

壹、緒論

一、前言

樟芝【*Antrodia cinnamomea* T.T. Chang & W.N. Chou】為多孔菌科 (*Polyporaceae*)、薄孔菌屬 (*Antrodia*)，是台灣特有的真菌，分布於台灣山區海拔 450~2000 公尺，主要在桃園縣、苗栗縣、南投縣、高縣及花蓮、台東等(林，2004)。樟芝在自然界中僅寄生於保育類牛樟木樹幹，最初是由原住民發現其對肝病的神奇療效，繼而被研究人員重視並開始實驗其功效。

近年文獻及研究指出，樟芝具有極佳抗氧化能力、抗 B 型肝炎病毒活性、在細胞實驗具有抑癌的效果等(陳和呂，2001)。樟芝菌絲體具療效之成分主要為多醣體，包括胞外多醣(發酵液萃取)及胞內多醣(菌絲體萃取)。胞外多醣體的療效主要為抗腫瘤、增強免疫力、降血壓及降血糖等，可被用於抗腫瘤藥劑(免疫力提升劑)，優點是幾乎無副作用(呂，2002；林和王，2002)；胞內多醣的療效為抗 B 型肝炎病毒活性(anti-hepatitis B virus activity)，但不會對正常細胞有毒殺作用(cytotoxic effect)(Lee *et al.*, 2002)，在體內及體外實驗中，無法毒殺但可抑制白血病細胞(Leukemic cells)的增殖(Liu *et al.*, 2004)。

在人工培養上，雖然成功地培育出樟芝子實體，但技術上仍有許多待努力的地方，目前大都以液態培養方式生產樟芝菌絲體，藉由嘗

試不同培養條件，來提高菌絲及多醣的產量及品質(林，2004)，以創造更大的經濟效應。

二、研究目的

由於在自然界中，樟芝生長的專一性寄主-牛樟木遭受砍闕而日益稀少，加上子實體生長期長，近年來已發展用工業發酵的方式進行液態培養，可快速且大量地生產樟芝菌絲體及其多醣體。

在培養過程中，碳源佔培養基成分中很重要的部份，如果能取得較便宜且成分穩定的碳源，將可降低生產成本。在發酵槽的運用上，以同一發酵槽不同操作條件培養，來探討對目標產物生成的影響，以得知不同條件之生產效能，並找出對於樟芝菌絲體及多醣體產率最大、品質最佳且成本最低的培養條件。

貳、文獻回顧

一、樟芝及其生物活性成分簡介

樟芝為台灣特有的真菌，其生長環境屬幽暗、潮濕且溫度稍低之區域，生長緩慢，因此要產生子實體的時間相當長。自然界中僅寄生在台灣山區海拔 450~2000 公尺，百年以上保育類的牛樟木樹幹腐朽之心材內壁，為一種木材腐朽菌，只能分解木材之纖維素而不能利用木質素。樟芝氣味芳香，味辛、苦，生長期為 6~11 月，主要分布於桃園縣復興鄉、苗栗縣南庄鄉、三灣鄉、南投縣竹山、水里鄉、高縣六龜及花蓮、台東山區等(林，2004)。

據傳早期樟芝是由原住民發現，由於原住民嗜飲酒，造成許多肝病的發生，後來無意間在牛樟木中發現樟芝，將其烹煮飲用，改善了肝病，其療效就被口耳傳開(陳和呂，2001)。樟芝(*Antrodia cinnamomea*)為真菌門 (*Mycota*)、擔子菌亞門 (*Basidiomycotina*)、層菌綱 (*Hymenomycetes*)、無褶菌目 (*Aphyllorphorales*)、多孔菌科 (*Polyporaceae*)、薄孔菌屬 (*Antrodia*)(林，2004)。

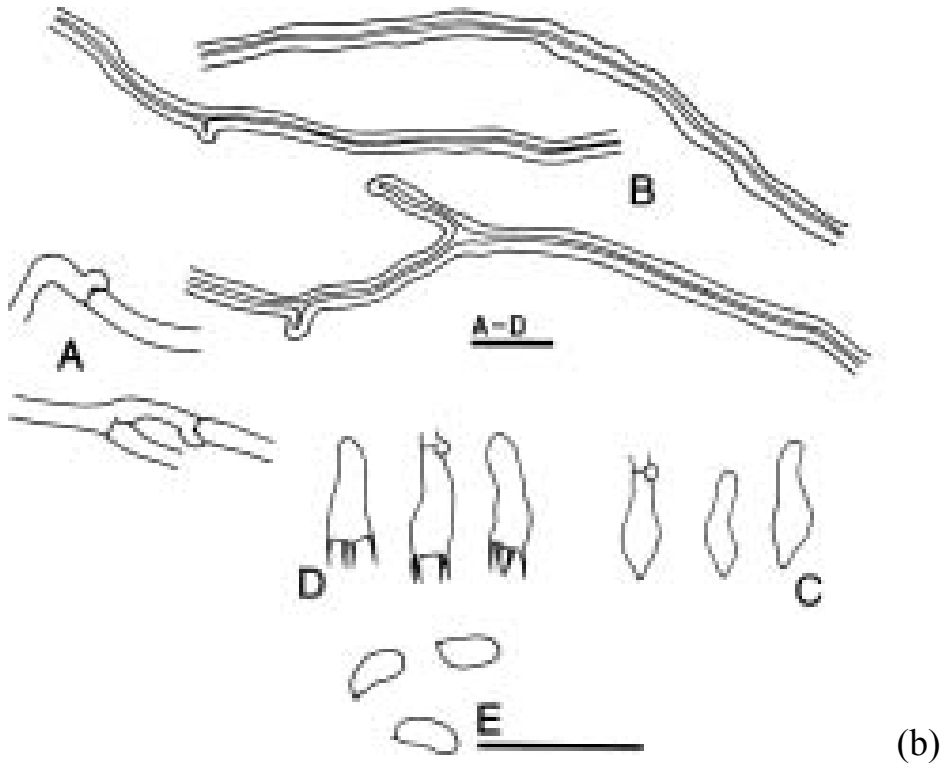
樟芝於 1990 年以 *Ganoderma camphoratum* 之名首次被發表，1995 年則以 *Antrodia cimmamomea* 之稱被發表，1997 重新組合新名為 *Antrodia camphorata* 廣為學界及業界採用。然而研究人員發現，*camphora* 指樟腦油，為香樟樹(Camphor Tree)主要芳香物質，但樟芝主要芳香物質為 terpenoids(一種三萜類，具高揮發性及特殊香氣)，根

據張東柱博士及周文能博士在 2004 年發表於中研院植物所彙刊的論文更名為 *Antrodia cinnamomea* T.T. Chang & W.N. Chou。

野生樟芝長在老齡的牛樟木，由其中空的樹幹內面長出真菌的子實體，子實體形態多變化，有板狀、鐘狀、馬蹄狀或塔狀如圖一(a)，無固定型態(陳和呂，2001)。初生時鮮紅色，漸長變為白色、淡紅褐色、淡褐色或淡黃褐色。子實體為多年生，無菌柄，表面新鮮時呈橘紅色，老化時呈褐色至黑褐色，頂面平滑，具同心環。菌孔為圓形至多角形，內含孢子(林，2004)。

菌絲有分營養菌絲(generative hyphae)、扣子體(clamp connections)及骨架菌絲(skeletal hyphae)；有性器官為擔孢子(basidiospore)，型態為微彎之圓柱狀(cylindrical)，而擔子柄呈棍棒狀(clavate)，菌絲體型態如圖一(b)，其活耀時呈橘紅色至肉桂色，老化後呈紅褐色(林，2004)。

樟芝主要生物活性成分為多醣體(polysaccharides)、三萜類化合物(triterpenoids)及固醇類(steroids)，其中多醣體可提升人體免疫力及抑制 B 型肝炎病毒，三萜類與抗癌、保肝有關，固醇類則具消炎效果。但可能因子實體與菌絲體生理、生化代謝不同，造成三萜類及固醇類等的生化合成能力降低(林，2004)。在固態及液態發酵樟芝



圖一 樟芝(a)子實體形態(張等, 1999)及樟芝(b)菌絲形態(Wu *et al.*, 1997)

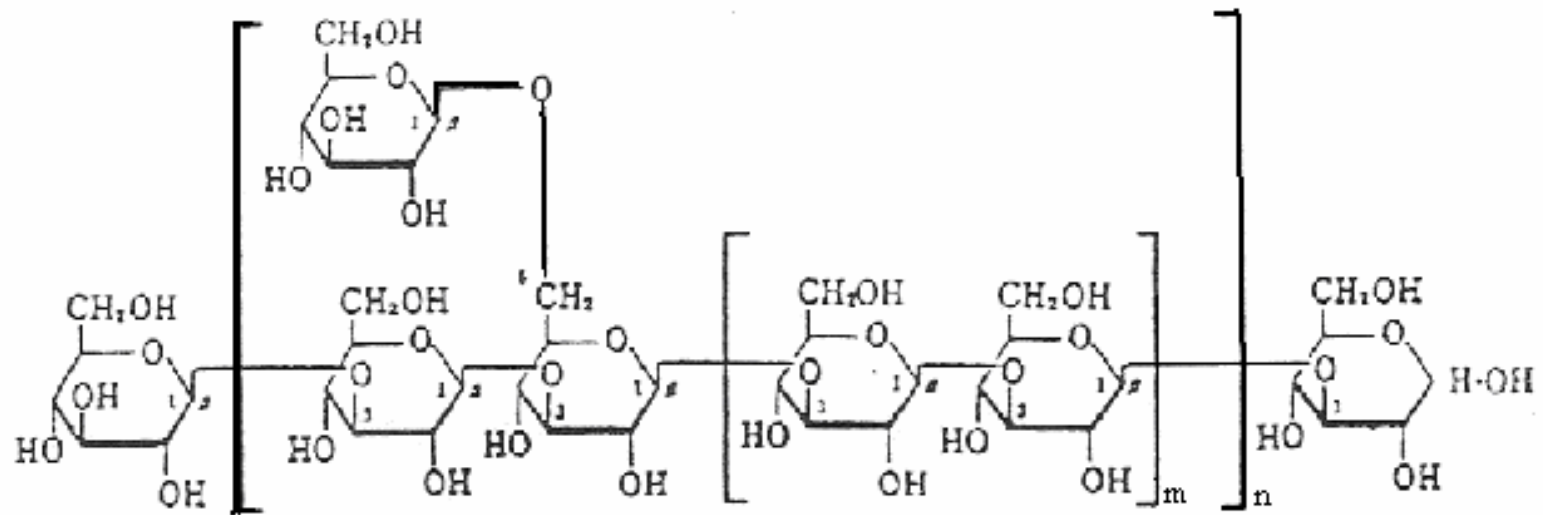
- A. Generative hyphae(生殖菌絲)；
- B. Skeletal hyphae(骨架菌絲)；
- C. Cylindrical(似囊狀體)；D. Basidia(擔子)；
- E. Basidiospores(擔孢子).Scale bars=10 μ m

的療效比較上(王和黃，2002)，固態的胞內多醣及液態發酵所得的胞外多醣在抗腫瘤方面針對胃癌、乳癌、肝癌及子宮頸癌，而液態發酵所得的胞內多醣則針對肝癌及血癌，此外不論液態或固態發酵皆具有抗氧化的功效，藉以保護細胞不受氧化傷害。而樟芝與其他保肝中藥的比較上(陳和呂，2001)，樟芝所需服用的劑量最少，但其對 B 型肝炎病毒的抑制率卻是最好的。

(一) 樟芝多醣體

菇類多醣體大多是由主鏈 β -1,3-glucan 及支鏈 β -1,6-glucan 所組成如圖二，不同來源的多醣體，會造成重複結構的分支度(m 值)及聚合度(n 值)的不同(水野和川合，1999)，多醣體的生理活性可依其分子量大小區隔為三類，分子量在 $3 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ Da 具有降血糖的功能；在 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ Da 具有消炎的功效；在 3×10^4 Da 以上即具有抗腫瘤的療效，且分子量越大效果越佳(王等，1998)。樟芝採用液態發酵時，發酵液中的多醣(胞外多醣)分子量為 1.1×10^4 Da $\sim 10^6$ Da，而菌絲體的多醣(胞內多醣)分子量為 7.6×10^5 Da $\sim 10^6$ Da (黃，2001)。

菇類多醣體生理活性主要為抗腫瘤、增強免疫力、降血壓及降血糖等，可被用於抗腫瘤藥劑(免疫力提升劑)，其抗癌機制是透過強化寄主的免疫機能以提高其免疫力，如 T 細胞和巨噬細胞



圖二 有抗腫瘤活性的 β -1,6 分支的 β -1,3-D-葡聚糖結構(水野和川合，1999)

的活化，而很大的優點是幾乎無副作用(呂，2002；林和王，2002)。在深層發酵培養所得之樟芝菌絲體及發酵液中的多醣體，皆可提昇 GST 酵素系統的活性，以增進 H₂O₂ 代謝能力，因此可抑制脂質過氧化作用，繼而保護 DNA 避免氧化傷害及減少細胞毒性(林，2004)。

樟芝胞內多醣體具抗 B 型肝炎病毒(anti-hepatitis B virus activity)的作用但不會對正常細胞有毒殺作用(cytotoxic effect)(Lee *et al.*, 2002)；胞內多醣體在體內及體外實驗中，雖無法毒殺白血病細胞(Leukemic cells)但可抑制其增殖(Liu *et al.*, 2004)；菌絲體的水萃取物在體外細胞實驗顯示，可保護人類紅血球避免氧化傷害(oxidative damage)(Hseu *et al.*, 2002)。此外菌絲體的甲醇萃取物有良好抗氧化力，具有還原力(reducing power)及螯合(chelating)鐵離子的能力(Mau *et al.*, 2004)。

(二) β -1,3-glucan 的介紹

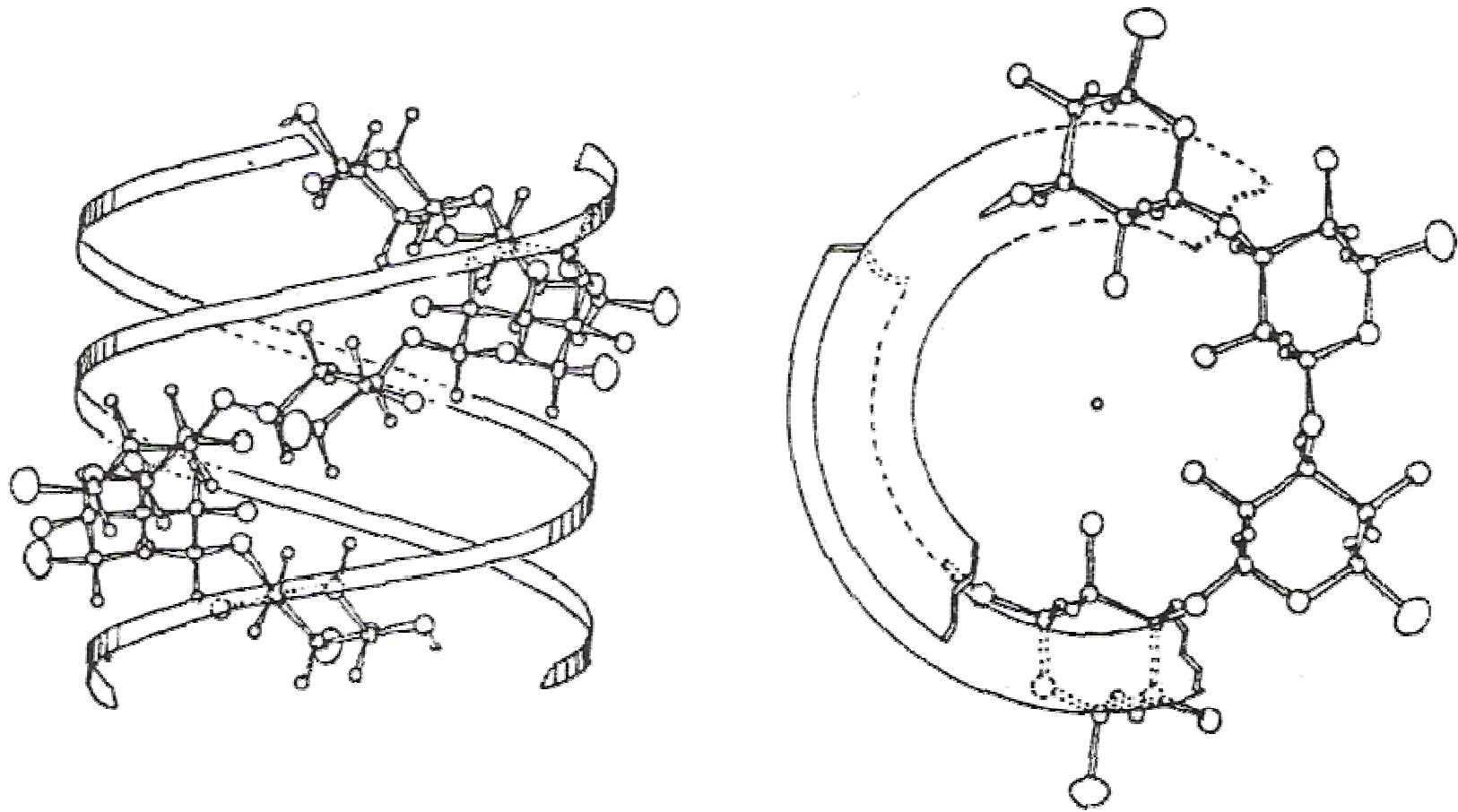
β -1,3-D-葡聚糖為一種膳食纖維，無法被人體消化道內的酵素分解，但可能與某些免疫蛋白結合，進而活化免疫系統(呂，2002)。 β -葡聚糖之生理活性受到本身水溶性、分子量、支鏈比例、三股螺旋結構和 β -1,3 主鏈及 β -1,6 支鏈連接系統等因素的影響，不同的分子結構會引起不同人體的免疫反應(陳，2006)。

用 X-ray 繞射分析如圖三得知，以 β -1,3 鍵結的 D-glucan 骨架呈現三股鏈右螺旋(helix)結構如圖四，而這種螺旋型結構可能是引發抗腫瘤作用的重要因素(水野和川合，1999)，因此 β -1,3-D-glucan 含量越高，其抗癌活性越高。

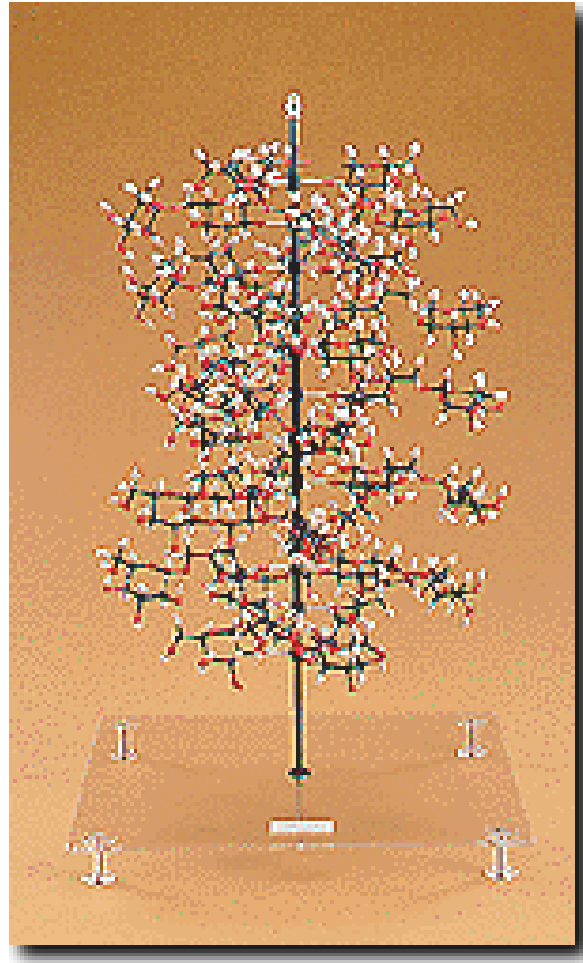
β -葡聚糖的免疫調節作用機制和人體中的補體系統(complement system)有關如圖五，補體可以辨識病原菌及抗原，將之標幟後以便免疫系統更有效率的摧毀它們。在白血球上的 CR3 是 β -葡聚糖的主要受體，所以嗜中性白血球、巨噬細胞及自然殺手細胞上的 CR3 皆會因葡聚糖的誘發啟動對腫瘤組織的細胞毒殺反應。除了細胞毒殺反應外，也會促進腫瘤局部細胞素的分泌作用，此種細胞素為腫瘤壞死因子，以達到腫瘤細胞萎縮的效果(陳，2006)。

β -1,3-glucan 含量檢測方法：Aniline blue 最早是植物學家用來檢測植物組織中多醣類最常用的螢光染劑，後來證實 aniline blue 對於 β -1,3-D-glucan 具有專一反應性(張，2003b)，可據以檢測樣品中是否含有活性多醣，以及其含量之多寡，並與粗多醣含量做比較，加強其可信度。

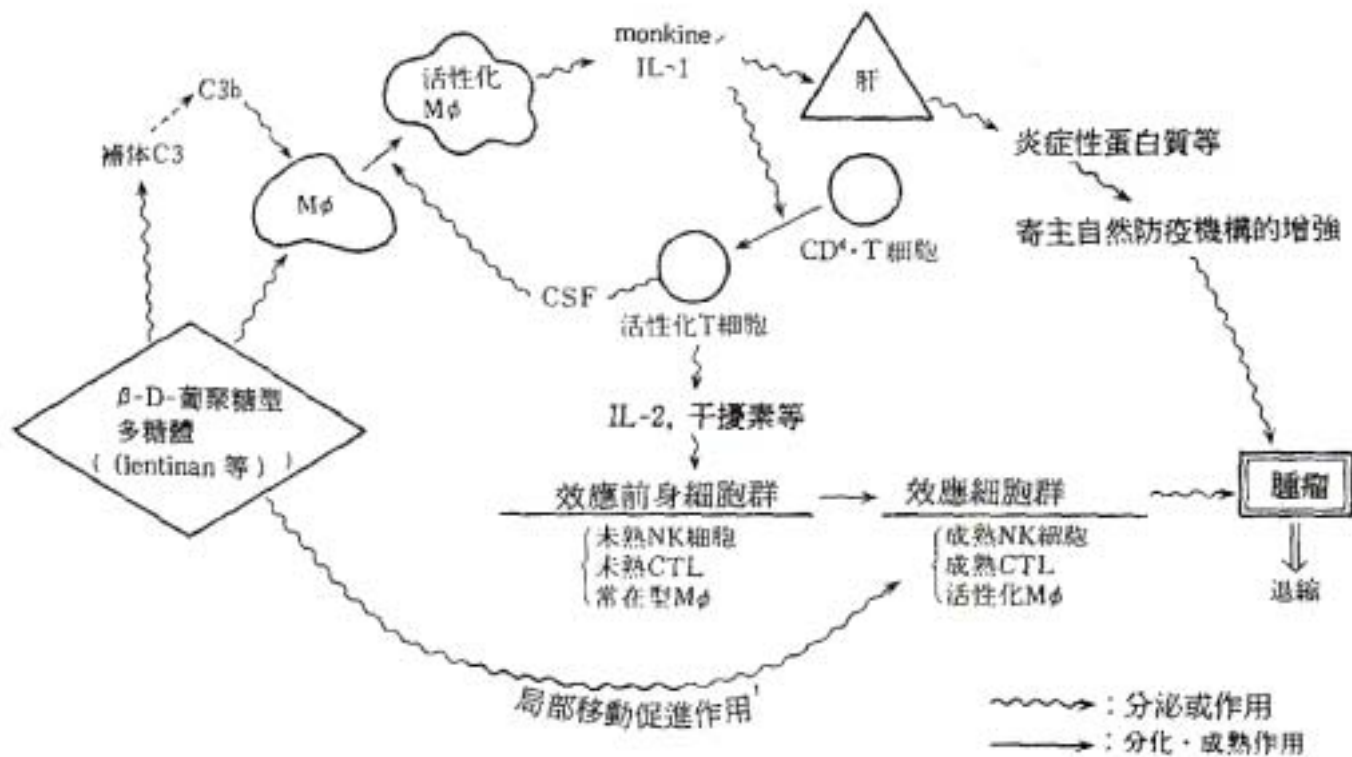
Aniline blue-glucan 錯合物的螢光密度，會因溶液中的離子強度、pH 值及溫度影響。在本實驗中以 laminarin(海藻多醣)作為標



