

含 β -聚葡萄糖之菇蕈類保健機能性食品規格基準

一、適用範圍

本規格基準適用於以菇蕈類原料所製成的含 β -聚葡萄糖(β -glucan)之食品。

二、定義

(一) 菇蕈類

菇蕈係指靈芝、香菇、磨菇、草菇、金針菇、牛樟芝、茯苓、銀耳、猴頭菇等可食真菌類。

(二) 菇蕈類 β -聚葡萄糖(β -glucan)

菇蕈類所含之多醣存在於真菌細胞壁中，真菌細胞壁由兩種多醣所組成，一種為緊實纖維狀的纖維素，另一種為基質狀的 α -聚葡萄糖、 β -聚葡萄糖和醣蛋白。多醣所具有的生理活性與其結構、組成、分子量、分支度等特性有關，近年來菇蕈類相關研究所得之具有抗腫瘤或免疫提昇特性的機能性多醣約可分為下列五類：(1)同元聚葡萄糖(homoglucans):主鏈為 β -(1-3)、 α -(1-3)、 β -(1-6)、 α -(1-6)，支鏈為 β -(1-6)、 β -(1-2)或 α -(1-4)鍵結。(2)異元聚葡萄糖(heteroglucans):主鏈為聚葡萄糖，支鏈為木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、木糖等。(3)異元聚半乳糖(heterogalactans):主鏈為聚半乳糖，支鏈為葡萄糖、海藻糖、木糖、阿拉伯糖等。(4)其他的異元聚醣(heteroglycans)：主鏈為聚木糖、聚海藻糖、聚甘露糖等，支鏈為葡萄糖、甘露糖、半乳糖等。(5)多醣蛋白或胜太複合物(polysaccharide-protein/peptide complexes)。本基準所指的 β -聚葡萄糖係指來自菇蕈類之具有抗腫瘤及免疫力提昇等生理活性的多醣，其主鏈結構以 β -糖苷鍵連接的聚葡萄糖為主。

(三) 含 β -聚葡萄糖之菇蕈類保健機能性食品

菇蕈類保健機能性食品係指利用可食菇蕈類等真菌或液態發酵培養所得的子實體或菌絲體等具有生物活性成分之產品。本基準所指之菇蕈類保健機能性食品特指來自於靈芝、巴西磨菇及猴頭菇之含 β -聚葡萄糖保健機能性食品，產品中 β -聚葡萄糖含量須達 3%(以乾重計)以上。

三、產品規格

(一) 外觀性狀

應具原有之風味及色澤，不得有腐敗、變色、異味、污染、發霉或含有異物。

(二) 規格成分含量

1. 符合標示。
2. 產品中 β -聚葡萄糖含量須達3%以上。

(三) 微生物限量

應符合衛生署公告之「食品衛生管理法」及「食品衛生標準」。

(四) 重金屬

1. 應符合衛生署公告之「食品衛生標準」中之「食用菇類重金屬限量標準」。
 - (1) 本標準依食品衛生管理法第十條規定訂定之。
 - (2) 本標準適用食用菇類之子實體，不適用其菌絲體。
 - (3) 食用菇類中重金屬含量應符合以下限量：

項目	限量(以乾重計)
鉛	3 ppm 以下
鎘	2 ppm 以下

2. 應符合衛生署公告之相關規定：重金屬最大容許量為20 ppm(以鉛計)；砷最大容許量為2 ppm。

(五) 殘留農藥

1. 應符合衛生署公告之「殘留農藥安全容許量」。

國際普通名稱	普通名稱	容許量 (ppm)	備註
Allethrin	亞烈寧	3.0	殺蟲劑
Carbendazim	貝芬替	0.5	殺菌劑
Diazinon	大利松	0.2	殺蟲劑

Dicloran	大克爛	0.5	殺菌劑
Malathion	馬拉松	2.0	殺蟲劑
Prochloraz	撲克拉	0.5	殺菌劑
Pyrethrins	除蟲菊精	1.0	殺蟲劑
Thiabendazole	腐絕	5.0	殺菌劑

