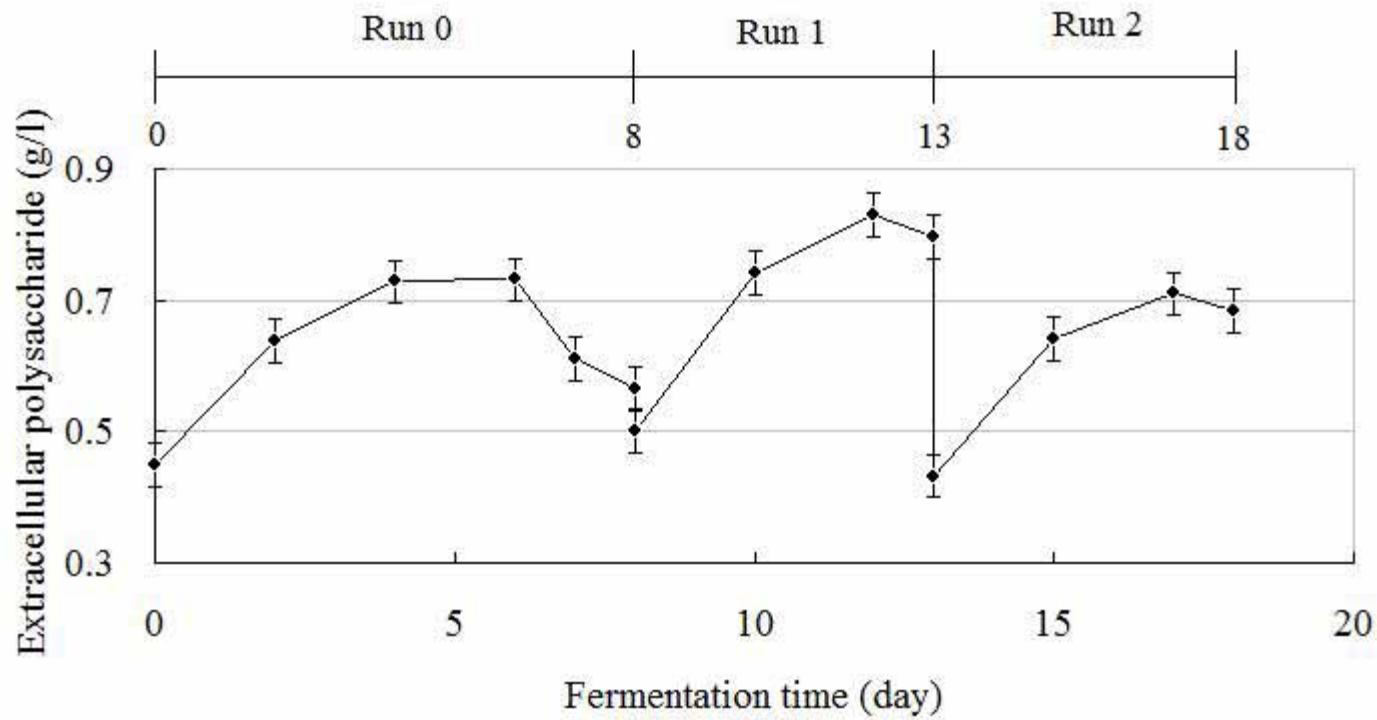


圖 4-31 固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽進行重覆批次發酵期間胞外多醣之變化(每一批次 5 天)。

Fig 4-31 Production of extracellular polysaccharides from repeated-batch fermentation with immobilized *T. versicolor* cells in the bubble column fermentor (Each batch run for 5 days).

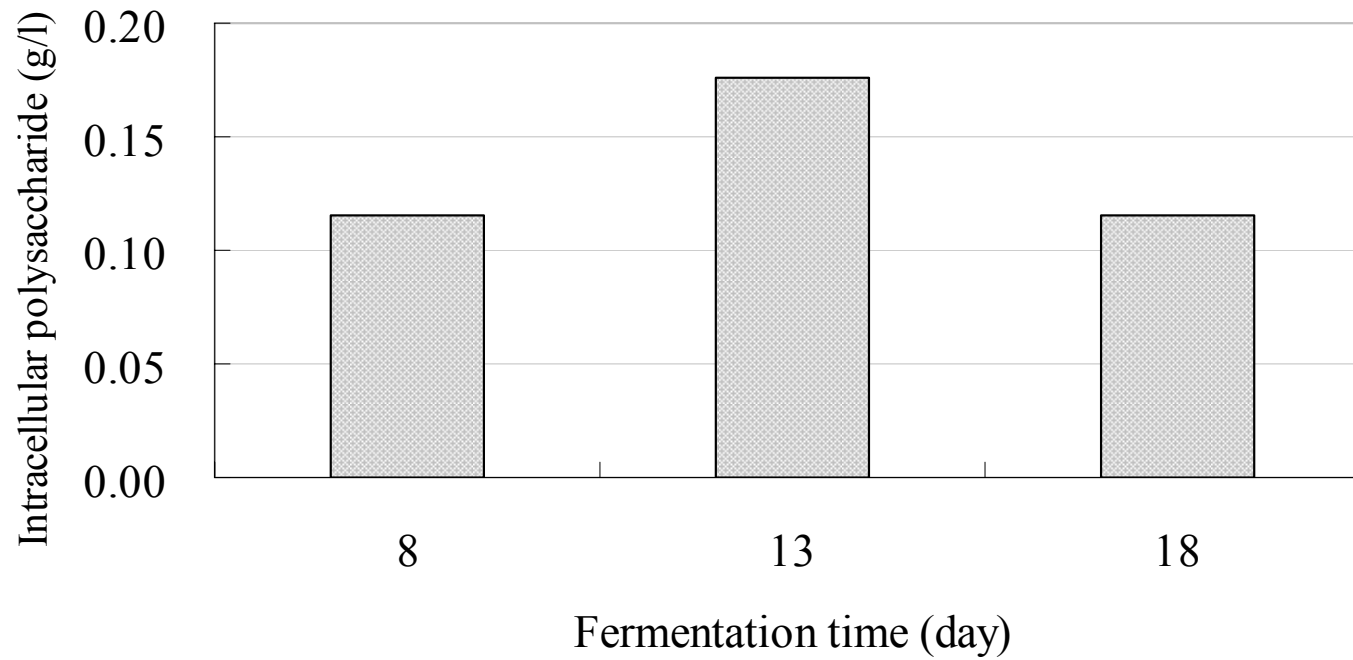


圖 4-32 固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽進行重覆批次發酵各批次胞內多醣之產量(每一批次 5 天)。

Fig 4-32 Production of intracellular polysaccharides from each repeated-batch fermentation with immobilized *T. versicolor* cells in the bubble column fermentor (Each batch run for 5 days).

