

培養基碳源對蛹蟲草菌(*Cordyceps militaris*)醱酵產程中生物活性成分及菌絲球型態特性之影響 = Effects of carbon sources on ...

謝雅惠、徐泰浩

E-mail: 9708314@mail.dyu.edu.tw

摘要

蛹蟲草又稱北冬蟲夏草，具有多種不同生物活性，包括抗發炎、抗腫瘤、抗氧化、降血糖等功效。本研究中利用三種不同碳源種類及濃度探討其葡萄糖、蔗糖及乳糖培養蛹蟲草菌(*Cordyceps militaris*)以5L醱酵槽連續14天培養並進行觀察菌絲球形態、菌絲體生質量及生物活性成份產出之影響，並以影像分析軟體計算其平均直徑、圓形度及粗糙度，且探討其對多醣體產出之影響及其菌絲球形態變化。結果顯示以乳糖為碳源時，其結果有利於EPS及醱酵液中蟲草素產出，其最高產值分別為0.52 g/L、1.35 mg/g，而以蔗糖為碳源有利於IPS及菌體內腺?產出，其最高產值分別為471 mg/L、1.137 mg/g，但於培養後期時以乳糖為碳源之EPS產量優於蔗糖。以不同碳源濃度培養下，以6%蔗糖為培養基培養時，能夠得到最高產量之菌絲體生質量及最高EPS含量其值分別為27.29 g/L、1.34 g/L，以6%乳糖為培養基培養時，能夠得到最高產量之菌絲體生質量及最高EPS含量其值分別為4.64 g/L、1.09 g/L。以葡萄糖為碳源時，平均直徑和粗糙度皆為最高，其值分別為4.53 mm和6.21，形態以毛狀鬆散菌絲球為主，以乳糖為碳源時，圓形度為最高，其值為0.88，形態以毛狀鬆散菌絲球為主；以蔗糖培養時，形態以菌絲球為主。

