

培養基對蛹蟲草固態發酵生產蟲草素之影響

林冠廷 陳淑德* 鄭永祥

國立宜蘭大學生物技術研究所

摘要

蛹蟲草(*Cordyceps militaris*)發酵能產生具有免疫調節、抗氧化、降血糖等生理活性成分。本研究採用小麥、薏仁和糙米三種穀類作為蛹蟲草固態發酵主要的基質；並分別加入豬腸膜蛋白粉、血漿蛋白粉、魚粉和酵母粉作為氮源，以探討培養基成分對蛹蟲草固態發酵生產蟲草素(Cordycepin)之影響。結果顯示，以小麥作為蛹蟲草固態發酵之基質，魚粉作為氮源進行發酵，於 22°C 環境下培養，在第 35 天可獲得最高量的蟲草素為 11.31 mg/g。

關鍵詞：蛹蟲草，固態發酵，蟲草素

Effects of Media on Production of Cordycepin by *Cordyceps militaris* Solid-State Fermentation

Guan-Ting Lin Su-Der Chen* Yeong-Hsiang Cheng

Institute of Biotechnology, National Ilan University

Abstract

Cordyceps militaris fermentation can produce immunomodulatory, antioxidant, hypoglycemic and other physical activity components. In this study, adlay, rice and wheat were three different media for *Cordyceps* solid-state fermentation. Moreover, dried porcine soluble, spray-dried plasma protein, fish meal, and yeast powder were used as different nitrogen sources in media in order to investigate the effects of medium on production of cordycepin by *Cordyceps militaris* solid-state fermentation. The results showed that using wheat as a major medium and fish meal as a nitrogen source for *Cordyceps militaris* solid-state fermentation at 22°C could produce the highest concentration of cordycepin, 11.3 mg/g, after 35-days fermentation.

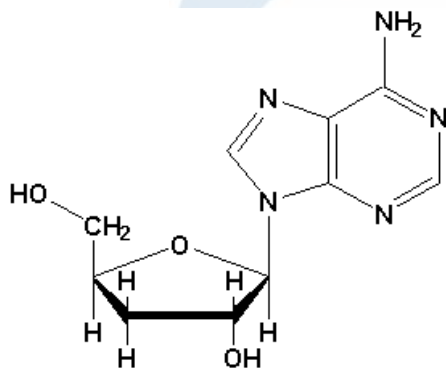
Key words: *Cordyceps militaris*, solid-state fermentation, cordycepin

*Corresponding author. E-mail: sdchen@niu.edu.tw

前言

蛹蟲草(*Cordyceps militaris*)別名北冬蟲夏草，為一種昆蟲寄生真菌，主要分布在中國大陸的高山地區，因採集不易數量稀少，所以價格較為昂貴。蛹蟲草具有的生物活性成分，包括多醣、腺苷(Adenosine)、蟲草素(Cordycepin)和甘露糖醇等(Russell & Paterson, 2008)。近幾年的研究報告證實蟲草具有抗腫瘤(Lin & Chiang, 2008)、調節免疫力(Kim *et al.*, 2006; Kuo *et al.*, 2007)、降血脂(Koh *et al.*, 2003)、降血糖(黃, 2004)、抗氧化(呂, 2007; Yu *et al.*, 2006)、增加鞣固酮生成(方, 2005)、抗病毒等活性(Holliday & Cleaver, 2004)。

蟲草素為 3'-deoxyadenosine 化合物(圖 A)，是蟲草屬中特有的具有生物活性之二次代謝產物(Bu'Lock *et al.*, 1965)，蟲草素被認定為蟲草屬中之標定化合物，且是蟲草治病防病的活性成分(王等, 2003)。蟲草素具有抗菌、免疫調節、抗腫瘤、抗病毒等活性。而且在蟲草屬中，蛹蟲草所含的蟲草素遠高於其餘蟲草屬的菌種。



Cordycepin (3'-deoxyadenosine)

圖 A 蟲草素之化學結構式(陳, 2002)。

Fig. A Chemical structure of Cordycepin.

固態發酵是利用低水分含量的天然顆粒狀的穀類如米、小麥、玉米、大豆或農業廢棄物作為基質(Couto & Sanroman, 2006)。與液態發酵相比，固態發酵培養具有高產率、低成本的培養基質、減少能源與成本、技術較為簡單、下游分離成本較低等優點(Philippoussis *et al.*, 2007; Prakash *et al.*, 2008)。

影響固態發酵產率之因素包括：培養基中的碳源、氮源、微量元素、pH 值和水分含量等基質特性與培養條件的溫度、接種量與培養基容量等。穀類可作為蟲草固態發酵的良好培養基質，因其具有完備的碳源和氮源(林, 2008)。本研究將以穀類基質培養，進行蛹蟲草固態發酵。

碳源是蛹蟲草合成碳水化合物和氨基酸的基礎，也是重要的能量來源。從碳源與蟲草素關係來看，培養基中碳源的增加，有利於菌絲體(Mycelial biomass)與蟲草素

的累積。氮是構成胺基酸之重要成分，亦是組成蛋白質與核酸的主要來源，氮源的種類會影響菌體生長。部分氮源可以轉作為碳源供菌體利用，有助於促使菌絲體於生長時的營養平衡及物質轉化(Carlile & Watkinson, 1994)。故本研究之目的是探討不同穀類和氮源培養基對蛹蟲草固態發酵生產蟲草素之影響。

材料與方法

一、實驗菌種

蛹蟲草(*Cordyceps militaris* BCRC 32219)購自生物資源保存及研究中心(新竹, 台灣)，以馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 PDA(Potato dextrose agar, Difco)平盤於 22°C 恆溫培養，每月於無菌操作台內進行繼代一次，並密封保存。

二、活化蛹蟲草菌液

以微量吸管吸取已滅菌之無菌水 5mL，洗下 PDA 培養皿的蛹蟲草菌絲，接入內含已滅菌冷卻之 PDB(Potato dextrose broth, Difco)培養基的 500 mL 具擋板三角搖瓶中，在 22°C 下以轉速 150 rpm 的恆溫振盪培養箱中(LM-600R, Yihder, Taiwan)震盪培養 5 天後，即得活化蛹蟲草菌液。

