

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 : Yang Fan-Chiang, Ph.D.

雞腿蘑與朱紅栓菌絲體水解物生理功能之探討

Bioactive functions of mycelial hydrolysates prepared

from *Coprinus cinereus* and *Pycnoporus cinnabarinus*

研究生：徐靖涵 撰

Graduate student : Hus Ching-Han

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

中文摘要

本研究將雞腿蘑菌與朱紅栓菌使用兩種方法製備水解液，第一種為菌體的自體溶解探討溫度、pH 值以及水解時間對生成胜肽、總酚含量以及捕捉 DPPH 自由基能力之影響；第二種為添加三種酵素(Bromelain、Papain、Xylanase)分別對雞腿蘑以及朱紅栓之整體均質液進行水解，探討酵素種類和水解時間對生成胜肽、總酚含量以及捕捉 DPPH 自由基能力之影響。

自體溶解實驗結果顯示當水解時間增加胜肽和總酚含量均上升，使捕捉 DPPH 自由基能力也跟著提升。在自體溶解實驗中，雞腿蘑水解條件為 50°C、pH6 而朱紅栓菌最佳自溶條件為溫度 50°C、pH5 時有最佳的胜肽總酚含量以及捕捉 DPPH 自由基能力。添加三種不同酵素進行水解，以 Bromelain 酵素效果最佳。

為了進一步提升水解物的生理活性功能，將四種水解液在最佳的條件水解後(雞腿蘑自體溶解、雞腿蘑添加 Bromelain 酵素、朱紅栓自體溶解、朱紅栓添加 Bromelain 酵)，分別使用超過濾膜分成三個區分物並探討分子量分布、清除 DPPH 自由基能力、還原力及血管收縮素轉化酶抑制活性。結果顯示分子量低於 1kDa 的胜肽具有血管收縮素 I 轉化酶抑制活性；分子量介於 1~5kDa 以及大於 5kDa 之分子具有較佳的抗氧化活性。

關鍵字：雞腿蘑菌、朱紅栓菌、抗氧化力、ACE 抑制劑、菌絲水解

Abstract

In this research the mycelial hydrolysates of *Coprinus cinereus* and *Pycnoporus cinnabarinus* were prepared by two methods. The first one was based on the autolysis process, in which the optimum conditions for fungal autolysis was determined, including temperature, pH and hydrolyzed time. In addition, the influence of hydrolysis time on the formation of peptide and the anti-oxidation activity of total phenol and DPPH radicals scavenging ability were also studied. In the second three kinds of commercial hydrolysis enzymes (bromelain, papain, xylanase) were used in the test to investigate the influence of enzyme types and hydrolysis time on the formation of peptide, total phenol and DPPH radicals scavenging ability.

The results showed that the peptide and total phenol contents increased with the prolonged hydrolysis time and DPPH radicals scavenging ability was thus improved at the same time. The optimum conditions for mycelia autolysis of *Coprinus comatus* were determined under the conditions of 50°C and pH6, on the other hand *Pycnoporus cinnabarinus* were 50°C and pH5. Among three kinds of enzymes used, the bromelain hydrolysate was relatively high in peptide amount, total phenol content and DPPH radicals scavenging ability.

In order to enhance the bioactive functions of hydrolysates obtained from the

hydrolysis processes, the hydrolysates were further fractionated into three fractions by using two different molecular weight cut-off (MWCO) membranes. The influence of molecular weight distribution on DPPH radicals scavenging ability, reducing power and angiotensin converting enzyme were studied. The results showed that the hydrolysate with the molecular weight less than 1kDa had the greater inhibitory activity of angiotensin-I converting enzyme. In contrast, those with the molecular weight of 1~5kDa and molecular weight greater than 5kDa had better antioxidant capacity.

Key words: *Coprinus cinereus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, antioxidant activity,

ACE inhibitor, Mycelium hydrolysis

目錄

中文摘要.....	I
ABSTRACT.....	II
目錄.....	IV
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XII
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
2-1 菇類的簡介與生理活性.....	2
2-2 雞腿蘑之介紹.....	4
2-3 朱紅栓菌之介紹.....	5
2-4 蛋白質之水解.....	6
2-4-1 水解之目的.....	6
2-4-2 水解方式.....	6
2-4-3 影響蛋白質水解之因素.....	10
2-5 自由基與活性氧對生物體之影響.....	11
2-5-1 自由基與活性氧之簡介.....	12

2-5-2 脂質自氧化作用 (autoxidation)	15
2-5-3 抗氧化劑作用機制.....	17
2-5-4 抗氧化物質種類.....	19
2-6 血管升壓素轉換酶 (ACE) 之生化特性	23
第三章 實驗材料與分法.....	27
3-1 實驗菌株.....	27
3-1-1 雞腿蘑菌株.....	27
3-1-2 朱紅栓菌株.....	27
3-2 實驗藥品.....	28
3-3 實驗儀器與設備.....	30
3-4 分析方法.....	31
3-4-1 菌體 biomass	31
3-4-2 胜肽含量測定.....	31
3-4-3 總多酚類化合物含量測定.....	32
3-4-4 捕捉 DPPH 自由基能力測定.....	33
3-4-5 還原力測定.....	34
3-4-6 血管收縮素轉化酶(ACE)抑制活性測定	35
3-4-7 幾丁質酶活性測定.....	37

3-5 實驗方法.....	38
3-5-1 實驗架構.....	38
3-5-2 菌種培養與保存.....	40
3-5-2-1 菌種斜面試管培養.....	40
3-5-2-2 培養皿平面培養與接菌活化.....	40
3-5-2-3 種菌的製備.....	41
3-5-3 三角瓶液態培養實驗.....	43
3-5-4 雞腿麩菌水解試驗.....	43
3-5-4-1 雞腿麩菌自體溶解.....	43
3-5-4-2 雞腿麩菌添加酵素水解.....	44
3-5-5 朱紅栓菌水解試驗.....	45
3-5-5-1 朱紅栓自體溶解.....	45
3-5-5-2 朱紅栓菌添加酵素水解.....	46
3-6 超過濾濃縮系統區分水解物.....	47
第四章 結果與討論.....	49
4-1 液態發酵菌絲體培養時間對幾丁質酵素活性之影響.....	49
4-2 均質時間對水解自體溶解生成胜肽含量之影響.....	51
4-3 改變水解條件菌絲體自體溶解對生理活性成分含量之影響.....	56

4-3-1 改變自體溶解條件對菌絲體自體溶解生成胜肽含量之影響.....	56
4-3-1-1 改變自體溶解條件對雞腿麈菌自體溶解生成胜肽含量之影響.....	56
4-3-1-2 改變自體溶解條件對朱紅栓菌自體溶解生成胜肽含量之影響.....	59
4-3-2 改變自體溶解條件對菌絲體自體溶解產生總酚含量之影響.....	61
4-3-2-1 改變自體溶解條件對雞腿麈菌自體溶解產生總酚含量之影響.....	62
4-2-2-2 改變自體溶解條件對朱紅栓菌自體溶解產生總酚含量之影響.....	62
4-3-3 改變水解條件菌絲體自體溶解對捕捉 DPPH 能力之變化.....	65
4-3-3-1 改變水解條件雞腿麈菌自體溶解對捕捉 DPPH 能力之變化.....	65
4-3-3-2 改變水解條件朱紅栓菌自體溶解對捕捉 DPPH 能力之變化.....	67
4-4 添加酵素對菌絲體自體溶解之影響.....	69
4-4-1 添加酵素對菌絲體自體溶解胜肽成分含量之影響.....	69
4-4-2 添加酵素對菌絲體自體溶解總酚成分含量之影響.....	71
4-4-3 添加酵素對菌絲體自體溶解捕捉 DPPH 能力之影響.....	73
4-4 超過濾膜系統區分物血管收縮素轉化酶抑制活性及抗氧化活性之分析...	75
4-4-1 區分物血管收縮素-I 轉化酶抑制活性之關係.....	75
4-4-2 區分物抗氧化之關係.....	81
第五章 結論與未來展望.....	90
5-1 結論.....	90

5-2 未來展望.....	91
參考文獻.....	92
附錄.....	98

圖目錄

圖 2-1 雞腿蘑野生子實體	4
圖 2-2 朱紅栓野生子實體	5
圖 2-3 胺基酸間形成胜肽鍵的反應	7
圖 2-4 真菌發生自體溶解之成因	9
圖 2-5 活性氧與自由基對生物體之傷害	11
圖 2-6 氧分子之氧化還原及激發狀態	13
圖 2-7 BHA、BHT、PG、TBHQ 的化學結構	21
圖 2-8 PHENOXIDE ANION 之共振結構	21
圖 2-9 血管收縮素轉化酶之作用機制	24
圖 3-1 實驗架構 (1)	38
圖 3-2 實驗架構 (2)	39
圖 3-3 超過濾濃縮系統	48
圖 3-4 超過濾膜區分流程圖。	48
圖 4-1 雞腿蘑液態發酵菌絲體培養時間對幾丁質酵素活性之影響	50
圖 4-2 朱紅栓液態發酵菌絲體培養時間對幾丁質酵素活性之影響	51
圖 4-3 雞腿蘑均質時間對水解溫度 40°C 自體溶解生成胜肽含量之影響	53
圖 4-4 雞腿蘑均質時間對水解溫度 50°C 自體溶解產生胜肽含量之影響	53

圖 4-5 雞腿磨均質時間對水解溫度 60°C 自體溶解產生胜肽含量的影響.....	54
圖 4-6 朱紅栓均質時間對水解溫度 40°C 自體溶解產生胜肽含量的影響	54
圖 4-7 朱紅栓均質時間對水解溫度 50°C 自體溶解產生胜肽含量的影響	55
圖 4-8 朱紅栓均質時間水解溫度 60°C 對自體溶解產生胜肽含量的影響.....	55
圖 4-9 不同水解溫度對雞腿磨菌自體溶解生成胜肽含量之影響	58
圖 4-10 不同水解 pH 值對雞腿磨菌自體溶解生成胜肽含量之影響.....	58
圖 4-11 不同水解溫度對朱紅栓菌自體溶解生成胜肽含量之影響.....	60
圖 4-12 不同水解 pH 值對朱紅栓菌自體溶解生成胜肽含量之影響.....	60
圖 4-13 不同水解溫度對雞腿磨菌自體溶解產生總酚含量之影響.....	63
圖 4-14 不同水解 pH 值對雞腿磨菌自體溶解產生總酚含量之影響.....	63
圖 4-15 不同水解溫度對朱紅栓菌自體溶解產生總酚含量之影響.....	64
圖 4-16 不同水解 pH 值對朱紅栓菌自體溶解產生總酚含量之影響.....	64
圖 4-17 不同水解溫度對雞腿磨菌自體溶解捕捉 DPPH 能力之影響.....	66
圖 4-18 不同水解 pH 值對雞腿磨菌自體溶解捕捉 DPPH 能力之影響	66
圖 4-19 不同水解溫度對朱紅栓菌自體溶解捕捉 DPPH 能力之影響	68
圖 4-20 不同水解 pH 值對朱紅栓菌自體溶解捕捉 DPPH 能力之影響	68
圖 4-21 添加酵素對雞腿磨菌自體溶解產生胜肽含量之影響.....	70
圖 4-22 添加酵素對朱紅栓菌自體溶解產生胜肽含量之影響	70
圖 4-23 添加酵素對雞腿磨菌自體溶解產生總酚含量之影響.....	72

圖 4-24 添加酵素對朱紅栓菌自體溶解產生總酚含量之影響.....	72
圖 4-25 添加酵素水解對雞腿麩菌自體溶解捕捉 DPPH 能力之影響.....	74
圖 4-26 添加酵素水解對朱紅栓菌自體溶解捕捉 DPPH 能力之影響.....	74
圖 4-27 雞腿麩菌自體溶解之區分物與抑制 ACE 活性關係.....	77
圖 4-28 雞腿麩菌添加 BROMELAIN 水解之區分物與抑制 ACE 活性關係.....	77
圖 4-29 朱紅栓菌自體溶解之區分物與抑制 ACE 活性關係.....	79
圖 4-30 朱紅栓菌添加 BROMELAIN 水解之區分物與抑制 ACE 活性關係.....	79
圖 4-31 雞腿麩菌自體溶解之區分物與胜肽、總酚含量關係.....	84
圖 4-32 雞腿麩菌自體溶解區分物與捕捉 DPPH 能力、還原力之關係.....	84
圖 4-33 雞腿麩菌添加 BROMELAIN 水解之區分物與胜肽、總酚含量關係.....	85
圖 4-34 雞腿麩菌添加 BROMELAIN 水解之區分物與捕捉 DPPH 能力、還原力關係.....	85
圖 4-35 朱紅栓菌自體溶解之區分物與胜肽、總酚含量關係.....	87
圖 4-36 朱紅栓菌自體溶解之區分物與捕捉 DPPH 能力、還原力關係.....	87
圖 4-37 朱紅栓菌添加 BROMELAIN 水解之區分物與胜肽、總酚含量關係.....	88
圖 4-38 朱紅栓菌添加 BROMELAIN 水解之區分物與捕捉 DPPH 能力、還原力關係.....	88
附圖 1 胜肽含量測定檢量線.....	98
附圖 2 總酚含量測定檢量線.....	98

表目錄

表 3-1 實驗藥品清單.....	28
表 3-2 實驗儀器清單.....	30
表 3-3 雞腿麴種菌與液態培養基組成.....	41
表 3-4 朱紅栓種菌液態培養基組成.....	42
表 3-5 朱紅栓液態培養基組成.....	42
表 3-6 各酵素反應溫度及 PH.....	45
表 4-1 雞腿麴菌自體溶解區分物與 ACE 半抑制濃度.....	78
表 4-2 雞腿麴菌添加 BROMELAIN 酵素區分物與 ACE 半抑制濃度.....	78
表 4-3 朱紅栓菌自體溶解區分物與 ACE 半抑制濃度.....	80
表 4-4 朱紅栓菌添加 BROMELAIN 酵素區分物與 ACE 半抑制濃度.....	80
表 4-5 菌絲體之 ACE 半抑制濃度.....	80
表 4-6 雞腿麴菌自體溶解區分物與清除 DPPH 半抑制濃度.....	86
表 4-7 雞腿麴菌添加 BROMELAIN 酵素區分物與清除 DPPH 半抑制濃度.....	86
表 4-8 朱紅栓菌自體溶解區分物與清除 DPPH 半抑制濃度.....	89
表 4-9 朱紅栓菌添加 BROMELAIN 酵素區分物與清除 DPPH 半抑制濃度.....	89
表 4-10 雞腿麴與朱紅栓菌絲體之捕捉 DPPH 半抑制濃度.....	89

第一章 緒論

根據行政院衛生署統計民國 98 年國人十大死因前三名為惡性腫瘤、心臟疾病、腦血管疾病。惡性腫瘤最主要是自由基與活性氧物質對細胞損傷與基因突變所造成，因此減少體內自由基生成或增強抗氧化能力，成為預防疾病重要課題[1]。占據二、三名的心臟疾病、腦血管主要是牽涉到血管硬化或血壓太高，若能有效的控制血壓則可以避免心血管之疾病。

現在觀念保養勝於治療，而菇類根據近年來研究發現具有明顯生理活性如增強免疫、抗腫瘤、抗菌、降血壓等，不僅在子實體方面也包括了液體培養的發酵液也有許多的生理功能。Bo Li 等人(2010)利用雞腿蘑(*Coprinus comatus*)整顆子實體萃取做抗氧化測定結果顯示有良好的效果。潘(2005)將朱紅栓菌(*Pycnoporus cinnabarinus*)培養子實體及深層液態培養探討其抗菌、抗氧化、抗發炎活性以及抑制腫瘤細胞生長之作用[2]。

由於前述文獻知雞腿蘑菌及朱紅栓菌均有抗氧化之功能，本實驗使用雞腿蘑菌及朱紅栓菌做深層液態培養，並利用自體溶解以及酵素水解的方式將蛋白質轉換成有生理活性之小分子胜肽，進一步探討是否可增強抗氧化能力及是否有抗高血壓能力。

第二章 文獻回顧

2-1 菇類的簡介與生理活性

許多食用菇既是美味佳餚，又具有獨特的醫療效用，因此，在此時食藥用菇普遍獲得人們的高度重視。食藥用菇在中國已應用了千年的歷史，中國利用食藥用菇治療疾病，經歷長久使用與驗證，食藥用菇在我國的醫學中已佔了一席之地。

由於在台灣趨於老齡化的社會型態，保健觀念日益重要，只要產品打著延緩及防止衰老，其相關產品能在銀髮族食品市場上展露頭角。大多菇菌因具有抗氧化效能之超氧歧化酵素，使菇類在保健食品市場居於領導地位。不僅是藥用受到重視，像是菇類低熱量的特性而成為愛美消費者的新焦點，廠商以開發減重訴求的減肥食品打進美容市場。

因菇類近幾年來受到民眾的信賴因此引起許多學者的注意，使菇類成分分析及生理活性的研究上也陸續的被證實。將食藥用菇類分成三種食品機能性功效；一般來說，菇類具有三項食品機能[3]：

(1) 營養特性：

菇類是良好的健康食材因含有豐富的食用纖維(β -葡聚糖、雜聚糖及幾丁質)、蛋白質、維生素和礦物質[4]。新鮮食用菇有80-90%水分，蛋白質含量約為蔬果之3~6倍，脂質主要為亞麻油酸，是人體中的必須脂肪酸，並含有8種人體所需

胺基酸，特別含有一般蔬菜缺乏的 isoleucine、leucine、lysine、methionine、phenylalanine、threonine、valine、tryptophane 等人體必需的胺基酸，尤其是lysine 含量最豐富。菇類經由日照或加熱作用，可以轉化成維生素D2，亦含有維生素A、C、B1、B2 及菸鹼酸，有助於身體維生素的補充。礦物質含量，則以鉀最高。

(2) 風味特性：

食品除了含有營養價值外，更要具備有讓人們喜愛的特色風味，可增進食慾及嗜好性，而菇類呈味成分中，八碳化合物和芳香族化合物被認為是主要呈味物質[5]。除此之外，另有低分子的肽類或糖醇、低分子游離糖及有機酸，也被認為與菇類風味有相關[6]。

(3) 生理功能特性：

無論是食用菇類的子實體萃取液或是其菌絲發酵液，近年來發現其含有相當多的活性成分，如多醣體(polysaccharides)、三萜類(triterpene)、超氧歧化酵素 (superoxide dismutase,SOD)、10-ODA (10-oxo-trans-8-decenoic acid) 及 3,4-dihydroxy-benzaldehyde，此外有許多生理功能如菇類具有抗腫瘤活性[7]、增強免疫和消炎作用[8, 9]、降血糖作用[10]、降血壓作用[11]、降膽固醇

2-2 雞腿蘑之介紹

毛頭鬼傘(*Coprinus cinereus*)，俗稱為雞腿蘑，屬真菌門、擔菌亞門、層菌綱、傘菌目、鬼傘科、鬼傘屬。雞腿蘑菌柄粗壯色白外形似雞腿，肉質肥嫩味道像似雞絲，是一種食藥兩用的珍貴菌類。其良好的營養特性及味道鮮美，其產量在 2006 年中國 38.20 萬噸且在歐洲德、捷、荷等國大量栽培。

活性成分雞腿蘑子實體的主要組成成分為粗蛋白25.9%、總糖56.2%、脂肪2.19%、粗纖維7.1%、灰分12.0% [12]。多種生物活性功能已有報導，如降血糖、免疫調節、降血脂、抗腫瘤和抗菌作用 [13]。在1957年時List等人，已發現雞腿菇含有麥角硫因(ergothioneine)、巯基化合物(thiol compound)具有抗氧化性能 [14]，後人研究證實了雞腿菇的抗氧化活性 [15]。而Bo Li等人利用整顆子實體將菌傘及菌柄分別利用熱水及乙醇萃取做抗氧化測定，以菌傘用熱水萃取效果最好 [16]。



圖 2-1 雞腿蘑野生子實體

2-3 朱紅栓菌之介紹

朱紅栓菌(*Pycnoporus cinnabarinus*), 又名朱血菌、紅菌子, 分類上為真菌界、擔子菌門、層菌綱、非褶菌目, 多孔菌科(*Polyporaceae*), 紅孔菌屬 (*Pycnoporus*), 生長形式為子實體單生, 群生或疊生, 常生長在針闊葉樹材上, 朱紅栓菌為一種白色木腐菌, 會引起木材的腐朽[17]。可以將枯枝落葉再次分解消化回歸大自然使生態衡。

在臺灣, 子實體已被應用多年, 主要用於抗癌及抗發炎疾病, 研究指出抑制腫瘤細胞存活率試驗中, 搖瓶試驗中發現, 搖瓶發酵液對乳癌(MCF-7)、纖維肉瘤(HT-1080)、子宮頸癌(HeLa)等細胞降低存活率達70%以上; 肝癌(Hep G2)對細胞降低存活率則達40%以上。抗發炎方面結果顯示, 以酒萃效果較佳, 濃度越高抑制NO能力越強, 80 μ g/ml 為最大有效濃度[2]

不僅是抗癌及抗發炎有研究, 朱紅栓菌在抗氧化方面也有貢獻, 由中國醫藥學研究所藉由體外之抗氧化活性評估方法比較朱紅栓菌乙醇和水萃提取物活性差異, 朱紅栓菌乙醇萃提取物抗氧化活性優於水萃提取物, 也發現總多酚類是朱紅栓菌的主要抗氧化成分。[18]



圖 2-2 朱紅栓野生子實體

2-4 蛋白質之水解

2-4-1 水解之目的

食品蛋白質經過水解之後，通常具有以下特性增進營養特性、溶解度的增加、降低黏度 [19]、增進起泡或凝聚性、增加風味等 [20] 及去除蛋白質水解物之苦味等 [21, 22]。完整的蛋白質其分子量過大，經過水解後蛋白質變成小分子胜肽容易有效及快速被人體所吸收。像是目前商業化的水解蛋白質奶粉水解到分子量小於 1000 Dalton 就不太會成為過敏原，完全水解配方就是指奶中的蛋白質~99% 都被水解到小於 1000 Dalton。

2-4-2 水解方式

胺基酸以胜肽鍵 (peptide bond)(圖 2-3) 彼此共價結合而形成蛋白質，此胜肽鍵是以一個胺基酸的羧基與另一個胺基酸的胺基所組成。

蛋白質的水解有化學法、酵素及自體溶解(autolysis)方式進行，經過不同程度之水解將胜肽鍵打斷而形成不同長度之胜肽分子。

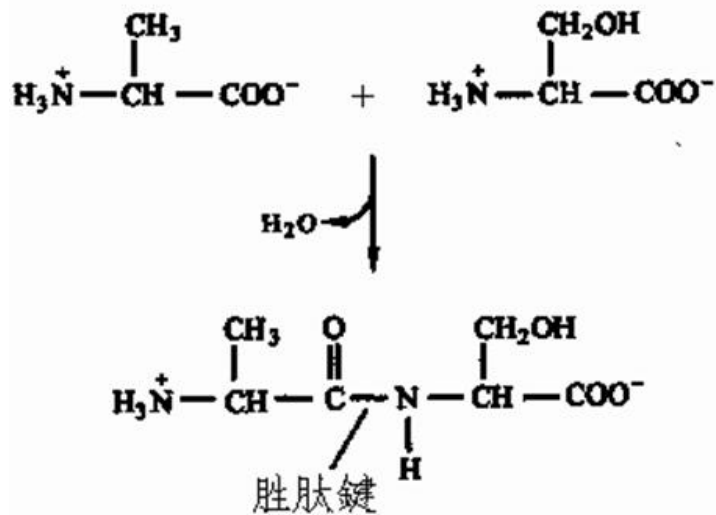


圖 2-3 胺基酸間形成胜肽鍵的反應

(1) 化學水解作用：

化學水解是以酸、鹼進行反應，此法既簡單又經濟，一般較常使用酸水解或添加甲苯或乙酸乙酯等有有機溶劑。但由於其製程不易控制；一些胺基酸在此過程中可能遭受破壞，因而導致營養價值流失，甚至形成有害化學物質，如將L型胺基酸破壞進而形成D型胺基酸，或形成離胺基丙胺酸(lysinoalanine)等物質，而使其營養價值降低[23]形成由離胺基酸 lysinoalanine 等有毒物質[20]

(2) 酵素方式水解

可以選擇酵素種類進行水解作用，且酵素水解大部分為專一性的作用方式得以保留胺基酸的營養價值，幾乎所有的酵素構造均為蛋白質，不易生成出有害的物質，並可保留營養價值甚至增加具有生理活性的物質，所以為主要的工業化製程。

(3) 自體溶解(autolysis)

自體溶解存在於各種微生物中，如細菌真菌中均有發現自溶現象。研究認為微生物的自溶是因外在營養物質耗盡或處於不適合自身生長的環境條件下，細胞壁和細胞質在微生物自體溶解將全部或部分的細胞或胞器分解，導致胞器空泡化和破壞細胞壁結構。研究指出各種微生物酶展開裂解活動時，可以降解真菌細胞壁也可降解如蛋白質，葡聚糖、幾丁質[24]。這些酶主要為蛋白酶、葡聚糖酶以及幾丁質酶和磷酸酶，這些酶的釋放會因不同物種的真菌而導致酶有不同的活性[25-28]。

自體溶解原因可分內在與外在兩種因素(圖 2-4)，內在因素是真菌本身衰老及菌絲分解所造成，外在因素則是受到營養來源的限制或機械力的破壞。促進真菌自體溶解又可分為機械力與非機械力[29]。

機械法破壞細胞壁的做法，在工業生產或是實驗室經常被使用，優點是可以大量處理及快速，但機械法都需要特殊設備來處理且破壞選擇性低是一大問題。目前最常用的像是超音波破碎法利用超音波頻率將細胞破碎，或是高速均質機利用高速馬達直接施與機械力的破壞，這兩種的機械破壞在實驗室最常用，唯一共通的是破壞選擇性低且破壞過程中產生高溫。

非機械法是利用物理、化學方法及添加酵素，物理方法像是控制溫度、pH 值等方法，化學方法大多是添加化學試劑。酵素法是添加酵素對微生物細胞壁或細胞膜進行水解，選用特定的酵素做專一性水解，但酵素法因酵素成本較高常無

