

國立臺灣大學生農學院生物環境系統工程學研究所



博士論文

Graduate Institute of Bioenvironmental Systems Engineering

College of Bioresource and Agriculture

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

整合類神經系統及反應曲面法探討牛樟芝液態栽培

最適化條件

A Hybrid of Response Surface Methodology and
Artificial Neural Network in the Optimization of culture
conditions for mycelia growth of *Antrodia cinnamomea*

李孟信

Meng-Hsin Lee

指導教授：張斐章 博士

Advisor：Fi-John Chang, Ph.D.

中華民國 111 年 8 月

August 2022



國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書

PHD DISSERTATION ACCEPTANCE CERTIFICATE
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY



整合類神經系統及反應曲面法探討牛樟芝液態栽培最適化條件

A Hybrid of Response Surface Methodology and
Artificial Neural Network in the Optimization of culture
conditions for mycelia growth of *Antrodia cinnamomea*

本論文係 李孟信 (D07622003) 在國立臺灣大學生物環境系
統工程學研究所完成之博士學位論文，於民國 111 年 6 月 14
日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Department / Institute of Bioenvironmental Systems
Engineering on 14/06/2022 have examined a PhD dissertation entitled above presented
by Meng-Hsin Lee (D07622003) candidate and hereby certify that it is worthy of
acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

The image shows a collection of handwritten signatures in blue ink on a light-colored background. The signatures are arranged in two columns. The top left signature is '張麗章' (Zhang Lizhang), with '(指導教授 Advisor)' written below it. Below it are '張麗秋' (Zhang Liqiu) and '黃文政' (Huang Wenzheng). The top right signature is '黃啟豪' (Huang Qihao), with '黃良得' (Huang Liangde) below it. At the bottom left, the text '系主任/所長 Director:' is followed by the signature '李孟信' (Li Mengxin).



謝誌



這是我第二次離開職場重回學校當學生，動機相當單純：「我始終認為人生有機會再回學校念書是人生最大的福份」。很幸運，能有機會進入張斐章特聘教授的水資源研究室學習，接觸目前的重要研究領域「水、糧食、能源的鏈結及調控」及智慧研究工具「類神經網路」，很感謝老師的耐心指導讓我有成長的機會及念書的幸福。

對於本論文，要感謝淡江大學水資源及環境工程學系張麗秋教授、海洋大學河海工程學系黃文政教授、臺灣大學農業化學系黃良得教授及臺灣大學生物環境系統工程學系范致豪教授對於本論文的指導，從資格考開始到口試時所給予的寶貴建議及研究方向的指導，讓本研究更加完整。

同時感謝研究室的學長、姐及學弟、妹在水文資訊學及類神經網路對我不厭其煩的說明及指導，才能跟上研究室的腳步。特別感謝林恒玥小姐在論文投稿上的英文修正才能準時畢業。

此外，感謝家人在我就讀博士班期間的體諒與包容，特別是二個小孩的自主管理讓我無後顧之憂，能全心投入博士課程。4年的博士班有點意猶未盡，但也不能耍賴不走，還是要完成最後階段的畢業。

最後，謹以此論文向所有在博士班就讀期間協助我的人，包含學業的指導、經濟上的支持及各種鼓勵，在此致上最深的謝意，謝謝 您們。

李孟信

2022 09 05

李孟信





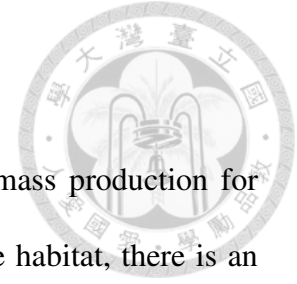
摘要

牛樟芝 (*Antrodia cinnamomea*) 如要發展成為保健產品和功能性商品時，需面臨大量生產及品質一致的挑戰。隨著自然環境的永續發展，實迫切需要以實驗室培養系統增加牛樟芝的產量，以彌補其產量下降和野外棲息地破壞的事實。由於影響微生物生物質產量(菌絲產量)的培養條件有多種因素組合，因此為了建立牛樟芝菌絲產量的最佳條件是一個繁瑣的過程。本研究目的使用混合類神經網路(ANN)法和反應曲面法(RSM)於建立「增加牛樟芝菌絲體產量、生長效率及產量效率的最佳條件」。反應曲面法目的在優化培養條件，而類神經網路目的在精準預測生物質量生產的主導因素，因而降低實驗次數及節省時間和成本。本次選擇了七個主要影響因子來評估這七個因子的最佳濃度和條件對生物質生產的影響，包括葡萄糖、馬鈴薯泥培養基(PDB)、樟木(CC)-多醣(PS)、樟腦、CC水提取物、洋菜和不同培養基起始 pH 值的培養條件。在反應曲面實驗階段應用 Plackett-Burman 及二水準部分因子實驗(2^{7-2})，確定了四個關鍵因子。再以四因子六個水準的中心混合設計，來研究生物質量與關鍵因素之間的相關性。結果顯示，最終培養牛樟芝菌種 B85 的最佳培養基組成為葡萄糖 20.83 g/L、PDB 40.44 g/L、CC-PS 0.16 g/L、樟腦 1 g/L、CC 水提取物 20 g/L、洋菜 3.47 g/L 和 pH 7.37。反應曲面法所得的生物質量比對照組的生物質量高 200%。類神經網路的加入，透過機器學習技術進行最佳條件預測，能夠縮短反應曲面法實驗次數。本研究所提出的方法可以在實驗室培養的最佳條件下提供可靠的藥用真菌生產，與傳統的窮舉法(所有的條件組合)實驗程序相比，可減少成本、時間和精力。在此最佳生長條件下，於工廠大量生產所需的牛樟芝，保護野生牛樟樹及牛樟芝，保有於自然界中緩慢生長的特性，還可達到聯合國 17 項永續發展目標中的第 12 項目標：確保永續的消費和生產模式(SDG 12)；及第 15 項目標：保育和永續利用陸域生態系統，永續管理森林，防治沙漠化，防

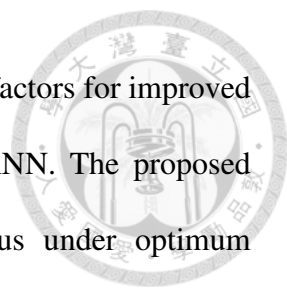
止土地劣化，遏止生物多樣性的喪失(SDG 15)。此外，本研究提出一個以混合 RSM-ANN 深具潛力的方法，在未來遇到多因子試驗任務時，希望能夠帶來新一代的生物質量生產技術。

關鍵詞：牛樟芝、反應曲面法、生物質量、菌絲體生長、類神經網路

Abstract



Antrodia cinnamomea has faced the challenge to cope with mass production for functional food and nutraceutical development. With the distinctive habitat, there is an urgent need to increase the production of *A.cinnamomea* through laboratory cultivation to make up for its declining yield and habitat destruction in the wild. Since mycelial biomass (mycelia yield) production is affected by a combination of various factors, it is a tedious process to obtain the optimal condition for production *A. cinnamomea* mycelia. The aim of this study was to enhance the biomass production of *A. cinnamomea* by a methodology that hybrids Artificial Neural Network (ANN) and Response Surface Methodology (RSM). RSM was performed to optimize the cultural condition, and ANN was used to discover the dominating factors of biomass production. Seven major affecting factors including agar, glucose, *Cinnamomea camphora* (CC)-polysaccharide (PS), camphor, CC water extract, PDB, and different pH of culture medium, were chosen to evaluate the impacts of optimal concentrations and condition on biomass production. The 32 (2⁷-2) fractional factorial designs and Plackett-Burman design identified four major factors. A four-factor six-level central composite design was performed to study the correlation between biomass and the major factors. The results showed that the final optimal medium compositions for the cultivation of *A. cinnamomea* B85 were be 3.47 g/L of agar, 20.83 g/L of glucose, 0.16 g/L of CC-PS, 1 g/L of camphor, 20 g/L of CC water extract, 40.44 g/L of PDB, and 7.37 for pH of the culture medium. The yield of RSM was 200% higher than that of the control. The proposed RSM-ANN can apply to construct different rules during the learning process so that the interdependence between seven input factors and mycelia yield can be explained which allows us to discover how



the model obtains a satisfactory prediction. In this process, four key factors for improved mycelia yield can be identified according to the rules of RSM-ANN. The proposed methodology can offer a mass production of the entitled fungus under optimum conditions, which have the advantages of a reduction in the time, effort, and cost compared to the traditional labor-intensive experimental procedures, while also meeting the Sustainable Development Goals (i.e. SDG 12 and SDG 15), hitting a new milestone. ANN offers a new opportunity in the prediction of mycelial growth systems. Also, we propose the potential of a hybrid RSM-ANN method for solving the difficulties of multifarious tasks in the future with the hope to create a new generation of biomass production technologies.

Keywords : *Antrodia cinnamomea*, Biomass production, Mycelia growth,

Response surface methodology (RSM), Artificial neural network (ANN)

目錄



謝誌.....	ii
摘要.....	iii
Abstract	v
目錄.....	vii
圖目錄.....	ix
表目錄.....	xi
一、緒論.....	1
1.1 研究背景	1
1.2 研究目的	5
1.3 牛樟芝的培養現況	7
1.4 論文章節架構	8
二、文獻探討.....	9
2.1 反應曲面設計(RSM)於發酵條件調控應用	9
2.2 機器學習於發酵最佳化應用	11
三、理論概述.....	18
3.1 類神經網路介紹	18
3.2 自組特徵映射網路	24
3.3 反應曲面法	28
3.4 液態栽培	32
四、材料與方法.....	35
4.1 牛樟芝的液態振盪培養	35
4.2 實驗設計	36
4.3 自組特徵映射網路	43
五、研究結果.....	46

5.1 應用自組特徵映射網路預測牛樟芝液態培養重要因子	46
5.2 Plackett-Burman design (PBD) 法求得最適培養條件	58
5.3 陡升趨近法找尋最陡上升的方向	61
5.4 中央合成設計模式適當性	62
5.5 以反應曲面法預測生物質量最大值	68
5.6 反應曲面法及類神經系統實驗驗證	69
5.7 反應曲面第一階段(T1)栽培條件及菌絲體成分分析	70
六、討論	73
七、結論	75
八、未來發展建議	76
九、參考文獻	78
附錄 1：牛樟芝取種、栽培及採收步驟	91



圖目錄



圖 1.1.1 各種牛樟芝的人工栽培方式.....	3
圖 2.1.1 RSM 常用的三種因子設計法.....	10
圖 2.2.1 應用機器探討發酵最佳條件流程.....	13
圖 2.2.2 探討不同菌種最佳組合栽培流程.....	14
圖 2.3.1 生物反應槽的智慧監測資訊系統說明.....	15
圖 3.1.1 人類神經元構造圖.....	18
圖 3.1.2 類神經網路基本架構圖.....	19
圖 3.1.3 前饋式類神經網路架構圖.....	20
圖 3.1.4 倒傳遞類神經網路架構圖.....	21
圖 3.2.1 自組特徵映射網路架構圖.....	25
圖 3.2.2 自組特徵映射網路 SOM 網路「鄰近區域」概念.....	27
圖 3.3.1 反應曲面法步驟.....	31
圖 3.4.1 液態栽培應用於藥用真菌研究構想流程圖.....	34
圖 4.1.1 牛樟芝栽培操作流程圖.....	36
圖 4.3.1 牛樟芝栽培因子整合類神經網路研究示意圖.....	44
圖 4.3.2 SOM 網路進行牛樟芝栽培因子資料聚類分析.....	45
圖 5.1.1 因子與網路神經元權重分佈圖.....	47
圖 5.1.2 聚類樣本數目分佈圖.....	48
圖 5.1.3 栽培因子 X_1 - X_7 聚類分析生物質量及神經元權重頻率結果 ..	54
圖 5.1.4 SOM 網路各組聚類 X_1 - X_7 頻率分析及生物質量分佈圖	57
圖 5.4.1 反應曲面法的最佳條件與對照組生物質量乾重比較.....	67
圖 5.7.1 牛樟芝菌絲體分離出的 15α -acetyl-dehydrosulphurenic acid 含量 ...	71




圖 5.7.2 從牛樟芝菌絲體分離出的 dehydrosulphurenic acid 含量.....	72
圖 5.7.3 從牛樟芝菌絲體分離出的 dehydroeburicoic acid 的含量。.....	72
圖 10.1.1 牛樟芝原原種.....	91
圖 10.1.2 原原種取種方式.....	92
圖 10.1.3 接種至錐型瓶培養.....	92
圖 10.1.4 振盪培養.....	92

表目錄



表 1.1.1 含蔥醌成分的 17 種食用真菌學名.....	4
表 3.1.1 常用的最佳化演算法.....	22
表 4.2.1 牛樟芝栽培因子高低濃度設計與 code level 對照表	38
表 4.2.2 反應曲面第一階段(T1)各組 code value 栽培條件	39
表 4.2.3 曲面設計各因子採用學習速率.....	40
表 4.2.4 反應曲面第二階段(T2)各組 code value 栽培條件	41
表 4.2.5 反應曲面第三階段(T3)各組 code value 栽培條件	42
表 5.1.1 T1 實驗生物質量產量明細	48
表 5.1.2 SOM 網路各聚類樣本分佈詳細資料.....	50
表 5.2.1 曲面反應第一階段(T1)迴歸分析.....	59
表 5.2.2 第二階段(T2)牛樟芝各栽培因子濃度設計與產量	60
表 5.4.1 第三階段牛樟芝栽培因子 code level 與濃度對照表	64
表 5.4.2 第三階段牛樟芝栽培因子 code level 與生物質量乾重	64
表 5.4.3 第三階段結果二階迴歸相關係數統計分析.....	66
表 5.7.1 三萜類含量與生物質量關係.....	70

一、緒論



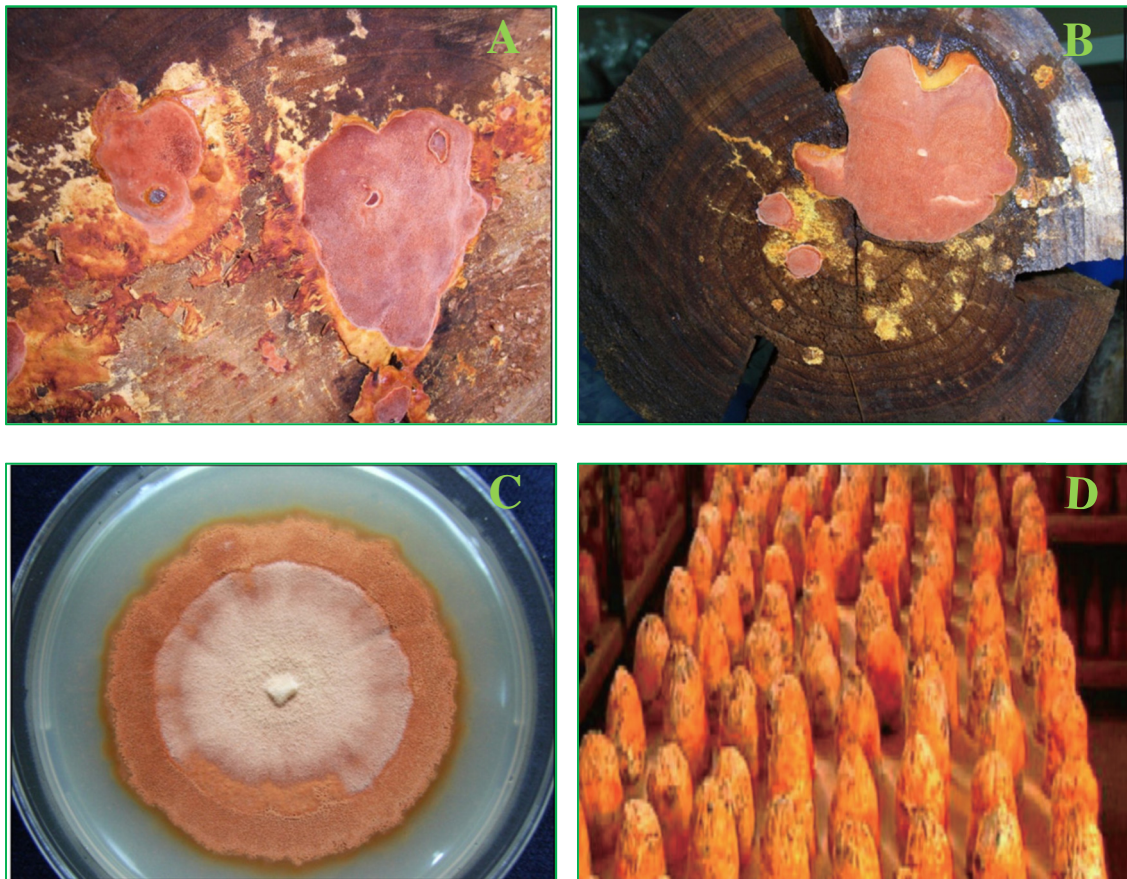
1.1 研究背景

藥用真菌因在癌症預防及免疫調節上展現出具有良好的發展潛力，對政府、學術研究及生技產業都引起相當大的關注。牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*)原為臺灣原住民部落的珍品；數百年來通常被原住民部落用來治療宿醉、強化肝臟功能及減輕病痛的效果。而在過去的數十年，經學術界及生技業者的研究證明，牛樟芝在抗發炎及治療癌症、高血壓及肝炎皆有顯著的效果，其已被列為亞洲民俗的重要藥物(Lu et al., 2013)。因牛樟芝具有多元潛力的療效，加上稀少性(牛樟芝在自然界中唯一宿主為牛樟樹，*Cinnamomum kanehirae*)及生長速度緩慢(每年平均直徑約 2.3 cm)，造成市場價格昂貴(每台斤 6 千元至數萬元)。牛樟芝因市場高收益的因素，促使人類於自然環境中大量採集牛樟芝以獲取利益，却也加速其宿主牛樟樹的瀕臨滅絕。為滿足牛樟芝不斷擴大的需求，國內學術界及生技業者開始思考如何透過人工的栽培技術生產大量的牛樟芝，避免再於自然界中採集而破壞生態系統(Lu et al., 2013)，期望未來，臺灣在中草藥的發展也能符合聯合國的永續發展目標(Aly et al., 2022)。

目前牛樟芝的主要發展了四種人工培養技術，分別為：液態培養(submerged fermentation；請參考圖 1.1.1 E 及 F)、固態培養(solid support culture；請參考圖 1.1.1 D)、椴木培養(cutting wood culture；請參考圖 1.1.1 A 及 B)和皿式培養(dish culture；請參考圖 1.1.1 C) (Lu et al., 2013)。本研究所採用的技術為液態培養(submerged fermentation)式生產牛樟芝。許多研究已證明這些人工栽培的牛樟芝與天然野生的牛樟芝有部分相似的成份和生物活性(藥效) (Huang et al., 2005; Lu et al., 2008; Chen et al., 2016)，其中液態培養具大量生產的潛力。未來，可將液態培養參數應用於生物反應槽(Fermentator)，藉由調控生長環境縮短牛樟芝栽培時間及增加產量，且裁

培過程不需砍伐樹木或採用滅菌太空包作為真菌的宿主，較具環保概念也符合未來循環經濟及永續發展的理念。

圖 1.1.1 說明：圖 A 及圖 B 為椴木栽培，圖 A 所使用的材料為樟樹椴木 *Cinnamomum camphora*：生長期為 12 個月)及圖 B 所使用的材料為杉木椴木 *Cunninghamia lanceolata* 為椴木栽培：生長期為 12 個月)；圖 C 為皿式培養，以上 3 張照片取自 Lu et al. (2013)；圖 D 為固態栽培(太空包栽培)，圖片來源(蘇慶華 (2013)；圖 E 及圖 F 皆為液體栽培，圖 F 為發酵槽(生物反應槽)，圖片來源衛生福利部國家中醫藥研究所盧美光博士提供。



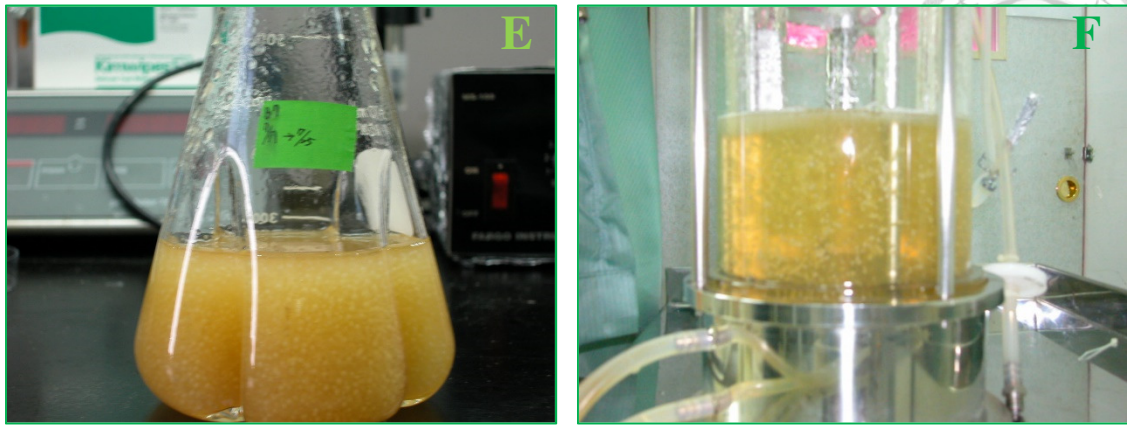
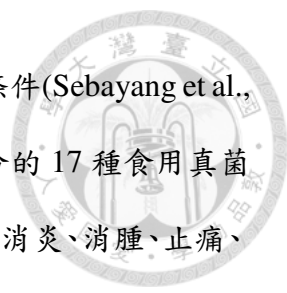


圖 1.1.1 各種牛樟芝的人工栽培方式

隨著生物科技的快速發展，發酵技術已從早期酒類釀造及食物保存的生活應用擴展至醫藥、農業、生質能源等生物材料的生產與廢棄物處理，以及資源再利用(Perez-Esteban et al., 2021)，這也包含珍貴中草藥的人工栽培生產；此外，再加上發酵技術因其具有乾淨(生產過程的均為有機廢料可再利用)及不受天候影響的生產特性，已被視為未來發展循環經濟的重要生產模式(Zhuang et al., 2021)。

大部分的珍貴藥用真菌(牛樟芝、冬蟲夏草)，通常具有以下特性：特殊療效(可控制及預防癌症或高血壓、糖尿病等慢性疾病)、稀少性(通常是生長速度緩慢及生長環境特殊)及售價昂貴，因上述原因，這些珍貴中草藥只能用於極少部分族群，限制了這些珍貴中草藥所能發揮的特殊藥效潛力(Lu et al., 2013)。因此，為能將中草藥應用於醫療以提昇人類的健康，除透過藥理分析證實中草藥的成份具有療效外，另外一項的重要工作為應用生物科技進行菌類藥材的人工栽培，藉由提供品質及數量穩定的中草藥材料，才有可能擴大中草藥的應用及提昇人類的健康。發酵技術在中草藥的人工栽培技術上扮演相當重要的角色。同時，提供材料的最佳發酵條件，才能確保所生產的產物可以達到預期品質及數量。探討發酵(栽培環境)的最佳條件，一直是發酵技術中的最重要技術與發展瓶頸(Zhuang et al., 2021)。

近幾年，類神經技術在非線性的資料模型分析、預測都已大幅提昇其準確性，並有研究開始應用類神經網路(artificial neural network；ANN)於發酵最佳化條件研



究(Yang et al., 2020), 包含由穀類轉化為生質能源的最佳化發酵條件(Sebayang et al., 2017); 由 17 種食用真菌進行混合栽培(詳如表 1.1.1 含蒽醌成分的 17 種食用真菌學名), 增加蒽醌(anthraquinone)產量(蒽醌同時為重要西藥材料有消炎、消腫、止痛、止癢及抑制細菌生長的效用, 及工業染料原料)(Yang et al., 2020)。而目前國內對於牛樟芝發酵條件最佳化研究仍未整合機器學習的資料分析技術, 藉由本研究能將機器學習技術應用至牛樟芝栽培最佳化, 未來, 結合實驗設計(反應曲面法 Response Surface Method, RSM; 正交試驗設計 Orthogonal experimental)等方法, 從實驗所得數據作為機器學習的資料來源, 再由機器學習依研究目的提供預測條件, 最後由實驗驗證機器學習所提供條件是否符合研究目的, 避免再應用傳統的「窮舉法」逐一驗證實驗條件, 節省研究時間及經費, 提昇國內中草藥的研究能量。

表 1.1.1 含蒽醌成分的 17 種食用真菌學名

序號	學名
1	<i>Agaricus bisporus</i>
2	<i>Aspergillus cristatus</i>
3	<i>Boletus bicolor</i>
4	<i>Coprinus comatus</i>
5	<i>Dictyophora inausiata</i>
6	<i>Fermentum rubrum</i>
7	<i>Flammulina velutipes</i>
8	<i>Ganoderma lucidum</i>
9	<i>Grifola frondosa</i>
10	<i>Hericium erinaceus</i>
11	<i>Hypsizygus marmoreus</i>
12	<i>Lentinula edodes</i>
13	<i>Morchella esculenta</i>
14	<i>Schizophyllum commune</i>
15	<i>Sparassis latifolia</i>


序號	學名
16	<i>Termitomyces albuminosus</i>
17	<i>Tremella fuciformis</i>

資料來源(Yang et al., 2020)

1.2 研究目的

在世界各國均追求經濟發展趨勢下，已對地球環境造成相當大的壓力，為避免地球環境繼續惡化，同時又能確保經濟發展，科學界開始尋找可循環再利用的資源，如生物質量能源，及循環技術。希望能藉生物資源的可循環再利用特性滿足不斷增長的經濟需求，並實現可永續發展的經濟目標(Destek et al., 2021)。

發酵為應用生物代謝原理所發展的技術，為一種清潔乾淨的生產方法，完全符合可循環再利用及永續發展特性。藉由液態發酵系統，可從真菌中獲取生物質量及其活性化合物（生物代謝物）的策略，是可實現永續發展的目標。加上液態發酵系統又具備相當多的優勢包括生產成本較低、可快速調整生產規模及發酵條件如光照、溫度、濕度及氧氣，或調整生長及代謝所需營養成分，像碳氮源、微量元素、特殊胺基酸、自身的代謝產物等，且在有在有限的空間下，生產高產量、高品質菌絲體的潛力。此外，液態發酵系統又比在野外環境生長，更能在短時間內完成生產，使目標真菌被其他細菌污染的機會更少。目前資料顯示，關於培養基中營養需求的報告僅限於少數真菌，如：牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*) (Yang et al., 2013; Chiang et al., 2013; Ma et al., 2016)、靈芝(*Ganoderma lucidum*) (Hassan et al., 2019)和擬青黴(*Paecilomyces japonica*) (Lee et al., 2013)。本研究，與許多努力探索從真菌生產生物質量，和二次代謝物的最佳液態培養條件不同，即係以一種人工神經網絡和反應曲面法(response surface methodology; RSM) 的聯合方式，提出解決在尋找多參數的最佳液態培養條件時，可以減少實驗次數，就可達到精準預測的一種具經濟和環境效益的方案(Lee et al., 2020)。



牛樟芝，一種藥用真菌，俗稱牛樟菇或樟芝，民間用於治療因中毒引起的疾病，如酒精、食物或藥物，以及治療皮膚瘙癢、癌症、抗衰老、腹瀉、腹痛和高血壓等 (Long et al., 2019 ; Tsai et al., 2018)。牛樟芝是一種寄生在牛樟樹(*Cinnamomum kanehirae*)樹幹內腔的本土真菌，為臺灣特有種。由於其宿主植物在自然界中分佈有限，且牛樟芝生長速度極為緩慢。研究人員已嘗試利用發酵系統，來大規模生產此藥用真菌 (Jin et al., 2021)。本研究將延續先前的研究成果，成功地使用添加硫酸銨(Lu et al., 2020)，大規模生產這種真菌的硫化多醣。另外，有研究顯示前驅物的添加包括微量元素 (Lin et al., 2018)、硫代硫酸鈉 (Lin et al., 2019)。真菌培養的菌絲體的多醣體具有抗癌活性(Lu et al., 2018) 和抗發炎活性(Lu et al., 2020)。

在牛樟芝的人工栽培培養基成分組成研究中，已知會影響牛樟芝菌絲體生長的幾個培養條件，包括樟木多醣(簡稱 CC-PS)、樟木水萃取物(簡稱 CC)、洋菜(agar)、葡萄糖、馬鈴薯泥培養基(簡稱 PDB)和(Ph Hunag et al., 2005 ; Lee et al., 2002 ; Shen et al., 2004)。這些栽培因子的探究研究，都是基於一次一因子的實驗。對於同時探討多因子及因子間交互作用如何影響該物種的大規模生產的研究資料則少見。反應曲面法 (RSM) 是 Box 和 Wilson(1951)引入的一種統計方法，可以有效地探索多個變因和立即觀察得到反應數值之間的關係，並已被廣泛用於優化操作因素，來得到最大化特定物質的產量(Prakash et al., 2013 ; Triveni et al., 2001)。關於使用反應曲面法(RSM)優化培養條件，以促進不同來源真菌物種生長的研究(Kumar et al., 2018 ; Senthivelan et al., 2019 ; Yadav et al., 2020)。人工神經網路 (ANNs)因為能夠提取輸入和輸出變數之間的非線性關係，以對非線性問題進行模擬，已廣泛應用於科學研究的各個領域。例如：生物量估算 (Obafemi et al., 2019 ; Özçelik et al., 2017 ; Yucel et al., 2019)、生物燃料生產 (Dahunsi et al., 2017 ; Naresh et al., 2018)、空氣污

染預測(Kow et al., 2020 ; Zhou et al., 2020)和水資源管理(Chen et al., 2018 ; Chang et al., 2020)。