圖三 用 X 射線衍射的 β -1,3-D-葡聚糖結晶結構 (水野和川合, 1999)



圖四 活性 β -1,3-D-葡聚糖的分子模型。持有 β -1,6-支鏈的三股螺旋構造(水野和川合，1999)



圖五 β-D-葡聚糖系多糖體抗腫瘤之可能機制(水野和川合，1999)

IL-1: 介白血細胞素(為巨噬細胞激素，可引起發燒、發炎及活化白血球)；

IL-2: 細胞激素(來自 T cell，可誘發 T cell、B cell 增生及活化巨噬細胞)；

Mφ: 巨噬細胞(可吞食外來病原菌及體內失控的細胞)

準品，由 SIGMA 藥品書得知 laminarin 是由 *Laminaria digitata* 中萃取出來的多醣，其主要結構幾乎為 β -1,3-D-glucan，僅少數的 β -1,6-D-glucan，而所測樣品的單位須加註標準品的種類，因不同標準品所測出的值也會不同。

檢測樣品溶液中的離子強度會增加 laminarin-aniline blue 的螢光密度；當 pH 值由 3 上升到 10，螢光強度會隨之增加，在 pH 11.5 時有最大值；溫度方面，在 25°C 時 β -glucan 與 aniline blue 鍵結速度最快(呂，2002；周，2002)。而 Aniline blue 僅能與單股螺旋鍵結者產生反應，所以須加入 NaOH 將標準品及 sample 中多醣體的三股螺旋結構變成單股螺旋結構，才可反應呈色，鍵結的速率取決於溫度及 NaOH 的濃度(Young and Jacobs, 1998；呂，2002)。

β -葡聚醣可能的抗腫瘤機制為其利用多醣體活化多種免疫細胞，如巨嗜細胞、嗜中性細胞、T 細胞、B 細胞及自然殺手細胞等，使其分泌一些細胞素(cytokine)，如腫瘤細胞壞死因子(TNF- α)、介白素(IL-1 β 、IL-6)或干擾素(interferon)等，以達到抑制腫瘤的效果(黃，2004)。

(三) 三萜類

經研究指出，樟芝子實體確實含有獨特的三萜類化合物如

表一，但其抗癌細胞生長能力，活化神經細胞生長能力等生理活性則未明(王和黃，2002)，以下是有關三萜類的論述：其對肝腫瘤細胞有毒殺性作用，另具抗發炎、抗過敏及降膽固醇作用(水野和川合，1999)，並能有效地抑制 Angiotensin converting enzyme(ACE)的活性，降低血壓繼而預防中風(黃，2004)，可抑制肝癌細胞 HepG2 生長，由細胞型態呈現萎縮，而後分裂成凋亡小體(apoptotic body)，推知其對肝癌細胞毒殺能力屬於誘導細胞凋亡 (apoptosis) 而非壞死作用 (necrosis)(顏，2003)。

二、菇類的糖質分解酵素

一般而言，以深層培養方式萃取的胞外酵素，在無褶菌目的擔子菌較多，包含許多澱粉酶、纖維素酶及 β -1,3-葡聚糖酶等。由香菇(*Lentinus edodes*)子實體萃取出來的澱粉酶，能作用於可溶性澱粉、直鏈澱粉及支鏈澱粉等，而其水解物僅產生葡萄糖(水野和川合，1999)。

擔子菌的 β -1,3-葡聚糖酶有很多種，外切型(exo-)及內切(endo-)型(水野和川合，1999)：若受質為直鏈無分支的 β -(1,3)-D-glucan，exo-glucanases 會由非還原端依序一個一個單元(葡萄糖)切下，直到無法作用的大小為止；若受質具分支，則僅

表一 樟芝子實體中所含三萜類 Ergostane 型化合物(張,2003a)

Compound name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Ref.
Antcin A	=O	H ₂	=O	H ₂	H	H	a, c
Antcin B (Zhankuic acid A)	=O	=O	=O	H ₂	H	H	a, b, c, d
Antcin C	=O	β-OH	=O	H ₂	H	H	a, c
Antcin D (Zhankuic acid F)	=O	=O	=O	H ₂	OH	H	c
Antcin E	=O	H ₂	=O	H ₂	—	H Δ ¹⁴	c
Antcin F	=O	β-OH	=O	H ₂	—	H Δ ¹⁴	c
Antcin G	=O	α-OAc	=O	H ₂	H	H	c
Antcin H (Zhankuic acid C)	α-OH	=O	=O	α-OH	H	H	b, c, d
Antcin I (Zhankuic acid B)	α-OH	=O	=O	H ₂	H	H	b, d
Methyl antcinate A	=O	H ₂	=O	H ₂	H	CH ₃	c
Methyl antcinate B	=O	=O	=O	H ₂	H	CH ₂ CH ₃	c
Methyl antcinate G	=O	α-OAc	=O	H ₂	H	CH ₃	c
Methyl antcinate H	α-OH	=O	=O	α-OH	H	CH ₃	c
Zhankuic acid E	α-OH	=O	=O	α-OH	H	CH ₂ CH ₃	d

Methyl antcinate A = Methyl-4α-methylergost-8,24(28)-dien-3,11-dione-26-oate
 Methyl antcinate B = Methyl-4α-methylergost-8,24(28)-dien-3,7,11-trione-26-oate
 Methyl antcinate B = Zhankuic acid D

能水解到分支點，但若是(1,6) branched (1,3)- β -D-glucans，此酵素除了水解主鏈為葡萄糖，遇到分支亦可將其水解成龍膽雙糖(gentiobiose)(張，2003b)；而 endo-glucanases 可隨機水解主鏈(1,3)- β -D-glucan 上的任何位置，水解產物為大小不同的寡糖及葡萄糖(張，2003b)。

真菌中 endo- 和 exo- β -D-glucanases 常共存，一般認為 endo- β -D-glucanases 先將大分子葡聚糖水解成分子較小的片段，再由 exo- β -D-glucanases 將這些小片段水解成葡萄糖(張，2003b)。

三、菇類的培養

傳統菇類是固態培養，常見的方式有段木栽培、太空包栽培及機械自動化控溫栽培等。菇類育種的工作主要在研發符合市場需求之高產量高品質的菌株，傳統育種方法有自然篩選及誘導突變，此外還有交配反應(mating reaction)、菌絲融合(anastomosis)、原生質體融合(protoplast fusion)及分子遺傳技術的基因重組(gene cloning)等。

由於固態培養從接種到子實體收成需長達數月的時間成本，另外鮮菇採收的保存、運輸及加工等投資，都有其技術的限制，因此在加強菇類利用方面，以深層培養(submerged culture)方式生產菇類菌絲體及其他有用的代謝產物，就成為值得開發的途徑(王，2005)。

(一) 固態發酵(Solid-state fermentation)

固態發酵是指在水分含量極低的環境下，利用固體的材料為基質供微生物生長，其培養過程包含固、液及氣三相的非勻相系統，其複雜的質傳與熱傳使得整體發酵過程的量測與監控較為困難，進而影響固態發酵生產程序的開發與規模放大(沈，2004；羅和余，2004)。

(二) 液態發酵(Submerged fermentation)

所謂液態(深層)發酵，一般是使用固定組成之液態培養基，控制在適當的 pH 值、溫度、通氣及攪拌(或震盪)的條件下，進行微生物的發酵培養，以製造生質(biomass)或其他代謝物。菇類的深層培養最大特色是發酵過程中並無孢子萌發期，所產生之菌絲體是以圓球狀物(pellets)形式存在，使培養液中營養源及氧氣之傳送較一般低等真菌更複雜(王，2005)，其菌絲體在不同培養條件下可產生直徑 1~20mm 不同的球狀菌絲，一般而言，搖瓶培養所產生的菌絲體會較發酵槽的大。

1. 液態培養中球狀菌絲體的形成(林，2005)：球狀菌絲體的形成

機制是在發酵過程當中，菌絲體會因外力作用而破碎剝落，剝落的部份會再形成另一個新的菌絲體顆粒，這可能是球狀菌絲體數量增加的原因之一(林，2005)。球狀菌絲體的型態結構變化很大，由鬆散不規則到平滑、結實、緊湊的球型皆有，可將

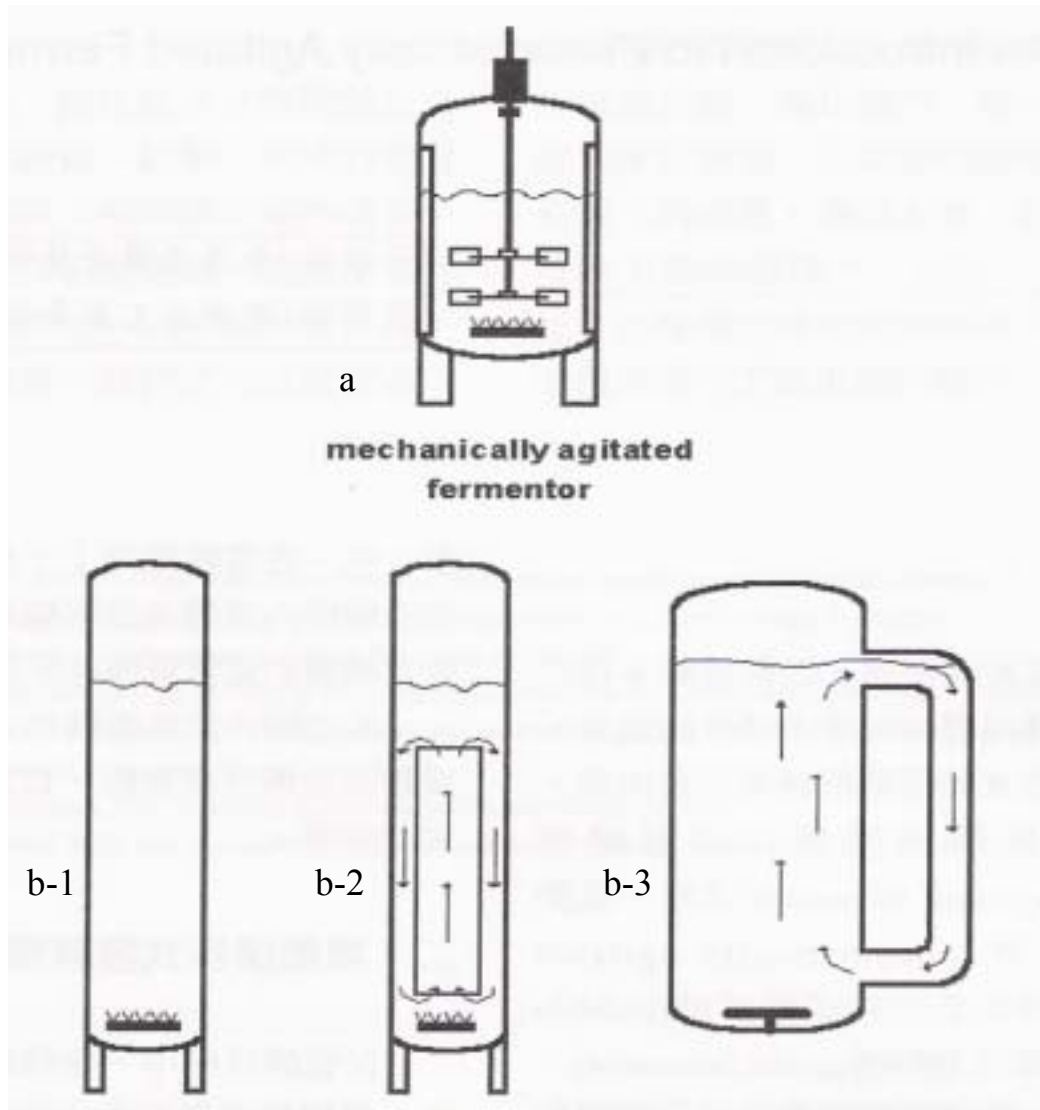
其分為三類(林，2005)：Fluffy loose pellets 之菌絲體中心緊湊結實，外部鬆散近似羽狀，例如裂褶菌；Compact smooth pellets 之菌絲體結構緊實，其外觀平滑，大小不一之小球，樟芝菌絲體即為此類；Hollows smooth pellets 之菌絲體中心因自我分解(Autolysis)而成凹陷中空狀(Hollow)，但外觀仍平滑。

2. 菌絲體大小的變化因素(林，2005)：在攪拌式發酵槽中，攪拌速率(agitation rate)會影響攪拌葉片產生的剪切力(shear stress)，擔子菌的球狀菌絲體只有在較低攪拌速率下才會出現，攪拌速率太高會形成較小且結構鬆散的羽狀菌絲體型態，在培養後期會導致菌絲乾重下降及胞內多醣量的降低，但攪拌速率不影響胞外多醣的產量。接菌量(inoculum size)為接菌時菌絲體的多寡、大小及當時的物理狀態，這些條件都會影響菌體在發酵槽內的生長形態，而較低的接菌量較適合球狀菌絲體的生長。氧氣是一種必須的營養基質，也是代謝反應的調控者，在通氣流量(aeration rate)較小或是較為缺氧的環境下有助於代謝產物的生成，較高的供氧量則有助於生質(biomass)的生成，有文獻指出，兩階段(bi-stage)的控制方式，利用前期增加通氣量使菌體大量生長，後期則降低供氧量以促進代謝產物生成。

3. 發酵槽的介紹與分類(王和黃，2001)：

隨著生物技術的發展，面對種類多樣的微生物，為了滿足發效程序上的需求，便有不同形式的發酵槽被開發出來。除了傳統使用的機械攪拌式發酵槽 (mechanically agitated fermentor) 外，氣動攪拌式發酵槽 (pneumatically agitated fermentor)，如氣泡塔式發酵槽 (bubble column fermentor) 及氣舉式發酵槽 (airlift fermentor) 等，如圖六所示。

(1) 機械攪拌式發酵槽 (mechanically agitated fermentor)：早在 1950 年代，以盤尼西林為主要產品的抗生素製藥工業，就是在攪拌式發酵槽中進行的。機械攪拌式發酵槽的混合效能取決於攪拌轉速與攪拌葉片的選擇，培養過程中，攪拌葉片不斷把通入槽內的氣泡擊碎，使氣泡均勻的散佈在培養液中，且使液氣介面變薄，空氣較易進入水中，增加溶氧量，並可防止菌絲體黏在一起而降低培養基中養分傳到細胞的速率。機械攪拌式發酵槽在設計上為了達到較好的攪拌混合效能，其槽高(H)與內徑(D)之比例值(H/D)通常在 2~3 左右，目前業界大都使用此種發酵槽。



圖六 各種常見之發酵槽

Fig. 6 Different kinds of fermentors (Chisti,1989)

a.Mechanically agitated fermentor ;

b.Pneumatically agitated fermentor ;

b-1.Bubble column fermentor ;

b-2.Airlift fermentor (internal loop) ;

b-3.Airlift fermentor (external loop)

(2) 氣動攪拌式發酵槽(pneumatically agitated fermentor)：一般而言，氣動攪拌式發酵槽的 H/D 值通常大於 3，甚至有些會大於 10，因此氣動攪拌式發酵槽在外觀上是呈高塔狀，和機械攪拌式發酵槽外觀明顯不同，而此種類發酵槽又細分為兩類，第一種是氣泡塔式發酵槽(bubble column fermentor)，其為一構造最簡單的氣動攪拌式發酵槽，僅由塔槽與氣體分散器裝置而成，壓縮氣體進入槽內後藉由氣體分散器將氣泡散佈在培養液中，並且往上升，因而帶動液體的混合，即壓縮氣體提供攪拌發酵液的動力需求；另一種為氣舉式發酵槽(airlift fermentor)，為一種改良的氣泡塔式發酵槽，主要是在氣泡塔式發酵槽內加裝一個導流管(draft tube)，導流管可使槽內液體被區隔為進氣區的上升流動區(riser)與非進氣區的下降流動區(downcomer)，因進氣區的流體有較高的氣體佔有率(gas holdup)，使此區域的流體密度低於非進氣區的，造成流體自然的循環流動。

四、玉米澱粉

美國為世界最大玉米產生國，由於生產過剩，便開始尋找新的應用機會，以符合需求又有經濟性(Rutenberg,1994)。玉米澱粉是玉米濕磨的主要產品(佔 65%)，為 α -D-葡萄糖聚合物，此聚合物具有直鏈及支鏈結構。玉米澱粉最早被運用在工業發酵上的產

物為酒精，由酵母菌發酵產生，美國境內有超過 90%的工業酒精都是由玉米澱粉製造(Kane and Reilly, 1994)。玉米澱粉由於成本低廉且產量穩定，亦可作為培養基，利用細菌或酵母菌在生產 α -amylase(Calderon, *et al.*, 2003)、carboxylic acids (Huang, *et al.*, 2002)及 β -amylase(Reddy *et al.*, 2003)等，而 Wu 等人(2003)將 corn starch 用在虎奶菇(*Pleurotus tuber-regium*)的發酵培養上發現較其他碳源(Fructose、Glucose)能得到更多的目標產物(菌絲體及多醣體)；田(2001)用水解過的澱粉當培養基培養冬蟲夏草，也有不錯的成果，因此便選用玉米澱粉當碳源來培養樟芝，並與葡萄糖做比較。

參、材料與方法

一、實驗菌株

本實驗所用菌株為 *Antrodia cinnamomea* T.T. Chang & W.N. Chou BCRC 35396，係購自新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(BCRC)。菌株是以 slant 的形式送達，約一週內將菌種接到新鮮 slain 及 plate 以 Potato Dextrose Agar (PDA, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)當培養基，在 28 生長活化後於 4 保存，菌配則是以 Potato Dextrose Broth (PDB, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)來培養。

二、培養基組成

搖瓶試驗中所使用之液態培養基是參考 Shu and Lung (2004)做為基礎培養基，其組成為 glucose, 30 g (林 純藥工業株式會社, Japan)；peptone, 5 g (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)；yeast extract, 3 g (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)；Malt extract, 3 g (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)； $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 g (聯工化學廠, Taiwan)； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g (林 純藥工業株式會社, Japan)；thiamine hydrochloride, 1 g (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO, USA)。

發酵槽試驗之培養基是由搖瓶試驗的結果，經統計分析所得到的最適培養基組成，其成分為 corn starch, 20 g (大勝商行, Taiwan)；peptone, 5 g (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)；yeast extract, 3 g

(HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) ; Malt extract, 3 g (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) ; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 g (聯工化學廠, Taiwan) ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g (林純藥工業株式會社, Japan) ; thiamine hydrochloride, 1 g (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO, USA) 。

三、實驗流程

將樟芝菌種接入 PDA 培養皿中，於 28℃ 活化培養 28 天，取 8 個單位的菌絲塊接種於含有 100 ml PDB 之 250 ml 三角錐形瓶中，並恆溫震盪培養 10 天(28℃、100 rpm)，活化後之菌絲體與菌液以均質機打碎混勻約 30 秒，再接入液態培養基，於搖瓶或發酵槽中進行培養。

每天取樣(粗發酵液)以 4 號濾紙(Whatman, England)進行抽氣過濾，過濾後分為菌絲體及發酵濾液兩個部份，菌絲體進行菌絲乾重、胞內多醣及其 β -1,3-glucan 的含量；發酵濾液則可測其 pH 值、殘醣量、殘澱粉量、胞外多醣產量、及其 β -1,3-glucan 的含量及胞外多醣分子量。

(一) 菌種保存

將購得之菌種(原是斜面培養)，接種到新鮮製好的斜面培養基(PDA)及培養皿(PDA)上，於 28℃ 恆溫培養，待菌落長至覆蓋培養基八分滿後移至 4℃ 冷藏保存備用。需約兩星期重新接種一次，

以防止菌體老化活性降低。

(二) 菌醃培養

在製作菌醃前需先將 4 之培養皿置於 28 培養箱中使其恢復活性，後於無菌操作台中，以直徑約 6 mm 之玻璃空心管自培養皿中切取同等大小直徑約 6 mm 的菌絲塊，取 8 個單位的菌絲塊置入含有 100 ml PDB 之 250 ml 三角錐形瓶中，之後以鋁箔紙封口置於 28 震盪培養箱中，100 rpm 培養 10 天，先以均質機攪拌均勻後再接種至搖瓶或發酵槽。

