

紳士塊菌液態發酵穀物之抗氧化性研究

徐翌玲 陳淑德*

國立宜蘭大學食品科學系

(接受刊載日期：中華民國一〇六年六月十五日)

紳士塊菌 (*Tuber magnatum*) 為著名的義大利白松露，有獨特迷人之香氣，且具有高經濟價值。松露培養需要4至7年，利用發酵技術可縮短產程，增加生理活性代謝物，如：多醣體、多酚及類黃酮等，並具有抗氧化、抗發炎和抗腫瘤等作用。本研究之目的為分別使用小麥、燕麥、糙米、薏仁及大豆作為紳士塊菌液態發酵之基質，進行搖瓶培養，分析不同紳士塊菌液態發酵穀液之抗氧化成分及抗氧化活性。5%紳士塊菌液態發酵穀液的條件是在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紳士塊菌發酵後，多酚及類黃酮的含量均比未發酵前高，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均有顯著提升趨勢，故紳士塊菌發酵產物具有良好抗氧化活性。

關鍵字：紳士塊菌，松露，穀物，液態發酵，抗氧化性。

Study of Antioxidant Properties of *Tuber magnatum* Submerged Fermented Grain Products

Yi-Lin Syu and Su-Der Chen*

Department of Food Science, National Ilan University, I-Lan, Taiwan

(Accepted for publication: June 15, 2017)

Tuber magnatum is the famous Italian white truffles, due to its fascinating aroma and high economic values. Truffle fruiting bodies cultivation requires 4-7 years. Truffle mycelium can be produced by the fermentation technology to reduce the cultivation time and to obtain a good amount of metabolites, such as polysaccharides, polyphenols, and flavonoids. Truffles have varieties of physiological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-tumor. The objectives of this study were to use several grains such as wheat, oat, brown rice, adlay and soy bean, respectively, as a *Tuber magnatum* submerged fermented medium, and then to analyze their antioxidant components and activities. *Tuber magnatum* submerged fermented with 5% grain at 25°C 120 rpm in shake flask cultivation for 3-days obtained maximum polysaccharide content. The results showed that *Tuber magnatum* submerged fermented grain products had higher total polyphenol and flavonoids content than those in unfermented grain media. *Tuber magnatum* submerged fermented grain products exhibited higher antioxidant activities in significant enhancement of scavenging DPPH radicals, chelating ferrous ions and reducing power than unfermented grain media.

Key words: *Tuber magnatum*, Truffles, Grains, Submerged fermentation, Antioxidant.

前 言

松露、魚子醬和鵝肝醬為世界著名的三大名菜，紳士塊菌 *Tuber magnatum*，別名為白松露或白塊菇，屬於真菌界 (Fungi)，子囊菌門 (Ascomycota)，子囊菌綱 (Ascomycetes)，盤菌目 (Pezizales)，塊菌科 (Tuberaceae)，塊菌屬

(*Tuber*)。松露分布於溫帶地區，與溫帶多種樹木根系 (松科及殼斗科) 形成外生菌根，樹木提供光合作用產生醣類及其他成分給松露，松露供給養分、水分給樹木，兩者菌根互換養份，形成良好共生系統，由此環境生長4至7年方可得松露子實體⁽¹⁾。由於松露的市場需求年年增長，供不應求的狀態下，松露培養獲得

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

DOI: 10.6578/TJACFS.201706_55(3&4).0004

世界各地越來越多的關注及重視⁽²⁻⁴⁾。

近年來松露液態發酵興起，以快速生產發酵產物，並分析其活性成分，如：牛磺酸、GABA、等效鮮味濃度(EUC)、脂質、胺基酸和植物固醇等，故試圖以松露發酵菌絲體可作為其子實體的替代資源。松露液態發酵的培養條件須探討溫度、pH值、接種量、碳源、氮源和金屬離子等因素^(2,3)。松露菌絲體培養喜歡好氣、嗜中溫、pH值中性的環境下生長，故20至25°C是松露生長的最適溫度，若過高或過低溫度，皆會使菌絲體生長略趨緩慢^(5,6)。

中國塊菌以487 mg乾菌絲重/L接種量為最適合的接種量，培養五天至七天可得最大細胞濃度為14.10 g乾重/L、最大胞外多醣產率為1.62 g/L及最大胞內多醣產率為1.39 g/L。另外以蔗糖作為中國塊菌生長和多醣生產的碳源，則培養第五天得最大細胞濃度為14.97 g DW/L、最大胞外多醣產率為1.61 g/L及最大胞內多醣產率為1.89 g/L⁽¹⁾。

以酵母萃取物及蛋白胨為可作為中國塊菌生長和多醣生產的氮源，以酵母萃取物培養，在第五天即可得最大細胞濃度為16.63 g乾重/L，其次以蛋白胨培養，在第八天可得最大細胞濃度為12.81 g乾重/L；另研究證實25 g/L酵母萃取物濃度為最適松露生長和多醣生產的濃度，且培養四天可得最大細胞濃度19.53 g乾重/L和最大胞外多醣產率為0.66 g/L及最大胞外多醣產率為0.90 g/L，另外若以30 g/L蛋白胨濃度，培養五天可得最大松露細胞濃度為15.57 g乾重/L，培養七天可得最大胞外多醣產率為1.12 g/L及最大胞內多醣產率為1.27 g/L⁽⁴⁾。甚至Tang等人⁽³⁾研究證實Mg²⁺及K⁺最適松露生長和多醣生產的金屬離子濃度分別為30 mM和10 mM，可在培養第十一天可得最大細胞濃度、胞外多醣和胞內多醣的產率。而Liu和Tang⁽⁷⁾研究證實黑孢塊菌液態發酵之最適合基質為65 g/L蔗糖、9.5 g/L酵母萃取物、9.5 g/L蛋白胨及20 mM Mg²⁺，可得最大細胞濃度為24.55 g DW/L、胞外多醣產率為3.69 g/L及胞內多醣產率為2.85 g/L，故松露的液態培養基質會影響生長、多醣的產量，然而過去的文獻研究中並未見過以營養源較豐富的穀物作為松露發酵的基質。

松露是由豐富的胺基酸和蛋白質組成，其松露成分含對人體有益的物質，脂肪酸(油酸、亞麻油酸、棕櫚酸等多元不飽和脂肪酸、單元不飽和脂肪酸)⁽⁸⁾、植物固醇(菜子固醇、菜油固醇、豆固醇、B-谷固醇)⁽⁹⁾， γ -胺基丁酸(GABA)、牛磺酸⁽¹⁰⁾、多醣^(11,12)、三萜⁽¹³⁾、酚

類⁽¹⁴⁾、類黃酮類⁽¹⁵⁾等。故近年來松露已由食用外，開始研究其生理活性功能，如：抗發炎⁽¹⁵⁾、抗菌^(14,16)、抗氧化^(15,17)、抗腫瘤^(11,12,15)、免疫調節、降低血清膽固醇、調節血壓、調節血糖和舒緩神經等功能等(10,17)。

許多研究證實松露具有抗氧化性質，Beara等人⁽¹⁵⁾以紳士塊菌及夏塊菌萃取物作抗氧化活性研究，夏塊菌和紳士塊菌子實體的甲醇及水萃取物，可清除50%以上DPPH自由基活性，EC₅₀為0.192至0.414 mg/mL，夏塊菌和紳士塊菌子實體的水萃取物，可清除50%超氧陰離子自由基，EC₅₀為0.018至0.061 mg/mL。另外印度塊菌子實體的正丁醇萃取物，具有最高可清除90%以上DPPH自由基活性，EC₅₀為1.38 mg/mL，及具有最高達70%以上的清除超氧陰離子自由基活性，EC₅₀為0.96 mg/mL；印度塊菌子實體的乙酸乙酯萃取物具有最高為清除90%以上的羥自由基活性，EC₅₀為3.31 mg/mL，以及最高可清除90%以上的螯合亞鐵活性，其EC₅₀為0.70 mg/mL，故松露具有良好抗氧化活性⁽¹⁷⁾。