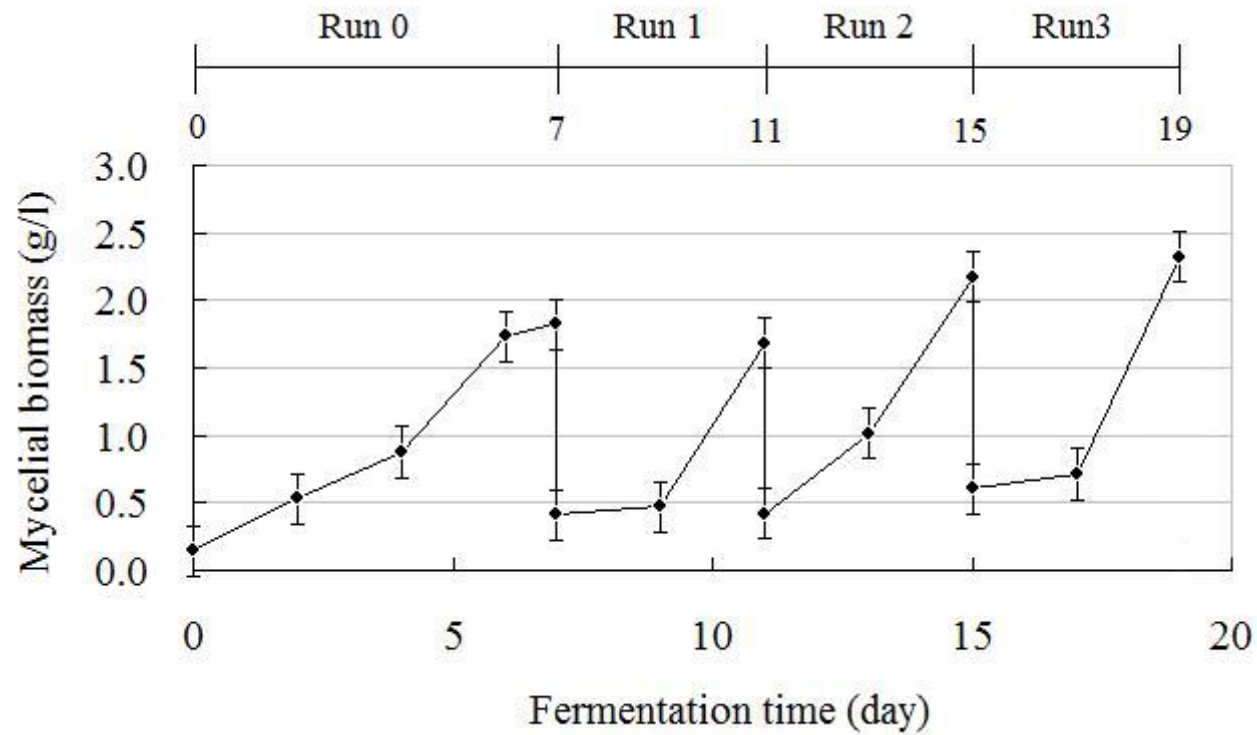


圖 4-33 固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽重複批次發酵期間懸浮菌體濃度之變化(每一批次 4 天)。

Fig 4-33 Production of mycelium biomass from repeated-batch fermentation with immobilized *T. versicolor* cells in the bubble column fermentor (Each batch run for 4 days).

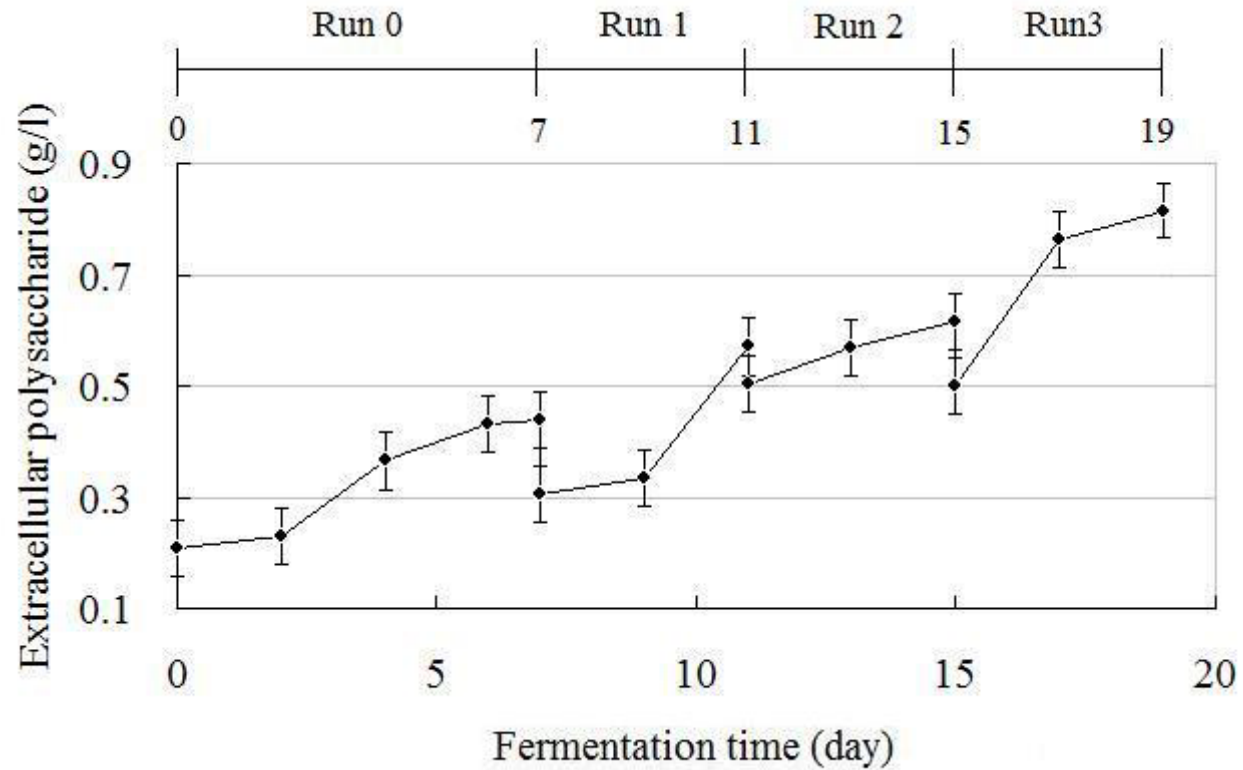


圖 4-34 固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽重複批次發酵期間胞外多醣之變化(每一批次 4 天)。

Fig 4-34 Production of extracellular polysaccharides from repeated-batch fermentation with immobilized *T. versicolor* cells in the bubble column fermentor (Each batch run for 4 days).

液產生之胞外多醣互相疊加之結果，發酵至末期(Day 19)可得到最大胞外多醣產量 0.815 g/L，由圖 4-31 與圖 4-34 比較得知，泡柱式發酵槽試驗由 5 天至 4 天縮短發酵週期後第一批(Run 0)至第四批(Run 3)平均胞外多醣最佳產量為 0.616 g/L，5 天的發酵週期第一批(Run 0)至第三批(Run 2)平均最佳產量為 0.757 g/L，縮短發酵週期為 4 天沒有更佳的胞外多醣產量，可能是因為縮短發酵週期使得菌體產量減少，也間接影響了胞外多醣的產量。另外，此次發酵液中最低殘糖濃度為 8.74 g/L(圖 4-35)，推估尚有可利用之碳源，且其最低 pH 值為 4.87(圖 4-36)，相較於上批 pH 值 4.71 高，有相關研究(Yang *et al.*, 2003；Xu *et al.*, 2003；Shu and Lung, 2004；Kim *et al.*, 2005)證實，食藥用菇類菌絲體生長與胞外多醣合成需在較酸的環境下培養，才有較佳的產量。而胞內多醣(圖 4-37)的平均產量為 0.199 g/L，相較於未縮短發酵週期的平均產量 0.136 g/L，則有較佳的表現量。另外，由於重複利用第 4 批發酵期間受到雜菌汙染，而無法繼續進行生產。