(三) 搖瓶培養

搖瓶試驗的目的是要測試不同碳源、氮源及其濃度和初始 pH 值對於樟芝菌絲體生長和其多醣體產量的影響。

以 250 ml 三角瓶，分別加入下列培養基 100 ml，之後於滅菌釜中以 121、20 分鐘進行滅菌，待冷卻後接入 5% 菌醃，置入迴轉震盪式培養箱在 28、100 rpm 下培養 10 天，每天測量其發酵液的 pH 值、黏度、分析菌體乾重、胞內與胞外多醣濃度、殘澱粉量及殘醣量。此試驗進行三重複取其平均值，以進行統計分析。

a. 不同碳源：使用葡萄糖或玉米澱粉(Wu *et al.*, 2003)各 3%(W/V) 作為碳源(並以玉米澱粉為碳源之未接菌空白組，和有接菌者做

對照)

b.不同氮源：基礎培養基中的 peptone 所佔比例最大，所以測試時以 peptone 或 corn steep powder 各 0.5 % 皆搭配等量的 yeast extract(0.3 %)及 malt extract(0.3 %)

c.不同碳源濃度：由 a 及 b 實驗中找出對樟芝菌絲體及多醣體生成較佳的碳源及氮源後，再測試 1 %、2 %及 3 %三種碳源濃度

d.不同初始 pH 值：找出最佳碳源濃度後，調整培養基初始 pH 值為 3、4、5、6 及不調整 pH 值五組以測試最適 pH

(四) 發酵槽培養

探討在放大規模(scale up)試驗中，不同培養條件對於樟芝菌絲體生長及其機能性成分產量的影響。

在發酵槽中加入總容積七分滿的培養基，檢查管路(包含取樣口、進氣出氣孔及冷卻水進水出水口)是否連接無誤，接口正確及密合與否，皆會影響發酵槽在發酵過程中遭外界環境污染的可能性高低。檢查完畢將槽體置入直立式滅菌釜，以 121 °C、20 min 進行滅菌程序，滅菌完成後將槽體移入無菌操作台中，待其冷卻至適當溫度(約 30 °C)後，再接入均質過的菌醃(5 %)，移至發酵主機體，連結通氣與溫控設備(空壓機、恆溫循環水浴槽) 在 28 °C、攪拌速率 100 rpm、通氣量 0.5 vvm (air volume / fermentor

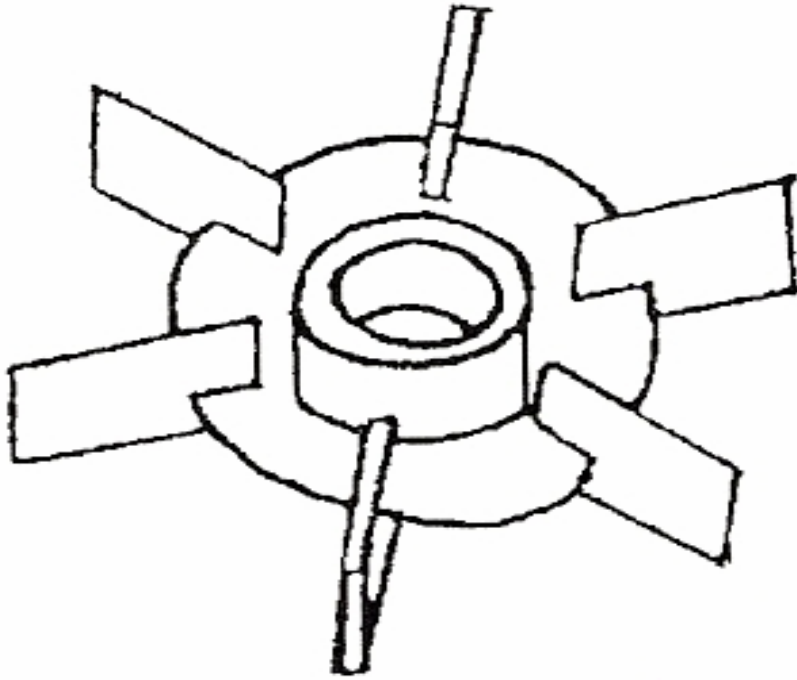
volume / minute)及 1 vvm, 10 天進行發酵。

發酵槽(Full Tech, CMF-5, Taiwan)使用的型式分為攪拌式發酵槽及模擬氣泡塔式發酵槽兩種。攪拌式發酵槽採用傳統渦輪葉片如圖七之攪拌器，總容積為 5 L，運作體積(working volume)3.5 L，全程攪拌速率維持在 100 rpm、通氣量分為全程維持在 1 vvm，或前 6 天維持在 1 vvm，後 6 天維持在 0.5 vvm 進行兩段式通氣量調控(林，2005)；模擬氣泡塔式發酵槽則是採用和攪拌式發酵槽相同之槽體，僅由槽體底部通入氣體，運作體積 3.5 L，全程不啟動攪拌器、通氣量維持在 1 vvm。會以相同槽體來模擬氣泡塔式發酵槽的原因，是由於目前業界大都是採用攪拌式發酵槽的設備，若要重新製作一個氣泡塔式槽體可能需再增加許多費用與工程變更，所以嘗試以原有的攪拌式發酵槽槽體不必更改槽體設計的方式來模擬氣泡塔式發酵槽，與原有的攪拌式發酵槽所得結果做比較。

四、分析方法

(一) 菌體乾重

將粗發酵液取定量，以烘乾測重過的 4 號濾紙過濾，再以 RO 水沖洗乾淨，放至 70 °C 烘箱，烘至恆重紀錄其重量。



圖七 發酵槽中的攪拌葉片(Rushton-turbine)(Gura and Rau,1993)

(二) pH 值

用 pH meter (Suntex, SP-2200)測定已過濾之樟芝發酵液的 pH 值

(三) 還原糖含量

利用經修正過的二硝基水楊酸法(Dinitrosalicylic acid, DNS method)(Miller, 1959)去測定還原糖含量，使用試劑為 3,5-dinitrosalicylic acid, 1% (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO, USA)；Phenol, 0.2% (聯工化學廠, Taiwan)；Sodium sulfite, 0.05% (林純藥工業株式會社, Japan)；Potassium sodium tartrate, 40% (島久藥品工業株式會社, Japan)；Sodium Hydroxide, 1% (聯工化學廠, Taiwan)。

其原理為 DNS 試劑在強鹼及高溫下會與還原糖之醛基反應，會形成紅棕色氨基化合物，在分光光度計(Spectronic 20 Genesys) 575 nm 下可測其吸光值。

實驗步驟是將 DNS 試劑和 phenol 溶於 NaOH 中再與 Na₂SO₄ 混合之後加入適量樣品中，於 100°C 水浴 15 分鐘，取出後立即加入 Potassium sodium tartrate，可穩定氨基化合物的顏色。

(四) 澱粉殘留量(Apar and Özbek, 2004)

其原理為 Amylose-iodin 結合會產生藍色的複合物，而 Amylopectin-iodin 結合會產生紫色複合物，在 550 nm 下可估算

其澱粉含量。

此試劑為 Iodine solution 包含 Potassium Iodate, 0.5 % (和光純藥工業株式會社, Japan)及 Iodine, 0.15 % (和光純藥工業株式會社, Japan)，將適量樣品和 Iodine solution 混合後測其吸光值。

(五) 粗多醣含量

利用酚硫酸法(phenol-sulfuric acid method)(Dubois *et al.*, 1956)來測胞外多醣及胞內多醣的含量。其原理為醣類與無機酸(如濃硫酸)作用，或以高溫處理時，會脫水分解而生成呋喃醛(furfural)等物質，此生成物再與酚類物質反應呈色，可用於醣類的定性或定量分析。優點是方法簡單且可快速測得結果，但缺點是，所測得的多醣量包含樣品中的大分子多醣及小分子單雙寡醣，所以容易造成多醣含量的高估(張等，1995；呂，2002)。

將經酒精萃取烘乾後的胞外及胞內多醣樣品加水，以超音波震盪器(Hwashin, Korea)復溶，取適當濃度加入 Sulfuric acid (聯工化學廠, Taiwan)及 phenol 後靜置 10 分鐘，震盪混合於水浴槽冷卻 15 分鐘，測其吸光值。

(六) 胞外多醣分子量

多醣體分子量是藉由膠體過濾層析法(GPC, Gel Permeation Chromatography)，以標準品及 sample 所測得之滯留時間來估算出

其分量大小。分離管柱中含有難溶性高度水合的聚合物，例如葡萄糖聚醣(dextran)、瓊脂醣(agarose)或聚丙烯醯胺(polyacrylamide)等做成的多孔性珠子(beads)，商業上的製品有 Sephadex 及 Sepharose 等。小分子可進入這些孔隙中，大分子不能，所以大分子通過 column 時會走珠子間的溶液而較小分子快通過，所以由樣品在管柱中的滯留時間和已知分子量標準品的滯留時間比較，即可推測其分子量大小(Stryer,1994)。

實驗步驟是將胞外多醣樣品以 0.22 μm 之濾膜(Blossombio, SY25NN)過濾後取 20 μL 經膠體過濾層析儀來測定。膠體過濾層析儀包含分析管柱(phenomenex, PolySep-SEC-P 4000 and 5000, USA)、多醣體分子量標準品(Dextran, Mw 11700、44100、123400、326600 and 848200 Da , USA)、高效能層析幫浦(aLCOTT 760, USA)及偵測器(ERC 7515A, USA)。

(七) β -1,3-glucan 含量

利用 fluorescence method 來測定多醣體中 β -1,3-glucan 含量。其原理是因 Aniline blue 中的 sirofluor 會與 β -1 \rightarrow 3-D-glucan 形成具有專一性的錯合物，此錯合物於激發波長 395 nm 照射下會於 495 nm 放出其特徵螢光(孫，2005；呂，2002)。

Laminarin(海藻多醣，from *Laminaria digitata*)為此分析之標

準品，主要以 poly β -1,3-Glucan 為主鏈鍵結，內部有少數 β -1,6-Glucan 鍵結的分支，為一個三股螺旋的結構，研究結果顯示，此多醣濃度和螢光強度具有良好線性關係，可應用在 β -1,3-glucan 含量的快速定量上(呂，2002)。因本試驗是以 Laminarin 當作標準品，所以樣品中之 β -1,3-glucan 含量單位以 Laminarin Equivalent (LE)表示，其值越高，表示此多醣結構所含 (1,3)- β -D-glucan 越多，抗腫瘤活性越佳(周，2002)。

此分析步驟是參考張(2003b)之博士論文，將適量胞外多醣及胞內多醣樣品和 0.3 N 之 NaOH 混合至完全溶解，再調整其 pH 值到 11.5，之後加入 pH 11.50, 50 mM 之 Na_2HPO_4 -NaOH buffer (Merck KGaA, Germany)定容。1 ml 樣品加入 0.1 ml, 1 mg/ml 之 Aniline blue (Ferak) 震盪混合後靜置 2 小時，之後以螢光分光光度計(HITACHI, F-2500, Japan)在激發波 395 nm 及放射波 495 nm 進行檢測。

(八) 統計分析

各平均值皆和其標準偏差一起顯示(mean \pm SEM)，本實驗中的數據是以 ANOVA 變方分析的比較採用 Duncans's test 來處理各均值間的比較，其顯著水準為 0.05($P < 0.05$)，所使用軟體為 SAS 系統(Windows V8)。

肆、結果與討論

一、搖瓶培養

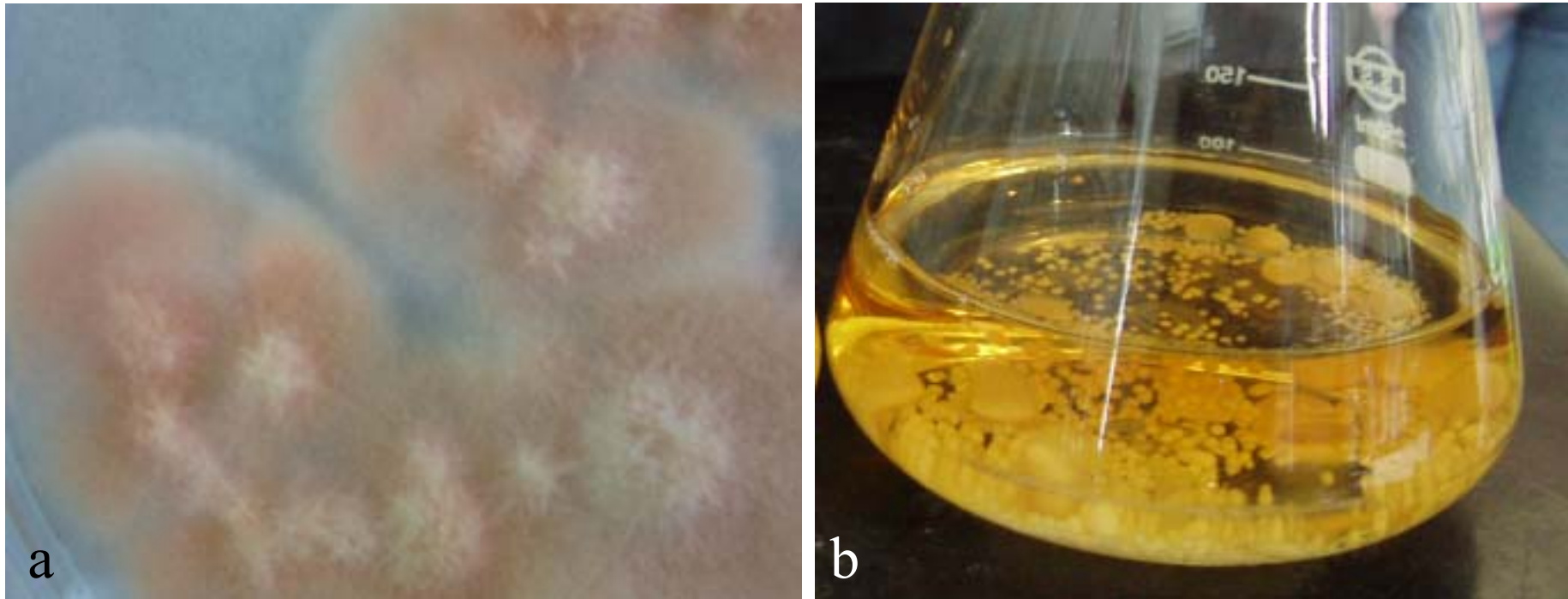
(一) 不同碳源及氮源對於樟芝(*A.cinnamomea*)培養之影響

1. 對菌絲體生長的影響

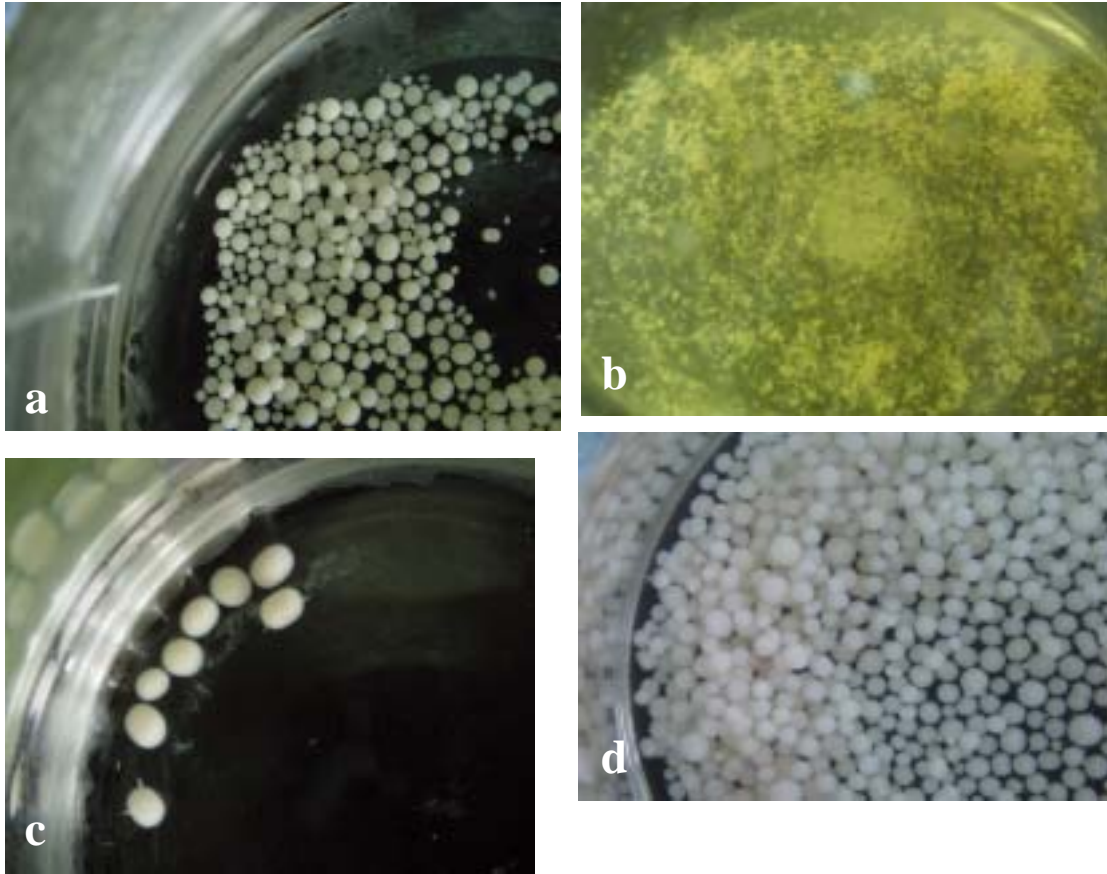
在搖瓶實驗前，需先將菌種活化，如圖八(a)為培養皿經劃線培養長出的樟芝菌落，圖八(b)則為以搖瓶培養所得之菌醃的外觀。本實驗的培養基，分別以葡萄糖及玉米澱粉各3%作為碳源，其他成分與基礎培養基相同(Shu *et al.*, 2004)，並接入5%菌醃發酵培養。

在三角瓶進行培養，結果如圖九，在菌體外觀上，當氮源相同(同為 peptone 或同為 corn steep powder)時，以葡萄糖當碳源所培養的樟芝菌絲球大小較不一致，而以澱粉為碳源時，菌絲體大小較接近。至於菌絲體的產量如圖十，以葡萄糖當碳源時，從第二天開始快速增生，到第五天達最大量(0.8 mg/ml)，之後趨於平緩，第九天菌絲體開始下降；而以玉米澱粉為碳源時，從第三天開始快速增生到第五天，再自第五天到第八天較和緩增生達最大量(1.2 mg/ml)，之後開始減少。

以葡萄糖為碳源，菌體可較早(Day 5)達到最大量(0.8 mg/ml)；以玉米澱粉為碳源需較長的時間(Day 8)才可達至最大



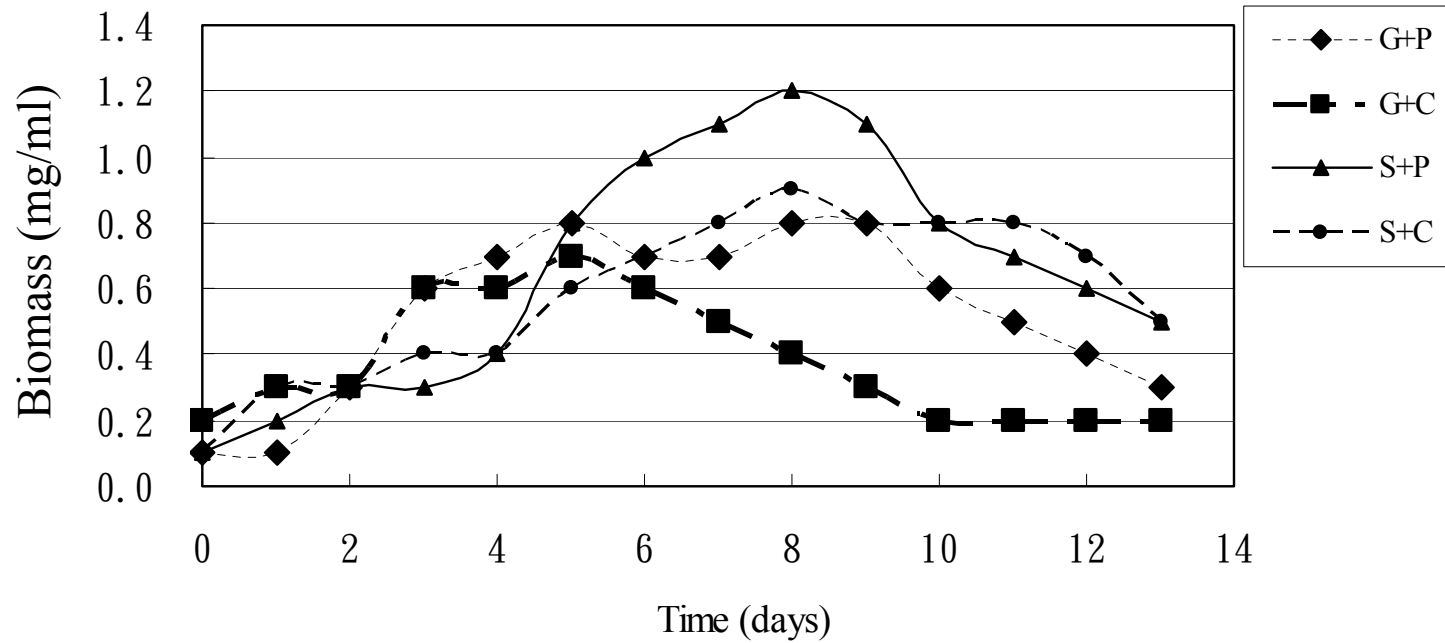
圖八 在 agar plate 培養 1 個月的(a)樟芝菌絲型態及在 agar broth 培養 10 天的(b)樟芝菌絲體菌醃型態
Fig. 8 The appearance of mycelia of *A.cinnamomea* in agar plate (a) and seed culture in shake flask (b)



圖九 樟芝在不同碳源及氮源組合以搖瓶培養 7 天的結果

Fig. 9 The appearance of *A. cinnamomea* cultured by using different carbon and nitrogen sources in shake flasks on day 7

a : glucose + peptone ; b : glucose + corn steep powder ; c : corn starch + peptone ;
d : corn starch + corn steep powder



圖十 不同碳源及氮源對樟芝菌絲體生長之影響

Fig. 10 Effect of different carbon and nitrogen sources on mycelium growth of *A. cinnamomea* during shake flask fermentation

