

以饋料批次發酵對舞菇多醣生產之探討

周碧溫、謝建元

E-mail: 9300027@mail.dyu.edu.tw

摘要

中文摘要 本研究主要探討以不同條件進行饋料批次對舞菇多醣生產之影響。於搖瓶實驗中發現，以不同起始pH 培養 *Grifola frondosa* 至第十三天時，以pH 6最高為4.3 g/L，而以pH 5之多醣產量0.82 g/L 為高；不同通氣量方面之研究，培養至第十三天時，以棉花塞為通氣量之菌體濃度(4.1 g/L)較橡皮塞(孔洞中心直徑0.49 cm) 為佳；不同油脂對 *G. frondosa* 菌絲體與多醣體產量之影響，以1% 橄欖油所產生之菌體濃度、多醣產量較其他組合為佳。不同碳源對菌體濃度之影響，以Maltose培養之菌體濃度最高為5 g/L，以Glucose培養之菌體濃度次為4.46 g/L。不同濃度氮源對 *G. frondosa* 菌絲體與多醣體產量之影響，培養十三天後，以酵母抽出物(YE) 0.4%+玉米浸液粉(CSP) 0.6%為氮源者為最佳，其多醣濃度為0.76 g/L。5L-發酵槽批次發酵中，添加酵母抽出物者，其發酵液黏度及菌體濃度皆高於未添加者；饋料批次發酵中糖濃度控制在0.5~1%範圍內(通氣量維持在1vvm)，可明顯提升多醣濃度，發酵第十三天時，發酵液降至pH 2.58，菌體濃度為11.3 g/L，胞外多醣達 2.04 g/L，發酵液黏度為 1256 cp。發酵槽改變通氣量由1 vvm增加至2 vvm及糖濃度控制在0.5~1%範圍內，培養至第15天時，其菌體濃度為11.66 g/L，胞外多醣降為 0.54 g/L。 關鍵字: 舞菇、胞外多醣、饋料批次發酵

關鍵詞：舞菇；胞外多醣；饋料批次發酵

目錄

目錄 封面內頁 簽名頁 授權書.....	iii
中文摘要.....	v
英文摘要.....	v
誌謝.....	v
目錄.....	vi
圖目錄.....	vii
表目錄.....	xii
附錄.....	xv
第一章 前言.....	xv
第二章 文獻回顧.....	1
2.1 舞菇之介紹.....	2
2.2 舞菇的一般成分分析.....	4
2.2.1 一般成份.....	4
2.2.2 多醣體.....	5
2.2.3 游離胺基酸.....	5
2.2.4 游離糖類.....	7
2.2.5 有機酸.....	7
2.2.6 脂質.....	8
2.2.6.1 中性脂質.....	8
2.2.6.2 固醇脂質.....	8
2.2.6.3 神經鞘脂質.....	8
2.3 舞菇之功效.....	9
2.4 舞菇多醣.....	9
2.4.1 有 β -(1 \rightarrow 6)支鏈的 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖.....	9
2.4.1.1 有 β -(1 \rightarrow 6)支鏈的 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖.....	9
2.4.1.2 有 β -(1 \rightarrow 3)支鏈的 β -(1 \rightarrow 6)-D-葡聚糖.....	10
2.4.2 多醣之定義.....	10
2.4.2.1 多醣的分類.....	11
2.5 多醣之回收方法.....	11
2.5.1 醇類提取法.....	11
2.5.2 膜過濾法.....	13
2.6 多醣之測定方法.....	14
2.6.1 酚硫酸法.....	14
2.6.2 高效能分子篩層析法(SE-HPLC).....	15
饋料批次發酵(Fed-Batch)之培養技術.....	16
2.7.1 各種饋料方式.....	18
2.7.2 Fed-Batch程序應用時機.....	18
第三章 材料與方法.....	20
3.1 實驗材料.....	20
3.1.1 菌株(Strain).....	20
3.1.2 實驗藥品.....	20
3.1.3 實驗器材.....	21
3.2 實驗方法.....	23
3.2.1 平板培養.....	23
3.2.2 液態菌西元 (seed)培養.....	23
3.3 基礎平板之試驗.....	24
3.3.1 不同碳源對 <i>G. frondosa</i> 固態培養基生長直徑 之試驗.....	24
3.3.2 不同氮源對 <i>G. frondosa</i> 固態培養基生長直徑 之試驗.....	24
3.4 不同萃取方法對 <i>G. frondosa</i> 多醣之影響.....	25
3.5 搖瓶液態發酵.....	25
3.5.1 不同起始pH值對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣 體產量之影響.....	25
3.5.2 不同通氣量對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量 之影響.....	26
3.5.3 不同油脂對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之 影響.....	26
3.5.4 不同濃度碳源對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之 影響.....	26
