

以饋料批次發酵進行蟲草菌(CCRC36421)多醣生產之研究

吳國暉、謝建元；張德明

E-mail: 9300041@mail.dyu.edu.tw

摘要

冬蟲夏草簡稱蟲草，一般人對它的第一印象多為中藥行所販售的中國蟲草。而自古以來，冬蟲夏草就一直被視為補藥中的聖品，主要的功效有降低血糖、固腎，提高人體免疫作用、抑制腫瘤細胞、保肝、預防心血管疾病、抗病毒作用、抗自由基性質等。本研究主要探討不同的培養條件，包括使用不同碳氮源、不同通氣條件、添加不同培養基添加物及使用饋料批次發酵等，進行冬蟲夏草菌絲體之培養，探討對菌體生長及多醣產量之影響。本研究結果發現，在搖瓶中，使用棉花塞(瓶塞直徑3.2 cm，棉花重約4.5 g)封瓶，其菌體濃度及多醣產量較使用橡皮塞(塞中心通氣孔洞，其孔徑約0.4 cm，孔隙中填充0.25 g棉花)好，碳源以葡萄糖及蔗糖為較佳，以0.5 % C.S.P.為較佳有機氮源濃度，較佳之有機氮源及無機氮比例為1/5。0.5 % Span85或0.5 % Sunflower oil為較佳之培養基質添加物。當殘糖濃度為1 % ~ 1.5 % 時，較適合菌體代謝多醣體，殘醣濃度為0.5 % ~ 1 % 時，較適合菌體生長菌絲體。於發酵槽中，以21 % O₂ 1 v.v.m.較適合菌體生長。培養中期減少一半通氣量可以促進菌體產生多醣體。關鍵字：冬蟲夏草、胞外多醣、液態發酵

關鍵詞：冬蟲夏草；胞外多醣；液態發酵

目錄

封面內頁 簽名頁 授權書.....	iii
中文摘要.....	iii
v 英文摘要.....	vi
誌謝.....	vi
vii 目錄.....	viii
圖目錄.....	viii
xiii 表目錄.....	xvi
第一章、前言.....	1
第二章、文獻回顧 2.1冬蟲夏草的簡介.....	1
2.2.1冬蟲夏草之分類.....	2
2.2.2冬蟲夏草生活史及特徵.....	2
2.2冬蟲夏草一般化學成份.....	5
2.3蟲夏草菌的多醣組成及分類.....	5
2.3.1多醣的定義.....	6
2.3.2多醣的組成分類.....	6
2.4冬蟲夏草的療效.....	8
2.4.1降低血糖作用.....	8
2.4.2固腎作用.....	8
2.4.3免疫作用.....	9
2.4.4抑制腫瘤細胞作用.....	10
2.4.5保肝作用.....	12
2.4.6預防心血管疾病.....	12
2.4.7抗病毒作用.....	12
2.4.8抗自由基性質.....	12
2.4.9致毒性研究及致突變性研究.....	13
2.5冬蟲夏草菌液態培養.....	13
2.5.1液態培養的特點.....	13
2.5.2影響冬蟲夏草菌培養的因子.....	15
2.5.2.1碳源的利用.....	16
2.5.2.2氮源的利用.....	16
2.5.2.2.1無機氮的利用.....	17
2.5.2.2.2有機氮的利用.....	17
2.5.2.3礦物質營養.....	18
2.5.2.4培養基碳氮比(C/N).....	19
2.5.2.5培養基質添加物.....	19
2.5.2.6 pH對多醣生成影響.....	20
2.6批次發酵及饋料批次發酵原理及應用.....	21
2.6.1各種饋料方法及其原理.....	23
2.6.2回饋控制的饋料方法.....	23
2.6.2.1以溶氧值為指標.....	24
2.6.2.2以pH值為指標.....	24
2.6.2.3以CO ₂ 釋放速率為指標.....	25
2.6.2.4以細胞濃度為指標.....	25
2.6.2.5以醋酸濃度為指標.....	25
2.6.2.6以基質濃度為指標.....	26
2.6.3適用饋料批次發酵的培養製程.....	26
2.6.3.1 避免營養源抑制(Nutrients inhibition).....	26
2.6.3.2 避免降解物抑制.....	26
2.6.3.3 達到高細胞密度培養.....	27
2.6.3.4增加營養需求變異株(Auxotrophic Mutant)產物之產率.....	27
2.6.3.5應用至Non-growth-associated-products，使產量增加.....	27
2.6.4葡萄糖效應.....	27
2.7 微生物的代謝作用.....	28
第三章、材料與方法 3.1實驗設備.....	30
3.1.1實驗菌種.....	30
3.1.2實驗儀器.....	30
3.1.3實驗藥品.....	30
3.1.3.1培養基.....	31
3.1.3.2分析藥品.....	31
3.2平板活化培養.....	32
3.3探討不同碳源對冬蟲夏草液態菌源培養之影響().....	33
3.4探討不同碳源對冬蟲夏草於搖瓶中生長之影響.....	33
3.5探討不同濃度有機氮源對冬蟲夏草於搖瓶中生長之影響.....	33
3.6探	

