

# 以饋料批次是發酵行本土靈芝菌(CCRC36041)之菌體與多醣生產

林佳滿、謝建元

E-mail: 9300048@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

中文摘要 本研究主要探討不同條件下搖瓶批次發酵與饋料批次式發酵並使用其條件在5L發酵槽探討靈芝菌絲生長與多醣體產生之影響。搖瓶實驗在不同起始pH發現以pH4-6菌絲濃度沒有明顯之差異性，以pH5發酵培養7天後胞外多醣濃度最高(937.18 ± 38.58 mg/L)；在基質方面以CSP為氮源培養所得之菌絲濃度與胞外多醣濃度較高；不同碳源則以蔗糖為碳源所得菌絲濃度最高(4.37 ± 0.36 g/L)，以葡萄糖之胞外多醣濃度較高(845.54 ± 19.77mg/L)，胞內多醣的差異不大(24.85 mg/g-29.95 mg/g)，但以果糖最高。以HPLC-SEC分析靈芝多醣分子量分佈情形，發現靈芝胞外多醣分子量分佈在22,200-205,800Da之間，胞內多醣分子量分佈在35,300-169,200Da之間。添加鹽類、糖濃度提高與氮源濃度提高有助於菌絲體乾重與胞外多醣增加。在搖瓶饋料批次發酵發現在第7天添加10mL 25 % CSP之胞外多醣濃度於第7天的869.69 mg/L下降至第9天755.13 mg/L，發酵第13天回到845.83 mg/L、而添加10mL 35 % 葡萄糖和10mL 35 % 葡萄糖+25 % CSP則分別達到1317.84 mg/L和1339.96 mg/L。培養基中磷源濃度降低至原基質的1/5，在磷源限制下培養13天後菌體乾重與胞外多醣濃度與原培養基並無明顯差異。培養基中氮源濃度限制為原基質40 %，單位菌體多醣產量由107.28 mg/g cell上升至177.86 mg/g cell。5L發酵槽批次式發酵培養時，攪拌速度從200rpm提高到350rpm，菌體濃度從11.61 g/L些微增至12.22 g/L，胞外多醣濃度則從2231.33 mg/L降至1765.88mg/L。在饋料批次中以發酵培養第三天饋入1 % CSP 1L (pH4.68)，第七天饋入4 % 葡萄糖1L，單位菌體多醣產量由144.51 mg/g cell上升至200.78 mg/g cell，但在發酵培養第三天饋入1 % CSP 2L (pH7)，單位菌體多醣產量則下降至129.28 mg/g cell。

關鍵詞：靈芝；饋料批次；胞外多醣；胞內多醣

## 目錄

目錄 頁次 封面內頁 簽名頁 授權書.....	iii
中文摘要.....	iv
英文摘要.....	vi
誌謝.....	viii
目錄.....	ix
圖目錄.....	xiv
表目錄.....	xvii
第壹章 前言.....	1
第貳章 文獻回顧.....	3
2.1 靈芝菌簡介.....	3
2.2 靈芝的功效.....	4
2.3 靈芝的藥理作用.....	6
2.3.1 靈芝的一般化學成分.....	6
2.3.2 降血壓.....	6
2.3.3 降血糖與降血脂作用.....	6
2.3.4 免疫作用.....	7
2.3.5 保肝作用.....	7
2.3.6 對內分泌與代謝的影響.....	8
2.3.7 抗癌作用.....	8
2.4 靈芝多醣之種類.....	9
2.5 靈芝培養.....	12
2.5.1 靈芝液態培養之優點.....	13
2.5.2 影響靈芝菌絲生長之因子.....	15
2.6 多醣之定義.....	19
2.6.1 多醣的分類.....	20
2.6.2 多醣之回收方法.....	20
2.6.2.1 醇類提取法.....	20
2.6.2.2 膜過濾法.....	22
2.6.3 多醣之測定方法.....	23
2.6.3.1 酚硫酸法.....	23
2.6.3.2 高效能分子篩層析法 (HPLC-SEC).....	24
2.6.3.3 黏度測定法.....	26
2.6.3.4 酵素法.....	26
2.6.4 影響多醣產量因子.....	26
2.6.4.1 碳源與氮源對多醣生成影響.....	26
2.6.4.2 pH對多醣生成影響.....	28
2.6.4.3 轉速對多醣生成影響.....	28
2.6.4.4 溫度對多醣生成影響.....	29
2.6.5 其他因子.....	30
2.7 饋料批次式操作.....	30
2.7.1 發酵槽進料方式.....	31
2.7.2 饋料式發酵的優點.....	31
2.8 微生物的代謝作用.....	32
第參章 材料與方法.....	36
3.1 實驗材料.....	36
3.1.1 菌株.....	36
3.1.2 實驗藥品.....	36
3.1.3 實驗器材.....	37
3.2 實驗方法.....	38
3.2.1 平板培養.....	38
3.2.2 液態菌原培養.....	38
3.2.3 搖瓶液態發酵.....	38
3.2.3.1 不同起始pH值對菌絲體與多醣產量之影響.....	39
3.2.3.2 不同氮源對菌絲體與	

