

第四章 結果與討論

一、茯苓的搖瓶培養

(一) 茯苓菌絲在搖瓶的型態

培養第三天茯苓菌絲體的型態是小球形，而懸浮於培養液（圖七），培養到第七天時，菌絲體漸漸結成大塊沉於瓶底（圖八），且發酵液常散發茯苓特有之氣味。





圖七 培養第三天茯苓菌絲體的型態

Fig 7 Morphological changes of *Wolfiporia cocos* in flask on day 3



圖八 培養第七天茯苓菌絲體的型態

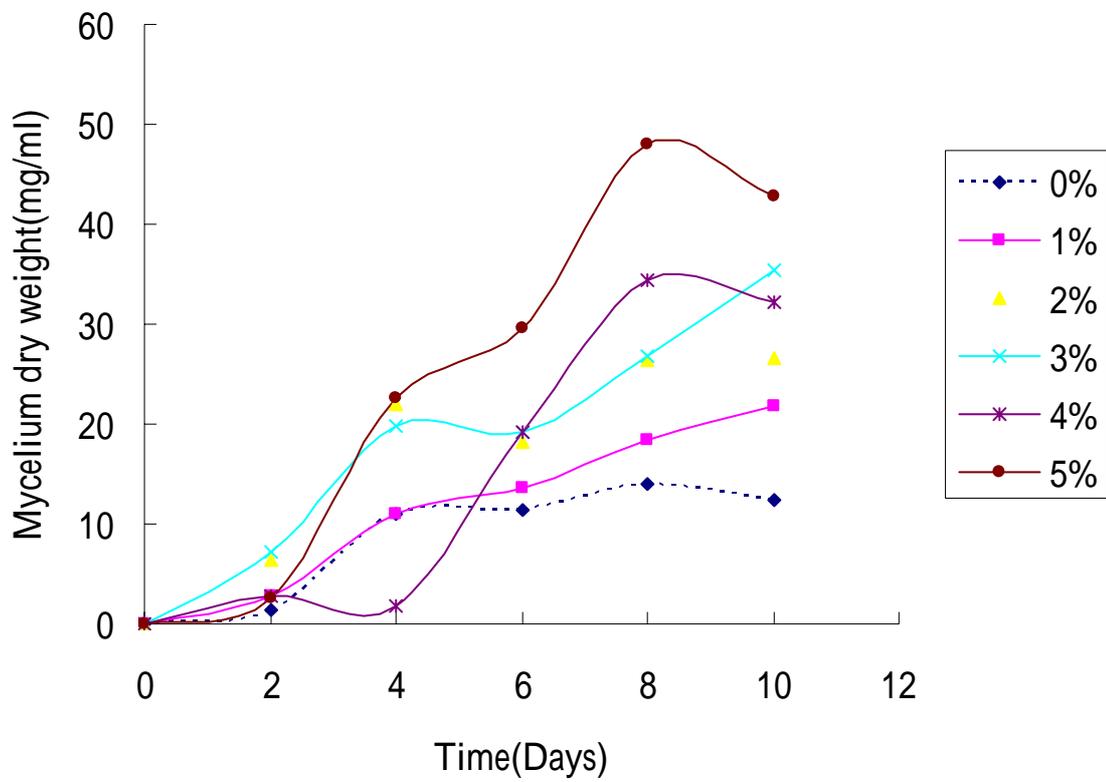
Fig 8 Morphological changes of *Wolfiporia cocos* in flask on day 7

(二)添加不同濃度之橄欖油對茯苓生長之影響

1. 茯苓菌絲體的生長

本實驗的基本培養基如下：surose 40g/l、 yeast extract powder 10g/l、 K₂HPO₄ 0.5g/l、 KH₂PO₄ 0.5g/l、 MgSO₄·7H₂O 0.5g/l，而由文獻(Yang et al., 2000)得知，添加適量的脂肪酸及植物油可以刺激靈芝菌絲體以及多醣體的生長，尤以橄欖油對靈芝菌絲體的生長為最佳，所以本實驗分別添加 1%至 5%之橄欖油，以探討橄欖油對 *Wolfiporia cocos* 生長之影響。由圖九所示，於 10 天的發酵生產期間，未添加橄欖油與添加 1 至 5%橄欖油的組別相比較，後者的菌體的生長較為旺盛，菌絲體濃度較高，代表在培養基中添加適量的橄欖油有利於茯苓的生長。而在添加橄欖在添加 1 至 5%的橄欖油組別於第三到五天時生長最旺盛，菌體快速繁殖，添加 2、4 和 5%橄欖油的組別在第五至六天達平穩期，之後進入死亡期，1 和 3%的組別則持續生長，在第八天達最高峰。而在添加橄欖油的組別中，以添加 5%者所得的效果最好，至第八天左右時達最大值，此時菌絲體乾重為 42.90mg/ml，4%的橄欖油在第八天時菌絲體為 32.17mg/ml、添加 3%的者在第十天時菌絲體為 35.37mg/ml、2%的橄欖油在第十天時為 26.67mg/ml 1%的橄欖油在第十天時菌絲體為 21.87mg/ml、不添加橄欖油的組別的最高產量在第八天，為 12.47

mg/ml。由實驗中可發現，0%、4%和5%的組別在第八天以後菌絲濃度會有下降的趨勢，推測原因是 autolysis 使菌絲濃度下降(Park et al.,2002)。



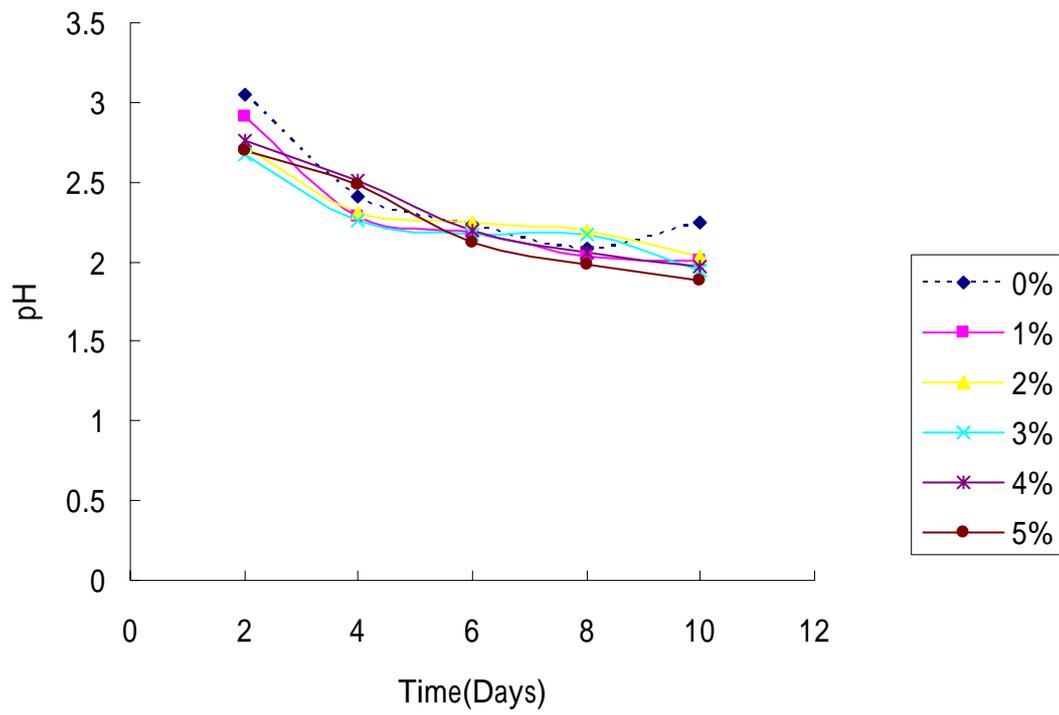
圖九、搖瓶培養下以不同橄欖油濃度對茯苓菌絲體生長之影響

Fig 9. Effect of olive oil concentration on mycelium dry weight of *Wolfiporia cocos* in shake flask fermentation

2.pH 之變化

液態培養 *Wolfiporia cocos* 的起始 pH 值為 3.0，如圖十所示，在發酵期間 pH 逐漸下降，在第四天 pH 值降至 2 左右，在此同一時間菌絲體則是持續增加中，為開始進入迅速繁殖之旺盛生長期，接著在進入第五至八天的平穩期時，pH 值仍會下降，但已不如發酵初期那般快速。

以不同濃度的橄欖油添加在培養基的情況下，菌絲體生長過程各有不同。*Wolfiporia cocos* 會利用碳源，進行醱解作用產生丙酮酸、乙醇、乳酸及醋酸等，再進入 TCA 循環之後，就由於這個因素，發酵液的 pH 值會先逐漸下降，到達某一個程度維持穩定一段時間(Robbins and Taylor,1989)。王等 (2002) 曾經分析茯苓發酵液中的各類型有機酸，包括如：十六烷酸(Hexadecanoic acid)和十八烷酸(Octadecenoic acid) 等，推測是該等成份造成發酵液 pH 下降的原因。

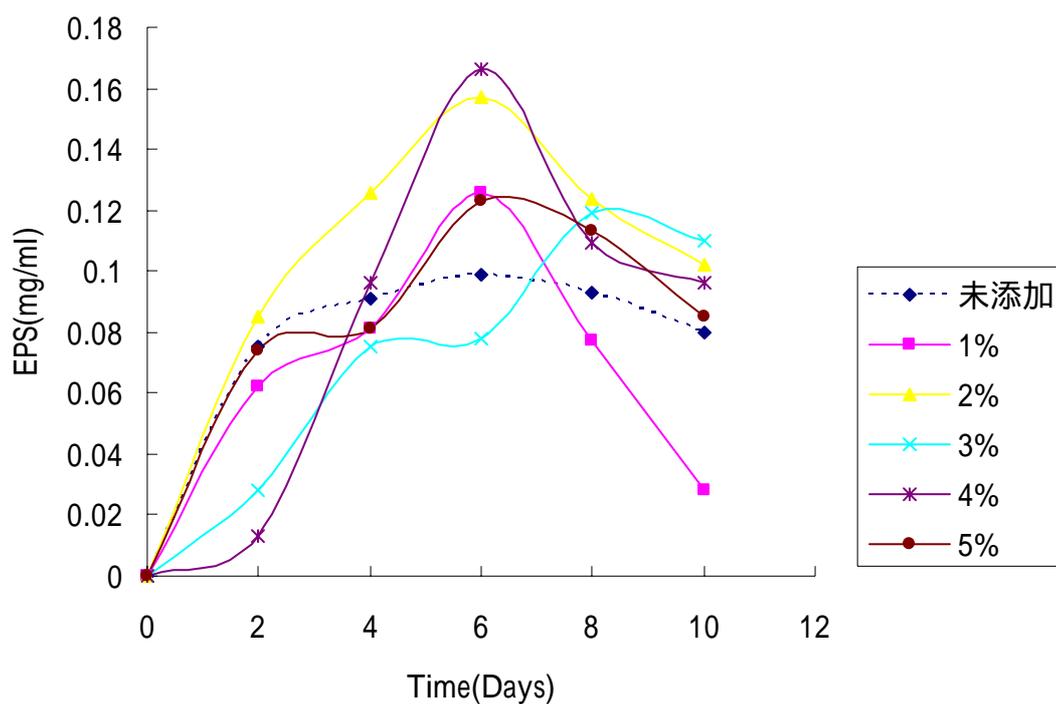


圖十、搖瓶培養下茯苓在搖瓶培養中 pH 的變化

Fig 10. Effect in pH during fermentation of *Wolfiporia cocos* in shake flask fermentation