討不同濃度無機氮源對冬蟲夏草於搖瓶中生長之影響	34
3.7 探討不同通氣瓶塞對冬蟲夏草於搖瓶中生長之影響	34
3.8 探討不同通氣及溶氧對冬蟲夏草於醱酵槽中批次醱酵之影響	34
3.9 探討通氣量對冬蟲夏草液態菌源培養之影響()	35
3.10 探討不同通氣量及界面活性劑對冬蟲夏草在搖瓶中生長之影響	35
3.11 探討不同添加物對蟲草菌於搖瓶中進行饋料批次醱酵之影	36
3.12 探討添加物對蟲草菌於醱酵槽中進行饋料批次醱酵之影響	36
3.13 探討添加不同油脂類對蟲草菌在搖瓶中生長影響	37
3.14 分析方法	37
3.14.1 乾菌體重及醱酵液pH值	37
3.14.2 冬蟲夏草醱酵液殘糖量測定	37
3.14.3 冬蟲夏草多醣體測定	38
3.14.3.1 酚硫酸法	38
3.14.3.1.1 標準曲線製作步驟	38
3.14.3.1.2 冬蟲夏草胞外多醣分析步驟	39
3.14.3.1.3 冬蟲夏草胞內多醣分析步驟	49
3.14.4 冬蟲夏草多醣體分子量測定	40
3.15 分析方法	40
第四章、結果與討論	41
4.1 探討不同碳源對冬蟲夏草液態菌源培養之影響()	42
4.2 探討不同碳源及不同時間對冬蟲夏草於搖瓶中醱酵之影響	44
4.3 探討不同濃度氮源對冬蟲夏草於搖瓶中醱酵之影響	49
4.4 探討不同通氣及溶氧對冬蟲夏草於搖瓶中批次醱酵之影響	55
4.5 不同通氣及溶氧對蟲草菌於醱酵槽中批次醱酵之影響	60
4.6 液態菌原培養()	66
4.7 探討不同種類瓶塞及界面活性劑對冬蟲夏草在搖瓶中生長影響	68
4.8 探討不同添加物對蟲草菌於搖瓶中進行饋料批次醱酵之影響	79
4.9 探討添加不同油脂類對冬蟲夏草在搖瓶中生長影響	90
第五章、結論	99
參考文獻	102
附錄1 C.S.P.主要成份一覽表	附錄2 微量金屬一覽表
附錄3 多醣體濃度檢量線	附錄4 多醣分子量分佈檢量線
附錄5 論文口試會議記錄	附錄6 第七屆生化年會論文發表全文
附錄7 第八屆生化年會論文發表全文	圖2.1 具有抗腫瘤活性的 α -D-葡聚糖結構(水野及水合, 1997)
圖2.2 α -葡聚糖產生之宿主免疫反應	圖4.1 使用不同碳源進行液態菌原培養 <i>C. sinensis</i> 對菌體生長之影響
圖4.2 使用不同碳源對 <i>C. sinensis</i> 菌體生長之影響	圖4.3 不同碳源對蟲草菌培養13天產胞外多醣分子量之分佈
圖4.4 不同碳源對蟲草菌培養13天產胞內多醣分子量之分佈	圖4.5 不同無機氮源濃度對 <i>C. sinensis</i> 菌於培養九天其醱酵液中胞外多醣分子量分佈
圖4.6 使用不同通氣量之瓶塞對 <i>C. sinensis</i> 菌體生長之影響	圖4.7 使用不同通氣量之瓶塞對 <i>C. sinensis</i> 菌體代謝胞外多醣產量
圖4.8 使用不同通氣量之瓶塞對 <i>C. sinensis</i> 菌體代謝胞內多醣產量之影響	圖4.9 <i>C. sinensis</i> 菌於不同通氣量之瓶塞培養九天其醱酵液中胞外多醣分子量分佈