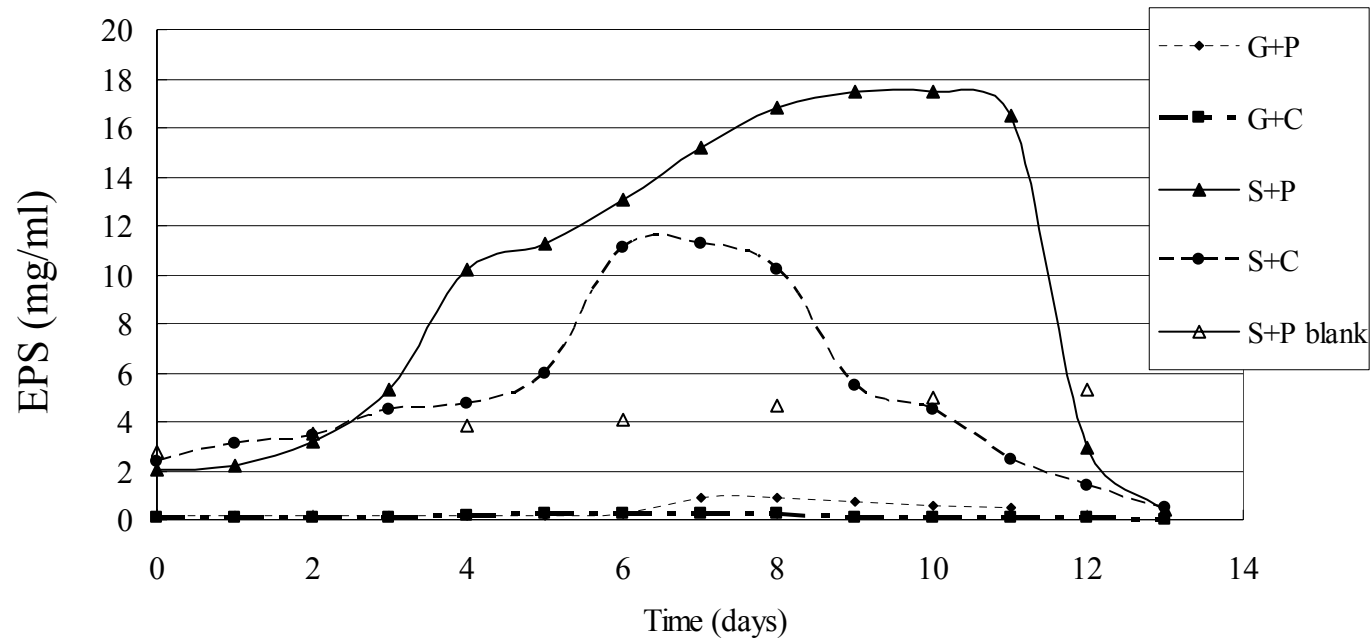
G+P=Glucose + peptone ; G+C=Glucose + Corn steep powder ; S+P=Corn starch + Peptone ; S+C=Corn starch + Corn steep powder
 S+P blank=Corn starch + Peptone but doesn't inoculate strain

量(1.2 mg/ml)，此現象可能因葡萄糖可直接被菌體利用，所以菌體適應期較短，較快進入對數生長期；而玉米澱粉為大分子多醣，菌絲體需較長的適應期，才可分泌能分解澱粉的酵素作用於澱粉(Wu *et al.*, 2003)以供其生長所利用。

2. 對多醣產量的影響

在胞外多醣的部份如圖十一，以葡萄糖當碳源，可在第七天達到最大胞外多醣量(0.91 mg/ml)；以玉米澱粉當碳源，自第八天產率趨於穩定，到第十天達到最大胞外多醣量(17.48 mg/ml)。由實驗數據觀察(表二)，當氮源相同，用玉米澱粉培養時所得到之胞外多醣產量，會較以葡萄糖所得到的多；當碳源相同時，以 peptone 當氮源所得之胞外多醣產量會較用 corn steep powder 所得到的多($P < 0.05$)，因此 corn starch 及 peptone 對於生產胞外多醣上是較有優勢的。而未接菌對照組(和 S+P 同成分，但未接菌)所取得之培養液去做粗多醣量的測試，由最初的 2.77 mg/ml 隨著時間緩緩上升，在第十二天時變成 5.28 mg/ml，由此可知，澱粉在無菌體作用時可能會因為震盪和水解作用導致其緩慢分解，但其多醣量和有接菌者相比則仍是低很多。

由於以玉米澱粉當碳源所得之胞外多醣產量較葡萄糖所生產者高非常多，且在剛接菌時含量就很高，為了削減其中可能



圖十一 不同碳源及氮源對樟芝胞外多醣產量之影響

Fig. 11 Effect of different carbon and nitrogen sources on the formation of exo-polysaccharides of *A. cinnamomea* during shake flask fermentation

G+P=Glucose + peptone ; G+C=Glucose + Corn steep powder ; S+P=Corn starch + Peptone ; S+C=Corn starch + Corn steep powder
 S+P blank=Corn starch + Peptone but doesn't inoculate strain

表二 不同碳源及氮源對樟芝菌絲乾重、多醣體產量、多醣體之 β -1,3-glucan 含量及分子量之影響

Table 2 Effect of different carbon and nitrogen sources on mycelium dry weight、polysaccharides content、 β -1,3- glucan content and EPS molecular weight of *Antrodia cinnamomea* in shake flasks

Group	Mycelium dry weight (mg/ml)	EPS (mg/ml)	IPS (mg/ml)	EPS β -1,3-glucan (μ g/ml,LE)	IPS β -1,3-glucan (μ g/ml,LE)	EPS MW (Da)
G+P	0.80±0.21 ^{ab}	0.91±0.21 ^c	0.02±0.00 ^b	4.62±0.57 ^b	1.08±0.10 ^b	2.70×10 ⁵ ^b
G+C	0.70±0.20 ^b	0.28±0.02 ^d	0.01±0.00 ^b	5.04±0.21 ^b	1.33±0.14 ^{ab}	2.43×10 ⁵ ^b
S+P	1.20±0.20 ^a	17.48±1.53 ^a	0.22±0.04 ^a	8.80±0.20 ^a	1.12±0.23 ^b	3.76×10 ⁵ ^a
S+C	0.90±0.20 ^{ab}	10.88±0.58 ^b	0.23±0.05 ^a	4.49±0.51 ^b	1.63±0.05 ^a	3.99×10 ⁵ ^a

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

Values are means \pm S.D. of triple determination

G+P=Glucose + peptone ; G+C=Glucose + Corn steep powder ;

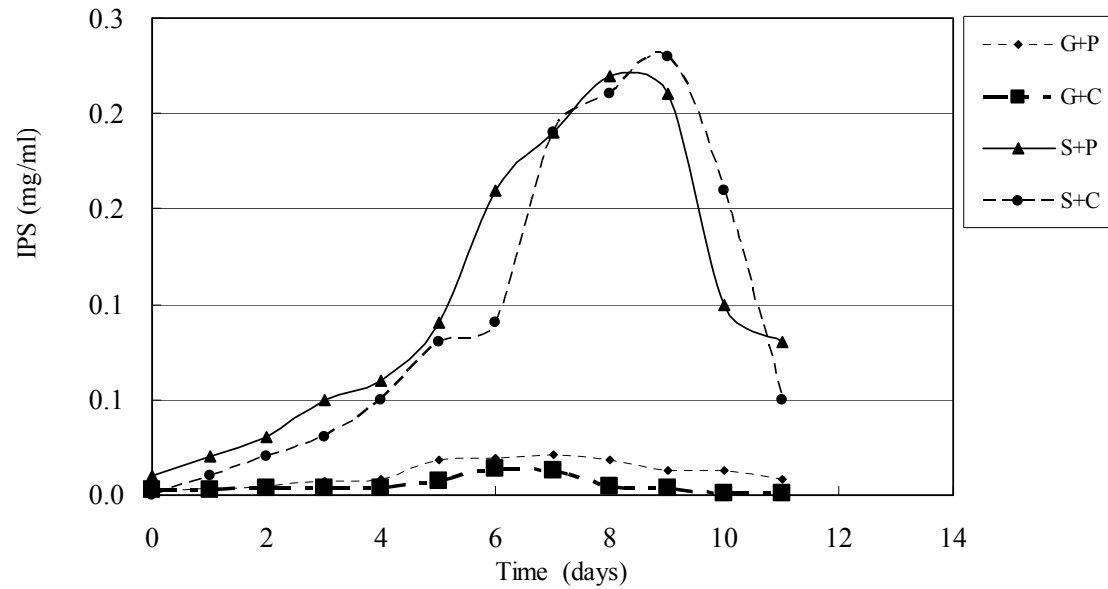
S+P=Corn starch + Peptone ; S+C=Corn starch + Corn steep powder

EPS = Exo-Polysaccharides ; IPS = Intra-Polysaccharides

造成的誤差，便將有接菌組扣掉未接菌空白組的數據，在第八天達到 12.23 mg/ml，第十天則可得到最大胞外多醣產量 12.52 mg/ml，仍較以葡萄糖當碳源者高很多，因此我們可推測，玉米澱粉對於樟芝菌絲體在胞外多醣的生產上，具有極佳的效果。

胞內多醣含量如圖十二的部分，以葡萄糖當碳源，可在第七天達到最大胞內多醣(0.02 mg/ml)；以玉米澱粉當碳源，可在第九天達到最大胞內多醣量(0.23 mg/ml)。在胞內多醣的含量上，當碳源相同時，氮源為 peptone 或是 corn steep powder 對於其含量多寡沒有顯著差異(表二)；當氮源相同時，玉米澱粉當碳源在胞內多醣含量上遠多於葡萄糖。由菌絲體生長曲線(圖十)來看，以葡萄糖當碳源時，平穩期在第五天到第九天，其胞內多醣最高產量在第七天；以玉米澱粉當碳源時，菌絲體生長之平穩期在第五到第十天，其胞內多醣最高產量在第九天，而 Kim 等人(2005)指出，具有活性之胞內多醣會在菌絲體平穩期的晚期(stationary phase)階段產生，因此當胞內多醣的最大含量在晚期(圖十二)產生時，對多醣品質而言是較佳的。

由胞外及胞內多醣曲線(圖十一及圖十二)可看到，碳源為玉米澱粉者在到達最高產量後會開始下降，而下降的幅度會較葡萄糖當碳源時快很多，此現象可能因為玉米澱粉為多醣，在菌



圖十二 不同碳源及氮源對樟芝胞內多醣含量之影響

Fig. 12 Effect of different carbon and nitrogen sources on the content of intra-polysaccharides of *A. cinnamomea* during shake flask fermentation

G+P=Glucose + peptone ; G+C=Glucose + Corn steep powder ; S+P=Corn starch + Peptone ; S+C=Corn starch + Corn steep powder
 S+P blank=Corn starch + Peptone but doesn't inoculate strain

絲體生長時會刺激其分泌較多酵素，包括 $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanase}$ 及 $\text{endo-}\beta\text{-1,3-glucanase}$ 等，使胞內及胞外多醣較快速被分解以致產值大幅下降(Wu *et al.*, 2003；Shu *et al.*, 2006)。

3. 對分子量的影響

在胞外多醣分子量(表二)的部份，當碳源相同時，以 peptone 或 corn steep powder 當氮源對於分子量大小的影響差不多；當氮源相同時，玉米澱粉相對於葡萄糖可產生分子量較大的胞外多醣($P < 0.05$)。玉米澱粉當碳源時，在第八天有最大分子量 3.99×10^5 Da (corn starch+ corn steep powder)；葡萄糖當碳源時，在第九天有最大分子量 2.70×10^5 Da (glucose+ peptone)，而 Shu and Lung (2004)在相同培養基(glucose+peptone)及相同培養環境下的搖瓶實驗中得到之分子量為 4.69×10^5 Da，較本實驗所測得之值略大。由文獻可知(王等, 1998)，菇類多醣體分子量在 3×10^4 Da 以上即具有抗腫瘤的療效，且分子量越大效果越佳。

水野和川合 (1999)曾在其研究中指出，gandoeran A(靈芝多醣)所測得分子量為 2.3×10^4 Da，在動物的降血糖實驗中發現對正常小鼠及糖尿病小鼠皆具有顯著的降血糖效果，所以就分子量大小而言，本實驗所得之多醣體可能也會有不錯的功效。

4. 對 $\beta\text{-1,3-glucan}$ 含量的影響

多醣體中 β -1,3-glucan 含量(表二)，是分別取發酵原液及菌絲體萃取原液來測胞外及胞內多醣體的 β -1,3-glucan 含量。胞外多醣的部分，以玉米澱粉和 peptone 這組的 β -1,3-glucan 含量 (Day9, 8.80 μ g/ml by S+P)高於其他三組($P < 0.05$)，而其他三組間無顯著差異；胞內多醣的部份，當碳源相同時，以 corn steep powder 當氮源比 peptone 有較多的 β -1,3-glucan 含量(1.63 μ g/ml)；當氮源相同時，兩種碳源對其含量的影響無顯著差異。

由文獻可得知(水野和川合，1999；周，2002；呂，2003)，菇類多醣體中 β -1,3-glucan 含量越高，其抗腫瘤活性越佳，雖然若以多醣產量和 β -1,3-glucan 含量的比例來看，玉米澱粉當碳源所得比例較葡萄糖低，但在單位發酵液中仍以玉米澱粉培養可得之 β -1,3-glucan 含量較多，因此藉以推測玉米澱粉和 peptone 這組培養基所能生產之總 β -1,3-glucan 含量較其他三者多。

然而以玉米澱粉當碳源時，所得之多醣量遠高於以葡萄糖當碳源者，不免令人懷疑所測得之胞外及胞內粗多醣量是否夾雜了澱粉或由其分解而成的多醣，而造成粗多醣量的高估，但從文獻(Stryer, 1994；Wurzburg, 1994)可知，澱粉多醣為 α -1,4 及 α -1,6 鍵結，而檢測 β -1,3-glucan 含量的螢光分析法對於菌體多醣之 β -1,3-glucan 是具有專一性結合的(張，2003b)，因此可

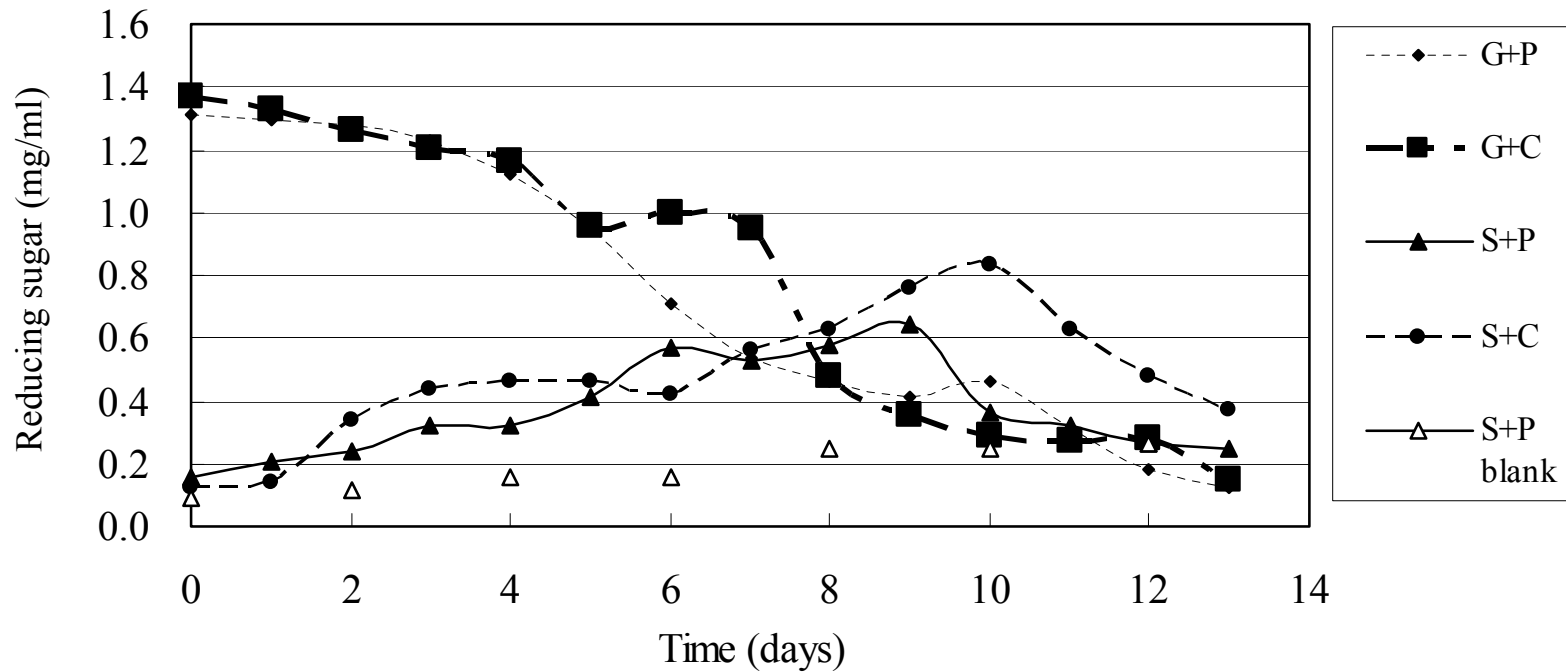
藉由此測量來確保多醣的品質。

5. 發酵液中還原醣量的變化

發酵液中的還原醣變化量如圖十三，是菌體利用碳源情況的指標。本實驗以葡萄糖當碳源時，還原醣量會隨著菌體生長而下降(由 1.35 mg/ml 降到 0.15 mg/ml)；但以玉米澱粉為碳源時，發酵液中的還原醣量則會有先上升再下降的趨勢，推測可能是因為隨著菌體生長分泌的澱粉酵素將之水解，產生較多帶有還原端的小分子醣類(Rutenberg, 1994)，而造成還原醣量的上昇(由 0.15 mg/ml 升到 0.65 mg/ml 再降到 0.25 mg/ml)。未接菌對照組(和 S+P 同成分，但未接菌)，也有緩慢上升的趨勢(由 0.09 mg/ml 升到 0.26 mg/ml)，推測可能澱粉因震盪搖晃在水中自然水解，但是其增加幅度就不像有接菌者那麼大。

6. 發酵液 pH 值的變化

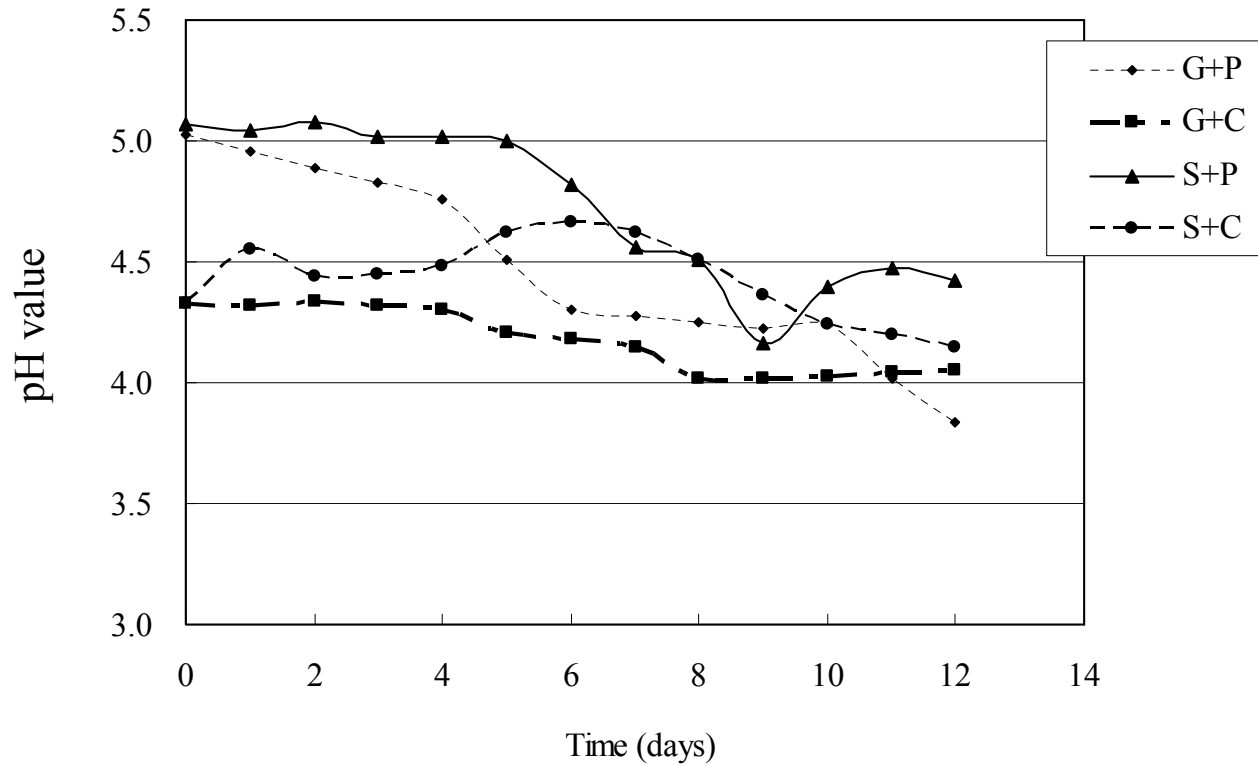
在 pH 值變化方面如圖十四，以 peptone 當氮源，初始 pH 值約在 5；以 corn steep powder 當氮源，則初始 pH 值約在 4.3。Shu 等人(2004)曾提出，樟芝菌絲體在 pH 值較高(約 pH=5)環境會產生較多胞外多醣(相較於 pH=4.3 時)，所以使用不同氮源造成培養液 pH 值的高低差異，可能是影響胞外多醣產量多寡的原因，以致於在碳源相同時，用 peptone 當氮源可得到較多胞外



圖十三 不同碳源及氮源對樟芝發酵液還原糖量之影響

Fig. 13 Effect of different carbon and nitrogen sources on the content of reducing sugar from *A. cinnamomea* during shake flask fermentation

G+P=Glucose + peptone ; G+C=Glucose + Corn steep powder ; S+P=Corn starch + Peptone ; S+C=Corn starch + Corn steep powder
 S+P blank=Corn starch + Peptone but doesn't inoculate strain



圖十四 不同碳源及氮源對樟芝發酵液 pH 值之影響

Fig. 14 Effect of different carbon and nitrogen sources on pH value of *A. cinnamomea* during shake flask fermentation
 G+P=Glucose + peptone ; G+C=Glucose + Corn steep powder ; S+P=Corn starch + Peptone ; S+C=Corn starch + Corn steep powder
 S+P blank=Corn starch + Peptone but doesn't inoculate strain

多醣(表二)。

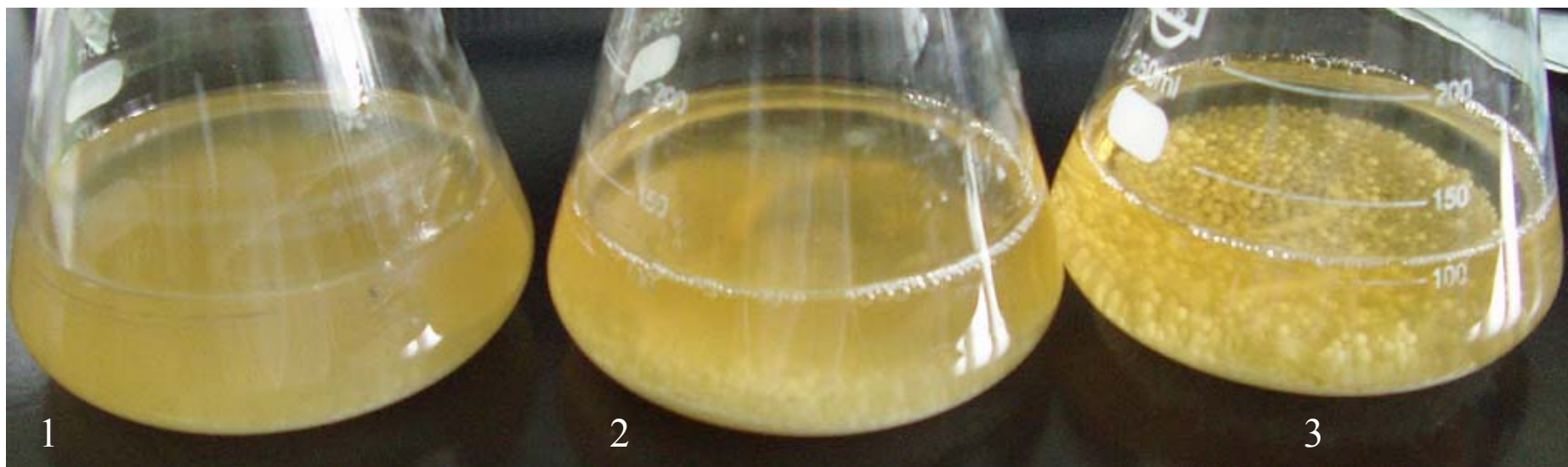
由表二可得知，當培養基以玉米澱粉及 peptone 培養時，對於樟芝的菌絲體產量、胞外多醣及其 β -1,3-glucan 含量和胞內多醣的生產與胞外多醣分子量接較其他三種培養基組成好($P < 0.05$)，因此選用 S+P 這組成分進行下一階段的實驗。