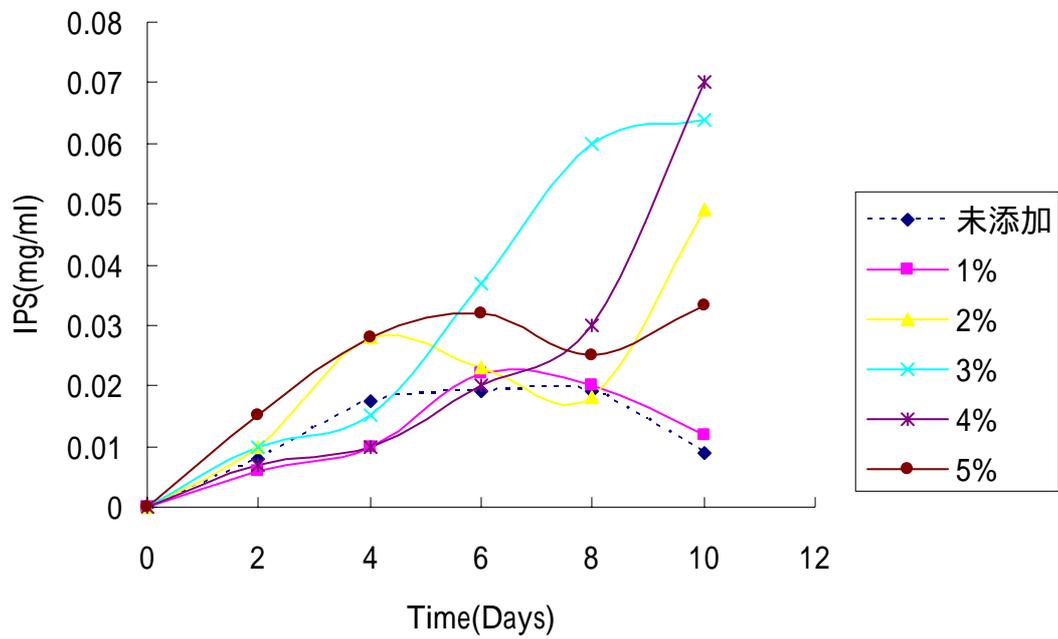
3. 胞內與胞外多醣之變化

以不同比例的橄欖油進行 *Wolfiporia cocos* 多醣之實驗，從圖十一及圖十二可以發現添加橄欖油對菌體分泌多醣有其一定的效果。由圖十一可以看出胞外多醣產量以添加 4% 的橄欖油效果較佳，在第六天時達到最高峰，濃度為 0.16mg/ml，由圖十二明顯可以看出胞內多醣產量以添加 4% 的橄欖油效果較佳，在第八天時達到最高峰，濃度為 0.07mg/ml。



圖十一、搖瓶培養下不同橄欖油濃度對茯苓胞外多醣產量的影響

Fig 11.Changes of olive oil concentration on exo-polysaccharide production of *Wolfiporia cocos* in shake flask fermentation



圖十二、搖瓶培養下不同橄欖油濃度對茯苓胞內多醣產量的變化

Fig 12.Changes of olive oil concentration on intra-polysaccharides production of *Wolfiporia cocos* in shake flask fermentation

(三)結果之比較

利用搖瓶實驗分別添加不同濃度之橄欖油培養所得之菌體乾重及胞內與胞外的多醣的結果顯示於表二。經統計分析的結果，在培養機中添加 1% 至 5% 的橄欖油對菌絲體生長並無顯著性差異；在胞外多醣方面，3% 和 4% 顯著性優於 0%、1%、2% 和 5%；另外，在胞內多醣方面，2%、3% 和 4% 顯著性優於 0%、1% 和 5%。

表二、搖瓶培養下不同濃度之橄欖油對茯苓菌絲生長及胞內、外濃度之影響

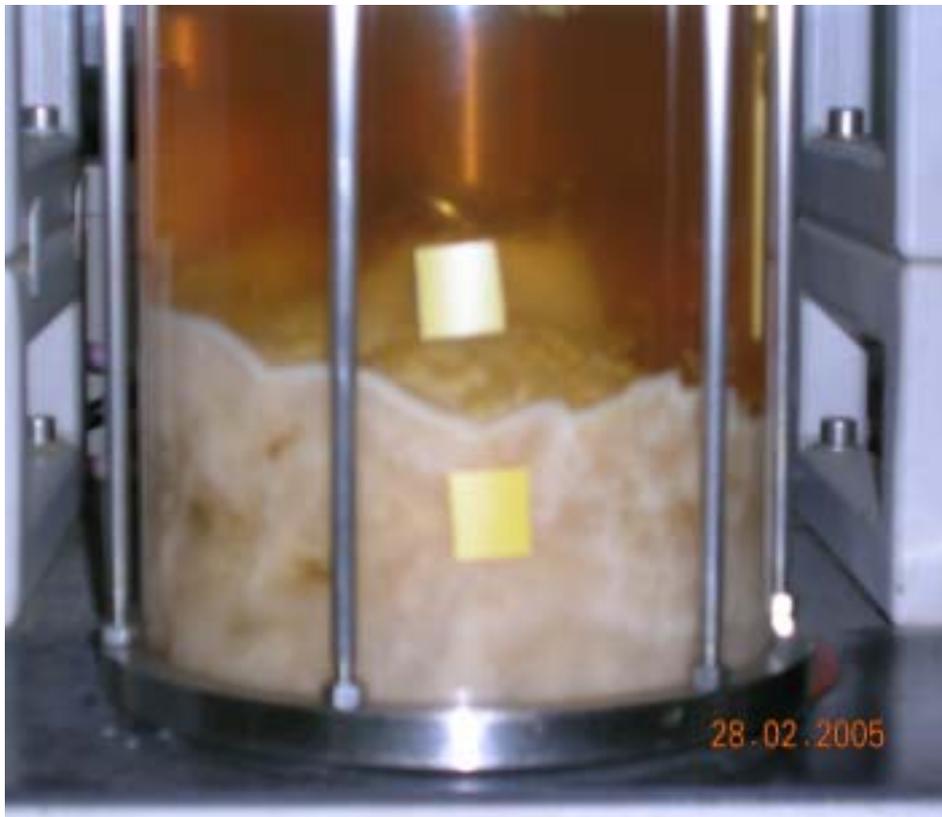
Table 2. Effect of olive oil concentration on mycelium dry weight and formation of IPS and EPS of *Wolfiporia cocos* in shake flask fermentation

olive oil conc.	dry weight (mg/ml)	exo-polysaccharide (mg/ml)	intra-polysaccharides (mg/ml)
Control	12.47±0.24 ^{bc}	0.10±0.01 ^b	0.02±0.09 ^{cd}
1%	21.87±0.87 ^{bc}	0.12±0.01 ^b	0.02±0.06 ^d
2%	26.67±1.50 ^b	0.13±0.00 ^b	0.05±0.05 ^b
3%	35.37±2.75 ^{ab}	0.15±0.01 ^a	0.06±0.08 ^{ab}
4%	32.17±4.20 ^{ab}	0.16±0.00 ^a	0.07±0.07 ^a
5%	42.90±9.18 ^a	0.11±0.00 ^b	0.03±0.06 ^c

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

二、發酵槽培養

茯苓在進行發酵槽培養時，所形成的菌絲體會逐漸累積而集結在發酵槽底部，而不是隨著發酵槽的攪拌動作懸浮至整個發酵液的空間以致取樣困難，所以在發酵槽培養的實驗部分不作菌絲體重和菌體胞內多醣的測定。



圖十三、培養第七天茯苓菌絲體的型態

Fig 13. Morphological of *Wolfiporia cocos* in 7L Fermentor on day 7

(一) 不同通氣量

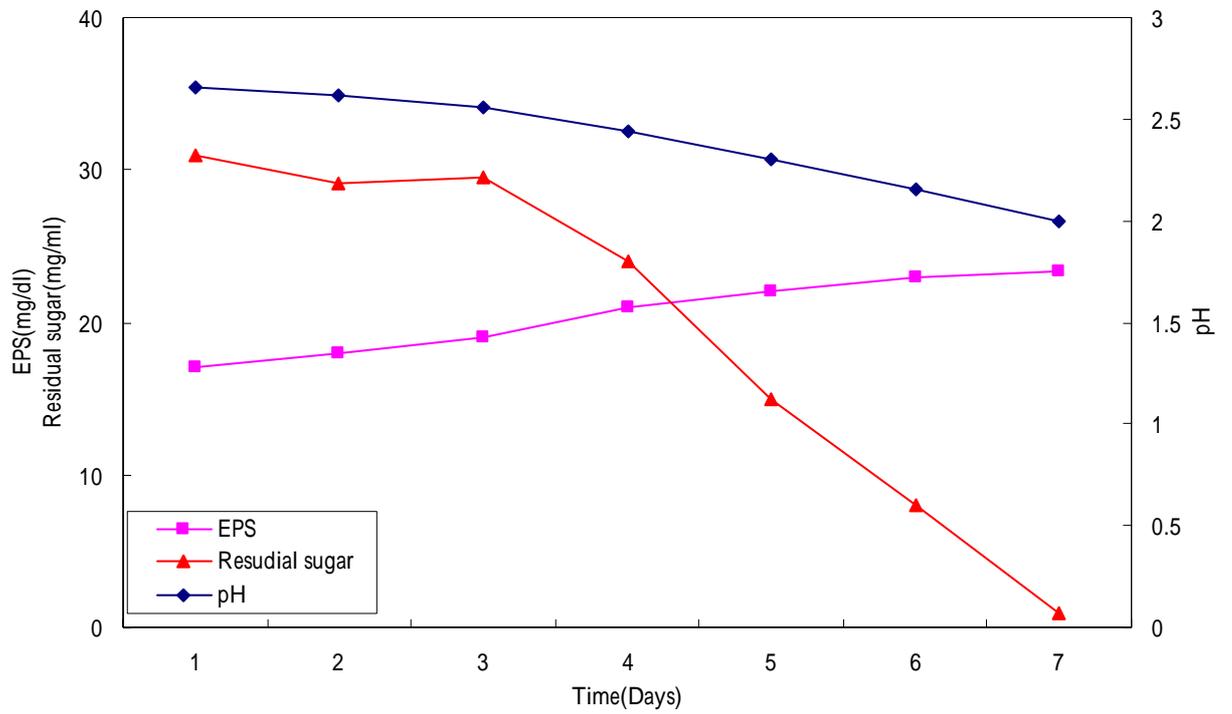
1. *Wolfiporia cocos* 培養期間 pH、還原醣量以及胞外多醣產量

如圖十四至十九所示，利用攪拌及氣泡塔式發酵槽培養 *Wolfiporia cocos* 培養基之起始 pH 值為 3.0，pH 值隨著發酵時間而漸漸下降，氣舉式或攪拌式在第一天到三天都呈下降的趨勢，接著在進入第五~八天的平穩期時，pH 值仍會下降，但已不如發酵初期那般快速。

還原醣量隨著發酵的進行而持續下降，又以攪拌式和氣泡塔式發酵槽通氣量在 2vvm 時，如圖十四和十七所示，還原醣量分別為 0.93mg/ml 和 1.00mg/ml，幾乎完全利用；攪拌式和氣泡塔式發酵槽通氣量 1vvm 者，如圖十五和十八所示，發酵終了仍有 12.00mg/ml 和 15.80mg/ml；而在通氣量 0.5vvm 部分，如圖十六和十九所示，發酵終了仍有 20.00mg/ml 和 18.00mg/ml，但其中攪拌式 0.5vvm 在第七天還原醣量有上升的情況，推測原因是胞外多醣在合成中釋放出小分子量短鍊的多醣，而造成還原醣的增加（游，1996）。從本實驗可以發現通氣量愈高，葡萄糖利用率愈好，還原醣量愈低。

