

猴頭菌穀物液態發酵條件及其抗氧化活性 之研究

林玉婷¹ 林詩菱¹ 陳淑德^{1*} 鄭永祥²

¹國立宜蘭大學食品科學系 ²國立宜蘭大學生物技術與動物科學系

摘要

猴頭菌(*Hericium erinaceus*)是一種非常有價值的菇蕈類。它具有許多生物功能，例如：抗氧化活性，抗腫瘤，抗潰瘍，抗發炎，抗菌，免疫調節，並可誘導產生神經生長因子(NGF)，以防止神經元細胞的死亡。本研究之目的在研究猴頭菌液態發酵條件及分析不同猴頭菌液態發酵穀液(大豆、玉米、小麥、燕麥、白米、薏仁)的抗氧化性質。結果顯示，猴頭菌以 3%大豆粉、2%玉米粉和 5%葡萄糖為基質，在 25 °C、轉速 150 rpm 下搖瓶發酵兩天即可達最高的多醣含量，為 15 mg/mL。且培養基中多添加 3%~5%葡萄糖會較添加 0%~2%葡萄糖產生較高多醣含量，猴頭菌搖瓶轉速在 150 rpm 和 200 rpm 時，多醣含量較在 50 rpm 和 100 rpm 操作時為高。猴頭菌液態發酵穀液的多醣濃度範圍為 7~26 mg/mL，以白米最高，大豆最少。凍乾熱水萃取穀類發酵液中的總多酚和類黃酮含量則以大豆最多。猴頭菌發酵穀液的清除 DPPH 能力、螯合亞鐵離子能力及還原力則以大豆和小麥明顯較其他猴頭菌發酵穀液為高。

關鍵詞：猴頭菌、發酵、多醣、抗氧化、穀類

*通訊作者。E-mail:sdchen@niu.edu.tw

Studies on the *Hericium erinaceus* Liquid Fermentation Conditions with Different Grains for their Antioxidant Activities

Yu-Ting Lin¹ Shy-Ling Lin¹ Su-Der Chen^{1*} Yeong-Hsiang Cheng²

¹Department of Food Science, ²Department of Biotechnology and Animal Science,
National Ilan University

Abstract

Hericum erinaceus is well known as a valuable mushroom. *H. erinaceus* has many biological functions such as antioxidant activity, antitumor, antiulcer, anti-inflammation, antimicrobial effects, immunomodulation, and induces nerve growth factor (NGF) production to protect against neuronal cell death. The objectives of this research were to study the *H. erinaceus* liquid fermentation conditions and to analyze the antioxidant properties of *H. erinaceus* liquid fermented grains (soybean, corn, wheat, oat, rice or adlay). The results showed that medium containing 3% soybean, 2% corn and 5% glucose at 25 °C and 150 rpm two-days shaking-flask fermentation had the highest polysaccharide content 15 mg/mL. The media adding 3~5% glucose produced higher polysaccharide than 0~2% glucose, and *H. erinaceus* was shaking-flask fermented at 150 rpm and 200 rpm to produce higher polysaccharide than at 50 rpm and 100 rpm operation. The crude polysaccharide contents in *H. erinaceus* liquid fermented grains were 7~26 mg/mL, and the highest and lowest polysaccharide contents were rice and soybean, respectively. The freeze-dried hot water extract from *H. erinaceus* fermented soybean had the highest total phenol and flavonoid contents than other fermented grains. The water extract from *H. erinaceus* fermented soybean and wheat had significantly higher antioxidant properties such as scavenging DPPH free radicals, capability of chelating ferrous ion and reducing power than other fermented grains.

Keywords: *Hericum erinaceus*, fermentation, polysaccharide, antioxidant, grain

*Corresponding author. E-mail:sdchen@niu.edu.tw

前 言

猴頭菌(*Hericum erinaceus*)依真菌分類系統被歸類於真菌界(Fungi)、擔子菌門(Basidiomycota)、擔子菌綱(Basidiomycetes)、非褶菌目(Aphyllorphorales)、猴頭菌科(Hericiaceae)中之猴頭菌屬(*Hericum*)，為著名藥膳兩用真菌(蔡等，2003)。猴頭菌的子實體稱為猴頭菇，它不同於一般菇類的表面呈光滑狀，猴頭菇的表面具絨毛，類似猴子的頭而得名，又名白髮菇、刺蝟菌、陰陽蘑、花菜菇，日本人則稱它為獅子茸或獅子菇(Pegler, 2003)。猴頭菇外形為軟圓形，由無數長條粗糙之突起所組成，直徑約4~10公分，新鮮時呈白色，乾燥過後變為黃褐色(Pegler, 2003)。猴頭菇主要產地為黑龍江、四川、雲南、湖北、廣西等一帶，在美國、日本、俄羅斯及歐洲國家也有分佈；在台灣則分布於南投山區及宜蘭等地區(吳等，2005)。

猴頭菌中含有醣類、胺基酸、蛋白質、微量元素、猴頭素(erinacines)及猴頭酮(hericenones)，其中以多醣的含量為最高。將發酵的菌絲體或人工培養的子實體經由熱水萃取後，不溶於乙醇者通稱粗多醣，猴頭菌多醣具抗腫瘤效果，其主要成分主要以主鏈 β -(1,3)糖苷鍵，側鏈為 β -(1,6)糖苷鍵鍵結之葡聚糖聚合物為主(吳等，2005; 孫等，1998; 梁等，2006)。另外猴頭菌子實體及菌絲含有之猴頭素及猴頭酮可促使星狀細胞或大鼠腎上腺髓質嗜鉻細胞(PC12)增加神經生長因子(Nerve growth factors, NGF)的合成(Kawagishi *et al.*, 1994; Kawagishi *et al.*, 1996; Shimbo *et al.*, 2005; 何等，2015)，而NGF和可治療智力衰退、神經衰弱及抗阿茲海默症等疾病(Rossner *et al.*, 1998; Inanaga, 2012)，且猴頭菌菌絲和猴頭素 A 可保護和避免大鼠因缺血性再灌流所造成的中風傷害(Lee *et al.*, 2014)，此由於免疫調節和抗氧化功能所致。另外，猴頭菌中含有七種人體必需胺基酸，並含磷、鐵、鈣等人體必須之微量元素(孫等，1998)。

