

私立東海大學化學工程研究所  
Graduate Institute of Chemical Engineering  
TUNGHAI UNIVERSITY

碩士論文  
Master Thesis

指導教授：楊芳鏘 博士  
Advisor : Fan-Chiang Yang, Ph.D.

培養條件對雲芝菌絲體生長與多醣生成之影響  
Effect of culture conditions on the mycelia growth and  
the formation of polysaccharides of *Coriolus versicolor*

研究生：林嘉隆 撰  
Graduate Student : Chia-Lung Lin

中華民國 九十五年 七月  
July, 2006

## 摘要

本研究主要目的在利用液態培養方式，藉由改變在不同的培養條件下雲芝(*Coriolus versicolor* BCRC 35253)菌絲體生長、多醣體生成及形態變化之影響，希望藉由控制培養因子來提高菌絲濃度與多醣體的產量。三角瓶培養實驗，主要探討培養基的成分、時間、pH 值、不同高分子添加等環境因子對菌絲生長與多醣生成之影響。

結果顯示：雲芝在搖瓶實驗的培養基中培養第七天時，菌絲濃度可達到 11.63 (g/L)，且多醣體的產量高達 2.1 (g/L)。添加不同高分子對菌絲濃度與形態有明顯的差異，在低接種量下實驗，添加 carboxymethyl cellulose sodium salt (0.2 %)菌絲濃度可達到 10.27 (g/L)，菌絲粒徑大小約 4~8 mm，添加 agar (0.2 %)菌絲濃度可達到 16.23 (g/L)，菌絲粒徑大小約 4 mm。綠茶在最適添加量 3 %時，有效增加雲芝多醣的產量，濃度可達到 3.16 (g/L)，比控制組多醣濃度高出許多。此外，發酵槽操作方面，在 5 L 的攪拌式發酵槽中，轉速 500 rpm、pH 值 6.0 及 25 °C 下菌絲能在短時間內達到高濃度，反之在轉速 100 rpm 下菌絲濃度低，而多醣體濃度較高。

關鍵字：雲芝、高分子添加、多醣生成、形態

## Abstract

The main purpose of this research was to study the effects of different culture conditions on the mycelium growth, polysaccharides formation and morphology of *Coriolus versicolor* (BCRC 35253) using liquid state fermentation to determine the optimum conditions for the the production of biomass and polysaccharide. The experiment items in shake-flasks cultures included the effects of medium compositions, time, pH value and polymer additions on mycelium growth and polysaccharides formation.

The results show that the biomass concentration reached to 11.63 (g/L) at 7<sup>th</sup> day and had a high level of polysaccharide of 2.1 (g/L). The additions of polymers were found to have a great influence on biomass concentration and morphology. When carboxymethyl cellulose sodium salt of 0.2 % was added, the biomass concentration reached to 10.27 (g/L) and mycelium size was around 4 mm to 8 mm. In contrast, with the addition of 0.2 % agar, the biomass concentration rose to 16.23 (g/L). In additions, the extract of green tea 3 % was proved to have a beneficial effect on the production of polysaccharide, in which the level was about 3.16 (g/L) and higher than that of the control.

Moreover, high agitation speed at 500 rpm was demonstrated to be beneficial to the growth of mycelium, but not the production of polysaccharide in the cultures using a fermentor.

Key words: *Coriolus versicolor*; polymer addition; polysaccharide production; morphology.

# 目 錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	VII
表目錄.....	IX
<b>第一章 緒論</b> .....	<b>1</b>
1-1 前言.....	1
1-2 本文大綱.....	2
<b>第二章 文獻回顧</b> .....	<b>4</b>
2-1 雲芝之介紹.....	4
2-1-1 雲芝分類.....	4
2-1-2 雲芝形態及分布.....	6
2-1-3 雲芝之成分分析.....	8
2-1-4 雲芝之藥理活性與應用.....	11
2-2 多醣簡介.....	14
2-3 雲芝液態培養.....	18
2-4 液態培養影響因子.....	21
2-4-1 物理因素.....	22

2-4-2 化學因素.....	25
2-5 菌絲形態之簡介.....	29
2-5-1 菌絲球的形成與構造.....	30
2-5-2 菌絲狀之生物特性.....	33
2-5-3 菌絲狀形態之影響因子.....	34
2-5-4 絲狀真菌培養之生物反應器設計.....	41
<b>第三章 實驗材料與分析方法.....</b>	<b>44</b>
3-1 菌株.....	44
3-2 實驗藥品.....	45
3-3 實驗儀器與設備.....	47
3-4 分析方法.....	49
3-4-1 pH 值測定.....	49
3-4-2 菌體濃度測定.....	49
3-4-3 葡萄糖濃度測定.....	49
3-4-4 黏度測定.....	50
3-4-5 多醣濃度測定.....	51
3-4-6 菌絲球數量測定.....	52
3-4-7 粒徑大小測定.....	52

<b>第四章 實驗方法</b> .....	53
4-1 平面培養.....	53
4-1-1 試管斜面培養.....	53
4-1-2 培養皿平面培養.....	54
4-2 液態種菌培養.....	55
4-2-1 種菌製備.....	55
4-3 菌絲切割器製作.....	56
4-4 菌種篩選.....	57
4-5 利用不同培養基組成取代原基礎液態培養基試驗.....	59
4-6 探討添加物對雲芝菌絲體生長、多醣體生成及形態之影響....	67
4-7 探討於低接種量下添加物對雲芝菌絲體生長及形態之影響..	69
4-8 探討在發酵槽中固定轉速攪拌對雲芝菌絲體生長及形態之影 響.....	73
 <b>第五章 結果與討論</b> .....	 74
5-1 菌種篩選.....	74
5-2 利用不同培養基組成取代原基礎液態培養基試驗.....	78
5-3 探討添加物對雲芝菌絲體生長、多醣體生成及形態之影響...94	
5-4 探討於低接種量下添加物對雲芝菌絲體生長及形態之影響..98	

5-5 探討在發酵槽中固定轉速攪拌對雲芝菌絲體生長及形態之影響.....	109
<b>第六章 結論與未來展望.....</b>	<b>115</b>
6-1 結論.....	115
6-2 未來展望.....	116
<b>參考文獻.....</b>	<b>117</b>
<b>附錄.....</b>	<b>123</b>
<b>簡歷.....</b>	<b>126</b>

## 圖目錄

圖 2-1 雲芝子實體(1) .....	5
圖 2-2 雲芝子實體(2) .....	5
圖 2-3 雲芝醣蛋白之分子結構.....	12
圖 2-4 $\beta$ -(1-3)-D-葡聚糖結晶結構.....	17
圖 2-5 球狀菌絲體之剖視圖.....	32
圖 3-1 CP-40 的黏度範圍.....	51
圖 5-1 不同種菌於平面培養皿培養之比較.....	75
圖 5-2 不同種菌於液態培養基中培養之比較.....	77
圖 5-3 不同接菌量對雲芝菌絲體生長之影響.....	79
圖 5-4 不同培養基對雲芝菌絲體生長之影響.....	81
圖 5-5 Glucose 的濃度對雲芝菌絲體生長及多醣生成之影響.....	83
圖 5-6 Yeast extract 的濃度對雲芝菌絲體生長及多醣生成之影響....	85
圖 5-7 pH 值對雲芝菌絲體生長及多醣生成之影響.....	87
圖 5-8 時間變化雲芝菌絲體產量與多醣生成的情況.....	89
圖 5-9 轉速對雲芝菌絲體生長與多醣生成的影響.....	91
圖 5-10 相異均質時間下對雲芝菌絲體生長與形態之影響.....	93
圖 5-11 綠茶的添加對雲芝多醣體生成之影響.....	95
圖 5-12 不同 Agar 濃度對雲芝菌絲球形態之影響.....	102



圖 5-13 不同濃度的 Carboxymethyl cellulose sodium salt 對雲芝形態 之影響.....	105
圖 5-14 不同濃度的 Sodium dihydrogenphosphate dihydrate 對雲芝形 態之影響.....	108
圖 5-15 300 rpm 轉速下之雲芝菌絲形態(28hr) .....	111
圖 5-16 500 rpm 轉速下之雲芝菌絲形態(16hr) .....	111
圖 5-17 固定轉速 100 rpm 對雲芝菌絲體生長之影響.....	112
圖 5-18 固定轉速 300 rpm 對雲芝菌絲體生長之影響.....	113
圖 5-19 固定轉速 500 rpm 對雲芝菌絲體生長之影響.....	114
圖 A 葡萄糖檢量線圖.....	123
圖 B 菌體切割器.....	125

## 表目錄

表 1-1 目前在日本已成功量產上市的菇類多醣體抗腫瘤製劑.....	3
表 2-1 雲芝在真菌門之分類地位.....	7
表 2-2 雲芝的活性物質成分.....	10
表 2-3 糖質部分的單醣組成.....	11
表 2-4 蛋白質部分的胺基酸組成.....	11
表 2-5 雲芝菌絲體的液態培養.....	19
表 2-5 雲芝菌絲體的液態培養(續).....	20
表 3-1 實驗藥品.....	45
表 3-1 實驗藥品(續).....	46
表 3-2 實驗儀器與設備.....	47
表 3-2 實驗儀器與設備(續).....	48
表 5-1 不同添加物對雲芝菌絲體生長及形態之影響.....	97
表 5-2 不同添加物對雲芝菌絲體生長及形態之影響.....	99
表 5-3 添加不同濃度的 Agar 對雲芝菌絲體生長之影響.....	101
表 5-4 添加不同濃度的 Carboxymethyl cellulose sodium salt 對雲芝菌 絲體生長影響.....	104
表 5-5 添加不同濃度的 Sodium dihydrogenphosphate dihydrate 對雲芝 菌絲體生長及形態之影響.....	107

# 第一章 緒論

## 1-1 前言

自古以來，食藥用菇雖然廣為用於民間流傳的藥方中，但許多藥效成分至今尚未闡明，其應用方面在中國已有二千多年的歷史，靈芝、雲芝、樟芝、茯苓、豬苓及冬蟲夏草等藥用菇就有明確的藥效記載(王等，1998)。

近年來研究發現無論是子實體或菌絲體發酵液，均含有相當多量的生物活性成分，或二次代謝物質，這些成分包括生物體防禦物質(如抗生素、抗腫瘤、抗病毒物質等)，及生體機能調節物質(如降血壓、降血糖、降血脂、抗血栓、抗癌症等活性物質)(黃，2000)。目前多種菇類的多醣或多醣蛋白已經步入臨床應用階段，當作一種免疫增強劑，以多孔菌科菇類及食用菇類子實體用熱水提取的萃取物，對Sarcoma 180 等動物移植癌有明顯寄主仲介性的抗腫瘤活性(賴，1997)。經過多年研究結果，目前以開發出雲芝多醣(Krestin)、香菇多醣(Lentinan)和裂褶菌多醣(Schizophyllan)等抗癌劑(表 1-1)，其抗癌的可能機制為刺激巨噬細胞與 T 淋巴細胞後增強免疫功能所致(丁，2000)。

## 1-2 本文大綱

本研究以液態菌絲體深層培養，不僅可以縮短培養時間，生產的效益也可大為提昇，對於環境的衝擊也能減少，其中唯一仍需考慮的是以發酵液所得的菌絲是否和天然的子實體具有相同生理活性物質。

本論文研究重點在於以液態培養雲芝菌絲體，首先以食品工業發展研究所生物資源保存中心所取得的菌種，進行實驗。因環境因素與培養條件的控制會影響菌絲體生長或多醣體生成。而在 250 mL 三角瓶的基礎培養研究試驗中，探討培養時間、pH 值、培養基成分等對菌絲體生長之影響，本論文分成六大部分，第二章為文獻回顧，介紹雲芝、多醣體及液態發酵培養等資料。第三章材料與方法，為本研究所使用的藥品、儀器設備及分析方法。第四章實驗方法，為實驗目的及實驗步驟作介紹。第五章結果與討論，依實驗結果進行討論。最後在第六章對實驗結果做出總結並對未來提出建議及展望。

表 1-1 目前在日本已成功量產上市的菇類多醣體抗腫瘤製劑

	雲芝素	香菇多醣	裂褶菌多醣
英文名稱	Krestin 或 PSK	Lentinan	Schizophyllan, Sonifilan 或 SPG
上市公司	Sonkyo, Kureha	Ajinomoto Yamanouchi-sciyaku Morishita-sciyaku	Taito Kaken-sciyaku
上市日期	1977 年 5 月	1985 年 12 月	1986 年 4 月
製程來源	<i>Trametes versicolor</i> 發酵菌絲體	<i>Lentinula edodes</i> 子實體	<i>Schizophyllum communc</i> 發酵培養液
多醣體種類	$\beta$ -葡聚糖-蛋白質 複合體	$\beta$ -葡聚糖	$\beta$ -葡聚糖
多醣體鍵結方式	主鏈成 $\beta$ -1,3 或 $\beta$ -1,4 鍵結， $\beta$ -1,6 分支	主鏈成 $\beta$ -1,3 鍵結， $\beta$ -1,6 分支	主鏈成 $\beta$ -1,3 鍵結， $\beta$ -1,6 分支
平均分子量	100,000	500,000	450,000
旋光度	—	+14-22°(NaOH)	+14-22°(水)
製劑型式	1 克袋裝(sack)	1 mg 小瓶(vial)	20 mg/ 2ml 安培小瓶 (ampoule)
使用方式	口服	靜脈注射	皮下注射
適用癌症	消化道器官癌症、 肺癌、乳癌	胃癌	子宮頸癌

(Mizuno *et al.*, 1995b)

## 第二章 文獻回顧

### 2-1 雲芝之介紹

#### 2-1-1 雲芝分類

雲芝又稱彩絨革蓋菌、雜色雲芝、彩絨菌、瓦菌，屬於真菌界 (Fungi)、擔子菌門(Basidiomycota)、擔子菌亞門(Basidiomycotina)、層菌綱(Hymenomycetes)、非褶菌目(Aphyllorphorales)、多孔菌科 (Polyporaceae)、雲芝屬(*Polystictus*)或革蓋菌屬(*Coriolus*)(戴&朱，1982；Ainsworth et al.,1973 )(表 2-1)。學名 *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.)Que'l.，俗稱雲芝。其同種異名有 *Polystictus versicololr* (L.)Fr., *Polystictus nigricans* Sacc., *Polysticrus versicolor var. nigricans* P. Henn., *Polyporus nigricans* Lasch, *Polyporus hirsutululus* Schw., *Polystictus hirsutululus* Cke 和 *Coriolus hirsutululus* Murr.另外亦稱之為 *Trametes versicolor* 菌絲系統為三次元(trimitic)，生殖菌絲(Generative hyphae)薄壁，而厚壁的是骨骼菌絲(Skeletal hyphae)和結合菌絲(Binding hyphae)。其子實體(見圖 2-1、2-2)一年生，且只一季產生孢子，雖然它的顏色變異性大，但環生帶狀的蕈蓋卻是它最易於辨別的標記，絨毛毛的輪環將顏色不同的各區隔開地井然有序，是雲芝外表最大的特色(王等，1998)。



圖 2-1 雲芝子實體(1)



圖 2-2 雲芝子實體(2)

## 2-1-2 雲芝形態及分布

雲芝又名青芝，為一種白腐擔子真菌(white-rot basidiomycete)，這類真菌廣泛分布世界各處，從溫帶到熱帶地區皆可發現，會造成植物白腐病。在台灣，從平地到兩千公尺以上海拔區皆有分布，且極為常見，為闊葉樹腐生菌。而在大陸的上海、福建、廣東、陝西、新疆、四川、雲南等諸多省份亦常可發現它的蹤跡。此菌主要營腐生生活，長於闊葉樹，如柳(*Salix* spp.)、楊(*Populus* spp.)、樟(*Cinnamomum camphora* (L.) Pysl.)等朽木上，但有時也會寄生在這些植物的活樹幹上。偶爾並會在松樹(*Pinus* spp.)的植株上寄生，雲芝也是森林生態環境變遷中，移生態系等一相(first phase)的菌種之一，是林相變異中的一個很好指標(劉，1984)。

雲芝子實體無柄或平伏而反捲，半圓形至貝殼狀，菌蓋革質。腹瓦狀排列，常互相連接而呈玫瑰花樣。菌肉薄，厚 0.1-0.3 cm，寬 1-3 × 8-10 cm，與寄生之樹木銜接處平行生長或些微凹陷的生長，菌肉白色至淡黃色，質輕脆疏鬆，有苦味。有細絨毛環生，隔開顏色多樣卻光滑、無毛的同心環帶。菌管(tubes)短，白色，成熟時為白褐色；管口圓形，灰白色，孢子圓形、表面平滑， $4.5-8 \times 1.5-3 \mu\text{m}$ ，先白後微褐色(王等，1998)。



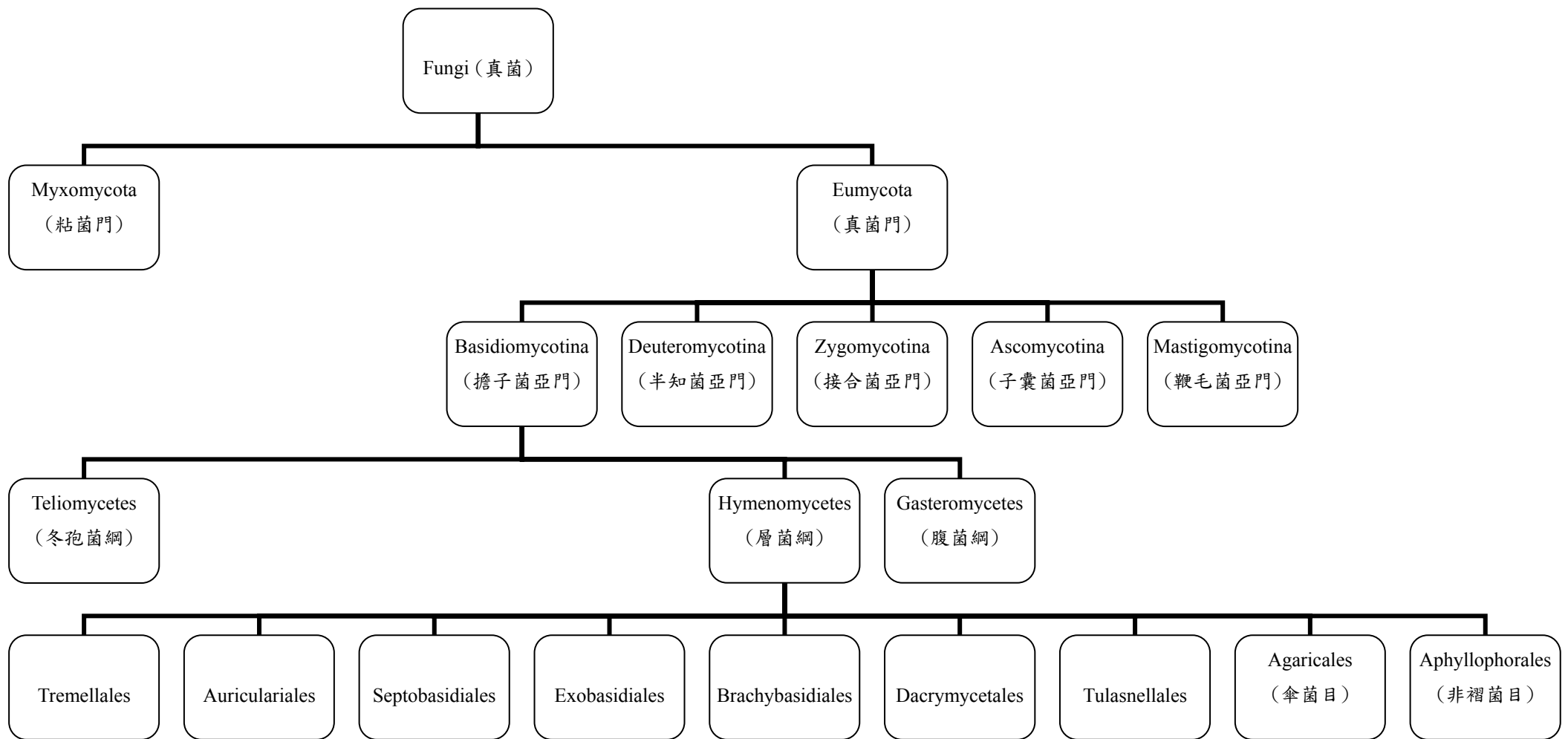


表 2-1 雲芝在真菌門之分類地位(王，1990)

### 2-1-3 雲芝之成分分析

在 1977 年，日本研究人員從雲芝的菌絲中分離出高分子的多醣體 PSK (polysaccharide Krestin) 在證實其療效後開發為藥物產品，並成為二十世紀最具經濟價值的藥物之一。大約十年後，中國科學家們發現療效比 PSK 更好的 PSP (polysaccharopeptide) (表 2-2)，通過更多的臨床試驗，PSK 和 PSP 被製成藥丸、膠囊、糖漿、茶以及食品添加物等。

Krestin (雲芝素，略稱 PSK) 是由日本人所發現，從擔子菌多孔菌科雲芝菌種 CM101 菌株的培養菌絲體的熱水抽取物，用硫酸銨飽和，分離所產生沉澱，通過脫鹽等過程。為褐色或帶褐粉末，可溶於水，不溶於甲醇、氯仿、苯、己烷等有機溶劑，水溶液大體成中性，Krestin 是由 62~80 % 的多醣部分與 20~38 % 的蛋白質部份組合而成 (賴，1997)。其中糖質部分由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖和岩藻糖(fucose)構成(表 2-3)，蛋白質部分則由大量的天門冬氨酸(aspartic acid)和麩氨酸(glutamic acid)組成(表 2-4)(王，2000)。

雲芝醣肽(PSP)為一種蛋白質結合多醣，由中國人從雲芝 Cov-1 菌株製造，多醣部分由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖和鼠李糖構成，PSK 和 PSP 的多醣部分在 4' 和 6' 位置皆有  $\beta(1\rightarrow3)$  glucan 分支，兩者都可從雲芝的菌絲體經深層培養萃取而得，也具有相似的

生理活性及分子量(~100KD)，但結構卻不相同。

表 2-2 雲芝的活性物質成分(Chu *et al.*, 2002)