2. 產品使用之各項原料應符合衛生署公告之「殘留農藥安全容許量」。

(六) 包裝

食品器具、容器、包裝：應符合衛生署公告之「食品衛生標準」。

(七) 其他

四、標示

(一) 應符合衛生署公告之「食品衛生管理法」及相關規定。

(二) 應列出 β -聚葡萄糖之含量。

五、檢驗方法

(一) 裝置及試藥

- Mushroom and yeast β -glucan assay kit (megazyme) ，內含
 - exo-1,3- β - glucanase(100 U/mL)及 β -glucosidase (20 U/mL)懸浮液，4°C下可穩定儲存4年。
 - amyloglucosidase (1630 U/mL)及溶於50 % (v/v)甘油中的invertase(500 U/mL)溶液，4°C下可穩定儲存2年，-20°C下可穩定儲存4年。
 - 濃縮葡萄糖試劑緩衝液，4°C下可穩定儲存2年，-20°C下可穩定儲存4年。
 - 濃縮葡萄糖測定試劑，溶於緩衝液(3)後glucose oxidase > 12,000 U/L，peroxidase > 650 U/L，4-aminoantipyrine 0.4 mM，-20°C下可穩定儲存4年。

- (5) D-glucose標準溶液(1.00 mg/mL)。
- (6) 由酵母菌 β -聚葡萄糖製備之控制樣品，室溫下可穩定儲存5年。
2. 醋酸鈉緩衝溶液(200 mM，pH 5.0):將11.6 mL冰醋酸(1.05 g/mL)加到900 mL蒸餾水中，以4 M(16 g/100mL)氫氧化鈉溶液調至pH 5.0，定量至1 L，在4°C下約可穩定儲存1年。
 3. 醋酸鈉緩衝溶液(1.2 M，pH 3.8): 將69.6 mL冰醋酸(1.05 g/mL)加到800 mL蒸餾水中，以4 M氫氧化鈉溶液調至pH 3.8，定量至1 L，在室溫下可穩定儲存2年。
 4. 氫氧化鉀(2 M)：將112 g氫氧化鉀加入800 mL蒸餾水，攪拌至溶解，定量至1 L，在室溫下可穩定儲存2年。
 5. 鹽酸(37 % (v/v)，約10 M)
 6. 酵素懸浮液：將8 mL 的200 mM 醋酸鈉緩衝液(pH 5.0) 加到exo-1,3- β -glucanase(100 U/mL)及 β -glucosidase(20 U/mL)懸浮液中，以聚丙烯瓶適量分裝儲存於-20°C，使用時應放在冰桶中。所稀釋的試劑在-20°C下可穩定儲存2年。
 7. 稀釋葡萄糖試劑緩衝液：以蒸餾水稀釋濃縮葡萄糖試劑緩衝液至1 L，所稀釋的試劑在4°C下可穩定儲存2年。
 8. 稀釋葡萄糖試劑緩衝液：將濃縮葡萄糖測定試劑加入稀釋的葡萄糖試劑緩衝液。將此試劑混合液(GOPOD)分裝儲存於褐色瓶中，此試劑在4°C下可穩定儲存2-3月，在-20°C下可穩定1年
 9. 水浴鍋：可維持水溫於40°C。
 10. 分光光度計：測定波長510 nm。
 11. 滾水浴
 12. 高速離心機：速度可達3000 rpm，約1500 g。