三、不同活化時間對蛹蟲草菌絲體的影響

活化之蛹蟲草菌液，在第 3 天、第 5 天、第 7 天、和第 10 天分別收瓶，以高速冷凍離心機(Kubota, high speed refrigerated centrifuge 6500) 轉速 8000 xg，離心 10 分鐘後，收集菌絲體，進行冷凍乾燥後秤重，以決定其菌絲體含量。

四、腺苷及蟲草素的分析(Chang *et al.*, 2005)

以高效能液相層析儀(HPLC)分析發酵產物中腺苷及蟲草素含量，先將腺苷及蟲草素標準品(Sigma, USA)以 15% 甲醇溶液分別稀釋成 100、200、300、400、500 及 600 $\mu\text{g/mL}$ ，再以 HPLC 分析並繪製腺苷及蟲草素標準曲線。稱取 0.5 g 乾燥發酵樣品裝入 10 mL 樣品瓶中，再加入 5 mL 15% 甲醇溶液，置入 100°C 烘箱中，萃取 60 分鐘後，再將萃取液分裝至 1.5 mL 微量離心管中，以轉速 14000 xg，離心 10 分鐘，收集上清液，以 0.22 μm 濾膜進行過濾後，裝入新的微量離心管中，以利後續 HPLC 分析。HPLC 分析條件：移動相為 0.02M KH_2PO_4 : MeOH(85:15(v/v))，樣品注入 HPLC 體積為 20 μL ，流速控制在 1.0 mL/min，UV 偵測器偵測波長為 254 nm，分析管柱為高效逆相層析柱 LiChrospher® 100 RP-18e (5 μm , Merck, Darmstadt, Germany)。

五、菌絲體的測定

(一) 純菌絲收集

以 5 mL 無菌水洗下 PDA 平板的蛹蟲草菌絲，接入已滅菌冷卻之 PDB 培養基中，在 22°C 下轉速 150 rpm 的

恆溫振盪培養箱中震盪培養 5 天後離心，將菌絲體進行冷凍乾燥。

(二) 麥角固醇之測定(Chang *et al.*, 2005)

將麥角固醇標準品(Sigma, USA)配成濃度 50、75、100、200 和 300 $\mu\text{g/mL}$ ，以 HPLC 所得面積繪製麥角固醇標準曲線圖。HPLC 條件如下：分離管柱以 LiChrospher® 100 RP-18e(5 μm , Merck, Darmstadt, Germany)注射量為 20 μL ，使用 100%甲醇(Labscan Asia Co., Ltd. Thailand)作為移動相，在檢測波長 282 nm，流速 1.0 mL/min 下進行分析。

(三) 菌絲體標準曲線

取液態發酵後經冷凍乾燥後之菌絲體粉末，加入無水酒精(島久藥品株式會社，日本)配製成 10、25 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 菌絲體標準溶液，於烘箱中以 60°C 萃取 60 分鐘，再以轉速 8000 $\times\text{g}$ 離心 10 分鐘後，取上清液，經 0.22 μm 濾膜 (TERUMO® Syringe with needle (TERUMO®, Philippines)) 進行過濾，置入新的微量離心管後進行 HPLC 分析，於麥角固醇標準品滯留時間處所得面積繪出菌絲體標準曲線，利用分析麥角固醇間接測定固態發酵產物菌絲體含量。

(四) 固態發酵產物菌絲體之測定

蛹蟲草穀類發酵產物經 60°C 熱風乾燥 24 小時後，將發酵產物以高速粉碎機均質粉碎。取 0.5 g 乾燥之菌絲體粉末加入 5 mL 無水酒精於 60°C 下萃取 60 分鐘，經 8000 $\times\text{g}$ 離心 10 分鐘後取上清液以 0.22 μm 濾膜進行過濾，以 HPLC 測定其麥角固醇含量，間接測定每克乾燥基質中菌絲體含量。

六、蛹蟲草固態發酵

以購自宜蘭市南館市場的小麥作為固態發酵培養基質。稱取 200 g 小麥加入 200 mL 水溶液，其中含 0.05% 磷酸二氫鉀(KH_2PO_4) (和光純藥工業株式會社，日本)、0.05% 硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、0.1% 磷酸二氫鈉 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、1% 葡萄糖(島久藥品株式會社，日本)和 5% 魚粉的氮源，裝入 800 mL 的玻璃瓶，於直立高壓蒸氣滅菌釜(TM-329, Tomin medical equipment Co., Ltd, Yihder)，121°C 殺菌 60 分鐘後，冷卻再接入 10 mL 已活化蛹蟲草菌液，於 22°C 恆溫培養箱中避光進行 0、4、7、14、21、28、35、42 天發酵培養，以決定蛹蟲草固態發酵最適生產蟲草素的發酵時間。

(一) 不同穀物作為蛹蟲草固態發酵培養基對腺苷和蟲草素產量的影響

分別以購自宜蘭市南館市場的小麥、糙米、薏仁作為固態發酵培養基質。取 200 g 穀類基質加入 200 mL 水溶液，內含 0.05% 磷酸二氫鉀、0.05% 硫酸鎂、0.1% 磷酸二氫鈉、1% 葡萄糖和 5% 魚粉為主要氮源，裝入 800 mL 的玻璃瓶，於 121°C 殺菌 60 分鐘後，冷卻再接入 10 mL 已活化蛹蟲草菌液，於 22°C 恆溫培養箱中避光進行 35 天發酵培

養，以決定最適蛹蟲草固態發酵的穀類培養基。

(二) 不同氮源對蛹蟲草固態發酵生產腺苷和蟲草素的影響

取 200 g 小麥基質加入 200 mL 水溶液，內含 0.05% 磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、0.05% 硫酸鎂、0.1% 磷酸二氫鈉、1% 葡萄糖，並分別加入 5% 魚粉、酵母粉、噴霧乾燥血漿蛋白粉(Spray-dried plasma protein, SDPP)和豬腸膜蛋白粉(Dried porcine soluble, DPS)作為氮源，裝入 800 mL 的玻璃瓶，於 121°C 殺菌 60 分鐘後，冷卻再接入 10 mL 已活化蛹蟲草菌液，於 22°C 恆溫培養箱中避光進行 35 天發酵培養，以決定最適蛹蟲草固態發酵培養基的氮源。