猴頭菌多醣體之生理活性包括免疫調節(任等，2007)、抗腫瘤(吳等，2005; Wang *et al.*, 2001; Kim *et al.* 2011)、抗氧化(任等，2007; 林等，2009; Xu *et al.*, 2010; Yeh *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012)、抗老化(周等，1991)、降低膽固醇(Yang *et al.*, 2003)、降血糖(Wang *et al.*, 2005)、抑制胃蛋白酶活性、增強胃黏膜屏障機能、促進潰瘍癒合，並對消化性潰瘍、慢性胃炎、胃腸癌、食道癌均有治療或改善之成效(孫等，1998; Li *et al.*, 2014)。

自由基與活性氧分子所引起的氧化傷害包括脂質氧化，蛋白質與DNA的氧化傷害。近年來食、藥用菇類被當作抗氧化物之來源(Okamura, 1994; Jacobson *et al.*, 1995)，由於其熱水萃取物或甲醇萃取物具有清除自由基的能力(Liu *et al.*, 1997)，因此食用、藥用菇類之抗氧化性質更值得探討(Mau *et al.*, 2002)。

猴頭菌的培養方法可分為天然與人工栽培。由於猴頭菇多為一年生之子實體，而子實體培養至少需要 4~5 個月，且採收相當費力，為因應研究與應用之需求，而發展出猴頭菌的固態和液態發酵。例如以玉米粉加入營養鹽溶液(K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$)，調整最適 pH 值於 4.0-5.0 後，再加入大豆粉作為氮源，最適碳氮比為 20:1；將培養基置於錐形瓶中，滅菌後接種猴頭菌菌絲，在 25 °C 下進行避光固態培養(賈和俞，1997)。而在菌絲體液態培養方面，可將猴頭菌菌絲培養於液態培養基中，並給予充足之氧氣與營養，使菌絲生長、繁殖並產生活性物質，一般需要 4-5 天(樂等，1999)，液體發酵的菌絲體中粗多醣、水溶性多醣和粗蛋白含量均高於子實體。

影響猴頭菌液態深層培養的因素，需考慮物理、化學因子影響，一般常見的有培養基成分、攪拌速率、溫度、pH 值及裝液量等因素。培養基成分對發酵的影響，包括碳

源、氮源和無機鹽類等，其中碳源是供應微生物菌絲體生長及多醣合成所需能量，作為合成細胞成分的原料，氮源主要作為菇蕈類合成蛋白質和核酸原料，有利於菌絲生長(蔡等，2003)。孫等(2001a)以黃豆粉、玉米粉、麩皮粉比例為 7:2:1 作為複合氮源，其菌絲乾重為 24.3-35.0 mg/mL、多醣為 0.70-1.10 mg/mL 之最大值。氮源主要作為菇蕈類合成蛋白質和核酸原料，有利於菌絲生長(蔡等，2003)。

由於猴頭菌適合在好氣、嗜中溫、微酸性(pH5.5)的環境中生長，故在 25-28°C 進行猴頭菌液態發酵有利於菌絲體和多醣的生成(孫等，2002)。以培養 84 小時正處於高速生長期的猴頭菌，可在短時間內大量繁殖並合成多醣(孫等，2001a, b)。除了菌之培養時間，菌種所使用的世代數也會影響菌株生產猴頭菌多醣的能力；第一代的猴頭菌多醣產量均高於第二、三、四代，不過第二、三、四代間的猴頭菌多醣產量差異並不明顯；在第五代之後，產量就開始明顯下降(孫等，2001a, b; 劉等，2003)。

由於文獻中猴頭菌的搖瓶培養，發現碳源以富含澱粉的穀類和氮源以富含蛋白質的黃豆等原料為主，故本研究之目的著重在利用不同的五穀雜糧液(黃豆、小麥、薏仁、燕麥、白米和玉米)進行猴頭菌搖瓶發酵培養以生產猴頭菌多醣體，並探討不同葡萄糖濃度、搖瓶轉速和不同穀類液對多醣產量的影響，以期獲最大得猴頭菌粗多醣產量，並測定不同猴頭菌發酵穀液的抗氧化性質。

材料與方法

一、材料

馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(Potato dextrose agar, PDA)、酵母抽出物(Yeast extract)、馬鈴薯葡萄糖培養基(Potato dextrose broth, PDB)購自 Difco Co. (Sparks, MD, USA)。氫氧化鈉(NaOH)、鹽酸(HCl)、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、硫酸鎂 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)、葡萄糖、酒精、酚(Phenol)、碳酸鈉(Na_2CO_3)、氯化鋁($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) 購自日本和光純藥工業株式會社(大阪，日本)。濃硫酸(H_2SO_4)購自聯工公司(台北，台灣)。小麥、薏仁、白米、玉米、大豆、燕麥購自宜蘭南館市場。磷鉬酸酚試劑(Folin-Ciocalteu's phenol reagent)、沒食子酸(Gallic acid)、槲黃素(Quercetin)、1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)、抗壞血酸(Ascorbic acid)、Butylated hydroxyanisole (BHA)、氯化亞鐵($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)、Ferrozine、檸檬酸(Citric acid)、Ethylenediaminetetraacetate(EDTA)、赤血鹽(Potassium ferricyanide)、三氯醋酸(Trichloroacetic acid, TCA)、氯化鐵(Ferric chloride)購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 公司。

二、猴頭菌培養條件

1. 菌株培養

猴頭菌 *Hericium erinaceus* (BCRC 36470) 置於 PDA 平板培養基，在 25 °C 培養箱中培養；長出菌落後再移至 PDA 平板，然後再將菌絲移至 150 mL PDB 培養液中進行預活化至十天，並分別收集第三、五、七和十天預活化的菌絲，離心後取菌絲進行冷凍乾燥，以決定菌絲的乾重，由於猴頭菌的菌絲產量以七天最多(圖 1)，故後續的實驗皆先將猴頭菌預活化七天，再將 1 mL 預活化菌接種到具有擋板三角瓶的培養液中進行搖瓶培養。

