

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

Master Thesis

指導教授：楊芳鏘 博士

Advisor : Fan-Chiang Yang, Ph.D.



豆渣回收再利用於食藥用菇菌絲體固體培養生產生理活性成分
之研究

Reusing soybean residue for the bioactive compounds production by
solid-state fermentation of medicinal or culinary mushrooms

研究生：傅子容 撰

Graduate student : Tzu-Jung Fu

中華民國 108 年 7 月

July, 2019

摘要

近年來，藥用菇類越來越受到重視，其含有的多種生理活性都被證明對人體有益，本研究計畫分別比較不同菇類的生理活性含量，並針對靈芝做進一步的研究，包括濃度、時間及生物反應器培養，探討菇類固態發酵菌絲體生長與生理活性生成的影響。另外，也將豆渣回收再利用於固態發酵中。

研究共分為三部分，第一部分比較不同菇類的菌絲體生長及生理活性的生成，發現麥角固醇、蛋白質、捕捉 DPPH 自由基能力、還原力以及總多酚表現最好的分別是木耳(0.286mg/g)、雲芝(152.1mg/g)、杏鮑菇(109.9%)、香菇(700nm 吸收值 1.58)以及靈芝(3.03mg/g)，此部分也針對異黃酮的生物轉換做分析討論，期望利用真菌培養將異黃酮糖苷轉換成異黃酮糖苷配基，結果顯示真菌無法成功轉換，在生長過程中也有消耗異黃酮的現象。第二部分探討不同成分的添加物（綠茶、醋酸鈉、番茄汁、胡蘿蔔汁）對靈芝豆渣發酵生理活性生成的影響，結果發現：除了綠茶以外，其他三種添加物對固態發酵沒有正面效果，甚至有抑制的現象。接著改用不同綠茶粉末濃度進行固態添加物與靈芝豆渣發酵培養，綠茶粉末的添加有效提升靈芝產生粗三萜，當添加濃度為 2g/80g 培養基時有 5.02mg/g 的生成量，是控制組的 3.61 倍，但在抗氧化方面並無明顯正面的影響。第三部分為設計強制通氣多層板式反應器，作為規模放大生產基礎探討，設計兩種不同通氣量（1mL/min、0.75mL/min），實驗結果顯示，通氣量大小明顯影響靈芝菌絲體生長之情形，當通氣量大時有利於其生長。而當通氣量為 1mL/min 時，比起傳統固態發酵培養也更有助於粗三萜的合成，培養兩週的粗三萜生成量就已達到 4.57mg/g D.W.，是傳統固態發酵培養在六週時有最大值的 2.6 倍。

關鍵字：豆渣、固態發酵、靈芝、生理活性物質、生物反應器

Abstract

Medicinal mushrooms have received more and more attention recently, and their various bioactive compounds have been proved to be beneficial to the human body. The aim of this study was to explore the physiological activity content of different mushrooms and different solid-state fermentation with various concentrations, time in different types of bioreactor for the mycelium growth and metabolites of *Ganoderma lucidum*. In addition, soy residues (Okara) were reused as the medium in solid-state fermentation.

This study could be categorized into three parts. In the first part, the bioactive compounds of different mushroom fermented products were explored. The highest levels of various bioactive compounds in different fermented products were described as follows: ergosterol of 0.286mg/g D.W. in *Auricularia auricula*, protein content of 152.1mg/g D.W. in *Coriolus versicolor*, scavenging of DPPH of 109.9% in *Pleurotus eryngii*, reducing power absorbance of 1.58 in *Lentinus edodes*, and polyphenol of 3.03mg/g D.W. in *Ganoderma lucidum*. Secondly, four different types of additives sodium acetate, tomato juice, carrot juice and green tea were used as an inducer or precursor to increase the bioactive compounds production of *Ganoderma lucidum*. The results show that only green tea was found to have a positive effect on the formation of bioactive compounds. Different amounts of green tea powder were added in the solid state fermentation, and green tea powder of 2g/80g medium could effectively increase production of crude triterpenoid to the concentration of 5.02mg/g D.W., and was 3.61 times higher than the control. Finally, a novel bioreactor with forced aeration was designed for solid-state fermentation. High aeration rate was demonstrated to enhance the production of bioactive compounds and the mycelia growth. The novel bioreactor

could be used for the large-scale production in the future.

Key words: soy residues, solid-state fermentation, *Ganoderma lucidum*, bioactive compounds, bioreactor

誌謝

從大四開始進入實驗室學習，從剛開始什麼都不會到在專題競賽中獲得第一名，現在順利畢業，在一年的專題與兩年的研究生的研究過程中，感謝許多人的幫助與建議。首先感謝我的指導老師楊芳鏘教授，謝謝老師在實驗過程中不厭其煩的討論及給予的建議，讓我順利完成實驗與論文。另外，同時感謝中興大學林松池教授、弘光科技大學黃進發教授以及陸軍專科學校馬德威教授，撥空蒞臨指導參與我的口試，針對實驗及論文給予指正、建議，讓我獲益良多。更感謝馬德威學長在最後積極地給予幫助，讓我在撰寫論文時能更加順利。

總共三年的研究生活中，感謝學長威仁、適任、舜緯、戴緯、爾街，同學又誠、峻緯、日賢、禮凡，學弟妹鏡璇、恆奕、界豪、世傑、淮安、沛修、宓璇、承志，以及在這段期間曾經幫助過我的老師及同學與朋友給的意見與幫助，讓我在實驗室的生活多采多姿。

最後感謝我的父母，謝謝他們的支持與鼓勵，讓我能無後顧之憂的學習研究並且完成我的學業，這一路上謝謝所有遇見的人，謝謝每一位曾對我伸出援手的人。

目錄

摘要.....	I
Abstract.....	II
誌謝.....	IV
目錄.....	V
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	X
第一章 緒論.....	1
1-1 前言.....	1
1-2 研究動機與目的.....	2
第二章 文獻回顧.....	3
2-1 真菌類的介紹.....	3
2-1-1 靈芝.....	3
2-1-2 雲芝.....	8
2-1-3 香菇.....	9
2-1-4 猴頭菇.....	11
2-1-5 黑木耳.....	13
2-1-6 秀珍菇.....	15
2-1-7 杏鮑菇.....	15
2-2 固態發酵.....	18
2-2-1 固態發酵培養之優點.....	18
2-2-2 固態發酵培養之缺點.....	20
2-2-3 固態發酵與傳統深層培養之比較.....	21
2-2-4 固態發酵參數.....	22

2-2-5 板式固態生物反應器	23
2-3 固態基質	24
2-3-1 豆渣	24
2-3-2 小米	28
2-4 異黃酮	30
2-4-1 大豆異黃酮(soy isoflavone, SI)	31
2-4-2 大豆異黃酮的生物可用度	32
2-4-3 異黃酮糖苷(IG)到異黃酮糖苷配基(IA)的微生物轉換	33
2-5 前驅物及誘導子添加	35
2-5-1 三萜類合成機制	35
2-5-2 醋酸鈉	37
2-5-3 番茄	37
2-5-4 胡蘿蔔	38
2-5-5 綠茶	38
第三章 實驗材料與方法	40
3-1 實驗架構	40
3-2 實驗材料	41
3-2-1 實驗菌株	41
3-2-2 實驗藥品與材料	42
3-3 實驗儀器與設備	44
3-4 實驗方法	45
3-4-1 培養基製備	45
3-4-2 不同菇類豆渣發酵物生理活性比較	45
3-4-3 時間對不同液態添加物豆渣靈芝培養之影響	45
3-4-4 濃度對綠茶粉末添加於豆渣靈芝培養之影響	46

3-4-5 設計多層板反應器培養靈芝.....	47
3-5 分析方法.....	48
3-5-1 樣品製備.....	48
3-5-2 甲醇萃取液製備.....	48
3-5-3 捕捉 DPPH 自由基能力測定.....	48
3-5-4 還原力 (Reducing power) 測定.....	49
3-5-5 總多酚(Total phenol)測定.....	49
3-5-6 麥角固醇測定(Ergosterol)測定.....	51
3-5-7 蛋白質測定.....	53
3-5-8 粗三萜(Crude triterpenoid)測定.....	55
3-5-9 異黃酮測定.....	56
第四章 結果與討論.....	57
4-1 不同菇類生理活性之比較.....	57
4-2 不同菇類異黃酮生物轉換之比較.....	61
4-3 時間對不同液態添加物豆渣靈芝培養之影響.....	62
4-3-1 綠茶及醋酸鈉溶液添加.....	64
4-3-2 番茄汁及胡蘿蔔汁添加.....	68
4-4 濃度對不同固態添加物豆渣靈芝培養之影響.....	72
4-4-1 綠茶粉末添加.....	72
4-5 多層板式反應器培養靈芝.....	76
第五章 結論與未來展望.....	80
5-1 結論.....	80
5-2 未來展望.....	81
第六章 參考文獻.....	82

圖目錄

圖 2-1 靈芝生活史	4
圖 2-2 麥角固醇含量與不同草本植物菌株所含的菌絲體數量之關係	7
圖 2-3 黑木耳多醣對黑色素瘤小鼠的影響	14
圖 2-4 板式固態生物反應器	23
圖 2-5 每一杯豆漿和牛奶的營養與化學物質比較	24
圖 2-6 豆渣	25
圖 2-7 植物雌激素化合物	30
圖 2-8 大豆苷元代謝為馬雌酚的路徑	33
圖 2-9 植物萜烯生合成路徑	37
圖 3-1 菌種	41
圖 3-2 多層板反應器	47
圖 3-3 總多酚檢量線	50
圖 3-4 麥角固醇檢量線	52
圖 3-5 蛋白質檢量線	54
圖 4-1 不同菇類生成之麥角固醇	58
圖 4-2 不同菇類之捕捉 DPPH 自由基能力	59
圖 4-3 不同菇類之還原力	59
圖 4-4 不同菇類之總多酚含量	60
圖 4-5 不同菇類之蛋白質含量	60
圖 4-6 靈芝豆渣固態培養過程生理活性成分隨時間變化	62
圖 4-7 靈芝豆渣固態培養過程生理活性成分隨時間變化	63
圖 4-8 綠茶及醋酸鈉添加對靈芝發酵物生成麥角固醇的影響	65
圖 4-9 綠茶及醋酸鈉添加對靈芝發酵物生成粗三萜含量的影響	65

圖 4-10 綠茶及醋酸鈉添加對靈芝發酵物捕捉 DPPH 自由基能力的影響	66
圖 4-11 綠茶及醋酸鈉添加對靈芝發酵物還原力的影響	66
圖 4-12 綠茶及醋酸鈉添加對靈芝發酵物生成總多酚的影響	67
圖 4-13 綠茶及醋酸鈉添加對靈芝發酵物生成粗三萜含量的影響	67
圖 4-14 番茄汁及胡蘿蔔汁添加對靈芝發酵物生成麥角固醇的影響	69
圖 4-15 時間對添加番茄汁及胡蘿蔔汁之靈芝捕捉 DPPH 自由基能力的影響 ...	69
圖 4-16 時間對添加番茄汁及胡蘿蔔汁之靈芝還原力的影響	70
圖 4-17 時間對添加番茄汁及胡蘿蔔汁之靈芝生成沒食子酸的影響	70
圖 4-18 時間對添加番茄汁及胡蘿蔔汁之靈芝生成粗三萜含量的影響	71
圖 4-19 不同濃度綠茶粉末對靈芝發酵物產生麥角固醇之影響	73
圖 4-20 不同濃度添加物對靈芝發酵物生成粗三萜之影響	73
圖 4-21 不同濃度綠茶粉末對靈芝發酵物捕捉 DPPH 自由基能力之影響	74
圖 4-22 不同濃度綠茶粉末對靈芝發酵物還原力之影響	74
圖 4-23 不同濃度綠茶粉末對靈芝發酵物生成總多酚含量之影響	75
圖 4-24 多層板式反應器培養對靈芝生成麥角固醇的影響	77
圖 4-25 多層板式反應器培養對靈芝捕捉 DPPH 自由基能力的影響	77
圖 4-26 多層板式反應器培養對靈芝還原力的影響	78
圖 4-27 多層板式反應器培養對靈芝生成總多酚含量的影響	78
圖 4-28 多層板式反應器培養靈芝生成粗三萜的影響	79

表目錄

表 2-1 固態發酵培養特點	18
表 2-2 固態發酵培養的缺點	20
表 2-3 固態發酵與傳統深層培養比較	21
表 2-4 豆渣中礦物質和維生素含量	25
表 2-5 豆渣和大豆蛋白中必需氨基酸組成	25
表 2-6 由各種微生物發酵豆渣生產產物	27
表 2-7 存在自然界與食品中的異黃酮化合物	31
表 2-8 從 IG 到 IA 的微生物轉換能力	34
表 2-9 茶菁中主要多元酚成分及其含量	39
表 3-1 實驗藥品清單	42
表 3-2 實驗材料清單	43
表 3-3 實驗儀器清單	44
表 3-4 麥角固醇 HPLC 設定條件	51
表 3-5 麥角固醇分析之 HPLC 移動相設定	51
表 3-6 異黃酮分析之 HPLC 條件	56
表 3-7 異黃酮分析之 HPLC 移動相設定	56
表 4-1 不同菇類異黃酮成分	61

第一章 緒論

1-1 前言

台灣六十五歲以上的老年人口已達到總人口數的 14.05%，正式宣告台灣已進入高齡化社會。這說明了科技與醫療的進步可以讓人類長壽，但是高齡化所帶來的疾病也接踵而來，在預防勝於治療的觀念下，標榜有保健功效的健康食品如眾星拱月般受到重視，各種的療效、用途如雨後春筍般發展開來。其中備受大家關注的就是從古至今人們廣為食用的食藥用菇類（王，2018）。食藥用菇雖然廣為用於民間流傳的藥方中，但許多藥效成分至今尚未闡明，其應用方面在中國已有二千多年的歷史，靈芝、雲芝、樟芝、茯苓、豬苓及冬蟲夏草等藥用菇就有明確的藥效記載(王等，1998)。近年來的研究更發現無論是子實體或菌絲體，均含有相當多量的生物活性成分，或二次代謝物質，這些成分包括生物體防禦物質(如抗生素、抗腫瘤、抗病毒物質等)，及生體機能調節物質(如降血壓、降血糖、降血脂、抗血栓、抗癌症等活性物質)(黃，2000)。

固態發酵意指微生物發酵，這種發酵方式是最接近微生物在自然環境中的生長狀態，尤其是真菌。這種技術在世界上已被使用很長的時間，在東方通常被稱做傳統的發酵食品製造。這可以被定義為一種系統，其中微生物生長在低含水量的固態基質上，已被確定為生物技術中潛在重要的方法。如今固態發酵已經被運用在大規模生物轉化和生物降解過程的技術，這在經濟上是可行的，而將其與生物程序工程結合是科學領域的一個新興發展。固態發酵更是提供了許多優於傳統深層發酵所沒有的優點，例如簡單且廉價的固態基質減少了在發酵過程中許多嚴格的參數控制，當產品的產量大時，所需要的能源相較於傳統發酵來的低，也就減少了能源廢棄物的產生（郭，2019）。

1-2 研究動機與目的

豆渣在目前來說，營養價值豐富，但經濟價值不高，又含高水量，且豆渣的產量隨著人們的對豆製品的需求增加而上升，但回收再利用的效率卻無法負荷其數量，導致過多的豆渣只能丟棄而造成環境汙染。本實驗以天然回收物-豆渣作為固態發酵之培養基質，利用相較於液態發酵能夠給予生物不同且豐富營養組成的固態培養，培養不同菇類，並比較個別的生理活性，同時達到提升回收豆渣率的期望。

另一方面，利用添加不同誘導子培養豆渣靈芝，提升菌絲體及三萜含量。更透過改良的反應器培養豆渣靈芝，期望提高生理活性成分含量的同時也能將產程縮短。

第二章 文獻回顧

2-1 真菌類的介紹

2-1-1 靈芝

靈芝(*Ganoderma lucidum*)是眾所皆知的担子菌，被稱作“不朽的蘑菇”(Li 等人, 2013)。在以靈芝固體培養來生產有效成分前，首先要了解確立靈芝屬菌株的分類系統，因為在不同種的靈芝會產生不同的產物，不同的產物會引起不同的藥效。靈芝根據 1979 年 Alexopolus 的分類系統 (Alexopolus, 1979) 是屬於真菌界 (*Myceteae*)，無鞭毛菌門 (*Amastigomycota*)，擔子菌綱 (*Basidiomycetes*)，無菌褶目 (*Aphyllorphorales*)，多孔菌科 (*Polyporaceae*) 的靈芝屬 (*Ganoderma*)；靈芝屬的外觀特性為：子實體具有光亮的表皮；擔孢子構造為卵形，且具雙層細胞壁，內壁為黃褐色有疣狀突起，外壁較薄而透明，成熟的孢子頂端為截頭狀 (Stern, 1972) (Furtado, 1965) (Donk, 1964) (許, 1988)。而靈芝屬菌株分類可以利用外觀的特性 (Stern, 1980) (許, 1988)，如：皮殼 (*crust*)、柵欄狀層的細胞 (*hymenodermelements fastigate*)、菌肉 (*context*) 等；靈芝屬菌株分類也可以由生理特性來分類，例如以酵素分析系統進行細胞外酵素活性分析、菌絲生長速度、單一雙核系之交配反應等方式來進行分類 (李, 1990)。

靈芝的擔孢子自菌褶散出後，在適當的生長環境下萌發後直接發育成菌絲，此菌絲每一節中具有一個核，一般稱為初級菌絲或單相菌絲。初級菌絲在靈芝生活史中存在時間很短，它萌發和生長主要是依靠孢子中儲存的營養。由不同性別的擔孢子所生成的初級菌絲融合後可生成具有二個核之菌絲，稱為次級菌絲或複相菌絲。由次級菌絲繼續生長最後形成有組織分化的子實體，凡是組成子實體的菌絲都稱為三級菌絲。靈芝生活史如圖 2-1 (劉, 1990) 所示。

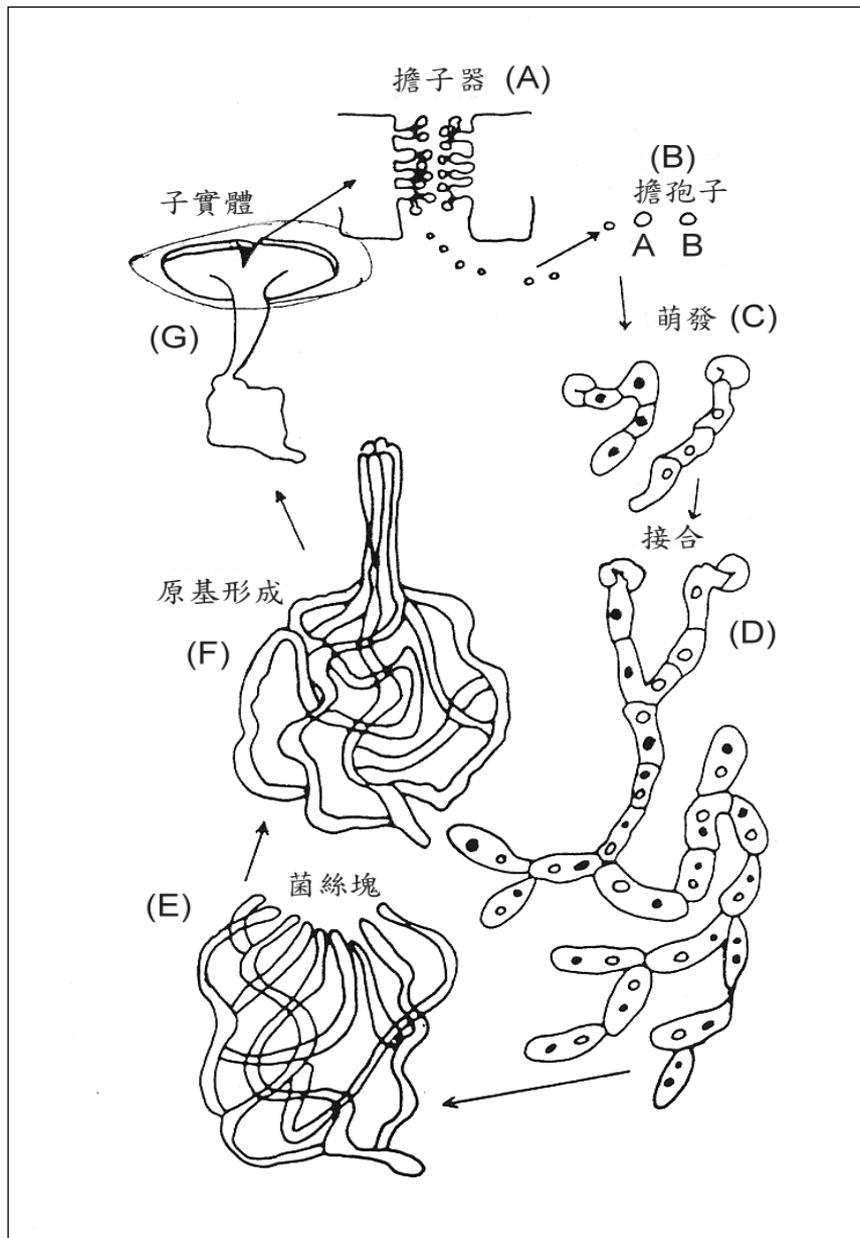


圖 2-1 靈芝生活史

成熟的靈芝子實體(G)從菌褶中的擔子器(A)散出擔孢子(B)，孢子再發芽成為不同交配形態的單核體(monok)(C)，此時的菌絲每一節只有一個細胞核，而兩條具有不同性核的單核體交配發生細胞質融合為雙核體(D)，並進行共軛分裂，形成菌絲塊(E)菌絲將繼續生長(F)在適當環境條件再生成子實體(G) (劉，1990)。

靈芝乃一天然食品藥材，天然食品的特色即含有多樣種類的成份，因此靈芝是屬於複方而非單劑；西方醫藥喜歡以單種成份製成藥劑，這也是為什麼過量服用西藥容易造成副作用的原因之一，人體臟腑機能是相當靈巧而複雜的，使用單劑容易顧此失彼導致臟腑失衡、機能失調而產生副作用；靈芝之所以被認為珍貴的藥用植物，主要是因為靈芝含有多種具有生理活性及有療效的物質，這些物質如下：

(一) 高分子多醣體(*Polysaccharide*)

靈芝之中可提取二百餘種多醣體分子，其中約有十餘種高分子量的多醣體具有抗癌作用，此十餘種多醣體分別使用於癌細胞均有抑癌作用，但其效果仍以十餘種多醣體一起使用來得好，也就是說使用多種多醣體之效果具有相乘效果。具抗癌及免疫增加作用之靈芝多醣體為 β 型之高分子多醣體（黃等人，1989），即必須有 C-6 側枝，(1-3)- β -D-glucopyranosyl-(1-3)- α -D-glucopyranosyl 之結構。由醫學臨床研究指出：靈芝多醣體之抗癌機轉可能是由靈芝之 β 型多醣體(β -(1,3)-glucan) 刺激巨噬細胞 (macrophage)，活化巨噬細胞使其分泌種種 Cytokines 以及 Lymphokines，例如：IL-I、TNF、INF、IL-II，刺激靜態 T 細胞活化，並分化成輔助性 T 細胞 (helper T cell)，繼而更進一步誘導產生自然殺戮細胞 (NK cell)、毒殺性細胞 (Cytotoxic) 與 LAK (lymphokine activated killer cell) 細胞等等一連串免疫增強反應，使動物體內增進免疫功能，發揮抗癌作用（黃等人，1989）。大陸的北京醫科大學及日本國立癌症研究中心已經研究證實，靈芝多醣體能促進人體免疫功能，並激發巨噬細胞及 T 淋巴細胞等兩大免疫細胞，產生大量和抗腫瘤有關的細胞激素，如 γ - 干擾素、 α - 腫瘤壞死因子等，有助於消滅突變細胞，降低轉形成惡性腫瘤的機率，同時改善藥物或放射線治療引發的副作用，對腫瘤防治具有重要意義。

(二) 三萜類(*Triterpenoids*)

又稱靈芝酸，三萜類是靈芝苦味的來源，約有二百餘種種類，可減輕肝炎和肝纖維化，是靈芝之所以具護肝功能的主要原因。萜類是普遍存在於植物界的化合物，在動物界為數甚少，而萜類的分類主要是依據所包含的異戊二烯單體數目，含有兩個異戊二烯單體稱為單萜(monoterpene)，於自然界常存在檸檬、極柑、薄荷中；含有三個異戊二烯單體稱為倍半萜(sesquiterpene)，於自然界存在玫瑰花中；含有四個異戊二烯單體稱為雙萜(dieterpene)，存在於維生素 A 中；含有五個異戊二烯單體稱為二倍半萜(sesterpene)；含有六個異戊二烯單體稱為三萜(triterpene)，存在於人參、甘草、地榆中(肖和陳，1989、李，2003)。另外，某些三萜類化合物，可以抑制 Angiotensin converting enzyme 而達到降血壓之目的(黃，2004)。除了護肝、降血壓功能外，三萜類還有抑制癌細胞生長、抑制組織胺釋放、防止過敏、降血脂等作用。

(三)蛋白質(*Protein*)

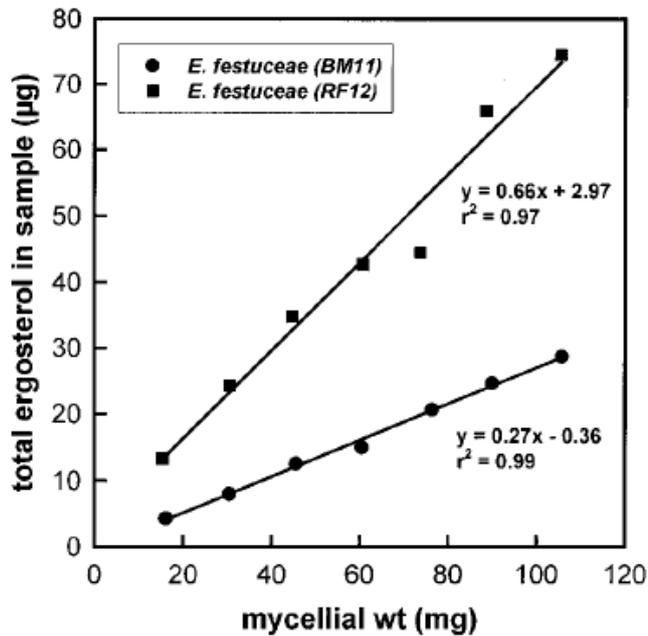
小分子蛋白質(LZ-8)、醣蛋白(Glycoprotein)。蛋白質是由氨基酸構成，而氨基酸有二十餘種，靈芝幾乎包含了所有人體必需的氨基酸(人體肝臟無法自己合成，必需由食物取得的氨基酸稱為必需氨基酸)，缺乏這些氨基酸將導致各種疾病。