七、統計分析

實驗結果三重複，並以平均值±標準偏差表示，所得之數據使用 Statistical package for social science (SPSS, SPSS Inc., 宏德國際軟體諮詢顧問股份有限公司) 14.0 版統計套裝軟體進行統計分析，以多元全距檢定分析 (Duncan's multiple range test)，以顯著水準為 $\alpha=0.05$ ，比較其差異之顯著性。

結果與討論

一、預活化蛹蟲草搖瓶培養時間與菌絲體生長之影響

由實驗室的小量發酵，放大到量產的過程，為縮短整個發酵時程，菌種的預活化條件是十分重要的。蛹蟲草以 PDB 搖瓶培養天菌絲體含量的變化，當搖瓶培養至第 5 天已達最高菌絲體生成量 3.8 mg/mL 而後趨於持平(圖 1)。楊(2001)以酵母和麥芽萃取物之混合培養基發酵第 5 天時，冬蟲夏草菌絲體生成量為 6 mg/mL。Kim 及 Yun (2005) 於 40 g/L 葡萄糖混合 5 g/L 玉米粉培養基發酵 16 天後，蛹蟲草菌絲體含量為 4.15 mg/mL。周等(2006)更進一步指出蛹蟲草培養 5 天可達最高菌絲產量，繼續

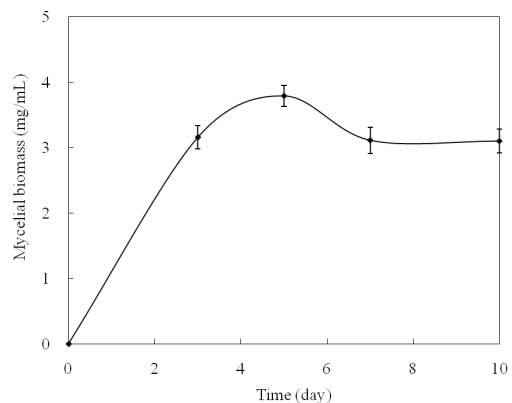


圖 1 PDB 搖瓶培養 0~10 天之蛹蟲草菌絲生長曲線
Fig. 1 The mycelial biomass growth curve of *C. militaris* in PDB during shaking-flask fermentation. (n=3, mean \pm S.D.)

培養產生菌絲體自溶(autolysis)現象，菌絲體質量開始下降進入衰退期，故選擇蛹蟲草搖瓶發酵 5 天作為活化菌種天數。

二、蛹蟲草固態發酵菌絲體之變化

蛹蟲草菌絲體於固態發酵培養期間之變化(圖 2)，於培養週期第 0 至 28 天期間，菌絲體量明顯的上升，由 0 mg/mL 增加至 18.2 mg/mL，自培養週期第 28 至 35 天，菌絲體量上升趨勢則較為緩慢，由 18.2 mg/mL 增加至 20.7 mg/mL，而菌絲體於發酵培養第 35 天後，即不再有明顯增加的趨勢。

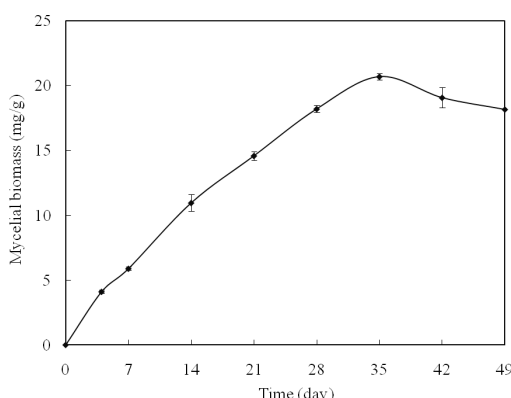


圖2 蛹蟲草固態發酵之菌絲生長曲線。

Fig. 2 The mycelial biomass growth curve of *C. militaris* solid-state fermentation. (n=3, mean ± S.D.)

三、蛹蟲草固態發酵期間蟲草素和腺苷含量之變化

蛹蟲草固態發酵培養至第 4 天測得產品中腺苷含量為 96.6 $\mu\text{g/g}$ ，之後腺苷含量隨發酵天數的增加而減少；至發酵第 28 天後，腺苷含量僅餘 40.0~63.4 $\mu\text{g/g}$ (圖 3)，此結果顯示菌體於發酵期間會先生成一級代謝產物的腺苷，然後再進一步生產二級代謝產物的蟲草素，故發酵時間會影響腺苷含量的變化。

自發酵週期第 0 至 28 天，蟲草素自 0 mg/g 逐漸增加至 6.15 mg/g；自培養第 28 天後，菌體在營養基質消耗殆盡的環境下，能使菌體進入二級代謝的階段，進而產生大量的次級代謝產物，開始增加蟲草素的代謝產量(圖 4)。於發酵培養第 35 天可獲得最高量之蟲草素為 11.31 mg/g。由於二次代謝物的生產機制極為複雜，有許多機制目前仍不清楚，但一般而言，二次代謝物通常受到逆境壓力時被誘導，因此良好的生長與二次代謝物的生產通常不能兼顧。

在腺苷含量方面，當菌體消耗培養基中的腺苷含量時，可能因其兩者間化學結構十分相似，而有利於蟲草素之生成。Chassy 和 Suhadolnik(1969)研究指出，腺苷可作為蟲草素合成的前驅物，蛹蟲草能將培養基中 25% 的腺苷成分轉換成蟲草素。劉等(1994)指出，蛹蟲草菌絲體中存有大量的腺苷及腺嘌呤等核苷類化合物，其含量

高於天然蛹蟲草。葉(2003)研究原始發酵培養基中腺苷含量愈高者，經培養後其蟲草素生成量則愈高。蟲草屬真菌的菌絲體中都存在微量的核苷類成分，分泌於胞外之產量極少(Tsutomu *et al.*, 1983)。故本研究進一步添加適量氮源，以了解幫助蛹蟲草菌是否能藉以增加核苷物質的生成。

