

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

高密度冬蟲夏草菌絲體發酵培養與多醣生產之探討

計畫類別：C 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 89 - 2311 - B - 009 - 006 -

執行期間：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

計畫主持人：何小台

共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立交通大學生物科技研究所

中 華 民 國 九 十 年 十 月 三 十 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

高密度冬蟲夏草菌絲體發酵培養與多醣生產之探討

計畫編號：NSC 89-2311-B-009-006

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：何小台 國立交通大學生物科技研究所

共同主持人：

計畫參與人員：李建良 國立交通大學生物科技研究所

呂光洲 國立交通大學生物科技研究所

一、中文摘要

冬蟲夏草是極為珍貴之中藥材，具有相當多的生理活性功能，由於天然冬蟲夏草得之不易且日益昂貴，利用其菌絲體做液態發酵大量生產以日趨盛行，因而對發酵條件的掌控與研究有其必要性。本計畫的目的則是利用統計學上的回應曲面法，對發酵條件做全面性研究與因子間交互作用的探討，以便在最短的時間內找出最適條件，實驗中我們以菌絲體及菌液多醣為條件指標。由結果，我們發現冬蟲夏草菌絲體最適培養條件之碳源為5%葡萄糖，氮源是1% yeast extract 或0.5% yeast extract + 0.5% con steep liquor，起始 pH 為 5-7，而無機鹽 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 會抑制冬蟲夏草菌絲培養之多醣體產量，而鎂離子與橄欖油之最適添加濃度分別為 0.06% 與 0.12%。利用回應曲面法加以探討，發現因因子間的作用而抑制多醣的生成。

關鍵詞：冬蟲夏草、多醣體、回應曲面法

Abstract

“Dongchongxiachao” is famous as crude drug in Chinese medicine expensively and rarely. The therapy and health claims include the benefits to lung and kidney, the enforcement of immunity and antitumor activity. The yield of Dongchongxiachao is limiting by the geographyc region and the condition of climate in the mainland of China leading to dear the price. The great potency of application in *C. sinensis* by fermentation

has been noticed as functional food.

This research is to investigate the influence of different environmental factors on the production of mycelium and polysaccharide in submerged culture of *C. sinensis*. The optimal medium condition for the mycelium and polysaccharide production is initial pH=6, glucose 5% and yeast extract 1%. The best carbon and nitrogen source are glucose and yeast extract, respectively. Adding $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ is to inhibit the yield of polysaccharide. The optimal concentration of the $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and olive oil to added is 0.06% and 0.12%. However, we study these three factors for polysaccharide formation by RSM, we found the interaction of factors had significant on inhibition of polysaccharide formation.

Keywords: *Cordyceps sinensis*, polysaccharide, Response Surface Methodology

二、計畫緣由與目的

冬蟲夏草菌是一種嗜低溫的真菌，在零度以下生長停止，在 1~4 時生長緩慢，15~20 為其適溫，25 以上生長受到抑制。此菌菌落堅硬，菌絲表生，無色有隔膜、分枝，平滑或具微疣。分生孢子梗無色、單生或 2~8 本簇生於無色球形細胞組成的小子座上，不分枝至分枝。不形成孢梗束。產孢細胞系平行小梗，無色，單點內壁產孢，平滑。腎形或長橢圓形，大多 2~4(~6)各一群，為一檸檬形黏膜所包圍；該菌對營養要求並不嚴格。在多種人工培

養基上都能生長發育⁽¹⁾。

經化學組成分析，冬蟲夏草含有水分 10.84 %、脂肪 8.4 %、蛋白 25.32 %、碳水化合物 28.90 %、灰分 4.10 %⁽²⁾，此外，還含有醇類、維生素、脂肪酸及多種氨基酸⁽³⁾，以原子吸收光譜分析證實，冬蟲夏草含有銅、錳、鎳、鎘、硒等金屬元素⁽⁴⁾。將冬蟲夏草經熱水萃取、以酒精沉澱並經膠體層析分離所得之多醣分析，主要是由半乳糖及 D-甘露糖所構成⁽⁵⁾，Kiho 等人⁽⁶⁾以熱水和鹼性溶液萃取冬蟲夏草菌絲體所得之中性多醣，分子量約為 45 kDa，由半乳糖、葡萄糖及甘露糖以 62：28：10 所組成。利用分子篩高效能層析法 (SE-HPLC) 結合化學法與酵素法，證實冬蟲夏草存在有能提昇免疫功能之 beta-1,3 多醣⁽⁷⁾。冬蟲夏草多醣能降血糖，在小鼠模式中，可降低血中膽固醇與三酸甘油酯含量⁽¹¹⁸⁾。有報告指出，冬蟲夏草多醣有治療 B 型肝炎⁽⁹⁾、抗腫瘤與免疫調節作用^(10、11) 等功能。

