

# Study on Solid State and Submerged Culture of Fungus and their Metabolite Productions

張書銘、施英隆

E-mail: 9701378@mail.dyu.edu.tw

## ABSTRACT

*Cordyceps militaris* is a famous traditional Chinese medicine, it's also known as "North Cordyceps". It originates from infected larva or pupa with fruiting body by fungus *Cordyceps militaris* in nature. *Cordyceps militaris* has various physiological activities, for example strengthening the function of immunity, antitumor function and lowering blood sugar, etc. Because the occurrence of natural *Cordyceps militaris* is rare and limited by the factors of environment and the climate, it has become popular to cultivate *Cordyceps militaris* artificially in recent years. This study investigated the effects of various factors on the production of cordycepin in submerged culture, as well as the production of cordycepin and adenosine in fruiting body and mycelium on solid state culture. The maximum of mycelium biomass and extracellular polysaccharide (EPS) production was obtained when sucrose was used as carbon source and 1% Yeast Extract (YE) as nitrogen source. All vegetable oils enhanced the production of mycelium biomass and extracellular polysaccharide; the maximum of production of biomass and EPS was obtained when sunflower oil was supplemented. However, the addition of plant oil has no apparent assistance on the production of cordycepin and adenosine. In shaken culture, high mycelium biomass and EPS was obtained when C/N ratio was 20:1, the concentration of biomass and EPS obtained was 9.89 g/L and 14.21 g/L, respectively. The maximum production of cordycepin was obtained when C/N ratio was 5:1, it was 45.15 mg/L. In the extraction of active ingredient from mycelium and fruiting body, ultrasonic shaking followed by hot water extraction improved the dissolution of cordycepin and adenosine. The adenosine of mycelium and fruiting body on solid state culture decreased as culture time increased. However, the production of cordycepin increased as culture time increased.

Keywords : *Cordyceps militaris* ; Submerged Culture ; Solid State Culture ; Cordycepin ; Adenosine ; Extracellular Polysaccharide(EPS)

## Table of Contents

目錄 封面內頁 簽名頁 授權書.....	iii	中文摘要.....	iv	英文摘要.....	v
誌謝.....	vii	目錄.....	viii	圖目錄.....	xi
表目錄.....	xii	第一章 前言.....	1	第二章 文獻回顧.....	2
2.1 蛹蟲草的簡介.....	2	2.2 蛹蟲草的成分.....	3	2.2.1 一般化學成分.....	3
2.2.2 水解胺基酸組成.....	3	2.2.3 脂肪酸組成.....	4	2.2.4 微量元素成分.....	4
2.3 生理活性成分.....	5	2.3.1 蟲草多醣 ( Polysaccharide ) .....	5	2.3.2 蟲草素 ( Cordycepin ) .....	6
2.3.3 腺? [ Adenosine ) .....	7	2.3.4 D-甘露醇 ( D-mannitol ) .....	9	2.3.5 超氧歧化? [ Superoxide dismutase ; SOD ) .....	9
2.3.6 甾醇類.....	10	2.4 蛹蟲草的藥理療效.....	10	2.4.1 抗腫瘤作用.....	10
2.4.2 抗氧化與清除自由基.....	11	2.4.3 鎮靜作用.....	12	2.4.4 抗菌作用.....	12
2.4.5 保護心臟功能.....	12	2.4.6 保護肝臟功能.....	13	2.4.7 降血壓、血脂、血糖作用.....	13
2.4.8 保護腎臟功能.....	14	2.5 人工培養蛹蟲草之發展.....	14	2.5.1 液態發酵.....	15
2.5.2 固態發酵.....	15	2.6 液態發酵之影響因子.....	16	2.6.1 碳源.....	16
2.6.2 氮源.....	18	2.6.3 pH值.....	18	2.6.4 添加植物油.....	19
2.7 二次代謝物.....	19	第三章 研究方法與材料.....	21	3.1 實驗材料.....	21
3.1.1 實驗菌株 ( Strain ) .....	21	3.1.2 種菌培養基.....	21	3.1.3 試驗藥品.....	22
3.1.4 儀器設備.....	23	3.2 實驗方法.....	25	3.2.1 菌株保存與維持.....	25
3.2.2 不同碳源對蛹蟲草液態培養之影響.....	25	3.2.3 不同碳源濃度對蛹蟲草液態培養之影響.....	26	3.2.4 不同氮源對蛹蟲草液態培養之影響.....	26
3.2.5 不同起始pH值對蛹蟲草液態培養之影響.....	26	3.2.6 添加不同植物油對蛹蟲草液態培養之影響.....	27	3.2.7 不同碳氮比之培養基對蛹蟲草液態培養之.....	27
3.2.8 不同培養天數對蛹蟲草液態培養之影響.....	27	3.2.9 固態發酵.....	28	3.2.10 不同加熱時間對蛹蟲草萃取成分之影響.....	28
3.2.11 不同震盪時間對蛹蟲草萃取成分之影響.....	28	3.2.12 不同培養時間對蛹蟲草固態培養之影響.....	29	3.2.13 比較人工培養、市售及野生蛹蟲草之差異.....	29
3.3 分析方法.....	29	3.3.1 菌絲體濃度 ( Mycelial biomass ) 測定.....	29	3.3.2 胞外多醣含量分析.....	30
3.3.3 胞內多醣含量分析.....	30	3.3.4 酚-硫酸法.....	30	3.3.5 多醣標準曲線製作步驟.....	31
3.3.6 胞外蟲草素及腺? [ 量分析.....	31	3.3.7 胞內蟲草素及腺? [ 量分析.....	31	3.3.8 蟲草素及腺? [ 量分析.....	31