圖4.10 於批次液態醱酵中使用不同通氣及溶氧對 <i>C. sinensis</i> 對乾菌重影響	圖4.11 於批次液態醱酵中使用不同通氣及溶氧對培養 <i>C. sinensis</i> 對培養基質中殘糖之影響
圖4.12 於批次液態醱酵中使用不同通氣及溶氧對 <i>C. sinensis</i> 對菌體生長胞外多醣影響	圖4.13 於批次液態醱酵中使用不同通氣及溶氧對 <i>C. sinensis</i> 對菌體生長胞內多醣影響
圖4.14 使用較大通氣量進行液態菌源培養 <i>C. sinensis</i> 對菌體生長之影響	圖4.15 不同通氣量及界面活性劑醱酵培養 <i>C. sinensis</i> 對菌體生長菌絲體重之影響
圖4.16 不同通氣量及界面活性劑醱酵培養 <i>C. sinensis</i> 對培養基中殘糖量之影響	圖4.17 不同通氣量及界面活性劑醱酵培養 <i>C. sinensis</i> 對菌體生長胞外多醣之影響
圖4.18 不同通氣量及界面活性劑醱酵培養 <i>C. sinensis</i> 對菌體生長胞內多醣之影響	圖4.19 於搖瓶中進行饋料批次醱酵之影響(箭頭指示為饋料天數及次數)
圖4.20 於搖瓶中添加0.5% Tween80進行饋料批次醱酵對菌體之影響(箭頭指示為饋料天數及次數)	圖4.21 於搖瓶中添加0.5% Span85進行饋料批次醱酵對菌體之影響(箭頭指示為饋料天數及次數)
圖4.22 於搖瓶中添加0.5% Sunflower oil進行饋料批次醱酵對菌體之影響(箭頭指示為饋料天數及次數)	圖4.23 <i>C. sinensis</i> 菌於不同添加物進行饋料批次醱酵培養五天時醱酵液中胞外多醣分子量分佈
圖4.24 <i>C. sinensis</i> 菌於不同添加物進行饋料批次醱酵培養九天時醱酵液中胞外多醣分子量分佈	圖4.25 添加不同油脂醱酵培養 <i>C. sinensis</i> 對菌體生長菌絲體重之影響(0.5% olein)
圖4.26 添加不同油脂醱酵培養 <i>C. sinensis</i> 對菌體生長菌絲體重之影響(1% olein)	圖4.27 添加不同油脂醱酵培養 <i>C. sinensis</i> 對菌體代謝胞外多醣之影響(0.5% olein)
圖4.28 添加不同油脂醱酵培養 <i>C. sinensis</i> 對菌體代謝胞外多醣之影響(1% olein)	圖4.29 添加不同油脂醱酵培養 <i>C. sinensis</i> 對菌體代謝胞內多醣之影響(0.5% olein)
圖4.30 添加不同油脂醱酵培養 <i>C. sinensis</i> 對菌體生長菌絲體重之影響(1% olein)	表4.1 不同碳源對蟲草產多醣之分子量之影響
表4.2 不同碳氮源比例對 <i>C. sinensis</i> 菌體生長之影響(第九天)	表4.3 不同碳氮源比例對 <i>C. sinensis</i> 菌體生長之影響(第十三天)
表4.4 不同無機氮源濃度對 <i>C. sinensis</i> 菌體生長之影響(第九天)	表4.5 不同無機氮源濃度對 <i>C. sinensis</i> 菌體生長之影響(第十三天)
表4.6 不同無機氮源濃度對 <i>C. sinensis</i> 菌體代謝胞外多醣濃度及分	

