

MC-Transaction on Biotechnology, 2011, Vol. 3, No. 1, e1

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

文獻回顧：

北蟲夏草菌絲體液態發酵培養

陳郁雯、梁致遠、鄭建瑋*

銘傳大學健康科技學院生物科技學系(中華民國 台灣 桃園)

中文摘要

由於野生冬蟲夏草資源枯竭且無法人工培養，因而使得易於人工培養的北蟲夏草生產成為近年來的一種新興事業。本文簡要回顧近年來有關於北蟲夏草的研究文獻，大抵而言人工培養的北蟲夏草菌絲體中所含有的蟲草素成分遠高於野生冬蟲夏草。北蟲夏草液態培養時，需考慮培養基組成、酸鹼值、培養溫度與攪拌速率等因素以求菌絲體生長的最佳化。然而機能性成分生成的生產控制條件卻可能與菌絲生長不同，因此在逐次放大的量化生產過程中，應逐一檢討各種控制條件。

關鍵字：冬蟲夏草、北蟲夏草、蟲草素、液態發酵、保健食品

通訊作者：鄭建瑋[ochien@gmail.com]

收稿：2011-3-7 接受：2011-3-11

一、前言

冬蟲夏草或稱為蟲草，一向以來被視為一種珍貴滋補的中藥材，主要產於中國西南地區海拔 3000 米至 5000 米的高山草原地帶。雖然名為“蟲草”，其實並非蟲也非草，而是由子囊菌門的 *Cordyceps* 一屬真菌的孢子於冬季寄生在高山蝙蝠蛾 (*Hepialus armoricanus*) 幼蟲身上，並於夏季自蟲屍頭部生出子實體所形成的菌蟲複合體。由於蝙蝠蛾幼蟲生長高山草原上的鬆軟土層。蟲草菌在土中感染並殺死蝙蝠蛾幼蟲，菌絲在蟲屍上持續生長，到夏季時子實體冒出地面，看起來像是一根根的小草，因而被稱之為「冬蟲夏草」。

Cordyceps spp. 中文稱為蟲草屬，在分類上屬於子囊菌綱(Ascomycetes)，肉座菌目(Hypocreales)，麥角菌科(Clavicipitaceae)，已經被發現且分類的已有約 100 餘種^[1, 2]，除了冬蟲夏草 (*Cordyceps sinensis*) 外，較常見的還有寄生於鱗翅目幼蟲或蛹

上的蛹蟲草 (*Cordyceps militaris*)，寄生於螞蟻上的蟻蟲草 (*Cordyceps myrmecophila*)，和樁象上的下垂虫草 (*Cordyceps nutans*)。由於冬蟲夏草至今尚無法人工培養，學術界與產業界莫不積極研究其他蟲草屬真菌中，是否有替代蟲草的菌種。蟲草屬真菌中，蛹蟲草（又稱為北方蟲草、蠶蛹蟲草或鱗蛹蟲草）較無寄主專一性，與冬蟲夏草相比，人工培養容易，且生產成本低廉，雖然機能性成分組成與野生冬蟲夏草不完全相同，蟲草素的含量甚至更高（表一），但相同的保健功效已經被多次證實，因此被大量生產利用^[3, 4, 5, 6]。

在蟲草的機能性成分中，蟲草菌素 (cordycepin, or 3'-deoxyadenosine) 被認為最主要的機能性成分，cordycepin 是一種腺苷(adenosine)類似物，由於結構近似腺苷，因此部分酵素無法分二者差異，因此可以參與某些生化反應，例如加入某一個 RNA 之中，使蛋白質合成作用提前結束。由於可以抑制某些 protein kinases 的作用，因此被認為具有抗癌抑菌的效果，而被用為一種抗癌藥物成分，目前已經可以人工合成^[7, 8, 9]。由於 cordycepin 也可自蛹蟲草液態培養中分離萃取，因此提升蛹蟲草液態生產的效率，也是當前重要的課題^[6]。

表一 各地區所採收的野生冬蟲夏草(*Cordyceps sinensis*)與人工培育之北蟲夏草(*Cordyceps militaris*)中所含的主要機能性成分含量比較 (mg/g)^[10, 11, 12]

