

# 第三章 材料與方法

## 一、菌株

*Polyporus umbellatus* (BCRC 36435)購於新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。

## 二、實驗藥品

Yeast Extract Powder (試藥特級, HIMEDIA)

Malt Extract Powder (試藥特級, HIMEDIA)

Peptone (DIFCO)

Glucose (試藥特級, 林純藥)

Sucrose (試藥特級, 和光純藥)

Maltose (試藥特級, 林純藥)

Fructose (試藥特級, SIGMA)

FeSO<sub>4</sub> (試藥特級, 林純藥)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (試藥一級, 聯工化學)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (試藥一級, 聯工化學)

Phenol (聯工化學廠)

YM broth (DIFCO)

藥用酒精 (台灣菸酒公司)

PDA (HIMEDIA)

PDB (HIMEDIA)

### 三、實驗儀器設備

恆溫培養箱：FIRSTEK：RI-150

低溫迴轉式震盪培養箱：FIRSTEK：ORBITAL S302R

分光光度計：GENESYS SPECTROPHOTOMETER 20

pH meter：SUNTEX TS-1

桌上型高速離心機：HETTICH EBA 12

高溫蒸氣臥式滅菌釜：HUXLEYHL-340 VERTICAL TYPE

高壓蒸氣直立式滅菌釜：YIM AI

烘箱：光勝儀器製造所

電子精秤：Precisa 3100C

電磁攪拌機：CORNING

均質機：OSTER REGENCY

無菌操作檯：海天科學股份有限公司

攪拌式發酵槽：CMF-5

氣舉式發酵槽：頂生儀器

低溫冷卻循環槽：FIRSTEK MODEL-B4 01L

空氣幫浦：SWAN DR-115

酸鹼電極：HAMILTON EASYFERM 325

pH meter : SUNTEX SP-2200

減壓濃縮機 : BUCHI RE111

層析管柱 :

新丹企業股份有限公司

PolySep-SEC-P 4000

PolySep-SEC-P 5000

保護管注裝置 : 新丹企業股份有限公司

PolySep-GFC-P

#### 四、培養基組成

(一) 菌種培養基 : Potato Dextrose Agar (PDA)

(二) 菌醃培養基 : Potato Dextrose Broth (PDB)

(三) 液體培養基 :

(1) 基礎培養基 :

組 成	含 量(W/V%)
Glucose	2%
Bacto Peptone	0.25%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05%
FeSO <sub>4</sub>	0.01%

(2) 發酵槽培養基：

組 成	含 量(W/V%)
Glucose	3%
Yeast Extract Powder	0.5%
$K_2HPO_4$	0.05%
$KH_2PO_4$	0.05%
$FeSO_4$	0.1%

## 五、發酵槽構造

### (一) 攪拌式發酵槽 (Stirred tank fermentor)

#### 1. 攪拌式發酵槽的結構

實驗中使用之攪拌式發酵槽為總容積 5 L 的玻璃槽體，容許運載量最高為 4 L，由槽外底部加熱器及槽內、底部冷卻管調控槽中溫度，有一通氣管外接氣體流量計以監控槽體通氣量，兩組攪拌葉片藉由轉動軸的轉動來帶動槽內培養液的流動混合。

#### 2. 攪拌式發酵槽葉片結構

攪拌式發酵槽的攪拌葉片一般常用為標準式渦輪扇葉 (Standard turbine impeller)，整體外徑為 3 英吋，內徑則為 5/16 英吋，葉片與轉動軸的角度為 90 度；另一種為船推進器型扇葉 (Marine type impeller)，外徑為 3 英吋，每片葉寬 1 英吋，葉片與轉動軸呈現 45 度角，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)，然而工業發展較多利用標準式渦輪扇葉，故實驗採用標準葉片進行。



