

第一章 緒 論

一、前言

舞菇 (*Grifola frondosa*)又名灰樹花、千佛菌、連花菌、貝葉其果菌、栗子蘑、重菇，英文俗名稱為“Hen of the Woods”，早在中國的神農本草經中即提及，經常食用舞菇，可改善脾胃的不舒服，安神及治療瘧疾等。舞菇生長於海拔 800 公尺以上的熱帶至溫帶的森林中，其環境即使到了 7-9 月，溫度也約在 20°C 左右，且日夜溫差大，空氣新鮮流通，溼度高，適合舞菇子實體的生長，一年可在春、秋兩季採收 (水野和川合, 1999)。

舞菇為一種具有均衡營養的食藥用真菌，有抗腫瘤、高血壓、高血脂、保肝、減肥及改善化療的不舒適感等等多種藥理功能 (Mayell, 2001, Lee *et al.*, 2003)。而主要的具有藥理作用的原因現在發現是舞菇所產生的多醣體，而其多醣體主要 β -D-Glucan 的長鏈分子聚合物的結構為 β -1 \rightarrow 3-及 β -1 \rightarrow 6-為鍵結 (Mizuno, 1995)。

在以前舞菇的取得還是採自野生的為主，近年來由於生物技術的進步，而得以人工生產，甚至於由於液態發酵技術的逐漸成熟，可以利用液態深層培養生產對於我們所需要的產物並加以量化，以達到穩定的品質且不需耗過久時間。

二、 研究目的

近年來由於生物技術不斷的進步，真菌類不再只靠在野外採收，對於人工栽培已有不錯的成果，而液態發酵比起人工鍛木栽培更加的方便且不需很大的空間，但對於如何控制菌絲體及二次代謝物產量生長，如何取得有效且所需要的成分，以及品質的控制等等，皆是需要努力的方向。不同的液態發酵條件對於培養舞菇(*G. frondosa*)菌絲體及二次代謝物是很重要的，如果找出較佳的條件，將可以得到高品質、高產量的產物。在發酵槽的運用上，探討兩種不同發酵槽，對於目標產物的影響，以得知不同條件對舞菇多醣體分子量及 β -1 \rightarrow 3-glucans 含量的影響，進而找出對於舞菇液態培養的最佳條件。

第二章 文獻回顧

一、舞菇簡介

舞菇 (*Grifola frondosa*) 又名灰樹花，英文俗名稱為 “Hen of the Woods”，早在中國的神農本草經中即提及，經常食用舞菇，可改善脾胃的不舒服，安神及治療瘧疾等。舞菇生長於熱帶至溫帶的森林中，分佈頗廣(水野和川合, 1999)。

舞菇通常生長於山毛櫸、栗樹和櫟樹，尤其在山毛櫸科的大樹幹根部造成聚叢發生例如梅樹、杏樹、李樹、陶樹和橡樹可見其發生。是一種能侵犯樹幹心材造成白色腐朽的菇菌 (水野和川合, 1999)。

舞菇子實體剛生長時為暗灰褐色，隨著時間而改變為淡褐色或者是灰色。其肉質有柄、多分枝，末端成扇形或匙形，形成一叢覆瓦狀的菌傘(圖一(a))。菌管管口成多角形，孢子成卵形或橢圓形，菌絲薄壁，多分支，有橫隔 (Chen *et al.*, 2000)。當菌絲體生長時會以短且不連貫的菌絲彎曲連結，新生菌絲體叢具有分支(寬小於 $1\mu\text{m}$)及營養(寬約 $3-7\mu\text{m}$)菌絲且接近橫隔處會呈現膨大，老化的菌絲體則否，但其會生成菌核(Buchalo *et al.*, 1999) (圖一(b))。在台灣直到 2003 的文獻中才有提到在南投有發現其野生菌種。(Chang and Chou, 2003)。

舞菇在日本為中醫高貴藥材「豬苓屬」中最容易栽培的一種，而

目前中國大陸試驗發表者稱之為「灰樹花」，日本則稱之為舞菇 Maitake，在封建時代，舞菇是和銀幣等值的，人們可用舞菇交換相同重量的銀子來當作貨幣使用（郭, 1999）。舞菇它可長到直徑20 英寸、重量100 磅之大，就像籃球一般，也因此人們都稱它為“菌類之王”。它是一種高級食藥用真菌，食用上不但味美可口且具備全面平衡的營養（劉和鄭, 1997），為近年國際醫界學者研究抗癌之熱門材料。

舞菇菌種分類隸屬於擔子菌門（Basidiomycota）、擔子菌亞門（Basidiomycotina）、層菌綱（Hymenomycetes）、非褶菌目（Aphylllophorales）、多孔菌科（Polyporaceae）、多孔屬（Polyporus）或稱豬苓屬（Grifola）。

舞菇主要的成分大致上分為八大類，第一類為在收穫時期的子實體含有 91%的水分，固形物主要成分有碳水化合物及蛋白質且纖維質也很多（水野和川合, 1999）。第二類為維生素 B1 與 B2（但不含維生素 A、C）與礦物質磷、鉀，其他依順序含量是 Mg、Ca、Na、Zn 等。（Mizuno and Zhuang, 1995）

第三類成分為氨基酸，其具有人體所需的 8 種必須氨基酸，而以呈現菇類鮮味的麩胺酸含量最多（Mau *et al.*, 2001）。第四類成分是游離糖類，主要含有海藻糖（trehalose）、葡萄糖（glucose）、甘露糖

(mannose)等。隨生長，甘露糖減少而海藻糖急增（水野和川合, 1999）。

第五類為脂質：具有中性脂質（甘油三脂, TG）、固醇脂質（醯基固醇）和神經鞘脂質（神經醯胺與腦苷脂）三種（Mizuno and Zhuang, 1995）（水野和川合, 1999）。第七類為紅血球凝集素（lectin）：只在子實體中發現具有，在菌絲體及其培養液中並無發現此種物質。將其稱為舞菇凝集素（*Grifola frondosa* lectin; GFL, 糖含量 3.3%的蛋白質）（水野和川合, 1999）。

第七類為舞菇中的酵素：具有纖維素酶、半纖維素酶、幾丁質酶、澱粉酶及果膠酶等等具有多醣水解酶及酚氧化酶、漆酶、過氧化酶等木質素分解酵素，而這些與木材的腐朽皆有關聯，才會稱其可造成樹木的白腐朽。舞菇子實體中具有特別的金屬蛋白酶（表一），而和其他不同的地方主要在於雖無法分解白氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸的聚合物，但可分解離氨酸、精氨酸、Lys-Phe、Lys-Ala 和 Lys-Glu 的聚合物進而生成低分子的肽類，故稱其為特異性水解離氨酸參與鍵的內切型胺肽酶（水野和川合, 1999）。

第八類也是舞菇中具有生理活性的成分——多醣體。「多醣體」為一統稱，當菌絲體或子實體經由熱水、鹼和醇類等萃取得到稱之為粗多醣，再經由一系列之分離、純化等等的步驟，又可細分成葡聚醣

(glucan)、雜多醣 (heteroglucan)、蛋白多醣等。經由核磁共振光譜 (NMR spectra)、紅外線光譜 (IR spectra) 等化學結構分析方法，針對葡聚醣、雜多醣、蛋白多糖等，進行分子量、分子間鏈結方式與分支程度、旋光度的分析，得知主要結構為 β 1 \rightarrow 3-D-glucan、galacto- β -glucan、 α -mannan-peptide 等，以 X 光繞射分析得知其中 β 1 \rightarrow 3-D-葡聚醣 (圖二) 呈現螺旋形結構，而這可能是引發抗腫瘤作用之重要結構(水野和川合, 1999)。

其中具有生理活性的多醣體具有 β 1 \rightarrow 6 支鏈點的 β 1 \rightarrow 3-D-葡聚醣及 β 1 \rightarrow 3 支鏈點的 β 1 \rightarrow 6-D-葡聚醣(圖三)。多醣分子量在 3~5KDa 左右者具有降血糖之功能;分子量在 10~100KDa 之間具有消炎作用;分子量在 30KDa 以上者具有抗腫瘤作用。 β -1 \rightarrow 3-D-Glucan 在真菌中主要為構成其細胞壁的成分之一 (圖四)。目前已知 β -1,3-D-Glucan 是由尿嘧啶葡萄糖 (UDP-glucose;uracil-2,4-dioxypyrimidine- glucose) 所組成，而 UDP-glucose 是經由細胞質流動將其輸送往菌絲頂，進而合成 β -1,3-D-Glucan (水野和川合, 1999)。近年來有許多具有抗腫瘤活性 (anti-tumor activity) 的多醣類已由細菌、真菌、地衣和麥類等植物中分離出來，這些多醣的結構大都為 β -1,3-D-Glucan (Mizuno, 1995)。

舞菇多醣體除了上述所說的 β -1,3-D-Glucan 外還有另一種形式

的多醣，但不具抗腫瘤活性的多醣稱為 α -D葡聚糖。曾有學者利用凝膠過濾和concanavalin A (Con A)-Sepharose CL管柱親和層析法，利用熱水萃取的方式由萃取液中分離出了 α -D葡聚糖(Flo-a- α)。所分離出的 α -D葡聚糖是 $[\alpha]_D^{+156}$ ，IR波峰 840cm^{-1} ，分子量100萬，依據PMR與 ^{13}C -NMR解析的結果，證實為一種特有 α -(1 \rightarrow 6)支鏈的 α -(1 \rightarrow 4)-D-葡聚糖(水野和川合, 1999)。菌絲體和子實體經由萃取所得的多醣體具有抗腫瘤活性並不相同，由子實體所萃取所得到的活性多醣種類較多，只需較少量的投藥量即可達到較好的腫瘤抑制率(表二)(表三)(水野和川和)。子實體萃取的又可分為水溶性和非水溶性(Takashi, 1986)，水溶性多醣分子量較大且其結構主要為 β -1 \rightarrow 3-glucan，大體上看來腫瘤抑制率比起非水溶性要好(表三)。

