

第一章 緒論

1- 1 前言

自古以來，靈芝，一直位處漢方藥的最高峰，又因野生靈芝量少難尋，故更顯得珍貴異常。靈芝之名初見於宋代沈括的靈芝苑，許多古老的藥學典籍中都對其著墨甚多，例如：神農本草經云：「山川、雲雨、四時、五行、陰陽、晝夜之精，以生五色神芝，為聖王休祥。」赤芝為苦平主胸中結益心氣補中增智慧不久忘食輕身不老延年神遷一名丹芝。」抱朴子一書則描述了多達數百種的芝類。李時珍所著的本草綱目云：「可久食輕身不老，延年神仙。」

靈芝被認為能強壯、補血、安定精神、利尿、補肝等，用治咳嗽、支氣管炎、關節炎等⁽¹⁾。近年來，隨著醫藥科技發達，人工栽培成功，因此，利用西方科學探討的模式，廣泛開展了對靈芝類真菌的化學成分、藥理作用和臨床應用的研究工作，揭開其神秘面紗，印證其療效，結果指出靈芝適用於狹心症、高血脂症、慢性支氣管炎、肝炎、白血球減少症、風濕性關節炎、腦發育不全、神經衰弱、矽肺、腎炎糖尿病、消化性潰瘍、沖狀腺機能亢進、不整脈、網膜色素變性、進行肌營養不良等各種疾患⁽¹⁾。

近來藉由椴木培養或是太空包裝培養已可大規模的生產靈芝子實體，此外亦有用固體或液體培養菌絲體方法，企圖將有效物質生產在菌絲體或培養基中的嘗試，市場價值與日俱增。

1- 2 靈芝的栽培方式

靈芝的來源可分為野生與人工栽培，其敘述如下：

(一) 野生靈芝 - 野生靈芝在台灣平地及高海拔山區皆有分佈，常常生於闊葉樹、針葉樹、相思樹及豆科植物，大部分為一年生的子實體。

(二) 人工栽培靈芝 - 靈芝目前因研究及應用需求迫切，而有人工栽培法出現。其方法有二⁽²⁾：

a. 子實體栽培

(1) 段木栽培：將靈芝的生長菌絲種植在櫟木或是枹木的枯木段上。

(2) 木屑培養瓶或太空包栽培：

於廣口瓶或太空包中填裝木屑與生長培養基，將靈芝菌絲接入後塞上棉塞培養，在 30 栽培 70~90 天即可採收子實體。

b. 菌絲體液態培養

由於靈芝子實體的培養一般要 2~3 個月的時間，而且從開始到採收相當費力，又因為野生靈芝不易取得，所以發展出像生產抗生素那樣以液體發酵的辦法，即為靈芝液體培養。

1-3 靈芝的成分及藥理特性

中國大陸發表的報告顯示⁽³⁾，靈芝定性分析實驗結果初步證明，靈芝子實體中含有糖類（包括還原糖和多醣）、三帖類、核酸、氨基酸、蛋白質、有機銻、甾類、揮發油、樹脂、油脂及少量無機離子等。其定量分析證明，乾的靈芝體含水分 12~13%、纖維素 54~56%、木質糖 13~14%、灰分 0.022%、粗脂肪 1.9~2.0%、總氮 1.6~2.1%、單糖 4.5~5.0%、多醣 1.0~1.2%、甾體 0.14~0.16%、總酚 0.08~0.12% 等，不同的生產方式及地點，其內成分的含量會有差異。

現代科學家的研究指出，靈芝成分中主要具有藥性的有：多醣類（polysaccharides）、三帖類（triterpenoids，為靈芝苦味的來源）、蛋白質（proteins）、核酸（nucleic acid）、固醇類（steroids）等，其藥效功能及生物活性請詳見 Table.1-1，其中以靈芝多醣最具抗腫瘤活性，而其在消化道內是不能被分解而消化吸收的，故靈芝多醣應該屬於一種膳食纖維（dietary fiber）⁽⁴⁾。

Table.1-1：靈芝成分中具有藥性之物質

材料	生理活性物	生理活性
子實體	核酸	抑制血小板凝集 ⁽⁵⁾
	三帖類	抑制組織胺釋放 ⁽⁶⁾ 抑制血小板凝集 ⁽⁷⁾
	多醣類	抑制腫瘤細胞生長 ^(8,9,10) 降血糖 ⁽¹¹⁾
菌絲體	核酸	提升血液中 Aldolase 活性 ⁽¹²⁾
	三帖類	促進肝臟功能 ⁽¹³⁾ 抑制血小板凝集 ⁽⁷⁾
	多醣類	抑制腫瘤細胞生長 ^(10,14) 降膽固醇 ⁽¹⁵⁾
	蛋白質	增強免疫作用 ⁽¹⁶⁾
發酵液	多醣類	抑制腫瘤細胞生長 ⁽¹⁷⁾

靈芝對人體有下述之功效：

由目前文獻得知^(3,18)，依照靈芝成分使用於動物的研究模式，可得其生理作用及藥效成果如下：

（一）抗癌作用

靈芝對於抗癌的主要成分為多醣體；具抗癌及免疫增加作用之靈芝多醣體為型之高分子多醣體，即必須有 C-6 側枝，(1-3)-D-gluco-pyr-anosyl-(1-3)-A-D-gluco-pyr-anosyl 之結構。

由醫學臨床研究指出：靈芝多醣體之抗癌機轉可能是由靈芝之 型多醣體

(- (1,3) -glucan) 刺激巨噬細胞 (macrophage), 活化巨噬細胞使其分泌種種 Cytokines 以及 Lymphokines , 例如 : IL-1 , TNF, INF, IL-11 , 刺激靜態 T 細胞活化 , 並分化成輔助性 T 細胞 (helper T cell), 繼而更進一步誘導產生自然殺戮細胞 (NK cell) 毒殺性細胞 (Cytotoxic) 與 LAK (Lymphokin actived killer cell) 細胞等等一連串免疫增強反應 , 使動物體內增進免疫功能 , 發揮抗癌作用。

(二) 降血壓作用

主要為 lanostane 類之衍生物及某些三帖類化合物可以抑制 Angiotensin Angiotensinconcerting eneyme 而達到降壓之目的。

(三) 降血糖與血脂作用

主要為多醣體 glucan 之結構化合物 , 除具降血糖之功能外亦具有抗發炎作用 , 此外 , - (1,3) -glucan 亦具有降血脂作用 , 能將血清、膽固醇、甘油三酯和 - 酯蛋白做不同程度的降低。

(四) 免疫作用

靈芝中多醣體類為無毒或低毒性的免疫促進劑 , 能增加免疫力 , 強化身體健康⁽¹⁹⁾。根據醫學研究靈芝多醣體可提高宿主免疫能力 , 如 NK 細胞之增加等 , 以對抗移植之肉瘤細胞。所以多醣體是一種生物學反應調節劑 (Biological Response Modifier, BRM) 長期服用可提高免疫系統。⁽²⁰⁾

(五) 對內分泌與代謝的影響

大陸方面研究指出 : 複方靈芝 (靈芝菌絲 + 銀耳孢子) 可能有腎上腺皮質激素樣作用。而靈芝多醣 D6 能明顯影響核酸、蛋白質代謝過程 , 促進蛋白質的合成 , 這一作用不但是靈芝多種藥理作用的物質基礎 , 而且還可能是靈芝扶正固本作用的重要環節⁽¹⁾。

由以上可知 , 在靈芝屬菌株中可以萃取許多具有不同生理活性的物質 , 有些可以相輔相成共同對抗疾病 (如 : -1,3-D-glucan 可以增加免疫能力以對抗癌細胞 , 而 ganodermicacid T&Z 對肝癌細胞有細胞毒性), 也有互相抵觸的部分 (如 : ganodermaicacid A、B、C 和 D 等會抑制免疫能力); 而傳統中藥在煎煮靈芝時隨著不同種的靈芝菌株、不同的萃取部位與不同的培養環境都會影響抽出液中的成分與濃度比例上的差異 , 故將不同藥效的成分由中藥材中加以分離 , 以便對症下藥 , 將可以使傳統中國醫學更有發展的空間。

靈芝屬菌株除了有以上的生物活性物質外 , 目前也有報告指出靈芝可以用來處理廢水 , 尤其利用其菌絲體 , 幾丁質 (chitin), 或多醣可以吸附水中的重金屬 , 例如銅、鉻或汞^(7, 21, 22, 23)。Matheichal 等學者在 1991 年更證明靈芝吸收附

重金屬離子為一不可逆反應，由以上可知靈芝在人體中也可能可以將食物中的重金屬吸附，以減少對人體的傷害。

靈芝屬菌株為一白腐型真菌，具有可以分解木質素 (lignin) 的酵素，故已有報告嘗試將其用於造紙工業，將木材中之木質素分解留下有用的纖維素 (cellulose) (2)。

因蘇聯柴諾此核能電廠事件，更發現靈芝可以作為核能污染的生物指標，因為 *G. lucidum* 可以將空氣中的 ¹³⁷Cs 蓄積在子實體中(24)。

1- 4 固態發酵的簡介

現代發酵工業是當代生物技術產業中以工業化方式生產的主體部分，其發酵水準是一個國家生物技術產業發展的重要標誌之一。眾所周知，微生物的發酵方法有兩類：液體深層發酵與固態發酵。1945 年青黴素的大規模工業化生產開創了液體深層發酵技術及現代發酵工業，發酵工程與生化工程也由此應運而生，主要研究對象是純種培養與大規模產業化。固態發酵古已有之，只因固態發酵技術至今未達到純種培養與大規模產業化要求，而一直被隔離在現代發酵工業的大門之外，作為傳統與落後的代表而被忽視(25, 26)。

但許多現代生物製品固態發酵的產率比液態深層發酵高的多，這是因為液態深層發酵產生的大量發酵廢水、通氣與機械攪拌的高動力耗能，成為液體深層發酵進一步發展的障礙，迫使其向高濃度、高黏度方向發展，然而高濃度、高黏度的極限就是固態發酵。再從生態學與仿生學角度看，經過千百萬年生物進化洗禮的自然界生物體，無論是最低等的單細胞生物，還是高等動植物及其單個活體細胞，都不是選擇在流體流動環境下生活。液體深層發酵反應器內的流體高速運動環境是否真正是微生物生長、繁殖的最佳條件呢？可見，現代發酵工業中液體深層發酵技術一統天下的局面是不完整的。由此可見，現代發酵技術從液體深層發酵開啟先河，發展趨勢必然向著固態發酵方向前進，徹底扭轉“固態發酵是一種古老而落後工藝”的世俗成見。

固態發酵係指傳統上以固體含有適當水分的基質，如傳統的纖維質廢棄物或是顆粒狀的穀類為原料，加入適當的水分後發酵。發酵期間，其酵素來源為(1)基質本身的酵素(如：茶)，或是(2)來自自然界的微生物，如堆肥、高粱酒釀造、乳酪的製造等；另有(3)接種菌種，如菇類菌種製造、菇類栽培、酵素製造等。近年來，固態發酵的發展著重在生物量能量保存、固態廢棄物處理及生產二次代謝產物的應用上。天然或是合成的物質都可拿來當固態的基質。而最主要可利用的天然有機材料有多醣、蛋白及木質素，這些都可被菌體拿來當作基質(碳源)利用。一般而言，農業培養的殘餘物都含有豐富的纖維與澱粉，可應用於固態發酵。

固態發酵是固態基質在低水含量或低水活性的情況下的發酵培養。典型深層培養的水含量高於 95 %。而固態發酵中固態基質的水含量則介於 40 % ~80 % 之

間。固態發酵通常使用在農業產物或食物的發酵上，如米、小麥、大麥、玉米、大豆等。固態發酵唯一的特點是在低水含量的條件下操作，提供了菌絲生長一個選擇性的環境，如黴菌。實際上，大部分的固態發酵為黴菌發酵，在潮濕的農業基質上生產胞外酵素。細菌與酵母菌不能忍受低水含量(水活性)的環境，因此，固態發酵受細菌與酵母菌感染的機會便大大的降低了。雖然大部分的發酵為黴菌發酵，但也有在相對高水含量(75%~90%)的情況下以細菌或酵母菌培養的例子。固態發酵在亞洲被廣泛的用在製造食品上，如味增、醬油發酵，以及生產酵素。

固態發酵優於深層發酵的主要優點是：(1)發酵料與反應器體積小，具低操作成本；(2)低水含量降低污染的機會；(3)產物分離簡單；(4)具能量效率；(5)允許分化的結構生長，對某些發酵而言是產物生成的關鍵點。固態發酵的主要缺點是天然基質具異質性，很難混合均勻，造成控制上的問題(pH、DQ、溫度)。為減少控制上的困難，基質通常以連續式或是間歇性攪拌來達到混合。對大型的發酵體積而言，菌絲細胞在高攪拌速率下會造成傷害，但低攪拌速率又無法避免濃度梯度的產生。因此，固態發酵系統通常採用滾動式的反應器，但必需找出最適合的滾動速率。

固態發酵新技術與液態深層發酵技術一樣，是一種普遍性的微生物生產應用技術，不限於某一種產品。隨著該技術體系的不斷改進與完善，以技術開發帶動產品開發，擴大應用範圍。因此，現代固態發酵技術有著無限廣闊的應用前景。

1- 5 本文大綱

靈芝是一種營養、保健價值極高的大型擔子菌，含有 20 多種微量元素及多醣、核酸、生物鹼等對人體有益的成分。近代醫學研究已證明，靈芝有降血脂、降血糖、調節免疫功能等多種生理作用。由於靈芝含有抗腫瘤活性的靈芝多醣，因此愈發引起人們的重視。近幾年，對於靈芝除了利用現代分離技術即在分子水平上研究各種成分的功效和用於醫藥外，在將其開發研製成為功能食品方面，也有許多人作了大量研究。一方面是選擇有效的抽提劑將靈芝子實體的功能性成分提出後，再與其他食物配合加工成便於消費者食用的功能性食品，例如用靈芝子實體生產醬油；另一方面主要集中在液體培養得到的菌絲體及液體培養基，生產飲料或其他食品⁽²⁷⁾。

液體培養靈芝，投資大，乾燥費用高，產品得率低，也易污染。本研究以可食用糧食類作為生產靈芝菌絲體的培養基，採取將流體培養獲得的靈芝菌液與滅過菌的固體糧食類混合，讓大量的靈芝菌在固體糧食基質上繼續發酵，大大的縮短了發酵生產時間，其產品也容易乾燥保存，具有生產週期短、勞動強度小、生產效率高等優點，且生產成本也比液態發酵有大幅度的降低。使用小麥當固態發酵培養的基質，接入靈芝菌進行發酵作用，所得到的靈芝小麥發酵物具有靈芝的靈芝酸成分，且發酵物中胺基酸含量高於子實體之胺基酸含量，且其中的礦質元素結合了靈芝子實體與小麥的優點。

本論文將在第二章對靈芝做基本介紹，並整理文獻中有關固態發酵培養靈芝菌的資料。第三章將針對本研究所使用的儀器設備、藥品及分析方法作介紹。第四章為本研究實驗項目、目的與步驟方法。第五章將所得到之結果加以討論。最後在第六章對實驗結果綜合的作出結論並對未來值得再研究、探討的方向提出建議與展望。

第二章 文獻回顧

2-1 靈芝簡介

2-1-1 靈芝的分類及生活史

在以靈芝固體培養來生產有效成分前，首先要了解確立靈芝屬菌株的分類系統，因為在不同種的靈芝會產生不同的產物，不同的產物會引起不同的藥效。靈芝根據 1979 年 Alexopolus 的分類系統⁽¹⁶⁾是屬於真菌界 (Myceteae)，無鞭毛菌門 (Amastigomycota)，擔子菌綱 (Basidiomycetes)，無菌摺目 (Aphyllophorales)，多孔菌科 (Polyporaceae) 的靈芝屬 (Ganoderma)；靈芝屬的外觀特性為：子實體具有光亮的表皮；擔孢子構造為卵形，且具雙層細胞壁，內壁為黃褐色有疣狀突起，外壁較薄而透明，成熟的孢子頂端為截頭狀^(17, 28, 29, 30)。而靈芝屬菌株分類可以利用外觀的特性^(29, 31)，如：皮殼 (crust)、柵欄狀層的細胞 (hymenodermelements fastigate)、菌肉 (context) 等；靈芝屬菌株分類也可以由生理特性來分類，例如以酵素分析系統進行細胞外酵素活性分析、菌絲生長速度、單一雙核系之交配反應等方式來進行分類⁽³²⁾。

靈芝的擔子孢子自菌褶散出後，在適當的生長環境下萌發後直接發育成菌絲，此菌絲每一節中具有一個核，一般稱為初級菌絲或單相菌絲。初級菌絲在靈芝生活史中存在時間很短，它萌發和生長主要是依靠孢子中儲存的營養。由不同性別的擔子孢子所生成的初級菌絲融合後可生成具有二個核之菌絲，稱為次級菌絲或複相菌絲。由次級菌絲繼續生長最後形成有組織分化的子實體，凡是組成子實體的菌絲都稱為三級菌絲。詳細靈芝生活史如(Fig.2-1)⁽³³⁾所示。

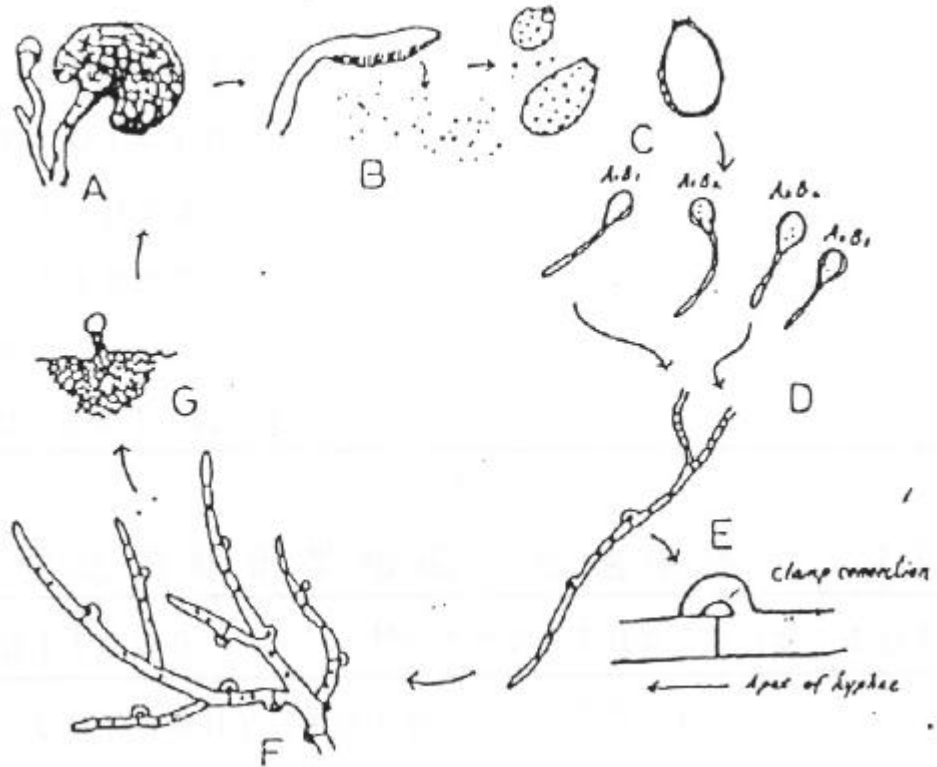


Fig.2-1：靈芝生活史（蘇慶華,1991）

成熟的靈芝子實體（A），從菌褶中散出擔孢子（B），孢子再發芽成為不同交配型態的單核體（monok）（C），此時的菌絲每一節只有一個細胞核，二條具有不同性核的單核體交配發生細胞質融合生成雙核體（D），雙核體繼續共軛分裂，分裂行為發生時將出現扣子體結構（E），菌絲繼續生長（F），在適當環境條件再生成子實體（G）。

2-1-2 靈芝成分分析

靈芝乃一天然食品藥材，天然食品的特色就是含有多樣種類的成份，因此靈芝是屬於複方而非單劑；西方醫藥喜歡以單種成份製成藥劑，這也是為什麼過量服用西藥容易造成副作用的原因之一，畢竟人體臟腑機能是相當靈巧而複雜的，使用單劑容易顧此失彼導致臟腑失衡、機能失調而產生副作用；而靈芝的多樣成份也使得它具『久服無毒(副作用)』特性的重要原因，靈芝在經過現代科學分析後發現含有以下之療效成份（深信仍有許多未發掘的有效成份，等待科學去驗證了解）：

（一）高分子多醣體(Polysaccharide)：

靈芝之中可提取二百餘種多醣體分子，其中約有十餘種高分子量的多醣體具有抗癌作用，此十餘種多醣體分別使用於癌細胞均有抑癌作用，但其效果仍以十餘種多醣體一起使用來得好，也就是說使用多種多醣體之效果具有相乘效果（一加一大於二）。大陸的北京醫科大學及日本國立癌症研究中心已經研究證實，靈芝多醣體能促進人體免疫功能，並激發巨噬細胞及 T 淋巴細胞等兩大免疫細胞，產生大量和抗腫瘤有關的細胞激素，如 α -干擾素、 α -腫瘤壞死因子等，有助於消滅突變細胞，降低轉形成惡性腫瘤的機率，同時改善藥物或放射線治療引發的副作用，對腫瘤防治具有重要意義。

(二) 三帖類(Triterpenoids)：

又稱靈芝酸，三帖類是靈芝苦味的來源，約有二百餘種種類，是靈芝保肝功能的主要因素，可減輕肝炎和肝纖維化，是靈芝之所以具護肝功能的主要原因。除了護肝功能外，三帖類還有調節血壓、抑制癌細胞生長、抑制組織胺釋放、防止過敏、增強肝機能、降血脂等作用。

(三) 蛋白質(Protein)：

小分子蛋白質(LZ-8)、醣蛋白(Glycoprotein)。蛋白質是由氨基酸構成，而氨基酸有二十餘種，靈芝幾乎包含了所有人體必需的氨基酸(人體肝臟無法自己合成，必需由食物取得的氨基酸稱為必需氨基酸)，缺乏這些氨基酸將導致各種疾病。

(四) 微量元素：

靈芝也包含了許多人體必需的微量元素如有機鍺(Ge-132)、鉀(K)、鈣(Ca)、磷(P)、鎂(Mg)...等，現代醫學經過長期研究後認為，微量元素雖在人體中含量極少(佔人體總重的 0.01%以下)，微量元素具有維持人體機能運作、調節體內新陳代謝、刺激免疫系統、活化細胞等功能。人體是不可或缺微量元素的，否則易導致難以治療的疑難雜症，靈芝中的有機鍺更經證實有增加血液含氧量、排除體內重金屬、提高身體免疫力、抑制癌細胞之功能且於自然界難以取得。

(五) 核酸類：

包括有腺? (Adenosine)、核醣核? 酸(RNA)、腺嘌呤(Adenine)、尿嘧啶(Uracil) 等物質，均有重要的生理活性。其中腺甘具有抑制血小板凝集作用，可防止血栓的形成，預防動脈硬化。

其他成份：

除了上述成份外，靈芝還含有酚類、醇類、甾醇類、生物鹼類、內酯、香豆精、蟲漆?、蟲漆異? ...等。

儘管靈芝的各別成份均具有特定藥理作用，但更特別的是各成份間彼此的合作協同作用，此作用使得靈芝療效得以大幅提昇，甚至以倍數或幾何級數計算，因此靈芝並不宜抽取單獨成份使用。藉著整體成份的全面配合，才得以全力發揮靈芝潛能，並全面性地對身體各系統生起療效。

2-1-3 靈芝多醣

多醣類是目前靈芝屬菌株被探討最多的有效成分，在此將其分為三類：

(一)降血糖活性蛋白多醣 (proteoglycan) ⁽¹¹⁾：

由子實體以熱水萃取液中加入乙醇時所沈澱的高分子成分，用管柱層析法純化取得兩種多醣 - 蛋白質複合體 ganoderan B 與 C 中，發現其有降血糖活性。現已證實各多醣部分均以 $-(1\rightarrow6)-$ ， $-(1\rightarrow3)-$ 葡聚糖鏈為主體。

(二)抗腫瘤活性多醣^(9, 34)：

對靈芝的高分子成分中，可用熱水、鹽類、鹼等萃取，再以層析法純化各種多醣，發現以 $-(1\rightarrow3)-D$ 葡聚糖鏈為活性中心的各種雜 $-D$ - 葡聚糖及其蛋白質複合體，有強抗腫瘤活性。這些多醣未有如化學療劑的藥害或副作用，而且亦無抗原性，因此，靈芝作為這種新型抗腫瘤劑（免疫增強劑）的開發素材，特別受矚目。

(三)靈芝菌體外生產的多醣：

1985 年 Sone, Y 等人將菌絲接種在液態培養基中 (Malt extract 4% , Yeast extract 0.1% , Glucose 5% , KH_2PO_4 0.05% , K_2HPO_4 0.05% , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%)，在 28℃ 下震盪培養七日，過濾以除去菌絲體，經透析後，加三倍體積的酒精，使胞外多醣沈澱，真空乾燥。將多醣體加水溶解，不溶部分 (47%) 完全由葡萄糖組成，水可溶性部分則含有葡萄糖、甘露糖及少量半乳糖，其分子比為 1.0 : 0.5 : 0.13，故為一雜多醣。和子實體所得到之多醣體一樣，故由菌絲體分泌的多醣體亦具有抗腫瘤活性。

靈芝中非水溶性多醣有如 (Fig.2-2) 之可能結構，不同分子量的多醣其生理活性亦有差異，一般可分三類：

(一)分子量在 3000-5000 左右者，具有降血糖之功用。

(二)分子量在 10000-20000 之間者，具有消炎作用。

(三)分子量在 30000 以上者，具有抗腫瘤作用。

一般分析多醣結構組成的方法為將得到之多醣純化以後，再配合酸水解以決定單醣組成，酵素水解偵測 anomeric 結構，甲基化及史密斯降解法用以了解單體連結的型態，GC mass 及配合 NMR 可了解多醣結構。多醣分離及純化一般可用酒精沈澱、離子交換層析、超過濾、GPC 等各種方法個別使用或混合使用⁽³⁴⁾。

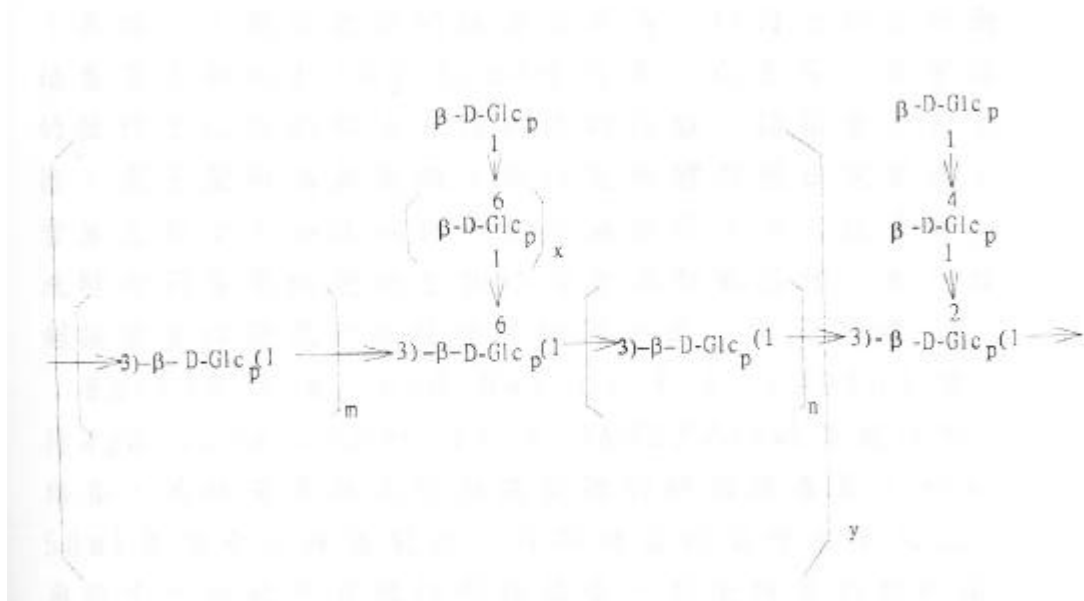


Fig.2-2：靈芝非水溶性多醣之結構⁽¹⁴⁾

其中 $mnxy$ 會隨著不同萃取方式及靈芝部位而有不同重複單元。

2-2 靈芝子實體的栽培方法

分析靈芝生長的环境便可知道，靈芝以木材中各種成分作為它的營養，需要較高的溫、濕度和良好的通風透光的環境。故以下就營養、溫度、濕度、空氣、光線五個方面來討論：

(1) 營養

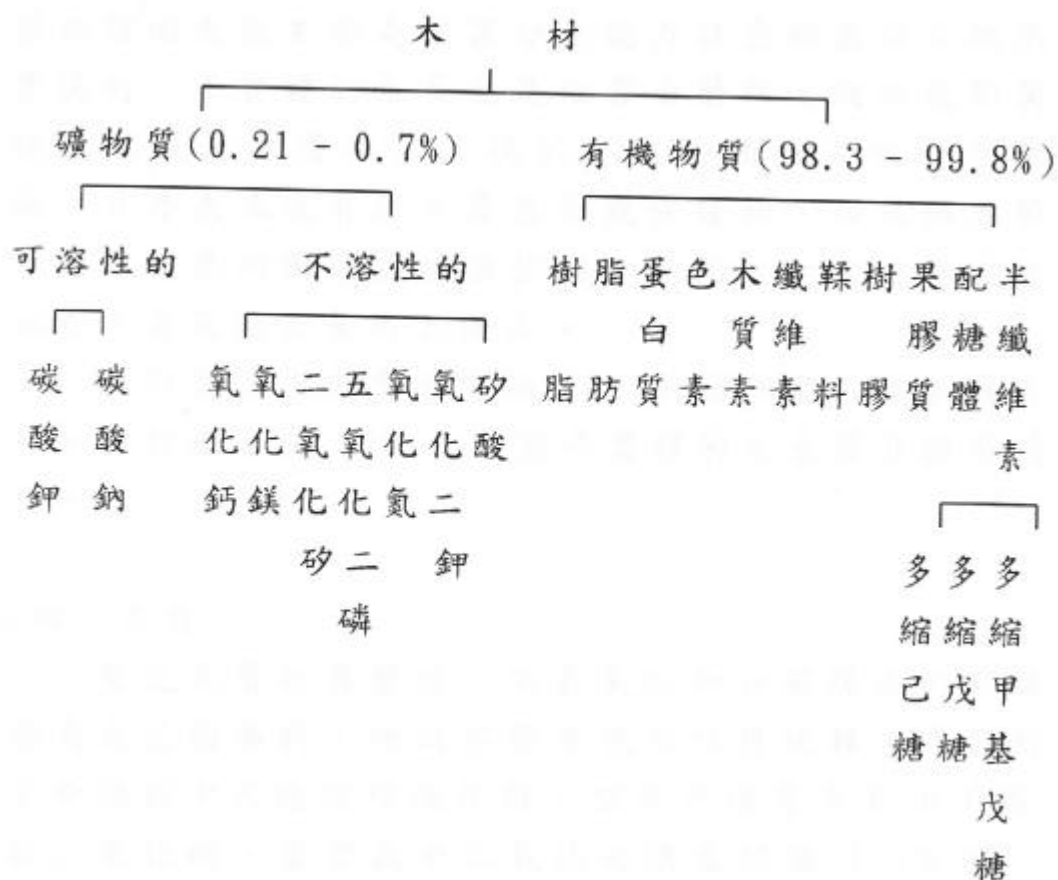
真菌所需的營養基本上有三大類：碳素營養、氮素營養和礦質營養。靈芝在朽木或樹樁上生長，無疑木材是靈芝的營養來源。木材的化學成分相當複雜，概括起來可包括兩大類：有機物質和礦物質。如 Table.2-1 所示。而靈芝菌絲可分泌多種？將有機成分分解利用，礦質營養則可從木材中各種礦質元素吸收得到。

此外，在人工栽培方面為了促使靈芝生長更加快速，一般會在木屑培養基中添加適量富含營養的物質（如米糠、麩皮、玉米渣等）當作配料。需注意的是配料比例高，除了感染雜菌的機會增加，更重要的是富含營養的配料太多，會使營養生長特別旺盛，因而抑制了子實體的分化（生殖生長）。

(2) 溫度

對於靈芝生長與溫度的關係，有研究指出⁽³⁾：25~30 是菌絲體生長的最適溫度，較高或較低的溫度都會使菌絲體生長速度減慢，同時子實體原基分化的最適溫度也在 25~30 之間。在接近 25 中培養的子實體生長較慢，質地較緊密，皮殼層發育的較好，色澤也較光亮。在 30 左右培養的子實體生長較快，個體發育週期較短，質地不如 25 中培養的緊密，皮殼及色澤也較差。

Table2-1 木材中有機物質和礦物質成分



(3) 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。在自然界中靈芝的發育離地面很近，又正值夏秋季節，雨量充足，這些都說明了靈芝生長發育需要很充足的水分和空氣濕度。因為菌絲體的生長主要是依靠分生能力旺盛的菌絲尖端來實現的。子實體的生長也是依靠菌絲尖端組成的菌柄頂端或菌傘邊緣來實現的。這些菌絲尖端特別幼嫩，其外表又沒有任何覆蓋物或保護物，如果濕度較低的話，這些幼嫩的尖端很快就會乾死，一旦菌絲尖端死亡，靈芝的生長停止。

(4) 空氣

靈芝是屬於異營性，依靠氧化和分解現成的有機物為自己的養料，所以不發生光合作用過程，在它的生命過程中只進行呼吸作用。空氣中通常含有 0.03 % 的二氧化碳，當空氣中二氧化碳濃度超過 0.1 % 時，靈芝子實體就不能發育菌傘。通常人工栽培中出現的各種不正常型態大都是由於培養室中二氧化碳濃度過高所造成的⁽³⁵⁾。試驗證明⁽³⁾：(1) 空氣中二氧化碳含量的增加對靈芝菌傘發育有

極大的影響。含量超過 0.1 % 就不發育菌傘；含量在 0.1~1.0 % 之間子實體的型態基本上相似，都長成分支極多的鹿角狀；含量達 10 % 時，雖然還能發育子實體，但型態極不正常，沒有任何組織的分化，甚至連皮殼也不發育。(2) 空氣中二氧化碳在 0.1~1.0 % 之間，對菌柄生長有促進作用，特別是 0.1 % 左右其促進作用更明顯。

(5) 光線

一般可能認為，光照對於進行光合作用的綠色植物是必不可少的，而對於進行呼吸作用的靈芝而言似乎不是必須的。其實不然，經實驗證實光照對靈芝正常生長發育的影響是多方面的，如光照對菌絲體的生長有抑制作用；對子實體的生長有促進作用以及菌柄和菌傘的生長有明顯的向光性。而光強度在 15000~50000 勒克司，生長情況最佳⁽³⁾。

2-3 固態發酵培養的技術

固態發酵是微生物培養的一種方式，使用固態物質當作基質，讓微生物生長在上面。與液態深層發酵相比，使用固態發酵培養，微生物有時能生長的不錯，也可產生較大量的胞外酵素，或其他代謝產物。另有研究指出，色素與香味也必須藉由固態培養來生產。雖然一些傳統食物與酒精飲料早已經應用在工業化生產，但近年來固態發酵的應用已經被擴展到製藥工業與生化產業上了。儘管固態發酵能產生高產量酵素或其他代謝產物的原因尚在未知階段，但固態發酵技術進一步的研究與進展在未來已經是指日可待。因為獨特的產物特性，它逐漸發展為新形的生物科技。

1960 年，許多火雞因攝取了黃麴毒素而死亡，此種毒素是由 *Aspergillus flavus* 這隻黴菌生長在花生粉上生產的。Hesseltine 發現大量的毒素皆是藉由固態發酵才能生產的，在液態深層發酵是無法生產的。這使固態發酵引起許多注意。因此固態發酵在亞洲國家的傳統製造食品過程扮演了一個很重要的角色。工業規模固態發酵發展到以酵素與檸檬酸的生產。現今，固態發酵工業之利用擴展到堆肥、菇類培養與其他食物的生產，如：麵包、乳酪⁽⁵⁸⁾。

固態發酵有獨特特性與限制。胞外水解酵素與其他代謝產物有時藉由固態發酵生產較大量的產物。雖然原因不是很清楚，但此特性對固態發酵的應用很重要。Martinez 等人研究指出以麥桿固態發酵培養菌絲所產生的酵素分子量與 PI 值與液態發酵不同。近年來，Ishida 等人研究指出以不同培養方法培養 *A. oryzae* 生產不同形式的葡萄糖澱粉酵素。

固態發酵與液態深層發酵主要的不同點⁽⁵⁸⁾：

1. 固態發酵，微生物分佈在固體表面，微生物生長與產物生成也主要在表面進行。基質不均勻且不易攪拌。因此培養環境為異質性的。
2. 固態基質的水分含量一般都非常低，必需依基質的物理性質與化學性質而定。對於高水分含量的培養基而言，穩定通氣通過基質床很困難，通常會發生“渠

