

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

金頂側耳麥角硫因微波及超音波輔助萃取

最適化條件探討及其抗氧化性質與純化

**Optimization of microwave and ultrasound assisted  
extraction of ergothioneine from *Pleurotus citrinopileatus*  
and their antioxidant activities and purification**

呂仲雯

Zhong-Wen Lu

指導教授：梁志弘 博士

Advisor: Chih-Hung Liang, Ph.D.

中華民國一百零八年一月

Jan, 2019

# 碩士論文指導教授推薦書

食品科學系碩士班食品科技組 呂仲雯 君所提之論文

金頂側耳麥角硫因微波及超音波輔助萃取  
最適化條件探討及其抗氧化性質與純化

Optimization of microwave and ultrasound assisted extraction of  
ergothioneine from *Pleurotus citrinopileatus* and their  
antioxidant activities and purification

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學系系主任

符 壽 亮

指導教授

梁 志 弘

中華民國 108 年 1 月 11 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 呂仲雯 君所提之論文

金頂側耳麥角硫因微波及超音波輔助萃取

最適化條件探討及其抗氧化性質與純化

Optimization of microwave and ultrasound assisted extraction of  
ergothioneine from *Pleurotus citrinopileatus* and their  
antioxidant activities and purification

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

梁志敏

大葉大學生物資源學系教授

林聖敏

弘光大學食品科技系教授

蔣煥昇

國立中興大學食品暨應用生物科技學系助理教授

梁志弘

東海大學食品科學系副教授

指導教授：

梁志弘

中華民國 108 年 1 月 11 日

## 謝誌

時光荏苒，韶光似箭，兩年半的研究所歲月將畫下休止符，開啟新的人生樂章。遙想當初來到東海時，還在校園裡迷了路，緊急求助芸禎（潔西卡）學姊才找到了農學院的位置。東海是個校風自由、充滿活力、學術與藝術結合的知識殿堂，能在這裡進行研究及求學，是我人生中非常美好的回憶。九百多天的日子裡，有過實驗成功的歡笑、儀器鬧警扭的無奈、數據不能看的悲愴及懷疑人生的悲鳴，但在仰天長嘯後痛快地吃個東別美食及逛個逢甲體驗一下人擠人的溫暖，霎那間會覺得人生還是充滿希望的(笑)。

能夠順利地完成人生中第一本學術論文，首先最要感謝我的指導教授梁志弘老師，作為師長，老師教學相長並採行開放式的討論，有任何的想法或問題老師都會給予我們指導及建議；作為前輩，老師會和我們分享業界及職場的生態，並鼓勵我們多考取證照，增加自己的優勢；作為朋友，老師常帶我們出去吃飯聚餐（我最愛御饌臻品及東山棧甕窯雞），也曾去菇園採香菇，寓教於樂，實驗室的氛圍和樂融洽，能在食品加工廠 204 室進行研究，真的非常幸福。此外，論文初稿承蒙蔣慎思、梁志欽及林聖敦老師的悉心斧正，並於口試中給予寶貴的建議，使內容更加完整，特此致上最深的感謝。

在研究所期間很幸運有你們這群開心果相伴左右：風趣幽默的金寶及愛叫人思考的柏璋學長、pipette 快手予捷學姊、喜愛乃木坂 46 的懋碩學長、洗衣機達人芸禎學姊、逛市集好夥伴純蕙、鼠鼠達人皓元、喜愛手作的昱均、互相對不到頻率又有點愛鬥嘴的子葶及凱勛，有你們陪伴，實驗室總是充滿笑聲；與我心靈相通的好朋友文彥、承彥、琮霖、鄺殷、銀丹、鎮宇、宏仰、紅茶（紹華）、萬宇、閔鴻（丁滿），能認識你們，真好；還有在我碩一時候結識的蓓蓓、美琳、思好、朱哥、阿杜、志閻、健生，謝謝你們的陪伴讓我在東海不孤單；與我一樣愛植物的敏純、巧玲及系辦女神柏逸學姊，和你們聊天的時光甚是美好；當然還包括在 2018 年聖誕節與我一起著蘿莉裝遨遊東海校園的王婷、小迪及筱萱，這是段心力無限的回憶啊！可愛的東海霸主罔哥及萌貓嚕嚕，你們都是我來到學校的動力。最重要的，謝謝我的父母、家人以及奐宇的陪伴與支持，你們是我無後顧之憂專心實驗的心靈支柱（包含聽我發牢騷的部分），期望自己能做個對社會有貢獻的人。最後，當個善良的人，勤勉踏實的努力總有一天會有回報的！

## 摘要

微波輔助萃取 (Microwave-assisted extraction, MAE) 及超音波輔助萃取 (Ultrasound-assisted extraction, UAE) 是新式之萃取方法，近年來廣泛被運用在食品化學和醫藥方面。與傳統熱水萃取法相比，具有減少萃取溶劑消耗、縮短萃取時間和增加萃取效率等優點。麥角硫因 (Ergothioneine) 是一種含硫的胺基酸，具有抗氧化、抗發炎及抗高血脂之功效，其主要存在於植物及動物組織中，在人體內無法被合成，僅能由食物中攝取。文獻指出金頂側耳 (*Pleurotus citrinopileatus*) 含高量麥角硫因，因此本研究利用微波及超音波輔助萃取技術，以一次一因子的方式來探討金頂側耳子實體中麥角硫因之最適萃取條件，並以反應曲面法探討各獨立變數之間的交互作用尋求最適萃取條件，最後進行麥角硫因之純化；另以麥角硫因標準品與金頂側耳微波、超音波輔助萃取及熱水萃取液進行抗氧化能力測定。

研究結果發現，一次一因子方面，金頂側耳子實體麥角硫因微波輔助萃取之最適條件為功率 500 W、時間 30 分鐘及固液比 1:30；超音波輔助萃取之最適條件為時間 40 分鐘、功率 75 W 及固液比 1:30。另本研究亦針對金頂側耳之主要生理活性成分麥角硫因，利用反應曲面法進行探討。由實驗結果得知，麥角硫因微波輔助萃取之最適萃取功率 552 W、時間為 29 分鐘及固液比 1:31，其預測萃取量與利用此條件進行四重複萃取後實際萃取量分別為 1.92 mg/g dw 及 1.92 mg/g dw；超音波輔助萃取之最適萃取條件為時間 47 分鐘、功率 74 W 及固液比 1:20，其預測萃取量與利用此條件進行四重複萃取後實際萃取量分別為 1.53 mg/g dw 及 1.50 mg/g dw，皆亦無顯著差異，表示實際萃取量符合預測之萃取量。

在抗氧化性質方面，金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取物於 5 mg/mL 時，清除 DPPH 自由基之能力分別為 82.43、83.93 及 81.39%；螯合亞鐵離子之能力分別為 82.80、72.47 及 72.26%；還原力分

別為 0.57、0.56 及 0.41；清除 ABTS<sup>+</sup> 自由基之能力分別為 71.16、86.66 及 84.66%。此外，由 EC<sub>50</sub> 值可得知，微波輔助萃取物在清除 DPPH 自由基及還原能力方面具有良好的抗氧化特性；超音波輔助萃取物則在清除 ABTS<sup>+</sup> 自由基勝過其他兩者；螯合亞鐵離子能力則為熱水萃取物為優。

在麥角硫因純化方面，因微波輔助萃取可得較高量之麥角硫因，因此後續以微波輔助萃取液進行麥角硫因的純化，結果顯示金頂側耳子實體粉末微波輔助萃取液之麥角硫因純度為 24.48%，經切向流過濾後純度為 29.03%，最後經 Diol 製備型管柱純化，得到純度為 83.25%，產率為 65.72% 之金頂側耳子實體純化液；最後經由 LTQ Orbitrap/MS 鑑定，確定純化物為麥角硫因。

綜上述結果可得知，以反應曲面法分析進行微波輔助萃取金頂側耳子實體粉末可獲得較高含量之麥角硫因，再搭配新穎技術之切向流過濾後以製備型管柱純化萃取液，可獲得純度高之麥角硫因純化物。因此，新式之萃取方式不僅可減少時間，亦可製備出純度高之機能性純化物，日後可用於菇類機能性成分的開發與應用。

關鍵字詞：金頂側耳、麥角硫因、最適化、抗氧化、微波輔助萃取、  
反應曲面法

## Abstract

Microwave-assisted extraction (MAE) and ultrasound-assisted extraction (UAE) are new extraction technology that has been widely used in food chemistry and medicine in recent years. Compared to conventional extraction, MAE and UAE have many advantages, such as less solvent consumption, shorter extraction time and higher extraction rate. Ergothioneine is a sulfur-containing amino acid that has antioxidant, anti-inflammatory and anti-hyperlipidemic effects; it is present throughout the plant and animal tissues, cannot be synthesized by humans and only available from dietary sources. Since some researchers discovered higher content of ergothioneine in *Pleurotus citrinopileatus*; this study is about using microwave and ultrasound-assisted extraction of ergothioneine by one-factor-at-a-time and response surface methodology (RSM) to investigate the optimum extraction conditions and purified of ergothioneine. In addition, test the antioxidant capacity by using ergothioneine standard and microwave, ultrasound assisted extraction and hot water extract.

The result in one-factor-at-a-time showed that microwave-assisted optimum extraction conditions of ergothioneine microwave power was 500 W, extraction time was 30 min and solid to liquid was 1:30; ultrasound-assisted optimum extraction conditions of ergothioneine extraction time was 40 min, ultrasound power was 75 W and solid to liquid was 1:30. Another result in RSM was focus on the main active components of *Pleurotus citrinopileatus*, which was ergothioneine, the optimum extraction conditions of MAE microwave power was 552 W, extraction time was 29 min and solid to liquid was 1:31; UAE extraction time was 47 min, ultrasound power was 74 W and solid to liquid was 1:20, which the predict value and the experimental value (n=4) respectively were 1.92 mg/g dw, 1.92 mg/g dw and 1.53 mg/g dw, 1.50 mg/g dw, no significant differences, the ergothioneine equation was valid. From these results, it was found that the MAE of ergothioneine extraction was superior to UAE.

On the antioxidant activity of microwave-assisted extraction extracts from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder (MEP), ultrasound-assisted extraction extracts from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder (UEP) and hot extracts from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder (HWEF). As the concentration was 5 mg/mL, the scavenging ability of DPPH radicals were 82.43, 83.93 and 81.39%; the chelating ability on ferrous ions were 82.80, 72.47 and 72.26%; the reducing power were 0.57, 0.56 and 0.41, and the scavenging ability on ABTS<sup>+</sup> radicals were 71.16, 86.66 and 84.66%. According to EC<sub>50</sub> value, MEP has good antioxidant properties on scavenging DPPH radicals and reducing power ability; UEP was more efficient than MEP and HWEF on scavenging ability of ABTS<sup>+</sup> radicals. Moreover, the chelating ability on ferrous ions, HWEF was the best.

MEP, which had most ergothioneine content, was further separated successively by tangential flow filtration (TFF) and Intersil<sup>TM</sup> Diol column to obtain higher purify ergothioneine. The purity of ergothioneine in MEP was 24.48%, after tangential flow filtration, the purity was 29.03%. In Intersil<sup>TM</sup> Diol column step, the purify of ergothioneine was 83.25%, recovery was 65.72%. The results show that using LTQ Orbitrap/MS examination purified compound in MEP is ergothioneine.

In conclusion, high content of ergothioneine can be obtained by MAE of *Pleurotus citrinopileatus* dried fruiting body powder. Next, with TFF and Intersil<sup>TM</sup> Diol column, we can get high purity ergothioneine purified product. Therefore, the new extraction technology can not only reduce time but also can prepare functional purified substances with high purity, which used for the development and application of functional components of mushrooms in the future.

**Key words:** *Pleurotus citrinopileatus*, ergothioneine, optimization, antioxidant activities, microwave-assisted extraction, response surface methodology



# 目錄

摘要 .....	I
ABSTRACT.....	III
目錄 .....	V
表次 .....	VIII
圖次 .....	X
第一章 前言 .....	1
第二章 文獻回顧 .....	3
一、金頂側耳簡介 .....	3
二、麥角硫因簡介 .....	4
(一) 麥角硫因理化特性.....	4
(二) 麥角硫因生物合成路徑.....	4
(三) 麥角硫因分布及食物來源.....	8
(四) 麥角硫因生理活性.....	8
(五) 麥角硫因的作用機制.....	16
三、新穎萃取技術介紹.....	19
(一) 微波輔助萃取 (MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION, MAE)....	20
(二) 超音波輔助萃取 (ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION, UAE)28	
四、反應曲面法 (RESPONSE SURFACE METHODOLOGY, RSM).....	32
(一) 介紹與原理.....	33
(二) 應用的理論和步驟.....	33
(三) 應用領域.....	38
五、切向流過濾 (TANGENTIAL FLOW FILTRATION, TFF) .....	39
(一) 參數定義.....	39

(二) 切向流過濾之優點.....	42
(三) 應用領域.....	42
六、抗氧化系統.....	43
(一) 抗氧化原理.....	43
(二) 常見抗氧化活性的評估方法.....	47
實驗架構.....	50
第三章 材料方法.....	51
一、實驗材料.....	51
二、實驗藥品.....	51
三、樣品製備.....	52
四、新式萃取方式之條件探討.....	52
(一) 微波輔助萃取一次一因子條件探討.....	52
(二) 超音波輔助萃取一次一因子條件探討.....	52
五、麥角硫因分析.....	53
六、反應曲面法.....	53
(一) 微波輔助萃取.....	53
(二) 超音波輔助萃取.....	55
七、不同萃取方式之抗氧化能力評估.....	55
(一) 金頂側耳子實體萃取物製備.....	55
(二) 抗氧化力檢測.....	57
八、麥角硫因純化方法.....	59
九、麥角硫因鑑定方法.....	59
十、統計分析.....	60
第四章 結果與討論.....	61
一、金頂側耳子實體粉末麥角硫因萃取條件之探討.....	61

(一) 微波輔助萃取一次一因子條件探討.....	61
(二) 以反應曲面法探討微波輔助萃取麥角硫因之最適化條件 .....	69
(三) 超音波輔助萃取一次一因子條件探討.....	81
(四) 以反應曲面法探討超音波輔助萃取麥角硫因之最適化條件 ...	91
二、抗氧化能力分析.....	106
(一) 金頂側耳子實體不同萃取方法之萃取率 .....	106
(二) 不同萃取方法之萃取物之抗氧化性質.....	108
(三) 三種萃取物與麥角硫因標準品之 EC <sub>50</sub> .....	115
三、麥角硫因之分離純化.....	119
四、麥角硫因純化物鑑定.....	124
第五章 結論 .....	130
參考文獻 .....	132

## 表次

附表一、特定食物中所含的麥角硫因含量 .....	9
附表二、食藥用菇子實體中所含的麥角硫因含量 .....	11
附表三、六種菇類子實體中所含的麥角硫因平均濃度 .....	12
附表四、主要的活性氧化物質 (ROS) 及活性氮物質 (RNS) .....	13
附表五、傳統和新式萃取技術之比較 .....	21
附表六、密閉式微波輔助萃取系統和開放式微波輔助萃取系統優缺點之比較 .....	25
附表七、用於三變量系統之 Box-Behnken 設計的編碼因子水平 .....	36
附表八、用於三變量系統的 Box-Behnken 設計的編碼因子水平 .....	37
附表九、抗氧化防禦系統之酵素型清除劑 .....	44
附表十、抗氧化防禦系統之非酵素型清除劑 .....	46
表一、金頂側耳麥角硫因之三因子三階方程式 Box-Behnken 設計 .....	54
表二、金頂側耳麥角硫因之三因子三階方程式 Box-Behnken 設計 .....	56
表三、微波功率對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取含量的影響 .....	63
表四、微波萃取時間對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響 .....	66
表五、固液比對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響 .....	68
表六、金頂側耳麥角硫因三因子三階層 Box-Behnken 設計萃取條件反應參數實驗值之範圍 .....	70
表七、金頂側耳麥角硫因之三因子三階層 Box-Behnken 設計與萃取量 (Y) .....	71
表八、微波輔助萃取金頂側耳麥角硫因反應曲面之二次多項式與迴歸係數分析 .....	72
表九、微波輔助萃取金頂側耳麥角硫因相關因子之變異數分析 .....	73
表十、反應曲面法之最適萃取條件與麥角硫因最佳產量之預測值 .....	79
表十一、麥角硫因產量最適化模型之驗證 .....	80
表十二、超音波頻率對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取含量的影響 .....	83

表十三、超音波萃取溫度對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取含量的影響.....	85
表十四、超音波萃取時間對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取含量的影響.....	88
表十五、超音波功率對金頂側耳子實體粉末麥角硫因萃取含量的影響.....	90
表十六、固液比對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響.....	93
表十七、金頂側耳麥角硫因三因子三階層 Box-Behnken 設計萃取條件反應參數實驗值之範圍.....	94
表十八、金頂側耳麥角硫因之三因子三階層 Box-Behnken 設計與萃取量 (Y).....	95
表十九、超音波輔助萃取金頂側耳麥角硫因反應曲面之二次多項式與迴歸係數分析.....	96
表二十、超音波輔助萃取金頂側耳麥角硫因相關因子之變異數分析.....	98
表二十一、反應曲面法之最適萃取條件與麥角硫因最佳產量之預測值...	104
表二十二、麥角硫因產量最適化模型之驗證.....	105
表二十三、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之萃取率.....	107
表二十四、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之清除 DPPH 自由基能力.....	110
表二十五、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之螯合亞鐵離子能力.....	112
表二十六、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之還原力.....	114
表二十七、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之清除 ABTS <sup>+</sup> 自由基能力.....	117
表二十八、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取和麥角硫因標準品抗氧化性質之 EC <sub>50</sub> .....	118
表二十九、麥角硫因分離純化表.....	123

## 圖次

附圖一、麥角硫因之結構 .....	5
附圖二、麥角硫因和穀胱甘肽的生物合成途徑 .....	6
附圖三、麥角硫因的結構及其可能的代謝物 .....	7
附圖四、麥角硫因體內之可能角色及相互作用 .....	17
附圖五、麥角硫因的作用機制 .....	18
附圖六、傳統加熱和微波加熱機制 .....	23
附圖七、微波輔助萃取 (MAE) 系統的操作原理和機制 .....	24
附圖八、超音波輔助萃取的作用機制和空化效應的形成 .....	29
附圖九、超音波輔助萃取 (UAE) 系統裝置 .....	31
附圖十、BBD 的立方體和 $2^2$ 因子設計示意圖 .....	35
附圖十一、切向流過濾示意圖 .....	40
附圖十二、切向流過濾之實驗設置、流量和壓力 (P1, P2 和 P3) 傳感器的 位置 .....	41
圖一、微波功率對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響 .....	62
圖二、微波萃取時間對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響 .....	65
圖三、固液比對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響 .....	67
圖四、柏拉圖—微波輔助萃取條件對金頂側耳麥角硫因萃取量的主要效應 .....	75
圖五、微波輔助萃取金頂側耳之萃取功率與時間對麥角硫因產量的反應曲 面圖 (a) 與等高線圖 (b) .....	76
圖六、微波輔助萃取金頂側耳之萃取功率與固液比對麥角硫因產量的反應 曲面圖 (a) 與等高線圖 (b) .....	77
圖七、微波輔助萃取金頂側耳之萃取時間與固液比對麥角硫因產量的反應 曲面圖 (a) 與等高線圖 (b) .....	78
圖八、超音波頻率對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響 .....	82
圖九、超音波萃取溫度對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響 .....	84

圖十、超音波萃取時間對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響	87
圖十一、超音波功率對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響	89
圖十二、固液比對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響	92
圖十三、柏拉圖—超音波輔助萃取條件對金頂側耳麥角硫因萃取量的主要 效應	99
圖十四、超音波輔助萃取金頂側耳之萃取功率與固液比對麥角硫因產量的 反應曲面圖與等高線圖	100
圖十五、超音波輔助萃取金頂側耳之萃取功率與時間對麥角硫因產量的反 應曲面圖與等高線圖	101
圖十六、超音波輔助萃取金頂側耳之萃取時間與固液比對麥角硫因產量的 反應曲面圖與等高線圖	103
圖十七、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之清除 DPPH 自由基能力	109
圖十八、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之螯合亞 鐵離子能力	111
圖十九、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之還原力	113
圖二十、金頂側耳子實體粉末微波超音波輔助萃取及熱水萃取之清 ABTS <sup>+</sup> 自由基能力	116
圖二十一、金頂側耳子實體粉末微波輔助萃取液 (A) 及麥角硫因標準品 (B) HPLC 圖譜	121
圖二十二、金頂側耳子實體粉末經製備型管柱純化之 HPLC 圖譜	122
圖二十三、麥角硫因標準品之電灑游離質譜圖	125
圖二十四、麥角硫因標準品之軌道阱質譜圖	126
圖二十五、微波輔助萃取金頂側耳子實體純化物之電灑游離質譜圖	128
圖二十六、麥角硫因純化物之軌道阱質譜圖	129

## 第一章 前言

菇類富含豐富的營養成分使其備受重視，包括蛋白質、多醣、膳食纖維、不飽和脂肪酸、礦物質、三萜甾醇和次級代謝產物等 (Ma *et al.*, 2018)；另亦富含抗氧化成分，如生育酚、抗壞血酸、類胡蘿蔔素、酚類化合物及沒食子酸 (Kim *et al.*, 2008)。在食用菇類中，側耳屬 (*Pleurotus spp.*) 因其食用和藥用性質而受到重視，目前已被證實具有抗癌、抗病毒、抗生素、抗發炎和降膽固醇等功效 (Bobek *et al.*, 1991; Shamtsyan *et al.*, 2004)。

金頂側耳 (*Pleurotus citrinopileatus*) 是側耳屬之金黃色蠔蘑，別名珊瑚菇、榆黃蘑 (Wu *et al.*, 2008)，外觀呈金黃色而得名。其子實體和菌絲體之營養價值及味道成分已被研究與探討 (Huang, 2003)。金頂側耳具有許多生理活性，如抗高血糖、抗高血脂作用 (Hu *et al.*, 2006)、免疫調節能力 (Chen *et al.*, 2010)、抑制腫瘤 (Li *et al.*, 2008)、抗氧化作用 (Lee *et al.*, 2007) 及抗基因毒性能力 (Wang *et al.*, 2004)，這些生理活性大多來自其多種的機能性成分，如麥角硫因 (Ergothioneine)、多醣 (Polysaccharides)、酚類化合物 (Phenolic compounds) 及維生素 (Vitamins) 等 (Tepwong *et al.*, 2012)。文獻指出金頂側耳含高量麥角硫因 (Chen *et al.*, 2012)，其為一種含硫的胺基酸，主要存在於植物及動物組織中，在人體內無法被合成，僅能由食物中攝取；菇類中以金頂側耳等側耳屬具有較高量之麥角硫因 (Dubost, Ou & Beelman, 2007)，具有抗發炎 (Chien *et al.*, 2016)、抗氧化作用、抗高血糖 (Hu *et al.*, 2006)、抗神經元損傷 (Laurenza *et al.*, 2008)、增強免疫能力 (Chen *et al.*, 2010) 等生理活性。

微波輔助萃取 (microwave-assisted extraction, MAE) 是使用微波能量加熱，與樣品接觸的溶劑可將目標物從樣品基質分配到溶劑中。微波是一種電磁波，頻率範圍介於 0.3~300 GHz 之間，其主要優點是可以快速加熱樣品溶劑混合物，加速目標物自樣品基質的傳導 (Eskilsson & Björklund, 2000)。



微波輔助萃取方法與一般萃取法相比，主要優點是減少萃取時間、減少溶劑消耗和提高樣品產量 (Gude *et al.*, 2013)；超音波輔助萃取藉由空化效應及內部擴散機制，可增加質量傳遞使萃取效率提升，使得溶劑能夠更有效地滲透到細胞，使生物細胞壁被破壞，從而改善質量傳遞 (Vilkhu *et al.*, 2011)。

本研究主要利用微波與超音波輔助萃取技術，先以一次一因子方式探討金頂側耳子實體中麥角硫因之萃取條件，再利用反應曲面法找出各獨立變數之間的交互作用，以獲得最適萃取條件；另會比較微波、超音波和傳統熱水萃取物及麥角硫因標準品之抗氧化能力；此外，會從萃取液中進行麥角硫因純化；並以 LTQ Orbitrap XL 鑑定純化物。期盼此研究可作為開發麥角硫因相關保健產品之參考應用。

## 第二章 文獻回顧

### 一、金頂側耳簡介

金頂側耳學名為 *Pleurotus citrinopileatus*，其菌傘呈金黃色且因子實體外形似珊瑚故又名珊瑚菇、榆黃蘑、黃金菇 (Wu *et al.*, 2008)。金頂側耳滋味鮮美且富含營養價值，在東亞地區十分受到歡迎 (Ghosh, Mitra & Chakravarty, 1991)。金頂側耳在分類學上屬擔子菌門 (Basidiomycota)、擔子菌綱 (Basidiomycetes)、傘菌目 (Agaricales)、側耳科 (Pleurotaceae)、側耳屬 (*Pleurotus*) 之真菌 (毛, 2002)。

金頂側耳菌肉呈白色，菌傘為鮮黃色，呈扇形、圓形或喇叭形 (Liu *et al.*, 2012)，菌柄偏生呈白色至淡黃色，基部相連 (林, 2016)；其味道鮮美、香味濃郁、含豐富的營養食用價值，又具滋補強身的藥用價值，在中國大陸地區已被列為十大發展珍稀菇類之一 (彭, 2011)。金頂側耳之人工培養技術，不論是固態或液態培養皆已相當純熟；液態培養可大幅縮短培養時程 (Corrêa *et al.*, 2015) 且生產出之菌絲體可用於食品調味料和功能性食品之配方 (Huang, 2003)，因此十分受到消費者喜愛。

### (二) 金頂側耳之自然分佈與生長特性

野生金頂側耳子實體屬於叢生，主要分布區域為中國大陸東北地區，河北、廣東、貴州、雲南、西藏等地亦有分佈。金頂側耳多生於榆、棟和胡桃等闊葉樹的枯木或倒木上，在雲南多生於核桃樹、柳樹的倒木上，故在當地俗稱核桃菌、柳樹菌、楊柳菌；金頂側耳菌蓋呈金黃色至草黃色，近似漏斗形，直徑約 3.0~10 cm；菌摺呈現白色，不分叉，與菌柄延生；菌肉為白色，具有濃香味，味道可口鮮美；菌柄偏生，顏色為白色至淡黃色，與基部相連。研究結果指出，金頂側耳菌絲最適生長溫度為 23 至 27°C、最適生長 pH 值為 5.0 至 6.5；子實體分化不需變溫刺激，其生長發育的最適溫度為 17 至 23°C (張, 2003)。

## 二、麥角硫因簡介

菇類富含多種機能性成分，除廣為人知的多醣外，還包括酚類物質、類胡蘿蔔素、麥角固醇及抗壞血酸，這些機能性成分皆具有抗氧化之效果 (Patel & Goyal, 2012)。Dubost 等人 (2007) 研究發現菇類中富含一種獨特之天然抗氧化劑—麥角硫因，在生物體內可預防氧化壓力之傷害，具有良好的抗氧化特性因此受到高度的關注。以下針對麥角硫因之理化特性、生物合成路徑及生理活性敘述如下：

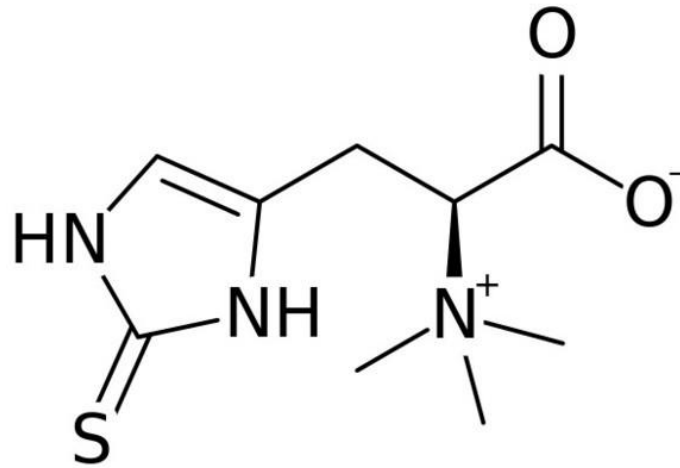
### (一) 麥角硫因理化特性

麥角硫因分子量為 229.30，化學式為  $C_9H_{15}N_3O_2S$ ，結構如附圖一所示 (Schultz, 2017)；是一種無色、無味和含硫咪唑的水溶性胺基酸，在水溶液中的溶解度相對較高 (25°C 時水溶解度極限為 0.9 M)，在一般生理 pH 值下，不會自動氧化亦不會促進羥自由基生成，為一種非常穩定的天然抗氧化劑 (Cumming *et al.*, 2017)。

### (二) 麥角硫因生物合成路徑

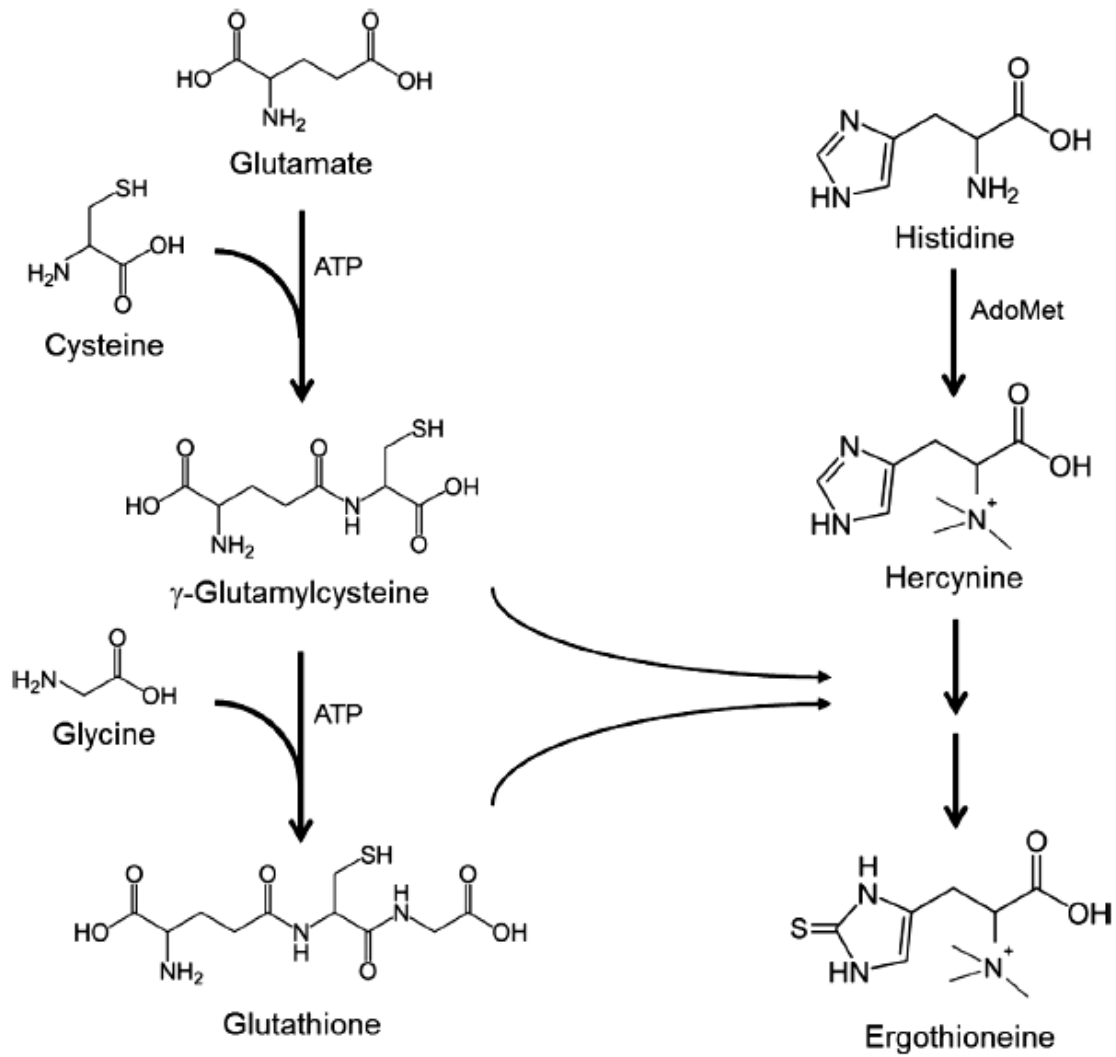
麥角硫因在動物體內及高等植物中皆無法合成 (Cheah & Halliwell, 2012)；研究發現麥角硫因之合成，與另一重要的含硫抗氧化劑—穀胱甘肽 (glutathione, GSH) 及其前驅物有關 (Giustarini *et al.*, 2007)。穀胱甘肽的合成主要是反應中有麩氨酸 (glutamate, Glu)、半胱氨酸 (cysteine, Cys) 及甘氨酸 (glycine, Gly) 之參與；而真菌可利用組胺酸 (histidine, His) 使其甲基化形成麥角硫因之前驅物—三甲基內鹽 (hercynine) 後，再與來自半胱氨酸提供之硫結合形成麥角硫因 (附圖二) (Kalaras *et al.*, 2017)。

研究發現麥角硫因會以硫酮 (thione) 和硫醇 (thiol form) 形式之互變異構體存在 (附圖三-a)，在生理 pH 下以硫酮形式佔大部分，與其他低分子量硫醇 (如穀胱甘肽) 相較，具有更佳的體內穩定性；另麥角硫因之可能代謝



附圖一、麥角硫因之結構

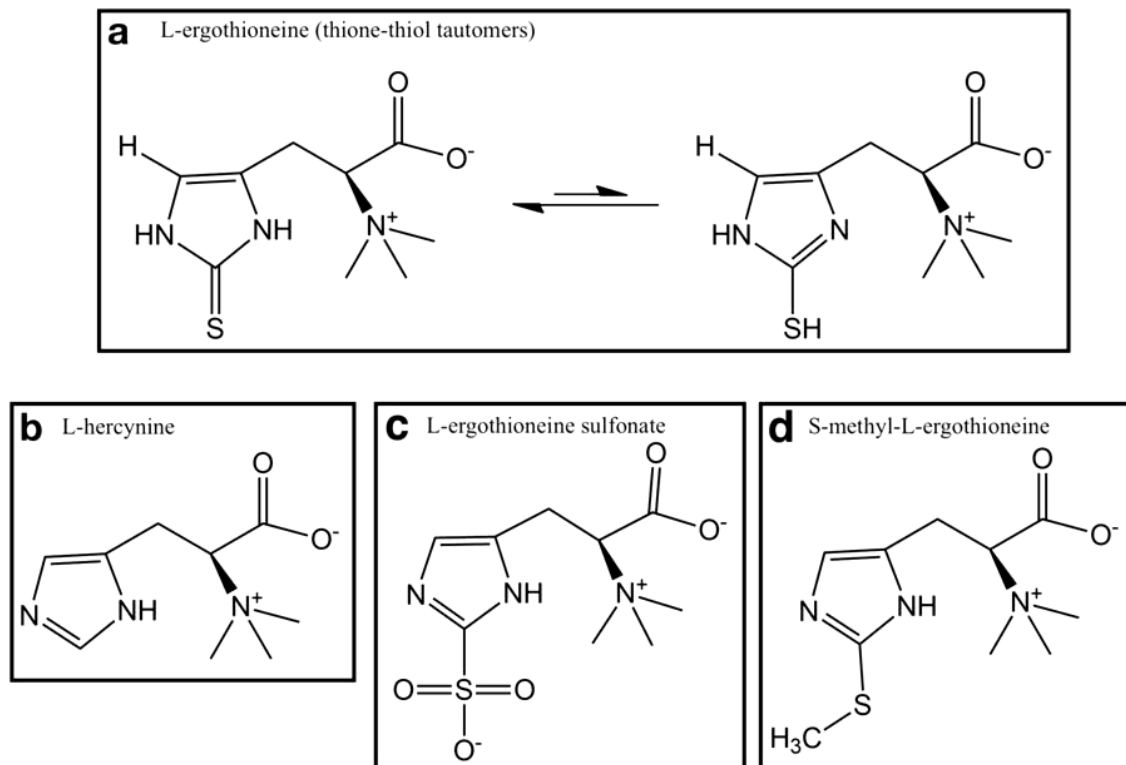
Referred figure 1. Structure of ergothioneine (Schultz, 2017)



附圖二、麥角硫因和穀胱甘肽的生物合成途徑

Referred figure 2. Biosynthetic pathway for ergothioneine and glutathione

(Michael *et al.*, 2017)



附圖三、麥角硫因的結構及其可能的代謝物

(a) 麥角硫因在生理 pH 下主要以硫酮形式存在。麥角硫因可能之代謝衍生物—(b) 三甲基內鹽, (c) 麥角硫因磺酸鹽, (d) 硫—甲基麥角硫因

Referred figure 3. Structure of ergothioneine (ET) and its possible metabolites.

(a) ET exists predominantly in the thione form at physiological pH. Putative metabolic derivatives of ET – (b) phercynine, (c) ET sulfonate (ET-SO<sub>3</sub>H), and (d) S-methyl ET

(Tang *et al.*, 2018)

衍生物包括三甲基內鹽、麥角硫因磺酸鹽及硫—甲基麥角硫因，其結構如附圖三 - (b) (c) (d) 所示 (Carlsson, Kierstan & Brocklehurst, 1974)。

### (三) 麥角硫因分布及食物來源

麥角硫因 (Ergothioneine ; 2-mercaptohistidine trimethylbetaine) 是一種天然存在的水溶性胺基酸，僅可在細菌、非酵母真菌和分歧桿菌中形成 (Akanmu *et al.*, 1991)。這些生物合成的麥角硫因，會藉由攝食方式傳遞到動物及人體內，於組織和血液中傳遞並供利用 (Melville, 1959)。

在人體的紅血球細胞、肝臟、腎臟及精液中，發現麥角硫因的濃度相對較高，其濃度高達 1~2 mM (Lee *et al.*, 2009)。麥角硫因在動物體內無法被合成 (Cheung *et al.*, 2016)，僅能由食物來提供 (Dubost *et al.*, 2007)。特定食物中所含的麥角硫因含量如附表一所示；另 Kalaras 等人 (2017) 針對常見食藥用菇類子實體麥角硫因含量進行分析，結果如附表二所示，其中以金頂側耳子實體麥角硫因含量最高為 3.94 (mg/g d.w.)。此外，Dubost 亦針對六種菇類子實體麥角硫因含量進行分析，結果發現香菇及蠔菇含有較高之麥角硫因 (Dubost *et al.*, 2007) (附表三)。

### (四) 麥角硫因生理活性

麥角硫因是菇類中獨特的二次代謝產物，研究指出麥角硫因具抗氧化、抗發炎、抗紫外線傷害、預防心血管疾病與保護神經等生理活性，分述如下：

#### 1. 抗氧化作用

##### (1) 自由基或活性氧/氮系列之捕捉劑

人體內存在之活性氧化物質 (Reactive oxygen species, ROS) 及活性氮物質 (Reactive nitrogen species, RNS) 主要包括羥自由基 (HO•)、過氧化物 (ROO•)、過氧化氫 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、一氧化氮自由基 (NO•)、過氧化亞硝酸鹽 (ONOO<sup>-</sup>) 及二氧化氮自由基 (NO<sub>2</sub>•) 等 (Valko *et al.*, 2006) (附表四)。

附表一、特定食物中所含的麥角硫因含量

Referred table 1. Ergothioneine concentration in selected foods

(Ey *et al.*, 2007)

Food groups with selected food items	Ergothioneine (mg/kg wet weight or mg/L)
Mushrooms	
King bolete ( <i>Boletus edulis</i> )	528.14
Oyster mushroom ( <i>Pleurotus ostreatus</i> )	118.91
Portabella mushroom ( <i>Agaricus bisporus</i> , brown strain)	0.93
Button mushroom ( <i>Agaricus bisporus</i> , white strain)	0.46
Meats and sausages	
Chicken (liver)	10.78
Pork (liver)	8.71
Pork (kidney)	7.66
Pork (loin fillet)	1.68
Beef (loin steak)	1.33
Lamb (loin fillet)	1.20
Chicken (breast)	1.15
Ham	1.12
Blood sausage (from pork)	1.08
Liver sausage (from pork)	1.03
Salami (from pork)	0.51
Aspic (from pork)	0.46



附表一、特定食物中所含的麥角硫因含量（續）

Referred table 1. Ergothioneine concentration in selected foods (continued)

Food groups with selected food items	Ergothioneine (mg/kg wet weight or mg/L)
<b>Grains and Grain products</b>	
Oat bran	4.41
Pumpkin seed	1.49
Wheat bran	0.84
Wheat germ	0.63
Whole grain wheat bread	0.53
Whole grain rye bread	0.47
Brown rice	0.04
Wheat flour (refined), rye flour (refined), barley flour(refined), rye bread, white bread, cornmeal (refined), oatmeal (refined), peanut, durum wheat, sorghum, white rice, walnut, biscuit, chestnut, coconut, hazlenut	b.l.d.
<b>Vegetables and Fruits</b>	
Black turtle bean	13.49
Red kidney bean	4.52
Garlic	3.11
Broccoli	0.24
Onion	0.23
Spinach	0.11
Celery	0.08
Green beans, white beans, green peas, lentils, tomato, potato,carrot, beetroot, red and green bell pepper, cabbage turnip,horseradish, white and green asparagus, cauliflower, Brussel,sprouts, eggplant, lettuce, soja beans, capers (canned), parsley, apple, pear, apricot, plum, orange, lemon,lime, grapefruit, red and white grape,banana	b.l.d.
b.l.d., below limit of detection	

附表二、食藥用菇子實體中所含的麥角硫因含量

Referred table 2. Contents of Ergothioneine in fruiting bodies of edible and medicinal mushrooms (Kalaras *et al.*, 2017)

Sample	n	Ergothioneine (mg/g d.w.)
<i>Agaricus bisporus</i>		
White Button	22	0.41 ± 0.18
Crimini	3	0.47 ± 0.16
Portabella	1	0.15
<i>Pleurotus ostreatus</i>		
Gray Oyster	5	1.21 ± 0.25
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>		
Yellow Oyster	1	3.94
<i>Lentinula edodes</i>		
Shiitake	3	0.92 ± 0.29
<i>Grifola Frondosa</i>		
Maitake	3	1.11 ± 0.49
<i>Ganoderma lucidum</i>		
Reishi	1	0.56
<i>Hericium erinaceus</i>		
Pom Pom	2	1.12 ± 0.12
<i>Agrocybe aegerita</i>		
Pioppini	1	2.56
<i>Cantharellus cibarius</i>		
Chanterelle	1	0.20
<i>Boletus edulis</i>		
Porcini	1	7.27
<i>Morchella esculenta</i>		
Morel	1	0.47

\*n denotes replicates from separate crops.