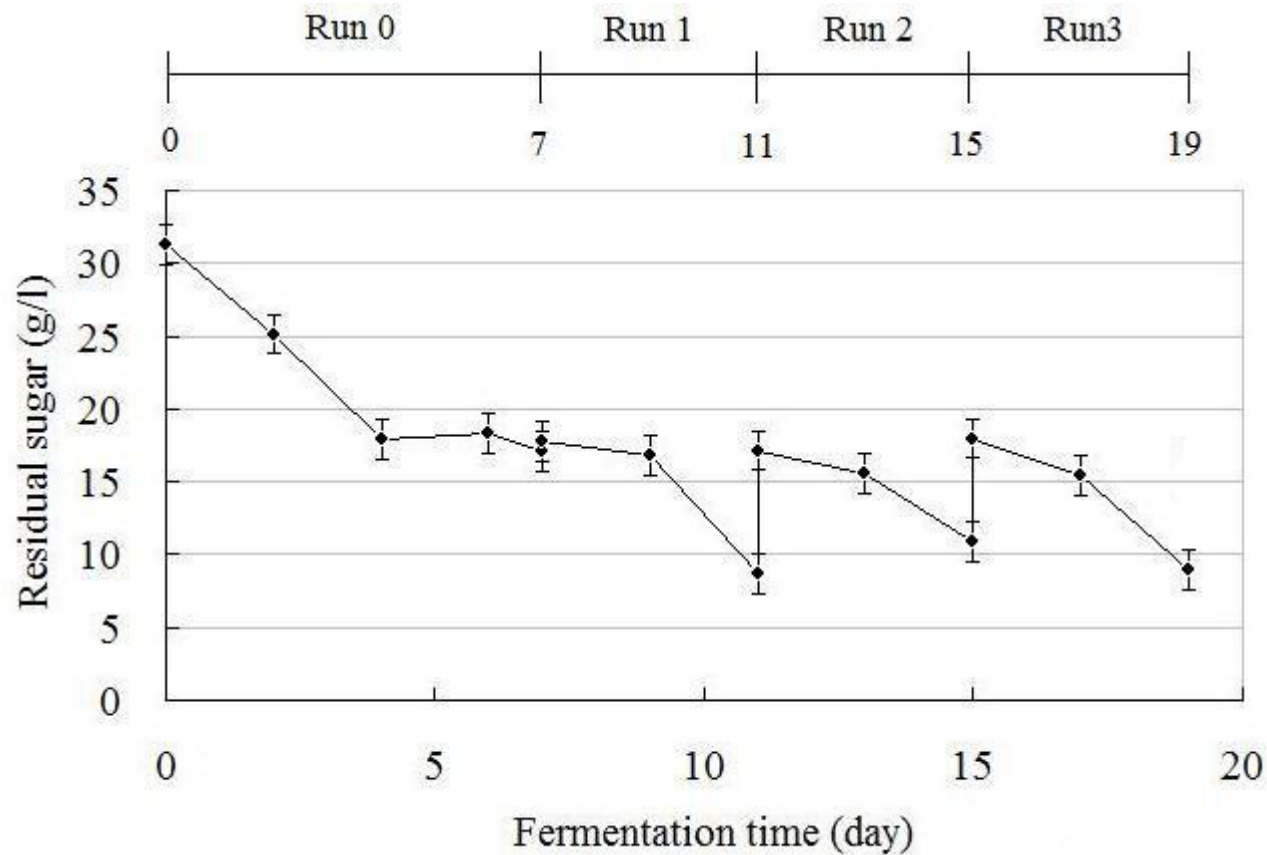


圖 4-35 固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽重複批次發酵期間殘糖之變化(每一批次 4 天)。

Fig 4-35 The residual sugar of culture at repeated-batch fermentation with immobilized *T. versicolor* cells in the bubble column fermentor (Each batch run for 4 days).

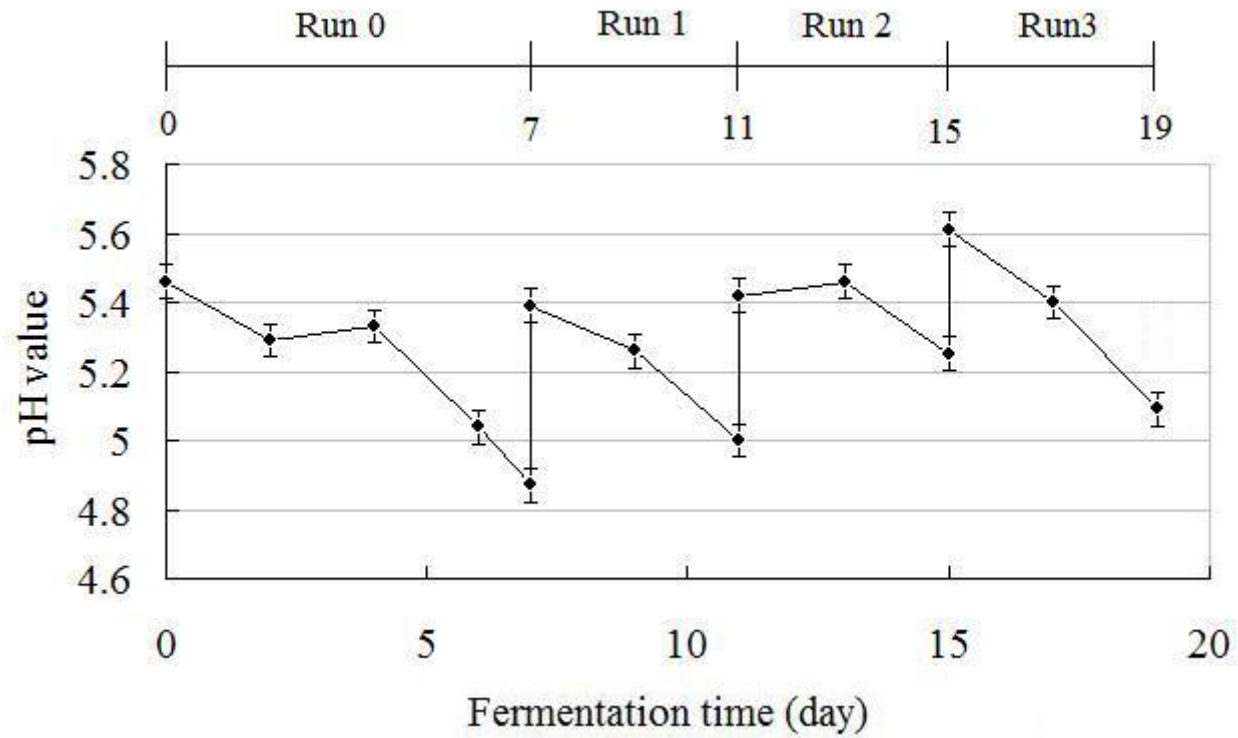


圖 4-36 固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽重複批次發酵期間 pH 值之變化(每一批次 4 天)。

Fig 4-36 The pH of culture at repeated-batch fermentation with immobilized *T. versicolor* cells in the bubble column fermentor (Each batch run for 4 days).