道”效應。

3. 由於菌體的新陳代謝與生長產生熱，提高了基質的溫度，造成水分的流失。此現象使得固態發酵的控制更具挑戰性。
4. 固態發酵的基質通常是天然物質，如：穀類、大豆、農業的生物量、固體廢棄物等。有時產物是整個發酵基質，如傳統性食品：miso、natto、tempeh。
5. 一般使用在固態發酵的微生物為黴菌，可生產澱粉？降級澱粉並穿透到固態基質中。固態發酵中，黴菌的菌絲型態與液態深層發酵之菌絲型態不同。這兩種菌絲有不同的生理活性，複雜的控制過程。
6. 對基質床進行攪拌非常困難，某些產物的活性對剪應力非常敏感，所以培養一般是靜態的，除了轉鼓反應器與流體化床發酵槽。

由於這些固態發酵的獨特性質引發了一些優點與缺點⁽⁵⁸⁾：

以工業化生產胞外酵素包括澱粉酶、細胞酵素、果膠酵素等，使用了固態發酵或液態深層發酵。這兩種方法的取舍需賴過程的成本與效率來決定。因此必需知道固態發酵與液態發酵的優點與缺點。

優點：

1. 固態發酵較不易受細菌污染，因為細菌的生長受到低水活性的限制，因此固態發酵很少受到污染。
2. 發酵槽與發酵設備非常緊密。固態發酵的填充容積比液態深層發酵高，因為固態發酵水含量低。
3. 如果產物必需從固態發酵中來萃取，只需要較少的溶劑與較低的回收成本。
4. 發酵殘餘物的處理非常簡單。因為發酵殘餘物的水含量很低，可將之乾燥做為動物飼料或肥料。
5. 微生物利用空氣中的氧氣，降低了通氣的能量成本。空氣的供給與基質床的溫度可藉由強制通氣來控制。固態基質的表面積大促進熱傳送與氧氣和二氧化碳的氣體交換。
6. 分生孢子可用來當作一般麴發酵的起始物。因為孢子可以保存很長一段時間，且可重複使用。

缺點：(困難點)

1. 基質床的攪拌非常困難。因此細胞、養分、溫度、水含量分佈不規則，造成基質床異質性的生理、物理、化學環境。這個複雜性使得過程控制非常困難。
2. 微生物呼吸或代謝產生熱使得溫度控制非常困難。因為固態基質床的熱傳導係數非常低。通常強制通氣是控制培養溫度的唯一方法。
3. 菌體生長與其他發酵參數的快速測量非常困難。尚無有用的感測器可供直接測量。
4. 微生物被限制在低水含量的基質上生長。黴菌或其他菌絲真菌最適合，細菌則不適合生長，除了旱生植物。
5. 通常溫度是固態發酵控制微生物生長與產物生成的唯一方法。因此沒有彈性的

方法可用來分析發酵的狀況，連續操作與自動化非常困難。

6. 由於固態發酵高產率的影響因子還是未知數，培養策略完全是靠經驗與實驗結果。

2-3-1 基質研究

在固態發酵中，固體基質是不溶於水的聚合物，不僅提供微生物所需營養(碳源、氮源、無機鹽、水及其他營養物)，還作為細胞的固定物，能提供微生物所需一切營養的基質被認為是理想基質。基質在固態發酵中具有獨特的作用，它影響微生物發酵過程的質傳、熱傳及微生物的代謝功能等。所以對基質研究比較透徹，主要集中在基質的特性、預處理及滅菌等方面⁽³⁶⁾。

(一)基質特性

微生物要在基質上進行生長並代謝產物，必將受到基質本身的物理因素(基質顆粒大小、形狀、空隙率、纖維含量、黏度、顆粒之間擴散率等)和化學因素(聚合度、疏水性、結晶度及電化學性質等)的影響。但基質顆粒的尺寸及濕度或水活性在固態發酵中對微生物的生長與活性最重要。基質顆粒的大小直接影響到單位體積反應表面積，也會影響顆粒間菌體的生長、氧的供給率及二氧化碳的移出率等。

一般來講，小的基質顆粒可以提供較大微生物攻擊表面積，可以明顯提高固態發酵反應速率，被認為是理想的選擇。但是在許多情況下太小的顆粒容易造成基質積團，顆粒間空隙率也減小，導致阻力增大，對熱傳、質傳產生不利的影響，以致於妨礙微生物的呼吸或通氣，結果導致微生物生長不良；同時，大顆粒由於存在較大間隙，有利於提高質傳和熱傳效率，還可提供更好的呼吸及通氣條件，但提供較小的微生物攻擊表面積。隨著菌絲的增長，空隙大小在反應過程中會減小，氧、二氧化碳有效擴散係數降低。

(二)基質預處理及吸收

大多基質都是聚合物，不僅具有不溶於水，在微生物開始發酵初期不易被攻擊等特點，而且基質經常缺少某些微生物所需的營養，這時需要從外部添加營養。為了使基質更容易地被微生物利用，經常對基質進行化學或機械預處理。基質預處理方法很多，包括：汽爆、浸提、粉碎、裂解、研磨等機械處理及鹼化學處理⁽³⁶⁾。

(三)培養基滅菌

隨著反應器的放大，培養基大規模滅菌會帶來許多問題，如：培養基物理、化學性質改變、有毒化合物的形成及營養物的損失等。滅菌加熱及冷卻時間隨培養基規模而變，滅菌過程受不同因素影響如殺死微生物的速率(與微生物活細胞成正比)、不同微生物對溫度的敏感性差別等。對大規模滅菌一般採用高溫、短時方法，這樣由於熱而引起營養成分破壞的機率較小。

在工業化生產時，培養基滅菌遇到的另一個棘手問題是：培養基有的有機成分易受熱分解，甚至在較高溫度下互相作用，形成對微生物有毒害作用的物質。

有時培養基滅菌除了考慮殺死微生物外，還應考慮溫度對基質的物理、化學性質的影響。例如：麩皮(培養基中經常用的物質)在較高溫度下物理、化學性質發生改變，這一般有利於微生物的吸收，所以滅菌時間要長一些⁽³⁶⁾。

2-3-2 無菌操作相對概念

在任何液態發酵中，大多都要求無菌操作，這是因為雜菌可以在含水量高的液體培養基中比發酵使用的微生物生長更好。而對於固態發酵來說，其菌種一般可以在含水量低的情況下快速生長；如果固態發酵所用微生物接種到已滅菌的基質上，此過程有利於微生物，優於雜菌生長，甚至可以排除雜菌的干擾。這意味著嚴格的無菌操作在固態發酵不是十分重要。當然，盡可能無菌操作。與液態發酵相比，這種生化反應器設計要求低，相對費用也低，這些可能是固態發酵備受青睞的重要原因⁽³⁶⁾。

2-3-3 固態發酵培養重要參數

(一)水分含量、濕度(Moisture)^(37, 38, 50)

在固態發酵過程，基質的水分含量是一個很重要的考量。水分含量中的自由水明顯的依固態基質的本質而有不同。許多固態發酵是在少許或是沒有自由水的情形下操作的，典型的基質水分含量約為 30-80% (w/w)。高水分含量會造成基質分子聚集在一起、通氣不良，或是缺氧環境。蒸汽處理過的米，是一種常見的基質，當水分含量超過 30-35% (w/w)時會變的黏稠。

最適水分的選擇取決於微生物與基質本身。對一般真菌而言，最適水分介於 40%與 80%之間。對於相同微生物而言，生長在不同基質，最適水分含量會明顯不同。大部分固態發酵的低水分環境較有利於酵母菌與真菌的生長。

除了影響生長，水活性還會影響產物的生成。產物的性質會被影響，例如香味。對某些例子而言，菌體生長與產物生成的水活性不同。最適水活性會依攪拌速率與培養溫度而不同。由於水活性會因為溶解溶質的濃度而不同，有時候加入鹽糖或其他溶質來改變水活性，即使產生相同的水活性，不同的添加劑還是會對發酵產生不同的影響。此外，發酵過程中，產物生成與基質水解皆會導致水活性改變。

發酵過程中，常利用通入潮濕的空氣或間歇性的噴灑水來控制水活性，通入飽和氣體通常被使用來增加基質的水含量。通入氣體的相對濕度通常為 60-80%。理想上，為了避免從未接菌基質流失或增加水分，必需將通入的氣體與基質的水活性一致。實際上，發酵會產生水分，為了達到蒸發冷卻，通入的氣體必需稍微乾於基質。通入氣體的溫度和濕度藉由空調系統來控制，溫度和濕度感測器可提供需要的數據，冷空氣藉由噴灑水或乾淨的蒸汽來調整濕度，或是提高溫度降低濕度到所需的值。

(二)溫度(Temperature)⁽⁵⁰⁾

固態發酵最大菌體濃度，約 10-30kg/m³，似乎比典型的液態發酵(40-50kg/m³)

還低，但因為固態發酵只有少許的水，因此，每單位質量發酵物所產生的熱比液態發酵大。溫度會快速上升，因為固態發酵只有少許水能吸收熱量(平均單位熱容量遠低於水的)。因此，大規模發酵的溫度很難控制。代謝熱的移除有時變成最主要的限制，特別對於熱傳導困難的多孔性發酵物。

發酵過程的溫度控制幾乎都是藉由蒸發冷卻的方法。因此，較乾的空氣提供較好的冷卻效果。控制空氣溫度，有時間歇性的噴灑冷卻水可防止基質脫水。對於大量堆積的基質而言，間歇性的攪拌可幫助熱移除。無論如何努力防止，對於最佳生長期的菌體培養，溫度梯度的存在還是無法避免。

(三)pH⁽⁵⁰⁾

對於固態發酵而言，基質的預處理通常都沒有 pH 的控制。對於某些無菌過程，都將初始 pH 調到 4 或以下，可防止細菌污染。酵母菌與真菌通常都可以忍受較酸的環境。此外，大部分的基質都是很有用的緩衝劑，可防止發酵過程中 pH 劇烈變化。對於富含蛋白質的基質，特別是蛋白去氨作用很微小的基質，都是很好的緩衝劑。可使用尿素與硫酸氨結合當作氮源來維持基質的 pH 的穩定。富含蛋白質或胺基酸的基質中，去氨反應會造成 pH 上升。發酵過程中 pH 穩定，對某些發酵很重要。酵素與某些二次代謝產物的穩定性會受 pH 的影響，即使產生速率不受 pH 影響，但因為產物被破壞，所以總產率會下降。以 *Aspergillus niger* 培養在富含葡萄糖的糖莖甘蔗渣上生產 pectinases，曾顯示類似的結果。

2-3-4 固態發酵生物量測定之原理^(39, 40, 41, 42, 43)

生物量是表示微生物生長狀況的一項基本參數。生物反應過程的終產物可以分為生物體和生物代謝產物兩類。對於前者，生物體的測量自然非常重要，它是產品多少的量度；對於後者來說，生物量與代謝產物通常有一定的比例關係。所以要得到最佳產物量，有必要使生物體生長達到最優狀態，這就涉及到生物量測定問題。

液態發酵中，水溶性基質是以一種連續狀態存在，其菌體生物量可藉由通過分離、提取等方法來測定。但固態發酵的基質中，氣、液、固三相同時存在，即多孔性的固態基質含有水和水不溶性物質。此物理環境適合絲狀真菌生長，但其生物量的測定較為困難。因為微生物不易從基質中分離，尤其當真菌菌絲深入培養基內部，緊密纏在一起，更不易進行分離測定。

為了改善這些問題，有幾種方法可用來測定固態發酵中菌絲的生物量：

1. 生物活性的測量，如 ATP、酵素活性、呼吸速率、免疫活性。
2. 養分的消耗量。
3. 細胞組成的分析，如：幾丁質/葡萄糖胺、麥角甾醇、核酸、蛋白質。

但酵素活性和麥角甾醇的量在培養過程中會改變，而養分消耗也只能應用在無寄生物的情況下，所以測量細胞組成(glucosamine)，是最適當的測量指標。

2-4 固態發酵反應器的設計

近年來，許多不同形式的反應器應用在固態發酵過程，包括了填充床反應器、轉鼓反應器、氣固相流體化床反應器，與攪拌式生物反應器。雖然液態深層發酵的規模放大的方法已經有很好的進展，範圍從成功的 thumb rule 到 semi-fundamental methods，這些方法不能直接應用在固態發酵反應器上：因為系統的物理構造不同，熱的移除是固態發酵反應器設計必須考量的主要問題，然而在通氣的液態深層發酵系統，氧氣的供給通常是必須克服的主要關鍵。最近，固態發酵反應器的重要發展，主要是在量化規模放大的方面，如生物現象的數學模式、質傳與熱傳的現象等。固態發酵反應器中所發生的現象可大致上分為大規模現象與小規模現象⁽⁴⁴⁾。

2-4-1 固態發酵的微觀現象

建立固態發酵中小規模現象的模式有兩個理由：需要描述固態發酵中真菌的生長狀況，以及想知道固態發酵中的小規模現象會如何限制生長。由於複雜的空間異質性，大部分反應器的模式都使用較簡單的表示法來描述生長機制，而小規模的傳送現象則被忽略⁽⁴⁴⁾。

(一)菌絲生長與死亡的動力模式

雖然已有固態發酵的 linear, exponential, logistic 生長機制的研究，大部分的反应器依然使用簡單的 logistic equation 來描述生長機制。這避免無限制的生長，也避免使用傳送現象方程式。以實驗性的研究描述生長機制可合理的預測生物反應器的效率。使用 logistic equation 描述生長，反應器的操作模式通常不把比生長速率(specific growth rate)與最大菌體濃度(maximum biomass concentration)設為常數，而把它們表示為局部溫度的函數。

最近有研究將培養的溫度轉變模擬短暫的溫度變化，因為比生長速率不只是當時溫度的函數，而是與整個培養期間的溫度變化有關。Arrhenius-type relationships 可用來描述死亡速率隨溫度增加而增加。

最近有另一研究指出假設菌體的呼吸速率在發酵培養的末期會下降，此過程稱為失活(inactivation)，類似於因本質老化過程造成的死亡。失活的速率被表示為 Arrhenius-type equation 中溫度的函數。

(二)建立菌絲生長、擴散、粒子尺寸減小的模式

近十年來，在小規模現象影響固態發酵生長的研究有很重要的進展。這些現象包括了微生物的生長行為，藉由擴散的部分質傳與基質粒子的縮小。

Mitchell 利用澱粉當作碳源，指出基質中 glucoamylase 的擴散會限制生長。大部分的 glucoamylase 會釋放在表面附近，所以表面附近的澱粉會很快的被水解利用，因此較深區域的生長會受葡萄糖釋放速率的限制。

氧氣的限制在固態發酵系統中是一個不可避免的問題。嚴重的氧限制會存在單一細胞的 biofilm 中。在真菌固態發酵系統，位於基質表面的穿透性菌絲將會

遭遇氧氣限制的問題。而且，就時間與位置而言，生長會受到可溶性營養物短缺的限制，特別是菌體的外層區域與發酵的末期。

另一個小規模的重要現象就是基質粒子的縮小。粒子縮小最原始的模式是假設整體粒子(基質粒子加 biofilm)的尺寸是保持不變的，而基質只在菌體-基質界面被消耗，而消耗速率被可獲得的氧(擴散通過 biofilm 的氧)所控制。但實驗結果顯示模式並不對，因為模式預測基質粒子最後會完全被消耗，然而實驗顯示發酵末期還有剩餘的基質粒子，這可解釋為基質粒子中的水解酵素擴散速率低，造成內部的大粒子較難接近酵素。

2-4-2 固態發酵生物反應器

生物反應器工程(Bioreactor Engineering)是生物工程領域中一個十分重要和非常活躍的分支，是近十幾年來孕育的年輕學科。它以生物反應器作為研究對象，在生物加工過程中處於中游加工過程的位置，是上游加工和下游加工的橋樑，因而在生物工程中佔有很重要的地位。生物反應器工程本身是一種生產工藝體系，屬於一個“產業”。目的是低投入、高產出、高質量生產產品。近年來由於固態發酵再次的被重視，對於固態發酵生物反應器的研究也越來越多，而且不只是著重在傳統生物反應器的設計，更添加了生物學的概念，真正將生物學的現代知識與工程學的現代知識融合成一體，發展出更接近微生物真正生長環境的固態發酵生物反應器^(45, 46, 47)。

近十年來，有許多不同形式的生物反應器使用在固態發酵系統中。可依攪拌與通氣分為六類。依攪拌可分為三類：基質床可靜止，也可參與週期性的攪拌，或是連續式的攪拌。依通氣可分為兩類：空氣可在基質床循環，也可強制通氣通過基質。

(一)淺盤反應器 (Tray bioreactors)

淺盤反應器放置在一個控制溫度與相對濕度的通氣容器中。每一個淺盤含有一薄層的基質，一般是介於 5cm 到 15cm 之間，通常有一個開放式的頂端與有孔洞的底部。規模放大時，不能只是增加淺盤的高度，這樣會導致過熱的問題，可以增加淺盤的面積，如：較寬的淺盤或是較多的淺盤⁽⁴⁴⁾。

(二)填充床反應器 (Packed-beds bioreactors)

填充床生物反應器一般含有一靜態的床，而下面則是有孔洞的板(plate)，並有氣體通過，另一較有趣的設計是將一根有孔洞的桿插入床的中央，氣體則由孔洞通出。研究顯示溫度梯度限制反應器的效率更勝於氧氣的梯度。若是將飽和氣體通入管柱，則軸向的溫度梯度促進氣化，因為當加熱時，氣體攜帶水的能力增加。氣化可帶走 65% 的代謝熱，但會使基質失去水分，進而抑制了生長，然而補充水到未混合的床中並不實際，因此必須使用其他的方法來進行熱移除。Zymotis 填充床生物反應器可改善此缺點，此設計是藉由插入熱量傳送板來促進輻射向的熱移除⁽⁴⁴⁾。

(三)間歇性轉鼓反應器 (Discontinuously rotating drums)

此反應器以間歇性的轉動取代連續性的轉動，其操作在靜止期間像一個淺盤反應器，而在轉動期間像一個轉鼓反應器。間歇性的轉動是為了防止菌絲與床連接在一起，這是與淺盤反應器最大的不同。間歇性的轉動對於菌絲所造成的傷害比連續式的轉動還小⁽⁴⁴⁾。

(四)連續式轉鼓反應器 (Continuously rotating drums)

此反應器的基質床是由一水平的轉鼓拖住，檔板可有可無，以及連續式的轉動。以每分鐘幾轉的低轉速轉動是一般轉鼓反應器的通性。對於一個無檔板的轉鼓反應器，床是以下滑的方式來造成低度的混合，因此，轉鼓反應器的效率沒有淺盤反應器來的好。有兩個方法可改善此問題，使用高轉速或是結合檔板。

(五)間歇性攪拌反應器 (Intermittent stirred beds)

間歇性的攪拌反應器與填充床反應器相似，除了攪拌器之外。在沒有攪拌的期間就像是填充床反應器。攪拌頻率一天一次的最大床溫比完全沒攪拌的預測床溫高，然而，若每 5 分鐘或更短的時間攪拌一次，則預測的最大床溫比沒有混合的低。因此攪拌頻率每 2 分鐘一次或更短時，預測的效率相當於完美的混合床，也就是最大床溫的最小值⁽⁴⁴⁾。

(六)連續混合且強制通氣的反應器

這類的反應器包含三種形式：氣固相流體化床、連續攪拌通氣床、轉鼓反應器。對於連續式的攪拌而言，必須藉由噴小水氣到基質上來補充水分，而對於轉鼓生物反應器，則是藉由滴水透過孔洞到轉鼓裡面，如此就可使用高氣化速率來當作冷卻機制。

轉鼓生物反應器有一個不同的設計，允許溫和的連續混合，基質是位於兩個具有孔洞的水平轉鼓中，外層再加裝一個不具孔洞的外殼。

氣固相流體化床，氣體通過一個有孔洞的板，而氣體具有足夠的速度流體化基質分子。並有一個攪拌器在底部，用來打碎基質，避免基質團塊形成。管柱必需夠高足以讓整個床展開，而管柱頂端附近較寬，因此當粒子到達頂端時便會掉下來。氣流的速度必須夠大造成流體化床，提供基質分子與氣相間良好的質傳與熱傳⁽⁴⁴⁾。

以上歸納的六類反應器是屬於較普遍的固態發酵反應器，加強質傳、熱傳的方法就是機械翻動，即氣相不動，固相連續翻動。其翻動的目的就是使顆粒混合，加速反應顆粒間或氣體分子間的接觸頻率，使料層間的氣體由分子擴散變為對流擴散。但對發酵過程中的微生物而言，過多的翻動對生長不利，使菌絲體斷裂，翻動引起的剪切力對菌絲往往有傷害。

2002 年有學者更發明了一種新型的“壓力脈動固態發酵反應器”(48, 49)。比起一般固態發酵反應器的剪切力，對於微生物的影響較為柔和。“壓力脈動固態發酵反應器”是一個對密閉低壓容器內的氣相壓力施以週期脈動的反應器，使發酵料層內的氣相質傳由分子擴散變為強制對流擴散，解決了固態發酵熱傳、質傳差和難於大規模純種培養等問題，是固態發酵實現純種培養與大規模產業化這—世界技術難題的希望(49)。

“壓力脈動”的作用有二種：(1)因氣體分子“無孔不入”，壓力脈動很容易在單顆粒水平上變分子擴散為對流擴散，以達到菌體周圍小尺度的溫度、濕度的控制與均勻性，加強供氧與排出 CO₂ 的速度；(2)在泄壓操作中，因突然快速排氣，顆粒間的氣相因減壓膨脹，對固體顆粒造成鬆動作用，為菌絲體的大量繁殖擴充了空間，所以發酵料層內外菌絲體都十分豐滿(49)。

2-4-3 固態發酵反應器的控制參數

控制固態發酵反應器最重要的操作參數有床溫、pH、固態基質的水含量，因為菌體只能在此小範圍的操作參數中生長。基質床的攪拌與通氣也是重要的因素。最後，養分的濃度與代謝的氣體影響了生物量(biomass)與代謝物產生速率，然而，這些參數很難控制(51)。

線上測量的設計，測量固態床中心、管壁、中心與管壁之中點的溫度，進口與出口氣體的溫度，進口氣體的相對濕度，出口氣體的二氧化碳濃度，以及反應器中的壓降。

(一)溫度

幾乎每一種靜態的固態發酵生物反應器都有 3 /cm 的溫度梯度。每一種微生物在生長的時候都會產生能量(代謝熱)。熱必需移除才能避免基質床溫增加。在某些形式的反應器，熱移除變的非常重要。對於實驗室規模的反應器而言，如 Raimbault column，溫度調節水浴可克服熱移除的問題。如果基質床夠薄，控制淺盤反應器的室溫，可有效調節基質床的溫度。大型工業規模反應器需要額外的冷卻技術。為了簡化，一般常用的冷卻方法，就是通入氣體到基質床。對於某些極端的例子，需要非常冷的氣體與非常高的流速，來調節基質床的溫度。在這種情況下，必需使用冷凍夾層、冷卻線圈、冷卻板來達到良好的溫度調節，但這會減少反應器的有效體積。蒸發冷卻是一種最有效的方法。調節進口氣體的相對濕度來控制基質床的蒸發速率，因此，氣流支配了熱移除的量。對於某些發酵過程，需要非常乾燥的進口氣體來達到熱移除，但這方法最主要的缺點是：過度乾燥的基質需要足夠的水含量來調節系統(51)。

(二)基質水含量

調節基質的水活性非常困難，因水含量會依菌體生長與代謝物產生速率而變。因此，實驗室研究必需決定最適的水活性。基質的水活性會隨著基質消耗與菌體累積所造成的水含量而變。控制水含量很困難，因為線上感測器很貴又不可

靠。然而，此限制可利用較軟性的感測器線上測量基質床的重量來克服。對於實驗室規模，也可週期性的取樣品分析其水含量。有許多方法用來調節基質床的濕度，最簡單的方法就是加入新鮮乾淨的水。水分也可藉由氣流加入，如噴霧或蒸汽⁽⁵¹⁾。

(三)pH

發酵床的高緩衝能力，加上缺乏適合的感測器，使得固態基質的 pH 控制很難執行。然而，在培養過程中，週期性的加入選擇過的輔助養分(如：氮源)，可調節 pH⁽⁵¹⁾。

(四)攪拌

固態發酵反應器的攪拌有以下的幾項功能：

1. 保持均一的操作條件
2. 培養過程中，使得水與養分分佈均勻
3. 更新包含在基質粒子中的空氣
4. 培養絲狀菌絲時，避免基質粒子結塊

攪拌策略的選擇是取決於發酵的主要目的。一般必需同時考慮好幾個因素，但很難決定哪一目的必需優先考量。程序設計必需確定攪拌不會傷害到具活性的菌體(如菇類培養)與基質。因此，此時的攪拌就必需以經驗式為基準。攪拌所牽涉的參數有轉速、感測性、間歇攪拌反應器其攪拌器的攪拌頻率，與攪拌時間等等。例如固定床反應器，攪拌會幫助熱移除⁽⁵¹⁾。

(五)通氣

因為大部分的固態發酵為好氧菌，所以氧氣傳送到菌體很重要。通氣也可幫助熱、CO₂與揮發性代謝物的移除。以下是固態發酵反應器中氣相與菌體間質傳的機制：

1. 從空氣到基質粒子的對流傳送
2. 基質粒子周圍靜態空氣層的擴散機制
3. 基質表面液態層的擴散機制。液態層的溶質濃度過高會嚴重影響空氣擴散，目前為止，還沒有研究報告直接指出這一重要的因素。
4. 多孔性基質粒子內的擴散
5. 菌體的氧消耗與 CO₂的產生

只有前兩項機制會受到反應器設計或操作條件的影響。對於填充床反應器而言，對流非常重要，尤其是當攪拌速率很小或不頻繁、通氣速率很低時更顯重要。對於培養絲狀菌而言，緊密的菌絲基質混合物阻止了分子內氧氣的傳送。如此也阻礙了空氣循環。其他的機制則取決於基質(粒子大小、外型、多孔性、結構等)與種菌的特性⁽⁵¹⁾。

2-5 固態發酵系統之規模放大

(一)規模放大的重要性

規模放大(scale-up)不僅僅是把小系統轉變成大系統的一種方法，也包含相反的過程，稱做規模縮小(Scale-down)。字義上更有採取較便宜的方式去生產我們需要的產物，並且有簡易和效率的特性。

規模放大也是將實驗室規模轉換成商業化規模的重要關鍵，提供大量的產物量，所以可能要去評估產物和有毒物質⁽⁵²⁾。

(二)規模放大的階段

規模放大牽涉到一連串的階段，包含相當多的主題。事實上，是由程序的類型和早期研究團體的經驗來決定。最終採取的手段則是用充足的規模放大實驗操作資訊。

對深層發酵(Submerged Fermentation)系統，Bank 已經提出一個四階段的系統，每一階段都選用一個發酵槽，此提議也適用於固態發酵(Solid State Fermentation)系統，這些階段如下：

(1)發酵瓶

培養選擇 50-1000 g 操作體積，過程和實驗變數的最佳化。增加資料的蒐集減少時間和金錢的浪費。

(2)實驗室發酵槽

程序上選擇 5-20 kg 操作體積，包含接種量、培養基的滅菌、通氣、攪拌、下游分析(downstream processing)、各種參數的標準化(如 O₂ 傳送速度、CO₂ 的發散速度、菌量生成)、pH 的影響、直接或間接營養物質的輸送、程序上經濟的模擬和它在商業上的可行性。

(3)前導發酵槽

50-5000 kg 來自實驗室發酵槽的資料，選擇最好的接種體、培養基滅菌和下游分析的策略。此階段促進了市場對產物、物化特性、毒物測試、程序可行性的決定上的考驗。

(4)生產發酵槽

25-1000 tonnes，有效率的生產，最終在長久的投資下得到財政上的回收⁽⁵²⁾。

(三)規模放大牽涉到的問題⁽⁵²⁾

(1)菌量生成的變化

微生物的培養，在生長上容易產生變化，然而這也是工業上的普遍現象。在較大的發酵槽裡，異種(Variant) 的數量將會更高。對於培養的選擇，最好的辦法是在篩選和人為操作上小心的處理，並先查清哪些異種會出現。

(2)大規模接種體的生長：

在大規模發酵槽中，較大量的接種體生產，形成明顯的單位操作系統，向來是由數個接菌體發酵槽來增加其容量。因此需要在生長培養基和培養參數上做一些必要的改變。此外，次培養菌(subculturing) 的增加，在某些狀況會造成培養退化，所以在在大規模發酵，降低次培養菌的量變的非常重要。若培養基上不能容

忍 4-5 種的次培養菌，那麼最好的方法是直接放棄，然後再篩選使用別種較穩定的培養基。

(3) 培養基滅菌

在大規模的培養基滅菌會引起許多問題，如溫度分佈、培養基的物化轉變、營養物質的熱退化、有毒物質的形成。在大規模的批式的滅菌時間為 3-6 小時而在實驗室為 15 分鐘 120℃。滅菌過程會受到下列因子影響 (a) 任何時間殺死微生物的速度正比於能養活細胞的數目 (b) 起始個體群在大小上變化很大 (c) 培養基出現微小植物擁有不同的熱敏感度 (d) 熱死亡速度受到這些微小植物的影響 (e) 初始和末端的對數比率關係 (f) 隨著對數培養基體積，滅菌尺度線性增加的必要性。

(4) 通氣

在實驗室中，通氣是在培養瓶中攪拌，然而在大規模發酵裡，則是使用強迫通氣(forced aeration)。通氣不僅僅是提供 O_2 ，也包含 CO_2 和熱的移除。通氣速度也由下列因子決定，如：微生物的生長需求、氣體的產生、揮發代謝物和熱散失。氧氣體積傳送係數 $K_L a$ ，被拿來測量深層發酵系統的通氣效率，也適用於固態發酵系統。很多操作因子和培養基性質都會影響 O_2 的傳送速度包含：氣體壓力、流速、孔隙度、潮濕發酵固體的床深、導管的穿孔、培養基的濕度、葉片的轉速。

(5) 攪拌

在好氣發酵裡，攪拌是個很重要的因素，它確保了系統的均勻，包含溫度、氣體環境。提供了氣液之間的面積，改善了在發酵過程中熱質傳和新營養物質加入的分佈。此外，攪拌能夠預防發酵物質的聚集形成，也能阻止菌絲黏於基質粒子深入裡面。在固態發酵過程中，攪拌系統的規模放大並不會引起問題，因為在大部分的過程中攪拌速度都相當小。間歇性的攪拌通常都會比連續性的攪拌要來的好，因為降低了菌體的傷害和打斷菌絲的機會。

(6) 熱移除

在發酵的過程中會產生大量的代謝熱，它的速度正比於系統中的代謝活性。此外，機械熱也會因會攪拌和通氣的注入而產生，所以在靜態固態發酵系統所產生的機械熱會比動態固態發酵系統還低許多。在實驗室用的生物反應器，熱通常是把培養容器移入控溫室或是水浴而被移除，在較大的反應器也是用此方法將熱移除，但是會額外的使用熱交換器。在很多情況下，蒸發冷卻(Evaporative cooling)常被拿來使用，它的熱移除效果都比熱傳導和熱對流好，且能夠移除約 80 % 的熱。

(7) 固體的濕度

水對固體的物化性質有深深的影響，甚至影響到它的產率，那是因為它是在發酵槽內，培養基濕度和相對濕度最重要的因子。在發酵槽內，使用高濕度的培養基和空氣約 90-98 %，能夠有效的維持固體的濕度。另外蒸發冷卻是熱移除常用的方法，因為系統水分大量的氣化，所以會導致水分的分佈不均勻。

(8) pH 控制

在固態發酵系統中，雖然 pH 電極能夠測量濕潤固體的 pH 值，但在缺乏自由水的情況下，要偵測 pH 值是非常困難的。一個適當的方法去測量 pH 值就是將 pH 電極插入潮濕固體裡面，然後從電極的尖端處慢慢地注入一些固體所吸收的水。最好的 pH 控制方法是，酸和鹼在想要的濃度下融入水中，然後噴入發酵槽內，這種技術能克服規模放大上的問題。

(9) 污染控制

一般而言，預防措施如果沒有做好，在規模放大的過程中容易發生污染問題。因此採取高比率的接種體來控制污染量，此外，低濕度、pH 值的培養基也能夠很有用的降低污染物的成長。在大規模中，選擇適當的發酵槽，污染也能夠有效的被控制，如密閉式和開放式反應槽，通常密閉式的反應器污染的發生機率比較低。

(10) 下游分析(Downstream processing)

在規模放大中這是個高度被忽略的問題。對於固態發酵系統，產物一開始必須從發酵的固體中過濾出來，再用適當的溶劑萃取出來，過濾的技術包括：

- (a) percolation
- (b) multiple-contact counter-current leaching
- (c) pulsed plug flow extraction in column
- (d) hydraulic pressing
- (e) supercritical fluid extraction

(11) 廢物處理

在固態發酵系統中，廢棄物累積上升，包含失去效能的固體、排出的液體和排出的氣體，而佔最大體積的是來自於過濾出來沒用的固體，這些固體包括：固體基質沒有用的部分、微生物細胞、孢子、水、溶劑、未過濾的產物和代謝物。它的處理的方法有：(a) 用在 biogas 生產、堆肥、填地、生產乙醇、從殘渣中的孢子回收核酸 (b) 建造上用的磚、板子和紙 (c) 當作燃料、抑制劑 (d) 滅菌後當作牲畜的飼料。必須注意的是這些處理過程需要花費高度的資本和操作費用，所以通常選擇簡單、可實行、有效率又便宜的方法來處理。

(12) 固體操作

在固態發酵系統，固態基質會產生很多固體傳送和運輸上的問題，特別是在大規模的系統中。這些固體可以用容器和儲液槽來儲存、在進料系統之傳送容器中準備好基質的固體、傳送帶和升降機把物質送到另一個操作系統，到達指定的位置。在基質準備和產物過濾上，通常會和固液混合器合併一起使用，使其均勻，若固體物質超過一種的話，那麼還需要額外使用固體混合器。

(四) 規模放大方法使用在固態發酵系統⁽⁵²⁾

(1) 規模縮小(Scaling-down)方法

在實驗室使用此方法前必須先決定在工業上會用哪一種的反應器，而在整個過程中會牽涉到四個階段：

1. 採用目前最有效率的工業規模的設計
2. 模擬實驗室規模
3. 環境的統一和操作方式
4. 執行小規模試驗性的設備

(2) Trial and error 方法

Trial and error 的方法起始於實驗室培養時所遭遇到的問題，為了消除這些問題，首先考慮最簡單又可行的裝置，不但使培養基均勻也能調控溫度，通常容量選擇 55 升，更進一步增加到 500 升，並維持幾何上的相似性，在每一個階段，經過連續的嘗試並修改其缺點直到成功。

(3) 幾何相似性的維持

這個規模放大的技術是使用相同的物理比率產生效用。例如在深層發酵系統中，容器面積和本質相同比率的維持。這是個簡單的方法，但是有許多限制，也不能保證在大規模中有相似的結果。

(4) 維持固定的熱和水平衡

這個結果是結合了不同實驗室的研究人員的研究，在固態發酵系統中，發展出簡單又有效率的規模放大尺度。而這個尺度是來自於分析每個會影響固態發酵的因子，它們的相對準則和狀態能夠確保最大值的產率。在規模放大尺度上，為了維持熱和水的平衡，則是用強迫性的通入潮濕的氣體和用蒸發冷卻維持固體的溫度，濕的空氣和循環排出的冷卻氣體也能夠控制固體的濕度。一個電腦整合軟體和控制系統能夠有效的控制溫度和濕度，因此，這個尺度是可以實行的，也許會在商業化的固態發酵系統中扮演重要的角色。

(五) 利用填充床生物反應器來作固態發酵的規模放大⁽⁵³⁾

生物反應器規模放大的問題在液態發酵有很詳細的研究，但在固態發酵卻不甚了解，因為固態發酵所限制的現象不一樣。對於通氣的液態發酵培養，限制步驟(limiting step)是氣液界面的氧氣傳送，相對的，在固態發酵中，依照基質床的位置、發酵的階段以及反應器的設計與操作的不同，生長有可能會受到熱傳送的限制，或是氧氣與養分的質量傳送的限制。因此，固態發酵沒有量的規模放大標準可利用。

最近的研究指出，攪拌對生物反應器的效率有害。雖然攪拌會對不同的微生物有不同的影響，但對某些系統而言攪拌所造成的影響是很明顯的。例如真菌孢子的產生，攪拌阻止生長並破壞分生孢子柄，嚴重的減少孢子的產量。對於這種 case 而言，基質床必需維持靜止。雖然此系統可使用淺盤反應器，但填充床生物反應器更適合，因為其具有強制通氣，可藉由調控氣體的流量與溫度來得到發酵的參數。因此最近的研究只著重在填充床生物反應器上。

靜態的填充床生物反應器，在發酵過程中加入水是不實際的。因此生物反應器必須減少床的乾燥，因為乾燥會使得床的水含量減少，進而限制菌體生長。這

需要進口氣體是飽和的。但必需注意即使進口氣體是飽和的，蒸發現象還是會發生，因為氣體的溫度增加，使得空氣的含水能力增加。

Saucedo-Castaneda 等人提出 Peclet number 與 Biot number 當作填充床生物反應器的規模放大標準。接著提出熱與水平衡的維持。然而這些構想沒有量的考量。最近的研究以發展填充床生物反應器量的規模放大為發展重點。因此發展出一個數學模式來探究填充床生物反應器中的熱傳現象對規模放大的影響。隨後又發展出較簡單的模式，modified Damkohler number。