Chemical Class	Name	Source	Physicochemical Properties	Chemical Composition	Biological Properties
Polysaccharopeptides	PSK (Krestin)	Mycelia of <i>Coriolus versicolor</i> CM-101 strain	Brown in color; soluble in water; insoluble in organic solvents; stable to heat; mean MW = 100 kDa	18%-38% w/w protein (1 → 3)β-glucan branched at 4' and 6' positions	In vitro and in vivo immunorestorative and antitumor activities
	PSP	Mycelia of <i>Coriolus versicolor</i> Cov-1 strain	Brown in color; soluble in water; insoluble in organic solvents; stable to heat; mean MW = 100 kDa	(1 → 3)β-glucan branched at 4' and 6' positions	In vitro and in vivo immunorestorative and antitumor activities
Polysaccharides	CVG (CV glucan)	Mycelia of <i>Coriolus versicolor</i> Iwade	White powder; soluble in water and DMSO; insoluble in organic solvents; heat stable; MW > 2000 kDa	Elemental analysis: C = 38%, H = 5.7%; glucose content = 98.4%-99.8%; (1 → 3)β-glucan	Enhance the antitumor effect of chemotherapy in vivo
	Coriolin I & II	Mycelia or fruiting body of <i>Coriolus versicolor</i>	MW: Coriolin I = 110 kDa; Coriolin II = 10 kDa	Monosaccharide units: glucose, fucose, mannose, galactose, galactose, and rhamnose; (1 → 3)β-glucan	In vivo antitumor and immunorestorative effect
Polypeptides	PCV (Peptide CV)	PSP	MW = 10 and 50 kDa		In vitro inhibitory effect on different human cancer cell lines; in vivo effects on proliferating white blood cells and increasing the weight of immune organs
	RNase-CV	PSP	Acidic; MW = 10-16 kDa	Partial amino acid sequence: Gly-Thr-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Glu-Arg-Glu-His-Met	In vitro inhibitory effect on different human cancer cell lines; in vivo antitumor activities; in vivo immunostimulatory effects
Small molecules	Coriolin (I)	Mycelia of <i>Coriolus consors</i>	Colorless; needle shaped; melting point 175°C; soluble in polar organic solvents and water; MW = 280 Da	Elemental analysis: C = 63.6, H = 7.2, N = 0; sesquiterpene	In vitro inhibitory effect on the growth of gram +ve and -ve bacteria; little inhibitory effect on leukemia 1210 cell line
	Deoxycoriolic acid (II)	Mycelia of <i>Coriolus consors</i>	Colorless; oily; soluble in organic solvents; insoluble in water; MW = 404.2	Elemental analysis: C = 68.2, H = 8.2	Inhibitory effect on certain bacteria and tumor

表 2-3 糖質部分的單糖組成

單 糖	組成 (%)
葡萄糖	74.6
半乳糖	2.7
甘露糖	15.5
木 糖	4.8
墨角藻糖	2.4

(賴，1997)

表 2-4 蛋白質部分的胺基酸組成

胺 基 酸	組成 (%)
天冬胺酸	13.2
酥胺酸	4.5
絲胺酸	4.7
麩胺酸	14.4
脯胺酸	+
甘胺酸	7.8
丙胺酸	9.2
胱胺酸	+
纈胺酸	9.6
甲硫胺酸	1.9
異白胺酸	5.9
白胺酸	13.4
酪胺酸	2.9
苯丙胺酸	6.7
色胺酸	+
離胺酸	2.8
組胺酸	2.3
精胺酸	0.7

(賴，1997)

#### 2-1-4 雲芝之藥理活性與應用

由於雲芝多醣的藥理活性研究指出，可以提高機體的免疫功能，實驗證明，將雲芝多醣與艾氏腹水癌細胞混合後，再接種至小白鼠時，能夠明顯地抑制腫瘤細胞的生長。又將雲芝多醣、艾氏腹水癌細胞和豚鼠腹膜巨噬細胞混合後，經體外培養一段時間後，再接種到小白鼠時，對腫瘤細胞生長的抑制率可以達到 80 %~99.9 %，而巨噬細胞的吞噬活性會有顯著的增強；以及對艾氏腹水癌細胞內核酸的合成也有明顯的抑制作用(對 RNA 合成的抑制率為 51 %，對 DNA 的抑制率為 45 %)，因而對腫瘤細胞有毒殺作用(丁，2000)。而雲芝多醣通常會與蛋白質結合成蛋白多醣複合物，其結構如圖 2-3 所示(賴，2003)。

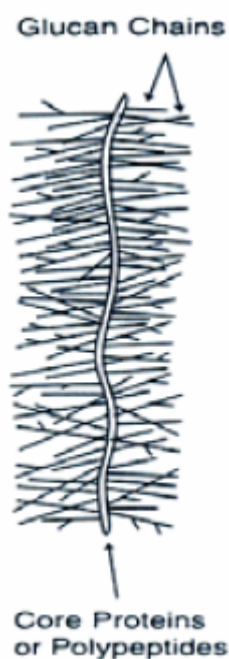


圖 2-3 雲芝醣蛋白之分子結構(賴，2003)

雲芝具有提高人體免疫系統功能的作用，可以增強人體的抗病能力。利用雲芝生產的藥物有兩類：一種是從雲芝的子實體中製取，另一種是用雲芝的菌絲體為原料製取的(丁，2000)。野地採集到的子實體，經清洗乾淨並曬乾即可算是用半成品了，其能清熱，消炎。取用6至15克，水煎服，性寒，味微甘，日服二次，可見其功效(王，1990)。另一是利用深層發酵培養菌絲體，製成膠囊顆粒。在傳統的中醫文件中，雲芝被認為有散熱、解毒、腹痛、增強體格、增強免疫功能，目前臨床上主要作為治療慢性B型肝炎、消化系統、呼吸系統、子宮頸及乳腺等癌症之免疫療法的用藥(丁，2000)。

由於雲芝的提取物對腫瘤細胞生長有抑制作用，且對人體無明顯的毒副作用，故在臨床上，已作為癌症免疫療法中的一種常用藥。日本用PSK口服藥治療食道癌、子宮頸癌、乳腺癌等；並用PSK配合化學藥物及放射療法治療轉移性腦腫瘤，而取得顯著的效果。

## 2-2 多醣簡介

雲芝萃取物最大部分為多醣體 (polysaccharides) 和三帖類 (triterpenoids)，佔總重量近30%。其中多醣具有抗腫瘤的活性，其作用機制可分為：

### 1. 作用在免疫系統：

在體外實驗，雲芝的水溶液萃取物，發現它可以活化T或B淋巴球，單和球、巨噬細胞、骨髓細胞、自然殺手細胞、促進增生或製造抗體和一些細胞介白素、干擾素。雲芝的免疫調節作用，可以復原一些因腫瘤或化療所造成的免疫低下。

### 2. 抗腫瘤作用：

雲芝的萃取物擁有選擇性的細胞毒殺作用，可以對抗一些腫瘤細胞，比如：胃癌、肺癌、肝癌、乳癌、膀胱癌、白血病、淋巴瘤。它可以抑制腫瘤細胞DNA的合成和分裂勝於誘導癌細胞走向程式死亡。

### 3. 抗菌作用：

雲芝顯示一個大範圍的抗菌、抗黴菌作用。比如對抗大腸桿菌、綠膿桿菌、金黃色葡萄球菌、肺炎鏈球菌。

多醣類是自然界中蘊藏豐富之生物聚合體(Biopolymer)，生物體中有三種重要的物質分別為蛋白質、脂肪及醣類，其中醣類可簡單分



為單醣、雙醣、寡醣及多醣，目前微生物多醣的來源絕大部分由細菌類所生成，少部分為真菌。由於多醣的發酵液黏度極高，這會使溶氧和質傳效果變差，若所使用菌種為真菌，因為菌體的絲狀形態，但在高濃度下即呈現非牛頓流體性質，因而使其流變行為更形複雜。

在微生物體中多醣依存在的方式主要分為以下三種：(1)胞內多醣(Intra-cellular polysaccharides)：此種形態多醣為提供微生物生長所需要的能量及碳源。(2)結構多醣(Structural polysaccharides)：此類多醣架構菌種基本形態如細胞壁。(3)胞外多醣(Extra-cellular polysaccharides)：為最常利用之多醣，為附著於細胞外部的黏性物質，但其亦可儲存細胞壁間隙(楊，2006)。

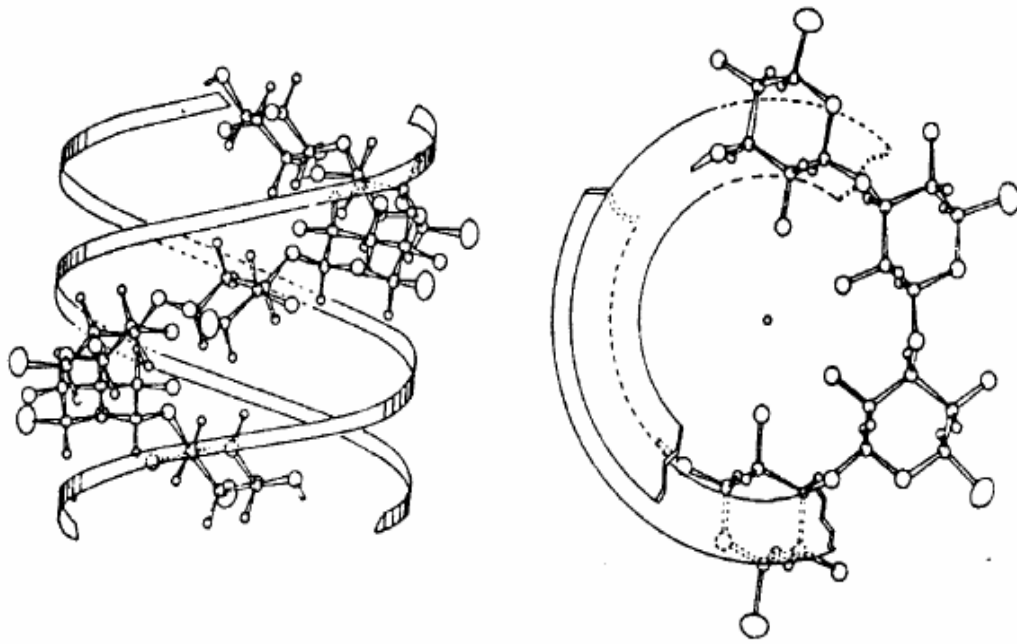
許多研究者分離出其有效成分主體，確認它是酸水解後，僅生成D-葡萄糖的一種多醣類 $\beta$ -D-葡聚醣(glucan)，多醣體結構中的 $\beta$ -1,3葡聚醣結構是抗腫瘤作用所必須，可從X-射線繞射分析中知道，這種以 $\beta$ -1,3鍵結的D-葡聚醣骨架呈現螺旋形的結構，這種螺旋結構可能是引發抗腫瘤作用的重要結構(圖 2-4)。除了結構因素外，對水的溶解性，分子量大小和分支度及形式等，均會影響其抗腫瘤活性的展現，其中分子量在 5,8000 Da 至 230,000 Da 具有抗癌及降血糖的功效(賴，1997)。

多醣主要功用有以下幾類：(1)細胞間的訊息傳遞，尤其是用於

免疫細胞間的傳遞活性。(2)活化體內巨噬細胞進行吞食作用，亦會引發補體的活化反應。(3)增強參與效應細胞活化的間白血球素 interleukin (IL-1IL-2)及干擾素(IFN- $\gamma$ )等的產生。(4)以增強寄主免疫機能，抑制癌細胞增殖或將其排除。

$\beta$ -D-葡聚糖與淋巴球表層或特定血清蛋白質結合，活化巨噬細胞、T細胞、自然殺手細胞等效應細胞，並促進抗體的產生。在生體實驗上已證實菇類多醣可利用腹膜內注射或口服，來治療小白鼠身上的 Sarcoma 180 腫瘤。菇類的多醣抗腫瘤機制並不是採用直接殺傷癌細胞或抑制癌細胞生長的方法，對自體腫瘤和移植性腫瘤產生療效，而是透過調節身體的免疫力而發揮作用。 $\beta$ -D-葡聚糖可刺激巨噬細胞與 T 淋巴細胞增強免疫功能，活化的巨噬細胞會引發補體的活化反應，這些活化的補體與活噬細胞表面的受體結合後會使吞噬細胞吞食能力提昇，因而可視菇類多醣為一種良好的免疫增強劑(賴，1997)。

巨噬細胞屬於遍佈機體內多種組織的單核吞噬細胞系統，對調節機體或局部環境的免疫狀態為主要作用，因此與腫瘤、動脈硬化等疾病的發生及轉變有關(龐等，1999)。它會刺激免疫系統幫助人體對抗傷寒、流行性感冒及各種傳染病且活化巨噬菌活性產生抗腫瘤效應。



(賴, 1997)

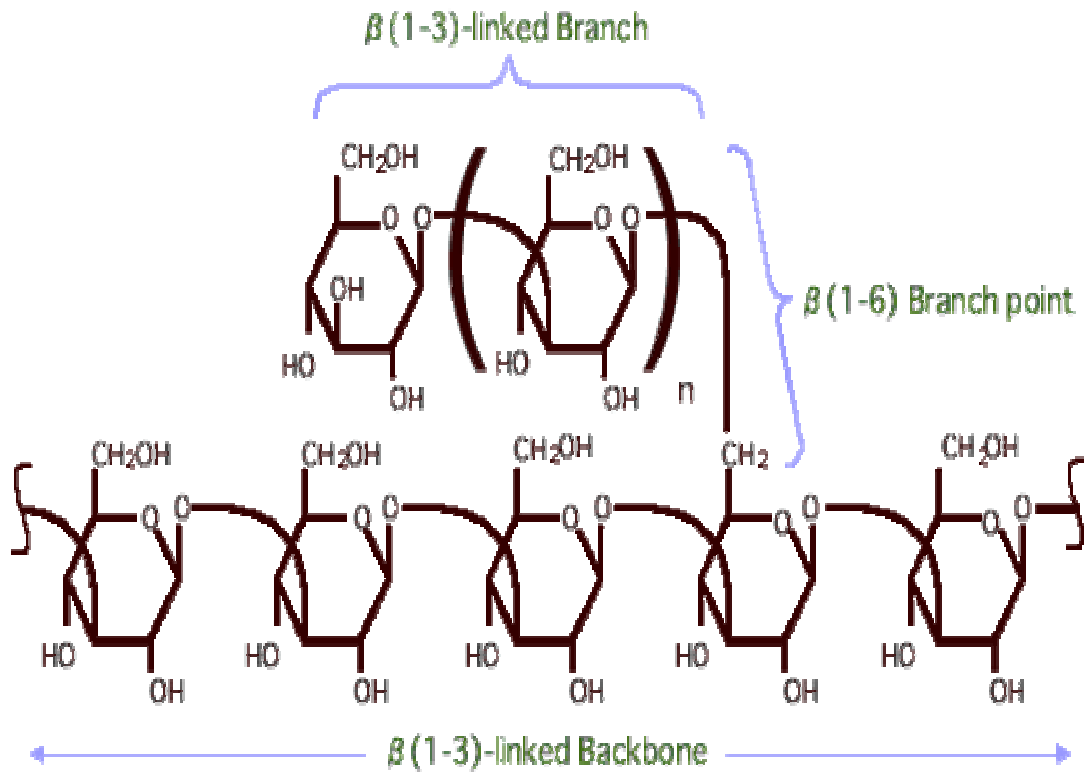


圖 2-4  $\beta$ -(1-3)-D-葡聚糖結晶結構(免疫情報研究會)

## 2-3 雲芝液態培養

長久以來，人們對菇類(Mushroom)的第一印象，多半在其形狀突出而且色彩豐富的傘狀結構，即所謂的子實體(Fruiting body)。傳統的食用菌加工均是選用子實體為原料，由於利用人工栽培菇類子實體，生產週期長、成本高、產量及品質不穩定，難以大規模工廠化生產，因此價格較為昂貴。研究結果顯示，食用菌的菌絲體與子實體相似，亦具有很高的營養價值與藥用價值(張，2001)。因此液態培養的方式是利用發酵槽生產菇類菌絲體，生產週期短、成本低等，更可以對生長條件加以控制，使菌絲體能得到最佳的液態培養條件，並且可以利用一些農產的廢棄物，做為培養基質，對環境有正面的影響。

雲芝是分佈極其廣泛的一種木腐菌，可侵害近 80 種闊葉林樹木，被侵害樹木的木質部形成白色腐朽。常常導致枕木、電桿、楞木、橋梁等木用建材腐朽。該菌含有蛋白酶(Proteinase)、過氧化酶(Peroxidase)、澱粉酶(Amylase)、蟲漆酶(Laccase)及革酶等。而子實體培養時會造成環境的破壞，若是液態培養可以降低對環境的傷害，因此更能控制菇類菌絲生長的環境因子，不會使菇類產生變異的現象，並且使菌絲體的量於短時間內增加。而文獻上提供許多的液態培養基，如下：

表 2-5 雲芝菌絲體的液態培養

液態培養基的成份	培養條件			培養天數 (day)	菌絲重 (g/100 mL) (參考文獻)
	溫度 (°C)	pH 值	轉速 (rpm/min)		
1. 葡萄糖 20g、酒石酸鈉 4.6g、 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1g、酒石酸銨 0.94g、 ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 10 <sup>-5</sup> g、Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.2g、CuSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.5g、CaCl <sub>2</sub> 10 <sup>-4</sup> g、FePO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 10 <sup>-4</sup> g、V <sub>B1</sub> 10 <sup>-4</sup> g	26	4.6	150	7	0.7 (崔等, 1994)
2. 葡萄糖 4.0%、Peptone 0.3%、 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.15%、MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.05%、花生餅粉 1.0%、V <sub>B1</sub> 0.005%	28	6	150	5~7	3.4 (張等, 1998)
3. 葡萄糖 3.0%、Peptone 0.5%、NaCl 0.1%、V <sub>B1</sub> 0.1%	28	5.8	160	7	0.96 (鄧等, 2000)
4. 葡萄糖 2.0%、KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.3%、MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.15%、 麵皮 2%、V <sub>B1</sub> 0.1%	28	5.8	160	7	0.98 (鄧等, 2000)
5. 葡萄糖 3.0%、Peptone 0.5%、KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1%、MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.05%、CaCO <sub>3</sub> 0.5%	28	5.8	160	7	1.04 (鄧等, 2000)
6. 葡萄糖 2.0%、KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.075%、MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.03%、 CaCO <sub>3</sub> 0.5%、豆餅 2.0%	28	5.8	160	7	0.82 (鄧等, 2000)
7. 葡萄糖 2.0%、KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.15%、MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.03%、 CaCO <sub>3</sub> 0.5%、玉米抽提物 2.0%	28	5.8	160	7	0.92 (鄧等, 2000)
8. 葡萄糖 2.0%、CaCO <sub>3</sub> 0.5%、 麸皮 1.5%	28	5.8	160	7	0.78 (鄧等, 2000)

表 2-5 雲芝菌絲體的液態培養(續)

液態培養基的成份	培養條件			培養天數 (day)	菌絲重 (g/100 ml) (參考文獻)
	溫度 (°C)	pH 值	轉速 (rpm/min)		
9. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1%、MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.07%、玉米抽提物 3.0%	28	5.8	160	7	0.72 (鄧等, 2000)
10. Peptone 0.2%、KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.05%、MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.02%、CaCO <sub>3</sub> 0.5%、NaCl 0.1%、豆餅 1.0%、麸皮 2.0%	28	5.8	160	7	0.79 (鄧等, 2000)
11. 葡萄糖 5.0%、Peptone 0.2%、KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1%、MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.1%、酵母 Yeast extract 0.3%	25~27		靜置	25	2~2.15 (黃, 2000)
12. 馬鈴薯 20%、葡萄糖 2%、KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3.0%、MgSO <sub>4</sub> 0.15%、V <sub>B1</sub> 1mg	28	6.0	150	7	0.5298 (王等, 2004)
13. 馬鈴薯 20g、澱粉 2g、KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.3g、MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.15g、V <sub>B1</sub> 1mg、干酪素 5g	30		110	5	(楊, 1999)
14. 馬鈴薯 20%、蔗糖 2%、KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1%、(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.2%	27~28	自然	130~140	7~8	(潘等, 1998)
15. 玉米粉 2.5%、豆餅粉 1%、KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1%、MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.05%	27~28	自然	130~140	7~8	(潘等, 1998)
16. 葡萄糖 10.0%、KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1%、MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.1%、酵母 Yeast extract 1.5%	26		150 (發酵槽)	7	(黃, 2000)

## 2-4 液態培養影響因子

一般在生化反應的過程中，由於細胞內和細胞外因子相互作用影響的結果，使得微生物能夠生長並產生代謝物。細胞內因子包括微生物的繁殖及一些遺傳上複製、轉錄和移轉的控制。而細胞外因子包括物理因素和化學因素。

此外，物理因素與化學因素主要針對培養系統和所使用的反應器來探討，其中物理因素主要是由溫度、pH 值、通氣與攪拌、光照等所組成，而化學因素包含有使用到的營養因子，例如：碳源、氮源等所構成。

## 2-4-1 物理因素

### (1)溫度

由文獻得知，對於蕈類菌絲液體培養適用溫度範圍在22~28 °C，可以獲得較好的生長速率與產量。針對雲芝生長而言，由資料顯示：雲芝屬中溫偏高型真菌類，菌絲在4~35 °C範圍內都能生長，最適生長溫度為25~30 °C，在22 °C以下生長緩慢，35 °C以上生長停止。子實體生長髮育的最適溫度為24~28 °C，低於22 °C生長停止，高於33 °C則易死亡；在生長發育期間，不需要溫差，溫差過大易長成畸形菇(丁，2004)。

### (2)pH 值

雲芝適合在偏酸性的培養基上生長，適宜的 pH 值為 5~6，pH 值低於 4 時菌絲生長細弱，不易形成菌蕾；pH 值高於 8 時菌絲易老化，甚至枯死(丁，2004)。pH 值控制，在生產帶電性聚合物是一項重要因子，缺乏 pH 值控制和不佳的培養基緩衝效果，會造成菌體停止生長與聚合物生成停止。根據 Litchfield (1967) 指出蕈類菌絲在液體培養下，蕈類菌絲生長的 pH 值範圍很廣，因菌種不同及培養基成分不同，會得到不同的最適 pH 值(楊，2006)。



### (3)攪拌與通氣

氧氣是代謝活性的因子，在三角瓶作液體培養中，常可用振盪方式增加培養基的溶氧量，而生物反應器經由通氣與攪拌，將氧氣及微生物所需要的基質分散均勻，並促進質量及熱量傳遞之效率。而雲芝是屬好氧性真菌；子實體生長髮育階段，則需要充足的氧氣，當二氧化碳濃度超過0.1%時，會生成大量的分枝，長成“鹿角狀”的畸形雲芝(丁，2004)。

### (4)光照

雲芝在生長發育過程中對光非常敏感，光照對菌絲生長有明顯的抑制作用，但對子實體發生的過程中，若無光照子實體則難以形成，即使形成發生了，速度也非常慢，且容易便為畸形雲芝，即菌蓋不開傘，並向光源方向扭曲。實驗證明菌絲在黑暗環境中生長良好；子實體生長要求一定的散射光照3000~10000 Lx的光照對子實體的正常生長有利(丁，2004)。

