

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science  
Tunghai University

食品科技組  
Food Technology Section

以固態發酵製備北蟲草紫米及其不易形成體脂肪  
之探討

Preparation of *Cordyceps militaris* fermented black rice  
using solid-state fermentation and its anti-obesity effect

陳容蓉

Jung-Jung Chen

指導教授： 梁志弘 博士  
蔣慎思 博士

Advisor: Chih-Hung Liang, Ph.D.  
Shen-Shih Chiang, Ph.D.

中華民國一百零四年一月  
Jan., 2015

## 碩士論文考試委員審定書

食品科學研究所科技組 陳容蓉 君所提之論文

以固態發酵製備北蟲草紫米及其不易形成體脂肪之探討

Preparation of *Cordyceps militaris* fermented black rice  
using solid-state fermentation and its anti-obesity effect

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

梁志敏 大葉大學 生物資源學系 教授兼系主任

王仲陽 國立中興大學 森林學系 特聘教授兼  
農資學院副院長

論文指導教授：

梁志弘 助理教授

李如雲 助理教授

中華民國一〇三年十二月二十四日

## 謝誌

在就讀研究所這兩年半的時間，誠摯感謝指導教授 梁志弘 博士在研究期間領導我實驗的方向及面對問題時悉心地教誨，更感謝老師給予我到中興 蔣慎思 博士實驗室共同指導的機會。在中興的研究期間感謝指導教授 蔣慎思 博士教導我實驗技巧、邏輯思考及表達能力，兩位老師力求學生閱讀文獻與上台報告的能力及實驗時的嚴謹態度讓我受益良多，諄諄教誨，深表感謝。

論文初成之際，承蒙口試委員王升陽教授及梁志欽教授於百忙中逐字詳加審閱，指正疏漏，並於口試時給予諸多指導，使論文之內容更加完善，深表感謝。

在東海的研究期間，感謝彥甫學長教導我實驗技巧、夥伴盈吟與毓琪的支持及學弟妹柏璋、庭瑋與予捷的陪伴，讓我在這兩年半除了實驗之外還多了許多樂趣。在中興的研究期間，感謝明悅學姐的帶領、夥伴佑珊與珮瑄的共患難及學弟妹昊擎、啟憲、琬庭及瓊峰的幫忙，讓我在東海中興兩邊奔波時能更加的從容。感謝研究所室友昱華的解憂、同學文華幫我解決實驗上的疑問以及其餘研究所同學們的陪伴，讓我在東海這兩年半的生活過得多采多姿，也感謝好朋友們在我遇到瓶頸時聽我發牢騷。

最後，感謝親愛的爸爸、媽媽、姐姐及哥哥給予我包容、鼓勵與支持，讓我在求學期間能毫無顧慮的完成學業，感恩之情，不茆言謝。

謹以此論文獻給所有關心我的親人、師長和朋友。

陳容蓉 謹致於  
東海大學食品科學系  
中華民國一百零四年一月

## 摘要

肥胖為人體內的脂肪堆積到一個危害健康程度的狀態，其會導致糖尿病、心血管疾病及非酒精性脂肪肝等疾病的產生。北蟲草 (*Cordyceps militaris*, CM) 屬蟲草屬真菌，具有抗糖尿病、降血脂及抗肝毒性等生理機能。紫米 (black rice, BR) 為禾本科植物，是黃酮類及花青素等生理活性物質之來源。研究指出北蟲草和紫米可改善高脂血症，故本研究利用固態發酵技術以一次一因子之方法探討北蟲草紫米最適固態培養條件，並針對紫米、北蟲草紫米、北蟲草菌絲體及子實體之一般成分及功能性成分進行分析，另探討其對抑制 3T3-L1 前脂肪細胞分化及油滴堆積之效果。結果顯示北蟲草紫米固態發酵培養時間為 15 天，最適生長溫度為 25 °C，水分添加量為 60%，接菌量為 4 mL，氮源部分以添加黃豆粉效果較佳，無機鹽類則以  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  效果較佳，而碳源添加與否則無顯著差異，利用上述所得之條件大量製備北蟲草紫米，進行後續實驗。在一般成分分析方面，北蟲草紫米水分含量為 5.43%、碳水化合物為 79.05%、粗灰分為 1.94%、粗脂肪為 3.91% 及粗蛋白為 9.67%。在生理活性物質方面，北蟲草紫米腺苷含量為 0.14 mg/g、蟲草素為 0.04 mg/g、甘露糖醇為 3.45 mg/g、多醣為 54.40 mg/g 及類黃酮為 0.75 mg/g，花青素則未檢出。在不易形成體脂肪方面，體外細胞試驗以北蟲草子實體水萃物 (CMFW)、北蟲草菌絲體水萃物 (CMMW)、紫米水萃物 (BRW) 和乙醇萃物 (BRE) 及北蟲草紫米水萃物 (CBW) 和乙醇萃物 (CBE) 來處理 3T3-L1 前脂肪細胞，並探討其抑制油滴堆積及促脂解作用之效果。結果顯示以濃度為 62.5-250  $\mu\text{g/mL}$  之 CMFW、CMMW、BRW、CBW 及 CBE 和 62.5-125  $\mu\text{g/mL}$  之 BRE 處理後可抑制細胞中油滴之堆積，另濃度為 125  $\mu\text{g/mL}$  之 BRE 及 62.5 和 250  $\mu\text{g/mL}$  之 CBE 可顯著促進脂解作用，增加成熟脂肪細胞之甘油釋放量 ( $p < 0.05$ )。另外，在體內動物試驗方面，以高脂飼料誘導肥胖之 BALB/c 小鼠為實驗模式，餵食 0.1% CM、10% BR、2% CBL 及 10% CBH 10 週後，評估其不易形成體脂肪之效果。結果顯示，此四處理組之體重與

HF 組相比，分別降低 5.04%、8.22%、7.38% 及 7.78% ( $p<0.05$ )，而體脂肪率則分別下降 2.44%、2.96%、2.37% 及 2.78% ( $p<0.05$ )，另副睪脂肪細胞大小皆明顯小於 HF 組。此外，在血清參數方面，四個處理組樣品之天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST) 及胺基丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT) 明顯低於 HF 組 ( $p<0.05$ )；另由肝臟組織切片結果顯示，CM、CBL 及 CBH 組之脂肪肝分數分別為 3.1、2.1 及 3.6，亦明顯低於 HF 組 (5.0) ( $p<0.05$ )。綜上所述，經固態發酵後之北蟲草紫米具有不易形成體脂肪之效果，未來可做為不易形成體脂肪相關之保健食品開發之材料。

關鍵字：北蟲草、紫米、固態發酵、肥胖、3T3-L1、BALB/c 小鼠



## Abstract

Obesity are defined as abnormal or excessive fat accumulation that presents a risk to health, which are major risk factors for a number of chronic diseases, including diabetes, cardiovascular diseases and cancer. *Cordyceps militaris* (CM) is a well-known traditional medicine in Asian countries. It has been known as a rich source of biologically active components and used for treatment of several diseases such as anti-tumour, anti-diabetic, hypolipidemic and antihepatotoxicity. Black rice (*Oryza sativa* L.) is a special cultivar of rice that contains rich anthocyanins in the aleurone layer, has been regarded as a health-promoting food in China and other Eastern. The aim of this study was to investigate the general composition, physiologically active components and the anti-obesity effects of *Cordyceps militaris* fruiting body (CMF), *Cordyceps militaris* mycelia (CMM), black rice (BR) and *Cordyceps militaris* fermented black rice (CB). CB was obtained from the solid state fermentation of cooked rice with 50% moisture content as the base under various conditions. The optimal growth conditions were temperature (25 °C), water supplementation (60%), inoculation rate (4 mL), nitrogen source (1% soybean meal) and mineral (0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O). The major component found in CMF, CMM, BR and CB was carbohydrate (79.05, 75.09, 53.3 and 51.62%). With regard to physiologically active components, the contents of adenosine, cordycepin and mannitol of CB (0.14, 0.04 and 3.45 mg/g) were lower than CMF (1.79, 6.71 and 13.64 mg/g) and CMM (4.14, 0.36 and 8.64 mg/g). With regard to anti-adipogenesis effects in 3T3-L1 preadipocytes, the water extracts from CMF, CMM, BR, CB (62.5-250 µg/mL) and the ethanol extracts from BR (62.5-125 µg/mL) and CB (62.5-250 µg/mL) could significantly inhibit the lipid accumulation. The glycerol release were significantly increased by ethanol

extracts from BR (125 µg/mL) and CB (62.5 and 250 µg/mL). With regard to anti-obesity effects of 0.1% CM, 10% BR, 2% CBL and 10% CBH were evaluated for 10 weeks on high-fat diet (HF) induced obese BALB/c mice model. The results showed that administration of CM, BR, CBL and CBH significantly reduced body weights (5.04%, 8.22%, 7.38% and 7.78%), body fat ratio (2.44%, 2.96%, 2.37% and 2.78%), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels compared to the HF group ( $p < 0.05$ ). Histopathological analysis showed that the score of fatty liver in HF group (5.0) was significantly higher than CM, CBL and CBH group (3.1, 2.1 and 3.6) ( $p < 0.05$ ). In conclusion, *Cordyceps militaris* fermented black rice have better physiologically active components compared with black rice. Furthermore, the extracts of CB can inhibit the lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes, and the powder of CB can potentially prevent the effects of fat accumulation in obese BALB/c mice.

Key words : *Cordyceps militaris*, black rice, solid-state fermentation, obesity, 3T3-L1, BALB/c mice

# 目錄

摘要.....	I
Abstract .....	III
表次.....	IX
圖次.....	X
第一章 前言.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
一、肥胖 (Obesity) .....	3
(一) 肥胖之定義.....	3
(二) 肥胖之成因.....	7
(三) 肥胖所引發之疾病.....	9
二、脂肪細胞 .....	15
(一) 前脂肪細胞介紹.....	15
(二) 脂肪細胞功能.....	15
(三) 前脂肪細胞分化過程.....	17
(四) 脂肪細胞分化之主要調控因子.....	17
三、北蟲草 .....	21
(一) 北蟲草簡介.....	21
(二) 北蟲草的自然分佈.....	21
(三) 北蟲草之機能性成分.....	21
(四) 北蟲草之生理活性.....	25
四、紫米 .....	29
(一) 紫米簡介.....	29
(二) 花青素 (Anthocyanins) .....	29
(三) 紫米之生理活性.....	31



五、固態發酵 .....	32
(一) 固態發酵定義 .....	32
(二) 固態發酵之特點 .....	32
(三) 固態發酵生物量之測量方法 .....	34
(四) 菇類固態發酵之相關文獻 .....	37
第三章 材料方法 .....	39
一、實驗材料 .....	39
二、實驗方法 .....	39
(一) 菌株培養及接種源製備 .....	39
(二) 固態發酵 .....	40
(三) 一般成分分析 .....	42
(四) 生理活性物質分析 .....	44
(五) 3T3-L1 前脂肪細胞之體外實驗模式 .....	47
(六) 體內動物模式 .....	53
(七) 統計分析 .....	56
第四章 結果討論 .....	57
一、北蟲草紫米固態發酵條件探討 .....	57
(一) 北蟲草紫米固態發酵生長曲線 .....	57
(二) 培養溫度 .....	57
(三) 水分添加量 .....	65
(四) 接菌量 .....	65
(五) 氮源 .....	65
(六) 碳源 .....	68
(七) 無機鹽種類 .....	68
二、一般成分分析 .....	72
(一) 水分 .....	72
(二) 碳水化合物 .....	72

(三) 粗灰分 .....	72
(四) 粗脂質 .....	72
(五) 粗蛋白 .....	74
三、生理活性物質分析 .....	74
(一) 腺苷 (Adenosine) .....	74
(二) 蟲草素 (Cordycepin) .....	76
(三) 甘露糖醇 (Mannitol) .....	76
(四) 多醣 (Polysaccharide) .....	76
(五) 花青素 (Anthocyanins) .....	77
(六) 類黃酮 (Flavonoid) .....	77
四、3T3-L1 前脂肪細胞之體外實驗模式 .....	78
(一) 3T3-L1 前脂肪細胞存活率測定 .....	78
(二) 北蟲草子實體與菌絲體冷水萃取物及紫米和北蟲草紫米冷水 與乙醇萃取物對 3T3-L1 前脂肪細胞分化與油滴堆積之影響 .....	82
(三) 北蟲草子實體與菌絲體冷水萃取物及紫米和北蟲草紫米冷水 與乙醇萃取物對 3T3-L1 成熟脂肪細胞脂解效率之影響 .....	89
五、體內動物實驗 .....	93
(一) 北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飲食誘導 肥胖 BALB/c 小鼠體重和飼料攝取量之影響 .....	93
(二) 北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飲食誘導 肥胖 BALB/c 小鼠臟器重量之影響 .....	93
(三) 北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飲食誘導 肥胖 BALB/c 小鼠體脂肪率之影響 .....	98
(四) 北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飲食誘導 肥胖 BALB/c 小鼠血清生化參數之影響 .....	98
(五) 北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飲食誘導 肥胖 BALB/c 小鼠肝臟組織脂肪堆積之影響 .....	100

(六) 北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飲食誘導 肥胖 BALB/c 小鼠副睪脂肪組織中脂肪細胞大小之影響 .....	100
(七) 北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飲食誘導 肥胖 BALB/c 小鼠腎臟組織之影響 .....	105
第五章 總結論 .....	107
第六章 參考文獻 .....	108



## 表次

附表一、肥胖之定義 .....	4
附表二、世界衛生組織及台灣地區之 BMI 類別 .....	5
附表三、亞洲人之肥胖相關基因 .....	8
附表四、肥胖引發相關併發症之相對發生風險 .....	11
附表五、白色及褐色脂肪組織之特性 .....	16
附表六、北蟲草主要之機能性成分與其生理活性 .....	22
附表七、北蟲草之生理活性 .....	26
表一、北蟲草紫米固態發酵期間，生物質含量和 pH 值之變化 .....	59
表二、不同發酵條件北蟲草紫米之生物質及最終 pH 值 .....	63
表三、北蟲草子實體、菌絲體、紫米及北蟲草紫米之一般成分 .....	73
表四、北蟲草子實體、菌絲體、紫米及北蟲草紫米之腺苷、蟲草素、 甘露糖醇、多醣、花青素及類黃酮含量 .....	75
表五、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飼料誘導肥胖 BALB/c 小鼠飼料攝取量及體重之影響 .....	95
表六、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飼料誘導肥胖 BALB/c 小鼠臟器重量之影響 .....	96
表七、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飼料誘導肥胖 BALB/c 小鼠血清生化參數之影響 .....	99
表八、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飼料誘導肥胖 BALB/c 小鼠脂肪肝分數之影響 .....	101

## 圖次

附圖一、脂肪細胞增生型與肥大型所引發之肥胖症.....	6
附圖二、肥胖相關之併發症.....	10
附圖三、肥胖與糖尿病及心血管疾病之相關性.....	13
附圖四、3T3-L1 脂肪細胞之分化過程.....	18
附圖五、北蟲草主要機能性成分之結構圖.....	22
附圖六、花青素之基本架構.....	30
附圖七、固態發酵系統之示意圖.....	33
圖一、北蟲草紫米固態發酵期間，生物質和 pH 值之變化.....	58
圖二、北蟲草紫米固態發酵期間之菌絲生長情形（正面）.....	60
圖三、北蟲草紫米固態發酵期間之菌絲生長情形（背面）.....	61
圖四、不同培養溫度對北蟲草紫米生物質和最終 pH 值之影響.....	62
圖五、不同水分添加量對北蟲草紫米生物質和最終 pH 值之影響.....	66
圖六、不同接菌量對北蟲草紫米生物質和最終 pH 值之影響.....	67
圖七、不同氮源添加對北蟲草紫米生物質和最終 pH 值之影響.....	69
圖八、不同碳源添加對北蟲草紫米生物質和最終 pH 值之影響.....	70
圖九、不同無機鹽添加對北蟲草紫米生物質和最終 pH 值之影響.....	71
圖十、（A）北蟲草子實體冷水萃取物與（B）北蟲草菌絲體冷水萃取物對 3T3-L1 前脂肪細胞存活率之影響.....	79
圖十一、（A）紫米冷水萃取物與（B）紫米乙醇萃取物對 3T3-L1 前脂肪細胞存活率之影響.....	80
圖十二、（A）北蟲草紫米冷水萃取物與（B）北蟲草紫米乙醇萃取物對 3T3-L1 前脂肪細胞存活率之影響.....	81
圖十三、以北蟲草子實體與菌絲體冷水萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞，於分化後第九天進行油紅染色觀察油滴堆積情形.....	83
圖十四、以北蟲草子實體與菌絲體冷水萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細	

胞，於分化後第九天進行油紅染色並量化觀察油滴堆積情形 .....	84
圖十五、以紫米冷水與乙醇萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞，於分化 後第九天進行油紅染色觀察油滴堆積情形 .....	85
圖十六、以紫米冷水與乙醇萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞，於分化 後第九天進行油紅染色並量化觀察油滴堆積情形 .....	86
圖十七、以北蟲草紫米冷水與乙醇萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞， 於分化後第九天進行油紅染色觀察油滴堆積情形 .....	87
圖十八、以北蟲草紫米冷水與乙醇萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞， 於分化後第九天進行油紅染色並量化觀察油滴堆積情形 .....	88
圖十九、以北蟲草子實體與菌絲體冷水萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細 胞，於分化後第九天進行脂解活性之測定 .....	90
圖二十、以紫米冷水與乙醇萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞，於分化 後第九天進行脂解活性之測定 .....	91
圖二十一、以北蟲草紫米冷水與乙醇萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞， 於分化後第九天進行脂解活性之測定 .....	92
圖二十二、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飼料誘導 肥胖 BALB/c 小鼠餵食十週體重變化之影響.....	94
圖二十三、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對肥胖 BALB/c 小鼠 (A) 脂肪組織重量與 (B) 體脂肪率之影響.....	97
圖二十四、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對肥胖 BALB/c 小鼠肝臟組織之影響 (圖中比例尺為 50 $\mu\text{m}$ ) .....	102
圖二十五、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對肥胖 BALB/c 小鼠副睪脂肪細胞大小之影響 (圖中比例尺為 50 $\mu\text{m}$ ) .....	103
圖二十六、比較餵食北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末組別 與肥胖 BALB/c 小鼠其副睪脂肪細胞截面積之分布柱狀圖.....	104
圖二十七、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對肥胖 BALB/c 小鼠腎臟組織之影響 (圖中比例尺為 30 $\mu\text{m}$ ) .....	106

## 第一章 前言

由於生活型態的靜態化以及飲食習慣的西化，使人們攝取過多能量但卻減少熱量的消耗，導致肥胖症的產生；另有研究指出睡眠不足、環境溫度變化減少、人種和人群年齡結構的重新分布及晚育等會導致肥胖症發病率和患病率增高 (Keith *et al.*, 2006)。根據 2013 年「國民營養健康狀況變遷調查」統計，我國成人過重及肥胖盛行率 38.3%，其中男性比率為 45.9%、女性比率為 33.1%。依據教育部學生健康檢查資料結果顯示，100 年國小學童過重及肥胖比率為 29.4%，其中男童為 33.2%、女童為 25.1%；100 年國中生過重及肥胖比率為 29.7%，其中男生 34.7%、女生 24.2%。國人過重和肥胖之比率與世界肥胖聯盟 (World Obesity Federation) 資料比較 (2013)，我國成年男性及兒童肥胖比率皆為亞洲之冠，顯示肥胖在台灣已成為嚴重之問題。肥胖會導致糖尿病、癌症、心血管疾病、非酒精性脂肪肝、骨關節炎、阻塞型睡眠呼吸中止症等疾病，故目前亦成為全球關注之健康議題，一般除了體育鍛煉外，現在許多研究都朝向利用飲食來抑制肥胖。

固態發酵 (Solid-state fermentation; SSF) 意指微生物生長於沒有流動液體的固體基質，加入適當的水分或營養源，利用微生物進行發酵生產各種有用物質或發酵品的過程 (Mitchell *et al.*, 2011)。研究指出利用固態發酵技術可獲得高含量之真菌菌絲體及其二次代謝產物 (Robinson *et al.*, 2001)，亦可利用其胞外酵素及代謝產物生產發酵食品、酶、色素、抗生素及有機酸等產品 (廖和鄭, 2005)。固態發酵具開發生物二次代謝產物之潛力，故許多生物技術產業，包括飼料、燃料、食品、工業化學品及醫藥產品等皆將其做為液態深層發酵之替代方法 (Pandey, 2003)。

北蟲草 (*Cordyceps militaris*) 屬蟲草屬真菌，為重要的傳統中藥材，在東亞常被用來做為天然藥用材料及民間滋補食品 (Ying *et al.*, 1987)，又稱北冬蟲夏草或蛹蟲草，具有抑制腫瘤細胞生長 (Sun *et al.*, 2014)、抗氧

化 (Chen *et al.*, 2013)、抗發炎 (Joung *et al.*, 2014)、保肝 (Choi *et al.*, 2014; Ueda *et al.*, 2014)、抗過敏 (Park *et al.*, 2012)、降血脂 (Gao *et al.*, 2011)及抑制脂肪細胞分化(Shin *et al.*, 2014)等生理活性。紫米為禾本科植物，因種皮含有花青素而呈現黑色，又稱黑米或墨米，其種皮是膳食纖維、類黃酮、多酚和花青素之良好來源，研究指出紫米具抗氧化 (Ling *et al.*, 2002)、抑制癌細胞增生及轉移 (Chen *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2013)、抗發炎 (Min *et al.*, 2010) 及降血脂和血糖 (Jang *et al.*, 2012)等功效。因北蟲草和紫米皆可改善高脂血症，故本研究將兩者結合利用固態發酵以一次一因子之方法探討北蟲草紫米固態發酵之培養條件包括碳及氮源(1%)、無機鹽類(0.5%)、溫度、水分添加量及接菌量等，之後以最適化條件製備北蟲草紫米作為實驗材料，並分析其功能性成分及探討其不易形成體脂肪之功效。

本論文探討重點如下：

1. 北蟲草紫米固態發酵生長條件探討
2. 北蟲草紫米、紫米、北蟲草菌絲體及子實體之一般成分及生理活性物質評估
3. 北蟲草子實體和菌絲體水萃物及紫米與北蟲草紫米冷水萃取物和乙醇萃物對 3T3-L1 前脂肪細胞脂質合成及脂解作用之影響
4. 北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飲食誘導肥胖 BALB/c 小鼠進行不易形成體脂肪之評估



## 第二章 文獻回顧

### 一、 肥胖 (Obesity)

#### (一) 肥胖之定義

肥胖為人體內的脂肪堆積到一個危害健康程度的狀態，在不同地區及文化會有不同的定義及測量方法。肥胖程度可藉由身體質量指數 (body mass index, BMI)、腰圍 (waist circumference)、皮下脂肪厚度 (skinfold thickness) 及生物電阻法 (bioelectrical impedance analysis, BIA) 來判斷 (附表一) (Kopelman, 2000)。其中，最常使用之方法為 BMI，其原理為在同身高的基準下，體重變化與體脂肪量呈正相關，再根據 BMI 分為不同區別來判定肥胖的程度。其計算公式為：

$$\text{身體質量指數 (BMI)} = \text{體重 (kg)} / \text{身高平方 (m}^2\text{)}$$

根據世界衛生組織 (WHO, 1997) 之定義，當 BMI  $\geq 25$  為體重過重，BMI  $\geq 30$  為肥胖，不過為了配合亞洲人的身型，衛生福利部於 2002 年將 BMI 的區分修正為：24  $\leq$  BMI  $<$  27 為過重，而肥胖又分為輕度肥胖 27  $\leq$  BMI  $<$  30，中度肥胖 30  $\leq$  BMI  $<$  35 及重度肥胖 BMI  $\geq 35$  等 3 種程度 (附表二)。

肥胖可藉由體內脂肪之不同累積形式，分成以下兩種：

#### 1. 單純性肥胖 (Simple obesity)

單純性肥胖又分為脂肪細胞增生型 (adipocyte hyperplasia)，其主要形成方式是因脂肪細胞增殖使細胞數量增加，導致器官不正常變大；另一為脂肪細胞肥大型 (adipocyte hypertrophy)，其形成則是因脂質堆積於細胞內導致體積增加，但細胞數量不變 (附圖一)。文獻指出脂肪組織的形態與脂肪細胞數量有關，其中脂肪細胞低產生率會導致脂肪組織肥大，高產生率會導致脂肪細胞增生 (Arner *et al.*, 2010)。

附表一、肥胖之定義

Referred table 1. Definition of obesity.

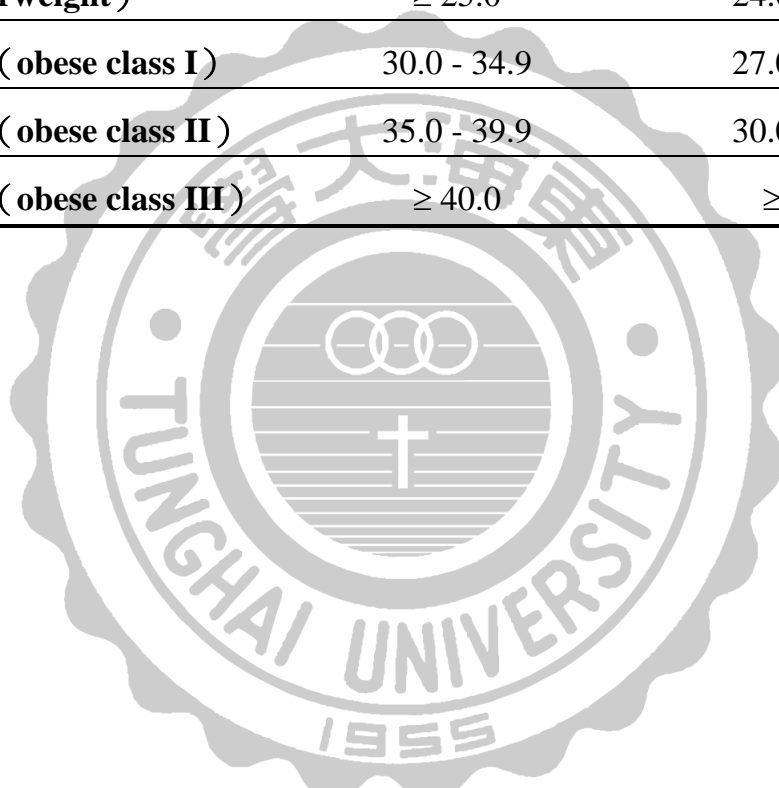
判斷方法	定義	優點與限制
BMI	體重 (kg) / 身高平方 (m <sup>2</sup> )	優點：與身體脂肪量有很好的相關 限制：無法判斷體重過重是來自於肥胖或是肌肉
腰圍	末根肋骨與骨盆上緣的水平量度 (cm)	優點：可藉由腰圍及腰圍與臀圍的比例做為評估上半身脂肪囤積的依據 限制：無法精確評估腹部內部（內臟）的脂肪含量
皮下脂肪厚度	前臂、三頭肌中點處、肩胛下、腋下、腹部、大腿等部位之皮脂厚度 (cm)	優點：藉由測量多個部位之皮脂厚度來評估脂肪量可增加準確度 限制：需要準確的測量卡鉗及無法評估腹部與肌肉內部之脂肪含量
生物電阻法	基於淨體重（除去脂肪的體重）主要為電解質的原則，利用電壓加於體內所產生之微弱電流測量計算出身體電阻可推算出淨體重，再經由經驗所得之方程式回推出體內脂肪含量	優點：設備簡單且實用 限制：無法測量體脂肪及不比簡易人體測量更準確

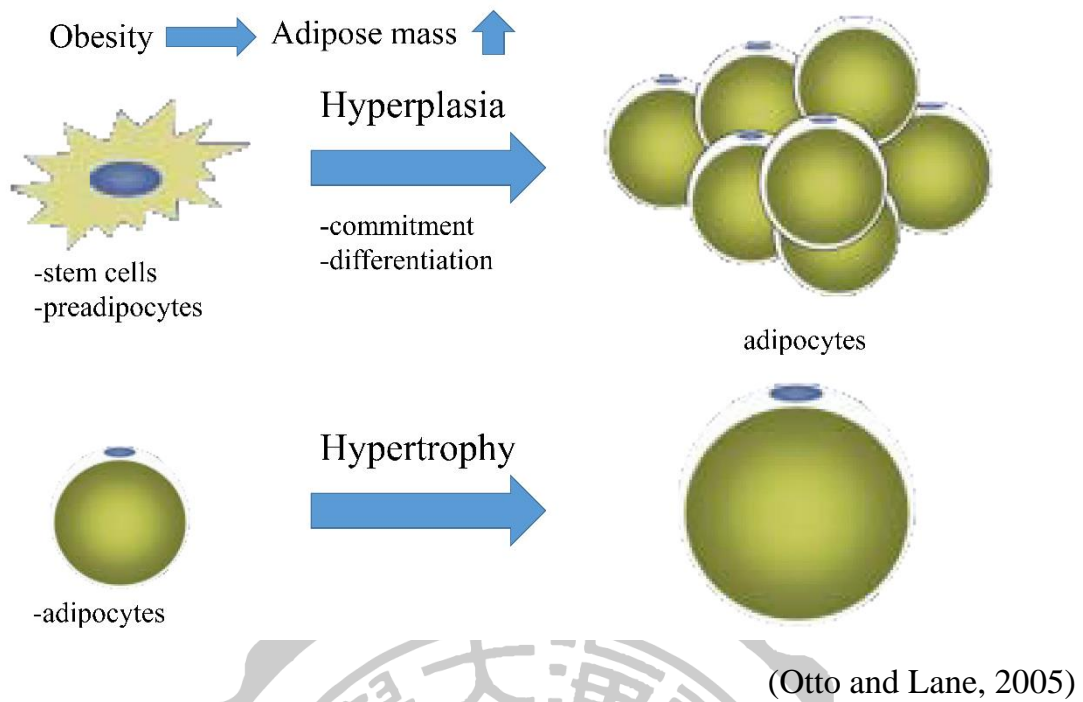
(Kopelman, 2000)

附表二、世界衛生組織及台灣地區之 BMI 類別

Referred table 2. The classification of BMI in WHO and Taiwan.

類別 (Classification)	世界衛生組織 (WHO)	台灣地區 (Taiwan)
過輕 (underweight)	< 18.5	< 18.5
正常 (normal range)	18.5-25	18.5 - 23.9
過重 (overweight)	≥ 25.0	24.0 - 26.9
輕度肥胖 (obese class I)	30.0 - 34.9	27.0 - 29.9
中度肥胖 (obese class II)	35.0 - 39.9	30.0 - 34.9
重度肥胖 (obese class III)	≥ 40.0	≥ 35.0





附圖一、脂肪細胞增生型與肥大型所引發之肥胖症

Referred figure 1. Adipocyte hyperplasia and hypertrophy are responsible for the increase of adipose tissue mass associated with obesity.

## 2. 續發性肥胖 (Secondary obesity)

續發性肥胖意指內分泌失調或代謝症候群所引發的肥胖症，又稱為症狀性肥胖 (symptomatic obesity) 約佔肥胖患者的 10% (Inukai, 2013; Wabitsch, 2000)。

### (二) 肥胖之成因

造成肥胖的成因主要有先天性遺傳基因及後天生活型態失調兩種，後者主要是因生活型態改變造成熱量攝取及消耗失衡所致 (Arnou *et al.*, 1992)，導致國人肥胖的情形愈趨嚴重。肥胖之成因分述如下：

#### 1. 遺傳

目前人類的全基因圖譜中與肥胖相關的基因約有 127 種，其中有 18 種基因為肥胖研究之焦點 (Rankinen *et al.*, 2006)，且 13 個基因與亞洲人相關 (Rong *et al.*, 2006) (附表三)。

#### 2. 生活型態

##### (1) 運動量少

體重的增加與基礎代謝率有關，若身體沒有維持一定的熱量消耗就會導致脂肪的累積，有文獻建議每週要維持 225 到 300 分鐘的運動量才可預防肥胖 (Saris *et al.*, 2003)。因現代人工作較為忙碌，生活習慣趨向於靜態，活動量偏低而影響脂質代謝速率。據簡等人 (2013) 研究顯示國內的肥胖發生率與人民的教育程度呈負相關，其中體重過重前兩名之縣市為台東縣與雲林縣，大專以上教育程度之民眾比例較低，分別為 16.99 % 及 22.30 %；而體重過重比例較低之台北市與新北市，大專以上教育程度之民眾比例則高達 57.19 % 及 42.04 %。

附表三、亞洲人之肥胖相關基因

Referred table 3. Gene associated with Asian obesity.

One hundred forty-two selected single nucleotide polymorphisms (SNPs) of 32 human obesity candidate genes by chromosome location

Gene symbol	Gene ID	Location	Gene name	Flanking base pair	Exons	SNP surrogates <sup>1</sup>	SNPs associated with obesity <sup>2</sup>	Extra SNPs
<i>ADIPOQ</i>	9370	3q27	Adiponectin	158,000	—	1	9	—
<i>ADRA2A</i> <sup>3</sup>	150	10q24-q26	Adrenergic, $\alpha$ -2A-receptor	3065	1	—	1	1
<i>ADRB2</i>	154	5q31-q32	Adrenergic, $\beta$ -3-, receptor, surface	2011	1	—	5	—
<i>ADRB3</i>	155	8p12-p11.2	Adrenergic, $\beta$ -3-, receptor	3669	2	—	2	—
<i>CAPN10</i> <sup>3</sup>	11132	2q37.3	Calpain 10	30,971	4	2	—	—
<i>CPE</i> <sup>3</sup>	1363	4q32.3	Carboxypeptidase E	119,383	9	—	2	—
<i>CYP19A1</i> <sup>3</sup>	1588	15q21.1	Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	129,126	10	—	1	1
<i>DRD2</i> <sup>3</sup>	1813	11q23.2	Dopamine receptor D2	65,576	8	1	1	—
<i>ESR1</i> <sup>3</sup>	2099	6q25.1	Estrogen receptor 1	295,721	9	1	1	2
<i>FABP2</i> <sup>3</sup>	2169	4q28-q31	Fatty acid binding protein 2	4913	4	—	2	—
<i>FTO</i> <sup>3</sup>	79068	16q12	Fat mass and obesity associated	411,500	9	—	1	—
<i>GHRH</i> <sup>3</sup>	51738	3p26-p25	Ghrelin	5000	5	—	7	—
<i>GNB3</i> <sup>3</sup>	2784	12p13.31	Guanine nucleotide binding protein (G protein), $\beta$	7183	11	—	1	5
<i>HSD11B1</i>	3290	1q32.2	Hydroxysteroid 11- $\beta$ dehydrogenase 1	48,746	7	1	—	—
<i>IL6</i>	3569	7p15.3	Interleukin-6	4797	5	—	1	1
<i>INS</i>	3630	11p15.5	Insulin	1416	3	1	—	1
<i>LDLR</i>	3949	19p13.3	LDL receptor	44,359	18	3	—	1
<i>LEP</i>	3952	7q32.1-3	Leptin (obesity homolog, mouse)	16,351	3	5	10	—
<i>LEPR</i>	3953	1p31.3	Leptin receptor	214,793	20	3	4	—
<i>LIPE</i>	3991	19q13.2	Lipase, hormone-sensitive	25,913	10	1	1	1
<i>MC4R</i>	4160	18q21.32	Melanocortin 4 receptor	999	1	1	12	—
<i>NPY</i>	4852	7p15.1	Neuropeptide Y	7669	4	1	2	—
<i>NROB2</i>	8431	1p36.11	Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	2482	2	—	5	—
<i>NR3C1</i>	2908	5p31.3	Nuclear receptor subfamily 3	123,763	9	1	3	—
<i>POMC</i> <sup>3</sup>	5443	2p23.3	Pro-opiomelanocortin (adrenocorticotropin/ $\beta$ -lipotropin/ $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone/ $\beta$ -melanocyte stimulating)	7665	3	—	6	—
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	5468	3p25.2	Peroxisome proliferative activated	146,424	7	1	5	—
<i>PTPNI</i> <sup>3</sup>	5770	20q13.13	Protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 1	74,194	10	—	3	—
<i>RETN</i> <sup>3</sup>	56729	19p13.2	Resistin	13,000	4	—	5	—
<i>TNF</i>	7124	6p21.3	Tumor necrosis factor	2763	4	2	2	—
<i>UCP1</i>	7350	4q31.1	Uncoupling protein 1	8958	6	1	3	—
<i>UCP2</i>	7351	11q13.3	Uncoupling protein 2	8174	8	1	3	—
<i>UCP3</i>	7352	11q13.4	Uncoupling protein 3	8794	7	1	3	—
Total						28	100	13

<sup>1</sup> Defined as SNPs that are close to or are in linkage disequilibrium with non-SNP genetic markers significantly associated with obesity in previous studies.

<sup>2</sup> Defined as SNPs reported to be significantly associated with obesity in previous studies.

<sup>3</sup> Additional gene associated with Asian obesity.



