

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

Master Thesis

指導教授：楊芳鏘博士

Advisor : Fan-Chiang Yang, Ph.D.

冬蟲夏草(中華被毛孢)深層培養技術開發

Developing Submerged Culture Technology Of *Ophiocordyceps*

*sinensis(Hirsutella sinensis)*

研究生：張勝凱 撰

Graduate student : Sheng-Kai Chang

中華民國 103 年 7 月

July, 2014

## 博碩士論文延後公開/下架申請書

本論文為本人(即著作權人) 張勝凱 於 東海 大學

化學工程與材料工程系所 102 學年度第 2 學期取得

碩士  博士學位之論文

論文題目: 冬蟲夏草(中華被毛孢)深層培養技術開發

指導教授: 楊芳鏞

因本人以上列論文向經濟部智慧財產局申請專利

(專利申請案號: \_\_\_\_\_),

請於 \_\_\_ 年 \_\_\_ 月 \_\_\_ 日後再將上列論文公開閱覽。

因本人準備以上列論文申請專利,

請於 108 年 8 月 6 日後再將上列論文公開閱覽。

其他(請敘明原因及公開日期)

原因: \_\_\_\_\_,

請於 \_\_\_ 年 \_\_\_ 月 \_\_\_ 日後再將上列論文公開閱覽。

研究生: 張勝凱 (親筆簽名)

指導教授: 楊芳鏞 (親筆簽名)

中華民國 103 年 8 月 6 日

## 碩士學位論文指導教授推薦書

化學工程與材料工程研究所 張勝凱 君所提供之論文

冬蟲夏草(中華被毛孢)深層培養技術開發

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

化學工程與材料工程研究所所長

指導教授：楊榮爵

日期：103年 7月 30日

## 碩士學位論文口試委員會審定書

化學工程與材料工程研究所 張勝凱 君所提供之論文

冬蟲夏草(中華被毛孢)深層培養技術開發

經本委員會審定通過，特此證明。

論文口試委員會

委員：

楊崇爵      張志輝  
徐揚奇      林松池

指導教授：

楊崇爵

中華民國 103 年 7 月 30 日

## 摘要

冬蟲夏草 (*Ophiocordyceps sinensis*) 為中國著名的傳統中藥，可用於治療夜間盜汗、高血糖、高血脂、虛弱、心律失常及其他心臟、呼吸及腎、肝臟等疾病，本研究目的為利用中華被毛孢深層培養，其培養基組成及環境條件對菌絲生長以及部分生物活性成分之影響。

本研究先以三角搖瓶進行較佳的發酵環境的選定，再放大至5L發酵槽進行發酵控制並探討。在三角搖瓶實驗方面，結果指出在種菌培養後，進行17 day發酵培養，會有較佳的菌體產量 (4.7g/L)。培養基中的碳源方面以蔗糖 (sucrose) 較佳，而氮源方面則以酵母萃取物 (YE) 有較佳的產物生成，可得菌體5.38 g/L、蟲草素3.645 mg/L。在二階段添加碳源及氮源方面，單獨加入酵母萃取物可得菌體6.603 g/L，蟲草素5.36 mg/L，但同時添加效果不顯著。在添加物實驗方面，以添加腺苷、丙氨酸和天門冬氨酸有較佳的產物生成，菌絲產量可達5.52 g/L、蟲草素2.12 mg/L。至於腺嘌呤部分，發現在低濃度下效果不顯著，提高濃度後可得菌體5.24 g/L，蟲草素2.148 mg/L。而在5L發酵槽培養方面，發現在低轉速下，有利於菌體及產物生成，菌絲體可達4.01 g/L，蟲草素可達2.283 mg/L。希望研究結果可供日後冬蟲夏草生理活性產量提升之參考。

**關鍵字：**液態發酵、冬蟲夏草、腺苷、蟲草素

## Abstract

DongChongXiaCao (*Ophiocordyceps sinensis*) is a well-described remedy that has been used in traditional Chinese medicine, which can be used to treat conditions such as night sweats, hyperglycemia, hyperlipidemia, asthenia, arrhythmias, and other heart, respiratory, renal and liver diseases. The purpose of this study was to study the influence of medium composition, environmental conditions on the mycelia growth and the formation of some bioactive components in submerged cultures of *Ophiocordyceps sinensis*

The experiments were carried out in 250 ml shaking flasks or in a 5 liter stirred tank bioreactor. By using basal medium the biomass concentration could reach the level of 4.7 g/L at 20°C and 120 rpm in 17 days flask culture. Sucrose and yeast extract were determined to be the best carbon and nitrogen source, which could raise biomass concentration and cordycepin to the level of 5.38 g/L and 3.645 mg/L. When yeast extract was fed into the flask in fed-batch cultures, which could raise biomass and cordycepin concentration to level of 6.603 g/L and 5.36 mg/L. In order to enhance the production of cordycepin, some kinds of amino acid and precursors were added into the media. The results indicate that the addition of adenosine, alanine and aspartic could enhance the mycelia concentration and cordycepin content to the level of 5.52 g/L and 2.12 mg/L, respectively. The addition of adenine with high concentration could raise biomass and cordycepin concentration to level of 5.24 g/L and 2.148 mg/L. In 5L fermenter experiment, lower rotation speed was demonstrated to be favorable to the production of biomass and bioactive ingredients. The results obtained from this study will be used to enhance the production of mycelia and bioactive components in the large-scale submerged culture of *Ophiocordyceps sinensis*.

**Keywords :** submerged culture 、*Ophiocordyceps sinensis* 、adenosine 、cordycepin

## 謝誌

三年的研究所階段，終於告一段落，在這求學的過程中要感謝許多人對我的提攜和幫助。首先要感謝我的指導教授-楊芳鏘教授，謝謝老師在實驗和論文的寫作上耐心的教導並提供良好的學習環境，讓我能順利的完成學業。同時感謝東海大學顏宏偉教授、中興大學林松池教授、綠茵生技公司徐榜奎經理，撥空參與口試並對本論文的指正和建議，讓我獲益良多。

在研究生活中，非常感謝實驗室的學長姐于萱、鴨子、金門、欣培、Laco、凱平、芒果、嘉豪、同學金杉、娟姊、義成、西瓜、小培、小紀、小喵、容慈、毛毛、旻玉、小孟、奕全、B文，學弟妹于婷、品紋、俊星、奕瑋、車車，專題生拉奇、小妞、廷宜們以及所有曾經幫助過我的老師及朋友。謝謝你們在實驗上提供寶貴的意見與幫助，並帶給實驗室許多歡笑，讓我的求學生活多采多姿。

最後，謹將此論文獻給我的父母親及家人，感謝他們無盡的付出，以及精神上的支持與鼓勵，讓我能求學階段沒有後顧之憂的學習並完成學業，謝謝你們，我愛你們。

# 目錄

摘要.....	I
Abstract.....	II
謝誌.....	III
圖目錄.....	VI
表目錄.....	VII
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
2.1 冬蟲夏草之簡介.....	3
2.1.1 冬蟲夏草之分類與特性.....	4
2.1.1.1 冬蟲夏草的寄主.....	7
2.1.1.2 冬蟲夏草的生活特性.....	7
2.1.1.3 冬蟲夏草的外部型態.....	8
2.1.2 冬蟲夏草之成分與藥理功能.....	9
2.1.3 冬蟲夏草的開發與應用.....	18
2.2 蟲草之人工培養.....	18
2.2.1 固態培養.....	19
2.2.2 液態培養.....	19
2.3 蟲草研究概況.....	22
2.3.1 冬蟲夏草的研究進展.....	22
2.3.2 蛹蟲草的研究進展.....	23
第三章 材料與方法.....	26
3.1 實驗材料.....	26
3.1.1 實驗菌種.....	26
3.1.2 實驗藥品.....	28
3.2 實驗儀器.....	30
3.3 分析方法.....	32
3.3.1 菌體濃度.....	32
3.3.2 甘露醇濃度測定.....	32
3.3.3 腺苷及蟲草素分析.....	33
3.4 實驗方法.....	35
3.4.1 菌種斜面試管保存.....	35
3.4.2 平板培養皿培養與接菌活化.....	35
3.4.3 種菌製備.....	36
3.4.3 培養基.....	36
3.4.3.1 種子培養基 (Seed medium, SM) .....	36



3.4.3.2	發酵培養基 (Fermentation medium, FM)	37
3.4.5	接菌	37
3.5	實驗架構	38
3.6	實驗培養條件	39
3.6.1	培養時間之影響	39
3.6.2	不同碳源之影響	39
3.6.3	不同氮源之影響	40
3.6.4	二階段添加碳源之影響	40
3.6.5	二階段添加氮源之影響	41
3.6.6	二階段添加碳氮源之影響	41
3.6.7	添加不同前驅物、氨基酸之影響	42
3.6.8	添加不同濃度腺嘌呤之影響	42
3.6.9	5-L 攪拌式發酵槽	43
第四章	結果與討論	44
4.1	搖瓶批次發酵程序	44
4.1.1	培養時間之影響	44
4.1.2	不同碳源之影響	47
4.1.3	不同氮源之影響	50
4.1.4	碳源饋料之影響	53
4.1.5	氮源饋料之影響	56
4.1.6	碳氮源饋料之影響	59
4.1.7	添加不同氨基酸與前驅物之影響	62
4.1.8	腺嘌呤濃度之影響	67
4.2	5-L 攪拌式發酵槽批次程序	70
4.2.1	不同轉速之影響	70
第五章	結論與未來展望	74
5.1	結論	74
5.2	未來展望	76
	參考文獻	77
	附錄	85

## 圖目錄

圖 2.1	冬蟲夏草的寄主成蟲.....	7
圖 2.2	形成兩個子座的冬蟲夏草.....	8
圖 2.3	單一子座的典型冬蟲夏草.....	9
圖 2.4	腺苷結構式.....	10
圖 2.5	蟲草素結構式.....	11
圖 2.6	蟲草素可能的合成路徑圖.....	12
圖 2.7	甘露醇結構式.....	13
圖 3.1	<i>Ophiocordyceps sinensis</i> (BCRC37843)在 PDA 上之外觀.....	26
圖 3.2	冬蟲夏草不同之菌落型態.....	27
圖 3.6	<i>Ophiocordyceps sinensis</i> (BCRC37843)斜面保存.....	35
圖 3.7	實驗架構圖.....	38
圖 3.8	發酵槽裝置圖.....	43
圖 4.1	Fig.A-B 培養時間對菌體生長與產物單位菌體濃度之影響.....	45
圖 4.2	碳源對菌體生長與產物單位菌體濃度之影響.....	48
圖 4.3	氮源對菌體生長與產物單位菌體濃度之影響.....	51
圖 4.4	碳源饋料對菌體生長與產物單位菌體濃度之影響.....	54
圖 4.5	氮源饋料對菌體生長與產物單位菌體濃度之影響.....	57
圖 4.6	碳氮源饋料對菌體生長與產物單位菌體濃度之影響.....	60
圖 4.7	Fig.A-D 為不同添加物在不同取樣時間對產物單位菌體濃度之影響.....	64
圖 4.8	腺嘌呤濃度對菌體生長及產物單位菌體濃度之影響.....	68
圖 4.9	Fig.A-D 發酵槽不同轉速對菌體生長與產物單位菌體濃度之影響.....	71

## 表目錄

表 2.1	冬蟲夏草之生物分類.....	5
表 2.2	幾種常見蟲草的比較.....	6
表 2.3	冬蟲夏草與蛹蟲草的比較.....	25
表 3.1	實驗藥品清單.....	28
表 3.2	實驗儀器清單.....	30
表 3.3	種子培養基.....	36
表 3.4	發酵培養基.....	37
表 4.1	培養時間對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響.....	46
表 4.2	碳源對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響.....	49
表 4.3	氮源對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響.....	52
表 4.4	碳源饋料對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響.....	55
表 4.5	氮源饋料對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響.....	58
表 4.6	碳氮源饋料對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響.....	61
表 4.7	不同添加物第 19 天取樣對菌體生長及活性成分單位菌體產量 之影響.....	65
表 4.8	不同添加物第 21 天取樣對菌體生長及活性成分單位菌體產量 之影響.....	65
表 4.9	不同添加物第 23 天取樣對菌體生長及活性成分單位菌體產量 之影響.....	66
表 4.10	腺嘌呤濃度對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響....	69
表 4.11	轉速 50 rpm 對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響 ..	72
表 4.12	文獻與本實驗結果比較.....	73

## 第一章 緒論

自古以來，冬蟲夏草在中國一直被視為珍貴的藥材，在中草藥中占有重要地位。從古商朝開始，就被視為是滋養強壯、改善體質的漢藥材。明朝李時珍所撰『本草綱目』已有對於蟬花及白殭蟲的詳細記載。清初吳儀洛所編『本草從新』中首見冬蟲夏草一詞。2005年『中國藥典』中記載，其主要功效為“補肺益腎，止血，化痰；用於久咳虛喘，勞嗽咯血，陽痿遺精，腰膝痠痛”，而被認為具有特殊功效的珍貴藥材。在中國，冬蟲夏草被列為國家二級保護名貴藥材，與人參、鹿茸並列稱“中藥三大寶”。

冬蟲夏草是青藏高原高寒草甸的特有珍貴生物資，主要分布地區為西藏那曲、青海玉樹、四川、甘肅等高寒地帶和雪山草原，近年來則在尼泊爾、印度和不丹等高寒草甸中亦發現蹤跡。其藥用價值自古以來就有記載，而採集冬蟲夏草更是高寒牧區農牧民的主要收入，因此不論是在藥用或是經濟方面都具有其價值。由於冬蟲夏草生長環境所具備的高寒、低氧、低壓等特殊氣候條件，以及蟲生真菌對於宿主的專一性，這造就了野生的冬蟲夏草產量稀少且價格珍貴。

冬蟲夏草為珍貴的藥用真菌，因為其獨特的藥用價值而成為研究的熱點。近來已有陸續的研究報導指出冬蟲夏草的有效成分包括：蟲草素（Cordycepin），具有調節免疫、抗腫瘤、抗菌抗病毒等功效；腺苷（Adenosine）等生物鹼，具有舒張血管平滑肌、抑制心肌收縮、防止心律不整和鎮靜等功用；蟲草多糖

(*Cordyceps Polysaechride*)，具有抗凝血、降血糖、降血脂等活性；甘露醇(D-mannitol)，在臨床上能夠進入血循環，提高血漿滲透壓、降低顱內壓、利尿止咳等療效。

由於冬蟲夏草的生長條件嚴苛以及人類大量的採集，自然環境遭受破壞，使得野生的冬蟲夏草資源更為稀少。又因近年來液態發酵工業的進步，使得人工培養液態發酵生產逐漸替代天然冬蟲夏草。本實驗藉由人工液態培養的環境，探討冬蟲夏草的生長，並放大於攪拌式發酵槽(Stirred tank fermentor)，探討不同轉速對冬蟲夏草菌絲體生長與活性成分腺苷、蟲草素的影響，找出較適合的發酵條件，以利商業生產。

## 第二章 文獻回顧

### 2.1 冬蟲夏草之簡介

冬蟲夏草一詞最早見於清初吳儀洛所編之『本草從新』，早在明朝時期，李時珍於本草綱目中將冬蟲夏草命名為雪蠶，記其味極為甘美。至 1832 年趙學敏之『本草綱目拾遺』中補述：「出四川江油縣化林坪，夏為草、冬為蟲，長三寸許，下跌六足，履以上絕類蠶，羌俗採為上藥，功與人參同，又如冬在土中身活如老蠶，有毛能動，至夏則毛出土上，連身俱化為草，若不取至冬復化為蟲」，冬為蟲，夏為草，故稱冬蟲夏草。侵染過程可分為三階段，即侵入、寄生和腐生。冬季蟲草菌侵入蟲體內後，菌絲蔓延滋長，次年夏天氣溫回升，積雪融化，蟲體內菌絲便會穿出蟲體長出子座，形成子座與幼蟲屍體的複合體。傳統上，蟲草菌是麥角菌科 Clavicipitaceae 中蟲草屬 *Cordyceps sensu lato* 的所有真菌的統稱，是形成“蟲草”的真菌。目前，全世界報導記載和蟲草菌有關的名稱已有五百多個，中國已報導約 120 種。蟲草菌的寄主範圍十分廣泛，分為蟲生蟲草與菌生蟲草，可以寄生動物（包括昆蟲、蜘蛛、線蟲等）或者其他真菌（如大團囊菌屬 *Elaphomyces* Nees 和麥角菌屬 *Claviceps* Tul. 真菌）。蟲草菌在地球分布也十分廣泛，以熱帶和亞熱帶地區的物種多樣性最高（張姝等人，2013）。其中，冬蟲夏草屬為典型的昆蟲寄生性真菌，蟲生蟲草的寄主包括：雙翅目（Diptera）、膜翅目（Hymenoptera）、鞘翅目（Coleoptera）、鱗翅目（Lepidoptera）、半翅目（Hemiptera）、

異翅目 (Isoptera)、直翅目 (Orthoptera) 等昆蟲綱之幼蟲、蛹及成蟲及蜘蛛綱 (Arachnida) 等，而冬蟲夏草主要寄生在鱗翅目幼蟲上 (劉慈欣, 2004)。

### 2.1.1 冬蟲夏草之分類與特性

中華冬蟲夏草原產於大陸西南地區，雲南、西藏、青海和尼泊爾、印度、不丹等高海拔地帶。冬蟲夏草的生活史可分為無性型 (分生孢子) 和有性型 (子囊孢子) 兩個階段，在人工栽培和發酵中通常運用其無性型 (孫愛紅、左雪枝, 2007)。近年來報導從冬蟲夏草分離出來的無性型有很多，但只有中華被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 經接種蝙蝠蛾幼蟲，並完成了從染菌直到長出子實體的全過程，證明是冬蟲夏草無性型菌株，而冬蟲夏草頭孢 (*Cephalosporium dongchongxiacae* N. Y. Shen, S. M. Zhang, L. Zeng, X. C. Zhang & S. L. Wei)、蟲草頭孢 (*Cephalosporium sinensis* C.T. Chen)、蝙蝠蛾被毛孢 (*Hirsutella hepiali* C. T. Chen & N. Y. Shen)、中華束絲孢 (*Synnematium sinense* X. C. Yin & N. Y. Shen) 等也已被證明是中華被毛孢 (*H. sinensis*) 的同物異名 (勞景輝等, 2012)。由於冬蟲夏草子實體形成條件嚴苛，大多數無性型人工培養無法長成子實體。為此，日本小林義雄首次提出無性型判定的五種標準：1. 蟲草子座一部分或分枝轉變成產生分生孢子的束絲；2. 蟲草子囊孢子接種在培養基上可人工形成產生孢子的束絲或菌絲層；3. 形成蟲草子座的寄主昆蟲上所覆蓋的菌絲束產生分生孢子；4.

在寄主昆蟲上同時出現蟲草子座與產分生孢子的束絲結構；5.在同一地區長蟲草子實體的同種昆蟲的不同蟲體上同時觀察到無性產孢結構(蔣毅、姚一建,2003)。

至於有性型名稱則由過去的 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.更名為

*Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G. H. Sung, J. M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora。

表 2.1 冬蟲夏草之生物分類

分類	中文名	英文名
界	真菌界	Fungi
亞界	雙核亞界	Dikarya
門	子囊菌門	Ascomycota
亞門	盤菌亞門	Pezizomycotina
綱	糞殼菌綱	Sordariomycetes
亞綱	糞殼菌亞綱	Sordariomycetidae
目	肉座菌目	Hypocreales
科	蛇形蟲草科	Ophiocordycipitaceae
屬	蛇形蟲草屬	<i>Ophiocordyceps</i>
種	中華蟲草	<i>O. sinensis</i>

來源：維基百科

(<http://zh.wikipedia.org/wiki/%E5%86%AC%E8%99%AB%E5%A4%8F%E8%8D%89>)



表 2.2 幾種常見蟲草的比較

	拉丁學名	子座特性	寄主	產地
蛹蟲草	<i>C.militaris</i>	橙黃色，單生，有十數個從蛹體前端或測部發出	鱗翅目	河北、安徽、陝西、遼寧、甘肅、廣西、湖北、福建
冬蟲夏草	<i>O.sinensis</i>	褐色，單生，從蟲體頭部發出	鱗翅目幼蟲	青海、四川、西藏、貴州
蟬花	<i>Cordyceps cicadicola</i>	柄棕褐色，頭部淡黃色，單生或2~3枝成叢，從蟲體前端發出	蟬成蟲	浙江、福建、四川
甘肅蟲草	<i>C.gansuensis</i>	褐色，單生	鱗翅目	甘肅
新疆蟲草	<i>Cordyceps sp</i>	橙黃色或深棕色	阿爾泰蝙蝠蛾幼蟲	新疆
香棒蟲草	<i>C.barnesii</i> <i>Thwaites ex</i>	暗褐色，單生，蟲體頭部與胸部之間一側長出	鞘翅目	青海、廣東、山西、雲南
亞香棒蟲草	<i>C.hawkesii</i>	黑褐色，單生，從蟲體前端發出	鱗翅目	廣西、安徽、福建、山西
大團囊蟲草	<i>C.ophioglossoides</i>	暗褐色，多分枝成群	大團囊菌屬	江蘇、廣西、四川、雲南

### 2.1.1.1 冬蟲夏草的寄主

冬蟲夏草的寄生昆蟲不只單一種，包括了蝠蛾科的蝙蝠屬 (*Hepialus*)、類蝙蝠屬 (*Hepialiscas*)、棒蝙蝠屬 (*Napialus*)、二岔蝙蝠屬 (*Forkalus*) 和雙節蝙蝠屬 (*Bipectilus*) 等 5 個屬的 20 種蝙蝠類幼蟲，其中，蝙蝠屬的蟲草蝙蝠蛾 (*Hepialus armoricanus*)、斜脈蝠蛾 (*H.oblifurcus*)、白馬蝠蛾 (*H.baimaensis*) 和人支蝠蛾 (*H. renzhiensis*) 等是冬蟲夏草的優勢寄主 (郭宏春等, 2003)。



圖 2.1 冬蟲夏草的寄主成蟲

### 2.1.1.2 冬蟲夏草的生活特性

原產於中國雲南、青藏等高海拔的冬蟲夏草，每年夏天時，蝙蝠蛾產卵於土中，孵化後的幼蟲，以啃食附近植物根為食，在土壤中被真菌感染，蟲草菌侵入幼蟲體內寄生，以蟲體為養分進行吸收，待冬天一到，幼蟲僵化而死，體內佈滿菌絲，但外觀仍維持毛毛蟲的型體，此稱為菌核，並以此種型態度過冬天，這便是「冬蟲」階段，於次年春天，氣溫回暖，菌核內的真菌開始活絡起來，並在蟲

