

中華大學生物資訊學系系統開發專題報告

氣舉式靈芝菌絲液態培養

Atmospheric Ganoderma mycelium liquid to culture

專題組員：何冠駿、陳彥勛、韓元愷

專題編號：PROJ2016-BIOINFO-102013

指導老師：劉志俊老師

1. 摘要

隨著都市不斷地發展，人口高齡化的問題已成為各國所關注的焦點，長輩們的健康漸漸受到重視，醫療的支出也逐漸偏向於高齡人口，但由於年輕時的辛苦耕耘，就好比現在年輕的我們輕忽健康一樣，身體早已不斷地累積這些傷害，包含了種種的慢性病，加上近年來不斷變異的細菌與流感病毒，所需消耗的資源日漸繁重。

然而，預防才是最好的根本之道，為調節人體的免疫能力，保健食品早已在我們的生活周遭隨處可見，在台灣也幾乎快人手一罐了，而靈芝更是屬於保健食品中最上級的，他的功效從早在千年以前，就已開始有人體的實證，並無出現過不良反應，可謂流傳千年的保健聖品。

2. 簡介

本實驗為探討靈芝菌絲的培養方式，我們以將氣體打入水中的方式來培養菌絲，期許靈芝能以工業化模式來大量生產。靈芝(*Ganoderma linzhi*)依培養的方式不同而可分為菌絲體培養和子實體培養，子實體最典型的培養方式為太空包，但由於子實體的培養時間過長，以致無法參與這項實驗。

菌絲的培養我們淺略地分為固態培養和液態培養：固態為培養皿；而液態又可細分為靜置液態培養與動態液態培養。放置於瓶中不予以外力自

行生長者為靜置，菌絲的形成通常為浮在水面上的薄片狀；動態則透過外在的機械，使氧氣能與培養液有所接觸，包含了震盪式培養(俗稱搖瓶)(如圖 1)與通氣(或稱氣舉)式培養(如圖二)，菌絲以球狀或團狀呈現。透過觀察各種培養方式，來了解菌絲生成的速率與變化，並找出最適合靈芝的培養濃度、溫度與培養基。



圖 1 震盪式培養



圖 2 通氣式培養

3. 專題進行方式

3-1 材料與方法

(一)準備材料

葡萄糖(如圖 4a)、蔗糖(台糖貳號砂糖)(如圖 4b)、馬鈴薯、飲用水、靈芝菌絲(菌種來源為台中菇種培養廠

-赤芝標準菌種)



(a)葡萄糖



(b)蔗糖



(c)馬鈴薯過塞成泥



(d)培養基調製



(e)完成培養基

圖 3 培養基的調製過程

(二)實驗儀器

1L 通氣錐形瓶、麵粉篩、橡皮刀、手術刀(品名:愛美格外科器械,規格:刀柄 NO.3)、微量天秤、純水製造機、電磁爐、滅菌釜(溫度:125°C,壓力:15 磅)、無菌操作台、鋁箔紙、玻璃管和橡膠塞、打氣機、"太平洋"外科抽吸引流管(型號:I10318,規格:NS.180cm)、大中氧氣延長接管(型號: DEN 21004)、Air/Vent Filter(Model No: PTFE050N0220-P C, Lot No: 0831E15)

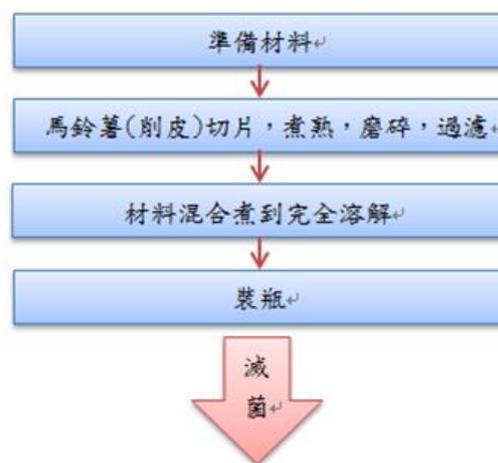
(三)製作流程

首先將馬鈴薯用電磁爐加熱至軟爛(如圖 4c),再通過麵粉篩將馬鈴薯塊過篩成泥。接著把馬鈴薯泥、葡萄糖、蔗糖及 240 ml 的飲用水均勻混和(如圖 4d),加熱至完全溶解後,即完成培養液調製,再將其裝進 1 L 通氣錐形瓶中,並用鋁箔紙包覆瓶口(如圖 3e),開始滅菌。