子量分佈之影響.....	54	表4.7使用不同通氣量之瓶塞對C. sinensis菌體代謝胞外多醣濃度及分子量分佈之影響.....	59
...75	表4.9使用不同界面活對C. sinensis菌體生長之影響(第七天).....	76	表4.10使用不同界面活對C. sinensis菌體代謝胞外多醣濃度及分子量分佈之影響(使用葡萄糖及棉花塞).....
77	表4.11使用不同界面活對C. sinensis菌體代謝胞外多醣濃度及分子量分佈之影響(使用蔗糖及棉花塞).....	77	表4.12使用不同界面活對C. sinensis菌體代謝胞外多醣濃度及分子量分佈之影響(使用葡萄糖及橡皮塞).....
78	表4.13使用不同界面活對C. sinensis菌體代謝胞外多醣濃度及分子量分佈之影響(使用蔗糖及橡皮塞).....	78	表4.14不同添加物進行饋料批次發酵對C. sinensis菌體於生長之影響(第五天).....
86	表4.15不同添加物進行饋料批次發酵對C. sinensis菌體於生長之影響(第八天).....	86	表4.16不同添加物進行饋料批次發酵對C. sinensis菌體代謝胞外多醣濃度及分子量分佈之影響(第五天).....
87	表4.16不同添加物進行饋料批次發酵對C. sinensis菌體代謝胞外多醣濃度及分子量分佈之影響(第九天).....	88	表4.17不同添加物進行饋料批次發酵對C. sinensis菌體代謝胞外多醣濃度及分子量分佈之影響(第九天).....
89	表4.18不同添加物進行饋料批次發酵對C. sinensis菌體代謝胞內多醣濃度及分子量分佈之影響(第五天).....	89	表4.19不同添加物進行饋料批次發酵對C. sinensis菌體代謝胞內多醣濃度及分子量分佈之影響(第九天).....
89	表4.20不同油脂類添加醱培養C. sinensis對菌體生長影響(第七天).....	98	表4.21不同油脂類添加醱培養C. sinensis對菌體生長影響(第三天).....
			98

