

以冬蟲夏草菌浸液發酵生產胞外多醣體之最適化研究=study on optimization of extra-cellular polysaccharides to cordyceps sine

陳重儒、徐泰浩；謝建元

E-mail: 9019800@mail.dyu.edu.tw

摘要

冬蟲夏草簡稱蟲草，蟲草多醣體因抗腫瘤及降血糖等生理活性受到矚目，然而天然蟲草稀少，其生長條件嚴苛，近年來多研究以冬蟲夏草菌發酵來替代天然蟲草。本研究目的在於以浸液培養冬蟲夏草菌，研究培養基組成份與蟲草多醣產量之間關係，期以回應曲面法求出培養基組成份最佳組合，獲得蟲草多醣最大產量。本研究結果發現，使用1%玉米浸液粉為主培養基，發酵培養蟲草菌其生物質量與胞外多醣含量，在發酵產程第6天達到高峰，各為1.02 g/dL與1.082 mg/mL，並以GPC分析發酵後期與前期胞外多醣分子量，其結果顯示發酵後期胞外多醣分子量大於前期，胞外多醣經粗蛋白分析則呈現陰性反應。利用不同氮源來發酵蟲草菌，結果發現酵母粉無論在蟲草生物質量與胞外多醣含量，其結果均不若玉米浸液粉培養基。在比較不同碳氮比發酵培養蟲草菌方面，雖氮源比例越高其胞外多醣含量測得越大，然玉米浸液粉比例超過3%以上時則開始抑制生物質量生成。再進行以3%玉米浸液粉及2.5%葡萄糖之培養基比例以10天發酵產程觀察胞外多醣產量增減趨勢，發現胞外多醣在第4天達到高峰，為1.17 mg/mL，增加氮源比例至3%，但多醣產量似乎無呈正比例增加。當氮源比例固定為1%，碳源比例增加，胞外多醣產量呈持續上升趨勢，當提高氮源濃度為3%而碳源為5%比例反而會抑制胞外多醣生成。在以回應曲面法探討多醣產量，發現在5種實驗選用碳源中蔗糖在菌絲體生物質量方面雖不若其他碳源，但胞外多醣產量方面卻明顯優於其他碳源。以不同比例氮源(0.25%-1.5%之間)以0.5%玉米浸液粉組產生較多胞外多醣。在不同起始pH值實驗以pH 4.5組產生較多胞外多醣。以24-1部分因子實驗設計探討各因子間對胞外多醣產量交互作用，發現蔗糖、玉米浸液粉、鹽類對蟲草多醣產量皆有正面影響，然而起始pH值雖對蟲草多醣產量有負面影響，但影響相對於其他因子來說並不顯著。以陡升路徑實驗設計逼近胞外多醣產量極值範圍，發現以蔗糖5.42%、玉米浸液粉0.564%、鹽類0.65%組合而成之培養基，其胞外多醣產量為最高達11.23 mg/mL，再以中心混成實驗設計求得生產蟲草多醣培養基最適組成為蔗糖為5.846%，玉米浸液粉為0.561%，鹽類分別為(NH₄)₂HPO₄ 0.5344%與KH₂PO₄ 0.1336%，以此培養基質比例作發酵槽培養蟲草生物質量在第5天達最大量1.94g/dL，胞外多醣含量最大量為13.46 mg/mL且在發酵期間內不控制槽內pH值為恆定，對蟲草胞外多醣產量較為助益。