體的頭部長出棒狀似的子實體，外觀類似雜草，此即為「夏草」，這便是冬蟲夏草一詞的由來，子座表層會釋放出子囊孢子，並感染其他幼蟲，完成生活史的循環。

### 2.1.1.3 冬蟲夏草的外部型態

冬蟲夏草的外部型態構造於前端褐色部分為真菌的子座，由菌核的前端產生，通常一個蟲體形成一個子座，少數有二到四個子座（如圖 2.1、2.2），長度約為 4-10 公分，為細長棒狀，基部約 0.1-0.5 公分寬，頭部圓柱型，較寬，約 0.2-0.6 公分，具有非常豐富的型態多樣性。前期內部充實，後逐漸中空，表面布有細粒狀突起，為子囊殼的開口。在顯微鏡下觀察，可發現子囊殼呈深褐色，表生或半埋生，倒梨形至橢圓形，約 300-500 微米長，直徑約 150-250 微米，內含無數個子囊，子囊約 250-400 微米長，寬約為 7-10 微米，每個子囊含有 1-4 個子囊孢子，自然彈射出的成熟子囊孢子無色，線形，有橫隔，大小均勻（何蘇琴等，2011）。



圖 2.2 形成兩個子座的冬蟲夏草



圖 2.3 單一子座的典型冬蟲夏草

## 2.1.2 冬蟲夏草之成分與藥理功能

### 1. 一般化學成分

根據研究表明，天然冬蟲夏草的重要化學成分為：水分 10.8%、脂肪 8.4%、粗纖維 18.53%、粗蛋白 25.32%、碳水化合物 28.9%，其中，甘露醇占了 7.29% 其他還有乳糖、葡萄糖以及麥角甾醇等糖醇類物質。此外，蛋白質中含有 1.9% 的天門冬氨酸、1.04% 的絲氨酸、1% 的蘇氨酸、3.1% 的谷氨酸、1.29% 的丙氨酸、1.14% 的脯氨酸、1.28% 的甘氨酸、1.25% 的纈氨酸、1.4% 的蛋氨酸、0.11% 的胱氨酸、1.12% 的昇亮氨酸、1.2% 的亮氨酸、0.88% 的苯丙氨酸、1.28% 的賴氨酸、1.73% 的精氨酸、0.94% 的組氨酸（陳仕江等，2001）。以原子吸收光譜儀分析天然冬蟲夏草，發現冬蟲夏草含有豐富的鐵、銅、鋅、錳、鈣、鎂等微量元素，特別是鋅的含量是其他保健中草藥無法比擬的。這與冬蟲夏草能增強肌體免疫、抑制腫瘤細胞生長、清熱解毒等保健功能吻合。其他還有維生素 B1、B2、B12 以及油酸、亞油酸等有機酸（叢柏燕，2010）。

## 2. 生物活性成分

根據文獻敘述，冬蟲夏草含有多種生物活性成分，用來評價品質的好壞，作為指標性產物的依據。

### (1) 腺苷 (Adenosine)

冬蟲夏草的腺苷結構鑑定源自於西藏產的冬蟲夏草子實體中分別得到次黃嘌呤核苷、腺嘧啶、尿嘧啶和鳥嘧啶的次黃嘌呤，自蟲體得到微量次黃嘌呤核苷、鳥嘌呤、腺嘌呤和腺苷等物質。腺苷具有鎮靜、血管擴張、降溫、鎮痛、抗缺氧、降低膽固醇等藥理活性。其為缺血性心臟病用藥，具有心肌代謝復活以及冠狀動脈擴張作用，用於治療陣發性上心室心搏過速。亦為一種抗心律不整藥物，其作用機制為降低心臟傳導速度，適用於突發性心跳快速症（李建良，2001）。

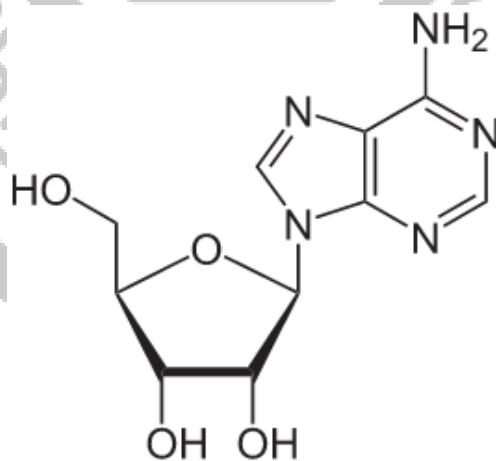


圖 2.4 腺苷結構式

## (2) 蟲草素 (Cordycepin)

1950 年 Cunningham 等人於蛹蟲草 (*C.militaris*) 之發酵製備物中發現具有成分 3'-deoxyadenosine 之核苷抗生素，將之稱作為蟲草素 (Cordycepin)。蟲草素在調節免疫、抗腫瘤、抗菌抗病毒、抗白血病等方面都具有功效。蟲草素具有抗病毒活性，是一種重要的核苷抗代謝物，可抑制細胞中 mRNA 後轉譯作用，是嘌呤再生合成的回饋抑制劑；腫瘤細胞無論是在活體內或外，其細胞抑制性均大於細胞毒性，人體腫瘤細胞的抗增值效應與蟲草素的吸收有直接關係，在癌症的化療上具有應用潛力 (李建良, 2001)。Werner 等人用實驗證明蟲草素能抑制小鼠腫瘤細胞的核酸合成，起到抑制腫瘤細胞 mRNA 合成的作用 (潭少君等, 2010)。另外在植物與真菌方面也有研究，對於皮膚致病性真菌及枯草桿菌具有抑制作用。

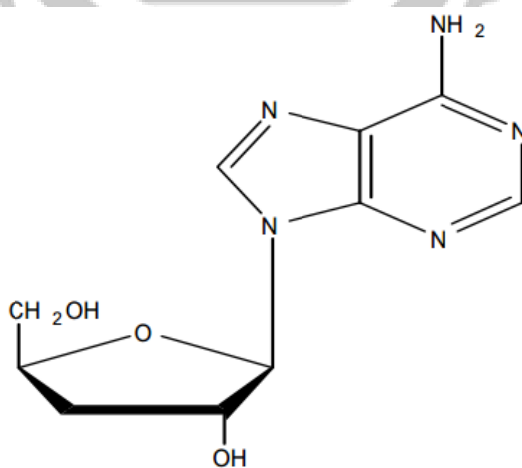


圖 2.5 蟲草素結構式

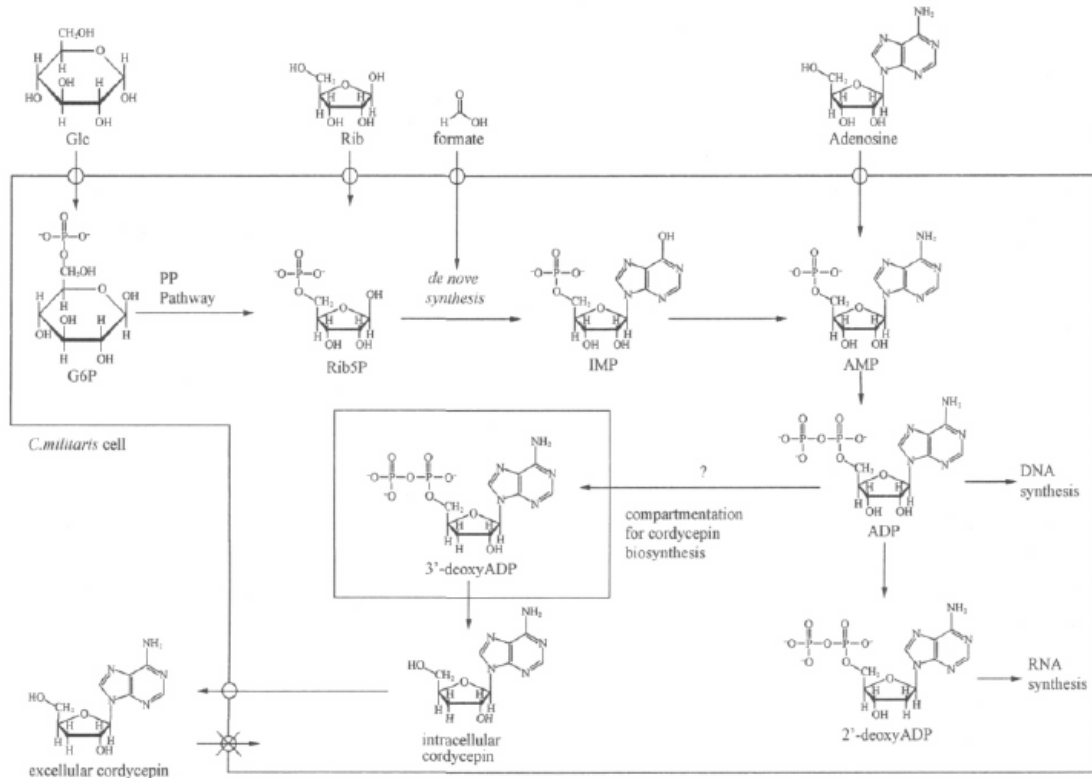


圖 2.6 蟲草素可能的合成路徑圖

### (3) 甘露醇 (Mannitol)

Chatterjee 等人於 1957 年首次將甘露醇從蟲草中分離出來，誤以為其結構為 1,3,4,5-四羥基環己烷酸，被譽為“蟲草酸”。後來經由 Sprecher 等人再次鑑定，確認蟲草酸的真正結構為甘露醇。目前許多研究從冬蟲夏草分離出來的甘露醇單體，通過物理和化學反應鑑定其結構為 D-甘露醇。由於冬蟲夏草的產地、種類、測定方法不同，各報導的含量也有差異，多數為 5%~8%。不同部位含量也有差異，蟲體含量高於子座，隨著子座發育，甘露醇含量也會增加(劉彥威，2004)。甘露醇具有利尿、脫水、鎮咳、去痰、平喘、提高血漿滲透壓、降低顯

內壓與眼內壓、清除人體內強毒性的羥自由基等作用，並且對多種疾病有一定療效。這與蟲草補肺益腎、止咳化痰、強身健體的功效一致。目前甘露醇已做為人工發酵蟲草的質量指標之一（劉彥威、蘇敬良等，2006）。

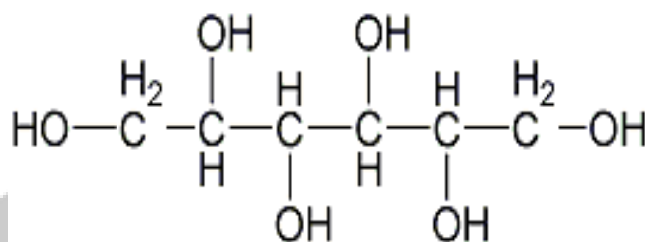


圖 2.7 甘露醇結構式

#### (4) 蟲草多醣 (Cordyceps Polysaechride)

一種高度分枝的半乳甘露聚糖，是藥食用真菌發揮功效的活性成分之一。蟲草多醣透過分析證明是由半乳糖、甘露糖、葡萄糖等單糖組成，其分子量大約 45,000。根據藥理學及臨床研究表明，抗腫瘤活性與分子量有關，分子量大於 16,000 才具有抗腫瘤活性，另外蟲草多醣還可以增強免疫力、抗病毒、抗放射、降血脂以及降血糖等功效。（劉高強，2007）。

蟲草多醣能提高機體的免疫功能、抗腫瘤等作用。對機體網狀內皮系統及腹腔巨噬細胞的吞噬功能具有明顯的激活作用，能促進淋巴細胞的轉化，沈敏等人對冬蟲夏草多醣的免疫作用進行研究，結果表明：蟲草多醣能改變大鼠淋巴細胞表面分子，進而調節機體的免疫反應，證明蟲草多醣是具有免疫調節作用的有效



成分。冬蟲夏草多糖能提高血清的皮質酮含量，促進機體核酸及蛋白質的代謝，具抑制腫瘤作用。袁建國等研究表明，冬蟲夏草多糖對小鼠有明顯的抑瘤作用，抑瘤率可達 45.71%（譚少君、劉鵬鵬，2010）。

### 3. 冬蟲夏草之藥理功能

#### (1) 免疫調節作用

冬蟲夏草水萃液可明顯增加小鼠腹腔吞噬細胞吞噬指數和百分率，可使小鼠胸腺縮小，提高皮質醇所致免疫抑制狀態小鼠的血清溶血素及脾細胞免疫溶血活性，對體液免疫有調節作用。在細胞免疫方面，可使小鼠脾臟 T 淋巴細胞增殖，提高 T 輔助細胞比例；也可激活巨噬細胞等。野生蟲草和人工菌絲體可在體外使脾細胞增生。在體內可提高心肌粒腺體 ATP 的生成。

#### (2) 抗腫瘤

蟲草素能抑制癌細胞裂變，阻止癌細胞的擴散，顯著提高體內 T 細胞、巨噬細胞的吞噬能力。而蟲草多糖能夠促進淋巴轉化，增強機體自身的抗癌能力。從冬蟲夏草的甲醇萃取物中分離到兩種抗腫瘤化合物，能有效抑制 K562、WM-1341、HL-60 和 RPMI-8226 等腫瘤細胞的增殖。這說明冬蟲夏草的抗腫瘤作用並非單一成分所為。Wang 等（2005）研究表明，用超臨界二氧化碳萃取法

獲得一組分 R 可透過誘導細胞凋亡而有效抑制腸癌和肝癌細胞的生長。

### (3) 調節內分泌作用

據研究，蟲草中腺苷能調節腎上腺素以及與性功能有關的內分泌。因此對中老年和內分泌萎縮、失調引起的性功能障礙有很好療效。添加冬蟲夏草到間質細胞中，能刺激雄性荷爾蒙分泌。其萃取液能使摘除睪丸的幼年大鼠精囊質量明顯增加，但並不影響幼年小鼠子宮質量，說明有雄性激素樣作用。另外，腎虛多是由內分泌功能萎縮引起的，而臨床上有許多蟲草治療腎虛的案例，所以也是治療腎虛的良藥。

### (4) 調節心血管系統

冬蟲夏草萃取液對小白鼠具有較強的擴張冠狀動脈的功能，可使心率減慢，心輸出血量和冠脈流量增加。降低心肌耗氧量，具有特異性增強心肌耐缺氧能力。對阿霉素性心肌損傷有明顯保護作用，能改善冠心病、高血壓性心臟病患者左心室舒張功能。亦能促進大白鼠血小板凝聚而起到止血作用，醇萃取液能抑制大鼠血栓形成。此外，對戊巴比妥鈉麻醉大有明顯的降壓作用。

#### (5) 對中樞神經的鎮靜作用

冬蟲夏草可明顯減少小白鼠自發性活動，延長戊巴比妥鈉睡眠時間和鎮靜、抗驚厥等作用。此外，還可使正常體溫降低，顯著延長番木鱉鹼所導致驚厥的潛伏期。

#### (6) 對腎臟的調節作用

冬蟲夏草對腎衰竭、急性腎衰竭、慢性腎病都有治療作用。Klotho 基因是與人類衰老相關的基因，主要表達於腎臟和大腦脈絡膜中，尤以腎小管上皮細胞表達明顯。而慢性腎功能衰竭的主要病變是腎組織纖維化，最終導致器官功能衰竭。因此，Klotho 基因與慢性腎臟疾病有相當關係。經研究觀察蟲草對該基因的影響，研究冬蟲夏草的抗凋亡機制，為高血壓腎損害的治療提供實驗依據（唐榮，2009）。

#### (7) 抗菌、抗炎、抗病毒作用

人工發酵菌絲體對小鼠，天然蟲草對大鼠都具有明顯的抗炎作用。蟲草中的蟲草素具有抑菌的作用。體外實驗證明，甘露醇對葡萄球菌、鏈球菌、鼻疽桿菌、炭疽桿菌、豬出血性敗血症桿菌及須癬菌、石膏樣小芽孢菌、羊毛狀小芽孢菌等真菌都有抑制作用。蟲草發酵液中含有耐熱的廣譜性抗菌物質，對於革蘭

氏菌、芽孢菌、放線菌中的鏈霉菌具有抑制作用，但對酵母及絲狀真菌則沒有效果。

#### (8) 對呼吸系統的作用

甘露醇能保肺益腎、止血化痰，增強支氣管纖毛活動能力，調節支氣管平滑肌，同時蟲草素對結核桿菌引起肺部感染的病菌有強烈抑制和消滅的作用。並且甘露醇和蟲草多醣都能修復已經受損的肺泡細胞。因此對各類型的肺部疾病和支氣管哮喘都有療效。尤其對中老年和吸菸引起的慢支、哮喘效果特顯著。

#### (9) 促進造血作用

蟲草對人體的造血系統的主要作用是因為蟲草多醣能提高骨髓細胞的造血功能，促進紅細胞生成，同時對抗白血病和粒細胞減少。對白血病人或接受化療的病人有積極的治療作用。

#### (10) 對骨骼肌的影響

冬蟲夏草對提高大鼠抗自由基的氧化的功能具有顯著性，能夠提高大鼠的運動能力，同時，對運動造成的骨骼肌細胞膜的損傷有明顯的保護作用。

### (11) 其他藥理作用

除了上述的藥理作用之外，冬蟲夏草還具有抗疲勞、去除自由基和抗氧化、延緩衰老、調節脂類代謝和護肝等作用。

### 2.1.3 冬蟲夏草的開發與應用

隨著人們對於冬蟲夏草的需求增加和野生冬蟲夏草資源逐漸枯竭，人們開始探索使用人工方法培育仿冬蟲夏草。因為人工培養出的菌絲體經由科學分析和實驗的驗證，其化學成分和生理活性成分與野生冬蟲夏草類似。因此，以人工的方法逐漸替代短缺的野生資源，在發展應用方面有其潛在市場。目前市場上，以蟲草菌粉為主要原料，已開發藥品、保健品與營養食品等。如蟲草膠囊、蟲草雞精、蟲草補酒、冬蟲夏草健康飲料等。台灣市面上則有台糖冬蟲夏草膠囊、統一冬蟲夏草雞精、統一冬蟲夏草黃金蜆錠、諾亞康蟲草多醣體有氧膠囊等產品。

## 2.2 蟲草之人工培養

由於野生的蟲草資源有限，又因人類過度的開採，導致野生資源產量更是珍稀。因此近年來利用生物技術等方式進行人工培養，而人工培育後經科學分析成分與野生蟲草類似，所以目前主要以人工培育方式取代野生資源，而人工栽培技術可分固態培養和液態培養。

## 2.2.1 固態培養

是指不脫離蟲草生長的自然環境，或利用天然的方式培養子實體的方法，其主要是先培養寄主昆蟲，然後以子囊孢子制成的懸浮液，利用噴灑或注射等方式接種到幼蟲體或基質上提高感染率，然後控制溫度、濕度及光照進行栽培。雖然固態培養在本質上最接近野生冬蟲夏草，都是利用蟲體作為營養來源，但由於此方法耗時較久、需要合適的寄主昆蟲、技術要求也高，且品質較不穩定，目前尚無重大突破。

## 2.2.2 液態培養

液態培養又稱深層發酵培養，最早是由德國學家 E.D.Wards 發明並用於食用菌菌絲體的大規模培養中，屬於現代生物技術之一，是指在生物反應器中模仿自然界將食、藥用菌在生育過程中所必須的糖類、有機和無機含氮的化合物、無機鹽等微量元素以及其他營養物質溶解在水中作為培養基，進行微生物發酵，藉由控制 pH 值、溫度、通氣量、攪拌速率或轉速等條件，使菌絲生長，累積有用的代謝產物。相對於固態發酵，其優點是菌體生快速、耗時較短、微生物生長所需條件容易控制、不受季節性以及培養空間的限制，但仍有其缺點，像是發酵後的廢液處理問題、冷乾或是噴霧乾燥設備費高等問題。培養過程中，通常影響發酵成敗的關鍵因素有兩個，分別為化學因子：碳源、氮源、pH 值等；物理因子：

溫度、攪拌速率或轉速、通氣量等。以下分別就工業化生產關鍵問題稍做介紹。

## 1. 碳源

即生物生長和發育所需的碳元素來源，對於微生物的生長極為重要，主要作用為構成細胞物質和提供細胞生命活動所需的能量，提供合成菌絲與產物的支架。主要來源主要有糖類、油脂、有機酸等。李等人（2004）在液態培養中國被毛孢實驗中得到，碳源方面利用葡萄糖、蔗糖和果糖較佳，其次為乳糖、澱粉。C. - H. Dong（2005）利用不同種類碳源對 *C.sinensis* 進行最佳碳源探討，發現以蔗糖效果較佳，所得菌絲產量為 22g / L。

## 2. 氮源

氮源主要用於構成菌體的細胞物質如氨基酸、蛋白質、核酸和含氮代謝物。從分子態的  $N_2$  到複雜的含氮化合物都能夠被不同的微生物利用，氮源種類多寡對真菌菌絲體的形態有所影響。氮源一般只提供合成細胞質和細胞中其他結構的原料，無法作為能源。常見的氮源種類可分兩大類：有機氮源和無機氮源。有機氮源如蛋白朊、酵母粉、尿素等，成分較複雜，除了氮源，還提供無機鹽及生長因子，冬蟲夏草較能利用複合有機氮中的蛋白朊轉換成菌絲體。而無機氮源主要有銨鹽、硝酸鹽、氨水，能被微生物較快吸收利用，但通常會引起 pH 的變化。

### 3. 無機鹽類

無機鹽類是微生物生長不可或缺的營養物質。如鉀、鈣、鎂、鐵、磷等元素，其主要作用是構成菌體細胞的成分、構成酵素的組成成分、促進酵素作用、調節菌體內外滲透壓。微生物對這些元素的需求量非常微小，但若生長過程中缺少這些元素，可能會降低細胞的生理活性，甚至停止生長。

### 4. pH 值

每種微生物的生長所需要的環境都有一個 pH 範圍，對大多數微生物而言，生長的環境 pH 值為 5-9，但不同的菌種會有不同的最適生長 pH 值。環境中 pH 變化若過於激烈，對微生物的生長會非常不利。pH 值對微生物的影響有：改變營養物質的供給狀態、影響菌體細胞膜的帶電荷性質和穩定性、影響酵素的活性、影響代謝產物的改變。

