

# 影響雲芝菌絲體與多醣體批次饋料發酵產程控制參數因子之探討

楊士賢、徐泰浩

E-mail: 9510775@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

雲芝菌(*Coriolus versicolor*)又稱瓦茸，屬於擔子菌綱、非褶菌目、多孔菌科、革蓋菌屬，是木生腐敗真菌，其多醣體具有抗腫瘤、抗癌、保肝、抗氧化及免疫調節等功能，以具有 1,6-β-糖苷鍵之 1,3-β-葡聚糖為其生物活性主要成分，在其子實體及菌絲體均有此結構的多醣體。本研究主要探討：(一)、不同培養條件對雲芝多醣體及生物質量生產之影響。(二)、使用GPC進行胞內、胞外及子實體水溶性多醣分子量測定。(三)、測定胞內、胞外及子實體多醣之單醣含量。(四)、比較雲芝素、胞內、胞外及子實體多醣體之一般化學成分分析。(五)、比較雲芝子實體多醣及胞內、胞外多醣之抗氧化性分析。(六)、比較胞內及胞外多醣之MTT存活率測定。(七)、使用傅立葉紅外線進行分析胞內及胞外多醣之官能基。研究結果顯現：饋料批次發酵中，控制pH值3.5~5之間，於培養第四天及第九天饋入2%葡萄糖(含0.1% peptone)0.5 L，可獲得生物質量8.32 g/L、胞內多醣0.31 g/L及胞外多醣 1.40 g/L。水溶性胞外多醣分子量大小介於0.06~2.08 KDa；水溶性胞內多醣分子量大小介於0.06~1800 KDa；水溶性子實體多醣分子量大小介於0.06~310 KDa。探討抗氧化性，雲芝子實體多醣(5 mg/mL)可獲得最高還原力為4.64；雲芝子實體多醣(5 mg/mL)可獲得最高亞鐵離子螯合能力為84.77%；胞外多醣(5 mg/mL)可獲得最高超氧陰離子去除能力93.21%。探討MTT存活率測定，胞外多醣(1 mg/mL)將HeLa細胞相對存活率下降至最低為31.88%；胞內多醣(0.5 mg/mL)將HepG2細胞相對存活率下降至最低為72.31%；胞內及胞外多醣(1 mg/mL)皆可將NIH-3T3細胞相對存活率下降至最低為52%。

關鍵詞：雲芝菌，蛋白多醣，饋料批次發酵，抗氧化性，MTT 細胞存活率

## 目錄

封面內頁 簽名頁-ii 授權書-iii 中文摘要-iv 英文摘要-vi 致謝-viii 目錄-ix 圖目錄-xv 表目錄-xviii 附錄-xx 第一章 前言-1 第二章 文獻回顧-2 2.1 雲芝菌之簡介-2 2.1.1 雲芝菌之分類地位-2 2.1.2 型態特徵與類型-2 2.1.3 生態環境-3 2.2 雲芝菌之多醣體種類-4 2.2.1 雲芝菌之子實體的多醣體-4 2.2.2 雲芝菌的多醣體-5 2.3 雲芝菌之液態培養-6 2.3.1 培養基組成-6 2.3.2 液態生長條件-12 2.4 藥用真菌多醣體之萃取及分析方法-13 2.4.1 胞內粗多醣體的萃取方法-13 2.4.2 多醣體的分析方法-14 2.5 雲芝菌之藥理作用-16 2.5.1 抗腫瘤、抗癌作用-16 2.5.2 抗動脈硬化作用-17 2.5.3 免疫調節作用-18 2.5.4 鎮痛作用-18 2.5.5 抗氧化作用-19 2.5.6 保肝作用-20 2.5.7 抗貧血作用-20 2.6 雲芝菌的應用-21 2.6.1 環境上的應用-21 2.6.2 臨床上的應用-23 2.7 藥用真菌菌絲體之浸液培養-23 2.7.1 真菌絲狀菌絲影響因子-23 2.8 饋料批次式操作-25 2.8.1 發酵槽進料方式-26 2.9 氧化作用及抗氧化之機制與原理-27 2.9.1 氧化作用與癌症-27 2.9.2 自由基與活性氧的生成-29 2.9.3 氧化壓力及氧化傷害-32 2.9.4 抗氧化劑作用之原理及機制-34 第三章 材料與方法-36 3.1 實驗材料-36 3.1.1 試驗菌株-36 3.1.2 基礎培養基-36 3.1.3 儀器與設備-36 3.2 菌種保存與更新-37 3.3 液態菌培養-37 3.4 五公升小型發酵槽批次式液態發酵生產條件之探討-37 3.4.1 不同攪拌速率之影響-38 3.4.2 控制不同pH值之影響-38 3.5 五公升小型發酵槽批次饋料式液態發酵生產條件之探討-38 3.5.1 恆定pH值以不同饋料濃度培養之影響-38 3.5.2 控制pH值範圍以不同饋料濃度培養之影響-39 3.6 分析方法-39 3.6.1 菌體之生物質量-39 3.6.2 酚硫酸法分析總醣-40 3.6.3 還原醣的測定-40 3.6.4 化學成分分析-41 3.6.4.1 粗蛋白測定-41 3.6.4.2 粗脂肪測定-42 3.6.4.3 灰分之測定-42 3.6.4.4 含水量之測定-43 3.6.5 胞外多醣分析-43 3.6.5.1 胞外多醣濃度測定-43 3.6.5.2 胞外多醣分子量分佈測定-43 