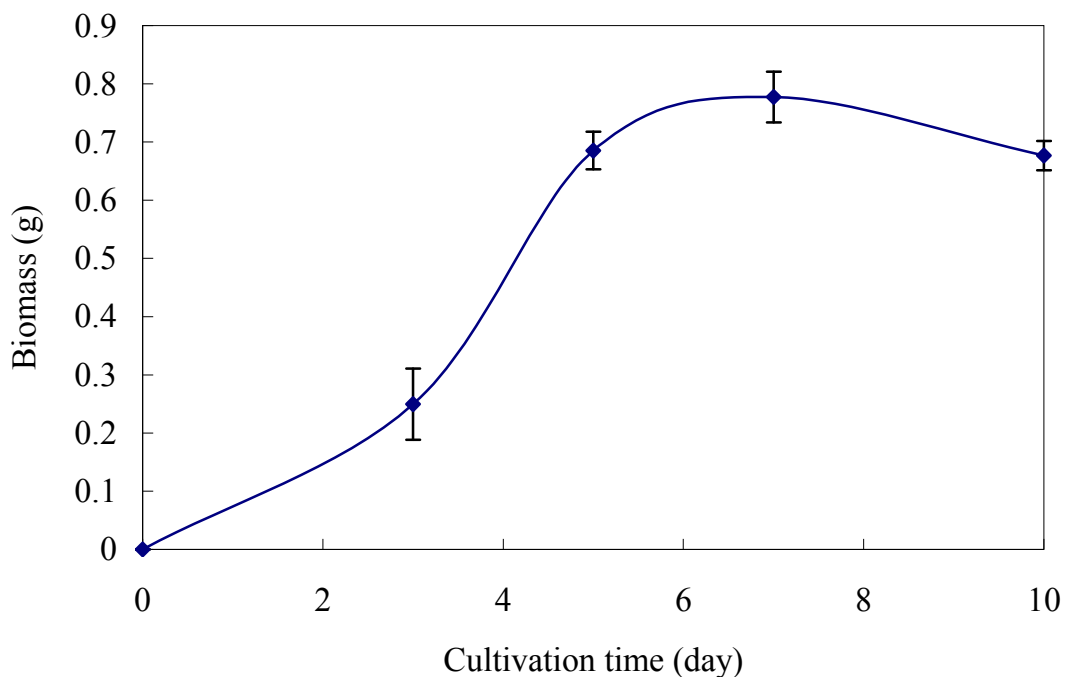


圖 1 猴頭菌以 PDB 進行預活化 10 天之菌絲總重變化。

Fig. 1 Change of *H. erinaceus* biomass during 10-day pre-activation for submerged fermentation. Data are expressed as mean \pm S.D. (n=3)

2. 培養液的製備

在研究猴頭菌發酵條件方面是先以三種不同的培養液 A、B 和 C 進行發酵五天，以多醣含量決定發酵收瓶的時間，所有培養液中均含 0.1% 酵母萃取物、0.1% K_2HPO_4 和 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，而在 A 培養液配方中尚含有 5% 葡萄糖，B 配方含有 3% 大豆粉、2% 玉米粉，C 配方含有 3% 大豆粉、2% 玉米粉及 5% 葡萄糖。另外上述培養液配方 B 再加入 0~5% 的葡萄糖，以作為研究不同葡萄糖濃度對猴頭菌產物中多醣的影響之培養液。而以上述培養液配方 C 作為不同搖瓶轉速(50 rpm、100 rpm、150 rpm 和 200 rpm)對猴頭菌產物中多醣的影響之培養液。

本研究穀類液體培養基為：1%葡萄糖、0.1%酵母萃取物、0.1% K_2HPO_4 、0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，和3%的不同穀類培養液，如：小麥、薏仁、白米、玉米、大豆和燕麥。先將液體培養基 150 mL 置於 500 mL 搖瓶進行 121 °C、20 min 殺菌，冷卻後，再加入 1 mL 預活化的菌液，在溫度 25 °C 下，於 150 rpm 下進行搖瓶培養兩天。

三、菌絲體之測定

在猴頭菌以 PDB 培養的預活化時，將培養液以 10000 × g 離心 15 min 後，取下層沉澱物，並用蒸餾水洗滌此沉澱物，再次離心，將此菌絲沉澱物進行冷凍乾燥後，精秤。

另外發酵完畢後的猴頭菌發酵液，經 121 °C 殺菌 20 min，冷卻、離心分離後，取沉澱物進行冷凍乾燥，然後再取 0.5 g 凍乾的菌絲體粉末或發酵物，加入 10 mL 無水酒精於 60 °C 下萃取 60 min，經 10000 × g 離心 15 min 後取上清液經 0.22 μm 濾膜進行過濾，以無水酒精配製成菌絲體標準溶液，利用高效能液相層析儀(HPLC)測定其麥角固醇含量，間接測定發酵產物菌絲體含量。

HPLC 的儀器包括 Shimadzu LC-10AT VP 泵浦，Shimadzu SPD-10A VP 可見光/紫外光檢測器，並連接 Shimadzu C-R6A Chromatopac 積分儀；分離管柱以 LiChrospher 100 RP-18 (4.0 × 250 mm, 5 μm, Merck) 注射量為 20 μL，使用 100% 甲醇作為移動相，在檢測波長 282 nm、流速 1.0 mL/min 下，滯留時間為 11 min 時出現的波峰為麥角固醇，先分析 5 ~ 500 μg/mL 麥角固醇的標準溶液(Chang *et al.*, 2005)以製備標準曲線。

四、猴頭菌發酵液的熱水萃取物之製備

發酵完畢的猴頭菌發酵液需經 121 °C 殺菌 20 min，此亦作為熱水萃取之步驟，冷卻後，離心分離取上清液，此為熱水萃取物，於多醣含量的分析時，加入四倍體積的 95% 乙醇沉澱以取得粗多醣；另外再將此熱水萃取物進行冷凍乾燥，並製備 5 mg/mL 的凍乾發酵液之熱水萃取物，以進行抗氧化能力分析。而大豆發酵液凍乾粉末 1 g 加入 30 mL 乙醚攪拌 10 min 以除去大豆油脂，取出大豆沉澱物置於抽氣櫃中使乙醚完全揮發，再製備 5 mg/mL 的凍乾大豆發酵液熱水萃取液。

五、猴頭菌發酵液之活性成分分析

1. 粗多醣的酚硫法分析(Dubois *et al.*, 1956)

將發酵完畢的發酵液進行 121 °C 殺菌 20 min，經 10000 × g 離心 15 分鐘，取 0.3 mL 上清液，加入四倍體積的 95% 酒精，使多醣沉澱出來，收集粗多醣沉澱物用 1.2 mL 95% 酒精洗滌兩次，再加 1 mL 1N 氫氧化鈉以溶解多醣。利用酚硫法分析，取 1 mL 樣品，加入 1 mL 5% 酚溶液和 5 mL 濃硫酸，反應 3 min 後，冰浴冷卻 2 min，於 488 nm 測定吸