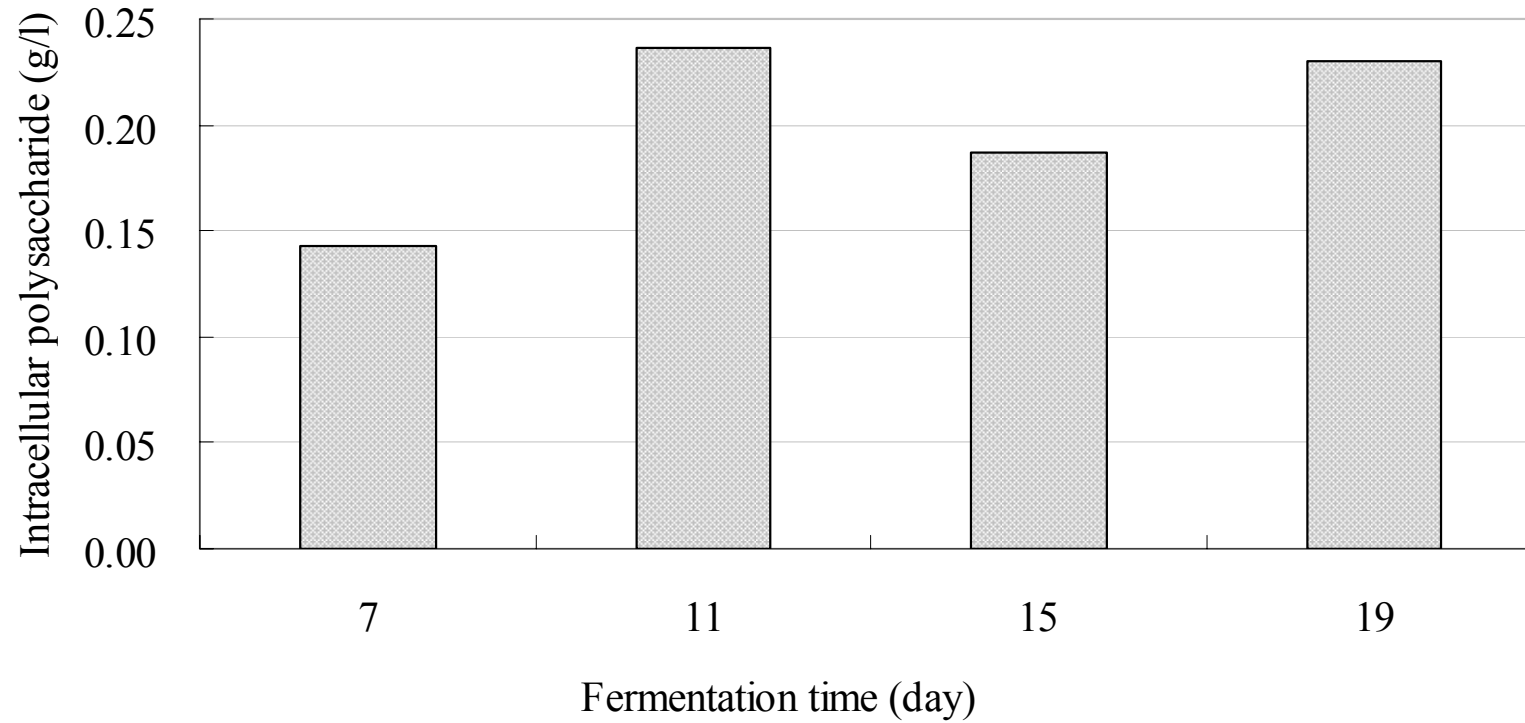


圖 4-37 固定化雲芝菌體以泡柱式發酵槽進行重覆批次發酵各批次胞內多醣之產量(每一批次 4 天)。

Fig 4-37 Production of intracellular polysaccharides from each repeated-batch fermentation with immobilized *T. versicolor* cells in the bubble column fermentor (Each batch run for 4 days).

三、多醣體分子量分析

文獻指出菇菌類多醣體主要以 β -1,3-glucan 結構組成所具有的功效活性強弱會受到多醣體的分支度、分子量大小、主鏈的鍵結方式和側鏈基團物種的影響，具有免疫調節活性的菇類多醣，其分子量約在 100 kDa 至 200 kDa(杜等人，2002)。雲芝多醣分子量分布在 200 kDa 左右時，能促進細胞增生及活化免疫力(Kurakata et al., 1991)；而靈芝多醣體由萃取方式不同分為 ganoderan A、B 及 C 等，其分子量分布在 5.8 kDa 至 23 kDa 左右者，皆能達到降血糖功效(Tomoda et al., 1986)；由黑木耳中萃取之木耳多醣，當分子量分布在 5000 kDa 左右時，具有降膽固醇的功效(Sone et al., 1978)；另外，竹蓀中萃取之多醣分子量在 330 kDa 及 620 kDa 左右時，具有抗癌效果。

(一) 搖瓶培養之多醣體

在泡棉及菜瓜布兩種載體中，產生多醣最大量的時間點，測得多醣含量及分子量，其結果顯示於表 4-1。由表來看，泡棉組所生成之胞外及胞內多醣分子量分別為 387 kDa 及 3480 kDa，菜瓜布組所生成之胞外及胞內多醣分子量分別為 1470 kDa 及 13500 kDa，皆明顯大於泡棉組之分子量，造成不同載體分子量不同的原因，可能與載體的材質、孔隙有關，菜瓜布組的表面粗糙且孔隙

表 4-1 載體對雲芝菌胞外多醣、胞內多醣產量及分子量之影響。

Table 4-1 Effect of carrier type on production and molecular weight of polysaccharides from *T. versicolor*.

Carrier	EPS (g/l)	IPS (g/l)	Molecular weight (Da)	
			EPS	IPS
Polypropylene foam	0.717 ± 0.057	0.182 ± 0.023	3.87×10 ⁵	3.48×10 ⁶
Scrub sponge	0.235 ± 0.011	0.101 ± 0.003	1.47×10 ⁶	1.35×10 ⁷

Values are means ± S.D. of triple determination.

EPS : extracellular polysaccharides ; IPS : intracellular polysaccharides.

大，生成之多醣不易黏附於菜瓜布，因此推測發酵液中之小分子多醣較易於聚合成大分子，因此造成此組分子量較大(蘇，2010)。

在產生最大多醣含量時間點，不同載體比例對分子量的影響結果表示於表 4-2。由表可知，三組的胞外多醣分子量介於 356 kDa~ 378 kDa，胞內多糖分子量介於 3310 kDa~3390 kDa，各組別間分子量大小無明顯變化，因此推測泡棉載體比例對多醣分子量大小之影響甚小。

表 4-3 為不同搖瓶轉數對雲芝菌胞外多醣、胞內多醣產量及分子量之結果。胞外多醣分子量方面，培養第四天分子量分布在 323 kDa~333 kDa，其多醣產量最大之第 8 天分子量介於 378 kDa~390 kDa，僅有小幅增大趨勢；胞內多醣分子量方面，發酵第四天和第八天分子量皆介於 3420 kDa~3770 kDa 之間，整體來說搖瓶轉數對改變分子量大小較無影響。

表 4-4 為搖瓶重複批次發酵對固定化雲芝菌體胞外多醣、胞內多醣產量及分子量之分析，由表得知發酵期間胞外多醣分子量分布在 281 kDa~436 kDa 之間；胞內多醣分子量分布在 3220 kDa~4890 kDa 之間。文獻指出，具抗腫瘤活性的雲芝多醣分子量為 2000 kDa 以上，其成分為(1→6)branched(1→3)-β-D-glucans (Sugiura *et al.*, 1980)；已製成抗腫瘤藥物與免疫增強劑之雲芝多醣

表 4-2 載體裝載量對雲芝菌胞外多醣、胞內多醣產量及分子量之影響。

Table 4-2 Effect of carrier load on production and molecular weight of polysaccharides from *T. versicolor*.

Carrier% (v/v)	EPS (g/l)	IPS (g/l)	Molecular weight (Da)	
			EPS	IPS
10	0.717 ± 0.055	0.182 ± 0.023	3.78×10 ⁵	3.39×10 ⁶
15	0.688 ± 0.009	0.172 ± 0.019	3.64×10 ⁵	3.31×10 ⁶
20	0.458 ± 0.033	0.199 ± 0.017	3.56×10 ⁵	3.37×10 ⁶

Values are means ± S.D. of triple determination.

EPS : extracellular polysaccharides ; IPS : intracellular polysaccharides.

表 4-3 不同搖瓶轉數對雲芝菌胞外多醣、胞內多醣產量及分子量之影響。

Table 4-3 Effect of shaker speed on production and molecular weight of polysaccharides from *T. versicolor*.

Revolutions per minute (rpm)	EPS (g/l)	IPS (g/l)	Molecular weight (Da)			
			EPS		IPS	
			Day 4	Day 8	Day 4	Day 8
100	0.717 ± 0.057	0.182 ± 0.022	3.23×10 ⁵	3.89×10 ⁵	3.57×10 ⁶	3.42×10 ⁶
150	0.333 ± 0.029	0.124 ± 0.012	3.25×10 ⁵	3.90×10 ⁵	3.74×10 ⁶	3.51×10 ⁶
Two-stage 150-100	0.581 ± 0.035	0.158 ± 0.014	3.33×10 ⁵	3.78×10 ⁵	3.56×10 ⁶	3.77×10 ⁶

Values are means ± S.D. of triple determination.

EPS : extracellular polysaccharides ; IPS : intracellular polysaccharides.

表 4-4 以搖瓶重複批次發酵固定化雲芝菌體對胞外多醣、胞內多醣產量及分子量之影響。

Table 4-4 Effect of repeat use on production and molecular weight of polysaccharides from immobilized *T. versicolor*.

Culture time (day)	EPS (g/l)	IPS (g/l)	Molecular weight (Da)	
			EPS	IPS
8 (Run 0)	0.644 ± 0.035	0.185 ± 0.021	3.77×10 ⁵	3.58×10 ⁶
13 (Run 1)	0.711 ± 0.015	0.126 ± 0.044	4.36×10 ⁵	4.89×10 ⁶
18 (Run 2)	0.500 ± 0.059	0.181 ± 0.068	3.43×10 ⁵	3.76×10 ⁶
23 (Run 3)	0.556 ± 0.002	0.124 ± 0.039	2.81×10 ⁵	3.22×10 ⁶
28 (Run 4)	0.674 ± 0.021	0.163 ± 0.036	3.73×10 ⁵	4.78×10 ⁶

Values are means ± S.D. of triple determination.

EPS : extracellular polysaccharides ; IPS : intracellular polysaccharides.