關鍵詞：冬蟲夏草；胞外多醣分析；回應曲面法

目錄

目錄 頁次 封面內頁 簽名頁 授權書 iii 中文摘要 iv 英文摘要 vi 誌謝 ix 目錄 x 圖目錄 xv 表目錄 xviii 第壹章 前言 1 第貳章 文獻回顧 2 2.1 冬蟲夏草與菌學上之蟲草 2 2.2 冬蟲夏草之生理作用與藥理效果 3 2.2.1 降低血糖作用 3 2.2.2 固腎作用 4 2.2.3 抑制腫瘤細胞作用 4 2.2.4 保肝作用 5 2.2.5 心血管作用 5 2.2.6 免疫作用 5 2.2.7 抗病毒作用 6 2.2.8 對能量代謝影響 6 2.2.9 致毒性研究 6 2.2.10 致突變性研究 6 2.3 冬蟲夏草菌之深層發酵 7 2.4 多醣體之成分與分析 7 2.4.1 多醣之定義 7 2.4.2 多醣的分類 9 2.4.3 多醣之回收方法 9 2.4.3.1 醇類提取法 9 2.4.3.2 膜過濾法 11 2.4.4 多醣之測定方法 12 2.4.4.1 酚硫酸法 12 2.4.4.2 高效液相層析法(HPLC) 14 2.4.4.3 膠體穿透色層層析法(GPC) 14 2.4.4.4 酵素法 15 2.5 影響多醣產量因子 15 2.5.1 化學因子 15 2.5.1.1 碳源對多醣生成影響 16 2.5.1.2 pH對多醣生成影響 16 2.5.2 物理因子 16 2.5.2.1 轉速對多醣生成影響 16 2.5.2.2 溫度對多醣生成影響 17 2.6 回應曲面法 17 第參章 材料與方法 19 3.1 實驗設備 19 3.1.1 菌種 19 3.1.2 實驗儀器 19 3.1.3 實驗藥品 20 3.1.3.1 培養基 20 3.1.3.2 分析藥品 22 3.2 基礎培養 22 3.2.1 平板培養 22 3.2.2 液態菌原培養 22 3.3 不同氮源培養基質種類及比例培養條件下 *C. sinensis* 搖瓶培養之菌絲體生物質量與發酵液中胞外多醣產量分析 23 3.3.1 不同天數及氮源基質之培養 23 3.3.2 不同天數及氮源比例之培養 23 3.3.3 以六天培養天數及不同碳氮原比例之培養 23 3.4 以回應曲面法探討多醣產量 24 3.4.1 前置實驗 24 3.4.1.1 五種不同碳源對多醣產量關係 24 3.4.1.2 五種不同氮源比例對多醣產量關係 24 3.4.1.3 五種不同起始pH值對多醣產量關係 24 3.4.2 24-1部分因子實驗設計 24 3.4.3 陡升路徑實驗設計 25 3.4.4 中心混成實驗設計 25 3.5 發酵槽培養 30 3.5.1 種菌培養 30 3.5.2 發酵槽培養基配方 30 3.5.3 發酵槽控制條件 31 3.6 分析方法 31 3.6.1 菌絲乾重測定 31 3.6.2 醱酵液多醣之測定 31 3.6.2.1 酚硫酸法 31 3.6.2.1.1 標準曲線製作步驟 31 3.6.2.1.2 蟲草胞外多醣分析 32 3.6.2.2 蛋白質測定法 23 3.6.2.3 GPC測定法 34 第肆章 結果與討論 35 4.1 不同天數及氮源基質之培養 35 4.1.1 *C. sinensis*以1%玉米浸液粉培養基於10天發酵產程期間菌絲體生物質量與醱酵液胞外多醣及pH值變化 35 4.1.2 *C. sinensis*以1%酵母粉培養基於10天發酵產程期間菌絲體生物質量與醱酵液胞外多醣及pH值變化 35 4.2 不同天數及氮源比例之培養 39 4.3 *C. sinensis*以3%玉米浸液粉培養基於10天發酵產程期間菌絲體生物質量與醱酵液胞外多醣及pH值變化 39 4.4 不同碳氮比培養基醱酵培養 *C. sinensis* 對菌絲體菌絲生物質量、與醱酵液胞外多醣及pH值之影響 43 4.5 以回應曲面法探討多醣產量 43 4.5.1 前置實驗 43 4.5.2 24-1部分因子實驗設計 48