法與別種方法競爭。

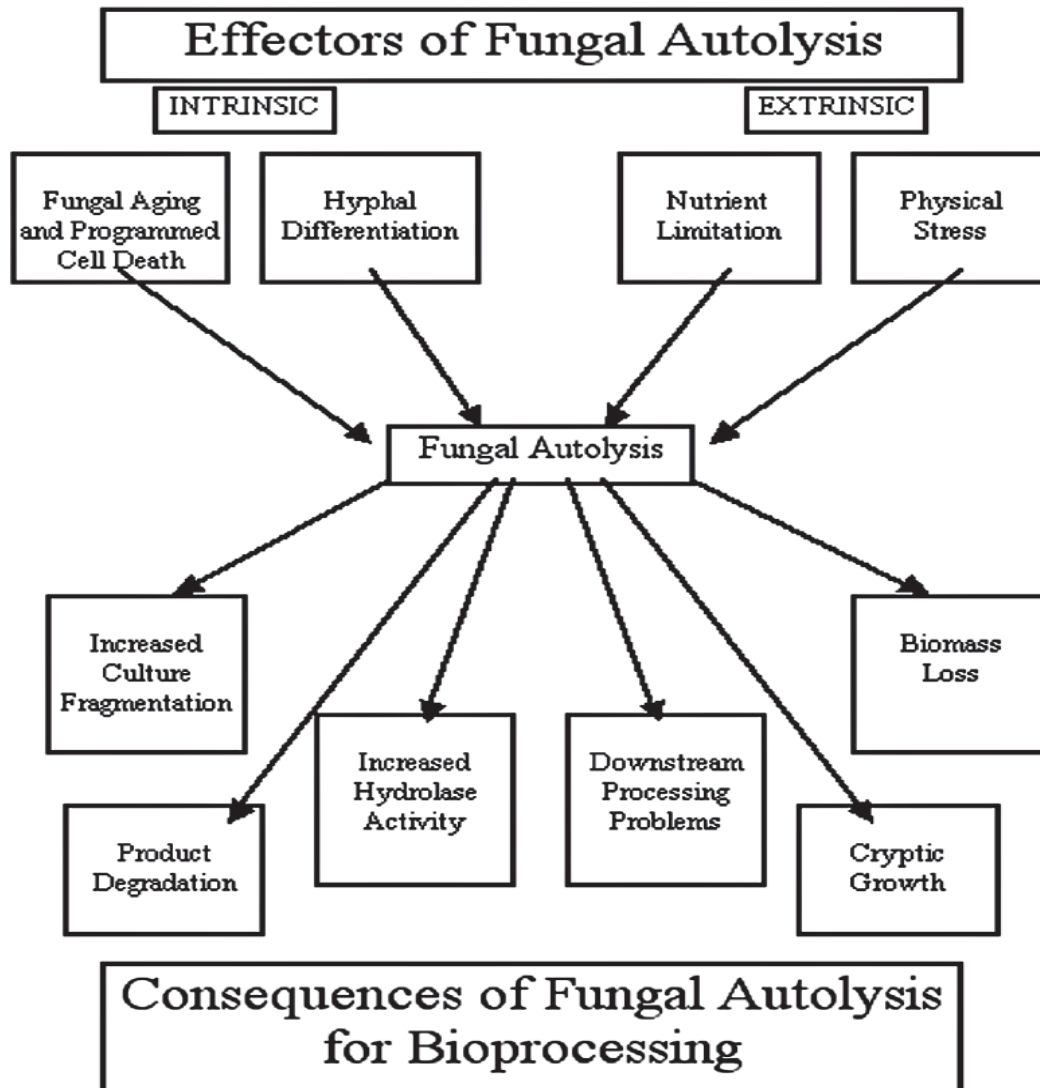


圖 2-4 真菌發生自體溶解之成因[29]

2-4-3 影響蛋白質水解之因素

(1) pH 值與溫度

酵素活性決定於周遭環境的影響，要進行蛋白酶水解時一般都會選擇其最適 pH 值與溫度，以利於酵素反應的進行。而一般蛋白酶最適作用之 pH 值為 7.0 左右，若以最適 pH 值來分類，可分為酸性蛋白酶、中性蛋白酶以及鹼性蛋白酶。溫度方面，最適溫度大多位於 30~50°C，超過 50°C 後，多數內生性酵素開始失活，只有少數可在高溫下作用[20]。

(2) 酵素與受質比

受質與酵素互相接觸時才有機會起化學反應，因此若能提高分子間衝撞的機率就有增加水解反應的速率，所以酵素與受質比例不只有說明酵素濃度，另外意思指整個水解反應的速率。酵素濃度與基質濃度的比例 (E/S) 以質量的比率來表示，水解率增加與酵素對受質比例成正相關，若比例太低會減少受質與酵素間的碰撞而降低水解效率；比例上升時就可提高蛋白質水解的反應速率，但比例太高則未必會提高水解率且不符合經濟效益[30]。

2-5 自由基與活性氧對生物體之影響

在十幾年前研究指出，自由基與活性氧物質對細胞損傷與基因突變有關，而造成疾病如動脈粥狀硬化 (atherosclerosis)、癌症及老化等，因此減少體內自由基生成或增強抗氧化能力，成為預防疾病重要課題[1]。生物體在代謝過程中會形成自由基(free radical)與活性氧(reactive oxygen species)，當體內的自由基與活性氧過量時則易與細胞上之多元不飽和脂肪酸作用而引發脂質過氧化反應(lipid peroxidation)，造成膜的傷害及擾亂許多代謝途徑而造成生物體老化與許多疾病[31]。

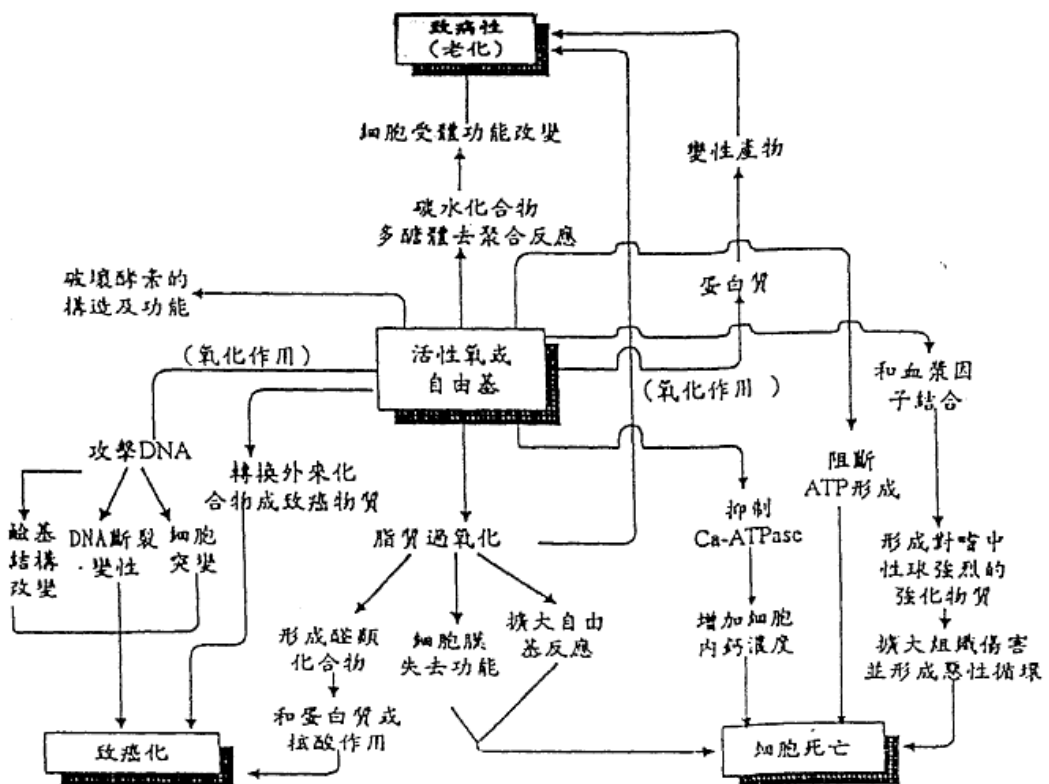


圖 2-5 活性氧與自由基對生物體之傷害[32]

2-5-1 自由基與活性氧之簡介

(一) 自由基與活性氧的種類

自由基是擁有一個或多個不成對電子而獨立存在的化學物質，因為電子的自旋有一上一下的方向排列，二個電子相配才能結合成一個穩定的化學鍵。當一個分子具有不成對的電子圍繞在分子軌道上時，會呈現不穩定的狀態。所以自由基活動性極大：自由基會急速地與附近的其他分子相碰撞而起化學作用，產生更多自由基而形成連鎖反應(chain reaction) [33]。

活性氧(reactive oxygen species ; ROS) 是指需氧生物體，在生物體內代謝過程中產生反應活性較強的含氧分子或稱為氧自由基(oxyradicals)。氧最穩定狀態為三旋態氧分子(tripletstate oxygen ; $^3\text{O}_2$) 氧可以經由數種途徑活化，當氧以其他形式存在時，會變成不穩定的狀態，須藉由得到電子來達到維持穩定的狀態。像是超氧自由基 (superoxyl radical ; $\text{O}_2 - \cdot$)、過氧化氫 (hydroperoxide ; H_2O_2)、氫氧自由基 (hydroxyl radical ; $\text{HO} \cdot$)

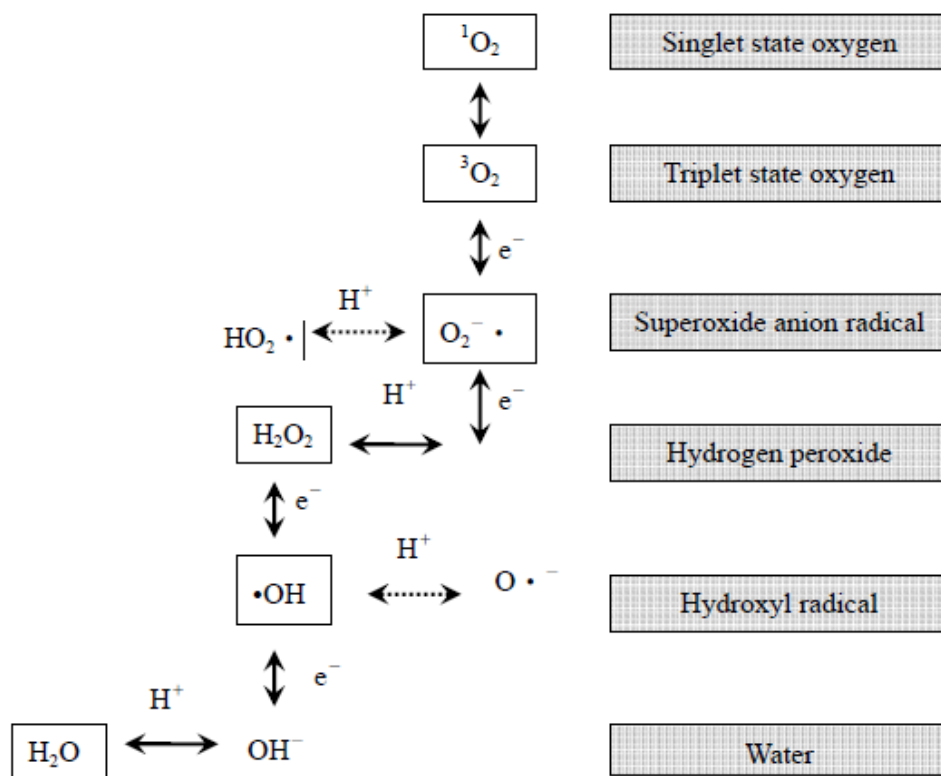


圖 2-6 氧分子之氧化還原及激發狀態[34]

(二) 自由基與活性氧的來源

生物體內自由基與活性氧的來源，一般可分為外在及內在兩方面。內在來源主要是細胞進行氧化作用或是藥物在體內的代謝過程皆會產生自由基；外在來源包括環境污染物、香菸、離子輻射及化學藥劑如農藥等所誘發體內產生的自由基。

人體內的自由基大約可分成三種：

第一種新陳代謝 (Metabolism) 產物身體每天行好氧呼吸時，約有1%~5%的氧分子經一連串步驟於粒腺體電子傳遞鏈，在電子傳遞鏈上電子依序傳遞，最

後傳到氧並與質子(H^+)結合而形成水，而無法形成水的氧分子會依序產生超氧陰離子($\cdot O_2^-$)、過氧化氫(H_2O_2)及氫氧自由基($\cdot OH$)，還有其他較複雜之生物合成或代謝過程中所生成之自由基。

第二種為生物合成 (Biosynthesis) 產物，此類自由基在人體內因需要而由胺基酸合成生成，或是人體因活化細胞、殺死細菌之需要而產生活性氧，如白血球在活化時會產生 $\cdot O_2^-$ 、 H_2O_2 ，這些自由基在殺死侵入人體之病菌上扮演重要之角色。另外，如淋巴細胞、纖維細胞、血管內皮細胞會產生 $\cdot O_2^-$ 。此外，人體內的某些氧化酵素之代謝也會產生自由基，例如體內合成一氧化氮自由基

($\cdot NO$)，乃由L-Arginine 在一氧化氮合成酶 (NO synthase) 的作用下所產生，參與體內正常的代謝與調控也是人類神經系統傳遞訊息的分子，是人體不可或缺的自由基，但若過量會造成細胞毒性[35]。

第三種為外在性的自由基來源包括空氣污染、化學藥劑、香煙、煙霧、紫外線照射及農藥等。如燒焦肉類就含有多種多環碳化物，如苯并蒽 (benzopyrene) 與苯并蔥 (benzanthracene)。這些多環碳化物在體內的代謝過程中極易形成自由基而能基因突變甚至於會引起癌症。對人體損傷的空氣污染是二氧化氮(NO_2)和臭氧(ozone)，臭氧會與不飽和脂肪酸反應產生自由基，再形成臭氧群及誘導脂質的自動氧化。最近日本地震引起討論的核能危機，因高能量輻射線會將人體含70%的水解離成氫原子、氫氧自由基、氧分子及過氧化氫等來造成細胞的損害。

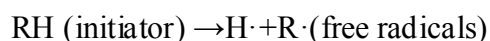
2-5-2 脂質自氧化作用 (autoxidation)

脂質自氧化 (autoxidation) 是最常見，脂質酸敗對食品影響大，脂質自氧化反應是由於不飽和脂肪酸或含不飽和脂肪酸之油脂，像是油脂內所含戊二烯雙鍵中間之甲烯基(α -methylene, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$)會受輻射作用、助氧化劑或酵素之存在，促使其與氧分子結合，形成過氧化物最後裂解成揮發性的醛類及酮類[36]，造成食品的顏色、風味、營養性與安全性的改變[37]。例如脂質的氧化後可能導致食品的酸敗(rancidity) 並造成風味與品質改變。現今有許多證據顯示，油脂的過氧化產物與人的老化、致癌性及心血管疾病有著密切關係[38]。如果體內的抗氧化物質不足，無法適時清除這些過氧化產物，可能導致細胞遭受氧化傷害，進而造成細胞中 DNA 複製差錯、結構性蛋白破壞及正常細胞死亡[39]

不飽和油脂自氧化反應，其反應機構可分為三個基本階段 [37, 40]

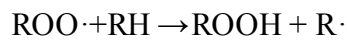
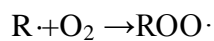
(1) 起始期 (initiation)

不飽和油脂雙鍵上的碳氫化合物(RH)，受到其他化學活性物質作用，移去氫原子而形成一自由基($\text{R}\cdot$)，此步驟通常非常緩慢，屬於自氧化反應中之決定步驟 [41]。



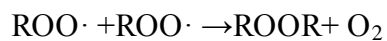
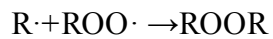
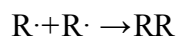
(2) 連鎖生長期 (propagation)

正常油脂因受到自由基的攻擊，而產生更多的自由基。脂質自由基在連鎖反應的過程中與氧反應形成過氧化自由基($\text{ROO}\cdot$)，過氧化自由基再去攻擊其他擁有質子的不飽和脂肪酸，以產生新的脂質自由基與脂質氫過氧化物 (lipid hydroperoxides)。



(3) 終止期 (termination)

在此反應階段，兩個自由基結合產生非游離基之產物而使反應終止。



(RH 表示為不飽和脂肪酸(unsaturated fatty acid)， $\text{R}\cdot$ 及 $\text{ROO}\cdot$ 皆代表反應所生成之自由基。)

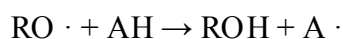
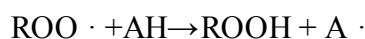
2-5-3 抗氧化劑作用機制

抗氧化劑的定義為抑制或延遲蛋白質、脂質、核酸等相關物質的氧化傷害，能有效抑制氧化速率之物質[42]。要防止脂質氧化首先就是去除其周圍的氧，然後去除促氧化的因子或是添加抗氧化劑。抗氧化劑主要有兩種方式，一種是預防性抗氧化劑（preventative antioxidants），主要是阻止脂質氧化中的起始反應（initiation），將氫過氧化物分解成不具活性物質，另一種是中斷自由基鏈鎖反應的抗氧化劑（free radical chain-breaking antioxidants），能干擾自氧化的鏈鎖反應，使自由基產生穩定的物質。一般抗氧化劑依其作用原理可分成下列四種

(1) 自由基終止劑

藉由釋放氫氧基上的氫原子，提供一個電子或直接供給氫原子給自由基，使自己形成較穩定的形式而終止氧化反應之進行，例如酚類化合物因釋出氫氧基上的氫原子使自身苯環結構上的不成對電子會轉移而形成穩定的共振結構。而食品中常用之抗氧化劑butylated hydroxyanisole (BHA)、butylated hydroxytoluene (BHT)、

TBHQ及維生素E皆屬此類 [43]。(AH = antioxidant)



(2) 還原劑或氧清除劑

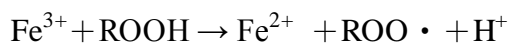
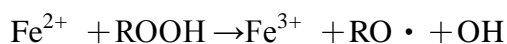
還原與氧化是相對的，還原劑利用還原他人而自身的氧化來清除一些活性氧分子，提供一個還原狀態的環境或是將已氧化的過氧化物還原成原態，以減緩氧化的進行，此類型的抗氧化有核黃素(riboflavin)及抗壞血酸(ascorbic acid)[44]。

(3) 單重態氧抑制劑

較穩定的氧形式為基態三旋態氧 (triplet oxygen, ${}^3\text{O}_2$) 狀態存在，當過多能量被三旋態氧吸收而提升至單旋態氧 (${}^1\text{O}_2$)，此單旋態氧就容易和食品中的不飽和脂肪酸上的雙鍵反應產生氫過氧化物。因此常在食品中添加此類抗氧化劑包括類胡蘿蔔素如 β -胡蘿蔔素 (β -carotene) 等，可吸收過多能量使單旋態氧恢復成穩定的三旋態氧型態，藉此降低與不飽和脂肪酸反應的可能性[45, 46]。

(4) 金屬螯合劑 (metal chelator)

因過渡金屬離子會促進自由基生成加速氧化反應進行：



金屬螯合劑本身不具抗氧化性，但能和促使氧化的金屬離子如銅及鐵離子結合，抑制脂質氧化反應。例如檸檬酸(citric acid)、EDTA及聚磷酸鹽(polyphosphate)等是屬於此類型的抗氧化劑[23]。

2-5-4 抗氧化物質種類

目前已有多種合成的抗氧化劑，如 Butyl hydroxyanisol(BHA)、Butyl hydroxytoluene(BHT)、Tert-butyl hydroquinone(TBHQ)、Propyl gallate(PG)這四種均是常見的合成抗氧化劑(圖 2-7)，這四種抗氧化劑多具有苯酚基 (phenolic hydroxyl group) 的結構，供出本身之氫給不安定的自由基分子後，本身形成穩定的抗氧化自由基分子而終止連鎖反應的進行。其用途多應用在食品的保存及保鮮，但由於人工合成抗氧化劑食入人體後可能會轉變成毒性物質危害人體如肝臟損害造成致癌性等。因此目前對於天然抗氧化物的研究愈來愈受到重視，例如天然植物的萃取物。

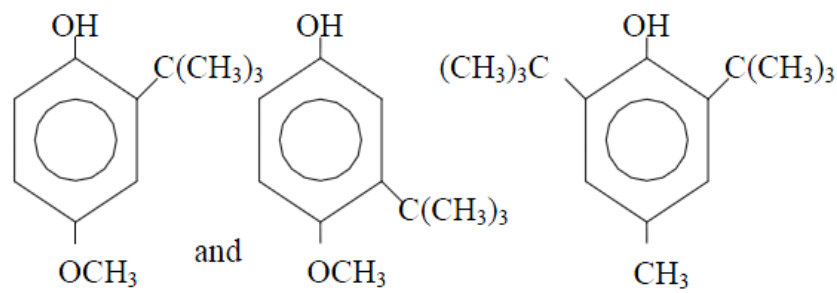
天然抗氧化物主要來源有酚類化合物、具有抗氧化性質之胜肽[47]、生育醇 (tocopherols)、抗壞血酸(ascorbic acid)、葉綠素衍生物(chlorophyll derivatives)、類胡蘿蔔素 (carotenoids)、類黃酮化合物 (flavonoids)、及生物鹼 (alkaloids) 等，之後實驗以總酚及胜肽為目標所以下面針對抗氧化物質-酚類化合物及有效胜肽作介紹[48]。

(1) 酚類化合物(phenolic compounds):

又稱多酚(polyphenols)，是生物體內主要的二次代謝產物，化學的定義是指具有羥基 (hydroxyl) 附加到芳烴組(圖 2-8)。最簡單的類是苯酚 (C₆H₅OH) 供出本身之氫給不安定的自由基分子後，本身形成穩定的抗氧化自由基分子。林

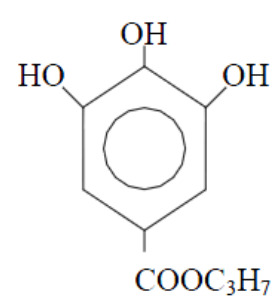
(2006)文獻回顧提到雞肉絲菇菌絲體甲醇萃取物發現含有大量的 total phenols、ascorbic acid 及 tocopherol...等抗氧化物質，對於抗氧化能力評估法都有相當好的效果。

酚類化合物是體內相當重要的成分之一，若多酚中有鄰位酚羥基極易被氧化，且對活性氧等自由基有較強的捕捉能力，使多酚具有很强的抗氧化性能力。許多關於酚類化合物含量研究均利用 Folin-Ciocalteu reagent 作用於具還原端的-OH 基之呈色反應，以 gallic acid 作為標準品，測定樣品中總酚類化合物的含量。楊(2010)用不同水萃液對樟芝液態發酵菌絲體進行總酚測定，在第 21 天時有最大總酚含量，添加蕎麥水萃液培養為最高，其總酚含量可達 7.59 mg/g D.W.，其捕捉 DPPH 能力 81.59% [49]。蔡(2004)巴西蘑菇、茶樹菇、牛肝菌和雞腿菇子實體熱水萃取物中在總多酚化合物含量上，分別為 5.67、5.80、5.81、5.60 mg/g，總酚含量排序牛肝菌 ~ 茶樹菇 > 巴西蘑菇 > 雞腿菇 [50]。駱(2004)麻豆文旦之外果皮及中果皮經 30°C、50°C 及 100°C 乾燥處理後，總多酚含量，有隨溫度上升而增加之趨勢，在外果皮及中果皮分別為 48.6、62.6、71.5 mg/g D.W 及 33.4、42.6、42.7 mg/g D.W [51]。

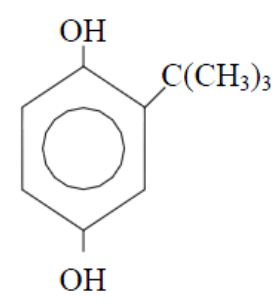


BHA

BHT



PG



TBHQ

圖 2-7 BHA、BHT、PG、TBHQ 的化學結構

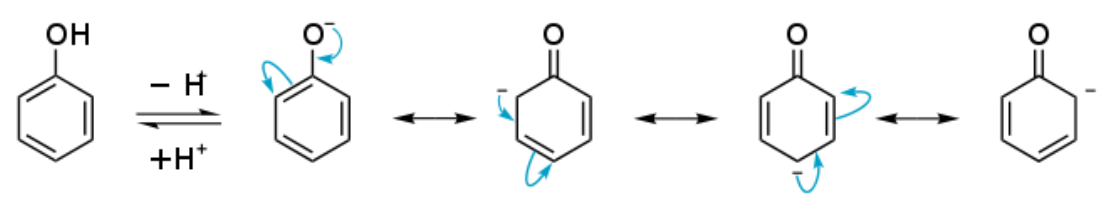


圖 2-8 Phenoxide anion 之共振結構

(2) 有效抗氧化之胜肽

是否生成出具有抗氧化性能之水解胜肽，常取決於水解胜肽分子量大小、氨基酸組成及疏水性質。而這些水解胜肽之抗氧化性能，包括自由基清除能力、抑制亞油酸自氧化、作為金屬離子螯合劑或作為還原劑。現存的某些氨基酸像組氨酸(histidine)、酪氨酸(tyrosine)、蛋氨酸(methionine)、賴氨酸(lysine)、色氨酸(tryptophan)、脯氨酸(proline)等，這些具有抗氧化能力大多來自食物源性胜肽。

研究指出大麻仁蛋白水解物(hemp seed protein hydrolysate)做分子量大小分離，分子量<1 kDa 清除 DPPH 能力 24.2%，分子量 5–10 kDa 清除 DPPH 能力 18.7%，而胜肽大小決定是否具有抗氧化效果，結果顯示大麻仁分子量較小有較好的清除 DPPH 能力[47]。將棉花蛋白質被 Neutrased 水解後用 Sephadex G-25 做分離，分離出 0.8-1.2 kDa 之胜肽抗氧化力最強，用氨基酸分析 0.8-1.2 kDa 也具有最高的總氨基酸含量，並含有豐富的 Phe、His、Pro、Met、Ile and Cys 與其他成分的氨基酸[52]

2-6 血管升壓素轉換酶 (ACE) 之生化特性

高血壓會引發心臟冠狀動脈疾病與腦血管病變，而引起血壓升高的原因之一為血管升壓素轉換酶(Angiotensin I-converting enzyme, ACE)因此若能抑制 ACE 之活性則可控制血壓升高。ACE 分佈於血循環與各類組織中並以在肺部分佈量較多，像是本實驗中購置的 SIGMA Angiotensin converting enzyme(ACE)是從兔子的肺部中萃取出。

(1) ACE 之作用原理

身體內主要有兩種系統負責調節血壓高低，一個是腎素-血管升壓素-醛固酮系統(Renin-Angiotensin-Aldosterone system, RAA) 系統是體內調控血壓上升系統，而另外一個是激肽釋放酶-激酶系統 (Kallikrein-Kinin System,KKS)是體內之降壓系統 (圖 2-9)。

