

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science

Tunghai University

食品科技組

Food Technology Section

深層培養舞菇菌胞外多醣及其萃取物抗氧化力之研究

Production of exopolysaccharide and antioxidant activity
of extract from submerged culture by

Grifola frondosa

徐榮駿

Jung-Chun Hsu

指導教授：閻立平 博士

Advisor: Lipyng Yan, Ph.D.

中華民國一零五年七月

July, 2016

碩士論文指導教授推薦書

食品科學系碩士班食品科技組 徐榮駿 君所提之論文


深層培養舞菇菌胞外多醣及其萃取物抗氧化力之研究

Production of exopolysaccharide and antioxidant activity
of extract from submerged culture by *Grifola frondosa*

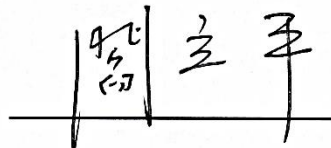
係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學系系主任



指導教授



中華民國一零五年七月五日

碩士論文考試委員審定書

食品科學系碩士班食品科技組 徐榮駿 君所提之論文

深層培養舞菇菌胞外多醣及其萃取物抗氧化力之研究

Production of exopolysaccharide and antioxidant activity
of extract from submerged culture by *Grifola frondosa*

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

林聖毅

弘光科技大學食品科學系 教授

顏文義

東海大學食品科學系 副教授

梁志弘

東海大學食品科學系 助理教授

指導教授：

周立平

東海大學食品科學系 教授兼農學院院長

中華民國一零五年七月五日

謝誌

感謝恩師 閻立平博士於研修碩士學位其間在實驗研究及課業上給予學生許多指導及照顧，並在論文撰寫其間感謝老師細心審閱與指正才得以順利完成論文和口試，恩師的鼓勵與教誨，學生會銘記在心，忠心感謝，特誌卷首，以表謝意。

論文口試其間，承蒙弘光科技大學林聖敦博士、系上教授顏文義博士及梁志弘博士撥冗審閱，並給予許多寶貴意見及指導，使學生論文更加完整，在此致上萬分謝意。此外也感謝麗豐實業黃俊智學長在菌種鑑定及研究上遇到的問題給予協助，由衷感謝。

在學期間，感謝系辦公室 王琴助理、淑瑜助教、怡君助教的幫忙與協助。另外也感謝許多學長姐的照顧與指導，感謝鈺欣學姊在我剛接觸實驗室時給予的指導；感謝哲瑜學長及孟蓉學姊帶領我熟悉微生物實驗室的環境、實驗方法及儀器設備的操作。本屆同窗好友柏漢、柏璋、庭瑋、怡臻、筑盈、有容、柏凱、宥勝、佳伶、逸林、鵬年、松佑一起互相幫助，此外特別感謝大學學妹，研究所同學予捷在研究所最後一年的幫忙。學弟妹萬宇、湘儀、佑星、育豪、欣瑜、秉叡、閔鴻及琤綾的協助與陪伴，讓我的研究生生活充滿歡樂及美好的回憶。

最後，感謝在我身後默默支持我的家人，感謝爸媽的支持、關心予照顧，讓我可以無後顧之憂的完成學業；謝謝女友盧萱的陪伴，在我不順利遇到困難的時後給我鼓勵，陪我聊天聽我吐苦水。謝謝你們的陪伴，讓我可以不斷成長。

徐榮駿 僅至於
東海大學食品科學研究所
中華民國一零五年七月

目錄

摘要.....	XI
Abstract.....	XII
壹、前言.....	1
貳、文獻回顧.....	2
一、舞菇菌 (<i>Grifola frondosa</i>) 簡介.....	2
(一) 舞菇菌之分類及分布.....	3
(二) 舞菇菌之生態習性及外觀.....	3
(三) 舞菇菌之化學成分.....	5
(四) 舞菇菌之生理功能.....	6
二、食藥用菇類多醣簡介.....	11
(一) 多醣體抗腫瘤活性.....	11
(二) 多醣體抗腫瘤機制.....	18
三、食藥用菇類之深層培養.....	21
(一) 深層培養之定義.....	21
(二) 深層培養與傳統固態培養之差異.....	21
(三) 影響深層培養的因素.....	22

(四) 發酵槽種類之介紹	27
參、材料與方法	32
一、試驗材料	32
(一) 試驗菌種	32
(二) 培養基	32
(三) 重要藥品	34
二、試驗儀器	36
三、試驗方法	37
(一) 試驗流程	37
(二) 菌種貯存	38
(三) 菌種活化	38
(四) 種菌培養	38
(五) 種菌懸浮液之製作	38
(六) 平板培養基試驗	39
(七) 搖瓶試驗	39
(八) 發酵槽試驗	42

四、分析方法	44
(一) 菌絲體乾重測定	44
(二) pH 值測定	44
(三) 胞外多醣測定	44
(四) 殘糖分析	45
(五) 發酵參數之分析	46
(六) 胞外多醣分子量之測定	47
(七) 胞外多醣、發酵液乙醇及熱水萃取物製備	48
(八) 抗氧化能力之測定	49
(九) 總酚類化合物測定	53
(十) 麥角硫因含量測定	53
(十一) 統計分析	54
肆、結果與討論	55
一、平板培養基試驗	55
(一) 培養溫度及培養基對舞菇菌菌絲體生長速度之影響	55
二、搖瓶試驗	60

(一) 碳源對舞菇菌胞外多醣體生成之影響	60
(二) 氮源對舞菇菌胞外多醣體生成之影響	62
(三) 無機鹽類對舞菇菌胞外多醣體生成之影響	64
(四) 生長因子對舞菇菌胞外多醣體生成之影響	66
(五) 培養基起始 pH 值對舞菇菌胞外多醣體生成之影響	68
(六) 正交試驗	70
(七) 搖瓶培養時間對舞菇菌胞外多醣體生成之影響	74
三、不同型式發酵槽培養試驗	76
(一) 胞外多醣體及菌絲產量之影響	76
(二) 多醣分子量測定	85
四、胞外多醣及發酵液萃取物抗氧化力之測定	88
(一) DPPH 自由基清除能力	89
(二) 總抗氧化能力測定	92
(三) 螯合亞鐵離子能力	95
(四) 還原力	98
五、機能性成分與抗氧化力測定之相關性	102

伍、結論.....	107
陸、參考文獻	109
柒、附錄.....	118



表目錄

表一	靈芝胞外多醣體及硫酸化靈芝胞外多醣體對癌細胞抑制 活性	16
表二	香菇多醣體對腫瘤細胞 Sarcoma 180 之抗腫瘤活性.....	17
表三	有機氮源營養成分	23
表四	不同型式發酵槽之優缺點比較	28
表五	不同培養溫度及培養基對舞菇菌於平板培養基上 (培養 15 天) 菌絲體生長之影響.....	59
表六	碳源對搖瓶培養之舞菇菌菌絲體及胞外多醣體產量之影 響	61
表七	氮源對搖瓶培養之舞菇菌菌絲體及胞外多醣體產量之影 響	63
表八	無機鹽類對搖瓶培養之舞菇菌菌絲體及胞外多醣體產量 之影響	65
表九	生長因子對搖瓶培養之舞菇菌菌絲體及胞外多醣體產量 之影響	67
表十	起始 pH 值 (4~8) 對搖瓶培養之舞菇菌菌絲體及胞外多醣 體產量之影響	69
表十一	L9 (33) 正交試驗試驗參數.....	71

表十二	菌絲體及胞外多醣產量之正交試驗結果.....	72
表十三	正交試驗胞外多醣產量結果變異數分析.....	73
表十四	舞菇菌於不同發酵槽培養時之發酵參數.....	84
表十五	膠體滲透層析法不同分子量多醣標準品 (α -D-葡聚糖) 之 滯留時間.....	86
表十六	膠體滲透層析法測定四種不同發酵液之胞外多醣體分子 量.....	87
表十七	氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之 DPPH 自由基清除能力之 IC50.....	91
表十八	氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之總抗 氧化力自由基之 IC50.....	94
表十九	氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之螯合 亞鐵離子能力之 IC50.....	97
表二十	氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之還原 力之 IC50.....	100
表二十一	舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之抗氧化力測定比較	101
表二十二	舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之總酚含量。.....	104
表二十三	舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之麥角硫因含量。....	105
表二十四	機能性成分與抗氧化力測定之相關係數.....	106

圖目錄

圖一	舞菇菌子實體之外觀形態。	4
圖二	具抗腫瘤活性的 β - (1 \rightarrow 6) 分支 β - (1 \rightarrow 3) -D-葡聚糖結構。 13	13
圖三	X 射線衍射測定之 β - (1 \rightarrow 3) -D-葡聚糖結晶結構。	14
圖四	香菇多醣 lentinan 之增進免疫作用途徑。	19
圖五	不同型式發酵槽之構造。	31
圖六	舞菇菌於不同平板培養基之菌絲生長情形 (30°C/15 天)。 .57	.57
圖七	舞菇菌於不同培養溫度下之菌絲體外觀 (15 天/PDA)。	58
圖八	搖瓶培養期間舞菇菌胞外多醣、菌絲體、pH 值及殘糖量之變化。	75
圖九	攪拌式發酵槽培養期間舞菇菌胞外多醣、菌絲體、pH 值及殘糖量之變化。	79
圖十	氣泡式發酵槽培養期間舞菇菌胞外多醣、菌絲體、pH 值及殘糖量之變化。	80
圖十一	氣舉式發酵槽培養期間舞菇菌胞外多醣、菌絲體、pH 值及殘糖量之變化。	81
圖十二	氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之 DPPH 自由基清除能力。	90
圖十三	氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之總抗氧化	

能力。 93

圖十四 氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之螯合亞鐵

離子能力 96

圖十五 氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之還原力 99



附圖目錄

附圖一	舞菇檢驗報告書.....	119
附圖二	酚硫酸法之葡萄糖標準曲線。.....	120
附圖三	蔗糖之 HPLC 殘糖檢量線。.....	121
附圖四	多醣分子量之標準曲線。.....	122
附圖五	食子酸標準曲線。.....	123
附圖六	麥角硫因標準曲線。.....	124



摘要

本實驗選用食藥用菇類舞菇菌 (*Grifola frondosa*) 為試驗菌種，探討深層培養條件及不同型式發酵槽對菌絲體及胞外多醣體生成之影響，以及氣舉式發酵槽培養所得之舞菇菌胞外多醣、發酵液萃取物之抗氧化力。

結果顯示舞菇菌於 PDA 平板培養基及 30°C 下具有最大菌絲體生長直徑 (6.4 cm/15 天)。最適胞外多醣生成之深層培養條件為：碳源為 7.0% (w/v) sucrose、氮源為 2.5% (w/v) yeast extract、無機鹽類為 0.15% (w/v) FeSO₄ 及 0.3% (w/v) KH₂PO₄、起始 pH6.0 及培養溫度 30°C。

三發酵槽中以氣舉式發酵槽具最高胞外多醣體產量 (1060.61 mg/L)、比生長速率 ($\mu=0.16 \text{ day}^{-1}$) 及胞外多醣生成速率 ($Q_p=88 \text{ mg/L/day}$)；搖瓶試驗及三發酵槽胞外多醣分子量範圍為 $7.06 \sim 7.36 \times 10^3 \text{ Da}$ 。

氣舉式發酵槽胞外多醣體、發酵液乙醇及熱水萃取物皆呈現抗氧化能力，然在四種之抗氧化力測定 (DPPH 自由基清除能力、總抗樣化力試驗、螯合亞鐵離子能力、還原力) 中，相對抗氧化力大小排序無一致性。

樣品中機能性成分 (總酚及麥角硫因) 與樣品之抗氧化力具正相關性。

關鍵字：舞菇菌、深層培養、胞外多醣、抗氧化力、機能性成分

Abstract

Medicinal mushroom *Grifola frondosa* was selected in this research to study the effect of submerged culturing condition and different types of fermenters on the production mycelial and exopolysaccharides (EPS) by this strain.

Antioxidant ability of EPS and extracts of culture from air-lift fermenter was also investigated.

Results showed that *G. frondosa* obtained a diameter of mycelial growth of 6.4 cm/15days on potato dextrose agar (PDA) at 30°C. Optimal culturing condition for EPS production was: sucrose (7.0%, w/v), yeast extract (2.5%, w/v), FeSO₄ (0.15%, w/v), KH₂PO₄ (0.3%, w/v), initial pH of 6.0, and incubation temperature of 30°C.

Among the three types of fermenters, the air-lift fermenter had the highest EPS yield (1060.61 mg/L), specific growth rate ($\mu=0.16 \text{ day}^{-1}$) and product formation rate ($Q_p=88 \text{ mg/L/day}$). The molecular weight of exopolysaccharides from shake flask and three types of fermenters ranged from 7.06 to $7.36 \times 10^3 \text{ Da}$.

Samples of EPS, EtOH and hot-water extracts of culture from air-lift fermenter possessed antioxidant ability on DPPH · scavenging ability, total antioxidant capacity, Fe²⁺ chelating ability and reducing power tests. However, those samples showed no common tendency of relative antioxidant ability for the four antioxidant tests.

Samples contained functional components of total phenol and ergothioneine, which were positively correlated with their antioxidant ability.

Keywords: *Grifola frondosa*, exopolysaccharide, submerged culture, antioxidant ability, functional components.

壹、前言

舞菇菌 (*Grifola frondosa*)，為一種食藥用真菌，早期因數量稀少十分珍貴，而在日本大量生產後已日漸普及。其多醣體及萃取物具許多保健功效如抗腫瘤、抑制愛滋病毒、降血壓與降血糖等，除了為保健食品之外在日本亦有製成藥物，因此極具開發潛力。

本實驗所用之舞菇菌其子實體可經由人工栽培取得，大陸及日本皆已大規模生產。生產方式以固態培養為主，但過程繁雜、耗費人力、培養時間長及所需空間大，且常受到培養環境（溫度、水分、重金屬污染等）及天候等外界因素而影響產量。此外，尚有菌絲體及培養基分離不易或所產生農業廢棄物(太空包及太空包廢土)不易處理之問題；若改以深層培養方式培養生產菌絲體及其代謝物，不但可以改良上述之缺點，還能有效率控制培養條件以獲得高產量的目標成分。而發酵液及菌絲體皆有其利用價值，並無農業廢棄物產生之問題，並可配合離心、膜過濾等技術將成分進行初步分離。

本研究嘗試以發酵槽深層培養之方式提高舞菇菌菌絲體及胞外多醣體產量，並探討胞外多醣體、發酵液萃取物之抗氧化能力。主要實驗目的為

1. 以三種不同平板培養基培養舞菇菌探討最適培養溫度及最佳培養基；
2. 以搖瓶試驗決定最適之深層培養條件(碳源、氮源、無機鹽類、生長因子、培養液起始 pH 及碳、氮源與無機鹽類最適濃度等)；
3. 於最適培養條件下，比較三種型式發酵槽(攪拌式、氣泡式、氣舉式)深層培養對舞菇菌菌絲體及胞外多醣體產量之影響；
4. 最適培養之發酵槽培養所得之胞外多醣、發酵液乙醇及熱水萃取物樣品之抗氧化力；
5. 探討胞外多醣及發酵液萃取物抗氧化力與彼等機能性成分含量之相關性。

貳、文獻回顧

一、舞菇菌 (*Grifola frondosa*) 簡介

舞菇菌 (*Grifola frondosa*) 別名灰樹花、舞茸、舞茸、重菇、貝葉多孔菌，為一種食藥用真菌，早在中國的神農草經中提及，經常食用舞菇，可改善脾胃不舒服，安神及治療痢疾等 (水野和川合，1999)。近代研究中則發現舞菇多醣體成分具有抗腫瘤功效，在日本已經開發成治療癌症藥物，此外亦有研究發現舞菇萃出物可以抑制愛滋病毒 (張和周，2005)；相關的功效成分還有降低血糖、降低血壓和血中膽固醇及保護肝臟、預防糖尿病、提升免疫力等功效 (吳，2009 b)；不僅可以食用還可以做成保健食品，是一種極具潛力的食藥用菇類。

日本學者伊藤一雄和廣江永最早開始從事舞菇的栽培研究，1940 年開始馴化，1980 年開始大規模生產，1990 年年產量 7712 公噸，為日本國內菇類產量第六名，到了 1994 年日本舞菇已達栽培技術設施化、機械化的周年生產，年產量 31000 公噸，躍居世界首位 (吳，2007)。

(一) 舞菇菌之分類及分布

舞菇菌在分類學上屬於真菌界 (Fungi)、擔子菌門 (Basidiomycota)、傘菌綱 (Agaricomycetes)、多孔菌目 (Polyporales)、薄孔菌科 (Meripilaceae)、樹花菌屬 (*Grifola*)。廣泛分布於世界上北半球各溫帶地區，舞菇於中國大陸地區分布很廣，北起黑龍江、吉林，南至浙江、福建、廣東，西至廣西、雲南、四川，而日本、北美、歐洲的一些國家也有發現野生種，最早大規模培養是由日本開始 (嚴等人，2013)。

(二) 舞菇菌之生態習性及外觀

舞菇在日本稱為舞茸，在江戶時代其價值與黃金相等，因此每當在深山裡找到此種稀有且美味又有益健康的珍品時，採集者都興奮得手舞足蹈，高興得跳起舞來，且其外型如舞者翩翩起舞的樣子，故得名為舞茸 Maitake，加上舞茸體積龐大，因此舞茸被譽為菇中之王。(吳，2007)。舞菇菌主要生長於北半球溫帶地區，野生菇生在每年 8~9 月，在山毛櫸科如山毛櫸、柯樹、椴樹尤其在山毛櫸科的樹幹根部成菌叢。在梅樹、柿樹、李樹、杏樹、桃樹等亦可見其生長。是一種能侵犯樹幹心材造成白色腐朽的菇菌 (水野和川合，1999)。子實體外觀形態 (圖一) 為肉質，有柄多分枝，末端成扇形、匙形或半圓形菌蓋，重疊成叢，最寬可達 40~60 cm，重達 3~4 千克。菌蓋寬 2~7 mm，外觀顏色為灰色至淡褐色，表面有細或乾後堅硬的絨毛，老熟後光滑，有放射狀條紋，邊緣薄，內捲 (嚴等人，2013)。



(a)



(b)

圖一 舞菇菌子實體之外觀形態

(a) 野生舞菇

(b) 栽植舞菇

Fig. 1 Morphology of fruit body of *Grifola frondosa*

(a) wild *Grifola frondosa*

(b) cultivated *Grifola frondosa*

(三) 舞菇菌之化學成分

1. 一般成分

新鮮舞菇含水分 90%、蛋白質 3.2%、脂肪 0.2%、碳水化合物 5.0%、灰分 0.7% (趙等人, 2011), 是以蛋白質與碳水化合物為主要成分的菇菌, 亦含大量纖維質。所含之維生素有 B₁、B₂、Vit-C 及 Vit-E, 但幾乎不含維生素 A。此外, 麥角固醇 (ergosterol, 維生素 D₂ 前驅物) 為菇類常有成分 (水野和川合, 1999)。

2. 無機成分

舞菇子實體中的礦物質成分以 P、K 為最多, 其次為 Mg、Ca、Zn 等礦物質 (村椿, 1986)。

3. 游離胺基酸

舞菇含有 18 種胺基酸, 其中 8 種人體所需之必需胺基酸 (趙等人, 2011), 呈味成分中, 除核苷酸、游離糖、有機酸以外, 游離胺基酸的種類與含量亦受到重視。舞菇中與鮮味有關聯的胺基酸以麩胺酸含量最多。子實體形成期, 游離胺基酸含量會隨原基→子實體→成熟子實體的菌體發育會減至一半; 其中以天門冬胺酸 (aspartic acid)、絲胺酸 (serine)、麩胺酸 (glutamic acid)、丙胺酸 (alanine)、酪胺酸 (tyrosine)、離胺酸 (lysine)、精胺酸 (arginine) 等含量會劇減 (水野和川合, 1999)。

4. 游離糖類

舞菇主要含葡萄糖 (glucose)、海藻糖 (trehalose)、甘露糖 (mannose) 等, 其中甘露糖含量會隨舞菇子實體生長而減少而海藻糖則急增。葡萄糖

含量會隨原基→幼稚子實體→成熟子實體的生長而暫時增加，在成熟子實體中則減少（村椿，1986；水野和川合，1997）。

5. 有機酸

菇類有機酸含量不高，以乾物計算約為0.5%，在子實體形成期，以游離狀測出的有焦麩胺酸 (pyroglutamic acid)、乳酸 (lactic acid)、醋酸 (acetic acid)、蟻酸 (formic acid)、蘋果酸 (malic acid)，檸檬酸 (citric Acid)、琥珀酸 (succinic acid)、草酸 (oxalic acid)，延胡索酸 (fumaric acid) 等（村椿，1986）。蘋果酸佔有機酸含量的47~50%，加上焦麩胺酸，延胡索酸及琥珀酸則超過80%（水野和川合，1999）。

6. 脂質

舞菇子實體主要含下列三種脂質：

- (1) 中性脂質（甘油三脂：TG）
- (2) 固醇脂質（醯基固醇）
- (3) 神經鞘脂質（神經醯胺與腦甘脂）

(四) 舞菇菌之生理功能

1. 增強免疫力

舞菇多醣是一種有效的生物免疫調節劑，其含有 β -1,3 和 β -1,6-葡聚醣 (glucan) 的結構，能夠刺激細胞免疫功能，提高自體免疫力。Inoue 等人 (2002) 對舞菇 D-Fraction 進行細胞免疫活性研究，其中 D-Fraction 為舞菇多醣經 SepharoseCL-4B 管柱和 DEAE-SepharoseCL-6B 管柱進一步純化之

產物，結果發現 D-Fraction 可調節 T 淋巴細胞亞群 Th-1 和 Th-2，抑制 B 細胞活性，加強輔助 T 細胞活性，誘導脾和淋巴細胞分泌 C-INF、IL-12p70 和 IL-8，同時抑制 IL-4 的產生。另外 Adachi 等人 (1994) 的研究證實舞菇多醣可活化巨噬細胞釋放細胞因子，增強自體免疫力。

Kodama 等人 (2003) 的臨床研究表明，舞菇萃取物通過刺激免疫細胞的活性呈現出顯著的抗癌作用，其中 58.3% 的肝癌患者、68.8% 的乳房癌患者和 62.5% 的肺癌患者的腫瘤縮小或臨床症狀顯著改善；對 Meth-A 纖維瘤、IMC-瘤和 MM-46 癌細胞有顯著抑制作用，抑制率為 25.6%-49%；亦可有效抑制 Meth-A 纖維瘤、IMC-瘤細胞增值。舞菇萃取物最為癌症的有效抑制劑，最近已被美國 FDA 批准直接進入二期臨床。

據白及羅 (1994) 收集日本、加拿大、澳洲、義大利、英國、捷克、中國大陸等有關樹花屬菇類之藥理研究指出，*Grifola frondosa* 具抗癌作用，其主要成分為多醣體 (polysaccharide)；另有文獻指出 *Grifola umbellata* 多醣體對 Lewis 肺癌自發轉移、S180 肉瘤等有抑制作用，對 Co-60 照射及環磷醯胺引起的免疫抑制有調節作用，對 *Staphylococcus aureus* 與 *Escherichia coli* 亦有抑制作用 (宋和許，1996)。

2. 抗腫瘤活性

難波氏等人 (1988) 證實，舞菇子實體萃取物所含之 β -D-葡聚糖對罹患 Sarcoma180/ICR 小白鼠有顯著的抗腫瘤活性。Mori 等人 (1987)，將八種不同食用菇類與舞菇各別以 20% 之重量加入一般正常之飼料中，結果證實抗腫瘤之效果以舞菇最佳。Mizuno 等人 (1995) 指出在菇類多醣中，發現有部份具有明顯抗腫瘤活性，其基本結構是含有 β -1-6 支鏈和 β -1-3-D-葡聚糖或以此為主體的雜聚醣及蛋白質複合體。由於許多研究指出，舞菇

萃取物對位於結腸、肺臟、胃、肝臟、前列腺、腦等器官之腫瘤具有抗腫瘤活性，因此美國舞菇製造業者 Maitake Product Inc. 所研發生產之舞菇萃取濃縮液 (D-Fraction) 商品於 1997 年 12 月向美國 FDA 提出臨床實驗申請，並於 1998 年 3 月開始進行人體相關之臨床實驗 (林，2002)，目前已有產品上市。

根據舞菇相關研究報告，可歸納出舞菇對抗癌症的方式有下面三種 (Mayell, 2001)：

- (1) 防止健康細胞轉變為癌細胞
- (2) 防止癌細胞轉移
- (3) 降低或停止腫瘤生長

此外，國外學者在臨床研究也發現舞菇亦可減低化學治療所產生之副作用 (Nanba *et al.*, 2000)。

3. 抗人類免疫不全病毒 (HIV) 活性

日本學者在動物試驗中證實以口服 D-Fraction 能有效增加 T 細胞捕捉 HIV，這也是最早針對舞菇可能可以治療 HIV 的臨床實驗 (Hishida *et al.*, 1988)。美國國家研究院於 1991 年，在一項抗 HIV 藥物篩選試驗中發現，在硫酸化舞菇萃取成分中具有明顯劑量相關性之抗病毒活性。Nanba 等人 (2000) 對商品化的舞菇萃取濃縮液進行抗 HIV 研究，並推測其抗 HIV 作用方式包含直接抑制 HIV 病毒、刺激生物體本身免疫系統及減少生物體被其他疾病感染的機會。

4. 降血糖

Kubo 等人 (1994) 將舞菇子實體磨粉並餵食糖尿病老鼠，發現舞菇中

含有特定成份可抑制血糖的上升，亦證實了舞菇抗糖尿病活性與胰島素受器有直接的關係。另有研究指出餵食舞菇菌之後 C57BL/6L 糖尿病小白鼠 (IDDM)，可明顯抑制血糖濃度 (Kurushima *et al.*, 2000) ，此外，舞菇菌中提取出的 MT- α -glucan 亦能夠修復受損胰臟 β 細胞 (Lei *et al.*, 2013) ，而 MT- α -glucan 亦能夠降低糖尿病小鼠血醣、血脂及減少胰臟 β 細胞損傷 (Lei *et al.*, 2012) 。

5. 降血壓

Kubo 等人 (1996) 利用舞菇子實體磨粉餵食高血壓老鼠八週後，發現老鼠血液中的膽固醇、三酸甘油酯、磷酯質含量與正常老鼠無異，若餵食老鼠高膽固醇食物後再餵食舞菇粉末亦可維持 HDL 基礎含量，降低血液中膽固醇。Choi 等人(2001)將舞菇子實體分別用冷水、熱水、乙醇及甲醇萃取後，測試對血管緊縮轉換酵素 (ACE) 的抑制活性，結果顯示冷水萃取表現出最高的抑制活性，顯示舞菇子實體對血管緊縮轉換酵素具有抑制活性功效，可表現出降低血壓之效果。

6. 保肝作用

舞菇萃取物可以顯著降低由口服 4-乙酰胺基分造成的肝損傷，作用機制為降低血液中的谷丙轉胺酶 (ALT) 活性和谷草轉胺酶濃度 (AST)。此外可激活被抑制的 T 細胞活性，逐漸減輕肝炎病症 (Vincent *et al.*, 2000) 。

7. 抗氧化

食藥用菇類具有良好的抗氧化性質。相關研究指出靈芝、雲芝及香菇等之子實體水萃取物及其菌絲體發酵代謝產物中之多醣體均具有清除超氧

自由基的功能 (Okamura, 1994)。而研究指出，自由基、活性氧、脂質過氧化作用與許多併發症有直接關係。

Mau 等人 (2004) 發現舞菇菌絲體在 DPPH 自由基清除能力、總抗氧化力、螯合亞鐵離子能力及還原力測定中具抗氧化力；Fan 等人 (2011) 亦以舞菇多醣進行抗氧化力試驗，在 DPPH 自由基清除能力及總抗氧化力測定中具抗氧化力。



二、食藥用菇類多醣簡介

多醣體是由多數單醣類（葡萄糖、果糖等）結合而成的高分子有機物，與一般常見醣類（澱粉、糊精、肝醣）的分子結構不同。許多文獻指出，從食藥用菇（子實體、菌絲體）分離之多醣體，具有良好的免疫及生理活性 (Wasser, 2002)。自 1960 年代開始，許多研究報告即發現多醣體具有良好的抗癌效果，然而每種多醣體的效用都不盡相同，這些多醣體各自擁有獨特的功效及對特定癌症具有療效。多醣體為自然界中含量相當豐富的生物聚合物質，在微生物體中多醣體的存在形式分為三大類：

1. 胞內多醣 (Intracellular polysaccharides)：主要提供微生物生長所需能量及碳源。
2. 結構多醣 (Structural polysaccharides)：為組成菌體構造中的多醣成分。
3. 胞外多醣 (Extracellular polysaccharides)：通常是附著於細胞外部的黏性物質。

(一) 多醣體抗腫瘤活性

Ikekawa 等人 (1969) 研究七種食用菇類子實體熱水萃取物對 Sarcoma 180 誘導模式小鼠之抗腫瘤活性，結果顯示可有效抑制腫瘤增生及提高腫瘤完全衰退 (complete regression)，日後由許多研究者證實其萃取物成分主要為多醣體。目前已有多種菇類多醣已確定具抗腫瘤活性例如：赤芝 (*Ganoderma lucidum*)、桑黃 (*Phellinus linteus*) 及巴西蘑菇 (*Agaricus blazei*) (Miyazaki and Nishijima, 1981; Han *et al.*, 1999; Mizuno *et al.*, 1999)。