(二) 方法

1. 測定總聚葡萄糖(α -聚葡萄糖+ β -聚葡萄糖)及以寡糖、蔗糖及游離葡萄糖型態存在的葡萄糖

- (1) 稱取約100 mg樣品至試管底部，加入1.5 mL濃鹽酸(37%)，以振盪器劇烈混合，將試管放入30°C水浴維持45分鐘，每15分鐘以振盪器混合，確認β-聚葡萄糖完全溶解。
 - (2) 加入10 mL的水，以振盪器混合均勻，鬆開試管上蓋，將試管放入滾水浴(~100°C)，5分鐘後蓋緊蓋子並在滾水浴中維持2小時，之後冷卻至室溫，小心鬆開蓋子，並加入10 mL 2 N KOH。
 - (3) 將試管內容物轉移至100 mL定量瓶，以200 mM 醋酸钠緩衝溶液(pH = 5.0)清洗試管，並定量至100 mL，翻轉試管將內容物混合均勻。之後將懸浮液以玻璃濾紙過濾或1500 g離心10分鐘。
 - (4) 取0.1 mL經過濾或離心的液體至試管底部(二重覆)，加入0.1 mL exo-1,3-β-glucanase (20 U/mL)及β-glucosidase (4 U/mL)酵素懸浮液，以振盪器混合，在40°C下維持60分鐘。
 - (5) 加入3 mL GOPOD試劑，於40°C下維持20分鐘後於510 nm下測其吸收值。
 - (6) 每一批次測定應包括至少一個酵母菌或真菌製備物的控制樣品及D-葡萄糖標準液(0.1 mL的1 mg/mL D-葡萄糖標準液，加0.1 mL的醋酸緩衝液，加3 mL的GOPOD試劑)，以試劑空白值(0.2 mL的醋酸緩衝液加3 mL的GOPOD試劑)歸零測定。
2. 測定α-聚葡萄糖(植物肝糖(phytglycogen)+澱粉)及以蔗糖及游離D-葡萄糖型態存在的D-葡萄糖
- (1) 稱取約100 mg樣品至試管底部，放入小磁石(5 * 15 mm)，加入2 mL 2 M KOH，在置於攪拌器上的冰水浴中攪拌約20分鐘，使植物肝糖及澱粉溶解。
 - (2) 加入8 mL 1.2 M醋酸钠緩衝溶液(pH=3.8)，之後立即加入0.2 mL的 amyloglucosidase (1630 U/mL)及invertase(500

U/mL)溶液，混合均勻後置於40°C的水浴中維持30分鐘，期間以振盪器混合均勻。

- (3) 若樣品中 α -聚葡萄糖含量大於10%，則將試管內容物轉移至100 mL定量瓶，以水定量後混合均勻，之後以1500 × g 離心10分鐘或以1號濾紙過濾；若樣品中 α -聚葡萄糖含量小於10%，則將試管內容物直接以1500 g 離心10分鐘。酵母菌及菇類樣品的 α -聚葡萄糖通常小於10%，但有些生長於穀物類培養基的市售菇類菌絲體，產品中澱粉的含量可能高達75%，此類樣品在測定 α -葡聚糖時需注意調整其稀釋倍數。
- (4) 取0.1 mL經過濾或離心的液體至試管底部(二重覆)，加入3 mLGOPOD試劑，於40°C下維持20分鐘後於510 nm下測其吸收值。

(三) 計算

$$\begin{aligned}\text{Total Glucan (\% w/w)} &= \Delta E \times F \times \frac{100}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \\ &= \Delta E \times F / W \times 90\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\alpha - \text{Glucan (\% w/w)} &= \Delta E \times F \times 1000(\text{或}103) \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \\ &= \Delta E \times F / W \times 90 (\text{最終體積為}100\text{mL}) \\ &= \Delta E \times F / W \times 9.27 (\text{最終體積為}10.3\text{mL})\end{aligned}$$

$$\beta - \text{Glucan (\%)} = \text{Total Glucan} - \alpha - \text{Glucan}$$

$$\beta - \text{D} - \text{glucan (\%)} = \Delta A \times \frac{F}{SW} \times 8.46$$

其中， ΔE = 樣品反應吸收值 - 樣品空白吸收值

F = 每 μg D-glucose 與吸光值之轉換係數

W = 樣品重 (mg)