### 5. 攪拌、轉速與通氣

真菌在液態培養發酵過程中，菌絲會形成團塊顆粒球狀或絲帶狀，培養基的黏度會變大，導致氧氣的傳遞困難，因此在液態發酵中常會利用攪拌、通氣、振盪的方式來增加質傳跟熱傳的效率。通氣量的大小通常取決於菌的厭氧或好氧，而攪拌速率太低容易造成混和不均，過高則會有剪切力影響。



## 2.3 蟲草研究概況

由於冬蟲夏草和蛹蟲草都具有很高的應用價值，因此成為近年來的研究熱點，不論是在分類學地位、分布及生活史、寄主範圍、生態學、分子遺傳學等方面都取得重要的研究進展，下面分別敘述兩種蟲草的近況發展。

### 2.3.1 冬蟲夏草的研究進展

冬蟲夏草的生活史可分為無性型和有性型兩個階段，在人工栽培和發酵中通常運用其無性型，而早期的研究中忽略了產生冬蟲夏草所必須的高寒生態環境以及特定的寄主昆蟲，致使部分研究的冬蟲夏草菌株其實只是生長於冬蟲夏草上的其他菌，但隨著對冬蟲夏草的認識加深及研究技術的發展，真正的冬蟲夏草使被廣泛研究。近年來報導從冬蟲夏草分離出來的無性型有很多，但只有中華被毛孢經接種蝙蝠蛾幼蟲，完成了從染菌直到長出子實體的過程，證明是無性型菌株，而蟲草頭孢、蝙蝠蛾被毛孢、中華束絲孢等已被證明為中華被毛孢的同物異名。因此，進行研究前，對菌種的鑑定是有必要的。

相較於液態發酵，固態的設備較簡單，且後續處理相對簡單，利於減輕環境汙染及生產成本。目前固態培養雖然已經掌握了一些基本技術，但離產業化還有很多關鍵問題需要解決，其中用冬蟲夏草菌接種幼蟲形成僵蟲或僵蟲長出子座的成功率非常低，成為目前限制冬蟲夏草固態培養的主要因素。

菌絲體乾重是冬蟲夏草液態發酵條件及培養機篩選的指標之一。Dong 等人對冬蟲夏草深層發酵進行單因素實驗，發現培養基中含有蔗糖、蛋白胨、維生素 B 等物質最有利於菌絲生長，而蔗糖、蛋白胨、酵母萃取物最佳濃度分別為 50 g/L、10 g/L、3 g/L，經過 40 day 發酵可得菌絲 22 g/L；Dong 等人進一步發現，冬蟲夏草最適合生長溫度為 15°C-18°C，超過 21°C 則生長開始緩慢，達 25°C 則停止生長。多糖做為蟲草的有效成分之一，產量也常做為評價指標。Choi 等人發現，在液態培養中加入柑橘類果皮，可有效提升多糖 (48.9 mg/mL) 與抗氧化活性。

### 2.3.2 蛹蟲草的研究進展

麥角菌科蟲草屬的模式種，又稱北蟲草，多發現於溫帶、低海拔的環境，在世界各地廣泛分布，包括美洲、歐洲、亞洲等地都有報導。其生活史類似於冬蟲夏草，菌感染蟲體並在體內形成菌核，當蟲化作蛹時，蟲體死亡菌核分化產生子座，自蛹中長出，故曰蛹蟲草。

與冬蟲夏草不同的是，蛹蟲草很容易在昆蟲體上形成子實體，在天然基質方面，像是糙米、玉米、小麥、大豆、高粱米等皆能培養形成子實體。在環境影響因子方面，適當的溫度、高濕度，都能使蛹蟲草長得更好。適當的光照，更能誘發子實體的形成 (Mu et al. 2010)，現已能實現規模化的生產。

蛹蟲草菌主要寄生鱗翅目昆蟲的蛹，與冬蟲夏草相比，寄主範圍更廣，生長

快速且容易人工培養產生子實體，因此常作為冬蟲夏草的替代品進行開發與研究。

培養基對蛹蟲草液態培養生產有效成分有著明顯影響。溫魯等人認為蠶蛹粉、豆粉是蛹蟲草液態發酵培養基中良好的氮源，可產較高的蟲草素與腺苷。尹萍等研究表明發酵培養基以蔗糖 2%、蛋白胨 1%、磷酸二氫鉀 0.1% 為主，接種量 5%、25°C、150rpm 條件下培養可產較高量菌絲體。雷坤等以蟲草素含量為指標，優化得出最佳碳源為蔗糖和玉米粉，最適合氮源為蛋白胨，最適合生長因子為 VB<sub>1</sub>，pH6.5。王英臣等分析不同因素對胞外多糖的影響，認為 pH6.5、20°C，可產多糖 11.8 g/L，菌絲 12.2 g/L。王蕾等比較營養物添加對蟲草素累積的影響，結果表明，腺苷、腺嘌呤、丙氨酸等氨基酸均能有效提蟲草素的產量。李祝等研究表明，添加 6% 鄰苯二甲酸二丁酯，相比於對照組而言，其菌絲體提高了約 7 倍。Shih 等人發現初始 pH6.0、YE4.5%、兩階段結合搖瓶發酵與靜態發酵可顯著提高蟲草素的生產，在此優化條件下，蟲草素最大產量為 2214.5mg/L。而添加 1% 植物油與在低 pH 值下可刺激菌絲與多糖的產量。

表 2.3 冬蟲夏草與蛹蟲草的比較

菌種	來源	形態特徵	部位	無性型階段菌種特性	腺苷 (mg/g)	蟲草素 (mg/g)
野生冬蟲夏草	西藏	黑褐色，子座呈圓柱型，從頭部長出	草	蝠蛾多毛孢子囊菌 低溫型	0.69	0.19
			蟲體		0.23	0.09
野生冬蟲夏草	青海	黑褐色，子座呈圓柱型，從頭部長出	草	蝠蛾多毛孢子囊菌 低溫型	0.71	0.10
			蟲體		0.20	0.06
野生蛹蟲草	遼寧	橙黃色，子座橢圓形，表面有黃色粉末狀	蟲草複合體	蛹草擬青霉子囊菌 中溫型	0.75	1.24
人工蛹蟲草	上海	橙黃色，子座橢圓形，表面有黃色粉末狀	蟲草複合體	蛹草擬青霉子囊菌 中溫型	0.70	19.20

## 第三章 材料與方法

### 3.1 實驗材料

#### 3.1.1 實驗菌種

本實驗所採用的菌種 *Ophiocordyceps sinensis* (BCRC 37843)，採購於食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。

在配置好的 PDA 平板上，18°C-20°C 的黑暗條件下培養約 45-60 天，菌落的直徑多約為 15mm。菌落外觀呈灰褐色或黃褐色，菌落堅硬、緊密，表面偶有放射狀縱紋，並產生黃褐色或黑褐色色素滲透至培養基，不同菌株的菌落型態或色澤、色素均有差異。



圖 3.1 *Ophiocordyceps sinensis* (BCRC37843) 在 PDA 上之外觀

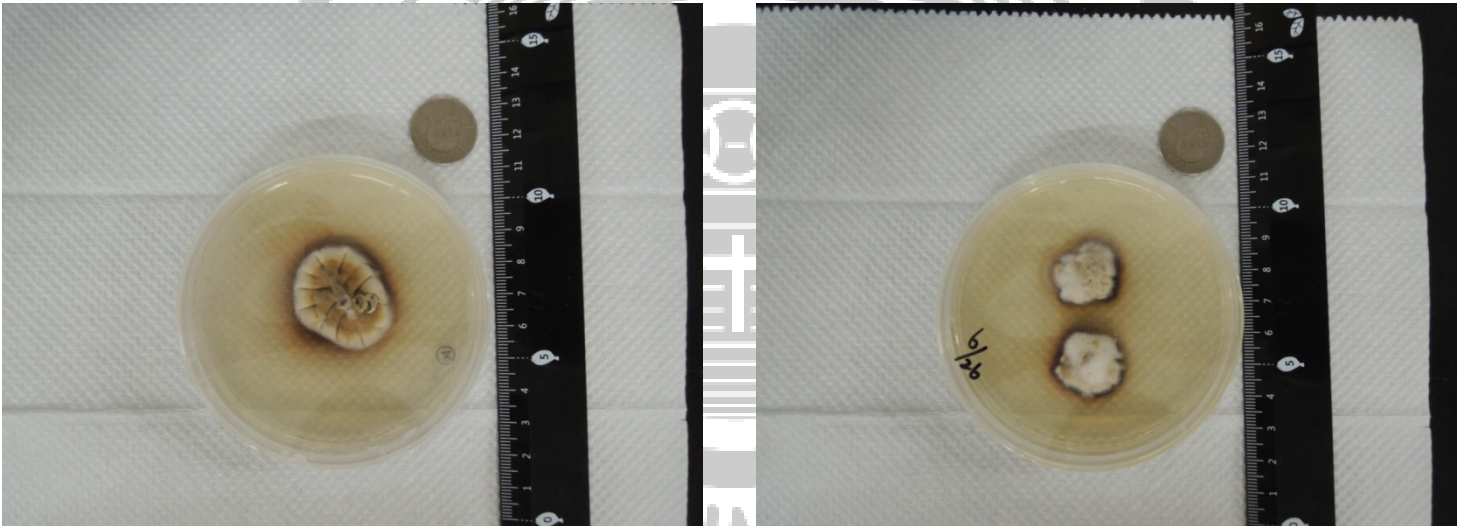
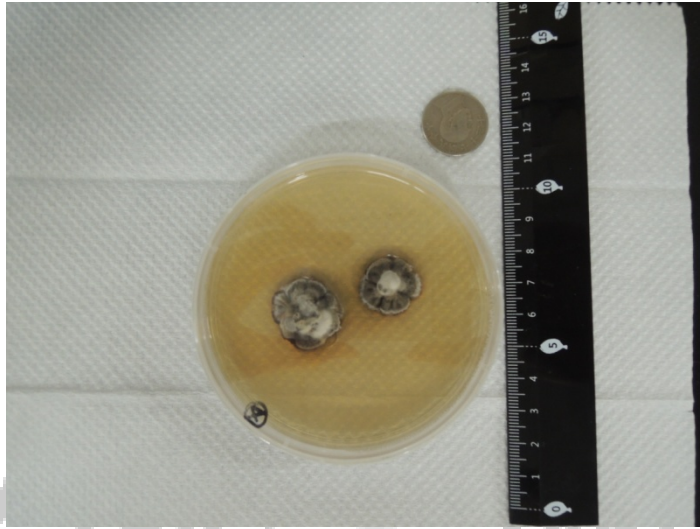


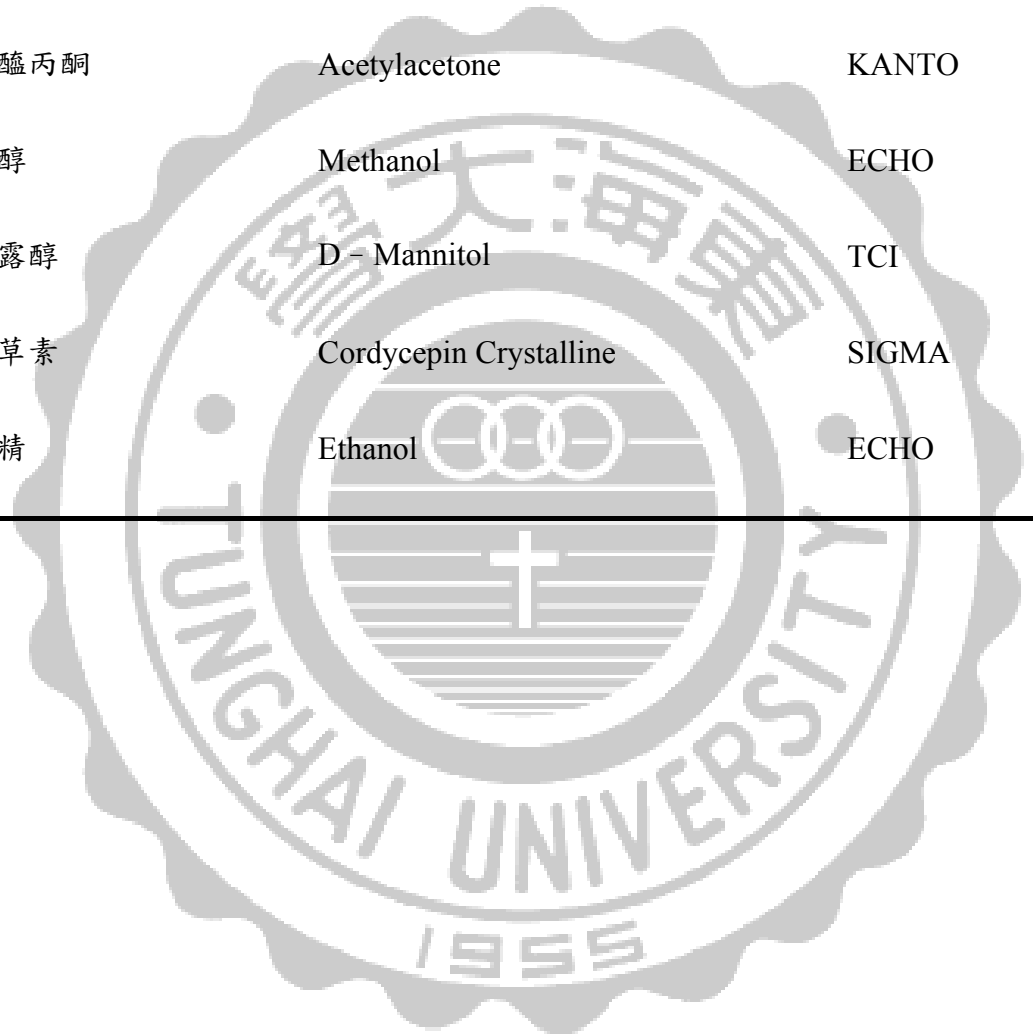
圖 3.2 冬蟲夏草不同之菌落型態

### 3.1.2 實驗藥品

表 3.1 實驗藥品清單

中文名	英文名	廠牌
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE
蔗糖	Sucrose	SHOWA
馬鈴薯葡萄糖瓊脂	Potato Dextrose Agar	DIFCO
酵母萃取物	Yeast Extract	DIFCO
蛋白胨	Peptone	BD
酵母粉	Yeast Powder	
黃豆粉	Soybean Powder	日正食品工業
丙氨酸	Alanine	TCI
甘氨酸	Glycine	ACROS
天冬氨酸	Aspartic Acid	TCI
腺苷	Adenosine	ALFA AESAR
磷酸二氫鉀	Potassium Phosphate Dihydrogen	SHOWA
硫酸鎂	Magnesium Sulfate	SHOWA
鹽酸	Hydrochloric Acid	AENCORE
氫氧化鈉	Sodium Hydroxide Pellets Gr	SHOWA

醋酸氨	Ammonium Acetate	SHOWA
冰醋酸	Acetic Acid	AENCORE
高碘酸钠	Sodium Periodate	ACROS
L-鼠李糖	L - Rhamnose Monohydrate	ACROS
乙酐丙酮	Acetylacetone	KANTO
甲醇	Methanol	ECHO
甘露醇	D - Mannitol	TCI
虫草素	Cordycepin Crystalline	SIGMA
酒精	Ethanol	ECHO





## 3.2 實驗儀器

表 3.2 實驗儀器清單

儀器設備	廠牌	型號
pH 計	Lutron	PH-206
烘箱	RISEN	
分光光度計	美國 Thermo	GENESYS UV10
電子天平	Precisa	BJ 100M
均質機(POLYTRON)	KINEMATICA	PT-2100
試管震盪器	IKA	MS1 minishaker
無菌操作台	台灣亮盛	JW-4N
超純水製造機	Millipore	Simplicity
超音波震盪器	美國 BRANSON	5210
葡萄糖分析儀	YSI	2300STAT
低溫恆溫水槽	DENGYNG	FY400
數位水浴加熱槽	日本 EYELA	SB-1000
磁石攪拌加熱器	ChromTech	MS-3250B
高速中型離心機	Hettich	Universal-32R
桌上型微量離心機	HSIANGTAI	MCD2000

---

恆溫震盪培養箱	台灣亮盛	LUS-150
冷凍乾燥機		FD-5020+MF-4
高效能液相層析儀	Agilent	HP 1100
高壓滅菌釜	台灣宏霖	H1-340
高效液相層析管柱	Phenomenex	LunaC18
微電腦蒸餾水製造機	英國 FISTREEM	WSC044
空氣壓縮機	SWAN	DY-115
4 兩裝高速粉碎機	台灣榮聰	RT-04A
5 公升攪拌式發酵槽	BIOTOP	BTF-A

---

### 3.3 分析方法

#### 3.3.1 菌體濃度

取適當培養發酵液，以 100mesh 篩網過濾，過濾後的菌絲體再以蒸餾水重複沖洗 3-5 次，利用冷凍乾燥機乾燥菌絲體，乾燥後所測得為菌絲體乾重量。

#### 3.3.2 甘露醇濃度測定

##### 比色法

##### 1. 測定原理

利用高碘酸鈉在室溫下與甘露醇反應十分鐘產生 3,5-二乙醯-1,4-脫氧二甲基吡啶，呈黃綠色溶液，再以分光光度計測量此化合物在可見光 415nm 波長的吸收值。

##### 2. 標準曲線製作

稱取對照用標準品甘露醇，以蒸餾水分別稀釋成濃度為 0、20、40、60、80、100  $\mu\text{g/mL}$ 。並以蒸餾水作為空白對照組。

(1) 取上述標準溶液 1mL 置於試管中，加入 1mL 高碘酸鈉均勻混合，放置室溫 10 分鐘。

(2) 加入 0.1% L-鼠李糖 2mL 除去過多高碘酸鹽，混和後再加入 4mL Nash 試劑（150g 醋酸銨+2mL 冰醋酸+2mL 乙醯丙酮，用蒸餾水稀釋至 1L），

混合均勻後，在 53°C 的恆溫水浴中加熱 15 分鐘，使其呈色，冷卻後，在波長 415nm 下測其吸光值。

### 3. 樣品分析

- (1) 取適量的菌絲體，加入蒸餾水，於 80°C 下的恆溫水浴中加熱一小時萃取，萃取液以 7000rpm 離心 10 分鐘，收集上清液。
- (2) 取上述上清液 1mL，置於試管中，加入 1mL 高碘酸鈉均勻混合，放置室溫 10 分鐘。
- (3) 加入 0.1% L-鼠李糖 2mL 除去過多高碘酸鹽，混合後再加入 4mL Nash 試劑，混均後，在 53°C 的恆溫水浴中加熱 15 分鐘，使其呈色，冷卻後，在波長 415nm 下測其吸光值，對照標準曲線即可求得樣品甘露醇濃度。

### 3.3.3 腺苷及蟲草素分析

#### 1. 標準曲線製作

稱取對照用標準品腺苷及蟲草素，以 15% 甲醇分別稀釋成濃度為 7.8125、15.625、31.25、62.5、125、250  $\mu\text{g/mL}$ 。將各個不同濃度的標準品注入 HPLC 中，以各標準品的波峰面積為 Y 軸，標準品的濃度為 X 軸，做檢量線並求出其線性迴歸方程式。

## 2. HPLC 操作條件

分析管柱：C18

偵測波長：254 nm

移動相：甲醇:0.02M 磷酸二氫鉀=15:85

溫度：30°C

流速：0.4 mL/min

注射量：20  $\mu$ L

## 3. 樣品分析

- (1) 稱取適量菌絲體，置於試管中，加入 5mL 的 15% 甲醇溶液，放置於 100 °C 的恆溫水浴中加熱，萃取一小時。以 7000rpm 的離心機離心 10 分鐘，收集上清液。
- (2) 將上述上清液分裝至 1.5mL 微量離心管，離心 10 分鐘，收集上清液，以 0.22  $\mu$ m 的濾膜過濾，樣品注入量為 20  $\mu$ L，經 HPLC 分析樣品中腺苷及蟲草素的含量。

### 3.4 實驗方法

#### 3.4.1 菌種斜面試管保存

本實驗以斜面試管保存菌種。配置 39g/L 濃度的 PDA(Potato Dextrose Agar) 作為斜面培養基，經高壓滅菌釜滅菌後，放置於無塵菌操作台中，待 PDA 冷卻硬化後，將冬蟲夏草菌種接種於斜面試管培養基，於 20°C 下培養兩個月後，放置於 4°C 冰箱中保存備用，約兩個月更新一次。



圖 3.6 *Ophiocordyceps sinensis* (BCRC37843) 斜面保存

#### 3.4.2 平板培養皿培養與接菌活化

配製 39g/L 濃度的 PDA 作為平面培養皿培養基，取已經長好的冬蟲夏草菌絲斜面菌種進行接菌，利用滅菌的白金鉤，刮取適當大小菌絲塊移到 PDA 培養皿中央，以封口膜封住，放至 20°C 培養箱中活化培養。

### 3.4.3 種菌製備

本實驗採用 Sucrose 50.0 g/L、Peptone 10.0 g/L、Yeast Extract 3 g/L 作為種子培養基，並利用 1 N HCL 調整 pH 為 6.0。

將種子培養基裝於 250mL 的三角瓶，經過滅菌後，取已經生長活化的平面培養菌絲，以白金鉤將菌絲切成四個單位菌絲塊（約為 0.5cm×0.5cm），接入種子培養基中，放置於 20°C 的迴轉式恆溫培養箱，以轉速 120 rpm 培養 17 天作為種菌。

### 3.4.3 培養基

#### 3.4.3.1 種子培養基 (Seed medium, SM)

表 3.3 種子培養基

組成	濃度 (g/L)
Sucrose	50
Yeast extract	3
Peptone	10

依上述比例配製成的培養基即為本實驗的種子培養基，並以 1 N HCL 調整 pH 值為 6.0。

### 3.4.3.2 發酵培養基 (Fermentation medium, FM)

表 3.4 發酵培養基

組成	濃度 (g/L)
Sucrose	50
Yeast extract	3
Peptone	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub>	0.5