淺盤反應器、填充床生物反應器、轉鼓反應器、攪拌式生物反應器、氣固相流體化床生物反應器等使用在不同的固態發酵系統。發展一個新的系統最好的方法就是以實驗室規模的生物反應器來做測試，看其是否適合發展成大規模。然而最近的研究特別集中在填充床生物反應器的規模放大上。也探討了防止床的溫度過高。

(1) 填充床生物反應器放大規模的實驗程序

首先，必需先作實驗室規模的生物反應器來決定菌體生長的動力參數，生物反應器必需足夠小，以至於不受熱量與質量傳送的影响。接著，實驗室規模的研究必須做到描述熱傳的效應，確定操作情況可避免過熱現象的產生。再接著，是必須設計具有臨界高度的前導規模生物反應器。臨界高度必需藉由進口氣體的溫度與表面流速的選擇來決定。當前導規模的研究證實生物反應器頂端的溫度不會超過臨界溫度，便可以建立全規模的生物反應器，維持床高及氣體的表面流速不變，只增加床寬即可。全規模當中的溫度展開以及壓降都可從前導規模的研究中得知。

由於填充床生物反應器的熱傳送性質，使得溫度隨床高增加而增加，生物反應器的床高便是一個關鍵性的設計，規模放大的方法必需提供設計方針。臨界床高的定義，就是避免床頂過熱所能建造的最大床高，必需藉由菌體的生長動力，以及進口氣體的溫度與表面流速來決定。然而，我們不知道實際上氣體流速(V_z)能夠增加到多大，進口溫度(T_{in})能降到多低。因此接下來的研究必需要能定義這些限制⁽⁵³⁾。

(2) 填充床生物反應器規模放大

雖然研究是對特殊的菌種和基質作測試，但動力模式與修正的 Da_M number 對其他系統還是適用，只要獲得適當的參數即可。床的臨界高度可藉由氣體表面流速的選擇來預測，表面流速越大，全規模的生物反應器越高，因此可容納的基質越多。實際上，只要 V_z/H 的值維持不變，就沒有床高的限制了。但表面流速不可能無限制的增加。因為發酵期間，菌體會將菌絲深入基質中，造成壓降增大。因此，就利用通氣系統所能對抗的最大壓降來找出實際的表面流速的限制。另外，過大的壓降會造成床在垂直方向上的破裂，造成“air-channelling”的現象。如此氣體便優先通過裂縫，對於其他區域，氧氣的補充則受到擴散的限制。若床是靜態的，即使不考慮壓降，也必需將氣體的表面流速控制在最小流體化速度之下⁽⁵³⁾。

(六)規模放大的量化研究⁽⁴⁴⁾

成功的大規模商業化固態發酵過程的發展受到了未知的質傳與熱傳現象的限制。然而，近年來，在建立模式的進展上，對規模放大的固態發酵過程做了許多合理的量化(quantitative)研究。

(1)規模放大的數學模式

對於傳統的填充床生物反應器而言，在發酵過程中，若有一溫度不超過反應器任何時間的任一溫度時，則顯示了填充床生物反應器高度的限制。增加進口氣體的表面流速與管柱的高度，可除去溫度限制塔高的因子，但可能導致過高的壓降與流體化。

對於 Zymotis 填充床生物反應器而言，若熱量傳送板保持 5cm 的間隔，將使得隨塔增加的溫度達到最小值，而不需要過高的進口氣體表面流速。因此溫度不再是限制塔高的因子，幾公尺的塔高似乎可行，但須考量過高的塔高是否會造成過高的壓降。

對於任何規模轉鼓反應器而言，成功的溫度控制需要通氣速率大於 2 vvm，使用相對的乾空氣(e.g. 15%RH)，來促進 headspace 的空氣氣化。但須注意隨時補充水分，藉由間歇性的噴灑水氣到移動床(moving bed)上。

(2)規模放大之 dimensionless number 的研究

對於填充床生物反應器與轉鼓反應器，能量平衡中的熱產生與熱移除項被提出來，而將比值當成一個 dimensionless number。dimensionless number 可用來建構操作圖，指出控制床溫所需的操作變數。

(3)近年來規模放大的技術

近十年來，對於固態發酵規模放大問題的了解增加許多，因此有一些策略被提出，然而有一些還沒經過實際的證明。儘管如此，數學模式所描述的固態發酵生物反應器的傳送現象將是一個指導規模放大過程的有力工具。許多研究只考慮到能量平衡。水平衡與可能造成的氧氣平衡也必須考量進去。而且，也必須做實驗來證明這些工具真正且成功的應用在大規模的設計。

2-6 靈芝小麥發酵物的成分組成⁽⁵⁴⁾

近年來，靈芝除作藥用外，已經將靈芝開發成保健品以及含靈芝成分的食品、飲料；主要是以靈芝的提取液為原料，添加到各種食品、飲料中，配製成具有保健作用的功能性食品。

(一)靈芝-小麥發酵物、靈芝子實體及靈芝孢子粉中靈芝酸含量

由 Fig.2-3 可知，靈芝-小麥發酵物中有效成分靈芝酸 C、D、A、E 的含量顯著低於靈芝子實體，其主要原因有兩點：(1)靈芝-小麥發酵物中主要成分為小麥和少量的菌絲體，而靈芝子實體全部為菌絲體；(2)靈芝子實體中有效成分累積的時間遠遠長於靈芝-小麥發酵物中有效成分的累積時間。但靈芝-小麥發酵物做為食品添加劑開發具有保健作用的保健食品其有效成分含量已經完全可以滿足需要。

樣品	靈芝酸含量(mg/g)				靈芝酸總含量(mg/g)
	C	D	A	E	
靈芝小麥發酵物	0.004150	0.001005	0.018900	0.042000	0.066
靈芝子實體	0.867250	0.024150	1.557500	1.102500	3.550
靈芝孢子粉	0.108125	0.003175	0.097250	0.208	

Fig.2-3 靈芝-小麥發酵物、靈芝子實體及靈芝孢子粉中靈芝酸含量
(二)靈芝-小麥發酵物、靈芝子實體及小麥中氨基酸組成及含量

由 Fig.2-4 可知，靈芝-小麥發酵物是以全麥作為培養基質經過發酵獲得的，因此，靈芝-小麥發酵物中氨基酸以及微量元素的含量主要取決於小麥，在氨基酸測定中，靈芝-小麥發酵物中氨基酸的含量普遍高於靈芝子實體中的含量，與小麥中氨基酸的含量基本一致，這一結果正說明了這一點。

氨基酸	含量(mg/g)		
	靈芝-小麥發酵物	靈芝子實體	小麥
天門冬氨酸	7.9	5.0	6.2
絲氨酸	4.7	2.9	3.7
蘇氨酸	6.0	3.0	5.6
谷氨酸	39.5	5.3	40.8
甘氨酸	7.1	3.3	6.0
丙氨酸	6.1	3.3	5.4
胱氨酸	4.0	1.8	3.8
賴氨酸	8.3	8.6	7.5
蛋氨酸	2.4	0.7	2.7
亮氨酸	5.9	2.2	5.6
亮氨酸	9.8	3.3	9.8
酪氨酸	4.7	1.7	4.6
苯丙氨酸	7.3	2.7	7.0
賴氨酸	3.7	1.5	3.9
組氨酸	3.2	0.8	2.9
精氨酸	7.3	1.9	7.1
脯氨酸	12.6	3.6	12.4
色氨酸	0.0	0.0	0.0

Fig.2-4 靈芝-小麥發酵物、靈芝子實體及小麥中氨基酸組成及含量

(三)靈芝-小麥發酵物、靈芝子實體及小麥中礦質元素組成和含量

由 Fig.2-5 可知，靈芝子實體中礦質元素含量高，說明靈芝菌絲具有很強的富集礦質元素的能力；同時，靈芝-小麥發酵物中礦質元素主要來源於培養基質小麥；因此，在靈芝-小麥發酵物的培養過程中，可透過在培養基質中加入無機礦質元素的方法，經過靈芝菌的發酵作用將無機元素轉變成人體易於利用的有機元素形式。

因為菌類的發酵培養週期短、見效快、而且營養成分豐富。在靈芝-小麥發酵物的發酵過程中透過人為的加入一些無機礦質元素，使其發酵過程更完善，發酵的目的產物更明確，加上靈芝特有的藥效作用，就會使靈芝-小麥發酵物在開發具有保健作用的食物、飲品方面具有廣泛的應用前景。

元素名稱	含量(mg/g)		
	靈芝-小麥發酵物	靈芝子實體	小麥
Ca	749.5	2134	613.0
K	3888	9540	1334
Mg	1443	2989	2668
P	3035	5350	1399
S	1626	1308	92.7
Na	144.5	252	263.9
Fe	148.5	184.8	283.9
Al	37.96	78.8	30.21
B	6.596	14.29	6.045
Ba	7.505	8.765	12.00
Cd	0.140	0.415	0.000
Co	0.000	0.000	0.000
Cr	18.83	22.70	20.40
Cu	14.46	14.71	18.14
Mn	34.36	59.90	32.55
Mo	0.000	0.000	0.140
Ni	0.000	2.235	1.530
Pb	0.000	5.652	0.000
Zn	37.80	39.96	37.80
Se	0.051	0.120	0.095
Ge	0.163	0.156	0.125

Fig.2-5 靈芝-小麥發酵物、靈芝子實體及小麥中礦質元素組成和含量

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 *Ganoderma lucidum* CCRC 36123，係購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。

以菌種保存中心所提供的 PDA 作為斜面培養基在 30℃ 下生長，並置於 4℃ 冰箱中保存。

3-2 實驗藥品

實驗藥品如 Table 3-1。

Table 3-1 實驗藥品

藥品名稱	廠牌	附註
葡萄糖	林 純藥工業株式會社	試藥一級
蔗糖	林 純藥工業株式會社	試藥一級
馬鈴薯澱粉	林 純藥工業株式會社	
玉米粉	裕馨香料有限公司	
黃豆粉	裕馨香料有限公司	
麥芽萃出物	MERCK	防潮
酵母萃出物	DIFCO	
NH ₄ H ₂ PO ₄	聯工	
乙醚	聯工	
乙醇	台灣省菸酒公賣局	酒精濃度 95%
甲醇	景明	HPLC 級
鹽酸	聯工	EP 級
氫氧化鈉	聯工	EP 級
PDA	DIFCO	
NH ₄ Cl	聯工	
KH ₂ PO ₄	聯工	
K ₂ HPO ₄	聯工	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	聯工	
硫酸	聯工	
NaNO ₂	林 純藥工業株式會社	試藥一級
KHSO ₄	林 純藥工業株式會社	試藥一級
NH ₄ OSO ₂ NH ₂	林 純藥工業株式會社	試藥一級

MBTH	SIGMA	
FeCl ₃ 6H ₂ O	林 純藥工業株式會社	防潮
D-Glucosamine	SIGMA	
Acetonitrile	景明	HPLC 級
Ethyl Acetate	景明	HPLC 級
Bacto Peptone	DIFCO	
Fructose	SIGMA	

3-3 實驗儀器與設備

實驗儀器與設備如 Table 3-2。

Table3-2 實驗儀器與設備

儀器設備	廠牌	附註
無塵無菌操作台	造鑫	附紫外光與抽氣設備
殺菌釜	新光精機	HL-350
殺菌釜(直立式)	HUXLEY	HL-340
電磁攪拌機	CORNING	Stirrer/Heater
烘箱	Risen	DV-452
光學顯微鏡	Nikon	附照相設備
振管振盪器	Thermolyne	37600 Mixer
均質機	osterixer	Cycle blend
恆溫培養箱 (迴轉式)	TKS	OSI-500
冷凍乾燥機	進階	附高真空油式幫浦
蠕動幫浦	MASTERFLEX	7553-70
空氣壓縮機	復盛	1/4 HP
真空幫浦	GAST	DOA-P104-AA
低溫冷藏櫃	TKS	Kcc-3
高速離心機	HITACHI	05P-21
低溫冷凍循環水槽	YIH-DER	BL-30
微電腦蒸餾水製造機	SANYO	WSC044.MH3.4
固態培養反應槽體及控制 器	頂生	照片十二
電子天平	Sartorius	

分光光度計	HITACHI	U-1100
超音波清潔器	BRANSON 5210	
葡萄糖分析儀	YSI	2300 STAT
往復式恆溫振盪水浴箱	TKS	
光譜儀用冷凍循環水槽	FIRSTEK	
超純水製造機	MILLIPORE	
PH meter	SUNTEX	
UV Detector	HITACHI	
RI Detector	BISCHOFF	
液相層析儀輸送系統	Agilent	
HPLC Column	LiChro CARCRT 250-4 RP18 (5 μm)	
GPC Column	TSK-4000 SWXL	

3-4 分析方法

3-4-1 pH 值測定

取乾燥之發酵物樣品 1g 加入 50ml 蒸餾水，30、100rpm 搖晃 1 天，使用 SUNTEX pH meter 測定其 pH 值。

3-4-2 菌絲長度測定

利用直尺測量固態菌絲生長長度。單位為 cm。

3-4-3 固態培養菌絲菌體濃度測定^(39, 40, 41)

1. 液態深層培養

(1) 菌體乾重

將培養後之發酵液經由濾網過濾，再以蒸餾水清洗過濾後的菌絲球，冷凍乾燥，再測乾重。

(2) 葡萄糖胺含量的測定

將乾燥的菌體與 5ml 72% H₂SO₄ 在 25、130rpm 的搖動振盪器中反應 30min，再以 54ml 蒸餾水稀釋，將水解液以 121 殺菌 2hr，再將水解液以 10M 與 0.5M NaOH 中和到 pH=7。最後，再以比色法(colorimetric method)分析葡萄糖胺的含量，將葡萄糖胺含量除以菌重便知每克菌重含有多少量的葡萄糖胺。

2. 固態發酵培養

(1) 發酵物乾重

將培養後的樣品放置於 60 °C 烘箱中烘 5 天，測量乾物樣品的重。

(2) 葡萄糖胺含量的測定

將 0.4g 的乾燥樣品進行水解，其分析的方法與深層培養一樣。最後再將葡萄糖胺含量除以深層培養之單位菌重葡萄糖胺含量，便可得知 0.4g 乾重所含有的菌體量。

3. 菌體濃度測定—葡萄糖胺比色法(blank 為 1ml sample and 3ml water)

(1) 將 1ml sample 加入 1ml 5% KHSO₄ 與 1ml 5% NaNO₂

(2) 放置並偶爾搖晃 15min，確保去氨反應完全

(3) 加入 1ml 12.5% NH₄SO₃NH₂，以移走過多的亞硝酸，並搖晃 5min

(4) 加入 1ml 0.5% MBTH，100 °C 水浴反應 10min

(5) 加入 1ml 0.5% FeCl₃ · 6H₂O，反應 30min

(6) 將上述反應後之樣品以分光光度計於 650nm 波長測吸光值

(7) 由已知濃度之標準葡萄糖胺檢量線 (附錄 A)，計算所含葡萄糖胺量

3-4-4 多醣濃度測定⁽⁴⁾

本研究之多醣測定步驟主要是將多醣萃取出來，再以酚 - 硫酸比色法測多醣含量。

1. 多醣萃取

將乾燥之靈芝小麥發酵物樣品加入 100ml 蒸餾水，在 90 °C 下熱水萃取 (100rpm、12小時) 後利用 55mm 的濾紙過濾，過濾除去菌體，收取萃出液分析。

2. 多醣含量測定 - 酚 - 硫酸比色法

詳細酚 - 硫酸法步驟如下：

(1) 取 2 毫升萃出液樣品，加入 1 毫升 5% 酚溶液，再加入 5 毫升的濃硫酸，靜置 10 分鐘後震盪混合，混合後放入 25 °C 水浴中 15 分鐘。

(2) 將上述反應後之樣品以分光光度計於 490nm 波長測吸收值 (ABS)。

(3) 由已知濃度之標準多醣檢量線 (附錄 B)，計算所含多醣量。

第四章 實驗方法

4-1 斜面培養

4-1-1 試管斜面

- (1) 以 39 g/L 的 PDA(Potato Dextrose Agar)溶於蒸餾水，置於水浴加熱溶解。
- (2) 每支試管趁熱裝入適量之 PDA 溶液。
- (3) 將試管以矽質塞塞住並以鋁箔紙包覆，放入殺菌釜中殺菌 20 分鐘。(操作壓力 1.2 kg/cm^2 ，溫度 121°C)
- (4) 將殺菌後之試管取出，使之適當傾斜，放置 1-2 天確定無污染發生，接靈芝菌於斜面上並置於 30°C 恆溫箱培養或置於冰箱備用。

4-1-2 培養皿培養

- (1) 配製 100 mL 39 g/L 之 PDA 溶液於 250 ml 三角瓶。
- (2) 將三角瓶以矽膠塞塞住並以鋁箔紙包覆，放入殺菌釜中殺菌 20 分鐘。(操作壓力 1.2 kg/cm^2 ，溫度 121°C)
- (3) 取 4 個培養皿(塑膠製，不可加熱)置於無塵無菌操作台，噴撒 75% 酒精，並打開紫外線燈殺菌 20 分鐘以上。
- (4) 將殺菌後之三角瓶取出，趁熱平均分配於 4 個培養皿。
- (5) 待培養基冷卻凝固後立刻接 1 單位(5mm \times 5mm) 靈芝菌於培養皿中央。
- (6) 最後將培養皿倒置，放入 30°C 恆溫箱培養。

4-1-3 菌體活化

為維持菌體的活性必須將菌體活化，將菌種接種於 PDA 斜面培養基上 30 培養 7 日後即更換新的 PDA 斜面繼續做培養。

4-2 接菌量

為了控制接菌量的穩定度，以免干擾後續的試驗因子。將靈芝菌絲體接種於 PDA 培養皿，在 30°C 下培養 7 天，待靈芝菌絲體長滿培養皿，以自製之菌體切割器 - 將鋁罐切開，裁取一片 $2 \times 5 \text{ cm}^2$ 鋁片，在較短的一邊分成 4 等分，並折成一長柱體，中空部分的面積則為 $5 \times 5 \text{ mm}^2$ ，即定義為一單位面積的接菌量依所需的接菌量，將培養皿中最外圍的靈芝菌絲體先切成若干單位菌絲塊，再以白金鉤將菌絲塊接入固態或液態培養基。

4-3 培養基組成

4-3-1 液態深層培養原培養基

葡萄糖	3 %
酵母萃出物	0.1 %
氯化銨	0.153 %

磷酸二氫鉀	0.05 %
磷酸氫二鉀	0.05 %
硫酸鎂	0.05 %

4-3-2 固態培養基礎培養基

麥糠

蒸餾水

料水比=1：5

4-4 菌原培養

將培養皿培養七天的活化菌種，在無塵無菌操作台內，以白金鉤接種 4 單位之靈芝菌絲塊，放入內裝 100ml 原培養基之 250ml 三角瓶中，再用矽膠塞塞住，置入迴轉式振盪培養箱中於 30、100rpm 培養七天利用 10 段變換的攪拌器經 10 秒打碎即為菌原培養液。

4-5 靈芝固態培養

以小麥代替 PDA 固態培養基作靈芝固態培養。小麥含有澱粉、蛋白質、蔗糖、玫芽糖、葡萄糖、果糖、棉子糖、蜜二糖、糊精、脂肪油等，尚含谷甾醇、卵磷脂、尿囊素、胺基酸類、維生素 B、-維生素 E、-生育三烯酚、麥芽糖？及蛋白分解？等。其中含有許多高營養價值的有機、無機物質，所以以小麥取代原培養基，觀察小麥是否適合應用於靈芝的固態培養。

4-5-1 培養皿試驗

一、菌種篩選

實驗一：平面培養皿篩選

實驗目的：利用培養皿平面培養，尋找出菌絲生長比較快速的菌株。

實驗方法：

- (1) 將活化後的靈芝菌絲培養皿以自製的菌絲切割器，切成一個單位的菌絲塊，置於裝有基礎培養基的平面玻璃培養皿中央。
- (2) 將平面培養皿置於 30，恆溫培養箱中培養。
- (3) 利用直尺以接菌的地點為圓心，每 12 小時量測一次菌絲生長半徑。

實驗二：固態培養篩選

實驗目的：利用固態培養的方式，尋找出菌絲生長較佳的菌株。

實驗方法：

- (1) 將培養七天之液態種菌以均質機打碎，吸取 5ml 均質液，接入裝有 5g 麥糠基礎培養基的培養皿中。
- (2) 將培養皿置於 30 的恆溫培養箱中培養 7 天。

(3) 測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

實驗三：不同固態基礎培養基對靈芝菌絲生長之影響

實驗目的：利用固態培養的方式，尋找出菌絲生長較佳的基礎培養基。

實驗方法：

- (1) 分別以 5g 米糠與 5g 麥糠當固態基質培養基進行靈芝的固態發酵培養。
- (2) 固態培養基殺菌後，將培養七天之液態種菌以均質機打碎，吸取 5ml 均質液，分別接入裝有麥糠與米糠的基礎培養基中。
- (3) 將培養皿置於 30 的恆溫培養箱中培養 7 天。
- (4) 測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

實驗四：不同培養時間對靈芝菌絲生長及多醣生成之影響

實驗目的：探討不同培養時間對靈芝菌絲生長的影響，並觀察菌絲的生長情形。

實驗方法：

- (1) 取培養皿 20 個，每個培養皿裝麥糠 5g，添加 25ml 水進行發酵。
- (2) 固態培養基於殺菌後，分別接入培養七天之液態種菌 5ml，置於 30 恆溫培養箱中，分別培養 1~20 天。
- (3) 測量其菌絲濃度、pH、多醣濃度，並記錄生長情況。

二、探討生長的物理因素對靈芝菌絲生長之影響

實驗五：不同初始 pH 值對靈芝菌絲生長之影響

實驗目的：由文獻發現，不同初始 pH 值會對菌絲生長造成影響，又得知固態基質通常是一個很強的緩衝劑，故本實驗就是要證明麥糠基質是否亦是一種很強的緩衝劑，藉由改變初始 pH，來觀察其對菌絲生長的影響。

實驗方法：

- (1) 取玻璃培養皿六個，每個培養皿裝麥糠 5g，添加 25ml 水進行發酵。
- (2) 以 0.1N HCl 及 0.1N NaOH 調整水的 pH，分別為
 - (a) pH=4
 - (b) pH=5
 - (c) pH=6
 - (d) pH=7
 - (e) pH=8
 - (f) pH=9
- (3) 固態培養基於殺菌後，分別接入培養七天之液態種菌 5ml，置於恆溫培養箱中，30 下培養七天。
- (4) 測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

實驗六：不同初始含水量對靈芝菌絲生長之影響

實驗目的：由文獻發現在固態培養時，基質的含水量會對菌絲的生長有重大的影響，同一菌種生長在不同基質上會有不同最適含水量，本實驗就是要找出這株菌種生長在麥糠培養基上的最佳含水量。

實驗方法：

- (1)取培養皿七個，每個培養皿裝麥糠 5g，分別添加 5ml、10ml、15ml、20ml、25ml 蒸餾水進行發酵。
- (2)固態培養基於殺菌後，分別接入培養七天之液態種菌 5ml，置於恆溫培養箱中，30℃ 下培養七天。
- (3)測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

實驗七：不同培養溫度對靈芝菌絲生長之影響

實驗目的：由文獻發現，菌絲在生長時有其最適的生長溫度，但是會因為菌種的不同而有所差距，而這個實驗就是要找出這株菌種的最適生長溫度。

實驗方法：

- (1)取培養皿五個，每個培養皿裝麥糠 5g，添加 25ml 水進行發酵。
- (2)固態培養基於殺菌後，分別接入培養七天之液態種菌 5ml，置於恆溫培養箱中培養，分別置於
 - (a)20
 - (b)25
 - (c)30
 - (d)35
 - (e)40
- (3)培養七天。
- (4)測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

實驗八：不同培養階段接菌對靈芝菌絲生長之影響

實驗目的：由文獻發現，菌絲的生長情形會受接入之菌絲生長活性的影響，而菌絲生長活性會隨著培養階段而有所不同，本實驗就是在探討不同培養階段接菌對靈芝菌絲生長的影響。

實驗方法：

- (1)取培養皿四個，每個裝 5g 麥糠基質，接 5ml 之液態種菌。
- (2)分別將液態種菌培養 5 天、7 天、10 天及 14 天接種到殺菌過的固態基礎培養基，置於恆溫培養箱中，30℃ 下培養七天。
- (3)測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

實驗九：探討不同接菌量對靈芝菌絲生長之影響

實驗目的：由文獻發現菌絲培養有其最佳的接菌量，本實驗就是在找出以 5g 麥糠當基質，所能提供菌體生長的最大量，即其最大的接菌量。

實驗方法：

- (1)取培養皿五個，每個裝 5g 麥糠基質，添加 25ml 蒸餾水。
- (2)分別將培養 7 天的液態種菌接入 1ml、3ml、5ml、7ml、9ml 到殺菌過的固態基礎培養基，置於恆溫培養箱中，30℃ 下培養七天。
- (3)測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

三、探討生長的化學因素對靈芝菌絲生長之影響

實驗十：添加不同碳源對靈芝菌絲生長之影響。

實驗目的：由文獻得知，麥糠中已經有很多的營養物質，本實驗即是嘗試添加不同碳源，測試其對麥糠基質上的菌絲生長是否有影響。

實驗方法：

- (1)取培養皿五個，每個培養皿裝麥糠 5g，添加 25ml 蒸餾水進行培養。
- (2)在每個培養皿中分別添加
 - (a):基礎培養基
 - (b):基礎培養基+1% Glucose
 - (c):基礎培養基+1% Saccharose
 - (d):基礎培養基+1% Fluctose
 - (e):基礎培養基+1% Potato Starch
- (5) 固態培養基於殺菌後，分別接入培養七天之液態種菌 5ml，置於恆溫培養箱中，30℃ 下培養七天。
- (6) 測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

實驗十一：添加不同濃度 Fructose 對靈芝菌絲生長之影響

實驗目的：進一步探討最佳碳源的添加濃度對靈芝菌絲生長的影響。

實驗方法：

- (1)取培養皿五個，每個培養皿裝麥糠 5g，添加 25ml 蒸餾水進行培養。
- (2)在每個培養皿中分別添加
 - (a):基礎培養基
 - (b):基礎培養基+1% Fructose
 - (c):基礎培養基+2% Fructose
 - (d):基礎培養基+4% Fructose
 - (e):基礎培養基+8% Fructose
- (3)固態培養基於殺菌後，分別接入培養七天之液態種菌 5ml，置於恆溫培養箱中，30℃ 下培養七天。
- (4)測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

實驗十二：添加不同氮源對靈芝菌絲生長之影響

實驗目的：由文獻得知，麥糠中已經有很多的營養物質，本實驗即是嘗試添加不

同氮源，測試其對麥糠基質上的菌絲生長是否有影響，另外，文獻指出添加氮源會降低基質的 pH 值，故此實驗也將探討其是否會對基質的 pH 有影響，並觀察此改變會對菌絲生長造成何影響。

實驗方法：

- (1)取培養皿五個，每個培養皿裝麥糠 5g，添加 25ml 蒸餾水進行培養。
- (2)在每個培養皿中分別添加
 - (a):基礎培養基
 - (b):基礎培養基+1% Yeast extract
 - (c):基礎培養基+1% Malt extract
 - (d):基礎培養基+1% Bactopeptone
 - (e):基礎培養基+1% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
- (3)固態培養基於殺菌後，分別接入培養七天之液態種菌 5ml，置於恆溫培養箱中，30℃ 下培養七天。
- (4)測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

實驗十三：添加不同濃度 Malt extract 對靈芝菌絲生長之影響

實驗目的：進一步探討最佳氮源的添加濃度對基質 pH、靈芝菌絲生長的影響。

實驗方法：

- (1)取培養皿五個，每個培養皿裝麥糠 5g，添加 25ml 蒸餾水進行培養。
- (2)在每個培養皿中分別添加
 - (a):基礎培養基
 - (b):基礎培養基+1% Malt extract
 - (c):基礎培養基+2% Malt extract
 - (d):基礎培養基+4% Malt extract
 - (e):基礎培養基+8% Malt extract
- (3)固態培養基於殺菌後，分別接入培養七天之液態種菌 5ml，置於恆溫培養箱中，30℃ 下培養七天。
- (4)測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

實驗十四：添加不同無機鹽對靈芝菌絲生長之影響

實驗目的：由文獻得知，麥糠中已經有很多的營養物質，包含了許多無機鹽，本實驗即是嘗試額外添加不同無機鹽對麥糠基質上的菌絲生長是否有影響。

實驗方法：

- (1)取培養皿五個，每個培養皿裝麥糠 5g，添加 25ml 蒸餾水進行培養。
- (2)在每個培養皿中分別添加
 - (a):基礎培養基
 - (b):基礎培養基+1% KH_2PO_4

- (c):基礎培養基+1% K_2HPO_4
- (d):基礎培養基+1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- (3)固態培養基於殺菌後，分別接入培養七天之液態種菌 5ml，置於恆溫培養箱中，30℃ 下培養七天。
- (4)測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

實驗十五：添加不同天然穀物對靈芝菌絲生長之影響

實驗目的：由文獻得知，麥糠中已經有很多的營養物質，本實驗即是嘗試添加不同天然穀物，降低養分成本，觀察其對麥糠基質上的菌絲生長是否有影響。

實驗方法：

- (1)取培養皿五個，每個培養皿裝麥糠 5g，添加 25ml 蒸餾水進行培養。
- (2)在每個培養皿中分別添加
 - (a):基礎培養基
 - (b):基礎培養基+4% 燕麥
 - (c):基礎培養基+4% 蕎麥
 - (d):基礎培養基+4% 大薏仁
 - (e):基礎培養基+4% 小薏仁
- (3)固態培養基於殺菌後，分別接入培養七天之液態種菌 5ml，置於恆溫培養箱中，30℃ 下培養七天。
- (4)測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

實驗十六：木屑添加量對靈芝菌絲生長之影響

實驗目的：由文獻得知，麥糠中已經有很多的有機、無機物質與微量元素，木屑中則含有有機物質與礦物質，而靈芝具有很強富集微量元素的能力，本實驗即是嘗試添加不同份量木屑對麥糠基質上的菌絲生長是否有影響。

實驗方法：

- (1)取培養皿五個，每個培養皿裝麥糠 5g，添加 25ml 蒸餾水進行培養。
- (2)在每個培養皿中分別添加
 - (a):基礎培養基
 - (b):基礎培養基+0.25g 木屑
 - (c):基礎培養基+0.5g 木屑
 - (d):基礎培養基+1g 木屑
 - (e):基礎培養基+2g 木屑
- (3)固態培養基於殺菌後，分別接入培養七天之液態種菌 5ml，置於恆溫培養箱中，30℃ 下培養七天。

(5) 測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

4-5-2 三角瓶試驗

實驗十七：不同表面通氣量對靈芝菌絲生長之影響

實驗目的：因為靈芝為好氧菌，所以希望探討不同表面通氣量對靈芝菌絲生長的影響，實驗是在三角瓶中進行，所以利用不同大小的錐形瓶，相同體積的固態培養基，造成不同的氣固界面，來探討不同的表面通氣量對菌絲生的影響。

實驗方法：

(1)取三角瓶三個，分別為 250ml、500ml、1000ml 的三角瓶，每個三角瓶裝麥糠 10g，添加 50ml 水進行發酵。

(2)固態培養基於殺菌後，分別接入培養七天之液態種菌 10ml，置於恆溫培養箱中，30 下培養七天。

(3)測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

實驗十八：攪拌頻率對靈芝菌絲生長之影響

實驗目的：文獻得知，攪拌可以幫助固態培養之質傳與熱傳，但卻會造成菌絲斷裂、傷害菌絲，因此本實驗就是要找出最適當的攪拌頻率，使得質傳與熱傳可以達到更均勻，而且不會嚴重阻礙菌絲生長。

實驗方法：

(1)取 250ml 三角瓶四個，每個三角瓶裝麥糠 10g，添加 20ml 水進行發酵。

(2)固態培養基於殺菌後，分別接入培養七天之液態種菌 10ml，置於恆溫培養箱中，30 下培養 14 天，分別 1 天、2 天、3 天攪拌一次，一次攪拌十秒，與不攪拌。

(3)測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

實驗十九：先液後固對靈芝菌絲生長之影響

實驗目的：本實驗即是嘗試大量接菌，另一方面也是在探討菌絲突然由液態環境變為固態環境，對於菌絲生長會有何影響。

實驗方法：

(1)取 250ml 三角瓶四個，每個三角瓶裝 50ml 液態培養基，接 5ml 培養七天之液態種菌，30 下培養。

(2)分別在培養 5 天、7 天、9 天後裝入 10g 殺菌過的固態基質，置於恆溫培養箱中，30 下培養至第 16 天。

(3)測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

實驗二十：利用三角瓶模擬填充式生物反應器之研究

實驗目的：以三角瓶模擬填充式生物反應器進行大量培養，其中除了基質培養基外，尚添加了測試出的最佳養分，觀察靈芝菌絲生長的情形。

實驗方法：

- (1)取 250ml 三角瓶四個，每個三角瓶底部填充鐵絲圈，上面再裝入 15g 麥糠、3g 大薏仁、3g Fructose、3g 麥芽萃出物、1g 木屑，添加 100ml 蒸餾水進行培養。
- (2)固態培養基於殺菌後，分別接入培養七天之液態種菌 15ml，置於恆溫培養箱中，30℃ 下培養 3、6、9、12、15、18、21 天。
- (3)培養期間，從三角瓶底部連續通入氣體，氣體流量為 1LPM。
- (4)測量其菌絲濃度、pH，並記錄生長情況。

4-5-3 發酵槽試驗

實驗二十一：利用發酵槽模擬填充床與攪拌式反應器之研究

實驗目的：探討填充床與攪拌式發酵槽中靈芝菌絲生長的情形。

實驗方法：

- (1) 先將 200g 麥糠，添加 400ml 蒸餾水，置於殺菌釜殺菌，121℃ 殺菌 2 小時，並置於 UV 燈下冷卻至室溫。
- (2) 在填充床發酵槽底部填充鐵絲圈，而轉鼓式發酵槽則裝上攪拌葉，將發酵槽裝置妥當，放入殺菌釜中，121℃ 殺菌 2 小時，並置於 UV 燈下冷卻至室溫。
- (3)將培養七天之液態種菌以均質機打碎，接 200ml 到殺過菌之固態培養基中，攪拌均勻，使菌液平均的分佈在固態基質中。
- (4)再將攪拌均勻之固態培養基倒入發酵槽中，接上循環冷卻水之水管，將溫度控制在 30℃ 下。接上通氣設備及濕度計管線，即可開始進行培養。
- (5)每天通氣 5 分鐘，通入飽和氣體，氣體流量控制在 5LPM，培養 14 天，測量 14 天後之菌絲濃度，並記錄生長情況。

實驗二十二：利用發酵槽模擬攪拌式反應器之研究

實驗目的：探討不同發酵體積攪拌式發酵槽中靈芝菌絲生長的情形。

實驗方法：

- (1) 分別以 200g 與 300g 麥糠為發酵體積，分別添加 400ml 與 600ml 蒸餾水，置於殺菌釜殺菌，121℃ 殺菌 2 小時，並置於 UV 燈下冷卻至室溫。
- (2) 將發酵槽裝上攪拌葉與管線，放入殺菌釜中，121℃ 殺菌 2 小時，並置於 UV 燈下冷卻至室溫。
- (3)將培養七天之液態種菌以均質機打碎，分別接入 200ml 與 300ml 到殺過菌之固態培養基中，攪拌均勻，使菌液平均的分佈在固態基質中。
- (4)再將攪拌均勻之固態培養基倒入發酵槽中，接上循環冷卻水之水管，將溫度控制在 30℃ 下。接上通氣設備、攪拌馬達及濕度計管線，即可開始進行培養。
- (5)每天通氣 5 分鐘，通入飽和氣體，氣體流量控制在 5LPM，配合攪拌葉轉動，每天緩慢轉動 5 轉，培養 14 天，測量其菌絲濃度，並記錄生長情況。

4-6 分子量分佈試驗

醫學已經證實，靈芝多醣在不同的分子量範圍內有不同的療效，為了探討本實驗室以固態發酵培養之靈芝菌絲體與液態培養之靈芝菌絲球，其多醣分子量分佈之差異，以膠體層析法(GPC)來進行實驗。

將固態培養之靈芝-小麥發酵物、靈芝子實體、小麥與液態發酵之菌絲球分別以 90 °C 熱水萃取 12 小時，取萃取液離心濃縮，以 0.22 μ m 濾頭過濾後，注入 20 μ L 於層析管柱中。

