

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science

Tunghai University

食品科技組

Food Technology Section

蜜環菌胞外多醣及深層培養萃取物生物活性之研究

Bioactivity of exopolysaccharide and extract from
submerged culture by *Armillaria mellea*

The seal of Tunghai University is a circular emblem with a scalloped border. It features a central cross, a horizontal line, and two interlocking rings above it. The text 'TUNG HAI UNIVERSITY' is written around the inner circle, and '1955' is at the bottom. The seal is semi-transparent and serves as a background for the author's name.

楊孟蓉

Meng-Jung Yang

指導教授：閻立平 博士

Advisor: Lipyng Yan, Ph.D.

中華民國一零四年六月

June, 2015

碩士論文指導教授推薦書

食品科學系碩士班食品科技組 楊孟蓉君所提之論文


蜜環菌胞外多醣及深層培養萃取物生物活性之研究

Bioactivity of exopolysaccharide and extract from
submerged culture by *Armillaria mellea*

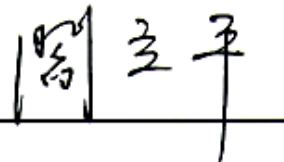
係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學系系主任



指導教授



碩士論文考試委員審定書

食品科學系碩士班食品科技組 楊孟蓉君所提之論文

蜜環菌胞外多醣及深層培養萃取物生物活性之研究

Bioactivity of exopolysaccharide and extract from
submerged culture by *Armillaria mellea*

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

林聖敦 弘光科技大學食品科學系 教授

顏文義 東海大學食品科學系 副教授

梁志弘 東海大學食品科學系 助理教授

指導教授：

周立平 東海大學食品科學系 教授兼農學院院長

中華民國一零六年六月二十九日

謝誌

首先要感謝恩師 閻立平博士於學生碩士班就讀期間給予許多學習機會及指導，並於論文撰寫期間感謝老師細心的審閱及指正終於完成這本論文，也順利通過學位口試，學生在此對恩師敬上最誠摯的謝意。特別感謝麗豐實業股份有限公司提供菌種，給予我這個機會完成此論文。

論文口試期間，承蒙 林聖敦博士、顏文義博士及梁志弘博士，撥冗審閱及詳加修正，並惠賜許多寶貴建議與指導，使論文更加周詳，在此深表萬分感謝。另外，感謝系上蘇正德博士、蔡正宗博士、盧錫祺博士、梁志弘博士及黃俊智學長總是不厭其煩地回應我研究上的問題並提供更多的意見，使學生更能多方面思考並使研究得以順利進行，由衷的感恩。

謝謝老爸老媽雖然看似年輕但其實一把年紀還不願退休希望等家中最小的我完成學業才願意好好休息，這下子你們總算是該好好考慮退休回台灣做自己想、去自己想的地方走走看看，別再讓我和姊姊們操心你們的身體健康。謝謝姐姐雅茜跟書慈總是在我不順利及心情煩悶時陪我聊聊天，有時還跟著我一起連帶被唸真是很有義氣。謝謝男朋友維哲及叔叔阿姨這些年來對我的照顧及關心，讓一直以來獨自生活的我多了一個家。

國中讀過一篇文章提到「要感謝的人太多了，那就謝天吧！」但我不一一感謝，你們怎麼知道我有開多開心這幾年有你們的陪伴。首先謝謝王姐、淑瑜助教、怡君助教及貞誼助教老為我們這些天兵忙得暈頭轉向，雖然我們有時偷偷躲起來讓你們找不到人氣得半死，但其實我們都超愛你們只是事情做完才敢出現。謝謝僕人一號哲瑜、僕人二號榮駿、僕人三號賢康、天兵文文、怪物健峰及小祕書予捷你們的陪伴，雖然你們老是惡搞我、嘲笑我讓我又氣又好笑，但也總在我難過或生氣時讓我很快忘記那些不快，實驗或寫論文遇到困難時也馬上跳出來幫助我，相信發酵槽也幫助你我鍛鍊出很結實的肌肉。你們就像是兄弟姊妹般地時而貼心時而欠揍，看你們一一的離開總難以習慣，會想到我們一起做的蠢事、寫論文期間的哀號甚至在學校到待到天亮時的深深嘆息聲，過去沒有好好把握相處的時間，現在想起來才覺得可惜。謝謝小蝦米總是乖巧等待並帶給每個人快樂。謝謝俊麟、碰碰、偉珊、凱琳、敏純、巧玲、瀚文、明興、暉婷、文華、貫中、盈吟、蓉蓉、毓琪、崇為、皓儀、昱翔、宥勝、怡臻、萬宇、庭瑋、柏璋、筑盈、柏凱於這期間帶給我的歡笑及實驗上的幫助，在東海食科研究所這期間我們不僅僅是同學，更像個大家族，而老師們還有你們就是家人。

楊孟蓉 謹致於
東海大學食品科學研究所
中華民國一〇四年六月

目 錄

摘 要.....	I
Abstract	II
壹、 前 言.....	1
貳、 文獻回顧.....	2
一、 蜜環菌 (<i>Armillaria mellea</i>) 簡介.....	2
(一) 蜜環菌之分類及分佈.....	2
(二) 蜜環菌的化學組成.....	4
(三) 桑黃菌的保健功效與有效成分.....	5
二、 食藥用菇類多醣簡介.....	11
(一) 多醣體抗腫瘤活性.....	11
(二) 多醣體抗腫瘤機制.....	18
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.....	21
(三) 影響深層培養的因素.....	21
(四) 發酵槽種類之介紹.....	25

參、 材料與方法.....	29
一、 試驗材料.....	29
(一) 試驗菌種.....	29
(二) 試驗細胞株.....	29
(三) 培養基.....	29
(四) 重要藥品.....	32
二、 試驗儀器.....	34
三、 試驗方法.....	36
(一) 試驗流程.....	36
(二) 菌種貯存.....	37
(三) 菌種活化.....	37
(四) 平板培養基試驗.....	37
(五) 種源培養基試驗.....	38
(六) 種菌培養.....	38
(七) 搖瓶培養.....	39
(八) 發酵槽試驗.....	41
四、 分析方法.....	43
(一) 菌絲體生物質生物質 (biomass) 產量測定.....	43
(二) pH 值之測定.....	45

(三) 胞外多醣之測定.....	46
(四) 殘糖分析.....	47
(五) 發酵參數之分析.....	48
(六) 胞外多醣分子量之測定.....	49
(七) 胞外多醣及發酵液乙醇萃取物製備	50
(八) 抗氧化之能力測定.....	51
(九) 總酚類化合物測定.....	53
(十) 癌細胞存活率試驗.....	54
(十一) 統計分析	55
肆、 結果與討論.....	56
一、 平板培養基試驗.....	56
二、 種源培養基試驗.....	58
三、 搖瓶試驗	60
(一) 培養溫度對蜜環菌菌絲體生長之影響	60
(二) 培養液起始 pH 值對蜜環菌胞外多醣生成之影響	63
(三) 碳源對蜜環菌胞外多醣生成之影響	65
(四) 氮源對蜜環菌胞外多醣生成之影響	67
(五) 正交試驗.....	69
(六) 搖瓶培養時間對蜜環菌胞外多醣生成之影響	73

四、 不同形式發酵槽培養試驗.....	75
(一) 胞外多醣體生成之影響.....	75
五、 分子量測定.....	85
六、 胞外多醣及發酵液乙醇萃取物抗氧化力之測定.....	94
(一) DPPH 自由基清除能力測定.....	94
(二) ABTS 自由基清除能力測定.....	98
(二) 總酚含量.....	102
七、 癌細胞存活率試驗.....	106
(一) 樣品萃取物對小鼠肝細胞 (FL83B) 存活率之影響.....	108
(二) 樣品萃取物對人類肝癌細胞 (HepG2) 存活率之影響....	108
伍、 結論.....	113
陸、 參考文獻.....	116
柒、 附錄.....	124

表目錄

表一	四種真菌子實體萃取物中的酚酸種類及含量.....	8
表二	四種野生食用菇類酚類化合物及肉桂酸之含量.....	9
表三	靈芝胞外多醣體及硫酸化靈芝胞外多醣體對癌細胞抑制活性.....	16
表四	香菇多醣體對腫瘤細胞 Sarcoma 180 之抗腫瘤活性.....	17
表五	有機氮源營養成分.....	23
表六	種源培養基營養添加物對蜜環菌菌絲體產量及最終 pH 之影響.....	59
表七	培養溫度對搖瓶培養蜜環菌菌絲體產量及最終 pH 之影響	61
表八	起始 pH 值對搖瓶培養蜜環菌菌絲體產量及最終 pH 之影響.....	64
表九	碳源對搖瓶培養蜜環菌菌絲體產量及最終 pH 之影響.....	66
表十	氮源對搖瓶培養蜜環菌菌絲體產量及最終 pH 之影響.....	68
表十一	L9 (3 ³) 正交試驗試驗數.....	70
表十二	菌絲體及胞外多醣產量之正交試驗結果.....	71
表十三	正交試驗胞外多醣產量結果方差分析.....	72
表十四	<i>A. mellea</i> 於搖瓶試驗及不同發酵槽培養時之發酵參數.....	84
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.....	87

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..93
表十七	攪拌式發酵槽蜜環菌胞外多醣及發酵液乙醇萃取物清 DPPH 自由基之 IC ₅₀97
表十八	攪拌式發酵槽蜜環菌胞外多醣及發酵液乙醇萃取物清 ABTS 自由基之 IC ₅₀ 101
表十九	蜜環菌胞外多醣及發酵液乙醇萃取物之總酚含量.....104
表二十	總酚含量與抗氧化力測定之相關性.....105
表二十一	蜜環菌胞外多醣及發酵液乙醇萃取物對小鼠肝細胞 (FL83B) 存活率之影響.....107
表二十二	蜜環菌胞外多醣及發酵液乙醇萃取物對肝癌細胞 (HepG2) 存活率之影響.....112

圖目錄

圖一	蜜環菌之外觀形態。.....	3
圖二	具抗腫瘤活性的 β -(1 \rightarrow 6)分支 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖結構。.....	13
圖三	X 射線衍射測定之 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖結晶結構。.....	14
圖四	香菇多醣 lentinan 之增進免疫作用途徑。.....	19
圖五	不同型式發酵槽之構造。.....	28
圖六	蜜環菌菌索於 PDA 培養基上之生長情形 (25°C/12 天)。.....	57
圖七	四種培養溫度下蜜環菌菌索於添加 core steep liquor PDA 上生長情形 (培養 10 天)。.....	62
圖八	搖瓶培養期間蜜環菌胞外多醣、菌絲體生物質、pH 值及殘糖量之變化。.....	74
圖九	攪拌式發酵槽培養期間蜜環菌胞外多醣、菌絲體、pH 值及殘糖量之變化。.....	78
圖十	氣泡式發酵槽培養期間蜜環菌胞外多醣、菌絲體、pH 及殘糖量之變化。.....	79
圖十一	氣舉式發酵槽培養期間蜜環菌胞外多醣、菌絲體、pH 值及殘糖之變化。.....	80
圖十二	培養期間三種型式發酵槽蜜環菌菌絲體顏色及外觀之變化。.....	81
圖十三	修飾培養基中多醣膠體滲透層析法之分子量圖譜。.....	88

圖十四	搖瓶培養蜜環菌胞外多醣體膠體滲透層析法之分子量圖譜。	.89
圖十五	攪拌式發酵槽蜜環菌胞外多醣體膠體滲透層析法之分子量圖譜。90
圖十六	氣泡式發酵槽蜜環菌胞外多醣體膠體滲透層析法之分子量圖譜。91
圖十七	氣舉式發酵槽蜜環菌胞外多醣體膠體滲透層析法之分子量圖譜。92
圖十八	攪拌式發酵槽蜜環菌胞外多醣及發酵液乙醇萃取物之 DPPH 自由基清除能力。96
圖十九	攪拌式發酵槽蜜環菌胞外多醣及發酵液乙醇萃取物之 ABTS 自由基清除能力。100
圖二十	不同濃度蜜環菌之胞外多醣體對人類肝癌細胞 (HepG2) 存活率之影響。110
圖二十一	不同濃度蜜環菌發酵液乙醇萃取物對肝癌細胞 (HepG2) 存活率之影響。111

附圖目錄

附圖一	Elson-Morgan 法之葡萄糖胺標準曲線。.....	125
附圖二	菌絲體乾重對應葡萄糖胺含量之標準曲線。.....	126
附圖三	酚硫酸法之葡萄糖標準曲線。.....	127
附圖四	葡萄糖之 HPLC 殘糖檢量。.....	128
附圖五	多醣分子量之標準曲線。.....	129
附圖六	沒食子酸標準曲線。.....	130



摘要

本實驗選用食藥用菇類蜜環菌 (*Armillaria mellea*) 為試驗菌種，探討深層培養條件及不同型式發酵槽對胞外多醣生成影響，以及攪拌式發酵槽培養前期、後期胞外多醣及發酵液乙醇萃取物之生物活性。

結果顯示PDA經添加 0.5% (w/v) 之corn steep liquor及蠶蛹粉(silkworm pupa powder) 營養強化後，可提高蜜環菌菌種生長活性。最適蜜環菌胞外多醣體生成之深層培養條件為：培養溫度25°C、起始pH值5.0、2.0% (w/v) glucose、1.5% (w/v) soybean powder、0.075% (w/v) MgSO₄及0.15% (w/v) KH₂PO₄。以上述最適條件進行搖瓶培養之最高胞外多醣產量 (0.79 g/l) 為基礎培養基 (102.73 mg/l) 之7.69倍。

三發酵槽組中以攪拌式組於發酵後期 (第13天) 之胞外多醣產量 (0.43g/l) 最高；比生長速率則以氣舉式組最高 ($\mu=0.48 \text{ day}^{-1}$)、氣泡式組最低 ($\mu=0.33 \text{ day}^{-1}$)；三發酵槽組中僅攪拌式組發酵後期之胞外多醣皆為蜜環菌所產生，分子量介於 $3.72 \times 10^3 \sim 1.9 \times 10^7 \text{ Da}$ 。故後續以攪拌式組胞外多醣及發酵液乙醇萃取物進行生物活性試驗。

胞外多醣及發酵液乙醇萃取物之DPPH自由基清除能力與ABTS自由基清除能力皆為EPS-13 > EPS-8 > EtOH-50%-13 > EtOH-95%-13 > EtOH-50%-8 > EtOH-95%-8。樣品相對抗氧化能力亦皆為胞外多醣抗氧化能力 > 乙醇萃取物、發酵後期 (第13天) 樣品 > 發酵前期 (第8天) 樣品、相同發酵天數之發酵液 50% 乙醇萃取物 > 發酵液 95% 乙醇萃取物。

胞外多醣及發酵液乙醇萃取物於 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時皆呈現極顯著 ($p < 0.01$) 抑制肝癌細胞 (Hep G2) 生長活性。抑制能力皆為發酵後期樣品 > 發酵前期樣品、發酵液 95% 乙醇萃取物 > 50% 乙醇萃取物。

關鍵字: 蜜環菌、深層培養、胞外多醣、抗氧化活性、抗腫瘤

Abstract

Medicinal mushroom *Armillaria mellea* was selected in this research to study the effect of submerged culturing condition and different types of fermenters on the production of exopolysaccharides (EPS) by this strain. Bioactivity of EPS and ethanolic extracts of cultures from stirred-tank fermenter was also investigated.

Results showed that optimal culturing condition for EPS production was: incubation temperature of 25°C, initial pH of 5.0, glucose (2.0%, w/v), soybean powder (1.5%, w/v), MgSO₄ (0.075%, w/v), KH₂PO₄ (0.15%, w/v). Under this optimized culturing condition, maximal yield of EPS (0.79 g/l) was obtained from shake flask culture and increased 7.69 times, as compared with that (102.73 mg/l) from basal medium.

The maximal EPS yield (0.43 g/l) was obtained on later period of incubation (the 13th day) from stirred-tank fermenter, while the highest specific growth rate ($\mu=0.48 \text{ day}^{-1}$) was observed from air-lift fermenter. Among the three types of fermenters, only the EPS, with molecular weights between 3.72×10^3 - 1.9×10^7 , from stirred-tank fermenter was mainly produced by *A. mellea* on later period of incubation.

Both DPPH radical and ABTS radical scavenging abilities showed the same increasing tendency of EPS-13 > EPS-8 > EtOH-50%-13 > EtOH-95%-13 > EtOH-50%-8 > EtOH-95%-8. The antioxidant capacity of test samples showed a relative tendency as follows: EPS > ethanolic extracts, later period (the 13th day) > early period (the 8th day) and 50% EtOH extracts > 95% EtOH extracts (same incubation day).

Both EPS and ethanolic extracts revealed significant ($p < 0.01$) inhibition activity on growth of liver-cancer cells (HepG2) at dosage of 1000 $\mu\text{g}/\text{mg}$. The relative inhibition ability of test samples was: later period (the 13th day) > early period (the 8th day) and 95% EtOH extracts > 50% EtOH extracts (same incubation day).

Keywords: *Armillaria mellea*, submerged culture, exopolysaccharide, antioxidant capacity, anti-tumor activity.

壹、前言

蜜環菌 (*Armillaria mellea*) 是中藥植物天麻 (*Gastrodia elata*) 的共生菌。天麻是一珍貴的中草藥，由於其價格昂貴且生長緩慢，因此許多學者轉而研究天麻共生菌蜜環菌之保健功效，結果證明蜜環菌發酵產物與天麻有類似的生理作用，具有鎮靜、增強耐缺氧能力及增強免疫功能等作用 (郭和徐，1992) 在中國大陸已有許多蜜環菌的相關產品上市。

本實驗所使用的蜜環菌為多年生真菌，其子實體可經由人工栽培取得，但過程繁雜、耗費人力、培養時間長及所需空間大，且常受到培養環境 (溫度、水分、重金屬污染等) 及天候等外界因素而影響產量；若改以深層培養的方式培養生產菌絲體及其代謝物，不但可以改良上述之缺點，還能有效率控制培養條件以獲得高產量的目標成分，並可配合離心、膜過濾等技術將成分進行初步分離。

本研究嘗試以深層培養之方式培養蜜環菌菌絲體，並以不同型式發酵槽培養以提高蜜環菌胞外多醣產量，並探討其發酵液乙醇萃取物及胞外多醣之抗氧化及癌細胞的抑制生長能力。主要的研究目的為 1. 探討最適營養強化的平板及活化培養液的培養條件使菌種生長及代謝活性提高；2. 以搖瓶試驗決定最適之深層培養條件 (溫度、培養液起始pH值、碳源、氮源、及碳氮源與硫酸鎂最適濃度等)；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) 深層培養對蜜環菌菌絲體及胞外多醣體產量之影響，並且測定其發酵液中之分子量分佈，以決定最適培養之發酵槽種類；4. 將最適培養之發酵槽發酵液進行粗多醣及乙醇萃取，再測定其抗氧化能力與總酚含量之關係、對肝癌細胞 (HepG2) 的抑制生長能力，以決定其生物活性。

貳、文獻回顧

一、蜜環菌 (*Armillaria mellea*) 簡介

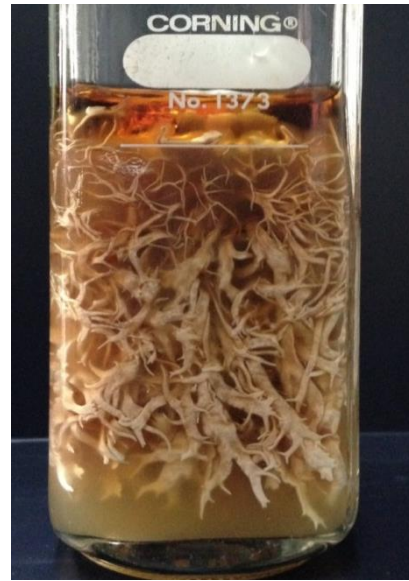
蜜環菌 (*Armillaria mellea*) 又名榛蘑、臻蘑、蜜蘑，為一食藥用真菌。子實體 (fruit body) 外觀呈現蜜黃色傘狀(圖一 a)，菌絲的生長形態不同於一般真菌形成細微菌絲，而是以類似植物根狀的菌絲束蔓延生長，稱為菌索 (shoe-strings)；生長於固態培養基時，菌索會伸入底部 (圖一 b)，而大部分的真菌僅能生長於平板表面。年輕菌索的顏色為白色至淡黃色 (圖一 c)，該部位具有良好的生長能力；老化的菌索則轉為褐色至深咖啡色 (圖一 d)，該部位生長能力差，且會隨著老化的時間增加而使得顏色加深。

(一) 蜜環菌之分類及分佈

蜜環菌在分類學上屬於真菌界 (Fungi)、擔子菌門 (Basidiomycotina)、層菌綱 (Hymenomycetes)、傘菌目 (Agaricals)、口蘑科 (Tricholomataceae)、蜜環菌屬 (*Armillaria*) (彭等人，2010)。蜜環菌廣泛分布於許多熱帶和溫帶國家的森林地區，包括台灣、河北、山西、吉林、浙江、湖南、廣西、甘肅、青海、新疆、四川、貴州、雲南、西藏、遼寧、福建、陝西、黑龍江、和內蒙古等地均有發現 (王等人，2006)。蜜環菌除了可腐生於枯木上，也可寄生於活的植物上且寄主範圍很廣，因此被視為世界性的林木病原菌之一 (王，2010)。



(a)



(b)



(c)



(d)

圖一 蜜環菌之外觀形態。

- (a) 子實體。
- (b) 生長於洋菜瓶內部之菌索。
- (c) 生長於平板表面之年輕菌索。
- (d) 生長於平板表面之老化菌索。

Fig. 1 Morphology of *Armillaria mellea*.

- (a) fruit body.
- (b) shot-strings inside agar bottle.
- (c) young shot-strings on agar plate.
- (d) aged shot-strings on agar plate.

(二) 蜜環菌之化學組成

根據 Vaz 等人 (2011) 對野生蜜環菌子實體乾燥粉末的各個基本組成進行分析，成分含碳水化合物 (71.28%)、蛋白質 (16.38%)、脂肪 (5.56%) 及灰分 (6.78%)。碳水化合物包含 21.97% 游離單糖 (甘露糖、岩藻糖、阿拉伯糖)。脂肪則含有 20 種脂肪酸，包含飽和脂肪酸(17.23%)、單元不飽和脂肪酸 (55.01%) 及多元不飽和脂肪酸 (27.76%)；其中以油酸 (C18:1) 及亞麻油酸 (C18:2, ω -6) 含量最高，分別為 47.74% 及 27.71%。

蜜環菌含有多醣體 (polysaccharide)、酚類化合物 (phenolic compounds)、神經鞘脂質 (sphingolipids)、麥角甾醇 (ergosterol)、麥角硫因 (Ergothioneine) 及具有抗菌性的倍半萜類等活性物質 (Muszyńska *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2009)。過去研究發現可從蜜環菌人工發酵的菌絲體中分離出幾種原伊魯烷型F (sesquiterpene aryl esters)，包括蜜環菌甲素 (armillarin)、蜜環菌乙素 (armillaridin)、蜜環菌丙素 (armillaricin)、蜜環菌戊素 (melleolide)、蜜環菌己素 (armillarigia)、蜜環菌庚素 (armillarikin)、蜜環菌辛素 (armillarilin)、蜜環菌壬素 (armillarinin)、蜜環菌癸素 (armillaripin)、蜜環菌子素 (armillasin)、蜜環菌丑素 (armillaritin)、蜜環菌寅素 (armillarivin)、蜜環菌酸 (armillaric acid) 等 (Yang *et al.*, 1984; Yang *et al.*, 1989a; Yang *et al.*, 1989b; Yang *et al.*, 1990a; Yang *et al.*, 1990b; Yang *et al.*, 1991a; Yang *et al.*, 1991b; Obuchi *et al.*, 1990.)，亦有學者研究蜜環菌乙素具抑制食道癌細胞增生及放射增敏性 (Chi *et al.*, 2013)。

(三) 蜜環菌的保健功效與有效成分

真菌的保健功效及有效成分的為近年研究的熱點，蜜環菌亦為其中之一。蜜環菌生物活性及臨床療效與天麻相似，從中醫角度而言，其具有止暈眩補氣血、通血脈、舒筋活血等作用（張等人，2006）。其所含多醣具有增強免疫力（Sun *et al.*, 2009）、抗腫瘤（Wu *et al.*, 2012）及抗氧化（Vaz *et al.*, 2011）等功效。

蜜環菌在台灣名氣雖不如靈芝、桑黃、巴西磨菇等食藥用真菌，但在市面上仍有蜜環菌相關產品上市，主要當作助眠、舒緩壓力之素材。在中國大陸則有較多樣的蜜環菌藥品和保健品，例如：心舒口服液、蜜環菌浸膏、蜜環菌片、蜜環菌糖漿等（劉等人，2003），作為改善睡眠、頭痛暈眩、四肢麻等功效之素材。

1. 抗腫瘤

Chi 等人 (2013) 進行蜜環菌乙素對於人類食道癌細胞治療性及放射增敏性的研究，體內試驗發現可顯著抑制 Balb/c 小鼠（以人類食道癌細胞株 CE81T/VGH 誘導腫瘤）的腫瘤增殖；體外試驗發現可使 CE81T/VGH 細胞株走向凋亡及增加其對放射治療的敏感度 1.6 倍，而細胞週期的 G2/M 期及 G1 期從原本 5.91% 及 4.44%，增加至 14.04 及 8.72%，顯示蜜環菌乙素對該細胞株產生 G2/M 期及 G1 期產生阻滯現象，而根據 Sinclair 等人 (1966) 研究指出，G2/M 期對於放射治療的敏感性最高。

Wu 等人 (2012) 指出蜜環菌水溶性多醣會經由降低粒線體跨膜電位 (mitochondrial membrane potential) 而釋出 cytochrome C，進而活化 caspase-9 及 caspase-3，促使癌細胞走向凋亡。

2. 增強免疫力

Sun 等人 (2009) 研究顯示蜜環菌粗多醣及純化多醣 (50~200 $\mu\text{l/ml}$) 皆可顯著性提高昆明小鼠 (Kunming mice) 脾臟淋巴細胞增殖且呈劑量依賴性。王與馮 (2009) 研究蜜環菌多醣對昆明小鼠功能的調節作用，結果顯示蜜環菌多醣於低劑量 25 mg/kg 及高劑量 50 mg/kg 皆可顯著增加小鼠吞噬細胞的吞噬活性；促進脾臟淋巴 T 細胞增殖能力以及血清溶血素水平的作用。

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。真菌多醣可透過多種途徑、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 (宋等人, 2004)。

3. 抗氧化

一般生物體內常見的自由基為含氧的自由基 (oxygen-containing free radicals) 包括過氧化物或超氧化物的分子，例如過氧化物 (superoxide; O^{2-})、過氧化氫 (hydrogen peroxide; H_2O_2) 和羥基自由基 (hydroxyl radicals; $\text{OH}\cdot$) 等，此類帶有不穩定電子的含氧的自由基，又稱為活性氧 (reactive oxygen species; ROS)，於體內會維持一個平衡狀態，當體內自由基和活性氧過多或抗氧化物質含量降低，超過人體細胞本身的抗氧化能力時，就會產生氧化壓力 (oxidative stress)，氧化壓力會引起人體產生許多病變或造成老化，如癌症、阿茲海默症、動脈粥狀硬化、糖尿病等疾病 (Aruoma, 1994)。

酚類化合物的含量與食用真菌抗氧化能力有很大的正相關性 (Dubost *et al.*, 2007)，而許多研究也指出食用菇類所含有的生育酚

(tocopherols)、抗壞血酸 (ascorbic acid)、和類胡蘿蔔素 (carotenoids) 等也提供了抗氧化活性 (Ferreira *et al.*, 2009)。酚酸 (phenolic acid) 被證實為菇類中主要的酚類物質 (Karaman *et al.*, 2010)，Muszyńska 等人 (2013) 比較多種食用真菌的酚酸種類 (表一)，結果顯示蜜環菌子實體主要含有原兒茶酸 (protocatechuic acid) 及芥子酸 (sinapic acid)；Vaz 等人 (2011) 指出蜜環菌野生子實體主要含有肉桂酸 (cinnamic acid) 及對羥基苯甲酸 (*p*-hydroxybenzoic acid)，但原兒茶酸則無檢出 (表二)，其差異可能與菌種來源、生長環境及萃取方式有相關性。

Vaz 等人 (2011) 對四種野生真菌子實體進行乙醇萃取物及熱水萃取多醣之抗氧化能力進行比較。其中蜜環菌乙醇萃取物的 DPPH 清除力 (DPPH scavenging active)、還原力 (reducing power) 及 β -胡蘿蔔素裂解抑制率 (β -carotene bleaching inhibition) 之 EC_{50} 分別為 17.13、7.53 及 8.94 mg/ml；而水溶性多醣抗氧化能力分別為 3.95、0.98 及 0.87 mg/ml。

Lung 等人 (2011) 將深層培養蜜環菌進行菌絲體甲醇萃取物 (MEM)、菌絲體熱水萃取物 (HWEM) 及發酵液甲醇萃取物 (MEB) 的主要抗氧化物質及抗氧化力分析。結果顯示三種萃取物皆含抗壞血酸 (ascorbic acid)、黃酮類及酚類，其中以菌絲體熱水萃取物之上述三者的含量最高；而 β -carotene 只存在菌絲體熱水萃取物中。抗氧化力方面，以菌絲體熱水萃取物的抗氧化能力 (共軛雙烯法, conjugate diene method)、螯合亞鐵離子能力 (chelating effect on ferrous) 及超氧陰離子清除能力 (scavenging effect on superoxide anion) 最強；而菌絲體甲醇萃取物的還原力及 DPPH 自由基清除能力最強，此結果與萃取物中的抗氧化成分及含量有相關性。

表一 六種真菌子實體萃取物中的酚酸種類及含量

Table 1 Phenolic acids in extracts from six fungal fruiting bodies.