在 RAA 系統中，當血壓降低或血流量減少時，腎臟會釋放出腎素(Renin)，將肝臟所分泌的血管升壓素原(angiotensinogen) 轉變為不具活性的血管升壓素 I (angiotensin I)，接著 ACE (Angiotensin Converting Enzyme)將 angiotensin I 之兩個胺基酸(His-Leu)切去，得到具有活性的 angiotensin II，angiotensin II 會使血管平滑肌收縮(vascular smooth muscle contraction)、腎上腺皮質分泌醛固酮 (aldosterone secretion)，促進人體腎臟對鈉、鉀的吸收，引起鈉貯量和血容量的增加，使血壓升高。

在 KKS 系統，激肽釋放酶 (Kallikrein, Kr) 作用於本身無活性的激肽原

(Kininogen)，產生具有血管舒張功能(kinin)。ACE 可將血管舒張素(bradykinin) 水解，切除末端的 Phe-Arg 及 Ser-Pro，使得 bradykinin 失去活性，喪失舒張血管的功能性。因上述的作用進而使血壓上升[53-55]。

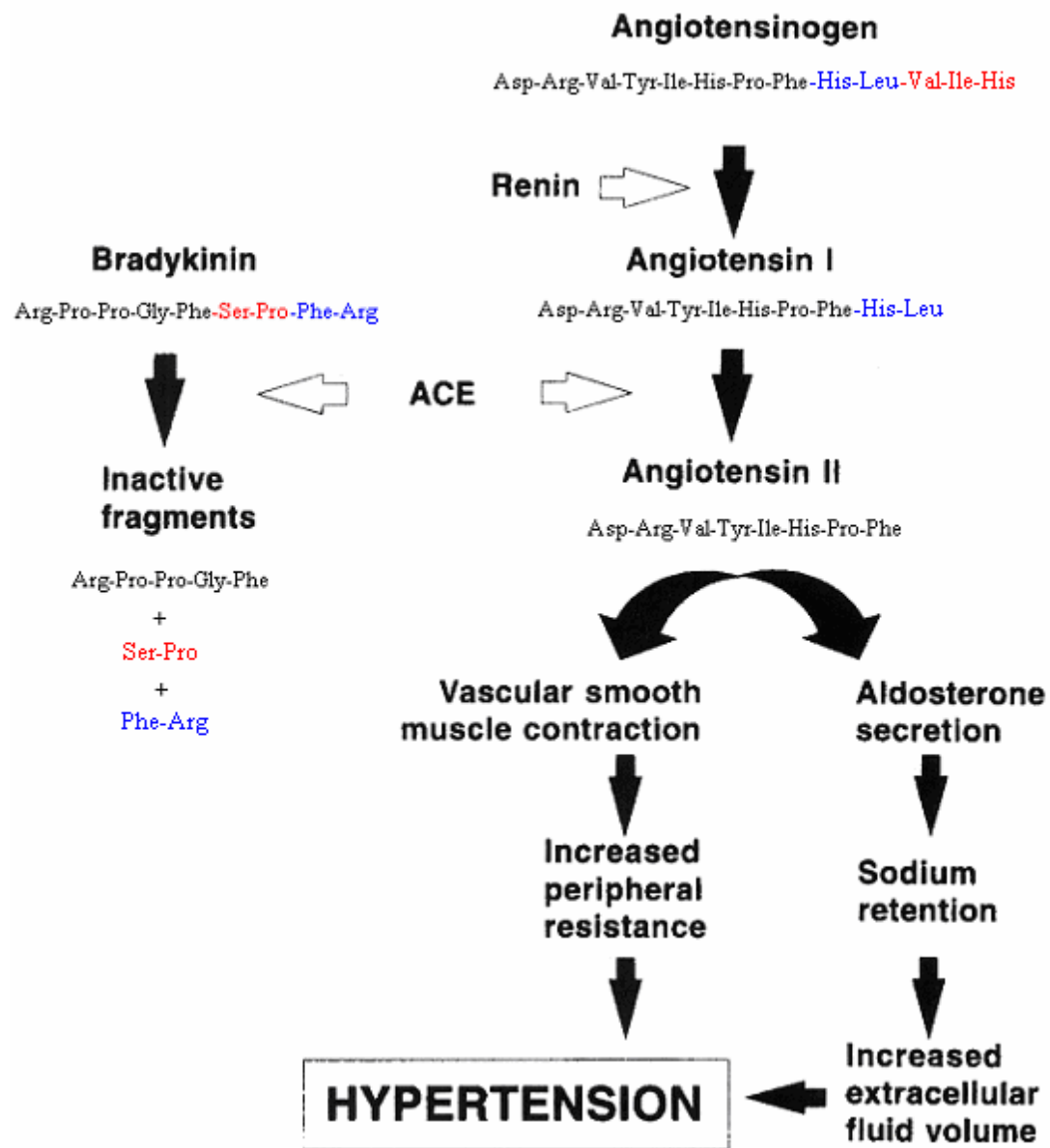


圖 2-9 血管收縮素轉化酶之作用機制[54]

(2) 抑制 ACE 活性之原理

上述原理已指出讓血壓上升最主要因素是 ACE，而不讓 ACE 與 angiotensin I 和 bradykinin 做反應，則可展現抗高血壓或降血壓之功能。ACE 抑制物對 ACE 的親合度比 angiotensin- I 或 bradykinin 還要強，且必須不易從 ACE 結合區脫落才可以有效地產生抑制作用。

可抑制 ACE 之胜肽主要有兩種特色第一是氮端(N-terminal)具有分岔支鏈的疏水性胺基酸，第二為羧端 (C-terminal)有芳香族的胺基酸(aromatic amino acid)或支鏈[56, 57]。只要有其中一種則可以發揮抑制 ACE 活性。而研究指出若水解物的胜肽上有較多的支鏈或是芳香族胺基酸(Pro, Glu, Val, Phe and Tyr)都可以有效的抑制 ACE 之活性[58]。

(3) 血管升壓素轉換酶抑制劑(ACEI)之來源

具有 ACE 抑制效果的成分主要是食物中的蛋白質經過酵素分解後所產生的短鏈胜肽，其鏈長多半在 2-14 個胺基酸。目前市面上有合成的 ACE 抑制劑，像是 captopril，是非常有效的抗高血壓藥物，但卻有副作用，例如咳嗽，過敏性反應，味覺障礙，以及皮膚皮疹等。因此研究開發天然經濟的 ACE 抑制劑是必要的。雖然從食品中分離出的 ACE 抑制劑效果不及化學藥品，但相對地也無任何副作用，可以當作日常生活中的保健食品[59]。食物中被找尋出來活性胜肽的包括有動物性來源如牛奶、卵白、畜產及水產物等蛋白質水解物。植物性來源如

水生藻類、玉米、黃豆及菇蕈類等。以下介紹以植物性來源為主。

紅藻(*porphyra yezoensis*)經 pepsin、protease P、denazyme AP 和 biopraxe PN4 水解，其中以 pepsin 的水解物對 ACE 的抑制活性最強。由水解物中可分離出 (Ile-Tyr)、五胜肽(Ala-Lys-Tyr-Ser-Tyr)及兩個三胜肽(Leu-Arg-Tyr 與 Met-Lys-Tyr)，1 個雙胜肽、五胜肽及 2 個三胜肽，其 IC₅₀ 值分別為 2.69、1.52、5.06 與 7.26 μMμM，水解物經由管柱純化之收集物對 SHR 具有良好降血壓的效果 [60]。

研究指出金福菇(*T.giganteum*.)用蒸餾水 30°C 萃取 3 h 效果為 IC₅₀0.31 mg。並且利用胃蛋白酶，胰蛋白酶和蛋白酶 N 測試口服後 ACE 抑制劑活性是否下降，結果顯示胰蛋白酶處理過的 ACE 抑制劑僅失活約 11%，表示 ACE 抑制劑經過胃後仍有良好的效果 [53]。

Wen 等人(2006)將黃豆利用 Alcalase 酵素在 50°C、pH 9.0 的水解條件下水解，水解六小時的過程中 IC₅₀ 從 66.4 降到 1.79 mg protein/ml。黃豆蛋白經 Alcalase 水解處理後，經 5000、10000、20000 MW 膜過濾，可分離出兩個較強抑制 ACE 活性之胜肽，Asp-Leu-Pro 與 Asp-Gly，其 IC₅₀ 值各為 4.8、12.3 μ [61]。

第三章 實驗材料與分法

3-1 實驗菌株

3-1-1 雞腿蘑菌株

本實驗所採用的雞腿蘑菌株為 *Coprinus cinereus* (BCRC 36099) 係購自食品工業發展研究所生物資源中心，菌株以生資中心所提供之配方 Potato Dextrose Agar (Diced Potatoes 20%、Glucose 2%、Agar1.5%) 做為斜面培養基，在 25 °C 培養箱生長，之後置於 4 °C 冰箱中保存。

3-1-2 朱紅栓菌株

本實驗所採用的朱紅栓菌株為 *Pycnoporus cinnabarinus* (BCRC 36234) 係購自食品工業發展研究所生物資源中心，菌株以生資中心所提供之配方 Potato Dextrose Agar (Diced Potatoes 20%、Glucose 2%、Agar1.5%) 做為斜面培養基，在 25 °C 培養箱生長，後置於 4 °C 冰箱中保存。

3-2 實驗藥品

表 3-1 實驗藥品清單

藥品名稱	廠牌
Peptone	DIFCO
Glucose	華興化學
Sucrose	SHOWA
Yeast extract	Difco
Potato dextrose agar	Difco
Methanol	ECHO
99.5% Ethanol	ECHO
Sodium tetraborate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	SHOWA
Potassium dihydrogen phosphate(KH_2PO_4)	SHOWA
Magnesium sulfate($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	SHOWA
Angiotensin converting enzyme (ACE , from rabbit lung)	SIGMA
Hippuryl-L-histidyl-L-leucine(HHL)	SIGMA
Hippruic acid(HA)	SIGMA
Trifluoroacetic acid (TFA)	SIGMA

Folin-ciocalteu's phenol reagent	SIGMA
Potassium ferricyanide	SHOWA
Ferric chloride	SHOWA
Trichloroacetic acid	SIGMA
1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl	SIGMA
Sodium carbonate	SHOWA
<i>o</i> -phthalaldehyde(OPA)	TCI
Sodium dodecyl sulfate(SDS)	SIGMA
sodium tetraborate	SIGMA
β -mercaptoethanol	SIGMA
Potassium ferricyanide	SHOWA
Papain	嘉年生化
Bromelain	嘉年生化
Xylanase	嘉年生化

3-3 實驗儀器與設備

表 3-2 實驗儀器清單

儀器設備	型號	廠牌
電磁加熱攪拌機	C-MAG HS7	德國 IKA
高壓滅菌釜	HI-340	台灣宏霖
無菌操作台	JW-4N	台灣亮盛
試管振盪器	MSI minishaker	德國 IKA
迴轉式震盪培養箱	LUS-150	台灣亮盛
往復式震盪恆溫水槽	OSI-500	台灣健鑫
分光光度計	GENESYS UV10	美國 Thermo
微電腦蒸餾水製造機	WSC044	英國 FISTREEM
超過濾濃縮純化系統	29755	美國 Millipore
超音波震盪機	5210	美國 BRANSON
高速中型離心機	Universal-32R	德國 Hettich
桌上型微量離心機	MCD2000	HSIANGTAI
烘箱	LO-150	台灣亮盛
冷凍乾燥機	CT-110	丹麥 HETO
高效液相層析儀	HP1100	美國 Agilent

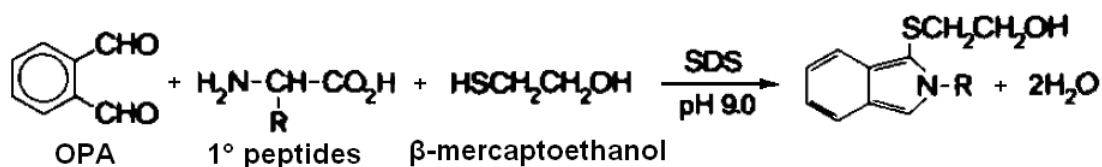
3-4 分析方法

3-4-1 菌體 biomass

取發酵液，以抽氣過濾裝置利用濾紙過濾後，將過濾後的菌體和已知重量的濾紙，在烘箱 60°C 下烘乾，測量其菌體乾重量。

3-4-2 胜肽含量測定[62]

依據 Church, F.C., et al 的方法，利用 *O*-Phthaldialdehyde (OPA)測定水解物中之胺基酸氮端濃度。OPA 在鹼性環境下，會與 β -mercaptoethanol 及一級胺之氮端(NH₂)反應，形成 1-alkylthio-2-alkylisoindole 雙環結構在波長 340nm 下具有最大的吸光值，當吸光值越高，則表示樣品所含的胜肽數越多。



取50 μ l的水解液於試管中，並加入2mL OPA溶液，靜置兩分鐘立即以分光光度計測定340 nm 吸光值。由Peptone溶液曲線換算水解液中胜肽含量，單位為 mg/mL。

OPA溶液的製備：將以下四種藥品混合均勻並加去離子水定量至50mL

藥品名稱	組成比例
100 mM sodium tetraborate	25 ml
20% Sodium dodecyl sulfate(SDS)	2.5ml
OPA (0.04g OPA溶於1 mLMeOH中)	1 ml
β -mercaptoethanol	100 μ l

3-4-3 總多酚類化合物含量測定[63]

利用酚類化合物，在鹼性的環境下能與 Folin-Clocalteu's phenol 試劑形成可溶性的藍色化合物，在 730 nm 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 為標曲線對照樣品中酚類化合物含量多寡。

取0.3 ml的水解液，加入6 ml 2%的 Na_2CO_3 ，均勻混和反應2分鐘之後再後加入0.3ml 50% Folin-Clocalteu's phenol reagent (FCPR)反應30分鐘，在730 nm 測其吸光值。由已知濃度的標準Gallic acid檢量線，計算總酚類的含量。

3-4-4 捕捉 DPPH 自由基能力測定[64]

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，藉由測定樣品在 517 nm 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，也就是其具有良好提供氫的能力。

取 0.2 ml 的水解液，加入 3.8 ml 的甲醇溶液以及 1 ml 之 0.2mM DPPH 自由基甲醇溶液，充分混合後靜置反應 30 分鐘，再以分光光度計測其於 517 nm 波長下之吸光值，並計算其自由基捕捉率。

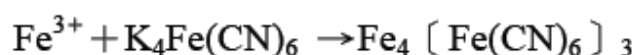
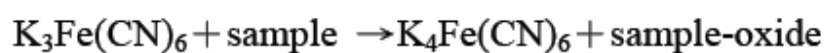
$$\text{捕捉率(\%)} = \left(\frac{A_c - A_s}{A_c} \right) \times 100\%$$

Ac：不含樣品之對照組於 517 nm 之吸光值

As：含有樣品之實驗組於 517 nm 之吸光值

3-4-5 還原力測定 [65]

還原力的測定，此方法是依據普魯士藍 $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ (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 700 nm 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。



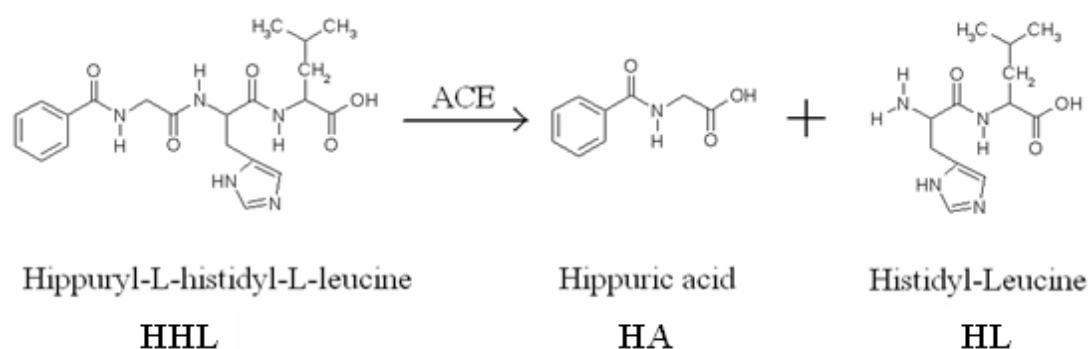
取 0.25 ml 的水解液，加入 0.25 ml 之 0.2 M 磷酸緩衝液(pH 6.6)以及 0.25 ml 的 1% potassium ferricyanide (赤血鹽)，在 50°C 水浴反應 20 分鐘後，快速使其冷卻，然後加入 0.25 ml 10% TCA (trichloroacetic acid) 溶液，均勻混合後以 9000 × g 離心 10 分鐘，取其上清液 0.5ml，再加入 0.5 ml 蒸餾水以及 0.1 ml 之 0.1% ferric chloride，混合後再反應 10 分鐘，以分光光度計測其在波長為 700 nm 之吸光值。

3-4-6 血管收縮素轉化酶(ACE)抑制活性測定[66]

1. 血管收縮素轉化酶抑制活性原理:

以Hippuryl-His-Leu (HHL) 作為ACE 之受質，具活性之ACE可將HHL分解為Hippuric acid(HA)及His-Leu (HL)，若有ACE 抑制物存在時，HA及HL之生成量將減少。其中HA於波長228 nm下具有最大之吸收，因此利用HPLC測定HA單位時間之生成量，即可得知各待測物之ACE 抑制活性。

反應式如下：



2. 藥品之配製:

(1) 含 0.4M NaCl 之 0.1M 硼酸緩衝液(pH=8.3): 將 1.91 克 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (s) ,

溶於 40ml D.D.W 中，微微加熱助溶解，以 6N HCl 調整 pH 至 8.3，加去離

子水定量至 50ml，再將 1.17 克 NaCl 溶入其中，最後以 0.45 μm 濾膜過濾。

(2) 5 mM HHL 溶液：稱取適量 HHL 溶於含 0.4M NaCl 之 0.1M 硼酸鈉緩衝液

(pH=8.3)，保存於 4°C

(3) 60 mU/mL ACE 溶液：將 ACE 粉末溶於適當含 0.4M NaCl 之 0.1M 硼酸鈉緩

衝液(pH=8.3)，保存於4°C(視購入ACE活性再加以稀釋)。

(4) 0.1% TFA(Trifluoroacetic acid、三氟醋酸)：取10μL(0.01mL)溶於9.99mL蒸餾水中。

3. 試驗步驟：

(1) 取90 μL 5 mM HHL 溶液當作受質，加入10 μL之待測物(蛋白質水解物)，於37 °C水浴預熱5分鐘。

(2) 再加入30 μL 60 mU/mL ACE 溶液，同樣於37 ±1°C水浴下反應30分鐘，最後加入130 μL 0.1% TFA 終止反應。

(3) 經離心、過濾後，以RP-HPLC 進行分析測定ACE抑制活性百分比。

(4) ACE 抑制活性百分比計算公式如下：

$$\text{Inhibitory activity (\%)} = \frac{(a-b)}{a} \times 100\%$$

a = 以去離子水取代水解物反應後之HA波峰高度

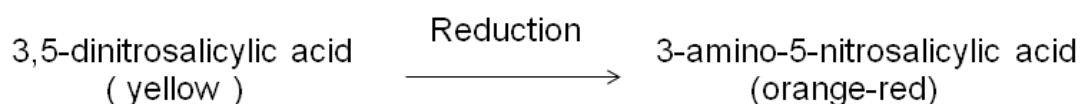
b = 水解物反應後之HA波峰高度

(5) 高效率液相層析分析條件：為應用LiChrospher RP-18 column (250 × 4 mm, 5 μm, Merck, Germany)分析型管柱。移動相為0.1% TFA 溶於50% 甲醇、50% 水；流速0.8 ml/min；樣品注射量為20 μL；偵測波長為228 nm(用紫外光偵測儀測定其吸收)。

3-4-7 幾丁質酶活性測定[67]

(1) DNS 還原糖測定原理

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 試劑之反應是利用 DNS 具還原力的特性，因此碳水化合物只要具有游離或游離趨勢之醛或酮基，即能在鹼性溶液下有還原的能力而進行以下反應。於一定範圍內，顏色的深淺強度和還原糖濃度成正比，故以標準葡萄糖檢量線來定量樣品中還原糖的比例。



(2) 膠態幾丁質(colloidal chitin)製備方法

取 15 g 的 chitin 粉末(Sigma C-7170) 溶於 200mL 的 12N HCl，以 40°C 隔水加熱作用 20 分鐘。上述溶液以 5L 純水中，放置於 4°C 靜置隔夜。將上層液移除留下沉澱物後加入 5L 純水攪拌再放入冰箱，此步驟重覆 2~3 次，將 pH 調整至 7。以 3000 rpm 離心 5 分鐘去除上清液，收集沉澱物。用真空乾燥法將沉澱物抽乾並秤取乾燥前後的重量，接著用定量(1ml)即可求得膠態幾丁質的濃度 % (w/v)。

(3) 幾丁質酶活性測定方法

1.0 ml 之上清液加入 1.0 ml 的幾丁質(10 mg/ml 在 pH 5.5 的檸檬酸鹽磷酸緩衝液)，在恒溫水槽 45°C 下振盪反應 30 分鐘，接著利用離心機，以 8000 rpm 離

心 10 分鐘，吸取上清液加入 1.0 ml DNS 試劑於 100°C 反應十分鐘，反應結束後

等待冷卻至室溫。在波長 540 nm 測其吸收值，計算出反應前後還原糖變化量。

(定義 1 單位(U)幾丁質酵素:在 45°C 下反應 30 分鐘，產生 1.0 μmol 的還原糖量)

3-5 實驗方法

3-5-1 實驗架構

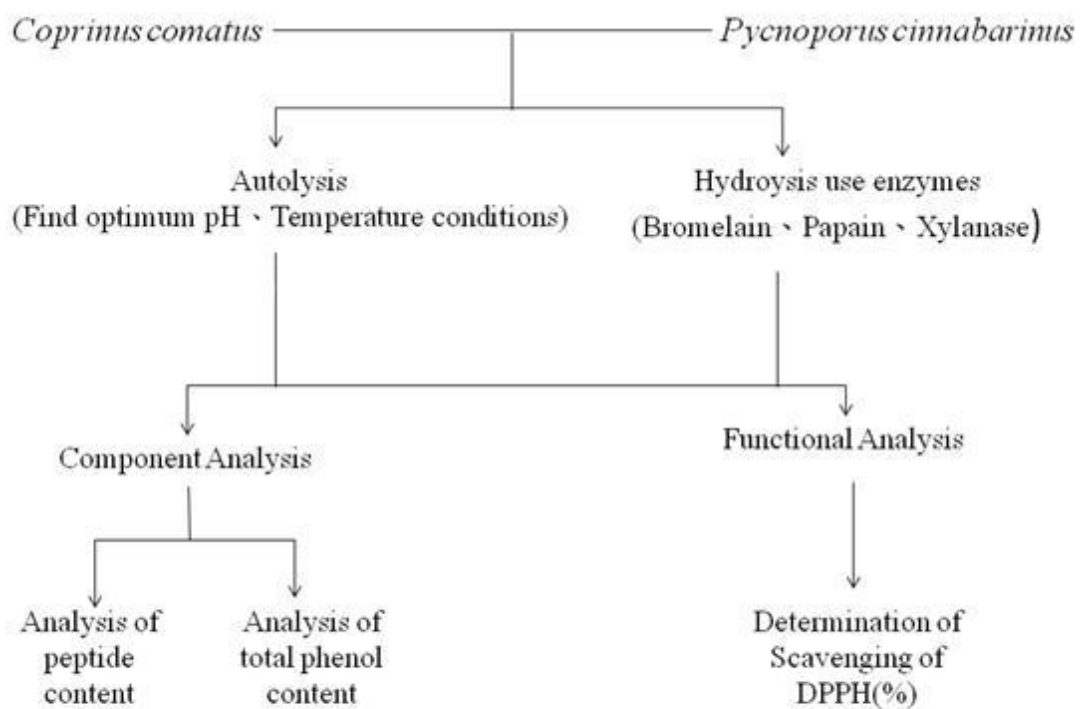


圖 3-1 實驗架構 (1)

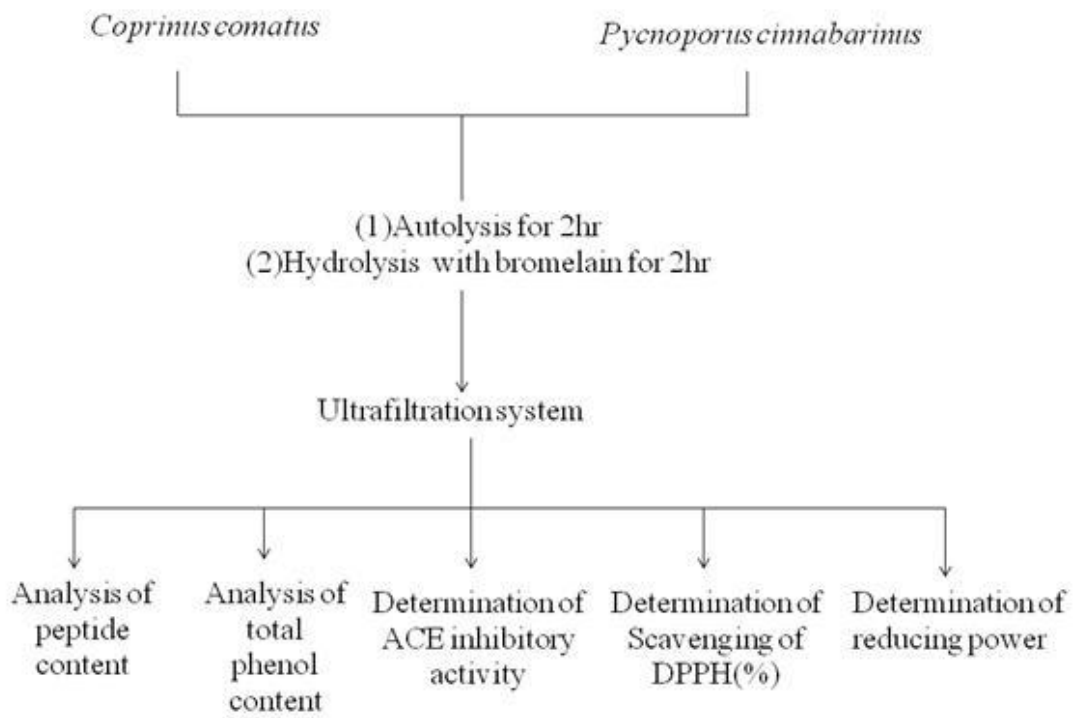


圖 3-2 實驗架構 (2)

