

## 영지의 액체배양에 미치는 통기·교반의 효과와 동력학적 특성

이 학 수 · 정 재 현 · 이 신 영  
†강원대학교 환경·생물공학부 및 연세대학교 생물산업소재연구센터  
‡충주산업대학교 식품공학과, 동방미래화학(주) 기술연구소  
(접수 : 2001. 5. 28., 게재승인 : 2001. 6. 25.)

### Effects and Batch Kinetics of Agitation and Aeration on Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum*

Hak-Su Lee, Jae-Hyun Jung<sup>1</sup>, and Shin-Young Lee<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea  
Bioproducts Research Center of Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Chungju National University, Chungju 380-702, Korea  
Technique Research Institute, Dongbang Future Chemical Co., Ltd. Kyunggi 445-920, Korea

(Received : 2001. 5. 28., Accepted : 2001. 6. 25.)

The effects of agitation and aeration on mycelial growth, exo-polysaccharide (EPS) production, and substrate consumption upon the submerged cultivation of *G. lucidum* were investigated, and the batch kinetics of the EPS fermentation of *G. lucidum* were interpreted as function of agitation speed and aeration rate. In a 2.6 L jar fermenter system, the optimum agitation speed and aeration rate for EPS production were determined to be 400 rpm and 1.0 vvm, respectively. The maximum production of EPS obtained was 15 g/L. The logistic model for mycelial growth fitted the experimental data better than that determined by the Monod and the two-thirds power models. The Luedeking-Piret equation adequately modelled the kinetic data obtained for product and substrate.

**Key Words** : batch kinetics, aeration/agitation effect, *G. lucidum*, jar fermenter, submerged cultivation

#### 서 론

최근 담자균류의 각종 생리 기능성이 밝혀지면서 액체배양에 관한 연구가 널리 수행되고 있다(1,4). 하지만 담자균류는 균사 형태의 다양성, 비교적 느린 증식속도, 낮은 균체량 및 계대 배양의 불안정성으로 대량생산이 매우 어렵다(5). 따라서 담자균류의 대량 액체배양 공정의 합리적 설계나 조작성을 위해서는 배양 중 균체, 기질 및 대사산물 농도의 경시적 분포에 대한 배양 동력학적 특성의 분석과 이의 수학적 모델이 필요하다(6-9). 그러나 다세포 미생물인 담자균류와 같은 펠렛 형성 균류의 경우는 균사의 선단이 증식하고, 기질이 균사체의 전 표면층을 통하여 확산되어 균체 표면적에 비례하여 생육하므로 지금까지 단세포 미생물에서 주로 이용된 Monod 식은 잘 적용되지 않는다(10-12). 따라서 균류의 생육속도가 균체량의 2/3승에 비례한

다는 점에 착안하여 개발된 two-thirds power 모델이 제안되었지만 이 모델도 담자균류인 운지버섯과 느타리 버섯의 생육을 대상으로 한 Caroad와 Wilke(13)의 결과에 의하면 만족스럽지 못하다. 결국 Weiss와 Ollis(8)는 펠렛 형성 균류의 배양 동력학적 해석을 보다 유용하게 분석하기 위하여 미생물 균체, 다당 생산 및 기질 소비에 대한 발효과정을 설명하는 동력학적 모델로서 각각 logistic 모델, Luedeking-Piret 모델 및 modified Luedeking-Piret 모델을 이용하였다(14,15). 이 모델은 모든 모델 변수를 용이하게 순차적으로 산출할 수 있는 장점을 갖지만 담자균류에 대한 검토는 이루어진 바가 없다.

그러므로 본 연구에서는 액체배양을 이용한 영지의 균사체 및 세포의 다당의 대량 생산 연구 일환으로, 교반 및 통기속도에 따른 영지 액체배양의 특성을 조사하고, 이들 동력학적 모델에의 적용성을 검토하였으며, 그 효과를 해석하였다.

\*Corresponding Author : Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Tel : +82-33-250-6273, Fax : +82-33-243-6350

E-mail : sylee@kangwon.ac.kr

#### 재료 및 방법

##### 균주 및 보존

본 연구에서 사용한 균주는 *Ganoderma lucidum* ASI 7004이다. P.D.A.(potato dextrose agar) 평판배지에서 30°C로 7일

간 배양한 후 4℃에서 보존하였고, 3개월마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

### 배지조성

본 실험에서 사용한 배지는 *G. lucidum*의 액체배양에 의한 세포외 다당 생산의 최적 배지이다(16). 배지는 121℃에서 15분간 가압 멸균 후 사용하였고, 멸균 시 염의 침전을 방지하기 위하여 탄소원, 질소원, 무기염류는 각각 분리 멸균한 후 혼합하여 사용하였다. pH는 필요시 1N NaOH 또는 1N HCl로 조절하였다.