關鍵詞：蛹蟲草；醱酵；多醣體；型態特性；影像分析

目錄

封面內頁	簽名頁	授權書	iii	中文摘要	iv	英文摘要	v	誌謝	vii	目錄	viii	圖目錄	xii	表目錄	xv	1. 前言	1	2. 文獻回顧	3	2.1 蛹蟲草的簡介	3	2.1.1 生物學特性	4	2.2 蛹蟲草成分	5	2.2.1 一般化學成分	5	2.2.2 水解胺基酸組成	6	2.2.3 微量元素成分	7	2.2.4 揮發性香氣成分	7	2.3 生物活性成分	7	2.3.1 腺?	7	2.3.2 蟲草素	8	2.3.3 多醣	9	2.3.4 其他機能性成分	10	2.3.4.1 甘露糖	10	2.3.4.2 麥角固醇	11	2.3.4.3 超氧歧化?	11	2.3.5 藥用真菌多醣	12	2.3.5.1 胞外生物聚合物	12	2.3.6 藥理作用	12	2.3.6.1 抗癌作用	12	2.3.6.2 抗氧化與清除自由基	13	2.3.6.3 降低血糖作用	13	2.3.6.4 抗腫瘤	13	2.3.6.5 增強免疫活性	14	2.3.6.6 降血脂及降血壓作用	14	2.3.6.7 保肝作用	15	2.3.6.8 保護心臟功能	15	2.3.6.9 延緩機能老化	15	2.3.6.10 固腎作用	16	2.3.6.11 致毒性研究及致突變性研究	16	2.3.6.12 抗菌作用	16	2.4 蛹蟲草的浸液培養	17	2.5 影像分析	18	2.5.1 絲狀真菌之形態變化	18	2.5.2 菌絲球形成機制及結構	18	2.6 絲狀真菌浸液培養菌球形態之影響因子	19	2.6.1 接種量	19	2.6.2 通氣量	20	2.6.3 攪拌速度	20	2.6.4 溫度	21	2.6.5 pH值	21	2.6.6 培養基的組成	22	2.6.6.1 不同碳源與濃度	22	2.6.6.2 不同氮源與濃度	23	2.6.6.3 其他添加物	24	3. 材料與方法	28	3.1 實驗藥品	28	3.2 儀器設備	29	3.3 試驗菌株	30	3.4 種菌培養	30	3.5 菌株保存	30	3.6 實驗流程	30	3.6.1 五公升化合物培養基醱酵槽試驗	31	3.6.2 五公升不同碳源培養基醱酵槽試驗	32	3.6.3 五公升不同碳源濃度培養基醱酵槽試驗	32	3.7 分析方法	34	3.7.1 菌絲體生質量	34	3.7.2 菌絲體胞外多醣之萃取	34	3.7.3 菌絲體胞內多醣之萃取	34	3.7.5 蟲草素及腺?標準溶液配置	35	3.7.5.1 HPLC操作條件	35	3.7.6 醱液殘糖量分析	35	3.7.6.1 檢液配製	35	3.7.6.2 HPLC操作條件	35	3.8 菌絲球影像分析	36	3.8.1 菌絲球計算	36	4. 結果與討論	37	4.1 不同碳源對蛹蟲草菌菌體球型態、生物活性成分之影響	37	4.1.1 以葡萄糖培養基中蛹蟲草菌對菌絲體生質量、醱酵液中EPS、菌體內IPS及最終pH值之影響	37	4.1.2 以蔗糖培養基中湧蟲草菌對菌絲體生質量、醱酵液中EPS、菌體內IPS及最終pH值之影響	39	4.1.3 以乳糖培養基中湧蟲草菌對菌絲體生質量、醱酵液中EPS、菌體內IPS及最終pH值之影響	39	4.2 不同碳源濃度對蛹蟲草菌生物活性成分之影響	43	4.2.1 不同蔗糖濃度培養基中湧蟲草菌對菌絲體生質量、醱酵液中EPS、菌體內IPS及最終pH值之影響	43	4.2.2 不同乳糖濃度培養基中湧蟲草菌對菌絲體生質量、醱酵液中EPS、菌體內IPS及最終pH值之影響	46	4.3 不同碳源對蛹蟲草菌醱酵液中蟲草素含量分析	49	4.4 不同碳源濃度對蛹蟲草菌醱酵液中蟲草素含量分析	51	4.5 不同碳源對蛹蟲草菌菌絲體中蟲草素含量分析	54	4.6 不同碳源濃度對蛹蟲草菌菌絲體中蟲草素含量分析	54	4.7 不同碳源對蛹蟲草菌菌絲體中腺?含量分析	59	4.8 不同碳源濃度對蛹蟲草菌菌絲體中腺?含量分析	61	4.9 菌絲生質量對殘糖含量分析	64	4.10 不同碳源及濃度之菌絲球型態分析	73	4.10.1 MIC-D顯微鏡下蛹蟲草菌浸液菌絲球型態圖	74	4.10.2 菌絲球之影像分析計算	83	5. 結論	94	參考文獻	96	圖2.1(a)冬蟲夏草(b)蛹蟲草	25	圖2.2腺?及蟲草素結構式	25	圖2.3具有抗腫瘤活性的(1-6)分支和(1-3)-D-葡聚醣結構	26	圖2.4凝聚型的菌絲球生長	26	圖2.5甘露醇之結構	27	圖2.6麥角固醇之化學結構	27	圖3.1實驗流程圖	33	圖4.1 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間以葡萄糖為碳源對菌絲體生質量、醱酵液中EPS、菌體內IPS及最終pH值之影響	38	圖4.2 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間以蔗糖為碳源對菌絲體生質量、醱酵液中EPS、菌體內IPS及最終pH值之影響	41	圖4.3 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間以乳糖為碳源對菌絲體生質量、醱酵液中EPS、菌體內IPS及最終pH值之影響	42	圖4.4 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間以4%蔗糖為碳源對菌絲體生質量、醱酵液中EPS、菌體內IPS及最終pH值之影響	44	圖4.5 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間以6%蔗糖為碳源對菌絲體生質量、醱酵液中EPS、菌體內IPS及最終pH值之影響	45	圖4.6 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間以4%乳糖為碳源對菌絲	
------	-----	-----	-----	------	----	------	---	----	-----	----	------	-----	-----	-----	----	-------	---	---------	---	------------	---	-------------	---	-----------	---	--------------	---	---------------	---	--------------	---	---------------	---	------------	---	----------	---	-----------	---	----------	---	---------------	----	-------------	----	--------------	----	---------------	----	--------------	----	-----------------	----	------------	----	--------------	----	-------------------	----	----------------	----	-------------	----	----------------	----	-------------------	----	--------------	----	----------------	----	----------------	----	---------------	----	-----------------------	----	---------------	----	--------------	----	----------	----	-----------------	----	------------------	----	-----------------------	----	-----------	----	-----------	----	------------	----	----------	----	-----------	----	--------------	----	-----------------	----	-----------------	----	---------------	----	----------	----	----------	----	----------	----	----------	----	----------	----	----------	----	----------	----	----------------------	----	-----------------------	----	-------------------------	----	----------	----	--------------	----	------------------	----	------------------	----	--------------------	----	------------------	----	---------------	----	--------------	----	------------------	----	-------------	----	-------------	----	----------	----	------------------------------	----	---	----	--	----	--	----	--------------------------	----	---	----	---	----	--------------------------	----	----------------------------	----	--------------------------	----	----------------------------	----	-------------------------	----	---------------------------	----	------------------	----	----------------------	----	------------------------------	----	-------------------	----	-------	----	------	----	-------------------	----	---------------	----	-----------------------------------	----	---------------	----	------------	----	---------------	----	-----------	----	---	----	--	----	--	----	--	----	--	----	--------------------------------	--