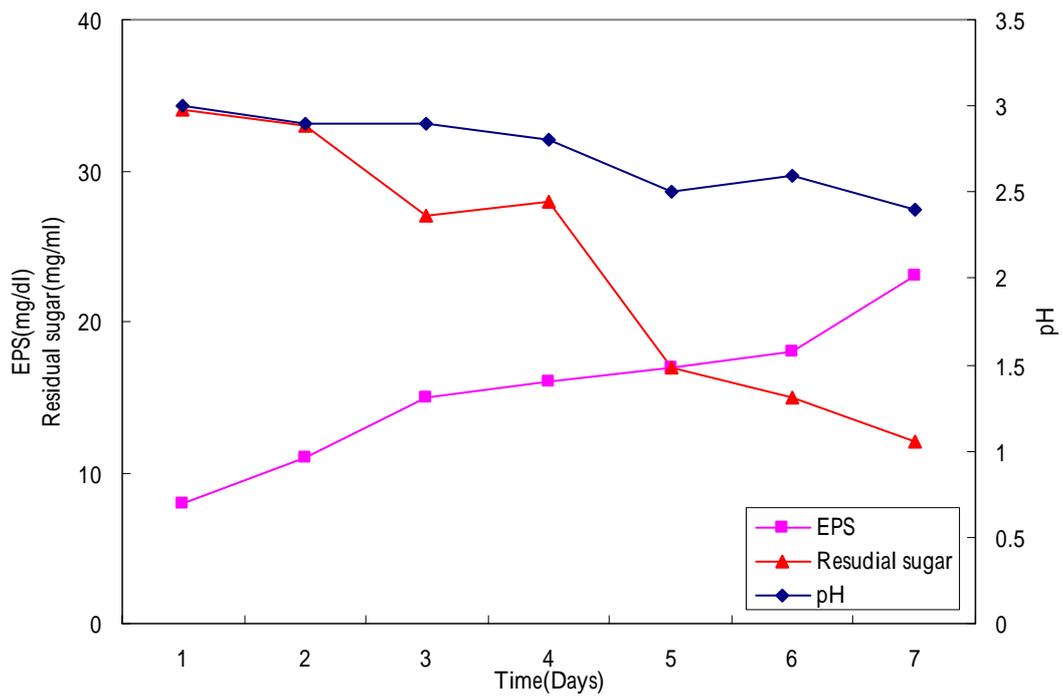
由圖二十可看出茯苓胞外多醣體的產量，在各類型發酵方法當中，以最高的是氣泡塔式發酵槽，通氣量 2vvm 最高，如圖十七所示，在發酵培養第七天，可得 0.39mg/ml 多醣產量，其次是攪拌式 2vvm，

如圖十四所示，多醣在發酵液的濃度為 0.23 mg/ml；攪拌式和氣泡塔式發酵槽，通氣量都降為 1vvm 時，如圖十五和十八所示，可得 0.21mg/ml 和 0.17mg/ml；而通氣量若只有在 0.5vvm 時，如圖十六和十九所示，攪拌式與氣泡塔式的多醣產量僅得 0.16mg/ml 和 0.12mg/ml。從本實驗可以發現，通氣量給予 2vvm，多醣的產量較高，其中又以氣泡塔式最高，更優於攪拌式發酵槽，推測原因是因為菌絲生長時會附著於發酵槽底部，攪拌扇葉形成的剪切力會對菌絲造成傷害，而氣泡塔式發酵槽沒有扇葉，所以對菌絲不會形成傷害，故胞外多醣產量也較高。在 1vvm 和 0.5vvm 方面，攪拌式的多醣產量反而優於氣泡塔式發酵槽，推測原因是菌絲在生長時會附著於通氣管，阻塞通氣孔，此時若通氣量不夠大，便無法衝破許多集中在槽體底部的菌絲塊，使槽內通氣效果減低，造成培養基循環流動效果也變差，進而使質傳效果降低，至於攪拌式發酵槽內，可利用扇葉的攪拌，減少通氣孔上菌絲的聚集以及增加槽內液氣循環，故胞外多醣產量較高。



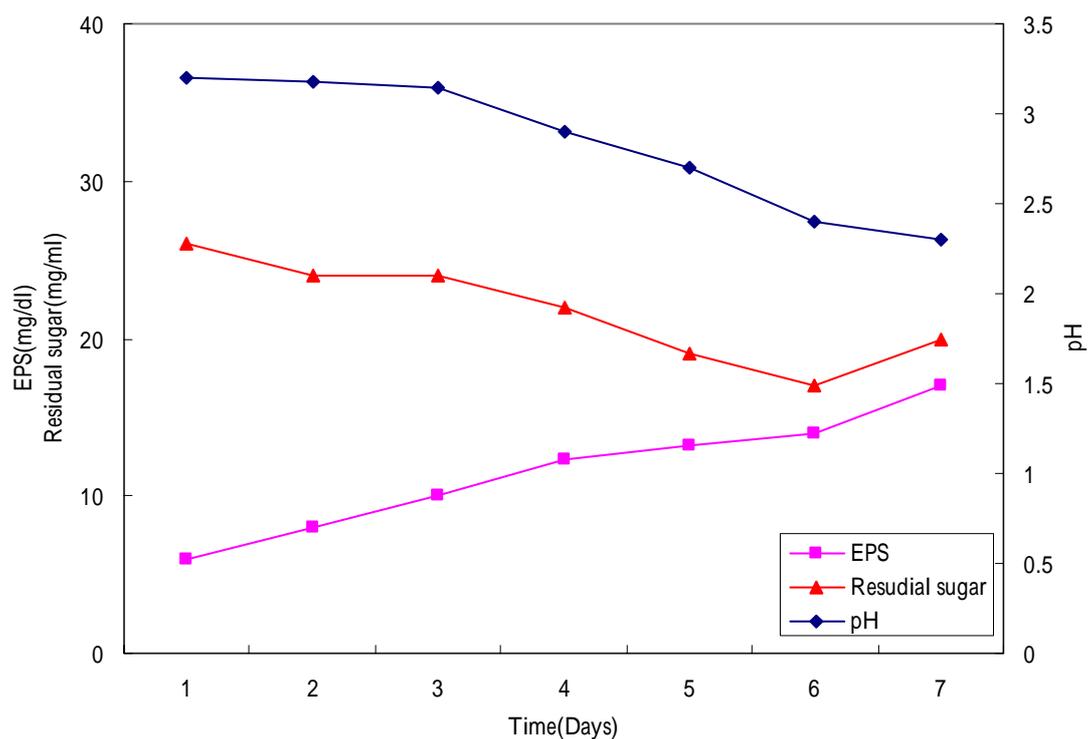
圖十四、茯苓在攪拌式發酵槽 2vvm 通氣量對胞外多醣、培養液還原醣濃及 pH 值之變化

Fig 14. Effect of exo-polysaccharide, residual sugar and pH of *Wolfiporia cocos* in stirred tank fermentor at 2vvm aeration



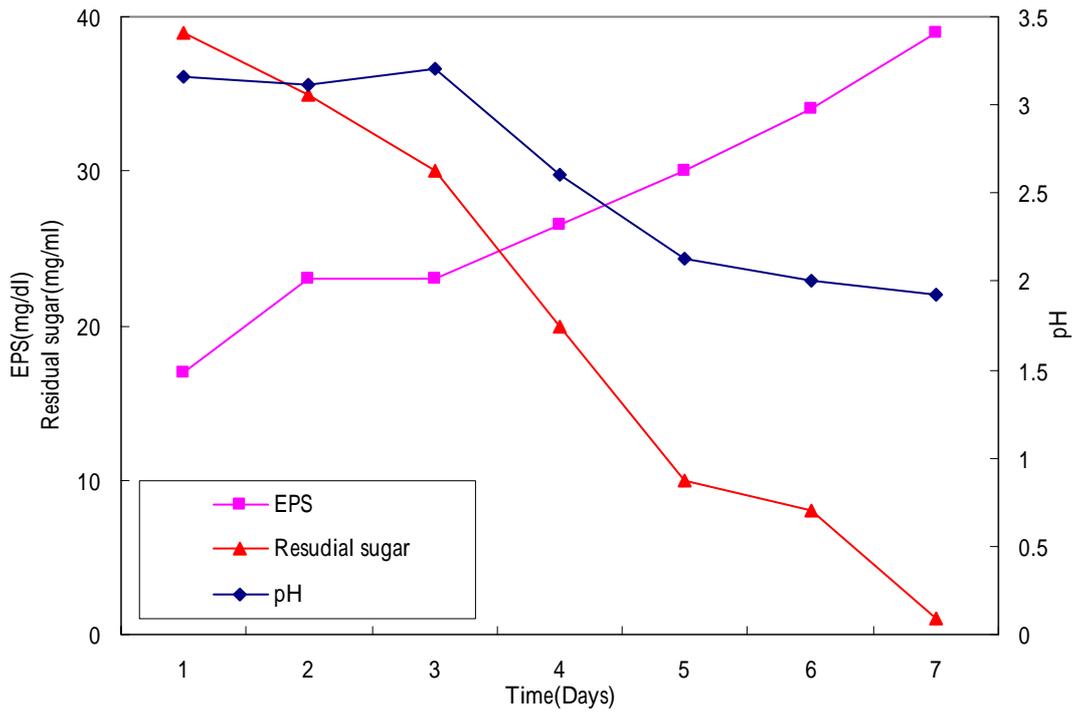
圖十五、茯苓在攪拌式發酵槽 2vvm 通氣量對胞外多醣、培養液還原醣濃及 pH 值之變化

Fig 15. Effect of exo-polysaccharide, residual sugar and pH of *Wolfiporia cocos* in stirred tank fermentor at 1vvm aeration



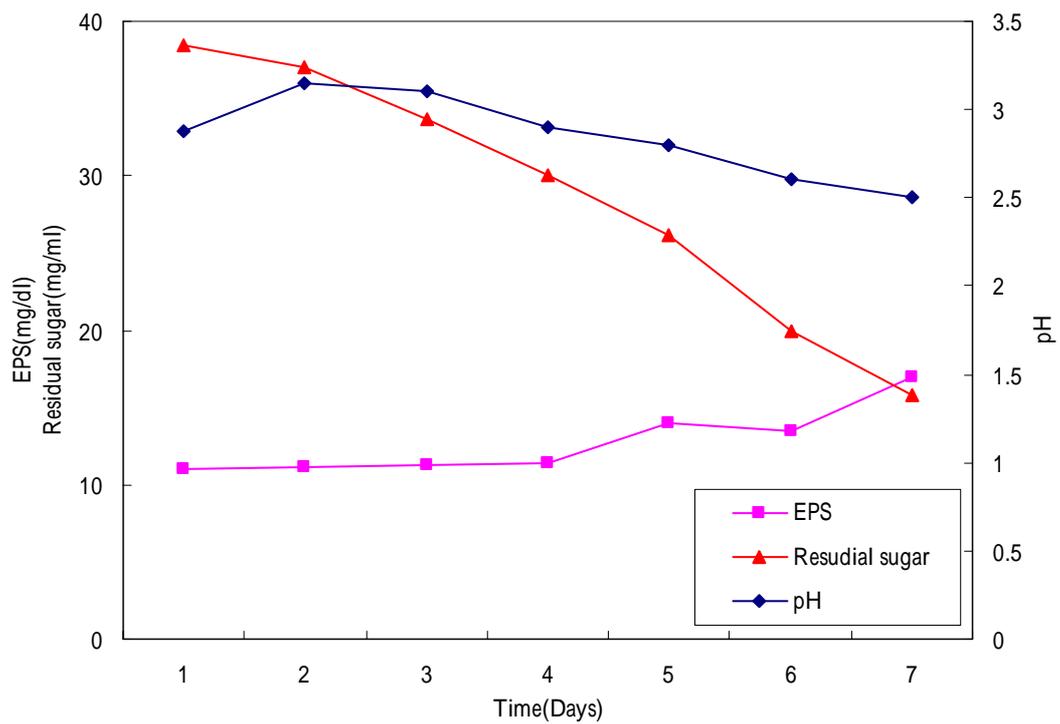
圖十六、茯苓在攪拌式發酵槽 0.5vvm 通氣量對胞外多醣、培養液還原醣濃及 pH 值之變化