隨著機器學習技術的快速發展及應用的普及，國外已有將機器學習應用於發酵最佳條件與產量的探討，也有相關研究相繼發表，例如：應用甜高粱 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) 發酵成生質酒精(Sebayang et al., 2017)；混合多種真菌進行液態栽培抽取蒽醌(anthraquinone)含量(Yang et al., 2020)；污水厭氧發酵收集沼氣(Sakiewicz et al., 2017)。這些研究都是透過機器學習方式速預測發酵的最佳條件，只是個別所採用的機器學習演算法及資料不同，所預測的發酵最佳條件都相當準確。因此，值得聯合應用反應曲面法和機器學習方法化推估多因子的牛樟芝生長條件。(Lee et al., 2022)

在先前的研究，比較來自宿主同屬不同種的四種樟屬植物，包括牛樟 (*C. kanehirae*)、冇樟 (*C. micranthum*)、土肉桂(*C. osmophloeum*)、樟樹(*C. camphora*) 和蘭嶼肉桂 (*C. kotoense*)，結果顯示樟樹 *C. camphora* (CC) 水萃取物比其他宿主具有更高的生長促進活性 (Hsu et al., 2006)。此外，據報導，樟腦濃度會影響牛樟芝的生長(Sheu et al., 2000)。在這項研究中提出了一種整合 RSM 和 ANN 的方法來確定樟樹水提取物 (CC) 和其他六個變因的關鍵影響因素，並優化牛樟芝在培養過程中的菌絲體生長。接下來，展示了所提出方法的有效性和適用性，得以在實驗室培養的最佳條件下可靠地生產藥用真菌。

1.3 牛樟芝的培養現況

特殊真菌牛樟芝，多孔菌科，為臺灣特有物種，生長於牛樟(*C. kanehirae* Hayata) 的寄主樹幹中空的部分。由於牛樟芝生長緩慢，在臺灣屬瀕危物種，體外培養成為獲得牛樟芝的重要途徑。深層培養可能會增加產量潛力，以實現商業規模的需求。從真菌中生產具有生物活性的化合物，液態培養顯然具有在特定空間裡和極短的

時間內，生產更高的生物質量和更少的被污染機會的優勢。藉由牛樟芝不同的培養條件，發現牛樟芝的新化學物質和功能，所以被用在本實驗中。研究發現碳源的種類和用量可以改變真菌多醣類化合物的組成(Chao et al., 2011)。



1.4 論文章節架構

本論文共分為八章，第一章為緒論：針對目前發酵工業發展作概要、研究動機及牛樟芝目前發展現況作說明。第二章為文獻探討：針對反應曲面設計(RSM)、類神經理論發展及應用發酵技術。第三章為理論概述，分別說明本研究的所使用的方法及理論，包含類神經網路的自組映射網路、反應曲面法及液態栽培說明。第四章為材料及方法：說明本研究所採用的牛樟芝品系、不同濃度培養條件分別為：pH、馬鈴薯培養基(potato dextrose broth; 簡稱 PDB)、葡萄糖、樟木多醣、樟腦(camphor)、樟木水萃取物、洋菜(agar) 共 7 種，透過曲面反應方法設計因子篩選實驗，同時並將初步實驗數據以類神經網路的自組映射網路 (Self-organizing maps; SOM) 進行分析，再行比對雙方實驗結果。第五章為研究結果：將類神經網路所預測重要因子及應排除因子進行說明，並推導類神經所預測的結果與實驗結果的一致性。第六章為討論：分別就反應曲面實驗結果與類神經網路所預測結果微細差異進行分析，及可能造成差異的原因。第七章為結論，類神經網路確實可協助尋找最佳化重要因子，節省實驗時間及成本和工作量。第八章為未來發展：說明中草藥發酵技術如何結合類神經網路技術，協助中草藥最佳化生長(發酵)條件。



二、文獻探討

2.1 反應曲面設計(RSM)於發酵條件調控應用

反應曲面是指期望值所代表的曲面。反應曲面法(Response Surface Methodology; RSM)是一種常用的實驗設計方法，主要用再針對多變因尋求最適化條件，並減少實驗次數，達到快速準確的目的 (Montgomery, 2005)。在使用 RSM 設計法，需確立變因的範圍。變因範圍的選擇是依先前的實驗結果或參考其他的研究論文。變因範圍的選擇很重要，因會影響實驗設計的精準度。通常變因範圍的選擇會再推導回歸分析前完成；範圍太窄會錯失有興趣探討的區域，範圍太寬則實驗的密度會降低，失去焦點，得到的結論較不精確。由前置實驗，即一次一因子的實驗，因子的範圍可稍擴大，但實驗組數不需太多，因此得到因子水準及範圍的選擇。這些因子的單位和數量級可能不同，可以藉由信賴區間常數來確保所有這些因子公平地影響反應值。實際值轉換為以下等式中的編碼值。經由 RSM 的方法，可以有效去除不重要的因子，得到重要的反應變數。

$$Z = \frac{(X-X^0)}{\Delta X}$$

其中 Z 是欲測試因子的範圍以+1 與-1 加以描述，X 為對應的反應值， X^0 是中心點； ΔX 為各因子變化的比例

反應曲面法 RSM 整組實驗主要分為三階段設計，包括變因篩選、陡升趨近、及反應曲面回歸。變因篩選有全階乘或部分因子篩選。陡升趨近法由 Box 及 Behnken 開發的三層設計，即被稱為 Box 和 Behnken 設計法 (Box and Behnken, 1960)。反應曲面回歸指二階反應曲面。中心混成設計 central composite design (CCD) 以二階因子設計加上 star point 及 central point 的組合，減少與全因子設計相比的實



驗次數(Marichamy et al., 2020)。圖 2.1.1 RSM 常用的三種因子設計法，由左至右分別為：

- 全因子設計(Full Factorial design)，如每個因子有 2 個水準，實驗設計如有 k 個因子，實驗次數為 2^k
- Box and Behuken 設計：實驗次數為 $N = 2k(k - 1) + C_0$ (K 為因子個數； C_0 為中心點個數)
- 中央合成設計(central composite design)：實驗次數為 $N = N = n_0 + 2K + 2^k$ (K 為因子個數； n_0 為中心點個數)

表示三個設計因子的反應曲面實驗設計(Breig et al., 2021)。

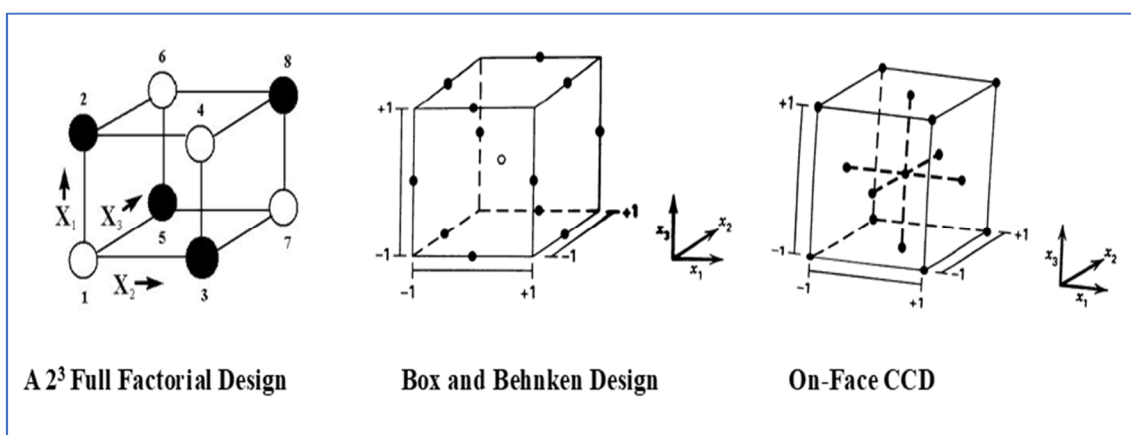



圖 2.1.1 RSM 常用的三種因子設計法

在生化和生物技術過程中，RSM 成功地用於優化和模擬微生物發酵變因 (Ramirez et al., 2000)，包括優化微生物發酵生產一次代謝物，如：蛋白質，碳水化合物，脂肪和核酸。AL-Saeedi 和 Luti (2018) 應用 CCD 的反應曲面方法探討 *Streptococcus salivarius* KA101 生產細菌素 bacteriocin。Bardhan 等人(2021) 研究真菌 *Penicillium citrinum* PKB20 生產脂肪。另外，RSM 也成功地用於優化微生物發酵生產二次代謝物，如：醫藥用途成分在免疫、抗癌等。Yulianto 等人(2022) 研究利用 RSM 法自茶葉發酵物中得到 theaflavin(一種兒茶素成分)。Mohammed 等人



(2018)應用 RSM 法自真菌 *Serratia marcescens* 發酵得到最高 prodigiosin 的產量，Prodigiosin 具有免疫調節及抗癌的功效。Yonis 等人 (2019) 以 RSM 基於 CCD 方法優化兩個因子（幾丁質濃度及培養時間）來增進真菌 *Asperigellus flavus* 產生的 chitin deacetylase 酶，用來將 chitin 甲殼素轉化為 chitosan。

最近，反應曲面法成為優化和分析不同微生物產品的常用方法，有程式設計專用 Statistica、Minitab 等 mbwu 電腦軟體可以使用，在 RSM 實驗的因子水準設計及採用何種因子設計(全因子設計、Box and Behuken 設計或中央合成設計)都可由上述軟體協助快速得到答案，使得 RSM 的應用更加容易。雖然 RSM 已成為在各種研究課題中尋找最佳條件的一種常見做法，然而至今，仍然很少有報導描述使用改進的統計實驗設計方法於生產牛樟芝生物質量(Shu et al., 2016)。此外，之前的大多數研究僅針對一項優化該過程的反應（例如，產量或最大生產率）。在這項工作中，本研究嘗試使用一種能夠同時考慮所有重要條件來找到最佳條件的性能指標，例如生物質量(Chiang and Chiang, 2013; Lin and Chen 2007)。

2.2 機器學習於發酵最佳化應用

目前將類神經網路應用於發酵技術，主要應用領域為最佳化的探討；包括快速尋找出發酵的最佳化條件(Sebayang et al., 2017；Wang et al., 2022)，及多菌種的最佳化組合發酵(Perez-Esteban et al., 2022；Chan et al., 2019；Yang et al., 2020)。此外，有部分研究應用類神經網路的預測能力對發酵過程進行調控，這種動態即時的調控模式，對於發酵過程提供更正確及有效的調控方式(Zhu et al., 2020)，上述有關機器學習於發酵最佳化應用及調控的文獻探討詳如 2.2.1 – 2.2.3 各小節說明。



2.2.1 應用機器學習預測最佳發酵條件

目前將機器學習應用於發酵條件最佳化的研究，最典型的應用方式為結合反應曲面法(RSM)設計降低實驗次數，經由 RSM 取得實驗數據，提供機器學習訓練模型，再經驗證及測試完成建模。然後，結合最佳化演算法(常用的最佳化演算法詳如表 3.2.1 常用最佳化演算法)預測出發酵最佳條件；最後依據預測條件，進行實際實驗，驗證實驗結果是否符合類神經網路的預測(Sebayang et al., 2017；Wang et al., 2022)，機器學習應用於發酵條件最佳化的典型應用研究流程詳如：圖 2.2.1 應用機器探討發酵最佳條件流程。

以甜高粱(*Sorghum bicolor*)發酵為生質酒精為例(Sebayang et al., 2017)，由 RSM 實驗結果提供機器學習的輸入資料來源，經機器學習的倒傳遞類神經網路(Back Propagation Neural Network，BP)完成建模及藉由蟻群演算法(Ant Colony Optimization，ACO)搜尋出最佳發酵條件。發酵過程共有二階段，第一階段為水解(hydrolysis)，預測受質高粱濃度、 α -amylase 濃度、amyloglucosidase 濃度及攪拌轉速 4 項因子的最佳發酵條件。第二階段為發酵(fermentation)將第一階段的產物(還原糖)繼續發酵為生質酒精，預測本階段的酵母菌濃度、溫度及攪拌轉速 3 項因子的最佳的發酵條件。並將機器學習所預測的條件進行實驗，並對預測結果與實驗結果進行比較，第一階段實驗比較預測值與實驗值結果為 $R = 0.997$ (multiple correlation coefficient，複相關系數)、 $R^2 = 0.994$ (coefficient of determination，決定係數)及 $RMSE = 1.752$ (Root Mean Squared Error，均方根誤差)；第二階段實驗比較預測值與實驗值結果為 $R = 0.993$ 、 $R^2 = 0.987$ 及 $RMSE = 2.128$ 。機器學習對澱粉發酵為酒精的傳統發酵應用，所預測的最佳化條件及產量經實驗證實有很高的正確度(Sebayang et al., 2017；Wang et al., 2022)。

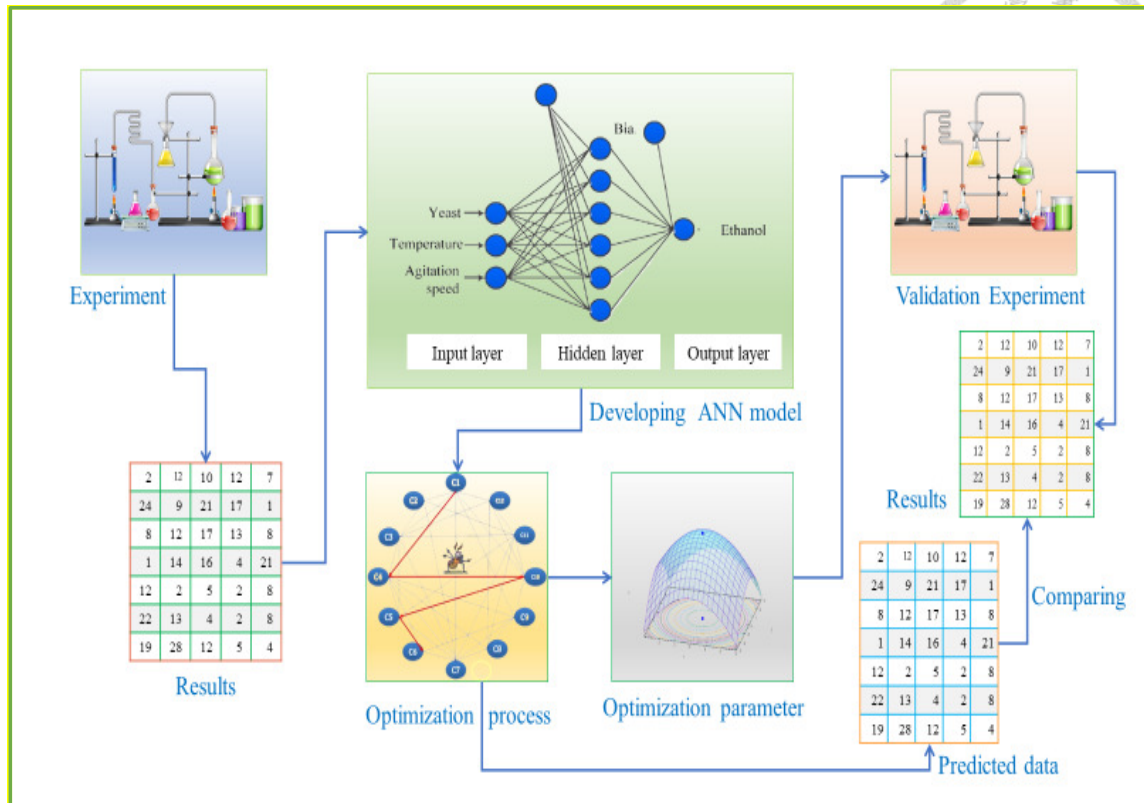


圖 2.2.1 應用機器探討發酵最佳條件流程

2.2.2 多菌種最佳混合培養

提高發酵物的產量，另一種的最佳化方法為，將可產生相同的發酵產物的不種菌種於生物反應槽(Fermentator)中共同培養，篩選出高產量的菌種組合進行栽培 (Yang et al., 2020)。

將類神經網路應用於發酵時需考慮二項問題，分別為選用何種類神經網路及如何方便取得資料提供類神經網路建模之用，而資料的取得往往才是導入類神經網路的最大瓶頸。生物實驗因受限於材料的製備及需人工操作的實驗步驟，無法快速取得大量樣本。如何應用有限樣本(數據)進行類神經建模及選用合適的類神經網路進行預測，對於應用類神經網路於發酵技術的優化是極其重要的基礎研究。

楊等人(Yang et al., 2020)應用隨機取樣分別於 2 項組合數中取樣 24 個樣本(總樣本數為 136 組)，3 項組合數中取樣 36 個樣本(總樣本數為 680 組)，樣本比率為 7.3 % ($\frac{24+36}{136+680}$)，作為類神經網路的訓練(Training)資料，另外，2 項組合數中取樣

9 個樣本(總樣本數為 136 組), 3 項組合數中取樣 21 個樣本(總樣本數為 680 組), 樣本比率為 3.7% ($\frac{9+21}{136+680}$), 作為類神經網路的驗證(validation)資料; 將上述所抽樣的資料分別於 Back Propagation Neural Network (BPNN)及徑向基底函數網路(Radial Basis Function Neural Network, RBFNN)進行類神經網路建模, 不以傳統的決定係數(R^2)作為評定優劣的指標, 而以平均絕對誤差(mean absolute error)及平均偏移誤差(mean bias error)作為選定較優類神經網路指標。透過抽樣作為類神經網路建模的資料來源, 比較不同類神經網路的平均絕對誤差及平均偏移誤差選定合適的類神經網路, 研究流程詳如圖 2.2.2 探討不同菌種最佳組合栽培流程。

發展多菌種最佳組合共同培養(發酵), 對於發酵工業具有很大的發展潛力, 目前多菌種最佳組合共同發酵, 主要應用在藥用發酵產物的生產(Yang et al., 2020), 污水處理(Perez-Esteban et al., 2022)及益生菌(Probiotics)的生產(Chan et al., 2019)。

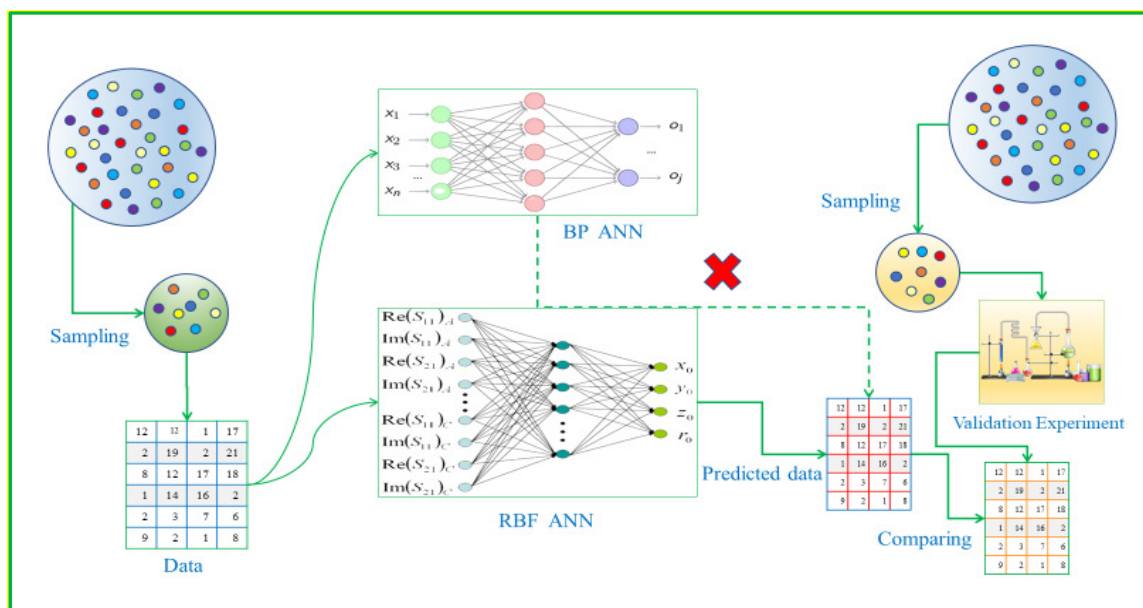


圖 2.2.2 探討不同菌種最佳組合栽培流程



2.2.3 應用類神經網路調控發酵流程

不管是 2.2.1 的最佳發酵條件探討或 2.2.2 的不同菌種最佳組合發酵探討，其探討的因子都是靜態環境的模式。發酵本身就是生物的一種代謝作用，其過程是動態的，生物的代謝會依據當時的環境自行調整。目前生物科技有一部分是透過生物反應槽(Fermentator)生產所需的發酵物，生物反應槽中的環境變化如同生物體內的環境一樣，相當複雜且不易調控。目前的科技尚無法透過設備快速取得生物反應槽的資訊發展調控技術；類神經網路技術主要為估計與預測，對於所監控發酵流程先藉由實驗找出關鍵發酵中間產物(通常無法由儀器直接測得濃度)作為監測目標，透過類神經網路的建模，由可由儀器可立即量測的數值(如溫度、壓力及含氧量)推測發酵流程關鍵發酵中間產物的概況，藉由類神經網路的推測資訊發展生物反應槽的智慧調控系統，相當符合生物反應槽的未來發展需求及發酵條件最佳化應用。以類神經網路發展生物反應槽的智慧監測資訊系統示意圖詳如圖 2.3.1 生物反應槽的智慧監測資訊系統(Zhu et al., 2020)。

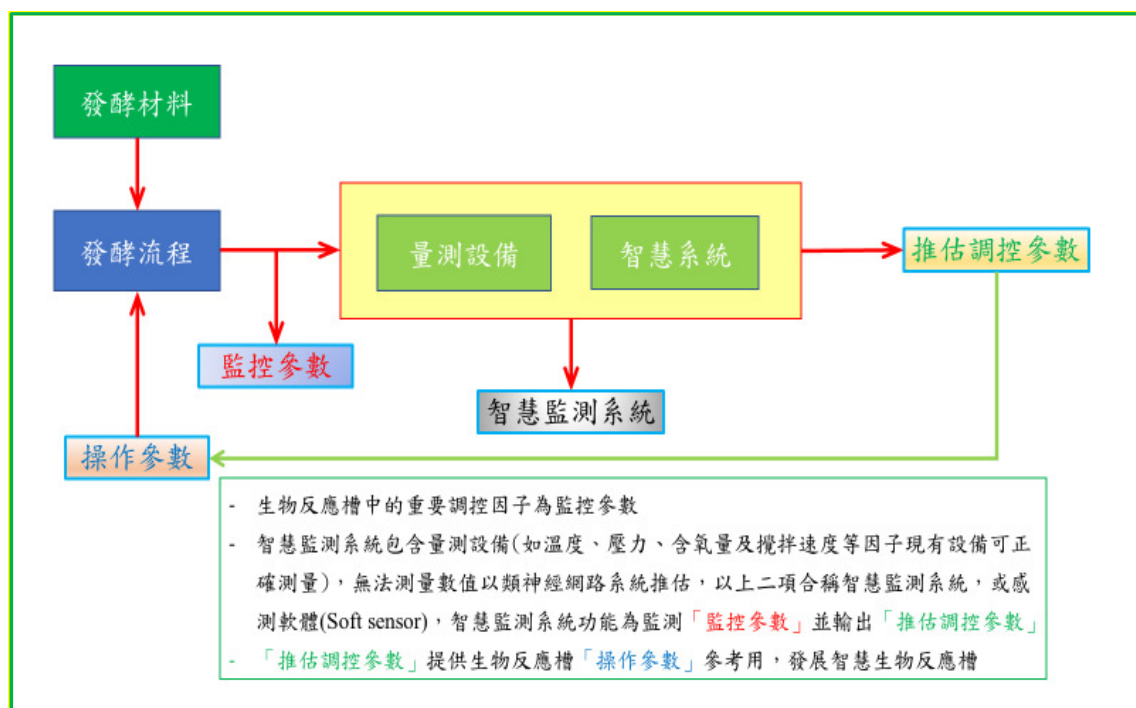


圖 2.3.1 生物反應槽的智慧監測資訊系統說明




2.2.4 應用類神經網路優化發酵的發展優勢

目前人類對於生物的複雜代謝系統的瞭解仍很有限，在現有的生物知識及理論基礎下很難建立高準確性的模型，能正確地預測發酵的最佳化條件及產量。因生物系統的複雜性及不確定性，提供了機器學習的發展機會，機器學習不需透過模型或方程式的建構，而透過數據的學習瞭解系統的特性，建構人工智慧的預測模型，這種不探討內部的完整機制，只透過數據的輸入及輸出，達到瞭解系統特性，所謂的黑盒子原理(Black Box)，這種黑盒子的特性相當符合目前人類對於生物的複雜代謝系統的有限瞭解(Ma et al., 2018)，提供了以類神經網路為基礎的預測模型及複雜問題的解決能力(Wang et al., 2022；張斐章和張麗秋，2015)。

機器學習主要應用於發酵最適化條件的探討，傳統上在發酵最適化條件的探討上只能採用一次一因子方法(one factor at time；OFAT) (Breig et al., 2021)，這種模式不但浪費時間，且無法評估因子間交互作用所產生的影響，而機器學習可一次將全部數據輸入類神經網路中，完整評估最適化條件與產量間關係，並可預測在產量最大時(最佳化)的最適化條件。在發酵最適化條件的研究上可節省大量的時間及費用(Sebayang et al., 2017)。

在類神經網路應用於發酵的優化，在資料取得方面，除可透過實驗設計反應曲面法(RSM)或田口法(Taguchi Test)的直交表(Orthogonal)實驗，降低實驗次數外；另一方法則採用隨機抽樣。在選用類神經網路方面，以平均絕對誤差(mean absolute error)及平均偏移誤差(mean bias error)作為選定較優類神經網路指標，而不以傳統的決定係數(R^2)作為評定優劣的指標，因資料取得不易，激發出類神經網路不同於一般的應用，可以在樣本數不多時，克服資料量稀少的難題，一樣可以完成高準確度的類神經網路建模及後續的預測功能。



發酵為應用生物代謝原理所發展技術，有乾淨生產特性，為能擴大乾淨生產規模，除結合機器學習找出最適化的發酵條件外，同時也可結合生物反應槽(fermentator)更多樣化功能，藉由生物反應槽所提供槽內的環境資訊(壓力、溫度、含氧量及攪拌速度等因子)及智慧監測系統，進行發酵過程的智慧操控以獲得大量的產能，其技術的發展都需依賴人工智慧的協助(Zhu et al., 2020)。



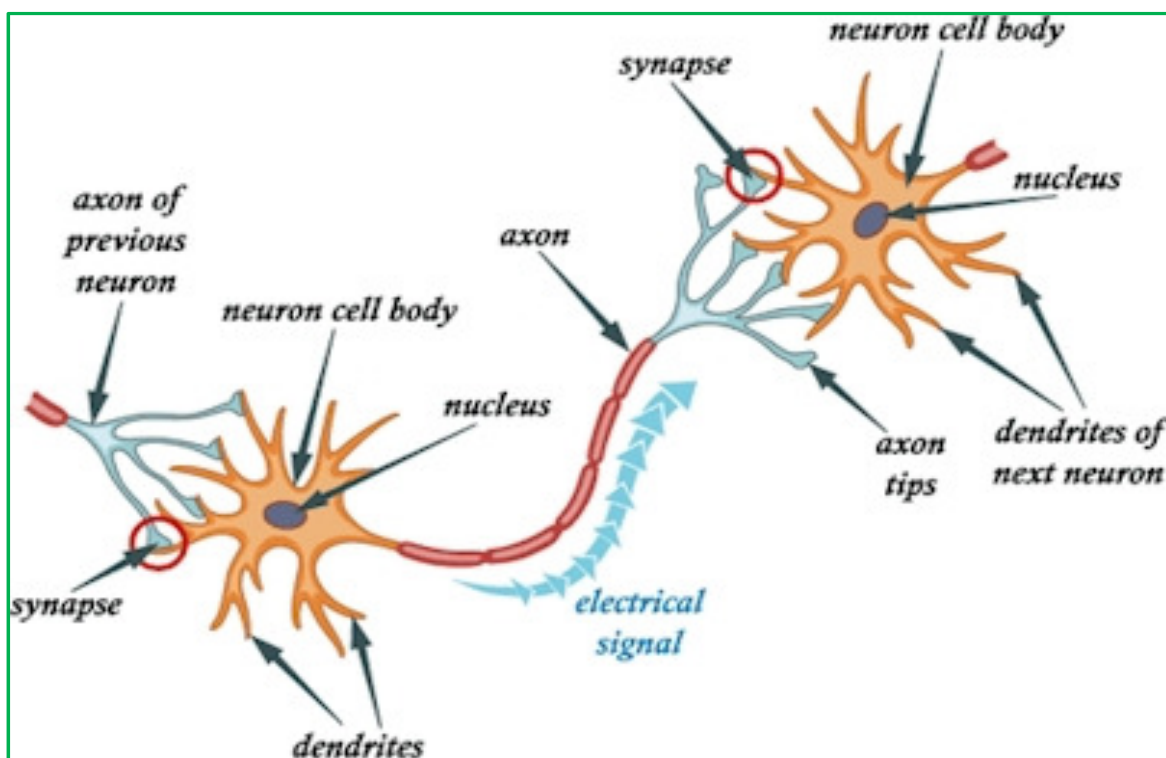
三、理論概述

3.1 類神經網路介紹

類神經網路是模仿人類神經系統中的神經元運作原理建構起來的模式，人類的神經元的構造主要分為以下 3 部分

- 細胞本體(cell body)是細胞核所在，並由此發出生理訊號 (processes)
- 軸突(axon)將細胞本體的神經訊息傳至末端的突觸(synapse)。有些軸突只有幾毫米長，但有些卻可長至一米以上。
- 樹突(dendrites)，是一群由細胞本體發出的樹狀突起，每一個神經元可以有數以百計的樹突。樹突可與其他神經元的軸突連接，是神經元的訊息接收站，把傳入的訊息送至神經元的本體。

