

東海大學化學工程與材料工程研究所

Graduate Institute of Chemical Engineering

Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：楊芳鏘教授

Advisor : Fan-Chiang Yang, Ph.D.

培養策略對蛹蟲草生理活性成分生成之影響

The influence of different cultivation strategies on the formation of
bioactive ingredients in submerged culture of *Cordyceps militaris*

研究生：賴榮駿 撰

Graduate student : Rong-Jyun Lai

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

摘要

蛹蟲草(*Cordyceps militaris*，又稱為北冬蟲夏草或北蟲草)已被用做冬蟲夏草之替代品，並在西方國家市場被高度期待。其具有廣泛多元的生物活性，例如抗發炎、抗氧化、抗衰老、抗腫瘤、免疫調節等等，主要的有效成分為一次代謝產物腺苷與二次代謝產物蟲草素。本研究主要探討利用不同的培養策略與添加物對蛹蟲草菌體活性成分生成之影響，包括靜置培養之饋料批次試驗、兩階段培養之饋料批次試驗與重複式批次培養之試驗等三種策略。

靜置培養之饋料批次試驗與兩階段培養之饋料批次試驗皆是以添加碳源葡萄糖與氮源 YE 獲得較多的菌體總量與一次代謝產物腺苷，在總培養天數 31 天時有最多的菌體總量，測得 30.72 (g/L)、26.29 (g/L)，在總培養天數 17 天時於胞內有最多的腺苷含量，測得 36.91 (mg/L)、64.89 (mg/L)。然而，此二種培養策略皆是以添加大豆勝肽，在總培養天數 31 天時於胞外測得最多的蟲草素含量為 580.46 (mg/L)、706.85 (mg/L)。其中，蛹蟲草菌種經由兩階段培養之饋料批次試驗所測得的腺苷與蟲草素含量皆優於靜置培養策略，顯示利用震盪轉靜置兩階段培養策略有助於提升蛹蟲草之有效成分腺苷與蟲草素。

重複式批次培養策略包含震盪培養與靜置培養，在以靜置方式進行重複式批次兩個循環的培養有較佳效果，在第二個循環下測得最多的蟲草素含量為 895.25 ($\mu\text{g/ml}$)，為前一循環的 1.55 倍。顯示利用重複式批次培養策略對於蛹蟲草之生物活性成分蟲草素有所提升。本研究結果對提高蛹蟲草生理活性成分提供可行性之培養策略與添加物。

關鍵字：蛹蟲草、靜置培養、兩階段培養、重複式批次培養、蟲草素。

Abstract

Cordyceps militaris has been used as a substitute of *Cordyceps sinensis*. Its demand is quickly rising in the whole world. The biological activities, like anti-inflammatory, antioxidant, anti-aging, antitumor and immunoregulation have been well known. Two of main active ingredients are primary metabolite (adenosine) and secondary metabolites (cordycepin). In this study, different culture strategies and additive were tested to investigate their influence on the formation of bioactive components in submerged cultures of *Cordyceps militaris*. The main experiment items included static culture with fed-batch, two-stage culture with fed-batch operation, and repeated batch culture.

In the tests of static cultures or two-stage cultures with fed-batch operation the addition of glucose and yeast extract achieved higher biomass and primary metabolite (adenosine). The levels of biomass concentration reached 30.72 (g/L) and 26.29 (g/L) on day 31, respectively and the corresponding adenosine concentration were 36.91 (mg/L) and 64.89 (mg/L) on day 17. However, adding soy peptide could obtain higher cordycepin concentration, which were 580.46 (mg/L) and 706.85 (mg/L) on day 31, respectively. Among various culture strategies, contents of adenosine and cordycepin in two-stage culture with fed-batch operation were higher than the static culture with fed-batch operation. So the strategy of two-stage culture is superior to that of static culture for the production of the active ingredients of *Cordyceps militaris*.

The tests of repeated batch culture were performed in Erlenmeyer flask in either shaking or static ways. The static repeated batch culture was demonstrated to be better, in which the concentration of cordycepin reached to 895.25 (μ g/ml) in second cycle, and was 1.55 times more than the first cycle. The strategy of repeated batch culture was proved to be effective for enhancing the active ingredients cordycepin of *Cordyceps militaris*. The results of this study provide the practicable strategies and additives for improving the active ingredients of *Cordyceps militaris*.

Keywords: *Cordyceps militaris*, static culture, two stage culture, repeated batch culture, cordycepin.

目錄

摘要.....	I
Abstract	II
目錄.....	III
圖目錄.....	V
表目錄.....	VI
第一章 緒論.....	1
1-1 前言.....	1
1-2 研究動機.....	2
第二章 文獻回顧.....	3
2-1 蟲草記載.....	3
2-2 蛹蟲草簡介.....	4
2-3 蛹蟲草型態.....	6
2-4 蛹蟲草分類.....	7
2-5 生物活性成分.....	9
2-5-1 蟲草素.....	9
2-5-2 腺苷.....	10
2-5-3 其他成分.....	10
2-6 蛹蟲草固態與液態發酵技術.....	12
2-6-1 液態發酵與生物活性成分.....	12
2-6-2 固態發酵與生物活性成分.....	15
2-6-3 蛹蟲草液態發酵技術.....	16
2-6-4 蛹蟲草固態發酵技術.....	18
2-6-5 重複式批次培養技術(Repeated-batch culture).....	20
第三章 實驗材料與方法.....	21
3-1 實驗材料.....	21
3-1-1 實驗菌種.....	21
3-1-2 實驗藥品.....	22
3-2 實驗儀器.....	23
3-3 分析方法.....	25
3-3-1 蟲草素、腺苷測定.....	25
3-4 實驗方法.....	26

3-4-1 實驗架構.....	26
3-4-2 菌種保存、製備與培養.....	27
3-4-2-1 菌種保存.....	27
3-4-2-2 菌種製備與培養.....	27
3-4-3 靜置培養之饋料批次試驗.....	28
3-4-4 兩階段培養之饋料批次試驗.....	29
3-4-5 重複式批次培養之試驗.....	30
第四章 結果與討論.....	33
4-1 液態震盪培養與靜置培養之探討.....	33
4-1-1 液態震盪培養之生長曲線.....	33
4-1-2 液態靜置培養.....	34
4-2 靜置培養之饋料批次試驗.....	35
4-3 兩階段培養之饋料批次試驗.....	39
4-4 重複式批次培養之試驗.....	49
4-4-1 重複式批次培養(震盪).....	50
4-4-2 重複式批次培養(靜置).....	58
第五章 結論與未來展望.....	66
5-1 結論.....	66
5-2 未來展望.....	67
參考文獻.....	68

圖目錄

圖 2-1 蟲草素結構.....	11
圖 2-2 腺苷結構.....	11
圖 2-3 基礎培養基與最佳化培養基在重複式批次操作下的生長曲線:.....	20
圖 3-1 <i>Cordyceps militaris</i> 在 PDA 上的外觀.....	21
圖 3-2 生長箱.....	32
圖 3-3 玻璃罐.....	32
圖 4-1 液態震盪培養之生長曲線.....	33
圖 4-2 靜置培養-無添加(胞內).....	34
圖 4-3 添加碳氮源對靜置培養胞內活性成分生成之影響.....	37
圖 4-4 添加碳氮源對靜置培養胞外活性成分生成之影響.....	37
圖 4-5 添加大豆胜肽對靜置培養胞內活性成分生成之影響.....	38
圖 4-6 添加大豆胜肽對靜置培養胞外活性成分生成之影響.....	38
圖 4-7 兩階段培養之生長曲線.....	39
圖 4-8 兩階段培養試驗-無添加(胞內).....	42
圖 4-9 兩階段培養試驗-無添加(胞外).....	42
圖 4-10 添加碳氮源對兩階段培養胞內活性成分生成之影響.....	43
圖 4-11 添加碳氮源對兩階段培養胞外活性成分生成之影響.....	43
圖 4-12 添加大豆胜肽對兩階段培養胞內活性成分生成之影響.....	44
圖 4-13 添加大豆胜肽對兩階段培養胞外活性成分生成之影響.....	44
圖 4-14 添加糙米漿對兩階段培養胞內活性成分生成之影響.....	45
圖 4-15 添加糙米漿對兩階段培養胞外活性成分生成之影響.....	45
圖 4-16 添加小米對兩階段培養胞內活性成分生成之影響.....	46
圖 4-17 添加小米對兩階段培養胞外活性成分生成之影響.....	46
圖 4-18 重複式批次培養試驗(震盪培養)-基礎培養基.....	51
圖 4-19 重複式批次培養試驗(震盪培養)-培養基 1.....	52
圖 4-20 重複式批次培養試驗(震盪培養)-培養基 2.....	53
圖 4-21 重複式批次培養試驗(震盪培養)-培養基 3.....	54
圖 4-22 重複式批次培養試驗(震盪培養)-培養基 4.....	55
圖 4-23 重複式批次培養試驗(震盪培養)-培養基 5.....	56
圖 4-24 重複式批次培養試驗(靜置培養)-基礎培養基.....	59
圖 4-25 重複式批次培養試驗(靜置培養)-培養基 1.....	60
圖 4-26 重複式批次培養試驗(靜置培養)-培養基 2.....	61
圖 4-27 重複式批次培養試驗(靜置培養)-培養基 3.....	62
圖 4-28 重複式批次培養試驗(靜置培養)-培養基 4.....	63
圖 4-29 重複式批次培養試驗(震盪培養)-培養基 5.....	64

表目錄

表 2-1、冬蟲夏草與蛹蟲草在外觀和特性方面的比較	4
表 2-2、幾種常見蟲草比較	7
表 3-1、實驗藥品清單	22
表 3-2、實驗儀器清單	23
表 3-3、液態培養基	28
表 3-4、生長箱之培養環境條件	29
表 3-5、重複式批次培養之培養基種類	31
表 4-1、靜置與兩階段之饋料批次培養比較 - 腺苷活性總量	47
表 4-2、靜置與兩階段之饋料批次培養比較 - 蟲草素活性總量	48
表 4-3、重複式批次培養(震盪)試驗之活性總量	57
表 4-4、重複式批次培養(靜置)與文獻結果比較	65

第一章 緒論

1-1 前言

冬蟲夏草藥材在中國、日本及其他亞洲國家做為醫藥目的使用相當普遍，由於野生天然冬蟲夏草受限於氣候及產地，來源日益稀少，蛹蟲草(*Cordyceps militaris*，又稱北冬蟲夏草或北蟲草)已被用做冬蟲夏草之替代品，在泛蟲草類真菌中僅次於冬蟲夏草為最具有發展潛力的種類。

蛹蟲草寄主已超過三目十一科十九種，廣泛分布於寒、溫氣候帶及熱帶、亞熱帶地區。蛹蟲草具有廣泛多元化生物活性，例如壯陽、抗發炎、抗氧化/抗衰老、抗腫瘤、免疫調節、抗微生物、降血糖/降血脂、抗疲勞、神經保護、保乾、固腎及益脾等，除了普遍被各年齡層應用為滋補藥物(tonic medicine)，也廣泛被現代醫藥體系所應用，在西方國家成藥(over-the-counter medicine)市場已被高度期待。

研究指出蛹蟲草主要的有效成分為一次代謝產物腺苷(Adenosine)與二次代謝產物蟲草素(Cordycepin)，分別具有抗病毒、抗菌、抗惡性腫瘤與防止心律不整、抑制心肌收縮、舒張血管平滑肌等功效。

1-2 研究動機

近年來，人們的健康意識逐漸提高，所謂「預防勝於治療」，預防意指保健，治療意指藥物醫療，因此，保健食品也被更多人所重視。然而中醫藥也進入全民健保體系照顧民眾健康，並漸漸獲得消費者的信賴。如何結合科技與實證，將生技產業科研成果導入中醫藥的治療體系，提升中醫藥的利用率並促進發展，相信是許多人所期盼的。本研究利用不同培養策略，探討蛹蟲草生理活性成分的影響，期望能藉此促進蛹蟲草有效成分的提升。

第二章 文獻回顧

2-1 蟲草記載

1694 年，清代汪昂，補圖本草備要中記載「冬蟲夏草、甘平、保肺益腎、止血化痰、止勞咳」、1757 年吳儀洛所著的《本草從新》提到《黔囊》稱冬蟲夏草，《本草問答》稱蟲草，甘肅稱冬蟲草。1795 年趙學敏所著《本草綱目拾遺》〈柳崖外篇〉中寫到「性甘、味平，歸肺腎經，補肺益腎、止血化痰、用於久咳虛喘、勞嗽咳血、陽萎遺精、腰膝酸痛」之功效，可「秘精益氣，專補命門」；《中藥大辭典》中提到，其味甘酸、性平、氣香、入肺腎二經，可強壯、益肺腎、補虛損、益精氣、解毒、止血化痰。1615 年，明朝內府大御醫、著名醫學家龔廷賢的《壽世保元》藥性歌四百味中：「冬蟲夏草，味甘性溫，虛勞咯血，陽痿遺精」。清代藥學名著《藥性考》（原名《太醫院手記》）中記載「味甘、性溫、秘精益氣，專補命門」。上述這些古典中醫文獻皆顯示出冬蟲夏草已成為重要的保健藥材之一（呂昫陞，2009）。然而，由於野生冬蟲夏草受到氣候與產地限制，來源日漸稀少，品種純正與否亦有待確認，目前之研究顯示蛹蟲草與冬蟲夏草之成分類似，未來具有極高潛力可取代冬蟲夏草

2-2 蛹蟲草簡介

蛹蟲草(*Cordyceps militaris*)又稱北冬蟲夏草、蛹草、北方蟲草或北蟲草。屬於子囊菌門，肉座菌目，麥角菌科，蟲草屬 (呂昫陞，2009)。寄主範圍廣泛，主要為鱗翅目的舟蛾科、天蛾科、大蠶蛾科、蠶蛾科、刺蛾科、尺蠖科、枯葉蛾科；鞘翅目的金龜科、花金龜科；雙翅目的大蚊科；適合生活的環境，要求土壤表層腐植質豐富，土壤含水量約 15%，呈中性或偏酸性的山地黃土。生長於土壤層厚度約 15~20 公分，質地疏鬆，砂礫石較少之區域。林間氣候溫度約 20~26 °C，相對濕度 85% 以上，是最適合蛹蟲草生長的條件 (林冠廷，2009)。表 2-1 為冬蟲夏草與蛹蟲草在外觀和特性方面的比較 (孫和張，2002)。

表 2-1、冬蟲夏草與蛹蟲草在外觀和特性方面的比較

名稱	子實體 顏色	子座形狀	寄主情況	對生長環境的要求
冬蟲夏草	黑褐色	圓柱狀	專一昆蟲上， 形態單一	嚴格，海拔 3000m 以上
蛹蟲草	橙黃色	橢圓狀	多種昆蟲的蛹上， 形態多樣	不嚴格

西元 1727 年，Vaillant 於《Botanicon Parisiense》一書中正式把蛹蟲草定名為 *Cordyceps militaris*。1982 年小林氏分類統計蟲草屬共有多達 282 種(Kobayasi, 1982)，其中又可區分為菌生蟲草和蟲生蟲草兩種。前者寄生在麥角菌屬 (*Claviceps*)及大團囊屬(*Elaphomyces*)的子實體上，後者寄生在昆蟲與蜘蛛體。

蟲生蟲草的寄主包含雙翅目 (*Diptera*)、膜翅目 (*Hymenoptera*)、鞘翅目 (*Coleoptera*)、鱗翅目 (*Lepidoptera*)、半翅目 (*Hemiptera*)、異翅目 (*Isoptera*)、直翅目 (*Orthoptera*)、等翅目 (*Homoptera*)等昆蟲綱的蛹與成蟲等 (Mains, 1958; McEwen, 1963; 徐和曾, 1992)。蛹蟲草生長在海拔 2500 公尺以下，有陽光照射的向陽地帶，子實體常發生於每年的夏秋之際，目前蛹蟲草的寄主超過三目十一科十九種，廣泛分布在寒、溫氣候帶，及熱帶、亞熱帶地區 (曾等人, 2011)。2010 年蒙古北方布里雅特共和國(Republic of Buryat)與俄羅斯 Irkutsk oblast 地區夏秋季間出現蛹蟲草與蟲草類真菌的疾病，巨異蛾類(Macroheterocera)及錘角葉蜂科(Cimbicidae)之葉蜂共有七科三十多種寄主受感染並於蛹期死亡 (Kryukov *et al.*, 2011)。蛹蟲草生長發育的最佳溫度是 17~25°C，子實體分化形成要求光照強度在 150lx 以上(王等人, 2006)。

2-3 蛹蟲草型態

蛹蟲草在型態上部分與冬蟲夏草相似，一般為單生子座或數個從寄主頭部生長出，也有從蟲體節部長出，子座為橘黃色或橘紅色的頂部略膨大的呈棒狀的子座，一般不分枝，有時分枝，長度約 3 至 5 公分。頭部呈棒狀，長 1 至 2 公分，粗 3 至 5 mm，表面略粗糙。此外，人工培養蛹蟲草與天然蛹蟲草外型類似，但其長度與寬度略大，平均為 7 至 5 公分，寬度為 7 至 5 mm，而冬蟲夏草為單生之細長棒狀子座，一般由蟲體頭部產生，長度約為 4 至 10 公分，其基部寬約 0.1 至 0.5 公分，頭部為圓柱狀，寬約為 0.2 至 0.6 公分，子座初期內部充實，逐漸變成中空狀，表面有細小粒狀突起物，此為子囊殼的開口，其顏色為黑褐色，因此藉由型態外觀即可將兩者進行區分。

2-4 蛹蟲草分類

蟲草屬種類超過 400 種，過去被分類在麥角菌科 (*Clavicipitaceae*)，特徵為柱狀子囊、厚子囊端、絲狀子囊孢及具柄子實體，過去強調子囊殼排列方式、子囊孢子型態與寄主範圍為其主要分類依據 (Sung *et al.*, 2007)。基於蟲草屬之特性與麥角菌科中其他屬在分類上之差異，蟲草屬已從麥角菌科中移出，新設蟲草科 (*Cordycipitaceae*)，該科主要以蟲草屬為主，包含了原先大多數的蟲草屬種類。

蟲草屬 (*Cordyceps* spp.) 為廣泛分布的昆蟲寄生型真菌之一 (林，2003)，目前已被發表的種類超過 400 種，如：中國蟲草 (*C. sinensis*)、蟬花 (*C. sobolifera*)、蛹蟲草 (*C. militaris*)、亞香棒蟲草 (*C. hawkesii*) (王，1995)。表 2-2 為幾種常見蟲草比較 (紀，2015)。