構成多醣體的單醣種類、化學鍵結的方式，或是分子量大小的不同，

對其生理活性皆會有影響，因此並非所有的多醣體都具有抗腫瘤的功能。

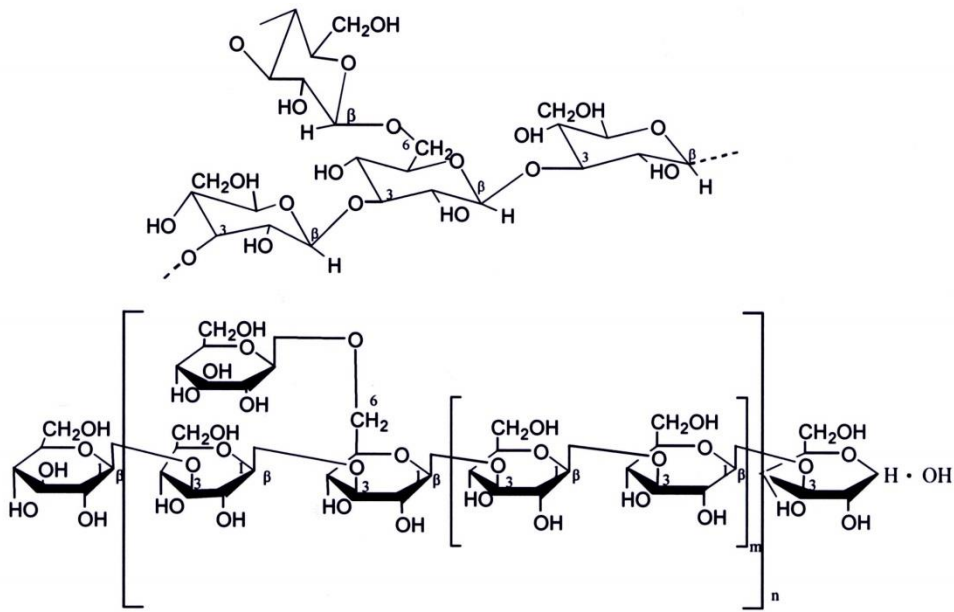
多醣體抗腫瘤活性會受到多種特性影響包括：

1. 分子量

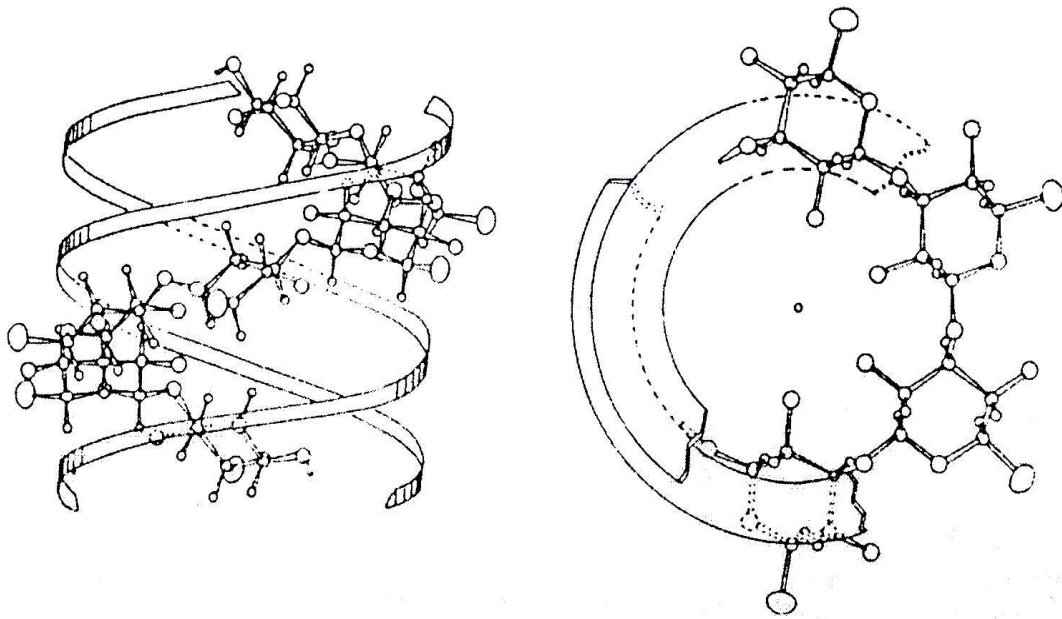
林等人 (2007) 指出多醣體的抗腫瘤活性與其分子量有一定關係，可能與多醣分子形成的高級構型有關。卯 (2000) 指出十種菇類多醣體 (靈芝多醣、猴頭菇多醣、雲芝多醣及蜜環菌多肽葡聚醣等)，其 β -glucan在分子量分布上有相當大的差異而使其生理活性有所差別；可分為三類：(1) 分子量在3000~5000 Da 左右者具降血糖功能，(2) 在 $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ Da 具抗發炎作用及 (3) 在 3.0×10^4 Da 以上具抗腫瘤作用。

2. 整體構型

多醣體的醣苷鍵結類型、主鏈支鏈鍵結的型式等皆會影響多醣體抗腫瘤活性。近年來研究證實，以 β - (1 \rightarrow 3) -D-glucan 為主鏈，以 β - (1 \rightarrow 6) -D-glucan 為支鏈的多醣體其抗腫瘤的效果最佳 (Wasser, 2002)，其結構如圖二 (水野和川合，1999) 所示。另有利用 X-射線繞射分析其立體結構結果，證實具活性的 β - (1 \rightarrow 3) -D-glucan 為一三股右旋螺旋 (triple helix)，其結構如圖三所示，此類型的結構可能是引發抗腫瘤作用的主要成因 (水野和川合，1999)。Surenjava 等人(2006)研究發現二甲基亞砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 會破壞 β - (1 \rightarrow 3) -D-glucan 之三股螺旋結構而導致其抗腫瘤活性下降。



圖二 具抗腫瘤活性的 β -(1 \rightarrow 6) 分支 β -(1 \rightarrow 3) -D-葡聚糖結構。
 Fig. 2 Structure of anti-tumor portion of β -(1 \rightarrow 3) -D-glucan with β -(1 \rightarrow 6)-branching side chain.
 (水野和川合，1999)



圖三 X射線衍射測定之 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖結晶結構。

Fig. 3 The crystal structure of β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan by X-ray analysis.
(水野和川合，1999)

3. 組成

Liao等人 (2013) 指出構成多醣體的單醣種類對於多醣體抗腫瘤活性有很大影響，研究顯示靈芝多醣體中的單醣岩藻糖 (fucose) 與其抗腫瘤活性有密切關連，若將岩藻糖去除，則靈芝多醣的抗腫瘤活性會大幅度下降。

4. 官能基

一些多醣體抗腫瘤活性與其所含的化學基團密切相關，因此可透過人為的化學修飾將基團接上或移除來提升多醣體的活性 (林等人，2007)。Wang等人(2006)自多孔真菌茯苓 (*Poria cocos*) 分離出一種非水溶性多醣體PCS3-II，將其分別進行硫酸化 (sulfated) 及羧甲基化 (carboxymethylated) 化學修飾後，對Sarcoma 180 腫瘤細胞的抑制活性顯著提升，推論經由化學修飾後會增加PCS3-II 的水溶性而使其活性提升。Zhang等人(2012)發現赤芝 (*Ganoderma lucidum*) 胞外多醣體 (GLP) 經硫酸化修飾後之 sulfated GLP會提升對六種癌細胞產生抑制活性的作用 (表一)。

5. 複合物

某些多醣體會與核酸或者蛋白質形成複合物，而這些複合物對於多醣體抗腫瘤活性也有影響，Surenjav等人 (2006) 比較香菇 (*Lentinus edodes*) 多醣體 (L-I₁, L-I₂, L-I₃, L-I₄) 及其去除結合蛋白質 (LNP-I₁, LNP-I₂, LNP-I₃, LNP-I₄) 的多醣體對於腫瘤細胞Sarcoma 180的抑制活性，發現蛋白質被去除後會降低香菇多醣體的抗腫瘤活性 (表二)。

表一 靈芝胞外多醣體及硫酸化靈芝胞外多醣體對癌細胞抑制活性
 Table. 1 Inhibition activity of GLP and sulfated GLP on carcinoma cells.

Samples	Dosage ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition rate (%)					
		KB	SGC-7901	HePG2	BEL-7402	MCF-7	SHZ
Control		ND ^a	ND	ND	ND	ND	ND
GLP	25	ND	ND	ND	9.33	19.94	ND
	50	ND	4.36	ND	11.19	21.14	1.81
	500	ND	6.57	ND	18.33	16.60	10.4
Sulfated GLP (DS= 1.46)	25	8.89	10.13	27.81	17.64	20.60	42.90
	50	19.66	13.77	42.26	24.23	30.09	52.30
	500	34.46	46.60	74.79	55.46	40.20	85.88

(Zhang *et al.*, 2012)



表二 香菇多醣體對腫瘤細胞 Sarcoma 180 之抗腫瘤活性

Table 2 Antitumor activities of mushroom (*Lentinus edodes*) polysaccharides against Sarcoma 180 tumor cells.

Sample	Structural feature	Dose (mg kg ⁻¹ × days)	Inhibition ratio (%)	Enhancement ratio of body weight (%)
Control				44.2
FU-5		20 × 7	48.6	39.1
L-I ₁	With bound protein	20 × 7	12.1	55.0
		60 × 7	47.8	29.1
L-I ₂	With bound protein	20 × 7	25.9	41.3
		30 × 7	40.7	34.7
		60 × 7	54.5	31.4
L-I ₃	With bound protein	20 × 7	50.0	42.7
		30 × 7	63.0	37.1
		60 × 7	70.0	27.4
L-I ₄	With bound protein	20 × 7	20.3	33.3
		30 × 7	31.8	46.1
		60 × 7	37.1	45.0
Control				45.4
FU-5		20 × 7	51.7	35.6
LNP-I ₁	Without bound protein	20 × 7	7.5	57.8
		60 × 7	17.1	58.6
LNP-I ₂	Without bound protein	20 × 7	0.6	52.2
		30 × 7	20.7	56.3
		60 × 7	30.4	45.3
LNP-I ₃	Without bound protein	20 × 7	12.1	50.9
		30 × 7	17.2	37.1
		60 × 7	41.4	45.0
LNP-I ₄	Without bound protein	20 × 7	9.8	49.6
		30 × 7	19.5	46.7
		60 × 7	37.6	45.4

(Surenjava *et al.*, 2006)

(二) 多醣體抗腫瘤機制

1. 預防癌症功能：

日本長野縣流行病學研究指出，一些種植金針菇 (*Flammulina velutipes*) 的菇農，死於癌症的比例顯著低於其他同縣市內的人 (Ikekawa, 2001)。

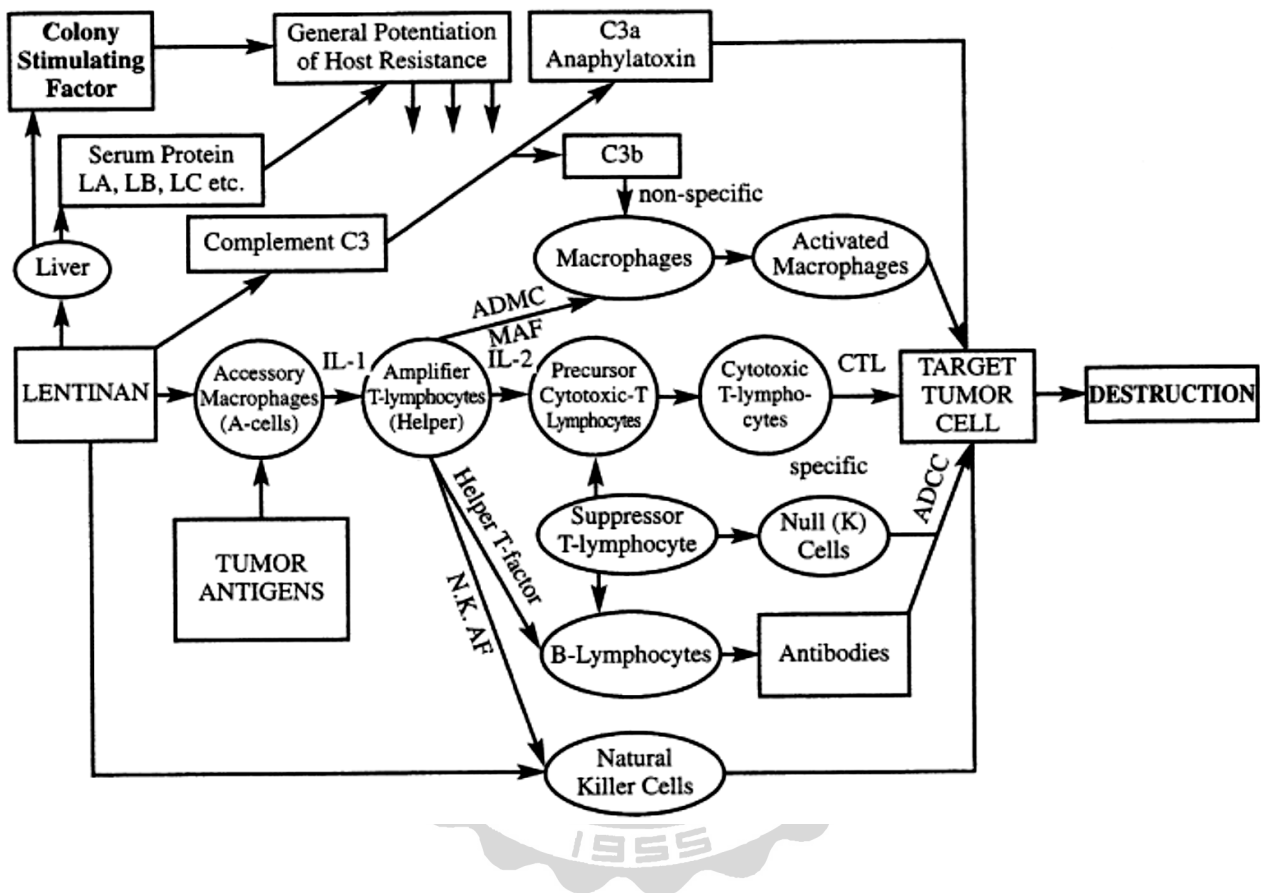
Kobayashi (1993) 指出雲芝 (*Coriolus versicolor*) 多醣 PSK (polysaccharide Krestin) 具降低大鼠經化學性誘導及輻射誘導之致癌機率。

2. 增進免疫功能：

多醣體可藉由增強宿主的免疫功能，從而抑制癌細胞的增生或將其排除，可歸類為一種生物反應調節劑 (Wasser, 2002)。

以香菇多醣 lentinan 對人體的免疫系統作用為例，lentinan 能從巨噬細胞或是 T 細胞誘導產生 interleukin-1 (IL-1) 因子，使未成熟的細胞殺傷性 T 前驅細胞、細胞管制輔助性 T 前驅細胞、自然殺手細胞 (NK) 等成熟分化，增加寄主免疫擔當細胞的受體，提高其對 IL-2、NK 活性因子 (NKAF)、巨噬細胞活化因子 (MAF) 等各種細胞激素的反應性，進而活化細胞殺傷性 T 細胞、NK 細胞、細胞殺傷性巨噬細胞或延遲型過敏反應有關的細胞群，最後以特異性或非特異性殺傷破壞目標 (水野和川合, 1999)，以上免疫活性總結如圖四所示 (Wasser, 2002)。

跨膜蛋白 Dectin-1 為存在於巨噬細胞 (macrophages)、樹突細胞 (dendritic cell) 及嗜中性白血球 (neutrophils) 等細胞之表面受體，其與 β -(1→3)-D-glucan 結合可促進和調節先天性免疫反應，進一步影響免疫細胞活性，包括吞噬作用及細胞激素 (cytokines) 釋放，部分細胞激



圖四 香菇多醣 lentinan 之增進免疫作用途徑。

Fig. 4 Possible pathways of immuno-enhancing activity by lentinan. (Wasser, 2002)

素在癌症治療中起著重要的作用 (Brown *et al.*, 2003; Herre *et al.*, 2004)。

3. 直接抑制癌細胞功能：

多醣體以阻斷細胞週期並誘導細胞凋亡的方式來直接導致腫瘤細胞的死亡，Zhang 等人(2006)從菇類菌核側耳菌 (*Pleurotus tuber regium*) 分離出一種多醣體 carboxymethylated polysaccharides (CMPTR)，再以 CMPTR 處理 MCF-7 人類乳癌細胞，發現其會降低 cyclin D1、cyclin E 及 Bcl-2 (抗凋亡蛋白) 的表現，並增加 Bax (促細胞凋亡蛋白) 的表達，使其阻滯於 G1 期，達到抑制細胞增殖的效果。



三、食藥用菇類之深層培養

食藥用菇類的深層培養 (submerged cultivation) 建立於抗生素的發酵技術基礎, 1948 年由 Humfeld 首先利用此培養技術培養四孢蘑菇 (*Agaricus campestris*) 的菌絲體。深層培養之目的為減少生產成本, 並在短時間內有效的提高生質 (biomass) 與代謝物 (metabolites) 的產量, 同時增加食藥用菇類的市場競爭力。

(一) 深層培養之定義

相較於一般的固態培養, 所謂的深層培養是指在液態的環境下固定培養基的組成份, 並且有效率的控制 pH 值、溫度、通氣量和攪拌 (或震盪) 速率等條件下, 進行微生物的培養, 以製造生質與其他的代謝物。食藥用菇類在深層培養不會產生孢子 (sporulation), 而菌絲體因受到外力 (剪切力) 的作用會形成菌絲球 (pellets) 的形態 (鄭, 2002)。

(二) 深層培養與傳統固態培養之差異

食藥用菇類深層培養與傳統固態培養相比, 最大差異為大幅縮短培養時間 (王, 2002) 及改善菌絲體與培養基質不易分離的問題 (毛, 2009)。

傳統固態培養是在開放的空間利用椴木、木屑、太空包等培養食藥用菇類的子實體, 生長環境容易受到溫度、濕度、重金屬等環境因素的影響, 且大部分菇類子實體的生長期都很漫長, 過程中需消耗大量人力與培養空間, 因此不適用於保健功效產品的生產。若藉由深層培養的方式生產菇類菌絲體與代謝物, 不僅可有效的控制其最適生長條件, 降低人力、培養時間、培養空間等生產成本, 也可以避免雜菌和重金屬等外界環境的污染, 故相較於傳統的固態培養, 深層培養在食品工業上更具有其發展的空間與

經濟價值 (王, 2005)。

(三) 影響深層培養的因素

菇類深層培養時，需考慮到會影響培養環境的不同化學及物理因子。一般常見的有培養基之組成份、通氣量、攪拌速率、溫度、pH 值等因素，以下介紹不同因素對發酵結果所產生的影響。

1. 碳源

碳源包括醣類、脂類、有機酸等，是菇類生長之重要因子，亦是構成菌體和代謝產物中碳基來源之營養物質。菇類因沒有行光合作用的能力，因此無法固定空氣中的二氧化碳 (趙等人, 2011)，碳源對於微生物主要的作用是提供能源以及細胞的生合成的重要成分，碳源不足易引起菌絲體衰老與自溶效應 (梁, 2001)。一般常用碳源有葡萄糖、果糖、蔗糖、麥芽糖以及乳糖等，一般單醣的使用速度要比雙醣及多醣快，而能被微生物快速利用的碳源稱為速效碳源，反之為遲效碳源 (汪等人, 2013)。

2. 氮源

氮源主要是構成菌體細胞結構，例如:蛋白質、胺基酸、核酸等，及合成含氮代謝產物，在碳源不足時也可當作能量來源。氮源可分無機氮源及有機氮源；無機氮源如硫酸銨、磷酸二氫銨等；有機氮源如酵母萃取物 (yeast extract)、玉米浸漬液 (corn steep liquor) 及蛋白胨 (peptone) 等，通常成分複雜而可提供多種的營養物質如維他命 B 群等 (表三)。但由於來源通常為天然原料加工製作，因此可能會因產地或加工方法不同而使得氮源精確成分不同 (韓等人, 2013)

表三 有機氮源營養成分

Table 3 Nutrient contents in organic nitrogen source.

成分	酵母萃取物	玉米浸漬液	黃豆餅粉
蛋白質 (%)	50.0	24.0	51.0
碳水化合物 (%)	-	5.8	-
脂肪 (%)	0.0	1.0	1.0
纖維 (%)	3.0	1.0	3.0
灰分 (%)	10.0	8.8	5.0
固形物 (%)	95.0	50.0	92.0
核黃素 (mg/kg)	-	5.73	3.06
硫胺 (mg/kg)	-	0.88	2.4
泛酸 (mg/kg)	-	74.6	14.5
菸鹼酸 (mg/kg)	-	83.6	21.0
吡哆醇 (mg/kg)	-	19.4	-
生物素 (mg/kg)	-	0.88	-
膽素 (mg/kg)	-	629	2750
精氨酸 (%)	3.3	0.4	3.2
胱氨酸 (%)	1.4	0.5	0.6
甘氨酸 (%)	-	1.1	2.4
組氨酸 (%)	1.6	0.3	1.1
異白氨酸 (%)	5.5	0.9	2.5
白氨酸 (%)	6.5	0.1	3.4
離氨酸 (%)	6.5	0.2	2.9
甲硫氨酸 (%)	2.1	0.5	0.6
苯丙氨酸 (%)	3.7	0.3	2.2
酥氨酸 (%)	3.7	-	1.7
色氨酸 (%)	1.2	-	0.6
酪氨酸 (%)	4.6	0.1	1.4
纈氨酸 (%)	4.4	0.5	2.4

(韓等人, 2013)

3. 碳氮比

所謂的碳氮比是指培養基中總碳量和總氮量的比值，常以 C/N 表示。碳氮比為深層培養重要的因素，會影響菇類菌絲的生長速率、代謝產物的濃度和菌絲體中蛋白質和脂質的含量。氮源過多，會使菌體生長過於旺盛，pH 偏高且不利於代謝產物的累積；氮源不足，則不利菌體成長，進而影響產物產量。碳氮比也隨碳源及氮源的種類以及通氣攪拌等條件而異（張等人，2013）。一般常見的食用菇類最適合生長的碳氮比為 5~25 之間（黃，1996）。

4. 無機鹽類

在深層培養中所含的微量無機鹽類，會影響微生物的生長與代謝功能。Park 等人 (2001) 指出真菌在深層培養下添加適當的無機鹽類有助於菌絲體生長與多醣體等二次代謝物產生。菇類培養時常用的無機鹽類皆會含有磷、鎂、硫、鐵、鉀等元素，而無機鹽類的主要作用為：(1) 構成細胞組成成份；(2) 構成酵素的組成成份；(3) 維持酵素作用；(4) 調節新陳代謝；(5) 調節細胞滲透壓 (6) 控制細胞氧化還原電位 (7) 維持細胞結構穩定性（汪等人，2013）。

5. 生長因子

生長因子為對微生物代謝必不可缺且微生物無法自行合成的有機物；種類包括有維生素、甾醇、胺類、脂肪酸等（汪等人，2013）；而來源除了可額外添加於培養基外，有些有機氮源及碳源都可提供生長因子例如：玉米浸漬液及酵母萃取物等，彼等富含維生素及其它微量營養素也能幫助菌絲體的生長，因此也常被當作生長因子來利用。

6. 溫度

微生物培養的過程中，培養溫度是一個非常重要的因子，因為溫度是影響酵素活性的重要因素，亦是影響菇類生長速率與多醣體生成的重要因子，一般菇類菌絲體的最適培養溫度範圍約為 22~28°C (Eyal *et al.*, 1991)，而舞菇菌絲生長溫度為 5~32°C，對低溫有較強的抵抗力，在有抗凍劑的環境下可以在-196°C 液態氮保存數年而不失活 (趙等人，2011)。

7. pH 值

培養液之 pH 值是影響微生物在液態培養環境中生長的重要因子，舉凡培養液的緩衝效應、氧化還原反應、代謝產物的生成和酵素的作用等均有很大的影響 (Margaritis and Zajic, 1978; Forage *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 2005)。Shu and Lung (2004) 研究指出 pH 值會影響牛樟芝 (*Antrodia camphorate*) 之胞外多醣產量及分子量分布。舞菇菌絲體適合在微酸性培養機中生長，pH 以 5.5-6.6 較為適宜 (嚴等人，2013)，而培養過程可考慮選用生理酸鹼物質作為培養基成分或直接以酸鹼液來使發酵過程 pH 值維持在最佳條件。

8. 攪拌速率

菇類的發酵環境中，適當的攪拌主要是用來增加質傳及分散氣泡增加溶氧量，並使發酵液產生流動循環以增加氣泡的停留時間。搖瓶培養時是利用震盪來達到攪拌混合的效果，而發酵槽則是利用攪拌葉片及通氣來達成。攪拌可使發酵液與菌絲體均勻分布，有助於菌絲的生長及產物的生成，但過程中相對應的也會產生剪切力 (shear stress) 而使菌絲體死亡；崔等人 (2006) 研究舞菇 (*Grifola frondosa*) 發現攪拌速率越高，菌絲體直徑越小

且形態趨於鬆散絮狀；攪拌速率越低，菌絲球直徑越大且形態趨於緊密球狀，但過高或過低之攪拌速率皆會導致菌絲體產量降低，最佳菌絲體及胞外多醣體產量之攪拌速率為 80~100 rpm。李等人 (2012) 發現松茸 (*Tricholoma matsutake*) 菌絲體最佳攪拌速率為 70~90 rpm。

9. 通氣量

菇類屬好氧性微生物，在代謝過程中，氧氣為末端反應的電子接受者，可以產生能量以提供細胞活性，同時也可以調節酵素之間的作用。因此，深層培養時通氣量的改變會直接影響培養基當中的溶氧量 (dissolved oxygen, DO)，也會影響菌體的呼吸作用、酵素合成及代謝產物的生成 (Forage *et al.*, 1985; Rau *et al.*, 1992)。此外，由於真菌於形成菌絲球後會增加氧氣傳送至菌絲球內部的困難度，以及於產生胞外多醣體的過程中，胞外多醣體有時只分泌在菌體細胞表面，因此適當通氣可以促進菌體細胞表面多醣的形成及分泌至發酵液中 (鄭，2002)。

(四) 發酵槽種類之介紹

人類利用微生物來發酵並製造各種食品已經有非常久遠的歷史，但是一般傳統的發酵有很多缺點，如：容易被雜菌污染、無法有效控制培養的環境、產量與品質不穩定等，並不符合經濟效益上面的考量。因此，學者們發展出利用發酵槽 (fermentor) 培養的方式來改良傳統發酵的缺點，以達到提升產品的產量和控制產品的品質。發酵槽培養也是目前食品工業上廣泛應用的深層培養方式，每種發酵槽各有其適合的應用範圍及其優缺點 (表四)。

目前常見的發酵槽大致上可依照其結構與特性分為三大類，分別為攪拌式 (stirred - tank type)、氣泡式 (bubble column type) 以及氣舉式 (air-lift type) 發酵槽。其特性及優缺點分述如下：

1. 攪拌式發酵槽

工業上最被廣泛使用為攪拌式發酵槽，其基本構造 (圖五- a) 槽體底部具有進氣管 (air-inlet) 及機械式攪拌葉片 (impellers)；特性為藉由攪拌槽內的機械攪拌使流體及氣泡均勻地散布在整個系統中，且具有較高的剪切力、高質傳能力與混合性質佳 (Brauer, 1985)。化學工業上因為攪拌式發酵具有高剪切力的特性，所以適用於高黏度的流體系統中；而在發酵工業上，此類發酵槽經常被用來進行好氧性微生物的發酵程序。攪拌式發酵槽雖被廣泛使用但仍有下列缺點：

表四 不同型式發酵槽之優缺點比較

Table 4 Advantages and disadvantages of different types of fermenters

發酵槽	優點	缺點
攪拌式發酵槽	<ol style="list-style-type: none"> 1.混和效果佳 2.適合高黏度培養液 	<ol style="list-style-type: none"> 1.產生額外熱量 2.過高的剪切力
氣泡式發酵槽	<ol style="list-style-type: none"> 1.構造簡單 2.成本低 3.剪切力較低 4.無機械性產熱 	<ol style="list-style-type: none"> 1.混和效果差 2.不適合高黏度培養基
氣舉式發酵槽	<ol style="list-style-type: none"> 1.導流效果好 2.較低剪切力 	<ol style="list-style-type: none"> 1.不適合高黏度培養基 2.氧氣傳導較差

(董，2001)

- (1) 攪拌翼快速運作時所產生的高剪切力，對菌絲體會造成一定程度的傷害，對微生物的生長型態、代謝機制、生長速率和產物產量等也會有很大的影響。
- (2) 機械攪拌在發酵過程易產生熱量，對於培養的環境會造成影響。
- (3) 機械攪拌需要較高的動力成本，會提高生產時的總成本。
- (4) 機械攪拌裝置設置在大型的發酵槽上會有其困難度。
- (5) 發酵槽中間的轉動軸可能會因為設計不良而造成雜菌污染。