人類神經元構造圖詳如 3.1.1 人類神經元構造圖。



From : <http://www.tswongsir-runners.guide/articles/neuron.htm>

圖 3.1.1 人類神經元構造圖

類神經網路是模仿人類神經系統所建構的人工神經系統模式。神經網路可以簡單分成輸入層、隱藏層以及輸出層。輸入層、隱藏層以及輸出層的各项功能(詳如圖 3.1.2：類神經網路的基本架構圖)。輸入層負責接受輸入資訊，輸入資訊有不同的維度(如： X_1, X_2, \dots, X_n ， N 個維度)，每個維度代表著不同的因子，以本研究為例各個因子為 pH(X_1)、葡萄糖(X_2)、PDB (X_3)、CC-PS 多醣(X_4)、樟腦(X_5)、CC 水提取物(X_6)及洋菜 (X_7)七項因子。

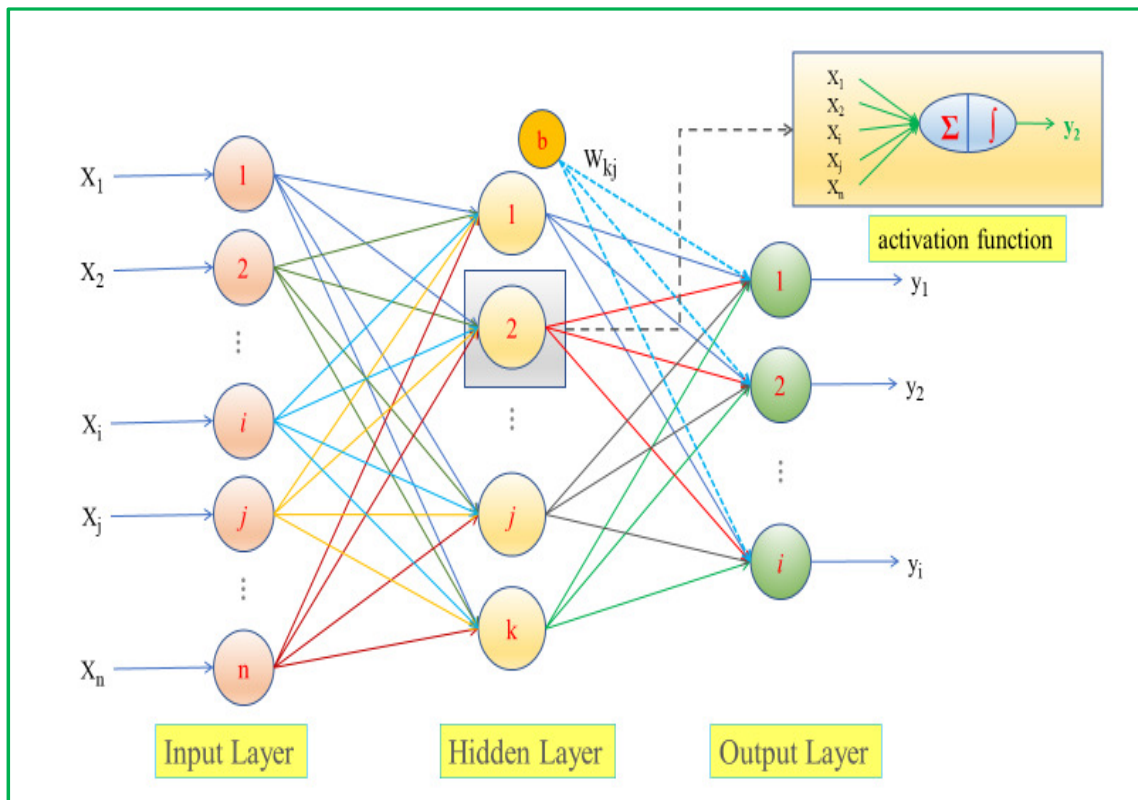


圖 3.1.2 類神經網路基本架構圖

輸入到輸入層之後，該資訊將會在隱藏層中進行學習，也就是說會將輸入資料進行組合運算，然後透過用非線性的活化函數(activation function)進行轉換及激活其輸出。最終資訊會在輸出層中輸出。



3.1.1 類神經網路類型

類神經網路依其傳遞方向可分為以下兩類：

1. 前饋式類神經網路(feedforward neural network, FNN)

最簡單的人工神經網路，其訊號傳遞只能傳向下一層，以圖 3.1.2 類神經網路基本架構為例，其資料的傳遞只能輸入層傳向隱藏層，再由隱藏層傳向輸出層，若有多層隱藏層則由第 0 層隱藏層傳向第 1 層隱藏層，以此類推再由最後一層隱藏層傳向輸出層，神經元（節點）的连接一樣配有權重，整個在網路中沒有反饋設計只能單向傳播(詳如圖 3.1.3 前饋式類神經網路架構圖)。

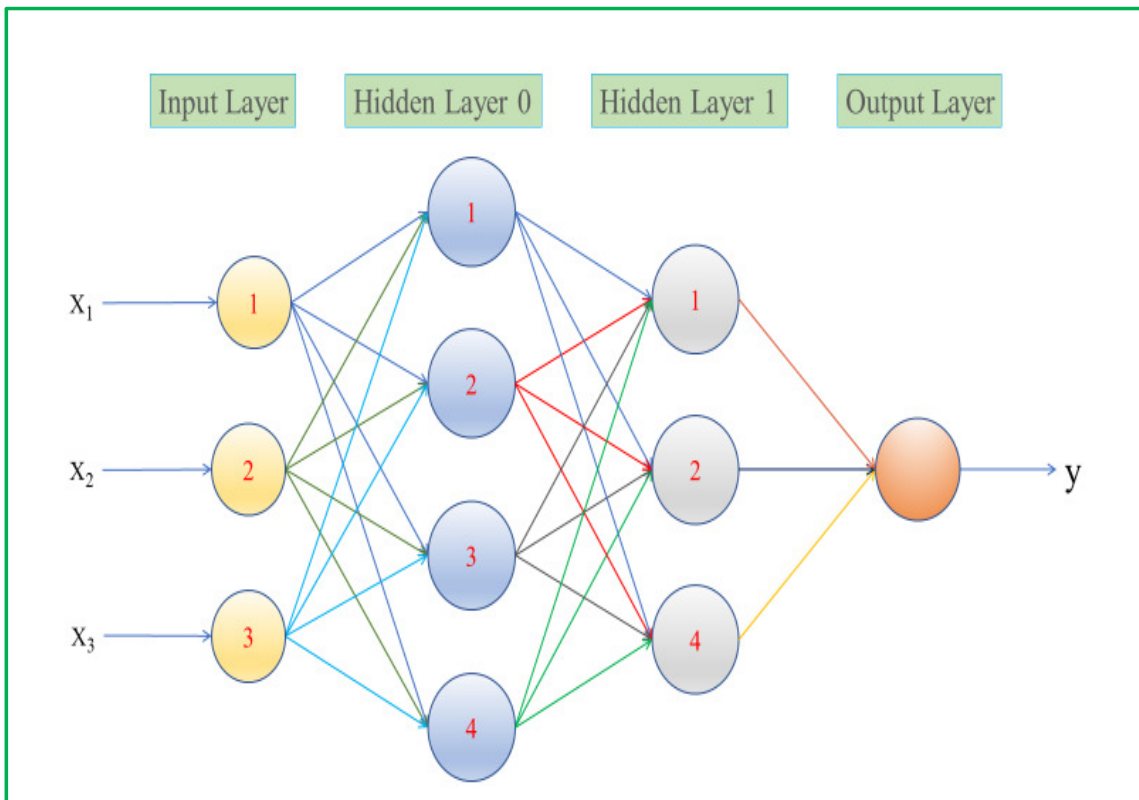


圖 3.1.3 前饋式類神經網路架構圖

2. 倒傳遞類神經網路(Backpropagation neural network, BPNN)

對比於前饋式類神經網路(FNN)，前饋式網路訊號只能向前傳遞(單一方向)。倒傳遞類神經網路訊號傳遞從輸入層（輸入層不參加計算）開始，每一層的神經元依該神經網路設計各神經元運算後經活化函數激活後將結果傳遞至下一層，同時，

將結果傳向上層提供類神經網路在訓練時網路權值和閾值的調整。倒傳遞類神經網路資料傳遞的最主要概念，就是將誤差值往回傳遞(圖 3.1.4 的 b 參數， b 表示偏差)，使網路權重可以利用偏差值進行更新權重(圖 3.1.4 W 的參數， W 表示權重)，透過偏差值(b)調整權重(w)，逐步的縮減誤差，更快速及正確建立類神經網路(Chen et. al., 2014) 詳如圖 3.1.4 倒傳遞類神經網路架構圖。

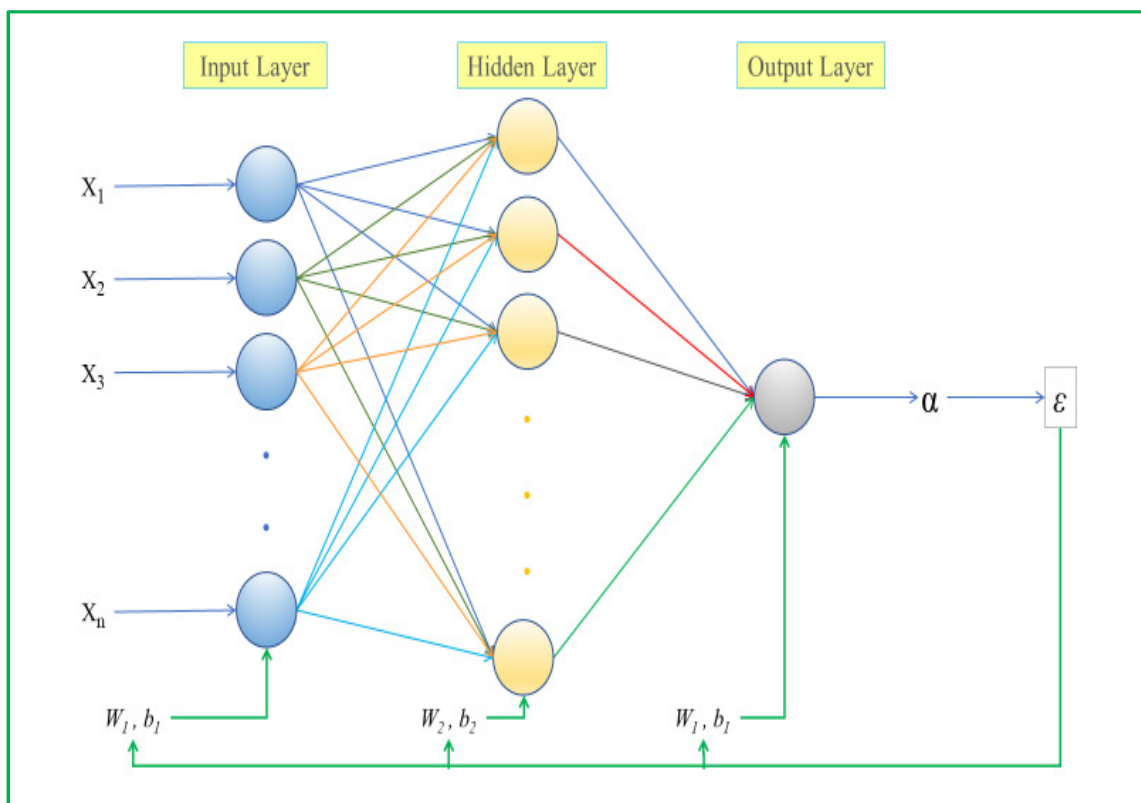


圖 3.1.4 倒傳遞類神經網路架構圖

類神經網路另外一種常用的分類方法為監督式學習與非監督式學習兩類：

1. 監督式學習(Supervised learning)

資料需先經人工進行「註記」(label)，註記資料相對應的值，以提供機器學習在輸出時判斷誤差使用。監督式學習機器學習的正確性會比較高，但需事先耗費大量時間標記資料特徵，主要應用在預測(predicting)與分類(classification)為目的應用。



2. 非監督式學習(Un-Supervised learning)

資料不需先經人工進行「註記」(label)，由機器自行尋找資料的特徵，機器自己進行分類。此種方法不需人工先進行資料分類，誤差較大。主要應用在資料的分群 (clustering)、關聯 (association) 與降維 (dimension reduction) 的應用。

3.1.2 常用最佳化演算法

最佳化演算法包含：基因演算法 (Genetic Algorithm, GA)、螞蟻演算法(Ant Colony Optimization, ACO)、模擬退火法 (Simulated Annealing, SA)、粒子群演算法 (Particle Swarm Optimization, PSO)及梯度下降法(Gradient Descent, GD)等其他演算法，就常用的最佳化演算法基因演算法、螞蟻演算法及粒子群演算法 進行說明詳如表 3.1.1 常用的最佳化演算法。

表 3.1.1 常用的最佳化演算法

演算法類型	原理概述
基因演算法 (Genetic Algorithms, GA)	<p>源由：模擬自然界生物演化過程，逐步淘汰適應力較差的個體，所發展出來的算法。</p> <p>說明：初始以隨機產生多組解，模擬生物的演化功能再藉由交配 (crossover)、突變 (mutation) 以及選擇 (selection) 等運算，經由適應度函數留下較佳的解，經多次疊代後尋得最佳解。</p> <p>最佳化過程：在進行基因演算法運算之前，先隨機地產生 X 個染色體，利用隨機的選擇讓族群中體的基因能具有多樣性，同時使得搜尋能具有隨機和多點的特性。應用生物交配的概念隨機的選擇交配槽中的兩個母代個體，彼此交換位元資訊進而產生兩個新的個體，藉由累積前代的</p>

演算法類型	原理概述
	<p>優秀位元資訊，以期望能繁殖出優秀的個體。接著透過突變來增加族群的多樣性，使得演化能盡可能的朝多個新方向進行，而不侷限在少數的個體上。在經過複製、交配及突變三個過程之後，在交配槽內產生了新世代族群的新個體(可能是新的最佳化的解)。在應用基因演算法時通常設定以下終止條件：</p> <p> 搜尋到指定的代數時</p> <p> 當搜尋結果達到所要求的目標時</p> <p> 搜尋結果停滯不前或已經達到某種飽和現象時</p> <p> 應用：多目標規劃(水庫管理：兼具發電民生用水農業灌溉)</p>
<p>螞蟻演算法 (Ant Colony Optimization, ACO)</p>	<p> 源由：螞蟻覓食發現路徑會留下費洛蒙(pheromone)行為，所發展出來的算法。</p> <p> 說明：螞蟻在覓食時，會在其經過的路徑留下費洛蒙，當經過此路徑的螞蟻增多時，費洛蒙的濃度隨之增強，反之，費洛蒙的濃度隨時間揮發而減少。</p> <p> 最佳化過程：螞蟻在移動過程會依據先前螞蟻所留下費洛蒙濃度，當此路徑為食物至蟻巢的最短距離時，路徑上因高濃度的費洛蒙會吸引其他螞蟻選擇該路徑，路徑上費洛蒙濃度會越來越高，相對地，其他路徑的費洛蒙會隨時間揮發而降低其濃度不會吸引後續螞蟻選擇此一路徑，最後全部螞蟻只選擇唯一的高濃度路徑最佳路徑(最佳解)。</p>

演算法類型	原理概述
粒子演算法 (Particle Swarm Optimization, PSO)	<p>應用：物流車輛最短路程安排</p> <p>源由：過觀察鳥類覓食行為鳥類會飛往食物最豐富的地方，所發展出來的算法。</p> <p>說明：每隻鳥(粒子)覓食行為主要受二項因素影響，鳥類自身經驗及鳥群中其他鳥類行為(群體)。</p> <p>最佳化過程：透過個體的最佳位置(最佳解)或稱個體極值；另一部分為群體的最佳位置(最佳解)或稱全域最佳解(全域性極值)。不斷更新個體與群體中的協作和資訊共享獲得最佳解。</p> <p>應用：工作排程最短時間；多點位置最短旅途路徑</p>

3.2 自組特徵映射網路

自組織映射網路圖(Self-Organizing Map, SOM)為一種前饋式、競爭式及非監督式學習網路，由學者 Kohonen (1982)提出；其原理為模仿人類大腦中，處理相似的資訊時神經元(腦細胞)會聚集在一起的特性，所發展出來的類神經網路。因此，可在輸入的資料中將類似的資料進行分類，將高維度的輸入向量映射為較低維度的特徵映射圖通常為(一維或二維的特徵映射圖)。

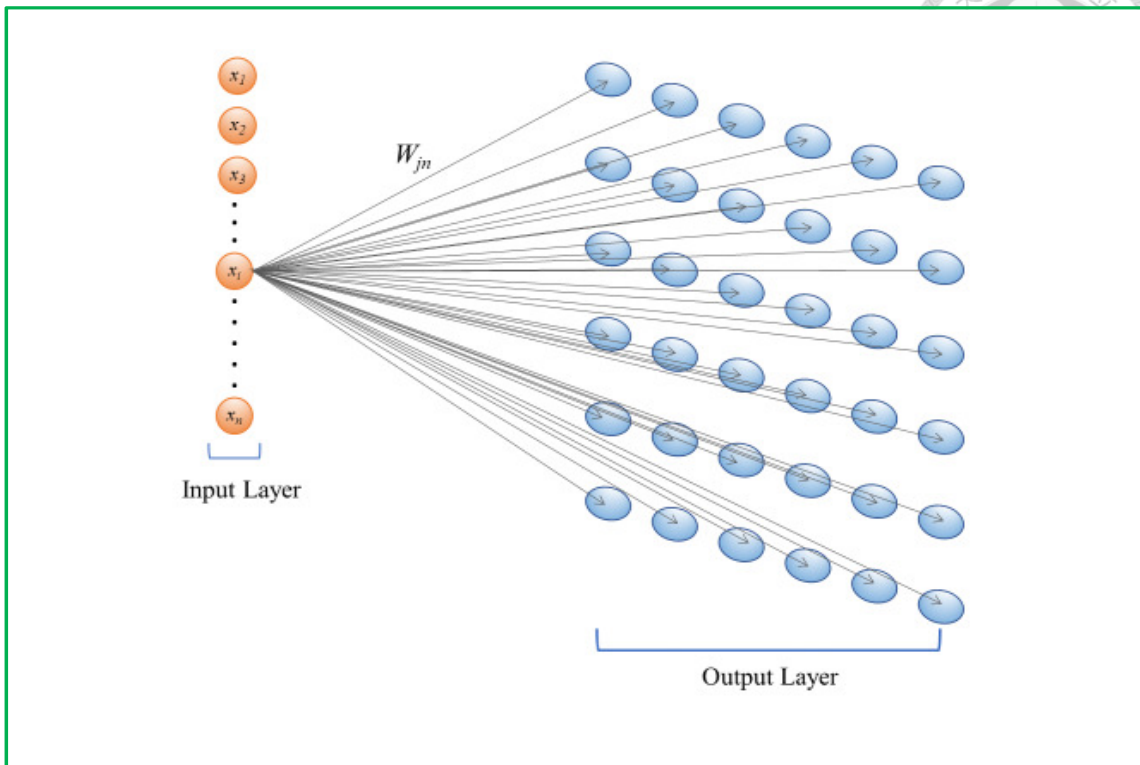


圖 3.2.1 自組特徵映射網路架構圖

3.2.1 自組特徵映射網路架構

自組特徵映射網路：其網路架構由輸入層及輸出層(拓樸層)所組成如圖 3.2.1 所示。在輸入層為所輸入資料會透過不同權重與輸出層的神經元進行連結。輸出層的神經元即為輸入資料映射至拓樸圖的結果。

在資料進入輸入層時，依輸入向量及輸出層的神經元相似度彼此競爭，由優勝(相似度最高)神經元獲得調整權重機會，與優勝神經元有鄰近關係的神經元其連結權重也會發生變化，藉此輸出層之神經元呈現輸入向量特徵，並以有意義的拓樸結構展現於輸出空間，此拓樸結構能反映輸入向量分布特徵映射圖，亦可稱為拓樸圖(topology)。

3.2.2 自組特徵映射網路演算法

自組特徵映射網路由輸入層及輸出層組成，輸入資料會分別映射至輸出層的神經元，輸入向量為 X ，且具有 N 個維度的輸入值，如式 3-1。

$$X = [x_1, x_2, x_i \dots x_n]^T$$

(3-1)

W 表示輸出層上全部的神經元個數(M)中第 i 個輸入權重之連結權重如式 3-2

$$W_i = [x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{in}]^T, \quad i = 1, 2, \dots, M$$

(3-2)

自組特徵映射的運算流程可以分為三個步驟：

第一步：所有神經元連結權重的初始值皆可隨機亂數產生，隨機產生的亂數則會影響收斂速度的快慢。

第二步：以競爭式學習法調整神經元，在拓樸結構中，各個神經元之間有鄰近關係，鄰近半徑越小的神經元之間關聯性越高，當調整優勝神經元的權重時，周圍的神經元也會同步調整，決定優勝神經元的方式則由所有神經元的連結權重及輸入向量間的距離比較而得，距離較近則獲選為優勝神經元，距離的算法有加權距離公式、歐幾里德距離(Euclidean norm)公式、Manhattan 距離公式等，本研究採用之距離公式為歐幾里德距離公式，如式 3-3 所示

$$q(X) = \min_{\forall i} \|X - w_i\|_2, \quad i = 1, 2, \dots, M$$

(3-3)

3-3 式中 $q(X)$ 為輸入向量 X 與所有神經元連結權重最小距離。優勝神經元與其鄰近神經元間之關聯，以參數具體表示有：鄰近中心、鄰近區域、鄰近半徑與鄰近函數等，如圖 3.2.2 所示。

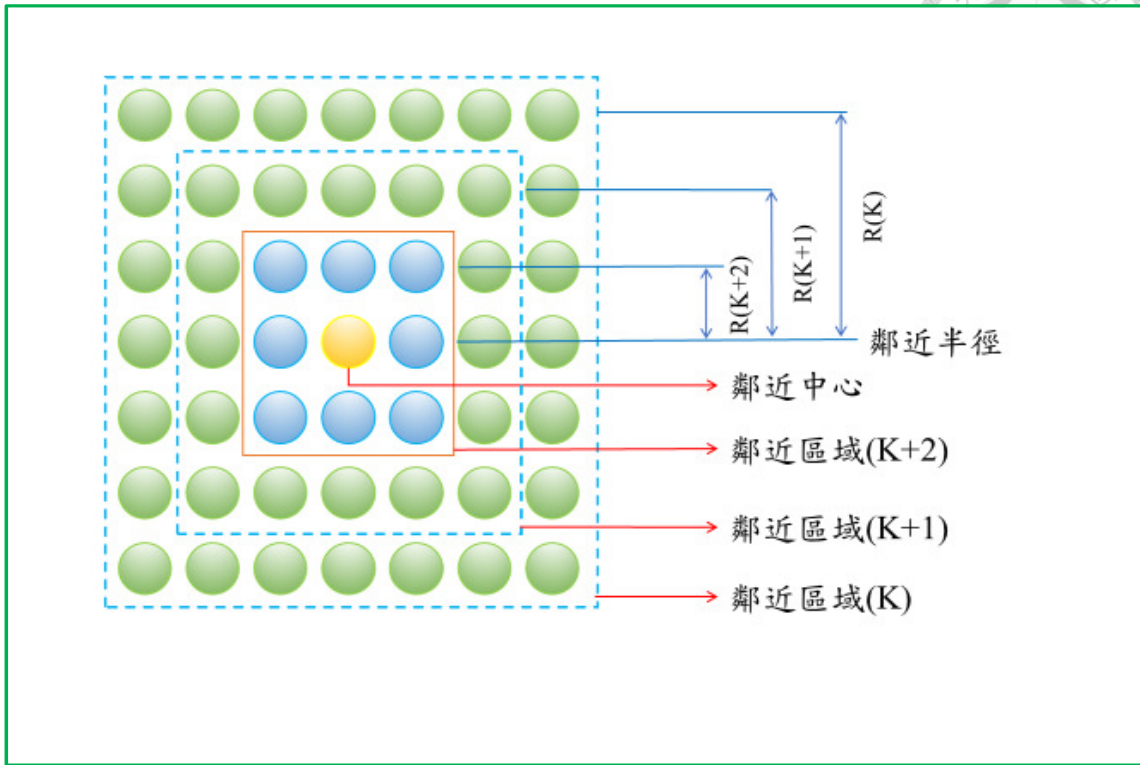


圖 3.2.2 自組特徵映射網路 SOM 網路「鄰近區域」概念

(資料來源：張斐章、張麗秋，2015)

其中優勝神經元為鄰近中心，如圖 3.2.2 中所標示，本研究採用矩形作為鄰近區域的選取方式，而鄰近半徑會隨著迭帶次數增加而逐漸減少，鄰近區域亦逐漸縮小。為了使鄰近神經元間有拓樸關係以鄰近函數(neighborhood function)建立其關係，如式 3-4。

$$h_{qj}(n) = \exp\left(-\frac{\|r_j - r_q\|^2}{2R^2(n)}\right), \quad n = 0, 1, 2, \dots \quad (3-4)$$

式中 h_{qj} 表示 j 個神經元與優勝神經元 q 之鄰近關係函數， r_q 為優勝神經元於拓樸圖上的座標位置， r_j 為鄰近區域中其他神經元於拓樸圖上的座標位置， R 為鄰近半徑， n 為迭帶次數其隨迭帶次數增加而遞減，如式 3-5。

$$R(n) = R_0 \exp\left(-\frac{k}{\tau_1}\right), \quad n = 0, 1, 2, \dots \quad (3-5)$$

其中， R_0 為初始半徑， τ_1 為一常數值。

因此鄰近區域內各神經元之權重調整可定義如式 3-6 所示：



$$\Delta w_j = \eta(n)h_{qj}(n)(x(n) - w_j(n)) \quad (3-6)$$

3-6 式中 $\eta(n)$ 為第 n 次迭代學習速率，一般介於 0-1 之間，並隨著迭代次數增加而減少。最後權重更新為式 3-7 式。

$$w_j(n + 1) = w_j(n) + \Delta w_j \quad (3-7)$$

經由上述計算後即可得到輸入層到拓樸層間各神經元之關係，並形成拓樸結構。

第三步：判斷是否達到停止條件，即迭代次數達到預設次數，若為否則重複第二步直到達預設迭代次數停止模式訓練。

經由上述三個演算步驟後，形成的拓樸圖為神經元間權重調整後所得出的聚類結果，拓樸結構中各神經元則代表一種分類結果，將訓練資料組分類為數個聚類，而最後更新權重值則可代表聚類於該神經元之訓練資料分布關係。

3.3 反應曲面法

3.3.1 反應曲面法簡介

反應曲面法 (RSM) 是一種應用數學和統計方法進行建模，並透過建模分析所研究的系統在不同的調控因子所產生的不同的反應變化；其研究目的通常為探索系統反應的最佳化條件，並已廣泛應用於農業、生物科技、材料科學及工業製程改善等領域。

以本研究為例，牛樟芝生物質量乾重受 pH (X_1)、PDB (X_3)、樟腦 (X_5)、葡萄糖 (X_2)、CC (*C. camphora*)-PS (X_4)、CC (*C. camphora*) 水提取物 (X_6) 及洋菜 (X_7) 上述 7 個獨立變數 (independable variable) 組合條件影響。當獨立變數為連續型變數 (continuous variable)，反應曲面法就非常適合用於該系統在發展及改善最佳化的反應條件，並可透過數學函式表示，若以本研究為例：牛樟芝生物質量乾重 (Y) 受 pH



(X₁)、PDB (X₃)、樟腦(X₅)、葡萄糖(X₂)、CC 水提取物(X₆)、CC-PS 多醣(X₄)及洋菜 (X₇) 7 個變數影響其函數可表示為：

$$Y = f(x_1) + f(x_2) + f(x_3) + f(x_4) + f(x_5) + f(x_6) + f(x_7) + \varepsilon$$

- 生物質量乾重 Y 稱為因變數(dependable variable)；
- pH (X₁)、PDB (X₃)、葡萄糖(X₂)、CC-PS 多醣(X₄)、CC 水提取物(X₆)、樟腦(X₅)及洋菜 (X₇) 稱為因獨立變數(independable variable)
- ε 稱為實驗誤差

反應曲面方法是一種基於曲面定位的方法。因此，反應曲面法的主要研究目的為瞭解不同反應條件所對應的反應結果所描繪的曲面圖，曲面圖包括局部最大化、局部最小化、局部情形及脊線(ridge lines)，及找出最適合的反應條件區域。

反應曲面法可估算獨立變數(independable variable)與因變數(dependable variable)之間近似值關係，透過上述的估算可協助系統在特殊條件下的最佳化操作。

目前反應曲面法所採用的實驗設計主要為 central composite design (CCD)和 Box-Behnken designs (BBD)二種。近年來 face central composite design 和 Central composite rotatable design 也已應用於發酵生產一級代謝物(primary metabolite)及二級代謝物(secondary metabolite)最佳化研究(Breig et al., 2021)。

反應曲面法常用關鍵字

- 因子(factor)：為系統的調控條件(獨立變數；independable variable)，透過條件調控可改變系統的產出，探討因子最佳化通常為反應曲面法的研究目的。
- 正規化水準(code level)：將因子的實際濃度值表示簡化為 -2、-1、0、+1、+2，低濃度以負號(-)表示；高濃度以正號(+)表示，方便資料處理及統計分析。

- 反應(response)：為系統的輸出狀態(因變數；dependable variable)，藉由實驗設計因不同因子所產生的輸出狀態推估因子間與輸出的數學模型。