表 2-2、幾種常見蟲草比較

	拉丁學名	子座特性	寄主	產地
蛹蟲草	<i>C. militaris</i>	橙黃色，單生，有十數個從蛹體前端或側部發出	鱗翅目	河北、安徽、陝西、廣西、遼寧、福建、湖北
冬蟲夏草	<i>O. sinensis</i>	褐色，單生，從蟲體頭部發出	鱗翅目幼蟲	青海、四川、貴州、西藏

	拉丁學名	子座特性	寄主	產地
蟬花	<i>Cordyceps</i> <i>Cicadicola</i>	柄棕褐色，頭部淡黃色，單生或 2~3 枝成叢，叢蟲體前端發出	蟬成蟲	浙江、四川、福建
甘肅蟲草	<i>C.gansuensis</i>	褐色，單生	鱗翅目	甘肅
新疆蟲草	<i>Cordyceps sp</i>	橙黃色或深棕色	阿爾泰蝙蝠蛾幼蟲	新疆
香棒蟲草	<i>C.barnesii</i> <i>Thwaites ex</i>	暗褐色，單生，蟲體頭部與胸部之間一側長出	鞘翅目	青海、山西、廣東、雲南
亞香棒蟲草	<i>C.hawkesii</i>	黑褐色，單生，重體前端發出	鱗翅目	山西、福建、安徽、廣西
大團囊蟲草	<i>C.ophioglossoides</i>	暗褐色，多分枝成群	大團囊菌屬	四川、廣西、雲南、江蘇

2-5 生物活性成分

蛹蟲草具有抗發炎、抗氧化/抗衰老、抗腫瘤/抗癌/抗白血病、抗增生、免疫調節、抗微生物、抗細菌、抗真菌、抗原蟲/抗瘧疾、抗病毒/抗 HIV 病毒、殺蟲、抗肝纖維化、促進類固醇生成 (steroidogenic)、降血糖、降血脂、抗血管生成 (anti-angiogenetic)、抗疲勞、神經保護、保肝、固腎及益脾等眾多功用。其主要化學成分除了粗碳水化合物、粗蛋白、粗脂外，還具有豐富的核苷類、胺基酸、脂肪酸及固醇類等。蛹蟲草中的生物活性包括：(1) 多醣體；(2) 蟲草素；(3) 腺苷；(4) 甘露醇 (蟲草酸)；(5) 超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)；(6) 黃酮；(7) 雙甲基鳥苷 (dimethylguanosine)；(8) 華蟾毒精 (cinobufagin) 衍生物；(9) 纖維溶解酶 (fibrinolytic enzyme) (徐等人，2015)。

2-5-1 蟲草素

蟲草素 (cordycepin) 又稱蟲草菌素、蛹蟲草菌素，為蛹蟲草中 (尤其是核苷類) 主要的活性成分，也是第一個從真菌中分離出來的核苷類抗生素。蟲草素具有抗腫瘤、抗菌抗病毒、免疫調節、清除自由基等多種藥理作用，有良好的臨床應用前景。蟲草素是腺苷的類似物，分子式： $C_{10}H_{13}N_5O_3$ ，分子量：251.24，鹼性，針狀或片狀結晶，熔點約 $230^{\circ}C$ ，最大吸收波長為 259 nm。德國的 Cunningham 等人於 1951 年從蛹蟲草的培養濾液中分離發現蟲草素。獲得蟲草素的方法大致分為三條途徑：從天然蟲草中提取、人工合成與透過生物工程的方法從蛹蟲草組織

液中提取。化學合成目前處於探索階段，國外亦有報導蟲草素能夠人工合成，但過程卻相對複雜且產量極低 (A+醫學百科)。

2-5-2 腺苷

腺苷是一種中樞神經系統的調節劑，具有調節腦部缺血所造成傷害的功用 (Gunha, 2001; Gomes *et al.*, 2011; Sweeney, 1997)。腺苷(adenosine; $C_{10}H_{13}N_5O_4$) 具有 HIV-1 蛋白酶抑制作用，未來有發展成為新的抗 HIV-1 新藥的潛力(Jiang *et al.*, 2011)。李等人於 2010 年在人工培育的蛹蟲草中測得腺苷含量 2.35mg/g，其培養基中腺苷含量為 0.12mg/g，而郭等人於 2011 年使用粳米+家蠶蛹浸提液當做培養基培育蛹蟲草子實體，測得其腺苷含量高達 39.96mg/g。

2-5-3 其他成分

多醣體具有免疫調節、抗腫瘤與抗氧化活性；甘露醇則為一種滲透利尿劑及自由基清除劑，常被使用來治療急性中風、神經性與腎臟等相關疾病；SOD 是一種抗氧化劑，在抗發炎、抗老化、中樞神經性及腦血管性疾病抗氧化壓力之第一道防禦機制上扮演著極其重要的角色；黃酮與雙甲基鳥苷則具有 HIV-1 蛋白酶抑制作用，未來具有成為抗 HIV-1 新藥的發展潛力；華蟾毒精衍生物具抗腫瘤活性；纖維溶解酶可用來溶解血栓，使突發心肌梗塞與腦血栓者在最短時間內恢復正常，並使人體所受到的傷害程度降至最低。

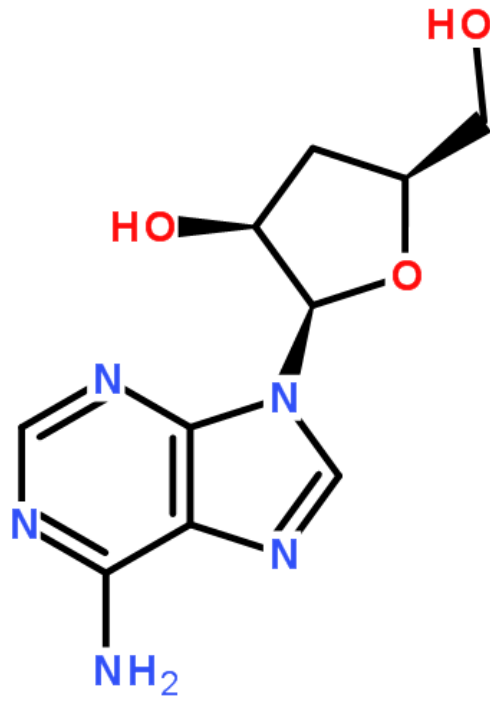


圖 2-1 蟲草素結構

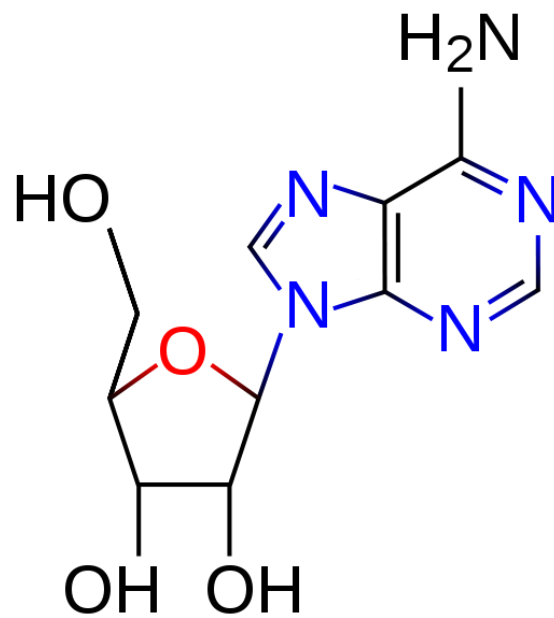


圖 2-2 腺苷結構

2-6 蛹蟲草固態與液態發酵技術

蛹蟲草培養主要可分為寄主活養、固態發酵培養與液態發酵培養三種方式，前兩種培養方式可以產生子實體，液態發酵培養主要以生產菌絲體為主。寄主活體培養主要以蠶蛹或柞蠶蛹為主(李，2006；邱及石，2010)；固態發酵方面，培養基以穀物和豆類為主；液態發酵培養的碳源主要為葡萄糖或蔗糖，氮源為酵母萃取物或蛋白胨，加上磷酸二氫鉀及硫酸鎂等無機鹽類。然而寄主活體培養和固態發酵培養，皆須先由液態發酵培養出菌絲體做為種源，而後續相關的培養與液態發酵所生產的種源品質有重要的關聯。

2-6-1 液態發酵與生物活性成分

1. 培養基碳源與氮源

培養基中較佳的碳源主要是葡萄糖或蔗糖，較佳的氮源是蛋白胨、酵母萃出物、玉米漿粉或磷酸氮(ammonium phosphate)。Liu 等人在 2012 年利用 Plackett-Burman 實驗設計及回應曲面法液態培養蛹蟲草菌絲體，發現培養基中葡萄糖、蛋白胨與酵母萃出物是重要的影響因子，其最佳濃度分別為 4.62%、3.36% 與 0.43%，測得最多的菌絲體為 23.727g/L。Liang 等人在 2012 年的研究顯示了培養基中的蔗糖與蛋白胨對菌絲體的胞內多醣有重要影響，其最佳濃度分別為 17.23g/L 及 13.80g/LL，經由最適化培養基所得胞內多醣較原先的培養基增加了 6.33%。Shih 等人在 2007 年發現以酵母萃取物做為有機氮源，有助於提升胞外

多醣及蟲草素，低碳氮比(C/N)有利於提升腺苷與蟲草素的含量。在最佳培養條件下，測得蟲草素含量 2214.5mg/L。Gu 等人於 2007 年的研究中顯示了 2% 的葡萄糖為最佳的碳源濃度，0.3% 的酵母萃取物及 0.3% 的蛋白胨添加 0.1mmol/L Mn^{2+} 可得到最多的菌絲體量，並有助於核苷酸和鹼基的生產。Kim 和 Yun 在 2005 年指出了以 40g/L 蔗糖當做碳源、5g/L 玉米漿粉當做氮源，起始 pH 值為 8.0，在溫度 30°C 培養下可得到最多的菌絲體與胞外多醣產量分別為 22.9g/L 與 5g/L。

2. 培養基添加物

除了碳氮源外，培養基中其他添加物如腺苷、鋅、L-天冬胺酸(l-aspartic acid)、氯化鈣、硫酸鎂、硫酸鐵、鉬酸銨(ammonium molybdate)、氫離子(NH_4^+)、鉀、鈣、鎂、錳及植物油等成分皆對蛹蟲草菌體與生物活性成分有不同的影響。Masuda 等人於 2011 年用高能質子輻射誘變所產生的變異株 G81-3，並在其培養基中添加腺苷，使蟲草素含量提高達 8.6g/L，而未添加腺苷的對照組含量為 6.7g/L。Cheng 等人於 2010 年發現在培養基中添加適當的鋅(453-906 mg/L)能促進蛹蟲草菌體的生長，當鋅濃度超過 4077mg/L 則會抑制菌體生長，鋅濃度在 680-906mg/kg 可促進多醣體的合成。Masuda 等人在 2007 年以嘌呤(purine)、輔酶及界面活性劑做為培養基的添加物，發現 L-天冬胺酸(l-aspartic acid)、L-麩醯胺酸(L-glutamine)、腺嘌呤及腺苷皆能有效提高蟲草素的含量，最佳的添加物為 1g/L 腺嘌呤與 16g/L 甘胺酸，測得蟲草素含量 2.5g/L，為對照組的 4.1 倍。Sehgal 和

Sagar 在 2006 年發現 100ppm 的激勃素(gibberellic acid)、2ppm 氯化鈣、2ppm 硫酸鎂、1ppm 硫酸鐵及 5ppm 鉬酸銨(ammonium molybdate)等成分皆有助於蛹蟲草菌體的生長。Mao 和 Zong 等人亦在 2006 年發酵饋料氮離子(NH₄⁺)有助於蟲草素的生產，產量最高達 420.5mg/L。D.D Fan 等人於 2012 年發現培養基中添加硫酸鐵可以提升蟲草素產量達 70%，達到 596.59mg/L。Shih 等人在 2007 年發現植物油可促進菌絲體及胞外多醣體生成，但無助於提升腺苷與蟲草素。

3. pH、溶氧、攪拌速率與通氣量控制

Zhou 等人在 2006 年發現兩階段培養基 pH 控制有助於提高菌絲體及甘露醇的含量，以 20g/L 蔗糖、5g/L 蛋白胨及 1g/L MgSO₄·7H₂O 做為培養基時，測得菌絲體及甘露醇產量分別為 17.31g/L 及 43.47g/L。然而，透過兩階段溶氧控制策略，明顯提高了蟲草素的生產，產量與產率分別為 188.3mg/L 及 14.5mg/L/d (Mao and Zhong, 2004)。菌絲球平均直徑、緊實度也和菌體生長、胞外聚合物的生產有關，當通氣量為 2 vvm 時，有較緊密的菌絲球及最多的胞外聚合物。當通氣量太高或太低，會導致菌絲球鬆散變形 (Reddy 等人，2002)。液態培養過程中，攪拌速率與通氣量會影響蛹蟲草菌絲體與纖維溶解酶的產量，Guo 等人於 2012 年的研究中發現在 100L 發酵槽中，攪拌速率 100rpm 與通氣量 3m³/h 或攪拌速率 150rpm 與通氣量 2m³/h 為最好。

2-6-2 固態發酵與生物活性成分

固態發酵過程中，暗培養與光培養的天數會影響蛹蟲草生物活性成分的含量，Lim 等人在 2012 年的實驗中以小米作為固態基質培，發現培養前七天為暗培養，在培養第四十天得到最高含量的腺苷，培養第五十天可以得到最高含量的 D-甘露醇；以大豆作為固態基質，前十四天為暗培養，在培養第五十天得到最高含量的蟲草素；以小米為固態培養基質，培養前七天為暗培養；於培養第四十天到五十天期間，腺苷含量逐漸減少而蟲草素含量逐漸增加 (Lim 等人，2012)。然而，光週期與光波長也會影響蛹蟲草生物活性成分的含量，Chen 等人在 2011 年以小米做為培養基質，光照與黑暗期最佳為 12 hr/12 hr。Dong 等人在 2012 年研究中顯示了光波波長對於蛹蟲草生物活性成分與菌絲體有明顯的影響，蟲草素以藍光最佳，其次分別是粉紅光、日光、暗培養、紅光；腺苷以紅光最佳，其次分別是粉紅光、暗培養、日光、藍光；菌絲體則以紅光最佳，其次為粉紅光、暗培養、日光、藍光。

此外，培養基中碳氮比與深度對於蟲草素的多寡也有影響，Masuda *et al* (2006)發現以固態表面培養方式培養蛹蟲草，氮源以蛋白腺與酵母萃取物混合較有利於提高蟲草素，最佳的碳氮比為 2:1，培養基深度越淺蟲草素含量越多，每日最高蟲草素產量可達 32mg (Masuda 等人，2006)。Dong 等人在 2012 年發現在小麥培養基質中添加濃度為 18.0 ppm 的亞硒酸鈉(sodium selenite)有助於蛹蟲草

產生的 SOD 活性與生物活性成分產量，提高 SOD 活性 145%、蟲草素 74%、蟲草酸 520%、腺苷 284%、多醣體 145%、總氨基酸 554% (Dong 等人，2012a)。

用不同培養基培育出的蛹蟲草子實體中，蟲草素和腺苷含量存在顯著差異，總體表現為粳米+家蠶蛹浸提液培養基 > 糯米+家蠶蛹浸提液培養基 > 粳米培養基 > 糯米培養基，其中用粳米+家蠶蛹浸提液作為培養基培育出的子實體蟲草素和腺苷含量分別高達 15.37mg/g 和 39.96mg/g。

2-6-3 蛹蟲草液態發酵技術

液態發酵的培養方式可在短時間內量產菌絲體和部分生理活性成分，相對於固態發酵有低成本、時間短、培養密度高等優點。而蛹蟲草的早期研究亦是從液態發酵開始，對於蛹蟲草胞內胞外多醣體的生產，仍是最佳培養方式。在 2000 年國內的大葉大學針對不同冬蟲夏草菌株的機能性指標成分研究中，顯示了蛹蟲草在液態發酵培養下，多項機能性成分均優於冬蟲夏草(*Cordyceps sinensis*)。若以機能性成分產率而言，蛹蟲草在蟲草屬中為相當理想的菌種選擇 (林桂英，2000)。

自 2001 年開始 (陳，2001)，其探討蛹蟲草於液態發酵時的生長情形及所生產的機能性成分，提出菌絲體生成量影響發酵液中一級、二級代謝產物，溫度、溶氧量、培養基的碳氮比有所關聯，該研究中蟲草素測得 61.1ppm。而 2002 年發表的論文中首次探討了菌絲球型態與蛹蟲草機能性成分產量的關聯性 (葉，

2002)，而在其研究中，透過靜置培養 5 週的時間，蟲草素含量達 $80 \mu\text{g/ml}$ 。2003 年的研究中，以氣舉式發酵槽量產蛹蟲草首次被研究與討論，並同時發表饋料培養技術優於一般批次培養方式的結論（劉，2003）。除了碳氮源外，包括添加植物油、精油等都被進一步探討（姚，2004），此外先振盪後靜置培養的兩階段培養技術對於蟲草素量產有相當幫助，可達 1435.79mg/L （蔡，2004）。

然而後續的液態發酵研究持續著重在生產目標成分，找出影響的單一成分，或天然培養基，其中包含了(1) 探討蛹蟲草生產蟲草素最佳化培養基，透過添加 Cysteine 提升產量達控制組的 4.9 倍 (147.5mg/L)（蔡，2009）。(2) 以各種顏色的 LED 及日光燈照射菌體發酵，在紅色燈照射下可提高菌絲體含量與菌絲體大小。提高光照度能促進蛹蟲草菌體生成與代謝產物（陳，2010）。(3) 以綠茶為培養基進行蛹蟲草發酵，可提升 DPPH 清除力與抗氧化成分（許，2011）。(4) 液態發酵過程中加裝脈衝紫外光照射，有助於維生素 D2 產量的提升（Agnes,2012）。