3.6.5.3 胞外多醣之單醣成分分析-44 3.6.5.4 胞外多醣之水溶性單醣成分分析-45 3.6.5.5 胞外多醣之水溶性蛋白含量分析-45 3.6.6 胞內多醣分析-46 3.6.6.1 胞內多醣濃度測定-46 3.6.6.2 胞內多醣分子量分佈測定-47 3.6.6.3 胞內多醣之單醣成分分析-47 3.6.6.4 胞內多醣之水溶性單醣成分分析-48 3.6.6.5 胞內多醣之水溶性蛋白含量分析-48 3.6.7 子實體胞內多醣分析-49 3.6.7.1 胞內多醣濃度測定-49 3.6.7.2 胞內多醣分子量分佈測定-49 3.6.7.3 胞內多醣之單醣成分分析-49 3.6.8 抗氧化分析-50 3.6.8.1 還原力的測定-50 3.6.8.2 亞鐵離子螯合能力之測定-51 3.6.8.3 超氧陰離子清除能力-51 3.7 MTT存活率測試法-52 3.8 傅氏紅外線掃描分析-52 第四章 結果與討論-53 4.1 五公升發酵槽批次式液態發酵-53 4.1.1 不同攪拌速率對菌絲體與多醣體之探討-53 4.1.2 恆定不同pH值對菌絲體與多醣體之探討-54 4.2 五公升發酵槽批次饋料式液態發酵-60 4.2.1 恆定pH值以不同饋料濃度培養對菌絲體與多醣體產量之探討-60 4.2.2 控制pH值範圍以不同饋料濃度培養對菌絲體與多醣體產量之探討-67 4.3 比較雲芝菌於不同發酵方式對生質量及多醣體之影響-68 4.4 比較雲芝子實體及浸液菌絲體、多醣體之各種成分分析-76 4.4.1 分子量分佈測定-76 4.4.2 單醣成分含量分析-76 4.4.3 水溶性單醣及水溶性蛋白質成分含量分析-81 4.4.4 一般化學成分分析-81 4.5 比較雲芝子實體多醣及多醣體之抗氧化性分析-85 4.5.1 還原力-85 4.5.2 亞鐵離子螯合能力-85 4.5.3 清除超氧陰離子能力-85 4.6 MTT存活率測定-86 4.6.1 EPS、IPS對HeLa細胞存活率之探討-86 4.6.2 EPS、IPS對HepG2細胞存活率之探討-90 4.6.3 EPS、IPS對NIH-3T3細胞存活率之探討-90 4.7 以傅立葉紅外線分析PSK、EPS及IPS之官能基-91 第五章 結

論-97 參考文獻-98 附錄-110 圖目錄 圖4.1 雲芝菌於五公升發酵槽(100 rpm)培養產程中其菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原糖(a圖)；胞內與胞外多醣體之變化(b圖)-55 圖4.2 雲芝菌於五公升發酵槽(150 rpm)培養產程中其菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原糖(a圖)；胞內與胞外多醣體之變化(b圖)-56 圖4.3 五公升發酵槽(100 rpm)培養14天對雲芝菌之菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原糖(a圖)；胞內與胞外多醣體之變化(b圖)-58 圖4.4 恆定不同pH於五公升發酵槽(100 rpm)培養7天對雲芝菌之菌絲體生物質量之變化-61 圖4.5 恆定不同pH於五公升發酵槽(100 rpm)培養7天對雲芝菌之胞外多醣之變化-61 圖4.6 恆定不同pH於五公升發酵槽(100 rpm)培養7天對雲芝菌之胞內多醣之變化-62 圖4.7 恆定不同pH於五公升發酵槽(150 rpm)培養7天對雲芝菌之菌絲體生物質量之變化-62 圖4.8 恆定不同pH於五公升發酵槽(150 rpm)培養7天對雲芝菌之胞外多醣之變化-63 圖4.9 恆定不同pH於五公升發酵槽(150 rpm)培養7天對雲芝菌之胞內多醣之變化-63 圖4.10 五公升發酵槽(100 rpm)；pH stat 4)培養14天對雲芝菌之菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原(a圖)；胞內與胞外多醣體之變化(b圖)-66 圖4.11 饋入不同濃度溶液於五公升發酵槽(100 rpm、pH-stat 4)培養 14天對雲芝菌之菌絲體生物質量之變化-69 圖4.12 饋入不同濃度溶液於五公升發酵槽(100 rpm、pH-stat 4)培養 14天對雲芝菌之胞外多醣之變化-70 圖4.13 饋入不同濃度溶液於五公升發酵槽(100 rpm pH-stat 4)培養 14天對雲芝菌之胞內多醣之變化-71 圖4.14 饋入不同濃度溶液於五公升發酵槽(100 rpm、pH 3.5~5)培養 14天對雲芝菌之菌絲體生質量之變化-72 圖4.15 饋入不同濃度溶液於五公升發酵槽(100 rpm、pH 3.5~5)培養 14天對雲芝菌之胞外多醣之變化-73 圖4.16 