附表三、六種菇類子實體中所含的麥角硫因平均濃度

Referred table 3. The average concentration of ergothioneine in fruiting bodies of six mushrooms (Dubost, Beelman *et al.*, 2007)

Sample type	mg/g dw of ergothioneine <sup>a</sup>	Moisture (%)	mg ERG/serving <sup>b</sup>
White button	0.21 ± 0.01 <sup>A</sup>	92	1.4
Portabella	0.45 ± 0.03 <sup>A</sup>	93	2.7
Crimini	0.40 ± 0.03 <sup>A</sup>	91	3.1
Maitake	1.13 ± 0.05 <sup>B</sup>	83	16.3
Shiitake	1.98 ± 0.11 <sup>C</sup>	88	20.2
Oyster	2.59 ± 0.18 <sup>D</sup>	88	26.4

<sup>a</sup> Mean mg/g dry weight (dw) ± standard deviation for three samples tested from one crop followed by different capital letters differ significantly ( $p = 0.05$ , Tukey's method).

<sup>b</sup> Serving size from USDA National Nutrient Database for standard reference for fresh mushrooms (85 g)

附表四、主要的活性氧化物質 (ROS) 及活性氮物質 (RNS)  
 Referred table 4. Main reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS)  
 species (Di Meo *et al.*, 2016)

	$O_2^{\cdot -}$	Superoxide anion
Radicals	$OH^{\cdot}$	Hydroxyl
	NO	Nitric oxide
	$NO_2^{\cdot}$	Nitrogen dioxide
Nonradicals	$H_2O_2$	hydrogen peroxide
	HOCl	Hypochlorous acid
	$OCOO^-$	Peroxynitrite

研究指出麥角硫因與其他簡單硫醇類 (如:穀胱甘肽, GSH) 相較, 具有更佳的去除單態氧 (Singlet oxygen,  $^1\text{O}_2$ ) 能力 (Rougee *et al.*, 1988)。Franzoni 指出麥角硫因是羥自由基 ( $\text{HO}\cdot$ )、過氧化亞硝酸鹽 ( $\text{ONOO}^-$ ) 及次氯酸 ( $\text{HOCl}$ ) 的強捕捉劑。此外, 麥角硫因亦是次氯酸良好清除劑, 可保護  $\alpha 1$ -抗蛋白酶, 免受到次氯酸的影響而失活 (Franzoni *et al.*, 2006)。

Arduini 等人 (1990) 指出在缺血早期階段, 脫氧肌紅蛋白若被氧化成高鐵肌紅蛋白, 在氧合灌流期間會導致細胞損傷; 麥角硫因已被證實可減少鐵基血紅蛋白 (含  $\text{Fe}^{4+}$ ) 氧化成高鐵肌紅蛋白 (含  $\text{Fe}^{3+}$ ), 進而改善缺血再灌流損傷 (Arduini, Eddy & Hochstein, 1990)。Poter 等人 (2013) 亦指出麥角硫因可減少過氧化氫與血紅素蛋白作用產生活性氧物質, 當血紅素蛋白與過氧化氫反應時, 會變成高活性鐵基血紅蛋白 (ferryl myoglobin, 含  $\text{Fe}^{4+}$ ), 而鐵基血紅蛋白的促氧化和促發炎作用似乎與動脈粥樣硬化有關。

## (2) 螯合二價金屬離子

研究指出在動物和人類精液中含有高量之麥角硫因, 可防止銅離子抑制精子的活力 (Mann & Leone, 1953)。另研究發現麥角硫因可和二價金屬陽離子 (包括  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ ) 形成複合物, 其中銅會與麥角硫因形成最穩定的二價金屬陽離子複合物 (Motohashi, Mori & Sugiura, 1976)。Ye 等人 (2012) 指出這些金屬離子在體內會與麥角硫因作用, 結合形成無氧化還原活性的 Ergothioneine-Cu 複合物, 有助於防止其參與 ROS 的形成, 可保護 DNA 和蛋白質, 免受二價銅離子、過氧化氫所誘導形成的氧化損傷。

## 1. 抗發炎作用

NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 是發炎反應過程中極為重要的分子, 當細胞受到胞外訊息刺激時, 細胞質中的 NF- $\kappa$ B 原本受 I $\kappa$ B 抑制, 會被釋放出來, 呈現活化狀態。活化之 NF- $\kappa$ B

會進入細胞核，引發特定基因轉錄及表現、產生發炎反應、細胞凋亡，甚而導致腫瘤發生；從發炎反應、細胞凋亡到腫瘤發生過程，NF- $\kappa$ B 一直扮演極重要之角色 (Valko *et al.*, 2006)。

Colognato 等人 (2006) 研究發現麥角硫因可抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 TNF- $\alpha$  誘導 NF- $\kappa$ B 之活化；另 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 TNF- $\alpha$  會增加 IL-8 (Interleukin-8, 白血球介素-8) 的釋放，當使用麥角硫因來預處理 A549 cell (肺泡上皮細胞)，可抑制 IL-8 釋放，顯示麥角硫因具有抗發炎作用。

## 2. 抗紫外線傷害

研究指出當皮膚細胞 (角質細胞及纖維母細胞) 暴露於太陽下，經紫外線照射，會使 DNA、蛋白質和脂質受到損傷，並影響細胞活性和代謝活動，最終可能導致光衰老 (photoaging) 及光致癌 (photocarcinogenesis) 情形發生 (Svobodova, Walterova & Vostalova, 2006)。紫外線所造成之損傷主要是因紫外光 (ultraviolet) 和細胞內分子相互作用，進而產生大量的活性氧物質。

研究指出麥角硫因可吸收紫外線範圍 (WL:280 nm ~400 nm) 內的光，此特性說明其對紫外線誘導的損傷和細胞死亡具有保護作用 (Botta *et al.*, 2008)。Markova 等人 (2009) 利用太陽能模擬紫外線 (ssUV, solar simulating UV) 進行細胞照射培養，結果發現麥角硫因可防止氧化損傷，亦可幫助經紫外線照射細胞進行 DNA 修復，故可作為皮膚抗氧化防禦系統的組成分。

## 3. 預防心血管疾病

研究指出麥角硫因可降低黏附分子 VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1, 血管細胞黏連分子-1)、ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, 細胞間黏連分子-1) 及 E-selectin (E-選擇素) 的表現，並抑制單核細胞與內皮的結合；當發炎反應產生時，會誘導黏附因子產生，造成內皮細胞受損，導致血管硬化及血小板凝集，使得罹患心血管疾病機率增加 (Martin, 2010)；麥角硫因可降低黏附分子表現，故可預防心血管疾病。

#### 4. 保護神經

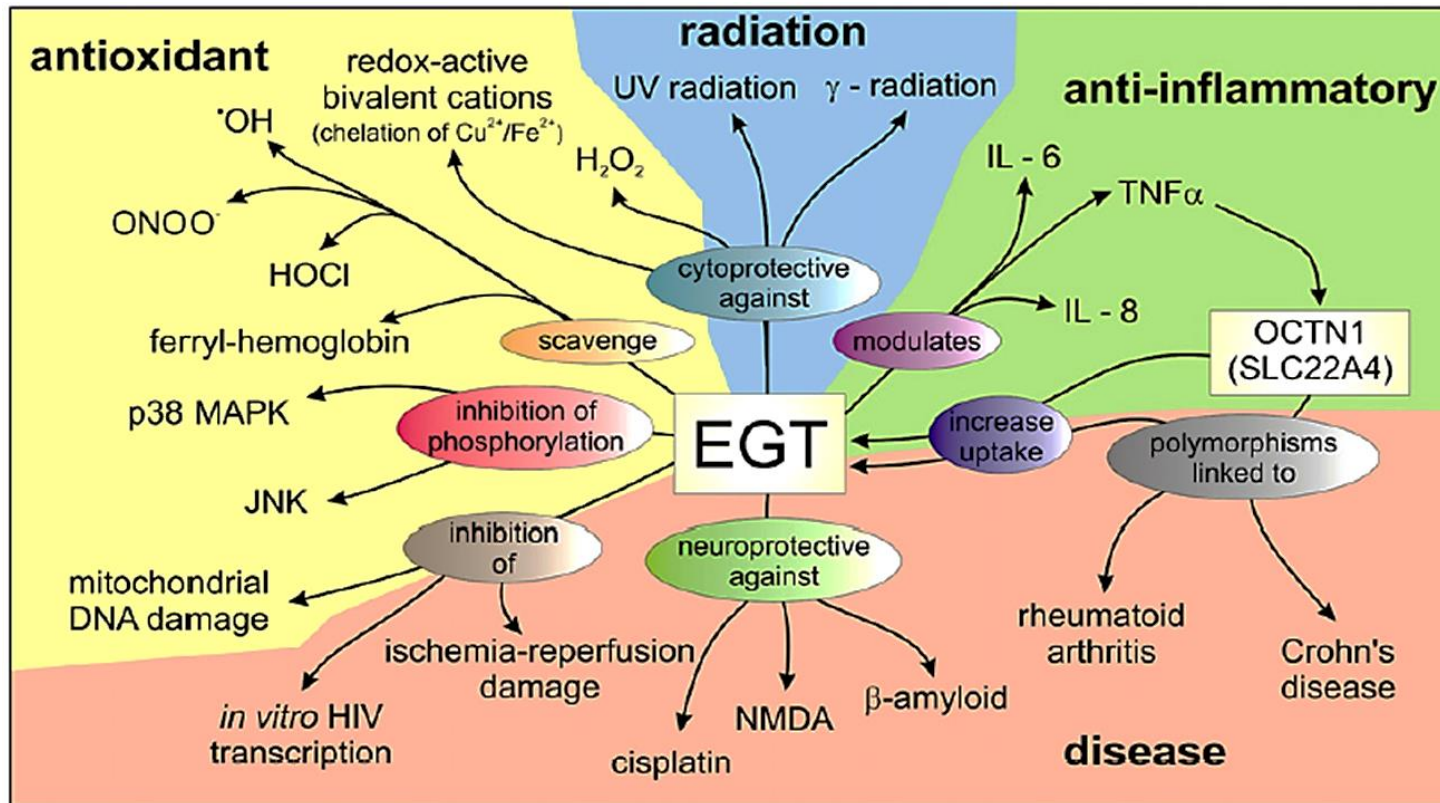
Guijarro 等人 (2002) 研究發現懷孕初期之老鼠，若每天補充麥角硫因，可防止其神經管缺陷之發展，進而降低胚胎畸形之機率。另研究發現麥角硫因可減少大鼠嗜鉻腫瘤細胞 (pheochromocytoma 12 cell, PC12 cell) 受到 A $\beta$  毒性傷害，降低凋亡程度，進而保護神經細胞 (Jang *et al.*, 2004)。此外，有研究指出在 A $\beta$  誘導小鼠試驗中，餵食麥角硫因可減少小鼠腦中 MDA 含量，並可增加穀胱甘肽/氧化型穀胱甘肽 (glutathione/glutathione disulfide, GSH/GSSG) 比值及 SOD 活性 (Yang *et al.*, 2012)。

Cheah 及 Halliwell 整理麥角硫因在體內之可能角色及作用如附圖四所示；包括可作為活性氧物質和相關分子的直接清除劑；麥角硫因亦具有抗發炎功效，可抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 TNF- $\alpha$  誘導的 NF- $\kappa$ B 活化，降低 IL-8 的釋放；另亦可吸收紫外線，降低 caspase-9 (凋亡蛋白酶-9) 的活性，以增加細胞的存活率；此外，麥角硫因亦可降低疾病的發生機率，如可減少 cisplatin 引起之週邊神經病變及降低  $\beta$ -amyloid ( $\beta$ -澱粉樣蛋白) 聚集及沉澱，減低阿茲海默症的發生率等 (Cheah & Halliwell, 2012)。

#### (五) 麥角硫因的作用機制

目前對於麥角硫因之作用機制，Kerley 等人 (2017) 認為可能有下列 5 種方式，如附圖五所示：

1. 直接清除活性氧物質：麥角硫因可清除活性氧物質和相關分子，如羥基自由基 ( $\cdot$ OH)、次氯酸 (HOCl)、過氧亞硝酸鹽 (ONOO<sup>-</sup>) 和鐵基肌紅蛋白的清除劑。另可防止 DNA 損傷和細胞凋亡，清除因氧化壓力誘導基因表現改變之因子。
2. 與二價金屬陽離子螯合：麥角硫因可與二價金屬陽離子形成複合物，其中以銅離子最穩定；在人體精液中含有高量的麥角硫因，可抑制 Cu<sup>2+</sup> 對精

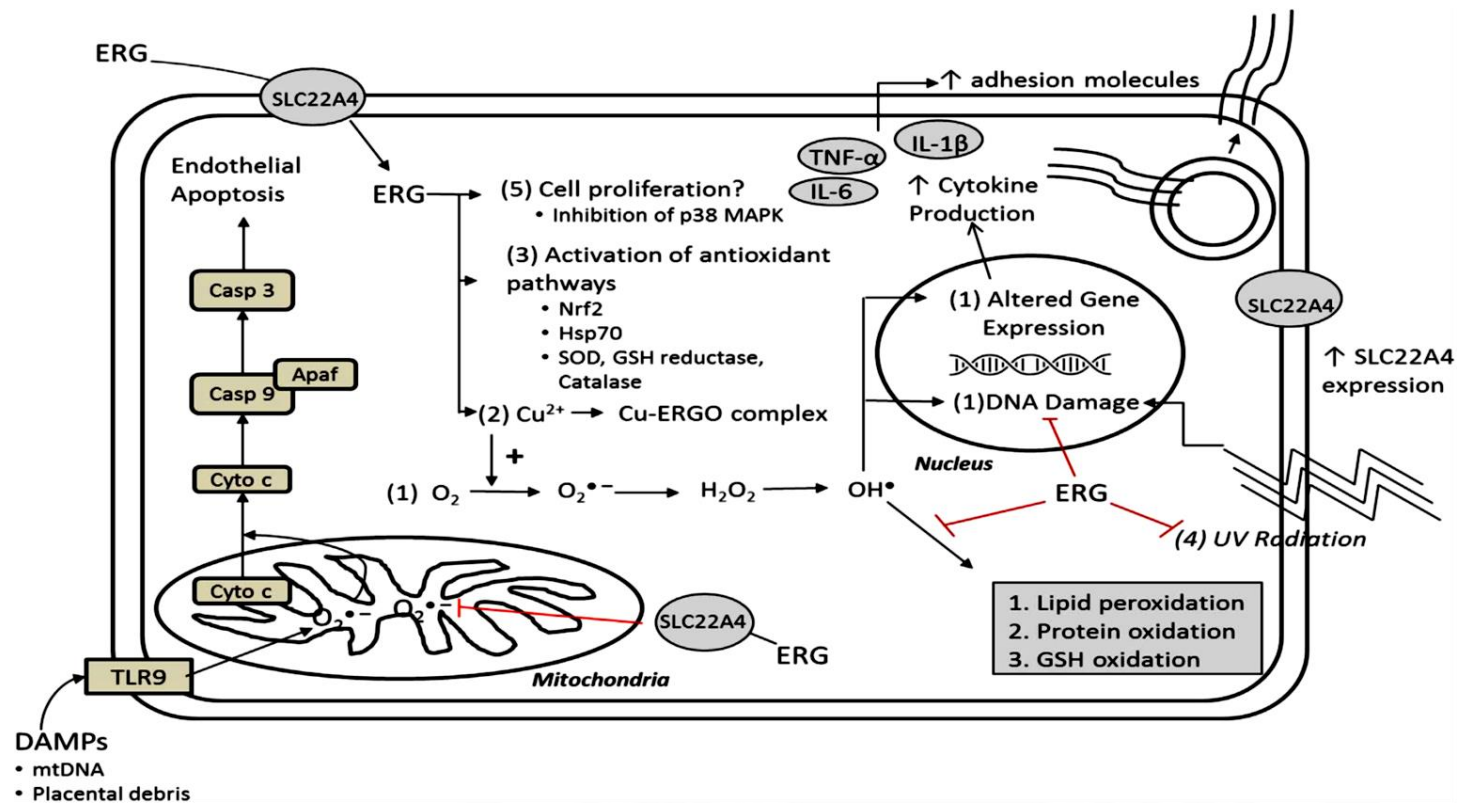


附圖四、麥角硫因體內之可能角色及相互作用

作為抗氧化劑的作用以黃色表示；抗發炎劑以綠色表示；輻射防護作用以藍色表示；橙色則與疾病作用相關

Referred figure 4. Possible roles and interactions of EGT *in vivo*; Functional roles as an antioxidant are highlighted in yellow, anti-inflammatory agent in green, protectant against radiation in blue and roles in disease in orange (Cheah & Halliwell, 2012)





附圖五、麥角硫因的作用機制 (Kerley *et al.*, 2017)

圖中顯示麥角硫因 (1) 直接清除活性氧物質; (2) 與二價金屬陽離子螯合; (3) 正向調控/活化抗氧化途徑; (4) 吸收紫外線輻射和 (5) 細胞修復和增殖

Referred figure 5. Proposed mechanism of action of ergothioneine. Evidence supports a role for ergothioneine in (1) direct scavenging of reactive oxygen species; (2) divalent metal cation chelation; (3) upregulation/activation of antioxidant pathways; (4) absorption of ultraviolet-radiation and (5) cellular repair and proliferation

子活力的影響。另在缺血/再灌注傷害之動物模型中，發現鐵和銅離子被螯合，可降低活性氧物質產生，此為麥角硫因對細胞保護之另一機制。

3. 正向調控/活化抗氧化途徑：麥角硫因會參與抗氧化途徑之蛋白質正向調升或活化，包括 Nrf2、Hsp70、超氧化物歧化酶 (SOD)、GSH 還原酶和過氧化氫酶等。相反地，內皮細胞經麥角硫因處理，發現促氧化酵素-NADPH 氧化酶有調降的現象。
4. 吸收紫外線輻射：麥角硫因可吸收紫外線範圍的光，此物理性質可部分解釋為何麥角硫因對 UV 誘導的損傷和細胞凋亡具有保護作用。另暴露於紫外線輻射之角質形成細胞，麥角硫因可降低 caspase-9 活性及增加細胞存活率。
5. 細胞修復和增殖：麥角硫因在細胞修復機制和增殖中可能扮演重要角色；Nakamura 等人 (2007) 指出，當 K562 (白血病細胞株) 細胞中麥角硫因聚積量減少時，會顯著降低細胞的生長；作者認為麥角硫因缺乏之細胞，會抑制細胞週期和誘導細胞凋亡產生。此外，麥角硫因可藉由 p38-MAPK 路徑之抑制，來阻止 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導細胞凋亡，此路徑會參與發炎和細胞凋亡。

### 三、新穎萃取技術介紹

萃取 (extraction) 是指利用溶劑將樣品中特定成分溶出之步驟，溶劑萃取法已被廣泛地應用於各個領域，如食品和農業分析、製藥、化妝品、營養品、生物能源或環境分析等。傳統的萃取技術包括蒸氣蒸餾、浸泡、索式萃取及加熱煮沸等，這些技術通常需要耗費較長的萃取時間和較高的萃取溫度，但其萃取效率較低，且會增加不耐熱活性化合物降解之風險 (Luque de Castro & Garcia Ayuso, 1998)。近年來，在環保意識逐漸抬頭及冀望能減少能源成本損耗的今日，各種新穎的萃取技術已陸續被開發應用，這些新技術具有萃取時間短、減少有機溶劑消耗、節省能源和降低成本等

優點 (Wang & Weller, 2006)，包括微波輔助萃取 (microwave-assisted extraction, MAE)、超音波輔助萃取 (ultrasound-assisted extraction, UAE)、超臨界流體萃取 (supercritical fluid extraction, SFE)、加壓液體萃取 (pressurized liquid extraction, PLE) 等。Eskilsson 及 Björklund (2000) 比較傳統索式萃取法和新式萃取技術之差別，將其優缺點整理如附表五所示。

以下就本實驗所使用之微波輔助及超音波輔助萃取法來進行介紹：

## (一) 微波輔助萃取 (microwave-assisted extraction, MAE)

### 1. 微波能量之應用

微波輔助萃取技術在 1991 年被應用於植物精油之萃取，之後從小型規模擴展至工業規模。目前，此技術已廣泛運用在各研究領域，尤其是藥用植物方面；與其他新式萃取方法相比，微波輔助萃取主要具有成本低、於一般大氣壓力下萃取效果佳且可持續升溫等優點 (Eskilsson & Björklund, 2000)。

### 2. 方法原理和加熱機制

微波是一種電磁波，頻率介於 0.3 至 300 GHz 之間 (Kaufmann & Christen, 2002)，為了避免干擾無線電通信，家用和工業微波之頻率通常為 2.45 GHz。微波具有電磁特性，電場和磁場會彼此垂直；電場會透過偶極旋轉和離子傳導兩個機制引起加熱反應。偶極旋轉是因溶劑和固體樣品中具有偶極矩 (永久或由電場誘導)，當微波能量進入時，電場來回變化，分子在電場中受到力矩作用，會轉向電場的方向，這種振盪產生與周圍分子的碰撞，從而將熱能釋放到介質中，且其加熱速度非常快 (Onuska & Terry, 1995)。

當溶劑的介電常數越大，加熱即越快速 (Jassie *et al.*, 1997)。因此，與傳統的傳導、熱對流、熱輻射加熱方法不同之處為，微波藉由內部極性分子

附表五、傳統和新式萃取技術之比較

Referred table 5: Comparison of traditional and recent extraction techniques (Eskilsson & Björklund, 2000)

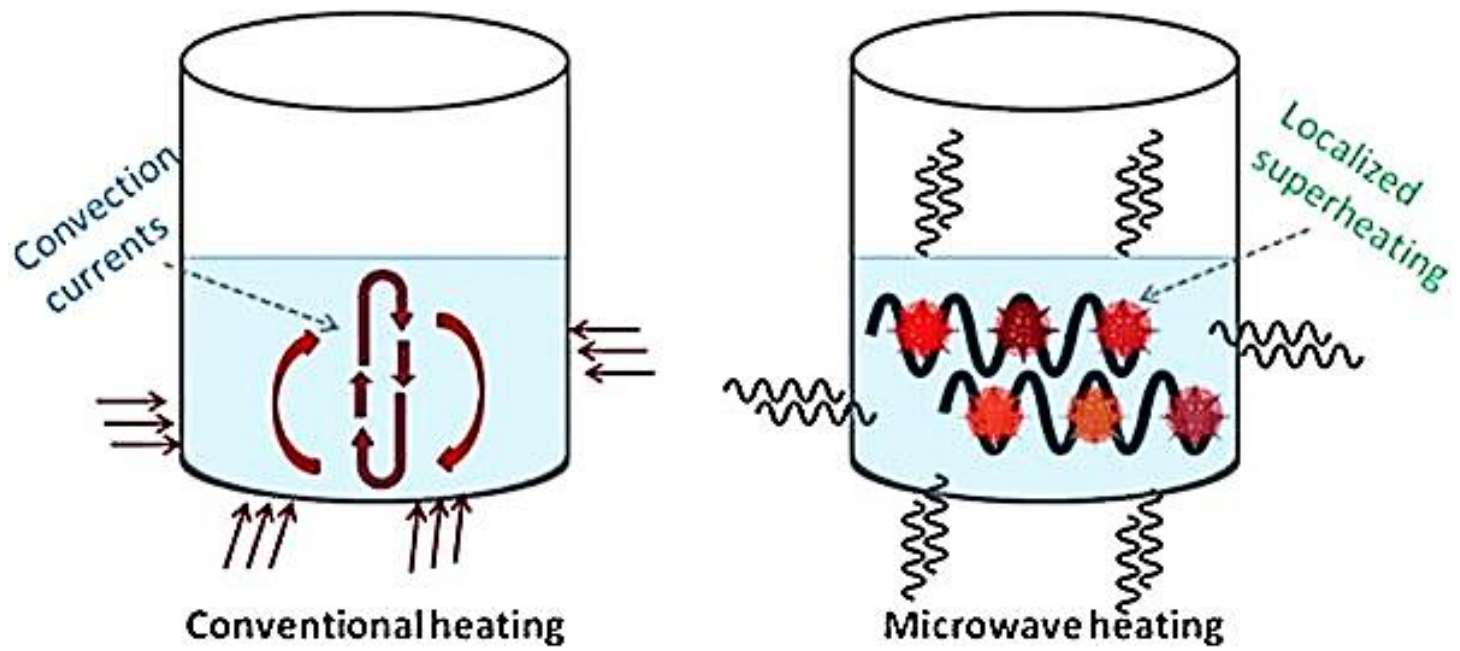
		萃取技術				
		索氏萃取法	加壓液體萃取	超臨界流體萃取	微波輔助萃取	超音波萃取
簡要描述	將樣品置於玻璃纖維套管中，並使用索氏萃取器，將樣品反覆滲透於溶劑的濃縮蒸氣	在萃取容器中加熱及加壓樣品和溶劑，萃取完成後，萃取物自動轉移至小瓶中	將樣品裝入高壓容器中並用超臨界流體(壓力：150-450 bar；溫度：40-150 °C) 的二氧化碳萃取。將分析物收集在少量溶劑中或固相捕集器上，後續步驟使用溶劑沖洗	將樣品置入密閉容器中，以微波能量加熱溶劑	將樣品置入含有溶劑的容器中並置於超音波水浴中	
整體成本	低	高	高	中	低	
優點	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 無需過濾</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 快速且可多重萃取</li> <li>• 溶劑量低</li> <li>• 無需過濾</li> <li>• 自動化系統</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 可濃縮萃取物</li> <li>• 溶劑量低</li> <li>• 可升溫</li> <li>• 無需過濾</li> <li>• 自動化系統</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 快速且可多重萃取</li> <li>• 溶劑量低</li> <li>• 可升溫</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 可多重萃取</li> </ul>	
缺點	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 萃取時間長</li> <li>• 溶劑消耗量大</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 後續需清潔</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 許多參數需考量，尤其是分析物的收集</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 必須確保溶劑能吸收微波輻射</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 溶劑消耗量大</li> <li>• 需反覆萃取</li> </ul>	

振盪產生能量，可同時加熱整個樣品，而傳統加熱熱量是由外向內傳遞，會有加熱不均及過度加熱的問題 (Gude *et al.*, 2013) (附圖六)。

### 3. 微波輔助萃取裝置

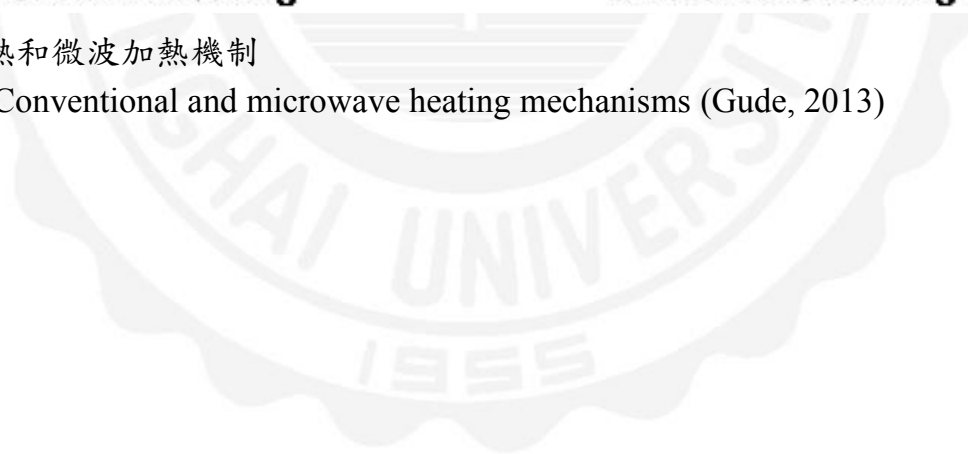
商用微波輔助萃取裝置一般是由爐艙、萃取瓶、磁控管、溫度和壓力感測器所組成，在操作方面具有控溫、控壓、定時、功率選擇等功能。微波輔助萃取依照萃取罐的不同可分為兩種類型，分別為密閉式微波輔助萃取 (Close type microwave-assisted extraction system) 和開放式微波輔助萃取系統 (Open type microwave-assisted extraction system) (Ameer, Shahbaz & Kwon, 2017) (附圖七)。在密閉式微波輔助萃取系統中，樣品在具有不同微波輻射模式的密閉容器中反應；可均勻且在一致的微波加熱下進行，內部的高壓和溫度可快速有效地萃取樣品，儀器之溫度和壓力皆可調控，同時溫度可調節到超過萃取溶劑沸點而達到快速加熱的作用。密閉式微波輔助萃取系統發展促成了高壓微波輔助萃取 (high pressure microwave-assisted extraction, HPMAE) 的發展。

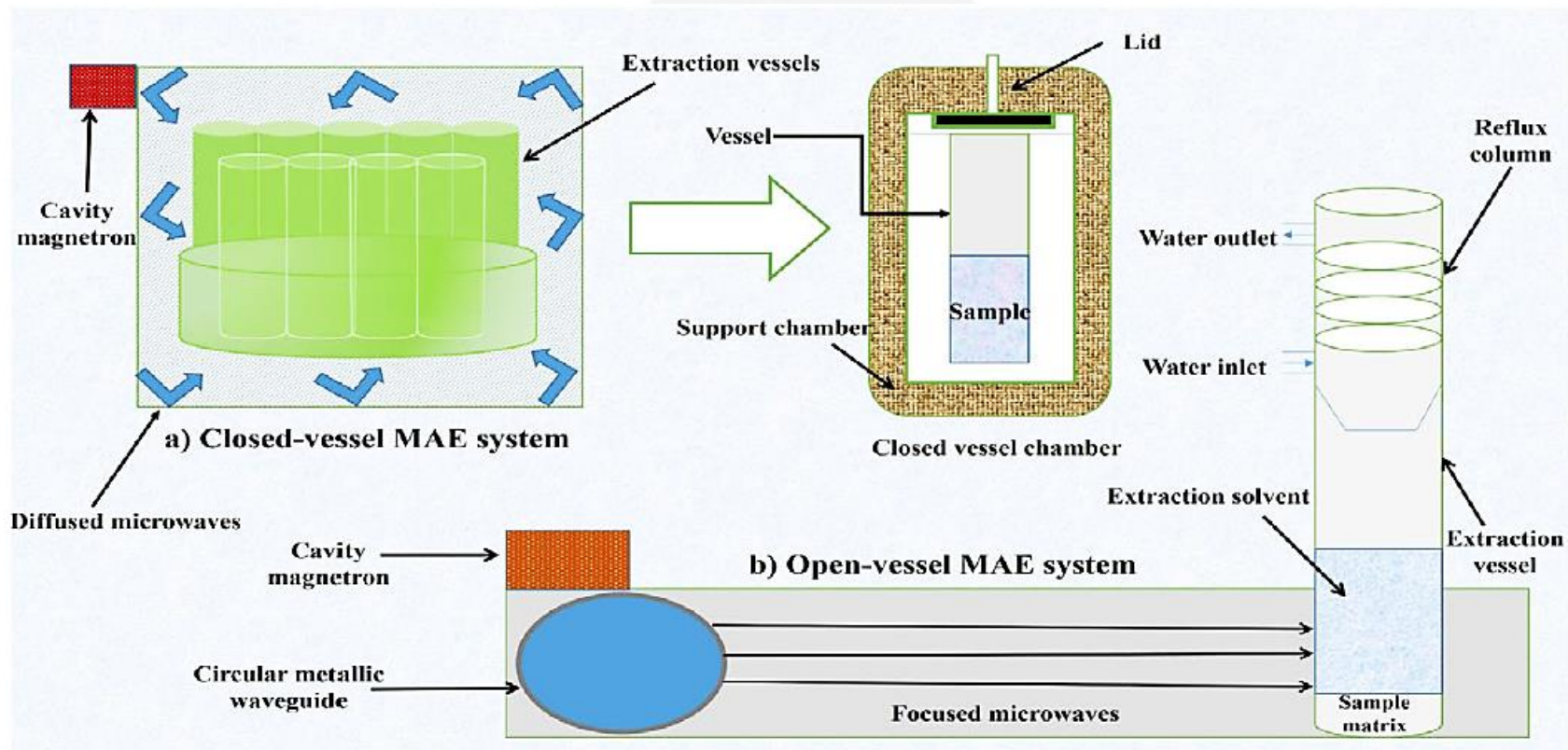
開放式微波輔助萃取系統是為了改善密閉式微波輔助萃取系統的缺點，如安全問題，此法適合用於耐熱性不佳化合物的萃取；該系統可置入較多的樣品量，另過程中可隨時添加溶劑。Garcia 及 Castro (2003) 指出此系統之優點為可廣泛應用於活性化合物的萃取，也可用於分析化學；萃取容器上方可連接冷凝裝置回收蒸發之溶劑重覆使用，故回收率較佳。Kashif 等人 (2017) 整理此兩種萃取系統之優缺點如附表六所示。(Chan *et al.*, 2011)指出因熱降解和一些活性化合物氧化導致萃取率較差，故近十幾年來陸續開發各種改良式之微波輔助萃取裝置，如氮氣保護微波輔助萃取 (Nitrogen-protected microwave-assisted extraction, NPMAE)、真空微波輔助萃取 (Vacuum microwave-assisted extraction, VMAE)、超音波微波輔助萃取 (Ultrasound microwave-assisted extraction, UMAE)、動態微波輔助萃



附圖六、傳統加熱和微波加熱機制

Referred figure 6. Conventional and microwave heating mechanisms (Gude, 2013)





附圖七、微波輔助萃取 (MAE) 系統的操作原理和機制 (a) 開放式 MAE 系統 (b) 封閉式 MAE 系統

Referred figure 7. Operational schematic principle and mechanism of microwave-assisted extraction (MAE) system.

(a) Open-vessel MAE system. (b) Closed-vessel MAE system.