(Rankinen *et al.*, 2006)

## (2) 睡眠不足

流行病學研究指出睡眠時間短、有睡眠障礙或是經常熬夜會因為晝夜顛倒導致代謝性疾病及第二型糖尿病的產生；此外，睡眠不足會影響神經內分泌系統失調而使食慾及對刺激性食物的喜好性增加，導致能量攝取過剩 (Schmid *et al.*, 2014)。

## (3) 飲食習慣

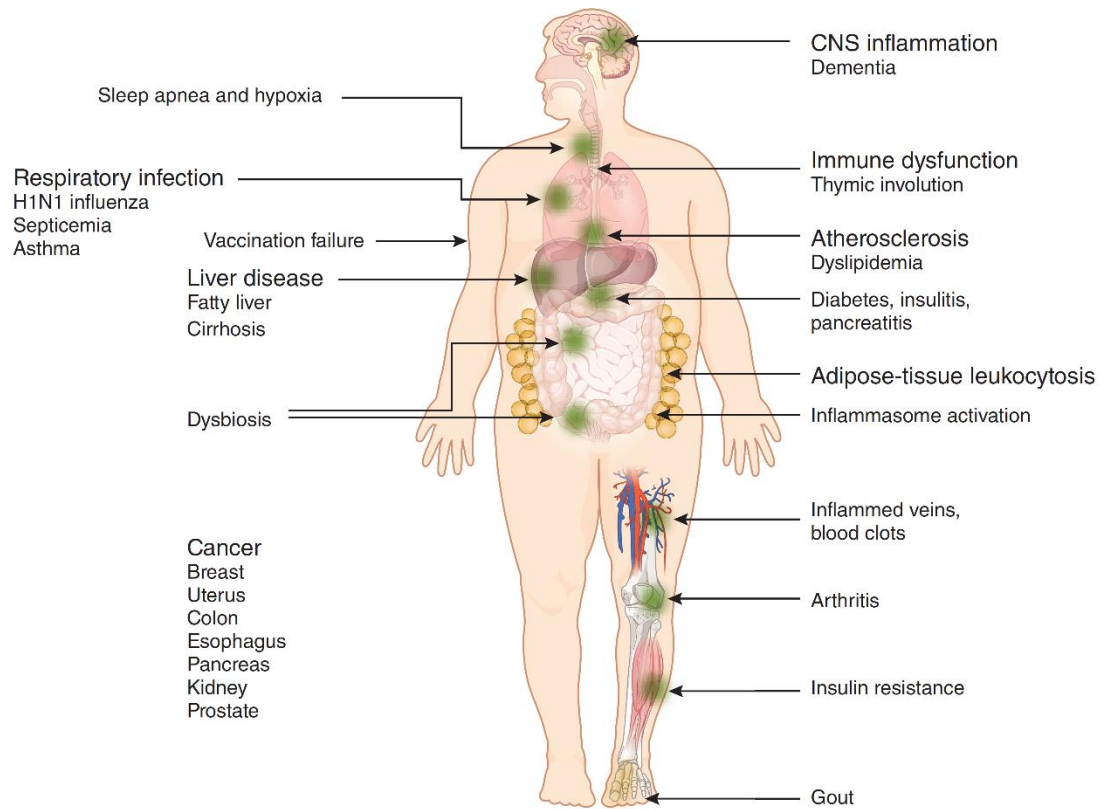
由於現代人除了三餐飲食外，會額外攝取零食、甜點或飲料等，以致攝取過多熱量導致肥胖的產生；且學齡兒童也因熱量攝取過多使得過重的比例增加，造成心血管疾病及第二型糖尿病等發病的年齡層逐漸下降 (Nicklas *et al.*, 2001)。

### (三) 肥胖所引發之疾病

肥胖會因為脂肪組織中的脂質堆積而使脂肪細胞呈現促發炎狀態，並透過發炎反應引發一連串疾病 (附圖二)。根據世界衛生組織統計，全球有 44% 糖尿病患者、7-41% 特定癌症患者 (如乳癌、子宮內膜癌及大腸癌) 及 23% 冠狀動脈心臟病患者是因過重及肥胖所引起 (WHO, 2009)；而衛生福利部於民國 102 年所公布的國人十大死因中，惡性腫瘤、心臟疾病、腦血管疾病、糖尿病、慢性下呼吸道疾病、高血壓性疾病、慢性肝病及肝硬化與腎炎、腎病症候群及腎病變等八項與肥胖具相關性。根據 Dixon (2010) 研究將肥胖引發相關併發症之相對風險整理如附表四所示，分述如下：

#### 1. 癌症 (Cancer)

臨床研究指出肥胖及過重會增加癌症的罹患率 (Calle *et al.*, 2003)，且根據 2012 年美國國家癌症研究所 (National cancer institute, NCI) 所公布的資料顯示肥胖與食道癌、胰臟癌、腎臟癌、結直腸癌、膽囊癌、停經後婦女乳癌與子宮內膜癌等特定癌症有相關。



(Kanneganti and Dixit, 2012)

附圖二、肥胖相關之併發症

Referred figure 2. Obesity-associated diseases linked to complications of the immune system. CNS, central nervous system.



附表四、肥胖引發相關併發症之相對發生風險

Referred table 4. The relative risk of some of the comorbidities, conditions and risks associated with obesity.

相對風險 > 5 倍	相對風險 2-5 倍	相對風險 1-2 倍
第二型糖尿病	高血壓	乳癌
血脂異常	心肌梗塞與中風	前列腺癌
阻塞型睡眠呼吸中止症	男：肝癌 女：子宮內膜癌	大腸癌
呼吸困難	膽囊癌	不孕症
嗜睡症	多囊性卵巢症候群	胎兒畸形
自發性顱內高血壓	關節炎（膝蓋）	氣喘
非酒精性脂肪肝	痛風	胃食道逆流

(Dixon, 2010)

## 2. 代謝症候群 (Metabolic syndrome)

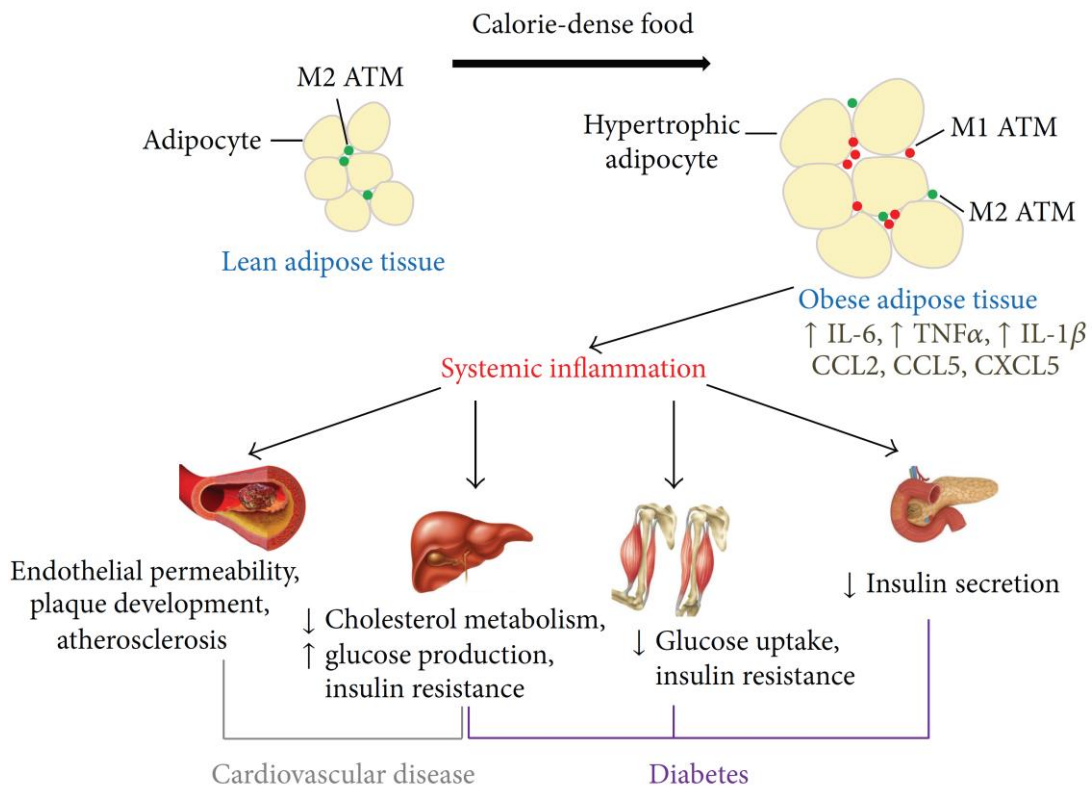
代謝症候群意指血脂異常 (dysglycemia)、高血壓 (hypertension)、高血糖 (hypertriglycemia)、高密度脂蛋白膽固醇 (HDL-c) 降低與肥胖等症狀之統稱 (Eckel *et al.*, 2005; Grundy, 2011)。衛福部國民健康署根據國內的健康狀況擬定代謝症候群的診斷標準，其標準為當同時具有下列三項或以上生理代謝異常則診斷為代謝症候群：

- (1) 中廣型肥胖：男性腰圍  $\geq 90$  cm、女性  $\geq 80$  cm
- (2) 血糖值偏高：空腹血糖值  $\geq 100$  mg/dL (服用降血糖藥物者同此標準)
- (3) 三酸甘油酯偏高：空腹三酸甘油酯  $\geq 150$  mg/dL
- (4) 高密度脂蛋白膽固醇偏低：男性  $< 40$  mg/dL、女性  $< 50$  mg/dL
- (5) 血壓偏高：收縮壓  $\geq 130$  mmHg、舒張壓  $\geq 85$  mmHg (服用降血壓藥物者同此標準)

## 3. 心血管疾病 (Cardiovascular disease, CVD) 及第二型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus)

心血管疾病是代謝症候群所引發的疾病之一，又稱循環系統疾病，包括心臟病、低血壓、高血壓、中風、心肌梗塞及動脈粥狀硬化等 (Van Gaal *et al.*, 2006)。研究指出矢狀腹圍，也就是從後背到介於骨盆頂端與肋骨底部間的上腹部之距離，與罹患心臟病風險有相關性，因為體內的脂肪會隨著年齡增長而逐漸堆積於腹部 (Iribarren *et al.*, 2006)。

另外，肥胖會使血液中之游離脂肪酸偏高，導致體內胰島素敏感性降低，令胰島素無法有效調控血糖，為引發第二型糖尿病之主因 (Eckel *et al.*, 2011)。研究顯示肥胖會誘導促發炎因子 IL-6、TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  與產生趨化因子 CCL2 (chemokine (C-C motif) ligand 2)、CCL5 及 CXCL5 (chemokine (C-X-C motif) ligand 5) 使脂肪組織產生促發炎現象，導致血管內皮受損、影響胰島素代謝路徑及降低胰島素分泌等，進而促使心血管疾病及糖尿病之產生 (附圖三) (Yao *et al.*, 2014)。



(Yao *et al.*, 2014)

附圖三、肥胖與糖尿病及心血管疾病之相關性

Referred figure 3. Obesity contributes to development of diabetes and cardiovascular disease. ATM-Adipose tissue macrophages

#### 4. 非酒精性脂肪肝 (non alcoholic fatty liver disease, NAFLD)

NAFLD 意指在無酒精攝取的情況下所產生之肝臟病變，多半是因肥胖所引起，包括肝臟脂肪病變 (hepatosteatosis)、非酒精性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、肝硬化 (hepatic cirrhosis) 及肝纖維化 (liver fibrosis) 等 (Lewis and Mohanty, 2010)。研究顯示 NAFLD 已為代謝症候群之顯著症狀之一，起因與胰島素阻抗有關 (Luthra *et al.*, 2007)。

#### 5. 高血壓 (Hypertension)

高血壓為肥胖患者常見併發症之一，起因被認為與內臟脂肪的增加、胰島素阻抗與瘦體素 (leptin) 及脂聯素 (adiponectin) 含量有關 (Kurukulasuriya *et al.*, 2011)。研究指出鈉的殘留會影響腎小管吸收，使腎臟的鹽與水調節紊亂進而產生高血壓的現象 (Kotsis *et al.*, 2010)。

#### 6. 呼吸系統疾病 (Respiratory Diseases)

由於腹部脂肪增加會造成其對橫膈膜產生壓力，導致肺部體積減少，進而影響呼吸系統，故肥胖為引起呼吸疾病原因之一 (Kopelman, 1992)。另研究指出肥胖與阻塞型睡眠呼吸中止 (obstructive sleep apnea, OSA) 及肥胖肺泡通氣不足症後群 (obesity-hypoventilation syndrome, OHS) 有關。此外，有研究指出肥胖會增加氣喘及支氣管敏感反應的發生率 (Murugan and Sharma, 2008)。

#### 7. 骨關節炎 (Osteoarthritis)

體重過重會使關節負重提高，增加骨關節炎發生率，而脂肪細胞所釋放之細胞激素會促使關節發炎 (Mundermann *et al.*, 2005)。研究指出與脂肪組織相關之細胞激素 leptin、adiponectin 及抵抗素 (resistin) 會引起骨關節退化及產生局部發炎現象 (Sowers and Karvonen-Gutierrez, 2010)。

## 二、 脂肪細胞

### (一) 前脂肪細胞介紹

研究指出間葉幹細胞 (mesenchymal stem cell) 及來自骨髓的基質細胞 (stromal cells) 等可被誘導成脂肪細胞 (Pittenger *et al.*, 1999; Taylor and Jones, 1979), 另在體外所培養之脂肪細胞與體內相比, 其分化的特徵與發育機制皆相似 (Green and Kehinde, 1979; Novikoff *et al.*, 1980; Vannier *et al.*, 1985), 因此可利用體外培養來模擬體內脂肪細胞的生長情況。

進行脂肪細胞分化體外試驗時, 最常使用的細胞株為自 Swiss 小鼠胚胎分離之 3T3-F442A 及 3T3-L1 (Green and Kehinde, 1976; Green and Meuth, 1974)。

### (二) 脂肪細胞功能

脂肪細胞會影響免疫反應、血管疾病及食慾 (Ahima and Flier, 2000; Gregoire, 2001; Havel, 2000), 其可組成脂肪組織。脂肪組織依據顏色的不同可分為以下兩種 (附表五) (Saely *et al.*, 2012):

#### 1. 白色脂肪組織 (White adipose tissue, WAT)

白色脂肪組織主要功能為儲存能量, 可將剩餘熱量轉換為三酸甘油脂 (TG), 以油滴的形式儲存於細胞中, 約佔脂肪細胞體積 90%, 分佈於腹部皮下、腎周邊、腹股溝、性腺與腹膜下 (姚, 2011)。

#### 2. 褐色脂肪組織 (Brown adipose tissue, BAT)

褐色脂肪組織主要功能為產生熱量及消耗能量, 可在寒冷環境中維持體溫 (Mattson, 2010), 主要分佈於肩胛間、脊椎周圍、腋下及會陰等 (姚, 2011)。

附表五、白色及褐色脂肪組織之特性

Referred table 5. Characteristics of white and brown fat.

	白色脂肪組織	褐色脂肪組織
功能	儲存能量	產生熱量
型態	體積較大之單一油滴 粒線體較少	油滴體積小但含量多 粒線體較少
主要作用蛋白	Leptin	UCP1 (uncoupling protein 1)
前驅物	Myf5-negative 前驅細胞	Myf5-negative 前驅細胞 (也有從其他譜系衍生的 Myf5-negative 褐色脂肪細胞)
與肥胖之關連性	含量多會增加與肥胖相關疾病的發生率	含量多會減少與肥胖相關疾病的發生率
對年齡之影響	隨著與體重相比較後之年齡增長而增加	隨著年齡增長而減少

(Saely *et al.*, 2012)

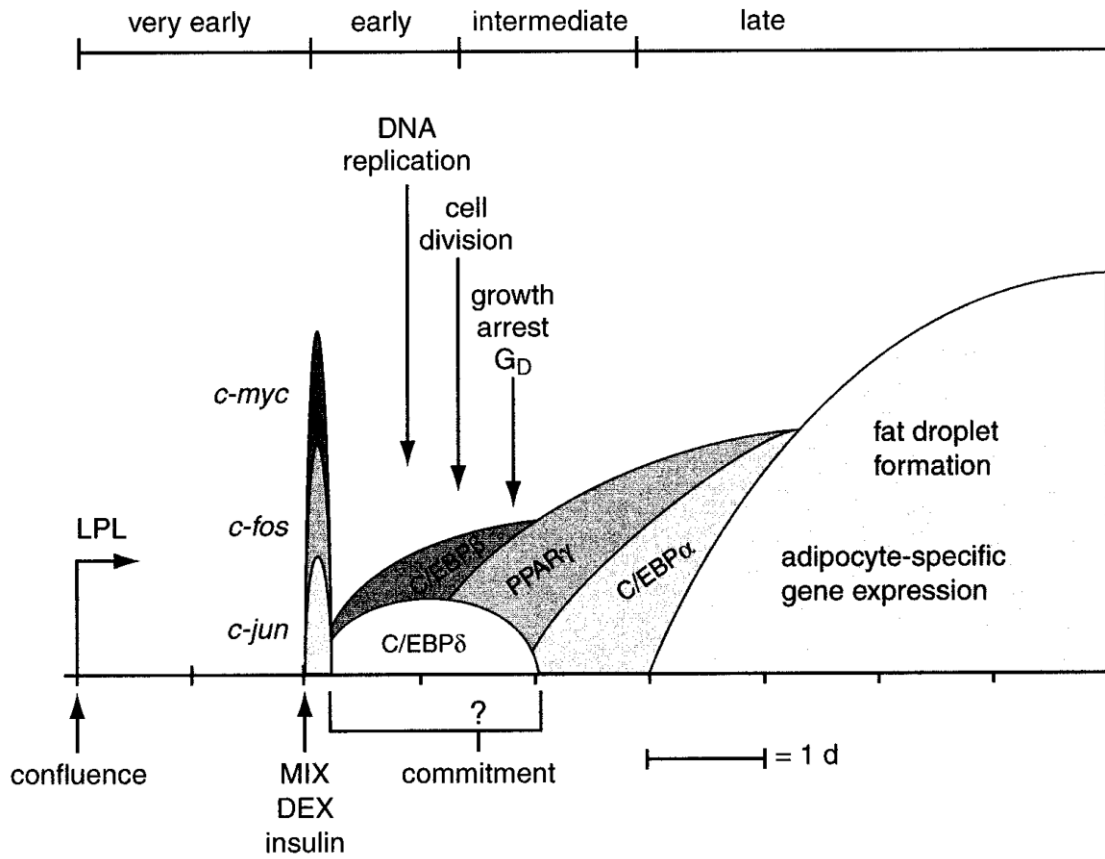
### (三) 前脂肪細胞分化過程

細胞分化 (cell differentiation) 為細胞受到轉錄因子的調控後轉化為不同型態及功能之過程。前脂肪細胞分化為成熟脂肪細胞時，需經過有絲分裂 (mitogenesis) 增加至長滿 (confluent) 階段，之後會達到接觸性抑制 (contact inhibition) 而停止增殖，即所謂生長停滯 (growth arrest)，此時可藉由添加激素誘導細胞進行分化；而分化過程中會受到前、中及後期相關轉錄因子的調控，而形態會由紡錘狀轉變為圓球狀並增加 TG 的累積，此過程稱為脂質生合成作用 (adipogenesis) (Gregoire *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999)。

3T3-L1 細胞株分化所使用之培養液包括 methylisobutylxanthine (MIX)、dexamethasone (DEX) 及 insulin 等藥劑，合稱 MDI。MIX 為環化腺苷酸磷酸二酯酶 (cAMP-phosphodiesterase) 的抑制劑，可抑制 cAMP 水解；DEX 為合成皮質素，可刺激糖皮質激素 (glucocorticoid) 之訊息傳遞路徑，活化與分化相關之基因表現，如 C/EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$ )；Insulin 可透過刺激類胰島素生長因子 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)，使細胞迅速累積 TG 以便快速轉換為成熟脂肪細胞 (Cornelius *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1988)。前脂肪細胞在受到 MDI 誘導後會再進行有絲分裂，讓 DNA 解旋並調控分化相關轉錄因子，正式進入分化階段 (Cornelius *et al.*, 1994)。

### (四) 脂肪細胞分化之主要調控因子

脂肪細胞生合成之過程中可分為前、中及後期三階段，隨著轉錄的過程使細胞轉為多功能狀態，其型態也因油滴的累積從紡錘狀轉為圓球狀，而這些變化皆由特定轉錄因子的表現所誘導，因此，脂肪細胞分化過程的關鍵在於特定基因的活化及表現 (Rosen *et al.*, 2000)。轉錄因子之間的相關性如附圖四所示，其特性說明如下：



(Ntambi and Kim, 2000)

附圖四、3T3-L1 脂肪細胞之分化過程

Referred figure 4. Progression of 3T3-L1 preadipocyte differentiation.



1. 過氧化體增生劑活化受體 (Peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)

PPAR為核荷爾蒙接受器 (nuclear hormone receptor) 系列家族，需經由另一核荷爾蒙接受器視黃醇 X 受體 (retinoid X receptor, RXR) 結合為異型二聚體 (heterodimers) 後才具調節轉錄之活性 (Brey *et al.*, 2009)。其家族包括 PPAR $\alpha$ 、 $\gamma$ 及  $\beta/\delta$ ，各分佈於不同組織並具有不同功能，主要作用於脂質代謝調節與脂質堆積。PPAR $\alpha$  主要表現於肝臟、腎臟與腸道中，可調控 $\beta$ 氧化代謝 ( $\beta$ -oxidation pathway)，產生之能量可提供周邊組織使用 (Kersten *et al.*, 1999)。PPAR $\gamma$  在脂肪組織中具高度表現量，被認為是脂肪細胞生合成之主要調控因子 (Rosen *et al.*, 2002)，在PPAR家族中唯一對脂肪組織具有專一性 (Berger and Moller, 2002)，可促進脂質生合成下游基因之表現，如FABP (fatty-acid binding protein) 及LPL (lipoprotein lipase) 等，促使脂肪酸轉變為 TG 並儲存於細胞中 (Guan *et al.*, 2002)。

2. CCAAT 增強子結合蛋白 (CCAAT/enhancer-binding protein, C/EBP)

C/EBP 家族包括 C/EBP $\alpha$ 、 $\beta$ 及 $\delta$ ，屬於鹼性白胺酸拉鏈 (basic leucine zipper) 家族，與脂肪細胞生合成具高度相關 (Farmer, 2006; Lane *et al.*, 1999)。C/EBP $\beta$  及  $\delta$  為分化前期之調控基因，會受到分化液中 DEX 與 MIX 的刺激而活化，進而促使脂肪細胞分化 (Cao *et al.*, 1991)，活化後會刺激分化中期指標基因 C/EBP $\alpha$  與 PPAR $\gamma$  之活性，進一步促進分化 (Tang *et al.*, 2003)。同時，C/EBP $\alpha$  具分化後期基因 aP2 (adipocyte protein 2) 與 GLUT4 (Glucose transporter type 4) 之結合位，亦可促進分化 (Gregoire *et al.*, 1998)。

3. 膽固醇調整元素結合蛋白 (Sterol regulatory element-binding protein-1, SREBP-1)

SREBP-1 又稱 ADD-1 (adipocyte determination and differentiation factor 1)，為 bHLH-LZ (basic helix-loop-helix leucine zipper) 家族之轉錄因子，

其中包括 SREBP-1a、SREBP-1c 及 SREBP-2 等三種，為膽固醇代謝關鍵基因之一 (Yokoyama *et al.*, 1993)，主要表現於褐色脂肪組織中 (Tontonoz *et al.*, 1993)。研究指出 SREBP-1c 為 PPAR $\gamma$  之內源性配體，可活化 PPAR $\gamma$  促進脂肪細胞分化，因此，兩者共同作用可促進脂質生合成作用 (Fajas *et al.*, 1999)。

#### 4. Krüppel 樣轉錄因子 (Krüppel-like transcription factors, KLF)

KLF 為鋅指樣轉錄因子 (Zinc finger like transcription factors) 家族，目前已有 17 種在哺乳動物中被發現，其中 KLF4、KLF5、KLF9 及 KLF15 可誘導 3T3-L1 細胞分化。KLF4 及 KLF5 mRNA 表現量在脂肪細胞生合成前期會增加，其表現量最高點分別在加入分化液兩及六小時後 (Birsoy *et al.*, 2008; Oishi *et al.*, 2005)。KLF9 及 KLF15 之 mRNA 表現量則於二到四天後開始表現，而最高點在六到八天 (Mori *et al.*, 2005; Pei *et al.*, 2011)。研究顯示 KLF5 及 KLF9 會結合 PPAR $\gamma$  啟動子，配合 C/EBPs 誘導其活化 (Oishi, *et al.*, 2005)，不過 KLF 對 PPAR $\gamma$  之完整調控機制還有待研究。

#### 5. 脂肪細胞脂肪酸結合蛋白 (adipocyte protein 2, aP2) 與葡萄糖轉運蛋白 (glucose transporter type 4, GLUT4)

aP2 為脂肪酸結合蛋白 (fatty acid binding protein, FABP) 家族成員之一，研究顯示 aP2 在前脂肪細胞中會受到 PPAR $\gamma$ 、脂肪酸及胰島素調控而表現，可調節細胞中之脂質代謝 (Maeda, 2007; Soukas *et al.*, 2001; Tchoukalova *et al.*, 2004)。

GLUT4 主要作用於肌肉及脂肪組織，在胰島素的刺激下從細胞質轉移至細胞膜上，促進血液中葡萄糖進入細胞質內，且可將脂質轉化為葡萄糖以供利用 (Bryant *et al.*, 2002; Klip *et al.*, 2014)。另有研究顯示 GLUT4 會受到 PPAR $\gamma$  及 C/EBP $\alpha$  的調控，主要在脂肪細胞分化後期表現並會參與脂質生合成作用 (Gregoire *et al.*, 1998)。

### 三、 北蟲草

#### (一) 北蟲草簡介

北蟲草 (*Cordyceps militaris*) 別名北冬蟲夏草或蛹蟲草，其分類屬子囊菌門 (Ascomycota)、子囊菌亞門 (Ascomycotina)、核菌綱 (Pyrenomycetes)、肉座菌目 (Hypocreales)、蟲草科 (Cordycipitaceae)、蟲草屬 (*Cordyceps*) 真菌。北蟲草是重要的傳統中藥材，在東亞常被用來做為天然藥用材料及民間滋補食品 (Ying *et al.*, 1987)，其具多種生理活性成分，如蟲草素、多醣類、麥角固醇與甘露糖醇等，目前已被用來做為開發保健食品與藥品之來源 (Gu *et al.*, 2007; Ng and Wang, 2005)。

#### (二) 北蟲草的自然分佈

北蟲草分佈於寒、溫、熱及亞熱帶地區 (曾等人, 2011)。主要集中在東亞國家如中國、日本及韓國 (Cui, 2014)；在中國主要分佈於雲南、河北、黑龍江、吉林、安徽及陝西等地 (李等人, 2007)。

#### (三) 北蟲草之機能性成分

目前研究指出北蟲草可分離出蟲草素、腺苷 (Huang *et al.*, 2004)、麥角固醇 (Li *et al.*, 2004)、甘露糖醇 (Liu *et al.*, 1989) 及多醣體 (Yu *et al.*, 2007) 等，其各別機能性成分所具有之生理機能整理如附表六 (Cui, 2014) 並分述如下：

##### 1. 腺苷 (Adenosine)

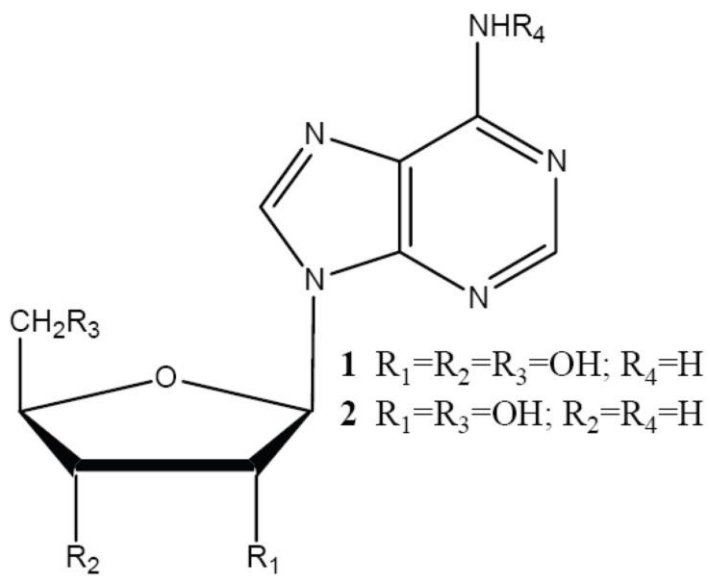
腺苷是核苷的一種，由核糖及腺嘌呤經 $\beta$ -N<sub>9</sub>-糖苷鍵鍵結而成 (附圖 5-1)，在能量轉移中扮演重要角色 (Sato *et al.*, 2005)，也是中樞神經系統及體內平衡之調節劑，具調節腦部缺血之損傷 (Gomes *et al.*, 2011)、調控血管擴張與刺激末梢神經 (Tabrizchi and Bedi, 2001)、預防癲癇發作

附表六、北蟲草主要之機能性成分與其生理活性

Referred table 6. The mainly bioactive constituents of *C. militaris* and its applications.

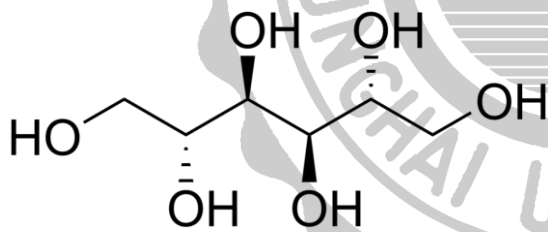
Bioactive constituents	Biological activity	References
Adenosine derivatives	Anticonvulsant, amnesic and anxiolytic	Regina et al. (2003)
	Antidepressant	Carlezon et al. (2005)
	Immunomodulatory	Ribeizo (1995)
	Regulator of blood vessel tone	Tabrizchi & Bedi (2001)
	Sleep-wake regulation	Basheer et al. (2004)
	Treat chronic heart failure	Kitakaze & Hori (2000)
Cordycepin	Antibacterial	Ahn et al. (2000)
	Anti-inflammatory	Kim et al. (2006) ; Jeong et al. (2010)
	Antitumor	Baik et al. (2012)
	Hypolipidemic	Guo et al. (2010)
	Inhibit platelet aggregation	Cho et al. (2007)
	Insecticidal activities	Kim et al. (2002)
Mannitol	Diuretic, anti-tussive and anti-free radical activities	Li et al. (2006)
Polysaccharide	Anti-aging activities	Li et al. (2010)
	Antioxidant	Lin et al. (2012)
	Antitumor	Kim et al. (2010)
	Antiviral	Ohta et al. (2007)
	Immunomodulatory	Lee et al. (2011)

(Cui, 2014)



(Xiao *et al.*, 2013)

(1) Adenosine (2) Cordycepin



(3) Mannitol

附圖五、北蟲草主要機能性成分之結構圖

Referred figure 5. Chemical structures of bioactive constituents in *C. militaris*.

(Regina Vinadé *et al.*, 2003)、免疫調節 (Ribeiro, 1995)、治療心臟衰竭 (Kitakaze and Hori, 2000)、調整睡眠 (Basheer *et al.*, 2004)及抗憂鬱 (Carlezon *et al.*, 2005)等功效。

## 2. 蟲草素 (Cordycepin)

蟲草素自1950年從北蟲草寄生之昆蟲中分離得之，結構式為3'-去氧腺苷 (3'-deoxyadenosine, C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>) (附圖5-2)，為核苷類似物，在結構上類似於腺苷 (Cunningham *et al.*, 1950)。近年來研究指出蟲草素具有許多生理活性如抗菌 (Ahn *et al.*, 2000)、殺蟲 (Kim *et al.*, 2002)、抗發炎 (Jeong *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2006)、抑制血小板凝集 (Cho *et al.*, 2007)、降血脂 (Guo *et al.*, 2010)、抑制腫瘤細胞生長 (Baik *et al.*, 2012)及改善酒精性肝毒性 (Cha *et al.*, 2013)等。

## 3. 甘露糖醇 (Mannitol)

甘露糖醇又稱蟲草酸 (cordycepic acid)，為多元醇 (附圖5-3)，因其可治療顱內壓上升及腎臟相關疾病與改善橫紋肌溶解症等功效，故廣泛利用於食品及製藥廠 (Shawkat *et al.*, 2012)，另有研究指出其具利尿、止咳及抗自由基活性之功效 (Li *et al.*, 2006)。

## 4. 多醣 (Polysaccharide)

北蟲草多醣的主要結構為β-1,4-支鏈-β-1,6-葡萄糖半乳糖甘露聚醣 (β-1,4- branched-β-1,6-galactoglucomannan) (Lee *et al.*, 2010)。具抗老化與抗氧化 (Li *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012)、抗腫瘤 (Kim *et al.*, 2010; Lee and Hong, 2011)、抗病毒 (Ohta *et al.*, 2007)及增強免疫 (Wang *et al.*, 2012)等功效。

#### (四) 北蟲草之生理活性

北蟲草具有許多生理活性，Das 等人 (2010) 將其整理如附表七，另將其重要之生理活性分述如下：

##### 1. 抗發炎作用

將北蟲草接種在發芽大豆上，其熱水萃取物在經由葡聚糖硫酸鈉 (dextran sodium sulfate, DSS) 誘導之急性結腸炎中可藉由調控下游基因 iNOS 及 TNF- $\alpha$  mRNA 表現量達到抗發炎之效果 (Han *et al.*, 2011)。另外，研究指出將北蟲草接種在皺紋盤鮑 (*Haliotis discus hannai*)，培養後之北蟲草菌絲體，經萃取所得之萃取物 (HFCM-5) 可降低促發炎因子 TNF- $\alpha$  及 IL-6 表現，另可減少 Interferon regulatory factor 3 (IRF3) 及 Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) 磷酸化 (Joung *et al.*, 2014)。

##### 2. 抑制腫瘤細胞生長作用

研究指出北蟲草之多醣可抑制 HeLa 與 HepG2 細胞生長 (Yang *et al.*, 2014)；此外，可藉由減少細胞因子 Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10)、Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) 與趨化激素 (eotaxin) 的活性，而達到抑制腫瘤細胞生長之作用 (Sun *et al.*, 2014)。另有研究顯示北蟲草接種於發芽大豆上，其丁醇萃取物可做為結腸癌細胞之抗增殖劑 (Mollah *et al.*, 2012)。

##### 3. 保肝作用

研究顯示北蟲草之蟲草素或干擾素  $\alpha$  (interferon- $\alpha$ ) 與瑞比達 (ribavirin) 藥物合併使用，可抑制 C 型肝炎病毒 (hepatitis C virus)，進而預防肝硬化及肝癌的發生率 (Ueda *et al.*, 2014)。另有研究指出北蟲草子實體水萃物具預防非酒精性脂肪肝之功效，其可降低肝臟中三酸甘油酯與血清中胺基丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT) 之含量，並改善肝臟之氧化壓力及降低血清中促發炎因子的表現 (Choi *et al.*, 2014)。

附表七、北蟲草之生理活性

Referred table 7. Biological activities of *Cordyceps militaris*.

Biological activity	References	Biological activity	References
Pro-sexual	Yu et al. Lin et al.	Insecticidal	Mao and Zhong Kim et al.
Anti-inflammatory	Yu et al. Won and park	Larvicidal	Kim et al.
Anti-oxidant/ anti-aging	Yu et al. Chen et al.	Anti-fibrotic	Nan et al.
Anti-tumour/anti-cancer/ anti-leukemic	Liu et al. John and Adamson Muller et al. Kodama et al. Penman et al.	Steroidogemic	Shih et al.
		Hypoglacaemic	Choi et al.
		Hypolipidaemic	Yu et al.
		Anti-angiogenic	Shen and Chen
Anti-proliferative	Liu et al.	Anti-diabetic	Yoo et al.
Anti-metastatic	Liu et al. Shih et al.	Anti-HIV	Choi et al.
Immunomodulatory	Lin and Chiang Sone et al. Mao and Zhong Shih et al.	Anti-malarial	Mueller et al.
		Anti-fatigue	Sugar and McCaffrey
		Neuroprotective	Jung et al.
		Liver-protective	Mizuno
Anti-microbial	Park		Ribeizo
Anti-bacterial	Ahn et al.		Gu et al.
Anti-viral	Lin and Chiang Ortiz et al. Mueller et al. Mao and Zhong		Jung et al.
		Reno-protective	Yu et al.
Anti-fungal	Mao and Zhong Shih et al.		Won and Park
Anti-protozoal	Trigg et al.		Yu et al.
		Pneumo-protective	Yu et al.

