

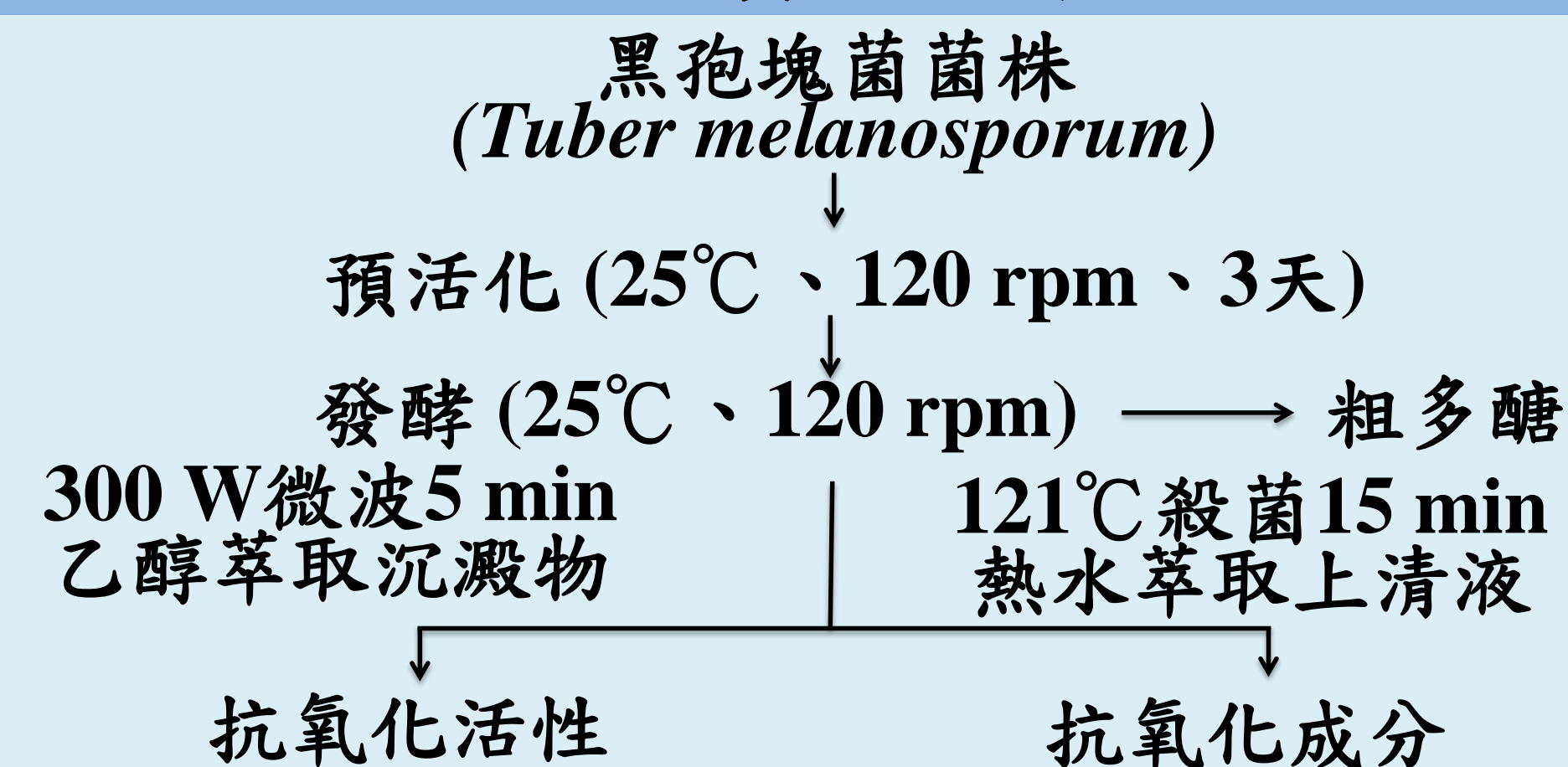
## 摘要

黑孢塊菌(*Tuber melanosporum*) 即是有名的法國黑松露，由於具有迷人的香氣，故有高經濟價值，而松露的培養需要4~7年，若能利用發酵技術，可縮短產程且可生產具有活性的代謝物，如：多醣體、多酚及類黃酮等，並具有降血糖、消炎和抗腫瘤等作用。本研究之目的為使用大豆、小麥、燕麥、糙米及薏仁作為黑孢塊菌液態發酵之基質，進行搖瓶培養，分析不同黑孢塊菌液態發酵穀液之抗氧化成分及抗氧化活性。最適穀類黑孢塊菌發酵是在25°C、120 rpm 下進行搖瓶培養三天的多醣含量最高，且進行抗氧化分析的結果顯示，不同穀類基質在經過黑孢塊菌發酵後，多酚及類黃酮的含量都比未發酵前高，而抗氧化活性，包括清除DPPH自由基能力、螯合亞鐵能力和還原力也皆有顯著提高。

## 前言

松露需求量日漸增加，故除天然松露外，開始研究子實體栽培，但菌絲需要與樹根形成外生菌根，並需要長達4-7年才可生成。雖然黑孢塊菌具有抗發炎、抗菌、抗氧化、抗腫瘤、免疫調節與降低血清膽固醇等多種生理活性功能，卻因產量稀少，大都用於高貴食材，而無法發揮其生理功用。若能使用發酵技術培養黑孢塊菌之菌絲體以取代植栽，可大幅縮短時間。此外黑孢塊菌菌絲體的活性成分如：不飽和脂肪酸、牛磺酸、 $\gamma$ -胺基丁酸(GABA)、植物固醇等含量皆高於其子實體2-9倍，故值得進行發酵研究。由於目前液態發酵文獻中大都使用單一碳源或氮源及金屬離子作為培養基質，而本實驗採取不同穀物作為液態培養液，並分析不同發酵穀液之抗氧化成分及抗氧化活性。

## 實驗架構



表一、不同黑孢塊菌液態發酵三天穀液之水溶性及非水溶性產物收率、多醣和菌絲含量

| Medium     | Water extract   |                        | Ethanol extract            |                            |
|------------|-----------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|
|            | Yield (%)       | Polysaccharide (mg/mL) | Yield (%)                  | Biomass (mg/mL)            |
| Wheat      | 42.025 ± 0.938* | 31.565                 | 2.898 ± 0.938              | 190.11 ± 7.51 <sup>a</sup> |
| Oat        | 41.053 ± 1.016* | 29.162                 | 3.507 ± 1.016              | 102.63 ± 1.50 <sup>d</sup> |
| Brown rice | 36.239 ± 0.280* | 32.616                 | 2.779 ± 0.280              | 120.40 ± 1.75 <sup>c</sup> |
| Adlay      | 43.919 ± 0.186* | 40.635                 | 3.012 ± 0.186              | 132.11 ± 2.08 <sup>b</sup> |
| Soy bean   | 39.702 ± 0.824* | 1.1317                 | 3.749 ± 0.824 <sup>a</sup> | 84.40 ± 2.97 <sup>e</sup>  |

Data are expressed as mean ± S.D. (n=3). \* Means in the each column followed by different letters are significantly difference <sup>a-d</sup> Means in the same row with different superscript letters are significantly different (p < 0.05).

