

# Studies on the Production and Purification of Intracellular and Extracellular Polysaccharides from *Grifola frondosa* by S

游清源、徐泰浩；張德明

E-mail: 9318495@mail.dyu.edu.tw

## ABSTRACT

*Grifola frondosa* have been reported in many research articles include cure of edema, beriberi, ascites, hypertension and adiposis. *Grifola frondosa*'s polysaccharide is a  $\beta$ -(1-3)-linked glucan with branches of  $\beta$ -(1-6)-D-linked glucan showing the main of antitumor activity. Submerged fermentation of great advantage to cycle brevity, productive pregnant. Because of medicine fungus breed is biodiversity, then have different optimize cultured control factor, need respective to proceed systematized experimental. This study on the mycelial biomass growth and extracellular Polysaccharides from *Grifola frondosa* by continuous stirred tank reactor and response surface methodology. Production pure polysaccharides by purification of extracellular polysaccharides. The study shows that, in different cultured control experimental, best cultured control is achieved under the condition of 1.5% fructose, medium pH 4, cluture temp for 25 ; in steepest ascent path experimental, the highest mycelial biomass growth is achieved under the condition of 1.65% fructose, medium pH 4.01, cluture temp for 25.3 , diffluence oxygen 71.93%; in different fermentation culture experimental, the highest mycelial biomass growth by continuous stirred tank reactor in 5L fermenter; the highest extracellular polysaccharides by 5L batch fermenter. All wave crest to have  $\beta$ -D-glucan in extracellular polysaccharides purification by ion exchange chromatography, all wave crest and  $\beta$ -D-glucan concentration is directly proportional; coarse extracellular polysaccharides's  $\beta$ -D-glucan concentration for 31.68 %.

Keywords : 0continuous stirred tank reactor ; response surface methodology ; chromatography

## Table of Contents

目錄 封面內頁 頁次 簽名頁 授權書.....	iii	中文摘要.....	vi
.....vi 英文摘要.....	vi	誌謝.....	ix
.....viii 目錄.....	ix	圖目錄.....	xiv
.....xiv 表目錄.....	xiv	表目錄.....	xvi
.....xvi 附錄.....	xvii	第一章 緒論.....	xvii
.....1 第二章 文獻回顧.....	2	2.1 蓮花菌之介紹.....	2
.....2 2.1.1 型態.....	2	2.1.2 環境.....	3
.....2 2.2 功能及組成.....	3	2.2.1 組成.....	3
.....3 2.2.1.1 一般成分.....	3	2.2.1.2 多醣體.....	4
.....4 2.2.2 功能.....	5	2.2.2.1 抗腫瘤作用.....	5
.....5 2.2.2.2 細胞毒性作用.....	5	2.2.2.3 免疫作用.....	6
2.2.2.4 抗高血壓作用.....	6	2.2.2.5 抗糖尿病作用.....	6
2.2.2.6 抗高血脂作用.....	6	2.2.2.7 抑制脂肪細胞.....	7
2.2.2.8 保肝作用.....	7	2.3 蓮花菌的生產.....	7
.....7 2.3.1 培養.....	7	2.3.1.1 培養基組成.....	8
.....9 2.3.2 多醣體之萃取、純化及分析.....	10	2.3.2.1 胞內粗多醣的萃取方法.....	10
.....10 2.3.2.2 純化多醣的方法.....	11	2.3.2.3 多醣體的分析方法.....	12
.....12 2.4 研究方法.....	14	2.4.1 連續式培養.....	14
.....14 2.4.2 回應曲面法.....	15	2.4.2.1 回應曲面法之原理.....	15
.....16 2.4.2.2 二水準因子設計.....	16	2.4.2.3 陡升路徑實驗設計.....	17
.....17 2.4.2.4 中心混合實驗設計.....	17	2.4.2.5 回應曲面法應用實例.....	17
.....18 第三章 材料與方法.....	19	3.1 試驗菌株.....	19
.....19 3.2 菌種的保存與更新.....	19	3.3 實驗材料.....	19
.....19 3.3.1 基礎培養基.....	19	3.3.2 儀器與設備.....	19
.....20 3.4 分析方法.....	21	3.4.1 菌絲體之生物量 (biomass).....	21
.....21 3.4.2 培養液最後pH.....	21	3.4.3 殘醣測定.....	21