2-6-4 蛹蟲草固態發酵技術

固態培養有著時間長、成本高等缺點，然而如果蟲草素卻大量存在於子實體中，若目的為蟲草素的生產，則培育子實體是最佳選擇。國內早期固態發酵研究中，蔡等人在 2003 年的研究顯示以棉花塞為瓶塞、麥芽糖為碳源最好。2004 年在蛹蟲草子實體培育方面，以 22°C 養菌之後再以 14 小時照光刺激，能夠獲得較多蟲草素、腺苷及多醣的子實體 (林，2004)。另有研究利用固態培養方式，以家蠶蛹與白米做為培養基，白米(蓬萊米) 32.8%、PDB 8.2%、Peptone 1.6%、家蠶蛹 7.4%、黃豆粉 0.8%、蒸餾水 49.2%，培養條件:溫度 20°C、相對溼度 70%、光照強度 1500-2000 lux、接菌量 10%，以固態培養 90 至 120 天後，可採收蛹蟲草子實體，並測得蟲草素高達 45.68mg/g (周，2004)。國內於 2007 年逐漸建立起培養蛹蟲草子實體的相關技術，也有進行量產的業者，在學術研究方面也有許多發現和創新。首先相較於過去對於蟲草素前驅物「腺苷」多認為來自於培養基內，有研究者認為雖然腺苷是蟲草素的前驅物，但發酵過程中腺苷並未出現遞減，因此蛹蟲草本身可能具有生產腺苷的能力 (陳，2009)。另外，蟲草素的產量與光照時間有關，隨著光照時間的增加，蟲草素含量有逐漸增加的趨勢，其中以溫度 21°C 培養測得最多的蟲草素含量，經 40 天的培養，蟲草素濃度測得 20.46±0.66mg/g (林，2009)。而透過 DNA 技術進行多種蛹蟲草比較及親緣分析，發現並非所有蛹蟲草皆能形成子實體，蟲草素產量差異頗大，從 101.07mg/g -

17.83mg/g 間差異，故菌種來源亦是關鍵 (張，2009)。此外採用天然培養基的研究方面，以小麥做為固態基質、魚粉做為氮源，在 22°C 環境下進行培養，蟲草素在第 35 天可達 11309.4 μ g/g (林，2009)。有研究者在 2010 年探討了不同品系的蛹蟲草菌種，結果顯示不同地理來源蛹蟲草菌的細胞核與粒線體核糖體基因親緣樹，所有序列形成了單一群集，顯示種內的變異相當小，但不同品系間一般成分與生物活性成分有差異 (徐，2010)。蛹蟲草不一定必須來自中國，台灣可能也有。有研究者於阿里山森林遊樂區塔山步道採集蛹蟲草，以菌液注射方式接種後進行蛹體覆蓋處理，成功誘導出子實體，蟲草素含量 98.20 ± 0.82 mg/g (梁，2010)。

2-6-5 重複式批次培養技術(Repeated-batch culture)

為了提高蟲草素生產的效率，Mikio 及 Akihiko 等人於 2006 年進行了葡萄糖消耗和重複式批次操作的研究。在基礎培養基與最佳化培養基下，重複進行了 6 個週期的培養，除了第一個週期是 15 天，其他五個週期皆為 12 天。結果顯示，在任一週期的蟲草素產量皆高於初始水平，在最佳培養基中蟲草素的產量是基礎培養基的 4.2 - 4.6 倍，而重複式批次操作能將產量提高為批次操作的 1.2 - 1.3 倍。最終，當使用最佳化培養基進行重複式批次操作時，產量可達 0.188 g/(1d)。

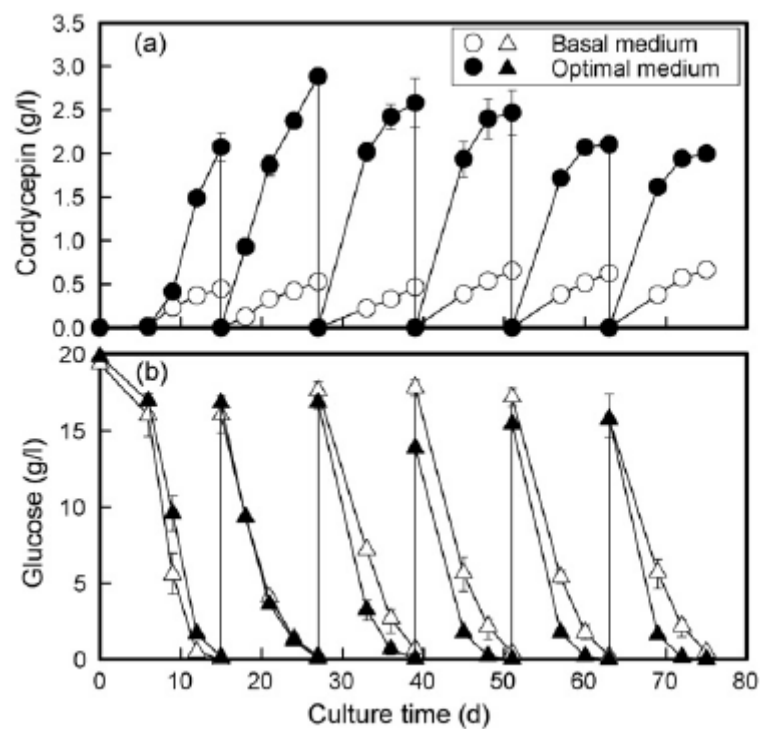


圖 2-3 基礎培養基與最佳化培養基在重複式批次操作下的生長曲線：

(a) 蟲草素；(b) 葡萄糖剩餘

第三章 實驗材料與方法

3-1 實驗材料

3-1-1 實驗菌種

本實驗所採用的蛹蟲草菌株為 *Cordyceps militaris* (THBE 01)。



圖 3-1 *Cordyceps militaris* 在 PDA 上的外觀

3-1-2 實驗藥品

本實驗藥品列於表 3-1。

表 3-1、實驗藥品清單

中文名	英文名	廠牌
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE
馬鈴薯葡萄糖瓊脂	Potato Dextrose Agar	DIFCO
酵母萃取物	Yeast Extract	DIFCO
蛋白胨	Peptone	BD
甲醇	Methanol	ECHO
酒精	Ethanol	ECHO
硫酸鎂	Magnesium Sulfate	SHOWA
磷酸二氫鉀	Potassium Phosphate Dihydrogen	SHOWA
乙腈	Acetonitrile	ECHO
氫氧化鈉	Sodium Hydroxide Pellets Gr	SHOWA
鹽酸	Hydrochloric Acid	AENCORE
醋酸銨	Ammonium Acetate	SHOWA
冰醋酸	Acetic Acid	AENCORE
乙醯丙酮	Acetylacetone	KANTO
高碘酸鈉	Sodium Periodate	ACROS
L-鼠李糖	L-rhamnose monohydrate	ACROS
蟲草素標準品	Cordycepin	SIGMA
腺苷標準品	Adenosine	ALFA AESAR

3-2 實驗儀器

本實驗主要設備與儀器列於表 3-2。

表 3-2、實驗儀器清單

儀器設備	廠牌	型號
pH 計	Lutron	PH-206
烘箱	台灣亮盛	LO-150
分光光度計	美國 Thermo	GENESYS UV10
電子天平	Precisa	BJ 100M
均質機	KINEMATICA	PT-2100
試管振盪器	IKA	MS1 minishaker
無菌操作台	台灣亮盛	JW-4N
超純水製造機	Millipore	Simplicity
超音波震盪器	美國 BRANSON	5210
葡萄糖分析儀	YSI	2300STAT
低溫恆溫溫水槽	PROYES	CRC-30L
數位水浴加熱槽	日本 EYELA	SB-1000
磁石攪拌加熱器	Chrom tech	MS-325B
高速中型離心機	Hettich	Univeral-32R
桌上型微量離心機	HSIANGTAI	MCD2000
恆溫震盪培養箱	台灣亮盛	LUS-150
粉碎機	台灣榮聰	RT-02A
高效能液相層析儀	美國 Agilent	HP 1100
高壓滅菌釜	台灣宏霖	HI-340

儀器設備	廠牌	型號
高效液相層析管柱	美國 Phenomenex	LunaC18
微電腦蒸餾水製造機	英國 FISTREEM	WSC004
空氣壓縮機	SWAN	DY-115
葡萄糖分析儀	YSI	2300STAT
冷凍乾燥機		FD-5020+MF-4

3-3 分析方法

3-3-1 蟲草素、腺苷測定

(1) 標準品測定

蟲草素、腺苷標準品以 15% 甲醇溶液分別製備成濃度 200、400、600、800、1000 μ g/mL，用高效液相層析儀(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)，使用 Luna C18 (5 μ m, 4 \times 250nm) 之液相層析管柱，對標準品進行定性與定量分析，測試製作標準線。

(2) 樣品測定

取 0.1g 乾樣品粉末裝入離心管中，加入 5mL 甲醇溶液，以 100 $^{\circ}$ C 的沸水進行 60 min 的萃取，萃取後進行離心 (7000rpm 10min)。取 1.5mL 裝入微量離心管進行離心 (7000rpm 10min)，之後以 0.22 μ m 濾膜，用高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 對蛹蟲草甲醇萃取液進行定性定量分析，使用 LunaC18 (5 μ m, 250 \times 4.6 mm) 之液相層析管柱。

HPLC 條件：

(1) Detector 波長：254nm

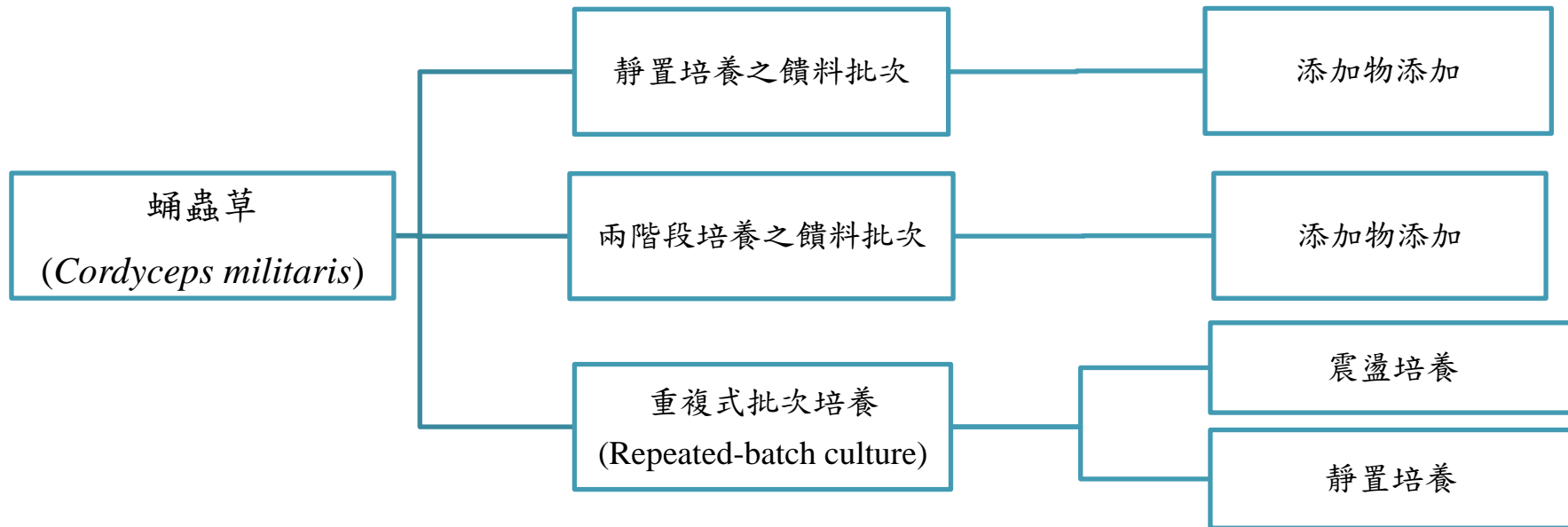
(2) Flow：0.4 mL/min

(3) Mobile Phase：甲醇：0.02M KH₂PO₄ = 15：85

(4) Inject Vol：20 μ L

3-4 實驗方法

3-4-1 實驗架構



3-4-2 菌種保存、製備與培養

3-4-2-1 菌種保存

製備平板與斜面試管培養基為 (Potato Dextrose Agar 39g/L)，將調配好的培養基置入 121°C 滅菌釜經高溫高壓滅菌 20min 後，置入無菌操作台，待其冷卻凝固後，取一手術刀過火 2 至 3 次，將蛹蟲草菌種切取一小塊放入斜面試管及平板中，將其分別用 parafilm 封口膜封好並放入恆溫培養箱中，以溫度 25°C 培養約 2 週，取培養後之平板和試管放入 4°C 冰箱保存。

3-4-2-2 菌種製備與培養

將液態培養基混合均勻後，置入 121°C 滅菌釜經高溫高壓滅菌 20 min 後，置入無菌操作台，待其冷卻後，從培養箱取出培養 2 週的蛹蟲草平板，取一手術刀過火 2 至 3 次，將蛹蟲草菌種切 3 塊(每塊約 6cm×6cm)接入三角瓶中。接菌完成後，以均質機將液態培養基中的菌塊打碎，用封口膜封好瓶口並置入 25°C 的恆溫培養箱，以轉速 110 rpm 培養 5 天。

表 3-3、液態培養基

組成	濃度 (g/L)
Glucose	40
Yeast extract	5
Peptone	5
Magnesium sulfate	0.5
Potassium dihydrogen phosphate	0.5
Potassium hydrogen phosphate	0.5

3-4-3 靜置培養之饋料批次試驗

此實驗是將液態種菌以接種量 10% 接種至配置好的液態培養基 100 ml (如表 3-3)，於 25°C 的恆溫培養箱持續靜置培養 10 天，添加不同添加物(如下所述)後，置入生長箱培養 1 週、2 週、3 週 (總培養天數為 17 天、24 天、31 天)，分別觀察蛹蟲草生長情形並取樣分析之。此靜置培養試驗包含添加碳源及氮源 (將碳源調整至初始濃度，氮源減少成 1/3，其餘無機鹽類濃度不變)、添加大豆胜肽(Soy Peptide) (5g/50ml) 二種試驗。

3-4-4 兩階段培養之饋料批次試驗

此實驗是將液態種菌以接種量 10% 接種至配置好的液態培養基 100 ml，於 25°C 的恆溫培養箱以轉速 110 rpm 震盪培養 5 天後轉靜置培養 5 天，添加不同添加物(如下所述)後，置入生長箱培養 1 週、2 週、3 週 (總培養天數為 17 天、24 天、31 天)，分別觀察蛹蟲草生長情形並取樣分析之。此兩階段培養試驗包含無添加物、添加碳/氮源 (將碳源調整至初始濃度，氮源減少成 1/3，其餘無機鹽類濃度不變)、添加大豆胜肽(Soy Peptide) (5g/50ml)、添加糙米漿(將糙米攪碎磨成粉，與水比例為 1 g : 15 ml 混和成糙米漿 50ml)、添加小米(將小米攪碎磨成粉，與水比例為 1 g : 15 ml 混和成 50ml)等五種試驗。

表 3-4、生長箱之培養環境條件

溫差	光照時間	光照強度	濕度
日 22°C/夜 18°C	10 h/D	500-1000 Lux	80-90 %

3-4-5 重複式批次培養之試驗

(1) 重複式批次培養(震盪)

此實驗所使用容器是以三角瓶 (Flask)做培養。將液態種菌以接種量 10%接種至不同的培養基種類(如表 3-5 所示)，置入 25°C 的暗室培養箱以轉速 110rpm 震盪培養 15 天，將培養完的菌液以過篩網(孔徑 0.048mm)過濾保留菌體，將濾液取之分析。再將菌體接入新配置好的同一培養基，繼續震盪培養 12 天 (共 27 天)，培養完的菌液同上述步驟過濾，將濾液取之分析做比較。

(2) 重複式批次培養(靜置)

此實驗所使用容器是以六角形玻璃罐做培養。將液態種菌以接種量 10%接種至不同的培養基種類(如表 3-5 所示)，置入 25°C 的暗室培養箱靜置培養 15 天，將培養完的菌液以過篩網(孔徑 0.048mm)過濾保留菌體，將濾液取之分析。再將菌體接入新配置好的同一培養基，繼續靜置培養 12 天 (共 27 天)，培養完的菌液同上述步驟過濾，將濾液取之分析做比較。

表 3-5、重複式批次培養之培養基種類

	碳源	氮源	無機鹽類	其他
基礎培養基	Glucose(40g/L)	Peptone(5g/L) YE(5g/L)	MgSO ₄ (0.5g/L) KH ₂ PO ₄ (0.5g/L) K ₂ HPO ₄ (0.5g/L)	
培養基 1	Glucose(40g/L)	Peptone(5g/L) YE(5g/L)	MgSO ₄ (0.5g/L) KH ₂ PO ₄ (0.5g/L) K ₂ HPO ₄ (0.5g/L)	Adenosine (0.5g/L)
培養基 2	Glucose(20g/L)	Peptone(2.5g/L) YE(7.5g/L)	MgSO ₄ (0.5g/L) KH ₂ PO ₄ (0.5g/L) K ₂ HPO ₄ (0.5g/L)	
培養基 3	Glucose(40g/L)	YE(45g/L)	MgSO ₄ (0.5g/L) KH ₂ PO ₄ (0.5g/L) K ₂ HPO ₄ (0.5g/L)	
培養基 4	Glucose(40g/L)	Soy peptide (20g/L)	MgSO ₄ (0.5g/L) KH ₂ PO ₄ (0.5g/L) K ₂ HPO ₄ (0.5g/L)	
培養基 5	Glucose(40g/L)	高鮮味精 (10g/L)	MgSO ₄ (0.5g/L) KH ₂ PO ₄ (0.5g/L) K ₂ HPO ₄ (0.5g/L)	



圖 3-2 生長箱



圖 3-3 玻璃罐

第四章 結果與討論

4-1 液態震盪培養與靜置培養之探討

4-1-1 液態震盪培養之生長曲線

由圖 4-1 顯示，初期菌絲體生長幅度大，於第 14 天達最大值(20.47 g/L)，隨著培養時間的增加，第 14 天時菌體生長幅度趨緩，推測碳源被消耗殆盡，無法供給碳源給菌絲體生長。而一次代謝產物腺苷在第 5 天測得最大值(393.54 $\mu\text{g/g}$)，隨著培養時間增加而減少，開始生成二次代謝產物蟲草素，由第 3 天的 21.45($\mu\text{g/g}$)增加至 10 天的 95.48 ($\mu\text{g/g}$)，到了第 18 天則快速成長至 504.82 ($\mu\text{g/g}$)並隨著培養時間而持續上升。