(Das *et al.*, 2010)



#### 4. 降血糖

北蟲草菌絲體乙醇萃取物可促進葡萄糖代謝與抑制血清中總膽固醇 (TC) 與 TG 的濃度而達到降血糖的作用，並藉由尿素氮、肌酸酐及尿酸的抑制反應推測其對糖尿病引發之腎病變具有保護效果 (Dong *et al.*, 2014)。另有研究指出 Wistar 大鼠以 10 mg/kg 劑量之北蟲草子實體水萃物餵食，可降低其血糖量並增加胰島素之分泌量與 Insulin receptor substrate 1 (IRS-1) 及 GLUT-4 之表現量，但若使用 atropine 或 hemicholinium-3 等副交感神經阻斷劑藥物後，降低血糖的效果會消失，故推測其作用與膽鹼性神經元有關 (Cheng *et al.*, 2012)。

#### 5. 調節免疫作用

研究顯示北蟲草之蟲草素可抑制刀豆蛋白 (Concanavalin A, ConA) 誘導的脾細胞增值及 Th1、Th2 路徑之細胞激素產生，推測蟲草素具調控免疫系統下游機制的作用 (Xiong *et al.*, 2013)。另有研究顯示北蟲草凍乾粉末在增加脾臟及胸腺指數、脾淋巴細胞活性、巨噬細胞功能及促進體內外 IL-2、Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) 之含量顯示其具調節免疫力之功效 (Zhu *et al.*, 2013)；亦有文獻指出在樹突細胞中加入北蟲草水萃物後，可提高 I、II 類主要組織相容性複合體 (major histocompatibility complex, MHC) 之表現量，但並不影響外源性卵白蛋白 (Ovalbumin) 的吞噬活性 (Shin *et al.*, 2010)。

#### 6. 抗過敏作用

將北蟲草接種於發芽大豆上培養後，其乙醇萃取物可降低嗜鹼性白血球細胞 RBL-2H3 受抗體刺激後 IL-4 及 TNF- $\alpha$  之表現量，並抑制磷酸化 Syk、ERK、p38 及 JNK 的表現量 (Oh *et al.*, 2011)，且萃取出之異黃酮甲基配醣體 (isoflavone methyl-glycosides) 可降低 IL-4 及 TNF- $\alpha$  之表現量，亦可抑制 AKT 與 ERK1/2 蛋白之表現量 (Park *et al.*, 2012)。

## 7. 抗氧化作用

文獻指出從北蟲草子實體萃取出之多醣具清除DPPH、羥基自由基及超氧陰離子自由基的能力 (Chen et al., 2013)，且北蟲草子實體之甲醇萃取物具有抑制脂質過氧化、增加還原能力及清除自由基之效果 (Reis et al., 2013)；亦有文獻指出子實體具抑制粒線體損傷、清除超氧陰離子及增加肝臟中Commercial catalase (CAT)、Superoxide dismutase (SOD)、Glutathione peroxidase (GPx) 與抗羥基自由基活性之作用 (Li et al., 2010)。

## 8. 不易形成體脂肪之作用

研究證實北蟲草中的蟲草素、烏苷及色胺酸在濃度為 10 µg/mL 下可減少 3T3-L1 中油滴的累積 (Liu et al., 2011)；32 µM 蟲草素及腺苷可以抑制 TG 的形成與 PPAR-γ、CEBP-α 及抗 leptin 的抑制作用，因蟲草素和腺苷合併使用抑制效果更佳，推測北蟲草是利用腺苷代謝干擾阻斷脂肪細胞中 TG 的形成 (Shin et al., 2014)，且蟲草素可抑制脂質的累積及脂肪細胞生成相關基因 C/EBP-β 及 PPAR-γ 之表現量，並藉由抑制 Akt 及活化 AMP kinase，推測蟲草素是經由抑制脂質生成上游基因達到抑制分化的效果 (Takahashi et al., 2012)。另有研究指出北蟲草菌絲體水萃物可以抑制與脂肪細胞 3T3-L1 分化相關基因 PPAR-γ 及 CEBP-α、脂鏈素 adiponectin 及前脂肪細胞標的物 MCP-1 之表現量，並減少分化後 3T3-L1 油滴的累積，推測其機制可能為藉由活化 Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 達到抑制 3T3-L1 分化之效果 (Shimada et al., 2008)。

此外，餵食高血脂症倉鼠及大鼠蟲草素 12.5、25 及 50 mg/kg BW 後可降低 TC、TG、LDL-C 與極低密度脂蛋白 (VLDL-C) 的含量，顯示蟲草素具降血脂的作用 (Gao et al., 2011)；且將北蟲草接種於米糠上，再利用 50% 酒精萃取物進行體內試驗餵食 C57BL/6J 小鼠，結果顯示餵食樣品後可降低其體重、脂肪細胞大小及血清參數 TG、TC 與低密度脂蛋白 (LDL-C) 等之含量，且純化後所得之 12 種化合物具抑制胰脂肪酶活性與脂肪細胞分化之效果 (Kim et al., 2014)。

#### 四、 紫米

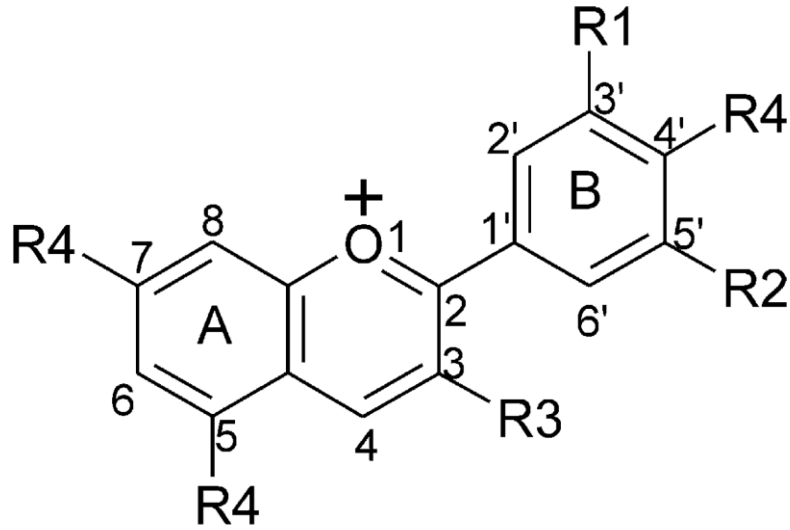
##### (一) 紫米簡介

紫米 (*Oryza sativa* L.) 又稱黑米及黑糯米等，為禾本科植物，因其種皮含花青素而呈紫黑色，紫米具許多機能性成分如多酚類、黃酮類及植酸 (phytic acid) 等 (Fardet *et al.*, 2008)。據『本草綱目』中記載紫米有補中益氣、治消渴、暖脾胃、上虛寒泄痢、發痘疱等功效，而『新修本草』記載黑米具滋陰補腎，健養肝及明目活血等功效，且現今也有研究顯示紫米具抗氧化 (Ling *et al.*, 2002)、抗癌 (Chen *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2013)、抗發炎 (Min *et al.*, 2010)、降血脂及血糖 (Jang *et al.*, 2012) 等功效。

##### (二) 花青素 (Anthocyanins)

花青素又稱花色素，為類黃酮 (flavonoids) 之一種，屬多酚類 (polyphenolics)，結構如附圖六所示。花青素為水溶性植物色素，顏色會因酵素與 pH 值的不同而改變，為植物之二次代謝物，也是天然的抗氧化劑 (Kong *et al.*, 2003)。花青素的呈色來自於結構中羥基的多寡、甲基化之程度及糖基之數目、種類及連接位置的不同，其中最主要之花青素有矢車菊素 (cyanidin)、芍藥素 (peonidin)、飛燕草素 (delphinidin)、矮牽牛素 (petunidin)、錦葵素 (malvidin) 及天竺葵素 (pelargonidin) 等六種 (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Stintzing and Carle, 2004)。

現今研究指出花青素具許多生理活性，包括治療癌症之效果 (Kocic *et al.*, 2011; Nichenametla *et al.*, 2006)、抗發炎 (Huang *et al.*, 2014)、心血管疾病 (Wallace, 2011)、治療非酒精性脂肪肝 (Valenti *et al.*, 2013)、抗菌 (Cisowska *et al.*, 2011)、清除自由基 (Jhin and Hwang, 2014)、抑制脂質代謝 (Belkebir and Benhassaine-Kesri, 2013) 及改善胰島素阻抗、高血糖與血脂症 (Jayaprakasam *et al.*, 2006; Tsuda *et al.*, 2003) 等。



(Kong *et al.*, 2003)

附圖六、花青素之基本架構

Referred figure 6. The basic chemical structure of anthocyanin. R1 and R2 are H, OH, or OCH<sub>3</sub>; R3 is a glycosyl or H; and R4 is OH or a glycosyl.

### (三) 紫米之生理活性

紫米因內含花青素等機能性成分而具許多生理活性，可促進人體健康。其具有之生理活性分述如下：

#### 1. 預防視網膜損傷

研究指出紫米花青素可預防視網膜因光害之損傷，亦可抑制螢光誘導之視網膜細胞凋亡 (Jia *et al.*, 2013)。

#### 2. 抑制癌細胞增生

紫米花青素可抑制人類舌癌細胞 SCC-4、肝癌細胞 Huh-7 及 HeLa 等癌細胞之增生 (Chen *et al.*, 2006)，另有研究指出紫米皮萃取物可抑制人類前列腺癌細胞 PC-3 之增生及誘導該細胞凋亡 (Jiang *et al.*, 2013)。

#### 3. 抑制脂質過氧化

研究指出由紫米糠所萃取出之生育醇與水溶性花青素可抑制脂肪酸氧化 (Zhang *et al.*, 2013)。

#### 4. 抗發炎

紫米中之花青素 (cyanidin-3-*O*- $\beta$ -D-glycoside, C3G) 可透過調節 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 之表現量達到抗發炎作用 (Min *et al.*, 2010)。

#### 5. 不易形成體脂肪之作用

研究指出紫米中之花青素 C3G 可調控肝臟中之脂質合成酵素改善高脂血症 (Um *et al.*, 2013); 亦可抑制高脂飲食誘導大鼠之高血脂症及改善血小板機能異常作用 (Yang *et al.*, 2011)。此外，紫米可降低膽固醇、LDL 及 TG 含量，進而抑制大鼠之高膽固醇血症 (Salgado *et al.*, 2010)，且紫米之乙醇萃取物可調控脂肪酸代謝之相關基因，進而降低高血脂及高血糖症之風險 (Jang *et al.*, 2012)。

## 五、 固態發酵

### (一) 固態發酵定義

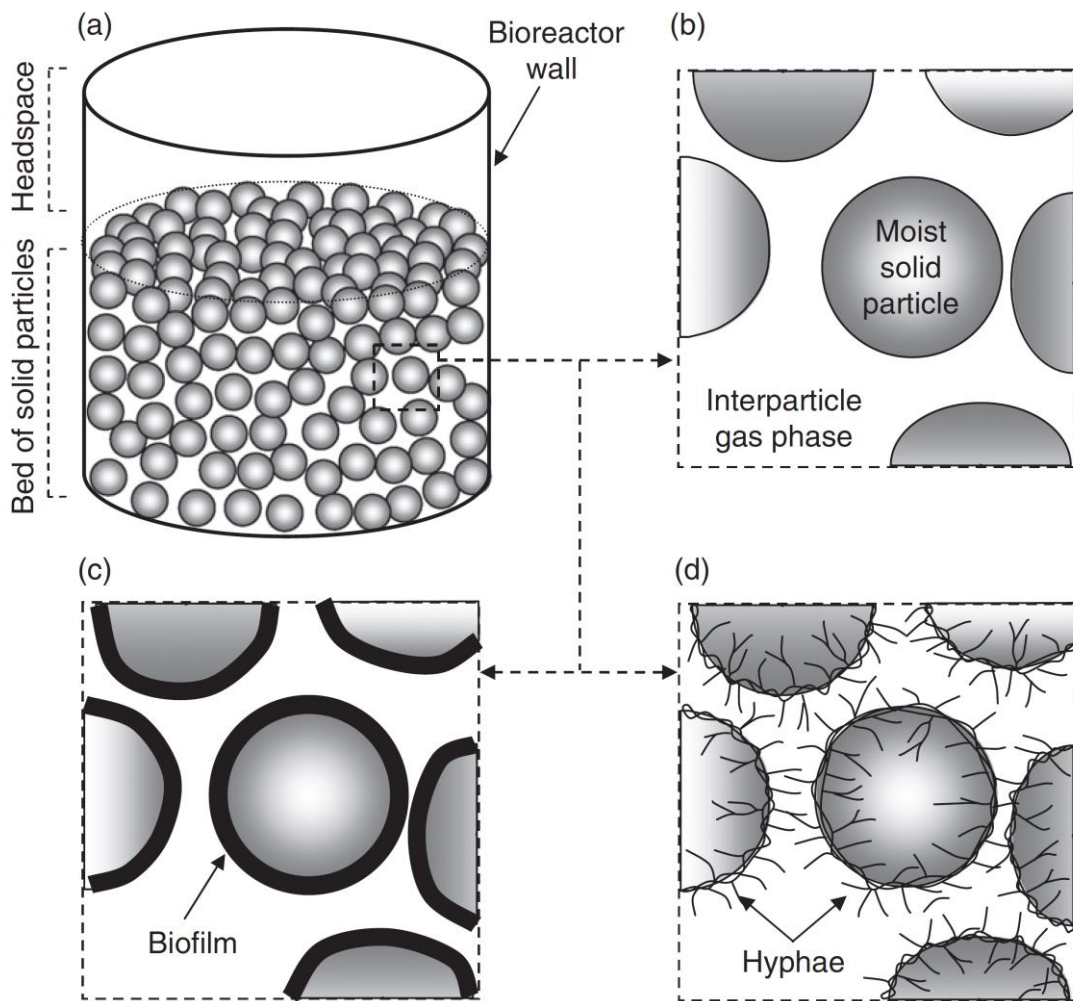
固態發酵意指微生物生長於沒有流動液體的固體基質，加入適當的水分或營養源，利用微生物進行發酵生產各種有用物質或發酵品的過程。固體基質，可使不斷增長的微生物附著之，而固體顆粒間之空隙有利於空氣進入，如附圖七 (Mitchell *et al.*, 2011)。

### (二) 固態發酵之特點

固態發酵最大的特點為可在低水活性下進行培養，綜合多位學者研究 (Durand, 2003; Holker *et al.*, 2004; Nigam and Pandey, 2009; Pandey, 2003; Sato and Sudo, 1999)，其優點分述如下：

1. 不易汙染：由於固態培養水分含量少，故微生物會因低水活性而不易生長，進而減少汙染。
2. 發酵槽及設備緊密度高：因固態發酵含水量低，故其填充容積較液態深層發酵高。
3. 成本少：從固態發酵中萃取所需之產物只需少量溶劑及成本。
4. 通氣佳：因曝氣過程（使大氣壓中之氧氣在基質內可有效利用）較簡單，所以增加氧進到固態發酵中的速率，使微生物可快速利用氧氣，降低了通氣的能量成本。
5. 廢物利用：利用農業廢棄物作為原料，可增加這些廢棄物的經濟價值，解決農業廢棄物的處理問題，降低環境汙染。

雖然固態發酵具有多項優點，但仍有多位學者指出 (Pandey, 2003; Sato and Sudo, 1999; 廖, 2003) 尚有缺點待克服，其缺點分述如下：



(Mitchell *et al.*, 2011)

附圖七、固態發酵系統之示意圖

Referred figure 7. The phases within a solid-state fermentation system.

1. 攪拌不易均勻：因基質內的微生物、養分、溫度及水含量容易分佈不均，造成基質床生理、物理、化學環境的異質性且不易控制其生長。
2. 控溫困難：由於基質的熱傳導系數低且因微生物呼吸或代謝所產生的熱能使得溫度不易控制，強制通氣是控制培養溫度的唯一方法。
3. 生物質含量不易測量：因基質與菌絲不易分離，目前尚無方便的感測器可供研究者直接測量菌體含量或其他之發酵參數。
4. 培養菌種受限：由於基質水含量低，所以微生物的生長會受限制，其中黴菌或真菌菌絲最適合，細菌則不適合生長。
5. 不易自動化：通常在固態發酵中微生物生長與產物生成之控制中溫度是唯一方法，因此沒有彈性的方法可用來分析微生物的發酵狀況，導致在執行連續操作與自動化上有困難。
6. 影響變數大：由於影響固態發酵高產率的因子還是未知數，所以其培養策略完全是靠經驗與實驗結果。

### (三) 固態發酵生物量之測量方法

生物量 (Biomass) 意指微生物之生長狀況，固態發酵的最終產物可分為生物量和代謝產物兩類，而生物量之測量為判定微生物生長狀況最直接的方法，且代謝產物之產量與生物量通常有一定比例的關係。然而，在固態發酵中微生物與基質經常不易分離，尤其有些微生物之菌絲會生長於固態基質表面甚至穿透至基質內部，很難直接測定其生物量。因此，路等人 (2000) 將固態發酵中生物量的測定方法分為三大類，分述如下：

1. 將菌體與固態基質直接分離

#### (1) 去除基質法

利用模擬固態發酵的模式，將酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 培養至半固態培養基 (semisolid media) 中，將其加熱至培養基融化後後



再利用離心即可將基質分離並獲得酵母菌，製成菌體懸浮液後再利用分光光度計測量其吸光值推算出細胞濃度，便可得知菌體之濃度(Wei *et al.*, 1981)。

## (2) 直接計數法

將培養完後之酵母菌菌絲與固態基質分離後，利用血球板計數器或平板計數法推算其菌絲菌數，再經由菌絲之直徑與密度去推算其菌絲量。不過，此方法因真菌會在固態基質表面形成密集之菌絲體甚至會滲入至基質內部生長，導致真菌與基質難以分離，且此方法需要大量的實驗以得到較為精確的數據，故測量困難 (Matcham *et al.*, 1984)。

## 2. 藉由檢測真菌代謝量推算其生物量

### (1) 氧氣和二氧化碳的代謝

因微生物生長時會利用呼吸作用消耗氧氣並釋放出二氧化碳來產生能量，所以可利用其消耗量及排放量來推算出微生物的生長狀況。且微生物會將基質中之碳水化合物經代謝後轉為菌絲體及二氧化碳，而在生長過程中因釋放出二氧化碳導致基質重量的減少，其可作為另一種推算菌絲體生長之方法。不過，必須確保其減少的重量為二氧化碳而不是水，如此才可準確推算出結果 (Okazaki *et al.*, 1980)。

### (2) 胞外酶的產生

胞外酶的產生是另一種與微生物生長相關之代謝活動，研究指出洋菇 (*Agaricus bisporus*) 經固態發酵培養過後所產生之胞外漆酶 (laccase) 活性在 70 天內與菌絲體產量呈正比，且不會受到培養溫度及培養基之不同而影響，故可作為推算菌絲體之方法 (Wood, 1979)。

### (3) 其他與代謝活動相關的產物

Matcham 等人 (1984) 研究發現可利用 ATP (Adenosine triphosphate) 含量來推算出微生物在固態發酵的生長情形，不過只可作為粗略估計菌體量，因菌體分佈不均，有些可能正在對數生長期，而其他已經進入穩定期，所以不易測量。另一種間接檢測代謝活性之方法為利用螢光素雙醋酸鹽染色，此種特殊螢光物質只有在被酶分解才會發光，由此可鑑別出代謝活躍區。

## 3. 利用生物體中之特殊物質含量推算其生物量

固態發酵過程中，若特定成分含量會產生變化或已知其在各生長期間之變化，且測量時不受基質之干擾，便可利用該成分與生物量的線性關係，去推算出細胞生物量。

### (1) 蛋白質與氮

蛋白質為生物體組成中最容易測得之成分之一，研究指出微生物中之蛋白質含量與其生長速率有一定比例的關係，因此，可藉由蛋白質含量推算出微生物之生長狀況 (Carrizalez *et al.*, 1981)。不過若基質本身含有大量蛋白質，微生物生長後產生之酵素會將固態基質中之蛋白質水解，而水解出之蛋白質會影響菌體中蛋白質含量之測定，因此，此方法適合用於蛋白質含量低之固態基質之測定。

### (2) 核酸

利用 DNA 及 RNA 之檢測來測得菌體含量，但此方法只適用於基質核苷酸含量少，且無化學物質干擾的情況，如可用於白米培養基，因米麴不產胞外核糖核酸酶 (DNase) (Matcham *et al.*, 1984)。

### (3) 葡萄糖胺

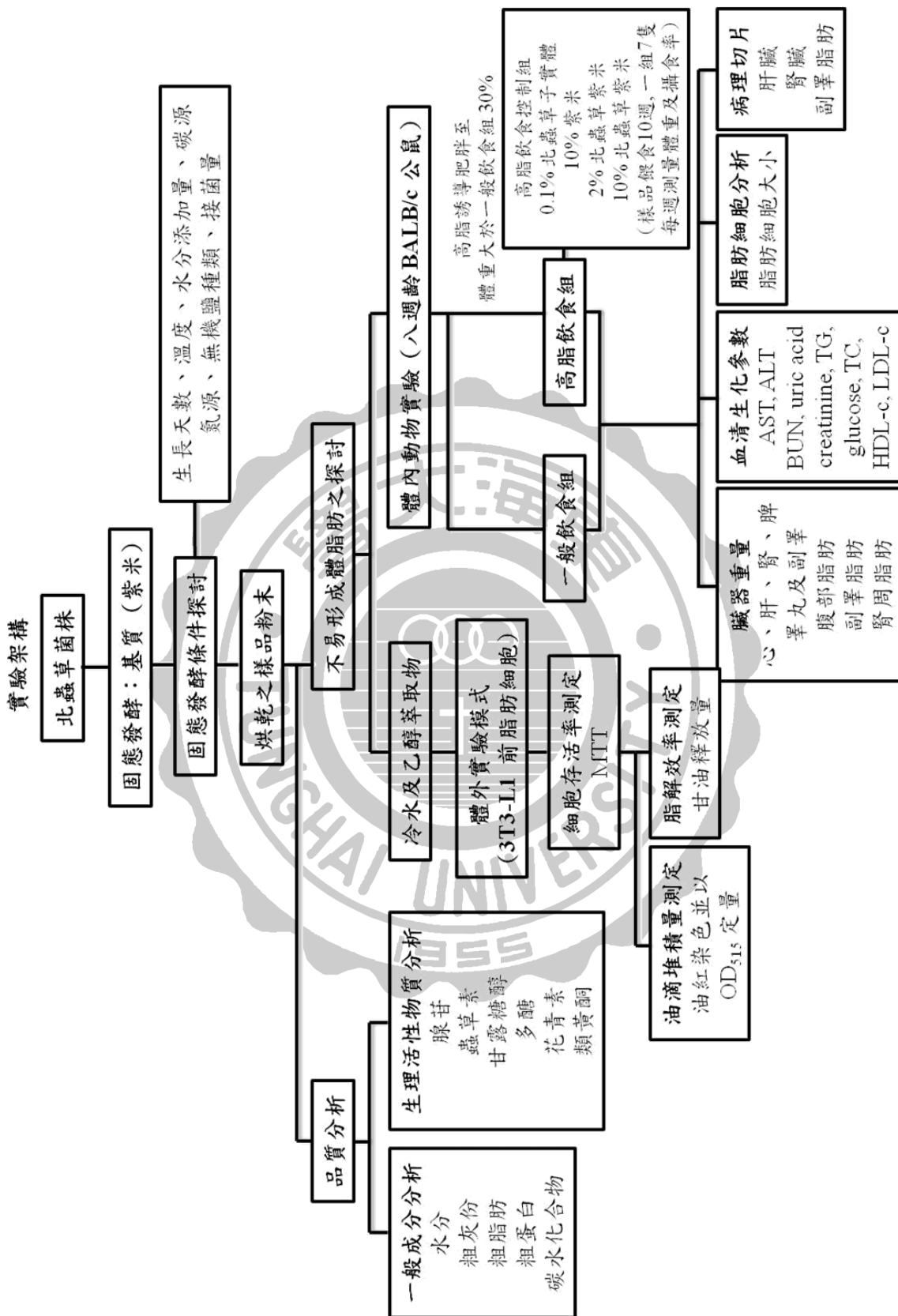
近年來葡萄糖胺分析法已成為測定固態發酵細胞生物量最常用方法之一，其原理主要是檢測真菌細胞壁中之葡萄糖胺，因在綠色植物或其他微生物中並無此成分，因此，特別適用於真菌菌體量的檢測。

### (4) 麥角固醇

麥角固醇為真菌中主要的固醇類物質，研究指出利用麥角固醇對比洋菇 (*A. bisporus*) 的生長情況，可得出固態發酵中麥角固醇與菌體間的線性關係 (Matcham *et al.*, 1985)，其測定可利用高效能液相層析儀 (HPLC) 配合 UV 偵測器提高靈敏度，因此，為低菌體含量提供了一個更靈敏的方法 (Ooijkaas *et al.*, 1998)。

## (四) 菇類固態發酵之相關文獻

研究指出以蔓越莓果渣為基質，利用香菇菌絲體進行固態發酵，發現所產生的 $\beta$ -glucosidase 可水解果渣產生酚苷 (phenolic glycosides) (Zheng and Shetty, 2000)；另將靈芝接種於玉米粉，經固態發酵培養可降解澱粉及增加活性物質以提升其營養價值 (Han *et al.*, 2005)；而韓 (1998) 亦利用羊肚菌來降解澱粉。此外，廖 (2003) 利用液態發酵及固態發酵來探討產生之靈芝 (*Ganoderma lucidum*) 菌絲體差異，結果發現固態發酵菌絲體之抗氧化力高出液態發酵菌絲體 4 倍之多，且其多醣分子量較大，顯示固態發酵技術具有發展之潛力。



## 第三章 材料方法

### 一、 實驗材料

1. 本研究試驗菌種為北蟲草菌株 (*Cordyceps militaris* 101)  
北蟲草菌株及子實體由大葉大學生物資源學系梁志欽教授提供
2. 紫米購自台中市建泰公司
3. 3T3-L1 (ATCC CL-173 ; BCRC 60159) 細胞株由台大生化科技學系潘子明教授提供
4. 酥油購自南僑公司 (Taoyaun, Taiwan)
5. 高脂飼料 (Research Diets, D12492) 購自 Research Diets 公司 (New Brunswick, NJ, USA)
6. 一般正常組成飼料 (Laboratory Rodent Diet, 5001) 購自 Labdiet PMI<sup>®</sup> Nutrition International 公司 (Brentwood, MO, USA)

### 二、 實驗方法

#### (一) 菌株培養及接種源製備

#### 1. 試藥

- (1) 馬鈴薯葡萄糖瓊脂(Potato dextrose agar; PDA)、酵母萃取物(Yeast extract powder) 購自印度HIMEDIA公司。
- (2) 葡萄糖 (Glucose)、蔗糖 (Sucrose)、乳糖 (Lactose)、果糖 (Fructose)、麥芽糖 (Maltose)、麥角固醇 (Ergosterol) 購自美國Sigma公司。
- (3) 正己烷 (*n*-Hexane)、甲醇 (Methanol) 購自美國MACRON公司。
- (4) 七水硫酸鎂 (Magnesium sulfate 7-hydrate) 購自西班牙Panreac公司。
- (5) 磷酸氫二鉀 (Potassium phosphate dibasic) 購自日本昭和化學株式會社公司。
- (6) 磷酸二氫鉀 (Potassium phosphate monobasic) 購自美國 J.T.Baker公司。
- (7) 乙醇 (Ethanol) 購自台灣恩加有限公司。

## 2. 菌種活化

將北蟲草菌種接種於 PDA 培養基中培養，約兩週後存放於 4 °C 冰箱中。活化時，取培養完全之培養皿，以滅菌後之接種刀切取外圍之菌絲作為菌種（約 5 mm × 5 mm），接種於新的 PDA 培養基並放於 25 °C 下培養活化。

## 3. 液態培養

於無菌操作台中，將保存於 PDA 之菌種以滅菌解剖刀切取 5 塊 5 mm × 5 mm 大小之菌絲塊，將其接種於含 100 mL 液態培養基之 250 mL 三角瓶中，於 100 rpm，25 °C 下進行振盪培養 3 天。再將已活化之液態菌種 3 mL（3%）接種於含有 100 mL 液態培養基之 250 mL 三角瓶，於 100 rpm，25 °C 下進行振盪培養。

三角瓶液態培養基成分：每升含葡萄糖 20 g、酵母萃取物 5 g、七水硫酸鎂（ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ）0.5 g、磷酸氫二鉀（ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ）0.5 g 及磷酸二氫鉀（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ）0.5 g。

### （二） 固態發酵

#### 1. 北蟲草紫米生長曲線探討

取固態基質紫米 15 g 於廣口瓶中，加入 RO 水 15 mL（水分添加量：50%），於滅菌釜中進行 121 °C，15 分鐘滅菌。冷卻後，加入 3 mL 液態菌種均質液於已滅菌之固態培養基中，經均勻攪拌後倒入平板培養皿中進行培養，培養天數為 0~19 天，並分析其菌絲體含量，以找出最佳培養天數。

#### 2. 北蟲草紫米最適培養條件探討

針對北蟲草紫米成品（紫米經北蟲草固態培養後之成品）之生長條件以單一因子進行探討，欲探討項目如下：

- (1) 溫度：20、25、30 ℃。
- (2) 水分添加量：40、50、60、70、80%。
- (3) 添加氮源（1%）：Yeast extract、Peptone、Soybean meal。
- (4) 添加碳源（1%）：Glucose、Sucrose、Fructose、Lactose。
- (5) 添加無機鹽（0.5%）：K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O。
- (6) 接種菌量：2、3、4、5 mL。

水分添加量（%）=加水量/（基質重 + 加水量）× 100%；碳氮源及無機鹽類則先溶於RO水後加入。

### 3. 菌絲體含量之測定 (Matcham *et al.*, 1985)

菌絲體含量以分析麥角固醇濃度來間接測定之。其方法如下：秤取樣品粉末 1 g 於螺旋管中，加入 4 mL 正己烷，經旋渦萃取 (vortex) 90秒，再經離心沉澱後，收集上清液。沉澱物再以相同條件萃取二次。將三次萃取收集之上清液以 40 ℃ 減壓濃縮至乾涸，再以 5 mL 甲醇回溶。所得萃取溶液經 0.45 μm 微孔濾膜過濾後，以高效能液相層析儀 (high performance liquid chromatograph, HPLC) 分析麥角固醇之含量，經由麥角固醇與菌絲體之檢量線可推算出菌絲體含量。

高效能液相層析儀包括 Agilent 1100 Series LC ChemStation 泵浦，UV-VIS DETECTOR/S-3702 可見光/紫外光檢測器，並連結數據處理之 SIC, Chromatocorder 21。

高效能液相層析條件如下：

- (1) 分離管柱：Prodigy 5u ODS3 100A (250 × 4.6 mm, 5 micron, Phenomenex)。
- (2) 注射量：20 μL。
- (3) 移動相：甲醇。
- (4) 檢測波長：282 nm。
- (5) 流速：1.2 mL/min。

#### 4. pH 值測定

取乾燥後之北蟲草紫米 2 g 於 50 mL 燒杯中，加入 20 mL RO 水，經磁石攪拌 30 分鐘後以 pH 計 (VisionPlus pH6175, JENCO) 測其值。

#### 5. 樣品粉末製備

##### (1) 北蟲草菌絲體粉末製備

取 3 mL 液態菌種，接種於已滅菌之 100 mL 液態培養基中，並於 25 °C，100 rpm 下培養。培養 4 天後，以去離子水清洗數次，直至濾液呈現澄清為止，之後於 50 °C 烘箱烘乾，以磨粉機 (Retch ultracentrifugal mil and sieving machine, Haan, Germany) 粉碎後過篩 (40 mesh) 即得北蟲草菌絲體粉末，而後置於乾燥箱以備後續實驗分析使用。

##### (2) 北蟲草紫米及紫米粉末製備

取 4 mL 北蟲草菌液接種於已滅菌之固態培養基 15 g 並適度攪拌使菌液平均分佈在基質上 (其水分添加量為 60%)，倒入培養皿中，於 25 °C 培養箱中靜置發酵 15 天。發酵完成後之北蟲草紫米於 50 °C 烘箱烘乾至恆重，以磨粉機粉碎後過篩 (40 mesh)，即得北蟲草紫米粉末。紫米於 50 °C 烘箱烘乾至恆重，以磨粉機粉碎後過篩 (40 mesh)，即得紫米粉末。

#### (三) 一般成分分析

##### 1. 試藥

- (1) 3,5 - 二硝基水楊酸 (3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS) 和葡萄糖 (Glucose) 購自美國 Sigma 公司。
- (2) 硼酸 (Boric acid)、乙醚 (Ethyl ether)、鹽酸 (Hydrochloric acid)、氫氧化鈉 (Sodium hydroxide) 和硫酸 (Sulfuric acid) 購自台灣聯工公司。
- (3) 雙氧水 (Hydrogen peroxide) 和酒石酸鉀鈉 (Sodium potassium tartrate) 購自日本和光純藥工業株式會社。
- (4) 甲基紅 (Methyl red) 購自日本東京化成公司。



## 2. 水分

取樣品乾燥後之粉末精稱 1~2 g ( $W_1$ )，置於經洗淨恆重後之稱量瓶( $W$ )中，以常壓加熱乾燥法，於烘箱中反覆乾燥、冷卻，稱至恆重 ( $W_2$ )，由樣品重量之損失量除以原樣品重可得該樣品之水分含量。樣品粉末水分含量之計算如下：

$$\text{水分含量 (\%)} = \left[ \frac{W_1 - (W_2 - W)}{W_1} \right] \times 100$$

## 3. 灰分

取樣品乾燥粉末精稱 2~5 克 ( $W$ ) 放入已洗淨且恆重後之坩堝 ( $W_1$ ) 中，並於 105 °C 烘箱中乾燥，去除部分水分，再放入灰化爐中灰化 (575 ± 25 °C) 至樣品粉末呈白灰色，當烘箱溫度降至 200 °C 時，移至玻璃乾燥器中繼續冷卻至室溫時稱重 ( $W_2$ )。樣品粉末灰分含量之計算如下：

$$\text{灰分含量 (\%)} = \left[ \frac{W_2 - W_1}{W} \right] \times 100$$

## 4. 粗脂質

樣品乾燥粉末精稱 2~3 g 置於圓筒濾紙中，頂部用脫脂棉蓋好，於 95~98 °C 烘箱內乾燥 2~3 小時後稱重 ( $W$ )，圓底燒瓶亦如上述步驟乾燥後稱重 ( $W_1$ )。圓筒濾紙裝入 Soxhlet 萃取裝置之萃取管中，且將圓底燒瓶加入 8 分滿之乙醚接於其下，置於 55 °C 恆溫水浴中連續萃取 16~18 小時。萃取完畢後，卸下冷凝管取出圓筒濾紙，將大部分乙醚蒸餾至萃取管中回收，再將圓底燒瓶置於水浴中繼續加熱使乙醚蒸發至乾。最後將圓底燒瓶置於 95~98 °C 烘箱中乾燥，每隔半小時稱重一次，取重量微增加前之重量 ( $W_2$ )。樣品粉末脂質含量之計算如下：

$$\text{粉末脂質含量 (\%)} = \left[ \frac{W_2 - W_1}{W} \right] \times 100$$

## 5. 粗蛋白

樣品乾燥粉末精稱 1.0 g (W) 置入消化分解管中，加入 25 mL 濃硫酸及少許蛋白質催化劑，加熱分解至溶液澄清為止，再直接裝入凱氏氮蒸餾裝置 (Gerhardt Vapodest 20) 內進行蒸餾，並添加 15 mL 之鹼液 (35% 氫氧化鈉溶液)，反應 30 秒後蒸餾 10 分鐘，出口用含有混合指示劑 (bromocresol green 和 methyl red) 的硼酸溶液 (4%，25 mL) 來接收，最後以 0.1 N 之鹽酸標準溶液滴定至桃紅色出現為止，記錄消耗的鹽酸毫升數 ( $V_1$ )。並做空白組且記錄消耗的鹽酸毫升數 ( $V_2$ )。樣品粉末蛋白質含量之計算如下：

$$\text{粉末蛋白質含量 (\%)} = [4.38^* \times 0.014^{**} \times (V_1 - V_2) \times M/W] \times 100$$

M : Molarity of HCl

\* 菇類之氮係數 (Crisan and Sands, 1978)

\*\* 相當於 1 mL 之 1 N 鹽酸溶液的氮量 (g)

## 6. 碳水化合物

$$\text{碳水化合物 (\%)} = 100 - (\text{水分} + \text{灰分} + \text{粗脂質} + \text{粗蛋白})$$

### (四) 生理活性物質分析

#### 1. 蟲草素 (孫等, 1999; 蕭, 1997)

樣品粉末 5 g 精稱入 250 mL 三角瓶，加入 100 mL RO 水，並以超音波 (Bransonic 5510) 裝置震盪萃取 60 min，再於 15,000 rpm 轉速下離心 10 min。所得上清液於 50 °C 下減壓濃縮至一定量後以去離子水定量至 5 mL，再經 0.45  $\mu\text{m}$  之濾膜過濾，最後以 HPLC 進行分析。另外，以不同濃度的標準品 (cordycepin) 注入 HPLC 中，由所得面積繪出檢量線，藉以計算樣品中蟲草素之含量。高效能液相層析儀分析方法：高效能液相層析儀包括 SHIMADZU LC-20AT 泵浦，SHIMADZU SPD-20A UV-VIS DETECTOR 可見光/紫外光檢測器，並連結數據處理之 SHIMADZU C-R6A Chromatopac。

高效能液相層析條件如下：

- (1) 分離管柱：Prodigy 5 u ODS3 100A (250 × 4.6 mm, 5 micron, Phenomenex)。
- (2) 注射量：20 μL。
- (3) 檢測波長：260 nm。
- (4) 移動相：甲醇：0.02 M 磷酸二氫鉀 = 15：85。
- (5) 流速：1.2 mL/min。

## 2. 腺苷 (劉等, 1994)

測定方法同蟲草素之分析方法。另外以不同濃度之標準品(adenosine) 注入HPLC中，由所得面積繪出檢量線，藉以計算樣品中腺苷之含量。

## 3. 多醣體

- (1) 多醣體之萃取：

固體樣品先經磨粉過篩後 (40 mesh)，取 1 g 後加入 20 mL 的 RO水，置於殺菌釜中加熱一小時，使多醣成分溶出，而後以離心機於 15,000 rpm，10 min 的條件分離，所得上清液作為樣品。樣品以澱粉分解酶( $\alpha$ -amylase和 $\beta$ -amylase)分解之，並以碘液測定澱粉是否存在，測定其無澱粉後 (加入碘液不形成深藍色)，再以透析膜 (MWCO 6000~8000) 透析隔夜以去除小分子，最後定量至一定體積分析之。

- (2) 多醣體含量之測定：

取多醣溶液、標準品及控制組溶液 0.5 mL 經吸取器吸入試管中，加入 0.5 mL 5 % 酚溶液和 2.5 mL 濃硫酸。靜置 30 min 後，使用分光光度計 (Hitachi U-2001 Spectrophotometer)，在 490 nm 之波長下，測其吸光值並和已知濃度之 (葡萄糖溶液) 標準品比對，計算出相對之總多醣濃度。

#### 4. 甘露糖醇 (Ajlouni *et al.*, 1995)

取樣品粉末精稱 1 g，加入 50 mL 80% 酒精，於室溫下振盪萃取 45 min。振盪後之樣品以濾紙抽氣過濾，濾渣以 25 mL 80% 酒精分 5 次清洗。所得濾液置於濃縮瓶中在 40 °C 下減壓濃縮至一定量。濃縮後之濾液放入 10 mL 定量瓶中，以去離子水定量至 10 mL，然後經 0.45  $\mu$ m 之濾膜過濾純化，最後以 HPLC 進行分析。另外，將不同濃度的標準品 (mannitol) 注入 HPLC 中，由所得面積繪出檢量線，藉以計算樣品中之含量。

高效能液相層析儀包括 HITACHI Chromaster 5110 泵浦，HITACHI Chromaster 5450 折射率檢測器，並連結數據處理之 Chromaster Sys 1。高效能液相層析條件如下：

- (1) 分離管柱：Luna 5  $\mu$  NH<sub>2</sub> 100A (250 × 4.6 mm, 5  $\mu$ m, Phenomenex)。
- (2) 注射量：5  $\mu$ L。
- (3) 移動相：乙腈：水 = 80：20 (v/v)。
- (4) 流速：0.8 mL/min。

#### 5. 花青素測定 (王, 2012)

取樣品粉末精稱 5 g，加入 100 mL 95% 0.1N 酸化乙醇，於 25 °C 下萃取 12 小時，萃取液以 Whatman No.1 濾紙抽氣過濾後，所得濾渣再以相同條件萃取一次。兩次收集之濾液以低於 40 °C 之情況下減壓濃縮去除有機溶劑，留下水層溶液。將水層溶液以正己烷和乙酸乙酯進行 partition，留下水層用減壓濃縮去除殘留之有機溶劑，濃縮後之濾液以去離子水定量至 10 mL，然後經 0.45  $\mu$ m 之濾膜過濾純化，最後以 HPLC 進行分析。另外，將不同濃度的標準品 (kuromanin chloride) 注入 HPLC 中，由所得面積繪出檢量線，藉以計算樣品中之含量。高效能液相層析儀分析方法：高效能液相層析儀包括 SHIMADZU LC-20AT 泵浦，SHIMADZU SPD-20A

UV-VIS DETECTOR 可見光/紫外光檢測器，並連結數據處理之 SHIMADZU C-R6A Chromatopac。

高效能液相層析條件如下：

- (1) 分離管柱：Prodigy 5 u ODS3 100A (250 × 4.6 mm, 5 micron, Phenomenex)。
- (2) 注射量：20 μL。
- (3) 檢測波長：254 nm。
- (4) 移動相：1% 甲酸 (formic acid)：乙腈 = 91：9。
- (5) 流速：1 mL/min。

## 6. 黃酮類測定 (Jia *et al.*, 1999)

(1) 黃酮類之萃取：

取 1 g 樣品粉末加入 20 mL 95% 乙醇，利用超音波震盪萃取一小時後，於 13,500 rpm 轉速下離心 10 min。所得上清液利用減壓濃縮至乾，最後以 80% 乙醇定量至 5 mL。

(2) 黃酮類含量之測定：

取萃取液 500 μL 加入 2.5 mL 45% 乙醇後，加入 150 μL 亞硝酸鈉 (5%, w/v) 混合，靜置 5 min 後加入 300 μL 氯化鋁 (10%, w/v) 混合後靜置 6 min，再加入 1 M 1 mL 氫氧化鈉與 550 μL 蒸餾水，Vortex 均勻混合後在 510 nm 之波長下，測其吸光值並和已知濃度之 (quercetin) 標準品比對，計算出相對之總黃酮類濃度。

### (五) 3T3-L1前脂肪細胞之體外實驗模式

#### 1. 試藥

- (1) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、Trypsin-EDTA、Phosphate buffered saline powder (PBS)、Penicillin-Streptomycin (PS)、Fetal bovine serum (FBS) 及 Insulin (Human Recombinant

Zinc, solution) 購自 Gibco 公司 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