### (5)濕度

水分是細胞內含物重要組成部分，又是有機生命活動中營養物質的運輸工具及溶劑，各種物質只有在溶解的情況下才能被吸收。雲芝

不同生長時期對水分要求不同，菌絲生長階段要求培養機中的含水量為60~65%，空氣相對溼度65~70%；在子實體生長發育階段，空氣相對溼度85~90%，低於80%或高於95%均生長不良(丁，2004)。

## 2-4-2 化學因素

蕈類液體培養過程中，必須具有碳源、氮源、無機鹽類與生長因子等營養成分，才能維持菌體生長發育，不同蕈類有不同的營養需求。一般而言，微生物培養基大多參考文獻的結果，並加上研究者自身累積的經驗。

### (1) 碳源

凡是構成蕈類細胞和生產代謝產物所需的碳基來源之營養物質均稱為碳源。碳源對於微生物生長很重要，其主要作用為構成細胞物質和供給菌種所需的能源。但較高之碳源也會阻礙菌種生長，一般的細菌、酵母及黴菌類常用的碳源是葡萄糖、果糖、蔗糖、麥芽糖等。但針對不同碳源對雲芝菌絲進行液態培養時，發現到並非所有的文獻都有一致的結果，例如 1988 年張等人所做的研究，探討不同碳源對菌絲生長，結果顯示葡萄糖有較佳的菌體產率，其次是土豆粉，而乳糖、蔗糖、麥芽糖等並沒有顯著的影響。

### (2) 氮源

氮是構成蕈類蛋白質和核酸的主要元素，一般而言，氮源並不提供菌體所需能量，蕈類所需的氮源種類如下：

(a)無機氮源：例如銨鹽與其他含氮的無機鹽類如氯化銨、磷酸二銨、硝酸鈉等。

(b)含氮的有機氮源：例如豆餅粉、麩皮、氨基酸、尿素、玉米浸出液等。

### (3)碳氮比

針對蕈類液體培養而言，碳氮比(C:N)是十分重要的控制因子，除了會影響到菌絲生長的效率及產量之外，也會影響到菌體中蛋白質和脂質的含量。一般碳氮比以 5:1 到 25:1 之範圍為宜。高於此值時，菌絲體脂質含量會過多而蛋白質含量會明顯下降，影響其營養價值(楊，2006)。

### (4)無機鹽類

蕈類液體培養之培養基中所含的無機鹽類，會影響到菇類香味物質及菌絲體之氨基酸組成。如 $ZnCl_2$ 、 $CuSO_4$ 及 $NH_4^+$ 等可促進菌絲之生長速率，然而所使用的無機鹽類濃度需控制在足以供給菌絲所需，以防止苦味物質的生成。此外，通常培養基所添加的無機鹽類皆會含有磷、鎂、硫、鐵、鉀等元素，而無機鹽類對菌絲體的生長與代謝物生成之作用如下：

(a)構成細胞組成。

(b)構成酵素的組成成分，維持酵素作用。

(c)調節新陳代謝。

磷在生物體內是構成蛋白質、磷脂體、磷酸脂等成分不可缺少的元素，尤其是對於發酵及呼吸作用，做些磷酸脂類扮演重要的角色，成為能量代謝之核心。硫對於菌體構成成分或菌體生理作用扮演重要的關鍵(楊，2006)。

## (5)生長因子

有些微生物雖可在酵母萃取液、血清等天然培養基中生長，但不能在糖、氨基酸及無機鹽類等調製之合成培養基中生長，這是因為缺乏生長所必需之微量有機化合物，這些生長必須之物質，稱為生長因子 (growth factor)，在糖份分解的過程中，維生素為重要賦活劑 (Activator)。生長因子是維持蕈類生長所不可或缺的物質，一般常見的生長因子有葉酸、維他命B<sub>12</sub>、維他命B<sub>6</sub>、維他命K等。在雲芝培養中一般常見的生長因子為酵母萃出物。培養基中若降低酵母萃出物用量，將使菌體生長較慢、糖類消耗變慢、多醣生成較少，所以可知酵母萃出物扮演重要的角色。此外玉米浸出物(corn steep liquor)因其富含維生素和其他微量營養素緣故，添加在培養基中能促進菇類菌絲體

的生長速率(楊，2006)。

#### (6)油類與脂肪酸的添加

蕈類進行液態培養時，在培養基中加入一些非離子型界面活性劑(nonionic surfactants)、油類與脂肪酸等物質將會刺激菌絲的生長速率。由文獻得知，利用 *Acremonium persicinum* 來產生多醣時，在發酵過程中加入某些消泡劑或者在培養基裡添加蔬菜油或脂肪酸等，除了可達到消泡的目的外，還能夠對多醣體產量造成影響。可能油脂在菌體表面形成油膜，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(楊，2006)。

## 2-5 菌絲形態之簡介

一般而言，絲狀微生物於發酵液中之形態變化會有兩種主形態：菌絲球(pellet)與菌絲狀(mycelium)，其外觀形態變化(morphology)取決於其培養環境。但是，環境影響因素很多，除了物理因素與化學因素之外，還包括反應器的選擇與設計，譬如：當培養於氣泡式反應器時，菌體大多以 pellet 之形態出現。但是採用攪拌式反應時，給予較大的剪切力。將使得菌體大多以菌絲(mycelium)型態出現。絲狀微生物之外觀形態會影響到發酵液的黏度、質傳效果，也間接影響到產物的生成(徐等，2002)。

## 2-5-1 菌絲球的形成與構造

菇類的液態培養最大的特色在於發酵過程中並無孢子萌發期(sporulation)，所生產之菌絲體是以菌絲球(pellets)形式存在，因為菌絲體的生長是輻射狀的向四周擴散，所以菌體呈現球形懸浮在培養液體中。這也使得培養液中營養源及氧氣之傳送程度，較一般低等真菌或酵母菌的液態培養來得更為複雜化。

蕈類液態在 1948 年首度由 Humfeld 提出，之後陸續有不同的研究者投入此領域，這些蕈類液態培養主要的研究方向在於提供一潛在之食物供給。除此之外蕈類所含有的香氣成分，呈味核苷酸與藥用生理活性物質亦是開發重點。蕈類液態培養與低等真菌、酵母和細菌的液態培養技術相仿，其主要特徵在於發酵液中會形成顆粒較大的菌絲球(Pellet)。

液體培養的過程中，因不同的培養條件，使得所形成的菌絲球在大小外貌與形狀皆不相同，菌絲球的生長與否和菌絲球的大小及外觀，皆會影響到產量。在液態培養下影響菌絲球凝結因素可分為：

- (1)微生物因素：
  - (a)遺傳的。
  - (b)細胞壁組成。
  - (c)菌種大小。
  - (d)生長速度。



(e)營養供給。

(f)碳/氮比。

(2)物理與化學因素：(a)剪力。

(b)表面活性劑。

(c)pH 值：溫度。

(d)Ca<sup>2+</sup>。

(e)離子強度。

(f)懸浮粒子。

Burk holder 和 Sinnot(1945)曾對五十多種會形成菌絲球的菌種進行研究指出：菌絲球的結構變化大，由鬆散不規則到緊密球型都有，分下列三種：

(1)鬆散不緊密的菌絲球(fluffy loose pellets)：這種菌絲球有緊密的中心及一個鬆散外圍區域，外觀看起來如羽毛狀無緊密感。

(2)緊密平滑的菌絲狀(compact smooth pellets)：整個菌絲球唯一緊密狀態，而且外為區域為平滑，由肉眼觀察知一平滑小球，大小不一。

(3)凹陷平滑的菌絲球(hollow smooth pellets)：菌絲球中心由於自我分解而產生凹陷，而外觀仍屬平滑狀態。因球狀菌絲體本身的結構特殊，在養分吸收及產物代謝上也不同於一般菌體，圖 2-5 為球狀菌絲體之剖面圖，並依菌絲體由外向內的養分吸收度與產物累積濃度

作圖，產物之濃度由中心點向外圍遞減，如果部分菌體因養分不足而死亡，則產物之濃度改以 b 之路線，於中心部分再增加。

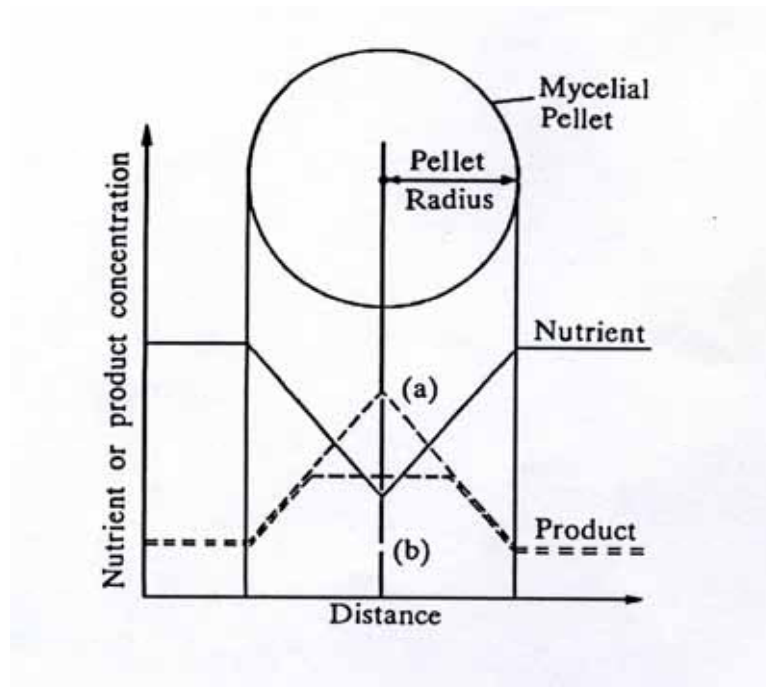


圖 2-5 球狀菌絲體之剖視圖(Burk holder and Sinnot,1945)

## 2-5-2 菌絲狀之生物特性

絲狀真菌中的黴菌屬於多細胞微生物，形態上的多樣性遠複雜於單細胞的細菌或酵母菌；從其生活史來看，呈現一個始於孢子並終於孢子的生命過程。常見的絲狀真菌菌體具有絲狀菌絲形態，當我們進行大規模的液態培養時，絲狀真菌的形態通常造成工程上的困擾。

然而在商業產上的考量下，液態培養為首選的培養系統。真菌於液態培養中，形態的差異除了個別菌種的基因特性外，發酵程序中的物理（溫度、pH、機械力）或化學因子（培養基組成）亦扮演重要角色。

事實上，絲狀真菌的形態可依微觀或巨觀而有不同的標的：以微觀看來，菌絲長度與分支程度是主要的觀察重點，而菌絲球的粒徑分佈與結構則屬於巨觀的範疇。不管微觀或者是巨觀的真菌形態都會影響發酵液的流變性質，進而造成不同的氣液質傳與混合攪拌差異。整體說來分散狀的菌絲體會使發酵液整體黏度與擬塑性提高，使得發酵液的混合變困難而形成非均一相，菌絲球則否。

### 2-5-3 菌絲狀形態之影響因子

當真菌形態呈菌絲狀時，在低菌體濃度下，即會表現非牛頓流體性質；而當真菌形成球狀菌體懸浮液時，一般來說是屬於低黏性的，而且只在高菌絲球濃度下，才會表現出非牛頓流體性質。

菌絲球的形成過程目前仍不是完全清楚，一般被接受有兩個形成機制：凝聚(Coagulating type)及非凝聚(Noncoagulating type)菌絲球形成(楊，2006)。

菌絲球的形成和菌種特性有相當程度的關係，菌絲球的形態是多樣性且跟培養條件有很大的關係。因此，對於進行菌絲球培養的實驗必須對菌絲球的形態詳加描述。

#### 1. 攪拌速率與剪切力：

攪拌速率的影響也就是攪拌葉片所產生的剪應力影響，其中有三種作用機制被提出來：(1)菌體與渦流之間的作用力；(2)菌體與攪拌葉片或擋板間的作用力；(3)菌體與菌體間的作用力。其中以渦流的影響最大，會影響細胞壁的組成和結構。對於高黏度的發酵環境，適當提高攪拌速率，不但能提高發酵液的溶氧量，有助於菌體生長以及多醣的生成，但過高的攪拌速率不但會抑制菌體生長及多醣生成，而且高轉速的攪拌速率所造成的剪切力，易造成細胞破裂，此時微生物

會消耗環境中的碳源轉換成能量以維持細胞生存，也因此減低葡萄糖等碳源合成多醣的數量(Peters *et al.*, 1989)。針對不同的菌種所產生的菌體與產物，必須選擇適當的攪拌轉速，以達到最高的生產效率。在發酵反應器中，由於菌絲的產生和高黏度多醣的生成，使反應器產生了shear-thinning，而這類的現象通常發生在高轉速擋板附近和緩慢轉動中的反應槽壁附近，此現象為發酵液的流變行為，或稱流變學(rheology)。對於一發酵設備而言，如何維持發酵液中良好的混合、質傳和熱傳效果，一直是相當重要的課題，而發酵液中的流變行為正是此基礎關鍵，因此，研究發酵液的流變行為將有助我們為日後放大規模的準備(楊，2006)。

真菌大部分會生成高黏度的胞外多醣，一但高黏度在發酵液中形成時，使得氧氣及培養基營養源無法進入到菌體中，繼續提供其生成條件，促使胞外多醣產量減少，而解決此現象方法為改變攪拌速率，在改變攪拌速率的同時，使得系統剪切力增加，讓菌體表面胞外多醣移入培養基中，表面薄膜減少，使菌體能和培養基等有良好的接觸，進而使得多醣產量增加。而另一現象為在一胞外多醣濃度還未影響菌體生長和胞外多醣生成時，增加攪拌速率，菌體因系統剪切力過大，而產生剪切力斷裂(shear damage)現象發生，使菌體必須修補斷裂部份，造成菌體和多醣量的減少，當剪切力到達一臨界點時，增加攪拌

速率反而對菌體和胞外多醣的生成有著負面的影響，此現象可能由於 shear damage 產生，以及攪拌速率的增加造成溶氧值的增加，無法達到限制溶氧量來刺激胞外多醣的生成(許，2002)。

## 2. 溶氧值(DO值)：

當好氧菌進行發酵培養時，氧氣為菌體代謝反應中的限制因子，且為終端電子接受者，用以產生能量提供細胞活性的作用。而培養基中的氧氣濃度可能改變菌體的代謝途徑是眾所皆知的，但對菌體形態似乎影響不大；反倒是對於發酵液的流變性質有顯著的影響：在較高的溶氧條件下，氧氣濃度會影響菌絲的張力和可塑性(許，2002)。

氧氣濃度對於菌體形態影響的研究，當溶氧使用 Oxygen rich 提高(約20-50 ppm)菌體形態由絲狀轉變成菌絲球狀，並且產物濃度快速下降。相對的以加壓方式控制溶氧至相同條件，菌體形態並無改變(楊，2006)。

## 3. 二氧化碳濃度：

二氧化碳是好氧性菌體行呼吸作用的代謝產物，Smith and Ho (1985)研究顯示，二氧化碳濃度會影響菌絲體的形態，在批次發酵槽中pH值控制在6.5，較低的二氧化碳濃度(3~5 %飽和濃度)會提升*P*.

*chrysogenum*的菌絲分支程度，進一步提高二氧化碳濃度至15~20 %飽和濃度，菌絲呈現膨脹、生長緩慢及高度分支，並有菌絲球生成，經由自動射線照相技術觀察發現，發酵液中的二氧化碳會刺激菌絲頂端及頂端下方細胞壁中的幾丁質合成，因而增進菌體分叉及產生可塑性的真菌細胞壁，故在高二氧化碳的環境下，常出現不規則的菌體形態。較為可惜的是，這些研究強調形態上的變化，而忽略了二氧化碳對菌量的高低與其多醣生成的影響。在*P. chrysogenum*液態培養中通入20 %的二氧化碳飽和濃度，將有助於發酵液黏度降低，進而增進氧氣的質傳效率，但高二氧化碳濃度會抑制Penicillin生產，這是由於二氧化碳改變了菌體形態，因而轉變了產物的代謝途徑(Ju *et al.*, 1991)。

#### 4. pH 值：

在發酵操作環境中，培養基的pH值對微生物的生長形態以及產物多醣的生成有著重要的影響，而且pH值的變化也會對副產物酸類物質、營養源的消耗、氧化還原反應與培養液的緩衝效果造成很大的影響。Kobayashi和Suzuki (1972)指出，*M. verrucaria*在pH=5的培養基中以菌絲球形態出現，在pH=8以絲狀菌絲形態出現。Du等人(1998)培養*R. oryzae*當添加CaCO<sub>3</sub>，使培養基pH=5.5形成菌絲球，而缺乏CaCO<sub>3</sub>培養基pH=2.0時則生成絲狀菌絲。相反的，Carlsen等人(1997)

進行*A. oryzae*培養生產 $\alpha$ -amylase發現，當培養基pH值高於5時，孢子凝聚現象發生，因而導致菌絲球形態發生，而當pH值在3.5以下孢子的分散性良好，所產生的是絲狀的菌絲。

## 5. 生長速率：

科學家發現*Penicillium chrysogenum*之懸浮菌絲體中含球狀菌絲體的比例會隨生長速率增加而增加，可能原因為較高的生長速率會促使更短更多分之的菌絲產生，使得菌絲體間相互作用較少，而容易產生球狀菌體(Metz and Kossen,1977)。

此外，連續式培養是用來作此類試驗的最佳選擇(因為當系統達成穩態時，稀釋速率等於此生長速率)，但在長時間的培養試驗時須考量突變菌種效應，很可能菌體形態的改變是由突變菌種自身所引起的。特別是當這些突變的子代有較佳的競爭能力，最後整個取代原始菌種。

## 6. 種菌製備：

接種時種菌的形態大小、接種量以及當時的物理狀態都會嚴重地影響菌體在發酵槽內的生長形態，且較低的接種量適合球狀菌體的生成，較高接種量則較適合菌絲的生成，其原因在於高接種量下，初期



菌絲體即因濃度較高而相互作用使得菌體無法呈現球狀形態，但是在 *Aspergillus* and *Aspergillus nidulans* 中任何孢子接種濃度菌體皆會形成球狀(Metz and Kossen, 1977)。另外，接種量的多寡也影響到發酵時間、發酵所生成的多醣產量以及菌重等。

## 7. 氮源與磷源：

氮源與磷源的選擇與濃度不僅影響菌體和代謝產物，亦會改變菌體形態。Park等人(1999)以一系列不同氮源種類和濃度培養 *M. alpina*，發現氮源是影響菌體形態的重要因素。以黃豆粉、棉籽粉及魚粉當氮源菌體成絲狀。酵母萃出物、玉米浸出液和穀蛋白粉菌體則以菌絲球形態表現，此現象可能與培養基整體的碳氮比有關。

利用不同種類氮源的添加或氮源之限制可造成不同形態的菌絲形態，例如在 *Mortierella alpina* 添加不同氮源來控制所需菌體形態提高 arachidonic acid 的產量(Park *et al.*, 1999)，而高濃度氮源下球狀菌體會呈現結實且平滑之球體(compact smooth pellet)，若在低濃度氮源下球狀菌體會呈現鬆散的球體結構(loose and fluffy pellet)(徐等，2002)。

## 8. 固形物與界面活性劑添加：

通常在真菌的發酵培養尤其在試驗工廠及量產工廠，因為經濟的

考量，培養基中常會含有一些固體或半固體的碳源或氮源。這些顆粒有利於菌絲的凝聚纏繞，形成的菌絲球有別於利用合成培養基所生成形態規則的菌絲球。

### **9.自我分解：**

在較大的菌體中會有中空的現象產生，表示菌體中有自我分解現象的發生。

#### 2-5-4 絲狀真菌培養之生物反應器設計

發酵液的流變行為最主要的影響在於培養過程中質傳及熱傳的效率，因此理想的發酵槽設計將有助發酵產物的生成。一般的微生物發酵槽，絕大部分是裝置 Rushton turbine (RT) 的攪拌式反應器。雖然進行真菌發酵的多數人都同意攪拌式的反應器有一些嚴重的問題，也想嘗試運用新式反應器，但是考慮到製程技術的成熟度、發酵槽的泛用性，攪拌式反應器仍然是工業界常用的發酵槽。儘管如此，適當的攪拌系統設備選擇更新，則為常見的做法，其中以攪拌葉片的改良最受重視，而幾種不同形態的攪拌葉片設計研究，在黏性的絲狀菌體發酵液中表現出較佳的混合效果(楊，2006)。

研究顯示：在高速攪拌所產生的剪應力，將導致某些代謝產物濃度下降，這可能與菌體在高剪應力環境下遭損傷有關。另外，高轉速所產生的高溶氧效果也可能抑制某些代謝產物的生成。有關真菌和攪拌葉片形態的研究不多，反倒是多醣生產菌的混合問題有較多的資訊。

除了改變攪拌葉片的種類，另外，氣舉式反應器(Air-Lift Reactor)也是一個研究重點。基本的構造是在反應器中加裝一套管，而套管底部通氣造成套管內外液體密度不同產生壓力差，進而產生流動現象。

氣舉式反應器雖然有低能量消耗(約只有攪拌式發酵槽的 50

%)、無轉軸設備以減低污染發生的機率以及較低的剪應力。但是，目前主要的問題是：當發酵液黏度增加時，會使得氧氣的質傳效率降低，進而影響菌體的生長和產物的代謝。在此情況下，誘發菌絲球的形成可能是一解決辦法，另一種適用於絲狀菌絲體培養的發酵槽為往復噴流反應器(reciprocating jet bioreactor)，這種反應器的構造由一系列具有孔洞的平板往復振動，迫使發酵液來回於平板間以達質傳效果。Lounes 等人(1995)指出應用此反應器以 *A. pullulans* 生產胞外多糖，效果較攪拌式發酵槽更佳(楊，2006)。

不管使用何種發酵槽，於真菌發酵系統而言，其流變性質最主要取決於菌體的濃度和形態以及代謝產物。對於菌體濃度的控制是比較容易達成的，但這意味著勢必降低代謝產品的產率。至於稀釋策略，通常是短暫而無法持久的，可能的解釋為黏度降低增加氧氣的質傳速率進而刺激菌體和代謝產物的生成，促使整個系統再次往黏度方向發展，但這只是表面的理由，整個反應的機制仍需進一步的研究確認。至於菌體形態方面，趨向菌絲球形態發展有降低發酵液黏度的優點，但仍需注意形態改變導致代謝途徑改變所造成的影響。

簡而言之，由於絲狀真菌特殊的菌體生長形態，增加了深層培養技術上的困難度。欲求更廣泛的開發利用絲狀真菌生物資源，必須對

菌體形態生成機制有深入的了解，並結合環境因子與培養條件的調整，以及發酵槽的設計與操作，讓培養過程中菌體的生長、菌絲體的形態形成與代謝產物的生成之間的關連，能夠完整而有效的掌握。