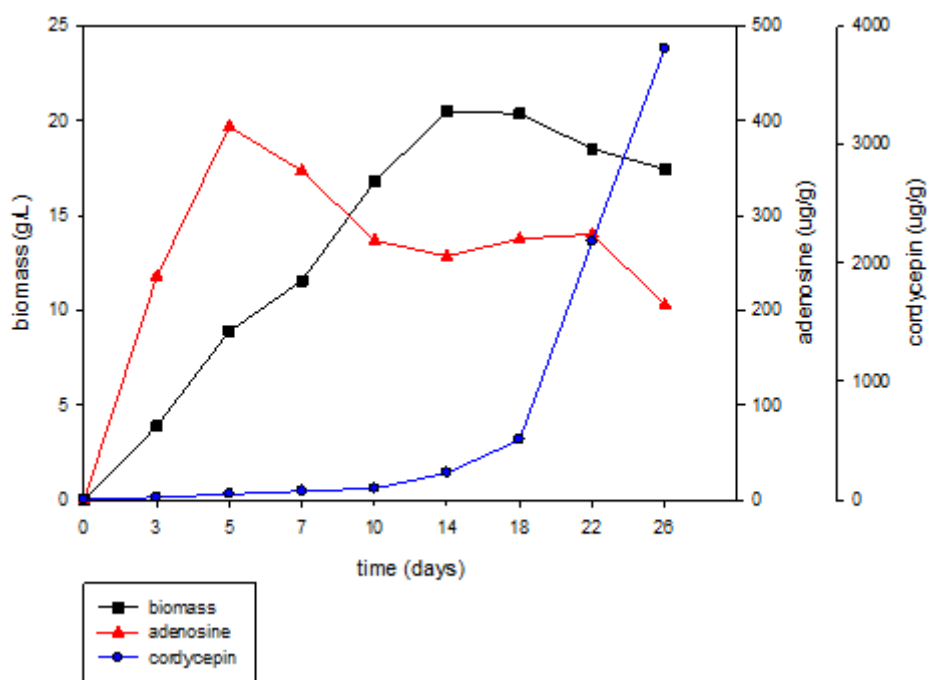


圖 4-1 液態震盪培養之生長曲線

培養基成分: Glucose(40g/L)、Peptone(5g/L)、YE(5g/L)、無機鹽類、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、轉速 110 rpm、溫度 25°C

4-1-2 液態靜置培養

由圖 4-2 得知蛹蟲草菌種透過液態靜置培養方式，在第 17 天時測得菌絲體總量 14.76 (g/L)，而胞內蟲草素單位產量已達 5132.90 ($\mu\text{g/g}$) 並隨著培養時間而上升，相較於圖 4-1 所示液態震盪培養方式所測得的蟲草素高點僅為 3805.57 ($\mu\text{g/g}$)。顯示透過此液態靜置培養方式，雖然菌體總量生成沒有透過液態震盪培養來的多，卻也促使了蛹蟲草產生二次代謝產物蟲草素的時間提早，並在產量上有所提升。

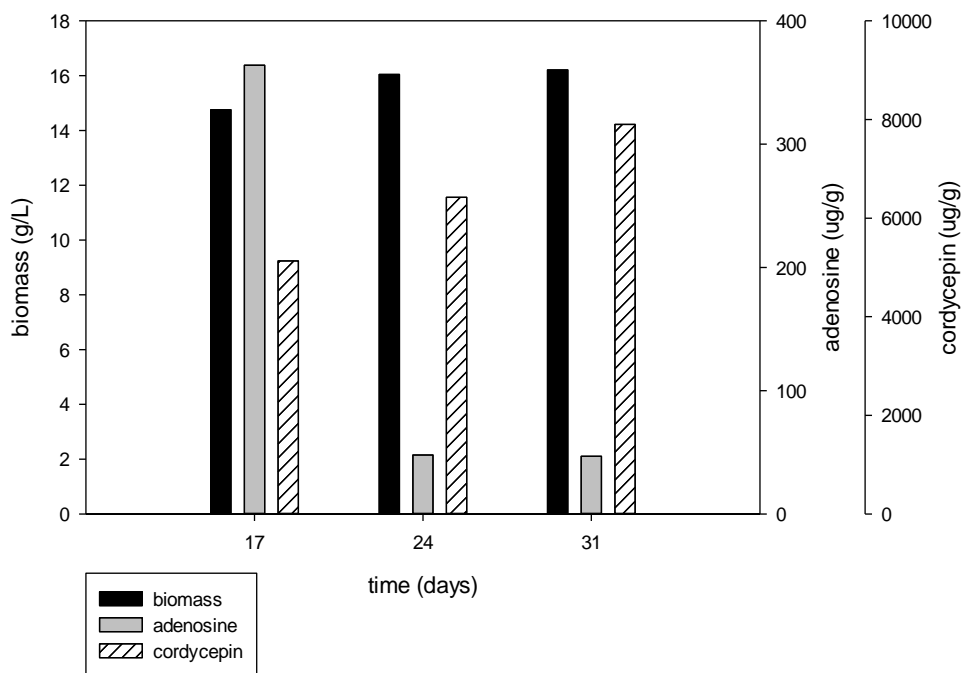


圖 4-2 靜置培養-無添加(胞內)

培養基成分: Glucose(40g/L)、Peptone(5g/L)、YE(5g/L)、無機鹽類、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、液態靜置、溫度 25°C

4-2 靜置培養之饋料批次試驗

此試驗為利用蛹蟲草菌絲體在靜置狀態下易凝結成菌層的特性，並以饋料批次的方式提供蛹蟲草養分碳源與氮源以延續生長，觀察生長情形並對其菌體總量、一次代謝產物腺苷與二次代謝產物蟲草素做探討。饋料批次營養源包括兩種：(一) 添加碳/氮源(以葡萄糖為碳源的添加，調整為培養基的初始濃度，YE 為氮源的添加，濃度調整為初始值的 1/3)與 (二) 添加大豆胍肽(5g/50ml)。

(一) 菌絲體總量

添加碳源與氮源與添加大豆胍肽試驗中提供了蛹蟲草菌種養分生長，菌絲體總量隨著培養天數增加而上升，並在總培養天數 31 天時有高點為 30.71 (g/L)、23.79 (g/L)。結果顯示以添加碳/氮源之試驗能得到較多的菌絲體總量。

(二) 腺苷含量

由圖 4-3 與圖 4-5 得知此靜置培養之饋料批次對於胞內的腺苷單位產量之影響，添加碳氮源與添加大豆胍肽之試驗皆在總培養天數 17 天時為高點，測得單位產量 1349.11、631.73 ($\mu\text{g} / \text{g}$)，隨著培養時間增加，其單位產量減少。推測添加碳源與氮源促使蛹蟲草菌體生長期延長，獲得較多的菌體總量與一次代謝產物腺苷。然而，胞外的腺苷含量並沒有一定的趨勢，判斷可能因素為一次代謝產物腺苷多存在於胞內，分泌到胞外的含量相當稀少。

(三) 蟲草素含量

由圖 4-3 與圖 4-5 可得知此靜置培養之饋料批次對於胞內的蟲草素單位產量之影響。添加碳源與氮源、添加大豆胜肽之試驗皆在總培養天數 31 天時為高點，測得 2839.56、4153.00 ($\mu\text{g} / \text{g}$)，隨著培養時間增加，單位產量上升。添加碳/氮源雖然有助於提高蛹蟲草菌種的菌體與一次代謝產物腺苷的生成，卻延滯了蛹蟲草代謝蟲草素的時間。然而，二者的單位產量經換算後僅得到 87.21、98.81 (mg/L)的蟲草素總量。由圖 4-4、圖 4-6 亦得知此靜置培養策略對於胞外的蟲草素含量之影響，皆在總培養天數 31 天時為高點，得到 299.51、580.46 (mg/L)，發現蟲草素在此靜置培養策略下，胞外的含量皆高於胞內達 3 至 5 倍之多。

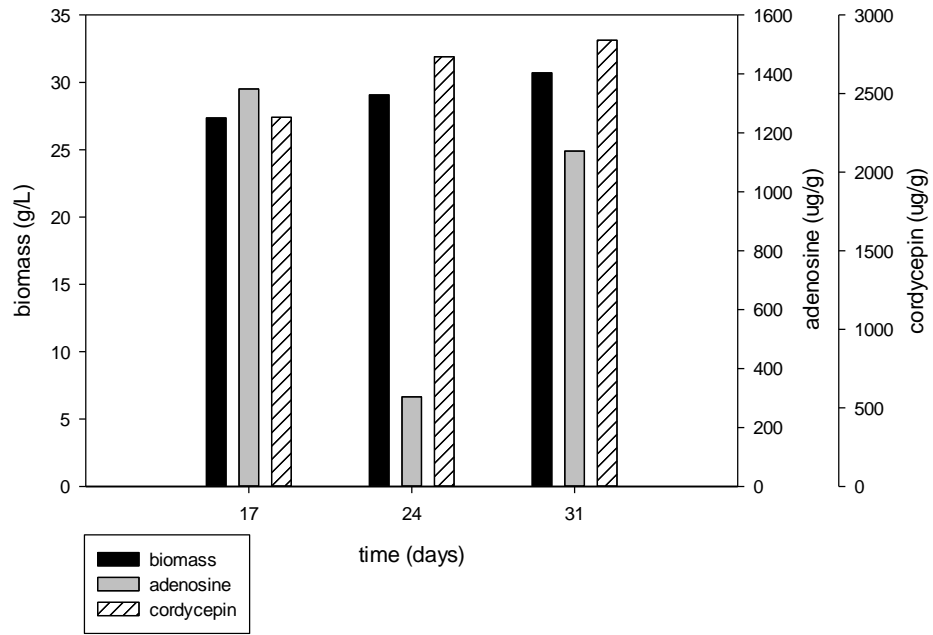


圖 4-3 添加碳氮源對靜置培養胞內活性成分生成之影響

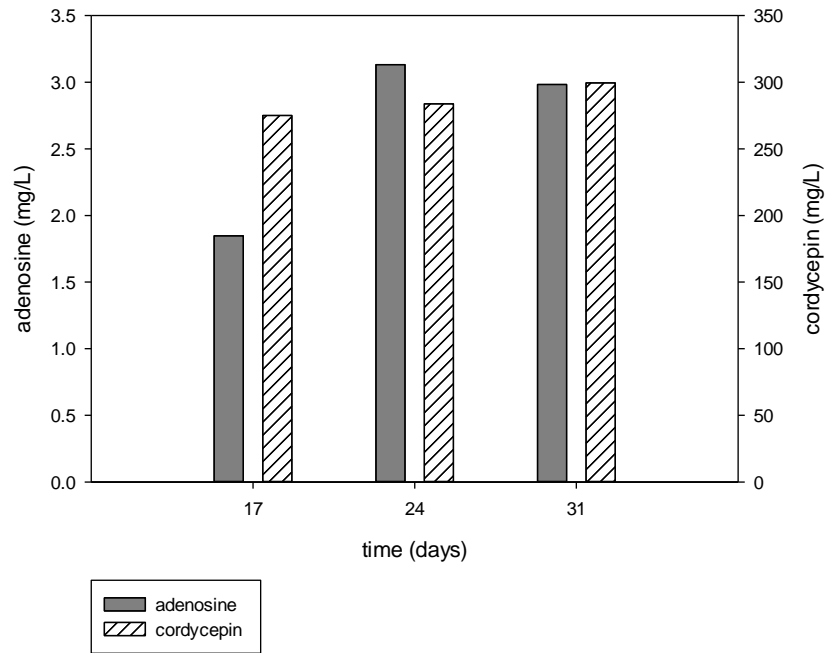


圖 4-4 添加碳氮源對靜置培養胞外活性成分生成之影響

培養基成分: Glucose(40g/L)、Peptone(5g/L)、YE(5g/L)、無機鹽類、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、液態靜置、溫度 25°C

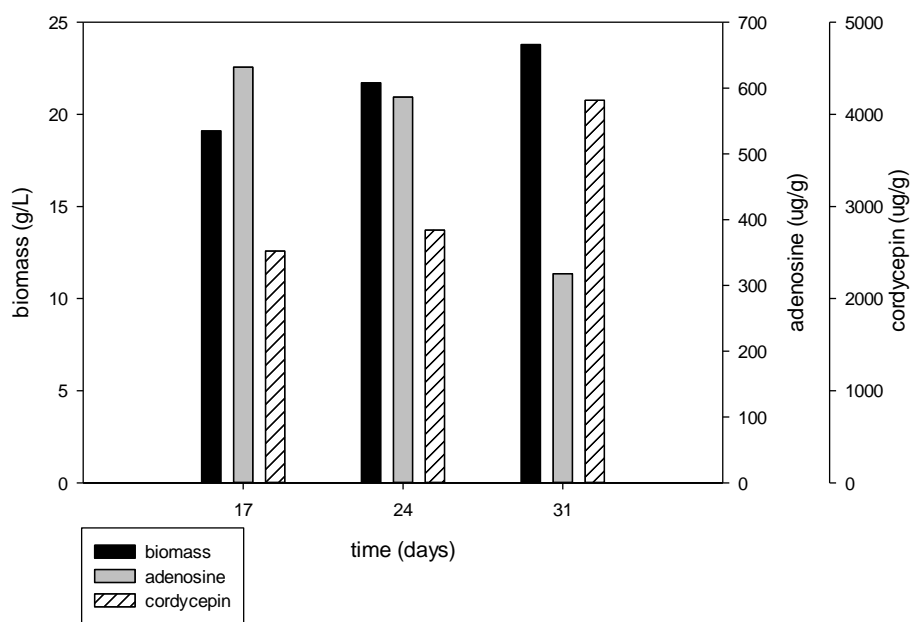


圖 4-5 添加大豆胜肽對靜置培養胞內活性成分生成之影響

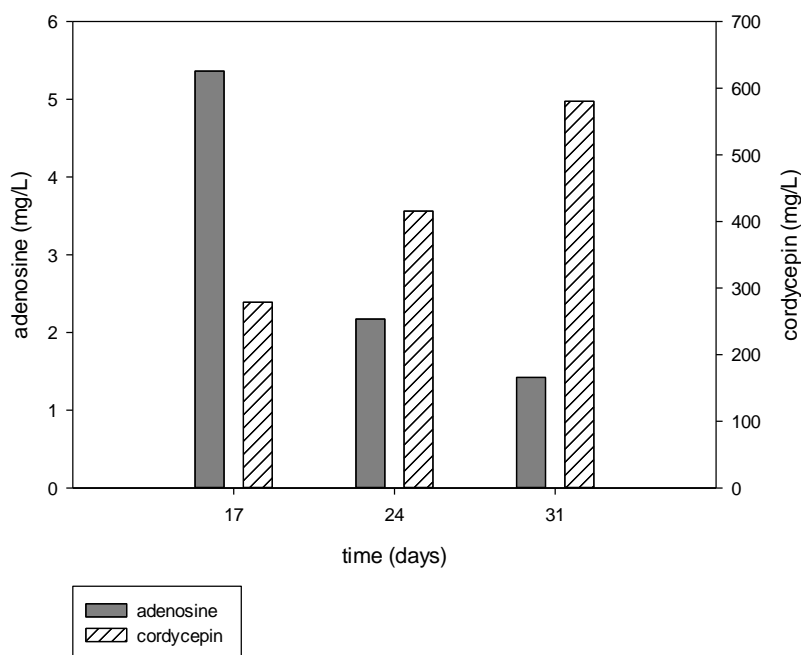


圖 4-6 添加大豆胜肽對靜置培養胞外活性成分生成之影響

培養基成分: Glucose(40g/L)、Peptone(5g/L)、YE(5g/L)、無機鹽類、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、液態靜置、溫度 25°C

4-3 兩階段培養之饋料批次試驗

由震盪 5 天培養菌絲體再分別靜置 5、9、13、17、21 天，共培養 10、14、18、22、26 天，圖 4-7 顯示菌絲體在培養 10 天時生長已趨緩，而腺苷含量則達高點並隨著時間逐漸減少，二次代謝產物蟲草素開始增加，並在第 22 天有高點為 4951.25 ($\mu\text{g/g}$)，相較於圖 4-1 所示液態震盪培養方式所測得的蟲草素高點僅為 3805.57 ($\mu\text{g/g}$)。

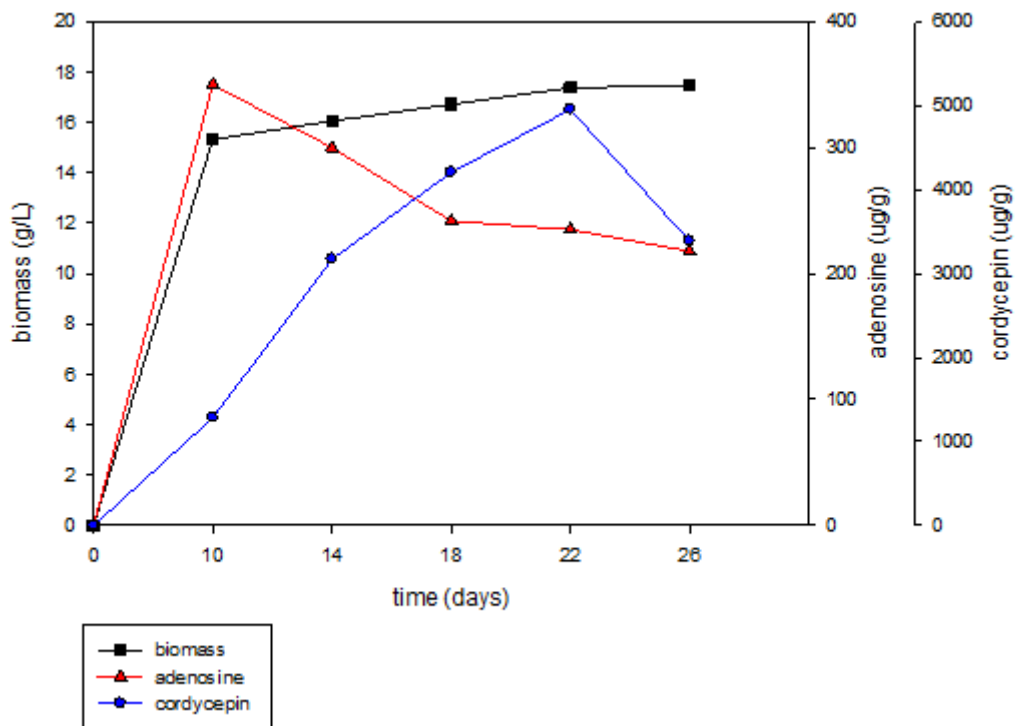


圖 4-7 兩階段培養之生長曲線

培養基成分: Glucose(40g/L)、Peptone(5g/L)、YE(5g/L)、無機鹽類、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、轉速 110 rpm、溫度 25°C