饋入不同濃度溶液於五公升發酵槽(100 rpm、pH 3.5~5)培養 14天對雲芝菌之胞內多醣之變化-74 圖4.17 雲芝菌之水溶性胞外多醣分子量-77 圖4.18 雲芝菌之水溶性胞內多醣分子量-78 圖4.19 雲芝子實體之水溶性胞內多醣分子量-79 圖4.20 雲芝菌之發酵液分子量-80 圖4.21 EPS、IPS、CVP、BHA及 -生育醇(A-T)之還原力比較-87 圖4.22 EPS、IPS、CVP、BHA、EDTA及 -生育醇(A-T)之亞鐵離子螯合能力比較-88 圖4.23 EPS、IPS、CVP及BHA之超氧陰離子清除能力比較-89 圖4.24 不同胞內多醣濃度對HeLa細胞相對存活率之影響-93 圖4.25 不同胞外多醣濃度對HeLa細胞相對存活率之影響-93 圖4.26 不同胞內多醣濃度對HepG2細胞相對存活率之影響-94 圖4.27 不同胞外多醣濃度對HepG2細胞相對存活率之影響-94 圖4.28 不同胞內多醣濃度對NIH-3T3細胞相對存活率之影響-95 圖4.29 不同胞外多醣濃度對NIH-3T3細胞相對存活率之影響-95 圖4.30 胞外及胞內多醣之紅外光譜-96 表目錄 表2.1 雲芝蛋白多醣的組分含量-7 表2.2 雲芝菌絲體蛋白多醣和日本商品PSK之胺基酸組成分析-8 表2.3 不同碳源對雲芝菌絲體生長之影響-10 表2.4 不同氮源對雲芝菌絲體生長之影響-11 表2.5 不同C / N對雲芝菌絲體生長之影響-11 表2.6 自由基之範例-28 表2.7 ROS及RNS之分類-30 表3.1 DNS試劑組成-40 表3.2 SOD試劑組成-51 表4.1 不同攪拌速率於搖瓶培養7天對雲芝菌菌絲體之菌絲體生物質量、胞內與胞外粗多醣體、還原糖含量及動力參數之變化-56 表4.2 恆定不同pH於五公升發酵槽(100 rpm)培養7天對雲芝菌菌絲體之菌絲體生物質量、胞內與胞外粗多醣體、還原糖含量及動力參數之變化-64 表4.3 恆定不同pH於五公升發酵槽(150 rpm)培養7天對雲芝菌菌絲體之菌絲體生物質量、胞內與胞外粗多醣體、還原糖含量及動力參數之變化-65 表4.4 不同培養條件於五公升發酵槽對雲芝菌菌絲體之菌絲體生物質量、胞內與胞外粗多醣體之變化-75 表4.5 饋料批次發酵培養(100 rpm；pH 3.5~5；fed 2 % glucose(0.1 % peptone))7天雲芝菌之水溶性胞外多醣分子量-77 表4.6 饋料批次發酵培養(100 rpm；pH 3.5~5；fed 2 % glucose(0.1 % peptone))7天雲芝菌之水溶性胞內多醣分子量-78 表4.7 雲芝子實體之水溶性胞內多醣分子量-79 表4.8 雲芝菌之發酵液分子量-80 表4.9 EPS、IPS及CVP之單糖含量-82 表4.10 EPS、IPS及CVP之水溶性單糖含量-83 表4.11 EPS及IPS之水溶性蛋白質含量-83 表4.12 比較雲芝人工培育子實體、浸液菌絲體、EPS、IPS及CVP之一般化學成分含量-84 附錄 附錄一 饋料批次發酵培養(100 rpm；pH stat 4；fed 1 % glucose(0.05 % peptone)) 14天對雲芝菌之菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原糖(a圖)；胞內與胞外多醣體之變化(b圖)-110 附錄二 饋料批次發酵培養(100 rpm；pH stat 4；fed 2 % glucose(0.1 % peptone)) 14天對雲芝菌之菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原糖(a圖)；胞內與胞外多醣體之變化(b圖)-111 附錄三 饋料批次發酵培養(100 rpm；pH stat 4；fed 4 % glucose(0.2 % peptone)) 14天對雲芝菌之菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原糖(a圖)；胞內與胞外多醣體之變化(b圖)-112 附錄四 饋料批次發酵培養(100 rpm；pH 3.5~5；fed 1 % glucose(0.05 % peptone)) 14天對雲芝菌之菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原糖(a圖)；胞內與胞外多醣體之變化(b圖)-113 附錄五 饋料批次發酵培養(100 rpm；pH 3.5~5；fed 2 % glucose(0.1 % peptone)) 14天對雲芝菌之菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原糖(a圖)；胞內與胞外多醣體之變化(b圖)-114 附錄六 饋料批次發酵培養(100 rpm；pH 3.5~5；fed 4 % glucose(0.2 % peptone)) 14天對雲芝菌之菌絲體生物質量、培養基中pH值與還原糖(a圖)；胞內與胞外多醣體之變化(b圖)-115 附錄七 動力參數命名法-116