3.5.5 不同濃度氮源對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之 影響.....	27
3.6 發酵槽批次式液態發酵.....	27
3.6.1 添加酵母抽出物 (YE) 對批次式液態發酵之影響.....	27
3.6.2 改變通氣量之發酵槽批次式液態發酵.....	28
3.7 發酵槽饋料批次式液態發酵.....	28
3.7.1 發酵槽碳源控制.....	28
3.7.2 發酵槽中通氣量及碳源濃度之控制.....	28

.....28	3.8分析項目.....	29	3.8.1酸鹼值(pH).....	29
3.8.2菌體濃度.....	29	3.8.3黏度.....	29	3.8.4電流值.....
.....30	3.8.5舞菇多醣.....	32	3.8.6統計分析.....
.....32	第四章 結果與討論.....	34	4.1基礎平板之試驗.....
.....34	4.2 不同萃取方法對於 <i>G. frondosa</i> 多醣之影響.....	39	4.3 搖瓶液態發酵.....
.....41	4.3.1 不同起始pH值對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之影響.....	41	4.3.2不同通氣量對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之影響.....	43
.....43	4.3.3不同油脂對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之影響.....	45	4.3.4不同濃度碳源對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之影響.....	49
.....49	4.3.5 不同濃度氮源對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之影響.....	51	4.4發酵槽批次式液態發酵.....	53
.....51	4.4.1 添加酵母抽出物(YE)於批次式液態發酵之比較.....	53	4.4.2 改變通氣量對發酵槽批次式液態發酵之影響.....	57
.....53	4.4.2 改變通氣量對發酵槽批次式液態發酵之影響.....	61	4.5.1發酵槽碳源控制.....	61
.....57	4.5發酵槽饋料批次式液態發酵.....	61	4.5.2發酵槽不同通氣量及不同濃度之碳源控制.....	67
.....61	第五章 結論.....	71	參考文獻.....
.....71	圖目錄 圖 2.1 舞菇子實體形態.....	2	圖 2.2 有抗腫瘤活性的 α -D-葡聚糖結構.....	6
.....2	圖 2.2 有抗腫瘤活性的 α -D-葡聚糖結構.....	6	圖 2.3 β -D-葡聚糖結構(用X射線衍射).....	6
.....6	圖 2.3 β -D-葡聚糖結構(用X射線衍射).....	6	圖 4.1 <i>G. frondosa</i> 於不同碳源菌落生長之影響(a).....	36
.....6	圖 4.1 <i>G. frondosa</i> 於不同碳源菌落生長之影響(a).....	36	圖 4.2 <i>G. frondosa</i> 於不同碳源菌落生長之影響(b).....	36
.....36	圖 4.2 <i>G. frondosa</i> 於不同碳源菌落生長之影響(b).....	36	圖 4.3 <i>G. frondosa</i> 於不同氮源菌落生長之影響(a).....	37
.....36	圖 4.3 <i>G. frondosa</i> 於不同氮源菌落生長之影響(a).....	37	圖 4.4 <i>G. frondosa</i> 於不同氮源菌落生長之影響(b).....	37
.....37	圖 4.4 <i>G. frondosa</i> 於不同氮源菌落生長之影響(b).....	37	圖 4.5 <i>G. frondosa</i> 於不同碳源菌落生長14天之比較.....	38
.....37	圖 4.5 <i>G. frondosa</i> 於不同碳源菌落生長14天之比較.....	38	圖 4.6 <i>G. frondosa</i> 於不同氮源菌落生長14天之比較.....	38
.....38	圖 4.6 <i>G. frondosa</i> 於不同氮源菌落生長14天之比較.....	38	圖 4.7 <i>G. frondosa</i> 以不同方式萃取多醣效率之比較.....	40
.....38	圖 4.7 <i>G. frondosa</i> 以不同方式萃取多醣效率之比較.....	40	圖 4.8 不同油脂0.1%之發酵液GPC 圖譜.....	47
.....40	圖 4.8 不同油脂0.1%之發酵液GPC 圖譜.....	47	圖 4.9 不同油脂1%之發酵液GPC 圖譜.....	48
.....40	圖 4.9 不同油脂1%之發酵液GPC 圖譜.....	48	圖 4.10 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(a).....	55