3-5-2 菌種培養與保存

3-5-2-1 菌種斜面試管培養

以斜面試管保存菌種。配製 Potato Dextrose Agar (Diced Potatoes 20%、Glucose 2%、Agar1.5%)作為斜面培養基，加熱攪伴均均溶解，將培養基倒入乾淨試管中置於滅菌釜，滅菌 20 分鐘。滅菌完後將試管傾斜於無菌操作台中，等待冷卻硬化。

接菌時，配製好的斜面培養基試管管口用酒精燈烤過滅菌，白金鉤燒至通紅三次。將白金鉤取雞腿麩菌種，移植至配製好的斜面上。於 25°C 下活化菌絲，生長一定量後放置 4°C 下保存備用。

3-5-2-2 培養皿平面培養與接菌活化

以 Potato Dextrose Agar (Diced Potatoes 20%、Glucose 2%、Agar1.5%)作為培養基，加熱攪伴使均均溶解。滅菌 20 分鐘。接菌時切取一已長有雞腿麩菌培養皿。先將白金鉤用酒精燒紅後，以白金鉤刮取一小塊移至空白培養皿中。於 25°C 下活化菌絲，一定成長量，再放於 4°C 下保存。

3-5-2-3 種菌的製備

本實驗雞腿麩及朱紅栓種菌培養基如表 3-3、3-4 並調至菌種所需的 pH。裝 100ml 培養基於 250ml 三角瓶。培養基滅菌過後，取長滿雞腿麩及朱紅栓菌絲之平面培養皿，用鋁片製成的切割器切 4 個單位菌絲塊（每塊單位面積 0.5 cm × 0.5 cm），以白金鈎將菌絲塊接入液態培養基中，將雞腿麩置於 25°C、朱紅栓置於 30°C 迴轉恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 7 天做為種菌。

表 3-3 雞腿麩種菌與液態培養基組成

藥品名稱	組成比例(%)
Glucose	4 %
Yeast extract	1 %
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.134%
MgSO ₄	0.05%
KH ₂ PO ₄	0.05%
K ₂ HPO ₄	0.05%

培養條件:25°C、pH7、100rpm

表 3-4 朱紅栓種菌液態培養基組成

藥品名稱	組成比例(%)
Sucrose	4 %
Peptone	2 %
Yeast extract	1 %
KH ₂ PO ₄	0.5%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05%

培養條件:30°C、pH 5.5、100rpm

表 3-5 朱紅栓液態培養基組成

藥品名稱	組成比例(%)
Glucose	2 %
Yeast extract	0.5 %
Peptone	3 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 %
KH ₂ PO ₄	0.5%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05%

培養條件:30°C、pH5.5、100rpm

3-5-3 三角瓶液態培養實驗

在三角錐形瓶中加入 100ml 的基礎液態培養基，雞腿蘑成份如表 3-3、朱紅栓成份如表 3-5。滅菌 20 分鐘。將基礎培養基培養 7 天後的種菌，以滅過菌的均質機(polytron)攪碎菌絲球，並以 5% 的接菌量接至每個三角瓶，雞腿蘑置於 25°C、朱紅栓置於 30°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100 rpm 培養 6 天，將整體均質液水解，進行總多酚含量、抗氧化能力及抗高血壓能力測試。

3-5-4 雞腿蘑菌水解試驗

3-5-4-1 雞腿蘑菌自體溶解

(1) 不同均質時間對自體溶解生成胜肽之影響

將菌種液態發酵培養 6 天的菌絲體用高速均質機(11000rpm)打碎菌絲體，分別均質 10 秒、1 分鐘，加入緩衝液(CH_3COOH 0.58ml+ CH_3COONa 0.82g)，將 pH 調至 6 分別放入 40°C、50°C、60°C 恆溫水槽，震盪速率為 100rpm，並於第 0、1、2、4、6 小時取樣。反應結束後以 8000 rpm 離心 10 分鐘，其上清液測定總胜肽含量。

(2) 不同溫度對自體溶解之影響

將菌種液態發酵培養 6 天的菌絲體用高速均質機 (11000 rpm) 均質 1 分鐘打碎菌絲體，加入緩衝液(CH_3COOH 0.58 ml+ CH_3COONa 0.82 g)，將 pH 調至 6 分別放入 40°C、50°C、60°C 恆溫水槽，震盪速率為 100rpm，並於第 0、1、2、4、6 小時取樣。反應結束後以 8000rpm 離心 10 分鐘，其上清液用來測定胜肽含量、總酚含量與清除 DPPH 自由基。

(3) 不同 pH 值對自體溶解之影響

將菌種液態發酵培養 6 天的菌絲體用高速均質機 (11000rpm) 均質 1 分鐘打碎菌絲體，加入緩衝液(CH_3COOH 0.58 ml+ CH_3COONa 0.82 g)，將 pH 值調為 5、6、7 並放入 50°C 恆溫水槽，震盪速率為 100rpm，並於第 0、1、2、4、6 小時取樣。反應結束後以 8000rpm 離心 10 分鐘，其上清液用來測定測定胜肽含量、總酚含量與清除 DPPH 自由基。

3-5-4-2 雞腿蘑菇添加酵素水解

將菌種液態發酵培養 6 天的菌絲體用高速均質機 (11000rpm) 均質 1 分鐘打碎菌絲體，加入緩衝液(CH_3COOH 0.58ml+ CH_3COONa 0.82g)，加入 1%(w/v)酵素並將 pH 值調整至各酵素所需的值，並放入各個酵素反應溫度(表 3-6)，震盪速率為 100rpm，並於第 0、1、2、4、6 小時取樣。取樣後以沸水作用 10 分鐘使酵素失活，再以 8000rpm 離心 10 分鐘，其上清液用來測定胜肽含量、總酚含量與清除 DPPH 自由基

表 3-6 各酵素反應溫度及 pH

酵素	pH	溫度(°C)
Bromelain	6.0	45
Papain	6.2	50
Xylanase	6.0	50

3-5-5 朱紅栓菌水解試驗

3-5-5-1 朱紅栓自體溶解

(1) 不同均質時間對自體溶解生成胜肽的影響

將菌種液態發酵培養 6 天的菌絲體用高速均質機(11000rpm)打碎菌絲體，分別均質 10 秒、1 分鐘，將 pH 調至 4 放入 40°C、50°C、60°C 恆溫水槽，震盪速率為 100rpm，並於第 0、1、2、4、6 小時取樣。反應結束後以 8000rpm 離心 10 分鐘，其上清液測定總胜肽含量。

(2) 不同溫度對自體溶解之影響

將菌種液態發酵培養 6 天的菌絲體用高速均質機 (11000rpm) 均質 1 分鐘打碎菌絲體，將 pH 調至 4 分別放入 40°C、50°C、60°C 恆溫水槽，震盪速率為 100rpm，並於第 0、1、2、4、6 小時取樣。反應結束後以 8000rpm 離心 10 分鐘，其上清液其清液用來測定胜肽含量、總酚含量與清除 DPPH 自由基。

(3)不同 pH 值對自體溶解之影響

將菌種液態發酵培養 6 天的菌絲體用高速均質機 (11000rpm) 均質 1 分鐘打碎菌絲體，將 pH 值調為 3、4、5、6 並放入 50°C 恆溫水槽，震盪速率為 100rpm，並於第 0、1、2、4、6 小時取樣。反應結束後以 8000rpm 離心 10 分鐘，其上清液用來測定測定胜肽含量、總酚含量與清除 DPPH 自由基。

3-5-5-2 朱紅栓菌添加酵素水解

將菌種液態發酵培養 6 天的菌絲體用高速均質機 (11000rpm) 均質 1 分鐘打碎菌絲體，加入 1%(w/v)酵素並將 pH 值調整至各酵素所需的值，並放入各個酵素反應溫度，震盪速率為 100rpm 並於第 0、1、2、4、6 小時取樣。取樣後以沸水作用 10 分鐘使酵素失活，再以 8000rpm 離心 10 分鐘，其上清液用來測定成分分析及功能性分析。

3-6 超過濾濃縮系統區分水解物

超過濾濃縮系統(美國 Millipore)，原理為利用不同 MWCO 膜進行水解物之區分，將雞腿麩菌及朱紅栓菌自體溶解與酵素水解兩小時之水解物，分別置於反應槽中，如圖以幫浦經管送入濾膜中，分子量小於濾膜 MWCO 的分子會通過且經由管 A 可收集濾液(permeate)，而剩餘較大的分子則順著管 B 回到反應槽中，如此不斷循環直到反應槽體積為原來的 1/2，最後於反應槽所收集即為分子量大於濾膜 MWCO 之濃縮液(concentrate)

本實驗雞腿麩菌及朱紅栓菌分成自體溶解及添加酵素水解兩部分，共四種水解液分別為雞腿麩菌(水解條件 50°C、pH6)、朱紅栓菌(水解條件 50°C、pH5)自體溶解兩小時及添加 Bromelain 酵素水解(1 % w/v 基質濃度)兩小時，先使用 75mm 再使用 0.45 μ m 濾膜過濾將懸浮物去除，進行超過濾反應系統區分，依序使用 5kDa、1kDa 的濾膜進行區分(如圖 3-4)。將澄清液先以 5kDa 濾膜過濾，回到反應槽為大於 5kDa 之區分物，再將 5kDa 濾液以 1kDa 濾膜處理，收集大於 1kDa 為 1~5kDa 之區分物，可透過 1kDa 濾膜則分子量為小於 1kDa。總共有四種不同分子量區分性之蛋白水解物，分別為未過膜水解液、>5KD 濃縮液、1~5KDa 濃縮液與 <1KDa 透析濾液。

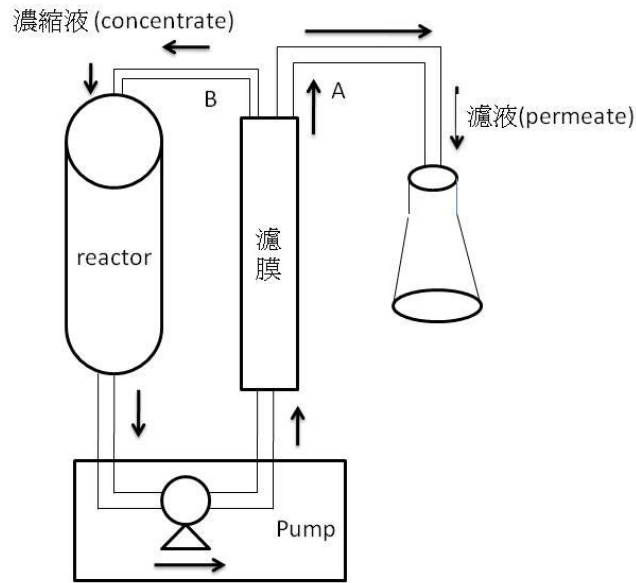


圖 3-3 超過濾濃縮系統

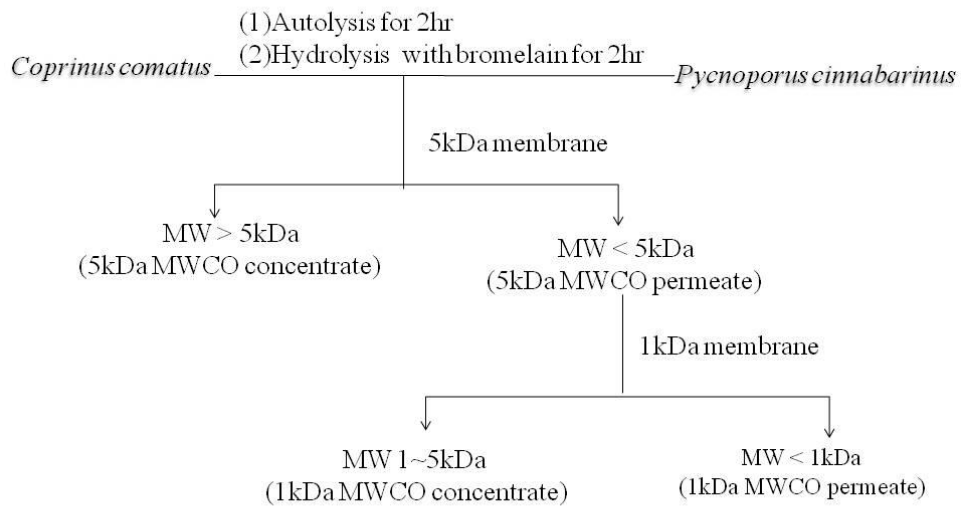


圖 3-4 超過濾膜區分流程圖。

第四章 結果與討論

4-1 液態發酵菌絲體培養時間對幾丁質酵素活性之影響

雞腿麩在九天培養中，可以觀察到菌絲體在搖瓶壁上的菌絲持續增厚。由圖 4-1 菌體重持續的增長當到第六天，但因搖瓶環境無法再提供養分給新生的菌體，所以在第七天菌重上升緩慢。相對的在第六天時幾丁質酵素活性達到最高量，此時幾丁質酵素會將為真菌細胞壁之主要成分幾丁質分解，造成細胞破裂放出胞內物質並分解成有用的養分給新生的菌體使用，也就是淘汰老化菌絲換成新生菌絲。所以在第七天後新生菌體有養分可吸收，導致在第八天時菌重快速的增加。

朱紅栓菌從圖 4-2 得 1~5 天菌重快速上升，5~7 天菌絲體較生長緩慢，推測原因搖瓶內養分不夠使得無法像前期快速生長，為了要提供足夠的養分給新生菌絲，開始做自體溶解將老舊菌絲溶解分解成養分，使第八天的菌重再次快速上升。

由於圖 4-1 雞腿麩與圖 4-2 朱紅栓菌均是在第六天幾丁質酵素活性最高，幾丁質酵素會將菌體細胞壁分解以助於未來的自體溶解實驗，所以往後實驗均取第六天菌絲做自體溶解之實驗。

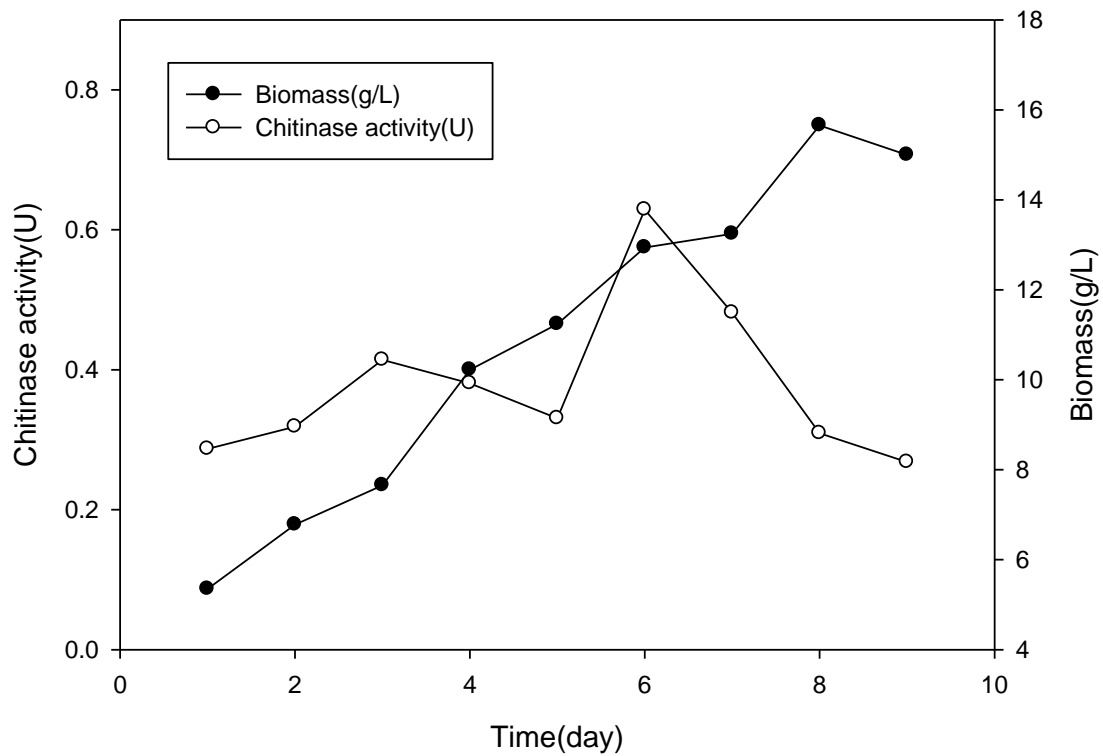


圖 4-1 雞腿磨液態發酵菌絲體培養時間對幾丁質酵素活性之影響

培養條件:

(1) 液態培養基: Glucose 4%、Yeast extract 1%、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.134%

MgSO_4 0.05%、 KH_2PO_4 0.05%、 K_2HPO_4 0.05%。

(2) 接菌量 5%、培養溫度 25°C 、pH7、培養九天。

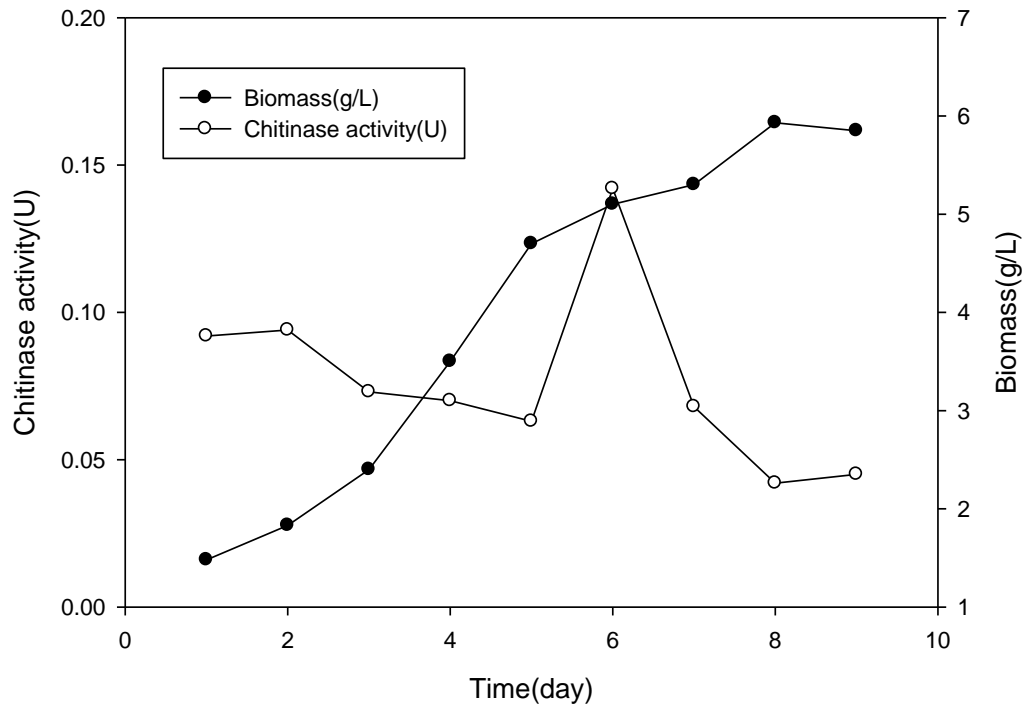


圖 4-2 朱紅栓液態發酵菌絲體培養時間對幾丁質酵素活性之影響

培養條件:

(1) 液態培養基: Glucose (2 %)、Peptone (3 %)、Yeast extract (0.5 %)、

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 %)、 KH_2PO_4 (0.5%)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05%)

(2) 接菌量 5%、培養溫度 30°C、pH5.5、培養九天

4-2 均質時間對水解自體溶解生成胜肽含量之影響

由前面文獻可知影響真菌自體溶解可分為機械力與非機械力來破壞細胞壁取得細胞中物質[29]，所以在此實驗利用均質機的機械力打破菌絲體之細胞壁後而產生自體溶解，看是否使用機械力會使自體溶解效果變好。

由圖 4-3 至 4-5 可知雞腿蘑使用高速均質機均質一分鐘的機械破壞後在 40°C、50°C、60°C 胜肽含量多於均質十秒鐘，從前述文獻知利用機械破壞可以將細胞內的物質釋放出所以測得的胜肽量會比 10 秒的含量高。

朱紅栓菌也重複實驗步驟利用高速均質機分別均質十秒與一分鐘。從圖 4-6、4-7 朱紅栓在 40°C、50°C 溫度下，均質一分鐘水解胜肽的含量高出均質十秒的胜肽含量，而 60°C 的成效較不明顯推測可能溫度過高使酵素活性失活。