舞菇為一種具有均衡營養的食藥用真菌，有多種藥理作用，例如抗腫瘤、高血壓、高血脂、保肝、減肥及改善化療的不舒適感等等(Mayell, 2001, Lee *et al.*, 2003)。以下為舞菇的一些藥理作用：

1、增強免疫力：舞菇多醣體不被人體所吸收消化，人體中的白血球皆具有對 β -1 \rightarrow 3或 β -1 \rightarrow 6-glucan高度專一性的受體，當人體腸道的受體接觸到多醣體時，會依不同濃度的多醣體，接受器會產生一連串的訊號，使調節各種細胞激素的釋放以及啟動免疫反應(Janusz *et al.*, 1989, Tapper and Sundler, 1995)。日本國立健康機構和美國國

立癌症機構所作的研究均證實，舞菇抽出物可防止97%的T細胞受到HIV的破壞，事實上，有些醫生已結合舞菇抽出物和其他療法來治療愛滋病患者，成效十分良好。此外舞菇不僅能增加癌症化學療法的功效，而且能減輕化學療法所帶來的不適副作用。(Mayell, 2001)

2、抗腫瘤：舞菇多醣具有很好的抗腫瘤效果，有學者發現將白鼠植入Sarcoma 180腫瘤後，口服不同種的菇類多醣體，發現已舞菇最具有腫瘤的抑制率，可高達80%以上(水野和川合, 1999)。經由多位學著的努力研究找出其抗腫瘤的可能機制(圖五)(水野和川合, 1999)。多醣對於抗腫瘤的作用並非直接殺死或是抑制癌細胞，是經由提高人體的免疫力進而表現抗癌活性。例如：促進Interleukin-2(IL-2)分泌進而增加T細胞的數目及功能(Lei和Lin, 1992);單核球巨噬細胞方面則是增加其吞噬能力，促進產生抑制腫瘤生長的各種細胞激素(如IL-1、IL-2、IL-6、INF- α 和INF- γ 等)的合成與釋放(Lieu *et al.*, 1992);增強T細胞活性促進生成T細胞的DNA合成來增加自然殺手細胞(NK Cell)的能力(Lei and Lin, 1992)。或者是直接干擾致癌基因，藉以減少自發性癌症的發生 (Costa *et al.*, 1990)。由日本的南波宏彰 (Hiroaki Nanba) 博士小組所作的研究報告顯示，舞菇抗乳癌的抑制率達86 %至86.6 %，靈芝則只達5.2 %至36.8 %，比椎茸的54.4 %更少，而瓦茸更是低 (Jones, 1998)。可知舞菇的抗腫瘤效

果不錯。經由臨床實驗發現服用舞菇萃取多醣D-fraction後，15名乳癌患者中，有11名的腫瘤消退或縮減；18名肺癌患者中有12名是如此；15名肝癌患者中，則有7名。與化療共同進行時，治療效率提高了12%到28%。許多已經診斷為第三期癌症的病患，後來都改善變成第一期癌症(Jones, 1998)。

3、調節血壓、胰島素、血糖:提昇血液中的胰島素濃度，並且加速葡萄糖在肝臟中代謝的速度，以達到控制血糖的目的(李和陳, 1999)。對於降低血壓則是利用萃取物會抑制血管收縮素(Angiotensin converting enzyme, ACE)的活性，以冷水萃取物的效果最好，可抑制高達58.7%的活性，熱水萃取物則可能是因為萃取物遭到破壞效果較差 (Choi *et al.*, 2001)。

4、降低膽固醇、三酸甘油脂以及肝臟的油脂:舞菇子實體可以改善脂質代謝且當攝取高脂質食物時能抑制肝臟脂質及血脂的下降 (Kubo and Nanba, 1997)。

表四 不同菇類的抗腫瘤試驗。白鼠以Sarcoma 180腫瘤植入第三十一天時，口服各種菇類抗腫瘤效果的比較。(Source: 水野和川合, 1999)

5、肝臟的保護:D-galactosamine 會抑制RNA與蛋白質的合成而誘導傷害肝臟的肝毒素的分泌，造成UDP減少使得肝細胞遭到破壞。在舞

菇低分子量水溶液萃提取物中發現，對於傷害肝細胞的D-galactosamin 具有抑制作用，進而達到保護肝臟的效果(Lee *et al.*, 2000)。

6、減肥:舞菇中具有6-8%的纖維質且還具有幾丁質，這些物質可以幫助減肥，纖維質亦可幫助清腸道使糞便不易堆積，減少罹患大腸癌的機率（李和陳, 1999）。

7、對於癌細胞的毒性作用:當舞菇凝集素濃度達到 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 時，可以完全抑制HeLa細胞的增殖但當濃度小於 $10.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 則不具有抑制作用(Kawagishi *et al.*, 1990)。

8、促進血液凝固:在舞菇子實體中經由萃取發現具有紅血球凝集素，故可促進血液凝固。而 β - glucan與血纖維蛋白的結合液促進血液凝固的主要因素，而 β - glucan 分子量在21KDa以上及濃度在 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上效果最為明顯(水野和川合, 1999)。

二、舞菇的人工培養

人工培養可分為兩種方式，一種是固態培養，另一種則是液態培養。兩種培養方式各有其優缺點，現今一般來說還是以固態培養為主，液態培養還是佔少數。傳統的固態培養需提供適當的培養環境，使其能達到「出菇」，進而使子實體生長。培養時間長和品質較不穩定也是其中的問題(陳等, 2004)。雖可經由菌種篩選、改良、栽培場地的改良及管理的改善而得到較大量的收成，但人力、栽培空間和設備

則較無好的方式來改善(黃和陳, 2000)。而所謂液態培養是指將微生物的菌絲體培養於液態基質的培養基中, 並給予其所需足夠的氣體, 使菌絲得以生長、繁殖, 並能生產我們所需的生物代謝產物(劉, 1997)。可以依培養的菌絲來改變培養條件, 所改變的培養條件和一般在自然界中的環境較為不同, 可能可將其原本存在的隱性基因加以表達, 而可得到不同的代謝產物或者使所需的代謝產物增加(王, 2002)。

近十幾年來對於真菌液態培養已有一初步的了解與認識。對於及培養基主要是可改變碳源、氮源及額外添加無機鹽類或油脂, 培養環境方面主要是可調控溫度、pH 值、通氣量、攪拌速率和培養方式等等。接著來介紹對於微生物液態培養有影響的因子。

培養基組成的影響因子有許多種, 有碳源、氮源的種類和濃度, 無機鹽類和油脂等等都是, 所以下面來稍加說明對於菇類菌體或是多醣體生產的影響。

首先是碳源對於微生物生長而言主要是作為構成細胞物質和供給菌體生長所需的能源 (Hsu et al., 2002)。高濃度的碳源有利於菌體的生長, 但濃度太高, 對於生長反而會產生抑制性, 一般來說碳源使用量約在 1-10%之間 (Lichfield, 1979)。有學者發現, 對舞菇來說, 依利用能力大小來看, 依序是玉米粉、葡萄糖、可溶性澱粉、乳

糖、麥芽糖、甲基纖維素、乙醇、土豆汁(孫和朱, 1999)。因此本研究將採取玉米澱粉和葡萄糖、果糖、蔗糖做碳源進行比較。

氮源對於微生物而言主要是構成蛋白質和核酸的主要元素，不同的氮源及含量多寡會對真菌菌絲體型態會有很大的影響。高濃度氮源培養基能產生較多平滑的菌絲球，低濃度則會產生較鬆散的菌絲球(胡, 1994)。以磷酸銨鹽類最為常用，因其可提供適合菇類菌絲生長的酸鹼範圍(pH5-7)的良好緩衝溶液大小 (Yang and Jong, 1989)。對於舞菇而言，較喜歡有機氮源，依其利用能力大小來看，依序是玉米漿、酵母萃取物、牛肉膏、豆餅粉、麩皮、蛋白、硫酸銨、尿素(孫和朱, 1999)。對於舞菇而言有機氮源比起無機氮源的利用還要好，主要是因為有機態氮可轉換為碳源，進而促進碳源增加(孫和朱, 1999)。故本研究以玉米漿和酵母萃取物、麥芽萃取物等有機氮來進行比較。

無機鹽類(如磷酸二氫甲、硫酸鎂、綠化鈣等等)是當真菌以液態培養時，另外在培養基中添加的，會影響菌絲體產量、香味物質及氨基酸組成，可促進菌絲體生長速率，對於多醣產量也會有影響，但當培養機中濃度過高時，則會有苦味成分的生成(林, 2002)。無機鹽類添加於培養基對於菌體生長與代謝的作用有構成細胞組成、構成酵素組成分、維持酵素作用及調節新陳代謝(吳, 2003)。

