

# 蛹蟲草菌固態及液態發酵條件探討及活性成分分析 = Investigation of culture conditions and bioactive ingredients analysis...

陳伊綾、施英隆

E-mail: 9901114@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

蛹蟲草 (*Cordyceps militaris*) 又名蛹草、蠶蛹蟲草、北冬蟲夏草、鱗次蟲草、北蟲草或是北方蟲草，是寄生在昆蟲幼體上或蛹體上所形成的一種假菌核。蛹蟲草其具有不同的生理活性，如增進免疫系統的功能，治療白血病，抗腫瘤和降低血糖等。由於天然蟲草資源採集不易及資源日漸短缺，因此近年來以人工培養蛹蟲草的技術日益盛行。本研究探討蛹蟲草 (*Cordyceps militaris*) 在液態發酵培養之不同條件下，所產生菌絲體及蟲草素之含量多寡，以及在固態發酵時，其子實體的產量及蟲草素與腺 $\beta$ 在子實體與大米培養基間之變化。結果顯示在液態發酵時，以23 $^{\circ}$ C為前培養溫度，可得到最高的菌絲體生質量及胞外蟲草素含量；在氮源方面，以Yeast Extract (YE) 為最佳氮源；菌絲體的生質量隨蔗糖濃度的高低而變化，其中蔗糖在低濃度下所得到的蟲草素含量最佳；*C.militaris*在碳氮源比率20：1之搖瓶培養，可獲得較高的菌絲體生質量為43.14 g/L；而以碳氮源比率5：1之搖瓶培養，則可獲得較高之胞內及胞外蟲草素含量分別為1.97 mg/g、170.28 mg/L。在固態發酵時，以18 $^{\circ}$ C為最佳液體菌種活化溫度；在氮源方面，以玉米粉為氮源時可得到最佳的子實體產量；濃度高低影響了子實體的出草率，在1%時為最佳的氮源濃度；在碳源濃度方面，為了講求經濟效益及整體品質為考量，以2%的蔗糖濃度為最適碳源水平。蛹蟲草之子實體與大米培養基在整個代謝過程中，其兩者之蟲草素和腺 $\beta$ 含量隨時間增加而增加，雖然腺 $\beta$ 是蟲草素的前驅物，但在此過程中並未因此遞減，由此可得知菌體在代謝過程時仍有腺 $\beta$ 產生。