製.....	32	3.3.9 HPLC分析條件.....	32	第四章 結果與討論.....	33	4.1碳源種類對蛹蟲草液態培養之影響.....	33	4.2碳源濃度對蛹蟲草液態培養之影響.....	35	4.3不同氮源對蛹蟲草液態培養之影響.....	36	4.4不同起始pH值對蛹蟲草液態培養之影響.....	39	4.5添加不同植物油對蛹蟲草液態培養之影響.....	42	4.6不同碳氮比之培養基對蛹蟲草液態培養之影響.....	44	4.7不同培養天數對蛹蟲草液態培養之影響.....	46	4.8不同加熱時間對蛹蟲草萃取成分之影響.....	49	4.9不同震盪時間對蛹蟲草萃取成分之影響.....	51	4.10不同培養時間對蛹蟲草固態培養之影響.....	53	4.11比較人工培養、市售及野生蛹蟲草之差異.....	55	第五章 結論.....	57	參考文獻.....	58
--------	----	---------------------	----	----------------	----	-------------------------	----	-------------------------	----	-------------------------	----	----------------------------	----	----------------------------	----	------------------------------	----	---------------------------	----	---------------------------	----	---------------------------	----	----------------------------	----	-----------------------------	----	-------------	----	-----------	----

## REFERENCES

1. 王化遠、唐心曜。1996。四川產冬夏草不同生長期子座、蟲體中甘露醇含量比較。華西醫學雜誌。11(1):58-59。
2. 王國棟。1995。冬蟲夏草類生態培植應用。科技科學文獻出版社。北京，中國。
3. 白壽熊、羅道蘊。1994。生物性多醣體及其應用。生物產業5:167-173。
4. 何志煌。1998。植物二次代謝的生產。生物技術的應用。九州圖書。台北，台灣。151-163。
5. 李楠、龔長虹、張宏。2001。北東蟲夏草人工栽培技術研究。食用菌。4:34-35。
6. 李雲準、李修遠。1991。用高效液相色譜法來測定冬蟲夏草及蟲草烏雞膠中麥角固醇的含量。藥學學報。26(10):768-771。
7. 宋振玉。1995。中草藥現代研究(第一卷)。北京醫學大學、中國協和醫科大學聯合出版社。北京，中國。100-101。
8. 金水日、張甲生、何玲。1990。蠶蛹蟲草和冬蟲夏草中D-甘露醇的分析。白求恩醫學大學學報18(1):47-49。
9. 杜雙田。2002。蛹蟲草灰樹花天麻高栽培新技術。中國農業出版社。北京，中國。
10. 沈曉云、李兆蘭、田軍。1998。冬蟲夏草與蟲草菌絲有效成分比較。山西大學學報(自然科學版)。21(1):80-85。
11. 周佳賢、曾耀銘、劉炳嵐。2004。蛹蟲草固態培養之探討。第九屆生化工程研討會論文集。大葉大學。彰化，台灣。
12. 周良楨、楊倚竹、續月名、朱慶義、馬紫亮、朱延瑞、葛孝炎。1990。冬蟲夏草菌絲體治療慢性乙型肝炎的近期療效觀察。中國中藥雜誌15(1):53-55。
13. 林石源。2005。蛹蟲草子實體培養條件與活性成分組成之研究。大葉學生物產業科技學系碩士論文。彰化，台灣。
14. 林桂英。2000。不同冬蟲夏草菌株發酵產程中機能性指標成分之探討。大葉大學食品工程研究所碩士論文。彰化，台灣。
15. 俞宙、何建新、王方方。1998。冬蟲夏草水提液抗心肌細胞缺氧再給氧損傷的實驗研究。第一軍醫大學學報18(2):108-109。
16. 胡廣玉、胡菽英。1993。蟬花及其人工培養藥理作用初探。中國蟲生真菌研究與應用(第三卷)。中國農業科技出版社。北京，中國。99-102。
17. 貢成良、吳衛東、徐承智、楊昆、陳國剛。2002。家蠶永蟲草的化學成分分析。蠶業科學。28(2):168-172。
18. 柴建萍、白興、謝道燕。2003。不同蛹蟲草菌株比較試驗與篩選。雲南農業科技4:22-23。
19. 馬玲、劉春光、姚小曼。1995。蟲草多醣對小鼠免疫功能的影響。衛生毒理學雜誌。9(3):162-167。