本研究目的為紳士塊菌(白松露)分別利用不同穀物包含小麥、燕麥、糙米、薏仁和大豆作為液態基質，進行液態搖瓶培養，探討不同紳士塊菌液態穀液之生理活性成分(總多酚、類黃酮和多醣)及抗氧化活性(清除DPPH自由基能力、螯合亞鐵能力和還原力)。

材料與方法

一、材料

本實驗所使用的松露菌株為義大利白松露紳士塊菌菌株(*Tuber magnatum*)，購自台灣大學森林環境暨資源學系胡弘道教授實驗室⁽⁶⁾，燕麥、小麥、薏仁、大豆和糙米購自宜蘭市場。95%乙醇、99%甲醇、氫氧化鈉(NaOH)、酚試劑(pheno1)、鹽酸(HCl)、硫酸鎂(MgSO₄·7H₂O)、磷酸氫二鉀(K₂HPO₄)、葡萄糖(C₆H₁₂O₆)購自和光純藥工業株式會社(Osaka, Japan)。馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(potato dextrose agar, PDA)、馬鈴薯液體培養基(potato dextrose broth, PDB)購自Difco Co. (Sparks, MD, USA)。濃硫酸、醋酸購自聯工公司(Taipei, Taiwan)。麥角固醇標準品、磷鉬酸酚試劑(Folin Ciocalteu's)、槲皮素(quercetin)、沒食子酸(gallic acid)、齊墩果酸(oleanolic acid)、香草醛、過氯酸、1,1-二苯基-2-苦味基團(1,1-diphenyl-2-picryl

hydrazyl, DPPH)、抗壞血酸(ascorbic acid)、butylated hydroxyanisole (BHA)、ferrozine、ethylenediaminetetraacetate (EDTA)、氯化亞鐵($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、赤血鹽(potassium ferricyanide)、三氯醋酸(trichloroacetic, TCA)、氯化鐵(ferric chloride)購自Sigma Chemical公司(St. Louis, MO, USA)。HPLC級100%甲醇購自Labscan Asia公司(Thailand)。

二、設備

25 °C 恆溫震盪培養箱(LM-600R, Yihder technology Co., Ltd., Taipei, Taiwan)、分光光度計(Model U-2001, Hitachi Co., Tokyo, Japan)、離心機(Hermle Z300, Germany)、高溫蒸氣直立式滅菌釜(TM-329, Tomim medical equipment Co., Ltd., USA)、烘箱、電子精秤、無菌操作台、自組微波萃取設備、減壓濃縮機(Eyela oil bath 0sb-2000, Tokyo, Japan)。HPLC系統包含Waters™ 486可見光/紫外光偵測器、Waters™ 717自動進樣裝置、Waters™ 510幫浦、Athena C18層析管柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、SISC積分數據處理系統(訊華股份有限公司, Taipei, Taiwan)。

三、試驗方法

1. 紳士塊菌之培養與活化

紳士塊菌菌株(*Tuber magnatum*)別名義大利白松露，以馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(potato dextrose agar, PDA)平板與斜面於25 °C 恆溫培養，每個月繼代一次。預活化則以紳士塊菌置於PDA平板培養基，在25 °C 培養箱中培養7天，取3塊1 cm² PDA菌塊接種於裝有150 mL PDB培養液的500 mL具有擋板錐形瓶中，在25 °C、120 rpm下進行搖瓶培養3~7天。

2. 紳士塊菌液態發酵穀液之製備

取小麥、燕麥、糙米、薏仁和大豆五種不同穀類基質磨粉，製備150 mL含5% (約為7.5 g) 穀粉之液態基質，在121 °C滅菌釜下滅菌15 min，冷卻後，接種5 mL已預活化3天之紳士塊菌菌液，在溫度25 °C、120 rpm下進行搖瓶培養3天。

3. 紳士塊菌液態發酵穀液的熱水萃取物和乙醇萃取物之製備

將紳士塊菌液態發酵穀液先進行121 °C滅菌釜殺菌15 min，此亦進行熱水萃取，離

心取上清液，此為熱水萃取液，可再進行抗氧化成分分析，包含粗多醣含量、總多酚含量和類黃酮含量；另外再將熱水萃取液冷凍乾燥，並配製20 mg/mL熱水萃取液，進行抗氧化活性分析。

另外將紳士塊菌液態發酵穀液殺菌、離心後取沉澱物，冷凍乾燥。秤取凍乾粉末2.5 g加入50 mL 95%乙醇，以300 W微波萃取5 min，離心取上清液，此為乙醇萃取液，可再進行抗氧化成分分析，包含總多酚和類黃酮含量；另外在將乙醇萃取液減壓濃縮至乾燥，回溶配製20 mg/mL乙醇萃取液，進行抗氧化活性分析。

4. 紳士塊菌液態發酵穀物之粗多醣分析

參考Dubois等人⁽¹⁸⁾方法，紳士塊菌液態發酵穀液的熱水萃取物取0.3 mL並加入1.2 mL 95%乙醇沉澱多醣，離心後去除上清液，並重複此步驟2次，再以60 °C乾浴將乙醇揮發至乾，加入1 mL 1 N NaOH於80 °C下回溶多醣。將回溶完之多醣溶液稀釋200倍，取稀釋完之多醣溶液1 mL加入1 mL 5%酚溶液及5 mL濃硫酸震盪均勻後冰浴2 min在波長488 nm下以分光光度計測其吸光值，並帶入0、10、25、50和100 μg/mL葡萄糖標準曲線中以求得樣品之粗多醣含量。

5. 紳士塊菌液態發酵穀物之總多酚含量之測定⁽¹⁹⁾

分別取1 mL紳士塊菌液態發酵穀液的熱水或乙醇萃取物，並加入1 mL磷鉬酸酚試劑(Folin-Ciocalteu's)及0.8 mL 7.5% Na₂CO₃，震盪後避光靜置30 min，在波長765 nm測其吸光值，並帶入0、10、25、50、100、250和500 μg/mL沒食子酸(gallic acid)標準曲線中以求得樣品之沒食子酸當量濃度。

6. 紳士塊菌液態發酵穀物之類黃酮含量之測定

參考Christel等人⁽²⁰⁾方法，分別取1 mL紳士塊菌液態發酵穀液的熱水或乙醇萃取物，並加入1 mL 2% AlCl₃ · 6H₂O甲醇溶液，震盪後避光靜置10 min，在波長430 nm測其吸光值，並帶入0、10、25、50和100 μg/mL槲皮素(quercetin)標準曲線中以求得樣品之槲皮素當量濃度。

7. 紳士塊菌液態發酵穀物之菌絲體收集和間接定量菌絲體⁽²¹⁾

將麥角固醇標準品配製成25、50、100、250、500及1000 μg/mL，利用HPLC在室溫下以C18管柱(250 × 4.6 mm)，100%甲醇作為移動相，流速1.0 mL/min、注射量20 μL並