3.3.2 實驗設計

實驗設計(design of experiment；DoE)是反應曲面法最重要的部分。實驗設計的目的是為選擇合適的條件提供反應過程能進行完整的試驗，以獲取客觀的數據進行模型驗證。實驗設計大都與數學模型有關；因此，實驗設計的選擇對反應曲面建構的正確性有很大的影響，反應曲面法步驟詳如圖 3.2.2。反應曲面法的優點，可提供獨立變數間交互作用關連性及建立系統的數學模型，並降低實驗次數可節省研究時間及費用。但反應曲面亦有其缺點，其主要的缺點為：在二次多項式的模型中，當實驗數據與二次多項式模型充分擬合時，系統經實驗所描繪的曲率與所建立的二次多項式模型，並非完全一致，仍有部分不一致，同時，對模型中的估計值也應透過完整實驗進行驗證。在實驗設計初期，通常會進行變數篩選(Screening)，在眾多的獨立變數中對反應有不同程度的影響，選擇對系統有較大影響性的變數，對這些影響性較大的變數再作深入的探討與研究，最後能找出系統的最佳化條件。

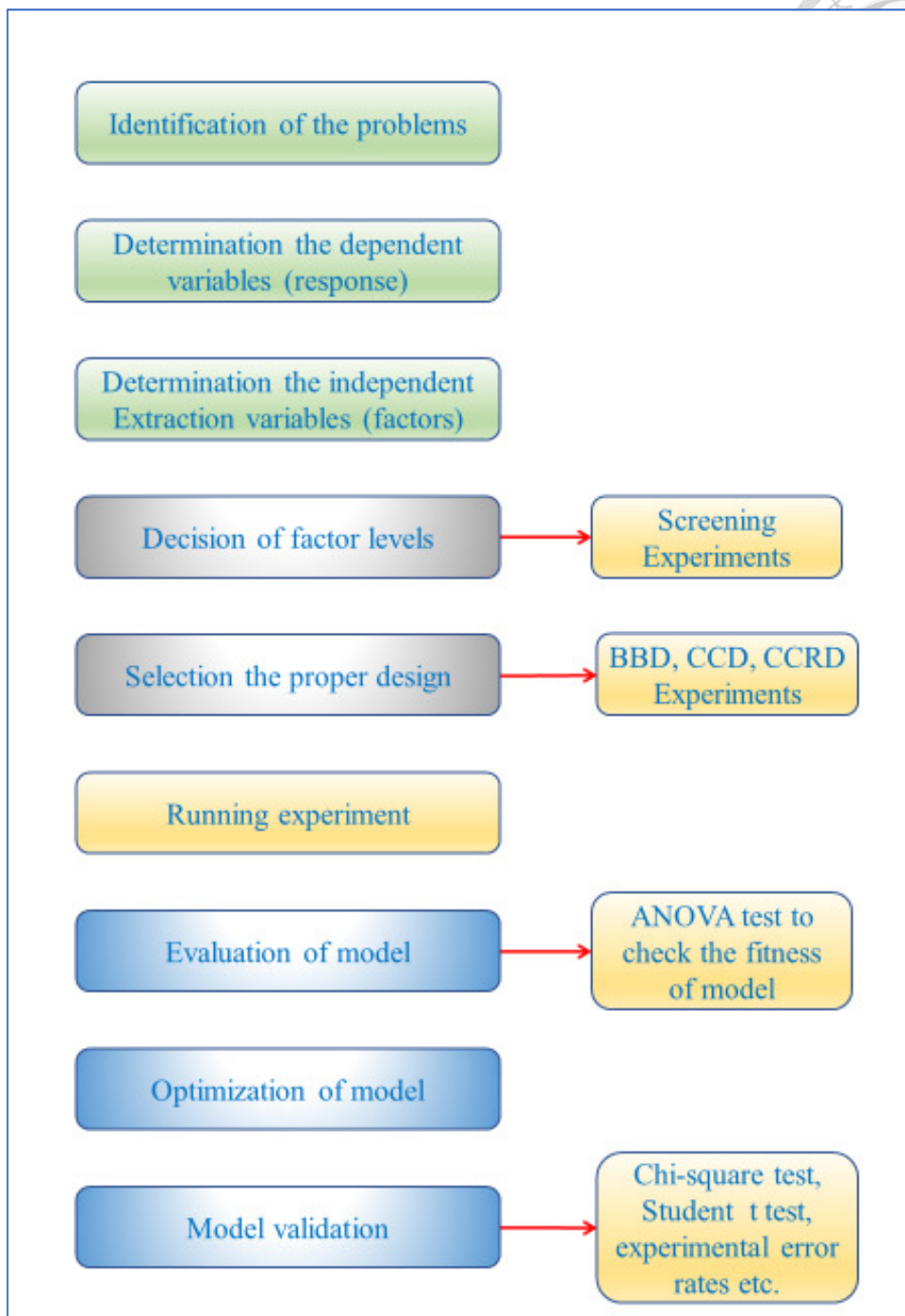


圖 3.3.1 反應曲面法步驟



3.4 液態栽培

生物科技的進步與創新，使得生物的代謝活動也能在人工的環境下進行(*in vitro*)。從複雜的醫藥產業、農業或環保工業都可以看到發酵工程的應用。液態栽培的最重要技術便是培養基的調配及栽培環境，提供細胞自母體分離後，於人工環境下進行生長繁殖。其相關技術說明如下：

3.4.1 培養基組成以牛樟芝培養為例

培養基為液態栽培最重要部分，攸關培養成敗的重要因素，故須針對所培養的生物及目的，慎重選擇適合的培養基成分應依據所栽培的菌種、部位、及培養目的等，必要時可透過實驗調配適合的培養基組成分以決定最合適的培養基。

培養基的重要成份為水、有機化合物、天然物，以及培養體的床材，各項材料說明如下：

1.水：

培養基中的水，使用蒸餾水，避免培養基受其他細菌污損，以維持培養基的無菌狀態。

2.有機化合物：

有機物通常作為提供培養細胞的碳素的來源，有機物主要為碳水化合物，一般以 20 ~30 g/L 的蔗糖或葡萄糖，作為有機物的來源。

3.天然物

天然物的成份非常複雜，對於栽培過程通常為決定其效果的主要因素，雖然迄今仍不甚明確，惟其所含的各種成份，對於液態培養上，效果頗為良好。如以馬鈴薯泥加入培養基中，或萃取所培養細胞其原生長環境的成份作為天然物的添加物，如本研究的牛樟芝其原生環境為牛樟樹樹幹，可萃取牛樟樹樹幹成份作為天然物添加。



4. 洋菜

一般使用洋菜(Agar)作為培養基的鋪底材料，常使用的洋菜量約為 2 g/L。

5. 培養溫度

一般培養溫度為 22 °C 至 25 °C。

6. 培養時間

7. 培養基 pH

一般培養基 pH 起始值為 pH5.6。

3.4.2 液態培養用途

液態培養在藥用植物領域上的應用發展構想流程詳如圖 3.4.1。

1. 大量繁殖

以生物反應器(Bioreactor)大量生產，如細胞培養過程中染色體之變異可以控制，由懸浮細胞之成長趨於一致。

2. 生產二次代謝物

藥用成分一般為二次代謝物，由於二次代謝物是指構造複雜的化合物，一般細胞不一定有合成，有特定的遺傳基因在控制，且其合成為特定細胞的分化有關，且對細胞的正常生長無直接關係的代謝物。如：生物鹼、抗生素、固醇、色素等。一次代謝物是指對細胞生長不可或缺之代謝物。如：蛋白質、核酸、碳水化合物、胺基酸、脂肪等。液態培養用來生產大量醫藥用的藥物，成為近期熱門的主題。由於真菌具有很高的生合成能力，能合成出的化合物種類很多、且結構又很複雜。另外，液態培養在受季節、土壤、氣候和病蟲害的影響非常小，所以可以在任何季節、任何區域進行，生產出的物質均勻，也能工廠化生產，所以所需面積小、生長迅速、可以科學化控制來提高品質及產量。生產出的化合物包括、酵素、殺蟲劑、賀爾蒙、植物鹼、碳水化合物、香料及色素(Canter et al., 2005)。

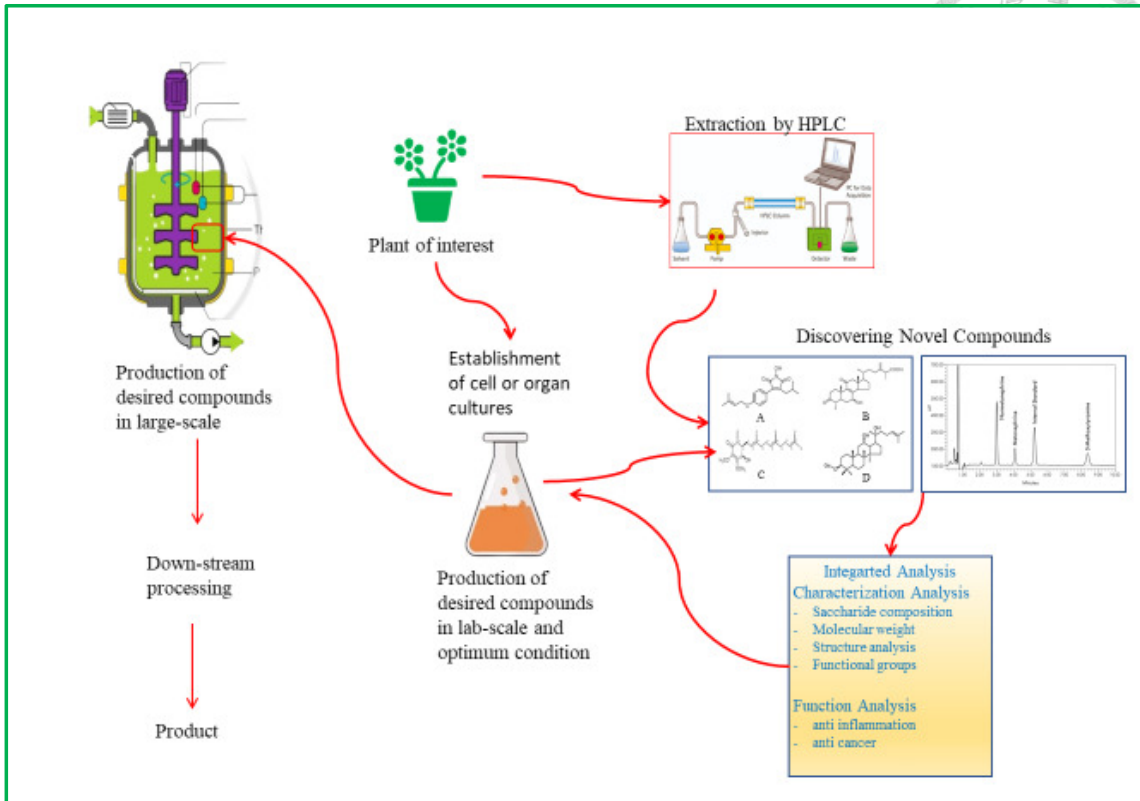


圖 3.4.1 液態栽培應用於藥用真菌研究構想流程圖

四、材料與方法



本研究所所使用的牛樟芝菌種 *A. cinnamomea* (菌株 B85) 是張東柱博士 (農業委員會林業試驗所) 的慷慨饋贈。所有試劑皆購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.)。

4.1 牛樟芝的液態振盪培養

牛樟芝的繼代培養和菌種維持方式與先前所發表的基本相同 (Lee et al., 2002)。即將牛樟芝培養在 28°C 下，含有 39 g/L 馬鈴薯泥葡萄糖洋菜 (potato dextrose agar; 簡稱 PDA，含葡萄糖 20 g/L，洋菜 15 g/L，和馬鈴薯澱粉 4 g/L) 的固態培養基中，培養 19 天後，以每 30 mL 液態培養接種 固態培養 19 天牛樟芝的外圈 0.7 x 0.7 公分大小 10 個，在無菌下轉移到液體培養基。液體培養基含馬鈴薯泥葡萄糖的液態培養基 (potato dextrose broth; 簡稱 PDB，含馬鈴薯澱粉 4 g/L，葡萄糖 20 g/L) 40.00 g/L、葡萄糖 20.00 g/L、樟樹多醣 (CC-PS) 0.16 g/L、樟腦 (camphor) 1.00 g/L、樟樹水萃取物 (CC water extract) 20.00 g/L、洋菜 (agar) 2.00 g/L，pH 值為 5.60，並以此培養條件 (因子) 為「起點」，透過反應曲面方法 (RSM) 實驗設計，調配不同濃度的培養基配方，逐步優化各項栽培條件 (因子)，最終實驗結果能獲得最佳的栽培條件組合。將各種條件在相應的劑量或條件下，於黑暗下以 50 rpm 轉速振盪培養 7 天，之後收集含有牛樟芝菌絲體的培養液。使用抽氣漏斗用 1 L 250 mM NaCl 快速洗滌菌絲體，以洗去牛樟芝菌體外的培養基。然後將牛樟芝菌絲體冷凍乾燥後，記錄牛樟芝菌絲體的乾重，上述牛樟芝栽培流程詳如圖 4.1.1 牛樟芝栽培流程圖，操作步驟說明請參見附錄 1 牛樟芝接種、栽培及採收步驟。

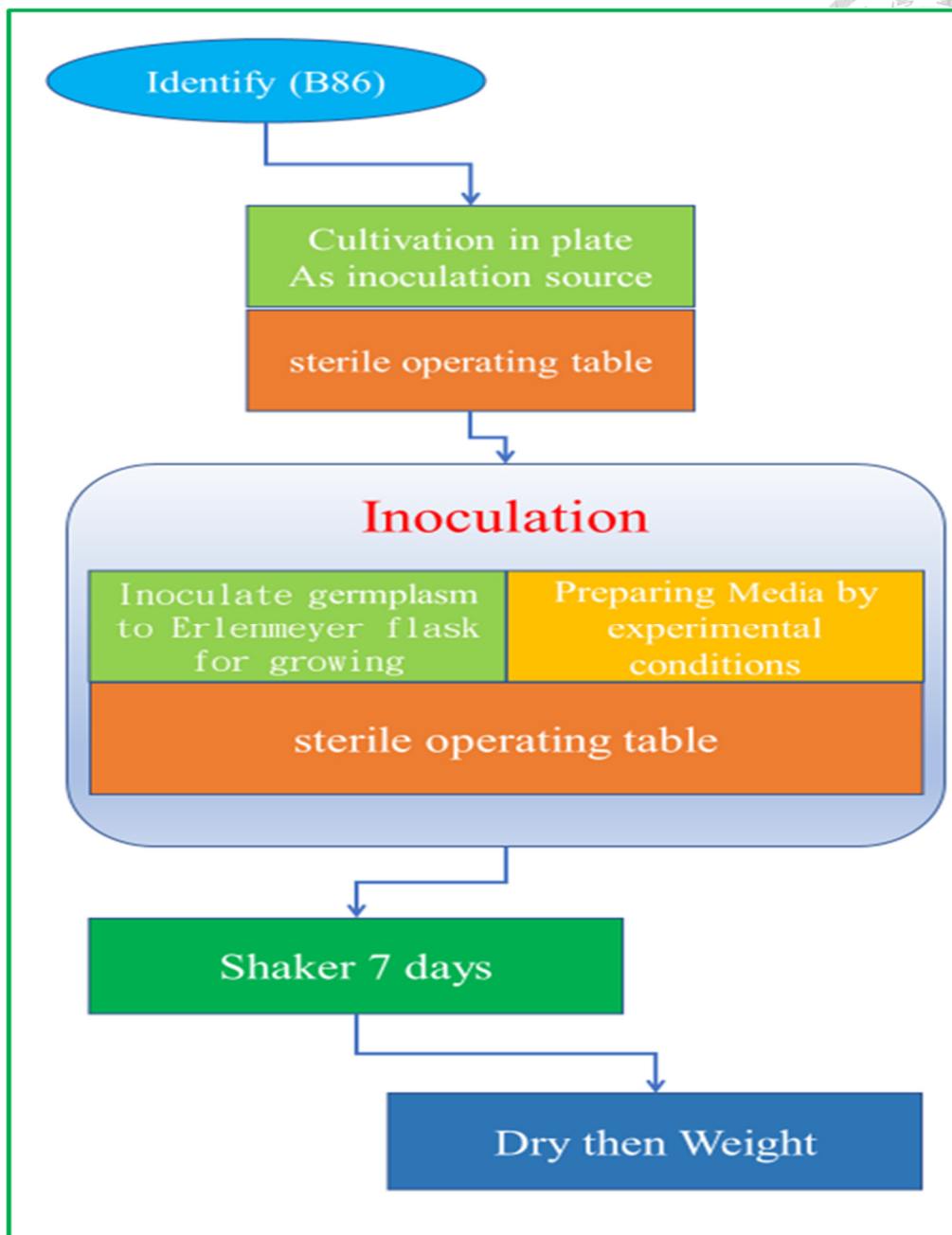



圖 4.1.1 牛樟芝栽培操作流程圖

4.2 實驗設計

4.2.1 生物質量生產條件優化

多種物理化學因素，被認為可以促進牛樟芝菌絲體的生長。在不同的物理化學參數中，選擇了一些重要的變因用於培養條件的優化過程。優化實驗以重複 3 次進行。優化過程的初始和重要步驟，包括實驗設計的選擇和每個變量範圍的的



確立。因為涉及多個變因，在本研究所有獨立因子的僅將產量定為研究目標，因產量在測量上容易量化，其他目標如品質或已知的具療效的成份因其量測方式不易量化，無法導入類神經網路，在本研究暫不列入研究目標。反應曲面法用於確定過程的反應曲面最佳條件。然而，使用反應曲面方法以確定影響反應曲面的重要因子，是一個耗時且費力的實驗步驟。因此，實驗使用以第一階段反應曲面 RSM 結果，作為人工神經網路的輸入數據，來有效地識別生物質量生產的主導因子。

4.2.2 反應曲面法 (Response Surface Method; RSM)

研究 pH (X_1)、樟腦(X_5)、葡萄糖(X_2)、PDB (X_3)、CC 水提取物(X_6)、CC-PS 多醣(X_4)及洋菜 (X_7)七種變因的交互作用，於牛樟芝生物質量的生產。實驗採用 RSM 常用的二水準法部分因子設計 (即 2^{7-2} 設計有 32 次試驗)，來識別菌絲生長條件的非顯著因素，以合理實驗組數完成大規模的變因篩選。

二水準部分因子設計：表示方式為 2^{k-p} 各項參數說明下：

- 底數 2 表示本實驗採用 2 階因子分析(因子分析值域只採用高，低二個值表示)
- 指數 k 為實驗中的因子數目，以本研究為例探討因子數目為 7(k 值)
- 指數 p 表示，因子間主要交互作用的因子數
- 2^{7-2} 表示：本實驗為二水準部分因子實驗設計，7 個主因子作用及因子交互作用多數為 2 因子

依二因子水準設計，本研究所探討牛樟芝皿式栽培 7 個因子的高、低濃度詳如表 4.2.1 牛樟芝栽培因子高低濃度設計與 code level 對照表。

表 4.2.1 牛樟芝栽培因子高低濃度設計與 code level 對照表

Independent variables		Low point		Middle point		High point	
		Real Value	Code Level	Real Value	Code Level	Real Value	Code Level
X ₁	pH 酸鹼度	4.6	-1	5.6	0	6.6	+1
X ₂	Glucose (g/ L) (葡萄糖)	0	-1	20	0	40	+1
X ₃	PDB (g/ L)	30	-1	40	0	50	+1
X ₄	CC polysaccharides (g/ L) (樟樹多醣)	0	-1	0.16	0	0.32	+1
X ₅	Camphor (g/ L) (樟腦)	0	-1	1	0	2	+1
X ₆	CC water extract (g/ L) (樟樹水萃取液)	10	-1	20	0	30	+1
X ₇	Agar (g/ L) (洋菜)	0	-1	2	0	4	+1

七個因子 (X₁ -X₇) 經二水準部分因子設計(2⁷⁻²)，經以 SAS JMP 軟體執行各組實驗設條件如表 4.2.2 反應曲面第一階段(T1)各組 code value 栽培條件，在完成 32 組二水準部分因子實驗，然後執行陡升趨近法(steepest ascent method; SAM)，使各因子的濃度接近極值點所在的範圍。最後，使用中央混合設計 (central composite design; CCD) 探索迴歸方程，用於估計中心點 (來自部分因子設計) 和星點(star point)的產量曲面和每個因素，找出最適點與最適操作區域。

表 4.2.2 各栽培因子的代碼(X₁-X₇)說明如下：X₁: pH; X₂: glucose; X₃: PDB; X₄: CC-PS; X₆: CC water extract; X₅: camphor 和 X₇: agar. 每一實驗為 3 重複 (N=3)，產量(Yield)為實驗 3 重複的平均值。

表 4.2.2 反應曲面第一階段(T1)各組 code value 栽培條件



Code level Run	Independent variables Code value						
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
1	1	1	1	1	1	1	1
2	-1	1	1	1	1	-1	-1
3	1	-1	1	1	1	-1	-1
4	-1	-1	1	1	1	1	1
5	1	1	-1	1	1	-1	1
6	-1	1	-1	1	1	1	-1
7	1	-1	-1	1	1	1	-1
8	-1	-1	-1	1	1	-1	1
9	1	1	1	-1	1	-1	-1
10	-1	1	1	-1	1	1	1
11	1	-1	1	-1	1	1	1
12	-1	-1	1	-1	1	-1	-1
13	1	1	-1	-1	1	1	-1
14	-1	1	-1	-1	1	-1	1
15	1	-1	-1	-1	1	-1	1
16	-1	-1	-1	-1	1	1	-1
17	1	1	1	1	-1	1	-1
18	-1	1	1	1	-1	-1	1
19	1	-1	1	1	-1	-1	1
20	-1	-1	1	1	-1	1	-1
21	1	1	-1	1	-1	-1	-1
22	-1	1	-1	1	-1	1	1
23	1	-1	-1	1	-1	1	1

Code level Run	Independent variables Code value						
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
24	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1
25	1	1	1	-1	-1	-1	1
26	-1	1	1	-1	-1	1	-1
27	1	-1	1	-1	-1	1	-1
28	-1	-1	1	-1	-1	-1	1
29	1	1	-1	-1	-1	1	1
30	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1
31	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
32	-1	-1	-1	-1	-1	1	1

4.2.3 陡升趨近法 (SAM)

當涉及許多變因時，兩水準法部分因子設計，可以很好地確定向反應最優值附近的最陡上昇路徑。使用 SAM 到達 Plackett-Burman 設計 (PBD) 空間的中心點附近，這可以被認為是 SAM 的原點，如表 4.2.3 曲面設計各因子採用學習速率。在這項研究中，實驗沿著 SAM (Ghosh et al., 2018) 描述的路徑進行。

依 RSM 第一階段結果再由表 4.2.3 的學習速率訂出第二階段各變數的 Code Levels 如表 4.2.4

表 4.2.3 曲面設計各因子採用學習速率

Factor	PH	Glucose	PDB	Agar
Central point	5.6	20	40	2
Unit	1	20	10	2
New step coeff.	0.94467	0.02175	0.04171	0.32463
New step ^a	0.94467	0.43504	0.41708	0.64926



$$\text{Coeff.}_{a1} = a1/\text{sqr}(a1^2+a2^2+a3^2+a7^2)$$

^a Other media components were kept at center point of the PBD space.

表 4.2.4 反應曲面第二階段(T2)各組 code value 栽培條件

Independent variables		Code Value (Level)					
		-2	-1	0	1	2	3
X ₁	pH 酸鹼度	3.1107	4.0553	5	5.9447	6.8893	7.834
X ₂	Glucose (g/ L) (葡萄糖)	19.13	19.56	20	20.44	20.87	21.32
X ₃	PDB (g/ L)	39.17	39.58	40	40.42	40.83	41.26
X ₄	CC polysaccharides (g/ L) (樟樹多醣)	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
X ₅	Camphor (g/ L) (樟腦)	1	1	1	1	1	1
X ₆	CC water extract (g/ L) (樟樹水萃取液)	20	20	20	20	20	20
X ₇	Agar (g/ L) (洋菜)	0.7	1.35	2	2.65	3.3	3.95

Under the condition of 50 rpm, 28 °C for 7 days. (repeated 3 times).

4.2.4 中央合成設計 (Central composite design; CCD)

中央合成設計是一種二階實驗設計。採用二階實驗設計的中央合成設計 來充分闡明接近最極值的反應面，這為二階多項式逼近真實反應提供了基礎。在本研究中，CCD 由四個因子 (X₁、X₂、X₃和 X₇) 組成，每個因子有五個水準 (-2、-1、0、1 和 2)。各自變因的範圍為：pH 值 5-8.7；葡萄糖 0.600-0.652 g/30 mL；PDB 為 1.200-1.250 g /30 mL；洋菜為 0.060-0.138 g/30 mL。使用 Design Expert 總共生成了 26 次實驗，其中 16 次實驗是因子實驗，8 次實驗是軸向實驗，2 次



實驗用於中心點的重複數，其他三個因素在 PBD 空間的中心點保持不變。第三階段(T3)各變數的高低值域轉換為 Code Levels 參見表 5.4.1，T3 實驗條件如表 4.2.5
反應曲面第三階段(T3)各組 code value 栽培條件

多項式模型的品質由決定係數(the coefficient of determination) (R^2) 來 評估。根據實驗數據，基於初始 pH 值和碳源濃度，利用多元回歸建立數學模型，然後利用偏微分求解最大值，得到下一步過程反應的新中心點（本研究中的 T4 實驗）。在這項研究中，將實驗數據帶進完整的二階回歸模型(方程式(1))以得到其係數。

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{14}X_1X_4 + a_{23}X_2X_3 + a_{24}X_2X_4 + a_{34}X_3X_4 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{44}X_4^2 \text{ 公式(1)}$$

其中 Y 是 RSM 預測的預期反應值； a_i , a_j 和 a_{ij} 是要估計的模型參數。

本研究採用多元回歸分析對實驗數據進行評估，顯著性由 p 值顯示。所有回歸公式均由“JMP 統計軟體”（SAS Institute Inc.，USA）分析。

表 4.2.5 反應曲面第三階段(T3)各組 code value 栽培條件

Run ^a	pH	Glucose	PDB	Agar
Code levels				
1	1	1	1	1
2	1	1	1	-1
3	1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	1	-1	-1	1
8	1	-1	-1	-1
9	-1	1	1	1
10	-1	1	1	-1
11	-1	1	-1	1
12	-1	1	-1	-1

Run ^a	pH	Glucose	PDB	Agar
	Code levels			
13	-1	-1	1	1
14	-1	-1	1	-1
15	-1	-1	-1	1
16	-1	-1	-1	-1
17	2	0	0	0
18	-2	0	0	0
19	0	2	0	0
20	0	-2	0	0
21	0	0	2	0
22	0	0	-2	0
23	0	0	0	2
24	0	0	0	-2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0

Under the condition of 50 rpm , 28 °C for 7 days (repeated 3 times).