PSK 及 PSP 的平均分子量為 100 kDa (Ng, 1998)； β -1,3-glucans 分子量大小與人體生理活性有關：分子量為 10 kDa~100 kDa 具消炎作用、30 kDa 以上具有抗腫瘤作用(黃, 1998)，推論本搖瓶試驗生產之多醣體與抗腫瘤及消炎作用有關，且大分子量(3220 kDa~4890 kDa)的胞內多醣還與增強免疫功能有關。

(二) 發酵槽培養之多醣體

泡柱式發酵槽重複批次發酵對雲芝菌發酵期間最佳胞外多醣、胞內多醣產量及分子量其結果顯示於表 4-5、表 4-6。由表可知發酵期間胞外多醣分子量大小主要介於 264 kDa~273 kDa 及 11 kDa~18 kDa 間等兩種；胞內多醣分子量大小主要介於 6270 kDa~7410 kDa 及 6370 Da~6820 Da 間等兩種，且有縮短發酵週期之組別(表 4-6)相較於未縮短發酵週期之組別(表 4-5)，其分子量片段大小並無太大差異。文獻得知，菇類多醣體的生理活性與其分子結構及分子量大小密切相關(韓等人, 2006)；菇類多醣體之分子結構以 β -1,3-D-glucans 為主鏈， β -1,6-glucans 為支鏈，分子量 3 kDa~5 kDa 之間具降血糖功能，在 10 kDa~1000 kDa 間者具抗發炎作用，在 30 kDa 以上具抗發炎及抗腫瘤作用(黃, 1998)；另外，有文獻報告分子量 10 kDa 具降血壓功能(水野與川合, 1999)，10 kDa~50 kDa 與 2000 kDa 具抑制腫瘤效果(Mizuno *et al.*, 1990)，20

表 4-5 以泡柱式發酵槽重複批次發酵固定化雲芝菌體對胞外多醣、胞內多醣產量及分子量之影響(固定化菌體發酵週期為 5 天)。

Table 4-5 Effect of repeat use on production and molecular weight of polysaccharides from immobilized *T. versicolor* cells in the bubble column fermentor. (The fermentation cycle was 5 days)

Culture time (day)	EPS (g/l)	IPS (g/l)	Molecular weight (Da)	
			EPS	IPS
8 (Run 0)	0.565 ± 0.019	0.116 ± 0.040	2.72×10 ⁵	6.62×10 ⁶
			1.82×10 ⁴	6.72×10 ³
13 (Run 1)	0.797 ± 0.009	0.176 ± 0.037	2.88×10 ⁵	6.37×10 ⁶
			1.09×10 ⁴	6.54×10 ³
18 (Run 2)	0.684 ± 0.036	0.115 ± 0.040	2.64×10 ⁵	7.14×10 ⁶
			1.61×10 ⁴	6.47×10 ³

Values are means ± S.D. of triple determination.

EPS : extracellular polysaccharides ; IPS : intracellular polysaccharides.

表 4-6 以泡柱式發酵槽重複批次發酵固定化雲芝菌體對胞外多醣、胞內多醣產量及分子量之影響(固定化菌體發酵週期為 4 天)。

Table 4-6 Effect of repeat use on production and molecular weight of polysaccharides from immobilized *T. versicolor* cells in the bubble column fermentor. (The fermentation cycle was 4 days).

Culture time (day)	Polysaccharide production (g/L)		Molecular weight (Da)	
	EPS	IPS	EPS	IPS
7 (Run 0)	0.438 ± 0.027	0.142 ± 0.030	2.70×10 ⁵ 1.71×10 ⁴	7.41×10 ⁶ 6.37×10 ³
11 (Run 1)	0.570 ± 0.027	0.236 ± 0.011	2.73×10 ⁵ 1.27×10 ⁴	6.66×10 ⁶ 6.78×10 ³
15 (Run 2)	0.616 ± 0.011	0.187 ± 0.030	2.68×10 ⁵ 1.33×10 ⁴	6.27×10 ⁶ 6.52×10 ³
19 (Run 3)	0.815 ± 0.040	0.230 ± 0.023	2.69×10 ⁵ 1.21×10 ⁴	6.38×10 ⁶ 6.82×10 ³

Values are means ± S.D. of triple determination.

EPS : extracellular polysaccharides ; IPS : intracellular polysaccharides.

kDa 則具殺滅癌細胞的活性(Fujimiya *et al.*, 1999)。比較文獻與本泡柱式發酵槽之結果，所得胞外多醣的生理活性與抗發炎、抗腫瘤及降血壓等有關；胞內多醣大分子量片段(6270 kDa~7410 kDa)其生理活性與降膽固醇有關。

第五章 結論

一、搖瓶培養

1. 以泡棉、菜瓜布為載體培養固定化的雲芝菌體，搖瓶試驗中以泡棉較易使雲芝菌絲體附著生長，且在菌體乾重、胞外多醣及胞內多醣產量方面，均較優於菜瓜布。
2. 以不同載體裝載量培養雲芝試驗中，加入泡棉量的比例對於雲芝生產胞外及胞內多醣無明顯影響，但是對於雲芝菌絲體產量有顯著影響($P < 0.05$)，以加入 10%體積單位泡棉的生長情形最佳。
3. 在搖瓶轉速調控試驗中，100 rpm 最適合菌體生長與附著於載體，150-100 rpm 的組別未達成預期中的效果，搖瓶轉數 150 rpm 機械剪力較大，會降低菌體正常生長及多醣產量。
4. 固定化的菌體在搖瓶中可重複發酵 4 次，EPS 及 IPS 產量分別為 0.754 g/L 及 0.185 g/L。發酵期間，載體由原先直徑 1.8 cm 增大至後期直徑 2.6 cm，固定化載體增大使內部質傳效果降低，造成第 4 次利用時菌體產量開始下降。

二、發酵槽培養

1. 泡柱式發酵槽的通氣量對於菌體包覆載體有很大的影響，以 0.2 vvm 最適合菌體附著於載體，較高的通氣量(0.5 vvm 及 1 vvm)會造成機械剪力，使已包覆好的菌體剝落。

2. 泡柱式發酵槽固定化菌體的培養週期為 5 天，將每批的發酵週期降低為 4 天，會使菌體產量減少 2.00 g/L，胞外多醣產量也降低 0.141 g/L，但是在胞內多醣的累積則增加為 0.063 g/L，因此可改變發酵週期調控發酵生產我們所需之目標產物。
3. 改造之氣舉式發酵槽接種培養 3、4 天後，菌體開始快速生長，培養液中懸浮菌體有卡在鐵絲網的孔隙中的現象，發酵完成之後不利於取出菌體，要使用氣舉式發酵槽進行固定化雲芝菌體的發酵生產，還有許多問題待研究。

三、多醣體分子量分析

搖瓶培養之雲芝多醣體胞外多醣分子量分布在 281 kDa~436 kDa 之間，胞內多醣分子量分布在 3220 kDa~4890 kDa 之間；發酵槽培養所得之胞外多醣分子量大小主要介於 264 kDa~273 kDa 及 11 kDa~18 kDa 間等兩種，胞內多醣分子量大小主要介於 6370 Da~6820 Da 及 6270 kDa~7410 kDa 間兩種。

第六章 參考文獻

- 水野卓、川合正允 (1999)。菇類的化學、生化學，pp.40-43。國立編譯館 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，第 M-87-019 號。財團法人食品工業發展研究所。
- 王培銘、黃定國 (2001)。氣動攪拌式發酵槽。食品工業，34(11)13-25。
- 王培銘 (2002)。食藥用菇液態培養製程之開發。食品工業，34(5)：31-35。
- 王伯徹 (2005)。菇類的應用研發與產業推動。食品工業，37(5)：1-9。
- 尤蓉、余斌、李正 (2001)。食品發酵工業，27(12)：20-21。
- 仝漢霖、楊芳鏘 (1994)。饋料培養技術在生化製程上之應用。製酒科技專論彙編，16：151-166。
- 何仁為 (2005)。深層培養環境對生產豬苓菌絲體及多醣體之影響。東海大學食品科學研究所碩士班碩士論文。
- 杜巍、李元瑞、袁靜 (2002)。食藥用菌多醣生物活性與鍵結的關係，中國食用菌，21(3)：28-29。
- 李俊峰 (2003)。雲芝的生理學特性、藥理作用及應用前景。農業科學 31(3)：509-510。
- 林余帥 (2002)。靈芝液態培養條件的探討及鳳梨果皮作為培養基之