體生質量、醱酵液中EPS、菌體內IPS及最終pH值之影響47 圖4.7 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間以6%乳糖為碳源對菌絲體生質量、醱酵液中EPS、菌體內IPS及最終pH值之影響48 圖4.8 蛹蟲草菌以不同碳源於5L醱酵槽培養期間醱酵液中蟲草素含量50 圖4.9 蛹蟲草菌不同濃度之蔗糖為碳源於5L醱酵槽培養期間對醱酵液中蟲草素含量變化52 圖4.10 蛹蟲草菌不同濃度之乳糖為碳源於5L醱酵槽培養期間對醱酵液中蟲草素含量變化53 圖4.11 蛹蟲草菌以不同碳源於5L醱酵槽培養期間對菌絲體中蟲草素含量變化56 圖4.12 蛹蟲草菌不同蔗糖濃度為碳源於5L醱酵槽培養期間對菌絲體中蟲草素含量變化 57 圖4.13 蛹蟲草菌不同乳培濃為碳源於5L醱酵槽培養期間對菌絲體中蟲草素含量變化 58 圖4.14 蛹蟲草菌以不同碳源於5L醱酵槽培養期間對菌絲體中腺?含量變化60 圖4.15 蛹蟲草菌以不同濃度之蔗糖為碳源於5L醱酵槽培養期間對菌絲體中腺?含量變化62 圖4.16 蛹蟲草菌以不同濃度之乳糖為碳源於5L醱酵槽培養期間對菌絲體中腺?含量變化63 圖4.17 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間以葡萄糖為碳源菌絲體生質量對殘糖含量變化 66 圖4.18 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間以蔗糖為碳源菌絲體生質絲體生質量對殘糖含量變化67 圖4.19 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間以乳糖為碳源菌絲體生質量對殘糖含量變化68 圖4.20 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間以4%蔗糖為碳源菌絲體生質量對殘糖含量變化69 圖4.21 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間以6%蔗糖為碳源菌絲體生質量對殘糖含量變化70 圖4.22 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間以4%乳糖為碳源菌絲體生質量對殘糖含量變化71 圖4.23 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間以6%乳糖為碳源菌絲體生質量對殘糖含量變化72 圖4.24 蛹蟲草菌(BCRC32219)於葡萄糖培養基中以5L醱酵槽培養下，其菌絲球型態之照片76 圖4.25 蛹蟲草菌(BCRC32219)於蔗糖培養基中以5L醱酵槽培養下，其菌絲球型態之照片77 圖4.26 蛹蟲草菌(BCRC32219)於乳糖培養基中以5L醱酵槽培養下，其菌絲球型態之照片78 圖4.27 蛹蟲草菌(BCRC32219)於4%蔗糖培養基中以5L醱酵槽培養下，其菌絲球型態之照片79 圖4.28 蛹蟲草菌(BCRC32219)於6%蔗糖培養基中以5L醱酵槽培養下，其菌絲球型態之照片80 圖4.29 蛹蟲草菌(BCRC32219)於4%乳糖培養基中以5L醱酵槽培養下，其菌絲球型態之照片81 圖4.30 蛹蟲草菌(BCRC32219)於6%乳糖培養基中以5L醱酵槽培養下，其菌絲球型態之照片82 圖4.31 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間，不同碳源對菌絲球之平均直徑變化85 圖4.32 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間，不同碳源對菌絲球之粗糙度變化86 圖4.33 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養期間，不同碳源對菌絲球之圓形度變化87 圖4.34 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養下以不同濃度之蔗糖為碳源對菌絲球之平均直徑變化88 圖4.35 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養下以不同濃度之蔗糖為碳源對菌絲球之粗糙度變化89 圖4.36 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養下以不同濃度之蔗糖為碳源對菌絲球之圓形度變化90 圖4.37 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養下以不同濃度之乳糖為碳源對菌絲球之平均直徑變化91 圖4.38 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養下以不同濃度之乳糖為碳源對菌絲球之粗糙度變化92 圖4.39 蛹蟲草菌於5L醱酵槽培養下以不同濃度之乳糖為碳源對菌絲球之粗糙度變化93 表3.1 YMA 培養基組成31