(四)麥角固醇(*Ergosterol*)

麥角固醇是真菌細胞膜的重要組成成分，能夠激活防禦基因的表達，進而增加真菌類植物對病原的抵抗力(Lochman J 等人，2006)。麥角固醇經紫外光照射會轉化成維生素 D₂，而這也是素食者攝取維生素 D 的唯一來源。

Michael 在 1997 年時，分析了草種子內的內生真菌，實驗結果顯示，麥角固醇含量與草種子量以及內含的內生真菌含量呈高度相關 ($r^2=0.99$)，因此可以利用麥角固醇檢測草本植物是否含有內生真菌 (Michael, 1997)。圖 2-2 為兩種不

同的菌株分別提取不同量的菌絲體與麥角固醇的相關圖。



(Michael, 1997)

圖 2-2 麥角固醇含量與不同草本植物菌株所含的菌絲體數量之關係

(五)微量元素

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

(六)核酸類：

包括有腺苷(Adenosine)、核糖核苷酸(RNA)、腺嘌呤(Adenine)、尿嘧啶(Uracil)等物質，均有重要的生理活性。其中腺苷具有抑制血小板凝集作用，可防止血栓的形成，預防動脈硬化(廖，2002)。

2-1-2 雲芝

雲芝(*Coriolus versicolor*)又稱彩絨革蓋菌、雜色雲芝、彩絨菌、瓦菌，屬於真菌界(*Fungi*)、擔子菌門(*Basidiomycota*)、擔子菌亞門(*Basidiomycotina*)、層菌綱(*Hymenomycetes*)、非褶菌目(*Aphyllphorales*)、多孔菌科(*Polyporaceae*)、雲芝屬(*Polystictus*)或革蓋菌屬(*Coriolus*)(Ainsworth et al.,1973)。學名 *Coriolus versicolor*，俗稱雲芝。其子實體一年生，且只一季產生孢子，雖然它的顏色變異性大，但環生帶狀的蕈蓋卻是它最易於辨別的標記，絨毛的輪環將顏色不同的各區隔開地井然有序，是雲芝外表最大的特色(王等人，1998)。

雲芝為一種白腐擔子真菌(*white-rot basidiomycete*)，這類真菌廣泛分布世界各處，從溫帶到熱帶地區皆可發現，會造成植物白腐病。在台灣，從平地到兩千公尺以上海拔區皆有分布，且極為常見，為闊葉樹腐生菌。而在大陸的上海、福建、廣東、陝西、新疆、四川、雲南等諸多省份亦常可發現它的蹤跡。此菌主要營腐生生活，長於闊葉樹，如柳(*Salix spp.*)、楊(*Populus spp.*)、樟(*Cinnamomum camphora* (L.) Pyesl.)等朽木上，但有時也會寄生在這些植物的活樹幹上。偶爾也會在松樹(*Pinus spp.*)的植株上寄生，雲芝是森林生態環境變遷中，移生態系等一相(first phase)的菌種之一，是林相變異中的一個很好指標(劉，1984)。

雲芝子實體無柄或平伏而反捲，半圓形至貝殼狀，蕈蓋革質。腹瓦狀排列，常互相連接而呈玫瑰花樣。蕈肉薄，厚 0.1-0.3 cm，寬 1-3× 8-10 cm，與寄生之樹木銜接處平行生長或些微凹陷的生長，菌肉白色至淡黃色，質輕脆疏鬆，有苦味。有細絨毛環生，隔開顏色多樣卻光滑、無毛的同心環帶。蕈管(tubes)短，白色，成熟時為白褐色；管口圓形，灰白色，孢子圓形、表面平滑， $4.5-8 \times 1.5-3 \mu\text{m}$ ，先白後微褐色(王等人，1998)。

在 1977 年，日本研究人員從雲芝的菌絲中分離出高分子的多醣體 PSK

(polysaccharide Krestin) 在證實其療效後開發為藥物產品，並成為二十世紀最具經濟價值的藥物之一。大約十年後，中國科學家們發現療效比 PSK 更好的 PSP (polysaccharopeptide)，通過更多的臨床試驗，PSK 和 PSP 被製成藥丸、膠囊、糖漿、茶以及食品添加物等。

PSK 與 PSP 的成分如下：

(一)Krestin(雲芝素，略稱 PSK)是由日本人所發現，從擔子菌多孔菌科雲芝菌種 CM101 菌株的培養菌絲體的熱水提取物，用硫酸銨飽和，分離所產生沉澱，通過脫鹽等過程。為褐色或帶褐粉末，可溶於水，不溶於甲醇、氯仿、苯、己烷等有機溶劑，水溶液大體成中性，Krestin 是由 62~80% 的多醣部分與 20~38% 的蛋白質部份組合而成(賴，1997)。其中糖質部分由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖和岩藻糖(fucose)構成，蛋白質部分則由大量的天門冬氨酸(aspartic acid)和麩氨酸(glutamic acid)組成(王，2000)。

(二)雲芝醣肽(PSP)為一種蛋白質結合多醣，由中國人從雲芝 Cov-1 菌株製造，多醣部分由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖和鼠李糖構成，PSK 和 PSP 的多醣部分在 4' 和 6' 位置皆有 $\beta(1\rightarrow3)$ glucan 分支，兩者都可從雲芝的菌絲體經深層培養萃取而得，也具有相似的生理活性及分子量(~100KD)，但結構卻不相同。

2-1-3 香菇

香菇 (*Lentinus edodes*) 又名花菇、香菌，是一種生長在木材上的真菌屬於食用菌的一種。因味道鮮美有嚼勁、富含維生素 B 群、維生素 D 原和相關礦物質元素等，是餐桌上的常見菜餚；又因其含有麥角固醇可防治佝僂病，內含的脂肪酸可降低血脂，特別是多醣具有抑制癌細胞生長的作用等功效使其保健作用十分顯著。隨著人民生活水平的提高對營養保健品的需求也居高不下，香菇已成為

醫學、食品工業製備保健品的“新寵兒”，關於香菇的綜合開發利用研究已取得一些成就。對香菇的營養價值和綜合利用現狀進行綜述，通過闡述香菇利用現狀發現存在問題，並就存在問題提出解決路徑以促進中國香菇產業的可持續發展（劉和閔，2017）。

香菇中白蛋白、谷蛋白、醇溶蛋白以 100：63：2 的佔比使其成為蔬菜中蛋白質含量的佼佼者，其中組成香菇蛋白質的 18 種氨基酸中有 8 種是人體必需氨基酸，對改善膳食結構、促進骨骼發育、強身健體等有良好的作用(何等人，1999)。其次，香菇乾品中的亞油酸、油酸含量高達 90%以上，可預防甚至治療動脈粥樣硬化(劉，2003)。然後，香菇中含有的豐富的礦物質如鈣、磷、鐵、錳和鋅等可提高人體免疫力，延長壽命(徐等人，1999)。最後含量高達 54%的多糖、海藻糖和甘露醇等物質提供了人體生理活動所需的能量，同時還可輔助脂肪氧化。除此之外，香菇中的維生素 D—麥角固醇，彌補了一般蔬菜此微量元素欠缺的不足，促進了人體對鈣的吸收，提高兒童骨骼牙齒生長速度(張等人，2004)。

由於香菇富含多種生理活性，在醫學上廣為被應用，包含下列五點：

(一)改善營養性貧血

香菇中的氨基酸、多糖等物質可促進肝臟合成蛋白，增加血清紅蛋白與白蛋白含量。香菇中的鐵元素促進血紅蛋白生成，對於治療營養性貧血效果顯著。王超等將香菇提取液灌胃營養性貧血的大鼠，與低鐵模型對照組相比試驗組的體重、攝食量、血紅蛋白含量等均高出一截（劉和閔，2017）。

(二)調節免疫系統

香菇多糖 β -葡聚糖具有三股繩狀螺旋形立體結構，活性較高，它充當宿主免疫增強劑，加速關鍵細胞的成熟、分化和增殖，改善宿主機體平衡，因此可提高巨噬細胞的吞噬能力、促進 T 淋巴細胞增殖、抗突變抗腫瘤等。白潤江等的試驗結果顯示香菇多糖可促進小鼠外周血 E 玫瑰花形成和體內淋巴細胞的轉化，

還可增加小鼠脾重，增強識別抗原功能（劉和閔，2017）。

(三)降低膽固醇

香菇嘌呤（也稱赤酮嘌呤）有降低人體血液、肝臟中膽固醇的功能，對冠心病、高血壓等心血管疾病有一定的預防和治療功能（劉和閔，2017）。

(四)抑制腫瘤細胞形成。

香菇中的雙鏈核糖核酸產生的干擾素可明顯抑制腫瘤細胞的擴散增殖，其中 *Lc-II* 的抑制腫瘤作用最明顯，作為輔助治療藥物抑制腫瘤的進一步擴大，提高腫瘤對化療藥物的敏感性，改善病人的身體狀況延長壽命。還可抑制化學致癌劑 3-甲蔥酮的致癌作用，因此在治療預防各種癌病方面發揮了巨大功效（劉和閔，2017）。

2-1-4 猴頭菇

猴頭菇 (*Hericium erinaceus*) 是一種歷史非常悠久食用菇類，因其子實體形狀像猴子頭部而得名，別名猴菇菇、獅鬃菇、山伏茸、熊頭菇、刺蝟菌等，分類學上屬真菌界，真菌門，層菌綱，多孔菌目，齒菌科，猴頭菌屬。自古以來，猴頭菇對於預防因高脂、高糖所引起的各種疾病有一定療效，而且在營養方面上與牛奶、肉、蛋類似，常常被人稱為“素中之葷”。

猴頭菌生長可分為菌絲體及子實體，其菌絲體及新鮮子實體皆呈白色，乾燥後則呈黃褐色或褐色，外觀上為扁圓狀或頭狀且有下垂枝針狀長刺，其直徑約為 3 - 17 cm，故依其外型在中國民間稱其為猴頭菇、猴頭菌或刺蝟菌等名稱，於日本又稱其為三伏茸；而在英文俗名上稱其為猴頭、刺蝟、獅子的鬃毛及熊頭等稱呼，而在野生菌種中又可分為四類，為猴頭菌 [*H. erinaceum* (Bull. Fr.) Pers.]、小

刺猴頭菌 [*H. caput-medusae* (Bull. Fr.) Pers.]、假猴頭菌 [*H. laciniatum* (Leers) Banker]、珊瑚狀猴頭菌 [*H. coralloides* (Scop. Fr.) Pers. ex Gray]，其中又以猴頭菌 (*H. erinaceum*) 為主要種。

野生猴頭菇多生長分布於北半球溫帶區域，如中國、美國、日本、俄羅斯及西歐等地，歐洲中部至英格蘭南部尤為普遍，中國則主要分布於東北及西北的山脈中，在台灣則是分佈於南投和宜蘭山區，是東方國家著名的食藥兩用菌(何等，2015)。其子實體普遍生長於胡桃木、橡木、櫟木或松樹的枯死部位或傷口處，猴頭菌的菌絲在 10-33°C 均可生長，最適溫度為 25-28°C，子實體的部分則是在 12-24°C 均可生長，最適溫度為 16-20°C，高於 30°C 子實體生長不良，低於 10°C 則生長緩慢，屬低溫喜光型真菌，在潮濕、偏酸的環境下皆可生長(丁，2006、張，2006)。由於產地關係，目前中國大陸對於猴頭菌的研究最為深入，臨床實驗結果也最多。

《本草綱目》記載，猴頭菇性平、味甘，有“利五臟、助消化”之功能。猴頭菇為天然菇蕈類而具有多樣種類成分，除了一般真菌含有的麥角固醇外，近年研究證明，猴頭菇含有多醣、寡糖、多肽、甾醇、萜類、酚類、腺苷等多種活性物質，具有抗氧化、抗腫瘤、降血糖、降膽固醇、滋補、保肝、增強機體免疫力等多種養生保健作用，猴頭菇子實體或菌絲體中抽出物在科學定性分析實驗後發現猴頭菌中含有醣類(Wang 等人，2001、Yang 等人，2003)、猴頭素(*Erinacines*) (Kawagishi 等人，1996、Kenmoku 等人，2000、Shimbo 等人，2005、Kawagishi 等人，2006)、猴頭酮(*Hericenones*) (Arnoner 等人，1994、Lee 等人，2000)、雙亞麻油酸磷脂酯乙烯胺(dilinoleoyl- phosphate- dylethanolamine；DLPE) (Kawagishi 等人，2006)、胺基酸、蛋白質及微量元素；而一般發酵的功能性產物以多醣體為主(陳等人，1999、但和付，2000、Jia 等人，2004、姜等人，2007)。

猴頭菌中富含多種胺基酸，其新鮮子實體中含有天門冬胺酸(Aspartic acid)、絲胺酸(Serin)、麩胺酸(Glutamic acid)、離胺酸(Lysine)、色胺酸(Tryptophan)、脯胺酸(Proline)、甘胺酸(Glycine)、丙胺酸(Alanine)、組胺酸(Histidine)、精胺酸

(Arginine)、胱胺酸(Cysteine)、纈胺酸(Valine)、甲硫胺酸(Methionine)、異白胺酸(Isoleucine)、白胺酸(Leucine)、苯丙胺酸(Phenylalaine)等十六種胺基酸。其中以麩胺酸含量最高達 0.406 mg/g，丙胺酸、異白胺酸、白胺酸、離胺酸的含量也都在 0.122 mg/g 以上(袁等人，2005)。

研究指出，每 100 克乾猴頭菇含 44.9 克碳水化合物，4.2 克脂肪，26.3 克蛋白質，水分 10.2 克，灰分 8.2 克，粗纖維 6.4 克，鐵 18.0 毫克，胡蘿蔔素 0.01mg，磷 850mg，維生素 B1 0.69mg，鈣 2mg，維生素 B2 1.86mg，核黃素 1.89mg，尼克酸 16.2mg，氨酸 40.4mg，酪氨酸 12.2mg，絲氨酸 26.0mg，氨酸 12.1mg，丙酸 23.2mg，天冬氨酸 21.5mg，精氨酸 9.0mg，苯丙氨酸 14.5mg，蘇氨酸 10.7mg，谷氨酸 42.2mg，組氨酸 6.5mg，脯氨酸 9.5mg，賴氨酸 17.5 毫克，其中含有 8 種人體必需胺基酸，成人每天約食用 0.1 kg 的新鮮猴頭菇就能滿足人體所需的胺基酸含量，具有豐富的營養價值(王，2006)。

猴頭菇中也含有許多維生素及微量元素，其子實體中含有胡蘿蔔素、B1、B2、B3 等豐富維生素(王，1990)。(符，2002)分析發現猴頭菇子實體中含有鈣、磷、硫、鋅、銅、鎂、鐵、錳、硒、鈷、砷、鋇、鉛等十三種元素，其中磷及硫的含量最高，分別達 8203.0 ppm 及 2503.8 ppm，而有害元素砷和鉛則含量低。微量元素不能在人體內自行合成，必須通過平常的飲食攝取來補充，其中硫是重要的營養元素，對人體是不可或缺的，猴頭菇含硫非常高，其很好的功效之一就是健脾益胃，能增進食慾，增加胃黏膜屏障機能，對各種慢性胃炎均有較好的治療作用，這些微量元素都能幫助人體維持機能運作、調節體內新陳代謝，刺激免疫系統、活化細胞。

2-1-5 黑木耳

黑木耳 (*Auricularia auricula*) 為屬真菌類擔子菌綱，是生長在朽木上的一種腐生菌，在我國作為藥食同源真菌被廣泛食用，主要生長於中國東北部的大、小

興安嶺山區。《本草綱目》中記載：木耳生於朽木之上，性甘平，主治益氣不飢，輕身強志，並有治療痔瘡，血痢，下血等作用。黑木耳的營養價值和多種藥理活性，可以降低人體血液粘度，緩解冠狀動脈粥樣硬化，有防止血栓形成的功能，主要含有蛋白質、碳水化合物、黑色素，多醣，多酚和黃酮等多種活性成分。國內外文獻報導黑木耳子實體多醣 (Auricularia auricula polysaccharide, AAP) 具有抗氧化、降血脂、降血糖、抗腫瘤、抗凝血和抗衰老改善心肌功能等活性 (苗等人, 2019)。

黑木耳其果實體中含有的豐富多醣，由具有各種 β -1,3-分支殘基鏈的 D 葡萄糖殘基組成，如葡聚糖、甘露糖、半乳糖、木糖、鼠李糖和阿拉伯糖等。近年來，許多多醣都逐漸被證明其抗腫瘤活性及其相關機制，黑木耳多醣抗腫瘤活性的研究也有所涉及，甘等人探討黑木耳多醣對 B16 黑色素瘤細胞抗腫瘤作用及相關可能的機制，研究結果表示黑木耳多醣對腫瘤小鼠的抑瘤率高達 40% 以上，對 B16 細胞活性的影響呈現劑量依賴性關係，且綜合黑木耳多醣能有效抑制 B16 細胞划痕的癒合，抑制 B16 細胞的遷移能力，及結合對小鼠的體質量、瘤重及精神狀態等指標，黑木耳多醣體內體外均能對腫瘤細胞具有抑制作用，實驗結果如圖 2-3，其中 A 圖為腫瘤大小、B 圖為腫瘤抑制率，而 CY 為環磷酰胺 (甘等人, 2017)。

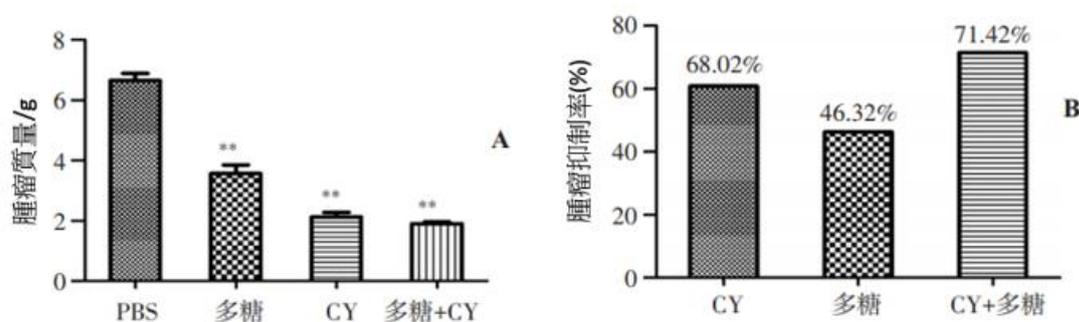


圖 2-3 黑木耳多醣對黑色素瘤小鼠的影響 (甘等人, 2017)。

2-1-6 秀珍菇

秀珍菇 (*Pleurotus geesteranus*) 學名環柄香菇，別名袖珍菇，肺形側耳，黃白側耳，環柄鬥菇，珍珠菇，珊瑚菇等，原產於印度南部查摩省，1974 年年由菌物學家 Jandiaik 馴化成功，20 世紀 90 年代從台灣引進至大陸地區。在分類學上屬真菌門，擔子菌綱，傘菌目，側耳科，側耳屬，是於平菇的一種。秀珍菇子實體成熟後不大，柄長約 6 厘米，蓋直徑約 4 厘米，一般為單生或叢生，平展後呈扁半球形 (郭等人，2018)。

據福建省農業科學院土壤肥料研究所測定，鮮菇中含蛋白質 3.65%~3.88%、粗脂肪 1.13%~1.18%、還原糖 0.87%、糖分 23.94%~34.87%、木質素 2.64%、纖維素 12.85%、果膠 0.14%，還含有不飽和脂肪酸、維生素、葉酸，還含有較多的鉀、磷、鈉、鎂、鐵、鈣等微量元素 (朱等人，2012)，其水溶性含蛋白質多醣體對小白鼠 180 肉瘤的抑制率可達 100% (汪等人，2007)，它的蛋白質含量接近肉類，比一般蔬菜高 3~6 倍 (徐等人，2004)。秀珍菇含有 17 種以上氨基酸，更為可貴的是，它含有人體自身不能製造而飲食中通常又缺乏的蘇氨酸、賴氨酸、亮氨酸等 (郭和王，2013)。此外，秀珍菇含有的多醣體被驗證具有抗腫瘤的功能，子實體所分離出的水溶性多醣可抑制乳腺癌腫瘤細胞的生長 (Dubois 等人，1956)。秀珍菇還具有降低膽固醇，提高免疫力，美容保健，防癌抗癌，延年益壽之功效 (Masuko 等人，2005)。

2-1-7 杏鮑菇

杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii*)，又稱刺芹木耳，隸屬於真菌門 (*Eumycota*) 真擔子菌綱 (*Eubasidiomycetes*) 傘菌目 (*Agaricales*) 側耳屬 (*Pleurotus*)，有“菇中之王”的美稱，是具有藥用價值的珍貴食用菌 (Xu 等人，2017)。杏鮑菇富含蛋白質，碳水化合物，礦物質，維生素和多種礦物質，其中蛋白質含量為 12.4%~35

% (張等人, 2013), 具有抗氧化和免疫活性調節等功能 (Mariga 等人, 2014), 為優質蛋白質來源的食物。杏鮑菇發酵菌絲體與子實體都有高營養價值, 而蛋白質與微量元素含量相近, 又菌絲體中多醣含量略高 (Gordon 和 Martinez, 2010)。

其中杏鮑菇蛋白的藥理作用如下：

(一) 抗炎性

Yuan B 等人利用乙酸溶解硫酸銨沉澱法從杏鮑菇中提取分子量為 40kDa 的蛋白 (PEP), 實驗結果顯示 PEP 可抑制經過 LPS (脂多醣) 誘導小鼠巨噬細胞 RAW264.7 對一氧化氮 (NO), 白介素 1 (IL-1 β) 和白介素 (IL-6) 等促炎性細胞因子的產生, 且通過蛋白質印記分析 PEP 對 NF- κ B 通路的抑製作用比對 MAPK 通路的抑制, 體內實驗顯示 PEP 可抑制小鼠結腸腫瘤的生長 (陳, 2018)。

(二) 抗癌性

Sun Y 等人從杏鮑菇菌絲體中利用磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS, pH 值為 8.2) 溶解硫酸銨沉澱提取蛋白質並純化。實驗結果顯示杏鮑菇菌絲體蛋白顯著抑制了宮頸癌 (BT-549)、乳腺癌 (Hela 細胞-229) 和胃癌細胞 (HGC-27) 的生長 (陳, 2018)。

(三) 抗病毒性

方芳利用蒸餾水溶解、(NH₄)₂SO₄ 沉澱的方法從杏鮑菇子實體中提取蛋白質, 實驗結果顯示杏鮑菇蛋白通過與煙草花葉病毒 (YMV) 顆粒表面相互作用來抑制 TMV 的侵染。並且通過研究發現杏鮑菇蛋白可抑制白血病 (HL-60) 細胞的生長 (陳, 2018)。

(四) 抗氧化性

程菲兒等人 (程等人, 2014) 利用鹼提酸沉法從杏鮑菇子實體中提取蛋白質

並用鹼性蛋白酶酶解製備多肽。實驗結果顯示杏鮑菇多肽可較大能力地清除超氧陰離子自由基 ($O_2^{\cdot -}$) 和 DPPH 自由基的產生，對體外脂質過氧化有一定的抑制作用 (陳, 2018)。

2-2 固態發酵

生物培養有兩種形式，固態發酵和液態培養。液態培養是以固定組成的培養液，在控制溫度、供氧、酸鹼、攪拌條件等條件下進行培養，以製造菌體和其菌體所產之代謝產物。小到實驗室搖瓶培養，大到工廠的大規模發酵槽製程，都可以看到液態培養的蹤跡。固態發酵則是利用一定比例的固態基質使微生物在基質上進行生長和代謝產物，與液態發酵相比，雖然生長時間較長，但能提供的營養相對比單純固定組成的培養液還要多，且有機會可以使生物有更好的生長環境。從吃的納豆、種菇的太空包等，到現在利用紅麴菌和米生產的保健食品等等，慢慢有使固態發酵技術往更寬廣的未來發展。

2-2-1 固態發酵培養之優點

由於固態基質相對於液態培養是無法攪拌的，導致兩者的培養環境有極大的差異，表 2-1 為固態發酵培養之特點。

表 2-1 固態發酵培養特點

優點類型	Remarks
生物性	高產量
	提高生產水平
	高產物穩定性
	沒有代謝物抑制
	天然的原料可提供完整的固態基質
	不用嚴格的發酵過程
	含水量低，減少污染
	可生產真菌孢子，孢子可以做為接種使用並可以長

	期保存
	沒有泡沫產生
處理	生物反應器通常體積小，結構扎實
	生長基質來自天然資源，比例簡單且未精製
	萃取產品所需的溶劑少
	生產過程不需加入抗泡沫化學藥品
環境	在製程中可以盡量減少污染物或有害廢物產生
	產生較少的液體廢物
	減少生物毒物生產的問題
經濟	固態基質通常為天然材料，非常便宜，可以減少農業工業和食物的浪費
	生物反應器簡單且便宜好操作

(Manan 和 Webb, 2017)

2-2-2 固態發酵培養之缺點

固態發酵有其獨特的優點，但同時也存在許多問題，在生物學方面的缺點總結如表 2-2 所示。

表 2-2 固態發酵培養的缺點

NO	固態基質發酵 (SSF) 缺點	克服的想法
1	溫度、pH 值控制、氧氣傳送、質傳熱傳、固態基質含水量梯度在規模放大上產生問題。	建立線上系統測量和控制溫度、氧氣二氧化碳梯度。
2	菌絲、營養成分、溫度、pH 值、含水量在固態基質上分配不均。	
3	氣體不容易流過固態基質。	強制進氣，藉此控制溫度。
4	新陳代謝和微生物生長導致固態基質溫度上升和流失含水量或生成糜狀固態基質。	建立溫度梯度來移除生成熱。
5	難以測量微生物生長量。	建立線上系統來監測。
6	生長量及動力學研究因為資料有限和散亂仍然困難。	建立數學模組來預測數據。

(Manan 和 Webb, 2017)

2-2-3 固態發酵與傳統深層培養之比較

現今的發酵工業仍然以傳統的深層培養最為常見，表 2-3 為固態發酵培養與傳統深層培養的相互比較。

表 2-3 固態發酵與傳統深層培養比較

固態發酵(SSF)	傳統深層發酵比較(SMF)
固態基質含水量為 12%~70%	水是培養基的主成分
微生物從固態基質吸收養分是一種濃度梯度	微生物從液態基質吸收養分沒有濃度梯度
培養系統為三種連續相系統(固態、液態、氣態)所組成	培養系統為液態連續相組成
接種量大	接種量小
所需的氧氣自氣相，這個過程所需要的能量消耗低	所需的氧氣來自溶解氧，溶解氧需要更大的能量消耗
微生物附著並滲透在固態基質	微生物均勻分布在培養基中
發酵結束時，固態基質含水量高，且產物濃度高	發酵結束時，基質為液態，且產物濃度低
生產率高。產品產量高	生產率低，產品產量低
固態基質混和困難，且微生物對攪拌和混和是很敏感的，微生物的生長會受到營養擴散的限制	混和容易，微生物的生長不受營養擴散限制
去除代謝熱困難	溫度控制容易
異質性	同質性
發酵參數難以線上控制及檢測	發酵參數可以線上控制及檢測
取樣過程簡單，較少水浪費	取樣過程複雜，會造成水大量浪費