- (2) Oil red O、Dimethyl sulfoxide (DMSO)、Trypan blue stain、Bovine serum albumin (BSA)、3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)、KCl、Tris-HCl、Methylisobutylxanthine 及 Dexamethasone 購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)
- (3) Triton X-100 購自 Merck 公司 (Rahway, NJ, USA)
- (4) NaCl 購自 Mallinckrodt Baker 公司 (Phillipsburg, NJ, USA)
- (5) CaCl<sub>2</sub> 及 NaHCO<sub>3</sub> 購自 TEDIA 公司 (Fairfield, OH, USA)
- (6) EDTA 購自 Dojin 公司 (Kumamoto, Japan)
- (7) Isopropanol 購自 ALPS 公司 (Taipei, Taiwan)
- (8) Formalin 購自 Choneye Pure Chemicals 公司 (Taipei, Taiwan)
- (9) BCA protein assay kit 購自 Pierce 公司 (Rockford, IL, USA)
- (10) Glycerol assay kit (GY105) 購自 Randox 公司 (Antrim, UK)

## 2. 樣品製備

### (1) 冷水萃取物製備

稱樣品粉末 10 g，置入 250 mL 錐形瓶中，加入 200 mL 去離子水，以超音波 (Bransonic 5510) 裝置震盪萃取 60 min。再以 Whatman No.1 濾紙抽氣過濾，所得濾渣以同樣條件再萃取一次，收集之濾液置於濃縮瓶中，於 40 °C 下減壓濃縮至乾，再以去離子水定量，將所得之萃取物以冷凍乾燥處理後保存於 -20 °C 下備用。

### (2) 乙醇萃取物製備

精稱樣品粉末 10 g，置入 250 mL 錐形瓶中，加入 100 mL 乙醇，於 25 °C 下，150 rpm 震盪萃取 24 小時，然後以 Whatman No.1 濾紙抽氣過濾。所得濾渣再以同樣條件萃取二次，三次收集之濾液以 40 °C 減壓濃縮至乾，再以乙醇定量至一定濃度後，將所得之萃取物儲存於 -20 °C 下保存備用。

### 3. 3T3-L1前脂肪細胞之培養

#### (1) 3T3-L1前脂肪細胞解凍培養

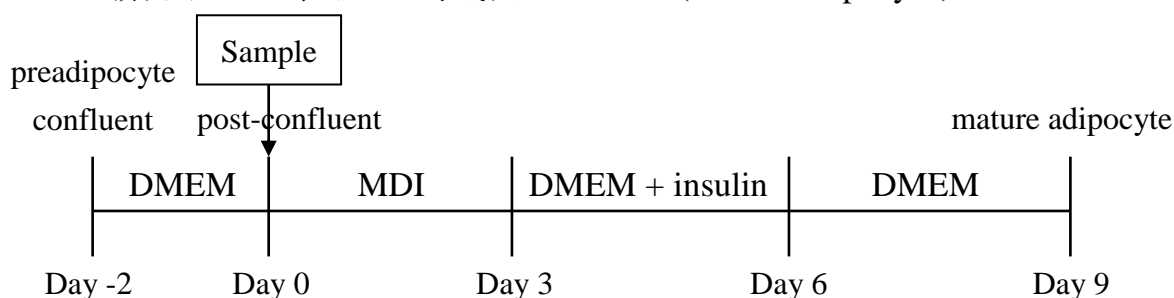
解凍細胞前，先將 DMEM 培養基 (DMEM 粉末、10% FBS、1% PS、1.5 g/L sodium bicarbonate 和 0.11 g/L pyruvic acid) 置於 37 °C 水浴槽回溫，取適當培養基加入 75 T flask 中。將保存於液態氮桶中之 3T3-L1細胞株 (含 13% 抗凍劑) 取出，於 37 °C 水浴槽中快速解凍，以 70% 酒精噴灑後移入無菌操作台中，吸取已解凍之細胞懸浮液加入 75 T flask 中，混合均勻後放置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養至隔天，更換新 DMEM 培養基後每隔兩天換一次培養基。

#### (2) 3T3-L1前脂肪細胞繼代培養

當細胞密度達 8-9 分滿時，進行繼代培養。先將舊 DMEM 培養基移除，加入 trypsin-EDTA 溶液後置於 37 °C 反應 3-5 分鐘，再用手輕拍培養盤使細胞自壁上脫落，加入新 DMEM 培養基將細胞沖下來，取出後均勻混合再加入新培養盤中，放入 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養。

#### (3) 3T3-L1前脂肪細胞分化培養

將 3T3-L1 前脂肪細胞以  $6 \times 10^4$  cell/well 之密度接種至 24 well 培養盤中培養，當細胞全部長滿 (confluents) 後再培養兩天，將 DMEM 培養基更換為 MDI 分化液 (含 0.5 mM methylisobutylxanthine、1  $\mu$ M dexamethasone 和 1  $\mu$ g/mL insulin 之 DMEM 培養基) 誘導分化。培養至第三天時更換為分化後培養基 (含 1  $\mu$ g/mL insulin 之 DMEM 培養基)，培養至第六天時換回 DMEM 培養基，培養至第九天時大部分細胞已完成分化。此時細胞會由纖維狀轉變為圓球狀，並有油滴累積其中，此時的細胞為成熟脂肪細胞 (mature adipocyte)。



#### 4. 細胞計數方法

將經 trypsin-EDTA 處理之 3T3-L1 細胞懸浮液收集起來後，取 10  $\mu$ L 細胞液與 40  $\mu$ L trypan blue stain 染劑混合均勻，再取 10  $\mu$ L 混合液添加至血球計數板 (hemacytometer) 中，於倒立顯微鏡下計數五個大正方格中之細胞數目。所得之平均細胞數乘以稀釋倍數後再乘以  $10^4$ ，即為每毫升細胞懸浮液中之細胞總數。

#### 5. 細胞存活率之測定

##### (1) 原理

MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 為水溶性黃色 tetrazolium 鹽類物質，活細胞粒線體中之琥珀酸去氫酶 (succinate dehydrogenase) 可將 MTT 之黃色鹽類物質還原為紫色非水溶性之 formazan 結晶並沉積於細胞內。當粒線體活性越高時，還原 MTT 能力就越強，因此 formazan 之生成量與活細胞數目成正比。其紫色結晶再以 DMSO 溶解成紫色溶液，於 570 nm 波長下測量其吸光值，吸光值越大表示細胞存活率越高 (Tominaga *et al.*, 1999)。

##### (2) 步驟

3T3-L1 前脂肪細胞以  $5 \times 10^3$  cell/well 之密度接種至 96 well 培養盤中，於 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  培養箱中培養一天後，加入不同濃度之樣品作用 0、24、48 及 72 小時，作用結束後將 DMEM 移除並加入 60  $\mu$ L MTT solution，於培養箱中反應 3 小時，之後緩慢移除 MTT solution 並加入 150  $\mu$ L DMSO 均勻搖晃 30 分鐘，再利用 ELISA Reader 測量 570 nm 波長下之吸光值，並利用公式換算出細胞存活率。公式如下：

細胞存活率 (cell viability, %) = [處理組之 OD 值 / 控制組之 OD 值]  $\times$  100



## 6. 油紅染色法 (Oil red O stain)

### (1) 原理

Oil red O stain 為重氮脂肪染色劑，會將細胞中之油滴染成紅色，可用於觀察細胞分化期間油滴累積之情形。

### (2) 步驟

3T3-L1 前脂肪細胞以  $6 \times 10^4$  cell/well 之密度接種至 24 well 培養盤中，取第九天已分化完全之細胞進行油紅染色。將培養盤中之 DMEM 培養基移除後，以 PBS 緩慢潤洗兩次後，加入 1 mL 甲醛 (formaldehyde) 靜置一小時，以固定細胞。移除甲醛後再的去離子水潤洗兩次，加入 0.5 mL Oil red O 染劑反應 10 分鐘，移除染劑後再的去離子水潤洗兩次，將液體移除後於顯微鏡下拍照觀察。再加入 1 mL 異丙醇 (isopropanol) 均勻搖晃 10 分鐘將油紅染劑溶出，測定在 515 nm 下之吸光值。

脂質含量 (lipid content, %) = [處理組之OD值/控制組之OD值] × 100

## 7. 成熟脂肪細胞脂解作用 (Lipolysis) 之測定

### (1) 原理

脂解作用意指 TG 水解為甘油及游離脂肪酸之過程，脂肪細胞中因僅含有微量甘油激酶 (glycerol kinase)，無法重複利用甘油，因此甘油會釋放至培養液中。因此可藉由檢測培養液中甘油的濃度來評估脂肪細胞之脂解效率。

### (2) 步驟

3T3-L1 前脂肪細胞以  $6 \times 10^4$  cell/well 之密度接種至 24 well 培養盤中，取分化後第九天之細胞進行脂解效率之測定。以 PBS 潤洗後，將培養液換成 Krebs-Ringer Bicarbonate (KRB) buffer，同時加入不同濃度之樣品處理 24 小時。利用市售套組 Glycerol kit (GY 105, Randox, Antrim, UK) 分析培養液中之甘油濃度。另外，以 PBS 潤洗已移除細胞上清液之培養盤，加入 120  $\mu$ L lysis buffer (pH 7.4, 20 mM

Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100) 反應 10 分鐘使細胞溶解，將細胞懸浮液收集至 1.5 mL 微量離心管中，Vortex 均勻混合後於冰浴下進行超音波震盪(40W, 10 min)，使細胞膜完全破碎，再以  $13000 \times g$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  離心 5 min，取上清液至新離心管中，並利用 BCA protein kit (Pierce, Rockford, IL, USA) 分析總蛋白質濃度。將兩者結果以 mg glycerol/mg protein 之比值來評估細胞脂解效率(Lee *et al.*, 2013)。

#### Krebs-Ringer Bicarbonate (KRB) buffer 配製方法：

藥品	重量 (體積)	最終濃度
NaCl	0.7 g	20 mM
KCl	0.035 g	4.7 mM
CaCl <sub>2</sub>	0.0244 mL	2.2 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0295 g	1.2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0163 g	1.2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	0.21 g	25 mM
glucose	0.99 g	5 mM
BSA	2.0 g	2%

將上述藥品加入 80 mL RO 水中，調整 pH 至 pH7.4，加水定容到 100 mL

#### Lysis buffer 配製方法：

藥品	重量 (體積)	最終濃度
Tris-HCl	3.152 g	20 mM
EDTA	0.292 g	1 mM
Triton X-100	1 mL	1%

將上述藥品加入 80 mL RO 水中，調整 pH 至 pH7.4，加水定容到 100 mL

## (六) 體內動物模式

### 1. 動物模式建立

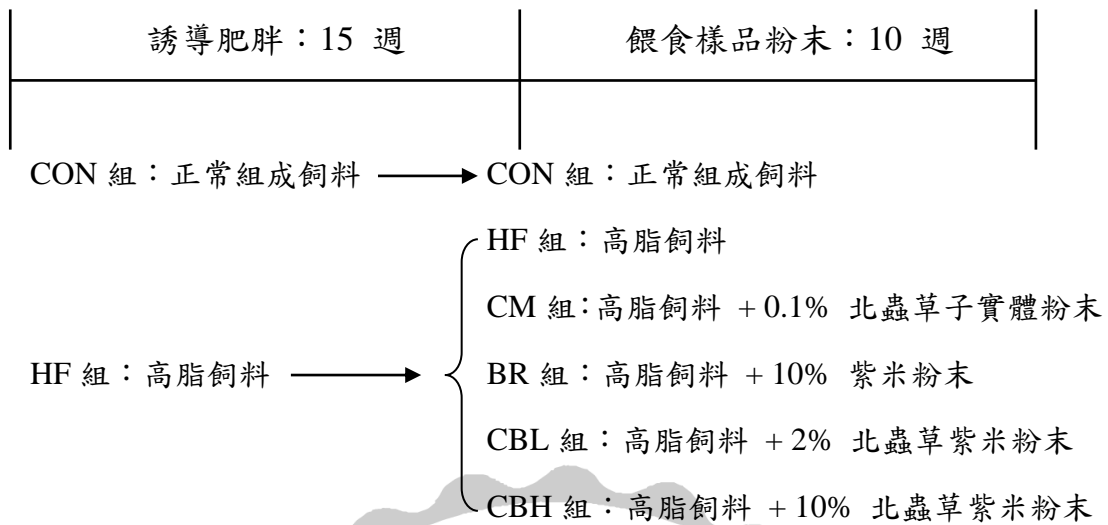
#### (1) 實驗動物之飼養

實驗動物為五週齡之雄性 BALB/c 小鼠，共 42 隻，購自國家實驗動物中心 (National Laboratory Animal Center Taiwan R.O.C.)。以一般飼料 (Laboratory Rodent Diet 5001) 預養至八週齡，飼養環境控制於溫度  $25 \pm 2$  °C、相對溼度  $60 \pm 10\%$  及各 12 小時的光照循環。代其適應環境後以耳洞標記隨機分組。每組 7 隻，共 6 組進行高脂飼料誘發肥胖之動物試驗，採自由進食及飲水方式飼養，並每週記錄其體重與攝食率。

#### (2) 高脂飼料誘導肥胖模式之建立

開始餵食樣品前，控制組 (control group, CON) 餵食一般正常組成飼料，其餘五組餵食高脂飼料 (Research Diets, D12492) 作為誘發肥胖組。餵食高脂飼料 15 週後，肥胖組平均體重均高於控制組平均體重 30% 以上，接著留下其中一組繼續餵食高脂飼料，並將其命名為高脂飲食組 (high-fat diet group, HF)，另外四組分別餵食高脂飼料中含北蟲草子實體 (*Cordyceps militaris* fruiting body, CM; 0.1%)、紫米 (black rice, BR; 10%)、低劑量 (CBL; 2%) 及高劑量 (CBH; 10%) 北蟲草紫米粉末 (*Cordyceps militaris* fermented black rice powder) 之飼料樣品。各組小鼠採自由進食其相對應樣品之方式，餵食樣品 10 週後犧牲動物，並進行各項分析。飼料分組與飼養方法如下圖：

犧牲



### (3) 北蟲草子實體粉末餵食劑量換算

衛福部公告北蟲草子實體粉末每日食用限量為 600 mg，小鼠每公斤體重攝食量為人每日建議攝取量 / 體重 x 9.01 (小鼠與人體的每公斤體重劑量折算係數) =  $600 \text{ mg} / 60 \text{ (kg)} \times 9.01 = 90.1 \text{ mg} / \text{kg mice} = 3.6 \text{ mg} / 40 \text{ g mice}$ 。

小鼠每日攝食量為  $100 \text{ g} / \text{week} \text{ (n=5)} = 20 \text{ g} / \text{week} / \text{per mice} = 2.86 \text{ g} / \text{day} / \text{per mice}$ 。小鼠每日北蟲草子實體粉末攝食率為  $3.6 \text{ mg} / 2.86 \text{ g} = 0.0036 \text{ g} / 2.86 \text{ g} = 0.0012 = 0.12 \%$

### (4) 高脂飼料之配製

一般正常組成飼料餵食 Laboratory Rodent Diet 5001，脂肪含量 6%，熱量約 3.34 kcal/g。高脂飼料是在 Laboratory Rodent Diet 5001 飼料中添加 26.7% 酥油，脂肪含量 35%，熱量約 5.15 kcal/g。

各組樣品配置方法如下：

	樣品粉末 (g)	Laboratory Rodent Diet 5001 (g)	Butter (酥油) (g)
0.1% 北蟲草子實體	1	680.7	318.3
10% 紫米	100	581.7	318.3
2% 北蟲草紫米	20	661.7	318.3
10% 北蟲草紫米	100	581.7	318.3

#### (5) 動物犧牲及檢體採集

犧牲前一天將各組小鼠禁食 12 小時後，以 CO<sub>2</sub> 使其窒息後犧牲。採集小鼠血液置於微量離心管，於室溫下靜置數小時，待血液沉澱分層後進行離心 (3000 × g, 20 min)，取上層血清至新微量管後，置於 -80 °C 凍存。後續進行血清中禁食血糖、三酸甘油脂、總膽固醇、高密度脂蛋白膽固醇及低密度脂蛋白膽固醇含量等血脂含量分析，並檢測血清天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)、胺基丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)、尿素氮 (blood urine nitrogen, BUN)、肌酐酸 (creatinine) 與尿素 (uric acid) 等肝腎功能指數以評估其肝腎功能。

犧牲時取下小鼠心臟 (heart)、肝臟 (liver)、脾臟 (spleen)、腎臟 (kidney)、睪丸 (testis)、副睪 (epididymis)、腎臟周邊脂肪 (perirenal fat)、副睪脂肪 (epididymal fat) 及腹部脂肪 (abdominal fat) 秤重後，取部分肝臟、腎臟及副睪脂肪組織浸泡於 10% 福馬林中固定 3 天後，進行組織修片。將石蠟包埋製成組織切片後，以蘇木青 (hematoxylin) 和伊紅 (eosin) 染色 (H&E stain)，並判讀組織之病理現象。其他臟器放入夾鏈袋內，迅速置於 -80 °C 冰箱凍存備用。

## 2. 生理參數分析

### (1) 體重

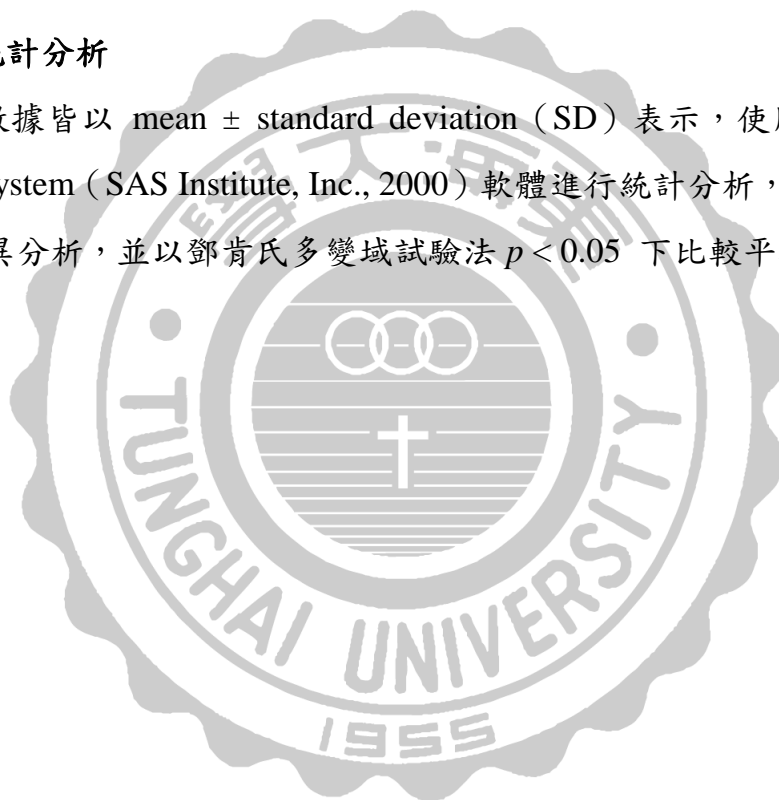
每週測量小鼠體重，於實驗結束後做圖比較各組間之體重變化情形。

### (2) 飼料攝取率及能量攝取量

記錄小鼠每週之飼料攝取量，並於實驗結束後計算每隻小鼠能量攝取量，作圖比較各組間之差異。

### (七) 統計分析

實驗數據皆以  $\text{mean} \pm \text{standard deviation (SD)}$  表示，使用 Statistical Analysis System (SAS Institute, Inc., 2000) 軟體進行統計分析，以 ANOVA 程序作變異分析，並以鄧肯氏多變域試驗法  $p < 0.05$  下比較平均值之顯著性差異。



## 第四章 結果討論

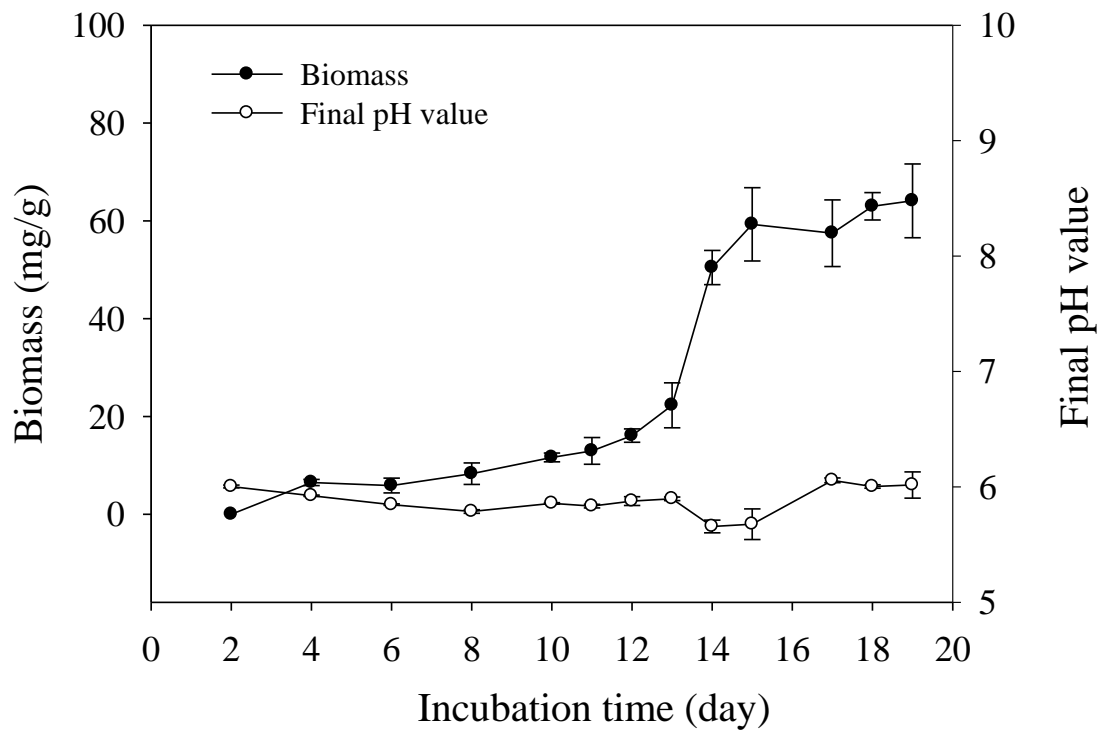
### 一、 北蟲草紫米固態發酵條件探討

#### (一) 北蟲草紫米固態發酵生長曲線

圖一為北蟲草紫米於固態發酵期間菌絲體生長及 pH 值變化之情形，斜率代表生長速率。接菌後剛開始 10 天為遲滯期 (lag phase)，北蟲草菌正在適應固態基質新環境故緩慢生長；當培養至 11-15 天時，北蟲草菌則會快速生長，此階段為對數生長期 (log phase)，當達第 15 天時可得最高生物質量為 59.27 mg/g (表一)；經過對數期後，即培養 15 天後，固態培養基營養減少，另新陳代謝產生有害廢物可能會增加，此時菌體數目呈動態平衡，沒有淨增加，此期為靜止期(stationary phase)。圖二及圖三分別為北蟲草紫米平板培養期間菌絲生長之正面及背面外觀，亦可發現接菌後開始 11 天北蟲草菌絲生長較為緩慢尚未佈滿所有基質；當培養至第 13-15 天時，菌絲已佈滿基質表面；第 15 天之後基質則開始呈現黃色，推測可能是二次代謝產物，因培養 15 天之後產生的生物量與第 15 天並無顯著差異，後續實驗條件探討培養天數將以 15 天為主。

#### (二) 培養溫度

溫度為影響微生物生長及代謝活性的重要因素之一 (Babitha *et al.*, 2007)，細胞之生長及代謝速率會因溫度的升高而加快，但微生物中之蛋白質、核酸等重要組成成分會因溫度增高而被破壞，因此，適當之溫度範圍可促進微生物生長及代謝，若溫度過高或過低，微生物生長會受到抑制甚至死亡。圖四為不同培養溫度下北蟲草紫米生物質及最終 pH 值，由圖可知培養溫度為 25°C，北蟲草紫米可得最高之生物質為 39.18 mg/g (表二)，但與 20°C 相比並無顯著差異，其生物質為 37.57 mg/g (表二)；而當培養溫度為 30°C 時其生物質則下降至 8.7 mg/g，顯見過高溫度會影響北蟲草菌絲體之生長。因 25°C 較接近一般室溫，為節省能源消耗，故後續試驗以 25°C 做為培養溫度。



圖一、北蟲草紫米固態發酵期間，生物質和 pH 值之變化

Figure 1. The changes of biomass and pH value during the growth of *Cordyceps militaris* fermented black rice.

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3) .



表一、北蟲草紫米固態發酵期間，生物質含量和 pH 值之變化

Table 1. The changes of biomass and pH value during the growth of *Cordyceps militaris* fermented black rice.

Day	Biomass ( mg/g )	pH value
4	6.49 ± 0.63E <sup>a</sup>	5.92 ± 0.01BC
6	5.87 ± 1.51E	5.85 ± 0.01CD
8	8.29 ± 2.20E	5.79 ± 0.02D
10	11.61 ± 0.90DE	5.86 ± 0.01CD
11	12.95 ± 2.74DE	5.83 ± 0.02CD
12	16.09 ± 1.38CD	5.88 ± 0.04CD
13	22.28 ± 4.61C	5.90 ± 0.02C
14	50.46 ± 3.49B	5.66 ± 0.06E
15	59.27 ± 7.49A	5.68 ± 0.13E
17	57.48 ± 6.81AB	6.06 ± 0.02A
18	62.98 ± 2.81A	6.00 ± 0.02AB
19	64.11 ± 7.54A	6.02 ± 0.11AB

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD ( *n* = 3 ) . Means with different letters within a column are significantly different ( *p* < 0.05 ) .



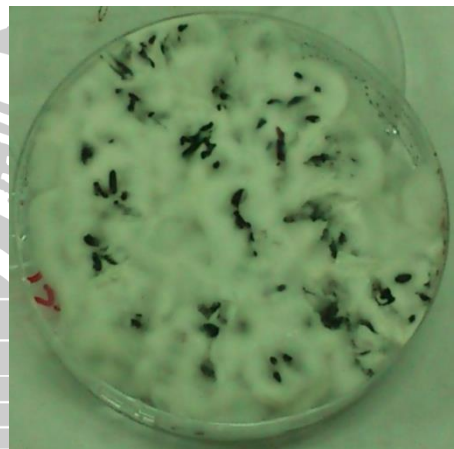
第四天



第八天



第十一天



第十三天



第十五天



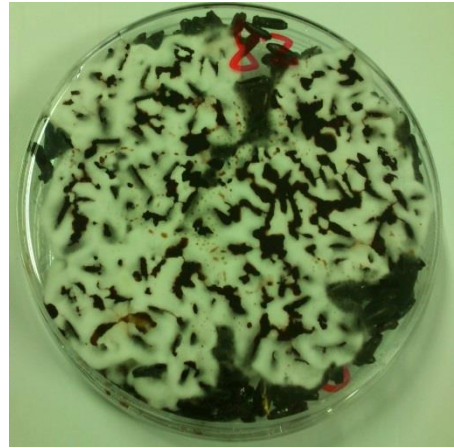
第十九天

圖二、北蟲草紫米固態發酵期間之菌絲生長情形（正面）

Figure 2. The mycelia growth during solid state fermentation of *Cordyceps militaris* fermented black rice (Top) .



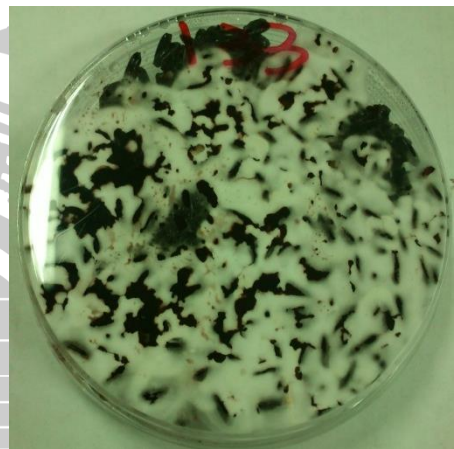
第四天



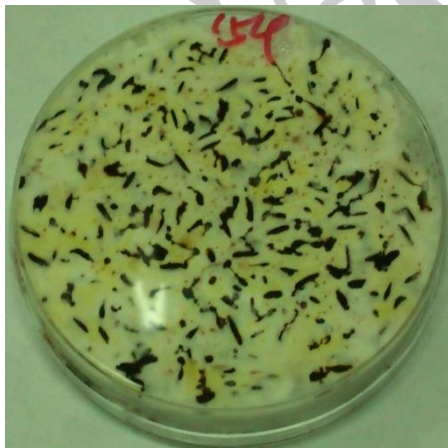
第八天



第十一天



第十三天



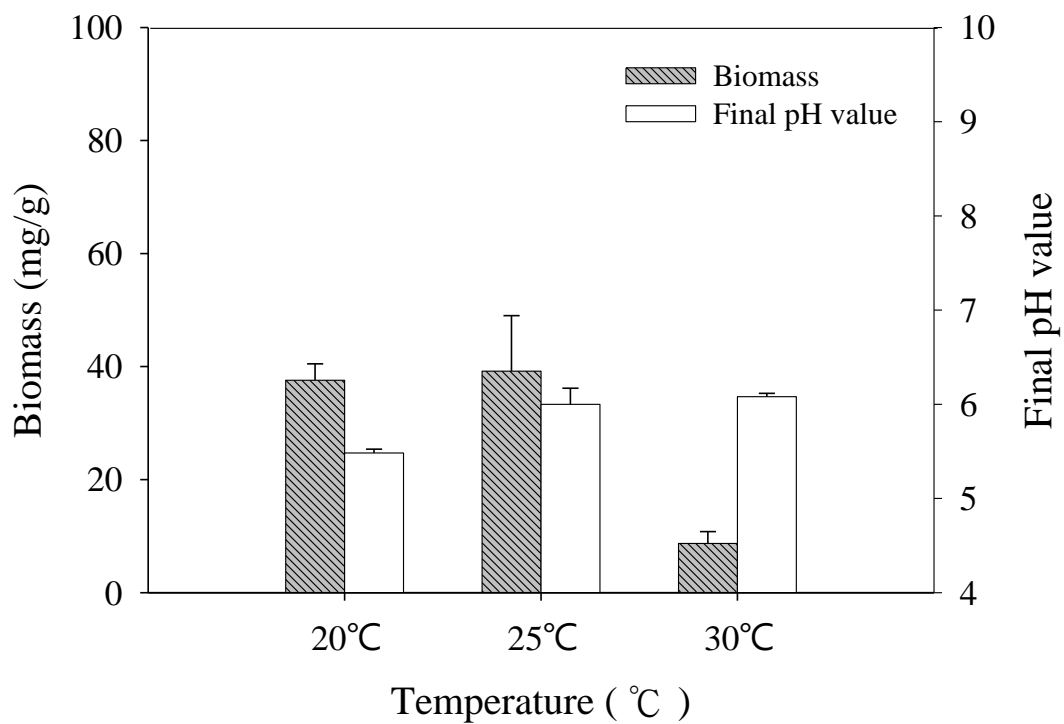
第十五天



第十九天

圖三、北蟲草紫米固態發酵期間之菌絲生長情形（背面）

Figure 3. The mycelia growth during solid state fermentation of *Cordyceps militaris* fermented black rice (Bottom) .



圖四、不同培養溫度對北蟲草紫米生物質和最終 pH 值之影響

Figure 4. Effects of various temperature on biomass and final pH value of *Cordyceps militaris* fermented black rice.

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

表二、不同發酵條件北蟲草紫米之生物質及最終 pH 值

Table 2. Biomass and final pH value of *Cordyceps militaris* fermented black rice at various culture conditions.

	Biomass (mg/g) <sup>a</sup>	Final pH value
Temperature (°C)		
20	37.57 ± 2.92A	5.48 ± 0.04B
25	39.18 ± 9.83A	6.00 ± 0.17A
30	8.70 ± 2.11B	6.08 ± 0.04A
Water supplementation (%)		
40	24.70 ± 4.48C	6.07 ± 0.12A
50	62.58 ± 13.30B	6.03 ± 0.02AB
60	79.94 ± 5.38A	5.48 ± 0.06D
70	57.78 ± 13.34B	5.61 ± 0.07C
80	22.63 ± 4.14C	5.92 ± 0.02B
Inoculation rate (mL)		
2	28.17 ± 2.86B	6.20 ± 0.06A
3	39.85 ± 12.28B	5.95 ± 0.03B
4	64.60 ± 14.43A	6.17 ± 0.02A
5	28.97 ± 9.41B	6.16 ± 0.05A
Nitrogen source (1%)		
Control	39.75 ± 11.41B	6.03 ± 0.02B
Yeast extract	35.89 ± 3.66B	6.12 ± 0.07B
Soybean meal	56.59 ± 11.24A	6.27 ± 0.12A
Peptone	44.40 ± 7.49B	6.06 ± 0.05B

(Continued)

---

Carbon source (1%)			
Control	39.75 ± 11.41A	6.03 ± 0.02A	
Sucrose	36.06 ± 1.27A	6.08 ± 0.06A	
Glucose	47.15 ± 6.87A	6.03 ± 0.05A	
Lactose	38.75 ± 10.24A	5.88 ± 0.02B	
Fructose	43.99 ± 2.55A	6.06 ± 0.07A	

---

Mineral (0.5%)			
Control	39.75 ± 11.41B	6.03 ± 0.02B	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	42.80 ± 8.38B	5.85 ± 0.02C	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	54.53 ± 7.65AB	6.25 ± 0.03A	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	61.90 ± 10.66A	6.07 ± 0.08B	

---

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD ( $n = 3$ ). Means with different letters within a column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### (三) 水分添加量

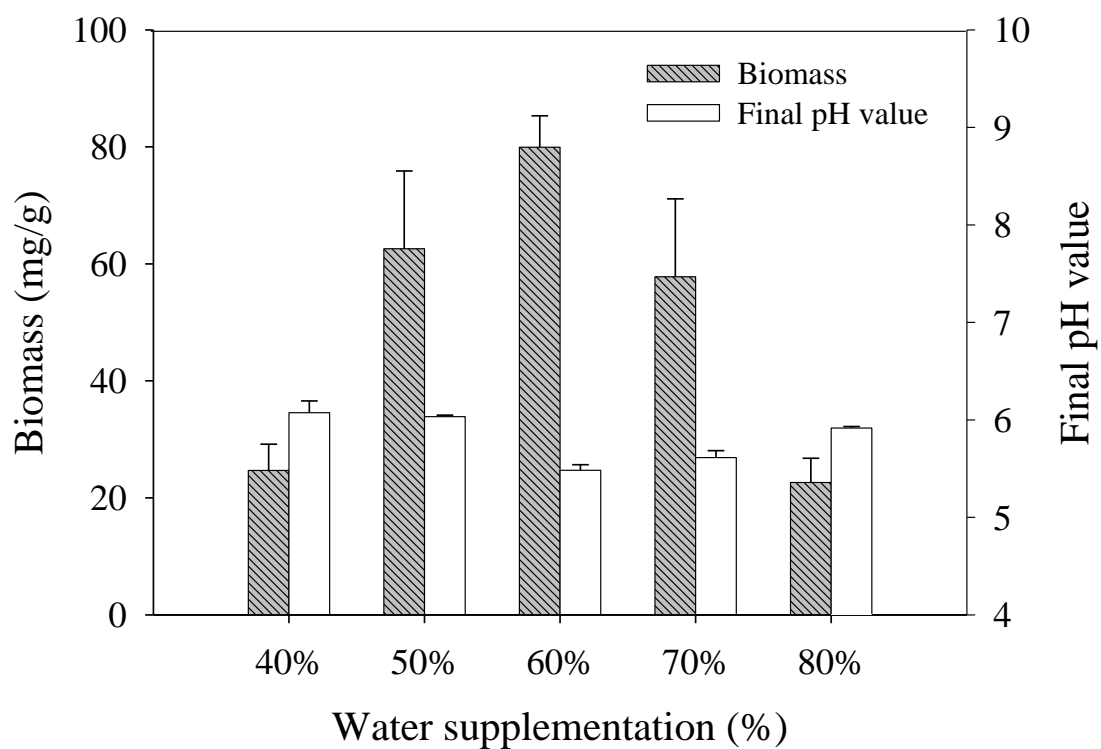
固態培養中之水分含量為影響微生物生長及代謝之重要關鍵，若在製程中無另添加水分的情況下，微生物仍可從基質中獲取水分以供生長及代謝 (Nigam and Pandey, 2009; Pandey, 2003)。廖等人 (2003) 指出真菌最適生長之水分添加量為 40-80% 之間，水分含量過低真菌不易生長。由圖五可得知水分添加量為 60% 時，北蟲草紫米生長情形最佳，具最高生物質為 79.94 mg/g (表二)；水分添加量為 50% 及 70% 次之，其生物質分別為 62.58 及 57.78 mg/g (表二)。而當水分添加量為 40% 時，可能因基質太過乾燥使北蟲草菌絲體不易滲入紫米生長，故其生物質僅為 24.70 mg/g；另水分添加量為 80% 時，則可能因基質太過黏稠，致通氣不良而使菌絲體生長不佳，其生物值低至 22.63 mg/g，故後續培養水分添加量固定為 60%。

### (四) 接菌量

廖 (2003) 指出一般而言固態發酵菌絲培養最佳之接菌率為 10~15%，而郭 (2005) 指出接菌量較高時會使基質之含水量增加，使其成黏稠狀，不利菌絲體生長。北蟲草紫米固態發酵培養添加之菌液為 2-5 mL，另水分添加量為 60%，於 25°C 下培養 15 天，由圖六可得知最適接菌量為 4 mL，其生物質為 64.60 mg/g (表二) 換算接菌率約為 12.5%，與廖 (2003) 之結果相近。而當接菌量為 2 mL 時，因起始菌量少，培養至 15 天時，可能尚未到達生物質之最高點，故其含量僅為 28.17 mg/g。此外，當接菌量為 5 mL 時生物質亦減少為 28.97 mg/g，推測原因為培養至第 15 天時，已過其生長對數及靜止期，菌體內可能會產生酵素自我分解導致生物質下降。

### (五) 氮源

在培養真菌時，氮源為其構成胺基酸、核酸及蛋白質的主要成分。當增加氮源後，菌體會加快生長，但會減少胞外多醣的合成，而當氮源耗盡時，培養基中剩餘之碳源則會刺激胞外多醣的合成 (Taurhesia and McNeil, 1994)。本研究在北蟲草紫米固態培養時，分別添加 1% 之蛋白腺

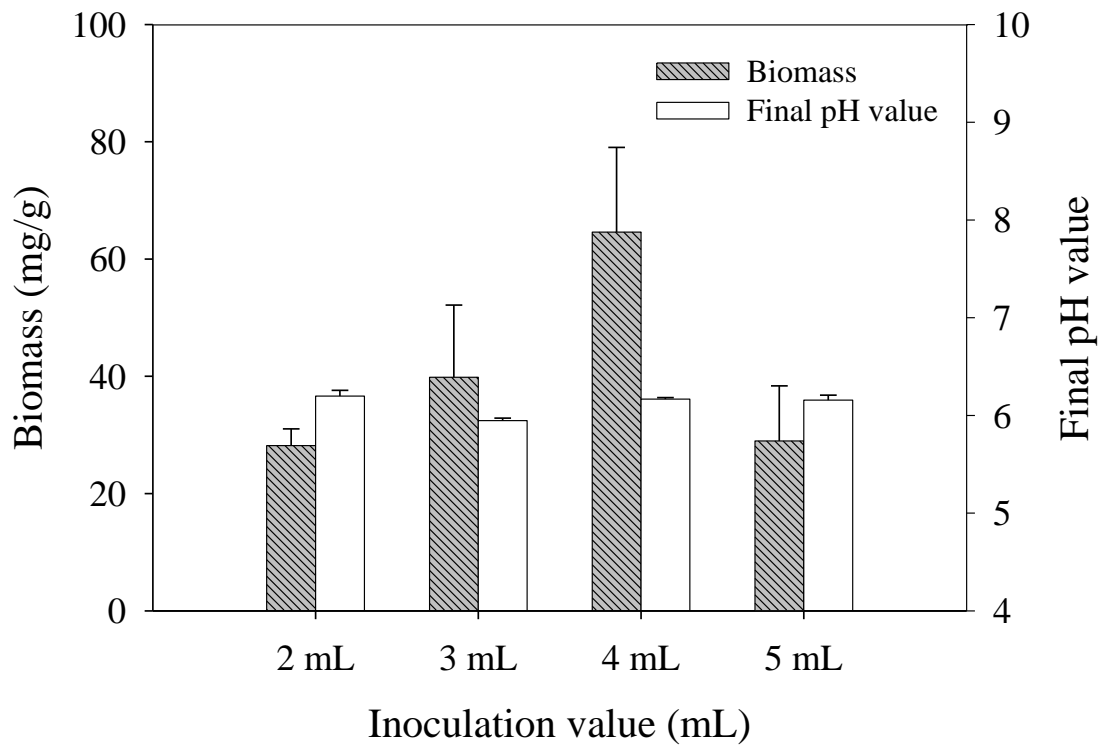


圖五、不同水分添加量對北蟲草紫米生物質和最終 pH 值之影響

Figure 5. Effects of various content of water supplementation on biomass and final pH value of *Cordyceps militaris* fermented black rice.