## 參考文獻

中文部分 1.丁少軍、宋美靜。1998。雲芝漆?的培養和分離純化的研究。纖維素科學與技術 6(3):16~20。 2.尤蓉、余斌、李正。2001。食品發酵工業 27(12):20~21。 3.王伯徹、邱世浩、黃仁彰。1998a。食用菇保健食品專輯。食品工業月刊 30(5):1~35。 4.王宜磊、揚道彩。1998b。雲芝胞外漆?活性研究。荷澤師範學報 20(4):57~59。 5.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。 6.王皓、鄒正舞、王洪雲、顧振綸。1996。雲芝糖?對小鼠骨髓粒一單系細胞的影響。蘇州醫學院學報 16(4):601~603。 7.王漢濤。1993。雲芝多糖對小鼠產生細胞因子的促進作用。中國藥學雜誌 28(12):722。 8.水野卓和川合正允編著，賴慶亮譯。1996。舞茸。菇類的化學、生化學。265~278。國立編譯館。台灣，台北。 9.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。 10.卯曉嵐。1989。中國的食用和藥用大型真菌。微生物學通報 16:290~297。 11.李俊峰。2003。雲芝的生理學特性、藥理作用及應用前景。農業科學 31(3):509~510。 12.李蕙蓉。1996。白腐真菌在石化環保中的應用。石油化工環境保護 (1):56~60。

- 13.江飛子。1985。B淋巴細胞的造血調控作用。實驗生物學報 18:149。14.林娟。1999。雲芝的生物學特性與栽培技術。中國林副特產4:23~24。15.吳國榮、程光宇、陳勝蘭、?玉珍。1995。液體發酵雲芝蛋白多醣的分離及其鑑定。南京師大學報 18(1):88~93。16.巫冠中。1991。雲芝多糖的抗傷害作用。中國藥科大學學報 22(5):301。17.俞光弟、端木正波、印其章。1994。雲芝糖?對大鼠下丘腦??基底節活動和脾淋巴?胞免疫功能的調節。蘇州醫學院學報 14 (5):365。18.周選圍。2000。雲芝細胞核的研究。食用菌學報 7(2):55~57。19.周曾同、張水龍、趙亦非、金芝貴、楊慶堯。2001。雲芝精華(PSP)防治口腔白斑癌變的臨床研究。臨床口腔醫學雜誌 17(2):133~144。20.周金熙。1988。雲芝多糖?對小鼠的抗腫瘤及免疫調節作用。上海師範大學學報 17(3):72。21.陳士瑜。1988。食用菌生產大全。第439~443頁。農業出版社。北京。22.陳海生、廖時萱、張學森、譚建權、田野萍。1996。野生雲芝兩種多醣的基本結構測定。第二軍醫大學學報 17(1):83~84。23.徐錦堂。1996。中國藥用真菌學。第475~495頁。北京醫科大學、中國協和醫科大學聯合出版社。北京。24.陶雪娟、徐崇敬、宋鳳菊、張建敏、陳建華。1999。蕈菌液體生物發酵技術的研究現狀與進展。上海農學院學報17(2):141~147。25.晏愛立、季生發。1998。雲芝多醣對往後乳腺癌化療病人免疫功能影響的研究。蘇州醫學院學報 18(1):36~37。26.梁中琴、王曉霞、陳星熾、顧振綸。1999a。雲芝糖?抗腫瘤的實驗研究。蘇州醫學院學報 19(7):764~765。27.梁中琴、王曉霞、顧振綸、楊吉成、盛偉華。1999b。雲芝糖?誘發人外周血淋巴細胞產生IL-6的研究。中國藥學雜誌 34(10):700~702。28.魯進宇、王漢濤、田野草、徐志工、譚建權、陳海生。1995。雲芝多糖對小鼠免疫功能的影響。中國藥學雜誌 30(1):10~14。29.婁寧、陳瓊、周玫。1995。雲芝多醣對實驗性動脈僵樣硬化家兔脂質過氧化損傷的保護作用。第一軍醫大學學報 15(2):107~110。30.許義勇。1993。氧自由基、抗氧化物、癌病發生機轉與防治。自由基生物學與醫學 1:24~31。31.張培玉、楊革、鄭恆河。1998。雲芝菌?體生長的?養需求及液體發酵研究。曲阜師範大學學報 24(3):65~68。32.張玉英、李金華、金杉、俞光弟、顧振綸、錢曾年。1997。雲芝糖?可能通過白介素提高小鼠抗急性缺氧的能力。中草藥 28(7):418~419。33.孫希雯、朱明光。1999。灰樹花深層培養基的最優化及一種胞外粗多醣快速測定方法的建立。天津輕工業學院學報15(3):24~28。34.黃中洋。1991。Superoxide dismutase醫療功效。臺灣醫界 34(2):139~143。35.黃悅璋。2004。