Species	<i>A. mellea</i>	<i>B. badius</i>	<i>B. edulis</i>	<i>C. cibarius</i>	<i>L. deliciosus</i>	<i>P. ostreatus</i>
Phenolic acid	mg kg ⁻¹ DW					
Protocatechuic acid	2.23 ±0.05	21.38 ±0.40	7.50 ±0.20	1.54 ±0.03	1.37 ±0.02	2.52 ±0.03
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	-	1.28 ±0.20	1.94 ±0.04	2.30 ±0.05	-	3.60 ±0.05
Vanilic acid	-	-	-	3.32 ±0.04	-	-
<i>p</i> -Coumaric acid	-	13.91 ±0.20	-	-	-	-
Sinapic acid	3.77 ±0.04	1.50 ±0.20	-	3.04 ±0.03	14.29 ±0.40	2.11 ±0.03
Cinnamic acid	-	8.73 ±0.10	-	1.29 ±0.03	4.06 ±0.20	1.09 ±0.01
Ferulic acid	-	1.45 ±0.02	-	-	-	0.46 ±0.01
Total amount	6.00 ±0.07	48.25 ±0.30	9.44 ±0.14	11.49 ±0.08	19.72 ±0.09	9.78 ±0.016

(Muszyńska *et al.*, 2013)



表二 四種野生食用菇類酚類化合物及肉桂酸之含量

Table 2 Phenolic compounds and cinnamic acid in four wild edible mushroom species. (mg/kg dry weight)

	<i>Armillaria mellea</i>	<i>Calocybe gambosa</i>	<i>Clitocybe odora</i>	<i>Coprinus comatus</i>
Protocatechuic acid	nd	2.58 ± 0.49	nd	nd
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	4.00 ± 0.72 c	38.40 ± 3.14 b	27.93 ± 2.79 b	61.53 ± 1.19 a
<i>p</i> -Coumaric acid	nd	4.04 ± 0.29 b	1.81 ± 0.09 c	18.79 ± 0.92 a
Total phenolic acids	4.00 ± 0.72 d	45.02 ± 3.34 b	28.83 ± 1.51 c	80.33 ± 0.27 a
Cinnamic acid	8.67 ± 0.03 c	17.69 ± 0.21 a	13.77 ± 0.59 b	12.58 ± 0.12 b

nd, not detected.

(Vaz *et al.*, 2011)



4. 抗暈眩

虞等人 (2006) 研究天麻多醣及蜜環菌多醣的抗暈眩能力，由機械旋轉使昆明小鼠產生暈眩後，通過迷宮實驗與跳台實驗測定各組小鼠逃避電擊所用時間，結果發現餵食昆明小鼠 50、100 及 200 mg/kg 皆相對於正常對照組有顯著性增加逃避電擊時間，顯示兩者皆有抗暈眩效果。

5. 降血糖

許 (2010) 發現蜜環菌菌索中多醣 AMP-1 (polysaccharide from the rhizomorph of *Armillaria mella*) 對四氧嘧啶 (alloxan, AXN) 糖尿病小鼠具降低血糖、MDA 含量，提高血清中胰島素含量及體內之 SOD、GSH-Px 活性；AMP-1 亦能抑制 AXN 造成的小鼠體重減輕與肝臟、腎臟、胰腺的萎縮和脾臟的增大。

6. 降低腦部神經細胞缺血性損傷

AMG-1 (N6-(5-hydroxy-2-pyridyl)-methyl-adenosine) 是從蜜環菌絲體中提取出的一種腺苷衍生物，是蜜環菌有效成分之一。劉等人 (1991) 研究發現 AMG-1 在 0.1 至 0.3 mmol/L 能明顯抑制 Wister 大鼠腦突觸前膜之鈣離子 (Ca^{2+}) 依賴性麩胺酸 (glutamate) 的釋放，具降低因缺血缺氧引起的神經元細胞損傷之效果。

二、食藥用菇類多醣簡介

目前已經有很多的研究報告證實從食藥用菇（子實體、菌絲體）分離的多醣體，具有良好的免疫及生理活性 (Wasser, 2002)。多醣體是由多數單醣類（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 (Structural polysaccharides)：為組成菌體構造中的多醣成分。
3. 胞外多醣 (Extracellular polysaccharides)：通常是附著於細胞外部的黏性物質。

(一) 多醣體抗腫瘤活性

Ikekawa 等人 (1969) 研究七種食用菇類子實體熱水萃取物對 Sarcoma 180 誘導模式小鼠之抗腫瘤活性，結果顯示可有效抑制腫瘤增生及提高腫瘤完全退縮率 (complete regression)，日後由許多研究者證實其萃取物主要為多醣體。目前已有多種菇類多醣已確定其具抗腫瘤活性例如：赤芝 (*Ganoderma lucidum*)、桑黃 (*Phellinus linteus*) 及巴西蘑菇 (*Agaricus blazei*) (Miyazaki and Nishijima.,1981; Han *et al.*,1999; Mizuno *et al.*,1999)。

構成多醣體的單醣種類、化學鍵結的方式，或是分子量大小的不同，對其生理活性皆會有影響，因此並非所有的多醣體都具有抗腫瘤的功能。多醣體抗腫瘤活性會受到多種特性影響包括：

1. 分子量

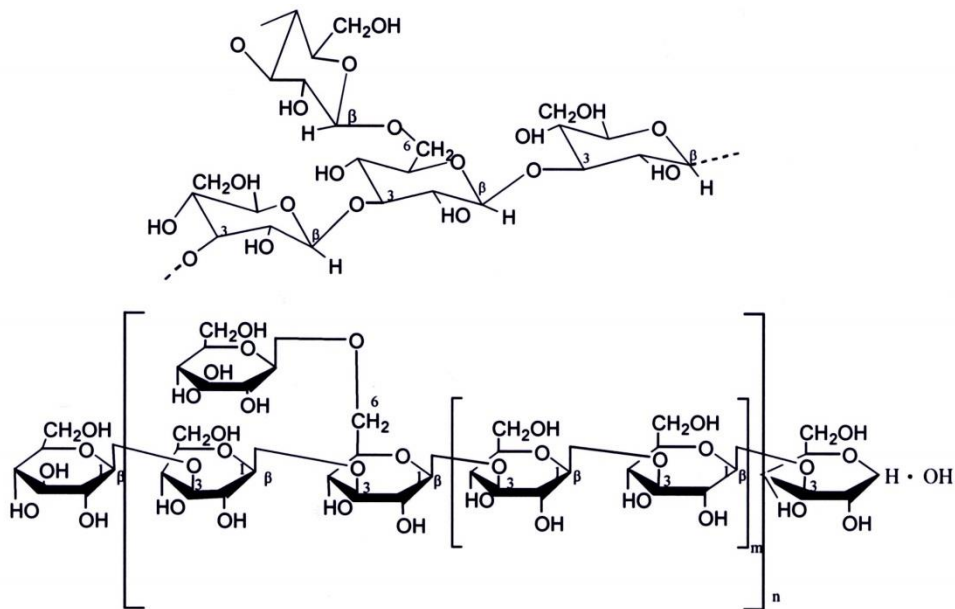
多醣體的抗腫瘤活性與其分子量有一定關係，可能與多醣分子形成的高級構型有關 (林等, 2007)。卯 (2000) 指出十種菇類多醣體 (靈芝多醣、猴頭菇多醣、雲芝多醣及蜜環菌多肽葡聚醣等)， β -glucan 在分子量分布上有相當大的差異使其生理活性有所差別；可分為三類：(1) 分子量在 3000~5000 Da 左右者具降血糖功能，(2) 在 $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ Da 具抗發炎作用及 (3) 在 3.0×10^4 Da 以上具抗腫瘤作用。

2. 整體構型

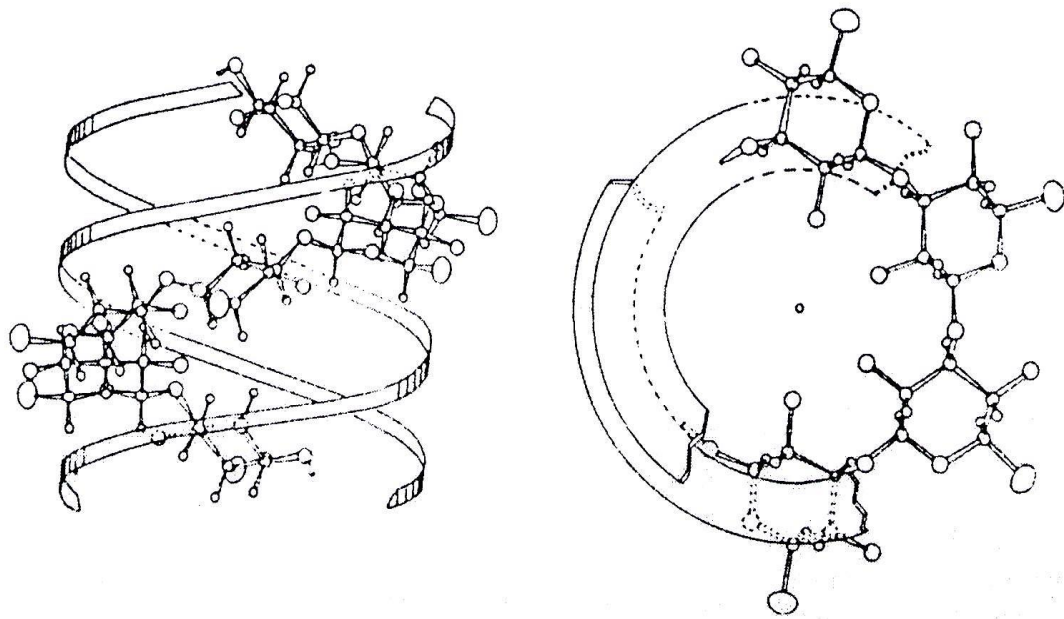
多醣體的醣苷鍵鍵結類型、主鏈支鏈鍵結的型式等皆會影響多醣體抗腫瘤活性。近年來研究證實，以 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 為主鏈，以 β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan 為支鏈的多醣體其抗腫瘤的效果最佳 (Wasser, 2002)，其結構如圖二 (水野與川合, 1999) 所示。另有利用 X-射線繞射分析其立體結構結果，證實具活性的 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 為一三股右旋螺旋 (triple helix)，其結構如圖三所示，此類型的結構可能是引發抗腫瘤作用的主要成因 (水野與川合, 1999)。Surenjav 等人 (2006) 研究發現二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 會破壞 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 之三股螺旋結構而導致其抗腫瘤活性下降。

3. 組成

構成多醣體的單醣種類對於多醣體抗腫瘤活性有很大影響，Liao 等人 (2013) 研究顯示靈芝多醣體中的單醣岩藻糖 (fucose) 與其抗腫瘤活性有密切關連，若將岩藻糖去除，則靈芝多醣的抗腫瘤活性會大幅度下降。



圖二 具抗腫瘤活性的 β -(1 \rightarrow 6)分支 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖結構。
 Fig. 2 Structure of anti-tumor portion of β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan with
 β -(1 \rightarrow 6)-branching side chain.
 (水野與川合，1999)



圖三 X射線衍射測定之 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖結晶結構。
Fig. 3 The crystal structure of β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan by X-ray analysis.
(水野與川合，1999)

4. 官能基

一些多醣體抗腫瘤活性與其所含的化學基團密切相關，因此可透過人為的化學修飾將基團接上或移除來提升多醣體的活性 (林等人，2007)。Wang等人 (2006) 自多孔真菌茯苓 (*Poria cocos*) 分離出一種非水溶性多醣體PCS3-II，將其分別進行硫酸化 (sulfated)，羧甲基化 (carboxymethylated) 化學修飾後，對Sarcoma 180 腫瘤細胞的抑制活性顯著提升，推論經由化學修飾後會增加PCS3-II (carboxymethylated-sulfated derivative of (1->3)-beta-d-glucan from *Poria cocos*) 的水溶性而使其活性提升。Zhang等人 (2012) 發現赤芝 (*Ganoderma lucidum*) 胞外多醣體 (GLP) 經硫酸化修飾後 (sulfated GLP) 會提升對六種癌細胞產生抑制活性的作用 (表三)。

5. 複合物

某些多醣體會與核酸或者蛋白質形成複合物，而這些複合物對於多醣體抗腫瘤活性也有影響，Surenjav等人 (2006) 比較香菇 (*Lentinus edodes*) 多醣體 (L-I₁, L-I₂, L-I₃, L-I₄) 及其去除結合蛋白質 (LNP-I₁, LNP-I₂, LNP-I₃, LNP-I₄) 的多醣體對於腫瘤細胞Sarcoma 180的抑制活性，發現蛋白質被去除後會降低香菇多醣體的抗腫瘤活性 (表四)。

表三 靈芝胞外多醣體及硫酸化靈芝胞外多醣體對癌細胞抑制活性
 Table 3 Inhibition activity of GLP and sulfated GLP on carcinoma cells.

Samples	Dosage ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Inhibition rate (%)					
		KB	SGC-7901	HePG2	BEL-7402	MCF-7	SHZ
Control		ND ^a	ND	ND	ND	ND	ND
GLP	25	ND	ND	ND	9.33	19.94	ND
	50	ND	4.36	ND	11.19	21.14	1.81
	500	ND	6.57	ND	18.33	16.60	10.4
Sulfated GLP (DS= 1.46)	25	8.89	10.13	27.81	17.64	20.60	42.90
	50	19.66	13.77	42.26	24.23	30.09	52.30
	500	34.46	46.60	74.79	55.46	40.20	85.88

(Zhang *et al.*, 2012)



表四 香菇多醣體對腫瘤細胞 Sarcoma 180 之抗腫瘤活性
 Table 4 Antitumor activities of mushroom (*Lentinus edodes*) polysaccharides against Sarcoma 180 tumor cells.

Sample	Structural feature	Dose (mg kg ⁻¹ × days)	Inhibition ratio (%)	Enhancement ratio of body weight (%)
Control				44.2
FU-5		20 × 7	48.6	39.1
L-I ₁	With bound protein	20 × 7	12.1	55.0
		60 × 7	47.8	29.1
L-I ₂	With bound protein	20 × 7	25.9	41.3
		30 × 7	40.7	34.7
		60 × 7	54.5	31.4
L-I ₃	With bound protein	20 × 7	50.0	42.7
		30 × 7	63.0	37.1
		60 × 7	70.0	27.4
L-I ₄	With bound protein	20 × 7	20.3	33.3
		30 × 7	31.8	46.1
		60 × 7	37.1	45.0
Control				45.4
FU-5		20 × 7	51.7	35.6
LNP-I ₁	Without bound protein	20 × 7	7.5	57.8
		60 × 7	17.1	58.6
LNP-I ₂	Without bound protein	20 × 7	0.6	52.2
		30 × 7	20.7	56.3
		60 × 7	30.4	45.3
LNP-I ₃	Without bound protein	20 × 7	12.1	50.9
		30 × 7	17.2	37.1
		60 × 7	41.4	45.0
LNP-I ₄	Without bound protein	20 × 7	9.8	49.6
		30 × 7	19.5	46.7
		60 × 7	37.6	45.4

(Surenjav *et al.*, 2006)

(二) 多醣體抗腫瘤機制:

1. 預防癌症功能：

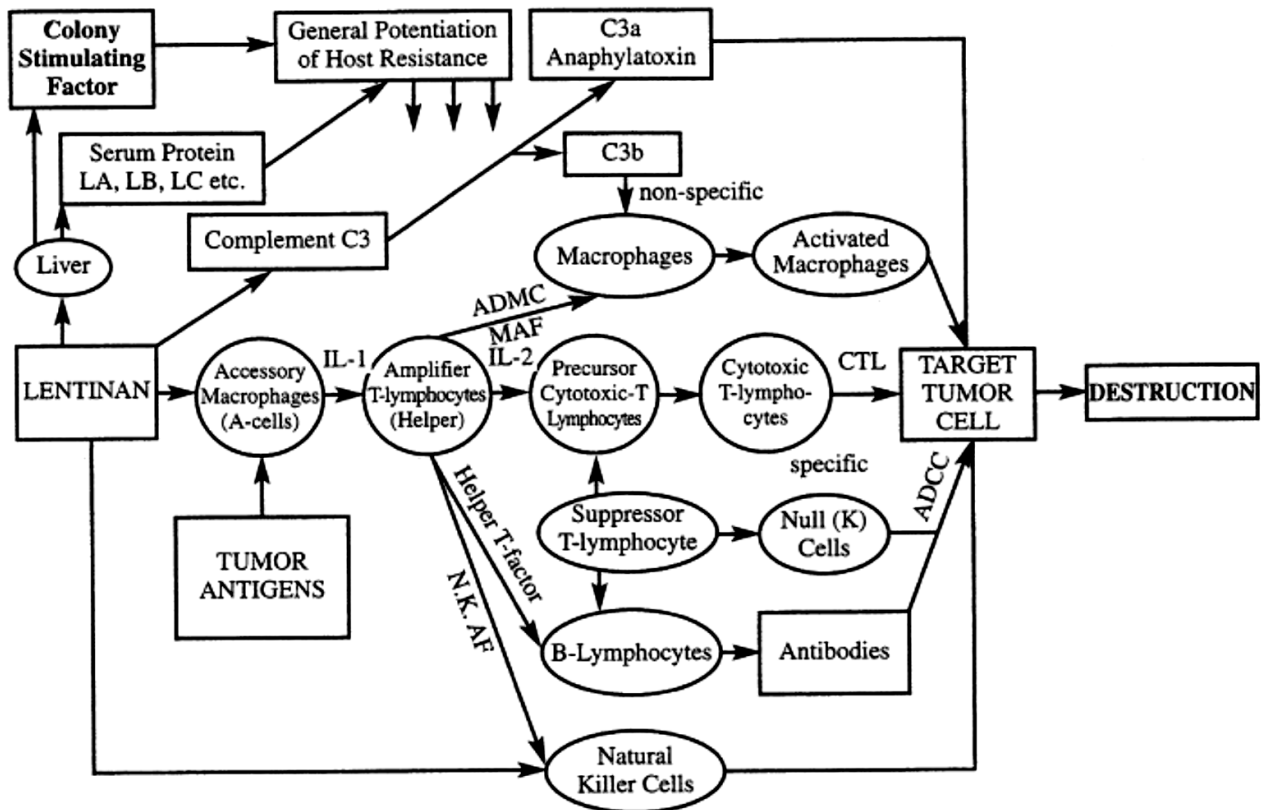
日本長野縣流行病學研究指出，一些種植金針菇 (*Flammulina velutipes*) 的菇農，死於癌症的比例顯著低於其他同縣市內的人 (Ikekawa *et al.*, 2001)。Kobayashi (1993) 指出雲芝 (*Coriolus versicolor*) 多醣 PSK (polysaccharide Krestin) 具降低大鼠經化學性誘導及輻射誘導之致癌機率。

2. 增進免疫功能：

多醣體可藉由增強宿主的免疫功能，從而抑制癌細胞的增生或將其排除，可歸類為一種生物反應調節劑 (Wasser, 2002)。

以香菇多醣 lentinan 對人體的免疫系統作用為例，lentinan 能從巨噬細胞或是 T 細胞誘導產生 interleukin-1 (IL-1) 因子，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、自然殺手細胞 (NK) 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)、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四所示 (Wasser, 2002)。

跨膜蛋白 Dectin-1 為存在於巨噬細胞 (macrophages)、樹突細胞 (dendritic cell) 及嗜中性白血球 (neutrophils) 等細胞之表面受體，其與 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 結合可促進和調節先天性免疫反應，進一步影響免疫細胞活性，包括吞噬作用及細胞激素 (cytokines) 釋放，部分細胞激素在癌症治療中起著重要的作用 (Brown *et al.*, 2003; Herre *et al.*, 2004)。



圖四 香菇多醣 lentinan 之增進免疫作用途徑。

Fig. 4 Possible pathways of immuno-enhancing activity by lentinan.
(Wasser, 2002)

3. 直接抑制癌細胞功能：

多醣體以阻斷細胞週期並誘導細胞凋亡的方式來直接導致腫瘤細胞的死亡，Zhang 等人（2005）從菇類菌核側耳菌（*Pleurotus tuber regium*）分離出一種多醣體 carboxymethylated polysaccharides (CMPTR)，再以 CMPTR 處理 MCF-7 人類乳癌細胞，發現其會降低 cyclin D1、cyclin E 及 Bcl-2 (抗凋亡蛋白) 的表現，並增加 Bax (促細胞凋亡蛋白) 的表達，使其阻滯於 G1 期，達到抑制細胞增殖的效果。

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四孢蘑菇 (*Agaricus campestris*) 的菌絲體。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。

(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、太空包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，因此不適用於保健功效成分的生產。若藉由深層培養的方式生產菇類菌絲體與代謝物，不僅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，故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) 影響深層培養的因素

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

碳源包括醣類、脂類、有機酸等，是菇類生長時之重要因子，亦是構成菌體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，一般單醣的使用速度要比雙醣及多醣快，而能被微生物快速利用的碳源稱為速效碳源，反之為遲效碳源（汪等人，2013）。

2. 氮源

氮源主要是構成菌體細胞結構例如:蛋白質、胺基酸、核酸等，及合成含氮代謝產物，在碳源不足時也可當作能量來源。氮源可分無機氮源及有機氮源，無機氮源例如:硫酸銨、磷酸二氫銨等，單獨使用培養蜜環菌的生長效率差；有機氮源如:酵母萃取物 (yeast extract)、玉米浸漬液 (corn steep liquor) 及蛋白胨 (peptone) 等，通常成分複雜而可提供多種的營養物質例如: 維他命 B 群等 (表五)。但由於來源通常為天然原料加工製作，因此可能會因產地或加工方法不同而使得氮源精確成分不同 (韓等人，2013)

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。氮源過多，會使菌體生長過於旺盛，pH 偏高且不利於代謝產物的累積；氮源不足，則不利菌體成長，進而影響產物產量。碳氮比也隨碳源及氮源的種類以及通氣攪拌等條件而異 (張等人，2013)。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)。

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。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；(5) 調節細胞滲透壓 (6) 控制細胞氧化還原電位 (7) 維持細胞結構穩定性 (汪等人，2013)。

表五 有機氮源營養成分

Table 5 Nutrient contents in organic nitrogen source.

成分	酵母萃取物	玉米浸漬液	黃豆餅粉
蛋白質 (%)	50.0	24.0	51.0
碳水化合物 (%)	-	5.8	-
脂肪 (%)	0.0	1.0	1.0
纖維 (%)	3.0	1.0	3.0
灰分 (%)	10.0	8.8	5.0
固形物 (%)	95.0	50.0	92.0
核黃素 (mg/kg)	-	5.73	3.06
硫胺 (mg/kg)	-	0.88	2.4
泛酸 (mg/kg)	-	74.6	14.5
菸鹼酸 (mg/kg)	-	83.6	21.0
吡哆醇 (mg/kg)	-	19.4	-
生物素 (mg/kg)	-	0.88	-
膽素 (mg/kg)	-	629	2750
精氨酸 (%)	3.3	0.4	3.2
胱氨酸 (%)	1.4	0.5	0.6
甘氨酸 (%)	-	1.1	2.4
組氨酸 (%)	1.6	0.3	1.1
異白氨酸 (%)	5.5	0.9	2.5
白氨酸 (%)	6.5	0.1	3.4
離氨酸 (%)	6.5	0.2	2.9
甲硫氨酸 (%)	2.1	0.5	0.6
苯丙氨酸 (%)	3.7	0.3	2.2
酥氨酸 (%)	3.7	-	1.7
色氨酸 (%)	1.2	-	0.6
酪氨酸 (%)	4.6	0.1	1.4
纈氨酸 (%)	4.4	0.5	2.4

(韓等人, 2013)

5. 生長因子

生長因子為對微生物代謝必不可缺且微生物無法自行合成的有機物；種類包括有維生素、甾醇、胺類、脂肪酸等 (汪等人, 2013)；而來源除了可額外添加於培養基外，有些有機氮源及碳源都可提供生長因子例如:玉米浸漬液及酵母萃取物等，彼等富含維生素及其它微量營養素也能幫助菌絲體的生長，因此也常被當作生長因子來利用。

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子，一般菇類菌絲體的最適培養溫度範圍約為 22~28°C (Eyal, 1991)，而蜜環菌最適培養溫度約為 24~28°C 之間，超過 30°C 菌絲生長速度減緩，而 40°C 以上則可導致菌絲體死亡 (王等人, 2006)。

7. pH 值

培養液之 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 與 Lung (2004) 研究指出 pH 值會影響牛樟芝 (*Antrodia camphorate*) 之胞外多醣產量及分子量分布。蜜環菌菌絲體於 pH 值 2.5 – 8.5 之間均可生長 (王等人, 2006)，而培養過程可考慮選用生理酸鹼物質作為培養基成分或直接以酸鹼液來使發酵過程 pH 值維持在最佳條件。

8. 攪拌速率

菇類的發酵環境中，適當的攪拌主要是用來增加質傳及分散氣泡增加溶氧量，並使發酵液產生流動循環以增加氣泡的停留時間。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。攪拌可使發酵液與菌絲體均勻分布，有助於菌絲的生長及產物的生成，但過程中相對應的也會產生剪切力（shear stress）而使菌絲體死；崔等人（2006）研究舞菇（*Grifola frondosa*）發現攪拌速率越高，菌絲體直徑越小且形態趨於鬆散絮狀；攪拌速率越低，菌絲球直徑越大且形態趨於緊密球狀，但過高或過低之攪拌速率皆會導致菌絲體產量降低，最佳菌絲體及胞外多醣體產量之攪拌速率為 80~100 rpm。李等人（2012）發現松茸（*Tricholoma matsutake*）菌絲體最佳攪拌速率為 70~90 rpm。

9. 通氣量

菇類屬好氧性微生物，在代謝過程中，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），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）。

（四）發酵槽種類之介紹

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，分別為攪拌式（stirred - tank type）、氣泡式（bubble column type）以及氣舉式（air-lift type）發酵槽（圖五）。其特性及優缺點分述如下：

1. 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（圖五- a）槽體底部具有進氣管（air-inlet）及機械式攪拌葉片（impellers）；特性為藉由攪拌槽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。
- (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。

2. 氣泡式發酵槽

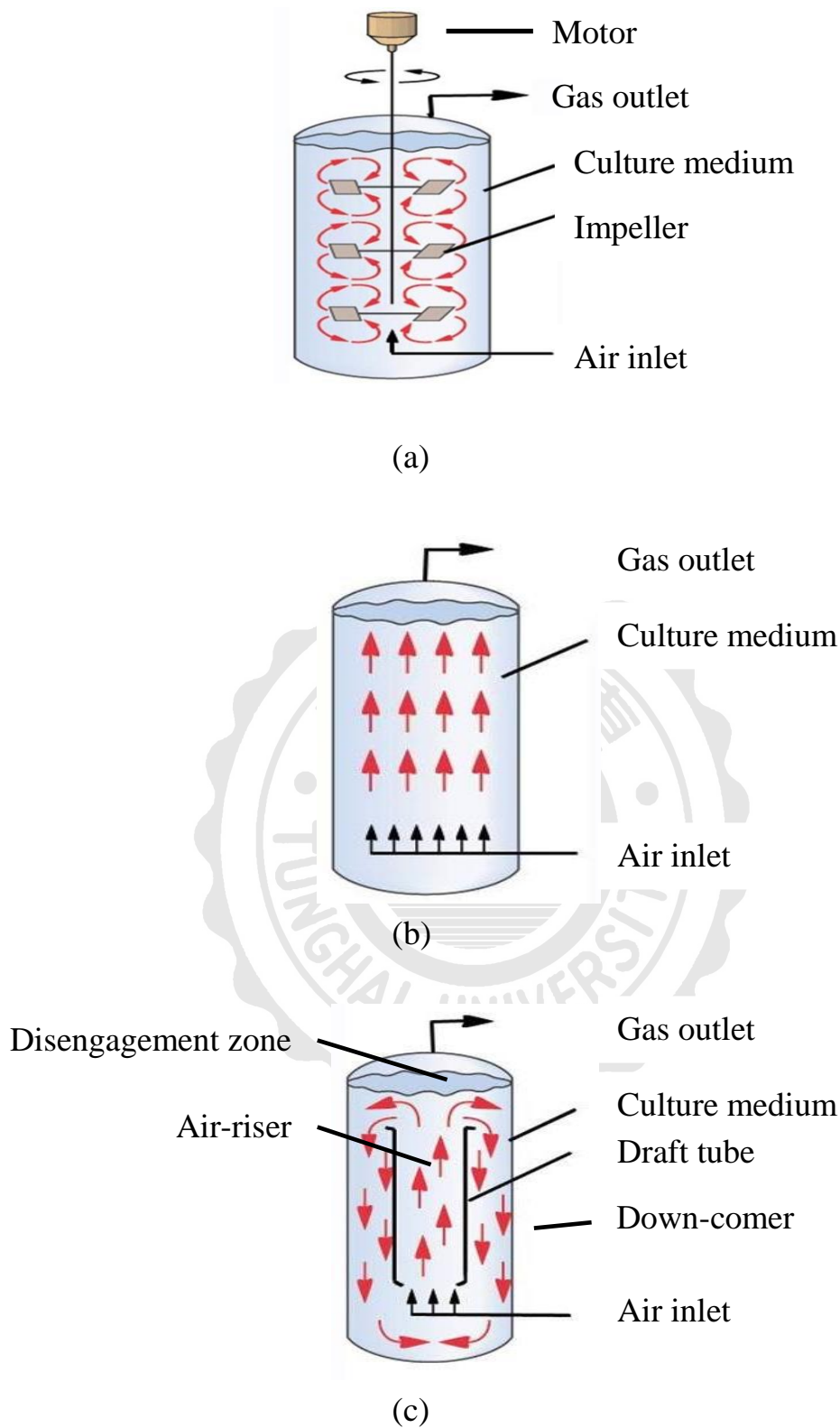
氣泡式發酵槽是發酵槽中構造最簡單的，由槽體內部主要結構（圖五- b）只有一個進氣管（air-inlet），特性為利用通入的氣體帶動整個培養的系統，以混合固液氣三相（王和黃，2001）。此發酵槽的優點有：不具攪拌葉片，故不需要額外的動力成本，也不會造成機械性產熱；剪切力極低，對微生物的生長影響較小；槽體構造簡單及建造成本低。氣泡式發酵槽的特性較適合應用在生化工程上，尤其在近年來，動植物細胞培養為生物技術中研究的重點之一，氣泡式發酵槽具低剪力的特性極適合用來培養此類細胞。然而氣泡式發酵槽亦有其使用上之缺點：

- (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。

3. 氣舉式發酵槽

氣舉式發酵槽的構造(圖五-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。流體本身則會因為上升、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) 培養後期菌絲體增加及液體年度增加都會使對流循環效果下降，並可能使菌絲體堆積在套筒外側或套筒與出氣孔之間。
- (3) 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。
- (4) 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發酵的進行。



圖五 不同型式發酵槽之構造。(a)攪拌式，(b)氣泡式，(c)氣舉式。

Fig. 5 Different types of fermentors. (a) stirred-tank type. (b) bubble column type. (c) air-lift type.