比較黃(2009)固態發酵 28 天蟲草素為 7.566 mg/g、Mao 等(2005a)固態培養 18 天蟲草素 0.354 mg/g、李等(2007)液態培養 4 天蟲草素 2.77 mg/g、溫等(2005a)液態發酵 8 天蟲草素 7.94 mg/g、溫等(2005b)固態發酵蟲草素 4.46 mg/g、魏(2007)固態培養 21 天蟲草素 5.09 mg/g、Mao 等(2005b)液態發酵蟲草素 0.25 mg/g、Masuda 等(2007)液態發酵蟲草素 2.50 mg/g，本研究以固態發酵培養 35 天可產生之蟲草素含量達 11.31 mg/g。比較天然蟲草，蒙山

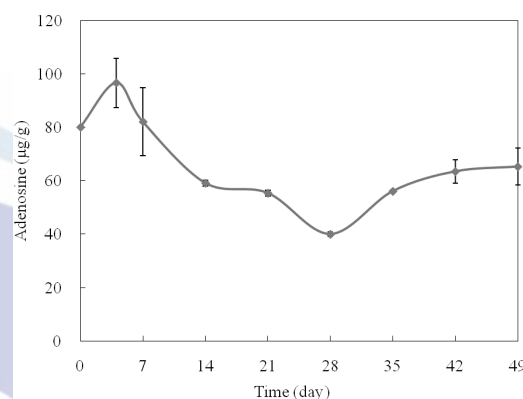


圖3 以小麥含5%魚粉為固態基質進行發酵之腺苷產量變化。

Fig. 3 The change of adenosine concentration during 42-days *C. militaris* solid-state fermentation in wheat with 5% fish meal. (n=3, mean ± S.D.)

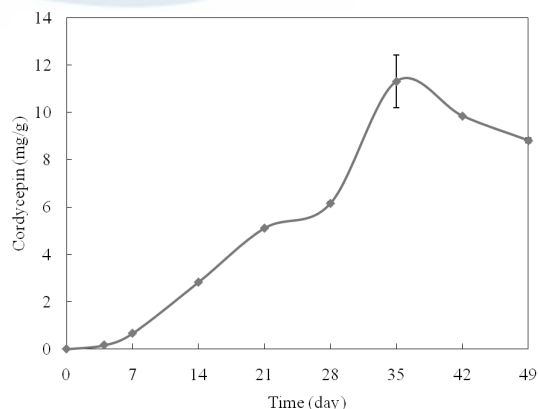


圖4 以小麥含5%魚粉為固態基質進行發酵之蟲草素產量變化。

Fig. 4 The change of cordycepin concentration during 42-days *C. militaris* solid-state fermentation in wheat with 5% fish meal. (n=3, mean ± S.D.)

九州蟲草蟲草素 4.36 mg/g(陳等, 2005)、無錫山蛹蟲草蟲草素 2.23 mg/g(陳等, 2006)、河南伏牛山蛹蟲草蟲草素 10.29 mg/g、江西井冈山山蛹蟲草蟲草素 6.59 mg/g(溫等, 2008), 本研究以固態發酵培養 35 天可產生蟲草素含量多出天然蛹蟲草蟲草素約 10~70%以上。

四、不同穀物對蛹蟲草固態發酵生成菌絲體、蟲草素及腺苷之影響

以薏仁、糙米和小麥作為不同穀類基質，進行蛹蟲草固態發酵 35 天，分析其菌絲體含量(圖 5)；以薏仁、糙米和小麥作為基質時，菌絲體含量分別為 20.1 mg/g、15.4 mg/g 和 20.7 mg/g。Cochrane(1958)指出，微生物藉由本身所產生的酵素分解利用碳源。結果顯示，以薏仁或小麥皆可作為主要碳源，可得到較佳的菌絲產量。

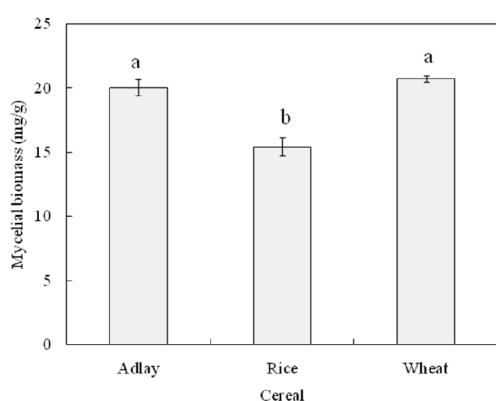


圖5 不同穀物基質(薏仁、米、小麥)含5%魚粉經蛹蟲草固態發酵35天之菌絲體含量。

Fig. 5 The mycelial biomass concentration in different cereal substrates (adlay, rice, wheat) with 5% fish meal after 35-days *C. militaris* solid-state fermentation. (n=3, mean ± S.D.)
^{a-b}Means in the same row followed by different letters are significantly different. (p<0.05)

以薏仁、糙米和小麥作為不同穀類基質進行蛹蟲草固態發酵，並於第35天測定蟲草素含量(圖6)；以薏仁、糙米和小麥作為基質時，蟲草素含量分別為6.11 mg/g、5.14 mg/g及11.31 mg/g。故蟲草素的生成量以小麥作為基質時，可於發酵第35天達最高量為11.31 mg/g。另一方面，由於本研究的穀類發酵基質中的含水量為50%的糙米和薏仁，殺菌後會形成糊狀，不容易質傳、散熱和氧氣傳遞，此可能影響菌絲生長，導致無法獲得更高量的二次代謝產物。

以薏仁、糙米和小麥作為穀類基質進行蛹蟲草固態發酵，於第35天測定腺苷含量(圖7)；以薏仁、糙米和小麥作為基質時，腺苷含量分別為103.4 μg/g、104.4 μg/g及56.1 μg/g。以薏仁及糙米作為基質時，能得到較高的腺苷生成量，此可能是以小麥為基質的發酵物中，腺苷的被利用率較佳，它進一步轉化成為蟲草素或被利用組