植物化學物質之抗氧化力及其抗突變性。中國文化大學碩士論文。台北。36.程光宇、吳國榮、鄒玉珍、陳勝藍。1998。深層培養雲芝菌絲體蛋白多醣的提取及性質。植物資源與環境 7(4):19~23。37.曾淑君、沈寶蓮、文良珍。1995。雲芝糖?對裸鼠人肺腺癌抗癌作用的研究。中國藥理學通報 11(1):46~48。38.塚越茂。1978。蛋白多糖体(PSK)?用??癌免療法??基??????特??床??用。PSK文獻集(2):70~95 39.楊芳鏘、蔣明哲。2001。菌絲狀真菌之深層培養技術。化工技術 9(2):176~186。40.楊道彩。1999。碳、氮源對雲芝胞外漆?分泌的影響。濟澤師範學報 21(4):42~44。41.蔣星紅、矯勇軼、龔珊、俞光弟、印其章、顧振綸、錢曾年。1997。不同劑量雲芝糖?對小鼠痛閾、游泳耐力和免疫功能的影響。中國藥理學通報 13(1):63~65。42.翟志武、李成文、韓春英、賀廣斌。2003。雲芝糖?研究發展 22(1):30~31。43.滕愛芬、張玉英、顧振綸、印其章、錢曾年、郭次儀、周文軒。1996。雲芝糖?鎮痛作用的實驗研究。中國藥學雜誌 31(10):591~594。44.魏文樹、譚建權。1997。雲芝多糖對活性氧清除機制的增強作用。中國藥學雜誌 32(4):199~201。45.魏文樹、譚建權、陳海生。1996。雲芝多糖對小鼠肝臟超氧化物歧化?活力和脂質過氧化的影響。中國藥理學與毒理學雜誌 10(4):307~307。46.蘇慶華。1991。靈芝之分類學及生理活性物質。北醫學報 20:1~16。英文部分 1. AOAC. 1984. Official Methods of Analysis of the AOAC, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC. 2. Allen, R. and Tresini, M. 2000. Oxidative stress and gene regulation. Free Radic. Biol. Med. 28: 463~499. 3. Algarra, I., Collado, A. and Garrido, F. 1997. Protein bound polysaccharide PSK abrogates more efficiently experimental metastases derived from H22 negative than from H22 positive fibrosarcoma tumor clones. J. Exp. Clin. Cancer Res. 16 (4): 373 4. Bradford, M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 31: 906~910. 5. Chow, L., Lo, C., Loo, W., Hu, X. and Sham, J. 2003. Polysaccharide peptide mediates apoptosis by up-regulating p21 gene and down-regulating cyclin D1 gene. Am. J. Chin. Med. 31: 1~9. 6. Cadet, J., Ravanat, J., Buchko, G., Yeo, H. and Ames, B. 1994. Singlet oxygen DNA damage: chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products. Methods Enzymol. 234: 79~88. 7. Christopher, F. 1994. The structure and function of fungal laccase. Microbiology. 140(1): 19. 8. Draper, H., Agarwal, S., Nelson, D., Wee, J., Ghoshal, A. and Farber, E. 1995. Effects of peroxidative stress and age on the concentration of a deoxyguanosine -aldehyde adduct in rat DNA. Lipids. 30: 959~961. 9. Devi, G., Prasad, M., Saraswathi, I., Raghu D., Rao D. and Reddy P. 2000. Free radicals antioxidants enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. Clin. chim. acta. 293: 53~62. 