多醣體產量之影響.....	39	3.2.3.3不同碳源對菌絲體與多醣體產量之影響.....	39	3.2.3.4培養階段之菌絲體與多醣體產量之變化.....	40
.....	40	3.2.3.5鹽類的添加對菌絲體與多醣體產量之影響.....	40	3.2.3.6不同濃度碳源菌絲體與多醣體產量之影響.....	40
.....	40	3.2.3.7不同濃度氮源菌絲體與多醣體產量之影響.....	41	3.2.3.8培養階段饋入不同基質之菌絲體與多醣體產量之變化.....	41
.....	41	3.2.4發酵槽批次式液態發酵.....	41	3.2.5發酵槽饋料批次式液態發酵.....	42
.....	42	3.3分析方法.....	42	3.3.1菌體乾重測定.....	42
.....	42	3.3.2 pH測定.....	42	3.3.3靈芝胞外多醣分析.....	43
.....	43	3.3.3.1酚硫酸法.....	43	3.3.3.1.1標準曲線製作步驟.....	43
.....	43	3.3.3.1.2胞外多醣濃度測定.....	43	3.3.3.2胞外多醣分子量分佈測定.....	44
.....	44	3.3.4靈芝胞內多醣分析.....	44	3.3.4.1胞內多醣濃度測定.....	44
.....	44	3.3.4.2胞內多醣分子量分佈測定.....	45	第肆章 結果與討論.....	46
.....	46	4.1不同起始pH值對菌絲體與多醣之探討.....	46	4.2不同氮源基質對菌絲體與多醣體之探討.....	54
.....	64	4.3不同碳源基質對菌絲體與多醣之探討.....	64	4.4 G. lucidum於液態搖瓶培養階段菌絲體與多醣體產量變化之影響.....	72
.....	72	4.5鹽類的添加對G. lucidum生成菌絲體與多醣體產量之影響.....	74	4.6不同碳源濃度對G. lucidum生成菌絲體與多醣體產量之影響.....	76
.....	76	4.7不同氮源濃度對G. lucidum生成菌絲體與多醣體產量之影響.....	78	4.8 G. lucidum於培養7天後添加入不同基質對菌絲體與多醣體產量變化之探討.....	80
.....	80	4.9批次發酵培養G. lucidum生成菌絲體與多醣體之探討.....	84	4.10饋料批次發酵培養G. lucidum生成菌絲體與多醣體之探88	88
.....	92	第五章 結論.....	92	參考文獻.....	94
.....	104	附錄一 酵母粉與玉米浸粉之成分表.....	104	附錄二 多醣體濃度檢量線.....	105
.....	106	附錄三 多醣分子量分佈檢量線.....	106	表目錄 表2.1靈芝的一般化學成分.....	14
.....	14	表2.2菇類子實體與菌絲體之比較.....	14	表4.1以GPC分析不同起始pH值之發酵液中水溶性多醣之濃度(M.W.>10,000)與分子量.....	52
.....	52	表4.2以GPC分析不同起始pH值之菌絲熱萃液之水溶性多醣濃度(M.W.>10,000)與分子量.....	53	表4.3以GPC分析不同氮源之發酵液中水溶性多醣之濃度(M.W.>10,000)與分子量.....	61
.....	61	表4.4以GPC分析不同氮源之菌絲熱萃液之水溶性多醣濃度(M.W.>10,000)與分子量.....	63	表4.5以GPC分析不同碳源之發酵液中水溶性多醣之濃度(M.W.>10,000)與分子量.....	70
.....	70	表4.6以GPC分析不同碳源之菌絲熱萃液之水溶性多醣濃度(M.W.>10,000)與分子量.....	71	表4.7比較培養基質中鹽類的添加對G. lucidum生長之影響75	75