20. 徐廷芳、王麗波、段文健、楊彤。2002。人工蛹蟲草胞外多糖對受抑制的免疫功能的影響及抗疲勞作用。中藥藥理與臨床18(6):17-18。
21. 徐文豪、薛智、馬建民。1988。冬蟲夏草的水溶性成分-核糖核酸的研究。中藥通報13(4):34-36。
22. 郭錫勇、郭莉莉、陳芳。1995。代式蟲草與冬蟲夏草化學成分的比較。中藥材。18(8):403-405。
23. 張德玉。2003。培養條件對靈芝菌絲體超氧化物(SOD)生成之影響。東海大學化工所碩士論文。台中，台灣。7-15。
24. 張甲生、王寶珍、王曉光、丁長江、李平亞、孫平、夏愛華。1994。蠶蛹蟲草和冬蟲夏草中游離胺基酸的比較分析。白求恩醫科大學學報20(1):24-25。
25. 張士善、張丹參、朱桐君、陳醒言。1991。冬蟲夏草胺基酸成分的藥理分析。藥學學報26(5):326-330。
26. 都興范、李應杰、王林華、石理鑫、徐宏、張俊濤、王曉燕、王鶴。2003。北東蟲夏草的研究發展現況。遼寧農業科學4:26-28。
27. 莊曉莉、李祥麟、黃樟溪。2003。蠶蛹蟲草具有顯著之抗氧化性與自由基清除能力。師大學報(數理與科技類)48(1,2):13-24。
28. 陳長安。1998。常用藥物治療手冊。全國藥品年鑑雜誌社。台北，台灣。534、592、706。
29. 陳桂寶、羅梅初、劉實晶。1997。蛹蟲草的藥理作用。中草藥28(7):415。
30. 黃賜源。1996。靈芝液體培養及氣舉式生化反應器應用之研究。東海大學化工研究所碩士論文。台中，台灣。
31. 黃起鵬、李德河、梁吉春、廖森泰、梁淑娃。1991。冬蟲夏草弱極性部分的化學成分研究。中藥材。14(11):35-37。
32. 彭國平、李紅陽、袁永泰。1996。冬蟲夏草與人工蛹蟲草的成分比較。南京中醫藥大學學報。12(5):26-27。
33. 張淑芬。2001。食藥用菇類搖瓶液態培養條件之探討。食品工業。33(7):39-46。
34. 梁宗琦。1999。真菌次代謝產物多樣性及其潛在應用價值。生物多樣性7(2):145-150。
35. 管代義、陳春華、孫璐西、孫蓮玉、張秀琴、張援平、陳順志、吳佩杰、劉毅、王永杰。1993。北冬蟲夏草抗氧化作用的實驗研究。中國醫藥雜誌28:473-475。
36. 葉淑幸。2003。培養基中碳氮源與培養方式對蛹蟲草菌發酵產程中生質、菌絲球及生物活性成分之影響。大葉大學食品工程研究所碩士論文。彰化，台灣。
37. 解軍、郭欣、李培毅、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。山西中藥。10(4):36-38。
38. 褚西寧、白玉明、江如琴、羅建穎、程巧梅。1997。蟲生真菌超氧化物歧化酶同工酶的研究。中國蟲生真菌研究與應用。中國農業科技出版社。北京。82-86。
39. 竇文、于榮敏和白秀峰。2000。人工培養蛹蟲草多醣的研究。瀋陽藥科大學學報17(5):361-364。
40. 蔡昆霖。2005。不同培養方式對蛹蟲草菌絲體生長及其生物活性成份之研究。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。
41. 蔡仲軍、尹定華、黃天福、陳仕江、李泉生。2003。不同產地冬蟲夏草甘露醇含量比較。中國藥房14(8):505-506。
42. 劉慈欣。2004。液態培養環境對北冬蟲草(*Cordyceps militaris*)菌絲體生長及其機能性成分之影響。東海大學食品科學所碩士論文。台中，台灣。
43. 劉建華、卜寧、孫月。1998。人工培育蛹蟲草與野生蛹蟲草胺基酸成份測試分析。中國食用菌18(3):18-19。
44. 劉靜明、鍾裕容、楊智、崔淑蓮、王伏華。1989。蛹蟲草之化學成分研究。中國中藥雜誌14(10):32-33。
45. 劉訥坤。1991。冬蟲夏草及菌絲體藥理研究近況。山東中醫雜誌。10(5):42-44。
46. 樊美珍、陳民、郭超、鄭有?。1990。蛹蟲草菌絲體和冬蟲夏草化學成分的比較。中國蟲生真菌研究與應用(第二卷)。中國農業科技出版社。北京。81-85。
47. 鄭豐、田勁、黎磊石。1992。冬蟲夏草對腎毒性緊急腎功能衰竭的療效及機制探討。中國中西藥結合雜誌12(5):288。
48. 鄧計廷、吳林、燕婉如、吳國傳、謝以俊。1995。可博利(冬蟲夏草多醣脂質體)治療乙型肝炎97例療效分析。現代診斷與治療。6(3)178-179。
49. 應建浙、卯曉嵐、馬啟明、宗毓臣、文華安。1987。中國藥用真菌圖鑑。21(4):37-41。
50. 蕭麗華。1997。冬蟲夏草藥材真偽品與發酵培養製備物之結構特徵與成分分析比較。大葉大