10. Dziezak, J. 1986. Preservatives: antioxidant. Food technol. 40: 94~102. 11. Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. and Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. biochem. 28(3): 350~356. 12. Decker, E. and Welch, B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. J. Agric. Food Chem. 38: 674~677. 13. Edenharter, R. and Grunhage, D. 2003. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in Salmonella typhimurium TA102. Mutat. Res. 540: 1~18. 14. Gordon, M. and Gordon-Smlth, E. 1981. Lymphocytes and haemopoiesis. Br. J. Haemat. 47: 163. 15. Guimaraes, C., Bento, L. and Mota, M. 1999. Biodegradation of colorants in refinery effluents: Potential use of the fungus Phanerochaete chrysosporium. Int. Sugar J. 101(1205): 246~251. 16. Gutteridge, J. 1993. Free radicals in disease process: A complication of cause and consequence. Free Rad. Res. Commun. 19: 141~158. 17. Gang-Liang, H., Man-Xi, L. and Xin-Ya, M.. 2004. Synthesis, (1-3)- $\beta$ -D-glucan -ase binding ability, and phytoalexin elicitor activity of a mixture of 3,4-epoxybutyl (1-3)- $\beta$ -Doligoglucosides. Carbohydr. res. 339: 1453~1457. 18. Groff, J. and Gropper, S. 1999. Advanced nutrition and human metabolism. Belmont, Wadsworth Thomson Learning. 19. Halliwell, B., Murcia, M., Chirico, S., and Aruoma, O. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 35: 7~20. 20. Halliwell, B. and Gutteridge, J. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. 219: 1~14. 21. Hanssen, G. and Seifert, G. 1987. Effects of cultivation techniques and media on yield and morphology of the basidiomycete Armillaria mellea. App. Microbiol. Biotechnol. 26: 468~473. 22. Hsieh, T., Kunicki, J., Darzynkiewicz, Z. and Wu, J. 2002. Effects of extracts of Coriolus versicolor on cell-cycle progression and

expression of interleukins-1 beta, -6, and -8 in promyelocytic HL-60 leukemic cells and mitogenically stimulated and nonstimulated human lymphocytes. *J. Altern. Complement. Med.* 8: 591–602.