冬蟲夏草具有抗衰老、降血脂、預防動脈硬化、恢復性功能障礙及清除自由機等功效^(12、13)，其藥用價值備受肯定，由於天然產品日漸稀少，近年來紛紛採用人工發酵技術生產冬蟲夏草菌絲體產品，在小白鼠試驗各種生理生化之零床活性證實，人工發酵生產之冬蟲夏草菌絲體與天然蟲草無顯著之差異⁽¹⁰⁾。發酵培養液中所含之多醣亦具有抗腫瘤與免疫調節之活性⁽¹⁰⁾。

在傳統上探討發酵條件之最適化，大多以「一次實驗決定一因子 (”one-factor at one time”)」的方法尋找最適化條件，此法往往忽略因子間之交互作用，因此當因子間交互影響顯著時，此法無法得到真正的最適值。為解決此問題，1951 年，Box 及 Wilson⁽¹⁴⁾ 首先提出回應曲面法 (Surface Response Methodology ; RSM) 的設計概念，並成功的應用在食品科學⁽¹⁵⁾ 與化工酵素生產上⁽¹⁶⁾。此法之基本構想是結合統計上的試驗設計與數據契合技巧 (data fitting technique)，根據實驗結果，建立描述一群受測因子及目標函數間相互關西之數學模式，藉此模式，以探尋出發酵條件之最適化。其步驟包括有下列五項：

- (1). 極值點區域之逼近
- (2). 回應曲面數學模式之建立
- (3). 模式適切性之檢測
- (4). 極值點之決定
- (5). 因子影響效應之分析

本計劃之主要目的是要探討不同培養機之組成對冬蟲夏草菌絲體密度及多醣含量的影響，利用回應曲面法，了解發酵產程中菌絲體、多醣體與酸鹼值變化上的關係，以找出冬蟲夏草菌絲體高密度發酵之最適化條件。

三、結果與討論

(1). 最適化基礎培養基條件之決定

PDB 是本實驗中冬蟲夏草菌絲體發酵之基礎培養基，由圖一 (A) 中可以得知，在 23、120 rpm 下，第七天時冬蟲夏草菌絲體達到最大值，0.81g/100mL。在起始培養基酸鹼值之測試結果 (圖一 (B)) 可以得知，pH 值在 5~7 時，最適合菌絲體生長，在菌液多醣含量以 pH=6 時達到最高產量。對基礎培養基中葡萄糖與酵母抽出物含量的試驗中 (圖一 (C)、(D))，得知其最佳含量分別為 5 % 與 1 %。

經由此一試驗結果，本計畫中一系列的培養條件測試均以此為基礎，即是在 23、120rpm、pH=6、Glucose 5 % 及 Yeast extract 1 % 時培養七天，作為基礎培養條件。

(2). 不同碳源試驗之比較

在 Guihua 與 Guoshan⁽¹⁷⁾ 對蛹蟲草菌 (*C. militaris*) 之固態人工培植結果顯示，葡萄糖與麥芽糖均可作為很好的碳源供蟲草利用，由圖二 (A) 與 (B) 之結果顯示，無論添加蔗糖或麥芽糖，冬蟲夏草菌絲體與菌液多醣之產量隨著此兩種糖濃度之增加而降低，可知對冬蟲夏草菌絲體之液態培養上，葡萄糖是較佳之碳源。

(3). 不同氮源試驗之比較

以 peptone 及 corn steep liquor 取代

yeast extract 或與 yeast extract 不同組成比例 (圖二 (A) 與 (B))，結果指出，在冬蟲夏草菌絲體之液態培養上，yeast extract 為較佳之氮源，而當 yeast extract 0.5 % + corn steep liquor 0.5 % 時與 yeast extract 1 % 的條件下所得到之菌絲體與多醣含量相同，而 corn steep liquor 的本遠較 yeast extract 便宜，基於成本考量，可利用上述之混合比例作為冬蟲夏草菌絲體之液態培養上之氮源。