待滅菌完畢後,將 PARAFILM、大中氧氣延長接管、"太平洋"外科抽吸引流管、Air/Vent Filter、剪刀、玻璃管、橡膠塞、手術刀和培養液,以 75% 酒精消毒,送進無菌操作台,開啟 UV 燈殺菌 15 min。此時培養基剛從滅菌釜拿出,仍處於高溫狀態,故須靜置一天,使其冷卻。

冷卻完畢後,並將原種菌絲以 75% 酒精消毒,送進無菌操作台。開始進入接種。將靈芝菌絲用手術到分割成均等大小(目測)後,將菌絲丟進裝有沒有基之通氣錐形瓶中,組裝好玻璃管和橡膠塞,並將大中氧氣延長接管、"太平洋"外科抽吸引流管和 Air/Vent Filter 接於瓶身。之後將所有管子連接處皆用 PARAFILM(規格: 4 IN X 125 FT)封死,即可完成接種,拿出無菌操作台。至後將其皆上打氣機,完成實驗流程(如圖 3)。

第一階段液態培養基製作



第二階段接種

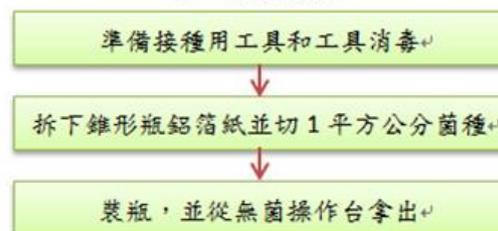


圖 3 實驗流程簡介

3-2 實驗目的

靈芝菌絲的生長會因為培養基的濃度不同而影響生長的效率，此實驗為探討靈芝是否會因培養基濃度的不同，而影響到靈芝的生長結果，並期許能找出最適合靈芝生長的標準濃度。

於是我們簡易的製作了三種不同濃度的培養基來觀測，分別為原始濃度、1/2 倍的原始濃度和 2 倍的原始濃度（如表 1），培養 5 天後，來觀察靈芝菌絲的乾重變化。

濃度 成分	50% 濃度	100% 濃度	200% 濃度
葡萄糖	9g	18g	36g
蔗糖	6g	12g	24g
馬鈴薯	3g	6g	12g
水	720ml		

表 1 培養基濃度推估

3-3 問題於討論

Q1、液態菌絲接種時，接種的菌絲量不固定。

A1：由於無法將精密天平帶進無菌操作台，所以每次的接種量只能目測；若要求精細，只能自費購買天平，配合夾鏈袋進出操作台。

Q2、靈芝冬天生長緩慢，生長速率大打折扣。

A：如果為培養皿或普通錐形瓶，可考慮放進培養箱，溫度設定在 27 度左右。

Q3、測量乾溼重時，會因培養基調製前，原料本身所夾帶的水分，可能感變培養基濃度，甚至影響乾溼種表現。

A3：為求精確，可在烹調前先將原料烘乾再進行調製，但會嚴重影響實驗速度。

Q4、做大型通氣錐形瓶時，玻璃管無

法伸進到瓶子最底層。

A4：可用實驗室現有的滴定管來替代該玻璃管，但由於但由於出氣口較小，容易被雜質阻塞，若需做長久實驗，則要自行訂製。

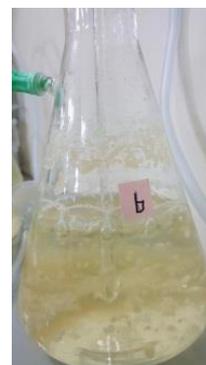
4. 主要成果

4-1 標準濃度實驗

本實驗為探討當初制定的原始濃度是否為培養靈芝菌絲的最佳解，來提高菌絲生產的數量與收成速度，經多次的實驗證實，100% 原始濃度確實比是接近靈芝的生長條件(如圖 5)，1/2 倍濃度對靈芝來說可能太淡了，但感染的次是相比其他兩瓶少了很多。至於 2 倍，我們只能大概推論原因：有可能液體為高張溶液，不適合靈芝細胞的生長(或好比是氣體的分壓過大)；至於另一個則有可能是，濃度過高可能把菌絲對酸鹼的敏感度提到了.....。



第 1 天



第 2 天



第 3 天



第 4 天

第 5 天

圖 5 100%濃度生長情形

4-2 靈芝菌絲乾重紀錄

這個實驗為該專題的主要核心，主要在呈現菌絲的生長變化，就震盪培養的成效來看，大約會在第 5 天就能達到培養最高峰，但是容積只能限制在 200ml 以內；而 1L 通氣式的培養基可裝入的容積為 700 至 800ml，超過時，則會在滅菌的過程中溢出。但由於培養基的含量增加，使得培養的時間被拉長了，但在過去的實驗可以推斷出大約在 12 至 14 天為生長曲線的最高峰，圖 6 為本實驗所測得的生長曲線圖。