此兩階段培養試驗利用前期震盪培養加速菌絲體的生長，並在靜置第五天時做饋料批次的添加，提供蛹蟲草養分以延續生長，觀察生長情形並對其菌體總量、一次代謝產物腺苷與二次代謝產物蟲草素做探討。饋料批次營養源包括四種：(一) 添加碳氮源(以葡萄糖為碳源的添加，調整為培養基的初始濃度，YE 為氮源的添加，濃度調整為初始值的 1/3)、(二) 添加大豆胜肽(5g/50ml)、(三) 添加糙米漿(與水比例為 1 g : 15 ml 混和成糙米漿 50ml)與 (四) 添加小米(將小米攪碎磨成粉，與水比例為 1 g : 15 ml 混和成 50ml)。

(一) 菌絲體總量

添加碳源與氮源、添加大豆胜肽、添加糙米漿、添加小米之等試驗等試驗中菌絲體總量皆隨著培養天數增加而上升，在總培養天數 31 天時有高點為 26.29 (g/L)、17.51 (g/L)、16.17 (g/L)、17.40 (g/L)，其中又以添加碳源與氮源之試驗獲得較多的菌絲體總量。

(二) 腺苷含量

由圖 4-10、圖 4-12、圖 4-14、圖 4-16 可得知此兩階段培養之饋料批次對於胞內的腺苷單位產量之影響，添加碳源與氮源、添加大豆胜肽、添加糙米漿、添加小米之試驗皆在總培養天數 17 天時為高點，測得 2828.50、562.32、2860.45、2640.03 ($\mu\text{g} / \text{g}$)，隨著培養時間增加，其單位產量減少。雖然腺苷單位產量在添加糙米漿試驗中為最高，經由換算成總量後卻僅有 44.35 (mg/L)，然而，以添加碳源與氮源之試驗能促使蛹蟲草菌種產生更多腺苷，推測原因是控制組在培養天數 17 天時的菌體總量僅有 14.00 (g/L)，而添加碳源與氮源之試驗所獲得的菌體總量則高達 22.94 (g/L)，菌體總量的多寡間接影響腺苷總量。

(三) 蟲草素含量

由圖 4-10 至圖 4-16 得知此兩階段培養之饋料批次對於胞內的蟲草素單位產量之影響，添加碳源與氮源、添加大豆胜肽、添加小米之試驗皆在總培養天數 31 天時為高點，測得 6600.85、7727.15、7856.48 ($\mu\text{g/g}$)，隨著培養時間增加，其單位產量增加。然而，此三者試驗所測得的蟲草素單位產量經換算後，僅僅得到總量 173.50、135.32、136.72 (g/L)，遠低於在胞外所測得的 372.98、706.85、169.12 (g/L)。在添加糙米漿試驗中，蟲草素的總量隨著培養天數增加卻是逐漸遞減，判斷可能因素為此添加物具有抑制蛹蟲草二次代謝產物蟲草素的成分存在，導致蛹蟲草不利於代謝有效成分蟲草素。

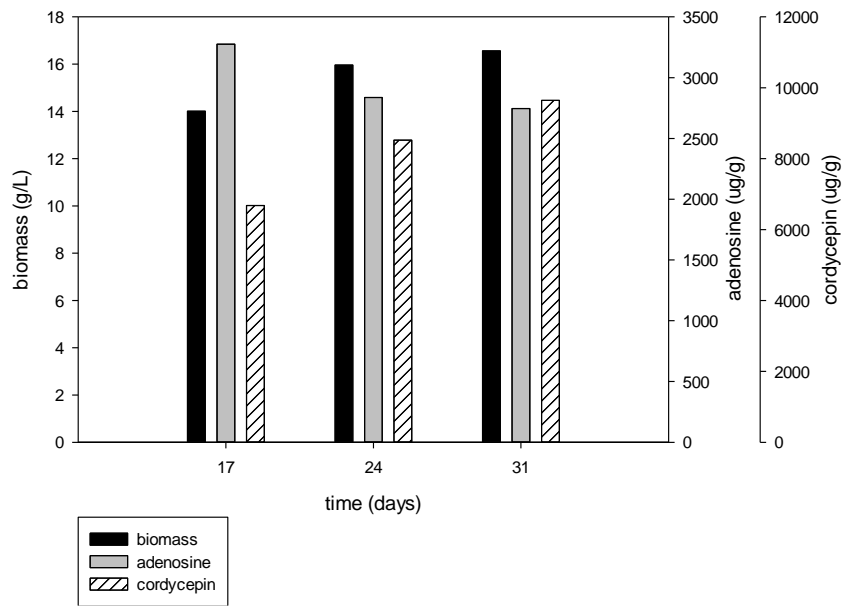


圖 4-8 兩階段培養試驗-無添加(胞內)

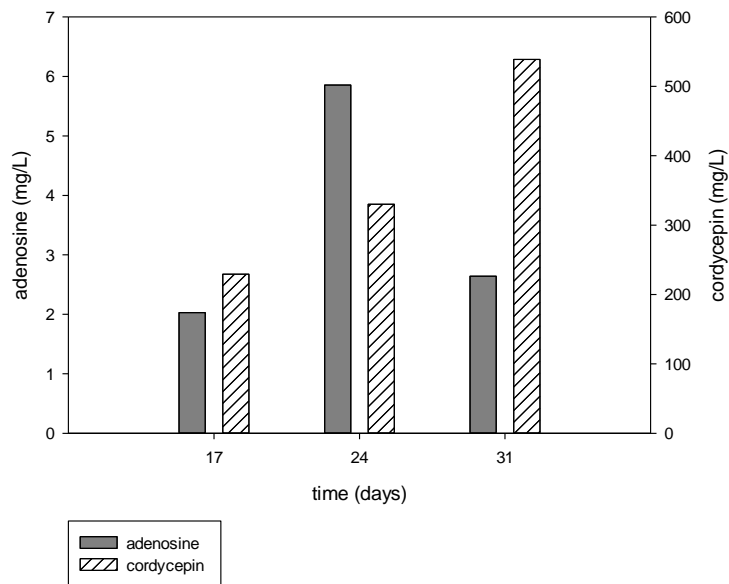


圖 4-9 兩階段培養試驗-無添加(胞外)

培養基成分: Glucose(40g/L)、Peptone(5g/L)、YE(5g/L)、無機鹽類、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、轉速 110 rpm 震盪 5 天、溫度 25°C

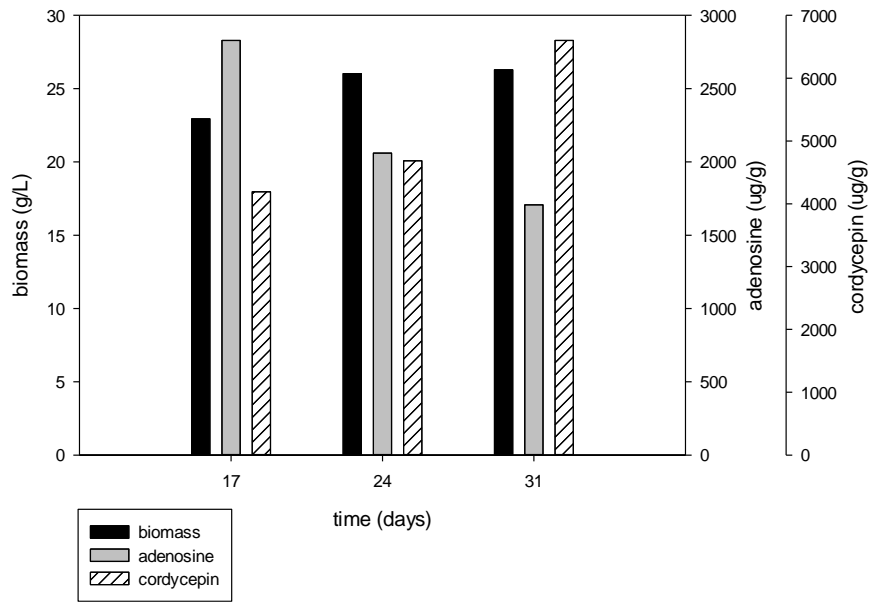


圖 4-10 添加碳氮源對兩階段培養胞內活性成分生成之影響

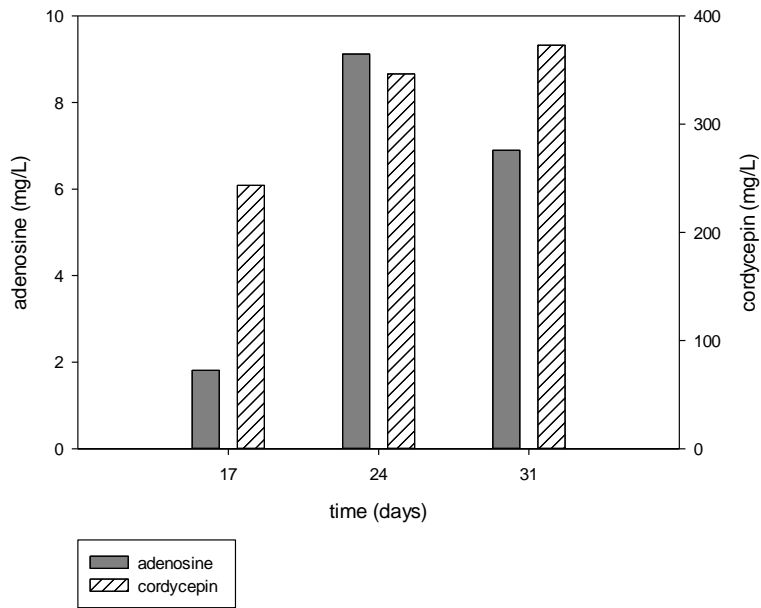


圖 4-11 添加碳氮源對兩階段培養胞外活性成分生成之影響

培養基成分: Glucose(40g/L)、Peptone(5g/L)、YE(5g/L)、無機鹽類、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、轉速 110 rpm 震盪 5 天、溫度 25°C

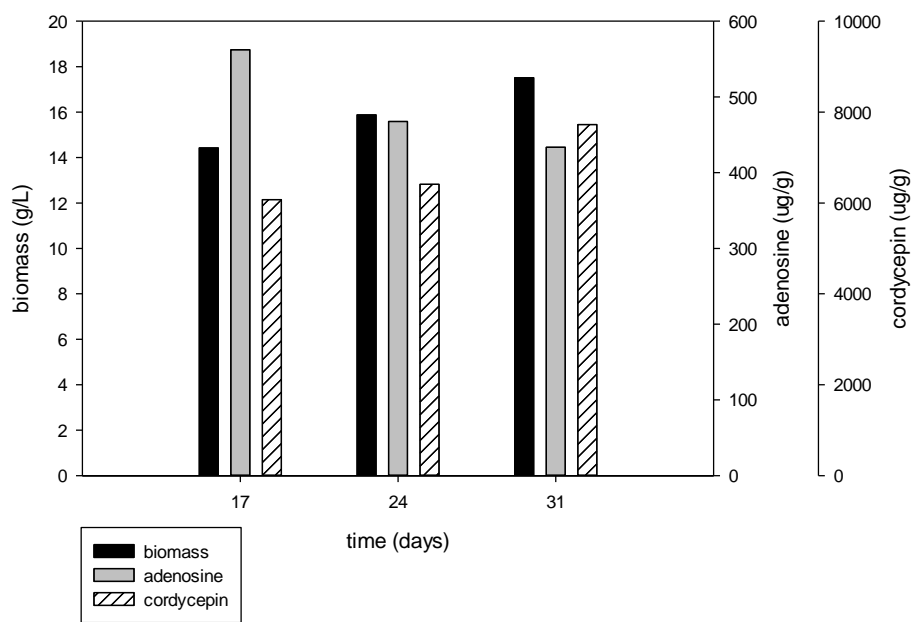


圖 4-12 添加大豆胜肽對兩階段培養胞內活性成分生成之影響

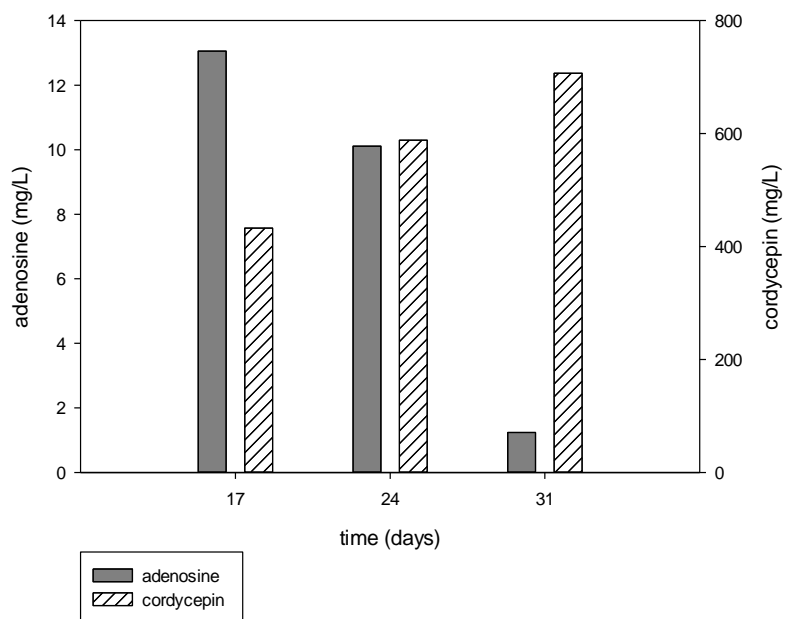


圖 4-13 添加大豆胜肽對兩階段培養胞外活性成分生成之影響

培養基成分: Glucose(40g/L)、Peptone(5g/L)、YE(5g/L)、無機鹽類、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、轉速 110 rpm 震盪 5 天、溫度 25°C

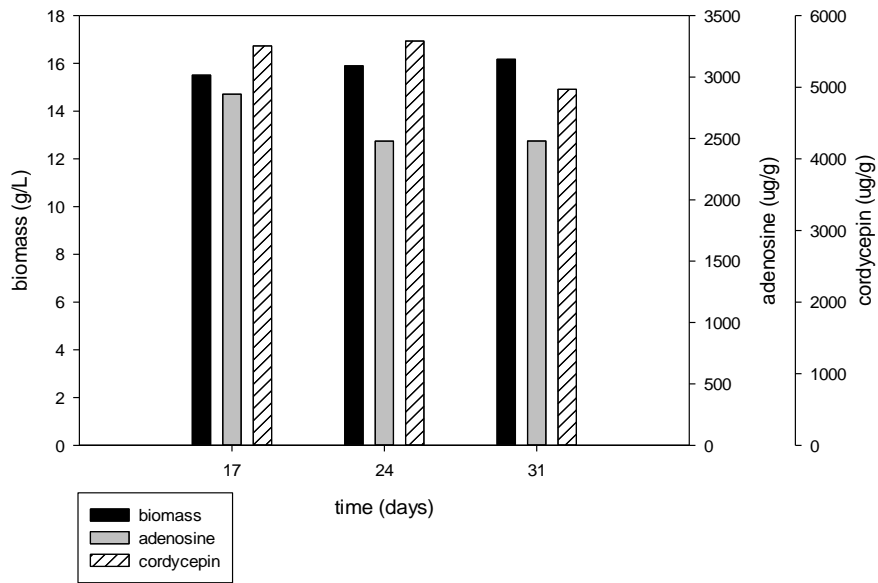


圖 4-14 添加糙米漿對兩階段培養胞內活性成分生成之影響

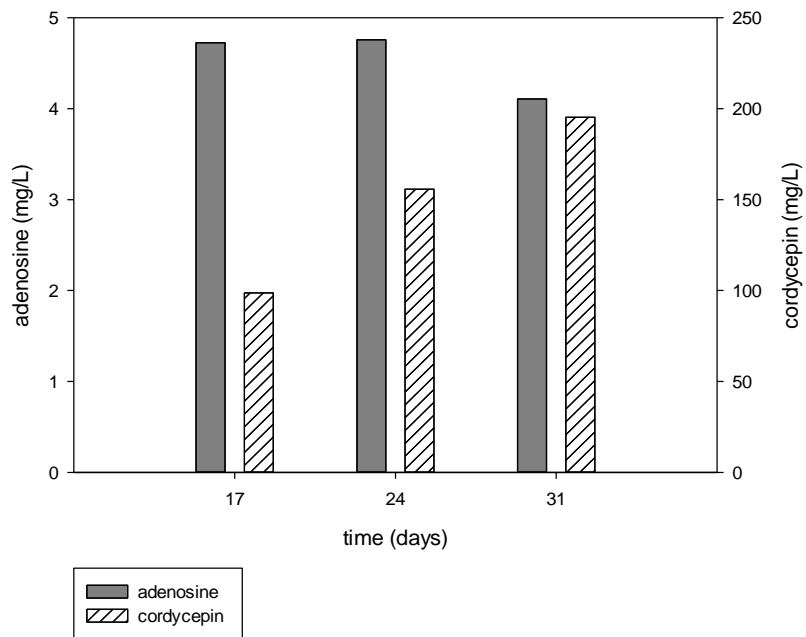


圖 4-15 添加糙米漿對兩階段培養胞外活性成分生成之影響

培養基成分: Glucose(40g/L)、Peptone(5g/L)、YE(5g/L)、無機鹽類、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、轉速 110 rpm 震盪 5 天、溫度 25°C