成其他的次級代謝產物，故造成小麥基質發酵物中的腺苷含量較薏仁及糙米低。

針對三種穀類固態基質，薏仁主要成份為醣類、脂肪、蛋白質以及豐富的維生素、礦物質(鈣、鉀、磷、鐵)等。糙米主要成份為醣類、脂肪、蛋白質以及豐富的維生素B群、纖維素等。小麥主要成份為醣類、蛋白質、脂肪、礦物質(鈣、鐵)及維他命A等。由於碳源為菌體生長主要能量來源之一，同時也是構成菌絲骨架的主要來源。固態基質顆粒的尺寸大小影響到單位體積反應面積，進而影響菌絲的生長、氧氣的供給、二氧化碳的移出與發酵熱的移除。小麥基質顆粒可以明顯提高固態發

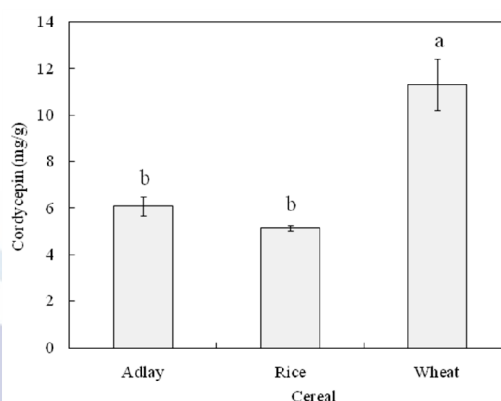


圖 6 不同穀物基質(薏仁、米、小麥)含 5%魚粉經蛹蟲草固態發酵 35 天之蟲草素含量。

Fig. 6 The cordycepin concentration in different cereal substrates (adlay, rice, wheat) with 5% fish meal after 35-days *C. militaris* solid-state fermentation. (n=3, mean ± S.D.)

^{a-b}Means in the same row followed by different letters are significantly different. (p<0.05)

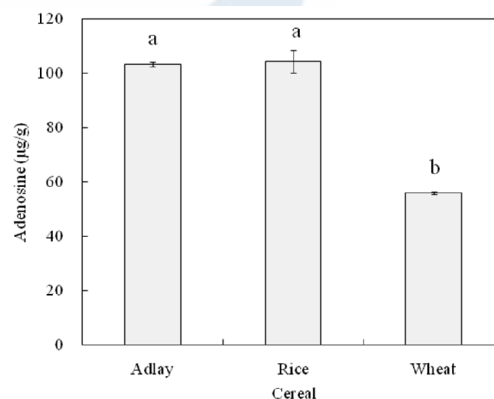


圖 7 不同穀物基質(薏仁、米、小麥)含 5%魚粉經蛹蟲草固態發酵 35 天之腺苷含量。

Fig. 7 The adenosine concentration in different cereal substrates (adlay, rice, wheat) with 5% fish meal after 35-days *C. militaris* solid-state fermentation. (n=3, mean ± S.D.)

^{a-b}Means in the same row followed by different letters are significantly different. (p<0.05)

酵速率，糙米與薏仁的顆粒則由於基質的積團，固態基質間隙變小，對熱傳與質傳產生不利，故需充分瞭解基質的特性，方有助於整個固態發酵製程。

Mao 等(2005a) 分別以乳糖、蔗糖、葡萄糖、果糖、半乳糖、麥芽糖和木糖作為碳源，進行蛹蟲草深層發酵，得到以葡萄糖為最適碳源的結果，於第 18 天得到最高量的蟲草素 0.345 mg/g，較本研究固態發酵的蟲草素含量低，此可能由於穀類基質提供固態發酵較佳的碳源和發酵時間增長所致。

李等(2007)以蟬擬青霉液體培養，研究顯示，以麩皮作為碳源時，蟲草素含量最高，達 2.8 mg/g，明顯較本研究的 11.3 mg/g 為低，其餘依次為葡萄糖、麥芽糖、白砂糖、蔗糖、乳糖；同時麩皮作為碳源時，生物質量也較高，達 12 mg/mL，但此均較本研究之菌絲體量的 20.7 mg/mL 含量低。

麥(2008)於培養皿，PDA培養基上試驗，針對碳源對蛹蟲草菌絲生長速度與長勢的影響，依序為：葡萄糖>蔗糖>麥芽糖>果糖>澱粉。可能是因為葡萄糖是活細胞的能量來源和新陳代謝的重要中間產物，澱粉多醣是為貯存能量的主要方式。欲獲得大量蛹蟲草菌絲體，需要給予高濃度之碳源以助於菌絲體增殖生長；如果以蟲草素為目標產物之狀態下，則需給予濃度較低之碳源含量，讓菌體於較少的培養天數下能進入次級代謝的階段。

溫等(2005b)的固態發酵研究指出，在培養基中的蟲草素含量均高於在子實體中蟲草素含量，因此，固態發酵培養菌絲體可代替子實體用來生產代謝產物-蟲草素；但腺苷在培養基中的含量很低(<1 mg/g)，比子實體低得多。

五、不同氮源對菌絲體、蟲草素及腺苷生成之影響

以 5%之 SDPP、酵母粉、DPS 和魚粉作為氮源進行蛹蟲草固態發酵，並於第 35 天測定菌絲體含量(圖 8)；以 SDPP、酵母粉、DPS 和魚粉作為氮源時，菌絲體含量分別為 16.7 mg/g、19.1 mg/g、17.9 mg/g 及 20.7 mg/g。推論為魚粉較其他氮源含有更高量之蛋白質和核苷類物質，會影響菌絲生長。

以 5%之 SDPP、酵母粉、DPS 和魚粉作為氮源進行蛹蟲草固態發酵，於第 35 天測定蟲草素含量(圖 9)；以 SDPP、酵母粉、DPS 和魚粉作為氮源時，蟲草素含量分別為 6.60 mg/g、6.49 mg/g、6.35 mg/g 和 11.31 mg/g，故以魚粉作為氮源時，可得較高的蟲草素生成量。

以 5%之 SDPP、酵母粉、DPS 和魚粉作為氮源進行蛹蟲草固態發酵，於第 35 天測定腺苷含量(圖 10)；以 SDPP、酵母粉、DPS 和魚粉作為氮源時，腺苷含量分別為 56.3 μg/g、65.7 μg/g、154.3 μg/g 和 56.1 μg/g，故以 DPS 為氮源時，能得到較高的腺苷生成量。可能原因是在利用其他氮源的發酵物中，腺苷的被利用率較高，腺苷可能轉化成為蟲草素或其他二級代謝產物，所以造成此結果。