以紫外光檢測器(波長282 nm)測定其麥角固醇之含量，並以波峰面積與麥角固醇濃度作圖，即得到麥角固醇標準曲線。

將預活化7天之紳士塊菌液態發酵搖瓶抽氣過濾收集菌絲體，並以5 mL蒸餾水沖洗後，進行冷凍乾燥後，加入無水乙醇配製成5、10、25、50、100、250、500及1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準液，另外秤取0.5 g乾燥完之猴頭菌固態發酵產物加入5 mL 99%甲醇，以60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱萃取1 hr，離心後取上清液以0.22 μm 濾膜過濾，用HPLC在室溫下以C18管柱(250 \times 4.6 mm)，99%甲醇作為移動相，流速1.0 mL/min、注射量20 μL 並以紫外光檢測器(波長282 nm)分析，於麥角固醇標準品滯留時間處所得面積與菌絲體標準液濃度作圖，即可得到菌絲體標準曲線，並與麥角固醇標準曲線作相關性，以便間接測定固態發酵後其菌絲之含量。

8. 紳士塊菌發酵產物的熱水及乙醇萃取物之抗氧化活性分析

(a) 清除1, 1-二苯基-2-苦味基團(1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, DPPH)之能力測定⁽²²⁾

分別取2 mL的20 mg/mL熱水或乙醇萃取液，再加入2 mL 0.2 mM DPPH-MeOH，將其混勻靜置於室溫30 min，反應時要避光，在波長517 nm測其吸光值，並以抗壞血酸(ascorbic acid)和BHA為樣品之對照組，吸光值越低表示清除能力越強。

(b) 螯合亞鐵離子能力測定⁽²³⁾

分別取2 mL的20 mg/mL熱水或乙醇萃取液，並加入0.1 mL 1 mM $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ，經30 min反應後，加入0.2 mL 0.25 mM ferrozine，在室溫下混合反應10 min，在波長562 nm下測其吸光值，並以抗壞血酸(ascorbic acid)和EDTA為正對照組，吸光值越低表示樣品螯合金屬能力越強。

(c) 還原能力測定⁽²⁴⁾

分別取2.5 mL的20 mg/mL熱水或乙醇萃取液，再加入2.5 mL 0.2 M磷酸緩衝溶液(phosphate buffer, KH_2PO_4)和2.5 mL 1% 赤血鹽，於50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下反應20 min，快速冷卻後，再加入2.5 mL 10%三氯醋酸(TCA)混勻後以轉速3,000 rpm、10 min後，取其上清液5 mL，依序加入5 mL蒸餾水及1 mL 0.1%氯化鐵混合均勻，在10 min反應後，在波長700 nm測其吸光值，並以抗壞血酸(ascorbic acid)和BHA作為正對照組。吸光

值越高表示樣品的還原能力越強。

9. 統計分析

試驗結果以平均值 \pm 標準偏差表示之，並以Statistical Package for Social Science (SPSS, SPSS INC. 宏德國際軟體諮詢顧問有限公司)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 $\alpha = 0.05$ 比較其差異之顯著性。

結果與討論

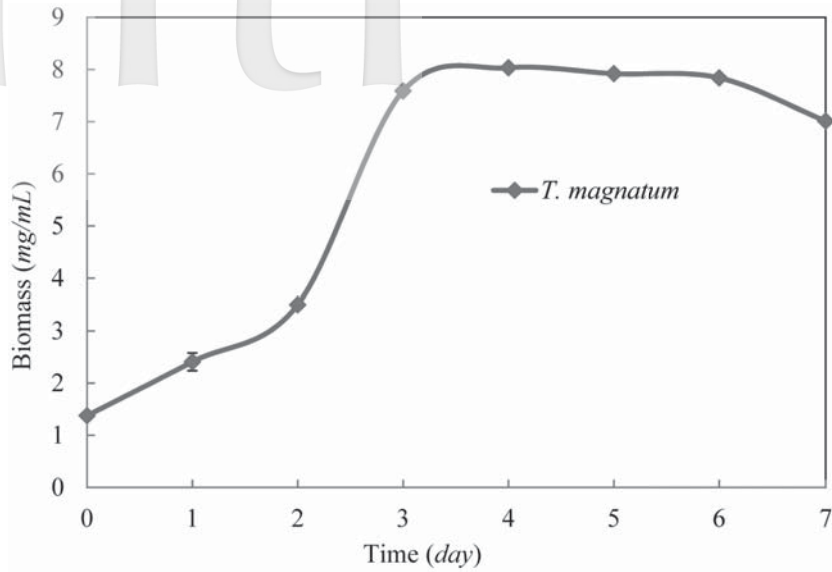
一、紳士塊菌液態發酵搖瓶之培養條件

紳士塊菌預活化以PDB液態培養基培養，於溫度25 $^{\circ}\text{C}$ 、轉數120 rpm震盪進行搖瓶培養1至7天，由圖一可得知培養1至3天期間隨著時間增加菌絲產量逐漸增加，此為菌體生長之指數生長期，培養3至4天期間菌絲體產量開始緩慢上升，此為菌體生長將進到恆定期，且預活化第3至4天期間可得最多的菌絲體乾重為1.21 g，相當於發酵液中菌絲體濃度為8.03 mg/mL，培養4至6天菌絲體產量呈現持平狀態，此為菌體生長之靜止期，第7天菌絲體產量則有明顯下降，進入菌體生長之衰退期，故紳士塊菌預活化以搖瓶第3天當後續研究條件。

黃⁽²⁵⁾研究以不同培養液對黑孢塊菌菌絲體生長之影響，培養條件於溫度20 $^{\circ}\text{C}$ 、初始pH 5.5、轉速100 rpm、培養1至14天，以MECT (malt extract and casein hydrolysate thiamine agar medium)培養液之菌體量最多，最大菌體濃度約為4.213 mg/mL，而以PGA (peptone glucose agar medium)培養液菌體量則最低。故本研究以穀液作為紳士塊菌的液態基質，僅三天發酵即可獲得較高的菌絲濃度。

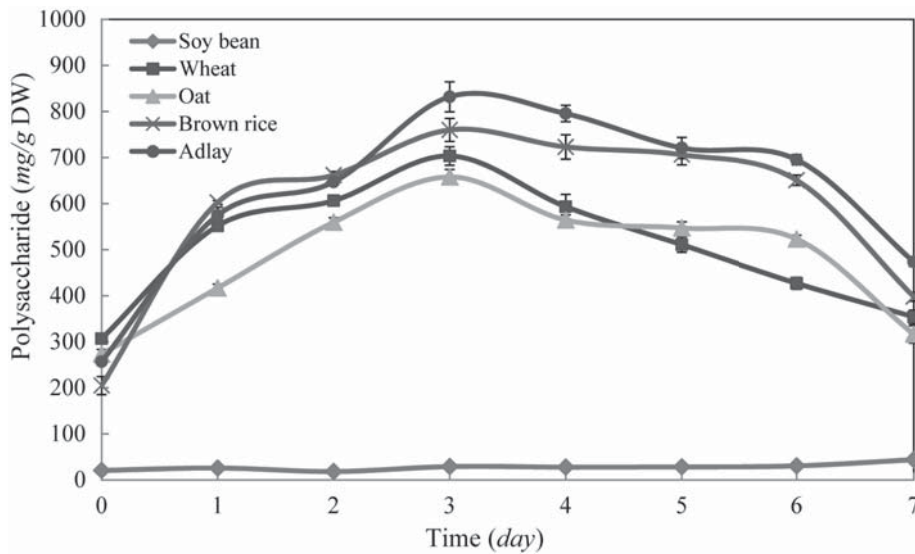
利用5%穀類(小麥、燕麥、糙米、薏仁和大豆)作為液態基質，於溫度25 $^{\circ}\text{C}$ 、轉數120 rpm震盪搖瓶培養1至7天，由圖二的結果顯示紳士塊菌培養1至3天期間內粗多醣含量為正向成長，在第3天皆可獲得最大粗多醣含量，隨後發酵天數增加會造成粗多醣產量則逐漸下降，由於紳士塊菌會先生產一級代謝產物供自己所利用，之後逐漸消耗基質本身的醣類等作為養分來源，故多醣含量才會有下降的趨勢，此外大豆液態基質除外，因為大豆缺乏碳源，故培養1至7天的粗多醣含量微量且無明顯增加。

圖二顯示不同穀類液態基質未經紳士塊菌



圖一 紳士塊菌以PDB培養基培養7天期間的菌絲體濃度變化

Fig. 1. Change of mycelia concentration in PDB during 7-days *Tuber magnatum* submerged fermentation. Data are expressed as mean \pm S.D. (n = 3).