成分	冬蟲夏草		北蟲夏草	
	青海	西藏	A	B
Ergosterol	1.43	1.00	4.19	1.00
Adenosine	0.45	0.42	1.42	0.64
Cordycepin	0.04	0.06	4.96	4.79
Guanosine	0.10	0.10	1.50	0.17
Inosine	0.33	0.20	0.03	0.02
Uridine	0.60	0.60	1.96	4.40
Mannitol	38.64	35.42	No data	No data
Polysaccharides	4.75	8.22	No data	No data

二、蟲草培養

由於冬蟲夏草中所含的各種機能性成分被視做是重要的藥材而被廣泛研究，對於

其他蟲草卻較為陌生。近年來由於野生冬蟲夏草來源日漸枯竭，蛹蟲草中含有蟲草素、蟲草多醣、超氧化物歧化酶等，可以替代野生冬蟲夏草的保健功效。從生產面的角度來看，蛹蟲草可以利用發酵生物技術大量生產，以提高部分機能性成分的產出率，使蟲草成為一種人人可以廉價取得的健康食品^[13]。

液態發酵培養可以有效控制培養基組成、酸鹼值、溫度、通氣量和攪拌速率等生長條件，達到縮短培育時間、提高生產效率以及降低成本的目的，且不需等待子實體的熟成，而是菌絲體的型態即可收成^[10]。

三、北蟲夏草液態發酵之影響因素

深層培養時，需考慮到不同的因子，一般需注意到的有培養基之組成份、攪拌速率、溫度、pH 值等因素。

(一) 培養基組成

提供生物活性產物環境的培養基很重要，其養分與代謝產物的生物合成和細胞的增殖有直接相關聯，當養分來源不同，可能造成微生物走別條生產路徑及產生別種生物代謝物，許多研究者嘗試利用不同的培養基成份進行發酵以得到更多的生物活性化合物和菌絲體及較高的生理活性^[5]。

(二) 溫度

溫度在微生物液態培養中是一個非常重要因子，先前文獻指出北蟲夏草素及其他核苷類物質發酵溫度位於 25°C^[1, 14]，目前文獻也指出 15°C~20°C，對於北蟲夏草或是其產物，並不是一個合適的生長條件，高溫 30°C 也會抑制生長^[6]，因此，在進行發酵時，溫度控管，不但是給予菌種一個適合的環境，也是影響生物活性及二次代謝物生成的一個重要影響因子。

(三) pH 值

pH 值亦是影響微生物在液態培養環境中的重要因子，先前文獻指出蟲草屬最適生長培養為酸性 pH 環境^[15, 16]，其影響到代謝產物的生成和酵素作用等。

(四) 攪拌速率

發酵環境中，攪拌是為了增進液體中溶氧量，達到菌種、培養液及氣體的混合均勻，有助於發酵期間菌絲體的生長及其代謝產物的生長。發酵搖瓶沒有攪拌機器的幫助，是利用發酵培養箱的轉速達到菌種、培養液及氣體的混合均勻；發酵槽

則是利用攪拌葉片不同的大小、轉速達到菌種、培養液及氣體的混合均勻，一些發酵槽還會配合打氣的裝置，使的好氧微生物生成更好。

四、近年來對北蟲夏草研究之回顧

近年來對於北蟲夏草的研究，除了對於其機能性成分的保健機能的研究之外，多半著重於生長條件與環境的測定，以取得產物的最佳化產出^[1, 14]。Mao and Zhong^[17]藉由液態發酵看氮源對蟲草菌素生長的影響，發現在培養基內所含的銨離子(NH₄⁺)濃度在蟲草菌素生物合成上扮演一個重要的角色，為了促進蟲草菌素生成，藉由 NH₄⁺最佳化饋料時間的調控及饋料的含量的比例，得到最大蟲草菌素產量每升當中含有 420.5 (±15.1)毫克。