光值，並先以葡萄糖溶液製作標準曲線。

2. 總多酚化合物之定量分析(Christel *et al.*, 2000)

取 0.2 mL 的 5 mg/mL 凍乾發酵穀液，加入 1 mL 的 Folic-Ciocalteau's phenol 混合均勻，加入 0.8 mL 的 7.5% 碳酸鈉溶液混合均勻後，在室溫下遮光靜置 30 min，在波長 765 nm 下測定吸光值。並以沒食子酸溶液製作標準曲線，代入回歸值，算出凍乾發酵穀液之總多酚類含量。

3. 類黃酮化合物之定量分析(Shimada *et al.*, 1992)

取 1 mL 的 5 mg/mL 凍乾發酵穀液，加入 1 mL 的 2% methanolic AlCl₃ · 6H₂O 溶液混合均勻後，在室溫下靜置 10 min，在波長 430 nm 測定吸光值。並以槲黃素溶液製作標準曲線，代入回歸值，算出凍乾發酵穀液之類黃酮含量。

六、猴頭菌發酵液的熱水萃取物之抗氧化性質分析

1. 清除 DPPH 之能力測定(Shimada *et al.*, 1992)

取 2 mL 的 5 mg/mL 凍乾發酵穀液，加入 2 mL 的 0.2 mM DPPH-MeOH 溶液混合均勻後，在室溫下遮光靜置 30 min，在波長 517 nm 測定吸光值，代入公式以求出 DPPH 清除率(Scavenging effect)，並以抗壞血酸、BHA 作為對照組。

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

2. 螯合亞鐵離子能力之測定(Dinis *et al.*, 1994)

取 2 mL 的 5 mg/mL 凍乾發酵穀液，加入 0.1 mL 的 1 mM FeCl₂ · 4H₂O 溶液混合均勻後，再加入 0.2 mL 的 2.5 mM Ferrozine 溶液振盪均勻，在室溫下遮光靜置 10 min，在波長 562 nm 測定吸光值，代入公式以求出螯合亞鐵離子的能力 (Chelating effect)，並以檸檬酸、EDTA 作為對照組。

$$\text{Chelating effect (\%)} = [(A_{562 \text{ nm}} \text{ of control}) - (A_{562 \text{ nm}} \text{ of sample})] / (A_{562 \text{ nm}} \text{ of control}) \times 100$$

3. 還原力之測定(Oyaizu, 1986)

取 2.5 mL 的 5 mg/mL 凍乾發酵穀液，加入 2.5 mL 的 0.2 M 磷酸緩衝溶液及 2.5 mL 的 1% 赤血鹽混合均勻後，50 °C 水浴 20 min 後以冰浴使其快速冷卻，再加入 10% TCA 2.5 mL，振盪均勻後，離心 10 min，取 5 mL 上清液，依序加入 5 mL 蒸餾水、0.1% Ferric chloride 1 mL 混合均勻後，室溫下遮光靜置 10 min，在波長 700 nm 測定吸光值。並以抗壞血酸、BHA 作為對照組。

七、統計分析

試驗結果三重複，並以平均值±標準偏差表示，所得之數據使用 Statistical Package for Social Science (SPSS, SPSS INC. 宏德國際軟體諮詢顧問股份有限公司) 14.0 版統計套裝軟體進行統計分析，以多元全距檢定分析(Duncan's Multiple Range Test)，以顯著水準為 $\alpha=0.05$ ，比較其差異之顯著性。

結果與討論

一、猴頭菌液態搖瓶發酵的條件

分析預活化期間猴頭菌菌絲的產量發現(圖 1)，預活化五天後猴頭菌菌絲乾重即可達 0.685 g，即發酵液中菌絲濃度為 4.5 mg/mL，其中以預活化七天可得最多的菌絲乾重為 0.777 g，即發酵液中菌絲濃度為 5.1 mg/mL，然後菌絲產量略為下降。

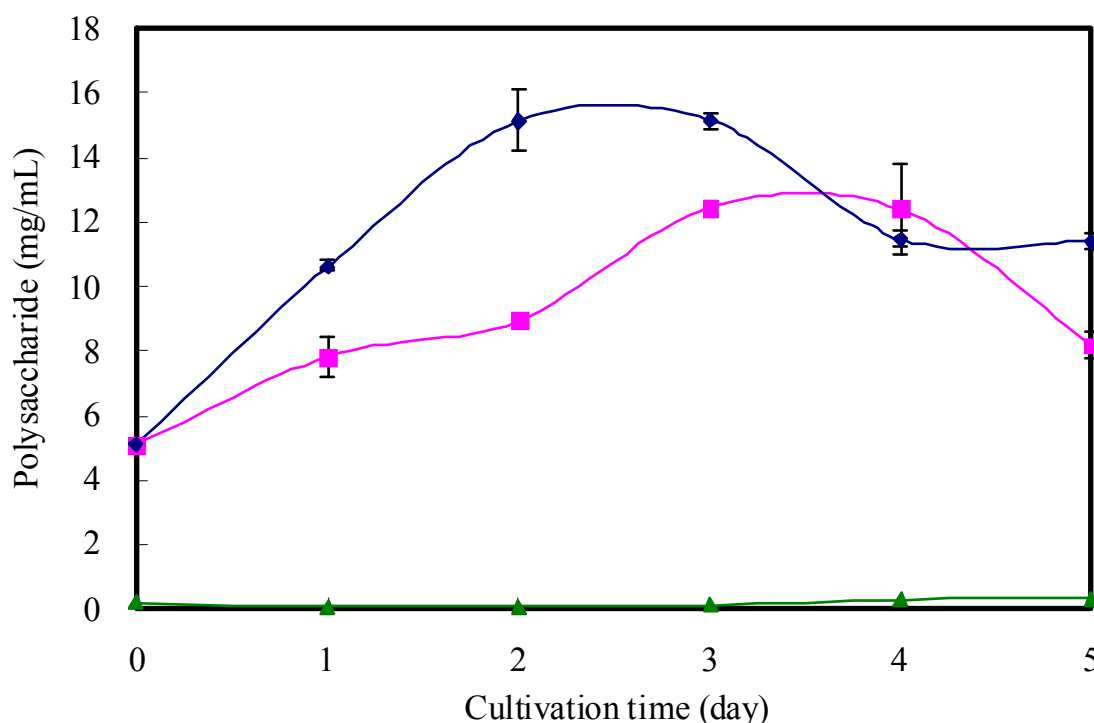


圖 2 猴頭菌發酵期間發酵液之粗多醣變化。▲：培養液 A(含 5%葡萄糖)，■：培養液 B(含 3%大豆粉+2%玉米粉)，◆：培養液 C(含 3%大豆粉+2%玉米粉+5%葡萄糖)。
 Fig. 2 Change of crude polysaccharide content during five-days *H. erinaceus* liquid fermentation. ▲：Medium A (containing 5% glucose), ■：Medium B (containing 3% soybean and 2% corn), ◆：Medium C (containing 3% soybean, 2% corn and 5% glucose). Data are expressed as mean ± S.D. (n=3)