圖七 攪拌式發酵槽之攪拌葉片

Fig.7 Impellers of stirred tank fermentor

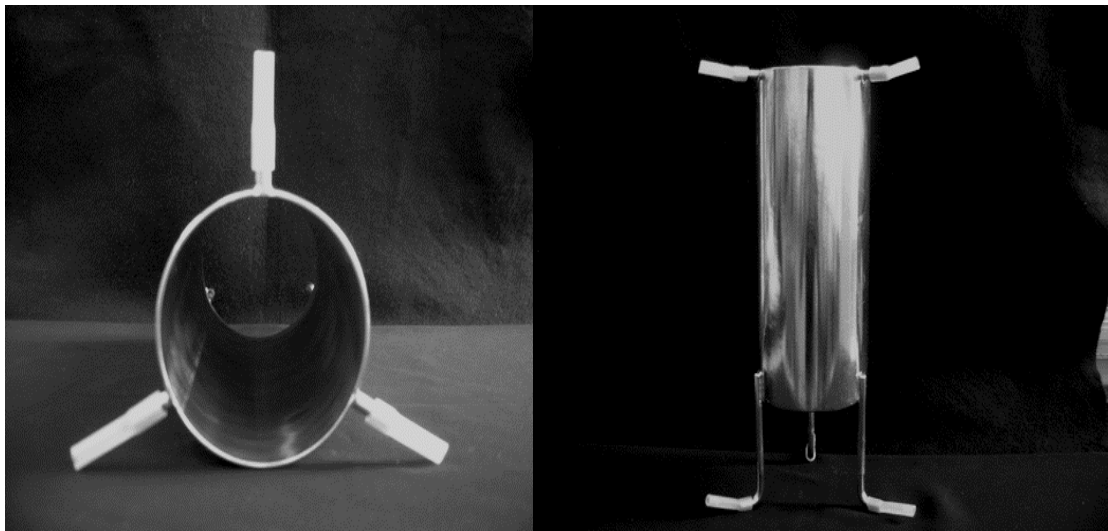
## (二) 氣舉式發酵槽 (Airlift fermentor)

### 1. 氣舉式發酵槽結構

氣舉式發酵槽為總容積 7 L 的玻璃槽體，最大載量為 6 L，槽體中央有一不鏽鋼材質導流管 (Draught tube)，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. 導流管構造

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。氣舉式發酵培養去除導流管部分，則稱為氣泡塔式發酵槽培養，也是氣舉式發酵之一種。



圖八 氣舉式發酵槽之導流管

Fig.8 Draught of airlift fermentor

## 六、實驗流程

將豬苓菌種接於 PDA 培養皿及斜面試管中，25 °C 下活化 7 天



取出菌絲塊接種於裝有 50 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均勻 30 秒

6% ↓ 菌液

接入於不同的液態培養條件下培養



菌絲體

發酵液



測定胞內多醣、菌體乾重

測定 pH、殘糖、胞外多醣濃度及分子  
子量

## 七、菌種保存

在真菌未被利用作為任何菌體生長和產物生成之前，斜面生長培養是最基本維持菌體活性的保存方式。

1. 以每升含有 39 克之 PDA 均勻融解於蒸餾水中，以磁石攪拌並加熱致溶解。
2. 於每支試管中加入 8 ml 溶解後之 PDA。
3. 將試管口以蓋子蓋住並在外層覆蓋上鋁箔紙，置入殺菌釜中殺菌 20 分鐘。
4. 殺菌後取出置入無菌操作台中，除去鋁箔紙並傾斜放置 1~2 天。
5. 確定其無污染後，將菌種接種於 PDA 斜面培養基中央，生長數天後，置入 4 °C 冰箱中保存備用 (Stock culture)。

## 八、菌體培養

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。



## 九、菌醃培養

在無菌操作台內，將 PDA 上培養 7 天的菌絲以直徑 6 mm 的玻璃吸管沿著培養皿邊緣切取數個菌絲塊（實驗中，一個 6 mm 直徑菌絲塊定義為一個單位），然後取 2 單位菌絲塊接種於裝有 50 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，此即為菌醃培養。

## 十、搖瓶培養

探討不同的碳與氮源培養基及其濃度對於豬苓菌體生長及其機能性成分產量的影響。

方法：

### 1. 較適碳、氮源試驗：

(1) 以 250 ml 三角瓶，分別裝入下列培養基 50 ml

- a. 嘗試利用不同碳源培養：分別使用葡萄糖、麥芽糖、果糖及蔗糖各 2% 作為碳源，其他條件與基礎培養基相同。
- b. 嘗試利用不同氮源培養：分別使用酵母萃出物、麥芽萃出物及蛋白胨 (Peptone) 各 0.25% 作為氮源，其他條件與基礎培養基相同。