(4). 無機鹽類與非離子介面活性劑對冬蟲夏草菌絲體之影響

絲狀真菌在液態培養時，發現使用介面活性劑會導致 *Acremonium persicinum* 明顯的減少其 β -glucan 的產量。後來在尋找適合介面活性劑的過程中，意外發現蔬菜油和其脂肪酸組成，可以增加聚葡萄糖 (Glucan) 的產量。橄欖油 (Olive oil) 和向日葵油 (Sunflower oil) (18)。即使在低濃度 (0.4 kgm^{-3}) 時，可以使體外多醣產量從 $12 \sim 14 \text{ kgm}^{-3}$ 增加到 $22 \sim 24 \text{ kgm}^{-3}$ ，並且在較高濃度時可以達到 28 kgm^{-3} 。而無機鹽類的添加會影想 β -glucan 的合成 (19, 20)，在本實驗中添加不同濃度的無機鹽與橄欖油 (圖四 (A) ~ (D))，隨著橄欖油濃度的提高菌絲體的產量增加但多醣產量降低 (圖四 (A))。低濃度的 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.1 %，有助於冬蟲夏草菌絲體與多醣的產量，隨著濃度的提昇反而抑制菌絲體與多醣的產量 (圖四 (B))， $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的添加，對冬蟲夏草菌絲體與多醣的產量則呈抑制現象 (圖四 (C))。0.1 % 鎂離子的添加則有助於冬蟲夏草菌絲體與多醣的產量 (圖四 (D))。

由此結果得知，橄欖油、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、鎂離子對冬蟲夏草菌絲體與多醣的產量有相當程度的影響，為了解此三因子之最適添加量與因子間相互影響效應，則經由 RSM 的試驗設計，來詳加探討。

(5). RSM 試驗設計之結果與討論

對冬蟲夏草菌絲培養之多醣體產量進行統計分析 (表一)，經回歸運算後可得

到以各因子單位水準來表示之方程式：

$$Y=66.18-33.6X_1-9.78X_2-10.04X_3$$

式中可知 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (X_1)、鎂離子 (X_2)、橄欖油 (X_3) 對多醣的產量有負面的影響，而 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (X_1) 的影響值遠較鎂離子 (X_2) 與橄欖油 (X_3) 大，表示 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 因子對冬蟲夏草菌絲培養之多醣體產量有更顯著的抑制。依據此表所得的結果，重新設計新一階的實驗組別，得到如表二所呈現的結果，當鎂離子與橄欖油之最適添加濃度分別為 0.06 % 與 0.12 % (表三)。

經由回應曲面法的探討，可以得知 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 的添加不利於冬蟲夏草菌絲培養多醣體之生成，而適量的鎂離子與橄欖油則有助於多醣的生成，這種結果的探討是傳統一次一因子法中所看不到的，因而應用回應曲面法可以減少資源的浪費，更可以得之各因子間的交互作用，使我們得到真正的最適化條件。

利用相同的研究方法，發現 Olive oil 添加、培養基的 C/N、起始 pH 值等均對其靈芝菌絲體液態培養有顯著影響。更進一步利用回應曲面法進行研究靈芝多醣生成的最適化條件，其中以 Olive oil 添加、培養基的 C/N、培養基起始 pH 值三個因子進行探討。經由實驗結果顯示靈芝多醣生成的最適化條件為：培養基的 C/N 為 45 55；Olive oil 添加量為 0.35 0.55mL；培養基起 pH 值為 4.0 5.0 (Data not show)。