關鍵詞：蛹蟲草；液態發酵；固態發酵；腺 $\beta$ ；蟲草素

## 目錄

目錄	頁次
封面	內頁
簽名頁	授權書
iii	中文摘要
iv	ABSTRACT
vi	誌謝
viii	目錄
ix	圖目錄
xiv	表目錄
xvi	第一章 前言
1	第二章 文獻回顧
3	2.1 蛹蟲草簡介與生物學特性
3	2.2 蛹蟲草的有效成分
8	2.2.1 一般化學成分
8	2.2.2 水解胺基酸組成
8	2.2.2 微量元素成分
9	2.3 生理活性成分
9	2.3.1 蟲草多醣
10	2.3.2 蟲草素
11	2.3.3 腺 $\beta$
12	2.3.4 超氧化歧化 $\beta$ (SOD)
14	2.3.5 蟲草酸
14	2.3.6 甾醇類
15	2.4 蛹蟲草的藥理作用
15	2.4.1 抗腫瘤作用
15	2.4.2 抗氧化、抗衰老作用
16	2.4.3 鎮靜作用
16	2.4.4 抑菌作用
17	2.4.5 保肝作用
17	2.4.6 保護心臟功能
17	2.4.7 保護腎臟功能
18	2.4.8 殺蟲作用
18	2.5 人工培養蛹蟲草子實體之發展
19	2.5.1 液態發酵
19	2.5.2 固態發酵
20	2.6 液態發酵之影響因子
20	2.6.1 碳源
21	2.6.2 氮源
22	2.6.3 無機鹽
22	2.6.4 生長因子
23	2.7 固態發酵影響因子
23	2.8 二次代謝物
24	第三章 材料與方法
25	3.1 實驗材料
25	3.1.1 試驗菌株
25	3.1.2 菌種培養基
25	3.1.3 試驗藥品
26	3.1.4 儀器設備
27	3.2 實驗方法
28	3.2.1 菌株儲存與維持
28	3.2.2 不同前培溫度對蛹蟲草液態培養之影響
29	3.2.3 碳源對蛹蟲草液態培養之影響
29	3.2.4 氮源對蛹蟲草液態培養之影響
29	3.2.5 蔗糖濃度對蛹蟲草液態培養之影響
30	3.2.6 不同起始 pH 值對蛹蟲草液態培養之影響
30	3.2.7 不同碳氮比之培養基對蛹蟲草液態培養之影響
30	3.2.8 轉速對蛹蟲草液態培養之影響
31	3.2.9 不同培養時間對蛹蟲草液態培養之影響
31	3.3 固態發酵
31	3.3.1 液態菌種培養
31	3.3.2 子實體培養
32	3.3.3 液體菌種培養溫度對子實體產量之影響
32	3.3.4 氮源對子實體產量之影響
32	3.3.5 蔗糖濃度對子實體之影響
33	3.3.6 氮源濃度對子實體之影響
33	3.3.7 只添加鹽類對子實體之影響
34	3.3.8 不同培養時間對蛹蟲草之蟲草素及腺 $\beta$ 之變化
34	3.3.9 不同加熱時間的萃取方式對蛹蟲草有效成分之影響
34	3.3.10 最佳產程在最適培養基中，時間對蟲草產量之影響
35	3.3.11 不同來源子實體、菌絲體之微量成分及蟲草素、腺 $\beta$ 含量差異分析
35	3.4 分析方法
35	3.4.1 菌絲體濃度測定 (Mycelial biomass) 測定
36	3.4.2 胞外蟲草素及腺 $\beta$ 含量分析
36	3.4.3 胞內蟲草素及腺 $\beta$ 含量分析
36	3.4.4 蟲草素及腺 $\beta$ 之標準溶液配製
36	3.4.5 HPLC 分析條件
37	第四章 結果與討論
38	4.1 不同前培養溫度對蛹蟲草液態培養之影響
38	4.2 碳源種類對蛹蟲草液態培養之影響
40	4.3 氮源對蛹蟲草液態培養之影響
42	4.4 蔗糖濃度對蛹蟲草液態培養之影響
45	4.5 不同起始 pH 值對蛹蟲草液態培養之影響
48	4.6 不同碳氮比之培養基對蛹蟲草液態培養之影響
51	4.7 轉速對蛹蟲草液態培養之影響
54	4.8 不同培養時間對蛹蟲草液態培養之影響
56	4.9 液體菌種培養溫度對子實體產量之影響
59	4.10 氮源對子實體產量之影響
61	4.11 蔗糖濃度對子實體之影響
63	4.12 氮源濃度對子實體之影響
67	4.13 只添加鹽類對子實體之影響
70	4.14 不同培養時間對蛹蟲草之蟲草素及腺 $\beta$ 之變化
72	4.15 不同加熱時間的萃取方式對蛹蟲草有效成分之影響
75	4.16 在最適生產培養基中，時間對蟲草產量之影響
77	4.17 不同來源子實體、菌絲體之微量成分及蟲草素、腺 $\beta$ 含量差異分析
79	第五章 結論
82	參考文獻
84	附錄
92	附錄一 腺 $\beta$ 標準品檢量線
92	附錄二 蟲草素標準品檢量線
93	