.....48	圖 4.10 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(a).....	55	圖 4.11 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(b).....	55
.....48	圖 4.11 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(b).....	55	圖 4.12 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(1vvm)+YE... ..	56
.....55	圖 4.12 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(1vvm)+YE... ..	56	圖 4.13 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(1vvm)+YE.....	56
.....55	圖 4.13 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(1vvm)+YE.....	56	圖 4.14 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(1?2 vvm).....	59
.....55	圖 4.14 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(1?2 vvm).....	59	圖 4.15 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(1?2 vvm).....	59
.....56	圖 4.15 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(1?2 vvm).....	59	圖 4.16 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(1?3 vvm).....	60
.....56	圖 4.16 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(1?3 vvm).....	60	圖 4.17 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(1?3 vvm).....	60
.....56	圖 4.17 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態批次發酵(1?3 vvm).....	60	圖 4.18 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態饋料批次發酵:碳源控制0.5~1% (a).....	63
.....59	圖 4.18 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態饋料批次發酵:碳源控制0.5~1% (a).....	63	圖 4.19 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態饋料批次發酵:碳源控制0.5~1% (b).....	64
.....59	圖 4.19 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態饋料批次發酵:碳源控制0.5~1% (b).....	64	圖 4.20 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態饋料批次發酵:碳源控制0.5~1.5% (a).....	65
.....60	圖 4.20 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態饋料批次發酵:碳源控制0.5~1.5% (a).....	65	圖 4.21 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態饋料批次發酵:碳源控制0.5~1.5% (b).....	66
.....60	圖 4.21 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態饋料批次發酵:碳源控制0.5~1.5% (b).....	66	圖 4.22 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態饋料批次發酵:碳源控制0.5~1%(1?2 vvm).....	68
.....60	圖 4.22 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態饋料批次發酵:碳源控制0.5~1%(1?2 vvm).....	68	圖 4.23 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態饋料批次發酵:碳源控制0.5~1%(1?2 vvm).....	69
.....60	圖 4.23 <i>G. frondosa</i> 於5L發酵槽液態饋料批次發酵:碳源控制0.5~1%(1?2 vvm).....	69	表目錄 表 2.1 菇類子實體與菌絲體之比較.....