2. 氣泡式發酵槽

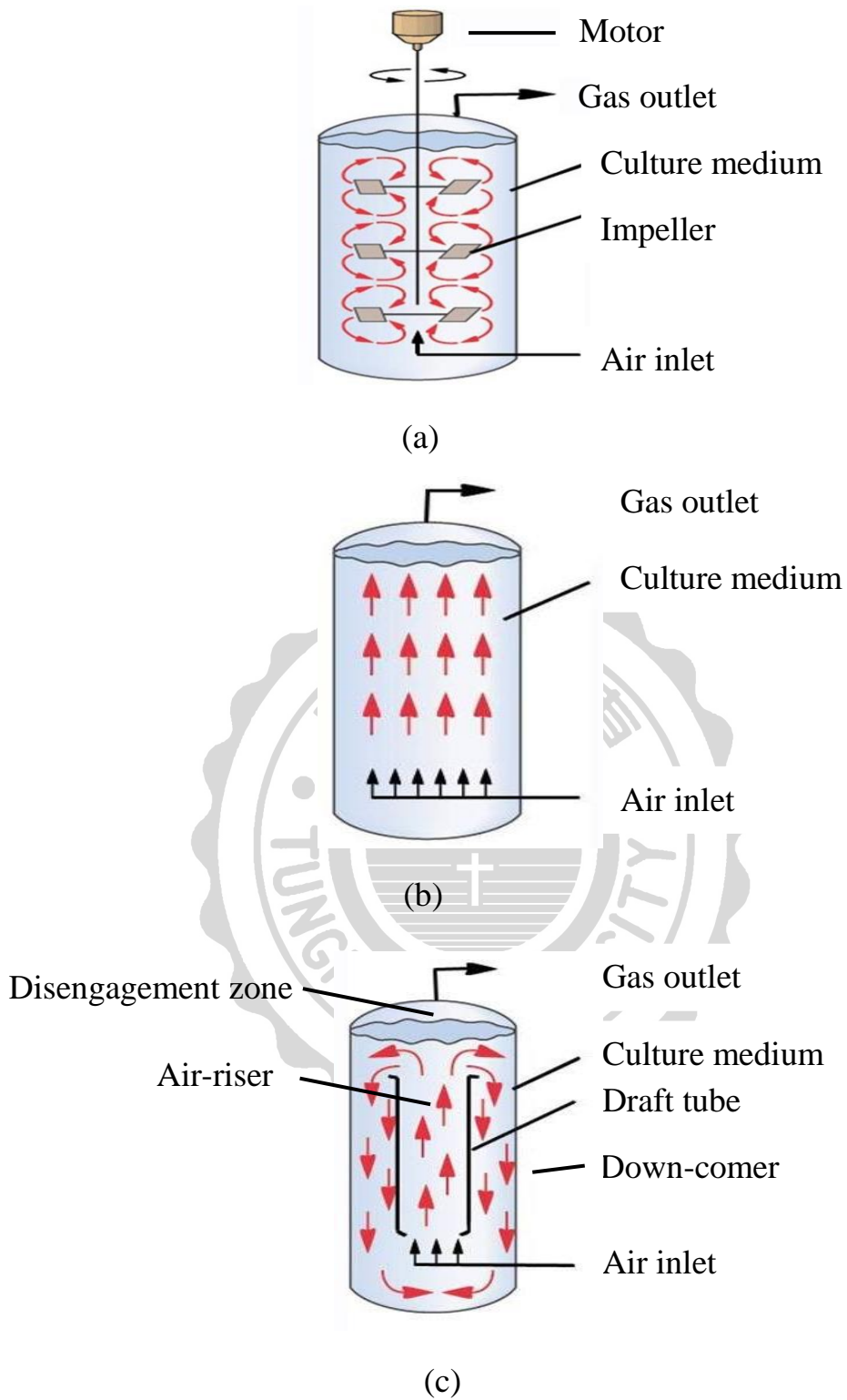
氣泡式發酵槽是發酵槽中構造最簡單的，由槽體內部主要結構(圖五-b)只有一個進氣管 (air-inlet)，特性為利用通入的氣體帶動整個培養的系統，以混合固液氣三相 (王和黃，2001)。此發酵槽的優點有：不具攪拌葉片，故不需要額外的動力成本，也不會造成機械性產熱；剪切力極低，對微生物的生長影響較小；槽體構造簡單及建造成本低。氣泡式發酵槽的特性較適合應用在生化工程上，尤其在近年來，動植物細胞培養為生物技術中研究的重點之一，氣泡式發酵槽具低剪力的特性極適合用來培養此類細胞。然而氣泡式發酵槽亦有其使用上之缺點：

- (1) 不易利用氣泡來達成固液氣三相的均勻混合，可能會造成混合不均影響微生物的生長。
- (2) 因為剪切力低，所以不適合應用在高黏度流體的系統，此外也易產生泡沫過多的問題。
- (3) 剪切力低容易造成菌體生長時體積過大，內部無法有效獲得養分而裂解。

3. 氣舉式發酵槽

氣舉式發酵槽的構造 (圖五- c) 可分為四個區域，由一個中空套筒 (draft tube) 將發酵槽內的流體分隔為空氣上升區 (air-riser) 和下降區 (down-comer)，再加上內管上方的氣-液分離區 (disengagement zone) 及底部進氣管 (air-inlet) (王和黃，2001)。應用的原理是利用進氣管排出的空氣會由中空套筒內部的空氣上升區將流體透過產生的向上力從發酵槽底部帶動到發酵槽頂部，過程中流體本身具有較大的氣體滯留量，當流體到達上升區上層的氣液分離區時器體會向上逸出，之後流體再往下流入中空套筒外部的下降區中。流體本身則會因為上升、下降兩區之間的氣體滯留量及其密度影響而形成循環對流的效果，有利於固液氣三相的混合及熱傳。氣舉式發酵槽的主要缺點為：

- (1) 剪切力較低，所以不適合應用在高黏度的流體系統。
- (2) 培養後期菌絲體增加及液體黏度增加都會使對流循環效果下降，並可能使菌絲體堆積在套筒外側或套筒與出氣孔之間。
- (3) 培養的過程中培養液液面不能低過中空套筒，否則無法產生液體對流循環的效果。
- (4) 發酵槽內部因為構造較為複雜，容易使微生物附著在接縫處而影響發酵的進行。



圖五 不同型式發酵槽之構造。(a) 攪拌式，(b) 氣泡式，(c) 氣舉式。
 Fig. 5 Different types of fermentors. (a) stirred-tank type. (b) bubble column type. (c) air-lift type.

參、材料與方法

一、試驗材料

(一) 試驗菌種

舞菇菌種 (*Grifola frondosa*)，由東海大學食科所梁志弘教授提供，並經麗豐實業股份有限公司菌種鑑定 (附圖一)。

(二) 培養基

1. Potato dextrose Agar (PDA)



Potato starch	4 g
Dextrose	20 g
Agar	15 g
Water	1000 mL
pH	5.6

2. Yeast & Mold Agar (YMA)

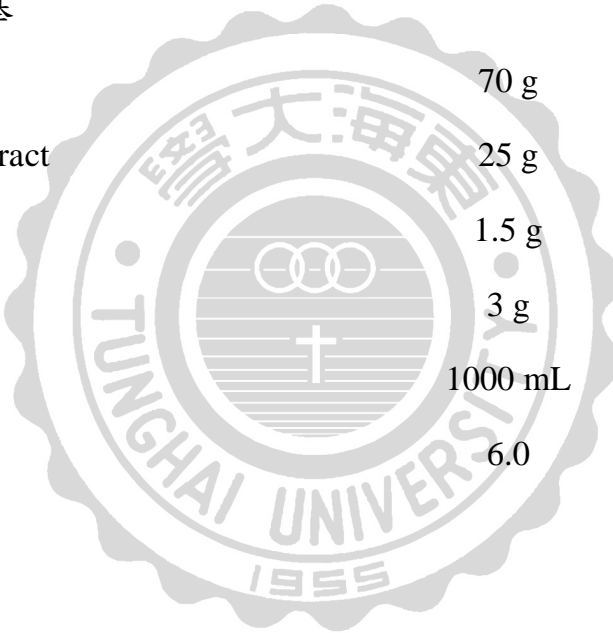
Yeast extract	3 g
Malt extract	3 g
Peptone	5 g
Dextrose	10 g
Agar	20 g
Water	1000 mL
pH	6.2

3. 基礎培養基 (Basal medium)

Glucose	10 g
Yeast extract	5 g
MgSO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	3 g
Water	1000 mL
pH	5.6

4. 修飾培養基

Sucrose	70 g
Yeast extract	25 g
FeSO ₄	1.5 g
KH ₂ PO ₄	3 g
Water	1000 mL
pH	6.0



(三) 重要藥品

1. 乳糖 (lactose)、麥芽糖 (maltose)、磷酸二氫鈉 (sodium dihydrogen phosphate) 等購自日本林純藥株式會社。
2. 磷酸二氫銨 (ammonium dihydrogen phosphate)、硫酸銨 (ammonium sulfate)、磷鉬酸酚試劑 (Folin-Ciocalteu reagent) 等購自德國 Merck 公司。
3. 葡萄糖 (glucose)、蔗糖 (sucrose) 購自西班牙 Scharlau 公司。
4. 果糖 (fructose)、蛋白胨 (peptone)、牛肉萃取物 (beef extract powder)、(Potato dextrose broth)、洋菜粉 (agar) 等購自印度 Himedia 公司。
5. 酵母萃取物 (yeast extract) 購自美國 BD 公司。
6. 消泡劑 購自日本信越化學工業。
7. 玉米浸漬液 (corn steep liquor)、葡萄糖胺 (glucosamine)、peroxidase、ABTS [(2,2-Azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid))]、DPPH (α,α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl)、三氯醋酸 (trichloroacetic acid)、ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt)、Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)、EDTA (ethylenedinitrilo tetraacetic acid disodium salt dehydrate)、沒食子酸 (gallic acid)、麥角硫因 (ergothioneine) 等購自美國 Sigma-aldrich 公司。
8. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (magnesium sulphate-7-hydrate)、酚 (phenol)、硫酸 (sulfuric acid)、磷酸二氫鉀 (potassium phosphate, Monobasic)、氫氧化鈉 (sodium hydroxide)、過氧化氫 (dihydrogen dioxide)、鹽酸 (hydrochloric acid) 等購自台灣自聯工化學試藥。

9. 氰甲烷 (acetonitrile)、甲醇 (methanol) 等購自美國 J. T. Baker 公司。
10. 葉酸 (folic acid) 購自日本和光純藥工業株式會社。
11. 乙醇 (ethyl ethanol) 購自台灣菸酒公賣局。
12. 過氧化氫 (hydrogen peroxide) 購自日本和光純藥工業株式會社。
13. 半乳糖 (galactose) 購自德國 Ferak 公司。

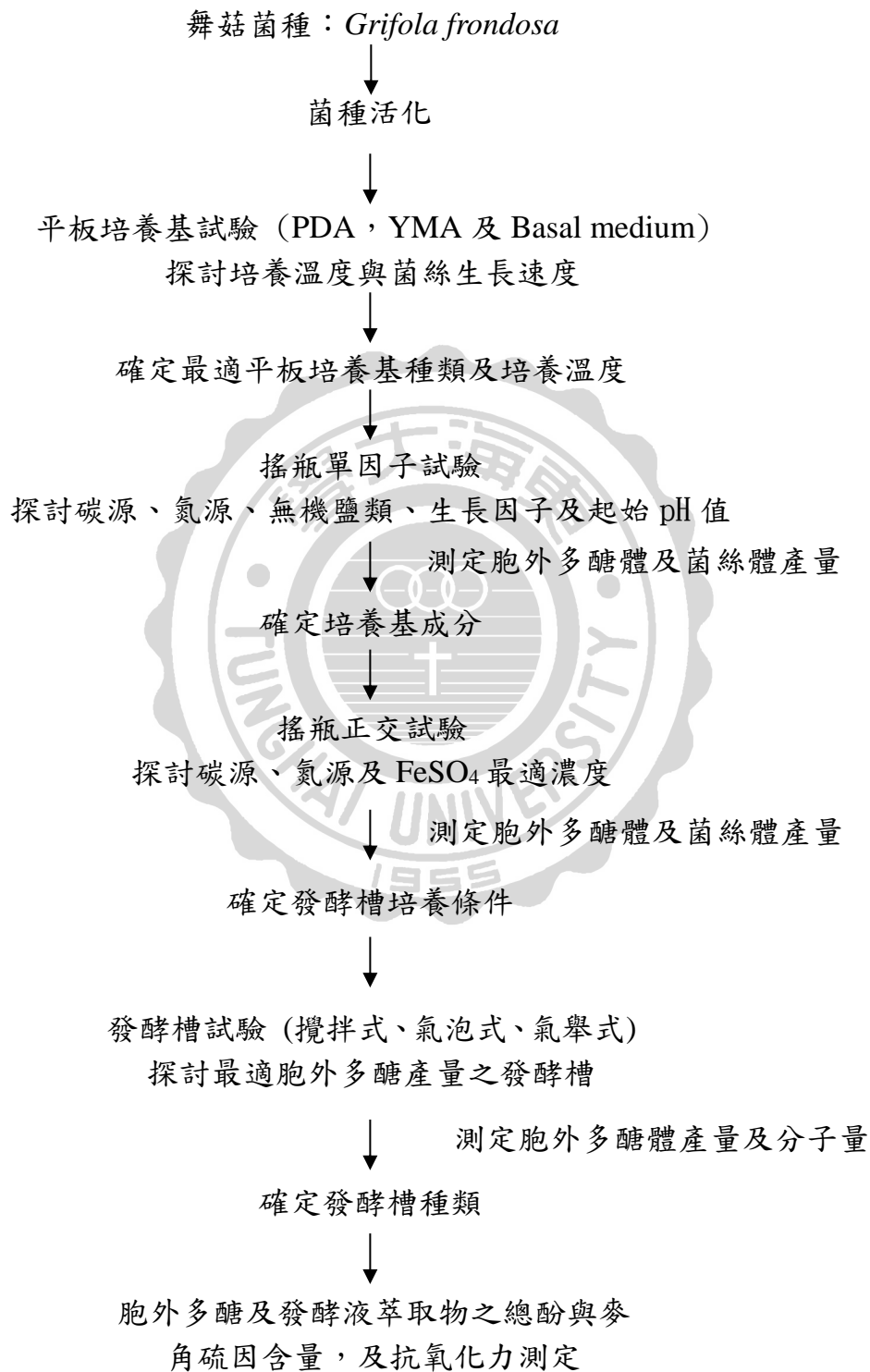


二、試驗儀器

1. 恆溫培養箱：FIRSTEK™ (Model-RI100、Model-RI150 及 Model-TG5)；TKS (Model-LTI601)，Firstek 公司，台灣。
2. 高溫高壓滅菌釜：永大明儀器公司，台灣。
3. pH meter：inolab (Model-Level 1)，W.T.W.公司，德國。
4. 冷凍高速離心機：Hitachi (Model-himac CR22G II)，日本。
5. 高效能液相層析儀：Hitachi Chromaster (Model-5110) pump，Hitachi Chromaster (Model-5430) Diode Array detector，Hitachi Chromaster (Model-5450) RI detector，日本。
6. 熱風乾燥機：Model-RHD 603，RISEN 公司，台灣。
7. 桌上型攪拌式發酵槽：Model-polygerm1000，MGT 公司，台灣。
8. 桌上型氣舉式及氣泡式發酵槽：MG1000S-7L，MGT 公司，台灣。
9. 旋轉減壓濃縮機：Model-R-2000V1，PAMCHOM 公司，德國。
10. 迴轉式振盪低溫恆溫培養箱：Model-S302R，Firstek 公司，台灣。
11. 水平式無菌操作檯：Model-TW 14U，LIAN SHEN 公司，台灣。
12. 恆溫水浴鍋：TKS (Model-KB-02)，KANSIN 公司，台灣。
13. 分析天平：Model-AB104 S，METTLER TOLEDO 公司，瑞士。
14. 分光光度計：Model-Spectrnic 601，Thermo Fisher Scientific，美國。
15. 電腦分析軟體：SAS™ R9.1 (SAS Institute Inc, USA)。
16. 電腦繪圖軟體：Sigmaplot-scientific Graphing Software Version 2000 (Microsoft Inc, USA)。
17. 酵素免疫分析儀 ELISA reader (型號 MRXII microplate reader, DYNEX, USA)

三、試驗方法

(一) 試驗流程



(二) 菌種貯存

將培養於 PDA 平板培養基上之舞菇菌菌種，於菌絲生長之最外緣部分以滅菌打孔器（直徑 7mm）挖取並接種至含有 PDA 斜面培養基之滅菌試管（直徑 12mm），於 25°C 培養直到菌絲長滿 PDA 培養基，再倒入滅菌冷卻後之礦物油覆蓋斜面（超過最高斜面高度約 1 cm）；封蓋及貼上石蠟膜，置於 4°C 保存，此即為貯存菌種 (stock culture)。每三個月活化並重複此步驟以確定菌種活性。

(三) 菌種活化

將貯存菌種內的礦物油移去後，以過火之接種環挑取適當菌絲塗抹在 PDA 平板培養基上，於 25°C 下培養至新生菌絲長出，再以滅過菌之穿孔器挖取外緣部分菌絲塊，移種於另一 PDA 平板培養基中央，於 25°C 培養 5 天後，重複以穿孔器取菌絲塊再移種一次即完成活化。

(四) 種菌培養

將活化後之菌絲，以滅過菌之穿孔器挖取 5 塊外緣部分的菌絲塊後，置入含 100 ml 液態基礎培養基之有溝三角錐瓶 (250 ml) 中，於 30°C 震盪培養 (150 rpm) 10 天，培養液中會形成直徑約為 0.3 cm 之菌絲球，此即為種菌 (seed culture)。

(五) 種菌懸浮液之製作

將前述震盪培養所得種菌 (含培養液)，以高速攪拌機打碎 5 次 (20 秒/次)，間隔時間為 10 秒，所得菌絲液即為種菌懸浮液。將經過 10 天震盪培養 (一級搖瓶) 所得之種菌懸浮液接種 (10%,v/v) 移至 250 ml 有溝

三角錐瓶 (含 100 ml 液態基礎培養基)，此即為二級搖瓶，爾後即以二級搖瓶進行各項搖瓶試驗。

(六) 平板培養基試驗

以滅過菌之穿孔器在完成菌種活化後的培養基上挖取相同大小之培養皿外緣部分菌絲塊，移種至測定之平板培養基中央依照不同測定條件進行培養，每日量取其菌絲生長範圍之直徑 (cm)，測定菌絲生長速度。

平板培養試驗測定條件

- (1) 平板培養基：選用 PDA、YMA 及基礎培養基進行測試。
- (2) 培養溫度：以 20、25、30 及 35°C 四種不同溫度進行測試。

(七) 搖瓶試驗

以平板培養所得之最佳培養溫度及液態基礎培養基，進行單因子變動試驗，即除探討因子變動外，其餘基礎培養條件維持不變。

1. 基礎培養條件

- (1) 碳源：glucose (1.0%)
- (2) 氮源：yeast extract (0.5%)
- (3) 無機鹽類： $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.1%)
- (4) 接菌量：5% (v/v)
- (5) 培養溫度：30°C
- (6) 震盪速率：150 rpm

(7) 起始 pH : 5.6

(8) 載液量 : 100 ml 培養液於 250 ml 有溝之三角錐瓶中。

2. 變動培養條件

(1) 碳源 : 選用三種單醣 (glucose、fructose、galactose) 及三種雙醣 (lactose, sucrose, maltose) 進行測試, 添加量均為 1% (w/v)。

(2) 氮源 : 選用五種有機氮源 (urea, malt extract, peptone, beef extract, yeast extract) 與三種無機氮源 (NH_4NO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$) 等八種氮源進行測試, 添加量均為 0.5% (w/v)

(3) 無機鹽類 : 選用 NaCl , KCl , CaCl_2 , FeSO_4 , CuSO_4 , ZnSO_4 及 MgSO_4 等七種無機鹽類進行測試, 添加量為 0.1% (w/v)。

(4) 生長因子 : 選用 thiamine, riboflavin 及 folic acid 三種生長促進物質進行測試, 添加量均為 0.3% (w/v)。

(5) 起始 pH : 4.0~8.0

3. 正交試驗 :

正交試驗設計 (Orthogonal experimental design) 為利用數理統計學, 從全面試驗中挑選出部分有代表性的因素, 再透過正交表來安排多因素、多水平試驗。可以較少的試驗次數獲得全面情況的試驗資料, 克服了單因子試驗不能全面考察因素的影響與因素之間交互效應的缺點, 是一種高效率、快速、經濟的試驗方法 (汪等人, 2013)。

正交試驗採用搖瓶試驗中 2. (1)、2. (2)、2. (4) 結果, 選取最適碳源 (sucrose)、氮源 (yeast extract) 及無機鹽類 (FeSO_4) 作為試驗因子, 並採用 $L_9(3)^3$ 進行三因子三水平正交試驗, 探討前述三因子最佳濃度比

例。其正交試驗參數表格列於結果與討論（表十一及表十二）。

結果將分別計算三因子之三水平算術平均值 K_1 、 K_2 及 K_3 ，再計算各因子之極差 R 值，計算分析方法如下（以 A 為範例）：

將每個因子的水平 1、2 及 3 各別試驗結果相加並平均，即是將每個水平成三組 K_1 、 K_2 及 K_3

$$A \text{ 的 } K_1 = (0.14+0.22+0.33) / 3 = 0.23$$

$$A \text{ 的 } K_2 = (0.20+0.21+0.42) / 3 = 0.28$$

$$A \text{ 的 } K_3 = (0.20+0.18+0.50) / 3 = 0.29$$

R 值為極差，為各因素 K 最大值減去最小值即為極差，極差越大表示對結果影響程度越大

$$A \text{ 的 } R = 0.29 - 0.23 = 0.06$$

另外再進行變異數分析 (variance analysis)，目的是將實驗因子水平變化所引起的實驗結果差異誤差波動所引起的實驗結果間的差異區分開來的一種數學方法。極差分析其優點為直觀、簡單且適用範圍廣，但缺點是分析結果較粗糙，往往不能從理論上給予確切的說明，當實驗結果存在有混雜現象時，往往會得出錯誤結論；而變異數分析其優點是透過統計分析的方法排除實驗誤差的干擾，得出比較科學的實驗結論（張等人，2013）。

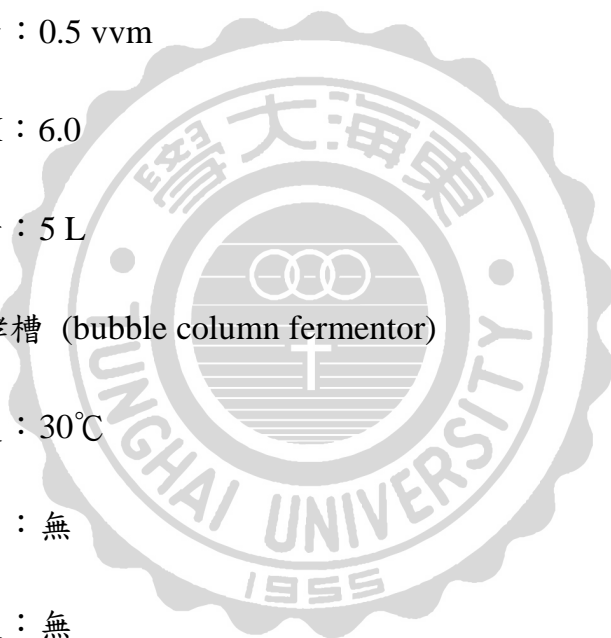
(八) 發酵槽試驗

1. 攪拌式發酵槽 (stirred-tank fermentor)

- (1) 培養溫度：30°C
- (2) 攪拌葉片：六片標準式渦輪葉
- (3) 攪拌速度：150 rpm
- (4) 接種量：5% (v/v) 種菌懸浮液
- (5) 通氣量：0.5 vvm
- (6) 起始 pH：6.0
- (7) 操作體積：5 L

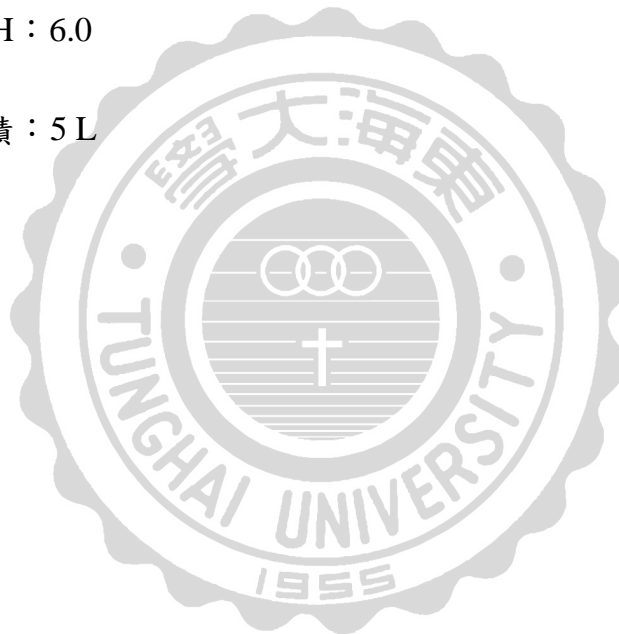
2. 氣泡式發酵槽 (bubble column fermentor)

- (1) 培養溫度：30°C
- (2) 攪拌葉片：無
- (3) 攪拌速度：無
- (4) 接種量：5% (v/v) 種菌懸浮液
- (5) 通氣量：0.5 vvm
- (6) 起始 pH：6.0
- (7) 操作體積：5 L



3. 氣舉式發酵槽 (air-lift fermentor)

- (1) 培養溫度：30°C
- (2) 攪拌葉片：無
- (3) 攪拌速度：無
- (4) 接種量：5% (v/v) 種菌懸浮液
- (5) 通氣量：0.5 vvm
- (6) 起始 pH：6.0
- (7) 操作體積：5 L



四、分析方法

(一) 菌絲體乾重測定

將定量之菌絲體培養液以烘乾後之濾紙 (No.2) 進行抽氣過濾，再將濾紙上的菌絲體以蒸餾水沖洗三次後，將帶有菌絲體的濾紙於 60°C 之烘箱乾燥至恆重。所得重量扣除濾紙乾重即為菌絲體之乾重，單位以 g dry wt./L 培養液表示。

(二) pH 值測定

使用 pH meter (inolab Level 1) 直接測定發酵液之 pH 值。

(三) 胞外多醣測定

1. 胞外多醣之萃取

取 1.0 ml 發酵液與 95% 酒精混合 (1:4, v/v)，於 4°C 進行沉澱 24h 後，離心 (15000 rpm, 15 min) 取含胞外多醣之沈澱物，再以 75% 之酒精進行震盪沖洗及離心去除雜質，再將沈澱物置 60°C 烘箱中移除殘留的酒精，所得之乾燥物即為胞外多醣體。

2. 胞外多醣體之定量

參考 Dubois 等人(1956)之酚硫酸法 (phenol-sulfuric acid method) 並加以修飾。將前述乾燥後之胞外多醣體加 1ml 去離子水震盪復水並稀釋，再將此稀釋液取 1.0 ml 依序加入 0.5 ml 5% 酚溶液及 2.5 ml 98% 濃硫酸，混合後靜置 40 分鐘，測定混合液之 OD₄₉₀ 值並比對葡萄糖標準曲線 (附圖二) 後，即可得待測液中胞外多醣體之葡萄糖相等量 X (mg/l)，換算成原培養液中胞外多醣體含量時，須將此一測定值乘以稀釋倍數及 0.9。

$$\text{胞外多醣體含量 (g/l)} = X \times \text{稀釋倍數} \times 0.9$$

3. 葡萄糖含量標準曲線之測定

精確秤取葡萄糖 0.1g 溶於 10ml 蒸餾水中，取上述溶液 5ml 稀釋至 100ml 備用 (0.5 mg/ml)。再以此溶液逐步稀釋成不同濃度之葡萄糖標準液 (0.01、0.02、0.04、0.06、0.08 及 0.1 mg/ml)，並且以不含葡萄糖之蒸餾水作為空白對照組，再利用酚硫酸法測定混合液之 OD₄₉₀ 值，即可得葡萄糖標準曲線 (附圖二)。

(四) 殘糖分析

取發酵液於 4°C 下，經冷凍離心 (10000 rpm, 30 min) 後，取其上清液經適當稀釋後，再以 0.2 μm 濾膜過濾，取 10 μl 濾液進行 HPLC 分析，分析條件如下：

分析管柱：Lichrospher 100 NH₂ (5 μm), 250 mm × 4 mm, Merck, 德國。

管柱溫度：室溫

移動相：氬甲烷：水 = 70 : 30 (v/v)

流速：1.2 ml / min

幫浦：Hitachi Chromaster 5110

偵測器：Hitachi Chromaster 5450 RI detector

標準品：蔗糖之 retention time 約為 5.39 分鐘，其 HPLC 之殘糖檢量線如附圖三。

(五) 發酵參數之分析

發酵參數 (fermentation parameters) :

1. 最大胞外多醣生成量 (maximal yield of exopolysaccharide, P_{\max})

於培養期間生成之最大胞外多醣產量 (mg/l)。

2. 最大菌絲體生成量 (maximal yield of mycelial dry weight, X_{\max})

於培養期間生成之最大菌絲體產量 (g/l)

3. 比生長速率 (specific growth rate, μ)

為菌體於對數生長期之生長曲線斜率。

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / t - t_0$$

4. 胞外多醣生成速率 (product formation rate, Q_p)

為平均每日之胞外多醣生成量。

$$Q_p = \text{最大胞外多醣生成量 } (P_{\max}) / \text{最大菌絲體生成天數 } (t)$$

5. 比多糖產率 (specific product yield, $Y_{p/x}$)

為單位重量 (g) 菌絲體生成之胞外多醣量。

$$Y_{p/x} = \text{最大胞外多醣生成量 } (P_{\max}) / \text{最大菌絲體生成量 } (X_{\max})$$

6. 多醣產率 (product yield, $Y_{p/s}$)

為單位蔗糖消耗量 (g) 能轉換為胞外多醣之量。

$$Y_{p/s} = \text{最大胞外多醣生成量 } (P_{\max}) / \text{最大消耗蔗糖量 (sucrose, g)}$$

7. 菌絲體產率 (dry weight yield, $Y_{x/s}$)

為單位蔗糖消耗量 (g) 能轉換為菌絲體之量。

$$Y_{x/s} = \text{最大菌絲體生成量 } (X_{\max}) / \text{最大消耗蔗糖量 (sucrose, g)}$$

8. 最大胞外多醣生成天數 (days, t) 於培養期間最高胞外多醣產量之發酵天數。

(六) 胞外多醣分子量之測定

參考呂等人 (2001) 之方法，多醣體分子量以膠體滲透層析 (gel permeation chromatography, GPC) 法進行分析。其固定相為孔徑大小相同的物質，可將移動相中不同分子量的物質經由其在固定相中所流動的路徑長短加以區分，大分子物質會因為難以進入孔徑內而隨著移動相在孔徑間隙流出，滯留時間短，較快被沖提出來；小分子物質則容易進入孔徑間隙，故滯留時間長，較慢被沖提出來，以達到分離不同分子量的效果，又稱為膠體過濾層析法 (gel filtration chromatography) 或分子排斥層析法 (size exclusion chromatography)。

