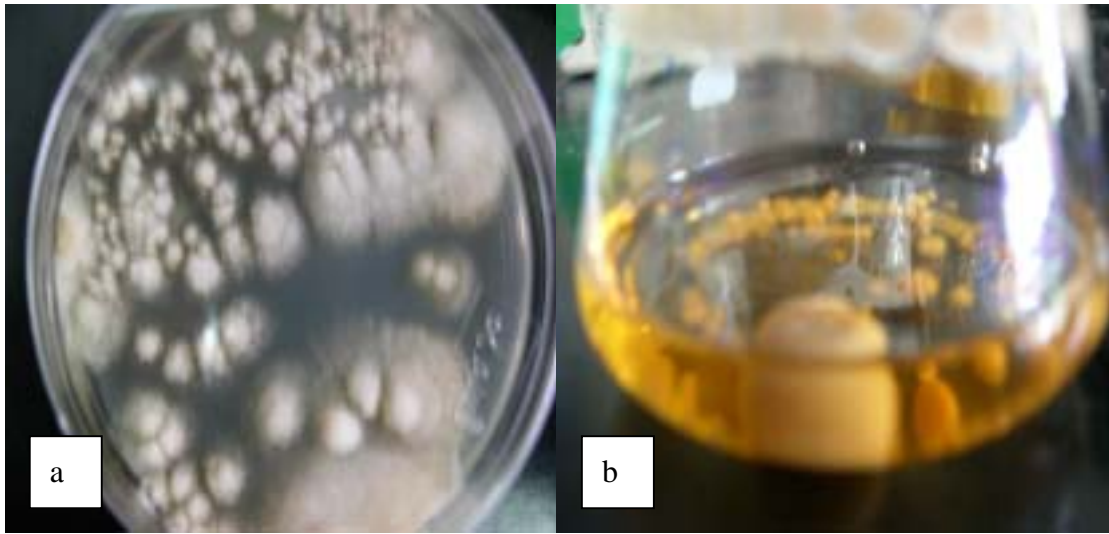


第四章 結果與討論

一、搖瓶培養

豬苓菌株劃線培養，形成灰白色菌絲體（圖十二-a），取一個單位菌絲塊接於另一培養皿進行活化，再將活化之菌絲接入三角瓶作菌醃培養培養 7 天（圖十二-b），培養之菌醃取 6% 接入不同條件下進行實驗（圖十三）。





圖十二-a 豬苓菌絲三分劃線培養之培養皿（第七天）

圖十二-b 豬苓菌醃培養之型態（第七天）

Fig.12 a. Plate of *P. umbellatus* on day 7.
b. Morphological starter of *P. umbellatus* in the flask on day 7



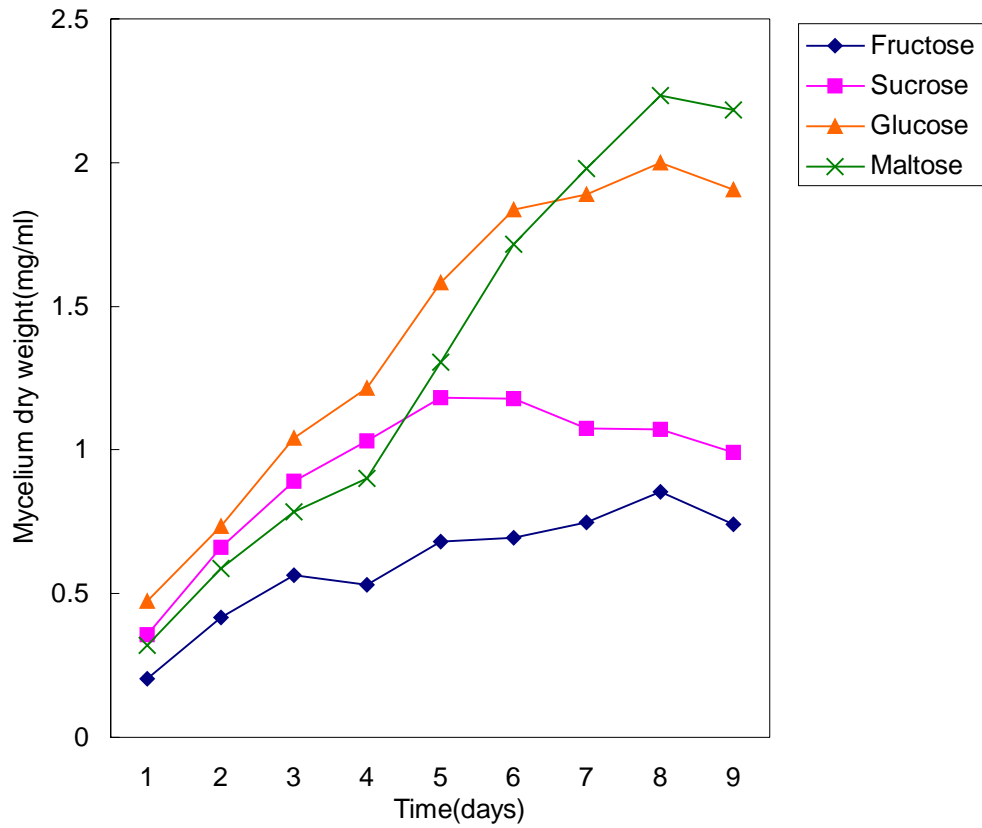
圖十三 搖瓶培養菌絲型態（第七天）

Fig.13 Morphological pellet of *P. umbellatus* in the flask on day 7.

(一) 不同的碳源培養對於豬苓 *P. umbellatus* 生長之影響

1. 對豬苓菌絲體生長影響

本實驗參考願等人(2001)的培養基，作為實驗中的基礎培養基質。而以葡萄糖、麥芽糖、果糖、蔗糖各2%作為碳源，其他條件與基礎培養基相同，欲探討不同的碳源培養對豬苓 *P. umbellatus* 的菌絲生長及胞內、外多醣體生產的影響，並尋找出豬苓 *P. umbellatus* 其較適生長之碳源。由圖十四顯示，於九天的發酵培養期間，在使用不同碳源實驗各組別中，第二至第五天時，菌體穩定的代謝利用碳源，菌體生長快速的繁殖分裂，第七至第八天期間，菌體生長趨於平穩，而後有逐漸下降的趨勢。其中以葡萄糖及麥芽糖組別，較有利於豬苓 *P. umbellatus* 之菌絲體的生長，第五天後菌絲體快速生長，於第八天菌絲體生長最大值；而以果糖及蔗糖組別時，則較不適合於豬苓 *P. umbellatus* 菌絲體的生長，於第五天以後生長速度則趨於平緩，且於第七天以後有下降的現象。而各碳源試驗中以使用麥芽糖對於豬苓 *P. umbellatus* 菌絲體生長所得的效果最佳，至第八天左右時達最大值，此時菌體乾重為每毫升發酵液中有 2.23 mg；其次為葡萄糖組於第八天時菌體乾重 2.00 mg/ml；蔗糖作為碳源組，在第五天時菌體乾重 1.18 mg/ml；而以果糖組生長較平穩，其菌絲體乾重為 0.85mg/ml。



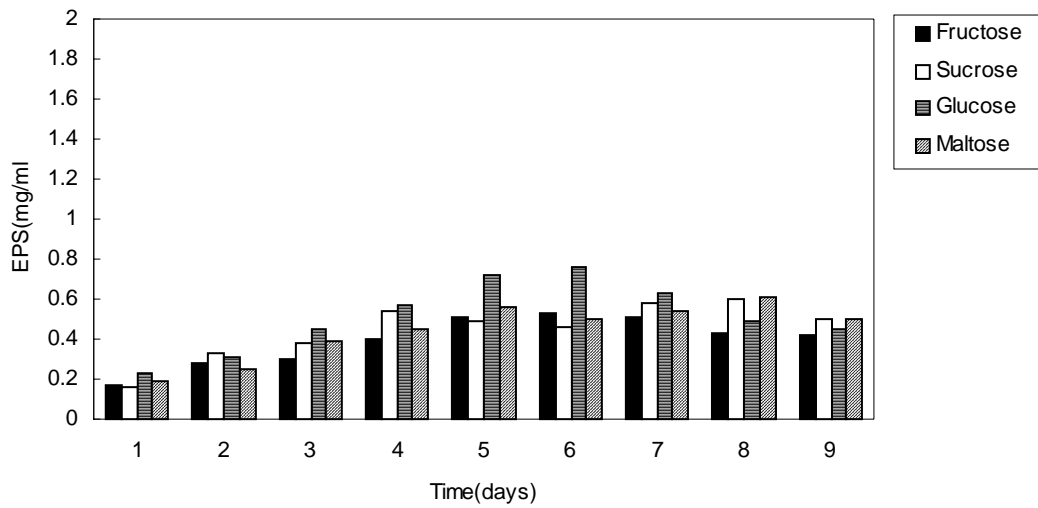
圖十四 不同碳源對於豬苓發酵期間菌體乾重之影響

Fig.14 Effect of different carbon sources on mycelium dry weight in the fermentation of *P. umbellatus*.

2.對豬苓胞內與胞外多醣體產量影響

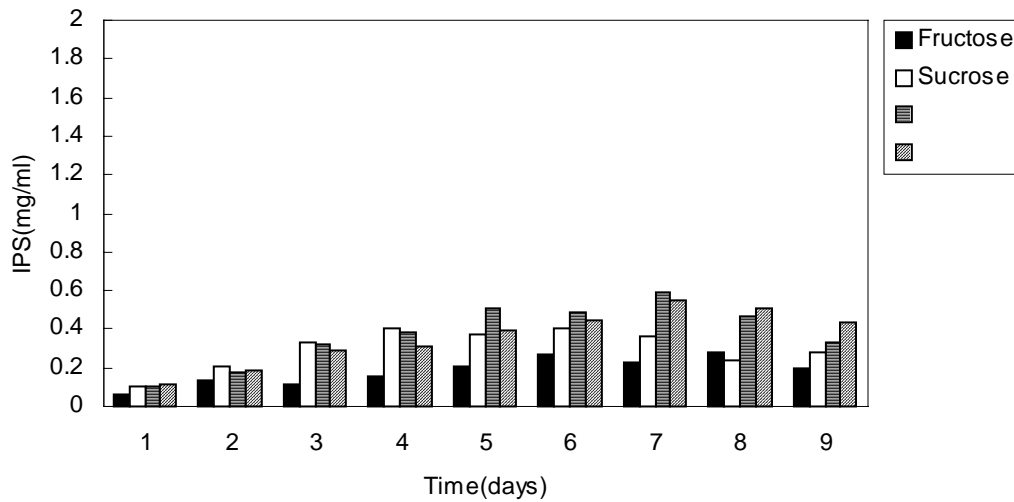
以不同的碳源培養進行實驗，在九天的豬苓 *P. umbellatus* 發酵培養期間，由圖十五可以發現四個實驗組於培養過程中，其胞外多醣體產量皆很平穩的代謝生產，其中以葡萄糖組之胞外多醣體產量最佳，於第五及第六天有較好的產量，達到 0.72 mg/ml 及 0.76 mg/ml 的產量，可能第五天及第六天時，因菌絲體生長到達較為平穩的狀態，此期間胞外多醣體快速的代謝生產所致。

由圖十六可以發現，果糖組較不適合胞內多醣體的生產，產量皆低於其他組別，最大產量為 0.28 mg/ml；蔗糖組於第二天至第四天時胞內多醣產量較其他組別佳，最大產量為 0.41 mg/ml，顯示蔗糖利於培養前期胞內多醣的代謝生產；而麥芽糖及葡萄糖作為碳源組，於第五天至第八天期間，胞內多醣體快速的代謝生長，於第七天達到最大值 0.54 mg/ml 及 0.59 mg/ml，可能與菌絲體大量生長有關，其中以葡萄糖組豬苓胞內多醣體的代謝產量較佳。而使用麥芽糖組其胞外、內多醣體產量皆較葡萄糖組差為 0.61 mg/ml 及 0.54 mg/ml，故以葡萄糖作為本實驗最適碳源。



圖十五 不同的碳源對於豬苓發酵期間胞外多醣體產量之影響

Fig.15 Effect of different carbon sources on exo-polysaccharide content during the fermentation of *P. umbellatus*.



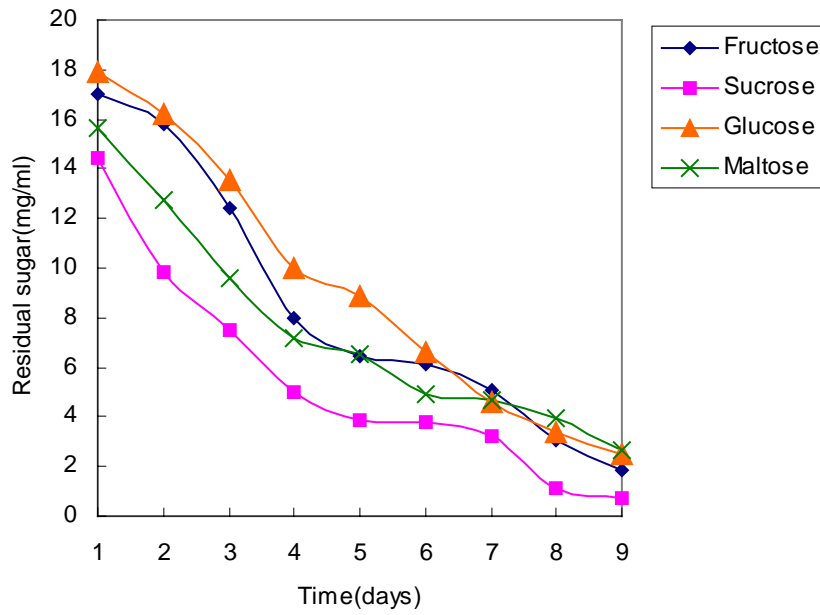
圖十六 不同的碳源對於豬苓發酵期間胞內多醣體產量之影響

Fig.16 Effect of different carbon sources on intra-polysaccharide content during the fermentation of *P. umbellatus*.

3.對豬苓殘糖及 pH 值之變化

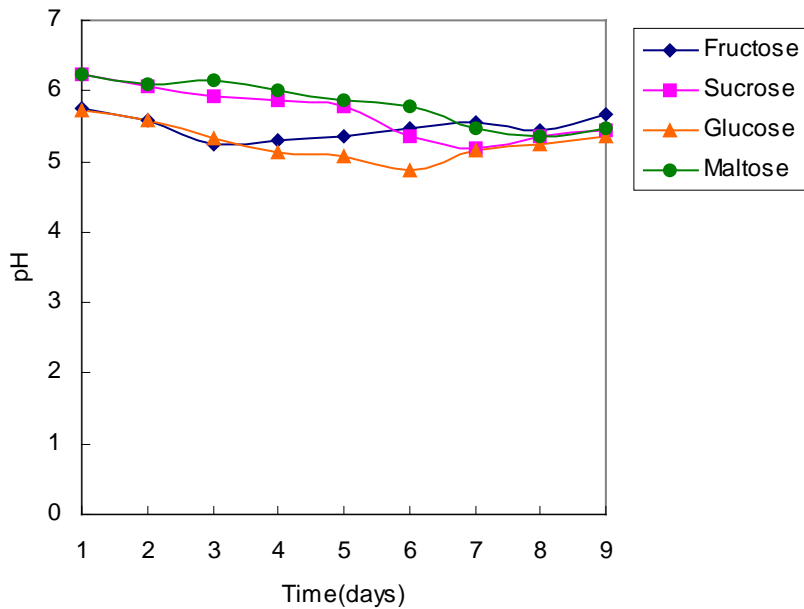
由圖十七，豬苓 *P. umbellatus* 液態培養過程中，菌體於第一天至第三天快速代謝碳源使菌絲體生長；而第四天至第六天菌體代謝速率呈現平穩狀態，可能於此期間菌絲體進行將碳源緩慢的代謝轉換成多醣體的過程；於第七天後，碳源再次快速的利用，於第九天時，碳源濃度有降至零的趨勢。

豬苓 *P. umbellatus* 液態培養之培養基起始 pH 值為 6.0，由圖十八所示，在發酵培養期間 pH 值變化較小，落在 5.0~6.0 上下。在發酵培養期間 pH 值會先往下降，至 5.0~5.5 之間，此時菌絲體濃度則持續增加，於第五至第八天時，pH 值會由持續下降而後變逐漸上升，代表此時碳源已經漸漸分解利用完全。



圖十七 不同的碳源對於豬苓發酵期間殘糖濃度變化

Fig.17 Effect of different carbon sources on residual sugar content during the fermentation of *P. umbellatus*.



圖十八 不同的碳源對於豬苓發酵期間 pH 值變化

Fig.18 Effect of different carbon sources on the change of pH in the fermentation of *P. umbellatus*.

利用搖瓶實驗分別以果糖、蔗糖、葡萄糖及麥芽糖作為碳源，而其他與基礎培養基相同條件，發酵期間所得之菌體乾重、胞外、胞內多醣體等結果，整理於表二中。由本實驗結果發現，以麥芽糖作為碳源時，將有利於豬苓菌株培養以產生菌絲體的生長；以葡萄糖作為碳源時，將較有利於豬苓菌株培養生產代謝物之胞內、外多醣體；而以果糖或蔗糖作為碳源時，豬苓菌株產量則較差。整體上，以葡萄糖作為碳源時，菌絲體乾重尚可達到 2.00 mg/ml、但能有較佳的胞內多醣體 0.59 mg/ml 及胞外多醣 0.76 mg/ml 產量。而豬苓菌株的功效成分以多醣體較受到重視，因此以葡萄糖作為後續實驗培養之最適碳源。以葡萄糖作碳源組別搖瓶培養過程中之菌體乾重、殘糖、胞內及胞外多醣之變化（圖十九），在九天的發酵生產期間，菌體在第五到第八天會快速繁殖生長，此時胞內、外多醣也會達到最高，而培養第八天後，菌體代謝及生產即有下降的趨勢。

表二 不同的碳源對於豬苓發酵期間菌體乾重、胞內多醣、胞外多醣
含量之影響

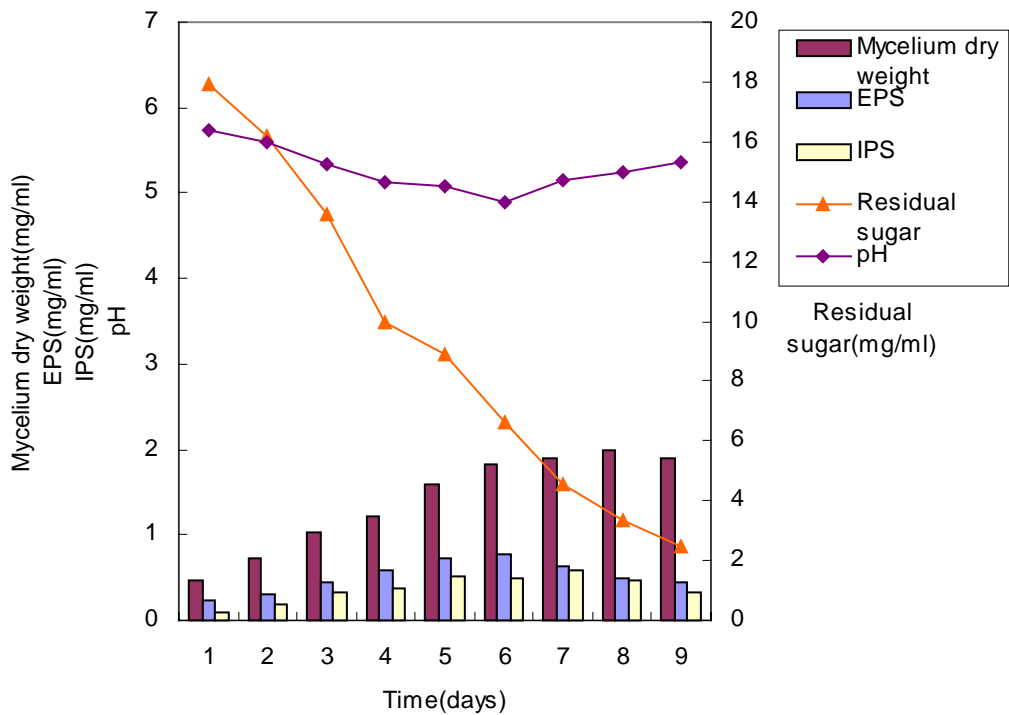
Table.2 Effect of different carbon sources on mycelium dry weight and polysaccharide content in the fermentation of *P. umbellatus*.