上述比例配製的培養基即為本實驗的發酵培養基，以 1 N HCL 調整 pH 值為 6.0。

### 3.4.5 接菌

將培養 17 天之 Seed medium 接至 Fermentation medium 中，接菌量為 Fermentation medium 10% 之體積。



### 3.5 實驗架構

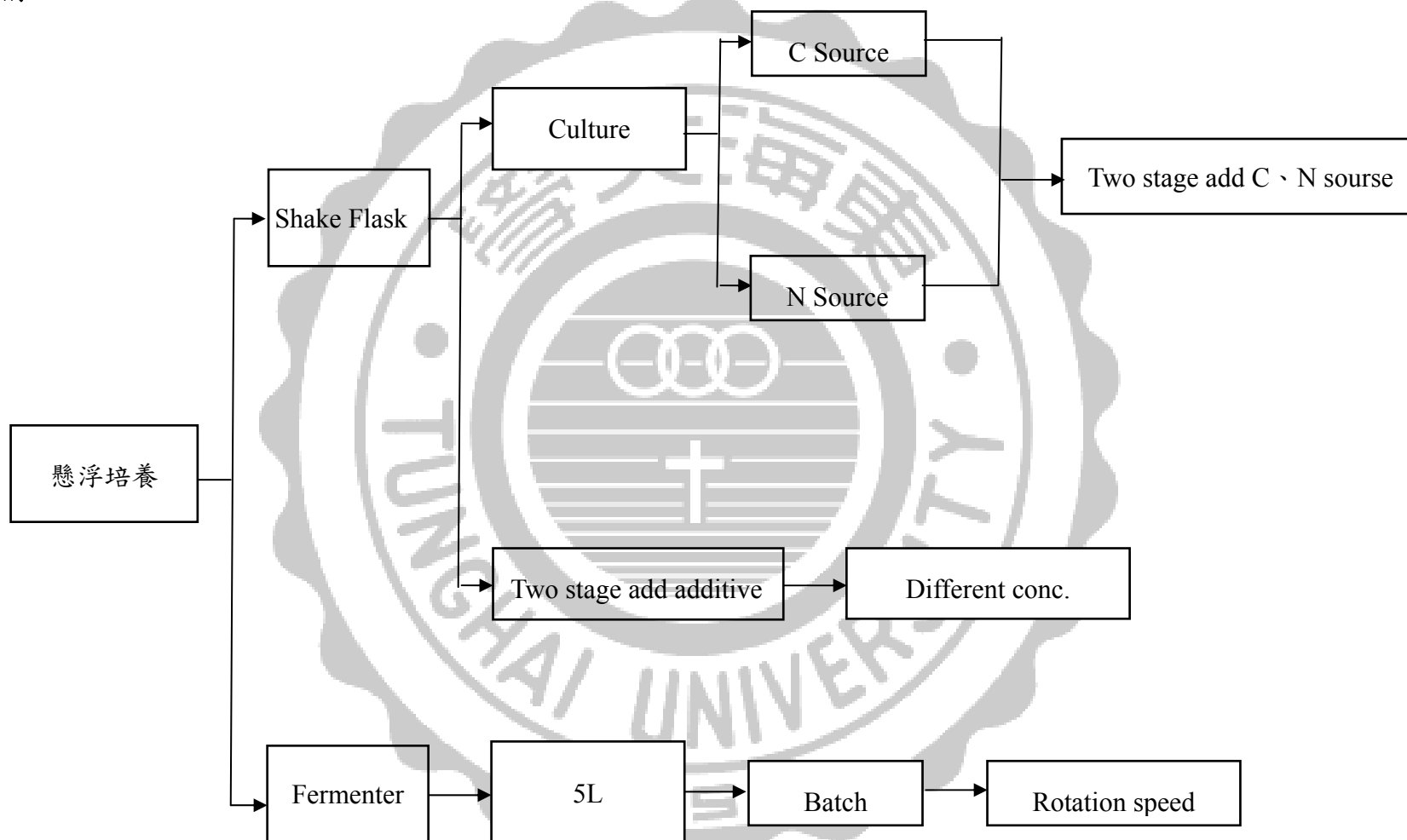


圖 3.7 實驗架構圖

## 3.6 實驗培養條件

### 3.6.1 培養時間之影響

目的:探討培養時間對菌體生長與腺苷、蟲草素產量之影響。

1. 菌體於 100 ml SM 培養基進行前培養。
2. 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 17 天。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接種至 FM 培養基中。
4. 於 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 23 天，第七天開始取樣，每兩天取樣一次，每次取三瓶。

### 3.6.2 不同碳源之影響

目的:探討不同碳源對菌體生長與腺苷、蟲草素生產之影響。

1. 菌體於 100 ml SM 培養基進行前培養
2. 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 17 天。
3. 於 100 ml FM 培養基中各別添加葡萄糖、蔗糖，碳源濃度為 50 g/L。
4. 以 10 %接菌量將 SM 接種至上述 FM 培養基中。
5. 於 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 17 天。

### 3.6.3 不同氮源之影響

目的:探討培養基中不同氮源對菌體生長與腺苷、蟲草素生產之影響。

1. 菌體於 100 ml SM 培養基進行前培養。
2. 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 17 天。
3. 於 100 ml FM 培養基中各別添加酵母萃取物、蛋白胨、黃豆粉、酵母粉，  
氮源濃度為 13 g/L。
4. 以 10%接菌量將 SM 接種至上述 FM 培養基中。
5. 於 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 17 天。

### 3.6.4 二階段添加碳源之影響

目的:探討二階段添加碳源對菌體生長與腺苷、蟲草素生產之影響。

1. 菌體於 100 ml SM 培養基進行前培養。
2. 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 17 天。
3. 以 10 %接菌量將 SM 接種至上 FM 培養基中。
4. 於 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 10 天。
5. 於第 11 天取出 FM 培養基，添加高濃度碳源，濃度為 500 g/L。
6. 於 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養至第 17 天。

### 3.6.5 二階段添加氮源之影響

目的:探討二階段添加氮源對菌體生長與腺苷、蟲草素生產之影響。

1. 菌體於 100 ml SM 培養基進行前培養。
2. 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 17 天。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接種至 FM 培養基中。
4. 於 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 10 天。
5. 於第 11 天取出 FM 培養基，添加高濃度氮源，濃度為 100 g/L。
6. 於 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養至第 17 天。

### 3.6.6 二階段添加碳氮源之影響

目的:探討二階段添加碳氮源對菌體生長與腺苷、蟲草素生產之影響。

1. 菌體於 100 ml SM 培養基進行前培養。
2. 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 17 天。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接種至 FM 培養基中。
4. 於 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 10 天。
5. 於第 11 天取出 FM 培養基，添加高濃度碳氮源。
6. 於 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養至第 17 天。

### 3.6.7 添加不同前驅物、氨基酸之影響

目的:探討不同添加物對腺苷、蟲草素生產之影響。

1. 菌體於 100 ml SM 培養基進行前培養。
2. 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 17 天。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接至 FM 培養基中。
4. 於 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 15 天。
5. 於第 16 天取出上述 FM 培養基，分別添加天冬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、腺苷、腺嘌呤，濃度為 1g/L。
6. 於 20°C、120rpm 震盪培養箱中培養至第 19、21、23 天。

### 3.6.8 添加不同濃度腺嘌呤之影響

目的:探討不同濃度腺嘌呤對菌體生長與腺苷、蟲草素產量之影響。

1. 菌體於 100 ml SM 培養基進行前培養。
2. 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 17 天。
3. 以 10 % 接菌量將 SM 接種至 FM 培養基中。
4. 於 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 15 天。
5. 於第 16 天取出上述 FM 培養基，添加各濃度腺嘌呤，濃度分別為 0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L、2.0 g/L。
6. 於 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養至第 19 天。

### 3.6.9 5-L 攪拌式發酵槽

目的:探討不同轉速對菌體生長與腺苷、蟲草素生產之影響。

1. 菌體於 100 ml SM 培養基進行前培養。
2. 20°C、120 rpm 震盪培養箱中培養 17 天。
3. 配製 3000 ml FM 培養基，於 5-L 攪拌式發酵槽中。
4. 以 10 % 接菌量將 SM 接至上述發酵槽中。
5. 於溫度 20°C、通氣量 0.5 vvm、pH 6.0 條件下，改變轉速分別為 20 rpm、50 rpm、100 rpm。
6. 於第七天取樣，之後每兩天取樣一次。

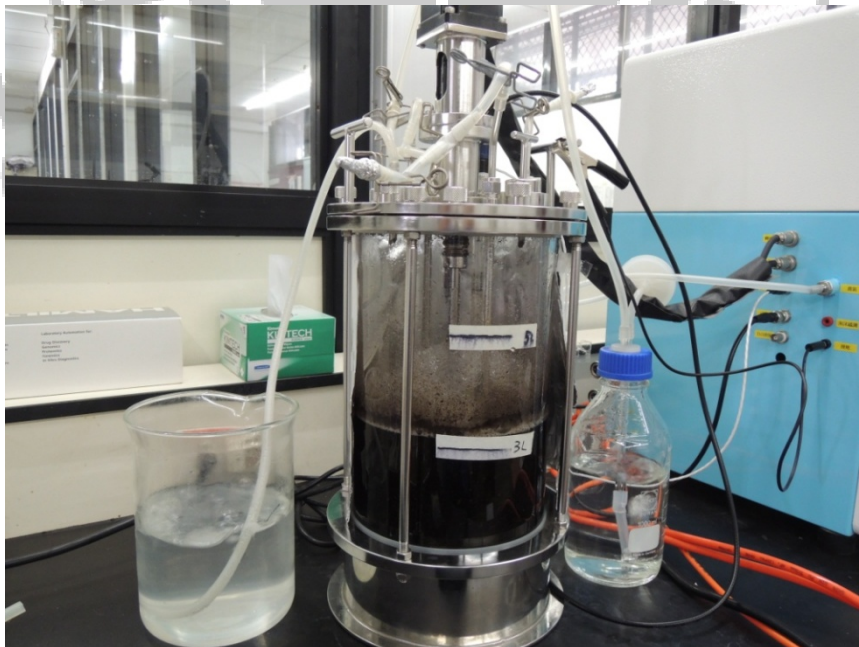


圖 3.8 發酵槽裝置圖

## 第四章 結果與討論

### 4.1 搖瓶批次發酵程序

#### 4.1.1 培養時間之影響

此實驗為探討培養時間對於菌體生長及 Adenosine 與 Cordycepin、D-mannitol 產量之影響。實驗結果如圖 4.1 與表 4.1。由圖 4.1.A 顯示，培養時間為 23 天，於開始培養後七天內，發酵液的 pH 值會由最初的 6.35 上升至約 7.4 左右，七天之後，pH 值維持在 7.7 左右，到第 17 天 pH 值開始略為下降。菌體濃度於開始培養後七天內，上升至 3.2g/L，七天之後菌體隨著時間緩慢遞增，到第 17 天達到最大值 4.7g/L，之後菌體量開始下降，可能與營養源的消耗有關，故後續搖瓶批次實驗都固定培養時間為 17 天。而腺苷與蟲草素在第七天有最大值，分別約為 1742.66  $\mu\text{g/g D.W}$  和 1300.47  $\mu\text{g/g D.W}$ ，此後隨著時間不斷遞減，而蟲草素在第 15 天後遞減趨勢趨於緩和。由圖 4.1.B 顯示，甘露醇在第七天有最大值 336.57 mg/g D.W，依生長時間逐漸遞減，在第 17 天達最低點，17 天過後，甘露醇濃度轉而開始增加，到第 23 天上升至 255.86mg/g D.W。

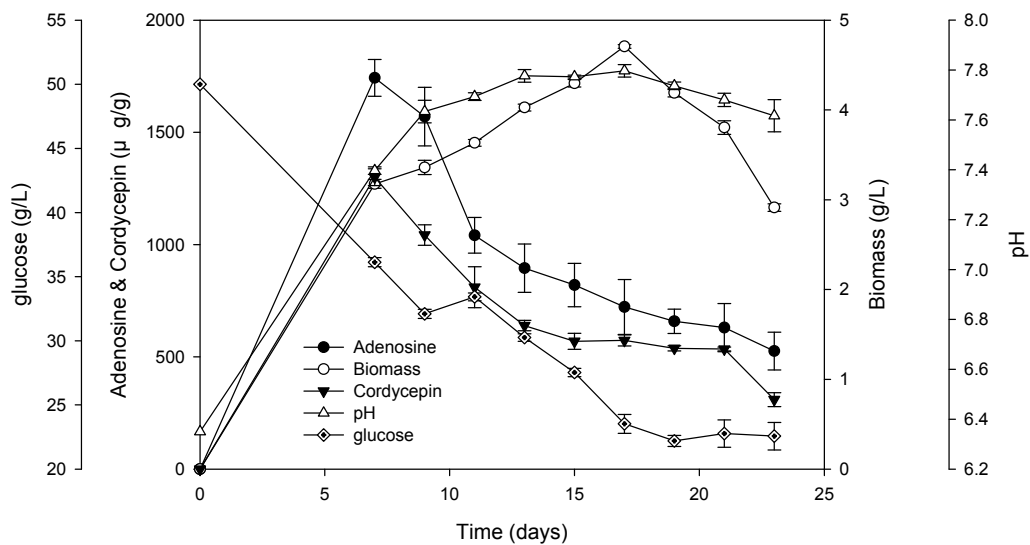


Fig. A

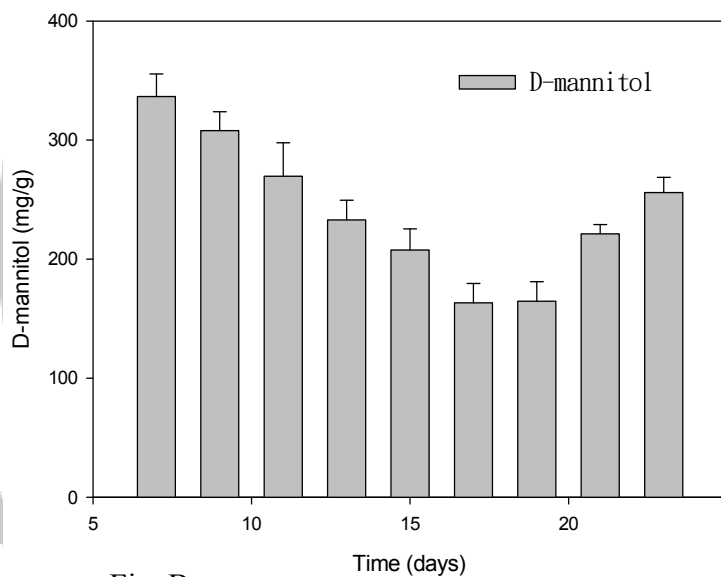


Fig. B

圖 4.1 Fig.A-B 培養時間對菌體生長與產物單位菌體濃度之影響

培養條件：發酵培養基

溫度：20°C

初始 pH：6.0

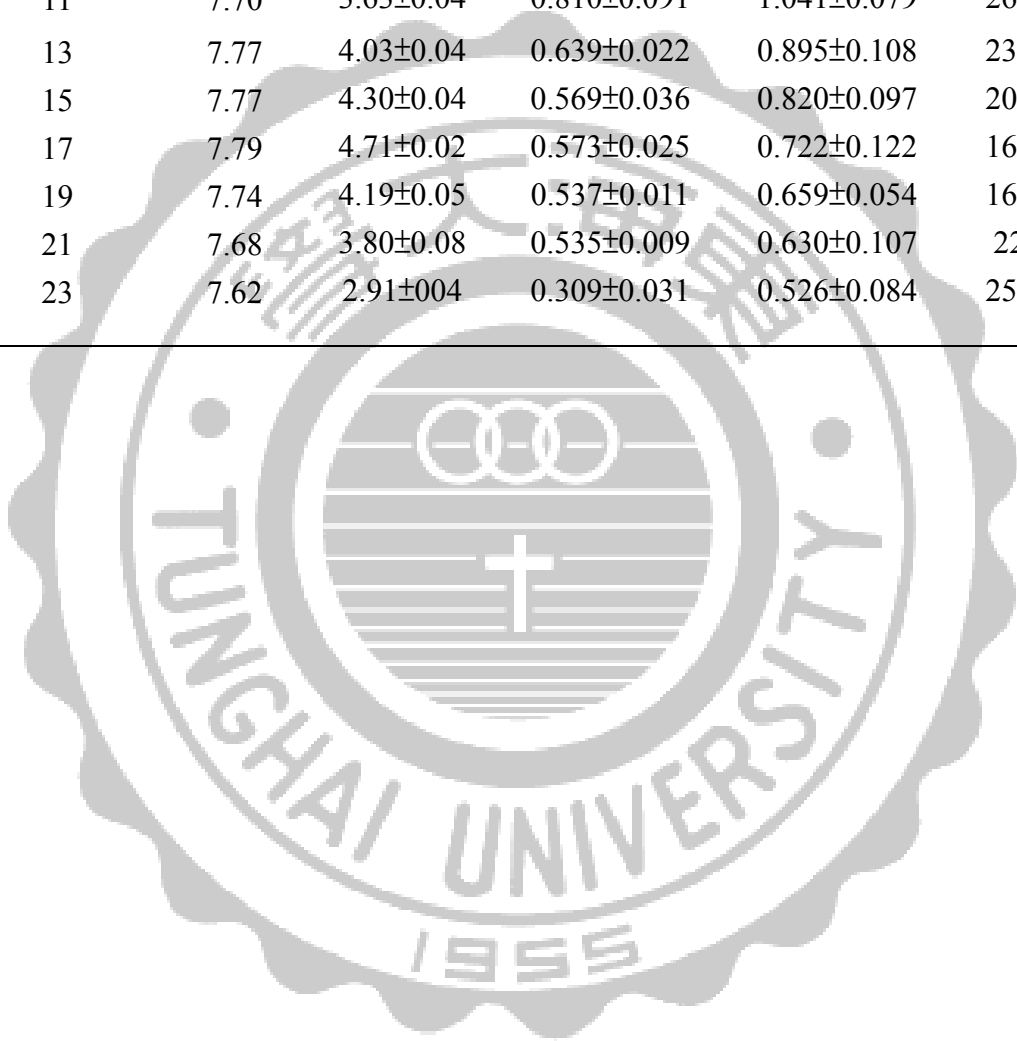
轉速：120 rpm

接種量：10%



表 4.1 培養時間對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響

Incubation time (day)	pH	Biomass (g/L)	Cordycepin (mg/g D.W)	Adenosine (mg/g D.W)	D-mannitol (mg/g D.W)
0	6.35	0	0	0	0
7	7.40	3.18±0.05	1.300±0.037	1.742±0.082	336.57±18.92
9	7.63	3.36±0.08	1.043±0.046	1.570±0.130	307.92±15.97
11	7.70	3.63±0.04	0.810±0.091	1.041±0.079	269.69±27.94
13	7.77	4.03±0.04	0.639±0.022	0.895±0.108	232.98±16.43
15	7.77	4.30±0.04	0.569±0.036	0.820±0.097	207.73±17.62
17	7.79	4.71±0.02	0.573±0.025	0.722±0.122	163.24±16.29
19	7.74	4.19±0.05	0.537±0.011	0.659±0.054	164.65±16.33
21	7.68	3.80±0.08	0.535±0.009	0.630±0.107	221.22±7.83
23	7.62	2.91±0.04	0.309±0.031	0.526±0.084	255.86±12.76



#### 4.1.2 不同碳源之影響

此實驗為探討不同碳源（葡萄糖、蔗糖）對於菌體生長及 Adenosine 與 Cordycepin、D-mannitol 產量之影響。實驗結果如圖 4.2 與表 4.2。由圖 4.2 顯示，不論是腺苷或是蟲草素，葡萄糖的效果都比蔗糖來的好，葡萄糖的效果可達到腺苷  $980.823 \mu\text{g/g D.W}$ ，蟲草素  $675.737 \mu\text{g/g D.W}$ ，推測可能是因為葡萄糖為單糖，蔗糖為雙糖，在自然界中的微生物，單糖在吸收利用的效果上會比雙糖來的好，所以在生產代謝產物上葡萄糖效果較好。由圖 4.2 顯示，菌體生長及甘露醇產量方面，仍是葡萄糖效果高於蔗糖，葡萄糖效果可達甘露醇  $200.844 \text{ mg/g D.W}$ ，菌體  $4.703 \text{ g/L}$ ，相較於文獻（黃楊等，2013）產值  $20.8 \text{ g/L}$  低了許多，猜測可能是該文獻的接種方式與接種量與本實驗有較大差異，所以導致結果差異較大。雖然蔗糖菌體量只有  $4.41 \text{ g/L}$ ，略低於葡萄糖，但若考慮到成本問題，選擇蔗糖會較佳，故後續搖瓶批次實驗碳源選擇以蔗糖為主。

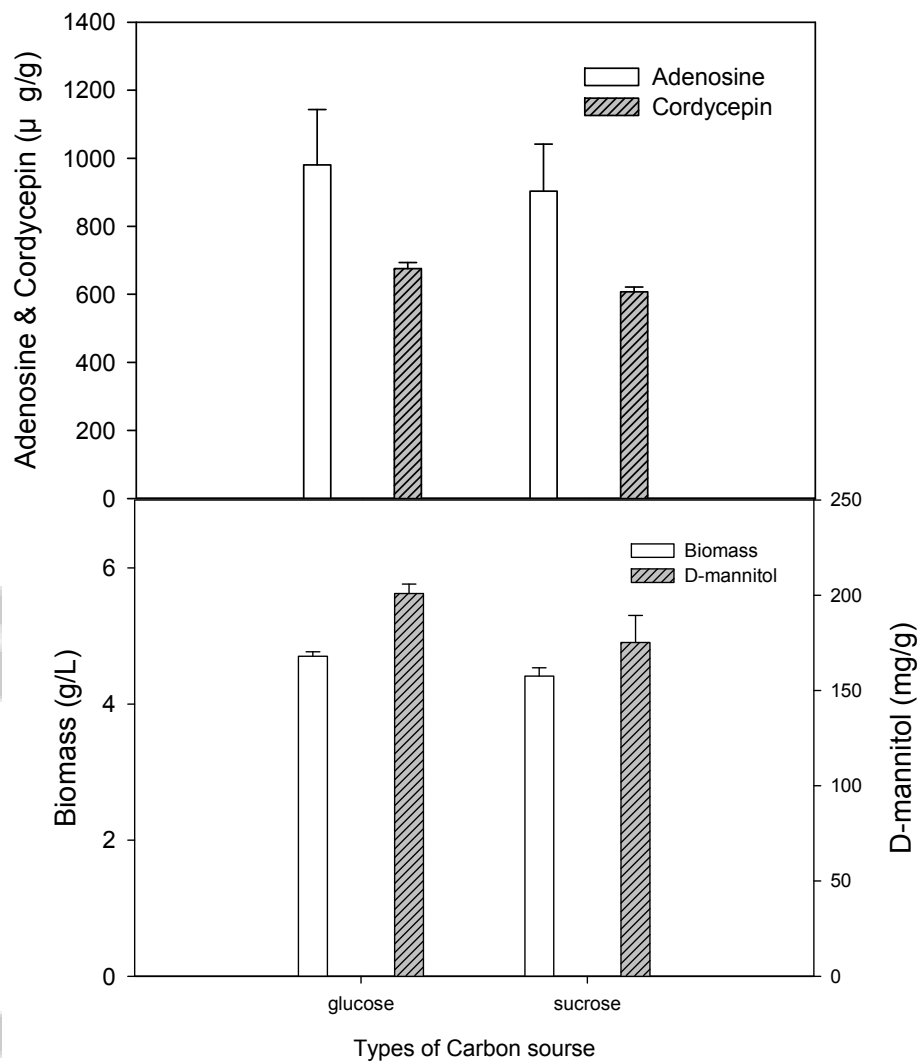


圖 4.2 碳源對菌體生長與產物單位菌體濃度之影響

培養條件：發酵培養基（改變碳源）

溫度：20°C

初始 pH：6.0

轉速：120 rpm

接種量：10%

表 4.2 碳源對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響

Carbon Source	Biomass (g/L)	Cost per unit of biomass (\$/g)	Adenosine (mg/g D.W)	Cordycepin (mg/g D.W)	D-mannitol (mg/g D.W)
Glucose	4.70±0.07	24.00	0.981±0.163	0.676±0.018	200.84±4.97
Sucrose	4.41±0.12	24.85	0.903±0.138	0.607±0.014	175.16±14.18