### 배 양

전 배양은 P.D.A. 평판배지에서 생육한 균사체를 직경 5 mm의 stainless steel pipe로 mycelium disk를 만든 다음, 이 disk 4-5개를 50 mL의 배지를 넣은 250 mL 삼각 플라스크에 접종하였다. 30℃에서 7일간 배양한 다음, 다시 종균용 배지 50 mL를 함유한 250 mL의 삼각 플라스크에 5%(v/v)의 전 배양액을 접종하였고, 30℃에서 100 rpm으로 5일간 진탕 배양하였다. 이 때 전 배양액은 균질기(동양(주), model 0820)로 30초 동안 균질화시켜 본 배양의 접종용으로 사용하였고, 매 실험마다 새로이 배양하여 사용하였다. 한편, 본 배양은 2.6 L의 jar fermenter(Marubishi, MD-250)에서 전 배양액을 5%(v/v)로 접종하여 온도 30℃, pH 조건은 배양 6시간 후 pH를 3에서 6으로 조정하는 pH shift(17), 배지 액량 1.5 L, 통기속도 0.5~2.0 vvm 및 교반속도 100~600 rpm의 배양 조건으로 실시하였다. pH는 1N HCl 또는 1N NaOH로 조절하였고, 통기로 인하여 발생한 거품은 Antifoam 289(Sigma Co.)를 사용하여 제거하였다.

### 분석방법

균사체량은 배양액을 10,000×g에서 15분간 원심분리하고 침전된 균사체를 filter paper (No. 2, Whatman)로 여과한 다음, 증류수로 2~3회에 걸쳐 세척하였으며, 70℃에서 24시간 건조한 후, desiccator에서 중량이 일정하게 될 때까지 방치하면서 건조중량 (mycelial dry weight, MDW)을 측정하였다. 한편, 세포외 다당은 원심분리 (10,000×g, 15분)하여 균사체를 제거한 후 얻어진 배양 여액에 2배 량의 acetone을 가하여 침전물로 얻었으며, 이를 70℃에서 24시간 건조한 다음 중량을 측정하여 조다당 (crude exo-polysaccharide)로 정량하였다(17). 또 배양액 중의 잔존 glucose의 농도는 DNS (dinitrosalicylic acid) 법(18)을 이용하여 575 nm에서 흡광도를 측정한 후, 각각 표준곡선으로부터 환산하여 구하였다.

### 동력학적 모델 및 모델 변수의 산출

영지의 회분배양 중 동력학적 모델로는 다음 식 (1)의 logistic 모델을 사용하였고, 비교 검토를 위하여 식 (2) 및 (3)의 Monod 및 two-thirds power 모델을 적용하였다.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_0 \left[ 1 - \frac{X}{X_m} \right] X \quad (1)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_0 X \quad (2)$$

$$\frac{dX}{dt} = \alpha X^{2/3} \quad (3)$$

또 다당 생산과 기질 소비에 대해서는 각각 Luedeking-Piret 및 modified Luedeking-Piret 모델인 식 (4) 및 (5)를 사용하였다.

$$\frac{dP}{dt} = m \frac{dX}{dt} + nX \quad (4)$$

$$dS_{\text{ovedt}} = -\alpha \frac{dX}{dt} - \beta X \quad (5)$$

식 (1)~(5)에서 X는 t 시간에서의 균체 농도(g/L)이고, X<sub>m</sub>은 최대 균체량(g/L)을 나타내며, μ<sub>0</sub>는 초기 비증식 속도(day<sup>-1</sup>)이다. P는 t시간에서의 생성물 농도(g/L)이고, m은 증식연동의 다당 생성계수(g P/g X), n은 비증식연동의 다당 생성계수(g P/g X day)를 나타낸다. 또 S는 t 시간에서의 기질 농도, α와 β는 각각 증식연동의 기질소비계수(g S/g X) 및 비증식연동의 기질소비계수(g S/g X day)를 나타낸다.

각 모델 변수 μ, X<sub>m</sub>, m, n, α 및 β 값은 Klimek와 Ollis(7)에 의해 확립된 방법을 사용하여 X(t), P(t) 및 S(t)의 회분자료로부터 산출하였다. 또 증식연동형 및 비증식연동형 기작에 의해 생산된 다당의 양, 즉 P<sub>m</sub>과 P<sub>n</sub>은 각각 다음 식에 의하여 계산하였다(6).

$$P_m(t) = mX_0 \left[ \frac{e^{\mu t}}{1 - (X_0/X_m)(1 - e^{\mu t})} - 1 \right] \quad (6)$$

$$P_n(t) = n \left( \frac{X_m}{\mu} \right) \ln \left[ 1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{\mu t}) \right] \quad (7)$$

여기서 X<sub>0</sub>는 초기 균체 농도(g/L)이다.