油類及脂肪酸為當真菌以液態培養時，另外在培養基中額外添加，會影響菌絲體產量，可促進菌絲體生長，對於多醣的產量也會有影響。添加油類及脂肪酸除了可以達到消泡的效果外，還可以改變培養基質及菌體間營養物質傳遞，間接改變菌體吸收及代謝能力 (Yang et al., 2000)。

液態環境影響因子有許多種，而本實驗主要以 pH 值和通氣量來進行試驗。接下來會先探討溫度 pH 值及攪拌速率和通氣量對於菌體生長及多醣體生產的影響。

關於溫度的影響，舞菇的菌絲生長溫度範圍很廣(5-32°C)，最適生長溫度為 20-25°C，菌絲體較耐高溫，在 32°C 左右會停止生長(吳和林, 1997)。另有一種說法為最適溫度在 21-27°C，40°C 以上菌絲體才會開始死亡(陳, 1997)。

有學者提出舞菇菌絲體最佳生長培養基為 pH 值在 5.5-6.5 之間(吳和林, 1997)。Catley (1980)提出在較高的 pH 值，葡萄糖主要用來供應生物質量(biomass)的生長，只在後階段且低 pH 值時，對於多醣的合成才會發生。對於培養基初始 pH 值對於真菌會產生以下的影響，(a)影響細胞膜作用(b)影響酵素活性(c)改變培養基中的離子狀態(d)攝取營養的改變(e)生物代謝產物的改變

攪拌與通氣量的影響是在液態培養的過程中，菌絲會聚集成團

狀，培養基黏度會增加，造成氧氣傳遞的困難，所以需利用攪拌、通氣或振盪的方式將培養基與氧氣、微生物混合均勻，以增加質傳或熱傳效率(Park *et al.*, 2002)。當進行發酵槽培養時，攪拌轉速過低，菌絲易形成球體而無法與培養基充分接觸，但轉速太高，則培養基的流動會有漩渦的現象，使菌絲附著於導流板或發酵槽壁上(Jeongseok *et al.*, 1999)。

三、發酵槽的介紹

利用生物特性進行相關生化反應的裝置，稱為生化反應器(Bioreactor)或發酵槽(Fermentor)。現今發酵槽是以機械攪拌式(Stirred tank)及氣動攪拌式(Pneumatically agitated)兩種最為常見。氣動攪拌式發酵槽又可分為氣舉式發酵槽(Airlift fermentor)與氣泡塔式發酵槽(Bubble column fermentor)(王和黃, 2001)。但現今發酵工業還是以機械攪拌式發酵槽最為常用，尤其是對於真菌發酵而言更是如此(吳, 2000)。故本實驗特別針對機械攪拌式發酵槽及氣舉式發酵槽兩者對於真菌的菌體生長及代謝產物生產量做一比較。以下就來介紹機械攪拌式發酵槽及氣舉式發酵槽。

(1)、機械攪拌式發酵槽 (mechanical stirred tank fermentor):

此種發酵槽主要是利用攪拌葉片來達到混合，使質傳效果提高，增加發酵液中的溶氧量，來營造一個對於好氣性微生物生長良好

的環境 (吳, 2000)。攪拌式發酵槽的攪拌系統主要有一組攪拌翼組及一片擋版所構成, 利用槽底的分散器(Sarger)將空氣通入槽體中, 在藉由攪拌翼的旋轉與擋版的配合, 使氣泡及流體均勻分佈於槽體中, 故此種發酵槽具有高氣液質傳能力及流體混和性佳的特性 (Roukas and Kyriakides, 1999)。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, 其槽高與內徑的比例值通常在 2-3 倍左右(王和黃, 2001)。

攪拌式發酵槽應用於早期的黴菌生產抗生素或有機酸、酵素、單細胞蛋白或乙醇, 到近期利用植物細胞組織培養技術, 生產高價值的二級代謝產物等等(王和黃, 2001)。

此種發酵槽的優點有(a)可提供反應系統良好的氣、液質傳導能力。(b) 混合能力強。(c) 可處理高黏度的培養基。缺點則是(a) 設備成本較高。(b) 剪切力較大。(c) 能量消耗高。(d) 機械性產熱。

(2)、氣舉式發酵槽 (Airlift fermentor):

此種發酵槽主要是在槽體裝置一個導流管 (draft tube), 此導流管將槽內液體被區隔為進氣區域的上升流動區 (riser) 與非進氣區域的下降流動區 (downcomer) (Kawagoe et al., 1997)。進氣區域的流體有較高的氣體佔有率(gas holdup), 使得此區域的流體密度低於非進氣區的流體密度, 由於流體密度上的差異, 造成流體自然的循

環流動。此種發槽具有較佳的液態循環流動的特性（王和黃, 2001）。

其槽高與舉內徑值比通常大於 3，有些比值甚至大於 10，因此外觀上

明顯不同於機械攪拌式發酵槽，而呈現高塔的型式(王和黃, 2001)。

此種發酵槽的優點有(a)較簡單的機械結構。(b)較低剪切力傷害的培養環境。(c)可適用於黏度較高的培養環境。在培養的過程中，某些因素例如使用澱粉或黃豆蛋白類的營養基質、使用過高濃度的營養基質、微生物生理特性，像絲狀真菌以菌絲形態生長時或是有些微生物會分泌較高黏度的代謝物，如胞外多醣等，都會影響發酵液的流變性質。當發酵液為高黏度、非牛頓流體特性時，使用機械攪拌式發酵槽，其混合效果通常僅及於攪拌葉片附近，槽體其他部分呈現靜止狀態，對於培養過程而言是十分不好的。如是使用氣舉式發酵槽時，當氣泡由氣體分散氣液出後，即使是在高黏度的發酵液中，小氣泡亦可能較容易融合成大氣泡，甚至可能有沸湧流(slugging flow)的現象，而液泡的快速上升與移動有利於整體的混合效能與液體循環流動（王和黃, 2001）。缺點則有(a)混合效能與氧氣質傳性能較差。(b)起泡問題較為嚴重。(c)氣泡破裂造成的傷害，原因為此種發酵槽在槽頂的氣液交界面附近區域，發酵液中的氣泡會以極快的速度逸出液面，在氣泡破裂離開液面的瞬間，氣泡與液膜間由於表面張力而產生劇烈的動量變化，產生速度極快的飛濺液滴與液流，會傷害培養中的

細胞，尤其是對於剪切力敏感的動物細胞（王和黃, 2001）。(d)規模放大與操作上的問題。

四、Aniline blue 與 β -1 \rightarrow 3- D glucan 的關係介紹。aniline blue 最早是植物學家用來檢測植物組織中「癒創多醣」[callose; 包含篩管 (sieve tubes)、薄壁細胞 (parenchymatous pits) 和花粉母細胞 (pollen mother cell)] 常用的螢光染劑，後經證實癒創多醣的主要結構為 β -1 \rightarrow 3- glucan，Aniline blue 對於 β -1 \rightarrow 3- glucan 專一反應性於是被證實。Aniline blue 中的副成分 siroflour (sodium 4,4'- [carbonylbis -(benzene-4,1-diyl) bis (imino)] bisbenzene-sulphonate) 是主要作用物質，與 β -1 \rightarrow 3- glucan 結合後在激發波長 395nm，放射波長 495nm 的螢光圖譜上會出現 aniline blue- β -1 \rightarrow 3- glucan 錯合物的特徵螢光波峰，進而將 β -1 \rightarrow 3- glucan 定量（張, 2003, Mayell, 2001）。

第三章 材料與方法

一、菌種及培養基

本次實驗所選用的舞菇菌種為 *Grifola frondosa* (BCRC 36434)，購於新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。將得到的菌種接種於 potato dextrose agar(PDA) (HIMEDIA, 微生物級, India) slant 和 plate 中，於 25°C 下培養七天，之後於 4°C 下儲存。菌醃的培養則是將 250mL 三角錐形瓶中加入 50mL 的 Potato Dextrose broth(PDB)(HIMEDIA, 微生物級, India)，之後加入 2 單位(直徑約 0.6cm)經由二次活化的菌塊，在 25°C、轉速 150rpm 下培養七天。

將培養好的菌源接種到內含 100mL 的培養基的 250mL 三角錐形瓶中，[培養機的組成份如下:30 g/L carbon source(註 1), 6 g/L nitrogen source(註 2), 2 g/L polypeptone(HIMEDIA, 微生物級, India), 0.5 g/L KH₂PO₄(聯工化學, 試藥一級, 台灣), 0.5 g/L K₂HPO₄(聯工化學, 試藥一級, 台灣), 0.01 g/L 微量元素(註 3)]，在 25°C、轉速 150rpm 下培養十三天。

註 :1. carbon source :glucose(林純藥 , 微生物級 , 日本), fructose(sigma-aldrich, 微生物級, USA), sucrose(林純藥, 微生物級, 日本), starch(大勝商行, 食品級, 台灣)

2. nitrogen source : yeast extract(HIMEDIA, 微生物級, India) , malt extract (HIMEDIA, 微生物級, India) , corn steep powder (CSP)

(sigma-aldrich, 微生物級, USA)

3. 微量元素組成 : 0.12 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (林純藥, 試藥一級, 日本), 0.006 g/L NaCl(林純藥, 試藥一級, 日本), 0.02 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (林純藥, 試藥一級, 日本), 0.02 g/L $CaCl_2$ (林純藥, 試藥一級, 日本), 0.02 g/L $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ (林純藥, 試藥一級, 日本)