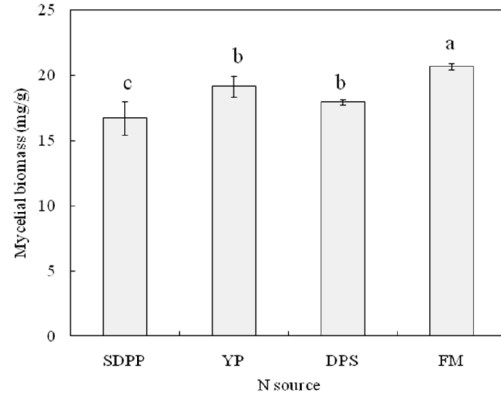


圖 8 蛹蟲草利用不同氮源固態發酵 35 天之菌絲體含量。(SDPP、YP、DPS、FM 分別為噴霧乾燥血漿蛋白粉、酵母粉、豬腸膜蛋白粉、魚粉)

Fig. 8 The mycelial biomass concentration after 35-day *C. militaris* solid-state fermentation in different nitrogen sources. (n=3, mean ± S.D.)
a-c Means in the same row followed by different letters are significantly different. (p<0.05)

SDPP: Spray-Dried Plasma Protein; YP: Yeast Powder; DPS: Dried Porcine Soluble; FM: Fish Meal.

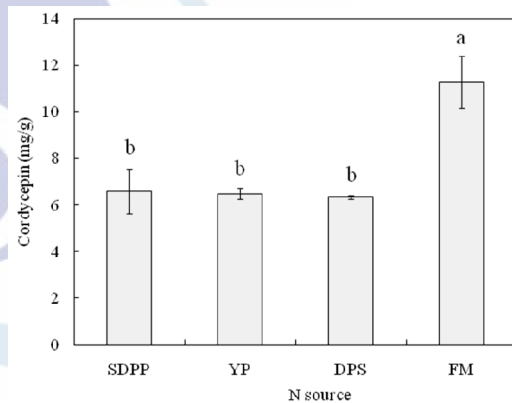


圖 9 蛹蟲草利用不同氮源固態發酵 35 天之蟲草素含量。(SDPP、YP、DPS、FM 分別為噴霧乾燥血漿蛋白粉、酵母粉、豬腸膜蛋白粉、魚粉)

Fig. 9 The cordycepin concentration after 35-day *C. militaris* solid-state fermentation in different nitrogen sources. (n=3, mean ± S.D.)
a-b Means in the same row followed by different letters are significantly different. (p<0.05)

SDPP: Spray-Dried Plasma Protein; YP: Yeast Powder; DPS: Dried Porcine Soluble; FM: Fish Meal.

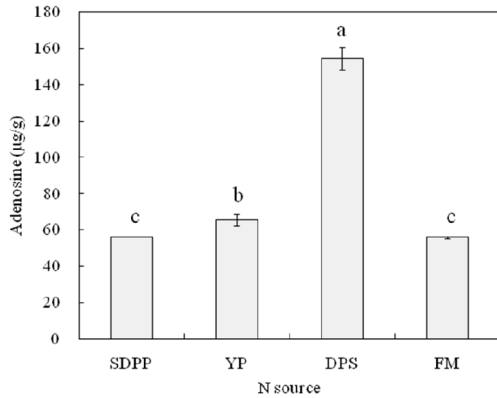


圖 10 蛹蟲草利用不同氮源固態發酵 35 天之腺苷含量。(SDPP、YP、DPS、FM 分別為噴霧乾燥血漿蛋白粉、酵母粉、豬腸膜蛋白粉、魚粉)

Fig. 10 The adenosine concentration of different nitrogen sources for 35-day *C. militaris* solid-state fermentation. (n=3, mean ± S.D.)

^{a-c}Means in the same row followed by different letters are significantly different. (p<0.05)

SDPP: Spray-Dried Plasma Protein; YP: Yeast Powder; DPS: Dried Porcine Soluble; FM: Fish Meal.

魚粉較酵母粉、SDPP及DPS有更佳的消化率，及優良的維生素供給來源。酵母粉中主要為酵母菌，其被活化後，單醣類的葡萄糖及果糖最先被消耗掉，在經過一段時間的新陳代謝之後，酵母開始分解富含多醣類的基質。培養基中所含的微量元素也會影響酵素的活性，進而影響菌體生長及代謝產物分泌的速度。

氮是一般為菌體構成胺基酸之重要成分，亦是組成蛋白質與核酸的主要來源，氮源的種類會影響菌絲生長。氮源是微生物分解有機物質的重要元素，這些氮源會被利用於微生物體的生長(Girma *et al.*, 2009)。有機碳源對於發酵微生物來說，是主要的能量來源，氮源可以增強利用這些碳源的效率。基質中含高碳氮比值時，微生物缺乏足夠氮源去分解碳源，導致發酵過程變緩慢，然而，基質在低碳氮比值時，會加速有機質的分解，造成氮素的礦化作用，即微生物需求過剩之有機氮源轉化為散佈空氣中之無機氮源。礦化作用會造成微生物營養生長的停止和起始二次代謝階段，碳氮源之耗竭，會促使產生微生物分解纖維素、半纖維素和木質素等，同樣地，過多的氮源會抑制微生物對木質素之分解(Erwin *et al.*, 1995)。愈高的碳氮比表示基質中愈多的可利用碳源，對菌絲體的生長幫助也愈大；但碳氮比在超過一臨界值(依菌體和基質有所不同)後，碳源對於菌體之生長即不再有幫助。這些過量的碳源甚至可能抑制酵素的作用，造成菌絲生長速率的減慢(Lilly & Barnett, 1951)。碳源、氮源和其之間之平衡關係，對於真菌的生長扮演著重要的角色，因為碳氮比間的交互作用除影響菌絲生長外，同時

也會影響到菌絲體中蛋白質和脂質的含量(Carlile & Watkinson, 1994)。

根據 Mao 等(2005b)液態發酵的研究指出，分別以酵母抽出物、蛋白脛、酪蛋白酵素水解物、酪蛋白酸水解物及蛋白加酵母抽出物作為氮源，進行蟲草液態發酵，蟲草素生成量是以蛋白脛為最佳氮源，在第 17 天可達最高量為 0.25 mg/mL 明顯較本研究之固態發酵 35 天的蟲草素含量低，若依成本考量，本研究以魚粉作為氮源，比起蛋白脛的成本便宜，又可以產生更高量的蟲草素，故未來可使用魚粉作為替代氮源，進行蛹蟲草固態發酵，可生成最高量之蟲草素。