置入滅菌釜中以 121 °C、20 分鐘進行滅菌後，冷卻備用。

(2) 液態菌醃以均質機打碎 30 秒後，取 3 ml (6% 的接菌量) 接入已

滅菌內含 50 ml 培養基的 250 ml 三角瓶中。

(3) 置入溫度 25 °C、轉速 150 rpm 的震盪培養箱中培養 9 天。

(4) 每天測量 pH 值，及分析其菌體乾重、胞內胞外多醣濃度、殘糖量。

(5) 重複 1~4 步驟 3 次，取平均值。

2. 較適碳氮源濃度試驗：

以 250 ml 三角瓶，分別裝入下列培養基 50 ml

a. 嘗試不同碳源濃度培養：分別加入 1%、2%、3%、4% 葡萄糖濃度作碳源，其他與基礎培養基不變。

b. 嘗試不同氮源濃度培養：分別加入 0.1%、0.2%、0.25%、0.3%、0.4%、0.5% 酵母萃出物濃度作氮源，其他與基礎培養基不變。

以上述方法步驟進行實驗，試驗濃度對菌體生長及多醣體產量之影響。

## 十一、發酵槽培養

探討不同發酵環境，對豬苓菌體生長及其機能性成分產量的影響。

(一) 發酵槽培養：

1. 攪拌式發酵槽培養：採用傳統渦輪葉片之攪拌器，總容量為

5 L，裝載量為 3 L。

2. 氣舉式發酵槽培養：本實驗以攪拌式發酵槽除去攪拌葉片替代，而僅利用槽底原有的環型空氣噴嘴因氣泡上升來帶動培養基循環流動與混和，總容量為 5 L，裝載量為 4 L。

## (二) 環境控制：

1. 在兩種發酵槽中各以不同的通氣量進行培養
  - a. 0.5 vvm    b. 1 vvm
2. 在兩種發酵槽中分別進行不同的培養方式
  - a. 批次培養    b. 饋料培養

## (三) 方法

### 1. 通氣量對豬苓生長之影響：

- (1) 將最適碳、氮源濃度培養基置入發酵槽中，以 0.1N HCl 將 pH 值調至 6.0，然後將整個槽體置入直立式滅菌釜中，以 121 °C 滅菌 20 分鐘，待殺菌冷卻至 70 °C 左右，取出置入於無菌操作台中，等待冷卻至 25 °C 左右。
- (2) 液態菌醃以均質機打碎 30 秒後，以 6% 的接菌量接種至發酵槽中。
- (3) 將槽體溫度控制在 26 °C，攪拌式發酵槽的轉速設定為 150 rpm，分別以 0.5 vvm、1 vvm 的通氣量培養 7 天。
- (4) 每天紀錄 pH 值及分析菌體乾重、胞內胞外多醣體濃度、殘糖量、胞內外多醣分子量。

(5)重複 1~4 步驟 3 次，取平均值。

## 2. 培養方式對豬苓生長之影響：

### 批次培養 (Batch culture)：

(1)將最適碳、氮源濃度培養基置入發酵槽中，以 0.1 N HCl 將 pH 值調至 6.0，然後將整個槽體置入直立式滅菌釜中，以 121 °C 滅菌 20 分鐘，待殺菌冷卻至 70 °C 左右，取出置入於無菌操作台中，等待冷卻至 25 °C 左右。

(2)液態菌醃以均質機打碎 30 秒後，以 6% 的接菌量接種至發酵槽中。

(3)將槽體溫度控制在 26 °C，攪拌式發酵槽的轉速設定為 150 rpm，分別以 0.5 vvm、1 vvm 的通氣量培養 7 天。

(4)每天紀錄 pH 值及分析菌體乾重、胞內胞外多醣體濃度、殘糖量、胞內外多醣分子量。

(5)重複 1~4 步驟 3 次，取平均值。

### 饋料培養 (Fed-Batch culture)：

(1)將培養基至入發酵槽中，但培養基中碳源濃度減為 1%、氮源濃度減為 0.25% 至入發酵槽中，以 0.1 N HCl 將 pH 值調至 6.0，然後將整個槽體置入直立式滅菌釜中，以 121 °C 滅菌 20 分鐘，待殺菌冷卻至 70 °C 左右，取出置入於無菌操作台中，等待冷卻至 25 °C 左右。