發酵槽的培養基組成分為 : 30 g/L corn starch, 6 g/L corn steep powder, 2 g/L polypeptone(HIMEDIA, 微生物級, India), 0.5 g/L KH_2PO_4 (聯工化學, 試藥一級, 台灣), 0.5 g/L K_2HPO_4 (聯工化學, 試藥一級, 台灣), 0.01 g/L 微量元素

二、實驗流程

將獲得的舞菇菌種接於 PDA 培養皿及斜面試管中, 25 °C 下活化 7 天, 之後取出 4 單位菌絲塊接種於裝有 100 ml PDB 的 250 ml 三角瓶中, 震盪培養 7 天 (25 °C, 150 rpm), 將活化後之菌醃以均質機 (OSTER REGENCY) 均質 30 秒, 接入不同的液態培養條件(搖瓶實驗中進行碳源及其濃度、氮源、初始 pH 值的試驗, 發酵槽實驗中進行不同發酵槽和通氣量的試驗)下培養十三天(25 °C, 150 rpm)。每日進行檢測, 取樣後將樣品經由四號濾紙(Whatman, 直徑 110mm, England) 過濾, 取菌絲體測其菌體乾重、胞內多醣、分子量、澱粉含量、 β -1 \rightarrow 3-glucan, 取發酵液測定 pH、黏度、胞外多醣的濃度及分子量、澱粉含量、 β -1 \rightarrow 3-glucan 含量。

三、發酵槽構造

本實驗所用之發酵槽有兩種, 一種是機械攪拌式發酵槽, 另一種

則是氣舉式發酵槽。

(一)、機械攪拌式發酵槽 (Stirred tank fermentor) (頂生儀器,NBS Bioflo2000,台灣)

1、槽體的結構

所使用之攪拌式發酵槽為總容積 7L 的玻璃槽體，運作容量最高為 6L，兩組葉片利用機械攪拌方式以提高發酵槽之質傳效果，增加發酵液中的溶氧量，去營造出一個適合好氣性微生物生長的環境。

2、攪拌葉片的結構

發酵槽的攪拌葉片一般常用為標準式渦輪扇葉 (Standard turbine impeller)(圖六(a));另一種為船推進器型扇葉 (Marine type impeller) (圖六(b))，外徑為 3 英吋，每片葉寬 1 英吋，葉片與轉動軸呈現 45 度角，皆為不鏽鋼材質。在發酵槽中培養真菌類，以船推進器型扇葉培養效果較佳 (張，2003)，故本實驗選用此種葉片。

(二)、氣舉式發酵槽 (Air-lift fermentor) (頂生儀器,台灣)

1、氣舉式發酵槽的結構

實驗使用的氣舉式發酵槽為總容積 7 L 的玻璃槽體，運作容量為 6 L，槽體中央有一不鏽鋼材質導流管 (Draught tube)，加裝導流管後，槽內液體被區隔為進氣區域的上升流動區 (riser) 與非進氣區域的下降流動區 (downcomer)，藉由下方的通氣管將氣體導入槽內，氣泡

由內管上升，帶動培養液上升而循環流動，以達到培養液通氣及混合效果。

2、導流管的構造

槽體內的導流管，內徑 7.5 cm、壁厚 2 mm、高度 20 cm，導流管上下有不鏽鋼支架，以利固定於槽體之中。(圖七)

四、菌種保存及菌體的培養

菌種的保存主要目的是在真菌未被利用作為任何發酵之前以確保菌體活性。一般以 PDA 斜面培養基來保存。步驟為先取 PDA 39 g/L 溶於蒸餾水中，將其置於加熱攪拌器上加熱使其完全溶解。溶解後將其溶液加入試管中(每支加入量為 8 mL)，將試管口以蓋子蓋住並在外層覆蓋上鋁箔紙，置入滅菌釜(Huxleyhl-340, vertical type)中滅菌(121°C, 20 分鐘)。滅菌後取出置入無菌操作台(海天儀器股份有限公司, 台灣)中，除去鋁箔紙並傾斜放置 1~2 天，確定其無污染後，將舞菇菌種接種於 PDA 斜面培養基中央，生長數天後，放入 4 °C 冰箱中保存備用 (Stock culture)。

菌體培養主要是將菌體接種於 PDA 培養皿上，以 25 °C 培養 7 天後，菌絲體長滿整個培養皿，即可進一步繼續做菌醃培養。且每兩週重新接種一次，以保持菌種的活性。

五、菌醅培養

在無菌操作台內，將 PDA 上培養 7 天的舞菇菌絲以直徑 6 mm 的玻璃吸管沿著培養皿邊緣切取數個菌絲塊（實驗中，以一個 6 mm 直徑菌絲塊定義為一個單位），然後取 4 單位菌絲塊接種於裝有 100 ml PDB 之 250 ml 三角瓶中，用鋁箔紙包住瓶口，置入震盪培養箱中在 25 °C，150 rpm 下培養 7 天，此即為菌醅。

六、搖瓶培養

主要在探討不同的碳源培養基及其濃度、氮源培養基和不同初始 pH 值對於舞菇菌體生長及其機能性成分產量的影響。

(一)、碳源及其濃度試驗：在 250 mL 三角瓶中加入 99 mL 的液態培養基及 1 mL 金屬離子溶液，而其液態培養基中的碳源分別加入濃度為 30 g/L 的 Glucose、Fructose、Sucrose 及 corn starch，氮源則選用一般常用的 yeast extract，將調配好的培養基置入滅菌釜中以 121 °C、20 分鐘進行滅菌後，冷卻備用。之後將液態菌醅以均質機打碎 30 秒後，取 6 mL（6% 的接菌量）接入已滅菌內含 100 ml 培養基的 250 ml 三角瓶中，置入以震盪培養箱中 (FIRSTEK, RI-150, 台灣)，溫度 25 °C、轉速 150 rpm 的培養 7 天，每天測量 pH 值、黏度及分析其菌體乾重、胞內及胞外多醣濃度、澱粉含量、殘糖量。重複上述步驟 3 次，取平均值。而碳源濃度測定步驟相同，只是將前述所測得較佳碳源分別改變其濃度為 20 g/L、30 g/L 和 40 g/L。

(二)、不同氮源的試驗：配製液態培養基，分別加入濃度為 6g/L

的 Yeast extract、Malt extract 及 Corn steep powder(CSP)做氮源，並以上項實驗所得之最適 corn starch 做碳源，其他成分和液態培養基及金屬離子溶液成分相同。而其培養方法與取樣分析操作均與較佳碳源的實驗方法相同

(三)、最適初始 pH 值的試驗:培養基的配製為碳源與氮源分別選用 corn starch 和 CSP，其他成分則相同。將其初始 pH 值用 0.1 N NaOH 或 0.1 N HCl 調至 4, 5, 6 及不調控四組(其測得的 pH 值約在 4.5 左右)。培養方法與取樣分析操作均與較佳碳源的實驗方法相同

七、發酵槽培養

探討舞菇的液態培養由三角瓶發酵擴大規模時，利用發酵槽的發酵環境，對舞菇菌體生長及其機能性成分產量的影響。

(一)、在不同的發酵槽培養方式：分為攪拌式及氣舉式兩種發酵槽進行，以比較菌絲生長和機能性成分形成試驗。攪拌式發酵槽的條件為採用船推進器型扇葉為攪拌器，總容量為 7 L，裝載量為 6L。本實驗所用的氣舉式發酵槽條件為利用槽底原有的環型空氣噴嘴所噴出的上升氣泡來帶動培養基循環流動與混和。內有裝置導流管。總容量為 7L，運作量為 6L。

(二)、不同的通氣量：在兩種發酵槽中各以不同的通氣量 (0.5vvm, 1.0vvm, 1.5vvm) 進行培養。vvm 為通氣量的單位，分別指發酵槽的體積(volume)、通入氣體的體積(volume)以及分鐘(minute)。

(三)、試驗方法則為將前項試驗所得最適碳源和濃度及氮源培養基置入發酵槽中，以 0.1 N HCl 或 0.1 N NaOH 將 pH 值調至 6.0，然後將裝有培養基的槽體移入直立式滅菌釜(永大明儀器, 台灣)中，以 121 °C、20 分鐘滅菌，滅菌結束後待冷卻至 70 °C 左右，將發酵槽取出至於無菌操作台中並將金屬離子溶液倒入，等待冷卻到室溫左右在將液態菌醃以均質機打碎 15 秒停 5 秒的方式重複兩遍後，接入菌量 6%。將槽體溫度控制在 25°C，攪拌式發酵槽的轉速設定為 150 rpm，分別以 0.5 vvm、1 vvm、1.5 vvm 的通氣量培養 13 天。每天測量發酵液 pH 值、黏度、殘糖量、殘留澱粉量及分析菌體乾重、胞內與胞外多醣體濃度、胞內外多醣分子量及 $\beta 1 \rightarrow 3$ glucan 含量。重複上述步驟 3 次，取平均值。

八、分析方法

(一) 菌體乾重

將發酵液以轉速 3000 rpm 離心機(HETTICH, EBA 12, Japan)離心 20 分鐘，去除上層液後，將菌絲體沉澱物以無菌水沖洗三次，留下之最終沉澱物以 70 °C 烘箱烘乾至恆重。

(二) 多醣濃度測定

分為胞內多醣和胞外多醣兩種。先以 4 號濾紙過濾將發酵液和菌絲體分開，過濾後所得的菌絲體加入蒸餾水 1:2 (W/V) 比例混勻，於 90 °C 熱水浴萃取 4 小時，再以 3000 rpm 離心 20 分鐘後過濾，經由減壓濃縮後取濾液 1 mL，加入 4 mL 95% 的酒精(台灣菸酒公司，