表三、不同黑孢塊菌液態發酵三天穀液之20 mg/mL熱水及乙醇萃取物之清除DPPH能力、螯合亞鐵離子能力、還原力

| Medium     | Scavenging DPPH radicals ability |                              | Chelating ferrous ions ability |                              | Reducing power              |                             |
|------------|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|            | Water extract(%)                 | Ethanol extract(%)           | Water extract(%)               | Ethanol extract(%)           | Water extract(%)            | Ethanol extract(%)          |
| Wheat      | 56.530 ± 0.675 <sup>b*</sup>     | 40.152 ± 1.736 <sup>d*</sup> | 57.021 ± 1.133 <sup>c*</sup>   | 80.031 ± 0.982 <sup>b*</sup> | 0.550 ± 0.002 <sup>d*</sup> | 0.648 ± 0.002 <sup>d*</sup> |
| Oat        | 49.708 ± 0.585 <sup>c*</sup>     | 59.091 ± 1.136 <sup>a*</sup> | 54.752 ± 0.246 <sup>c*</sup>   | 80.818 ± 0.721 <sup>b*</sup> | 0.574 ± 0.004 <sup>c*</sup> | 0.675 ± 0.014 <sup>c*</sup> |
| Brown rice | 56.920 ± 0.338 <sup>b*</sup>     | 45.265 ± 0.656 <sup>c*</sup> | 55.319 ± 0.301 <sup>c*</sup>   | 75.157 ± 0.272 <sup>b*</sup> | 0.493 ± 0.002 <sup>c*</sup> | 0.669 ± 0.008 <sup>c*</sup> |
| Adlay      | 63.158 ± 0.585 <sup>a*</sup>     | 56.439 ± 0.328 <sup>b*</sup> | 74.043 ± 0.426 <sup>a*</sup>   | 78.459 ± 0.334 <sup>b*</sup> | 0.805 ± 0.001 <sup>b*</sup> | 0.724 ± 0.001 <sup>b*</sup> |
| Soy bean   | 55.750 ± 0.893 <sup>b*</sup>     | 59.470 ± 1.747 <sup>a*</sup> | 69.220 ± 0.246 <sup>b*</sup>   | 82.862 ± 0.667 <sup>a*</sup> | 1.085 ± 0.002 <sup>a*</sup> | 0.826 ± 0.010 <sup>a*</sup> |

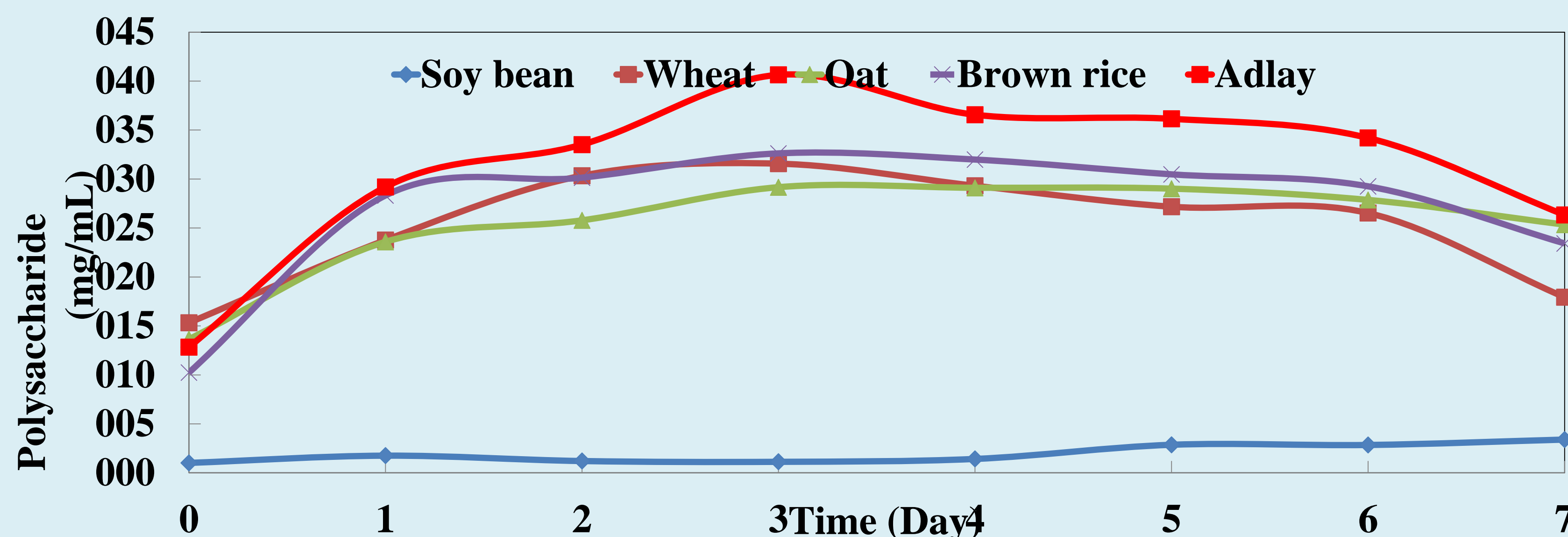
Data are expressed as mean ± S.D. (n=3). \* Means in the each column followed by different letters are significantly difference <sup>a-d</sup> Means in the same row with different superscript letters are significantly different (p < 0.05).