Hung 等人^[6]的研究則顯示溫度會影響液態發酵下北蟲夏草機能性成分生成量的多寡。研究的菌種為，在 15°C 和 30°C 的時候，會顯著的影響其代謝物的生長，如蟲草素，而最適溫度為 20°C、25°C，25°C 又比 20°C 更為適合，溫度的調控適宜，不是唯一的變數，在樣品的部分，使用不同種國家的北蟲夏草，證實其機能性成分產出量有顯著的差異，間接也證實，天然蟲草，在不同的國家，不同的環境，其溫度、濕度、蟲體品種、土壤品質等，都可能會影響著蟲草的生長以及其機能性成分含量的多寡。所以當進行發酵培養時，應該像大環境縮小成小環境一般，需要顧慮到的因子非常的多，不只是溫度，還有 pH 值、攪拌速率等，都會影響到菌絲體生長及機能性成分的產生等。

除了單一因子調控以外，Gu 等人^[18]為了更進一步促進北蟲夏草代謝物，包括蟲草素、腺苷、其他核苷類物質的產量生成，測試了許多的因子以找出北蟲夏草最適生長的環境以及養分來源，如：氮、碳、金屬離子等。醱類一開始的時候，使用比例為 2%，混合 0.3% 酵母萃出物和 0.3% 蛋白，接著選擇添加每升 0.1 mmol 錳，發酵的時間為六天，可使得代謝物生成量到達最大量。

除了在生長條件及養份濃度控制之外，為了得到好的機能性成分生長，在一開始的 pH 設定、培養基的組成、搖瓶轉速、品種都要兼顧，Shih 等人^[14]決定好菌種品種後，藉由 Box-Behnken 實驗設計和反應曲面分析，得到最佳生長酸鹼值為 pH 6，培養基為每升中包含 45 克的酵母萃出物(yeast extract, YE)，培養時，在第 8 天後，靜止生長維持 16 天，可促進機能性成分蟲草菌素的生成及生產率。在這些提件之下，得到蟲草菌素最大值生成量每升中含有 2214.5 毫克及最大值生產率，一天中產出 92.3 毫克。

因此，發酵製成過程中，除了物理因子，溫度、pH 值等的準確調控，也須配合化學因子，碳源、氮源、氧氣等饋料因子，才能得到更多的產物產值，獲得更

佳的機能性成分產出，那近年來這些研究於搖瓶中得到最大值的菌絲產量及機能性成分、二次代謝物的產出，但假使要大量開發生產，產出量必定是一個問題，近幾年，機械式液態發酵槽成了一個熱門生技技術，目的在提高產出率，但由於小型搖瓶到大型發酵槽，其放大製程後，並不一定是加乘作用，在製程上必定有些步驟需要修改，以得到大量產物，例如，菌種搖瓶的製作、發酵天數、饋料比含量、營養物質的補充等，都需要再改進。

五、結 論

北蟲夏草與野生冬蟲夏草的組成相似，且具有相近的保健機能，由於沒有冬蟲夏草的寄主專一性，且生長條件較不嚴格，因此可以大量培養，作為冬蟲夏草的替代品，成為一種較低成本的蟲草保健食品。雖然利用已知的最佳生長條件，北蟲夏草目前已經可以大量生產，而持續的研究以提高產量，縮短生產時程並降低成本，仍然在所必須。

參考文獻

- [1] Masuda M, Urabe E, Honda H, Sakurai A, Sakakibara M: Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology* 2007, 40:1199-1205.
- [2] Das SK, Masuda M, Sakurai A, Sakakibara M: Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. *Fitoterapia* 2010, 910-8507.
- [3] Li SP, Li P, Dong TTX and Tsim KWK: Anti-oxidation activity of different types of natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia*. *Phytomedicine* 2001, 8:207-212.
- [4] Kima CS, Leed SY, Choa SH, Kob YM: *Cordyceps militaris* induces the IL-18 expression via its promoter activation for IFN-production. *Journal of Ethnopharmacology* 2008, 120:366-371.
- [5] Lin YW, Chiang BH: Anti-tumor activity of the fermentation broth of *Cordyceps militaris* cultured in the medium of *Radix astragali*. *Process Biochemistry* 2008, 43:244-250.
- [6] Hung LT, Keawsompong S, Hanh VT, Sivichai S and Hywel-Jones NL: Effect of Temperature on Cordycepin Production in *Cordyceps militaris*. *Thai Journal of*

Agricultural Science 2009, 42:219-225.