台灣)，於 4 °C 下靜置 24 小時，以 3000 rpm 離心 20 分鐘，倒出上清液，在用 75%酒精 5 mL 清洗沉澱物，以 3000 rpm 離心 20 分鐘，去除上清液，接著再以 75%酒精重複洗滌兩次，最後將沉澱物置於 70 °C 烘箱中除去殘留的酒精，此極為胞內多醣的製備。胞外多醣則是將過濾後所得的發酵液，經適度的稀釋後取 1 ml 稀釋液，加入 4 ml 95 %的酒精，於 4 °C 下靜置 24 小時，使多醣由發酵液中分離出來，之後步驟同胞內多醣萃取。

將多醣以酒精沉澱分離出來，再以酚—硫酸比色法測定(Dubois et al., 1956) 多醣含量。測定步驟為將上述分離所得胞內和胞外多醣沉澱物烘乾後之多醣樣品加入 2 ml 的蒸餾水再加入 1 mL 5% 酚(聯工化學廠, 98%, 台灣)溶液，最後加入 5 mL 的濃硫酸(聯工化學廠, 98%, 台灣)，靜置 10 分鐘後振盪混合，混合後 25 °C 水浴 15 分鐘。之後將上述反應後之樣品以分光光度計 490 nm 波長測吸光值 (ABS)，由已知濃度之標準多醣檢量線，計算所含多醣濃度。

(三) 發酵液還原糖量分析

利用修正後的二硝基水楊酸法 (3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS) (Miller, 1959) 進行檢測。檢測步驟為將過濾後發酵液稀釋至適當濃度，取 2 mL 於有蓋試管中，加入 D 液(註 4) 2 mL，於 100 °C 下水浴加熱 15 分鐘，立刻加入 1 mL C 液(註 5)，沖水冷卻至室溫，於 575 nm 波長下測吸光值。由以知濃度之標準取線求出樣品中還原

糖量，以蒸餾水重複上述步驟作為空白組。

註四：D 液為使用前將 1 mL 之 B 液〔5% (w/v) Sodium sulfite(林純藥, 試藥一級, Japan)〕加入 99 mL 之 A 液〔1% (w/v) 之 1.0(W/V) 3,5-dinitrosalicylic acid(sigma-aldrich, 試藥一級, USA)及 0.2% (w/v) 之 phenol 溶於 1% (w/v) 之 NaOH 中〕中。

註五：C 液：40% (w/v) Sodium potassium tartrate。

(四)澱粉含量測定：(Apar and Özbek, 2004)

方法為取 5 mL Iodine solution〔0.5% KI(和光純藥工業, 試藥一級, Japan)+0.15% I₂(和光純藥工業, 試藥一級, Japan)〕, 加入經由 4 號濾紙過濾後所得的發酵液且將其適當的稀釋, 加至 15 mL, 於 550 nm 波長下測其吸光值, 測出的值為發酵液殘留澱粉的含量。由已知濃度之標準曲線求出樣品中澱粉量, 以蒸餾水重複上述步驟作為空白組, 以玉米澱粉作為標準品。

經由酒精沉澱烘乾後的定量多醣樣品, 在由加水覆溶和適當的稀釋後(不論胞內或胞外多醣樣品), 進行澱粉含量測定。玉米澱粉所產生的多醣量在扣除所多醣體中測得的澱粉含量, 即為菌體所生成的多醣體

(五)多醣分子量的分析

實驗中多醣體分子量分析步驟是將製備之檢液利用膠體滲透層

析儀及 RI 偵測器測定。利用已知標準品 Dextran 分子量對數對遲滯時間作標準曲線。

胞內多醣的樣品的取得方式和測試多醣含量的方式相同，不同的是只取1mL 蒸餾水復溶，之後在經0.22 μm 微過濾膜過濾，以20 μL 的注入量進行膠體滲透層析儀（GPC）分子量測定。胞外多醣分子量將過濾除去菌絲體後的發酵液15 mL，經減壓濃縮成1 mL，加入4 mL 95%的酒精，於4 $^{\circ}\text{C}$ 下靜置24小時，使多醣由發酵液中分離出來，之後步驟同測試胞內多醣分子量方式進行。所使用的多醣分子量標準品為 Dextran（Mw 11700、44100、123400、32600及848200 Da）（Polymer Standards Service Inc., Silver Spring, USA）。

GPC 操作條件為分析管柱 PolySep-SEC-P 4000 與 PolySep-SEC-P 5000 雙管柱串聯(Phenomenex, USA)，以去離子水做移動相，流速為0.8 mL/min，所使用的幫浦、RI Detector 及積分儀分別為 aLCOTT 760 HPLC Pump(USA)、ERC RI detector 7515A(USA) 及 Chromatocoder 21(USA)。

（六）pH 值

利用 pH meter(SUNTEX, SP-2200, USA)及 pH 電極測定舞菇發酵液的 pH 值。

（七）黏度

利用黏度測定儀(BROOKFIELD, Brookfield DV-II, USA)測量其視

黏度(apparent viscosity)。

(八) β -1 \rightarrow 3-D glucan 含量檢測：(張, 2003)

將取得的胞內多醣及胞外多醣經由是當的稀釋後，溶於 3 mL 0.3 N NaOH 攪拌 30 分鐘使其完全溶解，調整 pH 值至 11.50 \pm 0.05，加入 pH11.50 的 50 mM Na₂HPO₄-NaOH 緩衝液(內含 0.5 M NaCl)定容至 10mL，取 2 mL 溶液加入 0.2 mL 濃度 1 mg/mL aniline blue 後，將其振盪混合均勻，靜置 2 小時後以螢光分光光度計(HITACHI, F-2500, Japan)進行檢測(激發波長(Excitation wavelength):395nm，放射波長(Emission wavelength):495nm)。所選用的標準品為 laminarin (Polysaccharide; primarily poly(β -Glc[1 \rightarrow 3]))with some β -(1 \rightarrow 6) interstrand linkages and branch points)，樣品單位為 Laminarin Equivalent(μ g/mL LE)，當含量越大，則表示含有的 β -1 \rightarrow 3-D glucans 鍵結越多(周, 2002)。

(九) 統計分析

表格內所有的值為三重複後的平均值 \pm 標準偏差值，且利用 ANOVA 進行統計分析，為單因子變異數之鄧肯分析，設定顯著性為 $p < 0.05$ 。

第四章 結果與討論

本實驗分為兩部分，前半部是利用搖瓶實驗找出對於舞菇基本生長的較適條件，後半部則是利用兩種不同的發酵槽，來測試不同的通氣條件來生產所需的代謝物。

在進行培養前，先進行菌株的活化。將舞菇菌株進行三分劃線培養，在培養皿上的菌落會呈現白色聚集且具有絨毛如圖八。取一單位的菌塊(直徑約 0.6cm)，接種於另一培養皿上進行再次活化培養，菌塊會繁殖出更多且更密集的菌絲，而後慢慢向外擴散如圖九。取二次活化的菌絲塊二單位，接入 50mL 的 PDB 培養基中進行菌醃的培養如圖十，培養 7 天後如圖十一。以 6% 的量接此菌醃到所需測試培養的培養基中。

一、搖瓶培養試驗

(一)、不同碳源對舞菇生長的影響

碳源主要是作為能量的供給(Hsu et al., 2002)。本實驗選擇四種不同的碳源:Glucose、Fructose、Sucrose 及 Corn Starch。Glucose 是最容易被微生物吸收的，但有學者發現對於真菌生長而言，用 fructose 所得到的效果比起 glucose 並沒有差異(Wu et al., 2003, 2004)，而 sucrose 是屬於雙糖。至於 corn starch 則是多糖、成本低且已有學者發現它是適合真菌生長的碳源(孫和朱, 1999)。

1、不同碳源對舞菇的菌絲體生長、發酵液還原糖變化及玉米澱粉殘留的變化

由圖十二(a)顯示，不同的碳源進行 13 天舞菇的液態培養，在菌體生長方面，以 glucose 及 sucrose 最好，第 8 天其菌體產量均達 1.13mg/mL。玉米澱粉雖可在第 6 天達到最大量，但產量較少，只有 0.83mg/mL。對於舞菇菌體生長最差的是 fructose，最大量在第 9 天，可達 0.80mg/mL。由圖二十可看出以玉米澱粉培養舞菇是混濁不易見到菌絲的。

圖十二(b)顯示，由於 corn starch 並不屬於還原糖，故其初始值低於其他三種碳源第零天的值，之後 starch 會慢慢分解，所以可以看出其還原糖變化量隨著分解而增加，之後被分解出來的還原糖又被舞菇利用，故其值在第 6 天達最大量後又往下降。其他三種碳源的還原糖量及玉米澱粉的殘留量，則會因慢慢被利用而呈現下降的趨勢。澱粉殘留量初始值並非原來製備時的 30g/L，因此應是在滅菌時已經造成澱粉的水解，而使得量減少。

2、不同碳源對舞菇的胞外多醣及胞內多醣產量的影響

圖十四顯示，胞內多醣及胞外多醣皆是以 corn starch 作碳源所得到的產量最大。胞外多醣在第 6 天可得到最大產量 6.70mg/mL，胞內多醣則是在第 7 天達最大量 0.51mg/mL。胞外多醣變化方面，前 3