Fig 16. Effect of exo-polysaccharide, residual sugar and pH of *Wolfiporia cocos* in stirred tank fermentor at 0.5vvm aeration



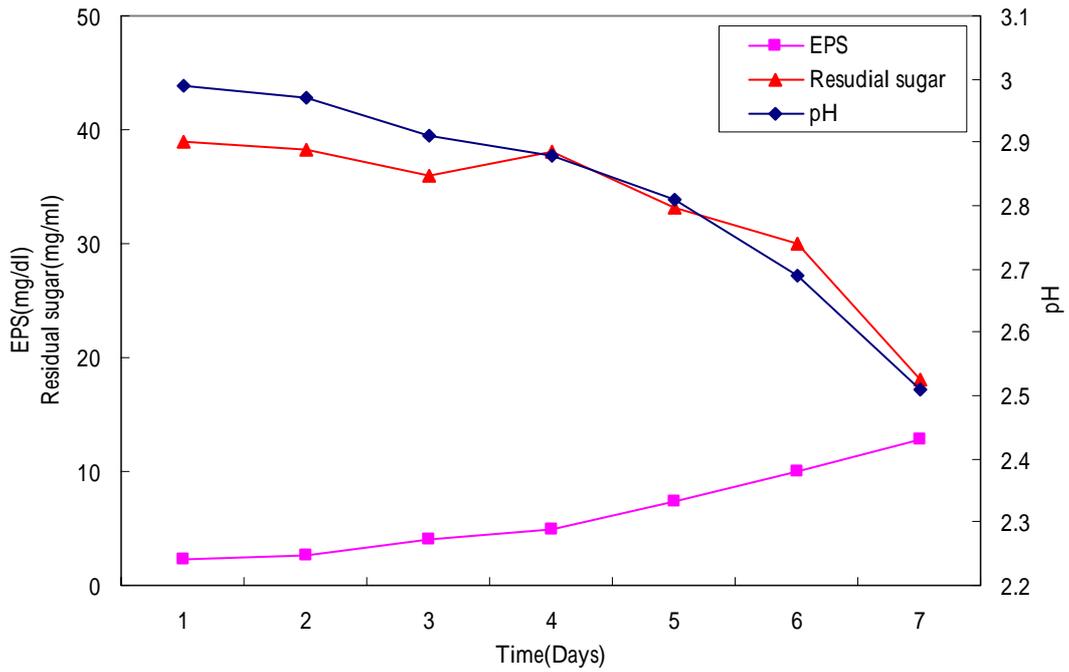
圖十七、茯苓在氣泡塔式發酵槽 2vvm 通氣量對胞外多醣、培養液還原醣濃度及 pH 值之變化

Fig 17. Effect of exo-polysaccharide, residual sugar and pH of *Wolfiporia cocos* in bubble column fermentor at 2vvm aeration cultures



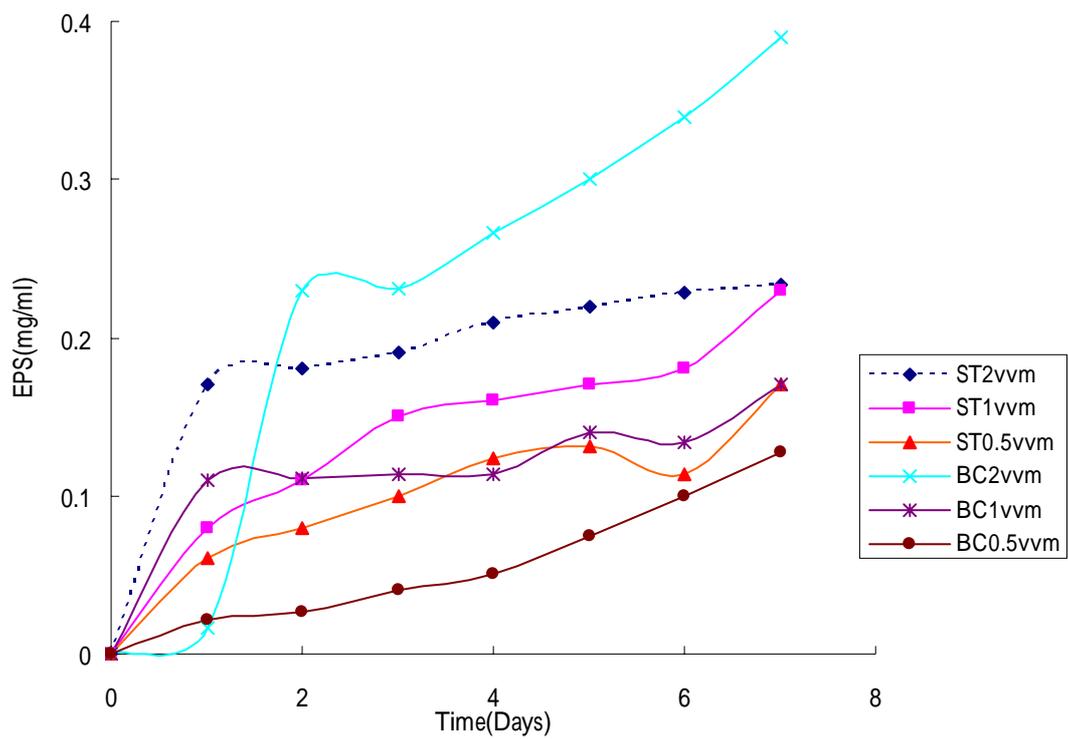
圖十八、茯苓在氣泡塔式發酵槽 1vvm 通氣量對胞外多醣、培養液還原醣濃度及 pH 值之變化

Fig 18. Effect of exo-polysaccharide, residual sugar and pH of *Wolfiporia cocos* in bubble column fermentor at 1vvm aeration cultures



圖十九、茯苓在氣泡塔式發酵槽 0.5vvm 通氣量對胞外多醣、培養液
還原糖濃度及 pH 值之變化

Fig 19. Effect of exo-polysaccharide, residual sugar and pH of *Wolfiporia cocos* in bubble column fermentor at 0.5vvm aeration cultures



ST, Stirred tank fermentor ; BC, Bubble Column fermentor

圖二十、不同通氣量對茯苓胞外多醣含量之變化

Fig 20. Effect of aeration on exo-polysaccharide formation of *Wolfiporia cocos*

2.胞外多醣分子量之變化

本實驗除了測量多醣的產量之外，對於這些菌體多醣的分子量也予以分析，以了解培養方式之差異對產品的品質是否有影響。

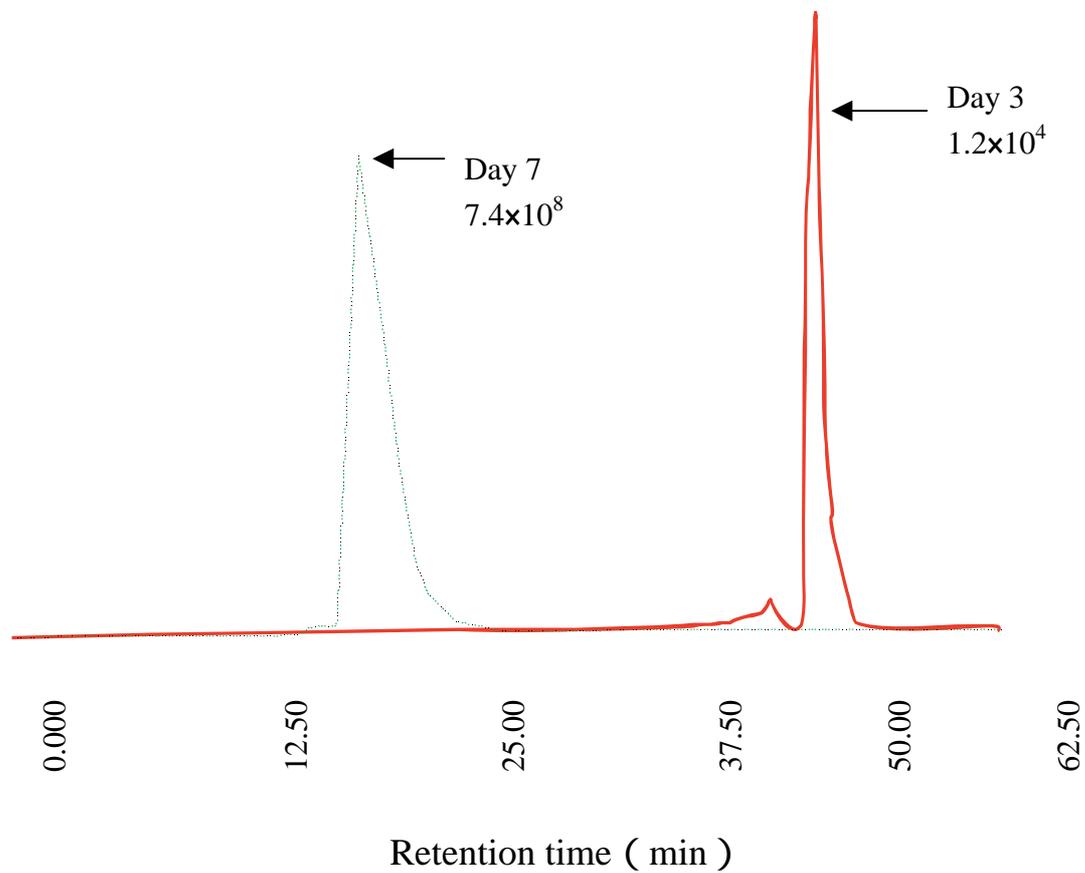
利用 GPC 管柱分析茯苓胞外多醣的變化，發酵第三天茯苓胞外多醣分子量：攪拌式 2vvm (圖二十一) 攪拌式 1vvm (圖二十二) 氣泡塔式 2vvm(圖二十四) 氣泡塔式 1vvm(圖二十五)和氣泡塔式 0.5vvm (圖二十六)的分子量主要只有一種，分別為 1.2×10^4 ， 6.1×10^8 ， 3.4×10^7 ， 8.0×10^3 和 3.6×10^3 Da；至於攪拌式 0.5vvm (圖二十三)的分子量主要則有兩種，為 3.1×10^7 Da 和 6.7×10^6 Da。到了發酵第七天，也就是培養期中止之後分子量：攪拌式 2vvm (圖二十一)，0.5vvm (圖二十三)和氣泡塔式 1vvm (圖二十五)的分子量主要只有一種，分別為 7.4×10^8 Da， 2.9×10^6 Da 和 1.4×10^9 Da；至於攪拌式 1vvm (圖二十二) 氣泡塔式 2vvm (圖二十四)和氣泡塔式 0.5vvm (圖二十六)所得的分子量主要卻有兩種，分別為 3.3×10^6 Da 與 5.9×10^5 Da， 7.1×10^7 Da 與 2.0×10^7 Da 和 3.9×10^4 Da 與 4.4×10^4 Da。