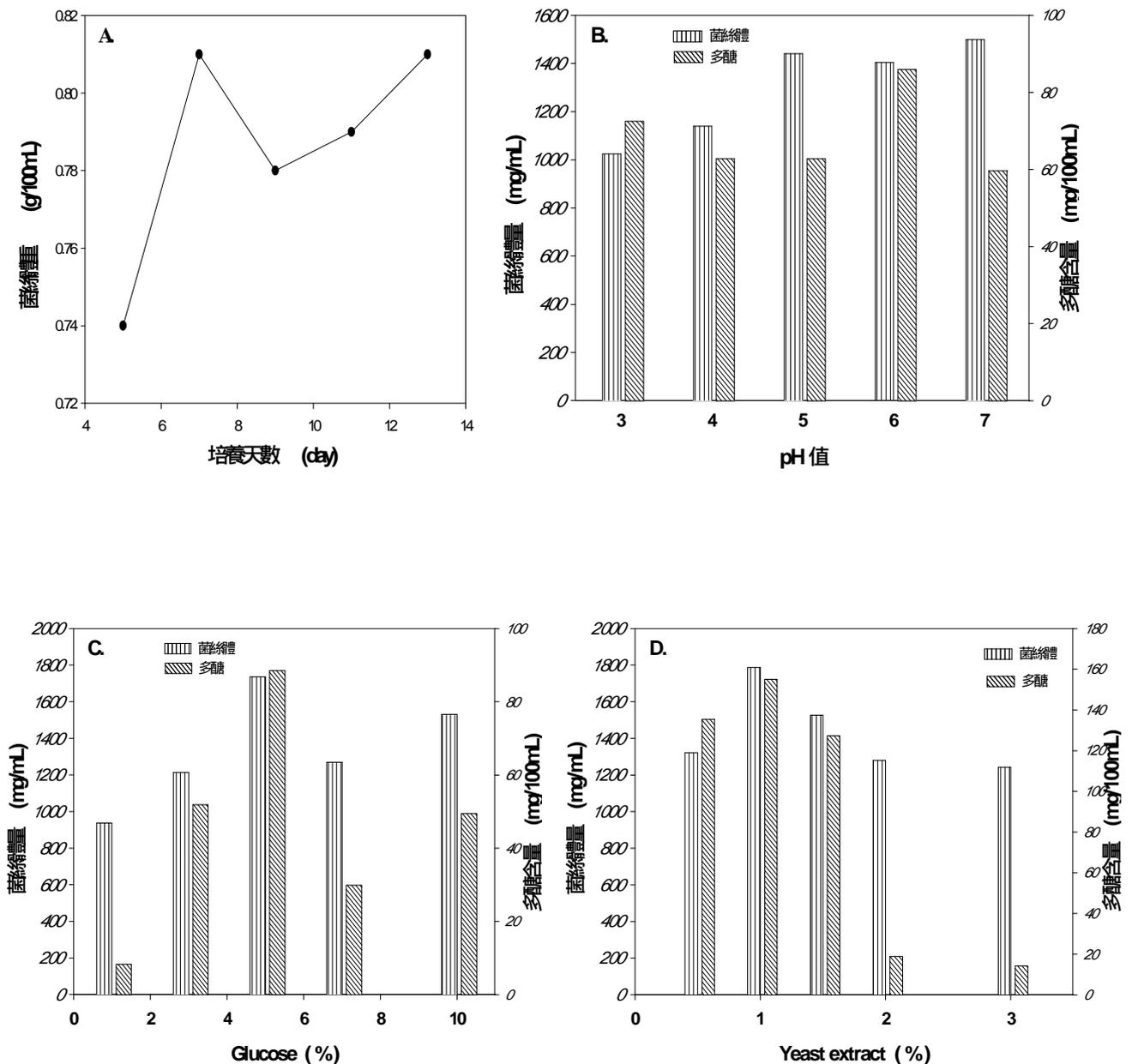
四、計畫成果自評

本計劃之執行，由於僅止於實驗室的研究規模，缺乏前置工廠的實驗數據，實是此一計劃之遺憾。冬蟲夏草是我國珍貴的傳統藥材，對其作進一部之前導工廠的實驗是有其必要性，尤其政府全力推動生物科技產業，於基礎研究單位設立前置工廠，可使產業界縮短量產研發時間以增加產業競爭力，在健康食品法公佈實行後，相關菌類產品的研發將是有增無減，縮短量化與產業化的時間是增加產業競爭力之不二法門，希望在日後之相關研究，能夠有前置工廠的設立與研究。