.....63	表目錄 表 2.1 菇類子實體與菌絲體之比較.....	表 3.1 無機鹽溶液組成.....	23
.....63	表 3.1 無機鹽溶液組成.....	23	表 4.1 不同起始pH對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之影響.....	42
.....63	表 4.1 不同起始pH對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之影響.....	42	表 4.2 不同通氣量對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之影響.....	44
.....63	表 4.2 不同通氣量對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之影響.....	44	表 4.3 不同油脂對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之比較.....	46
.....63	表 4.3 不同油脂對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之比較.....	46	表 4.4 不同油脂對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之比較.....	46
.....63	表 4.4 不同油脂對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之比較.....	46	表 4.5 不同油脂0.1%之發酵液多醣分子量分佈.....	47
.....63	表 4.5 不同油脂0.1%之發酵液多醣分子量分佈.....	47	表 4.6 不同油脂1%之發酵液多醣分子量分佈.....	48
.....63	表 4.6 不同油脂1%之發酵液多醣分子量分佈.....	48	表 4.7 2%碳源對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之比較(a).....	50
.....63	表 4.7 2%碳源對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之比較(a).....	50	表 4.8 4%碳源對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之比較(b).....	50
.....63	表 4.8 4%碳源對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之比較(b).....	50	表 4.9 不同濃度氮源對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之比較.....	52
.....63	表 4.9 不同濃度氮源對 <i>G. frondosa</i> 菌絲體與多醣體產量之比較.....	52	表 4.10 <i>G. frondosa</i> 菌絲體之游離胺基酸含量.....	70
.....63	表 4.10 <i>G. frondosa</i> 菌絲體之游離胺基酸含量.....	70	附錄 附錄一 糖蜜之碳、氮、氫元素分析表.....	87
.....63	附錄 附錄一 糖蜜之碳、氮、氫元素分析表.....	87	附錄二 玉米浸液粉之成分分析表.....	87
.....63	附錄二 玉米浸液粉之成分分析表.....	87	附錄三 營養源A成分分析.....	88
.....63	附錄三 營養源A成分分析.....	88	附錄四 營養源B成分分析表.....	88
.....63	附錄四 營養源B成分分析表.....	88	附錄五 GPC多醣分子量分佈檢量線.....	89
.....63	附錄五 GPC多醣分子量分佈檢量線.....	89	附錄六 GPC標準品之多醣分子量與滯留時間之分佈.....	89
.....63	附錄六 GPC標準品之多醣分子量與滯留時間之分佈.....	89	附錄七 論文口試問題實錄.....	90
.....63	附錄七 論文口試問題實錄.....	90		

參考文獻

- 參考文獻 1.丁懷謙(2000)食藥用菇多醣體之免疫生理活性, 食品工業, 32(5):28-42。 2.尤新(2001)機能性醱酵製品, 藝軒圖書出版社。 3.王伯徹、黃麗娜(2001)保健用菇類發酵工業之開發, 農業世界雜誌, 281:100-106。 4.王伯徹(2000a)具開發潛力食藥用菇介紹, 食品工業, 32(5):1-17。 5.王伯徹(2000b)食藥用菇保健食品之開發, 食品工業, 32(5):18-27。 6.王伯徹、陳啟楨、華傑(1998)食藥用菇類的培養與應用, 財團法人食品工業發展研究所報告:第M87-019號, 187頁。 7.王伯徹(1990)藥用真菌系列報導(一)靈芝, 食品工業, 22(1):23-33。 10.王三郎(1997)應用微生物學(二版), 高立圖書 85-436。 11.王進琦、李聰明、賴敏男(1998)猴頭菇以液體浸漬培養產製水溶性多醣類之探討, 食品科學, 26(5):714-726。 12.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, 台北。 13.全漢霖、楊芳鏞(1994)Fed-Batch培養技術在生化製程上之應用, 製酒科技專論彙編, 16:151-166。 14.白壽雄、羅道蘊(1994)生物性多醣體及應用, 生物產業, 5(34):167-173。 15.江國瑛、段國仁、許埕棋(1998)利用深層發酵法生產靈芝多醣之研究, 大同學報, 28:353-358。 16.江國瑛、張欣暘、許埕棋、段國仁(1997)利用深層醱酵法生產靈芝多醣的研究, 第二屆生化工程研討會論文集, 139-142。 17.任一平、黃百芬、陳俊青(1996)應用高效液相色譜法測定香菇多醣, 食品與發酵工業, 5:31-35。 18.杜?田(2002)蠅蟲草灰樹花天麻高產栽培新技術, 中國農