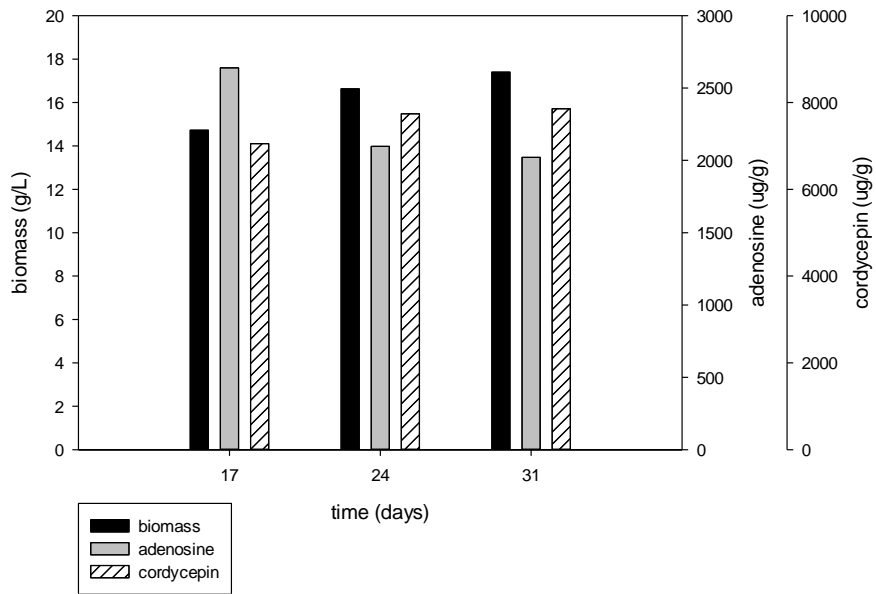


圖 4-16 添加小米對兩階段培養胞內活性成分生成之影響

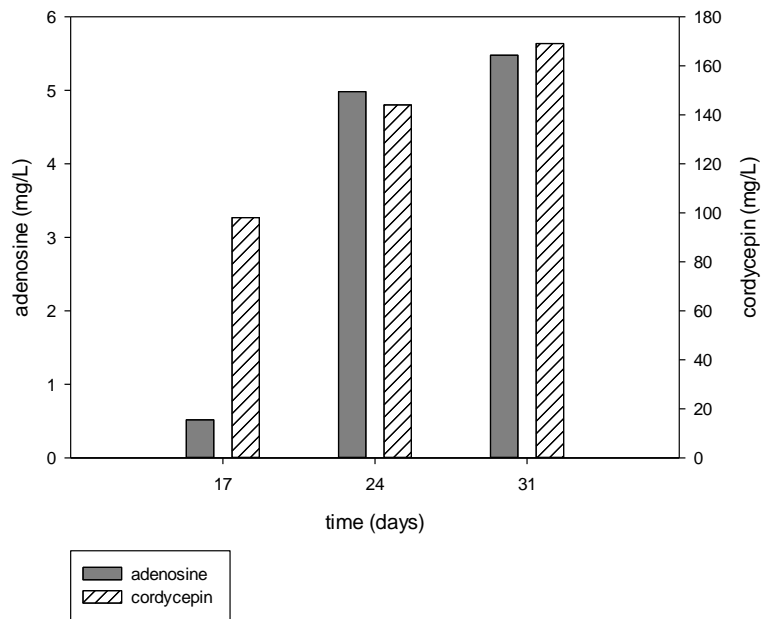


圖 4-17 添加小米對兩階段培養胞外活性成分生成之影響

培養基成分: Glucose(40g/L)、Peptone(5g/L)、YE(5g/L)、無機鹽類、水 100 ml

培養條件: 接菌量 10%、轉速 110 rpm 震盪 5 天、溫度 25°C

由表 4-1 綜合比較得知腺苷在胞內的含量明顯高於胞外，兩階段培養之饋料批次試驗中，培養天數 17 天時，胞內的腺苷總量測得最多為 64.89 (mg/L)。發現以葡萄糖為碳源添加，將其濃度調整至初始狀態，並以 YE 為氮源添加，降低其濃度調整至初始狀態的 1/3 能促使蛹蟲草代謝更多的腺苷。雖然大豆胜肽富含碳水化合物提供碳源與蛋白質提供氮源，卻無助於提升蛹蟲草菌種產生腺苷，推測其碳水化合物的醣類無法有效被蛹蟲草利用，亦或是其內含的醣類濃度偏低，無法提供蛹蟲草充足的碳源。

表 4-1、靜置與兩階段之饋料批次培養比較 - 腺苷活性總量

	靜置培養之饋料批次		兩階段培養加饋料批次	
	胞內 Adenosine (mg/L)	胞外 Adenosine (mg/L)	胞內 Adenosine (mg/L)	胞外 Adenosine (mg/L)
無添加	5.37	1.53	45.88	2.03
添加碳源與氮源	36.91	1.85	64.89	1.81
添加大豆胜肽	12.07	5.36	8.11	13.05
添加糙米漿	-	-	44.35	4.72
添加小米	-	-	38.88	0.52
文獻資料(蔡，2004)	-	-	114.00	-

透過表 4-2 綜合比較得知蟲草素在胞外的含量明顯高於胞內，其蟲草素在胞外所占比例達 55.3 % 至 85.5%。發現以大豆胜肽做為添加物在此兩種試驗中能有效提高二次代謝產物蟲草素在胞外的產量，推測此添加物雖然無法使蛹蟲草生成更多的一次代謝產物腺苷，卻也間接縮短了生成二次代謝產物的時間並分泌至胞外，促使蛹蟲草在胞外的蟲草素含量有所增加。

表 4-2、靜置與兩階段之饋料批次培養比較 - 蟲草素活性總量

	靜置培養之饋料批次		兩階段培養之饋料批次	
	胞內 Cordycepin (mg/L)	胞外 Cordycepin (mg/L)	胞內 Cordycepin (mg/L)	胞外 Cordycepin (mg/L)
無添加	128.05	543.65	159.69	538.70
添加碳源與氮源	87.21	299.51	173.50	372.98
添加大豆胜肽	98.81	580.46	135.32	706.85
添加糙米漿	-	-	80.41	195.31
添加小米	-	-	136.72	169.12
文獻資料(蔡, 2004)	-	-	-	1103.00

4-4 重複式批次培養之試驗

當蛹蟲草的菌絲體生長足夠時會逐漸附蓋表面，凝結成層並且健全與穩固，因此，重複式批次培養策略能在不破壞菌體的狀況下，將液態培養基更換成新的，在此循環下持續提供菌體充足的養分生長與代謝。透過此培養策略有助於省去前段菌絲體生成所需耗費的時間，並使蛹蟲草的代謝產物蟲草素含量有所提升。

研究指出低碳氮比(C/N)有助於提升腺苷(Adenosine)與蟲草素(Cordycepin)的產量，並以 YE 為氮源、濃度 45 (g/L)的培養條件下能產生較多的蟲草素(Shih *et al.*,2007)。Masuda 等人在 2005 年的實驗中發現以 Glucose 為碳源、C/N 為 2/1，氮源為 Peptone 和 YE 並以比例 25% : 75% 混和之，能使蛹蟲草產生更多的蟲草素。Masuda *et al* (2006) 發現 repeated batch operation (重複式批次操作) 策略對於蟲草素為更有用(practicable)、提升產率(productivity)，並發現蛹蟲草產生之蟲草素有高達 97% 分泌至胞外的培養基。此外亦有研究指出添加 Adenosine 能促使蛹蟲草產生更多蟲草素。本試驗的重複式批次培養策略包含震盪培養與靜置培養二種，利用不同的培養基種類並在成本考量下，使用大豆胨肽做為水解蛋白替代物，與內含核苷酸的高鮮味精做為培養基添加物培養，對蛹蟲草的一次代謝產物腺苷與二次代謝產物蟲草素做探討。

4-4-1 重複式批次培養(震盪)

由圖 4-18 顯示基礎培養基在此重複式批次培養(震盪)策略下，腺苷含量在第二個循環測得 3.10 ($\mu\text{g/ml}$)為第一個循環 0.79 ($\mu\text{g/ml}$)的 3.92 倍，蟲草素含量在第二個循環測得 78.65 ($\mu\text{g/ml}$)為第一個循環 39.54 ($\mu\text{g/ml}$)的 1.99 倍。顯示在此培養策略下有助於此二種活性成分的提升，並使用多種培養基種類做探討。

(一) 腺苷含量

由圖 4-18 至圖 4-23 可得知重複式批次培養(震盪)策略對於腺苷含量之影響，基礎培養基與其他五種培養基經由重複式批次培養後，均較前一個循環有較多的腺苷含量。然而，此策略雖然有效提高蛹蟲草在胞外之腺苷含量，對於胞內的腺苷含量卻還有待探討。

(二) 蟲草素含量

由圖 4-18 至圖 4-23 可得知重複式批次培養(震盪)策略對於蟲草素含量之影響。除了培養基 5，基礎培養基與其他四種培養基經由重複批次培養後，均較前一個循環有較多的蟲草素含量。然而，培養基 5 在此策略培養下，雖然具有 5'-鳥嘌呤核苷酸二鈉與 5'-次黃嘌呤核苷酸二鈉等成分，蟲草素含量卻是減少的，判斷可能因素為此培養基添加物高鮮味精亦含有黏稠劑(羧甲基纖維素鈉)之成分，抑制菌體吸收培養基之面積，進而影響蛹蟲草菌體生長與二次代謝產物蟲草素的生成。