後續研究將 1 mL 預活化七天之猴頭菌，加入 150 mL 培養液中；在猴頭菌液態發酵的操作條件為培養溫度 25 °C、振盪轉速 150 rpm，以 500 mL 具擋板的三角錐瓶中裝入

150 mL 培養液，三種培養液分別為 A (含 5%葡萄糖)，B (含 3%大豆粉和 2%玉米粉)，及 C (含 3%大豆粉、2%玉米粉及 5%葡萄糖)。發酵期間三種不同發酵液之多醣含量變化由圖 2 得知，培養液 A 中的猴頭菌生長狀況不佳，多醣含量極低；但是以培養基 B 進行培養，猴頭菌在第三天達到最高之多醣含量 12.45 mg/mL，第四天後則多醣濃度漸漸減少；若以培養液 C 進行培養，則猴頭菌可在第二天即達到最高之多醣含量 15.13 mg/mL，較培養基 B 高，此時猴頭菌的菌絲含量為 0.54 mg/mL。此可推論含大豆粉、玉米粉的穀類發酵液配方對於猴頭菌發酵生成多醣很有助益，並且在培養基中添加葡萄糖，可使猴頭菌生長並產生多醣，且可於發酵第二天收瓶。

孫等(2001a, b)以大豆粉：玉米粉：麩皮粉 (7:2:1) 作為複合氮源，猴頭菌之菌絲重量為 24.3-35.0 mg/mL、多醣為 0.70-1.10 mg/mL 之最大值。當維持一定氮量而適度提高含碳量時，可有效增加猴頭菌發酵生產水溶性多醣。比較有機氮源和無機氮源培養基，在水溶性多醣的產製上，使用有機氮源優於無機氮源(王等，1998)。

以 3%大豆粉和 2%玉米粉作為穀類培養液下，添加不同濃度之葡萄糖會對多醣產量顯著影響(表 1)，在完全沒有添加葡萄糖的培養基中，多醣產量明顯較添加葡萄糖的培養基還要低，多醣濃度只有 8.93 mg/mL；若添加 1%~2% 的葡萄糖則可使猴頭菌的多醣產量顯著提升，平均濃度可達 10.34 mg/mL，若添加 3%~5%的葡萄糖則又可使猴頭菌的多醣產量達 13.45 mg/mL。經統計分析添加 3%~5%的葡萄糖三組之間的多醣產量並無顯著差異，因考量成本的關係，後續研究還是選擇以添加 1%~3%的葡萄糖濃度作為培養基條件。

表 1 葡萄糖含量對猴頭菌發酵兩天穀液中粗多醣含量之影響

Table 1 Effect of glucose concentration on crude polysaccharide content of two-day *H. erinaceus* fermented grains

Glucose concentration (%)	Crude polysaccharide (mg/mL)
0	8.93 ± 0.11 ^d
1	10.22 ± 0.20 ^c
2	10.46 ± 0.56 ^c
3	13.41 ± 0.27 ^{ab}
4	13.82 ± 0.31 ^a
5	13.12 ± 0.13 ^b

Data are expressed as mean ± S.D. (n=3).

^{a-d} Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

一般碳源包括葡萄糖、木糖、甘露糖、乳糖、半乳糖、蔗糖、可溶性澱粉和糊精等，

其使用量為 1~10%(樂等, 1999; 孫等, 2001a, b; 劉等, 2003)。樂等(1999)分別以十種碳源探討對於 *H. erinaceus* 菌絲生長的影響, 其中以小麥、糊精、麥芽糖當作碳源可獲得較佳的菌絲產量。而蔡等(2003)探討利用 3%不同碳源對於 *H. erinaceus* 菌絲生長的影響, 所使用的麥芽糖及甘露糖, 可得分別為 25.1 mg/mL 和 22.4 mg/mL 菌絲乾重。在多醣產量部份, 孫等(2001a, b)及劉等(2003)皆以澱粉當作碳源, 猴頭菌發酵液中多醣含量可達 0.6 mg/mL 以上。

發酵時搖瓶轉速亦會影響猴頭菌多醣的生成, 因為攪拌速率會影響通氣量的大小, 理論上轉速愈大, 溶氧量愈大, 應會使多醣的生成愈多(Fang and Zhong, 2002), 但亦可能造成過大剪切力, 反而影響菌絲體的生長及多醣之生成(樂等, 1999)。表 2 的結果顯示, 在 50 rpm 時, 猴頭菌的多醣產量低, 只有 5.63 mg/mL; 若將轉速提升至 100 rpm, 生成的多醣濃度會提升到 9.45 mg/mL, 顯著比 50 rpm 培養下的多醣濃度還高, 每 mL 可增加 3.82 mg; 若再將搖瓶轉速分別提升到 150 和 200 rpm, 猴頭菌的多醣最大量可達 13.5 mg/mL, 二者間並無顯著差異, 此可能是因為過大的搖瓶轉速產生之剪切力會傷害菌絲體, 使猴頭菌的多醣產量無法再提升, 故採用 150 rpm 之轉速作為猴頭菌之培養條件。樂等(1999)控制搖瓶轉速在 50、100、150、200 及 250 rpm, 發現在 150 rpm 下菌絲量可達最大值, 之後隨著增大轉速其菌絲量明顯下降。

表 2 不同培養轉速對猴頭菌發酵兩天穀液的多醣含量之影響

Table 2 Crude polysaccharide content in the two-day *H. erinaceus* fermented grains by different shaking speed

Shaking speed (rpm)	Crude polysaccharide (mg/mL)
50	5.63 ± 0.05 ^c
100	9.45 ± 0.16 ^b
150	13.41 ± 0.27 ^a
200	13.52 ± 0.08 ^a

Data are expressed as mean ± S.D. (n=3).