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. 王培銘、黃定國(2001), 氣動攪拌式發酵槽, 食品工業, 33(11), 13-25. 3. 王伯徹(2000), 具開發潛力食藥用菇介紹, 食品工業, 32(5), 1-17. 4. 王伯徹(2000), 食藥用菇保健食品之開發, 食品工業, 32(5), 18-27. 5. 王伯徹(2001), 保健用菇類發酵工業之開發, 農業世界雜誌, 218, 100-106. 6. 王伯徹(2002), 常見食藥用菇類個論貳冬蟲夏草, 農業世界雜誌, 223, 40-43. 7. 王青牡、孫姝媛(1997), 我國液態培養藥用蟲草菌絲體的研究進展, 食用菌, 3, 2-3. 8. 王國棟(1995), 冬蟲夏草類的生態、培植、應用, 科學技術文獻出版社, 北京. 9. 王志欣、王興民、王同忠、王群(1995), 冬蟲夏草與蟲草菌絲體的藥理研究現況, 中國中西醫結合雜誌, 15(4), 255-256. 10. 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. 11. 尹定華、唐雪梅(1995), 冬蟲夏草中人工培養研究的進展, 中國中藥雜誌, 20(12), 352-354. 12. 呂仁貴(1999), 饋料批次發酵Agrobacterium radiobacter用以轉化生產D-氨基酸, 國立台灣科技大學化學工程學系碩士論文. 13. 杜自疆(1980), 食用菇栽培技術, 豐年社, 台北. 14. 李建良(2001), 液態培養生產冬蟲夏草菌絲體與冬蟲夏草多醣之研究, 交通大學生物科技研究所碩士論文. 15. 林佳滿(2002), 以饋料批次發酵行本土靈芝菌(CCRC36041)之菌體與多醣生產, 大葉大學食品工程學系碩士論文. 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. 徐敬衡、周柏甫(2002), 絲狀微生物之菌絲球粒徑控制生物反應器之新設計, 化工技術, 10(4), 102-119. 18. 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), 160-16. 19. 徐泰浩、曾耀銘(1992), 利用發酵技術開發機能性食物-冬蟲夏草, 科學發展月刊, 388-392. 20. 徐泰浩、曾耀銘(1993), 生物技術概論, 藝軒圖書出版社, 台北. 21. 莊榮仁(2002), 不只是使用直交表 田口式實驗計畫法側寫, 化工技術, 10(4), 230-238. 22. 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. 23. 黃進發(2001), 台灣應用生物反應槽研發生技產物現況, 食品工業, 33(11), 27-37. 24. 陳介甫(2003), 細胞及組織培養在中草藥研發的應用及簡介冬蟲夏草, 第一屆兩岸三地冬蟲夏草研討會論文集, 台北. 25. 陳召南(1992), 細腳擬青霉(固培物)與冬蟲夏草化學成的初步比較, 中成藥, 14(2), 35-37. 26. 陳宗融(1995), 冬蟲夏草的抗癌療效研究, 明通醫藥, 34-35. 27. 陳健棋(2000), 食用菇類在醫藥上的應用, 食品工業, 32(5), 54-69. 28. 陳特良(2002), 饋料批式發校之進料策略, 化工技術, 10(4), 190-195. 29. 陳國誠(1989), 微生物酵素工程學, 藝軒圖書出版社, 台北, 23-139. 30. 許勝傑、陳清農、陳勁初(2000), 樟芝宿主專一性之探討, 台灣農業化學與食品科學, 38(6), 533-539. 31. 黃仁彰(2000), 菇類多醣體製劑的研發與應用, 食品工業發展研究中心科技專案成果, 42, 1-7. 32. 黃仁彰(2000), 菇類多醣體製劑的研發與應用, 食品工業, 32(10), 45-58. 33. 黃起鵬、李德河、梁吉春、療森泰、梁淑桂(1991), 冬蟲夏草中弱極性部份的化學成分研究, 中藥材, 14(11), 35-37. 34. 黃家樑(1997), 液態培養生產靈芝菌絲體與靈芝多醣之研究, 東海大學化學工程研究所碩士論文. 35. 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. 36. 黃進發(2000), 食藥用菇的抗氧化SOD之研發與利用, 食品工業, 32(5), 43-53. 37. 傅偉光(2000), 高效能液相層析在食品分析上之應用, 食品工業, 32(12), 39-53. 38. 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. 39. 廖英明(1998), 菇類中的許不了-樟芝, 農業世界雜誌, 176, 76-79. 40. 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. 41. 劉波(1984), 中國藥用真菌, 頁228, 山西人民出版社, 山西. 42. 鄭豐、田勁、黎磊石(1992), 冬蟲夏草對腎毒性急性腎功能衰竭得療效及機制探討, 中國中西醫結合雜誌, 12(5), 288. 43. 鄭計廷、吳林、燕婉如、吳國傳、謝以俊(1995), 可博利(冬蟲夏草多糖脂質體)治療乙型肝炎97例療效分析, 現代診斷與治療, 6(3), 178-179. 44. 蕭麗華(1997), 冬蟲夏草藥材真偽品發酵培養製備物之結構特徵與成份分析之比較, 大葉大學食品工程碩士論文. 45. Cutayar, J. M., Poillon, D.(1989) High cell density culture of E. coli in a fed-batch system with dissolved oxygen as substrate feed indicator, Biotechnology and Bioengineering, 38, 1082-1090. 46. Fang, Q. H., 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. 47. Ghosh, A. K. and Sengupta, S.(1982) Influence of some growth factors on the production of mushroom mycelium in submerged culture. Journal of Food Science and Technology,