參考文獻

- 1.王培銘。2002。食藥用菇液態培養製程之開發。食品工業 34(5):31-35。
- 2.王懿丞。2003。食藥用真菌 - 蓮花菌菌絲體及多醣體發酵產程之研究。大葉大學食品科技研究所碩士論文。台灣，彰化。
- 3.王懿丞、周佳明、盧孟辰、羅芷芸、徐泰浩。2007。探討舞茸醱酵生產胞外多醣體之最適培養條件。第37次台灣食品科學技術學會論文集。大葉大學。台灣，彰化。
- 4.水野卓、川合正允(賴慶亮譯)。1997。菇類的化學、生化學。國立編譯館。
- 5.白壽雄和羅道蘊。1994。生物性多醣體及其應用。生物產業 5:167-173。
- 6.江曉路、葛蓓蕾和胡曉珂。2002。蛹蟲草(*Cordyceps militaris*)對藥物引起免疫抑制的拮抗作用。青島海洋大學學報 32(1):46-50。
- 7.匡彥德和王美英。1989。冬蟲夏草免疫增強作用機理的研究。上海免疫學雜誌 9(1):6-8。
- 8.宋振玉。1995。中草藥現代研究(第一卷)。第100-101頁。北京醫科大學、中國協和醫科大學聯合出版社。中國，北京。
- 9.李雲準和李修錄。1991。用高效液相色譜法測定冬蟲夏草及蟲草烏雞膠丸中麥角固醇的含量。藥學學報 26(10):768-771。
- 10.沈均、陶榮芬及胡錫澄。1999。蛹蟲草治療癌細胞療效初探。中成藥 17(5):22-23。
- 11.林家如。2002。浸液醱酵培養基與培養條件對藥用伏苓(*Wolfiporia cocos*)菌絲體及胞外多醣體生成之影響。大葉大學食工所碩士論文。台灣，彰化。
- 12.吳畏、高新華、崔星明、錢國深、陳偉。2000。北冬蟲夏草(*Cordyceps militaris*)的研究應用概況。上海農業報 16:99-104。
- 13.周良楯、楊倚竹、續月名、朱慶義、馬紫亮、朱延瑞和葛孝炎。1990。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。
- 14.吳國璋。2003。以饋料批次發酵進行蟲草菌(CCRC36412)多醣生產之研究。大葉大學食品科技研究所碩士論文。台灣，彰化。
- 15.金水日、張甲生和何玲。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.胡琦桂。1994。真菌球狀菌絲體生長之探討。食品工業26(9):37-45。
- 17.孫雲灌。1985。冬蟲夏草及人工蟲草菌絲體研究概況。中藥通報 10(12):3-5。
- 18.柴建萍、白興和謝道燕。2003。不同蛹蟲草菌株比較試驗與篩選。雲南農業科技 4:22-23。
- 19.貢成良、吳衛東、徐承智、楊昆和陳國剛。2002。家蠶蛹蟲草的化學成分分析。蠶業科學 28(2):168-172。
- 20.徐文豪、薛智和馬建民。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.徐泰浩。1999。冬蟲夏草的傳統與現代。生物資源及生物技術 1(3):160-176。
- 22.馬芳、越德化和盛寶恒。1987。秦巴蛹蟲草的藥理實驗研究。中國藥學雜誌 2(2):6。
- 23.都興范、李應杰、王林華、石理鑫、徐宏、張俊濤、王曉燕和王鶴。2003。北冬蟲夏草的研究發展現狀。遼寧農業科學 4:26-28。
- 24.陳桂寶、羅梅初和劉實晶。1997。蛹蟲草的藥理作用。中草藥 28(7):415。
- 25.陳佳玲和徐泰浩。2004。培養基中碳氮源對蛹蟲草菌(*Cordyceps militaris*)生質、菌絲球及生物活性成份生成之影響。第九屆生化工程研討會論文集。大葉大學。台灣，彰化。
- 26.陳熾伊。2002。蛹蟲草發酵液及區分物對肝細胞之影響。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。台灣，台北。
- 27.陳佳玲。2006。培養環境對蛹蟲草菌絲球形態及生物活性成份生產之相關性影響。大葉大學食品科技研究所碩士論文。台灣，彰化。
- 28.陳幼蘭。2003。冬蟲夏草菌絲體的深層培養。廣州食品工業科技 19(4):12-15。
- 29.陳萬群、陳吉榮。1994。冬蟲夏草代用品研究進展。中草藥25(5):269-271。
- 30.莊曉莉、李祥麟及黃檀溪。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。
- 31.黃麗娜。1996。菇類菌絲體深層培養在食品工業上之應用。食品工