## 第三章 實驗材料與分析方法

### 3-1 菌株

本實驗所採用之菌株為雲芝(*Coriolus versicolor*)係購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC)，編號為 BCRC35253、BCRC37503。菌種以生物資料保存及研究中心所提供的 PDA 作為斜面培養基，於 25 °C 下活化生長，並置於 4 °C 冰箱中保存備用。

### 3-2 實驗藥品

本實驗所使用的藥品如表 3-1 所示：

表 3-1 實驗藥品

藥品名稱	廠牌	出廠公司或地點
Glucose (試藥一級)	ROQUETTE	日本林純藥工業株式會社
Bacto Agar	DIFCO	USA
Yeast Extract	DIFCO	USA
Peptone	DIFCO	USA
PDA	DIFCO	USA
Phenol (EP 級)	聯工	台灣
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	聯工	台灣
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	聯工	台灣
NaOH <sub>(s)</sub>	聯工	台灣
NaCl	聯工	台灣
HCl <sub>(aq)</sub> ( 1N)	景明	台灣
95%酒精	景明	台灣
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	SHOWA	日本
polyacrylic acid solution(8000~12000cp)	SHOWA	日本

表 3-1 實驗藥品(續)

藥品名稱	廠牌	出廠公司或地點
Carboxymethyl cellulose sodium salt	SHOWA	日本
Sodium dihydrogenphosphate dihydrate	SHOWA	日本
藥用酒精	台灣公賣局	台灣
pH 4、7 Buffer	台灣哈納	台灣
Glucose Buffer	YSI	USA
Green tea	天仁茗茶	台灣



### 3-3 實驗儀器與設備

本實驗所使用的儀器與設備如表 3-2 所示：

表 3-2 實驗儀器與設備

儀器設備	廠牌	型號及出廠國家
超音波震盪機	BRANSON	5210；USA
pH 電極	CyberScan Bench	pH500；新加坡
電磁攪拌器	CORNING	Stirrer/Heater；USA
吸排兩用真空壓縮機	GAST	DOA-P704-AA；USA
微量取樣器	GILSON	5、1、0.1mL；法國
殺菌釜	HUXLEY	HL-340；台灣
微量小型高速離心機	LABNET	Spectrafuge 16M；USA
桌上型高速離心機	HITACHI	UNIVERSAL 32R；日本
高速離心機	HITACHI	O5P-21；日本
UV 可視紫外光譜儀	HITACHI	U-2001；日本
連續式均質機	IKA	ULTRA-TURRAX；德國
均質機	KINEMATICA	POLYTRON；瑞士
無塵無菌操作台	LIAN SHEN ENTERPRISE	TW-14U；台灣
低溫冷凍循環水槽	LIGHT	EBCA-20PT；台灣

表 3-2 實驗儀器與設備(續)

儀器設備	廠牌	型號及出廠國家
顯微鏡	Nikon	LABOPHOT-2；日本
數位相機	Nikon	995；日本
烘箱	RISEN	DV-452；台灣
微電腦蒸餾水製造機	SANYO	WSCO44.MH3.4；日本
自動計時器	SANYO	BTR-802；日本
分析天平	Sartorius	BP 190S；德國
超純水製造機	MILLIPORE	USA
Sterilizing Grade Filter	MILLIPORE	0.2 Micron；USA
空氣壓縮機	SWAN	DR-115；台灣
振管振盪器	Thermolyne	37600 Mixer；USA
恆溫震盪培養箱	TKS	OSI-500；台灣
低溫冷藏櫃	TKS	Kcc-3；台灣
葡萄糖分析儀	YSI	USA
電子式定時器	華志	TU-A/59；台灣
5L 發酵槽	頂生(BioTop)	BTF-A-5L；台灣
RVDV-III 流變儀	BROOKFIELD	USA
SPINDLE(CP-40)	BROOKFIELD	USA

## 3-4 分析方法

### 3-4-1 pH 值測定

使用 CyberScan Bench pH meter 測定發酵液的 pH 值。

### 3-4-2 菌體濃度測定

取適量發酵液，以抽氣過濾裝置利用 6 號濾紙(70 mm)將菌體自培養液分離，水洗數次。置於 70 °C 烘箱烘乾至恆重。

### 3-4-3 葡萄糖濃度測定

取適量發酵液，以 0.1M pH=7 之  $K_2HPO_4$  buffer，經適當稀釋，利用 YSI 2300 stat glucose analyzer 量測。

### 3-4-4 黏度測定

黏度量測係使用玻璃毛細管黏度計(Glass capillary viscometer)，其原理是：在已知的溫度下，利用液體本身的重力流動性(gravity-flow)，測定一定體積的液體，通過校正後的毛細管玻璃黏度計所需的時間，並根據流經時間與黏度計校正常數之乘積，即可得動力黏度值。實際操作如下：將黏度計置於 25 °C 水浴中，加入 15 mL 去除菌體的發酵濾液，以吸槍將發酵液吸起使其超越起始線，移走吸槍任發酵液自己下降待液面通過起始線開始計時，並於液面通過終點線時結束量測。所得時間與相同條件純水所測得時間依比例換算成黏度。

另一種測定黏度的方法是使用 RVDV-III 流變儀，將溫度控制於 25 °C 下，先用標準液(4.6 cp)校正其轉速，校正後再加入 2 mL 的培養基，而測得黏度。使用的 SPINDLE 為 CP-40，CP-40 的 ANGLE (deg)=0.8，RADIUS (cm)=2.4，圖 3-1 所示為測定的黏度範圍與轉速。

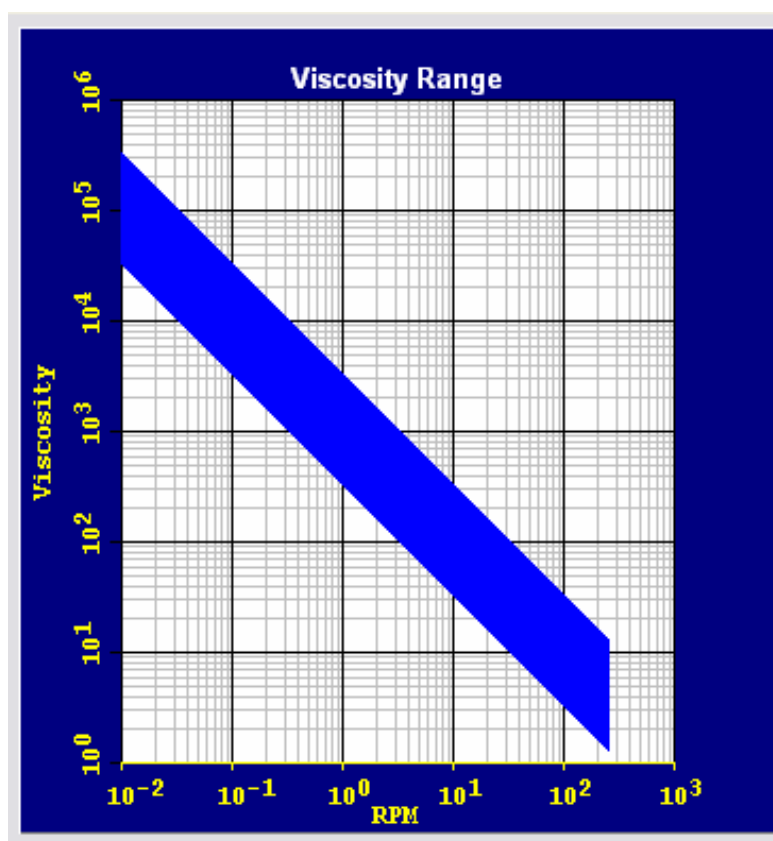


圖 3-1 CP-40 的黏度範圍

### 3-4-5 多醣濃度測定

方法一：

取適量過濾菌體後的發酵濾液(20-40 mL)，加入 4 倍體積，95 % 酒精，適當的均勻攪拌後產生棉絮狀的多醣凝聚物。以濾紙過濾後置於  $70^{\circ}\text{C}$  烘箱烘乾至恆重，秤取多醣重量除以濾液體積即得多醣濃度。

方法二：

取 2 mL 發酵液加入 8 mL 95 % 乙醇，於 4 °C 下靜置 18 小時以上使多醣沉澱，經離心之後(4000 rpm，20 min)，將乙醇液倒掉，再加入 8 mL 的 75 % 乙醇，再次離心(4000 rpm，20 min)，將乙醇液倒掉，取出沉澱物置於 70 °C 烘箱中烘乾。

將烘乾後的多醣加入 10 mL 純水，置於 90 °C 熱水中使多醣溶解，取 2 mL 上清液經適當比例稀釋後，加入 1 mL 5 % Phenol 與 5 mL 濃硫酸後靜置 10 分鐘後放入 25 °C 水浴中靜置 15 分鐘，使用分光光度計，在 495 nm 測量其吸光值，並與已知 Glucose 濃度的檢量線比較(見附錄圖 A)，計算所含多醣含量。

### 3-4-6 菌絲球數量測定

取適當含有菌絲體的培養液(20 或 50 mL)，以計數器數菌絲球數量，並根據計數器上的數量再乘上倍數，即可得到菌絲球的數目。

### 3-4-7 粒徑大小測定

在含有菌絲體的培養液中，取出較大和較小的菌絲球，置於載玻片上，藉由長度為 5 cm 的鐵尺來測量菌絲球之大小。

## 第四章 實驗方法

### 4-1 平面培養

#### 4-1-1 試管斜面培養

- (1)配製 39 g/L PDA 作為斜面培養基，以磁石攪拌並加熱使其完全溶解。
- (2)以每支試管 8 mL 的量，趁熱將培養基裝入試管中。
- (3)使用矽膠塞將試管瓶口塞緊，再以錫箔紙包裹矽膠塞，放入滅菌釜中，滅菌 20 分鐘(操作壓力 1.2 Kg/cm<sup>2</sup>，溫度為 120 °C)。
- (4)滅菌後，將試管傾斜置於無菌無塵操作台中，使其冷卻凝固後備用。
- (5)將白金鉤以 75 %酒精噴灑滅菌並置入無菌無塵操作台中，打開無菌無塵操作台送風裝置，再以紫外光滅菌 20 分鐘。
- (6)關閉紫外光。
- (7)準備已有雲芝菌絲的斜面培養試管與空白斜面各一支，將試管頸部過火焰滅菌。
- (8)將白金鉤過火焰燒至通紅三次後，刮取雲芝菌絲移植至空白試管的斜面上，再以矽膠塞將試管瓶口塞緊，置於 25 °C 恆溫箱中靜置活化培養。

#### 4-1-2 培養皿平面培養

- (1)配製 39 g/L PDA 作為固態培養基，以磁石攪拌並加熱使其完全溶解。
- (2)用矽膠塞將試管瓶口塞緊，再以錫箔紙包裹矽膠塞，放入滅菌釜中，滅菌 20 分鐘(操作壓力 1.2 Kg/cm<sup>2</sup>，溫度為 120 °C)。
- (3)取數個空白培養皿置入無菌無塵操作台中，再以紫外光滅菌 20 分鐘以上。
- (4)關閉紫外光。
- (5)培養基滅菌後，將錐形瓶置入無菌無塵操作台中，趁熱以每個 45 mL 的量倒入培養皿中。待培養基冷卻凝固後備用。
- (6)將白金鈎以 75 %酒精噴灑滅菌並置入無菌無塵操作台中，打開無菌無塵操作台送風裝置，再以紫外光滅菌 20 分鐘。
- (7)關閉紫外光。
- (8)準備已有雲芝菌絲的斜面培養試管與空白培養皿各一個，將試管頸部過火焰滅菌。
- (9)將白金鈎過火焰燒至通紅三次後，刮取雲芝菌絲移植至空白培養皿的表面上，再用止水膠帶將蓋子封口封住，置於 25 °C 恆溫箱中靜置活化培養。



## 4-2 液態種菌培養

本實驗研究所採用之液態基礎培養基成分如下：

Glucose	50 g/L
Yeast extract	20 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1 g/L

並利用 0.1 N HCl 將液體基礎培養基之 pH 調成 6，假設液體基礎培養基之 pH 值低於 6，則再以 0.1 N NaOH 調整至 pH 為 6，而溫度在 25 °C。

### 4-2-1 種菌製備

將活化後的雲芝菌絲體接入 PDA 培養皿中心，置於 25 °C 培養箱中培養 7 天，以菌體切割器在長有菌絲體的培養皿上切取 4 個單位的菌絲塊(每單位 5 mm × 5 mm)，再以白金鉤將菌絲塊接入液態基礎培養基中。將液態培養基置於 100 rpm、25 °C 恆溫培養箱中進行培養。將培養 7 天的液態種菌，利用滅過菌的均質機打碎，以作為 250 mL 三角錐形瓶培養試驗及發酵槽試驗之種菌。

### 4-3 菌絲切割器製作

- (1)將鋁罐切開，裁取一片  $2\text{ cm} \times 7\text{ cm}$  的鋁片。
- (2)在  $2\text{ cm}$  的一邊分成 4 等分，每份長為  $0.5\text{ cm}$ ，並折為一長柱體，則中空部分的面積為  $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ ，並定義為一單位的接菌量(見附錄圖 B)。

#### 4-4 菌種篩選

為了縮短實驗的時間及花費的成本，於是將由食品工業發展研究所生物資源保存中心購得之雲芝菌種編號為 BCRC35253 以及 BCRC37503 進行初步的比較，並試圖找出一個生長速度較快的菌株。

##### 實驗一：平面培養皿篩選

實驗目的：利用培養皿平面培養，尋找出菌絲生長較快的菌株。

實驗方法：

- (1)利用一個 0.5 cm × 0.5 cm 的切割器，切一單位活化後的雲芝菌種塊移植於平面培養皿的邊緣。
- (2)將平面培養皿倒放置於溫度 25 °C 下的恆溫培養箱中培養。
- (3)每 24 hrs 紀錄培養皿上的菌絲體的生長長度(半徑，單位 cm)。

## 實驗二：液態培養篩選

實驗目的：利用液態培養的方式，尋找出菌絲生長較快的菌株。

實驗方法：

(1)利用一個 0.5 cm × 0.5 cm 的切割器，切四單位活化後的雲芝菌

種塊移植於基礎培養基中。

(2)置於溫度 25 °C、轉速 100 rpm 迴轉式恆溫培養箱中培養七天。

(3)測量菌絲濃度。

## 4-5 利用不同培養基組成取代原基礎液態培養基試驗

實驗三：不同接菌量對雲芝菌絲體生長之影響

實驗目的：由不同的接菌量，進而找出菌絲體生長之最佳化。

實驗方法：

(1)將液態菌種以均質機打碎，再以 1%、3%、5% 比例的接菌量

接入基礎培養基中。

(2)置於溫度 25 °C、轉速 100 rpm 迴轉式恆溫培養箱中培養七天。

(3)測量菌絲濃度、葡萄糖含量，並紀錄之。

#### 實驗四：不同培養基成分對雲芝菌絲體生長之影響

實驗目的：藉由培養基的篩選，尋找出菌絲生長較快的培養基。

實驗方法：

(1)取 250 mL 錐形瓶，分別置入 100 mL 以下之不同液態培養基：

(a)Glucose 3.0 % + Peptone 0.5 % + NaCl 0.1 % + V<sub>B1</sub> 0.1 %

(b)Glucose 3.0 % + Peptone 0.5 % + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 % +

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05 % + CaCO<sub>3</sub> 0.5 %

(c)Glucose 5.0 % + Yeast extract 0.3 % + Peptone 0.2 % +

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 % + MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 %

(d)Glucose 10.0 % + Yeast extract 1.5 % + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 % +

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 %

(e)Glucose 5.0 % + Yeast extract 1.5 % + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 % +

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 %

待滅菌 20 分鐘後冷卻備用。

(2)將液態菌種以均質機打碎，再以 3 % 比例的接菌量接入基礎培養基中。

(3)置於溫度 25 °C、轉速 100 rpm 迴轉式恆溫培養箱中培養七天。

(4)測量菌絲濃度、pH 值、多醣濃度與葡萄糖含量，並紀錄之。

實驗五：培養基成分—不同濃度的碳源對雲芝菌絲體生長及多醣生成  
之影響

實驗目的：探討不同濃度的碳源對菌絲體產量及多醣生成的影響。

實驗方法：

(1)取 250 mL 錐形瓶，分別置入 100 mL 之液態培養基為 Yeast  
extract 1.5 % +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % +  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %。

(2)再以不同濃度的 Glucose 分別加入上式的培養基，濃度如  
下：

1.0 %、2.0 %、3.0 %、4.0 %、5.0 %、6.0 %

待滅菌 20 分鐘後冷卻備用。

(3)將液態菌種以均質機打碎，再以 3 % 比例的接菌量接入。

(4)置於溫度 25 °C、轉速 100 rpm 迴轉式恆溫培養箱中培養七天。

(5)測量菌絲濃度、pH 值、多醣濃度與葡萄糖含量，並紀錄之。

實驗六：培養基成分—不同濃度的氮源對雲芝菌絲體生長及多醣生成  
之影響

實驗目的：探討不同濃度的氮源對菌絲體產量及多醣生成的影響。

實驗方法：

(1)取 250 mL 錐形瓶，分別置入 100 mL 之液態培養基為

Glucose 5.0 % +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % +  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %。

(2)再以不同濃度的 Yeast extract 分別加入上式的培養基，濃度如

下所示：

0.5 %、1.0 %、1.5 %、2.0 %

待滅菌 20 分鐘後冷卻備用。

(3)將液態菌種以均質機打碎，再以 3 % 比例的接菌量接入。

(4)置於溫度 25 °C、轉速 100 rpm 迴轉式恆溫培養箱中培養七天。

(5)測量菌絲濃度、pH 值、多醣濃度與葡萄糖含量，並紀錄之。



實驗七：培養基成分—不同 pH 值對雲芝菌絲體生長及多醣生成之影響

實驗目的：探討不同的 pH 值對菌絲體產量及多醣生成的影響。

實驗方法：

- (1)取 250 mL 錐形瓶，分別置入 100 mL 液態培養基 Glucose 5.0 %  
+ Yeast extract 2.0 % +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % +  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %
- (2)以 0.1N HCl 或 0.1N NaOH 調整初始 pH 值，分別為 3.5、4.0、  
4.5、5.0、5.5、6.0。
- (3)待滅菌 20 分鐘後冷卻備用。
- (4)將液態菌種以均質機打碎，再以 3 % 比例的接菌量接入。
- (5)置於溫度 25°C、轉速 100 rpm 迴轉式恆溫培養箱中培養七天。
- (6)測量菌絲濃度、pH 值、多醣濃度與葡萄糖含量，並紀錄之。

## 實驗八：時間變化對雲芝菌絲體生長及多醣體生成之影響

實驗目的：探討時間變化對菌絲體產量及多醣體生成的影響。

實驗方法：

(1)取 250 mL 錐形瓶，分別置入 100 mL 液態培養基 Glucose 5.0%  
+ Yeast extract 2.0 % +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % +  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(2)以 0.1N HCl 或 0.1N NaOH 調整初始 pH=6.0。

(3)待滅菌 20 分鐘後冷卻備用。

(4)將液態菌種以均質機打碎，再以 3 % 比例的接菌量接入。

(5)置於溫度 25 °C、轉速 100 rpm 迴轉式恆溫培養箱中培養。

(6)每天觀察測量菌絲濃度、pH 值、多醣濃度與葡萄糖含量，並紀錄之。

實驗九：藉由震盪機的不同轉速下對雲芝菌絲體生長之影響

實驗目的：探討震盪機在不同轉速下對菌絲體產量的影響。

實驗方法：

(1)取 250 mL 錐形瓶，分別置入 100 mL 液態培養基 Glucose 5.0 %

+ Yeast extract 2.0 % +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % +  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(2)以 0.1N HCl 或 0.1N NaOH 調整初始 pH=6.0。

(3)待滅菌 20 分鐘後冷卻備用。

(4)將液態菌種以均質機打碎，再以 3 % 比例的接菌量接入。

(5)置於溫度 25 °C。

(6)分別在轉速 100 rpm、150 rpm 迴轉式恆溫培養箱中培養七天。

(7)測量菌絲濃度、pH 值、多醣濃度與葡萄糖含量，並紀錄之。

實驗十：均質機在不同的均質時間下對雲芝菌絲體生長及形態之影響

實驗目的：探討均質機在不同的均質時間下對菌絲體產量及形態的影響。

實驗方法：

- (1)取 250 mL 錐形瓶，分別置入 100 mL 液態培養基 Glucose 5.0 %  
+ Yeast extract 2.0 % +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % +  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %
- (2)以 0.1N HCl 或 0.1N NaOH 調整初始 pH=6.0。
- (3)待滅菌 20 分鐘後冷卻備用。
- (4)將液態菌種以均質機打碎，分別打碎時間為 1 min、3 min、5 min，再以 3 % 比例的接菌量接入。
- (5)置於溫度 25 °C、轉速 100 rpm 迴轉式恆溫培養箱中培養。
- (6)在培養第七天時測量其菌絲濃度、pH 值、多醣濃度與葡萄糖含量，並紀錄之。

## 4-6 探討添加物對雲芝菌絲體生長、多醣體生成及形態之影響

實驗十一：綠茶的添加對雲芝菌絲體生長及多醣體生成之影響

實驗目的：探討不同綠茶添加量對菌絲體產量及多醣體生成的影響。

實驗方法：

- (1)先將水沸騰後再置入綠茶葉，而綠茶與水之比例為 1：30。
- (2)於冷卻後，再以真空過濾把綠茶葉與綠茶液分離，然而取液使用。
- (3)取 250 mL 錐形瓶，分別置入 100 mL 液態培養基 Glucose 5.0 % + Yeast extract 2.0 % +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % +  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %
- (4)以 0.1N HCl 或 0.1N NaOH 調整初始 pH=6.0。
- (5)並分別添加不同量之綠茶為：0 mL、1 mL、3 mL、5 mL。
- (6)待滅菌 20 分鐘後冷卻備用。
- (7)將液態菌種以均質機打碎，再以 3 % 比例的接菌量接入。
- (8)置於溫度 25 °C、轉速 100 rpm 迴轉式恆溫培養箱中。
- (9)測量菌絲濃度、pH 值、多醣濃度與葡萄糖含量，並紀錄之。

## 實驗十二：不同添加物對雲芝菌絲體生長及形態之影響

實驗目的：探討不同添加物對菌絲體形態的影響，並求增加菌絲之產量。

實驗方法：

(1)先在 250 mL 錐形瓶內，添加 0.2 % 不同之物質如下：

control、Carboxymethyl cellulose sodium salt、

Polyacrylic acid solution、Sodium dihydrogenphosphate、Agar

(2)然後在 250 mL 錐形瓶，分別置入 100 mL 液態培養基

Glucose 5.0 % + Yeast extract 2.0 % +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % +

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3)以 0.1N HCl 或 0.1N NaOH 調整初始 pH=6.0。

(4)待滅菌 20 分鐘後冷卻備用。

(5)將液態菌種以均質機打碎，再以 3 % 比例的接菌量接入。

(6)置於溫度 25 °C、轉速 100 rpm 迴轉式恆溫培養箱中培養。

(7)在培養第七天時測量其菌絲濃度、pH 值，並紀錄之。

## 4-7 探討於低接種量下添加物對雲芝菌絲體生長及形態之影響

實驗十三：不同添加物對雲芝菌絲體生長及形態之影響

實驗目的：探討不同添加物對雲芝菌絲體的形態的影響。

實驗方法：

(1)先在 250 mL 錐形瓶內，添加 0.2 % 不同之高分子如下：

control、Carboxymethyl cellulose sodium salt、

Polyacrylic acid solution、Sodium dihydrogenphosphate、Agar

(2)然後在 250 mL 錐形瓶，分別置入 100 mL 液態培養基 Glucose 5.0 % + Yeast extract 2.0 % +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % +  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3)取一個 250 mL 錐形瓶，置入 99 mL 液態培養基。

(4)以 0.1N HCl 或 0.1N NaOH 調整初始 pH=6.0。

(5)待滅菌 20 分鐘後冷卻備用。

(6)將液態菌種以均質機打碎，再以 1 % 比例的接菌量接入 99 mL 液態培養基中(菌種稀釋 100 倍)。

(7)在 99 mL 液態培養中，以 3 % 比例的接菌量接入。

(8)置於溫度 25 °C、轉速 100 rpm 迴轉式恆溫培養箱中培養。

(9)在培養第七天時測量其菌絲濃度、pH 值，並紀錄之。

實驗十四：添加不同濃度的 Agar 對雲芝菌絲體生長及形態之影響

實驗目的：探討添加不同濃度的 Agar 對雲芝菌絲體的形態的影響，  
並求增加菌絲之產量。

實驗方法：

(1)先在 250 mL 錐形瓶內，添加不同濃度之 Agar 如下：

control、0.01 %、0.05 %、0.1 %、0.2 %、0.4 %

(2)然後在 250 mL 錐形瓶，分別置入 100 mL 液態培養基

Glucose 5.0 % + Yeast extract 2.0 % +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % +

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3)取一個 250 mL 錐形瓶，置入 99 mL 液態培養基。

(4)以 0.1N HCl 或 0.1N NaOH 調整初始 pH=6.0。

(5)待滅菌 20 分鐘後冷卻備用。

(6)將液態菌種以均質機打碎，再以 1 % 比例的接菌量接入 99 mL

液態培養基中(菌種稀釋 100 倍)。

(7)在 99 mL 液態培養中，以 3 % 比例的接菌量接入。

(8)置於溫度 25 °C、轉速 100 rpm 迴轉式恆溫培養箱中培養。

(9)在培養第七天時測量其菌絲濃度、pH 值，並紀錄之。



實驗十五：添加不同濃度的 Carboxymethyl cellulose sodium salt 對雲

芝菌絲體生長及形態之影響

實驗目的：探討添加不同濃度的 Carboxymethyl cellulose sodium salt

對雲芝菌絲體的形態的影響，並求增加菌絲之產量。

實驗方法：

(1)先在 250 mL 錐形瓶內，添加不同濃度之 Carboxymethyl cellulose sodium salt 如下：

control、0.2 %、0.4 %、0.6 %、1.0 %、2.0 %、3.0 %

(2)然後在 250 mL 錐形瓶，分別置入 100 mL 液態培養基

Glucose 5.0 % + Yeast extract 2.0 % +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % +

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3)取一個 250 mL 錐形瓶，置入 99 mL 液態培養基。

(4)以 0.1N HCl 或 0.1N NaOH 調整初始 pH=6.0。

(5)待滅菌 20 分鐘後冷卻備用。

(6)將液態菌種以均質機打碎，再以 1 % 比例的接菌量接入 99 mL

液態培養基中(菌種稀釋 100 倍)。

(7)在 99 mL 液態培養中，以 3 % 比例的接菌量接入。

(8)置於溫度 25 °C、轉速 100 rpm 迴轉式恆溫培養箱中培養。

(9)在培養第七天時測量其菌絲濃度、pH 值，並紀錄之。

實驗十六：添加不同濃度的 Sodium dihydrogenphosphate dihydrate 對  
雲芝菌絲體生長及形態之影響

實驗目的：探討添加不同濃度的 Sodium dihydrogenphosphate dihydrate  
對雲芝菌絲體的形態的影響，並求增加菌絲之產量。

實驗方法：

- (1)先在 250 mL 錐形瓶內，添加不同濃度之 Sodium dihydrogenphosphate dihydrate 如下：  
control、0.2 %、0.5 %、1.0 %、2.0 %、3.0 %
- (2)然後在 250 mL 錐形瓶，分別置入 100 mL 液態培養基  
Glucose 5.0 % + Yeast extract 2.0 % +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % +  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %
- (3)取一個 250 mL 錐形瓶，置入 99 mL 液態培養基。
- (4)以 0.1N HCl 或 0.1N NaOH 調整初始 pH=6.0。
- (5)待滅菌 20 分鐘後冷卻備用。
- (6)將液態菌種以均質機打碎，再以 1 % 比例的接菌量接入 99ml  
液態培養基中(菌種稀釋 100 倍)。
- (7)在 99 mL 液態培養中，以 3 % 比例的接菌量接入。
- (8)置於溫度 25°C、轉速 100 rpm 迴轉式恆溫培養箱中培養。
- (9)在培養第七天時測量其菌絲濃度、pH 值，並紀錄之。

## 4-8 探討在發酵槽中固定轉速攪拌對雲芝菌絲體生長及形態之影響

實驗十七：在發酵槽中定速 100 rpm、300 rpm、500 rpm 下對雲芝菌絲體的生長及多醣體生成之影響

實驗目的：探討在定速轉的情況下對菌絲體的產量及多醣生成的影響

實驗方法：

(1)取約 5 L 的容器，置入 4 L 的液態培養基 Glucose 5.0 % +

Yeast extract 2.0 % +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % +  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(2)以 0.1N HCl 或 0.1N NaOH 調整初始 pH=6.0。

(3)然後倒入 5 L 的發酵槽內，再加入一滴消泡劑。

(4)待滅菌 20 分鐘後冷卻備用。

(5)將液態菌種以均質機打碎，再以比例的接菌量接入發酵槽中。

(6)將溫度控制在 25 °C 下，分別以轉速 100 rpm、300 rpm、500 rpm

下培養。

(7)每 8 hrs 取一次菌絲，測量菌絲濃度、pH 值、多醣濃度與葡萄

糖含量，並紀錄之。

## 第五章 結果與討論

### 5-1 菌種篩選

#### 實驗一：平面培養皿篩選

此實驗的目的是為了要找出生長速度較快的菌株，所以將由生物資源保存及研究中心所購得的菌株 BCRC 35253 及 BCRC 37503 先在平面培養皿作篩選，以找出生長速度較快的菌株。

在培養皿培養過程中，因生長速度較快，第二天已經有一點的菌絲產生，接入的菌絲塊有像絨毛狀的情況，BCRC35253、BCRC37503 菌絲顏色呈現白色，隨著培養時間的增加，培養皿上的菌絲會長厚厚的一層，有突起的部分會呈現淡黃色，而在切割時會造成困難，因此在培養皿時大概培養五天後，並置於 4 °C 冰箱中保存備用。

由圖 5-1 可以看出菌株 BCRC35253、BCRC37503 在平面培養皿上的生長速度沒有明顯的差異。

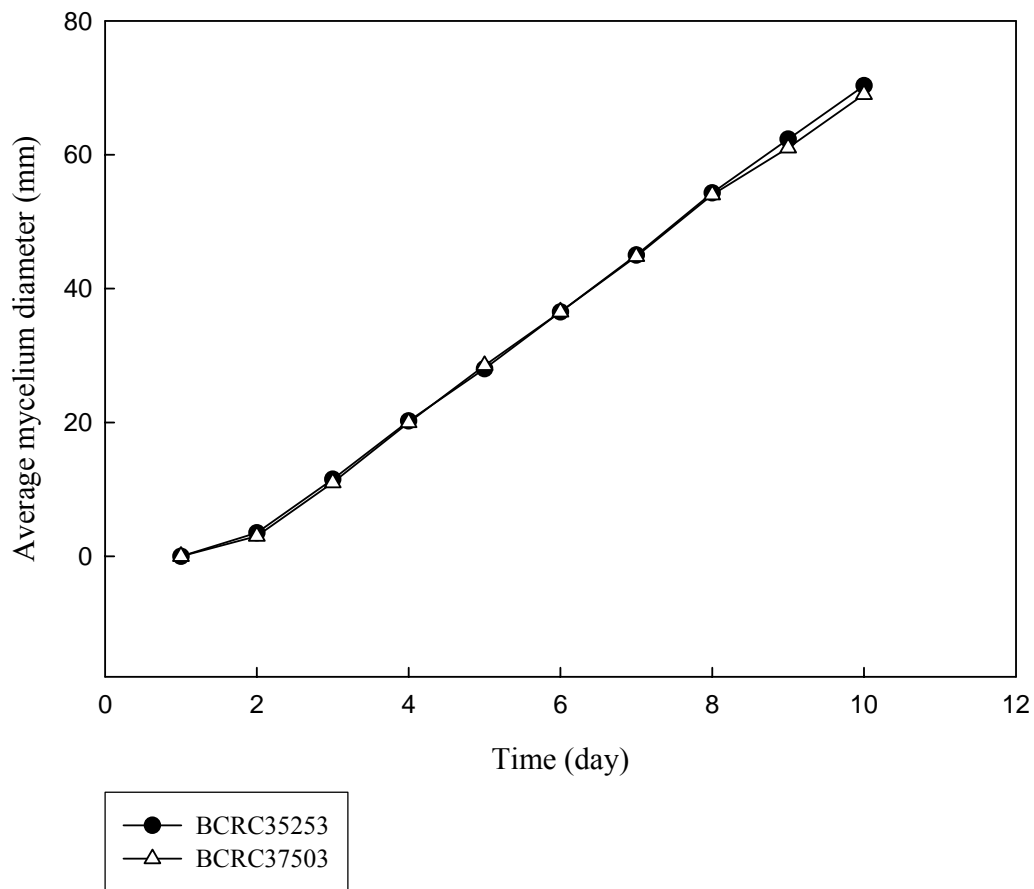


圖 5-1 不同種菌於平面培養皿培養之比較

培養條件：

(1)菌種：BCRC35253、BCRC37503。

(2)培養基：PDA。

(3)接一單位(0.5 cm × 0.5 cm)的菌絲於培養皿邊緣。

(4)於 25 °C 的恆溫箱培養。

## 實驗二：液態培養的篩選

由於相同的菌株於固態及液態培養基中會有不同之生長情況，所以此實驗之目的在於利用三角瓶液態培養的方式，尋找出菌絲生長較佳的菌株。

於實驗過程中發現液態培養與固態培養下有不同之結果，及菌株 BCRC35253 有較快的生長，並在培養的過程中接入的菌絲塊已經慢慢形成為乳黃色的菌絲球，而培養基中不只有四個菌絲球，在搖晃培養中會把球狀表面的菌絲狀切斷，而產生了菌絲球。使得菌株 BCRC35253 的菌絲乾重可達 9.662 (g/L)，因此選定 BCRC35253 為後續研究之菌株，以期能提升雲芝菌絲體生成之產量。

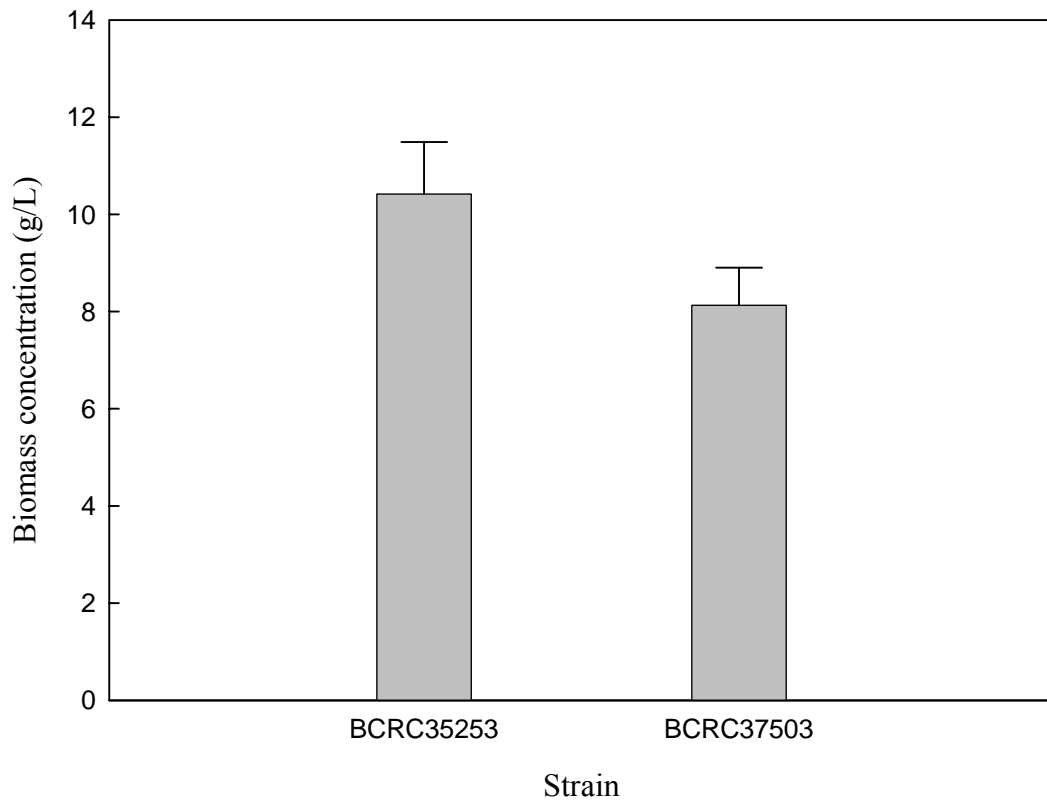


圖 5-2 不同種菌於液態培養基中培養之比較

培養條件：

(1)菌種：BCRC35253、BCRC37503。

(2)培養基：Glucose 5.0 %、Yeast extract 1.5 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3)分別於 250 mL 的三角瓶中接入四個單位(0.5 cm × 0.5 cm)的菌絲。

(4)置於 25 °C、100 rpm 的恆溫培養箱培養 7 天。

## 5-2 利用不同培養基組成取代原基礎液態培養基試驗

### 實驗三：不同接菌量對雲芝菌絲體生長之影響

為了能得到最佳菌絲體的產量，以液態菌種接入液態培養基中，會比以四個菌絲塊的產量還好。此實驗的目的是找出在液態培養基中接入菌絲的濃度，並不是接入的菌絲體濃度高會得到較多的菌絲體。當接入的菌絲體濃度低時，要達到所需的濃度，必須要培養的時間長。而在濃度高時可能會造成養分不足或菌絲體會產生自溶，進而分解出一些的養分。

由圖 5-3 可知接菌量在 3 mL 的時，菌絲濃度是最高的，可達 10.293 g/L，因此選定接菌量為 3 mL 作後續研究之準則。



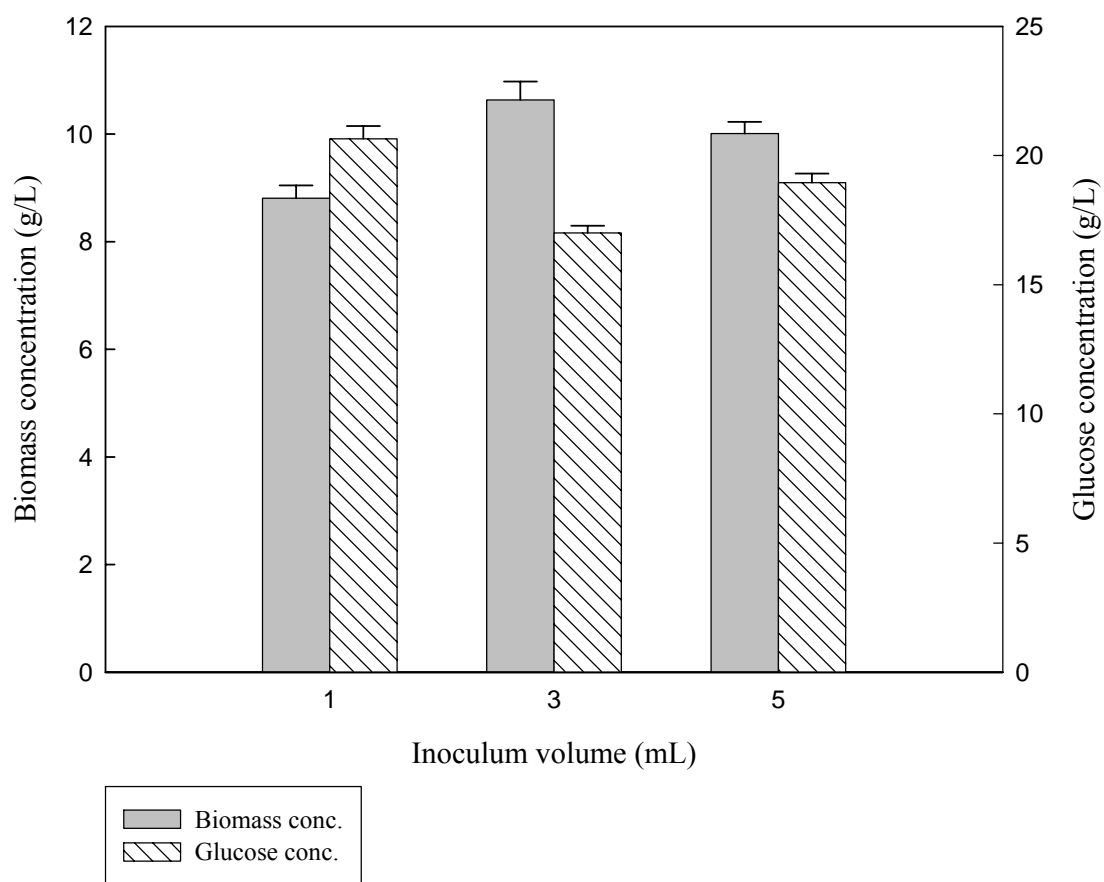


圖 5-3 不同接種量對雲芝菌絲體生長之影響

培養條件：

(1)菌種：BCRC35253。

(2)培養基：Glucose 5.0 %、Yeast extract 1.5 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3)置於 25°C、100 rpm 的恆溫培養箱培養 7 天。

#### 實驗四：不同培養基成分對雲芝菌絲體生長之影響

針對雲芝菌絲體液態培養基成分方面，在許多文獻中有所記載，而本實驗從文獻上選擇幾種較佳的液態培養基，進而探討菌絲濃度及多醣生成之影響。由圖 5-4 可顯示出培養基b的菌絲濃度最高，因培養基的成份中含有CaCO<sub>3</sub> (0.5%)，其性質為不可溶，因此在培養時CaCO<sub>3</sub>會被菌絲包覆在其中，菌絲球呈白色狀，會造成菌絲濃度過高，而非真實濃度。

由圖中可觀察得知在培養基c中的多醣生成較少，然而培養基d中產率為 1.57 g/L day<sup>-1</sup>，培養末期殘糖 37.3 g/L，而培養基e中產率為 1.4 g/L day<sup>-1</sup>、殘糖 17.4 g/L，兩者相比較下培養基d的產率沒較高，但殘糖卻高出許多，而在殘糖的觀點上，故本實驗選擇培養基e進而探討之。

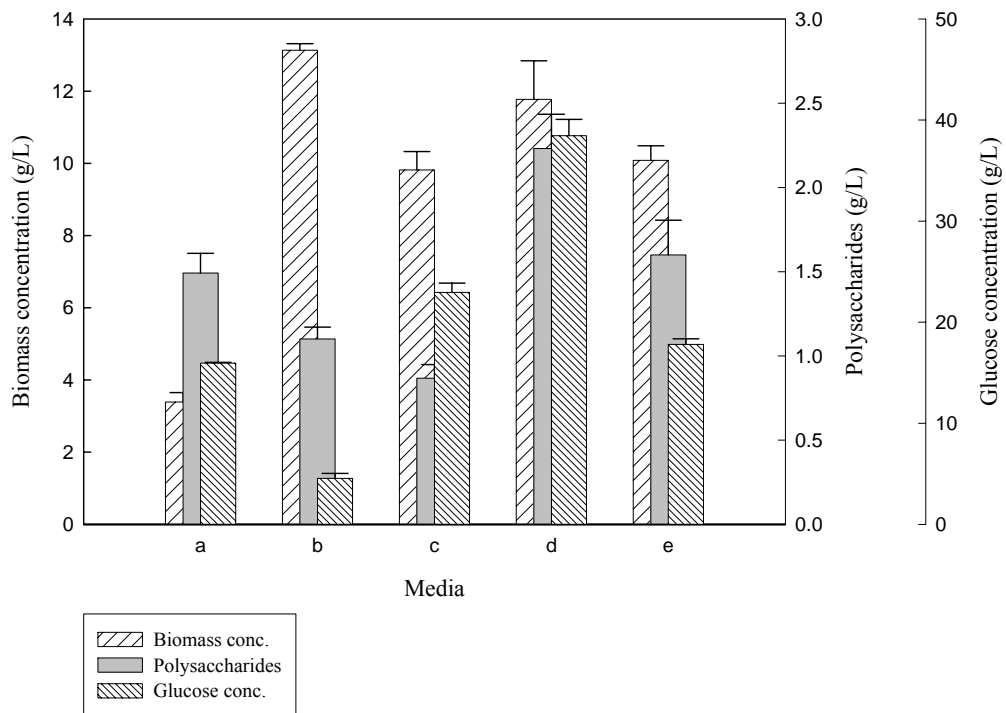


圖 5-4 不同培養基對雲芝菌絲體生長之影響

a : Glucose 3.0 % + Peptone 0.5 % + NaCl 0.1 % + V<sub>B1</sub> 0.1 %

b : Glucose 3.0 % + Peptone 0.5 % + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 % + MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05 % + CaCO<sub>3</sub> 0.5 %

c : Glucose 5.0 % + Yeast extract 0.3 % + Peptone 0.2 % + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 % + MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 %

d : Glucose 10.0 % + Yeast extract 1.5 % + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 % + MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 %

e : Glucose 5.0 % + Yeast extract 1.5 % + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 % + MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 %