.....21 3.4.3.1檢液之配製定量.....	21 3.4.3.2HPLC操作條件.....
.....21 3.4.4胞內及胞外多醣之測定.....	21 3.4.4.1胞外多醣體之製備.....22
3.4.4.2胞內多醣體之製備.....	22 3.4.4.3多醣質量測定(酚-硫酸法).....22 3.4.4.4
(1 3) -D-glucan含量測定(苯胺藍染色法).....	22 3.5不同培養條件對蓮花
菌BCRC 36355發酵產程之探討.....	23 3.5.1不同果糖濃度.....
23 3.5.2不同起始pH值.....	23 3.5.3不同培養溫度.....
25 3.6不同發酵方式蓮花菌對BCRC	25 3.6.1搖瓶發酵.....
36355生長之影響.....	25 3.6.2 5L發酵槽批式發酵.....
25 3.6.3 5L發酵槽連續式發酵.....	25 3.7利用回應區面法及連續式發酵探討對蓮
花菌多醣生產的最適化.....	26 3.7.1連續式發酵.....
26 3.7.2 24-1部分因子實驗設計.....	26 3.7.3 陡升路徑實驗設計.....
.....26 3.7.4 中心混合實驗設計.....	28 3.8利用離子交換樹脂及膠體過濾探討生物活性多醣體製備
技術.....	28 3.8.1樣品前處理.....
28 3.8.2	28 3.8.3膠體過濾分離.....
膠體前處理.....	29 3.8.4利用苯
胺藍染色法分析測定胞外粗多醣及經離子換樹脂及膠體過濾所分離之多醣體之	-D-glucan含量.....
.....	29 3.8.9動力學參數說明.....
30 第四章 結果與討論.....	31 4.1蓮花菌於不同培養條件下對發酵產程之影響.....
31 4.1.1不同果糖濃度對蓮花菌菌絲	體、胞外多醣、胞內多醣生產之影響.....
31 4.1.2不同pH值對蓮花菌菌絲體、胞外多醣	、胞內多醣生產之影響.....
31 4.1.3不同培養溫度對蓮花菌菌絲體、胞外多醣、胞內	多醣生產之影響.....
32 4.1.4蓮花菌於不同培養條件下對菌絲體及多醣體生成之影響.....	32 4.1.4.1果糖濃度對菌絲體及多醣體生成之影響.....
33 4.1.4.2培養溫度對菌	絲體及多醣體生成之影響.....
33 4.1.4.3培養液pH對菌絲體及多醣體生成之影響.....	33 4.2利用回應區面法及連續式
發酵探討對蓮花菌多醣生產的最適化.....	41 4.2.1 24-1部分因子實驗.....
41 4.2.2陡升路徑實驗設計.....	41 4.2.3中心混成實驗.....
42 4.3蓮花菌於不同發酵方式下對發酵產程之影響.....	55 4.3.1搖瓶發酵產程.....
55 4.3.2 5L批式發酵產程.....	55 4.3.3 5L連續式發酵產程.....
55 4.3.4蓮花菌於不同發酵方式下生物質量及EPS產量之差異	.....
56 4.4利用苯胺藍染色法分析測定胞外粗多醣及經陰離子交換樹脂及膠體過濾所分離之多醣體之(1 3)	-D-glucan含量.....
62 第五章 結論.....	64 參考文獻.....
65 附錄.....	72 圖目錄 圖一. 蓮花菌的實驗流程.....
24 圖二 連續式發酵示意圖.....	27 圖三 連續式發酵結構圖.....
27 圖四 不同果糖濃	度下搖瓶培養14天對蓮花菌菌絲體之生物質量、胞內與胞外粗多醣體之變化.....
34 圖五 不同pH下搖	瓶培養14天對蓮花菌菌絲體之生物質量、胞內與胞外粗多醣體之變化.....
35 圖六 不同培養	溫度下搖瓶培養14天對蓮花菌菌絲體之生物質量、胞內與胞外粗多醣體之變化.....
36 圖七 不同培養	條件其比生長速率(黑)及EPS(灰)結果之差異.....
40 圖八 pH	及DO(%)對蓮花菌菌絲體比生長速率( $\mu$ )之回應曲面圖.....
49 圖九 pH	及TP( )對蓮花菌菌絲體比生長速率( $\mu$ )之回應曲面圖.....
50 圖十DO(%)	及TP( )對蓮花菌菌絲體比生長速率( $\mu$ )之回應曲面圖.....
51 圖十一 pH	及DO(%)對蓮花菌胞外多醣(EPS)之回應曲面圖.....
52 圖十二 pH及TP( )對蓮花菌胞外多醣(EPS)之回應曲面圖.....	53 圖
十三 DO(%)及TP( )對蓮花菌胞外多醣(EPS)之回應曲面圖.....	54 圖十四 蓮花菌BCRC36355於搖瓶培養產程中菌絲體生物質
量、培養基中pH值與還原醣、胞外與胞內多醣之變化.....	57 圖十五 蓮花菌BCRC36355於5公升發酵槽培養產程中菌絲
體生物質量、培養基中pH值與還原醣、胞外與胞內多醣之變化.....	58 圖
十六 蓮花菌BCRC36355於5公升發酵槽連續式發酵培養產程中菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原醣、胞外與胞內多	醣之變化.....
59 圖十七 同體積培養液於不同發酵方式下對蓮花菌菌絲體之菌絲體	生物質量(黑)和EPS(灰)平均每日產量比較.....
61 圖十八 蓮花菌BCRC36355之胞外粗多糖體之DEAE Sephadex A-25	陰離子交換樹脂層析圖.....
63 表目錄 表一 不同果糖濃度下搖瓶培養14天對蓮花菌菌絲體之菌絲體生物	質量、胞內與胞外粗多醣體、殘糖含量及動力參數之變化.....
37 表二 不	同pH下搖瓶培養14天對蓮花菌菌絲體之菌絲體生物質量、胞內與胞外粗多醣體、殘糖含量及動力參數之變化.....
38 表三	不同培養溫度下搖瓶培養14天對蓮花菌菌絲體之菌絲體生物質量、胞內與胞外粗多醣體、殘糖含量及動力參數之變化.....
39 表四 24-1部分因子實驗設計表.....	44 表
五 24-1部分因子實驗設計及其實驗結果.....	44 表六 以比生長速率( $\mu$ )為目標之陡升路徑實驗.....
45 表七 以胞外多醣為目標產物的陡升路徑實驗.....	45 表八 中心混成補充實驗及其結果.....
46 表九 比生長速率之變異數分析表.....	47 表十 EPS之變異數分析表.....