簡單的發酵生物反應器	高科技的發酵生物反應器
設備投資成本低	設備投資成本高
原料成本低	原料成本高

(Manan 和 Webb, 2017)

2-2-4 固態發酵參數

在固態發酵中，重要的參數有含水量、濕度、溫度、酸鹼值。以一般真菌來說，最適合培養的水份在 40%至 80%之間，而一般市售太空包的含水量約為 65%左右，基於本實驗所用之固態基質為豆渣，豆渣本身具有高水分之特性，所以搭配穀類之後所需再添加的水分也相對較少。但是相對於以往，固態基質的水分稍微偏高，可能會導致實驗中有染菌的情形。最終目標是將含水量控制在 50%到 55%之間。因水分的不同，在溫度方面考量則以考慮最適生長環境為主，而不將代謝熱使水分蒸散的問題考慮入內，也沒有間歇性噴灑冷卻水保持基質的含水量和溫度。酸鹼值方面，雖然偏酸性環境可以防治細菌污染，但是是酵母菌和真菌可以忍受的範圍內，又以大部分來說，基質本身都有緩衝酸鹼值的能力，最終由於無法準確判斷基質中酸鹼值則無特別的調整。

在氣體方面，指的是氧氣和二氧化碳。氧必須從粒子空間擴散到生物基質；而二氧化碳必須從生物基質中擴散到粒子空間，並且從系統中去除。上述要求可以透過固態發酵的通氣與混和來實現。

微生物對於氧氣的需求不盡相同，通常強制通氣將氧氣或空氣散佈到介質中。強制通氣對於固態發酵有個兩種重要作用：(a)滿足好氧發酵中的需氧量、(b)非均相的系統中，熱量和質量傳遞，強制通氣提供維持固體基質中的高氧水平和低氧二氧化碳水平。而使用強制通氣時需要考慮的通氣大小和空氣濕度。高流速的乾燥空氣即使對於除熱方面有優勢，但對固態基質的水分含量產生影響。所以透過強制通入飽和空氣來維持水分的水平是很常用的策略，因此飽和空氣的流速對

固態基質的溫度和濕度梯度有著很大的關係(Manan 和 Webb, 2017)。

2-2-5 板式固態生物反應器

歷史上，板式反應器廣泛應用於固態發酵中。板式反應器的設計非常簡易，固態基質放置於靜止狀態的板床內，並無強制通風及機械攪拌，僅於床底設有網狀物以確保固態基質有正常的通氣。此系統僅限用於有限容量的待發酵固態基質，因為必須保持基質在薄層狀態時，持續維持有氧條件以及避免發生過熱之情形 (Tim Robinson, 2003)。Alcântara 等人 (2012) 及 Vaseghi 等人 (2013) 提到，基質厚度、接觸表面積以及室溫都對酵素活性產生正面影響，可以改善代謝熱及氣體轉移。

固態基質之床板厚度是可以變更的，床板與床板以適當的間隙相疊。通常將床板放置於發酵室中，並控制其溫度及濕度使其於最佳環境下生長 (Nee Nigam PS, 2009)。Zhang Chen et al. (2005)研究了兩種空氣的動態變化對板式反應器的影響，包含了氣壓變化和內部空氣循環，並觀察溫度梯度的變化。結果發現，內部的空氣循環是有益的，加速了基板表面和外部空氣之間的熱傳遞。此外，由於人為控制溫度及調控空氣流速較易於控制其生長條件，因此 Ruiza et al. (2012) 及 Assamoi et al. (2008)設計了強制通氣的柱式生物反應器。圖 2-4 為多個平板相疊板式反應器之示意圖(Manan 和 Webb, 2017)。

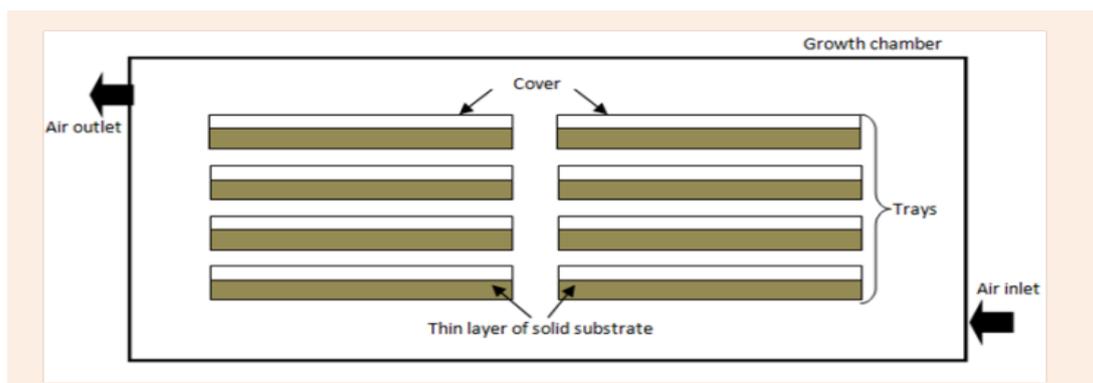


圖 2-4 板式固態生物反應器

2-3 固態基質

2-3-1 豆渣

黃豆為一種含有豐富營養的豆科植物，又稱旱田之肉。而在東方國家會製作許多豆類製品，例如：豆漿、豆腐、醬油、豆瓣醬等等。Bahareh(2009)研究豆漿和牛奶的差異，豆漿是以植物為主的植物蛋白，牛奶是從雌性乳牛身上取得，營養也非常豐富，含有大量的礦物質，鈣含量還是豆漿的三百倍以上，磷的含量也是豆漿的兩倍。但是豆漿含有比牛奶高十倍以上的鐵，並且豆漿的蛋白質和水份跟牛奶相當，還有牛奶不會有的纖維、低卡路里等。值得注意的是牛奶的脂肪是豆漿的兩倍，脂肪酸是豆漿的十倍，並且很多人有乳糖不耐症的問題，對於牛奶不好消化，引起腹瀉、嘔吐等症狀，對於這些人來說，豆漿是可以補足不適合喝牛奶的人所需的營養成分。圖 2-5 是該研究中所整理的每一杯中豆漿與牛奶的營養和化學物質。

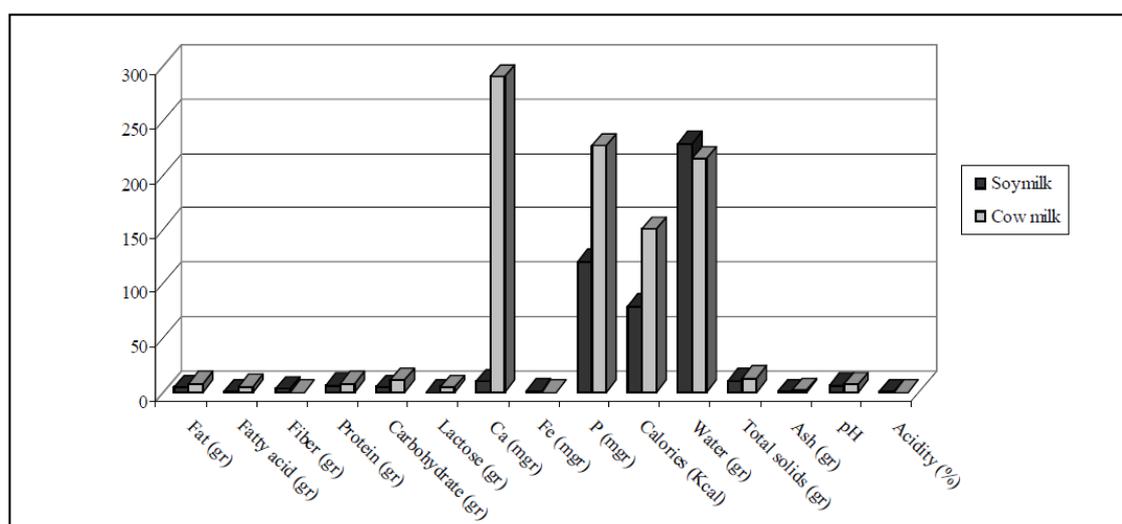


圖 2-5 每一杯豆漿和牛奶的營養與化學物質比較

(Bahareh, 2009)

在製作豆漿或豆腐的過程中，所留下來的豆渣，也擁有着跟黃豆一樣營養豐富的特性。豆渣含有多種礦物質及維生素，如表 2-4。更含有 50%~55%的膳食纖維

維、18%~23%的蛋白質、10%的脂肪、人體必需的8種氨基酸等等，見表 2-5(陳等人，2015)。但是豆渣本身經濟價值不高、口感不佳、含水量高，導致在使用前可能就先酸化腐敗，或者運送保存不便。目前豆渣可以運用在畜牧業中當飼料，或者添加於麵包、料理之中，特別的是做成貓砂、緩衝材料等。圖 2-6 為未經處理之豆渣。



圖 2-6 豆渣

表 2-4 豆渣中礦物質和維生素含量

項目	鋅	錳	鐵	銅	鈣	鎂	鉀	磷	VB ₁	VB ₂
含量	22.63	15.11	106.90	11.48	2100	390	2000	3800	2.72	9.76

單位 mg/Kg(陳等人，2015)

表 2-5 豆渣和大豆蛋白中必需氨基酸組成

項目	賴氨酸	蘇氨酸	纈氨酸	亮氨酸	異亮氨酸	甲硫氨酸	色氨酸	苯丙氨酸
豆渣蛋白	46.0	52.0	54.0	86.0	42.0	12.0	11.8	57.0
大豆蛋白	60.5	43.0	47.5	95.8	42.0	10.8	12.2	47.5

單位 mg/Kg(陳等人，2015)

目前豆渣的營養成分研究在大豆蛋白、豆渣蛋白、異黃酮、維他命 B_2 、天然維生素E等營養成分上。豆渣本身佔多數的成分為膳食纖維，雖不能透過小腸消化，但可以通過大腸中微生物發酵，據報導可以降低血壓和血脂，降低血液中膽固醇水平，預防冠心病、便秘等的發生。所以膳食纖維被稱為第七營養素，尤其是對於腸道有重要保健功能(王等人,1996)(Periago,1997)。Villanueva M. J. (2011)等餵食豆渣給敘利亞黃金倉鼠吃，研究顯示豆渣中的膳食纖維對倉鼠的血漿、肝臟、糞便脂質排泄中也有一些積極影響。(Bosaeus,2004)發現豆渣中不溶性膳食纖維會增加糞便的體積並減少胃腸運輸時間。此外，它似乎對腹瀉和便秘以及作為腸易激綜合徵的治療具有正面效果。

除了有預防便秘、減肥、預防心腦血管疾病等功效，也可以當重金屬離子去除劑(王等人,2012)、生物降解填充材料(張等人,2004)、微膠囊管壁(周等人,2005)、桿菌的增值劑(徐廣超等人,2012)等用途。豆渣中的微量元素也有很大的功用，這些化合物具有各種生理和治療功能，如抗氧化能力，預防心血管疾病，以及對某些類型的癌症有效的化學預防劑(Quitain,2006)。

豆渣在經過生物的發酵之後，使豆渣中一些不溶性聚合物分解為可溶性低與較好吸收的分子量化合物，或者生產出高價值產物。(Muroyama 等人,2001)等使用微生物在特定條件下分解豆渣的方式生產甲烷，以此可以延伸到作為沼氣系統的來源之一。而利用不同的真菌及其特性，不僅可以利於營養成分的吸收，又可以提高豆渣的經濟價值(Chung,2011)。本次研究則是利用豆渣搭配不同固態培養策略，探討不同菇類在其基質上的生理活性。表 2-6 是(Shuhong Li 等人,2013)等整理出豆渣再利用於各種生物發酵生產高價值產物。

表 2-6 由各種微生物發酵豆渣生產產物

Strain	Products	Authors
<i>Aspergillus japonicus</i> MU-2	β -Fructofuranosidase	Hayashi et al., 1992
NRRL 330 + NCIM 653	Citric acid	Khare et al., 1995
<i>Bacillus natto</i>	Crude antioxidant preparation	Hattori et al., 1995
<i>Bacillus subtilis</i> NB22	Iturin A	Ohno et al., 1996
Methanogens I and II	Methane	Muroyama et al., 2001
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Hydrogen	Noike et al., 2002
<i>Ganoderma lucidum</i>	Fruiting bodies	Hsieh and yang, 2004
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Lactic acid	Muroyama et al., 2006
<i>Bacillus subtilis</i> B2	Antioxidant	Zhu et al., 2008
Digestion sludge	Methane	Zhou et al., 2011
<i>B. subtilis</i>	Phenolic compounds	Chung et al., 2011
<i>Flammulina velutipes</i>	Polysaccharides	Shi et al., 2012

(Shuhong Li 等人，2013)

以下列舉豆渣有效成分:

(一)大豆多醣：豆渣中含有大量的水溶性多醣，具有天然的功能活性成分。與其他生物多醣相比，大豆多醣黏性較低，分散性、穩定性、乳化性和黏著性較好，可以有效改善食品的食用品質、加工特性和外觀特徵(尹等人，2006)。此外，大豆多醣還具有調節血糖和血脂、促進腸道有害物質的吸附與排泄、抗癌、促進礦物質吸收利用等生物學活性，在抗氧化、抗菌、抗病毒及免疫調節等方面也有一定功效(范等人，2007)。

(二)豆渣蛋白：豆渣中含有豐富蛋白質，在食品領域中可以當作良好的食品添加劑。經水解之後可得到含氨基酸和多肽的水解蛋白，是食品工業優質的植物蛋白來源，其中部分寡肽具有特殊的生理功能。關於豆渣蛋白提取方法的研究較為集中，包括酶法、鹼溶酸沉法、超聲波法、鹽析法等，(曾裕漳，2013)利用蛋白質水解酵素將豆渣製備成豆渣水解蛋白，對於氫氧自由基清除、抗氧化能力都有明顯的效果。

(三)異黃酮：大豆異黃酮是一種植物性雌激素，為一種天然賀爾蒙。對於人體有多種生理功能，除抗氧化作用外，還具有抗癌、防止心血管疾病、抗菌等功能。(黃曉東，2003)通過柱層析技術和薄層層析(TLC)法提取、分離大豆豆渣中黃酮類化合物，經紫外光譜和 TLC 鑑定，所獲得的 2 種化合物分別為大豆黃酮和染料木黃酮 2 種異黃酮。(張等人，2012)優化了豆渣中異黃酮的提取工藝，並對其抑菌活性進行分析，結果顯示，大豆異黃酮對金黃色葡萄球菌、枯草芽孢桿菌、短小芽孢桿菌和紅曲霉的生長均有明顯的抑制作用，而對大腸桿菌和短乳桿菌無顯著影響。(Lee 等人，2005)研究顯示大豆異黃酮影響癌症的抗性，預防骨質疏鬆，減少抗菌炎症，並控制心血管疾病。

2-3-2 小米

小米又稱粟，早在新石器時代就已被種植。台灣原生種的小米生長於山區，是台灣原住民早期主食。小米含有糖類、維生素 B 群、鈣、磷、鐵等營養成分，同等重量的小米中鐵的含量比同等重量之白米高一倍，維生素也比白米高 2~7 倍。可以煮成粥食用，或者釀造成小米酒（郭，2019）。

小米含多種維生素、氨基酸、脂肪、纖維素和碳水化合物，營養價值非常高，一般糧食中不含的胡蘿蔔素，小米也有，特別是它的維生素 B1 含量居所有糧食之首，所含鐵量很高、磷也豐富，是具有補血、健腦的原因。此外，小米含有大量的碳水化合物，對緩解精神壓力、緊張、乏力等有很大的功效。此外，小米的脂肪含量也高，約為大米含量地 4 倍之多。小米中富含的維生素 B1、B12 等，具有防止消化不良及口角生瘡的功效；小米具有防止泛胃、嘔吐的功效；還具有滋陰養血的功能，可以使產婦虛寒的體質得到調養，幫助她們恢復體力；小米具有減輕皺紋、色斑、色素沉著的功效。小米中富含的磷，具有構成骨骼和牙齒，促進成長及身體組織器官修復的功能，供給能量與活力，參與酸鹼平衡的調節。

富含鎂，提高精子的活力，增強男性生育能力。有助於調節人的心臟活動，降低血壓，預防心臟病。調節神經和肌肉活動、增強耐久力。富含鉀，有助於維持神經健康、心跳規律正常，可以預防中風，並協助肌肉正常收縮。具有降血壓作用。

2-4 異黃酮

異黃酮化合物是植物化學物質，是具有多酚結構的類黃酮。其功能類似女性雌激素，所以又稱為植物雌激素。圖 2-7 為異黃酮化合物與其他植物雌激素化合物的關係。

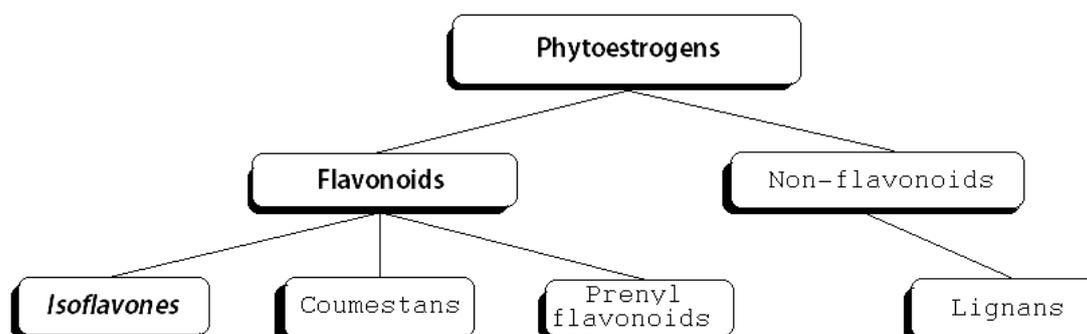


圖 2-7 植物雌激素化合物

(Hughes 等人，2003)

在自然界中，異黃酮化合物主要以兩種形式存在，如表 2-7 所示。第 1 種異黃酮糖苷配基 (Isoflavone aglycones，IA) 未與 β -糖苷共軛；第 2 種則是包括與 β -糖苷、異黃酮糖苷 (Isoflavone glycosides，IG) 共軛的三個亞類 (Thuy Thi，2009)。其中以糖苷配基 (aglycone) 形式存在之異黃酮素較易被人體吸收且具較高之生理活性 (錢，2004)。異黃酮化合物的主要食用來源是大豆，然而，異黃酮主要以 β -糖苷結合物的形式存在 83.9% 至 98.4% 的自然界以及非發酵大豆食品中 (King & Bignell，2000)。

與糖苷異黃酮糖苷相比，異黃酮糖苷配基包括大豆苷元，染料木黃酮，黃豆黃素，生物素 A 和 芒柄花素 更俱生物利用度 (King，1998、Piskula，Yamakoshi，和 Iwai，1999、Setchell 等，2001)。人體所需之適量 IA 為一天 40 mg (Malnig 和 Brown，2007)。

表 2-7 存在自然界與食品中的異黃酮化合物

Isoflavone compounds		Formula	Molecular weight
Group 1: Isoflavone aglycones			
Un-conjugated	Daidzein	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254
	Glycitein	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284
	Genistein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270
	Biochanin A	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284
	Formononetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268
Group 2: Isoflavone glycosides			
Conjugated to glucose	Daidzin	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	416
	Glycitin	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	446
	Genistin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432
	Ononin	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	446
	(Biochanin A glucoside)		
	Sissotrin	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	446
Conjugated to acetyl glycosides	(Formonenin glucoside)		
	Acetyl daidzin	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₀	458
	Acetyl glycitin	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁	488
Conjugated to malonyl glycosides	Acetyl genistin	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	474
	Malonyl daidzin	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂	506
	Malonyl glycitin	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	532
	Malonyl genistin	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	518

2-4-1 大豆異黃酮(soy isoflavone, SI)

在自然界中，大豆是異黃酮的主要來源，70 多年前首次被認為含有異黃酮，當時從大豆的 90% 甲醇提取物和酸水解中分離出染料木聚糖 (Walter, 1941)。如今，大豆和大豆產品已經普及於全世界。在亞洲，大豆已經被食用了將近五千年，在二十世紀初正式引入西方社會。在過去的幾十年裡，西方人逐漸開始接觸一些大豆食品，如醬油和豆漿。1936 年，大豆分離蛋白 (soy protein isolate, SPI) 由有機化學家 Percy Lavon Julian 首次提出。大豆分離蛋白含有高達 85-90% 的蛋白質，因為它具有最高的蛋白質消化率，被認為是蛋白質的完美來源。

King 和 Bignell (2000) 指出，大豆中的主要異黃酮化合物是大豆苷、染料木苷、丙二酰基大豆甙和丙二酰染料木苷，而 SPI 中大多數異黃酮成分是丙二酰染料木苷。

2-4-2 大豆異黃酮的生物可用度

大豆異黃酮是透過 IG 轉化至 IA 達到人體對 SI 的吸收。SI 在人體內的轉化和吸收仍未得到充分研究和了解。而在大豆食品中，異黃酮化合物主要以 IG 的形式存在，尤其是非發酵之產品。在大豆食物中的 IG 已被證實，無法直接透過健康的腸壁被人體吸收 (Setchell 等人, 2002)，更因為相對 IG 來說，IA 具有較高的疏水性以及較低的分子量，IA 比 IG 更容易被吸收 (Hughes 人等, 2003)。儘管 IA 可以直接被腸胃吸收，但 IG 在到達大腸的過程中，並無法切斷 β -糖苷形成 IA。連接 IA 與 β -糖苷配基的是 β -葡萄糖苷鍵，因此多數科學家認為，腸胃裡的菌群可以有效幫助 IG 轉化成 IA，例如乳酸桿菌(*lactobacilli*)、雙歧桿菌(*bifidobacteria*)、擬桿菌(*bacteroides*)、腸球菌(*Enterococcus*)、鏈球菌(*Streptococcus*)，這些菌能夠產生 β -葡萄糖苷酶並水解 β -葡萄糖苷鍵 (Chun 等, 2007)。

大豆異黃酮中主要是大豆苷元(Daidzein)、染料木黃酮(genistein)，其中大豆苷元在進入末梢循環以前會先透過肝臟中的酶或是腸胃微生物群轉化成葡萄糖苷和硫酸鹽的結合物，這些結合物會經由膽管從肝臟排泄到腸道中，再透過腸胃微生物群解除共軛，並進一步於腸道中被吸收，也因為腸道某些細菌具有芳基硫酸酯酶活性，他可以在膽汁中使葡萄糖苷和硫酸鹽的結合物斷開糖苷配基，進而使其再被吸收 (Hughes 等, 2003)。至於那些不被吸收的異黃酮便隨著糞便排出人體。

圖 2-8 為大豆苷元代謝為馬雌酚的路徑。馬雌酚是一種類雌性激素，經由大豆苷元透過腸胃代謝的最終產物，方能被人體吸收。

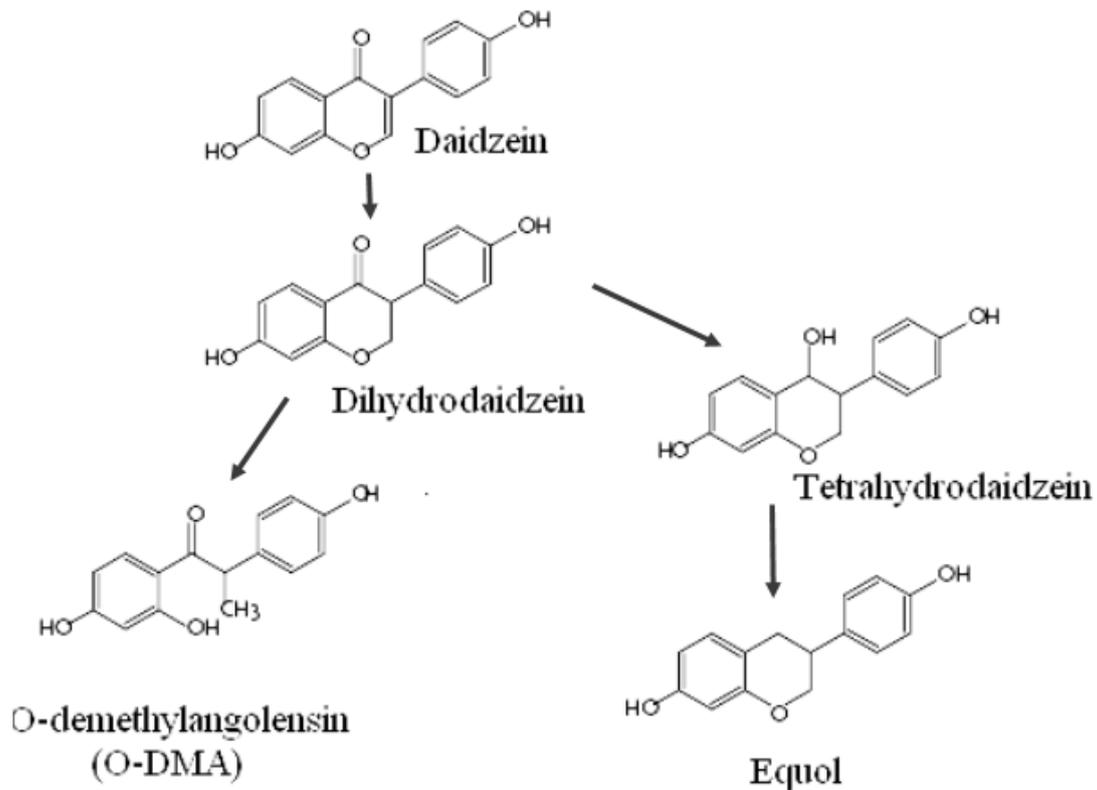


圖 2-8 大豆苷元代謝為馬雌酚的路徑

Joannoua et al. (1995)

2-4-3 異黃酮糖苷(IG)到異黃酮糖苷配基(IA)的微生物轉換

腸道微生物群在大豆異黃酮的代謝有很大的功用，因此多個研究小組開始研究微生物對 IG 到 IA 的生物轉化。乳酸菌(*lactic acid bacteria*, LAB)以及益生菌最為被廣泛使用， 乳酸菌主要包括乳桿菌屬(*Lactobacillus*)、明串珠菌屬(*Leuconostoc*)、片球菌屬(*Pediococcus*)、乳球菌屬(*Lactococcus*)和鏈球菌屬(*Streptococcus*)以及氣球菌屬(*Aerococcus*)、卡氏桿菌屬(*Carnobacterium*)、腸球菌屬(*Enterococcus*)、酒球菌屬(*Oenococcus*)、孢子乳桿菌屬(*Sporolactobacillus*) (Holzapfel & Wood, 1998)，這些乳酸菌可將碳水化合物發酵產生乳酸的代謝終產物，大多數已經被單獨使用或在混合培養中將 IG 轉化為 IA。除了上述菌屬，