(二) 不同碳源濃度對於樟芝(*A.cinnamomea*) 培養之影響

由前項實驗確定較佳碳源(corn starch)及較佳氮源(peptone)組合後，開始測試較佳的碳源濃度。原本碳源濃度為 30 g/L(3%)，再測試 10 g/L(1%)及 20 g/L(2%)，考量到以降低培養基成本為目的，所以選擇測試的碳源濃度是往下遞減的。

1. 對菌絲體生長的影响

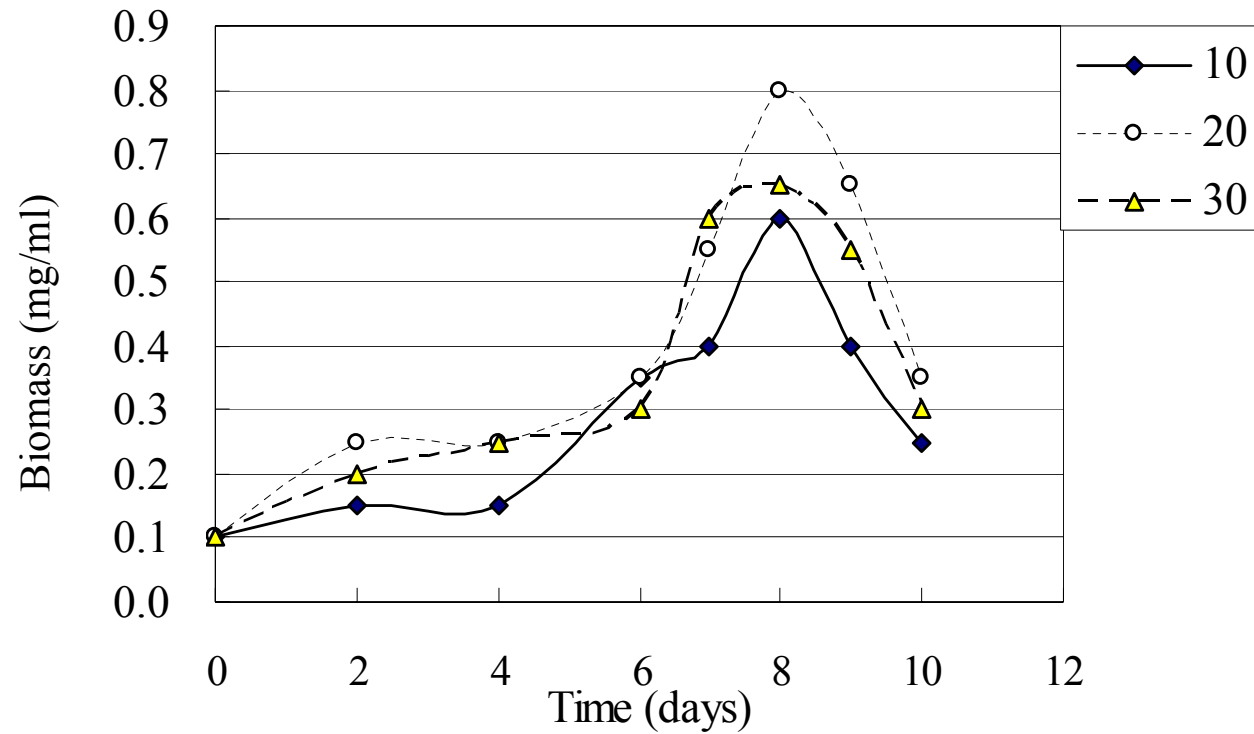
菌絲體外觀如圖十五，不同濃度的碳源對樟芝菌絲體外型影響不大，菌絲球的直徑約 0.1 cm。菌絲體乾重如圖十六及表三來看，三種濃度培養之菌絲體量在第六天以前緩緩上昇，之後開始快速生長，玉米澱粉濃度 10 g/L 之菌絲體在第八天有最大菌絲產量 0.60 mg/ml；濃度 20 g/L 在第八天有最大菌絲產量 0.80 mg/ml；濃度 30 g/L 也同在第八天有最大菌絲產量 0.65 mg/ml，之後三者之菌絲體量皆快速下降，而三者的菌絲產量是無顯著差異的。



圖十五 不同玉米澱粉濃度在第七天之樟芝菌絲體外觀

Fig. 15 The mycelia of *A. cinnamomea* from different corn starch concentration on day 7

1 = starch con. is 10 g/L ; 2 = starch con. is 20 g/L ; 3 = starch con. is 30 g/L



圖十六 不同玉米澱粉濃度對樟芝發酵期間菌絲生長之影響

Fig. 16 Effect of corn starch concentration on mycelium growth of *A. cinnamonomea* during shake flask fermentation

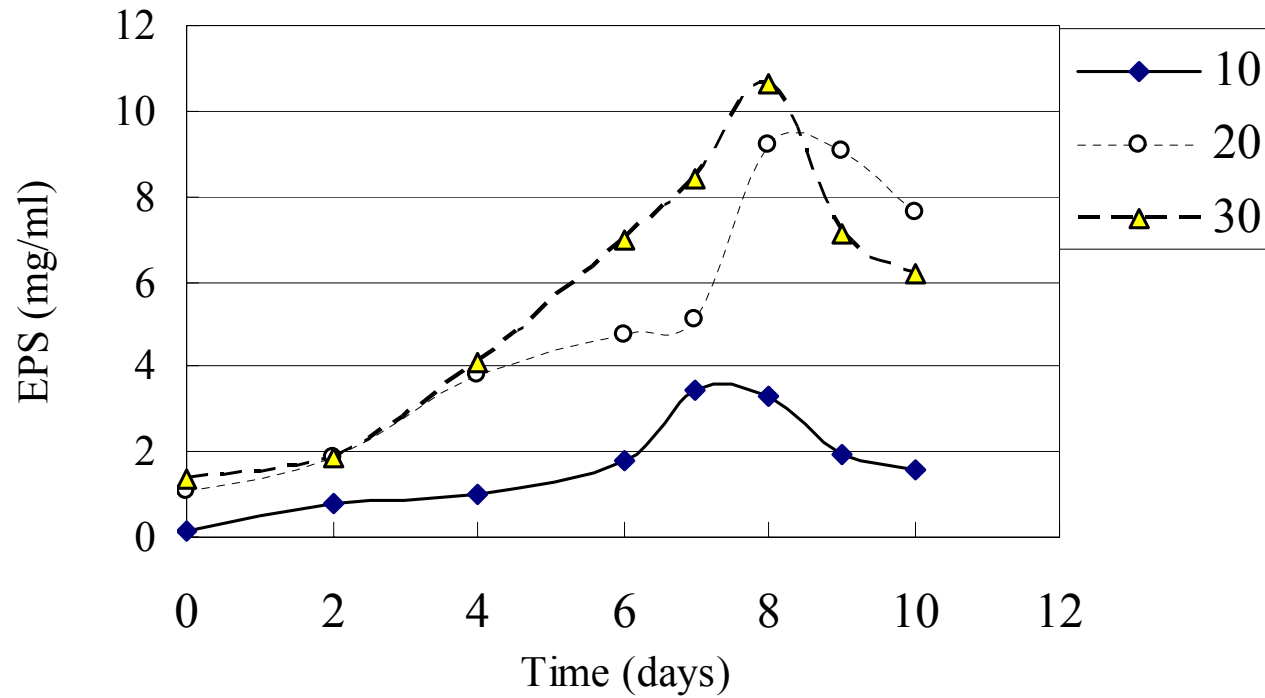
10 = starch con. is 10 g/L ; 20 = starch con. is 20 g/L ; 30 = starch con. is 30 g/L

2. 對多醣體產量的影響

在胞外多醣產量如圖十七及表三所示，玉米澱粉濃度 10 g/L 在第七天有最大胞外多醣產量 3.43 mg/ml；濃度 20 g/L 在第八天有最大產量 9.21 mg/ml；濃度 30 g/L 也同在第八天有最大產量 10.61 mg/ml，由產量曲線可看出，碳源濃度 20 及 30 g/L 明顯優於 10 g/L ($P < 0.05$)，不過 20 g/L 及 30 g/L 間的胞外多醣產量無顯著差異，而達到最大產量所需的時間三者是很接近的。

在上一個實驗中，因為用玉米澱粉當碳源所得之樟芝胞外多醣產量遠高於葡萄糖者，可能會有一起測到發酵液中澱粉多醣的疑慮，但在此次不同碳源濃度的測試中，可以發現並非碳源濃度越高(30 g/L)所測得之胞外多醣就會越多，由表三數值來看 30 g/L 和較低濃度(20 g/L)所得之胞外多醣產量相當。

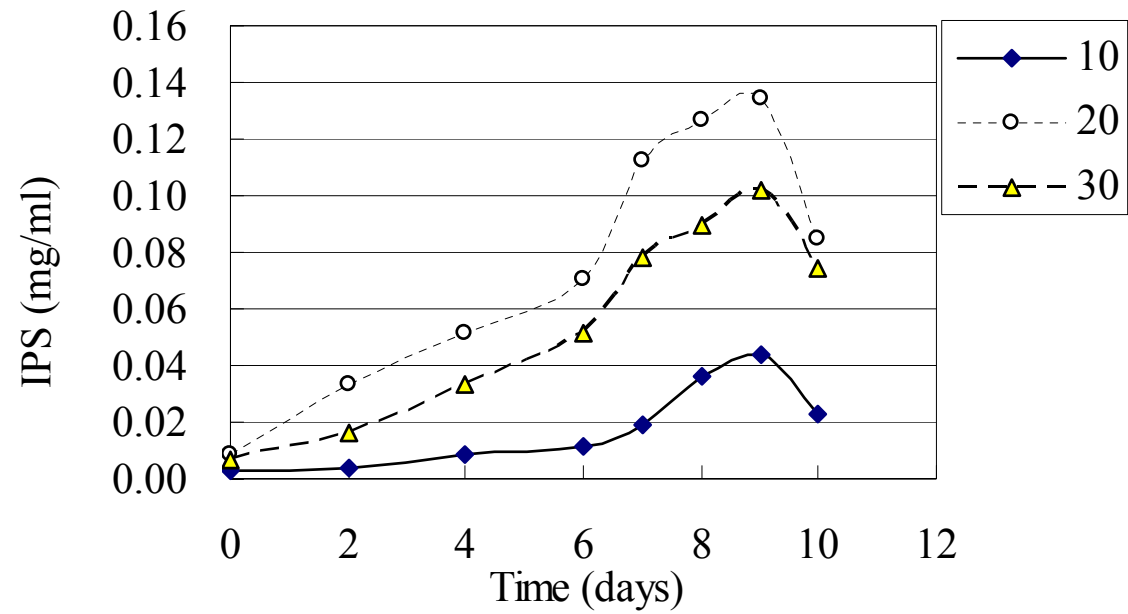
胞內多醣含量如圖十八及表三，玉米澱粉濃度 10 g/L 在第九天有最大胞內多醣產量 0.04 mg/ml；濃度 20 g/L 在第九天有最大產量 0.13 mg/ml；濃度 30 g/L 也同在第九天有最大產量 0.10 mg/ml，由產量曲線可看出，碳源濃度 20 g/L 優於 30 g/L，而 30 g/L 優於 10 g/L，但 20 g/L 和 30 g/L



圖十七 不同玉米澱粉濃度對樟芝發酵期間胞外多醣產量之影響

Fig. 17 Effect of corn starch concentration on the formation of exo-polysaccharides of *A. cinnamomea* during shake flask fermentation

10 = starch con. is 10 g/L ; 20 = starch con. is 20 g/L ; 30 = starch con. is 30 g/L



圖十八 不同玉米澱粉濃度對樟芝發酵期間胞內多醣含量之影響

Fig. 18 Effect of corn starch concentration on the content of intra-polysaccharides of *A. cinnamomea* during shake flask fermentation

10 = starch con. is 10 g/L ; 20 = starch con. is 20 g/L ; 30 = starch con. is 30 g/L

表三 不同玉米澱粉濃度對樟芝菌絲乾重、多醣體產量、多醣體之 β -1,3- glucan 含量之影響

Table 3 Effect of different corn starch concentration on mycelium dry weight、polysaccharides and β -1,3- glucan content of *Antrodia cinnamomea* in shake flasks

Corn starch (g / L)	Mycelium dry weight (mg/ml)	EPS (mg/ml)	IPS (mg/ml)	EPS β -1,3- glucan (μ g/ml,LE)	IPS β -1,3- glucan (μ g/ml,LE)
10	0.60 \pm 0.28 ^a	3.43 \pm 0.19 ^b	0.04 \pm 0.00 ^b	8.14 \pm 0.17 ^b	1.59 \pm 0.06 ^c
20	0.80 \pm 0.14 ^a	9.21 \pm 0.23 ^a	0.13 \pm 0.02 ^a	11.62 \pm 1.11 ^a	2.68 \pm 0.16 ^a
30	0.65 \pm 0.35 ^a	10.61 \pm 1.06 ^a	0.10 \pm 0.03 ^{ab}	9.83 \pm 0.65 ^{ab}	2.13 \pm 0.21 ^b

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

Values are means \pm S.D. of triple determination

EPS = Exo-Polysaccharides ; IPS = Intra-Polysaccharides

間則無顯著差異，10 g/L 和 30 g/L 間亦無顯著差異。

所以綜合來說，選擇碳源濃度 20 g/L，對於多醣體的生產應該是較有利的，因其產量較高且節省碳源用量。

3. 對 β -1,3-glucan 含量的影響

不同碳源濃度對樟芝胞外多醣之 β -1,3-glucan 含量的影響如表三，是以發酵原液來測量其含量。碳源濃度 10 g/L 在第七天有最大含量 8.14 $\mu\text{g/ml}$ ；濃度 20 g/L 在第八天有最大含量 11.62 $\mu\text{g/ml}$ ；濃度 30 g/L 亦在第八天有最大含量 9.83 $\mu\text{g/ml}$ 。濃度 20 g/L、30 g/L 及 10 g/L、30 g/L 間皆無顯著差異，但以多醣品質來看，20 g/L 優於其他兩者。

在胞內多醣之 β -1,3-glucan 含量如表三所示，是以菌絲體萃取液來測其含量。碳源濃度 10 g/L 在第八天有最大含量 1.59 $\mu\text{g/ml}$ ；20 g/L 在第九天有最大含量 2.68 $\mu\text{g/ml}$ ；30 g/L 亦在第九天有最大含量 2.13 $\mu\text{g/ml}$ 。三者間皆具顯著差異，而以 20 g/L 最優($P < 0.05$)。

綜合來說，以碳源濃度 20 g/L 培養所得之樟芝多醣有較多的 β -1,3-glucan 含量，可視為具有較其他兩者更佳的抗腫瘤活性，在生產上具有較大的效益。

4. 發酵液中還原醣的變化

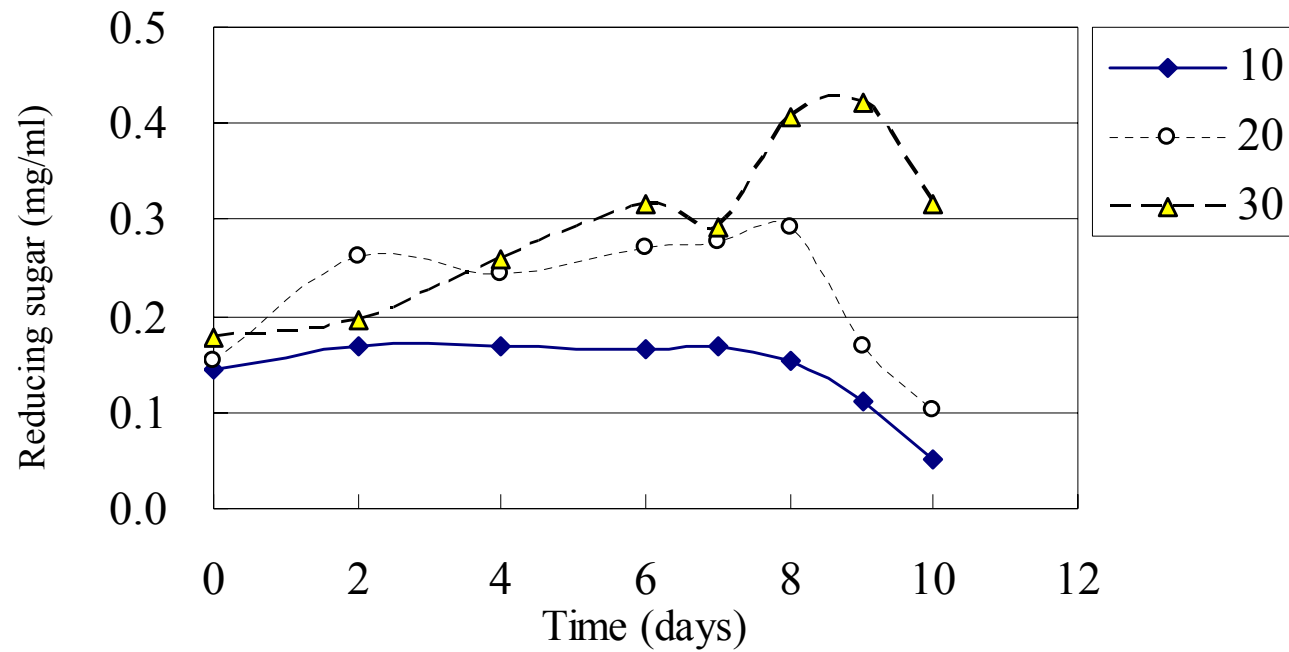
在還原醣量變化如圖十九的部份，三種碳源濃度之培養基的初始還原醣量是差不多的，濃度 10 g/L 的曲線是不明顯的上升後下降；20 g/L 的曲線是緩緩上昇到第八天後快速下降；30 g/L 的曲線是緩緩上昇到第七天開始快速上昇，第九天後快速下降，但可能因 30 g/L 澱粉量本來較多，所以水解後產生的小分子還原醣較多，因此在第十天的還原醣量仍比 10 g/L 及 20 g/L 高。

5. 發酵液中殘澱粉量的變化

殘澱粉量變化如圖二十所示，培養基經過滅菌處理，可能因高溫加熱造成澱粉部分水解，以致在未接菌前三者約有 63~66 %澱粉存在，之後澱粉量緩慢下降，從第七天到第八天可能被菌體產生的酵素分解才有明顯的下降趨勢。

6. 發酵液 pH 值的變化

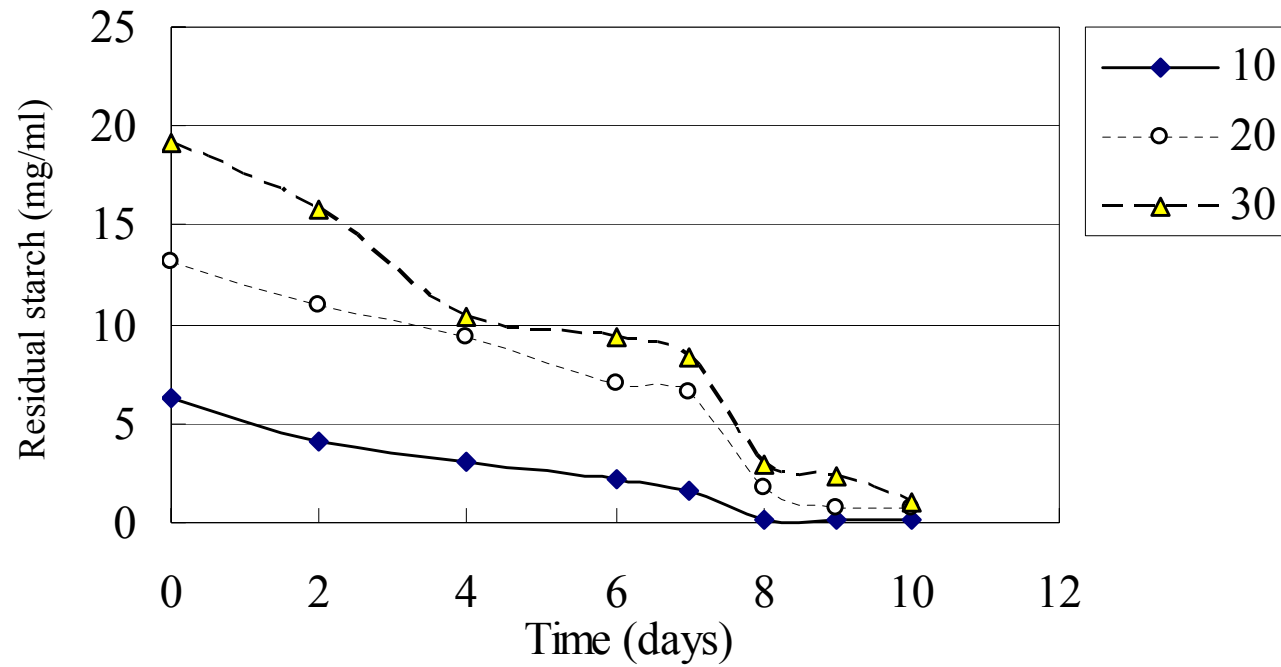
如圖二十一，在 pH 值的部份，三者的 pH 值分布範圍約在 5.4~4.4 間。從剛接菌到第五天，pH 值緩慢下降，第六天開始快速下降，而由菌絲體生長的曲線(圖十八)來看，也是第六天開始快速生長，推測可能因菌體生長代謝所產生的酸性物質使發酵液之 pH 值下降。



圖十九 不同玉米澱粉濃度對樟芝發酵期間還原糖量之影響

Fig. 19 Effect of corn starch concentration on the content of reducing glucose of *A. cinnamomea* during shake flask fermentation