23. Hawksworth, D., Kirk, P., Sutton, B. and Pegler, D. 1996. Dictionary of the fungi. International Mycological Institute.
24. Hotta, T., Enomoto, A., Yoshikumi, C., Ohara, M. and Ueno, S. 1981. Protein-bound polysaccharides. *US. Patent.* 4(271): 151.
25. Hiruta, O., Futamura, T., Takebe, H., Satoh, A., Kamisaka, Y., Yokochi, T., Nakahara, T. and Suzuki, O. 1996. Optimization and scale-up of  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mortierella ramanniana* MM 15-1 a High  $\gamma$ -linolenic acid producing mutant. *J. Frem. Bioeng.* 82: 366–370.
26. Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidants: A personal review. *Nutr. Rev.* 52: 253–265.
27. Jian, C., and Yusuf, C. 2003. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnol. adv.* 21: 109–122.
28. Jozef, S., Grigorij, K., Marta, K. and Eva, M. 1999. Microbial (1-3)- $\beta$ -D-glucans, their preparation, physicochemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers.* pp: 38.
29. Kamat, J. P., Bloor, K. K. and Devasagayam, T. P. A. 2000. Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex vivo. *B. B. A.* 1487: 113–127.
30. Lau, C.B.S., Ho, C. Y., Kim, C. F., Leung, K. N. and Fung, K. P. 2004. Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis. *Life Sci.* 75: 797–808.
31. Litchfield, J. 1967. Submerged culture of mushroom mycelium. In: *Micobial Technology*, 2nd ed. (Peppier, H. J. and Pertman, D., eds), pp: 93–145. Genetic engineering. New York.
32. Litchfield, J. 1979. Production of single cell protein for use in food and feed. In: *Micobial Technology*, 2nd ed. (Peppier, H. J. and Pertman, D., eds), pp: 93–145. Academic Press. New York.
33. Leung, M., Fung, K. and Choy, Y. 1997. The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. *Immunopharmacology.* 35: 255–263.
34. 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 polysaccharides. *J. Chromato. A.* 823 : 339–347.
35. Lander, H. 1997. An essential role for free radicals and derived species in signaltransduction. *FASEB.* 11: 118–124.
36. Mains, E. 1958. North american entomogeneous species of cordyceps. *Mycologia.* 50: 169–222.
37. Marklund, S. 1984. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem. J.* 222: 649–655.
38. Namiki, M. 1990. Antioxidants, Antimutagens in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29: 273–300.
39. Ng, T. 1998. A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae). *Gen. Pharmacol.* 30: 1–4.
40. Nakanishi, I., Kimura, K., Suzuki, T., Ishikawa, M., Banno, I. and Sakane, T. 1976. Demonstration of curdlan-type polysaccharide and some other (1-3)-D-Glucan in microorganisms with aniline blue. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 22: 1–11.
41. Ohno, N., Adachi, Y., Suzuki, I., Sato, K., Oikawa, S. and Yadomae, T. 1986a. Characterization of antitumor glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 34(4): 1709–1715.
42. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44: 307.
43. Ohno, N., Hayashi, M., Suzuki, I., Oikawa, S., Sato, K., Suzuki, Y. and Yadomae, T. 1986b. Effect of activation or blockade of the phagocytic system on the antitumor activity of Grifolan. *Chem. Pharm. Bull.* 34(10): 4377–4381.
44. Papagianni, M., Matthey, M. and Kristiansen, B. 1999. Hyphal vacuolation and fragmentation in batch and fed-batch culture of *Aspergillus niger* and its Relation to citric acid production. *Process. Biochem* 35: 359–366.
45. Robak, J. and Gryglewski, I. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharma.* 37: 837–841.
46. Rao, P. and Pattabiraman, T. 1989. Reevaluation of the phenolsulfuric acid reaction for the estimation of hexoses and pentoses. *Anal. Biochem.* 181: 18–22.
47. Ricotta A. 1996. Role of a laccase in the degradation of pentachlorophenol. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57(4): 560–567.
48. Shahidi, F., Janitha, P. and Wanasundara, P. 1992. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32: 67–103.
49. Stahl, W. and Sies, H. 1993. Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids. *Ann. NY. Acad. Sci.* 691: 10–19.
50. Smith, M. and Ho, C. 1985. The effect of dissolved carbon dioxide on Penicillin production: Mycelial Morphology. *J. Biotechnol.* 2: 347–363.
51. Sothill, E. and Fairhurst, A. 1997. The new field guide to fungi. London: Michael Joseph.
52. Tsukagoshi, S., Hashimoto, Y. and Fujii, G.. 1984. Krestin (PSK). *Cancer. Treat. Rev.* 11:131–155.
53. Temple, N. 2000. Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutr. Res.* 20: 449–459.
54. Wang, H., Ng, T., Liu, W., Ooi, V. and Chang, S. 1996. Polysaccharide-peptide complexes from the cultured mycelia of the mushroom *Coriolus versicolor* and their culture medium activate mouse lymphocytes and macrophages. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28: 601–607.
55. Wei, W., Tan, J. and Guo, F. 1996. Effects of *Coriolus versicolor* polysaccharides on superoxide dismutase activities in mice. *Acta pharmacol. Sin.* 17 (2): 174.
56. Wiseman, H., Kaur, H. and Halliwell, B. 1995. DNA damage and cancer. Measurement and mechanism. *Cancer Letters.* 93: 113–120.
57. Yeung, J., Chiu, L. and Ooi, V. 1994. Effect of polysaccharide peptide (PSP) on glutathione and protection against paracetamol-induced hepatotoxicity in the rat. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 16(10): 723.
58. Yang, Q., Jong, S., Li, X., Zhou, J., Chen, R., and Xu, L. 1992. Antitumor and immunomodulating activities of the polysaccharide-peptide (PSP) of *Coriolus versicolor*. *J. Immunol. Immunopharmacol.* 12: 29–34.
59. Yoshikumi, C., Matsunaga, K. and Toyota, N. 1978. Cultivation of Basidiomycetes. Japanese Patent JP. 53,029,987. Japanese.
60. Young, C., Young, H., Hyun, S., Young, N. and Si, M. 1987. Production of Pullulan by a Fed-batch Fermentation. *Biotechnol. Lett.* 9(9): 621–624.
61. Young, S. and Jacobs, R. 1998. Sodium hydroxide-induced conformational change in schizophyllan detected by the fluorescence dye, aniline blue. *Carbohydr. Res.* 310: 91–99.
62. Zhuang, C. and Mizuno, T. 1999. Biological responses from *Grifola frondosa* (Disk : Fr.) S. F. Gray - Maitake (Aphylllophoromyce-tideae). *Int. J. Med. Mushr.* 1: 317–324.
63. Zhou, M., Chen, Y. and Liu, S. 1996. Elevation of macrophage SeGSH-Px gene expression and prevention of foam cell formation. In: Eds By Lester Packer, Proceedings of the international Symposium on Natural antioxidants: Molecular Mechanisms and Health Effects. Maret. G. Traber. AOCS Press, Champaign, Illinois. USA. pp: 339–351.