溫等(2005a)以魚粉作為氮源，進行液態發酵。菌絲體產量逐漸增加，在第 7 天達到最高值(1.2 mg/g)後開始緩慢降低。培養液中的蟲草素從第 1 天就開始產生，直至第 8 天接近 0.09 mg/mL，再向後漲勢趨緩；腺苷則始終處於很低水平，隨時間延長雖略有波動，但一直未突破 0.01 mg/mL。菌絲的腺苷含量前期上升很快，並在前 8 天一直高於蟲草素，且高出很多，第 6 天時達最高，隨後開始下降，第 8 天時應蟲草素相等，之後即低於蟲草素，蟲草素始終呈上升趨勢，於第 9 天後升勢漸緩。每瓶 100 mg 培養液，在第 8 天時的蟲草素總量為 7.94 mg，菌絲體為 1.27 mg，但此均較本研究固態發酵的蟲草素和菌絲體含量低。

溫等(2005b)以豆粉、豆粕、蛹粉、魚粉作為氮源進行固態發酵，其蟲草素含量以豆粕的 7.28 mg/g 和魚粉的 6.98 mg/g，高於在子實體中蟲草素含量為 4.46 mg/g，因此，固態發酵菌絲體可代替子實體作為提取蟲草素之來源；但腺苷在培養基中的含量很低(<1 mg/g)，比子實體低得多，且各氮源之間相差不大。

周等(2006)以蔗糖作為碳源，蛋白脛作為氮源，液態培養 5 天達到最大，其菌絲體濃度為 17.31 g/L。繼續培養，產生菌絲體自溶現象，且菌絲體濃度開始下降，開始進入衰退期，此較本研究的菌絲體濃度低。

李等(2007)以蟬擬青霉液體培養，以酵母粉作為氮源時，蟲草素含量最高，為 2.5 mg/g，遠高於其它 8 種氮源(蛋白脛、牛肉膏、蛹粉、豆粕、黃豆粉、硝酸鈉、硫酸銨、硝酸銨)。菌體生長的前 4 天，隨著時間的增加，蟲草素產量不斷增加，第 4 天產量已達 1.14 mg/g，到第 5 天僅略有提高，為 1.15 mg/g，此後產量開始下降，可能是因為培養基中的營養物質消耗殆盡，菌體衰亡而影響二次代謝物的產生；同時菌絲體在第 4 天也較高，為 1.84 g/100mL，故確定 4 天為最佳培養時間，測定蟲草素含量最適化後可高達 2.77 mg/g。與本研究比較，魚粉氮源較酵母粉能得到較高量之蟲草素，含量為 11.3 mg/g，且以固態發酵程序生產二次代謝產物方面，因其培養特性可產生較高濃度的產物(黃等，2003; 吳等，2003)。

麥(2008)於培養皿，PDA 培養基上試驗，針對氮源

對菌絲生長速度與長勢，依序為：蛋白脛>黃豆粉>尿素>硫酸銨>硝酸鉀。故以有機氮比無機氮更有利於菌絲的生長，可能是因為部分的氮源可以轉作為碳源供菌體利用，有助於促使菌體於生長時的營養平衡及物質轉化(Carlile & Watkinson, 1994)。趙和郭(2008)以液態培養基配方葡萄糖、蔗糖、蛋白脛、酵母粉，培養 8 天，其菌絲體質量為 19.5 g/L，此較本實驗的菌絲體質量少。

結 論

本研究以小麥作為蛹蟲草固態發酵之基質，魚粉作為氮源進行發酵，於 22°C 環境下培養，在第 35 天可獲得最高量的蟲草素為 11.31 mg/g，蛹蟲草固態發酵物可供保健食品之量產開發應用。