實驗條件：

1. 管柱：TSK-4000 SWXL
2. 移動相：去離子水
3. 流速：1ml/min
4. 偵測儀：RI-Detector 8110

4-7 靈芝酸分析試驗

根據日本專利報導指出⁽²⁹⁾：靈芝子實體含有靈芝酸 A、B、C、C1、C2、D、E、F、G、H、I、K，而液態振盪培養的靈芝菌絲球則含有靈芝酸 Na~Nk、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y、Z 等。靈芝酸 B、D、F、H、K、S、Y 具有降血壓的作用，靈芝酸 U、V、W、X、Y、Z 則具有抗腫瘤的效果。靜置培養的固態氣生菌絲則同時含有靈芝子實體與液態培養之菌絲球之靈芝酸成分，含有靈芝酸 A、B、C、R、S、T，同時具有降血壓與抗腫瘤的效果。

為了探討本實驗室以固態發酵培養之菌絲體與液態培養之菌絲球靈芝酸之差異，以高效能液相層析儀(HPLC)來進行分析。

將固態培養之靈芝-小麥發酵物、靈芝子實體、小麥與液態發酵之菌絲球分別以乙酸乙酯在 80 °C 水浴下，萃取 2 小時，取萃取液離心濃縮，以添加 250ppm 之 thymol 的甲醇溶解，再以 0.22 μ m 濾頭過濾後，注入 20 μ L 於層析管柱中。

實驗條件：

1. 管柱：LiChro CARCART 250-4 RP18 (5 μ m)
2. 移動相：2 % CH₃COOH/CH₃CN=66.7/33.3
3. 流速：1ml/min
4. 偵測儀：L-4250 UV-VIS Detector
5. 偵測波長：254nm

4-8 菌絲形態分析試驗

據文獻指出⁽⁵⁷⁾：僅具有生殖菌絲者為一次元菌絲，而二次元菌絲為同時具有生殖菌絲與骨骼菌絲或同時具生殖菌絲與纏繞菌絲，三次元菌絲則是同時具有生殖、骨骼、纏繞菌絲(如 Fig.5-36)⁽⁵⁷⁾。而骨骼菌絲與纏繞菌絲是由生殖菌絲分化形成的。為了探討本實驗室以固態培養之靈芝菌絲體與液態培養之靈芝菌絲球

形態與結構之差異，以光學顯微鏡來進行分析。

第五章 結果與討論

5-1 培養皿培養試驗

實驗一：利用培養皿平面培養，尋找出菌絲生長比較快速之菌株

結果：

以麥糠當作基質培養基，以固態接菌方式接菌，將 CCRC 36123 與 CCRC 37200 各接一塊菌到固態培養基上，置於 30 的恆溫培養箱中培養，觀察這兩隻菌對固態培養基的適應情形及生長狀況，並比較其生長速率，結果如 Fig.5-1 所示。結果顯示，CCRC 36123 對麥糠培養基的適應狀況遠比 CCRC 37200 還佳，生長較快，密度也較高。就外觀來看，CCRC 36123 一開始生長速度就比較快，當培養到第 10 天，CCRC 36123 已經可以長滿整個培養皿，且可深入基質底部，長得很豐滿，菌絲長度可長達 7.1cm。而 CCRC 37200 的生長速度一開始就慢好多，且只能在基質表面生長擴展，培養到第 10 天菌絲只長了 2.7cm。由此可知，CCRC 36123 對於麥糠基礎培養基的適應力較佳，因此，選用 CCRC 36123 來當作實驗培養的菌株。

實驗二：利用固態培養的方式，尋找出菌絲生長較佳之菌株。

結果：

本實驗是延續上一個實驗，繼續探討兩菌株的菌體濃度與最終 pH 值。但此實驗是以液態接菌方式接菌，吸取液態培養之菌液 5ml 接到固態培養基上，置於 30 的恆溫培養箱中培養 7 天，結果如 Fig5-2 所示。結果顯示，CCRC 36123 培養 7 天後，其菌體濃度可以達到 1.165g dry weight/g substrate，而 CCRC 37200 卻只有 0.478g dry weight/g substrate。

從外觀來看，14 天後，CCRC 36123 菌絲已經長滿整個培養皿(如照片二)，且已經有一半面積已經出現咖啡色表面，推測咖啡色液體為代謝產物，此外，菌絲生長狀況良好，生長力強。而 CCRC 37200 生長速度則慢好多，只長了 1/3 個培養皿，生長狀況不是很好，也沒有代謝產物產生。由此可知 CCRC 36123 對於基質麥糠的適應力較強，故選用此菌株當培養菌種。

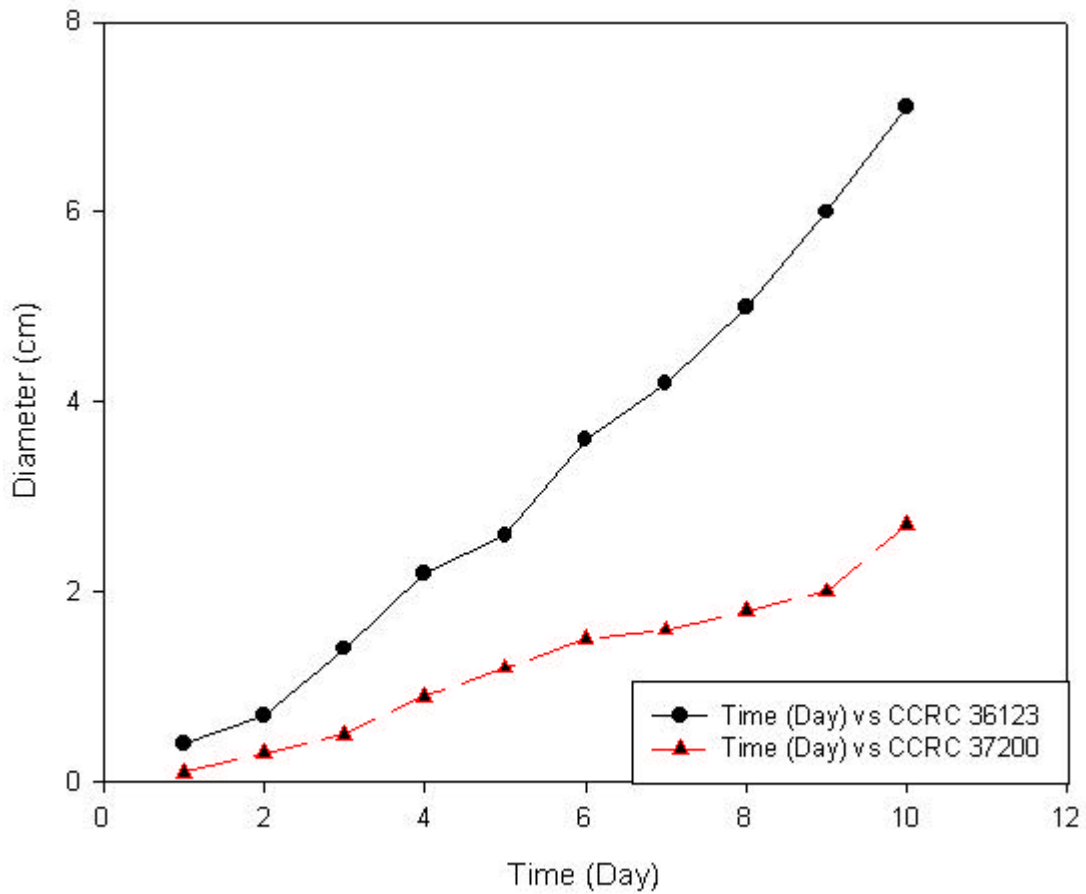


Fig. 5-1 不同菌株固態培養隨時間生長之情形

培養條件：

- (1) 菌種：CCRC 36123、CCRC37200
- (2) 接菌量：1 塊 0.5cm×0.5cm 的菌絲塊
- (3) 培養溫度 30 、培養 1~10 天
- (4) 在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，添加 25ml 蒸餾水

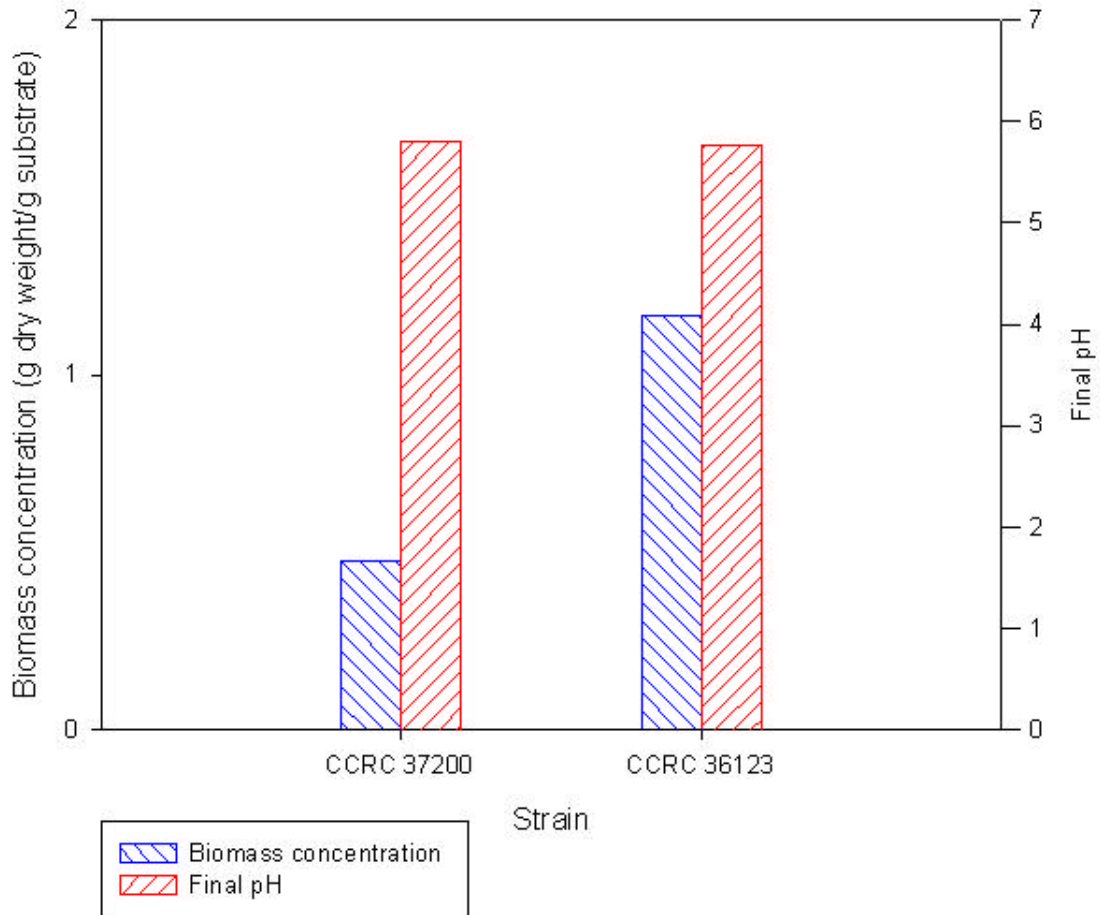


Fig. 5-2 不同菌株固態培養菌絲生長之情形

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123、CCRC37200
- (2)接菌量：液態菌源 5ml
- (3)培養溫度 30 、培養 7 天
- (4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，添加 25ml 蒸餾水

實驗三：不同固態基質培養基對靈芝菌絲生長之影響

結果：

本實驗選用麥糠與米糠兩種基質當基礎培養基，選用 CCRC 36123 這隻菌株，同樣的以液態接菌方式接菌，接 5ml 到固態培養基上，置於 30 的恆溫培養箱中培養 14 天，結果如 Fig.5-3 所示。當菌絲生長到第 14 天時，CCRC 36123 在麥糠上生長的菌體濃度已可達到 1.73g dry weight/g substrate，而在米糠上只達到 1.59g dry weight/g substrate。且米糠在殺菌後會成糊狀，在規模放大上較不理想，故採用麥糠來當作以後實驗的培養基質。

從外觀來看，以米糠當基質，在殺菌後會成糊狀，基質孔隙度低，且一開始在配製培養基時，含水量不容易控制，在規模放大上較不理想。培養後，菌絲與米糠幾乎連成一塊，分辨不太出來。當培養到了第七天，菌絲表面會生成大量黃色液體(如照片七)，推斷以米糠當培養基將有利二次代謝產物的生成。

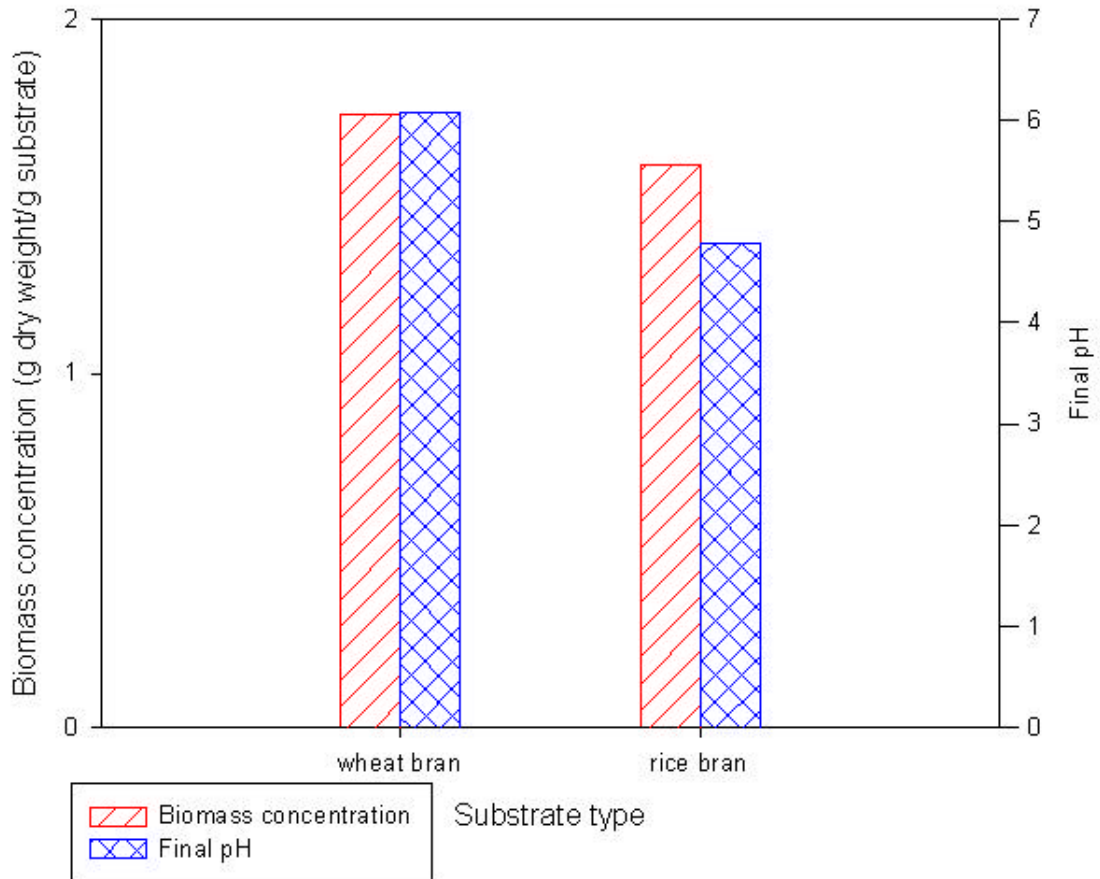


Fig.5-3 不同固態基質培養基對靈芝菌絲生長之影響

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態菌源 5ml
- (3)培養溫度 30 、培養 14 天
- (4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，分別以米糠和麥糠當基質，添加 25ml 蒸餾水

實驗四：不同培養時間對靈芝菌絲生長及多醣生成之影響

結果：

本實驗最主要是以培養皿固態培養探討靈芝隨時間生長的狀況。靈芝固態發酵有一股很濃郁的氣味，與甘蔗汁的味道相似。從外觀來看，菌絲生長到第五天，菌絲表面就開始有黃色液體出現(如照片八)，且幾乎已經快長滿整個培養皿，推測其黃色液體為代謝產物，有研究指出此黃色液體為 SOD 的可能性很大。到了第七天，菌絲的密度更高了，已經可以深入到基質底層，故往後的實驗皆以培養 7 天為主。菌絲繼續生長，若菌絲的生長狀況良好，約三~四星期後便可出現類似子實體之紅棕色表面(如照片三、四)。由於分析是以玻璃培養皿批示進行，因此在菌體濃度上並無連續之關係。

由 Fig.5-4 可知，pH 在整個培養過程中沒有太大的變化，都維持在 5~6 之間，這足以證明基質麥糠是一個很強的緩衝物質，在整個培養過程中發揮了調控 pH 的作用。至於單位乾重的菌體濃度在培養後第 15 天達到最大量，約為 2.298 g dry weight/g substrate，15 天後則因菌體漸漸死亡，產生自溶現象，故菌體濃度下降。

由於小麥本身含有澱粉、蛋白質、蔗糖、麥芽糖、葡萄糖、果糖、棉子糖、蜜二糖、糊精等糖類物質，因此此多醣的分析，其濃度為基質與靈芝多醣的加成，分析起來格外困難，只能就趨勢來作概略的分析。從 Fig.5-5 可看出，從培養第二天到第七天多醣濃度是呈現下降的趨勢，此階段是菌絲分解基質中之多醣成分，吸收其養分所造成的，從第八天到第十天，多醣濃度上升，到了第八天由於菌絲已長滿整個培養皿，便開始分泌小分子靈芝多醣，到第十天達到最大量。第十天後，多醣濃度變低，推測是由於菌絲開始進行多醣的結構修飾，並將小分子多醣聚合成大分子多醣所造成的。第十四天多醣濃度再次上升，這是由於小分子多醣不斷聚合成大分子多醣，因此歸因於大分子多醣的累積。推測大分子多醣多半為非水溶性，因此以水無法萃取，或是萃取時間太短，無法完全將大分子多醣萃出。然而其中有些小麥之糖類被靈芝菌分解利用，生成靈芝特有的靈芝多醣體，而另有些糖類則是以小麥多醣與靈芝多醣加成的方式形成。由於分析是以玻璃培養皿批示進行，因此在多醣濃度上並無絕對連續之關係。且由於所萃出之多醣，其中包含基質與靈芝之多醣，故其濃度趨勢僅供參考，並非絕對值。

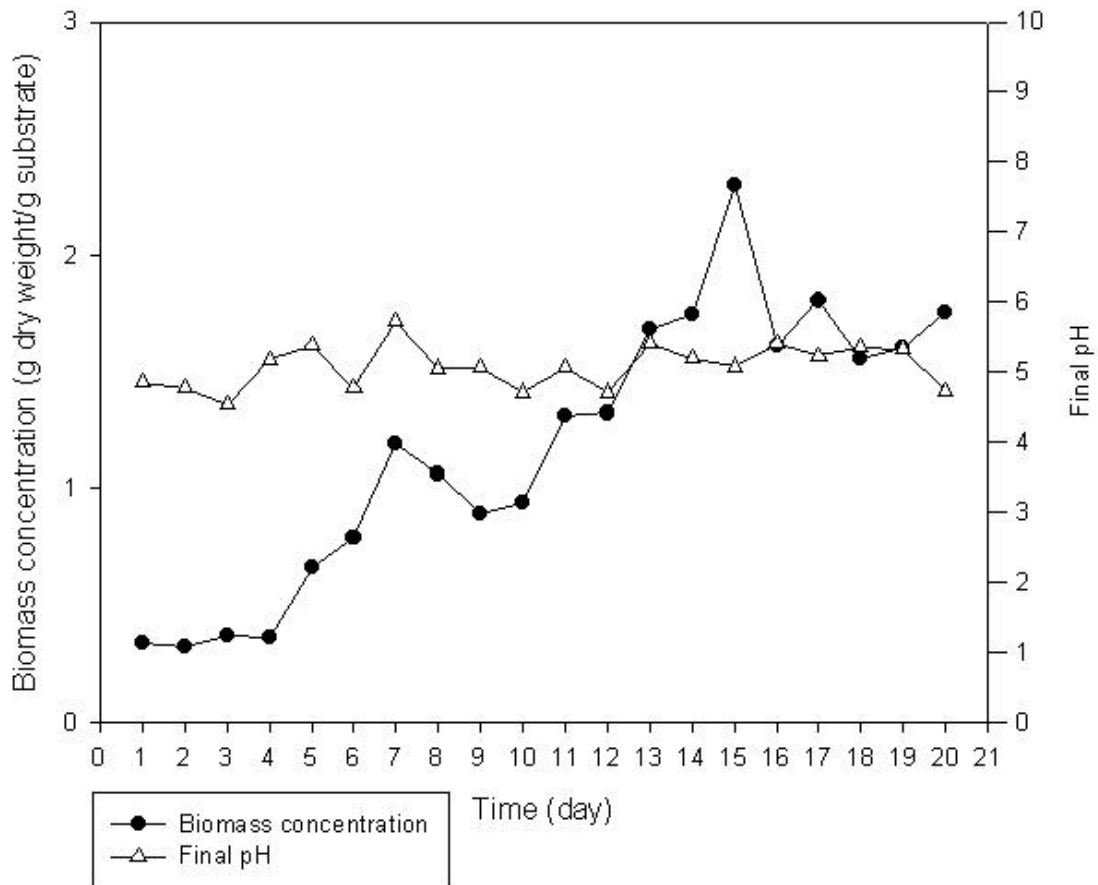


Fig.5-4 不同培養時間對靈芝菌絲生長之影響

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 5ml
- (3)培養溫度 30℃，分別培養 1~20 天
- (4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，添加 25ml 蒸餾水

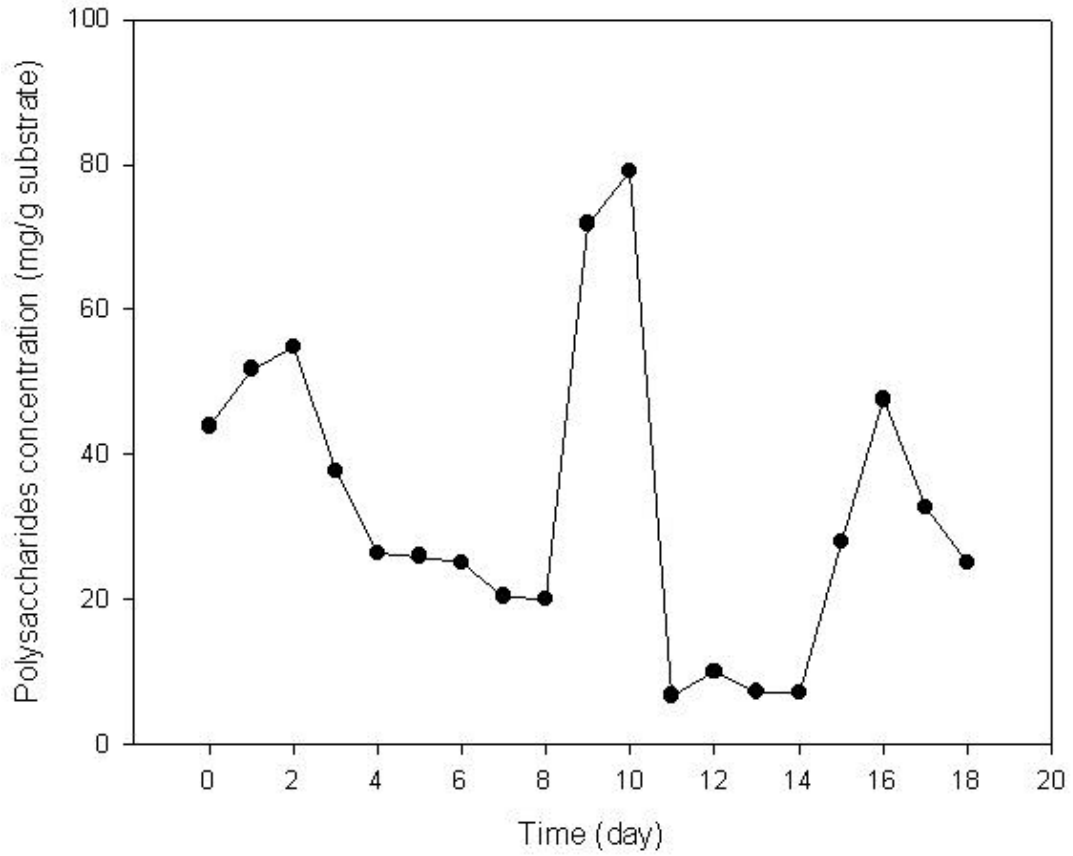


Fig.5-5 靈芝固態培養之多醣濃度分析

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 5ml
- (3)培養溫度 30℃，分別培養 1~18 天
- (4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，添加 25ml 蒸餾水

5-1-1 探討生長的物理因素對靈芝菌絲生長之影響

實驗五：不同初始 pH 值對靈芝菌絲生長之影響

結果：

本實驗最主要是探討初始 pH 對靈芝生長的影響，結果顯示不管初始 pH 如何改變，最終的 pH 都維持在 5~6 之間，這顯示了基質的緩衝性。使得培養基在培養過程中，pH 都能維持在 5~6 之間，使得菌體在幾乎為中性的環境下生長。在菌體濃度方面，由 Fig.5-6 可得，於初始 pH8 下，單位乾重之菌體濃度可達最大量，可達 1.39g dry weight/g substrate。但就整體來看，初始 pH 從 4~9，其菌體濃度都沒有明顯的差別。由外觀來看，不管基質的初始 pH 為何，對菌絲的生長影響也不大，其生長速度與生長狀況都差不多。若真正想要調整培養過程中的 pH，光用調整 pH 之後的水添加是於事無補的，應添加某些氮源或是緩衝劑才能使 pH 明顯下降。

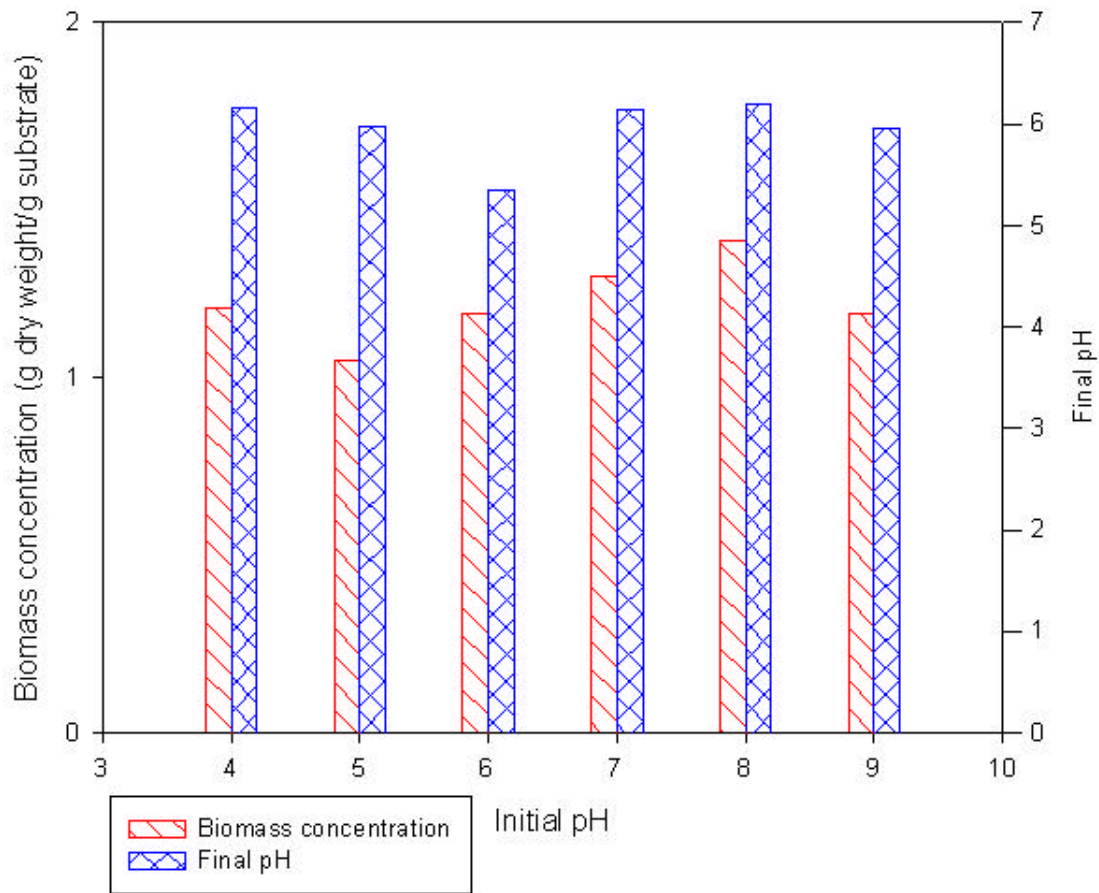


Fig.5-6 不同初始 pH 值對靈芝菌絲生長之影響

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 5ml
- (3)培養溫度 30 、培養 7 天
- (4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，添加 pH 為 4~9 之蒸餾水 25ml

實驗六：不同初始含水量對靈芝菌絲生長之影響

結果：

本實驗最主要是探討初始含水量對靈芝生長的影響。同樣的，最終 pH 都維持在 pH5~pH6 之間，並無太大的變化。就菌體濃度而言，由 Fig.5-7 可得，以添加 10ml 水時，也就是料水比 1:2 之單位乾重菌體濃度可達最大量，可達 1.72g dry weight/g substrate。推測其原因應是基質中含水量適中，基質中的水量足夠溶解基質中養分供菌體利用，也足以使菌體活化，基質縫隙中又不會有太多的水，以致於菌體可輕易的生長入基質的縫隙中，充分的利用基質的養分，如此就可使菌體濃度達最大量，相對的，當基質的含水量太高，菌體無法長入基質中，只在基質表面長一層密度很高的菌絲體。

由外觀來看，可看出生長初始添加水量在 10ml~15ml 時，也就是料水比 1:2~1:3，含水量 66%~75%，菌絲密度似乎較稀，但實際上由於含水量較低，菌絲容易深入到基質孔隙中生長，並緊緊紮住基質，在整個基質中生長非常豐滿，所以測起來菌體濃度較高。相反的，含水量在 80% 以上時，由於基質孔隙中含水量較高，導致菌絲無法深入其中生長，只在基質表面長一層厚厚的菌絲層，所以外觀上看起來較白，菌絲密度較高，但實際上，因為菌絲只在基質表層附近生長，生長空間較少，利用基質的養分也較少，菌體濃度自然較低。

若是以規模放大的觀點來看，含水量應該以 10ml~15ml 較佳，如此才可允許菌絲深入基質生長，配合翻面與通氣，讓菌絲能夠充分利用基質的養分，使其生長到達最大量。

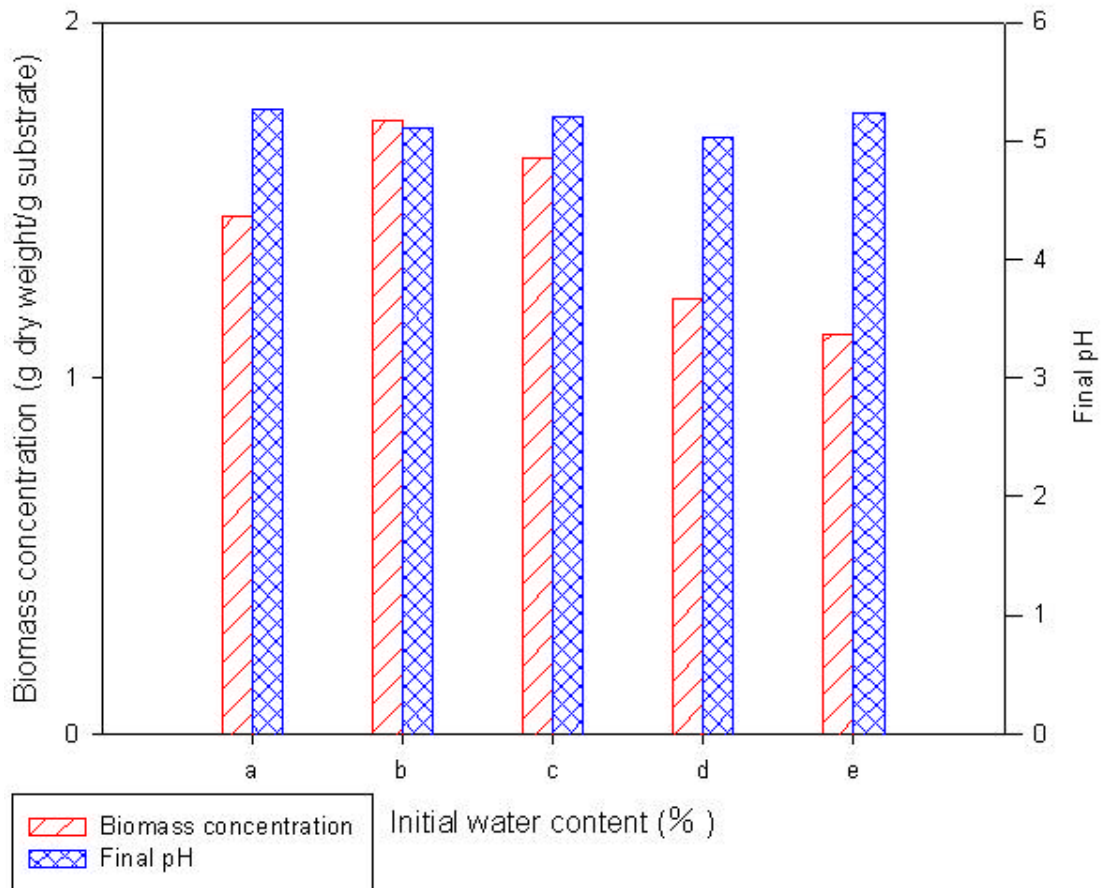


Fig.5-7 不同初始含水量對靈芝菌絲生長之影響

- a. 初始含水量:50 % (料水比=1 : 1)
- b. 初始含水量:66 % (料水比=1 : 2)
- c. 初始含水量:75 % (料水比=1 : 3)
- d. 初始含水量:80 % (料水比=1 : 4)
- e. 初始含水量:83 % (料水比=1 : 5)

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 5ml
- (3)培養溫度 30 ，培養 7 天
- (4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，分別添加 5ml、 10ml、 15ml、 20ml、 25ml 蒸餾水

實驗七：不同培養溫度對靈芝菌絲生長之影響

結果：

本實驗最主要是探討溫度對靈芝生長的影響。由外觀可看出生長溫度在 25~35 時，菌絲生長最快。此結果與液態深層培養所得知之最佳培養溫度相同。若細部分析，最終 pH 也有相同結果，都維持在 pH4.5~5.5 之間。就菌體濃度而言，溫度 20 與 40 的菌絲生長最慢，菌體濃度最低。相對的，培養溫度為 30 時，菌絲生長的速度最快，由 Fig.5-8 可得其菌體濃度可達 1.18g dry weight/g substrate。

從外觀來看，溫度 20 下，生長速度較慢，菌絲密度很低。而在 25、30 與 35 下，菌絲的生長速度較快，其中又以溫度 30 下，菌絲生長狀況最良好。而溫度 40 下，生長速度稍微慢於 20 下的培養，菌絲生長的密度最低。因此結論是以生長狀況最佳的 30 當作往後的培養條件。

25 與 35 培養的菌絲生長的比 30 的菌絲緊密結實，但生長速度較慢，25~30 下生長的菌絲形態皆呈起伏狀且平貼基質表面生長。而 20 培養的菌絲生長速度較低，其菌絲形態也呈起伏狀。40 培養的菌絲生長速度最低，但其菌絲會有相疊的情形，有向上生長的趨勢，並形成一堆一堆如雪堆般的菌絲。培養七天後，25 下生長的菌絲會明顯的出現黃色液體，且有些菌絲會呈現咖啡色表面，且 20 與 25 下培養的菌絲，經過 3~4 星期的培養，其菌絲會有明顯的分化現象，菌絲會有結塊現象，且以 25 下菌絲的表面較具多樣化(如照片一)。由此可見，要在較低的溫度下才較易形成分化的組織。