4.3 自組特徵映射網路

自組特徵映射網路(SOM)，屬於非監督式(unsupervised)的類神經網路，其主要應用為將高維度的資料進行聚類分析(Cluster Analysis)，透過擷取資料特徵降低維度，由輸入資料的特徵產生一維或二維的拓撲圖，將輸入資料轉為可視性的資料，提供輸入資料的關係判讀。

本研究將牛樟芝液態栽培中第一階段所設計的 32 組 (表 4.2.1)栽培因子資料輸入 SOM 網路進行訓練，因 SOM 為非監督式網路，不需事先提供類神經網路正確學習的答案，SOM 網路會自動自輸入的資料中分為訓練、驗證及測試步驟，尋找資料間的規則性進行資料的聚類運算，產生資料聚類結果。基於上述 SOM 網路的資料聚類能力，應用於牛樟芝栽培因子的研究，未來，整合類神經網路有更好的

研究成果詳如圖 4.3.1 牛樟芝栽培因子整合類神經網路研究示意圖及圖 4.3.2 SOM 網路進行牛樟芝栽培因子資料聚類分析。

將牛樟芝 7 項栽培因子輸入美國 MathWorks 軟體公司的 MATLAB (2019a 版 Neural Net Clustering) 進行自組特徵映射網路訓練，經過多次訓練(調整隱藏層神經元個數、學習半徑及迭代次數 (epoch))，最後在隱藏層為 9 個神經元時 (3 X 3)，及迭代次數為 600 (epochs)，自組特徵映射網路達到收斂，再將聚類分佈樣本的生物質量重量平均值進行與栽培因子間分析。

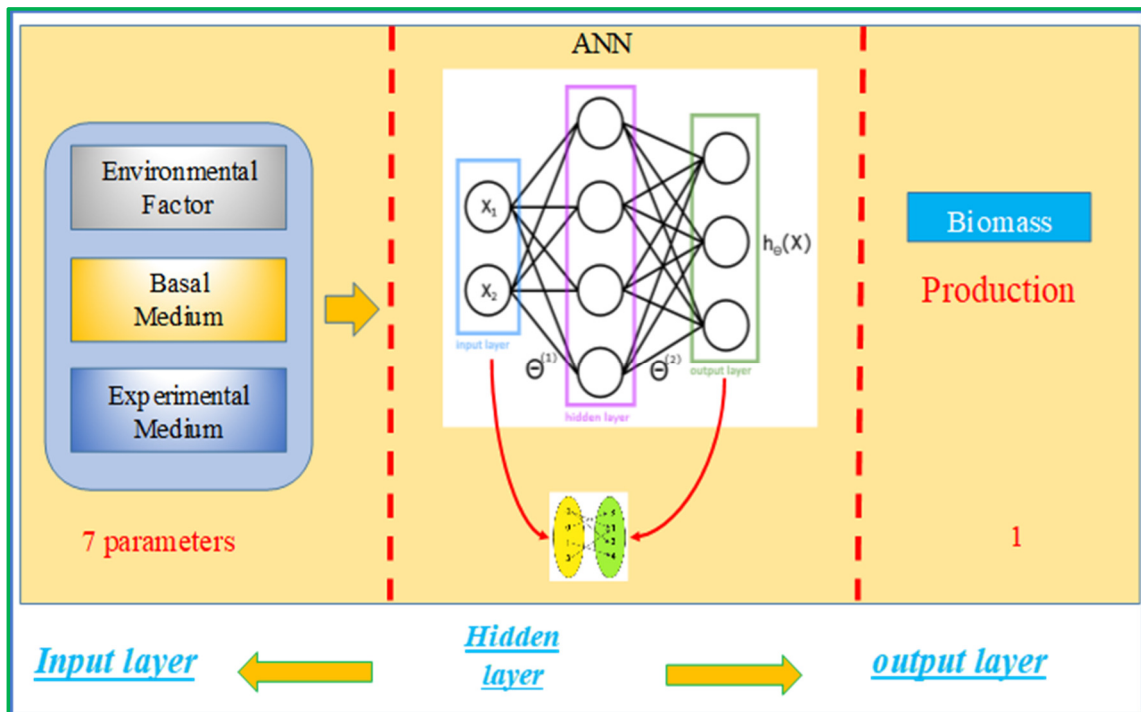


圖 4.3.1 牛樟芝栽培因子整合類神經網路研究示意圖

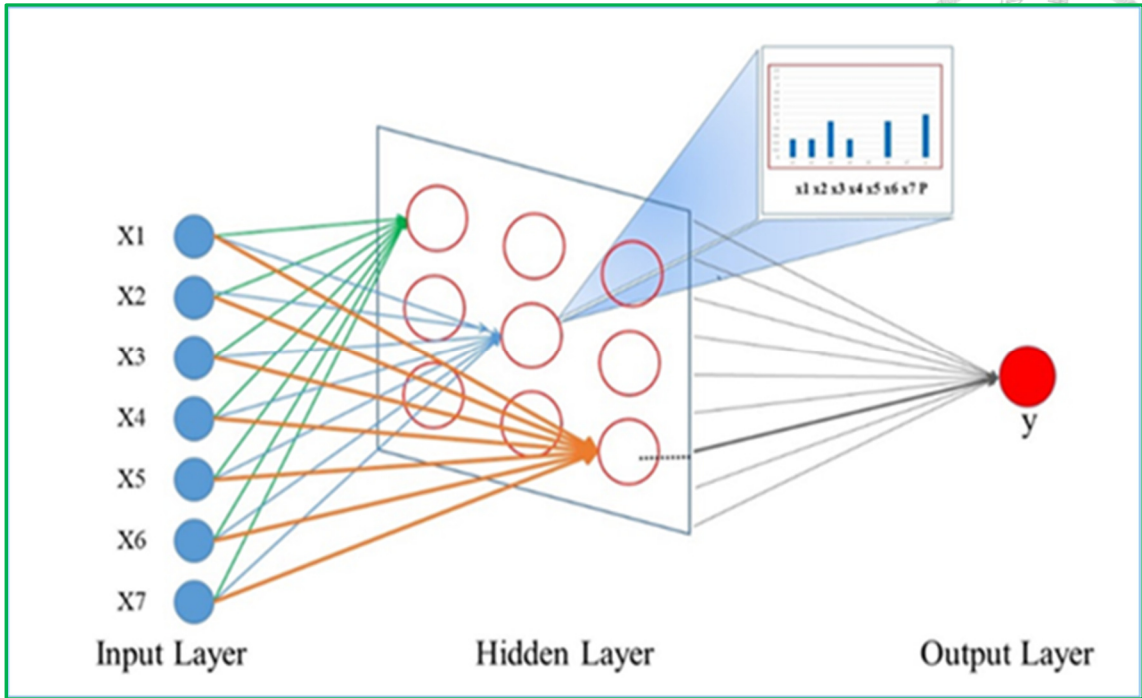



圖 4.3.2 SOM 網路進行牛樟芝栽培因子資料聚類分析

五、研究結果



在這項研究中，RSM 共進行 4 階段實驗 (T1-T4)，每種培養條件都以三重複進行。在 T1-T4 中分別進行 96、18、78 和 6 次實驗組數。為篩選顯著因子，RSM 以 T1 結果篩選不顯著因子，SOM 負責篩選顯著因子能更有效地識別生物質量生產的主要因子。根據單因子分析，選擇過程變因及其範圍，而變因在-1 和 1 之間的三個階層值，如表 4.2.1 牛樟芝栽培因子高低濃度設計與 code level 對照表所示，然後，依聚類分佈的樣品別計算同一聚類的生物質量(Biomass)平均值分析生物質量的重量與因子關係。

5.1 應用自組特徵映射網路預測牛樟芝液態培養重要因子

自組特徵映射網路(SOM)應用，可將原有樣本中複雜(高緯度)的資料，經由擷取樣本資料特徵並進行聚類分析，以降低資料維度，通常輸出一維或二維的特徵圖(拓撲圖)，顯示輸入資料分布。並可透過拓撲圖(簡化資料)，藉由資料的可視化快速分析輸入資料關係。

本研究從牛樟芝液體培養實驗過程的第一階段 (T1)的各項培養條件作為自組特徵映射網路的輸入資料，自組特徵映射網路的輸入層資料包含牛樟芝液態栽培的 7 個培養條件(因子)，分別為 pH 值、葡萄糖、PDB、CC-PS、樟腦、CC 水提取物和洋菜的濃度。因樣本數量有限(本研究中為 32 個詳如表 4.2.1 牛樟芝栽培因子高低濃度設計與 code level 對照表，每項樣本進行 3 重複，收穫量取平均值)。並以美國 MathWorks 軟體公司的 MATLAB (2019a 版 Neural Net Clustering) 進行自組特徵映射網路訓練，經過多次訓練(調整隱藏層神經元個數、學習半徑及迭代次數 (epoch))，最後在隱藏層為 9 個神經元時 (3X3)，及迭代次數為 600 (epochs)，自組特徵映射網路達到收斂。之後並應用 MATLAB 聚類分析所提供 1.輸入因子神



經元權重圖(Weights from input component)、2.各聚類的樣本分佈數及 3.各聚類的樣本明細生物質量重量，進行研判 7 個培養因子($X_1 - X_7$)與牛樟芝皿式栽培是否具有重要性。上述 3 項資料說明如下

1. 因子與網路神經元權重分佈圖(Weights from input component)

通常可由每個輸入因子的權重圖觀察各變數(輸入因子)間是否有相似性，每個六角形表示一個神經元，顏色表示權重，本研究神經元權重由大至小依次為淡黃色、澄色、紅色、咖啡色、黑色 (詳如圖 5.1.1 因子與網路神經元權重分佈圖)，input 1 分為為分析因子 (X_1)、input 2 分為為分析因子 (X_2)依此類推。

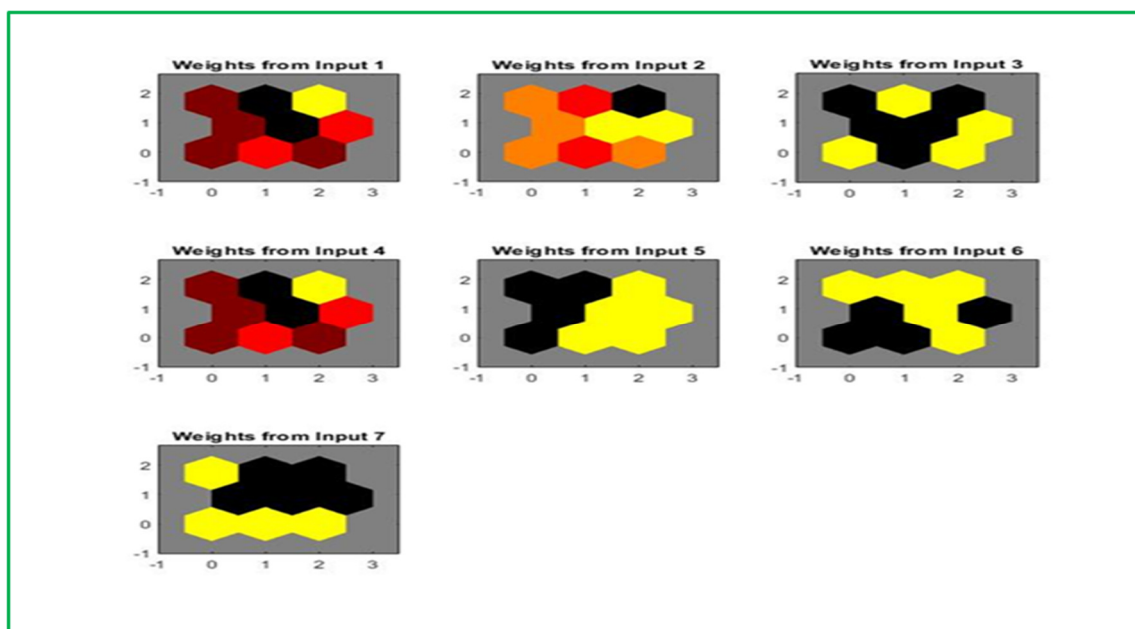


圖 5.1.1 因子與網路神經元權重分佈圖

2. 各聚類的樣本分佈數目

由此聚類樣本數目分佈圖可觀察到樣本數目與聚類關係，本研究樣本數目與聚類分佈詳如圖 5.1.2 聚類樣本數目分佈圖。

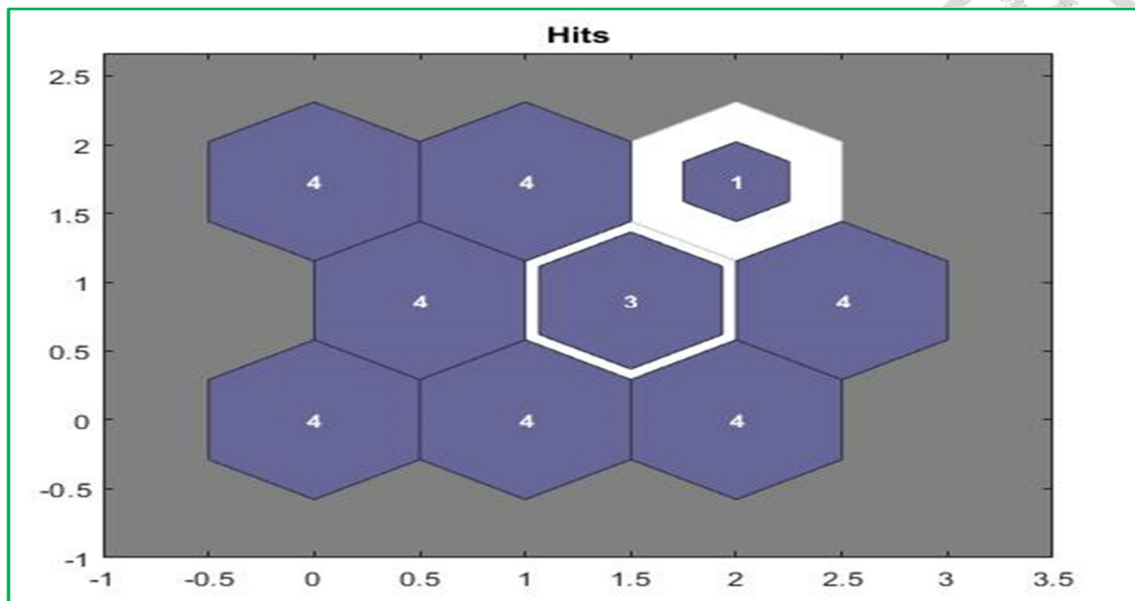


圖 5.1.2 聚類樣本數目分佈圖

3. 各聚類的樣本明細及生物質量平均值

可由聚類分佈數目再對應至各聚類的樣本，可再針對各聚類中的樣本特性進行分析本研究主要應用樣本的生物質量重量特性進行分析，T1 的 32 組實驗的生物質量重量詳如表 5.1.1 T1 實驗生物質量產量明細 (每組實驗並進行 3 重複，其產量(生物質量重量、平均重量、標準差(stdev)及 C.V.(變異係數)。本研究的各聚類樣本分佈明細表詳如表 5.1.2 SOM 網路各聚類樣本分佈詳細資料。

表 5.1.1 T1 實驗生物質量產量明細

Run	Yield (g/L)			Average	stdev	C.V
	# 1	# 2	# 3			
1	X	9.96	14.26	12.11	3.04	25.11
2	7.27	7.28	11.08	8.54	2.20	25.73
3	7.21	8.13	6.73	7.36	0.71	9.63
4	5.22	4.13	4.65	4.67	0.55	11.75
5	15.13	8.16	13.63	12.31	3.67	29.79
6	4.77	4.32	3.71	4.26	0.53	12.48
7	5.21	4.39	4.86	4.82	0.41	8.55
8	5.07	6.20	3.45	4.91	1.38	28.20
9	7.10	10.09	8.19	8.46	1.52	17.91

Run	Yield (g/L)			Average	stdev	C.V
	# 1	# 2	# 3			
10	4.67	5.16	5.97	5.27	0.66	12.46
11	9.54	12.78	7.84	10.05	2.51	25.00
12	7.47	5.06	5.07	5.87	1.38	23.60
13	5.86	5.24	5.46	5.52	0.31	5.69
14	4.86	4.80	5.21	4.95	0.22	4.45
15	6.39	7.77	4.80	6.32	1.48	23.47
16	5.28	3.44	4.07	4.26	0.93	21.91
17	8.49	5.77	6.03	6.76	1.50	22.15
18	5.81	6.10	5.30	5.74	0.41	7.06
19	9.47	9.43	7.35	8.75	1.21	13.87
20	5.40	5.74	4.97	5.37	0.39	7.18
21	5.15	4.66	4.34	4.72	0.41	8.66
22	4.80	4.50	4.49	4.60	0.18	3.83
23	8.63	6.29	7.57	7.50	1.17	15.60
24	4.73	4.25	4.57	4.51	0.25	5.45
25	12.63	13.40	12.49	12.84	0.49	3.85
26	5.63	5.18	5.11	5.31	0.29	5.39
27	4.98	6.34	5.65	5.66	0.68	11.99
28	3.90	6.48	6.45	5.61	1.48	26.39
29	11.27	15.13	16.36	14.25	2.65	18.61
30	4.43	4.17	0.99	3.20	1.92	59.99
31	5.34	4.32	4.21	4.63	0.62	13.49
32	4.34	5.00	4.86	4.73	0.34	7.28

表 5.1.2 SOM 網路各聚類樣本分佈詳細資料

Cluster ID	Samples #	Number of samples	Mean of biomass (g/L)
Cluster 1	18,19,25,28	4	8.23 ↑
Cluster 2	5,8,14,15	4	7.12
Cluster 3	1,4,10,11	4	8.02
Cluster 4	21,24,30,31	4	4.26 ↓
Cluster 5	6,13,16	3	4.68
Cluster 6	2,3,9,12	4	7.56
Cluster 7	22,23,29,32	4	7.77
Cluster 8	17,20,26,27	4	5.78
Cluster 9	7	1	4.82

Remark : ↑ denotes the largest mean of biomass; and ↓ denotes the smallest mean of biomass.

為提供更清楚的分析結果，將圖 5.1.1、圖 5.1.2 及表 5.1.2 資訊整併成圖 5.1.3，各輸入條件(X_1 - X_7)於自組特徵映射網路隱藏層各神經元權重，詳如圖 5.1.3 栽培因子 X_1 - X_7 聚類分析生物質量及神經元權重頻率結果。

經自組特徵映射網路依 T1 的栽培條件所聚類的 9 群資料，各群聚類詳如表 5.1.2 SOM 網路各聚類樣本分佈詳細資料。聚類 1 (包含樣本 #18、#19、#25 和 #28) 具有最大的生物質量(Biomass)的重量平均值，而聚類 4 (包含樣本 #21、#24、#30 和 #31) 具有最小的生物質量的重量平均值。

依續再將各組聚類樣本資料，統計樣本不同栽培條件於該聚類所出現的次數，描繪出各聚類中：生物質量與各栽培條件的出現頻率，由上述資料研判栽培條件與



生物質量及生物質量生成量關係，以相關、無關及無法判斷三種模式，說明牛樟芝液態培養與 7 項栽培因子關係。

1. 與生物質量生成有相關的栽培因子：

由圖 5.1.4 SOM 網路各組聚類 X_1 - X_7 頻率分析及生物質量分佈圖為比照圖 5.1.3 模式將圖 5.1.1、圖 5.1.2 及表 5.1.2 資訊，並將聚類資料明細轉換為栽培因子的頻率統計及生物質重乾重分佈圖，由圖 5.1.4 可得知生物質量平均值產量最高為聚類 1，最低為聚類 4，經比對最高與最低聚類的差異為栽培因子為 X_3 (PDB) 和 X_7 (Agar)，當這 2 個因子為高濃度時生物質量生成多(聚類 1)，在低濃度時生物質量生成少(聚類 4)。

2. 與生物質量生成無關栽培因子：

進一步探索 X_5 (樟腦) 及 X_6 (CC 水提取物) 二項因子，在聚類 1 及聚類 4 時均為最低濃度時，在生物質量却呈現最低值(聚類 4)與最高值(聚類 1)，在聚類 3 時生物質量平均值為第二高時， X_5 (樟腦) 及 X_6 (CC 水提取物) 二項因子的濃度則是高濃度狀態，說明生物質量生成與這二個因子的濃度無關。

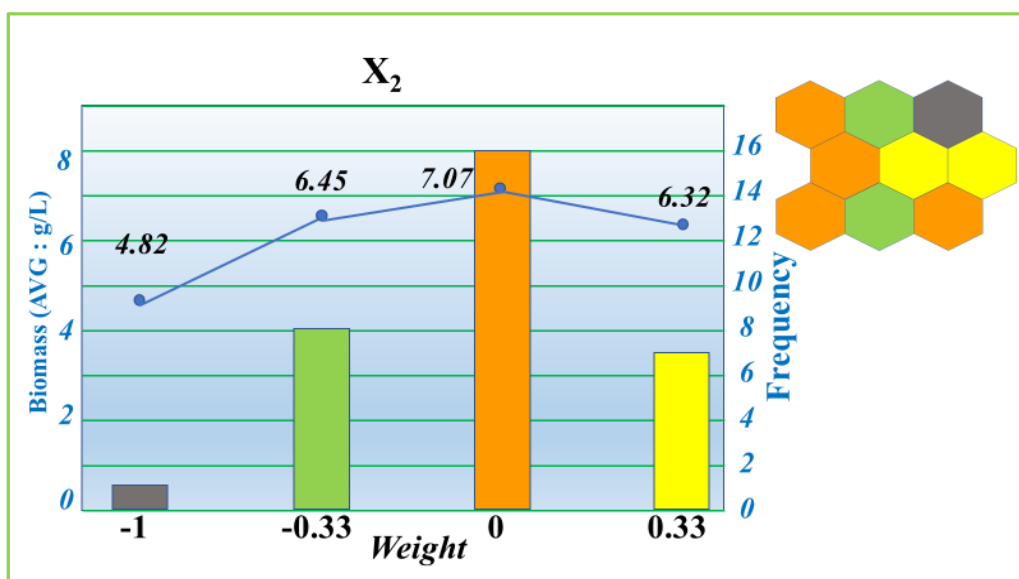
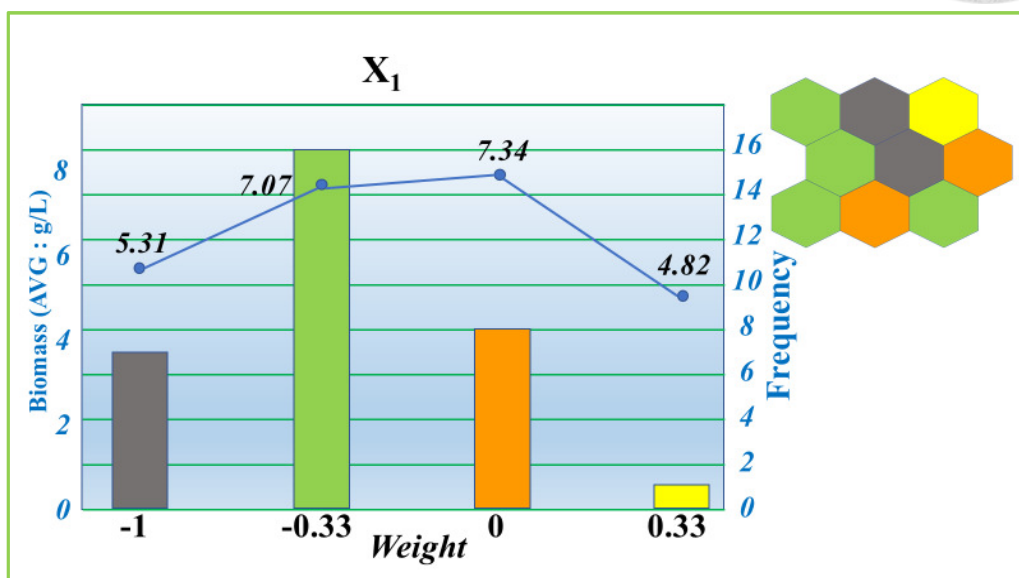
3. 無法清楚判斷的栽培因子：

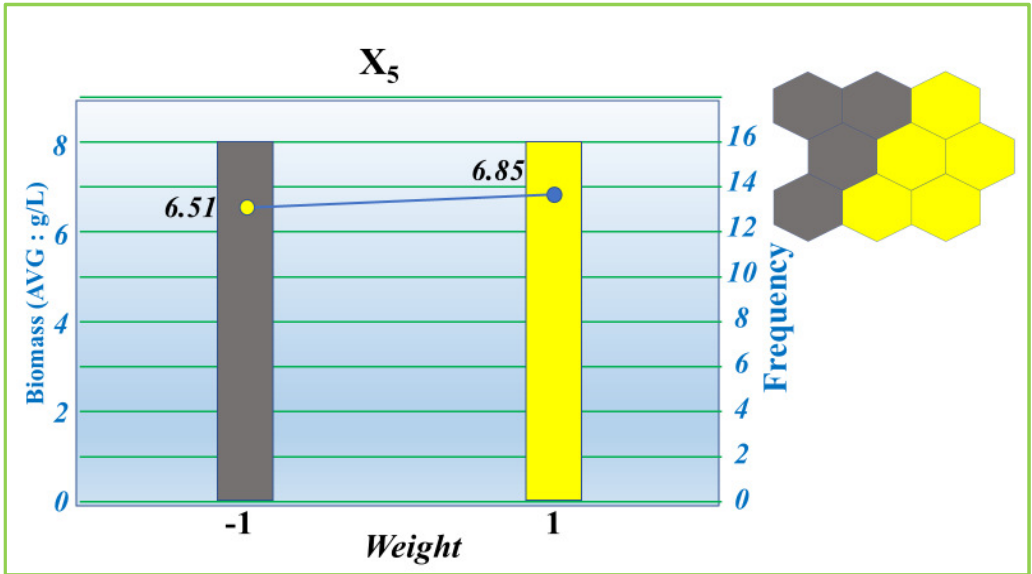
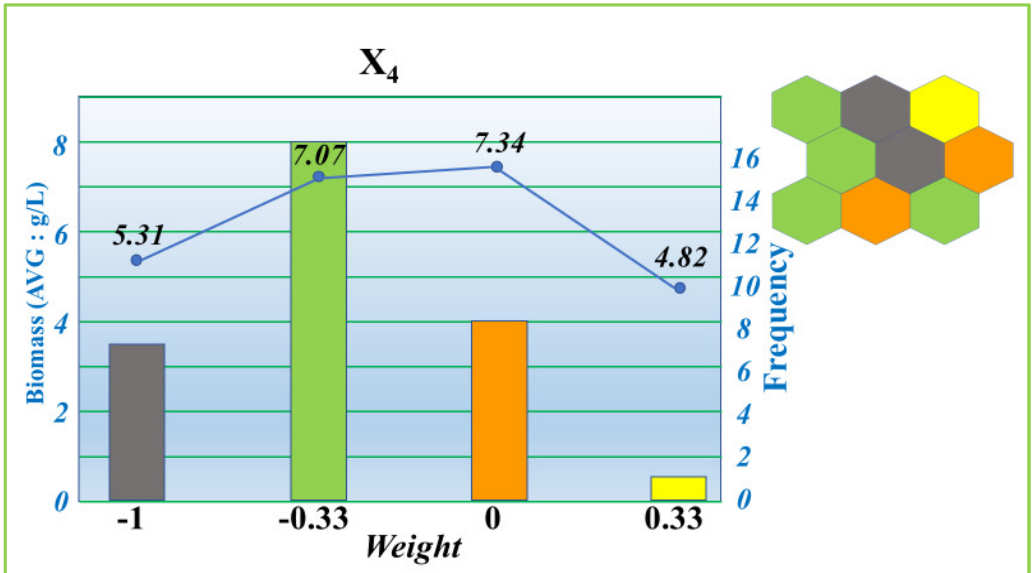
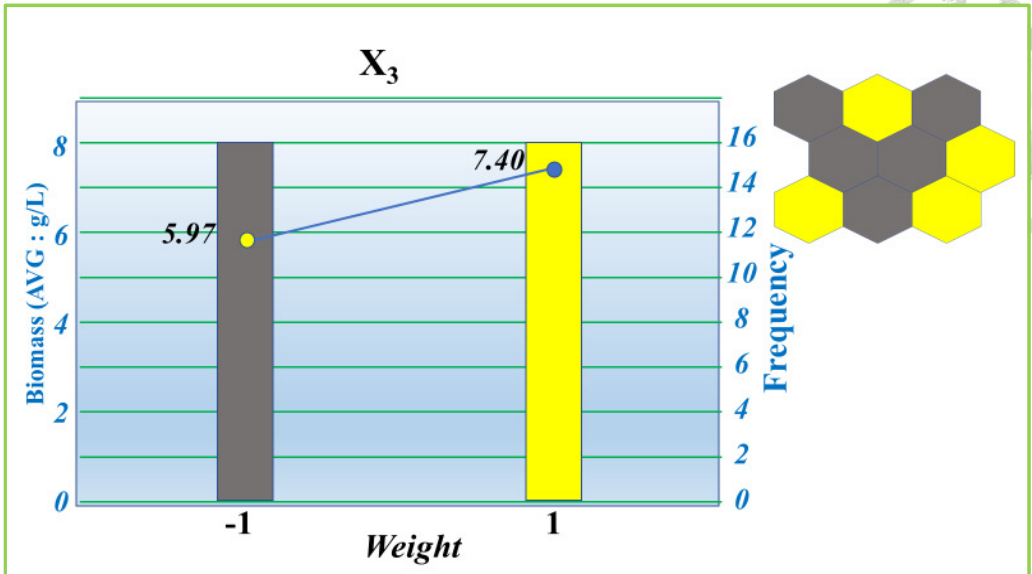
其他的栽培因子 X_1 (pH)、 X_2 (葡萄糖) 和 X_4 (CC-PS)，除聚類 9 除外，其他 8 個聚類，各聚類中高濃度與低濃度所出現的次數均相同，它無法清楚判別其濃度與生物質量的生成關係。以上三項因子在生物質量生成中沒有表現出一致的行為。但可透過曲面反應法進一步的探索這三項因子與生物質量的生成關係。

由圖 5.1.4 可歸納牛樟芝液態栽培因子： X_3 (PDB) 和 X_7 (洋菜) 的濃度似乎與生物質量呈正相關(濃度高時生物質量生成亦高)，而 X_5 (樟腦) 和 X_6 (CC 水提



取物) 的濃度與生物量無關(濃度變化與生物質量生成無影響)。此外，很難將 X_1 (pH)、 X_2 (葡萄糖) 或 X_4 (CC-PS) 由圖 5.1.4 所提供的資訊，無法比照前述說明，與生物質量建立聯結關係。