從實驗可得知使用機械均質時間較長可幫助菌絲體釋放胞內物質，所以往後之實驗均已均質一分鐘為基礎。

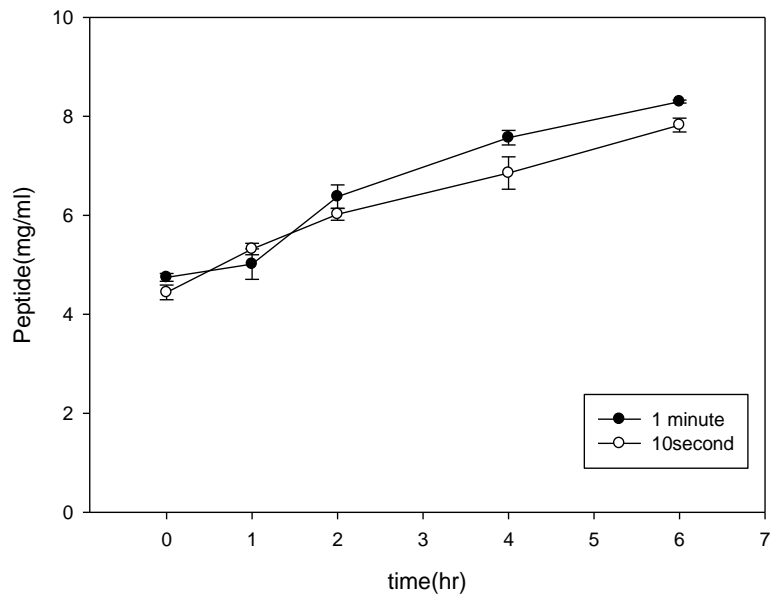


圖 4-3 雞腿磨均質時間對水解溫度 40°C 自體溶解生成胜肽含量之影響
 作用條件: 水解溫度 40°C、pH 6；震盪速率為 100rpm

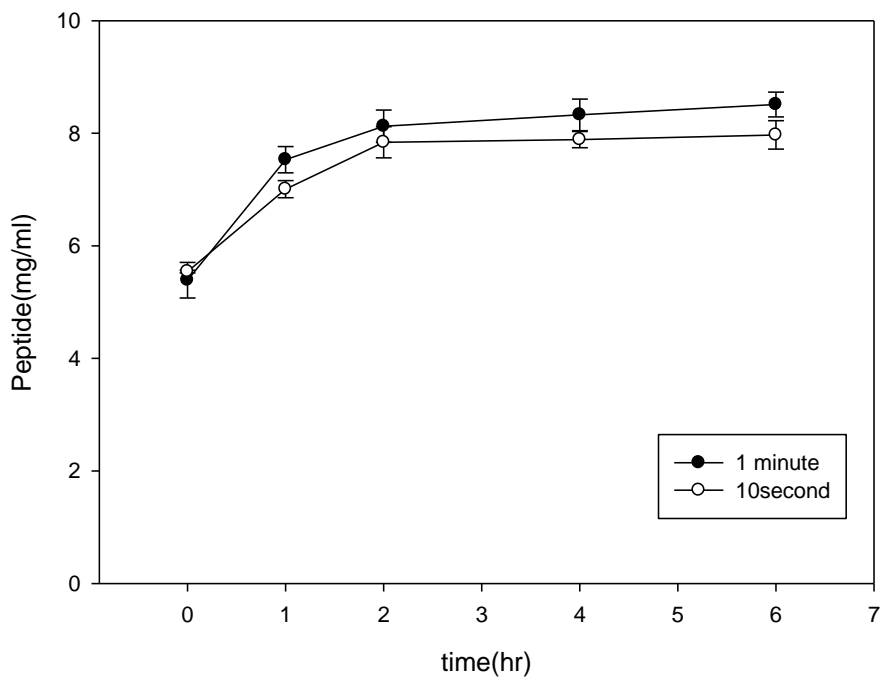


圖 4-4 雞腿磨均質時間對水解溫度 50°C 自體溶解產生胜肽含量之影響
 作用條件: 水解溫度 50°C、pH 6；震盪速率為 100rpm

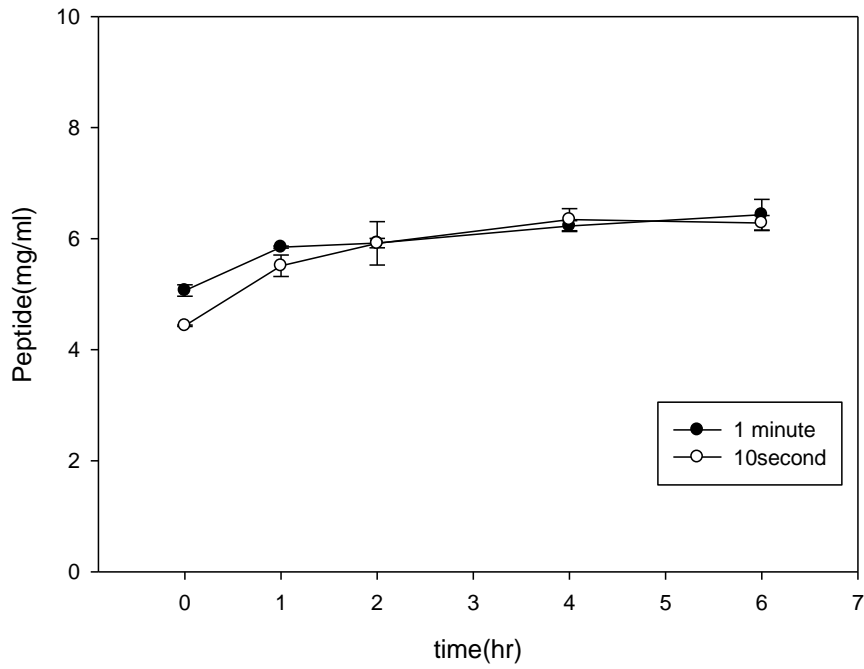


圖 4-5 雞腿磨均質時間對水解溫度 60°C 自體溶解產生胜肽含量的影響
 作用條件: 水解溫度 60°C、pH 6；震盪速率為 100rpm

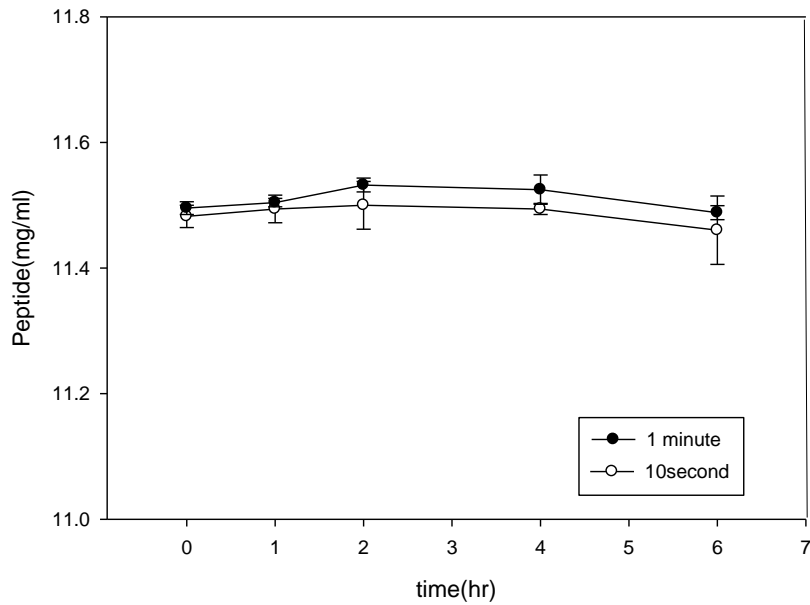


圖 4-6 朱紅栓均質時間對水解溫度 40°C 自體溶解產生胜肽含量的影響
 作用條件: 水解溫度 40°C、pH 4；震盪速率為 100rpm

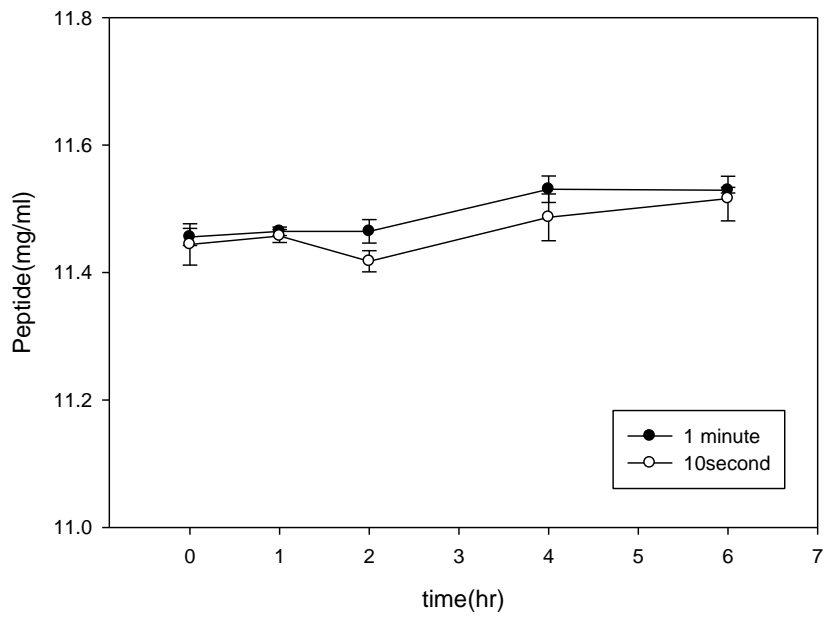


圖 4-7 朱紅栓均質時間對水解溫度 50°C 自體溶解產生胜肽含量的影響

作用條件: 水解溫度 50°C、pH 4；震盪速率為 100rpm

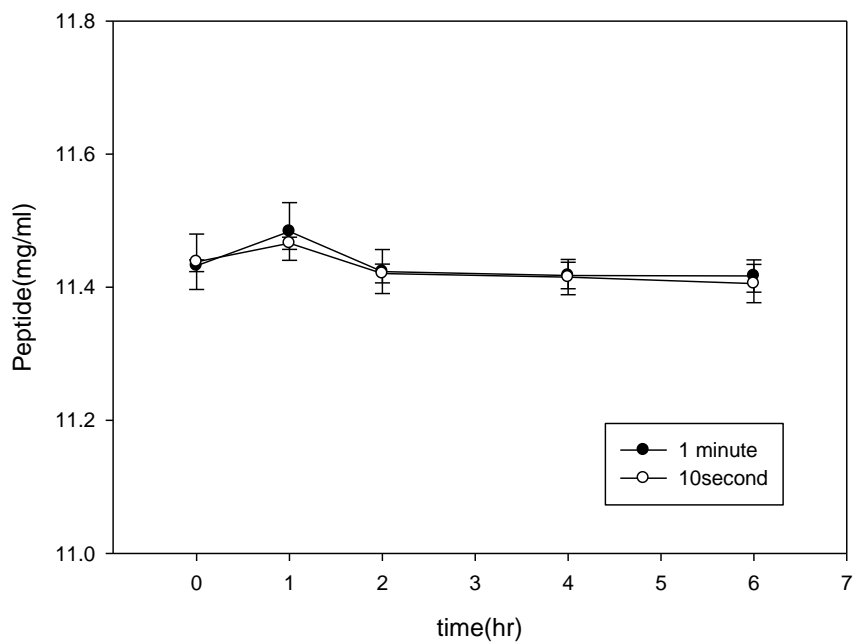


圖 4-8 朱紅栓均質時間水解溫度 60°C 對自體溶解產生胜肽含量的影響

作用條件: 水解溫度 60°C、pH 4；震盪速率為 100rpm

4-3 改變水解條件菌絲體自體溶解對生理活性成分含量之影響

高度液泡化和衰退區的菌絲蛋白質、細胞多醣體及細胞質內物質會被降解，當大規模的液泡化及菌絲破碎時，發現蛋白質水解酵素活性將會提升，自體溶解的菌絲會利用酵素作用轉化成胺基酸和能量來源，本實驗藉由改變水解溫度及 pH 促進菌絲自體溶解將內部之有效成分釋放出來。測定雞腿磨及朱紅栓菌之胜肽及總酚含量之生理活性成分評估。

4-3-1 改變自體溶解條件對菌絲體自體溶解生成胜肽含量之影響

酵素活性決定於周遭環境的影響，要進行酵素水解時需選擇其最適 pH 值與溫度以利於酵素反應的進行。以下實驗探討最佳的溫度與 pH 值使菌絲體自體溶解出胜肽與總酚。

4-3-1-1 改變自體溶解條件對雞腿磨菌自體溶解生成胜肽含量之影響

雞腿磨菌由圖 4-9 知胜肽含量隨著水解時間增加而提升，40°C 剛開始一小時胜肽含量生成量不多，推測可能原因是溫度低較不適合雞腿磨菌之酵素作用，使自體溶解速度較緩慢，水解時間需要六小時才會達到 8 mg/ml 以上。

50°C 一開始自體溶解速度快速，一個小時後可水解出 2.74mg/ml 的胜肽，使胜肽含量達到 8.13mg/ml，過兩小時後水解速度漸緩胜肽含量增加緩慢，將水解定於兩小時為最佳水解時間。60°C 經過一小時的水解出 0.78mg/ml 之胜肽，後面生成胜肽量趨緩推測可能是因為溫度較高，使雞腿磨菌之酵素被破壞導致水解速

度變慢。綜合上面結論知水解溫度 50°C 時，胜肽生出的胜肽量最高所以後續實驗為固定 50°C 改變 pH 值，測定胜肽含量是否有改變。

將雞腿麴菌自體溶解溫度固定於 50°C 改變 pH 值，圖 4-8 可明顯看出雞腿麴菌在 pH 值 6 時，胜肽含量明顯較高，可知雞腿麴菌自體溶解酵素最佳 pH 為 6。陳(2006)結果得知在 50°C、pH6 有最高自體溶解率 66.92% 且並說明在酸性條件下不利於雞腿麴菌自體溶解，本實驗結果也在 50°C、pH6 時有最佳的胜肽生成。綜合溫度與 pH 的結果，雞腿麴菌生成胜肽的最佳水解條件為溫度 50°C 及 pH 值為 6[68]。

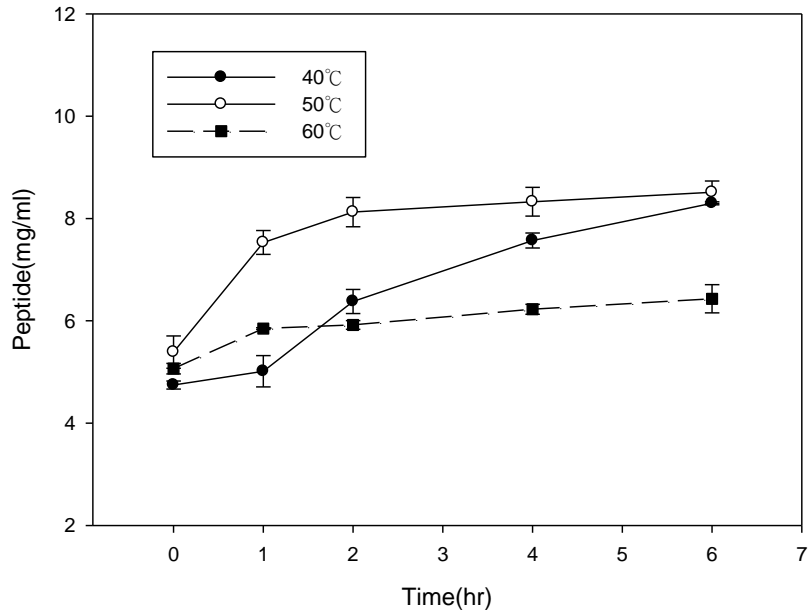


圖 4-9 不同水解溫度對雞腿麴菌自體溶解生成胜肽含量之影響
 作用條件: 溫度 40°C、50°C、60°C；pH 6；震盪速率為 100rpm

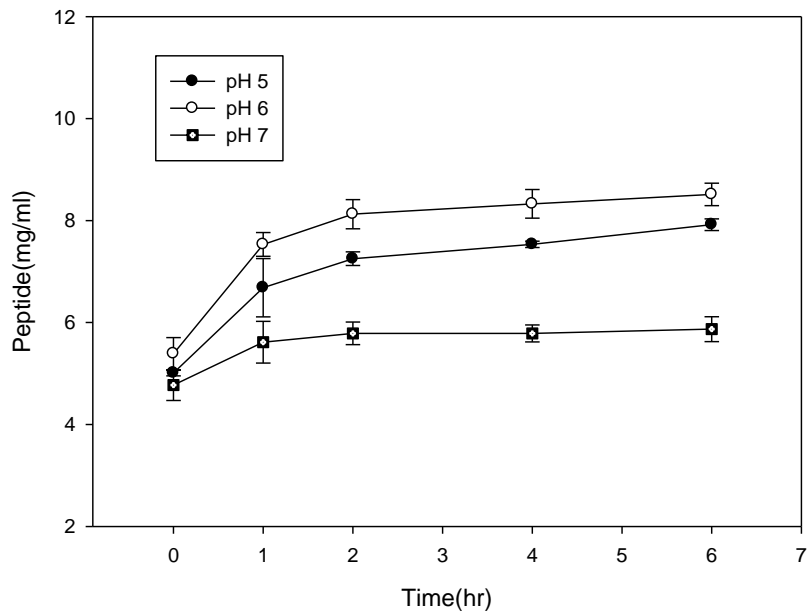


圖 4-10 不同水解 pH 值對雞腿麴菌自體溶解生成胜肽含量之影響
 作用條件: 溫度 50°C；pH 5、6、7；震盪速率為 100rpm

4-3-1-2 改變自體溶解條件對朱紅栓菌自體溶解生成胜肽含量之影響

朱紅栓菌自體溶解實驗固定 pH 4 改變溫度，從圖 4-11 可知 50°C 在兩小時後生成出 0.06mg/ml 的胜肽量，而 40°C、60°C 生成胜肽緩慢含量則沒有太大變化。

將朱紅栓菌自體溶解溫度固定於 50°C 改變 pH 值，圖 4-12 顯示 pH 5 兩小時候生成 10.69 mg/ml 胜肽，pH 3、pH 4 胜肽含量變化微小可能酸性條件下不利自體溶解反應，綜合上述結論朱紅栓菌最佳水解條件為溫度 50°C、pH5。

雞腿麩與朱紅栓以生成胜肽量做比較，雞腿麩菌比自體溶解效果明顯，原因是在第六天時幾丁質酵素活性雞腿麩菌酵素活性 0.629 U 而朱紅栓菌 0.142 U，幾丁質酵素會將為真菌細胞壁之主要成分幾丁質分解，使細胞破裂放出胞內物質並分解，所以幾丁質酵素活性越高自體溶解效果越好因此雞腿麩自溶水解過程中胜肽變化較明顯。

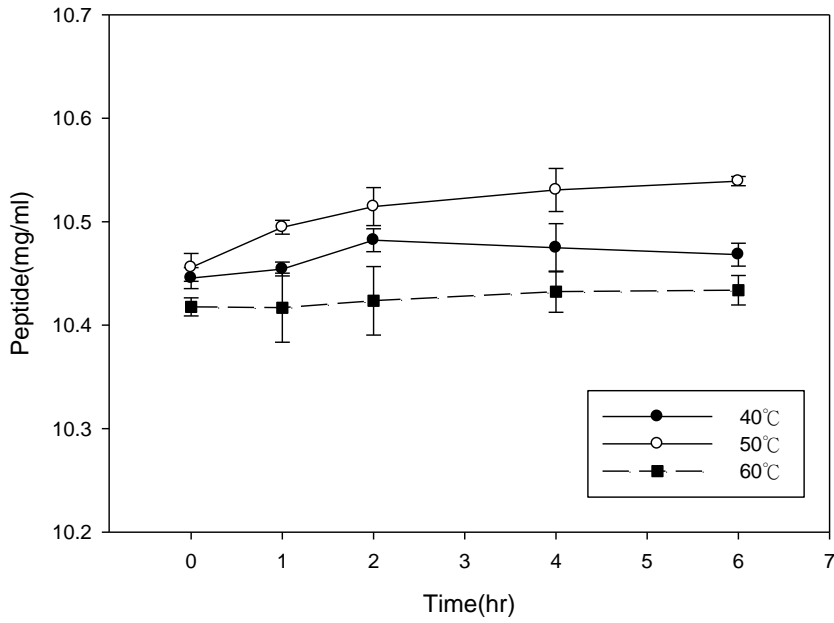


圖 4-11 不同水解溫度對朱紅栓菌自體溶解生成胜肽含量之影響
 作用條件: 溫度 40°C、50°C、60°C；pH4；震盪速率為 100rpm

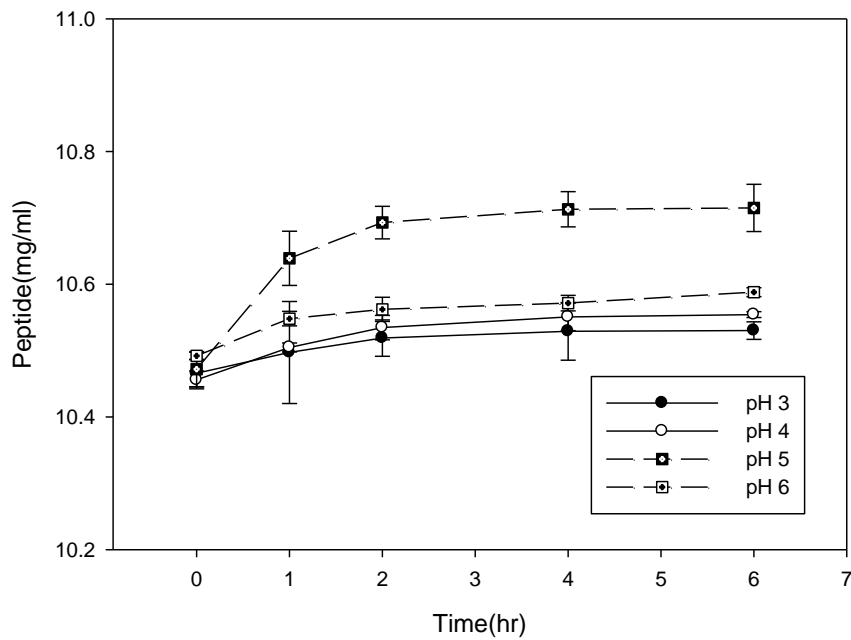


圖 4-12 不同水解 pH 值對朱紅栓菌自體溶解生成胜肽含量之影響
 作用條件: 溫度 50°C；pH 3、pH 4、pH 5、pH 6；震盪速率為 100rpm

4-3-2 改變自體溶解條件對菌絲體自體溶解產生總酚含量之影響

從文獻知不僅是胜肽可以抗氧化，還有總酚容易供出本身之氫給不安定的自由基分子後，本身形成穩定的抗氧化自由基分子也是有效的抗氧化成分[48]，接下實驗改變水解條件總酚是否有變化。

研究指出酚類化合物具有良好的抗氧化和抗腫瘤等特性，多酚中有鄰位酚羥基、苯環及雙鍵結構的多酚類抗氧化活性最強；本實驗利用 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 可與酚類化合物 OH 基反應，而多酚類或含有酚基之胺基酸均會將 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 還原成藍色。測定水解物總酚類化合物含量，以不同濃度的 gallic acid 做成檢量線，樣品中總酚類化合物的含量由檢量線換算其相當的 gallic acid 之含量，單位以每毫升水解物所含 gallic acid 之當量毫克數表示。

4-3-2-1 改變自體溶解條件對雞腿麩菌自體溶解產生總酚含量之影響

雞腿麩菌隨著自體溶解時間增長總酚含量緩慢的上升，圖 4-13 40°C、50°C 水解六小時達到最高量分別為 0.97 mg/ml、0.99 mg/ml。60°C 水解生成總酚的變化較不明顯，推測可能原因溫度較高無法使酵素有效分解。因 50°C 有較好的總酚含量，所以接下實驗自體溶解溫度固定 50°C 改變 pH 測定總酚含量。圖 4-14 知 pH5、pH6 水解時均有上升的趨勢，當 50°C、pH 為 6 水解兩小時總酚含量 0.911mg/ml。綜合前述實驗自體溶解胜肽及總酚最好的水解條件均在 50°C、pH 6。

4-2-2-2 改變自體溶解條件對朱紅栓菌自體溶解產生總酚含量之影響

朱紅栓菌結果與雞腿麩菌相同，自體溶解時間增長總酚含量上升，圖 4-15 知 50°C、60°C 自體溶解生成總酚效果明顯，最好為 50°C。當自體溶解兩小時後水解出 0.12 mg/ml 之總酚，接下實驗為固定 50°C 改變 pH 值測定總酚含量。圖 4-16 朱紅栓菌自體溶解溫度 50°C，pH 值為 3、4、5、6 自體溶解兩小時後總酚含量趨於平緩，pH 5 自體溶解兩小時總酚量變化較明顯可水解出 0.19 mg/ml 使總酚含量達到 0.878 mg/ml。綜合上述結果朱紅栓菌自體溶解生成最佳胜肽與總酚含量為 50°C、pH 5。

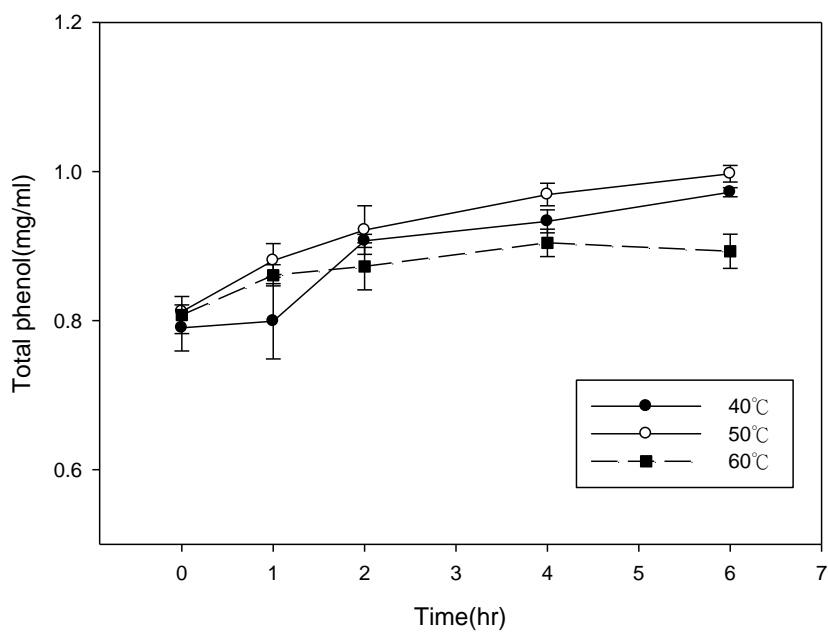


圖 4-13 不同水解溫度對雞腿蘑菌自體溶解產生總酚含量之影響
 作用條件: 溫度 40°C、50°C、60°C；pH 6；震盪速率為 100rpm

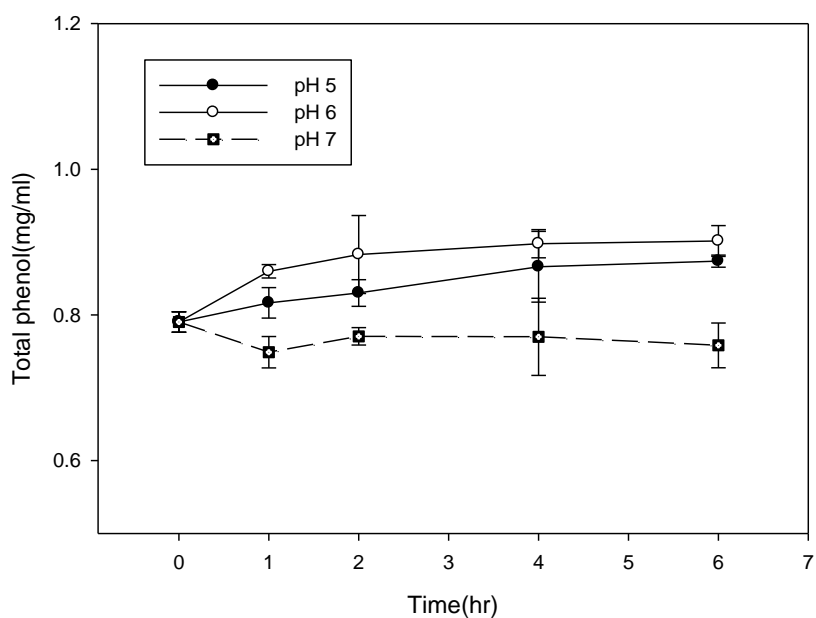


圖 4-14 不同水解 pH 值對雞腿蘑菌自體溶解產生總酚含量之影響
 作用條件: 溫度 50°C；pH 5、6、7；震盪速率為 100rpm

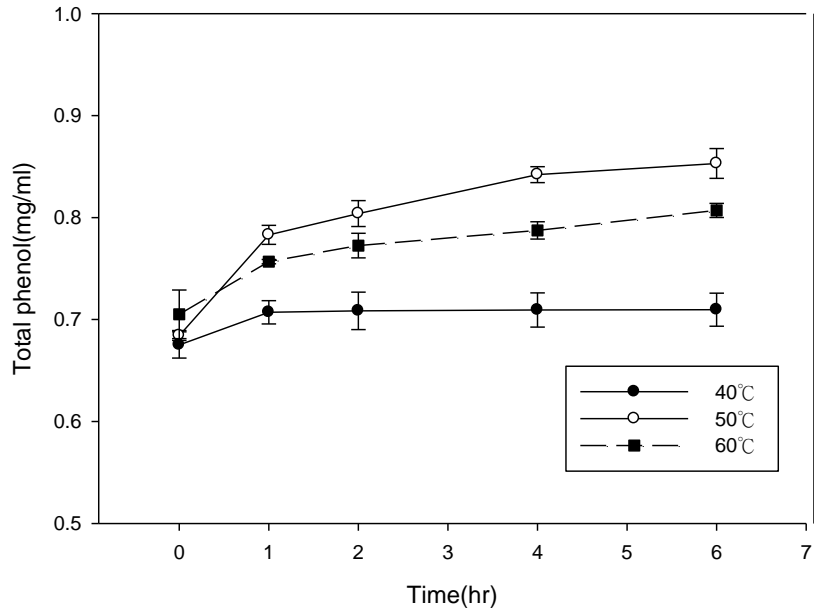


圖 4-15 不同水解溫度對朱紅栓菌自體溶解產生總酚含量之影響
 作用條件: 溫度 40°C、50°C、60°C；pH 4；震盪速率為 100rpm

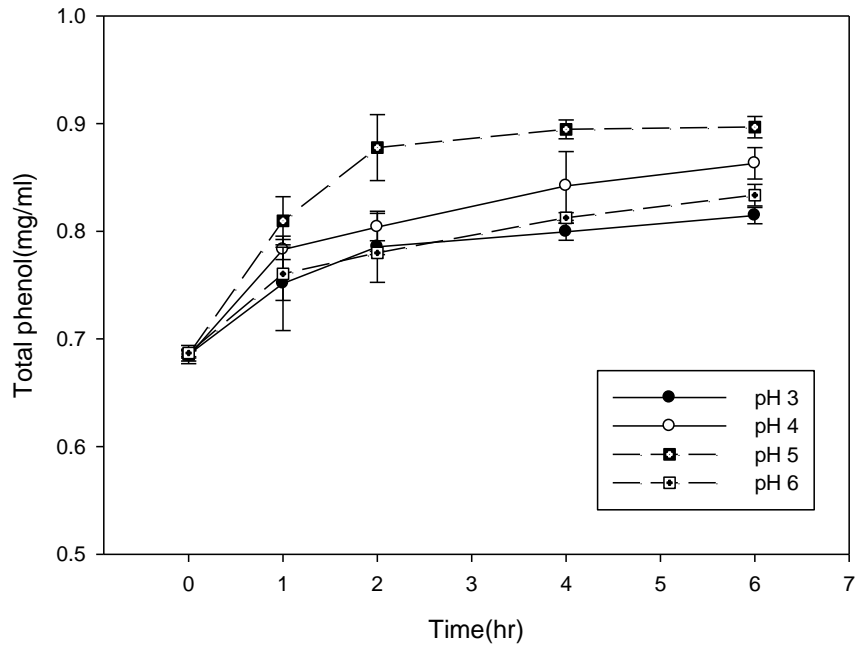


圖 4-16 不同水解 pH 值對朱紅栓菌自體溶解產生總酚含量之影響
 作用條件: 溫度 50°C；pH 3、pH 4、pH 5、pH 6；震盪速率為 100rpm

4-3-3 改變水解條件菌絲體自體溶解對捕捉 DPPH 能力之變化

測定捕捉 DPPH 能力是利用物質釋放氫氧基上的氫原子，提供一個電子或直接供給氫原子給 DPPH 自由基使其形成較穩定的型式，DPPH 在 517 nm 波長下具有高吸光值，若抗氧化劑與自由基結合時其吸光值會降低，故可藉由對 DPPH 自由基捕捉率之能力測定，來評估抗氧化活性。