圖二 不同穀類紳士塊菌液態發酵7天期間的粗多醣變化

Fig. 2. Change of polysaccharide contents during different 7-days *Tuber magnatum* submerged fermented grain products. Data are expressed as mean \pm S. D. (n = 3).

發酵前之粗多醣含量介於約20.41 mg/g DW (1.02 mg/mL)至306.53 mg/g DW (15.33 mg/mL)之間，不同穀類液態基質經紳士塊菌發酵後，以薏仁作為液態基質培養可得最大粗多醣含量，獲得851.17 mg/g DW (約42.59 mg/mL)，其次分別為糙米培養獲得759.82 mg/g DW (約37.99 mg/mL)，小麥培養獲得703.16 mg/g DW (約35.16 mg/mL)，燕麥培養獲得657.72 mg/g DW (約32.89 mg/mL)，最

少則為大豆培養獲得28.82 mg/g DW (約1.44 mg/mL)，故紳士塊菌以不同穀類液態基質發酵後，粗多醣含量顯著比未發酵之基質高 ($p < 0.05$)。不同穀類紳士塊菌液態發酵產物之粗多醣增加率，各穀類液態基質皆為正向成長，其中以糙米作為液態基質發酵之總多醣增加率最高，高達271%，其次是薏仁232%，燕麥141%與小麥129%，最少則為大豆41%，紳士塊菌以

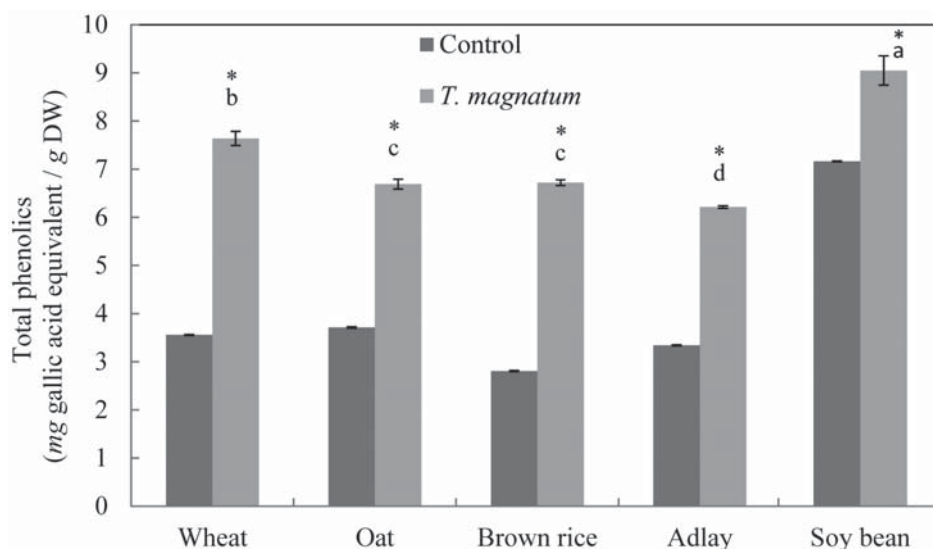
不同穀類液態發酵可以有效轉換及提升總多醣含量；小麥、燕麥、糙米和白薏仁主要成分為澱粉，澱粉分解轉換成碳源代替葡萄糖，小麥、燕麥、糙米和白薏仁為碳源是多醣及菌絲體生長合成所需含量⁽²⁶⁾，此外大豆為有機氮源其主要成分為蛋白質，缺乏澱粉、醣類等碳源成分，會影響多醣及菌絲體生長型態，延緩代謝產物產生。由於紳士塊菌以不同穀類液態發酵，於第3天時可獲得最大粗多醣產量，故後續研究的收瓶天數皆定為3天。

Liu等人⁽⁴⁾以中國塊菌液態發酵之氮源探討，選用酵母萃取物及蛋白胨製成培養基，此能提高細胞濃度和多醣產量，可得最大細胞濃度為23.94 g/L、最大胞外多醣產率為1.59 g/L及最大胞內多醣產率為1.48 g/L。探討中國塊菌液態發酵之碳源，選用接種濃度為487 mg DW/L及使用蔗糖培養能提高細胞濃度及多醣產量，得最大細胞濃度為24.07 g/L、最大胞外多醣產率為2.85 g/L及最大胞內多醣產率為2.92 g/L⁽¹⁾。另外探討金屬離子對中國塊菌液態發酵之影響，選用Mg²⁺及K⁺製成培養基能提高細胞濃度和多醣產量，達最大細胞濃度為22.97 g/L、最大胞外多醣產率5.56 g/L及最大胞內多醣產率為2.44 g/L⁽³⁾。此外黑孢塊菌以碳氮源饋料批式培養，碳源為蔗糖起始濃度為30 g/L，培養期間當蔗糖濃度降至5 g/L，就得再添加蔗糖濃度至30 g/L，反覆饋料9次，氮源為酵母萃

取物及蛋白胨，於第三天、第六天、第九天饋料添加8.33 g/L酵母萃取物及1.67 g/L蛋白胨，則進行液態培養第36天時得最大細胞濃度為53.72 g/L、最大胞外多醣為7.09 g/L及胞內多醣為4.43 g/L，得知培養塊菌之合成培養基可用碳源蔗糖，氮源酵母萃取物、蛋白胨、金屬離子Mg²⁺作為基質⁽²⁷⁾。故以上結果與本研究不同穀類紳士塊菌液態發酵粗多醣含量比較，以穀類作為液態發酵基質，經發酵後可得良好粗多醣和菌絲體含量，穀物本身含豐富碳源和氮源，如：澱粉和蛋白質等，有助於松露生長。

二、不同紳士塊菌液態發酵穀類產物抗氧化成分之分析

圖三為不同紳士塊菌液態發酵穀類產物之總多醣含量，由圖中可知不同穀類液態基質未經紳士塊菌發酵前，總多醣含量介於2.81至7.16 mg沒食子酸當量濃度(GE)/g乾物(DW)，但經紳士塊菌發酵後，總多醣含量提高介於6.21至9.05 GE mg/g DW，顯示以大豆作為液態基質培養，可得最大總多醣含量達9.05 mg GE/g DW，其次為小麥7.64 mg GE/g DW，然後是糙米6.72與燕麥6.69 mg GE/g DW，最少則為薏仁6.21 mg GE/g DW。不同穀類紳士塊菌液態發酵產物之總多醣增加率，各穀類液態基質皆為正向成長，其中以糙米作為液態基質之總多醣增加率最



圖三 不同穀類紳士塊菌液態發酵產物之總多醣含量

Fig. 3. Total phenol compound contents of different *Tuber magnatum* submerged fermented grain products.