雙歧桿菌(*bifidobacteria*)也被大量使用。益生菌被稱為活微生物，主要是指乳酸菌，在攝取足夠的量的情況下，其對宿主健康是有益處的，因此益生菌以及乳酸菌被使用在大豆食品中，可將 IG 發酵為 IA，而最終產品會同時擁有 IA 及微生物的益處，例如豆漿。

IG 到 IA 的生物轉換的能力各有不同，其變化範圍很廣，從 5.3%至 100%不等，如表 2-8 為各種微生物對轉換能力的比較。

表 2-8 從 IG 到 IA 的微生物轉換能力

Microorganism	Transformation level (%)*	Fermentation conditions	Reference
<i>L. lactis</i> KCTC 2181	75.0	Fermented soymilk (supplemented with 2% glucose) at 12 h at 37°C. IG was genistin only	(Choi et al., 2002)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> KCTC 1047	100.0	Fermented soymilk (supplemented with 2% (w/v) glucose) at 12 h at 37°C. IG was genistin only	(Choi et al., 2002)
<i>B. longum</i> BCRC 14661	85.4	Fermented soymilk (supplemented with 10% (w/v) of sucrose, fructose and lactose) at 24 h at 37°C.	(Wei et al., 2007)
<i>L. acidophilus</i>	5.3	Fermented soymilk at 32 h at 37°C	(Chien et al., 2006)
<i>B. longum</i>	6.4	Fermented soymilk at 32 h at 37°C	(Chien et al., 2006)
<i>L. acidophilus</i> and <i>B. infantis</i>	10.7	Fermented soymilk at 32 h at 37°C	(Chien et al., 2006)

(Thuy Thi, 2009)

(*)作者根據參考文獻中的數據依下列公式重新計算:

$$\frac{\text{Initial IG} - \text{residual IG}}{\text{Initial IG}} \times 100$$

2-5 前驅物及誘導子添加

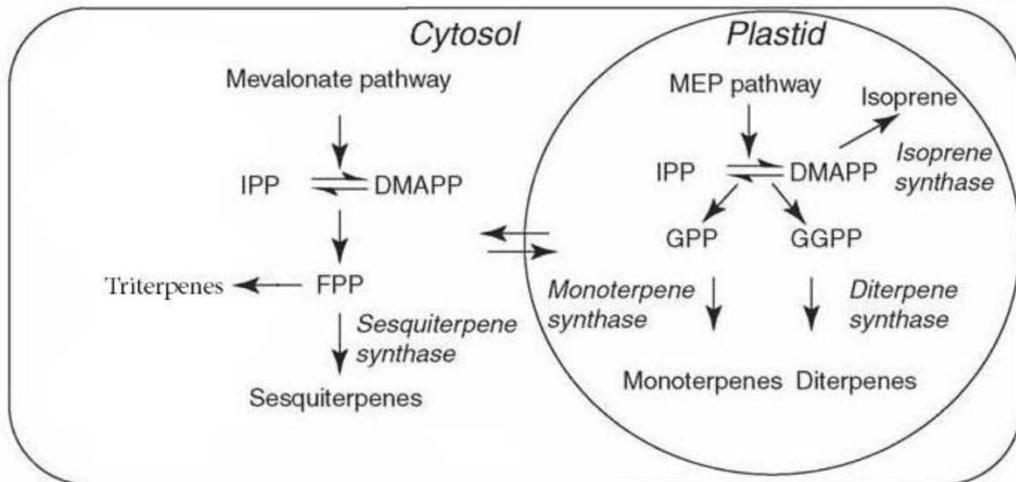
在植物抗病作用中，誘導子(elicitor)是指能夠激發或誘導植物寄主產生防禦反應的因子。利用誘導子添加策略促使細胞快速、大量合成目的二次代謝物，已被認為是促進植物細胞培養二次代謝產物生成最有效的途徑之一（任，2019）。

樟芝可合成三萜類或 Antroquinonol，而前驅物可有效提升三萜類與 Antroquinonol 之含量，而選擇前驅物的種類有三個方向可以探討，第一個是三萜類或者 Antroquinonol 側鏈，須由兩個 FPP(Farnesyl diphosphate)進行合成，而 FPP 是由 IPP(isopentenyl pyrophosphate)和 GPP(geranyl diphosphate)兩者經酵素作用生成，GPP 則是從 IPP 和 DMAPP 二者頭尾相接合成，所以提升 IPP 就能提升三萜類或者 Antroquinonol 的生成。再來是 Antroquinonol 的醌環(quinonoid nucleus)，是來自莽草酸路徑(Shikimic acid pathway)生成的對羥基苯甲酸(4-Hydroxybenzoic acid、PHBA)，由此可知含有酚基的化合物是有可能提升 Antroquinonol 生成。最後是直接經樟芝體內酵素修飾 Antroquinonol 的類似化合物，增加 Antroquinonol 化合物的含量，而這類的化合物以 CoQ (Coenzyme Q₁₀，CoQ₁₀)、β-胡蘿蔔素系列化合物為主。簡而言之，有效合成三萜之前驅物為(1)增加 IPP 含量、(2)添加含有酚基的化合物、(3)添加有關 CoQ(Coenzyme Q₁₀，CoQ₁₀)、β-胡蘿蔔素系列化合物（王，2018）。

2-5-1 三萜類合成機制

萜類化合物一般難溶於水，易溶於親脂性有機溶劑中，單萜和部份倍半萜等低分子量萜類，常溫時多呈液體或低熔點的固體，具揮發性，能隨水蒸氣蒸餾但隨著分子量增加，如部份多功能基的倍半萜，二萜，三萜等，化合物的揮發性將會降低，溶、沸點會提高，為具有高沸點的液體或結晶固體。這些萜類化合物的分子中大多包含雙鍵、共軛雙鍵、異丙烯基等，由於各種相似的結構部分和共同的表現，有助於波譜鑑定，並可利用這些表現的共同化學反應，提供各種化學方

法對萜類成份進行分離純化(肖和陳, 1989)。在萜類化學的研究過程中, 曾以為異戊二烯是萜類化合物在植物體中形成的單體, 例如檸檬烯的蒸氣經氮氣稀釋後, 均能獲得高產率的異戊二烯反之將異戊二烯加熱到 280°C 時, 兩個異戊二烯可以產生 Diels-Alder 反應聚合成單萜。但更多研究指出, 在植物的代謝過程中很難找到異戊二烯的存在, 有越來越多的實驗證明, 萜類化合物的形成是起源於生物代謝的最基本物質-葡萄糖, 首先葡萄糖在酵素的作用下形成醋酸, 三分子醋酸經生物合成產生甲戊二羧酸 (R-Mevalonic acid), 在具有高能鍵的三磷酸腺苷 (ATP), 經過脫水在生物體內形成的真正前體, 因此, 把萜類化合物的碳架結構分成若干個異戊二烯構成的方法, 只能當做為對萜類化合物的結構和分類的一種識別法, 不能代表萜類的生成路徑。在動物或植物體裡, 膽固醇 (cholesterol) 和羊毛脂醇 (lanosterol) 在生理或生化方面均扮演著非常重要的角色, 研究證實了膽固醇和羊毛脂醇分別是動物和植物中經由鯊烯生合成固醇 (sterol) 途徑中的中間產物, 在此生合成途徑中, 配合順序不同的 C-4、C-14 之去甲基 (demethylation), C-24 的甲基化 (methylation), 氧化還原及雙鍵等步驟, 可得到不同的類三萜化合物, 如圖 2-9, 這些類三萜廣泛存在於生物體中, 對於生物演化上佔有很重要的地位。由於膽固醇是細胞膜的重要組成物質, 若樟芝所含的氧化型類三萜在合成膽固醇的過程中, 有抑制或加速的作用會對於癌細胞生長分裂會有很重大的影響(肖和陳, 1989、李, 2003)。Harwood 在 1997 年 (Harwood 等人, 1997) 曾提到, 鯊烯在經過複雜的步驟才能合成膽固醇, 即通過抑制鯊烯合成酶 (squalene synthase, SS) 可以降低膽固醇的合成, 又有學者證實當抑制固醇生成的同時會刺激真菌生成萜類, 是因為累積過多固醇前體進而轉化成萜類 (Ratledge and Evans, 1989)。樟芝本身或其抽出物具有苦味, 在子實體中發現含有多氧化型的三萜類及固醇類, 可能是造成其強力苦味之主要成分, 而樟芝的甲醇萃取物含量高達 30%, 是靈芝萃取物含量 (3%) 的十倍, 這也是為何樟芝比靈芝更苦的原因。



(Dorothea T. , 2006)

圖 2-9 植物萜烯生合成路徑

2-5-2 醋酸鈉

了解三萜生成途徑後，以添加誘導子調節代謝使三萜大量生成。有研究報告顯示，在靈芝上，有利於刺激靈芝三萜靈芝酸合成，最直接的方法是在培養液中加入 5~8 mM 的醋酸，醋酸是醋的主要成分且使用上較其他誘導子安全，此外，可以降低血清膽固醇，刺激動物、植物及菌類的生長，可能有助於提升乙醯輔酶 A，由研究結果得知，靈芝酸的產量增加 105% (Ren 等人，2014)。研究也指出，鈉離子(Na⁺)可以顯著增加靈芝酸的產量，結果顯示，添加鈉離子為控制組的 2.8 倍(Xu 等人，2013)，本實驗以此研究為參考，再進一步延展出本實驗研究架構。

2-5-3 番茄

番茄中所含的茄紅素為類胡蘿蔔素，又胡蘿蔔素為四萜類，經實驗證實，胡蘿蔔素有效提升三萜類。本實驗以此研究為參考並納入實驗設計。

2-5-4 胡蘿蔔

2009 年 Bule.M 於 *P. diminuta* NCIM 2865 中提出添加番茄汁及紅蘿蔔汁有效誘導 CoQ10，因為 CoQ10 的結構與 *antroquinonol* 類似，所以進一步延伸出添加紅蘿蔔汁作為 *antroquinonol* 的誘導子 (Bule, 2009)。2019 年任於樟芝培養實驗中添加胡蘿蔔汁有效提升三萜，本實驗以此為參考納入實驗設計。

2-5-5 綠茶

茶葉化學組成中，以酚類化合物為含量最多之可溶成分，亦為構成茶湯滋味與湯色的主要物質，此類化合物約占茶葉乾物種之 30% 左右，占可溶性物質總量之 60%。而根據 Vuataz 等人(1959)的研究指出，茶葉的多酚類化合物一般可以分成下列五大類：(1)黃烷醇類及其沒食子酸酯類、(2)黃酮醇類及其配糖物、(3)酚酸與縮酚酸類、(4)氧化態之聚合酚類、(5)無色花青素類。而上述五類酚化物中，以第一類之黃烷醇類含量最多，約占總酚類之 80% 以上，其餘則含量甚少，(表 2-9)。黃烷醇類又稱為兒茶素，已知的兒茶素至少有十種以上，其存在的形式及量的多寡會隨著茶葉的老嫩與生長期不同而有顯著的變化，而大部分的兒茶素是以沒食子酸的酯化形式存在(區等, 1988)。

所有兒茶素中，以 EGC((-)-Epigallocatechin)、EGCg((-)-Epigallocatechin gallate)、EC((-)-Epicatechin)、ECg((-)-Epicatechin gallate) 等四種含量最多，約占兒茶素量之 80%，亦是兒茶素展現抗氧化活性等藥理性最強的部份。而製造方法對成茶的兒茶素成分總含量有很大的影響，一般來說，發酵的成度越高，不論茶樹的品種為何或採收季節是否不同，則成茶的兒茶素類的總含量會越低。據茶葉改良場的研究報告指出，四種茶類的兒茶素含量依序為：綠茶(民國 67 年平均值 17.04% / 民國 68 年平均值 17.07%) > 包種茶(15.25% / 16.15%) > 烏龍茶(13.49% / 13.34%) > 紅茶(11.51% / 10.53%)(甘, 1981)。

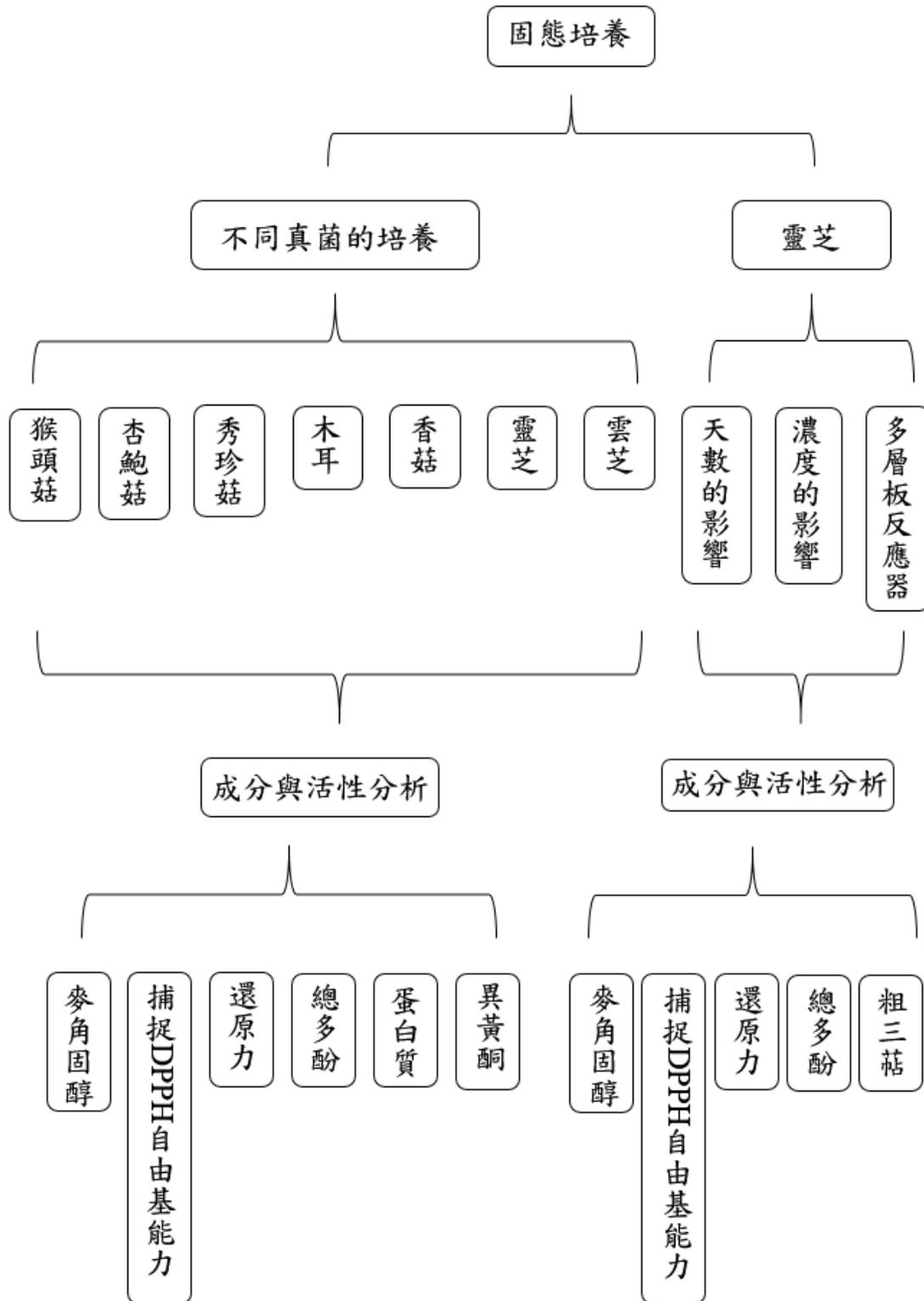
表 2-9 茶菁中主要多元酚成分及其含量

種類	分子式	分子量	含量(%乾重)
黃烷醇類			
(-)Epicatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	1-3
(-)Epicatechin gallate	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	442	3-6
(-)Epigallocatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306	3-6
(-)Epigallocatechin gallate	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	458	9-13
(+)Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	1-2
(+)Gallocatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306	3-4
黃酮醇類及其配糖物			
Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302	-
Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286	-
Quercetin 3-rhamnoglucoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610	-
Kaempferol 3-rhamnoglucoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594	-
Quercetin 3-rhamnoglucoside	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	772	-
Kaempferol 3-rhamnoglucoside	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	756	-
無色花青素類			~5
酚酸與縮酚酸類			
Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	170	-
Chlorogenic acids(4 個異構體)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354	-
P-Coumarylquinic acids(4 個異構體)	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338	-
Theogallin	C ₁₄ H ₁₅ O ₁₀	343	~1
Ellagic acid	C ₁₄ H ₆ O ₈	302	-
總多元酚類			25-35

(甘，1981)

第三章 實驗材料與方法

3-1 實驗架構



3-2 實驗材料

3-2-1 實驗菌株

本實驗所用靈芝、猴頭菇、杏鮑菇、木耳、秀珍菇皆購自南投埔里豐年農場，菌種購置後在無菌空間下進行分裝，使用直徑為 8cm、高 10cm 之圓盒分裝，並置於 4°C 冰箱中保存備用。待需使用時，直接取出並接種於培養基上。

圖 3-1 所示的菌種由左至右依序為靈芝、香菇、杏鮑菇、秀珍菇、木耳。



圖 3-1 之菌種由左至右依序為靈芝、香菇、杏鮑菇、秀珍菇、木耳。

圖 3-1 菌種

3-2-2 實驗藥品與材料

本實驗藥品與材料列於表 3-1 及表 3-2。

表 3-1 實驗藥品清單

藥品名稱	藥品廠牌
Phenol	SHOWA
Methanol	ECHO
99.5% Ethanol	ECHO
Folin-ciocalteu's phenol reagent	SIGMA
Chloroform	TEDIA
Sodium carbonate	SHOWA
Sodium hydrogen carbonate	SHOWA
Sodium acetate	SHOAW
HCl	AENCORE
NaOH	SHOWA
Gallic acid	SIGMA
Ergosterol	SIGMA
n-Hexane	TEDIA
Trichloroacetic acid	Alfa Aesar
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Thermo
Bicinchoninic acid	Thermo

表 3-2 實驗材料清單

材料名稱	廠牌
豆渣	豆在來社區豆腐坊(大進店)
小米	茂喜食品
紅蘿蔔	善美
牛番茄	善美
綠茶	天仁茗茶

3-3 實驗儀器與設備

本實驗主要設備與儀器列於表 3-3。

表 3-3 實驗儀器清單

儀器設備	型號	廠牌
pH meter	pH-206	Lutron
高壓滅菌釜	HI-340	台灣宏霖
無菌操作台	JW-4N	台灣亮盛
試管震盪器	MSI minishaker	德國 IKA
迴轉式震盪培養箱	LUS-150	台灣亮盛
分光光度計	GENESYS UV10	美國 Thermo
電子天平	BJ100M	Precisa
微電腦蒸餾水製造機	WSC044	英國 FISTREEM
超純水製造機	NDIT	台灣羅達
超音波震盪機	5210	美國 BRANSON
高速中型離心機	Universal-32R	德國 Hettich
冷凍乾燥機	CT-110	丹麥 HETO
烘箱	LO-150	台灣亮盛
高真空油壓式幫浦	PASCAL 2010 CI	法國 ALCATEL
超音波震盪破碎機	S-3000	DECTA
高效液相層析儀	1100	Agilent

3-4 實驗方法

3-4-1 培養基製備

將購買來的豆渣（含水量 76%）與乾燥小米以重量 6:4 之比例均勻混和，混和均勻之含水量為 45%，添加蒸餾水將含水量調整為 52%，於每個直徑 8cm、高 10cm 之圓盒填入 80g 之混和物，經 121°C 滅菌 40 分鐘，待其冷卻備用為固態培養基。

3-4-2 不同菇類豆渣發酵物生理活性比較

培養不同真菌類，並分析且探討真菌類所含之生理活性成分之差異。依照 3-4-1 節之培養基製備方法準備足夠的培養基。取出已進行分裝之相同大小之杏鮑菇、秀珍菇、木耳、香菇、靈芝、雲芝以及猴頭菇的種菌，接種於已冷卻之固態培養基，放入 25°C 恆溫避光靜置培養箱，培養六週。

3-4-3 時間對不同液態添加物豆渣靈芝培養之影響

於培養基內添加不同種類之前驅物，探討不同培養天數對靈芝生長的情形，並分析其生理活性之變化。

(1) 添加液態綠茶以及醋酸鈉溶液

將豆渣及小米依 6:4 之比例調配成培養基，分別加入綠茶以及醋酸鈉溶液並將含水量控制在 52%（此處直接利用綠茶以及醋酸鈉溶液調控含水量，意即將水取代為綠茶及醋酸鈉溶液），混和均勻後於每個圓盒（直徑 8cm×高 10cm）內放入 80g，經 121°C 滅菌 40 分鐘，待其冷卻備用。取出分裝的靈芝固態種菌，接種大小相同的種菌於固態培養基，放入 25°C 恆溫、避光、靜置培養箱，分別在第 4、6、8、10 週取樣並分析，實驗進行三重複。

綠茶及醋酸鈉溶液的製備方法如下，取 50g 之綠茶葉粉末，加入 1000mL 之熱水靜置 24 小時，將茶葉過濾後取上清液為實驗所使用的綠茶。將醋酸鈉

配製成濃度為 5mM。

(2) 添加胡蘿蔔汁以及番茄汁

將豆渣及小米依 6:4 之比例調配成培養基，加入番茄汁以及胡蘿蔔汁分別將濕度控制在 52%，混和均勻後於每個圓盒(直徑 8cm×高 10cm)內放入 80g，經 121°C 滅菌 40 分鐘，待其冷卻備用。取出大小相同之靈芝固態菌種接種於固態培養基，放入 25°C 恆溫、避光、靜置培養箱，分別在第 4、6、8、10 週取樣並分析，實驗進行三重複。

番茄汁與胡蘿蔔汁製備方法如下，將番茄及胡蘿蔔切丁後利用果汁機打碎，並用榨汁機將其榨出汁，再用篩網過濾後於 121°C 滅菌 20 分鐘。

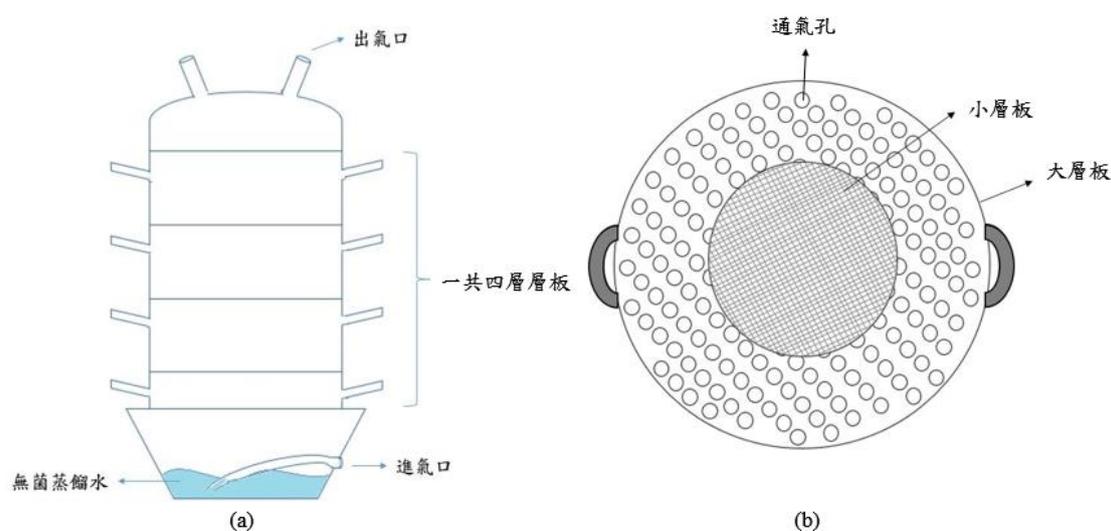
3-4-4 濃度對綠茶粉末添加於豆渣靈芝培養之影響

從 4-3 節之實驗結果得知，液態添加物對固態靈芝培養並無成效甚至有抑制的現象，於是將添加物改為固態。將豆渣及小米依 6:4 之比例調配成培養基，混和均勻後於每個圓盒(直徑 8cm×高 10cm)內放入 80g，再依序加入 0.5、1、2、4、7.5、10、13g 之綠茶粉末，將含水量控制在 52%，混和均勻後以 121°C 滅菌 40 分鐘，待其冷卻備用。取出相同大小之靈芝種菌接種於已冷卻的培養基，放入 25°C 恆溫、避光、靜置培養箱，培養六週，實驗進行三重複。

綠茶粉末製備如下，將固定貨源購入的綠茶茶葉用磨碎機磨碎，得到綠茶粉末備用。

3-4-5 設計多層板反應器培養靈芝

由於以圓盒自然通氣培養靈芝的方式成效有限，推測原因之一為圓盒內的空氣不足，使得靈芝生長時無法有足夠的氧氣來源，於是嘗試利用強制通氣，使靈芝在培養過程持續擁有足夠的氧氣並持續生長。設計概念以蒸籠出發並加以改良，於大層板內加裝小層板，目的在於使反應器內通氣良好，在層板最底層裝無菌蒸餾水，強制通氣由水層進入以達到飽和蒸氣，示意圖如圖 3-2 所示。



(a)多層板反應器側面圖、(b)多層板反應器俯視圖

圖 3-2 多層板反應器

於小層板內加入用豆渣及小米依比例調配的固態基質 80g，將濕度控制在 52%，經 121°C 滅菌 40 分鐘，待其冷卻備用。取相同大小靈芝菌種，接種於每一層已冷卻之小層板內，置於 25°C 恆溫、避光、靜置培養箱，培養 2 週。

重複上述培養基的製備，並於其內添加 9g 綠茶粉末，經 121°C 滅菌 40 分鐘，待其冷卻備用。取相同大小靈芝菌種，接種於每一層已冷卻之小層板內，置於 25°C 恆溫、避光、靜置培養箱，培養 2 週。

3-5 分析方法

3-5-1 樣品製備

將培養完成之豆渣發酵物適量填入樣品瓶，經冷凍乾燥後使用粉碎機將其粉碎並均勻混和，即為菌粉樣品。

3-5-2 甲醇萃取液製備

秤取冷乾後之菌粉樣品 1g 加入 5mL 甲醇，於超音波震盪 30 分鐘，以 7000rpm 離心 10 分鐘，取上清液為樣品置於 4°C 冰箱備用。

3-5-3 捕捉 DPPH 自由基能力測定

DPPH(α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 自由基是一種非常穩定的自由基。在抗氧化的研究常常使用 DPPH($C_{18}H_{12}N_6O_5$) 來檢測抗氧化劑提供氫的能力，藉由定樣品在 517nm 下的吸收值來判定樣品是否具有清除自由基的能力，當吸收值越低，就代表樣品對於 DPPH 自由基的捕捉能力越強，也表示其具有良好提供氫的能力 (Yamaguchi 等人, 1998)。