마찬가지로 증식 및 비증식 연동과 관련되는 기질의 양인 S<sub>α</sub>와 S<sub>β</sub>(g/L)는 각각 다음 식으로 계산하였다.

$$S_{\alpha}(t) = \alpha X_0 \left[ \frac{e^{\mu t}}{1 - (X_0/X_m)(1 - e^{\mu t})} - 1 \right] \quad (8)$$

$$S_{\beta}(t) = \beta \left( \frac{X_m}{\mu} \right) \ln \left[ 1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{\mu t}) \right] \quad (9)$$

## 결과 및 고찰

### 교반속도의 영향

2.6 L 교반 발효조에서 교반속도에 따른 균사 생육, 다당 생성 및 기질소비에 미치는 영향을 조사한 결과는 Figure 1과 같다. 통기량을 1 vvm으로 고정한 후 교반속도에 따른 균사체의 생육을 살펴보면 100~400 rpm까지는 교반속도의 증가에 따라 증가하다가 배양 4일후 감소하였다. 그러나, 500~600 rpm에서는 계속 증가하였고, 500 rpm에서 4.35 g/L의 최대 균체량을 얻었다. 반면, 다당의 생산은 100~400 rpm까지는 교반속도가 증가할수록 증가하였으며, 400 rpm에서 15.43 g/L의 최대 값을 얻었다. 그러나 높은 교반속도인 500~600 rpm에서는 다당 생성이 오히려 감소하였으며, 600 rpm에서는 최대 다당 생산량이 6.81 g/L로 가장 낮았다. 그러므로 높은 교반 속도는 균체의 생육에는 좋으나 다당의 생성을

3

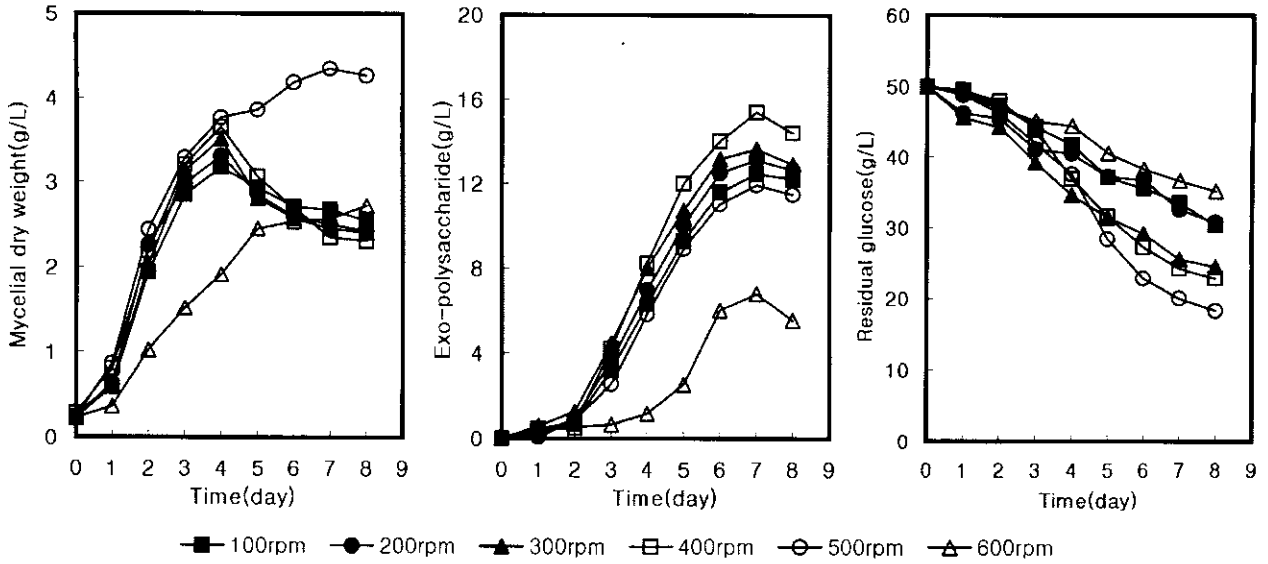


Figure 1. Effect of agitation speed on the mycelial dry weight, exo-polysaccharide and residual glucose of *G. lucidum* under bi-staged pH control process (pH shift from 3 to 6 after 6hr of batch cultivation) in 2.6-L jar fermenter.