4.5.3 陡升路徑實驗設計 48 4.5.4 中心混成實驗設計 48 4.6 以醱酵槽培養蟲草探討其胞外多醣產量 51 4.6.1 原始培養基配方 51 4.6.2 經回應曲面法求得之配方 60 4.6.2.1 不控制醱酵液內之pH值 60 4.6.2.2 控制醱酵液內之pH值 60 第五章 結論 65 參考文獻 68 附錄一 胞外多醣萃取及分析步驟 78 附錄二 多醣體濃度檢量線 79 圖目錄 圖2.1 具有抗腫瘤活性的 α -D-葡聚糖結構 10 圖2.2 利用不同波長測定糖類經酚硫酸反應後溶液吸光值變化 13 圖4.1 *C. sinensis*以1%玉米浸液粉培養基於10天醱酵產程期間菌絲體生物質量與醱酵液胞外多醣及pH值變化 36 圖4.2 *C. sinensis*於1%玉米浸液培養基中培養6天及10天其醱酵培養液中胞外多醣分子量分佈 37 圖4.3 *C. sinensis*以1%酵母粉培養基於10天醱酵產程期間菌絲體生物質量與醱酵液胞外多醣及pH值變化 40 圖4.4 不同濃度玉米浸液粉培養基醱酵培養*C. sinensis*對菌絲體菌絲生物質量、與醱酵液胞外多醣及pH值之影響 41 圖4.5 *C. sinensis*以3%玉米浸液粉培養基於10天醱酵產程期間菌絲體生物質量與醱酵液胞外多醣及pH值變化 42 圖4.6 不同碳氮比培養基醱酵培養*C. sinensis*對菌絲體菌絲生物質量與醱酵液胞外多醣及pH值之影響 44 圖4.7 不同碳源來源培養基醱酵培養*C. sinensis*對菌絲體菌絲生物質量與醱酵液胞外多醣及pH值之影響 45 圖4.8 不同氮源比例培養基醱酵培養*C. sinensis*對菌絲體菌絲生物質量與醱酵液胞外多醣及pH值之影響 46 圖4.9 不同起始pH值培養基醱酵培養*C. sinensis*對菌絲體菌絲生物質量與醱酵液胞外多醣及pH值之影響 47 圖4.10 蔗糖與玉米浸液粉對蟲草胞外多醣產量之回應曲面圖 53 圖4.11 蔗糖與玉米浸液粉對蟲草胞外多醣產量之等高線圖 54 圖4.12 玉米浸液粉與鹽類對蟲草胞外多醣產量之回應曲面圖 55 圖4.13 玉米浸液粉與鹽類對蟲草胞外多醣產量之等高線圖 56 圖4.14 蔗糖與鹽類對蟲草胞外多醣產量之回應曲面圖 57 圖4.15 蔗糖與鹽類對蟲草胞外多醣產量之等高線圖 58 圖4.16 *C. sinensis*以1%玉米浸液粉培養基於醱酵槽8天醱酵產程期間菌絲體生物質量與醱酵液胞外多醣及pH值變化 59 圖4.17 *C. sinensis*以經回應曲面法求得培養基配方於醱酵槽8天醱酵產程期間菌絲體生物質量與醱酵液胞外多醣及pH值變化 61 圖4.18 *C. sinensis*以回應曲面法求得培養基配方且恆定醱酵槽內pH值於8天醱酵產程期間菌絲體生物質量與醱酵液胞外多醣變化 62 圖 4.19 *C. sinensis*以回應曲面法求得培養基配方培養4天及6天其醱酵培養液中胞外多醣分子量分佈 63 圖 4.20 *C. sinensis*以回應曲面法求得培養基配方恆定pH值培養4天及6天其醱酵培養液中胞外多醣分子量分佈 64 表目錄 表2.1 冬蟲夏草菌搖瓶醱酵試驗培養基組成 8 表2.2 冬蟲夏草菌醱酵槽試驗培養基組成 8 表3.1 24-1部分因子實驗設計表 26 表3.2 陡升路徑實驗設計表 27 表3.3 中心混成實驗設計表(一) 28 表3.4 中心混成實驗設計表(二) 29 表4.1 玉米浸液醱酵培養冬蟲夏草菌絲液10天醱酵液內蟲草多醣之分子量 38 表4.2 24-1部分因子設計及實驗結果 49 表4.3 根據24-1部分因子設計實驗結果所進行之陡升路徑 50 表4.4 中心混成設計及其實驗結果 52