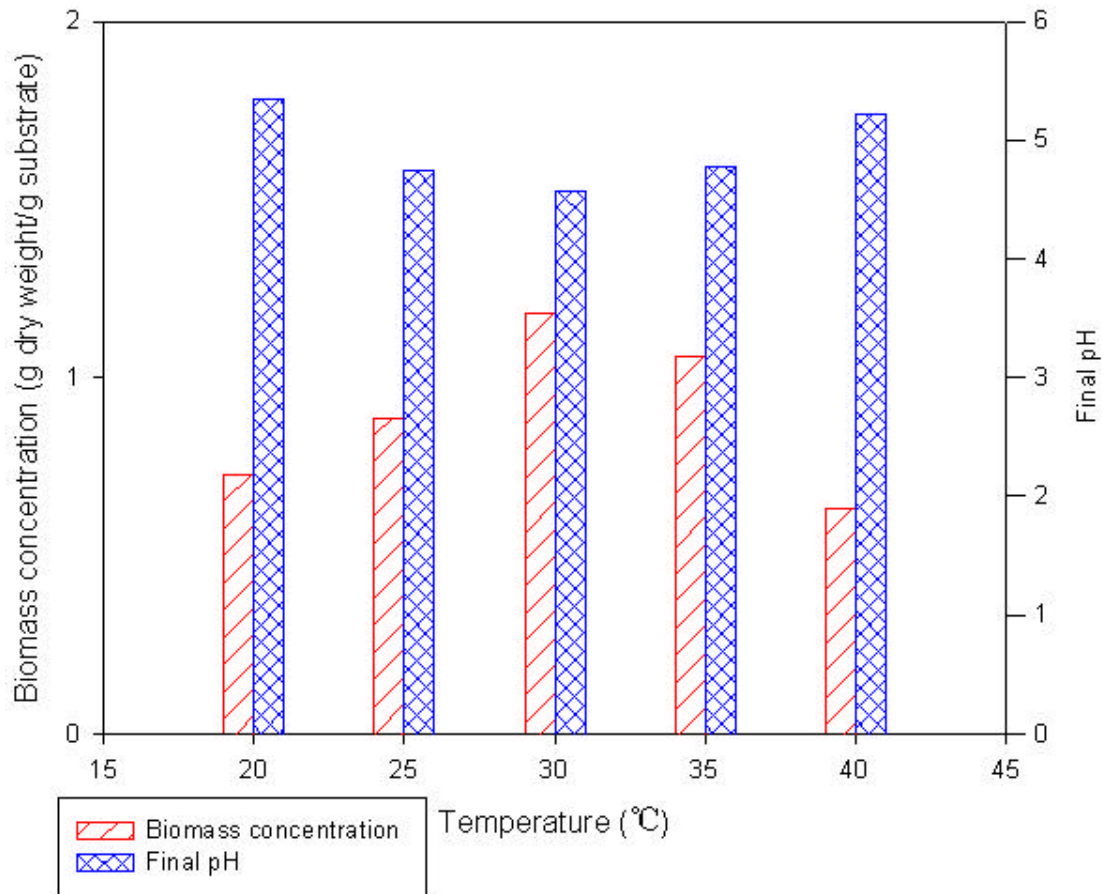


Fig.5-8 不同培養溫度對靈芝菌絲生長之影響

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 5ml
- (3)培養溫度 20 ~40 ，培養 7 天
- (4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，添加 25ml 蒸餾水

實驗八：不同培養階段接菌對靈芝菌絲生長之影響

結果：

本實驗最主要是探討不同培養階段接菌對靈芝生長的影響。最終 pH 也有相同結果，都維持在 pH5.5~6.5 之間。就菌體濃度而言，以液態培養 7 天接菌到固態培養基長的最好(如 Fig.5-9)，因為其菌絲生長活性最佳，故所得的菌絲量最多，菌體濃度可達 1.24g dry weight/g substrate。但以液態培養 14 天接菌，因菌絲在接近培養末期接菌，菌絲生長力較弱，故所得的菌體濃度較低，只有 0.99 g dry weight/g substrate。雖然菌體濃度較低，但較易分泌二次代謝產物，故菌絲表面所生成的黃色液體最多，且較易形成咖啡色表面，因此若以生產二次代謝產物的觀點來看，以液態培養 14 天接菌較好。

實驗九：不同接菌量對靈芝菌絲生長之影響

結果：

利用液態培養七天靈芝培養液，以均質機加以打碎，當成種源接入，觀察接菌量對靈芝菌絲體菌體濃度的影響。以此種方式接菌較容易定量，且較容易均勻。

結果發現(Fig.5-10)，最終 pH 同樣都維持在 pH5~pH6 之間，並無太大的變化。而菌絲體濃度會隨著接菌量的增加而增加。接菌量以 9ml 時，所得到的菌體濃度最多，由此可知，5g 的基質已經足夠讓 9ml 的菌體生長，並不會因為養分不足而造成限制，因此，可再嘗試接更大量的菌液到培養基中培養，找出 5g 基質所能供給生長的最大菌體量。若接以 9ml 的菌液，菌體濃度為 1.34g dry weight/g substrate。

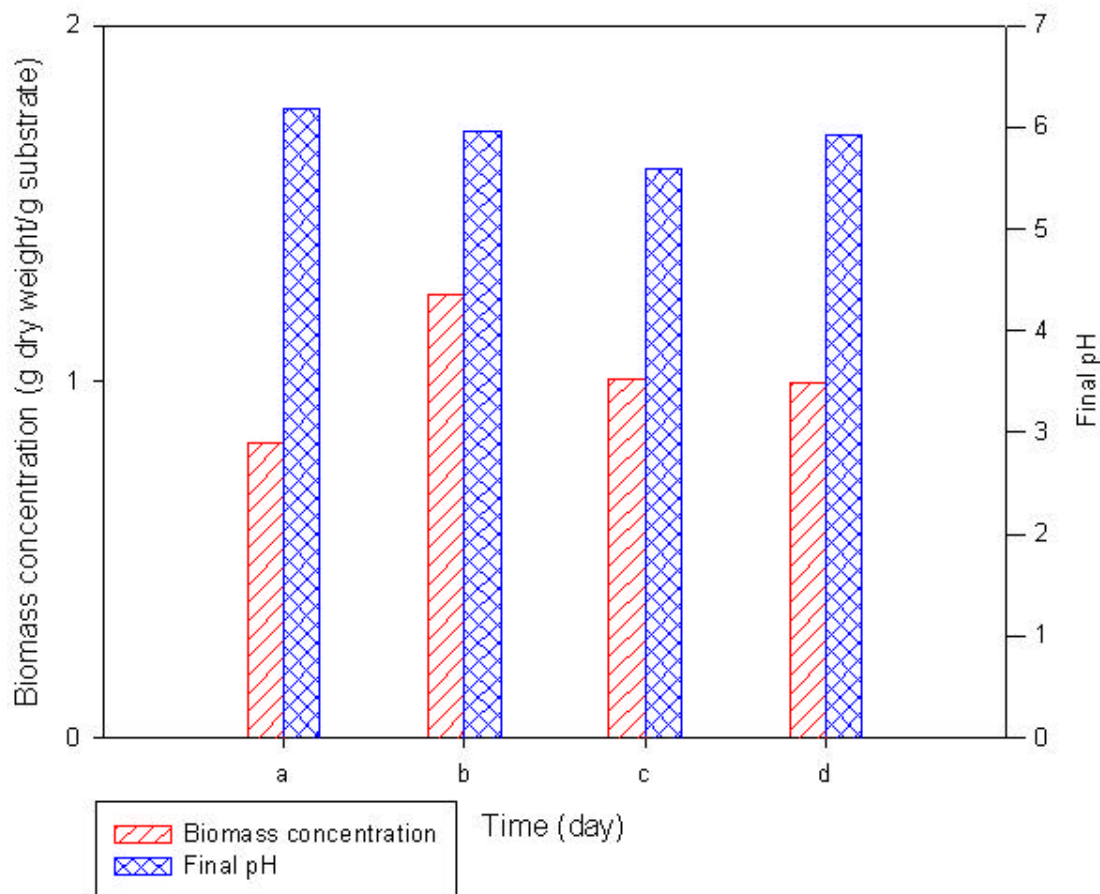


Fig.5-9 不同培養階段接菌對靈芝菌絲生長之影響

- a.液態種菌培養 5 天接菌
- b.液態種菌培養 7 天接菌
- c.液態種菌培養 10 天接菌
- d.液態種菌培養 14 天接菌

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 5ml
- (3)分別將液態種源培養 5 天、7 天、10 天、14 天，接到固態培養基後培養 7 天，培養溫度 30
- (4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，添加 25ml 蒸餾水

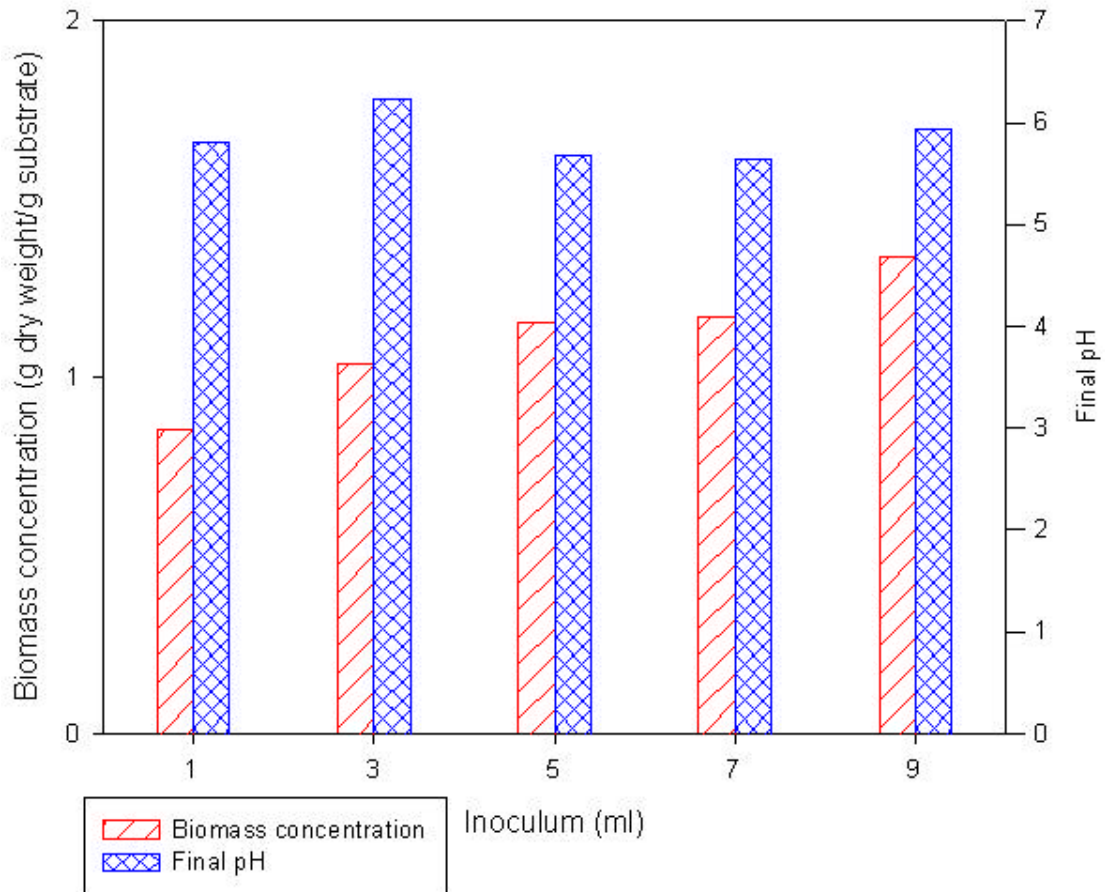


Fig.5-10 不同接菌量對靈芝菌絲生長之影響

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：分別接液態種源 1ml、 3ml、 5ml、 7ml、 9ml
- (3)培養溫度 30 、培養 7 天
- (4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，添加 25ml 蒸餾水

5-1-2 探討生長的化學因素對靈芝菌絲生長之影響

實驗十：添加不同碳源對靈芝菌絲生長之影響

結果：

本實驗最主要是探討碳源的添加對靈芝生長的影響。分別添加 Glucose、Saccharose、Fructose、Potato Starch 四種碳源各 1% 到麥糠基礎培養基，置於 30 的恆溫培養箱中培養 7 天，結果如 Fig.5-11 所示。以生長速度來說添加 1% Fructose 生長最快，可達 1.38g dry weight/g substrate，添加 1% Glucose 生長最慢，只有 1.13g dry weight/g substrate。但就整體而言，由於麥糠本身就含有蠻豐富的養分，所以添加碳源對於菌絲生長並沒有多大的幫助，以成本的觀點來看，較不符合成本，因此若要規模放大培養，應選擇不添加碳源。最終 pH 也都維持在 5~6 之間。

實驗十一：添加不同濃度 Fructose 對靈芝菌絲生長之影響

結果：

本實驗最主要是探討最佳碳源 Fructose 的添加量對靈芝生長的影響。分別添加 1%、2%、4%、8% 的 Fructose 到麥糠基礎培養基，置於 30 的恆溫培養箱中培養 7 天，結果如 Fig.5-12 所示。結果以添加 4% Fructose 對菌絲生長最有利，菌量可達到 1.56g dry weight/g substrate。因此若想藉添加碳源來增加菌體濃度，應該添加較高濃度碳源，才會有明顯的幫助。若以生產二次代謝產物的觀點，添加量以添加 1%~2% 為最佳，其表面所生成的黃色液體較多。最終 pH 都在 pH5.5~6.5 之間。

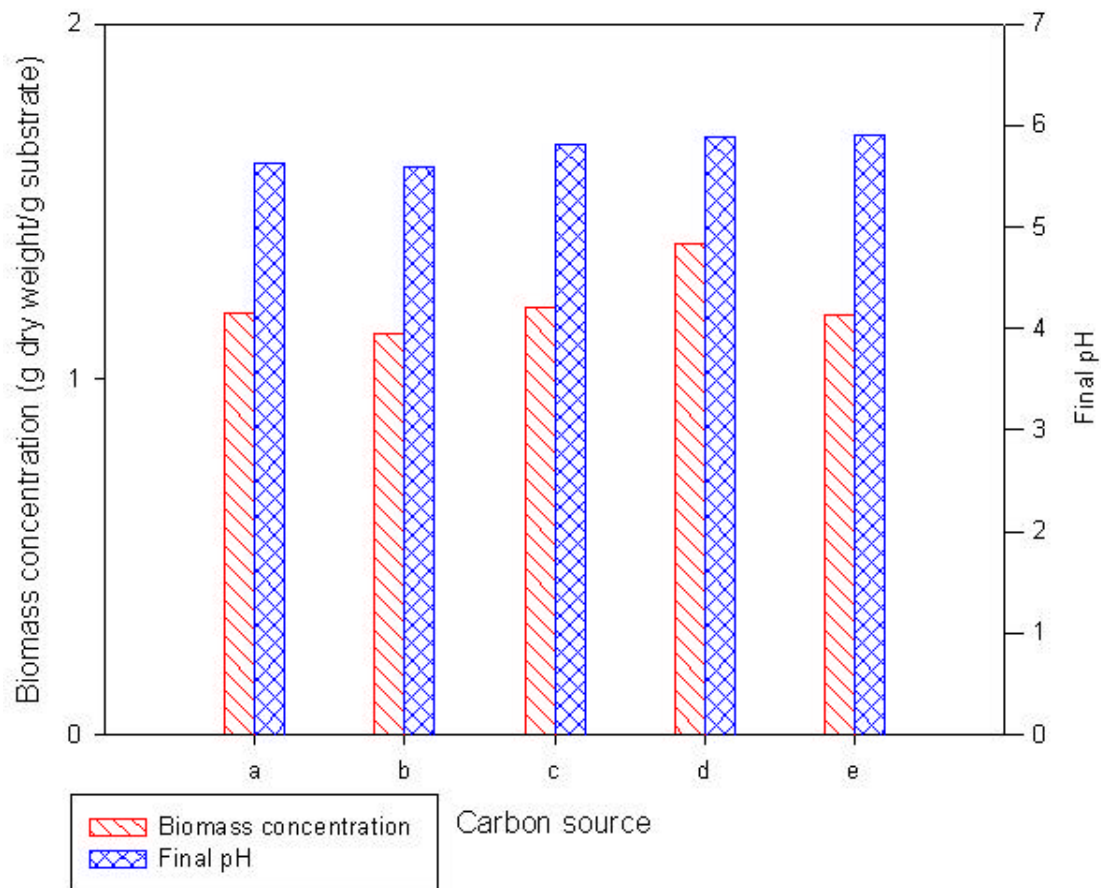


Fig.5-11 添加不同碳源對靈芝菌絲生長之影響

a:基礎培養基

b:基礎培養基+1% Glucose

c:基礎培養基+1% Saccharose

d:基礎培養基+1% Fructose

e:基礎培養基+1% Potato Starch

培養條件：

(1)菌種：CCRC 36123

(2)接菌量：液態種源 5ml

(3)培養溫度 30、培養 7 天

(4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，分別添加 1% Glucose、1% Saccharose、1% Fructose、1% Potato Starch，並添加 25ml 蒸餾水

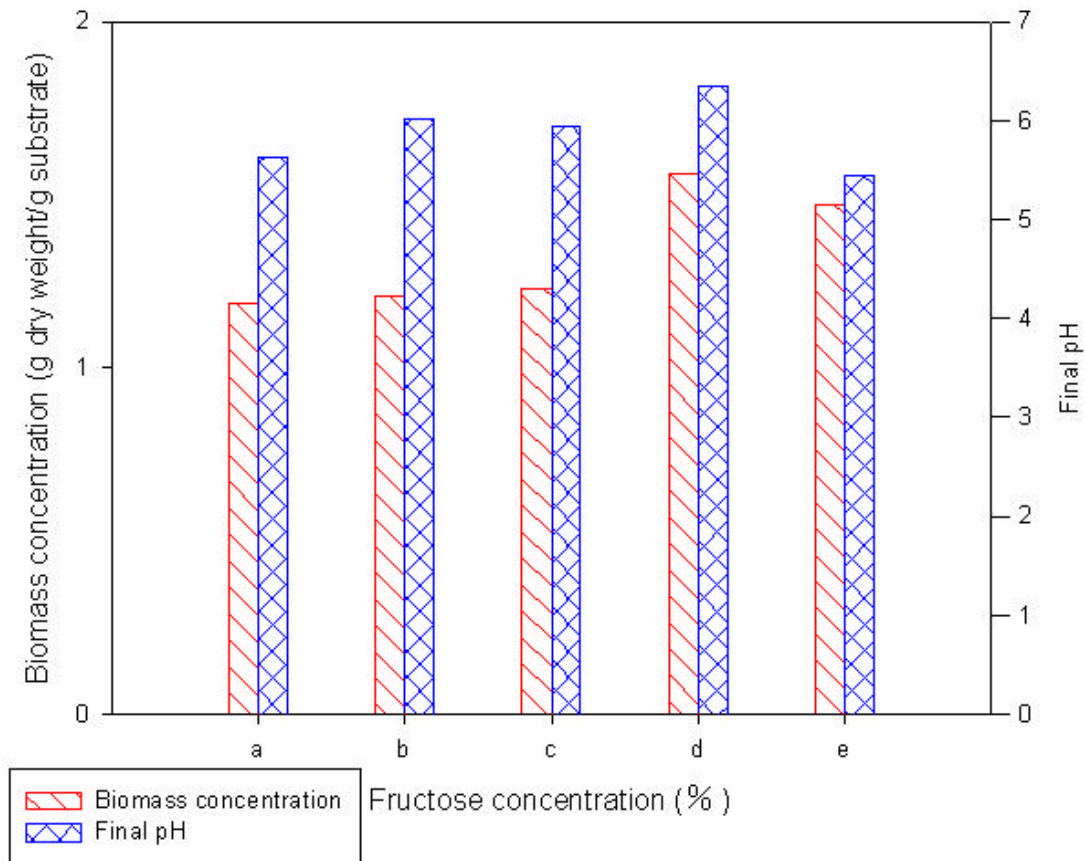


Fig.5-12 添加不同濃度 Fructose 對靈芝菌絲生長之影響

a:基礎培養基

b:基礎培養基+1% Fructose

c:基礎培養基+2% Fructose

d:基礎培養基+4% Fructose

e:基礎培養基+8% Fructose

培養條件：

(1)菌種：CCRC 36123

(2)接菌量：液態種源 5ml

(3)培養溫度 30、培養 7 天

(4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，分別添加 1% Fructose、2% Fructose、4% Fructose、8% Fructose，並添加 25ml 蒸餾水

實驗十二：添加不同氮源對靈芝菌絲生長之影響

結果：

本實驗最主要是探討氮源的添加量對靈芝生長的影響。分別添加 Yeast extract、Malt extract、Bacto Peptone、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 四種氮源各 1% 到麥糠基礎培養基，置於 30 的恆溫培養箱中培養 7 天，結果如 Fig.5-13 所示。以生長速度來說添加 1% Malt extract 生長最快，菌體濃度可達 1.33g/g dry weight。添加 1% Yeast extract 生長最慢，只有 1.07g dry weight/g substrate。但就整體而言，由於麥糠本身就含有蠻豐富的養分，所以添加氮源對於菌絲生長並沒有多大的幫助，以成本的觀點來看，較不符合成本，因此若要規模放大培養，應選擇不添加氮源。最終 pH 除了添加 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 為 4.19 外，其餘皆在 5~6 之間。

實驗十三：添加不同濃度 Malt extract 對靈芝菌絲生長之影響

結果：

本實驗最主要是探討最佳氮源 Malt extract 的添加量對靈芝生長的影響。分別添加 1%、2%、4%、8% 的 Malt extract 到麥糠基礎培養基，置於 30 的恆溫培養箱中培養 7 天，結果如 Fig.5-14 所示。結果以添加 8% Malt extract 對菌絲生長最有利，菌量可達到 1.84g dry weight/g substrate。由此結果發現，菌體濃度隨著 Malt extract 的添加量增加而增加，而添加高濃度的 Malt extract 對菌量生成有較大的幫助。若以生產二次代謝產物的觀點，添加量以添加 2%~4% 為最佳，其菌絲表面所生成的黃色液體較多。Malt extract 添加若超過 4%，會使得最終 pH 大大降低，添加 8% Malt extract 的 pH 為 3.9。綜觀結果，添加 4%~8% Malt extract，其最終 pH 都明顯偏低，約在 pH4 左右，且菌量有明顯較高的趨勢，因此推測添加高濃度氮源不僅降低 pH，對於菌量生成更有幫助。

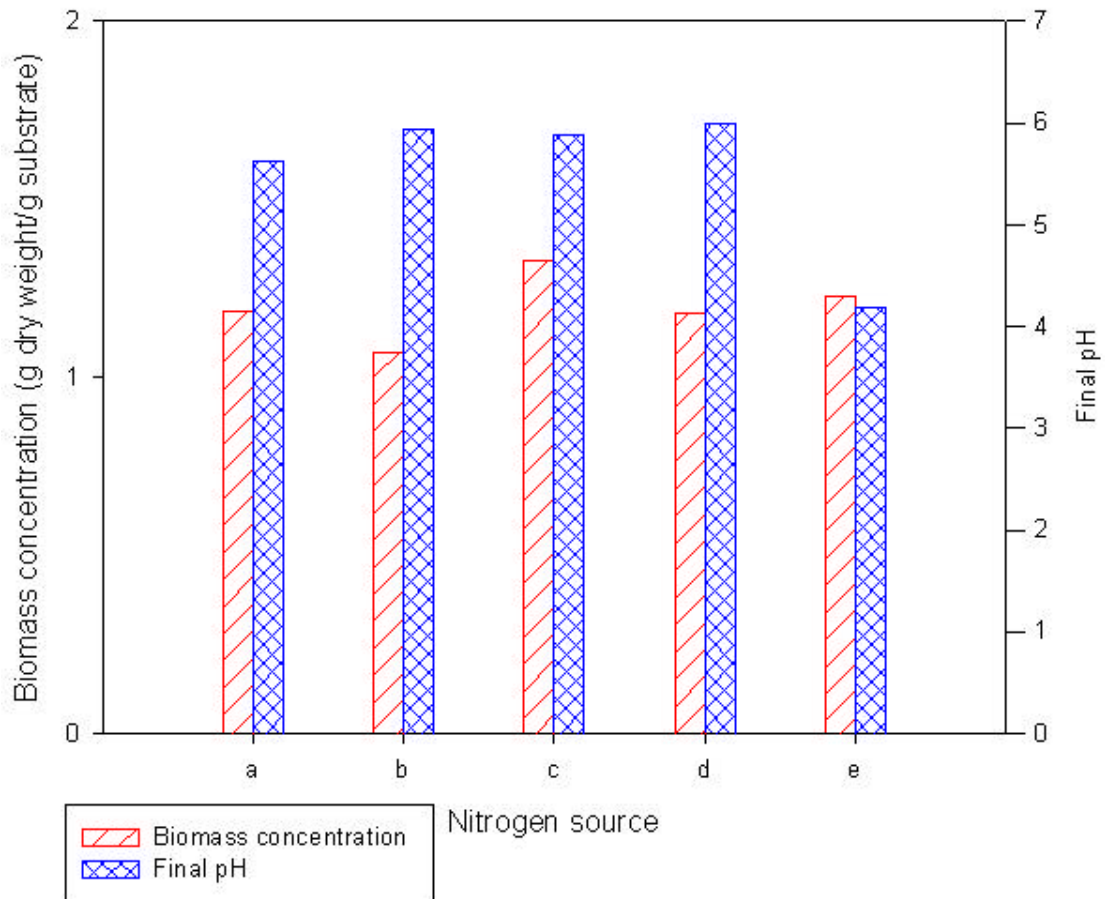


Fig.5-13 添加不同氮源對靈芝菌絲生長之影響

a:基礎培養基

b:基礎培養基+1% Yeast extract

c:基礎培養基+1% Malt extract

d:基礎培養基+1% Bacto Peptone

e:基礎培養基+1% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

培養條件：

(1)菌種：CCRC 36123

(2)接菌量：液態種源 5ml

(3)培養溫度 30 、培養 7 天

(4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，分別添加 1% Yeast extract、1% Malt extract、1% Bacto Peptone、1% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ，並添加 25ml 蒸餾水

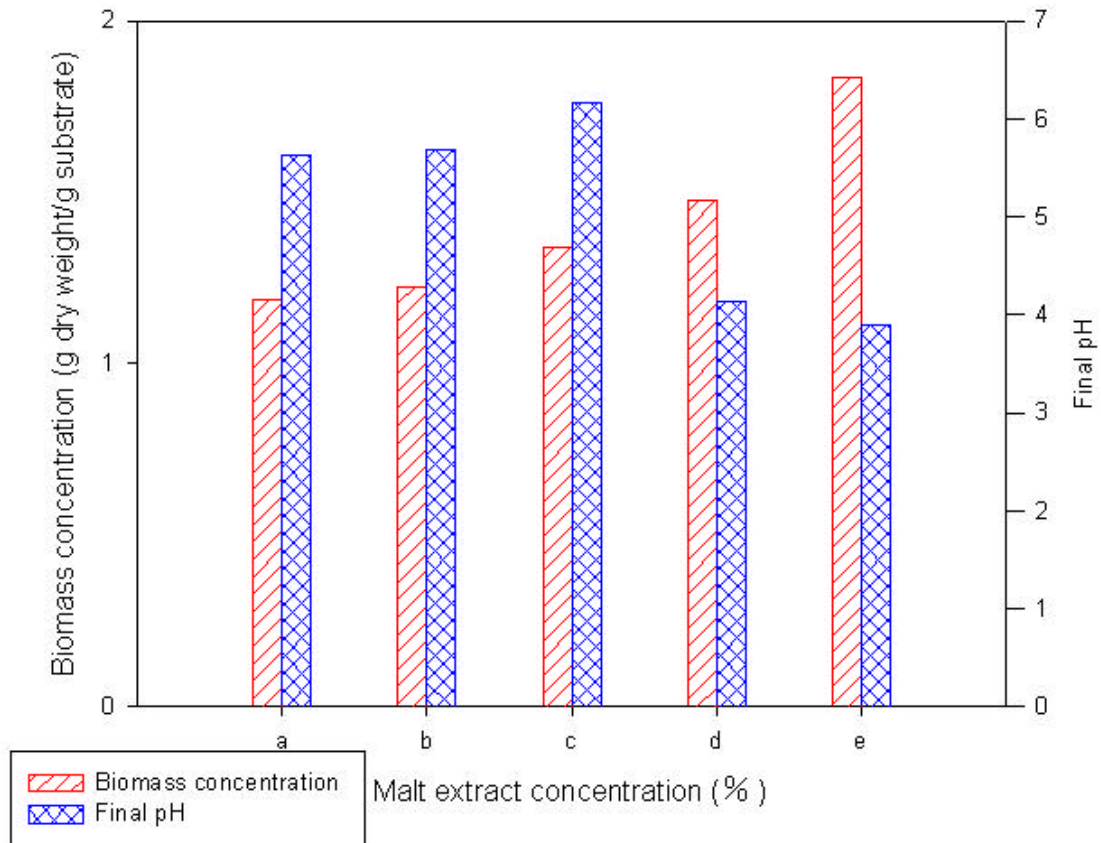


Fig.5-14 添加不同濃度 Malt extract 對靈芝菌絲生長之影響

a:基礎培養基

b:基礎培養基+1% Malt extract

c:基礎培養基+2% Malt extract

d:基礎培養基+4% Malt extract

e:基礎培養基+8% Malt extract

培養條件：

(1)菌種：CCRC 36123

(2)接菌量：液態種源 5ml

(3)培養溫度 30、培養 7 天

(4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，分別添加 1% Malt extract、2% Malt extract、4% Malt extract、8% Malt extract，並添加 25ml 蒸餾水

實驗十四：添加不同無機鹽對靈芝菌絲生長之影響

結果：

本實驗最主要是探討添加四種無機鹽類對靈芝生長的影響，分別添加 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 三種無機鹽各 1% 到麥糠基礎培養基，置於 30 的恆溫培養箱中培養 7 天，結果如 Fig.5-15 所示。以生長速度來說添加 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，菌絲生長最快，菌體濃度可達到 1.24g dry weight/g substrate， K_2HPO_4 最慢，菌量只有 1.17g dry weight/g substrate。但就整體而言，由於麥糠本身就含有蠻豐富的養分，所以添加無機鹽類對於菌絲生長似乎也沒有多大的幫助，以成本的觀點來看，不符合成本，因此若要規模放大培養，應選擇不添加。

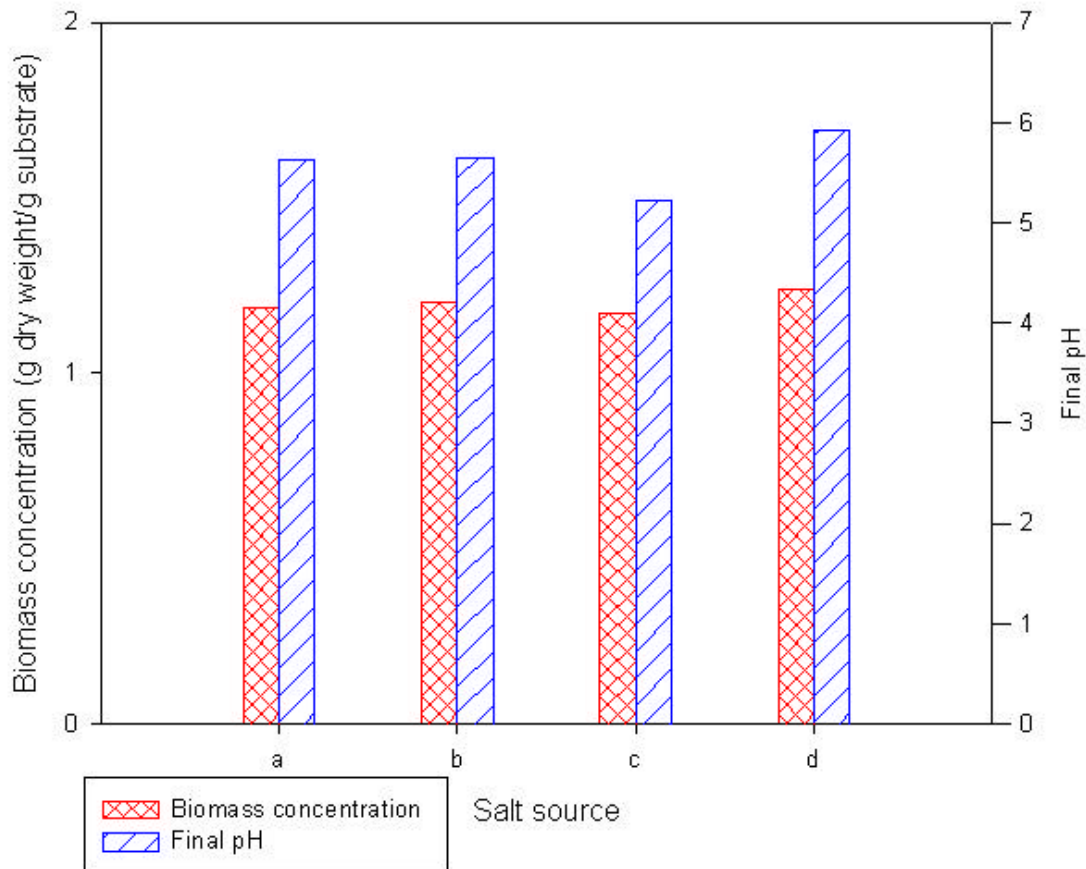


Fig.5-15 添加不同無機鹽對靈芝菌絲生長之影響

a:基礎培養基

b:基礎培養基+1% KH_2PO_4

c:基礎培養基+1% K_2HPO_4

d:基礎培養基+1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

培養條件：

(1)菌種：CCRC 36123

(2)接菌量：液態種源 5ml

(3)培養溫度 30、培養 7 天

(4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，分別添加 1% KH_2PO_4 、1% K_2HPO_4 、1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，並添加 25ml 蒸餾水

實驗十五：添加不同天然穀物對靈芝菌絲生長之影響

結果：

本實驗最主要是探討其他穀物的添加對靈芝生長的影響。分別添加燕麥、蕎麥、大薏仁、小薏仁四種穀物各 4 % 到麥糠基礎培養基，置於 30 的恆溫培養箱中培養 7 天，結果如 Fig.5-16 所示。以生長速度來說添加大薏仁生長最快，菌體濃度可達到 3.23g dry weight/g substrate，相對於基礎培養基，對於菌體量的增加有明顯的幫助。添加燕麥生長最差，菌體濃度只有 1.26g dry weight/g substrate，與無添加之基質培養基之菌體濃度差不多。就整體而言，添加較低成本的天然穀物當作補充養分，對於菌絲生長有明顯的幫助，以成本的觀點來看，也蠻符合成本，因此適合於規模放大培養時添加。

此外，若單獨使用燕麥、蕎麥、大薏仁、小薏仁四種穀物分別當作基質，菌絲生長的很好，其中又以燕麥培養菌絲生長得最佳，培養七天後通常都可以長滿整個培養皿，長得很豐滿，甚至可以長到蓋子上，而以小薏仁培養次之。大薏仁培養，由於顆粒較大，保水性不佳，因此菌絲生長也不甚理想。以蕎麥培養，菌絲生長最差，因其保水性最差，很容易失水，菌絲生長也跟著停止。以此四種穀物培養，菌絲生長狀況良好，相反的，培養 14 天後，仍不易見到菌絲表面有黃色液體分泌，因此推測對於分泌二次代謝產物較不利。且這四種穀物殺菌後會形成糊狀，在以攪拌式發酵槽做規模放大培養時較不理想，因此改採用磨成粉添加的方式來進行培養，基質培養基還是以麥糠為主，如此較容易實現規模放大的理想。

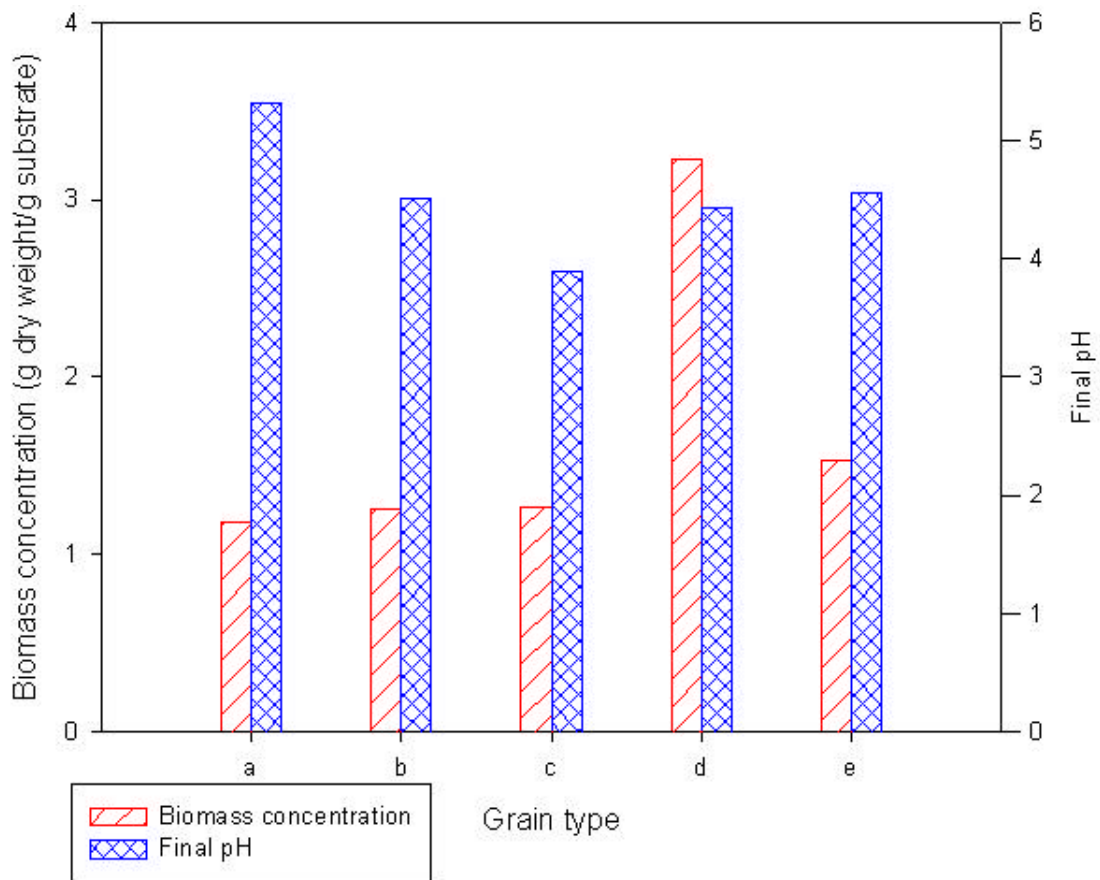


Fig.5-16 添加不同天然穀物養分對靈芝菌絲生長之影響

a:基礎培養基

b:基礎培養基+4%燕麥(oat)

c:基礎培養基+4%蕎麥(buckwheat)

d:基礎培養基+4%大薏仁

e:基礎培養基+4%小薏仁

培養條件：

(1)菌種：CCRC 36123

(2)接菌量：液態種源 5ml

(3)培養溫度 30、培養 7 天

(4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，分別添加 4% 燕麥、4% 蕎麥、4% 大薏仁、4% 小薏仁，並添加 25ml 蒸餾水