*^{a-d} Means within each fermented grain are significantly different ($p < 0.05$).

*** Means are significantly different between each fermented grain and the control group ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm S.D. (n = 3).

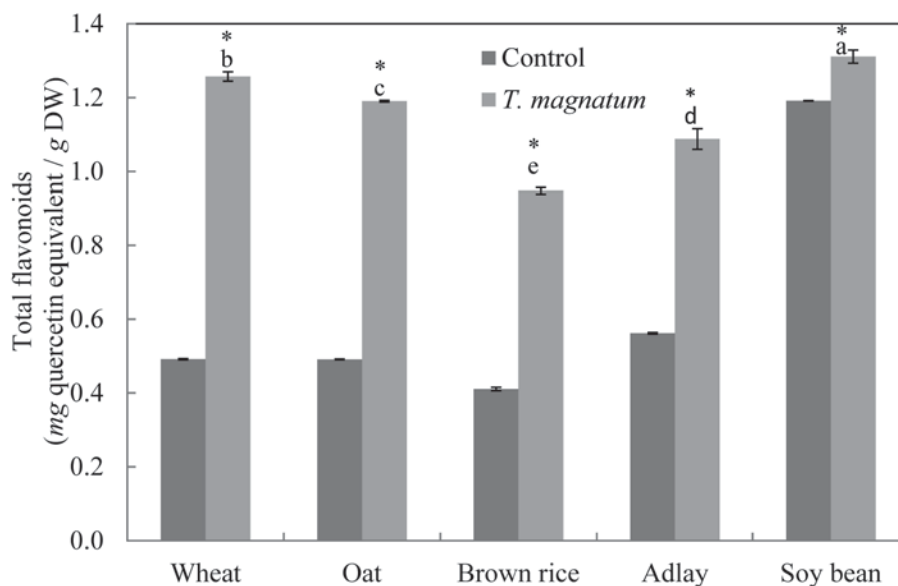
高，高達139%，其次是小麥115%，後續為薏仁86%與燕麥80%，最少則為大豆26%，紳士塊菌以不同穀類液態發酵可有效轉換及提升總多酚含量。

圖四為不同穀類紳士塊菌液態發酵產物之類黃酮含量，由圖可知不同穀類液態基質在未經紳士塊菌發酵前，類黃酮含量介於0.492至1.191 mg 槲皮素當量濃度(QE)/g乾物(DW)，而紳士塊菌以不同穀類液態基質發酵後，類黃酮含量介於0.948至1.312 mg QE/g DW，且發酵小麥、燕麥、糙米、薏仁和大豆的類黃酮含量分別為1.258、1.190、0.948、1.089和1.312 mg QE/g DW，以大豆作為液態基質發酵可得最大類黃酮含量，其次為小麥，最少則為糙米。不同穀類進行紳士塊菌液態發酵，其產物之類黃酮增加率皆為正向成長，其中以小麥作為液態基質之類黃酮增加率最高，高達155%，其次是燕麥142%，糙米131%，薏仁94%，最少則為大豆10%，故紳士塊菌以不同穀類液態基質發酵可有效轉換及提升類黃酮含量。

在分析松露子實體中的總多酚和類黃酮含量的文獻中，所考慮萃取溶劑，以使用甲醇萃取居多，另外另使用其他溶劑，如：石油醚、二氯甲烷、乙醇、石油醚、正丁醇、乙酸乙酯萃取，而萃取的含量亦以醇類萃取物中的總多酚和類黃酮含量較多，如甲醇萃取物之總

多酚和類黃酮含量在沙漠松露(*Tirmania nivea*)子實體中分別為13.28 mg GE/g DW和2.93 mg QE/g DW⁽²⁸⁾，在瘤孢地菌(*Terfezia boudieri*)子實體中甲醇萃取物分別含有總多酚和類黃酮含量為159.67 mg GE/g和96.18 mg QE/g較其他溶劑萃取物高⁽¹⁶⁾；印度塊菌(*Tuber indicum*)子實體中，以正丁醇萃取得最大總多酚和類黃酮含量⁽¹⁷⁾。Vetter和Kruzselyi⁽²⁹⁾分析夏塊菌(*Tuber aestivum*)子實體中以乙醇取之總多酚為2.8 mg GE/g DW，以甲醇萃取的類黃酮為0.093 mg QE / g DW。

另外在萃取方式，Beara等人⁽¹⁵⁾分析夏塊菌(*Tuber aestivum*)子實體以水浸泡萃取、熱水索氏萃取、甲醇浸泡萃取及甲醇索氏萃取之總多酚含量分別為13.84、11.72、15.14及18.22 mg GE/g DW，類黃酮含量分別為0.41、0.19、0.32及0.17 mg QE/g DW。而紳士塊菌(*Tuber magnatum*)子實體以水浸泡萃取、熱水索氏萃取、甲醇浸泡萃取及甲醇索氏萃取總多酚含量分別為16.73、16.35、12.69及18.68 mg GE/g DW；類黃酮含量分別為0.15、0.22、3.00和0.5 mg QE/g DW⁽¹⁵⁾。萃取溶劑和萃取方法會影響紳士塊菌的總多酚和類黃酮的含量，而使用水浴萃取、浸泡萃取和索氏萃取之萃取時間長達3至24 hr，遠較本研究所使用的300 W的微波萃取，僅需5至10 min，微波萃取時間短和效率高⁽³⁰⁾。比較



圖四 不同穀類紳士塊菌液態發酵產物之總類黃酮含量

Fig. 4. Total flavonoids contents of different *Tuber magnatum* submerged fermented grain products.

*^{a-d} Means within each fermented grain are significantly different ($p < 0.05$).

*** Means are significantly different between each fermented grain and the control group ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm S.D. (n = 3).

紳士塊菌的子實體較液態發酵產物所萃取總多酚和類黃酮含量為高。

三、不同紳士塊菌液態發酵穀類產物抗氧化活性之分析

Guo等人⁽¹⁷⁾將印度塊菌子實體以乙醇、石油醚、正丁醇和乙酸乙酯萃取之萃取物分別配製5、10、15、20、25和30 mg/mL，分析抗氧化活性(如：清除DPPH自由基能力、清除羥自由基能力、清除超氧陰離子自由基能力、螯合亞鐵離子能力和還原能力)，其隨著濃度增加抗氧化活性逐漸升高，至20 mg/mL抗氧化活性達持平，故本實驗配製20 mg/mL分析抗氧化活性。故本研究針對含5%穀粉(小麥、燕麥、糙米、薏仁和大豆)之液態基質經紳士塊菌發酵，滅菌離心後取上清液，配製20 mg/mL的熱水萃取物；以及滅菌離心後取沉澱物，經冷凍乾燥，以乙醇進行300 W微波萃取5 min，配製20 mg/mL的乙醇萃取物；再將熱水及乙醇萃取物進行抗氧化活性分析，包含清除DPPH自由基能力、螯合亞鐵離子能力和還原力測定。

首先由表一結果顯示，未經發酵之小麥、燕麥、糙米、薏仁和大豆液態基質的熱水萃取物收率為20.39至36.66%，而經過紳士塊菌發酵三天發酵產物的熱水萃取物收率上升至30.68至49.24%；此外，未經發酵穀物液態基質，乙醇萃取物收率為1.01至3.94%，經由紳士塊菌發酵三天，乙醇萃取物收率微幅上升2.31至4.96%；故經過紳士塊菌發酵後熱水萃取物及乙醇萃取物收率含量會上升一倍以上，而熱水萃取物收率遠比乙醇萃取物收率高出約十至十五倍，得知水溶性產物比非水溶性產物多，往後考量效率和成本，未來可以只收集殺菌後的發酵液即可。