參考文獻

1. 孔祥環、蔣保季、王惠琴、尹學鈞、唐玉萍、馬忠杰、沈家琴、張宏傳與肖中新。1995。發酵培育冬蟲夏草毒理研究 II、致突變性研究。首都醫學院學報16(4):256-258。
2. 王西華、陳志昇、黃雅惠與許瑞祥。1999。傳統保健食品 冬蟲夏草。生物產業10(1):19-27。
3. 水野卓與川合正允。1997。菇類的化學、生化學。國立編譯館，台北。pp40。
4. 任一平、黃百芬與陳青俊。1996。應用高效液相色譜法測定香菇多糖。食品與發酵工程5:31-35。
5. 沈曉云、李兆蘭與田軍。1998。冬蟲夏草與蟲草菌絲有效成份分析比較。山西大學學報21(1):80-85。
6. 李玲玟、王正怡與蘇慶華。1995。利用流動細胞分析儀測植生蟲草抗腫瘤多醣體(PN-2)對小白鼠巨噬細胞吞噬能力及輔助T淋巴細胞活性之影響。北醫學報23(1):11-19。
7. 李昌憲、紅哲穎與熊光濱。1992。利用回應曲面法進行以Streptococcus faecalis生產酪胺酸脫羧西每之培養基最適化研究。中國農業化學會誌30(2):264-272。
8. 李繡鈴、周正俊與吳淳美。1993。利用反應曲面法尋求Sporobolomyces odorus 產生 α -decalactone之最適條件。中國農業化學會誌31(1):28-34。
9. 邱德凱、靖大道、蕭樹東、曾民德與李繼強。1995。冬蟲夏草多糖脂質體對肝炎後肝硬化患者T細胞免疫調節作用的研究。中華消化雜誌15(5):265-267。
10. 徐泰浩。1999。冬蟲夏草與保健。中華傳統獸醫學會會刊3(1):48-61。
11. 食品分析方法手冊。1990。食品工業發展研究所。
12. 陳傳盈、馮觀泉、許曉興、弗迪波、許少春與袁亞。1992。冬蟲夏草工業深層發酵研究。中草藥23(8):409-416。
13. 張家俊與陳文為。1992。天然冬蟲夏草及其培養菌絲體對能量代謝的影響。北京中醫學院學報15(3):63-65。
14. 張為憲、李敏雄、呂政義、張永和、陳昭雄、孫璐西、陳怡宏、張基郁、顏國欽、林志城與林慶文。1996。食品化學。華香園出版社。pp44。
15. 蔣保季、孔祥環、王惠琴、尹學鈞、劉麗娟、馬忠杰、王虹、褚金花、沈家琴、張宏傳與肖中新。1995。發酵培育冬蟲夏草毒理研究 I、急性與亞慢性毒性研究。首都醫學院學報16(3):198-203。
16. 馮頤、傅蓮瑛與袁淑蘭。1996。天然冬蟲夏草與蟲草菌提取液薄層對比試驗。天津藥學8(4):93-94。
17. 郭育綺。1996。篩選具抑制活化腎間質細胞之冬蟲夏草子實體自然產物。中醫藥年報12(4):53-68。
18. 郭育綺與陳建志。1999。冬蟲夏草中腫瘤細胞生長抑制因子之純化。產業科技發展學術合作論文集。pp321-328。
19. 郭倩、周昌豔與高君輝。1998。無苦靈芝子實體多糖的研究。食用菌學報5(3):21-25。
20. 程慶藥、于力方、師鎖柱與陳香美。1994。冬蟲夏草對5/6腎切除大鼠腎臟病理改變的影響。中華腎臟雜誌10(1):20。
21. 解軍、郭欣、李培毅與徐衛東。1994。冬蟲夏草及人工菌絲體中蟲草菌素的定性定量研究。山西中醫10(4):36-38。
22. 唐瑞菁與程梅萍。1992。靈芝培養基的探討 酵母抽出物的取代。國立雲林技術學院學報1:145-156。
23. Arcidiacono, S. and Kaplan, D. L. 1992. Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. Biotech. Bioeng. 39:281-286。
24. Chen, G. Z. and Chen, G. L. 1991. Effects of *Cordyceps sinensis* on murine T lymphocyte subsets. Chin. Med. J. 104(1):4-8。
25. Cheung, P. C. 1996. The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. Nutr. Res. 11/12:1953-1957。
26. Choi, J. H., Oh, D. K., Kim, J. H. and Lebeault, J. M. 1991. Characteristics of novel high viscosity polysaccharide, methylan, produced by *Methylbacterium organophilum*. Biotech. Lett. 13(6):417-420。
27. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal chem. 28(3):350-356。
28. De la Vega, M. G., Cejudo, F. J. and Paneque, A. 1991. Production of exocellular polysaccharide by *Azotobacter chroococcum*. Appl. Biochem. Biotech. 30:273-284。
29. Gutierrez, A.