Group	Mycelium dry weight (mg/ml)	IPS (mg/ml)	EPS (mg/ml)
Fructose	0.85±0.05 ^d	0.28±0.06 ^c	0.53±0.03 ^b
Sucrose	1.18±0.09 ^c	0.41±0.06 ^{bc}	0.60±0.09 ^{ba}
Glucose	2.00±0.02 ^b	0.59±0.10 ^a	0.76±0.17 ^a
Maltose	2.23±0.15 ^a	0.54±0.07 ^{ba}	0.61±0.08 ^{ba}

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

EPS : Exo-polysaccharide

IPS : Intra-polysaccharide



圖十九 豬苓以 2% 葡萄糖作為碳源搖瓶培養期間其殘糖、菌絲乾重、多醣含量之變化（其他成分與基礎培養基相同，不同碳源實驗）

Fig.19 Time course of *P. umbellatus* in shake flasks fermentation with 2% glucose.

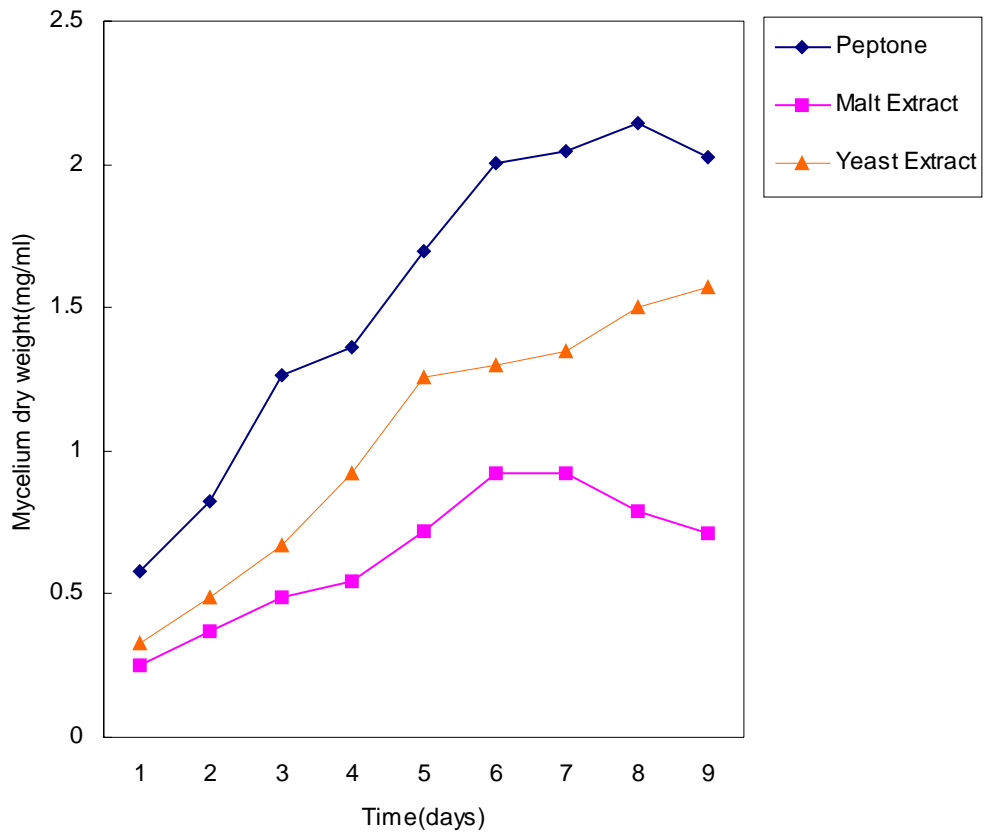
EPS : Exo-polysaccharide

IPS : Intra-polysaccharide

(二) 不同的氮源培養對於豬苓 *P. umbellatus* 生長之影響

1. 對豬苓菌絲體生長影響

本實驗以 Peptone、Malt extract 及 Yeast extract 各 0.25% 作為氮源，而其他培養條件與基礎培養基相同，欲探討不同的氮源培養對於豬苓 *P. umbellatus* 的菌絲生長及胞內與胞外多醣體生產的影響，並尋找出豬苓 *P. umbellatus* 其較適生長之氮源。由圖二十顯示，於九天的發酵培養期間，在不同氮源培養實驗各組別中，第二至第五天時，菌體穩定的代謝利用碳氮源，菌絲體快速生長繁殖分裂，第七至第八天期間，菌絲體生長趨於平穩，而後有逐漸下降的趨勢。其中以 Peptone 及 Yeast extract 作為氮源之組別，較有利於豬苓 *P. umbellatus* 之菌絲體的生長，第四天後菌絲體快速生長，於第八天時菌絲體生長達最大值；而以 Malt extract 作為氮源之組別，較不適合於豬苓 *P. umbellatus* 菌絲體的生長，於第五天以後生長速度則趨於平緩，且於第七天以後有下降的現象。在較適培養氮源試驗中以使用 Peptone 對於豬苓 *P. umbellatus* 菌絲體生長的效果較佳，至第八天左右時達最大值，此時菌體乾重為 2.14 mg/ml；其次為 Yeast extract 作為氮源組，於第九天時菌體乾重 1.57 mg/ml；而以 Malt extract 作為氮源組，豬苓菌絲體的產量則較低，其菌絲體乾重為 0.92 mg/ml。



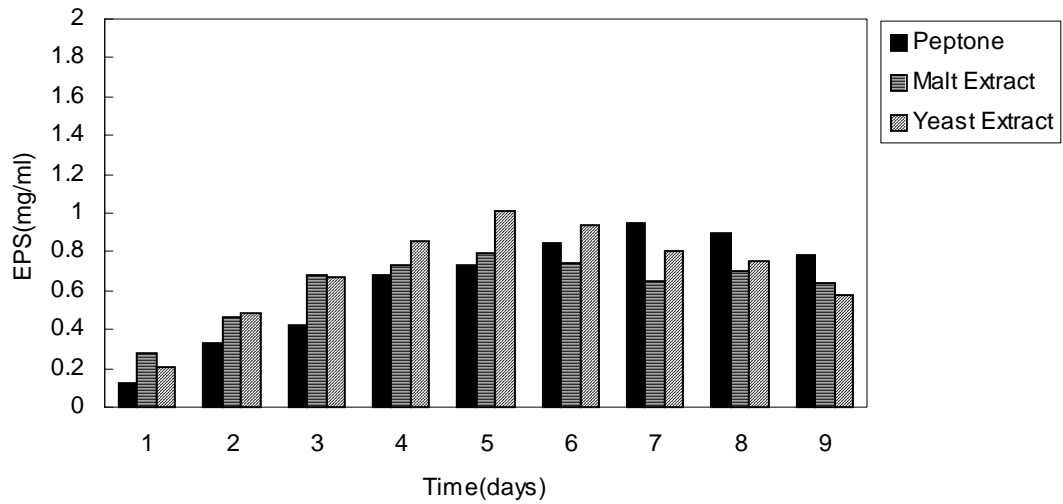
圖二十 不同氮源對於豬苓發酵期間菌體乾重之影響

Fig.20 Effect of different nitrogen sources on mycelium dry weight in the fermentation of *P. umbellatus*.

2. 對豬苓胞內與胞外多醣體產量影響

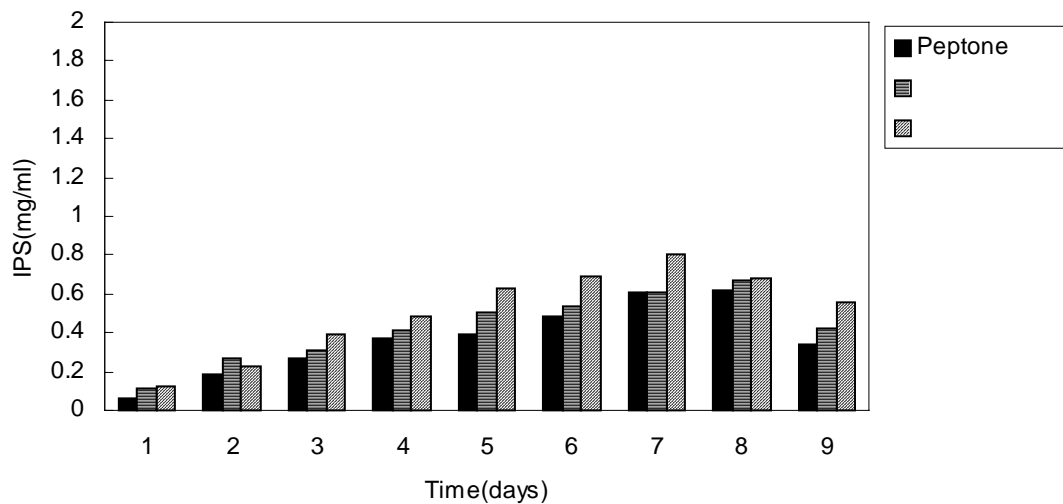
以不同的氮源培養基進行實驗，在九天的豬苓 *P. umbellatus* 發酵培養期間，由圖二十一，可以發現三個實驗組其胞外多醣體產量皆很平穩的代謝生產，其中以 Yeast extract 作為氮源組之胞外多醣體產量最佳，於培養第五天有較好的產量達到 1.02 mg/ml，可能以 Yeast extract 作為氮源於培養前段有促進豬苓菌體生產多醣。而以 Peptone 作為氮源組之胞外多醣體產量也有次佳的效果，在培養第五天後，多醣體快速增加，可能因菌絲體生長達到較穩定值，此期間胞外多醣體快速的代謝生產所致，於培養第七天有良好的產量，達 0.95 mg/ml 胞外多醣體產量。而以 Malt extract 作為氮源產量則比較平穩，於第五天能獲得最大胞外多醣體 0.79 mg/ml。

由圖二十二，可以發現各組胞內多醣體的生產，產量差異並不大。其中以 Yeast extract 作為氮源組，於第四天起胞內多醣產量有增加的趨勢且較其他組別佳，最大產量為 0.80 mg/ml，可能與菌絲體生長進入較平穩期有關；而使用 Peptone 及 Malt extract 作為氮源組，於培養發酵期間，胞內多醣體產量則較為平穩，於第八天達到最大值 0.62 mg/ml 及 0.67 mg/ml。



圖二十一 不同的氮源對於豬苓發酵期間胞外多醣體產量之影響

Fig.21 Effect of different nitrogen sources on exo-polysaccharide content during the fermentation of *P. umbellatus*.



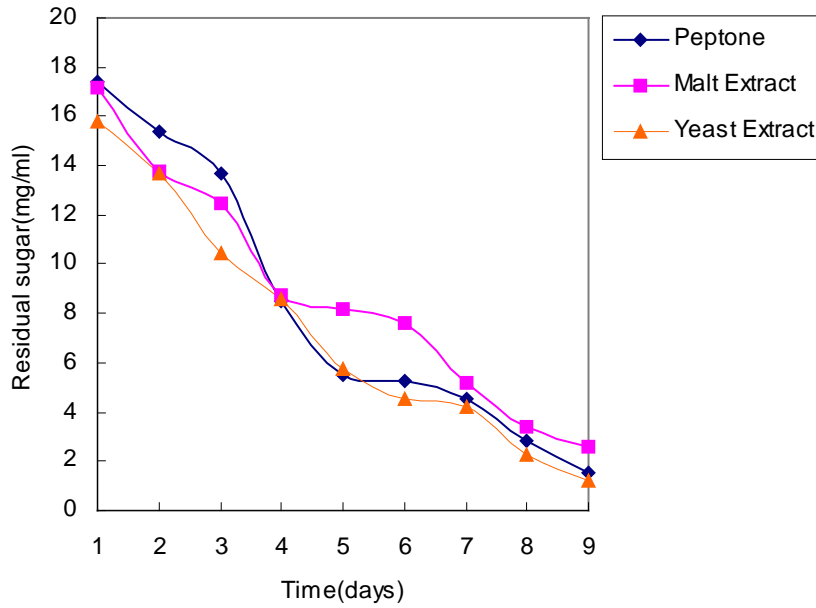
圖二十二 不同的氮源對於豬苓發酵期間胞內多醣體產量之影響

Fig.22 Effect of different nitrogen sources on intra-polysaccharide content during the fermentation of *P. umbellatus*.

3.對豬苓殘糖及 pH 值之變化

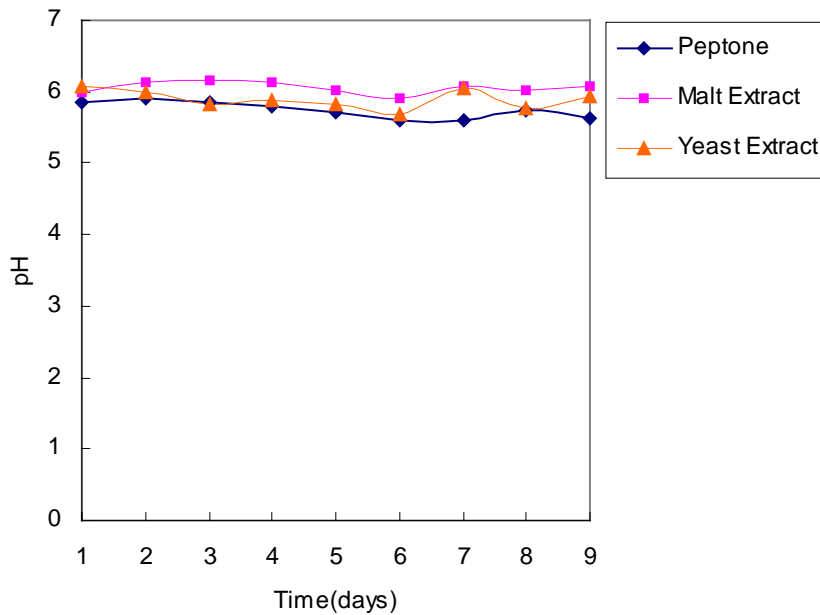
由圖二十三，於豬苓 *P. umbellatus* 液態培養過程中，菌體於第一天至第四天快速代謝碳源使菌絲體生長；而第五天至第六天菌體代謝速率呈現平穩狀態，可能此期間菌絲體進行將碳源緩慢的代謝轉換成多醣體的過程；於第七天後，碳源再次快速的利用，於第九天時，碳源濃度有降至零的趨勢。

豬苓 *P. umbellatus* 液態培養之培養基起始 pH 值為 6.0，在發酵培養期間 pH 值變化較小，落在 6.0 上下，由圖二十四所示。於發酵培養過程中 pH 值會先往下降至 5.5~6.0 之間，此時菌絲體濃度則持續增加，於第五至第八天時，pH 值會由持續下降而後變逐漸上升，代表此時碳源已經漸漸分解利用完全。文獻指出，於 pH 6.0 以上有利於豬苓菌絲體的形成（陳等人，2003）。



圖二十三 不同的氮源對於豬苓發酵期間殘糖濃度變化

Fig.23 Effect of different nitrogen sources on residual sugar content during the fermentation of *P. umbellatus*.



圖二十四 不同的氮源對於豬苓發酵期間 pH 值變化

Fig.24 Effect of different nitrogen sources on the change of pH in the fermentation of *P. umbellatus*.

分別以 Peptone、Malt extract 及 Yeast extract 各 0.25% 作為氮源搖瓶培養實驗所得之菌體乾重及胞外、胞內多醣體等結果，整理於表三中。由本實驗結果發現，以 Peptone 作為氮源時，將有利於豬苓菌株培養以產生菌絲體的生長；以 Yeast extract 作為氮源時，將較有利於豬苓菌株培養以生產代謝物之胞內、外多醣體；而以 Malt extract 作為氮源時，則產量皆較低的。整體上，以 Yeast extract 作為氮源時，能有菌絲體乾重 1.50 mg/ml，並有明顯較佳的胞外多醣 1.02 mg/ml 及胞內多醣 0.80 mg/ml 產量。因此以 Yeast extract 作為後續實驗培養之最適氮源。以 Yeast extract 作為氮源搖瓶培養豬苓 *P. umbellatus* 之菌體乾重、殘糖、胞內及胞外多醣之變化（圖二十五），在九天的發酵生產期間，菌體在第四到第六天會快速繁殖生長，此時胞內、外多醣也會達到最高，而培養第八天後，菌體代謝及生產即有下降的趨勢。

表三 不同的氮源對於豬苓發酵期間菌體乾重、胞內多醣及胞外多醣
含量之影響

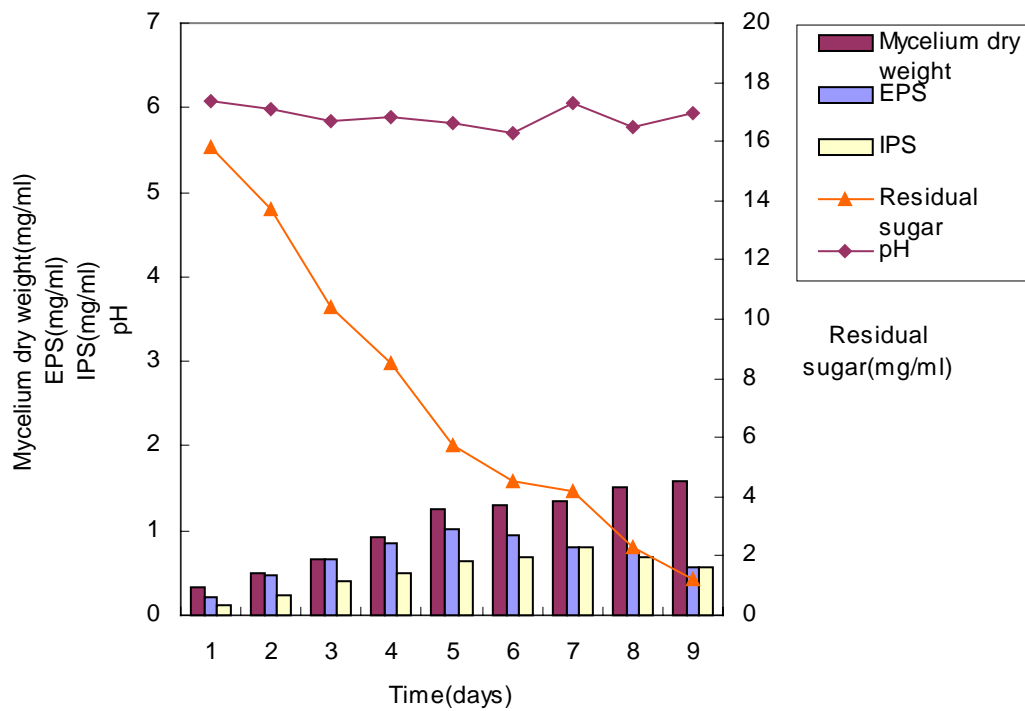
Table.3 Effect of different nitrogen sources on mycelium dry weight
and polysaccharide content in the fermentation of *P. umbellatus*.

Group	Mycelium dry weight (mg/ml)	IPS (mg/ml)	EPS (mg/ml)
Peptone	2.14±0.07 ^a	0.62±0.02 ^b	0.95±0.01 ^a
Malt extract	0.92±0.01 ^c	0.67±0.03 ^b	0.79±0.14 ^b
Yeast extract	1.50±0.12 ^b	0.80±0.03 ^a	1.02±0.11 ^a

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

EPS : Exo-polysaccharide

IPS : Intra-polysaccharide



圖二十五 豬苓以 0.25% 酵母萃取物作為氮源搖瓶培養期間其殘糖、菌絲乾重、多醣含量之變化（其他成分與基礎培養基相同，不同氮源實驗）

Fig.25 Time course of *P. umbellatus* in shake flasks fermentation with 0.25% yeast extract.