培養條件：

(1) 菌種：BCRC35253。

(2) 接菌量：3 mL 液態種菌。

(3) 置於 25 °C、100 rpm 的恆溫培養箱培養 7 天。

## 實驗五：培養基成分—不同濃度的碳源對雲芝菌絲體生長及多醣生成之影響

雖然碳源主要作用為構成細胞物質和供給菌種所需的能源，但過高之碳源則會抑制生長，此實驗的目的在於，使用葡萄糖做為碳源，並進行不同濃度的添加量，觀察是否會有葡萄糖抑制現象的發現，並尋找出最適當的葡萄糖添加量。

由圖 5-5 可知雲芝菌絲體對葡萄糖的供給能源使用率很高，在含量 1%、2%、3% 的葡萄糖都沒有殘餘，而 5% 與 6% 的菌絲體濃度沒有明顯的差異，因此選擇碳源為 5% 作為培養基。因培養的時間為 7 天，並不是很長的時間，而對雲芝菌絲體無法看出是否有抑制的現象發生。

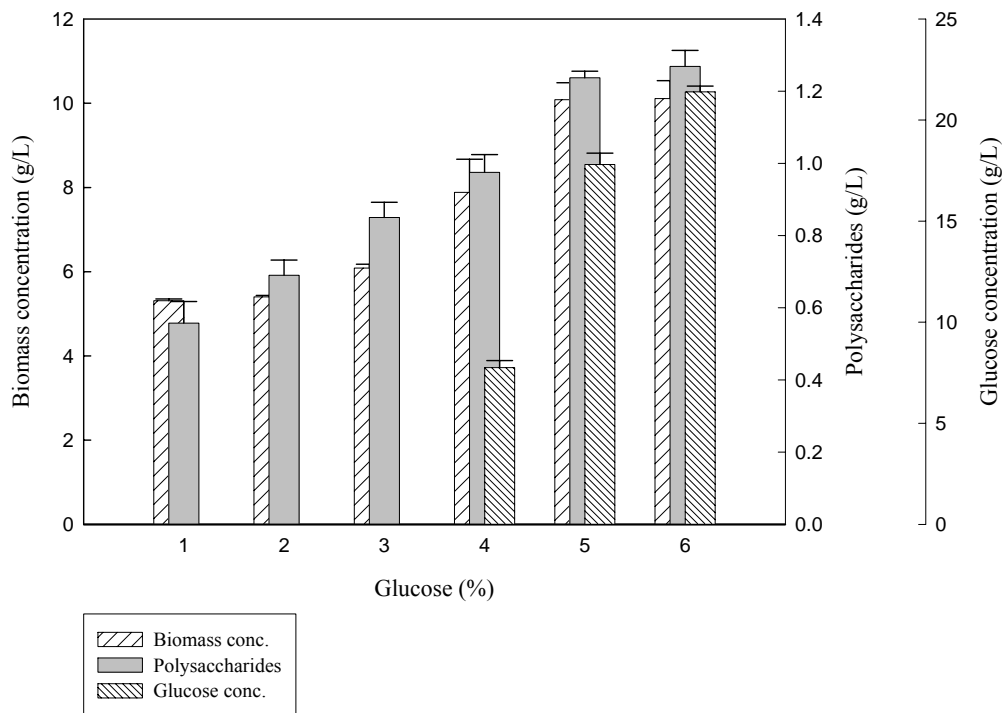


圖 5-5 Glucose 的濃度對雲芝菌絲體生長及多醣生成之影響

培養條件：

(1) 菌種：BCRC35253。

(2) 培養基：Yeast extract 2.0 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3) 接菌量：3 mL 液態種菌。

(4) 置於 25 °C、100 rpm 的恆溫培養箱培養 7 天。

## 實驗六：培養基成分—不同濃度的氮源對雲芝菌絲體生長及多醣生成之影響

一般而言氮源是構成葷類蛋白質和核酸的主要元素，並不提供菌體所需之能量，此實驗的目的探討不同濃度的氮源對雲芝菌絲體生長與多醣生成之影響，而氮源的選擇了培養基中的 Yeast extract 來做研究。

由圖 5-6 可知在濃度 2.0 % 的 Yeast extract 菌絲體濃度與多醣的生成含量達最大值，分別為 10.49 g/L 及 2.6 g/L，因此選擇了 2.0 % 的 Yeast extract 作為培養基的成分。

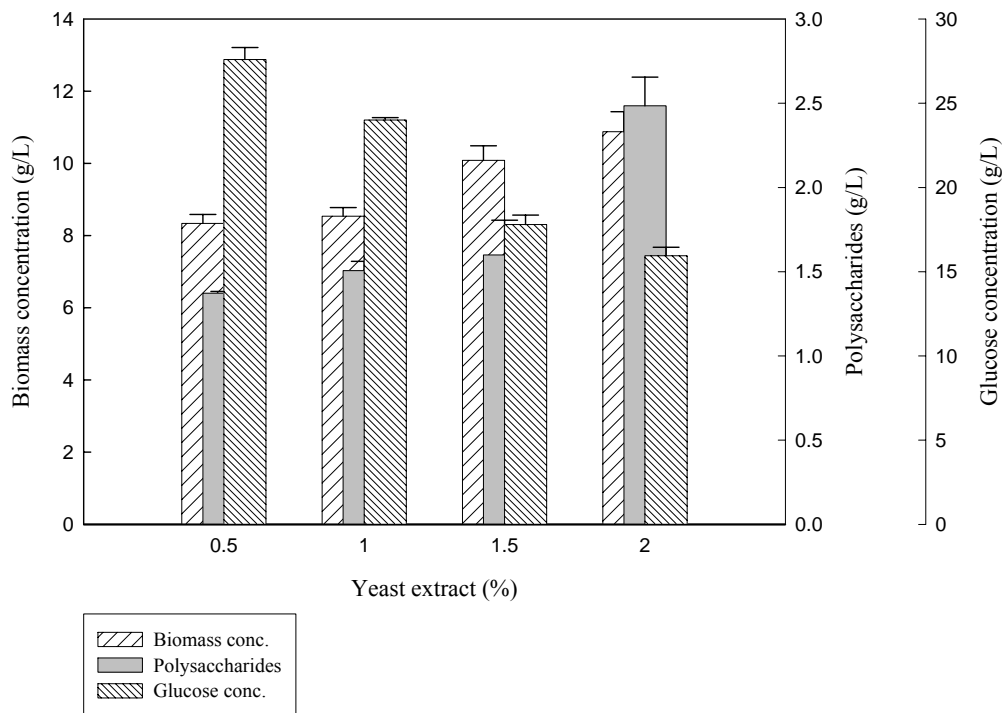


圖 5-6 Yeast extract 的濃度對雲芝菌絲體生長及多醣生成之影響

培養條件：

(1) 菌種：BCRC35253。

(2) 培養基：Glucose 5.0 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3) 接菌量：3 mL 液態種菌。

(4) 置於 25 °C、100 rpm 的恆溫培養箱培養 7 天。

## 實驗七：培養基成分—不同 pH 值對雲芝菌絲體生長及多醣生成之影響

由於一般蕈類菌絲生長為微酸性，最適 pH 值範圍從 4~6，過高或過低之 pH 值皆有礙於生長，所以本實驗的目的為調整不同 pH 值，並觀察對雲芝菌絲生長及多醣生成的影響，此實驗調整了六種不同 pH 值分別為 3.5、4、4.5、5、5.5、6。

藉由實驗結果中發現(圖 5-7)，菌體乾重並沒有明顯的差異，但在 pH 值為 6 達最高菌體乾重為 11.98 g/L，而多醣的生成也是達最高為 2.18 g/L，但多醣會隨著 pH 值的降低而減少，pH 值為 4 時多醣下降極快，在不同 pH 值實驗中，選擇了 pH 值為 6 較佳之改變量。



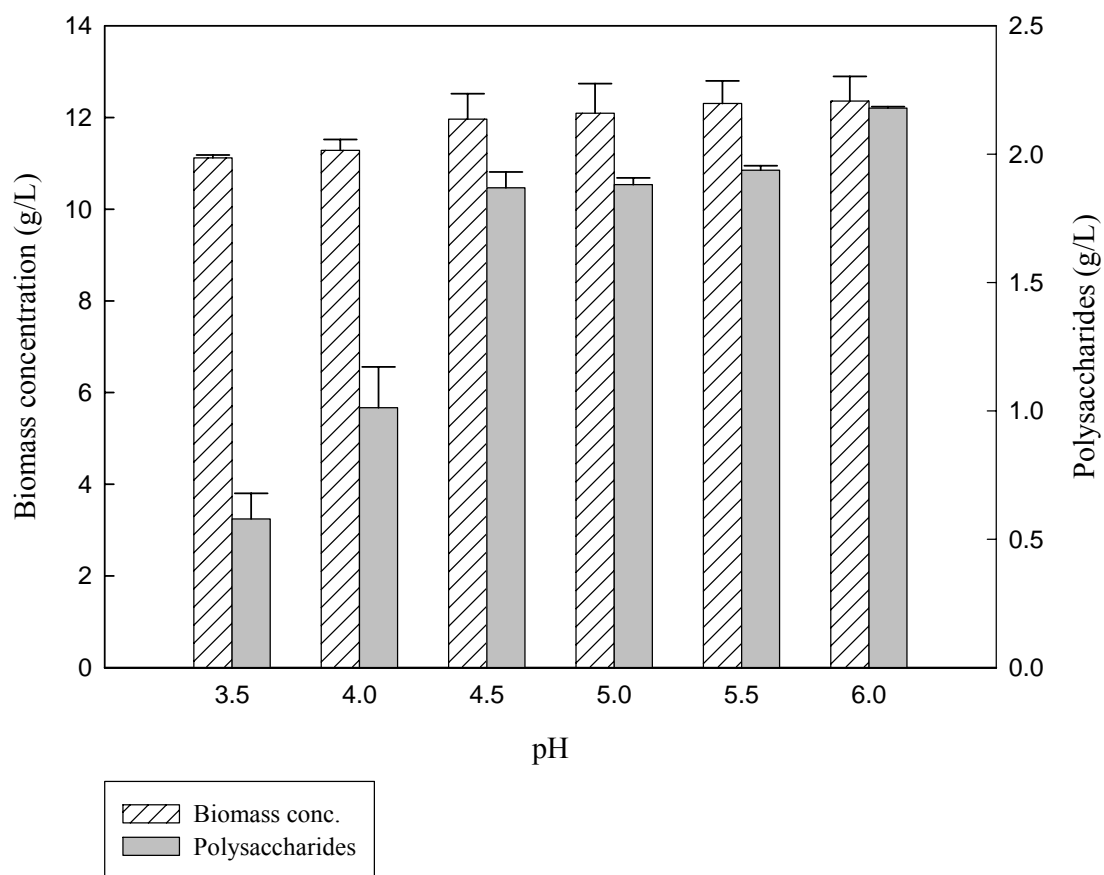


圖 5-7 pH 值對雲芝菌絲體生長及多醣生成之影響

培養條件：

(1) 菌種：BCRC35253。

(2) 培養基：Glucose 5.0 %、Yeast extract 2.0 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3) 接菌量：3 mL 液態種菌。

(4) 置於 25 °C、100 rpm 的恆溫培養箱培養 7 天。

#### 實驗八：時間變化對雲芝菌絲體生長及多醣體生成的情況

此實驗目的是觀察雲芝菌絲體每天的菌絲體的生長與多醣生成的情況，由圖 5-8 可知在培養第七天時的多醣是最大值，而菌絲體卻是一直往上升，到第十天菌絲體是最大值，但多醣卻在第七天時就開始下降，因此如果想要得到較多的多醣，就應培養七天。

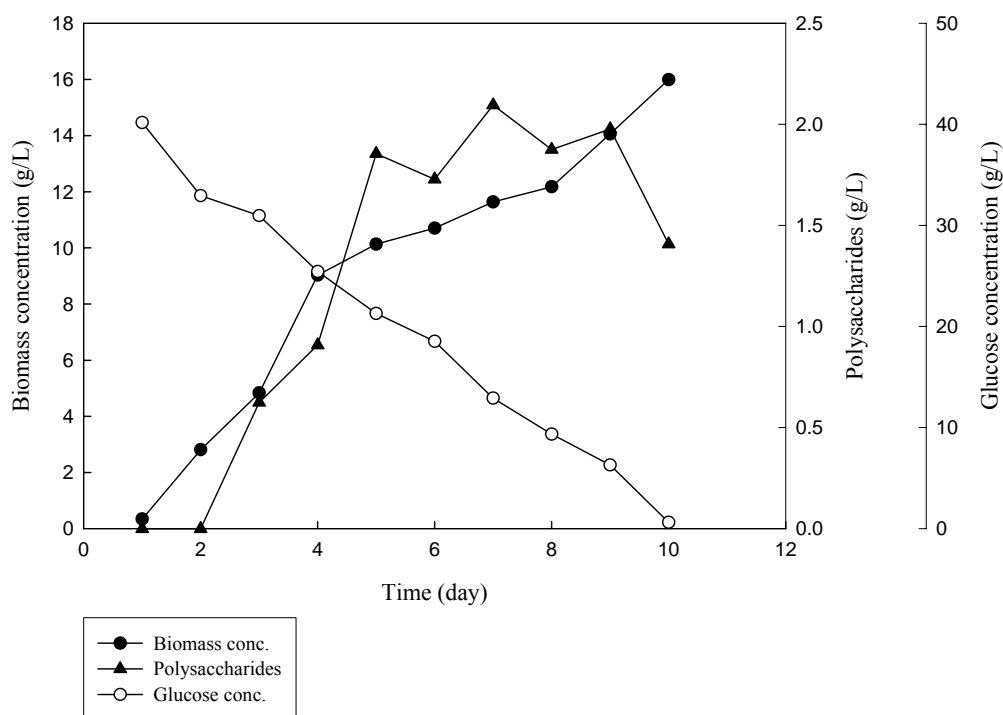


圖 5-8 時間變化對雲芝菌絲體產量與多醣生成的情況

培養條件：

(1)菌種：BCRC35253。

(2)培養基：Glucose 5.0 %、Yeast extract 2.0 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3)接菌量：3 mL 液態種菌。

(4)pH 6。

(5)置於 25 °C、100 rpm 的恆溫培養箱培養。

### 實驗九：藉由震盪機的不同轉速對雲芝菌絲體生長之影響

本實驗為了探討是否在轉速提高下，雲芝菌絲體的產量增加，在轉速提高下菌絲體之間的碰撞機會增加，會因碰撞的關係讓菌絲表面的菌絲片段掉落，而菌絲片段會形成菌絲體進而提高產量。

由圖 5-9 可知，改變轉速下對菌絲體的生長與多醣生成並沒有明顯的影響，因雲芝菌絲體的生長情況良好，而只由 100 rpm 改變至 150 rpm，對雲芝菌絲體是無影響，進一步探討在高轉速下是否對菌絲體生長與多醣生成之影響。

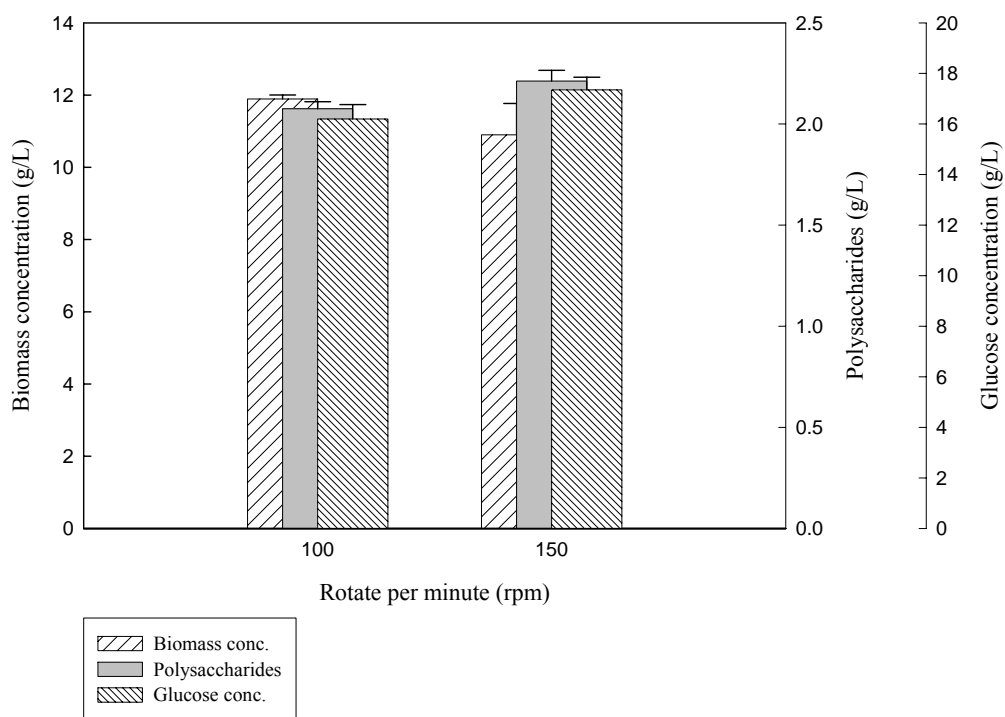


圖 5-9 轉速對雲芝菌絲體生長與多醣生成的影響

培養條件：

(1)菌種：BCRC35253。

(2)培養基：Glucose 5.0 %、Yeast extract 2.0 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3)接菌量：3 mL 液態種菌。

(4)pH 6。

(5)置於 25 °C 恆溫培養箱培養 7 天。

實驗十：均質機在不同的均質時間下對雲芝菌絲體生長及形態之影響

由於均質機的功用為打碎菌絲體，本實驗探討在不同的均質時間下，進而觀察菌絲體的粗細程度。

從圖 5-10 圖表中可觀察在均質 5 min 後，菌絲濃度並沒有顯著的變化。

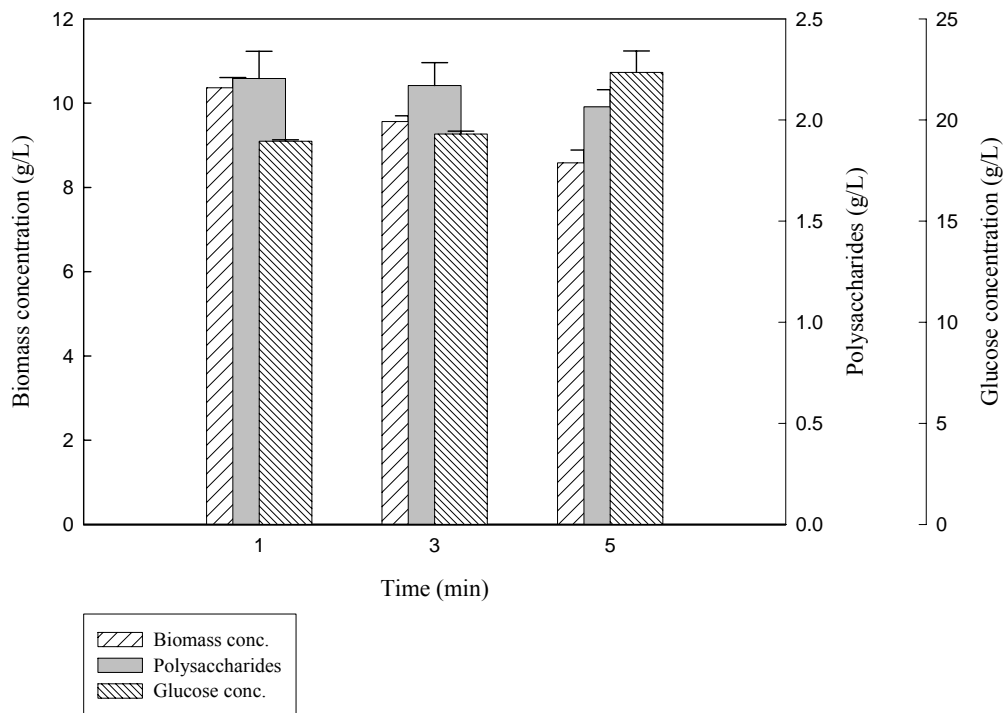


圖 5-10 相異均質時間下對雲芝菌絲體生長與形態之影響

培養條件：

(1)菌種：BCRC35253。

(2)培養基：Glucose 5.0 %、Yeast Extract 2.0 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3)接菌量：3 mL 液態種菌。

(4)pH 6。

(5)置於 25 °C 恆溫培養箱培養 7 天。

### 5-3 探討添加物對雲芝菌絲體生長、多醣體生成及形態之影響

#### 實驗十一：綠茶的添加對雲芝菌絲體生長及多醣體生成之影響

本實驗目的在探討，藉由綠茶量的添加，觀察對雲芝菌絲體多醣生成之影響，從圖 5-11 中可發現在添加 3 mL 的綠茶後，多醣的生成比控制組有提升，菌絲體濃度卻反而降低，因此推測經由綠茶的添加，可以促進多醣的生成。本實驗可進一步探討之綠茶中何種成分能促使多醣的生成。



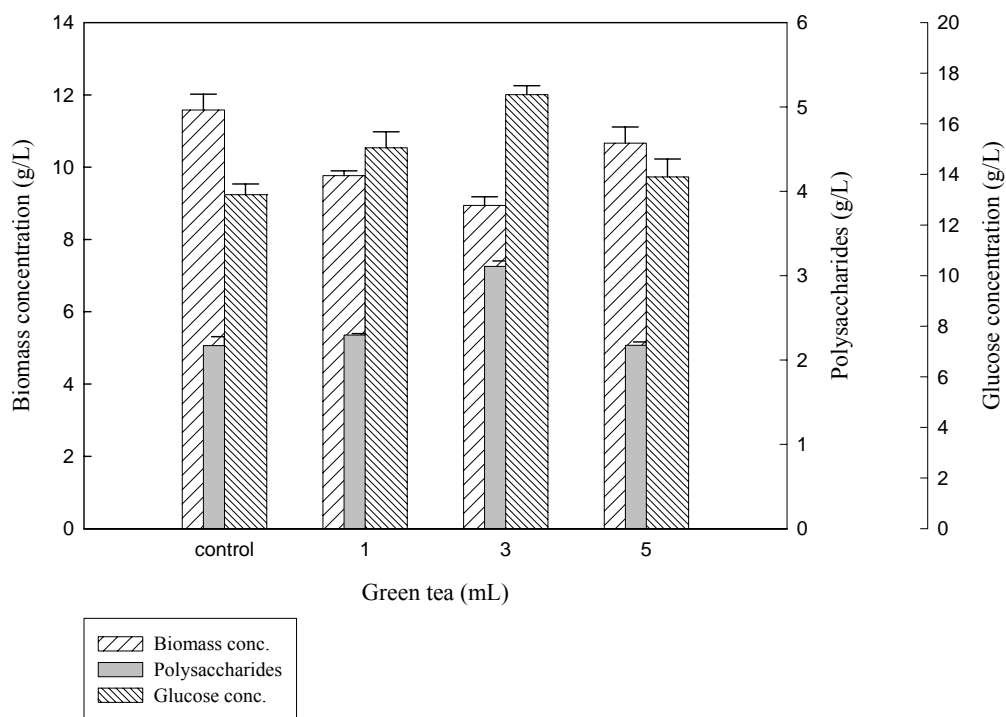


圖 5-11 綠茶的添加對雲芝多醣體生成之影響

培養條件：

(1)菌種：BCRC35253。

(2)培養基：Glucose 5.0 %、Yeast extract 2.0 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3)接菌量：3 mL 液態種菌。