攪拌式 1vvm (圖二十二) 氣泡塔式 2vvm (圖二十四)和氣泡塔式 0.5vvm (圖二十六)可看出在為期七天的發酵期間是屬於由在前期的單一胞外分子量到後期變為主要分子量，其中攪拌式 1vvm (圖二十二)分子量的變化是由大變小，而氣泡塔式 2vvm (圖二十四)在發

酵前後期的分子量則相似，沒什麼改變，至於氣泡塔式 0.5vvm (圖二十六) 分子量則是小變大。攪拌式 0.5vvm (圖二十三) 主要分子量是由兩種變成一種，而且分子量也變小。而攪拌式 2vvm (圖二十一) 和氣泡塔式 1vvm (圖二十五) 胞外多醣仍然維持一種，但卻有由小變大聚合的趨勢。

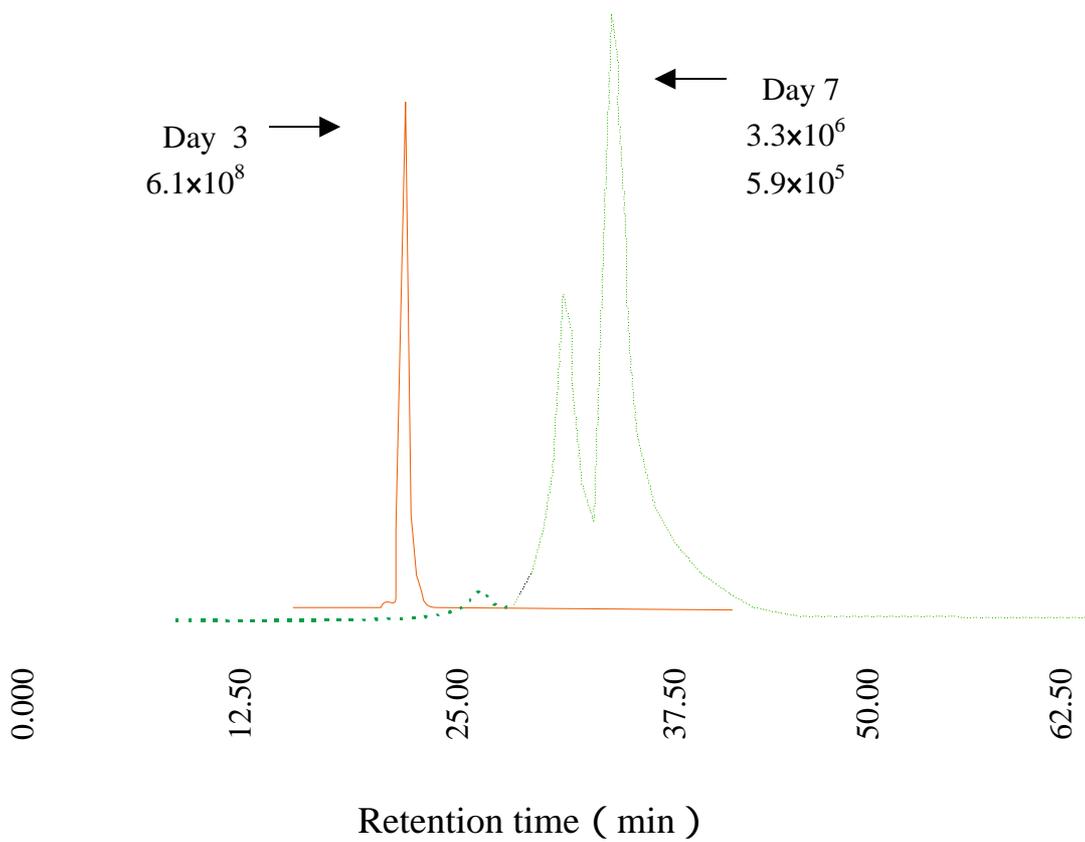
有報告顯示傳統中藥店所售的茯苓菌核多醣分子量為 $1.6 \times 10^5 \text{Da}$ ，將茯苓多醣萃取物培養在含人類單細胞培養基中， $15 \mu\text{g/ml}$ 對 leukemic U937 細胞 (人類白血病細胞株)、leukemic HL-60 (骨髓腫瘤細胞株) 細胞抑制生長率可達 87.3% (Chen and Chang, 2004)，此與本實驗中所用的攪拌式發酵槽 1vvm 所培養之胞外多醣分子量相似，分子量為 5.9×10^5 。另外有文獻指出茯苓菌核分子量為 $2.1 \times 10^5 \text{Da}$ 和 $8.9 \times 10^4 \text{Da}$ (Zhang et al., 1997)，此與本實驗氣泡塔式 0.5vvm 所培養之分子量相似，分子量為 3.9×10^4 和 4.4×10^4 。由本實驗可發現通氣量較大時 2vvm 或 1vvm，則胞外多醣分子量較大，攪拌式和氣泡塔式 2vvm 分別為 $7.4 \times 10^8 \text{Da}$ 和 ($7.1 \times 10^7 \text{Da}$ 、 $2.0 \times 10^7 \text{Da}$)；攪拌式和氣泡塔式 1vvm 分別為 ($3.3 \times 10^6 \text{Da}$ 、 $5.9 \times 10^5 \text{Da}$) 和 $1.4 \times 10^9 \text{Da}$ 。曾有文獻指出，通氣量 1vvm 培養舞菇，其胞外多醣分子量範圍是 $1.2 \times 10^4 \text{Da}$ (曾, 2004)，與本實驗通氣量 1vvm 所培養出的茯苓胞外多醣相較之下，分子量較小，攪拌式 1vvm 和氣泡塔式 1vvm 分子量分別為， $3.3 \times 10^6 \text{Da}$ 、

$5.9 \times 10^5 \text{Da}$ 和 $1.4 \times 10^9 \text{Da}$ 。不論是攪拌式或氣泡塔式，通氣量 0.5vvm 時，分子量都比較小，分別為 $2.9 \times 10^6 \text{Da}$ 和 $3.9 \times 10^4 \text{Da}$ 、 $4.4 \times 10^4 \text{Da}$ 。在另外一方面，通氣量 0.5vvm 培養舞菇，其胞外多醣分子量範圍是 6.0×10^3 到 3.4×10^6 (曾, 2004)，相較本實驗通氣量 0.5vvm 所得之胞外多醣相似，攪拌式 0.5vvm 和氣泡塔式 0.5vvm 分子量分別為， $2.9 \times 10^6 \text{Da}$ 和 $3.9 \times 10^4 \text{Da}$ 、 $4.4 \times 10^4 \text{Da}$ 。另外，在舞菇培養基中添加 1% 的橄欖油，分子量範圍是 3.6×10^4 到 1.0×10^6 (曾, 2004)。在另外一株真菌的研究方面，於冬蟲夏草培養基中添加 0.5% 葵花油，胞外多醣分子量範圍是 7.0×10^2 至 1.5×10^6 (吳, 2003)。也有文獻指出靈芝液態培養胞外多醣分子量分佈會受碳氮源類型類、氮源濃度、三角瓶體積、初始 pH 與轉速的影響而有不同的分佈 (張, 2003)，從本實驗發現不同通氣量也會造成不一樣的分子量分佈。所以，依照實驗結果得知，胞外多醣的分子量不僅只是不同菌株間造成的差異，不同通氣量也會造成胞外多醣分子量之間的變化，此種發現可作為日後研究的另一重點。



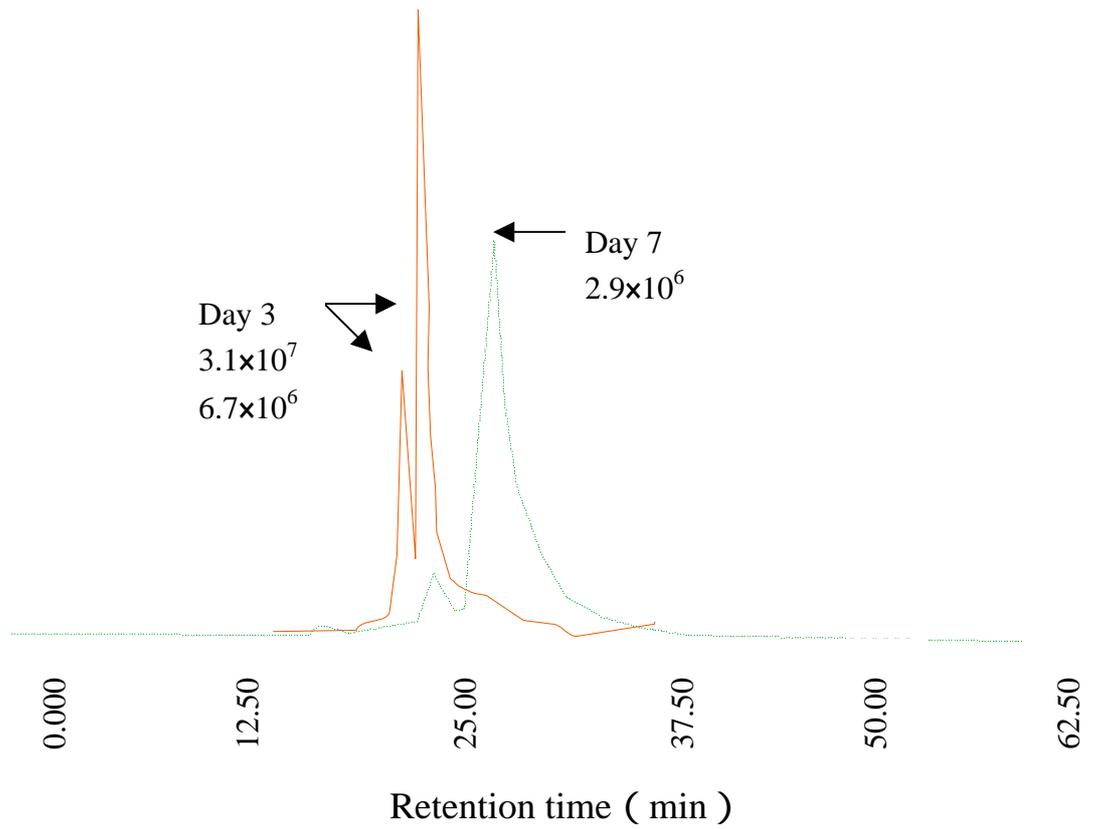
圖二十一、攪拌式發酵槽 2vvm 通氣量在第三天和第七天的茯苓多醣
體膠體層析沖提圖

Fig21. Gel filtration chromatograms of *Wolfiporia cocos* polysaccharides in stirred tank fermentor at 2vvm aeration on day 3 and 7