參、材料與方法

一、試驗材料

(一) 試驗菌種

蜜環菌菌種 (*Armillaria mellea*)，由麗豐實業股份有限公司
(台南市，台灣) 提供。

(二) 試驗細胞株

FL83B (mouse hepatocyte cell) BCRC 60325

HepG2 (human hepatoblastoma cell) BCRC60025

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)

(三) 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	5.6

(2) 種源培養基 (seed medium)

Potato starch	4 g
Dextrose	20 g
Silkworm pupa powder	5 g
Water	1000 ml
pH	5.1

(3) 基礎培養基 (Basal medium)

Glucose	10 g
Corn steep liquor	5 ml
KH_2PO_4	1.5 g
MgSO_4	0.75 g
Water	1000 ml
pH	4.0

(4) 修飾培養基

Glucose	20 g
Soybean powder	15 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
MgSO ₄	0.75 g
Water	1000 ml
pH	5.0

2. 細胞培養基

(1) 肝細胞 (FL83B) 培養基

Medium component	Final conc.
Nutrient mixture F-12 Ham (Kaighn's modification)	11.1g/L
Fetal bovine serum	10%
Sodium bicarbonate	1.8g/L
Final volume	500ml

(2) 肝癌細胞 (HepG2) 培養基 (DMEM / high glucose)

Medium component	Final conc.
L-glutamate	2mM
Sodium pyruvate	1mM
Penicillin	1 mM
Fetal bovine serum	10%
Sodium bicarbonate	3.7g/L
Final volume	500ml

(四) 重要藥品

1. 乳糖 (lactose)、麥芽糖 (maltose)、磷酸二氫鈉 (sodium dihydrogen phosphate) 等購自日本林純藥株式會社。
2. 磷酸二氫銨 (ammonium dihydrogen phosphate)、硫酸銨 (ammoniumsulfate)、磷鉬酸酚試劑 (Folin–Ciocalteu reagent) 等購自德國 Merck 公司。
3. 果糖 (fructose)、蛋白朊 (peptone)、牛肉萃取物 (beef extract poeder)、(Potato dextrose broth)、洋菜粉 (agar) 等購自印度 Himedia 公司。
4. 酵母萃取物 (yeast extract) 購自美國 BD 公司。
5. 消泡劑 購自日本信越化學工業。
6. 葡萄糖 (glucose) 購自西班牙 Scharlau 公司。

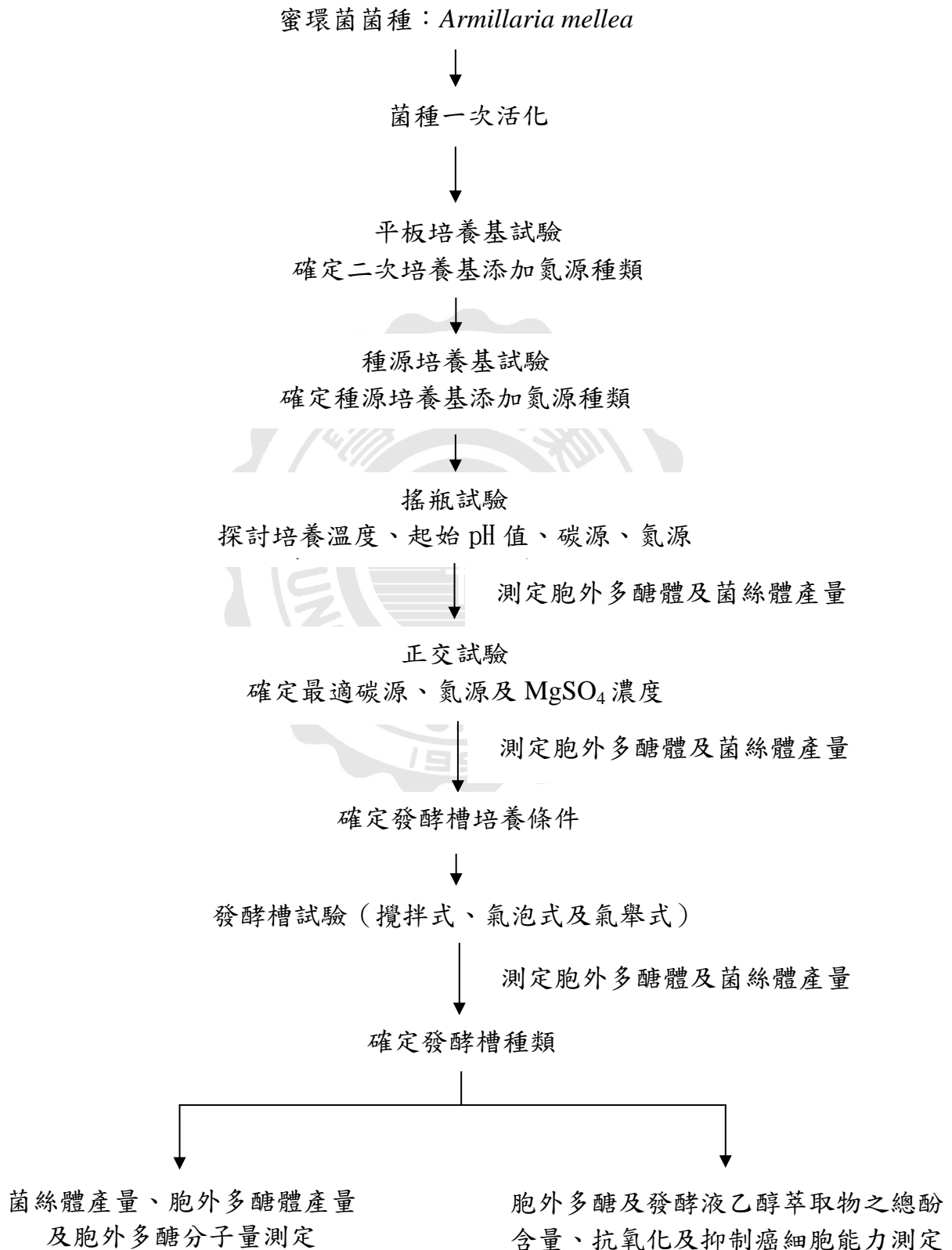
7. 玉米浸漬液 (corn steep liquor)、葡萄糖胺 (Glucisamine)、對二甲氨基苯甲醛 (ρ -dimethylaminobenzaldehyde)、nutrient mixture F-12 Ham (Kaighn's modification)、Peroxidase、 α -tocopherol、ABTS [(2,2-Azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid))]、DPPH (α,α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl)、沒食子酸 (gallic acid) 等購自美國 Sigma-aldrich 公司。
8. 乙醯丙酮 (acetylacetone) 購自英國 Alfa Aesar 公司。
9. AlamarBlue[®] 購自美國 Invitrogen 公司。
10. MgSO₄ (Magnesium sulfate)、酚 (phenol)、硫酸 (sulfuric acid)、磷酸二氫鉀 (potassium phosphate, Monobasic)、氫氧化鈉 (sodium hydroxide)、過氧化氫 (dihydrogen dioxide)、鹽酸 (hydrochloric acid) 等購自台灣自聯工化學試藥。
11. 95% 乙醇 (ethyl ethanol) 購自台灣菸酒公賣局。
12. 99.5% 乙醇 (ethyl ethanol) 購自景明化工。
13. 葉酸 (folic acid) 購自日本和光純藥工業株式會社。
14. DMEM / high glucose (粉末)、胎牛血清 (fetal bovine serum)、Trypsin-EDTA、L-麩胺酸 (L-glutamate)、丙酮酸鈉 (sodium pyruvate) 購自美國 Gibco 公司。
15. 蔗糖 (sucrose)、氰甲烷 (acetonitrile)、甲醇 (methanol) 等購自美國 J. T. Baker 公司。
16. Pullan 購自日本 Showa Denko 公司。
17. Soybean powder 購自台灣日正食品。
18. Silkworm pupa 購自台中元隆中藥房。

二、試驗儀器

1. 恆溫培養箱：FIRSTEK™ (Model-RI100、Model-RI150 及 Model-TG5)；TKS (Model-LTI601)，Firstek 公司，台灣。
2. 高溫高壓滅菌釜：永大明儀器公司，台灣。
3. pH meter：inolab (Model-Level 1)，W.T.W.公司，德國。
4. 冷凍高速離心機：HITACHI (Model-himac CR22G II)，日立儀器公司，日本。
5. 高效能液相層析儀：HITACHI (Model- L6000) pump，Bischoff RI Detector (Model-8110)，HITACHI (Model-D2500) chromatointegrato 積分儀，日立儀器公司，日本。
6. 熱風乾燥機：Model-RHD 603，RISEN 公司，台灣。
7. 冷凍乾燥機：Model-Freeze dryer FD 5N，EYELA 公司，日本。
8. 桌上型攪拌式發酵槽：Model-polygerm1000，MGT 公司，台灣。
9. 桌上型氣舉式及氣泡式發酵槽：MG1000S-7L，MGT 公司，台灣。
10. 旋轉減壓濃縮機：Model-R-2000V1，PAMCHOM 公司，德國。
11. 迴轉式振盪低溫恆溫培養箱：Model-S302R，Firstek 公司，台灣。
12. 水平式無菌操作檯：Model-TW 14U，LIAN SHEN 公司，台灣。
13. 恆溫水浴鍋：TKS (Model-KB-02)，KANSIN 公司，台灣。
14. 分析天平：Model-AB104 S，METTLER TOLEDO 公司，瑞士。
15. 分光光度計：Model-Spectrnic 601，Thermo Fisher Scientific，美國。
16. 電腦分析軟體：SAS™ R9.1 (SAS Institute Inc, USA)。
17. 電腦繪圖軟體：Sigmaplot-scientific Graphing Software Version 2000 (Microsoft Inc, USA)。
18. 酵素免疫分析儀 ELISA reader (型號 MRXII microplate reader, DYNEX, USA)

三、試驗方法

(一) 試驗流程



(二) 菌種貯存

將培養於 PDA 平板培養基上之蜜環菌菌索，於外緣部份以滅過菌的試管（直徑 12 mm）挖取菌索塊並接種至 PDA 斜面培養基上，於 25°C 培養 7 天至菌索佈滿斜面，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 cm），置 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，再以滅過菌之試管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 12 天後，重複以試管取菌絲塊再移種一次即完成菌種一次活化。

(四) 平板培養基試驗

以滅過菌之試管在完成菌種活一次活化後的平板培養基上挖取相同大小之乳白色菌索部分，接種至四種不同待測之平板培養基中央，培養溫度為 25°C，每日觀察其生長情況（生長密度及生長範圍），以確定最適之二次活化平板培養基。

待測平板培養基：

- (1) Potato Dextrose Agar (control)
- (2) Potato Dextrose Agar + 0.5% yeast extract
- (3) Potato Dextrose Agar + 0.5% beef extract
- (4) Potato Dextrose Agar + 0.5% corn steep liquor

(五) 種源培養基試驗

以滅過菌之試管在完成菌種二次活化後的平板培養基上挖取 3 塊相同大小之乳白色菌索部分，接種至五種不同待測之種源培養基於 25°C 振盪 (150 rpm) 培養 12 天後測定其菌絲體乾重量，以確定最適之種源培養基。

待測種源培養基：

- (1) Potato Dextrose Broth (control)
- (2) Potato Dextrose Broth + 0.5% silkworm pupa powder
- (3) Potato Dextrose Broth + 0.5% yeast extract
- (4) Potato Dextrose Broth + 0.5% corn steep liquor
- (5) Potato Dextrose Broth + 0.5% beef extract

(六) 種菌培養

將二次活化後平板培養基上之菌索，以滅過菌之試管挖取 3 塊外緣部分的菌索塊後，置入含 100 ml 種源培養基之有溝三角錐瓶 (250 ml) 中，於 25°C 振盪培養 (150 rpm) 8 天，會形成直徑約 0.4 cm 之菌絲球，此即為後續搖瓶試驗及發酵槽試驗之種菌 (seed culture)。

(七) 搖瓶試驗

以前述之基礎培養基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

- (1) 碳源：glucose (1.0%)
- (2) 氮源：corn steep liquor (0.5%)
- (3) 無機鹽類：MgSO₄
- (4) 培養溫度：25°C
- (5) 震盪速率：150 rpm
- (6) 起始 pH：4.0
- (7) 載液量：100 ml 培養液於 250 ml 有溝之三角錐瓶中。

2. 變動培養條件

- (1) 培養溫度：選用 20°C、25°C、30°C 及 35°C 四種不同培養溫度。
- (2) 起始 pH：3.0~7.0
- (3) 碳源：選用三種單糖 (fructose, glucose, galactose) 及三種雙糖 (lactose, maltose, sucrose) 進行測試，添加量均為 1% (w/v)。
- (4) 氮源：選用四種有機氮源 (beef extract, yeast extract, soybean powder, corn steep liquor) 與二種無機氮源 [(NH₄)H₂PO₄, (NH₄)₂SO₄] 等六種氮源進行測試，添加量均為 0.5% (w/v)。

3. 正交試驗：

正交試驗設計 (Orthogonal experimental design) 為利用數理統計學，從全面試驗中挑選出部分有代表性的因素，再透過正交表來安排多因素、多水平試驗。可以較少的試驗次數獲得全面情況的試驗資料，克服了單因子試驗不能全面考察因素的影響與因素之間交互效應的缺點，是一種高效率、快速、經濟的試驗方法 (汪等人，2013)。

本部分實驗採用搖瓶試驗中 2. (3)、2. (4) 結果，選取最適碳源 (glucose)、氮源 (soybean powder) 及硫酸鎂 ($MgSO_4$) 作為試驗因子，並採用 $L9(3)^3$ 進行三因子三水平正交試驗，探討前述三因子最佳濃度比例。其正交試驗參數表格列於結果與討論 (表九及表十一，71 及 72 頁)。

結果將分別計算三因子之三水平算術平均值 K_1 、 K_2 及 K_3 ，在計算各因子之極差 R 值，計算分析方法如下 (以 A 為範例)：

把每個因子的水平 1、2 及 3 各別試驗結果相加並平均，即是將每個水平成三組 K_1 、 K_2 及 K_3

$$A \text{ 的 } K_1 = (0.14+0.22+0.33)/3 = 0.23$$

$$A \text{ 的 } K_2 = (0.20+0.21+0.42)/3 = 0.28$$

$$A \text{ 的 } K_3 = (0.20+0.18+0.50)/3 = 0.29$$

R 值為極差，為各因素 K 最大值減去最小值即為極差，極差越大表示對結果影響程度越大

$$A \text{ 的 } R = 0.29-0.23 = 0.06$$

另外再進行變異數分析 (variance analysis)，目的是將實驗因子水平的變化所引起的實驗結果的差異誤差波動所引起的實驗結果間的差異區分開來的一種數學方法。極差分析其優點為直觀、簡單且適用範圍廣，但缺點是分析結果較粗糙，往往不能從理論上給予確切的說明，當實驗結果存在有混雜現象時，往往會得出錯誤結論；而方差分析其優點是透過統計分析的方法排除實驗誤差的干擾，得出比較科學的實驗結論 (張等人，2013)。

(八)、發酵槽試驗

1. 攪拌式發酵槽 (stirred-tank fermentor)

- (1) 培養溫度：25°C
- (2) 攪拌葉片：六片標準式渦輪葉
- (3) 攪拌速度：100 rpm
- (4) 接種量：5% (v/v) 種菌懸浮液
- (5) 通氣量：0.5 vvm ($\text{m}^3/\text{m}^3 \cdot \text{min}$)
- (6) 消泡劑：0.1% (v/v)
- (7) 起始 pH：5
- (8) 操作體積：4 L

2. 氣泡式發酵槽 (bubble column fermentor)

- (1) 培養溫度：25°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：0.5 vvm ($\text{m}^3/\text{m}^3 \cdot \text{min}$)
- (6) 消泡劑：0.1% (v/v)
- (7) 起始 pH：5
- (8) 操作體積：4 L

3. 氣舉式發酵槽 (air lift fermentor)

- (1) 培養溫度：25°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：0.5 vvm ($\text{m}^3/\text{m}^3 \cdot \text{min}$)
- (6) 消泡劑：0.1% (v/v)
- (7) 起始 pH：5
- (8) 操作體積：5 L

四、分析方法

(一) 菌絲體生物質(biomass) 產量測定

1. 搖瓶生物質產量測定

將定量之菌絲體培養液以烘乾後之濾紙 (No.2) 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。

2. 發酵槽生物質產量測定

由於 soybean powder 滅菌後會產生大量的蛋白質結塊，於培養過程中會隨著菌絲體的生長而被漸漸分解，導致以前述方法 (1. 搖瓶生物質測定) 測定生物質含量會有干擾的情況，使得菌絲體雖以目視有明顯生長但乾重量卻為下降或無顯變化，因此參考郭 (2012) 改以葡萄糖胺比色法分析樣品中葡萄糖胺 (glucosamine) 含量，因菌絲體主要構成物質為葡萄糖胺，故可以測定葡萄糖胺含量來間接表示菌絲體生物質產量。搖瓶培養時間及發酵槽試驗之菌絲體生物質產量皆以此法測定。

將培養後之液態樣品取 40 ml 靜置後離心，移除上清液後置於 60 °C 烘箱中烘乾，秤其乾重後磨成粉末後經篩網過篩 (40 mesh)，即可得乾燥粉末。秤取 0.1 g 乾燥粉末與 5 ml 72% H_2SO_4 混合，置入 125 ml 三角錐瓶後，在震盪培養箱中以 25°C/130 rpm 反應 30 min，再以 54 ml RO 水稀釋，置入滅菌釜中 121°C 水解反應 2hr，冷卻後將含葡萄糖胺水解液以 10 N 與 0.5 N NaOH 中和至 pH=7 再定量至 100 ml。再以葡萄糖胺比色法分析樣品中葡萄糖胺含量，間接換算成生物質含量。

葡萄糖胺比色法採用 Elson-Morgan 法 (Elson and Morgan, 1933), 並參考唐等人 (2006) 之方法加以修飾。測定原理為在一定的溫度下過量的鹼性乙醯丙酮 (acetylacetone) 溶液會將葡萄糖胺 2 號碳上的氨基乙醯化, 形成帶有吡咯環的 N-乙醯衍生物, 再與對二甲氨基苯甲醛 (ρ -dimethylaminobenzaldehyde) 在酸性乙醇溶液中縮合形成紫紅色物質。該縮合物於波長 525 nm 下具有最大吸光值, 因此樣品中葡萄糖胺含量越高, 其吸光值 OD_{525} 就越高。

試劑配置：

- (1) 鹼性乙醯丙酮溶液：取 3.5 ml 乙醯丙酮，溶於 50 ml 1.2 M 的碳酸鈉溶液中，混合均勻，需現配現用。
- (2) 酸性對二甲氨基苯甲醛溶液：取 1.33 g 對二甲氨基苯甲醛，溶於 25 ml 無水乙醇及 25 ml 濃鹽酸的混合液中，以棕色瓶保存，需現配現用。

測定步驟：

取 1.0 ml 前述水解液樣品加入 0.5 ml 鹼性乙醯丙酮溶液後，於沸水浴加熱 25 min，冷卻後加入 1.0 ml 乙醇及 0.5 ml 酸性對二甲氨基苯甲醛溶液震盪混勻，再加入 2 ml 乙醇，混合後置於 60°C 水浴反應 1 hr，利用分光光度計測定混合液之 OD_{525} 值，並比對葡萄糖胺標準曲線 (附圖一) 後，即可計算樣品中葡萄糖胺之含量。再經比對菌絲體乾重對應葡萄糖胺含量之標準曲線 (附圖二) 即可得樣品中生物質含量。

葡萄糖胺標準曲線測定

秤取 0.1 g 葡萄糖胺溶於 10 ml 蒸餾水中，取上述溶液 5 ml 稀釋至 100 ml 備用（500 $\mu\text{g/ml}$ ）。再以此溶液逐步稀釋成不同濃度之葡萄糖胺標準液（10、20、30、40、50 及 60 $\mu\text{g/ml}$ ），並且蒸餾水作為空白對照組。利用比色法測定混合液之 OD_{525} 值即可得葡萄糖胺標準曲線（附圖一）。

菌絲體乾燥粉末製備

將培養於種源培養基中種菌接種（5%，v/v）至 250 ml 有溝三角錐瓶（含 100 ml 基礎培養基），於 25°C 震盪培養（150 rpm）12 天，再將含菌絲體之培養液以濾紙（No.2）進行抽氣過濾，並以 RO 水清洗數次後，收集菌絲體置於 60°C 烘箱中乾燥，再以高速磨粉機磨成粉末。

菌絲體乾重對應葡萄糖胺含量標準曲線測定

精確秤取不同重量之冷凍乾燥菌絲體（0.025、0.05、0.1、0.2 及 0.3 g）以前述方式進行 H_2SO_4 酸水解可得含葡萄糖胺水解液，再利用葡萄糖胺比色法測定水解液中葡萄糖胺的含量，即可得菌絲體乾重對應葡萄糖胺含量之標準曲線（附圖二）。

(二) pH 值之測定

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

(三) 胞外多醣之測定

1. 胞外多醣之萃取

取 1.0 ml 發酵液與 95%酒精混合 (1:4, v/v)，於 4°C 進行沉澱 24h 後，離心 (15000 rpm, 15 min) 取含胞外多醣之沈澱物，再以 75%之酒精進行震盪沖洗及離心去除雜質，再將沈澱物置 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 1.0 ml 去離子水震盪復水並稀釋，再將此稀釋液取 1.0 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 35 分鐘測定混合液之 OD₄₉₀ 值並比對葡萄糖標準曲線 (附圖三) 後，即可得待測液中胞外多醣體之葡萄糖相等量 X (mg/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

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

3. 葡萄糖含量標準曲線之測定

精確秤取葡萄糖 0.1g 溶於 10ml 蒸餾水中，取上述溶液 5ml 稀釋至 100ml 備用 (0.5 mg/ml)。再以此溶液逐步稀釋成不同濃度之葡萄糖標準液 (0.01、0.02、0.04、0.06、0.08 及 0.1 mg/ml)，並且以不含葡萄糖之蒸餾水作為空白對照組，再利用酚硫酸法測定混合液之 OD₄₉₀ 值，即可得葡萄糖標準曲線 (附圖三)。

(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 (5μm)，250mm × 4mm，(VDS optilab)

管柱溫度：室溫

移動相：氘甲烷：水=85：15 (v/v)

流速：1 ml / min

偵測器：Bischoff model 8110 RI detector

積分儀：Hitachi model D-2500 chromatointegrator

標準品：葡萄糖 (retention time 約為 8.40 分鐘) 其 HPLC 之殘糖檢量線如附圖四。

(五) 發酵參數之分析

發酵參數 (fermentation parameters) :

1. 最大胞外多醣生成量 (maximal yield of exopolysaccharide, P_{\max})

於培養期間生成之最大胞外多醣產量 (g/l)。

2. 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。

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / t - t_0$$

3. 胞外多醣生成速率 (product formation rate, Q_p)

為平均每日之胞外多醣生成量。

$$Q_p = \text{最大胞外多醣生成量} (P_{\max}) / \text{最大菌絲體生成天數} (t)$$

4. 比多糖產率 (specific product yield, $Y_{p/x}$)

為單位重量 (g) 菌絲體生成之胞外多醣量。

$$Y_{p/x} = \text{最大胞外多醣生成量} (P_{\max}) / \text{最大菌絲體生成量} (X_{\max})$$

5. 多醣產率 (product yield, $Y_{p/s}$)

為單位葡萄糖消耗量 (g) 能轉換為胞外多醣之量。

$$Y_{p/s} = \text{最大胞外多醣生成量} (P_{\max}) / \text{消耗葡萄糖量} (\text{glucose, g})$$

6. 菌絲體產率 (biomass yield, $Y_{x/s}$)

為單位葡萄糖消耗量 (g) 能轉換為菌絲體之量。

$$Y_{x/s} = \text{最大菌絲體生成量} (X_{\max}) / \text{消耗葡萄糖量} (\text{glucose, g})$$

7. 最大菌絲體生成量 (maximal yield of mycelial biomass, X_{\max})

於培養期間生成之最大菌絲體產量 (g/l)

8. 最大胞外多醣生成天數 (days, t)

於培養期間最高胞外多醣產量之發酵天數。

(六) 胞外多醣分子量之測定

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 2 ml 與 95% 酒精混合 (1:4, v/v)，於 4°C 進行沉澱 24 hr 後，離心 (15000 rpm, 15 min) 取含胞外多醣之沈澱物，再以 75% 之酒精進行震盪沖洗及離心去除雜質，再將沈澱物置 60°C 烘箱中移除殘留的酒精，所得之乾燥物以熱水回溶後，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：PolySep-SEC-P 300 \times 7.80 mm, (Phenomenex, model 5000)。

管柱溫度：45°C

移動相：去離子水

流速：1 ml / min

偵測器：RI detector (Bischoff, model 8110)

標準品：pullulan (分子量 10000、21700、47300、113000、210000、366000 及 805000 Da, retention time 分別為 10.734、10.32、9.92、9.46、9.05、8.487 及 7.937 分鐘) 標準曲線如附圖五。

(七) 胞外多醣及發酵液乙醇萃取物製備

1. 胞外多醣製備

將含菌絲體之發酵液以濾紙 (No.2) 進行抽氣過濾去除菌絲體，收集發酵液減壓濃縮至 1/3 體積，再加入 95% 酒精 (1:4, v/v) 混合均勻，於 4°C 進行沉澱 24 hr 後，以濾紙 (No.2) 進行抽氣過濾取得粗胞外多醣之沉澱物，再以 75% 乙醇進行振盪沖洗及再過濾去除雜質，再進行冷凍乾燥即得胞外多醣體粉末，再以熱水回溶並定量至 20 mg/ml 備用。

2. 發酵液乙醇萃取物製備

將含菌絲體之發酵液以濾紙 (No.2) 進行抽氣過濾去除菌絲體，收集發酵液減壓濃縮至 1/3 體積，再進行冷凍乾燥即得液態發酵樣品粉末。樣品粉末置三角錐形瓶中，以 1:10 (g/ml) 比例加入乙醇 (50% 或 95%)，於 30°C，150 rpm 振盪萃取 24 小時後，離心收取上清液，再將所得之沉澱物以相同條件再萃取一次，收集兩次所得之上清液以 40°C 減壓濃縮至膏狀後進行冷凍乾燥，再以原萃取濃度之乙醇定量至 100 mg/ml 備用。