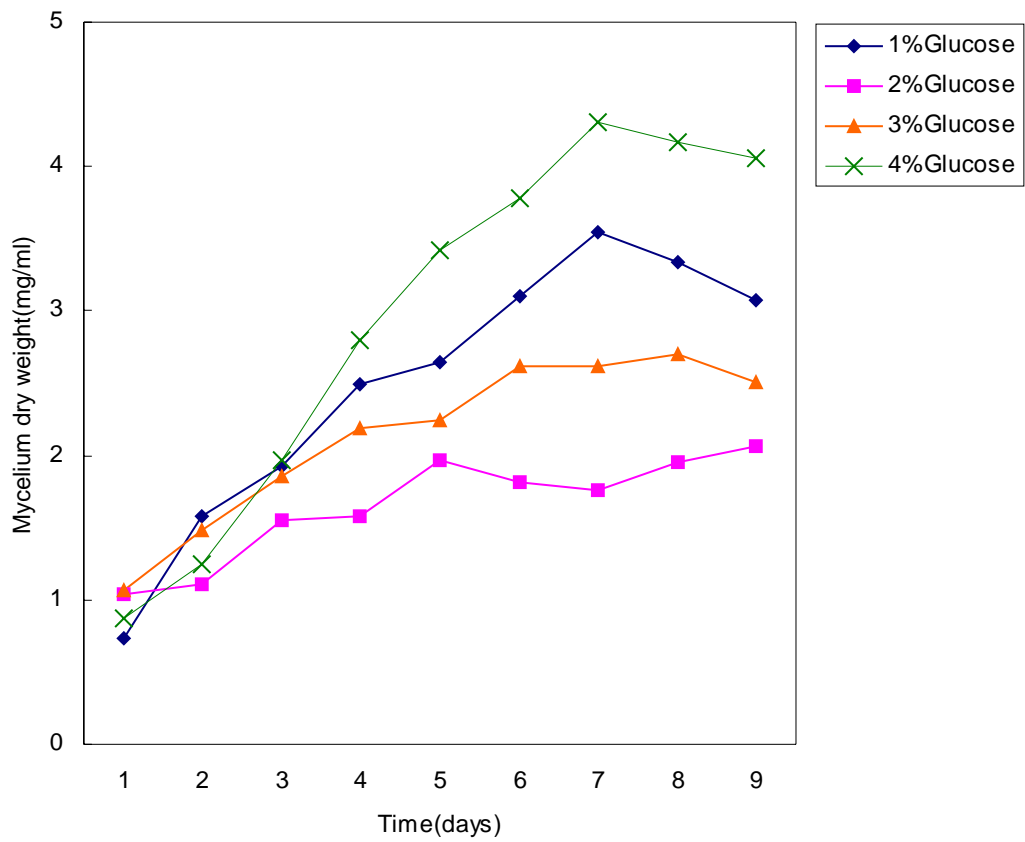
EPS : Exo-polysaccharide

IPS : Intra-polysaccharide

(三) 不同濃度的葡萄糖對於豬苓 *P. umbellatus* 生長之影響

1. 對豬苓菌絲體生長影響

本實驗以 1%、2%、3%、4% 的葡萄糖濃度作為碳源試驗，其他培養條件與基礎培養基相同，欲探討不同的碳源濃度培養對豬苓 *P. umbellatus* 的菌絲生長及胞內、外多醣體生產的影響，並尋找出豬苓 *P. umbellatus* 其最適生長之碳源濃度。由圖二十六顯示，於九天的發酵培養，在使用不同濃度的碳源實驗組別中，第二至第五天時，菌體快速的代謝利用碳氮源，菌體快速的生長繁殖分裂，第七至第八天，菌體生長趨於平穩，而後有逐漸下降的趨勢。其中以 1% 及 4% 葡萄糖作為碳源組別，較有利於豬苓 *P. umbellatus* 生產菌絲體，於第四天後菌絲體快速生長，在第七天時達最大值；而以 2% 葡萄糖組別，則較不適合於豬苓 *P. umbellatus* 菌絲體的生長，於第五天以後生長速度逐漸趨於平緩，且於第七天以後有下降的現象。而各碳源濃度試驗中，以 4% 葡萄糖濃度作為培養碳源對於豬苓 *P. umbellatus* 菌絲體生長的效果最佳，至第七天左右時達最大值，此時菌體乾重為 4.31 mg/ml；其次為使用 1% 葡萄糖濃度組，於第七天時菌體乾重 3.54 mg/ml；而 3% 葡萄糖濃度組，對於豬苓菌絲體的生長較平穩，其菌絲體乾重為 2.70 mg/ml；而 2% 葡萄糖濃度組，對於豬苓 *P. umbellatus* 菌絲體生長效果較差，為 2.06 mg/ml。

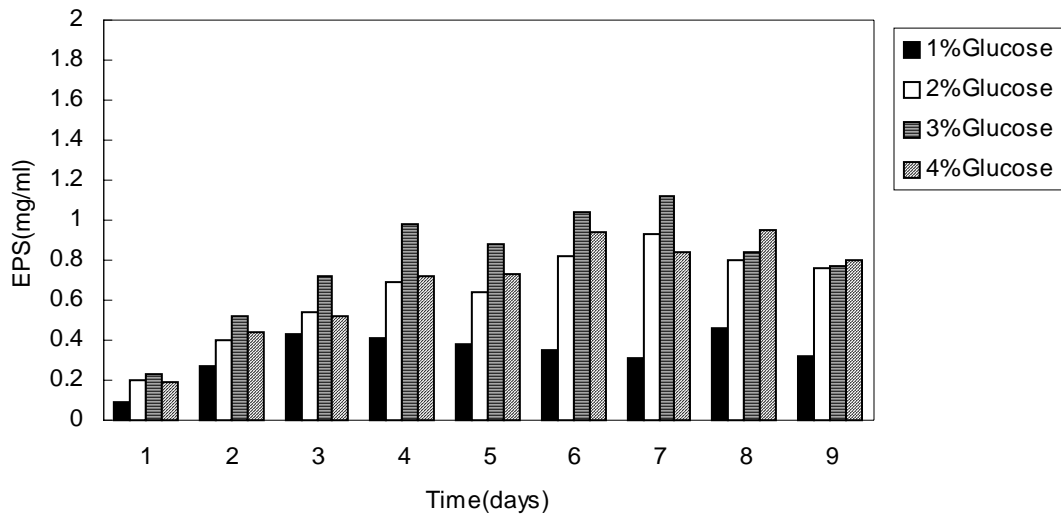


圖二十六 不同濃度的葡萄糖對豬苓發酵期間菌體乾重之影響

Fig.26 Effect of glucose concentration on mycelium dry weight in the fermentation of *P. umbellatus*.

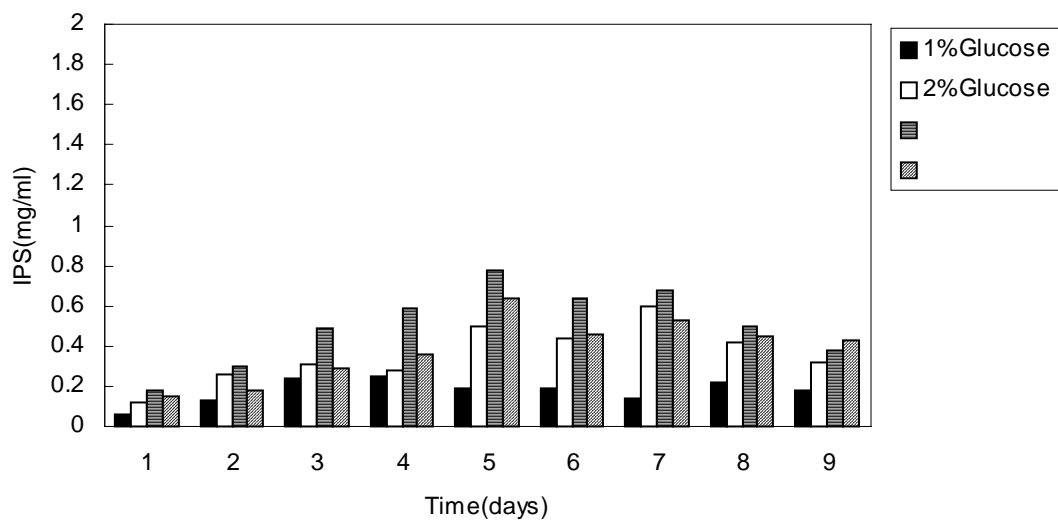
2.對豬苓胞內與胞外多醣體產量影響

以使用不同的碳源濃度進行實驗，在九天的豬苓 *P. umbellatus* 發酵培養期間，由圖二十七、圖二十八，可以發現四個實驗組於培養過程中，其豬苓胞內外多醣體產量於第四天以後緩緩的增加，在第七天至第八天能夠有最大的胞外多醣的累積，其中以使用 3% 葡萄糖濃度組之胞內外多醣體產量最佳，於第六及第七天有較好的胞外多醣產量，達到 1.04 mg/ml 及 1.12 mg/ml 的產量，於第五及第七天有較佳的胞內多醣產量，達到 0.78 mg/ml 及 0.67 mg/ml，可能於第五天至第七天時，因菌絲體生長達到較為平穩的狀態，此期間胞內外多醣體快速的代謝生產所致；而使用 4% 葡萄糖濃度組，則於培養的中後期有較佳的胞內外多醣體累積產量，最大產量為 0.95 mg/ml 胞外多醣體及 0.63 mg/ml 胞內多醣體；而使用 2% 葡萄糖濃度組，其胞外多醣的生產則較平穩，於第七天有最大胞外多醣產量 0.93 mg/ml，於第六天有最大胞內多醣體產量，達到 0.60 mg/ml；然而使用 1% 葡萄糖濃度組胞內外多醣體的產量則較差，產量皆低於其他組別，最大胞外多醣產量為 0.46 mg/ml，最大胞內多醣產量則為 0.24 mg/ml，可能當使用 1% 葡萄糖濃度之碳源組別，其碳源之代謝利用以趨向於生產豬苓的菌絲體（圖二十六）。



圖二十七 不同濃度葡萄糖對於豬苓發酵期間胞外多醣之影響

Fig.27 Effect of glucose concentration on exo-polysaccharide content during the fermentation of *P. umbellatus*.



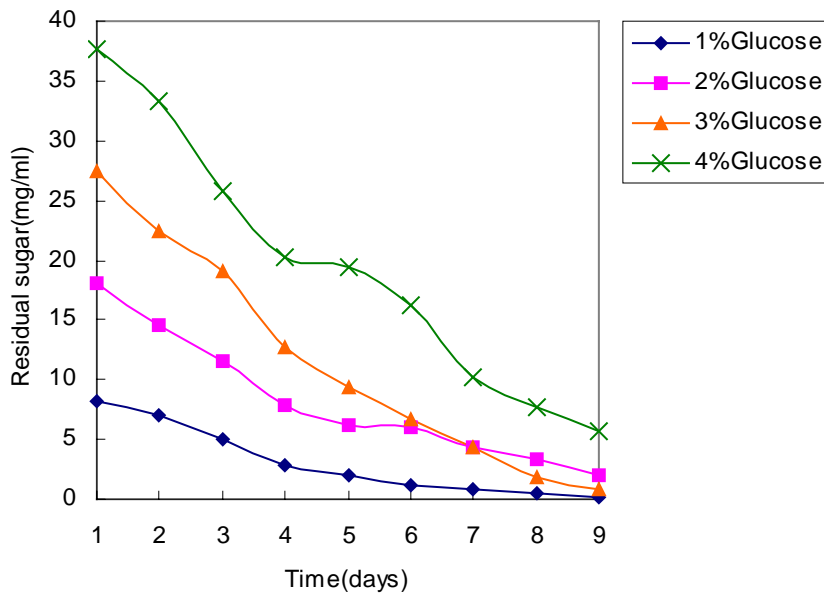
圖二十八 不同濃度葡萄糖對於豬苓發酵期間胞內多醣之影響

Fig.28 Effect of glucose concentration on intra-polysaccharide content during the fermentation of *P. umbellatus*.

3.對豬苓殘糖及 pH 值之變化

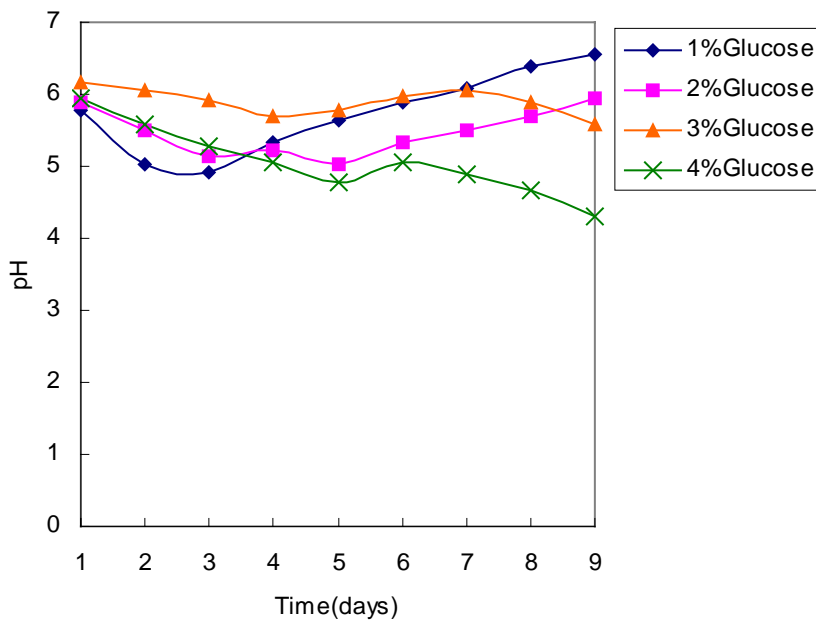
由圖二十九，於豬苓 *P. umbellatus* 液態培養過程中，菌體於第一天至第四天快速代謝碳源使菌絲體生長；而第五天至第七天菌體代謝速率呈現平穩狀態，可能於此期間菌絲體進行將碳源緩慢的代謝轉換成多醣體的過程；於第七天後，碳源再次快速的利用，於第九天時，碳源濃度有降至零的趨勢。而使用 4% 葡萄糖濃度組，於培養九天的過程中，在第五天以後碳源的消耗趨於平緩，至培養終止時仍然剩餘大量的碳濃度，可能代謝速率較差所致或過多的碳源濃度所致。

豬苓 *P. umbellatus* 液態培養之培養基起始 pH 值為 6.0，由圖三十所示，在發酵培養期間 pH 值變化落在 4.0~5.5 上下。在發酵培養期間 pH 值會先往下降，至 5.0~5.5 之間，此時菌絲體濃度則持續增加，於第五至第八天時，pH 值會由持續下降而後變逐漸上升，代表此時碳源已經漸漸分解利用完全。而使用 1% 葡萄糖濃度組其 pH 值於第四天以後快速上升，可能碳源濃度過低，菌絲體生長快速消耗碳源，而碳源之利用轉為利用有機酸或氮源，而使得 pH 值有上升之現象。



圖二十九 不同濃度葡萄糖對於豬苓發酵期間殘糖之變化

Fig.29 Effect of glucose concentration on residual sugar content during the fermentation of *P. umbellatus*.



圖三十 不同濃度葡萄糖對於豬苓發酵期間 pH 值之變化

Fig.30 Effect of glucose concentration on the change of pH in the fermentation of *P. umbellatus*.

將基礎培養基中碳源以 1%、2%、3%、4% 葡萄糖濃度培養豬苓，發酵期間所得之菌體乾重、胞外及胞內多醣體等結果，整理於表三四中。由本實驗結果發現，以 1% 及 4% 葡萄糖濃度作為碳源時，將有利於豬苓菌株生產菌絲體；而以 1% 葡萄糖濃度作為碳源組，其培養過程多醣產量較低，而以 4 % 作為碳源組，則於培養中有次佳多醣體產量；另以 3% 作為碳源時，將較有利於豬苓菌株培養以生產代謝物胞內、外多醣體；而以 2% 作為碳源時，則整體生產量皆較差。整體上，以 3% 葡萄糖濃度作為碳源時，有菌絲體乾重 2.70 mg/ml、且有較高胞外多醣 1.12 mg/ml 及胞內多醣 0.71 mg/ml 產量，然而 4 % 葡萄糖濃度作為碳源組，因於培養終止時仍然存在有較高濃度的碳源，故選擇碳源濃度利用消耗較適當組作為培養碳源，而以 3% 作為後續實驗培養之最適碳源濃度。使用 3% 葡萄糖濃度作碳源搖瓶培養豬苓之菌體乾重、殘糖、胞內及胞外多醣之變化（圖三十一），在九天的發酵生產期間，菌體在第三到第六天會快速繁殖生長，此時胞內、外多醣也會達到最高，而培養第八天後，菌體代謝及生產即有下降的趨勢。

表四 不同濃度葡萄糖對於豬苓發酵期間菌體乾重、胞內多醣及胞外多醣含量之影響

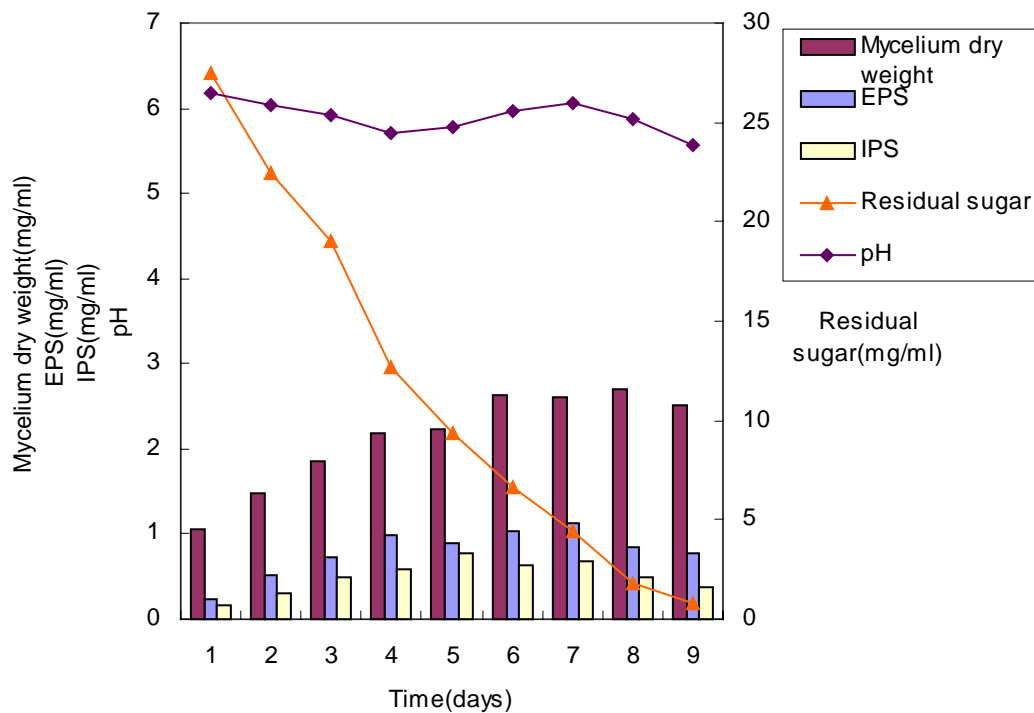
Table.4 Effect of different glucose concentrations on mycelium dry weight and polysaccharide content in the fermentation of *P. umbellatus*.

Group	Mycelium dry weight (mg/ml)	IPS (mg/ml)	EPS (mg/ml)
1%Glucose	3.54±0.12 ^b	0.25±0.04 ^c	0.46±0.02 ^c
2%Glucose	2.06±0.02 ^d	0.60±0.03 ^b	0.93±0.01 ^b
3%Glucose	2.70±0.06 ^c	0.78±0.02 ^a	1.12±0.01 ^a
4%Glucose	4.31±0.08 ^a	0.63±0.06 ^b	0.95±0.06 ^b

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

EPS : Exo-polysaccharide

IPS : Intra-polysaccharide



圖三十一 豬苓以 3% 葡萄糖作為碳源搖瓶培養期間其殘糖、菌絲乾重、多醣體含量之變化（其他成分與基礎培養基相同，不同碳源濃度試驗）

Fig.31 Time course of *P. umbellatus* in shake flasks fermentation with 3% glucose.