and Prieto, A. and Martinez, A. T. 1996. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carb. Res.* 281:143-154. 30. Gutierrez, A., Martinez, M. J., Almendros, G., Gonzalez-vila, F. J. and Martinez, A. T. 1995. Hyphal-sheath polysaccharides in fungal deterioration. *Sci. Environ.* 167:315-328. 31. Halpern, G. H. 1999. *Cordyceps china*'s healing mushroom. pp1. 32. Hensel, A., Schmidgall, J. and Kreis, W. 1998. The plant cell wall- a potential source for pharmacologically active polysaccharides. *Pharm. Acta Hel.* 73:37-43. 33. Hosono, A., Lee, J., Ametani, A., Natsume, M., Hirayama, M., Adachi, T. and Kaminogawa, S. 1997. Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M 101-4. *Biosci. Biotech. Biochem.* 64(2):312-316. 34. Isobe, Y., Endo, K. and Kawai, H. 1992. Properties of a highly viscous polysaccharide produced by *Bacillus* strain isolated from soil. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(4):636-639. 35. Israilides, C., Bocking, M., Smith, A. and Scanlon, B. 1994. A novel rapid coupled enzyme assay for the estimation of pullulan. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 19:285-291. 36. Israilides, C. J., Smith, A., Harthill, J. E., Barnett, C., Bambalov, G. and Scanlon, B. 1998. Pullulan content of the ethanol precipitate from fermented agro-industrial wastes. *Appl. Microbiol. Biotech.* 49:613-617. 37. Kiho, T., Hui, J., Yamane, A. and Ukai, S. 1993. Polysaccharides in fungi XXXII. Hypoglycemic activity and chemical properties of polysaccharide from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Biol. Pharm. Bull.* 16(12):1291-1293. 38. Kiho, T., Hui, J., Yamane, A., Hui, J., Usui, S. and Ukai, S. 1996. Polysaccharides in fungi XXXVI. Hypoglycemic activity of a polysaccharides (CS-F30) from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. *Biol. Pharm. Bull.* 19(2):294-296. 39. Kitamura, S., Hori, T., Kurita, K., Takeo, K., Hara, C., Itoh, W., Tabata, K., Elgsaeter, A. and Stokke, B. T. 1994. An antitumor, branched (1-3)-b-D-glucan from a water extract of fruiting bodies of *Cryptoporus volvatus*. *Carb. Res.* 263:111-121. 40. Litchfield, J. H., Overbeck, R. C. and Davidson, R. S. 1963. Mushroom culture. Factors affecting the growth of morel mushroom mycelium in submerged culture. *Agric. Food Chem.* 11(2):158-162. 41. Lopez-barajas, M., Lopez-tamames, E. and Buxaderas, S. 1998. Improved size-exclusion high-performance liquid chromatographic method for the sample analysis of grape juice and wine polysaccharides. *J. Chromato. A.* 823:339-347. 42. Machova, E., Kvapilova, K., Kogan, G. and Sandula, J. 1999. Effect of ultrasonic treatment on the molecular weight of carboxymethylated chitin-glucan complex from *Aspergillus niger*. *Ultra. Sonochem.* 5:169-172. 43. Manzi, P. and Pizzoferrato, L. 2000. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chem.