.....	77	表4.8以不同碳源濃度對G. lucidium於搖瓶發酵培養生長之影響.....	77	表4.9以不同氮源濃度對G. lucidium於搖瓶發酵培養生長之影響.....	79
.....	79	表4.10 G. lucidium搖瓶發酵培養7天後饋入10mL不同基質對pH之影響.....	81	表4.11 G. lucidium搖瓶發酵培養7天後饋入10mL不同基質對菌體重之影響.....	82
.....	82	表4.12 G. lucidium搖瓶發酵培養7天後饋入10mL不同基質對胞外多醣之影響.....	83	表4.13以不同濃度磷源對G. lucidium於搖瓶發酵培養生長之影響.....	91
.....	91	圖目錄 圖2.1靈芝的生長週期.....	4	圖2.2靈芝多醣之結構.....	11
.....	11	圖2.3微生物生長和產物形式的動力形式.....	34	圖4.1 G. lucidum以不同起始pH經搖瓶發酵培養7天後pH.....	48
.....	48	圖4.2 G. lucidum以不同起始pH經搖瓶發酵培養7天後之乾菌重.....	49	圖4.3 G. lucidum以不同起始pH經搖瓶發酵培養7天後之胞外多醣.....	50
.....	50	圖4.4 G. lucidum以不同起始pH經搖瓶發酵培養7天後之胞內多醣.....	51	圖4.5 G. lucidum於不同起始pH值發酵培養7天其發酵培養液中胞外多醣分子量分佈.....	52
.....	52	圖4.6 G. lucidum於不同起始pH值發酵培養7天其菌絲熱萃液中胞內多醣分子量分佈.....	53	圖4.7 G. lucidum以不同氮源經搖瓶發酵培養7天後之pH.....	56
.....	56	圖4.8 G. lucidum以不同氮源經搖瓶發酵培養7天後之乾菌重.....	57	圖4.9 G. lucidum以不同氮源經搖瓶發酵培養7天後之胞外多醣.....	58
.....	58	圖4.10 G. lucidum以不同氮源經搖瓶發酵培養7天後之胞內多醣.....	59	圖4.11 G. lucidum於不同無機氮源發酵培養7天其發酵培養液中胞外多醣分子量分佈.....	60
.....	60	圖4.12 G. lucidum於不同有機氮源發酵培養7天其發酵培養液中胞外多醣分子量分佈.....	60	圖4.13 G. lucidum於不同無機氮源發酵培養7天其菌絲熱萃液中胞內多醣分子量分佈.....	62
.....	62	圖4.14 G. lucidum於不同有機氮源發酵培養7天其菌絲熱萃液中胞內多醣分子量分佈.....	62	圖4.15 G. lucidum以不同碳源經搖瓶發酵培養7天後之pH.....	66
.....	66	圖4.16 G. lucidum以不同碳源經搖瓶發酵培養7天後之乾菌重.....	67	圖4.17 G. lucidum以不同碳源經搖瓶發酵培養7天後之胞外多醣.....	68
.....	68	圖4.18 G. lucidum以不同碳源經搖瓶發酵培養7天後之胞內多醣.....	69	圖4.19 G. lucidum於不同碳源發酵培養7天其發酵培養液中胞外多醣分子量分佈.....	70
.....	70	圖4.20 G. lucidum於不同碳源發酵培養7天其菌絲熱萃液中胞內多醣分子量分佈.....	71	圖4.21 G. lucidum於搖瓶發酵培養13天之pH與乾菌種及胞內、胞外多醣之化.....	73
.....	73	圖4.22以2%葡萄糖為碳源發酵槽批次發酵培			