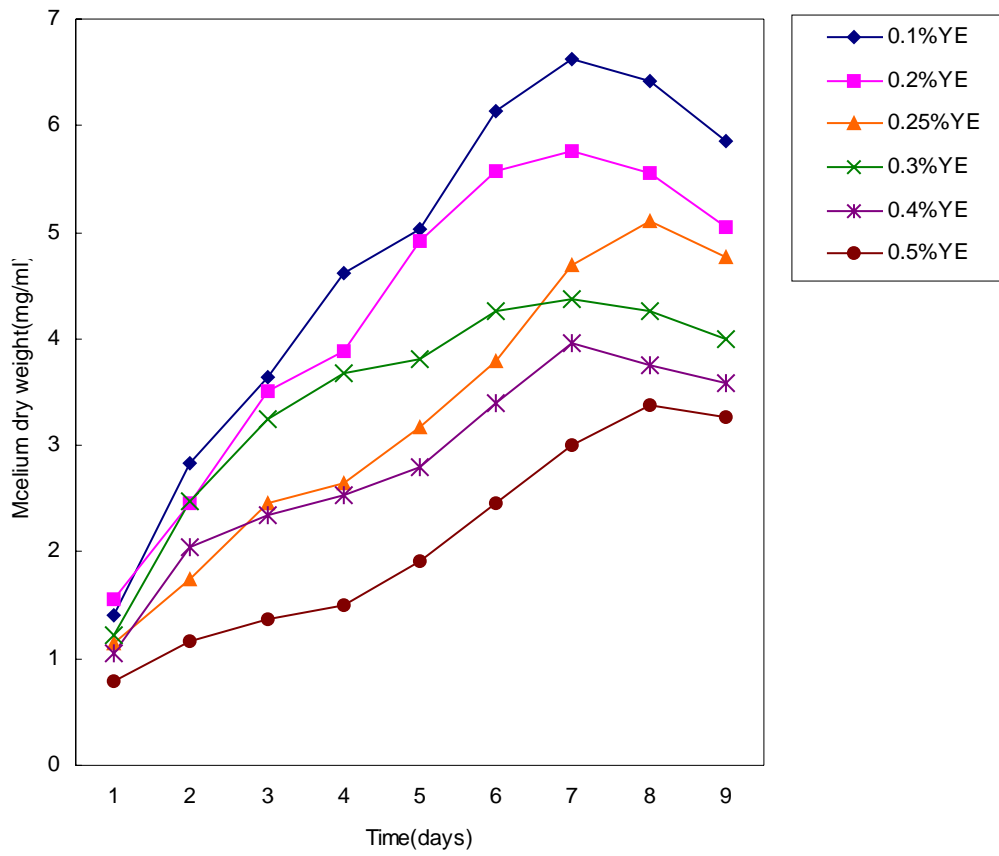
EPS : Exo-polysaccharide

IPS : Intra-polysaccharide

(四) 不同濃度的酵母萃取物對於豬苓 *P. umbellatus* 生長之影響

1. 對豬苓菌絲體生長影響

本實驗將基礎培養基另以 0.1%、0.2%、0.25%、0.3%、0.4% 及 0.5% 酵母萃取物濃度作為氮源培養豬苓，欲探討不同的氮源濃度培養對豬苓 *P. umbellatus* 的菌絲生長及胞內、外多醣體生產的影響，並尋找出豬苓 *P. umbellatus* 其最適生長之氮源濃度。由圖三十二顯示，於九天的發酵培養，在不同濃度的氮源使用組別中，第二至第五天時，菌體穩定的代謝利用碳源，菌體快速的生長繁殖分裂，第六至第八天期間，菌體生長趨於平穩，而後有逐漸下降的趨勢。其中以 0.1% 及 0.2% 酵母萃取物濃度組別，較有利於豬苓 *P. umbellatus* 之菌絲體的生長，第五天後菌絲體快速生長，在第六天及第七天有菌絲體生長較佳值；而使用 0.4% 及 0.5% 酵母萃取物濃度組別，培養豬苓 *P. umbellatus* 菌絲體的生產較低，第五天以後生長速度趨於平緩，且於第七天以後有下降的現象。而各氮源濃度使用試驗中，以 0.1% 酵母萃取物濃度對於豬苓 *P. umbellatus* 菌絲體生長所得的效果最佳，於第七天時達最大值，菌體乾重為 6.63 mg/ml；其次為 0.2% 酵母萃取物組，最大菌絲體為 5.77 mg/ml；而隨著氮源濃度的增加，菌絲體產量有下降的趨勢，菌絲乾重分別 0.25% 為 5.10 mg/ml > 0.3% 為 4.37 mg/ml > 0.4% 為 3.96 mg/ml > 0.5% 為 3.37 mg/ml。

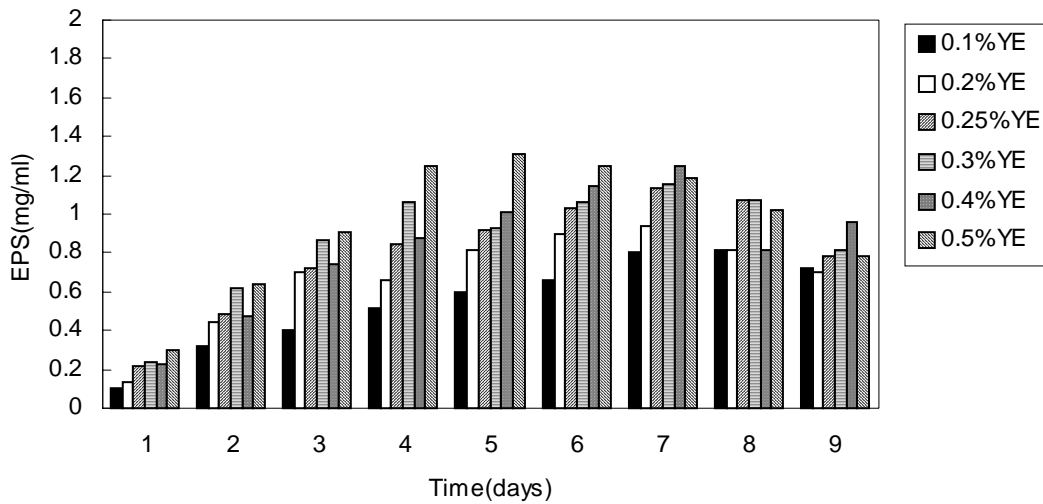


圖三十二 不同濃度酵母萃取物對豬苓發酵期間菌體乾重之影響

Fig.32 Effect of yeast extract concentration on mycelium dry weight in the fermentation of *P. umbellatus*.

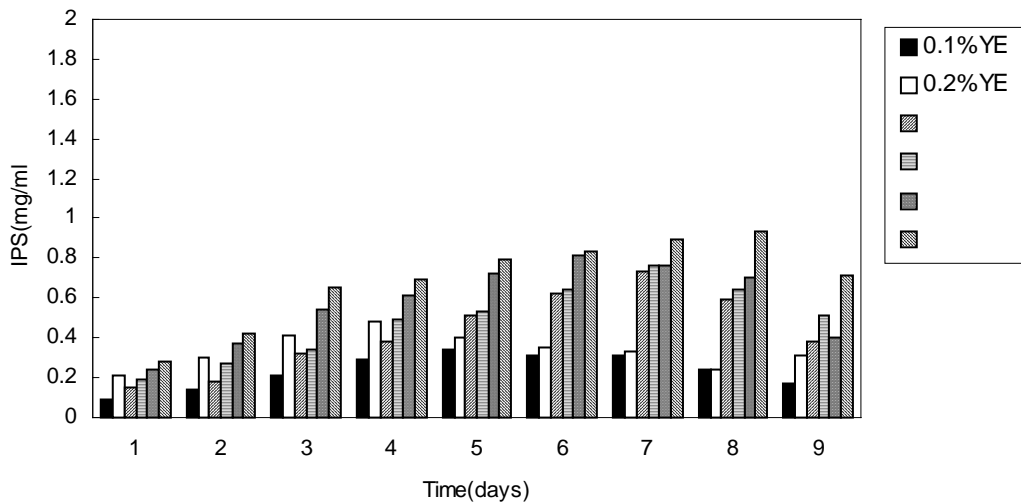
2.對豬苓胞內與胞外多醣體產量影響

以不同濃度酵母萃取物進行較適培養氮源濃度實驗，在九天的豬苓 *P. umbellatus* 發酵培養期間，由圖三十三、三十四，可以發現六個實驗組於培養過程中，於第二天至第五天期間，其胞內外多醣體產量逐漸增加，於第六天至第七天累積最大的產量，而第八天後有下降的現象。在培養九天期間，以 0.5% 酵母萃取物濃度組，分別於第五天有最佳的胞外多醣體產量 1.31 mg/ml 及第八天有最佳的胞內多醣體產量 0.93 mg/ml；其次以 0.4% 組有次佳的胞內胞外多醣累積，於第六天至第七天有最大的胞內、外多醣體生產，產量達 1.24 mg/ml 胞外多醣及 0.81 mg/ml 胞內多醣；並且發現隨著培養基氮源濃度的增加，其多醣體產量累積也逐漸增加的趨勢，胞外多醣含量由 0.1% 至 0.5% 分別為 0.82 mg/ml < 0.94 mg/ml < 1.13 mg/ml < 1.15 mg/ml < 1.24 mg/ml < 1.31 mg/ml，而胞內多醣體之含量由 0.34 mg/ml < 0.48 mg/ml < 0.74 mg/ml < 0.76 mg/ml < 0.81 mg/ml < 0.93 mg/ml，可能多醣及菌絲體的產率與碳氮比率組合有關。



圖三十三 不同濃度酵母萃取物對豬苓發酵期間胞外多醣之影響

Fig.33 Effect of yeast extract concentration on exo-polysaccharide content during the fermentation of *P. umbellatus*.



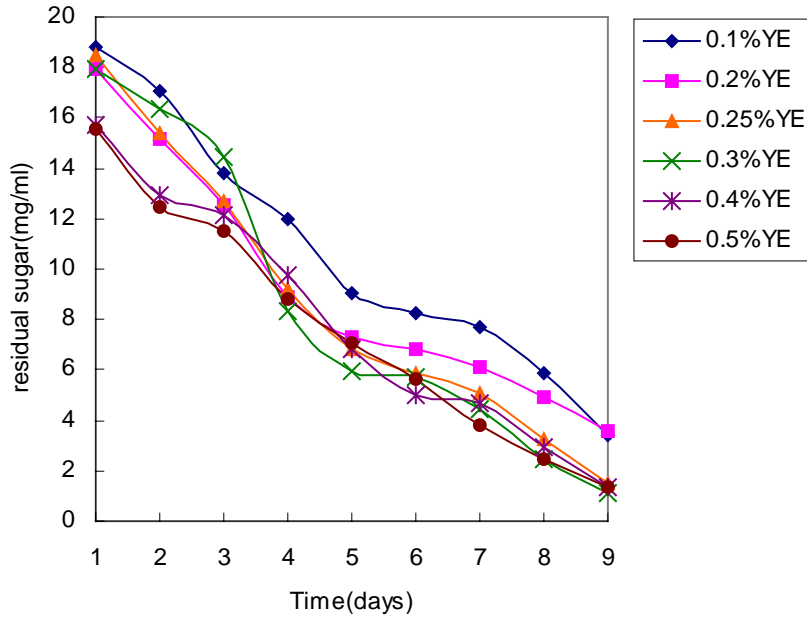
圖三十四 不同濃度酵母萃取物對豬苓發酵期間胞內多醣之影響

Fig.34 Effect of yeast extract concentration on intra-polysaccharide content during the fermentation of *P. umbellatus*.

3.對豬苓殘糖及 pH 值之變化

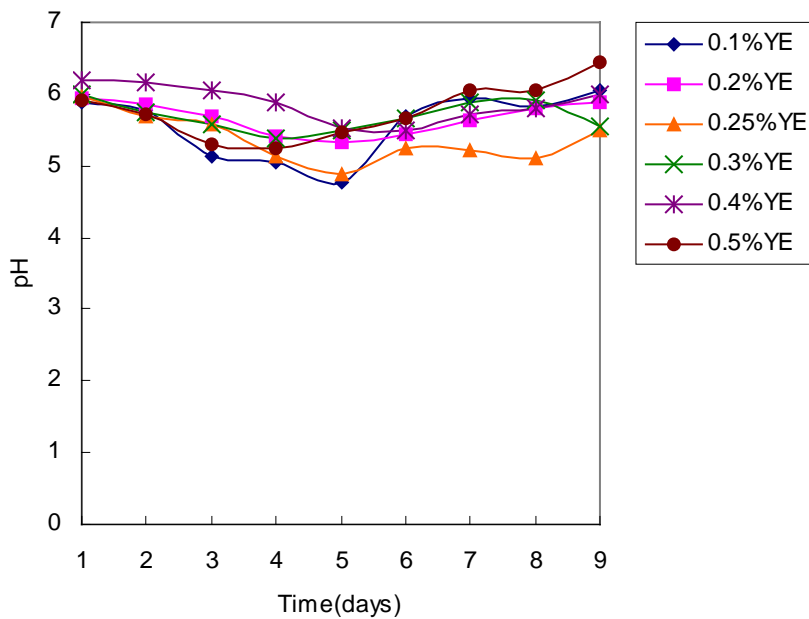
由圖三十五，於豬苓 *P. umbellatus* 液態培養過程中，菌體於第一天至第四天快速代謝碳源使菌絲體生長；而第五天至第六天菌體代謝速率呈現較穩定狀態；於第七天後，碳源再次快速的利用，而第九天時，碳源濃度有降至零的趨勢。使用 0.5% 酵母萃取物濃度組，於培養九天的過程中，在第三天以後碳源的消耗速率快速增加，於培養第八天以後，代謝速率才呈現較為穩定，可能此階段碳源快速的被利用生產菌絲體，並且快速的轉換碳源以生產多醣體所致。

豬苓 *P. umbellatus* 液態培養之培養基起始 pH 值為 6.0，由圖三十六所示，在發酵培養期間 pH 值變化落在 5.0~6.0 上下。在發酵培養期間 pH 值會先往下降，至 5.0~5.5 之間，此時菌絲體濃度則持續增加，於第五至第八天時，pH 值會由持續下降而後變逐漸上升，碳源代謝可能轉換為利用氮源的現象。而其中以 5% 酵母萃取物濃度組，於培養第三天後，pH 值則緩緩的上升至 6.0，可能 pH 值於 6.0 以上時較有利於菌絲體生產及多醣體的代謝。



圖三十五 不同濃度的酵母萃取物對於豬苓培養過程中殘糖之變化

Fig.35 Effect of yeast extract concentration on residual sugar content during the fermentation of *P.umbellatus*.



圖三十六 不同濃度酵母萃取物對於豬苓發酵期間 pH 值之變化

Fig.36 Effect of yeast extract concentration on the change of pH in the fermentation of *P. umbellatus*.

基礎培養基另以 0.1%、0.2%、0.25%、0.3%、0.4%及 0.5% 酵母萃取物作為氮源培養豬苓所得之菌體乾重、胞外及胞內多醣體等所得結果，整理於表五中。由本實驗結果發現，以 0.1%及 0.2% 酵母萃取物作為氮源時，將有利於豬苓生長產生菌絲體，但培養過程則較不利生產多醣體；以 0.4%及 0.5% 酵母萃取物作為氮源時，將較有利於豬苓培養生產代謝物胞內、外多醣體。整體上，豬苓菌株培養過程中，較低濃度的酵母萃取物有利於生產菌絲體，而較高濃度的酵母萃取物則有利於生產豬苓多醣體；其中以 0.5% 酵母萃取物濃度作為氮源時，有較佳的胞內外多醣體生產，胞外多醣體產量達 1.31 mg/ml、胞內多醣體達 0.93 mg/ml，而菌絲體產量為 3.37 mg/ml，因此以 0.5% 酵母萃取物作為後續實驗培養之最適氮源濃度。以 0.5% 酵母萃取物作為氮源搖瓶培養豬苓之菌體乾重、殘糖、胞內及胞外多醣之變化(圖三十七)，在九天的發酵生產期間，菌絲體在第三到第六天會快速繁殖生長，此時胞內、外多醣也會達到最高，而培養第八天後，菌體代謝及生產即有下降的趨勢。

表五 不同濃度酵母萃取物對於豬苓培發酵期間菌體乾重、胞內多醣、胞外多醣含量之影響

Table.5 Effect of different yeast extract concentrations on mycelium dry weight and polysaccharide content in the fermentation of *P. umbellatus*.

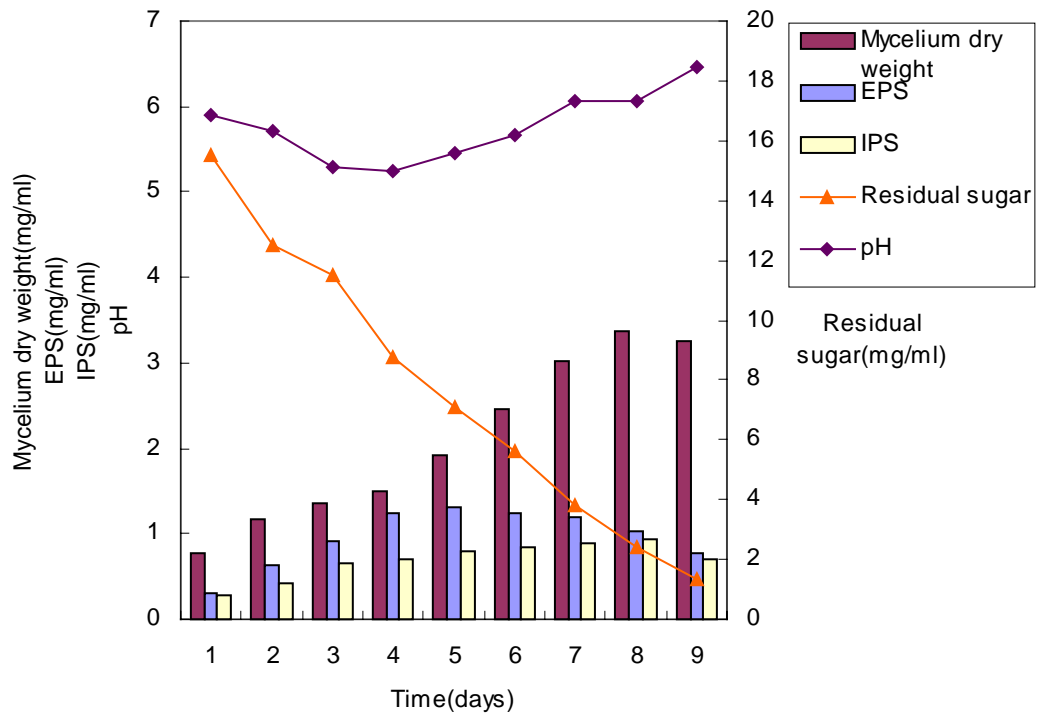
Group	Mycelium dry weight (mg/ml)	IPS (mg/ml)	EPS (mg/ml)
0.1%YE	6.63±0.19 ^a	0.34±0.09 ^d	0.82±0.03 ^d
0.2%YE	5.77±0.22 ^b	0.48±0.01 ^c	0.94±0.01 ^c
0.25%YE	5.10±0.13 ^c	0.74±0.10 ^b	1.13±0.04 ^b
0.3%YE	4.37±0.10 ^d	0.76±0.06 ^b	1.15±0.07 ^b
0.4%YE	3.96±0.12 ^e	0.81±0.04 ^b	1.24±0.05 ^a
0.5%YE	3.37±0.18 ^f	0.93±0.08 ^a	1.31±0.03 ^a

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

IPS : Intra-polysaccharide

EPS : Exo-polysaccharide

YE : Yeast extract



圖三十七 豬苓以 0.5% 酵母萃取物作為氮源搖瓶培養期間其殘糖、菌絲乾重、多醣含量之變化（其他成分與基礎培養基相同，不同氮源濃度試驗）

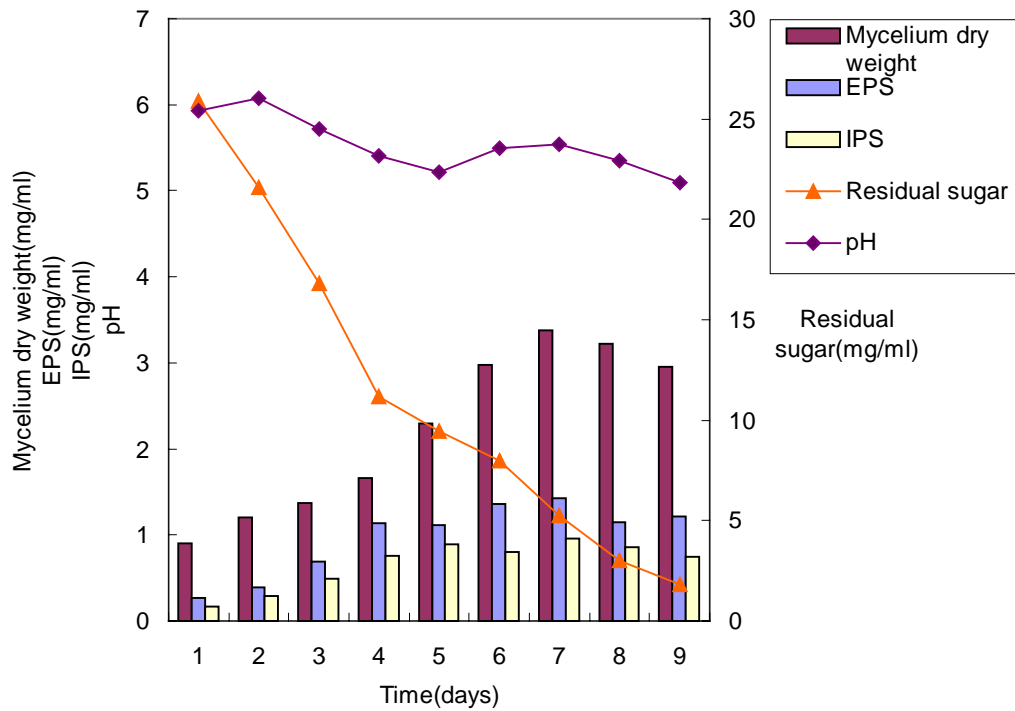
Fig.37 Time course of *P. umbellatus* in shake flasks fermentation with use 0.5% yeast extract.