(2)液態菌醃以均質機打碎 30 秒後，以 6% 的接菌量接種至發酵槽中。

- (3)將槽體溫度控制在 26 °C，攪拌式發酵槽的轉速設定為 150 rpm，通氣量為 1 vvm，培養 3 天。
- (4)在發酵後第三天再將培養基濃度添加至 3%碳源、0.5%氮源濃度，繼續培養 4 天。
- (5)每天紀錄 pH 值及分析菌體乾重、胞內胞外多醣體濃度、殘糖量、胞內外多醣分子量。
- (6)重複 1~4 步驟 3 次，取平均值。

## 十二、分析方法

### (一) 菌體乾重

將發酵液以轉速 3000 rpm 離心機離心 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

豬苓多醣濃度的測定步驟是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。

#### 1. 多醣的分離：

##### (1) 胞內多醣：

將發酵液利用過濾所得的菌絲體加入蒸餾水 1:2(W/V) 混勻，將此菌絲體以電磁攪拌器攪拌一分鐘，於 90 °C 熱水浴萃取 1 小時，

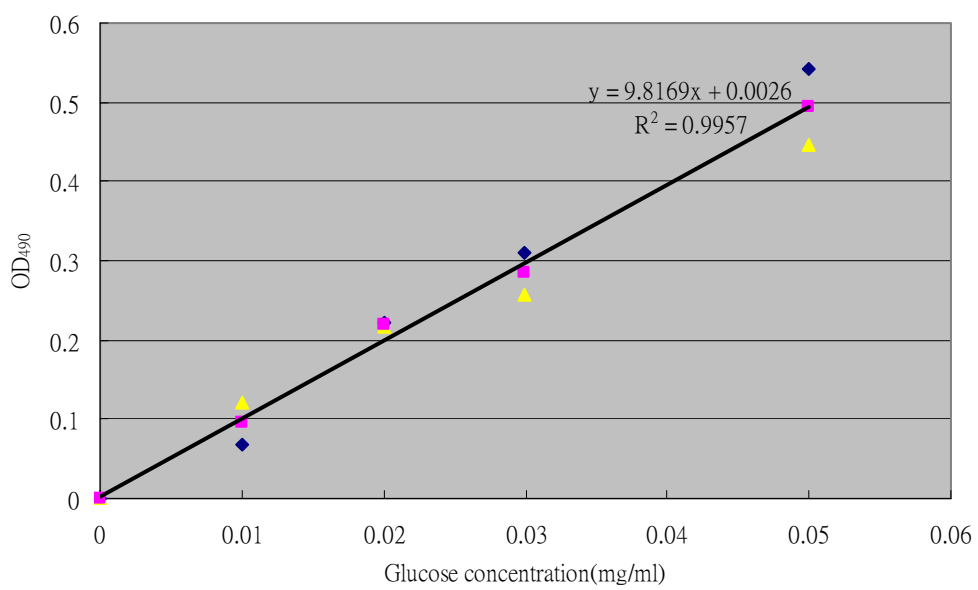
再以 3000 rpm 離心 20 分鐘，以濾紙過濾，取菌絲體萃取濾液 1 ml，加入 4 ml 95% 的酒精，於 4 °C 下靜置 24 小時後，以 3000 rpm 離心 20 分鐘，傾出上層液，用 75% 酒精 5 ml 清洗沉澱物，再以 3000 rpm 離心 20 分鐘，去除上層液，再以 75% 酒精重複洗滌兩次，最後將此酒精沉澱物置於 70 °C 烘箱中除去殘留的酒精。

## (2) 胞外多醣：

將過濾除去菌絲體後的發酵液，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，經 3000 rpm 離心 20 分鐘，傾出上層液，用 75% 酒精 5 ml 清洗沉澱物，再以 3000 rpm 離心 20 分鐘，去除上層液，再以 75% 酒精重複洗滌兩次，最後將此酒精沉澱物置於 70 °C 烘箱中除去殘留的酒精。