[7] Ahn Y, Park S, Lee S, Shin S, Choi D. Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp.. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2000, 48:2744-8.

[8] Yoshikawa N, Nakamura K, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M: Antitumor activity of cordycepin in mice. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2004, 31:S51-3.

[9] Nakamura K, Konoha K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M: Effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on hematogenic lung metastatic model mice. In Vivo 2005, 19:137-42.

[10] Li S, Li P, Ji H, Zhu Q, Dong TTX, Tsim KWK: The Nucleosides Contents and Their Variation in Natural *Cordyceps sinensis* and Cultured *Cordyceps* Mycelia. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences 2001, 10:4.

[11] Li SP, Li P, Lai CM, Gong YX, Kan KKW, Dong TTX, Tsim KWK, Wang YT: Simultaneous determination of ergosterol, nucleosides and their bases from natural and cultured *Cordyceps* by pressurised liquid extraction and high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 2004, 1036:239-243.

[12] Li SP, Yang FQ, Tsim KWK: Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2006, 41:1571-1584.

[13] Yan JK, Li L, Wang ZM, Leung PH, Wang WQ, Wu JY: Acidic degradation and enhanced antioxidant activities of exopolysaccharides from *Cordyceps sinensis* mycelia culture. Food Chemistry 2009, 117:641-646.

[14] Shih IL, Tsai KL and Hsieh C: Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. Biochemical Engineering Journal 2007, 33:193-201.

[15] Hsieh C, Tsai MJ, Hsu TH, Chang DM, Lo CT: Medium optimization for polysaccharide production of *Cordyceps sinensis*. Applied Biochemistry and Biotechnology 2005, 120:145-157.

- [16] Park JP, Kim SW, Hwang HJ, Yun JW: Optimization of submerged culture conditions for the mycelia growth and exobiopolymer production by *Cordyceps militaris*. Letters in Applied Microbiology 2001, 33:76-81.
- [17] Mao XB, Zhong JJ: Significant effect of NH_4^+ on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Enzyme and Microbial Technology 2006, 38: 343-350.
- [18] Gu YX, Wang ZS, Li SX, Yuan QS: Effect of multiple factors on accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris*. Food Chemistry 2007, 102:1304-1309.

Mini Review:

Submerged Liquid Culture of *Cordyceps militaris*

Evan Chen, Ji-yuang Liang, Chien-wei Cheng*

Department Biotechnology, School of Health Technology, Ming-Chuan University,
(Taoyuan, Taiwan, R.O.C.)

Abstract

There are more than one hundred species of the fungi belonging to the entomogenous *Cordyceps* have been found. Among the entomofungus, except for the famous Chinese medicinal fungus *C. sinensis*, *C. militaris* and *C. myrmecophila* were the most studied species. Because *C. sinensis* is not able to be cultured, a substituted entomofungus which can be mass-production is desired. It shows in the literatures that the composition of the functional ingredients from *C. militaris* is similar with *C. sinensis*. However, the mycelia of *C. militaris* can be mass-produced by submerged bioreactors. *C. militaris* attracts abundant efforts of research during the past decades. Previous studies in *C. militaris* have been focused on the analysis of the functional ingredients and health promotion ability tests, as well as the optimization of the processing parameters. Although *C. militaris* can be produced in a large scale, unceasing improvement and optimization to the incubation condition is necessary. This communication is a review to the development in the submerged fermentation of *C. militaris*.

Keyword: *Cordyceps militaris*, *Cordyceps sinensis*, entomofungus, cordycepin, submerged fermentation

Corresponding author: Chien-wei Cheng [ochien@gmail.com]

Received 7 March 2011/Accepted 11 March 2011

MC-Transaction on Biotechnology, 2011, Vol. 3, No. 1, e1

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.