取發酵液於 4°C 下，經冷凍離心 (10000 rpm, 30 min) 後，取其上清液經適當稀釋後，再以 0.2 μm 濾膜過濾，取 10 μl 濾液進行分子量分佈之分析，分析條件如下：

分析管柱：PolySep-GFC-P 5000 300 × 7.80 mm column，為 Phenomenex 公司之產品。

管柱溫度：45°C

移動相：去離子水

流速：1.2ml / min

幫浦：Hitachi Chromaster 5110

偵測器：Hitachi Chromaster 5450 RI detector

標準品：pullulan (分子量 6000、10000、21700、48800、113000、210000、366000 及 805000 Daltons or Da, retention time 分別為 8.03、7.913、7.723、7.463、7.1、6.737、6.313 及 5.88 分鐘) 標準曲線如附圖四。

(七) 胞外多醣、發酵液乙醇及熱水萃取物製備

1. 胞外多醣製備

將含菌絲體之發酵液以濾紙 (No.2) 進行抽氣過濾去除菌絲體，收集發酵液減壓濃縮至 1/3 體積，再加入 95% 酒精 (1:4, v/v) 混合均勻，於 4°C 進行沉澱 24 hr 後，以濾紙 (No.2) 進行抽氣過濾取得粗胞外多醣之沉澱物，再以 75% 乙醇進行振盪沖洗及再過濾去除雜質，再進行冷凍乾燥即得胞外多醣體粉末，再以熱水回溶並定量至 25 mg/ml 備用。

2. 發酵液乙醇萃取物製備

將含菌絲體之發酵液以濾紙 (No.2) 進行抽氣過濾去除菌絲體，收集發酵液減壓濃縮至 1/3 體積，再進行冷凍乾燥即得液態發酵樣品粉末。樣品粉末置三角錐形瓶中，以 1:10 (g/ml) 比例加入乙醇 (50% 或 95%)，於 30°C，150 rpm 振盪萃取 24 小時後，離心 (4427 xg，10min) 收取上清液，再將所得之沉澱物以相同條件再萃取一次，收集兩次所得之上清液以 40°C 減壓濃縮至膏狀後進行冷凍乾燥，再以原萃取濃度之乙醇定量至 100 mg/ml 備用。

3. 發酵液熱水萃取物製備

將含菌絲體之發酵液以濾紙 (No.2) 進行抽氣過濾去除菌絲體，收集發酵液減壓濃縮至 1/3 體積，再進行冷凍乾燥即得液態發酵樣品粉末。樣品粉末置三角錐形瓶中，以 1:10 (g/ml) 比例加入 RO 水後，置於加熱攪拌器上以隔水煮沸萃取 3 小時，冷卻離心 (4427 xg，10min) 後取上清液，再將所得之沉澱物以相同條件再萃取一次，收集兩次所得之上清液以 40°C 減壓濃縮至膏狀後進行冷凍乾燥，再以 RO 水定量至 100 mg/ml 備用。

(八) 抗氧化能力之測定

本試驗取前述 (七) 1、2、3 製備之胞外多醣體、發酵液乙醇及熱水萃取物並連同定量後之發酵原液，測定彼等抗氧化能力。

1. DPPH 自由基 (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl radical) 清除能力

參考 Shimada 等人 (1992) 之方法，食物中的脂質在自行氧化的過程中會產生自由基而造成脂質的酸敗，常見的抗氧化物可扮演供氫者 (hydrogen donor) 來清除脂質過氧化物自由基 (peroxyl radical)，實驗上常使用清除 DPPH· 自由基能力，來評估抗氧化物之抗氧化能力。DPPH· 是一種穩定的自由基，當其溶於甲醇中會呈現藍紫色，在 517nm 下有較強的吸光值。當測試的樣品具抗氧化能力時，則可清除自由基 (供氫還原)，此時藍紫色的 DPPH 甲醇溶液顏色會轉成橙黃色而降低 517nm 之吸光值，吸光值降低愈多，代表樣品之抗氧化力愈強。



實驗步驟：

- (1) 取 4 ml 不同濃度之發酵液、胞外多醣、乙醇及熱水萃取物待測液及標準品的甲醇溶液 (實驗組) 與純甲醇溶液 (對照組) 加入 1 ml 新鮮配製的 0.008% DPPH 甲醇溶液。
- (2) 震盪均勻混合反應 30 分鐘後，測定混合液之 OD₅₁₇。

DPPH 自由基清除率 (scavenging effect, %) =

$$\left[(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}} \right] \times 100$$

清除率愈高，代表樣品抗氧化能力愈好。

實驗中以抗氧化劑 BHA、ascorbic acid 及 trolox 作為正對照組，實驗結果以 IC₅₀（清除 50% DPPH 自由基所需之濃度）表示，IC₅₀ 由線性迴歸分析之內插法計算所得。

2. 總抗氧化力測定

參考 Miller 等人(1993)及 Arnao 等人(1996)之方法。Horseradish peroxidase 會催化 H₂O₂ 及 ABTS 反應，使 ABTS 上之一個電子進行轉移形成 ABTS·⁺。



ABTS·⁺為具穩定藍色之陽離子自由基，於波長 734nm 下具有最大吸光值，加入抗氧化劑可提供電子還原 ABTS·⁺使其吸光值降低或消失，故可利用此一特性測試水溶性樣品清除自由基之能力。樣品與 ABTS·⁺ 自由基作用後，OD₇₃₄ 下降越多，則表示樣品對 ABTS·⁺ 自由基之清除能力越強，抗氧化力越強。

實驗步驟：

- (1) 將 horseradish peroxidase、ABTS 與 H₂O₂ 混合均勻並調整三者之最後濃度分別為 4.4 unit/ml、100 μM 與 50 μM。
- (2) 於 30°C 下避光反應一小時，使其形成藍綠色穩定的 ABTS·⁺ 自由基反應試劑。
- (3) 加入 0.25 ml 不同濃度之發酵液、胞外多醣體、乙醇及熱水萃取物待測液及標準品 (trolox) 之乙醇溶液混合均勻後反應 10 分鐘，測定混合物之 OD₇₃₄。

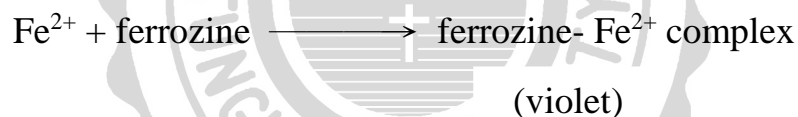
總抗氧化力 (total antioxidant capacity, %) =

$$\left[\frac{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}})}{\text{OD}_{\text{control}}} \right] \times 100$$

實驗中以 trolox 為正對照組，未加樣品者為控制組。實驗結果以 IC₅₀ (抑制 50% ABTS·+活性所需之濃度) 表示，IC₅₀ 由線性迴歸分析之內插法計算所得。

3. 螯合亞鐵離子能力測定

參考 Decker 等人(1990)之方法。金屬離子的促氧化作用經常是造成脂質過氧化的主要因素，藉由氧化還原反應 (redox cycle)，少量的金屬離子便可有效的產生自由基，並加速脂質氧化的進行；在多種金屬離子中，Fe²⁺經常是最具影響力的助氧化劑；Fe²⁺與 ferrozine 作用後形成之紫色複合物在 562 nm 具最大吸光值：



當樣品螯合 Fe²⁺離子時則反應後產物之吸光值降低；因此吸光值愈低即表示樣品之抗氧化能力愈強。

實驗步驟：

- (1) 取 1 ml 不同濃度之發酵液、胞外多醣體、乙醇及熱水萃取物及標準品 (EDTA) 分別加入 3.7 ml 蒸餾水、0.1 ml 之 2 mM FeCl₂ 及 0.2 ml 之 5 mM ferrozine。
- (2) 混合後室溫靜置反應 20 分鐘，測定混合液之 OD₅₆₂。

亞鐵離子螯合率 (ferrous ion chelating activity, %) =

$$\left[(\text{OD control} - \text{OD sample}) / \text{OD control} \right] \times 100\%$$

實驗中以金屬螯合劑 EDTA 作為正對照組，將所得實驗結果以 IC₅₀ (螯合 50% Fe²⁺離子所需之最低濃度) 表示。

4. 還原力測定

參考 Oyaizu (1988) 之方法，還原力測定是分析樣品將鐵氰化鉀 (potassium ferricyanide，或稱赤血鹽) 中之 Fe³⁺ 還原為 Fe²⁺ 之亞鐵氰錯離子的能力，此亞鐵氰錯離子再與 Fe³⁺ (三氯化鐵) 反應產生普魯士藍 (Prussian blue)，普魯士藍在波長 700 nm 下有最大吸收值，根據其吸收光值之高低，可評估樣品還原能力之強弱；吸光值愈高表示樣品還原能力愈強。還原力在抗氧化表現上係為具有還原過氧化物 (peroxide) 之能力，進而達到抗氧化之效果。

實驗步驟：

- (1) 取 0.5 ml 不同濃度之發酵液、胞外多醣體、乙醇及熱水萃取物分別加入 2.5 ml 之 0.2 M 磷酸鹽緩衝液 (pH 6.6) 及 2.5 ml 之 1% 鐵氰化鉀混合均勻。
- (2) 混合液於 50°C 水浴槽反應 20 分鐘。
- (3) 取 2.5 ml 10% 三氯醋酸停止反應後，加入混合液，使用離心 (3000 rpm，10 分鐘)。
- (4) 取 2.5 ml 上清液，加入 2.5 ml 蒸餾水及 2.5 ml 0.1% 三氯化鐵。
- (5) 震盪均勻混合反應後，測定混合液之 OD₇₀₀。

實驗中以抗氧化劑 BHA、ascorbic acid 及 α -tocopherol 作為正對照組，將所得實驗結果以 IC₅₀（吸光值達到 0.5 所需之最低濃度）表示。

(九) 總酚類化合物測定

本實驗參考 Amin 等人(2004)以 Folin-Ciocalteu 比色法測定胞外多醣及發酵液萃取物樣品中總酚類化合物含量，Folin-Ciocalteu 試劑中磷鉬酸 (phosphomolybdic acid) 於弱鹼性環境下可氧化多酚化合物而自身被還原 ($\text{Mo}^{6+} \rightarrow \text{Mo}^{5+}$)，生成之藍色化合物於波長 765 nm 下有最大吸收值，吸光值愈高表示樣品總酚類化合物含量愈高。

實驗步驟:

- (1) 取 0.1 ml 樣品，加入 0.75 ml 10% 的 Folin-Ciocalteu's reagent 混合均勻混合靜置 5 分鐘。
- (2) 加入 0.75 ml 碳酸鈉溶液 (6%)，混合均勻並避光靜置 90 分鐘後，於 765 nm 下測定吸光值，結果以沒食子酸相等量 (gallic acid equivalent) 表示 (mg GAE/100 g extracts)。

實驗中以沒食子酸 (gallic acid) 的標準曲線計算樣品總酚類化合物含量標準曲線如附圖五。

(十) 麥角硫因含量測定

參考 Dubost 等人 (2006) 的方法。取前述 (七) 1、2、3 製備之胞外多醣、乙醇及熱水萃取物及發酵液定量之樣品，測定彼等麥角硫因含量。

樣品以 0.2 μ m 濾膜過濾後，取 10 μ l 濾液進行 HPLC 分析，分析條件如下：

分離管柱：InertSustain 5 μ m C18 (4.6 \times 150 mm, GL Sciences)。

管柱溫度：室溫

移動相：20 mM 磷酸銨。

流速：1 mL/min。

幫浦：Hitachi Chromaster 5110

偵測器：Hitachi Chromaster 5430 Photo Diode Array detector

檢測波長：254 nm。

實驗中以麥角硫因標準品 (ergothioneine) 的標準曲線計算樣品麥角硫因含量標準曲線如附圖六。

(十一) 統計分析

試驗所得結果以平均值 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) 表示，試驗所得資料以 SAS 統計套裝軟體 (SAS, 1996) 進行變方分析 (analysis of variance) 及差異性顯著分析 (Duncan's new multiple range test) 之統計分析法估計結果是否有顯著差異 ($p < 0.05$)，並且使用 Student's t-test 來評估數據間的差異性。 $p < 0.01$ 時表示極顯著差異、 $p < 0.05$ 時表示達顯著差異， $p > 0.05$ 則表示為沒有顯著差異 (沈，2010)。

肆、結果與討論

一、平板培養基試驗

本實驗目的為探討舞菇菌菌株於三種平板培養基 (PDA、YMA 及基礎培養基) 在不同培養溫度 (20、25、30 及 35°C) 下菌絲體生長速度，以決定後續搖瓶試驗時所使用之種菌培養基種類及培養溫度。

(一) 培養溫度及培養基對舞菇菌菌絲體生長速度之影響

溫度對於微生物生長及其體內化學酵素反應速率有著密切的關係，控制並影響反應的進行，如酵素活性、菌絲體生長速度、多醣合成速度等，在適宜的溫度下酵素活動最旺盛，菌絲體生成及多醣合成速率較高，而不同的平板培養基對於微生物的生長也有影響。有研究指出一般液態培養真菌的溫度在 22~28°C 之間可獲得較好的生長速率與產量 (Eyal *et al.*, 1991); 本實驗以四種不同培養溫度 (20、25、30 及 35°C) 與三種不同培養基 (PDA、YMA 及基礎培養基) 探討彼等對舞菇菌菌絲體生長速率之影響。

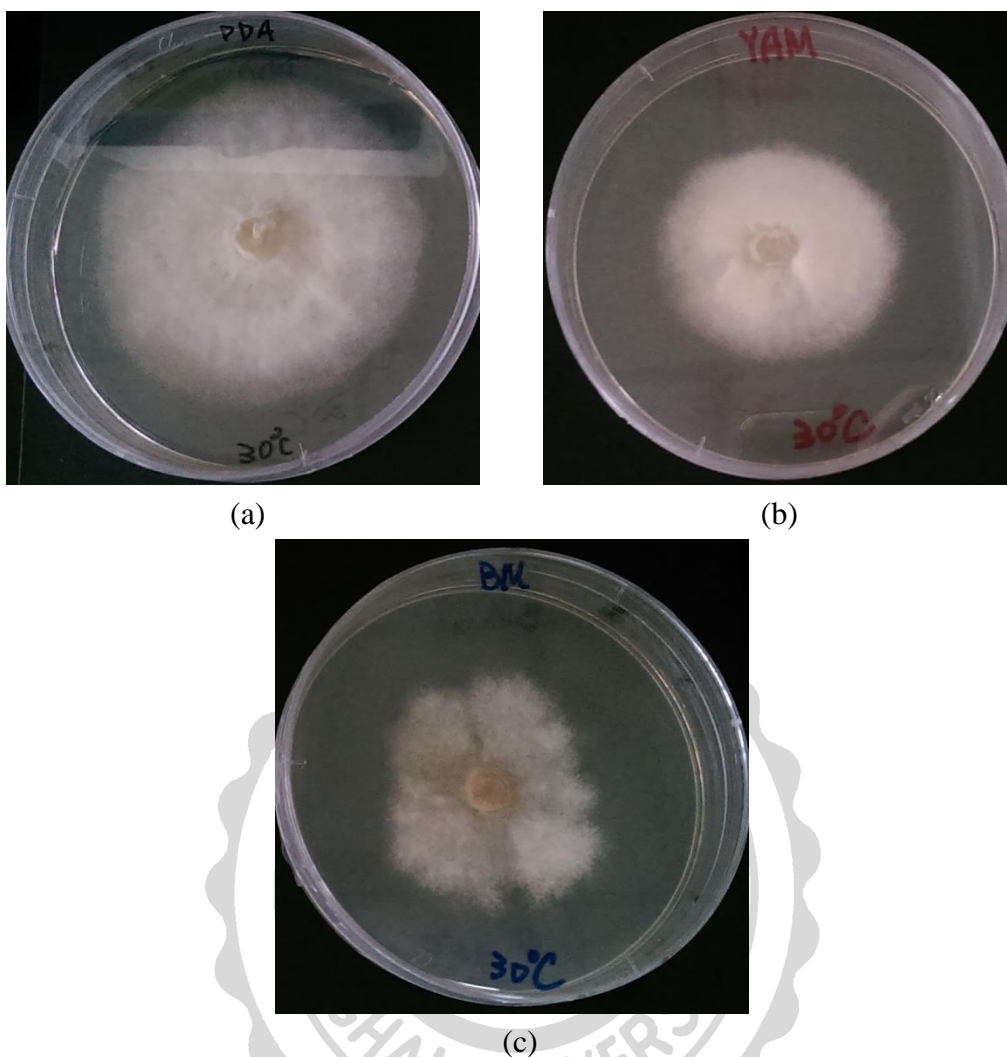
舞菇菌接種於三種平板培養基上之生長方式皆為自平板中央呈放射狀逐漸往周圍生長，外圍新生菌絲於三種平板培養基皆呈現白色，生長較為稀疏，而接近中心點老化部分的菌絲顏色則為深褐色或黃褐色，菌絲生長較為密集 (圖六)。

舞菇菌在不同培養溫度中發現菌絲體生長受到培養溫度的影響，生長直徑大小有不一樣的變化，溫度在 20°C 至 30°C 之間時，隨著溫度上升菌絲體生長直徑逐漸增加，於 30°C 培養時有最大生長直徑。此外，在最高培養溫度 35°C 培養時菌絲體幾乎沒有生長 (圖七)。圖七為舞菇菌在不同培養溫度及 PDA 上菌絲體之外觀。

實驗結果 (表五) 顯示三培養基組皆於 30°C 有較高之菌絲體生長直徑，其中又以 PDA 培養基組於 30°C 培養溫度下具最大之菌絲體生長直徑 (6.4 cm)，顯著 ($p < 0.05$) 高於其它二培養基組。Lee 等人 (2004) 指出舞菇菌最適培養溫度為 25°C，與本實驗結果不同，推測原因可能為不同來源舞菇菌菌株所致。

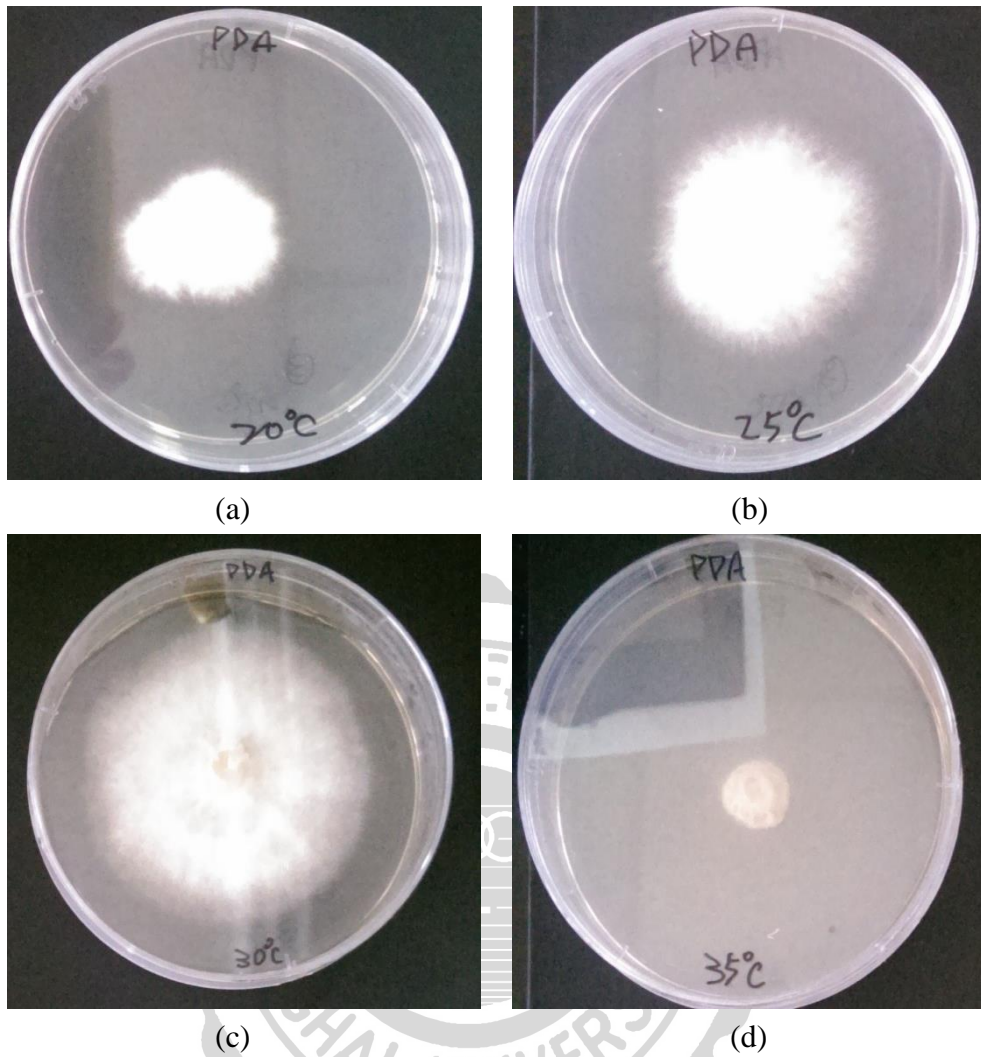
雖然 PDA 組具有最大菌絲體生長直徑，然而在之後搖瓶試驗中，菌絲體在 PDB 培養基中生長情況不佳，故後續種菌培養、搖瓶試驗皆仍以液態基礎培養基進行培養，培養溫度為 30°C。





圖六 舞菇菌於不同平板培養基之菌絲生長情形 (30°C/15 天)。
(a) PDA。(b) YMA。(c) 基礎培養基。

Fig. 6 Mycelial growth of *G. frondosa* on different agar plates (30°C/15days).
(a) PDA. (b) YMA. (c) Basal medium.



圖七 舞菇菌於不同培養溫度下之菌絲體外觀 (15 天/PDA)。
(a) 20°C。 (b) 25°C。 (c) 30°C。 (d) 35°C。

Fig. 7 Mycelial growth of *G. frondosa* at different incubation temperatures (15 days/PDA).
(a) 20°C. (b) 25°C. (c) 30°C. (d) 35°C.

表五 不同培養溫度及培養基對舞菇菌於平板培養基上 (培養 15 天) 菌絲體生長之影響

Table. 5 Effect of different incubation temperatures and media on mycelial growth by *G. frondosa* on agar plates incubated for 15 days

Media	Mycelial diameter (cm)			
	20°C	25°C	30°C	35°C
PDA	3.3±0.32 ^b	5.2±0.22 ^a	6.4±0.40 ^a	1.1±0.17 ^a
YAM	3.6±0.17 ^b	4.1±0.08 ^c	5.0±0.11 ^b	1.1±0.09 ^a
Basal	4.1±0.12 ^a	4.5±0.19 ^b	4.6±0.42 ^b	0.7±0.02 ^b

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

*Diameter (cm) of mycelial growth on agar plate after 15 days of incubation.

二、搖瓶試驗

本實驗為探討各項培養條件（碳源、氮源、生長因子、無機鹽類、培養液起始 pH 值、養分最適添加濃度等）對舞菇菌於搖瓶培養（shake flask culture）時菌絲體及胞外多醣體（exopolysaccharide）生成之影響。搖瓶所用之培養基為液態基礎培養基，採單因子變動試驗方法，確定碳、氮源等培養條件後，再以正交試驗確定各培養條件所添加濃度，培養時間為 14 天。

（一）碳源對舞菇菌胞外多醣體生成之影響

碳源為提供微生物菌種的生長繁殖所需的能源和合成菌體所必需的碳成分。常見的來源主要有糖類、油脂、有機酸、正烷烴等。工業上常用的糖類主要包括：葡萄糖、糖蜜（製糖生產時的結晶母液）、澱粉等。本實驗嘗試添加三種單糖（glucose、fructose、galactose）及三種雙糖（lactose、sucrose、maltose）等六種糖類（添加量為 1%，w/v）探討彼等對舞菇菌胞外多醣體生成之影響。

結果（表六）顯示雖然添加麥芽糖與果糖組具有較高的菌絲體產量（1.47 g/L 及 1.44 g/L），然蔗糖組可以獲得最高的胞外多醣產量（100.9 mg/L）且顯著（ $p < 0.05$ ）高於其它實驗組；因此後續實驗以蔗糖為培養基碳源。

本實驗結果與 Lin (2011) 碳源試驗結果有相似之處，即胞外多醣產量最高的碳源不等於菌絲體產量最高的碳源。此外，本實驗結果亦與 Lee 等人 (2004) 與 Cui 等人 (2006) 研究結果最適菌絲體及胞外多醣體生產之碳源為葡萄糖不同；原因可能為不同菌株 (strain) 其利用糖類合成多醣之性狀不盡相同，亦或是不同碳源會使菇類細胞產生二次代謝 (secondary metabolism) 的代謝物抑制效應 (catabolic repression) 所致 (Kim et al., 2003)。

表六 碳源對搖瓶培養之舞菇菌菌絲體及胞外多醣體產量之影響
 Table 6 Effect of carbon sources on mycelial dry weight and exopolysaccharide production by *G. frondosa* in shake flask culture

Carbon sources (1 %, w/v)	Mycelial dry weight (g/L)	Exopolysaccharide (mg/L)	Final pH
Fructose	1.44±0.10 ^a	73.1±19.04 ^b	4.79±0.09 ^{cd}
Galactose	0.78±0.45 ^b	45.9±8.46 ^c	3.63±0.01 ^{ab}
Lactose	1.27±0.38 ^a	65.5±9.12 ^b	5.06±0.33 ^{bc}
Sucrose	0.83±0.02 ^b	100.9±6.41 ^a	5.72±0.09 ^a
Maltose	1.47±0.05 ^a	78.1±9.14 ^b	4.37±0.2d ^e
Glucose (Control) *	1.35±0.38 ^a	80.7±1.50 ^b	4.28±0.46 ^e
No added carbon**	0.59±0.06 ^b	45.2±2.80 ^b	3.90±0.03 ^a

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

Each value are expressed as Mean ± SD (n=3).

*Basal medium with 1% (w/v) glucose as the major carbon source.

**Basal medium without glucose.

(二) 氮源對舞菇菌胞外多醣體生成之影響

氮源對菌絲體與代謝物生成有非常大的影響。本實驗嘗試添加五種有機氮源 (yeast extract、urea、malt extract、peptone、beaf extract) 與三種無機氮源 (NH_4NO_3 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 等八種氮源 (添加量為 0.5%，w/v) 探討彼等對舞菇菌胞外多醣生成之影響。

結果 (表七) 顯示 yeast extract 組可以獲得最高的菌絲體產量 (1.63 g/L) 及胞外多醣體產量 (60.6 mg/L) 且皆顯著 ($p < 0.05$) 高於其它實驗組。結果亦顯示 yeast extract 組相較於第二高菌絲體及胞外多醣體產量之實驗組有近兩倍的差距，表示 yeast extract 對於舞菇菌的生長有極大的影響。此外，添加有機氮源組之菌絲體及胞外多醣體產量皆顯著 ($p < 0.05$) 高於大部分未添加氮源組，推測原因可能為有機氮源富含可以使菌體合成某些生長所需氨基酸的物質，而無機氮源因缺乏這些物質導致菌體在此液態培養環境下不利於胞外多醣體的生產。

無機氮源組的最終 pH 值大都低於有機氮源組最終 pH 值，推測可能與氮源的利用程度有關，當胺基酸中的 $-\text{NH}_2$ 利用後 pH 會下降；但當氮源被分解成 NH_3 後 pH 會上升， NH_3 被利用後 pH 會再上升，而當碳源不足或菌種優先選擇該氮源作為養分來源時也會使 pH 上升 (張等人，2013)。

添加 urea 組之菌絲體及胞外多醣體產量不佳，可能因為其起始 pH 值過高導致培養環境呈現鹼性而不利於菌體的生長與代謝。

綜合上述結果，基於達到最高胞外多醣體產量條件，故後續實驗以添加 yeast extract 做為氮源。

表七 氮源對搖瓶培養之舞菇菌絲體及胞外多醣體產量之影響
 Table 7 Effect of nitrogen sources on mycelial dry weight and exopolysaccharide production by *G. frondosa* in shake flask culture

Nitrogen sources (0.5%, w/v)	Mycelial dry weight (g/L)	Exopolysaccharide (mg/L)	Final pH
Organic			
Urea	0.06±0.02 ^c	30.5±6.77 ^b	6.30±0.34 ^a
Malt extract	0.94±0.22 ^b	28.9±12.34 ^{bc}	3.54±0.28 ^c
Peptone	0.65±0.17 ^{bc}	30.8±10.92 ^b	4.91±0.09 ^b
Beaf extract	0.66±0.19 ^{bc}	17.9±0.56 ^{cd}	4.74±0.12 ^b
Yeast extract (Control) *	1.63±0.56 ^a	60.6±7.43 ^a	3.63±0.17 ^c
Inorganic			
NH ₄ NO ₃	0.39±0.10 ^{bc}	9.5±1.79 ^d	2.98±0.05 ^d
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.72±0.06 ^b	7.1±1.81 ^d	2.83±0.06 ^d
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.87±0.08 ^b	14.1±1.18 ^d	2.99±0.02 ^d
No added nitrogen**	0.30±0.70 ^b	15.3±2.40 ^d	3.71±0.15 ^c

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

Each value are expressed as Mean ± SD (n=3).

*Basal medium with 0.5% (w/v) yeast extract as the major nitrogen source.