實驗中以抗氧化劑 trolox、 α -tocopherol 及 ascorbic acid 作為正對照組，實驗結果以 IC₅₀（清除 50% DPPH 自由基所需之濃度）表示，IC₅₀ 由線性迴歸分析之內插法計算所得。

2. ABTS (2,2-Azino-bis (3-ethybenzo-thiazoline-6-sulfonic acid))

自由基清除能力分析

本實驗參考 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 734nm 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。

實驗步驟：

- (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 μ M 與 50 μ M。
- (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) 加入 0.25 ml 不同濃度之粗多醣體、乙醇萃提取物待測液及標準品 (trolox) 之乙醇溶液混合均勻後反應 10 分鐘，測定混合物之 OD₇₃₄。

ABTS 自由基清除率 (scavenging effect, %) =

$$\left[\frac{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}})}{\text{OD}_{\text{control}}} \right] \times 100$$

實驗中以 trolox 為正對照組，未加樣品者為控制組。實驗結果以 IC_{50} (抑制 50% $\text{ABTS} \cdot^+$ 活性所需之濃度) 表示， IC_{50} 由線性迴歸分析之內插法計算所得。

(九) 總酚類化合物測定

本實驗參考 Amin 等人 (2004) 以 Folin-Ciocalteu 比色法測定胞外多糖及發酵液萃取物樣品中總酚類化合物含量，Folin-Ciocalteu 試劑中磷鉬酸 (phosphomolybdic acid) 於弱鹼性環境下可氧化多酚化合物而自身被還原 ($\text{Mo}^{6+} \rightarrow \text{Mo}^{5+}$)，生成之藍色化合物於波長 765 nm 下有最大吸收值，吸光值愈高表示樣品總酚類化合物含量愈高。

實驗步驟:

- (1) 取 0.1 ml 樣品，加入 0.75 ml 10% 的 Folin-Ciocalteu's reagent 混合均勻混合靜置 5 分鐘。
- (2) 加入 0.75 ml 碳酸鈉溶液 (6%)，混合均勻並避光靜置 90 分鐘後，於 765 nm 下測定吸光值，結果以沒食子酸相等量 (gallic acid equivalent) 表示 (mg GAE/100 g extracts)。

實驗中以沒食子酸 (gallic acid) 的標準曲線計算樣品總酚類化合物含量標準曲線如附圖六。

(十) 細胞存活率試驗

本試驗為測定蜜環菌胞外多醣體及發酵液乙醇萃取物對正常小鼠肝細胞及肝癌細胞生長之影響。方法採用 Alamar blue assay Kit，原理為活細胞會將 Alamar blue 試劑中的 resazurin 經還原反應後，形成粉紅色之 resorufin 化合物，於波長 570 nm 具最大吸光值 (OD_{570})， OD_{570} 愈高代表活細胞數量愈多，細胞存活率愈高。測定正常小鼠肝細胞目的為確認樣品對正常細胞無毒殺能力；測定癌細胞目的則為確認樣品對癌細胞之抑制生長能力。

實驗步驟

1. 取前述 (七)-1、2 製備之胞外多醣體及乙醇萃取物樣品，以細胞培養液定量至不同濃度 (胞外多醣: 125、250、500、1000 $\mu\text{g/ml}$; 乙醇萃取物: 125、250、500 及 1000 $\mu\text{g/ml}$) 做為待測液，爾後以此待測液分別加入癌細胞組及正常細胞組細胞液中做細胞存活率測試。
2. 將細胞培養於 96 孔盤中 (2×10^4 cell/well)，移除原培養基後分別添加含不同濃度樣品 (實驗組)、不含樣品 (控制組) 及含 50% 甲醇 (甲醇組) 之培養液共置 2 hr，移除培養基並以 PBS 潤洗，加入 100 μg Alamar blue (Alamar blue : medium = 1:10) 試劑，於 37°C 反應 2 小時後，於 570 nm 下分別測定癌細胞組及正常細胞組吸光值。

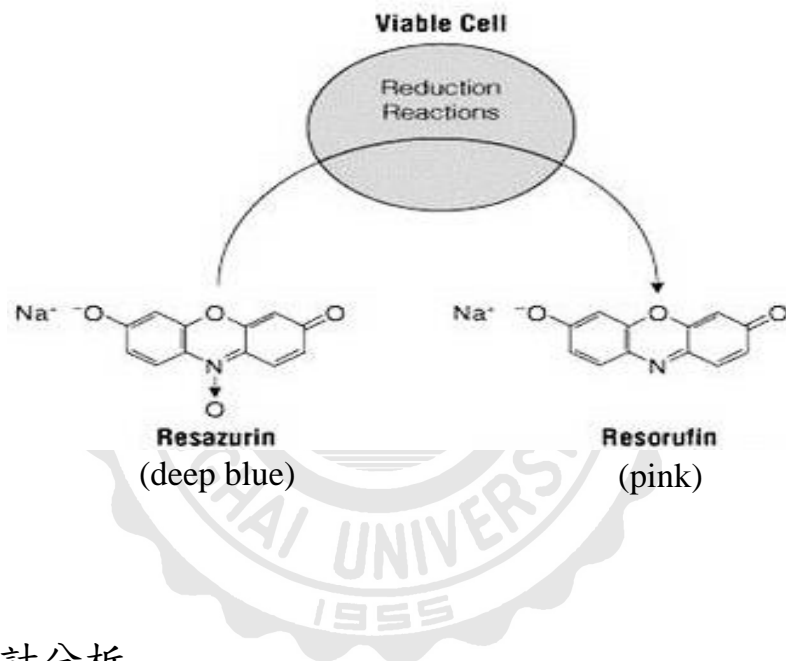
$$\text{細胞存活率 (cell viability, \%)} = \left[\frac{(\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{MeOH}})}{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{MeOH}})} \right] \times 100$$

細胞存活率愈高，代表樣品抑制癌細胞生長能力愈低。

OD_{sample}：經樣品處理後實驗組之吸光值。

OD_{control}：未經樣品處理控制組之吸光值。

OD_{MeOH}：經甲醇殺死細胞後甲醇組之吸光值，
作為試劑之吸光背景值。



(十一) 統計分析

試驗所得結果以平均值±標準偏差 (Mean ± SD) 表示，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 ($p < 0.05$)，並且使用 Student's t-test 來評估數據間的差異性。 $p < 0.01$ 時表示極顯著差異、 $p < 0.05$ 時表示達顯著差異， $p > 0.05$ 則表示為沒有顯著差異 (沈，2010)。

肆、結果與討論

一、平板培養基試驗

由於蜜環菌在 PDA 上進行一次活化時，菌索生長不規律、不夠密集且快速老化，僅生成少量具生長能力的乳白色菌絲（圖六- a），因此有必要探討強化 PDA 的營養成分，以增加菌索密度及新生部位的範圍。

本實驗以 PDA（potato dextrose agar）為培養基基礎，再額外添加（0.5 %，w/v）三種不同營養物質（yeast extract、beef extract、corn steep liquor），目的為增加蜜環菌菌索生長密度及增加具分生能力之年輕菌索，以進行菌種二次活化。由於菌索生長不規律的特性難以量化，故以觀察菌索生長密度、範圍及年輕菌索形成情形為判定生長之依據。

結果（圖六- b ~ d）顯示菌索於添加不同營養物質 PDA 上，於 25°C 培養 12 天後，其生長密度、生長範圍及年輕菌索（白色菌索）量皆較未添加營養物質者（圖六- a）為高。添加 yeast extract 組（圖六- b）及添加 corn steep liquor 組（圖六- c）之菌索生長密度與範圍相近，且皆高於 beef extract 組（圖六- d），三添加組中以添加 corn steep liquor 組的年輕菌索形成數量及密度最高，因此決定以添加 0.5% (w/v) corn steep liquor 之 PDA 做為菌種二次活化之培養基。



(a)

(b)



(c)

(d)

圖六 蜜環菌菌索於 PDA 培養基上之生長情形 (25°C/12 天)。
 (a) 未添加營養物。 (b) 添加 yeast extract。
 (c) 添加 corn steep liquor。 (d) 添加 beef extract。

Fig. 6 Shoe-string growth of *A.mellea* on PDA (25°C/12 days).
 (a) no nutrient added. (b) yeast extract added.
 (c) corn steep liquor added. (d) beef extract added.

二、種源培養基試驗

本實驗目的為探討 PDB 添加 0.5% (w/v) 四種不同營養物質 (silkworm pupa powder、yeast extract、corn steep liquor、beef extract) 對蜜環菌活化之影響，主要是為了擴大菌絲的數量，以作為爾後搖瓶試驗及發酵槽試驗之接種源，而這過程活化的菌種就稱為種源 (seed culture)。種源的製備過程對發酵有關鍵性的作用，因此必須達到下列要求: 1. 菌體的總量和濃度能滿足接種的需求; 2. 生理狀態穩定，菌群生長均勻; 3. 菌體活力強，生長旺盛，接種至發酵培養基中能迅速生長，縮短遲滯期 (lag phase); 4. 無雜菌污染(張等，2013)。

結果(表六)顯示，添加蠶蛹粉 (silkworm pupa powder) 組之菌絲體產量顯著 ($p < 0.05$) 高於未添加組及其他添加組。添加 silkworm pupa powder 組及添加 yeast extract 組之菌絲球顏色皆為乳白色，顯示其菌絲球仍處於未老化的狀態；然添加 corn steep liquor 組之菌絲球則為深色，顯示彼等菌絲球已有老化現象(資料未列)。冉等人 (2013) 指出蠶蛹蛋白在乾燥蠶蛹中占約 69.70 ~ 71.70% 且含 18 種氨基酸，另外也包含豐富脂肪酸、維生素等營養成分(王等人，2004)，因此提高了碳氮比中氮源之比例且可提供豐富生長因子，而促進蜜環菌菌絲體生長。

silkworm pupa powder 及 beef extract 組最終 pH 值顯著 ($p < 0.05$) 高於其它實驗組，可能是蜜環菌處於碳源不足或分解其中的氮源而使得 pH 值上升。

綜合以上結果，決定以添加 0.5% (w/v) silkworm pupa powder 之 PDB 作為種源培養基。

表六 種源培養基營養添加物對蜜環菌菌絲體產量及最終 pH 之影響
 Table 6 Effect of added nutrients in seed culture on mycelial production and final pH by *A. mellea*.

Media	Mycelial dry weight (g/l)	Final pH
PDB + Silkworm pupa powder	9.50±0.86 ^A	5.21±0.18 ^A
PDB + Yeast extract	3.44±0.46 ^B	4.83±0.04 ^B
PDB + Corn steep liquor	2.24±0.31 ^{BC}	4.75±0.03 ^B
PDB + Beef extract	1.21±0.04 ^{CD}	5.25±0.02 ^A
PDB (control)	0.29±0.07 ^{D*}	4.84±0.04 ^B

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$). Each value are expressed as Mean ± SE (n=3).

三、搖瓶試驗

本實驗為探討各項培養條件（溫度、起始 pH 值、碳源、氮源及碳、氮源、 MgSO_4 最適添加濃度等）對蜜環菌於搖瓶培養（shake flask culture）時菌絲體及胞外多醣（exopolysaccharide）生成之影響；搖瓶所用之培養基為液態基礎培養基，採用單因子變動試驗方法，培養 12 天確定碳、氮源後，再以正交試驗決定碳源、氮源及 MgSO_4 之最適添加濃度。

（一）培養溫度對蜜環菌菌絲體生長之影響

溫度對微生物的生長與基本代謝反應有著密切的關係，本實驗以四種不同培養溫度（20、25、30 及 35°C）探討彼等對蜜環菌菌絲產量之影響。

結果（表七）顯示 25°C 培養溫度之菌絲體產量（3.9 g/l）顯著（ $p < 0.05$ ）高於其他實驗組；35°C 組幾乎無生長且發酵液顏色呈黑褐色（資料未列）。此結果可與另一以 PDA 平板培養基（含 0.5%，w/v，corn steep liquor），於不同培養溫度下之蜜環菌生長情形相類似（圖七）。圖七顯示菌索會因培養溫度的高低而有不同的生長範圍及色素產生，較低之培養溫度（20°C 及 25°C）時生長較快且年輕菌索（白色部位）較多（圖七-a, b）；而在較高之培養溫度（30°C 及 35°C）時菌絲體生長緩慢且產生許多深色色素（圖七-c, d）。其中亦以 25°C 組菌索呈現最大之生長範圍及最多之年輕菌索（圖七-b）。本實驗結果與王等人（2006）指出蜜環菌最適生長溫度約 24 - 28°C，超過 30°C 菌絲體生長速度減緩，而 40°C 以上則可導致菌絲體死亡之敘述相符。綜上所述，後續試驗皆以 25°C 作為培養溫度。

表七 培養溫度對搖瓶培養蜜環菌菌絲體產量及最終 pH 之影響
 Table 7 Effect of different incubation temperatures on mycelial production and final pH by *A. mellea* in shake flask culture

Incubation temperature (°C)	Mycelial dry weight (g/l)	Final pH
20	3.04±0.04 ^B	5.36±0.04 ^A
25	3.90±0.07 ^A	5.03±0.01 ^B
30	2.62±0.34 ^B	4.86±0.02 ^C
35	0.96±0.70 ^C	4.35±0.01 ^D

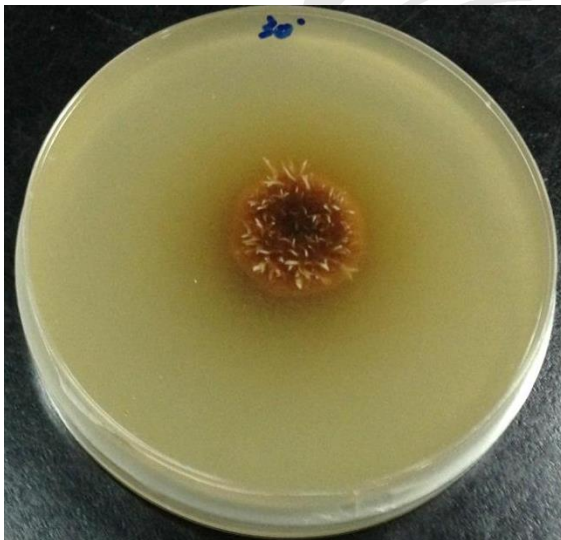
Values superscribed by different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$). Each value are expressed as Mean \pm SE (n=3).



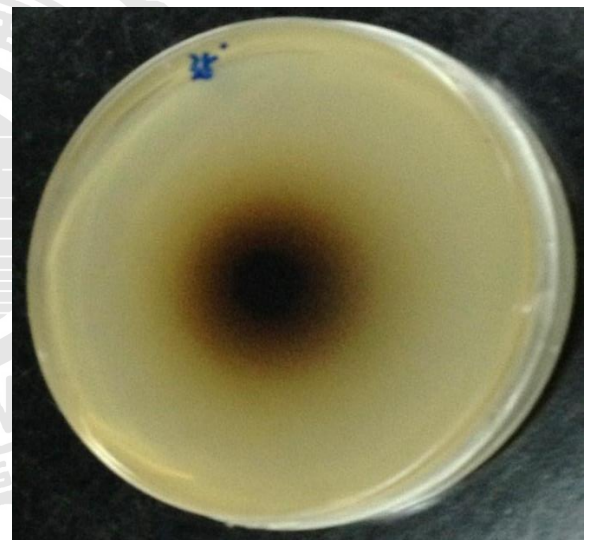
(a)



(b)



(c)



(d)

圖七 四種培養溫度下蜜環菌菌索於添加 core steep liquor PDA 上之生長情形（培養 10 天）。

(a) 20°C 。(b) 25°C 。(c) 30°C 。(d) 35°C 。

Fig.7 Shoe-string growth of *Armillaria mellea* on corn steep liquor-enriched PDA at four different incubation temperatures (10 days) .

(a) 20°C . (b) 25°C . (c) 30°C . (d) 35°C .

(二) 培養液起始 pH 值對蜜環菌胞外多醣生成之影響

微生物生長與 pH 值有很大的關係，不同菌體有其生長最適的 pH 值。本實驗將基礎培養基起始 pH 值以 HCl 或 NaOH 調整為 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 (實驗組)，探討彼等對蜜環菌菌絲體及胞外多醣生成之影響。

結果 (表八) 顯示，起始 pH 5.0 組菌絲體產量 (5.69 g/l) 雖非最高者，但胞外多醣體產量 (140.10 mg/l) 高於所有實驗組。起始 pH 值 6.0 及 7.0 之實驗組有最高的菌絲體產量 (7.37 及 6.92 g/l)，但彼等之胞外多醣產量 (98.70 及 69.65 mg/l) 則顯著 ($p < 0.05$) 低於其他實驗組。此結果與 Fang 等人 (2001) 指出於高起始 pH 值時，赤芝 (*Ganoderma lucidum*) 葡萄糖消耗速率及菌絲體產量較高，但胞外多醣體產量卻相對較少之結果相似；推論高起始 pH 值會使蜜環菌藉由增加碳源的代謝產生有機酸，將環境之 pH 值調節至適合生長之範圍，但反倒使胞外多醣體的合成減少。

最終 pH 值除了 pH 3.0 組外，其它各實驗組之最終 pH 值皆維持在 5.0 以上，此結果與蜜環菌之最佳生長範圍為 pH 4.5 ~ 5.5 相符 (王等人, 2006)。pH 3.0 實驗組可能因過低的 pH 值阻礙其生長及代謝，其菌絲體產量 (3.8 g/l) 顯著 ($p < 0.05$) 低於其他實驗組 (表八)。

基於達到最高胞外多醣產量之考量，後續之正交試驗及發酵槽試驗皆以 pH 5.0 為起始 pH 值。

表八 起始 pH 值對搖瓶培養蜜環菌菌絲體產量及最終 pH 之影響

Table 8 Effect of different initial pH on mycelial biomass and exopolysaccharide production by *A. mellea* in shake flask culture

Initial pH	Mycelial dry weight (g/l)	Exopolysaccharide (mg/l)	Final pH
3.0	3.80±0.19 ^C	110.93±13.87 ^{BC}	2.93±0.01 ^B
4.0	5.44±0.23 ^B	121.68±7.63 ^{AB}	5.10±0.16 ^A
5.0	5.69±0.22 ^B	140.10±19.22 ^A	5.17±0.07 ^A
6.0	7.37±0.27 ^A	98.70±13.33 ^C	5.30±0.08 ^A
7.0	6.92±0.20 ^A	69.65±11.95 ^D	5.50±0.31 ^A

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

Each value are expressed as Mean ± SE (n=3).

(三) 碳源對蜜環菌胞外多醣生成之影響

碳源為菇類生長時能量的來源，發酵培養基中常用碳源有糖類、油脂、有機酸和低碳醇等。本實驗嘗試添加三種單糖 (glucose、fructose、galactose) 及三種雙糖 (lactose、maltose、sucrose) 等六種糖類 (添加量為 1%，w/v) 探討彼等對蜜環菌胞外多醣及菌絲體生成之影響。

結果 (表九) 顯示在所有實驗組中以添加葡萄糖之對照組之菌絲體及胞外多醣體產量最高 (5.22 g/l 及 102.73 mg/l) 且顯著 ($p < 0.05$) 高於其他實驗組。

最終 pH 值以添加半乳糖實驗組最高 (6.12) 且顯著 ($p < 0.05$) 高於其他實驗組，蔗糖實驗組次之 (5.9)，然該兩組之菌絲體產量 (2.77 及 2.73 g/l) 顯著 ($p < 0.05$) 低於其他實驗組，可能原因 1. 蜜環菌對半乳糖及蔗糖之利用率低而使氮源利用率提高導致培養基 pH 上升; 2. 培養基不利蜜環菌生長使菌體提早老化自溶導致培養基 pH 上升。由於控制組之菌絲體及胞外多醣產量皆為最高，後續實驗以葡萄糖為培養基之碳源。

表九 碳源對搖瓶培養蜜環菌菌絲體產量及最終 pH 之影響

Table 9 Effect of different carbon sources on mycelial biomass and exopolysaccharide production by *A. mellea* in shake flask culture

Carbon sources (1.0%, w/v)	Mycelial dry weight (g/l)	Exopolysaccharide (mg/l)	Final pH
Fructose	4.32±0.18 ^B	94.55±3.64 ^B	5.39±0.04 ^D
Galactose	2.77±0.14 ^D	81.82±2.71 ^C	6.12±0.06 ^A
Lactose	3.60±0.01 ^C	57.27±2.53 ^D	5.33±0.12 ^{CD}
Maltose	3.64±0.41 ^C	94.55±2.73 ^B	5.71±0.01 ^C
Sucrose	2.73±0.21 ^D	59.82±0.91 ^D	5.90±0.05 ^B
Control*	5.22±0.18 ^A	102.73±5.45 ^A	5.32±0.03 ^D

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

Each value are expressed as Mean ± SE (n=3).

*Basal medium with 1% (w/v) glucose

(四) 氮源對蜜環菌胞外多醣生成之影響

氮源對菌絲體與代謝物生成有非常大的影響。本實驗嘗試添加四種有機氮源 (yeast extract、corn steep liquor、beef extract、soybean powder) 與二種無機氮源 ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 等六種氮源 (添加量為 0.5% , w/v) 探討彼等對蜜環菌胞外多醣生成之影響。

結果 (表十) 顯示在所有實驗組中以添加 yeast extract 組具有最高之菌絲體產量 (8.06 g/l) 且皆顯著 ($p < 0.05$) 高於其他實驗組及添加 corn steep liquor 之對照組, 其次為 soybean powder 及對照組 (5.34 g/l 及 5.22 g/l)。胞外多醣體則以添加 soybean powder 及對照組有最高之胞外多醣體產量 (104.66 及 102.73 mg/l) 且皆顯著 ($p < 0.05$) 高於其他實驗組, 其次為 yeast extract 及 beef extract (89.18 及 83.77 mg/l)。有機氮源組之菌絲體及胞外多醣體產量皆顯著 ($p < 0.05$) 高於無機氮源組。

無機氮源組之最終 pH 值 (4.21 ~ 4.22) 接近基礎培養基原始 pH (4.0), 而有機氮源組之最終 pH 值則與菌絲體及胞外多醣體產量無明顯相關趨勢, 此情況可能原因為氮源代謝對最終 pH 的影響是複雜的, 有機氮源成分複雜, 帶有含氮養分也有含碳養分, 因此代謝過程菌的利用不同, 造成 pH 變化不同。當胺基酸中的 $-\text{NH}_2$ 利用後 pH 會下降; 但當氮源被分解成 NH_3 後 pH 會上升, NH_3 被利用後 pH 會再上升, 而當碳源不足或菌種優先選擇該氮源作為養分來源時也會使 pH 上升 (張等人, 2013)。

基於產生最高胞外多醣體產量及氮源之成本考量, 後續之正交實驗及發酵槽試驗皆以 soybean powder 作為添加之氮源。

表十 氮源對搖瓶培養蜜環菌菌絲體產量及最終 pH 之影響
 Table 10 Effect of different nitrogen sources on mycelial biomass and exopolysaccharide production by *A. mellea* in shake flask culture

Nitrogen sources (0.5%, w/v)	Mycelial dry weight (g/l)	Exopolysaccharide (mg/l)	Final pH
Organic			
Yeast extract	8.06±0.34 ^A	89.18±10.50 ^B	4.97±0.10 ^B
Beef extract	3.50±0.25 ^C	83.77±12.14 ^B	4.46±0.01 ^{CD}
Soybean powder	5.34±0.22 ^B	104.66±15.16 ^A	4.73±0.06 ^{CB}
Control*	5.22±0.18 ^B	102.73±5.45 ^A	5.32±0.03 ^D
Inorganic			
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.46±0.04 ^D	40.18±8.66 ^C	4.21±0.04 ^D
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.44±0.14 ^D	43.01±4.22 ^C	4.22±0.00 ^D

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

Each value are expressed as Mean ± SE (n=3).

*Basal medium with 0.5% (w/v) corn steep liquor.

(五) 正交試驗

將前述最適碳、氮源進行預實驗找出試驗濃度範圍 (結果未列)，以及參考王等人 (2006) 使用之 $MgSO_4$ 濃度設計出三因子 (碳、氮源及 $MgSO_4$) 三水平 (濃度) 之試驗參數 (表十一)，並以 $L9(3^3)$ 正交表 (表十二) 進行試驗。

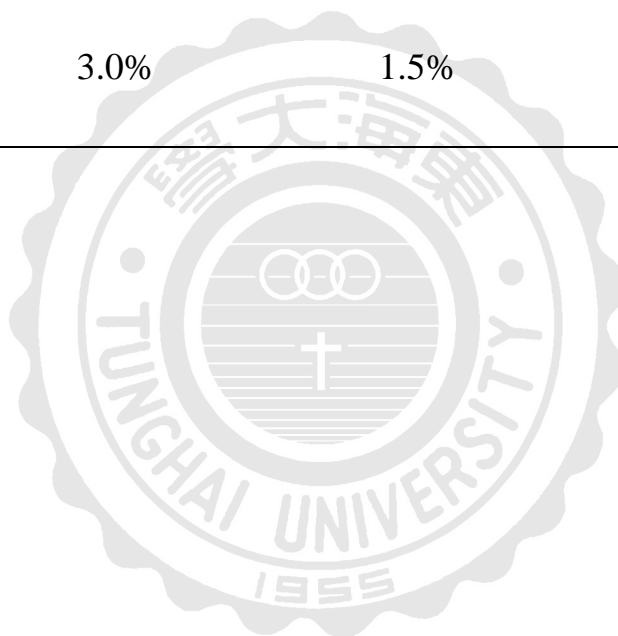
由表十二之結果可得知，最高胞外多醣體產量之組合為 A3 B3 C2；最高菌絲體產量之組合為 A3 B3 C1。對菌絲體乾重 (r^*)及胞外多醣生成(R^*)影響由大至小依序皆為 soybean powder > glucose > $MgSO_4$ ；根據方差分析結果 (表十三) 得知三因子僅 soybean powder 對胞外多醣生成之影響為顯著 ($p < 0.05$)，因此 soybean powder 之添加濃度採用菌絲體乾重及胞外多醣皆最佳的水平 1.5% (B3)，而菌絲體乾重及胞外多醣生成最佳之 glucose 水平為 3.0% (A3)，但主要考量胞外多醣之 K2 與 K3 相差不大，glucose 之影響並不顯著，因此改採用水平為 2.0% (A2)作為添加濃度； $MgSO_4$ 則選擇胞外多醣體生成最佳水平 0.075% (C2)。此組合之碳氮比為 1.33，與黃 (1996) 指出一般常見的食用菇類最適合生長的碳氮比為 5~25 之間之結果不同，原因可能為 soybean powder 亦存在豐富碳源。根據 soybean powder 營養標示，蛋白質及碳水化合物含量分別為 37.4% 及 32.2%，因此實際碳氮比應為 5.84。

綜合上述結果及分析，將以最佳組合 A2 B3 C2，即 2.0% glucose，1.5% soybean powder，及 0.075% $MgSO_4$ 進行後續搖瓶培養時間及發酵槽試驗。

表十一 L9 (3³) 正交試驗試驗參數

Table 11 Experimental factors and their levels for orthogonal layout L9 (3³)

		Factors		
		A Glucose (%)	B Soybean powder (%)	C MgSO ₄ (%)
Levels	1	1.0%	0.5%	0.05%
	2	2.0%	1.0%	0.075%
	3	3.0%	1.5%	0.10%



表十二 菌絲體及胞外多醣產量之正交試驗結果

Table 12 Mycelial biomass and exopolysaccharide production from orthogonal experiment

Factors Trials	A Glucose	B Soybean powder	C MgSO ₄	Mycelial dry weight (g/l)	Exopolysaccharide (mg/l)
1	1	1	1	4.57 ± 0.03	138.76 ± 15.38
2	1	2	2	6.89 ± 0.06	219.66 ± 38.74
3	1	3	3	8.43 ± 0.07	329.46 ± 47.79
4	2	1	2	5.32 ± 0.05	202.11 ± 26.54
5	2	2	3	10.43 ± 0.04	214.50 ± 10.19
6	2	3	1	12.58 ± 0.16	421.94 ± 20.51
7	3	1	3	7.53 ± 0.14	197.14 ± 7.16
8	3	2	1	9.75 ± 0.38	182.25 ± 7.98
9	3	3	2	13.96 ± 1.01	499.66 ± 37.58

Exopolysaccharide

K ₁	229.30	179.34	247.65
K ₂	279.52	205.47	<u>307.15</u>
K ₃	<u>293.02</u>	<u>417.02</u>	247.03
R*	63.72	237.68	60.11

Mycelial dry weight

k ₁	6.63	5.81	<u>8.97</u>
k ₂	9.44	9.02	8.72
k ₃	<u>10.41</u>	<u>11.66</u>	8.79
r*	3.78	5.85	0.24

Experiments were carried out for 14 days at 25°C with initial pH 5.0 .

K_{XI} = the average yield of mycelia or exopolysaccharide in three experiment at Xi.