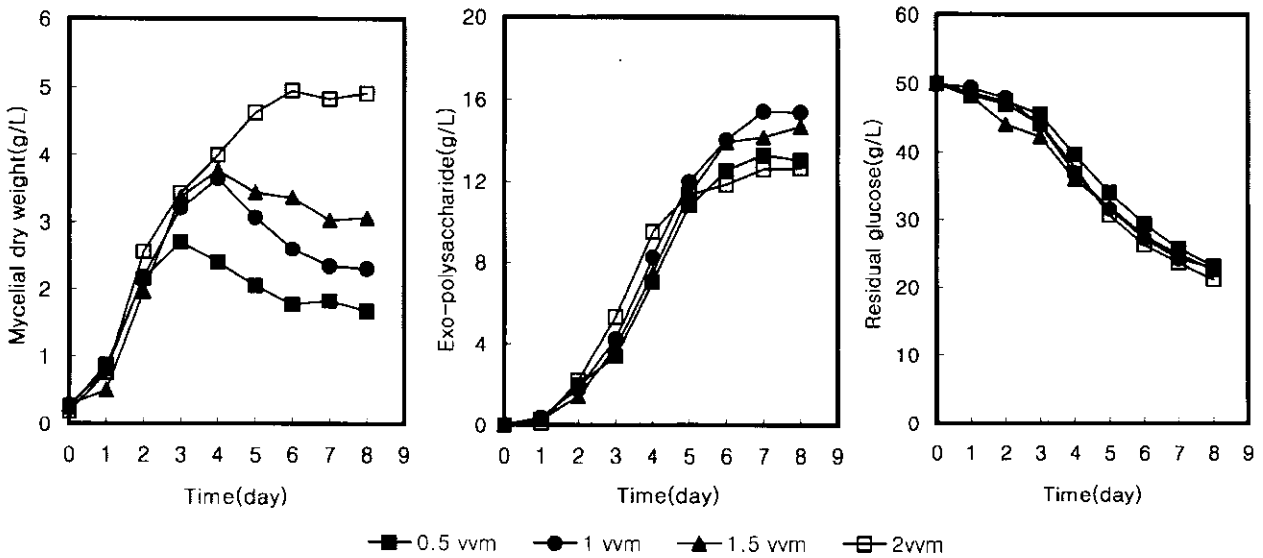


Figure 2. Effect of aeration rate on the mycelial dry weight, exo-polysaccharide and residual glucose of *G. lucidum* under bi-staged pH process (pH shift from 3 to 6 after 6hr of batch cultivation) in 2.6-L jar fermenter.

저해하는 것으로 생각된다. Gibbs와 Seviour 등(19)도 높은 교반 속도에서 다당의 생성은 감소하는 반면, 균체량은 증가한다고 보고한 바 있다. 이로부터 다당 생성의 최적 교반 조건은 400 rpm으로 선정하였는데, 이 보다 낮은 경우에는 교반에 의한 물질 전달이 충분하지 못하고, 더 높은 교반 속도일 때는 전단에 의한 균사 형태의 변화로 다당 생산이 낮은 것으로 판단되었다. *Aspergillus terreus*의 경우도 교반속도가 높은 경우는 균사의 형태를 변화시켜 itaconic acid 생성이 떨어진다고 하였다(20).

한편, 교반에 의한 기질 소비를 보면, 500 rpm의 경우는 배양후 32 g/L, 그리고 600 rpm에서는 15 g/L이 소비되었다.

반면, 100~400 rpm일 때의 기질의 소비는 500 rpm과 600 rpm의 중간 값 범위이었다. 다당 생성이 다소 높았던 300 및 400 rpm에서의 기질소비량은 약 25~27 g/L로, 교반속도가 높은 500 rpm 이상에서는 기질이 균체의 증식에 이용되는 반면, 100~400 rpm에서는 다당 생성에 이용되는 것으로 생각되었다.

통기속도의 영향

교반 속도를 최적 교반 속도로 선정한 400 rpm으로 고정 한 후 통기속도의 변화에 따른 균사 생육 및 다당 생성을 조사하였으며, 그 결과는 Figure 2와 같다. 통기속도가 0.5 vvm