誌謝

本研究的部分經費由農委會計畫編號:96農科-2.1.3-牧-U1(3)所提供，謹伸謝忱。

參考文獻

- 方宋齡。2005。蟲草素對雄性小鼠萊氏細胞固醇類生成之影響。國立成功大學細胞生物及解剖學研究所碩士論文。
- 王蕾、于榮敏、張輝、賓文、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。
- 吳其飛、黃達明、管國強、陸建明。2003。固態發酵蛋白飼料生產線的設計與研製。食品與發酵工業，29(9): 78-81。
- 呂欣怡。2007。蛹蟲草水萃取物之抗氧化、抗發炎與抗血管新生之研究。私立中山醫學大學營養學研究所碩士論文。
- 李瑞雪、胡飛、陳安徽、樊美珍。2007。蟬似青霉高產蟲草素菌株液體培養工藝的研究。徐洲工程學院學報，22(10): 23-30。
- 周洪波、肖升木、阮承超、邱冠周。2006。蛹蟲草液體的深層發酵。中南大學學報自然科學版，37(6): 1098-1102。
- 林秀芸。冬蟲夏發酵物之抗氧化活性及免疫調節之研究。國立宜蘭大學食品科學系碩士論文。宜蘭。(2008)
- 陳尚衛、虞銳鵬、朱松、吳勝芳、戴軍。2006。高效液相色譜法同時測定蛹蟲草中四種核苷類活性成分。食品安全與檢測，22(6): 107-109。
- 陳暢、羅珊珊、史豔秋、孫迎節、張長鎧。2005。液質聯用法對兩種蟲草中核苷類成分的研究。中國生化藥物雜誌，26(5): 260-263。
- 麥焯棉。2008。不同生態因子對蛹蟲草菌絲生長影響的研究。佛山科學技術學院學報自然科學版，26(4): 56-60。
- 黃達明、吳其飛、陸建明、管國強。2003。固態發酵技術及其設備的研究進展。江蘇大學生物工程研究所學報，第 29 卷第 6 期: 87-91。
- 黃靖涵。2009。蛹蟲草水萃液抑制人類肺癌細胞生長機制之研究。國立宜蘭大學生物技術研究所碩士論文。
- 黃騰億。2004。冬蟲夏草於糖尿病大鼠模式中之降血糖機制探討。私立東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。
- 楊雅琚。2001。蟲草屬菌種之深層培養及其區分物之抗氧化性評估。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。
- 溫魯、夏敏、宋虎衛、蔣潔、袁丞墅。2005a。液體培養蛹蟲草蟲草素和腺苷的代謝量。微生物學通報，32(3): 91-94。
- 溫魯、夏敏、葛宜和、劉金剛、翁梁、喻漣淮、王帥、沈芳、蔣紅。2005b。以蟲草素和腺苷含量為指標優化蛹蟲草人工栽培。江蘇農業學報，21(4): 359-363。
- 溫魯、翁梁、朱明佛、劉森琴。2008。不同林區蛹蟲草活性成分含量的比較。林業科學，44(8): 149-151。
- 葉淑幸。2003。培養基中碳氮源與培養方式對蛹蟲菌(*Cordyceps militaris*)發酵產程中生質、菌絲及生物活性成分之影響。大葉大學食品工程學系碩士論文。彰化。
- 趙潤、郭成金。2008。冬蟲夏草菌絲體液體培養基的優化。天津師範大學學報自然科學版，28(1): 8-11。
- 劉潔、楊旭、陳正、梁曼義、李景洛。1994。蠶蛹蟲草鎮靜及性激素樣作用的研究。白恩求醫科大學學報，20(1): 14-16。
- 魏羽橙。2007。蛹蟲草發酵產物萃取液誘導人類及犬乳癌細胞凋亡機制之探討。國立宜蘭大學生物技術研究所碩士論文。
- Bu'Lock, J. D., Hamilton, D., Hulme, M. A., Powell, A. J., Shepherd, D., Smalley, H. M., and Smith, G. N. 1965. Metabolic development and secondary biosynthesis in *Penicilliummurticae*. Can. J. Microbiol., 11: 765-778.
- Charlile, M. J., and Watkinson, S. C. 1994. The Fungi, Academic Press, London, Boston, San Diego, New York, Sydney, Tokyo, 9-76, 77-139, 153-172, 191-201.
- Chang, C. Y., Lue, M. Y., and Pan, T. M. 2005. Determination of adenosine, cordycepin and ergosterol contents in cultivated *Antrodia camphorata* by HPLC method. J. Food Drug Anal., 13(4): 338-342.
- Chassy, B. M., and Suhadolnik, R. J. 1969. Nucleoside antibiotics IV. Metabolic fate of adenosine and cordycepin by *Cordyceps militaris* during cordycepin

- biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 182: 307-315.
- Cochrane, V. W. 1958. *Physiology of fungi*. John Wiley and Sons, New York, p296.
- Couto, S. R., and Sanroman, M. A. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *J. Food Eng.*, 76: 291-302.
- Girma, K., Zhang, H., and Roberts, W. 2009. Building soil organic matter for a sustainable organic crop production. Division of agricultural sciences and natural resources, Oklahoma state university. PSS-2257: 1-4.
- Holliday, J., Cleaver, P., Loomis-Powers, M., and Patel, D. 2004. Analysis of quality and techniques for hybridization of medicinal fungus *Cordyceps sinensis*. *Intern. J. Med. Mushrooms*, 6: 147-160.
- Kim, H. G., Shrestha, B., Lim, S. Y., Yoon, D. H., Chang, W. C., Shin, D. J., Han, S. K., Park, S. M., Park, J. H., Park, H. II., Sung, J. M., Jang, Y., Chung, N., Hwang, K. C., and Kim, T. W. 2006. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 545(2-3): 192-199.
- Kim, H. O., and Yun, J. W. 2005. A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. *J. Appl. Microbiol.*, 99: 728-738.
- Koh, J. H., Kim, J. M., Chang, U. J., and Suh, H. J. 2003. Hypocholesterolemic effect of hot-water extract from mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Biol. Pharm. Bull.*, 26: 84-87.
- Kuo, C. F., Chen, C. C., Lin, C. F., Jan, M. S., Huang, R. Y., Luo, Y. H., Chuang, W. J., Sheu, C. C., and Lin, Y. S. 2007. Abrogation of streptococcal pyrogenic exotoxin B-mediated suppression of phagocytosis in U937 cells by *Cordyceps sinensis* mycelium via production of cytokines. *Food Chem. Toxicol.*, 45(2): 278-285.
- Lilly, V. G., and Barnett, H. L. 1951. *Physiology of the Fungi*, McGraw-Hill Book Co., New York, Toronto, London, 22-44, 304-337, 355-371.
- Lin, Y. W., and Chiang, B. H. 2008. Anti-tumor activity of the fermentation broth of *Cordyceps militaris* cultured in the medium of *Radix astragali*. *Process Biochem.*, 43(3): 244-250.
- Mao, X. B., Eksriwong, T., Chauvatcharin, S., and Zhong, J. J. 2005a. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Process Biochem.*, 40: 1667-1672.
- Mao, X. B., and Zhong, J. J. 2005b. Significant effect of NH_4^+ on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme Microb. Tech.*, 38: 343-350.
- Masuda, M., Urabe, E., Honda, H., Sakurai, A., and Sakakibara, M. 2007. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme Microb. Tech.*, 40: 1199-1205.
- Philippoussis, A., Diamantopoulou, P., and Israilides, C. 2007. Productivity of agricultural residues used for the cultivation of the medicinal fungus *Lentinula edodes*. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 59: 216-219.
- Prakash, G. V. S. B., Padmaja, V., and Kiran, R. R. S. 2008. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technol.*, 99: 1530-1537.
- Russell, R., and Paterson, M. 2008. Cordyceps-A traditional chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory. *Phytochemistry*, 69: 1469-1495.
- Tsutomu, F., Masao, H., and Masayuki, M. 1983. N^6 -(2-hydroxyethyl)adenosine, a biologically active compound from cultured mycelia of *Cordyceps* and *Isaria* species. *Phytochemistry*, 22(11): 2509-2512.
- Yu, H. M., Wang, B. S., Huang, S. C., and Duh, P. D. 2006. Comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 3132-3138.

99年9月8日投稿
99年12月10日接受