*R = K_{MAX} - K_{MIN}

*r = k_{MAX} - k_{MIN}

表十三 正交試驗胞外多醣產量結果變異數分析

Table 13 Analysis of variance of the orthogonal experiment for exopolysaccharides production

Variance source	Sum of square deviation (SS)	Degree of freedom (m)	Mean square (MS)	F ratio and significance level
Glucose	0.006	2	0.003	1.590
Soybean	0.102	2	0.051	25.098*
MgSO ₄	0.007	2	0.004	1.770
error	0.004	2	0.002	
total	0.120	8		

* $F_{ratio} > F_{0.05} = 19.0$



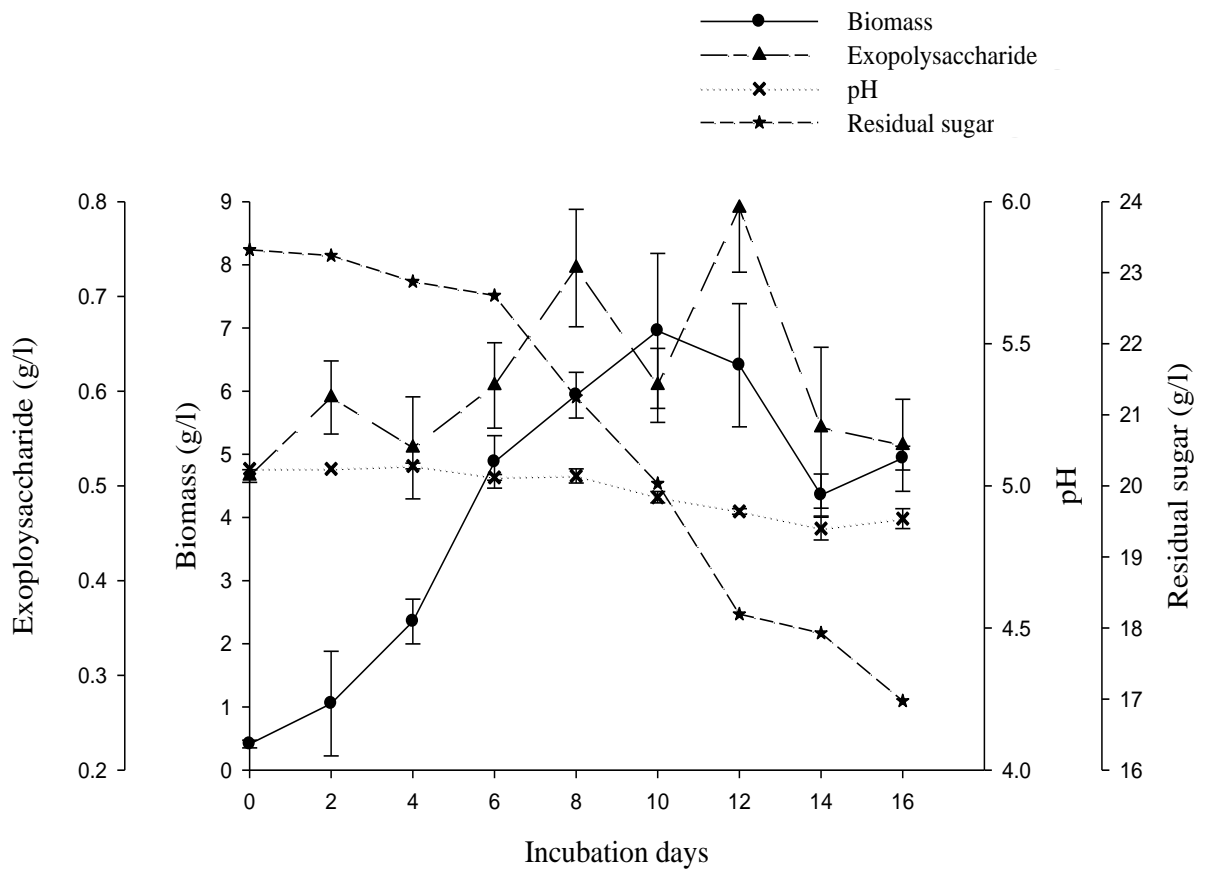
(六) 搖瓶培養時間對蜜環菌胞外多醣體生成之影響

本實驗採用前述實驗(一)~(五)所得最適胞外多醣體生成之培養條件，探討蜜環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 2.0% glucose, 1.5% soybean powder, 0.075% MgSO₄ 及 0.15% KH₂PO₄, 起始 pH 值 5.0), 培養溫度為 25°C。

圖八為 16 天培養期間搖瓶培養液中菌絲體生物質產量、胞外多醣體產量、pH 值與殘糖(葡萄糖)之變化情形。結果顯示，生物質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，生物質產量於第 10 天時達到最高(6.95 g/l)，此後隨培養時間增加而逐漸下降，至第 16 天時有再上升但因培養基流動性不佳因此無法再繼續後續天數之測定；而胞外多醣體產量則分別於第 8 天及第 12 天呈現二次產量高峰(0.73 g/l 及 0.79 g/l)，產量皆高於搖瓶試驗(pH 值、碳源、氮源及正交試驗)，其中第 12 天之胞外多醣產量(0.79 g/l)為基礎培養基產量(102.73 mg/l, 表九)之 7.69 倍(資料未列)。此結果顯示改用修飾培養基後可較基礎培養基增加蜜環菌胞外多醣產量。

生物質及胞外多醣產量開始下降的原因可能為 1. 培養基內葡萄糖消耗、菌體自家分解(autolysis)或轉而分解多醣所致。2. 培養後期搖瓶之菌絲體增加及流動性下降，使培養基質傳(溶氧量及營養濃度等)下降所致。

培養液殘糖(主要測定葡萄糖)及 pH 值會隨著培養時間的增加而有降低的趨勢，表示蜜環菌會消耗醣類(葡萄糖)用於菌體生長及胞外多醣之合成。pH 值下降原因可能為碳源被菌體代謝醣類產生酸性物質所致；培養末期葡萄糖仍未完全消耗，可能因培養基中含有其他碳源而使葡萄糖之利用率減少所導致。



圖八 搖瓶培養期間蜜環菌胞外多醣、菌絲體生物質、pH 值及殘糖量之變化。

Fig. 8 Changes of exopolysaccharide, mycelial biomass, pH and residual sugar by *A.mellea* during incubation in shake flask culture.

四、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。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（25°C，起始 pH 5），嘗試以三種不同型式發酵槽（攪拌式、氣泡式及氣舉式）進行蜜環菌之深層培養試驗，比較彼等對蜜環菌胞外多醣量之產量、產生時間及分子量分佈之影響，收槽時間以（12~14 天）菌絲體生長至取樣口無法取樣為止。

（一）胞外多醣體及菌絲體生物質產量之影響

圖九~圖十一分別為攪拌式、氣泡式及氣舉式發酵槽之發酵液於發酵期間胞外多醣體、菌絲體生物質 (biomass)、pH 值及殘糖（葡萄糖）之變化情形。

三種發酵槽胞外多醣體產量呈現有兩次產量高峰，此現象與搖瓶時間試驗時相同（圖八）；第一次高峰皆出現於培養後第 7~8 天（產量 0.45~0.57 g/l），但相較第 0 天起始多醣含量（0.43~0.48 g/l）差異並不大；胞外多醣體產量變化可能與殘糖之變化有關，由發酵液起始多醣含量顯示 soybean powder（1.5%）本身即含有大分子醣類，而由後續多醣體分子量測定結果（表十六，後詳述），顯示第一次高峰產生之多醣體大部分仍屬於 soybean powder 原本之大分子醣類；第二次高峰則出現於培養後第 11~13 天，後續多醣體分子量測定結果（表十六，後詳述）顯示，氣舉式及氣泡式組多醣體分子量近似 soybean powder 原本之大分子醣類，而攪拌式組多醣體分子量則完全不同於 soybean powder 原本之大分子醣類，因此可推論攪拌式組二次高峰之多醣皆

來自於蜜環菌本身所產生之胞外多醣體。綜上所述，以攪拌式組第二次高峰產生之胞外多醣產量 (0.43g/l, 第 13 天) 為三發酵槽組之最高胞外多醣產生組。

攪拌式及氣泡式發酵槽組生物質產量皆有兩次產量高峰，分別為培養後第 12、14 天及第 10、13 天 (圖九、圖十)，而氣舉式組只有一次高峰 (第 11 天, 圖十一)。攪拌式組產量高峰發生時間 (第 12、14 天) 較氣泡式組及氣舉式組 (第 10、13 天及第 11 天) 為慢，可能原因為攪拌產生之剪切作用使菌體生長受到延遲，此狀況也可解釋培養初期攪拌式組生物質產量會有下降情況之原因 (圖九)。攪拌式組培養初期生物質產量下降，雖與其他兩組生物質產量隨天數增加之現象不同，然培養後期仍會有增加的趨勢，但礙於取樣不便，培養至第十四天即收槽。氣舉式組因菌絲體生長速率較快速而使收槽時間提早，因此觀察不到二次高峰的產生。

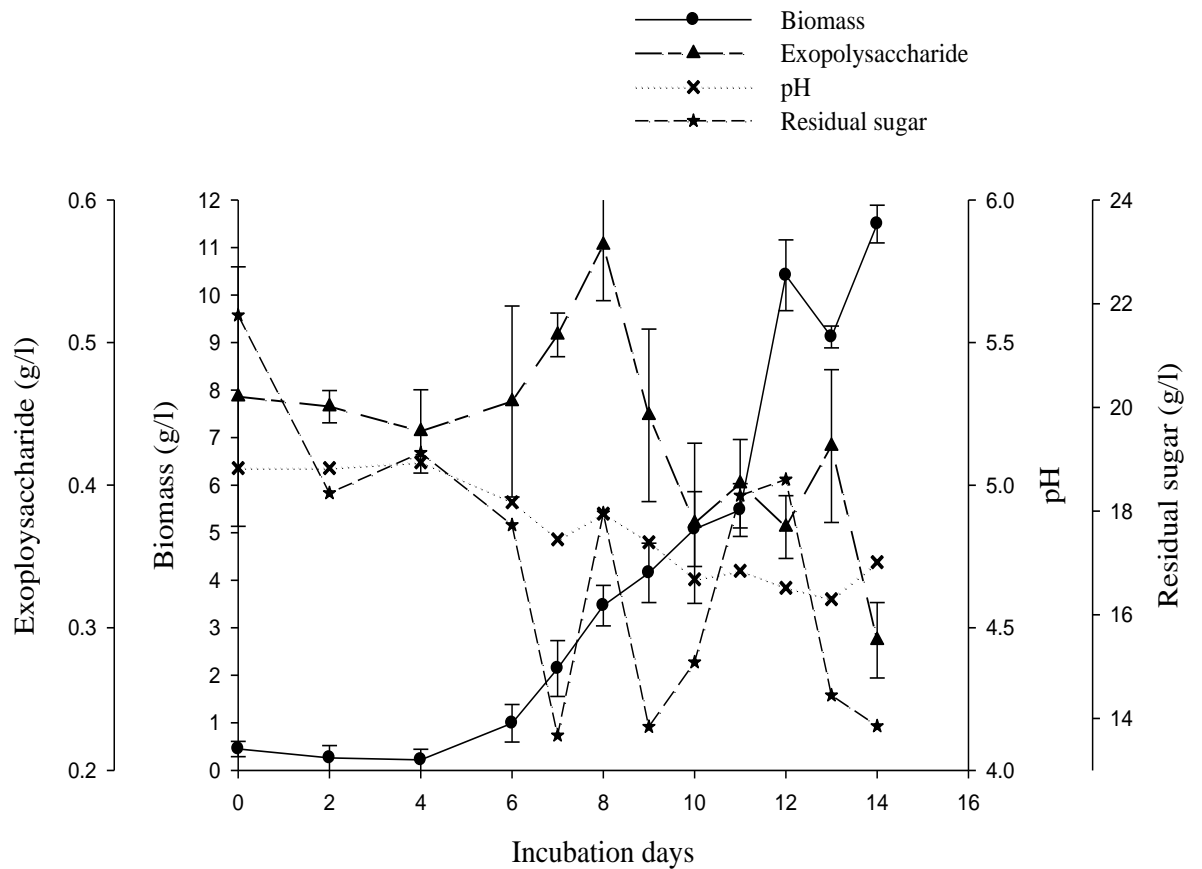
生物質產量以攪拌式最高 (11.49 g/l, 第 14 天), 其次為氣舉式 (9.76 g/l, 第 11 天) 及氣泡式 (9.53 g/l, 第 13 天), 皆高於搖瓶培養組 (6.95 g/l, 第 10 天), 而分別為搖瓶培養組之 1.65、1.4 及 1.37 倍 (資料未列)。三發酵槽組之生物質產量高峰時間 (11~14 天, 圖九~圖十一) 皆大於搖瓶試驗組 (10 天, 圖八)。以上結果顯示以修飾培養基及發酵槽擴大培養，可較搖瓶培養提高蜜環菌菌絲體生物質產量。

發酵液 pH 值變化結果顯示，攪拌式及氣泡式組有隨培養時間下降之趨勢 (圖九、圖十)，氣舉式組則呈現先降後升之現象 (圖十一)，但三組之 pH 值變化相較起始 pH 皆不超過 0.7。培養過程中可能因菌絲體生長消耗營養物質 (氮源及碳源) 產生之代謝物而產生 pH 起伏，原因可能有：1. 葡萄糖代謝產生酸性物質雖可使 pH 值下降，但同時消耗氮源過程也提升 pH 值。2. 葡萄糖消耗速率慢，酸性產物生成慢，pH 下降慢。3. 培養基本身 pH 緩

衝系統良好。

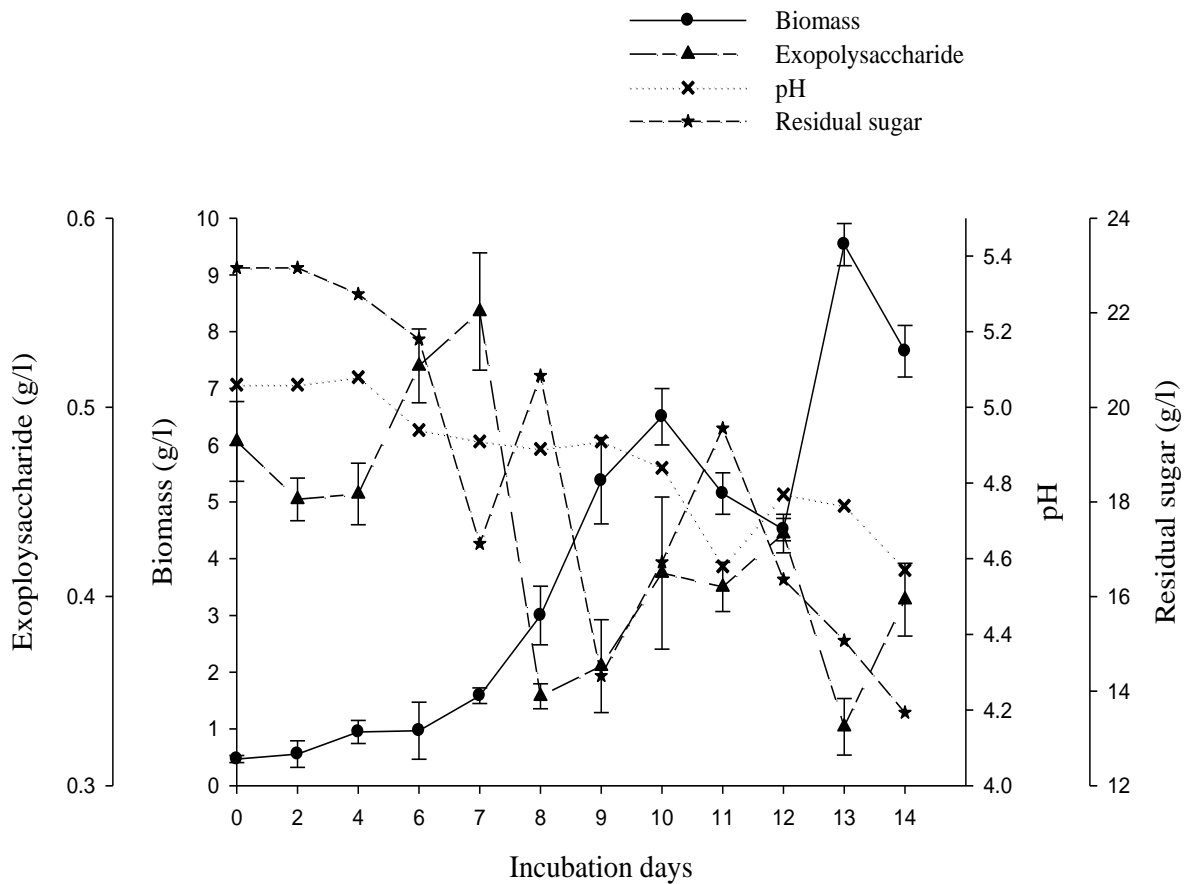
結果顯示三種發酵液中之殘糖量皆呈現起伏現象，且於收槽後殘糖仍未耗盡。此結果與吳 (2009) 深層培養桑黃菌 (*Phellinus linteus*) 及 Lung 等人 (2009) 深層培養蜜環菌之殘糖皆隨培養時間增加而減少之報告不同，推測原因可能與 soybean powder 本身亦含醣類 (寡糖、多醣及纖維素等) 有關，當其被當作碳源而分解成小分子單體時可能造成殘糖量上升，因此三種不同型式發酵槽在收槽後仍約有 14.55~14.16 g/l 殘糖。一般單醣的利用速率要比雙醣或多醣快，此次實驗殘糖尚未消耗前就先分解大分子醣類之原因不明，但推測可能因蜜環菌生長過程產生之水解酵素作用所導致。發酵液中存在多量殘糖，不僅為碳源之浪費還可能造成後續製成之產品需顧慮到消費族群的限制 (例如:糖尿病患者)，因此在將來可再對培養條件進行調整以降低收槽時殘糖之含量，方法包括: 1. 降低碳源 (葡萄糖) 添加量。2. 提高通氣量，催等人 (2006) 研究指出提高通氣量可增加舞菇 (*Grifola frondosa*) 對碳源的消耗。

圖十二為三種型式發酵槽培養期間發酵液中菌絲體顏色及外觀變化情形。結果顯示三種發酵槽原本乳白色發酵液 (圖十二- a) 隨培養天數增加至收槽皆轉變成深咖啡色。其中攪拌式組因攪拌作用菌絲體呈現均勻混濁狀 (圖十二- b)；氣泡式及氣舉式組 (圖十二- a、b) 則因培養後期大量菌絲體生成，導致流動性下降容易於發酵槽頂部槽壁及底部套筒與出氣口之間形成鬆散之塊狀區，使得發酵液呈現澄清深咖啡色。比較羅 (2008) 及吳 (2009) 三種型式發酵槽培養桑黃菌之菌絲球大小皆以攪拌式最小，推論因攪拌式之剪切力相對較大所造成。本實驗採較低之攪拌速率 (100 rpm)，希望降低剪切作用的傷害，結果顯示三發酵槽組之菌絲球大小並無太大差異，但以攪拌式之菌絲球形狀較規律；氣泡式及氣舉式組之菌絲球較鬆散 (圖十二)。



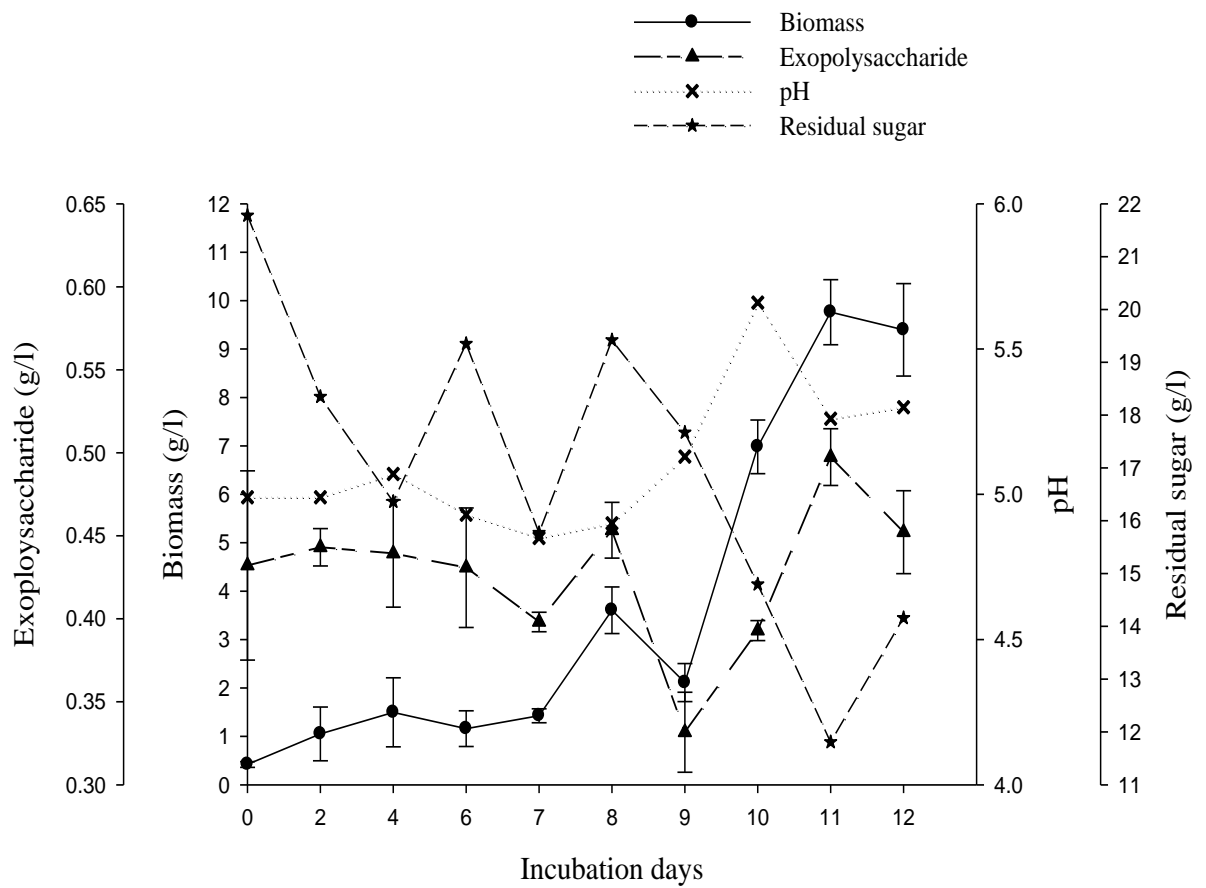
圖九 攪拌式發酵槽培養期間蜜環菌胞外多醣、菌絲體、pH 值及殘糖量之變化。

Fig. 9 Changes of exopolysaccharide, mycelial biomass, pH and residual sugar by *A.mellea* during incubation in stirred-tank fermentor.



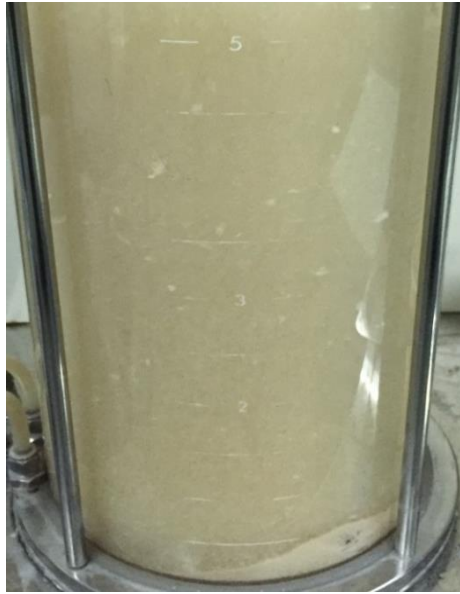
圖十 氣泡式發酵槽培養期間蜜環菌胞外多醣、菌絲體、pH 及殘糖量之變化。

Fig. 10 Changes of exopolysaccharide, mycelial biomass, pH and residual sugar by *A.mellea* during incubation in bubble column fermentor.



圖十一 氣舉式發酵槽培養期間蜜環菌胞外多醣、菌絲體、pH 值及殘糖之變化。

Fig. 11 Changes of exopolysaccharide, mycelial biomass, pH and residual sugar by *A.mellea* during incubation in air-lift fermentor.



(a)



(b)



(c)



(d)

圖十二 培養期間三種型式發酵槽蜜環菌菌絲體顏色及外觀之變化。
(a) 培養第 0 天。(b) 攪拌式發酵槽 (培養第 14 天)。
(c) 氣泡式發酵槽 (培養第 14 天)。
(d) 氣舉式發酵槽 (培養第 12 天)。

Fig. 12 Color and appearance changes of biomass by *A. mellea* during incubation in three different types of fermentors.
(a) day 0. (b) stirred-tank fermentor (day 14).
(c) bubble column fermentor (day 14).
(d) air-lift fermentor (day 12).