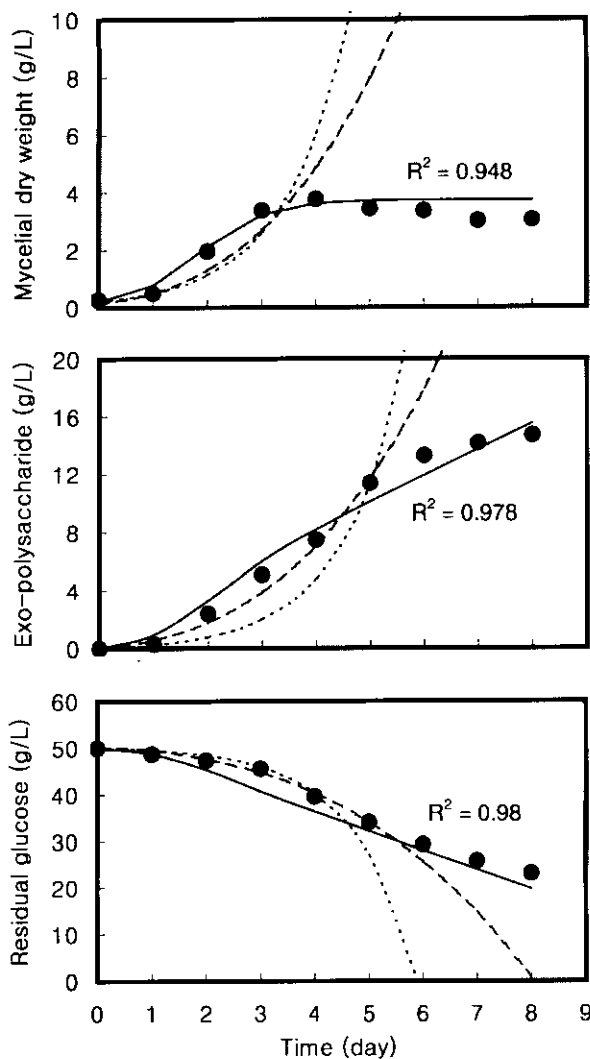


Figure 3. Comparison of the experimental data and simulations by using logistic model(—), Monod model(.....) and two-thirds power model(----) for submerged culture of *G. lucidum*.

에서 2.0 vvm으로 증가할수록 균체량은 증가하였으며, 0.5 vvm에서 1.5 vvm까지는 균체량이 4일 후 급격히 감소하였고, 2.0 vvm에서는 6일째 최대의 균체량인 4.95 g/L를 얻었는데, 배양말기에도 이 수준이 유지되었다.

교반 속도와 마찬가지로 높은 통기속도인 2.0 vvm에서는 균체량의 증가를 보였으나 다당의 생성은 감소하였다. 즉, 세포의 다당의 생성은 균사체의 경우와는 달리 1 vvm에서 최대값 15.54 g/L를 얻었으며, 통기속도가 낮은 0.5 vvm과 높은 2.0 vvm에서는 이 보다 다소 낮은 값이 얻어졌다. 따라서 세포의 다당의 생성에 최적적인 통기조건은 400 rpm에서 1 vvm인 것으로 판단하였다.

한편, 통기에 의한 기질의 소비는 큰 차이를 보이지 않았으나, 높은 통기속도일 때는 균체량이 높았고, 이때 기질의 소비도 28 g/L로 다소 높았다.

기질소비에 대한 교반 및 통기의 효과는 비슷하였지만, 통기속도보다는 교반속도에 의한 기질의 변화가 더 큰 것으로 나타났으며, 이는 통기보다는 교반에 의한 물질전달의 효과

가 더 크기 때문이라고 생각되었다. 또한 잔존 기질량은 약 20 g/L 이상으로 매우 높아서 과잉의 탄소원 기질하에서 다당 생산이 이루어지는 것으로 생각되었는데, 이러한 과잉의 탄소원 기질하에서의 다당 생성은 Bulmer 등(21)에 의해 보고된 바 있다. 이들은 *Aureobasidium pullulans*에 의해 생성되는 pullulan이 무시될 정도의  $NH_4^+$  농도 및 과잉의 포도당 농도에서 생산되는 2차 대사산물이라고 하였다.

배양 동력학적 모델의 선정

교반 및 통기속도는 기질소비, 균체량 및 다당 생산에 큰 영향을 미치므로 이들의 상관관계를 보다 명확히 살펴보기 위해 배양 동력학적 특성을 조사하였다. 이를 위해 우선 담자균류 액체 배양의 동력학적 모델로서 logistic 모델, Monod 모델 및 two-thirds power 모델을 비교하였고, 그 결과는 Figure 3과 같다. Monod 식의 모사결과는 실제 자료보다 대수기 중 더 낮은 균체량을 나타내었고, 반대로 잔존 기질은 더 낮았다. 배양 6일 후 기질의 완전소비가 예측되었으며, 또 더 높은 다당 생성이 예측되어 실험자료를 나타내는 데는 부적합하였다. Two-thirds power 모델도 더 낮은 잔존 기질과 더 높은 다당 생성이 예측되어 실험결과와는 차이가 있었다. 반면, logistic 모델을 사용한 모사결과는 실험자료와 유사하여 본 균주의 동력학적 모델로서 logistic 모델이 적합한 것으로 판단되었다( $R^2 \geq 0.95$ ).