天的變化不大，從第 3 天到第 4 天產量大大的增加。其他三種碳源所形成的量都不多，比較多的是以 glucose 在第 7 天所得到的 2.53 mg/mL。胞內多醣含量則是前 3 天皆沒有什麼明顯的變化，到了第 4 天產量快速增加，直到第 7 天達最大量。以 glucose 及 fructose 作碳源所得到的胞內多醣含量也不少分別達到 0.29mg/mL 和 0.25mg/mL，但在第 9 天才形成。以 sucrose 做碳源效果最差。

3、不同碳源對舞菇發酵期間的 pH 值變化

由圖二十二，以 sucrose 作碳源時的初始 pH 值較高一點，約在 6.5 左右，而其他的則都約在 6 附近。可以發現以 corn starch 為碳源的 pH 變化較大，下降至 3.42，下降的原因應該是發酵時會有有機酸產生而造成。

綜合以上結果如表四。以 glucose 及 sucrose 作碳源時，較有利於舞菇菌體生長 1.13 mg/mL；以 corn starch 作碳源則有利於生產胞外與胞內多醣體。整體而言，以 corn starch 為碳源時，菌體生長可達 0.83mg/mL，但所產生的胞外多醣(6.70 mg/mL)及胞內多醣(0.51 mg/mL)分別為 glucose(EPS:2.53 mg/mL; IPS:0.29 mg/mL)和 sucrose(EPS:0.47 mg/mL; IPS: 0.01mg/mL)作碳源時的數倍，因此後續的研究即以 corn starch 為碳源進行實驗。

(二)、不同氮源對舞菇生長的影響

較適合舞菇的氮源為有機氮(孫和朱, 1999)。一般最常用的有機氮源為 yeast extract 與 malt extract，而 corn steep powder 中除了水溶性蛋白質外，還具有維生素、礦物質、有機酸、糖類等，除了對於合成蛋白質及核苷酸外，還有提供其他方面營養的功能。所以使用此三種氮源為本試驗的條件。

1、不同氮源對舞菇的生長、殘留澱粉量及還原糖的變化

圖十六(a)顯示，由三種氮源經過 13 天後，菌體生長的變化。以 corn steep powder 所得的最好，在第 7 天即達到最高點 1.33mg/mL，之後呈現下降趨勢。以 malt extract 作氮源的舞菇菌體則是在第 2 天即表現出快速生長的趨勢，在第 6 天達最大量 0.83mg/mL。yeast extract 使菌體生長呈現穩定的增加，直到第 7 天達到最大量 1.05mg/mL。比起其他兩種氮源，malt extract 較不適合舞菇的液態培養。

圖十六(b)顯示，由於所用的碳源為玉米澱粉，還原糖量一開始很低，隨後由於澱粉的分解而上升，再因為被菌體利用所以又下降。

圖十七顯示，澱粉殘留量在第 2 天以後開始有明顯的下降，表示在那時的澱粉已開始被分解，菌絲體及多醣體的最大量也在隨後產生。

2、不同氮源對舞菇的胞外及胞內多醣產量的影響

以不同氮源培養，在 13 天後(圖十八)，對於胞外多醣所得到的量以 corn steep powder 在第四天有最好產量 7.40mg/mL，優於 malt extract 在第四天有 5.63mg/mL 及 yeast extract 在第 5 天 6.32mg/mL 所達到的最大量。

胞內多醣是以 corn steep powder 及 malt extract 作氮源所得到的樣好，分別在第 4 天及第 7 天可達最大量 0.86mg/mL。以 yeast extract 所得到的含量比前兩者低，在第 7 天有 0.60mg/mL。

3、不同氮源對舞菇的 pH 值和黏度的變化

圖十九顯示，由於是以玉米澱粉作碳源，黏度比起一般的基質要大，會隨著玉米澱粉被分解而變小。在 pH 變化方面，corn steep powder 初始值，比其他二者要低，大約在 pH4.5 左右，其他都在 pH6 以上。而以 corn steep powder 作氮源，pH 變化大約是從 4.5 到 3.8 左右，以 malt yeast 的變化較大，從 6.2 到 3.4。

綜合以上結果列於表五。以 corn steep powder 作氮源時，有利於舞菇菌株產生菌絲體及胞外多醣，但以 malt extract 得到的都較低。但對於胞內多醣則是以 csp 及 malt extract，所得到的結果較好。因此以 corn steep powder 作為後續實驗的氮源。

(三)、不同 corn starch 濃度對舞菇生長的影響

1、不同的 corn starch 濃度對舞菇的菌體、還原糖及澱粉殘留量的變化

圖二十(a)顯示，玉米澱粉濃度在 30g/L 時，菌絲體在第 8 天可得到最大量 1.70mg/mL，最差的是以 40g/L 的，在第 8 天只有 1.26 mg/mL，可能原因是濃度過高，造成抑制菌體的生長 (Lichfield, 1979)，20g/L 的效果較 30g/L 的稍低，在第 8 天有 1.57mg/mL。

圖二十(b)顯示，濃度 20g/L 和 30g/L 還原糖變化很類似，在第 6 天到第 7 天之後才會形成大量的還原糖，初期量都不多。在 40g/L 則是由第一天之後就開始大量形成，使得菌體可得到能量來利用。

圖二十一顯示，除了濃度 20g/L 的是由第 4 天起開始變化較大，其餘二者，則是從第 1 天到第 4 天開始澱粉殘留量變化就較明顯，濃度 40g/L 的更是由第 4 天起開始快速的下降。

2、不同 corn starch 濃度對舞菇多醣體含量的影響

圖二十一(a)顯示，胞外多醣是以濃度 30g/L 在第 6 天會有最大量 7.74mg/mL，而 40g/L 的高濃度則可能是碳源過多對生長產生抑制效果 (Lichfield, 1979)，所以產量沒有成正比，可得到 6.96 mg/mL，但兩者並無顯著差異 ($p < 0.05$)；濃度較低的 20g/L 在第 6 天達到最大

量 3.79 mg/mL，是較差的($p < 0.05$)。圖二十一(b)表示，胞內多醣以濃度 30g/L 比較好，第七天就有最大量 1.12 mg/mL 產生，雖然 40g/L 的產量(0.95mg/mL)和前者並無顯著差異，但是到第 8 天才達最大量。

綜合以上結果列於表六。對於菌體生長量、胞外多醣及胞內多醣而言，皆是以玉米澱粉濃度在 30g/L 時，可得到最大產量，分別是 1.70 mg/mL、7.74 mg/mL 及 1.12 mg/mL。但多醣體含量方面並沒有顯著差異，主要是菌體生長是以濃度 30g/L 明顯較好($p < 0.05$)。綜合上述胞內和胞外多醣的結果及成本觀點來看，當然選擇較低成本的來進行實驗，故選擇 30g/L 的濃度進行後續試驗。

(四)、培養基初始 pH 值對舞菇生長的影響

培養基初始 pH 值對於真菌會產生以下的影響：(1)影響細胞膜作用；(2)影響酵素活性；(3)改變培養基中的離子狀態；(4)攝取營養的改變；(5)生物代謝產物的改變 (Catley, 1980)。有研究舞菇較適生長環境時發現，初始 pH 值在 5.5 至 6.5 之間是最適合舞菇生長的 (吳和林, 1997)，所以先選擇初始 pH 值在 5 和 6，而使用的氮源 corn steep powder 會使培養基 pH 值降低，所以另一實驗條件為初始 pH4。

1、初始 pH 值對舞菇的菌絲體生長及發酵液還原糖的影響

圖二十三(a)，菌絲體重方面，有調整的三組，初始 pH 值接近中性的 pH6，所得到的較高的，第 8 天有 1.93 mg/mL，和其他三者比較

是明顯的較好。未進行調整 pH 值在第 7 天得到的 1.17mg/mL，pH 值 4 和 5 的則介於兩者之間，分別在第 6 天和第 7 天得到最大產量 1.30mg/mL 和 1.23mg/mL。

圖二十三(b)顯示，還原糖變化量是以初始 pH 值 6 時，在第 1 天之後就出現大量增加的趨勢，此時 corn starch 在快速分解提供微生物足夠的基質。

圖二十四顯示，澱粉含量則是以未調整初始 pH 值的在第 6 天後才開始快速減少，其餘的皆是在第 4 天過後數值就開始下降。圖二十三、圖二十四對照，發現在第 4 天後還原糖的量皆開始有明顯的增加。

2、調整初始 pH 值對舞菇多醣含量的影響

對於舞菇而言，不論是胞外或者胞內多醣，有調整初始 pH 值比未調整所得到的量都是較多的。圖二十五(a)顯示，胞外多醣在初始 pH 為 6 時產量最大($P < 0.05$)，第 7 天有 10.69mg/mL。其他三者則無明顯差別，pH5 在第 6 天有 7.68mg/mL。圖二十五(b)表示，胞內多醣在 pH5 和 6 皆是在第 1 天快速的增高，分別在第 7 天和第 8 天達到最大含量 1.35mg/mL 和 1.28mg/mL，和另外兩者有顯著差異，其餘的分別為 pH4 在第 7 天有最大量 0.51mg/mL，未調整的則是在第 8 天有 0.55mg/mL。