**Basal medium without peptone.

(三) 無機鹽類對舞菇菌胞外多醣體生成之影響

無機鹽類含微量金屬元素，適當添加可有助於菇類的生長與代謝。本實驗嘗試添加 NaCl、KCl、CaCl₂、FeSO₄、CuSO₄、ZnSO₄ 及 MgSO₄ 等七種無機鹽類探討彼等對舞菇菌胞外多醣體生成之影響。

結果 (表八) 顯示以添加 FeSO₄ 之菌絲體產量 (4.75 g/L) 顯著 ($p < 0.05$) 高於其它實驗組。胞外多醣體產量的部分亦以 FeSO₄ 組最高 (109.1 mg/L) 且顯著 ($p < 0.05$) 高於大部分其它實驗組。表示適當添加無機鹽類 (如 FeSO₄) 可增加舞菇菌絲體及胞外多醣體產量。基於達到最高菌絲體及胞外多醣體條件，後續實驗選用 FeSO₄ 做為添加之無機鹽類。



表八 無機鹽類對搖瓶培養之舞菇菌菌絲體及胞外多醣體產量之影響
 Table 8 Effect of minerals on mycelial dry weight and exopolysaccharide production by *G. frondosa* in shake flask culture

Minerals (0.1%, w/v)	Mycelial dry weight (g/L)	Exopolysaccharide (mg/L)	Final pH
NaCl	1.67±0.20 ^{bc}	28.3±3.86 ^d	3.88±0.66 ^{bc}
KCl	2.46±1.42 ^b	23.2±3.71 ^d	3.90±0.31 ^{bc}
CaCl ₂	1.97±0.23 ^b	96.1±5.05 ^b	4.31±0.21 ^{ab}
FeSO ₄	4.75±0.61 ^a	109.1±1.68 ^a	3.60±0.06 ^c
CuSO ₄	1.55±0.59 ^{bc}	101.5±9.11 ^{ab}	3.79±0.05 ^{bc}
ZnSO ₄	0.39±0.05 ^c	68.0±4.31 ^c	4.60±0.03 ^a
MgSO ₄ (Control) *	2.80±1.28 ^b	77.5±10.86 ^c	3.83±0.39 ^{bc}
No added mineral**	1.77±0.15 ^{bc}	21.2±5.82 ^d	3.99±0.21 ^{bc}

Values superscribed by different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$)
 Each value are expressed as Mean ± SD (n=3) .

*Basal medium with 0.1% (w/v) MgSO₄ as the major mineral.

**Basal medium without MgSO₄.

(四) 生長因子對舞菇菌胞外多醣體生成之影響

本實驗添加 thiamine、riboflavin 及 folic acid 等三種生長因子 (添加量為 0.3%，w/v)，探討彼等對舞菇菌胞外多醣體生成之影響，對照組為不含生長因子之基礎培養基。

結果 (表九) 顯示，添加 folic acid 組之菌絲體產量 (6.46 g/L) 最高且顯著 ($p < 0.05$) 高於對照組；然在胞外多醣體產量的部分，則以未添加生長因子的對照組之產量 (90 mg/L) 最高，且與大部分其他實驗組無顯著 ($p < 0.05$) 差異。表示生長因子的添加對於胞外多醣體產量的提升沒有幫助，此結果與 Lin (2011) 的結果相似，可能原因為此菌種可以自己合成維生素所致 (水野和川合，1999)。基於達到最高胞外多醣體產量考量，後續實驗將不添加生長因子。



表九 生長因子對搖瓶培養之舞菇菌菌絲體及胞外多醣體產量之影響
 Table 9 Effect of growth factors on mycelial dry weight and exopolysaccharide production by *G. frondosa* in shake flask culture

Growth factors (0.3%, w/v)	Mycelial dry weight (g/L)	Exopolysaccharide (mg/L)	Final pH
Thiamine	2.52±0.42 ^b	87.5±9.33 ^a	4.20±0.06 ^b
Riboflavin	5.67±0.70 ^a	78.6±7.37 ^{ab}	3.91±0.40 ^b
Folic acid	6.46±0.24 ^a	72.4±2.03 ^b	4.03±0.32 ^b
Control*	1.16±0.28 ^c	90.0±9.40 ^a	4.99±0.19 ^a

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

Each value are expressed as Mean ± SD (n=3).

* Basal medium without any added growth factor.

(五) 培養基起始 pH 值對舞菇菌胞外多醣體生成之影響

微生物生長與 pH 值有很大的關係，不同微生物有其生長最適的 pH 值。本實驗將基礎培養基起始 pH 值以 HCl 或 NaOH 調整為 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 (實驗組) 及不調整 pH 之對照組 (5.6)，探討彼等對舞菇菌菌絲體及胞外多醣體生成之影響。

結果 (表十) 顯示，起始 pH 值 6.0 實驗組所得之菌絲體產量最高 (3.39 g/L) 且顯著 ($p < 0.05$) 高於實驗組及對照組；大部分實驗組胞外多醣產量與對照組無顯著 ($p < 0.05$) 差異，其中 pH 5.0 之實驗組有最高胞外多醣體產量 (54.9 mg/L)，然與對照組產量 (51.9 mg/L) 無顯著 ($p < 0.05$) 差異。此結果指出起始 pH 值此結果指出對菌絲體產量有顯著的影響，但對於胞外多醣體產量卻無顯著的影響。雖然菌絲體產量與胞外多醣體產量沒有絕對的關係，但卻有著一定程度的關連，基於兼顧達到最高菌絲體及胞外多醣體產量之考量，後續實驗將起始 pH 值調整為 6.0。

綜合前述 (一)~(五) 之實驗結果，舞菇菌之胞外多醣最適培養條件為 sucrose (1%, w/v)、yeast extract (0.5%, w/v)、FeSO₄ (0.1%, w/v) 及培養起始 pH 值為 6.0。以此條件為進行後續正交實驗預實驗之試驗參數。

表十 起始 pH 值 (4~8) 對搖瓶培養之舞菇菌菌絲體及胞外多醣體產量之影響

Table 10 Effect of initial pH (4~8) on mycelial dry weight and exopolysaccharide production by *G. frondosa* in shake flask culture

Initial pH	Mycelial dry weight (g/L)	Exopolysaccharide (mg/L)	Final pH
4.0	2.35±0.07 ^d	41.1±5.79 ^b	3.51±0.01 ^b
5.0	1.89±0.09 ^c	54.9±4.17 ^a	3.64±0.18 ^b
6.0	3.39±0.08 ^a	53.2±1.58 ^a	3.52±0.03 ^b
7.0	0.87±0.16 ^d	41.3±6.67 ^b	5.07±1.28 ^a
8.0	0.82±0.22 ^d	51.2±2.85 ^a	5.08±0.98 ^a
Control*	2.54±0.82 ^b	51.9±6.38 ^a	3.50±0.04 ^b

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

Each value are expressed as Mean ± SD (n=3).

*Basal medium with an initial pH of 5.6

(六) 正交試驗

透過正交試驗的實驗可以利用較少的實驗次數找出適合的培養基內各成分的添加濃度。

將前述搖瓶單因子試驗所得的最適碳源、氮源、無機鹽類，進行預實驗找出試驗濃度範圍（結果未列），及參考王等人 (2006) 使用之三因子 (sucrose、yeast extract、FeSO₄) 三水平（濃度）之試驗參數，以 L9 (3³) 正交表（表十一）進行正交實驗。

由表十二結果可以看出最高胞外多醣體產量之組合為 A3B3C1；而最高菌絲體產量組合為 A3B1C3。各因子對胞外多醣產量 (R*) 之影響大小為 yeast extract > sucrose > FeSO₄；而各因子對菌絲體乾重 (r*) 產量之影響大小依序皆為 sucrose > yeast extract > FeSO₄；由以上結果可以發現，適合菌絲體生長的因子添加濃度與胞外多醣生產的最適因子濃度組合不一致，表示適合胞外多醣生產之培養基濃度組合不一定適合菌絲體生產之培養基組合，推論造成此結果的原因可能為碳源是真菌生長過程能夠直接被利用的養分，因此菌絲體生長與碳源有直接的關係；胞外多醣產量則是與 yeast extract 較有關係，可能與 yeast extract 中含有促生長因子，可以幫助舞菇生產二次代謝物如多醣等成分。

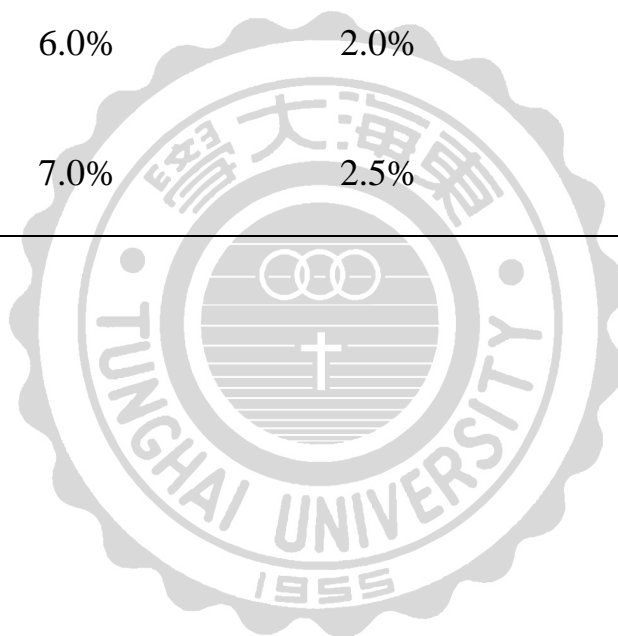
本實驗以胞外多醣生產量高的為篩選條件，因此對胞外多醣產量做進一步變異數分析，結果（表十三）發現三因子中只有 yeast extract 對於舞菇胞外多醣生產的統計上有顯著差異 ($p < 0.05$)，表示 yeast extract 對於舞菇胞外多醣體產量有關鍵性的影響。

綜合上述分析及基於達到最高胞外多醣體條件，因此最適組合濃度為 A3B3C1，即 7.0 % sucrose、2.5 % yeast extract 及 0.15 % FeSO₄。以此條件進行後續搖瓶培養實驗及發酵槽試驗。

表十一 L9 (3³) 正交試驗試驗參數

Table 11 Experimental factors and their levels for orthogonal layout L9 (3³)

		Factors		
		A Sucrose (%)	B Yeast extract (%)	C FeSO ₄ (%)
Levels	1	5.0%	1.5%	0.15%
	2	6.0%	2.0%	0.175%
	3	7.0%	2.5%	0.20%



表十二 菌絲體及胞外多醣產量之正交試驗結果

Table 12 Mycelial dry weight and exopolysaccharide production from orthogonal experiment

Factors Trials	A Sucrose	B Yeast extract	C FeSO ₄	Mycelial dry weight (g/L)	Exopolysaccharide (mg/L)
1	1	1	1	3.19±0.01	376.06±0.02
2	1	2	2	3.19±0.01	463.15±0.01
3	1	3	3	3.40±0.01	601.74±0.12
4	2	1	2	3.91±0.02	350.52±0.03
5	2	2	3	4.18±0.02	491.43±0.13
6	2	3	1	3.11±0.01	673.13±0.02
7	3	1	3	4.43±0.01	556.89±0.05
8	3	2	1	3.48±0.03	661.72±0.03
9	3	3	2	3.93±0.17	642.78±0.11
Exopolysaccharide					
K ₁	480.31	427.82	<u>570.30</u>		
K ₂	505.03	538.77	485.48		
K ₃	<u>620.46</u>	<u>639.22</u>	550.02		
R*	140.15	211.39	20.29		
Mycelial dry weight					
k ₁	3.26	<u>3.84</u>	3.26		
k ₂	3.73	3.62	3.67		
k ₃	<u>3.95</u>	3.48	<u>4.00</u>		
r*	0.69	0.36	0.33		

Experiments were carried out for 15 days at 30°C with initial pH 6.0 .

K_{X1} = the average yield of mycelia or exopolysaccharide in three experiment at Xi.

*R = K_{MAX} - K_{MIN}

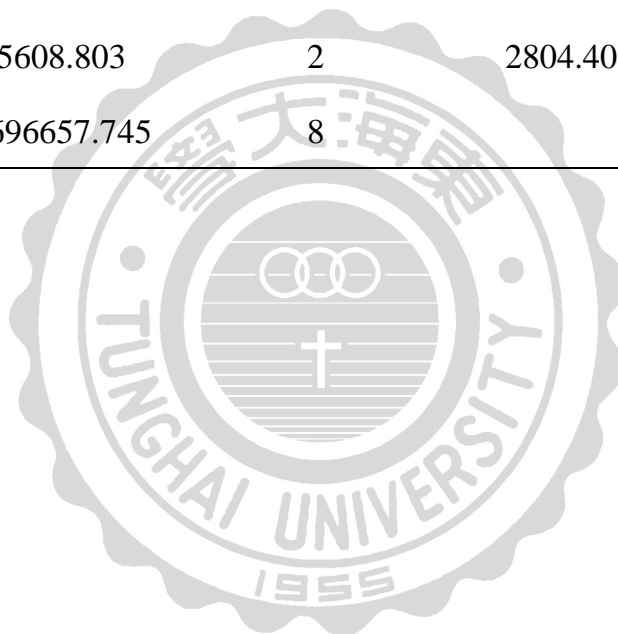
*r = k_{MAX} - k_{MIN}

表十三 正交試驗胞外多醣產量結果變異數分析

Table 13 Analysis of variance of the orthogonal experiment for exopolysaccharide production

Variance source	Sum of square deviation (SS)	Degree of freedom (df)	Mean square (MS)	F ratio and significance level
Sucrose	33577.296	2	16788.648	5.987
Yeast extract	3645700.818	2	881900.273	314.470*
FeSO ₄	11770.826	2	5885.414	2.099
error	5608.803	2	2804.402	
total	2696657.745	8		

* $F_{ratio} > F_{0.05} = 19.0$

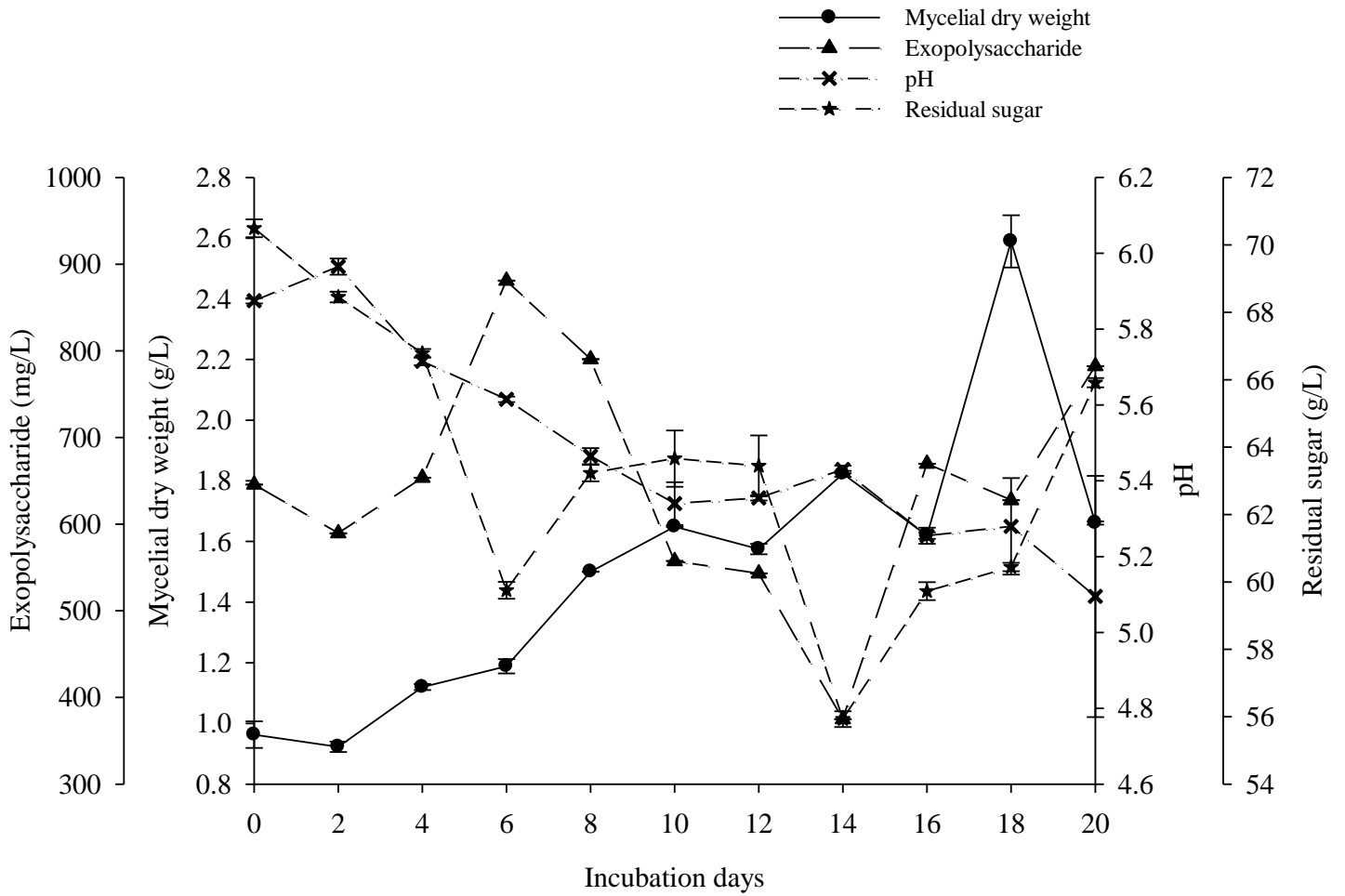


(七) 搖瓶培養時間對舞菇菌胞外多醣體生成之影響

本實驗採用前述正交試驗所得舞菇胞外多醣產量之最適培養條件，探討舞菇菌胞外多醣體最大生成量之搖瓶培養時間，所用的培養基為修飾培養基（含 7.0% sucrose、2.5% yeast extract、0.15% FeSO₄、0.3% KH₂PO₄，起始 pH 6.0），培養溫度為 30°C。

圖八為 20 天培養期間搖瓶內菌絲體產量、胞外多醣體產量、pH 值與殘糖（蔗糖）之變化情形。結果顯示，菌絲體產量隨著培養天數的增加而增加，在第 18 天達到最高 (2.59 g/L)；而胞外多醣分別在第 6 天及第 20 天有兩個產量高峰 (880.98 mg/L 及 782.33 mg/L)。此結果與正交試驗結果相比，在菌絲體最高產量 (2.59 g/L) 的部分，低於正交試驗的最高值 (4.18 g/L)，而在胞外多醣體產量的部分，搖瓶培養時間的兩個高峰 (880.98 mg/L 及 782.33 mg/L) 皆高於正交試驗的胞外多醣體最高產量 (673.13 mg/L)，亦是所有搖瓶單因子試驗胞外多醣產量的最高值，顯示透過單因子試驗及正交試驗，所得最適培養基成分及最適添加濃度之培養基（修飾培養基），可大幅提升胞外多醣產量；但菌絲體產量的部分，因所有試驗條件選擇皆是以達到最高胞外多醣產量作為篩選條件，因此在生物質產量的部分未達所有試驗之最高值。

培養液殘糖（蔗糖）及 pH 值則隨著培養天數的增加而呈現下降的趨勢，表示舞菇菌會消耗糖類（蔗糖）用於菌絲體及胞外多醣的生成，而 pH 值下降表示培養液中的碳源被菌體利用代謝後產生酸性物質所致。



圖八 搖瓶培養期間舞菇菌胞外多醣、菌絲體、pH 值及殘糖量之變化。
 Fig. 8 Changes of exopolysaccharide, mycelial dry weight, pH and residual sugar by *G. frondosa* during incubation in shake flask culture.

三、不同型式發酵槽培養試驗

搖瓶試驗時，利用有溝槽三角錐瓶進行震盪培養以達到供應氧氣及攪拌（混合固-液-氣三相）之效果，但無法控制通氣量之多寡，而發酵槽所具有之通氣裝置可以增加發酵液之溶氧量及固定通入空氣之含量，攪拌裝置也可以提高攪拌混合的程度。本部分之實驗為以搖瓶試驗所得之最適培養基（即修飾培養基）與培養條件（30°C，起始 pH 6.0），嘗試以三種不同型式發酵槽（攪拌式、氣泡式及氣舉式）進行舞菇菌之深層培養試驗，比較彼等對舞菇菌胞外多醣體之產量、產生時間及分子量分布之影響。

（一）胞外多醣體及菌絲產量之影響

圖九~圖十一分別為攪拌式、氣泡式及氣舉式發酵槽組在發酵培養期間胞外多醣體產量、菌絲體產量、pH 值及殘糖 (sucrose) 之變化情形。

結果顯示三種發酵槽在培養過程中菌絲體產量皆有兩次明顯上升高峰，分別為培養第 6、10 天（圖九）；第 2、14 天（圖十）及第 12、16 天（圖十一）。造成菌絲體產量高點不一致的原因可能與三種發酵槽不同特性有關，攪拌式發酵槽在培養初期及後期可能因攪拌產生的剪切力造成菌絲體不易生長；氣泡式發酵槽在培養過程因不具剪切力破壞所以菌絲體生長較為順利，菌絲體產量隨著培養天數增加而增加，但也因為氣泡式發酵槽質傳能力較差所以菌絲體產量未達最高；在氣舉式發酵槽中因具有中空套桶因此具有較好的質傳能力，且不具剪切力破壞，因此隨著培養天數的增加而增加，但在第 12 天後便開始下降，推測原因可能為菌絲體產量過多造成生長空間不足，使得菌絲體開始分解。

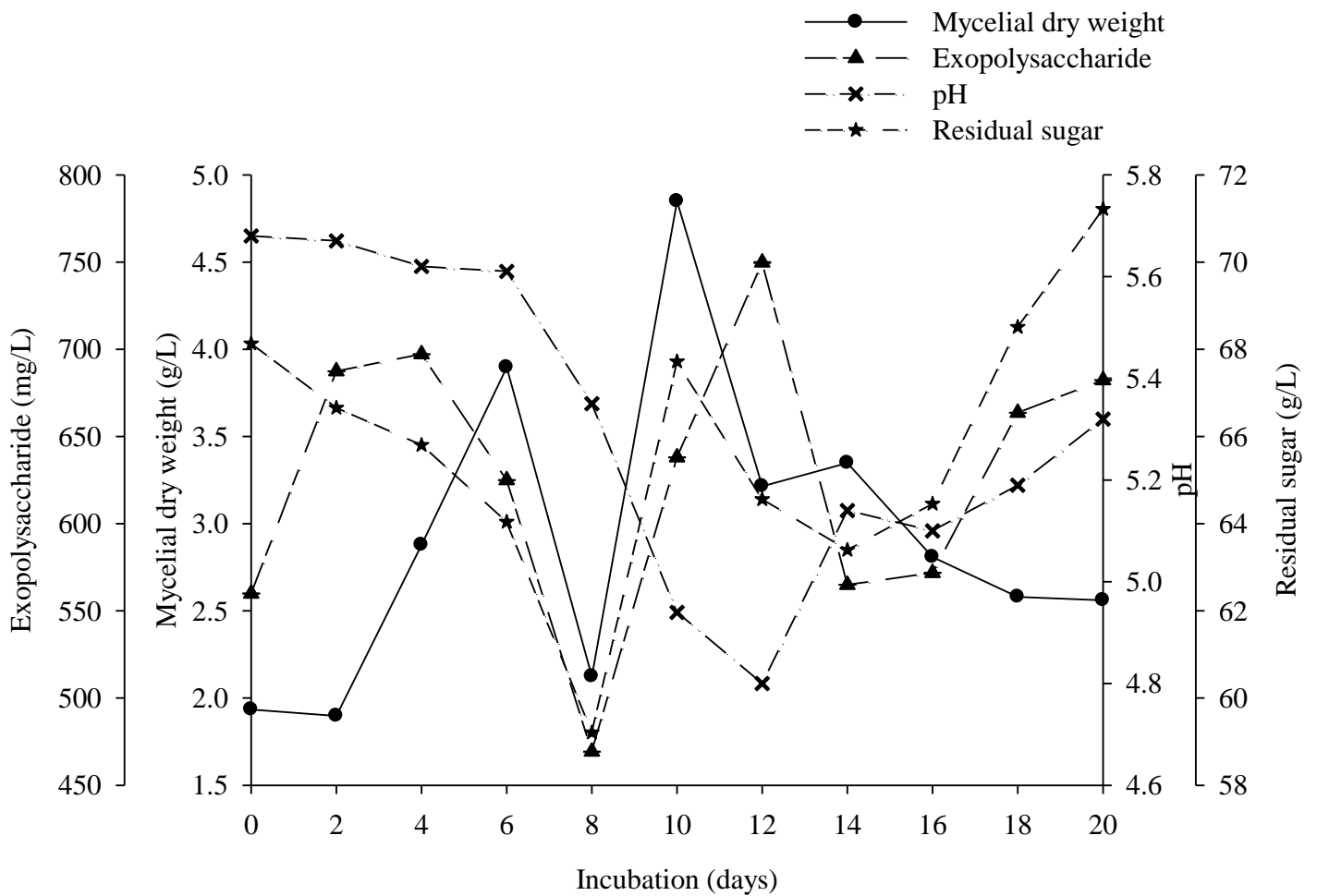
三發酵槽之菌絲體產量以氣舉式發酵槽最高 (8.84 g/L, 第 12 天), 其次為攪拌式 (4.85 g/L, 第 10 天) 及氣泡式 (3.85 g/L, 第 14 天), 三種發酵槽菌絲體產量皆高於搖瓶培養組 (2.59 g/L, 第 18 天), 分別為搖瓶培養組之 3.41、1.87、1.49 倍 (資料未列), 且最高產量發生的天數 (10~14 天, 圖九~十一) 皆低於搖瓶培養組 (18 天, 圖八)。以上結果顯示以修飾培養基及發酵槽擴大培養, 相較於搖瓶培養, 可提高舞菇菌絲體產量。

在胞外多醣產量部分, 三種發酵槽在培養期間亦皆有兩個高峰, 與搖瓶試驗相同 (圖八)。分別為第 4、12 天 (圖九); 第 2、16 天 (圖十) 及第 8、16 天 (圖十一)。培養過程中胞外多醣產量並未隨著培養天數增加或減少, 而是呈現上下跳動的變化, 推測此實驗結果可能與菌絲體及 pH 值變化有關。三種發酵槽多呈現胞外多醣產量最高時, 菌絲體產量也會達最高峰之趨勢, 表示胞外多醣產量與菌絲體產量具正相關之關係。胞外多醣可能可以助於菌絲體生長或者菌絲體產量提高有助於胞外多醣的生產; 此外, 三種發酵槽組皆呈現胞外多醣及菌絲體產量達到高峰後, 產量開始下降時 pH 值也會下降, 表示舞菇菌的生長及胞外多醣的產量會受到 pH 值影響, 因此如果可以穩定 pH 值變化, 可能有助於提升菌絲體及胞外多醣體的產量。

胞外多醣產量以氣舉式發酵槽產量最高 (1060.61 mg/L, 第 8 天), 其次為攪拌式 (749.79 mg/L, 第 12 天) 及氣泡式 (741.47 mg/L, 第 2 天)。與搖瓶培養最高胞外多醣產量 (880.98 mg/L, 第 6 天) 相比, 只有氣舉式發酵槽高於搖瓶培養, 推測可能是搖瓶培養因培養體積小因此比較沒有質傳不佳及剪切力破壞問題, 此外, 擴大培養後可能會產生質傳不佳問題導致生長效果不好, 因此透過適當的培養方式可以有助於胞外多醣的生產。

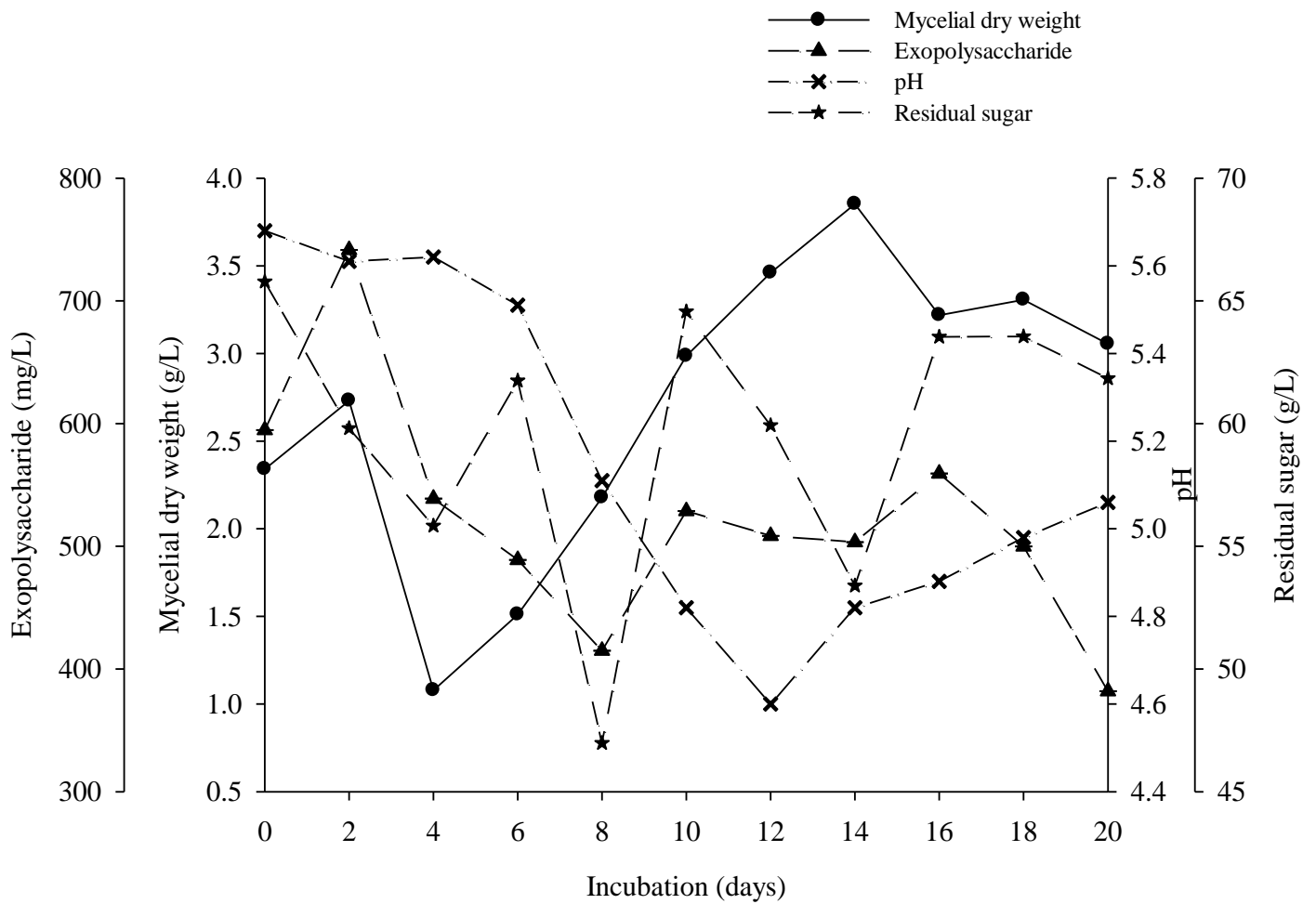
發酵液中殘糖（蔗糖）含量在三種發酵槽結果中皆呈現起伏現象，在培養初期三種發酵槽之殘糖含量皆隨著培養天數的增加而下降，表示在生長過程中會使用碳源提供生長所需養分，但在最後收槽後殘糖仍未耗盡。此結果與吳 (2009 a) 深層培養桑黃菌 (*P. linteus*)、Lung 等人(2009)深層培養蜜環菌 (*A. mellea*) 及 Shih 等人(2008)深層培養舞菇菌 (*G. frondosa*) 之殘糖皆隨培養時間增加而減少之報告不同，推測可能原因為在培養過程中舞菇菌會自己產生可溶性糖類，其中包含蔗糖 (林，2008)；在培養初期及中期殘糖含量隨著培養天數增加而下降，表示舞菇菌生長會消耗掉碳源，但在發酵後期菌絲體產量達到一定程度後便會開始自己產生醣類，此實驗結果和林 (2008) 固態發酵中有類似結果；蔗糖為葡萄糖及果糖所組成，在林 (2008) 實驗中以乳糖做為碳源，培養基也不具葡萄糖及果糖，但在分析菌絲體時測得含有葡萄糖及果糖，及在小麥固態培養基培養後蔗糖含量提升，可能舞菇菌在生長過程中能夠合成蔗糖，造成培養後期培養基中殘糖上升。