4-3-3-1 改變水解條件雞腿麩菌自體溶解對捕捉 DPPH 能力之變化

由於雞腿麩菌捕捉 DPPH 能力顯著，所以將水解物以兩倍稀釋測定。從圖 4-17 顯示當自體溶解時間增加清除 DPPH 能力也上升，抗氧化能力最好為水解溫度 50°C 並自體溶解兩小時與六小時後清除 DPPH 能力分別為 82.9%、85.3%。由實驗結果得知雞腿麩菌自體溶解溫度為 50°C 時清除 DPPH 能力比 40°C、60°C 效果好，所以接下固定溫度 50°C 改變 pH 值。

圖 4-18 水解兩小時後 pH 5、6、7 清除 DPPH 能力分別為 79.1%、82.9%、76.3%，而隨著水解時間增加清除 DPPH 能力均有上升趨勢，但 pH7 上升趨勢不明顯推測原因前述實驗中水解溫度 50°C、pH7 自體溶解過程中胜肽與總酚只有少量的變化，所以導致清除 DPPH 能力沒有明顯的提升。對照前述實驗測定胜肽與總酚含量，自體溶解溫度為 50°C、pH 6 時為最高，而清除 DPPH 效果最好為溫度 50°C、pH 6，從此可推知清除 DPPH 能力來自胜肽與總酚且由文獻知胜肽與總酚具有抗氧化能力。[16, 47]

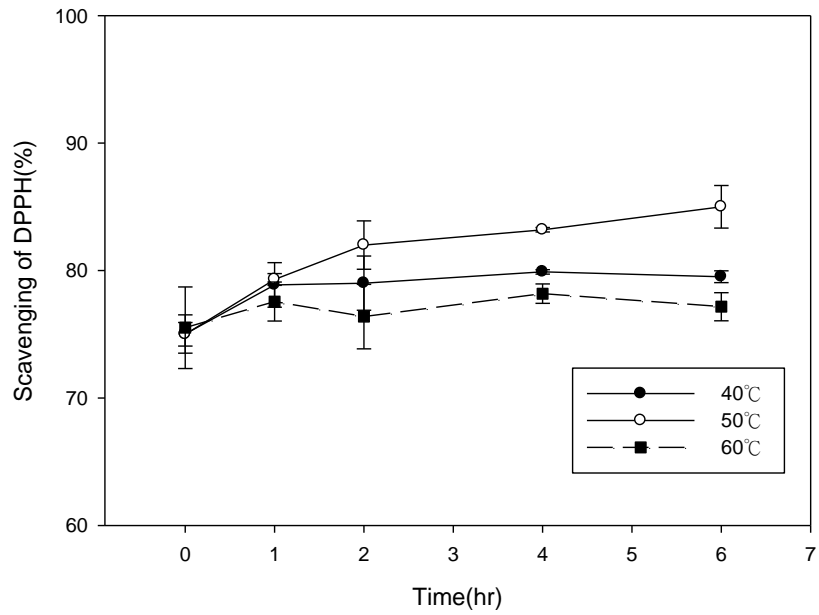


圖 4-17 不同水解溫度對雞腿麴菌自體溶解捕捉 DPPH 能力之影響

作用條件: 溫度 40°C、50°C、60°C；pH 6；震盪速率為 100rpm

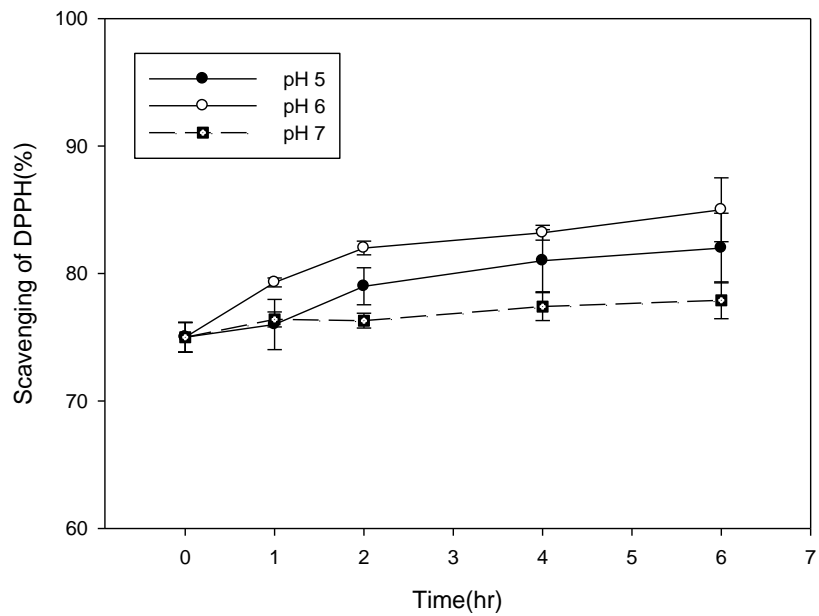


圖 4-18 不同水解 pH 值對雞腿麴菌自體溶解捕捉 DPPH 能力之影響

作用條件: 溫度 50°C；pH 5、6、7；震盪速率為 100rpm

4-3-3-2 改變水解條件朱紅栓菌自體溶解對捕捉 DPPH 能力之變化

圖 4-19 結果得知朱紅栓菌結果與雞腿麴菌相同，隨著自體溶解時間拉長清除 DPPH 能力增強。50°C 效果最好，自體溶解兩小時及四小時捕捉 DPPH 能力分別為 46.9%、55.4% 接著效果趨於平緩，而 60°C 水解六小時後清除率也可到達 53.8%，就時間效率而言 50°C 優於 60°C。

因自體溶解溫度 50°C 效果最好所以接下實驗將溫度固定 50°C 改變 pH 值，圖 4-20 顯示 pH5 能力最好，自體溶解兩小時及四小時捕捉 DPPH 能力分別為 61.3%、66.4%。綜合上述結果得知朱紅栓菌自體溶解溫度 50°C、pH 5 為最佳條件。

對照前述實驗測定胜肽與總酚含量，自體溶解溫度為 50°C、pH 5 時為最佳的自體溶解條件，且水解時間拉長胜肽、總酚及清除 DPPH 能力均上升；溫度 60°C 自體溶解也有此現象，從此可印證與雞腿麴菌結果相符，清除 DPPH 能力來自胜肽與總酚。而 40°C 因為自體溶解兩小時後胜肽與總酚含量只有些微增加量使得 40°C 自體溶解兩小時後清除能力就趨於平緩。

將雞腿麴菌與朱紅栓菌捕捉 DPPH 能力結果做比較，雞腿麴菌測定時需稀釋兩倍而朱紅栓菌不需稀釋，自體溶解兩小時後，雞腿麴菌效果最好為 82.9%、朱紅栓為 61.3%，可知雞腿麴菌抗氧化效果優於朱紅栓菌。

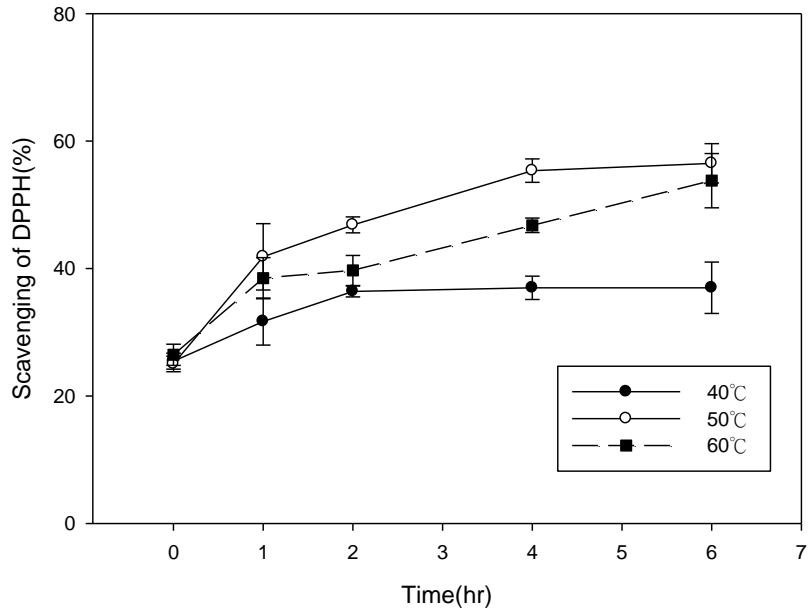


圖 4-19 不同水解溫度對朱紅栓菌自體溶解捕捉 DPPH 能力之影響

作用條件: 溫度 40°C、50°C、60°C；pH 4；震盪速率為 100rpm

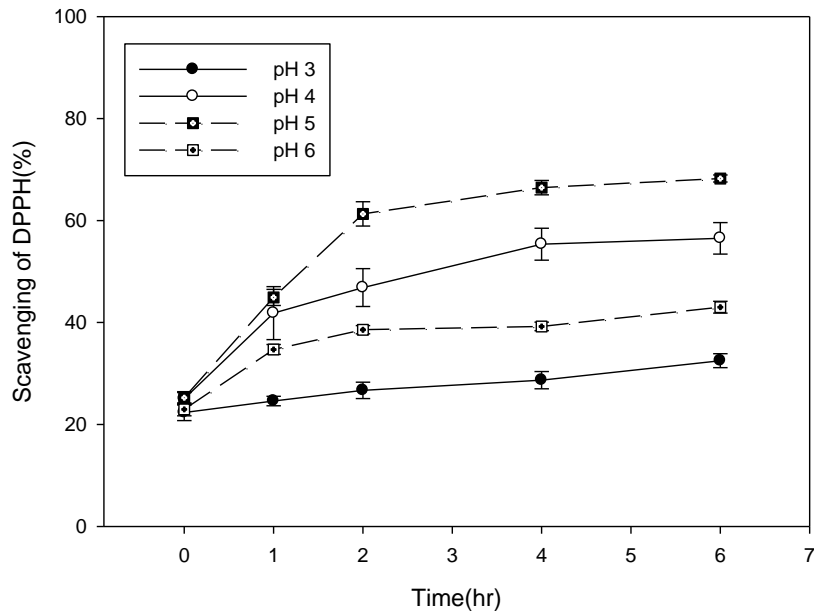


圖 4-20 不同水解 pH 值對朱紅栓菌自體溶解捕捉 DPPH 能力之影響

作用條件: 溫度 50°C；pH 3、4、5、6；震盪速率為 100rpm

4-4 添加酵素對菌絲體自體溶解之影響

胺基酸以胜肽鍵 (peptide bond)彼此共價結合而形成蛋白質，此胜肽鍵是以一個胺基酸的羧基與另一個胺基酸的胺基所組成。完整的蛋白質其分子量過大，經過水解後蛋白質變成小分子胜肽容易有效及快速被人體所吸收[19]。

幾乎所有的酵素構造均為蛋白質，不易生成出有害的物質，並可保留營養價值甚至增加具有生理活性的物質。本酵素水解實驗中添加 Bromelain、Papain、Xylanase 添加 1%(w/v) 酵素為基準，在 0、1、2、4、6 小時下取樣進行胜肽、總酚含量測定與清除 DPPH 自由基能力測定。表 3-6 為三種酵素作用條件。

4-4-1 添加酵素對菌絲體自體溶解胜肽成分含量之影響

實驗中所用的三種酵素，蛋白分解酵素為 Bromelain、Papain，將蛋白質分解成胜肽或更小分子的氨基酸；Xylanase 用來分解香菇與植物細胞壁。

圖 4-21、圖 4-22 分別為雞腿麩菌、朱紅栓菌添加不同酵素比較其胜肽含量，對照前述自體溶解之實驗，可知添加酵素後在兩小時內可生成之胜肽含量效果優於自體溶解。蛋白質分解能力最好為 Bromelain，而 Papain 酵素活性在一小時後才增強，兩種酵素的水解作用均在兩小時後趨於平緩。第三種酵素 Xylanase 將菌絲體之細胞壁分解將內部細胞質釋放，所以可生成之胜肽含量較少。

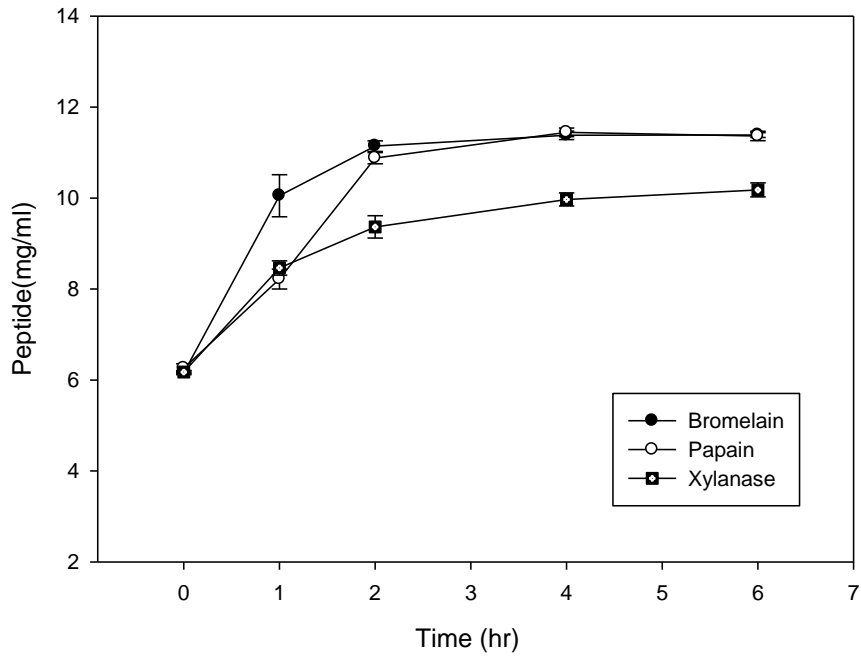


圖 4-21 添加酵素對雞腿蘑菇自體溶解產生胜肽含量之影響

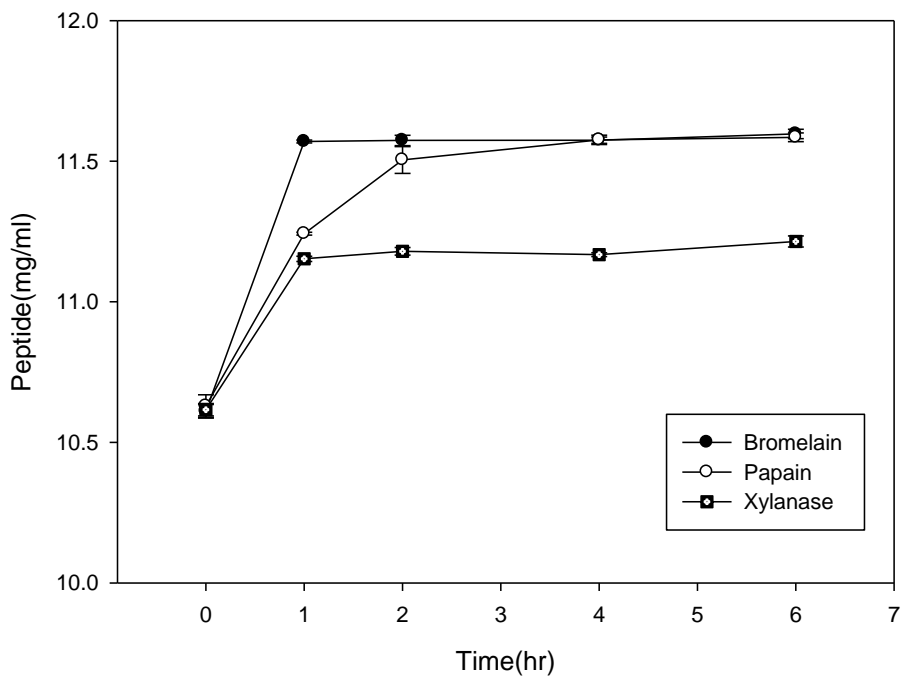


圖 4-22 添加酵素對朱紅栓菌自體溶解產生胜肽含量之影響

4-4-2 添加酵素對菌絲體自體溶解總酚成分含量之影響

雞腿麩與朱紅栓添加 Bromelein 與 Papain 兩種酵素可生成較多總酚，且在 0~1 小時快速生成，兩小後生成總酚量趨於平緩與生成胜肽結論相同。

從圖 4-23 可知雞腿麩菌添加酵素後會加速水解，以添加 Bromelein 與 Papain 兩種酵素可生成較多總酚，兩小時後可水解出 0.69mg/ml、0.63 mg/ml 使總酚含量分別為 1.38 mg/ml、1.36 mg/ml。與前述自體溶解實驗做比較，添加酵素可水解出總酚量比雞腿麩自體溶解多。圖 4-24 朱紅栓菌添加酵素水解，以添加 Bromelein 水解兩小時後水解出 0.21 mg/ml 使總酚含量為 0.92mg/ml，效果最好。雞腿麩與朱紅栓添加不同酵素水解之結果，均以添加 Bromelein 酵素生成較多的胜肽與總酚。

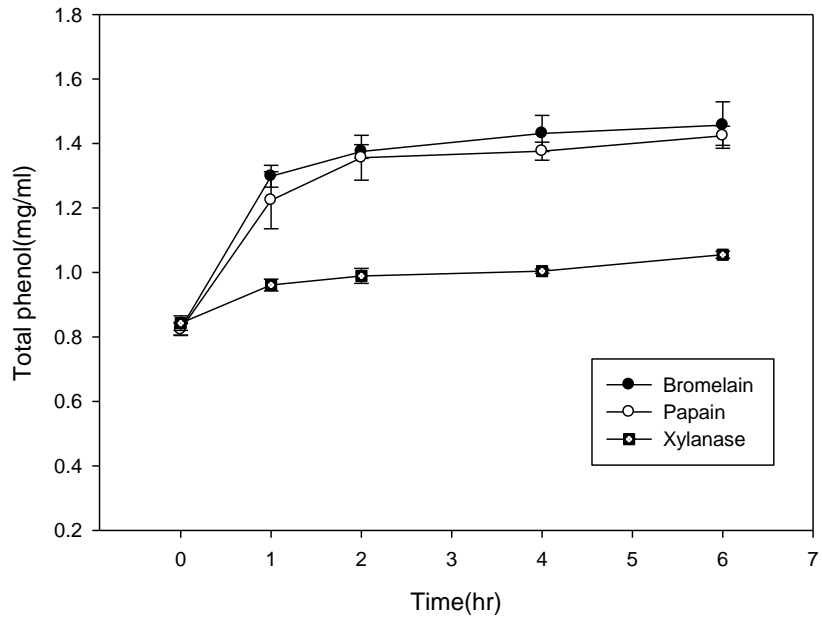


圖 4-23 添加酵素對雞腿蘑菌自體溶解產生總酚含量之影響

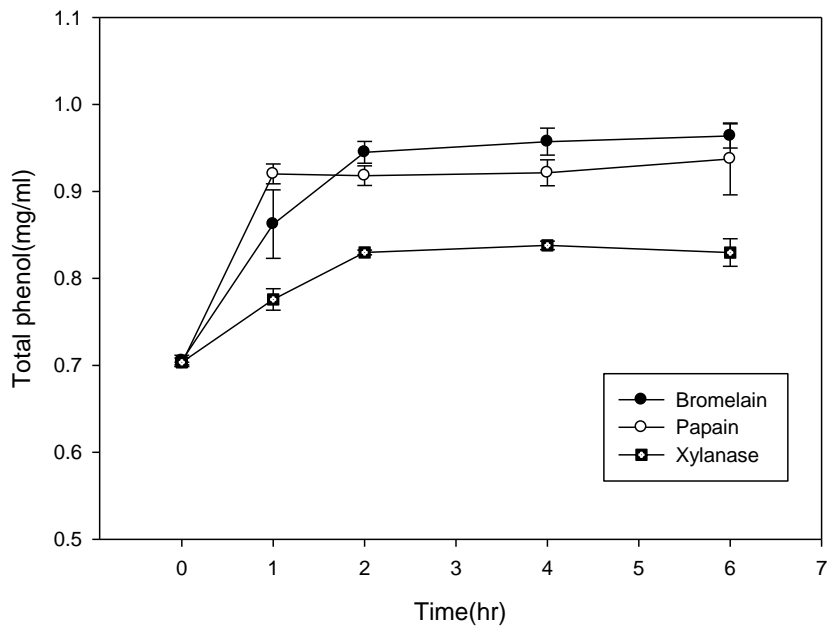


圖 4-24 添加酵素對朱紅栓菌自體溶解產生總酚含量之影響

4-4-3 添加酵素對菌絲體自體溶解捕捉 DPPH 能力之影響

雞腿麴菌添加酵素後捕捉 DPPH 能力如圖 4-25 所示，添加 Bromelein 酵素水解兩小時後捕捉能力大約提升 3%，提升幅度並不明顯，從文獻知雞腿麴多醣也具有抗氧化效果，推測在水解過程中具有清除能力之多醣並無增加所以使得提升幅度不明顯。圖 4-26 朱紅栓菌經過酵素水解後對捕捉 DPPH 能力明顯提升，兩小時後自體溶解 61.3% 而添加 Bromelein 酵素提升至 86.7% 增加 25.4%，隨著水解時間拉長，朱紅栓總酚含量相同大幅增加，推測朱紅栓抗氧化能力與總酚含量有關。蔡(2004)雞腿菇乙醇萃取物及熱水萃取物在 5 mg/ml 時的清除 DPPH 能力分別為 84.52%、49.98% [50]。林(2006)利用雞肉菇菌絲體甲醇熱萃液，在濃度 50 mg/mL 下清除率約 50%，而用乙醇冷萃液，在濃度 50 mg/mL 下清除率約 20% [69]。於(2005)將牡蠣抽出後利用食品用酵素水解 12 小時後，DPPH 清除力結果顯示 Prozyme 6 (78.4%)、Protease N (70.5%) 及 Protease A (65.7%) [70]，而本實驗雞腿麴菌經 Bromelein 酵素水解兩小時後 DPPH 清除力 83.18%，朱紅栓菌清除能力為 86.69%。

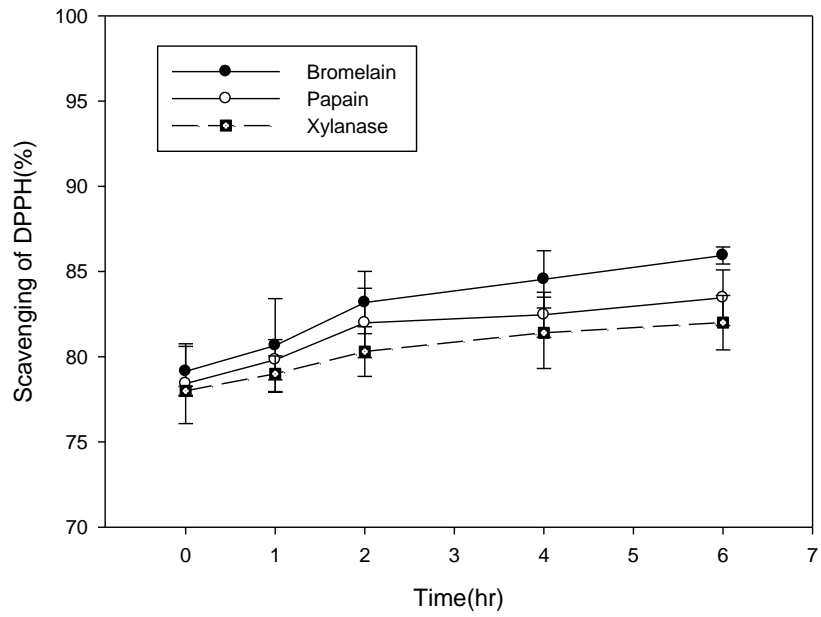


圖 4-25 添加酵素水解對雞腿麩菌自體溶解捕捉 DPPH 能力之影響

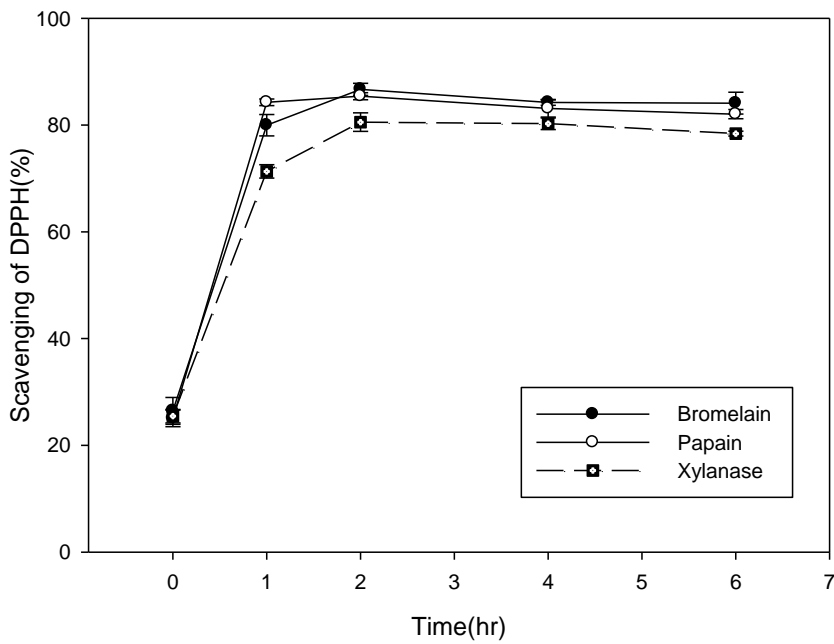


圖 4-26 添加酵素水解對朱紅栓菌自體溶解捕捉 DPPH 能力之影響

4-4 超過濾膜系統區分物血管收縮素轉化酶抑制活性及抗氧化活性之分析

4-4-1 區分物血管收縮素-I轉化酶抑制活性之關係

文獻指出具有 ACE 抑制效果的成分主要是食物中的蛋白質經過酵素分解後所產生之短鏈胜肽，其鏈長多在 2-14 個胺基酸，而胺基酸的平均分子量是 110，所以具有 ACE 抑制效果之胜肽分子量大約 200~1600Da。因前述自體溶解實驗結果顯示，雞腿蘑自體溶解水解條件為 50°C、pH6 而朱紅栓菌自體溶解條件 50°C、pH6 均有較佳的胜肽含量，添加 Bromelain 酵素胜肽含量較多，且水解兩小時後胜肽量趨於平緩，所以將自體溶解兩小時以及添加 Bromelain 酵素水解兩小時之水解物經超過濾膜系統做分子量區分。