- 研究。東海大學食品科學研究所碩士班碩士論文。
- 林葦郁 (2005)。利用固定化菌體進行樟芝的深層培養生產菌體代謝物之研究。東海大學食品科學研究所碩士班碩士論文。
- 胡琦佳 (1994)。真菌球狀菌絲體生長之探討。食品工業，26(9): 37-45。
- 徐錦堂 (1996)。中國藥用真菌學，pp.475-495。北京醫科大學、中國。協和醫科大學聯合出版社。
- 張淑芬 (2001)。食藥用菇類搖瓶液態培養條件之探討。食品工業，33(7)：39-46。
- 楊芳鏘、楊明哲 (2001)。菌絲狀真菌之深層培養技術。化工技術，9(2)：176-189。
- 楊士賢 (2006)。影響雲芝菌絲體與多醣體批次饋料發酵產程控制參數因子之探討。大葉大學生物產業科技學系碩士班。
- 周文能、張東柱 (2005)。野菇圖鑑：台灣四百種常見大型真菌圖鑑 Mushrooms of Taiwan。pp.269。遠流出版有限公司。
- 婁寧、陳瓊、周玫 (1995)。雲芝多糖對實驗性動脈僵樣硬化家兔脂質過氧化傷害的保護作用。第一軍醫大學學報，15(2)：107-110。
- 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。
- 滕愛芬、張玉英、顧振綸、印其章、錢曾年、郭次儀、周文軒 (1996)。

- 雲芝醣肽鎮痛作用的實驗研究。中國藥學雜誌，31(10)：591-594。
- 余光弟、端木正波、印其章 (1994)。雲芝醣肽對大鼠下丘腦內側基底部電活動和脾淋巴細胞免疫功能的調節。蘇州醫學院學報，14(5)：365。
- 張培玉、楊革、鄭恆河 (1998)。雲芝菌絲體生長的營養需求及液體發酵研究。曲阜師範大學學報，24(3)：65-68。
- 張文苑 (2003)。不同的液態培養條件對樟芝菌絲生長及多醣體型成的影響。東海大學食品科學研究所碩士班碩士論文。
- 張玉英、龔珊、張惠琴 (2004)。雲芝醣肽鎮痛抗炎作用的實驗研究。蘇州大學學報(醫學版)，24(5)：652-653。
- 洪聖修 (2004)。幾丁聚醣顆粒固定化惡臭假單胞菌對酚降解的評估。國立成功大學化學工程學系碩士論文。
- 劉慈欣 (2004)。液態培養環境對北冬蟲夏草菌絲體生長及其機能性成分之影響。東海大學食品科學研究所碩士班碩士論文。
- 蕭美鈴 (2007)。深層培養條件與不同型式之發酵槽對巴西蘑菇菌胞外多醣體生成之影響。東海大學食品科學研究所碩士班碩士論文。
- 賴佩君 (2008)。雲芝在不同發酵槽及不同培養條件對菌絲體及多醣體之影響。東海大學食品科學研究所碩士班碩士論文。
- 蘇莉娟 (2010)。以蔗糖為基質及菌體固定化進行 *Zymomonas mobilis*

的液態培養生產細菌聚果糖(leven)之研究。東海大學食品科學研究所碩士班碩士論文。

董純婷 (2001)。網狀內管氣舉式反應器混合效能之探討。清華大學化學工程研究所碩士論文。

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。

Bae J.T., Park J.P., Song C.H., Yu C.B., Park M.K., and Yun J.W. (2001) Effect of carbon source on the mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of *Paecilomyces japonica*. *J. Ind. Microbiol.* 91:522-524.

Birhanli E. and Yesilada. O. (2010) Enhanced production of laccase in repeated-batch cultures of *Funalia trogii* and *Trametes versicolor*. *Biochemical Engineering Journal* 52:33-37.

Chihara G., Hamuro J., Maeda Y.Y., *et al.* (1987) Antitumor and metastasisinhibitory activities of lentinan as an immunomodulator : an overview. *Cancer Detect Prev. Suppl.* 1:423-443.

Chisti Y. (1989) Airlift bioreactors. *Adv. Biochem. Eng.* 13:121-214.

Chu K.K.W., Ho S.S.S. and Chow A.H.L. (2002) *Coriolus versicolor* : A meecinal mushroom with promising immunotherapeutic values. *J. Clinical Pharmacology.* 42:976-984.

Chow L., Lo C., Loo W., Hu X. and Sham J. (2003) Polysaccharidepeptide mediates apoptosis by up-regulating p21 gene and down-regulatingcyclinD1 gene. *Am. J. Chin. Med.* 31:1-9.

Collins R.A. and Ng T.B. (1997) Polysaccharopeptide from *Coriolus versicolor* has potential for use against human immunodeficiency

virus type 1 infection. *Life Sci.* 60:PL383-387.

Cui J. and Chisti Y. (2003) Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor* : physiological activity, uses, and production. *Biotech Adv.* 21:109-122.

Devi S. and Sridhar P. (2000) Production of cephamycin C in repeated-batch operations from immobilized *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochem.* 36:225-231.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analysis Chemistry.* 28:350-356.

Fang Q.H., Tang Y.J., and Zhong J.J. (2002) Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Process biochem.* 37:1375-1379.

Fujimiya Y., Suzuki Y. and Katakura R. (1999) Tumor-specific cytotoxic and immunopotentiating effects of relatively low molecular weight products derived from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill. *Anticancer Res.* 19:113-8.

Gerbsch N. and Buchholz R. (1995) New processes and actual trends in biotechnology. *FEMS Microbiol Rev.* 16:259-269.

Guimaraes C., Bento L. and Mota M. (1999) Biodegradation of colorants in refinery effluents : Potential use of the fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Int. Sugar J.* 101(1205):246-251.

Hayakawa K., Mitusubishi N., Saito Y., Takahashi M., Katano S., Shiojima K., Furuta M. and Niibe H. (1993) Effect of krestin(PSK) as adjuvant treatment on the prognosis after radical radiotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 13:1815-1820.

Hotta T., Enomoto A., Yoshikumi C., Ohara M. and Ueno S. (1981)

Protein-bound polysaccharides. *U.S. Patent*. 4(271):151.

Ho J.C.K., Konerding M.A., Gaumann A., Groth M. and Liu W.K. (2004) Fungal polysaccharopeptide inhibits tumor angiogenesis and tumor growth in mice. *Life Science*. 75:1343-1356.

Hsieh T., Kunicki J., Darzynkiewicz Z. and Wu J. (2002) Effect of extracts of *Coriolus versicolor* on cell-cycle progression and expression of interleukins-1-beta-6 and -8 in promyelocytic HL-60 leukemic cells and mitogenically stimulated and nonstimulated human lymphocytes. *J. Altern Complement. Med.* 8:591-602.

Jian C. and Yusuf C. (2003) Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor* : physiological activity, uses, and production. *Biotechnol adv.* 21:109-122.

Kim H.O., Lim J.M., Joo J.H., Kim S.W., Hwang H.J, Choi J.W. and Yun J.W. (2005) Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresource Technol.* 96:1175-1182.

Kurakata Y., Kizawa I., Oomori K., Iwano I., Kita T. and Kato K. (1988) Effect of PSK on inteleukin-2 production by peripheral lymphocytes of patients with advanced ovarian carcinoma during chemotherapy. *Jpn. J. Cancer Res.* 79:125-130.

Kurakata Y., Sakagami H., Sato A., Kikuchi K., Takeda M., Asano K. and Sato T. (1991) Functional maturation of monocytes/macrophages induced by PSK subfractions. *Anticancer Res.*, 11:1767-1772.

Lee B.C., Bae J.T., Pyo H.B., Choe T.B., Kim S.W., Hwang H.J. and Yun J.W. (2004) Submerged culture conditions for the production of mycelia biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme Microb Technol.* 35:369-376.