養13天.....85	圖4.23以4 % 葡萄糖為碳源發酵槽批次發酵培養.....86	圖4.24以4 % 葡萄糖為碳源發酵槽批次發酵培養轉速提高到 350rpm.....87	圖4.25饋料批次發酵培養，在培養第三天饋入1 % CSP 1L (pH4.68)，在第七天饋入4 % 葡萄糖1L，發酵培養13天.....89	圖4.26饋料批次發酵培養，在培養第三天饋入1 % CSP 2L (pH7)，發酵培養13天.....90
-------------	----------------------------------	--	--	---

## 參考文獻

- 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。
- 尤新(2001)機能性發酵製品，藝軒圖書出版社。
- 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。
- 王伯徹(2000a)具開發潛力食藥用菇介紹，食品工業，32(5):1-17。
- 王伯徹(2000b)食藥用菇保健食品之開發，食品工業，32(5):18-27。
- 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。
- 王伯徹(1990)藥用真菌系列報導(一)靈芝，食品工業，22(1):23-33。
- 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。
- 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。
- 全漢霖、楊芳鏘(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。
- 白壽雄、羅道蘊(1994)生物性多醣體及應用，生物產業，5(34):167-173。
- 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。
- 江國瑛、張欣暘、許埕棋、段國仁(1997)利用深層發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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 李玲玟、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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 林俊清(1990)生藥的解說 靈芝的介紹，藥學介紹，6(3):104-111。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 高益槐(2000)世紀奇草話靈芝。元氣齋出版社，台北市。
- 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。
- 許瑞祥(1995)靈芝的研究現況與展望，生物產業，6(4):289-296。
- 陸文樑、林忠平、林志彬(1992)靈芝的科學應用，渡假出版社。
- 梁志欽(1991)松杉靈芝浸漬發酵培養生產的1,3- $\beta$ -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。
- 陳大為、黃禎基、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。
- 陳健祺(2000)食用菇類在醫學上的應用，食品工業，32(5):54-69。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 劉柯俊、黃雪芳、蘇慶華、董大成(1989)口服靈芝多醣體之吸收ICR老鼠口服標幟碳14靈芝培養液之研究，中華癌醫會誌，5(2):22-30。
- 劉國柱(1990)現代科學看靈芝，雙利實業有限公司，台北。
- 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。
- 蘇慶華(1991)靈芝之分類學及生理活性物質，北醫學報20:1-16。
- Alexopolus, C. J. and C. W. Mims (1979) Introductory Mycology. John Wiley and Sons, Inc. N. Y.
- Arcidiacono, S. and Kaplan, D. L. (1992) Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. *Biotech. Bioeng.* 39:281-286.
- Breene, W. M. (1990) Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *J. of Food Protection.* 53(10):883-894.
- Chen, W. C., Hau, D. M., Wang, C. C., Lin, I. H., and Lee, S. S. (1995) Effect of *Ganoderma lucidum* and Krestin on subset T-cell in spleen of g-irradiated mice. *J. of Chinese Med.* 23(1):71-80.
- Choi, J. H., Oh, D. K., Kim, J. H. and Lebeault, J. M. (1991) Characteristics of novel high viscosity polysaccharide, methylan, produced by *Methylbacterium organophilum*. *Biotech. Lett.* 13(6):417-420.
- De la Vega, M. G., Cejudo, F. J. and Paneque (1991) Production of exocellular polysaccharide by *Azotobacter chroococcum*. *Appl. Biochem. Biotech.* 30:273-284.
- 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.
- 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. p.31-64.
- 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 Biochem. 37:769-774. 60.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. 61.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.* 4:339-404. 62.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. 63.Israilides, C., Bocking, M., Smith, A. and Scanlon, B. (1994) A novel rapid coupled enzyme assay for the estimation of pullulan. *Biotech. Appl. Biochem.* 19:285-291. 64.Kawagishi, H. (1995) Mushroom lectins. *Food Rev. Int.* 11(1):62-68. 65.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. 66.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. 67.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. 68.Lacroix C., Ledyu A., Noel G. and Choplin L. (1985) Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. *Biotech. Bioeng.* 27:202-207. 69.Lee, S. S., Wei, Y. H. Chen, C. F., Wang, S. Y., and Chen, K. Y. (1995) Antitumor effects of *Ganoderma lucidum*. *J. of Chinese Med.* 6(1):1-12. 70.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. 71.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 Res.* 12:1211-1216. 72.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):93-145, Academic Press, New York. 73.Litchfield, J. H. (1967) Submerged culture of mushroom mycelium. In : *Microbial Technology*(Peppier, H. J., ed), Reinhold, New York, 107-144. 