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).





圖六、不同接菌量對北蟲草紫米生物質和最終pH值之影響

Figure 6. Effects of various inoculation value on biomass and final pH value of *Cordyceps militaris* fermented black rice.

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

(peptone)、黃豆粉 (soybean meal) 及酵母萃取物 (yeast extract) 作為氮源，探討其對北蟲草菌絲體生長之影響。由圖七發現以添加黃豆粉的生長情況最佳，生物質達 56.59 mg/g (表二)，而添加蛋白胨及酵母萃取物與控制組並無顯著差異，有研究指出利用深層培養生產北蟲草菌絲體及蟲草素時，若添加大豆蛋白液 (soybean meal juice) 可增加此兩者之含量 (Xie *et al.*, 2009)。

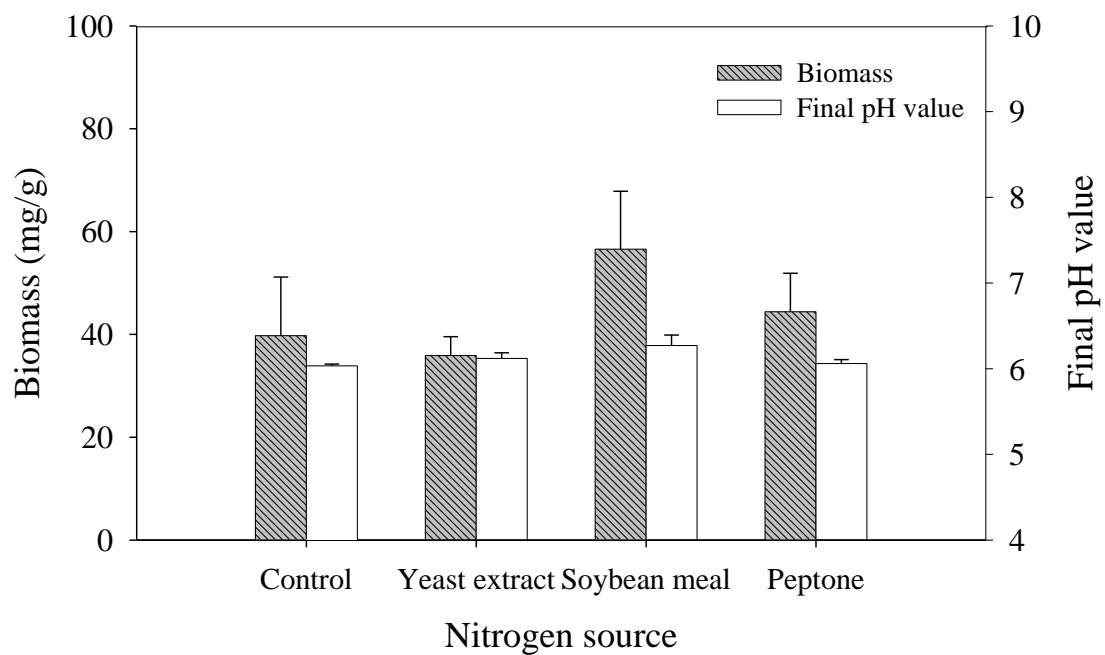
#### (六) 碳源

研究指出在培養菇類時經常會添加澱粉、蔗糖、麥芽糖、葡萄糖及半乳糖等碳源促進其生長 (Bae *et al.*, 2001; Bae *et al.*, 2000)。由圖八結果可知，北蟲草紫米固態培養以添加葡萄糖為碳源，可得最高生物質為 47.15 mg/g (表二) 但與其他碳源及控制組皆無顯著差異，顯示紫米中所提供之碳源已足夠，不需要額外添加其他碳源。

#### (七) 無機鹽種類

無機鹽類與菇類的生長代謝有相關，為構成菌類細胞及酵素之組成成分、可維持酵素之作用及調節新陳代謝等，因此培養期間會另添加無機鹽類以促進菌體生長 (李, 2001)。亦有學者指出鈣、鎂、鉀及微量的銅與鋅等金屬離子可刺激菌絲生長 (Jonathan and Fasidi, 2001)。由圖九結果可知，添加  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  於北蟲草紫米固態培養中，可顯著增加其生物質含量 (61.90 mg/g) (表二)，汪等 (1999) 指出培養基中加添加鎂有利於菌絲生長，與本實驗結果類似；另有研究指出利用靜置式液態培養來培養北蟲草菌絲體時，若添加  $KH_2PO_4$  及  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  等可增加蟲草素的產量 (Kang *et al.*, 2014)。而添加  $KH_2PO_4$  及  $K_2HPO_4$  雖生物質含量有增加但與控制組並無顯著差異。

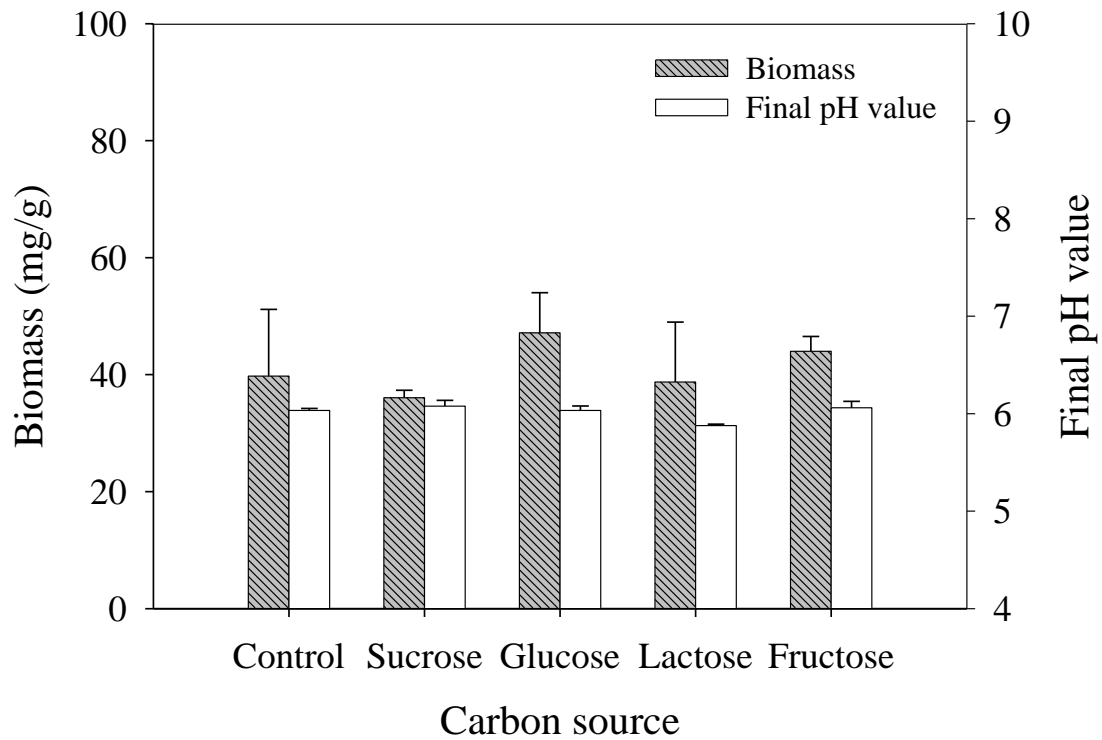
綜合上述結果，北蟲草紫米固態培養之較適條件為 60% 水添加量、4 mL 接菌量、添加黃豆粉作為氮源、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  為作無機鹽，在 25 °C 下培養 15 天。



圖七、不同氮源添加對北蟲草紫米生物質和最終 pH 值之影響

Figure 7. Effects of various nitrogen sources on biomass and final pH value of *Cordyceps militaris* fermented black rice.

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

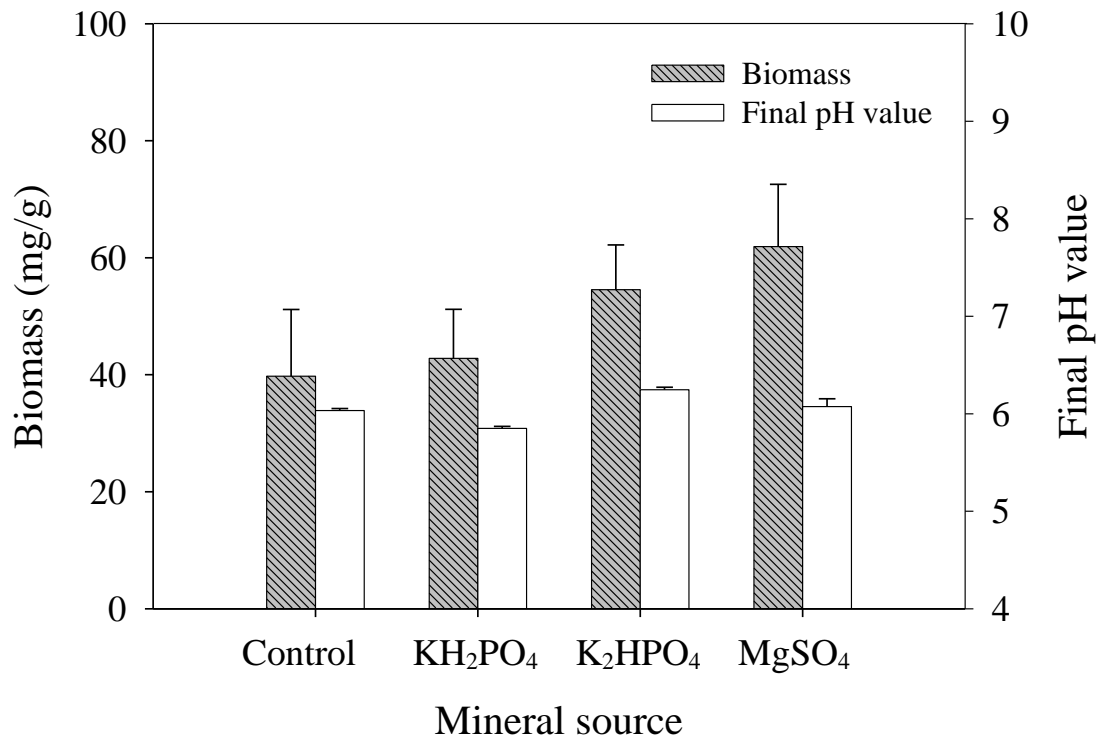


圖八、不同碳源添加對北蟲草紫米生物質和最終 pH 值之影響

Figure 8. Effects of various carbon sources on biomass and final pH value

*Cordyceps militaris* fermented black rice.

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).



圖九、不同無機鹽添加對北蟲草紫米生物質和最終 pH 值之影響  
 Figure 9. Effects of various mineral on biomass and final pH value of *Cordyceps militaris* fermented black rice.

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

## 二、 一般成分分析

### (一) 水分

北蟲草紫米、紫米、北蟲草菌絲體及子實體之水分含量分別為 5.43、10.83、5.93 及 6.90% (表三)。一般而言菇類風乾後之水分含量為 5-20% (Breene, 1990)，而經過凍乾後之菇類菌絲體其水分含量之範圍為 2.2-10.3% (張, 2002; 蔡, 2002)。影響菇類水分含量之主因為培養及儲存環境之溫度及溼度，另不同來源之菌種及發酵條件亦會影響菌絲體之水分含量 (黃, 2000)。

### (二) 碳水化合物

碳水化合物為菇類之主要成分之一，約佔 40-70% (香川, 2004)，北蟲草菌絲體及子實體之碳水化合物含量為 53.30 及 51.62% (表三)，顯著低於北蟲草紫米 (79.05%) 及紫米 (75.09%)。

### (三) 粗灰分

粗灰分為經 500°C 燃燒灰化後之殘留物，多為金屬離子或維生素等無機物之成分。一般菇類灰分含量約 5-16%，以磷、鉀為主，並含有維生素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、菸鹼酸等 (水野和川合, 1997)。由表三可知北蟲草子實體粗灰分含量最高為 5.89%，依序為菌絲體 (2.91%)、北蟲草紫米 (1.94%) 及紫米 (1.61%)，亦有研究指出北蟲草子實體及菌絲體之含量為 5.94% 及 3.15% (Huang *et al.*, 2006)，與本研究分析結果相近。

### (四) 粗脂質

難溶於水但可溶於氯仿及乙醚等有機溶劑之化合物或衍生物稱為脂質 (左, 2004)，其中包含游離脂肪酸、單、雙與三酸甘油酯、磷脂類及固醇類等 (李及賴, 1990)。一般菇類之總脂質含量約為乾重之 1.1-8.3% (Crisan and Sands, 1978)，由表三可知北蟲草菌絲體粗脂質含量最高為 8.46%，依序為子實體 (3.96%)、北蟲草紫米 (3.91%) 及紫米 (3.52%)，

表三、北蟲草子實體、菌絲體、紫米及北蟲草紫米之一般成分

Table 3. Proximate composition of *Cordyceps militaris* fruiting body, mycelia, black rice and *Cordyceps militaris* fermented black rice.

Component	Content <sup>a</sup> (%)			
	CB <sup>b</sup>	Black rice	Mycelia	Fruiting body
Moisture	5.43 ± 0.13D <sup>c</sup>	10.83 ± 0.13A	5.93 ± 0.05C	6.90 ± 0.12B
Dry matter	94.57 ± 0.13A	89.17 ± 0.13D	94.07 ± 0.05B	93.10 ± 0.12C
Carbohydrate	79.05 ± 0.10A	75.09 ± 0.40B	53.30 ± 1.08C	51.62 ± 0.36D
Crude ash	1.94 ± 0.01C	1.61 ± 0.01D	2.91 ± 0.01B	5.89 ± 0.02A
Crude fat	3.91 ± 0.02B	3.52 ± 0.16B	8.46 ± 0.84A	3.96 ± 0.11B
Crude protein	9.67 ± 0.07C	9.14 ± 0.03D	20.46 ± 0.02B	22.11 ± 0.12A

<sup>a</sup> Moisture and dry matter were presented on air-dried weight basis, other were presented on dry weight basis.

<sup>b</sup> CB, *Cordyceps militaris* fermented black rice.

<sup>c</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n = 3). Means with different letters within a row are significantly different ( $p < 0.05$ ).

然而這三者並無顯著差異。研究指出北蟲草及冬蟲夏草之粗脂質含量約為 2.93-9.09% (張等, 1996; 蕭, 1997), 與本實驗相符。

### (五) 粗蛋白

菇類粗蛋白質含量之分析主要是利用凱氏法 (Kjeldahl method), 得其含氮量後再藉由氮轉換係數 (N conversion factor) 換算出粗蛋白質含量; 然而因菇類消化率較低且細胞壁之組成分為 N-acetyl-glucosamine 聚合物, 此非蛋白態氮會被計入其中而提高菇類的含氮量, 故含氮係數以 4.38

(Crisan and Sands, 1978) 進行粗蛋白含量之計算。由表三可知北蟲草子實體粗蛋白含量最高為 22.11%, 依序為北蟲草菌絲體 (20.46%) > 北蟲草紫米 (9.67%) > 紫米 (9.14%)。一般食用菇之蛋白質含量為 15.4-26.7% (Yang *et al.*, 2001), 藥用菇為 4.2-7.92% (Mau *et al.*, 2001), 亦有研究指出蛹蟲草、冬蟲夏草子實體粗蛋白含量為 25.73-30.40% (張等, 1996; 蕭, 1997), 菌絲體為 14.8-29.12% (Chang *et al.*, 2001), 與本研究分析結果相近。

## 三、生理活性物質分析

### (一) 腺苷 (Adenosine)

腺苷是核苷的一種, 為蟲草屬中廣泛存在的一種成分, 具有調節腦部缺血所造成的損傷 (Gomes *et al.*, 2011)、調節血管擴張和刺激末梢神經 (Tabrizchi and Bedi, 2001)、預防癲癇發作 (Regina Vinad'e *et al.*, 2003) 及抗憂鬱 (Carlezon *et al.*, 2005) 等功效。

由表四結果可知北蟲草菌絲體中含有較高之腺苷含量 (4.14 mg/g), 依序為子實體 (1.79 mg/g)、北蟲草紫米 (0.14 mg/g), 而紫米中並未檢出。若與其他藥用真菌固態培養產品相比, 腺苷含量順序為白樺茸 (34.43 mg/g) (葉, 2009) > 蟬花米 (1.83 mg/g) (紀, 2014) > 桑黃米 (0.25 mg/g) (徐, 2008) > 樟芝米 (0.18 mg/g) (吳, 2006) > 北蟲草紫米 (0.14 mg/g) > 蟲草米 (0.04 mg/g) (郭, 2005), 北蟲草紫米之腺苷含量高於蟲草米。



表四、北蟲草子實體、菌絲體、紫米及北蟲草紫米之腺苷、蟲草素、甘露糖醇、多醣、花青素及類黃酮含量

Table 4. Contents of adenosine, cordycepin, mannitol, polysaccharide, anthocyanins and flavonoid in *Cordyceps militaris* fruiting body, mycelia, black rice and *Cordyceps militaris* fermented black rice

	Content <sup>a</sup> (mg/g)			
	CB <sup>b</sup>	Black rice	Mycelia	Fruiting body
Adenosine	0.14 ± 0.02C	nd <sup>c</sup>	4.14 ± 0.20A	1.79 ± 0.20B
Cordycepin	0.08 ± 0.01C	nd	0.36 ± 0.01B	6.71 ± 0.25A
Mannitol	3.45 ± 0.33C	nd	8.64 ± 0.17B	13.64 ± 0.28A
Polysaccharide	54.40 ± 9.58B	30.68 ± 1.46C	47.97 ± 2.58B	81.81 ± 2.40A
Anthocyanins	nd	1.50 ± 0.05C	nd	nd
Total flavonoid	0.75 ± 0.11B	1.67 ± 0.14A	0.61 ± 0.05B	1.44 ± 0.13A

<sup>a</sup> Each value is expressed as mean ± SD (n = 3). Means with different letters within a row are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>b</sup> CB, *Cordyceps militaris* fermented black rice.

<sup>c</sup> Not detected.

## (二) 蟲草素 (Cordycepin)

蟲草素為蟲草屬中特有之功效成分，具抗發炎 (Kim *et al.*, 2006)、抑制血小板聚集 (Cho *et al.*, 2007)、降血脂 (Guo *et al.*, 2010)、抑制腫瘤細胞生長 (Baik *et al.*, 2012) 及改善酒精性肝毒性 (Cha *et al.*, 2013) 等功效。

由表四結果可知北蟲草子實體含有之蟲草素含量最高為 6.71 mg/g，依序為菌絲體 (0.36 mg/g)、北蟲草紫米 (0.04 mg/g)，而紫米中並未檢出。若與其他藥用真菌固態培養產品相比，蟲草素含量順序為北蟲草紫米 (0.04 mg/g) > 蟲草米 (0.005 mg/g) (郭，2005)，北蟲草紫米之蟲草素含量高於蟲草米。

## (三) 甘露糖醇 (Mannitol)

甘露糖醇又稱蟲草酸及 D-甘露醇，為菇類中的重要成分之一，具有清除自由基、利尿、降低眼球內壓和顱腔內壓、提高血漿滲透壓、治療腦水腫、青光眼、及燒傷或休克等引發的急性腎功能損傷等作用，亦可作為食品添加劑 (詹，2004)。

由表四結果可知北蟲草子實體之甘露糖醇含量最高為 13.64 mg/g，依序為菌絲體 (8.64 mg/g)、北蟲草紫米 (3.45 mg/g)，而紫米中並未檢出。與其他藥用真菌固態發酵後產品相比，甘露糖醇含量順序為舞菇小麥 (64.50 mg/g) (林，2008) > 白樺茸胚芽米 (11.99 mg/g) (葉，2009) > 桑黃米 (4.98 mg/g) (徐，2008) > 北蟲草紫米 (3.45 mg/g) > 蟲草米 (0.69 mg/g) (郭，2005) > 蟬花米 (0.12 mg/g) (紀，2014)。

## (四) 多醣 (Polysaccharide)

多醣是生命有機體重要組成分，由單醣聚集而成的高分子化合物。大多數真菌多醣具有提高免疫力、抗腫瘤、抗病毒等生理活性 (翁，2010)，研究指出北蟲草多醣具抗老化與抗氧化 (Li *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012)、抗腫瘤 (Kim *et al.*, 2010; Lee and Hong, 2011)、抗病毒 (Ohta *et al.*, 2007) 及增強免疫 (Wang *et al.*, 2012) 等功效。

由表四結果可知北蟲草子實體中含有較高之多醣含量 (81.81 mg/g)，其次為北蟲草紫米 (54.4 mg/g)、菌絲體 (47.97 mg/g) 與紫米 (30.68 mg/g)。若與其他藥用真菌固態培養產品相比，多醣含量順序為北蟲草紫米 (54.4 mg/g) > 白樺茸胚芽米 (40.61 mg/g) (葉, 2009) > 舞菇小麥 (18.04 mg/g) (林, 2008) > 蟬花米 (4.31 mg/g) (紀, 2014) > 桑黃米 (3.65 mg/g) (徐, 2008) > 樟芝米 (1.42 mg/g) (吳, 2006)。

#### (五) 花青素 (Anthocyanins)

花青素為植物之二次代謝物，也是天然的抗氧化劑 (Kong et al., 2003)，具抗發炎、心血管疾病、治療非酒精性脂肪肝、抑制脂質代謝及改善胰島素阻抗、預防高血糖與高血脂症等生理活性 (Belkebir and Benhassaine-Kesri, 2013; Huang et al., 2014; Jayaprakasam et al., 2006; Tsuda et al., 2003; Valenti et al., 2013; Wallace, 2011)。由表四結果顯示紫米中含花青素 1.5 mg/g，而其餘樣品並無檢出。

#### (六) 黃酮類 (Flavonoid)

黃酮類為多酚類植物色素，為植物之二次代謝產物，廣泛存在於水果及蔬菜等食用植物中，目前研究指出黃酮類具抗癌 (Prasad et al., 2010)、預防心血管疾病 (Hodgson, 2008; Peterson et al., 2012)、抗微生物 (Kliebenstein, 2004) 及抑制 ROS 產生 (Agati et al., 2013; Stolarzewicz et al., 2013) 等生理活性。由表四結果顯示在紫米中含有較高之黃酮類含量 (1.67 mg/g)，其次為北蟲草子實體 (1.44 mg/g)、北蟲草紫米 (0.75 mg/g) 與菌絲體 (0.61 mg/g)，亦有研究指出北蟲草菌絲體經  $\gamma$ -射線照射後，其乙醇萃取物之黃酮類含量為 0.88 mg/g (林, 2014)。

#### 四、 3T3-L1 前脂肪細胞之體外實驗模式

##### (一) 3T3-L1 前脂肪細胞存活率測定

1. 北蟲草子實體冷水萃取物 (CMFW) 對 3T3-L1 前脂肪細胞存活率之影響

以濃度 0-250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CMFW 處理 3T3-L1 前脂肪細胞，並培養 24、48 及 72 小時，最後以 MTT assay 測定細胞存活率。結果如圖 10 A 顯示 CMFW 在最高濃度 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，3T3-L1 前脂肪細胞存活率仍大於 80%，得知在此濃度下對 3T3-L1 前脂肪細胞不具毒性，故後續實驗選擇 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下 (含) 進行處理。

2. 北蟲草菌絲體冷水萃取物 (CMMW) 對 3T3-L1 前脂肪細胞存活率之影響

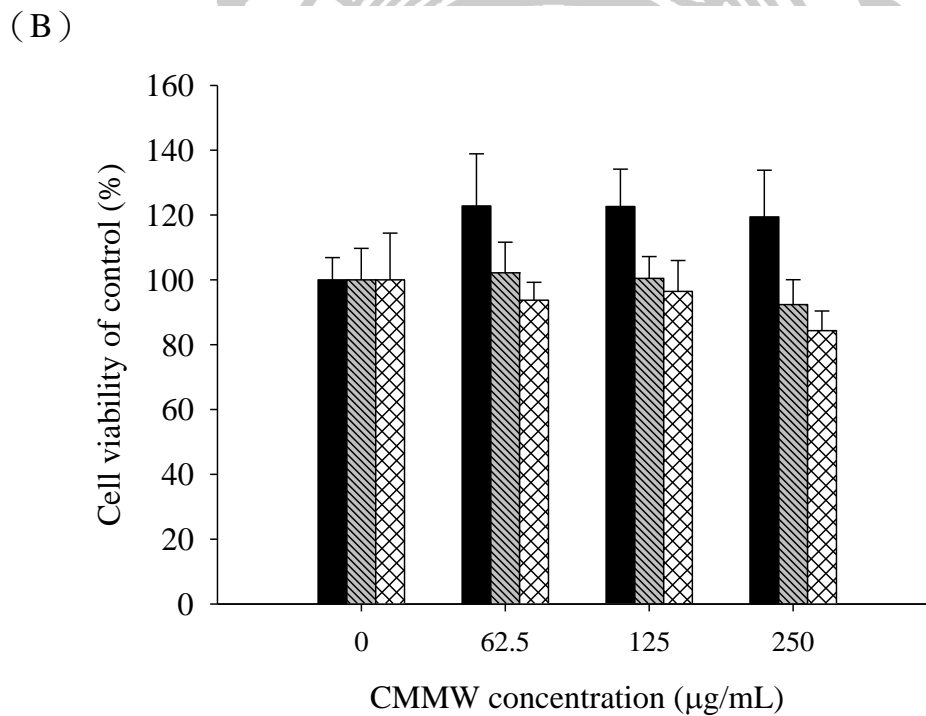
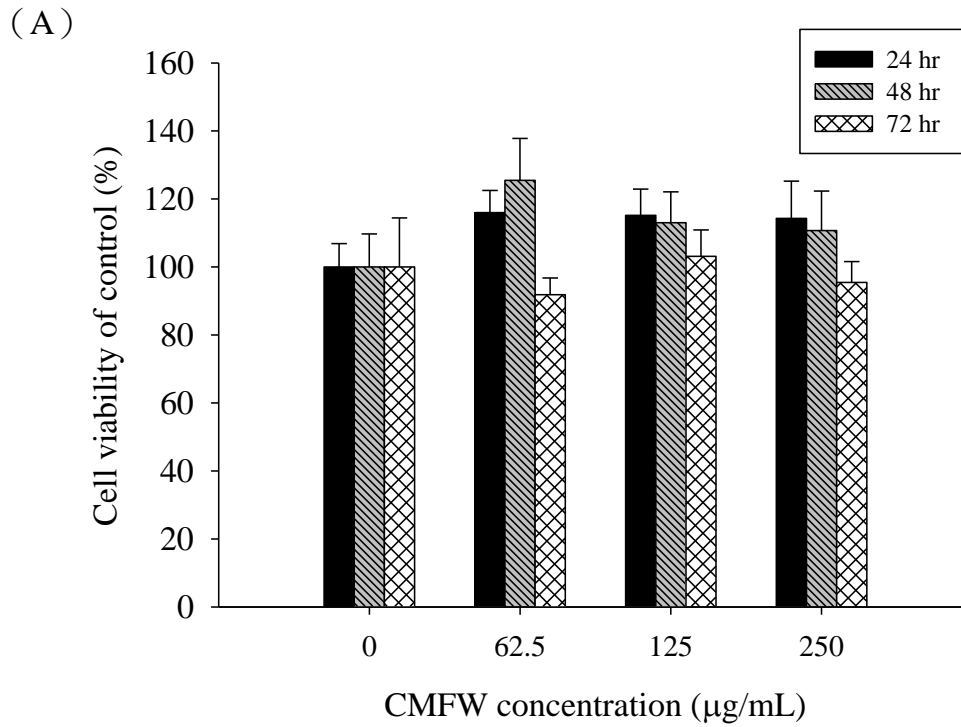
以濃度 0-250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CMMW 處理 3T3-L1 前脂肪細胞，測定其細胞存活率。結果如圖 10 B 顯示 CMMW 在最高濃度 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時細胞存活率仍大於 80%，得知在此濃度下對 3T3-L1 前脂肪細胞不具毒性，故後續實驗選擇 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下 (含) 進行處理。

3. 紫米冷水 (BRW) 與乙醇萃取物 (BRE) 對 3T3-L1 前脂肪細胞存活率之影響

以濃度 0-250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BRW 與 BRE 處理 3T3-L1 前脂肪細胞，測定其細胞存活率，結果顯示 BRW (圖 11 A) 與 BRE (圖 11 B) 在最高濃度 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下細胞存活率皆大於 80%，得知兩者在此濃度下對 3T3-L1 前脂肪細胞皆不具毒性，故後續實驗皆選擇 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下 (含) 進行處理。

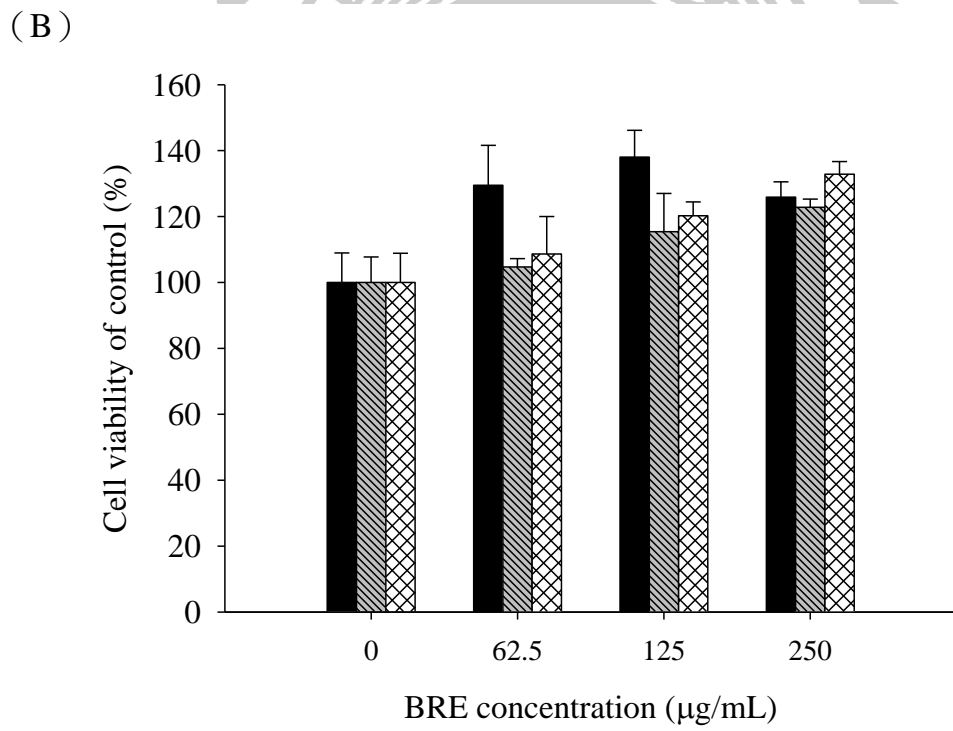
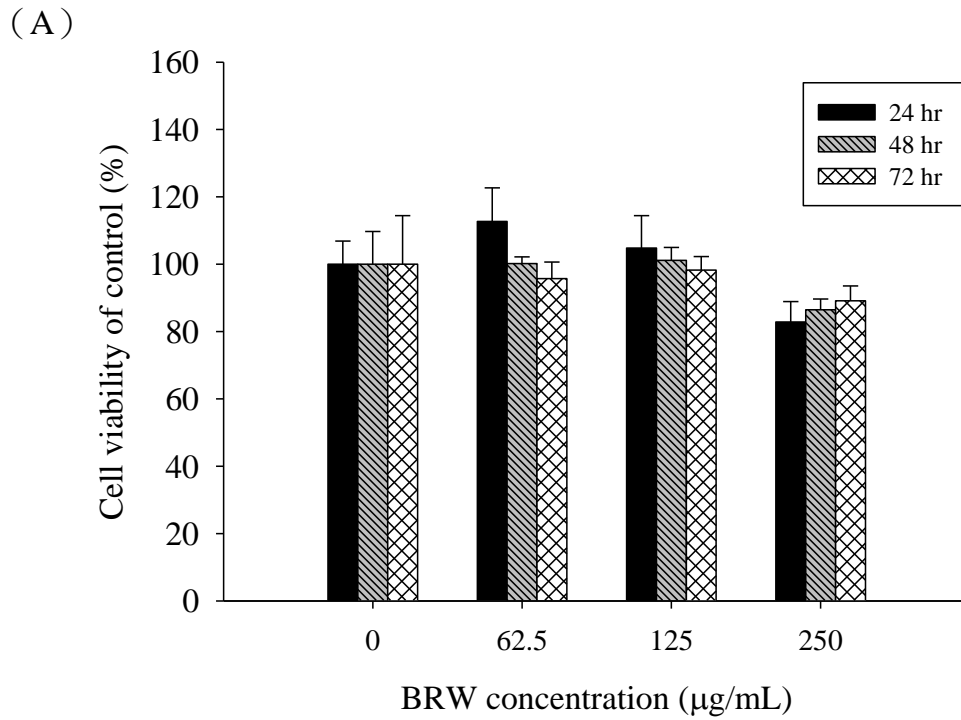
4. 北蟲草紫米冷水 (CBW) 與乙醇萃取物 (CBE) 對 3T3-L1 前脂肪細胞存活率之影響

以濃度 0-250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CBW 與 CBE 處理 3T3-L1 前脂肪細胞，測定其細胞存活率。結果顯示 CBW (圖 12 A) 與 CBE (圖 12 B) 在最高濃度 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下細胞存活率皆大於 80%，得知兩者在此濃度下對 3T3-L1 前脂肪細胞皆不具毒性，故後續實驗皆選擇 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下 (含) 進行處理。



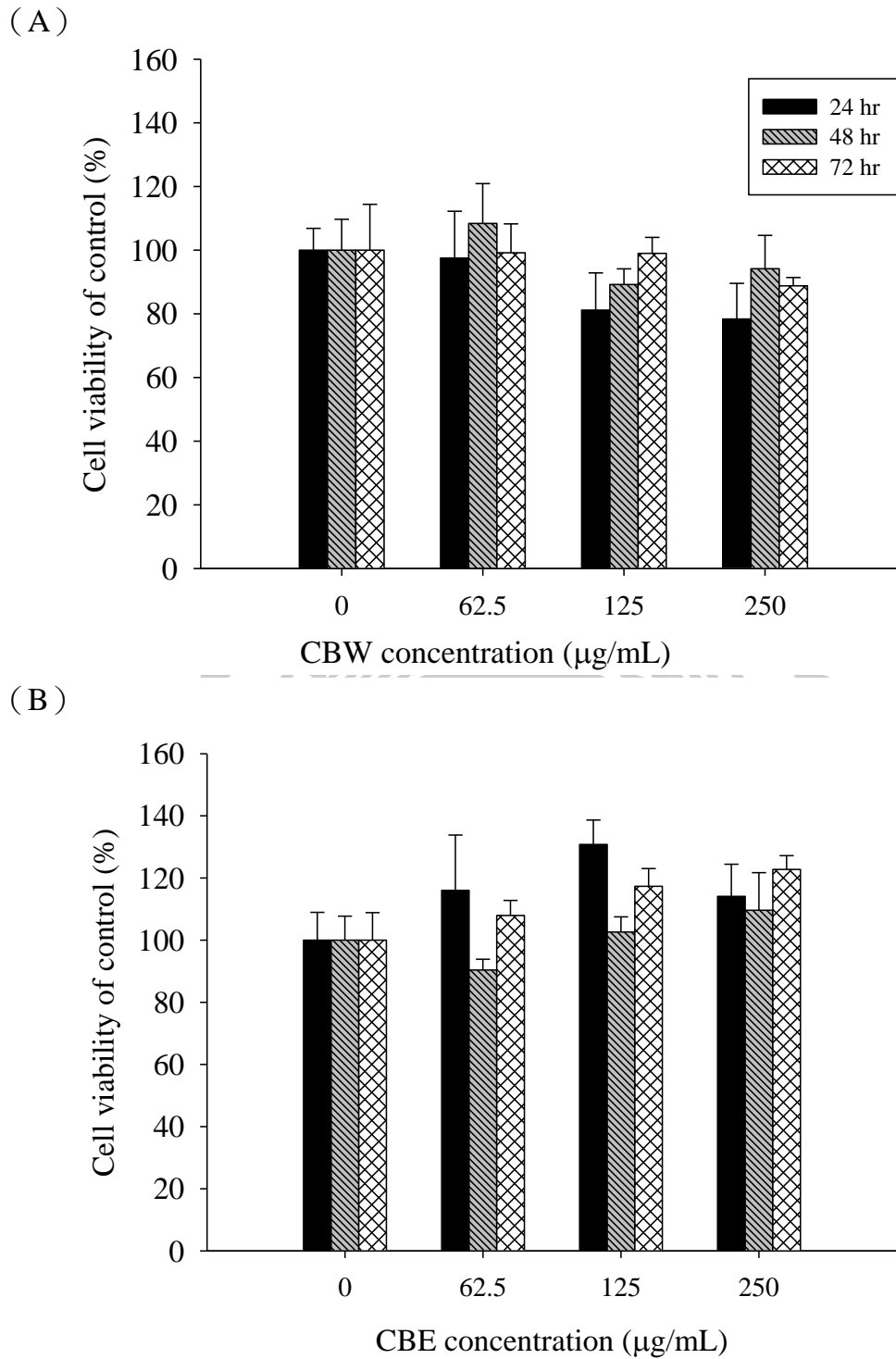
圖十、(A) 北蟲草子實體冷水萃取物與 (B) 北蟲草菌絲體冷水萃取物對 3T3-L1 前脂肪細胞存活率之影響

Figure 10. Cytotoxic effects of (A) CMFW and (B) CMMW in 3T3-L1 preadipocytes. Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3) .