^{a-c} Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

二、不同猴頭菌發酵穀液的抗氧化成分和抗氧化性質

針對不同穀液進行猴頭菌液態發酵前後之多醣含量(表 3), 結果顯示經過發酵後多醣含量明顯比發酵前還高($P < 0.05$), 由於猴頭菌會分泌澱粉分解酵素而轉化穀類培養液的成分而增加多醣含量(Han, 2003), 當然和原先穀液培養液中的多醣含量有關, 其中發酵兩天後穀類發酵液中的多醣含量以白米最高可達 26.37 mg/mL, 大豆最低只有 7.06 mg/mL, 其多醣含量的依高至低次序為白米 > 薏仁 > 燕麥 > 玉米 > 小麥 > 大豆。

表 3 不同穀液基質對猴頭菌液態發酵前後之粗多醣含量變化

Table 3 The change of crude polysaccharide contents in different grain media (3%) by *H. erinaceus* fermentation

3% Grain medium	0-day Polysaccharide (mg/mL)	2-day Polysaccharide (mg/mL)
Soybean	1.80 ± 0.31 ^e	7.06 ± 0.87 ^{f*}
Wheat	6.84 ± 0.11 ^d	11.04 ± 0.25 ^{e*}
Adlay	11.97 ± 0.29 ^b	16.17 ± 0.32 ^{b*}
Oat	8.03 ± 0.20 ^c	15.28 ± 0.14 ^{c*}
Rice	16.87 ± 0.63 ^a	26.37 ± 0.76 ^{a*}
Corn	7.10 ± 0.46 ^d	12.97 ± 1.10 ^{d*}

Data are expressed as mean ± S.D. (n=3).

^{a-f} Means with different letters are significantly different among grain media at the same fermentation day ($p < 0.05$).

Means with * are significantly different between 0 and 2 day fermentation ($p < 0.05$).

猴頭菌多醣是很好的自由基清除劑，具有抗氧化功能，而自由基是人類致病、人體組織細胞老化之根源，故它可保護巨噬細胞免於自由基之侵襲，進而促進體內細胞機能之正常，降低老化(吳等，2005)。任等(2007)的抗氧化功能試驗中發現，高劑量猴頭菌絲多醣可以提高小鼠血清中 SOD、CAT 的含量，且高、中、低之劑量猴頭菌多醣均可降低小鼠血清中 MDA 的含量。

由表 4 得知，猴頭菌發酵二天後之穀液(冷凍乾燥)總多酚類含量，以大豆最高 4.71 mg/g，其餘依序為玉米、小麥、薏仁、白米及燕麥。Mau 等(2002)以甲醇萃取猴頭菇子實體之總多酚含量為 12.05 mg/g；而吳(2001)以乙醇萃取經搖瓶發酵 24 天的不同品種猴頭菌中的多酚含量約 13~15 mg/g，另外亦發現總多酚生產效率是發酵槽培養 > 搖瓶培養 > 子實體，此由於猴頭菇子實體培養需 4~5 個月，故總多酚生產速率極低。而本研究的猴頭菌發酵產物利用搖瓶發酵二天，總多酚類含量較低。由表 4 得知，猴頭菌發酵

表 4 發酵兩天的猴頭菌發酵穀液之總多酚和類黃酮含量

Table 4 Total phenol and flavonoid contents of two-day *H. erinaceus* fermented grains

3% Grain medium	Total phenol (mg/g FWE)	Flavonoid (mg/g FWE)
Soybean	4.71 ± 0.85 ^a	0.63 ± 0.06 ^a
Wheat	2.75 ± 0.47 ^{bc}	0.25 ± 0.10 ^b
Adlay	2.55 ± 1.03 ^d	0.15 ± 0.09 ^d
Oat	2.30 ± 0.11 ^c	0.25 ± 0.14 ^{bc}
Rice	2.38 ± 0.60 ^c	0.14 ± 0.07 ^d
Corn	3.60 ± 1.02 ^{ab}	0.27 ± 0.16 ^{cd}

Data are expressed as mean ± S.D. (n=3).

^{a-d} Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

FWE:freeze-dried water extracts from *H. erinaceus* fermented grains.

二天後之穀液(冷凍乾燥)類黃酮含量,以大豆最高為 0.63 mg/g,其餘依序為玉米、小麥、燕麥、薏仁及白米。故整體而言,在猴頭菌穀類發酵產物的抗氧化成分中,以多醣含量最多、總多酚含量次之,類黃酮含量較少。

猴頭菌發酵二天後,配製 5 mg/mL 猴頭菌發酵穀液的凍乾熱水萃取物之清除 DPPH 能力,以小麥及大豆最高達 67.24%和 65.03%,其餘依序為玉米、薏仁、白米及燕麥(表 5)。文獻指出,以甲醇萃取之猴頭菇子實體在濃度為 6.4 mg/mL 時,其清除 DPPH 能力為 67.8%(Mau *et al.*, 2002);而吳(2001)分析不同猴頭菌種經搖瓶發酵 24 天之乙醇萃取液的清除 DPPH 能力介於 40%~73%,另外亦發現猴頭菌絲乙醇萃取液的清除 DPPH 能力仍以發酵槽培養(87%) > 搖瓶培養(73%) > 子實體(37%)。結果顯示本研究猴頭菌液態發酵的小麥和大豆亦可提供和人工培養 4~5 個月的猴頭菇子實體有相似的清除 DPPH 自由基的效果。

表 5 猴頭菌發酵兩天穀液的凍乾熱水萃取物(5 mg/mL)之抗氧化活性

Table 5 Antioxidant activities of freeze-dried hot water extracts (5 mg/mL) from two-day *H. erinaceus* fermented grains

3% Grain / control	Scavenging DPPH (%)	Chelating Fe ⁺² (%)	Reducing power ABS at 700 nm
Soybean	65.03 ± 1.87 ^a	90.68 ± 1.33 ^a	0.93 ± 0.01 ^a
Wheat	67.24 ± 3.5 ^a	85.41 ± 0.86 ^a	0.85 ± 0.02 ^{ab}
Adlay	51.42 ± 3.35 ^{bc}	74.06 ± 6.74 ^b	0.61 ± 0.03 ^c
Oat	47.22 ± 4.54 ^c	23.55 ± 2.04 ^d	0.84 ± 0.06 ^{ab}
Rice	47.71 ± 1.63 ^c	48.12 ± 2.97 ^c	0.79 ± 0.01 ^b
Corn	56.63 ± 7.04 ^b	79.21 ± 0.64 ^b	0.90 ± 0.04 ^a
Vitamin C	94.87 ± 0.31	-	2.28 ± 0.04
BHA	96.54 ± 0.19	-	2.28 ± 0.01
EDTA	-	99.85 ± 0.05	-
Citric acid	-	36.71 ± 4.65	-

Data are expressed as mean ± S.D. (n=3).