可。

在表二結果顯示不同穀類液態基質未經紳士塊菌發酵前，20 mg/mL熱水萃取物清除DPPH自由基能力為40.36至52.63%，不同紳士塊菌液態發酵穀液類的熱水萃取物清除DPPH自由基能力為51.85至66.86%，以薏仁液態基質發酵後之清除DPPH自由基能力達最高66.86%，其次分別為小麥57.12%、糙米55.75%、大豆53.41%和燕麥51.85% ($p < 0.05$)，對照組的抗壞血酸及BHA分別為81.75及90.16%。不同穀液未經紳士塊菌發酵前，20 mg/mL乙醇萃取物清除DPPH自由基能力為30.68至49.24%，紳士塊菌發酵3天的穀液之乙醇萃取物清除DPPH自由基能力為40.34至59.28%，發酵的小麥、燕麥、糙米、薏仁和大豆分別為40.34、55.11、47.73、51.89和59.28%，以大豆清除DPPH自由基能力最高，其次為燕麥 ($p < 0.05$)。故針對紳士塊菌以不同穀類液態發酵後，熱水萃取物和乙醇萃取物之清除DPPH自由基能力均能夠顯著提高 ($p < 0.05$)。

Al-Lai th⁽²⁸⁾分析0.9至1.0 mg/mL的沙漠松露(*Tirmania nivea*)子實體甲醇萃取物之清除DPPH自由基能力能為85至90%， EC_{50} 為0.3至1.1 mg/mL，及另一株沙漠松露，5 mg/mL瘤孢地菌(*Terfezia boudieri*)子實體甲醇萃取物之清除DPPH自由基能力能為86%， EC_{50} 為0.58 mg/mL⁽¹⁴⁾；Guo等人⁽¹⁷⁾分析20 mg/mL印度塊菌(*Tuber indicum*)子實體的乙醇、石油醚、正丁醇和乙酸乙酯萃取物之清除DPPH自由基能力能皆為90%以上， EC_{50} 分別為1.61、2.87、1.38和2.24 $\mu\text{g/mL}$ ；Zhao等人⁽³¹⁾分析2.4 mg/mL中國塊菌(*Tuber sinence*)子實體的水及鹼溶劑萃取物之清除DPPH自由基能力能為45.9及35.98%；Beara等人⁽¹⁵⁾將夏塊菌(*Tuber aestivum*)子實體以水浸泡萃取、水索氏萃取、甲醇浸泡萃取及

表一 不同穀類紳士塊菌液態發酵產物之熱水及乙醇萃取物中收率

Table 1. Yields of hot water and ethanol extracts from different *Tuber magnatum* submerged fermented grain products

Medium	Yield (%) of water extract		Yield (%) of ethanol extract	
	0-day (Control)	3-days	0-day (Control)	3-days
Wheat	22.45 ± 0.01 ^d	34.66 ± 0.57 ^{c*}	1.27 ± 0.01 ^d	2.98 ± 0.04 ^{c*}
Oat	32.16 ± 0.01 ^b	42.42 ± 0.01 ^{b*}	2.43 ± 0.01 ^c	4.45 ± 0.06 ^{a*}
Brown rice	20.39 ± 0.02 ^c	30.68 ± 0.06 ^{d*}	1.01 ± 0.01 ^c	2.31 ± 0.07 ^{d*}
Adlay	28.69 ± 0.01 ^c	49.24 ± 1.43 ^{a*}	2.56 ± 0.01 ^b	3.41 ± 0.02 ^{b*}
Soy bean	36.66 ± 0.02 ^a	42.05 ± 0.98 ^{b*}	3.94 ± 0.01 ^a	4.96 ± 0.65 ^{a*}

* a-c Means within each column with followed by different letters are significantly different among the different grains ($p < 0.05$).

** Means in the each row are significantly different between the fermented grains and the control group ($p < 0.05$). Data are expressed as mean ± S. D. (n = 3).

表二 不同穀類紳士塊菌液態發酵產物之20 mg/mL熱水及乙醇萃取物之清除DPPH能力

Table 2. Scavenging DPPH ability of 20 mg/mL hot water and ethanol extracts from different *Tuber magnatum* submerged fermented grain products

Medium	Scavenging DPPH ability (%) of 20 mg/mL water extract		Scavenging DPPH ability (%) of 20 mg/mL ethanol extract	
	0-day (Control)	3-days	0-day (Control)	3-days
	Wheat	46.59 ± 0.89 ^b	57.12 ± 0.89 ^{b*}	34.66 ± 0.57 ^c
Oat	43.08 ± 0.89 ^c	51.85 ± 1.47 ^{c*}	42.42 ± 1.21 ^b	55.11 ± 0.80 ^{b*}
Brown rice	46.78 ± 0.59 ^b	55.75 ± 1.22 ^{b*}	30.68 ± 0.56 ^d	47.73 ± 1.50 ^{d*}
Adlay	52.63 ± 1.69 ^a	66.86 ± 1.35 ^{a*}	49.24 ± 1.43 ^a	51.89 ± 1.43 ^{c*}
Soy bean	40.35 ± 1.65 ^d	53.41 ± 0.34 ^{c*}	42.05 ± 0.98 ^b	59.28 ± 0.87 ^{b*}
Vitamin C	81.75 ± 0.98			
BHA	90.16 ± 0.55			

* a-c Means within each column with followed by different letters are significantly different among the different grains ($p < 0.05$).

** Means in the each row followed by different letters are significantly different compared with the control group ($p < 0.05$).

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

甲醇索氏萃取之萃取物清除DPPH自由基能力，EC₅₀分別為243.0、242.8、335.9和192.3 mg/mL，另外紳士塊菌(*Tuber magnatum*)子實體以水浸泡萃取、水索氏萃取、甲醇浸泡萃取及甲醇索氏萃取之萃取物清除DPPH自由基能力，EC₅₀分別只有149.2、414.1、277.8和232.7 μg/mL⁽¹⁵⁾。故不同品種的松露子實體的清除DPPH自由基能力相差非常大，而本研究經過紳士塊菌液態發酵產物之清除DPPH自由基能力雖會提升，但20 mg/mL熱水和乙醇萃取物之清除DPPH自由基能力約只在40~60%左右，此或許是因為液態發酵時間較短，而造成有些能夠幫助提升清除DPPH自由基能力之二級代謝產物尚未生成之故。

由表三結果顯示，不同穀類液態基質未經紳士塊菌發酵前，20 mg/mL熱水萃取物螯合亞鐵離子能力為43.40至57.88%，紳士塊菌以不同穀類液態基質發酵後，20 mg/mL熱水萃取物螯合亞鐵離子能力為51.21至65.96%，小麥、燕麥、糙米、薏仁和大豆的熱水萃取物之螯合亞鐵離子能力分別為56.88、51.21、53.90、65.96和64.82%，以薏仁與大豆發酵產物之螯合亞鐵離子能力最高，小麥次之($p < 0.05$)，對照組抗壞血酸及EDTA分別為82.07及90.50%。此外，不同穀類液態基質未經紳士塊菌發酵前，20 mg/mL乙醇萃取物螯合亞鐵離子能力為59.43至64.86%，紳士塊菌以不同穀類液態基質發酵後會提高20 mg/mL乙醇萃取物螯合亞鐵離子能力