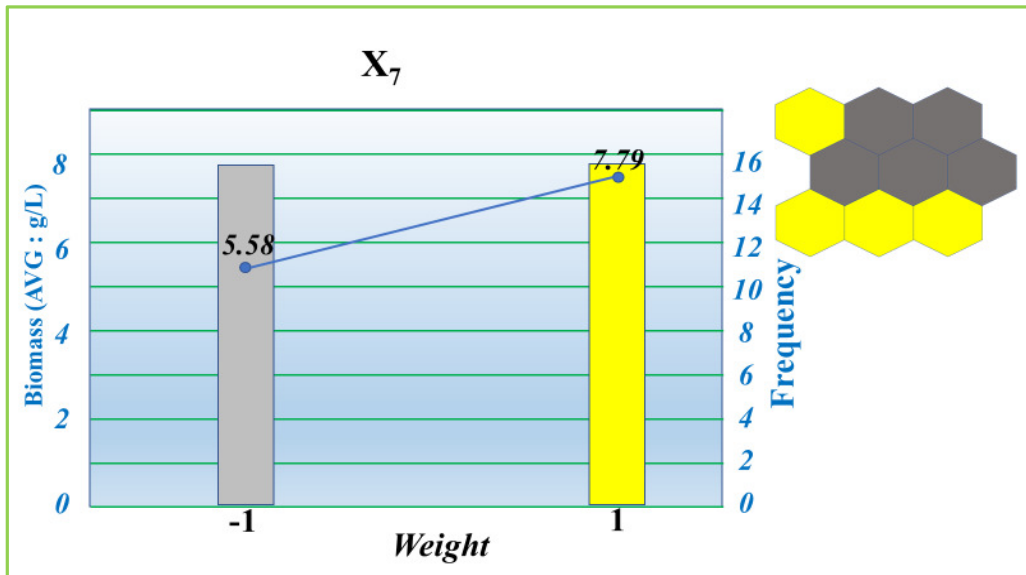
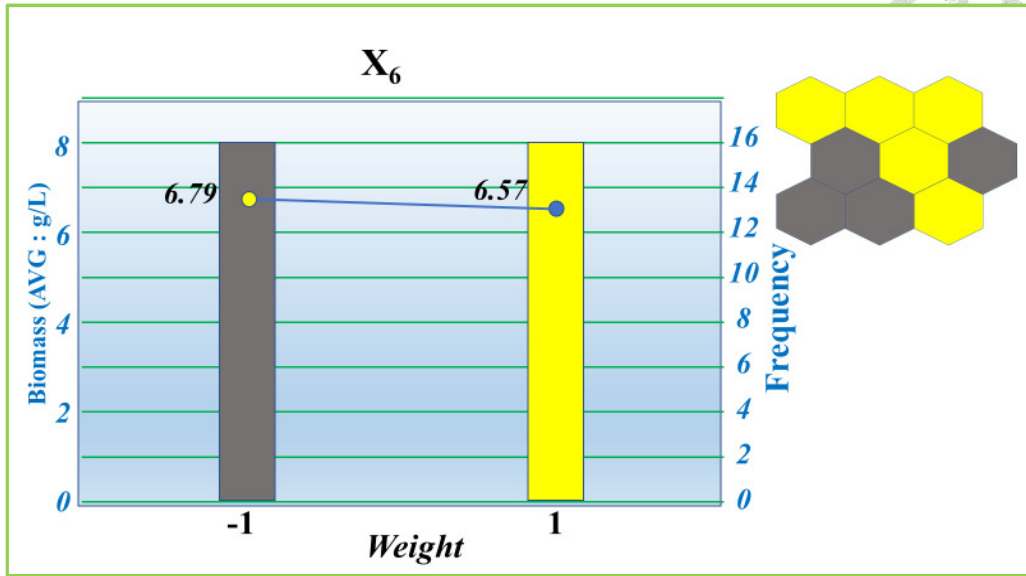
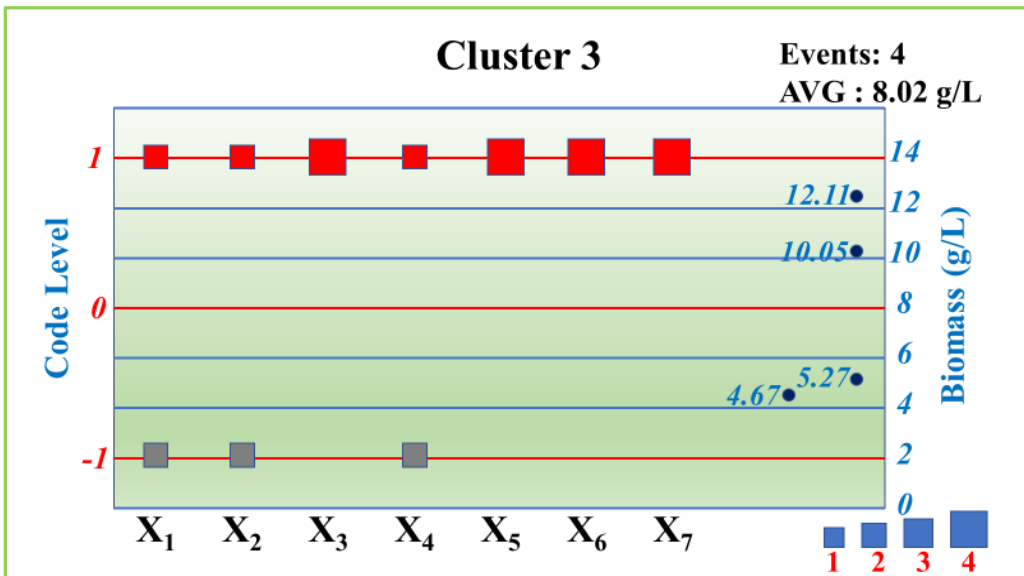
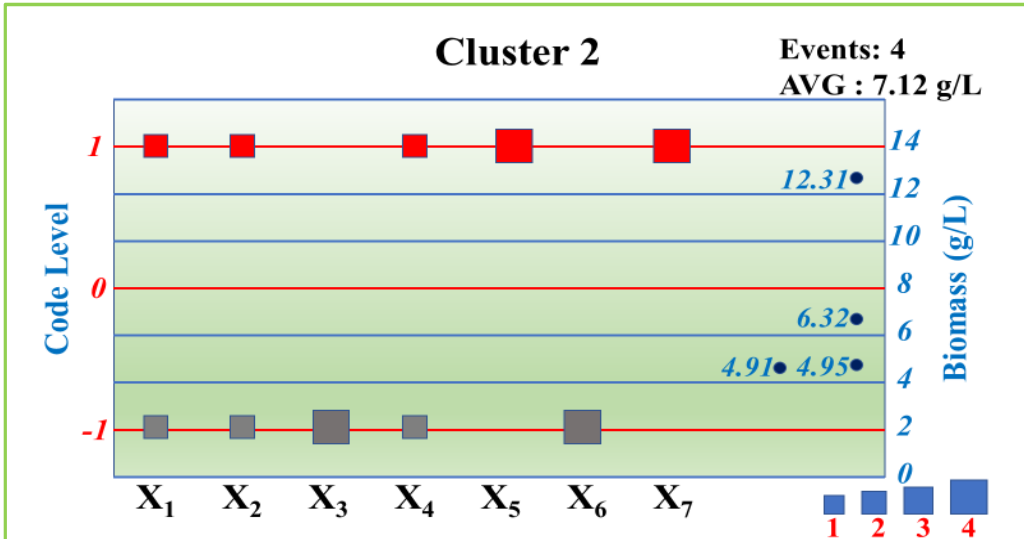
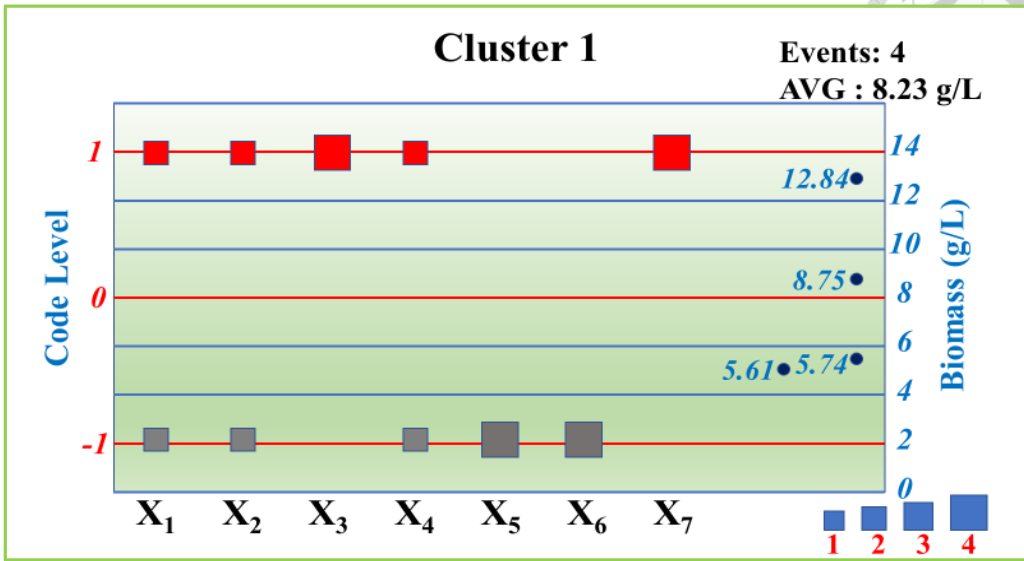
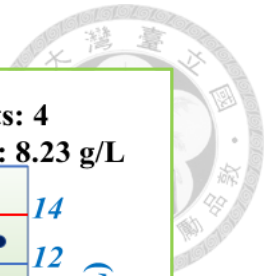
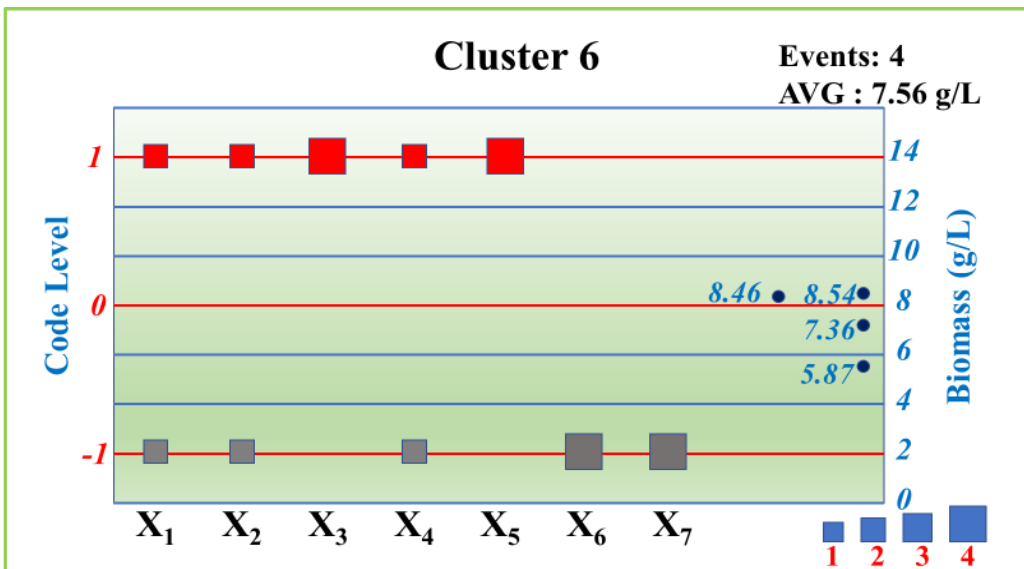
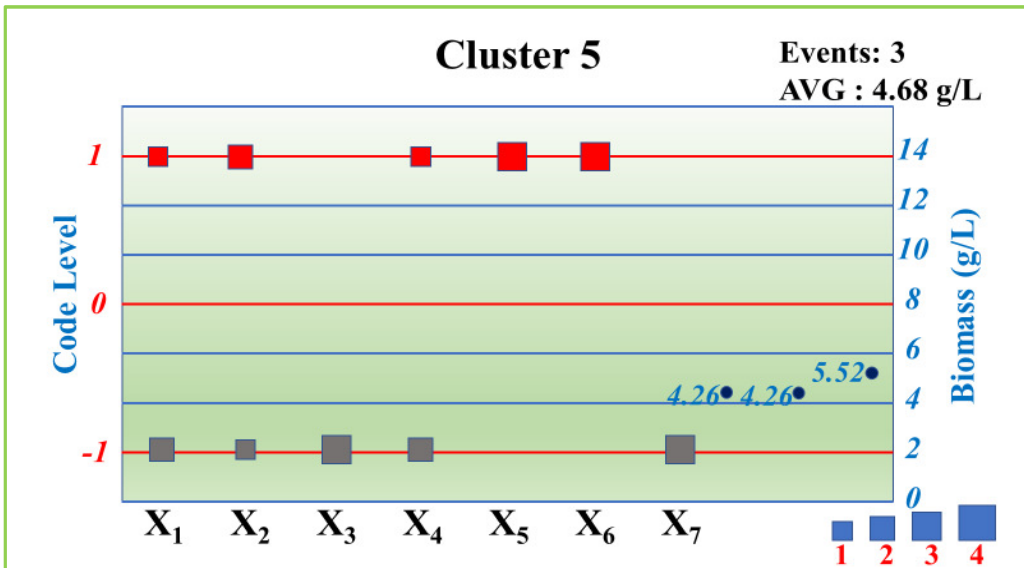
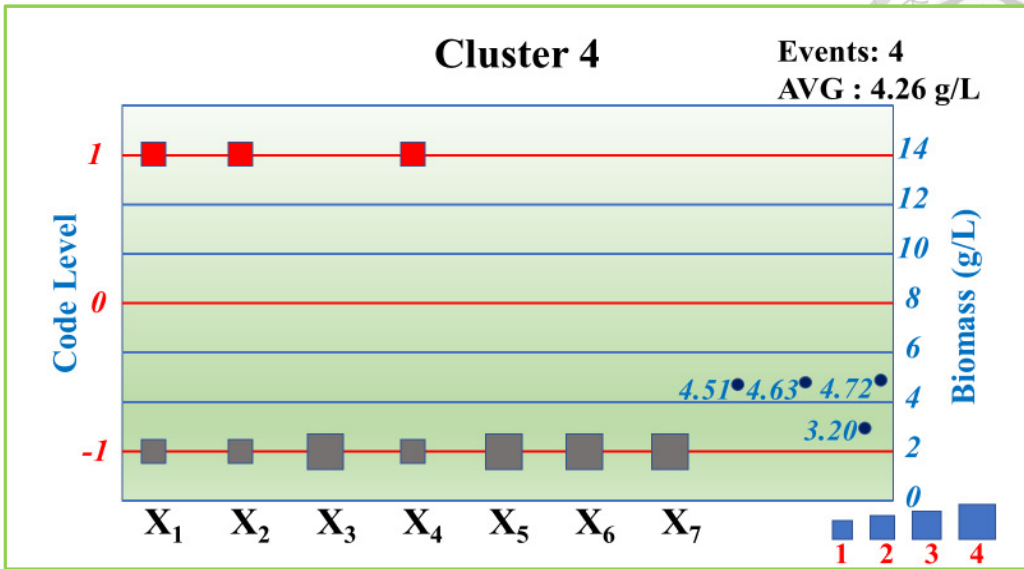
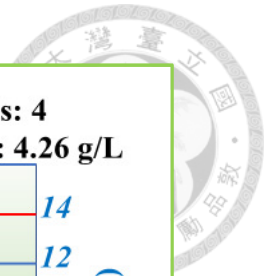


圖 5.1.3 栽培因子 X₁ - X₇ 聚類分析生物質量及神經元權重頻率結果





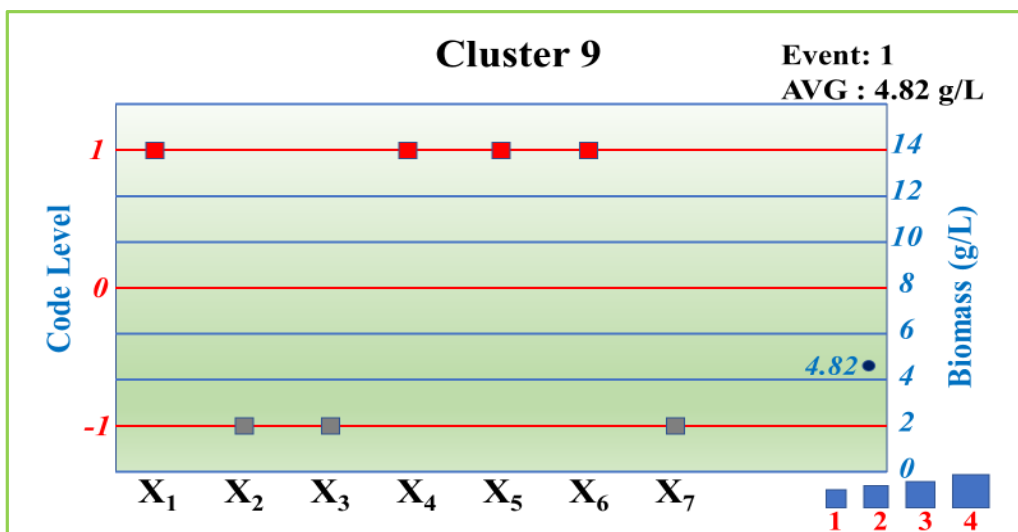
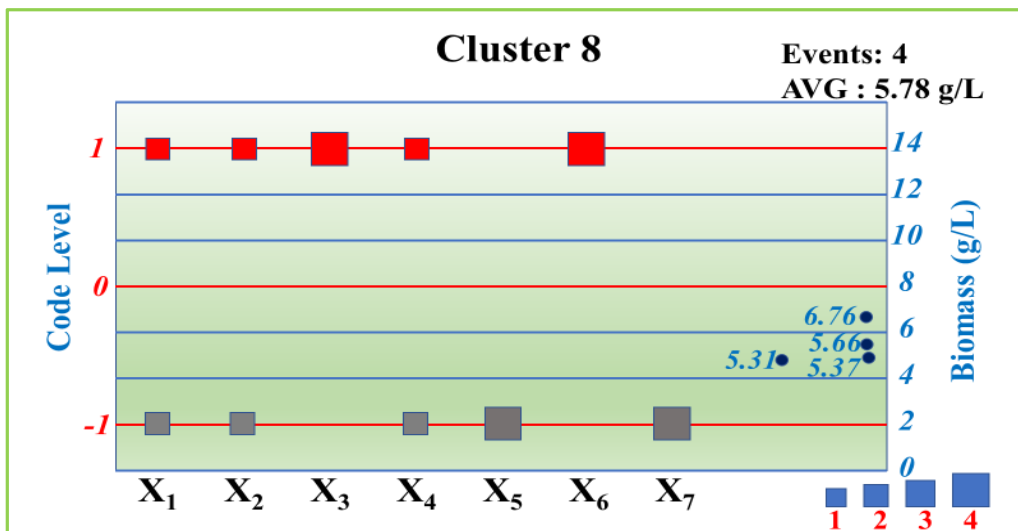
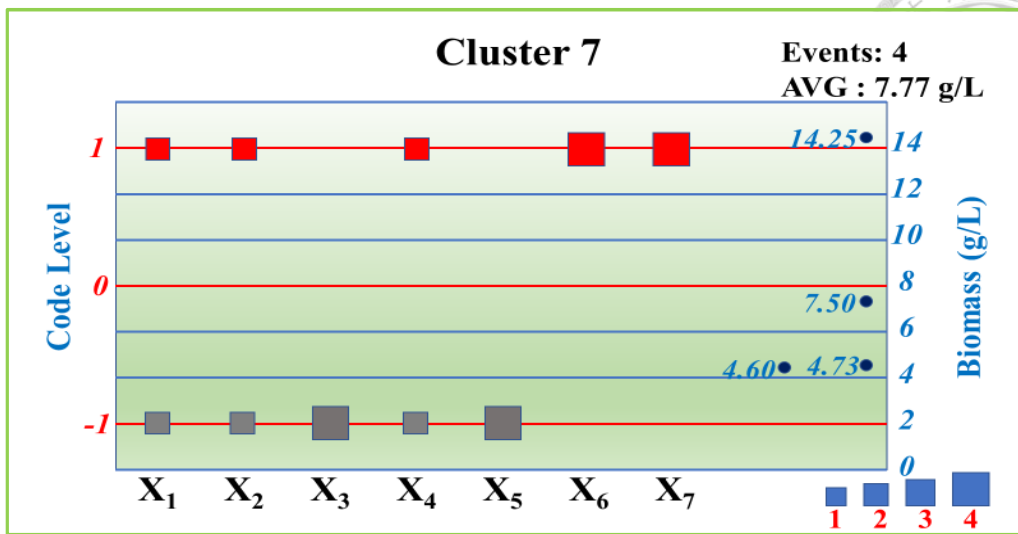


圖 5.1.4 SOM 網路各組聚類 X₁-X₇ 頻率分析及生物質量分佈圖



5.2 Plackett-Burman design (PBD) 法求得最適培養條件

本研究開發一種混合方法來最適化牛樟芝的生長條件。經過先前一系列單因子實驗，確定初始 pH 值、葡萄糖、馬鈴薯泥葡萄糖液態培養基(PDB)、樟木多糖(CC-PS)、樟腦、樟木(CC)水萃取物和洋菜是影響牛樟芝生長的潛在因素。使用 RSM 評估七個實驗因素與觀察到的生物質量之間的關係，並根據一次一個因子方法獲得的結果，為生物質量生產選擇了七個變因的級別變化的範圍。

在為七個變因中的每一個定義了變化範圍之後，每個級別變化值之間的關係可以簡單地從以下公式中獲得。

$$Z = \frac{(X-X^0)}{\Delta X} \quad (2)$$

其中 Z 是欲測試因子的範圍以+1 與-1 加以描述，X 為對應的反應值， X^0 是中心點； ΔX 為各因子變化的比例。

表 4.2.1 顯示了以+1 與-1 水準和自然單位表示的實驗變因和水準間距。表 4.2.1 描述了 2^{7-2} 部分因子設計和 PBD 法的結果。實驗包含變因 X_1 - X_7 和 32 組實驗變因的+1 與-1 兩部分因子設計和 PBD，以篩選被認為是潛在的因素，然後培養 7 天。在實驗設計中，測量了菌絲體的乾重（生物質量）。

根據+1 與-1 水準和對應的值，進行了 96 組的實驗。牛樟芝的菌絲生產數據以產量（培養 7 天的生物質量 (g/L)）表示。兩水平結果被視為部分因子設計實驗的一階回歸方程中 X_1 - X_7 的係數（表 5.2.1 曲面反應第一階段(T1)迴歸分析），以及每個變因的最陡上昇路徑的斜率（表 4.2.2）。SigmaPlot 11.0 的非線性回歸進行的回歸分析的 R^2 為 0.5155（表 5.2.1）。觀察值與篩選模型結果之間的相關性似乎非常顯著（p 值 < 0.05），代表反應（生物質量）與變因之間的實際關係是顯著的。變因 pH (X_1)、葡萄糖 (X_2)、PDB (X_3) 和洋菜 (X_7) 顯示 $p < 0.01$ 或 $p <$



0.001 的顯著性值，並被認為是以下最陡上昇路徑設計中的關鍵因素。考慮所有項目的迴歸方程式，無論其意義如何（以實際濃度值表示），如方程式 (3)。

$$Y = -5.7475 + 1.5886X_1 + 0.0366X_2 + 0.0701X_3 - 0.0822X_4 + 1.5935X_5 - 0.0124X_6 + 0.5459X_7 \quad (3)$$

其中 Y 是預測的菌絲體生物質量 (g/L)；變因 pH (X₁)、葡萄糖 (X₂)、PDB (X₃) 和洋菜 (X₇) 顯示 p < 0.01 或 p < 0.001 的顯著性值。如果 X₁ (pH) 增加一個單位，則生長質量應將增加 1.5886 g/L。同樣，如果 X₂ (葡萄糖濃度) 增加 1 個單位，則生長質量將增加 0.0366 g/L。如果 X₃ (PDB 的濃度) 增加 1 個單位，則生長質量將增加 0.0701 g/L。如果 X₇ (洋菜濃度) 增加 1 個單位，生長質量將增加 0.5459 g/L。

表 5.2.1 曲面反應第一階段(T1)迴歸分析

Coefficients	Estimate	Std. Error	t value	Probability	
(Intercept)	-5.7475	1.58745	-3.621	0.00049	***
X ₁	1.58864	0.21997	7.222	1.58E-10	***
X ₂	0.03658	0.01106	3.307	0.00136	**
X ₃	0.07014	0.02212	3.171	0.00208	**
X ₄	-0.0822	1.38267	-0.059	0.95274	
X ₅	1.5935	0.22123	0.72	0.4732	
X ₆	-0.0124	0.02212	-0.562	0.5753	
X ₇	0.54593	0.11061	4.935	3.65E-06	***

***: p < 0.001; **: p < 0.01; *: p < 0.05; R-Squared: 0.5155.

表 5.2.2 第二階段牛樟芝各栽培因子實驗濃度高低設計與實際濃度對照表及平均產量，資料中的非顯著因素包括 X₄ (樟樹多醣)、X₅ (樟腦) 和 X₆ (樟樹水萃取液)，它們在下一個最陡上昇路徑設計之前被捨棄。相比之下，X₁ (pH)、X₂ (葡萄糖)、X₃ (PDB) 和 X₇ (洋菜) 用於下一步陡升實驗變因。一般來說，較高的生物質量發酵取決於物種、培養基、培養溫度、pH、溶解氧和接種量。培養基中所需的碳水化合物通常會影響細胞的滲透作用，有助於維持細胞和組織的在培養基中的滲透壓，有助於細胞和組織的生長(Rout et al., 2000)。

表 5.2.2 第二階段(T2)牛樟芝各栽培因子濃度設計與產量

Independent variable		Code Value(level)					
		-2	-1	0	1	2	3
X ₁	pH 酸鹼度	3.1107	4.0553	5	5.9447	6.8893	7.834
X ₂	Glucose (g/ L) (葡萄糖)	19.13	19.56	20	20.44	20.87	21.32
X ₃	PDB (g/ L)	39.17	39.58	40	40.42	40.83	41.26
X ₄	CC polysaccharides (g/ L) (樟樹多醣)	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
X ₅	Camphor (g/ L) (樟腦)	1	1	1	1	1	1
X ₆	CC water extract (g/ L) (樟樹水萃取液)	20	20	20	20	20	20
X ₇	Agar (g/ L) (洋菜)	0.7	1.35	2	2.65	3.3	3.95
Average Yield (g/L)		3.22 ± 0.08	2.60 ± 0.08	5.31 ± 1.11	6.89 ± 0.37	7.77±0.93	5.84±0.83

Under the condition of 50 rpm, 28 °C for 7 days. (repeated 3 times).



5.3 陡升趨近法找尋最陡上升的方向

陡升趨近法是透過找尋最陡上升的方向，並將使各因子濃度趨近於極值點所在的範圍，直到頂點，在那個點進行的實驗不會有進一步的增加(Gheshlaghi et al., 2005)。該模型可用於不同階段實驗條件組合，7天後分析各階段菌絲產量(如表 5.2.2 所示)，以提高菌絲體生物質量的方向 ($Yield_{max}$ (Eq. (3)))。最陡上升的路徑可以使用 Eq. (3) 確定。

從回歸分析中，顯著性概率 $Prob > |T|$ 值顯示 X_1 (pH)、 X_2 (葡萄糖)、 X_7 (洋菜) 和 X_3 (PDB) 顯著影響生物質量，而 X_4 (CC-PS)、 X_6 (CC 水提取物) 和 X_5 (樟腦) 對生物質量沒有顯著影響(表 5.2.1)。因此，在 SAM 中使用對生物質量有相對顯著貢獻的 X_1 (pH)、 X_2 (葡萄糖)、 X_3 (PDB) 和 X_7 (洋菜)。因此，最陡上升路徑旨在將其他非顯著因素(在 95% 信賴區間不顯著)保持在 PBD 空間的中心點水準。SAM 用於估計一階近似的係數。在嘗試水準中， X_1 (pH)、 X_2 (葡萄糖)、 X_3 (PDB) 和 X_7 (洋菜) 分別增加了 0.94467、0.02175、0.04171 和 0.32463 個單位(表 4.2.2)。基於方程式 (3)、表 4.2.2 顯示變因不斷變化的方向。SAM 驗證當變因按照方程式系統地改變時，生物質量是如何以公式(3) 依預定的反應值遞增。最速上升實驗 (T2) 路徑(第二階)有六個實驗(表 5.2.2)。以下實驗組成基於補充表 3.2.2 中列出的 X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_7 的係數以特定的恆定速率增加。從表 4.2.2 可以得出，將 pH 值和葡萄糖、PDB 和洋菜的濃度增加兩個單位可以導致 Z 反應(生物質量)的最大增加(7.77 g/L)，因此該級別為用作 CCD 的星點來估計曲率。之後，生物質量減少(第三水平級別導致產量為 5.84 g/L)。它揭示了接近極值點所在範圍的每個因子的濃度在星點的兩個單位左右。本研究以此點(表 4.2.2 中+2 的級別)作為 CCD 的中心點。

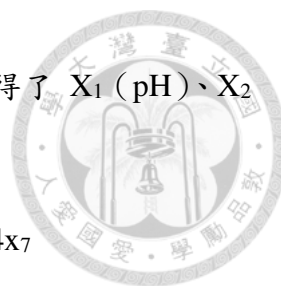


5.4 中央合成設計模式適當性

本實驗設計為中央合成設計用於分析生產牛樟芝的生物質量的變因（培養基成分和 pH 值）的濃度，以及探討生物質量與每個選定變因之間水準和相互作用實驗區域回歸方程。並依其中心點向條件方向移動，在最陡的路徑上產生最高的生長反應。中央合成設計以部分因子設計（帶有中心點）開始，並添加“星”點來估計曲率。 X_1 (pH)、 X_2 (葡萄糖)、 X_3 (PDB) 和 X_7 (洋菜) 濃度範圍，pH 值是根據 SAM 的結果，PDB 中採用的濃度範圍，未優化的濃度範圍確定(Box and Wilson, 1951)。所有其他因子 (X_4 (CC-PS)、 X_5 (樟腦) 和 X_6 (CC 水提取物)) 的濃度均保持在中心點水平。因此，制定了實驗設計，其中中心點沿條件方向移動，在最陡的路徑上給出最高的生長反應。超出初始區域的實驗區域被重新排列以在中央合成設計中進一步進行（表 5.4.1 第三階段牛樟芝各栽培因子實驗濃度高低設計與實際濃度對照表）。

本研究由 26 組的部分因子設計組成。評估二階係數以估計模型的 15 個係數。統計軟件 JMP 統計軟體 (SAS Institute Inc., USA) 用於執行 26 次部分因子設計，該設計包含四個變因 (X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_7)，在五個不同的級別上變化，即非常高 (+2)、高 (+1)、0、低 (-1) 和非常低 (-2)。設計中的 26 組試驗由 16 個立方 (因子) 點、2 個中心點仿行和 8 個軸向 (星形) 點組成。 X_1 (pH)、 X_2 (葡萄糖)、 X_3 (PDB)和 X_7 (洋菜)不同組合下，發酵 7 天後因子的不同水準和菌絲體產量見表 5.4.2 第三階段牛樟芝各栽培因子正規化實驗濃度所收穫生物質量乾重。

中央合成設計的實驗數據，使用包含二階回歸的多項式方程式 (方程式 (1)) 進行適當性測試，以確定每個變因的係數和 p 值 (表 5.4.3 第三階段結果二階回歸相關係數統計分析)。以水準值 (公式 (1)) 表示的最終回歸方程用的實際值 (公



式 (4)) 表示，因此預測 Y (培養 7 天后的生物質量)。並獲得了 X_1 (pH)、 X_2 (葡萄糖)、 X_3 (PDB) 和 X_7 (洋菜) 的值 (表 5.4.2)。

$$Y = -2698.3713 + 55.6831x_1 + 6.0232x_2 + 114.4838x_3 + 70.9194x_7 \\ -0.5696x_1x_2 - 0.7760x_1x_3 - 1.1495x_1x_4 - 1.1598x_2x_3 + 0.2945x_2x_7 - 1.4737x_3x_7 \\ -0.5716x_1^2 + 1.0578x_2^2 - 0.9827x_3^2 - 1.2911x_7^2 \quad (4)$$

其中 X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_7 分別表示四個測試變因 (即 pH、葡萄糖濃度、PDB 和洋菜)。

表 5.4.3 中的 p 值表示 X_1 (pH)、 X_3 (PDB) 和 X_7 (洋菜) 是影響 Y 值的關鍵因素，而 X_2 (葡萄糖) 對 Y 值沒有顯著影響。此外，相互作用 X_1 和 X_7 的重要性， X_3 和 X_7 的重要性類似。

以偏微分計算出部分因子的最大值。

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = a_1 + 2a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + a_{17}X_7 \quad (5.1)$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_2} = a_2 + a_{12}X_1 + 2a_{22}X_2 + a_{23}X_3 + a_{27}X_7 \quad (5.2)$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_3} = a_3 + a_{13}X_1 + a_{23}X_2 + 2a_{33}X_3 + a_{37}X_7 \quad (5.3)$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_7} = a_7 + a_{17}X_1 + a_{27}X_2 + a_{37}X_3 + 2a_{77}X_7 \quad (5.4)$$

理論上，在初始 pH (7.39)、葡萄糖 (20.83 g/L)、PDB (40.44 g/L) 和洋菜 (3.47 g/L) 時，菌絲體達到最大的生物質量。為了證明其適當性，用最佳培養基進行 3 次重複，平均生物質量為 9.70 g/L。最佳濃度及生物質量生產結果見圖 5.4.1 反應曲面法的最適化條件與對照組的條件生物質量乾重比較。

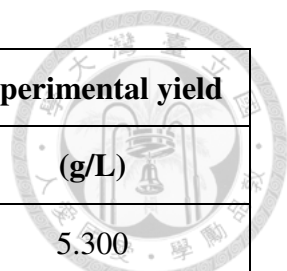
表 5.4.1 第三階段牛樟芝栽培因子 code level 與濃度對照表

Independent variable ^a		Code Value (levels)				
		-2	-1	0	1	2
X ₁	pH 酸鹼度	5	5.9447	6.8893	7.834	8.77867
X ₂	Glucose (g/ L) (葡萄糖)	20.000	20.440	20.870	21.320	21.755
X ₃	PDB (g/ L)	40.000	40.420	40.830	41.260	41.677
X ₇	Agar (g/ L) (洋菜)	2.000	2.650	3.300	3.950	4.599

^a Other media components were kept at center point of the PB design space.