### 4.1.3 不同氮源之影響

此實驗為探討不同氮源（黃豆粉、酵母粉、酵母萃取物、蛋白胨）對於菌體生長及 Adenosine 與 Cordycepin、D-mannitol 產量之影響。實驗結果如圖 4.3 和表 4.3。由圖 4.3 顯示，以酵母萃取物作為氮源有最高的腺苷和蟲草素，分別為  $973.633 \mu\text{g/g D.W}$  和  $677.083 \mu\text{g/g D.W}$ ，其次為控制組，分別為  $888.749 \mu\text{g/g D.W}$  和  $560.117 \mu\text{g/g D.W}$ ，效果最差的是黃豆粉。推測是酵母萃取物中含有較豐富的蛋白質與核苷類物質，所以有比較好的利用率，而黃豆粉可能是因為植物性蛋白質較難被菌體吸收利用。由圖 4.3 顯示，菌體生長以酵母萃取物最好  $5.377\text{g/L}$ ，其次為酵母粉與黃豆粉，而蛋白胨效果最差。甘露醇部分則沒有太大變化，最高為酵母萃取物  $167.075 \text{mg/g D.W}$ ，總含量為  $893.83 \text{mg/L}$ ，與文獻(劉彥威等, 2006) 產值  $758 \text{mg/L}$  相比，約多了 18%。最低為黃豆粉，推測為酵母萃取物營養物質含量較豐富，菌絲生長較快，而酵母粉與黃豆粉因為不完全溶於水，所以菌絲可能有包含部分的酵母粉與黃豆粉，因此菌體量次高。考慮到菌體與有效成分產量和成本問題，後續搖瓶批次實驗仍以控制組的氮源作為氮源。

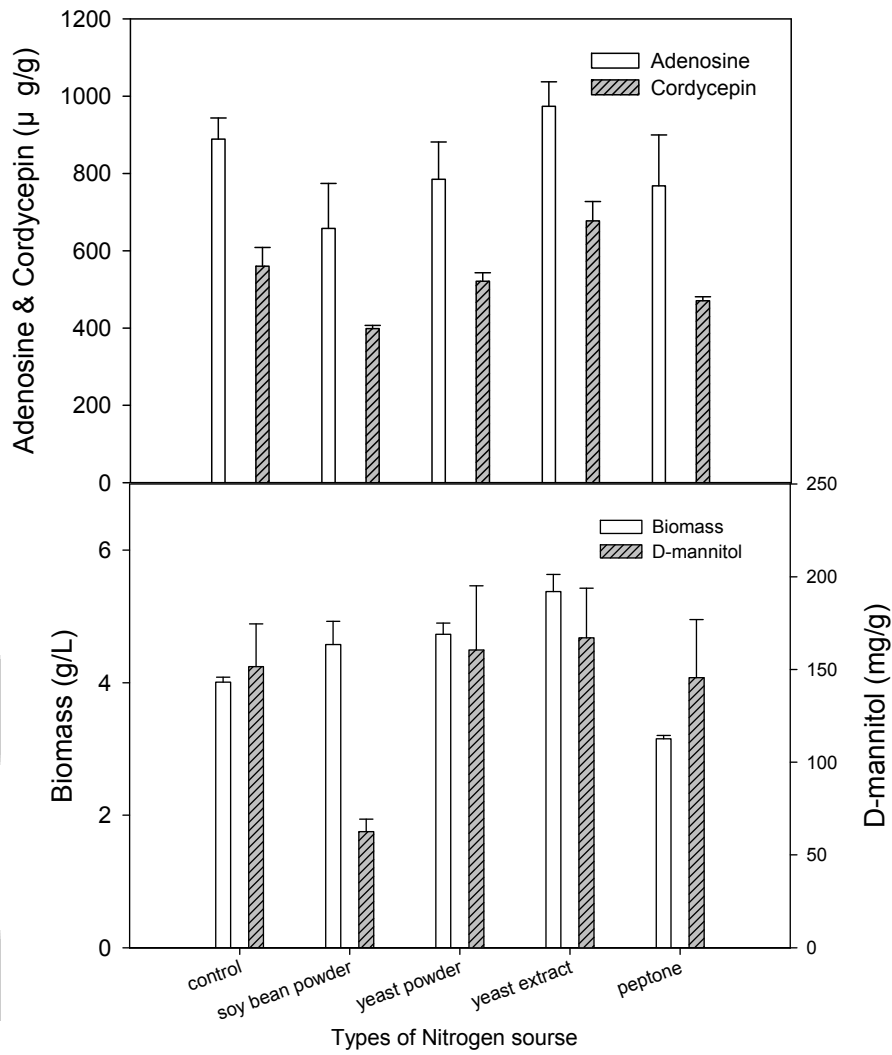


圖 4.3 氮源對菌體生長與產物單位菌體濃度之影響

培養條件：發酵培養基（改變氮源）

溫度：20°C

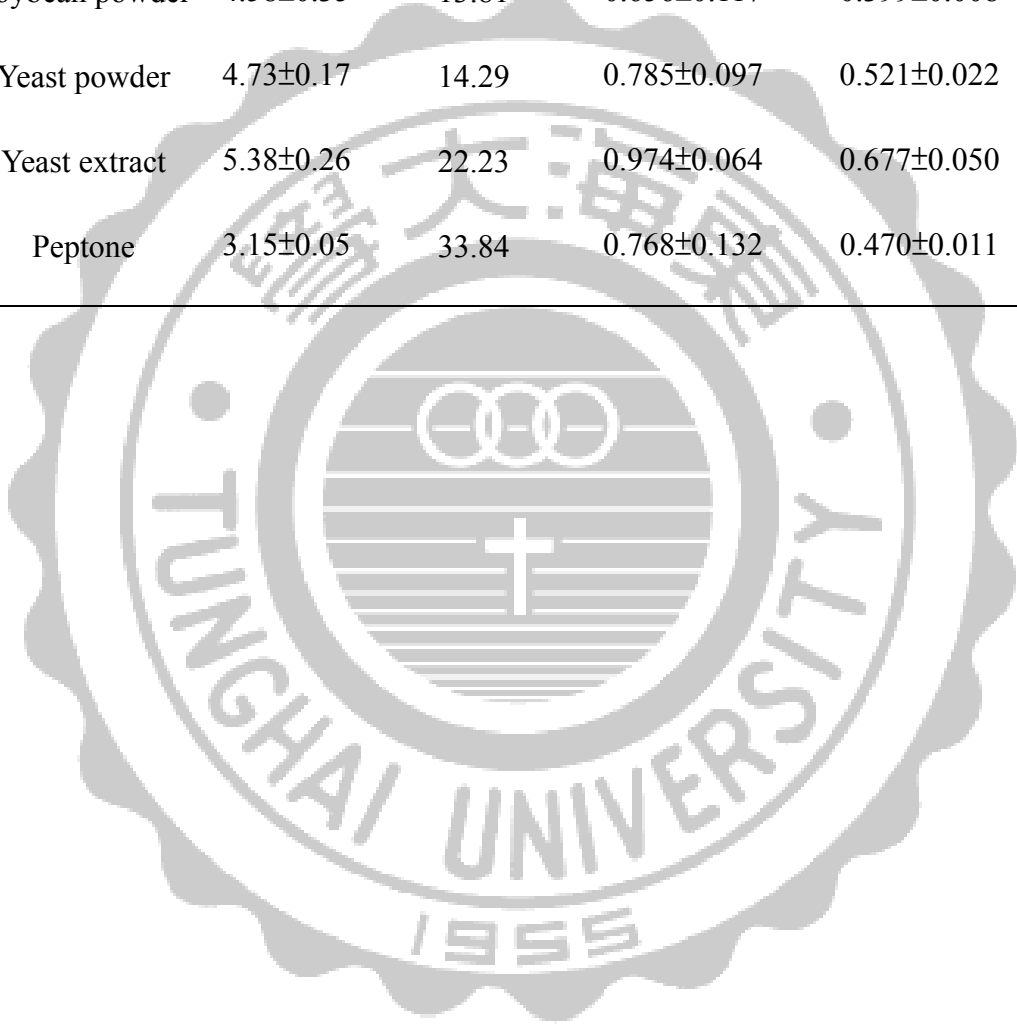
初始 pH：6.0

轉速：120 rpm

接種量：10%

表 4.3 氮源對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響

Nitrogen Source	Biomass (g/L)	Cost per unit of biomass (\$/g)	Adenosine (mg/g D.W)	Cordycepin (mg/g D.W)	D-mannitol (mg/g D.W)
Control	4.01±0.07	27.33	0.889±0.054	0.560±0.048	151.56±23.04
Soybean powder	4.58±0.35	13.81	0.656±0.117	0.399±0.008	62.59±6.80
Yeast powder	4.73±0.17	14.29	0.785±0.097	0.521±0.022	160.54±34.56
Yeast extract	5.38±0.26	22.23	0.974±0.064	0.677±0.050	167.07±26.71
Peptone	3.15±0.05	33.84	0.768±0.132	0.470±0.011	145.58±31.37



#### 4.1.4 碳源饋料之影響

此實驗為探討饋料碳源對於菌體生長及 Adenosine 與 Cordycepin·D-mannitol 產量之影響。由 4.1.2 實驗確定碳源為蔗糖，本實驗是為了在培養 10 天後藉由添加新的碳源，作為菌絲生長的新能量來源，提高菌絲體與代謝產物的產量。實驗結果如圖 4.4 與表 4.4。由圖 4.4 顯示，培養到十天後在添加高濃度碳源，其腺苷與蟲草素均高於未添加的控制組，分別為  $1042.428 \mu\text{g/g D.W}$  和  $674.329 \mu\text{g/g D.W}$ ，增加了 23%和 16.8%，推測為培養到後期添加新的碳源作為提供蟲草菌的新能量來源，有利於腺苷和蟲草素的代謝。由圖 4.4 顯示，後期添加碳源對於甘露醇和菌絲生長均有提高的效果，分別為  $190.476 \text{ mg/g D.W}$  和  $5.633 \text{ g/L}$ ，但增加幅度不大，僅有 7%和 13%，效果不是很明顯。



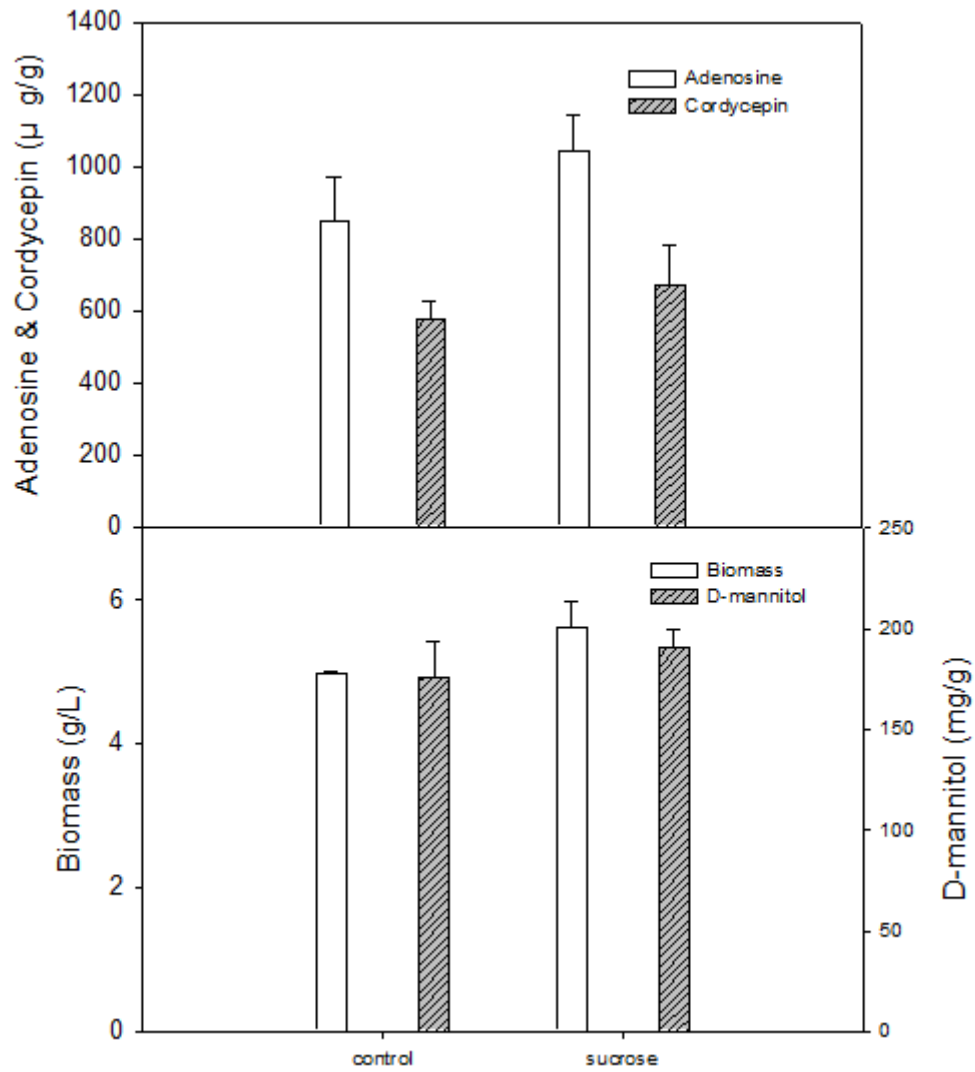


圖 4.4 碳源饋料對菌體生長與產物單位菌體濃度之影響

培養條件：發酵培養基（蔗糖饋料）

溫度：20°C

初始 pH：6.0

轉速：120 rpm

接種量：10%

表 4.4 碳源饋料菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響

Carbon Source	Biomass (g/L)	Cost per unit of biomass (\$/g)	Adenosine (mg/g D.W)	Cordycepin (mg/g D.W)	D-mannitol (mg/g D.W)
Control	4.987±0.032	21.98	0.848±0.125	0.578±0.052	176.05±17.98
Sucrose	5.633±0.337	19.94	1.042±0.102	0.674±0.109	190.48±8.95



#### 4.1.5 氮源饋料之影響

此實驗為探討饋料氮源對於菌體生長及 Adenosine 與 Cordycepin·D-mannitol 產量之影響。由 4.1.3 實驗中確定氮源的效果以酵母萃取物、酵母粉效果較佳，所以二階段添加氮源的實驗以這兩種為主，探討培養後期，提供新的氮源，對於菌體生長狀況是否有正面影響。實驗結果如圖 4.5 與表 4.5。由圖 4.5 顯示，FM 培養到 10 天後取出，添加高濃度的氮源，效果以酵母萃取物最好，其腺苷與蟲草素分別為  $1098.718 \mu\text{g/g D.W}$  和  $812.474 \mu\text{g/g D.W}$ ，而添加酵母粉則與未添加的控制組相差不多，推測應該是酵母粉並不像酵母萃取物一樣經過自身水解自溶，去除細胞壁與不溶性分子等降解步驟，所以無法快速被菌體吸收利用。由圖 4.5 顯示，甘露醇與氮源的再添加並無相關性，而菌絲體部分，以酵母萃取物有較好的效果，可達到  $6.603 \text{ g/L}$ 。比未添加的控制組高出了 32%。

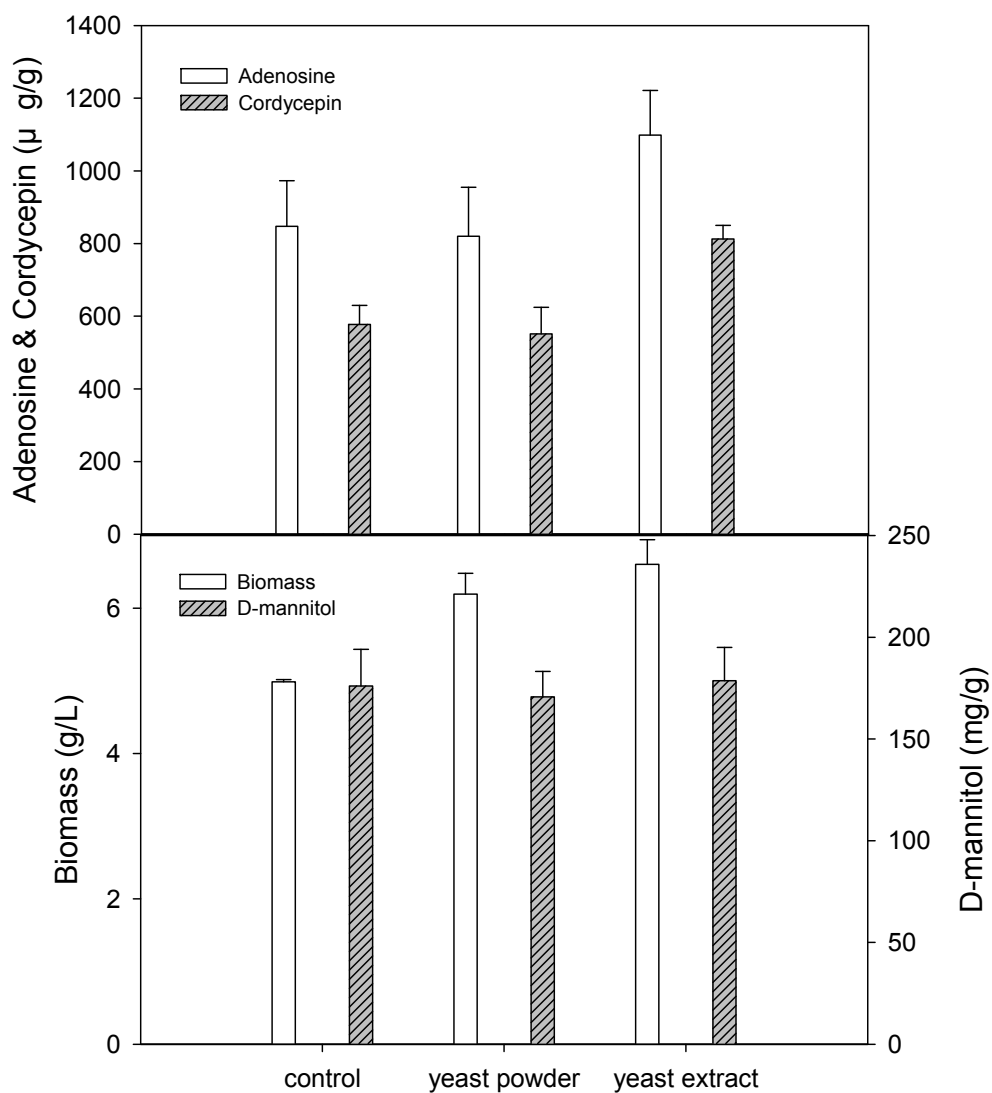


圖 4.5 氮源饋料對菌體生長與產物單位菌體濃度之影響

培養條件：發酵培養基（氮源饋料）

溫度：20°C

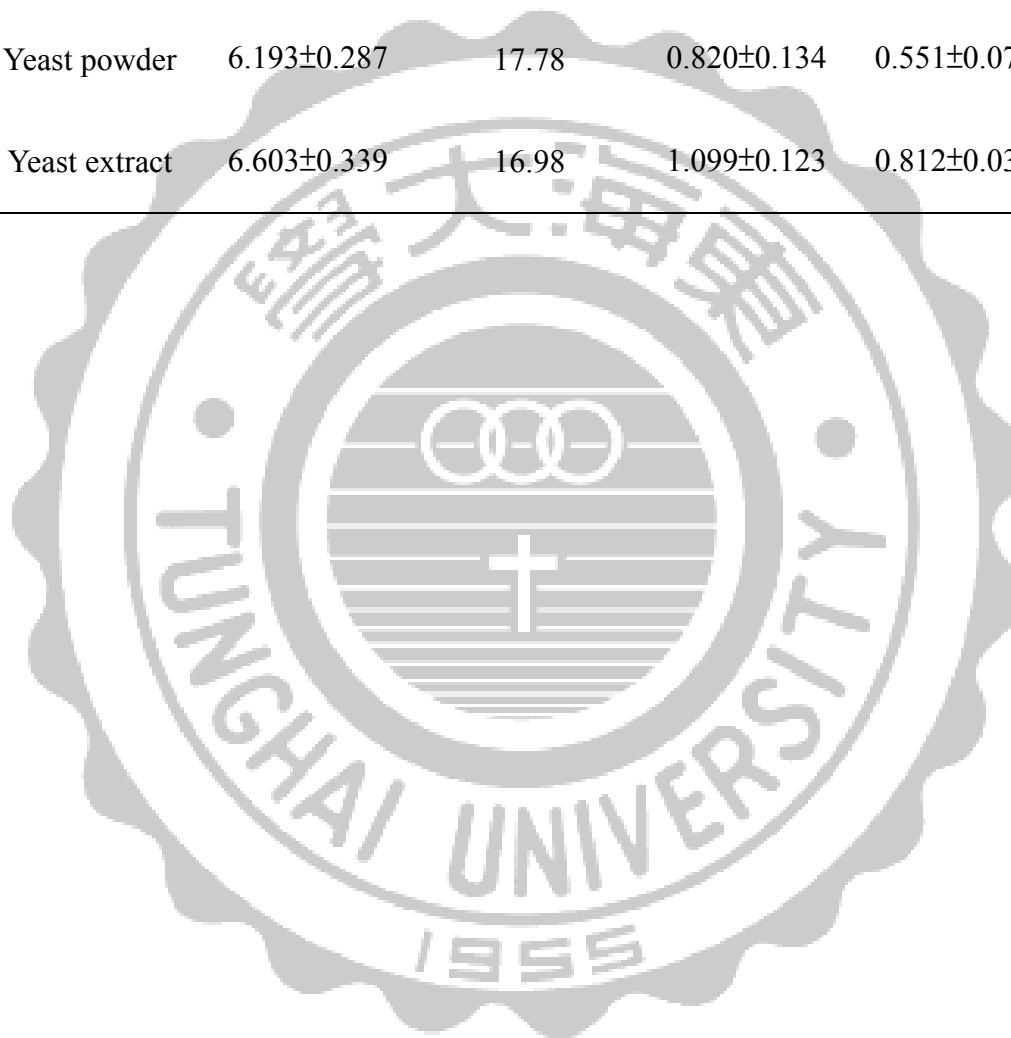
初始 pH：6.0

轉速：120 rpm

接種量：10%

表 4.5 氮源饋料對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響

Nitrogen Source	Biomass (g/L)	Cost per unit of biomass (\$/g)	Adenosine (mg/g D.W)	Cordycepin (mg/g D.W)	D-mannitol (mg/g D.W)
Control	4.987±0.032	21.98	0.848±0.125	0.578±0.052	176.05±17.98
Yeast powder	6.193±0.287	17.78	0.820±0.134	0.551±0.073	170.65±12.55
Yeast extract	6.603±0.339	16.98	1.099±0.123	0.812±0.037	178.64±16.35