(Ameer *et al.*, 2017)

附表六、密閉式微波輔助萃取系統和開放式微波輔助萃取系統優缺點之比較

Referred table 6. Comparison of closed-vessel and open-vessel MAE systems according to intrinsic advantages and disadvantages (Kashif *et al.*, 2017)

	優點	缺點
密閉式萃取系統	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 溫度可維持、萃取時間縮短</li> <li>• 減少揮發性物質流失</li> <li>• 降低溶劑使用量</li> <li>• 加壓萃取期間煙霧不外溢</li> <li>• 操作簡易</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 壓力高，安全性較低</li> <li>• 須審慎考量容器的耐壓及耐熱性</li> <li>• 實驗中途不可添加溶劑</li> <li>• 冷卻、卸下裝置後必須確保揮發性成分不外溢</li> </ul>
開放式萃取系統	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 實驗中途可添加溶劑、安全性高</li> <li>• 裝載容器可用玻璃或石英製成</li> <li>• 實驗後無需冷卻或減壓</li> <li>• 操作簡便</li> <li>• 與密閉系統相比，其更有效地萃取熱敏酚類化合物</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 與密閉相比其實驗精確度較低</li> <li>• 無法同時處理多組樣品</li> </ul>



取 (Dynamic microwave-assisted extraction, DMAE) 及無溶劑微波輔助萃取 (Solvent-free microwave-assisted extraction, SFME) 等。

#### 4. 影響微波輔助萃取的因素

微波輔助萃取系統的操作條件選擇、萃取機制和參數的調整對其萃取效率有著極大的影響 (Chan *et al.*, 2011)。一般影響微波萃取的因素有下列幾點：

- (1) 萃取時間：萃取時間會隨著所使用的樣品不同和萃取技術的類型而變化。當萃取時間增加時，可提高分析物的產量，但亦會增加熱敏感性化合物降解的風險 (Wang *et al.*, 2007)。Chen 等人 (2007) 指出若需要較長的萃取時間，可利用循環式萃取來降低熱降解的風險，透過批次加入溶劑方式來萃取，配合長時間萃取以確保萃取之完全。
- (2) 微波功率：微波功率可提供足夠能量破壞植物基質，使得分析物可擴散並溶解在溶劑中，增加功率通常可提高萃取率及縮短萃取時間 (Mandal & Mandal, 2010)。Alfaro 等人 (2003) 曾指出，植物樣品萃取過程中，當植物基質被微波輻射破壞，活性化合物就會釋放出來；但過高的微波功率有時會導致萃取率變差，可能是因熱敏感性化合物降解所致。
- (3) 溶劑的選擇：Chen 等人 (2008) 指出，溶劑的選擇需考量因素包括對目標物具有高溶解度、溶劑與基質相互作用能力及對微波的吸收性能等；若溶劑不能吸收微波能量，則無法加熱及有效萃取。另萃取溶劑與最終分析步驟之方法相容性亦需考量 (Eskilsson & Björklund, 2000)。
- (4) 萃取溫度：微波萃取溫度和功率是相互關聯的，當微波功率越高，萃取溶劑的溫度亦會提高。但萃取功率太高時，有時反而會降低萃取率，主要是因非耐熱之化合物會有熱降解的問題。在使用密閉式微波輔助萃取系統時需特別小心，因溫度可能會遠高於所使用溶劑的沸點 (Mandal, Mohan & Hemalatha, 2007)。

(5) 攪拌速率：在微波輔助萃取系統中若進行攪拌，可降低黏稠萃取液對萃取效率的負面影響，亦可降低濃縮之活性化合物於局部區域中產生的傳質屏障，進而提升萃取率 (Ruan *et al.*, 2008)。此影響因子較少被探討，倘若能找出最佳的攪拌速率，若許可得不錯之萃取效果 (Liazid *et al.*, 2011)。

(6) 樣品顆粒大小：當樣品粉末顆粒越細，與萃取溶劑接觸的表面積會越大，進而增加萃取效率；但使用越細之樣品顆粒進行微波萃取，可能會造成後續樣品與溶劑分離的問題 (Chupin *et al.*, 2015)。

## 5. 微波輔助萃取的應用

研究指出利用微波輔助萃取應用於朝鮮薊草 (*Cynara scolymus* L.) 葉黃酮類化合物之萃取，其回收率 (74%) 較常規溶劑萃取 (conventional solvent extraction, CSE) (70.5%) 要來的高 (Ani, Calinescu & Lavric, 2012)。另有研究發現高叢藍莓 (*Vaccinium corymbosum*) 葉中酚類及黃酮類化合物之萃取，若利用微波輔助萃取效果會優於超音波輔助萃取 (ultrasound-assisted extraction, UAE) 及常規溶劑萃取 (conventional solvent extraction, CSE) (Routray & Orsat, 2014)。此外，研究發現黃香草木樨 (*Melilotus officinalis* L.) 之香豆素和鄰香豆酸，利用微波輔助技術來進行萃取，萃取 10 分鐘之效果與超音波輔助萃取 60 分鐘差不多 (Martino *et al.*, 2006)。

研究指出利用微波輔助萃取枇杷葉之抗氧化成分，與傳統之熱溶劑萃取 (hot solvent extraction, HSE) 相較，萃取時間可從數小時縮短至 3 分鐘 (Chen *et al.*, 2008)。微波輔助萃取除可應用於機能性成分之萃取外，另近年來亦廣泛應用在土壤中之農藥檢測、金屬及有機污染物含量分析、聚合物之溶出等之消化分解方面 (Mahmoud *et al.*, 2018)。

## (二) 超音波輔助萃取 (ultrasound-assisted extraction, UAE)

### 1. 方法原理和機制

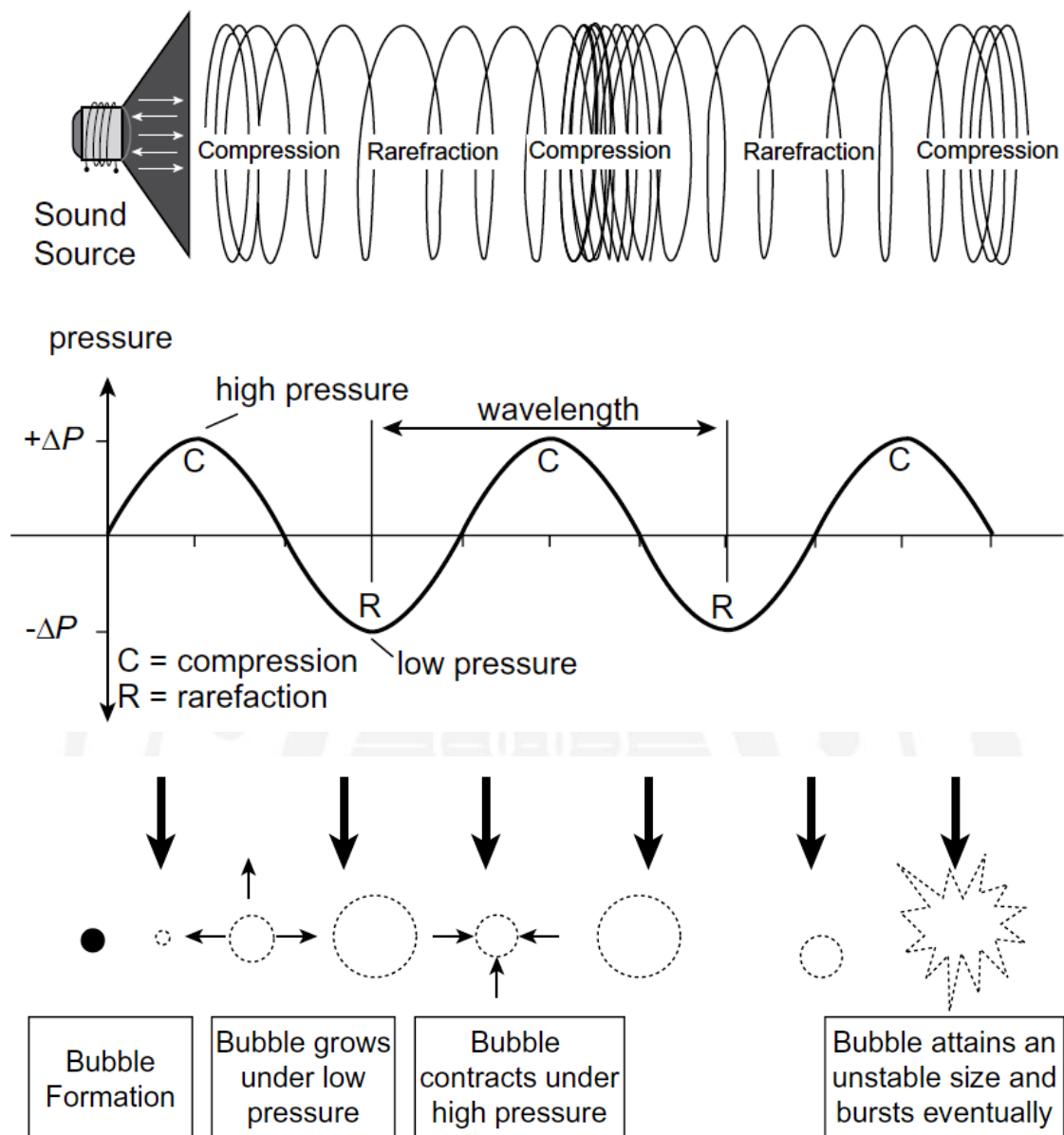
超音波為高於人類聽覺以上的高頻聲波，即 20 kHz 以上 (Azmir *et al.*, 2013)。超音波於介質中透過壓力波引起分子傳遞與振動，傳播到液體介質中的音波產生交替的高壓（壓縮）和低壓（稀疏）循環，其速率取決於聲波的振動頻率。在液體中，壓縮循環將分子聚集，而膨脹循環產生負壓，迫使分子彼此遠離；如果壓力超過液體的拉伸強度，即會形成蒸汽氣泡 (Luque & Luque de Castro, 2004)。氣泡持續吸收能量直至其最大極限，這種空化氣泡在液體中產生、破裂、饋陷或消失的現象，稱為空化效應（附圖八）。

空化效應除會引起微射流、高壓和高溫塌陷外，其物理力包括微射流、剪切力、衝擊波和湍流 (Chandrapala *et al.*, 2012)。由於空泡不斷地被壓縮和膨脹，會產生相當大的能量，這種能量以不可控制的方式在超音波浴槽的每個方向作用；此時產生微量的熱可高達約 5000 K 和 100 MPa 的壓力，使液體溶質可以 280 m/s 的速度浸出 (Barrera Vázquez *et al.*, 2014)。

空化效應及內部擴散機制可增加質量傳遞，使萃取效率提升；另超音波的機械效應，讓溶劑能更有效地滲透到細胞，進而破壞生物細胞壁，從而改善質量傳遞。因此，細胞的破碎和有效的質量傳遞，被認為是超音波輔助萃取的主要有利因素 (Vilkhu *et al.*, 2011)。

### 2. 影響空化效應的因素

(1) 超音波頻率：超音波頻率會影響氣泡生成的大小，在較低頻率 (20 kHz) 下，產生的氣泡會較大，當氣泡饋陷會產生較高的能量，伴隨產生局部的高壓及高熱；反之在較高頻率下，氣泡形成不易，較不會發生空化現象。研究指出高頻超音波震盪產生的微小空泡，可鑽入微裂隙或細小盲



附圖八、超音波輔助萃取的作用機制和空化效應的形成

Referred figure 8. Mechanism of action of UAE and formation of cavitation

(Mandal *et al.*, 2015)

孔且所生成的音波空泡半徑較小，因此穿透能力較強 (Mandal *et al.*, 2015)。

- (2) 溫度：萃取液的溫度、黏度和超音波頻率與氣泡坍塌強度有關；高溫雖有助於溶劑的擴散速率，但隨著溫度升高，空化氣泡會產生得更快，但饋陷的強度會降低。研究指出這是由於蒸汽壓增加，抗拉強度降低，兩者會互相抵消，減弱空化效應。因此，為使空化效應最佳化，試驗盡可能於較低溫度下進行或使用低蒸氣壓的溶劑 (Mandal *et al.*, 2015)。

### 3. 超音波輔助萃取裝置

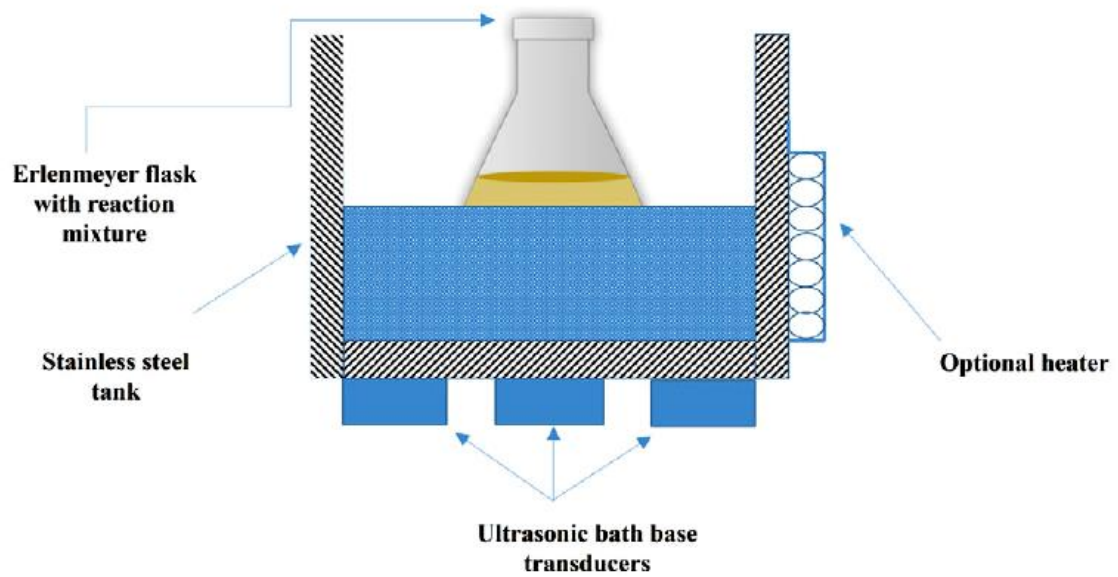
超音波輔助萃取裝置如附圖九所示，主要包括三個部分：

- (1) 發電機：為電子或機械振盪器，必須堅固、耐用、耐熱，能夠在有負載和無負載的情況下運作。
- (2) 換能器：可將機械能或電能轉換成超音波能量的裝置。
- (3) 超音波槽：藉由液體的傳送，將能量從發射區域傳送至反應容器，進而間接作用於萃取液。

### 4. 超音波輔助萃取的優缺點

超音波輔助萃取常用於熱敏感性化合物之萃取，其設備成本低於其他新式萃取技術且可使用多種各種溶劑進行萃取，包括水、乙醇及甲醇等溶劑 (Chemat *et al.*, 2017)；超音波可破壞細胞壁，使溶劑能有效地滲透到樣品中，進而促進細胞內容物釋放，增強質量傳遞 (Subhash, Vivekananda & Kumar, 2015)。與傳統萃取技術相比，超音波輔助萃取是一種較為簡單、經濟、高效率和目標萃取物易回收的萃取方法 (Vilkhu *et al.*, 2011)。

超音波輔助萃取主要缺點是分散相的音波振幅，會隨著距離的增加而減小，使超音波會被限制在發射器附近的區域，故設計時必需須考慮此因素；另超音波萃取裝置屬開放式系統，操作人員暴露於溶劑影響之風險較高 (Danlami *et al.*, 2014)。



附圖九、超音波輔助萃取 (UAE) 系統裝置

Referred figure 9. Operational schematic principle of ultrasound-assisted extraction (UAE) system

(Ameer *et al.*, 2017)

## 5. 超音波輔助萃取技術之應用

目前超音波輔助萃取技術已廣泛應用在化學、食品和製藥等行業；Zhang 等人 (2009) 研究指出，超音波輔助萃取技術應用在杏仁油之萃取，空化效應會破壞杏仁粉末之結構，使萃取時間大幅縮短。另 Jovanovic 等人 (2014) 自不同水果 (藍莓、油桃、覆盆子、西瓜) 與蔬菜 (大蒜、菊芋、韭蔥、蔥、白洋蔥)，使用超音波輔助技術來萃取寡糖，發現萃取總寡糖含量較乙醇萃取法增加 2~4 倍，顯示此法可提高萃取率。Chemat (2016) 等人指出超音波輔助萃取技術應用在水果、蔬菜、草藥、香料及含油量高種子等生物活性物質之萃取，可提高其萃取率及經濟效益。

超音波輔助萃取屬非熱加工技術，目前除應用於萃取製程外，亦可應用於其他食品的加工程序，如過濾、消泡、烹煮、脫氣、切割、乾燥、肉類嫩化、均質化和結晶等 (Chemat, Zill e & Khan, 2011)。

## 四、反應曲面法 (Response surface methodology, RSM)

最適化是指改善系統、流程或產品的性能，並在不增加成本的情況下提高產量的過程；通常應用於化學工業，作為使產量最佳化條件的方法 (Araujo & Brereton, 1996)。傳統上，透過一次僅變動一個因子，同時將其他操作條件維持在固定水平，依此而得到合適之操作條件，此方法稱為一次一因子實驗法 (One-Factor-at-a-Time)。一次一因子實驗法主要缺點是無法獲得研究變量間的交互作用及各參數對過程的影響；另一缺點是進行研究所需的實驗組數較多，會增加時間、材料和試劑成本 (Leardi, 2009)。

為了克服這個問題，透過使用多變量統計方法來進行分析程序的最適化，而在最適化分析方法中，最廣為被使用的多變量技術是反應曲面法(Response surface methodology, RSM)。以下將介紹 RSM 的原理與應用：

## (一) 介紹與原理

反應曲面法是由 Box 和 Wilson 兩位學者在 1951 年所開發的統計方法，目的是為了改進化學工業中的製造過程，期望降低成本以獲得更高的產率和純度；近年來則廣泛應用於製藥、食品、化學及農業等產業 (Khuri, 2017)。反應曲面法是利用多項式方程式（線性及平方多項式等）與統計獲得實驗設計 (Design of experiment, DOE) 及經模型驗證，來得到與數學模型吻合的實驗結果；此法可用於探討最適化過程中自變量（單獨或組合）對實驗過程的影響 (Bas & Boyacı, 2007)。在使用反應曲面方法之前，必須先選擇一個切合的實驗設計，將研究限制在定義的實驗區域中進行。以下將介紹進行反應曲面法的因子選擇及步驟：

## (二) 應用的理論和步驟

### 1. 篩選變量

在實驗中有許多變量可能會影響系統的反應，但實務上很難控制每個變量的微小影響。因此，如何篩選出適當且具有顯著影響的因子，進而選擇合適的範圍，以增加找出最適值的成功機率 (Bezerra *et al.*, 2008)。利用全因子 (full factorial) 或二水準部分因子 (fractional factorial) 設計進行因子篩選，其優點是快速且有效挑選出對數據有明顯影響的因子。

### 2. 選擇實驗設計

目前反應曲面法中被廣泛使用的兩種設計為中心混成設計 (central composite design, CCD) 和 Box-Behnken 設計 (Box-Behnken design, BBD)，可用於生產流程的改善或最適化，以提高生產效率。步驟為將各顯著變數與編碼之所有可能組合一一列出，再將實驗結果與數學方程相結合，故該方程可用於最適化、預測及解釋 (Demirel & Kayan, 2012)。以下將介紹本研究所使用的 Box-Behnken 設計方法：



Box-Behnken 設計 (BBD) 為作者 Box 及 Behnken 於 1960 所提出的三因子三水準中心可旋轉實驗設計 (three-variable and three-level rotatable design)。以三因子為例，其圖形可以兩種形式表示 (附圖十) (Ferreira et al., 2007)。BBD 優點是不包含同時處於最高或最低水平組合的因子 (位於立方體的角點)，因此，此設計可避免實驗在極端的條件下進行。BBD 實驗矩陣是由兩個水平因子設計 (-1, +1) 與經過改良的不完全區集 (Block) 所建構的，中心點 (0, 0, 0) 重複進行實驗，用來估計純誤差總和的平方 (pure error sum of squares)，以提高實驗的精確度。

開發 BBD 所需的實驗次數 ( $N$ ) 定義為  $N = 2k(k-1) + C_0$ ，(其中  $k$  是因子數， $C_0$  是中心點個數)。附表七及附表八分別表示包含三、四和五個因子的 BBD 因子水平的編碼值 (Ferreira et al., 2007)。在使用 BBD 法上有兩個限制：一為實驗因子的數目必須大於等於三，另一則為此設計法只可與二階方程式相配合 (Dwivedi & Sharma, 2015)。

### 3. 執行試驗並獲得數據

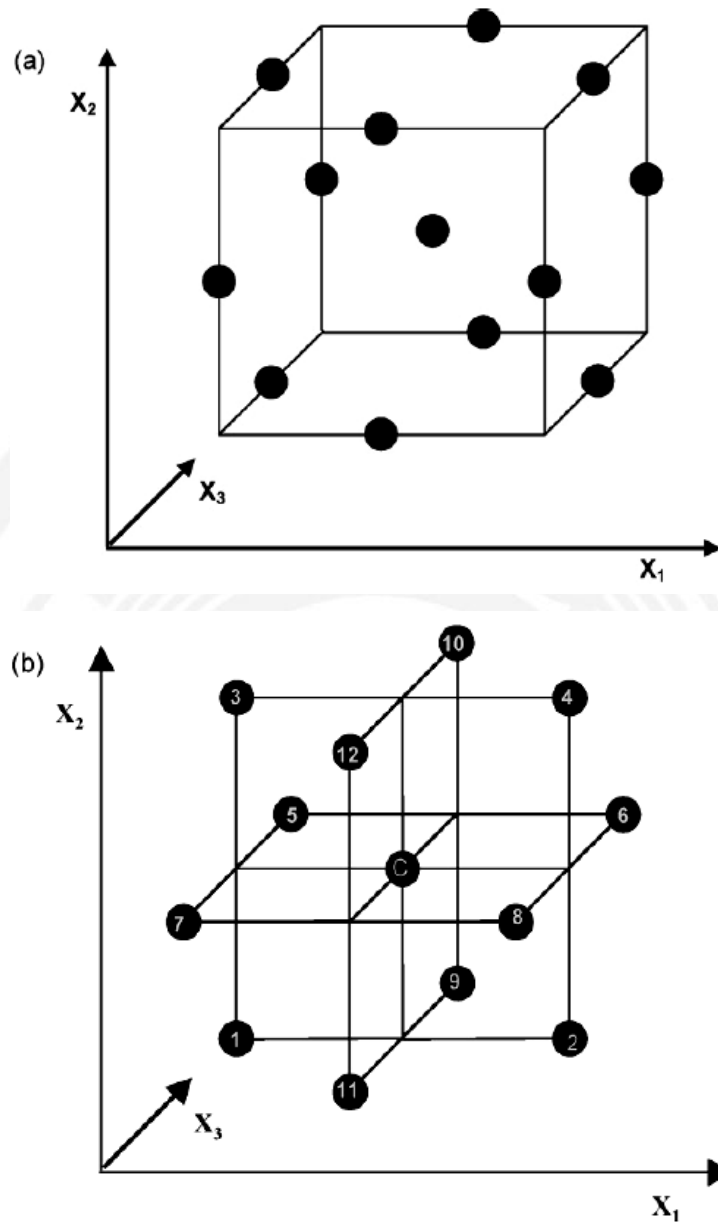
以步驟 2 設計出來之三因子三階層實驗組進行試驗，並經由分析獲得實驗數據。

### 4. 評估模型擬合度

依方程式對變量進行編碼並將反應值與數據結合後，利用 Statgraphics 統計軟體以回歸分析進行二階模型 (second-order model) 的擬合，找出預測之極值，並藉由二階方程式來描述反應曲面之變化 (Bhattacharya, Srivastav & Mishra, 2014)。其二階方程式通式如下 (Zhao et al., 2015)：

$$Y = \beta_0 + \sum_i \beta_i X_i + \sum_i \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j} \beta_{ij} X_i X_j$$

其中， $Y$  為反應之預測值， $X_i$  及  $X_j$  為影響應變量  $Y$  之自變量； $\beta_0$  為偏移



附圖十、BBD 的立方體和  $2^2$  因子設計示意圖

Referred fig 10. (a) the cube for BBD and (b) three interlocking  $2^2$  factorial design

(Ferreira *et al.*, 2007)

附表七、用於三變量系統之 Box-Behnken 設計的編碼因子水平  
 Referred table 7. Coded factor levels for a Box-Behnken design of a three-variable system (Ferreira. *et al.*, 2007)

Experiment	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0

附表八、用於三變量系統的 Box-Behnken 設計的編碼因子水平  
 Referred table 8. Coded factor levels for Box-Behnken designs for optimizations  
 involving four and five factors (Ferreira. *et al.*, 2007)

Four-factor				Five-factor				
$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5$
$\pm 1$	$\pm 1$	0	0	$\pm 1$	$\pm 1$	0	0	0
0	0	$\pm 1$	$\pm 1$	0	0	$\pm 1$	$\pm 1$	0
0	0	0	0	0	$\pm 1$	0	0	$\pm 1$
-----				$\pm 1$	0	$\pm 1$	0	0
$\pm 1$	0	0	$\pm 1$	0	0	0	$\pm 1$	$\pm 1$
0	$\pm 1$	$\pm 1$	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	-----				
-----				-				
$\pm 1$	0	$\pm 1$	0	0	$\pm 1$	$\pm 1$	0	0
0	$\pm 1$	0	$\pm 1$	$\pm 1$	0	0	$\pm 1$	0
0	0	0	0	0	0	$\pm 1$	0	$\pm 1$
				$\pm 1$	0	0	0	$\pm 1$
				0	$\pm 1$	0	$\pm 1$	0
				0	0	0	0	0

； $\beta_{ii}$  為二次項係數， $\beta_{ij}$  則為交互作用項之係數。

## 5. 獲得反應的最佳值及圖形並進行變數分析

經由統計軟體 Statgraphics 將實驗數據回歸分析後，可得到反應曲面圖及等高線圖。數學方程之適切度可利用 ANOVA 以數學函數得出模型之決定係數 (coefficient of determination,  $R^2$ ) 及變異數比率檢驗 (F-test value)。 $R^2$  為檢定係數與實驗總變異數之比值 ( $R^2 = SSR/SST$ )，其數值越趨近 1，表示此迴歸模式能夠解釋全體變異量的比例愈大；亦即  $R^2$  愈接近 1，此模式愈有解釋能力 (Chivassa *et al.*, 2017)。另變異數比率檢驗常用來分析超過一個參數的統計模型，藉以判斷該模型之全部或部分參數，是否適合用來估計母體；若數據符合常態分佈且 alpha 值大於 0.05，則該檢驗模型被認為是可靠的 (Duncan, 1955)。

### (三) 應用領域

與傳統一次一因子變量方法相比，RSM 具有實驗組數較少即可獲得大量訊息、省時並可清楚解釋影響實驗之關鍵因子和獨立參數對反應的交互作用等優點，故此方法廣泛應用於各個研究領域。

RSM 普遍應用於電子、機械、農業、化學工業、生物科技、材料科學、食品科學及工業製程改善等各研究領域。1980 年代由於電腦模擬 (computer simulation) 應用於決策科學上漸受歡迎，RSM 亦成為複雜系統重要影響變數分析的一項工具。2000 年後，多反應值最佳化設計 (multi-response optimal design) 與多反應值同步最佳化 (multi-response simultaneous optimization) 成為 RSM 研究的主流 (Vadde, Syrotiuk & Montgomery, 2006)。由於 RSM 符合經濟性原則、以數學理論求得最適化實驗條件及可減少模擬時間，至今日依舊是食品界及各行業廣泛應用的分析法之一。

## 五、切向流過濾 (Tangential Flow Filtration, TFF)

傳統過濾方式是靠正壓或負壓提供過濾的動力，短時間內會在膜表面形成高濃度凝膠層 (cake layer) 造成過濾速度急劇下降 (Negrete *et al.*, 2014)；超過濾 (Ultra-filtration) 為分子量級的分離，其過濾動力亦為液體的壓力差，過濾時樣品極易殘留在膜表面而造成過濾效率不佳，因此，切向流過濾是防止濃度極化造成過濾速度下降的一種有效方法。附圖十一為切向流過濾原理示意圖；主要原理為濾液沿著過濾膜流動，使流動方向與過濾方向垂直；其優點為液體流動過程除可進行過濾外，大分子樣品會隨著液體流動而散開，較不易堆積在膜上。切向流過濾可保持通透膜的乾淨與降低濃縮所引起的極化現象 (concentration polarization)，另可提升過濾效率與延長過濾膜的使用壽命；此外，尚未過濾的分子可經由幫浦再次循環，故可減少樣品損失、降低使用成本 (Pinto, 2018)。

### (一) 參數定義

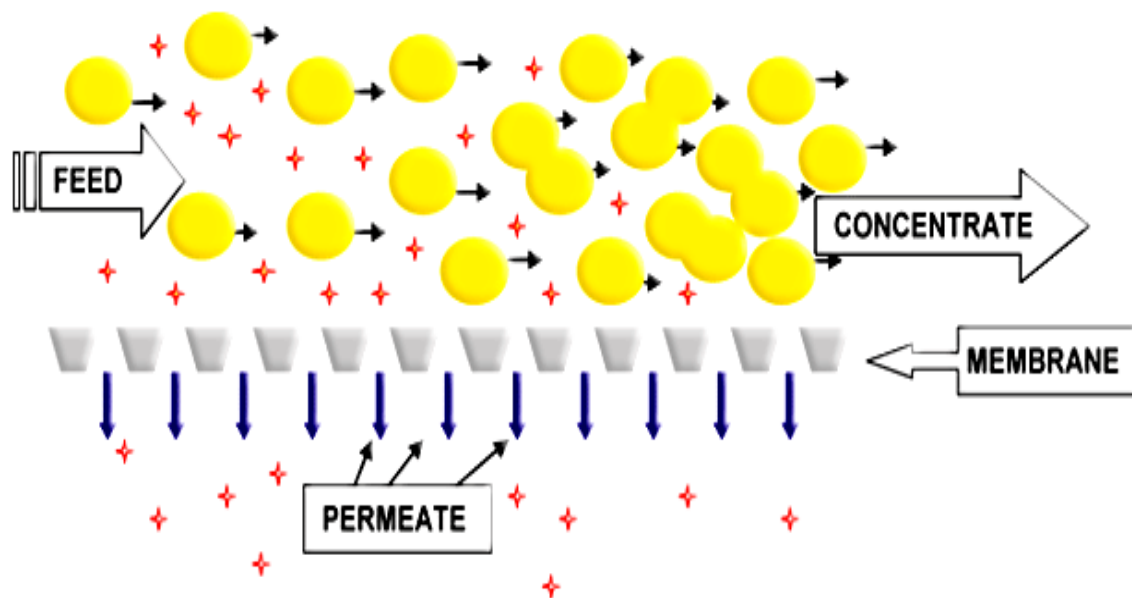
跨膜壓力 (Transmembrane pressure, TMP 或  $\Delta P$ ) 是指膜的進料側和回流側的平均值與滲透壓之間的壓力差，通常以 bar 或 psi 表示。當跨膜壓力增加時，會增加穿過膜的通量，跨膜壓力 (TMP) 定義為：

$$TMP = \left( \frac{P_{feed} + P_{retentate}}{2} \right) - P_{permeate}$$

TMP = 跨膜壓力 (psi)； $P_{feed}$  = 進樣壓力 (psi)； $P_{retentate}$  = 回流壓力 (psi)；

$P_{Permeate}$  = 滲透壓力 (psi)

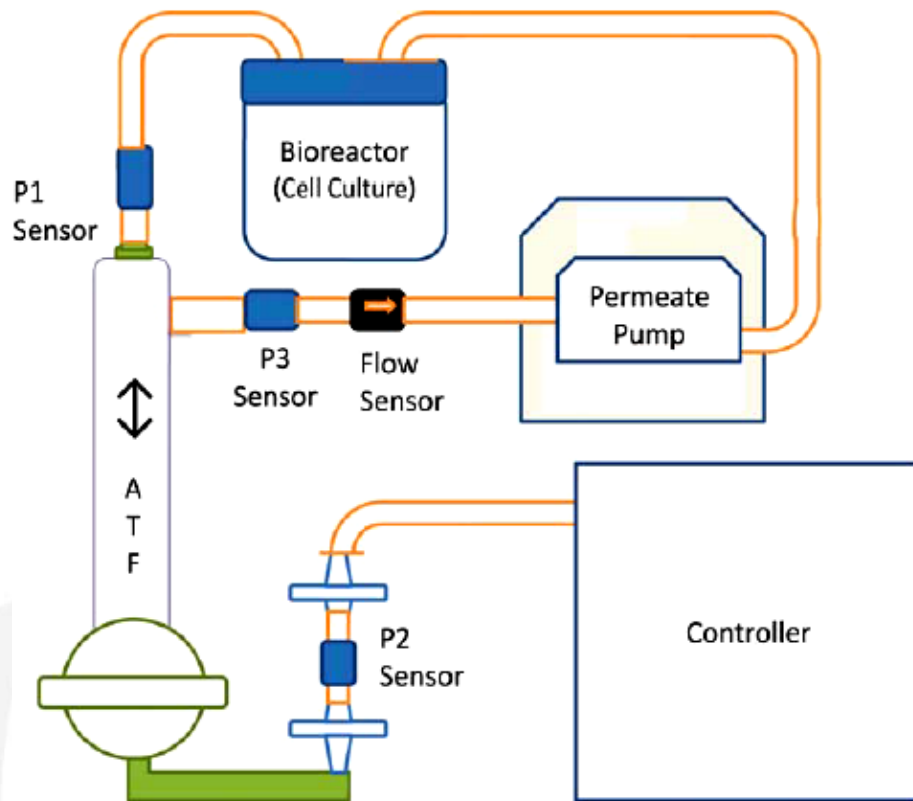
理想的跨膜壓力因膜及樣品的不同而有所差異，測量 TMP 值可得知施加的壓力及循環時間，可使過濾效率最佳化且不會超出膜之負荷 (Skinner, Stickland & Scales, 2018)，附圖十二為儀器設置、流量和壓力測量器之顯示位置 (P1、P2 和 P3)。



附圖十一、切向流過濾示意圖

Referred fig 11. Schematic diagram of tangential flow filtration

(Dorney *et al.*, 2014)



附圖十二、切向流過濾之實驗設置、流量和壓力（P1，P2 和 P3）傳感器的位置

Referred fig 12. Experimental setup, showing location of flow and pressure (P1, P2 and P3) sensors

(Kelly *et al.*, 2014)



## (二) 切向流過濾之優點

常見之分離方法有大小排除層析法 (size exclusion chromatography, SEC) 及逆流透析法 (countercurrent dialysis, CCD) 兩種，與其相比，TFF 具有下列優點 (Chow, 2017)：

1. 進行緩衝液交換可同時濃縮，使目標物損失降到最低。
2. 堆疊離子去除率高：SEC 只能大約去除  $5 \times 10^5$  個離子，而 TFF 可去除多達  $5 \times 10^{12}$  個離子。
3. 管柱以及管路皆可高壓滅菌，可重複使用減少成本。
4. 孔徑分子量選擇範圍廣，具有多種孔徑及材質可供選擇。
5. 操作過程取樣方便。

## (三) 應用領域

切向流過濾系統可廣泛應用於各領域，如病毒顆粒之回收和純化，因 TFF 之高擴展及高通量性，可使病毒顆粒和雜蛋白質因大小差異而分離，進而得到高病毒回收率 (Grzenia, Carlson & Wickramasinghe, 2008)。另利用 TFF 分子大小差異及膜孔徑選擇，亦可有效進行蛋白質純化、濃縮及濾析 (Arunkumar *et al.*, 2018)。此外，亦可應用在製藥領域純化產品和醫學領域，奈米顆粒及乳膠顆粒之濃縮及濾析 (Musumeci, 2018)；另生物環境領域將水生環境中的有機膠體分離 (Guéguen, Belin & Dominik, 2002)，亦可應用切向流過濾系統。

從食品、生物技術到製藥領域，皆可利用切向流過濾技術將目標物分離且無不穩定之現象。在食品工業中，利用 TFF 可去除對視覺外觀、感官特性、營養價值或安全性產生負面影響的污染物及其他物質，因此 TFF 被認為是經濟效益高且安全的一種過濾方式 (Musumeci, 2018)。

## 六、抗氧化系統

人體在正常代謝過程中會產生自由基 (free radical) 與活性氧 (reactive oxygen species, ROS)，而自由基在人類所發生許多疾病的發展上扮演著重要的角色，其所導致的氧化傷害對人體健康有相當大的影響。一般在正常生理狀況下，自由基維持在平衡狀態，不會對身體造成傷害；當自由基不正常累積時，就會使身體正常機能受到傷害並導致疾病 (Shen *et al.*, 2010)。生物體中有一套抗氧化系統可清除多餘的自由基，包含許多酶參與的酵素系統及維他命 C、E 等化合物相輔相成作用，藉由修復系統修補自由基所引發的傷害 (Birben *et al.*, 2012)。

### (一) 抗氧化原理

應用於食品之理想抗氧化劑應具備以下特性，包括具有熱安定性 (因食品大多需加熱烹調)、無顏色及味道 (避免影響食品色澤及風味)、低濃度下具有良好抗氧化效果、易操作使用、穩定性佳、效果即時等條件。以下將介紹兩類常見之抗氧化系統 (Birben *et al.*, 2012)：

#### 1. 酵素抗氧化系統 (enzymatic antioxidant)

人體內有數種對抗自由基的抗氧化酶，可迅速將體內產生的自由基，利用氧化還原方式轉變成毒性較小或無毒的物質，而這些抗氧化酶因難敵胃酸的破壞，很難經由口服方式來達到抗氧化效果；因此，可藉由輔助因子之補充，以提高其抗氧化能力。附表九列出體內數種抗氧化酶作用方式及所需的輔助因子。

##### (1) 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)

超氧化物歧化酶是人體內重要的抗氧化酵素，可將活性較大的超氧化物 (superoxide,  $O_2^-$ ) 作用成活性較小的過氧化氫 ( $H_2O_2$ )，反應式為  $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ；然 SOD 需與金屬離子 ( $Cu_2^+$ 、 $Zn_2^+$  或  $Mn_2^+$ )

附表九、抗氧化防禦系統之酵素型清除劑

Referred table 9. Enzymatic Scavenger of Antioxidant Defense (Birben *et al.*, 2012)

Name of Scavenger	Acronym	Catalyzed Reaction
Superoxide dismutase	SOD	$M^{(n+1)+}\text{-SOD} + O_2^- \rightarrow M^{n+}\text{-SOD} + O_2$ $M^{n+}\text{-SOD} + O_2^- + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+}\text{-SOD} + H_2O_2$
Catalase	CAT	$2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$ $H_2O_2 + Fe(III)\text{-E} \rightarrow H_2O + O = Fe(IV)\text{-E}(\cdot+)$ $H_2O_2 + O = Fe(IV)\text{-E}(\cdot+) \rightarrow H_2O + Fe(III)\text{-E} + O_2$
Glutathione peroxidase	GTPx	$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ $2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$
Thioredoxin	TRX	Adenosine monophosphate + sulfite + thioredoxin disulfide = 5'-adenylyl sulfate + thioredoxin Adenosine 3',5'-bisphosphate + sulfite + thioredoxin disulfide = 3'-phosphoadenylyl sulfate + thioredoxin
Peroxiredoxin	PRX	$2 R'\text{-SH} + ROOH = R'\text{-S-S-R}' + H_2O + ROH$
Glutathione transferase	GST	$RX + GSH = HX + R\text{-S-GSH}$

結合，才能發揮作用；另 SOD 在體內經氧化還原反應後，可循環再利用 (Valko *et al.*, 2007)。

## (2) 觸酶 (catalase, CAT)

觸酶主要是將 SOD 產生的  $H_2O_2$  作用成無害的氧及水，反應式為  $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ ，但 CAT 需要有  $Fe^{3+}$  參與，才能催化整個反應進行。

## (3) 穀胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GPx)

主要活化 glutathione (GSH)，直接將過氧化脂質 R-OOH 還原成醇 (R-OH) 或分解  $H_2O_2$ ，但 GPx 需要硒 (Se) 的參與，才能催化反應進行。

## 2. 非酵素抗氧化系統 (non-enzymatic antioxidant)

非酵素抗氧化劑包括低分子量化合物，如維生素 (維生素 C、E)， $\beta$ -胡蘿蔔素、尿酸、GSH 及硫醇 (巰基) 基團等 (Birben *et al.*, 2012)。附表十列出常見之非酵素型抗氧化劑：

### (1) 維生素 C (Vitamin C)

維生素C是利用分子上的氫氧基 (OH) 和自由基作用，O 會釋出一個  $H^+$  和一個電子，當自由基得到電子後，會成為較穩定的的化合物；而維生素C上的OH則變成  $O^-$ ，但由於其可產生共振，故活性較低且無破壞性。當維生素C氧化後，會被 GPx系統還原，可再重複利用 (Sies *et al.*, 1992)。

### (2) 維生素 E (Vitamin E)

維生素 E 是一種脂溶性維生素，具有酚的結構，利用其上的 OH 基釋出一個  $H^+$  和一個電子，使自由基變成較穩定的化合物，維生素 E 上的 OH 則變成  $O^-$ ，因旁有苯環可以產生共振，成為較穩定的自由基。當維生素 E 氧化後會形成氧化態維生素 E，可被維生素 C 還原，因此可重複再利用；只要有足量的維生素 C，就可將氧化的維生素 E 還原。

### (3) $\beta$ 胡蘿蔔素 ( $\beta$ -carotene)

$\beta$ -胡蘿蔔素為維生素 A 之前驅物質，在人體內具有二種抗氧化作用能力；一是可與脂質過氧化自由基結合，中斷脂質過氧化連鎖反應；另一

附表十、抗氧化防禦系統之非酵素型清除劑

Referred table 10. Nonenzymatic scavenger of antioxidant defenses

(Birben *et al.*, 2012)

Chemical name of scavenger	Name of scavenger	Structure
All trans retinol 2	Vitamin A	
Ascorbic acid	Vitamin C	
α-tocopherol	Vitamin E	
β-carotene		
Glutathione		

是可吸收氧因光線照射而變成的激發態氧，進而阻止氧化作用進行。 $\beta$ -胡蘿蔔素主要食物來源是深綠、黃色的蔬菜和藻類，其中以胡蘿蔔最具代表性 (Burton., 1984)。

#### (4) 穀胱甘肽 (glutathione, GSH)

穀胱甘肽是由甘胺酸 (glycine)、穀胺酸 (glutamic acid) 及半胱胺酸 (cysteine) 等三種胺基酸所組成，需經 GPx 活化後方有作用，GSH 會被氧化成硫化穀胱甘肽 (glutathione disulfide, GSSG)，而 GSSG 可被 NADPH 還原成 GSH，因而可循環重複利用 (Valko *et al.*, 2007)。

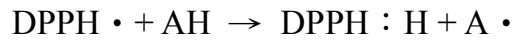
#### (5) 鋅 (Zn)、銅 (Cu)、硒 (Se) 及鐵 (Fe)

鋅和銅是超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的輔助子，主要存在於海產、肝臟、肉類和堅果類食物內；硒是穀胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GPx) 的輔助因子，主要存在於海產、蔥、洋蔥和蒜中；鐵則是觸酶 (catalase, CAT) 的輔助因子，主要存在於肉類和魚中 (Cho *et al.*, 2004)。