實驗十六：木屑添加量對靈芝菌絲生長之影響

結果：

本實驗最主要是探討木屑的添加量對靈芝生長的影響。分別添加 0.25g、0.5g、1g、2g 的相思木屑到麥糠基礎培養基，置於 30 的恆溫培養箱中培養 7 天，結果如 Fig.5-17 所示。結果以添加 1g 木屑對菌絲生長最有利，菌絲生長較快，且二次代謝產物分泌也較多，菌量可達到 1.35g dry weight/g substrate。但整體而言，添加木屑對於菌絲生成並無明顯的幫助，若以生成菌絲製成健康食品的觀點考量，則應添加可食用性的穀物，而不添加木屑。

若將添加木屑的培養基繼續培養至三~四個星期，則會出現橘紅色之菌絲表面(如照片五、六)，菌絲表面完全被所分泌的代謝產物覆蓋，尤其木屑添加量越多，二次代謝產物分泌量越多。且菌絲會有結塊現象，推測添加木屑將有助於菌絲分泌代謝產物，且較易出現分化組織。

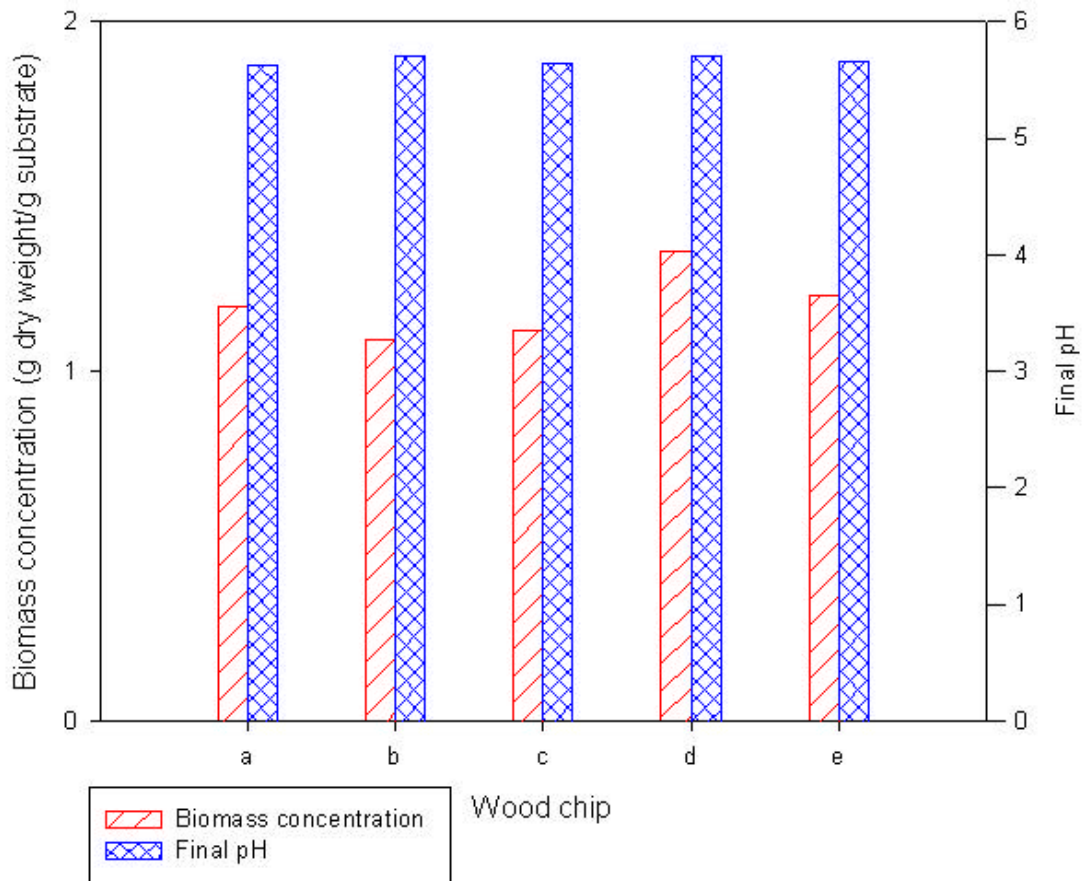


Fig.5-17 木屑添加量對靈芝菌絲生長之影響

a:基礎培養基

b:基礎培養基+0.25g 木屑

c:基礎培養基+0.5g 木屑

d:基礎培養基+1g 木屑

e:基礎培養基+2g 木屑

培養條件：

(1)菌種：CCRC 36123

(2)接菌量：液態種源 5ml

(3)培養溫度 30 、培養 7 天

(4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，分別添加 0.25g 木屑、0.5g 木屑、1g 木屑、2g 木屑，並添加 25ml 蒸餾水

5-2 三角瓶試驗

5-2-1 三角瓶通氣試驗

實驗十七：不同表面通氣量對靈芝菌絲生長之影響

結果：

本實驗主要是利用三角瓶大小的不同來探討表面通氣效應對固態菌絲生長的影響。若以不同容積的三角瓶裝入同體積的固態培養基，其接觸空氣的表面積會隨著瓶子的增大而增加。

以 10g 基質加 50ml 水當作固態培養基，以液態方式接菌接 10ml 菌液到固態培養基中，分別以 250ml、500ml 及 1000ml 三角瓶培養，置於 30 的恆溫培養箱中培養 14 天，結果如 Fig.5-18 所示。結果顯示，表面通氣面積對菌絲生長有著很重要的影響。以 1000ml 三角瓶培養，菌絲接觸空氣的面積最多，生長最佳，且基質層薄，菌絲容易深入基質層中生長，其菌體濃度可達到 0.97g dry weight/g substrate。相反的，若以 250ml 三角瓶培養，則因為表面通氣面積小，菌絲無法深入基質底層生長，所以菌絲只集中在表層生長，基質底層則幾乎沒有菌絲生長的跡象，故菌體濃度只有 0.24 g dry weight/g substrate，遠低於 1000ml 三角瓶培養之菌體濃度，可見通氣面積對菌體濃度具有決定性的影響。

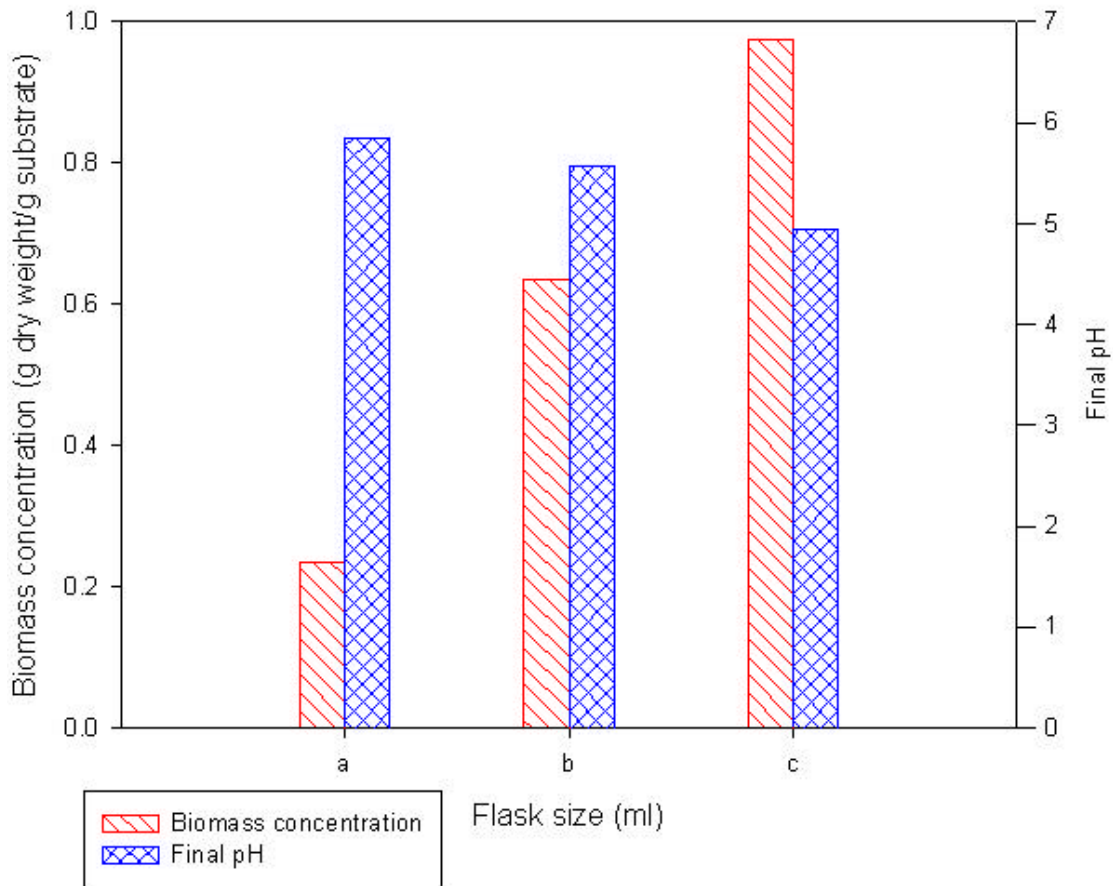


Fig.5-18 不同表面通氣面積對靈芝菌絲生長之影響

- a. 250ml 三角瓶
- b. 500ml 三角瓶
- c. 1000ml 三角瓶

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 10ml
- (3)培養溫度 30 、培養 14 天
- (4)在三角瓶中裝 10g 基質培養基，添加 50ml 蒸餾水

5-2-2 三角瓶攪拌試驗

實驗十八：攪拌頻率對靈芝菌絲生長之影響

結果：

本實驗主要是以三角瓶試驗攪拌頻率對固態菌絲生長的影響。以 10g 基質加 20ml 水當作固態培養基，以液態方式接菌接 10ml 菌液到固態培養基中，以 250ml 三角瓶培養，置於 30 的恆溫培養箱中培養 14 天，結果如 Fig.5-19 所示。結果顯示，攪拌對菌絲真的具有強烈的影響，攪拌頻率太高或不攪拌皆對菌絲生長不利，攪拌頻率太高會造成菌絲斷裂，使得菌絲生長不佳；相反的，不攪拌造成菌絲無法完全長入基質中，同時基質層中的氧氣不足，也不利菌絲生長。結果以 2 天攪拌一次對菌絲生長比較有利，菌體濃度可達 0.87g dry weight/g substrate。若每天攪拌，則因嚴重傷害菌絲，故菌體濃度不高，只有 0.79 g dry weight/g substrate，比不攪拌還差。培養過程中若不攪拌，則其菌體濃度為 0.84 g dry weight/g substrate。

就外觀來看，也可明顯的發現，天天攪拌的三角瓶，其中的菌絲生長狀況很差，氣生菌絲才剛生長起來又被機械攪拌絞斷，因此幾乎看不到白色的氣生菌絲。而不攪拌三角瓶當中，菌絲生長狀況雖然不錯，但只生長在基質表層附近，無法生長入基質深層，至於兩天攪拌一次的三角瓶，菌絲生長則較佳，其菌絲可在沒攪拌的期間內再次發芽生長，其生長範圍也可到達基質深層。因此攪拌頻率要適中才能有利菌絲生長，且攪拌頻率要隨培養容器尺寸與基質量的多寡隨時做調整。

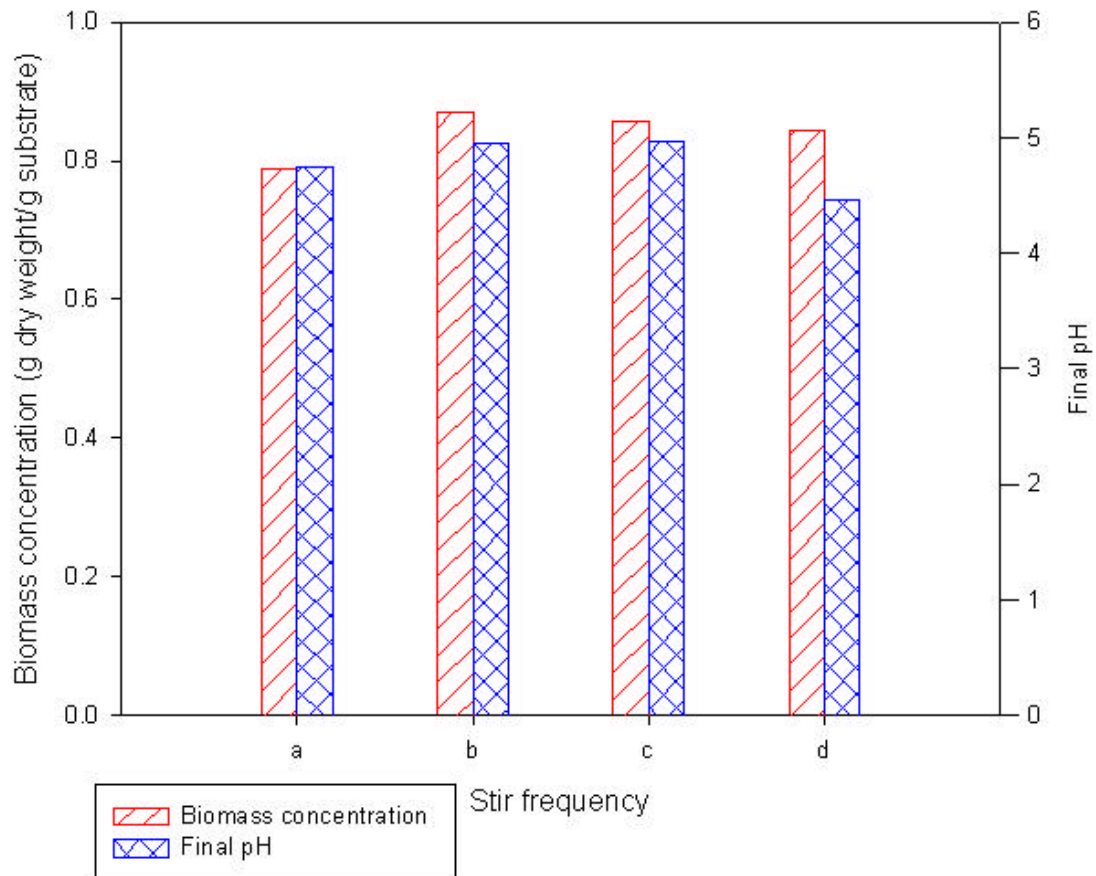


Fig.5-19 攪拌頻率對靈芝菌絲生長之影響

- a. 1 天攪拌一次
- b. 2 天攪拌一次
- c. 3 天攪拌一次
- d. 無攪拌

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 10ml
- (3)培養溫度 30 ，培養 14 天
- (4)在 250ml 三角瓶中，裝入 10g 基質培養基，添加 20ml 蒸餾水
- (5)以刮杓攪拌，一次攪拌 10 秒

5-2-3 三角瓶先液後固試驗

實驗十九：先液後固對靈芝菌絲生長之影響

結果：

本實驗是在液態培養 5 天、7 天、9 天後，加入 10g 殺過菌的的固態培養基，並攪拌均勻，使基質與菌種充分混合，繼續培養到第 16 天，觀察菌絲生長的情況。目的是在模擬大量接菌到固態培養基中培養的試驗。結果顯示，在液態培養 7 天後，加入固態培養基，菌絲生長最佳，菌體濃度可達 1.42g dry weight/g substrate。

此先液後固實驗，相當於在固態培養基中接入大量的菌種，因此，菌體都生長的相當不錯。但由於液態菌液太多了，使得基質過於潮濕，一直要等到接入後第 2 天才會有少數幾點白色氣生菌絲出現在基質表面，但一旦液態菌絲成功地轉變成氣生菌絲的形態後，便生長得非常迅速，到了第 16 天收菌時，菌絲都已經長滿基質到縫隙中，且在基質表面的菌絲也長得很豐滿，並有向上生長的趨勢，甚至形成一大塊菌絲層，其表面也有分泌黃色代謝產物，甚至有些許分化的現象。

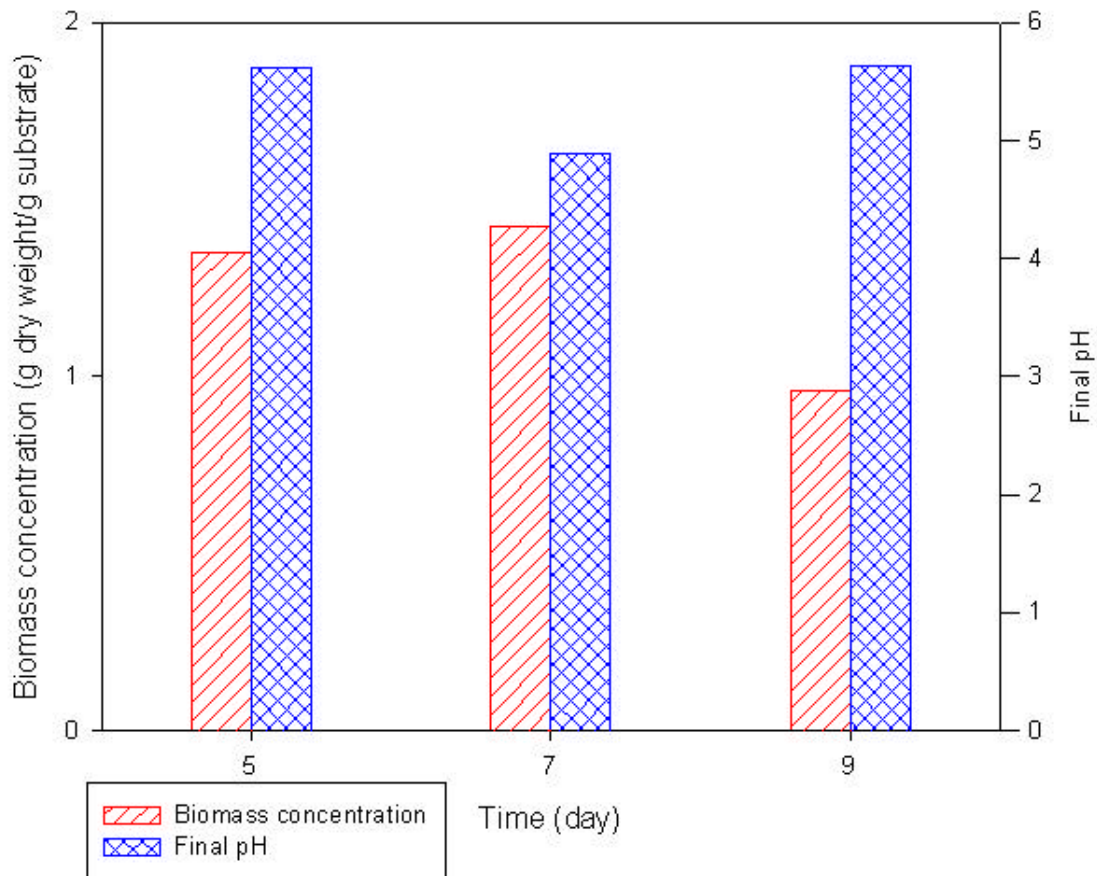


Fig.5-20 先液後固對靈芝菌絲生長之影響

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 50ml
- (3)培養溫度 30 ，分別培養到第 16 天
- (4)液態培養之菌量 50ml，在培養 5、7、9 天後，分別裝入 10g 滅過菌的基質培養基

5-2-4 三角瓶模擬填充床反應器之試驗

實驗二十：利用三角瓶模擬填充床發酵槽之研究

結果：

本實驗嘗試以三角瓶模擬填充式生物反應器來作放大培養，並觀察菌體隨時間生長的情形，其裝置圖如照片九。首先在 4 個 250ml 三角瓶底部裝入鐵絲圈，使得底部空出一些通氣空間，上面再加入 15g 的麥糠、3g 大薏仁、3g Fructose、3g 麥芽萃出物、1g 木屑，添加 100ml 蒸餾水，最後再接入 15ml 菌液，從底部通氣，通氣量為 1LPM，置於 30℃ 下培養，於不同天數取樣分析，結果如 Fig.5-21 所示。結果發現，當菌絲體培養到了第 12 天，菌體濃度才有顯著的增加。而到了第 15 天，菌絲已經有明顯的分化現象了，會有子實體原基出現，菌絲會結成塊，而不再呈絲狀。當培養至 21 天時，菌體濃度可達到 1.51g dry weight/g substrate。由於分析是以三角瓶批示進行，因此在菌絲密度上並無連續之關係。

此結果明顯比培養皿之結果還低，這是由於培養皿的基質層幾乎為單層，因此菌絲可以輕易的長滿整個基質層，而於此三角瓶的培養中，由於基質層很厚，故菌絲不容易充分長滿基質層，因此雖然添加其他養分，其菌絲濃度還是無法達到很高。由此可見培養之容器形狀、大小都會影響菌絲的生成。

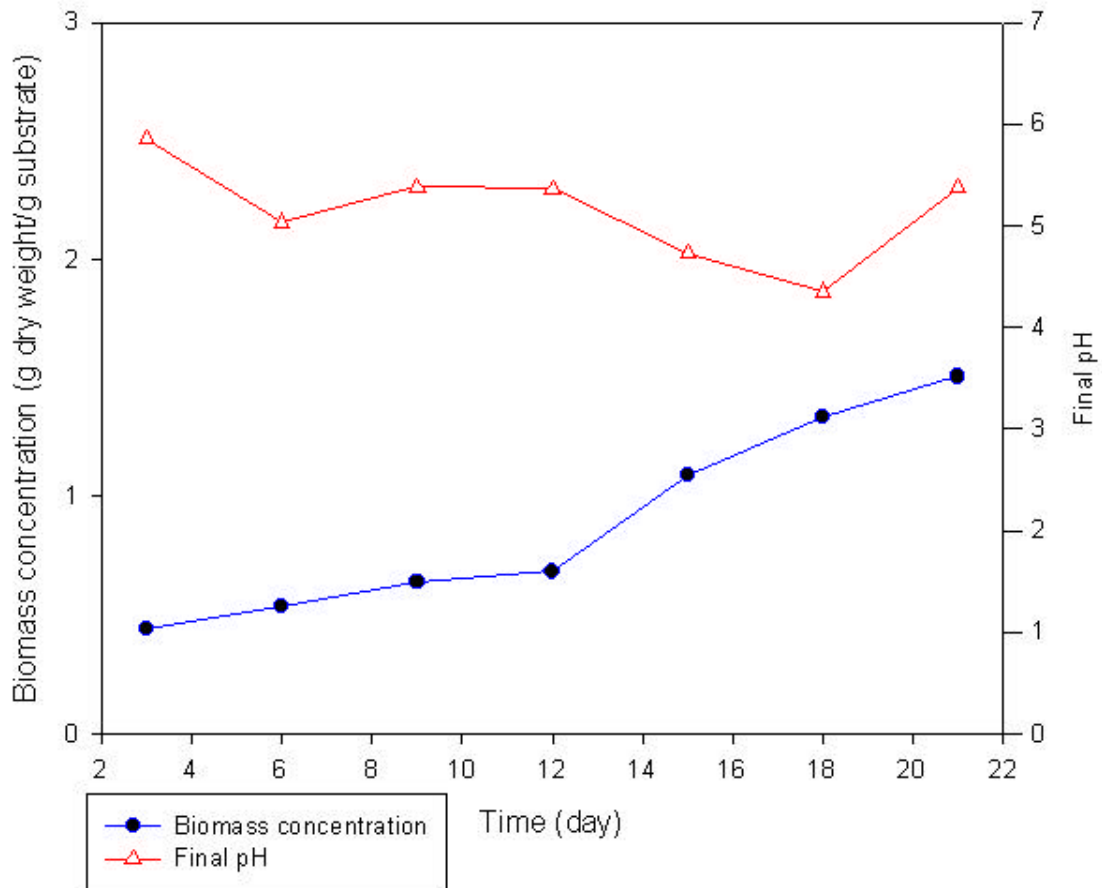


Fig.5-21 填充式生物反應器中時間對靈芝菌絲生長之影響

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：15ml
- (3)培養溫度 30 ，培養 1~21 天
- (4)在 250ml 三角瓶中裝 25g 固態培養基，添加 100ml 蒸餾水
- (5)固態培養基成分：麥糠 15g + 蒸餾水 100ml + 3g 大薏仁 + 3g Malt extract + 3g Fructose + 1g 木屑

5-3 發酵槽試驗

實驗二十一：利用發酵槽模擬填充床反應器與攪拌式反應器之研究

結果：

由 Fig.5-22 可知，攪拌式反應器明顯優於填充床反應器(如照片十三、十四)。這顯示攪拌式反應器的攪拌對菌體生長有絕對的影響。雖然只是每天翻面，就足以使基質縫隙的氣體達到氣體交換的目的，新鮮空氣便可再次提供菌體吸收，而二氧化碳也可藉此機會排出，翻面的同時配合通氣，可大大提高氣體交換的效率。對攪拌式反應器而言，菌體濃度可以達到 0.80g dry weight/g substrate，而對填充床反應器而言，菌體濃度只有 0.70g dry weight/g substrate。

但若就生產代謝產物來看，則以填充床發酵槽較佳，填充床發酵槽培養，其菌絲濃度雖較不均勻，但其菌絲為靜態，緊密交纏的機會較大，分化的機會也較多，培養到第九天，便可見菌絲分泌大量黃色液體，且表層菌絲會由白色變橘紅色，推測此現象是所分泌的代謝產物所造成的，也或許此菌絲已有某些程度上的分化了。而攪拌式發酵槽其菌絲濃度較均勻，但培養過程中菌絲只分泌出黃色液體，其菌絲並未變色。

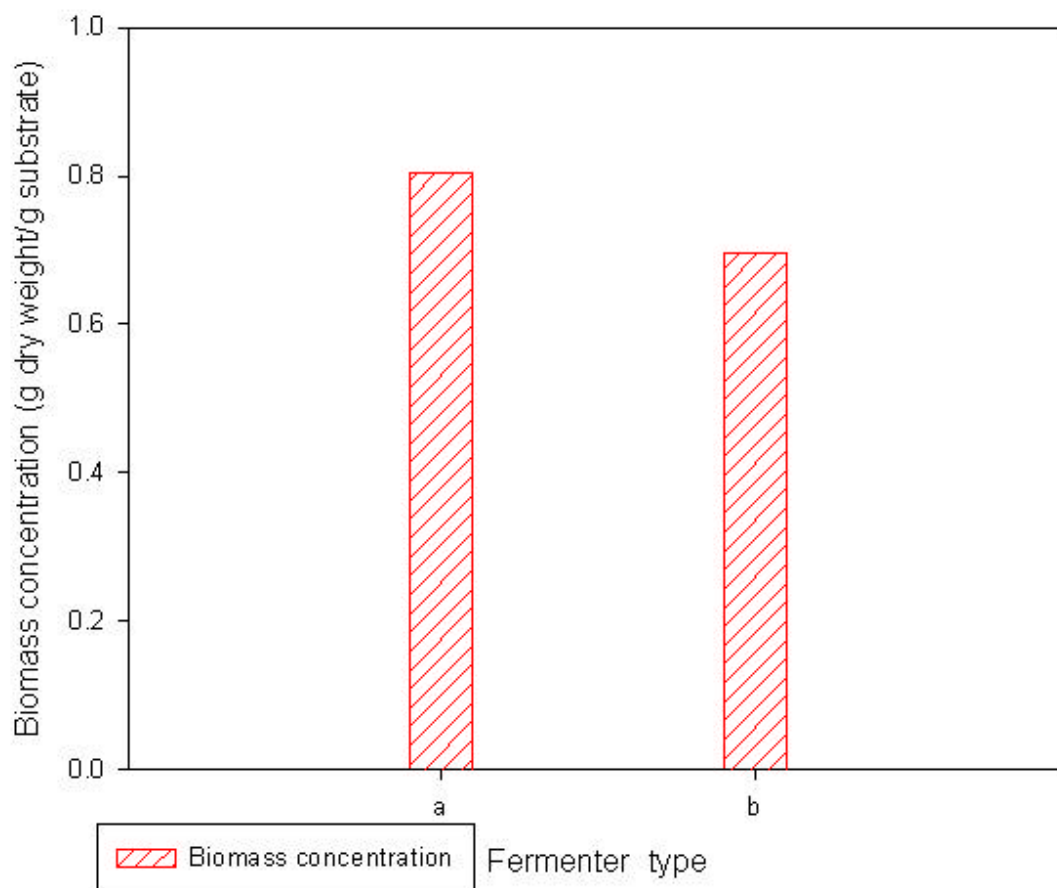


Fig.5-22 填充床與攪拌式發酵槽中靈芝菌絲生長之情形

- a: 攪拌式反應器
- b: 填充床反應器

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：200ml
- (3)培養溫度 30 ，培養 14 天
- (4)在發酵槽中分別裝 200g 基質培養基，添加 400ml 蒸餾水

實驗二十二：探討不同發酵體積攪拌式發酵槽中靈芝菌絲生長之情形
結果：

由 Fig.5-23 可知，發酵體積越大，其菌體濃度越低。這顯示發酵體積對菌體生長有絕對的影響。對於同體積的發酵槽而言，發酵體積越大，接觸氣體的表面積就越小，雖然透過強制通氣與翻面，但還是無法避免基質結塊的現象，造成菌體生長不良。對 200g 的發酵體積而言，菌體濃度可以達到 0.80g dry weight/g substrate，而對 300g 的發酵體積而言，菌體濃度只有 0.63g dry weight/g substrate。

曾經進行攪拌速率為 1rpm 與 5rpm 之連續攪拌試驗，但菌絲生長的情形都很差，在 5rpm 之連續攪拌培養中，液態菌絲幾乎無法轉變為氣生菌絲的形態，維持在液態菌絲的形態，一直要培養到第 6 天後才會出現少許氣生菌絲。而轉速 1rpm 的實驗中，攪拌速率低，在培養到第 3 天，有些許液態菌絲可轉變成為氣生菌絲的形態，但由於連續攪拌，菌絲還是無足夠喘息的機會，因此大部分菌絲都還是維持在液態菌絲的形態。而不攪拌時，菌絲雖可生長的不錯，但卻不能均勻的生長在基質中，基質底層的菌絲形態仍為液態菌絲，只有基質表層為氣生菌絲，培養到末期，甚至會形成一大塊一大塊的基質塊，菌絲只能生長在其基質塊之表層附近，無法深入其中生長。

最後選擇用手動的方式來轉動攪拌葉，並溫柔的緩慢轉動，轉動次數為 5 次，類似只有翻面的動作，結果大部分的液態菌絲均能順利將形態轉變為氣生菌絲，且配合通氣和翻面，已可使得菌絲生長入基質層中，當培養到了第六天，基質便會形成一顆一顆的小球狀，外部都被氣生菌絲所包圍，有些菌絲甚至都可生長到基質球中。以此種翻面的方式培養，已經可使菌絲的固態培養更完善，更容易實現大規模培養。此實驗雖然沒有明確的數據，但由培養中的觀察，確定以此翻面的動作代替連續攪拌，其培養更容易達到大規模生成菌絲的目標。

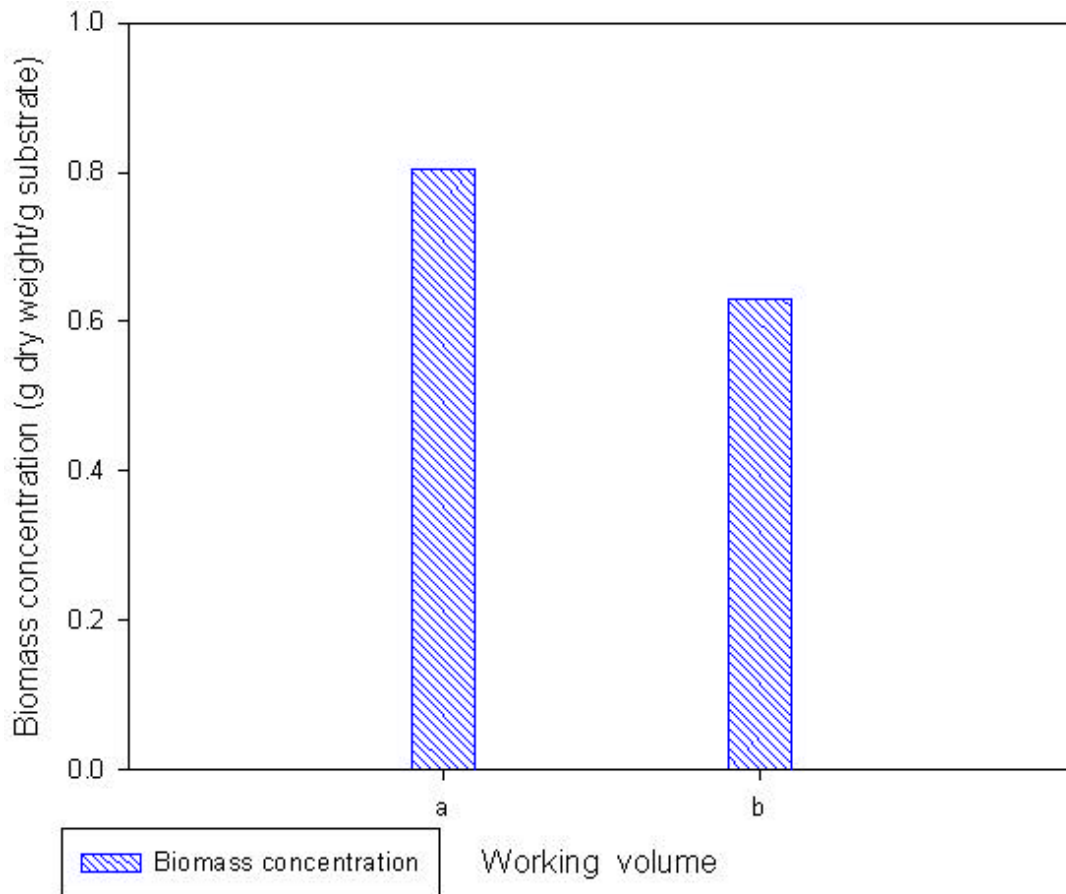


Fig.5-23 不同發酵體積攪拌式發酵槽中靈芝菌絲生長情形

a: 200g substrate +400ml water +200ml inoculum

b: 300g substrate +600ml water +300ml inoculum

培養條件：

(1)菌種 CCRC 36123

(2)培養溫度 30 ，培養 14 天

5-4 多醣分子量分佈試驗結果

5-4-1 靈芝液態培養菌絲球及固態培養菌絲體之多醣分子量分佈比較

由 Fig.5-24、5-25 可知，由固態培養之靈芝菌絲體與液態培養之菌絲球，其多醣分子量分佈有蠻大的差異，由固態培養之氣生菌絲，其多醣分子量有比較大的趨勢，比起液態培養之多醣分子量，明顯多了 2000~3000000 之大分子量多醣。據文獻推測此固態培養菌絲體生成之靈芝多醣，較具有抗癌的效果。