#### 4.1.6 碳氮源饋料之影響

此實驗為探討同時饋料碳源及氮源對於菌體生長及 Adenosine 與 Cordycepin、D-mannitol 產量之影響。實驗結果如圖 4.6 和表 4.6。由圖 4.6 顯示，同時添加碳源及氮源，相較於未添加的控制組，其活性成分均略微增加，而菌體生長方面，比未添加的控制組增加了約莫 28%，但若列入成本問題考量，同時添加碳氮源效果並不顯著。



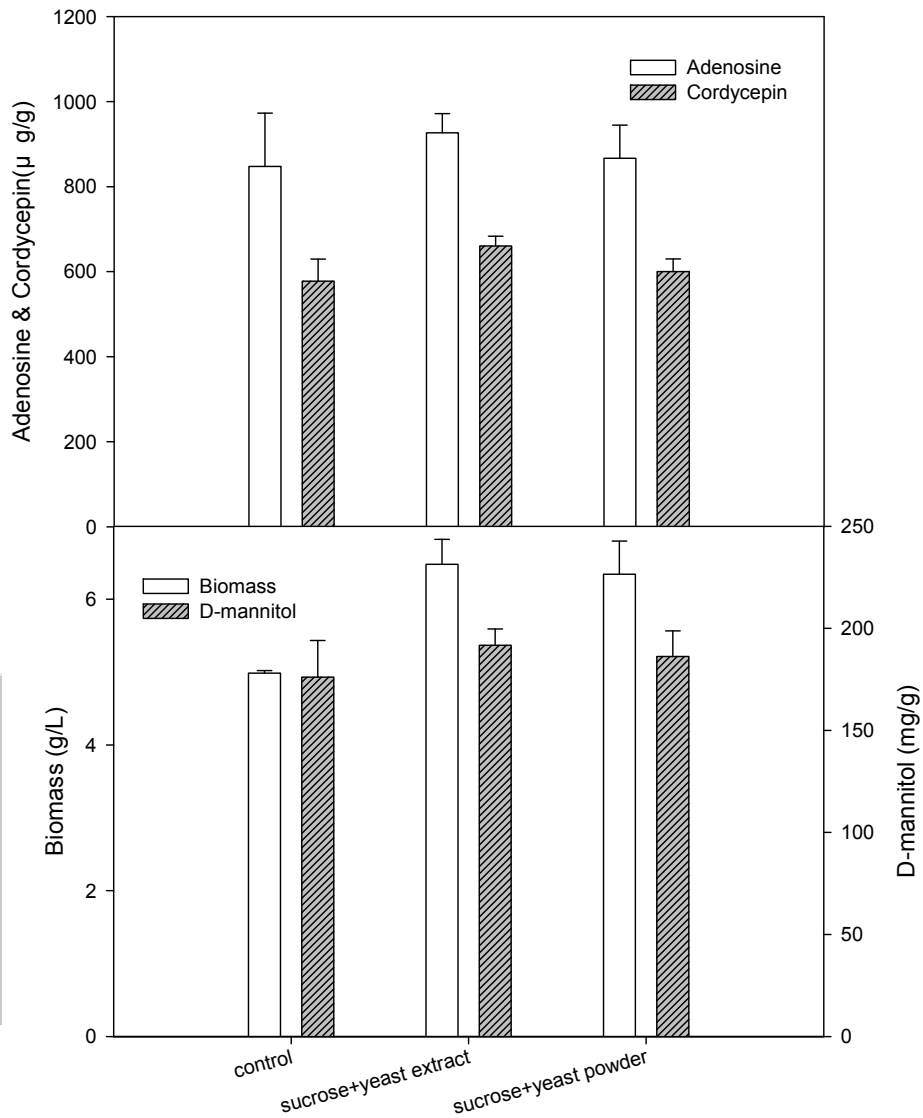


圖 4.6 碳氮源饋料對菌體生長與產物單位菌體濃度之影響

培養條件：發酵培養基（碳氮源饋料）

溫度：20°C

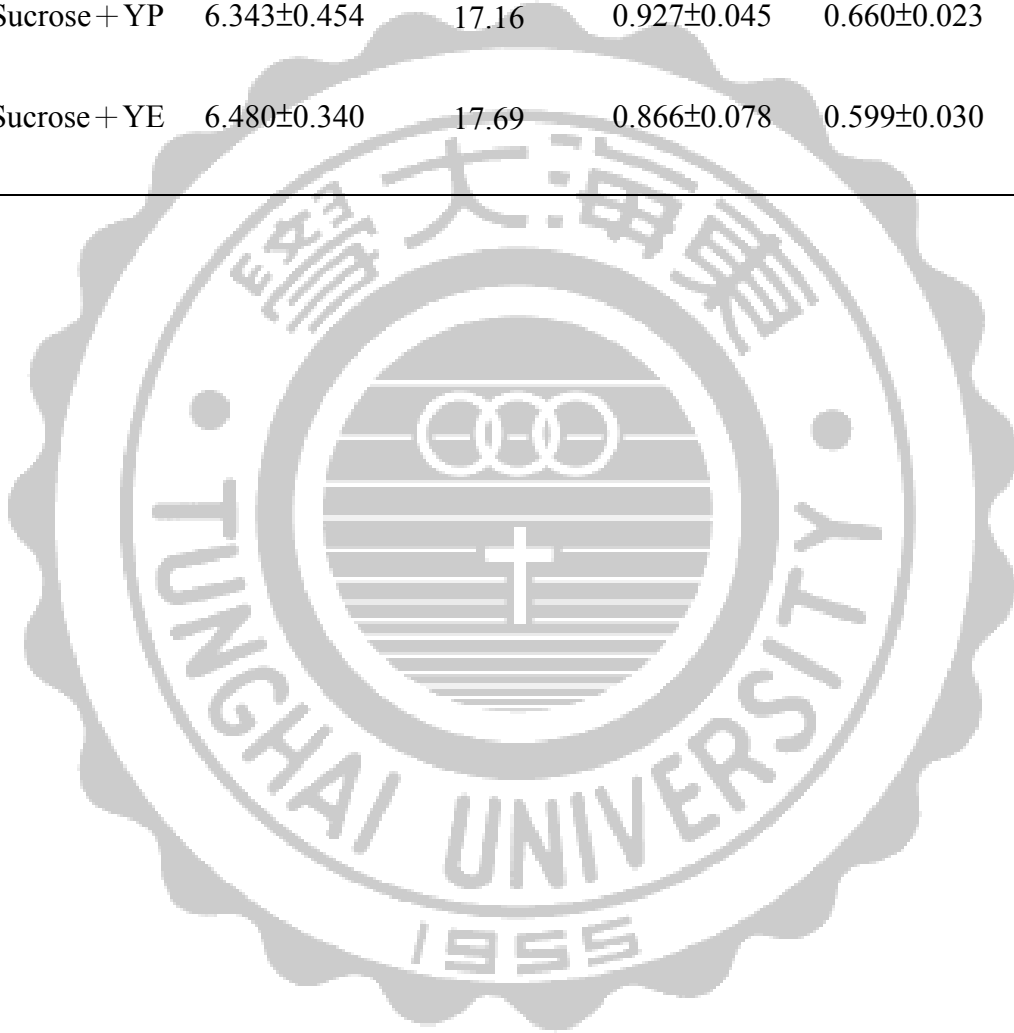
初始 pH：6.0

轉速：120 rpm

接種量：10%

表 4.6 碳氮源饋料對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響

Carbon & Nitrogen Source	Biomass (g/L)	Cost per unit of biomass (\$/g)	Adenosine (mg/g D.W)	Cordycepin (mg/g D.W)	D-mannitol (mg/g D.W)
Control	4.987±0.032	21.98	0.848±0.125	0.578±0.052	176.05±17.98
Sucrose + YP	6.343±0.454	17.16	0.927±0.045	0.660±0.023	191.65±7.98
Sucrose + YE	6.480±0.340	17.69	0.866±0.078	0.599±0.030	186.20±12.55





#### 4.1.7 添加不同氨基酸與前驅物之影響

此實驗為探討搖瓶添加不同的氨基酸與前驅物對於菌體生長及 Adenosine 與 Cordycepin、D-mannitol 產量之影響，添加濃度均為 1 g/L。根據文獻指出，添加不同的氨基酸與蟲草素前驅物等作為營養源，有助於蛹蟲草累積蟲草素(王蕾等，2012)，因此挑選 Adenosine、Adenine、Aspartic、Alanine、Glycine 這五種作為此實驗階段的添加源。實驗結果如圖 4.7 與表 4.7 到表 4.9。由圖 4.7.A 顯示，以取樣的天數來看，取樣的天數越短，腺苷的含量越高，就添加的種類而言，以腺苷、丙氨酸和天門冬氨酸效果較佳，其中以添加腺苷在第 19 天取樣的含量最高，可達到 996.846 $\mu\text{g/g}$  D.W，而腺嘌呤與甘氨酸的效果則不明顯。

由圖 4.7.B 顯示，取樣時間越早，蟲草素含量越高，後面兩個時間點的取樣，蟲草素的單位濃度幾乎差不多，以添加種類而言，以腺苷、丙氨酸和天門冬氨酸效果較佳，其中以添加腺苷在第 19 天取樣有最高的蟲草素，可達到 384.359 $\mu\text{g/g}$  D.W，是未添加控制組的 1.9 倍。而腺嘌呤和甘氨酸結果不如預期，與文獻不同，推測可能是添加濃度導致或因為冬蟲夏草與蛹蟲草雖然是同為蟲草屬菌，但不同種，在代謝機制上可能也有差異。

由圖 4.7.C 顯示，取樣天數越短，會有越高量的菌絲體，就添加種類而言，以天門冬氨酸有較高的菌體量，在第 19 天有最大值 5.75 g/L，是控制組的 1.2 倍左右，其次是腺苷，而甘氨酸、丙氨酸和腺嘌呤雖然都高於控制組，但增加的幅度不高，不到 10%，因此添加的營養物與菌絲生長的相關性不高。

由圖 4.7.D 顯示，取樣天數越長，則甘露醇含量越高，若以添加種類來看，以丙氨酸效果較佳，在第 23 天含量可達 214.422 mg/g D.W，其次為甘氨酸和腺苷，分別為 200.544 mg/g D.W 和 188.299 mg/g D.W，天門冬氨酸效果最差，還低於未添加的控制組，猜測可能是天門冬氨酸會有抑制作用。

此階段實驗與文獻（王蕾等，2012）相比較，五種添加物均能提高產物的產量，文獻中腺嘌呤效果最佳（73.81 mg/L），其次為丙氨酸，而本實驗則為腺苷與丙氨酸效果較佳（2.12 mg/L），腺嘌呤效果較不顯著，猜測可能是本實驗腺嘌呤來自於酵母粉，在純度上可能有差異，故效果不顯著。

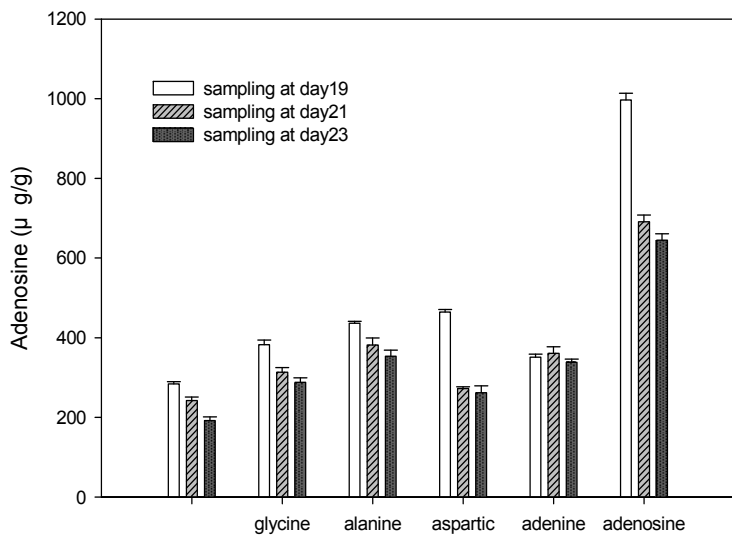


Fig. A

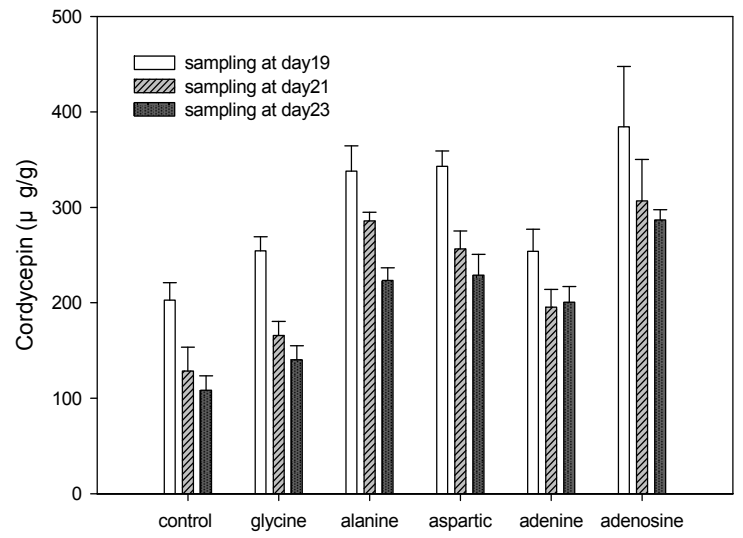


Fig. B

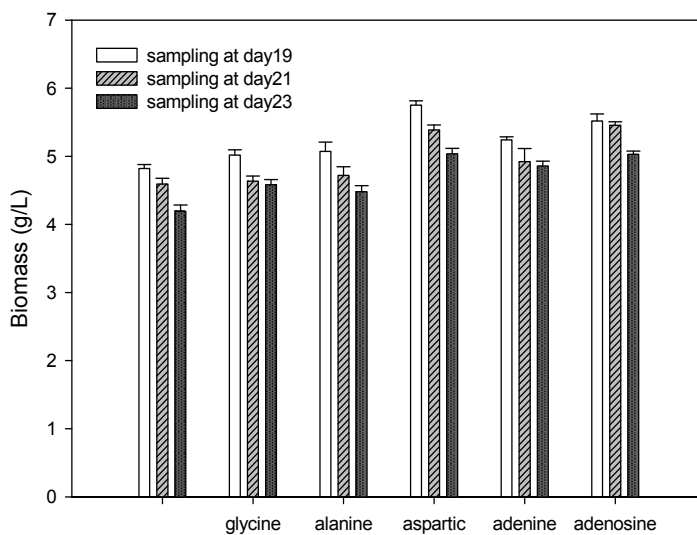


Fig. C

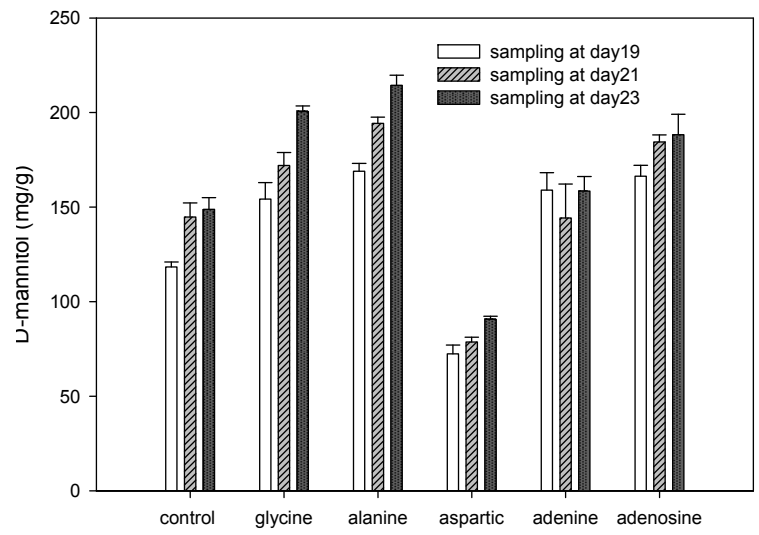


Fig. D

圖 4.7 Fig.A-D 為不同添加物在不同取樣時間對產物單位菌體濃度之影響

培養條件：發酵培養基（添加不同添加物）

添加濃度：1.0 g/L

添加時間：發酵培養至第 15 天

溫度：20°C 初始 pH：6.0 轉速：120 rpm 接種量：10%

表 4.7 不同添加物第 19 天取樣對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響

Types of additives	Biomass (g/L)	Cost per			
		unit of biomass (\$/g)	Adenosine (mg/g D.W)	Cordycepin (mg/g D.W)	D-mannitol (mg/g D.W)
Control	4.820±0.060	22.74	0.284±0.006	0.203±0.018	118.37±2.62
Glycine	5.017±0.078	22.47	0.382±0.012	0.255±0.015	154.29±8.65
Alanine	5.073±0.136	22.24	0.436±0.005	0.338±0.026	168.98±4.11
Aspartic	5.750±0.066	19.79	0.464±0.007	0.343±0.016	72.45±4.64
Adenine	5.240±0.046	23.40	0.352±0.008	0.254±0.023	158.98±9.18
Adenosine	5.520±0.102	21.21	0.997±0.017	0.384±0.063	166.36±5.71

表 4.8 不同添加物第 21 天取樣對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響

Types of additives	Biomass (g/L)	Adenosine (mg/g D.W)	Cordycepin (mg/g D.W)	D-mannitol (mg/g D.W)
Control	4.593±0.085	0.242±0.009	0.129±0.025	144.76±7.48
Glycine	4.633±0.078	0.313±0.012	0.166±0.015	171.97±6.94
Alanine	4.720±0.128	0.382±0.017	0.286±0.009	194.29±3.30
Aspartic	5.387±0.074	0.272±0.004	0.257±0.019	78.71±2.49
Adenine	4.923±0.191	0.361±0.016	0.195±0.019	144.29±17.90
Adenosine	5.457±0.050	0.691±0.017	0.307±0.044	184.49±3.68

表 4.9 不同添加物第 23 天取樣對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響

Types of additives	Biomass (g/L)	Adenosine (mg/g D.W)	Cordycepin (mg/g D.W)	D-mannitol (mg/g D.W)
Control	4.193±0.091	0.192±0.009	0.108±0.015	148.84±6.16
Glycine	4.583±0.075	0.288±0.011	0.140±0.015	200.54±2.94
Alanine	4.480±0.089	0.353±0.015	0.223±0.013	214.42±5.35
Aspartic	5.037±0.082	0.262±0.017	0.229±0.022	90.68±1.63
Adenine	4.857±0.072	0.338±0.008	0.201±0.016	158.42±7.79
Adenosine	5.030±0.047	0.645±0.016	0.287±0.011	188.30±10.80



#### 4.1.8 腺嘌呤濃度之影響

此實驗為探討不同濃度的腺嘌呤對於菌體生長及 Adenosine 與 Cordycepin、D-mannitol 產量之影響，由 4.1.7 實驗中發現，添加腺嘌呤結果與文獻不符合，並沒有明顯增加產物量，除了菌種的差異之外，猜測可能是濃度所造成的影響，因此做添加腺嘌呤濃度變化的實驗探討，濃度分別為 0.5g/L、1.0 g/L、1.5 g/L、2.0 g/L，實驗結果如圖 4.8 和表 4.10。由圖 4.8 顯示，添加濃度為 0.5g/L、1.0 g/L 時，腺苷與蟲草素的單位含量與未添加的控制組差不多，而當濃度增加到 1.5 g/L、2.0 g/L 時，腺苷與蟲草素的單位含量提高了約 19%，可能是因為前面添加的濃度太低，效果較不顯著，當濃度提高到 1.5 g/L 時，才有較明顯的變化。隨著嘌呤濃度的增加，甘露醇有微量上升的趨勢，而菌絲生長並沒有特定的趨勢，以 1.5 g/L 的濃度最高，菌絲體量可達到 5.24 g/L。