業出版社。19.李平作、徐柔、章克昌(1999)靈芝發酵過程中胞外多醣快速測定模型的建立，無錫輕工大學學報，18(3):62-65。20.李秉征(2001)以液態培養生成香菇菌絲體之研究，東海大學化學工程研究所碩士論文。21.李明彥(1990)松杉靈芝浸漬發酵的培養條件對產物的影響，台灣大學農業化學研究所碩士論文。22.李玲玖、王正怡、蘇慶華(1995)利用流動細胞分析儀測植生蟲草抗腫瘤多醣體(PN-2)對小白鼠巨噬細胞吞噬能立即輔助淋巴細胞活性之影響，北醫學報，23(1):11-19。23.李泰興(1998)氧氣傳送介質及消泡劑對模擬醱酵液中氧氣傳送之影響，技術學刊，13(1):103-108。24.李俊賢、高寶璧、詹美華、蘇慶華(1992)真菌性中藥材水溶性多醣之分析，北醫學報，21(1):25-32。25.李幸嫻、陳勁初(1999)食藥用菇菌類-舞茸，鄉間小路，25(4):32-33。26.吳景陽(2001) -聚葡萄糖之生理功能與理化特性，食品工業，33(6):1-9。27.林俊清(1990)生藥的解說 靈芝的介紹，藥學介紹，6(3):104-111。28.武梅、周應揆、趙永昌、李亞輝(1999)靈芝菌絲體液體發酵 培養產靈芝多醣的動態研究，雲南大學學報，21(2):165-166。29.俞國平(1997)光散射與膠體滲透層析儀的聯結與應用，科儀新知，18(5):44-53。30.唐瑞菁、程梅萍(1992)靈芝培養基的探討 - 酵母抽出物的取代，國立雲林技術學院學報，1:145-156。31.徐泰浩、謝建元(2001)靈芝生物活性成分與生物活性之療養品觀，生物產業，12(2):117-135。32.高益槐(2000)世紀奇草話靈芝。元氣齋出版社，台北市。33.郭倩、周昌艷、高軍輝(1998)無苦靈芝子實體多醣的研究，食用菌學報，5(3):21-25。34.許瑞祥(1995)靈芝的研究現況與展望，生物產業，6(4):289-296。35.陸文樑、林忠平、林志彬(1992)靈芝的科學應用，渡假出版社。36.梁志欽(1991)松杉靈芝浸漬發酵培養生產的1,3- β -glucanase對菌體外多醣的影響，國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。37.陳大為、黃襪基、李旭生(1991)靈芝對體外培養之口腔癌細胞的毒殺效應，中華醫誌，48:54-57。38.陳健祺(2000)，食用菇類在醫學上的應用，食品工業，32(5):54-69。39.陳啟楨(1999)菇類二次代謝物質及其利用，食品工業31(5):1-11。40.張為憲、李敏雄、呂政義、張永和、陳昭雄、孫璐西、陳怡宏、張基郁、顏國欽、林志城、林慶文(1996)，食品化學，華香園出版社。41.張淑芬(2001)食藥用菇類搖瓶液體培養條件之探討，食品工業33(7):39-46。42.黃仕政、陳勁初(2000)發酵生物技術在菇類食品的應用，中華食品工業，40:62-66。43.黃家樑(1997)液態培養靈芝菌絲體與靈芝多醣體之研究，東海大學化學工程研究所碩士論文。44.黃雪芳、劉柯俊、管育慧、董光世、蘇慶華、董大成(1989)口服靈芝之菌絲培養液之抗癌人工轉移作用，中華癌醫會誌，5(1):10-15。45.黃賜源(1996)靈芝液體培養及氣舉式生化反應器應用之研究，東海大學化工所碩士論文。46.黃麗娜(1996)食用菇菌絲體深層培養在食品工業上之應用，食品工業，28(9):20-26。47.黃麗娜(1998)菇類菌絲體深層培養在食品工業上之應用，食藥用菇類的培養與應用，144-150，食品工業研究所出版。48.傅偉光、呂淑芳、宮昭雲(2001)靈芝中水溶性粗多醣分析方法之研究，台灣農業化學與食品科學，39(2):153-161。49.傅偉光(1998)高效能液相層析在食品方面之應用，科儀新知，19(4):86-95。50.趙純一(1997)，微差黏度計與光散射儀在膠體滲透層析儀的原理與應用，科儀新知，19(3):26-40。51.楊革(1997)靈芝菌絲體深層培養及多糖提取工藝研究，食用菌學報，19(2):8-9。52.游英欽(1996)以搖瓶振盪及小型發酵槽培養探討培養基組成及物理化學因子對靈芝多醣生長形態變化的影響，國立交通大學生物科技研究所碩士論文。53.劉峻(1996)靈芝液態培養及多醣生成之研究，東海大學化學工程研究所碩士論文。54.劉柯俊、黃雪芳、蘇慶華、董大成(1989)口服靈芝多醣體之吸收ICR老鼠口服標幟 14 C靈芝培養液之研究，中華癌醫會誌，5(2):22-30。55.劉國柱(1990)現代科學看靈芝，雙利實業有限公司，台北。56.韓紹英、趙傳孝、姜彥祥、龔國華(1989)食用菌高產栽培及科學加工。中國食品出版社，北京。57.蘇慶華(1991)靈芝之分類學及生理活性物質，北醫學報，20:1-16。58.張雅雯(2002)化學合成與天然浸液培養基及培養溫度對蓮花菌(*Grifola frondosa*)菌株間發酵產程菌絲體及多醣之影響，大葉大學食品工程學系碩士班碩士論文。59.田蔚城(2001)生物技術的發展與應用。九州圖書。60.孫希雯、朱明光(1999)灰樹花深層發酵培養基的優化及一種胞外多醣快速測定方法的建立，天津輕工業學院學報，3(3):24-28。61. Alexopolus, C. J. and C. W. Mims (1979) Introductory Mycology. John Wiley and Sons, Inc. N. Y. 62. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Reber, P. A. and Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal chem. 28(3): 350-356 63. Eyal, J. (1991) Mushroom mycelium growth in submerged culture potential food applications. In Biotechnology and Food Ingredients. ed. Goldberg, I. and Williams, R., Van Nostrand Reinhold. New York, 31-64. 64. 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. 65. Gutierrez, A., Prieto, A. and Martinez, A. T. (1996) Structural characterization of extracellular polysaccharide produced by fungi from the genus *Pleurotus*. Carb. Res. 281: 143-154. 66. Hikino, H., Konno, C., Mirin, Y., and Hayashi T. (1985) Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. Planta Medica. 4: 339-40. 67. Hosono, A., Lee, J., Ametin, A., Natsume, M., Hirayama, M., Adachi, T. and Kaminogawa, S., (1997) Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M 101-4. Biosci. Biotech. Biochem. 64(2): 312-316. 