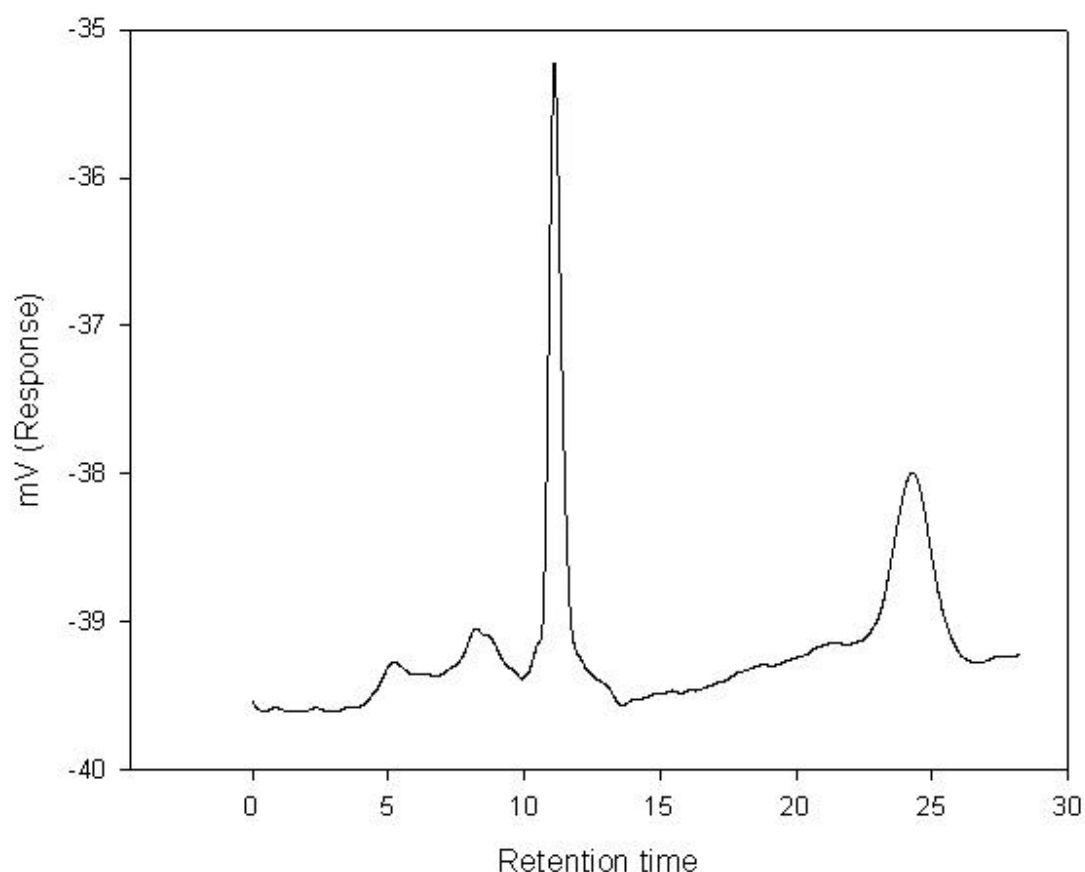


Fig.5-24 靈芝固態培養 14 天之菌絲體之多醣分子量分佈

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)培養溫度 30 ，培養 14 天
- (3)樣品取自填充床反應器(如照片十一)，基質培養基為麥糠與蒸餾水，料水比為 1：2

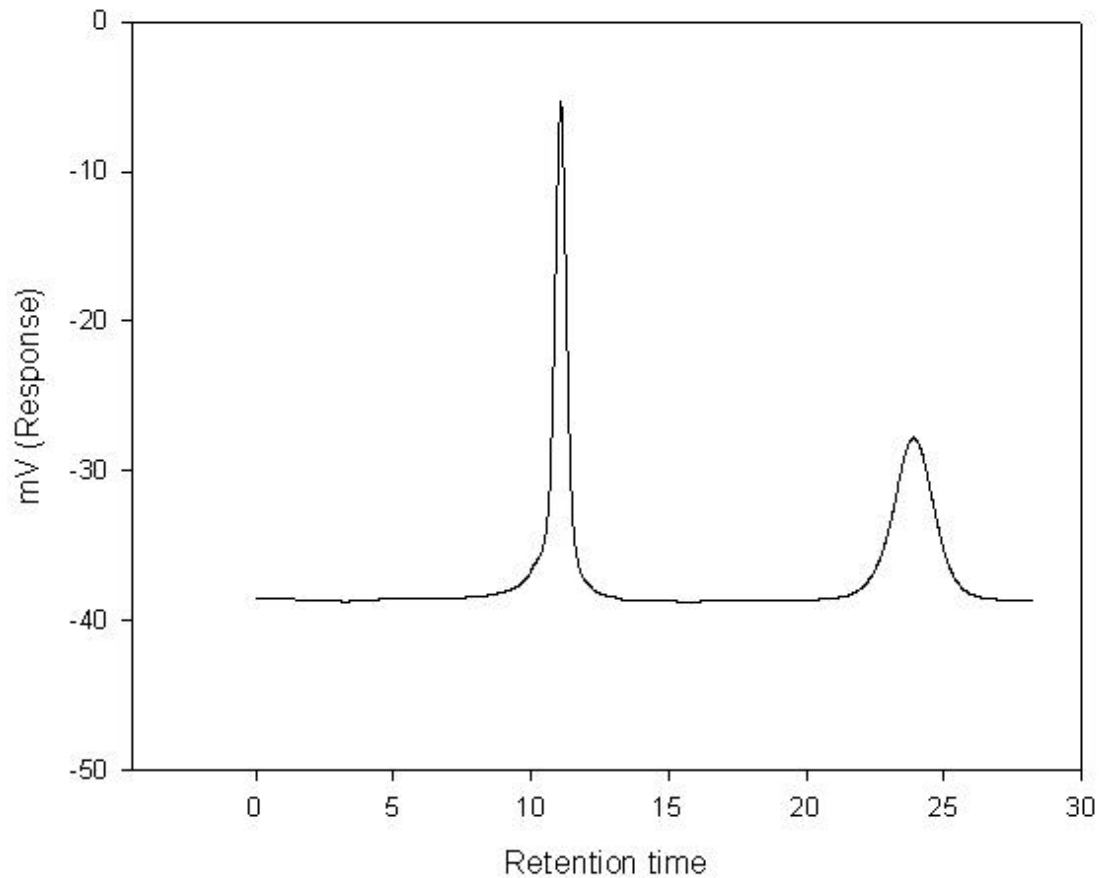


Fig.5-25 靈芝液態培養 14 天之菌絲球之多醣分子量分佈

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 5ml
- (3)培養溫度 30 ，培養 14 天
- (4)液態培養基：3 % 葡萄糖、0.1 % 酵母萃出物、0.153 % 氯化銨、0.05 % 磷酸二氫鉀、0.05 % 磷酸氫二鉀、0.05 % 硫酸鎂

5-4-2 固態培養靈芝-小麥發酵物隨時間變化之多醣分子量分佈

由固態培養靈芝-小麥發酵物與純麥糠、靈芝子實體之多醣分子量分佈圖 (Fig.5-26~5-31)比較可明顯的發現固態培養靈芝多醣之生成機制，初步可以斷定靈芝菌吸收基質麥糠之某分子量多醣養分，分泌靈芝多醣，且靈芝多醣與基質多醣分子量分佈不太一樣，推測其結構也不一樣。菌絲體之多醣分子量會隨著時間而有所變化，最後會逐漸集中在某分子量區間，且趨向於靈芝子實體之多醣分子量。靈芝會分解並吸收麥糠多醣，分泌分子量小的靈芝多醣，最後聚合成分子量大的靈芝多醣。

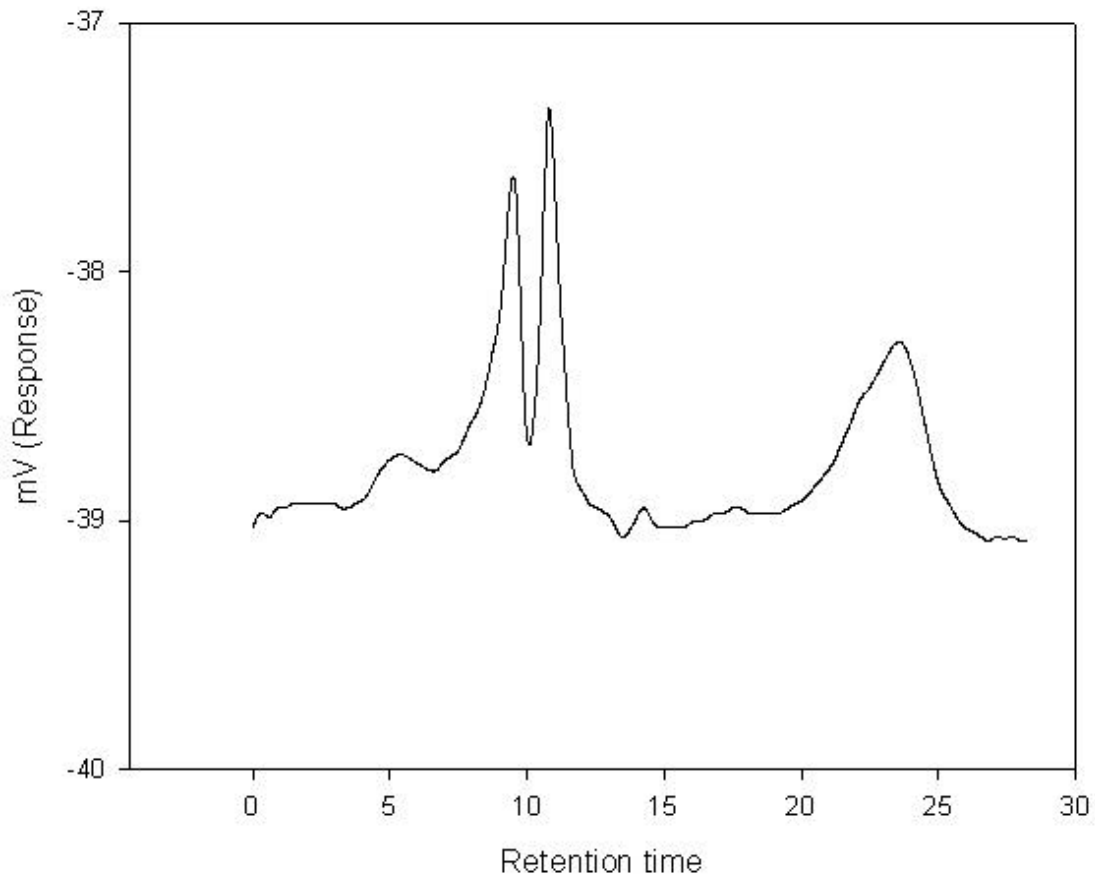


Fig.5-26 純麥糠基質之多醣分子量分佈

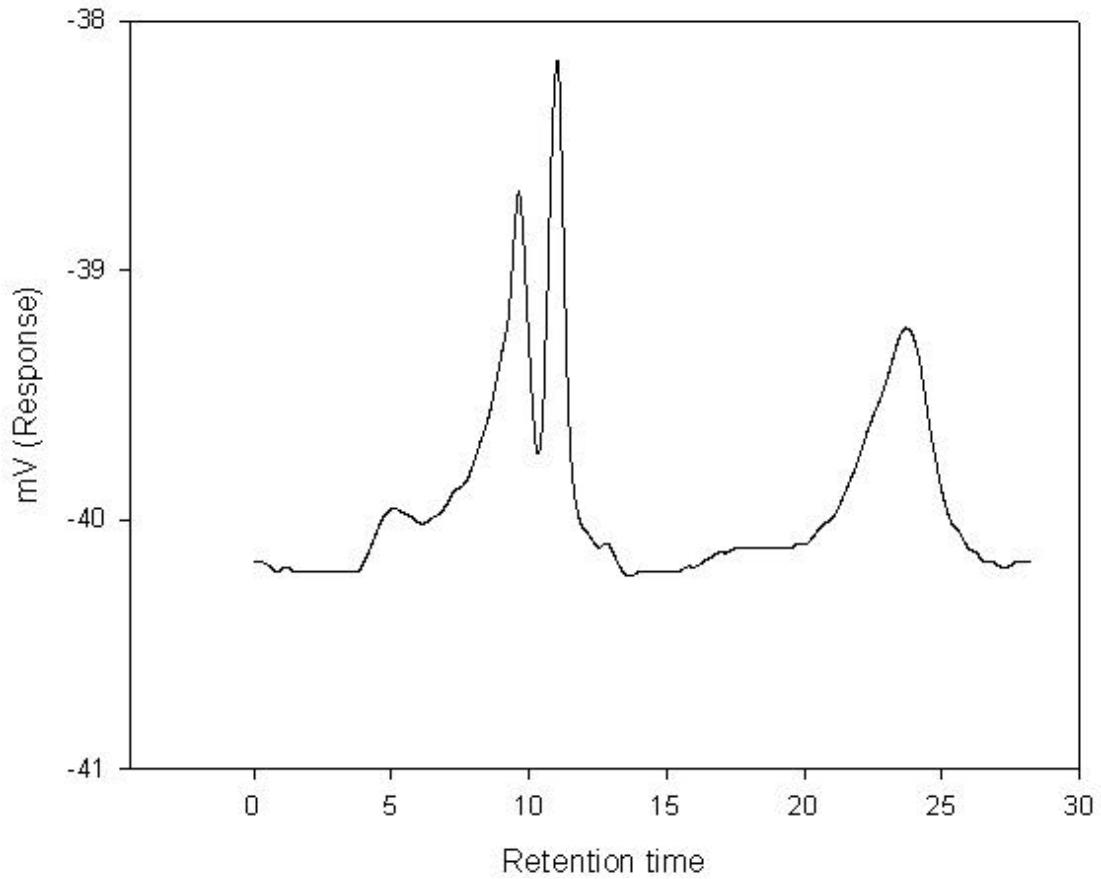


Fig.5-27 固態培養七天之靈芝-小麥發酵物多醣分子量分佈

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 5ml
- (3)培養溫度 30 ，培養 7 天
- (4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，添加 25ml 蒸餾水

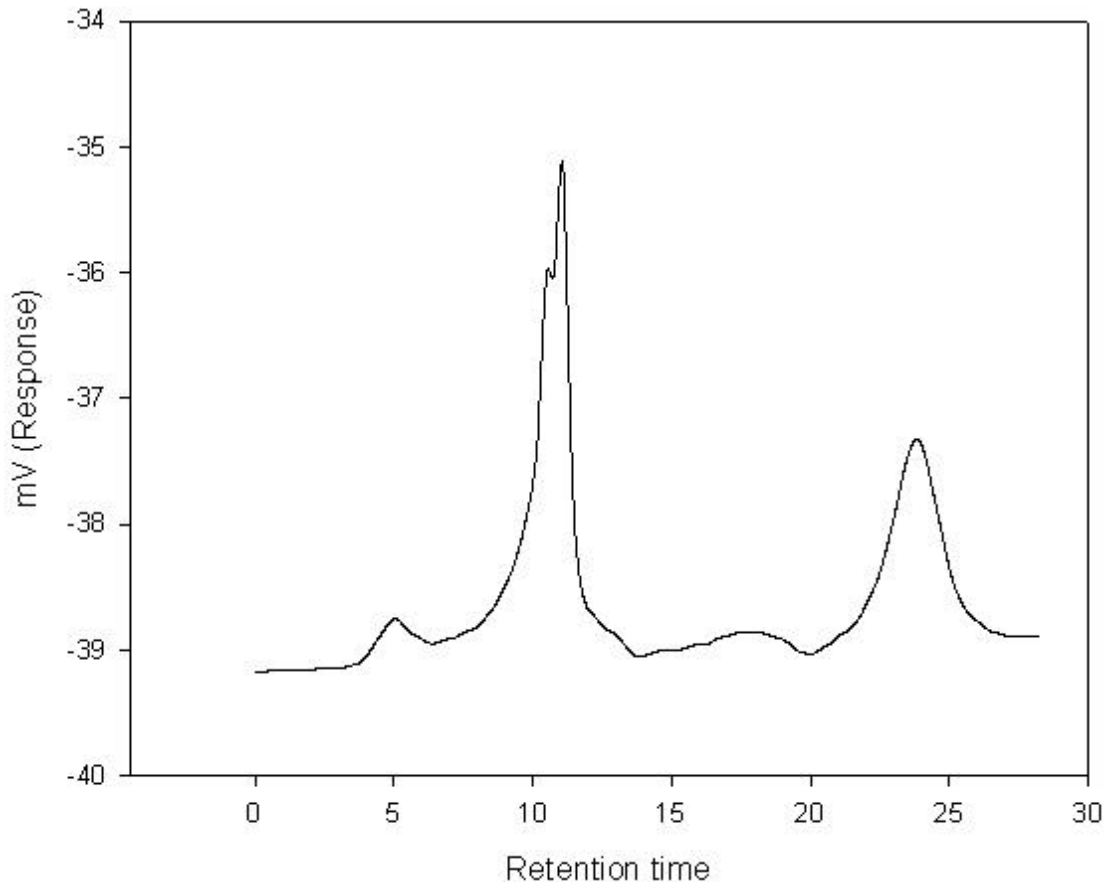


Fig.5-28 固態培養 14 天之靈芝-小麥發酵物多醣分子量分佈

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 5ml
- (3)培養溫度 30 ，培養 14 天
- (4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，添加 25ml 蒸餾水

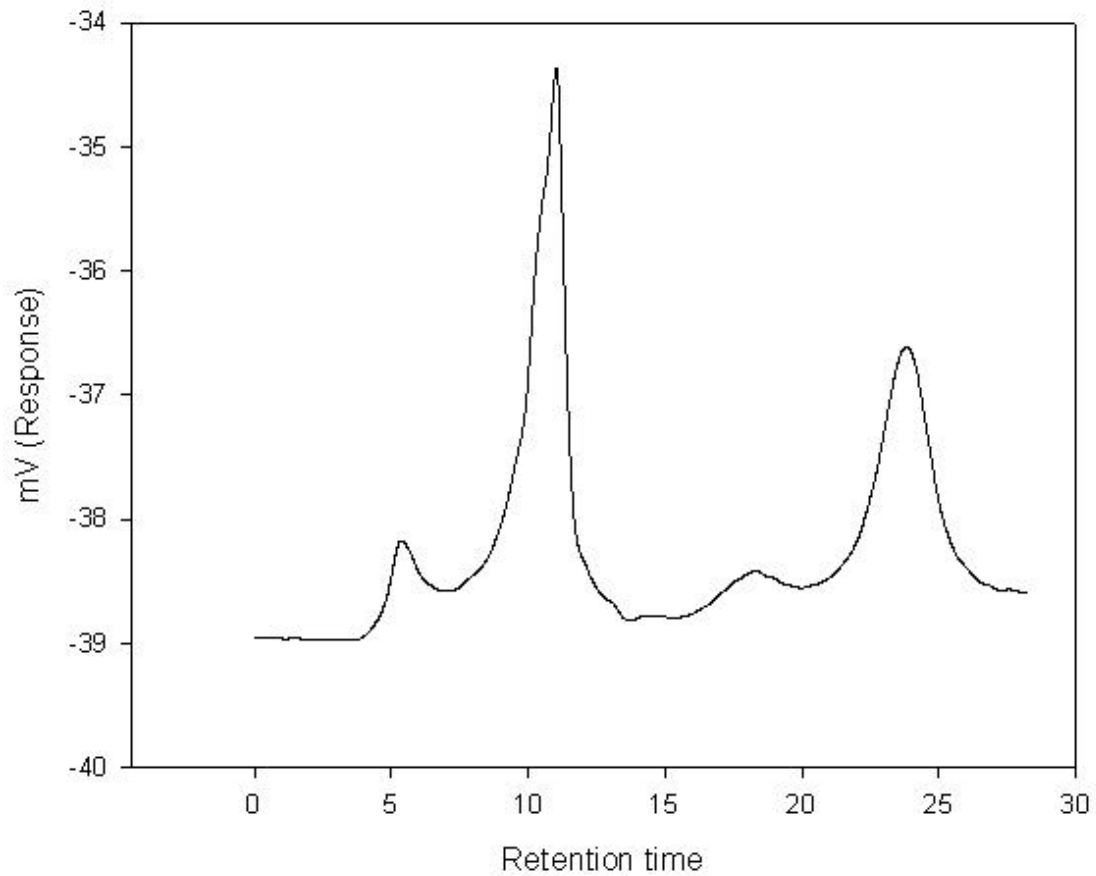


Fig.5-29 固態培養 17 天之靈芝-小麥發酵物多醣分子量分佈

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 5ml
- (3)培養溫度 30 ，培養 17 天
- (4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，添加 25ml 蒸餾水

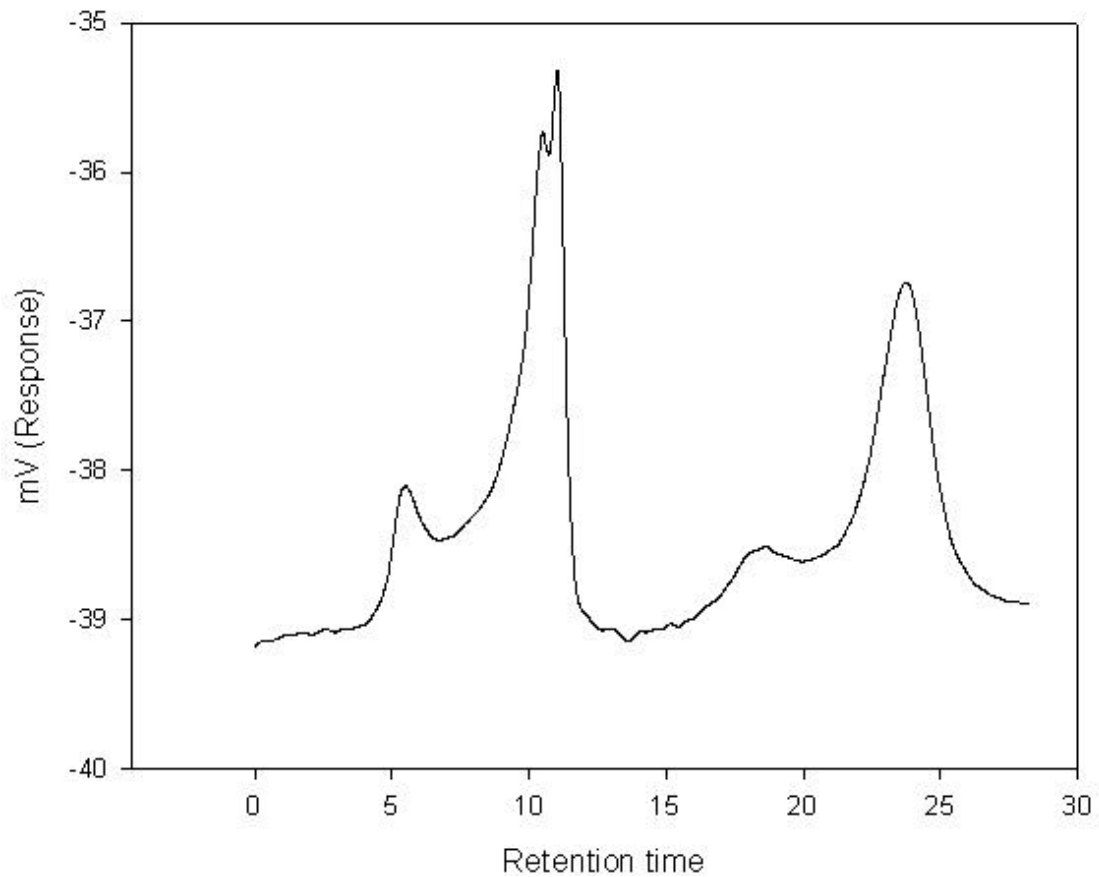


Fig.5-30 固態培養 20 天之靈芝-小麥發酵物多醣分子量分佈

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 5ml
- (3)培養溫度 30 ，培養 20 天
- (4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，添加 25ml 蒸餾水

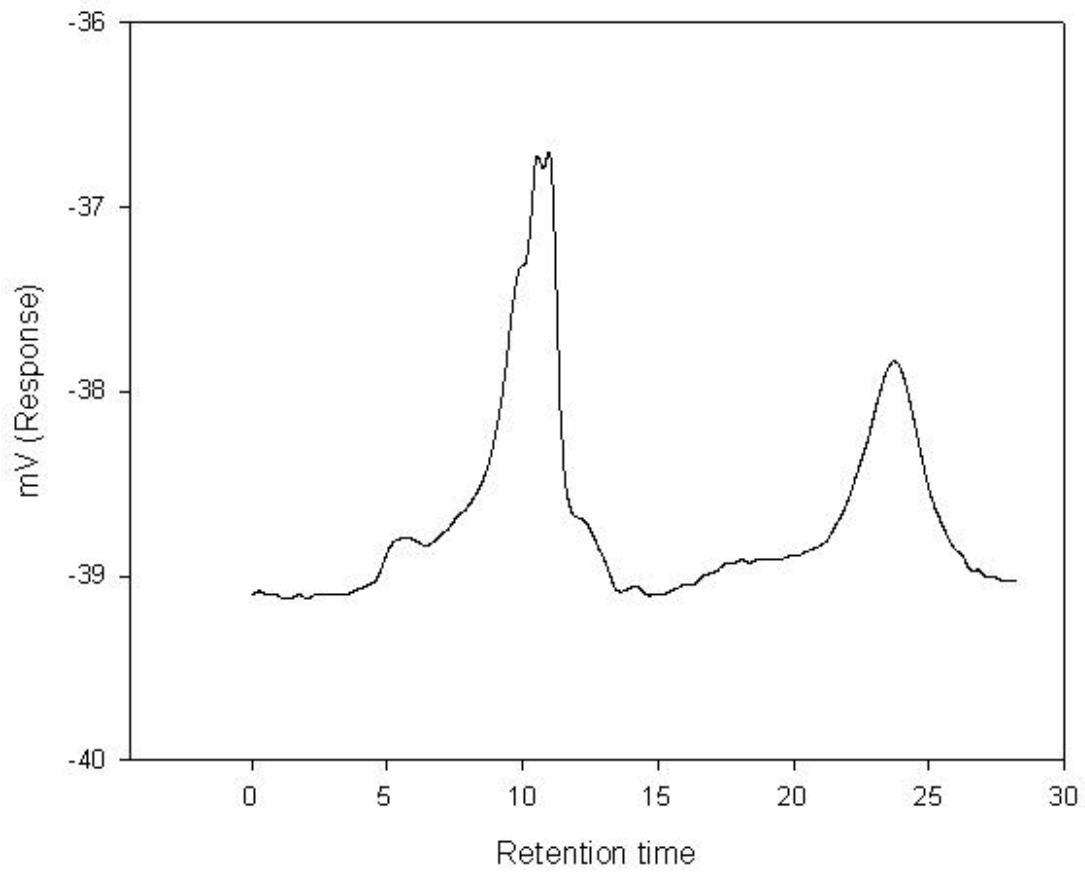


Fig.5-31 靈芝子實體之多醣分子量分佈

培養條件：

(1)菌種：CCRC 36123

(2)培養溫度 30

5-5 靈芝酸分析試驗結果

由 Fig.5-35、Fig.5-33 可知，靈芝-小麥發酵物的成分濃度比麥糠低，故推測其成分間的轉換也類似多醣轉換機制，其中有些小麥之成分被靈芝菌分解利用，生成靈芝特有的靈芝酸成分。就 Fig.5-32 與 Fig.5-33 來看，由於固態培養時間遠短於子實體，且靈芝酸成分的形成機制是因時間累積不斷修飾轉變而成的，故固態菌絲之成分明顯的比子實體成分少了許多，不能看出其成分是否趨向於子實體，其成分峰雖然不像子實體那麼多、那麼明顯，但相信其中有些成分是因為濃度太低而成份峰不明顯。固態菌絲體相對於子實體的培養時間少很多，當然靈芝酸種類會比較少，量也會比較少，且因靈芝酸種類也是一開始由少數幾種靈芝酸加以修飾，改變其結構而生成較多靈芝酸種類的。

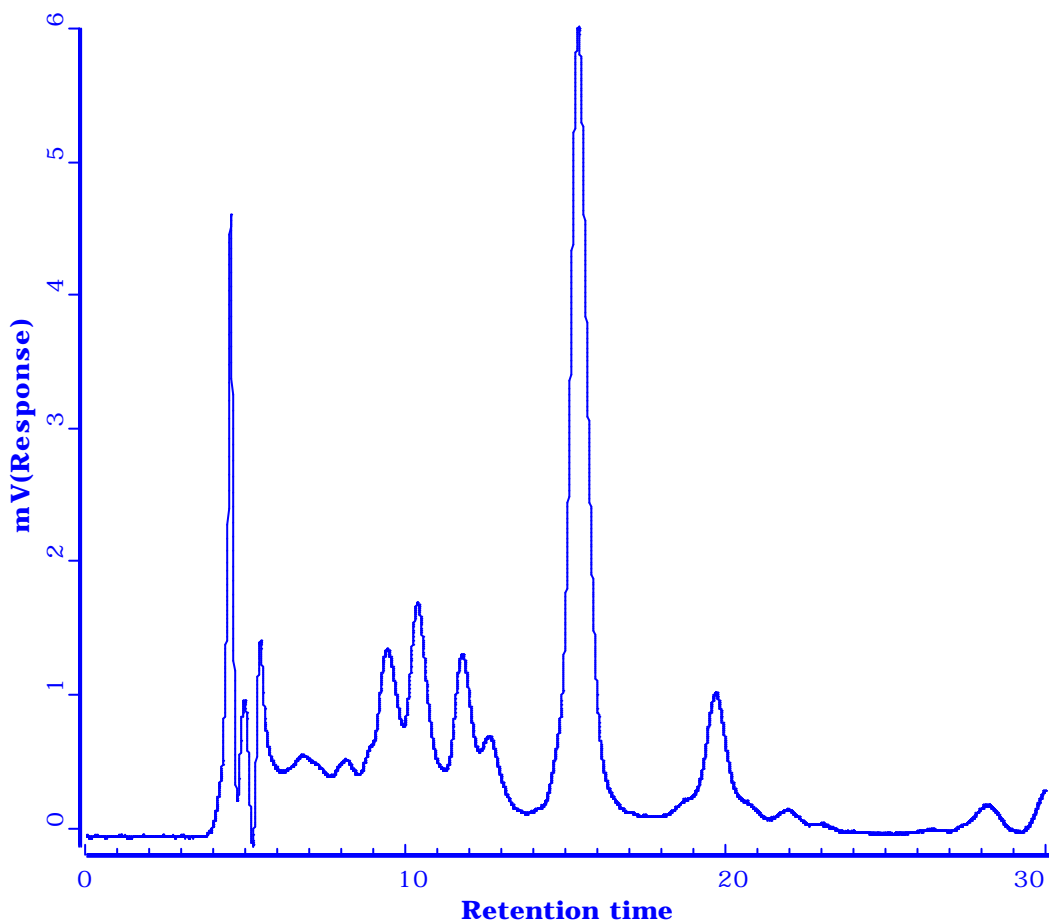


Fig.5-32 靈芝子實體靈芝酸成分分佈

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)培養溫度 30

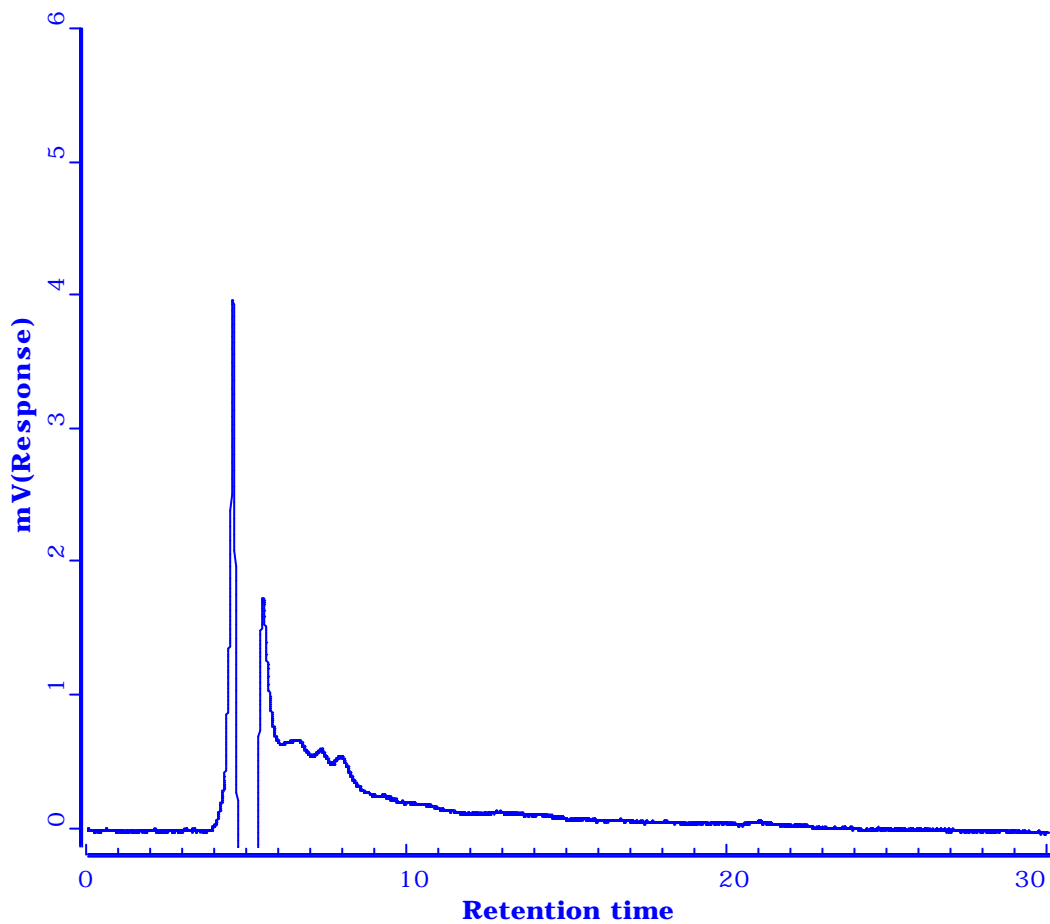


Fig.5-33 固態培養 14 天靈芝-小麥發酵物靈芝酸成分分佈

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 5ml
- (3)培養溫度 30 ，培養 14 天
- (4)在玻璃培養皿中裝 5g 基質培養基，添加 25ml 蒸餾水

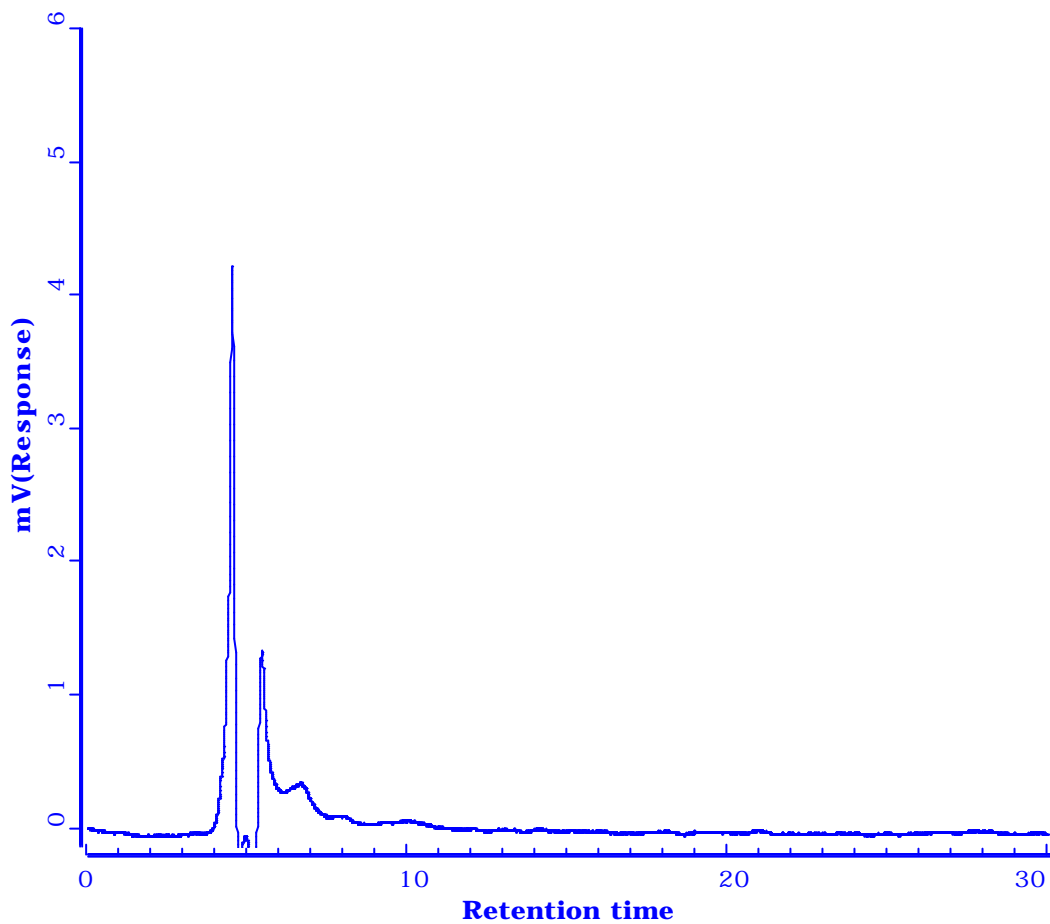


Fig.5-34 液態培養 14 天靈芝菌絲球靈芝酸成分分佈

培養條件：

- (1)菌種：CCRC 36123
- (2)接菌量：液態種源 5ml
- (3)培養溫度 30 ，培養 14 天
- (4)液態培養基：3 % 葡萄糖、0.1 % 酵母萃出物、0.153 % 氯化銨、0.05 % 磷酸二氫鉀、0.05 % 磷酸氫二鉀、0.05 % 硫酸鎂