## (二) 常見抗氧化活性的評估方法

### 1. 清除 DPPH 自由基能力

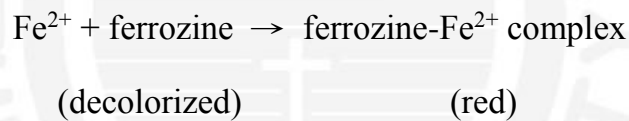
1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 是一種具有不成對電子之自由基，溶於甲醇後呈紫靛色，在 517 nm 下有吸光值；當 DPPH 被自由基 ( $R\cdot$ ) 或抗氧化劑 (AH) 還原時，會由紫靛色變成無色，吸光值會下降；藉此特性來判定樣品是否具有清除 DPPH 能力 (Brand *et al.*, 1995)。當 517 nm 吸光值越低，即表示抗氧化劑之供氫能力越強；常用  $IC_{50}$  (抑制 50% DPPH 自由基之濃度) 來表示抗氧化能力，其值愈低，清除能力越好。



(violet)                      (decolorize)

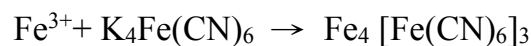
## 2. 螯合亞鐵離子能力

除自由基外，脂質氧化的起始反應亦可經由金屬離子的促氧化作用而發生；藉由芬頓反應 (fenton reaction)，只需少量的金屬離子存在，便會產生自由基，加速脂質氧化 (Halliwell *et al.*, 1995)。因此，具有螯合金離子能力之化合物，亦可避免金屬離子誘導脂質過氧化反應；在多種金屬離子中，鐵離子是最具影響力助氧化劑。本研究利用  $\text{Fe}^{2+}$  與菲囉嗪 (ferrozine) 作用，在 562 nm 下會呈色，進而獲知樣品對  $\text{Fe}^{2+}$  離子之螯合能力。若  $\text{Fe}^{2+}$  與試樣結合，ferrozine- $\text{Fe}^{2+}$  的生成即會減少，將會降低吸光值，由此藉以判斷試樣螯合亞鐵離子的能力，其吸光值愈低，表示試樣清螯合亞鐵離子的能力愈強 (Mohammad, 2008)。



## 3. 還原力測定

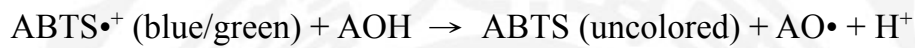
還原力測定主要是檢測樣品是否為電子的良好供應者，還原力強之物質除可與自由基反應外，亦可進一步還原氧化物，使之成為穩定的化合物。還原力測定是參考 Oyaizu (1986) 的方法，其原理是樣品溶液將赤血鹽 ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) 還原成黃血鹽 ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ )，黃血鹽再與  $\text{Fe}^{3+}$  作用，生成普魯士藍，於 700 nm 下測定吸光值，以檢測普魯士藍之生成量，當吸光值愈高，表示樣品還原力愈強。



## 4. 清除 ABTS 自由基能力

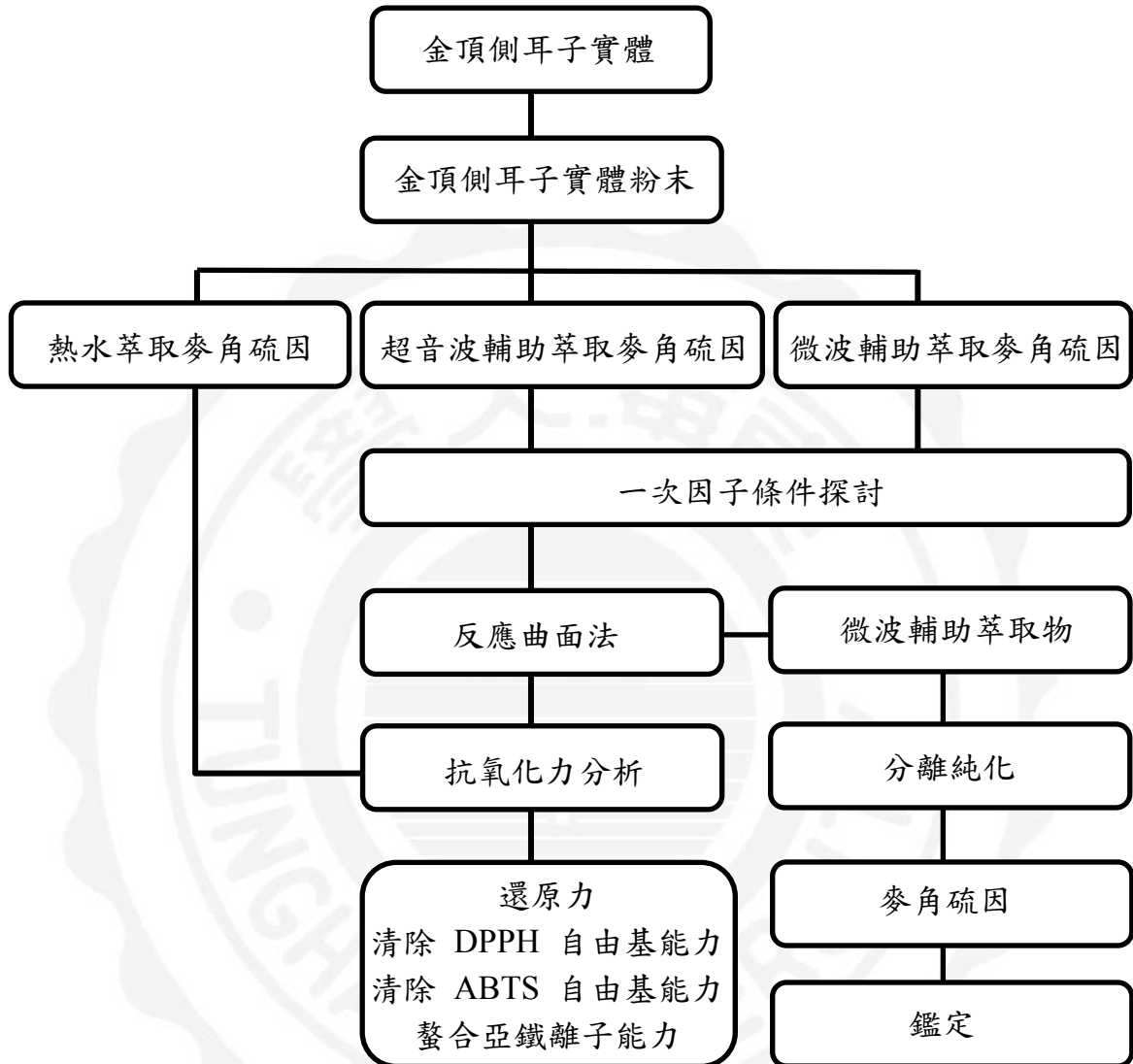
ABTS [2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)] 為一穩定

的自自由基，於 734 nm 下可測得吸光值；ABTS 自由基可溶於水及有機溶劑，且不受離子強度影響，故可用於親水及親油性之抗氧化力測定 (Awika *et al.*, 2003)，此法亦稱總抗氧化力 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)。主要原理為 ABTS 與過硫酸鉀 (potassium peroxodisulfate,  $K_2S_2O_8$ ) 反應後，會生成藍綠色  $ABTS^{\bullet+}$  自由基；當樣品含抗氧化成分，會與  $ABTS^{\bullet+}$  作用而使之褪色；故吸光值越低，表示樣品抗氧化能力越佳 (Gupta *et al.*, 2015)。





## 實驗架構



### 第三章 材料方法

#### 一、實驗材料

本研究試驗使用之金頂側耳子實體 (*Pleurotus citrinopileatus*) 購自帝品菇園。南投，台灣。

#### 二、實驗藥品

1. 麥角硫因標準品 (Ergothioneine) 購自 Cayman Chemical 公司，美國。
2. 醋酸銨 (Ammonium acetate) 購自 Panreac 公司，歐洲。
3. 乙腈 (Acetonitrile) 購自 J.T. Baker 公司，歐洲。
4. 甲醇 (Methanol) 購自 Macron 公司，美國。
5. Ferrozine 購自 Alfa Aesar 公司，美國。
6. 抗壞血酸 (Ascorbic acid)、無水碳酸鈉 (Sodium carbonate anhydrous)、三氯乙酸 (Trichloroacetic acid, TCA) 購自 Riedel 公司，美國。
7. 鐵氰化鉀 (Potassium ferricyanide, PFC) 購自 SHIMAKYU'S PURE CHEMICALS 公司，日本。
8. 氯化鐵 (Iron (III) chloride anhydrous) 購自 panreac 公司，歐洲。
9. 氯化亞鐵 (Iron (II) chloride tetrahydrate) 購自 Merck 公司，德國。
10. 偏磷酸 (Metaphosphoric acid) 購自關東化學株式會社，東京，日本。
11. 磷酸二氫鈉 (Sodium phosphate monobasic)、磷酸氫二鈉 (Disodium hydrogen phosphate)、酒石酸鉀鈉 (Potassium Sodium Tartrate) 購自 KATAYAMA CHEMICAL 公司，日本。
12. 丁基羥基苯甲醚 (Butylated hydroxyl anisole, BHA)、Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、沒食子酸 (Gallic acid)、生育酚 (Tocopherol)、2,2-二苯基-1-苦基苯肼 (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)、檸檬酸 (Citric acid)、ABTS 及 Trolox 購自 Sigma 公司，美國。

### 三、樣品製備

將新鮮的金頂側耳子實體置入 45°C 烘箱，烘 48 小時後，以磨粉機粉碎後過篩 (40 mesh)，即得金頂側耳子實體樣品粉末。

### 四、新式萃取方式之條件探討

#### (一) 微波輔助萃取一次一因子條件探討

採用義大利進口之 Milestone START D 微波設備進行微波輔助萃取實驗。實驗方法依據郭 (2015) 進行修飾，精秤適量金頂側耳子實體樣品粉末，加入蒸餾水於 250 mL 圓底萃取瓶中，進行微波輔助萃取一次一因子條件探討。直接升溫至指定溫度後進行萃取，萃取液於 4°C、12500 rpm 離心 15 分鐘，取上清液於 50°C 下減壓濃縮至一定量，再以蒸餾水定量至 250 mL，儲存於 -20°C 冰箱備用。欲探討因子及條件如下：

1. 功率：100、300、500、700、900 W
2. 時間：10、20、30、40、50 min
3. 固液比：1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 (g/mL)

#### (二) 超音波輔助萃取一次一因子條件探討

採用 ChromTech UC-10200BDT 超音波設備進行超音波輔助萃取實驗。精秤金頂側耳子實體樣品粉末，加入蒸餾水於 250 mL 三角錐瓶中，進行超音波輔助萃取一次一因子條件探討。萃取液於 4°C、12500 rpm 離心 15 分鐘，取上清液於 50°C 下減壓濃縮至一定量，再以蒸餾水定量至 250 mL，儲存於 -20°C 冰箱備用。欲探討因子及條件如下：

1. 頻率：40 kHz、60 kHz
2. 溫度：40、50、60、70°C
3. 時間：10、20、30、40、50 min

4. 固液比：1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 (g/mL)

5. 萃取功率：25、50、75、100、150、200 W

## 五、麥角硫因分析

經由微波及超音波輔助萃取後，以 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜過濾，再以高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 進行分析。並將不同濃度之麥角硫因 (ergothioneine) 標準品注入 HPLC 中由所得到的面積繪出檢量線，藉以計算出樣品中麥角硫因的含量。高效能液相層析儀包括 HITA HCI Chromaster 1110 泵浦，HITA HCI Chromaster 1410 UV detector 並連結數據處理之 Chromaster Sys 1。高效能液相層析條件根據 Dubost (2006) 進行修正：

1. 分離管柱：Inertsil HPLC  $\text{NH}_2$  COLUMN (5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250 mm)。
2. 注射量：20  $\mu\text{L}$
3. 移動相：乙腈: 5 mmol 醋酸胺=80 : 20 (v/v)
4. 流速：1 mL/min
5. 檢測波長: 254 nm

## 六、反應曲面法

### (一) 微波輔助萃取

#### 1. 實驗設計

由先前一次一因子之實驗結果，挑選出對麥角硫因萃取量有顯著影響之因子，並利用反應曲面法探討因子間的交互作用，找出最佳的萃取條件。一次一因子的實驗結果顯示攪拌速率並不影響萃取效果；因此，反應曲面法以功率、時間及固液比這三個因子進行三因子三階層之 Box - Behnken 設計，實驗組數共有 15 組，實驗設計如表一所示。

#### 2. 實驗結果分析

麥角硫因萃取條件依實驗設計設定之範圍進行，萃取後將萃取液離心

表一、金頂側耳麥角硫因之三因子三階方程式 Box-Behnken 設計  
 Table 1. 3-level-3-factor Box-Behnken design of ergothioneine in *Pleurotus citrinopileatus* (n=3)

Treatment	Coded level of factor		
	Power (W)	Time (min)	S/L ratio
1	0 (500)	-1 (20)	1 (1 : 40)
2	-1 (300)	-1 (20)	0 (1 : 30)
3	-1 (300)	0 (30)	1 (1 : 40)
4	0 (500)	1 (40)	1 (1 : 40)
5	1 (700)	0 (30)	1 (1 : 40)
6	1 (700)	1 (40)	0 (1 : 30)
7	0 (500)	-1 (20)	-1 (1 : 20)
8	-1 (300)	0 (30)	-1 (1 : 20)
9	1 (700)	-1 (20)	0 (1 : 30)
10	0 (500)	1 (40)	-1 (1 : 20)
11	-1 (300)	1 (40)	0 (1 : 30)
12	1 (700)	0 (30)	-1 (1 : 20)
13	0 (500)	0 (30)	0 (1 : 30)
14	0 (500)	0 (30)	0 (1 : 30)
15	0 (500)	0 (30)	0 (1 : 30)

、濃縮及定量，之後以 HPLC 進行分析。數據結果利用 STAGRAPHS 統計軟體分析可得一組二次方程式，並繪製成反應曲面圖、等高線圖及柏拉圖 (Pareto graph)。以下將簡述此三種結果圖之用途：

- (1) 反應曲面圖及等高線圖：透過不同顏色的表達，可輕易地了解實驗之最適與最佳萃取條件坐落何處。
- (2) 柏拉圖：藉由圖中之顯著線及長條圖顏色得知，何種效應對整體實驗有正顯著或負顯著之影響，藉此可對實驗設計之中心點進行調整。

## (二) 超音波輔助萃取

### 1. 實驗設計

由先前一次一因子之實驗結果，挑選出對麥角硫因萃取量有顯著影響之因子，並利用反應曲面法探討因子間的交互作用，找出最佳的萃取條件。因頻率只有兩條件需探討，且經過實驗結果顯示 60 kHz 萃取效果顯著大於 40 kHz，因此後續即固定萃取頻率為 60 kHz。反應曲面法以時間、固液比及萃取功率這三個因子進行三因子三階層之 Box - Behnken 設計，實驗組數共有 15 組，實驗設計如表二所示。

### 2. 實驗結果分析

結果分析方法與微波輔助萃取之實驗結果分析所述同，結果圖亦包含反應曲面圖、等高線圖及柏拉圖。

## 七、不同萃取方式之抗氧化能力評估

### (一) 金頂側耳子實體萃取物製備

#### 1. 熱水萃取物

秤取金頂側耳粉末 6.67 g，置於 250 mL 錐形瓶中，加入 200 mL 蒸餾水，於 100°C 下加熱萃取 2 小時，再以 Whatman No.1 濾紙抽氣過濾，離心後將濾液收集至濃縮瓶中，於 50°C 下減壓濃縮至一定量，再以蒸餾水定量至

表二、金頂側耳麥角硫因之三因子三階方程式 Box-Behnken 設計  
 Table 2. 3-level-3-factor Box-Behnken design of ergothioneine in *Pleurotus citrinopileatus* (n=3)

Treatment	Coded level of factor		
	Time (min)	Power (W)	S/L ratio
1	-1 (30)	-1 (50)	0 (1 : 30)
2	-1 (30)	0 (75)	1 (1 : 40)
3	1 (50)	0 (75)	1 (1 : 40)
4	0 (40)	1 (100)	-1 (1 : 20)
5	0 (40)	-1 (50)	-1 (1 : 20)
6	1 (50)	0 (75)	-1 (1 : 20)
7	-1 (30)	0 (75)	-1 (1 : 20)
8	1 (50)	1 (100)	0 (1 : 30)
9	0 (40)	1 (100)	1 (1 : 40)
10	0 (40)	-1 (50)	1 (1 : 40)
11	-1 (30)	1 (100)	0 (1 : 30)
12	1 (50)	-1 (50)	0 (1 : 30)
13	0 (40)	0 (75)	0 (1 : 30)
14	0 (40)	0 (75)	0 (1 : 30)
15	0 (40)	0 (75)	0 (1 : 30)

250 mL，所得萃取物冷凍乾燥後，保存於 -20°C 備用。

## 2. 微波輔助萃取物

秤取金頂側耳粉末 6.67 g，置於 250 mL 萃取瓶中，加入 200 mL 蒸餾水，以 552 W 萃取 29 分鐘，再以 Whatman No.1 濾紙抽氣過濾，離心收集濾液至濃縮瓶中，於 50°C 下減壓濃縮至一定量，再以蒸餾水定量至 250 mL，所得萃取物冷凍乾燥後，保存於 -20°C 備用。

## 3. 超音波輔助萃取物

秤取金頂側耳粉末 6.67 g，置於 250 mL 錐形瓶中，加入 200 mL 蒸餾水，以 74 W 萃取 47 分鐘，再以 Whatman No.1 濾紙抽氣過濾，離心收集濾液至濃縮瓶中，於 50°C 下減壓濃縮至一定量，再以蒸餾水定量至 250 mL，所得萃取物冷凍乾燥後，保存於 -20°C 備用。

## (二) 抗氧化力檢測

### 1. 清除 DPPH 自由基能力 (Hyun, 2009)

#### (1) DPPH 自由基清除能力

取不同濃度 (20、10、5、1、0.5、0.1 mg/mL) 之樣品萃取物 1000  $\mu$ L，分別加入 250  $\mu$ L DPPH 溶液，對照組則取 1000  $\mu$ L 甲醇加入 250  $\mu$ L DPPH 溶液；避光反應 30 分鐘後，混合液以分光光度計 (Hitachi U-2001 Spectrophotometer)，於 517 nm 下測定其吸光值；當吸光值愈低，表示樣品清除 DPPH 自由基之能力愈強。EC<sub>50</sub> 值 (mg/mL) 為清除 50% DPPH 自由基之有效濃度，由線性迴歸以內插法計算而得；另以抗壞血酸 (ascorbic acid)、丁基羥基甲氧苯 (butylated hydroxyanisole, BHA) 及  $\alpha$ -生育酚 ( $\alpha$ -tocopherol) 作為樣品的對照組。DPPH 自由基清除率之公式如下：

$$\text{Scavenging effect (\%)} = [1 - (A_{517\text{ nm sample}}) / (A_{517\text{ nm control}})] \times 100\%$$



## 2. 螯合亞鐵離子能力 (Dinis *et al.*, 1994)

### (1) 實驗步驟

取 250  $\mu\text{L}$  不同濃度 (20、10、5、1、0.5、0.1 mg/mL) 之樣品萃取物 250  $\mu\text{L}$  與 925  $\mu\text{L}$  甲醇及 25  $\mu\text{L}$  2 mM 氯化亞鐵溶液均勻混合，反應 30 秒後，加入 50  $\mu\text{L}$  5 mM ferrozine，室溫下避光反應 10 分鐘，測定其在 562 nm 下之吸光值。EC<sub>50</sub> 值為螯合 50% 亞鐵離子之有效濃度，由線性迴歸以內插法計算而得；另以檸檬酸 (citric acid) 和乙二胺四乙酸 (EDTA) 樣品的對照組。其計算公式如下：

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = [1 - (A_{562 \text{ nm sample}}) / (A_{562 \text{ nm control}})] \times 100\%$$

## 3. 還原力之測定 (Oyaizu *et al.*, 1988)

### (1) 實驗步驟

取不同濃度 (20、10、5、1、0.5、0.1 mg/mL) 之樣品萃取物 75  $\mu\text{L}$ ，加入 75  $\mu\text{L}$  0.2 M pH 6.6 磷酸鹽緩衝液及 75  $\mu\text{L}$  1% 赤血鹽 (potassium ferricyanide) 溶液，混勻後於 50°C 水浴下反應 20 分鐘；冷卻後加入 75  $\mu\text{L}$  10% TCA 溶液、300  $\mu\text{L}$  去離子水及 300  $\mu\text{L}$  0.1% 氯化鐵溶液，混合反應 10 分鐘後，以分光光度計在 700 nm 下測定其吸光值；當吸光值愈高，表示樣品之還原力愈強。EC<sub>50</sub> 值 (mg/mL) 為吸光值 0.5 之有效濃度，由線性迴歸以內插法計算而得；另以抗壞血酸、丁基羥基甲氧苯及  $\alpha$ -生育酚作為樣品的對照組。

## 4. 清除ABTS 自由基能力 (Arts *et al.*, 2003)

### (1) 實驗步驟

取不同濃度之萃取物 (20、10、5、1、0.5、0.1 mg/mL) 50  $\mu\text{L}$ ，加入 1 mL ABTS 溶液，震盪混勻後，靜置暗室 10 分鐘，以分光光度計測定其在 734 nm 下之吸光值。EC<sub>50</sub> 值 (mg/mL) 為清除 50% ABTS 自由基之有效濃度，由

線性迴歸以內插法計算而得；另以 Trolox 作為標準品樣品的對照組。其計算公式如下：

$$\text{Scavenging effect (\%)} = [1 - (A_{734 \text{ nm sample}}) / (A_{734 \text{ nm control}})] \times 100\%$$

## 八、麥角硫因純化方法

將金頂側耳微波輔助萃取液，先利用 1  $\mu\text{m}$  之過濾膜 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 去除雜質，再利用切向流過濾 (Tangential Flow Filtration, TFF) 收集萃取液之小分子濾液，並於 50°C 下減壓濃縮至 100 毫升，最後利用 Intersil™ Diol COLUMN (20  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 搭配分液收集器 (Fraction collector)，收集區分液 (1.5 mL  $\times$  22 管) 並利用上述麥角硫因分析方法測定區分液是否含麥角硫因，以下為純化條件：

1. 分離管柱: Intersil™ Diol COLUMN (20  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )
2. 注射量: 1 mL
3. 檢測波長: 254 nm
4. 移動相: 乙腈 : 5 mmol/L 醋酸胺 = 80 : 20
5. 流速 : 3.0 mL/min

純度及回收率計算公式：

1. 純度：以高效能液相層析圖譜中麥角硫因面積與全部波峰面積之比值來計算
2. 回收率：以微波輔助萃取液內之麥角硫因總量除以各純化步驟所得之麥角硫因含量來計算

## 九、麥角硫因鑑定方法

1. 低解析質譜儀器型號：Finnigan LCQ ion-trap mass spectrometer  
(Thermo Finnigan Corporation, San Jose, CA)  
(1) 游離源：電灑法 (Electrospray ionization, ESI)

- (2) 掃描質量範圍：50-1000 m/z
- 2. 高解析質譜儀器型號：LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany)
  - (1) 游離源：電灑法 (Electrospray ionization, ESI)
  - (2) 掃描質量範圍：229.9652~230.2272m/z

## 十、統計分析

實驗數據皆以 mean  $\pm$  standard deviation (SD) 表示，使用 Statistical Analysis System (SAS Institute, Inc., 2000) 軟體進行統計分析，並以 ANOVA 程式做變異分析，鄧肯氏多變域試驗法  $p < 0.05$  比較平均值之顯著差異。反應曲面法之設計與數據處理軟體為 STAGRAPHICS Version 16.1.11 (*StatPoint technologies, Inc.*)。

## 第四章 結果與討論

### 一、金頂側耳子實體粉末麥角硫因萃取條件之探討

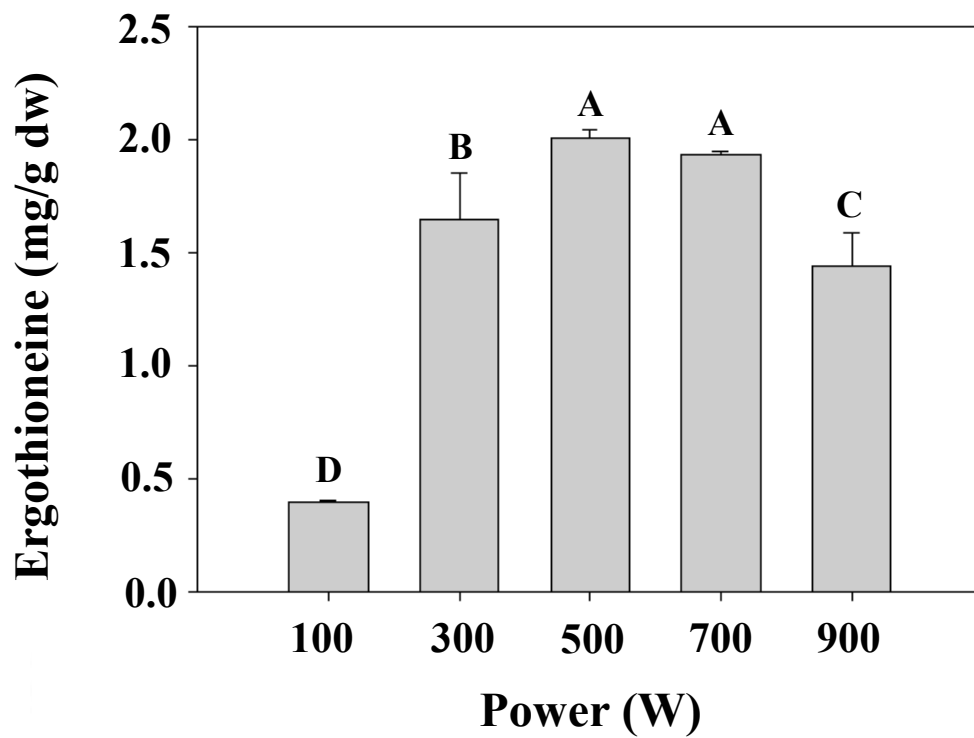
在過去的十年中，隨著綠色工業的興起，各種新穎的萃取技術已陸續被開發應用，這些技術具有縮短萃取時間、減少有機溶劑消耗、降低製備成本及可控制萃取條件等優點 (Eskilsson & Björklund, 2000)。微波及超音波輔助萃取技術，近年來廣泛應用於食品、藥用植物及中草藥等生物活性物質的萃取。本研究擬就此兩種技術進行萃取條件之探討：

#### (一) 微波輔助萃取一次一因子條件探討

微波輔助萃取效率與條件參數的選擇有極大的關係 (Azmir *et al.*, 2013)，本研究將探討萃取功率、時間及固液比等常見因子對微波輔助萃取的影響：

##### 1. 萃取功率

功率條件設定取決於溶劑體積及溶劑特性，選擇適當之功率，可使萃取時間達最小化。Mandal 等人 (2010) 曾指出，當微波功率增加，可縮短萃取時間，但過高功率可能導致溫度升高，進而造成目標萃取物破壞及降解。本試驗以蒸餾水作為萃取溶劑，萃取時間固定為 40 分鐘、固液比為 1:40 (g/mL)，探討不同微波功率 (100、300、500、700、900 W) 對金頂側耳子實體粉末麥角硫因萃取量的影響。由圖一可獲知萃取功率為 100 W 時，萃取量僅為 0.40 mg/g dw (表三)；300 W 時萃取量逐漸升高，當功率為 500 W 可萃取出最高含量之麥角硫因 (2.01 mg/g dw)。但功率升至 700 W 時，麥角硫因萃取量與 500 W 並無顯著差異，到 900 W 時萃取量反而下降至 1.45 (mg/g dw)。Michael 等人 (2017) 指出麥角硫因有硫醇和硫酮兩種互變異構體，具有較高的熱穩定性，因此能耐較高的功率萃取，其萃取量會比低功率效果來的好；但過高功率可能導致溫度升高，進而造成目標萃取物破壞及降解 (Mandal *et al.*, 2010)。此外，



圖一、微波功率對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響  
Figure 1. Effect of microwave power on content of ergothioneine from  
*Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder  
Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)

表三、微波功率對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取含量的影響

Table 3. Effect of microwave power on content of ergothioneine from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder.

Power (W)	Content (mg/g dw) <sup>a</sup>
	Ergothioneine
100	0.40 ± 0.01 D
300	1.65 ± 0.20 B
500	2.01 ± 0.03 A
700	1.93 ± 0.01 A
900	1.45 ± 0.14 C

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Means with different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ )

Microwave-assisted extraction experimental conditions:

Time: 40 min

Solid/Liquid ratio: 1:40 (g/mL)

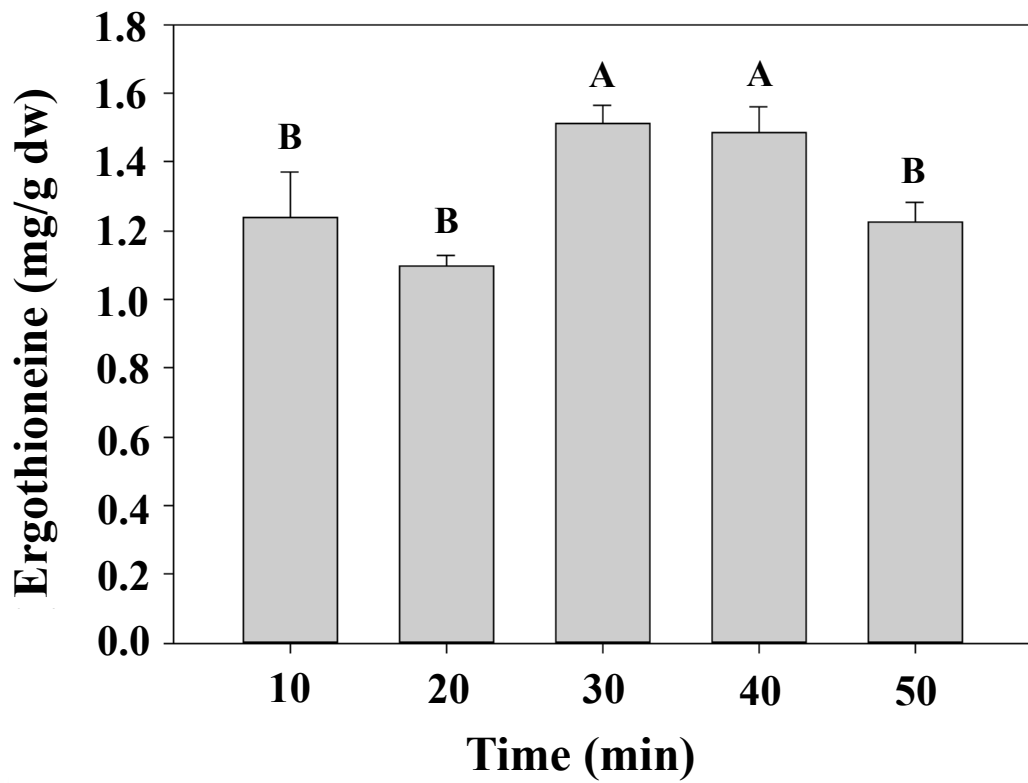
500 W 與 700 W 麥角硫因之萃取量並無顯著差異，然為了節省能源，後續以功率 500 W 作為萃取之條件。

## 2. 萃取時間

當萃取時間不足，便無法將目標物完整萃取出來，但若萃取時間過長，對熱敏感之萃取物則易造成降解；另萃取溶劑的介電性質亦會影響整體萃取率 (Mandal, Mohan & Hemalatha, 2007)。本試驗以蒸餾水作為萃取溶劑，萃取率固定為 500 W、固液比為 1:40 (g/mL)，探討不同萃取時間 (10、20、30、40、50 min) 對金頂側耳子實體粉末麥角硫因萃取量的影響。由圖二可知當萃取時間為 10 及 20 分鐘時，麥角硫因萃取量較低，分別為 1.24 及 1.10 mg/g dw，但並無顯著差異；當萃取時間提升至 30 分鐘時，可獲得最高萃取量為 1.51 mg/g dw (表四)；當萃取時間增加為 40 分鐘時，麥角硫因萃取量與 30 分鐘並無顯著差異；若當萃取時間增加為 50 分鐘時，萃取量則反而下降為 1.23 mg/g dw。後續為了提升效率及節省時間，以萃取時間 30 分鐘作為後續實驗條件。

## 3. 固液比

樣品與溶劑之固液比亦會影響目標成分的萃取效率，因在一定限度內，不同的比例可能導致較高的濃度差異，且會影響溶質的質量傳遞和溶解程度 (Yank, 2017)。Cheng (2017) 及 Xie (2014) 等人研究指出，利用微波輔助萃取龍膽草之多醣及自野百合中萃取黃酮類化合物時，當固液比為 1:20 可獲得最大的萃取量，而後隨著固液比的升高萃取率逐漸降低。本試驗以蒸餾水為萃取溶劑，功率固定為 500 W、時間 30 分鐘，探討固液比 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 (g/mL) 對金頂側耳子實體粉末麥角硫因萃取量的影響。圖三結果顯示，當固液比為 1:10 及 1:20 時，其萃取量分別為 1.43 和 1.47 mg/g dw，兩者並無顯著差異 (表五)；當固液比為 1:30 時，可獲得最高萃取量為 1.99 mg/g dw；但隨著固液比的升高(1:40 及 1:50)，麥角硫因萃取量反而



圖二、微波萃取時間對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響

Figure 2. Effect of extracted time on content of ergothioneine from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

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



表四、微波萃取時間對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響  
 Table 4. Effect of extracted time on content of ergothioneine from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

Time (min)	Content (mg/g dw) <sup>a</sup>
	Ergothioneine
10	1.24 ± 0.13 B
20	1.10 ± 0.03 B
30	1.51 ± 0.06 A
40	1.48 ± 0.08 A
50	1.23 ± 0.06 B

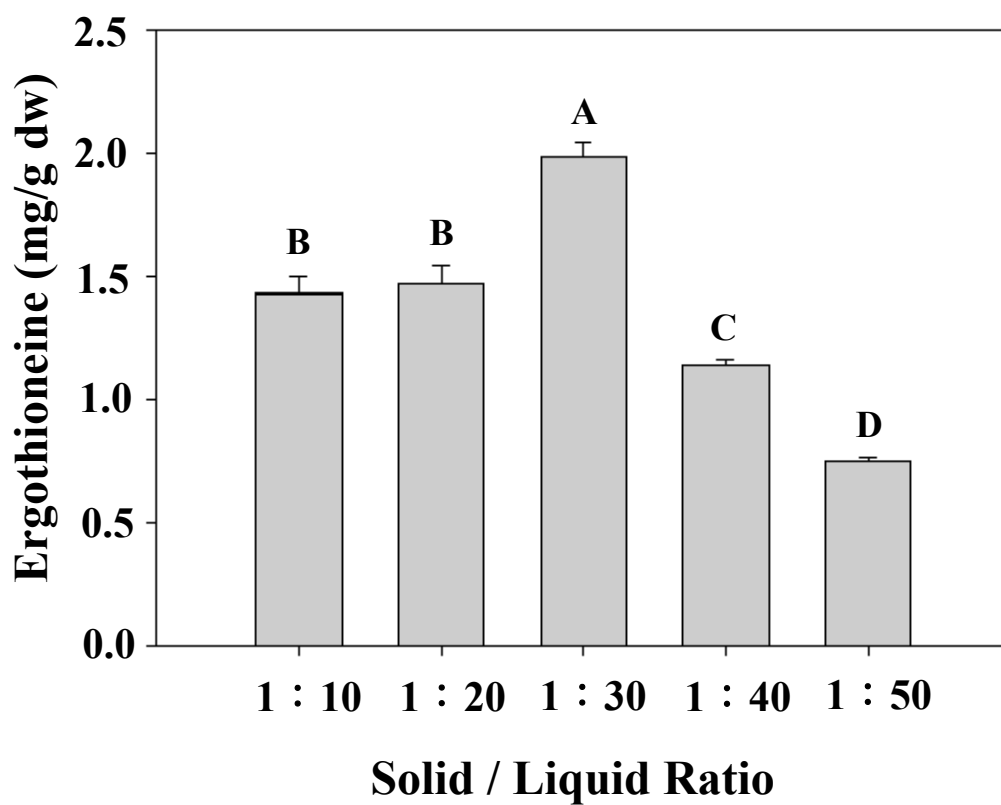
<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Means with different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ )

Microwave-assisted extraction experimental conditions:

Microwave power: 500 W

Solid/Liquid ratio: 1:40 (g/mL)



圖三、固液比對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響  
 Figure 3. Effect of solid / liquid ratio on content of ergothioneine from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder  
 Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)

表五、固液比對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響

Table 5. Effect of solid / liquid ratio on content of ergothioneine from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

Solid / Liquid ratio	Content (mg/g dw) <sup>a</sup>
	Ergothioneine
1 : 10	1.43 ± 0.07 B
1 : 20	1.47 ± 0.07 B
1 : 30	1.99 ± 0.05 A
1 : 40	1.14 ± 0.02 C
1 : 50	0.75 ± 0.02 D

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Means with different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ )

Microwave-assisted extraction experimental conditions:

Microwave power: 500 W

Time: 30 min

逐漸降低。後續實驗將以固液比 1 : 30 作為萃取條件。

## (二) 以反應曲面法探討微波輔助萃取麥角硫因之最適化條件

若僅探討一次一因子實驗設計，則無法解決因子間交互作用之影響，因此，本試驗以反應曲面法探討微波輔助萃取金頂側耳子實體粉末之麥角硫因最適化條件。本試驗採用 Box-Behnken design (BBD) 三因子三階層設計方法，依一次一因子條件探討所得到之萃取條件，來設計適合的實驗範圍。

本試驗以萃取功率、時間及固液比三因子為獨立變數，試驗範圍分別為 300~700 W、20~40 分鐘及 1 : 20~1 : 40，如表六所示。另利用 BBD 進行實驗設計，可得 15 組不同的萃取條件組合，如表七所示，其中最後三組為連續三個重複中心點。將這 15 個實驗組依照實驗設計之組合進行萃取，並分析各實驗組之麥角硫因萃取量，實驗結果如表七所示。由表中可看出當萃取功率較低或萃取時間較短時，多數麥角硫因萃取量皆不高；連續重複中心點之萃取量為 1.812~1.978 mg/g dw，而實驗組 15 之萃取條件，可獲得最高的麥角硫因萃取量。