68. Huang, S.Y. and Chou, C.J. (2000) Effect of Gaseous composition on Cell Growth and Secondary Metabolite Production in Suspension Culture of *Stizolobium hassjoo* Cells. Bioprocess Eng. 23:585-593. 69. Israilides, C., Bocking, M., Smith, A. and Scanlon, B. (1994) A novel rapid coupled enzyme assay for the estimation of pullulan. Biotechnol. Appl. Biochem. 19: 285-291. 70. Kawagishi, H. (1995) Mushroom lectins. Food Reviews International. 11(1): 62-68. 71. Kiho, T., Hui, J., Yamane, A. and Ukai, S. (1993) Polysaccharide in fungi XXXII. Hypoglycemic activity and chemical properties of polysaccharide from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis*. Biol. Pharm. Bull. 16(12): 1291-1293. 72. Kim, K. C. and Kim, I. G. (1999) *Ganoderma lucidum* extract protects DNA from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation. Int. J. Mol. Med. 4: 273-277. 73. Kim, D. H., Shim, S. B., Kim, N. J. and Jang, I. S. (1999) Beta-glucuronidase inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. Biol. Pharm. Bull. 22: 162-164. 74. Kim, S.W., Hwang, H.J., Park, J.P., Cho, Y.J., Song, C.H. and Yun, J.W (2002) Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media, Applied Microbiology . 34:56-61 75. Lacroix C., Ledyu A., Noel G. and Choplin L. (1985) Effect of H on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. Biotechnol Bioeng. 27: 202-207. 76. Lee, S. S., Wei, Y. H. Chen, C. F., Wang, S. Y., and Chen, K. Y. (1995) Antitumor effects of *Ganoderma lucidum*. Journal of Chinese Medicine. 6(1): 1-12. 77. Lei L. S. and Z. B. Lin (1992) Effect of *Ganoderma* polysaccharides on T cell subpopulations and production of interleukin 2 in mixed lymphocyte response. Acta

Pharmaceutica Sinica. 27(5): 331-335. 78. Lieu, C. W., Lee, S. S. and Wang S. Y. (1992) The effect of *Ganoderma lucidum* on induction of differentiation in leukemic U937 cells. *Anticancer Research*. 12: 1211-1216. 79. Litchfield, J. H. (1979) Production of single cell protein for use in food and feed. In: *Microbial Technology*, 2nd ed. (Peppier, H.J. and Perlman, D., eds), Academic Press, New York, 93-145. 80. Litchfield, J. H. (1967) Submerged culture of mushroom mycelium. In: *Microbial Technology* (Peppier, H. J., ed), Reinhold, New York, 107-144. 81. Lopez-barajas, M., Lopez-tamames, E. and Buxaderas, S. (1998) Improved size-exclusion high-performance liquid chromatographic method for the sample analysis of grape juice and wine polysaccharide. *J. Chromato. A*. 823: 339-347. 82. Luo, J., Huang, R., Chen, L., Li, H. and Z, Z. (1998) Fermentation of *Ganoderma lucidum* and studies on polysaccharides. 98th Nanjing International Symposium on Science & Cultivation of Mushrooms. Nanjing, China. 83. Machova, E., Kvapilova, K., Kogan, G. and Sandual, J. (1999) Effect of ultrasonic treatment on the molecular weight of carboxymethylated chitin-glucan complex from *Aspergillus niger*. *Ultra. Sonochem*. 5: 169-172. 