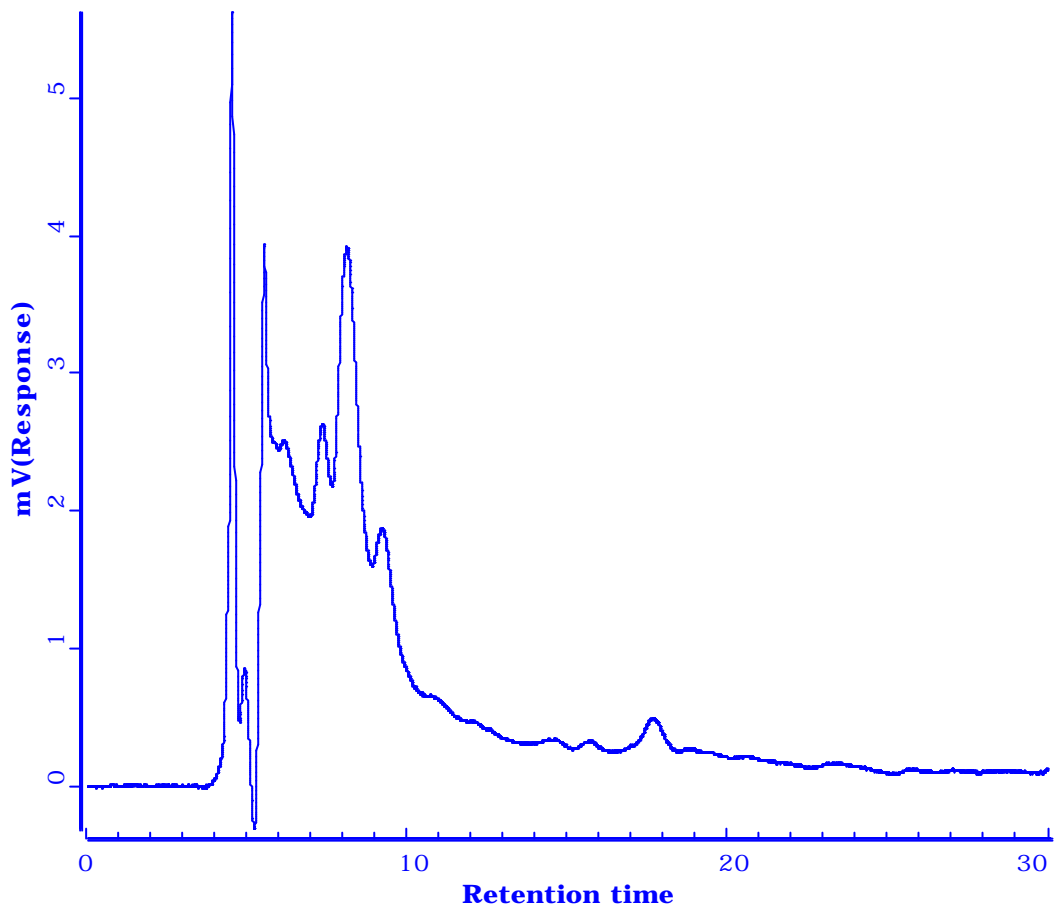


Fig.5-35 麥糠成分分佈

5-6 菌絲形態分析試驗結果

靈芝的擔子孢子自菌褶散出後，在適當的生長環境下萌發後直接發育成菌絲，此菌絲每一節中具有一個核，一般稱為初級菌絲或單相菌絲。初級菌絲在靈芝生活史中存在時間很短，它萌發和生長主要是依靠孢子中儲存的營養。由不同性別的擔子孢子所生成的初級菌絲融合後可生成具有二個核之菌絲，稱為次級菌絲或複相菌絲。由次級菌絲繼續生長最後形成有組織分化的子實體，凡是組成子實體的菌絲都稱為三級菌絲⁽³⁶⁾。

據文獻指出⁽⁵⁷⁾：僅具有生殖菌絲者為一次元菌絲，而二次元菌絲為同時具有生殖菌絲與骨骼菌絲或同時具生殖菌絲與纏繞菌絲，三次元菌絲則是同時具有生殖、骨骼、纏繞菌絲(如 Fig.5-36)⁽⁵⁷⁾。而骨骼菌絲與纏繞菌絲是由生殖菌絲分化形成的。



Fig.5-36 菌絲構造圖

子實體與固態培養之菌絲體，其菌絲結構很像，皆有纏成一塊之現象，由顯微鏡觀察發現，固態菌絲培養 14 天後會先出現少許的骨骼菌絲與纏繞菌絲(如照片十八、十九)，隨著培養時間增加，骨骼菌絲與纏繞菌絲的比例會增加。而子實體則是大部分為骨骼菌絲與纏繞菌絲(如照片二十一、二十二)，生殖菌絲已經非常少見了。子實體與固態培養之菌絲體，皆為三次元菌絲也是三級菌絲，推測所產生的代謝產物及酵素也類似。

由此可見，固態培養菌絲體同時具有生殖菌絲、骨骼菌絲、纏繞菌絲，是一種三次元菌絲，其原基結構已有分化，只差無出菇的現象，是一種三級菌絲。而液態培養之菌絲球，僅具有生殖菌絲及少數的骨骼菌絲，屬於二次元菌絲，並無分化現象，僅是次級菌絲。固態菌絲體與液態菌絲球，其菌絲形態不同，生理功能也不同，推測固態培養與液態培養菌絲所產生的代謝產物及酵素會有些許不同。

由顯微鏡觀察固態培養與液態培養之靈芝菌絲，其生殖菌絲皆有扣子體(如照片十七)，但因液態菌絲球之菌絲生長在液態環境中，無法緊密交纏在一起，是分化的一大阻礙，相反的，固態培養之菌絲體，因為以靜態的方式培養，又為氣生菌絲，菌絲較易緊密交纏在一起，因此很快就能有分化的組織出現，而此分化組織是菌絲體長成子實體的初始結構。由此結果更加肯定固態培養菌絲體是液態培養菌絲球分化為子實體之必經途徑。也可由此推斷固態菌絲體之靈芝酸成分涵蓋了子實體與菌絲球之靈芝酸的成分。

第六章 結論與展望

6-1 結論

6-1-1 菌體濃度分析

本研究重點在於利用玻璃培養皿與三角瓶固態培養，探討不同物理及化學環境因子，對靈芝菌絲體菌體濃度之影響。希望藉由培養因子的調整與控制增加靈芝菌的菌體濃度。最後再利用發酵槽嘗試規模放大的試驗。

整體而言，主要結果與討論如下：

一、目前靈芝的固態培養雖然是以太空包培養生產子實體，但是如能改以固態培養方式培養固態菌絲體，不僅可以縮短培養時間，生產的效益也可大為提升，對於環境的衝擊也能減少。固態發酵培養所提供的環境接近靈芝生長的天然環境，故推測其生長環境比液態培養更適合菌絲生長，進而增加菌絲的產量。

二、培養溫度與初始 pH 值方面：在最適生長溫度與初始 pH 值探討上，本研究結果在 25~35 為最適溫度，又以 30 為最佳。而初始 pH 值方面，由於基質的高緩衝性，所以不管初始 pH 值為何，都不會使最終 pH 有很大的變動。唯獨添加高濃度的氮源時，會使得 pH 下降。

三、表面通氣與攪拌方面：由於固態培養的質傳與熱傳難以達到均一性，故需藉由攪拌與通氣來促使熱傳與質傳均勻，而攪拌頻率不能太高，否則會對菌絲造成機械性傷害；而通入的氣體流速也不能太高，且通入的氣體必需飽和，否則基質會因水氣蒸發而乾燥；又因固態培養不像液態培養，其菌絲直接與空氣接觸，所以不需連續式的通氣，只需每天換氣一段時間，再配合間歇性的翻面就行了，故通氣速度與攪拌頻率的最佳值探討是不容忽視的。本研究通氣速度訂在 5LPM，每天通氣 5min，且每天翻面 5 次。

四、含水量與濕度方面：研究結果為最佳含水量為 66%~75%，也就是料水比為 1:2~1:3 之間。而空氣濕度方面，由於通入的氣體為飽和氣體，所以在 14 天內其空氣濕度都可維持在 85% 以上。

五、在氮源與碳源及無機鹽方面：以添加 4% Fructose 為最佳碳源，菌體濃度可達 1.56g dry weight/g substrate；添加 8% Malt extract 為最佳氮源，菌體濃度可達 1.84 g dry weight/g substrate；以添加 1% MgSO₄ · 7H₂O 為最佳無機鹽，菌體濃度可達 1.24 g dry weight/g substrate。但本研究最主要是以固態發酵規模放大為主，故主要以降低生產成本，生產高價值的產物為主。所以以天然的麥糠當基質，添加天然可食用之穀類為營養源，結果顯示添加大薏仁可使菌體生長最佳，且有明顯的幫助。

六、添加天然穀物方面：以添加大薏仁，菌絲生長最佳。因本研究最主要是以固態發酵規模放大為主，故主要以降低生產成本，生產高價值的產物為主。以低成本的天然穀物為添加養分，而放棄添加價格較高之碳氮源，且添加天然穀物，菌絲生長的比添加碳氮源好，因天然穀物同時含有高濃度的碳氮源成分。

七、添加木屑方面：由於木屑含有大量礦質元素，利用靈芝富集礦質元素能

力強的特點，將木屑中的礦質元素結合起來，因此添加木屑對於菌絲生長與菌量的形成雖沒有太大的幫助，但對於代謝產物的誘發卻有明顯的幫助，若將固態培養基添加少量木屑即可使靈芝菌絲在培養三星期後分泌大量代謝產物，可使之形成類似子實體菌蓋皮殼之紅棕色光澤漆面，如照片五、六，且有助於菌絲分化。

6-1-2 多醣分析

以酒精沈澱法沈澱多醣，發現固態培養之靈芝多醣無法以酒精沈澱，而以液態培養之靈芝菌絲球萃取液與發酵液皆能以四倍酒精沈澱出白色多醣。其中的機制雖不是很清楚，但以此推論固態靈芝發酵物之多醣與液態培養之靈芝多醣結構不同。

以酚-硫酸法測試，結果發現液態培養之多醣皆可以酚-硫酸分解，但固態發酵物之多醣卻無法以酚-硫酸完全分解，會出現分層的現象。推測固態發酵物之多醣結構較液態多醣複雜許多，且分子量有較大的趨勢。

由文獻得知(Fig.2-2)⁽⁵⁶⁾，靈芝多醣的結構會隨著不同萃取方式與靈芝部位而有不同。由 UV 所測出之液態培養靈芝菌絲球之多醣最大吸收波長為 490nm，而固態培養之靈芝發酵物之多醣其最大吸收波長為 486nm，由此可推論其所萃出之多醣結構不同。

從多醣的濃度與分子量分佈隨時間變化之圖，可以大膽的假設，菌絲一開始分解基質多醣，其後便開始分泌靈芝多醣，兩者的多醣結構與分子量也許不太相同，大概在第十天左右，靈芝多醣分泌到最大量，其後便開始進行多醣結構的修飾，菌絲將小分子多醣聚合成大分子多醣。

6-1-3 靈芝酸分析

根據日本醫學報導⁽⁵⁶⁾靈芝子實體之表皮、菌褶部、芽尖部皆含有三帖類。分別占了 20.4 %、61.5 %、12.8 %，表皮只占了菌褶部的三分之一，而芽尖部更少了。推斷固態培養菌絲體之紅棕色表面，其成分與子實體之表皮類似，因此，推測固態培養之菌絲體亦含有少量之三帖類。

由日本專利文獻⁽⁵⁵⁾得知，固態培養之靈芝菌絲體，其靈芝酸種類，包含了液態培養之菌絲球與子實體之靈芝酸種類，但並不一定每一種靈芝酸都有，但此結果就可使得固態培養菌絲體同時含有抗腫瘤與降血壓的療效。由此結果也可推斷靈芝酸種類之間的轉換機制，其三帖類大致上結構式都差不多，只是其中有幾個官能基會進行修飾與轉換，使得每一種靈芝酸的醫療效果不一樣。固態培養菌絲體之培養時間遠短於子實體，故其靈芝酸成分較少，但大致上可確定其生成機制為靈芝菌吸收基質成分，分泌特有的靈芝酸成分，時間一久，其成分也會趨向子實體之靈芝酸成分。由此結果也可推測固態培養菌絲體是液態培養菌絲球發展為子實體之必經途徑。

6-1-4 菌絲形態分析

子實體與固態培養之菌絲體，其菌絲結構很像，皆有纏成一塊之現象，由顯微鏡觀察發現，固態菌絲培養 14 天後會先出現少許的骨骼菌絲與纏繞菌絲(如照片十八、十九)，隨著培養時間增加，骨骼菌絲與纏繞菌絲的比例會增加。而子實體則是大部分為骨骼菌絲與纏繞菌絲(如照片二十一、二十二)，生殖菌絲已經非常少見了。子實體與固態培養之菌絲體，皆為三次元菌絲也是三級菌絲，推測所產生的代謝產物及酵素也類似。

固態培養菌絲體同時具有生殖菌絲、骨骼菌絲、纏繞菌絲，是一種三次元菌絲，其原基結構已有分化，只差無出菇的現象，是一種三級菌絲。而液態培養之菌絲球，僅具有生殖菌絲及少數的骨骼菌絲，屬於二次元菌絲，並無分化現象，僅是次級菌絲。固態菌絲體與液態菌絲球，其菌絲形態不同，生理功能也不同，推測固態培養與液態培養菌絲所產生的代謝產物及酵素會有些許不同。

6-2 未來展望

對於靈芝多醣體分子量與成分的分析，受限於時間，本研究未能深入探討。只作了簡單的分析，可作個小小的結論：靈芝菌絲會吸收麥糠基質的多醣分泌特有的靈芝多醣體，且這兩種多醣分子量與成分都不太一樣。固態培養之靈芝菌絲之多醣分子量分佈與液態培養之菌絲球的多醣不一樣，其多醣分子量有較大的趨勢。推測此大分子量的多醣較具抗癌效果。

而對於靈芝酸分析方面，雖未鑑定其成分，但根據日本專利報導指出⁽⁵⁵⁾：靈芝子實體含有靈芝酸 A、B、C、C1、C2、D、E、F、G、H、I、K，而液態振盪培養的靈芝菌絲球則含有靈芝酸 Na~Nk、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y、Z 等。靈芝酸 B、D、F、H、K、S、Y 具有降血壓的作用，靈芝酸 U、V、W、X、Y、Z 則具有抗腫瘤的效果。靜置培養的固態菌絲則同時含有靈芝子實體與液態培養之菌絲球之靈芝酸成分，具有靈芝酸 A、B、C、R、S、T，同時具有降血壓與抗腫瘤的效果。因此可以大膽推論本實驗室所培養之固態培養之靈芝菌絲，同時含有靈芝子實體與液態培養之菌絲球之靈芝酸成分。

由於受限於時間限制，且固態培養本身所能監控的參數不多，故對於發酵槽並未有深入的研究，因此找出分析所培養之固態菌絲之靈芝酸成分，與規模放大最適的培養條件，應是未來值得研究的重點。

照片一：25 培養 24 天之靈芝固態培養菌絲體

培養條件：

1. 麥糠 5g + 25ml 蒸餾水
2. 溫度 25 、培養 24 天
3. 接菌量：液態種源 5ml

照片二：30 培養 14 天之靈芝固態培養菌絲體

培養條件：

1. 麥糠 5g + 25ml 蒸餾水
2. 溫度 30 、培養 14 天
3. 接菌量：液態種源 5ml

照片三：30 培養 24 天之靈芝固態培養菌絲體

培養條件：

1. 麥糠 5g + 25ml 蒸餾水
2. 溫度 30 、培養 24 天
3. 接菌量：液態種源 5ml

照片四：30 培養 28 天之靈芝固態培養菌絲體

培養條件：

1. 麥糠 5g + 25ml 蒸餾水
2. 溫度 30 、培養 28 天
3. 接菌量：液態種源 5ml

照片五：添加 1g 木屑之靈芝固態培養菌絲體

培養條件：

1. 麥糠 5g + 25ml 蒸餾水 + 木屑 1g
2. 溫度 30 、培養 21 天
3. 接菌量：液態種源 5ml

照片六：添加 2g 木屑之靈芝固態培養菌絲體

培養條件：

1. 麥糠 5g + 25ml 蒸餾水 + 木屑 2g
2. 溫度 30 、培養 21 天
3. 接菌量：液態種源 5ml

照片七：米糠培養基培養 14 天之固態培養菌絲體

培養條件：

1. 米糠 5g + 25ml 蒸餾水
2. 溫度 30 、培養 14 天
3. 接菌量：液態種源 5ml

照片八：麥糠培養基上之黃色液體

培養條件：

1. 麥糠 5g + 25ml 蒸餾水
2. 溫度 30 、培養 7 天
3. 接菌量：液態種源 5ml

照片九：填充式生物反應器

照片十：試管之靈芝固態培養

培養條件：

1. 麥糠 5g + 25ml 蒸餾水
2. 溫度 30 、培養 21 天
3. 接菌量：液態種源 5ml

照片十一：Packed column 之靈芝固態培養

培養條件：

1. 培養基為麥糠與蒸餾水，料水比為 1：2
2. 溫度 30 、培養 14 天

照片十二：固態培養之攪拌式發酵槽

照片十三：攪拌式發酵槽之靈芝固態培養

培養條件：

1. 培養基為麥糠與蒸餾水，料水比為 1：2
2. 溫度 30 、培養 14 天

照片十四：發酵槽模擬 packed bed 之靈芝固態培養

培養條件：

1. 培養基為麥糠與蒸餾水，料水比為 1：2
2. 溫度 30 、培養 14 天

照片十五：液態培養之菌絲結構(100x)

照片十六：液態培養之菌絲結構(100x)

照片十七：固態培養之生殖菌絲(400x)

照片十八：固態培養之骨骼菌絲(400x)

照片十九：固態培養之骨骼菌絲與纏繞菌絲(100x)

照片二十：固態培養之菌絲結構(100x)

照片二十一：子實體之骨骼菌絲與纏繞菌絲 (100x)

照片二十二：子實體之菌絲結構(400x)

參考文獻

- (1) 林俊清, “生藥的解說—靈芝的介紹”, 藥學介紹, 6(3), 104-111, 1990
- (2) 林哲聖, “靈芝在深層培養之研究”, 中興大學食科所碩士論文, 1990
- (3) 陸文樑, 林忠平, 林志彬, “靈芝的科學應用”, 渡假出版社, 台北市, 1992
- (4) 李明彥, “松杉靈芝浸漬發酵的培養條件對產物的影響”, 台灣大學農化所碩士論文, 1990
- (5) Shimizu A., Yano T., Saito Y. and Indad Y., “Isolation of an inhibitor of pelette aggregation from a fungus, *Ganoderma Lucidum*”. Chom. Pharm. Pull., 33(7), 3012-3015, 1985
- (6) Kohda H., Tokumoto W., “The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (FR.) Karst. histamine release-inhibitory triterpenes.” Chem. Pharm. Pull, 33(4), 1367-1374, 1985.
- (7) Wang, S. D., and Wang D. I. C., “Cell adsorption and local accumulation of extracellular polysaccharide in an immobilized *Acinetobacter calcoaceticus* system.” Biotechnology and Bioengineering, 34, 1261-1267, 1989
- (8) Kim B. K., Chung H. S., Yang K. S., “Studies on the antineoplastic components of Korean basidiomycetes.” Hunguk Kyunhakoe Chi, 8(2), 107-113, 1980
- (9) Miyazaki T. and Nishijima M., “Studies on fungal polysaccharides. XXVII structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma Lucidum*.” 29(12), 3611-3616, 1981
- (10) Mizuno T., Kato N., Tostsuka A., “Fractionation structural features and anti-tumor activity of water-soluble polysaccharide from 'Reishi', the fruit body of *Ganoderma Lucidum*.” Nippon Nogei, Kagaku Kaishi, 58(9), 871-880, 1984
- (11) Hikino H., Lomnno C., Mirin Y., Oriental medicines. Part 91. Antidiabetes drugs, part 9, “Isolation and hypoglycemic activity of Ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies.”, Planta Med, 4, 339-340, 1985
- (12) Lin. C. N., Tome W. P., Won S. J., “Novel cytotoxic principles of *Ganoderma lucidum*”, T. Nat. Prod., 54(5), 998-1002, 1991
- (13) Furue H., “Biological characteristics and clinical effect of sizofilan (SPG).”, Drugs of Today, 23(6), 335-346, 1987
- (14) Sone Y., Okuda R., Wada N., Kishida E., Misaki A., “Structure and antitumor activities of the polysaccharide isolated from fruiting body and growing culture of mycelium of *Ganoderma Lucidum*.” Agriculture and Biology Chemistry, 49(9), 2641-2653, 1985
- (15) Misiki A., Kututa M., “Studies in interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides.” Carbohydr. Res., 92, 115-129, 1981
- (16) Alexotolus C. J. and Mims C. W., “Introductory mycology.” John Wiley and

Sons, Inc. New York.,1979

- (17) Steryaerl R.L., "Species of Ganoderma and related generamainly of the Bogor and Leiden Herbaria", *Persoonia*,7,55-118,1972
- (18) 劉國柱, "現代科學看靈芝", 雙利實業公司, 台北市, 1990
- (19) 王伯徹, "藥用真菌系列報導(一)靈芝", *食品工業*,22(1),23-30,1990
- (20) 黃雪芳、劉柯俊、管育慧、董光世、蘇慶華、董大成, "口服靈芝菌絲培養液之抗癌人工轉移作用", *中華癌醫會誌*,5(1),10-15,1989
- (21) Matherickal J.T. , Lyengar L., "Sorption and desorption of copper(II) by *Ganoderma lucidum*", *Water Pollut. Res. J. Can.*,26(2),187-200,1991
- (22) Vankobachar C., "Metal removal by waste biomass to upgrade waster treat plant." *Water Sci. Technol.* ,22(7-8),319-320,1990
- (23) Muramastu H., Tamiya E., "Piezoelectric resonator as a chemical and Biochemical sensing device." *Sensors and Actuators*, 21-23,362-368,1990
- (24) Van L. T. and Dut T. L., "Linchi mushroom as biological, monitors for Cs Pollution." *J. Radioanal. Nuel. Chem. Lett.*, 155(6),451-458,1991
- (25) 陳洪章, 李佐虎, "固態發酵新技術及其反應器的研製", *化工進展* ,21(1),37-42,2002
- (26) 陳洪章, 李佐虎, 徐福建, "固態發酵技術在資源環境中的應用" *生物技術通報* , 3,27-30,2002
- (27) 陳洪章, 李佐虎, 徐福建, "固態發酵工程研究進展", *生物工程進展* ,22(1),44-48 , 2002
- (28) Furtado J.S., "Relation of microstructures to taxonomy of the Ganodermoidea(polyporaceae)with special reference to the structure of the cover of pilear surface", *Mycologia*, 57,588-611,1965
- (29) 許瑞祥, "靈芝的奧秘-靈芝的分類,栽培與臨床療效", 正義出版社,1988
- (30) Donk M. A., "A conspectus of the families of Aphyllophorales", *Persoonia*, 3,199-324,1964
- (31) Steryaerl R. L., "Study of some Ganoderma species", *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.*,50,135-186,1980
- (32) 李明彥, "松杉靈芝發酵液中活化補體之 -1,3-D-glucan及覆被 Clq 生物壓電晶體感測器篩選活化補體物質之研究", 台灣大學農化所博士論文,1993
- (33) 蘇慶華, "靈芝之分類學及生理活性物質", *北醫學報*,20,1-16,1991
- (34) Pazur J. H. , "Neutral polysaccharide" in "Carbohydrate analysis" , ed. Chaplin, F., Kennedy, J. F., Oxford press,55-142,1987
- (35) 王鐸, 許英, 王濤, "靈芝栽培中畸形菇的發生", *浙江慶應大學學報* , 20(3),327-328,1994

- (36) 林志彬, “靈芝的現代研究”,北京醫科大學出版社,25-29,2001
- (37) 賀世紅, “水分對靈芝菌絲體和子實體的影響”, 中國食用菌, 19(5), 16, 2000
- (38) Michael L. Shuler, Fikret Kargi, “Operating considerations for bioreactors for suspension and immobilized cultures.”, *Bioprocess Engineering*, 262-265, 1992
- (39) Tsuji A., Kinoshita T., Hoshino M., “Analytical chemical studies on amino sugar. Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride.”, *Chem. Pharm. Bull.*, 17, 1505-1510, 1969
- (40) Ride J.P., Drysdale R.B., “A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue.”, *Physiol. Plant Pathol.*, 2, 7-15, 1972
- (41) Tomaselli Scotti C., Vergoignan C., Feron G., Durand A., “Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions.”, *Biochemical Engineering Journal*, 7, 1-5, 2001
- (42) 路秀玲, 趙樹欣, “固態發酵中生物量的測定方法”, 天津輕工業學院學報, 4, 57-62, 2000
- (43) 韓北忠, 王家槐, “固態發酵中生物量的評估和測定”, 中國釀造, 3, 6-10, 2001
- (44) David A., Mitchell, Nadia Krieger, Deidre M., Stuart, Ashok Pandey, “New developments in solid-state fermentation. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors.”, *Process Biochemistry*, 35, 1211-1225, 2000
- (45) Ashok Pandey, “Aspects of Fermenter Design for Solid-State Fermentations.”, *Process Biochemistry*, 26, 355-361, 1991
- (46) 翁佩芳, “固態發酵生物反應動力學理論及反應器研究進展”, 中國釀造, 2, 6-8, 2001
- (47) 陳洪章, 李佐虎, “生物反應器工程”, 生物工程進展, 18(4), 46-49, 1998
- (48) 徐福建, 陳洪章, 李佐虎, “纖維素氣相雙動態固態發酵”, 環境科學, 23(3), 53-58, 2002
- (49) 陳洪章, 李佐虎, “固態發酵新技術及其反應器的研製”, 化工進展, 21(1), 37-42, 2002
- (50) Yusuf Chisti, “Solid substrate fermentation, Enzyme production, Food enrichment”, *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, 5, 2450-2451, 1999
- (51) Ricardo J., Perez-correa, Eduardo Agosin, “Solid substrate fermentation, Automation”, *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, 5, 2431-2432, 1999
- (52) Lonsane B.K., Saucedo-Castaneda G., Raimbault M., Roussos S., Viniestra-Gonzalez G., Ghildyal N.P., Ramakrishna M. & Krishnaiah M.M., “Scale-Up Strategies for Solid State Fermentation Systems.”, *Process*

- Biochemistry*, 27,259-273,1992
- (53) David A. Mitchell, Ashok Pandey, Penjit Sangsurasak, Nadia Krieger,
“Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation”,
Process Biochemistry,35,167-178,1999
- (54) 王秋穎, 郭順星, 吳懼, “靈芝-小麥發酵物開發利用的研究” *Science and
Technology of Food Industry*, 21(4),2000
- (55) 社倉佳子, 極口俊男, 宮本芳則, “靈芝酸類的製造方法”, 公開特許公
報,513-517,1992
- (56) 林一夫, “確立靈芝「品質評價法」的嘗試”, *靈芝與健康* ,46-52,1989
- (57) 張東柱, 周文能, 王也珍, 朱宇敏, “大自然的魔法師-台灣大型真菌”, 206,2001
- (58) Kazuo Sato, Shigetoshi Sudo, “Small-Scale Solid-State Fermentations”, *Manual
of Industrial Microbiology and Biotechnology*,2,61-63,1999

附錄 A

葡萄糖胺檢量線製作步驟：

- (1)精確秤取 Glucosamine 標準品為 0.1g，溶於 100ml 的蒸餾水中。
- (2)取步驟(1)的溶液 1ml 加水稀釋至 100ml；
取步驟(1)的溶液 2ml 加水稀釋至 100ml；
取步驟(1)的溶液 3ml 加水稀釋至 100ml；
- (3)分別取上述所配得的標準液各 1ml，再以比色法來檢測。
- (4)將樣品以分光光度計於 650nm 波長測量吸收值，即可繪出葡萄糖胺檢量線之關係圖。

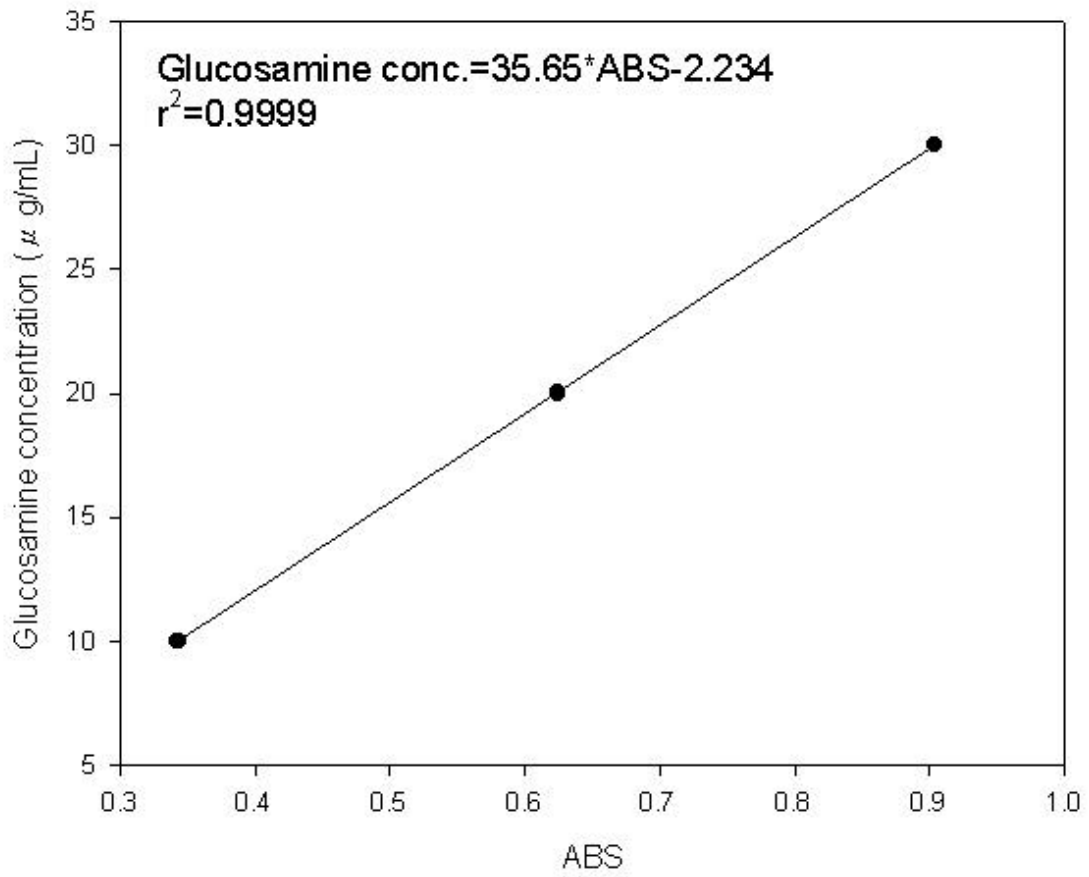


Fig.A 葡萄糖胺檢量線圖

附錄 B

多醣檢量線製作步驟：

- (1)精確秤取 D-Glucose 標準品為 1g，溶於 100ml 的蒸餾水中。
- (2)取上述溶液 5ml 稀釋至 100ml 備用(0.5mg/ml)
- (3)取步驟(2)的溶液 1ml 加水稀釋至 100ml；
取步驟(2)的溶液 2ml 加水稀釋至 100ml；
取步驟(2)的溶液 3ml 加水稀釋至 100ml；
取步驟(2)的溶液 4ml 加水稀釋至 100ml；
取步驟(2)的溶液 5ml 加水稀釋至 100ml；
- (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、0.025mg/mL 各 2ml，以及蒸餾水 2ml(作為空白對照用)。
- (5)各加入 1ml 濃度為 5 % 酚溶液，最後再加入 5ml 的濃硫酸，靜置 10 分鐘後振盪混合，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 490nm 波長測量吸收值，即可繪出多醣檢量線之關係圖。

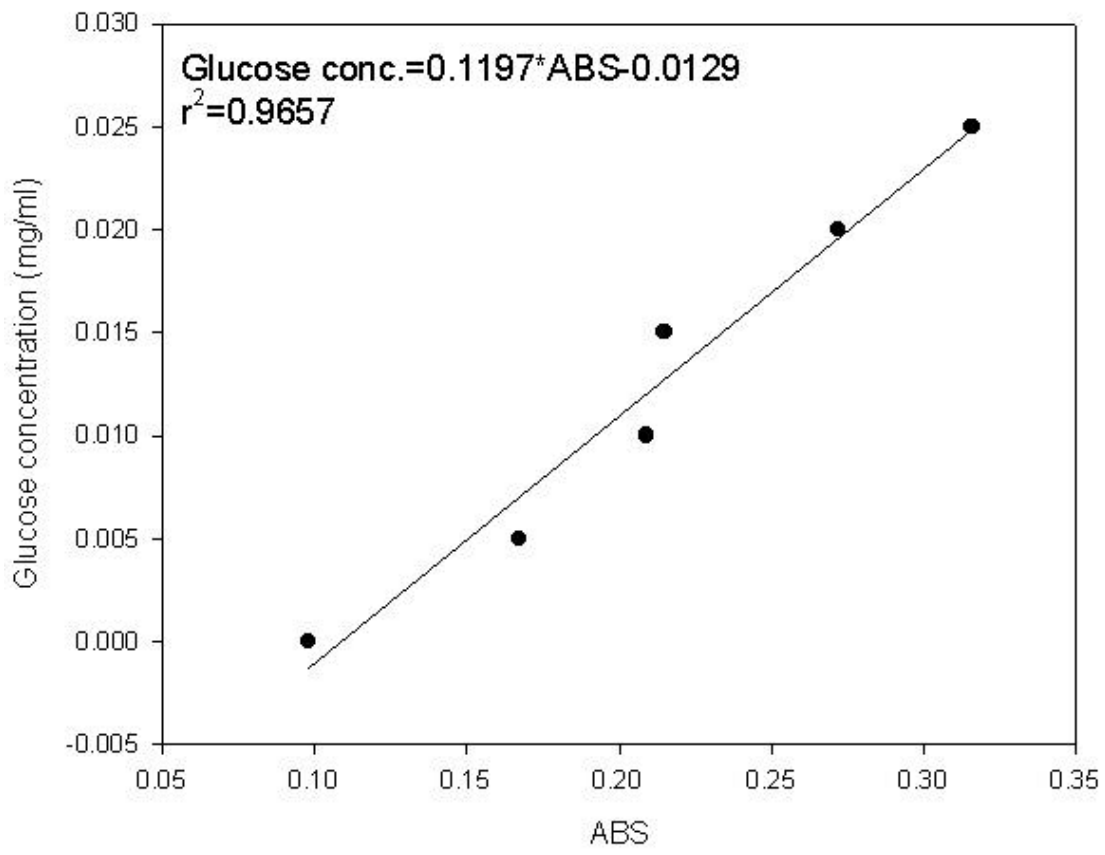


Fig.B 多醣檢量線圖

附錄 C

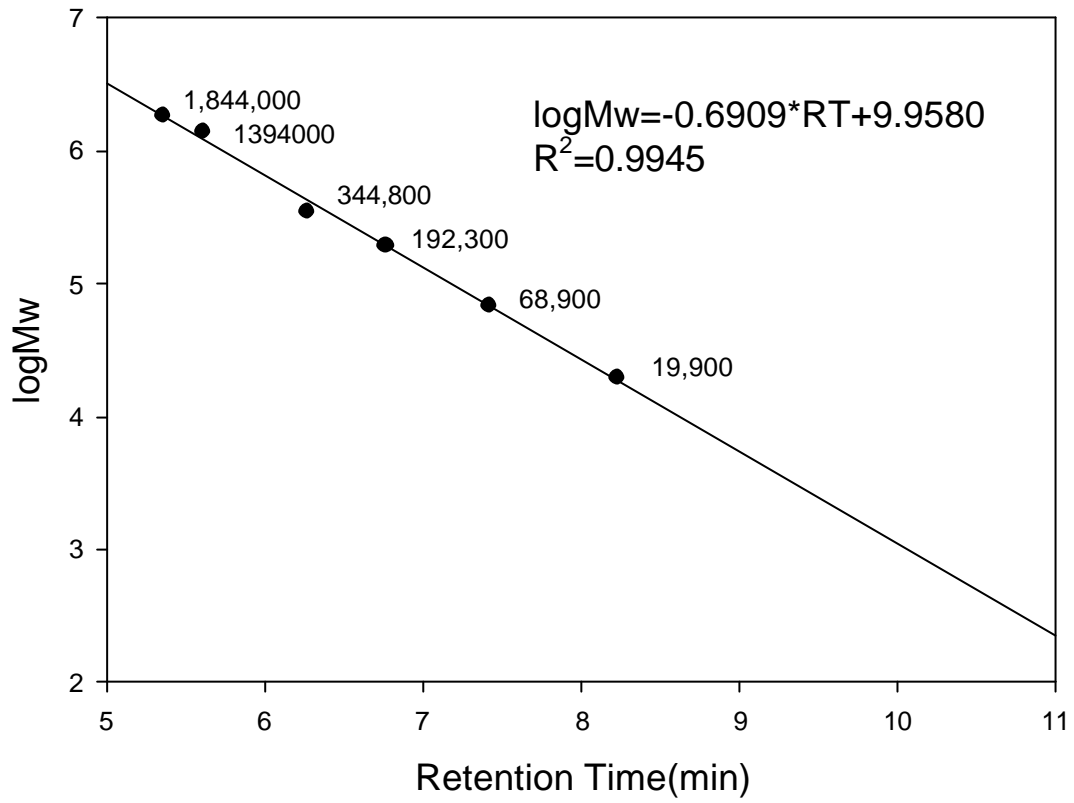


Fig.C 多醣分子量檢量線圖

簡歷

姓名：廖仁宏

籍貫：台灣省南投縣

出生日期：民國 67 年 6 月 26 日

學歷：東海大學化學工程學系畢業

東海大學化學工程研究所畢業

經歷：東海大學化學工程系助教