74.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. 75.Luo, J., Huang, R., Chen, L., Li, H. and Z, Z. (1998) Fermentation of *Ganoderma lucidum* and studies on polysaccharides. 98<sup>th</sup> Nanjing International Symposium on Science & Cultivation of Mushrooms. Nanjing, China. 76.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. 77.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. of Pharmacobio-Dynamics.* 12:118-123. 78.Miyazaki, T. and Nishijima M. (1981) Studies on fungal polysaccharides XXVII. Structural examination of a water-soluble, anti-tumor polysaccharides of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Parm. Bull.* 29(12):3611-3616. 79.Mizuno, T., Nishitoba, T., Saito, H. and Kawagishi, H. (1995a) Antitumor-active substances from mushrooms. *Food Rev. Int.* 11(1):23-61. 80.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 Rev. Int.* 11(1):151-166. 81.Mizuno, T., T. Sakai and G. Chihara (1995c) Health foods and medicinal usages of mushroom. *Food Rev. Int.* 11(1):69-81. 82.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. 83.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. 84.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. 85.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. 86.Seviour, R. J. and Kristiansen, B. (1983) Effect of ammonium ion concentration on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *Appl. and Microbiol Biotechnol.* 17:178-181. 87.Smith, I. H. and Pace, G. W. (1982) Recovery of microbial polysaccharides. *J. of Chem. Technol. and Biotechnol.* 32:119-129. 88.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. and Biol. Chem.* 49(9):2641-2653. 89.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. 90.Staats, N., Stal, L. J. and Mur, L. R. (2000) Exopolysaccharide production by the epipellic diatom *Cylindrotheca closterium*: effect of nutrient conditions. *J. of Exp. Marine Biol. and Ecolo.* 249:13-27. 91.Stasinopoulos, S. I. and Seviour, R. J. (1992) Exopolysaccharide production by *Acremonium persicinum* in stirred-tank and air-lift fermentors. *Appl. and Microbiol Biotechnol.* 36:465-468. 92.Stasinopoulos, S. J., Seviour, R. J. (1990) Stimulation of exopolysacch avide production in the fungus *Acremonium persicinum* with fatty acids. *Biotech. and Bioeng.* 36:778-782. 93.Stasinopoulos, S. J., Seviour, R. J. and Auer, D. F. (1989) Inhibition of fungal exopolysaccharide production by chemical antifoams. *Lett. in Appl. Microbiol.* 8:91-93. 94.Stejskal, J. and Potucek, F. (1985) Oxygen transfer in liquids. *Biotech. and Bioeng.* 27:503-508. 95.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. 96.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. *Int. J. of Cancer.* 70:699-705. 97.William C. and Wernau, G. C. (1981) Fermentation Process for Production of Xanthan. U.S. Patent. 4(80):195-203. 98.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. 99.Wood, P. J., Weisz, J. and Blackwell, B. A. (1991) Molecular characterization of ceral

-D-glucans. Structural analysis of oat l -D-glucans from different source by high-performance liquid chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal. Chem.* 68(1):31-39. 100. Yamane, T. and S. Shimizu (1984) Fed-batch Techniques in Microbial Processes, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 30, 147-194. 101. Yang, F. C. and Liao, C. B. (1998a) Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures. *Bioprocess Eng.* 19:233-236. 102. Yang, F. C. and Liao, C. B. (1998b) The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochem.* 33(5):547-553. 103. Yang, F. C. and Hwang S. Y. (1998c) Nutritional studies on submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Tunghai J.* 39:1-10. 104. 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 Technol.* 27(3-5):295-301. 105. 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. *Biotechnol. Lett.* 9(9):621-624. 106. 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 Biochem.* 34:355-366. 107. 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.