圖十一、(A) 紫米冷水萃取物與 (B) 紫米乙醇萃取物對 3T3-L1 前脂肪細胞存活率之影響

Figure 11. Cytotoxic effects of (A) BRW and (B) BRE in 3T3-L1 preadipocytes. Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3) .



圖十二、(A) 北蟲草紫米冷水萃取物與 (B) 北蟲草紫米乙醇萃取物對 3T3-L1 前脂肪細胞存活率之影響

Figure 12. Cytotoxic effects of (A) CBW and (B) CBE in 3T3-L1 preadipocytes. Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3) .

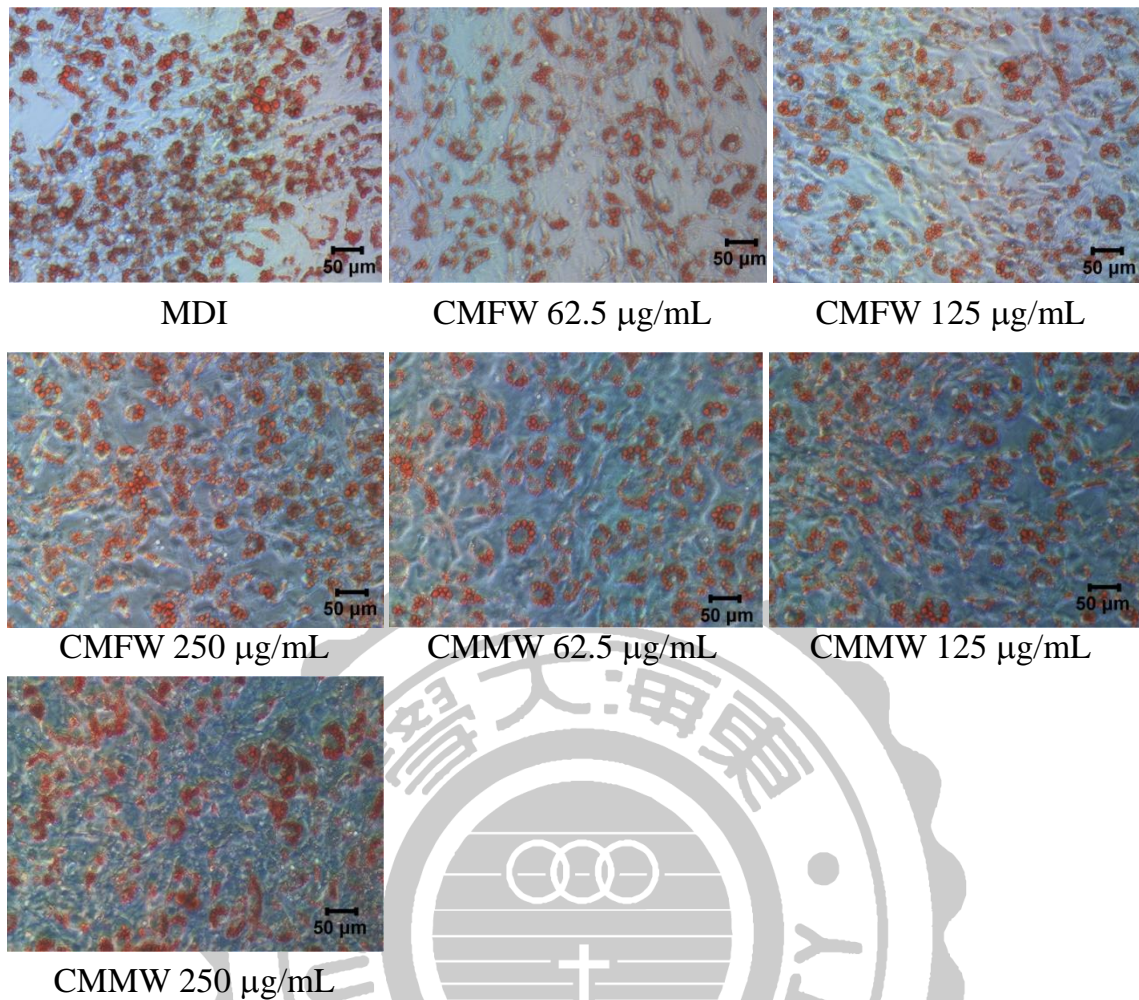
## (二) 北蟲草子實體與菌絲體冷水萃取物及紫米和北蟲草紫米冷水與乙醇萃取物對 3T3-L1 前脂肪細胞分化與油滴堆積之影響

3T3-L1 前脂肪細胞在給予分化液誘導其分化後，利用油紅染劑結合脂肪細胞內之油滴將其染成紅色後，觀察細胞分化狀況與油滴堆積之情形。以不同濃度之 CMFW、CMMW、BRW、BRE、CBW 及 CBE 處理 3T3-L1 前脂肪細胞，在分化第九天後進行油紅染色，於顯微鏡下觀察其細胞狀態與油滴分佈情形，再以異丙醇 (isopropanol) 將油紅染劑溶解後測定 OD<sub>515</sub>。

圖十三為經 CMFW 與 CMMW 處理後利用顯微鏡觀察下之情況，發現其油滴之數量與分佈範圍與 MDI 組相比有減少的趨勢，量化結果發現 CMFW 在濃度 62.5-250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下皆有抑制效果，而 62.5 與 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抑制效果最好(圖十四); CMMW 在濃度 62.5-250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下皆具抑制效果(圖十四)。Shimada 等人(2008)研究指出，以北蟲草菌絲體水萃取物在 0.05-0.2% 濃度下處理 3T3-L1 前脂肪細胞後進行油紅試驗，結果發現無論是利用顯微鏡觀察或是量化後之數據皆顯示其具抑制油滴堆積之效果，與本實驗結果相符。圖十五為經 BRW 與 BRE 處理後利用顯微鏡觀察下之情況，亦發現其油滴之數量與分佈範圍與 MDI 組相比有減少的趨勢，量化後發現 BRW 在濃度 62.5-250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下皆有抑制效果，而 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抑制效果最好(圖十六); BRE 在濃度 62.5-125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下有相同抑制效果，而 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  無抑制效果(圖十六)。圖十七為經 CBW 與 CBE 處理後利用顯微鏡觀察下之情況，同樣發現其油滴之數量與分佈範圍與 MDI 組相比有減少的趨勢，量化結果顯示 CBW 在濃度 62.5-250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下皆有抑制效果，而 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抑制效果最好(圖十八); CBE 在濃度 62.5-250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下皆有抑制效果，而 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抑制效果最好(圖十八)。

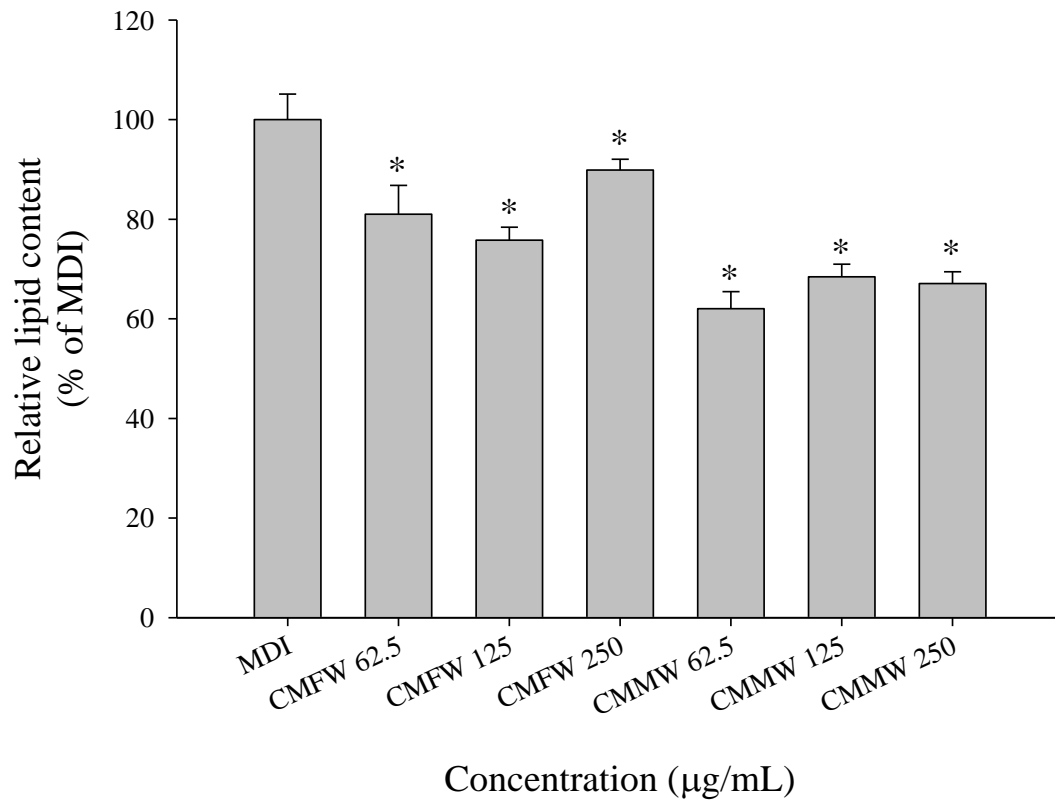
綜合以上結果得知北蟲草子實體冷水萃取物、北蟲草菌絲體冷水萃取物、紫米冷水與乙醇萃取物及北蟲草紫米冷水與乙醇萃取物皆具抑制前脂肪細胞分化及油滴堆積之效果。





圖十三、以北蟲草子實體與菌絲體冷水萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞，於分化後第九天進行油紅染色觀察油滴堆積情形

Figure 13. Effects of CMFW and CMMW on lipid accumulation during 3T3-L1 preadipocytes differentiation. After 9 days treatment, the levels of lipid accumulation were determined by Oil red O staining.

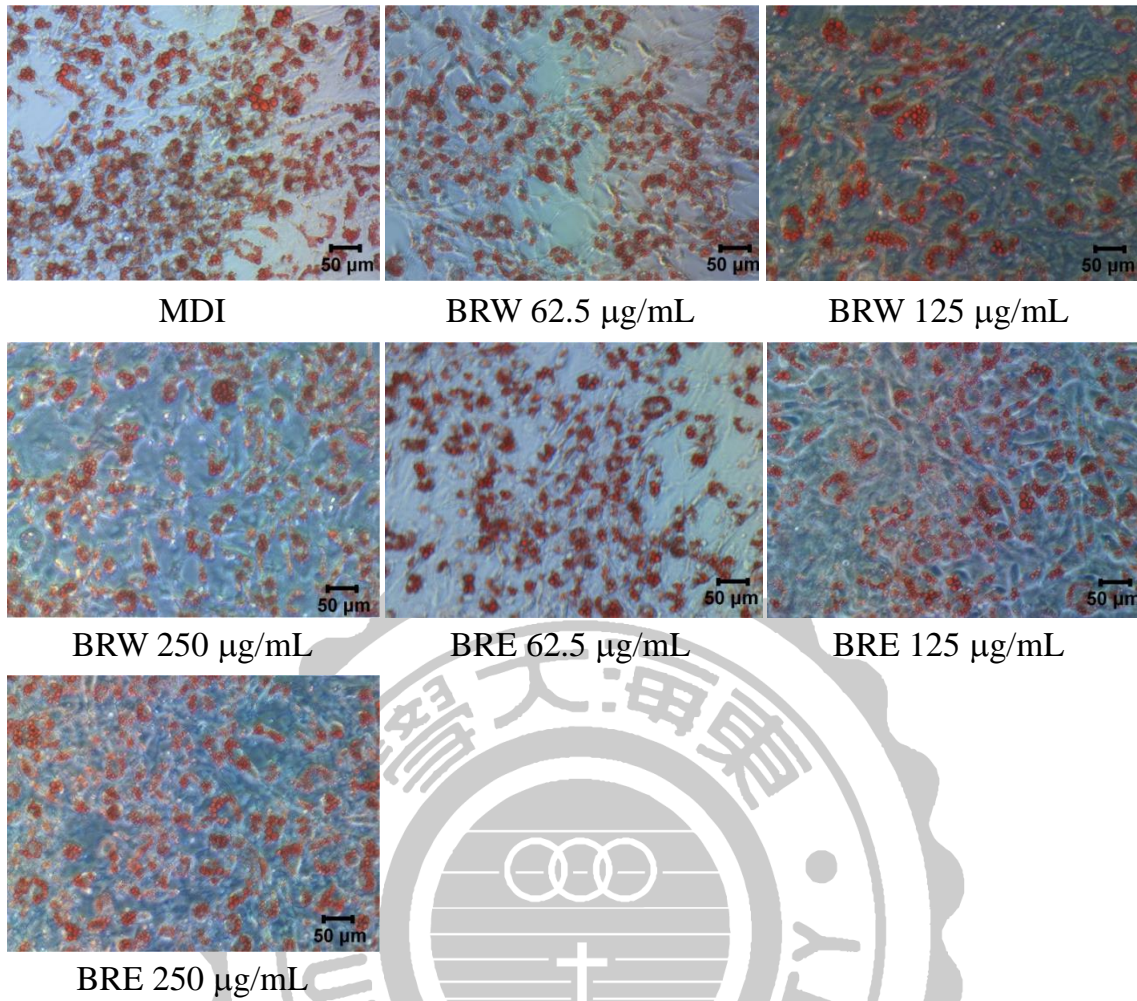


圖十四、以北蟲草子實體與菌絲體冷水萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞，於分化後第九天進行油紅染色並量化觀察油滴堆積情形

Figure 14. Effects of CMFW and CMMW on lipid accumulation during 3T3-L1 preadipocytes differentiation. After 9 days treatment, the levels of lipid accumulation were determined by Oil red O staining and quantified by detecting the absorbance of isopropanol-eluted supernatant at 515 nm by ELISA reader.

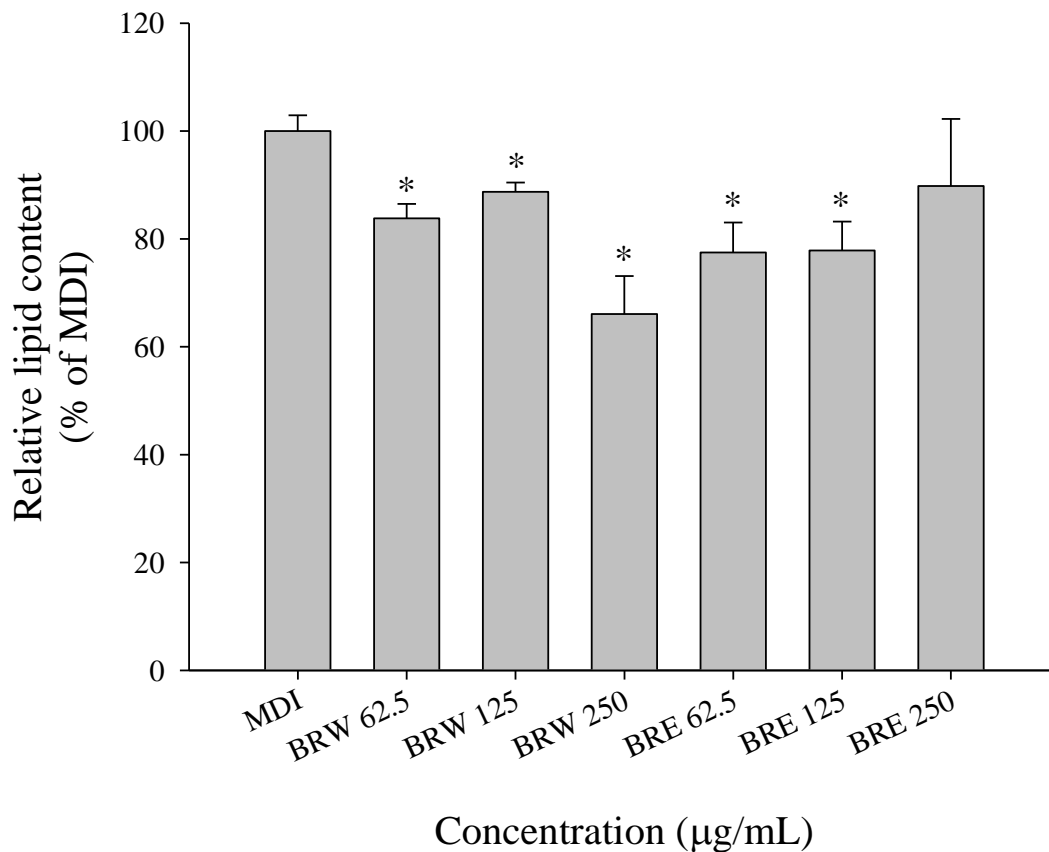
Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3) .

\*  $p < 0.05$ , mean values were significantly different from MDI group.



圖十五、以紫米冷水與乙醇萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞，於分化後第九天進行油紅染色觀察油滴堆積情形

Figure 15. Effects of BRW and BRE on lipid accumulation during 3T3-L1 preadipocytes differentiation. After 9 days treatment, the levels of lipid accumulation were determined by Oil red O staining.

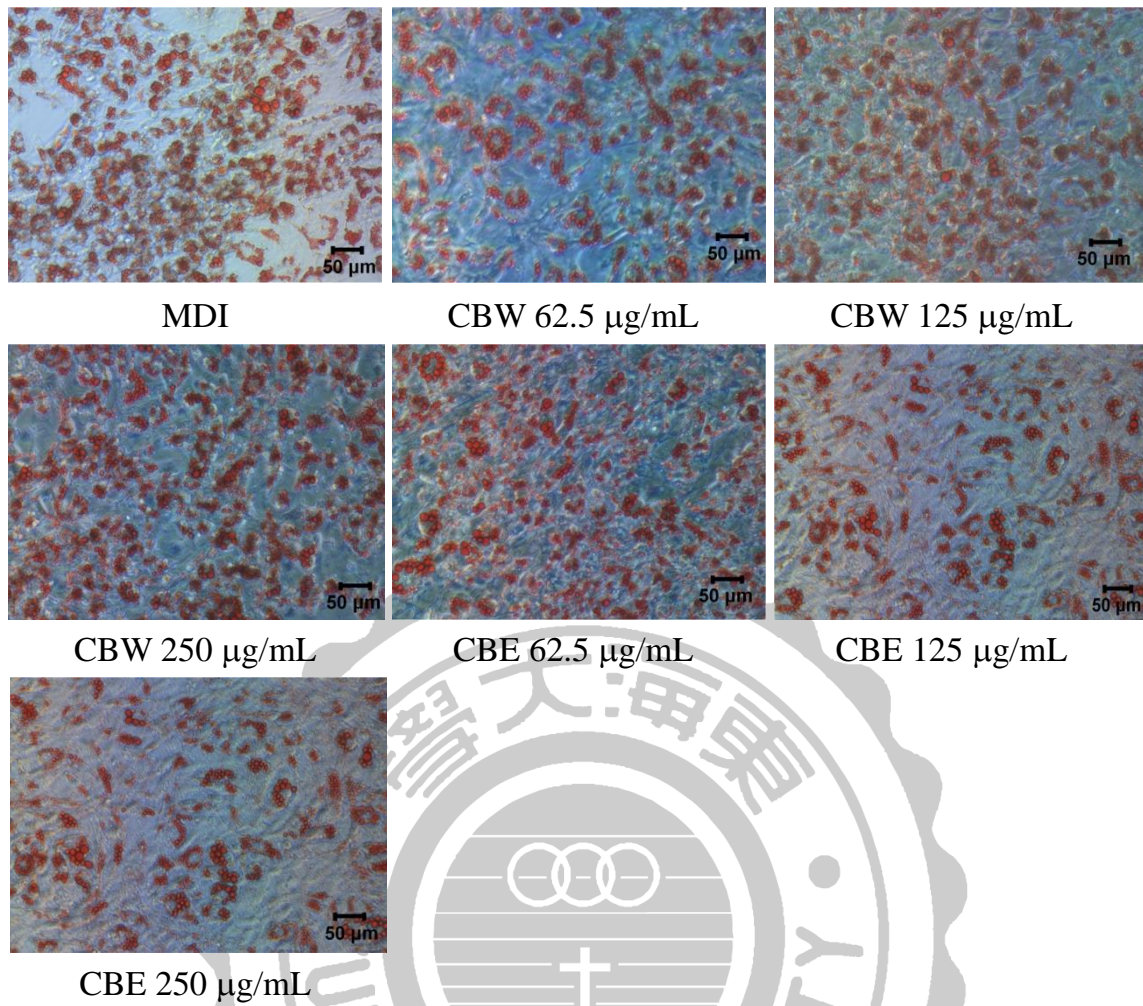


圖十六、以紫米冷水與乙醇萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞，於分化後第九天進行油紅染色並量化觀察油滴堆積情形

Figure 16. Effects of BRW and BRE on lipid accumulation during 3T3-L1 preadipocytes differentiation. After 9 days treatment, the levels of lipid accumulation were determined by Oil red O staining and quantified by detecting the absorbance of isopropanol-eluted supernatant at 515 nm by ELISA reader.

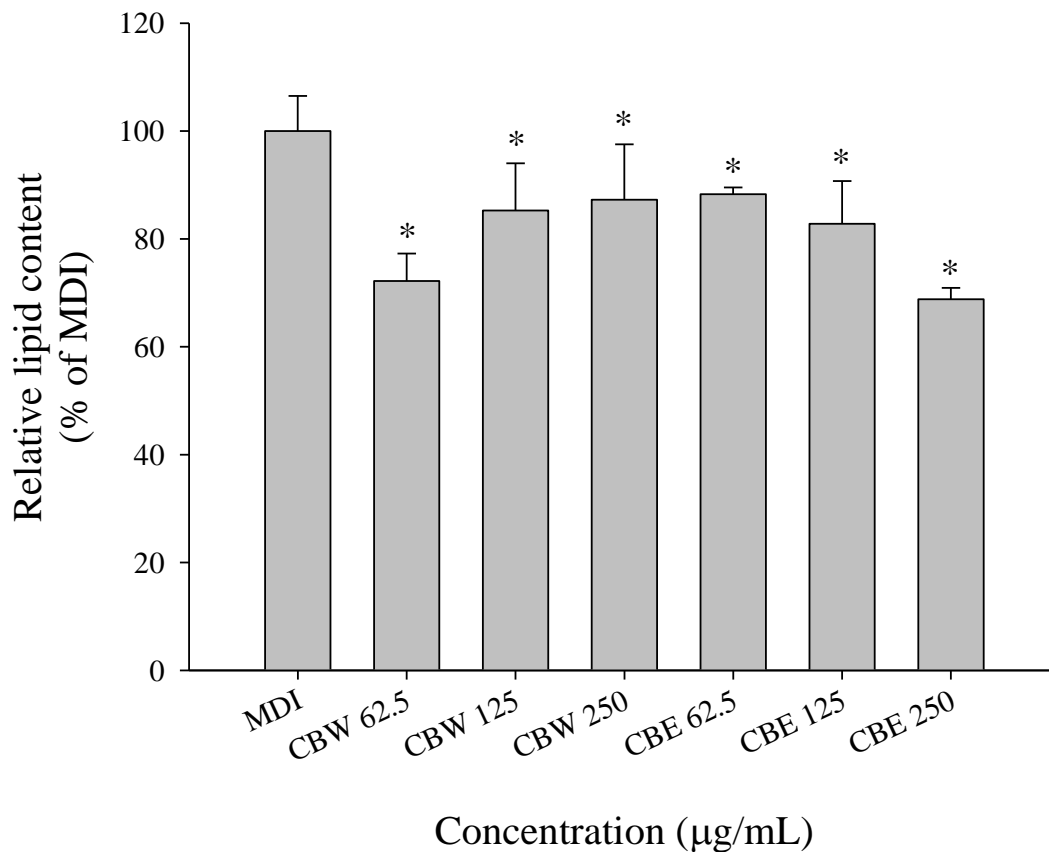
Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3) .

\*  $p < 0.05$ , mean values were significantly different from MDI group.



圖十七、以北蟲草紫米冷水與乙醇萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞，於分化後第九天進行油紅染色觀察油滴堆積情形

Figure 17. Effects of CBW and CBE on lipid accumulation during 3T3-L1 preadipocytes differentiation. After 9 days treatment, the levels of lipid accumulation were determined by Oil red O staining.



圖十八、以北蟲草紫米冷水與乙醇萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞，於分化後第九天進行油紅染色並量化觀察油滴堆積情形

Figure 18. Effects of CBW and CBE on lipid accumulation during 3T3-L1 preadipocytes differentiation. After 9 days treatment, the levels of lipid accumulation were determined by Oil red O staining and quantified by detecting the absorbance of isopropanol-eluted supernatant at 515 nm by ELISA reader.

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3) .

\*  $p < 0.05$ , mean values were significantly different from MDI group.

### (三) 北蟲草子實體與菌絲體冷水萃取物及紫米和北蟲草紫米冷水與乙醇萃取物對 3T3-L1 成熟脂肪細胞脂解效率之影響

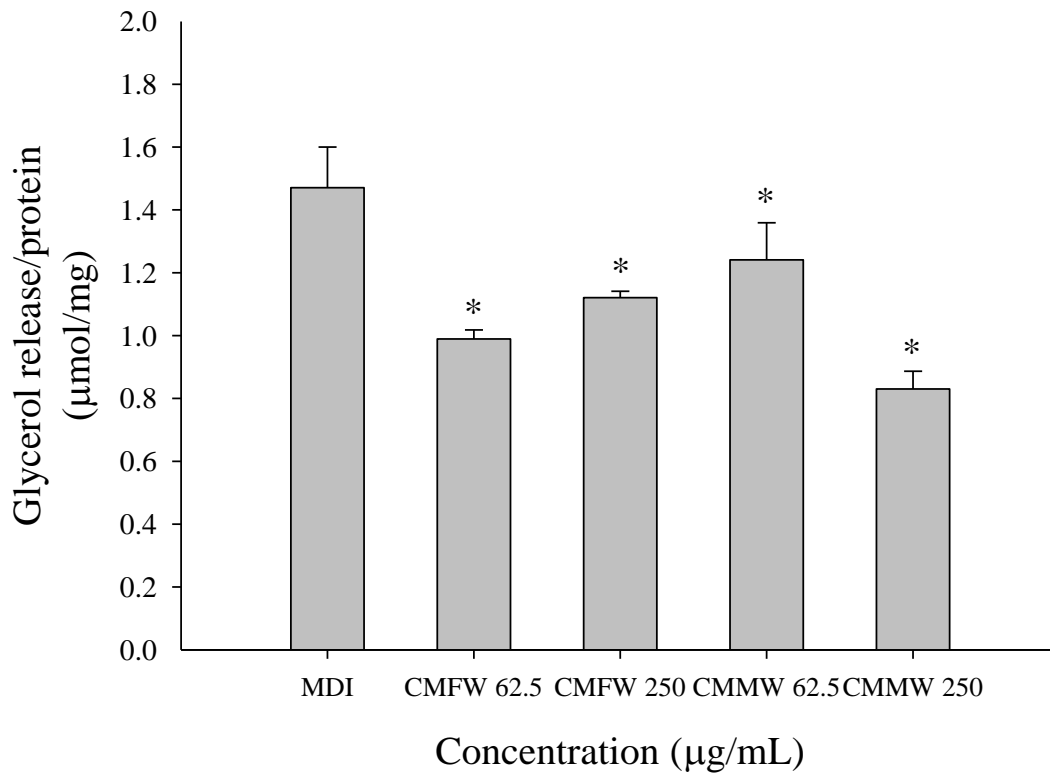
脂解作用為將三酸甘油酯分解代謝成游離脂肪酸及甘油的過程，可藉由測量甘油釋放至培養液中的濃度來判斷脂肪細胞之脂解效率。以樣品處理細胞並於分化後第九天進行脂解活性之測定。

結果指出以 CMFW 與 CMMW 處理後甘油濃度並無增加 (圖十九)，顯示北蟲草子實體與菌絲體並無促進脂解活性之效果，對照油紅染色之結果 (圖十四) 後，發現經 CMFW 與 CMMW 處理後會顯著減少脂肪細胞中三酸甘油酯的堆積，推測 CMFW 對於 3T3-L1 前脂肪細胞分化為成熟脂肪細胞之過程有抑制作用，但對成熟脂肪細胞之脂解能力無影響。

以 BRW 與 BRE 處理成熟脂肪細胞後發現經 BRW 的甘油濃度並無增加，但 BRE 在濃度 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下增加了 21.77% (圖二十)，顯示 BRE 具有刺激成熟脂肪細胞脂解作用之功效，但 BRW 並無此效果，但對照油紅染色之結果 (圖十六) 後，發現 BRW 會顯著減少脂肪細胞中三酸甘油酯的堆積，推測 BRW 對分化過程具抑制作用。

以 CBW 與 CBE 處理成熟脂肪細胞後發現經 CBW 的甘油濃度並無增加，但 CBE 在濃度 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下增加了 18.37% 及 17% (圖二十一)，顯示 CBE 具有刺激成熟脂肪細胞脂解作用之功效，但 CBW 並無此效果，但對照油紅染色之結果 (圖十八) 後，發現 CBW 會顯著減少脂肪細胞中三酸甘油酯的堆積，推測 CBW 對分化過程具抑制作用。

綜合以上結果得知紫米及北蟲草紫米乙醇萃取物具刺激成熟脂肪細胞脂解作用之功效。



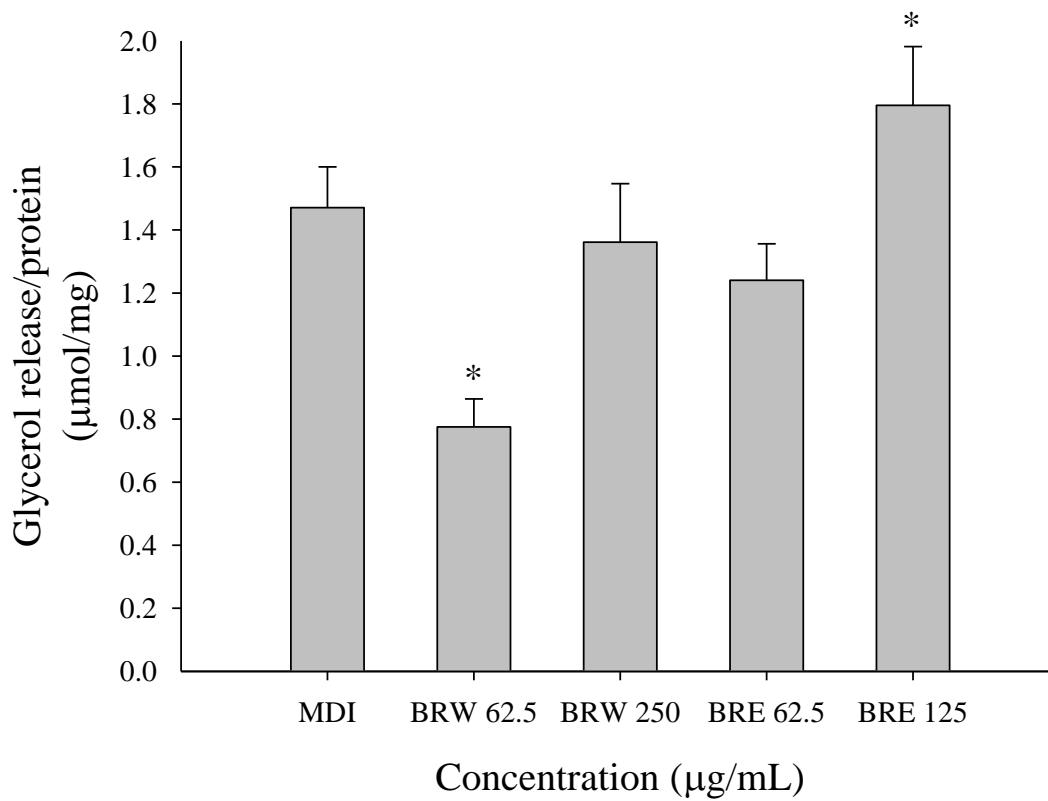
圖十九、以北蟲草子實體與菌絲體冷水萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞，於分化後第九天進行脂解活性之測定

Figure 19. Effects of CMFW and CMMW on lipolysis activity in 3T3-L1 preadipocytes differentiation at 9 days.

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)

\*  $p < 0.05$ , mean values were significantly different from MDI group.



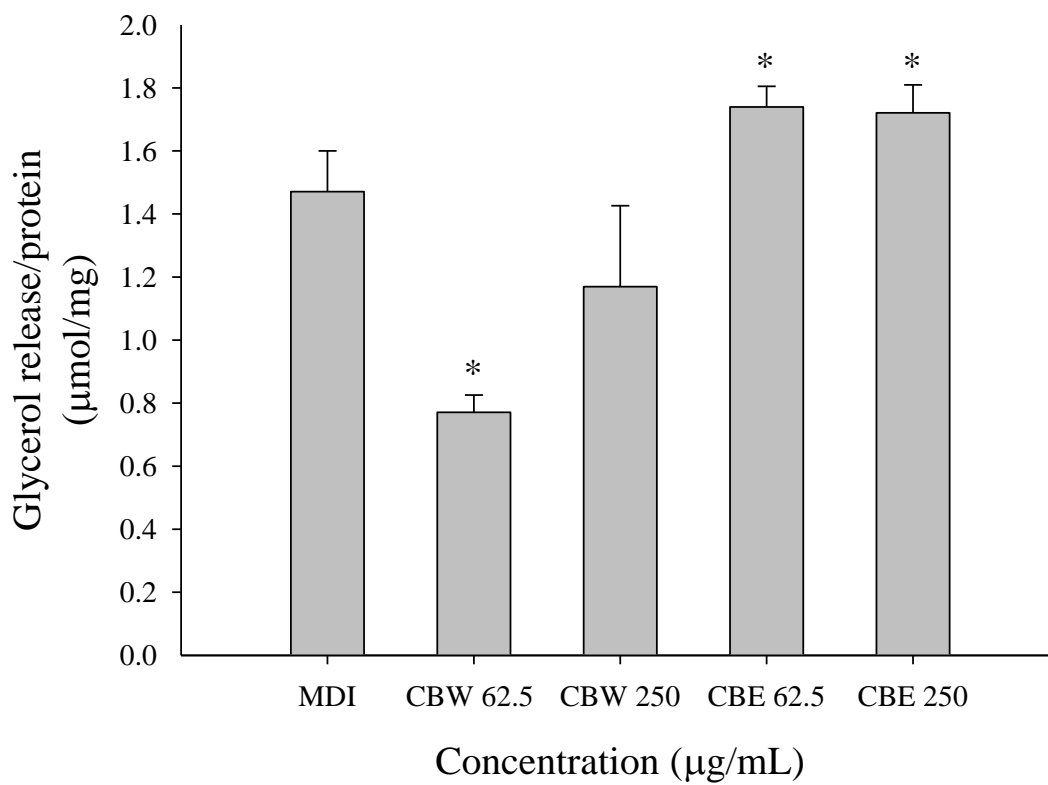


圖二十、以紫米冷水與乙醇萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞，於分化後第九天進行脂解活性之測定

Figure 20. Effects of BRW and BRE on lipolysis activity in 3T3-L1 preadipocytes differentiation at 9 days.

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)

\*  $p < 0.05$ , mean values were significantly different from MDI group.



圖二十一、以北蟲草紫米冷水與乙醇萃取物處理 3T3-L1 前脂肪細胞，於分化後第九天進行脂解活性之測定

Figure 21. Effects of CBW and CBE on lipolysis activity in 3T3-L1 preadipocytes differentiation at 9 days.

Each value is expressed as mean  $\pm$  SD (n=3)

\*  $p < 0.05$ , mean values were significantly different from MDI group.