參考 Mai 等人之文獻 (Mai 等人, 2015)。取 0.5mL 的甲醇萃取液，加入 1mL 之 0.1mM DPPH 自由基甲醇溶液，充分混和後，靜置反應 30 分鐘，再以分光光度計測其於 517 nm 波長下之吸收光值，並計算其自由基捕捉率*。

$$*捕捉率(\%) = [1 - (\frac{A1}{A2})] \times 100\%$$

A1：樣品萃取液於 517nm 之吸光值

A2：控制組於 517nm 之吸光值

3-5-4 還原力 (Reducing power) 測定

此方法主要是依據普魯士藍 $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ (Prussian Blue)的生成量為指標，原理為將赤血鹽 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 還原成黃血鹽 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ，然後黃血鹽再利用 Fe^{3+} 形成普魯士藍，藉由波長 700nm 的吸光值變化來檢測還原力的大小，吸光值越高則表示還原力越強(Mai 等人，2015)。

取 0.5mL 甲醇萃取液，加入 0.1mL 1% potassium ferricyanide(赤血鹽)，於 50°C 水浴中反應 30 分鐘，使 ferricyanide(鐵氰化物)還原為 ferrocyanide(亞鐵氰化物)後，加入 0.1mL 1% TCA(trichloroacetic acid)溶液以及 0.1mL 0.1% FeCl_3 ，反應 20 分鐘後以分光光度計測其在波長 700nm 下之吸光值。

3-5-5 總多酚(Total phenol)測定

利用酚類化合物在鹼性的環境下能與 Folin-Ciocalteu's phenol reagent (FCPR) 形成可溶性的藍色化合物，在 730nm 有最大的吸收值，吸收值越大，表示其中所含的酚類化合物越多，以 Gallic acid 為標準品製作檢量線，對照樣品中酚類化合物含量多寡。

參考 Mai 等人之文獻 (Mai 等人，2015)。取 0.2mL 甲醇萃取液，加入 0.2mL 50% FCPR 以及 4mL 2% Na_2CO_3 ，均勻混和後靜置 30 分鐘，利用分光光度計測其在波長 730nm 下之吸光值，比對檢量線後得到總多酚含量。

圖 3-3 為總多酚檢量線。Gallic acid 檢量線製作方法如下，配製濃度為 500ppm 之 Gallic acid 甲醇溶液，並依序列稀釋法往下配製 9 種濃度，經反應後測其吸光值，利用吸光值對應濃度做線性回歸即可得到總多酚檢量線。

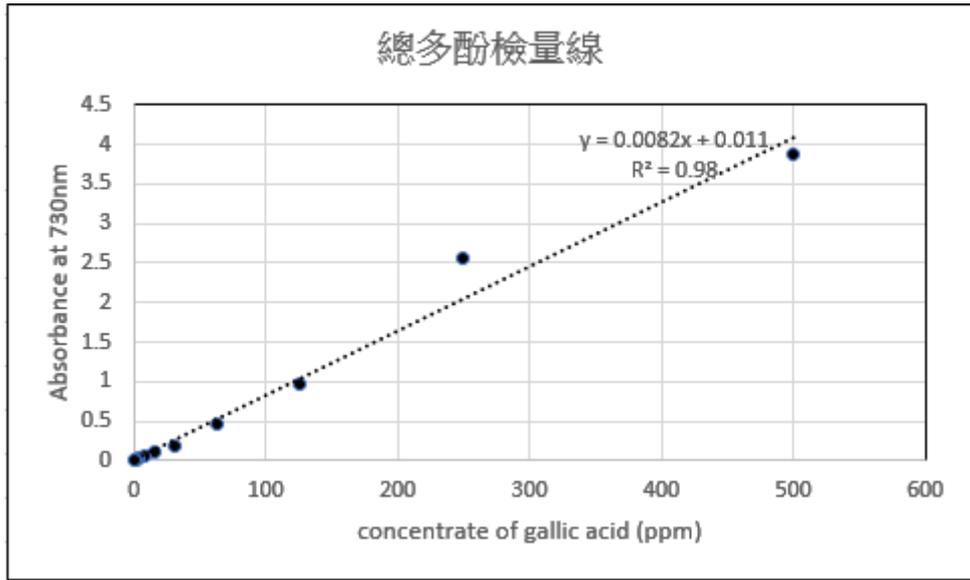


圖 3-3 總多酚檢量線

3-5-6 麥角固醇測定(Ergosterol)測定

參考(涂, 2016)。秤取 2 g 菌粉樣品加入 10 mL n-Hexane, 超音波震盪萃取 30 分鐘。7000rpm 離心 10 分鐘。收集上清液, 以 40°C 減壓濃縮, 用 2mL CHCl₃ 回溶, 經 Nylon membrane filter(0.45µm pore size, Extra Gene)過濾, 利用高效能液相層析儀(High performance liquid chromatography, HPLC, Alginat 1100 Series) 進行定性與定量分析, 使用 LunaC18(5µm, 4x250mm)之液相層析管柱, 設定條件如表 3-4 及表 3-5。

將麥角固醇標準品用 CHCl₃ 依序列稀釋法配製 7 種濃度, 經 HPLC 分析後, 以吸收面積對麥角固醇濃度作線性回歸得到檢量線, 如下圖 3-4。

表 3-4 麥角固醇 HPLC 設定條件

設定項目	設定參數
Mobile phase	A : 60% methanol B : 100% methanol
流速	1mL/min
注射量	20 µL
波長	280nm
溫度	25°C

表 3-5 麥角固醇分析之 HPLC 移動相設定

分鐘	A	B
0	100%	0%
20	0%	100%
50	0%	100%

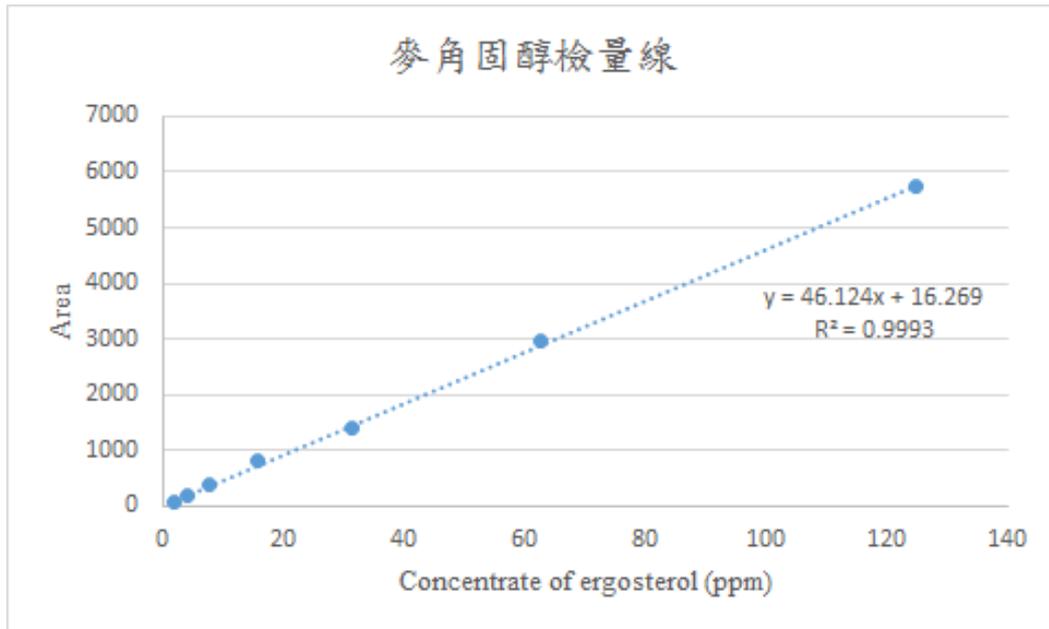


圖 3-4 麥角固醇檢量線

3-5-7 蛋白質測定

BCA(bicinchoninic acid)是一種穩定的水溶性複合物，在鹼性條件下，二價銅離子可以被蛋白質還原成一價銅離子，一價銅離子和 BCA 相互作用，兩分子的 BCA 螯合成一個銅離子，形成紫色的複合物，該複合物為水溶性，在 562nm 處有強吸光值，在一定濃度範圍內，吸光值與蛋白質含量成良好的線性關係，因此可以依據標準蛋白液在 562nm 處的吸光值與其濃度製作檢量線。

將冷乾後的 0.2g 菌粉樣品與 4mL 磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)均勻混合，使用超音波震盪破碎機進行萃取 5 分鐘，完畢後靜置 5 分鐘，以 7000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液，再將 6 μ L 上清液與 24 μ L PBS 均勻混和後即為粗蛋白樣品。

配置 BCA 工作液：將 A 液和 B 液搖晃混勻，按照 A:B=50:1 的比例配置 BCA 工作液，充分混勻。

利用磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)配製不同濃度的標準蛋白液(BSA)，2000、1500、1000、750、500、250、125、25 μ g/ μ L。

取空白組 (0 μ g/ μ L BSA，即 PBS) 及各濃度的標準蛋白液 25 μ L 與待測的蛋白樣品 25 μ L 加入 96 孔平板中，並加入 200 μ L 的 BCA 工作液 (加樣時應當動作輕柔，防止產生氣泡影響讀數)，混和均勻後於 37 $^{\circ}$ C 水浴反應 30 分鐘，靜置冷卻至室溫，利用 Elisa 測定法測其在波長 562nm 下之吸光值，將標準蛋白液的濃度與吸光值作線性回歸得到檢量線。將待測樣品的吸光值對照檢量線，如圖 3-5，計算樣品所含蛋白質濃度。

分析方法取自：蛋白質測定套組 (BCA Protein Assay Kit, Thermo)。

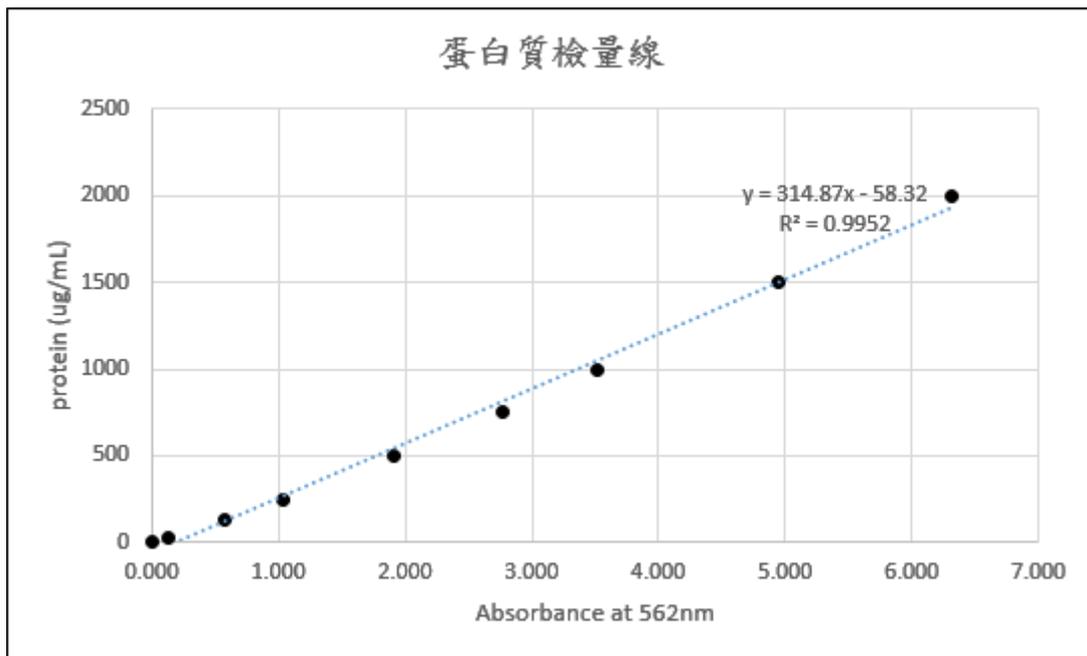


圖 3-5 蛋白質檢量線

3-5-8 粗三萜(Crude triterpenoid)測定

第一天

取 0.3g 冷乾後的菌粉，加入 3mL 50%乙醇，超音波震盪 30 分鐘，以 7000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液至樣品瓶，重複上述步驟 (取出之上清液不可有渣)，收集共約莫 6mL 之上清液後烘乾。

第二天

取出烘乾物加入 3mL 去離子水，震盪 30 分鐘。再加入 3mL CHCl_3 (在抽氣櫃操作)，取下層液(不要搖動)，加入 3mL 5% NaHCO_3 ，震盪 30 分鐘。將樣品底層白色混合物之 pH 調整為 2.7~3，搖晃混和後，取下層液入樣品瓶後烘乾。

第三天

取出烘乾物加入 2mL 99%乙醇，震盪 30 分鐘，稀釋 2 倍(1mL 99%乙醇+1mL sample)，並製作空白組(2mL 99%乙醇)，以 7000rpm 微量離心 10 分鐘，利用分光光度計測其在波長 245nm 下之吸光值，代入標準線得粗三萜濃度。

3-5-9 異黃酮測定

參考 (Thuy Thi, 2009)。取 1g 乾燥菌粉，加入 20ml 80% 甲醇以及 100 μ l flavone (1 mg/mL)，在 50°C 下在水浴中靜置 120 分鐘進行萃取。取出後利用 Whatman No.3 濾紙過濾，將 1ml 過濾溶液通過 0.45 μ m 之 nylon membrane filter 到 vial 瓶，並在 4 小時內注入 HPLC 進行分析以避免 malonyl- and acetyl- glycosides 降解。詳細 HPLC 條件見表 3-6 及表 3-7。

表 3-6 異黃酮分析之 HPLC 條件

設定項目	設定參數
Mobile phase	A : water: phosphoric acid = 1000:1, v/v B : water: acetonitrile: phosphoric acid = 200:800:1, v/v/v (A、B 溶液之 pH 皆為 2.5 左右)
流速	0.8mL/min
注射量	20 μ L
波長	259 nm
溫度	25°C
管柱	Alltima HP C18 HL (7.5 mm \times 4.6 mm internal diameter, 5 μ m)

表 3-7 異黃酮分析之 HPLC 移動相設定

分鐘	A	B
0	100%	0%
50	0%	100%
60	100%	0%

第四章 結果與討論

4-1 不同菇類生理活性之比較

本實驗選用珍貴菇類以及幾種常見菇類作分析比較。從圖 4-1 可以看出在相同條件培養下，木耳與秀珍菇的麥角固醇含量遠大於其他菇類，由於麥角固醇與真菌生物量成正比，表示木耳與秀珍菇的菌絲體含量遠大於其他菇類，除了其本身含量高，也從培養過程的觀察推測，由於木耳及秀珍菇的生長速度快，在相同時間取樣的情況下，與菌絲體量成正比的麥角固醇含量自然會高於其他菇類。

而抗氧化方面，在捕捉 DPPH 自由基能力的部分，相比豆渣之捕捉率為 42.6% (Mai, 2015)，所有菇類都遠高於豆渣，其中杏鮑菇的捕捉率最高為 109.9%，如圖 4-2。還原力的部分，豆渣在 700nm 下的吸收值為 0.15 (Mai, 2015)，除了木耳無明顯提升外，其餘菇類皆提高不少，而香菇擁有最大吸收值為 1.58，如圖 4-3。由沒食子酸的含量來檢測總多酚含量，見圖 4-4，靈芝為所測菇類中含量最高 3.03 mg/g D.W.，是豆渣對照組 0.83 mg/g D.W. (Mai, 2015) 的 3.6 倍。從圖 4-5 所示，芝類菌菇的蛋白質較其他菇類都來的高，而雲芝更是達到豆渣對照組 13.47 mg/g D.W. 的 11.3 倍，為 152.1 mg/g D.W.。結果顯示，經過豆渣培養的發酵物，蛋白質含量明顯提升，其中又以靈芝與雲芝為優。

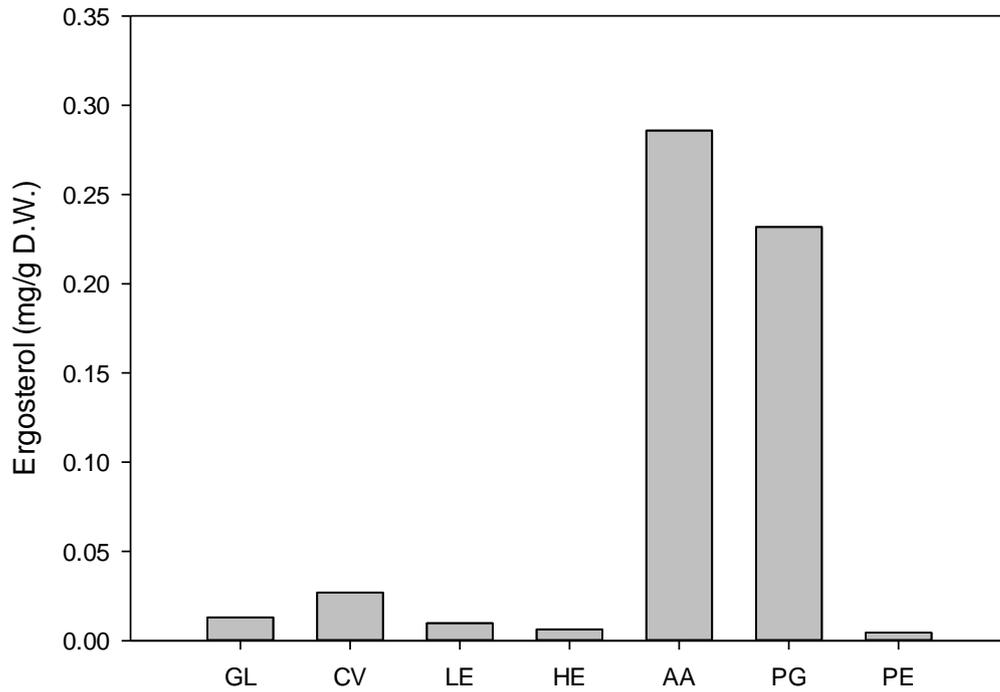


圖 4-1 不同菇類生成之麥角固醇

GL：靈芝(*Ganoderma lucidum*)

CV：雲芝(*Coriolus versicolor*)

LE：香菇(*Lentinus edodes*)

HE：猴頭菇(*Hericiium erinaceus*)

AA：黑木耳(*Auricularia auricula*)

PG：秀珍菇(*Pleurotusgeesteranus*)

PE：杏鮑菇(*Pleurotus eryngii*)

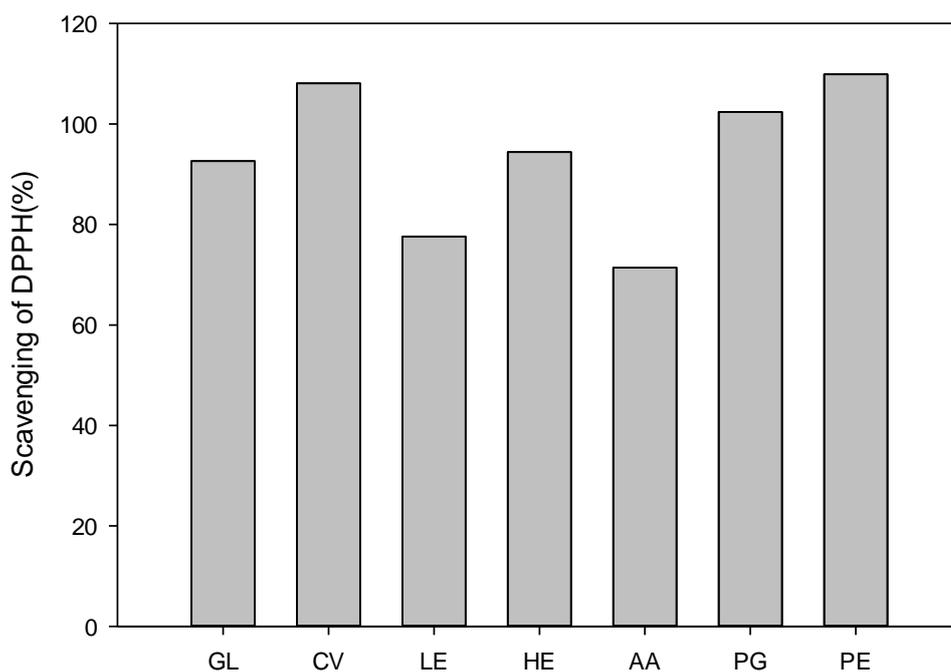


圖 4-2 不同菇類之捕捉 DPPH 自由基能力

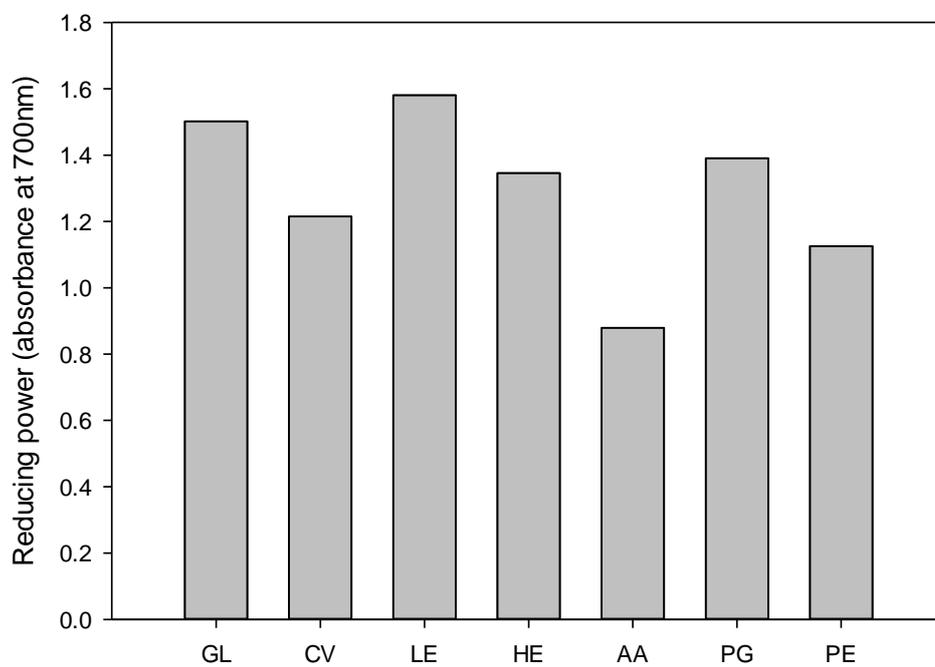


圖 4-3 不同菇類之還原力

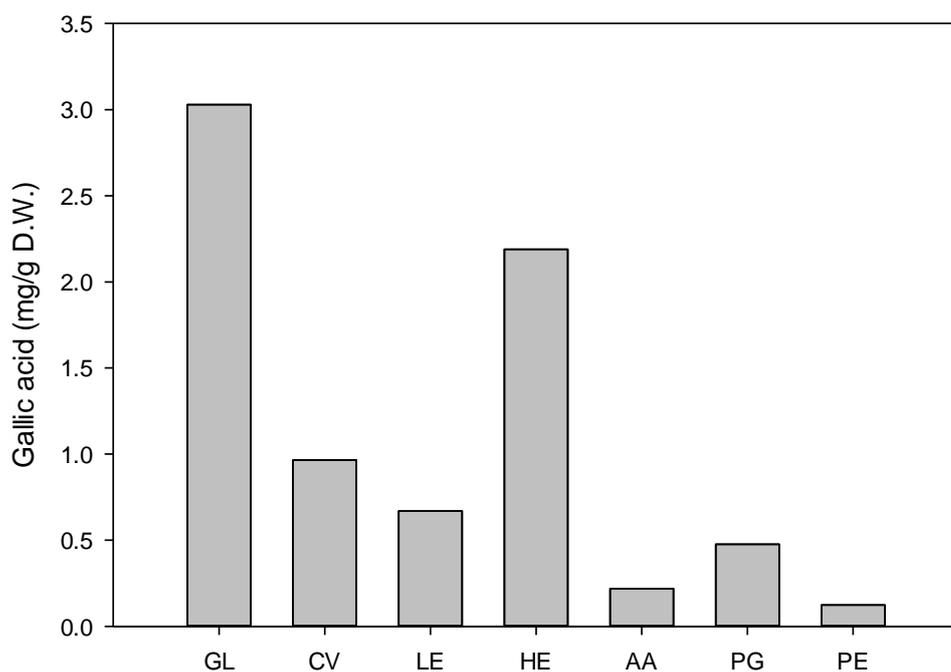


圖 4-4 不同菇類之總多酚含量

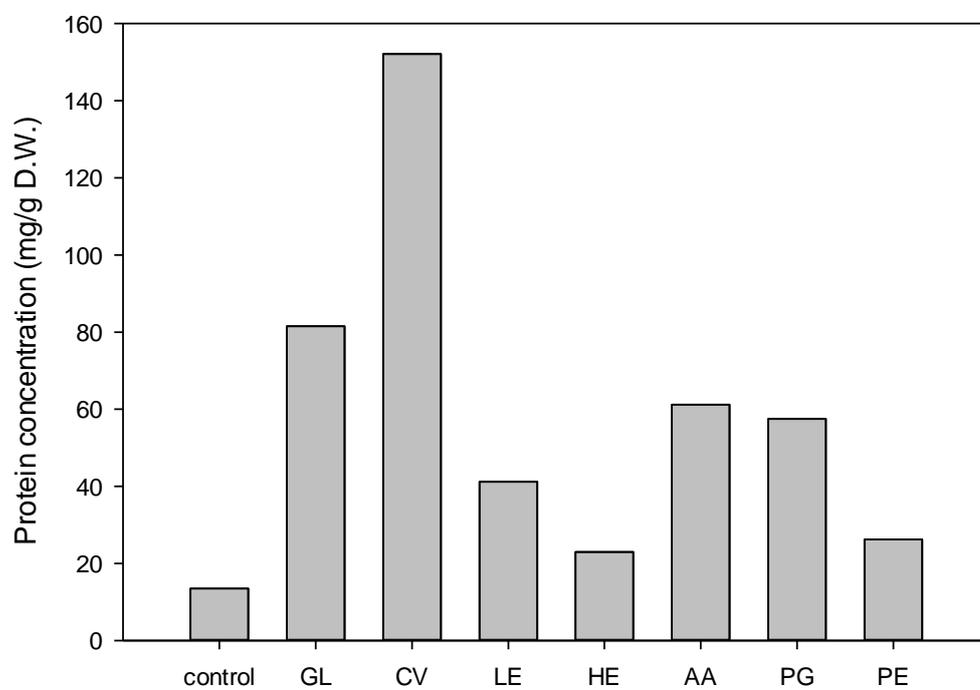


圖 4-5 不同菇類之蛋白質含量

4-2 不同菇類異黃酮生物轉換之比較

自然界中的異黃酮普遍以 Isoflavone glycosides(IG)存在，但 IG 無法直接被人體吸收，透過微生物培養能夠成功轉換成 Isoflavone aglycones(IA)進而被人體吸收，例如益生菌。本實驗嘗試將細菌改成真菌，期望能夠達到同樣成效。從表 4-1 可以看到，含有豆渣以及小米的培養基所擁有可直接被人體吸收的 IA 有 25.28mg/100g D.W.，遠高於另外五種菇類培養六週的生成量，結果顯示真菌的培養無法使豆渣內的 IG 轉換成 IA，甚至在培養過程中會消耗其中的異黃酮。

