

Investigation of Culture Conditions and Bioactive Ingredients Analysis of Cordyceps Militaris in Solid and

陳伊綾、施英隆

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

ABSTRACT

Cordyceps militaris is a famous traditional Chinese medicine, it 's also known as pupa grass, silkworm cordyceps *militaris*, " North Cordyceps ". It originates from infected larva or pupae with fruiting body by fungus *Cordyceps militaris* in nature. *Cordyceps militaris* has the various biological activities, such as enhancing immune function, anti-tumor activity and lowering blood glucose etc. Because of the increasing shortage of natural resource, the collection of natural *Cordyceps militaris* is not practicle. It has become prevalent to cultivable *Cordyceps militaris* artificially. This study investigated the production of mycelium and cordycepin by *Cordyceps* (*Cordyceps militaris*) in the liquid fermentation culture under different conditions. In addition , fruit body production , cordycepin and adenosine present in the fruiting bodies and rice medium were also investigation. The results showed that hight amount of mycelium extracellular cordycepin was obtained when seed culture temperature was 23 in liquid fermentation . Yeast Extract (YE) is the best nitrogen source in mycelium biomass varied with sucrose concentration, in that the optimum cordycepin was obtained at low sucrose concentration.when carbon-nitrogen ratio was 20:1, a higher mycelium biomass 43.14 g / L and quality was obtained.when carbon-nitrogen ratio was 5:1 , a higher intracellular 1.97 mg / g and extracellular cordycepin 170.28 mg / L contents were obtained. In solid – state fermentation ,18 was the seed culture , the corn steep powder was the best nitrogen source for fruiting body production. The concentration of corn steep powder affected the rush of fruiting body, in which 1% corn steep powder is the best nitrogen concentration. In order to emphasis on economic efficiency and overall quality for the product of 2% sucrose concentration was the optimal level of carbon concentration. In the cultivable process, the cordycepin and adenosine in both fruiting body and rice medium increased with time.Although adenosine is known as precursor of cordycepin, it is not reduced in the process, this indicated that adenosine is produced in the metabolic process.

Keywords : *Cordyceps* ; liquid fermentation ; solid-state fermentation ; adenosine ; cordycepin

Table of Contents

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?	12
2.3.4 超氧化歧化? (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? 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? 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? 含量分析	36
3.4.3 胞內蟲草素及腺? 含量分析	36
3.4.4 蟲草素及腺? 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 不同碳氮比率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? 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	

REFERENCES

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):252-254
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?類化合物的研究。中藥通報13(4): 34-36。
21. 貢成良、吳丕杰、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、劉實晶。1997。蛹蟲草的藥理作用。中草藥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、黃潭溪。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。
38. 張德玉。2003。培養條件對靈芝菌絲體超氧歧化酶(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、田勤、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 an f Wang, S. Y. 1997. Effect of Cordyceps sinesis 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. .XXXII. 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-KB 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 metabolite 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.