Lee C.L., Yang X. and Wan J.M.F. (2006) The culture duration affects the immunomodulatory and anticancer effect of polysaccharide

derived from *Grifola frondosa* : *Enzyme Microb. Technol.* 38:14-21.

Li X.M., Wang J.F., Xhu P.P., Ge J.B. and Yang S.X. (1990) Immune, enhancement of a polysaccharides peptides isolated from *Coriolus versicolor*. *Acta Pharm Sinica.* 11:542-545.

Litchfield J. (1967) Submerged culture of mushroom mycelium. In: *Micobial Technology*, 2nd ed. (Peppier H. J. and Pertman D., eds). pp : 93-145. Genetic engineering. New York.

Lu C.J., Lee C.M. and Huang C.Z. (1996) Biodegradation of chlorophenols by immobilized pure-culture microorganisms. *Water Science and Technology.* 34:67-73.

McNeil B., Berry D.R., Harvey L.M. Grant A., and White S. (1998) Measurement of autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* 57:297-305.

Metz, B., and Kossen. N.W.F. (1977) The growth of molds in the form of pellets:Literature review. *Biotechnol.Bioeng.* 19:781-799.

Miller G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistery.* 31(3):426-428.

Mizuno T., Hagiwara T., Nakamura T., Ito H., Shimura K., Sumiya T. and Asakura A. (1990) Antitumer activity and some properties of water-insoluble hetero-glucans from Himematsutake, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agaric. Biol. Chem.* 54:2889-2896.

Ng T.B. (1998) A review of research on the protein-bound polysaccharide(Polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor*(Basidiomycetes:Polyporaceae). *Gen. Pharmac.* 30(1):1-4.

Pang Z.J., Chen Y., Zhou M. and Wan J. (2000) Effect of polysaccharide Krestin on glutathione peroxide gene express in mouse peritoneal macrophages. *Br. J. Biomed. Sci.* 57:130-136.

- Park, E.Y., Koike Y., Higashiyama, K., Fujikawa, S., and Okabe, M. (1999) Effect of nitrogen source on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Moruerella alpine*. *J. Biosci. Bioeng.* 88:61-67.
- Park J.P., Kim Y.M., Kim S. W., Hwang H.J., Cho Y.J., Lee Y.S., Song C.H., and Yun J.W. (2002) Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. *Process Biochem.* 37:1257-1262.
- Parris M.K. (2000) The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternative Medicine Review.* 5(1):4-27.
- Pinheiro I.R. and Facciotti M.C.R. (2008) Retamycin production by immobilized cells of *Streptomyces olindensis* ICB20 in repeated-batch cultures. *Process Biochem.* 43:661-666.
- Rau U., Gura E., Olszewski E., and Wagner F. (1992) Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. *J. Ind. Microbiol.* 9:19-26.
- Sailas B., Ashok P. (1997) Enhancement of lipase production during repeated batch culture using immobilized *Candida rugosa*. *Process Biochem.* 32:437-40.
- Scott C.D. (1987) Immobilized cell : a review of recent literature. *Enzyme Microb. Technol.* 9:66-73.
- Shu C.H. and Lung M.Y. (2004) Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorate* in batch culture. *Process Biochem.* 39:931-937.
- Sinha J., Bae J.T., Park J.P., Song C.H., and Yun J.W. (2001) Effect of substract concentration on broth rheology and fungal morphology during exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica* in a batch bioreactor. *Enzyme Microb Technol.* 29:392-399.
- Solomons G.L. (1969) Material and Methods in Fermentation. Academic

Press, London.

Sone Y., Kakuta M. and Misaki A. (1978) Isolation and characterization of polysaccharides of “Kikurage”, fruit body of *Auricularia auricular-judae*. *Arg. Biol. Chem.*, 42:417-425.

Stewart W., Mhairi M., David R. B., and Brian M. (2002) The autolysis of industrial filamentous fungi. *Critical Review in Biotechnology*. 22(1) :1-14.

Sugiura M., Ohno H., Sasaki Y. and Hama K. (1980) Gulcan having antitumor activity. *United states patent* 4237266.

Tomoda M., Gonda R., Kasahara Y. and Hikino H. (1986) Autidiabetes drugs. Glycan structures of ganoderans B and D, hypoglycemic glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Phytochem.*, 25:2817-2820.

Tsukagoshi S., Hashimoto Y. and Fujii G. (1984) Krestin(PSK). *Cancer Treat Rev.* 11:131-155.

Wei W., Tan J. and Guo F. (1996) Effects of *Coriolus versicolor* polysaccharides on superoxide dismutase activities in mice. *Acta pharmacol. Sin.* 17(2):174.

Winfried H. (1988) Methods of immobilization. Chapter 6 in *Immobilized Biocatalysts*, translated by Joy Wieser, printed in Germany:22-50

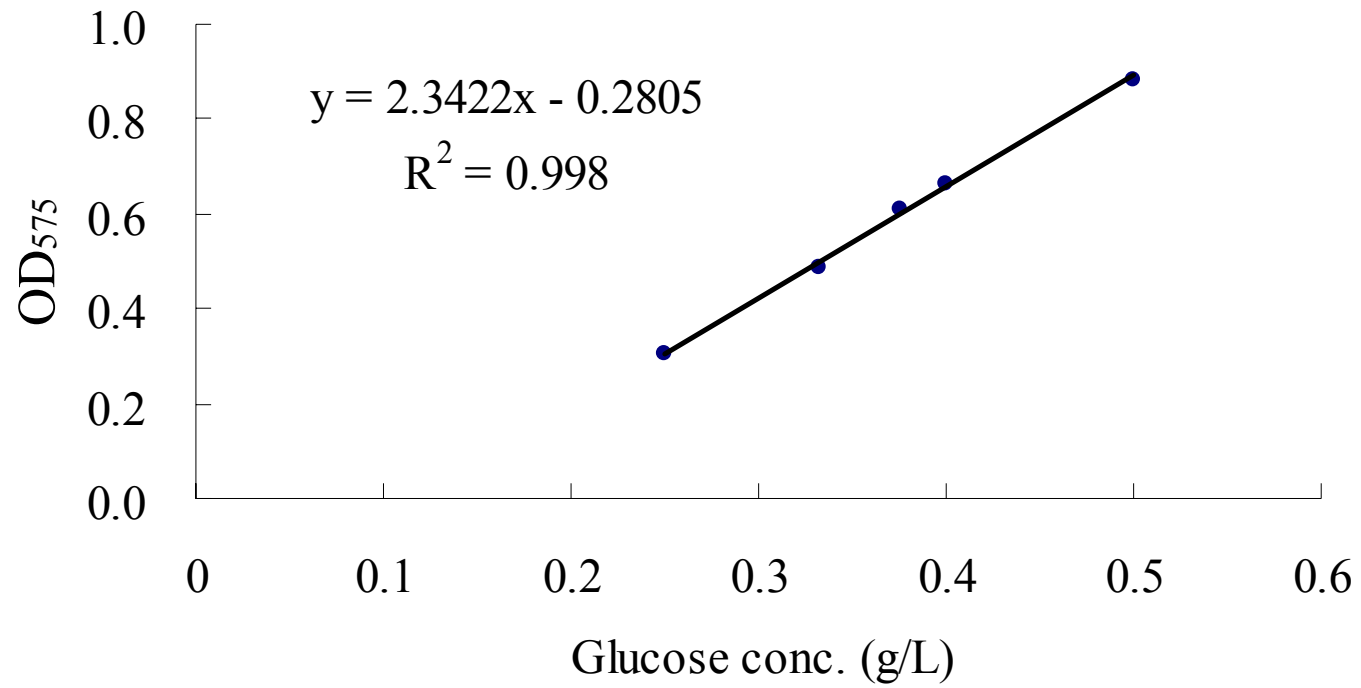
Xu C.P., Kim S.W., Hwang H.J, Choi J.W. and Yun J.W. (2003) Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. *Process Biochem.* 38:1025-1030.

Yang Q.Y. (1997) Yun Zhi polysaccharopeptide(PSP) and the general aspects of its research. *Fung Sci.* 12:1-8.