表 4-1 不同菇類異黃酮成分

Isoflavone compounds		初始 培養基	靈芝	雲芝	香菇	猴頭菇	秀珍菇
Isoflavone glycosides	Daidzin	7.19	0.11	-	1.19	-	-
	Glycitin	0.91	-	-	-	0.10	-
	Genistin	9.57	-	-	-	0.78	0.03
	Malonyl daidzin	0.96	-	-	-	-	-
	Malonyl glycitin	0.33	-	-	0.38	-	0.26
	Malonyl genistin	2.05	0.05	-	-	-	-
	Acetyl daidzin	0.57	-	-	-	2.05	-
	Acetyl glycitin	0.05	-	-	0.16	-	-
	Acetyl genistin	0.69	-	-	-	-	-
	total	22.32	0.16	0	1.73	2.93	0.29
Isoflavone aglycones	Daidzein	11.99	1.17	-	2.11	9.35	0.12
	Glycitein	1.78	0.12	-	0.14	0.38	-
	Genistein	11.51	0.11	-	0.47	5.26	-
	total	25.28	1.40	0	2.72	14.99	0.12

單位：mg/100g

4-3 時間對不同液態添加物豆渣靈芝培養之影響

從圖 4-6 可以看到靈芝的麥角固醇與三萜隨著生長週數的變化，由於麥角固醇與菌絲體產量成正比，所以可以發現到隨著生長週數越長，麥角固醇產量越大，在第 10 週達到最大值為 0.164 mg/g D.W.，結果顯示菌絲體含量隨著週數越長而生成越多。而粗三萜在第 6 週達到最大值為 1.78 mg/g D.W.，後面儘管第 10 週有上升的現象，也不及第 6 週。

圖 4-7 所示為抗氧化方面，DPPH 自由基捕捉率在第 6 週達到捕捉率 95.65% 後開始趨於平緩，還原力則是在第十週有最高吸收值為 1.174，但也只比第 8 週高不到一倍，而沒食子酸在第 8 週達到最高值 2.067 mg/g D.W. 後開始趨於平緩，代表其總多酚含量在第 8 週後並無繼續增加，這表示利用圓盒培養的靈芝即便菌絲體持續生長，抗氧化能力到達一定值後便不再上升。

綜觀上述實驗結果，靈芝的培養隨著週數越長菌絲體生長越多，但也因為時間過長，菌絲體有老化的現象而造成內含有益之生理活性下降，抗氧化能力也只能達到一定程度。

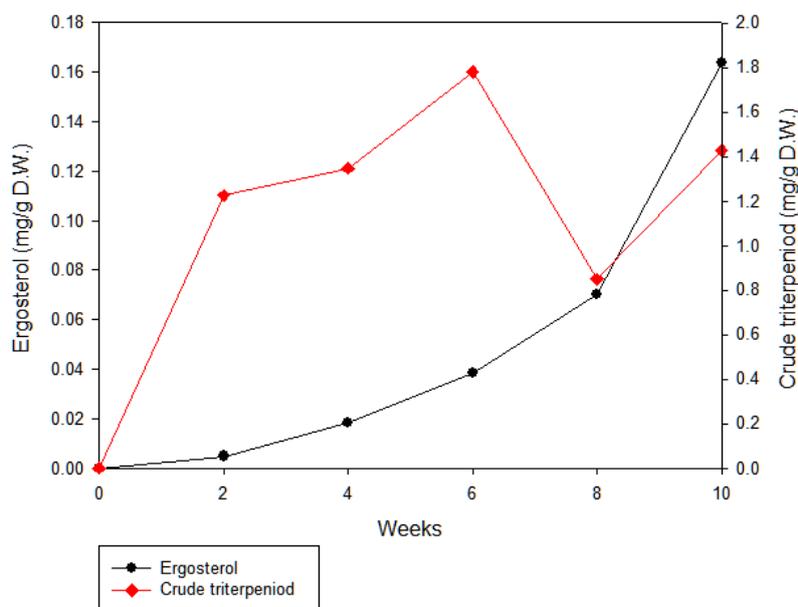


圖 4-6 靈芝豆渣固態培養過程生理活性成分隨時間變化

(培養溫度：25°C、濕度：52%)

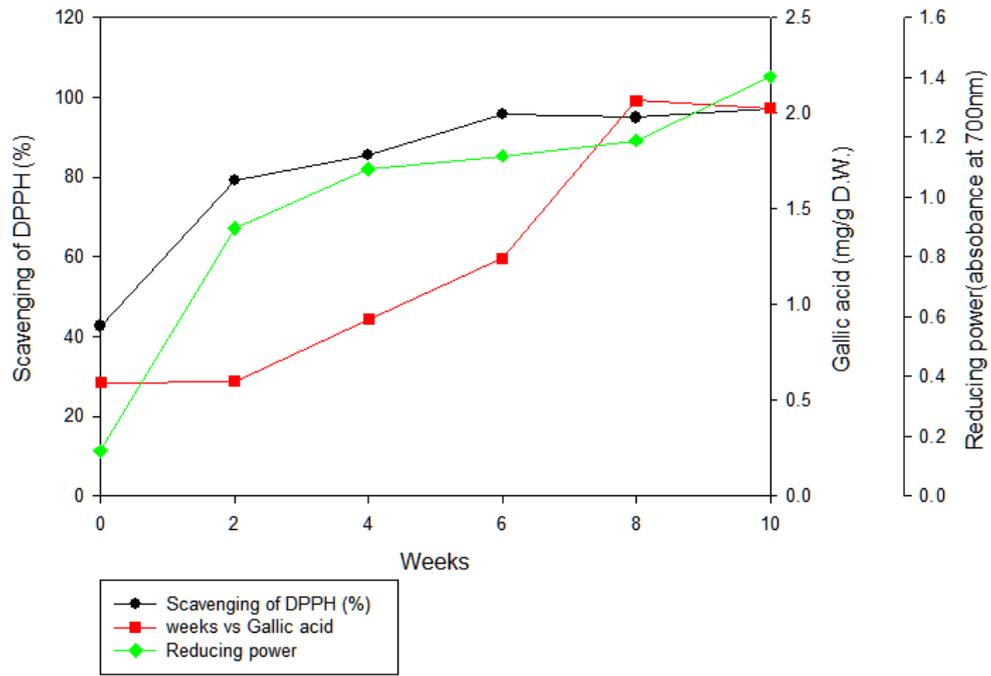


圖 4-7 靈芝豆渣固態培養過程生理活性成分隨時間變化

(培養溫度：25°C、濕度：52%)

4-3-1 綠茶及醋酸鈉溶液添加

根據前面實驗結果，將添加物培養的實驗取樣時間點設定為菌絲體、抗氧化能力及粗三萜含量達成長和衰退的最佳狀態，即為 4、6、8 週。由於生長過程目測在第 8 週時靈芝菌絲體並未生長完全，因此增加一個取樣點為第 10 週。由圖 4-8 的麥角固醇含量可以知道，菌絲體皆隨著培養週期越長而生成越多，但相較控制組，添加綠茶有抑制的現象，生成量皆低於控制組，而添加醋酸鈉溶液則在第 10 週達到最高點為 0.211 mg/g D.W.，是控制組的 1.46 倍。也因為綠茶抑制了麥角固醇的生成進而誘發三萜的合成，從圖 4-9 可以看到，添加液態綠茶的培養在第 4 週有最高值為 3.54 mg/g D.W.，是控制組的 1.83 倍。在抗氧化方面，添加綠茶培養的捕捉 DPPH 自由基能力在第 6 週捕捉率達到 86.8% 後開始趨於平緩，添加醋酸鈉溶液則是在第 4 週時就已達到最高點為捕捉率 90.9%，是控制組的 1.68 倍，如圖 4-10。而由圖 4-11 及圖 4-12 可以發現不論是添加綠茶或是醋酸鈉溶液，都在還原力與總多酚的部分表現不佳，甚至低於控制組。由上述情況可以得知，添加液態綠茶以及醋酸鈉溶液在靈芝培養時產生有益生理活性物質有下降的情況，表示即使菌絲體量上升但在抗氧化能力的部分仍然造成抑制現象。

綜合上述之觀察，發現添加綠茶以及醋酸鈉溶液都對靈芝的培養造成抑制的作用，不同的是，綠茶抑制麥角固醇的現象反而提升了三萜的含量，符合 Ratledge 和 Evans 在 1989 時所提到當抑制固醇生成的同時會刺激真菌生成萜類，乃因累積了過多的固醇前體進而轉化生成萜類之故 (Ratledge 和 Evans, 1989)。而郭等人也在 2012 時證實普洱茶富含多酚類成分，成功抑制大鼠肝內鯊烯合成酶的表達和活性而減少膽固醇的合成量 (郭, 2012)。

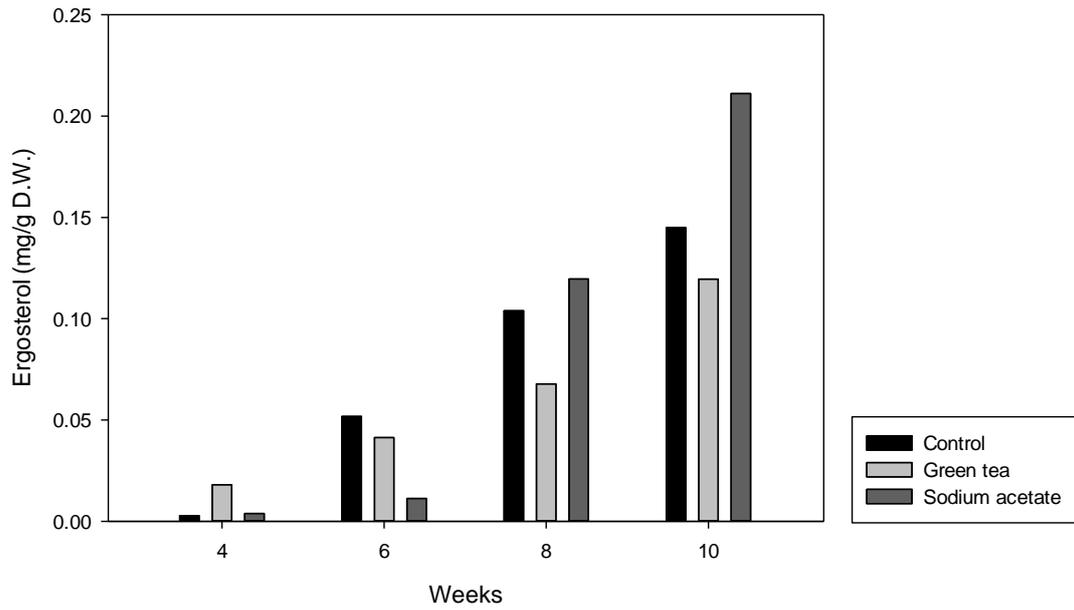


圖 4-8 綠茶及醋酸鈉添加對靈芝發酵物生成麥角固醇的影響

(溫度：25°C、濕度：52%、綠茶及醋酸鈉濃度：10mL/80g medium)

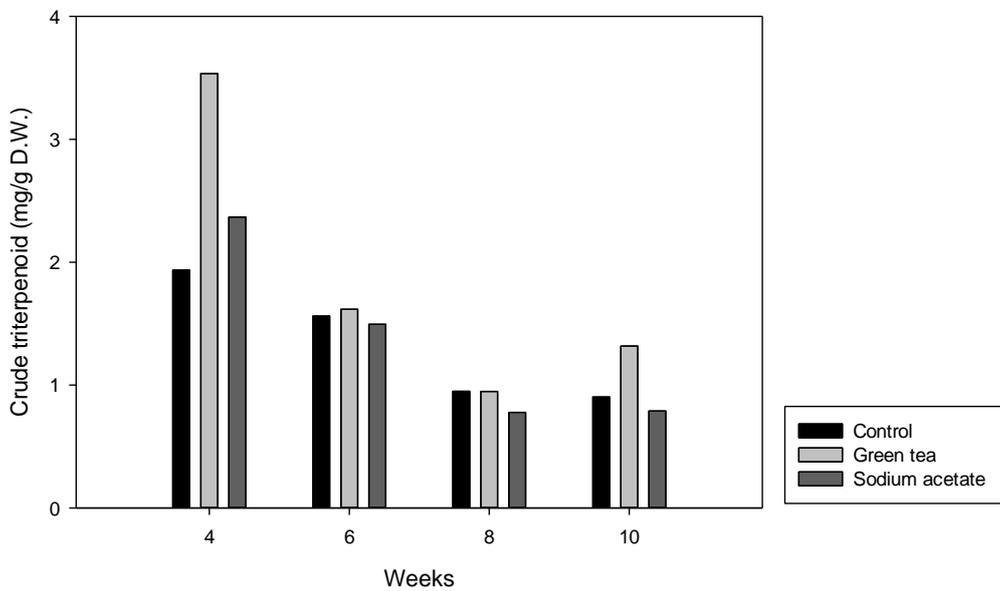


圖 4-9 綠茶及醋酸鈉添加對靈芝發酵物生成粗三萜含量的影響

(溫度：25°C、濕度：52%、綠茶及醋酸鈉濃度：10mL/80g medium)

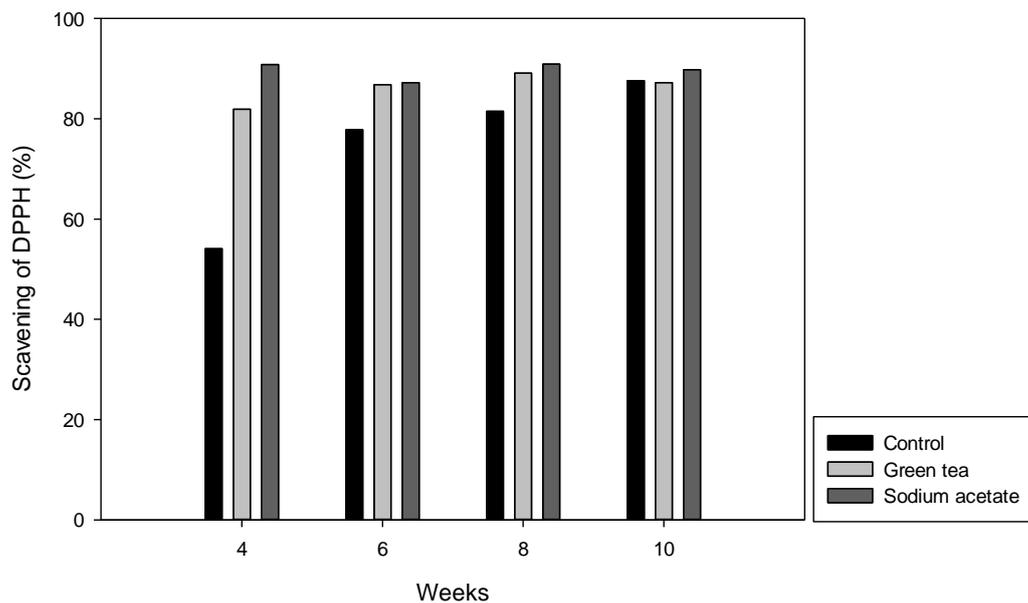


圖 4-10 綠茶及醋酸鈉添加對靈芝發酵物捕捉 DPPH 自由基能力的影響

(溫度：25°C、濕度：52%、綠茶及醋酸鈉濃度：10mL/80g medium)

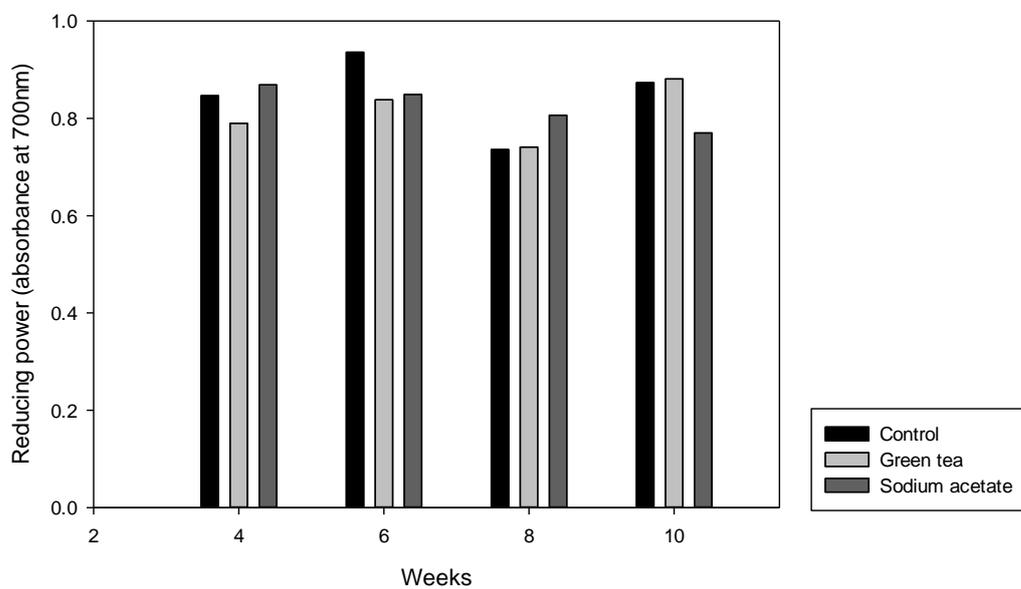


圖 4-11 綠茶及醋酸鈉添加對靈芝發酵物還原力的影響

(溫度：25°C、濕度：52%、綠茶及醋酸鈉濃度：10mL/80g medium)

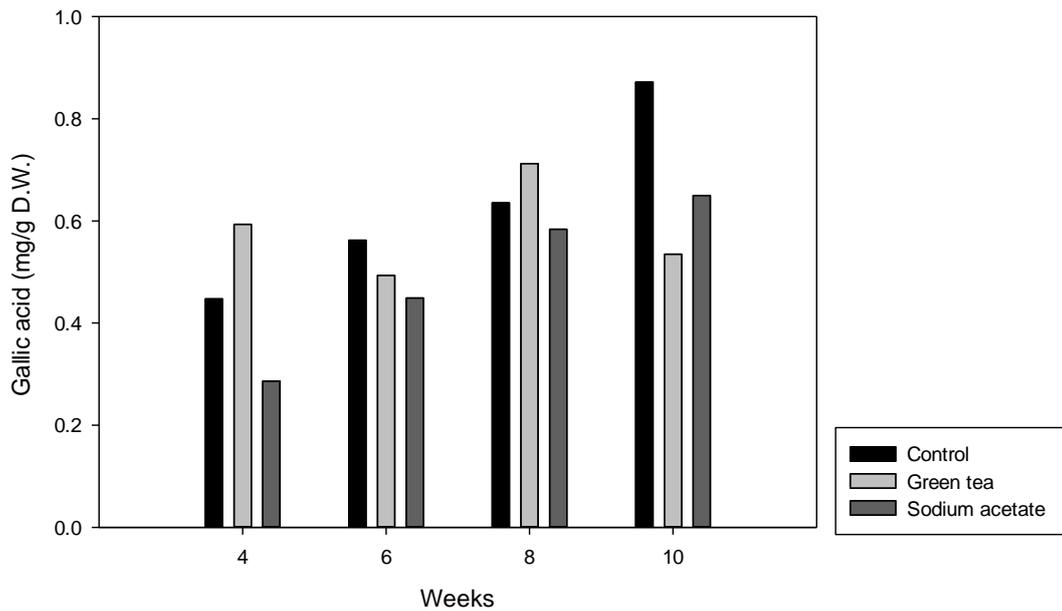


圖 4-12 綠茶及醋酸鈉添加對靈芝發酵物生成總多酚的影響

(溫度：25°C、濕度：52%、綠茶及醋酸鈉濃度：10mL/80g medium)

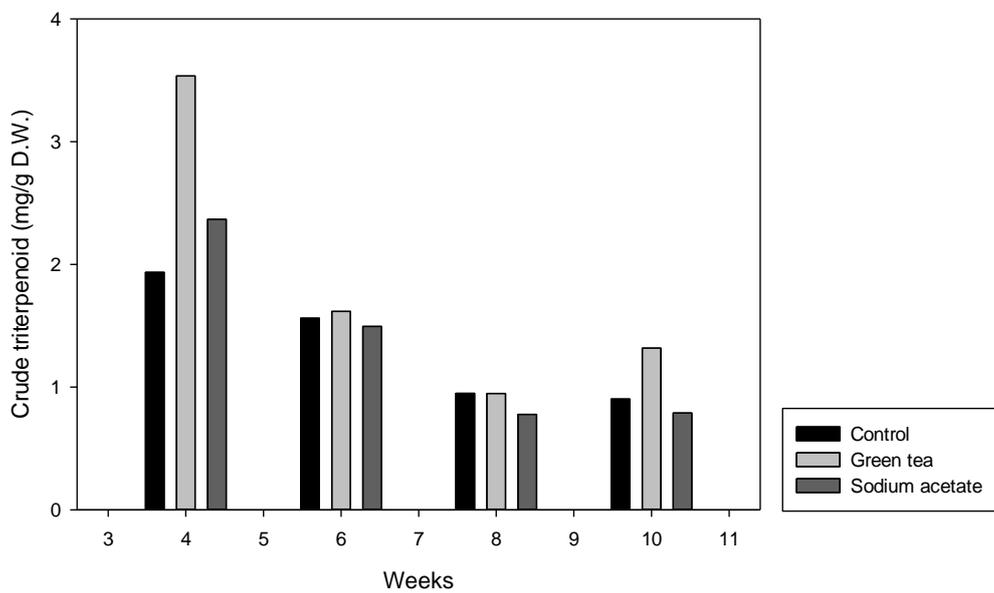


圖 4-13 綠茶及醋酸鈉添加對靈芝發酵物生成粗三萜含量的影響

(溫度：25°C、濕度：52%、綠茶及醋酸鈉濃度：10mL/80g medium)

4-3-2 番茄汁及胡蘿蔔汁添加

在添加番茄汁及胡蘿蔔汁的實驗當中，由圖 4-14 麥角固醇含量可以得知，菌絲體的生長情形並不理想，皆比控制組低了許多，但是在抗氧化方面，捕捉 DPPH 自由基能力以及還原力的部分，並沒有像麥角固醇一樣大幅下降，捕捉 DPPH 自由基能力在第 8 週時，添加胡蘿蔔汁的培養有最高點為 100.08%，僅為控制組的 1.08 倍，還原力則是在控制組的 $\pm 8\%$ 之內，如圖 4-15 及 4-16。再看到圖 4-17 末食子酸的含量，儘管單看添加番茄汁及胡蘿蔔汁培養的靈芝生長情形有上升的趨勢，但仍然比控制組低了許多，從上述情形來看，可以推測，添加番茄汁及胡蘿蔔汁對靈芝生長在菌絲體及抗氧化方面都造成抑制的現象。

而在粗三萜的部分，添加番茄汁及胡蘿蔔汁在第 8 週皆達到最高點，但相比控制組在第 6 週即達最高點之含量相比，仍略低了些許，如圖 4-18，這更代表了添加番茄汁及胡蘿蔔汁對靈芝生長是沒有幫助的。茄紅素屬於類萜類，胡蘿蔔素屬於萜類，原先想利用兩種添加物所含的成分刺激靈芝菌絲體生成三萜，但實驗結果顯示添加番茄汁與胡蘿蔔汁培養靈芝並沒有明顯提高三萜產量，推測其中一原因為萜類並非水溶性，在製備番茄汁與胡蘿蔔汁時將僅取上清液，但裡面並不含有我們所需之誘導子，因而造成其成效不佳。也推測番茄汁與胡蘿蔔汁內含有會抑制靈芝抗氧化能力之物質，可做為後續研究之目標。

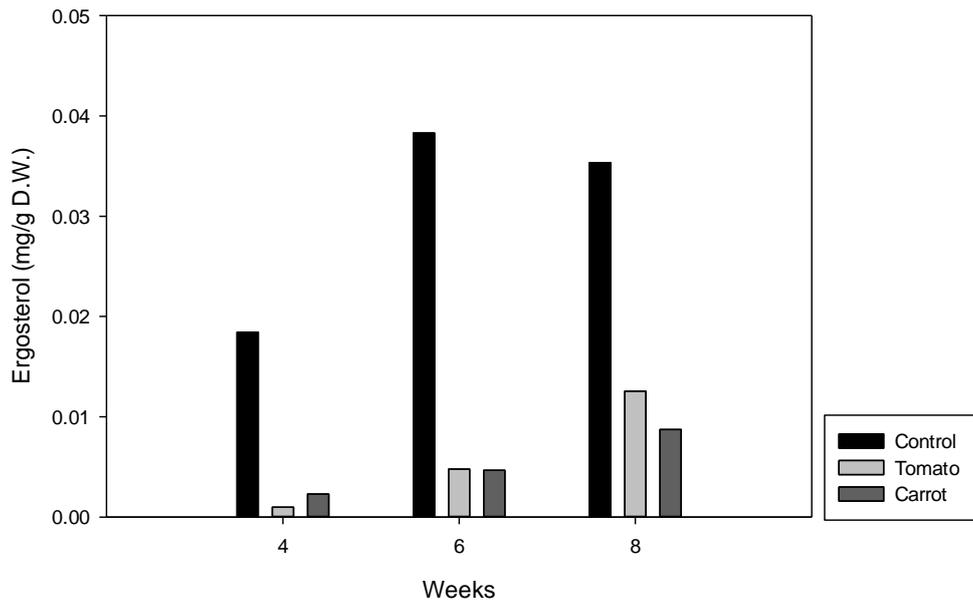


圖 4-14 番茄汁及胡蘿蔔汁添加對靈芝發酵物生成麥角固醇的影響

(溫度：25°C、濕度：52%、番茄汁及胡蘿蔔汁濃度：10mL/80g medium)