교반 효과의 동력학적 해석

Logistic 모델을 이용하여 기질 소비, 균체량 및 다당 생산에 대한 각 동력학 변수들을 산출하였고, 교반에 따른 이들의 변화를 Figure 4에 나타내었다. Figure 4에서 보는 바와 같이, 비증식 속도는 1.84~1.05 day<sup>-1</sup>로 교반속도의 증가에 따라 감소하였다. 그러나 균체증식 및 다당 생성은 교반속도의 증가에 따라 균체증식은 500 rpm까지, 그리고 다당 생성은 400 rpm까지 증가하다가 감소하였으며, 각각 4.35 g/L 및 15.43 g/L를 얻었다. 한편, 생성물인 다당은 교반속도가 500 rpm 까지 증가할수록 생성물의 증식연동형 생성물계수 m값이 증가하였고, 600 rpm에서는 다소 감소하였다. 비증식 연동형 생성물계수 n값은 교반속도의 증가에 따라 감소하였으나, 생성물 생성에 대한 증식 및 비증식 기작의 상대적인 기여도 지표인 Pm과 Pn(g/L)을 통기속도의 함수로서 나타낸 Figure 5에서 보면 교반에 따른 다당의 생성은 증식연동형 및 비증식연동형 기작의 혼합형인 것으로 볼 수 있었다.

Klimek와 Ollis(7) 및 Ollis(15)는 *Pseudomonas* sp.가 생산하는 다당은 비증식 연동형 기작으로 생성된다고 하였으나, xanthan gum은 혼합형, 그리고 pullulan과 *Azotobacter vinelandii*의 alginate는 증식연동형 기작에 의해 생성된다고 하였다. 또 기질소비의 경우는 교반속도가 증가할수록 증식연동형 기질소비계수  $\alpha$  값은 증가하는 반면, 비증식연동형 기질소비계수  $\beta$  값은 거의 일정하게 유지되었다. 교반속도의 증가에 따른 증식연동의 기질소비계수  $\alpha$  값은 균체증식과 비슷한 결과를 나타내었다. 따라서 균체증식에는 증식연동형의 기작이, 그리고 다당의 생성에는 비증식연동형의 기작이 큰 영향을 미치는 것으로 생각되었다.

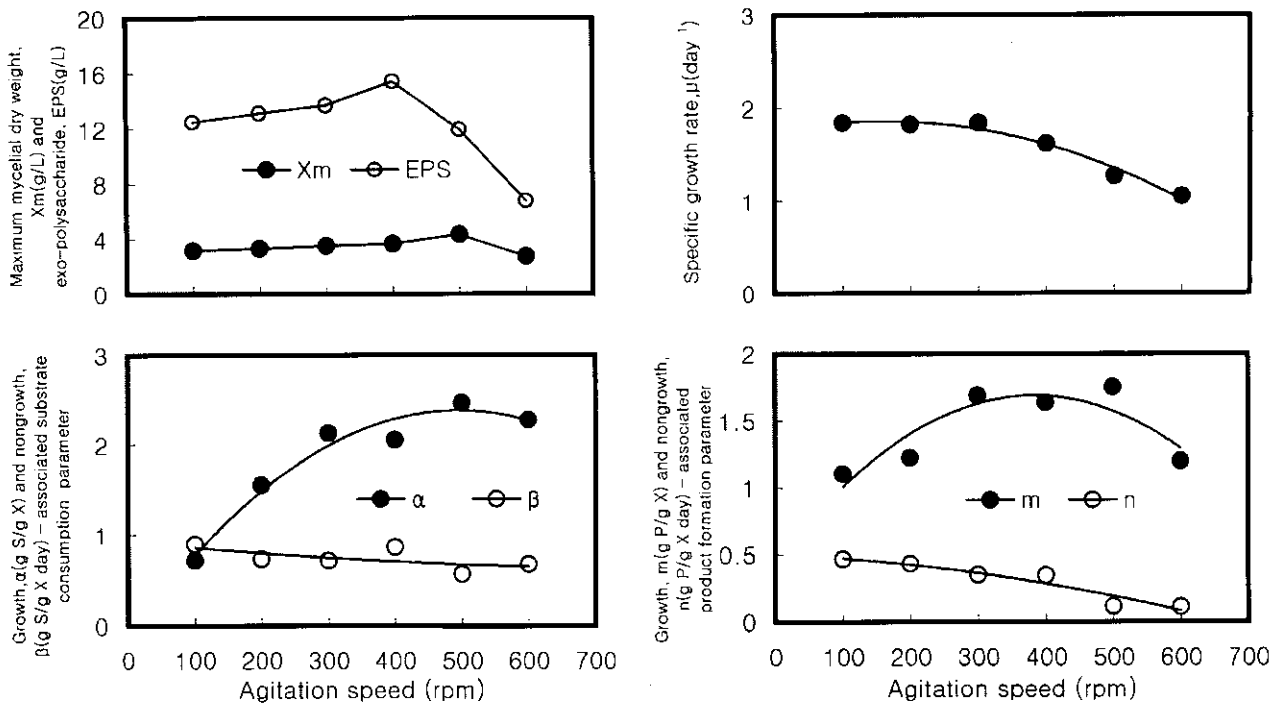


Figure 4. Effect of agitation speed on kinetic parameters of *G. lucidum* under batch fermentation.