本計劃提供研究發酵最佳化條件之研究模式。讓參予研究者能學習以統計之概念，設計出相關的研究方法，以達到最佳化之目的。

五、參考文獻

- (1). 伊定華、唐雪梅，1995，冬蟲夏草人工培養研究的進展，中國中藥雜誌，20(12)：707-709。
- (2). 陳明、張榮，1995，冬蟲夏草中核甘及鹼基含量測定方法的研究，中成藥，17(4)：40-41。
- (3). 黃起鵬、李德河、梁吉春、療森泰及梁淑娃，1991，冬蟲夏草弱極性部分的化學成分研究，中藥材，14(11)：35-37。
- (4). 陳昭南，1992，細腳擬青黴(固培物)與冬蟲夏草化學成分的初步比較，中成藥，14(2)：36-37。
- (5). Miyazaki, T., Oilawa, N., and Yamada, H. 1997, Studies on fungal polysaccharides. XX. Galactomannan of *Cordyceps sinensis*. Chem. Pharm. Bull. 25(12)：3324-3328.
- (6). Kiho, T., Hui, J.I., Yamane, A., and Ukai, S. 1993, Polysaccharides in fungi. XXXII. Hypoglycemic activity and Chemical properties of the polysaccharide from the culture mycelium of *Cordyceps sinensis*. Biol. Pharm. Bull. 16(12)：1291-1293.
- (7). 蘇慶華，1993，利用分子篩-高效液態層析儀(SE-HPLC)分析真菌中藥材之1-3 beta 多醣體，行政院衛生署中醫藥年報，10(2)：477-499。
- (8). Kiho, T., Yamane, A., Hui, J.I., Usui, S., and Ukai, S. 1996, Polysaccharides in fungi. XXXVI. Hypoglycemic activity of the polysaccharide (CS-30) from the culture mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effects on glucose metabolism in mouse liver. Biol. Pharm. Bull. 19(2)：294-296.
- (9). 鄧計廷、吳林、燕宛如、吳國傳及謝以俊，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。
- (10). 劉訥坤，1991，冬蟲夏草及菌絲體要李研究近況，山東中醫雜誌，10(5)：42-44。
- (11). 馬玲、劉春光及姚小曼，1995，蟲草功能對小鼠免疫功能的影響，衛生毒理雜誌，9(3)：162-167。
- (12). Zhu., J.S., Halpern, G.M., and Jones, K. 1998a, The scientific rediscovery of the Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*: part I. J. Altern. Complement. Med. 4(3)：289-303.
- (13). Zhu., J.S., Halpern, G.M., and Jones, K. 1998b, The scientific rediscovery of a precious ancient Chinese herbal regimen: *Cordyceps sinensis*: part II. J. Altern. Complement. Med. 4(4)：429-457.
- (14). Box, G.E.P., and Wilson, K.B. 1951, On the experimental attainment optimum conditions. J. Roy. Statist. Soc. B13：1-45.
- (15). 高馥君，1992，回應曲面法在食品開發上的應用，化工 39：225-236。
- (16). 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 39：3-18。
- (17). Guiha, Y., and Guoshan, W. 1988, Apreliminary report on growth habit of *Cordyceps militaris*. Edible Fungi. 4：110-111.
- (18). Stasinopoulos, S. J., and R. J. Seviour. 1990. Stimulation of exopolysaccharide production in the fungus *Acremonium persicinum* with fatty acids. Biotech. Bioeng., 36：778-782.
- (19). Reeslev, M., and Jensen, B. 1995. Influence of Zn^{2+} and Fe^{3+} on polysaccharide production and mycelium/yeast dimorphism of *Aureobasidium pullulans* in batch cultivations. Appl. Microbiol. Biotechnol., 42：910-915.
- (20). Pilz, F., Auling, G., Stephan, D., Rau, U., and Wagner, F. 1991. A high affinity Zn^{2+} uptake system controls growth and biosynthesis of an extracellular, branched -1,3-B-1,6-glucan in *Sclerotium rolfsii* ATCC 15205. Mycol., 15, 181-192.