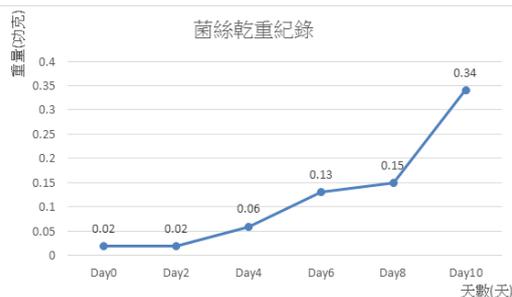


圖 6 通氣式菌絲生長曲線

5. 評估與展望

5-1 成本估計

假設 1L 通氣錐形瓶、橡膠塞、玻璃管、過濾器 and 打氣機可以重複用，大中氧氣接管僅用單次，每做一瓶 800ml 的

培養基需要花 86.3086 元(如表二)。若考量商業利益，一次做 4 瓶培養基材料成本 345.234 元，人工成本若以每小時 120 元計算，人工成本 600 元，如果把培養好的培養基每 200ml 以 1400 元賣出，可以裝 16 瓶共 22400 元，扣除人工成本和材料成本，總共淨利大約為 21471.895 元。

材料	單價
1L 通氣錐形瓶	12 元
橡膠塞	1.3 元
玻璃管 8mm*300mm	1.5 元
大中氧氣延長接管	25 元
“太平洋”外科抽吸引流管	17.5 元
石蠟膜(3 公分)	0.444 元
諾貝兒寶貝結晶葡萄糖(7g)	6.664 元
《台糖》二號砂糖(14g)	0.504 元
馬鈴薯(21g)	1.3965 元
50mm 過濾器	10.6333 元
水	0 元
銀箭打氣幫浦 K-8000 型	20 元
總計 86.3085 元	

表 2 每瓶靈芝培養液所需成本

5-2 未來發展

靈芝一直以來都被視為昂貴的藥材，透過本次的專題實驗，希望能將靈芝的培養的方式發揚光大，在不失本身的營養價值的情況下，來降低培養成本與提高生產效能，希望外來能夠成為以後人手一罐的保健食品，甚至期許每個家庭都夠可自己 DIY 來培養靈芝，不再需為了怎麼孝順父母和長輩們，而在花大錢購買了。

6. 結語

統整目前的實驗結果，就此三種培養濃度而言，還是最初暫定的原始濃度最適合靈芝生長，其他 1/2 倍濃度和 2 倍濃度雖然也會生長，但似乎並沒有像原始濃度效率高。不過也有可能因生長緩慢，而使生長週期被拉長了，但由於觀測的時間過短，使得無法做出太長遠的判斷。

本次實驗由於器材的數目限制，加上必須要確保菌種能否延續下去和感染的風險，每次若要測量精確的數據時，就必須消耗一瓶培養瓶(該瓶菌絲烘乾後將無法延續接種)，所以無法做出太長遠的實驗結果。不過由於給予的養分是固定的，理應當會有一個生長點是高峰期(700ml 的培養基大約位在 12 至 14 天左右)，後面會因養分消耗殆盡(或者代謝廢物的累積)而停止了生長，甚至開始出現自溶現象，使得曲線開始下滑。

7. 銘謝

在專題進行的過程中，每當我們在某個階段徘徊而停滯不前時，我們的指導教授 劉志俊老師，總是能指引我們當下該何去何從，並且給予我們諸多的辦法，使我們漸漸地養成能夠獨立思考的能力。雖然實驗的結果讓老師失望了，自己也很不滿意，但老師卻沒有就此放棄我們，及時為我們想出替代方案來應對，使我們專題能順利進行，謝謝。

此外，還要感謝另一位老師，每當遇到困境而陷入低潮時，這位老師總是能徹底消弭我們的低氣壓，並引導我們務實的經驗之談，即使我們並不是您的指導學生、即使您已忙得不

可開交，又即使我們沒有做出任何回報，您還是一樣不惜辛勞，默默地為我們付出，不只是培養的相關認知，還教導我們處理事情應有的態度，謝謝您，張慧玫老師。

8. 參考文獻

[1]魏賽金，靈芝發酵液發酵生產靈芝多醣醇工藝的初探，江西同業大學學報，2009(8)，Vol.31，No.4

[2]曾裕琇，松杉靈芝之栽培及其菌絲之深層培養，農林學報 52(3)：35~47 (2003)

[3]趙繼鼎，中國靈芝亞科的分類研究，微生物學報 19(3)：265-279，1979