.....48 表十一 不同發酵方式下培養對蓮花菌菌絲體之菌絲體生物質量、胞內與胞外粗多醣體、殘糖含量及動力參數之變化.....60 附錄 附錄一 蓮花菌BCRC36355於1%果糖培養產程中菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原醣、胞外與胞內多醣之變化.....72 附錄二 蓮花菌BCRC36355於1.5%果糖培養產程中菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原醣、胞外與胞內多醣之變化.....73 附錄三 蓮花菌BCRC36355於2%果糖培養產程中菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原醣、胞外與胞內多醣之變化.....74 附錄四 蓮花菌BCRC36355於2.5%果糖培養產程中菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原醣、胞外與胞內多醣之變化.....75 附錄五 蓮花菌BCRC36355於pH3培養產程中菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原醣、胞外與胞內多醣之變化.....76 附錄六 蓮花菌BCRC36355於pH4培養產程中菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原醣、胞外與胞內多醣之變化.....77 附錄七 蓮花菌BCRC36355於pH5培養產程中菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原醣、胞外與胞內多醣之變化.....78 附錄八 蓮花菌BCRC36355於pH6培養產程中菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原醣、胞外與胞內多醣之變化.....79 附錄九 蓮花菌BCRC36355於22 培養產程中菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原醣、胞外與胞內多醣之變化.....80 附錄十 蓮花菌BCRC36355於25 培養產程中菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原醣、胞外與胞內多醣之變化.....81 附錄十一 蓮花菌BCRC36355於28 培養產程中菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原醣、胞外與胞內多醣之變化..82 附錄十二 蓮花菌BCRC36355於31 培養產程中菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原醣、胞外與胞內多醣之變化..83