六、補充說明資料

- (一) 目前國內外並無公定 β -聚葡萄糖分析方法，對於 β -聚葡萄糖之分析謹說

明如下：

1. 現有之菇蕈類多醣中，結構已被鑑定出來，且已有商業販售，臨床上用於癌症病人療程中的輔助療法之多種具有抗腫瘤或免疫調節功能的多醣如下，包括香菇多醣 (letinan)、裂褶菌多醣 (schizophyllan)、雲芝多醣 (PSK Krestin) 及多醣胜肽 (PSP polysaccharides peptide)、舞菇製劑 Grifola D 等。香菇多醣和裂褶菌多醣為由 β -(1-3) 主鏈與 β -(1-6) 支鏈組合而成的聚葡萄糖；雲芝多醣為含 β -(1-3)、 β -(1-4) 主鏈與 β -(1-6) 支鏈的多醣，其主要所含的單糖為葡萄糖，PSK 中含有海藻糖而 PSP 中含有阿拉伯糖和鼠李糖。
2. 如基準之定義中所述，菇蕈類所含之具生理活性之多醣種類繁多且結構複雜，由於結構的多樣性造成定量分析上的困難，因此目前並無一合適例行分析方法可以定量機能性多醣，由於上述之已商業販售的多醣製劑多以 β -(1-3)-D-聚葡萄糖為結構主體，因此定量方法的發展大多以此為出發點，目前可分為下列幾類：(1) 免疫反應法：首先純化欲定量之標的多醣，以標的多醣使動物藉由免疫反應產生抗體，純化抗體，以所純化之抗體經化學修飾後來定量標的多醣。此法為目前較能定量出機能性多醣含量之方法，但其所利用之抗體僅能定量其所對應之機能性多醣，無法廣泛地應用於定量其他結構的機能性多醣，且純化多醣、製備抗體等步驟耗時費功，定量成本昂貴，不適用於一般例行性分析，但若針對各種不同結構的機能性多醣發展為商業化抗體試劑，則可能成為一種精確快速的機能性多醣測定法。(2) aniline blue 螢光測定法：利用 aniline blue 可與 β -(1-3)-D-聚葡萄糖形成具有強螢光特性的複合物，來定量 β -(1-3)-D-聚葡萄糖。此法為一簡易快速的方法，但無法測出真正具機能性多醣的含量且分析結果易受干擾，較適於方法開發時之初步測試及單一產品的線上品質監控。(3) 酵素水解配合高效能液相層析法：利用 (1-3)- β -D-glucanases 將 (1-3)- β -D-聚葡萄糖水解成小分子糖類後，定量小分子糖類的含量來計算其總量。此法較螢光測定法不易受干擾，雖其測出之多醣含量與具機能性多醣之含量，仍有一段差

距，但若有適當水解條件可完全水解(1→3)-β-D-聚葡萄糖，則可較精確地定出(1→3)-β-D-聚葡萄糖之含量，但僅以酵素不易完全將(1-3)-β-D-聚葡萄糖水解。

3. 基於上述說明，目前並無可精確定量機能性多糖的分析方法，本基準綜合各方考量，建議參考 megazyme 公司的”mushroom and yeast beta-glucan assay”分析套組，其先以酸及酵素將總聚葡萄糖水解成葡萄糖後，定量葡萄糖的含量，再扣除 α-聚葡萄糖來計算 β-聚葡萄糖的量。

(二) 相關分析項目之檢驗方法如下：

項 目	檢 驗 方 法
重 金 屬	食品中重金屬之檢驗方法--鎘之檢驗(二) (中華民國 92 年 4 月 4 日署授食字第 0929206232 號) 食品中重金屬檢驗方法--鉛之檢驗(二)(中華民國 92 年 12 月 23 日署授食字第 0929227157 號) AOAC999.10、AOAC999.11
殘留農藥	食品中殘留農藥檢驗方法(中華民國 94 年 8 月 24 日署授食字第 0949424750 號)
一般生菌數	食品微生物之檢驗法-生菌數之檢驗 CNS10890
大腸桿菌群	食品微生物之檢驗法-大腸桿菌群之檢驗 CNS10984
大腸桿菌	食品微生物之檢驗法—大腸桿菌之檢驗(中華民國 90 年 4 月 20 日衛署食字第 0900025538 號)
病原菌	依照行政院衛生署公告以及 CNS 國家標準。
病原菌	依照行政院衛生署公告以及 CNS 國家標準。