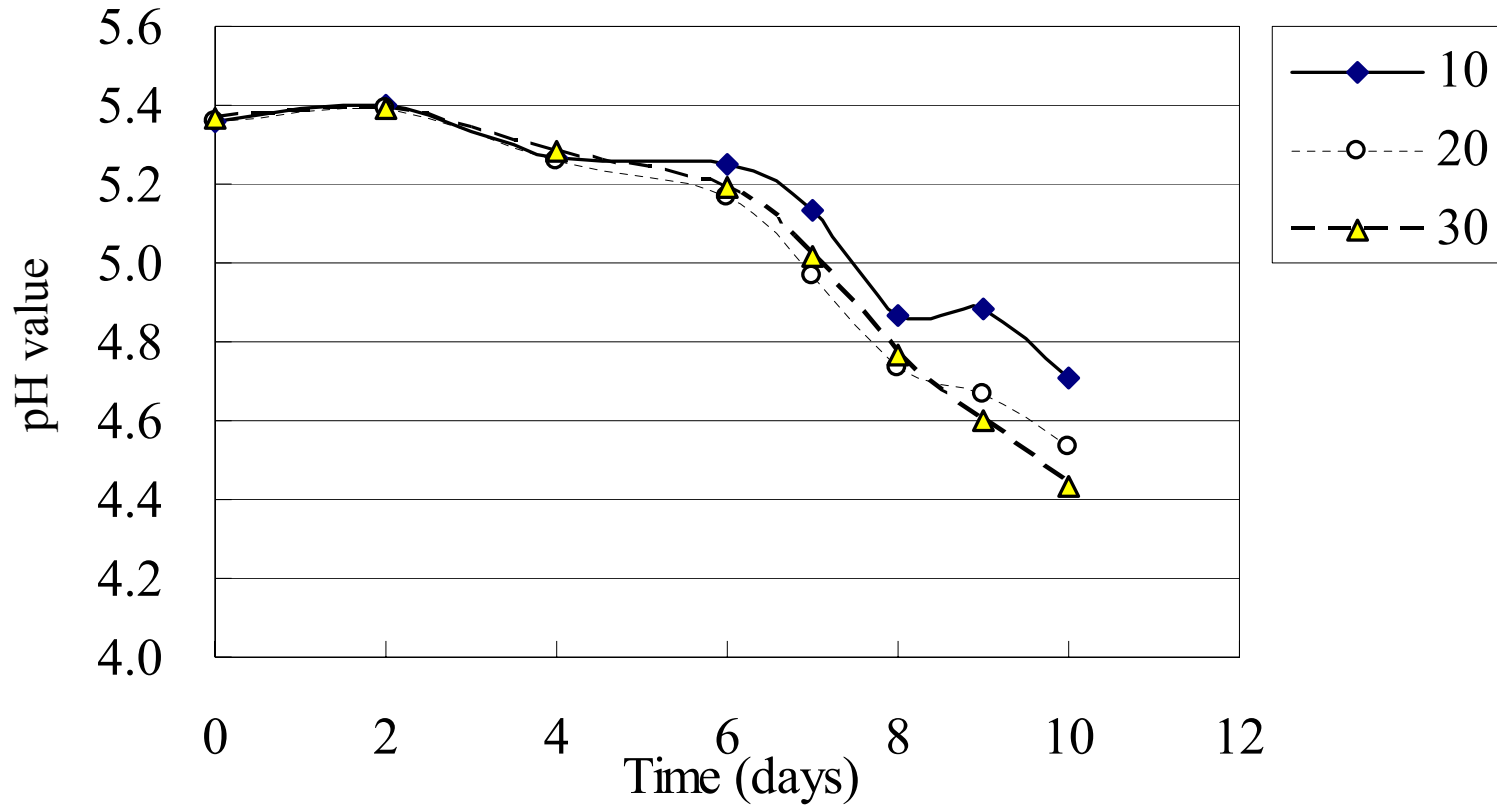
10 = starch con. is 10 g/L ; 20 = starch con. is 20 g/L ; 30 = starch con. is 30 g/L



圖二十 不同玉米澱粉濃度對樟芝發酵期間殘澱粉量之影響

Fig. 20 Effect of corn starch concentration on the content of residual starch of *A. cinnamomea* during shake flask fermentation

10 = starch con. is 10 g/L ; 20 = starch con. is 20 g/L ; 30 = starch con. is 30 g/L



圖二十一 不同玉米澱粉濃度對樟芝發酵液 pH 值之影響

Fig. 21 Effect of corn starch concentration on pH value of *A. cinnamomea* during shake flask fermentation

10=starch con. is 10 g/L ; 20=starch con. is 20 g/L ; 30=starch con. is 30 g/L

(三) 不同初始 pH 值對於樟芝(*A.cinnamomea*)培養之影響

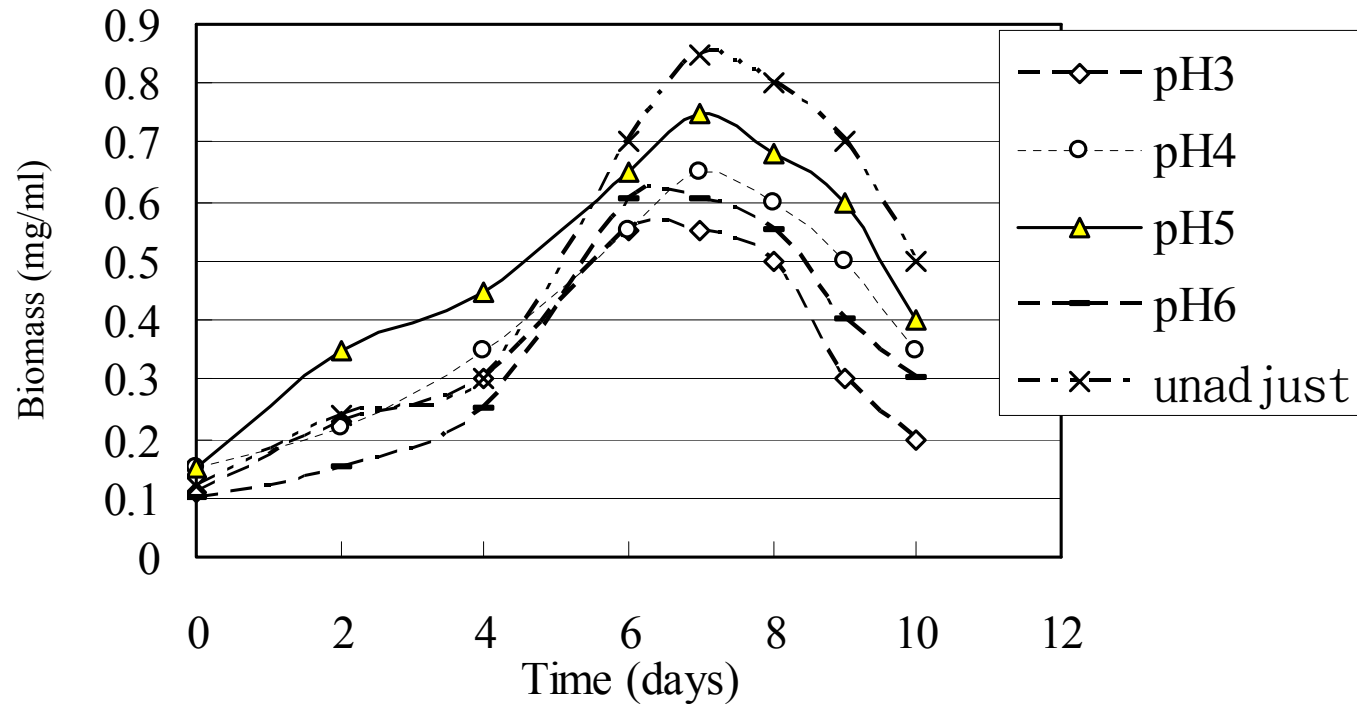
由上一組實驗中得知，利用碳源濃度 20 g/L 在多醣體產量及其 β -1,3- glucan 含量上皆有較佳的效果，所以選擇此濃度來進行隨後的測試，項目包含調整培養基的初始 pH 值分別至 3、4、5、6 以及不調整 pH(約 5.3)，共五組。

1. 對菌絲體生長的影響

在菌絲體生長如圖二十二及表四，初始 pH 值不調整者在第七天有最大產量 0.85 mg/ml；初始 pH 3 在第六天有最大產量 0.55 mg/ml；初始 pH 4 以及 5 在第七天分別有最大產量 0.65 mg/ml 及 0.75 mg/ml；初始 pH 6 在第六天有最大產量 0.60 mg/ml，五組的菌絲體生長約在第四天開始快速生長，以數據來看，除了初始 pH=3 時產量較差，其他四組間無顯著差異，但以不調整初始 pH 對於菌絲體產量有較佳的結果。

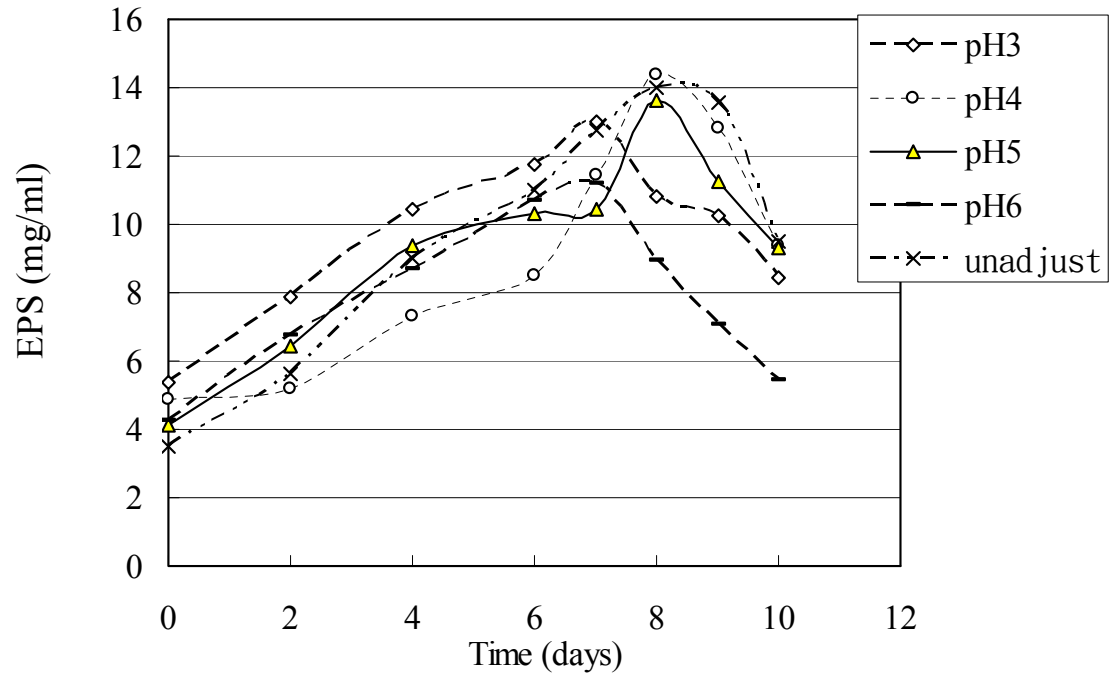
2. 對多糖體產量的影響

在胞外多醣產量如圖二十三及表四的部份，初始 pH 值不調整組在第八天有最大產量 14.02 mg/ml；初始 pH 3 在第七天有最大產量 13.01 mg/ml；初始 pH 4 以及 5 在第八天分別有最大產量 14.37 mg/ml 及 13.60 mg/ml；初始 pH 6 在第七天有最大產量 11.16 mg/ml，而五組間的產值是無顯著差異的。以曲線來看，除了初



圖二十二 不同初始 pH 對樟芝菌絲生長之影響

Fig. 22 Effect of different initial pH on the mycelium growth of *A. cinnamomea* during shake flask fermentation
 Unadjust=initial pH unjusted ; pH3=initial pH adjusted to 3 ; pH4=initial pH adjusted to 4 ; pH5=initial pH adjusted to 5 ; pH6=initial pH
 adjusted to 6



圖二十三 不同初始 pH 對樟芝胞外多醣產量之影響

Fig. 23 Effect of different initial pH on the formation of exo-polysaccharides of *A. cinnamomea* during shake flask fermentation

Unadjust=initial pH unjusted ; pH3=initial pH adjusted to 3 ; pH4=initial pH adjusted to 4 ; pH5=initial pH adjusted to 5 ; pH6=initial pH adjusted to 6

表四 不同初始 pH 值對樟芝菌絲乾重、多醣體產量及多醣體之 β -1,3- glucan 含量之影響

Table 4 Effect of different initial pH value on mycelium dry weight、polysaccharides and β -1,3-glucan content of *Antrodia cinnamomea* in shake flasks

Group	Mycelium dry weight (mg/ml)	EPS (mg/ml)	IPS (mg/ml)	EPS β -1,3-glucan (μ g/ml,LE)	IPS β -1,3-glucan (μ g/ml,LE)
unadjusted	0.85 \pm 0.07 ^a	14.02 \pm 1.42 ^a	0.07 \pm 0.00 ^a	11.06 \pm 0.42 ^a	2.54 \pm 0.31 ^a
pH3	0.55 \pm 0.07 ^b	13.01 \pm 0.87 ^a	0.01 \pm 0.00 ^c	7.40 \pm 0.41 ^c	0.82 \pm 0.20 ^c
pH4	0.65 \pm 0.11 ^{ab}	14.37 \pm 1.49 ^a	0.04 \pm 0.00 ^b	11.35 \pm 1.44 ^a	1.99 \pm 0.37 ^{ab}
pH5	0.75 \pm 0.05 ^a	13.60 \pm 1.64 ^a	0.04 \pm 0.00 ^b	9.44 \pm 0.29 ^{ab}	2.14 \pm 0.16 ^a
pH6	0.60 \pm 0.08 ^{ab}	11.16 \pm 0.70 ^a	0.01 \pm 0.00 ^c	8.40 \pm 0.60 ^{bc}	1.37 \pm 0.20 ^{bc}

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

Values are means \pm S.D. of triple determination

Unadjust = initial pH unadjusted ; pH3 = initial pH adjusted to 3 ; pH4 = initial pH adjusted to 4 ; pH5 = initial pH adjusted to 5 ; pH6 = initial pH adjusted to 6

EPS = Exo-Polysaccharides ; IPS = Intra-Polysaccharides

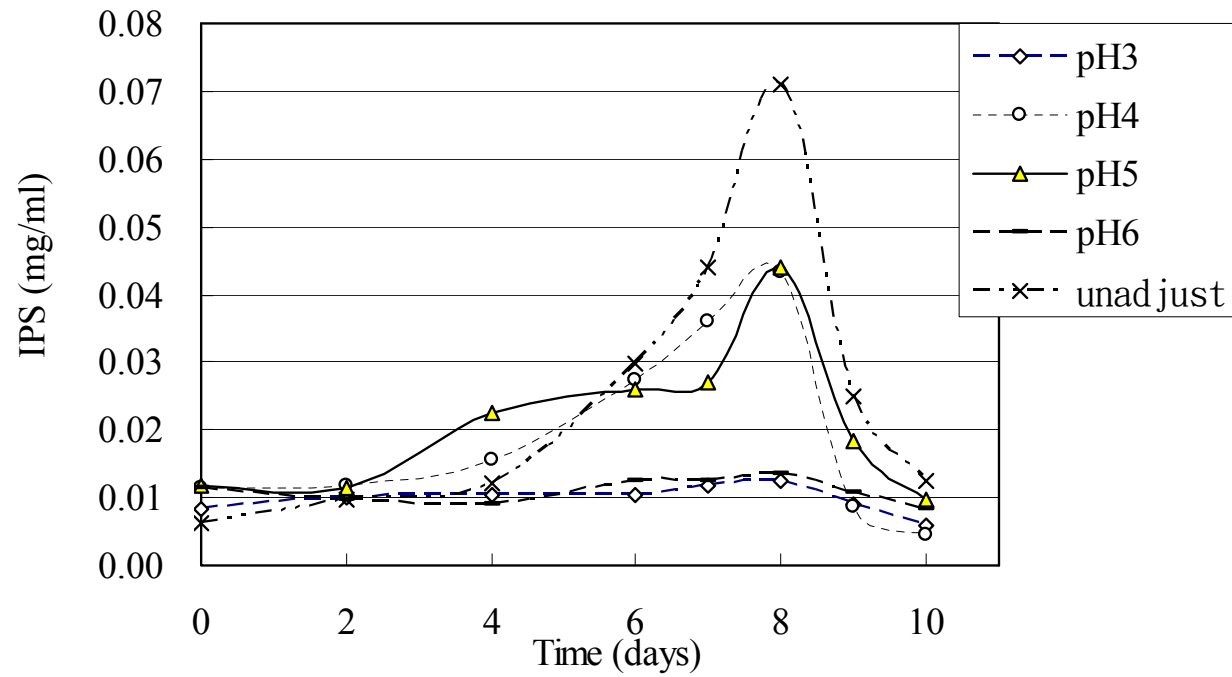
始 pH 4 者從第六天開始快速上昇，其他四組上升皆較和緩，而 pH 值 3 及 6 兩組在第七天之後開始快速下降，其他三組則是在第八及第九天之後開始快速下降。

在胞內多醣含量如圖二十四及表四的部份，初始 pH 不調整、pH 3、pH 4、pH 5 及 pH 6 五組的最大產量皆在第八天，產值分別為 0.07 mg/ml；0.01 mg/ml；0.04 mg/ml；0.04 mg/ml；0.01 mg/ml，以數值來看，不調整組優於其他四組，而初始 pH 4 及 5 間無顯著差異；pH 3 及 6 間無顯著差異，但 pH 4 與 5 兩組優於 3 與 6 兩組。以曲線來看，pH 3 及 6 兩組趨勢相近，皆不明顯的上昇，在第八天後下降；pH 4 及不調整組皆是在第四天開始較快速上昇，pH 5 者在第七天快速上昇，後三者皆在第八天後開始快速下降。所以綜合來說，不調整初始 pH 在多醣產量上較其他組好，且因為不用調控 pH 可較需調控者更節省成本。

3. 對 β -1,3-glucan 含量的影響

在 β -1,3-glucan 含量如表四所示，胞外及胞內多醣之 β -1,3-glucan 含量，分別由發酵原液及菌絲體萃取液來測定。

胞外多醣之 β -1,3-glucan 含量，不調整初始 pH、pH 4 及 5 者較高，皆在第八天有最大量，分別為 11.06 μ g/ml、11.35 μ g/ml 及 9.44 μ g/ml，三者間無顯著差異；而 pH 為 3 及 6 則在第七天



圖二十四 不同初始 pH 對樟芝胞內多醣含量之影響

Fig. 24 Effect of different initial pH on the content of intra-polysaccharides of *A. cinnamomea* during shake flask fermentation

Unadjust=initial pH unjusted ; pH3=initial pH adjusted to 3 ; pH4=initial pH adjusted to 4 ; pH5=initial pH adjusted to 5 ; pH6=initial pH adjusted to 6

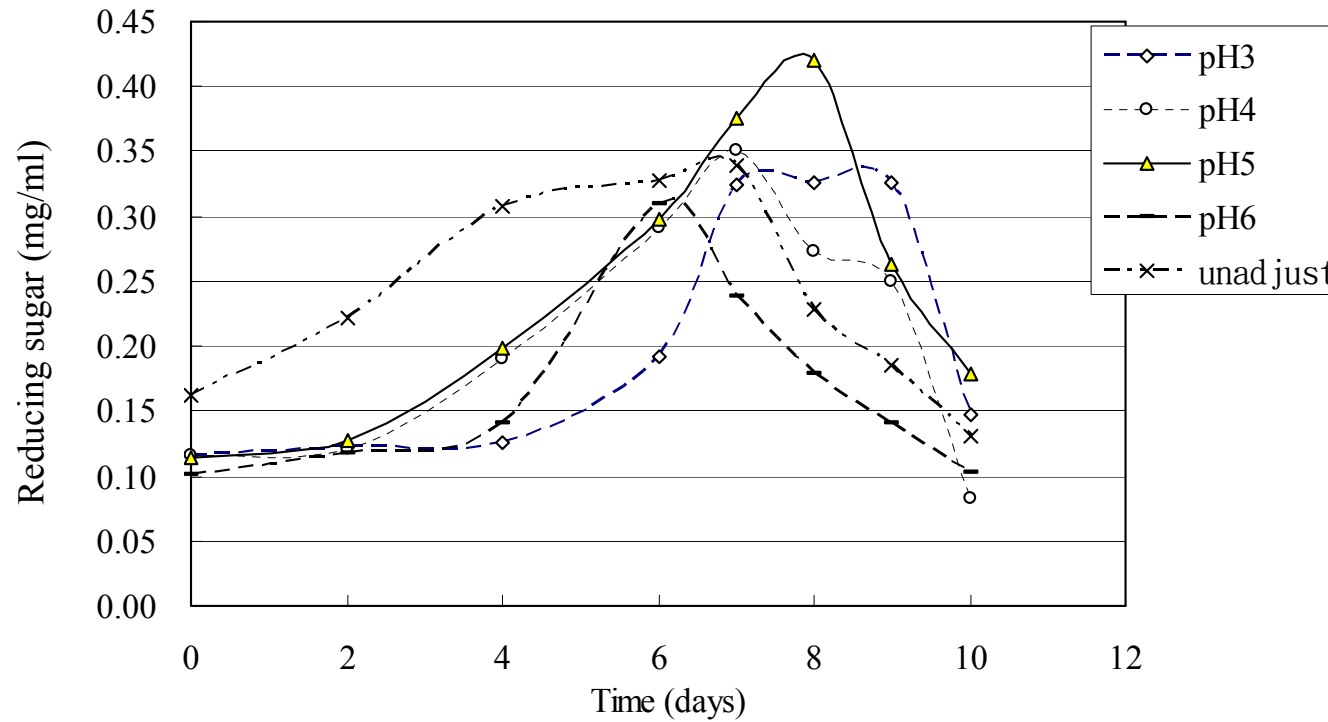
有最大量，分別為 7.40 $\mu\text{g/ml}$ 及 8.40 $\mu\text{g/ml}$ ，兩者間無顯著差異，但前三者的 β -1,3-glucan 含量對後兩者的量是有顯著差異的多。

胞內多醣之 β -1,3-glucan 含量，除了初始 pH 3 者之最大含量在第七天，有 0.82 $\mu\text{g/ml}$ ，其他四組最大量則都在第八天，而 pH 不調整、pH 4、5 及 6 之含量分別為 2.54 $\mu\text{g/ml}$ 、1.99 $\mu\text{g/ml}$ 、2.14 $\mu\text{g/ml}$ 及 1.99 $\mu\text{g/ml}$ 。以數據來看，不調整組、初始 pH 4 及 5 之含量間無顯著差異，pH 3 及 6 間無顯著差異但較前三組低，和胞外多醣的 β -1,3-glucan 含量的結果相同。