## 2. 酚—硫酸比色法

- (1) 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% 酚溶液，最後加入 5 ml 的濃硫酸，靜置 10 分鐘後振盪混合，混合後 25 °C 水浴 15 分鐘。
- (2) 將上述反應後之樣品以分光光度計 490 nm 波長測吸光值 (ABS)。
- (3) 由已知濃度之標準多醣檢量線 (圖九)，計算所含多醣濃度。



圖九 多醣標準曲線

Fig.9 Standard curve of polysaccharides

### (三) 發酵液還原糖量分析

利用修正後的二硝基水楊酸法(Dinitrosalicylic acid, DNS)(Miller, 1959)檢測法的試劑如下：

DNS 試劑 (component)	濃度 (W/V%)
3,5-dinitrosalicylic acid	1.0
Phenol	0.2
Sodium sulfite	0.05
Sodium hydroxide	1.0
Sodium potassium tartarate	40.0

A 液：將 1% (w/v) 之 3,5-dinitrosalicylic acid 及 0.2% (w/v) 之酚溶於 1% (w/v) 之氫氧化鈉中。

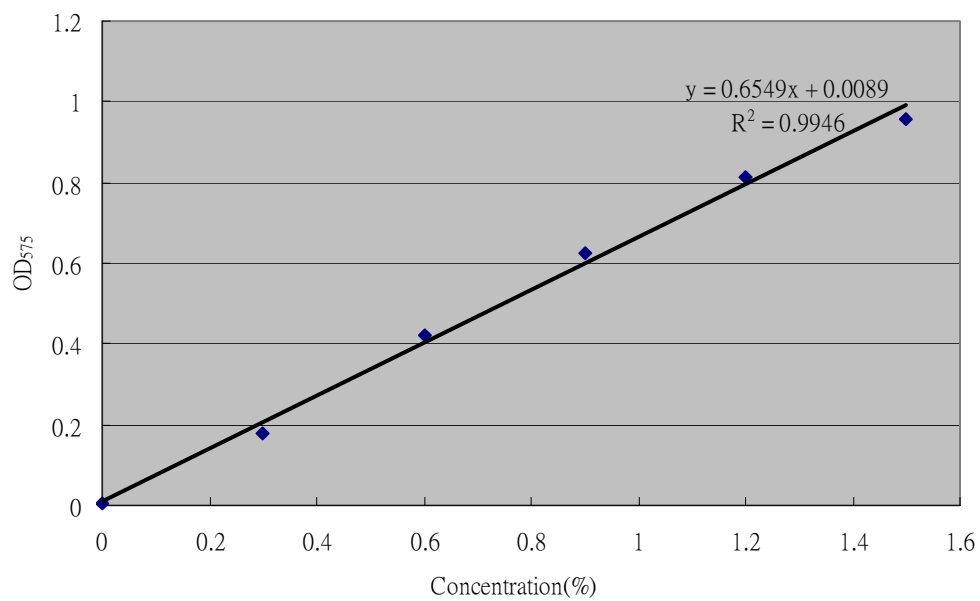
B 液：5% (w/v) 硫酸鈉。

C 液：40% (w/v) 酒石酸鉀鈉 (Sodium sulfite)。

D 液：於使用前將 1 ml 之 B 液加入 99 ml 之 A 液中。

將發酵液稀釋至適當濃度後，取 3 ml 於有蓋試管中，加入 D 液 3 ml，於 100 °C 下水浴加熱 15 分鐘，立刻加入 1 ml C 液，沖水冷卻至室溫後，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 (圖十)，以蒸餾水重複上述步驟作為空白組。