* 68:315-318. 44. Muller, W. E. G., Weiler, B. E., Charubala, R., Pfeleiderer, W., Leserman, L., Sobol, R. W., Suhadolnik, R. J. and Schroder, H. C. 1991. Cordycepin analogues of 2', 5'-oligoadenylylate inhibit human immunodeficiency virus infection via inhibition of reverse transcriptase. *Biochemistry* 30:2027-2033. 45. Oh, S., Rheem, S., Sim, J., Kim, S. and Baek, Y. 1995. Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone-yeast extract-glucose medium by using response surface methodology. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(11):3809-3814. 46. Pang, P. K. T., Shan, J. J. and Chiu, K. W. 1996. The cardiovascular effects of *Cordyceps sinensis* in normotensive rats. *J. Chin. Med* 7(2):153-167. 47. Peters, H., Herbst, H., Hesselink, P. M., Lunsdorf, H., Schumpe, A. and Deckwer, W. 1989. The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Bioeng.* 34:1393-1397. 48. Roukas, T. and Liakopoulou-kyriakides M. 1999. Production of pullulan from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank fermentor. *J. Food Eng.* 40:89-94. 49. Smith, I. H. and Pace, G. W. 1982. Recovery of microbial polysaccharides. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 32:119-129. 50. Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A. 1985. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* 49(9):2641-2653. 51. Souza, M. C. O., Roberto, I. C. and Milagres, A. M. F. 1999. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:768-772. 52. Srinivasan, M., Natarajan, K. and Natarajan, G. 2000. Growth optimization of an ectomycorrhizal fungus with respect to pH and temperature in vitro, using design of experiments. *Bioproc. Eng.* 22:267-273. 53. Williams, D. L., Pretus, H. A. and Browder, I. W. 1992. Application of aqueous gel permeation chromatography with in-line multi-angle laser light scattering and differential viscometry detectors for the characterization of natural product carbohydrate pharmaceuticals. 1992. *J. Liquid Chromato.* 15:2297-2309. 54. Wood, P. J., Weisz, J. and Blackwell, B. A. 1991. Molecular characterization of cereal β -D-glucans. Structural analysis of oat β -D-glucans from different sources by high-performance liquid chromatography of oligosaccharides released by lichenase. 1991. *Cereal Chem.* 68(1):31-39. 55. Xu, H., Lee, S. H., S., Lee, S. F., White, R. L. and Blay J. 1999. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. *Antiviral Res.* 44:43-54. 56. Yamaguchi, N., Yoshida, J., Ren, L. J., Chen, H., Miyazawa, Y., Fujii, Y., Huang, Y. X., Takamura, S., Suzuki, S. and Zeng F. D. 1990. Augmentation of various immune reactivities of tumor-bearing hosts with an extract of *Cordyceps sinensis*. *Biotherapy* 2:199-205. 57. Yang, F. C. and Liou, C. B. 1998. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum*. *Proc. Biochem.* 33(5):547-553.