表三 不同穀類紳士塊菌液態發酵產物之20 mg/mL熱水及乙醇萃取物之螯合亞鐵離子能力

Table 3. Chelating ferrous ions effect of 20 mg/mL hot water and ethanol extracts from different *Tuber magnatum* submerged fermented grain products

Medium	Chelating Fe ⁺² effect (%) of 20 mg/mL water extract		Chelating Fe ⁺² effect (%) of 20 mg/mL ethanol extract	
	0-day (Control)	3-days	0-day (Control)	3-days
	Wheat	44.47 ± 0.30 ^d	56.88 ± 1.49 ^{b*}	62.03 ± 0.33 ^c
Oat	43.40 ± 0.60 ^c	51.21 ± 0.25 ^{c*}	63.68 ± 1.33 ^b	72.96 ± 0.72 ^{d*}
Brown rice	51.49 ± 0.90 ^c	53.90 ± 1.07 ^{c*}	59.43 ± 0.33 ^d	75.64 ± 0.82 ^{c*}
Adlay	55.75 ± 0.93 ^b	65.96 ± 0.30 ^{a*}	63.68 ± 0.67 ^b	76.89 ± 0.47 ^{c*}
Soy bean	57.88 ± 0.67 ^a	64.82 ± 0.43 ^{a*}	64.86 ± 1.00 ^a	82.70 ± 0.27 ^{a*}
Vitamin C	82.07 ± 0.90			
EDTA	90.50 ± 0.73			

* a-c Means within each column with followed by different letters are significantly different among the different grains ($p < 0.05$).

** Means in the each row are significantly different between the fermented grains and the control group ($p < 0.05$). Data are expressed as mean ± S. D. (n = 3).

為72.96至82.70%，發酵小麥、燕麥、糙米、薏仁和大豆之乙醇萃取物螯合亞鐵離子能力分別為80.03、72.96、75.64、76.89和82.70%，以大豆螯合亞鐵離子能力最高，小麥次之($p < 0.05$)。故由表三顯示紳士塊菌以不同液態穀類基質發酵後，熱水和乙醇萃取物之螯合亞鐵離子能力均皆能顯著比未發酵前高($p < 0.05$)，且螯合亞鐵離子能力以乙醇萃取物之高於熱水萃取物。

Guo等人⁽¹⁷⁾分析12 mg/mL的印度塊菌(*Tuber indicum*)子實體以乙醇、石油醚、正丁醇和乙酸乙酯萃取之萃取物螯合亞鐵離子能力分別為89.9、69.5、88.0和77.4%，20 mg/mL印度塊菌的甲醇萃取物之螯合亞鐵離子能力最高， EC_{50} 分別為0.98、1.39、0.82和0.70 $\mu\text{g/mL}$ ，松露子實體之螯合亞鐵離子能力高達到70%，與而本研究紳士塊菌的液態發酵產物之20 mg/mL乙醇萃取物螯合亞鐵離子能力達72.96至82.70%相近。

表四為不同穀類液態基質未經紳士塊菌發酵前，20 mg/mL熱水萃取物還原力為0.34至0.81，而紳士塊菌以不同穀類液態基質發酵之20 mg/mL熱水萃取物還原力為0.47至0.93，小麥、燕麥、糙米、薏仁和大豆熱水萃取物之還原力分別為0.55、0.63、0.47、0.82和0.93，由以上數據顯示大豆培養之還原力最高，其次為薏仁($p < 0.05$)，對照組抗壞血酸及BHA分別為3.00及3.05。而不同穀類液態基質未經紳士塊菌發酵前，20 mg/mL乙醇萃取物還原力為0.45至0.61，紳士塊菌以不同穀類液態基質發酵後，20 mg/mL乙醇萃取物還原力為0.62至0.86，小麥、燕麥、糙米、薏仁和大豆乙醇萃取物之還原力分別為0.62、0.66、0.67、0.75和0.86，以

大豆的還原力最高，其次為薏仁($p < 0.05$)，故不同穀類經紳士塊菌液態發酵產物之熱水及乙醇萃取物的還原力，皆能顯著提高($p < 0.05$)。

Guo等人⁽¹⁷⁾分析20 mg/mL的印度塊菌(*Tuber indicum*)子實體乙醇、石油醚、正丁醇、和乙酸乙酯萃取物之還原力為0.559、0.281、0.790和0.168，故不同萃取溶劑會顯著影響松露子實體之萃取液的還原力，以正丁醇萃取物之還原力最高。Zhao等人⁽²⁸⁾分析0.6 mg/mL中國塊菌(*Tuber sinence*)子實體水及鹼溶劑萃取物之還原力為0.332及0.0078；Dođan and Aydin⁽¹⁴⁾分析0.4 mg/mL瘤孢地菌(*Terfezia boudieri*)子實體甲醇萃取物之還原力能只為0.214。本研究之紳士塊菌的液態發酵產物之穀物之20 mg/mL乙醇萃取物還原力已為0.62至0.86，故穀液透過紳士塊菌液態發酵確實可以提升抗氧化能力。

結 論

配製5%小麥、燕麥、糙米、白薏仁和大豆穀液作為紳士塊菌液態基質，在溫度25°C、120 rpm搖瓶震盪發酵三天，粗多醣含量為851.17至28.82 mg/g DW，並以紳士塊菌發酵薏仁液的粗多醣含量最高，達28.82 mg/g DW。不同穀類紳士塊菌液態發酵產物之熱水及乙醇萃取物抗氧化成分，經過紳士塊菌發酵，所有穀類發酵液的總多酚含量、類黃酮含量均有顯著提升，並以紳士塊菌大豆發酵液的總多酚和類黃酮含量最高，分別達9.05和1.31 mg/g DW；20 mg/mL紳士塊菌穀類液態發酵產物之熱水及乙醇萃取物之抗氧化活性，如：清除DPPH自由基能力、螯合亞鐵離子與還原能力均有顯著提升趨

表四 不同穀類紳士塊菌液態發酵產物之20 mg/mL熱水及乙醇萃取物的還原力

Table 4. Reducing power of 20 mg/mL hot water and ethanol extracts from different *Tuber magnatum* submerged fermentation grain products

Medium	Reducing power of 20 mg/mL water extract		Reducing power of 20 mg/mL ethanol extract	
	0-day (Control)	3-days	0-day (Control)	3-days
Wheat	0.475 ± 0.021 ^c	0.552 ± 0.003 ^{b*}	0.446 ± 0.002 ^c	0.623 ± 0.001 ^{ca*}
Oat	0.440 ± 0.003 ^d	0.628 ± 0.004 ^{a*}	0.517 ± 0.005 ^d	0.655 ± 0.006 ^{da*}
Brown rice	0.338 ± 0.006 ^c	0.471 ± 0.002 ^{a*}	0.526 ± 0.003 ^c	0.667 ± 0.016 ^{ca*}
Adlay	0.670 ± 0.002 ^b	0.816 ± 0.002 ^{a*}	0.612 ± 0.001 ^a	0.754 ± 0.004 ^{ba*}
Soy bean	0.810 ± 0.002 ^a	0.934 ± 0.001 ^{a*}	0.533 ± 0.001 ^b	0.855 ± 0.006 ^{aa*}
Vitamin C		3.000 ± 0.006		
BHA		3.052 ± 0.040		

*^{a-c} Means within each column with followed by different letters are significantly different among the fermented grains ($p < 0.05$).

** Means in the each row are significantly different between the fermented grains and the control group ($p < 0.05$). Data are expressed as mean ± S. D. (n = 3).