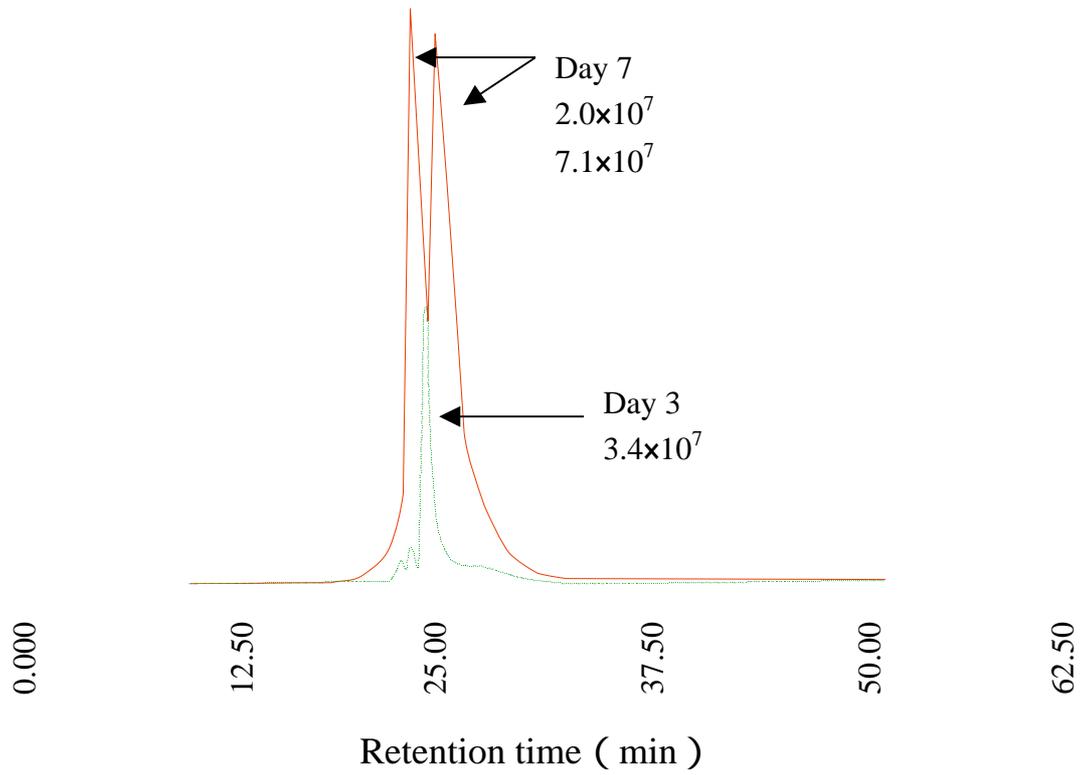
圖二十二、攪拌式發酵槽 1vvm 通氣量在第三天和第七天的茯苓多醣
體膠體層析沖提圖

Fig22. Gel filtration chromatograms of *Wolfiporia cocos* polysaccharides
in stirred tank fermentor at 1vvm aeration on day 3 and 7



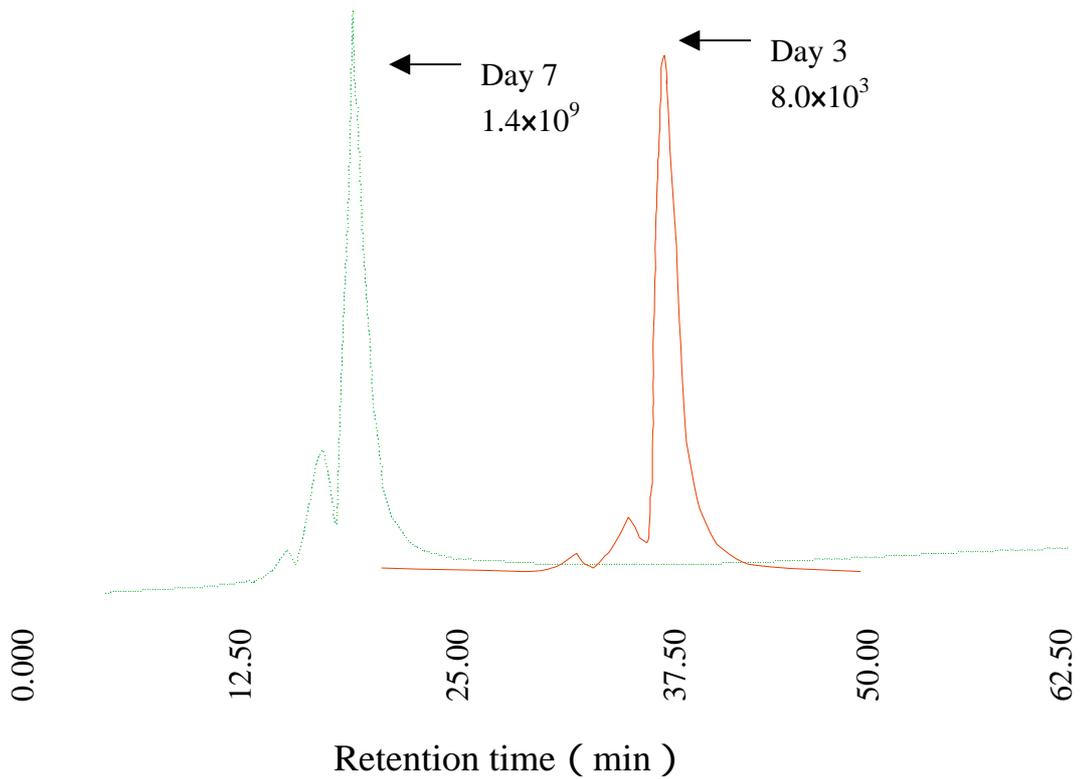
圖二十三、攪拌式發酵槽 0.5vvm 通氣量在第三天和第七天的茯苓多醣體膠體層析沖提圖

Fig23. Gel filtration chromatograms of *Wolfiporia cocos* polysaccharides in stirred tank fermentor at 0.5vvm aeration on day 3 and 7



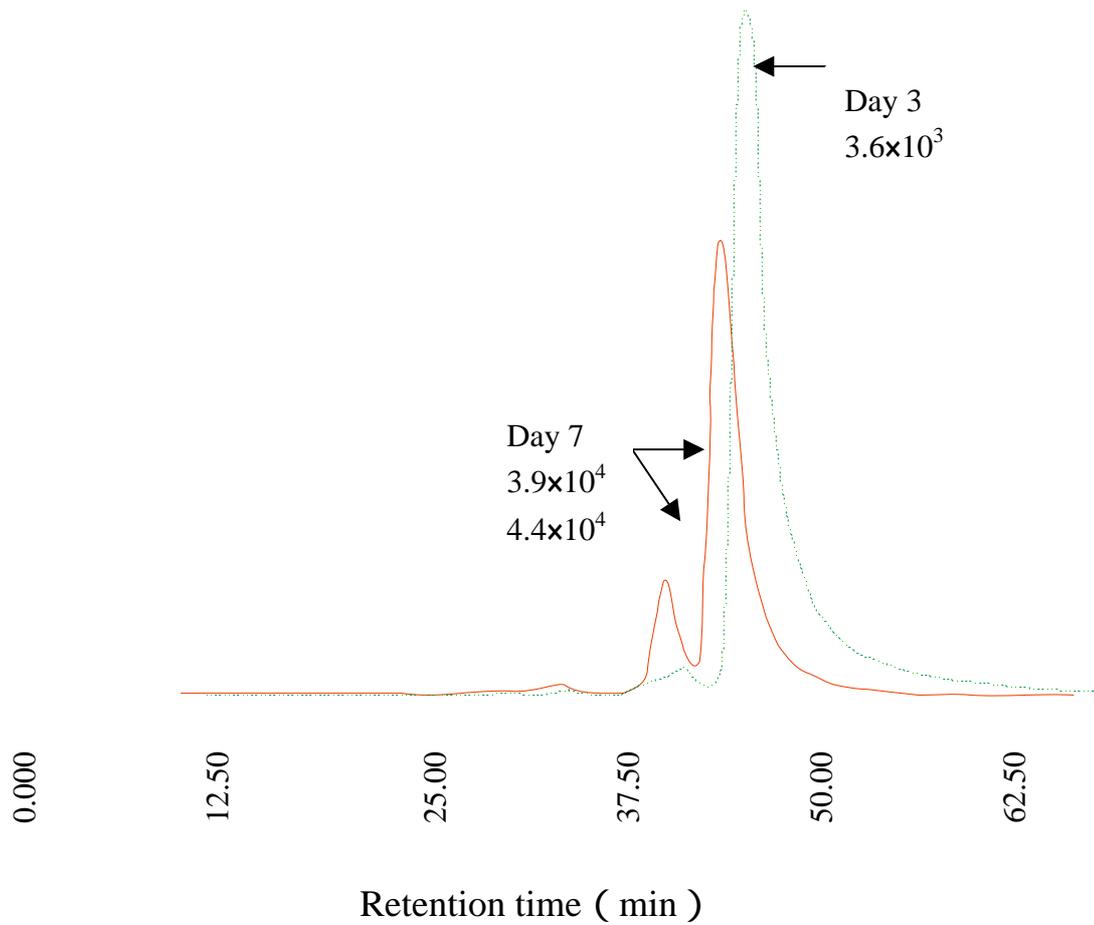
圖二十四、氣泡塔式發酵槽 2vvm 通氣量在第三天和第七天的茯苓多醣體膠體層析沖提圖

Fig24. Gel filtration chromatograms of *Wolfiporia cocos* polysaccharides in bubble column fermentor at 2vvm aeration on day 3 and 7



圖二十五、氣泡塔式發酵槽 1vvm 通氣量在第三天和第七天的茯苓多醣體膠體層析沖提圖

Fig25. Gel filtration chromatograms of *Wolfiporia cocos* polysaccharides in bubble column fermentor at 1vvm aeration on day 3 and 7



圖二十六、氣泡塔式發酵槽 0.5vvm 通氣量在第三天和第七天的茯苓
多醣體膠體層析沖提圖

Fig26. Gel filtration chromatograms of *Wolfiporia cocos* polysaccharides
in bubble column fermentor at 0.5vvm aeration on day 3 and 7

將攪拌式、氣舉式發酵槽通入不同通氣量，在七天培養期間所得之 pH、還原醣、最高胞外多醣和第三天以及第七天茯苓胞外多醣主要分子量做一整理(表三)。由於氧氣在水中的溶解度很低，且菌絲體生長旺盛時菌液濃稠度高，氣體需求量增加，使用高通氣量可以供給菌體充足的氧氣及較佳的循環效果，故以利用氣泡塔式 2vvm 通氣量最有利於茯苓生長及代謝，胞外多醣之產量為最佳。在 1vvm 和 0.5vvm 方面，因茯苓菌絲生長特性的因素，攪拌式的多醣產量反而優於氣泡塔式發酵槽。

經統計分析的結果(表三)，氣泡塔式 2vvm 的胞外多醣產量明顯優於其他組別，其次是攪拌式 2vvm 和攪拌式 1vvm，攪拌式 0.5vvm 和氣泡塔式 1vvm 則是無明顯差異，最差的是氣泡塔式 0.5vvm ($p < 0.05$)。

表三、不同通氣量在七天對茯苓 pH、還原醣、胞外多醣體濃度以及胞外多醣分子量分部之影響

Table 3. Effect of aeration rate on pH , residual sugar, exo-polysaccharide, and distribution of molecular weight of *Wolfiporia cocos* after days 7 of fermentation

	Stirred tank fermentor			Bubble column fermentor		
	2vvm	1vvm	0.5vvm	2vvm	1vvm	0.5vvm
EPS(mg/ml) *	0.23±0.03 ^b	0.21±0.06 ^c	0.16±0.03 ^d	0.39±0.03 ^a	0.17±0.06 ^d	0.12±0.05 ^e
MW(Da) day 3	1.2×10 ⁴	6.1×10 ⁸	6.7×10 ⁶	3.4×10 ⁷	8.0×10 ³	3.6×10 ³
			3.1×10 ⁷			
day 7	7.4×10 ⁸	3.3×10 ⁶	2.9×10 ⁶	2.0×10 ⁷	1.4×10 ⁹	3.9×10 ⁴
		5.9×10 ⁵		7.1×10 ⁷		4.4×10 ⁴
Final pH	2.0	2.4	2.4	1.9	2.5	2.5
residual sugar (mg/ml)	0.93	12.00	20.00	1.00	15.80	18.00

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

(二) 不同培養方式

本實驗除了一般的批次發酵，也進行饋料培養中，首先在發酵槽的培養基加入每升二十克的葡萄糖，到發酵的第三天再添加額外 20g/l 的葡萄糖到培養基中，觀察其 pH、還原糖、胞外多醣和第三天及第七天主要胞外多醣的變化。