^{a-d} Means with different letters are significantly different among grain media ($p < 0.05$).

針對相同濃度 5 mg/mL 菇蕈類萃取物之清除 DPPH 能力和猴頭菌發酵穀液作比較,本樣品熱水萃取物的清除 DPPH 能力為 47%~67%,而靈芝子實體熱水萃取物為 78%高於靈芝發酵物的 54%~65%(Mau *et al.*, 2005)。在稀有菇蕈類的甲醇萃取物,除竹筴為 88%較高外,猴頭菇、金福菇、舞菇約為 53%(Mau *et al.*, 2002)。在常見的食用菇蕈類的甲醇萃取物,秀珍菇和香菇為 61%和 56%,金針菇和鮑魚菇較低約只有 36%和 33%(Mau *et*

al., 2005)。故本樣品的清除 DPPH 能力除較靈芝子實體和竹筴低外，和大多數的菇蕈類相近。

猴頭菌發酵二天後，5 mg/mL 猴頭菌發酵穀液的凍乾熱水萃取物之螯合亞鐵能力(表 5)，以大豆培養基所得發酵液的螯合能力最高，可達 90.68%，小麥 85.41%次之，其餘依序為玉米、薏仁和白米均較檸檬酸為高，然而燕麥之螯合亞鐵能力最低只有 23.55%。比較猴頭菇子實體甲醇萃取液之螯合亞鐵能力在濃度 3 mg/mL 時為 29.8%，在濃度 24 mg/mL 時為 46.4%(Mau et al., 2002)。比較其他相同濃度 5 mg/mL 菇蕈類萃取物之螯合亞鐵離子能力，其中靈芝的子實體的熱水萃取物只有 27%，靈芝發酵菌絲和發酵液更低於 10%(Mau et al., 2005)。在稀有菇蕈類的甲醇萃取物中，只有舞菇較高達 67%，而金福菇和猴頭菇也只有 36%和 33%，竹筴最低，只有 22%(Mau et al., 2002)。結果顯示經猴頭菌發酵兩天的大豆、小麥、玉米和薏仁穀液明顯較猴頭菇子實體和其他菇蕈類有較高的螯合亞鐵能力。

表 5 顯示猴頭菌發酵兩天後之 5 mg/mL 猴頭菌發酵穀液的凍乾熱水萃取物之還原力大小依序為大豆、玉米、小麥、燕麥及白米，其吸光值分別為 0.93、0.90、0.85、0.84 和 0.79，而薏仁最低，吸光值為 0.61。比較猴頭菇子實體甲醇萃取之還原力在濃度 9 mg/mL 時為 1.01，在濃度 24 mg/mL 時為 1.78(Mau et al., 2002)。在比較其他相同濃度 5 mg/mL 菇蕈類萃取物之還原能力，靈芝的子實體和發酵液的熱水萃取物可達 1.1 左右，靈芝發酵菌絲較低只有 0.48(Mau et al., 2005)。在稀有菇蕈類，除竹筴為 1.7 明顯為最高外，金福菇為 0.47 較低，而猴頭菇和舞菇分別為 0.70 和 0.77(Mau et al., 2002)，和本樣品中的燕麥、小麥、薏仁和白米相近，但較大豆和玉米樣品為低。在常見的食用菇蕈類中，以金針菇最低為 0.33，香菇和鮑魚菇分別為 0.57、和 0.6(Yang et al., 2002)，皆低於本樣品，而秀珍菇 0.8 和本樣品相近。整體而言，本研究的猴頭菌發酵穀液樣品之抗氧化能力和大多數的菇蕈類子實體相比，除竹筴和靈芝外，其餘都相差不多，甚至也不比猴頭菌子實體差，基於培養時間和成本，極有商用的應用價值。

結 論

猴頭菌以不同穀類培養基進行液態發酵皆能顯著提升多醣的含量，其中以白米作為培養基發酵所得的多醣含量為最高。不同的穀液進行猴頭菌發酵兩天，其中猴頭菌發酵大豆液雖然多醣含量較低，但其多酚和類黃酮含量、螯合亞鐵離子能力及還原力均較其他發酵液為高。除此之外，小麥亦呈現良好的抗氧化能力，故採用穀類粉末配製培養液

以作為猴頭菌發酵基質，可提供較佳的抗氧化效果。

誌 謝

本研究感謝農委會農糧署「開發保健食品」- 97 農科-3.1.3-糧-Z1(11)的計畫經費支持，及施玟蓮專題生協助，使本實驗得以完成，特此致謝。

參考文獻

- 王進琦、李聰明、賴敏男。1998。猴頭菇以液體浸漬培養產製水溶性多醣類之探討。食品科學 25(6):714-726。
- 任大明、杜志強、李秀娜、程宇、石莉娜、王瑩。2007。猴頭菌絲多糖免疫調節與抗氧化功能研究。瀋陽農業大學學報 38(3):370-374。
- 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。
- 吳云艷、宋慧、馬福。2005。猴頭菌屬(*Hericium*)真菌多糖的研究進展。吉林農業大學學報 27(6):621-626。
- 吳姿宜。2001。探討不同培養方式對猴頭菇抗氧化與抗腫瘤性質的影響。國立中央大學化學工程所碩士論文。新竹，台灣。
- 但飛君、付若秋。2000。猴頭菇的研究概況。中醫藥研究 16(4):60。
- 林玉婷、陳淑德、鄭永祥、高建元。2009。猴頭菌發酵米漿之研發。宜蘭大學生物資源學刊，5:89-95。
- 周慧萍、劉溫理、陳錢華。1991。猴頭菌多糖的抗衰老作用。中國藥理大學學報 22(2):86-88。
- 賈顯祿、俞孕珍。1997。猴頭菌營養生長最佳條件研究。食用菌學報 4(3):33-39
- 孫紅斌、劉梅森、陳海晏。1998。猴頭菌的藥用價值概述。中國食用菌 18(1):24-25。
- 孫紅斌、劉梅森、陳海晏。2000。液態發酵猴頭菌多醣工藝優化研究(II)-促生長劑 pH 值、裝液量、菌齡及菌種穩定性對多糖產量的影響。食品與發酵工業 27(11):30-32。
- 孫紅斌、劉梅森、陳海晏。2001a。液態發酵猴頭菌多醣工藝優化研究(I)-碳、氮源對得率的影響。食品與發酵工業 27(9):30-33。
- 孫紅斌、劉梅森、陳海晏。2001b。液態發酵猴頭菌多醣工藝優化研究(III)-還原糖、總糖、多糖、pH、氨基氮與培養時間的動態關係。食品與發酵工業 28(2):29-31。