84. Maruyama, H., Yamazaki, K., Murofushi, S., Konda, C., and Ikekawa, T. (1989) Antitumor activity of *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito and *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *J. pharmacobio-dyn*. 12: 118-123. 85. Miyazaki, T. and Nishijima M. (1981) Studies on fungal polysaccharides XXVII. Structural examination of a water-soluble, anti-tumor polysaccharides of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* 29(12): 3611-3616. 86. Mizuno, T., Nishitoba, T., Saito, H. and Kawagishi, H. (1995a) Antitumor-active substances from mushrooms. *Food Reviews International*. 11(1): 23-61. 87. Mizuno, T., Wang, G., Zhang, J., Kawagishi, H., Nishitoba, T. and Li J. (1995b) Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: Bioactive substance and medicinal effects. *Food Reviews International*. 11(1): 151-166. 88. Mizuno, T., T. Sakai and G. Chihara (1995c) Health foods and medicinal usages of mushroom. *Food Reviews International*. 11(1): 69-81. 89. Morigiwa, A., Kitabatake, K., Fujimoto, Y., and Ikekawa, N. (1986) Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 34: 3025-3028. 90. Pan, J., Cao, X., Li, F., Zuo, Z., Sun, Q. and Wang, L. (1996) Studies on the nutritional requirement of *Ganoderma lucidum* in submerged culture. *Acta Edulis Fungi*. 3(4):31-34. 91. Park, E. J., Ko, G., Kim, J., and Sohn, D. H. (1997) Antifibrotic effects of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*, glycyrrhizin, and pentoxifylline in rats with cirrhosis induced by biliary obstruction. *Biol. Pharm. Bull.* 20:417-420. 92. Peter, H., Herbst, H., Hesselink, P. M., Lunsdorf, H., Schumpe, A. and Deckwer, W. (1989) The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Bioeng.* 34: 1393-1397. 93. Seviour, R. J. and Kristiansen, B. (1983) Effect of ammonium ion concentration on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *Applied and Microbiol Biotechnology*. 17:178-181. 94. Smith, I. H. and Pace, G. W. (1982) Recovery of microbial polysaccharides. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*. 32:119-129. 95. Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E., and Misaki, A. (1985) Structure and antitumor activities of the polysaccharide isolated from fruiting body and growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. biol. chem.* 49(9):2641-2653. 96. Song, C. H., and Nair, N. G. (1987) A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus Edodes*. *Mycologia*. 79(6):866-876. 97. Staats, N., Stal, L. J. and Mur, L. R. (2000) Exopolysaccharide production by the epipellic diatom *Cylindrotheca closterium*: effect of nutrient conditions. *J. exp. mar. biol. ecol.* 249:13-27. 98. Stasinopoulos, S. I. and Seviour, R. J. (1992) Exopolysaccharide production by *Acremonium persicinum* in stirred-tank and air-lift fermentors. *Applied and Microbiol Biotechnology*. 36:465-468. 99. Stasinopoulos, S. J., Seviour, R. J. (1990) Stimulation of exopolysaccharide production in the fungus *Acremonium persicinum* with fatty acids. *Biotech. and Bioeng.* 36:778-782. 