(4)pH 6。

(5)置於 25 °C 恆溫培養箱培養 7 天。

## 實驗十二：不同添加物對雲芝菌絲體生長及形態之影響

本實驗目的是在高分子的添加是否能夠影響雲芝菌絲體的生長，從參考文獻可得知以添加高分子 0.2 % (w/v) 為基準，由表 5-1 顯示不同高分子的添加，對雲芝菌絲體生長之影響，經由培養後可發現，只有在添加 Agar 之後，對菌絲體生長較為顯著，而比較其他高分子與控制組後差異並不大，因而失去添加高分子的意義。

表 5-1 不同添加物對雲芝菌絲體生長及形態之影響

	control	Agar	Carboxymethyl cellulose sodium salt	Sodium dihydrogenphosphate dihydrate	Polyacrylic acid solution
Biomass conc. (g/L)	11.63	18.23	12.63	12.55	12.56
Viscosity (cp)	1.34	3.56	3.11	1.36	1.31
pH value	4.03	4.1	4.31	4.01	4.23

培養條件：

(1)菌種：BCRC35253。

(2)培養基：Glucose 5.0 %、Yeast extract 2.0 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3)接菌量：3 mL 液態種菌。

(4)pH 6。

(5)置於 25 °C 恆溫培養箱培養 7 天。

## 5-4 探討於低接種量下添加物對雲芝菌絲體生長及形態之影響

### 實驗十三：不同添加物對雲芝菌絲體生長及形態之影響

由於雲芝菌絲體生長情況較良好，而對高分子的添加後差異並不大，因此本實驗的目的是為了證實添加高分子的效果，所以藉由稀釋菌絲濃度後，再比較其差異。由表 5-2 觀察出在添加 Agar 的情況下，與控制組比較後可得知，Pellet Size 略小、菌絲球數目增多。

在添加 Carboxymethyl cellulose sodium salt 的情況下，也有些許的差異，進而探討是否與黏度相關。

表 5-2 不同添加物對雲芝菌絲體生長及形態之影響

	control	Agar	Carboxymethyl cellulose sodium salt	Sodium dihydrogenphosphate dihydrate	Polyacrylic acid solution
Biomass conc. (g/L)	7.81	16.23	10.27	9.11	8.05
Pellet number (granule)	156	1588	589	200	197
Pellet Size (mm)	7~12	4	4~8	4~12	5~12
Viscosity (cp)	1.34	3.56	3.11	1.36	1.31
Residual glucose (g/L)	26	0	22.5	26.6	28.8
pH value	4.94	4.76	4.97	4.88	4.91

培養條件：

(1)菌種：BCRC35253。

(2)培養基：Glucose 5.0 %、Yeast extract 2.0 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3)接菌量：3 mL 液態種菌。

(4)pH 6。

(5)置於 25 °C 恆溫培養箱培養 7 天。

#### 實驗十四：添加不同濃度的 Agar 對雲芝菌絲體生長及形態之影響

由於添加 Agar 之後，對雲芝菌絲體的生長較為顯著，因此本實驗目的探討在不同濃度下的添加，比較其生長及形態之差異。由表 5-3 的數據顯示出濃度添加越高，菌絲球數目越多以及菌絲球粒徑也越小；在添加 0.4 % (w/v) 的 Agar 時，發現菌絲體無法形成菌絲球，卻形成菌絲狀，如圖 5-12 所示。

此外，本實驗中可觀察到添加的濃度越高會使黏度增加，而導致菌絲體間的聚集能力降低，而無法形成菌絲球。而黏度影響是否為主要的原因，需要進一步探討之。

表 5-3 添加不同濃度的 Agar 對雲芝菌絲體生長之影響

	0 %	0.01 %	0.05 %	0.1 %	0.2 %	0.4 %
Biomass conc. (g/L)	8.27	15.15	15.75	16.34	17.29	18.75
Pellet number (granule)	236	603	770	1032	1170	mycelium*
Pellet size (mm)	7~12	4~6	4~6	4~5	4~5	
Viscosity (cp)	1.34	1.38	1.44	2.06	3.56	15.63

\*沒形成菌絲球(Pellet)皆為菌絲(mycelium)。

培養條件：

(1)菌種：BCRC35253。

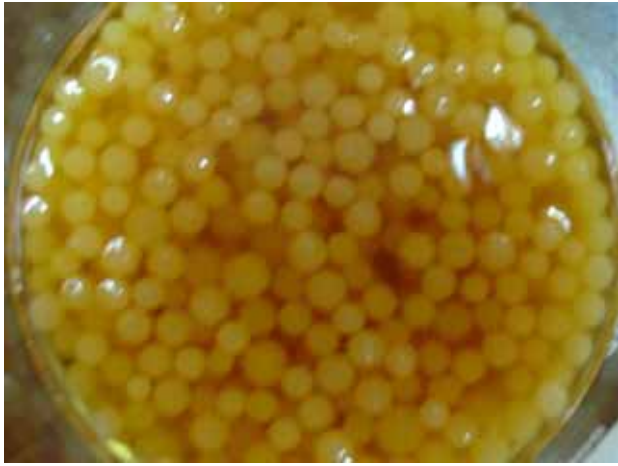
(2)培養基：Glucose 5.0 %、Yeast extract 2.0 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

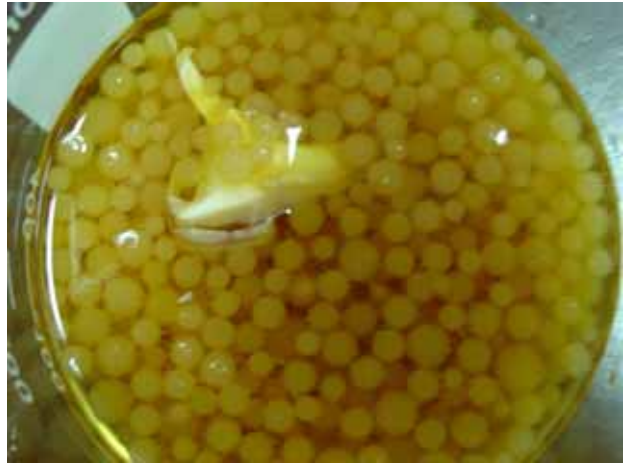
(3)接菌量：3 mL 液態種菌。

(4)pH 6。

(5)置於 25 °C 恆溫培養箱培養 7 天。



**a**



**b**



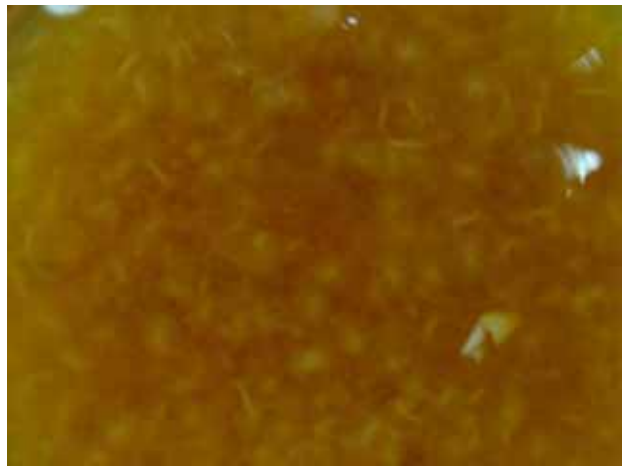
**c**



**d**



**e**



**f**

**a : 0 %**

**b : 0.01 %**

**c : 0.05 %**

**d : 0.1 %**

**e : 0.2 %**

**f : 0.4 %**

**圖 5-12 不同 Agar 濃度對雲芝菌絲球形態之影響**



## 實驗十五：添加不同濃度的 Carboxymethyl cellulose sodium salt 對雲

### 芝菌絲體生長及形態之影響

由於添加 Carboxymethyl cellulose sodium salt 之後，對雲芝菌絲體的生長有些許的差異，因此本實驗目的探討在不同濃度下的添加，其比較生長及形態之差異。由表 5-4 的數據顯示出濃度添加越高，菌絲球數目越多以及菌絲球粒徑也越小；黏度也隨著添加的濃度增加而上升，卻發現菌絲濃度並沒有顯著的影響(圖 5-13)。因此初始發酵液黏度越高能讓菌絲球數目變多與菌絲球粒徑也變小，而對菌絲體濃度影響有限。

表 5-4 添加不同濃度的 Carboxymethyl cellulose sodium salt 對雲

芝菌絲體生長影響

	0 %	0.2 %	0.4 %	0.6 %	1.0 %	2.0 %	3.0 %
Biomass conc. (g/L)	8.27	10.27	10.14	9.25	9.4	9.54	10.01
Pellet number (granule)	236	552	683	746	962	1384	3693
Pellet size (mm)	7~12	5~9	4~8	4~8	4~8	2~5	2~4
Viscosity (cp)	1.34	3.11	5.48	7.32	23.05	226.28	1576.14

培養條件：

(1)菌種：BCRC35253。

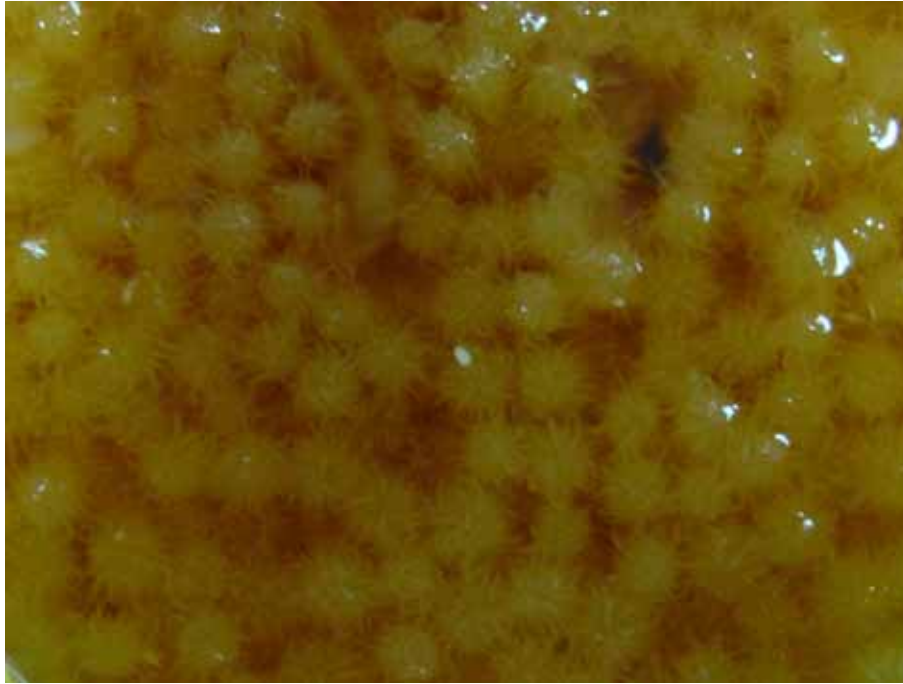
(2)培養基：Glucose 5.0 %、Yeast extract 2.0 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3)接菌量：3 mL 液態種菌。

(4)pH 6。

(5)置於 25 °C 恆溫培養箱培養 7 天。



**a**



**b**

**a : 0.2 % 、 b : 3.0 %**

**圖 5-13 不同濃度的 Carboxymethyl cellulose sodium salt 對雲芝形態之影響**

實驗十六：添加不同濃度的 Sodium dihydrogenphosphate dihydrate 對  
雲芝菌絲體生長及形態之影響

由於添加 Sodium dihydrogenphosphate dihydrate 之後，對雲芝菌絲體的生長並無顯著的差異，因此本實驗目的探討在不同濃度下的添加，觀察其生長及形態。

從表 5-5 可得知，所添加的濃度越高，菌絲球的粒徑有減小，菌絲球數目也有些許的增加，但卻發現黏度方面並沒有變化，因此推測黏度為影響菌絲體形態原因之一(圖 5-14)。雖然菌絲球的粒徑有變小，但菌絲球並沒有像 Agar 與 Carboxymethyl cellulose sodium salt 的數目多，可能造成菌絲體濃度降低的原因，而可使用 SEM 進一步了解何種物質影響菌絲體生長。

表 5-5 添加不同濃度的 Sodium dihydrogenphosphate dihydrate 對

雲芝菌絲體生長及形態之影響

	0 %	0.2 %	0.5 %	1.0 %	2.0 %	3.0 %
Biomass conc. (g/L)	8.27	9.11	9.90	9.47	7.44	6.95
Pellet number (granule)	236	200	257	308	395	568
Pellet size (mm)	7~12	5~12	5~11	5~10	5~9	2~6
Viscosity (cp)	1.34	1.36	1.37	1.37	1.38	1.41

培養條件：

(1)菌種：BCRC35253。

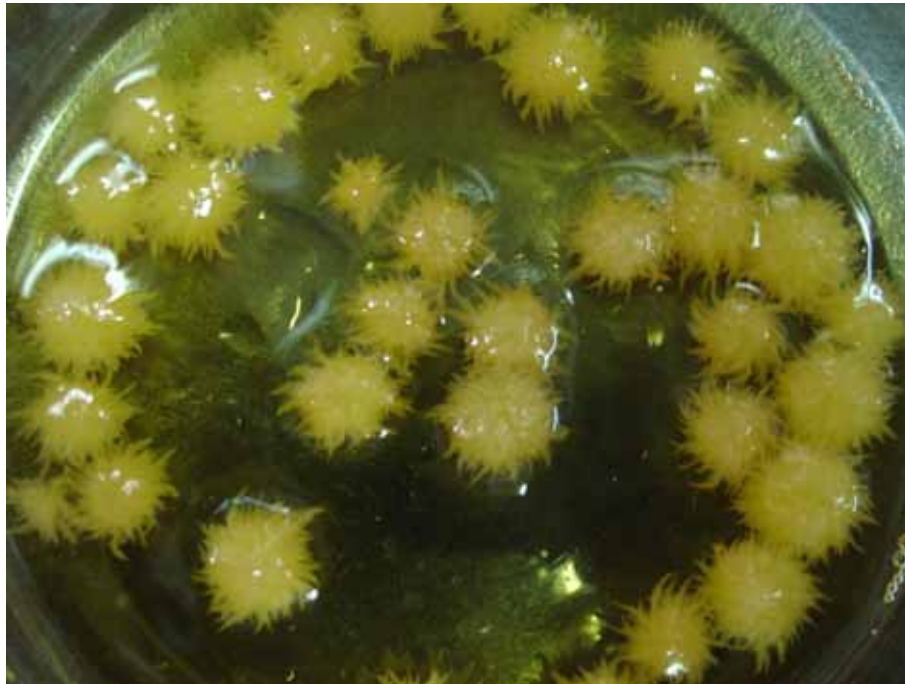
(2)培養基：Glucose 5.0 %、Yeast extract 2.0 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

(3)接菌量：3 mL 液態種菌。

(4)pH 6。

(5)置於 25 °C 恆溫培養箱培養 7 天。



**a**



**b**

**a : 0.2 % 、 b : 3.0 %**

**圖 5-14 不同濃度的 Sodium dihydrogenphosphate dihydrate 對雲芝形態之影響**

## 5-5 探討在發酵槽中固定轉速對雲芝菌絲體生長及形態之影響

實驗十七：在發酵槽中定速 100 rpm、300 rpm、500 rpm 下對雲芝菌絲體的生長及多醣體生成之影響

本實驗目的為在不同的轉速下，探討以及觀察菌絲體生長之變化情形，由圖 5-17 可知在 100 rpm 下菌絲體濃度並沒有很顯著，反而沒有比三角瓶好，在 168 hr 後菌絲濃度才達到 5.23 g/L，最後的菌絲體形態是以菌絲狀，因此在 100 rpm 下並沒有形成菌絲球，對雲芝菌絲體生長影響並不大。

由圖 5-18 可知在 300 rpm 下 136 hr 菌絲濃度可達到 13.77 g/L，當在 24 hr 時已經有菌絲開始聚集了成菌絲球，而 28 hr 已經有菌絲球狀的出現表面具有的菌絲片段形態出現了(圖 5-15)，到 36 hr 已經有更緊實的菌絲球，56 hr 時槽壁已經有菌絲體附著在液面上，而取樣時流動也開始緩慢，最後多醣濃度可達到 3.65 g/L。

藉由圖 5-19 在 500 rpm 下很快就形成菌絲球，在 16 hr 時就可以清楚的看到菌絲球(圖 5-16)，72 hr 時已經沒有葡萄糖含量，在 88 hr 後菌絲濃度就沒有明顯的上昇，因此在第 96 hr 添加濃度為 200g/L 的葡萄糖 500 mL，則菌絲濃度在第 104 hr 後上昇，而到了第 120 hr 葡

萄糖含量的值又降為零，而此時的菌絲濃度最高可達到 24.64 g/L。

由此可知，轉速越高對雲芝菌絲體的生長能提早就形成菌絲球，而越有利菌絲體濃度提升。





圖 5-15 300 rpm 轉速下之雲芝菌絲形態(28 hr) 倍數：40 倍

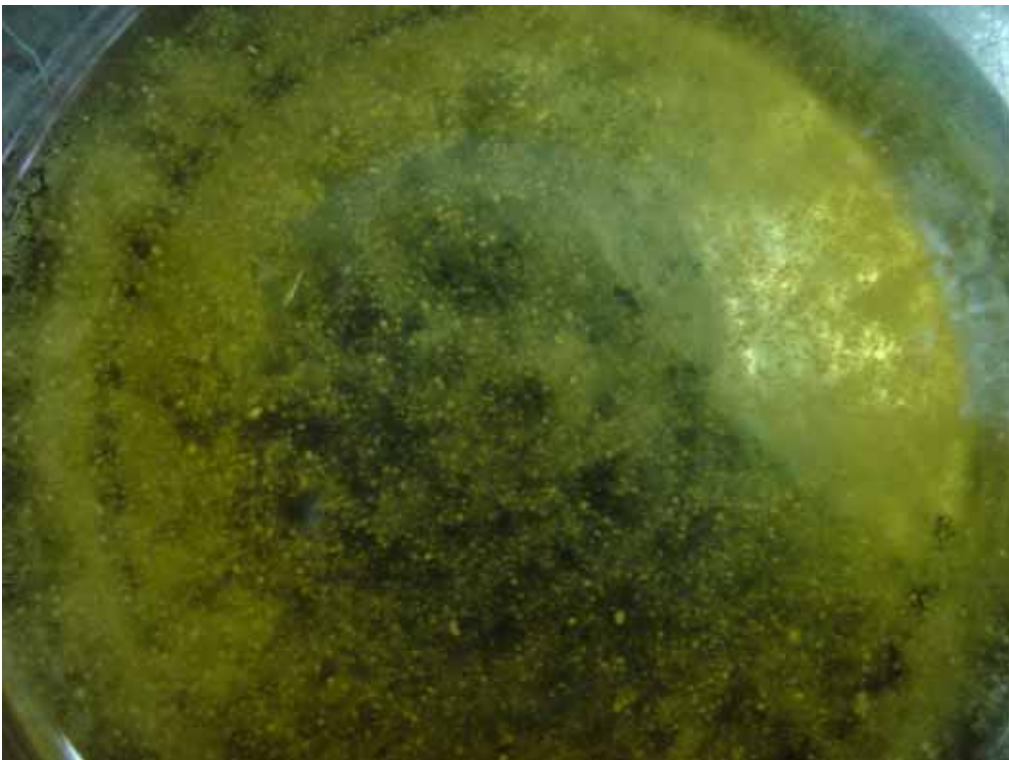


圖 5-16 500 rpm 轉速下之雲芝菌絲形態(16 hr)

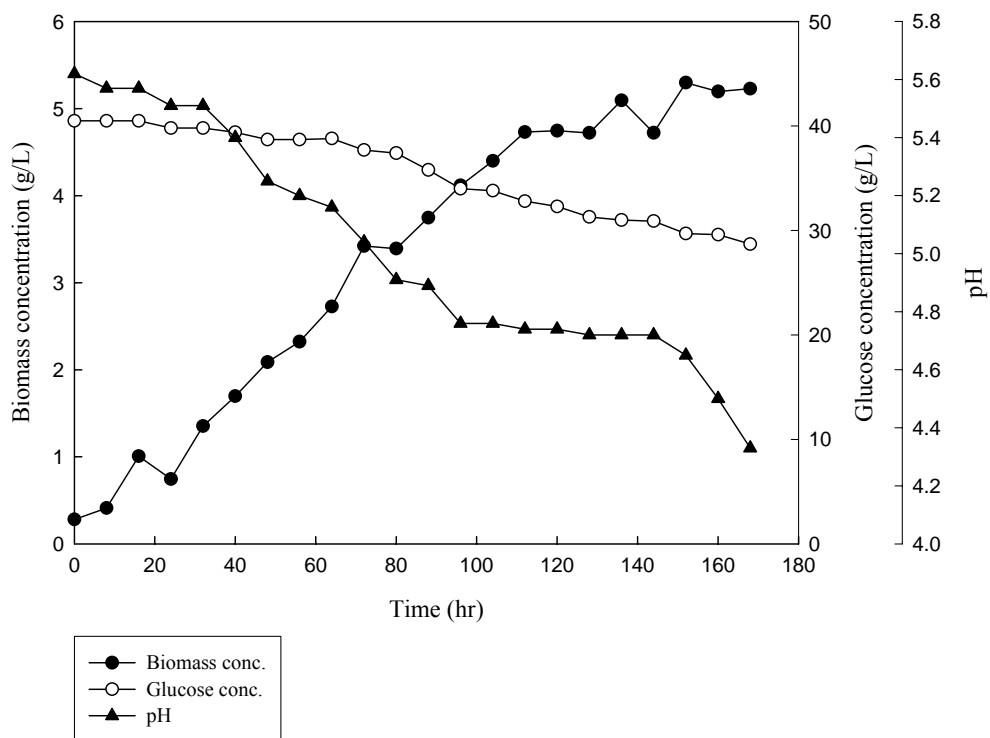


圖 5-17 固定轉速 100 rpm 對雲芝菌絲體生長之影響

培養條件：

培養基：Glucose 5.0 %、Yeast extract 2.0 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