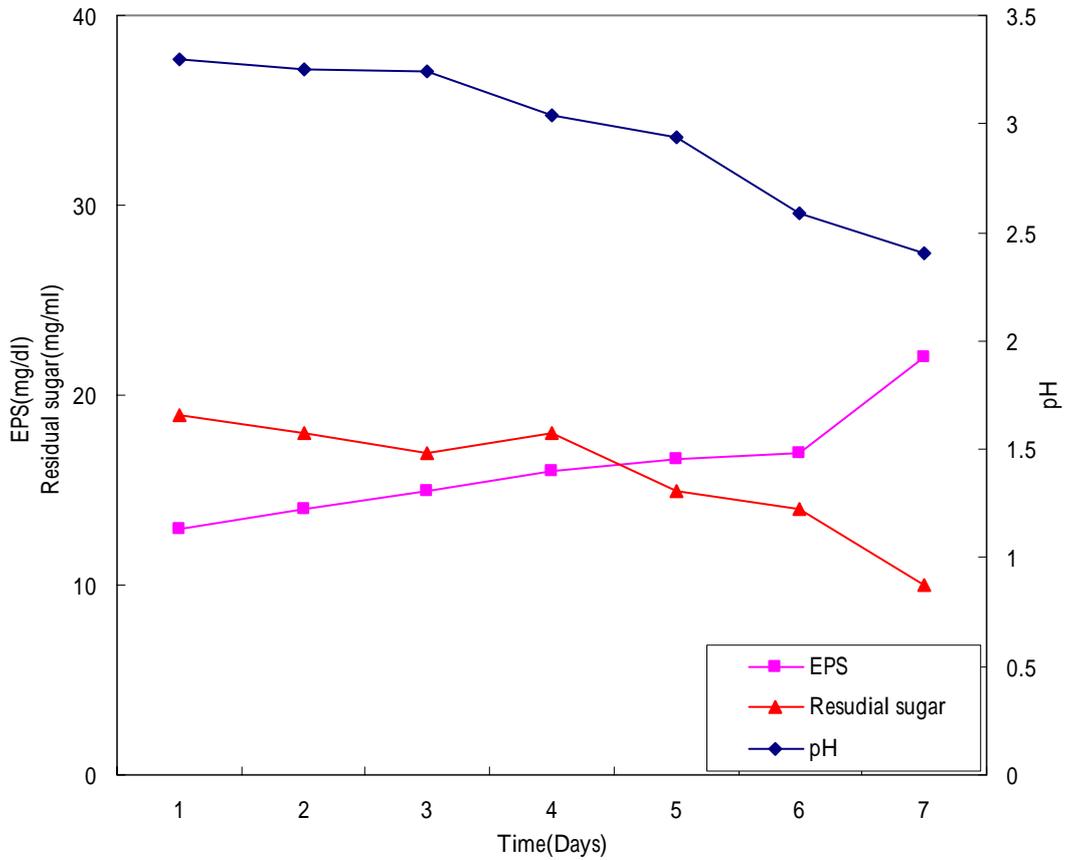
1. *Wolfiporia cocos* 培養期間 pH、還原糖量以及胞外多醣產量

由前實驗結果得知，添加 4% 的橄欖油於基礎培養基裡對外菌體生長與茯苓胞多醣有幫助，使用較大的通氣量亦有助於胞外多醣產量，但在培養第五天後，培養基裡面還原糖量的下降快速，可能因為碳源濃度不足，培養基營養源過低，而影響胞外多醣的產量。但若培養初期在槽中添加濃度過高的碳源，反而會抑制菌體的生長，不利於菌體生存，且在批式培養中碳源會快速的被代謝利用產酸，使得發酵液 pH 值下降，可能會間接抑制了菌體生長及有用代謝物的形成 (Yang et al., 1989)。若改採用饋料的培養方式，進行碳源的控制，可藉由改變培養基供給方式，獲得更多的胞外多醣。

本實驗在利用攪拌式與氣泡塔式兩種發酵槽，並以一般批式以及饋料式兩種培養方式，在 26℃，0.5vvm，攪拌式以 100rpm，7 天的發酵期發現因葡萄糖快速分解，pH 值隨著發酵時間而漸漸下降，不論是批式或饋料式在第一天到三天都有下降的情形，之後開始維持在

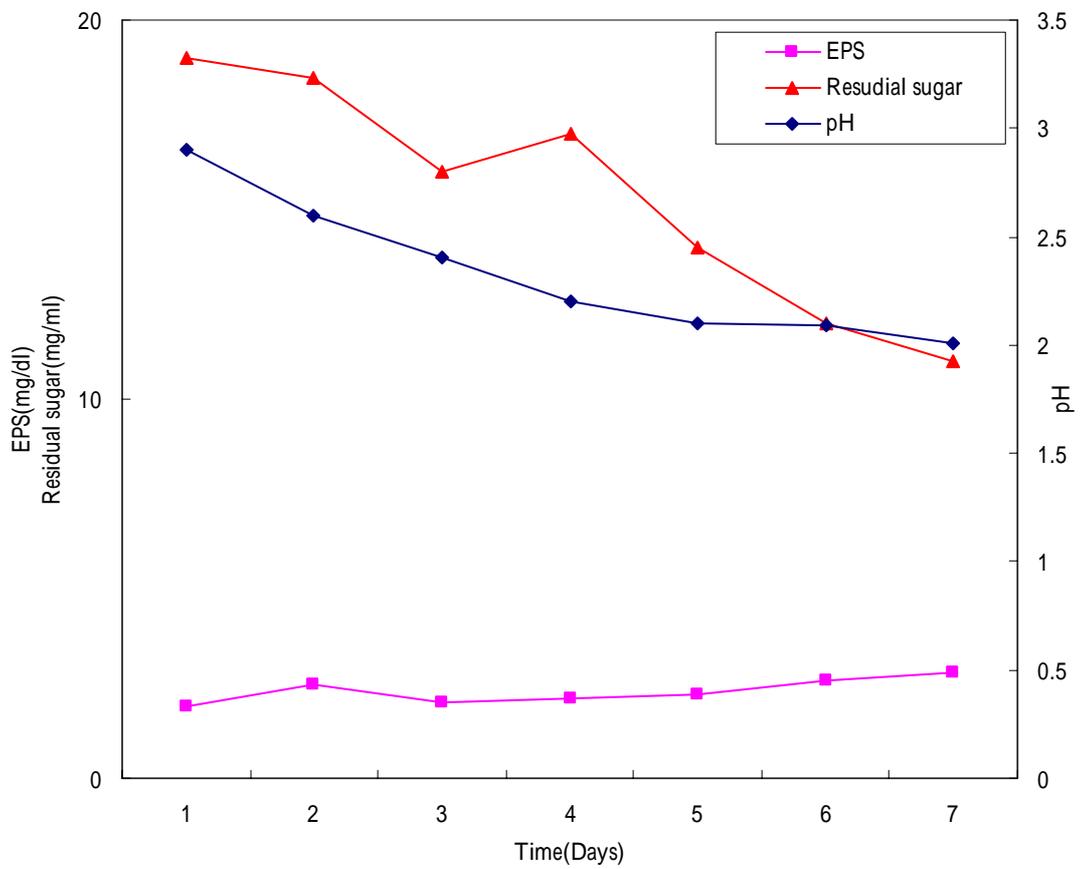
pH2~2.5 之間。

胞外多醣隨著發酵天數增加持續上升，又以攪拌饋料式（圖二十七）胞外多醣產量最好（0.22mg/ml），其次是攪拌批式（圖十六）和氣泡塔批式（圖十九）胞外多醣是 0.17mg/ml 和 0.12mg/ml，最差的是氣泡塔饋料式（圖二十八）胞外多醣為 0.03mg/ml。另一方面，還原醣量隨著發酵天數增加持續下降，又以攪拌饋料式（圖二十七）利用率最好（10.00mg/ml），其次是氣泡塔批式和饋料式（圖十九、二十八）還原醣量分別為 18.00mg/ml 和 11.00mg/ml，最差的是攪拌批式（圖十六）還原醣量為 20.00mg/ml。



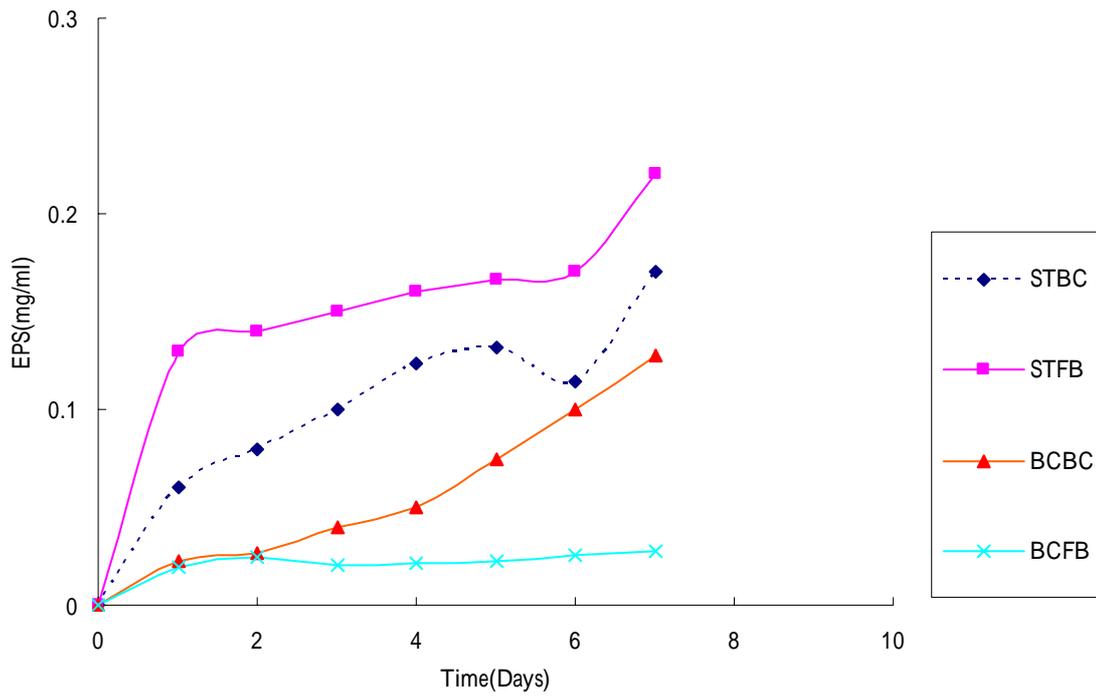
圖二十七、攪拌饋料式培養對茯苓胞外多醣、還原醣濃度及 pH 值之變化

Fig 27.Changes of fed-batch culture on exo-polysaccharide,residual sugar and pH of *Wolfiporia cocos*



圖二十八、氣泡塔饋料式培養對茯苓胞外多醣、還原醣濃度及 pH 值之變化

Fig 28.Changes of fed-batch culture on exo-polysaccharide,residual sugar and pH of *Wolfiporia cocos*



ST, Stirred tank fermentor; BC, Bubble Column fermentor; BC', Batch Culture FC, Fed-batch Culture