3、不同培養基初始 pH 值對舞菇的 pH 及黏度的變化

圖二十六(a)所顯示，舞菇在 pH4 時，pH 的變化會有先上升後下降的現象，但幅度不大，而其他的則是呈現下降的趨勢。

圖二十六(b)表示，有調整 pH 的，黏度會比沒調整的大，而全部在第四天過後，就變的很低，之後就都很平穩。

綜合以上結果列於表七。對於舞菇菌體生長而言，培養基初始 pH 值 6 在第 8 天所得的 1.93mg/mL 最高($P < 0.05$)；胞外多醣，明顯的是以初始 pH 值 6 時，在第七天所得到的含量 10.69 mg/mL 為最佳($P < 0.05$)；胞內多醣以 pH 在 5 和 6 時是比較理想的($P < 0.05$)。因此選擇初始 pH 值 6 繼續接下來的實驗。

二、發酵槽培養實驗

由上述實驗發現，分別以 30g/L 的 corn starch 及 6g/L 的 corn steep powder 做碳源及氮源時，對於舞菇菌體的生長及多醣體的形成較為有利，遂將此培養條件用於攪拌式發酵槽及氣舉式發酵槽中培養菌體，並比較不同的通氣量，對舞菇生長的影響。

通氣的目的除了供應氧氣外，還可以有將培養基和菌體、氧氣三者混合均勻，增加質傳及熱傳的效能，與攪拌的效果類似，所以在探討發酵槽時，是重要的因素。發酵槽比搖瓶試驗更接近實際的生產，故進行培養時，除了菌體和多醣體的產量外，對產品的品質也可同時

探討。目前多醣體的品質主要是比較其分子量及 β -1 \rightarrow 3- glucans 的含量。目前認為多醣體具有 β -1 \rightarrow 3- glucans 時，才比較具有生理活性(Mizuno, 1995)。

(一)、攪拌式發酵槽對舞菇生長的影響

1、不同通氣量於攪拌式發酵槽對菌絲體及還原糖的影響

圖二十七顯示，微生物生長量隨著時間而增加，三種通氣量中以 1.0vvm 所得到的效果是最好的，在第 3 天就達到最大量 1.43mg/mL。當給予 1.5vvm 時，加上攪拌，可能因有較多的菌絲附著於發酵槽壁上而無法和培養基充分混合，使得菌體在第 6 天才達到最大量 1.20mg/mL；較低的 0.5vvm 則因為通氣不足，即使有攪拌幫助，還是無法有足夠的氧氣，所以會在第 5 天才達到最大量 1.10mg/mL。對於菌體在攪拌式發酵槽的生長來說，以 1.0vvm 較佳。還原糖變化量方面，一樣是先由少量而後大量，然後減少的曲線形式。

2、不同通氣量對多醣體含量的影響

由圖二十八顯示，通氣量對於多醣體的形成影響很大。以 1.0vvm 通氣量是較好的，第 8 天時，胞外多醣則是在第 5 天達最大量 14.25 mg/mL，而胞內多醣達到最大量 1.49 mg/mL。給予較高的 1.5vvm 時，胞外多醣，在第 3 天左右就達最大量 7.09mg/mL，而胞內多醣體的最大量在第 5 天產生 0.90mg/mL，可能是因為通氣量較大，所以較快達

最大量。當給予 0.5vvm 時，胞外多醣則是在第 6 天有 12.43 mg/mL，第 7 天可以產生胞內多醣最大量 1.35 mg/mL，比 1.5 vvm 效果要好。

3、不同通氣量於攪拌式發酵槽對 β -1 \rightarrow 3- glucans 的影響

圖二十九顯示，胞外多醣中的 β -1 \rightarrow 3- glucans 含量以 1.5vvm 的最高，在第 7 天有 111.90 μ g/mL LE，且多醣體在此時產量並不高，表示所佔的比例特別高。當通氣量 1.0vvm 時雖有最大量的胞外多醣產量，但所得到的 β -1 \rightarrow 3 鍵結反而較低(67.72 μ g/mL LE)。

圖二十九顯示，胞內 β -1 \rightarrow 3- D-glucans 含量以 1.0vvm 的通氣量最高，可以在第 9 天左右有最大量 10.45 μ g/mL LE(P<0.05)，而 0.5 vvm 與 1.5vvm 所得的產量差別不大，約在 5 μ g/mL LE 左右(第 5 天)。所以如果希望所產的胞外多醣體中含有較多的 glucans 時，選擇較高通氣量 1.5vvm 會較適合，而希望胞內多醣體有較多 glucans 則是以 1.0vvm 較好(P<0.05)。

4、不同通氣量對發酵液 pH 值和黏度變化

圖三十，所有的初始 pH 值皆已調整在 6，舞菇菌體在發酵期間，會分泌一些酸性物質如有機酸等等的，使得 pH 值會一直下降(陳, 1997)，較高通氣量的最終 pH 值約在 3.5 左右是最低的，其他兩者則是差不多，約在 pH 值 4 左右，造成這方面的差異或許是因為較大通氣量培養時，無法使菌體和氧氣及培養基充分混合，而培養基氮

源玉米浸出粉末無法被有效利用時，可能使 pH 值偏低，在前述實驗檢測較佳氮源時的圖二十六顯示，使用此種氮源的 pH 值較其他的低。

黏度方面，在圖三十中顯示發酵後幾天逐漸下降，表示玉米澱粉被分解，隨後黏度就一直很低。

當舞菇以攪拌式發酵槽培養時，混合的能力雖然顯著，但可能是攪拌時會有機械熱能產生以及剪切力等等的問題(Roukas and Kyriakides, 1999)，所以當攪拌速率維持一定，再配合較高的通氣量或許對於菌體的生長會較好。綜合以上結果整理於表八。菌體生長以及胞內與胞外多醣體，是以 1.0vvm 的通氣量是最好(圖三十一)，當考慮胞內 β -1 \rightarrow 3- D-glucans 含量依然是以 1.0vvm 的條件較好，但考慮胞外的 glucans 含量時，1.5vvm 是較好的。對於工業生產而言，並沒有何者較好的問題，端看所需的產物品質要求來進行條件控制。

(二)、氣舉式發酵槽對舞菇生長的影響

現今發酵工業的發酵槽以機械攪拌式最為常用，包括真菌發酵在內(吳, 2000)。大部分舞菇培養的研究也是如此，例如 Lee 等人(2003)利用 7L 的攪拌式發酵槽探討舞菇的生物活性物質，Mau 等人(2004)所進行的抗氧化特性測試以及 Norio Suzuki 等日本學者(2005)所發表關於舞菇多醣成分測定均為搖瓶實驗，而不同形式的發

酵槽培養的研究可以說是很少。Lee 等人在 2004 曾提出利用攪拌式發酵槽的較適條件，利用於氣舉式發酵槽，而提出了攪拌式較好的理論，但這樣在結果上或許會有所偏差，因為設定的培養條件和攪拌式發酵槽的相同，故此次實驗加以探討。

1、不同通氣量於氣舉式發酵槽對菌絲體及還原糖的影響

由圖三十二顯示，氣舉式發酵槽由於只由通氣來提供氧氣及達到混合菌體及培養基的效果，所以需要較長時間才達到菌體生長的最大量(此實驗以 0.5vvm 及 1.5vvm 通氣量都達到最高 1.30mg/mL); 1.0vvm 培養效果最差，第 7 天達到最大量 1.03 mg/mL，將三者統計分析發現是不具有顯著差異的。還原糖變化，由於碳源是玉米澱粉，所以都呈現先上升在下降的曲線，由圖三十二觀察，以 0.5vvm 和 1.5vvm，從第 2 天開始快速增加到了第 5 天、第 6 天達到高峰，之後又快速的被利用。

2、不同通氣量於氣舉式發酵槽對多醣體含量的影響

圖三十三顯示，胞外多醣體是以 0.5 vvm 在第 5 天就有 12.69 mg/mL 的產生量為最好($P < 0.05$)，在第 3 天到第 6 天時，還原糖變化量正在大量產生，所以那時的能量足夠供給菌絲體代謝產生胞外多醣，菌體的生長也十分緩慢，直到第 6 天到第 7 天，還原糖變化量達最大值，菌體生長也在當天達最大值(參照圖三十二); EPS 在 1.5vvm

方面，第5天產生 9.33 mg/mL 已達最大量；在 1.0vvm 也是第5天有最大量 9.29 mg/mL 產生，之後就呈現快速下降，可能是因為菌體分解多醣的酵素已大量產生(水野和川合, 1999)，所以快速被分解。IPS 則是以 1.0vvm 所得到的含量最多(1.41mg/mL)，1.5vvm 的次之，0.5vvm 的最差，在第8天才只有 0.68mg/mL 的含量。

3、不同通氣量對 β - 1 \rightarrow 3- D- glucans 的影響

由圖三十三和圖三十四顯示，不論胞內或胞外多醣，當發酵期間其多醣含量最大時， β - 1 \rightarrow 3- D- glucans 含量不一定是最大。胞外多醣不論何種通氣量在第5天就有最大值出現，但 β - 1 \rightarrow 3- D- glucans 含量卻是在第11天(0.5vvm)及第九天(1.0vvm和1.5vvm)才達到，而那時的胞外多醣由圖三十三可以發現含量十分少，大約只有 1.0mg/mL 左右，但卻可以有 35 μ g/mL LE 以上的 β glucans 含量，在最大胞外多醣含量時，卻只有 13-30 μ g/mL LE glucans 含量。胞內多醣的情形是相同的， β - 1 \rightarrow 3- D- glucans 含量是在前3天多醣體含量不是最大時有最大量產生，尤其是 1.5vvm 的最為明顯，在胞內多醣只有 0.59mg/mL 的情形下，就有 11.56 μ g/mL LE 的 glucans，在產生最大胞內多醣量的第6天卻只有 6.80 μ g/mL LE，其他兩種通氣量也是這種情形。對於胞內、胞外 β - 1 \rightarrow 3- D- glucans 含量而言，提供較大的通氣量可以有較好的結果產生。