發酵液 pH 值在結果中顯示，攪拌式及氣泡式發酵槽隨培養天數增加而下降在第 12 天最低 (pH 4.8、pH 4.6) 而後開始上升，而氣舉式發酵槽則是隨著培養天數增加而降低在第 18 天有最低點 (pH 4.62)，此三種發酵槽 pH 值變化趨勢雖不完全相同，但是 pH 值最低點卻都落在 4.6 左右，顯示培養液本身 pH 緩衝系統良好，而造成培養液 pH 值變化起伏其它原因可能有：1. 碳源代謝過程產生酸性物質使 pH 值下降，但同時消耗氮源過程中也會提升 pH 值。2. 碳源消耗速率不同，酸性物質生成速率不同，使 pH 值下降速率不同。



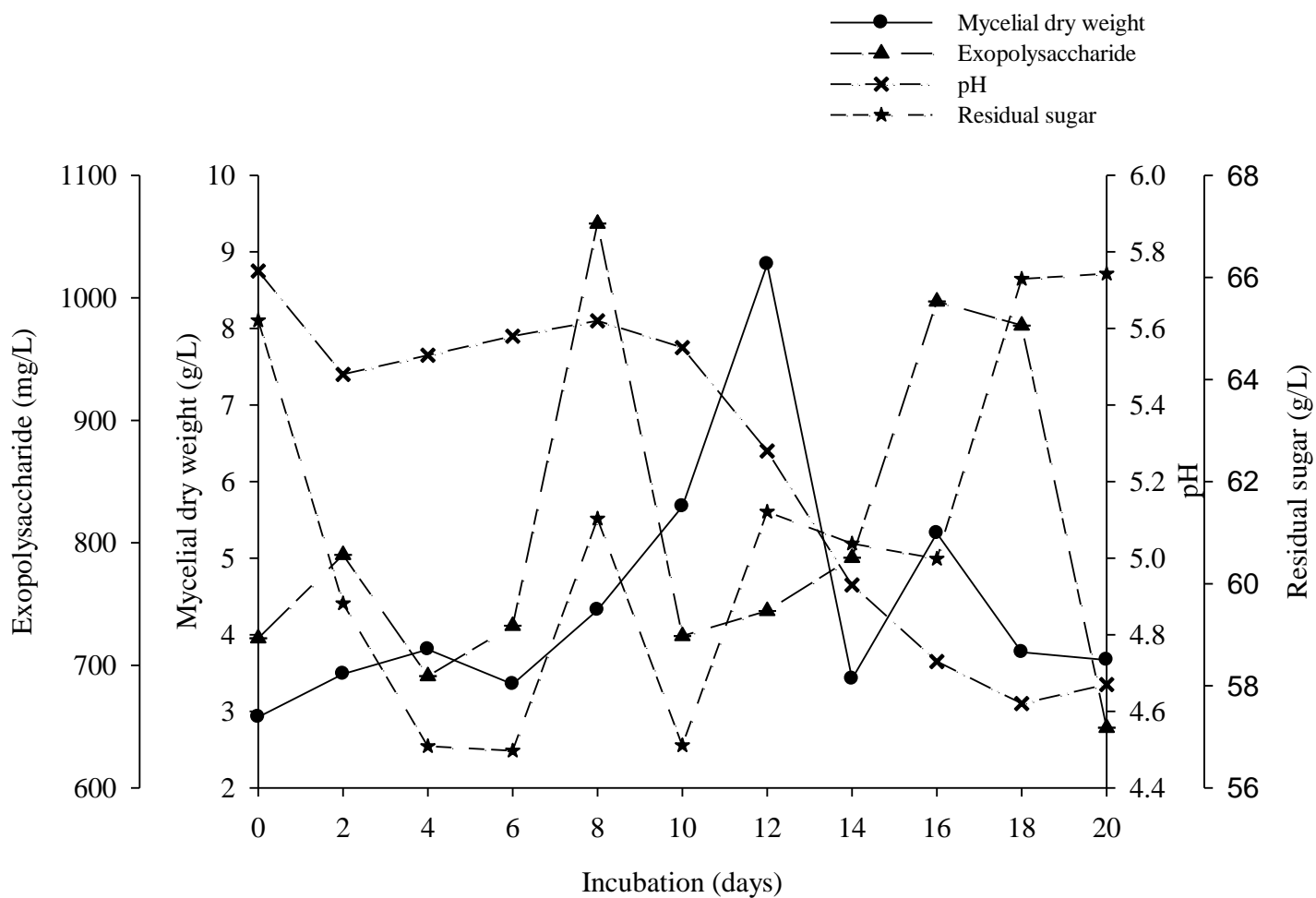
圖九 攪拌式發酵槽培養期間舞菇菌胞外多醣、菌絲體、pH 值及殘糖量之變化。

Fig. 9 Changes of exopolysaccharide, mycelial dry weight, pH and residual sugar by *G. frondosa* during incubation in stirred-tank fermentor.



圖十 氣泡式發酵槽培養期間舞菇菌胞外多醣、菌絲體、pH 值及殘糖量之變化。

Fig. 10 Changes of exopolysaccharide, mycelial dry weight, pH and residual sugar by *G. frondosa* during incubation in bubble column fermentor.



圖十一 氣舉式發酵槽培養期間舞菇菌胞外多醣、菌絲體、pH 值及殘糖量之變化。

Fig.11 Changes of exopolysaccharide, mycelial dry weight, pH and residual sugar by *G. frondosa* during incubation in air-lift fermentor.

表十四為舞菇菌於三種形式發酵槽培養（攪拌式、氣泡式及氣舉式發酵槽）下各項發酵參數（fermentation parameters）之比較，由於三種發酵槽之最高菌絲體及胞外多醣體最高產量皆不在相同培養天數（圖九 ~ 圖十一），故跟先前單因子試驗一樣以胞外多醣最高產量之培養天數作為篩選條件。三種發酵槽胞外多醣產量皆有兩次高峰，因此三發酵槽皆以胞外多醣產量最高峰之天數計算發酵參數（表十四）。

結果（表十四）顯示氣舉式發酵槽因具有良好質傳及溶氧效果，有助於菌絲體生長，因此具有最高的比生長速率（ $\mu=0.16 \text{ day}^{-1}$ ）；其次為攪拌式發酵槽（ 0.12 day^{-1} ）及氣泡式發酵槽（ 0.04 day^{-1} ）。攪拌式及氣舉式發酵槽皆具有良好質傳，但攪拌式發酵槽所產生的剪切力可能破壞菌絲體，造成菌絲體生長較為緩慢；氣泡式發酵槽因質傳能力差，因此生長速率遠不及其他兩組。

胞外多醣生成速率（ Q_p ）之結果，亦以氣舉式發酵槽最高（ $Q_p=88 \text{ mg/L/day}$ ）其次為攪拌式（ $Q_p=62 \text{ mg/L/day}$ ）及氣泡式（ $Q_p=53 \text{ mg/L/day}$ ）發酵槽。其中攪拌式發酵槽（圖九）最高產量出現在第二次高峰（第十二天，圖九），氣泡式及氣舉式發酵槽胞外多醣皆出現在第一次高峰（第二天及第八天，圖十及圖十一）。最高胞外多醣產量依序為氣舉式（ 1060.61 mg/L ）、攪拌式（ 749.79 mg/L ）及氣泡式（ 741.47 mg/L ）發酵槽，顯示氣舉式發酵槽胞外多醣產率皆優於其他兩組發酵槽。

產率（yield）發酵參數中（表十四），比多醣產率（ $Y_{p/x}$ ）以氣泡式發酵槽產率（ $Y_{p/x}=193 \text{ mg/L}$ ）最高，其次為攪拌式（ $Y_{p/x}=155 \text{ mg/L}$ ）及氣舉式（ $Y_{p/x}=120 \text{ mg/L}$ ）發酵槽，但在整體發酵過程（圖十）可以發現氣泡式發酵槽生長狀況並不好，第二天及出現最高胞外多醣產量後便無大幅度上升，而氣舉式發酵槽比多醣產率最低原因為有最高的菌絲體產量，高於氣泡式

發酵槽兩倍以上，是造成比多醣產率最低的原因；而多醣產率 ($Y_{p/s}$) 及菌絲體產率 ($Y_{x/s}$) 的部分可能較不具意義，原因可能為此三種發酵槽殘糖皆未隨培養天數增加而下降，且在發酵後期皆有上升趨勢 (圖九~十一)。此外，舞菇可能會自行產生蔗糖 (林，2008)，導致產率計算上可能有誤差。

參考上述發酵參數結果，氣舉式發酵槽胞外多醣產量(P_{max})及菌絲體產量(X_{max})、比生長速率 (μ)、胞外多醣生成速率 (Q_p) 皆為三發酵槽中最高，顯示以低剪切力及較佳混合效果之氣舉式發酵槽培養舞菇菌時，較能促進將碳源轉換成菌絲體及胞外多醣體。因此後續將以氣舉式發酵槽第一次產量高峰 (第八天) 所得之胞外多醣及發酵液進行抗氧化力試驗。



表十四 舞菇菌於不同發酵槽培養時之發酵參數

Table 14 Fermentation parameters of different batch cultures of fermentors by *iiG. frondosa*

Culture	P_{\max}^a	X_{\max}^b	μ^c	Q_p^d	$Y_{p/x}^e$	$Y_{p/s}^f$	$Y_{x/s}^g$	t^h
	mg/L	g/L	day ⁻¹	mg/L/day	mg/g	mg/g	g/g	day
Stirred-tank fermentor	749.79	4.85	0.12	62	155	68	0.44	12
Bubble column fermentor	741.47	3.85	0.04	53	193	32	0.17	2
Air-lift fermentor	1060.61	8.84	0.16	88	120	76	0.63	8

a : maximal yield of exopolysaccharide

c : specific growth rate

e : specific product yield= P_{\max} / X_{\max}

g : dry weight yield= $X_{\max} / \text{sucrose}$, g

b : maximal yield of dry weight

d : product formation rate= P_{\max} / t

f : product yield = $P_{\max} / \text{sucrose}$, g

h : days to reach maximal exopolysaccharide production

(二) 多醣分子量測定

本實驗採用前述搖瓶試驗及三種不同發酵槽組最高胞外多醣體生成時間之發酵液樣品，測定發酵液中胞外多醣分子量及分子量分布情形。分子量的分析以高效液相層析儀及膠體滲透層析管柱進行測定。表十五為不同分子量多醣標準品 (α -D-葡聚糖，pullulan) 之滯留時間。附圖四為多醣體 (pullulan) 分子量 (6000、10000、21700、113000、210000、366000 及 805000 Da) 之標準曲線。

結果 (表十六) 發現四種形式之發酵液皆在滯留時間 8.6 鐘左右時有一明顯波峰產生，比對多醣分子量標準曲線 (附圖四) 後得知分子量範圍為在 $7.06 \sim 7.36 \times 10^3$ Da。各發酵液胞外多醣分子量大小經膠體滲透層析法測定結果如表十五所示。

根據上述實驗結果，搖瓶及三種不同發酵槽培養所得之舞菇胞外多醣分子量皆十分接近，顯示不同培養方式並不會影響多醣分子量大小。此外，Fan 等人 (2011) 指出舞菇子實體多醣具抗氧化能力，故本實驗後續將以胞外多醣產量較高之氣舉式發酵槽所得之發酵液進行抗氧化力實驗。

表十五 膠體滲透層析法不同分子量多醣標準品 (α -D-葡聚糖) 之滯留時間

Table 15 Retention times of pullulan standards with different molecular weights by gel permeation chromatography

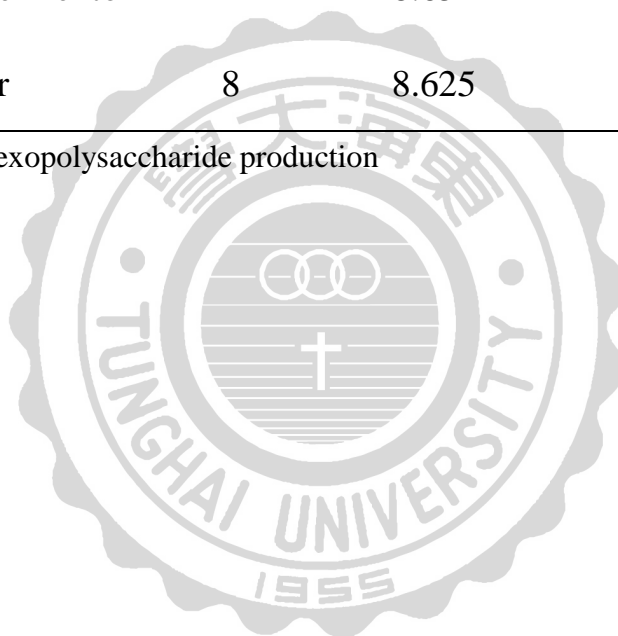
Molecular weight (Da)	Retention time (min)	Log M.W.*
6000	8.730	3.78
10000	8.413	4.00
21700	8.023	4.34
47300	7.463	4.67
113000	7.100	5.05
210000	6.737	5.32
366000	6.313	5.56
805000	5.880	5.91

* Log molecular weight

表十六 膠體滲透層析法測定四種不同發酵液之胞外多醣體分子量
 Table 16 Estimation of molecular weights of exopolysaccharides from four different cultures by gel permeation chromatography

Cultures	Day*	Retention time (min)	Molecular weight (Da)
Shake flask	6	8.621	7.28×10^3
Stirred-tank fermentor	12	8.618	7.32×10^3
Bubble column fermentor	2	8.654	7.06×10^3
Air-lift fermentor	8	8.625	7.36×10^3

*Day of maximal exopolysaccharide production



四、胞外多醣及發酵液萃取物抗氧化力之測定

人體會經由飲食、外在接觸或體內所進行生理反應的過程中產生自由基 (free radicals) 或活性氧族群 (reactive oxygen species)，此類物質會造成脂質過氧化作用 (lipid peroxidation) 導致細胞死亡甚至人體病變。而體內有一套防禦系統可以清除有害物質，當人體產生自由基速度超過人體可以清除之能力時，便會在體內累積自由基造成傷害，此時如果可以透過攝取等方式提高自由基清除能力便可降低對人體傷害。目前已證實清除自由基對於細胞保護、疾病預防與衰老延緩等，具有顯著的作用，而使得控制體內自由基的成份或是有效清除已產生之自由基，成為目前醫藥界積極努力的方向；任何具有上述功能的成份或是物質，亦受到學界及業界的關注 (梁，2009)。

本實驗以氣舉式發酵槽於第一次產量高峰 (第八天) 所得之發酵液胞外多醣及發酵液萃取物及熱水萃取物，測定彼等之 DPPH 自由基清除能力、總抗氧化力、螯合亞鐵能力及還原力。Lung(2011)以甲醇及熱水萃取蜜環菌菌絲體，發現不同萃取方法會影響萃取物中抗氧化物質種類及含量，進而影響萃取物之抗氧化活性。因此本次實驗分別以 50% 及 95% 乙醇萃取發酵液後，比較萃取物之抗氧化活性。樣品及樣品萃取物樣品代號分別為 EPS (第八天發酵液胞外多醣)、EtOH-95% (第八天發酵液 95% 乙醇萃取)、EtOH-50% (第八天發酵液 50% 乙醇萃取物)、HW (第八天發酵液熱水萃取物)。

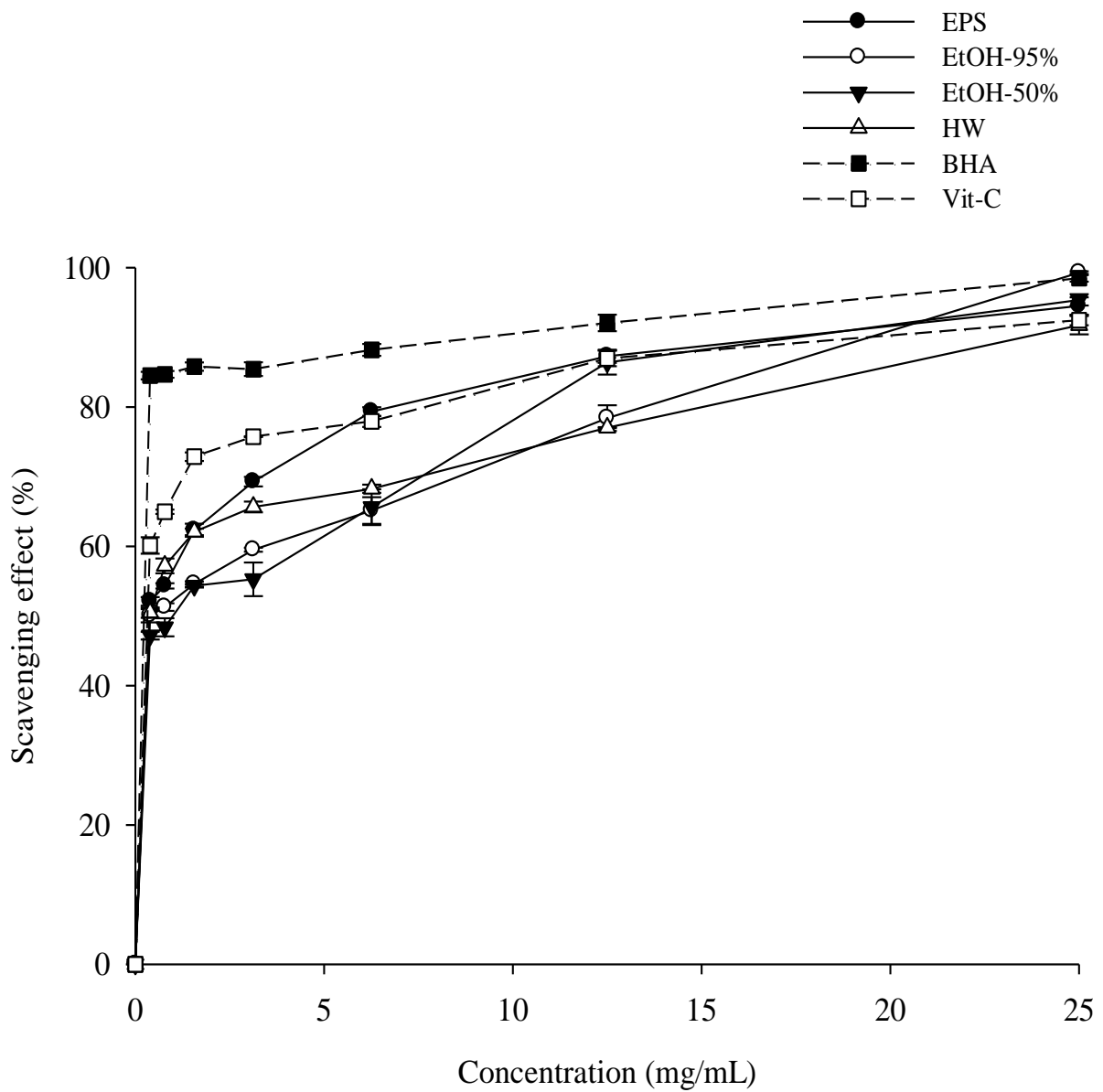
(一) DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基可接受抗氧化劑所提供之氫原子而被清除並形成一穩定之分子，因此常被用以檢測抗氧化物之抗氧化活性 (Shimada *et al.*, 1992)。

結果 (圖十二) 顯示舞菇菌胞外多醣及發酵液乙醇及熱水萃取物之 DPPH 自由基清除能力皆隨著濃度增加而升高，於濃度為 25 mg/mL 時，所有樣品組之 DPPH 自由基清除率皆可達 90% 以上。其中以 EtOH-95% 組之清除率 (99.28%) 最高。比較不同樣品 DPPH 自由基清除能力 IC_{50} (清除率為 50% 之最低濃度， IC_{50} 值愈低，表示樣品抗氧化力愈強) 之結果 (表十七) 顯示：EPS 組 (0.38 mg/mL)、EtOH-95% 組 (0.39 mg/mL) 及 HW 組 (0.39 mg/mL) 較低，且皆顯著 ($p < 0.05$) 低於 EtOH-50% 組 (0.97 mg/mL)。然 EPS 組、EtOH-95% 組及 HW 組之間並無顯著 ($p < 0.05$) 差異。

綜上所述，各樣品之抗氧化力大小 (依彼等 DPPH 自由基清除能力 IC_{50} 由低而高排序) 依序為：EPS 組 > (EtOH-95% 組 = HW 組) > EtOH-50% 組

與 Mau 等人 (2004) 研究舞菇菌菌絲體乙醇萃取物於 25mg/mL 時之 DPPH 自由基清除能力為 90% 及 IC_{50} 為 4.95mg/mL 之實驗結果相比，Mau 等人之實驗數據分別低於及高於本實驗結果。



圖十二 氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之 DPPH 自由基清除能力。

Fig.12 DPPH · scavenging effect of exopolysaccharide and extracts from culture of *G. frondosa* using air-lift fermentor

表十七 氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取出之 DPPH 自由基清除能力之 IC₅₀

Table 17 The IC₅₀ of DPPH · scavenging effect of exopolysaccharide and extracts from culture of *G. frondosa* using air-lift fermentor

Samples	IC ₅₀ (mg/mL)*
EPS	0.38±0.01 ^b
EtOH-95%	0.39±0.01 ^b
EtOH-50%	0.97±0.14 ^a
HW	0.39±0.01 ^b
BHA (control)	0.23±0.01 ^c
Vit-C (control)	0.33±0.01 ^{c^b}
Trolox (control)	0.03±0.01 ^d

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

Each value are expressed as Mean ± SE (n=3).

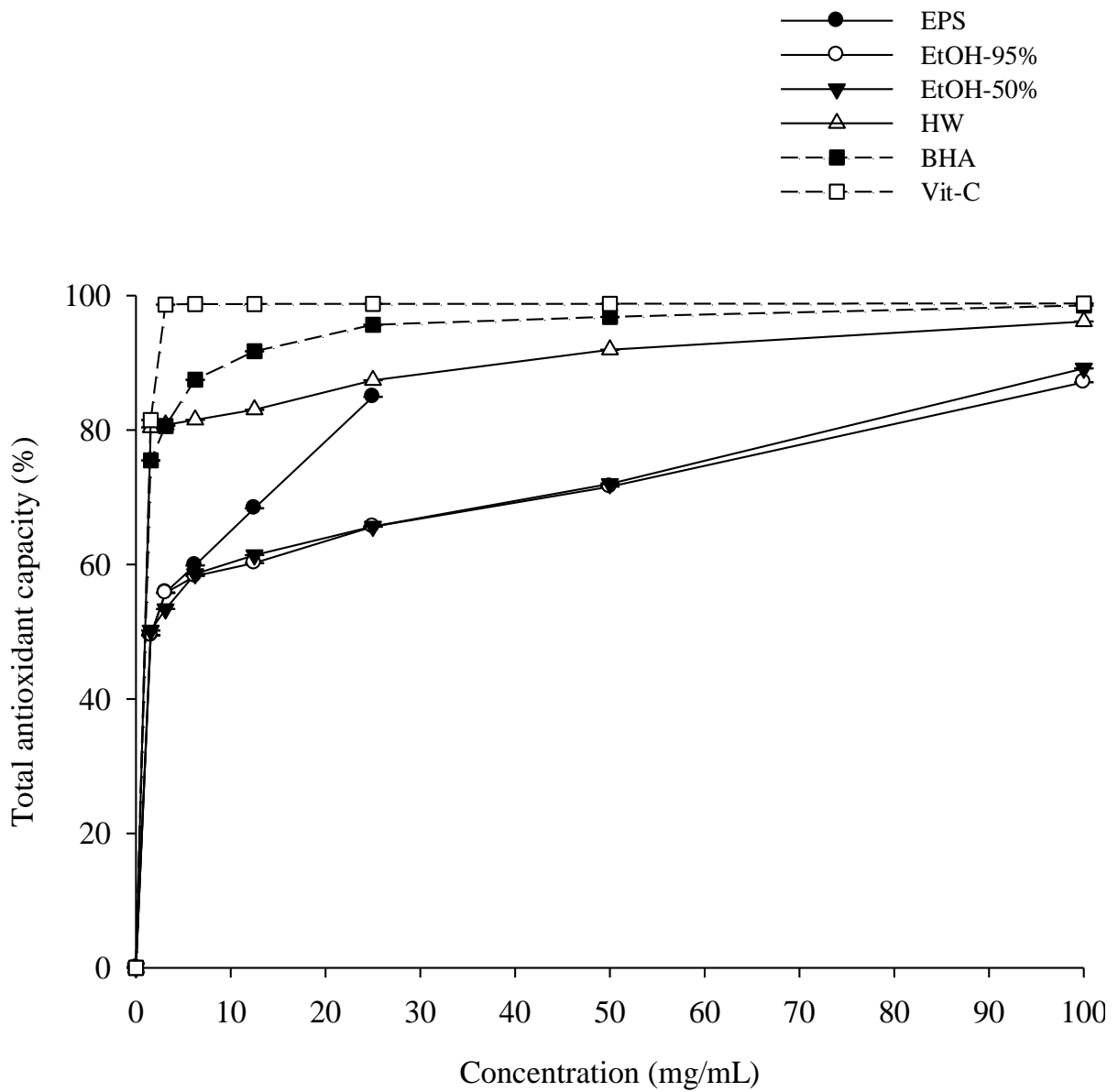
*The minimal concentration required to inhibit 50% activity of DPPH ·

(二) 總抗氧化能力測定

ABTS 會與 peroxidase 及 H_2O_2 反應形成藍綠色穩定之 $ABTS \cdot^+$ 陽離子自由基，加入抗氧化劑會減少 $ABTS \cdot^+$ 含量，使其在波長 734 nm 下之吸光值降低。在本實驗中因 EPS 濃度過高時會干擾吸光值測定，故本實驗之 EPS 組濃度只測定至 25 mg/mL。

結果 (圖十三) 顯示舞菇菌胞外多醣、發酵液乙醇及熱水萃取物之總抗氧化能力皆隨著濃度增加而升高，於濃度為 25 mg/mL 時，HW 組具最高總抗氧化能力 (87.4%)。比較不同樣品總抗氧化能力 IC_{50} (抑制 50% $ABTS \cdot^+$ 活性所需之最低濃度， IC_{50} 值越低，表示樣品抗氧化力愈強) 之結果 (表十八) 顯示：HW 組具最低之 IC_{50} (0.97 mg/mL)，且顯著 ($p < 0.05$) 低於其它三實驗組。然 EPS 組 (1.7 mg/mL)、EtOH-95% 組 (1.96 mg/mL) 及 EtOH-50% 組 (1.63 mg/mL) 三組間無顯著 ($p < 0.05$) 差異。

綜上所述，各樣品之抗氧化力大小 (依彼等總抗氧化力 IC_{50} 由低至高排序) 依序為：HW 組 > EtOH-50% 組 > EtOH-95% 組 > EPS 組。



圖十三 氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之總抗氧化能力。
 Fig. 13 Total antioxidant capacity on ABTS ·⁺ of exopolysaccharide and extracts from culture of *G. frondosa* using air-lift fermentor.

表十八 氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取出之總抗氧化力自由基之 IC₅₀

Table 18 The IC₅₀ of total antioxidant capacity on ABTS ·⁺ of exopolysaccharide and extracts from culture of *G. frondosa* using air-lift fermentor

Samples	IC ₅₀ (mg/mL)*
EPS	1.70±0.17 ^a
EtOH-95%	1.69±0.15 ^a
EtOH-50%	1.63±0.49 ^a
HW	0.97±0.01 ^b
BHA (control)	0.89±0.01 ^b
Vit-C (control)	0.96±0.01 ^b
Trolox (control)	0.93±0.01 ^b

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

Each value are expressed as Mean ± SE (n=3).

*The minimal concentration required to inhibit 50% activity of ABTS ·⁺.