以數值來看，不調整初始 pH 者可得到品質較佳的多醣體，而且操作上較簡便，所以是較佳的培養方式。

4. 發酵液中還原醣量的變化

還原醣變化量如圖二十五的部份，不調整初始 pH 由剛接菌開始便較快速的上昇，第四到第七天趨於平緩，第七天後開始快速下降；初始 pH 3 則是在第四天開始快速上昇，第七到第九天趨於平緩，之後開始快速下降；pH 4 在第二天開始快速上昇第七天後開始快速下降；pH 5 也是在第二天開始快速上昇，第八天後開始快速下降；pH 6 在第四天開始快速上昇，第六天後開始快速下降。和菌絲體生長曲線來比較觀察，當菌絲體開始快速生長，



圖二十五 不同初始 pH 對樟芝發酵液還原醣量之影響

Fig. 25 Change of different initial pH on reducing sugar content of *A. cinnamomea* during shake flask fermentation
 Unadjust=initial pH unjusted ; pH3=initial pH adjusted to 3 ; pH4=initial pH adjusted to 4 ; pH5=initial pH adjusted to 5 ; pH6=initial pH adjusted to 6

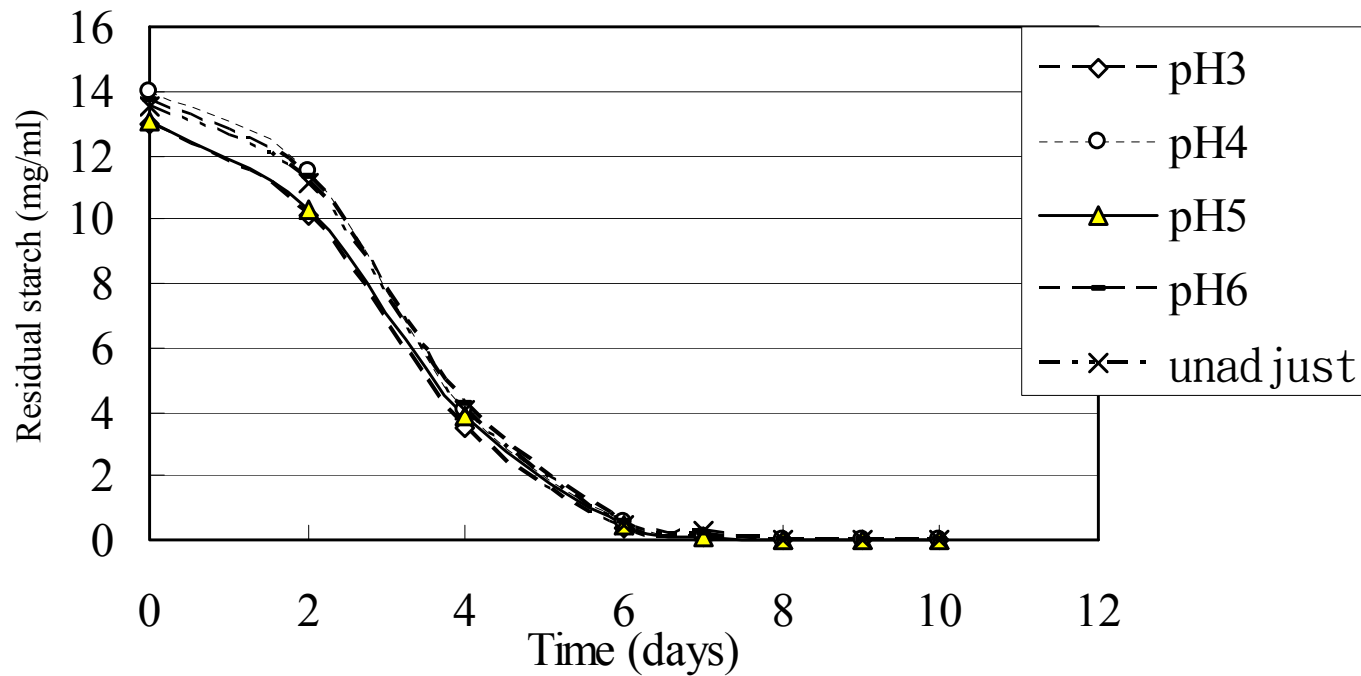
還原糖量也會開始上升，所以推測菌體在生長期間會分泌可分解澱粉的酵素，供其生長所利用。

5. 發酵液中殘澱粉量的變化

殘澱粉變化量如圖二十六的部份，在剛接菌時約有 65~70% 澱粉殘留，五組的澱粉殘留量皆從剛接菌開始便快速下降，第六天以後趨近於零，表示澱粉幾乎被分解成較小的多醣分子。

6. 發酵液 pH 值的變化

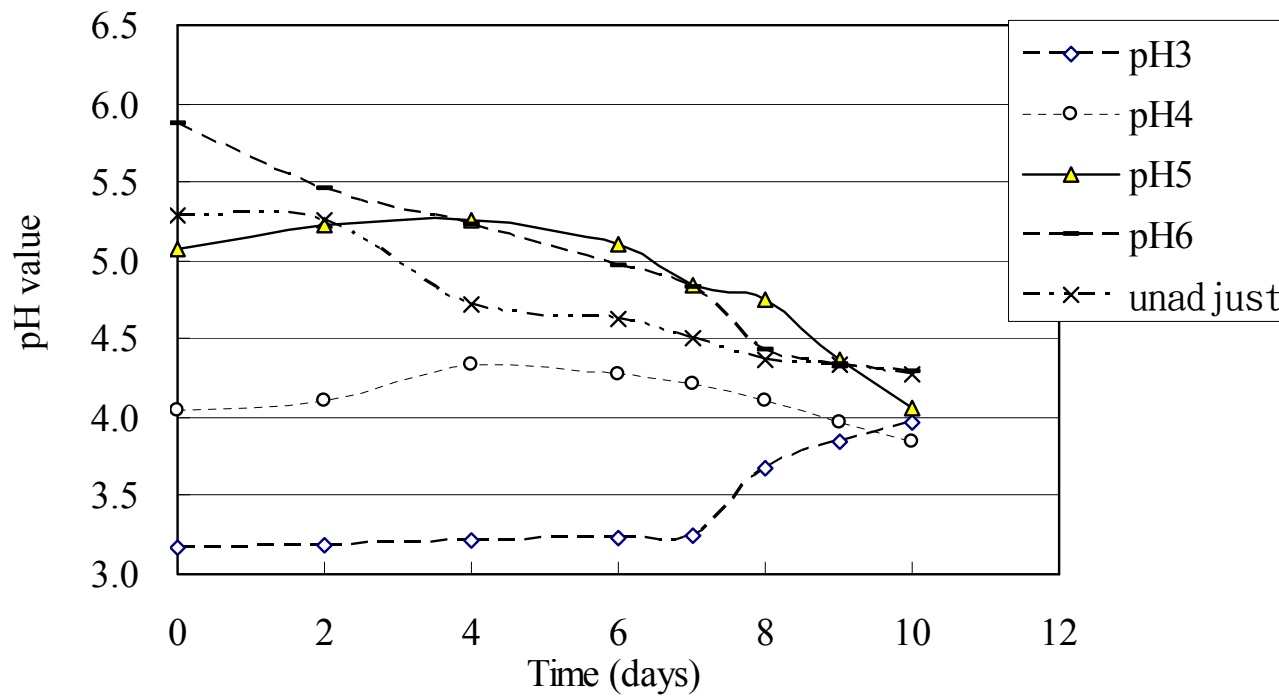
發酵液 pH 值變化如圖二十七所示，除了初始 pH 3 及 4 以外，其他三組在第九天的 pH 皆約在 4.3 左右；pH 4 的全程 pH 變化不大；只有 pH 3 的值是緩緩上昇的，其他四組皆具有下降的趨勢。



圖二十六 不同初始 pH 對樟芝發酵液殘澱粉量之影響

Fig. 26 Effect of different initial pH on residual starch content of *A. cinnamomea* during shake flask fermentation

Unadjust=initial pH unjusted ; pH3=initial pH adjusted to 3 ; pH4=initial pH adjusted to 4 ; pH5=initial pH adjusted to 5 ; pH6=initial pH adjusted to 6



圖二十七 不同初始 pH 對樟芝發酵液 pH 值之影響

Fig. 27 Effect of different initial pH on pH value of *A. cinnamomea* during shake flask fermentation

Unadjust=initial pH unjusted ; pH3=initial pH adjusted to 3 ; pH4=initial pH adjusted to 4 ; pH5=initial pH adjusted to 5 ; pH6=initial pH adjusted to 6

二、發酵槽培養

在一 5 公升的攪拌式發酵槽中以 2 % corn starch，不調整初始 pH 值，由下列 a、b 和 c 三種不同通氣及攪拌速度的條件在 28°C 培養。

(一) 三種不同培養條件在相同發酵槽對樟芝(*A.cinnamomea*)培養之影響

- a 條件：全程保持在攪拌速度 100rpm,通氣量 1.0vvm
- b 條件：全程保持在攪拌速度 1.0vvm,無攪拌(模擬氣泡塔式發酵槽)
- c 條件：全程保持在攪拌速度 100 rpm,通氣量前六天維持 1.0 vvm, 後六天維持在 0.5 vvm

1. 對菌絲體生長的影響

菌絲體生長的外觀如圖二十八，發酵槽以 a 法(全程保持在 100rpm, 1.0vvm)培養之菌絲體幾乎都呈現球型，直徑約 0.1 cm；b 法(全程保持在 1.0vvm, 無攪拌)之菌絲體幾乎聚集成團塊狀，無固定形狀；c 法(100rpm 攪拌,兩段式通氣)之菌絲體約一半形成菌絲球，另一半呈團塊狀，但有許多菌絲球附在團塊上面，由於塊狀菌絲較大，取樣管為一直徑約 0.1 cm 的細管，此發酵槽取樣的方式是藉由進氣的壓力球推出取樣管，因此若菌絲球較 0.1 cm



圖二十八 三種不同培養條件在同一發酵槽培養所得樟芝菌絲體型態外觀

Fig. 28 The mycelia of *Antrodia cinnamomea* from three different conditions of cultures in the same fermentor in stirring fermentor

a : 100rpm,1.0vvm ; b : 不攪拌,1vvm ; c : 100rpm,前六天 1.0vvm,後五天 0.5vvm

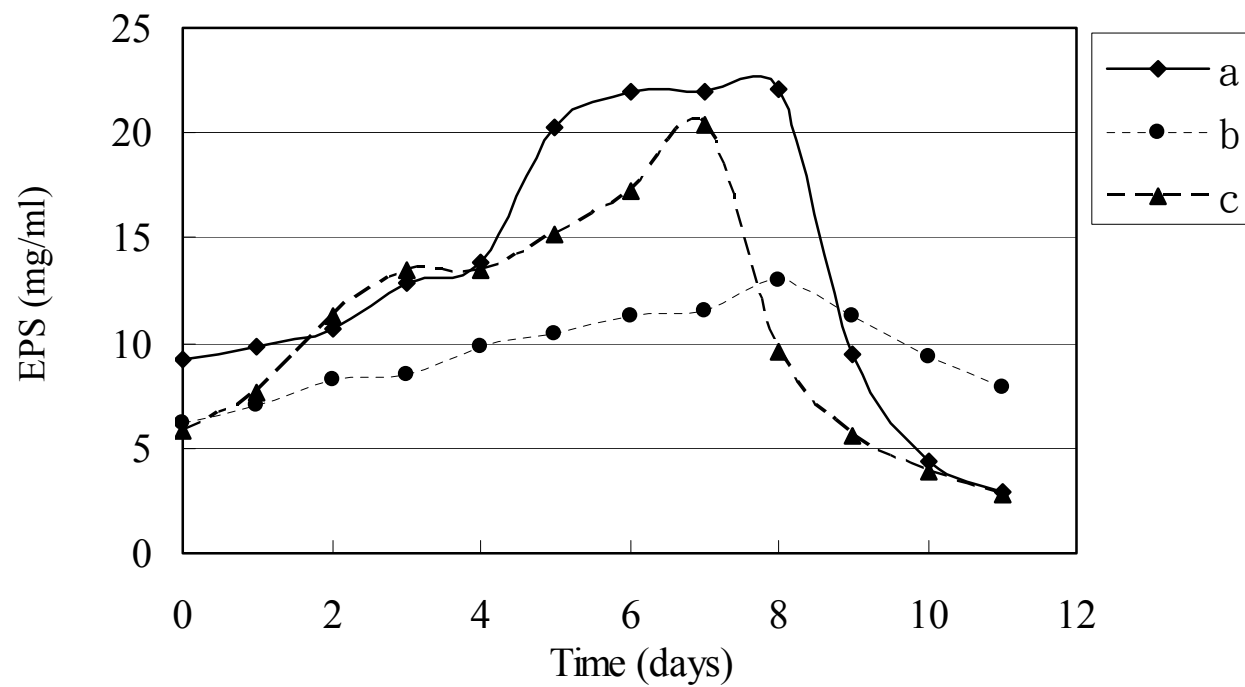
稍微大一點就會堵住而無法順利經由取樣管取出正在發酵液中菌絲體。

a 及 c 法之菌絲球取樣困難度較小，而 b 法之菌絲體在第五天後就完全無法取出，全數沉在槽底聚集為團塊狀，以至於第五天後就無法做菌絲萃取方面的分析，包括胞內多醣量及胞內多醣之 β -1,3-glucan 含量。

2. 對多醣體產量的影響

胞外多醣產量如圖二十九及表五所示，a 條件之發酵槽在第八天有最大產值 22.06 mg/ml；b 在同一天亦有其最高產值，但僅有 12.95 mg/ml；c 則在第七天有最大產值 20.40 mg/ml。由曲線來看，a 緩緩上昇到第四天開始快速增加，從第六天到第八天趨於平緩，之後快速下降；b 則全程趨勢都很平緩，產量較另兩者低很多；c 在剛接菌到第三天及第四天到第八天有較大幅度的增加，之後快速下降。a、b 及 c 之最大產值皆有顯著差異 ($P < 0.05$)，a 雖然在第八天才有最大量，但其第五天就有產值 20.31 mg/ml，並平穩地維持到第八天，因此三種培養方式對胞外多醣產量以 a 最佳，c 條件次之，b 最不理想。

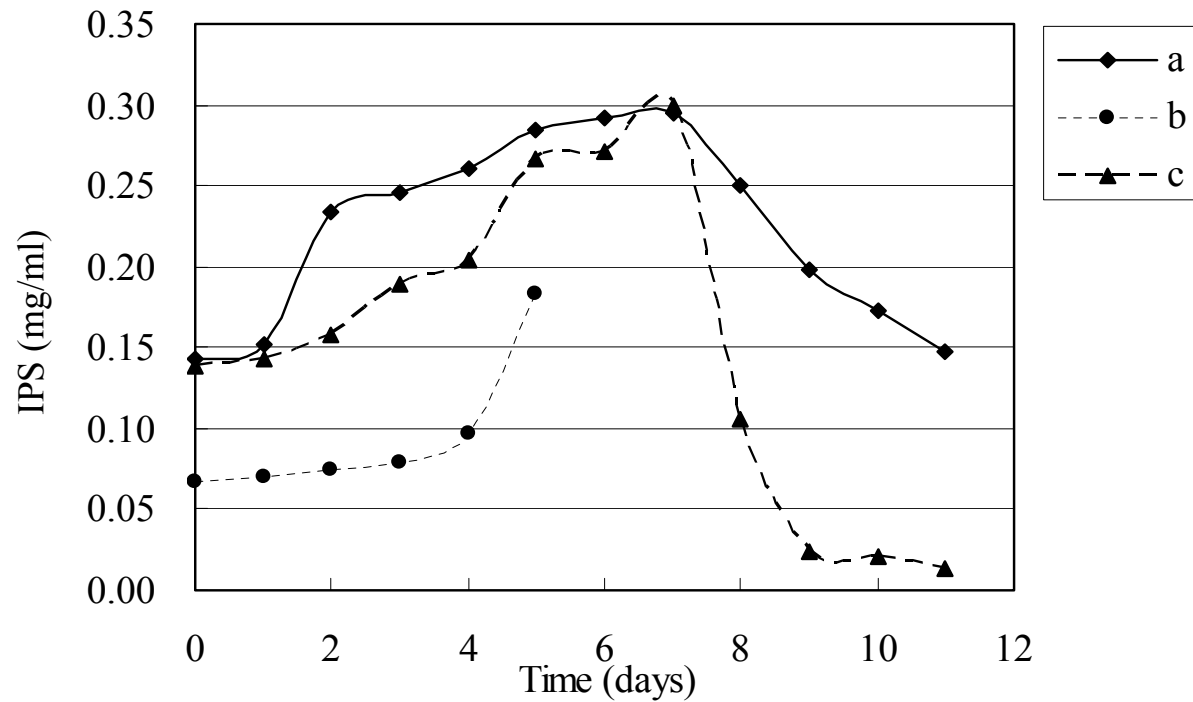
胞內多醣含量如圖三十及表五，a 條件之發酵槽在第七天有最大產值 0.28 mg/ml；b 則在第五天後就無法取樣測量；c



圖二十九 不同培養條件在相同發酵槽對樟芝發酵期間胞外多醣產量的影響

Fig. 29 Effect of different conditions of cultures on formation of exo-polysaccharide of *A. cinnamomea* during stirring fermentor fermentation

a=100rpm,1.0vvm ; b=no stirred, 1.0vvm ; c=100rpm, two stage air rate



圖三十 不同培養條件在相同發酵槽對樟芝發酵期間胞內多醣含量的影響

Fig. 30 Effect of different conditions of cultures on content of Intra-polysaccharide of *A. cinnamomea* during stirring fermentor fermentation

a=100rpm,1.0vvm ; b=no stirred, 1.0vvm ; c=100rpm, two stage air rate

表五 不同培養條件在相同發酵槽對樟芝之多醣體產量、多醣體之 β -1,3-glucan 含量及分子量之影響

Table 5 Effect of different conditions in the same fermentor on polysaccharides content、 β -1,3-glucan content and EPS molecular weight of *Antrodia cinnamomea* in stirred fermentor

Group	EPS (mg/ml)	IPS (mg/ml)	EPS β -1,3- glucan (μ g/ml,LE)	IPS β -1,3- glucan (μ g/ml,LE)	EPS MW (Da)
a	22.06 \pm 0.30 ^a	0.28 \pm 0.02 ^a	21.81 \pm 0.14 ^{ab}	2.92 \pm 0.57 ^a	1.48 \times 10 ⁴ ^b
b	12.95 \pm 0.48 ^c	-	21.35 \pm 6.91 ^{ab}	-	1.78 \times 10 ⁴ ^a
c	20.40 \pm 0.64 ^b	0.29 \pm 0.02 ^a	24.59 \pm 1.14 ^a	2.83 \pm 0.25 ^a	1.53 \times 10 ⁴ ^b

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

Values are means \pm S.D. of triple determination

a=100rpm,1.0vvm ; b=no stirred, 1.0vvm ; c=100rpm, two stage air rate

EPS = Exo-Polysaccharides ; IPS = Intra-Polysaccharides

在第七天有最大產值 0.29 mg/ml，而 a 及 c 兩者無顯著差異。由曲線來看，a 第一天開始快速增加，從第二天到第七天趨於平緩，之後快速下降；b 則在第四天開始快速增加，但產量仍較另兩者低；c 在第二天到第七天有較大幅度的增加，之後急速下降。

3. 對分子量的影響

在分子量的部份如表五，a 及 c 在第八天皆有最大分子量分別為 1.48×10^4 Da 及 1.53×10^4 Da；b 則同在第八天有最大分子量為 1.78×10^4 Da。以數據來看，a 及 c 間無顯著差異，而 b (全程保持通氣 1.0vvm, 無攪拌) 較前兩者分子量大，這些分子量稍小於 Shu 等人(Shu *et al.*, 2004)在以葡萄糖當碳源，初始 pH 5 在發酵槽所得之樟之多醣分子量(1.03×10^5 Da)。

由數據我們可以看出，分子量是 $b > c > a$ ，這三者 in 培養條件上的差異就是攪拌及通氣，其他因素皆相同，而攪拌及通氣皆會產生剪切力，b 僅有通氣的剪切力，而 a 跟 c 剪切力的差異在第六天後的通氣量，a 因為全程通氣量都在 1.0 vvm，c 則是第六天後通氣量減為 0.5 vvm (氣體剪切力較 1.0 vvm 小)，所以可推測，培養過程培養基中攪拌或通氣所引起的剪切力，對於多醣分子量的大小可能是有影響的，剪切力越大

可能會造成分子量的下降。

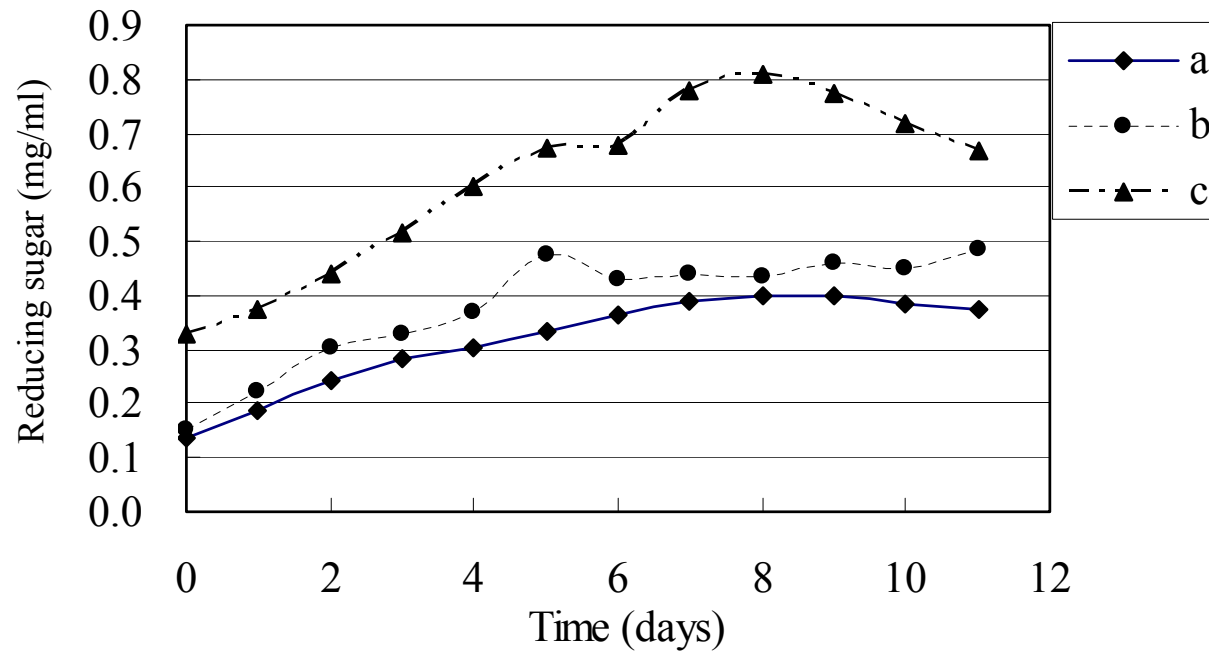
4. 對 β -1,3-glucan 含量的影響

在 β -1,3-glucan 含量如表五的部份，胞外及胞內多醣之 β -1,3-glucan 含量分別由發酵原液及菌絲體萃取原液來測量。

胞外多醣 β -1,3-glucan 含量，a 及 b 在第八天有最大含量，分別為 21.81 $\mu\text{g/ml}$ 及 21.35 $\mu\text{g/ml}$ ；c 則在第六天有最大含量 24.59 $\mu\text{g/ml}$ ，三者間無顯著差異($P < 0.05$)。以數據來看，以 c 法所得之 β -1,3-glucan 含量較多且能在較短時間達到最大量來看，c 法在於生產具較佳品質的活性多醣上優於另兩者。而周在其碩士論文中(周，2002)，以 5 公升發酵槽所得之濃縮赤芝發酵液測其含量為 80 $\mu\text{g/ml}$ ，但由於其濃縮倍數未知，無法直接比較。胞內多醣 β -1,3-glucan 含量，a 及 c 分別在第七天及第八天可得到最大含量為 2.92 $\mu\text{g/ml}$ 及 2.83 $\mu\text{g/ml}$ ，兩者在生產活性多醣上的影響並無顯著差異。