初始 pH 6、溫度  $25^\circ\text{C}$ 、接種量 5 %v/v、通氣量 1 vvm

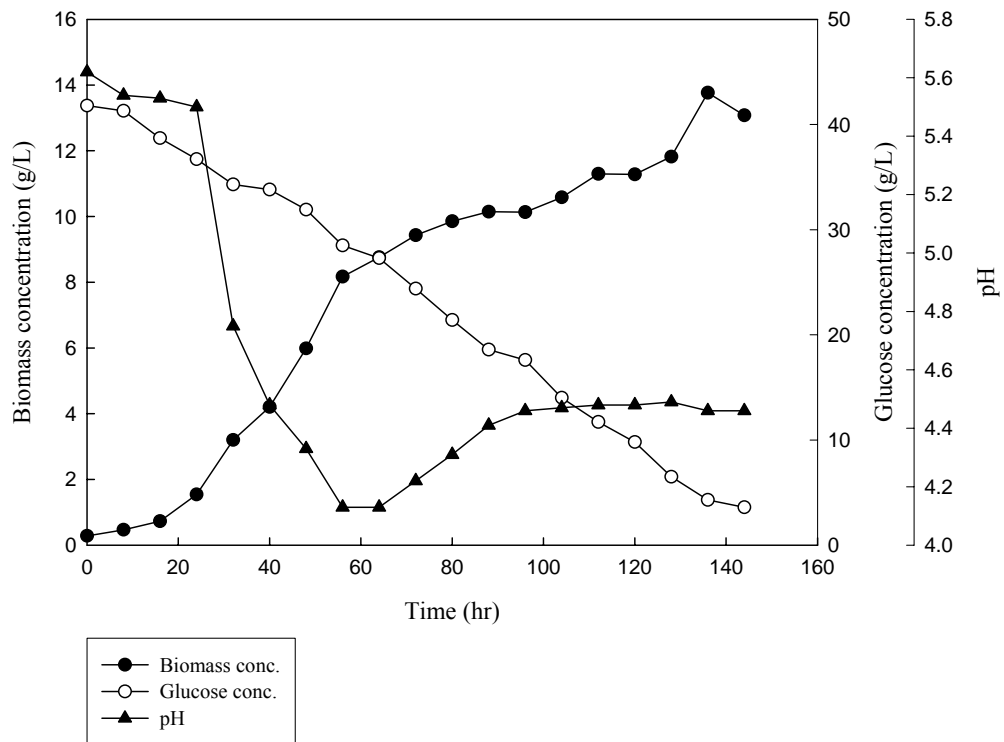


圖 5-18 固定轉速 300 rpm 對雲芝菌絲體生長之影響

培養條件：

培養基：Glucose 5.0 %、Yeast extract 2.0 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

初始 pH 6、溫度 25 °C、接種量 5 %v/v、通氣量 1 vvm

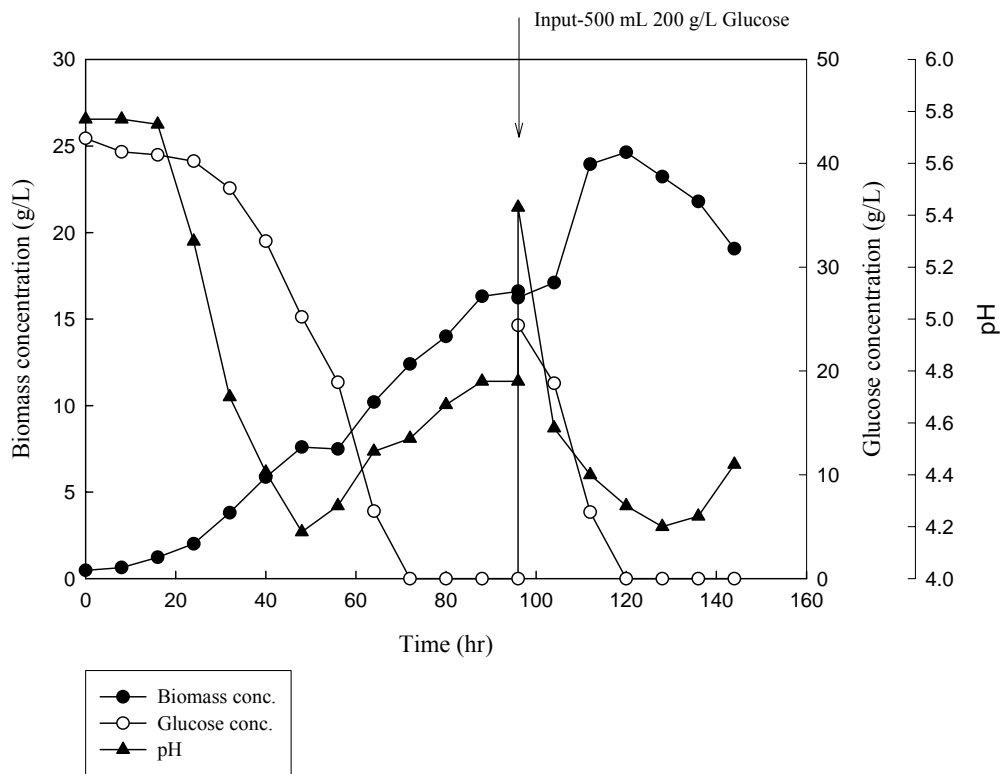


圖 5-19 固定轉速 500 rpm 對雲芝菌絲體生長之影響

培養條件：

培養基：Glucose 5.0 %、Yeast extract 2.0 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 %

初始 pH 6、溫度  $25^\circ\text{C}$ 、接種量 5 %v/v、通氣量 1 vvm

於第 96 hr 加入濃度為 200 g/L 的 Glucose 500 mL

## 第六章 結論與未來展望

### 6-1 結論

本論文研究重點在於以液態培養雲芝菌絲體，不僅可以縮短培養時間，生產的效益也可大為提昇，對於環境的衝擊也能減少，探討不同培養因子對菌絲體生長及多醣生成之影響。

因為環境因素與培養條件的控制會影響菌絲體生長或多醣體生成。透過 5L 發酵槽試驗方面證實提高轉速能縮短培養時間，而達到相同菌絲體濃度。雲芝菌絲體是屬於容易將菌絲球表面的菌絲片段脫落，因此在高轉速下可打斷較多的菌絲片段，而菌絲片段都能形成菌絲球，所以菌絲濃度也隨著增加。

而在 250 mL 三角瓶的基礎培養研究試驗中，關於培養時間、pH 值、培養基成分等對菌絲體生長之影響方面可以發現 pH 值對菌體濃度影響不大，在多醣生成方面 pH 值為 6 時有較高的濃度。在綠茶的添加能夠提高多醣生成，此外添加少量的 Agar 可以形成較小顆粒的菌絲球，進而提高菌絲體的產量，進而探討是否與黏度有直接的關係。

## 6-2 未來展望

雲芝多醣體用在免疫提昇及治療已有長久的歷史，而這些化合物在生理上的效益也有完整文獻記載，未來研究應著重於結構、組成、萃取方法及培育，進而能產生出更好療效的雲芝。通常分離純化的設備和操作成本遠大於發酵生產過程。經濟可行的分離程序為多醣生產的另一重大關鍵。

胞外多醣為雲芝菌液態培養的重要產物，隨著雲芝菌絲體與胞外多醣濃度的增加，發酵液的黏度亦快速增加，造成了取樣時的困難。氧氣的供給不足，進而影響菌絲體與胞外多醣的生長。因此，高黏度也是一項值得深入研究的問題。菌絲體形態的變化也會改變雲芝菌絲體與胞外多醣產量，尤其在添加Agar時的菌絲體有大幅的提升，除了黏度的影響外，並針對Agar的物性去探討與研究，希望在未來能適用於不同的菌種上。

此外，雲芝多醣體為一種抗腫瘤、提升機體免疫功能的多醣類物質，是一種極有前途的抗腫瘤藥物，值得對其進行深入和廣泛地研究，以開發出更好、更適宜臨床需要的新劑型。

## 參考文獻

丁懷謙，“食藥用菇多醣體之免疫生理活性”，食品工業，32(5)：28-42，2000。

丁湖廣，“雲芝的特性及人工栽培技術”，特種經濟動植物，7：39，2004。

王伯徹，“藥用真菌系列報導(八)雲芝”，食品工業，22(10)：59-62，1990。

王伯徹、陳啟楨、華傑，“食藥用菇類的培養與應用”，財團法人食品工業發展研究所，1998。

王伯徹，“食藥用菇保健食品之開發”，食品工業，32(5)：18-27，2000。

王伯徹，“具開發潛力食藥用菇介紹”，食品工業，32(5)：1-17，2000。

王培銘、黃定國，“氣動攪拌式發酵槽”，食品工業，33(11)：13-25，2001。

王俊明、周自雲、胡景江、曹支敏，“雲芝液體培養過程中胞外酶與胞外多醣的變化”，西北林學院學報，19(2)：22-24，2004。

卯曉嵐，“中國的食用真菌和藥用大型真菌”，微生物學通報 216，290-297，1989。

李秉征，“以液態培養生成香菇菌絲體之研究”，東海大學化工所碩士論文，2001。

吳文騰，“發酵槽之設計”，生物產業，11(2)：91-97，2000。

周選圍、林娟，“雲芝的生物學特性與栽培技術”，化工技術，4：23，1999。

邱紫文、劉懷勝，“生化反應器概述”，化工技術，3(3)：86-92，1995。

柯銀府，郭尚鑫，楊芳鏘，“脂肪酸添加對靈芝液體培養之影響”，第三屆生化工程研討會論文集，六月廿七日，國立東華大學，台灣121-124，1998。

徐敬衡、周柏甫，“絲狀微生物之菌絲球粒徑控制生物回應器之新設計”，化工技術，10(4)：102-119，2002。

崔黎、趙岩、馮朴蓀，“雲芝深層培養生產木質素降解酶的研究”，生物工程學報，10(2)：190-193，1994。

許英欽，“探討麩胺酸的添加和供氧量對液態發酵生產裂褶菌多醣體之研究”，中央大學化工與材料所碩士論文，2002。

張培玉、楊革、鄭恆河，“雲芝菌絲體生長的營養需求及液體發酵研究”，曲阜師範大學學報，24(3)：65-68，1998。

張淑芬，“食藥用菇類搖瓶液體培養條件之探討”，食品工業，33(7)：39-46，2001。

張德玉，“培養條件對靈芝菌絲體超氧歧化酶(SOD)生成之影響”，東海大學化工所碩士論文，2002。

黃仁彰，“菇類多醣製劑的研發與應用”，食品工業，32(10)：46-58，2000。

黃進發，“食藥用菇的抗氧化 SOD 之研發與利用”，食品工業，32(5)：43-53，2000。

黃惠琴，“樟芝菌絲深層培養之研究”，東海大學化工所碩士論文，2001。

賴慶亮釋，水野卓、川合正允原著，“菇類的化學生化學”，國立編譯



館，1997。

賴進此，“菇類活性物質的分離及其應用”，食品工業，35(5)：29-38，2003。

楊芳鏘、楊明哲，“菌絲狀真菌之深層培養技術”，化工技術，9(2)：176-189，2001。

楊明哲，“控制菌體形態對靈芝液態培養之影響”，東海大學化工所博士論文，2006。

楊道彩，“碳、氮源對雲芝胞外漆酶分泌的影響”，荷澤師專學報，21(4)：42-44，1999。

詹宏偉，“不同培養方式對靈芝菌絲體生理活性成分之影響”，東海大學化工所碩士論文，2003。

劉慈欣，“液態培養環境對北冬蟲夏草(*Cordyceps militaris*)菌絲體生長及機能性成分之影響”，東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文，2004。

劉波，“中國藥用真菌”，山西人民出版社 2228 頁，1984。

鄧百萬、陳文強，“雲芝液態培養及富集硒研究”，氨基酸和生物資源，21-24，2000。

潘繼紅、王登、查曉紅、孫莉茵，“雲芝深層培養及發酵液的應用研究”，中國野生植物資源，19(1)：19-21，1998。

戴郁軌、朱凱俊，“真菌名詞辭典”，名山出版社 2467 頁，1982。

龐戰軍、陳瓊、周玫，“雲芝多醣增強巨噬細胞 M-CSF 的表達與分泌”，免疫學雜誌，15(4)：245-252，1999。

免疫情報研究會，<http://www9.ocn.ne.jp/%7Eimmunit/>。

Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K., and Sussman, A. S. The Fungi. Vol. IVA. A Taxonomic Review with Keys: Ascomycetes and Fungi Imperfecti. Academic Press, Inc. New York, 621pp., 1973a.

Allen D. G. and Robinson C. W., “Measurement of Rheological Properties of Filamentous Fermentation Broths” ,Chem. Eng. Sci. 45 : 37-48, 1990.

Burkholder, P. R., Sinnot, E. W., and Am. J. Bot., 32 : 424, 1945.

Carlsen, M., Spohr, A. B., Nielsen J., and Villadsen, J., “Morphology and Physiology of an Alpha-Amylase Producing Strain of *Aspergillus oryzae* During Batch Cultivations.” , Biotechnol. Bioeng., 49 : 266-276, 1997.

Chu, K.K.W., Ho, S.S.S., and Chow, A.H.L. “*Coriolus versicolor*: A Medicinal Mushroom with Promising Immunotherapeutic Values.” , J. Clinical Pharmacology, 42 : 976-984, 2002.

Heydarian S. M., Ison A. P., Ayazi Shamlou P., “Rheology of Filamentous Microorganisms, Submerged Culture” , University College London, London, United Kingdom, Encyclopedia of Bioprocess Technology, 5 : 2278-2289, 1999.

Ju, L. K., Ho, C. S., and Shanahan, J. F. “Effects of Carbon Dioxide on the Rheological Behavior and Oxygen Transfer in Submerged Penicillin Fermentations.” , Biotechnol. Bioeng., 38 : 1223-1232, 1991.

Kawagoe, M., Kawakami, K., Nakamura, Y., Naoe, K., Mili, K., and Noda, H. “Submerged Culture of *Tricholoma matsutake* Mycelium in Bubble Column Fermentors.” , J. Biosci. Bioeng., 1 : 116-118, 1999.

Kemblowski Z. and Kristiansen B., “Rheometry of Fermentation

Liquids” , *Biotechnol. Bioeng.*, 28 : 1474-1483, 1986.

Kobayashi, H., and H. Suzuki, “Studies on the Decomposition of Raffinose by Alpha-Galactosidase of Mold(II). Formation of Mold Pellet and its Enzyme Activity” , *J. Ferment. Technol.*, 50 : 625-629, 1972.

Litchfield, J. H., “Submerged Culture of Mushroom Mycelium” in "Microbiol Technology", ed. Peppler, H. J., Reinhold Publishing Corporation, USA, 107-144, 1967.

Lounes, M., Audet, J., Thibault, J. and LeDuy, A., “Description and Evaluation of Reciprocating Plate Bioreactors” , *Bioproc. Eng.*, 13 : 1-11, 1995.

Metz, B., and Kossen, N. W. F. “The Growth of Molds in the form of Pellets: Literature Review.” , *Biotechnol. Bioeng.*, 19 : 781-799, 1977.

Mizuno, T., Sakai, T., and Chihara, G., “Health Foods and Medicinal Usages of Mushrooms.” , *Food Reviews International* 11 : 69-81, 1995b.

Mohsoni, M. and Allen, D. G., “The Effect of Particle Morphology and Concentration on the Directly Measured Yield Stress in Filamentous Suspensions” , *Biotechnol. Bioeng.*, 48 : 257-265, 1995.

Olsvik E., Tucker K. G., Thomas C. R. and Kristiansen B., “Correlation of *Aspergillus niger* Broth Rheological Properties with Biomass Concentration and the Shape of Mycelial Aggregates” , *Biotechnol. Bioeng.*, 42 : 1046-1052, 1993.

Peters, H. U., Herbst, H., Hesselink, P. G. M., Lunsdort, H., Schumpe, A. and Deckwer, W. D. “The Influence of Agitation Rate on Xanthanproduction by *Xanthomonas campestris.*” , *Biotechnol. Bioeng.*, 34 : 1393-1397, 1989.

Park, E. Y., Y. Koike, K. Higashiyama, S. Fujikawa and M. Okabe, "Effect of Nitrogen Source on Mycelial Morphology and Arachidonic Acid Production in Cultures of *Moruerella alpine*" , J. Biosci. Bioeng., 88 : 61-67, 1999.

Roukas, T., and Kyriakides, M. L. "Production of Pullulan from Beet Malasses by *Aureobasidium Pullulans* in a Stirres Tank Fermentor." , J. Food Eng. 40 : 89-94, 1999.

Riley G. L., Tucker K. G., Paul G. C., and Thomas C. R., "Effect of Biomass Concentration and Mycelial Morphology on Fermentation Broth Rheology" , Biotechnol. Bioeng., 68(2) : 160-172, 2000.

Shamlou P. Ayazi and Edwards M. F., "Power Consumption of Helical Ribbon Mixers in Viscous Newtonian and Non-newtonian Fluids" , Chem. Eng. 40 : 1773-1781, 1985.

Smith, M. D., and Ho, C. S. "The Effect of Dissolved Carbon Dioxide on Penicillin Production: Mycelial Morphology." , J. Biotechnol., 2 : 347-363, 1985.

Stasinopoulos, S. J., and Seviour, R. J., "Stimulation of Exopolysaccharide Production in the Fungus *Acremonium pericinum* with Fatty Acids" , Biotechnol. Bioeng., 36 : 778-782, 1990.

Wu, W. T., Huang, T. K., Wang, P. M., and Chan, J. W. "Cultivation of *Absidia coerulea* for Chitosan Production in a Modified Airlift Reactor." , J.Chin.Inst.Chem. Engrs.,32(3) : 235-240, 2001.

Warren S. J., Keshavarz-Moore E., Ayazi Shamlou P., M. D. Lilly, C. R. Thomas , and Dixon K., "Rheologies and Morpholoies of Three Actinomycetes in Submerged Culture" , Biotechnol. Bioeng., 45 : 80-85, 1995.

## 附錄 A

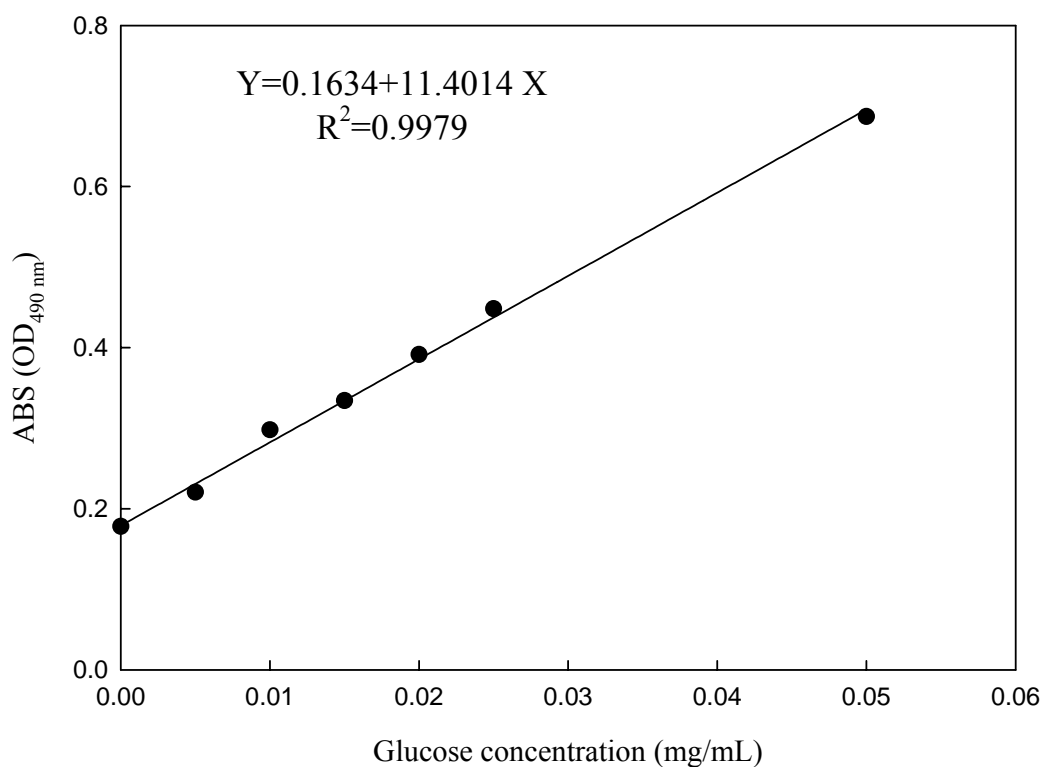


圖 A 葡萄糖檢量線圖

葡萄糖檢量線製作方法：

- (1)精確秤取 D-Glucose 標準品為 1 g，容於 100 mL 的蒸餾水中。
- (2)取上述溶液 5 mL 稀釋至 100 mL 備用(0.5 mg/mL)
- (3)取步驟(2)的溶液 1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、10 mL 分別加水稀釋至 100 mL。
- (4)分別取上述所配得的標準溶液，濃度分別為：  
0.005、0.01、0.015、0.02、0.025、0.05 mg/mL 各為 2 mL，以及蒸餾水 2 mL(作為空白對照用)。

(5)各加入 1 mL 濃度為 5 % 酚溶液，最後再加入 5 mL 的濃硫酸，靜置 10 分鐘後震盪混合，混合後放入 25 °C 水浴中 15 分鐘。

(6)將上述反應後之樣品以分光光度計於 495 nm 波長測量吸收值，即可繪出多醣檢量線之關係圖。

## 附錄 B

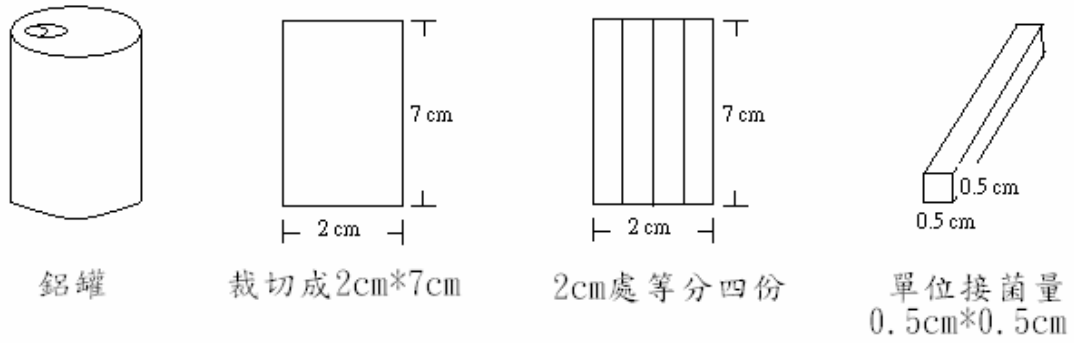


圖 B 菌體切割器