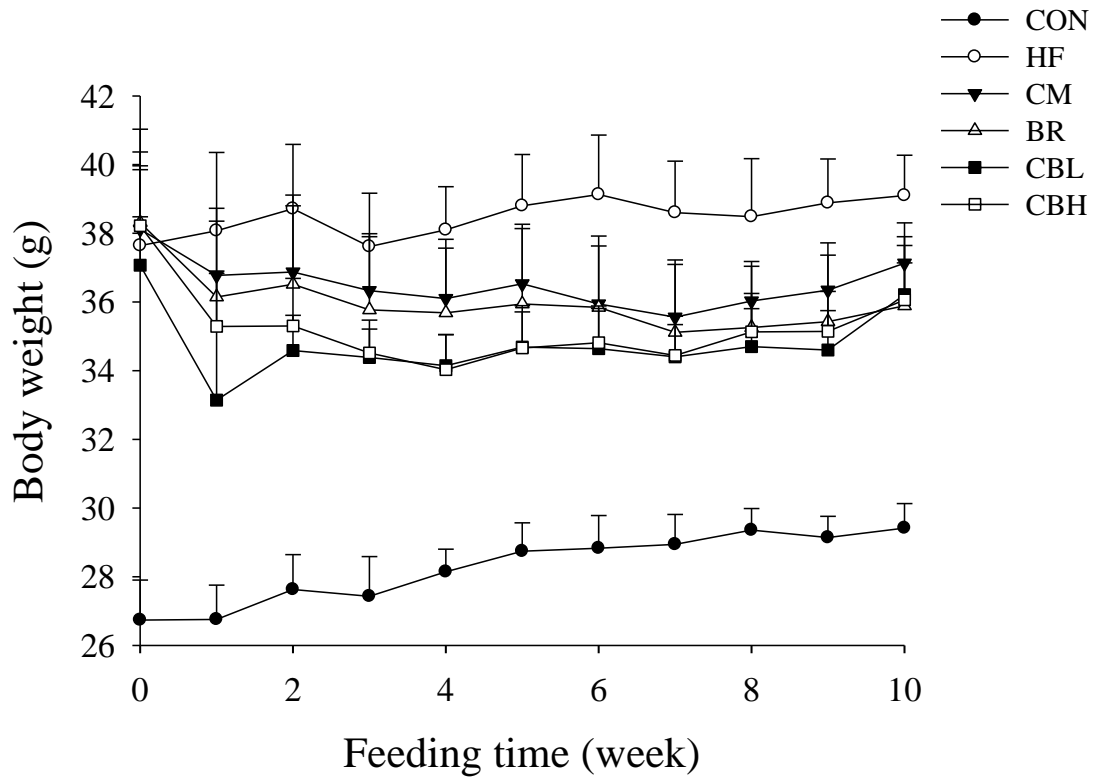
## 五、 體內動物實驗

### (一) 北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飲食誘導肥胖 BALB/c 小鼠體重和飼料攝取量之影響

圖二十二為小鼠在餵食樣品十週期間之體重變化，可看出與高脂組相比樣品組體重有逐漸降低的趨勢。餵食樣品後第十週之小鼠體重如表五所示，結果指出 HF 組之體重顯著高於 CON 組，而 CM、BR、CBL 及 CBH 組體重皆顯著低於 HF 組 ( $p < 0.05$ )，分別下降了 5.04%、8.22%、7.38% 及 7.78%。餵食高脂飼料之小鼠其平均攝食量皆比 CON 組低 (表五)，其原因可能為高脂飼料所提供之熱量較高，因此攝取較少量的飼料就足以提供一天熱量所需。顯示北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末皆可減少因高脂飲食導致體重上升的情形。Kim 等人 (2014) 研究指出餵食高脂飼料含北蟲草米糠固態發酵萃取物之 C57BL/6J 小鼠 (100 及 300 mg/kg)，其體重增加率與高脂飲食組相比減少了 48% 及 52.2%，顯示其具抑制體重上升之效果，與本實驗相較之下效果較顯著，推測其原因為 Kim 等人採取同時給予高脂飼料與樣品，與本研究先利用高脂飼料誘發實驗動物之肥胖症後再給予樣品之方法不同。

### (二) 北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飲食誘導肥胖 BALB/c 小鼠臟器重量之影響

在小鼠臟器重量方面，HF 組的肝臟重量為 CON 組之 1.35 倍，而 CM、BR、CBL 及 CBH 組之肝臟重量與 HF 組相比，分別下降 10.88%、15.54%、18.13% 及 14.50%；在脂肪組織總重方面，HF 組的脂肪組織總重為 CON 組之 2.11 倍，而 CM、BR、CBL 及 CBH 組之脂肪組織總重與 HF 組相比，分別顯著下降 46.15%、36.69%、49.11% 及 40.83% ( $p < 0.05$ )，而其餘臟器像是腎臟及脾臟等樣品組與 HF 組皆無統計上之差異 (表六)。圖二十三 A 為副睪、腎週及腹腔脂肪組織重量之比較，結果顯示 HF 組之副睪、腎週及腹腔脂肪組織重量均顯著高於樣品組 ( $p < 0.05$ )，顯示餵食樣品後可顯著



圖二十二、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飼料誘導肥胖 BALB/c 小鼠餵食十週體重變化之影響

Figure 22. Effects of *Cordyceps militaris* fruiting body, black rice and *Cordyceps militaris* fermented black rice powder on body weights of high-fat diet BALB/c mice during 10 weeks.

Values are expressed as mean  $\pm$  SD (n=7)

表五、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飼料誘導肥胖 BALB/c 小鼠飼料攝取量及體重之影響

Table 5. Effects of *Cordyceps militaris* fruiting body, black rice and *Cordyceps militaris* fermented black rice powder on food intake and 10<sup>th</sup> week of body weight of high-fat diet BALB/c mice.

Group	Food intake (g/day mice)	10 <sup>th</sup> week of body weight (g)
CON <sup>a</sup>	4.54 ± 0.40A <sup>b</sup>	29.41 ± 0.72C
HF	2.64 ± 0.10C	39.10 ± 1.17A
CM	3.13 ± 0.45B	37.13 ± 1.18B
BR	2.80 ± 0.28BC	35.89 ± 2.02B
CBL	2.99 ± 0.43B	36.21 ± 1.43B
CBH	2.95 ± 0.31BC	36.06 ± 1.08B

<sup>a</sup> CON, control; HF, high fat diet; CM, *Cordyceps militaris* fruiting body; BR, black rice; CBL, 2% *Cordyceps militaris* fermented black rice. CBH, 10% *Cordyceps militaris* fermented black rice.

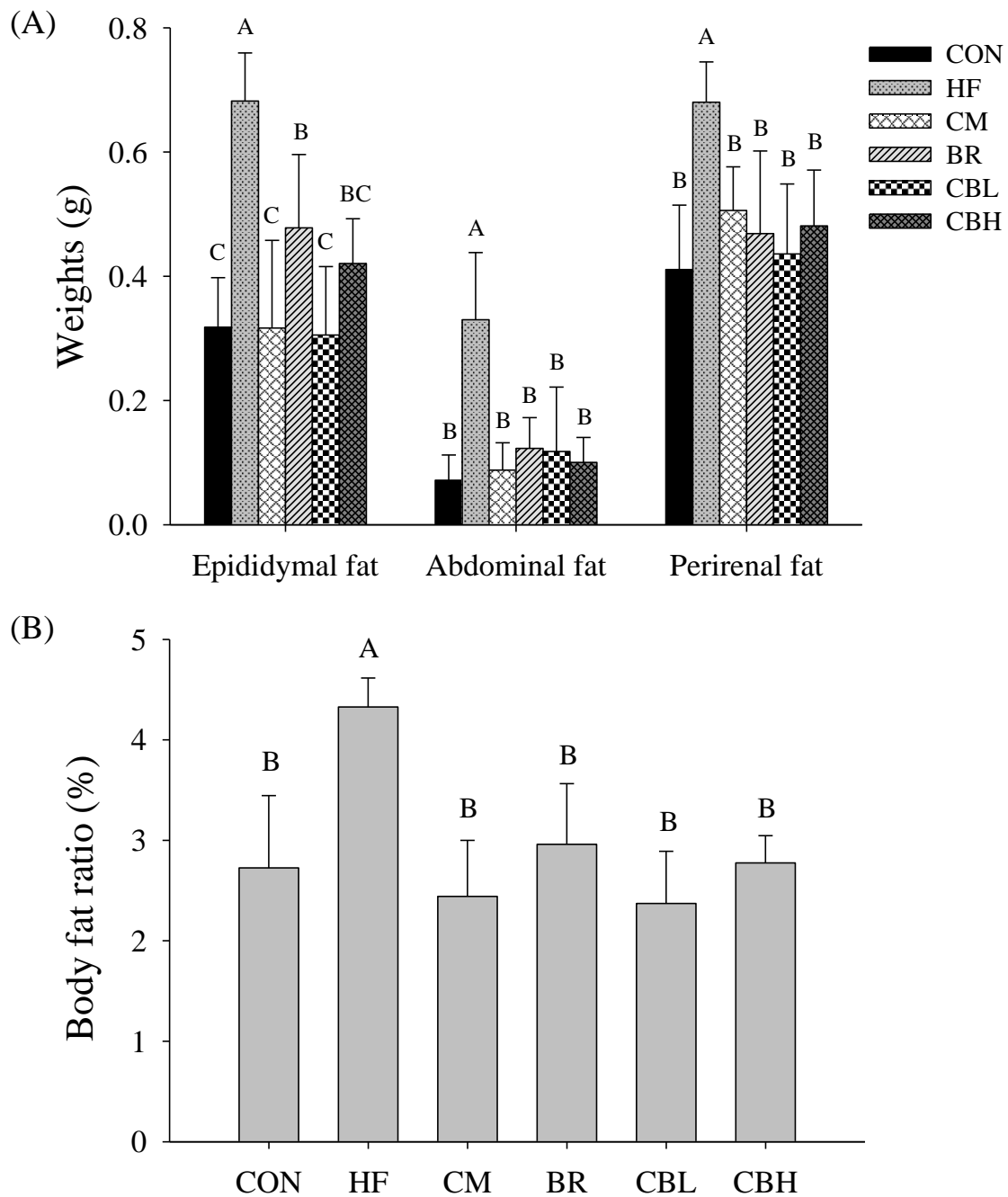
<sup>b</sup> Values are expressed as mean ± SD (n=7). Means with different letters within a row are significantly different ( $p < 0.05$ ).

表六、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飼料誘導肥胖 BALB/c 小鼠臟器重量之影響

Table 6. Effects of *Cordyceps militaris* fruiting body, black rice and *Cordyceps militaris* fermented black rice powder on visceral organ weights of high-fat diet BALB/c mice.

	CON	HF	CM	BR	CBL	CBH
<b>Heart</b>	0.16 ± 0.01B <sup>a</sup>	0.23 ± 0.03A	0.23 ± 0.03A	0.23 ± 0.02A	0.24 ± 0.03A	0.24 ± 0.04A
<b>Liver</b>	1.43 ± 0.08D	1.93 ± 0.13A	1.72 ± 0.12B	1.63 ± 0.11BC	1.58 ± 0.15C	1.65 ± 0.10BC
<b>Kidney</b>	0.50 ± 0.06B	0.62 ± 0.04A	0.64 ± 0.03A	0.61 ± 0.03A	0.64 ± 0.06A	0.63 ± 0.04A
<b>Spleen</b>	0.10 ± 0.01B	0.11 ± 0.01AB	0.12 ± 0.03AB	0.10 ± 0.01B	0.13 ± 0.04A	0.10 ± 0.01B
<b>Teates &amp; epididymis</b>	0.23 ± 0.02A	0.25 ± 0.04A	0.24 ± 0.03A	0.24 ± 0.02A	0.24 ± 0.02A	0.24 ± 0.03A
<b>Epididymal fat</b>	0.32 ± 0.08C	0.68 ± 0.08A	0.32 ± 0.14C	0.48 ± 0.12B	0.31 ± 0.11C	0.42 ± 0.07BC
<b>Abdominal fat</b>	0.07 ± 0.04B	0.33 ± 0.11A	0.09 ± 0.04B	0.12 ± 0.05B	0.12 ± 0.10B	0.10 ± 0.04B
<b>Perirenal fat</b>	0.41 ± 0.10B	0.68 ± 0.06A	0.51 ± 0.07B	0.47 ± 0.13B	0.44 ± 0.11B	0.48 ± 0.09B
<b>Fat pad</b>	0.80 ± 0.21C	1.69 ± 0.13A	0.91 ± 0.23BC	1.07 ± 0.26B	0.86 ± 0.19BC	1.00 ± 0.12BC

<sup>a</sup> Values are expressed as mean ± SD (n=7) . Means with different letters within a row are significantly different ( $p < 0.05$ ) .



圖二十三、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對肥胖 BALB/c 小鼠  
 (A) 脂肪組織重量與 (B) 體脂肪率之影響

Figure 23. Effects of *Cordyceps militaris* fruiting body, black rice and *Cordyceps militaris* fermented black rice powder on (A) fat pad and (B) body fat ratio of high-fat diet BALB/c mice. Values are expressed as mean  $\pm$  SD (n=7) . Means with different letters within a row are significantly different ( $p < 0.05$ )

減少脂肪組織之重量。本實驗證實給予肥胖小鼠北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末可減緩脂質累積於肝臟及脂肪組織中，使其重量降低。Kim 等人 (2014) 研究指出餵食高脂飼料含北蟲草米糠固態發酵萃取物之 C57BL/6J 小鼠 (100 及 300 mg/kg)，與高脂飲食組相比可顯著減少體內副睪脂肪之產生，與本實驗相符。

### (三) 北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飲食誘導肥胖 BALB/c 小鼠體脂肪率之影響

圖二十三 B 為各處理組體脂肪率 (body fat ratio, %) 之結果，其計算方法為脂肪組織總重除以體重乘以 100%。結果顯示 HF 組之體脂肪率 ( $4.33 \pm 0.29\%$ ) 顯著高於 CON 組 ( $2.73 \pm 0.72\%$ )，在餵食北蟲草子實體、紫米及北蟲草紫米粉末後，CM、BR、CBL 及 CBH 與 HF 組相比均可顯著降低體脂肪率 ( $2.44 \pm 0.56\%$ 、 $2.96 \pm 0.60\%$ 、 $2.37 \pm 0.52\%$  及  $2.78 \pm 0.27\%$ ) ( $p < 0.05$ )，顯示餵食北蟲草子實體、紫米及北蟲草紫米粉末可減少體脂肪之生成。

### (四) 北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飲食誘導肥胖 BALB/c 小鼠血清生化參數之影響

各處理組血清生化參數分析如表七。天門冬胺酸轉胺酶 (AST) 及胺基丙胺酸轉胺酶 (ALT) 為評估肝臟細胞發炎及壞死程度之依據，因其存在於肝臟中之酵素，若肝臟受損時 AST 及 ALT 會被釋放至血液中。結果指出 HF 組之 AST 與 ALT 顯著高於 CON 組 ( $p < 0.05$ )，在餵食北蟲草子實體、紫米及北蟲草紫米粉末後，CM、BR、CBL 及 CBH 與 HF 組相比皆可顯著降低 ( $p < 0.05$ )，顯示樣品具減緩肝臟損傷之效果；血清中之尿素氮 (blood urine nitrogen, BUN)、肌酐酸 (creatinine) 與尿素 (uric acid) 為檢視腎功能之參數，因其為身體中之代謝產物，會經腎臟由尿液排出體外，若血中尿素氮、肌酐酸及尿素濃度升高表示腎功能異常。結果顯示 CM、BR、CBL 及 CBH 組之尿素氮素顯著低於 HF 組，而肌酐酸與 HF 組相比



表七、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉未對高脂飼料誘導肥胖BALB/c小鼠血清生化參數之影響

Table 7. Effects of *Cordyceps militaris* fruiting body, black rice and *Cordyceps militaris* fermented black rice powder on serum biochemical values of high-fat diet BALB/c mice.

	CON	HF	CM	BR	CBL	CBH
AST (U/L)	77.29 ± 0.01B <sup>a</sup>	143.29 ± 26.78A	91.29 ± 20.46B	90.14 ± 15.32B	72.00 ± 8.33B	88.00 ± 12.33B
ALT (U/L)	47.57 ± 3.46B	180.71 ± 62.17A	57.71 ± 12.24B	56.43 ± 14.36B	40.14 ± 7.78B	48.14 ± 5.96B
BUN (mg/dL)	25.43 ± 2.92A	17.70 ± 2.16B	13.29 ± 1.94CD	11.59 ± 0.59D	14.71 ± 1.63C	14.49 ± 2.91C
Creatinine (mg/dL)	0.25 ± 0.03A	0.23 ± 0.04AB	0.19 ± 0.04B	0.21 ± 0.03B	0.19 ± 0.03B	0.22 ± 0.04AB
Uric acid (mg/dL)	3.70 ± 0.90AB	2.74 ± 0.75B	3.67 ± 1.26AB	3.06 ± 0.60B	4.24 ± 1.03A	3.26 ± 0.97AB
Glucose (mg/dL)	86.14 ± 34.46BC	111.71 ± 18.34AB	137.57 ± 40.15A	105.71 ± 27.18AB	135.86 ± 18.84A	67.29 ± 16.12C
Triglyceride (mg/dL)	232.29 ± 33.58A	119.29 ± 21.95CD	133.00 ± 20.84CD	160.43 ± 25.40B	113.86 ± 12.40D	142.86 ± 12.06BC
Cholesterol-T (mg/dL)	196.00 ± 17.61A	210.71 ± 21.02A	200.57 ± 21.97A	213.14 ± 13.99A	198.43 ± 22.20A	201.57 ± 9.83A
HDL (mg/dL)	166.71 ± 18.57A	184.00 ± 19.62A	171.43 ± 24.41A	178.14 ± 12.16A	160.86 ± 21.02A	171.00 ± 16.01A
Chol./HDL	1.17 ± 0.05A	1.16 ± 0.05A	1.19 ± 0.11A	1.20 ± 0.01A	1.26 ± 0.05A	1.19 ± 0.09A
LDL (mg/dL)	14.71 ± 3.73C	19.57 ± 1.51B	26.57 ± 6.40A	26.71 ± 4.68A	29.43 ± 5.03A	26.14 ± 3.98A

<sup>a</sup> Values are expressed as mean ± SD ( n=7 ) . Means with different letters within a row are significantly different (  $p < 0.05$  ) .

皆無顯著差異，根據文獻所整理之小鼠血清指標 (Johnson-Delaney, 1996) 顯示各組間之血清尿素氮、肌酐酸皆在正常範圍內，顯示各組樣品對腎臟功能皆無影響；在血清中 TG 方面，BR 組顯著高於 HF 組，顯示攝取過多紫米會導致血清中 TG 增加，而其餘樣品與 HF 組無顯著差異。

#### (五) 北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飲食誘導肥胖 BALB/c 小鼠肝臟組織脂肪堆積之影響

表八為各組間脂肪肝程度評分表，文獻指出可將肝臟中脂肪累積的程度分為五個等級(1-5 分)，分數越高表示脂肪肝的程度越嚴重 (Shackelford *et al.*, 2002)。結果顯示 HF 組脂肪肝分數最高(5.0 分)，而餵食樣品後 CM、CBL 及 CBH 組之分數 (3.1、2.1 及 3.6 分) 顯著低於 HF 組 ( $p < 0.05$ )。

將小鼠肝組織切片利用 H&E 染色後發現，肝組織中有許多白色空泡，其形成原因為在切片製造過程中，肝組織中的油脂會被溶解，無法染上染劑，於是當切片固定後會形成一顆顆空泡，此空泡即為肝臟細胞內油滴累積之處。從肝組織切片 (圖二十四) 發現 HF 組中出現許多白色空泡，代表其中有許多油滴累積，而 CM、BR、CBL 及 CBH 組中白色空泡較少，顯示肝臟中之油滴有減少的趨勢。

綜上所述，餵食高脂飼料誘導之 BALB/c 小鼠會導致脂肪肝的發生，而餵食 CM、CBL 及 CBH 組 10 週後有減緩脂肪肝形成之效果，與 AST 及 ALT 降低之結果相符。

#### (六) 北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飲食誘導肥胖 BALB/c 小鼠副睪脂肪組織中脂肪細胞大小之影響

圖二十五為副睪脂肪組織切片圖，由圖中可看出 HF 組之副睪脂肪細胞大小與 CON 組相比有顯著增加的趨勢，而 CM、BR、CBL 及 CBH 組則可降低副睪脂肪細胞之大小。圖二十六為副睪脂肪細胞截面積之分布柱

表八、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飼料誘導肥胖 BALB/c 小鼠脂肪肝分數之影響

Table 8. Effects of *Cordyceps militaris* fruiting body, black rice and *Cordyceps militaris* fermented black rice powder on fatty liver scores of high-fat diet BALB/c mice

Group	NO.	Histopathologic score of livers <sup>1</sup>		
		Fatty liver (general degree)	Micro-vesicles	Macro-vesicles
CON	7	3.9 ± 1.6	3.9 ± 1.6	1.9 ± 0.8
HF	7	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0*
CM	7	3.1 ± 1.1 <sup>a</sup>	2.3 ± 2.1 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.5 <sup>a</sup>
BR	7	4.9 ± 0.3	4.9 ± 0.3	2.1 ± 0.3 <sup>a</sup>
CBL	7	2.1 ± 1.5 <sup>a</sup>	1.6 ± 1.5 <sup>*, a</sup>	1.9 ± 1.2 <sup>a</sup>
CBH	7	3.6 ± 0.9 <sup>a</sup>	3.6 ± 0.9 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.5 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Degree of lesions was graded from one to five depending on severity:

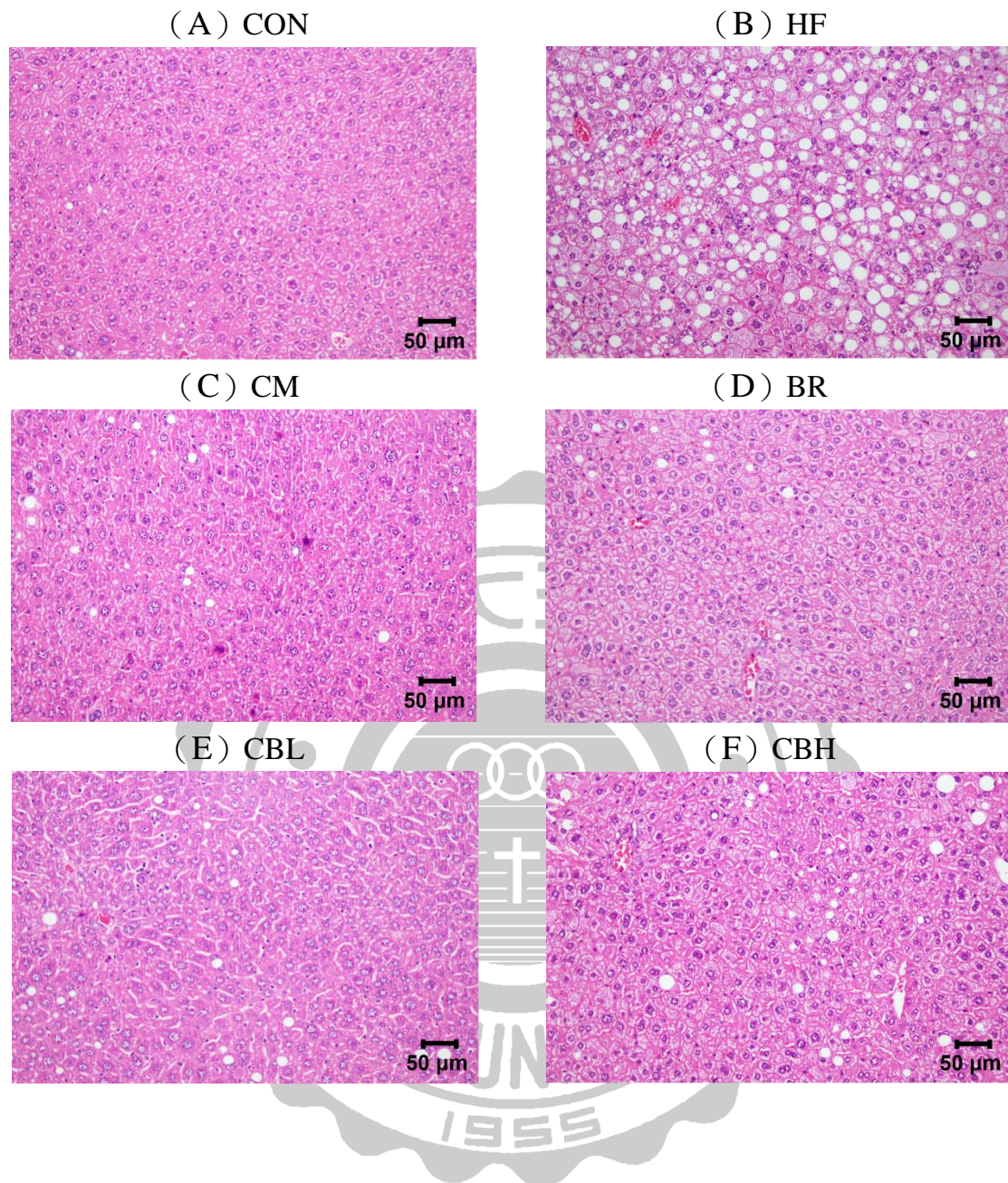
1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%);

4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%)

<sup>2</sup> The final numerical score was calculated by dividing the sum of the number per grade of affected mice by the total number of examined mice.

\* Statistically significant difference between CON and treated groups at  $p < 0.05$ .

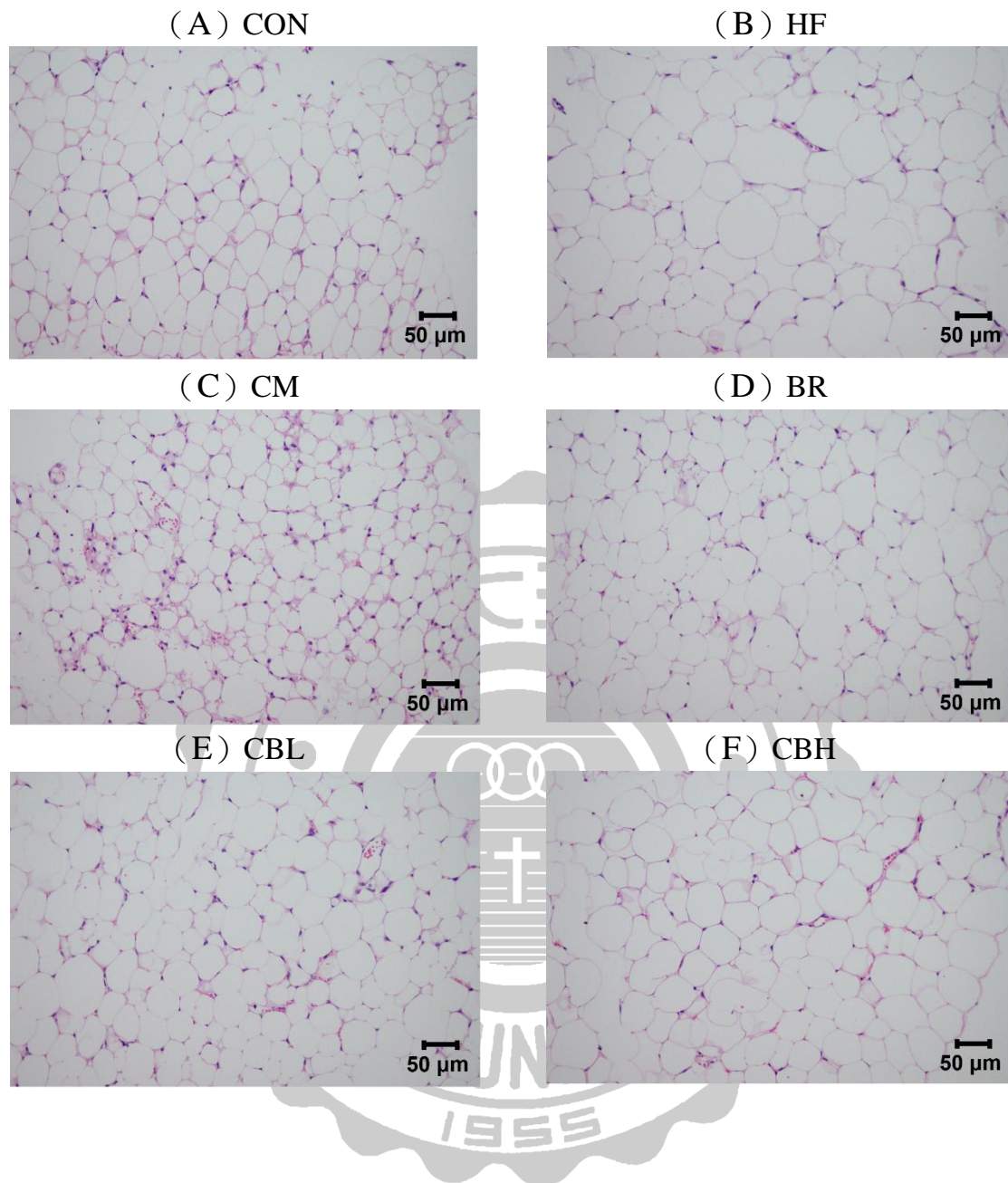
<sup>a</sup> Statistically significant difference between HF and treated groups at  $p < 0.05$ .



圖二十四、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對肥胖 BALB/c 小鼠  
肝臟組織之影響（圖中比例尺為 50  $\mu\text{m}$ ）

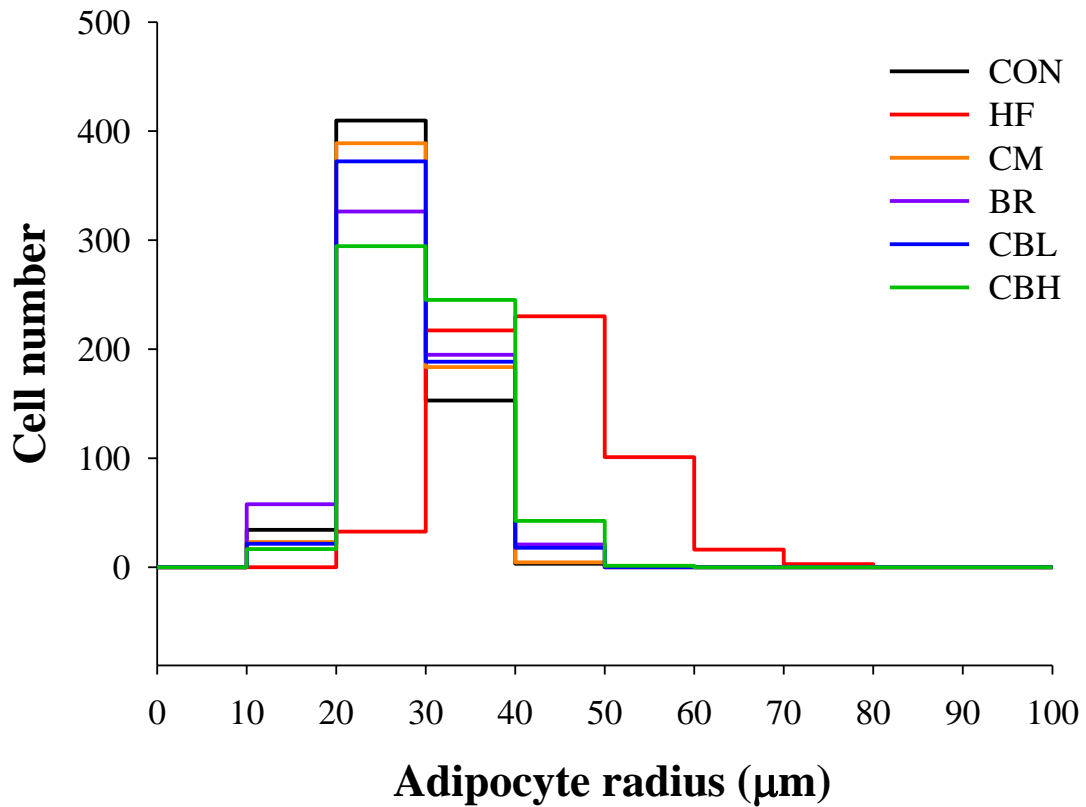
Figure 24. Effects of *Cordyceps militaris* fruiting body, black rice and  
*Cordyceps militaris* fermented black rice powder on histopathological  
alterations of liver in high-fat diet BALB/c mice.

H&E stain, 200x. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$



圖二十五、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對肥胖 BALB/c 小鼠副睪脂肪細胞大小之影響（圖中比例尺為 50  $\mu\text{m}$ ）

Figure 25. Effects of *Cordyceps militaris* fruiting body, black rice and *Cordyceps militaris* fermented black rice powder on histopathological alterations of epididymal fat cell size in high-fat diet BALB/c mice. H&E stain, 200x. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$



圖二十六、比較餵食北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末組別與肥胖 BALB/c 小鼠其副睪脂肪細胞截面積之分布柱狀圖

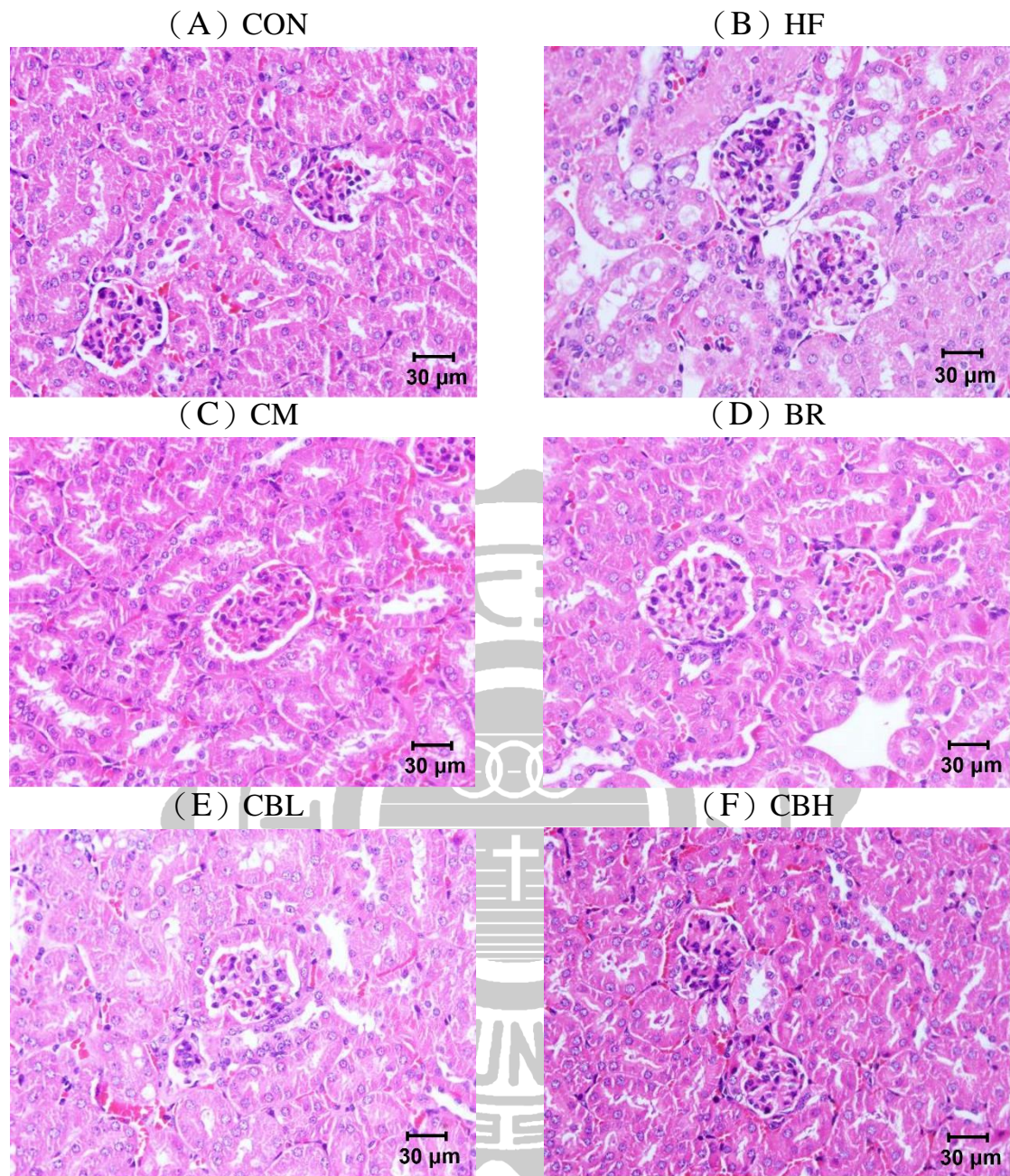
Figure 26. Compared high-fat diet group with *Cordyceps militaris* fruiting body, black rice and *Cordyceps militaris* fermented black rice powder and positive control group on histograms distribution of adipocytes cross-sectional area from BALB/c mice.

狀圖，結果指出 CON 組截面積較大之細胞（40-70  $\mu\text{m}$ ）約佔 0.5%，HF 組則佔 58.3%，而在餵食樣品後，CM、BR、CBL 及 CBH 組截面積 40-70  $\mu\text{m}$  之細胞所佔比例（0.7%、3.5%、3.0%及 7.3%）與 HF 組相比有顯著減少的趨勢（ $p < 0.05$ ），顯示樣品具減少脂肪細胞油滴累積之效果。

#### （七） 北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對高脂飲食誘導肥胖 BALB/c 小鼠腎臟組織之影響

圖二十七為腎臟組織切片圖，可看出各處理組之腎小管上皮細胞排列整齊，基底膜完整，且組織間質中未發現炎症細胞浸潤之現象，與上述尿素氮、肌酐酸及尿素等腎功能指標結果相符，顯示北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末不會造成腎功能損傷。





圖二十七、北蟲草子實體、紫米與北蟲草紫米粉末對肥胖 BALB/c 小鼠腎臟組織之影響（圖中比例尺為 30  $\mu\text{m}$ ）

Figure 27. Effects of *Cordyceps militaris* fruiting body, black rice and *Cordyceps militaris* fermented black rice powder on histopathological alterations of kidney in high-fat diet BALB/c mice.

H&E stain, 400x. Scale bar = 30  $\mu\text{m}$



## 第五章 總結論

本研究主要探討北蟲草紫米固態發酵之最適培養條件，並針對其一般成分、生理活性物質及抑制 3T3-L1 前脂肪細胞分化及油滴堆積效果進行評估。經實驗結果得知北蟲草紫米在水分添加量 60%、接菌量 4 mL、添加 1% 黃豆粉作為氮源及 0.5%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  作為無機鹽種類，於 25 °C 下培養 15 天可得最高生物質含量，以上述所得之條件製備北蟲草紫米並進行相關分析。在一般成分方面，北蟲草紫米含水分 5.43%、碳水化合物 79.05%、粗灰份 1.94%、粗脂肪 3.91% 及粗蛋白 9.67%。在生理活性物質方面，北蟲草紫米含腺苷 0.14 mg/g、蟲草素 0.04 mg/g、甘露糖醇 3.45 mg/g、多醣 54.40 mg/g 及類黃酮 0.75 mg/g，花青素則未檢出。在不易形成體脂肪方面，體外細胞試驗結果顯示，北蟲草子實體和菌絲體水萃物及紫米與北蟲草紫米水萃和乙醇萃取物均可顯著抑制 3T3-L1 前脂肪細胞油滴之堆積，另紫米及北蟲草紫米之乙醇萃取物可明顯促進脂解作用，增加成熟脂肪細胞之甘油釋放量 ( $p < 0.05$ )。另外，由體內動物試驗結果可知，餵食 0.1% 北蟲草子實體、10% 紫米、2% 及 10% 北蟲草紫米 10 週後，可明顯降低 BALB/c 小鼠體重、體脂肪率及副睪脂肪細胞大小；另血清中 AST 及 ALT 含量均明顯下降。此外，肝臟組織切片結果發現，餵食北蟲草紫米可顯著減少肝臟中之脂質堆積，證實北蟲草紫米可有效抑制 BALB/c 雄性小鼠體脂肪之生成且具減緩脂肪肝之能力。

綜上所述，經固態發酵後之北蟲草紫米具有不易形成體脂肪之效果，未來可做為不易形成體脂肪相關之保健食品開發之材料。

## 第六章 參考文獻

- 水野卓、川合正允。賴慶亮譯。1997。菇類的化學、生化學。國立編譯館。台北。台灣。
- 王怡勤。2012。探討紫米粗萃花青素抑制人類口腔舌癌 CAL 27 細胞之轉移機制。亞洲大學生物科技學系碩士論文。台中。台灣。
- 左豔芳。2004。食品學。匯華圖書出版有限公司。台北。台灣。
- 吳彩平。2006。以固態發酵製備樟芝米及其品質與抗氧化性質。國立中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。台中。台灣。
- 李秀、賴滋漢。1990。食品檢驗與分析。精華出版社。台中。台灣。
- 李建良。2001。液態培養生產冬蟲夏草菌絲體與冬蟲夏草多醣之研究。國立交通大學生物科技研究所碩士論文。新竹。台灣。
- 李勣等修。新修草本（唐）。昭和 43 [民 57]。
- 李翠新、張國慶、何永珍、王賀祥。2007。野生蛹蟲草的分離與高產菌株的篩選。中國食用菌。26(2)：20-21。
- 汪維云、朱金華、吳守一。1999。食用菌絲體在氣升式生物反應器中的培養條件。中國食用菌。17：11-12
- 林子群。2014。以液態發酵技術結合 $\gamma$ -照射技術提升蛹蟲草之機能性成分。亞洲大學保健營養生技學系碩士論文。台中。台灣。
- 林欣儀。2008。以固態發酵製備舞菇小麥及其品質與抗氧化性質。國立中興大學食品科學系碩士論文。台中，台灣。
- 姚旋、張穎、單仕芳、應浩。2011。褐色脂肪組織研究的最新進展和科學意義。中國細胞生物學學報
- 紀彥甫。2014。以固態發酵製備蟬花米及其品質與抗氧化性質。東海大學食品科學系碩士論文。台中。台灣。
- 香川芳子（監修）。2004。五訂食品成分表。女子營養大學出版部。東京。日本。
- 孫月、卜寧、劉建華。1999。蛹蟲草蟲草酸蟲草素含量測定與分析。中國食用菌。

18：19。

徐佳莉。2008。以固態發酵製備桑黃蕈仁與桑黃米產品及其呈味性質與生理活性。

國立中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。台中。台灣。

翁梁。2010。野生蟬花與人工蟬花多醣的提取及抑菌試驗。農業科技與裝備。11：22-24。

張雅雯。2002。化學合成與天然浸液培養基及培養溫度對蓮花菌(*Grifola frondosa*)菌株間發酵產程菌絲體及多醣之影響。大葉大學食品工程研究所碩士論文。彰化。台灣。

張顯科、王玉柱、劉文霞。1996。蛹蟲草的研究 IV. 蛹蟲草與冬蟲夏草化學成分比較。遼寧大學學報 23：80-83

郭惠菁。2005。以固態發酵製備蟲草米及其品質與抗氧化性質。國立中興大學食品科學系碩士論文。台中。台灣。

曾宏彬、宋斌、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。

黃鈴娟。2000。樟芝與姬松茸之抗氧化性及其多醣組成分析。國立中興大學食品科學系碩士論文。台中。台灣。

葉展均。2009。以固態發酵製備白樺茸胚芽米及其呈味性質與生理活性。國立中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。台中。台灣。

詹天榮。2004。甘露醇系列衍生物的合成及其生物活性。中國科學院海洋研究所。青島。中國。

路秀玲、趙樹欣。2000。固態發酵中生物量的測定方法。天津輕工業學院學報。4:57-62。

廖仁宏。2003。固態培養生產靈芝菌絲體之研究。東海大學化學工程學系碩士論文。台中。台灣。

廖春燕、鄭裕國。2005。固態發酵生物反應器。微生物學通報。32：99-103。

劉仲敏、曹友聲、常琴。1994。人工固態發酵培養冬蟲夏草絲體的研究。河南科學。12：335-338。

蔡淑瑤。2002。靈芝與柳松菇之抗氧化性質和其對腫瘤細胞之毒性及柳松菇之抗致性突變性質。國立中興大學食品科學系碩士論文。台中。台灣。

興大學食品科學系碩士論文。台中。台灣。

蕭麗華。1997。冬蟲夏草藥材真偽品與發酵培養製備物之結構特徵與成分分析比較。大葉大學食品工程研究所碩士論文。彰化，台灣。

韓建榮。1998。四種羊肚菌在固體發酵條件下的菌絲生物量和降解澱粉作用。菌物系統。17: 312-317。

簡義紋、吳岱穎、林光洋、吳逸帆、郭冠良、季瑋珠。2013。肥胖的環境與生活型態因素。台灣衛誌。32: 101-113

Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., and Tattini, M. (2013) Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiol Biochem*, 72: 35-45.