4、不同通氣量於氣舉式發酵槽對 pH 值和黏度的變化

將圖三十和圖三十五進行比較，以氣舉式發酵槽進行發酵培養舞菇，其最終 pH 值和攪拌式培養的差不多，但如是給予 1.0vvm 通氣量的最終 pH 值，則是較低。pH 值變低是因在發酵期間，不斷的有有機酸或是氨基酸等等的物質釋出所造成的(陳, 1997)。

在黏度曲線方面，和前面的實驗相同的，因為 corn starch 持續進行分解，而使黏度一直下降，直到大約第 3 天到第 4 天，即呈現平緩的趨勢，表示已分解的差不多，大部分都已呈現單糖或者雙糖等等小分子糖的形式。

將上述結果整理列於表十。如果只考慮菌體生長及胞外多醣體量，選用通氣量 0.5vvm 或許是較好的選擇(圖三十六)，但如果是胞內多醣含量，則是以 1.0vvm 是較好的。若以 β -1 \rightarrow 3- D- glucans 的量則又有不同的選擇，此時 1.5 vvm 的就會是較好的，所以端看所需的代謝產物為何來進行。

(三)、不同發酵槽環境下所生產的多醣體分子量比較討論

菇類多醣體的種類有很多，一般認為具有生理活性的多醣種類是由 β -1 \rightarrow 3- D- glucans 結構組成的，而影響 β -1 \rightarrow 3- D- glucans 含量多少的因素有很多，如分子量大小、分支度多寡、分支的型態與

構型等等，各個因子間會有相互影響，例如分子量需大到某一程度才可形成triple helix，分子量太小時只能形成random coil，而具有免疫調節活性的菇類多醣，其分子量約在 1×10^5 至 2×10^5 Da（杜等, 2002）；Kulicke 等(1997)用鹼萃取的方式，將四種不同真菌菌體萃取出不同的多醣，在經由超音波處理製備不同分子量的樣品，檢測對於人體單核細胞產生TNF- α 與superoxide-anions的影響，發現不論是何種來源的 β -1 \rightarrow 3-D-glucans，最具活性的樣品分子量在 5.5×10^5 Da；1976年Sasaki等以酸水解香菇多醣(Lentinan)後，經由不同濃度的酒精沉澱後得到大分子、中分子、小分子三區，但只有在大分子與中分子區具有抗腫瘤活性，小分子區並不具有效果；在1989年Maruyama等利用分子篩膜(molecular weight cut-off membrane)將靈芝熱水萃取物分成兩類，一類是分子量在 1×10^4 以上的，稱為G-W-M1，另一類是分子量在 1×10^4 以下的，稱G-W-M2，但只有G-W-M1具有明顯活性；靈芝多醣由於萃取方式不同，分為ganoderan A、B及C等，其分子量分布在 5.8×10^3 至 2.3×10^4 Da，皆可達到降血糖之功效（Tomoda et al., 1986）。大部分的真菌所產生的多醣體需具有高度三股螺旋結構，才具有表現較佳的生物活性，而要讓 β -1 \rightarrow 3-D-glucans產生三股螺旋，其分子量同常需高於 9×10^4 Da（Suzuki, 1992；杜等, 2002）。

經由上述例子可知，真菌所產生的多醣體分子量大小，對於生物活性具有很大的影響。有文獻指出，靈芝液態發酵培養胞外多醣體的分子量分佈，會受多種因子的影響，如碳、氮源的類型、氮源濃度、三角瓶的體積、初始pH值和轉速等等的影響而產生不同的分子量(張, 2003)。故本實驗經由膠體滲透層析(GPC; Gel permeation chromatography)，探討在相關條件環境下，測量經由發酵槽培養期間的舞菇所產生胞內、胞外多醣體分子量大小。

1、攪拌式發酵槽

表十顯示，胞內多醣分子量的分佈，以1.0 vvm的通氣量培養時，不論在第3天或是第7天，皆分布在數十萬 Da(4.7×10^5 Da 和 1.2×10^5 Da)，不過是第7天分子量會變小；而0.5 vvm和1.5 vvm則是在第3天時有兩個主要分子量，而以1.5 vvm所得的差距較大，由數千到十幾萬，而到了第7天，皆變成只有一個分子量分佈。大致上來說，以0.5 vvm進行實驗所得到的分子量是最大的，分子量到後期是變小的。至於胞外多醣，只有在以0.5 vvm培養時發現分子量分佈是由一個變為兩個主要分佈的情形，而其他在第3天及第7天所得到的分子量分佈多寡是相同的。以0.5 vvm所得到的分子量最大，而以1.5 vvm培養時，會得到最多的分子量分佈情形，大致上，第3天所得到的分子量大於第7天。

2、氣舉式發酵槽

表十一顯示，不論用何種大小的通氣量，對於胞內多醣體而言，第 7 天所測得的分子量比起第 3 天都是較大的，而只有在以 1.0 vvm 發現分子量的分佈會由一個變成有兩個主要的分佈，其餘二者皆不會有此情形。以 1.0 vvm 進行實驗時所得到的是最大，而最小的是以 1.5vvm 所得到的結果；胞外多醣分子量及其分佈，第 7 天所得到的分子量比起第 3 天所得到的都要小，在第 3 天時以 1.0vvm 所得到是最大，1.5vvm 所得到是最小；分子量分佈情形，只有以 1.5vvm 進行實驗時，會有兩個主要的分子量分佈，其餘兩項條件所做出的結果皆是只有一個主要的分子量分佈。在第 7 天則是以 0.5 vvm 所得到的最大，但分佈的也差距最大，有三個主要的分佈；1.5 vvm 所得到的最小，有一個主要的分佈。

第五章 結論

本實驗分為兩部分，第一部分的搖瓶實驗培養舞菇所需的基本條件，第二部分是在探討不同的發酵槽及不同通氣量下，對於菌體及舞菇多醣產量與品質的影響。

一、搖瓶實驗

- 1、以 glucose、fructose、sucrose 和 corn starch 等四種碳源培養舞菇(*G. frondosa*)時，以 corn starch 為碳源對於多醣體的含量是較佳的分別有胞外多醣(EPS)6.70 mg/mL 及胞內多醣(IPS)0.51mg/mL; corn starch 在培養基的濃度以 30g/L 優於 20g/L 及 40g/L，對舞菇菌絲體生長可達 1.70mg/mL，EPS 產量可達 7.74 mg/mL，IPS 含量 1.12 mg/mL。
- 2、以 corn steep powder 作氮源，濃度 6g/L，來培養舞菇會優於 yeast extract 和 malt extract，菌體產量可達 1.33 mg/mL，EPS、IPS 含量各有 7.40mg/mL、0.86mg/mL。
- 3、培養基初始 pH 值 4, 5, 6 及不調整(pH 值約 4.5)四組進行培養時，不論是菌絲產量(1.93 mg/mL)及 EPS(10.69 mg/mL)、IPS(1.28 mg/mL)都是以 pH6 的較好，其次是 pH5。

二、發酵槽實驗

- 1、以攪拌式發酵槽通氣量 1.0 vvm 較有利，可得到菌絲體含

量 1.43 mg/mL，EPS 含量 14.25 mg/mL 及 IPS 含量 1.49 mg/mL；1.5 vvm 的通氣量可有很好的胞外 glucans 的含量 111.90 μ g/mL LE，1.0 vvm 有較好的胞內 glucans 的含量 10.45 μ g/mL LE。

- 2、氣舉式發酵槽對菌絲體及 EPS 的影響。通氣量 0.5 vvm 所得到的產量最好，分別是 1.33 mg/mL 和 12.69 mg/mL，IPS 以 1.0 vvm 的 1.41 mg/mL 較佳； β -1 \rightarrow 3-D-glucans 的含量不論是胞外或是胞內的含量皆是以 1.5 vvm 所得到的較好，分別是 40.14 μ g/mL LE 及 11.56 μ g/mL LE。
- 3、利用 GPC 分析發酵槽所產生的多醣體在攪拌式發酵槽，EPS 的發酵前期，以 1.0 vvm 通氣量所得的分子量為最大 3.3×10^6 Da，後期則是以 0.5 vvm 的最大 2.0×10^6 Da；IPS 皆是以 0.5 vvm 通氣量所得到的分子量最大 5.0×10^5 Da，1.5 vvm 的分子量同一批產品差距最多， 5.3×10^3 Da 到 4.8×10^5 Da。
- 4、氣舉式發酵槽 EPS 的分子量，發酵前期以 1.0 vvm 所得到 1.3×10^6 Da 為最大，後期則以 0.5 vvm 最大 3.5×10^5 Da，但是分佈差距也最大；IPS 的分子量，不論發酵前、後期分別以 1.0 vvm 通氣量所產生的分子量 5.0×10^5 Da 及 4.2×10^5 Da 為最大。

5、 對於舞菇菌體生長及代謝物的產量而言，都會受到不同的發酵槽種類和通氣量的影響，可以依所需要的產物來進行條件的選擇，以達到最佳效果。