## REFERENCES

- 1.丁懷謙。2000。食藥用菇多醣體之免疫生理活性。食品工業32(5):28-42。
- 2.王培銘。2002。食藥用菇液態培養製程之開發。食品工業34(5):31-33。
- 3.水野卓、川合正允編著，賴慶亮譯。1992。菇類的化學及生化學，國立編譯館。台灣，台北。p.265~270。
- 4.任凌波、張思規、任?蕾。2001。工業用微生物及其培養方法。生物化工產品生產工藝技術及應用。22-25。
- 5.汪維云、朱金華、吳守一。1999。香菇菌絲體在氣生式生物反應器中的培養條件。中國食用菌18(2):11-13。
- 6.李幸儒、陳勁初。1999。舞茸-溫帶森林中的舞仙子。鄉間小路25(4):32-33。
- 7.李昌憲、洪哲穎、熊光濱。1992。利用回應曲面法進行以Streptococcus faecalis 生產酪胺酸脫羧?-培養基最適化研究。中華農業化學會誌30(2):264-272。
- 8.吳經倫、林金枝。1997。灰樹花栽培訓化。食用菌學報4(2):33-39。
- 9.洪哲穎、陳國誠。1992。回應曲面實驗設計法在微生物酵素生產上之應用。化工39(2):3~17。
- 10.陳隆鍾。1997。舞菇生物學之研究(一)舞菇菌絲生理、生態之研究。台灣洋菇雜誌。
- 11.孫希雯、朱明光。1999。灰樹花深層培養基的最優化及一種胞外粗多醣分析方法的建立。天津輕工業學院學報15(3):24-28。
- 12.徐錦堂。1997。灰樹花。中國藥用真菌學。707-716。
- 13.徐敬衡。2001。微生物發酵動力學與數學模型之研究發展。化工48(5):72-81。
- 14.陳健祺。2000。食用菇類在醫藥上的應用。食品工業32(5):56-63。
- 15.張淑芬。2001。食藥用菇類搖瓶液體培養條件之探討。科學與技術33(7):39-46。
- 16.馮慧琴、楊慶堯、糜可、沈涌。2000。灰樹花液體培養菌絲產多醣的研究。食用菌學報7(2):5-10。
- 17.賴進此。2002。菇類機能性成分的分離與純化。食品工業34(5):37-39。
- 18.賴龍山、蔡幸宜、潘結昌。2001。以回應曲面法探討真菌Aspergillus terreus 發酵生產其二次代謝物lovastatin 之培養基設計。朝陽學報(6):1~14。
19. Adachi, Y., Ohno, N. and Yadpmae, T.. 1998. Activation of murine kupffer cell by administration with gel-forming(1-3)-D-Glucan from Grifola frondosa . Biol. Pharm. Bull. 21(3):278-283.
20. Buchalo, A. S., Wasser, S. p., Reshetnikov, S. V. and Grigansky, A. P. 1999. Studies on microstructures of vegetative mycelium in the medicinal mushrooms Hericium erinaceus (Bull.:Fr.) pers. And Grifola frondosa (Dick.:Fr) S. F. Gray (Aphyllorhizomycetidae). Int. J. Med. Mushrooms. 1 :235-241.
21. Chen, A. W., 1999. A Practical Guide for Synthetic-Log cultivation of Medicinal Mushroom Grifola frondosa (Dick.:Fr) S. F. Gray (Maitake). Int. J. Med. Mushrooms. 1 : 153-167
22. Chen, A. W., Stamets, P., Cooper, R. B., Huang, N. and Han, S. 2000. Ecology, morphology, and morphogenesis in nature of edible and medicinal mushroom Grifola frondosa (Dick.:Fr) S. F. Gray -Maitake (Aphyllorhizomycetidae). Int. J. Med. Mushrooms. 2 : 221-228.
23. Choi, H. S., Cho, H. Y., Yang, H. C., Ra, K. S. and Suh, H. J. 2001. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from Grifola frondosa. Food Res. Int. 34 : 177-182.
24. Horio, H. and Ohtsuru, M. 2001. Maitake (Grifola frondosa) improve glucan tolerance of experimental diabetic rats. Nutr. Sci. Vitaminol. 47 :57-63.
25. Kawagishi, H., Nomura, A., Mizuno, T., Kimura, A. and Chiba, S. 1990. Isolation and characterization of a lectin from Grifola frondosa fruiting bodies. Biochimica Biophysica Acta. 1034 : 247-252.
26. Kubo, K. and Nanba, H. 1997. Anti-Hyperliposis effect of Maitake fruit body (Grifola frondosa). J. Biol. Pharm. Bull. 20(7) : 781-785.