5. 發酵液中還原醣量的變化

還原醣變化量如圖三十一，a 及 c 皆是先上升在第八天開始下降，而 c 的幅度較大；b 則是保持緩緩上昇的趨勢，可能因菌絲體沉積在槽體底部且無攪拌，和培養液接觸的面積變小，使菌體產生的酵素無法較有效率的和培養液作用分解，



圖三十一 不同培養條件在相同發酵槽對樟芝發酵期間發酵液還原糖量的影響

Fig. 31 Effect of different conditions of cultures on content of reducing sugar of *A. cinnamomea* during stirring fermentor fermentation

a=100rpm,1.0vvm ; b=no stirred, 1.0vvm ; c=100rpm, two stage air rate

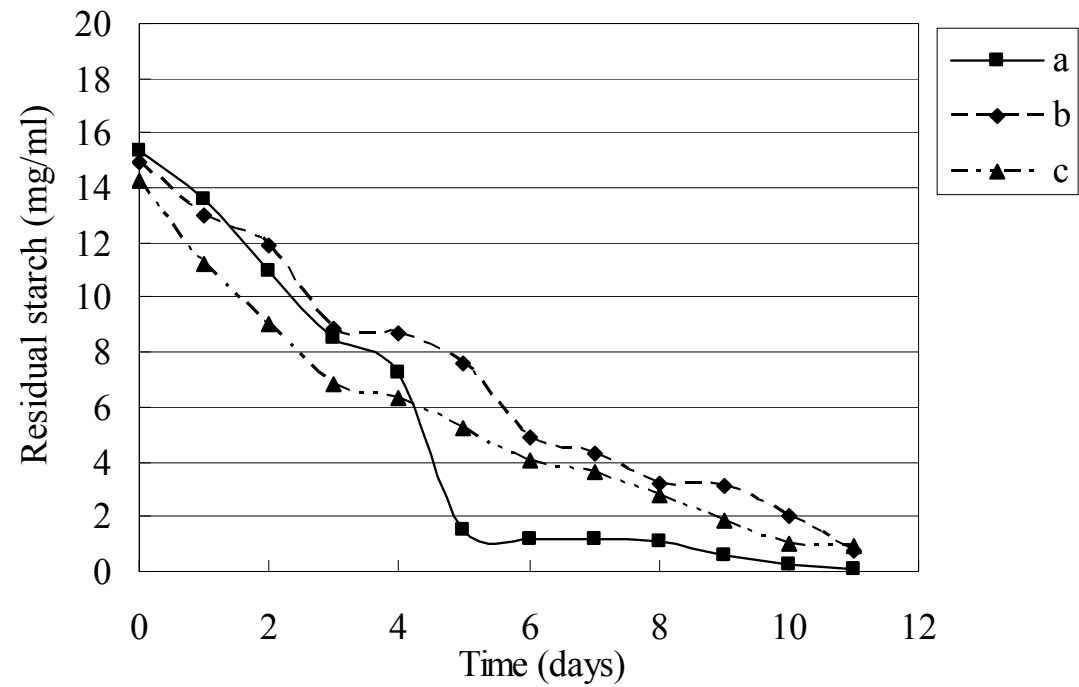
所以到第十一天還沒看到下降的趨勢。

6. 發酵液中殘澱粉量的變化

殘澱粉變化量如圖三十二，三者剛接菌時發酵液的殘澱粉量約為原來的 71~76 %。a 從一開始到第五天殘澱粉量快速下降到 2 mg/ml 以下，之後趨於平緩；b 和 c 則是全程呈現快速下降的趨勢，但幅度不若 a 那麼大。

7. 發酵液 pH 值的變化

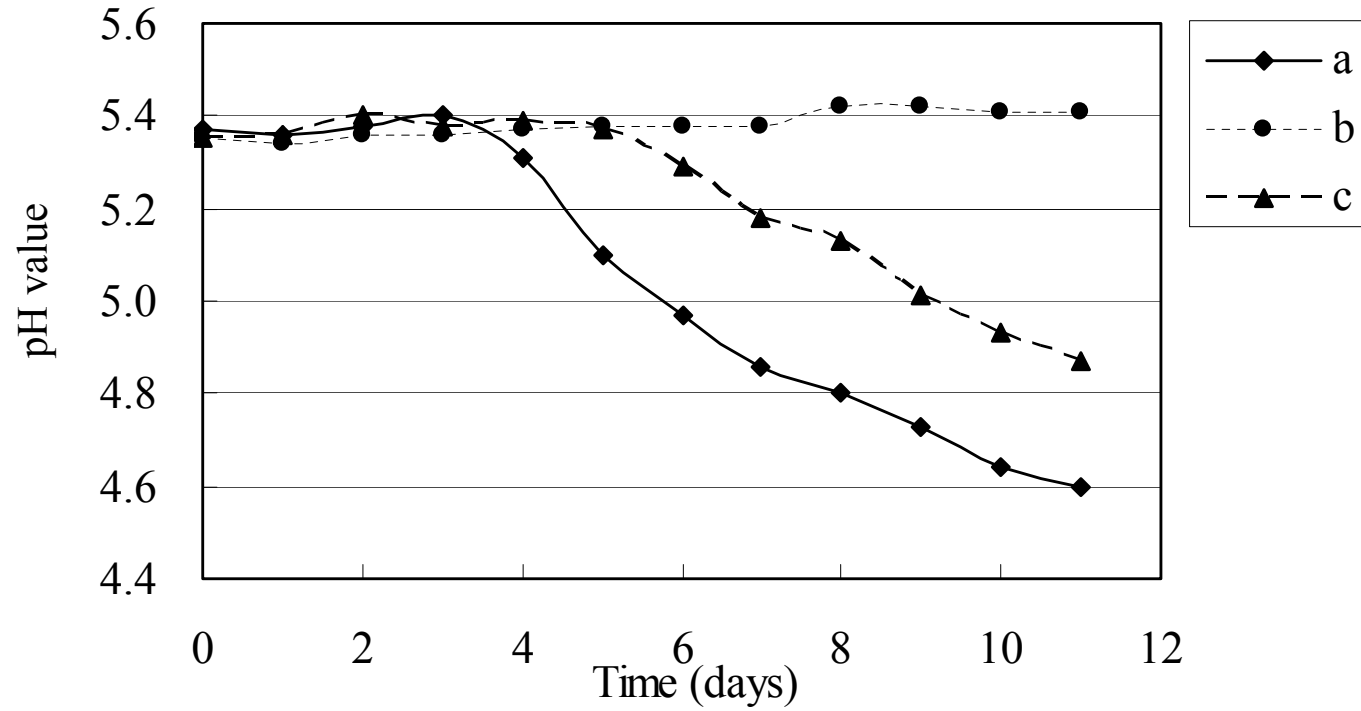
在 pH 值變化量如圖三十三，b (全程保持通氣 1.0vvm 及無攪拌) 全程的 pH 值變化不大，僅由 5.35~5.41；a (全程保持 100rpm, 1.0vvm) 及 c (全程保持 100rpm 及兩段式氣調) 則分別從第四天及第五天開始快速下降，最終 pH 值是 a 最低(4.6)。



圖三十二 不同培養條件在相同發酵槽對樟芝發酵期間發酵液之殘澱粉量的影響

Fig. 32 Effect of different conditions of cultures on content of residual starch of *A. cinnamomea* during stirring fermentor fermentation

a=100rpm,1.0vvm ; b=no stirred, 1.0vvm ; c=100rpm, two stage air rate



圖三十三 不同培養條件在相同發酵槽對樟芝發酵期間發酵液 pH 值的影響

Fig. 33 Effect of different conditions of cultures on content pH of *A. cinnamomea* during stirring fermentor fermentation

a=100rpm,1.0vvm ; b=no stirred, 1.0vvm ; c=100rpm, two stage air rate

(二) 搖瓶及發酵槽結果的綜合比較

1. 搖瓶部分

如表六(a)所示，RCSP 及 RC30 皆為使用 corn starch(3%)+peptone 培養樟芝；RC20 及 RCUN 皆為使用 corn starch(2%)+peptone 培養樟芝，也就是說，RCSP 及 RC30 是完全相同的培養條件；RC20 及不調組也是完全相同的培養條件，但由表六可看到，RCSP 及 RC30 的數據差距不少。在菌絲乾重、胞外及胞內粗多醣含量的部份差到快 1 倍，而胞外多醣之 β -1,3-glucan 含量的部分則是很接近的，但在胞內的部份也是差到快 1 倍。在相同培養條件下造成如此大的差異，推測可能因實驗所使用的菌落間，不同批菌配，人為操作因素及生長情形(菌體活性)的差異太大，致使數值有很大的差異。

RC20 及 RCUN 這兩組，在菌絲乾重及胞外胞內 β -1,3-glucan 含量上是差距不大的，但在胞外及胞內粗多醣含量的部份則是也有不小的差異。但在同一測試項目下(同一個表之橫列的實驗內容)，所選用的菌配是相同的，所以同組間所得數值的標準偏差並不大，代表所得結果有其參考價值，而不同測試項目則可能因選用的菌配差異，造成再現性的降低。

表六 搖瓶整理比較(a)及搖瓶及發酵槽整理比較(b)

Run Code	Biomass (mg/ml)	EPS (mg/ml)	IPS (mg/ml)	EPS β -1,3-glucan (μ g/ml,LE)	IPS β -1,3-glucan (μ g/ml,LE)
RCSP	1.20±0.20	17.48±1.53	0.22±0.04	8.80±0.20	1.12±0.23
RC30	0.65±0.35	10.61±1.06	0.10±0.03	9.83±0.65	2.13±0.21
RC20	0.80±0.14	9.21±0.23	0.13±0.02	11.62±1.11	2.68±0.16
RCUN	0.85±0.07	14.02±1.42	0.07±0.00	11.06±0.42	2.54±0.31

(a)

Run Code	EPS (mg/ml)	IPS (mg/ml)	EPS β -1,3-glucan (μ g/ml,LE)	IPS β -1,3-glucan (μ g/ml,LE)	EPS Mw (Da)
RCSP	-	-	-	-	3.76×10^5
RCUN	14.02±1.42	0.07±0.00	11.06±0.42	2.54±0.31	-
a	22.06±0.30	0.28±0.02	21.81±0.14	2.92±0.57	1.48×10^4
b	12.95±0.48	-	21.35±6.91	-	1.78×10^4
c	20.40±0.64	0.29±0.02	24.59±1.14	2.83±0.25	1.53×10^4

(b)

RCSP=corn starch (3 %) + peptone ; RC30=corn starch (3 %) ; RC20=corn starch (2 %) ; RCUN=unadjusted initial pH

2. 搖瓶及發酵槽

如表六(b)所示，由搖瓶 RCUN(不調整培養液之初始 pH)和發酵槽培養條件 a (100rpm, 1.0vvm)、b (無攪拌, 1.0vvm,)及 c (100rpm,兩段式通氣)來比較，在胞外多醣的部分，只有 b 法的量較搖瓶 RCUN 低，a 及 c 法都比搖瓶 RCUN 多；胞內多醣的部份也是發酵槽所得的產量較搖瓶高；在胞外多醣的 β -1,3-glucan 含量上，發酵槽皆較搖瓶高；胞內多醣的 β -1,3-glucan 含量上，則是搖瓶略高於發酵槽。

多醣分子量由搖瓶 RCSP 和發酵槽比較，可發現搖瓶培養所得的分子量大於發酵槽的，而 Shu 等人(2004)發表的論文也曾提出相同結果，而本實驗中搖瓶之分子量約為發酵槽分子量的 25 倍。

伍、結論

一、搖瓶培養

1.用葡萄糖及玉米澱粉兩種碳源和 peptone 及 corn steep powder 兩種氮源作較適碳源及氮源培養樟芝(*Antrodia cinnamomea*)時，以玉米澱粉及 peptone 之組合，可得到最佳效果，其菌絲體重、胞外多醣(EPS)及胞內多醣(IPS)之產量分別為 1.20 mg/ml、17.48 mg/ml 及 0.22 mg/ml，而 EPS 及 IPS 之 β -1,3-glucan 含量分別為 8.80 μ g/ml LE、1.12 μ g/ml LE 及 EPS 分子量 3.76×10^5 Da。

2.用 1 %、2 %及 3 %三種濃度的玉米澱粉作較適碳源濃度培養樟芝時，以 2 %時可得到最佳效果，其菌絲體重、EPS 及 IPS 之產量分別為 0.80 mg/ml、9.21 mg/ml 及 0.13 mg/ml，而 EPS 及 IPS 之 β -1,3-glucan 含量分別為 11.62 μ g/ml LE 及 2.68 μ g/ml LE。

3.用 pH3、pH4、pH5、pH6 及未調整五種作較適培養基之初始 pH 值調整來培養樟芝時，以初始 pH 值未調整可得到最佳培養效果，其菌絲體重、EPS 及 IPS 之產量分別為 0.85 mg/ml、14.02 mg/ml 及 0.07 mg/ml，而 EPS 及 IPS 之 β -1,3-glucan 含量分別為 11.06 μ g/ml LE、2.54 μ g/ml LE。

二、發酵槽培養

在同一發酵槽做較適攪拌及通氣條件培養樟芝生產多醣時，全程維持在 100 rpm, 1.0 vvm 的培養過程中，可得到最大 EPS 及 IPS 產量，

產值分別為 22.06 mg/ml、0.28 mg/ml，而 EPS 及 IPS 之 β -1,3-glucan 含量分別為 21.81 μ g/ml LE、2.92 μ g/ml LE，EPS 分子量為 1.48×10^4 Da；全程維持在 1.0 vvm，無攪拌之過程中，可得到最大 EPS 產量 12.95 mg/ml、EPS 之 β -1,3-glucan 含量 21.35 μ g/ml LE 及 EPS 之分子量 1.78×10^4 Da；全程保持在 100 rpm，前六天維持在 1.0 vvm，後六天維持在 0.5 vvm 之過程中，可得到最大 EPS 及 IPS 產量，分別為 20.40 mg/ml、0.29 mg/ml，而 EPS 及 IPS 之 β -1,3-glucan 含量為 24.59 μ g/ml LE、2.83 μ g/ml LE 及 EPS 之分子量 1.53×10^4 Da。三者相較下，以第一種條件可較快取得產量高且品質佳的多醣，因此在生產目標產物上前者較後兩者佳。

三、搖瓶及發酵槽試驗的比較

1. EPS 和 IPS 及 EPS 之 β -1,3-glucan 的產值由發酵槽培養所得的較大；但搖瓶及發酵槽培養所得 IPS 之 β -1,3-glucan 含量則不具顯著差異。
2. 搖瓶培養所產生之 EPS 之分子量較發酵槽培養所得的大且具顯著差異。

陸、參考文獻

- 王伯徹 (2005)。菇類的應用研發與產業推動。食品工業 37(5)：3-5
- 王伯徹、陳啟楨、華傑 (1998)。食藥用菇類的培養與應用。食品工業。第M-87-019號：187
- 王伯徹、黃仁彰 (2002)。靈芝與樟芝之研發與市場面面觀。食品工業 34(5)：3-17
- 王培銘、黃定國 (2001)。氣動攪拌式發酵槽。食品工業 33(11)：13-26
- 水野 卓、川合正允 (1999)。菇類的生化學。 P.42, 43, 45, 58, PP.195-202。國立編譯館。
- 田雅嵐 (2001)。培養基與培養條件對冬蟲夏草菌菌絲體生物質量、化學組成及水溶性胞內多醣體生成之影響。大葉大學食品工程研究所碩士論文。
- 沈育維 (2004)。固態發酵的量測與監控。食品工業 36(10)：17-24
- 呂淑芳 (2002)。靈芝之機能性與其分析方法。食品工業 34(11)：3-8
- 林永浩 (2004)。樟芝之牛樟樹宿主專一性。食品工業 36(5)：57-70
- 林永浩 (2005)。食藥用菇類液態發酵培養菌絲體型態之探討。食品工業 37(5)：35-49
- 林錫杰、王伯徹 (2002)。菇類之藥效功用及其生產研究。食品工業 34(5)：18-30
- 周欣漪 (2002)。靈芝子實體與液態發酵生成之(1→3)-β-D-葡聚糖的差異性。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
- 孫璐西 (2005)。台大校友雙月刊-2005年11月號第42期學術發展靈芝

之活性成分與發酵生產。

張東柱、謝煥儒、張瑞璋、傅春旭 (1999)。工業區綠化樹種常見病害防治手冊。台灣省林業試驗所。203頁。

張怡潔 (2003a)。樟屬植物之牛樟芝菌絲體生長促進因子。台北醫學大學生藥學研究所碩士論文。140頁。

張為憲、李敏雄、呂政義、張永和、陳昭雄、孫璐西、陳怡宏、張基郁、顏國欽、林志城、林慶文 (1995)。食品化學，p.37, 52。國立編譯館。

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

陳勁初、呂鋒洲 (2001)。樟芝是什麼？。靈芝之王:台灣樟芝，pp.38-78。元氣齋出版社。

陳慶源 (2006)。醫藥用菇菌類之抗癌活性及其分子標的。食品工業 38(5)：35-44

黃惠琴 (2001)。樟芝菌絲體深層培養之研究。東海大學化學工程研究所碩士論文。

黃惠君 (2004)。食用藥菇的營養與藥用價值。食品工業 36(5)：25-32

顏國欽 (2003)。樟芝菌絲體液體培養萃取物抗氧化及抗腫瘤特性之探討。92年度「保健食品研究開發」計畫成果發表會。5-13頁。

羅國立、余立文 (2004)。固態發酵製程的開發與應用。食品工業 36(10)：2-10

Apar, D. K. and Özbek, B. (2004) α -Amylase inactivation by temperature during starch hydrolysis. Process Biochemistry 39:1137-1144

- Calderon, M., Loiseau, G. and Guyot, J. P. (2003) ◦ Fermentation by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 of different combinations of carbohydrates occurring naturally in cereals consequences on growth energetics and α -amylase production. International Journal of Food Microbiology 80:161-169
- Chisti, Y. (1989) Airlift bioreactors. Adv Biochem. Eng. 13:121-214
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28 : 350-356
- Gura, E. and Rau, U. (1993) Comparison of agitators for the production of branched β -1,3-glucan by *Schizophyllum commune*. J. Biotechnol. 27:193-201
- Hseu, Y. C., Chang, W. C., Hseu, Y. T., Lee, C. Y., Yech, Y. J., Chen, P. C., Chen, J. Y. and Yang, H.L. (2002) Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorata* mycelia in normal human erythrocytes. Life Sci. 71(4):469-482
- Huang, Y. L., Wu, Z., Zhang, L., Cheung, C. M. and Yang, S. T. (2002) ◦ Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor. Bioresource Technology 82:51-59
- Kane, S. M. and Reilly J. M. (1994) ◦ 在美國生產玉米酒精的經濟性。工業用玉米製品，pp.102-122。美國飼料穀物協會。
- Kim, Y. O., Han, S. B., Lee, H. W., Ahn, H. J., Yoon, Y. D., Jung, J. K., Kim, H. M. and Shin, C. S. (2005) Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus*

obliquus. Life Science 77(19) : 2438-2456

Lee, I. H., Huang, R. L., Chen, C. T., Chen, H. C., Hsu, W. C. and Lu, M. K. (2002) *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effect. FEMS Microbiology Letters 209:63-67

Liu, J. J., Huang, T. S., Hsu, M. L., Chen, C. C., Lin, W. S., Lu, F. J. and Chang, W. H. (2004) Antitumor effects of the partially purified polysaccharides from *Antrodia camphorata* and the mechanism of its action. Toxicology and Applied Pharmacology 201:186-193

Mau, J. L., Huang, P. N., Huang, S. J. and Chen, C. C. (2004) Antioxidant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antrodia camphorate* mycelia. Food Chemistry 86:25-31

Miller, G. L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry Vol.31, NO.3:426-428

Reddy, P. R. M., Bamesh, B., Mrudula, S., Reddy, G. and Seenayya, G. (2003) ◦ Production of thermostable β -amylase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 in solid-state fermentation Optimization of nutrient levels using response surface methodology. Process Biochemistry 39:267-277

Rutenberg, M. W. (1994) ◦ 以過去和未來的觀點看玉米原料。工業用玉米製品，pp.1-34。美國飼料穀物協會。

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 Biochemistry 39:931-937

Shu, C. H., Xu, C. J. and Lin, E. S. (2006) Production, purification and

partial characterization of a novel endo- β -1,3-glucanase from *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochemistry* 41:1229-1233

Stryer, L. (1994)。Stryer's生物化學，p49。合記圖書出版社。

Wu, J. Z., Cheung, P. C. K., Wong, K. H. and Huang, N. L. (2003)
Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.)
Singer-Part 1 : physical and chemical factors affecting the rate of
mycelial growth and bioconversion efficiency. *Food Chemistry* 81 :
389-393

Wu, S. H., Ryvarden, L. and Chang, T. T. (1997) *Antrodia camphoratum*
("niu-chang-chih"), new combination of a medicinal fungus in Taiwan.
Bot. Bull. Acad. Sin. **38**: 273-275.

Wurzburg, O. B. (1994)。澱粉、修飾澱粉及糊精。工業用玉米製品，
pp.35-60。美國飼料穀物協會。

Young, S. H. and Jacobs, R. R. (1998) Sodium hydroxide-induced
conformational change in schizophyllan detected by the fluorescence
dye, aniline blue. *Carbohydrate Research* 310:91-99