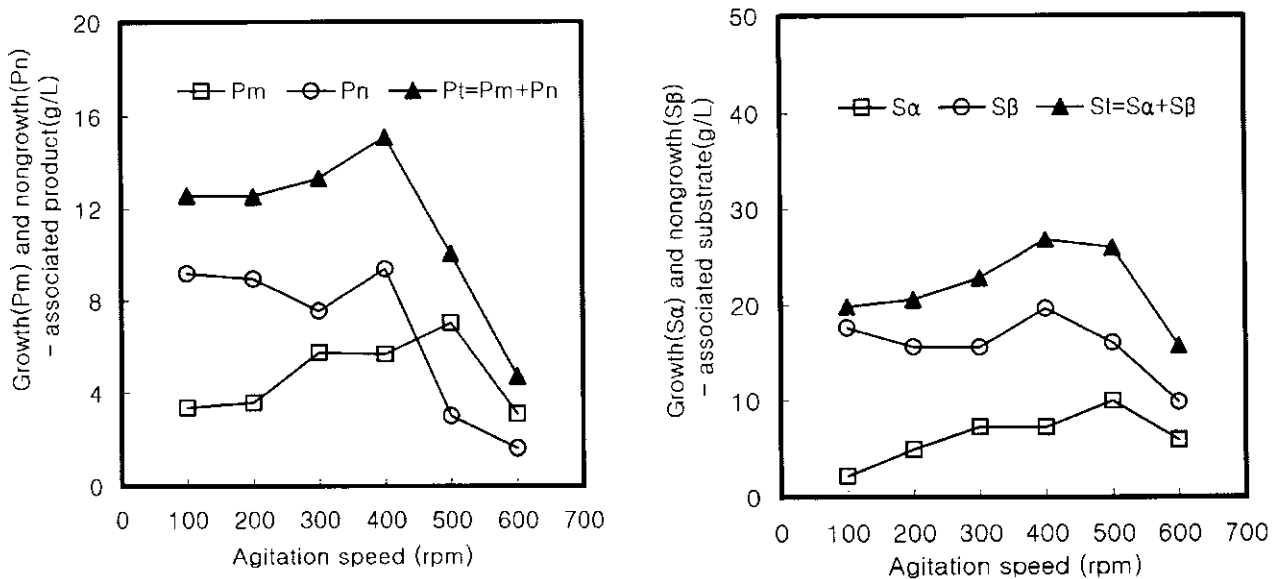


Figure 5. Effect of agitation speed on kinetic parameters of *G. lucidum* under batch fermentation.

**통기 효과의 동력학적 해석**

통기속도에 따른 영향은 Figure 6과 같고, 최대의 균체량은 4.95 g/L로 2 vvm에서 얻어졌으며, 통기속도가 증가할수록 균체의 증식도 증가하였다. 그러나 다당 생성에서는 1 vvm에서 최대량 15.43 g/L이 얻어졌다. 비증식속도도 교반속도와 마찬가지로 통기속도가 증가할수록 감소하였으며, 교반속도의 경향과 비슷한 값을 나타내었다. 반면, 교반속도와는 달리 증식연동형 기질소비계수  $\alpha$  값은 통기속도의 증가에 따라 증가하였고, 비증식연동형 기질소비계수  $\beta$  값은 감소하여, 통기속

도가 높을수록 증식연동의 기질 이용성이 양호함을 알 수 있었다. 아울러 증식연동의 생성물 계수  $m$  값은 증가하지만 비증식연동의 생성물 계수  $n$  값은 통기속도의 증가에 따라 감소하였다. Figure 7은 생성물 생성에 대한 증식 및 비증식 기질의 상대적인 기여도 지표인  $P_m$ 과  $P_n$ (g/L)을 통기속도의 함수로서 나타낸 것으로, 교반 효과에서와 마찬가지로 증식연동 및 비증식연동형 기질의 혼합형임을 알 수 있었다.