(三) 衛生署公告之「食品衛生管理法」之規定:有容器或包裝之食品、食品添加物，應以中文及通用符號顯著標示下列事項於容器或包裝之上：

1. 品名。

2. 內容物名稱及重量、容量或數量；其為二種以上混合物時，應分別標明。
3. 食品添加物名稱。
4. 廠商名稱、電話號碼及地址。輸入者，應註明國內負責廠商名稱、電話號碼及地址。
5. 有效日期。經中央主管機關公告指定須標示製造日期、保存期限或保存條件者，應一併標示之。
6. 其他經中央主管機關公告指定之標示事項。經中央主管機關公告指定之食品，應以中文及通用符號顯著標示營養成分及含量；其標示方式及內容，並應符合中央主管機關之規定。

(四) 衛生署公告之「食品衛生標準」中之「食用菇類重金屬限量標準」可參閱中華民國96年6月29日衛署食字第0960404397號令。

(五) 衛生署公告之「殘留農藥安全容許量」可參閱中華民國96年10月17日衛署食字第0960407051號令之葷菜類標準。

(六) 衛生署公告之「健康食品營養成分及含量之標示方式」(中華民國92年12月23日衛署食字號第0920402301號公告):健康食品應於包裝容器外表之明顯處所提供以下標示內容：

1. 營養標示之標題。
2. 熱量。
3. 蛋白質、脂肪、碳水化合物、鈉之含量（註：此碳水化合物包括膳食纖維）。
4. 其它出現於營養宣稱中之營養素含量。
5. 廠商自願標示之其他營養素含量。
6. 保健功效之相關成分含量。

(七) 衛生署公告之「食品衛生標準」中之「食品器具、容器、包裝衛生標準」可參閱中華民國94年07月15日衛署食字第 0940405538號令。

七、參考資料

1. Megazyme Mushroom and Yeast Beta-glucan Assay 操作手冊(2007)
2. Zhang, M., Cui, S.W., Cheung, P.C.K. and Wang, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in food science and technology*. 18:4-19. (2007)
3. 行政院衛生署：健康食品管理法(2006)
4. 行政院衛生署：健康食品衛生標準(1999)
5. 行政院衛生署：食品衛生管理法(2002)
6. AOAC International. 2003. Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods. In. "Official Methods of Analysis of AOAC International" 17th ed. 999.10. William Horwitz ed. Gaithersburg, MD U.S.A
7. AOAC International. 2003. Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods. In. "Official Methods of Analysis of AOAC International" 17th ed. 999.11. William Horwitz ed. Gaithersburg, MD U.S.A
8. 行政院衛生署：食品殘留農藥安全容許量(2007)
9. 行政院衛生署：食品中殘留農藥檢驗方法-多重殘留分析方法(三)(2005)
10. 經濟部工業局：食品良好作業規範(2006)
11. 經濟部標準檢驗局：食品微生物之檢驗法-生菌數之檢驗 CNS10890(1991)
12. 經濟部標準檢驗局：食品微生物之檢驗法-大腸桿菌群之檢驗 CNS10984 (1998)
13. 行政院衛生署：食品微生物之檢驗法—大腸桿菌之檢驗(2001)
14. 行政院衛生署：健康食品工廠良好作業規範(1999)
15. 行政院衛生署：市售包裝食品營養宣稱規範(2007)
16. 行政院衛生署：市售包裝食品營養標示規範 (2007)
17. 行政院衛生署：健康食品營養成分及含量之標示方式(2004)
18. 行政院衛生署：食品器具、容器、包裝衛生標準(2005)