- 孫紅斌、劉梅森、陳海晏。2002。液態發酵猴頭菌多糖工藝化研究(IV)-培養基重要組成的影響。食品與發酵工業 (28)3:25-27。
- 梁華、李雪林、陸業春。2006。猴頭菌多糖提取工藝研究。食品與機械 22(1):35-38。
- 樂超銀、邵佛、劉慶剛、郭慶華。1999。猴頭菌液體發酵條件的研究。中國食用菌 18(3):32-34。
- 蔡德華、董洪新、肖長生、卜慶梅。2003。猴頭菌液體發酵的環境條件試驗。湖北農業科學 (3):78-80。
- 劉艷芳、楊焱、賈薇、張勁松、唐慶九。2003。猴頭菌深層發酵培養基篩選初探。食用菌學報 10(3):26-31。
- Chang, C. Y., Lue, M. Y., and Pan, T. M. 2005. Determination of adenosine, cordycepin and ergosterol contents in cultivated *Antrodia camphorata* by HPLC method. Journal of Food Drug Analysis 13:338-342.
- Christel, Q. D., Bernard, G., Jacques, V., Thierry, D., Claude, B., Michel, L., Micheline, C., Jean-Cluade, C., Francois, B. and Francis, T. 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) hulls and flour. Journal of Ethnopharmacology 72:35-42.
- Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., and Almeida, L. M. 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-amino salicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. Archives of Biochemistry and Biophysics 315:161-169.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28:350-356.
- Fang, Q. H. and Zhong, J. J. 2002. Submerged fermentation of high fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. Biochemical Engineering Journal 10:61-65.
- Han, J. 2003. Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Hericiium erinaceum* for degrading starch and upgrading nutritional value. International Journal of Food Microbiology 80:61-66.
- Inanaga, K. 2012. Amycetonone, a nootropic found in *Hericiium erinaceum*. Personalized Medicine Universe 1:13-17.
- Jacobson, E. S., Hove, E. and Emery, H. S. 1995. Antioxidant function of melanin in black

- fungi. *Infection and Immunity* 63:4944-4945.
- 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 Nerve Growth Factor (NGF) Synthesis, from the Mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Letters* 37:7399-7402.
- Kawagishi, H., Shimada, A., Shirai, R., Okamoto, K., Ojima, F., Sakamoto, H., Ishiguro, Y., and Furukawa, S. 1994. Erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF) synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Letters* 35:1569-1572.
- Kim, S. P., Kang, M. Y., Kim, J. H., Nam, S. H., and Mendel, F. 2011. Composition and mechanism of antitumor effects of *Hericium erinaceus* mushroom extracts in tumor-bearing mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:9861-9869.
- Lee, K.-F., Chen, J.-H., Teng, C.-C., Shen, C.-H., Hsieh, M.-C., Lu, C.-C., Lee, K.-C., Lee, L.-Y., Chen, W.-P., Chen, C.-C., Huang, W.-S.,* and Kuo, H.-C*. 2014. Protective effects of *Hericium erinaceus* mycelium and its isolated erinacine A against ischemia-injury-induced neuronal cell death via the inhibition of iNOS/p38 MAPK and nitrotyrosine. *International Journal of Molecular Sciences* 15:15073-15089.
- Li, G., Yu, K., Li, F., Xu, K., Li, J., He, S., Cao, S., and Tan, G. 2014. Anticancer potential of *Hericium erinaceus* extracts against human gastrointestinal cancers. *Journal of Ethnopharmacology* 153:521-530.
- Liu, F., Ooi, V. E. C. and Chang, S. T. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Science* 60:763-771.
- Mau, J. L., Lin, H. C., Song, S. F. 2002. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Research International* 35:519-526.
- Mau, J. L., Tsai, S. Y., Tseng, Y. H. and Huang, S. J. 2005. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae*. *Murrill*. *LWT-Food Science and Technology* 38:589-597.
- Okamura, M. 1994. Distribution of ascorbic acid analogs and associated glycosides in mushrooms. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 40:81-94.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reactions:antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44:307-315.
- Pegler D. N. 2003. Useful fungi of the world:the monkey head fungus. *Mycologist*, 17:120-121.

- Rossner, S., Ueberham, U., Schliebs, R., Perez-Polo, J. R., Bigl, V. 1998. The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. *Progress in Neurobiology* 56:541–69.
- Shimada, K., Fujikawa, K. and Nakamura, T. 1992. Anti-oxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:945-948.
- Shimbo, M., Kawagishi, H. and Yokogoshi, H. 2005. Erinacine A increases catecholamine and nerve growth factor content in the central nervous system of rats. *Nutrition Reviews* 25:617-623.
- 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.* *Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 17:461-467.
- Wang, J. C., Hu, S. H., Wang, J. T., Chen, K. S. and Chia, Y. C. 2005. Hypoglycemic effect of extract of *Hericium erinaceus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:641-646.
- Xu, H., Wu, P. R., Shen, Z. Y., and Chen, X. D. 2010. Chemical analysis of *Hericium erinaceum* polysaccharides and effect of the polysaccharides on derma antioxidant enzymes, MMP-1 and TIMP-1 activities. *International Journal of Biological Macromolecules* 47:33–36.
- Yang, B. K., Park, J. B. and Song, C. H. 2003. Hypolipidemic effect of exo-biopolymer produced from a submerged mycelial culture of *Hericium erinaceus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67:1292-1298.
- Yang, J. H., Lin, H. C. and Mau, J. L. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* 77:229-235.
- Yeh, S. P., Hsia, L. F., Chiu, C. S., Chiu, S. T., and Liu, C. H. 2011. A smaller particle size improved the oral bioavailability of monkey head mushroom, *Hericium erinaceum*, powder resulting in enhancement of the immune response and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 30:1323–1330.
- Zhang, Z., Lv, G., Pan, H., Pandey, A., He, W., and Fana, L. 2012. Antioxidant and hepatoprotective potential of endo-polysaccharides from *Hericium erinaceus* grown on tofu whey. *International Journal of Biological Macromolecules* 51:1140–1146.

104年3月10日投稿

104年8月15日接受