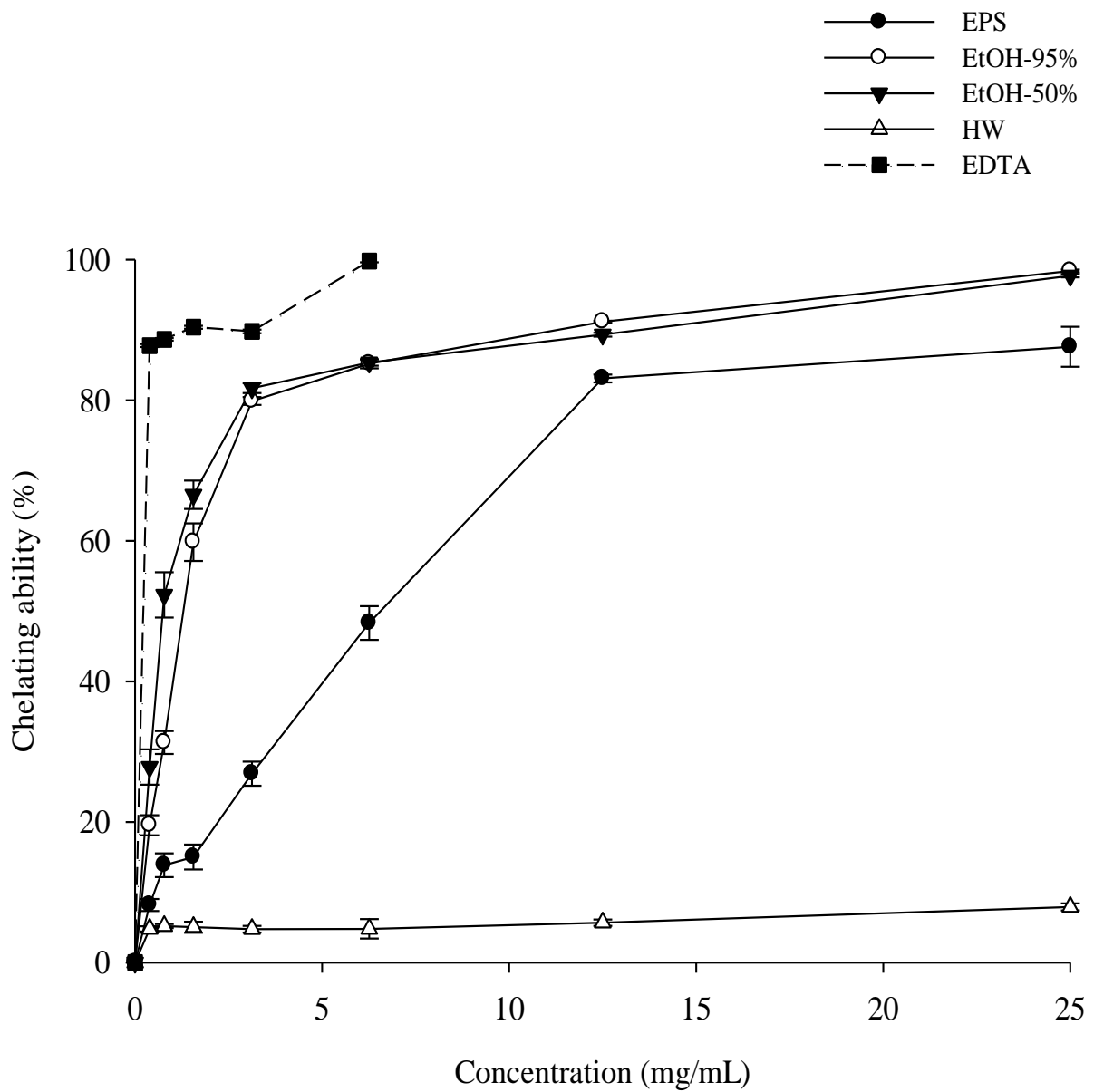
(三) 螯合亞鐵離子能力

脂質氧化的起始反應除了可由自由基引發之外，還可由金屬離子引發，且只需要少量的金屬離子即可產生大量的自由基而加速脂質的氧化反應，進而對人體造成傷害(Halliwell *et al.*, 1995)。其中以亞鐵離子為對油脂氧化作用最具影響力之助氧化劑。

結果(圖十四)顯示所有樣品組(除 HW 組外)之螯合亞鐵離子能力皆隨著濃度增加而升高，於濃度 25 mg/mL 時，EtOH-95%組具最高亞鐵離子螯合能力(98.38%)。而 HW 組即使在最高濃度 25mg/mL 時，其螯合能力仍偏低(7.91%)，顯示舞菇發酵液熱水萃取物抗氧化成分中，對於螯合亞鐵離子能力極差。比較不同樣品螯合亞鐵離子能力 IC_{50} (螯合 50% 亞鐵離子所需之最低濃度， IC_{50} 值越低，表示樣品抗氧化力愈強)之結果(表十九)顯示：EtOH-50%組具最低之 IC_{50} (0.76mg/mL)，且顯著 ($p < 0.05$) 低於其它三實驗組。其次為 EtOH-95%組(1.3 mg/mL)、EPS 組(6.35mg/mL)及 HW 組(266.09 mg/mL)。

綜上所述，各樣品之抗氧化力大小(依彼等螯合亞鐵離子能力 IC_{50} 由低至高排序)依序為：EtOH-50%組 > EtOH-95%組 > EPS 組 > HW 組。

與 Mau 等人(2004)研究舞菇菌絲體乙醇萃取物於 25 mg/mL 時之螯合亞鐵離子能力為 95%及 IC_{50} 為 3.49 mg/mL 之實驗結果相比，Mau 等人之實驗數據分別低於及高於本實驗結果。



圖十四 氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取出之螯合亞鐵離子能力
 Fig. 14 Chelating ability on ferrous ion of exopolysaccharide and extracts from culture of *G. frondosa* using air-lift fermentor

表十九 氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取出之螯合亞鐵離子能力之 IC₅₀

Table 19 The IC₅₀ of of Chelating ability on ferrous ion of exopolysaccharide and extracts from culture of *G. frondosa* using air-lift fermentor

Samples	IC ₅₀ (mg/mL)*
EPS	6.35±0.27 ^a
EtOH-95%	1.30±1.30 ^b
EtOH-50%	0.76±0.06 ^c
HW	266.09±57.21
EDTA (control)	0.22±0.01 ^d

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

Each value are expressed as Mean ± SE (n=3).

* The minimal concentration required to chelate 50% of ferrous ion.

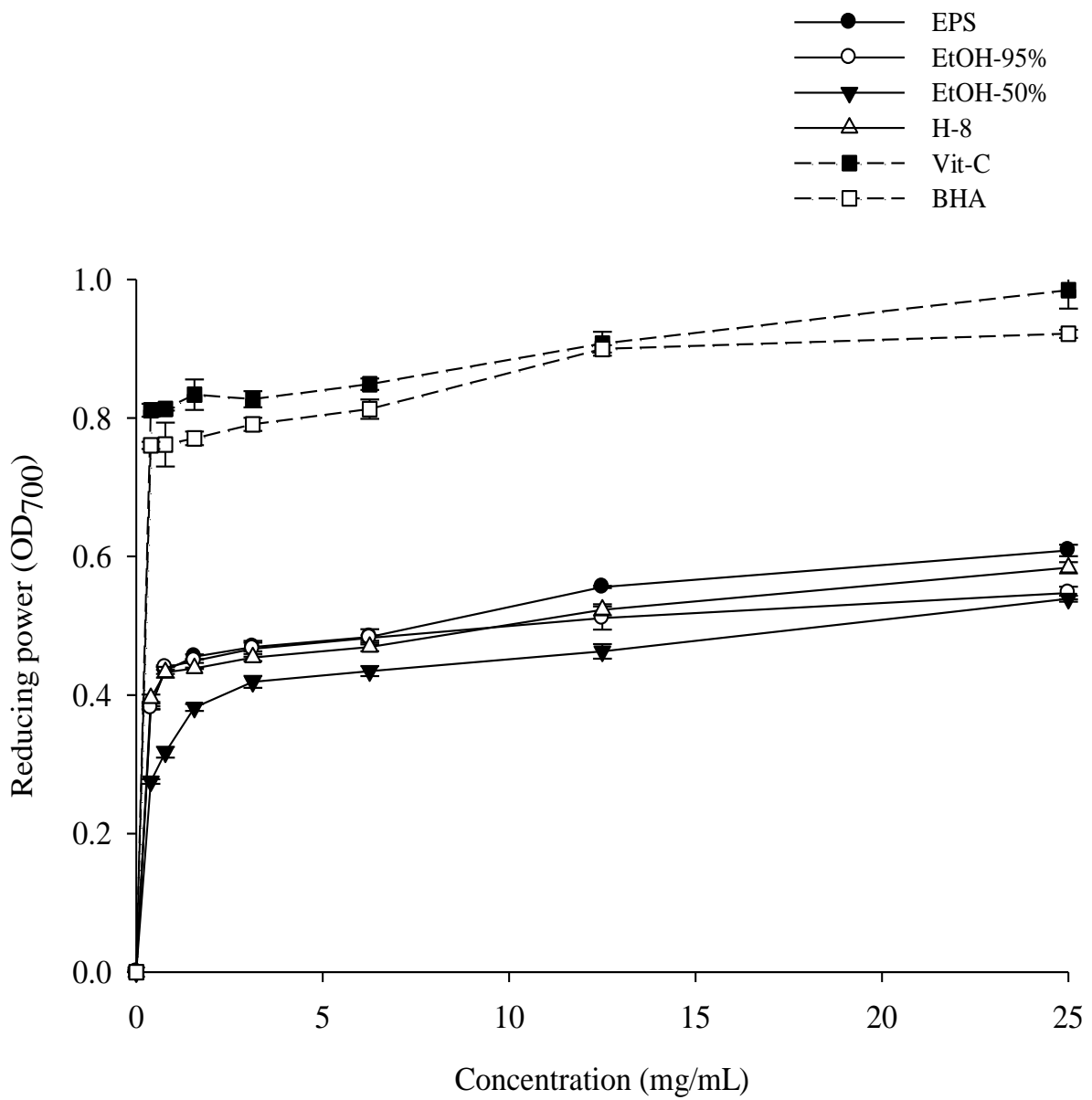
(四) 還原力

所謂的還原性質是將已氧化的物質還原，或是將環境維持在一個傾向於還原的狀態，便不易進行氧化反應。而本身具有還原力者可作為電子之提供者，與自由基的清除有很大的關係 (蔡，2002)。

結果 (圖十五) 顯示各樣品組之還原力皆隨樣品濃度增加而升高，但相較於前述 (一)~(三) 抗氧化力實驗之結果，其上升趨勢較為平緩。於濃度 25 mg/mL 時，EPS 組具最高還原力 ($OD_{700}=0.61$)。其次為 HW 組 ($OD_{700}=0.58$)、EtOH-95% 組 ($OD_{700}=0.55$) 及 EtOH-50% 組 ($OD_{700}=0.54$)。比較不同樣品還原力 IC_{50} (OD_{700} 達 0.5 所需之最低濃度， IC_{50} 愈低表，表示樣品抗氧化力愈強) 之結果 (表二十) 顯示：EPS 組具最低之 IC_{50} (7.56 mg/mL)，且顯著 ($p<0.05$) 低於其他三實驗組。其次為 HW 組 (9.86 mg/mL)、EtOH-95% 組 (11.01 mg/mL) 及 EtOH-50% 組 (18.58 mg/mL)。

綜上所述，各樣品之抗氧化力大小 (依彼等還原力 IC_{50} 由低至高排序) 依序為：EPS 組 > HW 組 > EtOH-95% 組 > EtOH-50% 組。

綜合前述 (一)~(四) 實驗結果顯示四樣品組皆具抗氧化力，然對不同抗氧化測定則呈現不同之抗氧化力，相對抗氧化力大小排序並無一致性 (表二十一)。可能原因為四樣品組之抗氧化機制不同，然確實原因有待後續進一步研究。



圖十五 氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之還原力
 Fig. 15 Reducing power of exopolysaccharide and extracts from culture of *G. frondosa* using air-lift fermentor

表二十 氣舉式發酵槽之舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之還原力之 IC₅₀
 Table 20 The IC₅₀ of Reducing power of exopolysaccharide and extracts from culture of *G. frondosa* using air-lift fermentor

Samples	IC ₅₀ (mg/mL)
EPS	7.56±0.82 ^c
EtOH-95%	11.01±2.80 ^b
EtOH-50%	18.52±0.79 ^a
HW	9.86±0.23 ^b
Vit-C (control)	0.24±0.01 ^e
BHA (control)	0.26±0.01 ^e

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

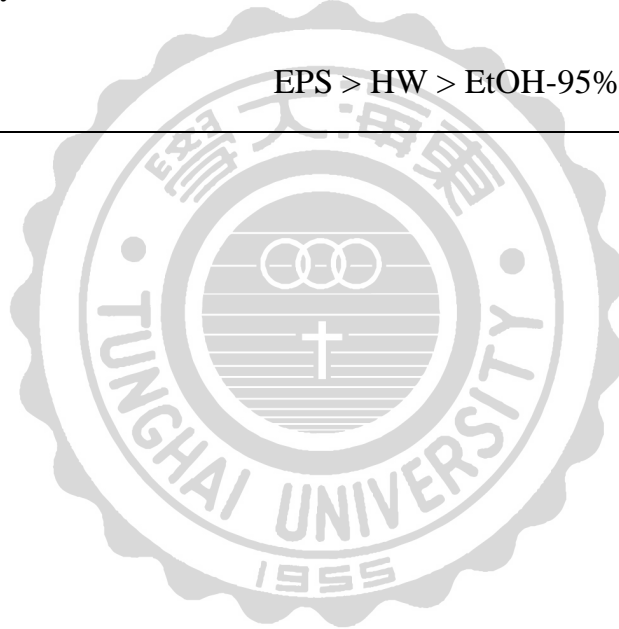
Each value are expressed as Mean ± SE (n=3).

* The minimal concentration required to reach OD₇₀₀ of 0.5.

表二十一 舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之抗氧化力測定比較

Table 21 Comparison of antioxidant ability on exopolysaccharide and extracts of culture of *G. frondosa*

Antioxidant assays	Antioxidant ability
DPPH · scavenging ability	EPS > (EtOH-95% = HW) > EtOH-50%
Total antioxidant capacity	HW > EtOH-50% > EtOH-95% > EPS
Fe ²⁺ chelating ability	EtOH-50% > EtOH-95% > EPS > HW
Reducing power	EPS > HW > EtOH-95% > EtOH-50%



五、機能性成分與抗氧化力測定之相關性

菇類常帶有一些可能與抗氧化力有關之機能性成分如總酚 (total phenol) 及麥角硫因 (ergothioneine) 等，前者與氧自由基吸收能力 (oxygen radical absorbance capacity)、DPPH 自由基清除能力及 ABTS 自由基清除能力等抗氧化力試驗具高度關聯性 (Dubois *et al.*, 1956; Karaman *et al.*, 2010; Floegel *et al.*, 2011)；後者則與抑制過氧化氫在鐵及銅離子存在下轉化為羥自由基 (Akanmu *et al.*, 1991) 及保護細胞免於因過氧化氫誘導而造成細胞死亡有關 (Aruoma *et al.*, 1999)。

本實驗所用之胞外多醣體樣品為未經純化之粗多醣，即使經 75% 乙醇多次清洗移除小分子物質後，仍可能帶有其它具抗氧化力成份。因此本實驗目的為測定前述樣品中總酚及麥角硫因含量，以了解彼等與樣品抗氧化能力之相關性。

結果 (表二十二) 中顯示四樣品組皆含總酚，其中 HW 組含量 (1.12 mg GAE/100 g) 最高，且顯著 ($p < 0.05$) 高於其它三樣品組。四樣品組亦皆含麥角硫因 (表二十三)，其中以 EPS 組含量 (72.81 mg/L) 顯著 ($p < 0.05$) 高於其它三樣品組。上述結果指出四樣品組中可能含有鍵結或附著於多醣分子上之機能性化合物。因此，四樣品組之抗氧化能力應有部分來自於其中所含之機能性成分。

相關性分析用於評估兩者間之影響程度，以相關係數 (r) 表示， r 數值範圍為 $1 \sim -1$ ，愈接近 1 則表示正相關性愈高；愈接近 -1 則表示負相關性愈高；本實驗進行相關性統計分析時，係以樣品抗氧化力測試之 IC_{50} 值為分析數據，而樣品 IC_{50} 與抗氧化力成反比， IC_{50} 值越低代表效果越好，但機能性成分與抗氧化力卻是正比，故在相關性統計之結果會多加一個負號，在數據判斷上較好分析，相關係數越高表示機能性成分與該抗氧化能

力相關性越高。

表二十四為樣品中機能性成分與抗氧化力測定之相關性分析，結果顯示樣品總酚含量與四種抗氧化力測定之相關性，除螯合亞鐵離子測定外 ($r=-0.8425$)，其餘皆為正相關。其中在 DPPH 自由基清除能力及還原力測定上呈現中度相關性 ($r=0.5082$ 及 $r=0.0.5914$)，而在總抗氧化力測定上則呈現高度相關性 ($r=0.7635$)。

樣品麥角硫因含量與抗氧化力測定相關性之結果 (表二十四)，亦為除螯合亞鐵離子能力測定外 ($r=-0.2087$)，其餘皆為正相關。其中 DPPH 自由基清除能力及總抗氧化力測定為低度相關 ($r=0.3579$ 及 $r=0.1171$)，於還原力測定之相關性則為中度相關 ($r=0.5965$)。

綜上所述，四種樣品中所含機能性成分 (總酚與麥角硫因) 與樣品之 DPPH 自由基清除能力、總抗氧化力及還原力測定有正相關性，表示 1. 樣品之抗氧化力應有部分來自於所含之總酚與麥角硫因；2. 樣品所含機能性成分 (總酚與麥角硫因) 與樣品呈現之亞鐵離子螯合能力較無關係。三種與機能性成分有正相關性的抗氧化力測定中，以還原力測定與樣品之機能性成分 (總酚與麥角硫因) 皆有中度之相關性 ($r=0.5914$ 及 $r=0.5965$)；而總抗氧化力測定則與樣品總酚含量呈現高度相關性 ($r=0.7635$)。此外，螯合亞鐵離子能力測定雖與二種機能性成分皆為負相關性，但之前在樣品螯合亞鐵離子能力測定時，樣品組 (除 HW 組外) 皆呈現螯合能力 (圖十四、表二十)，表示樣品中具有除總酚及麥角硫因以外之其它抗氧化成分，而菇類另外常見之抗氧化物質包括生育醇 (tocopherols)、抗壞血酸 (ascorbic acid) 及類胡蘿蔔素 (carotenoids) 等 (Ferreira *et al.*, 2009)。

表二十二 舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之總酚含量。

Table 23 Total phenol contents in exopolysaccharide and extracts of culture from *G. frondosa*.

Samples	Total phenol content (mg GAE/100 g extract)*
EPS	0.85±0.07 ^b
EtOH-95%	0.48±0.02 ^c
EtOH-50%	0.50±0.03 ^c
HW	1.12±0.11 ^a

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

Each value is expressed as mean \pm SD (n=3).

* The results were expressed in milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per 100 grams of extract.

表二十三 舞菇菌胞外多醣及發酵液萃取物之麥角硫因含量。

Table 23 Ergothioneine in exopolysaccharide and extracts of culture from *G. frondosa*.

Samples	Ergothioneine (mg/L)
EPS	72.81±2.68 ^a
EtOH-95%	15.98±2.16 ^d
EtOH-50%	29.05±2.32 ^c
HW	48.73±1.08 ^b

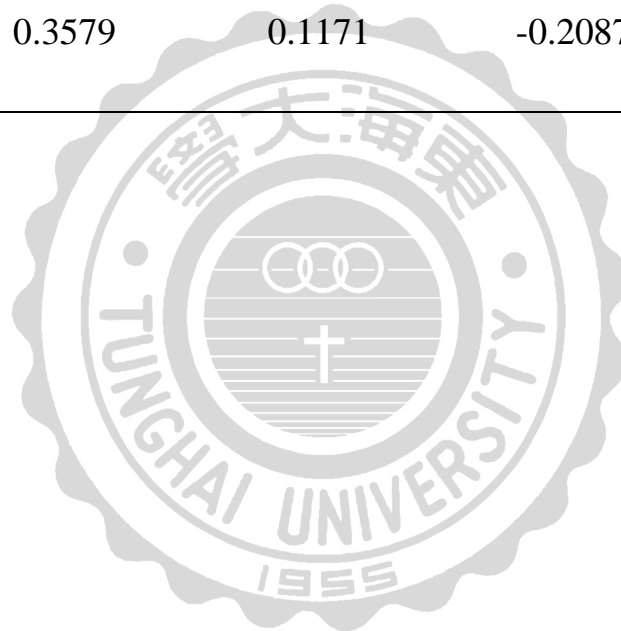
Values superscribed by different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

表二十四 機能性成分與抗氧化力測定之相關係數

Table 24 Correlation between functional components and antioxidant assays

Antioxidant assays	DPPH · scavenging ability	Total antioxidant capacity	Fe ²⁺ chelating ability	Reducing power
Total phenol	0.5082	0.7635	-0.8425	0.5914
Ergothioneine	0.3579	0.1171	-0.2087	0.5965



伍、結論

一、平板培養基試驗

舞菇菌在 PDA 平板培養基 30°C 下培養 15 天，具有最大菌絲體生長直徑 (6.4 cm)，高於其它二實驗組 (YMA 及基礎培養基)。

二、搖瓶試驗

1. 最適舞菇菌胞外多醣體生成之培養條件：碳源為 sucrose (7.0%，w/v)、氮源為 yeast extract (2.5%，w/v)、無機鹽類為 FeSO₄ (0.15%，w/v) 及 KH₂PO₄ (0.3%，w/v)、起始 pH 6.0、培養溫度為 30°C。
2. 以最適條件進行搖瓶培養，可於培養第 6 天獲得最高胞外多醣體產量 (880.98 mg/L)，高於各單因子試驗之結果。

三、不同型式發酵槽培養試驗

1. 搖瓶培養及三發酵槽之胞外多醣體與菌絲體產量高峰時間天數皆非常接近，顯示兩者產量具正相關性。
2. 三發酵槽中以氣舉式發酵槽具有最高胞外多醣體產量 (1060.61 mg/L，第八天)，高於搖瓶試驗 (880.98 mg/L，第六天)，顯示發酵槽之擴大培養有助於胞外多醣體產量之提升。
3. 氣舉式發酵槽之比生長速率 ($\mu=0.16 \text{ day}^{-1}$) 及胞外多醣生成速率 ($Q_p=0.88 \text{ mg/L/day}$) 亦為三發酵槽中最高，顯示以低剪切力及較佳混合效果之氣舉式發酵槽培養舞菇菌時，較能促進將碳源轉換成菌絲體及胞外多醣體。

四、多醣體分子量之測定

搖瓶試驗及三種不同發酵槽培養所得之發酵液，其胞外多醣體分子量範圍為 $7.06 \sim 7.36 \times 10^3$ Da。

五、胞外多醣及發酵液萃取物抗氧化力之測定

1. 氣舉式發酵槽所得胞外多醣及發酵液萃取物 (95%EtOH、50%EtOH、及熱水萃) 四樣品組皆呈現 DPPH 自由基清除能力、總抗氧化力、螯合亞鐵離子能力及還原之抗氧化能力。
2. 四樣品組在四種抗氧化力測定中，相對抗氧化力大小排序無一致性。

六、機能性成分與抗氧化力之相關性

樣品中所含總酚與麥角硫因之機能性成分與樣品之 DPPH 自由基清除能力、總抗氧化力及還原力具有正相關性。顯示樣品之抗氧化力應有部分來自其機能性成分。

陸、參考文獻

- 毛正倫。2009。食藥用菇類及其固態發酵保健食品開發。農業生技產業季刊，18：50-55。
- 水野卓，川合正允。賴慶亮譯。1999。菇類的化學、生化學。國立編譯館，台北，台灣。
- 王伯徹，陳啟楨，華傑。2006。食藥用菇類的培養與應用。食品工業發展研究所，新竹，台灣。
- 王伯徹。2005。食品工業。37(5)：1-9。
- 王培銘，黃定國。2001。氣動攪拌式發酵槽。食品工業，33(11)：13-26。
- 王培銘。2002。食藥用菇液態培養製成之開發。食品工業，34(9)：31-35。
- 卯曉嵐。2000。中國大型真菌。477-479。
- 白壽雄，羅道蘊。1994。生物性多醣體及應用。生物產業期刊，5：3/4。台灣。
- 吳子瑋。2009a。不同型式發酵槽深層培養桑黃菌 *Phellinus linteus* 生產胞外多醣體之研究。私立東海大學食品科學系研究所碩士論文。台中，台灣。
- 吳寬澤。2007。國內外五菇栽培生產技術之開發與未來發展。農業試驗所，72：15-19。
- 吳寬澤。2009b。藥用菇類栽培技術開發。農業生技產業專刊，18：26-33。台灣。
- 呂淑芳，宮昭雲，傅偉光。2001。靈芝中之水溶性粗多醣分析方法之研究。台灣農業化學與食品科學。39(2)：153-161。
- 宋細福，許玲卿。1996。舞菇之開發與研究（一）。技術服務。p.11-17。
- 李長田，刁盈盈，毛欣欣，李玉。2012。松茸液態發酵菌絲生長量因子之研究。菌物學報。39(2)：153-161。
- 村椿孝行他。1986。食工誌 33，181；香川綾（監修）。1989。四訂食品成分表，女子營養大學出版部。

- 汪釗，魏春，應向賢，岑沛霖。2013。微生物工程。科學出版社。
中國 北京。
- 林欣儀。2008。以固態發酵製備舞菇小麥及品質與抗氧化性質。國立中興大學食品暨應用生物科技學系研究所碩士論文。台中，台灣。
- 林俊材。2002。舞茸抗腫瘤多醣及胺基胜肽酶之研究。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。台北，台灣。
- 林夢感，楊義芳，李永輝。2007。多糖抗腫瘤活性構效關係的研究進展。中草藥。38(6)：949-953。
- 崔鳳杰，陶文沂，許泓瑜，許正宏，敖宗華。2006。攪拌轉速和通氣量對灰樹花深層發酵培養的影響。食品與生物技術學報。25(4)：67-80。
- 張嗣良，王永紅，王澤建，莊英萍，陳長華，杭海峰，宮衡，夏建業，錢江潮，郭美錦，黃明志，儲炬。2013。發酵工程原理。高等教育出版社。中國 北京。
- 梁志弘。2009。桑黃之液態培養及其生理活性。國立中興大學食品暨應用生物科技學系研究所博士論文。
- 梁峙。2001。食用菌深層液體發酵參數控制的研究。食品科學。22(1)：38-241。
- 黃麗娜。1996。食用菇菌絲體深層培養在食品工業上的應用。食品工業 28(9)：20-26。
- 董純婷。2001。網狀內氣管氣舉式反應器混合效能之探討。清華大學化學工程研究所碩士論文。
- 趙國強，王鳳春，于田。2011。灰樹花無公害栽培實用新技術。中國農業出版社，北京，中國。
- 蔡淑瑤。2002。靈芝與柳松菇抗氧化性質和其對腫瘤細胞之毒性及柳松菇之抗致突變性質。國立中興大學食品暨應用生物科技學系研究所碩士論文。
- 鄭萬禎。2002。利用批式發酵生產巴西洋菇菌絲體及胞外多醣之研究。國立中興大學食品暨應用生物科技學系研究所碩士論文。台中，台灣。
- 韓德權，王華，趙輝，孫玉梅，王莘，李沖偉，姜雲，賈樹彪，董浩。2013。微生物發酵工藝學原理。化學工業出版社，中國，北京。

難波宏彰。1988。キノコの生理,生化学とその周邊技術 講習會テキスト。
4-1-16。

嚴澤湘，劉建先，嚴新濤。2013。蟲草・蟲蛹草・灰樹花。內蒙古出版集團，內蒙古，中國。

Adachi, Y., Okazaki, M., Ohno, N. and Yadomae, T. 1994. Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17(12), 1554-1560.

Akanmu, D., Cecchini, R., Aruoma, O. I. and Halliwell, B. 1991. The antioxidant action of ergothioneine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288(1), 10-16.

Amin, I., Zamaliah, M. M. and Chin, W. F. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, 87(4), 581-586.

Arnao, M. B., Cano, A., Hernadez-Ruiz, J., Carcia-Canovas, F. and Acosta, M. 1996. Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of 2,2'-azino-bis (3-ethylbiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase : a new approach for determining total antioxidant status of food. *Analytical Biochemistry*, 236(2), 255-261.

Aruoma, O. I., Spencer, J. P. E. and Mahmood, N. 1999. Protection Against Oxidative Damage and Cell Death by the Natural Antioxidant Ergothioneine. *Food and Chemical Toxicology*, 37(11), 1043-1053.

Brauer, H. 1985. Stirred Vessel Reactors In Biotechnology. *Wiley-VCH Verlag GmbH*, 395-444.

Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S. and Gordon, S. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(9), 1119-1124.

Choi, H. S., Cho, H. Y., Yang, H. C., Ra, K. S. and Suh, H. J. 2001. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa*. *Food Research International*, 34(2-3), 177-182.

Cui, F. J., Li, Y., Xu, Z. H., Xu, H. Y., Sun, K. and Tao, W. Y. 2006. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology. *Bioresource*

Technology, 97(10), 1209-1216.

Decker, E. A. and Welch, B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 674-677.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.

Dubost, N. J., Beelman, R. B., Peterson, D. and Royse, D. J. 2006. Identification and Quantification of Ergothioneine in Cultivated Mushrooms by Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 8(3), 215-222.

Eyal, J., Goldberg, I. and Williams, R. 1991. Mushroom mycelium growth in submerged culture-potential food applications. *Biotechnology and Food Ingeredints, Van Nostrand Reinhold, New York*, 31-64.

Fan, Y., Wu, X., Zhang, M., Zhao, T., Zhou, Y., Han, L. and Yang, L. 2011. Physical characteristics and antioxidant effect of polysaccharides extracted by boiling water and enzymolysis from *Grifola frondosa*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(5), 798-803.