(1) 基礎培養基

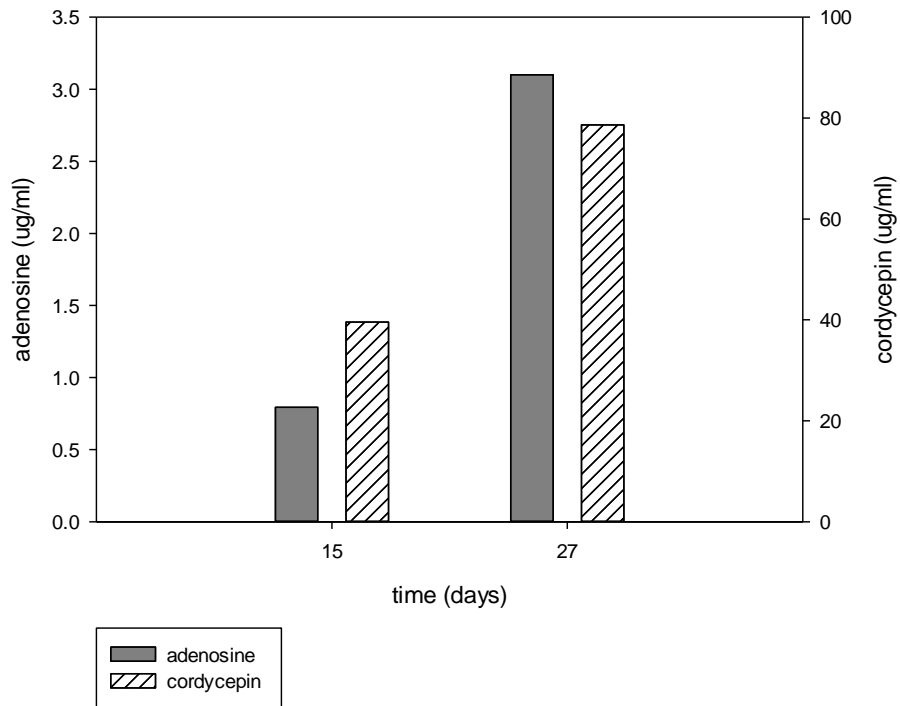


圖 4-18 重複式批次培養試驗(震盪培養)-基礎培養基

培養基成分: Glucose (40g/L)、Peptone (5g/L)、YE (5g/L)、無機鹽類、水 100 mL

培養條件: 轉速 110 rpm、溫度 25°C

(2) 培養基 1

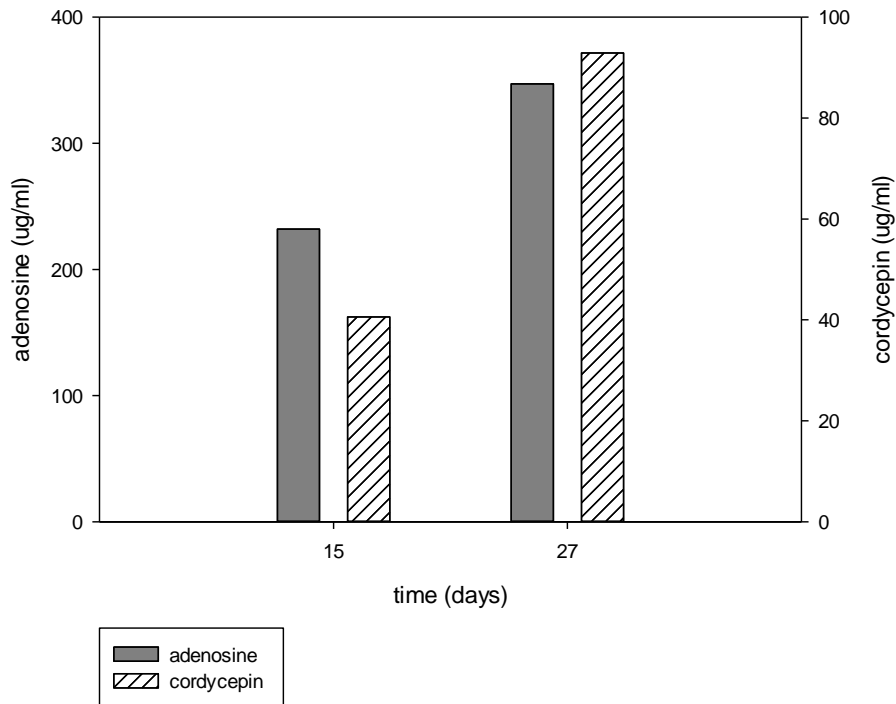


圖 4-19 重複式批次培養試驗(震盪培養)-培養基 1

培養基成分: Glucose (40g/L)、Peptone (5g/L)、YE (5g/L)、無機鹽類、Adenosine (0.5g/L)、水 100 mL

培養條件: 轉速 110 rpm、溫度 25°C

(3) 培養基 2

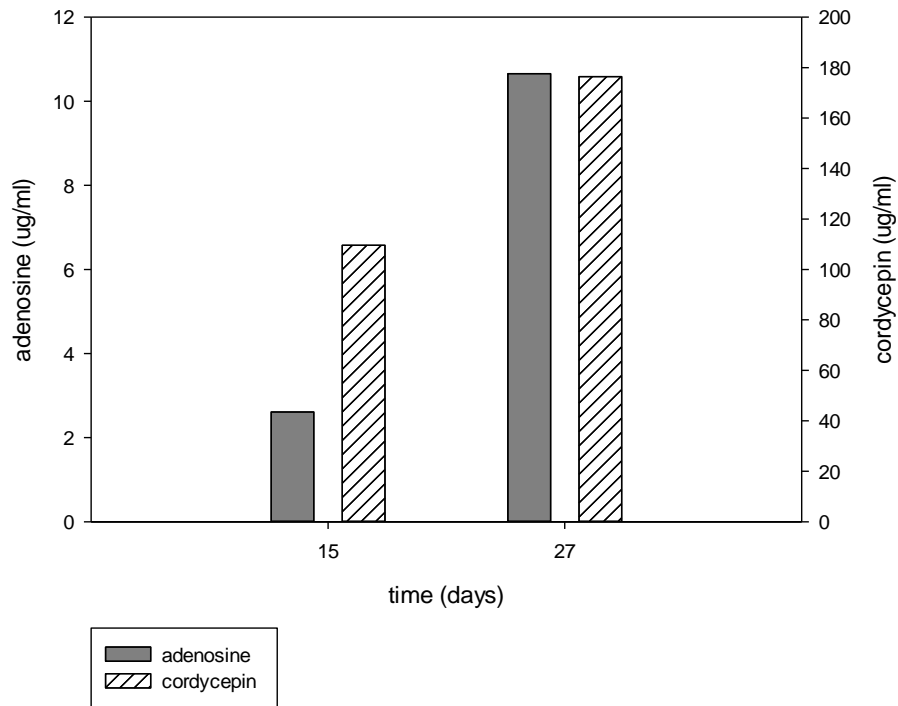


圖 4-20 重複式批次培養試驗(震盪培養)-培養基 2

培養基成分: Glucose (20g/L)、Peptone (2.5g/L)、YE (7.5g/L)、無機鹽類、水 100 mL

培養條件: 轉速 110 rpm、溫度 25°C

(4) 培養基 3

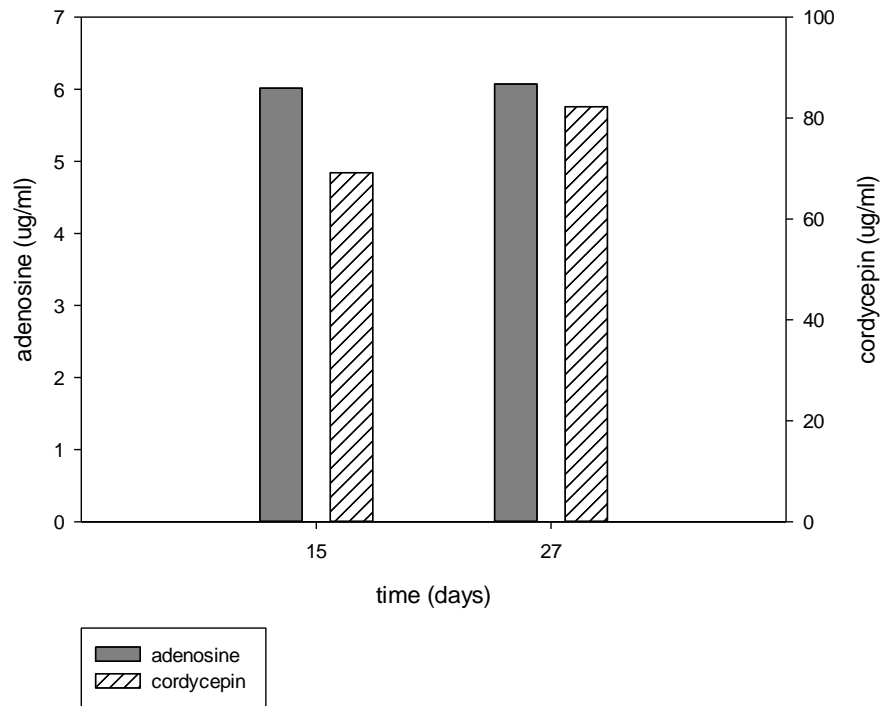


圖 4-21 重複式批次培養試驗(震盪培養)-培養基 3

培養基成分: Glucose (40g/L)、YE (45g/L)、無機鹽類、水 100 mL

培養條件: 轉速 110 rpm、溫度 25°C

(5) 培养基 4

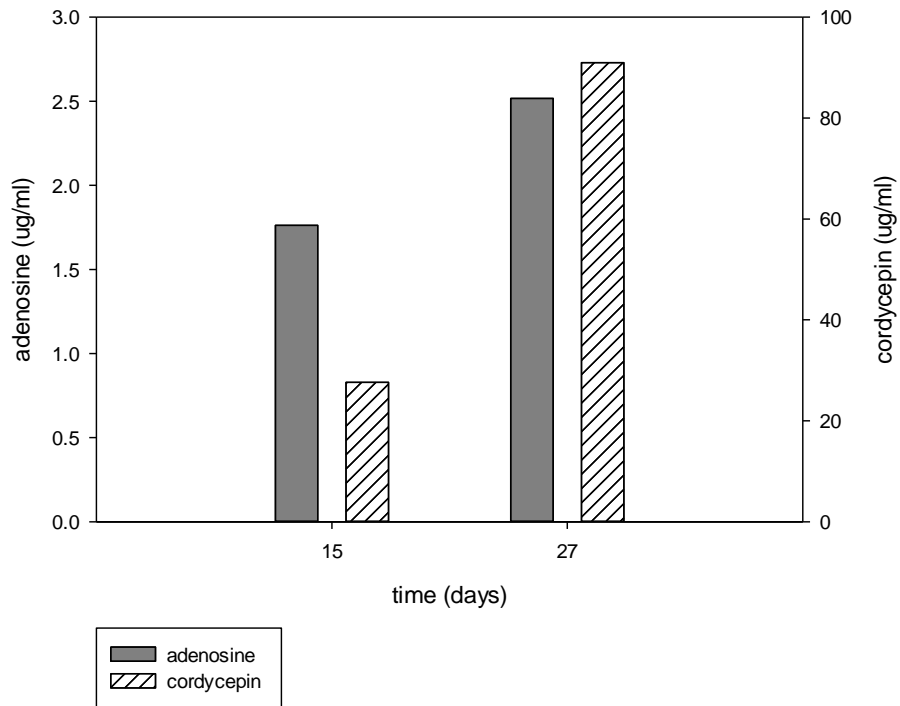


圖 4-22 重複式批次培養試驗(震盪培養)-培养基 4

培养基成分: Glucose (40g/L)、Soy peptide (20g/L)、無機鹽類、水 100 mL

培養條件: 轉速 110 rpm、溫度 25°C

(6) 培養基 5

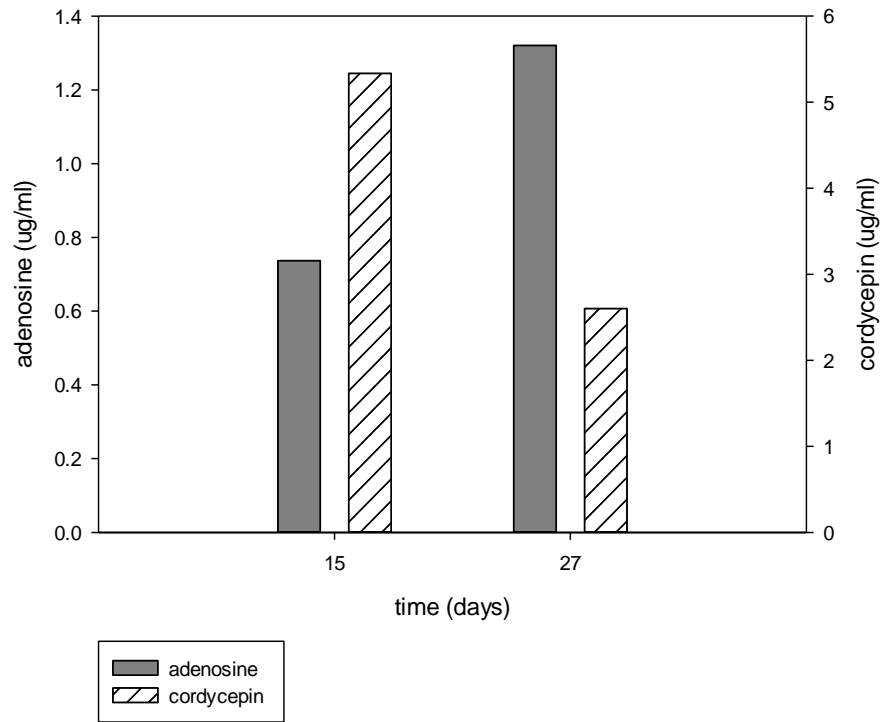


圖 4-23 重複式批次培養試驗(震盪培養)-培養基 5

培養基成分: Glucose (40g/L)、高鮮味精 (10g/L)、無機鹽類、水 100 mL

培養條件: 轉速 110 rpm、溫度 25°C

由表 4-3 綜合比較得知培養基 1 經由重複批次培養(震盪)所得到的腺苷含量為 347.11 ($\mu\text{g/ml}$)，明顯高於其他種類的培養基，但由於培養基的添加物本身即為 Adenosine，因此測得腺苷有最高含量。由表 4-5 亦得知經由重複批次培養(震盪)，除了內含黏稠劑的培養基 5 之外的各種類培養基所獲得的蟲草素含量分別為前一循環的 1.99 倍、2.29 倍、1.61 倍、1.19 倍、3.29 倍，顯示此策略雖然有助於提高蛹蟲草之蟲草素含量，但總體而言含量卻是偏低，高點也僅為 176.41 ($\mu\text{g/ml}$)，效果並不顯著。

表 4-3、重複式批次培養(震盪)試驗之活性總量

	Adenosine ($\mu\text{g/ml}$)		Cordycepin ($\mu\text{g/ml}$)	
	Cycle1(15D)	Cycle2(27D)	Cycle1(15D)	Cycle2(27D)
基礎培養基	0.79	3.10	39.54	78.65
培養基 1	232.05	347.11	40.57	92.91
培養基 2	2.61	10.66	109.60	176.41
培養基 3	6.01	6.07	69.19	82.25
培養基 4	1.76	2.52	27.63	90.99
培養基 5	0.74	1.32	5.33	2.60

4-4-2 重複式批次培養(靜置)

由圖 4-24 顯示基礎培養基在此重複式批次培養(靜置)策略下，腺苷含量在第二個循環測得 1.78 ($\mu\text{g/ml}$)相較於第一個循環 2.37 ($\mu\text{g/ml}$)還低，蟲草素含量在第二個循環測得 574.30 ($\mu\text{g/ml}$)為第一個循環 459.50 ($\mu\text{g/ml}$)的 1.25 倍。顯示在此培養策略下有助於活性成分蟲草素的提升，並使用多種培養基種類和震盪培養做比較與探討。

(一) 腺苷含量

由圖 4-24 至圖 4-29 可得知重複式批次培養(靜置)策略對於腺苷含量之影響。除了培養基 5，基礎培養基與其他四種培養基經由重複批次培養後，腺苷含量均低於前一個循環，判斷可能因素為靜置狀態下，蛹蟲草菌體會逐漸停止產生一次代謝產物腺苷，並消耗之，以利於產生二次代謝產物蟲草素。

(二) 蟲草素含量

由圖 4-24 至圖 4-29 可得知重複式批次培養(靜置)策略對於蟲草素含量之影響，基礎培養基與其他五種培養基經由重複批次培養後，均較前一個循環的蟲草素含量有所提升。而經由此策略所測得的蟲草素含量與重複式批次培養(震盪)策略之含量相比，高達 5 至 9 倍，顯示此策略能有效提高蛹蟲草之蟲草素含量。由表 4-6 亦得知培養基 2 經由重複批次培養(靜置)所得到的蟲草素含量為 895.25 ($\mu\text{g/ml}$)，明顯高於其他種類的培養基。發現蛹蟲草菌種在此培養策略下，將培養基的 C/N 調至 2/1，氮源部分 P : Y (Peptone : YE) 調至 25% : 75% 能產生較多的二次代謝產物蟲草素。