表十四為將蜜環菌於三種型式發酵槽(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,由於三種發酵槽之最高菌絲體生物質產量與最高胞外多醣產量皆發生於不同培養天數(圖九~圖十一),本實驗以胞外多醣最高產量之培養天數結果為主要考量。三種發酵槽之胞外多醣產量皆有二次高峰,其中攪拌式及氣泡式最高多醣體產量雖然出現於第一次高峰(圖九、圖十),但考慮其可能含大部分原本培養基中之大分子醣類(表十六,後詳述),因此三發酵槽皆以第二次胞外多醣產量高峰天數(第13、12及11天)之數值計算發酵參數(表十四)。

結果(表十四)顯示氣舉式組因具良好之溶氧及混合效果,可快速促進菌絲體的生成,因而具最高之比生長速率($\mu=0.48 \text{ day}^{-1}$);其次為攪拌式組($\mu=0.40 \text{ day}^{-1}$),攪拌式組雖具氣舉式組之優點,然其菌絲體生長曲線(圖九)較氣舉式組緩慢(圖十一)可能原因為其具有較高之剪切力,造成菌絲體部分傷害所致。氣泡式發酵槽可能因混合效果較其他兩組差,因此其比生長速率($\mu=0.33 \text{ day}^{-1}$)為三發酵槽組中最低。

胞外多醣體生成速率之結果(表十四)亦以氣舉式組最高($Q_p = 45 \text{ mg/l/day}$)、攪拌式組最低($Q_p = 33 \text{ mg/l/day}$),可能原因為氣舉式組第二產量高峰之胞外多醣仍含原修飾培養基中之多醣(表十六,後詳述),因而影響計算。

產率(yield)發酵參數中(表十四),比多醣產率($Y_{p/x}$)以氣舉式組最高($Y_{p/x} = 51 \text{ mg/g}$),但其多醣產率($Y_{p/s} = 50 \text{ mg/g}$)及菌絲體產率($Y_{x/s} = 0.98 \text{ g/g}$)卻為三發酵槽組中最低,顯示氣舉式發酵槽每單位菌絲體可生產較高之胞外多醣,但碳源轉換成菌絲體及胞外多醣之效率則較差;攪拌式組之菌絲體產率($Y_{x/s} = 1.45 \text{ g/g}$)為三發酵槽組中最高,然其比多醣產率($Y_{p/x} = 37 \text{ mg/g}$)卻為三發酵槽組中最低,顯示攪拌式組碳源轉換成菌絲體之效率較高,但每

單位菌絲體生產胞外多醣之效率則較差。

發酵過程中三種型式發酵槽之殘糖量皆有濃度上的波動（圖九~圖十一），攪拌式甚至出現三次之增幅（圖九），因此結果（表十四）中三發酵槽之多醣產率（ $Y_{p/s}$ ）及菌絲體產率（ $Y_{x/s}$ ）之計算值，可能高於實際值。

由於三發酵槽組發酵過程中皆呈現殘糖量波動、及氣泡式與氣舉式組發酵後期（第 12 天）皆仍含有原修飾培養基中之多醣（表十六，後詳述），因此影響本發酵參數實驗結果計算之精確度。故後續以影響程度較小之攪拌式組胞外多醣進行抗氧化及抑制癌細胞之生物活性試驗。



表十四 *A. mellea* 於及不同發酵槽培養時之發酵參數

Table 14 Fermentation parameters of different batch cultures of fermentors by *A. mellea*

Culture	P_{\max}^a	X_{\max}^b	μ^c	Q_p^d	$Y_{p/x}^e$	$Y_{p/s}^f$	$Y_{x/s}^g$	t^h
	g/l	g/l	day ⁻¹	mg/l/day	mg/g	g/g	g/g	day
Stirred-tank fermentor	0.43	11.49	0.40	33	37	58	1.45	13
Bubble column fermentor	0.43	9.53	0.33	36	45	66	1.21	12
Air-lift fermentor	0.50	9.76	0.48	45	51	50	0.98	11

a : maximal yield of exopolysaccharide

c : specific growth rate

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

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

b : maximal yield of biomass

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

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

h : days to reach maximal exopolysaccharide production

五、多醣體分子量測定

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 (10000、21700、47300、113000、210000、366000 及 805000 Da) 之標準曲線。由於樣品中存在分子量超過或低於標準曲線範圍內之胞外多醣，因此超出範圍之胞外多醣其分子量應視為外插預估值。

圖十三~圖十七為修飾培養基、搖瓶培養液及三種不同形式發酵槽發酵液中多醣體膠體層析法之分子量圖譜，彼等之分子量分析結果列於表十六。圖十三得知修飾培養基多醣體於滯留時間 5.78 分鐘時有一明顯波峰產生，比對多醣分子量標準曲線 (附圖五) 後得知其為等分子量 3.29×10^7 Da 之大分子醣類 (表十六)，其來源應來自於培養中之 soybean powder；搖瓶培養液 (培養第 12 天，圖十四)、攪拌式發酵液 (發酵第 8 天，圖十五-a)、氣泡式發酵液 (發酵第 8 天、12 天，圖十六-a、b) 及氣舉式發酵液 (發酵第 8 天、12 天，圖十七-a、b) 皆出現與此分子量近似之大分子醣類 (表十六)，因此推測蜜環菌於培養過程並未消耗或完全消耗此大分子醣類 ($2.75 \times 10^7 \sim 3.68 \times 10^7$ Da，表十六)。攪拌式發酵液發酵後期 (發酵第 13 天，圖十五-b) 則未測出此分子量之大分子醣類，表示攪拌發酵槽發酵後期 (第 13 天) 所產生之多醣體為蜜環菌本身所產生。而氣舉式發酵液發酵前、後期 (第 8 天、第 12 天) 測出之分子量 $2.75 \times 10^7 \sim 2.97 \times 10^7$ Da 大分子醣類 (表十六)，推測係來自於修飾培養基，但購買批次不同之 soybean powder 所致。

所有培養方式經過培養後，相較於原修飾培養基皆有新的胞外多醣產生(表十六)。三種型式發酵槽發酵後期(第 12~13 天)皆產生相對於發酵前期(第 8 天)較大分子量之胞外多醣(表十六)。攪拌式第 8 天產生胞外多醣之分子量為 2.04×10^4 Da(圖十五-a, 表十六)，但再發酵至第 13 天時產生四種不同分子量胞外多醣，由大至小依序為 1.99×10^7 、 5.48×10^5 、 3.27×10^4 及 3.72×10^3 Da(圖十五-b, 表十六)。氣泡式及氣舉式發酵槽發酵第 8 天及第 12 天皆產生分子量分布於 $3.93 \times 10^3 \sim 4.08 \times 10^3$ Da 之胞外多醣，但氣泡式發酵槽發酵第 12 天、氣舉式發酵槽發酵第 8 天及第 12 天則分別另產生分子量分別為 2.73×10^5 、 1.84×10^5 及 5.45×10^5 Da 之胞外多醣。

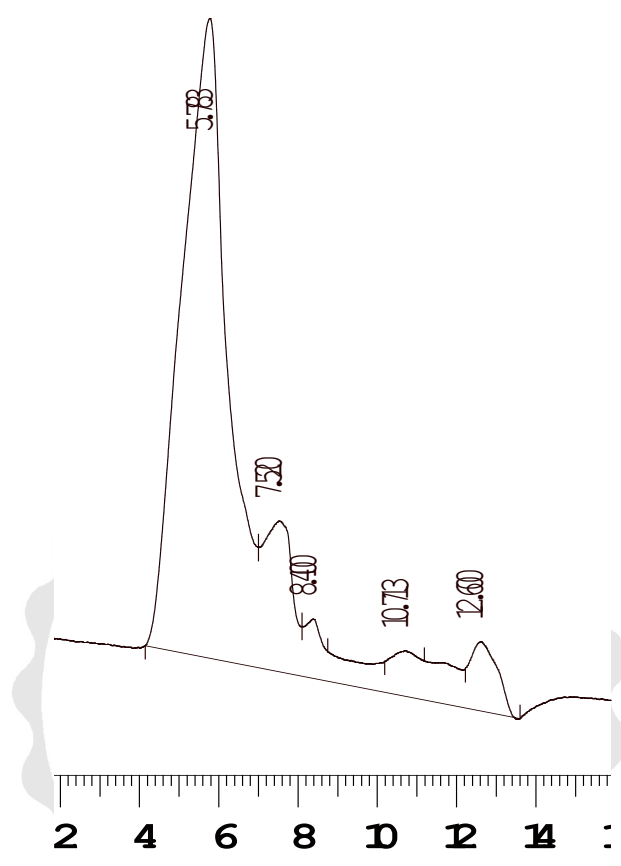
基於本研究以探討蜜環菌本身產生之胞外多醣的生物活性為目的，而三發酵槽中僅攪拌式發酵槽發酵前、後期胞外多醣分子量分佈不同，以及發酵後期之胞外多醣為蜜環菌本身產生，故後續以攪拌式發酵槽兩次產量高峰(發酵第 8 天及第 13 天)之胞外多醣及發酵液乙醇萃取物，進行彼等之抗氧化及抑制癌細胞能力試驗。

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

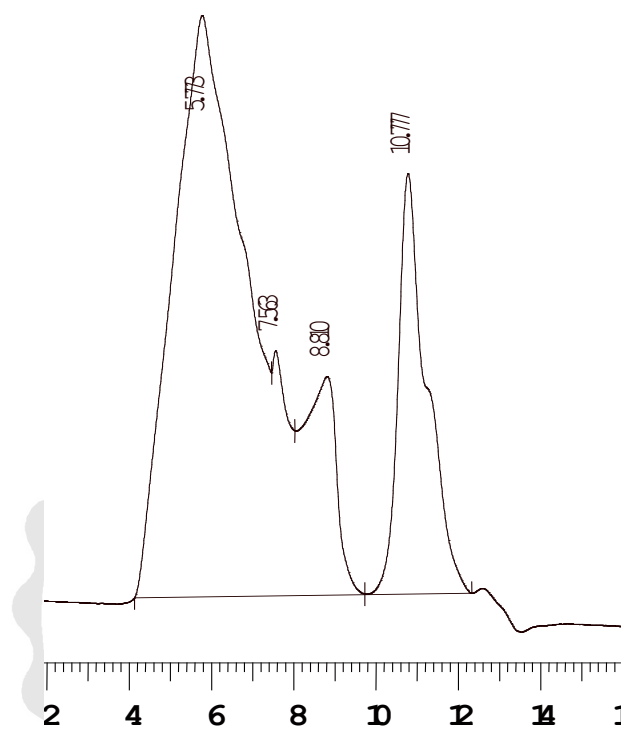
Table 15 Retention times of pullulan standards with different molecular weights by gel permeation chromatography.

Molecular weight (Da)	Retention time (min)	Log M.W.*
10000	10.659	4.00
21700	10.250	4.34
47300	9.920	4.67
113000	9.330	5.05
210000	9.052	5.32
366000	8.487	5.56
805000	7.977	5.91

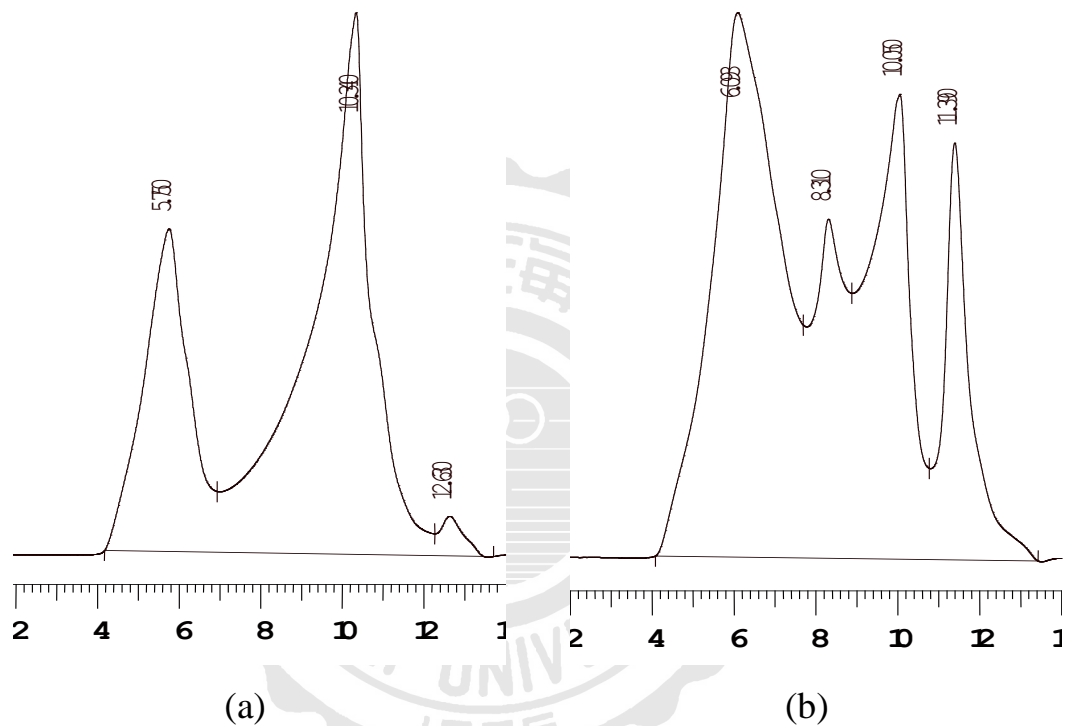
* Log molecular weight



圖十三 修飾培養基中多醣體膠體滲透層析法之分子量圖譜。
 Fig. 13 Molecular weight chromatogram of polysaccharide from modified medium by gel permeation chromatography.

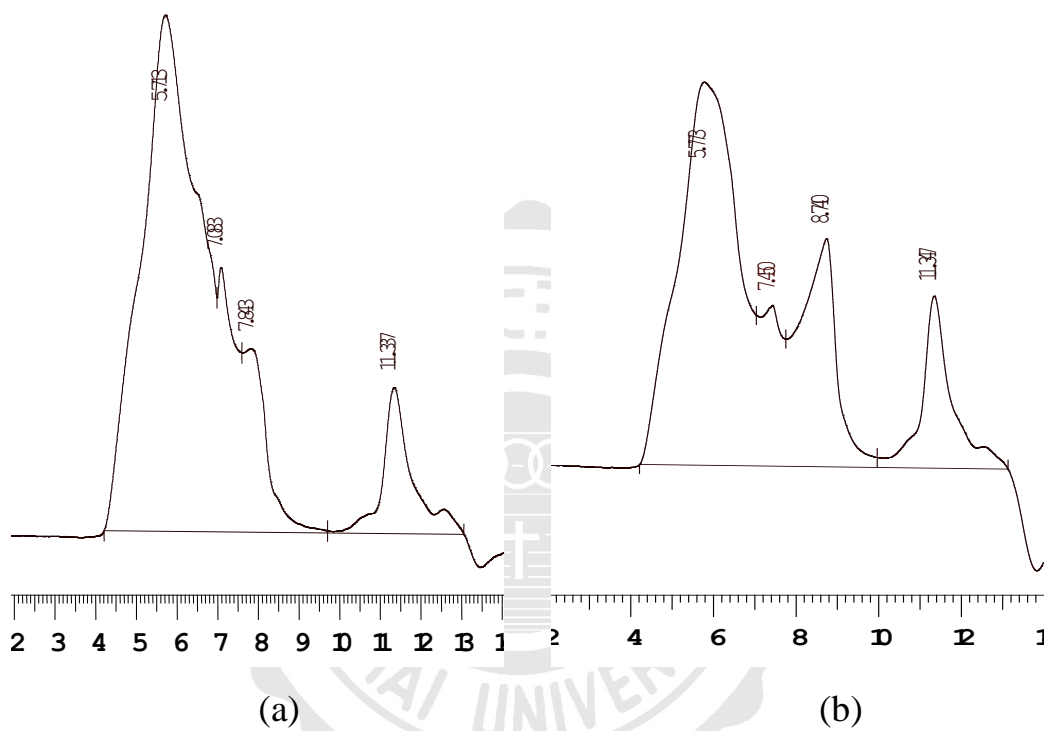


圖十四 搖瓶培養蜜環菌胞外多醣體膠體滲透層析法之分子量圖譜。
 Fig. 14 Molecular weight chromatogram of exopolysaccharides from *A. mellea* in shake flask by gel permeation chromatography.



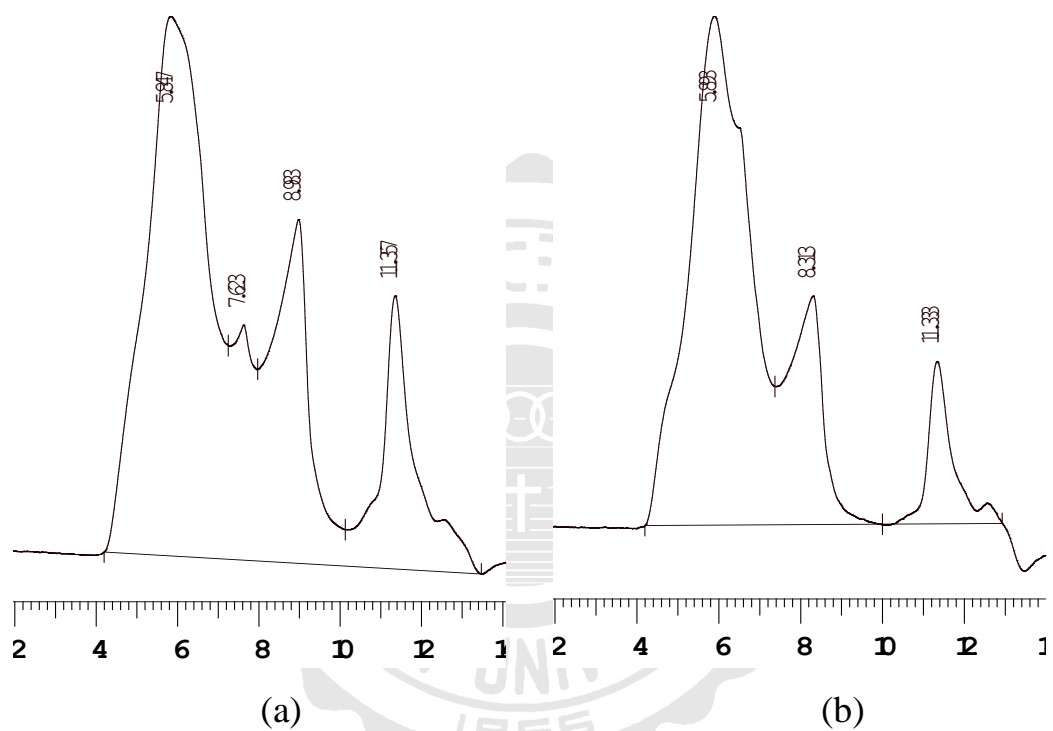
圖十五 攪拌式發酵槽蜜環菌胞外多醣體膠體滲透層析法之分子量圖譜。
 (a) 發酵第 8 天。 (b) 發酵第 13 天。

Fig. 15 Molecular weight chromatograms of exopolysaccharides from *A. mellea* in stirred-tank fermentor by gel permeation chromatography.
 (a) day 8 of fermentation, (b) day 13 of fermentation.



圖十六 氣泡式發酵槽蜜環菌胞外多醣體膠體滲透層析法之分子量圖譜。
 (a) 發酵第 8 天。 (b) 發酵第 12 天。

Fig. 16 Molecular weight chromatograms of exopolysaccharides from *A. mellea* in bubble column fermentor by gel permeation chromatography.
 (a) day 8 of fermentation. (b) day 12 of fermentation.



圖十七 氣舉式發酵槽蜜環菌胞外多醣體膠體滲透層析法之分子量圖譜。
 (a) 發酵第 8 天。 (b) 發酵第 12 天。

Fig. 17 Molecular weight chromatograms of exopolysaccharides from *A. mellea* in air-lift fermentor by gel permeation chromatography.
 (a) day 8 of fermentation. (b) day 12 of fermentation.

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
 Table 16 Estimation of molecular weights of exopolysaccharides from four different cultures by gel permeation chromatography.

Cultures	Day	Retention time (min)	Molecular weight (Da)
Modified medium	-	5.783	3.29×10^7
Shake flask	12	5.77	3.34×10^7
		8.10	2.44×10^5
		10.777	1.01×10^4
Stirred-tank fermentor	8	5.75	3.47×10^7
		10.34	2.04×10^4
	13	6.093	1.99×10^7
		8.31	5.48×10^5
		10.05	3.27×10^4
		11.39	3.72×10^3
Bubble column fermentor	8	5.713	3.68×10^7
		11.337	4.06×10^3
	12	5.773	3.34×10^7
		8.74	2.73×10^5
		11.347	3.99×10^3
Air-lift fermentor	8	5.847	2.97×10^7
		8.983	1.84×10^5
		11.353	3.93×10^3
	12	5.893	2.75×10^7
		8.313	5.45×10^5
		11.333	4.08×10^3

六、胞外多醣及發酵液乙醇萃取物抗氧化力之測定

本實驗以攪拌式發酵槽於兩次產量高峰天數（第 8 天及第 13 天）所得之胞外多醣體及發酵液乙醇萃取物，測定彼等之 DPPH 自由基清除能力及 ABTS 自由基清除能力。Lung (2011) 以甲醇及熱水萃取蜜環菌菌絲體，發現不同萃取方法會影響萃取物中抗氧化物質種類及含量，進而影響萃取物之抗氧化活性。另有研究指出以不同濃度乙醇或甲醇萃取植物性素材亦會影響萃取物中抗氧化物質之組成 (Tatiya *et al.*, 2011)。因此本次實驗分別以 50% 及 95% 乙醇萃取發酵液後，比較萃取物之抗氧化活性。萃取物樣品代號分別為 EtOH-50%-8 (50% 乙醇，第 8 天發酵液)、EtOH-50%-13 (50% 乙醇，第 13 天發酵液)、EtOH-95%-8 (95% 乙醇，第 8 天發酵液)、EtOH-95%-13 (95% 乙醇，第 13 天發酵液)。多醣體抗氧化機制目前尚未明確，但許多研究指出多醣結構之特性 (Huimin *et al.*, 2005) 或官能基種類及含量 (Yuan *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009) 會影響其抗氧化能力。本次實驗胞外多醣體樣品代號為 EPS-8 (第 8 天發酵液) 及 EPS-13 (第 13 天發酵液)。

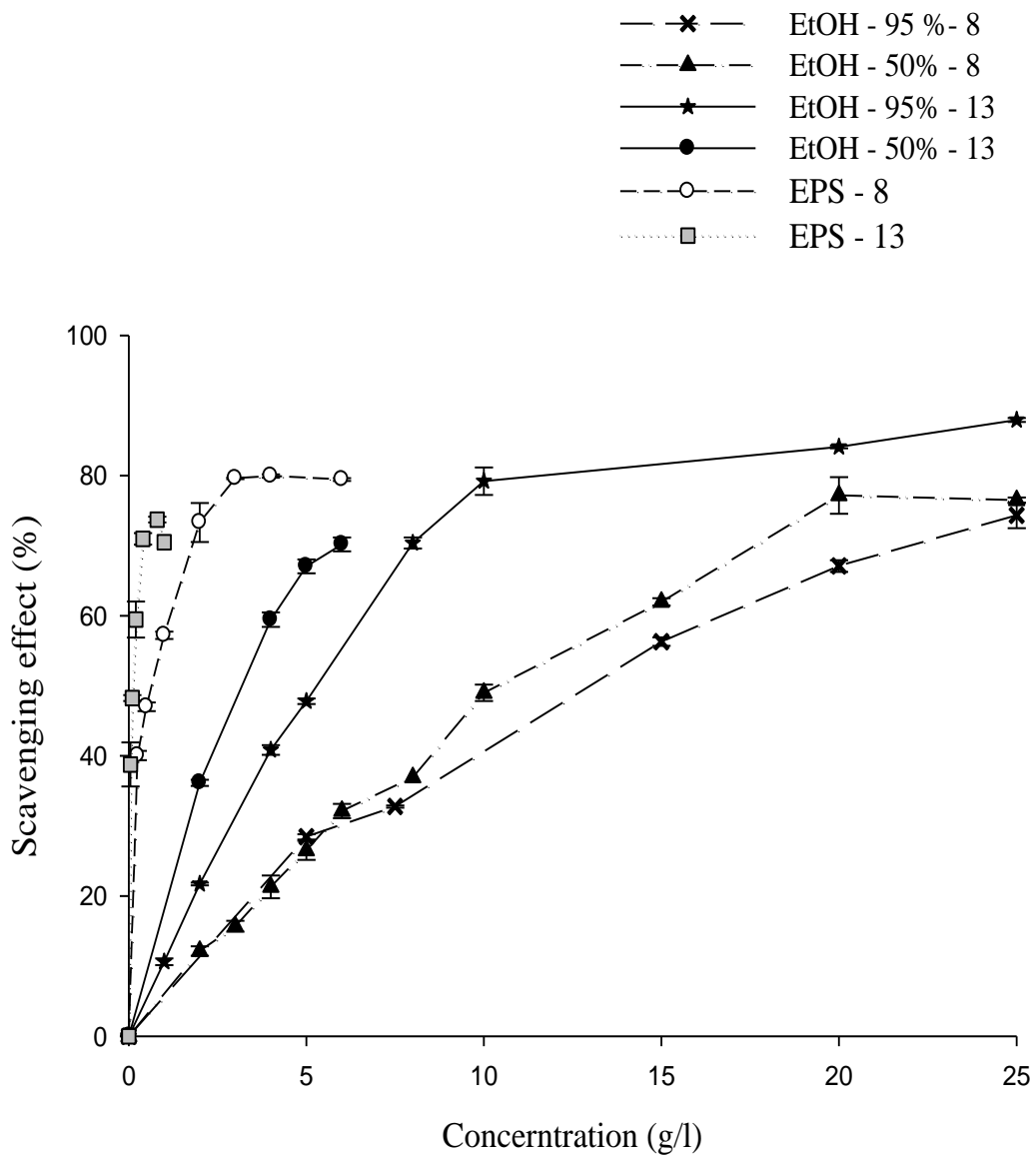
(一) DPPH 自由基清除能力測定

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)。

本實驗所有樣品皆先以預實驗測試 DPPH 自由基清除能力之濃度範圍，再個別訂定測定濃度，因 EPS-8、EPS-13 及 EtOH-50%-13 實驗組原液顏色較深，濃度過高會干擾分析結果，因此最高測定濃度分別訂為 6.0、1.0 及 6.0 g/l。

結果(圖十八)顯示兩種胞外多醣組及四種乙醇萃取物組之自由基清除能力皆隨濃度之增加而升高,其中胞外多醣組之升高速率皆大於乙醇萃取組。自由基清除能力 IC_{50} (清除 50% DPPH 自由基所需濃度) 之結果(表十七)亦顯示胞外多醣組之 IC_{50} 皆顯著 ($p < 0.05$) 低於乙醇萃取組。以上結果指出胞外多醣組之 DPPH 自由基清除能力大於乙醇萃取組。胞外多醣組中以 EPS-13 組之 IC_{50} (0.12 g/l) 顯著 ($p < 0.05$) 低於 EPS-8 組之 IC_{50} (0.70 g/l); 乙醇萃取組中則以 EtOH-50%-13 之 IC_{50} (3.22 g/l) 顯著 ($p < 0.05$) 低於其他三組 (5.42~13.76 g/l) (表十七)。

綜合上述結果得知胞外多醣組之 DPPH 自由基清除能力皆大於乙醇萃取組;胞外多醣組及乙醇萃取組皆以發酵後期(第 13 天)樣品之 DPPH 自由基清除能力大於發酵前期(第 8 天)之樣品;相同發酵天數 50% 乙醇萃取物組之 DPPH 自由基清除能力皆大於 95% 乙醇萃取物組;所有實驗中以 EPS-13 組具最強之抗氧化能力,其 IC_{50} (0.12 g/l) 分別相當於 4.99×10^{-3} 、 2.83×10^{-3} 及 2.92×10^{-3} g/l 之 trolox、ascorbic acid 及 α -tocopherol (表十七)。



圖十八 攪拌式發酵槽蜜環菌胞外多醣及發酵液乙醇萃取物之 DPPH 自由基清除能力。

Fig. 18 DPPH · scavenging effect of exopolysaccharides and ethanolic extracts from cultures of *A. mellea* using stirred-tank fermentor.

表十七 攪拌式發酵槽蜜環菌胞外多醣及發酵液乙醇萃取物清
DPPH 自由基之 IC₅₀

Table 17 The IC₅₀ of DPPH· scavenging effect of exopolysaccharides and ethanolic extracts from cultures of *A. mellea* using stirred-tank fermentor.

Samples	IC ₅₀ (g/l)*
EPS-8	0.70±0.01 ^E
EPS-13	0.12±0.00 ^F
EtOH-50%-8	11.72±0.13 ^B
EtOH-50%-13	3.22±0.05 ^D
EtOH-95%-8	13.76±0.06 ^A
EtOH-95%-13	5.42±0.03 ^C
Trolox (positive control)	4.99×10 ⁻³
Ascorbic acid (positive control)	2.83×10 ⁻³
α-tocopherol (positive control)	2.92×10 ⁻³

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$). Each value are expressed as Mean ± SE (n=3).

* IC₅₀ is defined as the total antioxidant necessary to decrease the initial DPPH by 50%.

(二) ABTS 自由基清除能力測定

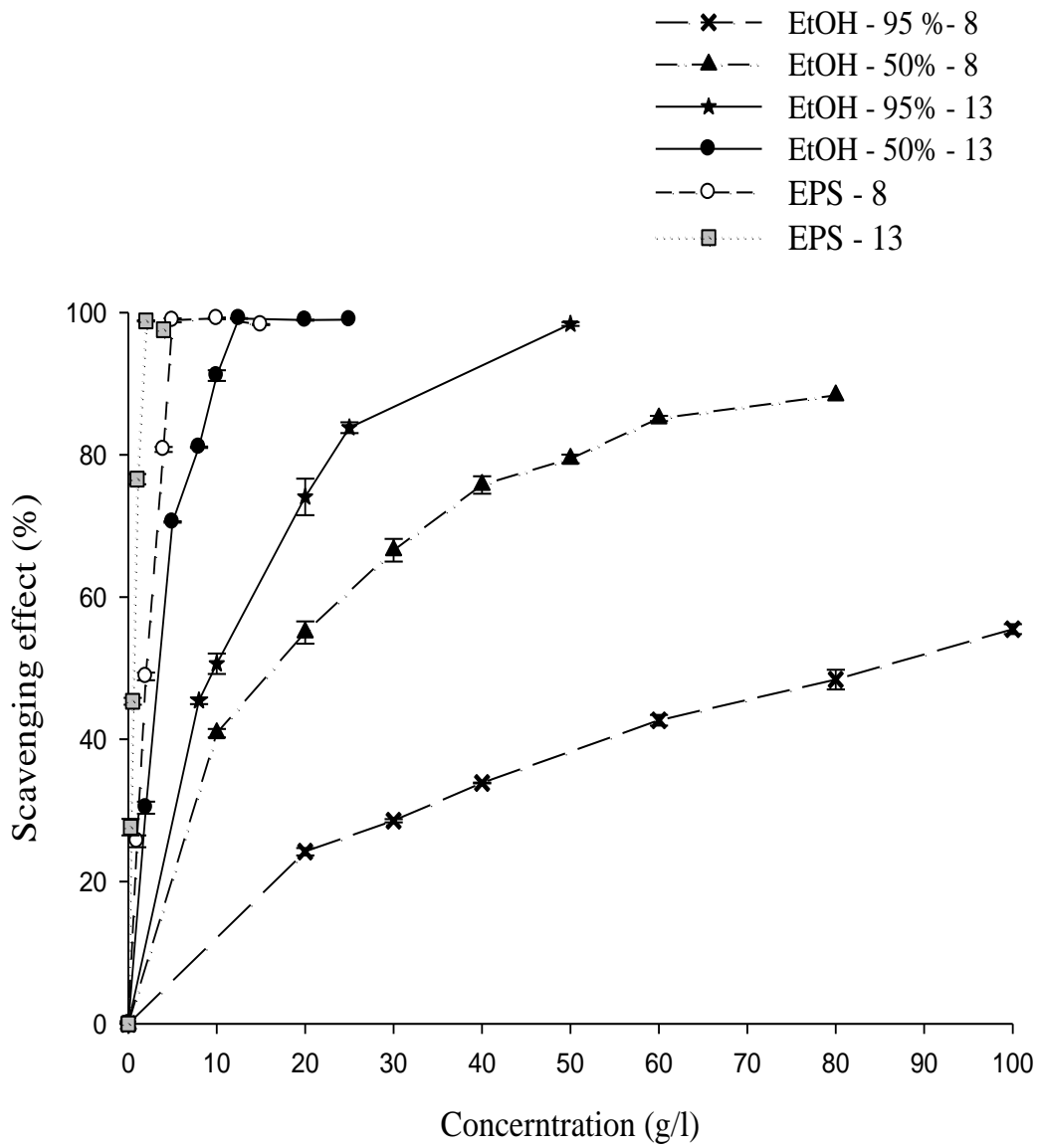
ABTS 會與 peroxidase 及 H_2O_2 反應形成藍綠色穩定之 $ABTS \cdot^+$ 陽離子自由基，加入抗氧化劑會減少 $ABTS \cdot^+$ 含量，使其在波長 734nm 下之吸光值降低。本實驗所有樣品皆先以預實驗測試 ABTS 自由基清除能力之濃度範圍，再個別訂定測定濃度，因 EtOH-50%-13、EPS-13 及 EPS-8 實驗組 ABTS 自由基清除能力強且前兩者原液顏色較深，濃度過高會干擾吸光值測定，因此 EtOH-50%-13 組只測定至 25 mg/ml，EPS-8 及 EPS-15 組只測定至 15 及 4.0 mg/ml。

結果（圖十九）顯示兩種胞外多醣及四種乙醇萃取物之 ABTS 自由基清除能力皆隨濃度之增加而升高，其中胞外多醣組之升高速率皆大於乙醇萃取組。自由基清除能力 IC_{50} （清除 50% DPPH 自由基所需濃度）之結果（表十八）亦顯示胞外多醣組之 IC_{50} 皆顯著（ $p < 0.05$ ）低於乙醇萃取組。以上結果指出胞外多醣組之 ABTS 自由基清除能力大於乙醇萃取組。胞外多醣組中 EPS-13 組之 IC_{50} (0.59 g/l) 顯著（ $p < 0.05$ ）低於 EPS-8 組 (2.30 g/l)，且於 5.0 及 2.0 g/l 濃度時，彼等之 ABTS 自由基清除能力皆可達 98% 以上（圖十九）；乙醇萃取組中以 EtOH-50%-13 之 IC_{50} (3.50 g/l) 顯著（ $p < 0.05$ ）低於其他三組 (9.82~83.63g/l)。

綜合上述結果得知胞外多醣組之 ABTS 自由基清除能力皆大於乙醇萃取物；胞外多醣組及乙醇萃取組皆以發酵後期（第 13 天）樣品之 ABTS 自由基清除能力大於發酵前期（第 8 天）之樣品；相同發酵天數 50% 乙醇萃取物組之 ABTS 自由基清除能力皆大於 95% 乙醇萃取物組；所有實驗組中以 EPS-13 組具最強之抗氧化能力，其 IC_{50} (0.59 g/l) 相當於 31.27×10^{-3} g/l 之 trolox（表十八）。

比較前述 (一)、(二) 實驗結果 (表十七、表十八) 可知: 1. DPPH 自由基清除能力與 ABTS 自由基清除能力皆為皆為 EPS-13 > EPS-8 > EtOH-50%-13 > EtOH-95%-13 > EtOH-50%-8 > EtOH-95%-8 ; 2. 胞外多醣與乙醇萃取組皆為發酵後期 (第 13 天) 樣品之抗氧化活性大於發酵前期 (第 8 天) 之樣品, 推論蜜環菌深層發酵後期相較於前期可產生更多之抗氧化物質。





圖十九 攪拌式發酵槽蜜環菌胞外多醣及發酵液乙醇萃取物之 ABTS 自由基清除能力。

Fig. 19 ABTS \cdot^+ scavenging effect of exopolysaccharides and ethanolic extracts from cultures of *A. mellea* using stirred-tank fermentor.