EPS : Exo-polysaccharide

IPS : Intra-polysaccharide

(五) 搖瓶培養總結

較適碳源試驗中，四種碳源中以葡萄糖對於培養豬苓生產多醣體較佳，而在較適培養濃度試驗中，以 3% 葡萄糖對於豬苓生產多醣較佳，因此後續實驗選用 3% 葡萄糖濃度作為培養豬苓之最適培養碳源。在較適氮源試驗中，三種氮源中以酵母萃取物對於培養豬苓生產多醣體較佳，而在較適培養濃度試驗中，以 0.5% 酵母萃取物較有利於生產多醣體，因此後續實驗選用 0.5% 酵母萃取物作為培養豬苓之最適培養氮源。而以 3% 葡萄糖及 0.5% 酵母萃取物作為碳氮源培養豬苓發酵九天，試驗此培養基組合是否利於生產多醣體，培養生長過程如圖三十八，於第三天至第六天期間，胞內外多醣快速的代謝生長，此時菌絲體代謝碳源的速率較為平穩，可能此時豬苓菌株碳源的消耗轉為生產代謝為多醣體。而於第七天至第八天期間，菌絲體生長維持較穩定狀態，而多醣體代謝也達到最高峰 1.43 mg/ml 之胞外多醣及 0.96 mg/ml 之胞內多醣體產量，而菌絲體產量為 3.37 mg/ml。於第七天有較佳的菌絲生長、胞內及胞外多醣體的產量，且於第七天後，豬苓生長代謝速率有下降的趨勢，因此後續發酵槽培養一批次發酵時間定為七天發酵培養。



圖三十八 豬苓以 3% 葡萄糖及 0.5% 酵母萃取物搖瓶培養期間其殘糖、菌絲乾重、多醣含量之變化（其他成分與基礎培養基相同，最適碳氮源濃度組合試驗）

Fig.38 Time course of *P. umbellatus* in shake flasks fermentation with 3% glucose and 0.5% yeast extract.

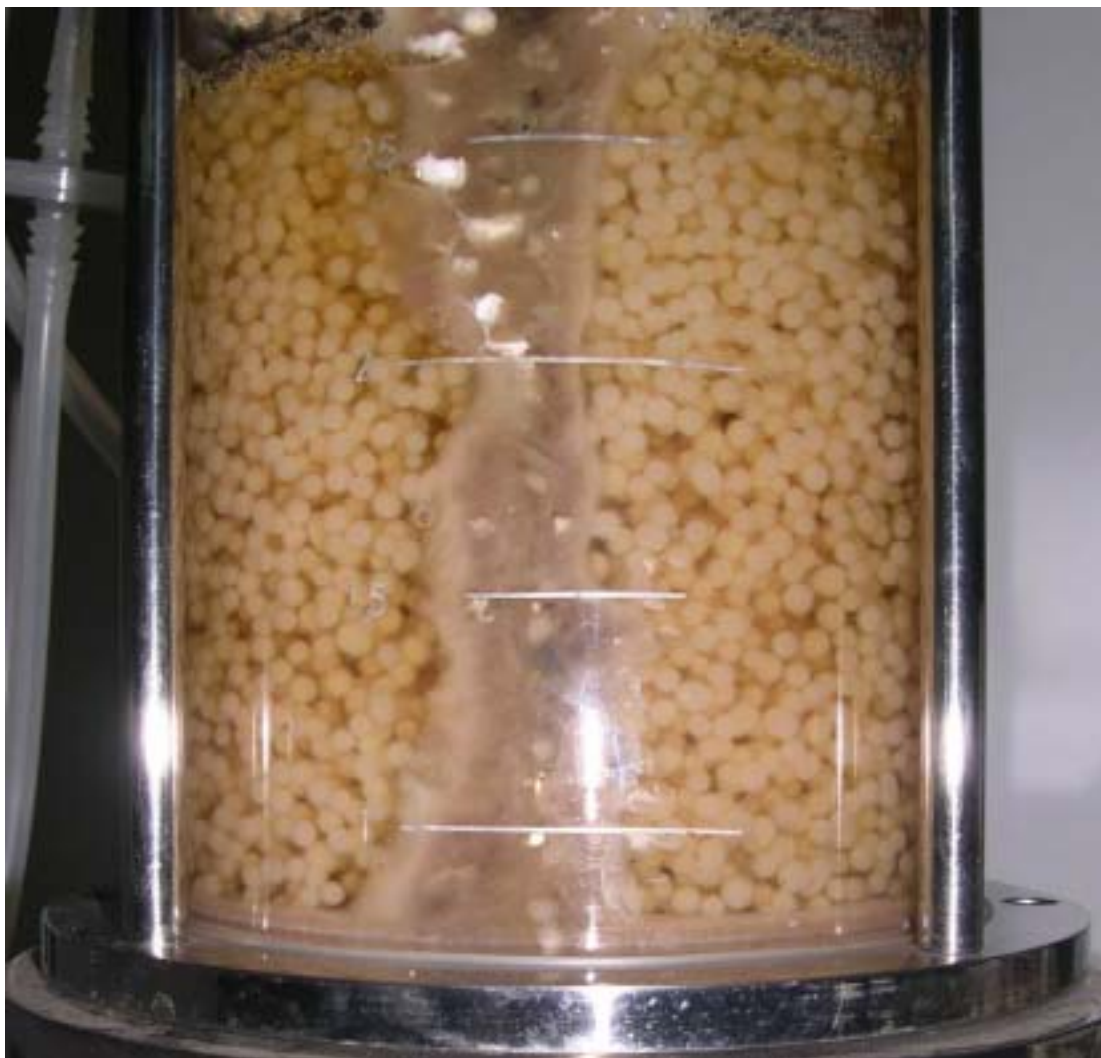
EPS : Exo-polysaccharide

IPS : Intra-polysaccharide

二、發酵槽培養

由前述實驗結果，利用 3% 葡萄糖及 0.5% Yeast extract 作為碳氮源較有利於多醣體生產，將此培養基組成利用於攪拌式發酵槽及氣泡塔式發酵槽中培養，並通入不同的通氣量，來探討不同通氣量及發酵環境對豬苓 *P. umbellatus* 生長之影響；另外於搖瓶培養發現，當碳氮源濃度較低的狀態下，將有利於豬苓菌株生產菌絲體，而當碳氮源濃度較高的狀態則有益於豬苓菌株生產較多的多醣體，因此設計饋料式培養試驗，於前期以 1% 葡萄糖及 0.25% Yeast extract 作為培養基質，希望此期間能夠促進豬苓菌絲體生長，於培養第三天終了時，在另外饋料入 60 g 葡萄糖及 7.5 g 酵母萃取物混合液 500 ml，使總培養基質濃度達 3 % 葡萄糖及 0.5 % Yeast extract，培養第四至第七天，希望此期間有利於增加豬苓生產胞內、外多醣體。當以 0.5 vvm 通氣量培養時，豬苓菌絲體有累積聚集於進氣口的現象，而使得供氣不足，易造成菌體死亡現象，故於饋料培養過程僅以 1 vvm 通氣量進行探討。

圖三十九，豬苓發酵槽培養時菌絲生長圖，於培養第二天菌絲逐漸形成小珠粒狀、乳白色狀，隨培養時間增加菌絲逐漸聚集於槽壁或槽底造成通氣下降，而當槽內有利條件下降，菌絲體逐漸形成白灰色至灰褐色菌絲。



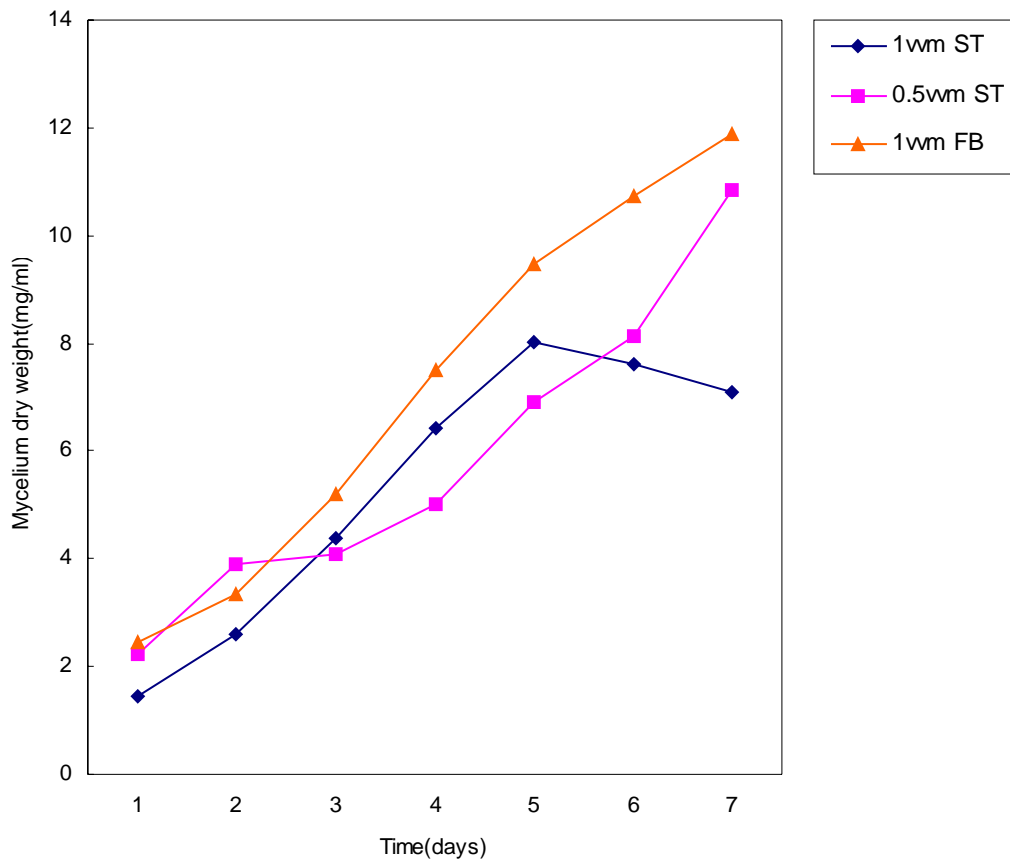
圖三十九 培養第七天豬苓菌絲體的型態

Fig.39 Morphological pellet of *P. umbellatus* in 5 L fermentor on day 7.

(一) 攪拌式發酵槽對於豬苓 *P. umbellatus* 生長之影響

1. 對豬苓菌絲體生長影響

以攪拌式發酵槽培養之菌絲體生長變化如圖四十，可以發現菌絲體生長隨著發酵時間的進行逐漸增加，於第六天至第七天，其生長速率較為快速的，而在第七天時菌絲體產量達到最大值。其中以 1 vvm 通氣量效果較佳，在培養第七天能夠獲得最高菌絲乾重產量 10.85 mg/ml；而 0.5 vvm 通氣量培養狀態，則於第五天達到最大產量 8.02 mg/ml，於培養第五天以後，菌絲體生長有逐漸平緩的趨勢，且有些微的下降，可能菌絲體快速生長，並且聚集覆蓋於通氣口表層，使得供氣循環能力下降，使得菌絲體生長趨於平緩或造成缺氧死亡現象；而在饋料培養方面，於培養前期並未發現有促進菌絲生長的狀態，但是在第三天以後則能發現菌絲體生長增加的現象，且於第七天時達到最大值 11.87 mg/ml，可能當豬苓生長於低濃度培養基質期間時，能夠較快適應培養基質並且快速的渡過遲滯期，而於第三天後饋入足量的碳氮源，則可以適時提供菌絲生長所需的大量能量所致。因此饋料式培養將有利於豬苓生產菌絲體，菌絲體繁殖生長比一般批式發酵更為旺盛。

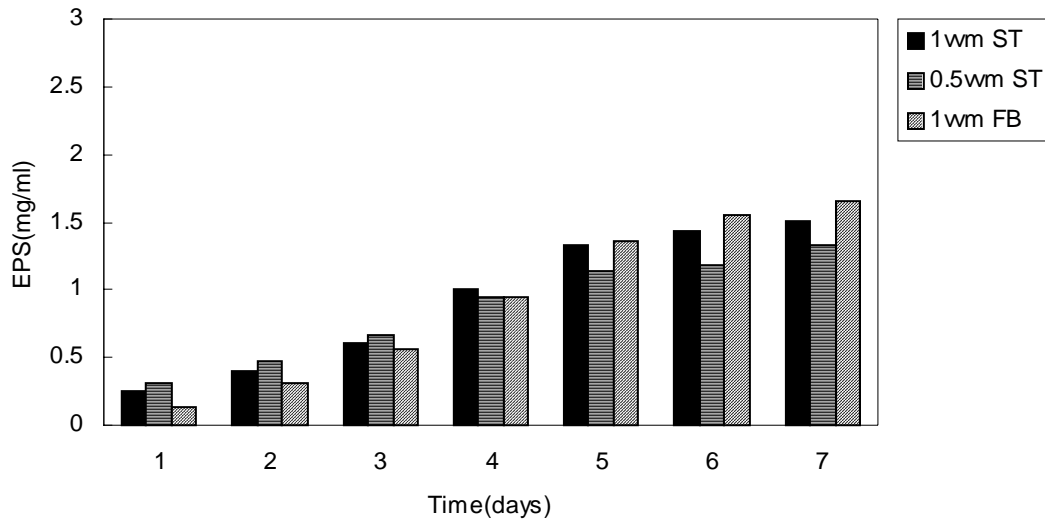


圖四十 攪拌式發酵槽不同通氣量及饋料式培養對豬苓菌絲體生長之影響

Fig.40 Effects of aeration rate and fed-batch culture on mycelium dry weight in the stirred tank fermentor of *P. umbellatus*.

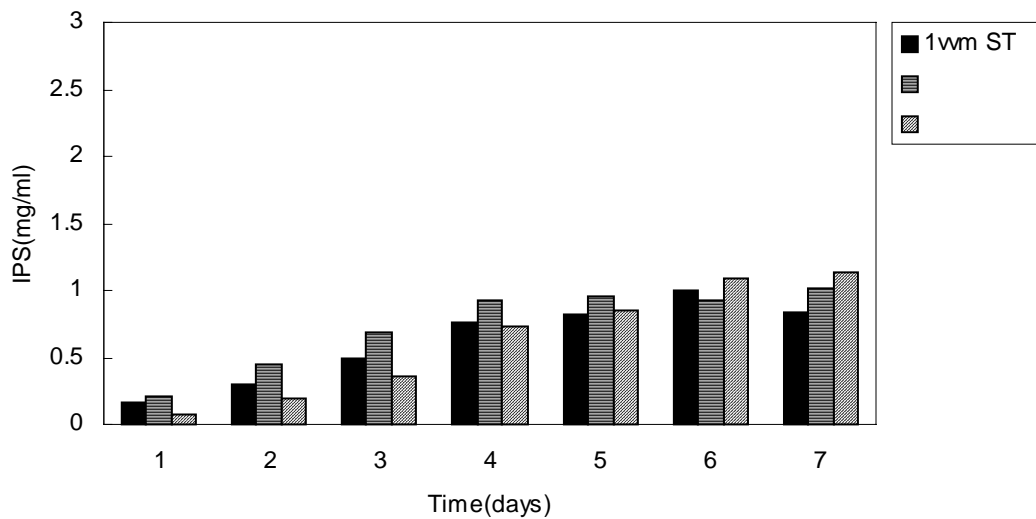
2.對豬苓胞內與胞外多醣體產量影響

以攪拌式發酵槽培養之胞內、胞外多醣體變化如圖四十一、四十二，在培養七天過程中可以發現，胞內外多醣的代謝隨著培養時間逐漸增加，於第三天至第五天時，胞內外多醣代謝速率快速增加，於第六天時代謝速率漸漸趨於平穩，於第七天到達最佳代謝生產量或有微降的趨勢。其中以 1 vvm 通氣量培養時胞外多醣體生產效果較佳，在培養第七天時有最大胞外多醣體產量 1.50 mg/ml，在培養第六天有較佳的胞內多醣體產量 0.99 mg/ml；而 0.5 vvm 通氣量培養時，於第七天有較佳胞外多醣體產量 1.33 mg/ml、胞內多醣體產量 1.02 mg/ml，造成其胞內多醣體含量較高之原因，可能是於 0.5 vvm 培養前期豬苓菌絲體生長代謝較快速，而於前五天時大量累積菌絲體，然而菌絲累積於通氣孔，使得通氣不足而菌體死亡，並造成培養後段期間，胞外多醣的累積速率下降。而在饋料培養方面，利用饋料方法能夠些微促進後期培養豬苓多醣體的生長，但效果並不明顯，於培養前三天，因培養基質濃度較低的狀態，並不利於產多醣體，而於第三天後饋料入培養基質是有效的，在第三天後逐漸使多醣代謝速率上升，於培養第七天時有最佳的胞外多醣體產量 1.65 mg/ml 及胞內多醣產量 1.14 mg/ml。



圖四十一 攪拌式發酵槽不同通氣量及饋料式培養對豬苓胞外多醣體之影響

Fig.41 Effects of aeration rate and fed-batch culture on exopolysaccharide content in the stirred tank fermentor of *P. umbellatus*.

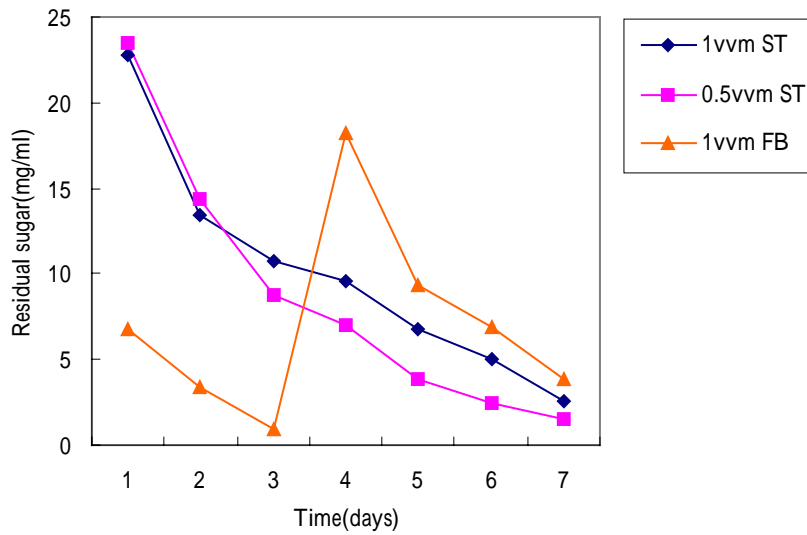


圖四十二 攪拌式發酵槽不同通氣量及饋料式培養對豬苓胞內多醣之影響

Fig.42 Effects of aeration rate and fed-batch culture on intrapolysaccharide content in the stirred tank fermentor of *P. umbellatus*.