學食品工程研究所碩士論文。彰化，台灣。 51. 蘇慶華。1993。利用分子篩-高效液態析儀 (SE-HPLC) 分析真菌中藥材之1-3-BETA 多醣體。行政院衛生署中藥醫年報。10 (2) :477-499。 52. Carlsen, M., Spohr, A. B., Nielsen, J. and Villadsen, J. 1996. Morphology and physiology of an  $\alpha$ -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng* 49:266-276。 53. Chang, H. L., Chao, G. R., Chen, C. C and Mau, J. L., 2001. Non-Volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorate* and *Cordyceps militaris* mycelia. *Food Chemistry* 74:203-207。 54. Chen, Y. J., Shiao, M. S., Lee, S. S and Wang, S.Y. 1997. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Sciences* 60 (25) :2349-2359。 55. Choi, M A., Lee, W. K. and Kim, M. S. 2001 Identification and antibacterial activity of volatile flavor components of *Cordyceps militaris*. *J. Food. Sci. Nutr.* 4 (1) :18-22。 56. Fang, Q. H and Zhong, J. J. 2002. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* 37:769-774。 57. Furuya, T., M. Hirofani, and M. Matsuzawa. 1983. N6-(2-hydroxyethyl) adenosine, a biologically active compound from cultured mycelium of *Cordyceps* and *Isaria* species. *Phytochemistry* 22:2509-2512。 58. Guoging, Y. and Guoshan, W. 1988. Preliminary report on growth habit of *Cordyceps militaris*. *Edible Fungi* 2:4。 59. Hsieh, C., Tsai, M. J., Hsu, T. H., Chang, D. M. and Lo, C.T. 2005. Medium optimization for polysaccharide production of *Cordyceps sinensis*. *Appl. Biochem Biotechnol* 120 (2) 145-157。 60. Jin, B., Leeuwen, J. V. and Patel, B. 1999. Mycelial morphology and fungal protein production from starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. *Process Biochem.* 34:335-340。 61. Kim, K. M., Kwon, Y. G., Kim, T. W and Kim, Y. M. 2003. Methanol extract of *Cordyceps pruinosa* inhibits in vitro and in vivo inflammatory mediators by suppressing NF-KB activation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 190:1-8。 62. Kim, S. W., Hwang, H. J., Xu, C. P., Sung, J. M., Choi, J. W and Yun, J. W. 2003a. Production and Characterization of Exopolysaccharides from an Entomopathogenic Fungus *Cordyceps militaris* NG3. *Biotechnol. Prog.* 19:428-435。 63. Kim, S. W., Hwang, H. J., Xu, C. P., Sung, J. M., Choi, J. W and Yun, J. W. 2003b. Optimization of submerged culture process for the production of biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. *Journal of Applied Microbiology* 94:120-126。 64. Kodama, E. N., McCaffrey, R. P., Yusa, K and Mitsuya, H. 2002. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase – positive (TdT+) leukemic cells. *Biochemical pharmacology* 59:273-281。 65. Kiho, T., Hui, J. I., Yamane, A. and Ukai, S. 1993. Polysaccharides in fungi. .XXII. Hypoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharides from the culture mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Biol. Pharm. Bull.* 16 (12) :1291-1293。 66. Kuznetsov, D. A. and Musajev, N. I. 1990. The molecular mode of brain mRNA processing damage followed by the suppression of posttranscriptional poly (A) synthesis with cordycepin. *Int.J. Neurosci. (Eng)* 51:53-67。 67. Ling, J. Y., Sun, Y. J., Zhang, H., Lv, P and Zhang, C.K. 2002. Measurement of Cordycepin and Adenosine in stroma of *Cordyceps* sp. By Capillary Zone Electrophoresis (CZE) . *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 94 (4) :371-374。 