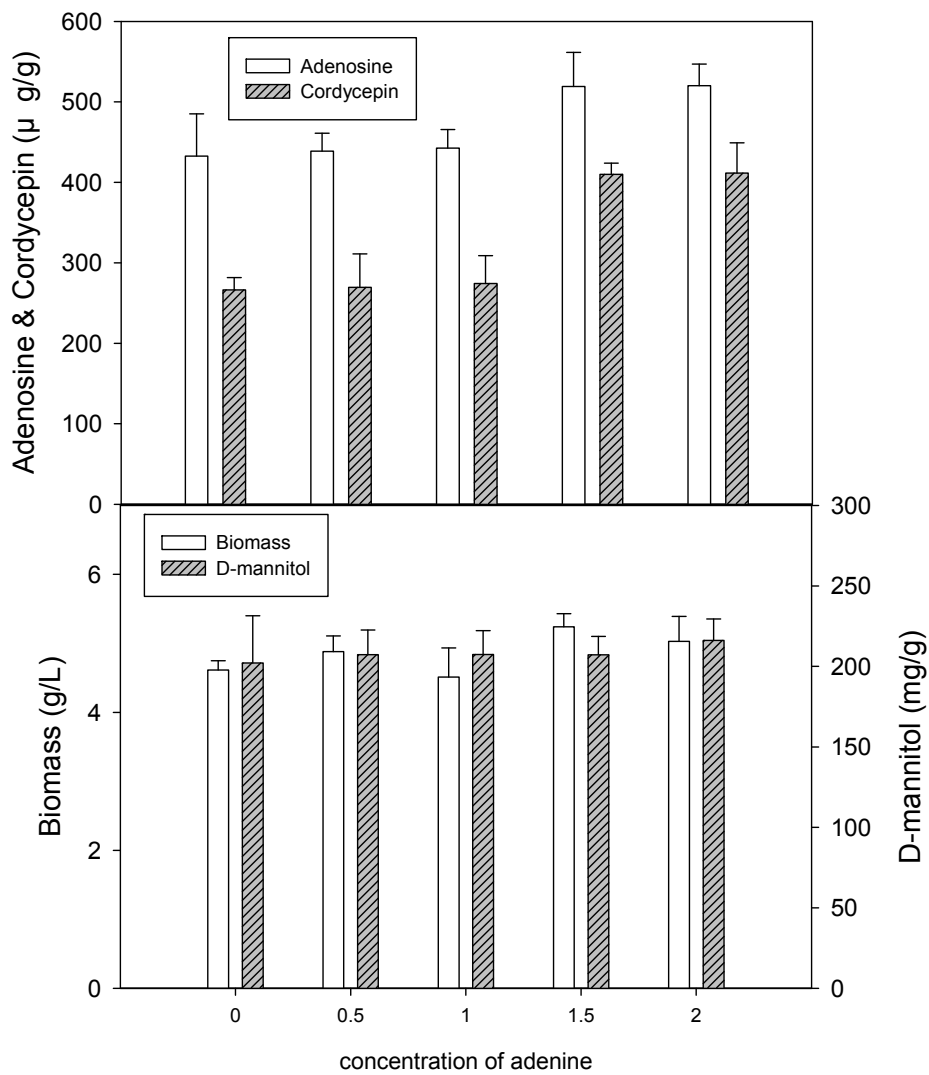


圖 4.8 腺嘌呤濃度對菌體生長及產物單位菌體濃度之影響

培養條件：發酵培養基（添加不同濃度腺嘌呤）

添加濃度：0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L、2.0 g/L

添加時間：發酵培養至第 15 天

溫度：20°C

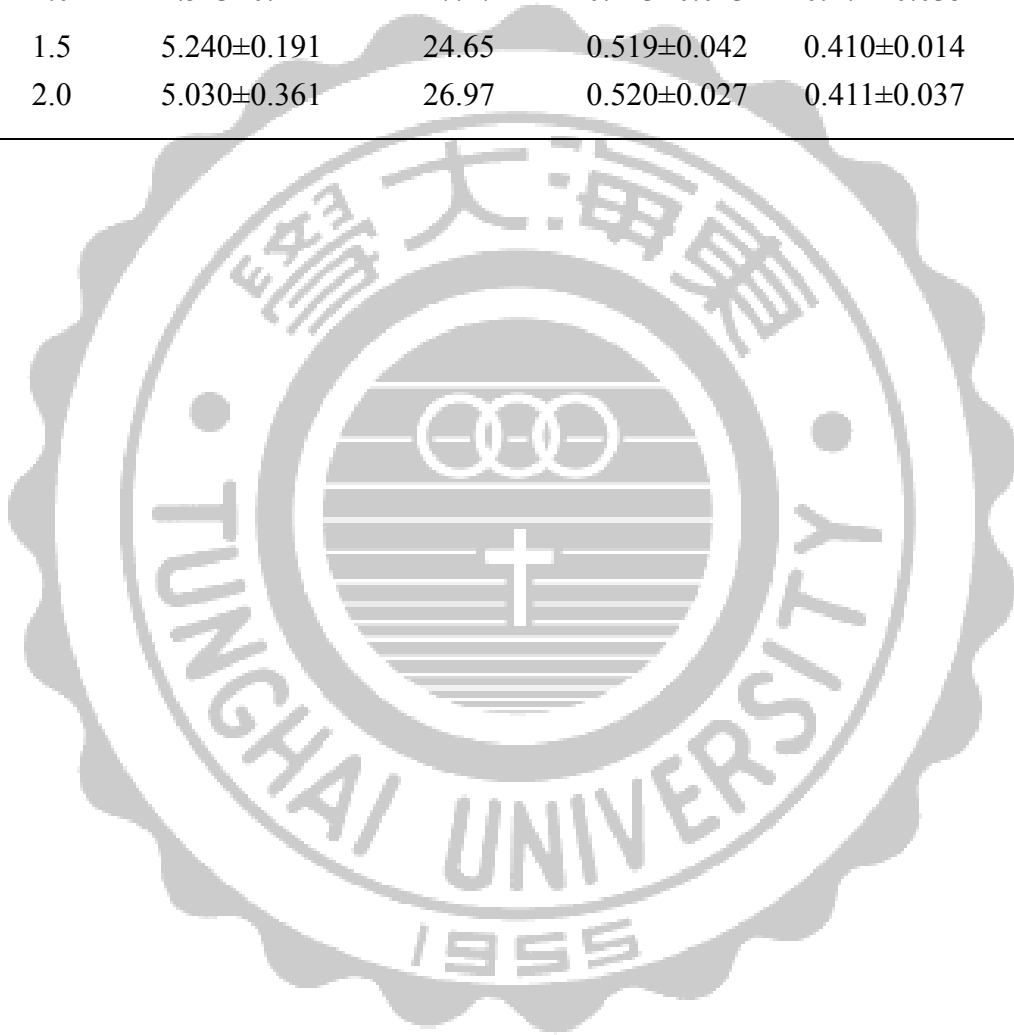
初始 pH：6.0

轉速：120 rpm

接種量：10%

表 4.10 腺嘌呤濃度對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響

Adenine (g/L)	Biomass (g/L)	Cost per unit of biomass (\$/g)	Adenosine (mg/g D.W)	Cordycepin (mg/g D.W)	D-mannitol (mg/g D.W)
0	4.613±0.136	23.76	0.432±0.053	0.266±0.015	202.10±29.42
0.5	4.880±0.229	23.80	0.439±0.022	0.270±0.041	207.27±15.43
1.0	4.513±0.422	27.17	0.443±0.023	0.274±0.035	207.46±14.73
1.5	5.240±0.191	24.65	0.519±0.042	0.410±0.014	207.24±11.41
2.0	5.030±0.361	26.97	0.520±0.027	0.411±0.037	216.11±13.37





## 4.2 5-L 攪拌式發酵槽批次程序

### 4.2.1 不同轉速之影響

此實驗為從搖瓶批次實驗放大到 5L 攪拌式發酵槽，探討在不同的轉速下對於菌體生長及 Adenosine 與 Cordycepin、D-mannitol 產量之影響，實驗結果如圖 4.9 與表 4.11。由圖 4.9.D 顯示，當轉速為 50 rpm 時菌絲體含量最高，可達到 4.01g/L，其次為 20 rpm，菌絲量最低的是 100 rpm，推測可能是因為轉速過高，剪切力太大，葉片對菌體造成傷害，導致高轉速下菌體生長不良。而在轉速 20 rpm 下，因為轉速極低，而且冬蟲夏草算是微好氧的真菌，轉速過低造成攪拌不均，導致發酵液的質傳與熱傳效果較差，造成菌體生長較差。由圖 4.9.A.B 顯示，50 rpm 時腺苷與蟲草素的單位含量較高，當轉速在過低或過高的情況下，代謝產物的產量都不高。由圖 4.9.C 顯示，在 20 rpm 和 50 rpm 的甘露醇單位濃度幾乎差不多，在 100 rpm 高轉速下，甘露醇的單位濃度大幅降低。

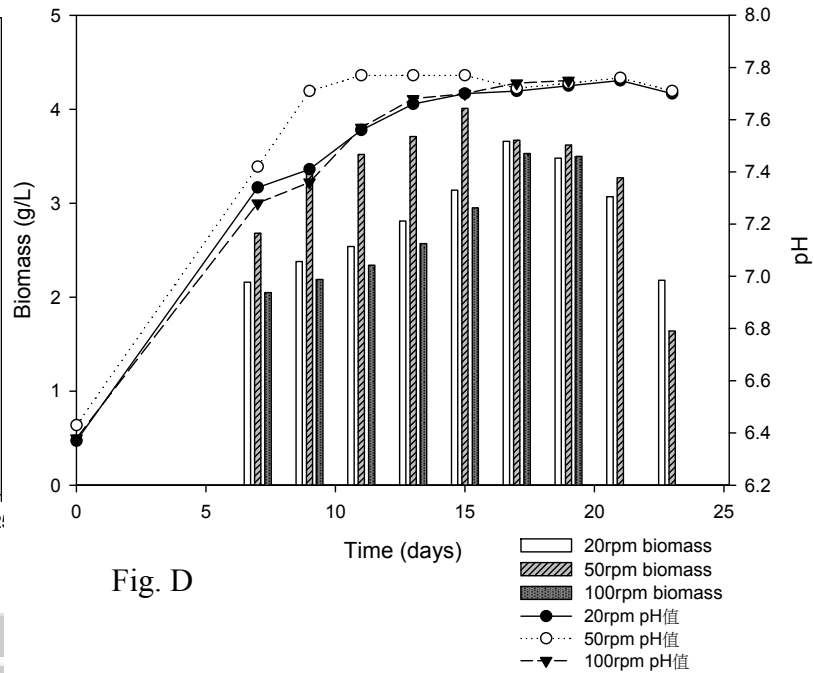
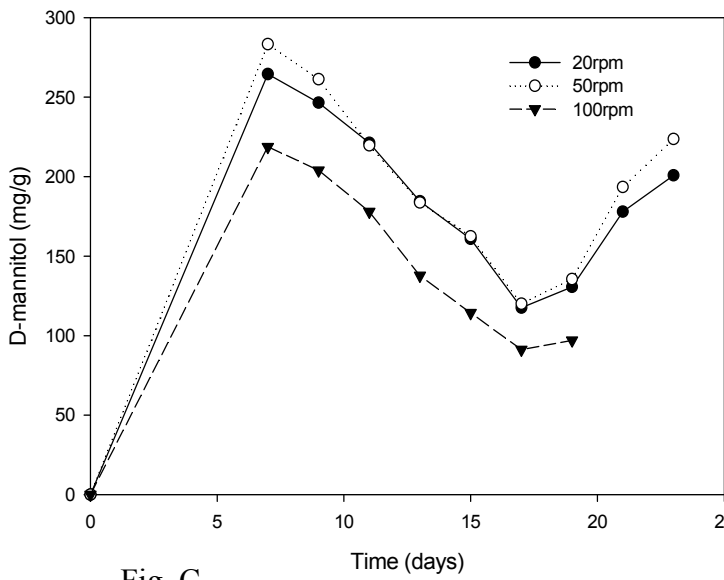
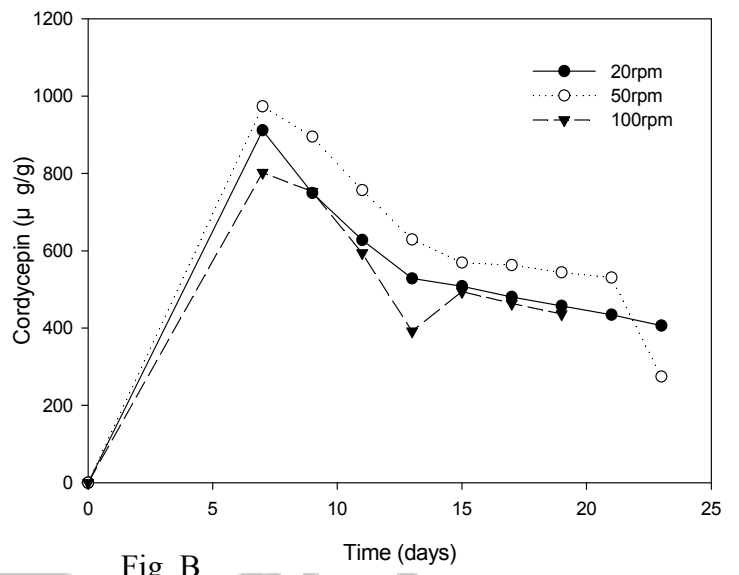
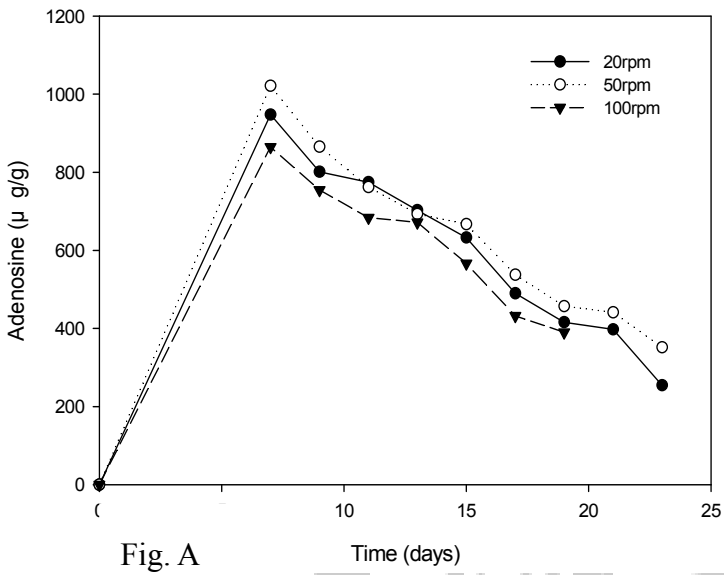


圖 4.9 Fig.A-D 發酵槽不同轉速對菌體生長與產物單位菌體濃度之影響

培養條件：發酵培養基

接種量：10% 通氣量：0.5 v.v.m

溫度：20°C 初始 pH：6

轉速：20 rpm、50 rpm、100 rpm

表 4.11 轉速 50 rpm 對菌體生長及活性成分單位菌體產量之影響

Incubation time (day)	pH	Biomass (g/L)	Cordycepin (mg/g D.W)	Adenosine (mg/g D.W)	D-mannitol (mg/g D.W)
0	6.43	0	0	0	0
7	7.42	2.68	0.973	1.021	283.27
9	7.71	3.32	0.895	0.865	261.22
11	7.77	3.52	0.757	0.762	219.59
13	7.77	3.71	0.629	0.693	183.67
15	7.77	4.01	0.569	0.667	162.45
17	7.72	3.67	0.563	0.538	120.00
19	7.74	3.62	0.544	0.457	135.51
21	7.76	3.27	0.530	0.441	193.47
23	7.71	1.64	0.275	0.352	223.67

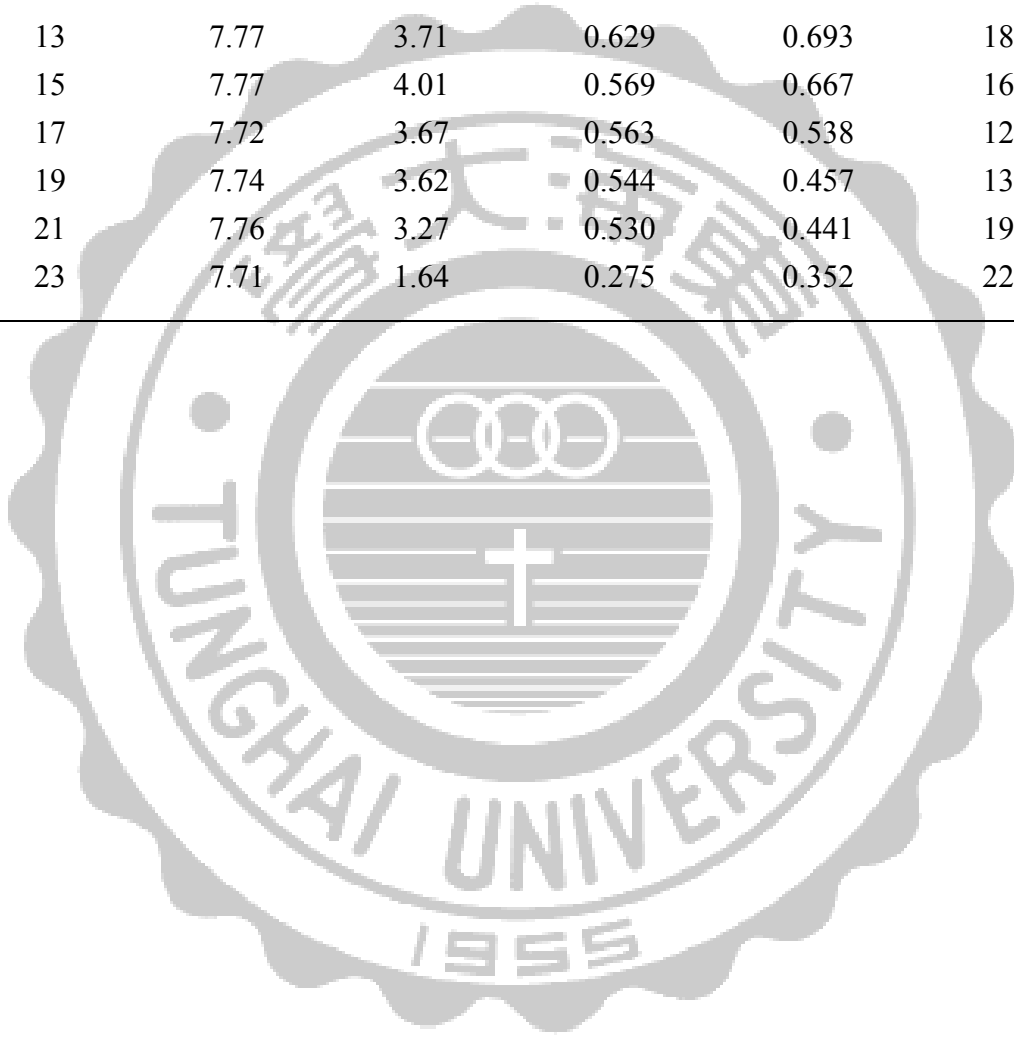


表 4.12 文獻與本實驗結果比較

Organism	Culture conditions	Biomass (g/L)	Cordycepin (mg/g)	Adenosine (mg/g)	D-mannitol (mg/g)	Reference
<i>H. sinensis</i>	Sucrose YE 20°C 120rpm	6.603	0.812	1.099	178.64	This study
<i>O. sinensis</i>	Glucose NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 18°C	4.690	—	—	33.05	劉(2006)
<i>H. sinensis</i>	20°C 150rpm	7.890	—	—	35.40	王(2011)
<i>H. sinensis</i>	Glucose YE 18°C 180rpm	20.800	—	—	—	黃(2013)
西藏冬蟲 夏草		—	0.280	0.920	—	陸(2012)

## 第五章 結論與未來展望

### 5.1 結論

本實驗探討培養條件、添加物對菌體生長、生產腺苷、蟲草素之影響，綜合以上實驗結果，整理出以下幾點結論：

1. 在搖瓶批次發酵實驗中，於培養 7 day 期間，pH 值會從起始 6.3 上升至 7.4 左右，此後 pH 維持在 7.7 左右，直到第 17day 開始略為下降；菌絲體在經歷了對數生長期和短暫的穩定期後，在第 17 day 達到最大菌體量 4.7 g/L，其後因為衰退死亡，菌體量下降。培養基的優化以蔗糖為碳源，起始濃度 50 g/L，酵母萃取物為氮源，起始濃度 13 g/L；培養溫度 20°C、初始 pH 6.0、轉速 120 rpm 的條件下，可產菌體量 5.38 g/L、蟲草素 677.08  $\mu$ g/g D.W。饋料批次實驗，以酵母萃取物為新氮源加入，腺苷與蟲草可提高約 30%與 40%，菌體濃度提升約 32%。
2. 在添加物實驗中，以菌體濃度而言，培養天數越短，菌體濃度越高，添加種類以天門冬氨酸 5.75 g/L 較佳；蟲草素的部分，培養天數越短，單位菌體濃度越高，以添加腺苷效果較好 384.36  $\mu$ g/g D.W；甘露醇則是培養天數長較佳，以丙氨酸的添加較佳 214.42 mg/g D.W，而天門冬氨酸則有抑制作用。探討腺嘌呤濃度實驗中，以添加濃度 2.0 g/L 效果較佳，相對於不添加腺嘌呤的控制組，其蟲草素可提升約 54%。

3. 5-L 攪拌式發酵槽批次發酵之轉速實驗中，以轉速 50 rpm 優於其他轉速，最高菌體濃度 (4.01 g/L)、腺苷濃度 (1021.09  $\mu\text{g/g D.W}$ )、蟲草素濃度 (973.35  $\mu\text{g/g D.W}$ )、甘露醇 (283.26 mg/g D.W)；過低轉速的情況下，對於冬蟲夏草這種微好氧真菌而言，近乎靜置培養，所以生長情況較差；而在 100 rpm 高轉速下，則因為有攪拌葉片所產生的剪切力，對菌的生長造成較嚴重的破壞，所以生長情況相對最差。



## 5.2 未來展望

目前的實驗為利用蔗糖、酵母萃取物等複合培養基作為培養基，未來將可以利用回收再生作為替代原料，例如糖蜜、麩皮等農業廢棄物，以降低培養基的成本。在菌種方面，由於冬蟲夏草生長緩慢，在 PDA 平板上培養兩個月，菌落大小約莫一個五元硬幣左右，而不同的菌落，其型態跟特徵也都有差異，挑選生長狀況良好，找出具有高菌體濃度、高生產速率之菌種，以提高商業化潛力。在發酵策略方面，可嘗試改變通氣量與溶氧或結合兩段式通氣與溶氧，以增加菌體濃度進而提高產物產量。研究後續分離純化步驟，提高產物純度，發酵液的再利用以及處理。



## 參考文獻

- 丁婷，胡豐林，耿德貴，邵穎，葛飛，陳安徽，樊美珍，(2006)。冬蟲夏草及其無性型菌株發酵液中核苷類成分的 HPLC 法定量分析，*食品與發酵工業*，32 (6)：97-99。
- 王蕾、羅巍、胡瑕、劉東波、夏志蘭、謝紅旗，(2012)。蟲草素高產菌株的篩選及不同添加物對蟲草素產量的影響研究，*菌物學報*，31 (3)：382-388。
- 王忠，馬啟龍，喬正強，(2001)。甘肅冬蟲夏草菌分離培養研究，*甘肅農業科技*，7：43-44。
- 王祖華，王安亭，(2012)。冬蟲夏草蟲草甘露醇含量測定的研究，*食品工業*，33 (12)：186-188。
- 文庭池、雷幫星、康冀川、李光榮、何勁，(2009)。添加前體促進蛹蟲草發酵生產菌絲體和蟲草菌素的研究，*食品與發酵工業*，35 (8)：49-52。
- 付彥凱、冷雲偉、曹文化，(2012)。蛹蟲草的人工培育歷程，*北方園藝*，(04)：178-182。
- 申愛榮、譚著明、曾糧斌，(2012)。蛹蟲草人工液體發酵的研究進展，*湖南林業科技*，39 (5)：142-145。
- 李春如、彭凡、樊美珍、李曾智，(2004)。中國被毛孢 RCEF0273 培養工藝的研究，*安徽農業大學學報*，31 (4)：460-465。