27. Kubo, K. and Nanba, H. 1998. Modification of cellular immune responses in experimental autoimmune hepatitis in mice by maitake (Grifola frondosa). Mycoscience. 39:351-360.
28. Kuo-Cheng Chen, Tze-Chung Lee and Jer-Yiing Houng. 1992. Search method for the optimal medium for the production of lactose by Kluyveromyces fragilis . Enzyme Microb. 14:659~664.
29. Lee, E. W., He, P., Kawagishi, H. and Sugiyama, K. 2000. Suppression of D-Galactosamine-induced liver injury by mushrooms in rats.
30. Leung, M. Y. K., Fung, K. P. and Choy, Y. M. 1997. The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide prepapa on from Flammulina velutipes . Immunopharmacology 35:255-263.
31. 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.
32. Mayell, M. 2001. Maitake extracts and their therapeutic potential. Altern. Med. Rev. 6(1): 48-60.
33. Mau, J., Lin, H., Ma, J. and Song, Si-Fu. 2001. Non-volatile taste components of several speciality mushrooms. Food Chem.. 73 : 461-466.
34. Mizuno, T. and Zhuang, C. 1995. Maitake, Grifola frondosa : Pharmacological effects. Food Rev. Int.. 11(1):135-149.
35. Mizuno, T., Ohsawa, K., Hagiwara, Ni. And Kuboyama, R. 1986. Fractionation and Characterization of antitumor polysaccharides from Maitake, Grifola frondosa. Agric. Biol. Chem. 50(7):1679-1688.
36. Nanba, H., hamaguchi, A. and Kuroda, H. 19 . 1987. The chemical structure of an antitumor polysaccharide in fruit bodies of Grifola frondosa (Mautake).

Chem. Pharm. Bull. 35(3) : 1162-1168. 37. Nakai, R., Masui, H., Horio, H. and Ohtsuru, M. 1999. Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) water extract on inhibition of adipocyte conversion of C3H10T1/2B2C1 cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 45 : 385-389. 38. Ohno, N., Adachi, Y., Suzuki, I., Sato, K., Oikawa, S. and Yadomae, T. 1986. Characterization of antitumor glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 34(4):1709-1715. 39. Rao, P. and Pattabiraman, T. 1989. Reevaluation of the phenolsulfuric acid reaction for the estimation of hexoses and pentoses. *Anal. Biochem.* 181 : 18-22. 40. Suzuki, I., Hasimoto, K., Oikawa, S., Sato, K., Osaea, M. and Yadomae, T. 1989. Antitumor and immunomodulating activities of a  $\beta$ -Glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 37(2) : 410-413. 41. Yoang, S. and Jacobs, R. 1998. Sodium hydroxide-induced conformational change in schizophyllan detected by the fluorescence dye, aniline blue. *Carbohydr. Res.* 310 : 91-99.