將 15 組萃取量結果輸入 STATGRAPHICS 統計軟體進行分析，可得到一組二次回歸方程式如下，而其個別參數值如表八所示：

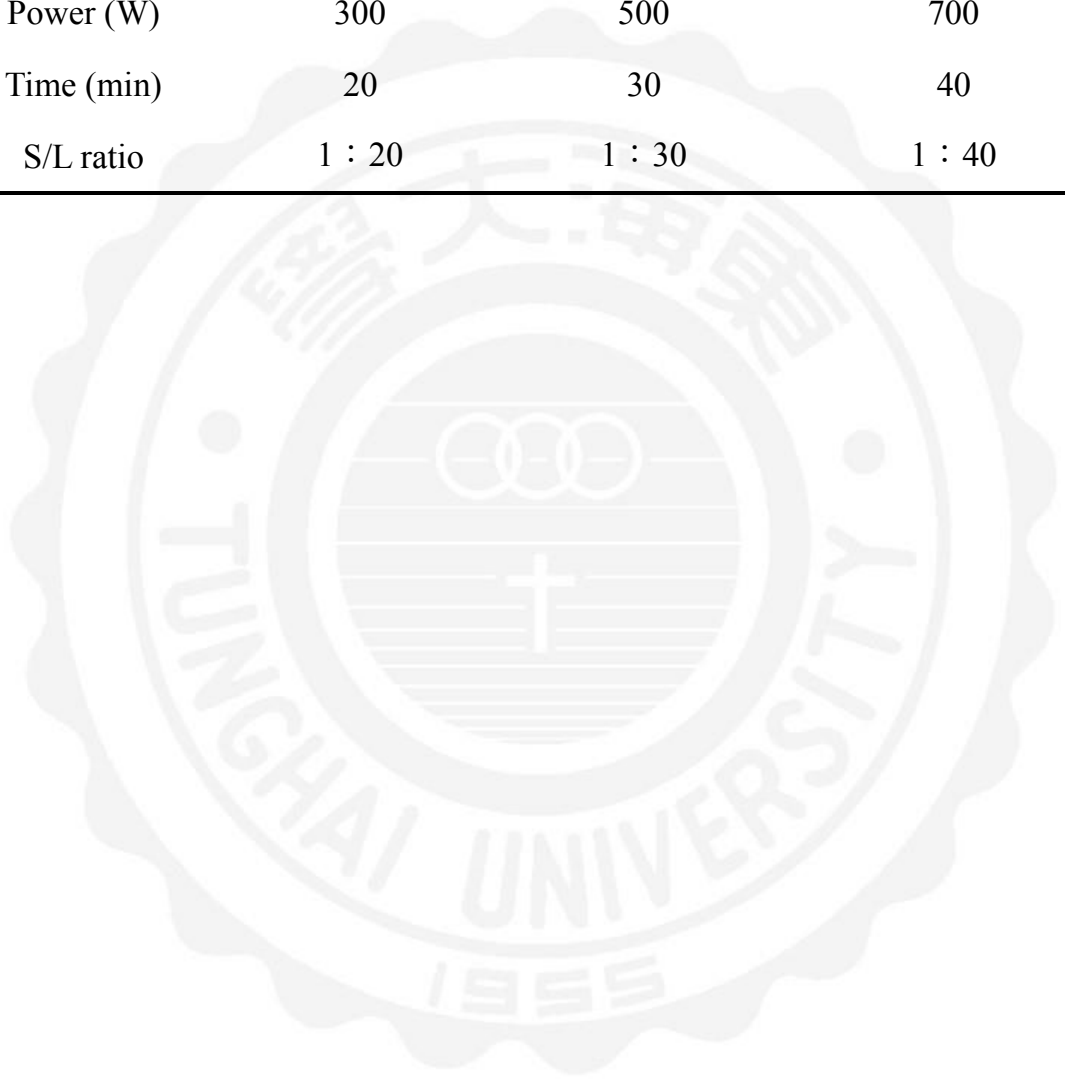
$$Y = -1.58598 + 0.00284521 \times \text{Power} + 0.0769375 \times \text{Time} + 0.102212 \times \text{S/L ratio} - 0.00000340833 \times \text{Power}^2 - 0.000007875 \times \text{Power} \times \text{Time} + 0.00003675 \times \text{Power} \times \text{S/L ratio} - 0.000755833 \times \text{Time}^2 - 0.0009125 \times \text{Time} \times \text{S/L ratio} - 0.00153333 \times \text{S/L ratio}^2$$

此外，此統計軟體亦可得到變異數分析表 (ANOVA) (表九)，可得知功率、時間及固液比三變數對於麥角硫因萃取量的影響，其是以均方及實驗誤差的估計值來進行比較，當  $P$  值小於 0.05 表示在統計上具有顯著性。由表九可得知，因子間沒有一個效應是顯著的 ( $p < 0.05$ )；R-square 值為 76.4877%，表示上述之回歸方程式與反應曲面實驗結果之相關性佳，亦代表藉由此實驗數據建構的數

表六、金頂側耳麥角硫因三因子三階層 Box-Behnken 設計萃取條件反應參數  
實驗值之範圍

Table 6. The reaction parameters experiment range of 3-level-3-factor  
Box-Behnken design (BBD) of ergothioneine from *Pleurotus citrinopileatus*

Factor	Coded level of factor		
	-1	0	1
Power (W)	300	500	700
Time (min)	20	30	40
S/L ratio	1 : 20	1 : 30	1 : 40



表七、金頂側耳麥角硫因之三因子三階層 Box-Behnken 設計與萃取量 (Y)  
 Table 7. 3-level-3-factor Box-Behnken design (BBD) and the extraction yield (Y)  
 of ergothioneine in *Pleurotus citrinopileatus* (n=3)

Treatment	Coded level of factor			Y (mg/d dw) extraction yield of ergothioneine
	Power (W)	Time (min)	S/L ratio	
1	0 (500)	-1 (20)	1 (1 : 40)	1.820
2	-1 (300)	-1 (20)	0 (1 : 30)	1.530
3	-1 (300)	0 (30)	1 (1 : 40)	1.551
4	0 (500)	1 (40)	1 (1 : 40)	1.625
5	1 (700)	0 (30)	1 (1 : 40)	1.658
6	1 (700)	1 (40)	0 (1 : 30)	1.836
7	0 (500)	-1 (20)	-1 (1 : 20)	1.556
8	-1 (300)	0 (30)	-1 (1 : 20)	1.731
9	1 (700)	-1 (20)	0 (1 : 30)	1.844
10	0 (500)	1 (40)	-1 (1 : 20)	1.726
11	-1 (300)	1 (40)	0 (1 : 30)	1.585
12	1 (700)	0 (30)	-1 (1 : 20)	1.544
13	0 (500)	0 (30)	0 (1 : 30)	1.942
14	0 (500)	0 (30)	0 (1 : 30)	1.812
15	0 (500)	0 (30)	0 (1 : 30)	1.978

表八、微波輔助萃取金頂側耳麥角硫因反應曲面之二次多項式與迴歸係數分析

Table 8. Second-order model equations for the response surfaces fitted to the experimental data, as a function of microwave assisted extraction of ergothioneine in *Pleurotus citrinopileatus* and the analysis of regression

Regression coefficient for ergothioneine	
Coefficient	Estimate
constant	-1.58598
A:Power	0.00284521
B:Time	0.0769375
C:S/L ratio	0.102212
AA	-0.00000340833
AB	-0.000007875
AC	0.00003675
BB	-0.000755833
BC	-0.0009125
CC	-0.00153333

The equation of the fitted model is

$$Y = -1.58598 + 0.00284521 \times \text{Power} + 0.0769375 \times \text{Time} + 0.102212 \times \text{S/L ratio} - 0.00000340833 \times \text{Power}^2 - 0.000007875 \times \text{Power} \times \text{Time} + 0.00003675 \times \text{Power} \times \text{S/L ratio} - 0.000755833 \times \text{Time}^2 - 0.0009125 \times \text{Time} \times \text{S/L ratio} - 0.00153333 \times \text{S/L ratio}^2$$

表九、微波輔助萃取金頂側耳麥角硫因相關因子之變異數分析

Table 9. Analysis of variance for factors related to microwave-assisted extraction of ergothioneine in *Pleurotus citrinopileatus*

Source	Sum of Squares	Degree of freedom	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A: Power	0.0294031	1	0.0294031	1.97	0.2190
B: Time	0.0000605	1	0.0000605	0.00	0.9516
C:S/L ratio	0.00117613	1	0.00117613	0.08	0.7899
AA	0.0686281	1	0.0686281	4.61	0.0846
AB	0.00099225	1	0.00099225	0.07	0.8066
AC	0.021609	1	0.021609	1.45	0.2823
BB	0.0210936	1	0.0210936	1.42	0.2874
BC	0.0333062	1	0.0333062	2.24	0.1950
CC	0.0868103	1	0.0868103	5.83	0.0605
Total error	0.0744569	5	0.0148914		
Total (corr.)	0.316672	14			

R-squared = 76.4877 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 34.1655 percent

Standard Error of Est. = 0.12203

Mean absolute error = 0.0637889

Durbin-Watson statistic = 1.37857 (P=0.0807)

Lag 1 residual autocorrelation = 0.27368

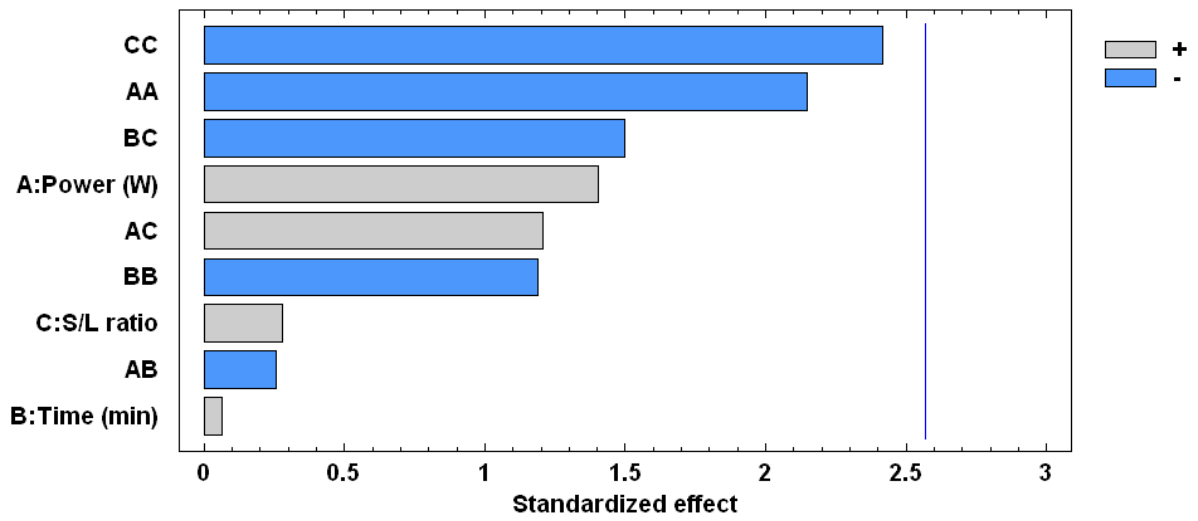


學模型是合理且有意義的，可適切地描述反應曲面法之結果。另一種次要效應分析圖又稱為柏拉圖 (Pareto chart)，代表各因子對麥角硫因萃取量影響的效應 (圖四)，由圖可知無任何因子之效應超過顯著線，表示沒有因子對麥角硫因萃取量有明顯的影響；此分析圖亦顯示功率 (A)、時間 (B)、固液比 (C) 之一次項及功率和固液比之交互項 (AC) 對麥角硫因萃取量會有正向影響，而其餘之二次項及交互作用項則對麥角硫因萃取量為負向影響。

藉由表九之二次方程式，分別固定其中一變數，再以其餘兩變數繪製一系列的反應曲面圖與等高線圖，藉由這些結果圖可了解各因子對於麥角硫因萃取量之間的關係。圖五為固液比在 1:30 的條件下，萃取功率與時間對麥角硫因萃取量的影響，麥角硫因之萃取量會隨著功率提高而增加，而當功率接近 700 W 時，萃取量會逐漸減少；萃取時間則在 28~32 分鐘間，會有最高萃取量。圖六為時間固定在 30 分鐘條件下，萃取功率與固液比對麥角硫因萃取量的影響，由圖可看出固液比在 1:28~1:32 之間與功率在 500~600W 時，有最高萃取量；但當固液比大於 1:32 之後，不論於何種萃取功率下，麥角硫因之萃取量皆呈現下降趨勢。圖七為萃取功率固定在 500 W 條件下，時間與固液比對於麥角硫因萃取量的影響，結果顯示當萃取時間介於 28~32 分鐘與固液比位於 1:28~1:32 時，會有最高的萃取量；當固液比越大，其萃取量亦跟著下降。Chan 等人 (2011) 研究指出，微波輔助萃取固液比之選擇，與目標物的溶解度及溶劑的滲透性、與樣品的相互作用及其介電常數有關。

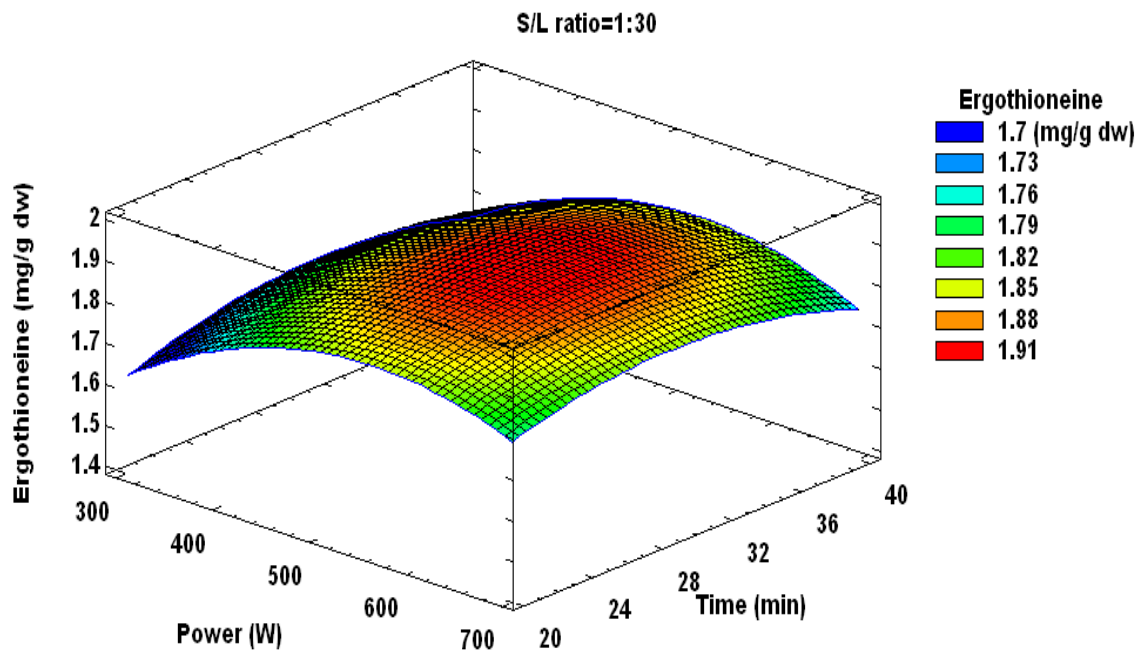
表十顯示微波輔助萃取之最適萃取條件，經調整後功率為 552 W、時間為 29 分鐘及固液比為 1:31，麥角硫因預測之最大萃取量為 1.92 mg/g dw；以此條件進行四重複試驗，來驗證實際萃取量與預測值有無差異，以確定本試驗之數學模型之有效性。結果顯示，麥角硫因之實際萃取量為 1.92 mg/g dw (表十一)，將此數據與預測值經由 SAS 統計軟體以 t Tests 法進行分析。表十一結果顯示， $P>0.05$  且明顯大於第一型錯誤 ( $H_0$ ) 機率，因此，沒有足夠信

Standardized Pareto Chart for Ergothioneine

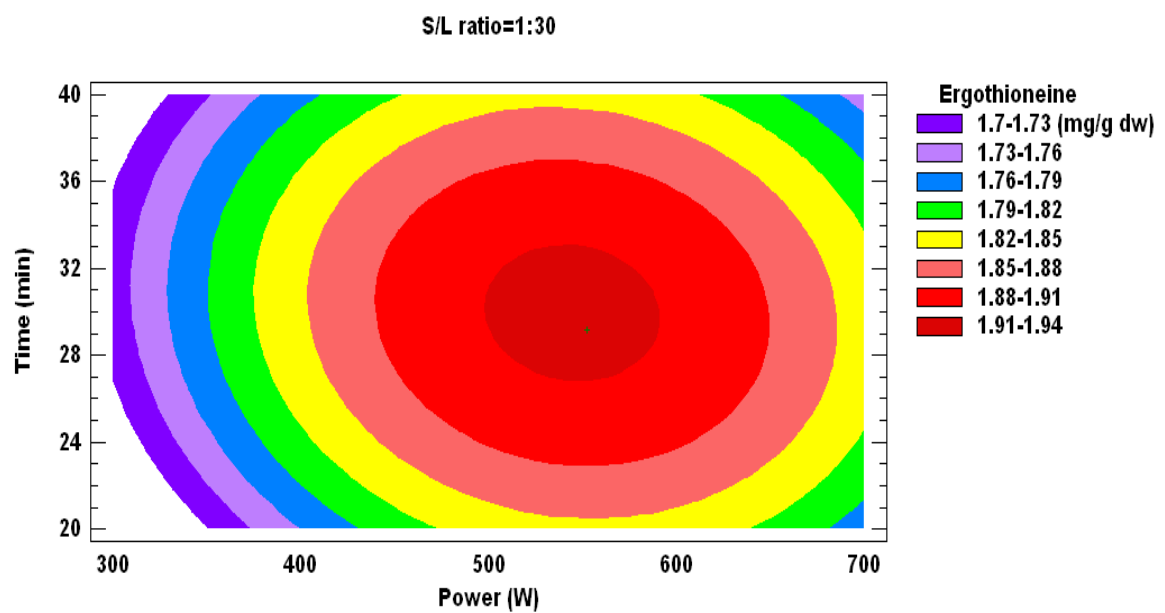


圖四、柏拉圖—微波輔助萃取條件對金頂側耳麥角硫因萃取量的主要效應

Table 4. Pareto chart of main effects for microwave-assisted extraction conditions of ergothioneine content in *Pleurotus citrinopileatus*



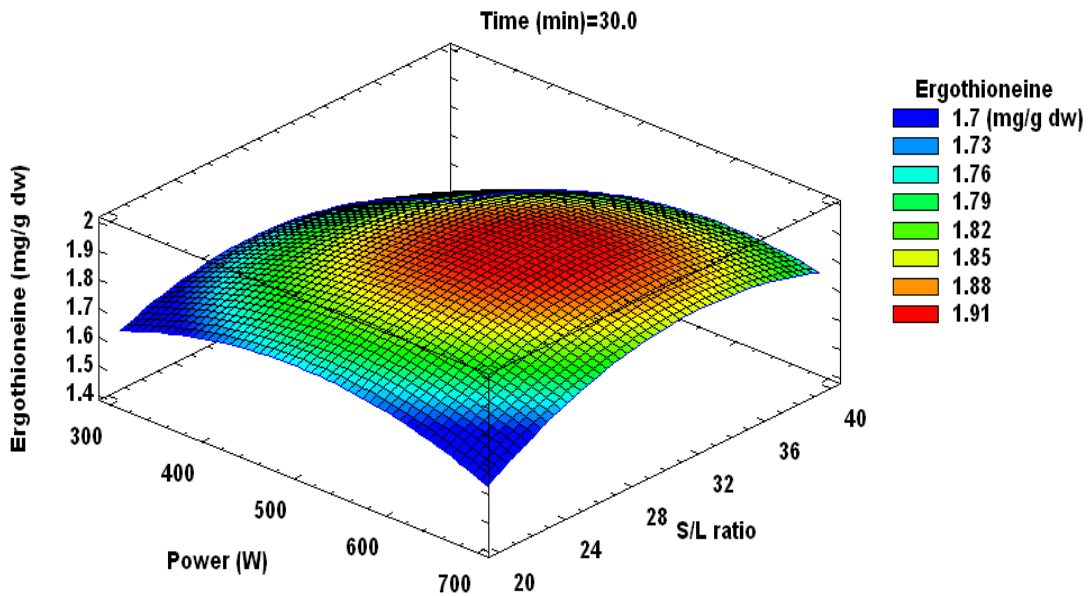
(a) Surface plot



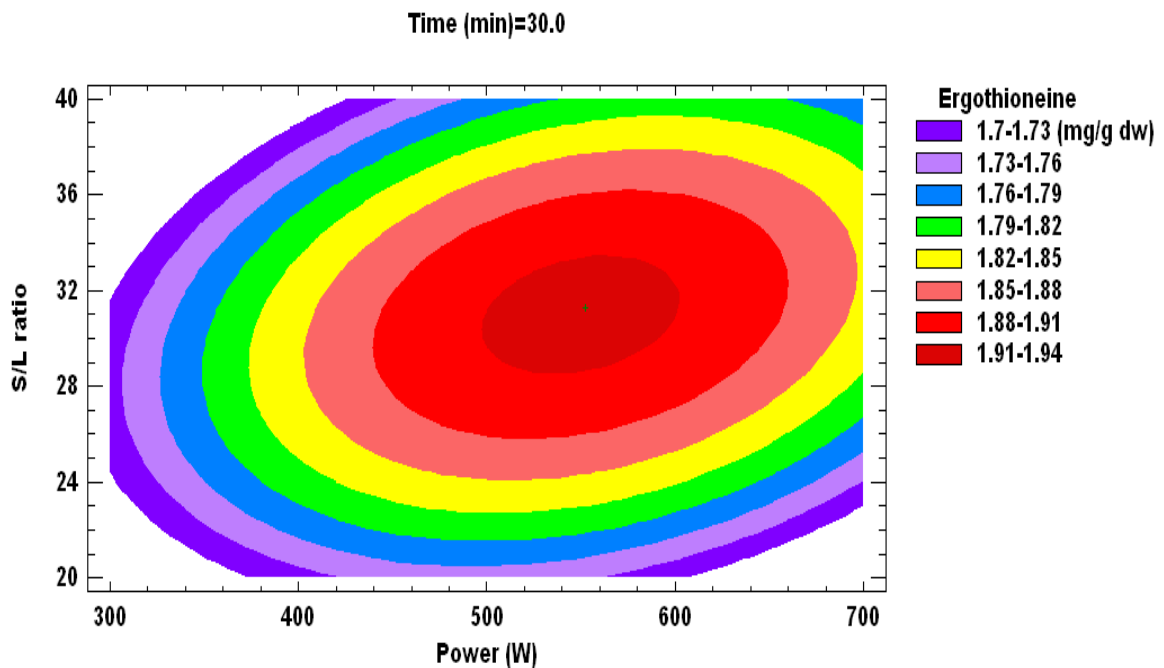
(b) Contour plot

圖五、微波輔助萃取金頂側耳之萃取功率與時間對麥角硫因產量的反應曲面圖 (a) 與等高線圖 (b)

Figure 5. Surface plot (a) and contour plot (b) of extraction power and time on ergothioneine in *Pleurotus citrinopileatus*



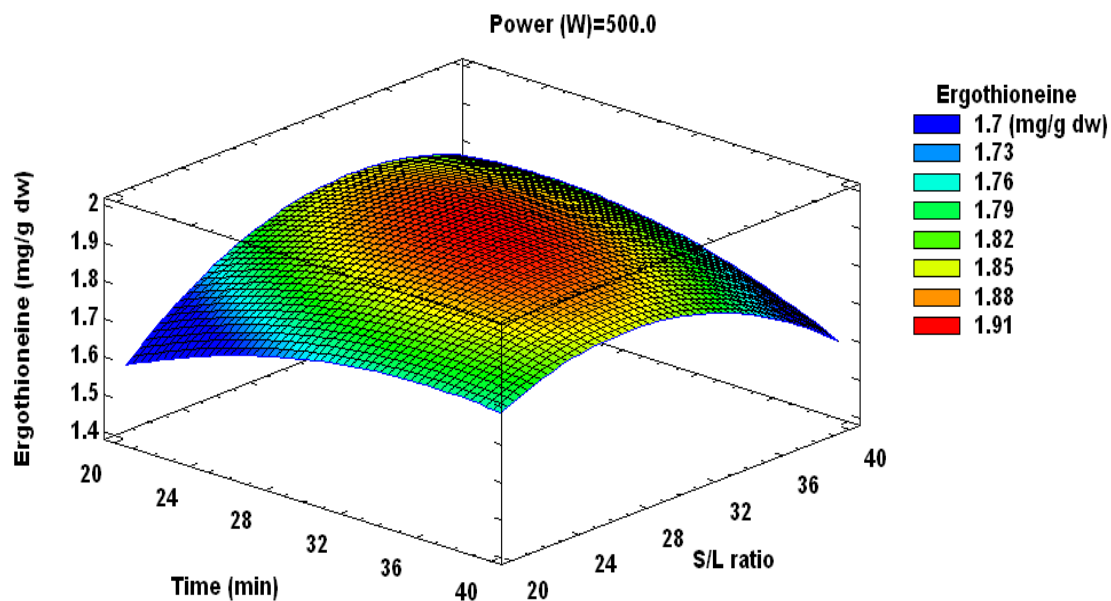
(a) Surface plot



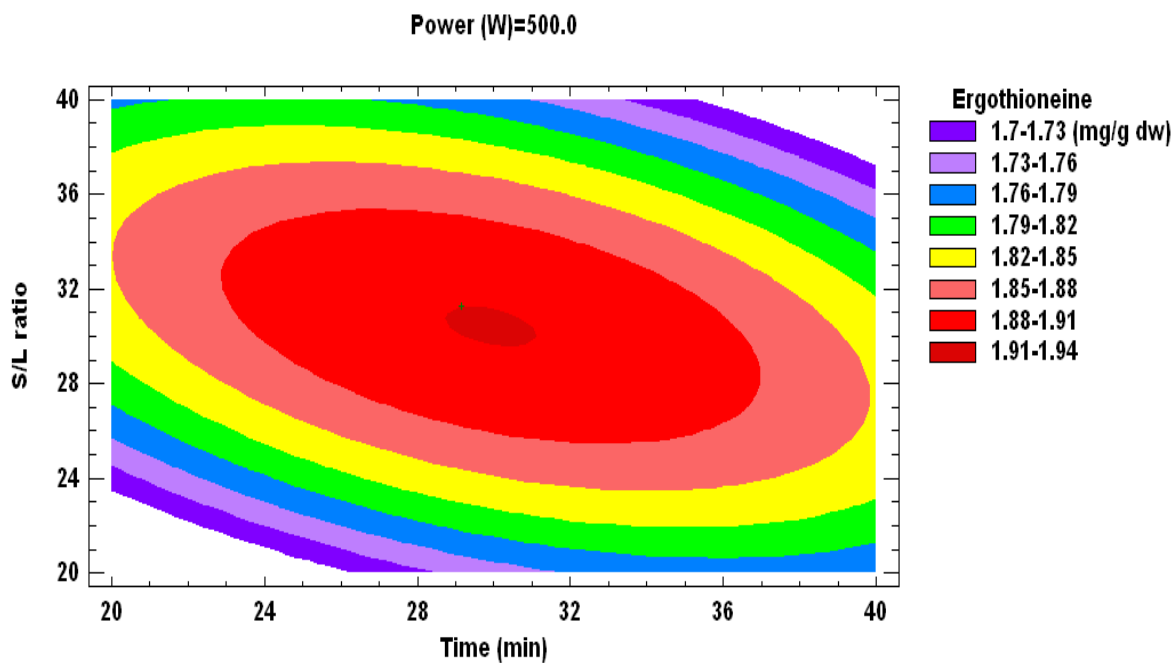
(b) Contour plot

圖六、微波輔助萃取金頂側耳之萃取功率與固液比對麥角硫因產量的反應曲面圖 (a) 與等高線圖 (b)

Figure 6. Surface plot (a) and contour plot (b) of extraction power and S/L ratio on ergothioneine in *Pleurotus citrinopileatus*



(a) Surface plot



(b) Contour plot

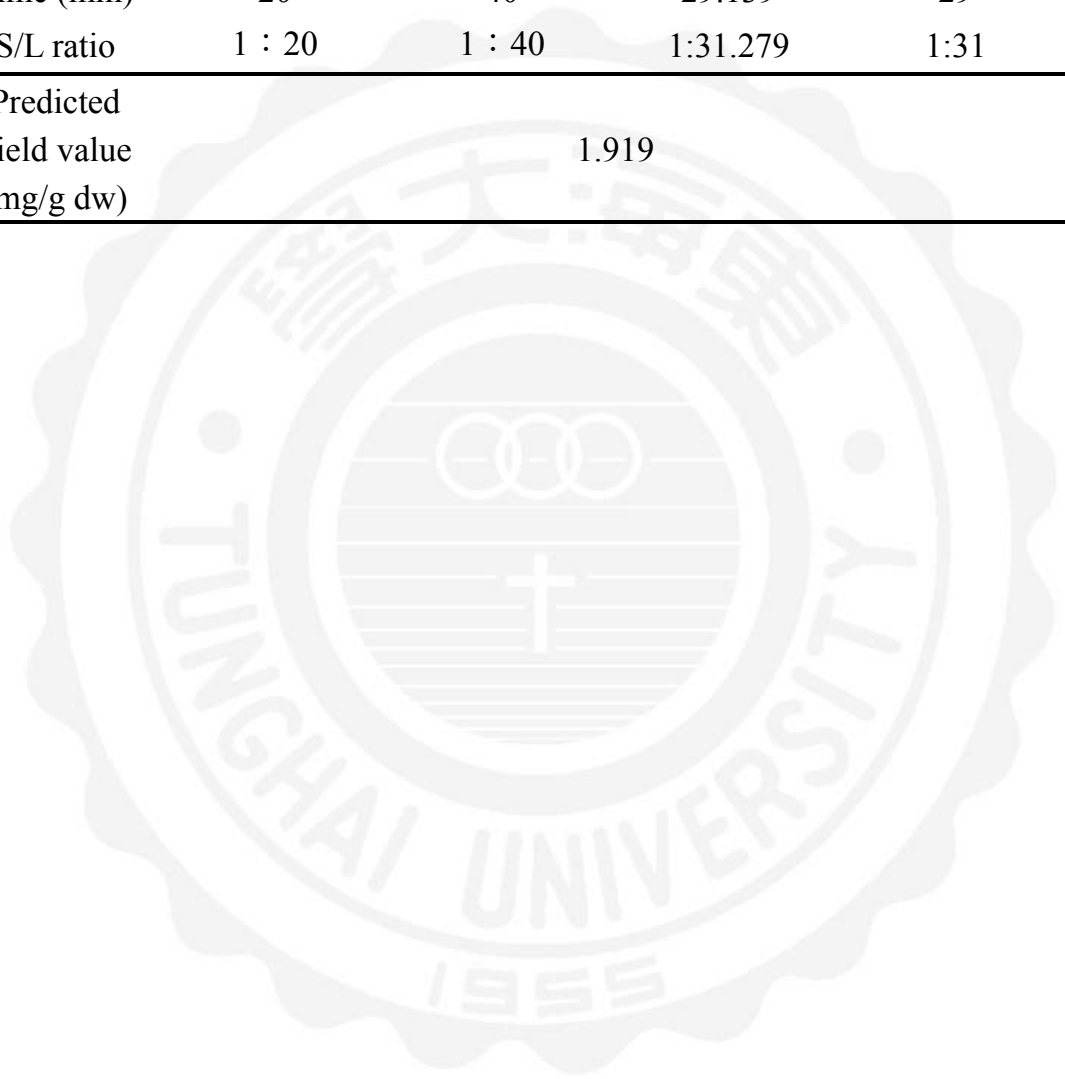
圖七、微波輔助萃取金頂側耳之萃取時間與固液比對麥角硫因產量的反應曲面圖 (a) 與等高線圖 (b)

Figure 7. Surface plot (a) and contour plot (b) of extraction time and S/L ratio on ergothioneine in *Pleurotus citrinopileatus*

表十、反應曲面法之最適萃取條件與麥角硫因最佳產量之預測值

Table 10. Optimum conditions and the ergothioneine predicted yield value of response at the optimum conditions

Factor	Low	High	Optimum conditions	Modified conditions
Power (W)	300	700	552.398	552
Time (min)	20	40	29.139	29
S/L ratio	1 : 20	1 : 40	1:31.279	1:31
Predicted yield value (mg/g dw)			1.919	



表十一、麥角硫因產量最適化模型之驗證

Table 11. Verification tests for fitted model of ergothioneine yield

Variable : Ergothioneine yield (mg/g)									
N	Lower CL Mean	Mean	Upper CL Mean	Lower CL Std Dev	Std Dev	Upper CL Std Dev	Std Err	Min.	Max.
4	1.83	1.92	1.96	0.03	0.06	0.22	0.03	1.83	1.96

Variable	DF	t Value	Pr >  t
Ergothioneine yield	3	0.08	0.94

心拒絕虛無假說  $H_0$ ，故可得兩樣本的平均值相等 ( $H_0: m_1=m_2$ )。DF=3 代表有四對樣本在進行比較，而  $t$  值等於 0.08， $P$  值等於 0.94，因 0.94 大於 0.05，故有足夠信心證明實驗之數據與預測值並無顯著差異，代表本實驗之方程式為有效的。Li 等人 (2017) 曾利用微波輔助萃取大頭茶 (*Gordonia axillaris*) 之酚類化合物並探討其最適萃取條件，結果發現當固液比為 29.56 g/mL、功率為 400 W 及時間 71 分鐘時，有最佳的酚類萃取量。綜上所述，微波輔助萃取之固液比、功率及時間皆會影響萃取量且會相互影響；故利用反應曲面法可獲得最適化之萃取條件，以節省時間及減少能源的消耗。

### (三) 超音波輔助萃取一次一因子條件探討

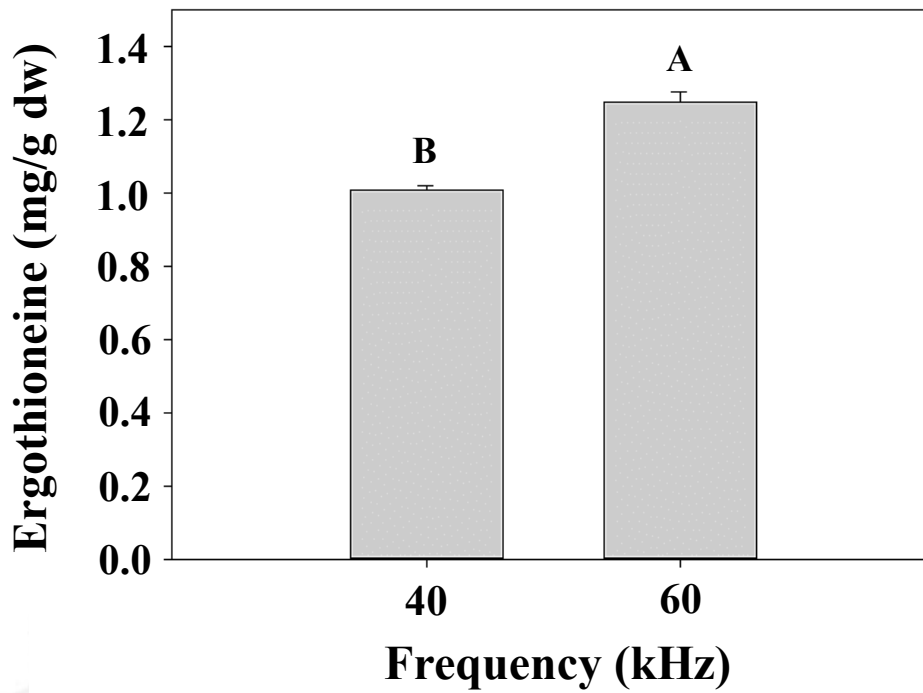
超音波輔助萃取除可減少萃取時間及提升萃取效率外，與微波輔助萃取相比，於操作過程中可在較低溫度及常壓下進行，適用於熱敏感性化合物的萃取 (Li *et al.*, 2014)。本研究針對超音波輔助萃取常見之影響因子，包括萃取溫度、功率、時間及固液比，進行一次一因子條件探討。本研究所使用之超音波儀器頻率有 40 及 60 kHz 兩種，實驗結果顯示 60 kHz (1.25 mg/g dw) 萃取效果顯著高於 40 kHz (1.01 mg/g dw) (圖八、表十二)，故後續試驗萃取頻率固定為 60 kHz。

#### 1. 萃取溫度

本研究以蒸餾水為萃取溶劑，萃取頻率為 60 kHz、功率為 200 W、時間 40 分鐘、固液比 1:30，探討不同萃取溫度(40、50、60 和 70°C)對金頂側耳子實體粉末麥角硫因萃取量的影響。因超音波輔助萃取儀器溫度上限為 80°C，故本研究探討之溫度以 70°C 為上限。

圖九結果顯示，隨著萃取溫度上升，金頂側耳子實體粉末麥角硫因萃取量會隨之升高；在溫度 40°C 時，麥角硫因萃取量為 0.11 mg/g dw，當溫度上升到 70°C，其麥角硫因萃取量為 0.88 mg/g dw (表十三)，相差約 8 倍。研究指





圖八、超音波頻率對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響

Figure 8. Effect of ultrasound frequency on yield of ergothioneine from

*Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

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

表十二、超音波頻率對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取含量的影響  
Table 12. Effect of ultrasound frequency on content of ergothioneine from  
*Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

Frequency (kHz)	Content (mg/g dw) <sup>a</sup>
	Ergothioneine
40	1.01 ± 0.01 B
60	1.25 ± 0.03 A

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Means with different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ )

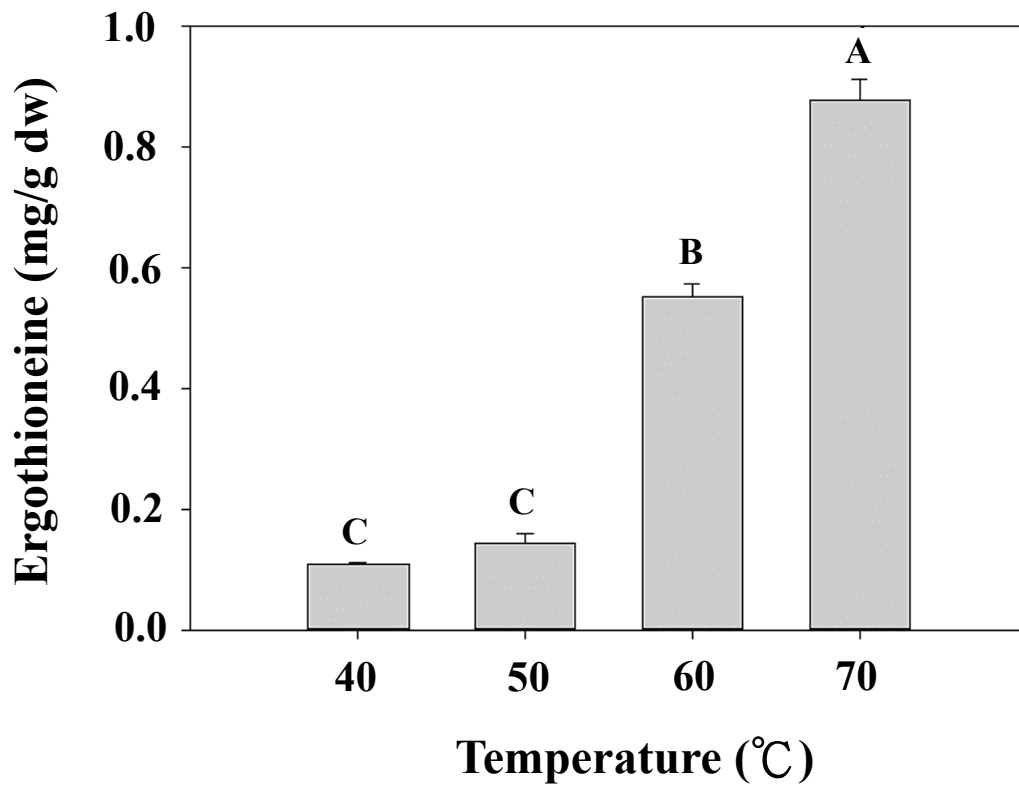
Ultrasound-assisted extraction experimental conditions:

Temperature: 60°C

Time: 40 min

Ultrasound power: 200 W

Solid/Liquid ratio: 1:30 (g/mL)



圖九、超音波萃取溫度對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響  
Figure 9. Effect of extracted temperature on content of ergothioneine from  
*Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder  
Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)

表十三、超音波萃取溫度對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取含量的影響  
 Table 13. Effect of extracted temperature on content of ergothioneine from  
*Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

Temperature (°C)	Content (mg/g dw) <sup>a</sup>
	Ergothioneine
40	0.11 ± 0.00 C
50	0.14 ± 0.02 C
60	0.55 ± 0.02 B
70	0.88 ± 0.03 A

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Means with different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ )

Ultrasound-assisted extraction experimental conditions:

Frequency: 60 kHz

Time: 40 min

Ultrasound power: 200 W

Solid/Liquid ratio: 1:30 (g/mL)