19(2),57-60. 48. Han, S. B., Lee, C. W., Jeon, Y. J., Hong, N. D., Yoo, I. D., Yang, K. H., and Kim, H. M.(1999) The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology*,41,157-164. 49. Jong, P. P., Sang, W. K., Hye, J. H., Youn, J. C., Jong, W. Y.(2002) Stimulatory effect of plant oils and fatty acids on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology*,31,250-255. 50. Kabir, Y., Yamaguchi, M., and Kimura, S.(1987) Effect of shiitake (*Lentinus edodes*) and maitake(*Grifola frondosa*) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*,33,341-346. 51. Kabir, Y., Kimura, S., and Tamura, T.(1988) Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rat (SHR). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*,34,433-438. 52. Kabir, Y. and Kimura, S.(1989) Dietary mushroom reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rat (SHR). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*,35,91-94. 53. Kiho, T., Hui, J. I., Yamane, A. and Ukai, S.(1993) Polysaccharides in fungi. XXXII. Hypoglycemic activity and Chemical properties of a polysaccharides from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*,16(12),1291-1293. 54. Kiho, T., Yamane, A., Hui, J., Usui, S. and Ukai, S.(1996) Polysaccharide in fungi XXXVI. Hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-30) from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effects on glucose metabolism in mouse liver. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*,19(2),294-296. 55. Klaus, B. A., Kaspar, V., M.(1980) Are growth rate of *Escherichia coli* in batch culture limited by respiration, *Journal of Bacteriology*,144,114-123. 56. Lee, S. Y.(1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*,14,98-105. 57. Litchfield, J. H.(1967) Submerged culture of mushroom mycelium. In: *Microbial Technology* (Peppier, H. J., ed.),107-144. 58. Liu, F. Ooi, V. E. C., and Chang, S. T.(1997) Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences*,60,763-771. 59. McEwen, F. L.(1963) *Insect Pathology*. Academic Press, N. Y. 2,273-290. 60. Mori, H., Yano, T., Kobayashi, T., Shimizu, S.(1979) High density cultivation of biomass in fed-batch system with DO-stat, *Journal of Chemical Engineering of Japan*,12,313-319. 61. Muller E, Von Arx Ja.(1973) *Pyrenomycetes, Sphaeriales, in the Fungi V,IV,Chap.5*. 62. Robbins, J. W., Jr., Taylor, K.B.(1989) Optimization of *Escherichia coli* growth by controlled addition of glucose. *Biotechnology and Bioengineering*,34,1289-1294. 63. Scragg, A.H.(1991) *Bioreactors in biotechnology a practical approach*, pp.59, Ellis Horwood Limited. 64. Stasinopoulos, S. J., Seviour, R. J.(1990) Stimulation of exopolysaccharide production in the fungus *Acremonium persicinum* with fatty acids. *Biotechnology and Bioengineering*,36,778-782. 65. Suzuki, T., Yamane, T., Shimizu, S.(1990) Phenomenological background and some preliminary trials of automated substrate supply in pH-stat modal fed-batch culture using a setpoint of high limit, *Journal of Fermentation Technology*,69,292-297. 66. Tsuru, S., Shinomiya, N., Katsura, Y., Gotoh, M., Noritake, M., and Nomoto, K.(1991) Effects of combined therapies with protein-bound polysaccharide (PSK, Krestin) and fluorinated pyrimidine derivatives on experimental liver metastases and on the immunologic capacities of the hosts. *Oncology*, 48,498-504. 67. Ueno, Y., Kohgo, Y., Sakamaki, S., Itoh, Y., Takahashi, M., Hirayama, Y., and Niitsu, Y.(1994) Immunotherapy in B-16-melanoma-cell transplanted mice with combinations of interleukin-2, cyclophamide, and PSK. *Oncology*,51,296-302. 68. Wasser, S. P. and Weis, A. L.(1999) Therapeutic Effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushroom; a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*,19,65-96. 69. Yang, F. C. and Hwang S. Y.(1998a) Nutritional studies on submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Tunghai Journal*,39,1-10. 70. Yang, F. C. and Liao, C. B.(1998b) The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochemistry*,33(5),547-553. 71. Yang, F. C., Ke, Y. F. and Kuo, S. S.(2002) Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 27,295-301. 72. Yee, L., Blanch, H. W.(1992) Recombinant protein expression in high cell density fed-batch culture of *Escherichia coli*. *Biotechnology*,10,1550-1556.