## 結論

以5%之大豆、小麥、燕麥、糙米和薏仁穀液作為黑孢塊菌液態發酵基質，發酵三天時，粗多醣含量最高，其中以薏仁為最高；菌絲體方面，則以小麥基質最高。收率方面，水溶性產物比非水溶性高出約10-20倍。不同基質之熱水及乙醇萃取物之抗氧化成分分析顯示，發酵三天後之總多酚、類黃酮含量均顯著提升；而在抗氧化活性的部分，其清除DPPH自由基能力、螯合亞鐵離子能力與還原能力皆有顯著提升趨勢。

## 結果和討論

圖一為黑孢塊菌發酵期間不同穀液之粗多醣變化情形，除大豆最低外，其餘四種發酵穀液之多醣含量皆在第三天達到最高峰，且以薏仁發酵液最高達40.635 mg/mL。水溶性收率遠比非水溶性高出約10-20倍，考量效率和成本，未來只收集殺菌後的發酵液，另外在菌絲體部分，以小麥發酵產生最多的菌絲體為132.11 mg/mL(表一)。表二為不同黑孢塊菌發酵穀液前與發酵3天後的多酚及類黃酮之變化，發酵3天後，在熱水萃取物及乙醇萃取物方面皆能有效提高總多酚及類黃酮的含量，其中皆以大豆最高，其次為小麥。表三為不同穀液發酵3天後之抗氧化活性分析，發酵後，在熱水萃取物及乙醇萃取物方面皆能有效提高DPPH自由基清除能力、螯合亞鐵離子能力及還原力，在熱水萃取物方面以薏仁的DPPH清除能力最高，可達66.862%，螯合能力也以薏仁最佳可達74.043%，還原力最佳為大豆，可達1.085；在乙醇萃取物方面皆以大豆為最高，其DPPH清除能力為59.280%，螯合能力可達82.862%，還原力可達0.826。



圖一、不同黑孢塊菌液態發酵期間之穀液中多醣變化

表二、不同黑孢塊菌液態發酵三天穀液之熱水及乙醇萃取物中總多酚、類黃酮含量

| Medium     | Total phenolic compounds    |                             | Total flavonoids            |                             |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|            | Water extract (mg/g DW)     | Ethanol extract (mg/g DW)   | Water extract (mg/g DW)     | Ethanol extract (mg/g DW)   |
| Wheat      | 2.993 ± 0.003 <sup>b*</sup> | 1.919 ± 0.004 <sup>c*</sup> | 0.807 ± 0.020 <sup>b*</sup> | 0.037 ± 0.003 <sup>c*</sup> |
| Oat        | 2.187 ± 0.022 <sup>c*</sup> | 2.325 ± 0.033 <sup>b*</sup> | 0.653 ± 0.025 <sup>c*</sup> | 0.054 ± 0.001 <sup>b*</sup> |
| Brown rice | 2.846 ± 0.016 <sup>b*</sup> | 1.949 ± 0.019 <sup>d*</sup> | 0.536 ± 0.003 <sup>d*</sup> | 0.049 ± 0.001 <sup>b*</sup> |
| Adlay      | 2.654 ± 0.014 <sup>c*</sup> | 1.873 ± 0.007 <sup>c*</sup> | 0.682 ± 0.030 <sup>c*</sup> | 0.040 ± 0.001 <sup>c*</sup> |
| Soy bean   | 4.922 ± 0.009 <sup>a*</sup> | 3.472 ± 0.021 <sup>a*</sup> | 1.398 ± 0.005 <sup>a*</sup> | 0.105 ± 0.004 <sup>a*</sup> |

Data are expressed as mean ± S.D. (n=3). \* Means in the each column followed by different letters are significantly difference <sup>a-d</sup> Means in the same row with different superscript letters are significantly different (p < 0.05).