100. Stasinopoulos, S. J., Seviour, R. J. and Auer, D. F. (1989) Inhibition of fungal exopolysaccharide production by chemical antifoams. *Letters in Applied Microbiology*. 8:91-93. 101. Stejskal, J. and Potucek, F. (1985) Oxygen transfer in liquids. *Biotech. And Bioeng.* 27:503-508. 102. Syoichi Kikumoto, Handa., Osamu Yamamoto., Nobuhiko Komatsu., Haruhiko Kobayashi., Teruo Kamasuka (1978) Method of Producing Neoschizophyllan Having Novel Pharmacological activity. United States Patent (No.4098661). 103. Tseng, T. C., Shiao, M. S., Shieh, Y. S. and Hao, Y. Y. (1984) Study on *Ganoderma lucidum* 1. Liquid culture and chemical composition of mycelium. *Bot. Bull. Academia Sinica*. 25:149-157. 104. Wang, S. Y., Hsu, M. L., Hsu, H. C., Tzeng, C. H., Lee, S. S., Shiao, M. S., and Ho, C. K. (1997) The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *International Journal of Cancer*. 70:699-705. 105. William C. and Wernau, G. C. (1981) Fermentation Process for Production of Xanthan. United States Patent. 4(80):195-203. 106. Williams, D. L., Pretus, H. A. and Browder, I. W. (1992) Application of aqueous gel permeation chromatography with in-line multi-angle laser light scattering and differential viscometry detectors for the characterization of natural product carbohydrate pharmaceuticals. *J. Liquid Chromato.* 15:2297-2309. 107. Wood, P. J., Weisz, J. and Blackwell, B. A. (1991) Molecular characterization of cereal β -D-glucans. Structural analysis of oat I β -D-glucans from different source by high-performance liquid chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal. Chem.* 68(1):31-39. 108. Xu, H., Lee, S. H., S., Lee, S. F., White, R. L. and Blay J. (1999) Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. *Antiviral Res.* 44:43-54. 109. Yamane, T. and S. Shimizu (1984) Fed-batch Techniques in Microbial Processes, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 30: 147-194. 110. Yang, F. C. and Liau, C. B. (1998a) Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures. *Bioprocess Engineering*. 19:233-236. 111. Yang, F. C. and Liau, C. B. (1998b) The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochemistry*. 33(5):547-553. 112. Yang, F. C. and Hwang S. Y. (1998c) Nutritional studies on submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Tunghai Journal*. 39:1-10. 113. Yang, F. C., Ke, Y. F., and Kuo, S. S. (2000) Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 27(3-5):295-301. 114. Yee, L. and Blanch, H. W. (1992) Recombinant Protein Expression in High Cell Density Fed-Batch Cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology*. 10:1550-1556. 115. Young, C. S., Young, H. K., Hyun, S. L., Young, N. K. and Si, M. B. (1987) Production of Pullulan by a Fed-batch Fermentation. *Biotechnology Letters*. 9(9):621-624. 116. Youssef, F., Roukas, T. and Biliaderis, C. G. (1999) Pullulan production by a non-pigmented strain of

Aureobasidium Pullulans using batch and Fed-batch culture. Process Biochemistry. 34:355-366.