Ahima, R. S., and Flier, J. S. (2000) Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*, 11: 327-332.

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. *J Agric Food Chem*, 48: 2744-2748.

Ajlouni, S. O., Beelman, R. B., Thompson, D. B., and Mau, J. L. (1995) Changes in Soluble Sugars in Various Tissues of Cultivated Mushrooms, *Agaricus bisporus*. During Postharvest Storage. G. Charalambous (Ed.), *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*: 1865-1880.

Arner, E., Westermark, P. O., Spalding, K. L., Britton, T., Ryden, M., Frisen, J., Bernard, S., and Arner, P. (2010) Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*, 59: 105-109.

Arnou, B., Kenardy, J., and Agras, W. S. (1992) Binge eating among the obese: a descriptive study. *J Behav Med*, 15: 155-170.

Babitha, S., Soccol, C. R., and Pandey, A. (2007) Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresour Technol*, 98: 1554-1560.

Bae, J. T., Park, J. P., Song, C. H., Yu, C. B., Park, M. K., and Yun, J. W. (2001) Effect of carbon source on the mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of *Paecilomyces japonica*. *J Biosci Bioeng*, 91: 522-524.

Bae, J. T., Sinha, J., Park, J. P., Song, C. H., and Yun, J. W. (2000) Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces*

- japonica*. *J Microbiol Biotechnol*, 10: 482-487.
- Baik, J. S., Kwon, H. Y., Kim, K. S., Jeong, Y. K., Cho, Y. S., and Lee, Y. C. (2012) Cordycepin induces apoptosis in human neuroblastoma SK-N-BE(2)-C and melanoma SK-MEL-2 cells. *Indian J Biochem Biophys*, 49: 86-91.
- Basheer, R., Strecker, R. E., Thakkar, M. M., and McCarley, R. W. (2004) Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog Neurobiol*, 73: 379-396.
- Belkebir, A., and Benhassaine-Kesri, G. (2013) Sethoxydim treatment inhibits lipid metabolism and enhances the accumulation of anthocyanins in rape (*Brassica napus* L.) leaves. *Pestic Biochem Physiol*, 107: 120-126.
- Berger, J., and Moller, D. E. (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*, 53: 409-435.
- Birsoy, K., Chen, Z., and Friedman, J. (2008) Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4. *Cell Metab*, 7: 339-347.
- Breene, W. M. (1990) Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *J Food Protect*, 53: 883-894.
- Brey, C. W., Nelder, M. P., Hailemariam, T., Gaugler, R., and Hashmi, S. (2009) Kruppel-like family of transcription factors: an emerging new frontier in fat biology. *Int J Biol Sci*, 5: 622-636.
- Bryant, N. J., Govers, R., and James, D. E. (2002) Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 267-277.
- Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., and Thun, M. J. (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*, 348: 1625-1638.
- Cao, Z., Umek, R. M., and McKnight, S. L. (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev*, 5: 1538-1552.
- Carlezon, W. A., Jr., Mague, S. D., Parow, A. M., Stoll, A. L., Cohen, B. M., and Renshaw, P. F. (2005) Antidepressant-like effects of uridine and omega-3 fatty acids are potentiated by combined treatment in rats. *Biol Psychiatry*, 57: 343-350.
- Carrizalez, V., Rodriguez, H., and Sarrdina, I. (1981) Determination of specific growth of molds on semi-solid cultures. *Biotechnol Bioeng*, 23: 321-333.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. d. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., and Galán-Vidal, C. A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem*, 113: 859-871.
- Cha, J. Y., Ahn, H. Y., Cho, Y. S., and Je, J. Y. (2013) Protective effect of cordycepin-enriched *Cordyceps militaris* on alcoholic hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol*, 60: 52-57.

- Chang, H. L., Chao, G. R., Chen, C. C., and Mau, J. L. (2001) Nonvolatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. *Food Chem*, 74: 203-207.
- Chen, P. N., Kuo, W. H., Chiang, C. L., Chiou, H. L., Hsieh, Y. S., and Chu, S. C. (2006) Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. *Chem Biol Interact*, 163: 218-229.
- Chen, X., Wu, G., and Huang, Z. (2013) Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris*. *Int J Biol Macromol*, 58: 18-22.
- Cheng, Y. W., Chen, Y. I., Tzeng, C. Y., Chen, H. C., Tsai, C. C., Lee, Y. C., Lin, J. G., Lai, Y. K., and Chang, S. L. (2012) Extracts of *Cordyceps militaris* lower blood glucose via the stimulation of cholinergic activation and insulin secretion in normal rats. *Phytother Res*, 26: 1173-1177.
- Cho, H. J., Cho, J. Y., Rhee, M. H., and Park, H. J. (2007) Cordycepin (3'-deoxyadenosine) inhibits human platelet aggregation in a cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent manner. *Eur J Pharmacol*, 558: 43-51.
- Choi, H. N., Jang, Y. H., Kim, M. J., Seo, M. J., Kang, B. W., Jeong, Y. K., and Kim, J. I. (2014) *Cordyceps militaris* alleviates non-alcoholic fatty liver disease in ob/ob mice. *Nutr Res Pract*, 8: 172-176.
- Cisowska, A., Wojnicz, D., and Hendrich, A. B. (2011) Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Nat Prod Commun*, 6: 149-156.
- Cornelius, P., MacDougald, O. A., and Lane, M. D. (1994) Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr*, 14: 99-129.
- Crisan, E. V., and Sands, A. (1978) Nutritional value. In *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*. Eds Chang, S. T. and Hayes, W. A. pp. 137-165. Academic Press, New York.
- Cui, J. D. (2014) Biotechnological production and applications of *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Crit Rev Biotechnol*.
- Cunningham, K. G., Manson, W., Spring, F. S., and Hutchinson, S. A. (1950) Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. *Nature*, 166: 949.
- Das, S. K., Masuda, M., Sakurai, A., and Sakakibara, M. (2010) Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects. *Fitoterapia*, 81: 961-968.
- Dixon, J. B. (2010) The effect of obesity on health outcomes. *Mol Cell Endocrinol*, 316: 104-108.
- Dong, Y., Jing, T., Meng, Q., Liu, C., Hu, S., Ma, Y., Liu, Y., Lu, J., Cheng, Y., Wang, D., and Teng, L. (2014) Studies on the antidiabetic activities of *Cordyceps*

- militaris* extract in diet-streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats. *Biomed Res Int*, 2014: 160980.
- Durand, A. (2003) Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem Eng J*, 13: 113-125.
- Eckel, R. H., Grundy, S. M., and Zimmet, P. Z. (2005) The metabolic syndrome. *The Lancet*, 365: 1415-1428.
- Eckel, R. H., Kahn, S. E., Ferrannini, E., Goldfine, A. B., Nathan, D. M., Schwartz, M. W., Smith, R. J., and Smith, S. R. (2011) Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? *J Clin Endocrinol Metab*, 96: 1654-1663.
- Fajas, L., Schoonjans, K., Gelman, L., Kim, J. B., Najib, J., Martin, G., Fruchart, J. C., Briggs, M., Spiegelman, B. M., and Auwerx, J. (1999) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol*, 19: 5495-5503.
- Fardet, A., Rock, E., and Rémésy, C. (2008) Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? *J Cereal Sci*, 48: 258-276.
- Farmer, S. R. (2006) Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*, 4: 263-273.
- Gao, J., Lian, Z. Q., Zhu, P., and Zhu, H. B. (2011) Lipid-lowering effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) from *Cordyceps militaris* on hyperlipidemic hamsters and rats. *Yao Xue Xue Bao*, 46: 669-676.
- 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. *Biochim Biophys Acta*, 1808: 1380-1399.
- Green, H., and Kehinde, O. (1976) Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell*, 7: 105-113.
- Green, H., and Kehinde, O. (1979) Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *J Cell Physiol*, 101: 169-171.
- Green, H., and Meuth, M. (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, 3: 127-133.
- Gregoire, F. M. (2001) Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood)*, 226: 997-1002.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M., and Sul, H. S. (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*, 78: 783-809.
- Grundy, S. M. (2011) The Metabolic Syndrome. 1-26.

- 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 Chem*, 102: 1304-1309.
- Guan, H. P., Li, Y., Jensen, M. V., Newgard, C. B., Steppan, C. M., and Lazar, M. A. (2002) A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med*, 8: 1122-1128.
- Guo, P., Kai, Q., Gao, J., Lian, Z.-q., Wu, C.-m., Wu, C.-a., and Zhu, H.-b. (2010) Cordycepin prevents hyperlipidemia in hamsters fed a high-fat diet via activation of AMP-activated protein kinase. *J Pharmacol Sci*, 113: 395-403.
- Han, E. S., Oh, J. Y., and Park, H. J. (2011) *Cordyceps militaris* extract suppresses dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and production of inflammatory mediators from macrophages and mast cells. *J Ethnopharmacol*, 134: 703-710.
- Han, J. R., An, C. H., and Yuan, J. M. (2005) Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Ganoderma lucidum* for degrading starch and upgrading nutritional value. *J Appl Microbiol*, 99: 910-915.
- Havel, P. J. (2000) Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proc Nutr Soc*, 59: 359-371.
- Hodgson, J. M. (2008) Tea flavonoids and cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr*, 17 Suppl 1: 288-290.
- Holker, U., Hofer, M., and Lenz, J. (2004) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64: 175-186.
- Huang, L. F., Guo, F. Q., Liang, Y. Z., and Chen, B. M. (2004) Determination of adenosine and cordycepin in *Cordyceps sinensis* and *C. militaris* with HPLC-ESI-MS. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 29: 762-764.
- Huang, S. J., Tsai, S. Y., Lee, Y. L., and Mau, J. L. (2006) Nonvolatile taste components of fruit bodies and mycelia of *Cordyceps militaris*. *LWT*, 39: 577-583.
- Huang, W. Y., Liu, Y. M., Wang, J., Wang, X. N., and Li, C. Y. (2014) Anti-inflammatory effect of the blueberry anthocyanins malvidin-3-glucoside and malvidin-3-galactoside in endothelial cells. *Molecules*, 19: 12827-12841.
- Inukai, T. (2013) Symptomatic obesity-classification, pathogenesis, diagnosis and therapy. *Nihon Rinsho*, 71: 291-296.
- Iribarren, C., Go, A. S., Husson, G., Sidney, S., Fair, J. M., Quertermous, T., Hlatky, M. A., and Fortmann, S. P. (2006) Metabolic syndrome and early-onset coronary artery disease: is the whole greater than its parts? *J Am Coll Cardiol*, 48: 1800-1807.



- Jang, H. H., Park, M. Y., Kim, H. W., Lee, Y. M., Hwang, K. A., Park, J. H., Park, D. S., and Kwon, O. (2012) Black rice (*Oryza sativa* L.) extract attenuates hepatic steatosis in C57BL/6 J mice fed a high-fat diet via fatty acid oxidation. *Nutr Metab (Lond)*, 9: 27.
- Jayaprakasam, B., Olson, L. K., Schutzki, R. E., Tai, M. H., and Nair, M. G. (2006) Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*). *J Agric Food Chem*, 54: 243-248.
- Jeong, J. W., Jin, C. Y., Kim, G. Y., Lee, J. D., Park, C., Kim, G. D., Kim, W. J., Jung, W. K., Seo, S. K., Choi, I. W., and Choi, Y. H. (2010) Anti-inflammatory effects of cordycepin via suppression of inflammatory mediators in BV2 microglial cells. *Int Immunopharmacol*, 10: 1580-1586.
- Jhin, C., and Hwang, K. T. (2014) Prediction of Radical Scavenging Activities of Anthocyanins Applying Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System (ANFIS) with Quantum Chemical Descriptors. *Int J Mol Sci*, 15: 14715-14727.
- Jia, H., Chen, W., Yu, X., Wu, X., Li, S., Liu, H., Liao, J., Liu, W., Mi, M., Liu, L., and Cheng, D. (2013) Black rice anthocyanidins prevent retinal photochemical damage via involvement of the AP-1/NF-kappaB/Caspase-1 pathway in Sprague-Dawley rats. *J Vet Sci*, 14: 345-353.
- Jia, Z. S., Tang, M. C., and Wu, J. M. (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64: 555-559.
- Jiang, W., Yu, X., and Ren, G. (2013) Inhibition effects of black rice pericarp extracts on cell proliferation of PC-3 cells. *Wei Sheng Yan Jiu*, 42: 474-477, 482.
- Johnson-Delaney, C. (1996) *Exotic Companion Medicine Handbook for Veterinarians* (2 Vol. set). Lake Worth, FL: Zoological Education Network.
- Jonathan, S. G., and Fasidi, I. O. (2001) Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyrella atroumbonata* (Pegler), a Nigerian edible mushroom. *Food Chem*, 72: 479-483.
- Joung, H. J., Kim, Y. S., Hwang, J. W., Han, Y. K., Jeong, J. H., Lee, J. S., Moon, S. H., Jeon, B. T., and Park, P. J. (2014) Anti-inflammatory effects of extract from *Haliotis discus hannai* fermented with *Cordyceps militaris* mycelia in RAW264.7 macrophages through TRIF-dependent signaling pathway. *Fish Shellfish Immunol*, 38: 184-189.
- Kang, C., Wen, T. C., Kang, J. C., Meng, Z. B., Li, G. R., and Hyde, K. D. (2014) Optimization of large-scale culture conditions for the production of cordycepin with *Cordyceps militaris* by liquid static culture. *The Scientific World Jo*, 2014: 510627.

- Kanneganti, T. D., and Dixit, V. D. (2012) Immunological complications of obesity. *Nat Immunol*, 13: 707-712.
- Keith, S. W., Redden, D. T., Katzmarzyk, P. T., Boggiano, M. M., Hanlon, E. C., Benca, R. M., Ruden, D., Pietrobelli, A., Barger, J. L., Fontaine, K. R., Wang, C., Aronne, L. J., Wright, S. M., Baskin, M., Dhurandhar, N. V., Lijoi, M. C., Grilo, C. M., DeLuca, M., Westfall, A. O., and Allison, D. B. (2006) Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *Int J Obes (Lond)*, 30: 1585-1594.
- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., and Wahli, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*, 103: 1489-1498.
- Kim, H. G., Shrestha, B., Lim, S. Y., Yoon, D. H., Chang, W. C., Shin, D. J., Han, S. K., Park, S. M., Park, J. H., Park, H. I., Sung, J. M., Jang, Y., Chung, N., Hwang, K. C., and Kim, T. W. (2006) Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF-kappaB through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol*, 545: 192-199.
- Kim, H. S., Kim, J. Y., Kang, J. S., Kim, H. M., Kim, Y. O., Hong, I. P., Lee, M. K., Hong, J. T., Kim, Y., and Han, S. B. (2010) Cordlan polysaccharide isolated from mushroom *Cordyceps militaris* induces dendritic cell maturation through toll-like receptor 4 signalings. *Food Chem Toxicol*, 48: 1926-1933.
- Kim, J. R., Yeon, S. H., Kim, H. S., and Ahn, Y. J. (2002) Larvicidal activity against *Plutella xylostella* of cordycepin from the fruiting body of *Cordyceps militaris*. *Pest Manag Sci*, 58: 713-717.
- Kim, S. B., Ahn, B., Kim, M., Ji, H. J., Shin, S. K., Hong, I. P., Kim, C. Y., Hwang, B. Y., and Lee, M. K. (2014) Effect of *Cordyceps militaris* extract and active constituents on metabolic parameters of obesity induced by high-fat diet in C58BL/6J mice. *J Ethnopharmacol*, 151: 478-484.
- Kitakaze, M., and Hori, M. (2000) Adenosine therapy: a new approach to chronic heart failure. *Expert Opin Investig Drugs*, 9: 2519-2535.
- Kliebenstein, D. J. (2004) Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell Environ*, 27: 675-684.
- Klip, A., Sun, Y., Chiu, T. T., and Foley, K. P. (2014) Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT4 translocation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 306: C879-886.
- Kocic, B., Filipovic, S., Nikolic, M., and Petrovic, B. (2011) Effects of anthocyanins and anthocyanin-rich extracts on the risk for cancers of the gastrointestinal

- tract. *J BUON*, 16: 602-608.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., and Brouillard, R. (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64: 923-933.
- Kopelman, P. G. (1992) Sleep apnoea and hypoventilation in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 16 Suppl 2: S37-42.
- Kopelman, P. G. (2000) Obesity as a medical problem. *Nature*, 404: 635-643.
- Kotsis, V., Stabouli, S., Papakatsika, S., Rizos, Z., and Parati, G. (2010) Mechanisms of obesity-induced hypertension. *Hypertens Res*, 33: 386-393.
- Kurukulasuriya, L. R., Stas, S., Lastra, G., Manrique, C., and Sowers, J. R. (2011) Hypertension in obesity. *Med Clin North Am*, 95: 903-917.
- Lane, M. D., Tang, Q. Q., and Jiang, M. S. (1999) Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 266: 677-683.
- Lee, B. H., Lo, Y. H., and Pan, T. M. (2013) Anti-obesity activity of *Lactobacillus* fermented soy milk products. *J Funct Foods*, 5: 905-913.
- Lee, J. S., and Hong, E. K. (2011) Immunostimulating activity of the polysaccharides isolated from *Cordyceps militaris*. *Int Immunopharmacol*, 11: 1226-1233.
- Lee, J. S., Kwon, J. S., Yun, J. S., Pahk, J. W., Shin, W. C., Lee, S. Y., and Hong, E. K. (2010) Structural characterization of immunostimulating polysaccharide from cultured mycelia of *Cordyceps militaris*. *Carbohydr Polym*, 80: 1011-1017.
- Lewis, J. R., and Mohanty, S. R. (2010) Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci*, 55: 560-578.
- Li, P., Li, S. P., Gong, Y. X., and Wang, Y. T. (2004) Simultaneous determination of ergosterol, nucleosides and their bases from natural and cultured *Cordyceps* by pressurized solvent extraction and high performance liquid chromatography. *Yao Xue Xue Bao*, 39: 917-920.
- Li, S. P., Yang, F. Q., and Tsim, K. W. (2006) Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. *J Pharm Biomed Anal*, 41: 1571-1584.
- Li, X. T., Li, H. C., Li, C. B., Dou, D. Q., and Gao, M. B. (2010) Protective effects on mitochondria and anti-aging activity of polysaccharides from cultivated fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Am J Chin Med*, 38: 1093-1106.
- Lin, R., Liu, H., Wu, S., Pang, L., Jia, M., Fan, K., Jia, S., and Jia, L. (2012) Production and in vitro antioxidant activity of exopolysaccharide by a mutant, *Cordyceps militaris* SU5-08. *Int J Biol Macromol*, 51: 153-157.
- Ling, W. H., Wang, L. L., and Ma, J. (2002) Supplementation of the black rice outer layer fraction to rabbits decreases atherosclerotic plaque formation and increases antioxidant status. *J Nutr*, 132: 20-26.
- Liu, J. M., Zhong, Y. R., Yang, Z., Cui, S. L., and Wang, F. H. (1989) Chemical

- constituents of *Cordyceps mililaris* (L.) Link. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 14: 608-609, 639.
- Liu, Q., Hong, I. P., Ahn, M. J., Yoo, H. S., Han, S. B., Hwang, B. Y., and Lee, M. K. (2011) Anti-adipogenic activity of *Cordyceps militaris* in 3T3-L1 cells. *Nat Prod Commun*, 6: 1839-1841.
- Luthra, A., Nigam, P., and Misra, A. (2007) Metabolic correlation and management strategies of non-alcoholic fatty liver disease: An Asian Indian perspective. *Diabetol Metab Syndr*, 1: 279-285.
- Maeda, K. (2007) Role of adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract*, 77 Suppl 1: S17-22.
- Matcham, S. E., Jordan, B. R., and Wood, D. A. (1984) Methods for assessment of fungal growth on solid substrates. *Soc. Appl. Bacterioc. Tech. Ser.*, 19: 6-18.
- Matcham, S. E., Jordan, B. R., and Wood, D. A. (1985) Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Appl Microbiol Biotechnol*, 21: 108-112.
- Mattson, M. P. (2010) Perspective: Does brown fat protect against diseases of aging? *Ageing Res Rev*, 9: 69-76.
- Mau, J. L., Lin, H. C., and Chen, C. C. (2001) Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Res Int*, 34: 521-526.
- Min, S. W., Ryu, S. N., and Kim, D. H. (2010) Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O-beta-D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid. *Int Immunopharmacol*, 10: 959-966.
- Mitchell, D. A., de Lima Luz, L. F., Krieger, N., and Berovič, M. (2011) Bioreactors for Solid-State Fermentation. 347-360.
- Mollah, M. L., Park, D. K., and Park, H. J. (2012) *Cordyceps militaris* Grown on Germinated Soybean Induces G2/M Cell Cycle Arrest through Downregulation of Cyclin B1 and Cdc25c in Human Colon Cancer HT-29 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012: 249217.
- Mori, T., Sakaue, H., Iguchi, H., Gomi, H., Okada, Y., Takashima, Y., Nakamura, K., Nakamura, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Kadowaki, T., Matsuki, Y., Ogawa, W., Hiramatsu, R., and Kasuga, M. (2005) Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J Biol Chem*, 280: 12867-12875.
- Mundermann, A., Dyrby, C. O., and Andriacchi, T. P. (2005) Secondary gait changes in patients with medial compartment knee osteoarthritis: increased load at the ankle, knee, and hip during walking. *Arthritis Rheum*, 52: 2835-2844.
- Murugan, A. T., and Sharma, G. (2008) Obesity and respiratory diseases. *Chron Respir Dis*, 5: 233-242.

- Ng, T. B., and Wang, H. X. (2005) Pharmacological actions of Cordyceps, a prized folk medicine. *J Pharm Pharmacol*, 57: 1509-1519.
- Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D. L., and Exon, J. H. (2006) A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 46: 161-183.
- Nicklas, T. A., Baranowski, T., Cullen, K. W., and Berenson, G. (2001) Eating patterns, dietary quality and obesity. *J Am Coll Nutr*, 20: 599-608.
- Nigam, P. S. n., and Pandey, A. (2009) Biotechnology for agro-industrial residues utilisation. *Utili-sation, Springer Science, Netherlands.p.*: 466.
- Novikoff, A. B., Novikoff, P. M., Rosen, O. M., and Rubin, C. S. (1980) Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Biol*, 87: 180-196.
- Ntambi, J. M., and Kim, Y.-C. (2000) Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr*, 130: 3122S-3126S.
- Oh, J. Y., Choi, W. S., Lee, C. H., and Park, H. J. (2011) The ethyl acetate extract of *Cordyceps militaris* inhibits IgE-mediated allergic responses in mast cells and passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice. *J Ethnopharmacol*, 135: 422-429.
- Ohta, Y., Lee, J. B., Hayashi, K., Fujita, A., Park, D. K., and Hayashi, T. (2007) In vivo anti-influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans. *J Agric Food Chem*, 55: 10194-10199.
- Oishi, Y., Manabe, I., Tobe, K., Tsushima, K., Shindo, T., Fujiu, K., Nishimura, G., Maemura, K., Yamauchi, T., Kubota, N., Suzuki, R., Kitamura, T., Akira, S., Kadowaki, T., and Nagai, R. (2005) Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab*, 1: 27-39.
- Okazaki, N., Sugama, S., and Tanaka, T. (1980) Mathematical model of surface culture of Koji mold. *J Ferment Bioeng*, 58: 471-476.
- Ooijskaas, L. P., Tramper, J., and Buitelaar, R. M. (1998) Biomass estimation of *Coniothyrium minitans* in solid-state fermentation. *Enzyme Microb Tech*, 22: 480-486.
- Otto, T. C., and Lane, M. D. (2005) Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 40: 229-242.
- Pandey, A. (2003) Solid-state fermentation. *Biochem Eng J*, 13: 81-84.
- Park, D. K., Choi, W. S., and Park, H. J. (2012) Antiallergic activity of novel isoflavone methyl-glycosides from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans in antigen-stimulated mast cells. *J Agric Food Chem*, 60: 2309-2315.
- Pei, H., Yao, Y., Yang, Y., Liao, K., and Wu, J. R. (2011) Kruppel-like factor KLF9 regulates PPARgamma transactivation at the middle stage of adipogenesis.

*Cell Death Differ*, 18: 315-327.

- Peterson, J. J., Dwyer, J. T., Jacques, P. F., and McCullough, M. L. (2012) Associations between flavonoids and cardiovascular disease incidence or mortality in European and US populations. *Nutr Rev*, 70: 491-508.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147.
- Prasad, S., Phromnoi, K., Yadav, V. R., Chaturvedi, M. M., and Aggarwal, B. B. (2010) Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. *Planta Med*, 76: 1044-1063.
- Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y. C., Weisnagel, S. J., Argyropoulos, G., Walts, B., Perusse, L., and Bouchard, C. (2006) The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*, 14: 529-644.
- Regina Vinadé, E., Prato Schmidt, A., Emilio Santos Frizzo, M., Izquierdo, I., Elisabetsky, E., and Onofre Souza, D. (2003) Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. *Brain Research*, 977: 97-102.
- Reis, F. S., Barros, L., Calhella, R. C., Ciric, A., van Griensven, L. J., Sokovic, M., and Ferreira, I. C. (2013) The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties. *Food Chem Toxicol*, 62: 91-98.
- Ribeiro, J. A. (1995) Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. *Pharmacol Toxicol*, 77: 299-305.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., and Nigam, P. (2001) Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour Technol*, 77: 247-255.
- Rong, R., Tao, Y. X., Cheung, B. M., Xu, A., Cheung, G. C., and Lam, K. S. (2006) Identification and functional characterization of three novel human melanocortin-4 receptor gene variants in an obese Chinese population. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 65: 198-205.
- Rosen, E. D., Hsu, C. H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J., and Spiegelman, B. M. (2002) C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev*, 16: 22-26.
- Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., and Spiegelman, B. M. (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*, 14: 1293-1307.
- Saely, C. H., Geiger, K., and Drexel, H. (2012) Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology*, 58: 15-23.

- Salgado, J. M., Oliveira, A. G., Mansi, D. N., Donado-Pestana, C. M., Bastos, C. R., and Marcondes, F. K. (2010) The role of black rice (*Oryza sativa* L.) in the control of hypercholesterolemia in rats. *J Med Food*, 13: 1355-1362.
- Saris, W. H., Blair, S. N., van Baak, M. A., Eaton, S. B., Davies, P. S., Di Pietro, L., Fogelholm, M., Rissanen, A., Schoeller, D., Swinburn, B., Tremblay, A., Westerterp, K. R., and Wyatt, H. (2003) How much physical activity is enough to prevent unhealthy weight gain? Outcome of the IASO 1st Stock Conference and consensus statement. *Obes Rev*, 4: 101-114.
- Sato, A., Terata, K., Miura, H., Toyama, K., Loberiza, F. R., Jr., Hatoum, O. A., Saito, T., Sakuma, I., and Gutterman, D. D. (2005) Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288: H1633-1640.
- Sato, K., and Sudo, S. (1999) Small-scale solid-state fermentations. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, 2: 61-63.
- Schmid, S. M., Hallschmid, M., and Schultes, B. (2014) The metabolic burden of sleep loss. *Lancet Diabetes Endocrinol*.
- Shackelford, C., Long, G., Wolf, J., Okerberg, C., and Herbert, R. (2002) Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. *Toxicol Pathol*, 30: 93-96.
- Shawkat, H., Westwood, M. M., and Mortimer, A. (2012) Mannitol: a review of its clinical uses. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 12: 82-85.
- Shimada, T., Hiramatsu, N., Kasai, A., Mukai, M., Okamura, M., Yao, J., Huang, T., Tamai, M., Takahashi, S., Nakamura, T., and Kitamura, M. (2008) Suppression of adipocyte differentiation by *Cordyceps militaris* through activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295: E859-867.
- Shin, S., Park, Y., Kim, S., Oh, H. E., Ko, Y. W., Han, S., Lee, S., Lee, C. K., Cho, K., and Kim, K. (2010) *Cordyceps militaris* Enhances MHC-restricted Antigen Presentation via the Induced Expression of MHC Molecules and Production of Cytokines. *Immune Netw*, 10: 135-143.
- Shin, Y. K., Ye, M. B., Kim, S. W., Lee, S. C., Kim, I. W., Kim, S. N., Yang, H. O., and Kim, S. K. (2014) 3'-Deoxyadenosine inhibits pre-adipocyte differentiation and biosynthesis of triacylglycerol in 3T3-L1 cells. *J Funct Foods*, 6: 331-338.
- Smith, P. J., Wise, L. S., Berkowitz, R., Wan, C., and Rubin, C. S. (1988) Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 263: 9402-9408.
- Soukas, A., Socci, N. D., Saatkamp, B. D., Novelli, S., and Friedman, J. M. (2001)

- Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem*, 276: 34167-34174.
- Sowers, M. R., and Karvonen-Gutierrez, C. A. (2010) The evolving role of obesity in knee osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 22: 533-537.
- Stintzing, F. C., and Carle, R. (2004) Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci Tech*, 15: 19-38.
- Stolarzewicz, I. A., Ciekot, J., Fabiszewska, A. U., and Bialecka-Florjanczyk, E. (2013) Plant and microbial sources of antioxidants. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 67: 1359-1373.
- Sun, Y., Shao, Y., Zhang, Z., Wang, L., Mariga, A. M., Pang, G., Geng, C., Ho, C.-T., Hu, Q., and Zhao, L. (2014) Regulation of human cytokines by *Cordyceps militaris*. *J Food Drug Anal.*
- Tabrizchi, R., and Bedi, S. (2001) Pharmacology of adenosine receptors in the vasculature. *Pharmacol Ther*, 91: 133-147.
- Takahashi, S., Tamai, M., Nakajima, S., Kato, H., Johno, H., Nakamura, T., and Kitamura, M. (2012) Blockade of adipocyte differentiation by cordycepin. *Br J Pharmacol*, 167: 561-575.
- Tang, Q. Q., Otto, T. C., and Lane, M. D. (2003) CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 850-855.
- Taurhesia, S., and McNeil, B. (1994) Physicochemical factors affecting the formation of the biological response modifier scleroglucan. *J Chem Technol Biotechnol*, 59: 157-163.
- Taylor, S. M., and Jones, P. A. (1979) Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*, 17: 771-779.
- Tchoukalova, Y. D., Sarr, M. G., and Jensen, M. D. (2004) Measuring committed preadipocytes in human adipose tissue from severely obese patients by using adipocyte fatty acid binding protein. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287: R1132-1140.
- Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., and Watanabe, M. (1999) A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal Comm*, 36: 47-50.
- Tontonoz, P., Kim, J. B., Graves, R. A., and Spiegelman, B. M. (1993) ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol*, 13: 4753-4759.
- Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., and Osawa, T. (2003) Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates



- hyperglycemia in mice. *J Nutr*, 133: 2125-2130.
- Ueda, Y., Mori, K., Satoh, S., Dansako, H., Ikeda, M., and Kato, N. (2014) Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Biochem Biophys Res Commun*, 447: 341-345.
- Um, M. Y., Ahn, J., and Ha, T. Y. (2013) Hypolipidaemic effects of cyanidin 3-glucoside rich extract from black rice through regulating hepatic lipogenic enzyme activities. *J Sci Food Agric*, 93: 3126-3128.
- Valenti, L., Riso, P., Mazzocchi, A., Porrini, M., Fargion, S., and Agostoni, C. (2013) Dietary anthocyanins as nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2013: 145421.
- Van Gaal, L. F., Mertens, I. L., and De Block, C. E. (2006) Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 444: 875-880.
- Vannier, C., Gaillard, D., Grimaldi, P., Amri, E. Z., Djian, P., Cermolacce, C., Forest, C., Etienne, J., Negrel, R., and Ailhaud, G. (1985) Adipose conversion of ob17 cells and hormone-related events. *Int J Obes*, 9 Suppl 1: 41-53.
- Wabitsch, M. (2000) Overweight and obesity in European children: definition and diagnostic procedures, risk factors and consequences for later health outcome. *Eur J Pediatr*, 159 Suppl 1: S8-13.
- Wallace, T. C. (2011) Anthocyanins in cardiovascular disease. *Adv Nutr*, 2: 1-7.
- Wang, M., Meng, X. Y., Yang, R. L., Qin, T., Wang, X. Y., Zhang, K. Y., Fei, C. Z., Li, Y., Hu, Y., and Xue, F. Q. (2012) *Cordyceps militaris* polysaccharides can enhance the immunity and antioxidation activity in immunosuppressed mice. *Carbohydr Polym*, 89: 461-466.
- Wei, C. J., Tanner, R. D., and Wood, W. J. (1981) Elucidating the transition between submerged culture and solid-state baker's yeast fermentation. *Biotechnol Bioeng Symp*, 11: 541-553.
- Wood, D. A. (1979) A method for estimating biomass of *Agaricus bisporus* in a solid substrate, composted wheat straw. *Biotechnol Lett*, 1: 255-260.
- Wu, Z., Puigserver, P., and Spiegelman, B. M. (1999) Transcriptional activation of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 689-694.
- Xiao, J. H., Qi, Y., and Xiong, Q. (2013) Nucleosides, a valuable chemical marker for quality control in traditional Chinese medicine *Cordyceps*. *Recent Pat Biotechnol*, 7: 153-166.
- Xie, C. Y., Gu, Z. X., Fan, G. J., Gu, F. R., Han, Y. B., and Chen, Z. G. (2009) Production of cordycepin and mycelia by submerged fermentation of *Cordyceps militaris* in mixture natural culture. *Appl Biochem Biotechnol*, 158: 483-492.
- Xiong, Y., Zhang, S., Xu, L., Song, B., Huang, G., Lu, J., and Guan, S. (2013)

- Suppression of T-cell activation in vitro and in vivo by cordycepin from *Cordyceps militaris*. *J Surg Res*, 185: 912-922.
- Yang, J. H., Lin, H. C., and Maub, J. L. (2001) Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. *Food Chem*, 72: 465-471.
- Yang, S., Jin, L., Ren, X., Lu, J., and Meng, Q. (2014) Optimization of fermentation process of *Cordyceps militaris* and antitumor activities of polysaccharides in vitro. *J Food Drug Anal*, 22: 468-476.
- Yang, Y., Andrews, M. C., Hu, Y., Wang, D., Qin, Y., Zhu, Y., Ni, H., and Ling, W. (2011) Anthocyanin extract from black rice significantly ameliorates platelet hyperactivity and hypertriglyceridemia in dyslipidemic rats induced by high fat diets. *J Agric Food Chem*, 59: 6759-6764.
- Yao, L., Herlea-Pana, O., Heuser-Baker, J., Chen, Y., and Barlic-Dicen, J. (2014) Roles of the chemokine system in development of obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. *J Immunol Res*, 2014: 181450.
- Ying, J., Mao, X., Ma, Q., and Wen, H. (1987) Icons of medicinal mushroom from China. *Science Press Beijing*: 151-155.
- Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M. R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1993) SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*, 75: 187-197.
- Yu, R., Yang, W., Song, L., Yan, C., Zhang, Z., and Zhao, Y. (2007) Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydr Polym*, 70: 430-436.
- Zhang, X., Shen, Y., Prinyawiwatkul, W., King, J. M., and Xu, Z. (2013) Comparison of the activities of hydrophilic anthocyanins and lipophilic tocopherols in black rice bran against lipid oxidation. *Food Chem*, 141: 111-116.
- Zheng, Z., and Shetty, K. (2000) Solid-state bioconversion of phenolics from cranberry pomace and role of *Lentinus edodes* beta-glucosidase. *J Agric Food Chem*, 48: 895-900.
- Zhu, S. J., Pan, J., Zhao, B., Liang, J., Ze-Yu, W., and Yang, J. J. (2013) Comparisons on enhancing the immunity of fresh and dry *Cordyceps militaris* in vivo and in vitro. *J Ethnopharmacol*, 149: 713-719.