出麥角硫因熱穩定性佳 (Michael., 2017)，因此，高溫不會破壞麥角硫因且萃取較完全，故後續實驗將溫度固定為 70°C。

## 2. 萃取時間

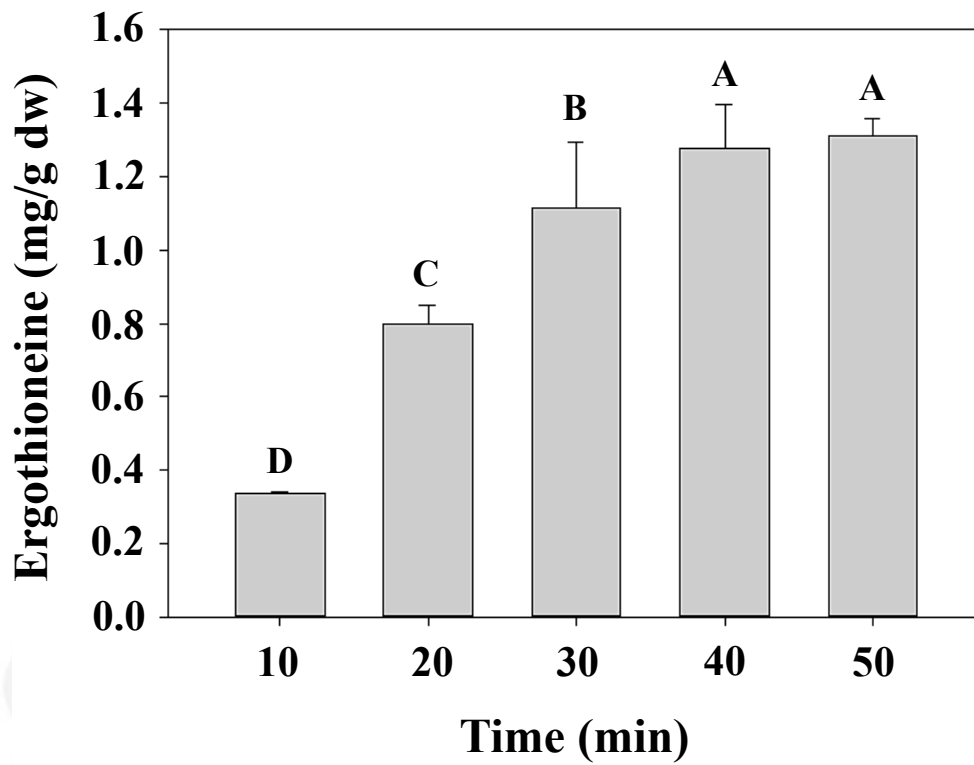
實驗中以蒸餾水為萃取溶劑，萃取頻率為 60 kHz、功率為 200 W、固液比 1:30 和溫度 70°C，探討不同萃取時間 (10、20、30、40 及 50 分鐘)對金頂側耳子實體粉末麥角硫因萃取量的影響。由圖十結果顯示，隨著萃取時間之增加，麥角硫因萃取量會上升。萃取時間小於 30 分鐘，麥角硫因萃取量介於 0.33~1.11 mg/g dw 間；當萃取時間增加至 40 及 50 分鐘，萃取量明顯增加，分別為 1.27 及 1.31 mg/g dw (表十四)，但兩者並無顯著差異。然考量時間及能源成本，後續萃取時間將固定為 40 分鐘。

## 3. 萃取功率

實驗中以蒸餾水為萃取溶劑，萃取頻率為 60 kHz、溫度 70°C、時間 40 分鐘和固液比 1:30，探討不同萃取功率 (25、50、75、100、150 及 200 W)對金頂側耳子實體粉末麥角硫因萃取量的影響。由圖十一結果顯示，功率自 25 W 逐漸上升，麥角硫因萃取量亦跟著升高，於 75 W 時可萃出較高量之麥角硫因 (1.32 mg/g dw) (表十五)；然而當功率繼續上升時，於 100 W 時萃取量下降至 1.24 (mg/g dw)，而後以 150 及 200 W 萃取，兩者皆低於 75 W 所萃取出得麥角硫因含量。Li 等人 (2012) 研究指出，隨著功率的增加，多醣的萃取率會上升，但過高的功率可能會導致多醣結構的降解、干擾反應物分子間的交互作用，由此可知適當的功率對目標物萃取率有顯著之影響。後續萃取功率將固定為 75 W。

## 4. 固液比

實驗中以蒸餾水為萃取溶劑，萃取頻率為 60 kHz、溫度 70°C、時間 40 分鐘和功率 75 W，探討不同固液比 (1:10、1:20、1:30、1:40 和 1:50)，



圖十、超音波萃取時間對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響  
 Figure 10. Effect of extracted time on content of ergothioneine from  
*Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder  
 Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)

表十四、超音波萃取時間對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取含量的影響  
 Table 14. Effect of extracted time on content of ergothioneine from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

Time (min)	Content (mg/g dw) <sup>a</sup>
	Ergothioneine
10	0.33 ± 0.00 D
20	0.80 ± 0.05 C
30	1.11 ± 0.18 B
40	1.27 ± 0.12 A
50	1.31 ± 0.05 A

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Means with different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ )

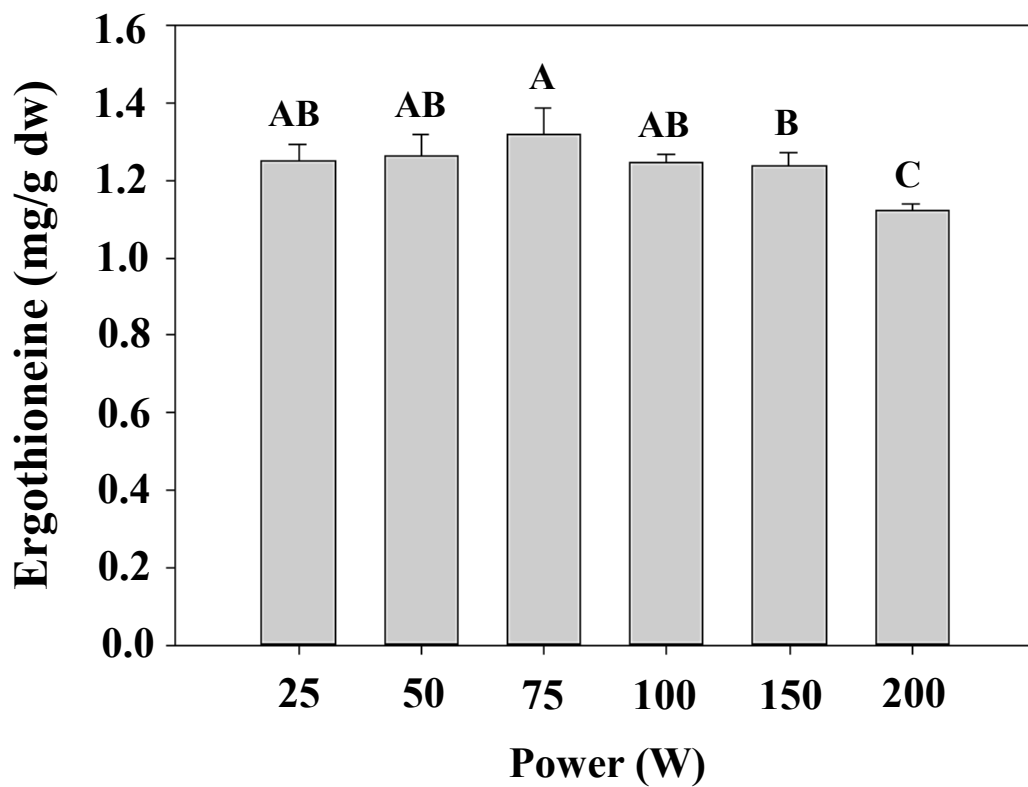
Ultrasound-assisted extraction experimental conditions:

Frequency: 60 kHz

Temperature: 70°C

Ultrasound power: 200 W

Solid/Liquid ratio: 1:30 (g/mL)



圖十一、超音波功率對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響  
 Figure 11. Effect of ultrasound power on yield of ergothioneine from  
*Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder  
 Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)



表十五、超音波功率對金頂側耳子實體粉末麥角硫因萃取含量的影響

Table 15. Effect of ultrasound power on content of ergothioneine from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

Power (W)	Content (mg/g dw) <sup>a</sup>
	Ergothioneine
25	1.25 ± 0.04 AB
50	1.26 ± 0.06 AB
75	1.32 ± 0.02 A
100	1.24 ± 0.07 AB
150	1.24 ± 0.04 B
200	1.12 ± 0.02 C

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Means with different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ )

Ultrasound-assisted extraction experimental conditions:

Frequency: 60 kHz

Temperature: 70°C

Time: 40 min

Solid/Liquid ratio: 1:30 (g/mL)

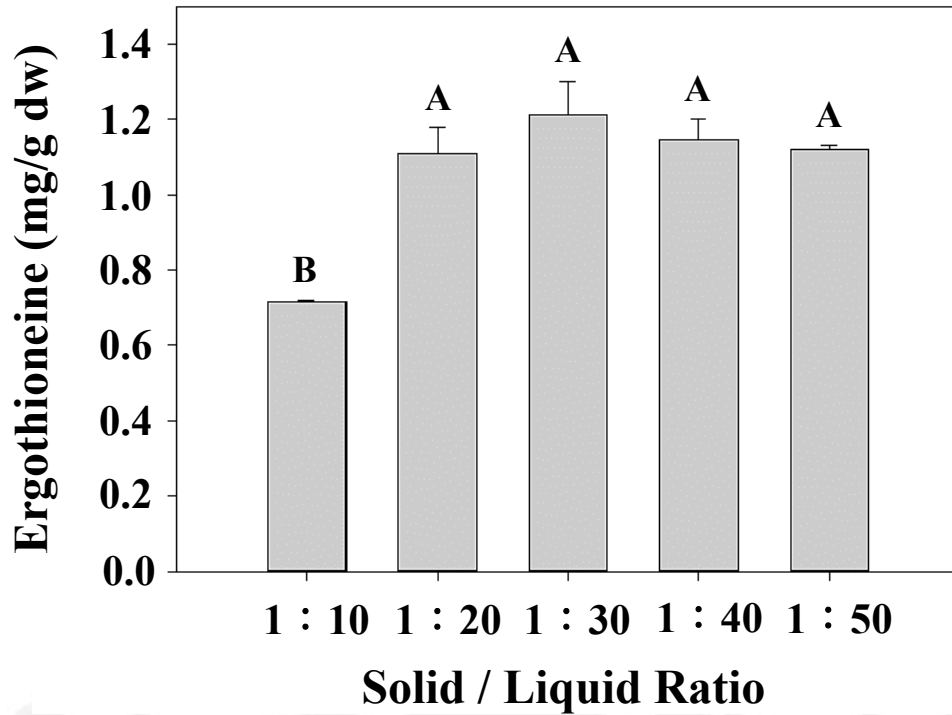
對金頂側耳子實體粉末麥角硫因萃取量的影響。圖十二結果顯示，當固液比為 1：10 時，麥角硫因萃取量僅為 0.71 mg/g dw；而當固液比提升至 1：20 時，萃取量逐漸上升，在 1：30 時，有最高萃取量為 1.21 mg/g dw (表十六)；當固液比升高至 1：50，萃取量雖和 1：30 無顯著差異，但萃取量仍低於 1：30。而後為避免溶劑的消耗與浪費，後續實驗選擇 1：30 作為最佳固液比。

#### (四) 以反應曲面法探討超音波輔助萃取麥角硫因之最適化條件

以超音波輔助萃取金頂側耳子實體粉末麥角硫因成分，實驗以萃取時間、功率及固液比三因子為獨立變數，探討範圍分別為 30~50 分鐘、50~100 瓦及 1：20~1：40 如表十七所示，本實驗未將溫度放入反應曲面探討之原因為：因功率與溫度因子可能會相互干擾，如當溫度較低時，不需較高的功率；溫度需較高時，低功率可能較難以達到所需之溫度，故不將溫度列入反應曲面法實驗設計探討之因子，接者以 BBD 進行實驗設計，可得 15 組不同的萃取條件組合如表十七，其中最後三組為連續三個重複中心點，將這 15 個實驗組依照實驗設計之組合進行萃取，並分析各實驗組之麥角硫因萃取量，實驗結果如表十八所示。

由表中可看出處理組 1 之萃取條件較不適用於麥角硫因之萃取，所得的萃取量為 15 組中最低 (1.173 mg/g dw)，連續重複中心點之萃取量為 1.397~1.451 mg/g dw；經由實驗結果發現處理組 5、6 及 7，其麥角硫因萃取量亦高，其共同點為固液比皆為 1：20，其中兩組瓦數為 75 W，推測此原因可能因固液比較小使得菇液較飽和，以一次一因子所之最佳萃取功率進行萃取，亦可得高量之麥角硫因。

將 15 個萃取量的結果輸入 STATGRAPHICS 統計軟體進行分析，可得到一組二次回歸方程式如下，其各別參數值如表十九所示：



圖十二、固液比對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響  
Figure 12. Effect of solid / liquid ratio on content of ergothioneine from  
*Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder  
Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)

表十六、固液比對金頂側耳子實體粉末中麥角硫因萃取量的影響

Table 16. Effect of solid / liquid ratio on content of ergothioneine from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

Solid / Liquid ratio	Content (mg/g dw) <sup>a</sup>
	Ergothioneine
1 : 10	0.71 ± 0.01 B
1 : 20	1.11 ± 0.07 A
1 : 30	1.21 ± 0.09 A
1 : 40	1.12 ± 0.01 A
1 : 50	1.14 ± 0.06 A

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n=3).

Means with different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ )

Ultrasound-assisted extraction experimental conditions:

Frequency: 60 kHz

Temperature: 70°C

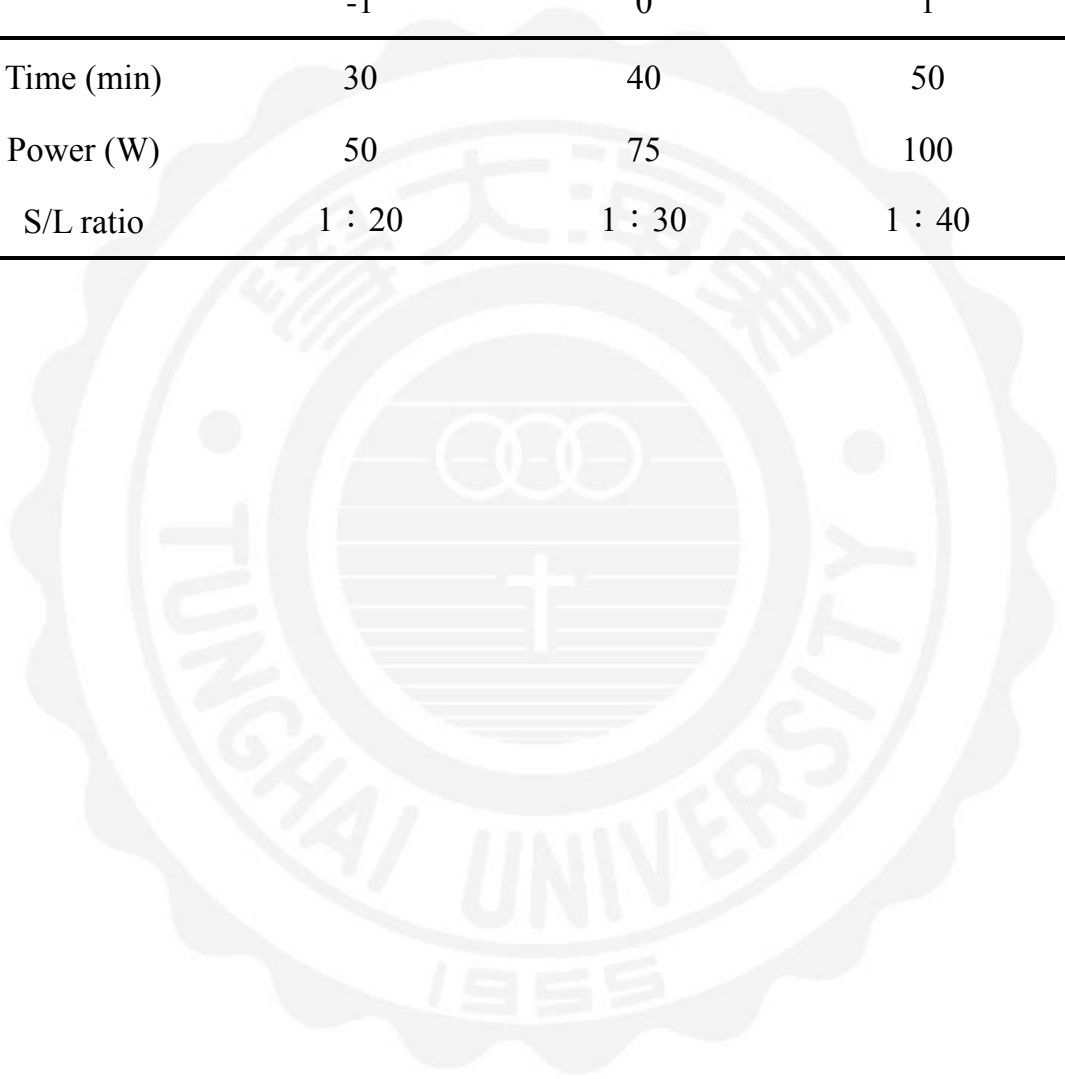
Time: 40 min

Ultrasound power: 75 W

表十七、金頂側耳麥角硫因三因子三階層 Box-Behnken 設計萃取條件反應參數實驗值之範圍

Table 17. The reaction parameters experiment range of 3-level-3-factor Box-Behnken design (BBD) of ergothioneine from *Pleurotus citrinopileatus*

Factor	Coded level of factor		
	-1	0	1
Time (min)	30	40	50
Power (W)	50	75	100
S/L ratio	1 : 20	1 : 30	1 : 40



表十八、金頂側耳麥角硫因之三因子三階層 Box-Behnken 設計與萃取量 (Y)  
 Table 18. 3-level-3-factor Box-Behnken design (BBD) and the extraction yield (Y)  
 of ergothioneine in *Pleurotus citrinopileatus* (n=3)

Treatment	Coded level of factor			Y (mg/d dw) extraction yield of ergothioneine
	Time (min)	Power (W)	S/L ratio	
1	-1 (30)	-1 (50)	0 (1 : 30)	1.173
2	-1 (30)	0 (75)	1 (1 : 40)	1.240
3	1 (50)	0 (75)	1 (1 : 40)	1.418
4	0 (40)	1 (100)	-1 (1 : 20)	1.179
5	0 (40)	-1 (50)	-1 (1 : 20)	1.483
6	1 (50)	0 (75)	-1 (1 : 20)	1.482
7	-1 (30)	0 (75)	-1 (1 : 20)	1.385
8	1 (50)	1 (100)	0 (1 : 30)	1.432
9	0 (40)	1 (100)	1 (1 : 40)	1.281
10	0 (40)	-1 (50)	1 (1 : 40)	1.255
11	-1 (30)	1 (100)	0 (1 : 30)	1.290
12	1 (50)	-1 (50)	0 (1 : 30)	1.408
13	0 (40)	0 (75)	0 (1 : 30)	1.397
14	0 (40)	0 (75)	0 (1 : 30)	1.451
15	0 (40)	0 (75)	0 (1 : 30)	1.424

表十九、超音波輔助萃取金頂側耳麥角硫因反應曲面之二次多項式與迴歸係數分析

Table 19. Second-order model equations for the response surfaces fitted to the experimental data, as a function of ultrasound-assisted extraction of ergothioneine in *Pleurotus citrinopileatus* and the analysis of regression

Regression coefficient for ergothioneine	
Coefficient	Estimate
constant	0.134021
A: Time	0.0454799
B: Power	0.0162003
C: S/L ratio	-0.0200804
AA	-0.000454811
AB	-0.0000935043
AC	0.000201644
BB	-0.0000835925
BC	0.0000297335
CC	0.0000304779

The equation of the fitted model is:

$$Y = 0.134021 + 0.0454799 \times \text{Time} + 0.0162003 \times \text{Power} - 0.0200804 \times \text{S/L ratio} - 0.000454811 \times \text{Time}^2 - 0.0000935043 \times \text{Time} \times \text{Power} + 0.000201644 \times \text{Time} \times \text{S/L ratio} - 0.0000835925 \times \text{Power}^2 + 0.0000297335 \times \text{Power} \times \text{S/L ratio} + 0.0000304779 \times \text{S/L ratio}^2$$

The equation of the fitted model is:

$$Y = 0.134021 + 0.0454799 \times \text{Time} + 0.0162003 \times \text{Power} - 0.0200804 \times \text{S/L ratio} - 0.000454811 \times \text{Time}^2 - 0.0000935043 \times \text{Time} \times \text{Power} + 0.000201644 \times \text{Time} \times \text{S/L ratio} - 0.0000835925 \times \text{Power}^2 + 0.0000297335 \times \text{Power} \times \text{S/L ratio} + 0.0000304779 \times \text{S/L ratio}^2$$

此外，利用統計軟體得到變異係數分析表 (ANOVA) (表二十)，ANOVA 分析是探討時間、功率及固液比這三個變異數對麥角硫因萃取量的影響，利用均方和實驗誤差估計值進行比較， $p$  值在 0.05 以下表示統計上具有顯著性。

由表二十可得知，因子間共有兩個效應是顯著的 ( $p < 0.05$ )，分別為時間及固液比的一次項 (A 和 C)，表示此兩效應顯著地影響超音波輔助萃取金頂側耳麥角硫因之萃取量。R-square 值為 92.4328%，表示上述之回歸方程式與反應曲面實驗結果之相關性非常好，亦代表藉由此實驗數據建構的數學模型是合理且有意義的，可適切地描述反應曲面法之結果。

另一種次要效應分析圖又稱為柏拉圖 (Pareto chart)，代表各因子對麥角硫因萃取量影響的效應 (圖十三)，由圖可看出時間及固液比的一次項皆超過顯著線，此分析圖顯示時間之一項對麥角硫因萃取為正向影響；另固液比之一項則為負向影響，表示增加時間及減少固液比有助於麥角硫因萃取量之提高。

經由表二十之二次方程式，分別固定其中一個變數，再以其餘兩變數繪製一系列的反應曲面圖與等高線圖，經由這些結果圖可了解各因子對麥角硫因萃取量之關係。圖十四為萃取時間固定在 40 分鐘條件下，萃取功率與固液比對麥角硫因萃取量的影響，由圖中可看出固液比越高，萃取量反而有下降趨勢，而萃取功率在 70~80 W 間有較佳的萃取量。圖十五為固液比固定在 1:30 之條件下，萃取功率與時間對麥角硫因萃取量的影響，麥角硫因之萃取量會隨時間增加而上升，由圖可知，過高或過低的功率對萃取率皆無實質的提升，過



表二十、超音波輔助萃取金頂側耳麥角硫因相關因子之變異數分析

Table 20. Analysis of variance for factors related to ultrasound-assisted extraction of ergothioneine in *Pleurotus citrinopileatus*

Source	Sum of Squares	Degree of freedom	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A: Time	0.0528973	1	0.0528973	25.30	0.0040*
B: Power	0.00330735	1	0.00330735	1.58	0.2641
C: S/L ratio	0.0506371	1	0.0506371	24.22	0.0044 *
AA	0.00763767	1	0.00763767	3.65	0.1142
AB	0.00218576	1	0.00218576	1.05	0.3535
AC	0.00162641	1	0.00162641	0.78	0.4182
BB	0.0100784	1	0.0100784	4.82	0.0796
BC	0.00022102	1	0.00022102	0.11	0.7583
CC	0.0000342979	1	0.0000342979	0.02	0.9031
Total error	0.0104556	5	0.00209112		
Total (corr.)	0.13817	14			

\*: Significant at 5% level

R-squared = 92.4328 percent

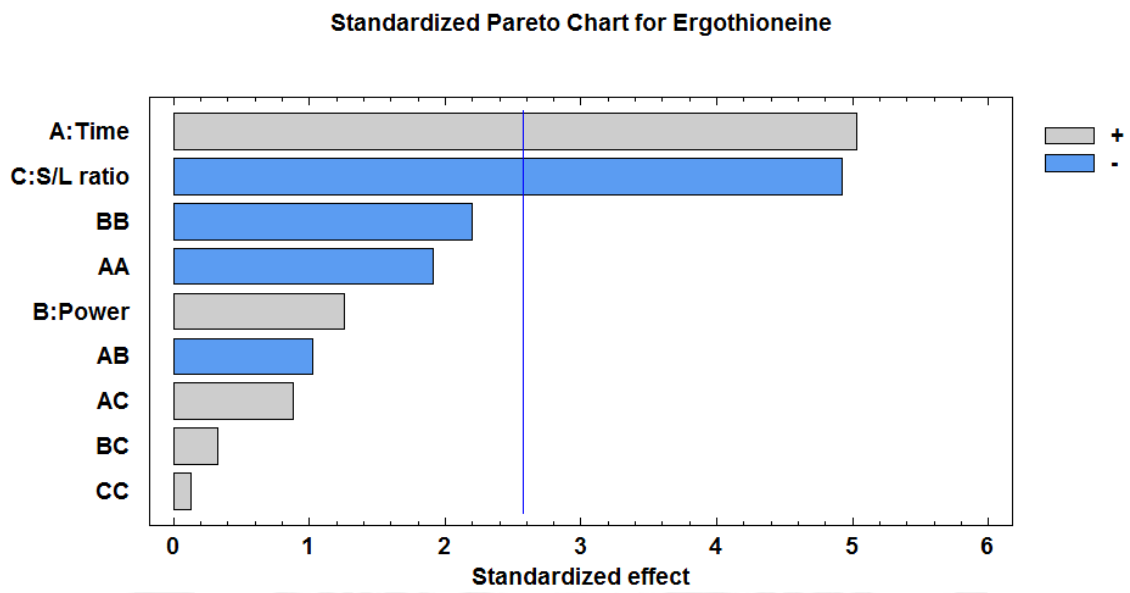
R-squared (adjusted for d.f.) = 78.8118 percent

Standard Error of Est. = 0.0457287

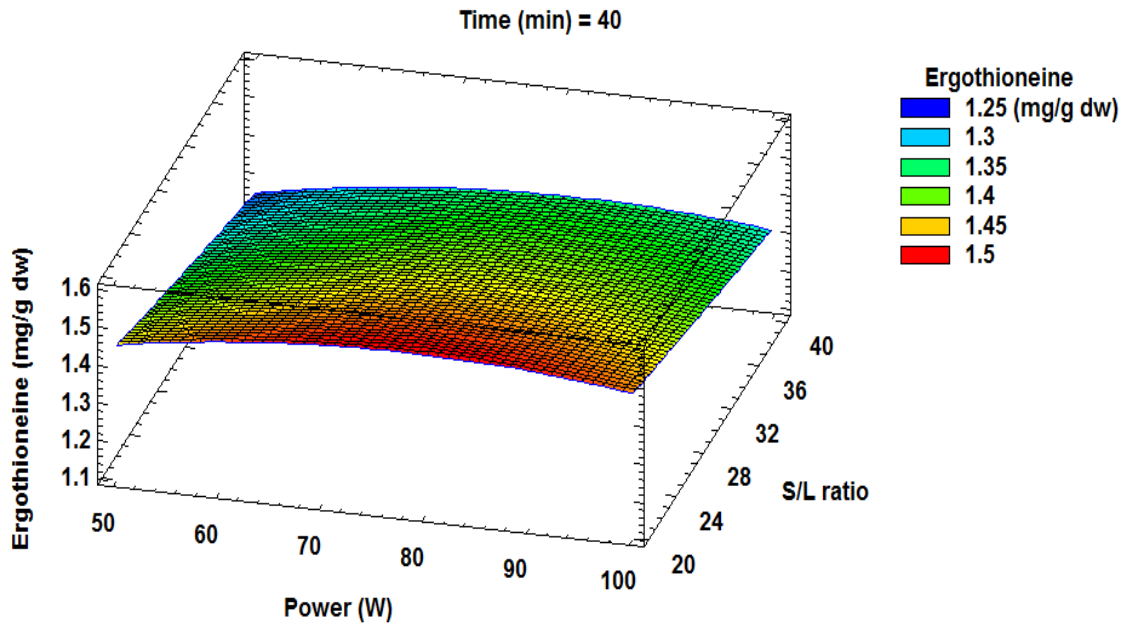
Mean absolute error = 0.0220732

Durbin-Watson statistic = 2.67845 (P=0.9431)

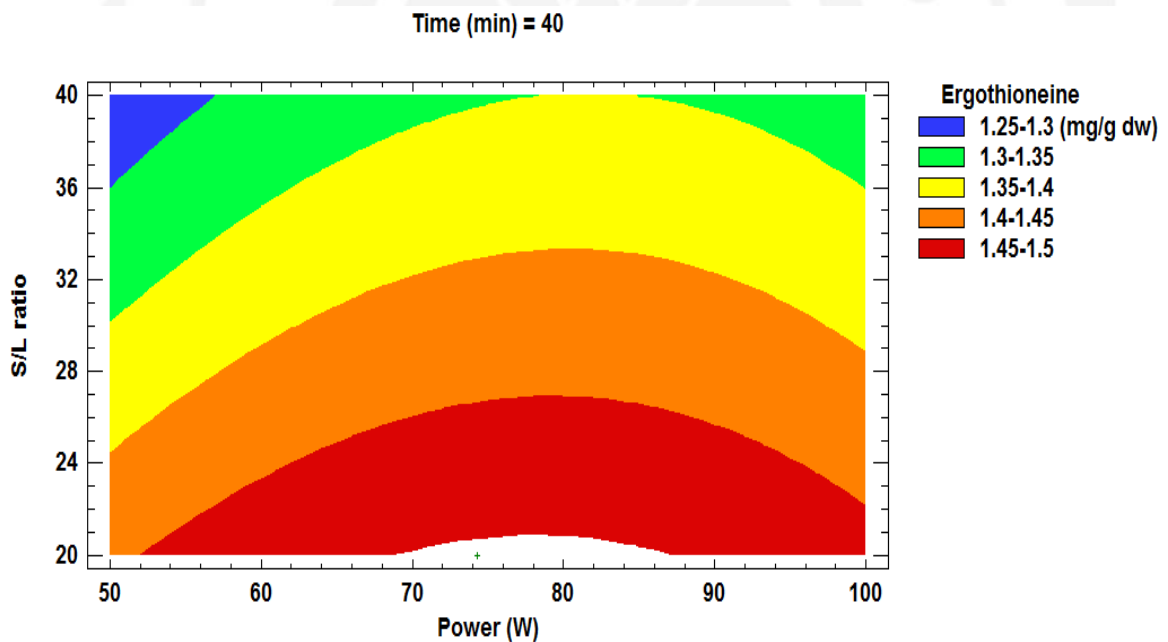
Lag 1 residual autocorrelation = -0.375702



圖十三、柏拉圖—超音波輔助萃取條件對金頂側耳麥角硫因萃取量的主要效應  
 Figure 13. Pareto chart of main effects for ultrasound-assisted extraction conditions of ergothioneine content in *Pleurotus citrinopileatus*



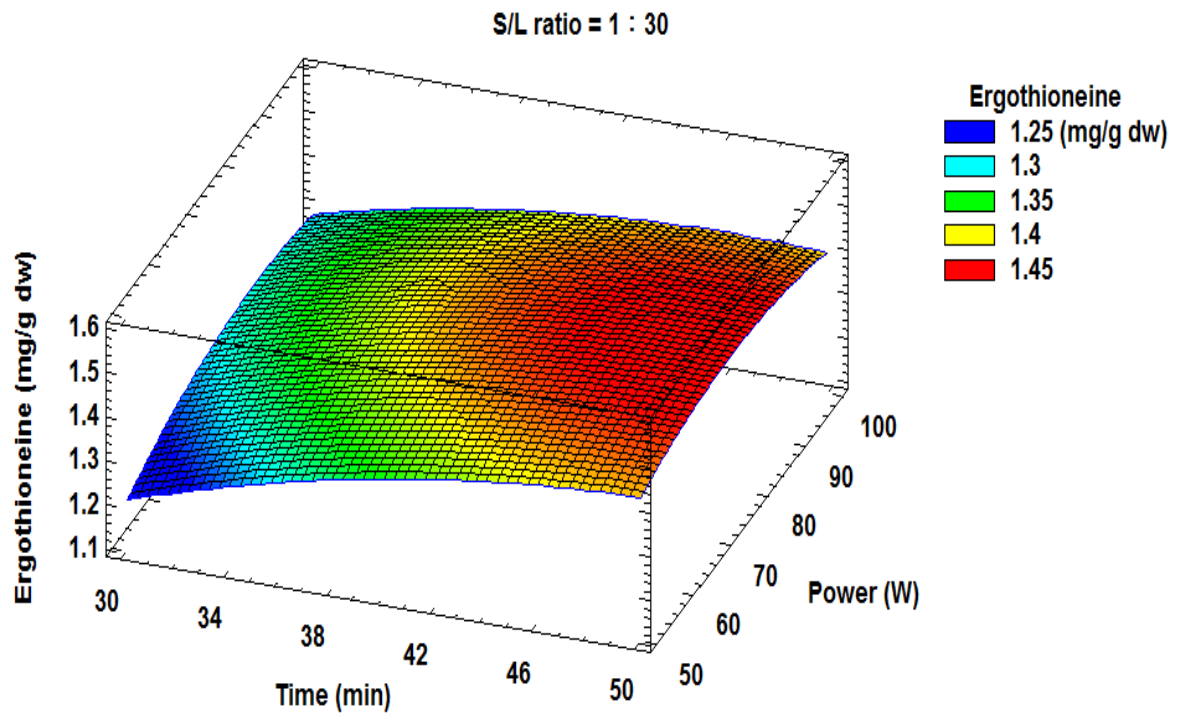
(a) Surface plot



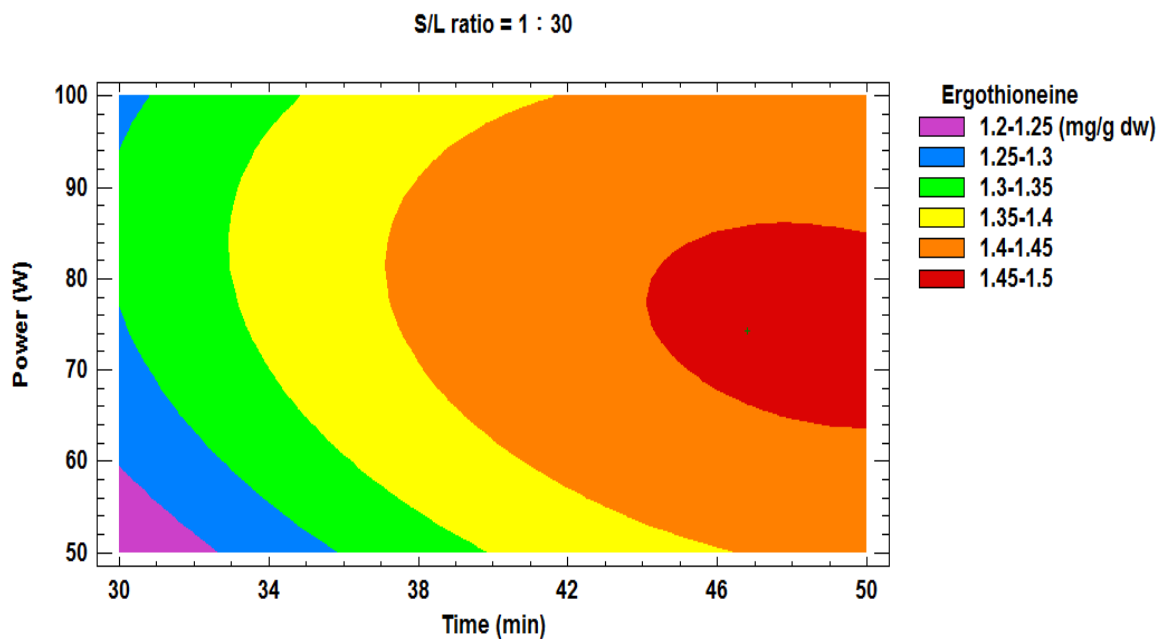
(b) Contour plot

圖十四、超音波輔助萃取金頂側耳之萃取功率與固液比對麥角硫因產量的反應  
曲面圖與等高線圖

Figure 14. Surface plot and contour plot of extraction power and S/L ratio on ergothioneine in *Pleurotus citrinopileatus*



(a) Surface plot



(b) Contour plot

圖十五、超音波輔助萃取金頂側耳之萃取功率與時間對麥角硫因產量的反應曲面圖與等高線圖

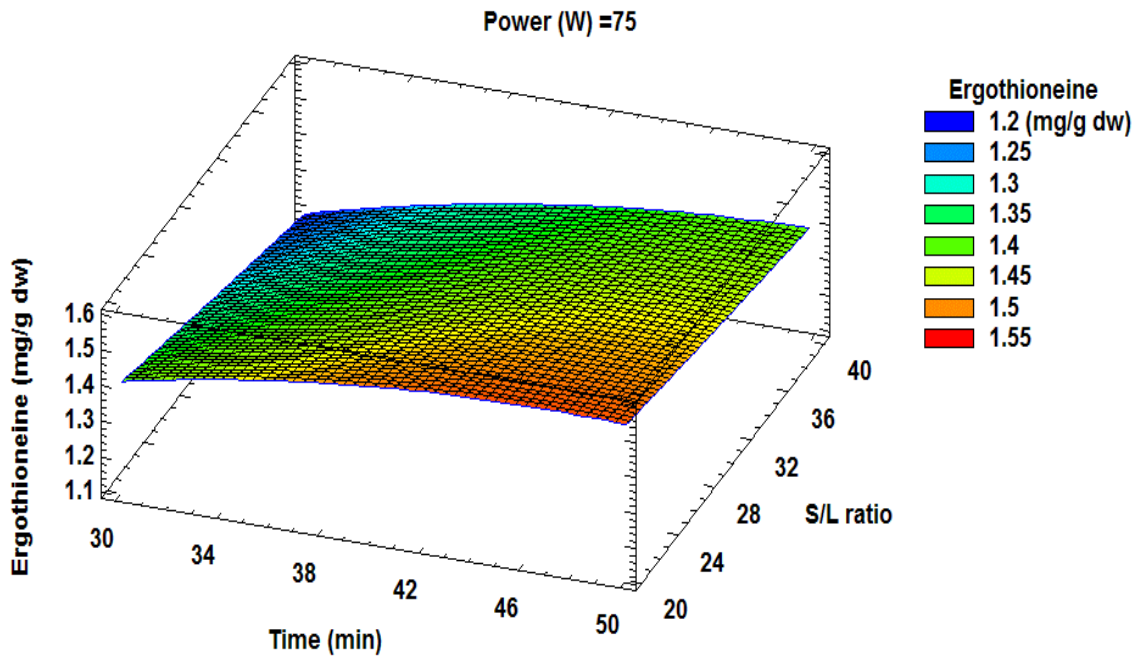
Figure 15. Surface plot and contour plot of extraction power and time on ergothioneine in *Pleurotus citrinopileatus*