勢。

謝 誌

感謝農委會105農科-3.1.1-牧-U1「射頻殺菌和乾燥在固態發酵松露之研究」科技計畫之經費支持。

參 考 文 獻

- (1) 胡弘道：塊菌(松露)培育與食譜。第一版。臺北市：國立編譯館。1-104 (2010)。
- (2) Y. J. Tang, L. L. Zhu, D. S. Li, Z. Y. Mi and H. M. Li: Significance of inoculation density and carbon source on the mycelial growth and *Tuber* polysaccharides production by submerged fermentation of Chinese truffle *Tuber sinense*. *Process Biochem.*, **43**(5): 576-586 (2008a).
- (3) Y. J. Tang, L. L. Zhu, R. S. Liu, H. M. Li, D. S. Li and Z. Y. Mi: Quantitative response of cell growth and *Tuber* polysaccharides biosynthesis by medicinal mushroom Chinese truffle *Tuber sinense* to metal ion in culture medium. *Bioresour. Technol.*, **99**(16): 7606-7615 (2008b).
- (4) R. S. Liu, D. S. Li, H. M. Li and Y. J. Tang: Response surface modeling the significance of nitrogen source on the cell growth and *Tuber* polysaccharides production by submerged cultivation of Chinese truffle *Tuber sinense*. *Process Biochem.*, **43**(8): 868-876 (2008).
- (5) 胡弘道、王亞男、劉啟福：溫度及pH對臺灣塊菌與印度塊菌菌落在洋菜培養基上生長之效應。《中華林學季刊》，**41**(1): 43-58 (2008a)。
- (6) 胡弘道、王亞男、劉啟福：溫度及pH對法國黑孢塊菌、義大利白塊菌與擬外孔塊菌菌落在洋菜培養基上生長之效應。《中華林學季刊》，**41**(2): 181-198 (2008b)。
- (7) R. S. Liu and Y. J. Tang: *Tuber melanosporum* fermentation medium optimization by Plackett-Burman design coupled with Draper-Lin small composite design and desirability function. *Bioresour. Technol.*, **101**(9): 3139-3146 (2010).
- (8) Y. Tang, Y. Y. Li, H. M. Li, D. J. Wan and Y. J. Tang: Comparison of lipid content and fatty acid composition between *Tuber* fermentation mycelia and natural fruiting bodies. *J. Agric. Food Chem.*, **59**(9): 4736-4742 (2011).
- (9) Y. Tang, H. M. Li and Y. J. Tang: Comparison of sterol composition between *Tuber* fermentation mycelia and natural fruiting bodies. *Food Chem.*, **132**(3): 1207-1213 (2012).
- (10) P. Liu, H. M. Li and Y. J. Tang: Comparison of free amino acids and 5'-nucleotides between *Tuber* fermentation mycelia and natural fruiting bodies. *Food Chem.*, **132**(3): 1413-1419 (2012).
- (11) W. Zhao, X. H. Wang, H. M. Li, S. H. Wang, T. Chen, Z. P. Yuan and Y. J. Tang: Isolation and characterization of polysaccharides with the antitumor activity from *Tuber* fruiting bodies and fermentation system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**(5): 1991-2002 (2014a).
- (12) W. Zhao, D. D. Chai, H. M. Li, T. Chen and Y. J. Tang: Significance of metal ion supplementation in the fermentation medium on the structure and anti-tumor activity of *Tuber* polysaccharides produced by submerged culture of *Tuber melanosporum*. *Process Biochem.*, **49**(12): 2030-2038 (2014b)..
- (13) 許祐誠：應用深層液態培養義大利白松露(*Tuber magnatum*)生產總三萜-不同添加劑效應之探討。國立中興大學化學工程學系碩士學位論文。臺中，臺灣 (2012)。
- (14) H. H. Dođan and S. Aydin: Determination of antimicrobial effect, antioxidant activity and phenolic contents of desert truffle in Turkey. *Afr. J. Tradit., Complement. Alter. Med.*, **10**(4): 52-58 (2013).
- (15) I. N. Beara, M. M. Lesjak, D. D. Cetojevic-Simin, Z. S. Marjanovic, J. D. Ristic, Z. O. Mrkonjic and N. M. Mimica-Dukic: Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of black (*Tuber aestivum* Vittad) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles. *Food Chem.*, **165**: 460-466 (2014).
- (16) A. Hamza, N. Zouari, S. Zouari, H. Jdir, S. Zaidi, M. Gtari and M. Neffati: Nutraceutical potential, antioxidant and antibacterial activities of *Terfezia boudieri* Chatin, a wild edible desert truffle from Tunisia arid zone. *Arab. J. Chem.*, **9**(3): 383-389 (2013)
- (17) T. Guo, L. Wei, J. Sun, C. I. Hou and L. Fan: Antioxidant activities of extract and fractions from *Tuber indicum* cooke & massee. *Food Chem.*, **127**(4): 1634-1640 (2011).
- (18) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. Rebers and F. Smith: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**(3): 350-356 (1956).
- (19) J. Y. Lin and C. Y. Tang: Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chem.*, **101**: 140-147 (2007).
- (20) Q. D. Christel, G. Bernard, V. Jacques, D. Thierry, B. Claude, L. Michel, C. Micheline, B. Francois and T. Francis: Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculenym* Moench) hulls and flour. *J. Ethnopharmacol.*, **72**: 35-42 (2000).
- (21) C. Y. Chang, M. Y. Lue and T. M. Pan: Determination of adenosine, cordycepin and ergosterol. Contents in cultivated *Antrodia camphorate* by HPLC method. *J. Food Drug Anal.*, **13**: 38-42 (2005).
- (22) K. Shimada, K. Fujikawa, K. Yahara and T. Nakamura: Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agri. Food Chem.*, **40**: 945-948 (1992).
- (23) T. C. P. Dinis, V. M. C. Madeira and L. M. Almeida: Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-amino salicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.*, **315**: 161-169 (1994).
- (24) B. J. Xu and S. K. C. Chang: A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.*, **72**(2): S159-S166 (2015).
- (25) 黃國展：塊菌分離菌絲之培養與香味成分之研究。東海大學化學工程與材料工程學所碩士論文。臺中，臺灣。(2003)。
- (26) 吳文惠：以穀物澱粉為碳源的培養基中葡萄糖的動態變化。《食品科學》，**21**(4): 13-19 (2000)。
- (27) Q. N. Liu, R. S. Liu, Y. H. Wang, Z. Y. Mi, D. S. Li, J. J. Zhong and Y. J. Tang: Fed-batch fermentation of *Tuber melanosporum* for the hyperproduction of mycelia and

- bioactive *Tuber* polysaccharides. *Bioresour. Technol.*, **100**(14): 3644-3649 (2009).
- (28) A. A. A. Al-Laith: Antioxidant components and antioxidant/ antiradical activities of desert truffle (*Tirmania nivea*) from various Middle Eastern origins. *J. Food Compos. Anal.*, **23**(1): 15-22 (2010).
- (29) J. Vetter and D. Kruzelyi: Complex chemical evaluation of the summer truffle (*Tuber aestivum* Vittadini) fruit bodies. *J. Appl. Bot. Food Qual.*, **87**: 291-295 (2014).
- (30) 陳伯翰、陳淑德：茯苓固態發酵產物中多醣與三萜類之微波萃取。 *台灣農業化學與食品科學*，**51**(4,5,6): 188-194 (2013)。
- (31) L. Zhao, K. Wang, R. Yang, X. Wang, D. Chen and F. Shi: Antioxidant activity of the water-soluble and alkali-soluble polysaccharides from Chinese truffle *Tuber sinense*. *J. Anim. Vet. Adv.*, **11**(10): 1753-1756 (2012).