Yang F.C., Huang H.C., Yang M.J. (2003) The influence of

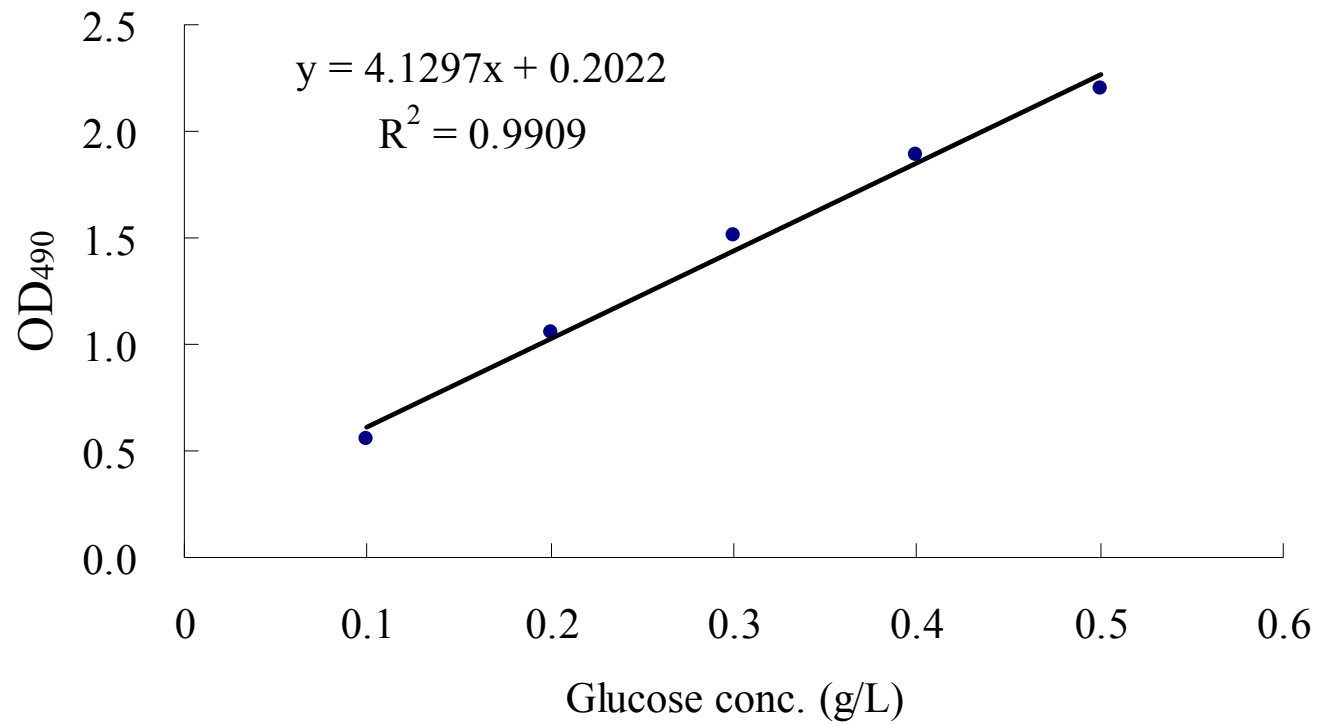
- environmental conditions on the mycelial growth of *Antrodia cinnamomea* in submerged cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 33:395-402.
- Yang X.H., Wang B.G., Cui F.N. and Tan T.N. (2005) Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem.* 40:2095-2103.
- Yeung J., Chiu L. and Ooi V. (1994) Effect of polysaccharide peptide(PSP) on glutathione and protection against paracetamol 2 induced hepatotoxicity in the rat. *Methods Find Exp. Clin Pharmacol.* 16(10):723.
- Yoo I.K., Seong G.H., Chang H.N. and Park J.K. (1996) Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. *Enzyme and Microbial Techn.* 19:428-433.
- Zhang Y.H., Zhong J.J., and Yu J.T. (1995) Effect of osmotic pressure on cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharide in suspension cultures of *Panax notoginseng*. *Biotechnol Lett.* 17:1347-1350.
- Zhou J.X., Li X.Y. and Shen X.T. (1988) The antitumor and immunomodulating activity of PSP in mice. *J. Shanghai Teachers Univ.* 17(3):72-77.

第七章 附錄



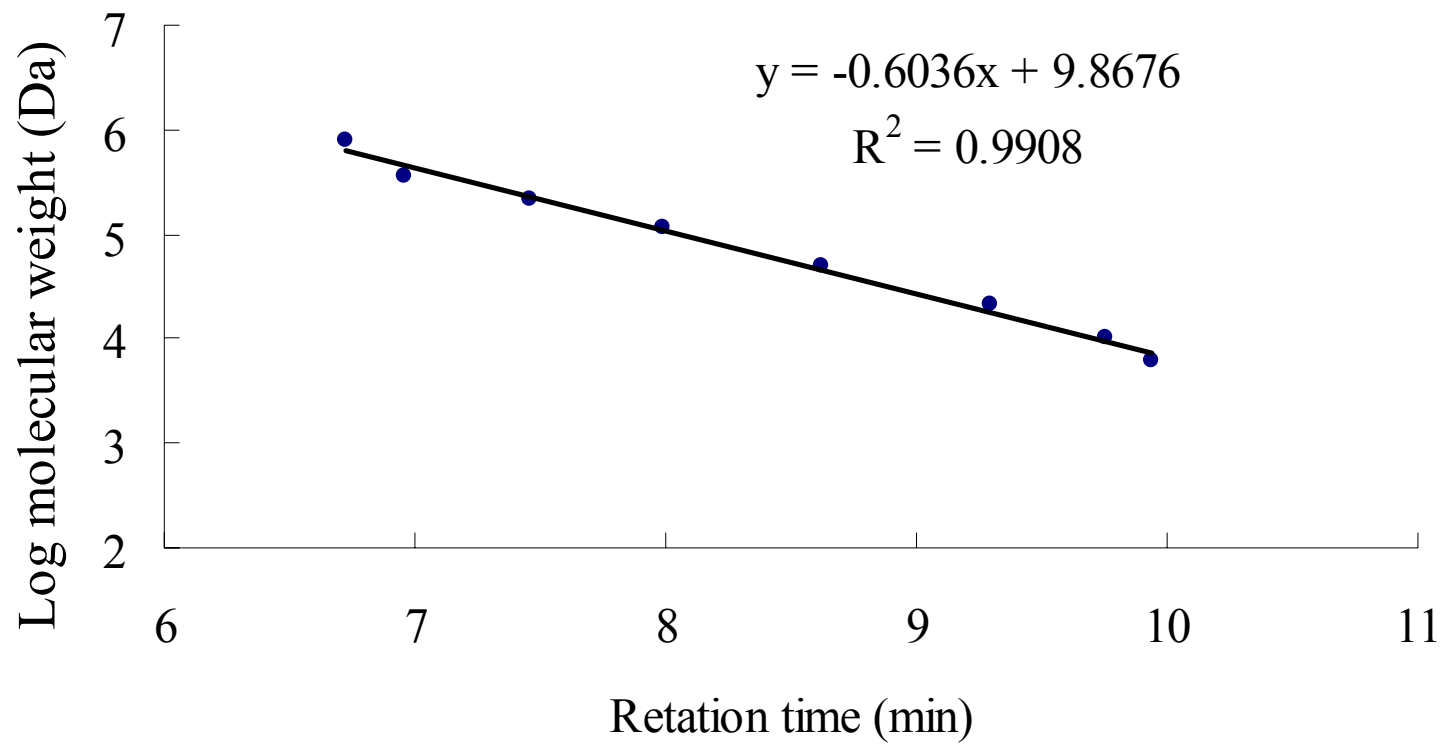
附圖 1-1 二硝基水楊酸法之葡萄糖標準曲線。

Appendix Fig 1-1 Glucose standard curve by DNS method.



附圖 1-2 酚硫酸法之葡萄糖標準曲線。

Appendix Fig 1-2 Glucose standard curve by phenol-sulfuric acid method.



附圖 1-3 多醣分子量標準曲線。

Appendix Fig 1-3 Molecular weight standard curve of polysaccharide.