68. Liu, J. Y.S., Yang, X., Chen, Z. and Li, J. 1997. Anticarcinogenic effect and hormonal effect of *Cordyceps militaris* Link. *Zhongguo Zhongyao Zazhi.* 22 (2) :111-113。 69. Mao, X. B., Eksiwong, T., Chauvatcharin, S and Zhong, J. J. 2004. Optimization of carbon source and carbon / nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Process Biochemistry.* 1-6。 70. Park, C., Hong, S. H., Lee, J. Y., Kim, G. Y., Choi, Y. H. 2005. Growth inhibition of U937 leukemia cells by aqueous extract of *Cordyceps militaris* through induction of apoptosis. *Oncol Rep.* 13 (6) :1211-1216。 71. Park, J. P., Kim, Y. M., Woo, Kim, S. W., Hwang, H. J., Cho, Y. J., Lee, Y. S., Song, C. H and Yun, J.W. 2002a. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. *Process. Biochemistry* 37:1257-1262。 72. Park, J.P., Kim, S. W., Hwang, H. J., Cho, Y. J and Yun, J. W. 2002b. Stimulatory effect of plant oils and fatty acids on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology* 31:250-255。 73. Park, J. P., Kim, S. W., Hwang, H. J and Yun, J. W. 2001. Optimization of submerged culture conditions for the mycelia growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. *Letters in Applied Microbiology* 33:76-81。 74. Sugar, Alan. M. and McCaffrey, R. P. 1998. Antifungal activity of 3'-deoxyadenosine (cordycepin) . *Antimicrob. Agents Chemother* 42 (6) :1324-1327。 75. Wang, Z., He, Z., Li, S and Yuan, Q. 2005. Purification and partial characterization of Cu,Zn containing superoxide dismutase from entomogenous fungal species *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology* 5:1-8。 76. Wu, Z. L., Wang, X. X and Cheng, W. Y. 2002. Inhibitory effect of *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* on human glomerular mesangial cell proliferation induced by native LDL. *China Medical Board of New York* 90:527。 77. Xiao, J. H., Chen, D. X., Xiao, Y., Liu, J. W. Liu, Z. L., Wan, W. H., Fang, N., Bing, B. T., Liang, Z. Q and Liu, A. Y. 2004. Optimization of submerged culture conditions for mycelial polysaccharide production in *Cordyceps pruinosa*. *Process Biochemistry* 1-7。 78. Yamaguchi, Y., Kagota, S., Nakamura, K., Shinozuka, K and Kunitomo, M. 2002. Antioxidant activity of the extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. *Phytotherapy Research* 14:647-649。 79. Yu, R., Song, L., Zhao, Y. Bin, W., Wang, L., Zhang, H., Wu, Y., Ye, Y and Yao, X. 2004. Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*. *Fitoterapia.* 75: 465 - 472。 80. Yang, F. C., Ke, Y.F and Kuo, S. S. 2000. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 27:295-301。 81. Yoo, H. S., Shin, J.W., Cho, J. H., Son, C. G., Lee, T. W., Park, S.Y. and Cho, C. K. 2004. Effects of *Cordyceps militaris* extract on angiogenesis and tumor growth. *Acta pharmacol Sin.* 25 (5) :657-665。 82. Yoshikawa, N., Nakamura, K., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K and Kunitomo, M. 2004. Antitumor activity of cordycepin in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 31 (2) :51-53。 83. Zhu, J. S., Halpern, G. M and Jones, K. 1998. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*: Part I. *J Altern Complement Med.* 4:289-303。