Ferreira, I. C., Barros, L. and Abreu, R. M. 2009. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), 1543-1560.

Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I. and Chun, O. K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.

Forage, R. G., Harrison, D. E. F. and Pitt, D. E. 1985. Effect of environment on microbial activity. *Comprehensive Biotechnology*, 1, 253-279.

Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S. and Aruoma, O. I. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(1-2), 7-20.

Han, S. B., Lee, C. W., Jeon, Y. J., Hong, N. D., Yoo, C. D., Yang, K. H. and Kim, H. M. 1999. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *International Immunopharmacology*, 41, 157-164.

- Herre, J., Gordon, S. and Brown, G. D. 2004. Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Molecular Immunology*, 17, 869-876.
- Hishida, I., Nanba, H. and Kuroda, H. 1988. Antitumor activity exhibited by oral administered extract from fruit body of *Grifola frondosa* (maitake). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36, 1819-1827.
- Humfeld, H. 1948. The production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in submerged culture. *Science*, 107, 373.
- Ikekawa, T. 2001. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in health care. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3, 291-298.
- Ikekawa, T., N., U., Maeda, Y., Nakanishi, M. and Fukuoka, F. 1969. Antitumor Activity of Aqueous Extracts of Edible Mushrooms. *Cancer research*, 29, 734-735.
- Inoue, A., Kodama, N. and Nanba, H. 2002. Effect of maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the control of the T lymph node Th-1/Th-2 proportion. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(4), 536-540.
- Karaman, M., Jovin, E., Malbasa, R., Matavuly, M. and Popovic, M. 2010. Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. *Phytotherapy Research*, 24(10), 1473-1481.
- Kim, H. O., Lim, J. M., Joo, J. H., Kim, S. W., Hwang, H. J., Choi, J. W. and Yun, J. W. 2005. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresource Technology*(96), 1175-1182.
- Kim, S. W., Hwang, H. J., Xu, C. P., Sung, J. M., Shog, J. W. and Yun, J. W. 2003. Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. *Journal of Applied Microbiology*, 94(1), 120-126.
- Kobayashi, H., Matsunaga, K. and Fujii, M. 1993. PSK as a chemopreventive agent. *Cancer Epidemiology*, 2, 271-276.
- Kodama, N., Komuta, K. and Nanba, H. 2003. Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) D-Fraction on the activation of NK cells in cancer patients. *Journal of Medicinal Food*, 6(4), 371-377.

- Kubo, K., Aoki, H. and Nanba, H. 1994. Anti-diabetic activity present in the fruiting body of *Grifola frondosa* (maitake). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17, 1106-1110.
- Kubo, K. and Nanba, H. 1996. The effect of maitake mushroom on liver and serum lipids. *Alternative Therapies In Health And Medicine*, 2, 62-66.
- Kurushima, H., Kodama, N. and Nanba, H. 2000. Activities of polysaccharides obtained from *Grifola frondosa* on insulin-dependent diabetes mellitus induced by streptozotocin in mice. *Mycoscience*, 41, 473-480.
- Lee, B. C., Bae, J. T., Pyo, H. B., Choe, T. B., Kim, S. W., Hwang, H. J. and Yun, J. W. 2004. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(6), 369-376.
- Lei, H., Guo, S., Han, J., Wang, Q., Zhang, X. and Wu, W. 2012. Hypoglycemic and hypolipidemic activities of MT- α -glucan and its effect on immune function of diabetic mice. *Carbohydrate Polymers*, 89, 245-250.
- Lei, H., Wang, Q., Guo, S., Han, J., Sun, H., Zhang, X. and Wu, W. 2013. The protective effect of MT- α -glucan against streptozotocin (STZ)-induced NIT-1 pancreatic β -cell damage. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1211-1217.
- Liao, S. F., Liang, C. H., Ho, M. Y., Hsub, T. L., Tsai, T. I., Hsieh, Y. S. Y., Tsai, C. M., Li, S. T., Cheng, Y. Y., Tsao, S. M., Lin, T. Y., Lin, Z. Y., Yang, W. B., Ren, C. T., Lin, K. I., Khoo, K. H., Lin, C. H., Hsu, H. Y., Wu, C. Y. and Wong, C. H. 2013. Immunization of fucose-containing polysaccharides from Reishi mushroom induces antibodies to tumor-associated Globo H-series epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(34), 13809-13814.
- Lin, E. S. 2011. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of *Grifola frondosa* TFRI1073 and their antioxidant and antiproliferative activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 555-561.
- Lung, M. Y. and Chang, Y. C. 2011. Antioxidant properties of the edible basidiomycete *Armillaria mellea* in submerged cultures. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 6367-6384.
- Lung, M. Y. and Huang, P. C. 2009. Optimization of exopolysaccharide production from *Armillaria mellea* in submerged cultures. *Letters in Applied Microbiology*,

50(10), 198-204.

- Margaritis, A. and Zajic, J. E. 1978. Biotechnology Review-mixing, mass transfer, and scale-up of polysaccharide fermentations. *Biotechnol, Bioeng*(2), 939-1001.
- Mau, J. L., Chang, C. N., Huang, S. J. and Chen, C. C. 2004. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chemistry*, 84, 111-118.
- Mayell, M. 2001. Maitake extracts and their therapeutic potential-a review. *Alternative Medicine Review*, 6, 48-60.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. and Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412.
- Miyazaki, T. and Nishijima, M. 1981. Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 29(12), 3611-3616.
- Mizuno, M., Minato, K. I., Ito, H., Kawade, M., Terai, H. and Tsuchida, H. 1999. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mill. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 47(4), 707-714.
- Mizuno, T. 1995. Bioactive bioactive biomolecules of mushrooms: Food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Reviews International*, 11, 7-21.
- Mori, K., Nanba, H., Toyomasu, T. and Kuroda, H. 1987. Antitumor action of shiitake (*Lentinus edodes*) fruit bodies orally administered to mice. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 35(6), 2453-2458.
- Nanba, H., Kodama, N., Schar, D. and Turner, D. 2000. Effects of maitake (*Grifola frondosa*) glucan in HIV-infected patients. *Mycoscience*, 41, 293-295.
- Okamura, M. 1994. Distribution of ascorbic acid analogs and associated glycosides in mushrooms. *Journal of Nutritional Science*, 40, 81-94.
- Oyaizu, M. 1988. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin*

Kogyo Gakkaishi, 35(11), 771-775.

Park, J. P., Kim, S. W., Hwang, H. J. and Yun, J. W. 2001. Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. *Applied Physics Letters. Microbiol*, 33, 6-81.

Rau, U., Gura, E., Olszewski, E. and Wagner, F. 1992. Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 9, 19-26.

Shih, I. L., Chou, B. W., Chen, C. C., Wu, J. Y. and Hsieh, C. 2008. Study of mycelial growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Grifola frondosa*. *Bioresource Technology*, 99, 785-793.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative Properties of Xanthan on the Autoxidation of Soybean Oil in Cyclodextrin Emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 948-948.

Shu, C. H. and Lung, M. Y. 2004. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. *Process Biochemistry*, 39(8), 931-948.

Surenjava, U., Zhang, L., Xu, X. J., Zhang, X. F. and Zeng, F. B. 2006. Effects of molecular structure on antitumor activities of (1→3)- β -d-glucans from different *Lentinus Edodes*. *Carbohydrate Polymers*, 63, 97-104.

Vincent, E., Ooi, C. and Liu, F. 2000. Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes. *Current Medicinal Chemistry*, 7, 715-725.

Wang, Y. f. and Zhang, L. 2006. Chain conformation of carboxymethylated derivatives of (1→3)- β -d-glucan from *Poriacocos sclerotium*. *Carbohydrate Polymers*, 65, 504-509.

Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 258-274.

Zhang, J., Liu, Y. j., Park, H., Xia, Y. M. and Kim, G. 2012. Antitumor activity of sulfated extracellular polysaccharides of *Ganoderma lucidum* from the submerged fermentation broth. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1539-1544.

Zhang, M., Cheung, P. C., Chiu, L. C., Wong, E. Y. and Ooi, V. E. 2006. Cell-cycle arrest and apoptosis induction in human breast carcinoma MCF-7 cells by carboxymethylated β -glucan from the mushroom sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. *Carbohydrate Polymers*, 66(4), 455-462.







麗豐實業股份有限公司
 New Bellus Enterprises Co., Ltd.
 ISO9001、HACCP、食品 GMP 認證廠
 72042 台南市官田區二精里工業路 48 號
 No. 48, Industrial Rd., Erh. Chen Vil., Kuan Tien Dist.,
 Tainan City 72042, TAIWAN
 TEL : +886-6-6989025
 FAX : +886-6-6989806
 E-mail : Service@newbellus.com.tw
 Web : www.newbellus.com.tw



檢驗報告書 Certificate of Analysis

樣品名稱 (Product Name) : BIO-HAN®*Grifola frondosa* GF639

收件日期 (Received Data) : 2014/06/23

測試日期 (Test Data) : 2014/06/25

報告日期 (Report Data) : 2014/07/01

ITS1-5.8S rDNA-ITS2 部分序列

TCTGCAGATGACTGCGGaAGGATCATTACGAGTTCAGAAATGGGTTGTCGCTG
 GCCTCAAATCCGGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTCACACCTGTGC
 ACTTTCTGTAGGTCGGTTTCGGGATCTGGTCCCTCGCGGGGTCGGGTTCTGCGCCT
 TCCTATGTACAATCACAAACGCTTCAGTATTAGAATGTCATTGCGATAATTAA
 AACGCATCTTATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
 GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
 GAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTG
 AGTGTGCATGGAATTCTCAACCCACACATCCTTGTGATGTGGACGGGCTTGGACT
 TTGGAGGTTTCTGCCGGCCCCCATTTCGGGTCGGCTCCTCTGGAATGCATTAGCT
 CCATCCCTTGCAGGATCGGCTCTCGGTGTGATAATTGTCTACGCCGTGGTCGTTGA
 AGCCTCAGTTGGGCGAGCTACAATCGTCCCCTCCGGGACAATTCAATCTGACA
 TCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAACCATATCAAAAAGGG
 GAAAGGGAATG

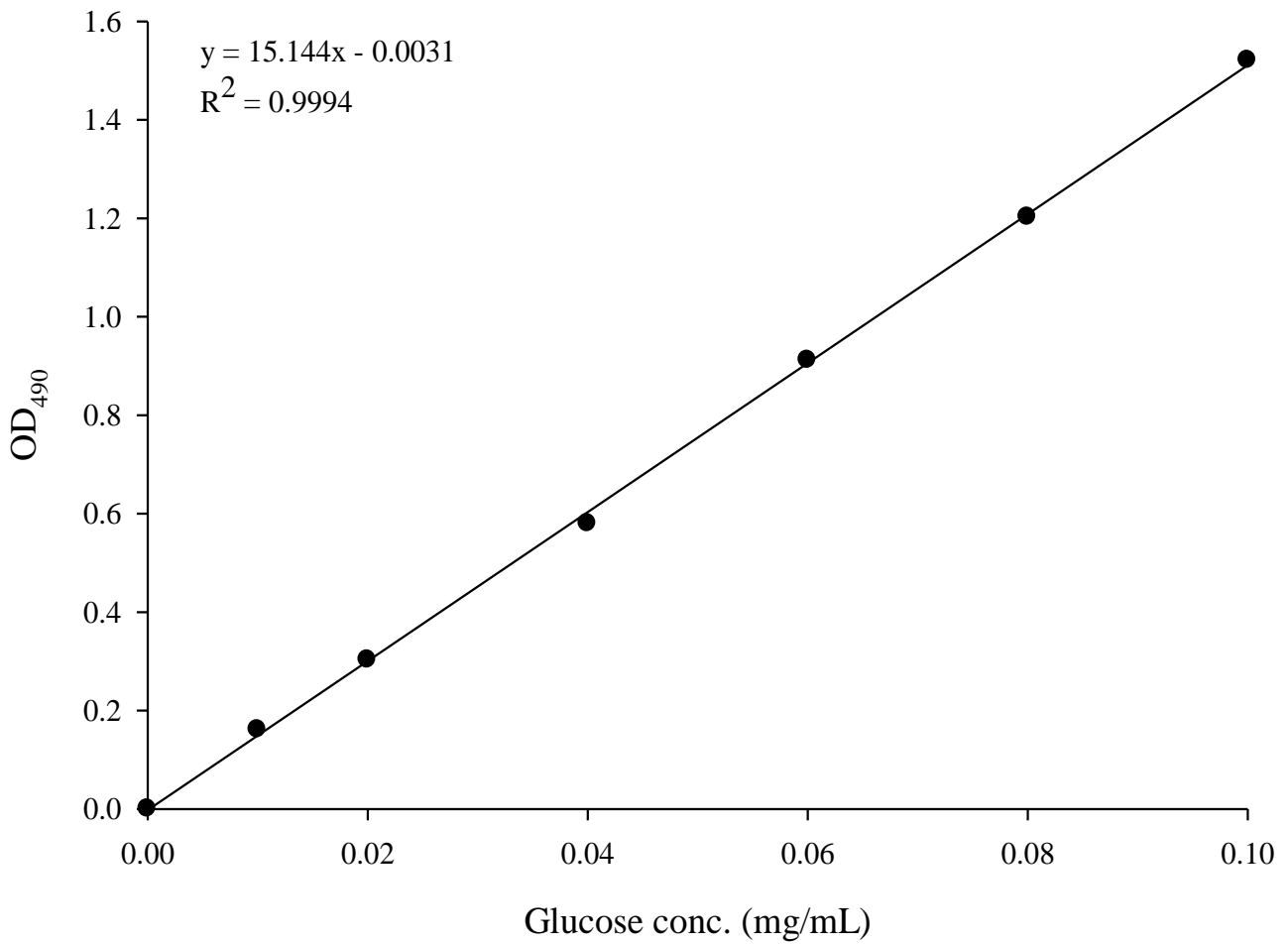
鑑定結果為 *Grifola frondosa* (相似度 99.52%)

- 一、本序列委由第三方公正單位測定而得。
- 二、本序列比對資訊參考 National Center for Biotechnology Information(NCBI)。
- 三、本單位所用樣品與名稱係由各部門提供，測試結果僅對送測試品有效。
- 四、試驗報告數據更正者無效。

核 准 (Appropriate)	檢 測 單 位 (Inspection Department)	檢 驗 人 員 (Verifier)
	麗豐實業股份有限公司 品管課	
簽核日期		簽核日期

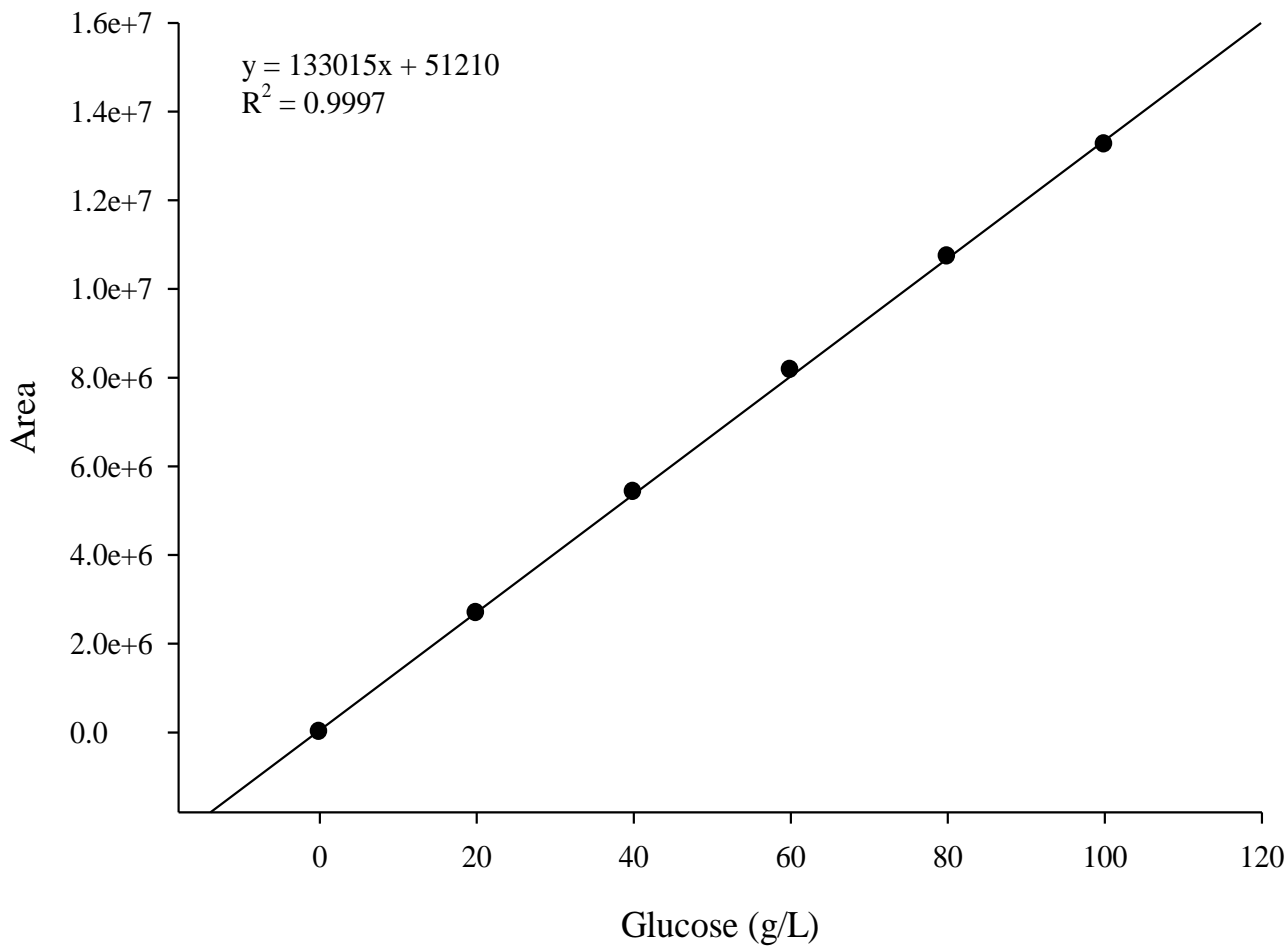
附圖一 舞菇檢驗報告書

Appendix Fig.1 *Grifola frondosa* Certificate of Analysis



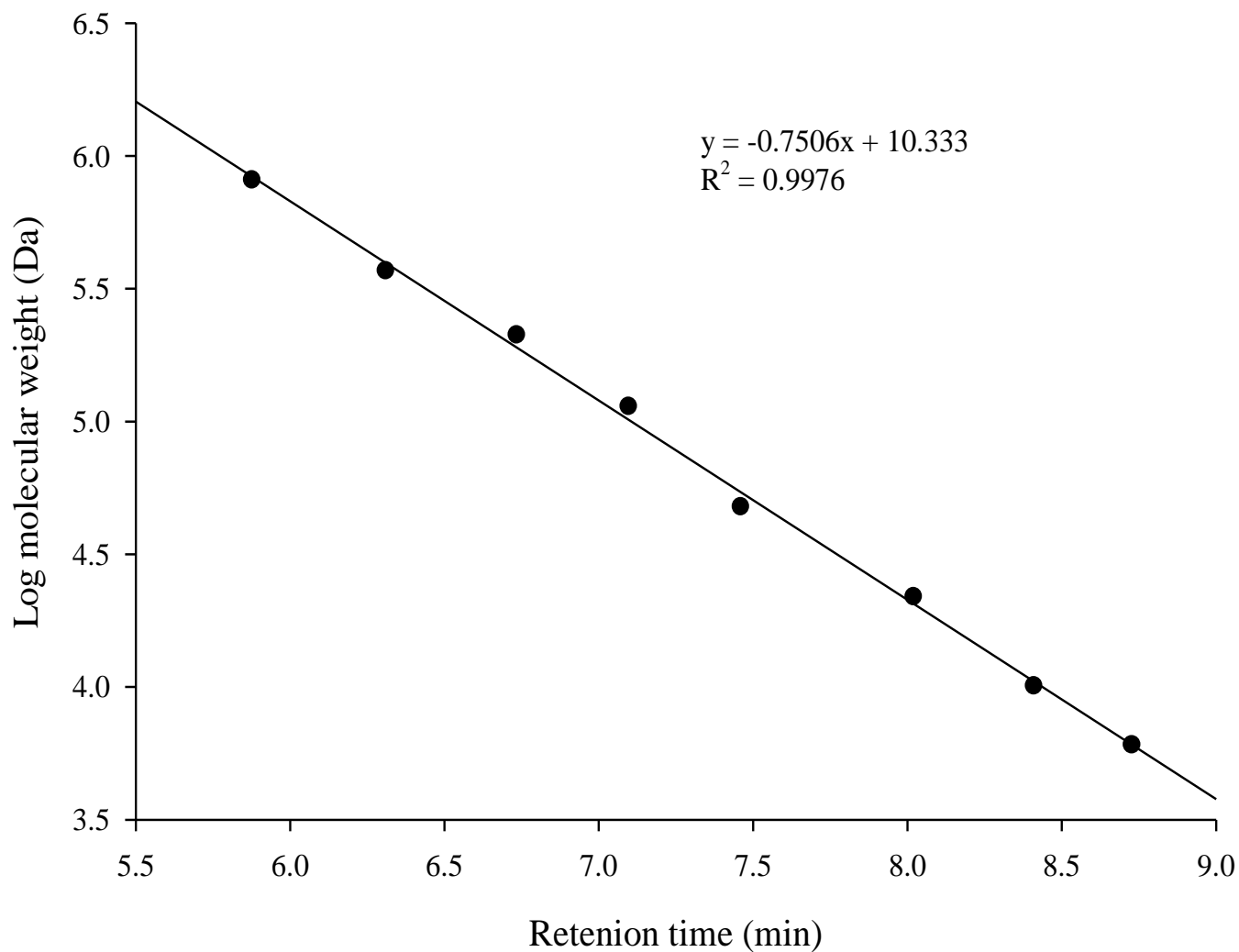
附圖二 酚硫酸法之葡萄糖標準曲線。

Appendix Fig.2 Glucose standard curve by phenol-sulfuric acid method.



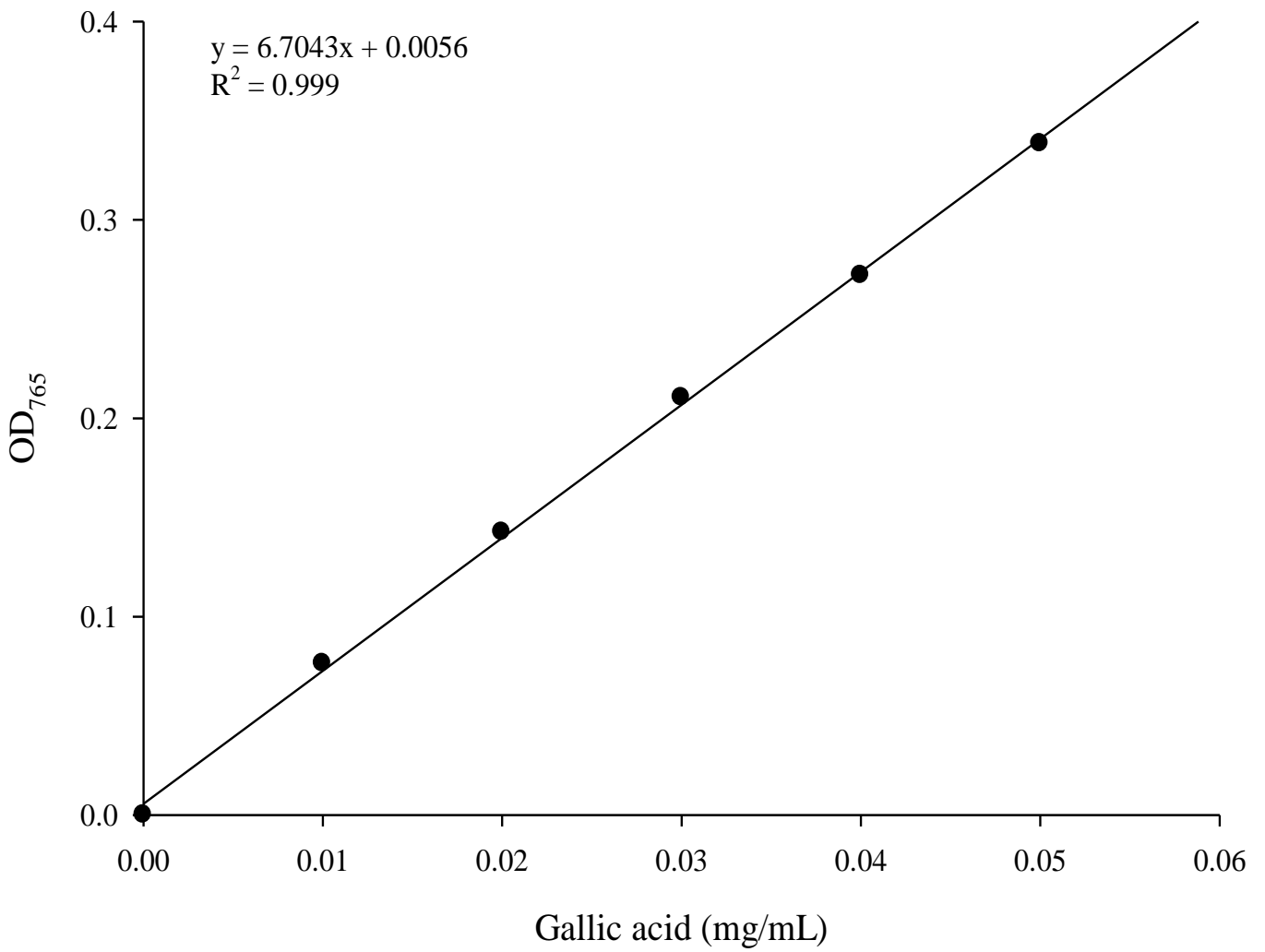
附圖三 蔗糖之 HPLC 殘糖檢量線。

Appendix Fig.3 The calibration curve of sucrose analysis by HPLC.



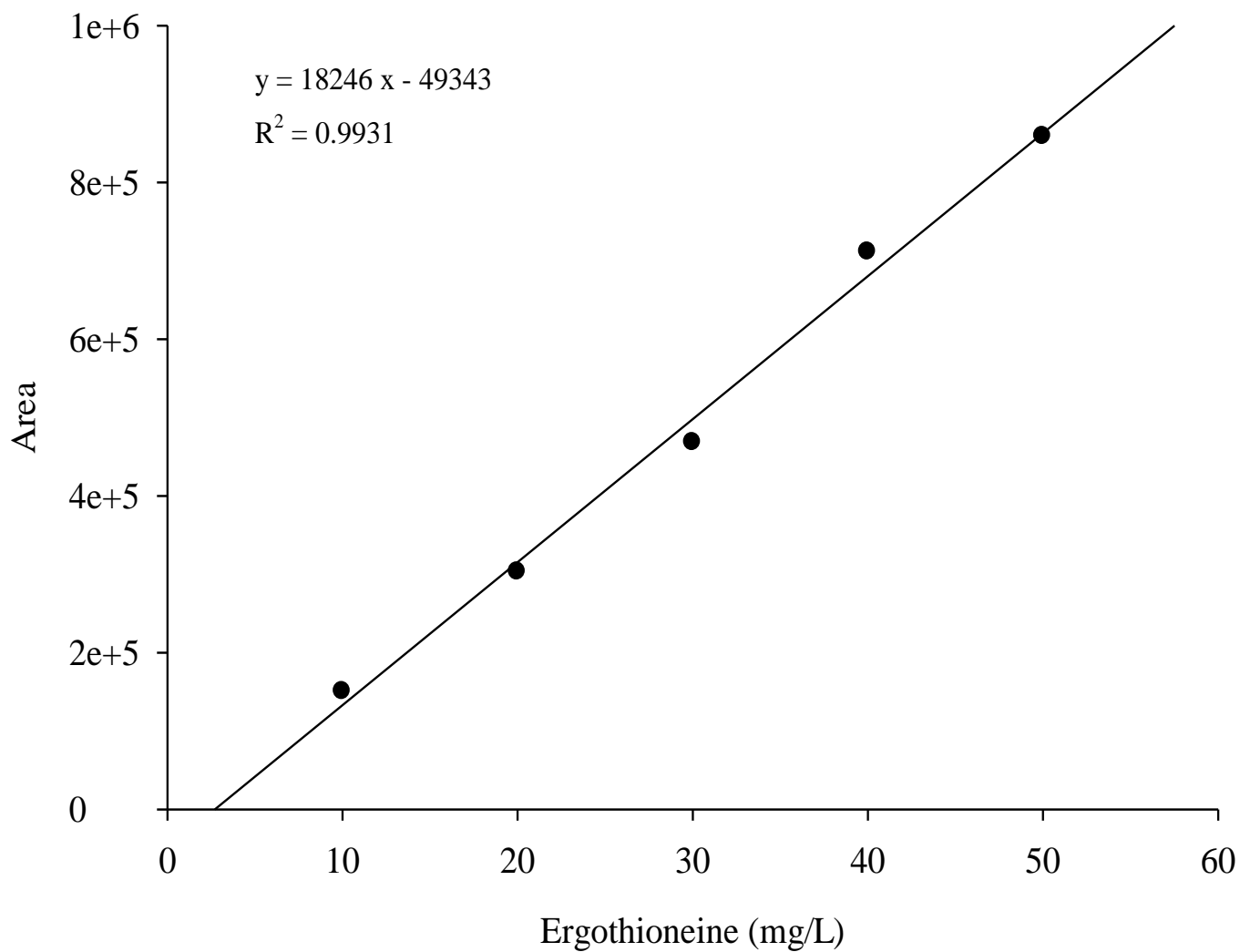
附圖四 多醣分子量之標準曲線。

Appendix Fig.4 Molecular weight standard curve of polysaccharide.



附圖五 沒食子酸標準曲線。

Appendix Fig.5 Gallic acid standard curve by Folin-Ciocalteu assay.



附圖六 麥角硫因標準曲線。
Appendix Fig.6 Standard curve of ergothioneine.