(1) 基礎培養基

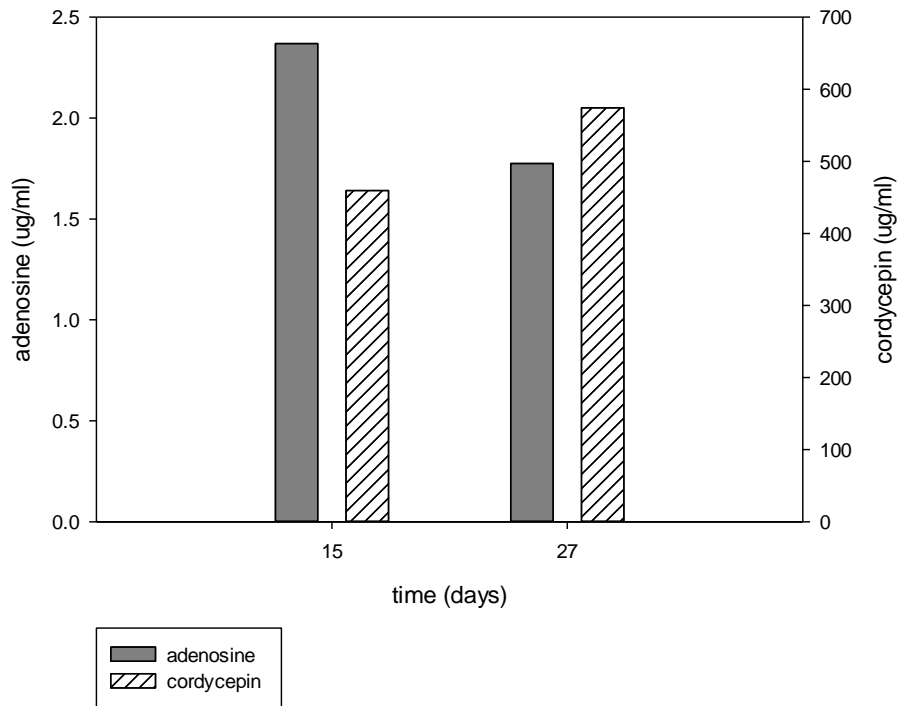


圖 4-24 重複式批次培養試驗(靜置培養)-基礎培養基

培養基成分: Glucose (40g/L)、Peptone (5g/L)、YE (5g/L)、無機鹽類、水 100 mL

培養條件: 溫度 25°C

(2) 培養基 1

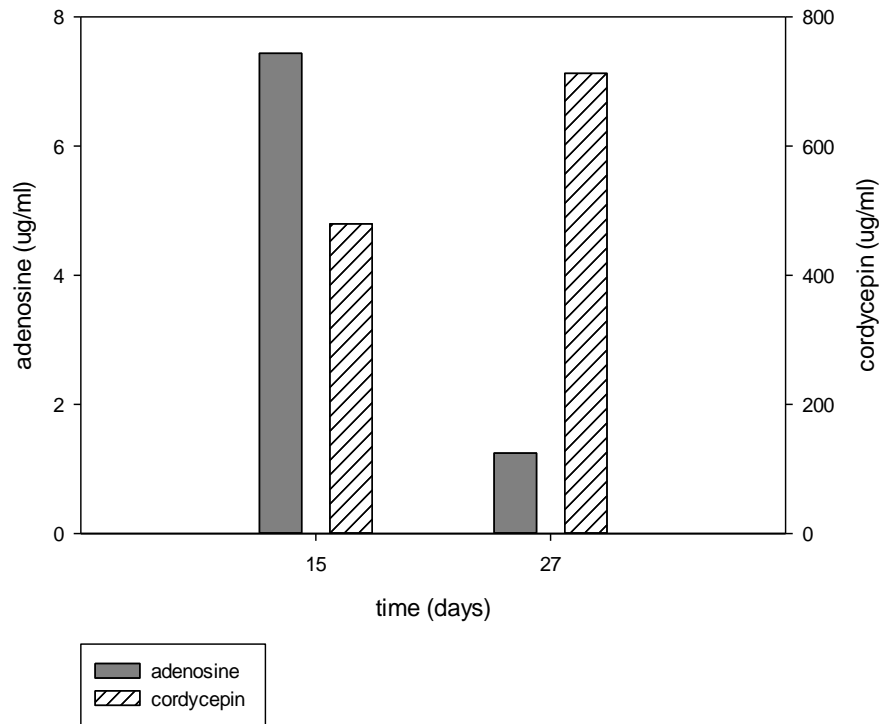


圖 4-25 重複式批次培養試驗(靜置培養)-培養基 1

培養基成分: Glucose (40g/L)、Peptone (5g/L)、YE (5g/L)、無機鹽類、Adenosine (0.5g/L)、水 100 mL

培養條件: 溫度 25°C

(3) 培養基 2

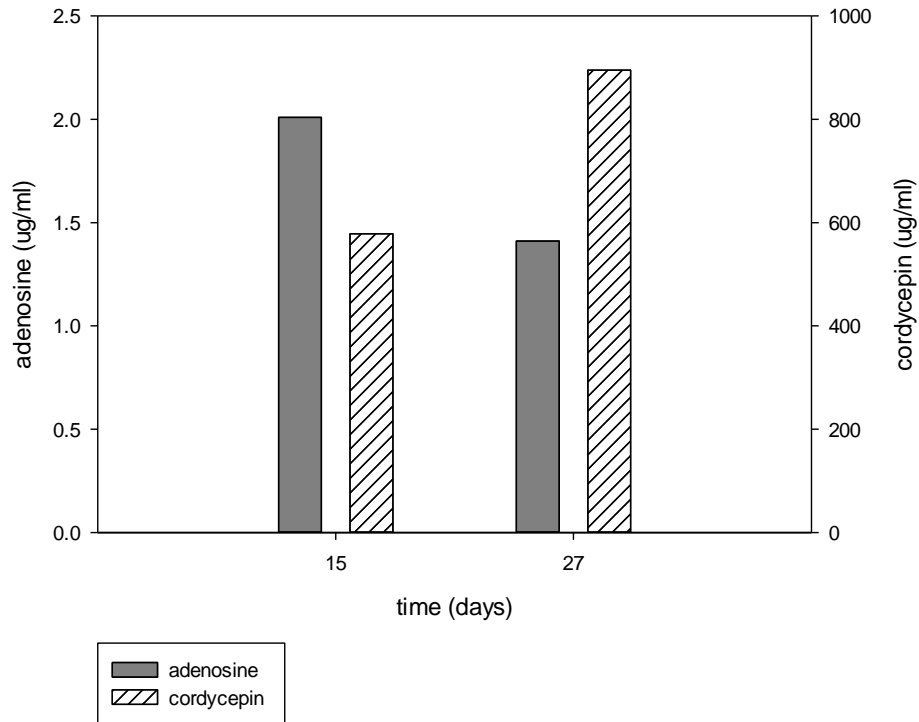


圖 4-26 重複式批次培養試驗(靜置培養)-培養基 2

培養基成分: Glucose (20g/L)、Peptone (2.5g/L)、YE (7.5g/L)、無機鹽類、水 100 mL

培養條件: 溫度 25°C

(4) 培養基 3

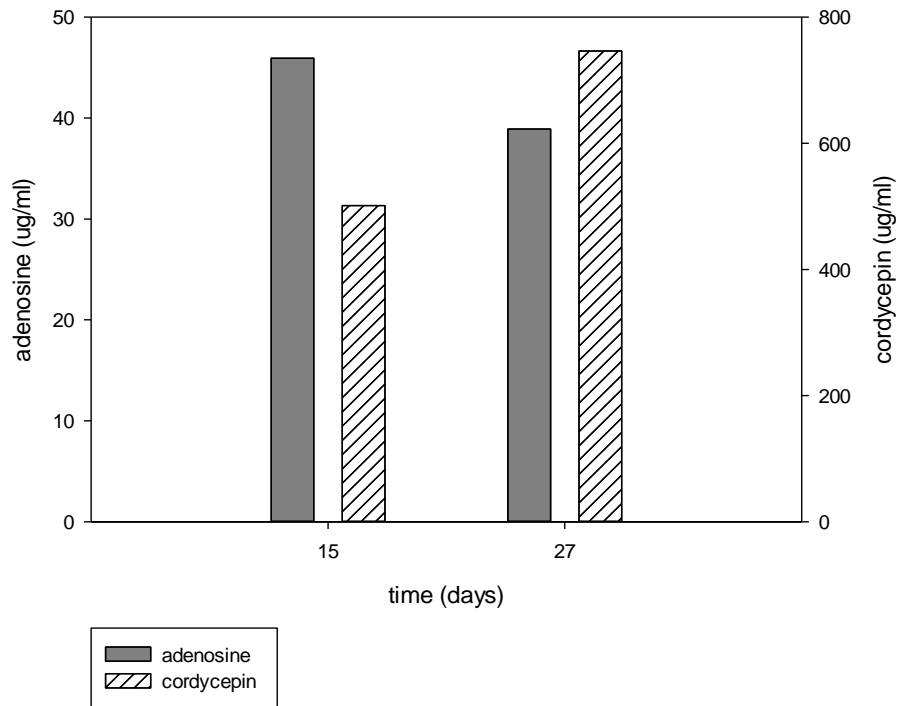


圖 4-27 重複式批次培養試驗(靜置培養)-培養基 3

培養基成分: Glucose (40g/L)、YE (45g/L)、無機鹽類、水 100 mL

培養條件: 溫度 25°C

(5) 培養基 4

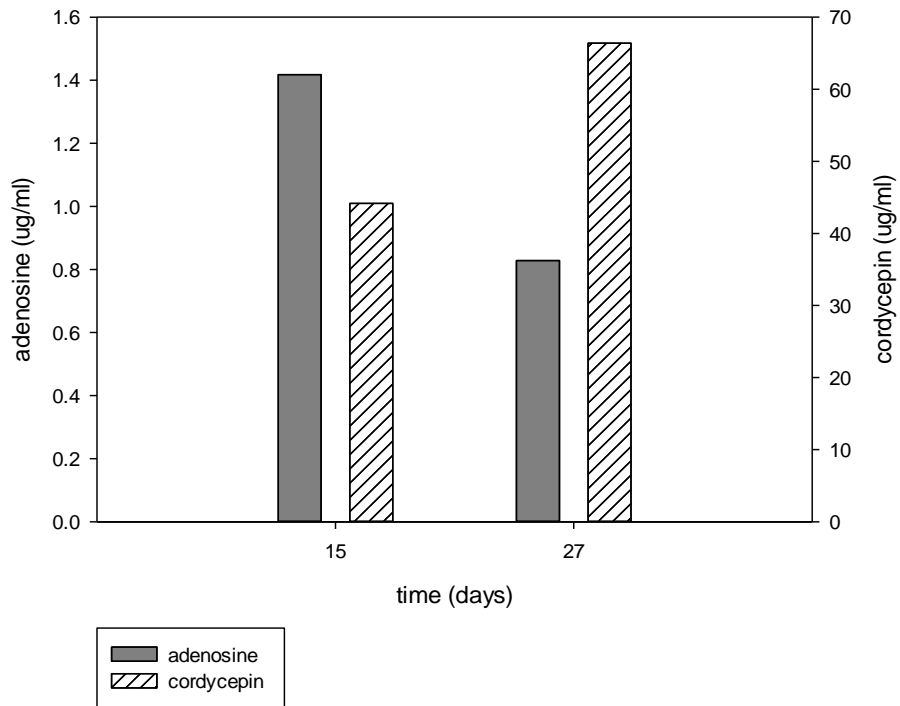


圖 4-28 重複式批次培養試驗(靜置培養)-培養基 4

培養基成分: Glucose (40g/L)、Soy peptide (20g/L)、無機鹽類、水 100 mL

培養條件: 溫度 25°C

(6) 培養基 5

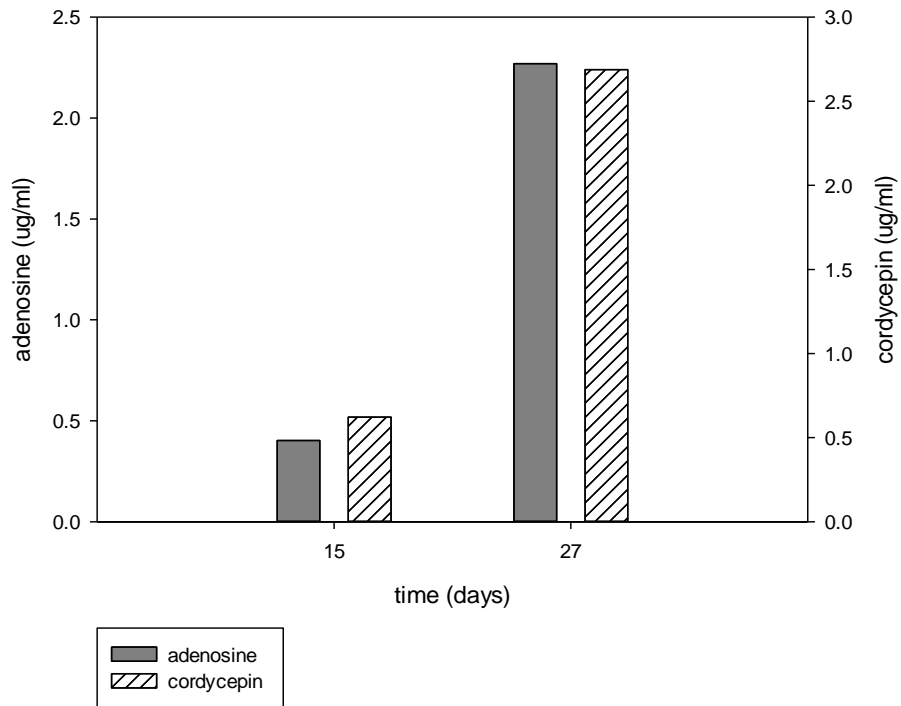


圖 4-29 重複式批次培養試驗(震盪培養)-培養基 5

培養基成分: Glucose (40g/L)、高鮮味精 (10g/L)、無機鹽類、水 100 mL

培養條件: 溫度 25°C

由表 4-4 顯示透過此重複式批次培養(靜置)策略與文獻結果比較，培養基 4 (添加大豆胜肽) 與培養基 5 (添加高鮮味精) 在此策略培養下明顯低於其他組試驗，推測可能因素是大豆胜肽內含碳水化合物的醣類來源並非能被蛹蟲草有效利用的葡萄糖，蛋白質的種類也有待進一步確認。高鮮味精成分則具有黏稠劑(羧甲基纖維素鈉)成分，影響菌體與培養基之接觸面積，抑制菌體生長與代謝有效成分。然而，文獻中最佳化培養基的蟲草素含量高達 2900.00 (mg/L)，遠高於各種試驗所測得的含量，可能原因為文獻中的實驗添加了多種的 purines (嘌呤)、coenzymes (輔酶)、surfactant (界面活性劑) 等高成本添加物，促使蛹蟲草擁有豐富的營養源能產生最多的有效成分蟲草素。

表 4-4、重複式批次培養(靜置)與文獻結果比較

	Cycle1 (15D) Cordycepin (mg/L)	Cycle2 (27D) Cordycepin (mg/L)
基礎培養基	459.50	574.30
培養基 1	479.77	712.64
培養基 2	578.49	895.25
培養基 3	501.47	746.33
培養基 4	44.17	66.39
培養基 5	0.62	2.69
Masuda <i>et al</i> (2006) Basal medium	520.00	約 560.00
Masuda <i>et al</i> (2006) Optimal medium	2370.00	約 2900.00

第五章 結論與未來展望

5-1 結論

本實驗探討以不同培養策略與添加物對菌體生長、生產一次代謝產物腺苷與二次代謝產物蟲草素之影響，綜合以上實驗結果，整理出以下結論：

- (1) 在靜置培養之饋料批次試驗與兩階段培養之饋料批次試驗中得知，以添加碳源與氮源之試驗能獲得較多的菌絲體總量、胞內的腺苷總量，而胞外的腺苷總量明顯少於胞內。以添加具有蛋白質與碳水化合物的大豆胍肽則能有效提升胞外的蟲草素總量，而胞內的蟲草素總量明顯少於胞外，蟲草素在胞外所佔比例約 85.5 % 與 83.9 %。
- (2) 在重複式批次培養試驗中，以培養基 1 (添加 Adenosine 0.5 g/L) 震盪培養能獲得最多的腺苷總量，但是總量卻比添加濃度(500 μ g/ml) 還低，可能原因為蛹蟲草的一次代謝產物腺苷多存在於胞內。然而，透過重複式批次培養(靜置)策略，除了添加大豆胍肽與高鮮味精，其餘試驗所測得的蟲草素在第二個循環相較前一循環的含量多達 5 倍至 9 倍，以培養基 2 為例，調整培養基的碳氮比(C/N)，從基礎培養基的 4/1 降低至 2/1，並調整氮源 Peptone 與 YE 的比例為 25% : 75%，能促使蛹蟲草菌種產生更多的蟲草素。

5-2 未來展望

蛹蟲草菌種的靜置培養與兩階段培養皆以添加葡萄糖(碳源)與 YE(氮源)能促進菌絲體生長與一次代謝產物腺苷的增加，未來可針對此方面做濃度的調整以增加產量。實驗結果發現蛹蟲草菌種的二次代謝產物蟲草素多數存在於胞外，並以大豆胍肽的添加為最佳，然而，其內含的碳水化合物與蛋白質的種類仍有待確認。若是以重複式批次培養的策略進行，未來可調整培養基的碳氮比與氮源 (Peptone、YE)，並添加其餘的核苷酸、輔酶替代物，在成本考量下找出更完善的配方以利於更多的蟲草素生成。蛹蟲草的一次代謝產物腺苷亦可透過此重複式批次培養的策略做探討，並進行胞內的分析。子實體生產部分則可考慮使用全固態基質、固液共存、液態靜置培養等策略，然而液態靜置培養方面則須考慮培養基養分的充足與否，並增加溫差刺激與光照強度等培養條件。

參考文獻

(一) 中文文獻

- 丁彥懷、李玉、朱繼紅、陳穎、王秋雨及王增學，(1995)，蛹蟲草人工培養條件下的顯微觀察，*食用菌學報*，2(02)。
- 王菊鳳、楊道德、李鵠鳴、易思富及楊朝霞，(2006)，蛹蟲草的光溫反應及生長發育特性，*山地農業生物學報*，25(02)。
- 呂昫陞，(2009)，蛹蟲草之特性與栽培現況，*農業試驗所技術服務*，78期。
- 李亞潔，(2006)，柞蠶蛹蟲草的研究，*遼寧農業科學* (02):16-29。
- 李辰、吳盼盼、卿寧、梁碩及黃俊添，(2012)，蛹蟲草廢棄培養殘基中蟲草素的提取工藝研究，*五邑大學學報(自然科學版)*26(03):37-41。
- 李祥玲、胡勁松及陳作紅，(2010)，HPLC 測定人工蛹蟲草及其培養基中蟲草素和腺苷含量，*湖南師範大學自然科學學報* 33(02):107-110。
- 邱小明及石偉林，(2010)，蠶蛹蟲草市場化過程中的問題及對策，*江蘇蠶業* (04):41-42。
- 周佳賢，(2004)，蛹蟲草固態培養研究探討，*朝陽科技大學生物技術碩士論文*。
- 林石源，(2004)，蛹蟲草子實體培養條件與活性成分組成之研究，*大葉大學生物產業科技學碩士論文*。
- 林佳慧，(2009)，溫度效應對蛹蟲草固態培養期間生物活性成分含量之影響，*弘光科技大學食品暨應用生物科技碩士論文*。
- 林冠廷，(2009)，影響蛹蟲草固態生產蟲草素之研究，*國立宜蘭大學生物技術碩士論文*。
- 林桂英，(2000)，不同冬蟲夏草菌株發酵產程中機能性指標成分之探討，*大葉大學食品工程碩士論文*。

- 姚淑玲，(2004)，培養條件對北冬蟲夏草(*Cordyceps militaris*)菌絲生長之影響，東海大學化學工程學碩士論文。
- 紀奕璋，(2015)，時間與光照對冬蟲夏草(中華被毛孢)固態培養之影響，私立東海大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。
- 徐胤桓，(2010)，不同來源蛹蟲草菌株親緣分析、生物活性成分含量及抗氧化特性探討，大葉大學生物產業科技學碩士論文。
- 梁宗琦，(2007)，中國真菌志:第 32 卷蟲草屬，北京科學出版社，190 頁。
- 張郁涵，(2009)，蛹蟲草菌株之生理生化特性與親緣分析，弘光科技大學食品暨應用生物科技碩士論文。
- 梁家源，(2010)，中華蝠蛾之生物學特性及蛹蟲草接種家蠶之研究，國立嘉義大學森林暨自然資源學碩士論文。
- 許築雅，(2011)，不同碳源或氮源影響北蟲草於綠茶液生長及生長期時期綠茶發酵液之功能性能力變異之探討，高苑科技大學化工與生化工程碩士論文。
- 陳郁雯，(2010)，LED 光照與培養基組成對蛹蟲草發酵產物的影響，銘傳大學生物科技碩士論文。
- 陳逸璇，(2009)，經加瑪射線照射處理幾丁聚醣對北蟲草生長特性及其快速品質分析之建立，弘光科技大學食品暨應用生物科技碩士論文。
- 陳嫻伊，(2001)，蛹蟲草發酵液及其區分物對肝細胞之影響，國立台灣大學食品科技碩士論文。
- 曾宏彬、宋斌及李泰輝，(2011)，蛹蟲草研究進展及其產業化前景，食用菌學報 18(02):70-74。
- 葉淑幸，(2002)，培養基中碳源與培養方式對蛹蟲草菌(*Cordyceps militaris*)發酵產程中生質、菌絲球及生物活性成分之影響，大葉大學食品工程學碩士論文。

劉建華、卜寧及孫月，(1999)，撫順地區蛹蟲草的組織學鑑定，*遼寧師專學報(自然科學版)* 1(02):80-81。

劉志剛、顏仁梁、趙樹進及韓麗萍，(2009)，不同級別人工蛹蟲草腺苷含量的比較，*解放軍藥學學報* 25(01):88-89,111。

劉慈欣，(2003)，液態培養環境對北冬蟲夏草(*Cordyceps militaris*)菌絲體生長及其機能性成分之影響，*東海大學食品科學碩士論文*。

蔡宇舟，(2009)，蛹蟲草生產蟲草素最適化培養基之初步探討，*朝陽科技大學應用化學碩士論文*。

蔡昆霖，(2004)，不同培養方式對蛹蟲草菌絲體生長及其生物活性成分之研究，*大葉大學生物產業科技學碩士論文*。

(二) 英文文獻

Arif Rahmanduta，(2013)，以脈衝光提升蛹蟲草廢棄培養基中維生素 D2 以及其它生物活性成分的含量，*亞洲大學生物科技碩士論文*。

Ahn, Y. J., Park, S. J., Lee, S. G., Shin, S. C. and Choi, D. H. (2000). Cordycepin: Selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(7):2744-2748.

Cheng, X., Ge, Y., Sun, H., Bai, X. and Bai, X. and Zhang, Q. (2010). Zinc tolerance and accumulation characteristics of *Cordyceps militaris*. *Shengtai Xuebao/Acta Ecologica Sinica* 30(6):1449-1455.

Chen, Y. S., Liu, B. L. and Chang, Y. N. (2011). Effect of light and heavy metals on *Cordyceps militaris* fruit body growth in rice grain-based cultivation. *Korean Journal of Chemical Engineering* 28(3):875-879.

- Dong, J. Z., Lei, C., Ai, X. R. and Wang, Y. (2012a). Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* link and analysis on its main active components. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166(5):1215-1224.
- Dong, J. Z., Lei, C., Zheng, X. J., Ai, X. R., Wang, Y. and Wang, Q. (2012b). Light Wavelengths regulate growth and active components of *Cordyceps militaris* fruit bodies. *Journal of Food Biochemistry*, vol. 37, issue 5 (2013) pp. 578-584.
- Dong, J. Z., Liu, M. R., Lei, C., Zheng, X. J. and Wang, Y. (2012c). Effects of selenium and light wavelengths on liquid culture of *Cordyceps militaris* link. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166(8):2030-2036.
- Fan, D. D., Wang, W. and Zhong, J. J. (2012). Enhancement of cordycepin production in submerged cultures of *Cordyceps militaris* by addition of ferrous sulfate. *Biochemical Engineering Journal* 60:30-35.
- Gomes, C. V., Kaster, M. P., Tome, A. R., Agostinho, P. M. and Cunha, R. A. (2011). Adenosine receptors and brain diseases: Neuroprotection and neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1808(5):1380-1399.
- Guo, J., Chen, H., Liu, X., Gao, H., Deng, Y., Xiao, J. and Zhang, J. (2012). A scale up submerging fermentation to produce fibrinolytic enzyme and mycelia by *Cordyceps militaris*. 2011 *International Conference on Smart Materials and Nanotechnology in Engineering, SMNE 2011*, vol. 345 (2012) pp. 239-244.
- Gunha, R. A. (2001). Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry International* 38(2):107-125.
- Gu, Y. X., Wang, Z. S., Li, S. X. and Yuan, Q. S. (2007). Effect of multiple factors on accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris*. *Food Chemistry* 102(4):1304-1309.

- Jiang, Y., Wong, J. H., Fu, M., Ng, T. B., Liu, Z. K., Wang, C. R., Li, N., Qiao, W. T., Wen, T. Y. and Liu, F. (2011). Isolation of adenosine, iso-sinensetin and dimethylguanosine with antioxidant and HIV-1 protease inhibiting activities from fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Phytomedicine*, vol. 18, issue 2-3 (2011) pp. 189-193.
- Kim, H. o. and Yun, J. W. (2005). A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. *Journal of Applied Microbiology* 99(4):728-738.
- Kryukov, V. Y., Taroslavtseva, O. N., Lednev, G. R. and Borisov, B. A. (2011). Local epizootics caused by teleomorphic cordycipitoid fungi (Ascomycota: Hypocreales) in populations of forest lepidopterans and sawflies of the summer-autumn complex in Siberia. *Microbiology* 80(2):286-295.
- Liang, D., Zhang, N., Zhang, Y., Zhang, T., Lu, L., Wang, Z. and Teng, L. (2012). Response surface methodology used for statistical optimization media of *Cordyceps militaris*. 2011 *International Conference on Information Technology and Agricultural Engineering, ICITAE 2011*, vol. 134 AISC (2012) pp. 485-491.
- Lim, L., Lee, C. and Chang, E. (2012). Optimization of solid state culture conditions for the production of adenosine, cordycepin, and d-mannitol in fruiting bodies of medicinal caterpillar fungus *Cordyceps militaris* (L.:Fr.) link (Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 14 (2):181-187.
- Lee, S. J., Kim, S. K., Choi, W. S., Kim, W. J. and Moon, S. K. (2009). Cordycepin causes p21WAF1-mediated G2/M cell-cycle arrest by regulation c-Jun N-terminal kinase activation in human bladder cancer cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 490 (2) : 103-109.

- Liu, X., Meng, F., Zhang, Y. B., He, H., Han, W., Juan, W. and Teng, L. (2012). Enhanced production of mycelia by the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* using placket-burman design and response surface methodology. 2011 2nd *International Conference on Applied Mechanics and Mechanical Engineering, ICAMME 2011*, vol. 138-139 (2012) pp. 1209-1214 Published by Trans Tech Publications Ltd.
- Masuda, M., Das, S. K., Fujihara, S., Hatashita, M. and Sakurai, A. (2011). Production of cordycepin by a repeated batch culture of a *Cordyceps militaris* mutant obtained by proton beam irradiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111(1):55-60.
- Masuda, M., Eriko Urabe, Hiromitsu Honda, Akihiko Sakurai and Mikio Sakakibara, (2007). Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40, issue 5 (2007) pp. 1199-1205.
- Masuda, M., Urabe, E., Sakurai, A. and Sakakibara, M. (2007). Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology* 40(5):1199-1205.
- Masuda, M., Urabe, E., Sakurai, A. and Sakakibara, M. (2006). Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology* 39(4):641-646.
- Mao, X. B. and Zhong, J. J. (2004). Hyperproduction of cordyceps by two-stage dissolved oxygen control in submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* in bioreactors. *Biotechnology Progress* 20(5):1408-1413.

- Mao, X. B. and Zhong, J. J. (2006). Significant effect of NH_4^+ on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology* 38(3-4):343-350.
- Panigrahi, A. (1997). Mycosis in the tea pest *Andraca biopunctata* Walker (Lepidoptera:Notodontidae). *Ecology, Environment and Conservation*.
- Reddy, V., Reddy, P., Pillay, B. and Singh, S. (2002). Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. *Process Biochemistry* 37(11):1257-1262.
- Sehgal, A. K. and Sagar, A. (2006). In vitro isolation and influence of nutritional conditions on the mycelial growth of the entomopathogenic and medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Plant Pathology Journal* 5(3):315-321.
- Sung, G. H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J. M., Luangsa-Ard, J. J., Shrestha, B. and Spatafora, J. W. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57:5-59.
- Shih, I. L., Tsai, K. L. and Hsieh, C. (2007). Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 33, issue 3 (2007) pp. 193-201.
- Sweeney, M. I. (1997). Neuroprotective Effects of Adenosine in Cerebral Ischemia: Window of Opportunity. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 21 (2) :207-217
- Zhou, H. B., Xiao, S. M., Ruan, C. C. and Qiu, G. Z. (2006). Submerged fermentation of *Cordyceps militaris*. *Zhongnan Daxue Xuebao (Ziran Kexue Ban) /Journal of Central South University (Science and Technology)* 37(6):1098-1102.