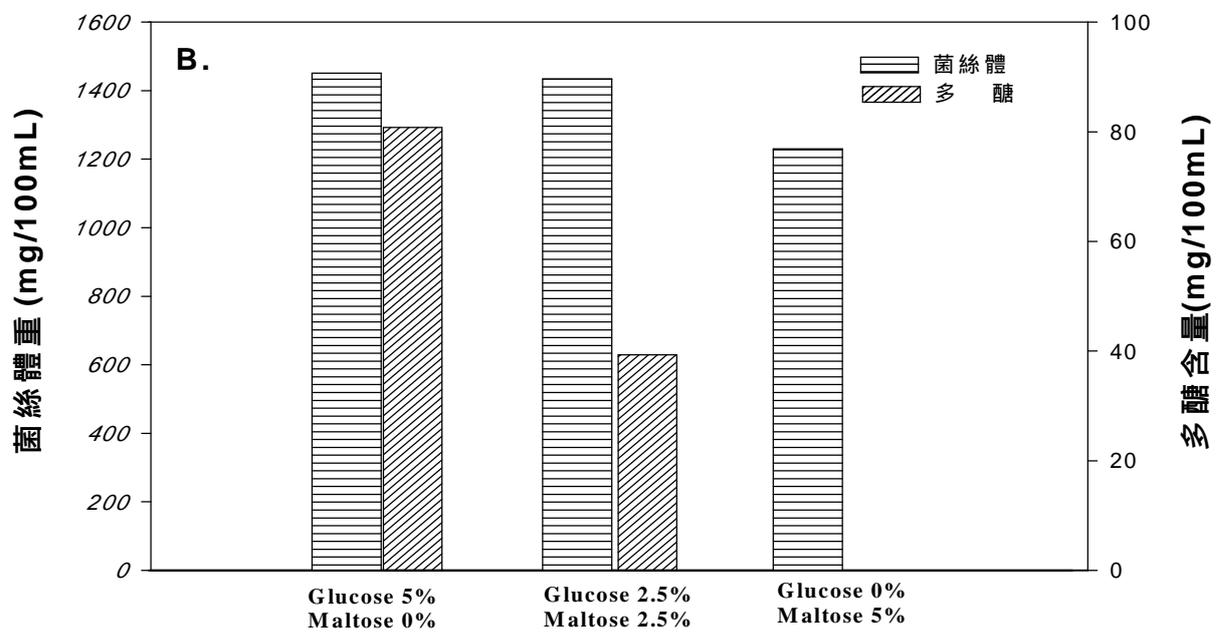
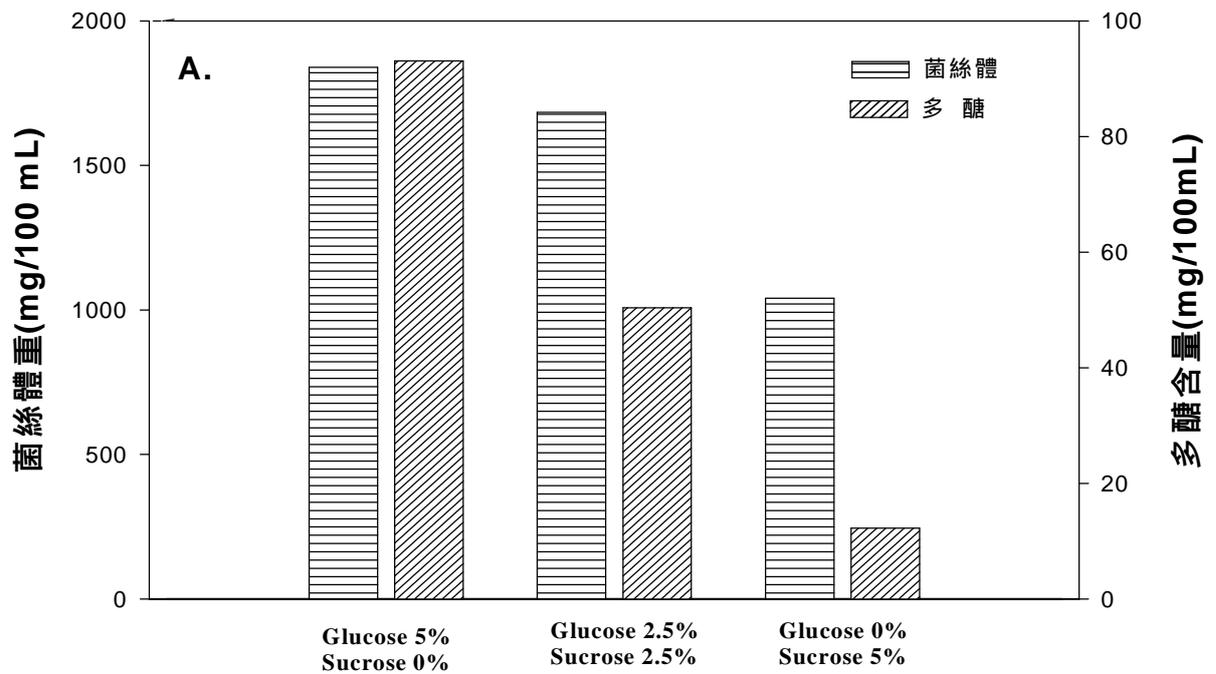
圖一：冬蟲夏草菌絲體基礎培養基最適化條件之決定。