圖 4-27、圖 4-28 雞腿蘑菌在自體溶解與添加酵素水解實驗中，水解物分子量越大胜肽含量越高但抑制 ACE 活性能力卻是降低，推測有用的胜肽分子量為小於 1 kDa。從表 4-1、4-2 ACE 半抑制濃度表中，可比較出雞腿蘑自體溶解與添加酵素之結果，因添加酵素後分子被酵素水解成較小之分子，使得抑制 ACE 能力明顯提升，自體溶解與添加酵素水解兩者效果最好均為 <1kDa 之區分物，ACE 半抑制濃度分別 10.82、5.35(mg/ml)。

而朱紅栓菌在自體溶解與酵素水解之實驗中，可從圖 4-29、4-30 得到與雞腿蘑相同之結果，當分子量越大時所含的胜肽含量越高但抑制 ACE 之能力卻下降。從表 4-3、4-4 之 ACE 半抑制濃度表中，可比較出朱紅栓菌自體溶解與添加

酵素水解兩者效果最好均為<1kDa 之區分物，ACE 半抑制濃度分別 4.21、1.78 mg/ml。當添加酵素經水解後分子量較小的胜肽含量變多，相對的抑制 ACE 能力提升。將雞腿蘑與朱紅栓兩者<1 kDa 分子之 ACE 半抑制濃度做比較，可知朱紅栓菌水解物抑制 ACE 活性優於雞腿蘑菌。

表 4-5 為菌絲體取出並使用冷水及乙醇超音波萃取一小時後所測得之 ACE 半抑制濃度，可知使用冷水萃取後抑制 ACE 能力較佳，雞腿蘑與朱紅栓菌絲體冷水萃取 ACE 半抑制濃度分別為 12.46、2.37 mg/ml。與前述實驗做比較，使用添加酵素水解後分子<1 kDa 時 ACE 半抑制濃度雞腿蘑 5.35 mg/ml、朱紅栓 1.78 mg/ml，結果顯示添加酵素水解且分子量<1 kDa 時抑制 ACE 能力優於菌絲體冷水萃取。葉(2010)將雞腿蘑與朱紅栓菌絲體取出並以冷水萃取 15 小時，雞腿蘑菌半抑制濃度 13.5 mg/ml、朱紅栓菌為 2.54mg/ml，結果也顯示朱紅栓菌抑制 ACE 效果較佳；朱紅栓菌取菌絲體出來做自體溶解與酵素水解，水解兩小時後抑制 ACE 活性分別為 64%、75%[71]。而與本實驗相較之下，可能因本實驗為整體均質液發酵液中亦含有抑制 ACE 之小胜肽所以有較佳的結果。

黃(2009)研究將雞蛋蛋白粉末用蛋白質水解酵素 Thermolysin 進行水解經超膜過濾後的 10kDa 濾液、3kDa 濾液以及 1kDa 濾液，分別做 ACE 抑制活性測試可發現隨分子量下降，ACE 抑制活性有逐漸提高的趨勢[72]。與本實驗結果一致，分子量<1kDa 抑制 ACE 能力較好。

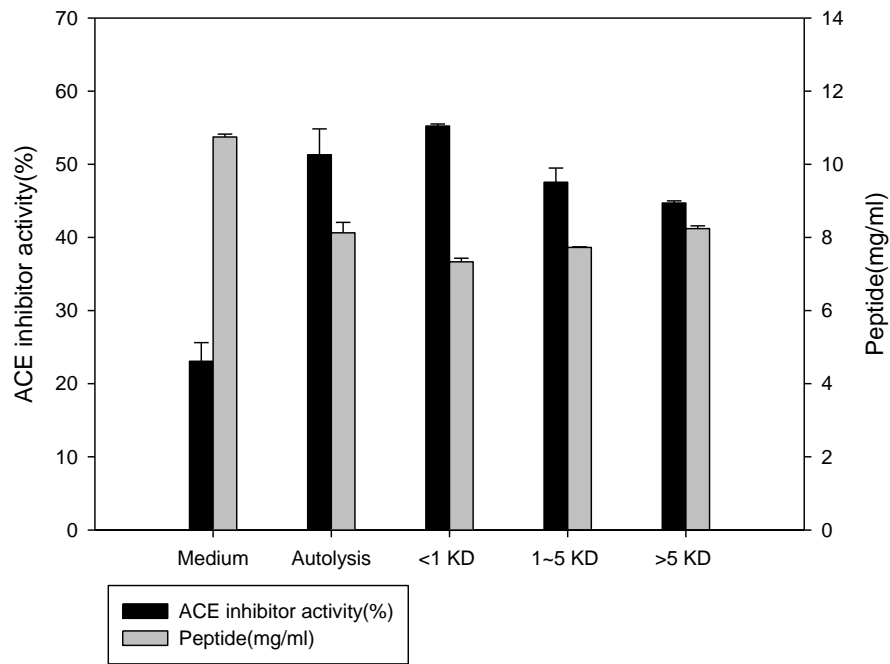


圖 4-27 雞腿蘑菇自體溶解之區分物與抑制 ACE 活性關係

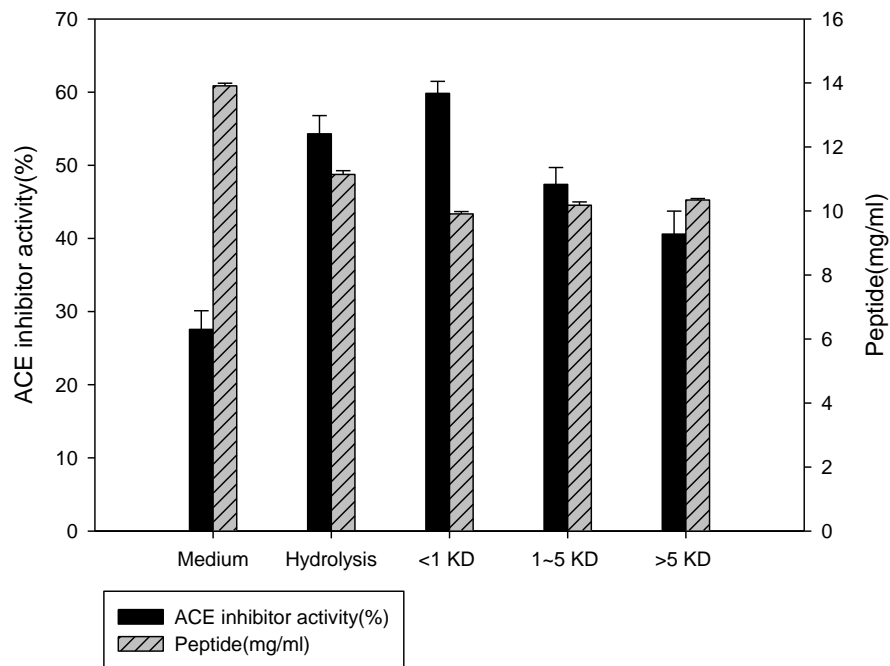


圖 4-28 雞腿蘑菇添加 Bromelain 水解之區分物與抑制 ACE 活性關係

表 4-1 雞腿麴菌自體溶解區分物與 ACE 半抑制濃度之關係

Molecular size	IC ₅₀ (mg/ml)
Autolysis	13.73
< 1kDa	10.82
1~ 5kDa	12.32
> 5kDa	15.51

表 4-2 雞腿麴菌添加 Bromelain 酵素區分物與 ACE 半抑制濃度之關係

Molecular size	IC ₅₀ (mg/ml)
Hydrolysis	7.89
< 1kDa	5.35
1~ 5kDa	6.73
> 5kDa	10.26

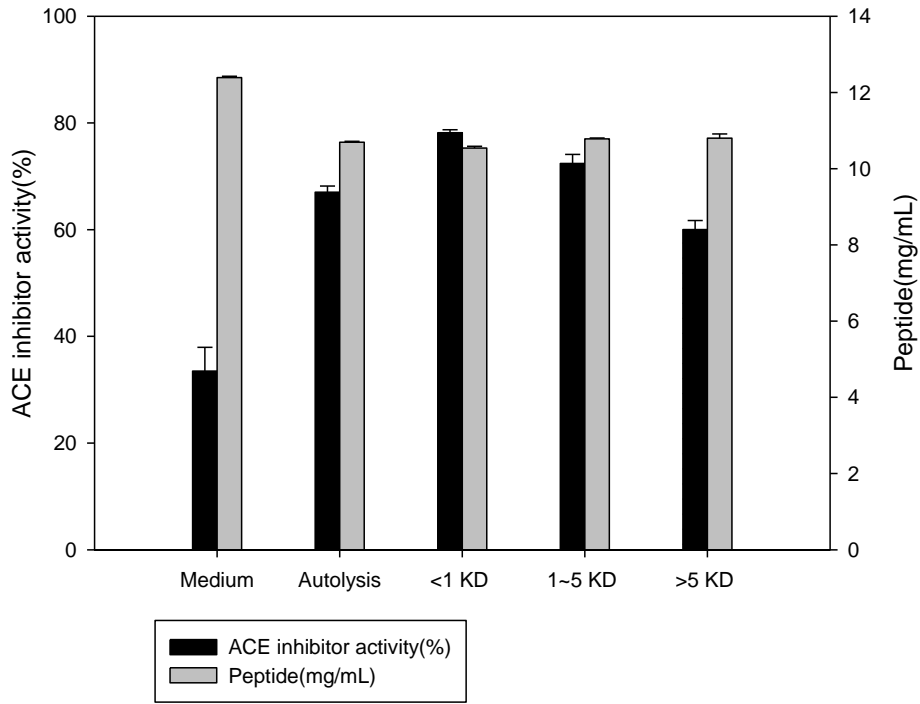


圖 4- 29 朱紅栓菌自體溶解之區分物與抑制 ACE 活性關係

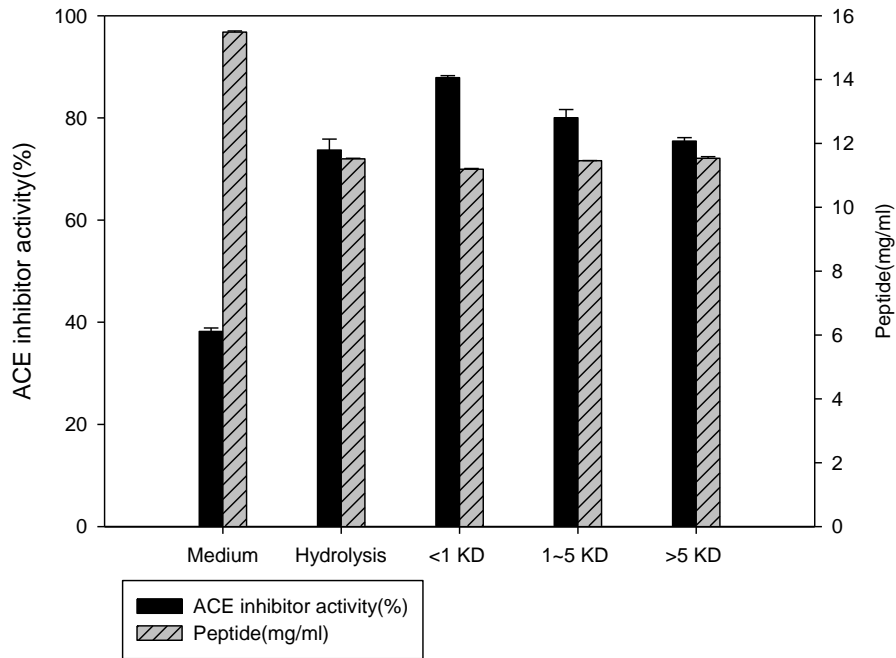


圖 4- 30 朱紅栓菌添加 Bromelain 水解之區分物與抑制 ACE 活性關係

表 4-3 朱紅栓菌自體溶解區分物與 ACE 半抑制濃度之關係

Molecular size	IC50 (mg/ml)
Autolysis	9.86
< 1kDa	4.21
1~ 5kDa	7.62
> 5kDa	11.17

表 4-4 朱紅栓菌添加 Bromelain 酵素區分物與 ACE 半抑制濃度之關係

Molecular size	IC50 (mg/ml)
Hydrolysis	5.84
< 1kDa	1.78
1~ 5kDa	4.14
> 5kDa	7.56

表 4-5 菌絲體之 ACE 半抑制濃度

Sample	IC50 (mg/ml)	
	H ₂ O	EtOH
<i>Coprinus cinereus</i>	12.46	25.42
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	3.27	9.53

4-4-2 區分物抗氧化之關係

抗氧化物主要來源有酚類化合物、具有抗氧化性質之胜肽、生育醇 (tocopherols)、抗壞血酸 (ascorbic acid) 等。具有抗氧化性能之水解胜肽，常取決於水解胜肽分子量大小、氨基酸組成及疏水性質；而多酚中有鄰位酚羧基極易被氧化，且對活性氧等自由基有較強的捕捉能力，使多酚具有很强的抗氧化能力，從文獻回顧知胜肽與總酚成分都與抗氧化有關。

前述自體溶解與添加酵素水解實驗結果顯示，雞腿蘑自體溶解水解條件為 50°C、pH6 而朱紅栓菌自體溶解條件 50°C、pH6 均有較佳的胜肽含量與總酚含量，且水解兩小時後清除 DPPH 能力趨於平緩，所以將自體溶解及添加酵素水解兩小時之水解物經超過濾膜系統做分子量區分，並測定抗氧化能力。雞腿蘑菌取未發酵基質未稀釋及已發酵之水解物以兩倍稀釋；朱紅栓菌未經發酵基質以及已發酵之水解物均未稀釋，測定 DPPH 自由基捕捉能力及還原力。

圖 4-31、4-33 知雞腿蘑菌自體溶解、酵素水解 2hr 後經超過濾膜區分，分子量越大胜肽與總酚含量越高，相對的捕捉 DPPH 能力及還原力均較好。圖 4-32 顯示，未發酵基質捕捉 DPPH 能力為 10.30%，而經發酵自體溶解 2hr 之水解物捕捉 DPPH 能力均達到 80% 以上；未發酵基質還原力 OD 值 0.382，經發酵且水解 2hr 之水解物 OD 值 2.0 以上。可知雞腿蘑菌絲體具有刺激清除自由基活性物質的產生，並非由基質本身而是經由發酵而來。分子量 5kDa 以上，兩倍稀釋後

做抗氧化測定效果仍然顯著，捕捉 DPPH 能力達到 89.19% 而還原力其 OD 值 2.311。

圖 4-34 雞腿麩菌添加 Bromelain 酵素水解分子量大於 5kDa 之捕捉 DPPH 能力 87.98%；比較圖 4-32、34 自體溶解與添加酵素分子量 1kDa 以下之捕捉 DPPH 能力，發現添加酵素後分子量 1kDa 以下清除率會增加。

表 4-5、4-6 為雞腿麩清除 DPPH IC_{50} 結果，得知添加酵素水解之清除 DPPH 能力較強，在自體溶解效果最好是 <1kDa 之區分物 IC_{50} 為 4.78 mg/ml；而添加酵素後效果最好是 1~5kDa 之區分物 IC_{50} 為 1.89 mg/ml，文獻指出分子量 <1kDa 以及 1~3 kDa 有較佳的清除 DPPH 能力 [47]，推測較多大分子被酵素水解成 1~3 kDa 的分子，使得添加酵素水解為 1~5kDa 區分物清除能力提升。表 4-10 將雞腿麩菌絲體取出做冷水以及乙醇萃取，以冷水萃取清除 DPPH 之 IC_{50} 為 5.88 mg/ml 效果較佳。與前述實驗比較，添加酵素水解分子量 1~5kDa 之 IC_{50} 為 1.89 mg/ml，清除 DPPH 效果優於冷水萃取。

朱紅栓自體溶解(圖 4-36)經超過濾系統膜做分子大小區分，結果顯示分子量 1~5kDa 及 5kDa 抗氧化能力相近，清除 DPPH 自由基分別為 72.22%、70.27%；而還原力在 700nm 的吸收值為 1.86、1.84。圖 4-38 朱紅栓添加 bromelain 酵素水解，1~5kDa 效果最好清除 DPPH 自由基 85.21% 而還原力吸收值為 1.92。

從表 4-8、4-9 得知朱紅栓添加酵素水解之清除 DPPH 能力較優，在自體溶解效果最好是 1~5kDa 之區分物 IC_{50} 為 4.03 mg/ml；而添加酵素後效果最好是 <1Da 之區分物 IC_{50} 為 2.60 mg/ml，因添加酵素大分子被水解，所以 <1kDa 分子

變多使得區分物效果提升。表 4-10 朱紅栓菌以冷水萃取 IC_{50} 為 3.05 mg/ml，與前述實驗比較，添加酵素水解分子量 <1kDa 之 IC_{50} 為 2.60 mg/ml，清除 DPPH 效果優於冷水萃取。

從前述實驗知添加酵素水解中分子量 <5kDa 抗氧化能力會提升，據此推測分子量小於 5kDa 的胜肽或總酚具有清除 DPPH 自由基及還原力之能力。王(2009)將脫脂淘汰雞胸肉與鵝胸肉水解物用 alcalase 酵素水解測定其抗氧化性質，結果顯示分子量 1,355-6,512 Da 和小於 1,355Da 的胜肽或游離胺基酸都具有清除氫氧自由基的能力，也證實小分子具有較好的抗氧化力[73]。

表 4-10 菌絲體萃取中以朱紅栓冷水萃取清除 DPPH 能力效果最佳，與前述實驗中所得為雞腿蘑有較佳的抗氧化能力相反，由於文獻指出雞腿蘑菌多醣具有良好的抗氧化性質[74]，推測前述實驗中含有發酵液，而發酵液中的多醣也具有抗氧化性質，使得在自體溶解及添加酵素實驗中雞腿蘑抗氧化能力較好。