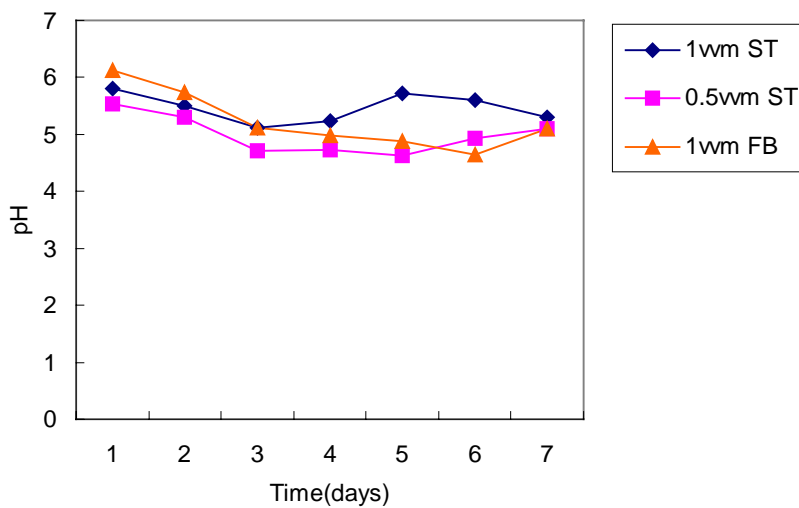
3.對豬苓殘糖及 pH 之變化

以攪拌式發酵槽培養之殘糖及 pH 值變化如圖四十三、四十四，菌體於第一天至第三天快速代謝碳源使菌絲體生長，而第四天至第五天菌體代謝速率呈現較穩定狀態，於第六天後，碳源再次快速的利用，於第七天時，碳源濃度有降至零的趨勢。而使用 0.5 vvm 通氣量實驗組，於培養七天的過程中，在第一天至第三天後碳源的消耗速率快速增加，使得 pH 下降較大至 4.71，於培養第三天至第四天期間碳源消耗速率漸平緩，而 pH 變化也較小，於第五天後菌絲再次大量利用碳源，而大量生長的菌絲體有聚集的現象產生，使得供氣循環較差且菌體產生死亡，而 pH 也逐漸上升。在使用 1 vvm 通氣量培養過程中，則於第四天後其 pH 有些微上升，可能與代謝產生多醣體有關，而於第六天後再次快速利用碳源，使得 pH 值下降。而在饋料培養方面，於第一天至第三天菌體快速利用碳源並使 pH 下降至 5.12，而於第三天後饋入培養基質，菌絲體能夠於較大活性狀態，再次利用碳源使得 pH 逐漸下降至 4.63。



圖四十三 攪拌式發酵槽不同通氣量及饋料式培養對豬苓殘糖之變化

Fig.43 Effects of aeration rate and fed-batch culture on residual sugar content in the stirred tank fermentor of *P. umbellatus*.



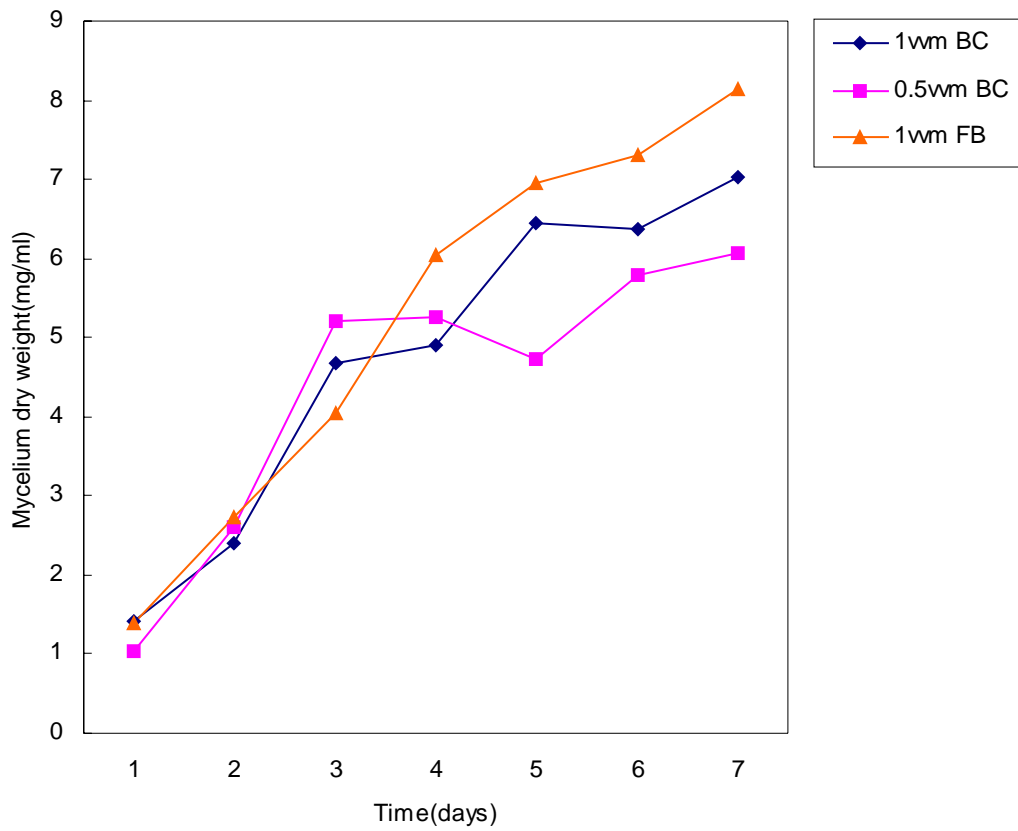
圖四十四 攪拌式發酵槽不同通氣量及饋料式培養對豬苓 pH 值之變化

Fig.44 Effects of aeration rate and fed-batch culture on the change of pH in the stirred tank fermentor of *P. umbellatus*.

(二) 氣泡塔式發酵槽對於豬苓 *P. umbellatus* 生長之影響

1. 對豬苓菌絲體生長影響

以氣泡塔式發酵槽培養之菌絲體生長變化如圖四十五，可以發現菌絲體生長隨著發酵時間的進行逐漸增加，於第五天至第六天，其生長速率較為平穩的，而再第七天時菌絲體產量達到最大值。其中以 1 vvm 通氣量效果較佳，在培養第七天能夠獲得最高菌絲乾重 7.02 mg/ml；而 0.5 vvm 通氣量培養狀態，於培養第四天第五天以後，菌絲體生長有逐漸平緩的趨勢且有些微的下降，第七天菌體再次快速利用碳源，此時達到最大產量 6.06 mg/ml；而在饋料培養方面，於培養前期並未發現有促進菌絲生長的狀態，但是於第二及第三天以後則能發現菌絲體快速生長，於第七天時達到最大值 8.13 mg/ml，可能當豬苓生長於低濃度培養基質期間時，能夠較快適應培養基質並且快速的渡過遲滯期，而於第三天後饋入足量的碳氮源，則可以適時提供菌絲生長所需的大量能量所致。因此饋料式培養將有利於豬苓生產菌絲體，菌絲體繁殖生長比一般批式發酵更為旺盛。

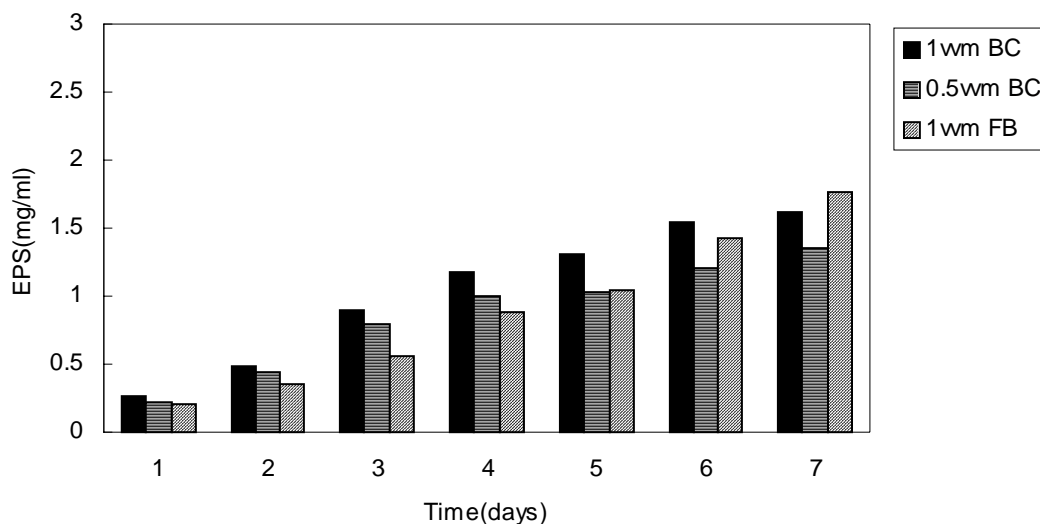


圖四十五 氣泡塔式發酵槽不同通氣量及饋料式培養對豬苓菌絲體生長之影響

Fig.45 Effects of aeration rate and fed-batch culture on mycelium dry weight in the bubble column fermentor of *P.umbellatus*.

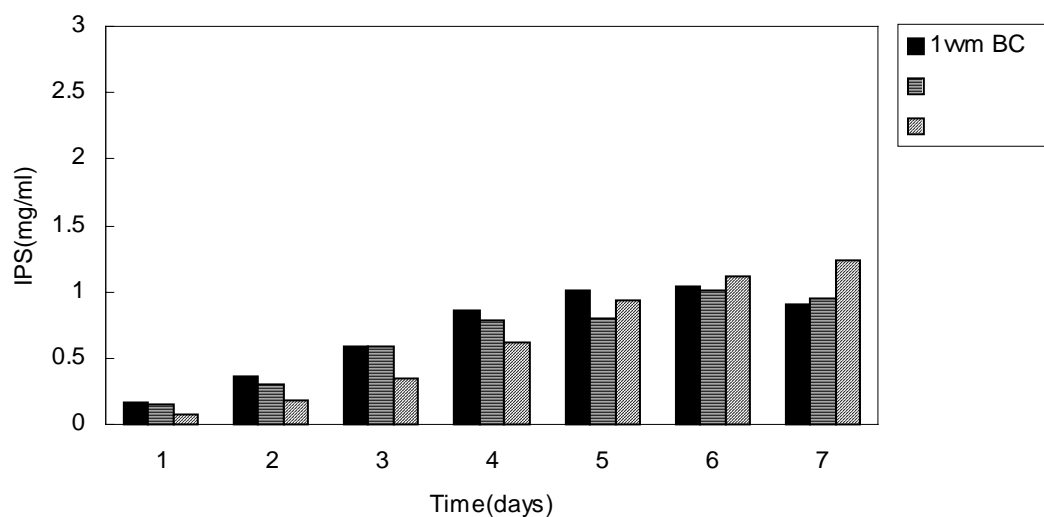
2. 豬苓胞內與胞外多醣體產量影響

以氣泡塔式發酵槽培養之胞內、胞外多醣體變化如圖四十六、四十七，可以發現培養七天過程中，胞內外多醣的代謝隨著培養時間逐漸增加，於第三天至第四天時，胞內外多醣代謝速率快速增加，於第五天時趨於平穩，於第七天到達最佳代謝生產量或有微降的趨勢。其中以 1 vvm 通氣量培養時胞外多醣體生產效果較佳，於培養第七天時有最大胞外多醣體產量 1.62 mg/ml，於培養第六天有較佳的胞內多醣體產量 1.04 mg/ml；而 0.5 vvm 通氣量培養時，於第七天有較佳胞外多醣體產量 1.35 mg/ml，培養第六天有最佳胞內多醣體產量 1.01 mg/ml。而在饋料培養方面，利用饋料方法能夠促進後期培養豬苓多醣體的生長，於培養前三天，因培養基質濃度較低的狀態下較不利於產多醣體，而於第三天後饋料入培養基質是有效的，在第三天後逐漸使多醣代謝速率上升，於培養第七天時有最佳的胞外多醣體產量 1.77 mg/ml 及胞內多醣產量 1.24 mg/ml。



圖四十六 氣泡塔式發酵槽不同通氣量及饋料式培養對豬苓胞外多醣體之影響

Fig.46 Effects of aeration rate and fed-batch culture on exopolysaccharide content in the bubble column fermentor of *P. umbellatus*.

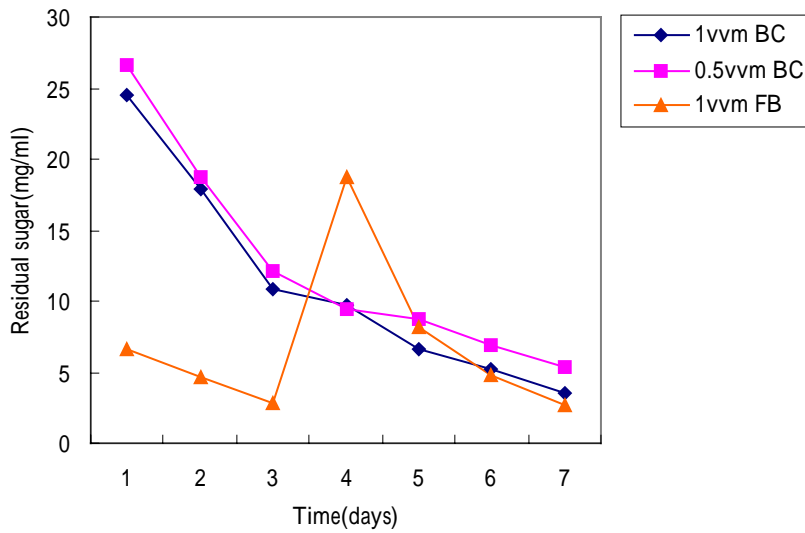


圖四十七 氣泡塔式發酵槽不同通氣量及饋料式培養對豬苓胞內多醣之影響

Fig.47 Effects of aeration rate and fed-batch culture on intrapolysaccharide content in the bubble column fermentor of *P. umbellatus*.

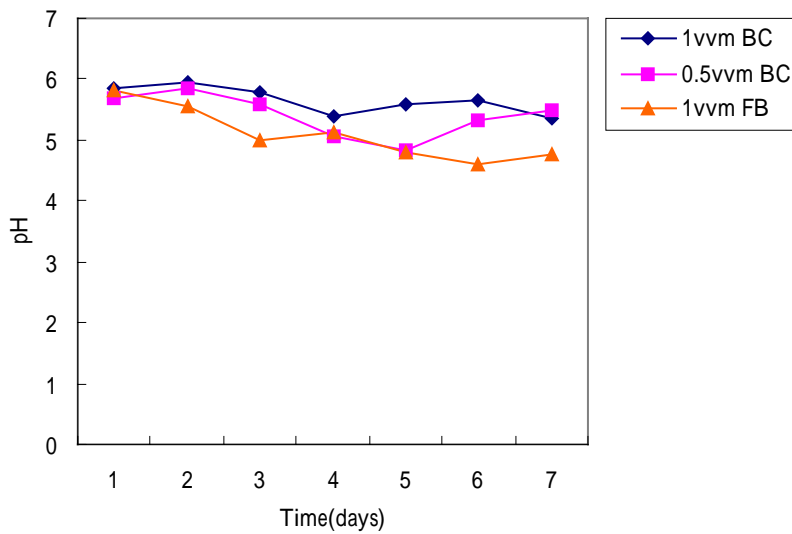
3.對豬苓殘糖及 pH 值之變化

以氣泡塔式發酵槽培養之殘糖及 pH 值變化如圖四十八、四十九，菌體於第一天至第三天快速代謝碳源使菌絲體生長，而第四天至第五天菌體代謝速率呈現較穩定狀態，於第六天後，碳源再次快速的利用，於第七天時，碳源濃度有降至零的趨勢。再使用 1 vvm 通氣量培養過程中，在第一天至第三天後碳源的消耗速率快速增加，且碳源消耗利用的速率較以 0.5 vvm 通氣量培養大，而於第四天後其 pH 有些微上升，可能與代謝產生多醣體有關，而於第六天後再次快速利用碳源，使得 pH 值下降。使用 0.5 vvm 通氣量實驗組，在第一天至第四天碳源的消耗速率快速，使得 pH 下降至 5.01，於培養第四天至第五天期間碳源消耗速率漸平緩，於第六天後再次代謝碳源，但此時 pH 些微上升，可能與菌絲生長有關。而在饋料培養方面，於第一天至第三天菌體快速利用碳源並使 pH 下降至 5.01，而於第三天後饋入培養基質，菌絲體能夠於較適活性狀態下生長，再次利用碳源使得 pH 逐漸下降至 4.60，於第六天至第七天碳源代謝速率趨於平穩。



圖四十八 氣泡塔式發酵槽不同通氣量及饋料式培養對豬苓殘糖之變化

Fig.48 Effects of aeration rate and fed-batch culture on residual sugar content in the bubble column fermentor of *P. umbellatus*.



圖四十九 氣泡塔式發酵槽不同通氣量及饋料式培養對豬苓 pH 值之變化

Fig.49 Effects of aeration rate and fed-batch culture on the change of pH in the bubble column fermentor of *P. umbellatus*.

不同的發酵槽培養、通氣量及饋料式培養所得之菌體乾重、胞外、胞內多醣體等所得結果整理於表六中。由本實驗結果發現，攪拌式發酵槽部分，以 1 vvm 通氣量培養豬苓 *P. umbellatus* 較有利於菌絲體及多醣體生產，菌絲體產量達 10.85 mg/ml、胞內多醣產量 0.99 mg/ml 及胞外多醣產量達 1.50 mg/ml；而以 0.5 vvm 通氣量培養時，則於第五天培養時，可能產生大量菌絲體累積造成菌體缺少充足氧氣而使菌體死亡，而菌絲體及多醣體產量下降；氣泡塔發酵槽部分，也是以 1 vvm 通氣量培養豬苓 *P. umbellatus* 較有利於菌絲體及多醣體的生產，而菌絲體產量達 7.02 mg/ml、胞內多醣產量 1.04 mg/ml 及胞外多醣體產量達 1.62 mg/ml；而以 0.5 vvm 通氣量培養時，對菌絲體及多醣體產量效果較差。在以攪拌式發酵槽及泡柱式發酵槽培養豬苓 *P. umbellatus* 實驗中發現，以前者較有利於豬苓菌絲體的生長，而後者則較有利於豬苓多醣體生產。而在饋料式培養豬苓 *P. umbellatus* 方面，在菌絲體及多醣體代謝生產上，皆優於批式發酵槽培養，可能因進行碳源的控制，不會使培養初期過高的碳氮源濃度而不利於菌絲體生存，間接抑制了菌體的生長，故使用饋料批式培養能提供較佳的生長環境供菌體生長及多醣體代謝。整體上，以泡柱式饋料培養豬苓 *P. umbellatus* 時，較有利於生產胞內外多醣體。

表六 不同的發酵槽、通氣量及饋料式培養對於豬苓培養過程中菌體
乾重、胞內多醣、胞外多醣含量之影響

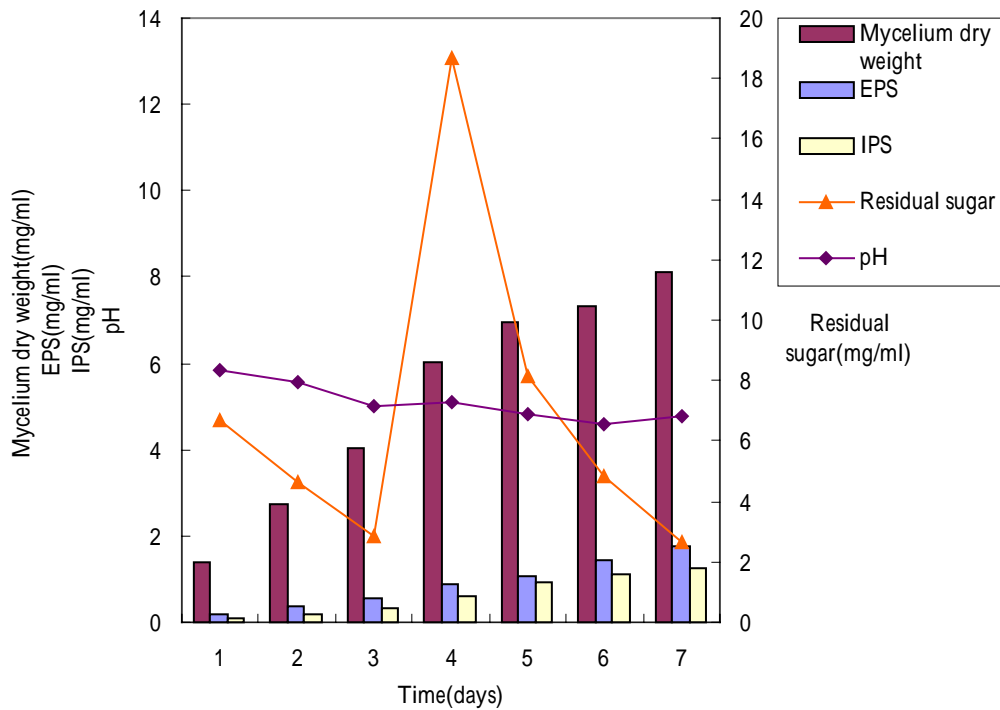
Table.6 Effects of different type of fermentors, aeration rate and fed-batch culture on mycelium dry weight and polysaccharide content in the fermentation of *P. umbellatus*.