低功率可能造成目標物無法完整被萃出，而過高功率可能會造成目標物被破壞。

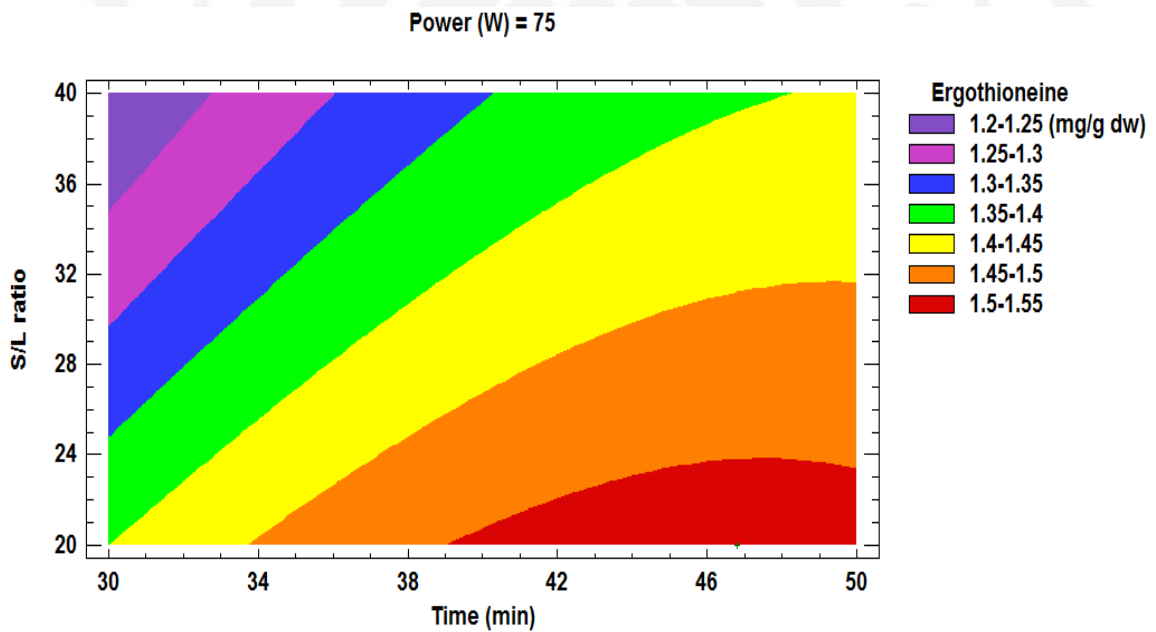
圖十六為萃取功率固定在 75 W 之條件下，時間與固液比對麥角硫因萃取量的影響，結果顯示當萃取時間介於 42~50 分鐘與固液比介於 1:20~1:25 時，會有較高的萃取量；當固液比超過 1:20，會隨著固液比增加，萃取量會隨之下降。Li 等人 (2012) 曾以超音波輔助萃取元麈 (*Hohenbuehelia serotina*) 之多醣，並以反應曲面法探討各因子對萃取量之影響，結果與本實驗結果相似。當固定其他因子 (功率與溫度) 時，時間及固液比皆為顯著的影響因子，但無明顯之鞍點出現，推測各因子間的交互作用影響程度，可能大於一次一因子估計之最佳條件值。

表二十一表示經調整過後的最適萃取條件為時間為 47 分鐘、功率 74 W 及固液比 1:20，於此條件下預測麥角硫因最大產量為 1.53 mg/g dw，之後以此條件進行四重複之實驗，來驗證實際產量與預測值是否有差異，以確定本實驗之數學模型的有效性。由表二十二可知麥角硫因之實際萃取量為 1.50 mg/g dw，將此數據與預測值經由 SAS 統計軟體以 t Tests 法進行分析；結果顯示， $P > 0.05$  且明顯大於第一型錯誤 ( $H_0$ ) 機率，故沒有足夠信心拒絕虛無假說  $H_0$ ，故可得兩樣本的平均值相等 ( $H_0: m_1 = m_2$ )， $DF = 3$  代表有四對樣本在進行比較，而 t 值等於 1.73，P 值等於 0.13，因 0.13 大於 0.05，證明實驗之數據與預測值並無顯著差異，代表本實驗之方程式為有效的。

Dranca 及 Oroian (2016) 曾以超音波輔助萃取茄子 (*Solanum melongena* L.) 之花青素及總酚，探討因子包含時間、溫度、頻率，其結果與本實驗之反應曲面圖類似，圖中無明顯之鞍點，最適值集中於邊緣極值處，此現象可解釋目標萃取物於特定因子的較高或較低處有較佳萃取效果；另由柏拉圖亦可發現



(a) Surface plot



(b) Contour plot

圖十六、超音波輔助萃取金頂側耳之萃取時間與固液比對麥角硫因產量的反應曲面圖與等高線圖

Figure 16. Surface plot and contour plot of extraction time and S/L ratio on ergothioneine in *Pleurotus citrinopileatus*

表二十一、反應曲面法之最適萃取條件與麥角硫因最佳產量之預測值  
 Table 21. Optimum conditions and the ergothioneine predicted yield value of response at the optimum conditions

Factor	Low	High	Optimum conditions	Modified conditions
Time (min)	30	50	46.799	47
Power (W)	50	100	74.281	74
S/L ratio	1 : 20	1 : 40	1 : 20	1 : 20
Predicted yield value (mg/g dw)	1.527			

表二十二、麥角硫因產量最適化模型之驗證

Table 22. Verification tests for fitted model of ergothioneine yield

Variable : Ergothioneine yield (mg/g)									
N	Lower CL Mean	Upper CL Mean	Lower CL Std Dev	Upper CL Std Dev	Std Dev	Std Err	Min.	Max.	
4	1.43	1.50	1.56	0.02	0.03	0.06	0.02	1.44	1.53

Variable	DF	t Value	Pr >  t
Ergothioneine yield	3	1.73	0.13



時間及固液比條件，亦皆在邊緣值處有較佳之麥角硫因萃取量。Chen 等人 (2010) 研究各因子對於靈芝多醣萃取亦是在邊緣極值處有較佳之萃取量；另有研究指出，利用超音波輔助萃取機能性成分，較無明顯之鞍點呈現，推測原因可能為超音波萃取設備之敏感度較微波萃取設備低，在功率作用的同時，溫度較無法控制在恆溫之狀態，容易造成萃取結果明顯集中於邊緣處 (Sandrina *et al.*, 2016)；此外，本研究使用之超音波輔助萃取設備屬開放式系統，環境之因素亦會影響整體萃取效益。

## 二、抗氧化能力分析

文獻指出金頂側耳中所含有的麥角硫因及其他機能性成分，具有良好的抗氧化性，因此本研究分別以微波、超音波輔助萃取及熱水萃取，經凍乾後取得萃取物，以濃度 0.1~5 mg/mL 進行四種抗氧化性質測定，包括清除 DPPH 自由基能力、螯合亞鐵離子能力、還原力和清除 ABTS 自由基能力，並計算出 EC<sub>50</sub> 以比較萃取物之抗氧化力。

### (一) 金頂側耳子實體不同萃取方法之萃取率

樣品之萃取率會因萃取方式、萃取溶劑、萃取時間或樣品前處理不同而有所差異 (吳，2006)。本研究將比較微波、超音波輔助萃取及熱水萃取物之抗氧化性質，結果如下：

由表二十三可知金頂側耳子實體之萃取率依序為超音波輔助萃取>熱水萃取>微波輔助萃取，其萃取率分別為 47.21%、44.49% 及 43.65%。Bendicho (2012) 指出超音波輔助萃取可提高萃取率、增加萃取效果及減少熱敏性機能性成分被破壞等優點；蔡 (2006) 研究發現熱水萃取可能取決於可溶性物質的極性加上熱能可破壞細胞壁結構，使水溶性物質或小分子變多，而更容易被萃取；Gude (2013) 指出微波輔助萃取利用微波透過內部偶極分子快速來回轉動，產生之摩擦熱能使物質被加熱，可減少反應之時間。

表二十三、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之萃取率  
 Table 23. Extraction yield of microwave, ultrasound-assisted extraction and hot extracts from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

	Extraction yield <sup>a</sup> (%)
MEP <sup>b</sup>	43.65 ± 0.09 C
UEP <sup>c</sup>	47.21 ± 0.28 A
HWEP <sup>d</sup>	44.49 ± 0.04 B

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n = 3). Means with different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ )

<sup>b</sup> Microwave-assisted extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

<sup>c</sup> Ultrasound-assisted extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

<sup>d</sup> Hot water extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

## (二) 不同萃取方法之萃取物之抗氧化性質

將上述微波、超音波輔助萃取及熱水萃取所得之萃取物，與麥角硫因標準品一同進行抗氧化能力探討；由於麥角硫因標準品成本因素，故配製濃度為 0.1~1 mg/mL，其餘萃取物配製濃度則為 0.1~5 mg/mL。

### 1. 清除 DPPH 自由基能力

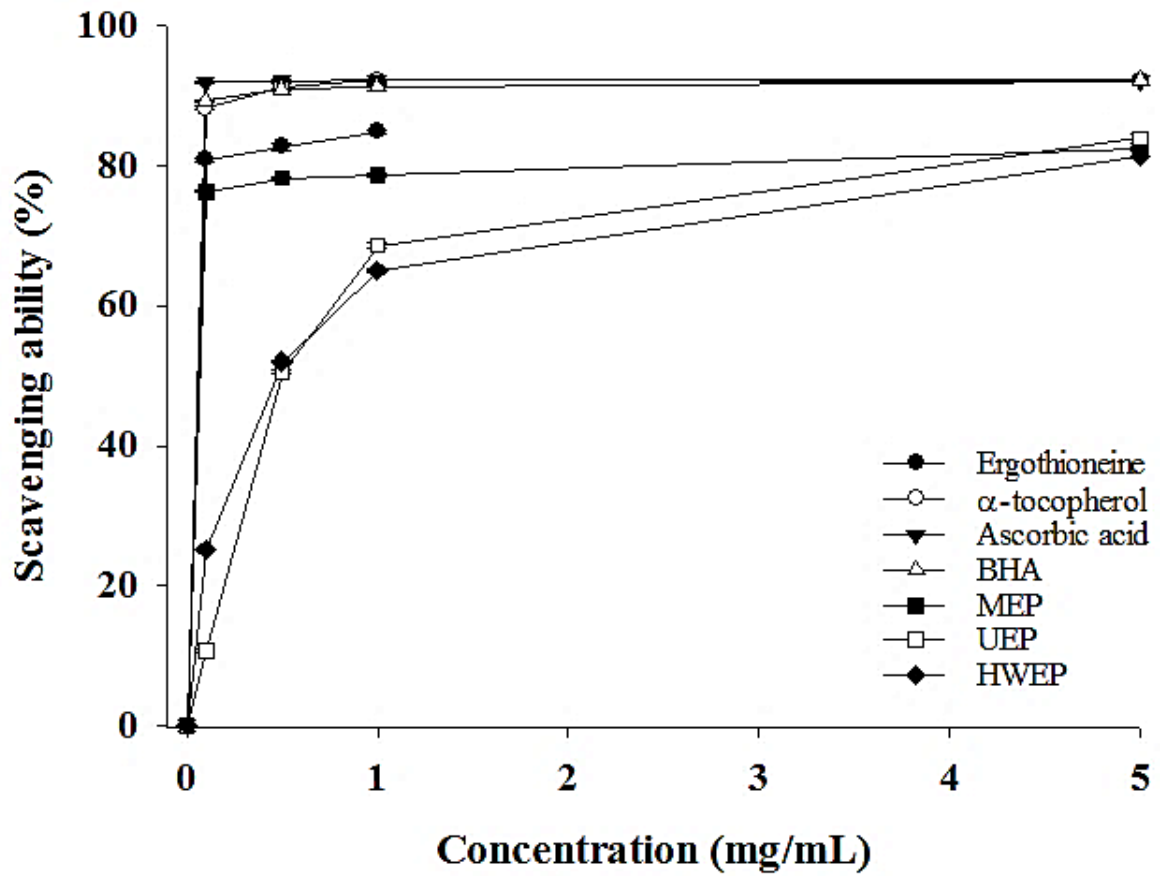
由圖十七可得知，三種萃取物之清除 DPPH 能力會隨著濃度上升而增加；當濃度為 1 mg/mL 時，清除 DPPH 能力依序為麥角硫因標準品 (84.86%)>微波輔助萃取物 (78.69%)>超音波輔助萃取物 (68.63%)>熱水萃取物 (65.06%) (表二十四)，之後隨濃度的增加清除 DPPH 能力緩慢增加。但當濃度為 5 mg/mL 時，超音波輔助萃取物之清除 DPPH 能力最佳 (83.93%)，其次為微波輔助萃取物 (82.43%) 及熱水萃取物 (81.39%)。由結果發現，三者萃取物之清除能力雖然皆小於其他對照組，但以數值來看，三者萃取物之清除能力屬優。

### 2. 螯合亞鐵離子能力

由圖十八可知，金頂側耳子實體之微波、超音波輔助萃取及熱水萃取物之螯合亞鐵能力皆會隨濃度上升而增強。當樣品濃度為 1 mg/mL 時，微波輔助萃取物之螯合亞鐵能力最高 (73.33%)，其次為熱水萃取物 (69.89%) 及超音波輔助萃取物 (66.88%)，三者皆大於麥角硫因標準品之螯合能力為 60.65% (表二十五)。另當濃度為 5 mg/mL 時，微波輔助萃取物之螯合亞鐵能力 (82.80%) 僅次於 EDTA 標準品 (87.42%)；此三種萃取物之螯合亞鐵能力皆高於檸檬酸標準品 (48.06%)。Motohashi (1976) 曾指出麥角硫因可螯合二價金屬離子，尤其以鋅和銅為佳，由結果得知，三種萃取物之螯合亞鐵能力大於麥角硫因標準品，推測金頂側耳萃取物可能有其他抗氧化物質。

### 3. 還原力之測定

由圖十九及表二十六可知，三種萃取物之還原力會隨著濃度增加而提高，



圖十七、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之清除 DPPH 自由基能力

Figure 17. Scavenging ability of microwave, ultrasound-assisted extraction and hot water extracts from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder on DPPH radicals

表二十四、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之清除 DPPH 自由基能力

Table 24. Scavenging ability of microwave, ultrasound-assisted extraction and hot extracts from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder on DPPH radicals

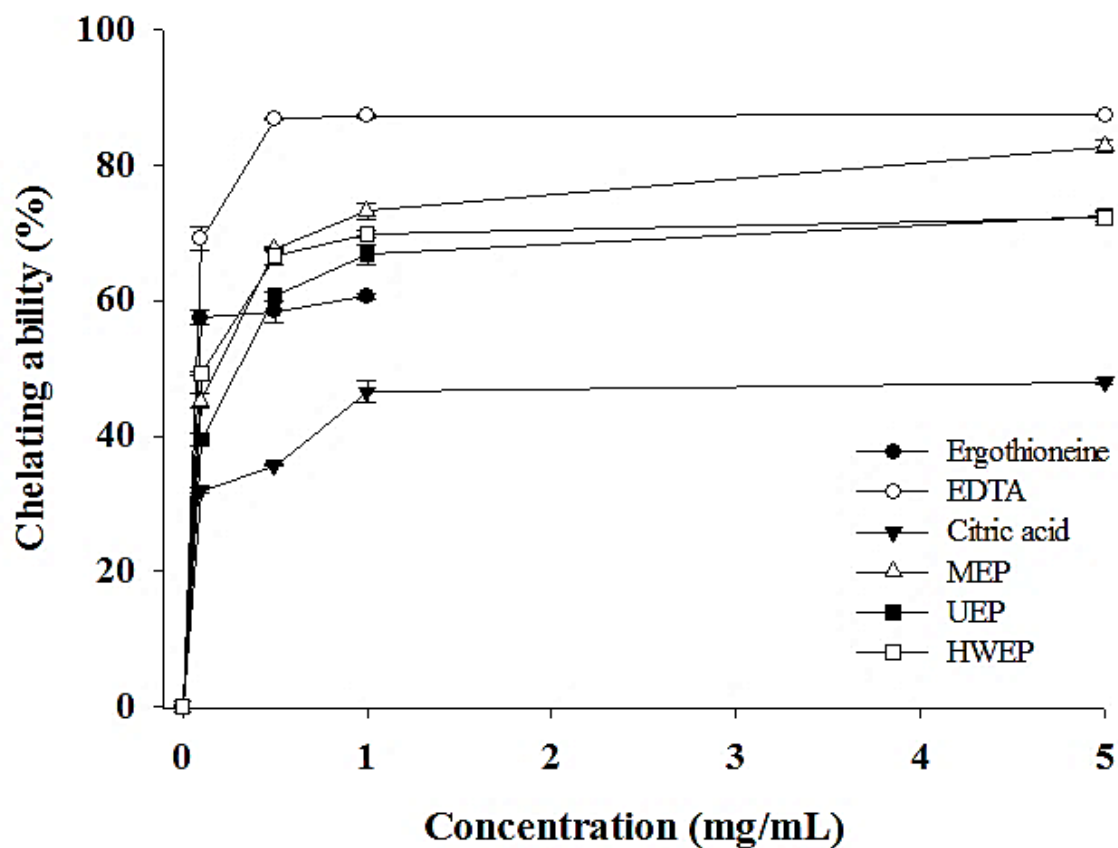
Amount (mg/mL)	Scavenging ability <sup>a</sup> (%)						
	Ergothioneine	$\alpha$ -tocopherol	Ascorbic acid	BHA	MEP <sup>b</sup>	UEP <sup>c</sup>	HWEP <sup>d</sup>
0.1	80.96 $\pm$ 0.26 D	88.29 $\pm$ 0.35 C	91.99 $\pm$ 0.15 A	89.29 $\pm$ 0.25 B	76.36 $\pm$ 0.20 E	10.73 $\pm$ 0.15 G	25.16 $\pm$ 0.10 F
0.5	82.73 $\pm$ 0.45 C	91.29 $\pm$ 0.55 B	92.16 $\pm$ 0.20 A	90.99 $\pm$ 0.06 B	78.29 $\pm$ 0.12 D	50.59 $\pm$ 0.25 F	52.03 $\pm$ 0.06 E
1	84.86 $\pm$ 0.36 C	92.29 $\pm$ 0.65 A	92.23 $\pm$ 0.06 A	91.33 $\pm$ 0.55 B	78.69 $\pm$ 0.15 D	68.63 $\pm$ 0.45 E	65.06 $\pm$ 0.20 F
5		92.33 $\pm$ 0.06 A	92.19 $\pm$ 0.44 A	92.19 $\pm$ 0.15 A	82.43 $\pm$ 0.35 C	83.93 $\pm$ 0.55 B	81.39 $\pm$ 0.06 D

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3). Means with different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ )

<sup>b</sup> Microwave-assisted extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

<sup>c</sup> Ultrasound-assisted extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

<sup>d</sup> Hot water extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder



圖十八、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之螯合亞鐵離子能力

Figure 18. Chelating ability of microwave, ultrasound-assisted extraction and hot water extracts from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder on ferrous ions

表二十五、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之螯合亞鐵離子能力

Table 25. Chelating ability of microwave, ultrasound-assisted extraction and hot extracts from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder on ferrous ions

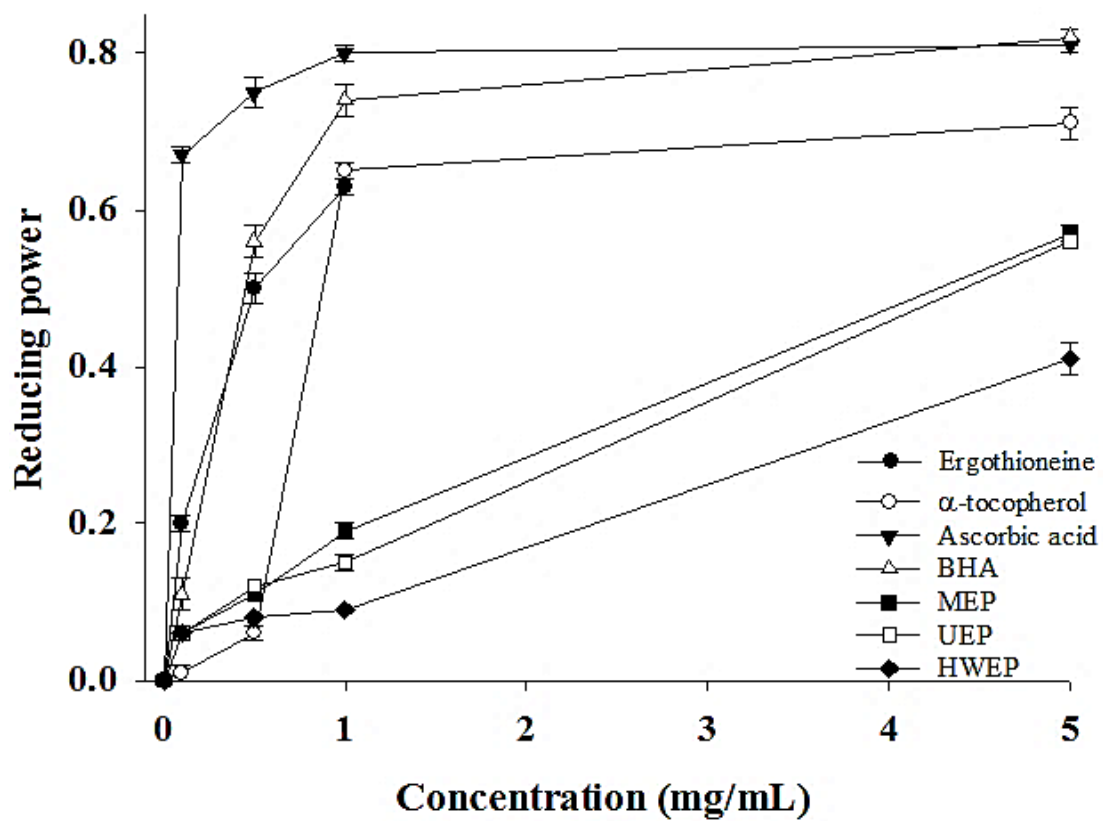
Amount (mg/mL)	Chelating ability <sup>a</sup> (%)					
	Ergothioneine	EDTA	Citric acid	MEP <sup>b</sup>	UEP <sup>c</sup>	HWEP <sup>d</sup>
0.1	57.53 ± 1.13 B	69.19 ± 1.68 A	31.94 ± 0.32 F	45.27 ± 1.04 D	39.46 ± 1.03 E	49.25 ± 0.19 C
0.5	58.39 ± 1.61 D	86.94 ± 0.19 A	35.70 ± 0.19 E	67.74 ± 0.32 B	60.75 ± 0.67 C	66.56 ± 1.13 B
1	60.65 ± 0.36 E	87.26 ± 0.19 A	46.56 ± 1.66 F	73.33 ± 1.22 B	66.88 ± 1.52 D	69.89 ± 0.49 C
5		87.42 ± 0.19 A	48.06 ± 0.32 D	82.80 ± 0.93 B	72.47 ± 0.67 C	72.26 ± 1.16 C

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n = 3). Means with different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ )

<sup>b</sup> Microwave-assisted extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

<sup>c</sup> Ultrasound-assisted extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

<sup>d</sup> Hot water extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder



圖十九、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之還原力  
 Figure 19. Reducing power of microwave, ultrasound-assisted extraction and hot water extracts from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder



表二十六、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之還原力

Table 26. Reducing power of microwave, ultrasound-assisted extraction and hot extracts from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

Amount (mg/mL)	Reducing power <sup>a</sup> (Absorbance at 700 nm)						
	Ergothioneine	$\alpha$ -tocopherol	Ascorbic acid	BHA	MEP <sup>b</sup>	UEP <sup>c</sup>	HWEP <sup>d</sup>
0.1	0.20 $\pm$ 0.01 B	0.01 $\pm$ 0.01 E	0.67 $\pm$ 0.01 A	0.11 $\pm$ 0.02 C	0.06 $\pm$ 0.00 D	0.06 $\pm$ 0.01 D	0.06 $\pm$ 0.00 D
0.5	0.50 $\pm$ 0.02 C	0.06 $\pm$ 0.01 F	0.75 $\pm$ 0.02 A	0.56 $\pm$ 0.02 B	0.11 $\pm$ 0.00 D	0.12 $\pm$ 0.00 D	0.08 $\pm$ 0.00 E
1	0.63 $\pm$ 0.01 D	0.65 $\pm$ 0.01 C	0.80 $\pm$ 0.01 A	0.74 $\pm$ 0.02 B	0.19 $\pm$ 0.01 E	0.15 $\pm$ 0.01 F	0.09 $\pm$ 0.00 G
5		0.71 $\pm$ 0.02 B	0.81 $\pm$ 0.01 A	0.82 $\pm$ 0.01 A	0.57 $\pm$ 0.01 C	0.56 $\pm$ 0.00 C	0.41 $\pm$ 0.02 D

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3). Means with different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ )

<sup>b</sup> Microwave-assisted extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

<sup>c</sup> Ultrasound-assisted extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

<sup>d</sup> Hot water extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

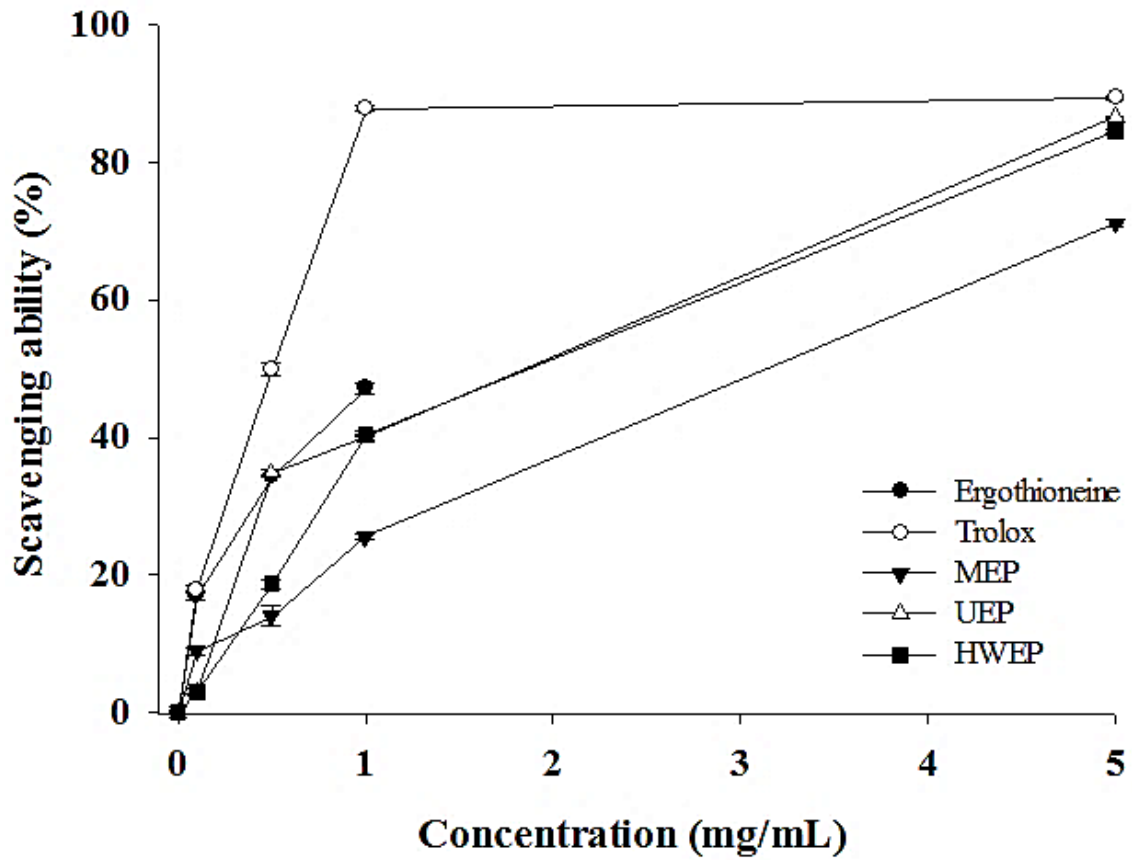
在濃度為 1 mg/mL 時，麥角硫因標準品還原力為 0.63，而後依序為微波輔助萃取物 (0.19)>超音波輔助萃取物 (0.15)>熱水萃取物 (0.09)；另當樣品濃度為 5 mg/mL 時，微波輔助萃取物之還原力為最高 (0.57)，其次為超音波輔助萃取物 (0.56)，而熱水萃取物為 (0.41)，由結果可得知微波及超音波萃取物之還原力相當。

#### 4. 清除 ABTS<sup>+</sup> 自由基能力

由圖二十可知金頂側耳子實體之微波、超音波輔助萃取及熱水萃取物之清除 ABTS<sup>+</sup> 能力皆隨濃度上升而增強。當樣品濃度為 1 mg/mL 時，超音波輔助萃取物和熱水萃取物之清除 ABTS<sup>+</sup> 能力相當，分別為 40.02% 及 40.48% (表二十七)；之後隨濃度增加，清除 ABTS<sup>+</sup> 能力亦隨之增加，當濃度為 5 mg/mL 時，超音波輔助萃取物之清除能力高達 86.66%，熱水萃取及微波輔助萃取物分別為 84.66% 及 71.16%；另 Trolox 對照組之清除能力為 89.45%。

#### (三) 三種萃取物與麥角硫因標準品之 EC<sub>50</sub>

EC<sub>50</sub> (Effective concentration) 為抗氧化能力達 50% 所需之濃度，利用內插及外插法計算而得出結果，當 EC<sub>50</sub> 越低則表示抗氧化能力越好，越高則反之。表二十八為金頂側耳子實體粉末微波輔助、超音波輔助及熱水萃取物和麥角硫因標準品清除 DPPH 自由基能力、螯合亞鐵離子能力、還原力及清除 ABTS 自由基能力之 EC<sub>50</sub>。在清除 DPPH 自由基能力方面，EC<sub>50</sub> 值依序為麥角硫因標準品 (0.06 mg/mL)≒微波輔助萃取物 (0.07 mg/mL)<熱水萃取物 (0.47 mg/mL)≒超音波輔助萃取物 (0.49 mg/mL)。研究結果顯示麥角硫因標準品之清除 DPPH 自由基方面與胡 (2016) 結果相似 (0.07 mg/mL)，清除能力為最佳；其他萃取物清除 DPPH 自由基有所差異，應與萃取物之抗氧化成分種類及含量不同有關。



圖二十、金頂側耳子實體粉末微波超音波輔助萃取及熱水萃取之清 ABTS<sup>+</sup> 自由基能力

Figure 20. Scavenging ability of microwave, ultrasound-assisted extraction and hot water extracts from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder on ABTS<sup>+</sup> radicals

表二十七、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取之清除 ABTS<sup>+</sup> 自由基能力

Table 27. Scavenging ability of microwave, ultrasound-assisted extraction and hot extracts from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder on ABTS<sup>+</sup> radicals

Amount (mg/mL)	Scavenging ability <sup>a</sup> (%)				
	Ergothioneine	Trolox	MEP <sup>b</sup>	UEP <sup>c</sup>	HWEP <sup>d</sup>
0.1	16.96 ± 0.69 A	17.82 ± 0.53 A	08.88 ± 0.53 B	03.00 ± 0.40 C	02.99 ± 0.40 C
0.5	34.37 ± 0.20 B	50.00 ± 0.87 A	14.07 ± 1.40 D	34.83 ± 0.53 B	18.69 ± 0.69 C
1	47.17 ± 0.80 B	87.89 ± 0.40 A	25.61 ± 0.35 D	40.02 ± 0.53 C	40.48 ± 0.35 C
5		89.45 ± 0.35 A	71.16 ± 0.53 D	86.66 ± 0.20 B	84.66 ± 0.20 C

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n = 3). Means with different letters within a column are significantly different (*p* < 0.05)

<sup>b</sup> Microwave-assisted extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

<sup>c</sup> Ultrasound-assisted extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

<sup>d</sup> Hot water extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

表二十八、金頂側耳子實體粉末微波、超音波輔助萃取及熱水萃取和麥角硫因標準品抗氧化性質之 EC<sub>50</sub>

Table 28. EC<sub>50</sub> value of microwave, ultrasound-assisted extraction and hot extracts from *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder and ergothioneine standard in antioxidant properties

	EC <sub>50</sub> value <sup>a</sup> (extract mg/mL)			
	Ergothioneine	MEP <sup>b</sup>	UEP <sup>c</sup>	HWEP <sup>d</sup>
Scavenging ability on DPPH radicals	0.06 ± 0.03 A	0.07 ± 0.01 A	0.49 ± 0.04 B	0.47 ± 0.03 B
Chelating ability on ferrous ions	0.09 ± 0.01 A	0.18 ± 0.06 B	0.30 ± 0.05 C	0.12 ± 0.02 B
Reducing power	0.50 ± 0.03 A	4.28 ± 0.18 B	4.43 ± 0.44 B	14.67 ± 0.11 C
Scavenging ability on ABTS <sup>+</sup> radicals	1.06 ± 0.01 A	1.89 ± 0.36 B	1.86 ± 0.06 B	2.64 ± 0.23 C

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub>, the effective concentration at which the antioxidant activity was 50%, the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals were scavenged by 50%, the absorbance was 0.5 for reducing power, and ferrous ions were chelated by 50% EC<sub>50</sub> was obtained by interpolation from linear regression analysis

<sup>b</sup> Microwave-assisted extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

<sup>c</sup> Ultrasound-assisted extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

<sup>d</sup> Hot water extract of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder

在螯合亞鐵離子能力方面，EC<sub>50</sub> 值依序為麥角硫因標準品 (0.09 mg/mL) < 熱水萃取物 (0.12 mg/mL) ≙ 微波輔助萃取物 (0.18 mg/mL) < 超音波輔助萃取物 (0.30 mg/mL)。Lee 等人 (2007) 研究指出金頂側耳子實體螯合亞鐵離子能力，熱水萃取物比冷水萃取物好，可能是高溫可萃取出螯合亞鐵離子物質較多；本研究試驗結果亦顯示熱水萃取物有不錯之螯合亞鐵離子能力。另在還原力方面，EC<sub>50</sub> 值依序為麥角硫因標準品 (0.50 mg/mL) < 微波輔助萃取物 (4.28 mg/mL) ≙ 超音波輔助萃取物 (4.43 mg/mL) < 熱水萃取物 (14.67 mg/mL)，熱水萃取相較於其他兩種萃取方式，其還原力明顯較差；Lee 等人 (2007) 之研究結果亦與本結果相似，推測高溫可能導致樣品內具還原力成分被破壞。此外，在清除 ABTS<sup>+</sup> 自由基能力方面，EC<sub>50</sub> 值依序為麥角硫因標準品 (1.06 mg/mL) < 超音波輔助萃取物 (1.86 mg/mL) ≙ 微波輔助萃取物 (1.89 mg/mL) < 熱水萃取物 (2.64 mg/mL)。

綜上所述，於四種抗氧化性質方面，麥角硫因標準品效果為最佳，顯示麥角硫因具有良好的抗氧化功能；另三種不同萃取方法所得到之金頂側耳萃取物方面，微波輔助萃取物在清除 DPPH 自由基及還原力方面具有較好的抗氧化能力；超音波輔助萃取物則在清除 ABTS<sup>+</sup> 自由基能力勝過其他兩者；另熱水萃取物則在螯合亞鐵離子能力方面較優。由研究結果可知，金頂側耳子實體粉末經不同的萃取方式，所得萃取物在各種抗氧化試驗中會有不同，故除麥角硫因外，子實體內尚有其他抗氧化物質存在，如酚類物質、類胡蘿蔔素、麥角固醇及抗壞血酸等，會因不同萃取方法而種類及含量會有所不同。

### 三、麥角硫因之分離純化

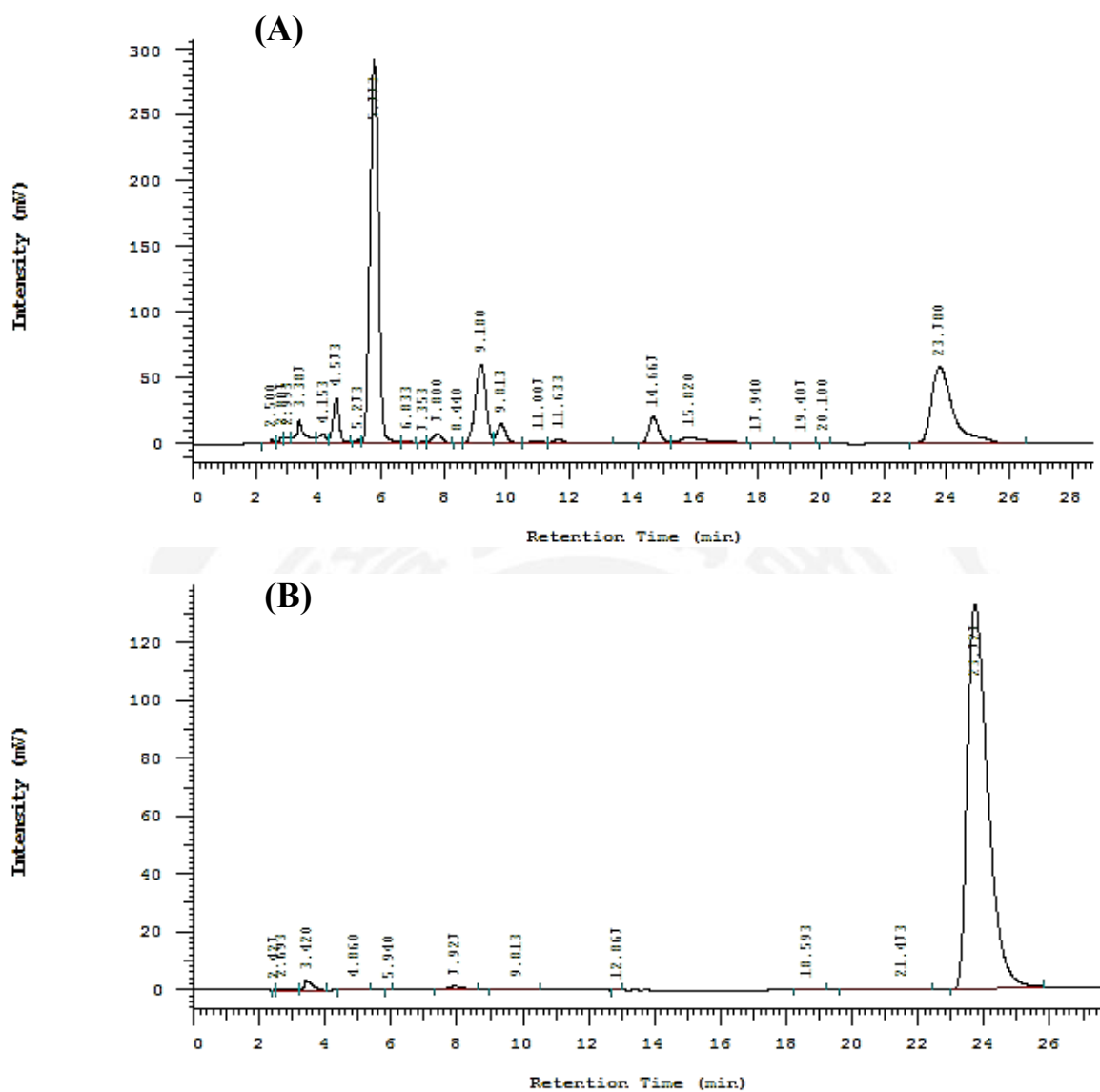
姜等人 (2014) 曾利用 4 kDa 的中空纖維超濾膜，進行蠔菇 (*Pleurotus ostreatus*) 菌絲體萃取液麥角硫因之分離；Cremades 等人亦於 2015 年利用

酵素分解及特定孔徑之通透膜透析，以提高洋菇 (*Agaricus bisporus*) 子實體乾燥粉末水萃液麥角硫因之含量。因此，本研究欲利用切向流過濾及製備管柱層析建立麥角硫因純化方法，期盼能從金頂側耳子實體粉末中純化出麥角硫因。

先前實驗結果可知，微波輔助萃取可獲得較高麥角硫因萃取量 (1.92 mg/g dw)，因此，後續選用微波輔助萃取液作為純化之原液。圖二十一 (A) 為微波輔助萃取液之 HPLC 分析圖譜，而圖二十一 (B) 為麥角硫因標準品 HPLC 分析圖譜，由圖譜可知麥角硫因滯留時間約為 24 分鐘。圖二十一 (A) 可看出微波輔助萃取液存在許多雜質。本研究先利用切向流過濾將 1 kDa 以上之大分子雜質去除，經此步驟後，將濾液於 50°C 下減壓濃縮至 100 mL，再以 Intersil™ Diol COLUMN 製備型管柱進行純化。先利用分液收集器個別收集分液管，再利用 HPLC 分析各管數麥角硫因的含量並收集含量高的分液管，合併後配合 NH<sub>2</sub> 分析型管柱，進行麥角硫因含量分析，由圖二十二可看出經純化後之雜質幾乎都已去除。