業8(5):144-150. 32.彭國平、李紅陽、袁永泰。1996。冬蟲夏草與人工蛹蟲草的成分比較。南京中醫藥大學學報12(5):26-27. 33.葉淑幸。2003。培養基中碳氮源與培養方式對蛹蟲草菌(*Cordyceps militaris*)醱酵產程中生質、菌絲球及生物活性成分之影響。大葉大學食品科技研究所碩士論文。台灣,彰化。34.楊雅君。2001。蟲草屬菌種之深層培養及區分物之抗氧化性評估。台灣大學食品科技研究所碩士論文。台灣,台北。35.楊芳鏘及楊明哲。2001。菌絲狀真菌之深層培養技術。化工技術9(2):176-186. 36.張淑芬。2001。科學與技術。食用菇類搖瓶液體條件之探討。食品工業。33(7):39-46. 37.張緒璋。2002。北冬蟲夏草的人工培養及其營養成分分析。中國食用菌22(2):19-21. 38.張德玉。2003。培養條件對靈芝菌絲體超氧化歧化(SOD)生成之影響。東海大學化工所碩士論文。台灣,台中。39.張平、朱述鈞、錢大順、蔣宇、李建軍。2003b。北冬蟲夏草功能成分及保健作用分析。江蘇農業科學6:105-107. 40.張文苑。2003a。不同的液態培養條件對樟芝菌絲生長及多醣形成之影響。東海大學食品科學研究所碩士論文。台灣,台中。41.張甲生、王寶珍、王曉光、丁長江、李平亞、孫平及夏愛華。1994。蠶蛹蟲草和冬蟲夏草中游離胺基酸的比較分析。白恩求醫科大學學報20(1):24-25. 42.褚西寧、白玉明、江如琴、羅建穎和程巧梅。1997。蟲生真菌超氧化物歧化?的研究。中國蟲生真菌研究與應用。中國農業科技出版社82-86. 43.蔡昆霖。2005。不同培養方式對蛹蟲草菌絲體生長及其生物活性成分之研究。大葉大學食品科技研究所碩士論文。台灣,彰化。44.蔡明璉。2004。以液態及固態發酵進行蛹蟲草機能性成分之研究。大葉大學生科所碩士論文。台灣,彰化。45.鄭萬禎。2002。利用批次發酵生產巴西洋菇菌絲體及胞外多醣之研究。中興大學食品科學研究所碩士論文。台灣,台中。46.劉靜明、劉岱、楊立新、鍾裕容、崔淑蓮。1994。蛹蟲草菌絲與冬蟲夏草中核?類成分的含量測定。中國中藥學誌19(10):615-616. 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.劉慈欣。2004。液態培養環境對北冬蟲夏草(*Cordyceps militaris*)菌絲體生長及其機能性成分之影響。東海大學食品科學研究所碩士論文。台灣,台中。49.蘇慶華。1994。冬蟲夏草及蟲草。農藥世界136:32-36. 50.劉新裕、林義恭、賴瑞聲、王昭月。2000。冬蟲夏草之開發與利用。農業世界雜誌203:91-93. 51.Bai, D.M., Jia, M. Z., Zhao, X. M., Ban, R., Shen, F., Li, X. G. and Xu, S. M. 2003. L(+) – Lactic acid production by pellet-from *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. Chem. Eng. Sci. 58:785-791. 52.Braun, S. and Vecht-Lifshitz, S. E. 1991. Mycelial morphology and metabolite production. Trends Biotechnol. 9:63-68. 53.Bullock, W. E., Luke, R. G., Nuttall, C. E and Bhathena, D. 1976. Can Mannitol Reduce Amphotericin B Nephrotoxicity? Double-Blind Study and Description of a New Vascular Lesion in Kidneys. Antimicrob Agents Chemother. 10(3):555-563. 54.Birmingham S, Maltby L, Cooke R.C. 1995. A critical assessment of the validity of ergosterol as an indicator of fungal biomass. Mycol Res. 99(4):479-484. 55.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 56.Casas Lopez, J. L., Sanchez Perez, J. A., Fernandez Sevilla, J. M., Rodriguez Porcel, E. M. and Chisti, Y. 2005. Pellet morphology, culture theology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. J. Biotechnol. 116:61-77. 57. Choi, S. B., Park, C. H., Choi, M. K., Jun, D. W. and Park, S. 2004. Improvement of insulin resistance and insulin secretion by water extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus linteus*, and *Paecilomyces tenuipes* in 90% pancreatectomized rats. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68:2257-2264. 58.Domingues, F. C., Queriroz, J. A., Cabral, J. M. S. and Fonseca, L. P. 2000. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulose production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. Enzyme Microb. Technol. 26:394-401. 59.Frederiksen s. Klenow H. 1975. Mode of action of Cordycepin, in Antineoplastic and Immunosuppressive Agents. Sartorelli, A. C. and Johns ends, D. G., Springer-Verlar, New York. 60.Fang, Q. H. and Zhong, J. J. 2002. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. Process Biochemistry. 37:769-774. 61.Gu, Y. X., Wang, Z. S., Li, S. X. and Yuan, Q. S. 2006. Effect of multiple factors on accumulation of nucleosides and basea in *Cordyceps militaris*. 102:1304-1309. 62.Hajjaj, H., Blane, P. J., Groussac, E., Goma, G., Uribealrea, J. L and Loubiere, P. 1999. Improvement of red pigment / citrinin production ratio as a function of environmental conditions by *Monascus ruber*. Biotechnol. Bioeng. 64:497-501. 63.Hsieh, C., Tsai, M. J., Hsu, T. H., Chang, D. M. and Lo, C. T. 2005. Medium optimization for polysaccharide production of *Cordyceps sinensis*. Appl. Biochem. Biotechnol. 120(2):145-157. 64.Haq, I. U., Ali, S., Qadeer, M. A. and Iqbal, J. 2002. Effect of copper ions on mould morphology and citric acid productivity by *Aspergillus niger* using molasses media. Process Biochem. 37:1085-1090. 65.Jones, J. P. and MCGawley, E. C. 1984. Karyology and ascus formation in *Cordyceps capotata*. Can. J. Bot. 62:2146-2149. 66.Kobayasi, Y. 1982 Key to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella* Tran. Mycol. Soc. Japan.23:329-364 67.Koc, Y., Urbano, A. G., Sweeney, E. B. and McCaffrey, R. 1996. Induction of apoptosis by cordycepin in ADA-inhibited TDT-positive leukemia cell. Leukemia. 10(6):1019-1024. 68.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 cell. Biochem. Pharmacol. 59:273-281. 69.Koh, J. H., Yu, K. W., Choi, Y. M., Ahn, T. S. and Suh, H. J. 2002. Activation of macrophages and the intestinal immune system by an orally administered decoction from cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66(2):407-411. 70.Kabir, Y., Yamaguchi, M. and Kimura, S. 1987. Effect of shiitake and maitake mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rates. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 33:341-346. 71.Kim, S. W., Xu, C. P., Hwang, H. J., Choi, J. W., Kim, C.W. and Yun, J.W. 2003. Production and Characterization of exopolysaccharides from an enthomopathogenic Fungus *Cordyceps militaris* NG3. 72.Kim, S. W., Hwang, H. J., Xu, C. P., Sung, J. M., Chol, J. W. and Yum, J. W. 2003c. Optimization of submerged culture process for the production of biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. Journal of Applied Microbiology. 94:120-126. 73.Lai, L. T., Pan, C. C. and Tzeng, B. K. 2003. The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high-producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerged cultures. Process Biochem. 38:1317-1326. 74.Liu, J. Y. S., Yang, X., Chen, Z. and Li, J. 1997. Anticarcinogenic effect and hormonal effect of *Cordyceps militaris* Link. Zhongguo Zhongyao Zanzhi. 22(2):111-113 75.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. 76.Metz, B. and Kossen, N. W. F. 1997. The