Growth condition		Mycelium dry weight (mg/ml)	IPS (mg/ml)	EPS (mg/ml)
Stirred tank	1vvm	10.85±0.25 ^b	0.99±0.04 ^c	1.50±0.02 ^{bc}
	0.5vvm	8.02±0.49 ^c	1.02±0.01 ^c	1.33±0.02 ^c
	Fed-batch	11.87±0.15 ^a	1.14±0.03 ^{ba}	1.65±0.14 ^{ba}
Bubble column	1vvm	7.02±0.12 ^d	1.04±0.03 ^{bc}	1.62±0.01 ^{ba}
	0.5vvm	6.06±0.22 ^e	1.01±0.11 ^c	1.35±0.18 ^c
	Fed-batch	8.13±0.05 ^c	1.24±0.09 ^a	1.77±0.06 ^a

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

EPS : Exo-polysaccharide

IPS : Intra-polysaccharide



圖五十 豬苓在氣泡塔式發酵槽以饋料培養期間其殘糖、菌絲乾重、多醣含量之變化

Fig.50 Time course of *P. umbellatus* in the bubble column fermentor with fed-batch culture.

EPS : Exo-polysaccharide

IPS : Intra-polysaccharide

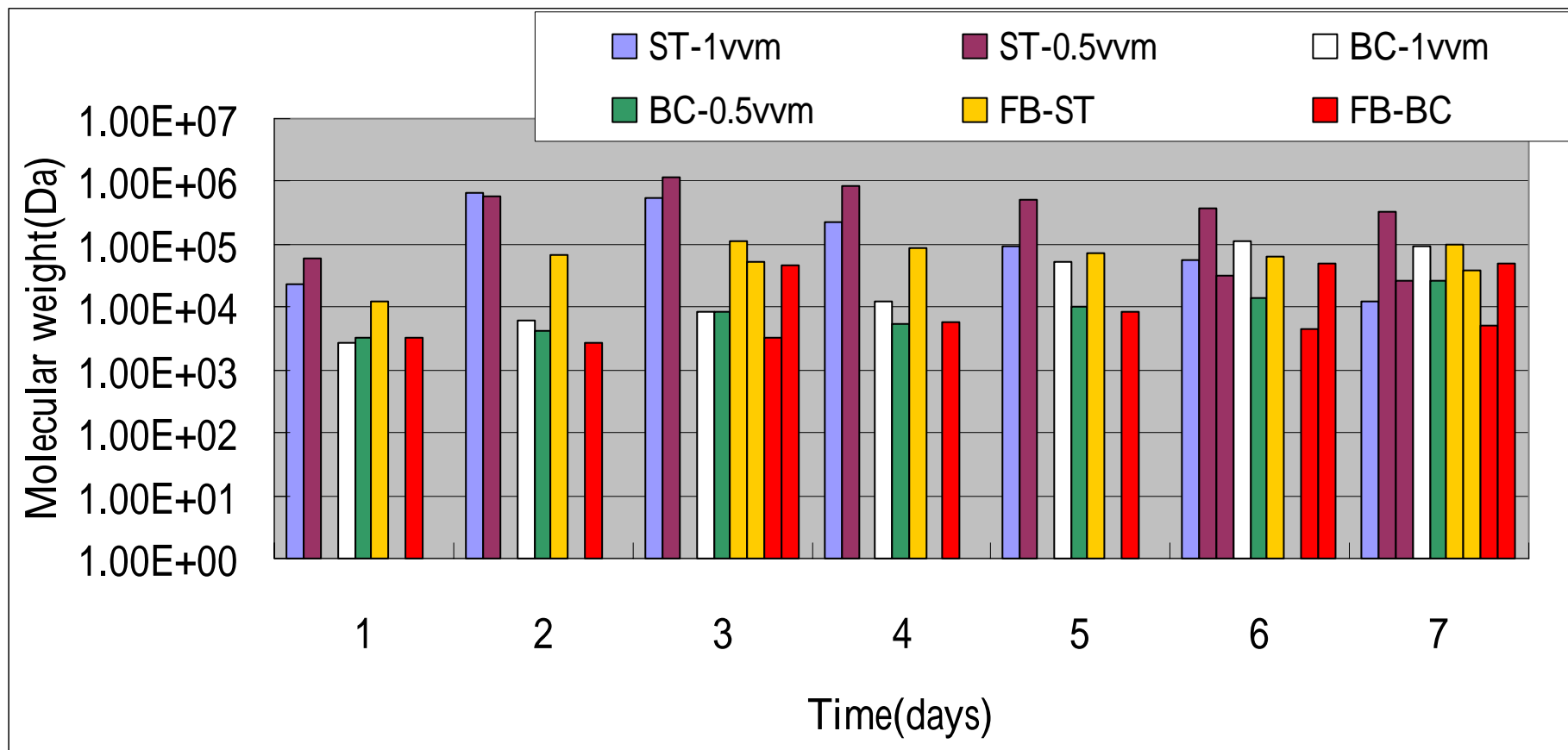
(三) 多醣體分子量分析

文獻指出菇菌類多醣體主要以 β -1,3-glucan 結構組成，所具有的功效活性強弱會受到多醣體的分支度、分子量大小、主鏈的鍵結方式和側鏈基團物種的影響，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，2002)；尚有實驗指出，在雲芝多醣分子量分佈在 2×10^5 Da 左右時，能促進細胞增生及活化免疫力(Kurakata et al., 1991)；而靈芝多醣體由萃取方式不同分為 ganoderan A、B 及 C 等，其分子量分佈在 5.8×10^3 至 2.3×10^4 Da 左右者，皆能達到有降血糖功效 (Tomoda et al., 1986)；由黑木耳中萃取之木耳多醣，當分子量分佈在 5×10^6 Da 左右時，具有降膽固醇的功能 (Sone et al., 1978)；而樟芝多醣體分子量分佈在 5.8×10^4 至 2.3×10^5 Da 左右，具有抗癌及降血糖的功效 (劉等，1990)；另外，由竹蓀中萃取之多醣體分子量分佈在 3.3×10^5 及 6.2×10^5 Da 左右時，具有抗癌效果。而要能表現較佳具有功效的生物活性，則必須要有高度的三股螺旋結構，而要讓 β -1,3-glucan 產生三股螺旋，其分子量通常要高於 9×10^4 Da (Susuki, 1992；杜，2002)。因此本實驗乃以膠體滲透層析 (GPC) 測量豬苓在發酵槽培養時之胞內與胞外多醣體分子量大小，探討各培養條件所得之多醣體，是否達到具有較佳生物活性之分子量。

1. 攪拌式發酵槽

利用攪拌式發酵槽通氣量為 1 vvm 培養豬苓 *P. umbellatus* 時，發酵液中主要的多醣體分子量集中為單一種，在培養期間，分子量於第二天後有逐漸下降的現象，而分子量分佈介於 1.0×10^4 至 7.5×10^5 Da 之間（圖五十一）。至於要達到具有上述具有調節免疫功效活性的分子量範圍，則在培養的第三天即出現，分子量為 5.4×10^5 Da（圖五十二）；其後分子量有逐漸變小的趨勢，並且降至 1.2×10^4 Da（圖五十二）。另外，胞內多醣體其分子量分佈變化較小介於 2.7×10^6 至 5.6×10^6 Da 之間（表七），而分子量主要只有單一種類，於培養第三天時有較大分子量為 3.3×10^6 Da（圖五十三），於第三天後緩緩下降。

當以 0.5 vvm 之通氣量攪拌式發酵槽培養豬苓時，在培養期間胞外多醣體分子量分佈介於 1.8×10^5 至 2.1×10^6 Da 之間（圖五十一），於培養第三天有較大的多醣分子量（ 1.2×10^6 Da）（圖五十四），而隨著培養時間的增加，分子量有下降的現象，於第七天降至 3.2×10^5 Da（圖五十四），且發酵液中主要的多醣分子量變成有兩種，分別為 3.2×10^5 及 2.7×10^5 Da（表七，圖五十四），而其中以較大分子量佔比例比較少；另外，胞內多醣體經過分析，分子量分佈為單一種類，於培養第二天即有較大的分子量產生 1.1×10^7 Da（表七），而隨著培養時間增加多醣分子量逐漸下降（表七），於第七天時為 6.2×10^6 Da（圖五十五）。培養過程中，分子量分佈介於 3.5×10^6 至 1.5×10^7 Da 之間（圖



圖五十一 發酵方法對豬苓在培養期間多醣分子量的影響

Fig.51 Effects of culture method on molecular weight of polysaccharides from *P. umbellatus* in fermentation.

ST: Stirred tank fermentor BC: Bubble column fermentor FB: Fed-batch culture

表七 不同發酵槽及通氣量培養豬苓之多醣體分子量分佈

Table.7 Effects of fermentors type and aeration rate on molecular weight of polysaccharide from the fermentation of *P. umbellatus*.

DAY	ST-1vvm		ST-0.5vvm	
	EPS	IPS	EPS	IPS
1	2.3×10^4	9.3×10^5	5.8×10^4	5.5×10^5
2	6.6×10^5	1.5×10^6	5.8×10^5	1.1×10^7
3	5.4×10^5	3.3×10^6	1.2×10^6	9.1×10^6
4	2.3×10^5	2.9×10^6	8.3×10^5	8.3×10^6
5	9.3×10^4	N/A	5.1×10^5	8.9×10^6
6	5.6×10^4	N/A	3.8×10^5	7.4×10^6
7	1.2×10^4	1.6×10^6	3.1×10^4	6.2×10^6
			2.7×10^4	

DAY	BC-1vvm		BC-0.5vvm	
	EPS	IPS	EPS	IPS
1	2.7×10^3	2.3×10^4	3.2×10^3	1.15×10^4
2	6.3×10^3	5.1×10^4	4.2×10^3	2.2×10^4
3	8.5×10^3	3.7×10^3	8.3×10^3	2.9×10^5
		7.1×10^4		3.5×10^4
4	1.2×10^4	9.4×10^3	5.3×10^3	N/A
5	5.2×10^4	1.2×10^5	1.5×10^4	5.3×10^5
		N/A		N/A
6	1.1×10^5	N/A	1.4×10^4	N/A
7	9.6×10^4	9.3×10^5	2.7×10^4	1.7×10^6
		7.3×10^3		

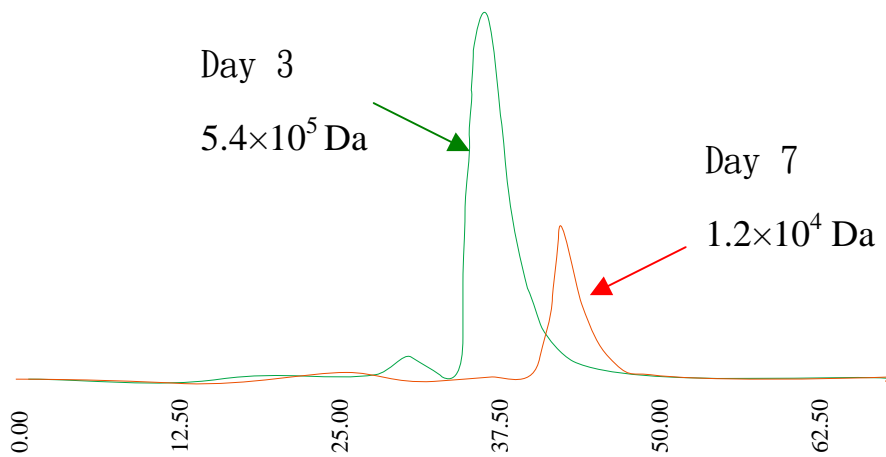
N/A : Date not available

ST : Stirred tank fermentor

BC : Bubble column fermentor

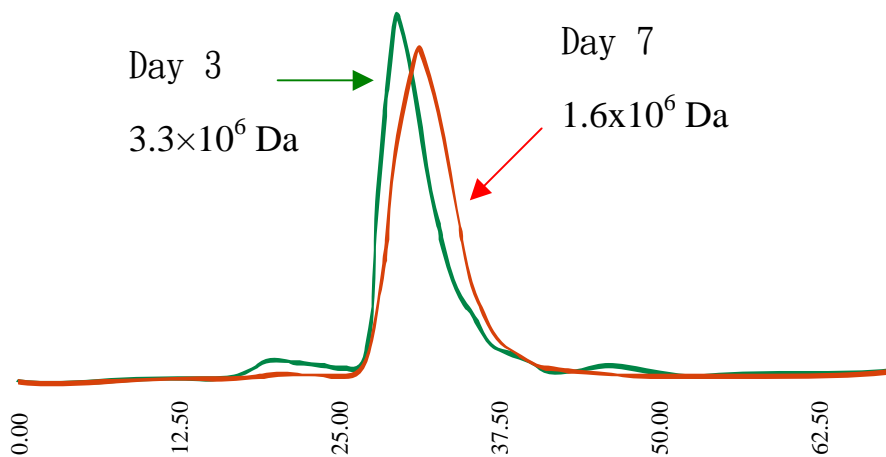
EPS : Exo-polysaccharides

IPS : Intra-polysaccharides



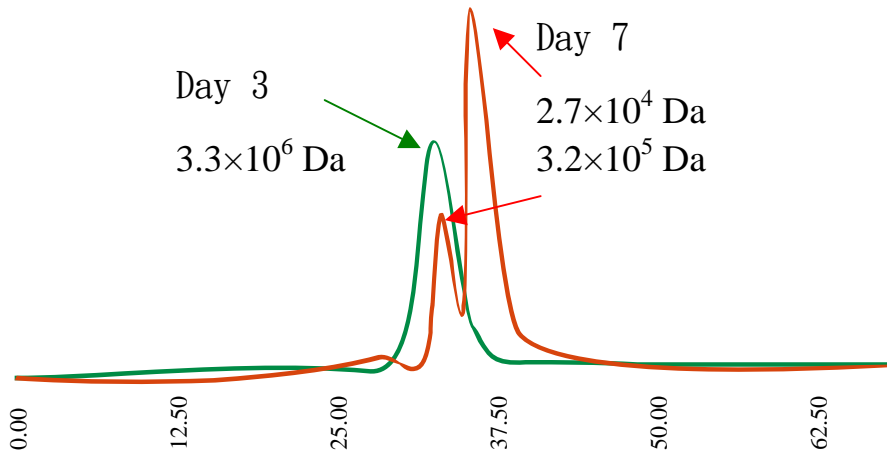
圖五十二 攪拌式發酵槽 1 vvm 通氣量豬苓胞外多醣體膠體層析沖提圖 (第三天、第七天)

Fig.52 Gel filtration chromatograms of *P. umbellatus* exopolysaccharides of 1 vvm aeration in stirred tank fermentor on day 3 and day 7.



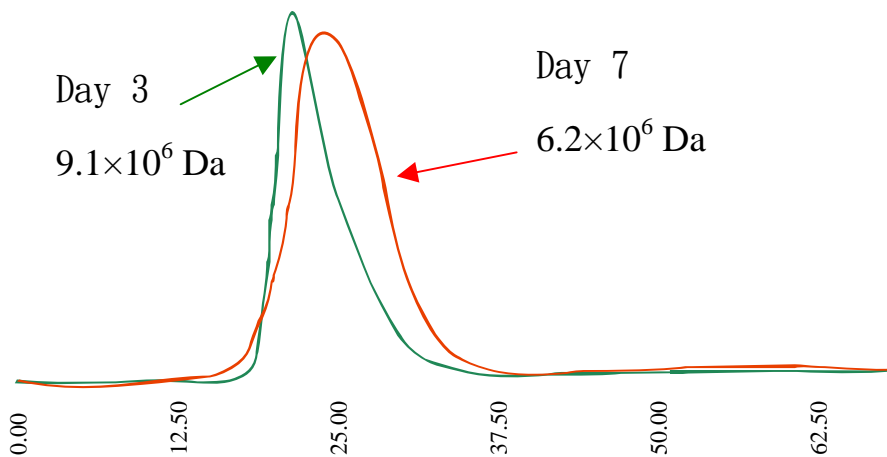
圖五十三 攪拌式發酵槽 1 vvm 通氣量豬苓胞內多醣體膠體層析沖提圖 (第三天、第七天)

Fig.53 Gel filtration chromatograms of *P. umbellatus* intracellular polysaccharides of 1 vvm aeration in stirred tank fermentor on day 3 and day 7.



圖五十四 攪拌式發酵槽 0.5 vvm 通氣量豬苓胞外多醣體膠體層析沖提圖 (第三天、第七天)

Fig.54 Gel filtration chromatograms of *P. umbellatus* exopolysaccharides of 0.5 vvm aeration in stirred tank fermentor on day 3 and day 7.



圖五十五 攪拌式發酵槽 0.5 vvm 通氣量豬苓胞內多醣體膠體層析沖提圖 (第三天、第七天)

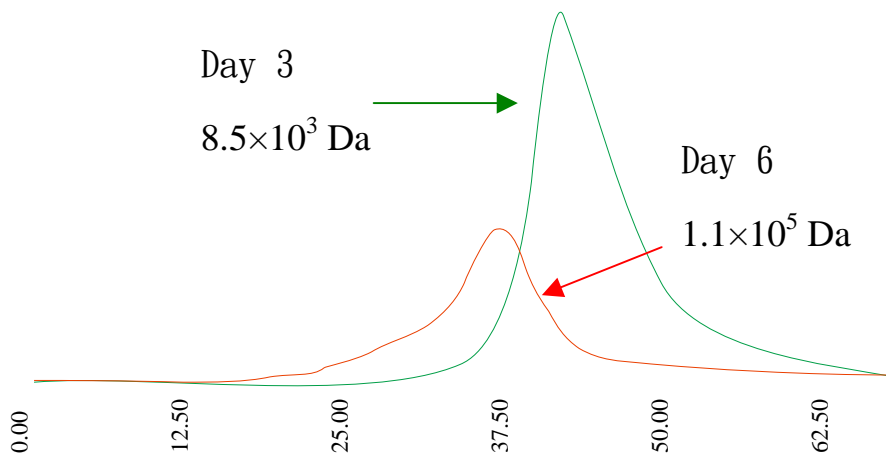
Fig.55 Gel filtration chromatograms of *P. umbellatus* intracellular polysaccharides of 0.5 vvm aeration in stirred tank fermentor on day 3 and day 7.