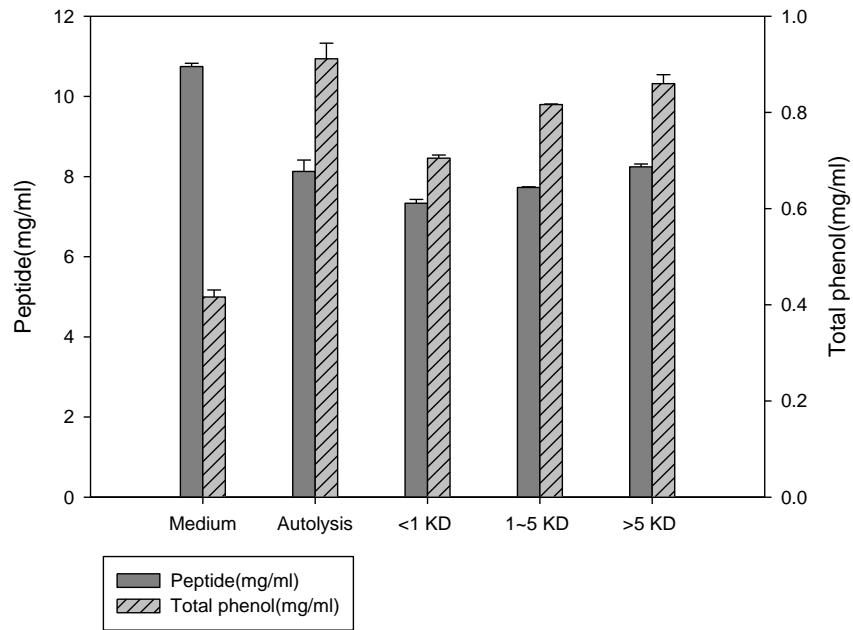


圖 4- 31 雞腿蘑菇自體溶解之區分物與胜肽、總酚含量關係

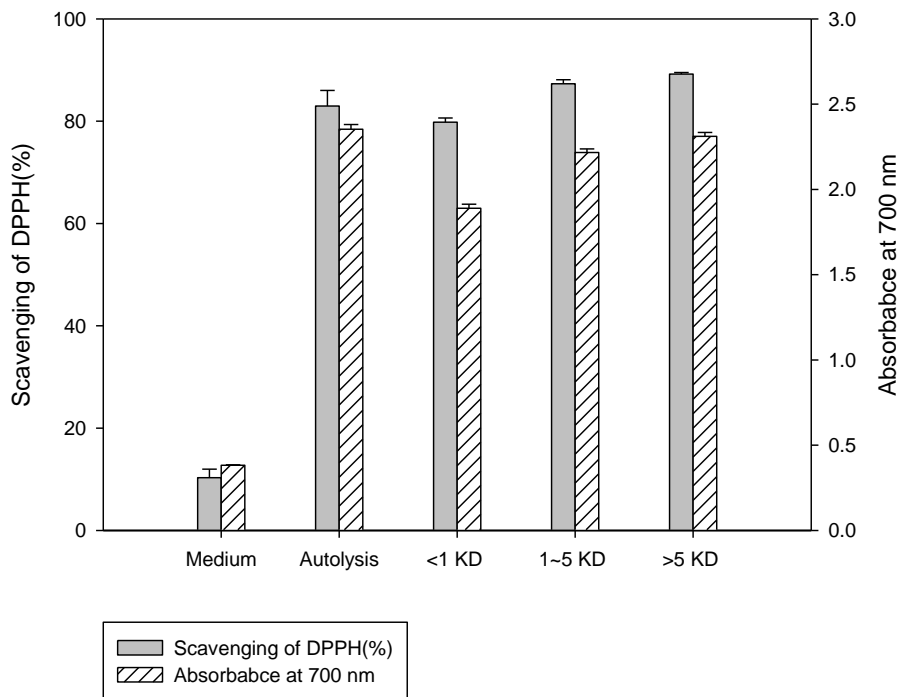


圖 4- 32 雞腿蘑菇自體溶解區分物與捕捉 DPPH 能力、還原力之關係

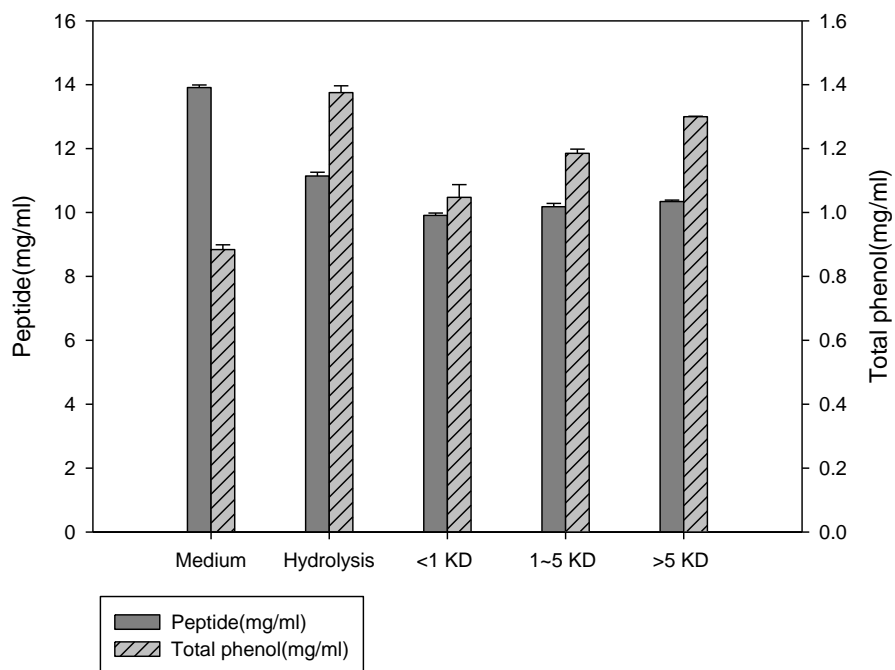


圖 4-33 雞腿磨菌添加 Bromelain 水解之區分物與胜肽、總酚含量關係

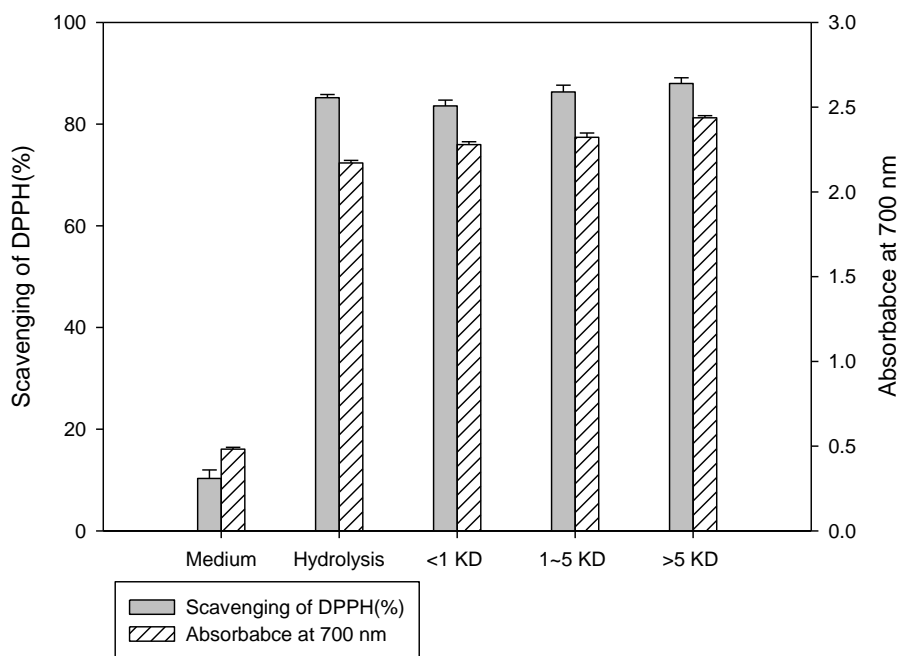


圖 4-34 雞腿磨菌添加 Bromelain 水解之區分物與捕捉 DPPH 能力、還原力關係

表 4-6 雞腿麴菌自體溶解區分物與清除 DPPH 半抑制濃度

Molecular size	IC50 (mg/ml)
Autolysis	6.43
< 1kDa	4.78
1~ 5kDa	5.05
> 5kDa	5.20

表 4-7 雞腿麴菌添加 Bromelain 酵素區分物與清除 DPPH 半抑制濃度

Molecular size	IC50 (mg/ml)
Hydrolysis	2.03
< 1kDa	2.39
1~ 5kDa	1.89
> 5kDa	2.41

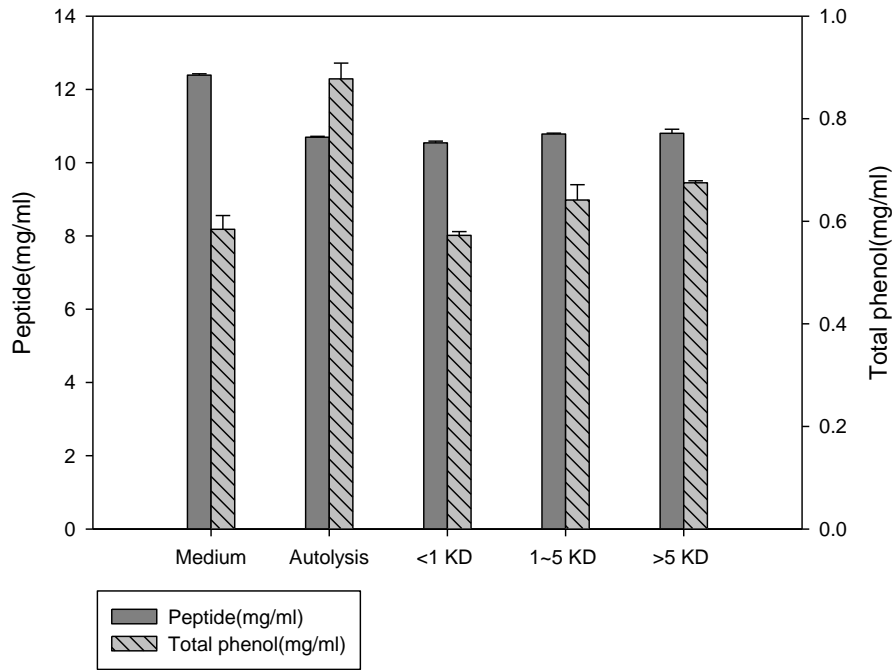


圖 4-35 朱紅栓菌自體溶解之區分物與胜肽、總酚含量關係

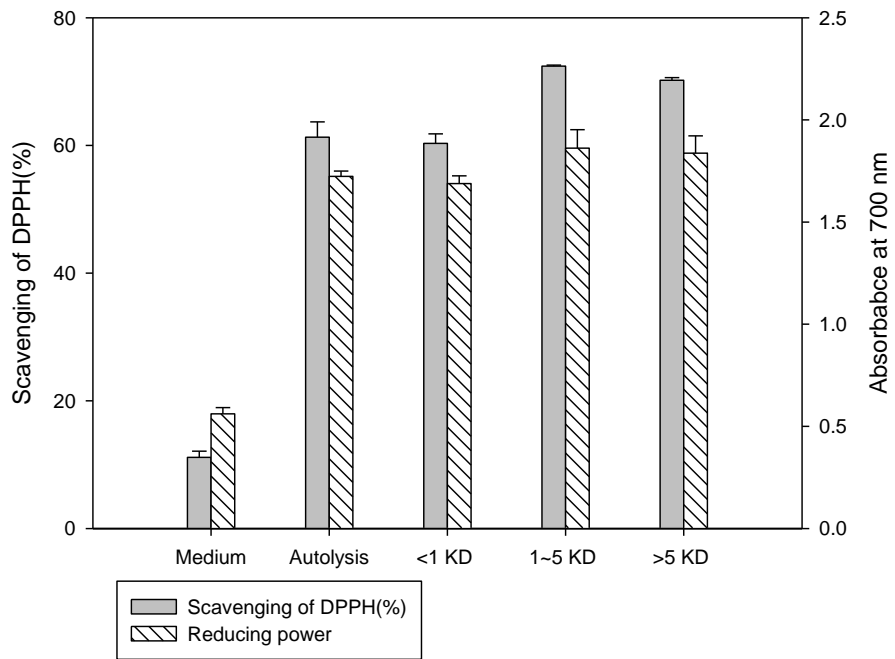


圖 4-36 朱紅栓菌自體溶解之區分物與捕捉 DPPH 能力、還原力關係

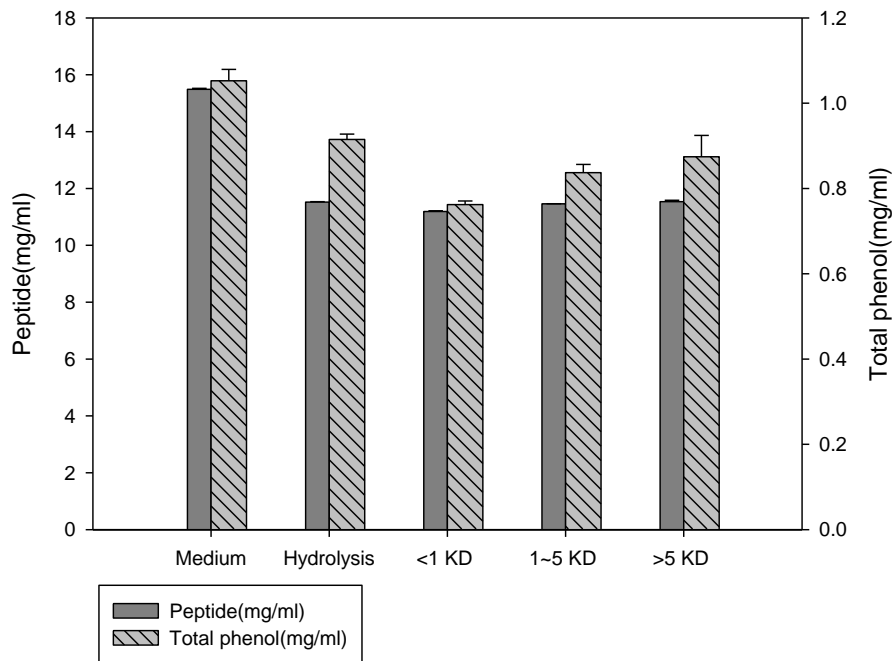


圖 4-37 朱紅栓菌添加 Bromelain 水解之區分物與胜肽、總酚含量關係

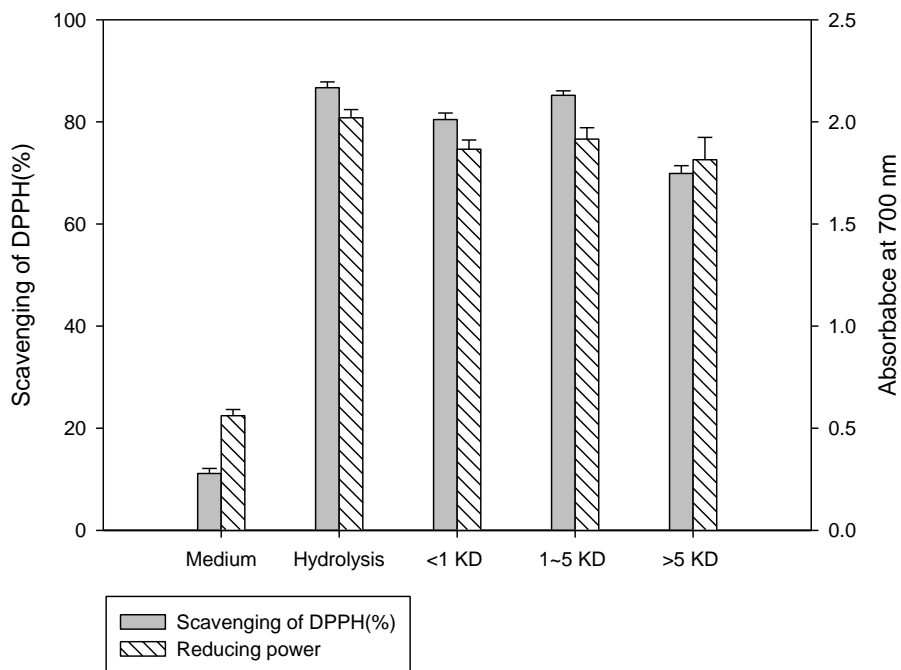


圖 4-38 朱紅栓菌添加 Bromelain 水解之區分物與捕捉 DPPH 能力、還原力關係

表 4-8 朱紅栓菌自體溶解區分物與清除 DPPH 半抑制濃度

Molecular size	IC ₅₀ (mg/ml)
Autolysis	6.85
< 1kDa	4.91
1~ 5kDa	4.03
> 5kDa	7.39

表 4-9 朱紅栓菌添加 Bromelain 酵素區分物與清除 DPPH 半抑制濃度

Molecular size	IC ₅₀ (mg/ml)
Hydrolysis	4.38
< 1kDa	2.60
1~ 5kDa	3.84
> 5kDa	5.07

表 4-10 雞腿蘑與朱紅栓菌絲體之捕捉 DPPH 半抑制濃度

Sample	IC ₅₀ (mg/ml)	
	H ₂ O	EtOH
<i>Coprinus cinereus</i>	5.88	14.41
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	3.05	10.63

第五章 結論與未來展望

5-1 結論

本研究分成兩部分，第一部分最佳水解條件探討，第二部分將水解液經超過濾將分子大小區分。

第一部份分成兩種方式，分別為自體溶解及添加酵素水解，比較兩種方式對生成胜肽、總酚含量以及清除 DPPH 自由基能力之影響。第一種自體溶解是利用菌體本身酵素去水解，所以需探討溫度及 pH 值；第二種添加酵素是添加不同酵素將菌體水解。第二部份找出自體溶解最佳水解條件以及選出一種有最佳水解效果之酵素，將水解物分別經超過濾膜系統將分子大小區分，並探討其抑制 ACE 能力、清除 DPPH 自由基能力以及還原力。根據以上實驗觀察到的結果，可歸納出以下幾點：

1. 自體溶解之生理活性探討:

雞腿麴菌自體溶解，當水解溫度為 50°C、pH6 並水解兩小時後胜肽含量達到 8.13mg/mL、總酚含量為 0.911 mg/mL、清除 DPPH 自由基能力 82.9%。朱紅栓菌當自體溶解溫度 50°C、pH5 並水解兩小時後胜肽含量達 10.69mg/mL、總酚含量為 0.878 mg/mL、清除 DPPH 自由基能力 61.3%。

2. 添加酵素之生理活性探討:

添加三種不同酵素水解後，從上述實驗結果得知添加 Bromelain 酵素水解

效果最好。雞腿麩菌添加酵素水解兩小時後水解速率就趨於平緩，胜肽含量達 11.14mg/mL、總酚含量為 1.375mg/mL、清除 DPPH 自由基能力 83.2%。朱紅栓菌添加酵素水解兩小時後胜肽含量達 11.52mg/mL、總酚含量為 0.915 mg/mL、清除 DPPH 自由基能力 86.7%。

3. 水解液經超過濾膜後之抑制 ACE 活性與抗氧化活性

抑制 ACE 活性部分可以從前述實驗知雞腿麩菌與朱紅栓菌共四種水解液均為分子量<1kDa 效果較顯著，且以朱紅栓添加 Bromelain 酵素 ACE 半抑制濃度 1.78 mg/ml 效果最佳。

抗氧化活性，分子量<1kDa 及 1~5kDa 之區分物抗氧化活性較佳，其中雞腿麩菌添加酵素分子量 1~5kDa 之區分物捕捉 DPPH 之 IC₅₀ 為 1.89 mg/ml 是四種水解液中能力效果最好。

5-2 未來展望

在生理活性成分做了胜肽以及總酚總量的測定，若能進一步的分離純化測定，對於有效成份的確定及功效提供更有力的佐證。本實驗將水解後之水解液直接做抑制 ACE 活性以及抗氧化，若能利用胃蛋白酶或胰蛋白酶模擬試驗，測試若經過人體腸道之分解酵素消化作用後是否仍能保持抑制能力。生理功能測定方面目前只做了胞外試驗，對動物細胞試驗生理活性未能深入探討，因此希望於往後能將培養之樣品對細胞實驗或是人體試驗做進一步之研究。

參考文獻

1. Bergendi, L., et al., *Chemistry, physiology and pathology of free radicals*. Life Sciences, 1999. **65**(18-19): p. 1865-1874.
2. 潘威仁, 朱紅栓菌生物活性探討. 南台科技大學生物科技研究所碩士論文, 2005.
3. Mizuno, T., *Bioactive Biomolecules of Mushrooms - Food, Function and Medicinal Effect of Mushroom Fungi*. Food Reviews International, 1995. **11**(1): p. 7-21.
4. Chen, H.S., et al., *Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of Ganoderma lucidum (Reishi) polysaccharides*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2004. **12**(21): p. 5595-601.
5. Cronin, D.A. and M.K. Ward, *Characterisation of Some Mushroom Volatiles*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1971. **22**(9): p. 477-&.
6. 水野卓, 川合正允, and 賴慶亮譯, 菇類的化學: 生化學. 國立編譯館, 1997.
7. Wasser, S.P. and A.L. Weis, *Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective*. Critical Reviews in Immunology 1999. **19**(1): p. 65-96.
8. Wang, S.Y., et al., *The anti-tumor effect of Gandoderma lucidumis mediated by cytokines released from activated macrophages*. International Journal of Cancer, 1997. **70**:699-705.
9. Misaki, A., et al., *Comparsion of structure and antitumor activity of polysaccharide isolated from Fukuroate, the fruiting body of Volvariella volacea*. Agricultural and Biological Chemistry 1986. **50** (9): **2171-2183**.
10. Kiho, T., et al., *Polysaccharides in fungi. XXXII. Hypoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharide from the cultural mycelium of Cordyceps sinensis*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1993. **16**(12): p. 1291-3.
11. Jong, S.C. and J.M. Birmingham, *Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom*. Advances in Applied Microbiology 1993. **39**:153-84.
12. 朱鴻, 雞腿蘑馴化栽培及營養分析. Edible fungi of china 2001. **120**(13).
13. Fan, J., et al., *Structural elucidation of a neutral fucogalactan from the mycelium of Coprinus comatus*. Carbohydrate Research 2006. **341**(9): p. 1130-4.
14. List, P.H., *Occurrence of ergothioneine in shaggy-mane, Coprinus comatus*. Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen

- Gesellschaft, 1957. **62**, 517-520.
15. Badalyan, C.M., A.V. Gasparyan, and N.G. Garibyan, *Investigation of the antioxidant activity of some basidial macromycetes*. Mikologiya I Fitopatologiya, 2003. **37**(5): p. 63-68.
 16. Li, B., et al., *Antioxidant Properties of Cap and Stipe from Coprinus comatus*. Molecules, 2010. **15**(3): p. 1473-1486.
 17. Watanabe, T., Y. Watanabe, and K. Nakamura, *Biodegradation of wood in dual cultures of selected two fungi determined by chopstick method*. Journal of Bioscience and Bioengineering 2003. **95**(6): p. 623-6.
 18. 黃世勳, et al., *朱紅栓菌之抗氧化特性*. 中國醫藥大學藥學研究所.
 19. Frokjaer, S., *Use of hydrolysates for protein supplementation*. Food Technol, 1994. **10**: p. 86-88.
 20. Lahl, W.J. and S.D. Braun, *Enzymatic production of protein hydrolysates for food use*. Food Technology, 1994 **48**: p. 68-71.
 21. Wang, J.S., et al., *Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten*. Journal of Food Science, 2007. **72**(2): p. C103-7.
 22. Kaul, P., et al., *Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation*. Food Chemistry, 2007. **101**(4): p. 1484-1491.
 23. Kristinsson, H.G. and B.A. Rasco, *Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2000. **40**(1): p. 43-81.
 24. Perezlebllic, M.I., et al., *Cell-Wall Degradation in the Autolysis of Filamentous Fungi*. Mycopathologia, 1982. **80**(3): p. 147-155.
 25. Santamaria, F. and F. Reyes, *Proteases Produced during Autolysis of Filamentous Fungi*. Transactions of the British Mycological Society, 1988. **91**: p. 217-220.
 26. Pitson, S., et al., *Production and Regulation of Beta-Glucanases in Acremonium and Cephalosporium Isolates*. Mycological Research, 1991. **95**: p. 352-356.
 27. Nuero, O.M., *Production of Chitinase by Fusarium Species*. Current Microbiology, 1995. **30**(5): p. 287-289.
 28. Reyes, F., P. Villanueva, and C. Alfonso, *Comparative-Study of Acid and Alkaline-Phosphatase during the Autolysis of Filamentous Fungi*. Letters in Applied Microbiology, 1990. **10**(4): p. 175-177.
 29. White, S., et al., *The autolysis of industrial filamentous fungi*. Critical Reviews in Biotechnology, 2002. **22**(1): p. 1-14.

30. Gopalkrishnan, M.V. and J. Prakash, *Optimum time requirement for enzymic hydrolysis of food proteins*. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2000. **37**(3): p. 319-322.
31. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, *Oxygen-Toxicity, Oxygen Radicals, Transition-Metals and Disease*. Biochemical Journal, 1984. **219**(1): p. 1-14.
32. 施益民 and 呂鋒州, *自由基與各種疾病*. 當代醫學 1989. **16**(54-62).
33. Halliwell, B., *Free-Radicals, Antioxidants, and Human-Disease - Curiosity, Cause, or Consequence*. Lancet, 1994. **344**(8924): p. 721-724.
34. 遠藤剛 and 淺田浩二, *活性酸素在生物中之生存、消去、作用*. 食品工業 1992. 5月30日(20-25).
35. Moncada, S. and A. Higgs, *Mechanisms of Disease - the L-Arginine Nitric-Oxide Pathway*. New England Journal of Medicine, 1993. **329**(27): p. 2002-2012.
36. 續光清, *食品化學*. 徐氏基金會出版, 1992.
37. Fennema, O., *Education of students in food chemistry: How well is this being done in the US?* Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1996. **211**: p. 13-Agfd.
38. Thomas, M.J., *The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working?* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1995. **35**(1-2): p. 21-39.
39. Fagan, J.M., B.G. Słeczka, and I. Sohar, *Quantitation of oxidative damage to tissue proteins*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 1999. **31**(7): p. 751-7.
40. Van Gorkum, R. and E. Bouwman, *The oxidative drying of alkyd paint catalysed by metal complexes*. Coordination Chemistry Reviews, 2005. **249**(17-18): p. 1709-1728.
41. Frankel, E.N., *Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids*. Progress in Lipid Research, 1984. **23**(4): p. 197-221.
42. Maxwell, S.R.J., *Prospects for the Use of Antioxidant Therapies*. Drugs, 1995. **49**(3): p. 345-361.
43. Giese, J., *Antioxidants: Tools for preventing lipid oxidation*. Food Technology, 1996. **50**(11): p. 73-&.
44. 拱玉郎, *天然抗氧化劑發展近況*. 食品工業, 1997. **29**(3): p. 29-37.
45. Kellogg, E.W. and I. Fridovich, *Superoxide, Hydrogen-Peroxide, and Singlet Oxygen in Lipid Peroxidation by a Xanthine-Oxidase System*. Journal of Biological Chemistry, 1975. **250**(22): p. 8812-8817.
46. Bando, N., et al., *Participation of singlet oxygen in ultraviolet-a-induced lipid*

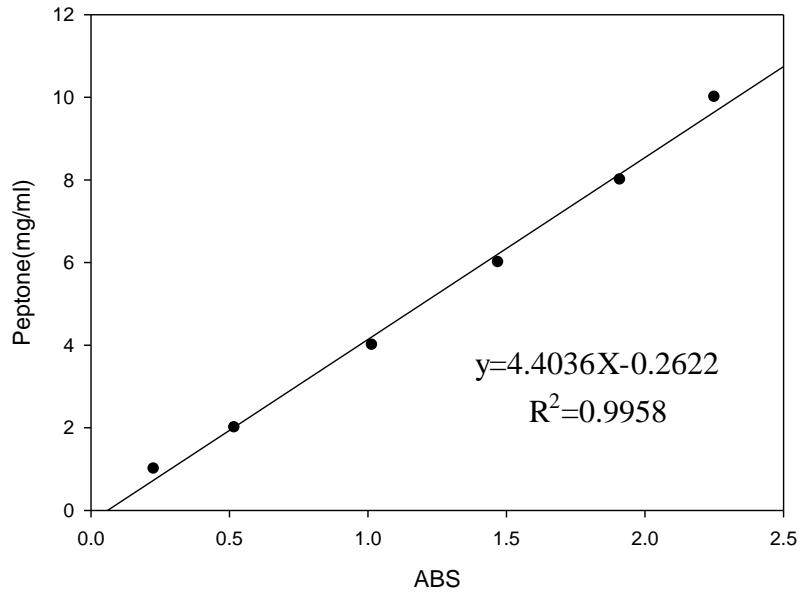
- peroxidation in mouse skin and its inhibition by dietary beta-carotene: An ex vivo study*. Free Radical Biology and Medicine, 2004. **37**(11): p. 1854-1863.
47. Aluko, R.E., A.T. Girgih, and C.C. Udenigwe, *In Vitro Antioxidant Properties of Hemp Seed (Cannabis sativa L.) Protein Hydrolysate Fractions*. Journal of the American Oil Chemists Society, 2011. **88**(3): p. 381-389.
 48. Papas, A.M., *Diet and antioxidant status (Reprinted from Antioxidant status, diet, nutrition, and health, pg 89-106, 1998)*. Food and Chemical Toxicology, 1999. **37**(9-10): p. 999-1007.
 49. 楊于萱, 培養條件對樟芝菌絲體抗氧化活性及抗腫瘤能力之影響. 私立東海大學化學工程研究所碩士論文, 2010.
 50. 蔡惠利, 巴西蘑菇、茶樹菇、牛肝菌和雞腿菇之呈味與抗氧化性質. 國立中興大學食品科學研究所碩士論文, 2004.
 51. 駱秋燕, 柚子多酚化合物及抗氧化活性之研究. 國立中興大學食品科學研究所碩士論文, 2004.
 52. Cao, Y.S., D.D. Gao, and H.X. Li, *Antioxidant activity of peptide fractions derived from cottonseed protein hydrolysate*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010. **90**(11): p. 1855-1860.
 53. Li, G.H., et al., *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects*. Nutrition Research, 2004. **24**(7): p. 469-486.
 54. Hansen, K., et al., *In-Vitro Screening of Traditional Medicines for Antihypertensive Effect Based on Inhibition of the Angiotensin-Converting Enzyme (Ace)*. Journal of Ethnopharmacology, 1995. **48**(1): p. 43-51.
 55. Barrett, E., et al., *Fermentation, cell factories and bioactive peptides: food grade bacteria for production of biogenic compounds*. Australian Journal of Dairy Technology, 2005. **60**(2): p. 157-162.
 56. Byun, H.G. and S.K. Kim, *Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from Alaskan pollack skin*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2002. **35**(2): p. 239-243.
 57. Cushman, D.W., et al., *Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme by Analogs of Peptides from Bothrops-Jararaca Venom*. Experientia, 1973. **29**(8): p. 1032-1035.
 58. Zhang, Y.Z., et al., *High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis*. Bioresource Technology, 2007. **98**(18): p. 3499-3505.
 59. Lee, D.H., et al., *Isolation and characterization of a novel angiotensin*

- I*-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides*, 2004. **25**(4): p. 621-627.
60. Suetsuna, K., *Purification and identification of angiotensin I converting enzyme inhibitors from the red alga Porphyra yezoensis*. *Journal of Marine Biotechnology*, 1998. **6**(3): p. 163-167.
 61. Chiang, W.D., et al., *Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor*. *Food Chemistry*, 2006. **98**(4): p. 725-732.
 62. Church, F.C., et al., *Spectrophotometric Assay Using Ortho-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk-Proteins*. *Journal of Dairy Science*, 1983. **66**(6): p. 1219-1227.
 63. Singleton, V.L., *Citation Classic - Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents*. *Current Contents/Agriculture Biology & Environmental Sciences*, 1985(48): p. 18-18.
 64. Yamaguchi, T., et al., *HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1998. **62**(6): p. 1201-1204.
 65. Oyaizu, M., *Effects of Amino-Acids, Organic-Acids or Sugars on Antioxidative Activity of Browning Products Prepared from Glucosamine*. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 1988. **35**(12): p. 846-850.
 66. Cheung, H.S. and D.W. Cushman, *Inhibition of Homogeneous Angiotensin-Converting Enzyme of Rabbit Lung by Synthetic Venom Peptides of Bothrops-Jararaca*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1973. **293**(2): p. 451-463.
 67. Wirth, S.J. and G.A. Wolf, *Dye-Labeled Substrates for the Assay and Detection of Chitinase and Lysozyme Activity*. *Journal of Microbiological Methods*, 1990. **12**(3-4): p. 197-205.
 68. 陳啟倫, *Coprinus cinereus 真菌菌絲體自溶現象之探討*. 私立東海大學化學工程研究所碩士論文, 2006.
 69. 林忠昇, *雞肉絲菇其菌種分離及菌種活性之探討*. 南台科技大學生物科技研究所碩士學位論文, 2006.
 70. 於柏伸, *牡蠣抽出物之抗氧化活性與其季節及產地之變動*. 國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文, 2005.
 71. 葉怡妏, *不同菇類菌絲體萃取物 ACE 抑制活性之探討*. 私立東海大學化學工程研究所碩士論文, 2010.
 72. 黃雅琪, *純化與定序具有抑制血管收縮素轉化酵素活性之雞蛋蛋白胍*.

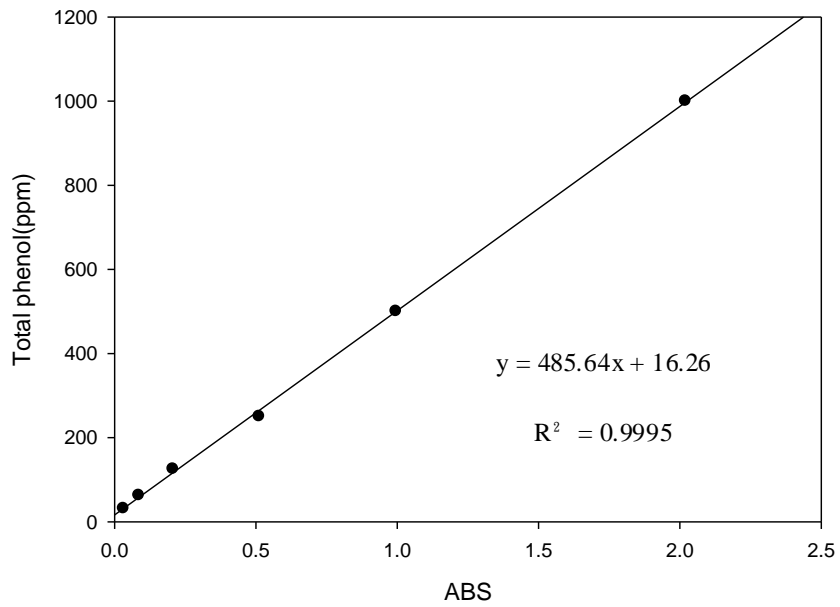
私立東海大學食品工程研究所碩士論文, 2009.

73. 王曉捷, 脫脂淘汰雞胸肉與鵝胸肉水解物抗氧化性之探討. 私立東海大學食品工程研究所碩士論文, 2009.
74. 吳艷兵, et al., 毛頭鬼傘(*Coprinus comatus*)多醣的理化性質及體外抗氧化活性. ACTA LASER BIOLOGY SINICA, 2007. 16(4): p. 438~442.

附錄



附圖 1 胜肽含量測定檢量線



附圖 2 總酚含量測定檢量線