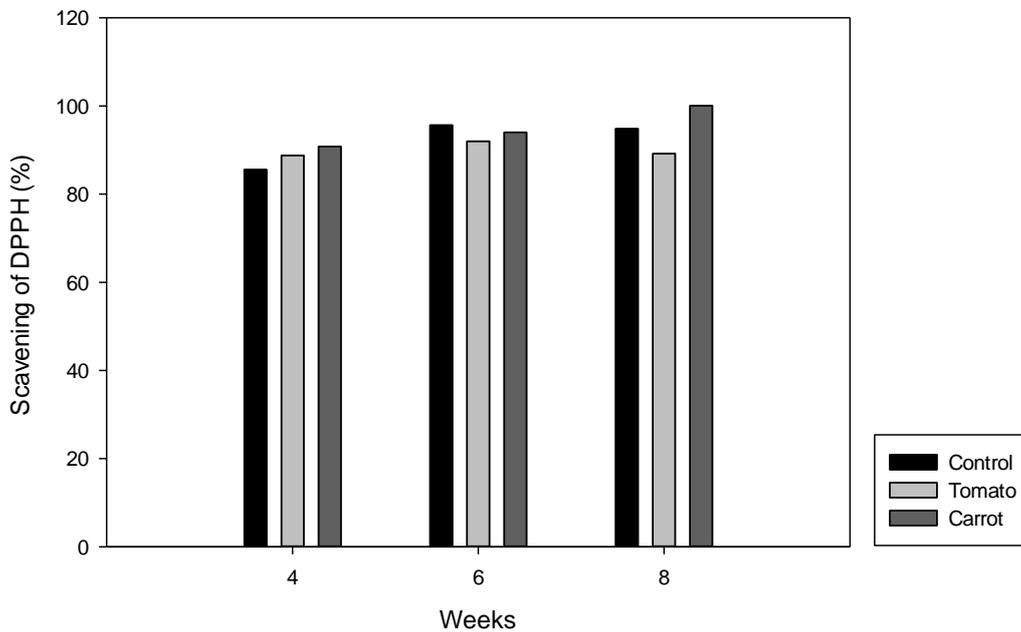


圖 4-15 時間對添加番茄汁及胡蘿蔔汁之靈芝捕捉 DPPH 自由基能力的影響

(溫度：25°C、濕度：52%、番茄汁及胡蘿蔔汁濃度：10mL/80g medium)

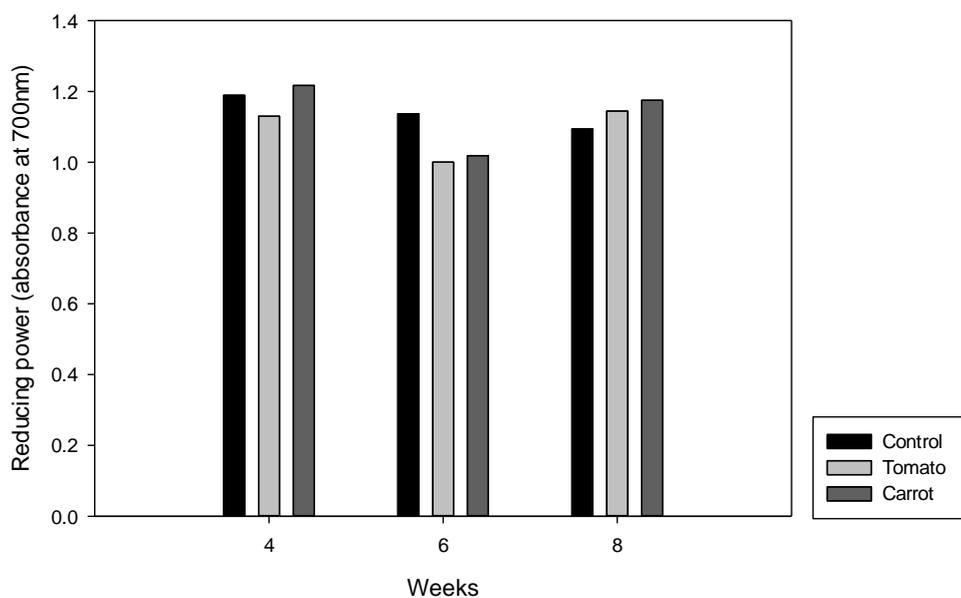


圖 4-16 時間對添加番茄汁及胡蘿蔔汁之靈芝還原力的影響

(溫度：25°C、濕度：52%、番茄汁及胡蘿蔔汁濃度：10mL/80g medium)

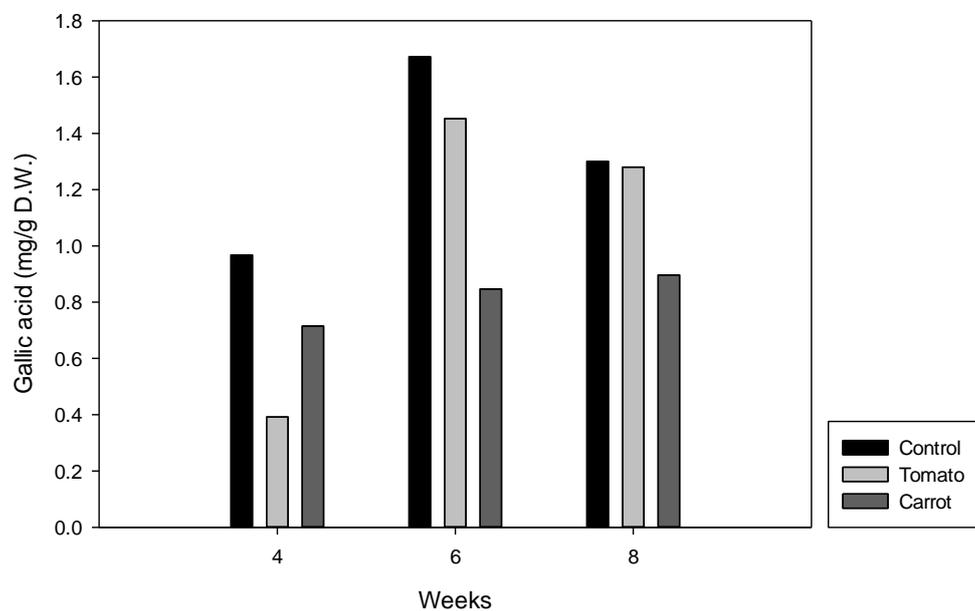


圖 4-17 時間對添加番茄汁及胡蘿蔔汁之靈芝生成沒食子酸的影響

(溫度：25°C、濕度：52%、番茄汁及胡蘿蔔汁濃度：10mL/80g medium)

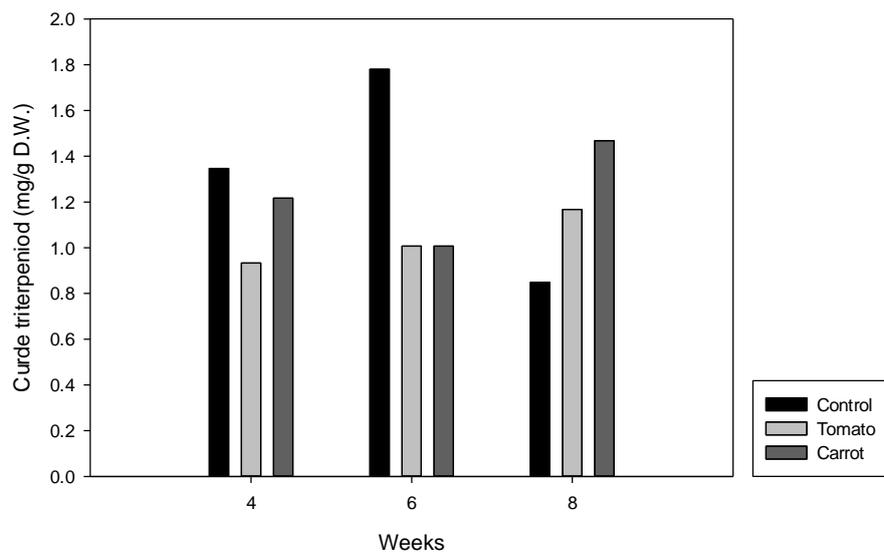


圖 4-18 時間對添加番茄汁及胡蘿蔔汁之靈芝生成粗三萜含量的影響

(溫度：25°C、濕度：52%、番茄汁及胡蘿蔔汁濃度：10mL/80g medium)

4-4 濃度對不同固態添加物豆渣靈芝培養之影響

從圖 4-6 的實驗結果得知，靈芝培養的三萜類在培養六週時會達到最高點，於是將濃度的影響之實驗設計取樣於培養六週時，並對其樣品做分析並討論。

4-4-1 綠茶粉末添加

三萜類的合成是異戊二烯轉化成固醇類前體再轉化而成，從圖 4-19 可以看出，有添加綠茶粉末的豆渣靈芝所產生的麥角固醇含量皆小於控制組，明顯有抑制的現象，而當綠茶粉末添加濃度為 2g/80g medium 時，麥角固醇量為最低。再從圖 4-20 所示，粗三萜含量隨著麥角固醇的含量改變，當麥角固醇生成量小時，粗三萜含量即上升；反之，當麥角固醇生成量大時，粗三萜含量下降，由此可證，在添加綠茶粉末的情況下有助於抑制固醇生成，進而刺激三萜類的生成，在綠茶粉末濃度為 2 g/80g 時成效最佳，粗三萜生成量有最大值為 5.02mg/g，是控制組的 3.61 倍。

在捕捉 DPPH 自由基能力方面，見圖 4-21，綠茶粉末濃度低時捕捉率與控制組並無太大的增減，而濃度越高捕捉率越低。還原力的部分則是在綠茶粉末濃度為 10 g/80g 時有最大吸光值 1.156，如圖 4-22。至於在總多酚方面，結果顯示低濃度的綠茶粉末添加有益於豆渣靈芝生成總多酚，在 1g/80g 時為最高值 0.98 mg/g。而在濃度 4g/80g medium 之後的總多酚含量又再上升，推測為培養基內含有過多的綠茶，綠茶自身含有綠茶多酚，因此提高整體總多酚的含量。王在 2017 時提到，含有酚基化合物之前驅物有可能提升三萜的合成，由上述討論可以得知，添加含有綠茶多酚的綠茶粉末對豆渣靈芝培養在抗氧化方面並無太大增益，但在生成粗三萜的部分有明顯上升，綠茶中的兒茶素有效提升靈芝三萜類之生成。

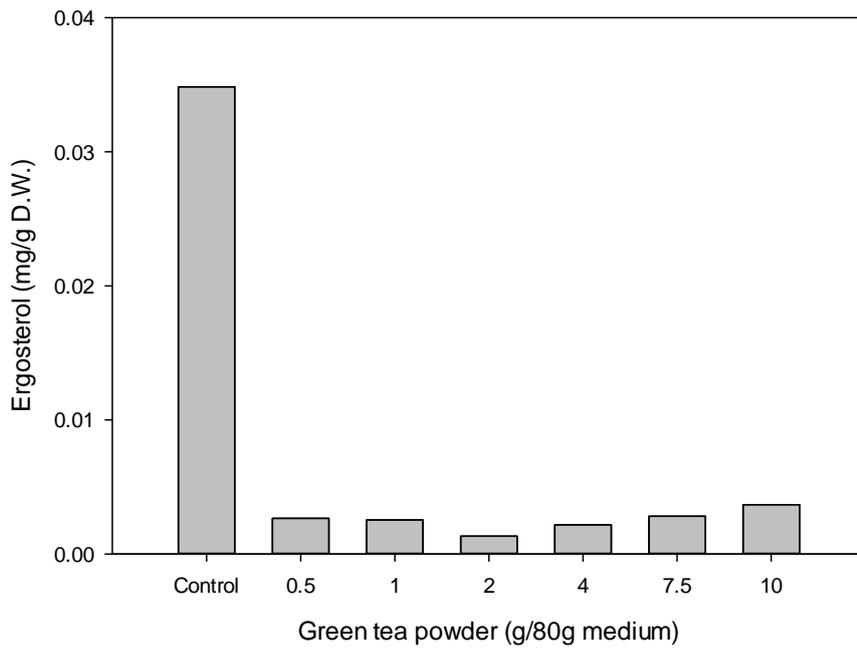


圖 4-19 不同濃度綠茶粉末對靈芝發酵物產生麥角固醇之影響

(溫度：25°C、培養時間：6 週)

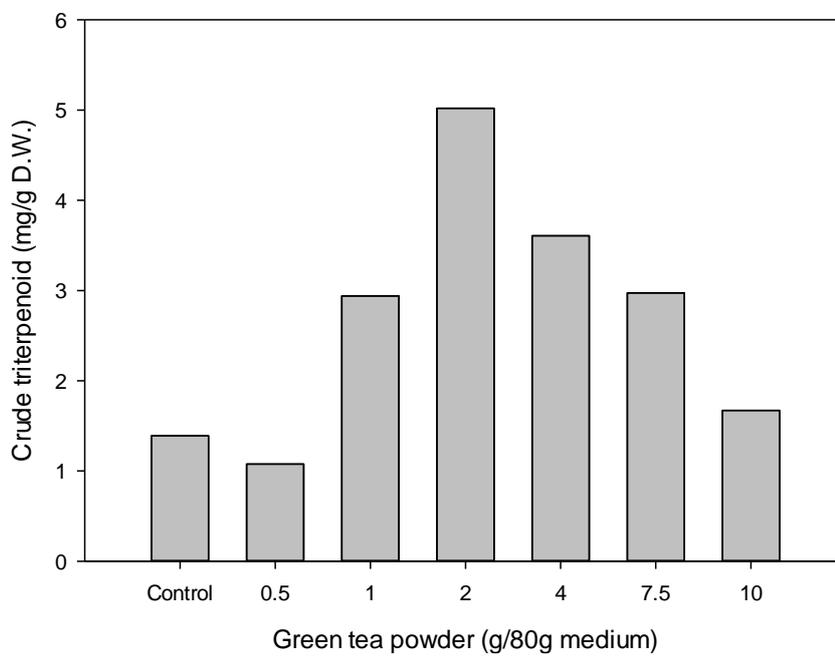


圖 4-20 不同濃度添加物對靈芝發酵物生成粗三萜之影響

(溫度：25°C、培養時間：6 週)

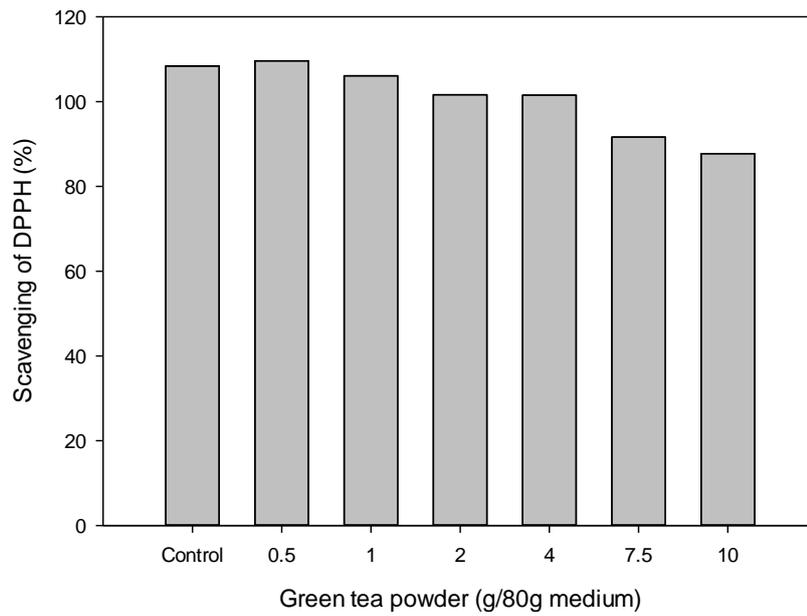


圖 4-21 不同濃度綠茶粉末對靈芝發酵物捕捉 DPPH 自由基能力之影響

(溫度：25°C、培養時間：6 週)

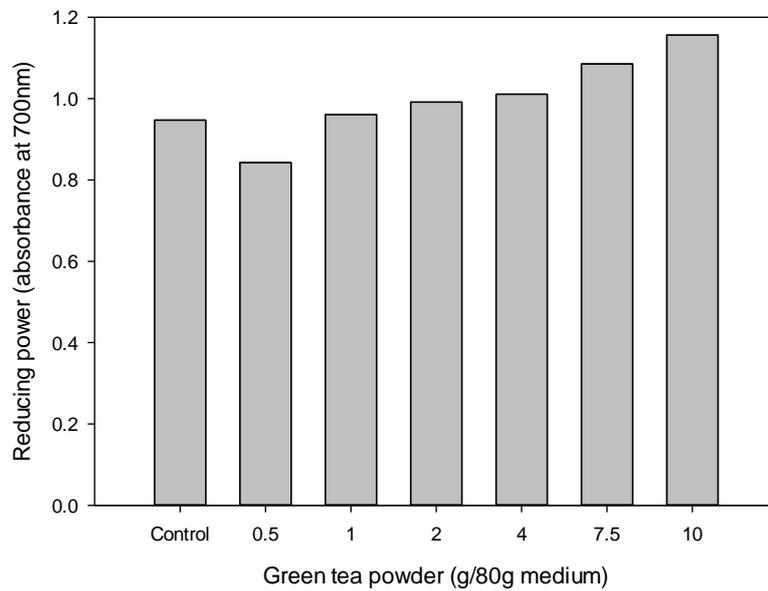


圖 4-22 不同濃度綠茶粉末對靈芝發酵物還原力之影響

(溫度：25°C、培養時間：6 週)

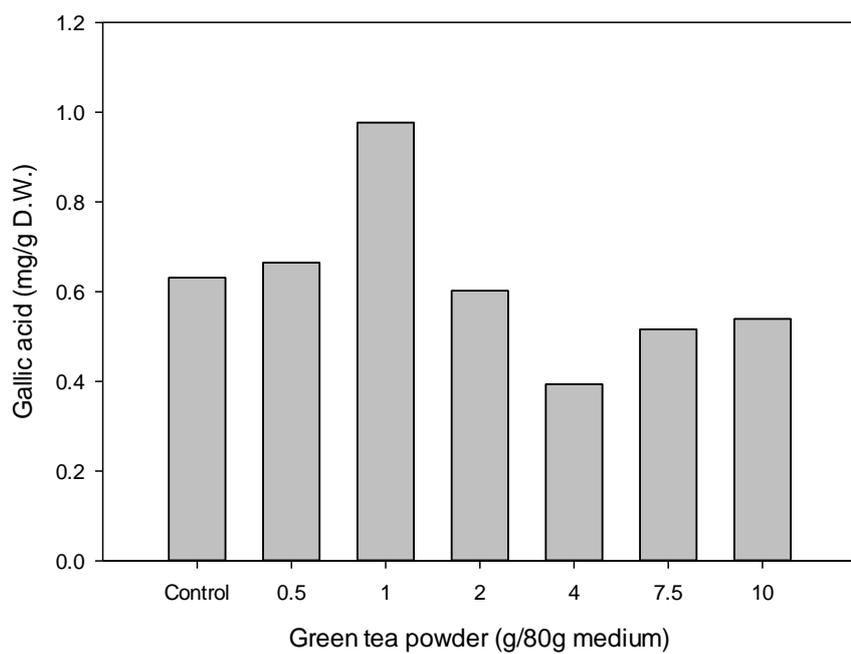


圖 4-23 不同濃度綠茶粉末對靈芝發酵物生成總多酚含量之影響

(溫度：25°C、培養時間：6 週)

4-5 多層板式反應器培養靈芝

由於傳統的固態發酵培養時間過長，為了縮短培養時間以及放大化生產，首先從通氣方面下手，將原本的圓盒培養改成強制通氣反應器培養，分別進行第一次通氣量為 0.75L/min 以及第二次通氣量為 1L/min 的實驗並做比較。

由於麥角固醇隨著菌絲體越多而生成越多，從圖 4-24 可以得知，當通氣量大時對靈芝菌絲體的生長有利，在第 4 層時有最高的生成量，是通氣量小時的 3.58 倍。而在第二次培養時，4 層之間的麥角固醇生成量並沒有第一次培養時來得平均，推測原因有二，一為固態接種尚未發展出能夠精準量化的方式，二為反應器的大層板並非完全密合，當通氣量大時層板與層板間的氣量便較容易受到漏氣之影響，上述兩個原因可能為造成生長不均勻情況發生的因素。在捕捉 DPPH 自由基能力方面，兩次的培養都穩定於 100%~105% 之間，相比 4-3 節生長曲線於第六週後穩定於 95% 左右，有明顯達到縮短時間提高效益之目的，見圖 4-25。而還原力以及總多酚的部分見圖 4-26 及圖 4-27，氣量大時的培養平均高於氣量小時的培養，由此可見，氣量大時對於靈芝發酵物的抗氧化能力有明顯幫助。最後則是粗三萜的生成量，從圖 4-28 可以發現，當通氣量大時，第 1、3、4 層的含量達到 4.5mg/g D.W.，除了是氣量小時的 1.5 倍，更是傳統固態發酵在培養六週時的 3.61 倍。郭在 2019 時證實強制通氣培養猴頭菇比自然通氣培養猴頭菇所生成之猴頭素 A 提升 13%，由上述實驗可以發現，當強制通氣量大時明顯有利於靈芝的生長並且生成有益之生理活性，而多層板式反應器也有效將培養靈芝時間縮短並且達到傳統式培養的最佳效益。

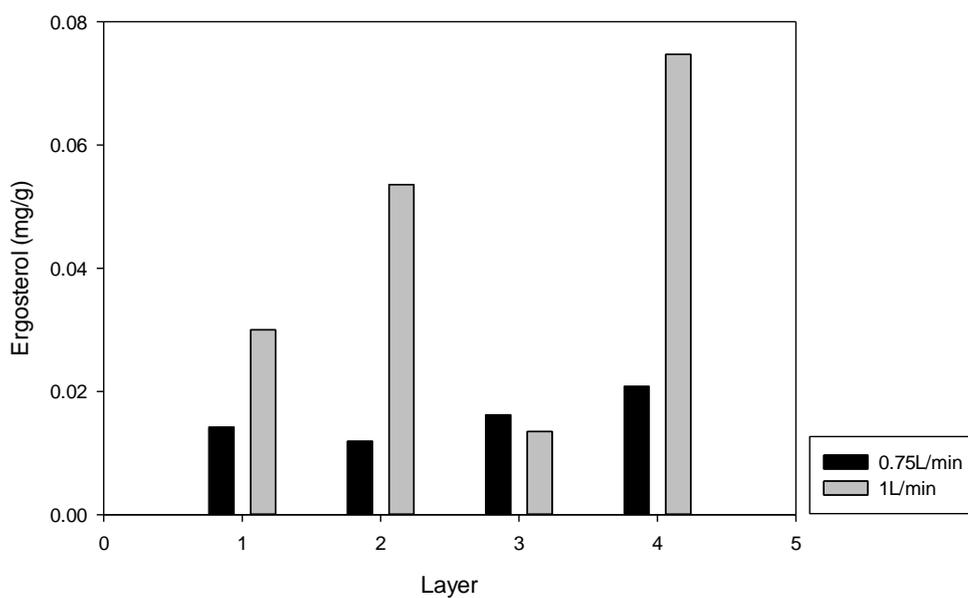


圖 4-24 多層板式反應器培養對靈芝生成麥角固醇的影響

(溫度：25°C、培養時間：2 週)

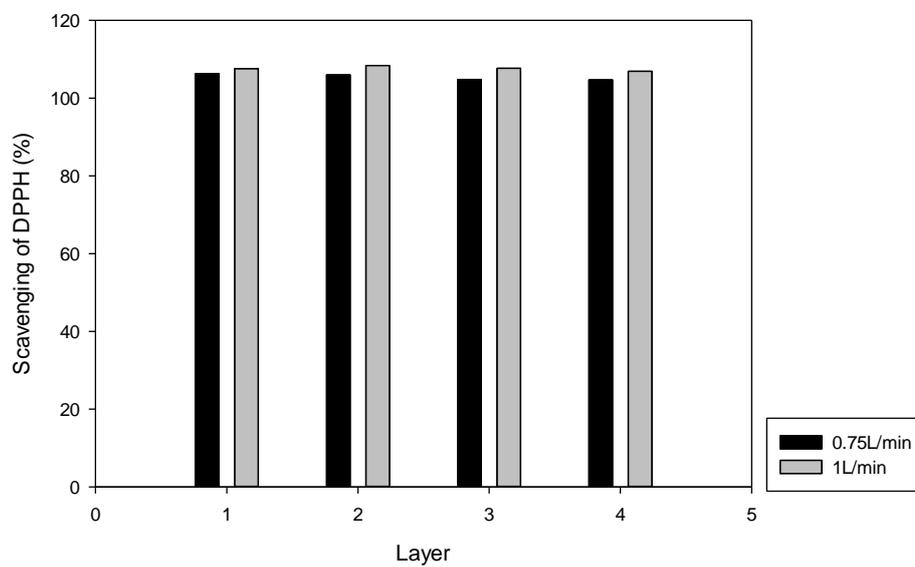


圖 4-25 多層板式反應器培養對靈芝捕捉 DPPH 自由基能力的影響

(溫度：25°C、培養時間：2 週)

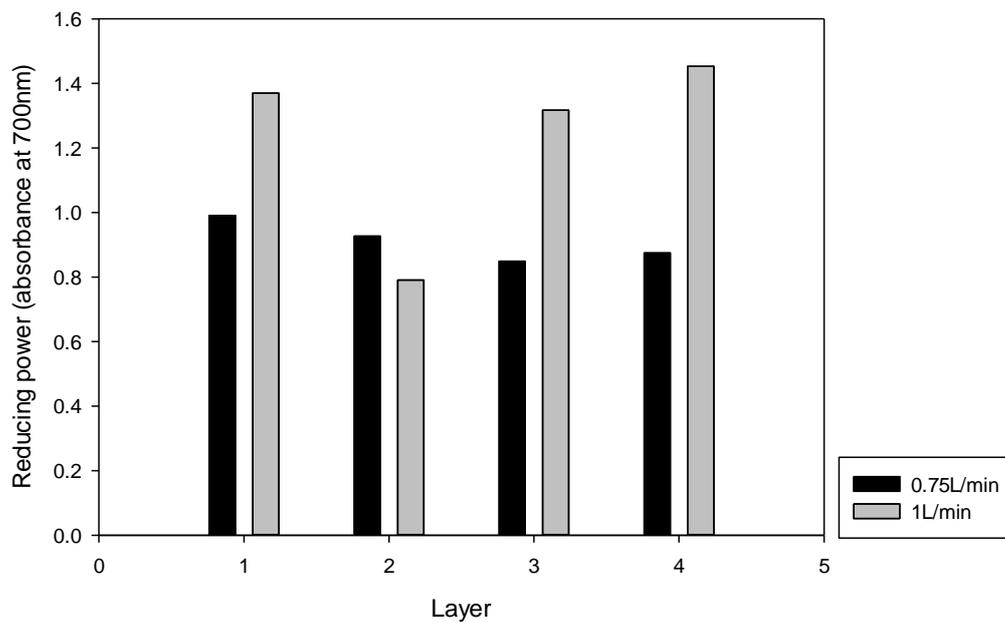


圖 4-26 多層板式反應器培養對靈芝還原力的影響

(溫度：25°C、培養時間：2 週)