表 5.4.2 第三階段牛樟芝栽培因子 code level 與生物質量乾重

Run ^a	pH	Glucose	PDB	Agar	Experimental yield
	Code levels				(g/L)
1	1	1	1	1	4.800
2	1	1	1	-1	5.907
3	1	1	-1	1	5.047
4	1	1	-1	-1	5.633
5	1	-1	1	1	5.540
6	1	-1	1	-1	7.847
7	1	-1	-1	1	8.400
8	1	-1	-1	-1	6.190
9	-1	1	1	1	9.213
10	-1	1	1	-1	5.117
11	-1	1	-1	1	8.443



Run ^a	pH	Glucose	PDB	Agar	Experimental yield (g/L)
	Code levels				
12	-1	1	-1	-1	5.300
13	-1	-1	1	1	7.033
14	-1	-1	1	-1	6.853
15	-1	-1	-1	1	8.753
16	-1	-1	-1	-1	5.290
17	2	0	0	0	8.050
18	-2	0	0	0	2.450
19	0	2	0	0	8.610
20	0	-2	0	0	7.603
21	0	0	2	0	7.030
22	0	0	-2	0	6.170
23	0	0	0	2	4.237
24	0	0	0	-2	5.980
25	0	0	0	0	10.110
26	0	0	0	0	5.340

^a Other media components were kept at center point of the PBD space.

表 5.4.3 第三階段結果二階迴歸相關係數統計分析

Independent variable	Coefficient estimate	t-value	p-value
a ₀	-2698.02	-0.6368	0.5265
a ₁	55.679	1.2854	0.2033
a ₂	6.015	0.0529	0.9580
a ₃	114.472	0.6654	0.5082
a ₇	70.919	1.1302	0.2627
a ₁₂	-0.57	-0.6317	0.5298
a ₁₃	-0.776	-0.8216	0.4144
a ₁₇	-1.15	-1.8834	0.0643
a ₂₃	-1.16	-0.5721	0.5693
a ₂₇	0.295	0.2248	0.8228
a ₃₇	-1.474	-1.0738	0.2870
a ₁₁	-0.572	-1.4230	0.1597
a ₂₂	1.058	0.5681	0.5720
a ₃₃	-0.983	-0.4819	0.6315
a ₇₇	-1.291	-1.5206	0.1334

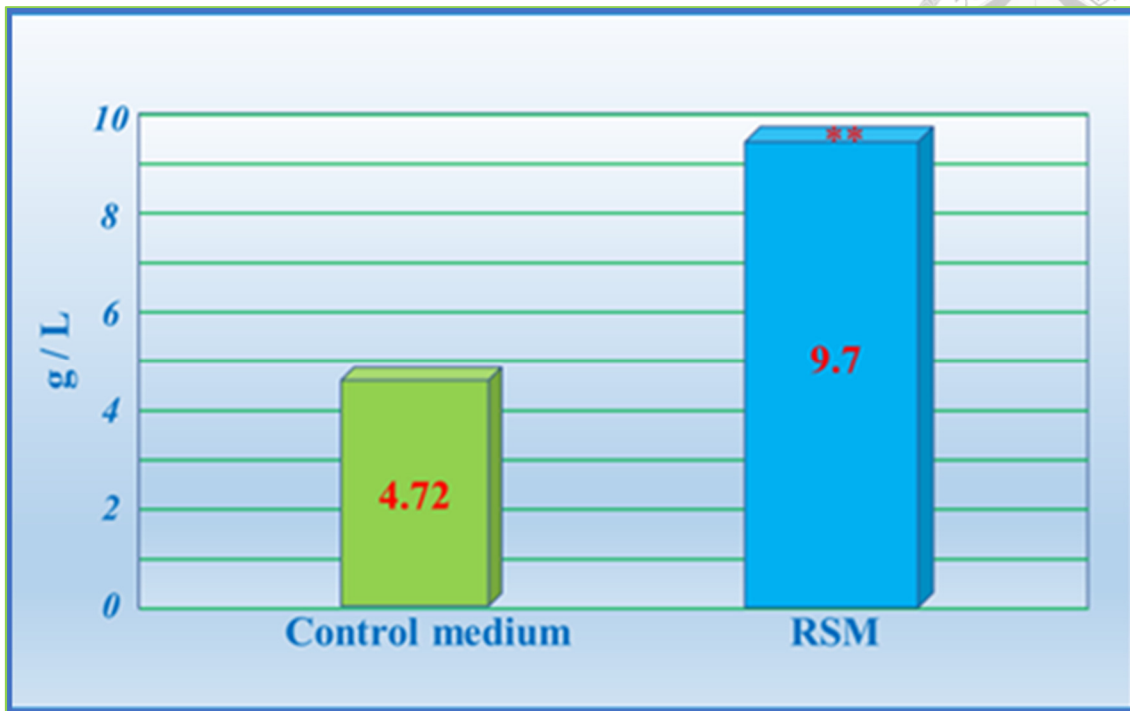


圖 5.4.1 反應曲面法的最佳條件與對照組生物質量乾重比較



5.5 以反應曲面法預測生物質量最大值

為證明 RSM 是否可以準確預測最佳生物質量生產的培養基條件。因此，RSM 設計預測的生物質量生產效能，以實驗的結果來驗證。使用位於最佳範圍 i 內的培養基組成（培養基 pH 值 7.39、葡萄糖 20.83 g/L、PDB 40.44 g/L、CC-PS 0.16 g/L、樟腦 1 g/L、20 g/L CC 水提取物和 3.47 g/L 洋菜），確認實驗的結果為 9.70 ± 0.60 g/L 的生物質量值 (Y) (圖 5.4.1)。RSM 的產量比對照培養基的產量 (4.72 ± 0.33 g/L) 高 200%，表示反應曲面分析確實是提高生物質量的有效工具。

在大多數真菌生物質研究中，相對較高的 C/N（碳氮）比有利於菌絲體生長 (Lin et al., 2007)，碳水化合物被認為是生物質量生產最重要的決定因子。據報導，單醣的有效性優於雙糖，葡萄糖濃度對牛樟芝菌絲體產生的影響最大 (Chen et al., 2019)。從這項研究中獲得的 RSM 和 SOM 結果都說明 PDB (X_3) 和洋菜 (X_7) 是比葡萄糖 (X_2) 更重要的碳源，其中碳源的選擇主要基於單醣和雙糖。根據這項研究，高生物質量值說明將碳水化合物 (PDB 和洋菜) 轉化為生物質量生產的有效性。因此，實驗進一步進行反應曲面分析，PDB 和洋菜對產量的交互影響。結果顯示 PDB 和洋菜之間的相互作用對產量很重要 (方程式 (4))。在這項研究中，pH 似乎對培養系統的影響很小。初始 pH 值設計為 5 至 8.77 (表 5.4.1)，最適 pH 值確定為 7.39。RSM 據報導還用於優化培養基組成，以提高牛樟芝的生物量生產力 (Yang et al., 2013)。此外，pH 在生物質量生產中具有關鍵的作用，以最佳初始 pH 值 5.54 與玉米粉 4.78 g/100 mL、酵母麥芽 3.19 g/100 mL 一起培養，可達到最大的生物質量 (Yang et al., 2003)。此 RSM 實驗中使用的不同真菌菌株和碳水化合物成分可能導致與本研究有不同的最佳初始 pH 值。



5.6 反應曲面法及類神經系統實驗驗證

從本研究中，發現從 RSM 獲得的牛樟芝最高生物質量生產的最佳培養條件為 pH 7.39、葡萄糖 20.83 g/L、PDB 40.44 g/L、CC-PS 0.16 g/L、1 g/L 樟腦、20 g/LCC 水萃取物和 3.47 g/L 洋菜。與對照培養基（起始點）一起比較，重複 3 次進行實驗。RSM 的生物質量值為 9.70 ± 0.60 g/L，而對照培養基的生物質量值為 4.72 ± 0.33 g/L（圖 5.4.1），表示 RSM 生產的生物質量增加了 200% 以上。這顯示與一次一個因素的測試相比，RSM 是一種更成功的統計設計，用於在小規模測試中優化多個因素。

進一步進行反應曲面分析，以檢查 PDB 和洋菜對產量的交互影響。幾項研究基於為 Yieldmax 建立的反應曲面模型（方程（1）、（2）和（4））表明了 X_3 （PDB）和 X_7 （洋菜）的範圍，並獲得了最佳操作條件。由於 pH (X_1)、葡萄糖 (X_2)、PDB (X_3) 和洋菜 (X_7) 的性能指標顯示它們是 RSM 的關鍵因素，因此揭示導致最佳整體能力的全局最優值將是非常有趣的生物質量生產的多因素系統。

根據 RSM，本研究進行 4 階段實驗（T1-T4），其中第一階段 96 個試驗（32 個條件，重複 3 次），第二階段 18 個試驗（6 個條件，重複 3 次），第三階段 78 個試驗（26 個條件，重複 3 次），第四階段 6 個試驗（2 個條件，重複 3 次）。值得注意的是，基於 RSM 第一階段結果（T1）的 SOM 結果指出， X_3 和 X_7 在牛樟芝生長中的優勢，RSM 也獲得相同的結果。ANN 以相當有效的方式確定生物質量生產的主導因素方面的適用性和實用性，這在支持 RSM 方面可能具有成本效益與節省時間的優勢。

綜上所提的 RSM 和 ANN 混合模型適用於將菌絲體生物質量與初始 pH、葡萄糖、PDB 和洋菜相關聯，基於計算的優化結果，可適用於液體培養過程，以提高牛樟芝的產量。



5.7 反應曲面第一階段(T1)栽培條件及菌絲體成分分析

目前三萜類被視為牛樟芝的主要活性成分 (Lu et al., 2013)。本研究自牛樟芝菌絲體甲醇萃取物中發現三種三萜類化合物，分別是 dehydrosulphurenic acid、15 α -acetyl-dehydrosulphurenic acid 及 dehydroeburicoic acid。這三種化合物是三萜類合成的重要中間產物，具有 31 個碳骨架，C-7、C-8、C-9 和 C-11 之間的雙鍵和一個 24-exo-methylene-21-油酸鏈結構。如圖 5.7.1 – 5.7.3 所示，為了測定牛樟芝菌絲體在 2⁷⁻² 部分因子設計中三萜類化合物的含量，使用高效液相層析系統進行分析三萜類化合物的含量。接著比較這些化合物在 2⁷⁻² 部分因子設計中培養菌絲體的三萜類化合物的含量差異，依表 5.1.2 SOM 網路各聚類樣本分佈詳細資料分析，三萜類含量與生物質量的關係詳如表 5.7.1 所示。

表 5.7.1 三萜類含量與生物質量關係

Triterpenoids	Contents	
	High triterpenoids content	
	Biomass high	Biomass low
15 α -Acetyl-dehydrosulphurenic acid	Sample 3、 Sample 9	Sample 13、 Sample 17 Sample 27
Dehydrosulphurenic acid	Sample 8、 Sample 32	Sample 24、 Sample 30 Sample 31
Dehydroeburicoic acid	Sample 5、 Sample 32	Sample 24、 Sample 31

由於不同培養基成分含量會影響牛樟芝吸收和降解的差異，而影響三萜類化合物的積累和含量。

牛樟芝菌絲體的三萜類化合物含量

15 α -Acetyl-dehydrosulphurenic acid 分離

牛樟芝 B85 在表 4.2.2 中 2⁷⁻² 部分因子實驗 32 個測試條件下在 28 °C 培養 7 天的菌絲體中提取甲醇提取物 0.1 g/ml 的 15 α -acetyl-dehydrosulphurenic acid

的含量。以高效液相層析系統分析，分離管柱 (Cosmosil 5C18-AR-II, 250 mm x 4.6 mm, Kyoto)，流洗液為由 A 和 B 組成的線性溶劑梯度系統 (A: 0.0085 % H₃PO₄ 水溶液; B: 100% 乙腈)，根據以下梯度：第 0 到第 65 分鐘以 70%-53% 的流洗液 A，及 30-47% 的流洗液 B，第 65 到第 110 分鐘，以 53% 的流洗液 A，及 47% 的流洗液 B，第 110 到第 140 分鐘，以 53-0% 的流洗液 A，及 47-100% 的流洗液 B，以 1.0 mL/min 的流速展開。標準品 15 α -acetyl-dehydrosulphurenic acid 出現在 127.42 分鐘。各樣品的 15 α -acetyl-dehydrosulphurenic acid 含量如表 5.7.1 牛樟芝分離出的 15 α -acetyl-dehydrosulphurenic acid 的含量。

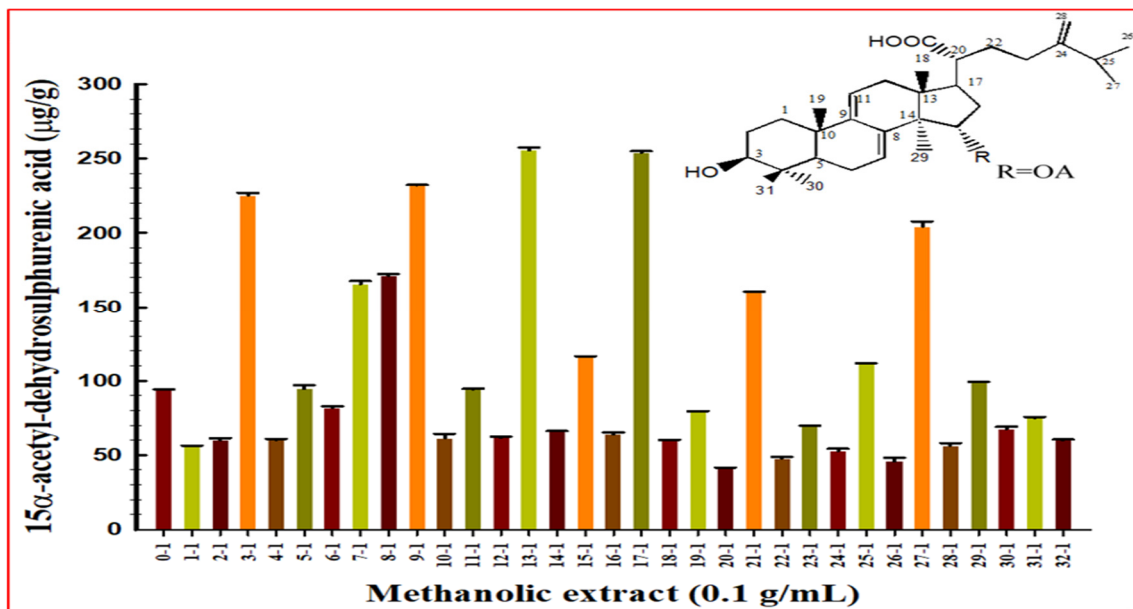


圖 5.7.1 牛樟芝菌絲體分離出的 15 α -acetyl-dehydrosulphurenic acid 含量
- Dehydrosulphurenic acid 分離

牛樟芝 B85 在表 4.2.2 中 2⁷⁻² 部分因子實驗的 32 個測試條件下在 28 °C 培養 7 天的菌絲體中提取甲醇提取物 0.1 g/ml 的 dehydrosulphurenic acid 的含量。

以高效液相層析系統分析，方法同上所示。標準品 dehydrosulphurenic acid 出現在 81.11 分鐘。各樣品的 dehydrosulphurenic acid 含量如表 5.7.2 牛樟芝分離出的 dehydrosulphurenic acid 的含量。

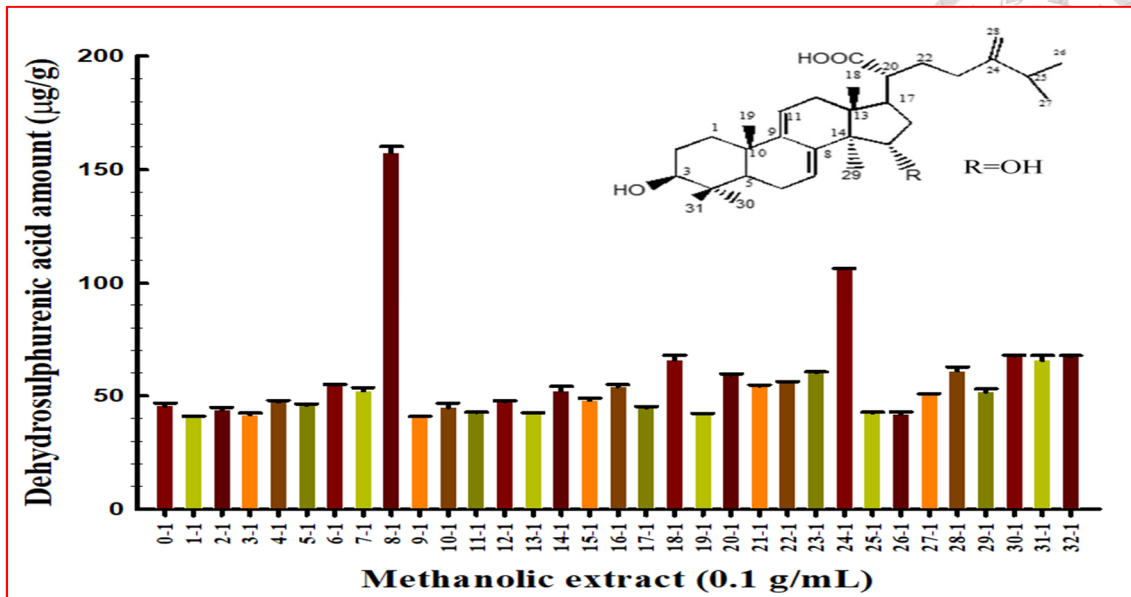


圖 5.7.2 從牛樟芝菌絲體分離出的 dehydrosulphurenic acid 含量

- dehydroeburicoic acid 分離

牛樟芝 B85 在表 4.2.2 中 2⁷⁻² 部分因子實驗的 32 個測試條件下在 28 °C 培養 7 天的菌絲體中提取甲醇提取物 0.1 g/ml 的 dehydroeburicoic acid 的含量。以高效液相層析系統分析,方法同上所示。標準品 dehydroeburicoic acid 出現在 139.17 分鐘。各樣品的 dehydroeburicoic acid 含量如表 5.7.2 牛樟芝分離出的 dehydroeburicoic acid 的含量。

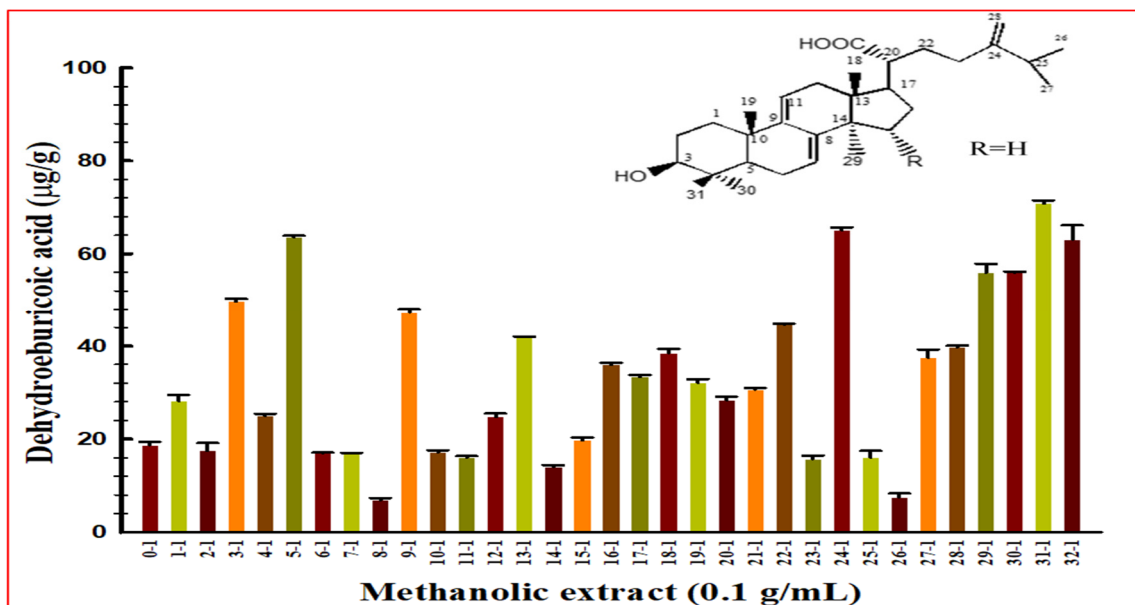


圖 5.7.3 從牛樟芝菌絲體分離出的 dehydroeburicoic acid 的含量。

六、討論




分別就反應曲面實驗結果與類神經網路所預測結果微細差異進行分析，及可能造成差異的原因。

本研究所採用的 Plackett-Burman 設計，以 32 個實驗設計組，探討 7 個變因，每一實驗設計組重複 3 次，共計 96 個實驗，培養 7 天後各實驗組的菌絲乾重如表 4.2.2 所示。將表 4.2.2 的數據以軟體 JAM statistical software package 的 Plackett-Burman 設計模式，進行一階模式的回歸分析。發現 X_1 (pH)、 X_2 (葡萄糖)、 X_3 (PDB) 和 X_7 (洋菜) 四個因子對產量達到顯著水準 (* $p < 0.05$)。

將 X_1 (pH)、 X_2 (葡萄糖)、 X_3 (PDB) 和 X_7 (洋菜) 四個顯著因子應用為下一步陡升實驗變因。一般來說，較高的生物質量發酵取決於物種、培養基(Bittar et al., 2021)、培養溫度、pH、溶解氧和接種量(Bellincampi & Morpurgo, 1987)。培養基中所需的碳水化合物通常會影響細胞的滲透作用(Gumral et al., 2015)，有助於維持細胞和組織在培養基中的滲透壓，有助於細胞和組織的生長 (Rout et al., 2000)。

本次所採用 2^{7-2} 部分因子設計，在實驗設計上的目的，為求取各因子的主效應。依此可以得到六個實驗設計組，探討四個因子對目標產量的影響。每一實驗設計組重複 3 次，共計 18 個實驗，經培養 7 天後各實驗組的菌絲乾重如表 5.2.2 所示。將表 5.2.2 的數據以軟體 JAM statistical software package 的 2^{7-2} 部分因子設計模式，進行一階模式的迴歸分析。在 SAM 中使用了對生物質量有相對顯著貢獻的 X_1 (pH)、 X_2 (葡萄糖)、 X_3 (PDB) 和 X_7 (洋菜) 估計一階近似的係數。在嘗試水準中， X_1 (pH)、 X_2 (葡萄糖)、 X_3 (PDB) 和 X_7 (洋菜) 分別增加 0.94467、0.02175、0.04171 和 0.32463 個單位 (表 4.2.3)。基於方程式 (3)、表 4.2.3 顯示變因不斷變化的方向。在最適化過程中，陡升路徑法是一個如何使實驗因子的階層，逐漸接近極值點的關鍵技術。陡升路徑是以上一次因子設計的中心點為原點，以回歸分析



而得的各因子係數，來決定方向，再依其比值來設定固定距離，而由此中心點逐次向外延伸。在某點的反應值之後不再上升，此實驗點即為下次實驗的中心點。表 4.2.3 為陡升路徑法的結果。以上一期實驗的中心點為 Central point，Unit 為各因子每階層的濃度或值的差距，New step coeff. 為各因子的斜率，以 Unit 及 New step coeff. 的乘機為 New step。此 New step 決定各因子的增減比例。由結果得知最高的產率位於 Step 2，等於 7.77 g/L。故以其培養基組成 pH 6.8893，agar 3.3 g/L，Glucose 20.87 g/L，PDB 40.83 g/L，CC water extract 20 g/L，CC PS 0.16 g/L，camphore 1 g/L 作為下次實驗的中心點。

本實驗(T4)採中心混成設計，由 X_1 (pH)、 X_2 (葡萄糖)、 X_7 (洋菜) 和 X_3 (PDB)，作為本實驗的四個因子。以 X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_7 表示，並將其正規化為 -2、-1、0、1、2 五個階層，其範圍以表 5.4.1 所示。本實驗(T4)採 26 個實驗組，每一實驗設計組重複 3 次，共計 78 個實驗，培養 7 天後各實驗組的菌絲乾重如表 5.4.2 所示。將表 5.4.2 的數據以軟體 SigmaPlot 11.0，進行二階模式的回歸分析。結果如表 5.4.3 所示。由表 5.4.3 可以發現 X_1 (pH)、 X_3 (PDB) 和 X_7 (agar) 對產量有重要影響， X_2 (glucose) 對產量並無影響。以偏微分計算出部分因子的最大值。得到 pH (7.39)、葡萄糖 (20.83 g/L)、PDB (40.44 g/L) 和洋菜 (3.47 g/L)。由表 5.4.3 可以發現各因子的線性向係數都為正值，標示增加各因子的值或營養濃度，將提升牛樟芝的產率。但也發現除了 X_2 以外所有因子的交互作用及各因子的平方係數都為負值，表示如果過量增加 pH 值或營養濃度會抑制牛樟芝的產率。

因數據量化原因，本研究目前只將生物質量重量列為最佳化研究指標，尚無法將品質指標如藥效成份列入類神經網路最佳化因子探討，未來，思考如何量化品質指標在最佳化的栽培環境能培養出高品質的藥用真菌。


七、結論

本研究開發了一種整合 ANN 和 RSM 的混合方法，來優化牛樟芝的培養條件，其中 ANN 用於有效識別生物質量生產的主導因素，RSM 用於探索過程反應的最佳條件。

應用類神經網路的 SOM 聚類分析(clustering analysis) RSM 第一階段結果(T1) 表示 PDB 和洋菜是牛樟芝皿式培養所需的主導因素。在 28°C 的 7 天內，在 RSM 條件下觀察到最大產量為 9.70 g/L (與對照培養基相比，生物量增加了 200%)，這比文獻中記錄的報告要好。結果表示，實驗設計的統計方法在提高產量方面是有效的。此外，PDB 和洋菜及其相互作用是影響生物質量生產的關鍵因素，符合類神經網路 SOM 的聚類分析結果。

本研究中建立的混合 (Hybrid) 類神經網路系統 (ANN) 和 RSM 方法可以在培養中獲得有利的碳水化合物組成和 pH 值，從而顯著提高生物質量的產量。這些發現肯定將有助於開發一種商業上可行的方法，以經濟的方式生產其他生物材料的生物質量，同時也將機器學習的方法，整合至藥用真菌及發酵的研究，未來在栽培最佳化條件的研究能夠更有效率節省研究時間及成本。

八、未來發展建議



本研究開發一種整合 ANN 和 RSM 的混合方法，來優化牛樟芝的培養條件，其中 ANN 用於有效識別生物質量生產的主導因素，RSM 用於探索過程反應的最佳條件。目前的研究已廣泛使用反應曲面法 RSM 和 ANN 工具來提高生產階段的效率。中心混成設計和 Box-Behnken 設計等 RSM 工具最常用於尋找最佳條件，以在發酵過程中提高產量。為了求取得成功，正確選擇因子及其水平是必需的，這可以以部分因子設計和 Plackett Burman 設計來完成。當評估超過五個因子時，Plackett-Burman 設計是最適切的。此外值得注意的是當使用 CCD 或 Plackett-Burman 設計產生的二階多項式模型，來預測其它未研究條件下的反應時，需要對數據進行正確的統計分析。最終需獲得簡化的數學模型，來預測反應，並進行最佳條件的實驗驗證，來評估數學模型的預測能力。