表十八 攪拌式發酵槽蜜環菌胞外多醣及發酵液乙醇萃取物清除
ABTS 自由基之 IC₅₀

Table 18 The IC₅₀ of ABTS ·⁺ scavenging effect of exopolysaccharides and ethanolic extracts from cultures of *A. mellea* using stirred-tank fermentor.

Samples	IC ₅₀ (g/l)*
EPS-8	2.30±0.06 ^D
EPS-13	0.59±0.01 ^E
EtOH-50%-8	16.80±0.91 ^B
EtOH-50%-13	3.50±0.20 ^D
EtOH-95%-8	83.63±1.97 ^A
EtOH-95%-13	9.82±0.48 ^C
Trolox (positive control)	31.27×10 ⁻³

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$). Each value are expressed as Mean ± SE (n=3).

* IC₅₀ is defined as the total antioxidant necessary to decrease the initial ABTS ·⁺ by 50%.

(三) 總酚含量

總酚含量 (total phenol) 於某些抗氧化力試驗中，具有高度相關性例如：氧自由基吸收能力 (oxygen radical absorbance capacity)、DPPH 自由基清除能力及 ABTS 自由基清除能力等 (Dubost *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Karaman *et al.*, 2010; Floegel *et al.*, 2011)。本實驗目的為測定胞外多醣及乙醇萃取物中之總酚含量，以了解其與樣品抗氧化能力之相關性。本實驗所用之胞外多醣體樣品未經純化，即使經 75% 乙醇多次清洗移除小分子物質，仍不排除多醣分子上鍵結其他化合物之可能性，因此亦將其進行總酚含量測定。

結果 (表十九) 顯示，胞外多醣組樣品 (EPS-8 及 EPS-13) 之總酚含量 (17.18~39.06 mg GAE/100 g extract) 皆顯著 ($p < 0.05$) 高於所有乙醇萃取組樣品 (3.94~8.51 mg GAE/100 g extract)，其中以 EPS-13 組之總酚含量 (39.06 mg GAE/100 g extract) 顯著 ($p < 0.05$) 高於其他實驗組，表示胞外多醣樣品存在鍵結或依附於多醣分子上之酚類化合物，因此推論胞外多醣樣品之抗氧化能力應有部分來自於其中所含之酚類化合物。結果亦顯示發酵後期 (第 13 天) 之胞外多醣及乙醇萃取組樣品之總酚含量皆顯著 ($p < 0.05$) 高於發酵前期 (第 8 天) 之樣品組，且 50% 乙醇萃取組之總酚含量高於 95% 乙醇萃取組 (表十九)。

表二十為兩種抗氧化能力測定方法與樣品總酚含量之相關性。相關性用於評估兩者間之影響程度，以相關係數 (r) 表示， r 數值範圍為 1 ~ -1，愈接近 1 則表示正相關性愈高；愈接近 -1 則表示負相關性愈高。結果顯示，樣品總酚含量與其 DPPH 自由基清除能力及 ABTS 自由基清除能力之 IC_{50} 分別為高度負相關性 ($r = -0.7085$) 及中度負相關性 ($r = -0.4408$)，但在統計上皆無顯著相關性 (資料未列)，這說明總酚含量不是影響抗氧化能力的一個主要因素。可能原因為樣品存在其他抗氧化物質，菇類常見之抗氧化物質包括生育醇 (tocopherols)、抗壞血酸 (ascorbic acid) 及類胡蘿蔔素 (carotenoids) 等 (Ferreira *et al.*, 2009)，麥角硫因 (ergothioneine) 亦是菇類富含之抗氧化物質 (Lee *et al.*, 2009)。

表十九 蜜環菌胞外多醣及發酵液乙醇萃取出之總酚含量。
 Table 19 Total phenol contents in exopolysaccharides and ethanolic extracts of cultures from *A. mellea*.

Samples	Total phenol content (mg GAE/100 g extract)
EPS-8	17.18±0.19 ^B
EPS-13	39.06±0.25 ^A
EtOH-50%-8	4.25±0.05 ^E
EtOH-50%-13	8.51±0.25 ^C
EtOH-95%-8	3.94±0.09 ^E
EtOH-95%-13	4.65±0.08 ^D

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$). Each value is expressed as mean \pm SD (n=3).

* The results were expressed in milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per 100 grams of extract.

表二十 總酚含量與抗氧化力測定之相關性

Table 20 Correlation between total phenol contents and antioxidant assays.

Samples	IC ₅₀ (g/l)	
	DPPH · scavenging ability	ABTS · ⁺ scavenging ability
EPS-8	0.70±0.01 ^E	2.30±0.06 ^D
EPS-13	0.12±0.00 ^F	0.59±0.01 ^E
EtOH-50%-8	11.72±0.13 ^B	16.80±0.91 ^B
EtOH-50%-13	3.22±0.05 ^D	3.50±0.20 ^D
EtOH-95%-8	13.76±0.06 ^A	83.63±1.97 ^A
EtOH-95%-13	5.42±0.03 ^C	9.82±0.48 ^C
Correlation coefficient (r)	-0.7085	-0.4408

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$). Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

七、 癌細胞存活率試驗

本試驗採用 Alamar blue assay 方法測定蜜環菌胞外多醣及發酵液乙醇萃取物，對正常小鼠肝細胞（FL83B）及人類肝癌細胞（HepG2）之抑制生長的能力。樣品抑制癌細胞能力以癌細胞經過樣品處理（5% CO₂/37°C/24hr）後之細胞存活率（cell viability, %）表示，樣品抑制能力越強，細胞存活率越低。

實驗所用樣品之代號同前。主要比較蜜環菌發酵培養前期（第 8 天）及後期（第 13 天）產物之抑制癌細胞活性。

（一） 胞外多醣及發酵液乙醇萃取物對小鼠肝細胞（FL83B）

存活率之影響

本實驗目的為測定胞外多醣及發酵液乙醇萃取物對正常細胞之毒殺能力。Beattie 等人 (2011) 測定多種真菌子實體萃取物之抑制癌細胞活性，發現部分真菌萃取物之細胞毒殺能力不具選擇性，即對於多種癌細胞具有細胞毒殺活性，但對正常細胞亦具抑制生長之能力。

結果（表二十一）顯示，胞外多醣及發酵液乙醇萃取物處理組（劑量 1000 µg/ml）皆與無樣品處理之控制組無顯著 ($p < 0.05$) 差異，表示樣品對於正常小鼠肝細胞無毒殺能力，因此於此劑量以下之測定濃度無正常細胞毒殺活性之顧慮。

表二十一 蜜環菌胞外多醣及發酵液乙醇萃取物對小鼠肝細胞 (FL83B) 存活率之影響

Table 21 Cell viability of FL83B cells treated with exopolysaccharide and ethanolic extracts from cultures of *A. mellea*.

Samples*	Cell viability (%)
EPS-8	99.94±1.56 ^a
EPS-13	99.85±0.91 ^a
EtOH-50%-8	101.96±1.65 ^a
EtOH-50%-13	98.66±2.07 ^a
EtOH-95%-8	100.76±0.46 ^a
EtOH-95%-13	98.84±0.78 ^a
Control **	100.0±1.07 ^a

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

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

* Samples with a concentration of 1000 µg/ml.

** Medium without any added sample.

(二) 胞外多醣對人類肝癌細胞 (HepG2) 存活率之影響

圖二十為胞外多醣對人類肝癌細胞存活率之影響，結果顯示肝癌細胞之存活率皆隨樣品濃度增加而降低；於濃度 125~1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，所有樣品組之細胞存活率皆顯著 ($p<0.05$) 低於未添加樣品之對照組。於最高劑量 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，EPS-8 及 EPS-13 樣品組之細胞存活率 (56.65% 及 43.70%) 皆極顯著 ($p<0.01$) 低於對照組 (表二十二，圖二十)。此外，EPS-13 各劑量組之細胞存活率皆低於 EPS-8 各劑量組，顯示發酵後期 (第 13 天) 之胞外多醣 (EPS-13) 抑制肝癌細胞生長活性較發酵前期 (第 8 天) 之胞外多醣 (EPS-8) 高。

由多醣體分子量測定結果 (表十六) 顯示，EPS-13 含有三種胞外多醣，彼等之分子量 (3.27×10^4 、 5.48×10^5 及 1.99×10^7)，皆高於 EPS-8 之胞外多醣分子量 (2.04×10^4 Da)。Zhuang 等人 (1993) 研究顯示，分子量相對較大的多醣其抗腫瘤活性較高，與本實驗結果相同。

(三) 發酵液乙醇萃取物對人類肝癌細胞 (Hep G2)

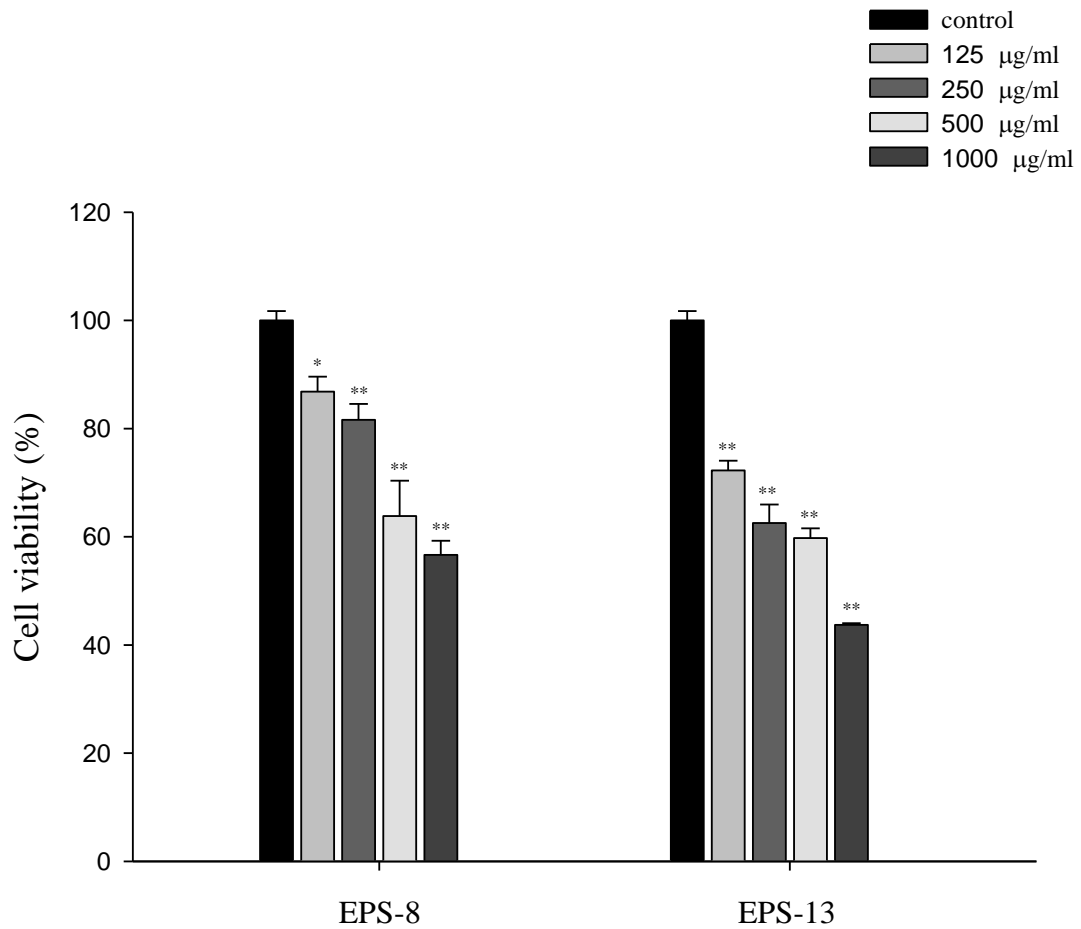
存活率之影響

圖二十一結果顯示肝癌細胞之細胞存活率皆隨著樣品濃度增加而降低，於濃度 250~1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，所有樣品組之細胞存活率皆顯著 ($p<0.05$) 低於未添加樣品之對照組。於最高劑量 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，所有樣品組之細胞存活率 (36.38~62.2%) 皆極顯著 ($p<0.01$) 低於對照組 (表二十二，圖二十一)，其中以 EtOH-95%-13 組細胞存活率最低 (36.38%)。此外，發酵後期 (第 13 天) 各劑量組之細胞存活率皆低於發酵前期 (第 8 天) 各劑量組 (圖二十一)，顯示發酵後期之乙醇萃取物抑制肝癌細胞生長活性較發酵前期之乙醇萃取物高；EtOH-95%-13 各劑量組之細胞存活率皆低於 EtOH-50%-13 各劑量組 (圖二十一)，顯示發酵液 95% 乙醇萃取物相對於 50% 乙醇萃取物，有更高的肝癌細胞

抑制活性。

綜合以上 (二)、(三) 實驗結果顯示，無論胞外多醣或發酵液乙醇萃取物，皆以發酵後期產物之抑制肝癌細胞活性較好，主要原因為蜜環菌培養後期產生之胞外多醣分子量分布較培養前期大 (表十六)，且一般培養後期產生之次級代謝物 (secondary metabolites) 也較培養前期多；Zhong and Xiao (2009) 指出高等真菌之次級代謝物具有許多生物活性。





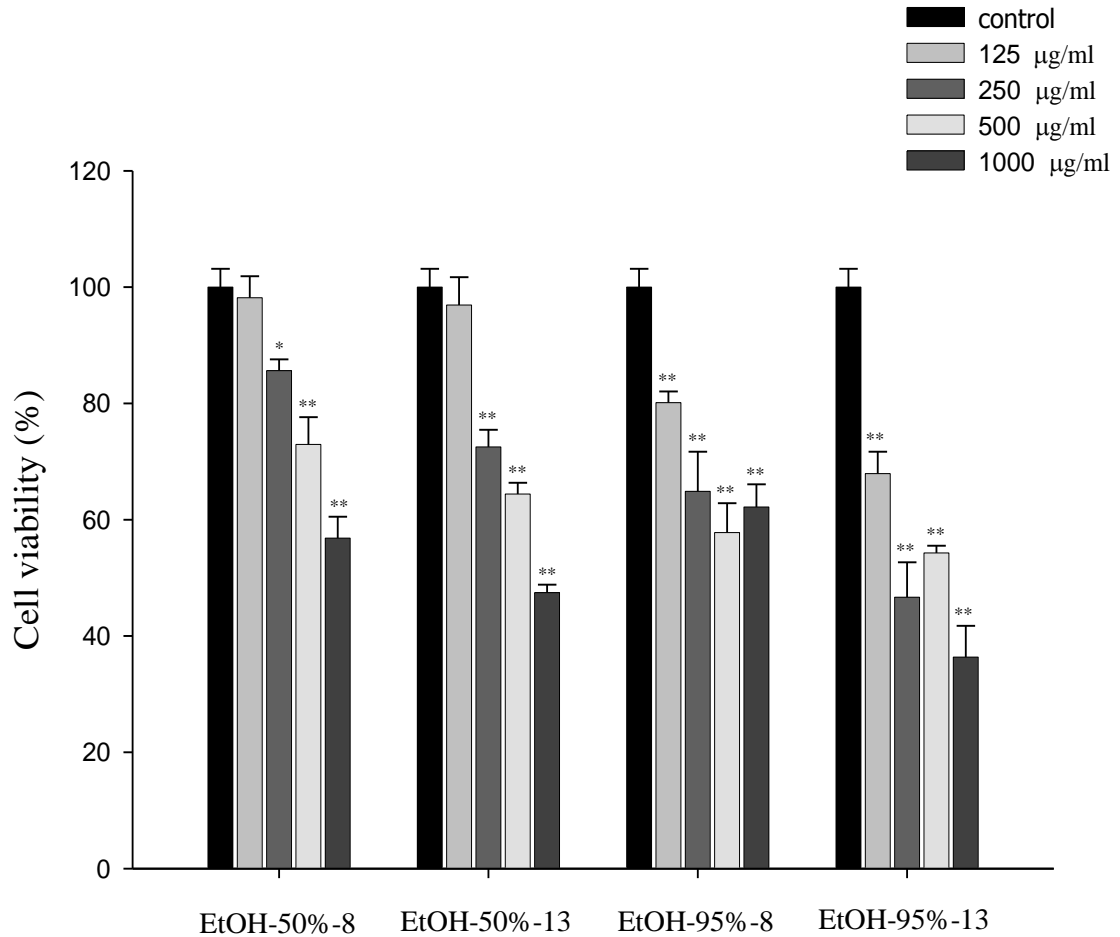
圖二十 不同濃度蜜環菌之胞外多醣體對人類肝癌細胞 (HepG2) 存活率之影響。

Fig. 20 Cell viability of HepG2 cells treated with various concentrations of exopolysaccharide from cultures of *A. mellea*.

Each value is expressed as mean \pm SD (n=3).

*Significantly different from control ($p < 0.05$).

**Significantly different from control ($p < 0.01$).



圖二十一 不同濃度蜜環菌發酵液乙醇萃取物對肝癌細胞 (HepG2) 存活率之影響

Fig. 21 Cell viability of HepG2 cells treated with various concentrations of ethanolic extracts from cultures of *A. mellea*.

Each value is expressed as mean \pm SD (n=3).

*Significantly different from control ($p < 0.05$).

**Significantly different from control ($p < 0.01$).

*

表二十二 蜜環菌胞外多醣及發酵液乙醇萃取物對肝癌細胞 (HepG2) 存活率之影響

Table 22 Cell viability of HepG2 cells treated with exopolysaccharide and ethanolic extracts from cultures of *A. mellea*.

Samples*	Cell viability (%)
EPS-8	56.65±2.62 ^B
EPS-13	43.70±0.33 ^C
EtOH-50%-8	56.82±3.70 ^B
EtOH-50%-13	47.45±1.36 ^C
EtOH-95%-8	62.20±3.90 ^B
EtOH-95%-13	36.38±5.38 ^D
Control **	100.0±2.87 ^A

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

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

* Samples with a concentration of 1000 µg/ml.

** Medium without any added sample.

伍、結論

一、平板培養基試驗

PDA (potato dextrose agar) 經額外添加 (0.5 % , w/v) corn steep liquor 可明顯增加蜜環菌菌索生長密度及具分生能力之年輕菌索。

二、種源培養基試驗

PDB 添加 0.5% (w/v) silkworm pupa powder 可顯著 ($p < 0.05$) 提高菌絲體產量 (9.5 g/l)，且菌絲球顏色為乳白色，顯示其菌絲球仍處於未老化的狀態，因此決定以該液態培養基做為種源培養基。

三、搖瓶試驗

1. 最適蜜環菌胞外多醣體生成之培養條件：培養溫度為 25°C、起始 pH 值為 5.0、碳源為 glucose (2.0% , w/v)、氮源為 soybean powder (1.5% , w/v)、無機鹽類為 $MgSO_4$ (0.075% , w/v) 及 KH_2PO_4 (0.15% , w/v)。
2. 以最適條件進行搖瓶培養，分別於培養第 10 天及第 12 天時可得最高菌絲體及胞外多醣體產量 (6.95 及 0.79 g/l)，其中胞外多醣產量皆高於各單因子試驗之結果，且為基礎培養基產量 (102.73 mg/l) 之 7.69 倍。

四、不同型式發酵槽培養試驗

1. 三發酵槽組僅攪拌式組發酵後期發酵液中無原修飾培養基之大分子醣類，因此以攪拌式組第二次高峰產生之胞外多醣產量 (0.43g/l，第 13 天) 為三發酵槽組之最高胞外多醣產生組。

2. 氣舉式組因具良好之溶氧及混合效果，可快速促進菌絲體的生成，因而具最高之比生長速率 ($\mu=0.48 \text{ day}^{-1}$)；氣泡式組可能因混合效果較其他兩組差，因此其比生長速率 ($\mu=0.33 \text{ day}^{-1}$) 為三發酵槽組中最低。
3. 三發酵槽組中僅攪拌式組發酵後期之胞外多醣完全為蜜環菌本身所產生，故以攪拌式組胞外多醣進行後續生物活性試驗。

五、多醣體分子量之測定

1. 修飾培養基存在一來自 soybean powder、分子量為 $3.29 \times 10^7 \text{ Da}$ 之大分子醣類。除攪拌式組發酵後期 (第 13 天) 外，搖瓶、攪拌式組發酵初期、氣泡式及氣舉式組發酵前、後期皆出現與此分子量近似之大分子醣類。
2. 攪拌式發酵槽培養第 13 天時產生四種蜜環菌本身產生之胞外多醣，分子量介於 $3.72 \times 10^3 \sim 1.9 \times 10^7 \text{ Da}$ 。

六、胞外多醣及發酵液乙醇萃取物抗氧化力之測定

1. DPPH 自由基清除能力與 ABTS 自由基清除能力之測定結果相同，皆為 $\text{EPS-13} > \text{EPS-8} > \text{EtOH-50\%-13} > \text{EtOH-95\%-13} > \text{EtOH-50\%-8} > \text{EtOH-95\%-8}$ 。亦即胞外多醣抗氧化能力皆大於乙醇萃取物；發酵後期 (第 13 天) 樣品之抗氧化活性皆大於發酵前期 (第 8 天) 之樣品；相同發酵天數之發酵液乙醇萃取物之 50% 乙醇萃取物抗氧化能力皆大於 95% 乙醇萃取物。
2. 胞外多醣樣品 EPS-8 及 EPS-13 仍存在鍵結或依附於多醣分子上之酚類化合物，因此也提供部分抗氧化活性。

七、 癌細胞存活率試驗

1. 肝癌細胞之細胞存活率皆隨胞外多醣及發酵液乙醇萃取物樣品濃度增加而降低，於最高劑量 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，細胞存活率皆極顯著 ($p<0.01$) 低於未添加樣品之對照組。細胞存活率以 EtOH-95%-13 組最低 (36.38%)。
2. 胞外多醣及發酵液乙醇萃取物，皆以發酵後期 (第 13 天) 之樣品抑制肝癌細胞能力高於發酵前期 (第 8 天) 之樣品。
3. 發酵液 95% 乙醇萃取物萃取物之抑制肝癌細胞活性皆大於 50% 乙醇萃取物。



陸、參考文獻

- 水野卓，川合正允。賴慶亮譯。1999。菇類的化學、生化學。國立編譯館，台北，台灣。
- 王伯徹，陳啟楨、華傑。2006。食藥用菇類的培養與應用。食品工業發展研究所，新竹，台灣。
- 王伯徹。2005。食品工業。37(5):1-9。
- 王偉，何國慶，金英哲，陳啟，劉彩琴。2006。蠶蛹蛋白的綜合利用現狀分析和開發前景展望。食品與工業發酵，23(9):112-115。
- 王培銘，黃定國。2001。氣動攪拌式發酵槽。食品工業，33(11):13-26。
- 王惠國，馮寶明。2009。蜜環菌多糖免疫調節活性的實驗研究。陝西科技大學學報自然科學版，27(2):62-64。
- 王敦，白耀宇，張傳溪。2004。家蠶蛹營養成分及其開發利用研究進展。昆蟲知識，41(5):418-421。
- 王漢臣。2010。世界蜜環菌屬系統學研究進展。重慶師範大學學報自然科學版，27(1):61-68。
- 卯曉嵐。2000。中國大型真菌。477-479。
- 吳子瑋。2009。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。私立東海大學食品科學系研究所碩士論文。台中，台灣。
- 沈明來。2010。試驗設計學 (第4版)。九州圖書文物有限公司。台北，台灣。
- 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。
- 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。
- 李長田，刁盈盈，毛欣欣，李玉。2012。松茸液態發酵菌絲生長量因子之研究。菌物學報。39(2):153-161。
- 汪釗，魏春，應向賢，岑沛霖。2013。微生物工程。科學出版社。中國 北京。

- 林夢感，楊義芳，李永輝。2007。多糖抗腫瘤活性構效關係的研究進展。中草藥。38(6):949-953。
- 唐玉玲，溫魯，李芬。2006。猴頭菌絲體中氨基葡萄糖的測定。時珍國醫國藥。17(12):2428-2429。
- 崔鳳杰，陶文沂，許泓瑜，許正宏，敖宗華。2006。攪拌轉速和通氣量對灰樹花深層發酵培養的影響。食品與生物技術學報。25(4):67-80。
- 張海元，賀曉青。2006。腦珍（複方天麻蜜環菌片）治療血管性痴呆的臨床研究。中國醫藥論壇。4(3):14-16。
- 張嗣良，王永紅，王澤建，莊英萍，陳長華，杭海峰，宮衡，夏建業，錢江潮，郭美錦，黃明志，儲炬。2013。發酵工程原理。高等教育出版社。中國 北京。
- 梁峙。2001。食用菌深層液體發酵參數控制的研究。食品科學。22(1):38-241。
- 許寶奎。2010。蜜環菌菌索多糖降血糖作用機理的研究。安徽大學生物化學與分子生物學系碩士論文。
- 郭俊麟。2012。固態發酵與深層培養桑黃菌 *Phellinus linteus* 萃取物抗氧化及抗腫瘤活性之研究。私立東海大學食品科學系研究所碩士論文。台中，台灣。
- 郭順星，徐錦棠。1992。蜜環菌索發育的研究。真菌學報。11(4):308。
- 彭述敏，陳玉惠，程立君，蔣仕坤，馮小飛。2010。中國食用菌。29(4):22-25。
- 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。
- 楊淑雲，林遠崇，羿紅，王琛，楊永彬，蘭家細。2007。珍稀食藥用菌-蜜環菌的開發與應用。生物學雜誌，24(3):52-54。
- 虞磊，沈業壽，繆化春。2006。天麻多糖與蜜環菌多糖抗眩暈症作用研究。中國中醫藥信息雜誌，13(8):26-36。
- 劉嵐，馮亦璞。1993。AMG-1 和腺苷對大鼠腦突觸體麩胺酸釋放的影響。藥學學報。28(12):881-885。

- 劉景聖，袁媛，田忠華。2003。蜜環菌的活性成分研究及其在功能性食品中的應用菌物學報。24(6) : 165-168。
- 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。台中，台灣。
- 韓德權，王華，趙輝，孫玉梅，王莘，李沖偉，姜雲，賈樹彪，董浩。2013。微生物發酵工藝學原理。化學工業出版社，中國，北京。
- 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。台中，台灣。
- Amin, I., Zamaliah, M. M. and Chin, W. F. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. Food Chem. 87(4) : 581-586
- Arnao, M. B., Cano, A., Hernandez-Ruiz, J., Garcia-Canovas, F. and Acosta, M. 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.
- Aruoma, O.I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidant. Food chem. Toxicol. 32 : 671-683.
- Beattie, K. D., Ulrich, R., Grice, I. D., Uddin, S. J., Blake, T. B., Wood, K. A., Steele J., Iu, F., May, T. W., and Tiralongo, E. 2011. Ethanolic and aqueous extracts derived from Australian fungi inhibit cancer cell growth in vitro. Mycol . 103(3) : 438-465
- Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S. and Gordon, S. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. The Journal of experimental medicine.197(9) : 1119-1124.
- Brauer, H. 1985. Stirred Vessel Reactors In Biotechnology. Wiley-VCH Verlag mbH, Weinheim. (2) : 395-444.
- Chen, S. K., Tsai M. L., Huang, J. R., and Chen, R. H.. 2009. In vitro antioxidant activities of low-molecular-weight polysaccharides with various functional groups. J. Agric. Food Chem.57 : 2699-2704.