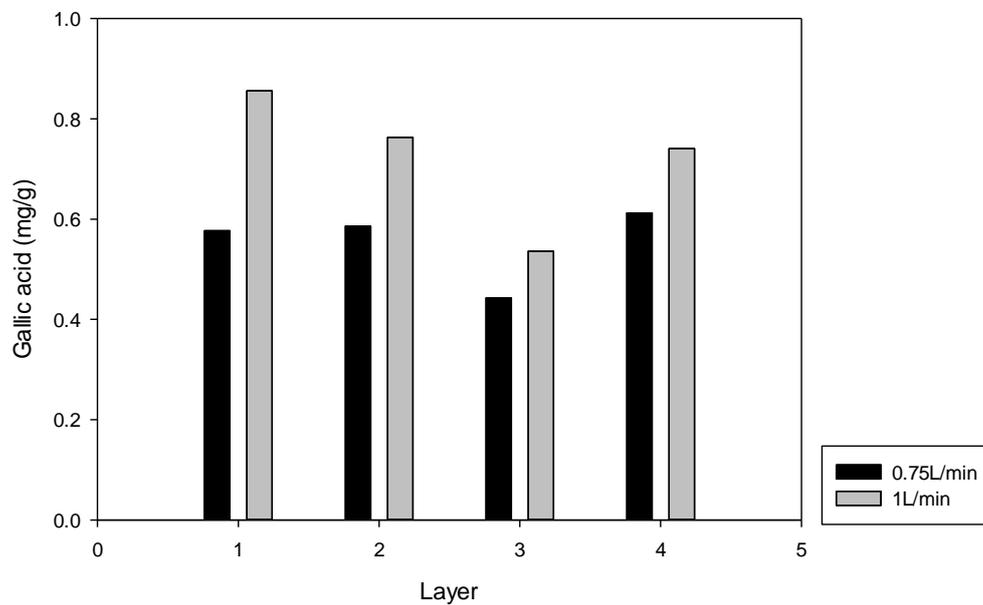


圖 4-27 多層板式反應器培養對靈芝生成總多酚含量的影響

(溫度：25°C、培養時間：2 週)

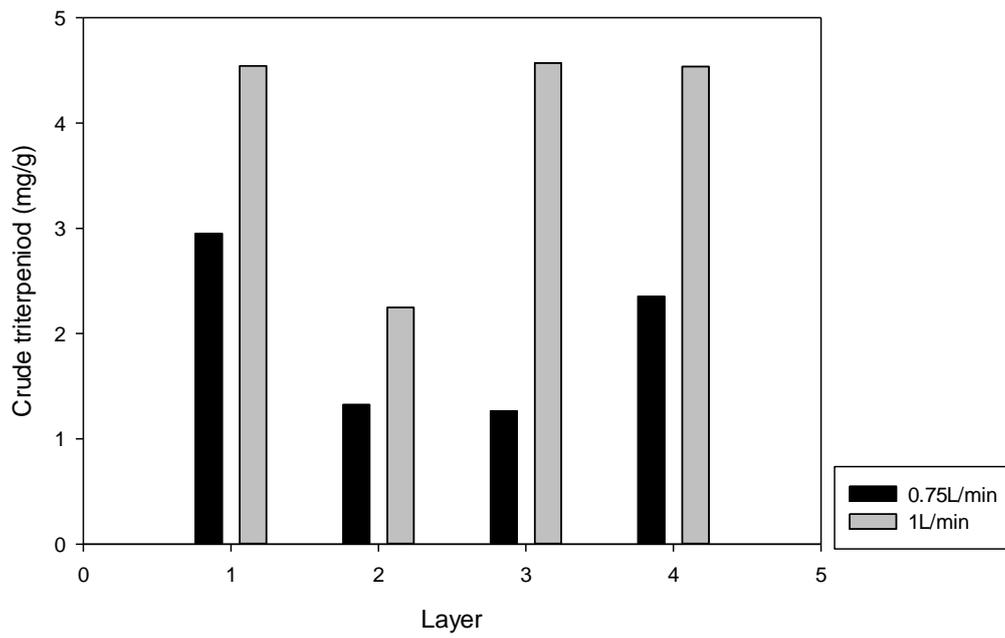


圖 4-28 多層板式反應器培養靈芝生成粗三萜的影響

(溫度：25°C、培養時間：2 週)

第五章 結論與未來展望

5-1 結論

本實驗主要分成三部分，第一部分為不同菇類生成之生理活性的比較，只從單一生理活性方面觀察，在每種不同生理活性都各自有不同的最佳菇類，而綜合菌絲體生長、抗氧化以及蛋白質之生成量來看，靈芝與雲芝為最佳。在異黃酮方面，真菌的培養無法使豆渣內的 IG 轉換成可直接被人體吸收的 IA。

第二部分則是時間及濃度對不同添加物培養豆渣靈芝所造成的影響。從實驗結果發現，在時間對液態添加的實驗中，除了綠茶有效提升粗三萜以外，普遍對靈芝在抗氧化方面沒有太多正面上的影響，在菌絲體以及粗三萜方面也不盡然有正面影響。而在濃度對固態添加的實驗中發現，添加適當濃度的綠茶粉末對靈芝產生粗三萜有顯著的正面影響，實驗顯示當綠茶粉末為 2g/80g medium 時，有最佳效果，粗三萜生成量高達 5.02mg/g。再者，比較添加液態綠茶以及綠茶粉末，當添加綠茶粉末時成效明顯，原因為液態綠茶所含的兒茶素濃度不及直接添加綠茶粉末，相較添加液態綠茶，添加綠茶粉末在操作上以及成效上都優於添加液態綠茶。

最後一個部分則是多層板反應器培養豆渣靈芝，從實驗結果發現，強制通氣培養確實比傳統圓盒固態發酵培養效果來的佳，培養兩週的豆渣靈芝所生成的粗三萜含量最高，已達到 4.57mg/g，接近六週圓盒培養添加綠茶粉末實驗中效果最好的 5.02mg/g，而兩項實驗時間差距四週，此實驗不但將培養時程縮短，也提高了靈芝生成粗三萜的含量，在時間成本以及產率上都大大提升。

5-2 未來展望

本次實驗原本期望不論是在抗氧化方面、麥角固醇亦或是粗三萜含量都有正面影響，但結果發現在抗氧化方面固態培養的成效都不盡然是好的，對於前驅物以及誘導子的添加形式仍需做多方考量。

而在多層板反應器設計上面，初步已經證實強制通氣的效果比自然通氣的效果顯著許多，但在設計上面仍有不完善的缺失，該如何改善這些缺失並且讓每一層的培養都可以達到相同的生長條件，仍需加以探討並測試其結果。最後再結合濃度對不同添加物培養的實驗，期望能做到有效縮短時間又提升靈芝生成三萜含量，達到放大化生產快、產率高之目的。

第六章 參考文獻

- 丁湖廣(2006)。猴頭菇高品位栽培關鍵技術。特種經濟動植物，3：39-40。
- 尹艷、高文宏、于淑娟(2006)。豆渣中水溶性大豆多醣提取工藝的研究。食品工業科技，27(8)：97-98。
- 王舜緯(2018)。豆渣回收再利用於猴頭菇固態發酵之研究。東海大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。
- 王伯徽、陳啟楨、華傑(1998)。食藥用菇類的培養與應用。財團法人食品工業發展研究所，53-64。
- 王伯徽(2000)。食藥用菇保健食品之開發，食品工業，32(5)：18-27。
- 王伯徽(1990)。食用菇及藥用菇系列報導(九)－猴頭菌。食品工業，22(12)：42-47。
- 王薇(2006)。猴頭菇的營養保健功能及其在食品工業中的應用。食品與藥品8(4):24-26。
- 王常青、李思漢(1996)。豆渣纖維的降脂作用及對血液流變學影響的研究。營養學報，18(2)：168-174。
- 王義、黃先飛、胡繼偉、雄康寧、段素明(2012)。重金屬污染與修復研究進展。河南農業科學，41(4)：1-6。
- 甘霓、吳小勇、鄭傳進、尹輝、吳森玲(2017)。黑木耳多糖對 B16 黑色瘤細胞抗腫瘤作用研究。廣東藥科大學。
- 甘子能(1981)。茶中的多元酚類成分。食品工業，13, 1:10-18。
- 甘子能(1981)。茶中的多元酚類成分（之二）製茶過程中的多元酚類的轉變。食品工業，13, 7:10-16。
- 甘子能(1981)。茶中的多元酚類成分（之三）茶多元酚類成分的生物性作用。食品工業，13, 9:29-34。

- 朱華玲、班立桐、徐曉萍(2012)。食用菌發酵的應用研究進展。江西農業學報，24(4): 80-83。
- 任峻緯(2019)。回收豆渣在張之固態培養之應用。東海大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。
- 汪維雲、王繼先(2007)。灰樹花液體發酵及多醣提取工藝的優化研究。農業工程學報，23(4): 276-279。
- 肖崇厚、陳蘊如(1989)。中藥化學。上海：科學技術出版社。323-360。
- 何晉浙、孫培龍、朱建標(1999)。香菇營養成分的分析。食品研究與開發，(6): 44-46。
- 李明彥(1990)。松杉靈芝浸漬發酵的培養條件對產物的影響。台灣大學農化所碩士論文。
- 李宛蓁(2003)。樟菌絲體培養與生理活性成分生成之研究。東海大學化學工程研究所碩士論文。
- 何純誼、陳淑德、呂宛儒、王楨翔、張永鍾、鄭永祥、賴裕順(2015)。猴頭菌固態發酵小麥的萃取物對神經細胞生長的影響。食品與營養科學，4: 1-10。
- 但飛君、付若秋(2000)。猴頭菇的研究概況。中醫藥研究 16(4):60。
- 周德紅、鄭為完、祝團結、楊靜(2005)。酶法水解豆渣製備水溶性膳食纖維及其作為微膠囊壁材的研究。食品與發酵工業，31(5):55-58。
- 范遠景，張倩，朱曷(2007)。豆渣中水溶性大豆多醣提取及組分鑑定。食品科學，28(9): 295-298。
- 苗晶因、邱軍強、李海霞、張華、劉樹民(2019)。食品研究與開發，40(6)。
- 姜瑞芝、王穎、陳英紅、高陽、黃恩喜、高其品(2007)。猴頭菌寡糖的分離及其結構確定。高等學校化學學報，28(7)1313-1315。
- 袁亞宏、岳田利、王雲陽、高振鵬(2005)。猴頭菇營養液提取工藝研究。中國食品學報，5(2): 64-69。

- 馬德威(2012)。柑橘類果皮添加對樟芝代謝生理活性物質之影響。東海大學化學工程與材料工程研究所博士論文。
- 徐廣超、唐一瀟、趙梅(2012)。豆渣水溶性膳食纖維對雙歧桿菌增殖的影響。糧油食品科技，20(6)。
- 徐爾尼、劉文群、李曼(1999)。食用菌對 Fe、Zn、Se 生物富集作用的探討。食品科學，(11): 44-46。
- 徐艷萍、王樹英、李華鐘(2004)。聚 γ -谷氨酸高產突變株的選育及搖瓶發酵條件。無錫輕工大學學報，23(5): 6-10。
- 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。
- 許瑞祥(1988)。靈芝的奧秘-靈芝的分類，栽培與臨床療效。正義出版社。
- 張福麗、葛紅蓮、李婷、林輝(2012)。大豆渣中異黃酮的提取及抑菌活性。光譜實驗室，29(2):1176-1181。
- 張化朋、張靜、劉阿娟(2013)。杏鮑菇營養成分及生物活性物質分析。營養學報，(3)：307-309。
- 張力臣(2006)。猴頭菇栽培技術，人參研究 4:38-39。
- 張潤光、蘇東華、張小翠(2004)。香菇的營養保健功能及其產品開發。食品研究與開發，(4): 125-128。
- 陳清農、楊梅春、陳勁初(1999)。猴頭菌。鄉間小路 25(8):34-35。
- 陳紅(2018)。杏鮑菇蛋白生物活性的研究進展。揚州大學旅遊烹飪學院食品科學與工程系。
- 陳曉柯、常虹、郭衛芸、周家華(2015)。豆渣的綜合利用現狀及其研究進展。河南農業科學，44(12): 1-5。
- 郭尚、王慧娟(2013)。食用菌深層發酵技術及其應用。山西農業科學，41(81): 885-888。

- 郭煒、於洪久、張楠、鐘鵬、孫彬、左辛、劉傑(2018)。不同氮碳源對秀珍菇菌絲生長的影响。黑龍江省農業科學院農村能源研究所。
- 郭又誠(2019)。生物反應器型態對猴頭菇固態培養菌絲體生長與代謝產物生成之影响。東海大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。
- 郭少晨、劉洪娟、朱迪娜、閔世軍、姜國華、沈培平、張文生、盛軍(2012)。普洱茶對高脂血症大鼠膽固醇代謝的影响作用機制。中國科學雜誌社，42(11):883-892。
- 符偉玉、李尚德、莫麗兒、張建和、揭新明(2002)。猴頭菇微量元素含量的分析。廣東微量元素科學，9(6):65-67。
- 區少梅、蔡永生、張如華(1988)。包種茶酚類化合物分析方法之比較與評估，台灣茶葉研究彙報，7:43-61。
- 黃曉東(2003)。大豆豆渣中黃酮類化合物的分離與鑑定。山西食品工業。(2):17-18。
- 黃鈴娟(2000)。樟芝與姬松茸之抗氧化性質及多醣組成。國立中興大學食品科學研究所碩士論文。
- 黃雪芳、劉柯俊、管育慧、董光世、蘇慶華、董大成(1989)。口服靈芝菌絲培養液之抗癌人工轉移作用。中華癌醫會誌，5(1):10-15。
- 黃惠君 (2004)。實用藥菇的營養與藥用價值。食品工業，36(5):25-32。
- 程菲兒、趙宇宏、趙凡(2014)。杏鮑菇多肽生物活性的研究。食品工業科技，35(17):347-350。
- 曾裕漳(2013)。以蛋白質酵素水解大豆豆渣分離蛋白以製備具生理活性之胜肽及性質之研究。國立嘉義大學食品科學系研究所博士論文。
- 劉麗萍(2003)。香菇的營養價值及開發利用。食品研究與開發，(3): 57-59。
- 劉曉、閔語婷(2017)。香菇的營養價值及綜合利用現狀與前景。南京信息工程大學。

- 劉波(1984)。中國藥用真菌。山西人民出版社，2228。
- 劉國柱(1990)。現代科學看靈芝。雙利實業公司，台北市。
- 廖仁宏(2002)。固態培養生產靈芝菌絲體之研究。東海大學化學工程與材料工程研究所碩士論。
- 賴慶亮釋，水野卓、川合正允(1997)。菇類的化學生化學。國立編譯館。
- 錢香伶(2004)。乳酸菌與雙叉桿菌發酵豆奶中異黃酮素含量之變化。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
- Alcântara S.R., Da Silva F.L.H. (2012), Solid state fermentation process for polygalacturonase production using tray bioreactor. *Chemical Engineering Transactions* 27: 355-359.
- Assamoi A.A., Destain J., Delvigne F., Lognay G., Thonart P. (2008), Solidstate fermentation of xylanase from *Penicillium canescens* 10-10c in a multi-layer-packed bed reactor. *Applied Biochem and Biotechnol* 145(1-3): 87-98.
- Alexotolus C.J. and Mims C.W. (1979), *Introductory mycology*. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Ainsworth G.C., Sparrow F.K. and Sussman A.S. (1973), *The Fungi*. Vol. IVA. A Taxonomic Review with Keys: Ascomycetes and Fungi Imperfecti. Academic Press, Inc. New York, 621pp.
- Arnoner A., Cardillo R., Nasini G. and Vajna-de-pava O. (1994). Secondary mold metabolites: part 46. hericenones AC and erinapyrone C, new metabolites produced by the fungus *Herichium erinaceus*. *Journal of Natural Products*,57(5): 602–606.
- Bahareh Hajirostamloo (2009), Comparison of Nutritional and Chemical Parameters of Soymilk and Cow milk. *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Nutrition and Food Engineering* 3-(9).
- Bosaeus I. (2004), Fibre effects on intestinal functions diarrhoea, constipation and

- irritable bowel syndrome. *Clinical Nutrition, Supplement*,1-(2), 33–38.
- Chun J., Kim G.M., Lee K.W., Choi I.D., Kwon G.H., Park J.Y., Jeong S. J., Kim J. S., and Kim J.H. (2007), Conversion of Isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, 72, M39-M44.
- Chen H.Z., Xu J., Li Z.H. (2005), Temperature control at different bed depths in a novel solid-state fermentation system with two dynamic changes of air. *Biochemical Engineering Journal* 23(2): 117-122.
- Chung I.M., Seo S.H., Ahn J.K., and Kim S.H. (2011), Effect of processing, fermentation, and aging treatment to content and profile of phenolic compounds in soybean seed, soy curd and soy paste. *Food Chemistry*. 127(3): 960-967.
- Dorothea T. (2006), Terpene Synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 297-304.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. (1956), Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Division of Biochemistry, University of Minnesota.
- Donk M.A. (1964), A conspectus of the families of Aphylllophorales. *Persoonia*, 3,199-324.
- Furtado J.S. (1965), Relation of microstructures to taxonomy of the Ganodermoidea (polyporaceae) with special reference to the structure of the cover of pilear surface. *Mycologia*, 57,588-611.
- Gordon S. and Martinez F.O. (2010), Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32(5): 593-604.
- Harwood H.J.Jr., Barbacci-Tobin E.G., Petras S.F., Lindsey S. and Pellarin L.D. (1997), 3 - (4-Chlorophenyl) - 2 - (4-diethylaminoethoxyphenyl) - a - pentenitrile monohydrogen citrate and related analogs: reversible, competitive, first half-

- reaction squalene synthetase inhibitors. *Biochem Pharmacol*, 53: 839–864.
- Hughes I., Aggett P., Ariyanayagam S., Carthew P., Chipman J. K., Jackson P., Joffe M., Kimber I., Lunec J., Piersma A., Rowland I.R., Rushton L., Salfield J., Smith A.G., Stanley L., Strobel S., Timbrell J.A., Tucker M., Benford D., Butler K., Gott D., Mulholland C.A., Tahourdin C., Thatcher N., Maycock B., Ball N., Moizer K. and Sivapathasundaram S. (2003), *Phytoestrogens and Health*. London: Food Standards Agency.
- Holzappel W. H., and Wood B.J.B. (eds.). (1998), *The genera of lactic acid bacteria* (1st ed.). Glasgow, UK. London Blackie Academic & Professional.
- Jia L.M., Liu L., Dong Q. and Fang J.N. (2004), Structural investigation of a novel rhamnoglucogalactan isolated from the fruiting bodies of the fungus *Herichium erinaceus*, 15;339(16):2667-71.
- Joannou G.E., Kelly G. E., Reeder A. Y., Waring M., and Nelson C. (1995), A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 54, 167-184.
- King R., and Bursill D. (1998), Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single meal in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67, 867-872.
- Kenmoku H., Sassa T., and Kato N. (2000), Isolation of erinacine P, a new parental metabolite of cyathane xylosides, from *Herichium erinaceum* and its biomimetic conversion into erinacines A and B. *Tetrahedron Letters*, 41(22): 4389–4393.
- Kawagishi H., Shimada A., Hosokawa S., Mori H., Sakamoto H., Ishiguro Y., Sakemi S., Bordner J., Kojima N. and Furukawa S. (1996), Erinacines E, F, and G, stimulators of neuron growth factor (NGF) synthesis, from the mycelia of

- Hericium erinaceum. *Tetrahedron Letters*, 37(41): 7399–7402.
- Kawagishi H., Masui A., Tokuyama S., and Nakamura T. (2006), Erinacines J and K from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Journal of Tetrahedron*, 62(36): 8463–8466.
- King R.A., and Bignell C.M. (2000), Concentration of isoflavone phytoestrogens and their glucosides in Australian soya beans and soya foods. *Australian Journal of Nutrition and Dietetics*, 57(2):70-78.
- Lee Y.B., Lee H.J., and Sohn H.S.,(2005), Soy isoflavones and cognitive function. *Journal of Nutritional Biochemistry*,16(11):641–649.
- Logendra S. and Richardson M.D. (1997), Ergosterol as an Indicator of Endophyte Biomass in Grass Tissue, Boston, MA: Springer US: 267-270.
- Li S., Zhu D., Li K., Yang Y., Lei Z., and Zhang Z. (2013), Soybean Curd Residue: Composition, Utilization, and Related Limiting Factors. Hindawi Publishing Corporation, International Scholarly Research Notices, Industrial Engineering, 423590, 8 page.
- Li P., Zhang X., Hu H., Sun Y., Wang Y., and Zhao Y. (2013), High carbon dioxide and low oxygen storage effects on reactive oxygen species metabolism in *Pleurotus eryngii*. *Postharvest Biology and Technology* 85:141-146 ◦
- Lee E.W., Shizuki K., Hosokawa S., Suzuki M., Sukanuma H., Inakuma T., Li, J., Ohnishi–Kameyama M., Nagata T., Furukawa S., and Kawagishi H. (2000), Two novel diterpenoids, erinacines H and I from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(11): 2402–2405.
- Lochman J. and Mikes V. (2006). Ergosterol treatment leads to the expression of specific set of defence- related genes in tobacco. *Plant Mol Biology*. 62: 43-51.
- Li J., Zhang J., Chen H., Chen X.Q., Lan L. and Liu C., (2013), Complete

- mitochondrial genome of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. PLoS ONE 8, 1-11.
- Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S.I. and Yuan C.L. (2005), Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, (4): 69-72
- Muroyama K., Mochizuki T., and Wakamura T. (2001), Methane fermentation of bean curd refuse. *J. Bioscience. Bioengineering*. 91: 208–212.
- Mariga A.M., Pei F., Yang W., Zhao L.Y., Shao Y.N., Mugambi D.K., Hu Q.H. (2014), Immunopotential of *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. *Journal of Ethnopharmacology*, 153 (3) : 604-614.
- Manan M.A., Webb C., (2017), Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing, *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 4-1
- Mai M.M.N., Hoida A.M.E., Yousseria M.S.A., Sheba S.O., Samira S.M., Al Zahraa A.K.E (2015), antioxidant of fermented okara. National Research Centre, Egypt.
- Nee N.P.S., Ashok P. (2009), Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. In: Nigam PS & Pandey A (Eds.), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Springer Science + Business Media, Germany, pp. 197-221.
- Periago M.J., Ros G., Rinc'on F., and Mart'nez C.,(1997), Nutritional meaning of dietary fibre and phytic acid in meat-based homogenised weaning foods, *Food Research International*,30-(3-4), 223–230.
- Piskula M.K., Yamakoshi J. and Iwai, Y. (1999), Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Letters*, 447, 287-291.
- Quitain A.T., Oro K, Katoh S., and Moriyoshi T. (2006), Recovery of oil components

- of okara by ethanol-modified supercritical carbon dioxide extraction. *Bioresource technology*. 97(13): 1509-1514.
- Ratledge C., Evans C.T. (1989), *The Yeast: metabolism and physiology of yeast*, Academic Press, 3, pp. 367-455.
- Ruiza H.A., Rodríguez-Jasso R.M., Rodríguez R., Juan C.C., Cristóbal N.A. (2012), Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 65: 90-95.
- Ren J.G., Seth P., Clish C.B., Lorkiewicz P.K., Higashi R.M., Lane A.N., Fan T.W., and Sukhatme V.P. (2014), Knockdown of malic enzyme 2 suppresses lung tumor growth, induces differentiation and impacts PI3K/AKT signaling. *Scientific Reports*. 4: 5414.
- Shuhong L., Dan Z., Kejuan L., Yingnan Y., Zhongfang L. and Zhenya Z. (2013), Soybean Curd Residue: Composition, Utilization, and Related Limiting Factors, *International Scholarly Research Notices: Industrial Engineering*: 1-8.
- Setchell, K. D. R. (2001). Soy isoflavones- Benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SRRMs). *Journal of the American College of Nutrition*, 20(5), 354-365.
- Setchell K.D., Brown N.M., Zimmer-Nechemias L., Brashear W.T., Wolfe B.E., Kirschner A.S. and Heubi J.E. (2002), Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 447-453.
- Shimbo M., Kawagishi H. and Yokogoshi H. (2005), Erinacine A increases catecholamine and neuron growth factor content in the central nervous system of

- rats, *Nutrition Research*, 25(6): 617–623.
- Steryaerl R.L. (1972), *Species of Ganoderma and related generamainly of the Bogor and Leiden Herbaria. Persoonia*,7,55-118.
- Steryaerl R.L. (1980), *Study of some Ganoderma species, Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.*, 50,135-186.
- Tim R., Poonam N. (2003), *Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal* 13(2-3): 197-204.
- Thuy Thi Pham (2009), *Enhancing the transformation level of bioactive soy isoflavones. Victoria University, PhD_Thesis.*
- Vautaz H., Brandenberger H., and Egli R.H. (1959), *Plant phenols. I. Separation of the tea leaf polyphenols by cellulose column chromatography. J. Chromatogr.*, 2, 173-187.
- Villanueva M.J., Yokoyama W.H., Hong, Y. J., Barttley G.E., and Rup'erez P. (2011), *Effect of high-fat diets supplemented with okara soybean by-product on lipid profiles of plasma, liver and faeces in Syrian hamsters, Food Chemistry*, 124-(1), 72–79.
- Vaseghi Z., Najafpour G.D., Mohseni S., Mahjoub S. (2013), *Production of active lipase by Rhizopus oryzae from sugarcane bagasse: Solid state fermentation in a tray bioreactor. International Journal of Food Science & Technology*, 48(2): 283- 289.
- Walter E.D. (1941), *Genistein (an isoflavone glucoside) and its aglucone, genistein, from soybeans. Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63, 3273-3276.
- Wang J.C., Hu S.H., Su C.H. and Lee T.M. (2001), *Antitumor and immunoenhancing activities of polysaccharide from culture broth of Hericium spp, The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 17: 461–467.

- Xu N., Gao Z., Zhang J., Jing H., Li S., Ren Z., Wang S. and Jia L. (2017),
Hepatoprotection of enzymatic extractable mycelia zinc polysaccharides by
Pleurotus eryngii var. tuoliensis. *Carbohydrate Polymers*, 157 (2): 196-206.
- Xu Y. N., Xia X. X., and Zhong J. J. (2013), Induced effect of Na⁺ on ganoderic acid
biosynthesis in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* via calcineurin signal
transduction.
- Yang B.K., Park J.B., Song C.H. (2003), Hypolipidemic effect of exo-biopolymer
produced from a submerged mycelial culture of *Herichium erinaceus*, *Bioscience
Biotechnology Biochemistry*, 67(6): 1292–1298.
- Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T., Terao J. (1998), HPLC method for evaluation
of the free radical scavenging activity of foods by using 1,1,-Diphenyl-2-
Picrylhydrazyl. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 62:1201–1204.