本實驗利用 Plackett-Burman design (PBD) 法及 2^{7-2} 部分因子設計求得最適培養條件，篩選出 pH (X_1)、葡萄糖 (X_2)、PDB (X_3) 和洋菜 (X_7) 四種因子，為顯著的影響因子，再以四因子五個水準中心混成設計，找出培養牛樟芝的最適化條件，並探討因子間的交互作用。結果顯示極值點所位於之最佳培養條件為 pH (7.39)、葡萄糖 (20.83 g/L)、PDB (40.44 g/L)、CC-PS (0.16 g/L)、樟腦 (1 g/L)、CC 水提取物 (20 g/L) 和洋菜 (3.47 g/L)。用最佳培養基進行 3 次重複，實際生物質量為 9.70 g/L。

以反應曲面法和人工神經網絡來尋找牛樟芝的最適化條件，是一個很新的嘗試。基於人工神經網絡的 RSM 第一階段結果的 SOM 聚類分析 (clustering analysis) 顯示 PDB 和洋菜是所需的主要因素。在 28°C 的 7 天內，在 RSM 條件下觀察到最大產量為 9.70 g/L (與對照培養基相比，生物量增加 200%)。結果

表示，實驗設計的統計方法在提高產量方面是有效的。此外，PDB 和洋菜及其相互作用是影響生物質量生產的關鍵因素，符合 SOM 結果。

本研究中建立的混合 ANN 和 RSM 方法可以在培養中獲得有利的碳水化合物組成和 pH 值，從而顯著提高生物質量的產量。因此在發酵培養時對於起始 pH 值和碳水化合物二個因素進行探討。本實驗主要針對碳源及培養基 pH 值對生物質量的累積作探討。未來建議可進行以添加營養物質或藥效成分的前驅化合物，對牛樟芝的二次代謝物的累積的研究。

這些發現肯定將有助於開發一種商業上可行的方法，以經濟的方式生產其他生物材料的生物質量。作為經典建模的替代方案，自反應曲面結合神經網絡的學習技術實驗設計，可用於建模依賴關係。這種方法在數據中，對傳統 RSM 的學習和預測表現出優越的準確性。

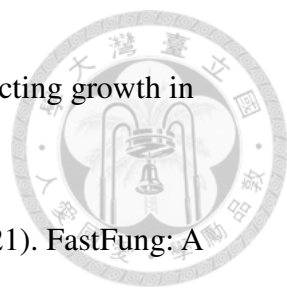
本研究應用類神經網路的自組映射網路，對牛樟芝的栽培因子進行分類，並藉此判別何者為提高牛樟芝生物質量(Biomass)的重要栽培因子。經由反應曲面法進行實驗設計，藉由獨立變數(調控栽培因子)與反應變數(牛樟芝生物質量)建立數學模型，推導系統最佳化條件，透過模型推導大幅縮減實驗次數節省實驗時間及成本，可廣泛應用於農業、化學工業、生物科技及食品科學製程改善。

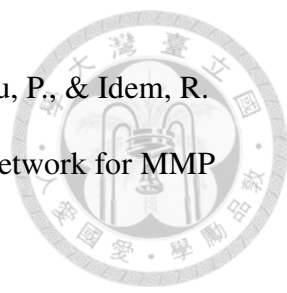
藉由曲面反應法及類神經網路的混合研究，對牛樟芝的研究能在科學上或醫療上有重大的進展，目前在文獻上已發表的相當多有關牛樟芝具潛力發展的化合物，這些資料都可作為牛樟芝未來的研究目標(reference)。

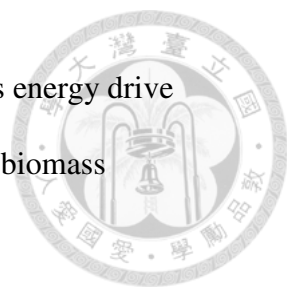
九、參考文獻

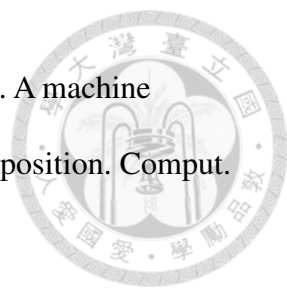


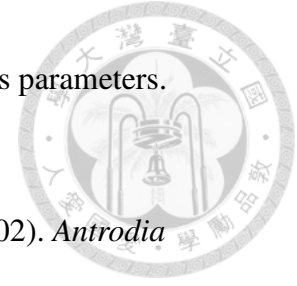
1. Adeloeye, A., Rustum, R., & Kariyama, I. (2012). Neural computing modeling of the reference crop evapotranspiration. *Software*, 29, 61-73.
2. AL-Saeedi, B., & Luti, K. (2018). Bacteriocin from *Streptococcus salivarius* optimized statistically by response surface methodology active against different clinical oral pathogenic Streptococci. *Iraqi J. of Sci.* 59, 463-475.
3. Aly, E., Elsayah, S., & Ryan, M. J. (2022). A review and catalogue to the use of models in enabling the achievement of sustainable development goals (SDG). *J. Cleaner Prod.* 340, 130803.
4. Baruah, D., Baruah, D.C., & Hazarika, M.K. (2017). Artificial neural network based modeling of biomass gasification in fixed bed downdraft gasifiers. *Biomass Bioener.* 98, 264-271.
5. Bittar, F., Gouriet, F., Khelaifia, S., Raoult, D., Ranque, S. (2021). FastFung: A novel medium for the culture and isolation of fastidious fungal species from clinical samples. *J. Microb. Methods*, 180, 106108.
6. Box, G., & Wilson, K. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Royal Stat. Soc. Series A (General)*, 13, 1-45.
7. Box, G., Behnken, D. (1960) Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2, 455-475.
8. Bardhan, P., Baruah, J., BhagyaRaj, G., Kalita, E., Mandal, M. (2021) Optimization of culture conditions for biomass and lipid production by oleaginous fungus *Penicillium citrinum* PKB20 using response surface methodology (RSM). *Biocat. Agri. Biotechnol.* 37, 102169.

- 
9. Bellincampi, D., Morpurgo, G. (1987) Conditioning factor affecting growth in plant cells in culture. *Pl. Sci.* 51, 83-91.
 10. Bittar, F., Gouriet, F., Khelaifia, S., Raoult, D., Ranque, S. (2021). FastFung: A novel medium for the culture and isolation of fastidious fungal species from clinical samples. *J. Microb. Methods*, 180, 106108.
 11. Breig, S. J .M., & Luti, K. J. K. (2021). Response surface methodology: A review on its applications and challenges in microbial cultures. *Mat. Today: Proceed.* 42, 2277–2284.
 12. Canter, P., Thomas, H., Ernst, E. (2005). Bring medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trend Biotechnol.* 23, 180-185.
 13. Chan, M. Z. A., Chua, J. Y., Toh, M. Z., & Liu, S. Q. (2019). Survival of probiotic strain *Lactobacillus paracasei* L26 during co-fermentation with *S. cerevisiae* for the development of a novel beer beverage. *Food Microbiol.* 82, 541-550.
 14. Chang, L., Chang, F., Yang, S., Tsai, F., Chang, T., & Herricks, E. (2020). Self-organizing maps of typhoon tracks allow for flood forecasts up to two days in advance. *Nat. Commun.* 11, 1-13.
 15. Chang, L., Wang, W., & Chang, F. (2021). Explore training self-organizing map methods for clustering high-dimensional flood inundation maps. *J. Hydrol.* 595, 125655.
 16. Chao, C., Wu, H., & Lu, M. (2011). Promotion of fungal growth and underlying physiochemical changes of polysaccharides in *Rigidoporus ulmarius*, an edible Basidiomycete mushroom. *Carbohydr. Polym.* 85, 609-614.


- 
17. Chen, G., Fu, K., Liang, Z., Sema, T., Li, C., Tontiwachwuthiku, P., & Idem, R. (2014). The genetic algorithm based back propagation neural network for MMP prediction in CO₂-EOR process. *Fuel*. 126, 202-212.
 18. Chen, I., Chang, L., & Chang, F. (2018). Exploring the spatio-temporal interrelation between groundwater and surface water by using the self-organizing maps. *J. Hydrol.* 556, 131-142.
 19. Chen, L., Wang, Z., Zhang, B., Ge, M., Ng, H., Niu, Y., & Liu, L. (2019). Production, structure and morphology of exopolysaccharides yielded by submerged fermentation of *Antrodia cinnamomea*. *Carbohydr. Polym.* 205 , 271-278.
 20. Chen, Y. T., Shen, Y. C., Chang, M. C. & Lu, M. K. (2016). Precursor-feeding strategy on the triterpenoid production and anti-inflammatory activity of *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochem.* 51, 941-949.
 21. Chiang, C., Chiang, B. (2013). Processing characteristics of submerged fermentation of *Antrodia cinnamomea* in airlift bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 73, 65-71.
 22. Dahunsi, S., Oranusi, S., & Efevbokhan, V. (2017). Pretreatment optimization, process control, mass and energy balances and economics of anaerobic co-digestion of *Arachis hypogaea* (Peanut) hull and poultry manure. *Bioresour. Technol.* 241, 454-464.
 23. Dave, N., Varadavenkatesan, T., Selvaraj, R., & Vinayagam, R. (2021). Modelling of fermentative bioethanol production from indigenous *Ulva prolifera* biomass by *Saccharomyces cerevisiae* NFCCI1248 using an integrated ANN-GA approach. *Sci. Total Environ.* 791, 148429.


- 
24. Destek, M., Sarkodie, S., & Esamoah, A. (2021). Does biomass energy drive environmental sustainability? An SDG perspective for top five biomass consuming countries. *Biomass Bioener.* 149, 106076.
25. Gheshlaghi, R., Scharer, J., Moo-Young, M., & Douglas, P. (2005). Medium optimization for hen egg white lysozyme production by recombinant *Aspergillus niger* using statistical methods, *Biotechnol. Bioeng.* 90 ,754-760.
26. Ghosh, P. & Mukherji, S. (2018). Optimization of media composition for enhancing carbazole degradation by *Pseudomonas aeruginosa* RS1. *J. Environ. Chem. Eng.* 6, 2881-2891.
27. Gong, P., Wang, S., Liu, M., Chen, F., Yang, W., Chang, X., Liu, N., Zhao, Y., Wang, J., & Chen, X. (2020). Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides: A mini-review. *Carbohydr. Res.* 494, 108037.
28. Hassan, N., Supramani, S., Sohedein, M., Usuldin, S., Klaus, A., Ilham, Z., Chen, W., & Wan-Mohtar, W. (2019). Efficient biomass-exopolysaccharide production from an identified wild-Serbian *Ganoderma lucidum* strain BGF4A1 mycelium in a controlled submerged fermentation. *Biocatal. Agri. Biotechnol.* 21, 101305.
29. Hsu, F., Chen, H., & Lu, M. (2016). Polysaccharides from *Cunninghamia konishii* promote the mycelial growth of *Antrodia cinnamomea*. *Food Hydrocoll.* 53, 2-6.
30. Hsu, F., Chou, C., Chang, Y., Chang, T. & Lu, M. (2006). Promotion of hyphal growth and underlying chemical changes in *Antrodia cinnamomea* by host factors from *Cinnamomum cinnamomea*. *Intl. J. Food Microbiol.* 106, 32-38.

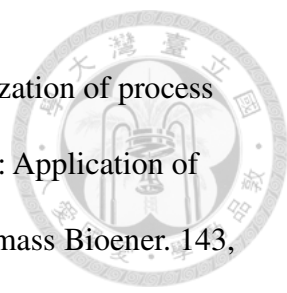
- 
31. Huang, D. P., Fuhg, J. N., Weißenfels, C. & Wriggers, P. (2020). A machine learning based plasticity model using proper orthogonal decomposition. *Comput. Methods Appl. Mech. Engrg.* 365, 113008.
32. Huang, N. K., Cheng, J. J., Lai, W. L., & Lu, M. K. (2005). *Antrodia camphorata* prevents rat pheochromocytoma cells from serum deprivation-induced apoptosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 244, 213-219.
33. Huang, N., Cheng, J., Lai, W., & Lu, W. (2005). *Antrodia camphorata* prevents rat pheochromocytoma cells from serum deprivation-induced apoptosis, *FEMS Microbiol. Lett.* 244, 213-219.
34. Jin, Y., Liu, H., Liu, J., Xing, H., Wang, F. & Deng, L. (2021). Efficient production of 4-Acetylanthroquinonol B from *Antrodia cinnamomea* through two-stage carbon source coordination optimization, *Bioresour. Technol. Rep.* 15, 100732.
35. Kirsi-Marja, O., & Dirk, I. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.* 9, 433-440.
36. Kohonen, T (1982). Self-organized formation of topologically correct feature maps. *Biol. Cybernet.* 43, 59-69.
37. Kow, P., Wang, Y., Zhou, Y., Kao, I., Issermann, M., Chang, L., & Chang, F. (2020). Seamless integration of convolutional and back-propagation neural networks for regional multi-step-ahead PM_{2.5} forecasting. *J. Cleaner Prod.* 261, 121285.
38. Kumar, N., Rajarathinam, M., Muthuvelu, K., & Senniyappan, T. (2018). New insight into the effect of fungal mycelia present in the bio-pretreated paddy straw




- on their enzymatic saccharification and optimization of process parameters. *Bioresour. Technol.* 267, 291-302.
39. Lee, I., Huang, R., Chen, C., Chen, H., Hsu, W., & Lu, M. (2002). *Antrodia camphorata* polysaccharide exhibits anti-hepatitis B virus effects, *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 63-67.
40. Lee, J., Jung, W., Park, S., Lee, K., Shin, W., & Hong, E. (2013). Culture conditions and medium components for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides with *Paecilomyces japonica* in liquid culture. *J. Biosci. Bioeng.* 115, 433-437.
41. Lee, K., Zamil, M., Chan, K., Chin, Z., Liu, Y., & Lim, S. (2020). Synergistic ultrasound-assisted organosolv pretreatment of oil palm empty fruit bunches for enhanced enzymatic saccharification: An optimization study using artificial neural networks. *Biomass Bioener.* 139, 105621.
42. Lee, M. H., Lu, W. B., Lu, M. K., & Chang, F. J. (2022). A hybrid of response surface methodology and artificial neural network in optimization of culture conditions of mycelia growth of *Antrodia cinnamomea*. *Biomass Bioenergy.* 158, 106349.
43. Lin, E., & Chen, Y. (2007). Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media. *Bioresour. Technol.* 98, 2511-2517.
44. Lin, T., Chang, C., Tseng, A., Chao, C., & Lu, M. (2019) Sodium thiosulfate enhances production of polysaccharides and anticancer activities of sulfated polysaccharides in *Antrodia cinnamomea*. *Carbohydr. Polym.* 216, 204-212.

- 
45. Lin, T., Tseng, A., Chao, C., & Lu, M. (2018). Microelements induce changes in characterization of sulfated polysaccharides from *Antrodia cinnamomea*. Intl. J. Biol. Macromol. 120, 952-958.
46. Long, H., Hu, C., & Weng, C. (2019). *Antrodia cinnamomea* prolongs survival in a patient with small cell lung cancer. Medicina, 55, 640.
47. Lu, M. C., El-Shazly, M., Wu, T. Y., Du, Y. C., Chang, T. T., Chen, C. F., Hsu, Y. M., Lai, K. H., Chiu, C. P., Chang, F. R., & Wu, Y. C. (2013). Recent research and development of *Antrodia cinnamomea*. Pharmacol. Therapeu. 139, 124-156.
48. Lu, M. K., Cheng, J. J., Lai, W. L., Lin, Y. R. & Huang, N. K. (2008). Fermented *Antrodia cinnamomea* extract prevents rat PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis: the role of the MAPK family. J. Agri. Food Chem. 56, 865-874.
49. Lu, M., Lee, M., Chao, C., & Hsu, Y. (2020). Physiochemical changes and mechanisms of anti-inflammation effect of sulfated polysaccharides from ammonium sulfate feeding of *Antrodia cinnamomea*. Intl. J. Biol. Macromol. 148, 715-721.
50. Lu, M., Lin, T., & Chang, C. (2018). Chemical identification of a sulfated glucan from *Antrodia cinnamomea* and its anti-cancer functions via inhibition of EGFR and mTOR activity. Carbohydr. Polym. 202, 536-544.
51. Ma, J., Yu, M. K., Fong, S., Ono, K., Sage, E., Demchak, B., Sharan, R., & Ideker, T. (2018). Using deep learning to model the hierarchical structure and function of a cell. Nature Methods. 15(4), 290-298.

- 
52. Ma, T., La, Y., Chen, L. & Yang, F. (2016). The cultivation strategy of enhancing triterpenoid production in submerged cultures of *Antrodia cinnamomea* by adding monoterpenes. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 58, 210-218.
53. Marichamy, S., Stalin, B., Ravichandran, M., Sudha, G. (2020) Optimization of system and piezoelectric effect on PZT crystal. *Mat. Today: Proceed.* 24, 1400-1409.
54. Mohammed, S., Kadhum, K., Hameed, K., (2018). Classical and statistical optimization of medium composition for promoting prodigiosin produced by local isolate of *Serratia marcescens*. *Al-Khwarizmi Eng. J.* 14, 92-102.
55. Mohapatra, S., Dandapat, S. J., Thatoi, H. (2017) Physicochemical characterization, modelling and optimization of ultrasono-assisted acid pretreatment of two *Pennisetum sp.* using Taguchi and artificial neural networking for enhanced delignification. *J. Env. Mang.* 187, 537-549.
56. Naresh, K., Ravikumar, R., Kirupa, S., & Thenmozhi, S. (2018). New insight into the effect of fungal mycelia present in the bio-pretreated paddy straw on their enzymatic saccharification and optimization of process parameters. *Bioresour. Technol.* 267, 291-302.
57. Obafemi, O., Stephen, A., Ajayi, O., & Nkosinathi, M. (2019). A survey of artificial neural network-based prediction models for thermal properties of biomass. *Procedia Manufact.* 33 , 184-191.
58. Özçelik, R., Diamantopoulou, M., Eker, M., & Gürlevik, N. (2017). Artificial neural network models: an alternative approach for reliable aboveground pine tree biomass prediction. *Forest Sci.* 63, 291-302.

- 
59. Ozonoh, M., Oboirien, B.O., & Daramol, M.O. (2020). Optimization of process variables during torrefaction of coal/biomass/waste tyre blends: Application of artificial neural network & response surface methodology. *Biomass Bioener.* 143, 105808.
60. Ozonoh, M., Oboirien, B.O., & Daramol, M.O. (2020). Optimization of process variables during torrefaction of coal/biomass/ waste type blends: Application of artificial neural network & response surface methodology. *Biomass Bioener.* 143, 105808.
61. Perez-Esteban, N., Vinardell, S., Vidal-Antich, C., Peña-Picola, S., Chimenos, J.M., Peces, M., Dosta, J. & Astals, S. (2022). Potential of anaerobic co-fermentation in wastewater treatments plants: A review. *Sci. Total Environ.* 813, 152498.
62. Pomeroy, B., Grilc, M., & Likozar, B. (2022). Artificial neural networks for bio-based chemical production or biorefining: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 153, 111748.
63. Prakash, M., Sivakumar, V., Sridhar, R., & Prince, I. (2013). Development of model for mechanical properties of tapioca starch based films. *Ind. Crops Prod.* 42, 159-168.
64. Ramirez, J., Santos, I., Morales, O., Morrissey, M., Vazquez. (2000). Application of microbial transglutaminase to improve mechanical properties of surimi from silver carp. *Food*, 3, 21-28.
65. Rout,S., & Das, S. (2000). In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnol. Adv.* 18 ,91-120.

- 
66. Sakiewicz, P., Piotrowski, K., Ober, J., & Karwot, J. (2020). Innovative artificial neural network approach for integrated biogas – wastewater treatment system modelling: Effect of plant operating parameters on process intensification. *Renew. Sust. Energy Rev.* 124, 109784.
67. Sebayang, A. H., Masjuki, H. H., Ong, H. C., Dharma, S., Kusumo, F., & Milano, J. (2017). Optimization of bioethanol production from sorghum grains using artificial neural networks integrated with ant colony. *Ind. Crops Prod.* 97, 146-155.
68. Senthivelan, T., Kanagaraj, J., Panda, R., & Narayani, T. (2019). Screening and production of a potential extracellular fungal laccase from *Penicillium chrysogenum*: Media optimization by response surface methodology (RSM) and central composite rotatable design (CCRD). *Biotechnol. Rep.* 23, e00344.
69. Shen, Y., Chou, C., Wang, Y., Chen, C., Chou, Y., & Lu, M. (2004). Anti-inflammatory activity of the extracts from mycelia of *Antrodia camphorata* cultured with water-soluble fraction from five different *Cinnamomum genera*. *FEMS Microbiol. Lett.* 231, 137-143.
70. Sheu, S., Chen, C., Chen, C. (2000). Study on the host specificity of *Antrodia camphorata*, *Taiwanese J. Agri. Chem. Food Sci.* 38, 533-539.
71. Shu, C., Wu, H., Ko, Y., Lin, W., R. Jaiswal. (2016) Effects of red light and addition of monoterpenes and tangerine oil on the production of biomass and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea* in submerged cultures. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 67, 140-147.
72. Suresh, T., Sivarajasekar, N., Balasubramani, K., Ahamad, T., Alam, M. & Naushad, M. (2020). Process intensification and comparison of bioethanol



production from food industry waste (potatoes) by ultrasonic assisted acid hydrolysis and enzymatic hydrolysis: Statistical modelling and optimization. *Biomass Bioener.* 142, 105752.

73. Triveni, R., Shamala, T., & Rastogi, N. (2001). Optimised production and utilization of exopolysaccharide from *Agobacterium radiobacter*. *Process Biochem.* 36, 787-795.
74. Tsai, D., Chung, C., & Lee, K. (2018). *Antrodia cinnamomea* induces autophagic cell death via the CHOP/TRB3/Akt/mTOR pathway in colorectal cancer cells. *Sci. Rep.* 8, 1-12.
75. Wang, Z., Peng, X., Xia, A., Shah, A., Huang, Y., Zhu, X., & Liao, Q. (2022). The role of machine learning to boost the bioenergy and biofuels conversion. *Bioresour. Technol.* 343, 126099.
76. Yadav, M., & Vivekanand, V. (2020). Biological treatment of lignocellulosic biomass by *Curvularia lunata* for biogas production. *Bioresour. Technol.* 306, 123151.
77. Yang, F., Huang, H., & Yang, M. (2003). The influence of environmental conditions on the mycelial growth of *Antrodia cinnamomea* in submerged cultures. *Enz. Microb. Technol.* 33, 395-402.
78. Yang, F., Yang, U., Lu, H. (2013). Enhanced antioxidant and antitumor activities of *Antrodia cinnamomea* cultured with cereal substrates in solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 78, 108-113.
79. Yang, J., Huang, Y., Xu, H. Y., Gu, D. G., Xu, F., Tang, J. T., Fang, C., & Yang, Y. (2020). Optimization of fungi co-fermentation for improving anthraquinone



- contents and antioxidant activity using artificial neural networks. *Food Chem.* 313, 126138
80. Yonis, R., Luti, K., Aziz, G. (2019) Statistical optimization of chitin bioconversion to produce an effective chitosan in solid state fermentation by *Asperigellus flavus*. *Iraqi J. Agri. Sci.* 50, 916-927
81. Yucel, O., Aydin, E. S., & Sadikoglu, H. (2019). Comparison of the different artificial neural networks in prediction of biomass gasification products, *Intl. J. Ener. Res.* 43, 5992-6003.
82. Yulianto, M., M. Yuniastuti, A., Rohnidia, D., Paranita, V., Amalia, A., Hartati, I., Yohana, E., Mustikaningrum, M., Nyamiati, R., Hardiana, M. (2022). Optimization of UV-photo fermentation conditions theaflavin from tea leaves (*Camellia sinensis*) using response surface methodology (RSM) as inhibitor in SARS-CoV-2. *Mat. Today: Proceed.* 2, 031.
83. Zhou, Y., Chang, F.J., Chen, H., & Li, H. (2020). Exploring Copula-based Bayesian Model Averaging with multiple ANNs for PM2. 5 ensemble forecasts. *J. Cleaner Prod.* 263, 121528.
84. Zhu, X., Rehman, K. U., Wang, B., & Shahzad M. (2020). Modern Soft-Sensing Modeling Methods for Fermentation Processes. *Sensors*, 20, 1771.
85. Zhuang, S., Renault, N., & Archer, I. (2021). A brief review on recent development of multidisciplinary engineering in fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 339, 32-41.
86. 張斐章、張麗秋，2015，類神經網路導論原理與應用，滄海書局

87. 蘇慶華，2013，台灣特有國寶牛樟芝，科學研習雙月刊，52(7) 8-17。國立
台灣科學教育館



附錄 1：牛樟芝取種、栽培及採收步驟

1.放大菌種：

將鑑別完成的牛樟芝菌種(原原種)於培養皿進行栽培(皿式栽培)，本步驟主要為放大原原種數量，作為接種(inoculate)至錐型瓶培養的牛樟芝菌種來源(如下圖 10.1.1 牛樟芝原原種)。

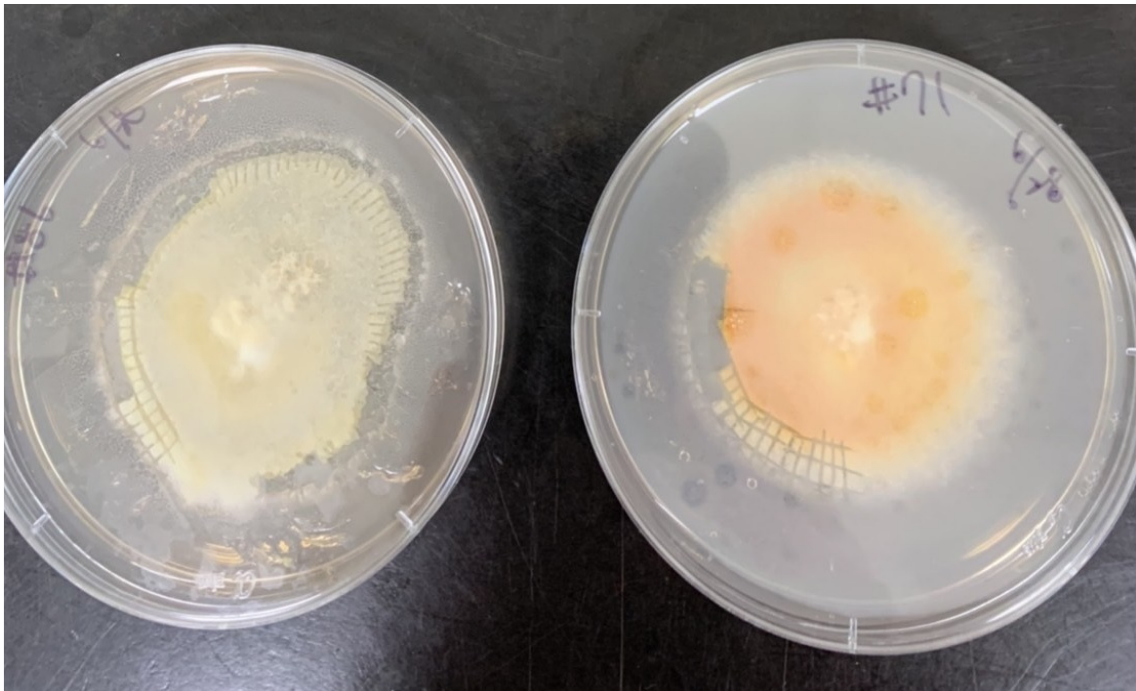


圖 10.1.1 牛樟芝原原種

2.接種

將培養皿中的牛樟芝菌種依序接種至錐型瓶，培養皿中牛樟芝菌種取樣方式，從外圈往內開始切割(生長較旺盛菌種)(如圖 10.1.2 原原種取種方式)，切割單位為正方形(1 mm * 1 mm)，每一錐型瓶接種 10 單位(如圖 10.1.3 皿式培養錐型瓶)。

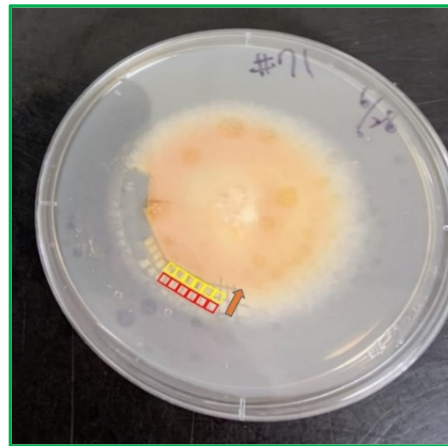


圖 10.1.2 原原種取種方式



圖 10.1.3 接種至錐型瓶培養

3. 振盪培養

將接種完成的牛樟芝菌種(錐型瓶)移至迴轉式振盪器(轉速 50 rpm)，進行液態培養 7 天。

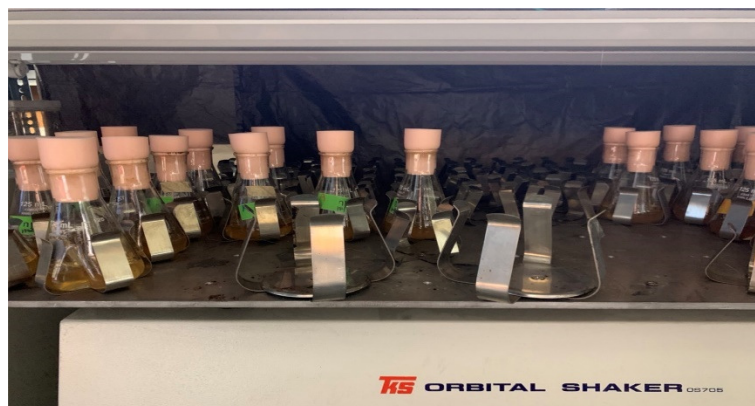


圖 10.1.4 振盪培養

4.烘乾稱重

完成 7 天振盪培養後，離心完成後稱重記錄生物質量重量(Biomass)。

附錄 1：牛樟芝取種、栽培及採收步驟的照片由衛生福利部國家中醫藥研究所

盧美光博士提供。