- Chi, C. W., Chen, C. C. and Chen, Y. J. 2013. Therapeutic and radiosensitizing effects of armillaridin on human esophageal cancer cells. Evidence-based complementary and alternative medicine . eCAM. Article ID 459271.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28 (3) : 350-356.
- Dubost, N. J., Ou, B., and Beelman, R. B. 2007. Quantification of polyphenoles and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. Food Chem. 5 : 717-735.
- Elson, L. A. and Morgan, W. T. J. 1933. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. J. Biochem. 27 : 1824-1828.
- 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
- Fang, Q. H. and Zhong, J. J. 2002. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. Process Biochem. 37 : 769-774.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L. and Abreu, R. M.V. 2009. Antioxidants in wild mushrooms. Curr. Med. Chem.16 (12) : 1543-1560.
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I. and Chun, O. K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. J. Food Compos. Anal.24 : 1043-1048.
- Forage, R. G., Harrison, D. E. F. and Pitt, D. E. 1985. Effect of environment on microbial activity. Compr. Biotechnol. 1 : 253-279.
- Gao, J. M., Yang, X., Wang, C. Y., and Liu, J. K. 2001. Armillaramide, a new sphingolipid from thefungus *Armillaria mellea*. Fitoterapia. 72 : 858-864.
- Gao, L. W., Li, W. Y., Zhao, Y. L. and Wang, J. W. 2009. The cultivation, bioactive components and pharmacological effects of *Armillaria mellea*. Afr. J. Biotechnol. 8(25) : 7383-7390.

- Herre, J., Gordon, S. and Brown, G. D. 2004. Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol. Immunol.* 17 : 869-876.
- Han, S. B., Lee, C. W., Jeon, Y. J., Hong, N. D., Yoo, C. D., Yang, K. H. and Kim, H. M. 1999. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacol.* 41 : 157–164.
- Humfeld, H. 1948. The production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in submerged culture. *Science*, 107:373.
- Huimin Q, Zhao T., Zhang, Q., Li, Z., Zhao, Z. and Xing R. 2005. Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* 17 : 527–534.
- Ikekawa, T., Uehara N., Maeda, Y., Nakanishi, M. and Fukuoka, F. 1969. Antitumor Activity of Aqueous Extracts of Edible Mushrooms. *Cancer research* 29 : 734-735.
- Ikekawa T. 2001. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in health care. *Int J Med Mushrooms* 3:291–298
- Karaman M., Jovin E., Malbasa R., Matavuly M. And Popovic M. 2010. Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. *Phytother. Res.* 24(10) : 1473-1481.
- 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.
- Kobayashi, H., Matsunaga, K., and Fujii, M. 1993. PSK as a chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol., Biomarkers & Prev.*, 2: 271-276.
- Lee, W. Y., Park, E. J., Ahn, J. K., and Ka, K. H. 2009. Ergothioneine contents in fruiting bodies and their enhancement in mycelial cultures by the addition of methionine. *Microbiol.* 37(1) : 43-47.

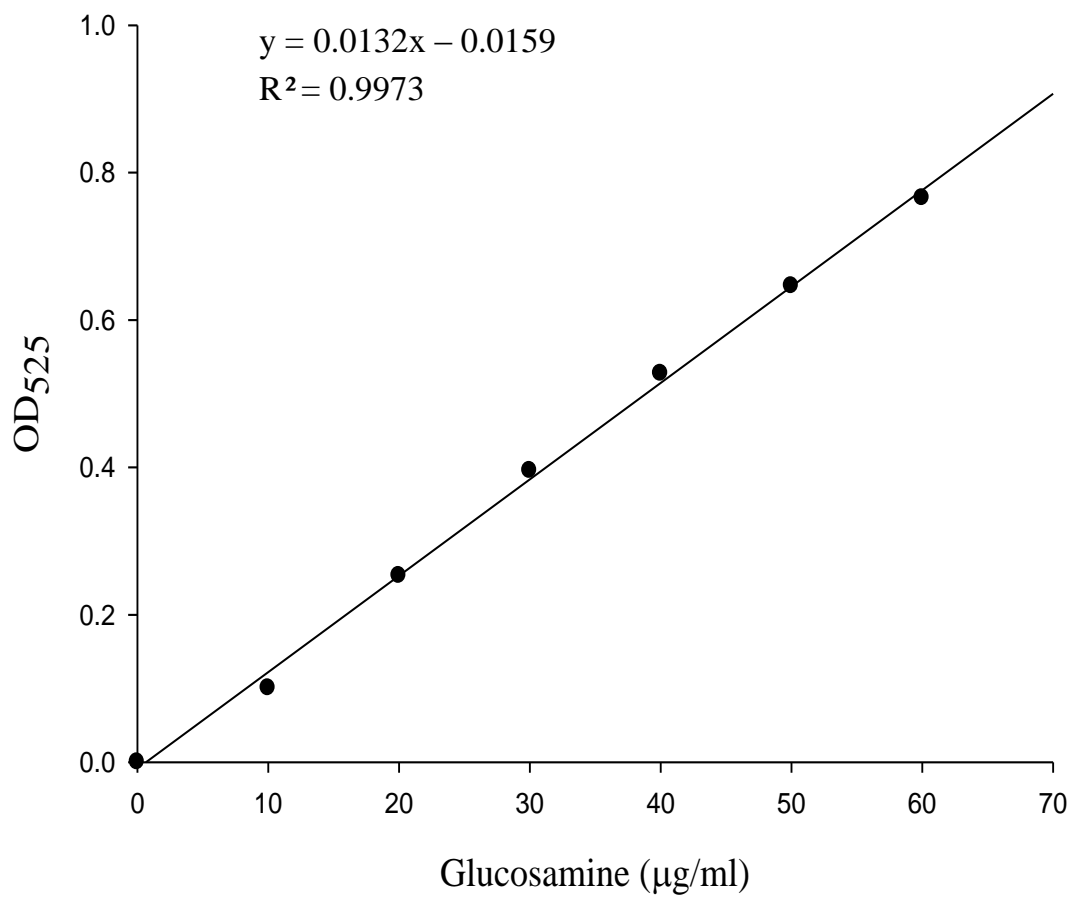
- Liao, S. F., Liang, C. H., Ho, M. Y., Hsub, T. L., Tsai T.I., Hsieh Y. S. Y., Tsai, C. M., Li, S.T., Cheng, Y.Y., Tsao, S.M., Lin, T.Y., Lin, Z.Y., Yang, W. B., Ren C. T., Lin K.I., Khoo, K. H., Lin, C. H., Hsu H. Y., Wu C. Y. and Wong C. H. 2013. Immunization of fucose-containing polysaccharides from Reishi mushroom induces antibodies to tumor-associated Globo H-series epitopes. PNAS.110(34) : 13809–13814.
- Lung, M. Y. and Chang, Y.C. 2011. Antioxidant properties of the edible basidiomycete *Armillaria mellea* in submerged cultures. Int. J. Mol. Sci. 12(10) : 6367-6384.
- Lung, M. Y. and Huang, P. C. 2009. Optimization of exopolysaccharide production from *Armillaria mellea* in submerged cultures. Lett. Appl. Microbiol. 50(10) : 198-204.
- Margaritis, A. and Zajic, J. E. 1978. Biotechnology Review-mixing, mass transfer, and scale-up of polysaccharide fermentations. Biotechnol. Bioeng. 2 : 939-1001.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. and Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin. Sci. 84 : 407-412.
- Mizuno, M., Minato, K. I., Ito, H., Kawade, M., Terai, H. and Tsuchida, H. 1999. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Mill. Biochem. Mol. Biol. Int. 84 : 707-714.
- Muszyńska, B., Sułkowska, Z., K. and Ekiert H. 2013. Phenolic acids in selected edible basidiomycota Species: *Armillaria mellea*, *Boletus badius*, *Boletus edulis*, *cantharellus cibarius*, *lactarius deliciosus* and *Pleurotus ostreatus*. Acta Sci. Pol.Hortorum Cultus. 12(4) : 107-116.
- Miyazaki, T. and Nishijima, M. 1981. Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. Chem. Pharm. Bull. 29(12) : 3611-3612.
- Obuchi, T., Kondoh, H., Watanabe, N., Tamai, M., Omura, S., Yang, J. S. and Liang, X. T. 1990. Armillaric acid, a new antibiotic produced by *Armillaria mellea*. Planta Med. 56 : 198-201.

- Park, J. P., Kim, S. W., Hwang, H. J. and Yun, J. W. 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., 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.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agric. Food Chem. 40 : 945-948.
- Shu, C. H. and Lung, M. Y. 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.
- Sinclair W. K. and Morton R. A. 1966. X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells. Radiat. Res. 29(3) : 450-474.
- Sun, Y. X., Liang, H. T., Zhang, X. T., Tong, H. B. and Liu, J. C. 2009. Structural elucidation and immunological activity of a polysaccharide from the fruiting body of *Armillaria mellea*. Bioresour. Technol. 100 : 1860- 1863.
- Surenjava, U., Zhang, L., Xu, X. J., Zhang, X. F. and Zeng, F. B. 2006. Effects of molecular structure on antitumor activities of (1→3)-β-d- glucans from different *Lentinus Edodes*. Carbohydr. Polym. 63 : 97-104.
- Tatiya, A. U., Tapadiya, G. G., Kotecha, K. and Surana, S. J. 2011. Effect of solvents on total phenolics, antioxidant and antimicrobial properties of *Bridelia retusa* Spreng. stem bark. Indian J. Nat. Prod. Resour. 2(4) : 442-447.
- Vaz, J. A., Barros, L., Martinse, A., Celestino, S. B., Vasconcelos M. H. and Ferreira, I.C.F.R.. 2011. Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharide and ethanolic fractions. Food Chem.126 : 610-616.
- Wang, Y. f., Zhang, L. 2006. Chain conformation of carboxymethylated derivatives of (1→3)-β-d-glucan from *Poriacocos sclerotium*. Carbohydr. Polym. 65 : 504-509.

- Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60 : 258–274.
- Wu, J., Zhou, J., Lang, Y., Yao, Lei., Xu, H., Shi, H. and Xu, S. 2012. A polysaccharide from *Armillaria mellea* exhibits strong in vitro anticancer activity via apoptosis-involved mechanisms. *Int. J. Biol. Macromol.* 51 : 663-667.
- Yang, J. S., Chen, Y. W., Feng, X. Z., Yu, D. Q., and Liang, X. T. 1984. Constituents of *Armillaria mellea* mycelium isolation and characterization of armillarin and armillaridin. *Planta Med.* 50 : 288-290.
- Yang, J. S., Chen, Y. W., Feng, X. Z., Yu, D. Q., He, C. H., Zheng, Q. T., Yang, J., and Liang, X. T. 1989a. Isolation and structure elucidation of armillaricin. *Planta Med.* 55 : 564-565.
- Yang, J. S., Su, Y. L., Wang, Y. L., Feng X. Z., Yu, D. Q., Cong, P. Z., Tamai, M., Obuchi, T., Kondoh, H. and Liang, X. T. 1989b. Isolation and structures of two new sesquiterpenoid aromatic esters: armillarigin and armillarikin. *Planta Med.* 55 : 479-481.
- Yang, J. S., Su, Y. L., Wang, Y. L., Feng X. Z., Yu, D. Q. and Liang, X. T. 1990a. Studies on the chemical constituents of *Armillaria mellea* mycelium. V. Isolation and characterization of armillarilin and armillarinin. *Acta Pharm. Sinica.* 25 : 24-28.
- Yang, J. S., Su, Y. L., Wang, Y. L., Feng X. Z., Yu, D. Q. and Liang, X. T., Yang, J. J. and Yang, J. 1990b. Chemical constituents of *Armillaria mellea* mycelium. VI. Isolation and structure of armillaripin. *Acta Pharm. Sinica.* 25 : 353-356.
- Yang J.S., Su, Y. L., Wang, Y. L., Feng, X. Z., Yu, D. Q. and Liang, X. T. 1991a. Chemical constituents of *Armillaria mellea* mycelium. VII. Isolation and characterization of chemical constituents of the acetone extract. *Acta Pharm. Sinica.* 26 : 117-22.
- Yang, J. S., Su, Y. L., Wang, Y. L., Feng X. Z., Yu, D. Q. and Liang, X. T. 1991b. Two novel protoilludane norsesquiterpenoid esters, armillasin and armillatin, from *Armillaria mellea*. *Planta Med.* 57 : 478-480.

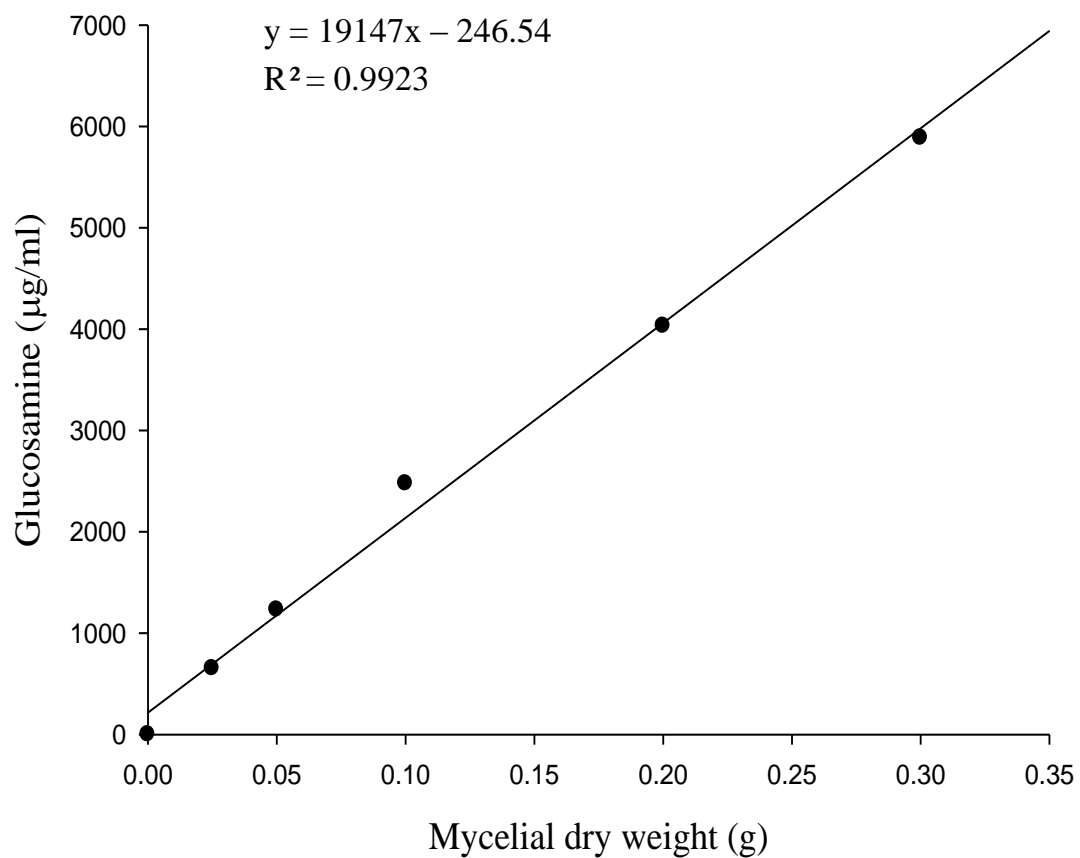
- Yuan, H., Zhang, W., Li, X., Lu, X., Li, N., Gao, X. and Song, J. 2005. Preparation and in vitro antioxidant activity of κ -carrageenan oligosaccharides and their over sulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives. *Carbohydr. Res.* 340 : 685–692.
- Zhang, J., Liu, Y. j., Park, H., Xia, Y.M. and Kim, G. 2012. Antitumor activity of sulfated extracellular polysaccharides of *Ganoderma lucidum* from the submerged fermentation broth. *Carbohydr. Polym.* 87 : 1539– 1544.
- Zhang, M., Cheung, P. C., Chiu L. C., Wong, E. Y. and Ooi V. E. 2005. Cell-cycle arrest and apoptosis induction in human breast carcinoma MCF-7 cells by carboxymethylated β -glucan from the mushroom sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. *Carbohydr. Polym.* 66 : 455-462.
- Zhuang, C., Mizuno, T., Shimada, A., Ito, H., Suzuki, C., Mayuzumi, Y., Okamoto, H., Ma, V. and Li, J. 1993. Antitumor protein-containing polysaccharides from a chinese mushroom *Fengweigu* or *Houbitake*, *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) sings. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 (6) : 901-906
- Zhong, J. J. and Xiao, J. H. 2009. Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. *Biochem Engin/Biotechnol.* 113 : 112-119.





附圖一 Elson-Morgan 法之葡萄糖胺標準曲線。

Appendix Fig.1 Glucosamine standard curve by Elson-Morgan method.

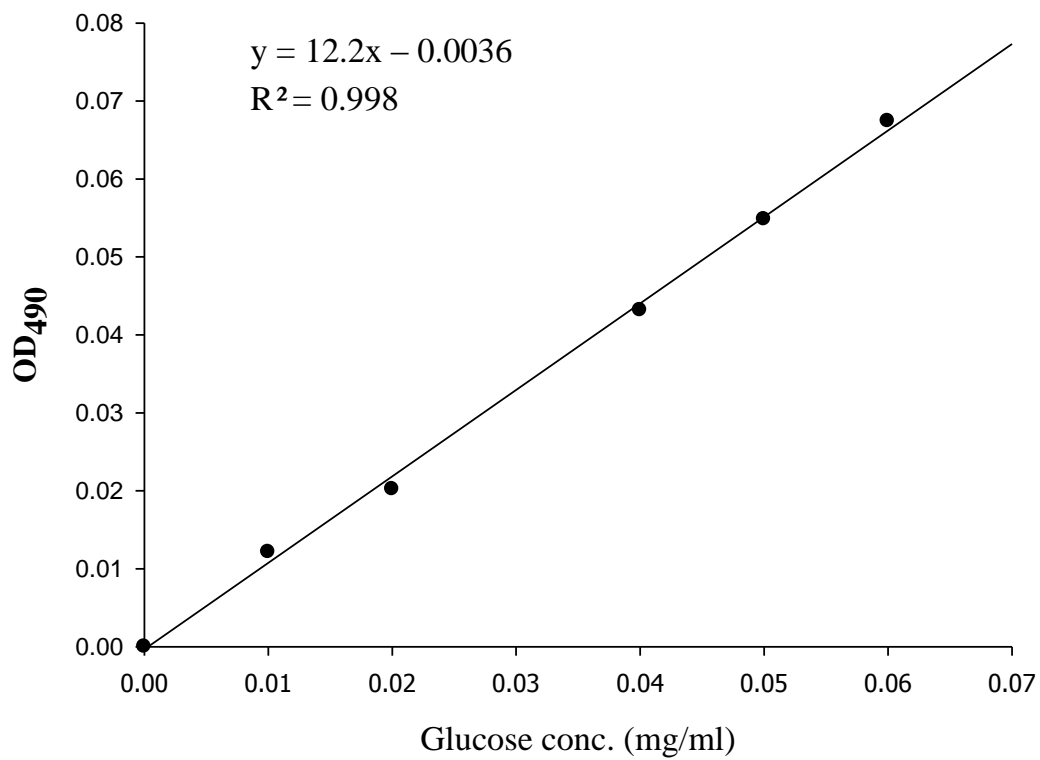


附圖二

菌絲體乾重對應葡萄糖胺含量之標準曲線。

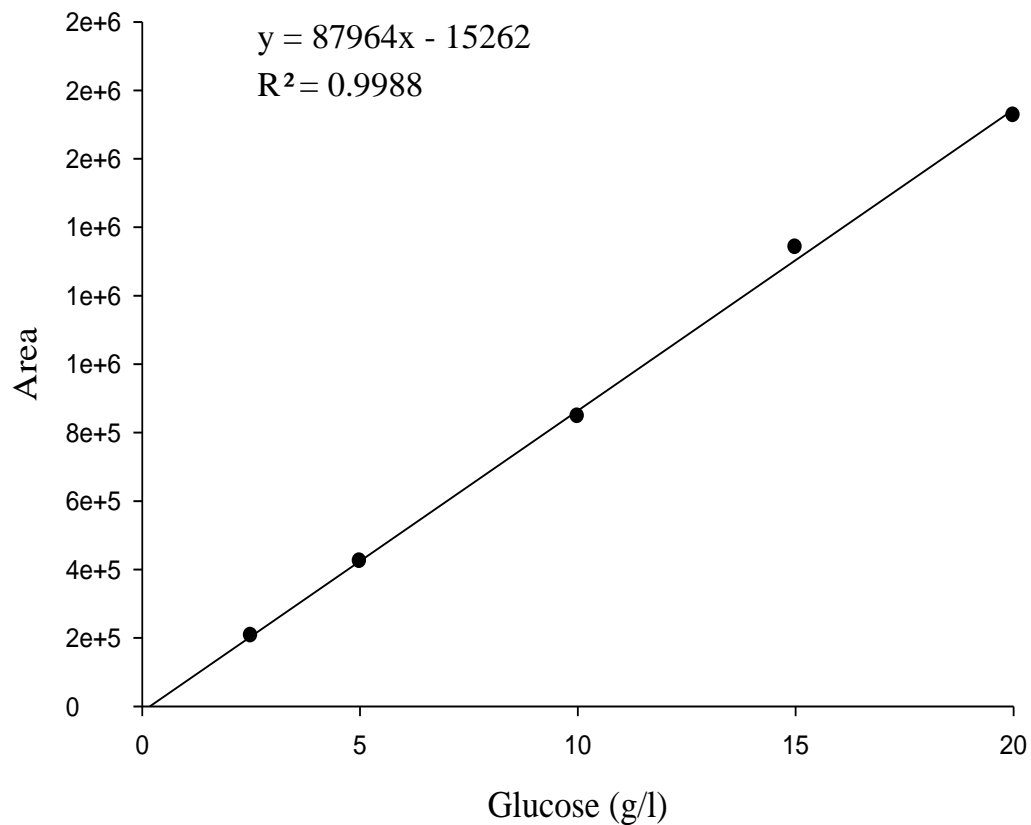
Appendix Fig.2

Standard curve of mycelial dry weight corresponding to glucosamine content.



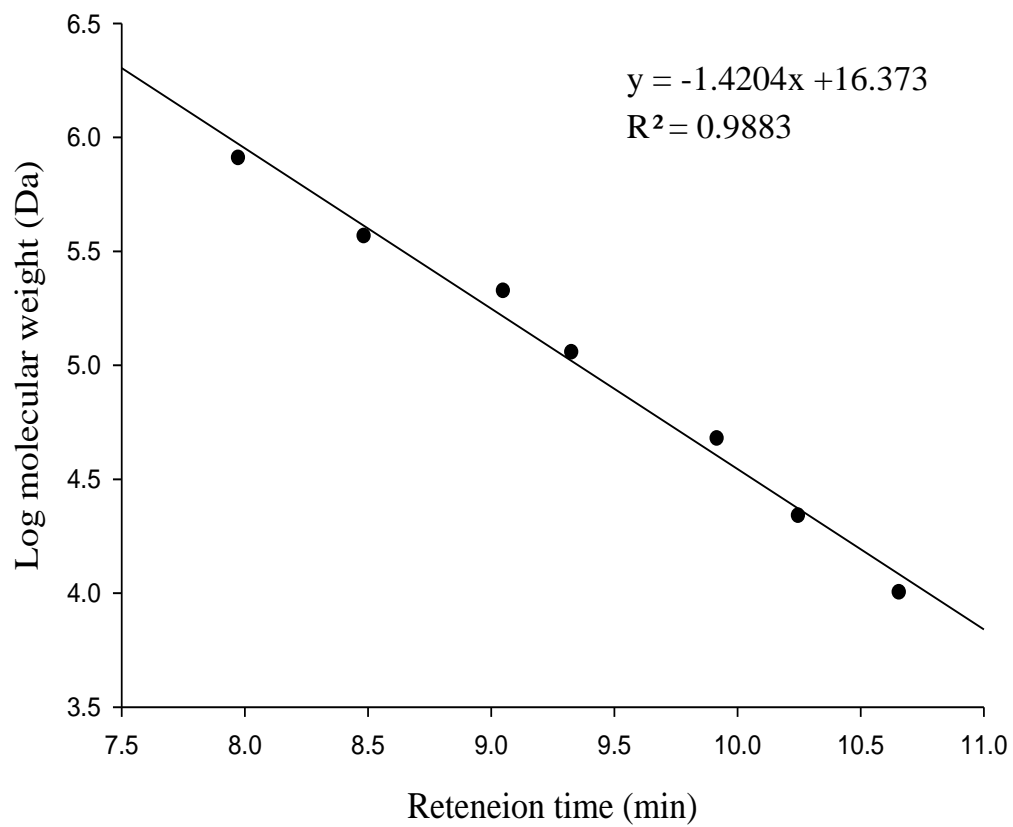
附圖三 酚硫酸法之葡萄糖標準曲線。

Appendix Fig.3 Glucose standard curve by phenol-sulfuric acid method.



附圖四 葡萄糖之 HPLC 殘糖檢量線。

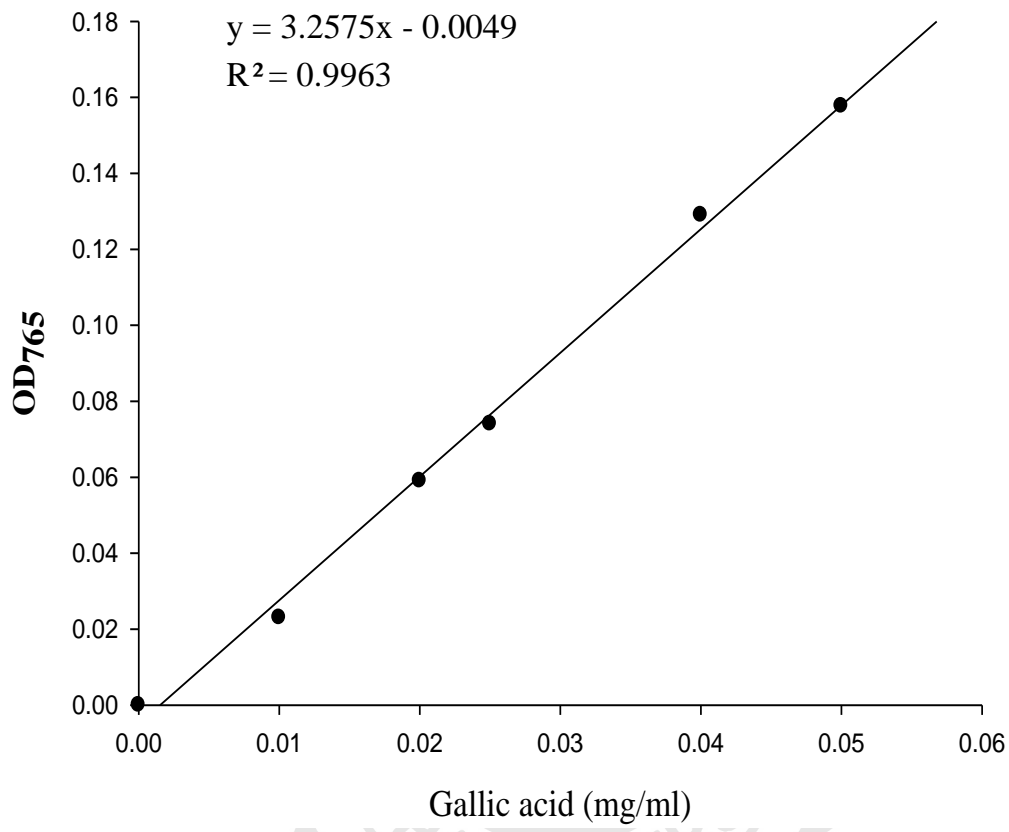
Appendix Fig. 4 The calibration curve of glucose analysis by HPLC.



附圖五

多醣分子量之標準曲線。

Appendix Fig.5 Molecular weight standard curve of polysaccharide.



附圖六 沒食子酸標準曲線。

Appendix Fig.6 Gallic acid standard curve by Folin-Ciocalteu assay