圖二十九、不同培養方式對茯苓胞外多醣含量之變化

Fig 29. Effect of culture method on exo-polysaccharide of *Wolfiporia cocos*

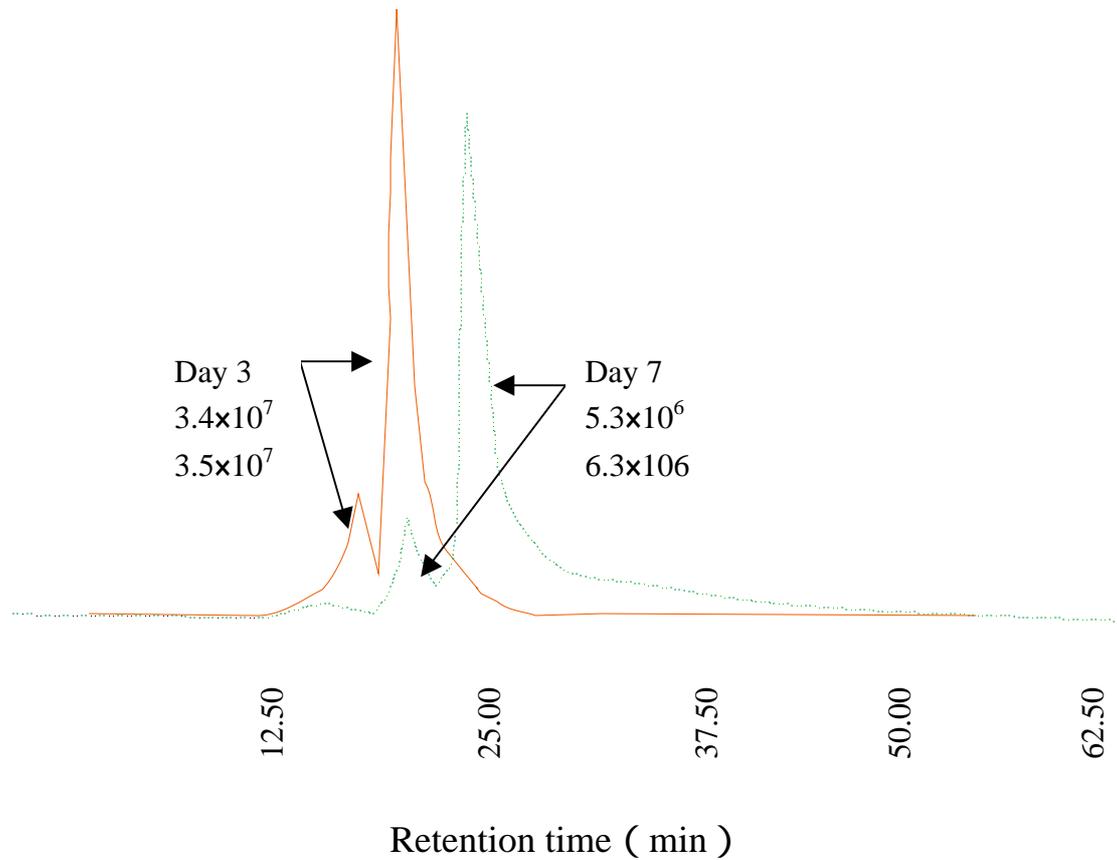
2. 胞外多醣分子量之變化

發酵第三天胞茯苓外多醣分子量氣泡塔批式(圖二十六)和氣泡塔饋料式(圖三十一)的分子量主要只有一種,分別為 3.6×10^3 和 4.7×10^3 Da,攪拌批式(圖二十三)和攪拌饋料式(圖三十)分子量主要卻有兩種,分別為 3.1×10^7 Da 和 6.7×10^7 Da, 3.4×10^7 Da 和 3.5×10^7 Da。發酵第七天攪拌饋料式(圖三十)和氣泡塔批式(圖二十六)的分子量主要有兩種,分別為 5.3×10^6 Da 和 6.3×10^6 Da, 3.9×10^4 Da 和 4.4×10^4 Da,而攪拌批式(圖二十三)和氣泡塔饋料式(圖三十一)分子量主要卻有一種,分別為 2.9×10^6 Da 和 4.0×10^3 Da。

氣泡塔批式(圖二十六)是由一種分子量變為兩種分子量,且分子量由小變大,攪拌批式(圖二十三)則是由兩種分子量變為一種分子量,分子量由大變小,攪拌饋料式(圖三十)則是維持兩種分子量,分子量是由大變小。而氣泡塔式(圖三十一)則是維持一種分子量,分子量範圍大致不變。

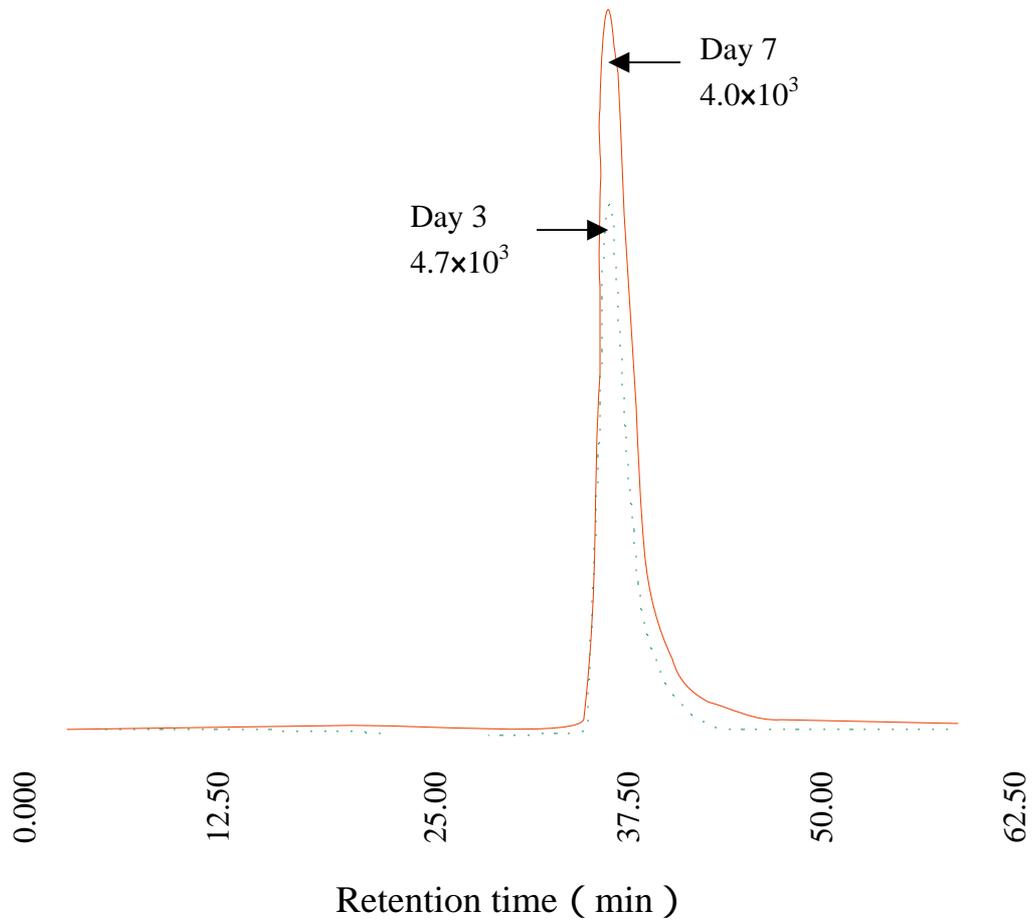
曾有研究指出在冬蟲夏草培養基中添加葵花油,並進行饋料式發酵的情況下,冬蟲夏草第三天的胞外多醣分子量範圍是 5.5×10^4 1.5×10^6 Da,第五天則是出現一個最主要的多醣分子量 4.9×10^4 (吳,2003),另外,曾有研究指出在舞菇培養基中添加橄欖油,並進行饋料式發酵的情況下,舞菇的胞外多醣分子量範圍是 3.8×10^5 1.2×10^6 Da(曾,

2004), 這兩類型菇類在添加植物油, 並進行饋料式發酵所得的胞外多醣, 分子量分佈較廣, 不如本實驗所產生之茯苓胞外多醣, 只有一個或兩個最主要的胞外多醣分子量。由茯苓菌何分離出之多醣分子量為 $9.15 \times 10^4 \text{Da}$ (Zhang et al., 1999), 與氣泡塔批式所產生之胞外多醣分子量相似, 唯不同的是氣泡塔批式所得之茯苓胞外多醣有兩個主要分子量, 但由茯苓菌核所純化出的多醣只有一個多醣分子量。曾有文獻指出靈芝液態培養胞外多醣分子量分佈會受碳氮源類型類、氮源濃度、三角瓶體積、初始 pH 與轉速的影響而有不同的分佈 (張, 2003), 從本實驗發現不同培養方式也會造成不一樣的分子量分佈。



圖三十、攪拌饋料式在第三天和第七天的茯苓多醣體膠體層析沖提圖

Fig30. Gel filtration chromatograms of *Wolfiporia cocos* polysaccharides in stirred tank fermentor on day 3 and 7



圖三十一、氣泡塔饋料式在第三天和第七天的茯苓多醣體膠體層析沖
提圖

Fig31. Gel filtration chromatograms of *Wolfiporia cocos* polysaccharides
in bubble column fermentor on day 3 and 7

由表三可發現攪拌饋料式胞外多醣產量最高(0.22mg/ml), 還原醣量最低(10.00mg/ml), 胞外多醣分子量也較大(6.3×10^6 Da), 氣泡塔饋料式所得的胞外多醣產量最低(0.028mg/ml), 還原醣量最低(11.00mg/ml) 胞外多醣分子量也最小(4.0×10^3 Da)。推測原因是因為攪拌式發酵槽內的攪拌扇葉可提高氣液循環, 使培養基與通入氣體均勻分佈於槽內, 菌體可充分利用, 所以多醣產量高, 氣泡塔式發酵槽則無此優點, 以致於多醣產量低。

經統計分析的結果, 攪拌批式明顯優於攪拌饋料式的胞外多醣產量, 其次是氣泡塔批式, 最差的是氣泡塔饋料式。

本次實驗可發現, 菌絲積聚於發酵槽底部, 若無攪拌扇葉幫助氣液循環, 饋料式反而會降低胞外多醣產量; 但若有攪拌扇葉幫助氣液循環下, 饋料式確實有助於胞外多醣的生產。然而, 胞外多醣的產量與槽體氣液循環有關, 較佳的氣液循環可有較高的多醣體產量, 因此若增加攪拌速度, 幫助氣液循環, 可能會提高多醣體產量。

由表三和表四比較可發現饋料式發酵較容易形成單一茯苓胞外多醣分子量, 分子量範圍也較接近, 且分子量較小, 不如改變通氣量實驗所得之胞外多醣結果, 有較多的變化。由本實驗可發現, 不同通氣量與不同培養方式會有不同的胞外多醣分子量的分佈。

表四、不同培養方式七天對茯苓 pH、還原糖、以及胞外多醣分子量
分部之影響

Table4. Effect of culture method on pH , residual sugar,
exo- polysaccharide, and distribution of molecular weight of
Wolfiporia cocos after days 7 of fermentation

		Stirred tank fermentor		Bubble column fermentor	
		Batch culture	Fed-batch culture	Batch culture	Fed-batch culture
EPS(mg/ml) *		0.17±0.03 ^a	0.22±0.06 ^b	0.12±0.05 ^c	0.03±0.03 ^d
MW (Da)	day 3	3.1×10 ⁷ 6.7×10 ⁷	3.4×10 ⁷ 3.5×10 ⁷	3.6×10 ³	4.7×10 ³
	day 7	2.9×10 ⁶	5.3×10 ⁶ 6.3×10 ⁶	3.9×10 ⁴ 4.4×10 ⁴	4.0×10 ³
Final pH		2.3	2.4	2.5	2.0
residual sugar (mg/ml)		20.00	10.00	18.00	11.00

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