A：以 PDB 為培養基，冬蟲夏草菌絲體在 23 、 120 rpm 下的成長曲線。

B：培養基中，起始酸鹼值 (pH 3、4、5、6、7) 對冬蟲夏草的菌絲體量與多醣生成量的影響。

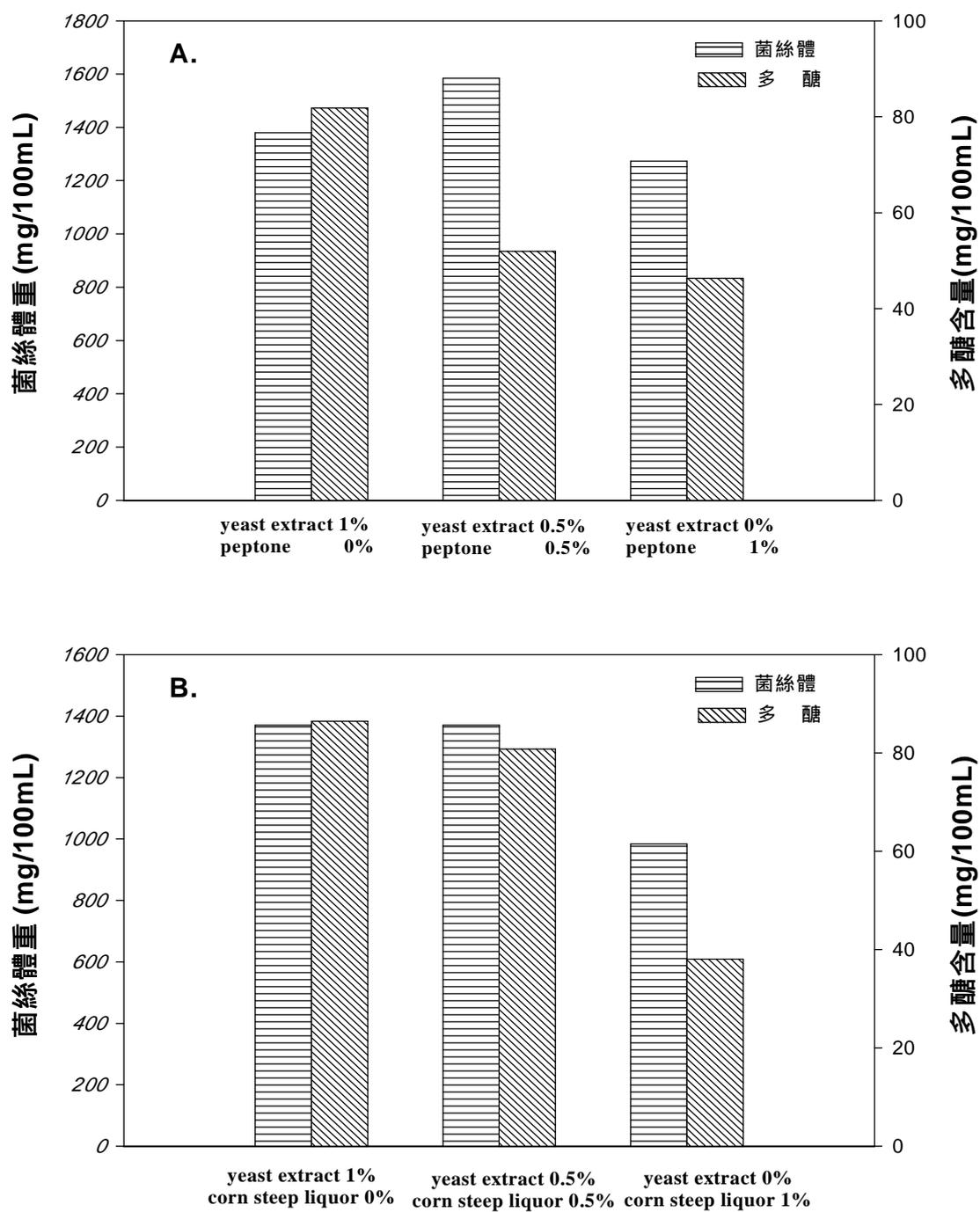
C：冬蟲夏草培養在含不同濃度葡萄糖 (1%、3%、5%、7%、10%) 的培養機中，對其菌絲體量與多醣生成量的影響。