表二十九顯示在純化過程中 (微波輔助萃取、切向流過濾及製備型管柱純化) 各步驟之麥角硫因濃度、總量、純度及產率。金頂側耳子實體粉末經微波輔助萃取後，麥角硫因純度為 24.48%；經切向流過濾後，純度稍微提升至 29.03%，產率為 74.43%；最後經製備型管柱純化後，麥角硫因純度為 83.25%，產率為 65.72%。過程中產率下降的原因可能有二：一為操作過程中目標物流失，二是在製備型管柱純化過程，為收集含量較高之麥角硫因區分液，捨棄部分含量少及雜質較多之區分液。因此，金頂側耳子實體微波輔助萃取液原含有 55.31 mg 的麥角硫因；經切向流過濾及製備型管柱純化後，可回收純度為 83.25% 之麥角硫因，總量為 36.35 mg。

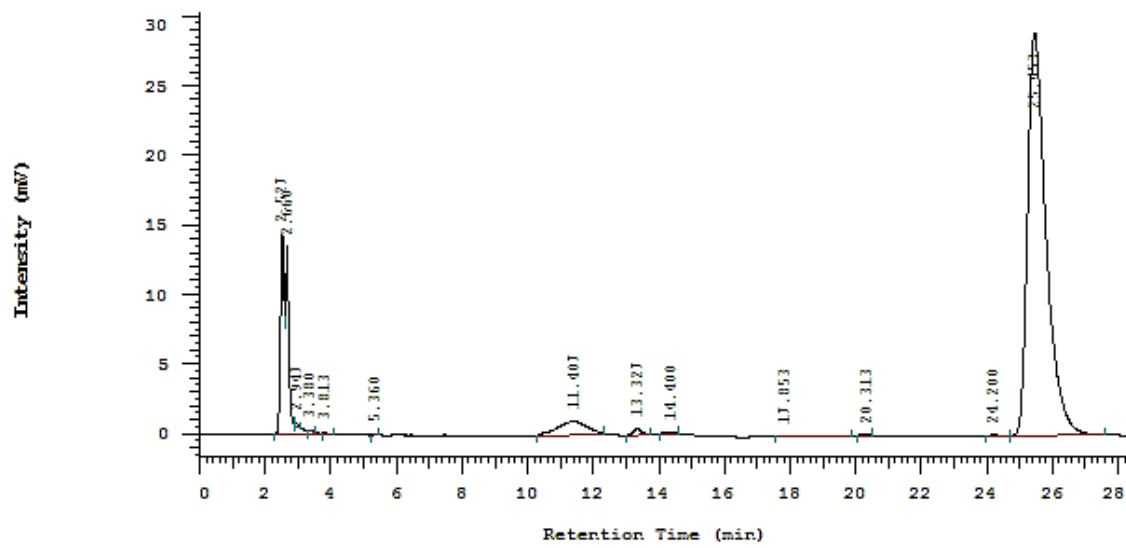
Cremades 等人曾於 2015 年利用酵素分解及通透膜透析，藉以分離洋菇子實體乾燥粉末水萃液之麥角硫因，實驗結果顯示凍乾及噴霧乾燥粉末麥角



圖二十一、金頂側耳子實體粉末微波輔助萃取液 (A) 及麥角硫因標準品 (B) HPLC 圖譜

Figure 21. HPLC chromatograms of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder extract obtained by microwave-assisted extraction (A) and ergothioneine standard (B)





圖二十二、金頂側耳子實體粉末經製備型管柱純化之 HPLC 圖譜

Figure 22. HPLC chromatogram of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder extract obtained by microwave-assisted extraction Intersil™ Diol column purification

表二十九、麥角硫因分離純化表

Table 29. Ergothioneine purity and yields of the different steps from *Pleurotus citrinopileatus* fruting body powder

	Dry weight (g)	Volume (mL)	Ergothioneine ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ergothioneine (mg)	Purity (%) <sup>a</sup>	Recovery (%) <sup>b</sup>
crowave extraction	38.727	1130	48.95	55.31	24.48	100
Tangential Flow Filtration		750	54.90	41.17	29.03	74.43
Intersil™ Diol COLUMN		100	363.66	36.37	83.25	65.72

<sup>a</sup> Purity: Calculated by the ratio of ergothioneine area to total peak area in high performance liquid chromatogram

<sup>b</sup> Recovery rate: Calculated by dividing the total amount of ergothioneine in the microwave-assisted extraction by the ergothioneine content obtained in each purification step

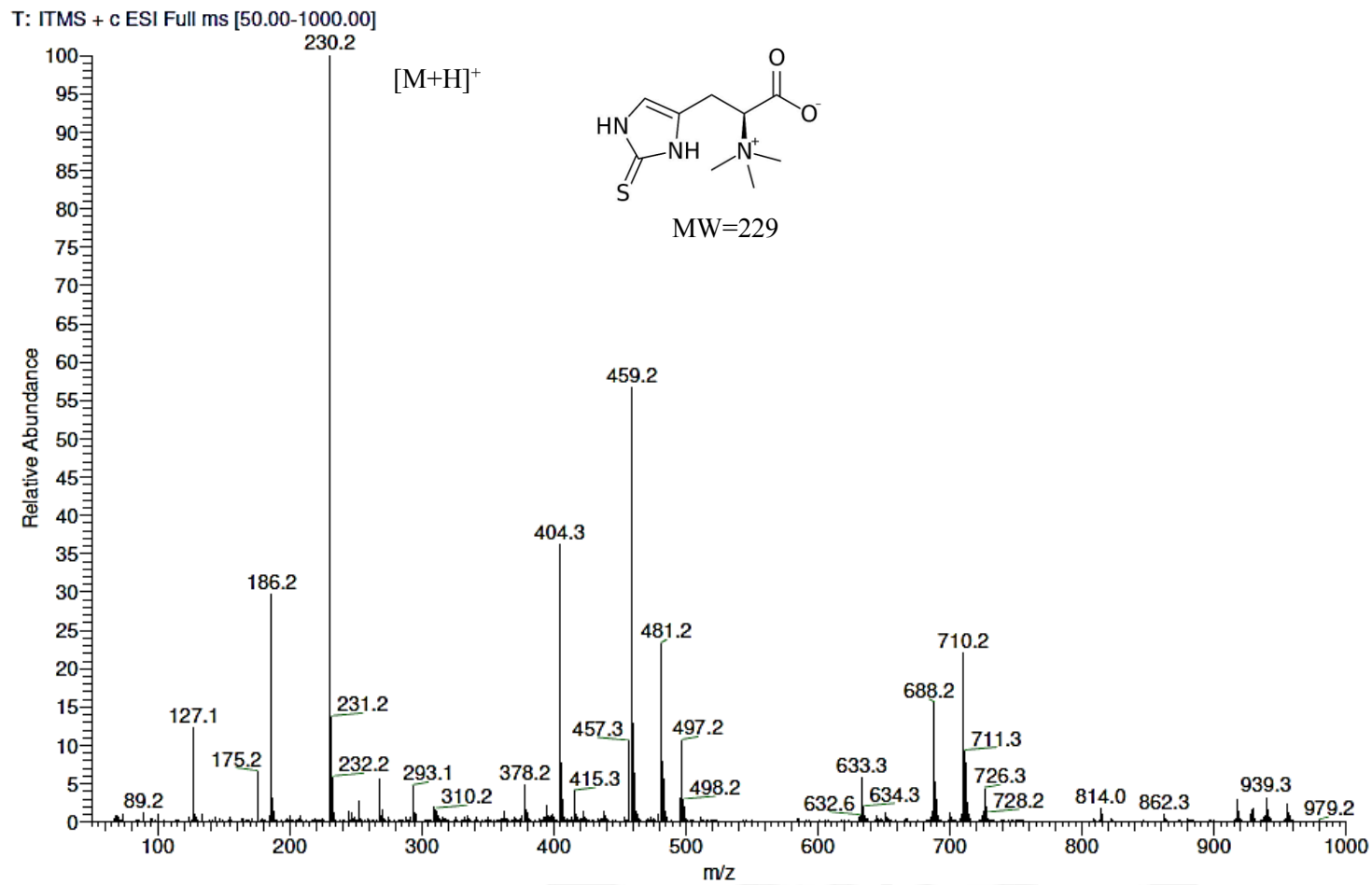
硫因回收率分別為 79.37 及 78.22%，然兩者麥角硫因純度僅 11.86 及 5.50%。

由本研究結果可得知，利用切向流過濾及製備型管柱，可得較高純度之麥角硫因，以整體效益及成本的考量，此純化流程是可行且具經濟效益的。

#### 四、麥角硫因純化物鑑定

質譜分析技術係利用分析物於真空內形成離子後，在電場和磁場作用下，依質荷比 ( $m/z$ ) 大小不同而分離。軌道阱質譜術 (Orbitrap Mass Spectrometry) 為近年來發展的新型高解析質譜技術，其原理為利用高靜電場方式，將離子捕捉於特殊的軌道阱中，離子在此阱中運動時，會產生特殊的圓周半徑及震盪頻率，而此頻率與質荷比有關，經由傅立葉轉換方式，可將其轉變為該離子之精確質量數。本研究鑑定所使用到的是 LTQ-Orbitrap (二維線性離子阱式傅立葉轉換電場軌道多次質譜系統)，LTQ Orbitrap 是由兩種不同類型的質譜組成，前端為二維線性離子阱質譜 LTQ，提供結構碎片信息；後端為 Orbitrap 高分辨質譜，提供元素組成，二者之間藉由一個彎曲雙曲面四極桿 C-Trap 相連接，其作用是將離子聚焦及把離子束推入 Orbitrap 的裝置。和其它質譜儀器相比，前端的 LTQ 是可獨立工作的低分辨質譜，可完成所有的離子阱質譜如 MS、MS / MS 和 MS<sup>n</sup> 分析；而在進行高分辨質譜分析時，LTQ 的作用是聚集離子和產生多級碎片，透過 C-Trap 壓縮成狹窄一束後送入 Orbitrap；其優點為耐用性高、容易操作和維護 (無須內標)、高分辨率及高解析度，與 Q-TOF 相比，更適合做定性和結構鑑定分析。

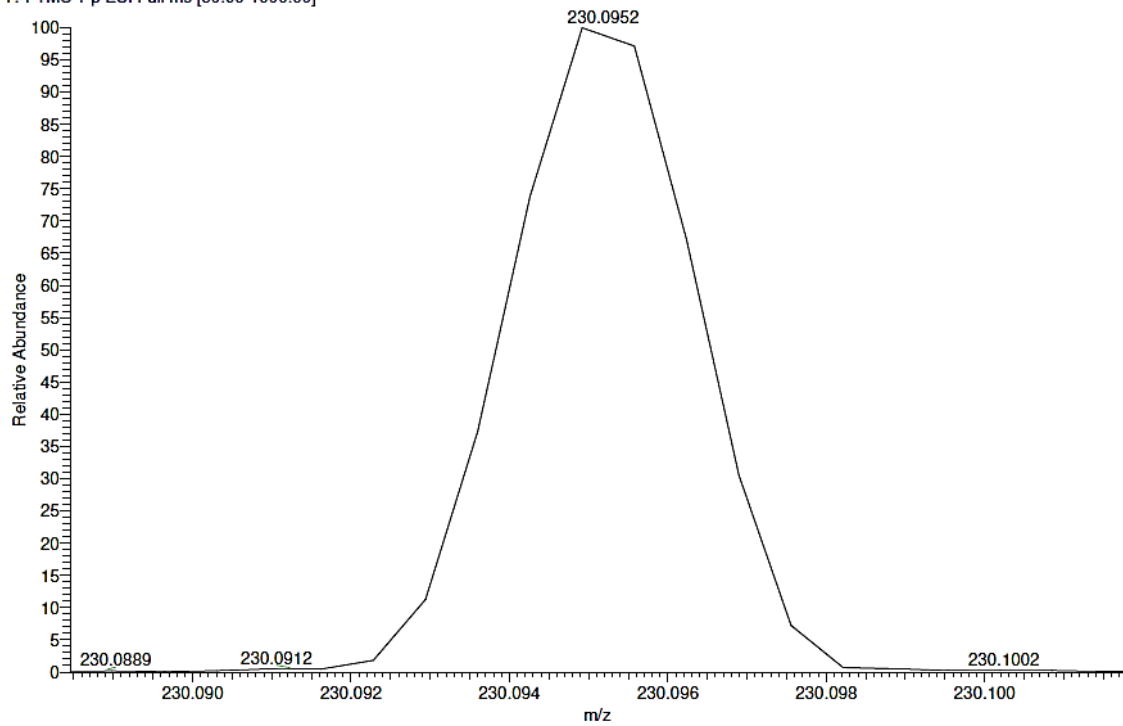
麥角硫因標準品及純化後之樣品，選用適合極性較高化合物之電灑離子技術 (electrospray ionization, ESI)，進行選擇性掃描，掃瞄範圍為 50-1000  $m/z$ ，可得到電灑離子圖譜及軌道阱質譜圖。由圖二十三可得知麥角硫因標準品 [M+H]<sup>+</sup> 離子之質荷比為 230.2  $m/z$ ；另圖二十四為高解析掃描下的軌道阱質圖



圖二十三、麥角硫因標準品之電灑游離質譜圖

Figure 23. Finnigan LCQ ion-trap mass spectrum of ergothioneine standard

94-Ergothioneine standard-H#1-20 RT: 0.01-0.28 AV: 20 NL: 6.88E6  
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-1000.00]

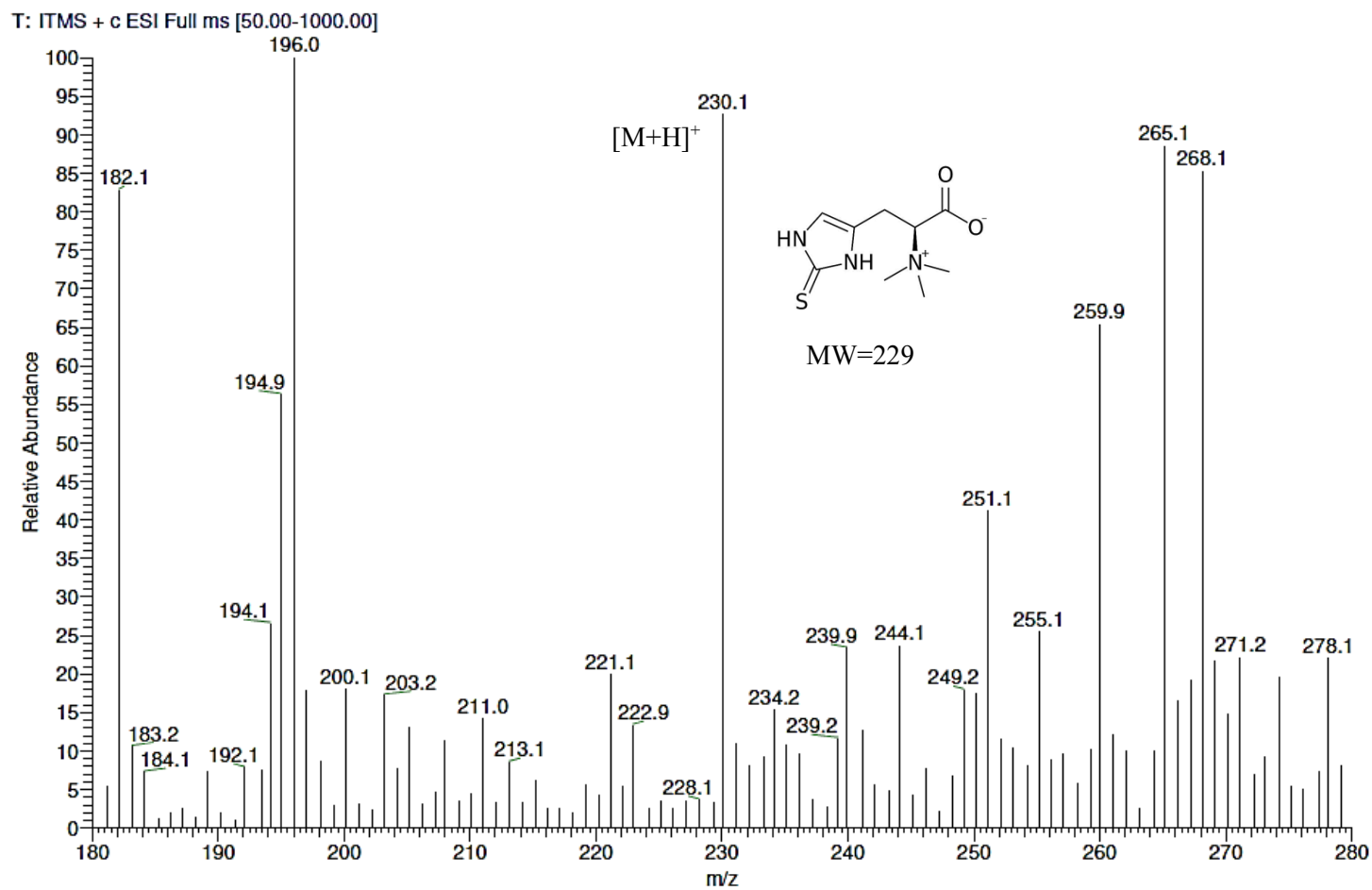


圖二十四、麥角硫因標準品之軌道阱質譜圖

Figure 24. LTQ Orbitrap XL spectrum of ergothioneine standard

，其質荷比更加精確，為  $230.0952\ m/z$ ；此外，由圖二十五可知純化物之  $[M+H]^+$  離子之質荷比為  $230.1\ m/z$ ，高解析掃描下的軌道阱質圖下（圖二十六），其質荷比為  $230.0954\ m/z$ ，因實驗使用電灑離子技術分析，必須將樣品先行離子化，故可推知麥角硫因純化物分子量為 229，與標準品所標示之分子量一致，且實際值與誤差值之偏差為  $-1.43\ ppm$ ，小於  $5\ ppm$ ，因此，本研究之純化物為麥角硫因。

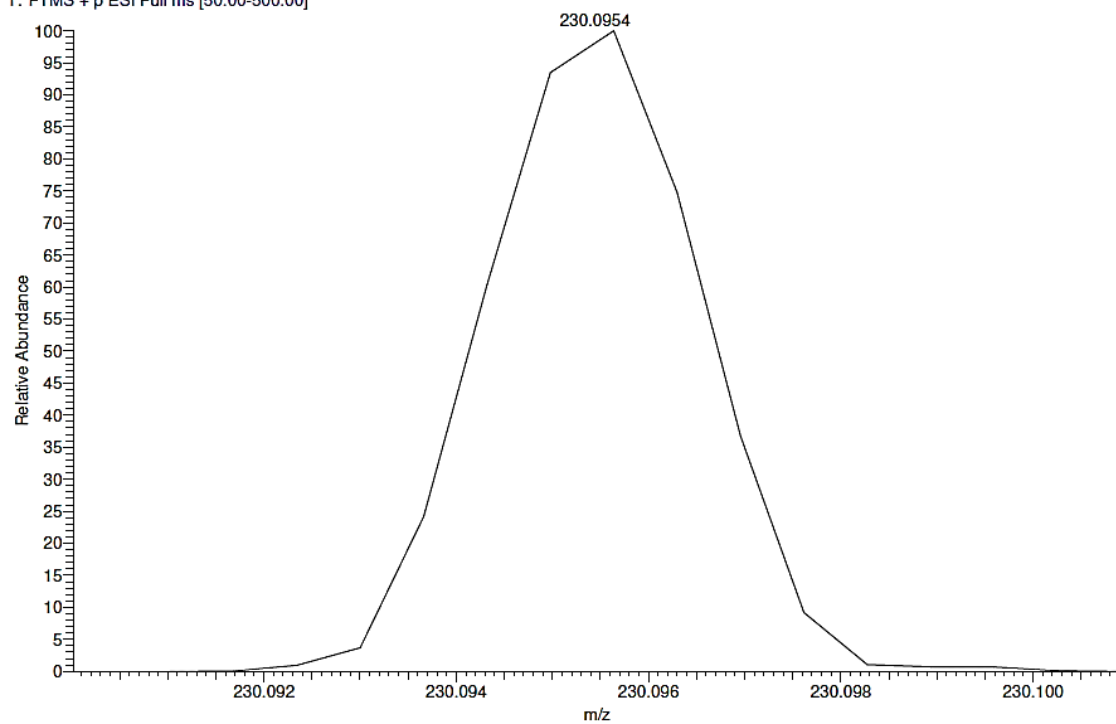




圖二十五、微波輔助萃取金頂側耳子實體純化物之電灑游離質譜圖

Figure 25. Finnigan LCQ ion-trap mass spectrum of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder obtained by microwave-assisted extraction

84-Ergothioneine sample-H #1-20 RT: 0.01-0.28 AV: 20 NL: 8.16E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-500.00]



圖二十六、麥角硫因純化物之軌道阱質譜圖

Figure 26. LTQ Orbitrap XL spectrum of *Pleurotus citrinopileatus* fruiting body powder obtained by microwave-assisted extraction



## 第五章 結論

本研究主要探討金頂側耳子實體麥角硫因之新型萃取方式，包括微波與超音波輔助萃取方法，利用一次一因子之探討，從結果中挑選出顯著影響因子，再利用反應曲面法探討各因子間之交互作用，藉以得到最大萃取量之最適萃取條件並對萃取物進行抗氧化性質評估；此外，亦利用製備型管柱純化萃取液中的麥角硫因。研究結果顯示，在一次一因子方面，微波輔助萃取之一次一因子最佳萃取條件為功率 500 W、時間 30 分鐘及固液比 1:30；超音波一次一因子最佳萃取條件為功率 75 W、時間 40 分鐘及固液比 1:30；後續利用反應曲面法進行最適萃取條件探討。微波輔助萃取最適化條件為功率 552 W、時間 29 分鐘及固液比 1:31；超音波輔助萃取最適化條件為：功率 74 W、時間 47 分鐘及固液比 1:20，預測萃取量與實際萃取量分別為 1.92 mg/g dw 與 1.92 mg/g dw；1.53 mg/g dw 與 1.50 mg/g dw，並無顯著差異，可得知模型為有效的。

此外，以微波、超音波輔助萃取物、熱水萃取物及麥角硫因標準品進行抗氧化能力分析，並利用  $EC_{50}$  來評估四者之抗氧化能力。在清除 DPPH 自由基能力方面，麥角硫因標準品與微波輔助萃取物相當，較超音波及熱水萃取物為佳；在螯合亞鐵離子能力方面，麥角硫因標準品大於熱水萃取物及微波輔助萃取物，並大於超音波輔助萃取物；還原能力部分，麥角硫因標準品較微波輔助萃取物及超音波輔助萃取物佳，且顯著大於熱水萃取物；清除 ABTS 自由基能力方面，麥角硫因標準品大於超音波輔助萃取物與微波輔助萃取物，三者顯著大於熱水萃取物。

最後，本研究以金頂側耳子實體粉末經微波輔助萃取及製備型管柱純化，以獲得麥角硫因純化物，其純度和產率分別為 83.25% 及 65.72%；純化物經 LTQ Orbitrap/MS 鑑定，質荷比為 230.0954  $m/z$ ，可確認純化物即為

麥角硫因。

綜上所述，以微波輔助萃取金頂側耳子實體粉末可得高量之麥角硫因，再以製備型管柱純化可得高純度之麥角硫因純化物。未來，亦可利用反應曲面法進行機能性成分萃取含量探討，作為開發具保健功效之麥角硫因相關產品之參考應用。



## 參考文獻

- 毛正倫。2002。食藥用菇類產品之加工利用。中興大學農業期刊。40 (4)。台中，台灣。
- 彭金騰。2011。東亞近年食用菌生產概況。菇類產業發展研討會專刊。155 (9-21)。
- 李喜范。1981。野生金頂側耳的分離和栽培技術。《食用菌》。3 (7)。
- 林欣儀。2016。液態培養之含高麥角硫因珊瑚菇菌絲體及其生理活性。國立中興大學食品暨應用生物科技學系所學位論文。台中，台灣。
- 胡予捷。2016。杏鮑菇麥角硫因萃取方法與純化之探討及其抗氧化性質評估。東海大學食品科學系碩士論文。台中，台灣。
- 涂庭璋。2016。以固態發酵製備猴頭菇糙米及其抗氧化性質。東海大學食品科學系碩士論文。台中，台灣。
- 郭吟盈。2015。微波輔助萃取北蟲草機能性成分之最適化條件。東海大學食品科學系碩士論文。台中，台灣。
- 郭芸禎。2018。以固態發酵製備北蟲草茶葉及其抗氧化與抑菌活性。東海大學食品科學系碩士論文。台中，台灣。
- 張影、包海鷹、李玉。2003。珍貴食藥用菌金頂側耳研究現狀。吉林農業大學學報。25 (1)：54-57。
- 彭金騰。2011。東亞近年食用菌生產概況。菇類產業發展研討會專刊。155 (9-21)。
- 楊珺堯。2017。非熱超音波技術在食品萃取與發酵製程上之應用。國立中興大學農林學報。65(3): 125-136
- 鄧富元。2006。NF- $\kappa$ B 在發炎反應、細胞凋亡與癌症生成過程中的調控。中華牙誌。25 (1)：12-24
- 劉芷翔。2012。丹蔘之抗菌與抗氧化活性探討。義守大學生物技術與化學工程研究所碩士論文。高雄，台灣。
- Akanmu, D., Cecchini, R., Aruoma, O. I. (1991). The antioxidant action of ergothioneine. Archives of Biochemistry and Biophysics, 288(1), 10-16.
- Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J. H. (2017). Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16(2), 295-315.
- Ani, T. A., Calinescu, I., & Lavric, V. (2012). Microwave Extraction of active principles from medicinal plants 74(2), 130-142.
- Araujo, P. W., & Brereton, R. G. (1996). Experimental design II. Optimization. TrAC

Trends in Analytical Chemistry, 15(2), 63-70.

- Arduini, A., Eddy, L., & Hochstein, P. (1990). Detection of ferryl myoglobin in the isolated ischemic rat heart, 9(6), 511-3.
- Arunkumar, A., Zhang, J., Singh, N. (2018). Ultrafiltration behavior of partially retained proteins and completely retained proteins using equally-staged single pass tangential flow filtration membranes. Biotechnology Progress, 34(5), 1137-1148.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. Journal of Food Engineering, 117(4), 426-436.
- Barrera Vázquez, M. F., Comini, L. R., Martini, R. E. (2014). Comparisons between conventional, ultrasound-assisted and microwave-assisted methods for extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae). Ultrasonics Sonochemistry, 21(2), 478-484.
- Bas, D., & Boyacı, I. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. Journal of Food Engineering, 78, 836-845.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta, 76(5), 965-977.
- Bhattacharya, M., Srivastav, P. P., & Mishra, H. N. (2014). Optimization of process variables for supercritical fluid extraction of ergothioneine and polyphenols from *Pleurotus ostreatus* and correlation to free-radical scavenging activity. The Journal of Supercritical Fluids, 95(1), 51-59.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. The World Allergy Organization journal, 5(1), 9-19.
- Bobek, P., Ginter, E., Jurčovičová, M. (1991). Cholesterol-Lowering effect of the mushroom *Pleurotus ostreatus* in Hereditary Hypercholesterolemic Rats. Annals of Nutrition and Metabolism, 35(4), 191-195.
- Botta, C., Di Giorgio, C., Sabatier, A, S. (2008). Genotoxicity of visible light (400 – 800nm) and photoprotection assessment of ectoin, l-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 91(1), 24-34.
- Carlsson, J., Kierstan, M. P. J., & Brocklehurst, K. (1974). Reactions of L-Ergothioneine and Some Other Aminothiones with 2,2'- and 4,4'-Dipyridyl Disulphides and of L-Ergothioneine with Iodoacetamide. Biochemical Journal,

139 (1), 221.

- Chan, C. H., Yusoff, R., Ngoh, G. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants, 1218(37), 6213-6225.
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S. (2012). Ultrasonics in food processing – Food quality assurance and food safety, 26(2), 88-98.
- Cheah, & Halliwell. (2012). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Basis of Disease*, 1822(5), 784-793.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
- Chemat, F., Zill e, H., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835.
- Chen, Ho, K. J., Hsieh, Y. J. (2012). Contents of lovastatin,  $\gamma$ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 274-278.
- Chen, X., Wang, W., Li, S. (2010). Optimization of ultrasound-assisted extraction of Lingzhi polysaccharides using response surface methodology and its inhibitory effect on cervical cancer cells. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 944-948.
- Chen, Ma, C. Y., Tsai, P. F. (2010). In Vitro Antitumor and Immunomodulatory Effects of the Protein PCP-3A from Mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12117-12122.
- Cheung, B., Kwan, M., Chan, R. (2016). Chapter 47 - Potential of Asian Natural Products for Health in Aging. *Molecular Basis of Nutrition and Aging*, 659-676
- Chien, R. C., Yang, S. C., Lin, L.-M. (2016). Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Pulsed Light Irradiated *Lentinula edodes*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4), e13045.
- Chivassa, G., Fornari, C., Sirovichr, R. (2017). A mathematical model to study breast cancer growth. In 2017 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM), 1438-1445.
- Cho, Y. E., Byun, Y. M., Kwak, E. H. (2004). Potential Antioxidant Trace Mineral (Zn, Mn, Cu and Fe) Concentrations Measured by Biochemical Indices in South Koreans, 9(4), 374-382.

- Chow, G. I. (2017). Tangential Flow Filtration for the Purification of Lucentis, University of Nevada, Reno.
- Chupin, L., Maunu, S. L., Reynaud, S. (2015). Microwave assisted extraction of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark: Impact of particle size and characterization. *Industrial Crops and Products*, 65, 142-149.
- Corrêa, R. C. G., de Souza, A. H. P., Calhelha, R. C. (2015). Bioactive formulations prepared from fruiting bodies and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. *Food & Function*, 6(7), 2155-2164.
- Cumming, B. M., Chinta, K. C., Reddy, V. P. (2017). Role of Ergothioneine in Microbial Physiology and Pathogenesis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 28(6), 431-444.
- Danlami, J. M., Arsad, A., Zaini, M. A. A. (2014). A comparative study of various oil extraction techniques from plants. 30(6), 605-626.
- Demirel, M., & Kayan, B. (2012). Application of response surface methodology and central composite design for the optimization of textile dye degradation by wet air oxidation. *International Journal of Industrial Chemistry*, 3(1), 24.
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1245049.
- Dorney, K. M., Baker, J. D., Edwards, M. L. (2014). Tangential Flow Filtration of Colloidal Silver Nanoparticles: A “Green” Laboratory Experiment for Chemistry and Engineering Students. *Journal of Chemical Education*, 91(7), 1044-1049.
- Dranca, F., & Oroian, M. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 637-646.
- Dubost, N. J., Ou, B., & Beelman, R. B. (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 105(2), 727-735.
- Duncan, D. B. (1955). Multiple Range and Multiple F Tests. *Biometrics*, 11(1), 1-42.
- Dwivedi, G., & Sharma, M. P. (2015). Application of Box – Behnken design in optimization of biodiesel yield from Pongamia oil and its stability analysis. *Fuel*,

145, 256-262.

- Eskilsson, C., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
- Ey, J., Schömig, E., & Taubert, D. (2007). Dietary Sources and Antioxidant Effects of Ergothioneine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6466-6474.
- Ferreira, Bruns, R. E., Ferreira, H. S. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186.
- Ferreira, S., Bruns, R., Ferreira, H. S. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, 597(2), 179-186.
- Franzoni, F., Colognato, R., Galetta, F. (2006). An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(8), 453-457.
- Ghosh, N., Mitra, D. K., & Chakravarty, D. K. (1991). Composition analysis of tropical white oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus*). *Annals of Applied Biology*, 118(3), 527-531.
- Grzenia, D. L., Carlson, J. O., & Wickramasinghe, S. R. (2008). Tangential flow filtration for virus purification. *Journal of Membrane Science*, 321(2), 373-380.
- Guéguen, C., Belin, C., & Dominik, J. (2002). Organic colloid separation in contrasting aquatic environments with tangential flow filtration. *Water Research*, 36(7), 1677-1684.
- Gude, V. G., Patil, P., Martinez-Guerra, E. (2013). Microwave energy potential for biodiesel production. *Sustainable Chemical Processes*, 1(1), 5.
- Guijarro, M. V., Indart, A., Aruoma, O. I. (2002). Effects of ergothioneine on diabetic embryopathy in pregnant rats. *Food and Chemical Toxicology*, 40(12), 1751-1755.
- Hu, S. H., Wang, J. C., Lien, J. L. (2006). Antihyperglycemic effect of polysaccharide from fermented broth of *Pleurotus citrinopileatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(1), 107-113.
- Huang, G. W. (2003). Taste quality and antioxidant and antimutagenic properties of *Pleurotus citrinopileatus*. Master's thesis, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan.
- Jang, J. H., Aruoma, O. I., Jen, L. S. (2004). Ergothioneine rescues PC12 cells from  $\beta$ -amyloid-induced apoptotic death. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(3), 288-299.

- Kalaras, M., P. Richie, J., Calcagnotto, A. (2017). Mushrooms: A rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione, 233,429-433
- Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction, 13,105-113
- Kelly, W., Scully, J., Zhang, D. (2014). Understanding and modeling alternating tangential flow filtration for perfusion cell culture. *Biotechnology Progress*, 30(6), 1291-1300.
- Kerley, R., Mc Carthy, C., B. Kell, D. (2017). The Potential Therapeutic Effects of Ergothioneine in Pre-eclampsia, 117, 145-157.
- Khuri, A. I. (2017). Response Surface Methodology and Its Applications In Agricultural and Food Sciences. *Biom Biostat Int J*, 5(5).
- Kim, M. Y., Seguin, P., Ahn, J. K. (2008). Phenolic Compound Concentration and Antioxidant Activities of Edible and Medicinal Mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7265-7270.
- Laurenza, I., Colognato, R., Migliore, L. (2008). Modulation of palmitic acid-induced cell death by ergothioneine: Evidence of an anti-inflammatory action, 33(4),237-247.
- Leardi, R. (2009). *Experimental Design in Chemistry: A Tutorial*, 65(1-2), 161-172.
- Lee, Y. L., Huang, G. W., Liang, Z. C. (2007). Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *LWT - Food Science and Technology*, 40(5), 823-833.
- Lee, W. Y., Park, E. J., Ahn, J. K. (2009). Ergothioneine contents in fruiting bodies and their enhancement in mycelial cultures by the addition of methionine. *Mycobiology*, 37(1), 43-47.
- Li, Y. R., Liu, Q. H., Wang, H. X. (2008). A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(1), 51-57.
- Liu, J., Sun, Y., Yu, H. (2012). Purification and identification of one glucan from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus* (Fr.) Singer). *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 348-352.
- Luque, & Luque de Castro. (2004). Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment: Application to the extraction of



- total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography A*, 1034(1), 237-242.
- Luque de Castro, M. D., & Garcia Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1), 1-10.
- Ma, G. X., Yang, W. J., Zhao, L.Y. (2018). A critical review on the health promoting effects of mushrooms nutraceuticals. *Food Science and Human Wellness*, 7(2), 125-133.
- Mahmoud, M. E., Hassan, S. S. M., Kamel, A. H. (2018). Fast microwave-assisted sorption of heavy metals on the surface of nanosilica-functionalized-glycine and reduced glutathione. *Bioresource Technology*, 264, 228-237.
- Mandal, Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007). Microwave Assisted Extraction-An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research *Pharmacognosy Reviews*, 1(1).
- Mandal, Subhash, Mandal, V., et al. (2015). Chapter 6 - Classification of Extraction Methods. In S. C. Mandal, V. Mandal & A. K. Das (Eds.), *Essentials of Botanical Extraction* (pp. 83-136). Boston: Academic Press.
- Martin, K. R. (2010). The Bioactive Agent Ergothioneine, a Key Component of Dietary Mushrooms, Inhibits Monocyte Binding to Endothelial Cells Characteristic of Early Cardiovascular Disease. *Journal of Medicinal Food*, 13(6), 1340-1346.
- Martino, E., Ramaiola, I., Urbano, M. (2006). Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1125(2), 147-151.
- Melville, D. B. (1959). Ergothioneine. *Vitamins & Hormones*, 17(1959), 155-204.
- Musumeci, T. L., Antonio; Bonaccorso, Angela; Pignatello, Rosario; Puglisi, Giovanni. (2018). Tangential Flow Filtration Technique: An Overview on Nanomedicine Applications. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 6(13), 48-60.
- Negrete, A., Pai, A., & Shiloach, J. (2014). Use of hollow fiber tangential flow filtration for the recovery and concentration of HIV virus-like particles produced in insect cells. *Journal of Virological Methods*, 195, 240-246.
- Onuska, F. I., & Terry, K. A. (1995). Microwave extraction in analytical chemistry of pollutants: Polychlorinated biphenyls. *Journal of High Resolution chromatography*, 18(7), 417-421.

- Patel, S., & Goyal, A. (2012). Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*, 2(1), 1-15.
- Pinto, N. D. S. (2018). Evolution of TFF-based perfusion: A path towards non product sieving and direct chromatography integration. *Cell Culture Engineering XVI*.
- Rougee, M., Bensasson, R. V., Land, E. J. (1988). Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity. *Photochemistry and Photobiology*, 47(4), 485-489.
- Routray, W., & Orsat, V. (2014). MAE of phenolic compounds from blueberry leaves and comparison with other extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 58, 36-45.
- Ruan, Z., Zhou, Q. C., & Deng, Z. Y. (2008). Study on Optimization of Extraction Conditions of *Platycodon grandiflorum* A. DC polysaccharide using response surface methodology. *Food Science*, 29(12), 283-287.
- Schultz, H. (2017). L-ergothioneine poised for breakthrough in 2017, *Nutra Ingredients USA*, 114(19).
- Shamtsyan, M., Konusova, V., Maksimova, Y. (2004). Immunomodulating and anti-tumor action of extracts of several mushrooms. *Journal of Biotechnology*, 113(1), 77-83.
- Subhash, Vivekananda, M., & Kumar, D. (2015). Chapter 6-Classification of Extraction Methods. In S. C. Mandal, V. Mandal & A. K. Das (Eds.), *Essentials of Botanical Extraction*, (pp. 83-136). Boston: Academic Press.
- Svobodova, A., Walterova, D., & Vostalova, J. (2006). Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 150(1), 25-38.
- Tang, R. M. Y., Cheah, I. K.-M., Yew, T. S. K. (2018). Distribution and accumulation of dietary ergothioneine and its metabolites in mouse tissues. *Scientific Reports*, 8(1), 1601.
- Tepwong, P., Giri, A., Sasaki, F. (2012). Mycobial enhancement of ergothioneine by submerged cultivation of edible mushroom mycelia and its application as an antioxidative compound, *131(1)*, 247-258.
- Vadde, K. K., Syrotiuk, V. R., & Montgomery, D. C. (2006). Optimizing protocol interaction using response surface methodology. *IEEE Transactions on Mobile Computing*, 5(6), 627-639.

- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40.
- Vilkhu, K., Manasseh R, Mawson R. (2011). Ultrasound technologies for food and bioprocessing. *Ultrasonic recovery and modification of food ingredients*, 345 – 368.
- Wang, Chen, F., Wu, J. (2007). Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(2), 693-700.
- Wang, J. C., Hu, S. H., Liang, Z. C. (2004). Antigenotoxicity of extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(5), 770-778.
- Wang, L. J. & Weller, C. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
- Wu, C. Y., Liang, Z. C., Lu, C. P. (2008). Effect of Carbon and Nitrogen Sources on the Production and Carbohydrate Composition of Exopolysaccharide by Submerged Culture of *Pleurotus citrinopileatus*, 16(2), 61-67.
- Yang, N. C., Lin, H. C., Wu, J. H. (2012). Ergothioneine protects against neuronal injury induced by  $\beta$ -amyloid in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 3902-3911.
- Yank, D. K. (2017). Alternative to traditional olive pomace oil extraction systems: Microwave-assisted solvent extraction of oil from wet olive pomace. *LWT*, 77, 45-51.
- Zhao, Z. Y., Zhang, Q., Li, Y. F. (2015). Optimization of ultrasound extraction of *Alisma orientalis* polysaccharides by response surface methodology and their antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 119(30), 101-109.