參考文獻

1. 王國棟。(1995)。冬蟲夏草類生態、培植、應用。科學文獻出版社，北京。
2. 王蕾、于榮敏、張輝、賈文、汪文、李春燕、吳海燕。(2003)。人工培養蛹蟲草多醣的分離純化及其結構的初步研究。中國生化藥物雜誌，24(2): 23-25。
3. 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。
4. 文庭池。2006。蛹蟲草高產蟲草菌素的深層培養工藝研究。貴州大學碩士研究論文。
5. 田雪蓮。2003。蛹蟲草擬青霉不同菌株間蟲草菌素含量及子實體形成差異的比較研究。貴州大學真菌資源研究所碩士論文。
6. 白壽熊、羅道蘊。1994。生物性多醣體及其應用。生物產業5:167-173。
7. 刑來君、李明春。1999。普通真菌學。北京:高等教育出版社，78。
8. 李南、張宏。2001。北冬蟲夏草人工栽培技術研究。食用菌4:34-35。
9. 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。
10. 周良楨、楊倚竹、續月明、朱慶義、馬紫亮、朱延瑞及葛孝炎(1990)甲、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。
11. 肖波、胡開始。2004。蛹蟲草藥用價值考。中藥材 27(3):215-217
12. 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。
13. 沈齊英、沈秋英。2001。北蟲草抗氧化自由基和煙基自由基作用的研究。廣西植物 21(3):52-254
14. 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。
15. 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。
16. 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。
17. 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。
18. 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
19. 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。
20. 徐文豪、薛智、馬建民。1988。冬蟲夏草的水溶性成分-核糖類化合物的研究。中藥通報13(4):34-36。
21. 貢成良、吳丕東、徐承東、楊昆、陳國剛。2002。家蠶蛹蟲草的化學成份分析。蠶藥科學，28(2): 168-172。
22. 馬冰如、何玲、張甲生、谷恒生、苑貴華、羅曼逸、李井洛、陳丹。1994。蠶蛹蟲草與冬蟲夏草化學成分的比較。中國食用菌，13(1): 34-37。
23. 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。
24. 徐泰浩、曾耀銘。1992。利用發酵技術開發機能性食品-冬蟲夏草。科學發展月刊，20(4):388-392。
25. 徐錦堂。1997。中國藥用真菌學[M]。北京醫科大學、中國協和醫科大學聯合出版社，354-39。
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. 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。
28. 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。
29. 柴建萍、白興榮、謝道燕。(2003)。蛹蟲草主要有效成分及其藥理功效。雲南製藥科技，4: 22-23。
30. 陳桂寶、羅梅初、劉寶晶。1997。蛹蟲草的藥理作用。中藥材28(7):415。
31. 孫稅迎、張旭東。2002。冬蟲夏草與蛹蟲草特性分析。中醫藥學報30(2):43-44。
32. 莊曉莉、李祥麟、黃禪溪。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。
33. 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。
34. 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。
35. 張桂英、王寶貴、趙林伊等。2001。柞蠶蛹蟲草對老齡大鼠LPO含量和SOD、GSH-Px活性的影響。中國老年雜誌(2):137-138
36. 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。
37. 張書銘。2008。真菌之固態和液態發酵及代謝物之研究。大葉大學環境工程研究所碩士論文。彰化。台灣。7-15。
38. 張德玉。2003。培養條件對靈芝菌絲體超氧歧化物(SOD)生成之影響。東海大學化工所碩士論文。台中，台灣。7-15。
39. 張飛翔、張慶。(2001)。蛹蟲草人工瓶栽技術要點。中國食用菌，甲、20(4): 29-30。
40. 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。
41. 賈文、宋麗豔、于榮敏、李博。(2003)。人工培養蛹蟲草多糖的抗炎及免疫作用研究。時珍國醫國藥，14(1):1-2。
42. 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。
43. 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。
44. 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。
45. 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。
46. 劉訕坤。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。
47. 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。
48. 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。
49. 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。
50. Aravindan T, Viamala RN. Defferential effect of cordycepin on S and G2 phases of cell cycle in plasmodia of Physarum polycephalum Schw. Indian J Exp Biol 1991;29(9):801-804
51. Chassy, B, M. and Suhadolink, R. J.1969. Nucleoside antibiotics IV. Metabolic fate of adenosine and cordycepin by Cordyceps militaris during cordyceoin biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta. 182:307-315
52. 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.
53. 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.
54. Furuya, T., M. Hirotoni, and M. Matsuzawa. 1983. N6-(2-hydroxyethyl) adenosine, a biologically active compound from cultured mycelium of Cordyceps and Isaria species. Phytochemistry 22:2509-2512.
55. 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.
56. 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- $\kappa$ B activation. Toxicology and Applied Pharmacology 190:1-8.
57. 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. 58. Kneifel, H., Konig, W. A., Loeffler, W. and Muller, R. 1977 .Ophiocordin and antifungal antibiotics of *Cordyceps ophioglossoides*. Archives Microbiology, 26: 113-121. 59. 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. 60. 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. 61. 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. 62. 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. 63. 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. 64. 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. 2002. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. Process. Biochemistry 37:1257-1262. 65. Shih, I L ; Tsai, K-L, Hsieh, C. 2007. Effect of culture condition on the mycelial growth and bioactive mefabolite production in submerged culture of *cordyceps militaris*. Biochem Eugin.J. 33,193-201. 66. Sugar, Alan. M. and McCaffrey, R. P. 1998. Antifungal activity of 3 ' -deoxyadenosine ( cordycepin ) . Antimicrob. Agents Chemother 42 ( 6 ) :1324-1327. 67. 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. 68. Wataya Y, Hiraoka O. 1984. 3 ' -Deoxyinosine as an anti-Leishmanial agent: The metabolism and cytotoxic effect of 3 ' -deoxyinosine in *Leishmania tropica* promastigotes. Biochem Biophys Res Commun. 123(2):677-683. 69. 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. 70. Yamaguchi Y, Couitis N, Park SJ, et al. 1976. The action of cordycepin on nascent nuclear RNA and poly(A) synthesis in regenerating liver [J]. European Journal of Biochemistry. (5):125~129. 71. 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. 72. 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.