D：培養基裡氮源，酵母抽出物，含量的變化 (0.5%、1%、1.5%、2%、3%) 與冬蟲夏草的菌絲體量及多醣生成量的關係。



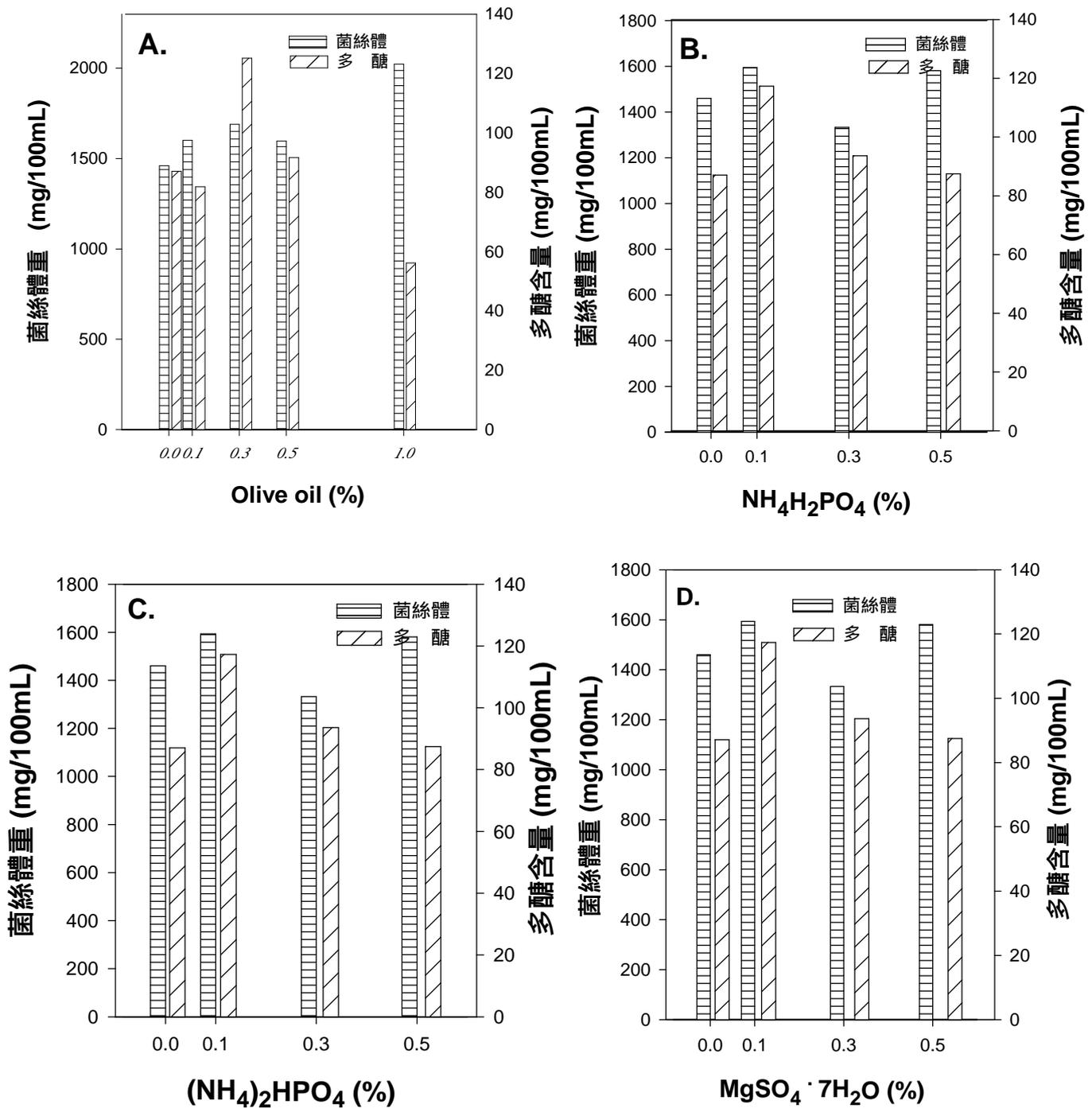
圖二：冬蟲夏草菌絲體對不同碳源反應之比較。

比較葡萄糖與蔗糖（A）及葡萄糖與麥芽糖（B）在培養基中的不同組成，對冬蟲夏草的菌絲體量與多醣生成量的影響。



圖三：冬蟲夏草菌絲體對不同氮源反應之比較。

比較 yeast extract 與 peptone (A) 及 yeast extract 與 corn steep liquor (B) 在培養基中的不同組成例，對冬蟲夏草的菌絲體量與多醣生成量的影響。



圖四：冬蟲夏草菌絲體養對不同無機鹽類與界面劑反應之比較。

冬蟲夏草的菌絲體培養時，加入不同濃度之無機鹽與油脂：(A) Olive oil、(B) NH₄H₂PO₄、(C) (NH₄)₂HPO₄ 與 (D) MgSO₄ · 7H₂O，對冬蟲夏草的菌絲體量與多醣生成量的影響。

表一：一階 RSM 實驗設計之結果

No.	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (g/100 mL)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/100 mL)	Oliver oil (mL/100 mL)	Polysaccharide (mg/100 mL)
1	0.1	0.1	0.2	93.14
2	0.5	0.1	0.2	65.34
3	0.1	0.5	0.2	85.42
4	0.5	0.5	0.2	40.88
5	0.1	0.1	1.0	91.86
6	0.5	0.1	1.0	33.93
7	0.1	0.5	1.0	61.48
8	0.5	0.5	1.0	57.36
9 (C)	0.3	0.3	0.6	70.49
10 (C)	0.3	0.3	0.6	75.38

No. 9 (C)、10(C) 表示是中心點

表二：陡升路徑實驗設計之結果

No.	NH ₄ H ₂ PO ₄ (g/100 mL)	MgSO ₄ · 7H ₂ O (g/100 mL)	Oliver oil (mL/100 mL)	Polysaccharide (mg/100 mL)
1	0.3	0.3	0.6	62.25
2	0.18	0.26	0.52	66.37
3	0.06	0.22	0.44	68.43
4	0	0.18	0.36	75.64
5	0	0.14	0.28	75.64
6	0	0.10	0.20	80.79
7	0	0.06	0.12	107.56
8	0	0.02	0.04	99.87
9	0	0	0	79.76

表三：中心混成實驗設計之結果

No.	MgSO ₄ · 7H ₂ O (g/100 mL)	Oliver oil (mL/100 mL)	Polysaccharide (mg/100 mL)
1	0.04	0.07	99.32
2	0.08	0.07	105.76
3	0.04	0.17	92.63
4	0.08	0.17	112.20
5	0.02	0.12	85.59
6	0.10	0.22	86.19
7	0.06	0.02	113.23
8	0.06	0.02	107.30
9	0.06	0.12	121.98
10	0.06	0.12	123.01
11	0.06	0.12	117.60
12	0.06	0.12	120.77
13	0.06	0.12	119.28