李雪芹,包天桐,王雁,(1999)。比色法測定冬蟲夏草中甘露醇的含量, *中草藥*,  
30 (1): 19-21。

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*。

何蘇琴、王三喜、羅進倉、李風慶、金秀琳、文朝慧、馬福全、周昭旭、唐德志,  
(2011)。冬蟲夏草和中國被毛孢型態學再研究, *微生物學通報*, 38(11):  
1730-1738。

杜曉蒙,孫海龍,崔建東(2011)。培養基成分對冬蟲夏草菌生長的影響及其優化, *中國釀造*, 3: 72-74。

吳勇,陳衛東,王利,張榮嘎,張華,(2010)。蛹蟲草培養基中蟲草素的幾種提取方法比較, *安徽醫藥*, 14 (3): 284-285。

周佳賢,(2005)。蛹蟲草固態培養研究探討, *朝陽科技大學生物技術研究所碩士論文*。

林冠廷,(2010)。影響蛹蟲草固態發酵生產蟲草素之研究, *國立宜蘭大學生物技術研究所碩士論文*。

郭宏春、高繼全、習欠雲、李小紅,(2003)。冬蟲夏草研究進展, *微生物雜誌學*,  
1 (23): 50-55。

殷海松、喬長晟、秦韶燕、湯衛華、賈士儒,(2013)。冬蟲夏草發酵培養基的優化, *食品研究與開發*, 34 (11): 5-8。

- 范志華，湯衛華，林霖 (2007)。HPLC 法測定冬虫夏草发酵菌丝粉中腺苷的含量，*現代食品科技*，23 (7)：94-97。
- 陸艷艷，邱細敏，蔣誠，劉勝姿，郭思維，陳文，(2011)。人工冬虫夏草不同部位核苷類成分分析，*食品科技*，36 (4)：250-252，256。
- 張古忍、余俊鋒、吳光國、劉昕，(2011)。冬虫夏草發生的影響因子，*生態學報*，31 (14)：4117-4125。
- 張姝、張永傑、SHRESTHA Bhushan、徐建平、王成樹、劉杏忠，(2013)。冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究現狀、問題及展望，*菌物學報*，32 (4)：577-597。
- 張志瑾、毛寧，(2012)。蛹虫草液體培養基配方優化研究，*天津農業科學*，18 (4)：120-122。
- 梁宗琦、韓燕峰、梁建東、董旋、杜文，(2010)。冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 研究中幾個值得關注的問題，*微生物學通報*，37 (11)：1692-1697。
- 黃楊、鄭永標、蔡水淋、黃建忠，(2013)。中華被毛孢的液體培養條件優化，*安徽農業科學*，41 (1)：78-80。
- 勞景輝、閔文娟、方佳茂、陳偉濱，(2012)。冬虫夏草發酵技術的研究進展，*中國食用菌*，31 (6)：5-7。
- 湯佳鵬、柳依婷、趙強、董偉、朱俐，(2012)。蛹虫草發酵產蟲草素的培養條件研究，*食品工業科技*，33 (21)：181-183，187。

劉高強、王曉玲、楊青、魏美才，(2007)。冬蟲夏草化學成分及其藥理活性的研究，*食品科技*，(01)：202-205，209。

劉春泉，宋江峰，李大婧，金邦荃，(2007)。蟲草素的提取純化及測定方法研究進展，*食品科學*，28 (11)：596-599。

劉彥威，蘇敬良，韓博，田向榮，(2006)。不同培養條件對冬蟲夏草菌絲體甘露醇的影響，*食品科學*，27 (1)：90-92。

劉艷芳，唐慶九，顧俊傑，張勁松，楊焱，馮娜，週帥，魏東芝，(2010)。北冬蟲夏草深層發酵高產蟲草素工藝的優化，*上海農業學報*，26 (3)：26-30。

蔣毅、姚一建，(2003)。冬蟲夏草無性型研究概況，*菌物系統*，22 (1)：161-176。

顧宇翔，王尊生，李素霞，袁勤生，(2006)。培養基組分對蛹蟲草生物量及核苷、鹼基積累的影響，*中國醫藥工業雜誌*，37 (10)：661-664。

Cha, S. H., Lim, J. S., Yoon, C. S., Koh, J. H., Chang, H. I., & Kim, S. W., (2007).

Production of mycelia and exo-biopolymer from molasses by *Cordyceps sinensis* 16 in submerged culture. *Bioresour Technology*, 98(1):165-168.

Choi, J. W., Ra, K. S., Kim, S. Y., Yoon, T. J., Yu, K. W., Shin, K. S., Suh, H. J.,

(2010). Enhancement of anti-complementary and radical scavenging activities in the submerged culture of *Cordyceps sinensis* by addition of citrus peel.

*Bioresour Technology*, 101(15):6028-6034.

Chunyan XIE, Gaixia LIU, Zhenxin GU, Gongjian FAN, Lei ZHANG, & GU, Y., (2009). Effects of culture conditions on mycelium biomass and intracellular cordycepin production of *Cordyceps militaris* in natural medium. *Annals of Microbiology*, 59(2):293-299.

Cui, J.-D., & Jia, S.-R., (2010). Optimization of medium on exopolysaccharides production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Food Science and Biotechnology*, 19(6):1567-1571.

Dong, C. H., & Yao, Y. J., (2005). Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. *Journal Applied Microbiology*, 99(3):483-492.

Dong, C. H., & Yao, Y. J., (2011). On the reliability of fungal materials used in studies on *Ophiocordyceps sinensis*. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 38(8):1027-1035.

Hsu., T.-H., Shiao., L.-H., Hsieh., C., & Chang., D.-M., (2002). A comparison of the chemical composition and bioactive ingredients of the Chinese medicinal mushroom DongChongXiaCao, its counterfeit and mimic, and fermented mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Food Chemistry*, 78:463-469.

John C.Holliday, Phillip Cleaver, Megan Loomis-Powers, & Dinesh Patel., (2004).

Analysis of Quality and Techniques for Hybridization of Medicinal Fungus

*Cordyceps sinensis*. *Medicinal Mushrooms*, 6(2) :151-164.

Kim, H. O., & Yun, J. W., (2005). A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4):728-738.

Kwon, J. S., Lee, J. S., Shin, W. C., Lee, K. E., & Hong, E. K., (2010). Optimization of culture conditions and medium components for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides with *Cordyceps militaris* in liquid culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(6):756-762.

Li, C., Li, Z., Fan, M., Cheng, W., Long, Y., Ding, T., & Ming, L., (2006). The composition of *Hirsutella sinensis*, anamorph of *Cordyceps sinensis*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(8):800-805.

Li, S. P., Yang, F. Q., & Tsim, K. W., (2006). Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5):1571-1584.

Masuda, M., Urabe, E., Honda, H., Sakurai, A., & Sakakibara, M., (2007). Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5):1199-1205.

Paterson, R. R., (2008). Cordyceps: a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? *Phytochemistry*, 69(7):1469-1495.

Shih, I.-L., Tsai, K.-L., & Hsieh, C., (2007). Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Biochemical Engineering Journal*, 33(3):193-201.

Shrestha, B., Zhang, W., Zhang, Y., & Liu, X. (2012). The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development. *Mycological Progress*, 11(3):599-614.

Xiao, J.-h., Chen, D.-x., Wan, W.-h., Hu, X.-j., Qi, Y., & Liang, Z.-q., (2006). Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps jiangxiensis* using desirability functions. *Process Biochemistry*, 41(8):1887-1893.

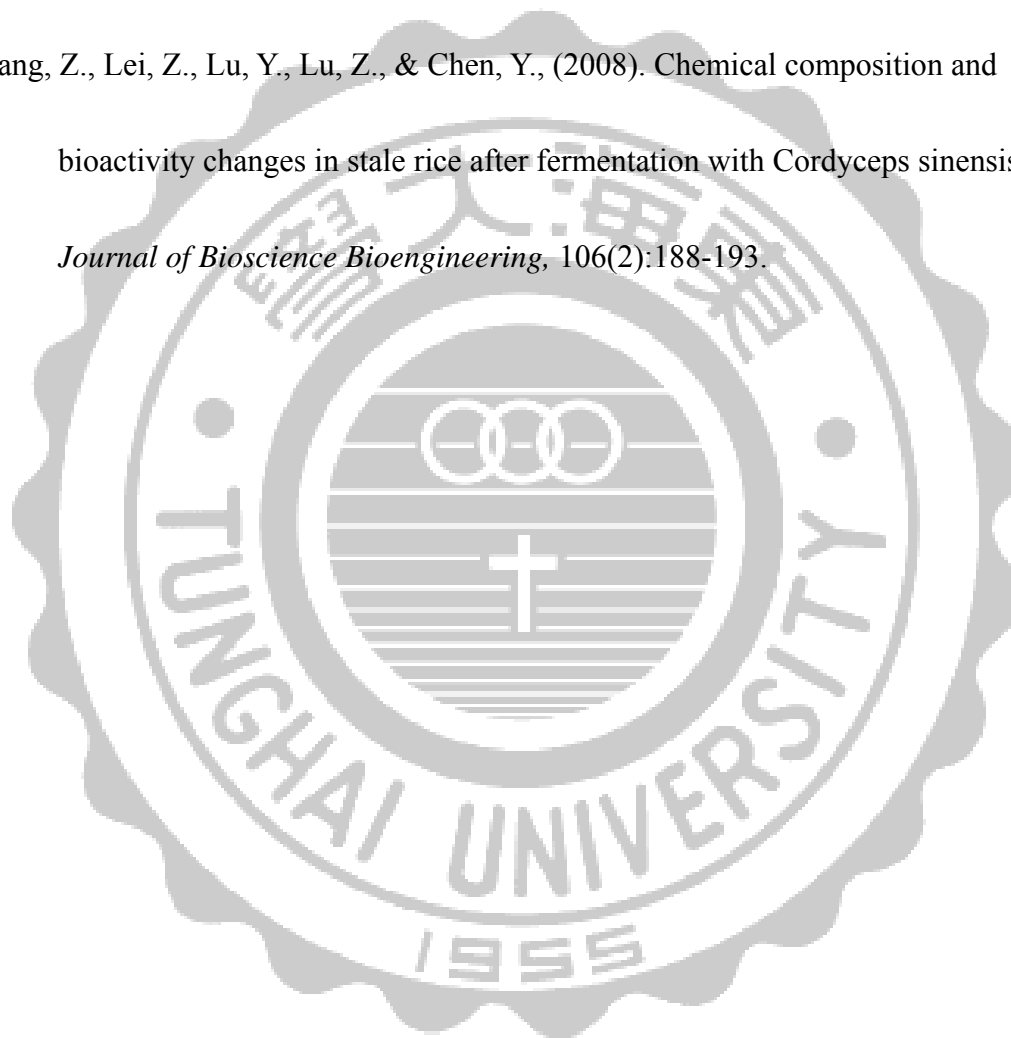
Xie, C. Y., Gu, Z. X., Fan, G. J., Gu, F. R., Han, Y. B., & Chen, Z. G., (2009). Production of cordycepin and mycelia by submerged fermentation of *Cordyceps militaris* in mixture natural culture. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 158(2):483-492.

Xu, Q., Liu, Z., Sun, Y., Ding, Z., LÜ, L., & Li, Y., (2012). Optimization for Production of Intracellular Polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides* L2 in Submerged Culture and Its Antioxidant Activities in vitro. *Chinese*

*Journal of Chemical Engineering*, 20(2):294-301.

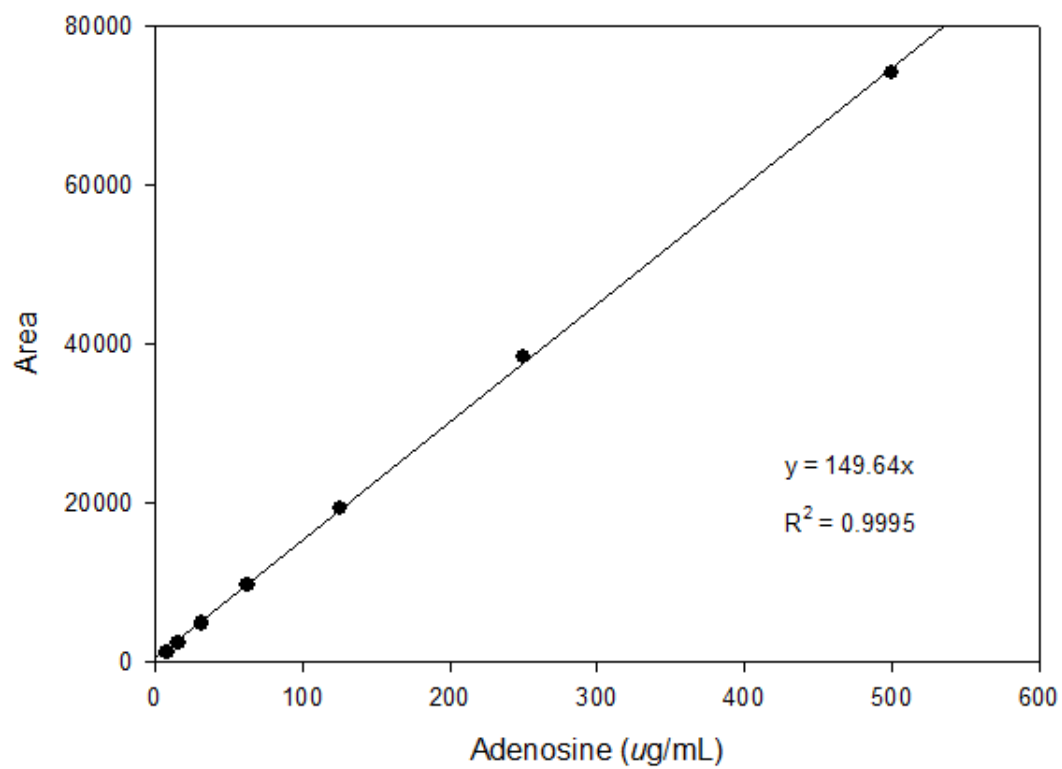
Yuan, J.-P., Wang, J.-H., Liu, X., Kuang, H.-C., & Zhao, S.-Y., (2007). Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC. *Food Chemistry*, 105(4):1755-1759.

Zhang, Z., Lei, Z., Lu, Y., Lu, Z., & Chen, Y., (2008). Chemical composition and bioactivity changes in stale rice after fermentation with *Cordyceps sinensis*. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 106(2):188-193.



## 附錄

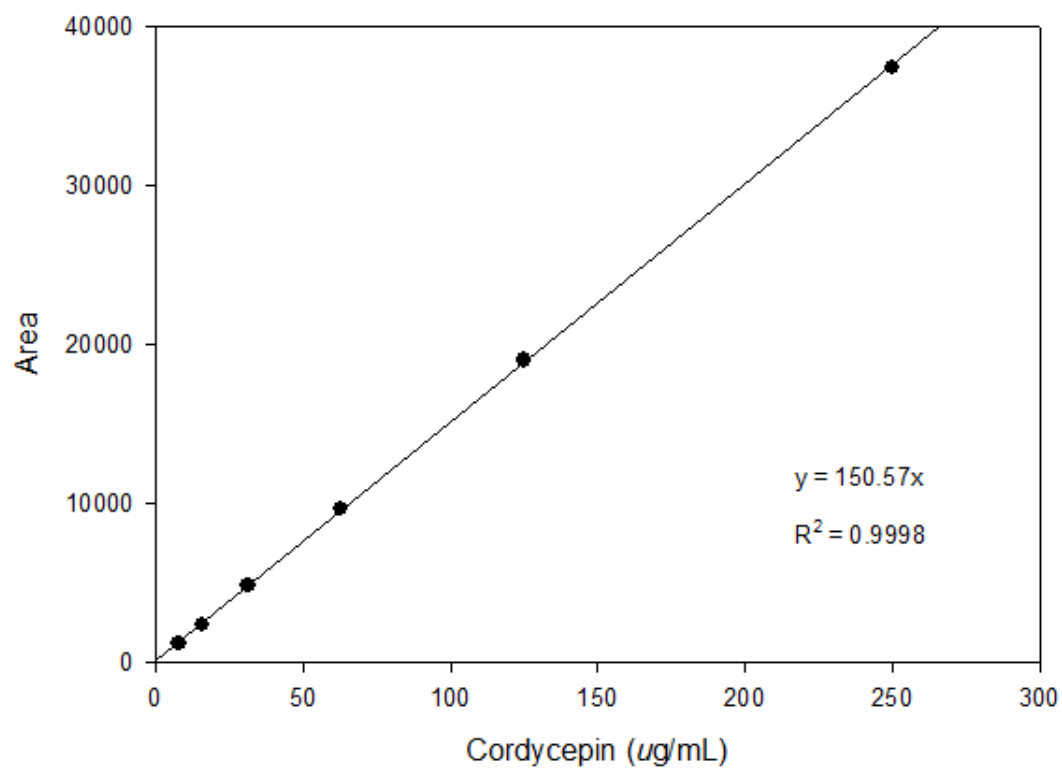
### 附錄 A：腺苷 (Adenosine) 檢量線



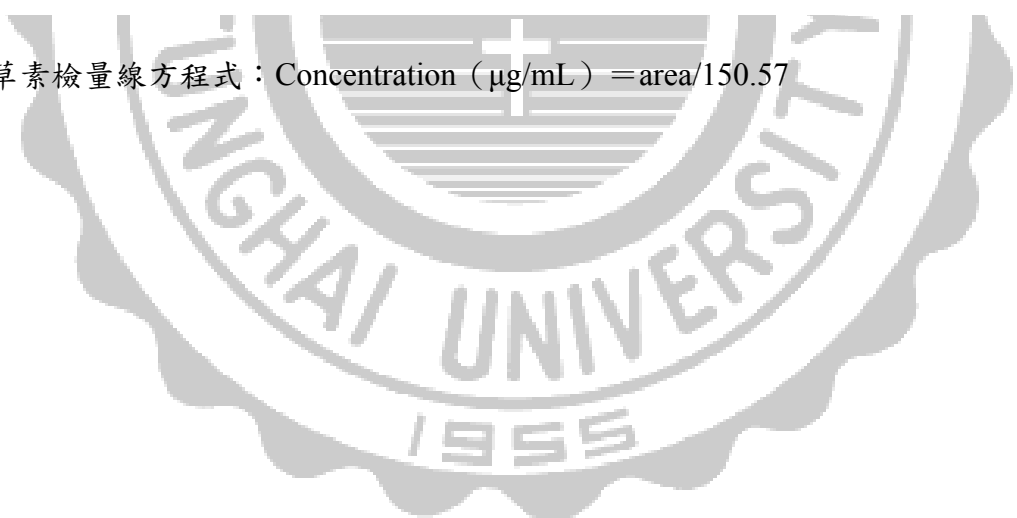
腺苷檢量線方程式：Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) = area/149.64



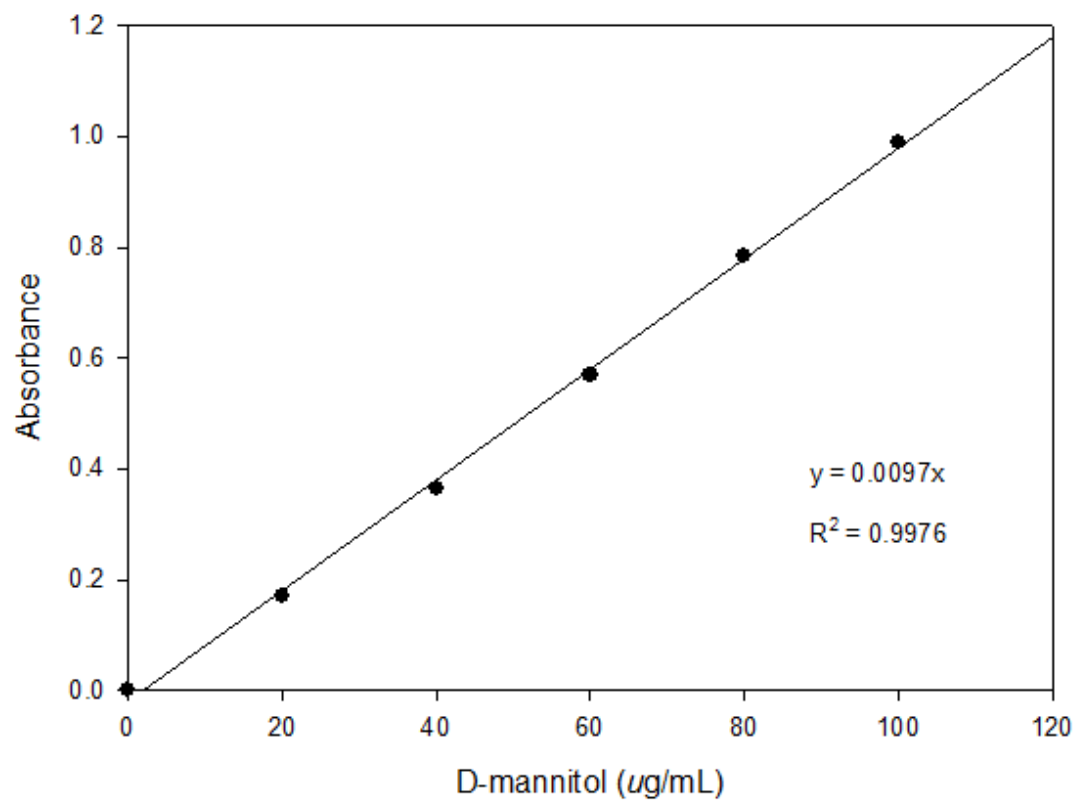
附錄 B：蟲草素 (cordycepin) 檢量線



蟲草素檢量線方程式：Concentration (µg/mL) = area/150.57



附錄 C：甘露醇 (D-mannitol) 檢量線



甘露醇檢量線方程式：Concentration (ug/mL) = absorbance/0.0097



附錄 D：腺苷及蟲草素標準品 HPLC 圖譜