growth of molds in the form of pellets—a literature review. *Biotechnol. Bioeng.* 19:781-799.

77. Marks, D. B. and Keller, B. J. 1971. Growth of unicellular forms of the fungus *Cordyceps militaris* and analysis of the chemical composition of their wall. *J. Gen. Microbiol.* 69:235-239.

78. Nan, J. X., Park, E. J., Yang, B. K., Song, C. H., Ko, G. and Sohn, D. H. 2001. Antifibrotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of *Cordyceps militaris* on liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in Rat. *Arch Pharm Res.* 24(4):327-332.

79. Nakamura, K., Konoha, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K. and Kunitomo, M. 2005. Effect of cordycepin (3'-deoxy adenosine) on hematogenic lung metastatic model mice. *In Vivo.* 19(1):137-141.

80. Papagianni, M., Matthey, M. and Kristiansen, B. 1999. The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. *Enzyme Microb. Technol.* 25:710-717.

81. Park, J. P., Kim, S. W., Hwang, H. J., Cho, Y. J. and Yun, J. W. 2002a. Stimulatory effect of plant oils and fatty acid on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. *Enzyme. Microb. Technol.* 31:250-255.

82. Park, J. P., Kim, Y. M., Kim, S. W., Hwang, H. J., Cho, Y. J., Lee, Y. S., Song, C. H. and Yun, J. W. 2002b. Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and mycelial morphology in *Cordyceps militaris*. *Lett. Appl. Microbiol.* 34(6):433-438.