圖十 還原糖標準曲線

Fig.10 Standard curve of residual sugar

#### (四) 多醣分子量的分析

實驗中多醣體分子量分析步驟是將配置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。

##### 1. 胞內多醣分子量

將發酵液利用過濾所得的菌絲體加入蒸餾水 1:2(W/V) 混勻，將此菌絲體以電磁攪拌器攪拌一分鐘，於 90 °C 熱水浴萃取 1 小時，再以 3000 rpm 離心 20 分鐘，以濾紙過濾，取菌絲體萃取濾液 15 ml，經減壓濃縮成 1 ml，加入 4 ml 95% 的酒精，於 4 °C 下靜置 24 小時後，多醣由發酵液中分離出來，以 3000 rpm 離心 20 分鐘，傾出上層液，用 75% 酒精 5 ml 清洗沉澱物，再以 3000 rpm 離心 20 分鐘，去除上層液，再以 75% 酒精重複洗滌兩次，將此酒精沉澱物置於 70 °C 烘箱中除去殘留的酒精，取得多醣沉澱粉末，加入 1 ml 蒸餾水復溶，在經 0.45  $\mu$ m 微過濾膜過濾，以 20  $\mu$ L 的注入量進行膠體滲透層析儀 (GPC) 分子量測定。

##### 2. 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 °C 下靜置 24 小時，使多醣由發酵液中分離出來，經 3000 rpm 離心 20 分鐘收集得到多醣沉澱物，傾出上層液，用 75% 酒精 5 ml 清洗沉澱物，再以 3000 rpm 離心 20 分鐘，去除上層液，再以 75% 酒精重複洗滌兩次，將此酒精沉澱物置於 70 °C 烘箱中

除去殘留的酒精，取得多醣沉澱粉末，加入 1 ml 蒸餾水復溶，在經 0.45  $\mu\text{m}$  微過濾膜過濾，以 20  $\mu\text{L}$  的注入量進行膠體滲透層析儀(GPC) 分子量測定。

### 3. GPC 操作條件

分析管柱：PolySep-SEC-P 4000 與 PolySep-SEC-P 5000 雙管柱串聯

流速：0.8 ml/min

移動相：去離子水

多醣分子量標準品：Dextran (Mw 11700、44100、123400、32600 及 848200 Da)。

高效能液相層析幫浦：aLCOTT 760 HPLC Pump

RI Detector：ERC RI detector 7515A

積分儀：Chromatocoder 21

### 4. 分子量測定

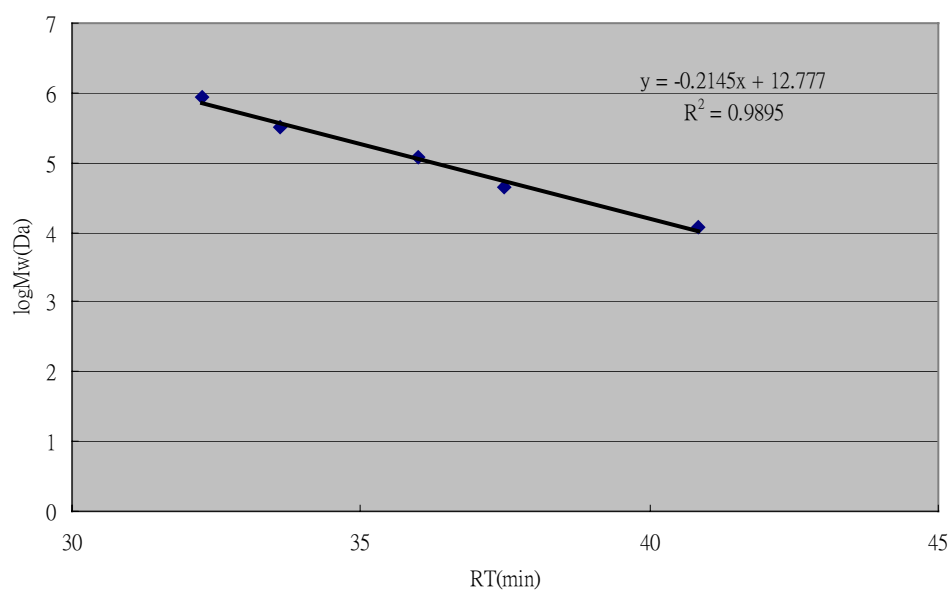
由已知標準品分子量標準曲線（圖十一），計算其分子量分佈。

#### （五）pH 值

利用 pH meter 及 pH 電極測定豬苓發酵液的 pH 值。

#### （六）統計分析

利用 SAS 軟體分析，以單因子變異數之當肯分析，設定顯著性為  $p < 0.05$ 。



圖十一 分子量標準曲線

Fig.11 Standard curve of molecular weight