五十一)。

2. 氣泡塔發酵槽

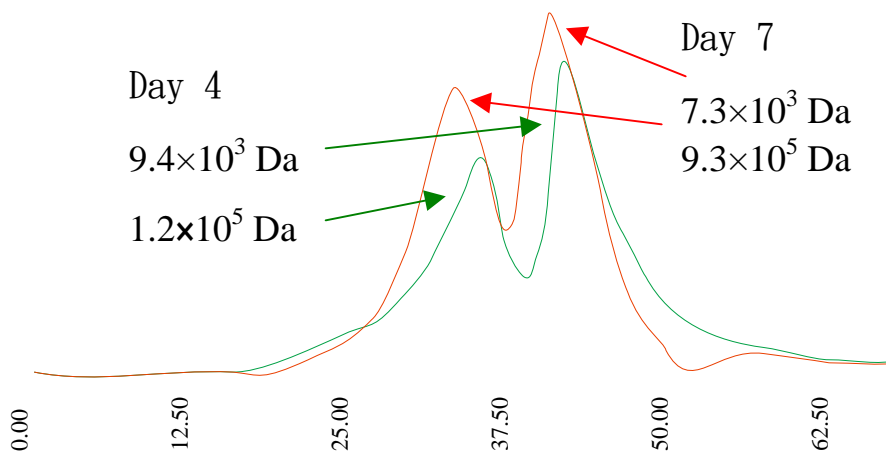
利用氣泡塔式發酵槽培養，以 1 vvm 通氣量培養豬苓時，主要的多醣分子量分佈為單一種類。在培養第二至第五天分子量較低介於 5×10^3 至 6×10^4 Da 之間 (圖五十一、圖五十六及表七)，而分子量大小隨著培養時間有逐漸增加的趨勢，於培養第六天形成較大分子量 1.1×10^5 Da (圖五十六)，於培養過程中，胞外多醣體分子量分佈介於 5.6×10^3 至 1.5×10^5 Da 之間 (圖五十一)。另外，胞內多醣體主要由兩種種類分子量所構成，以分子量 9.4×10^3 Da 佔比例比較高，而高分子量型態佔比例較低。於培養期間胞內多醣體分子量分佈介於 6×10^3 至 1.6×10^5 Da 之間 (表七)，在培養第四天即有較大分子量 1.2×10^5 Da 產生 (圖五十七)。

當以 0.5 vvm 通氣量氣泡塔式發酵槽培養豬苓時，所生產的多醣體主要分子量分佈為單一種類 (圖五十八)，並且所代謝的多醣分子量皆為較小分子的狀態功效活性較差 (低於 9×10^4 Da 較不易形成三股螺旋結構)，而隨著培養時間的增加，分子量有逐漸增加的現象，於第七天培養時達 2.7×10^4 Da (圖五十八)。在培養期間中，胞外多醣體分子量分佈介於 3.8×10^3 至 3.0×10^4 Da 之間 (圖五十一)；然而胞內多醣體其分子量分佈介於 1.2×10^4 至 2.4×10^6 Da 之間 (表七)，於培養第



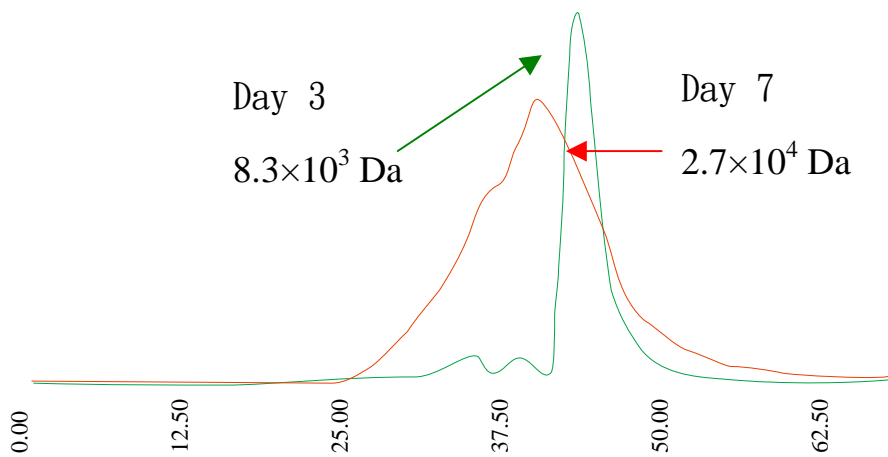
圖五十六 氣泡塔式發酵槽 1 vvm 通氣量豬苓胞外多醣體膠體層析
沖提圖 (第三天、第六天)

Fig.56 Gel filtration chromatograms of *P. umbellatus* exopolysaccharides of 1 vvm aeration in bubble column fermentor on day 3 and day 6.



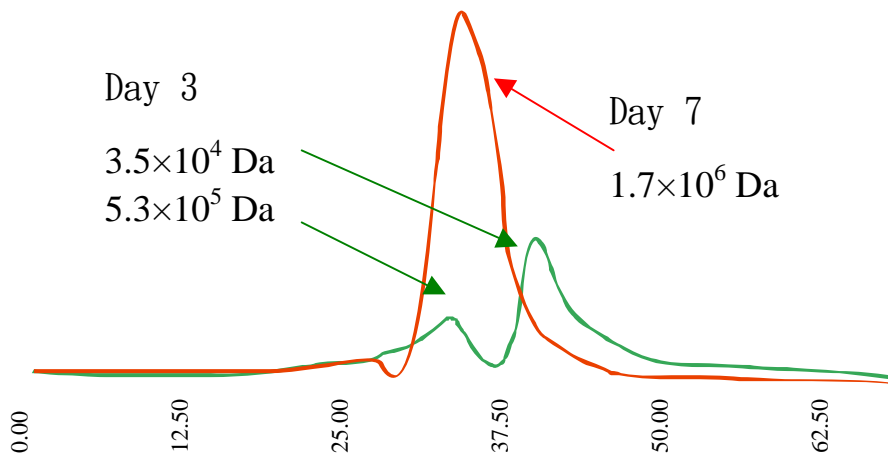
圖五十七 氣泡塔式發酵槽 1 vvm 通氣量豬苓胞內多糖體膠體層析
沖提圖 (第四天、第七天)

Fig.57 Gel filtration chromatograms of *P. umbellatus* intracellular polysaccharides of 1 vvm aeration in bubble column fermentor on day 4 and day 7.



圖五十八 氣泡塔式發酵槽 0.5 vvm 通氣量豬苓胞外多醣體膠體層析
沖提圖 (第三天、第七天)

Fig.58 Gel filtration chromatograms of *P. umbellatus* exopolysaccharides of 0.5 vvm aeration in bubble column fermentor on day 3 and day 7.



圖五十九 氣泡塔式發酵槽 0.5 vvm 通氣量豬苓胞內多醣體膠體層析
沖提圖 (第三天、第七天)

Fig.59 Gel filtration chromatograms of *P. umbellatus* intracellular polysaccharides of 0.5 vvm aeration in bubble column fermentor on day 3 and day 7.

三天形成具有功效活性較大分子量多醣體（表七），而分子量分佈以兩種種類構成，較小分子量多醣的部份（ 3.5×10^4 Da）含有較高比例的含量，另一則為較大分子量多醣部份（ 5.3×10^5 Da）含量較低，而隨培養時間增加多醣分子量變大為 1.7×10^6 Da（圖五十九）。

3. 饋料式培養

當進行饋料攪拌式培養時，胞外多醣分子量分佈介於 9.6×10^3 至 1.7×10^5 Da 之間（圖五十一）；在培養第三天主要的多醣體分子量分佈有兩種種類，一種為分子量較大部份 1.1×10^5 Da 其含量佔比例比較小（圖六十），另一多醣分子量為 5.4×10^4 Da 佔含量比例較高。而於第三天饋料後，胞外多醣的產量增加，但其分子量變化較不明顯，於培養第四至第六天多醣體分子量維持在 7.1×10^4 至 9.7×10^4 Da 之間（表八），可能為累積較大分子量之多醣體生產，於第七天較大分子量所佔比例有增加的現象，而較小分子量所佔比例則減少了（圖六十）；而胞內多醣分子量主要的分佈為單一種類，於培養過程中，其分子量比一般批式培養來的低，可能與培養初期低濃度培養基有關，在培養第五天才出現較大分子量，培養第六至第七天分子量下降至 6.2×10^5 Da（圖六十一）。而多醣體分子量分佈介於 4.3×10^5 至 2.5×10^6 Da 之間（表八）。

當以饋料氣泡塔式進行培養豬苓實驗，其胞外多醣分子量分佈

表八 以饋料式培養豬苓在攪拌式及氣泡塔式發酵槽中多醣體分子
量分佈

Table.8 Effects of fed-batch culture on molecular weight of polysaccharides from the fermentation of *P. umbellatus*.

DAY	FB-ST		FB-BC	
	EPS	IPS	EPS	IPS
1	1.2×10^4	N/A	3.2×10^3	3.7×10^3
2	6.9×10^4	7.3×10^4	2.7×10^3	5.9×10^3
3	1.1×10^5	1.02×10^5	3.3×10^3	4.1×10^3
	5.4×10^4		4.5×10^4	
4	9.3×10^4	8.32×10^5	N/A	N/A
5	7.1×10^4	1.7×10^6	8.2×10^3	N/A
6	N/A	N/A	4.5×10^3	N/A
			4.8×10^4	
7	9.7×10^4	6.2×10^5	5.2×10^3	4.3×10^3
	3.8×10^4		5.1×10^4	4.2×10^4
				7.5×10^4

ST : Stirred tank fermentor

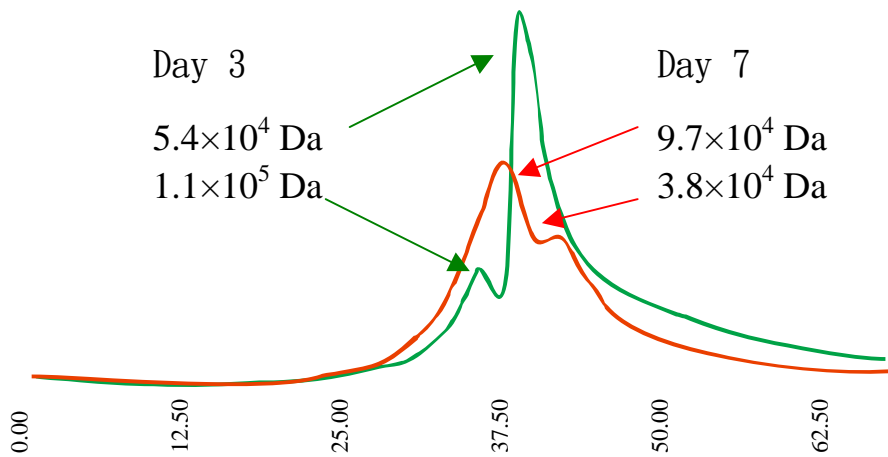
BC : Bubble column fermentor

FB : Fed-batch culture

EPS : Exo-polysaccharide

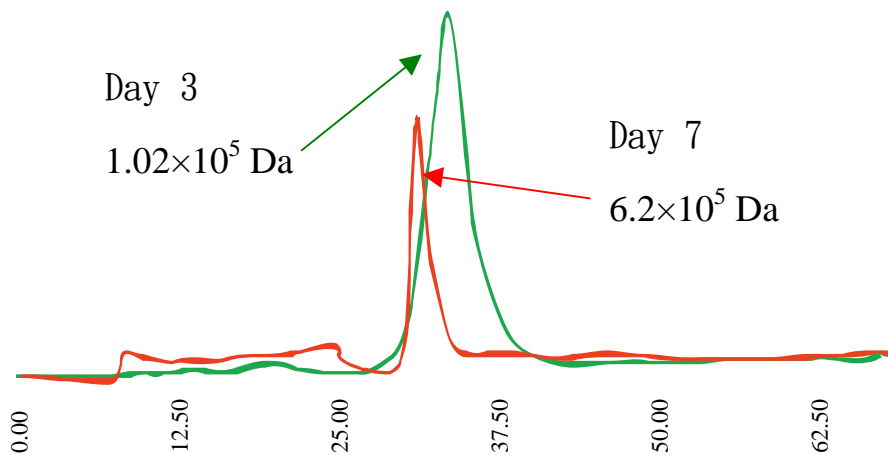
IPS : Intra-polysaccharide

N/A : Data not available



圖六十 攪拌式發酵槽饋料式培養豬苓胞外多醣體膠體層析沖提圖
 (第三天、第七天)

Fig.60 Gel filtration chromatograms of *P. umbellatus* exopolysaccharides during the fed-batch culture in stirred tank fermentor on day 3 and day 7.

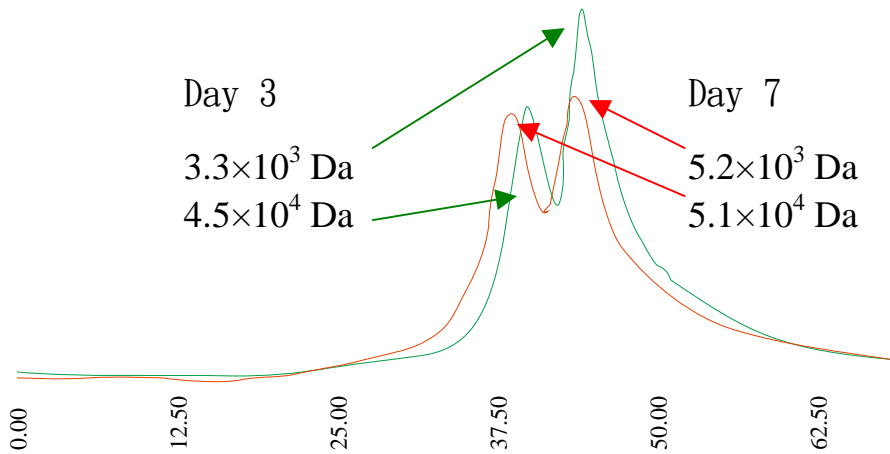


圖六十一 攪拌式發酵槽饋料式培養豬苓胞內多醣體膠體層析沖提圖
 (第三天、第七天)

Fig.61 Gel filtration chromatograms of *P. umbellatus* intracellular polysaccharides during the fed-batch culture in stirred tank fermentor on day 3 and day 7.

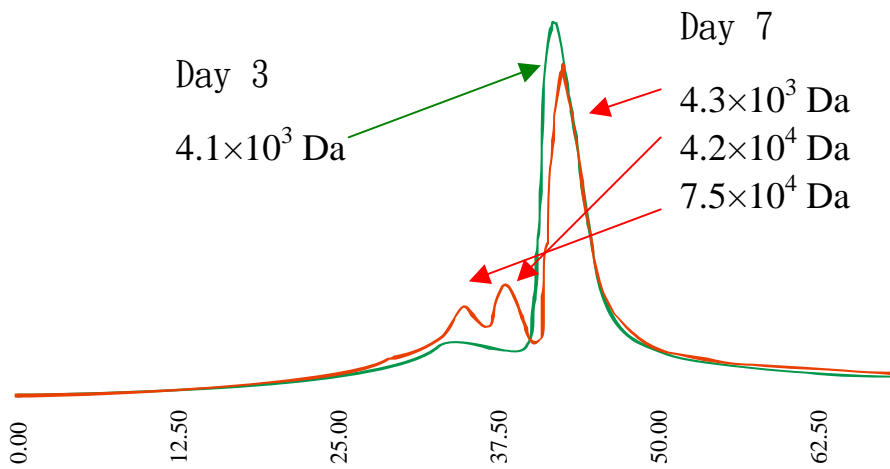
1.1×10³ 至 5.7×10⁴ Da 之間 (圖五十一)。在培養第三天多醣體主要的分子量分佈有兩種，較低分子量部份 3.3×10³ Da 含量較多，較高分子量部份 4.5×10⁴ Da 其含量則較少 (圖六十二)。隨著培養時間的增加，多醣體分子量變化較小，而培養第五天至第七天時，多醣體含量的累積可能為增加高分子量多醣體含量 (圖六十二)；而胞內多醣體其分子量分佈介於 5.2×10³ 至 1.0×10⁵ Da 之間。於培養前期胞內多醣體分子量較低在 7.5×10³ 至 1.3×10⁴ Da 之間 (表八)，主要多醣分子量分佈為單一種類，而隨著培養時間增加多醣體分子量分佈仍然較低，在培養第七天時分子量分佈形成三種分子量種類，其中以較低分子量 (4.3×10³ Da) 之含量比例最多，其餘兩個多醣分子量分別為 4.2×10⁴ Da 及 7.5×10⁴ Da，而多醣體累積含量比例皆較低 (圖六十三)。

尚有文獻指出一種製備豬苓活性多醣的方法，主要是以熱水萃取子實體，其可溶部份再以酒精沉澱，後經冷凍乾燥發進行純化及濃縮，產品中 β -glucan 含量可達 15%，分子量範圍在 7.5×10⁴—1.15×10⁵ Da 之間 (韓國專利 KB 2001105709, 2001)。由本實驗液態發酵槽培養所測得分子量範圍 1.0×10⁴ 至 7.5×10⁵ Da 與豬苓子實體中萃取多醣相似。另外，與目前研究較多之菇類多醣體中的 β -1,3-glucans 之分子量比較：*Phytophthora erythroseptica* 經熱水萃取菌絲體所得之多醣體分子量為 2.0×10⁴ Da 左右，具有功效活性 (Kraus et al, 1992)，與



圖六十二 氣泡塔式發酵槽饋料式培養豬苓胞外多醣體膠體層析沖提圖 (第三天、第七天)

Fig.62 Gel filtration chromatograms of *P. umbellatus* exopolysaccharides during the fed-batch culture in bubble column fermentor on day 3 and day 7.



圖六十三 氣泡塔式發酵槽饋料式培養豬苓胞內多醣體膠體層析沖提圖 (第三天、第七天)

Fig.63 Gel filtration chromatograms of *P. umbellatus* intracellular polysaccharides during the fed-batch culture in bubble column fermentor on day 3 and day 7.

本實驗氣泡塔式發酵槽培養胞內多醣分子量相似。*Phytophora parasitica* 熱水萃取菌絲體所得之多醣體分子量在 9×10^3 Da 及 2×10^5 Da 之間具有高的抗腫瘤活性 (Bruneteau et al., 1988)，與本實驗中以饋料式氣泡塔發酵槽培養之多醣分子量相似。*Pleurotus citrinopileatus* 之子實體經 NaOH 萃取具有功效活性之多醣體分子量介於 4.0×10^5 至 1.9×10^6 Da 之間 (Zhang et al, 1994)，與本實驗中攪拌式發酵槽培養之胞內多醣分子量分佈相似。而 *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395 發酵液經酒精沉澱測得胞外多醣分子量為 5×10^6 Da (Ohino et al., 1987)，與攪拌式發酵槽培養分子量相似。另外，Gao 等，在 *Tremella fuciformis* 子實體中水萃取之多醣體分子量分佈 1×10^3 至 5.3×10^4 Da 之間仍具有生物活性 (1996)。另外，利用發酵槽培養豬苓，在攪拌式及泡柱式培養上皆以通氣量為 0.5 vvm 進行培養時較有利於豬苓生產較高分子量之胞內與胞外多醣體。當在不同的發酵槽培養時，以攪拌式發酵槽較有利於豬苓生產較高分子量的胞內外多醣體。而在利用饋料式培養時，豬苓所生產的多醣體之分子量皆較一般批式培養所得之多醣分子量低。可能當豬苓在多醣體代謝生產速度較快時，較不利於累積形成大分子胞內外多醣，或攪拌式發酵槽剪力較大，使得培養時間進行分子量逐漸下降。

(四) 發酵槽總結

以不同發酵槽培養豬苓 *P. umbellatus*，僅以生產胞外多醣體含量來評估於何種發酵槽培養較有利時，以泡柱式饋料培養較佳，能生產 1.77 mg/ml 之胞外多醣；而以多醣體生物活性分析作為評估何種發酵槽較有益時，由多醣體分子量分佈可發現，發酵槽培養方面以攪拌式發酵槽培養時有較佳的胞內外多醣體分子量，其中 0.5 vvm 通氣量較有利於高分子量胞內外多醣之生產，而不論氣舉式或攪拌式發酵槽以饋料式培養皆使多醣體分子量大小有下降之現象。

表九 不同的發酵槽、通氣量及饋料式培養對於豬苓發酵期間菌體乾重、胞內多醣、胞外多醣含量及分子量之影響

Table.9 Effects of different type of fermentors, aeration rate and fed-batch culture on mycelium dry weight, polysaccharide content and distribution of molecular weight during the fermentation of *P.umbellatus*.

Growth condition	Mycelium dry weigh (mg/ml)	EPS + IPS (mg/ml)	Molecular weight (Da)		
			EPS	IPS	
Stirred tank fermentor	1vvm	10.85	2.49	1.0×10^4	2.7×10^6
				7.5×10^5	5.6×10^6
	0.5vvm	8.02	2.35	1.8×10^5	3.5×10^6
				2.1×10^6	1.5×10^7
	Fed-batch	11.87	2.79	9.6×10^3	4.3×10^5
				1.7×10^5	2.5×10^6
Bubble column fermentor	1vvm	7.02	2.66	5.6×10^3	9.4×10^5
				1.5×10^5	1.2×10^5
	0.5vvm	6.06	2.36	3.8×10^3	1.2×10^4
				3.0×10^4	2.4×10^6
	Fed-batch	8.13	3.01	1.1×10^3	5.2×10^3
				5.7×10^4	1.0×10^5

EPS : Exo-polysaccharide

IPS : Intra-polysaccharide