83. Park, J. P., Kim, Y. M., Kim, S. W., Hwang, H. J., Cho, Y. J., Lee, Y. S., Song, C. H. and Yun, J. W. 2002c. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. *Process. Biochem.* 37:1257-1262.

84. Park, C., Hong, S. H., Lee, J. Y., Kim, G. Y., Choi, B. T., Lee, Y. T., Park, D. I., Park, Y. M., Jeong, Y. K. and Choi, Y. H. 2005. Growth inhibition of U937 leukemia cells by aqueous extract of *Cordyceps militaris* through induction of apoptosis. *Oncol. Rep.* 13:1211-1216.

85. Park, J. P., Kim, S. W., Hwang, H. J. and Yun, J. W. 2001. Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-polymer production by *Cordyceps militaris*. *Lett. Appl. Microbiol.* 33:76-81.

86. Papagianni, M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* 22:189-259.

87. Pons, M. N. and Vivier, H. 2000. Biomass quantification by image analysis. *Adv. Biochem. Enz. Biotechnol.* 66: 133-184.

88. Rosowsky, A., Lazaurs, H. and Yamashita, A. 1976. Nucleosides 1,9-(3'-alkyl-3'-deoxy-beta-D-ribofuranosyl adenine as lipophilic analogues of cordycepin.) *Synthesis and Preliminary Biological Studies.* *J. Med. Chem.* 19(11):1265-1279.

89. *Rhizopus nigricans* as a biocatalyst for progesterone 11 β -hydroxylation. *J. Biotechnol.* 60:207-216.

90. Metabolites of *alternata*: ergosterol and ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one. *J. Agric Food Chem.* 25(4):838-841.

91. Shen, Q and Chen, S. 2001. Effect of *Cordyceps militaris* on the damage of rats induced by n-hexane. *Zhong Yao Cai.* 24(2):112-116.

92. Stasinopoulous, S. I. and Seviour, R. J. 1990. Stimulation of exopolysaccharide production in the fungus *Acremonium persicinum* with fatty acid. *Biotech. and Bioeng.* 36:778-782.

93. Won, S. Y. and Park, E. H. 2005. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *J. Ethnopharmacol.* 96:555-561.

94. Wu, Z. L., Wang, X. X. and Cheng, W. Y. 2000. Inhibitory effect of *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* on human glomerular mesangial cell proliferation induced by native LDL. *Cell Biochem & Function.* 18(2):93-97.

95. 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.

96. Wang, Y. H., Ye, J., Li, C. L., Cai, S. Q., Ishizaki, M and Katada, M. 2004. An experimental study on anti-aging action of *Cordyceps* extract. *Zhongguo Zhong Yao Zhi.* 29(8):773-776.

97. 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 polysaccharide production in *Cordyceps pruinosa*. *Process Biochemistry.* 1-7.

98. Yoo, H. S., Shin, J. W., Cho, J. H., Son, C. G., Lee, Y. W., Park, S. Y. and Cho, C. K. 2004. Effects of *Cordyceps militaris* extract on angiogenesis and tumor growth. *Acta. Pharmacol. Sin.* 25:657-665.

99. Yoshikawa, N., Nakamura, K., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K., and Kunitomo, M. 2004. Antitumour activity of cordycepin in mice. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31:51-53.

100. Yang, Q. Y. and Jong, S. C. 1989. Medicinal mushroom in China. *Mushroom Sci.* 12:631-643.

101. Znidarsic, P., Komel, R. and Pavko, A. 2000. Influence of some environmental factors on *Rhizopus nigricans* submerged growth in the form of pellets. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16:589-593.

102. Znidarsic, P., Komel, R. and Pavko, A. 1998. Studies of a pellet growth form of *Rhizopus nigricans* as a biocatalyst for progesterone 11 β -hydroxylation. *J. Biotechnol.* 60:207-216.

103. Zhou, Y., Du, J. and Tsao, G..T. 2000. Mycelial pellet formation by *Rhizopus oryzae* ATCC 20344. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86:779-789.