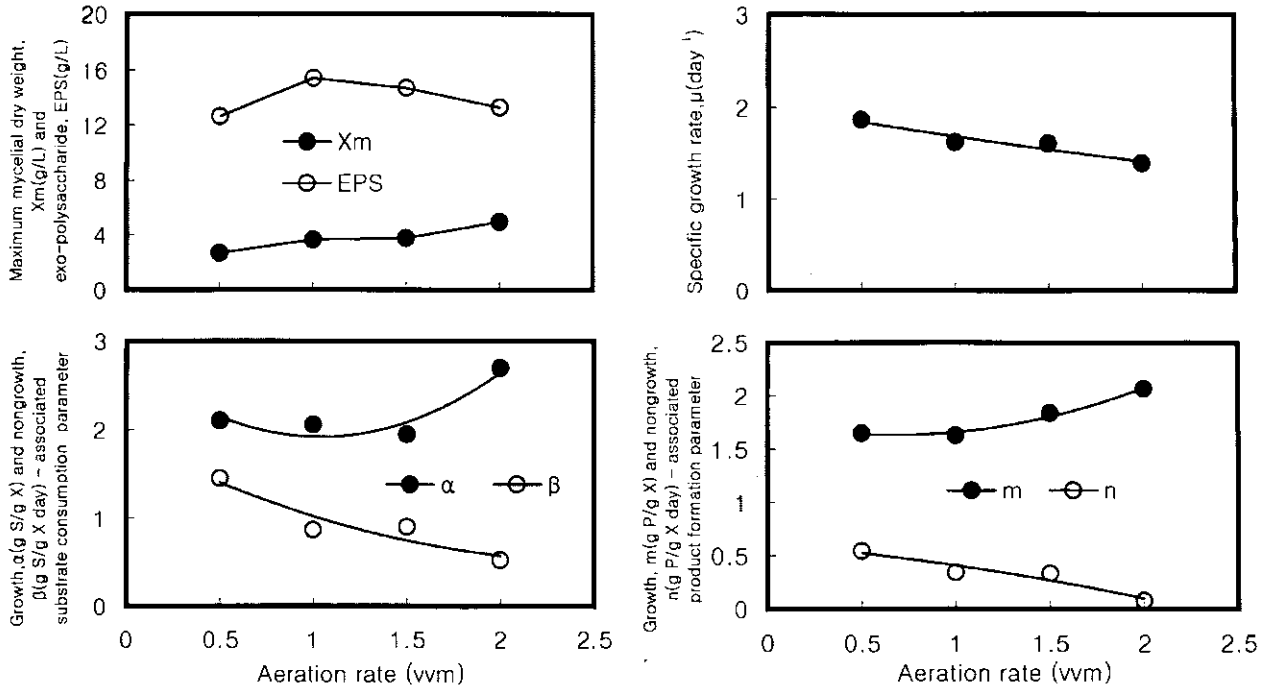


Figure 6. Effect of aeration rate on kinetic parameters of *G. lucidum* under batch fermentation.

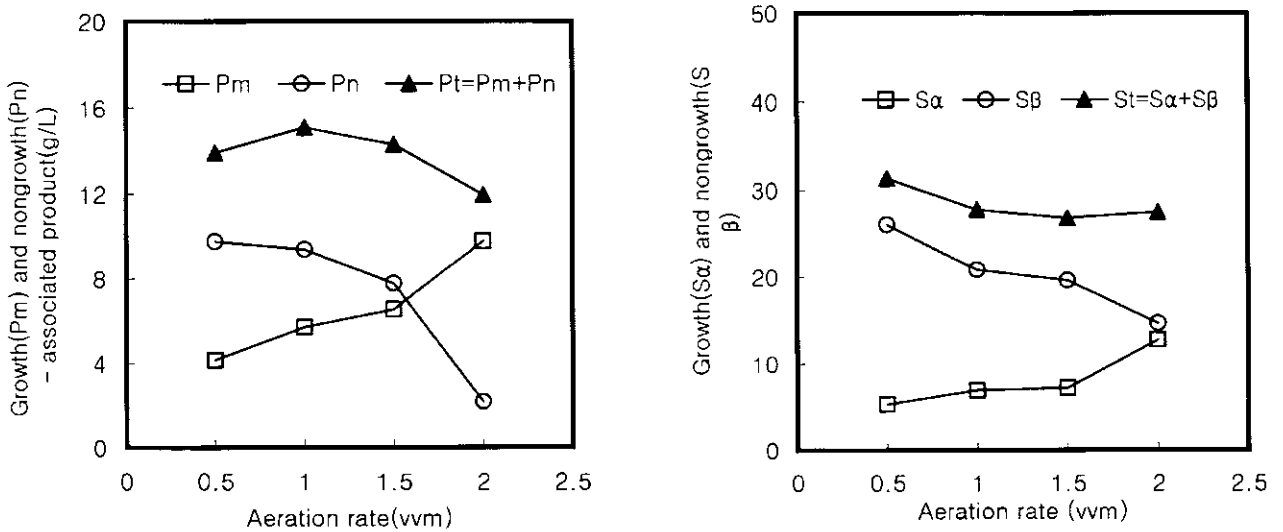


Figure 7. Effect of aeration rate on kinetic parameters of *G. lucidum* under batch fermentation.

결론

영지의 세포의 다당 발효 중 동력학적 특성을 교반 및 통기에 의한 함수로서 조사하였다. 다당 생성량에 미치는 통기 및 교반의 효과를 조사한 결과, 일정 통기속도 (1 vvm) 하에서 교반속도(100~600 rpm)를 달리한 경우는 400 rpm에서 다당의 최대값(15.43 g/L)을 얻었으며, 일정 교반속도(400 rpm)에서 통기속도(0.5~2.0 vvm)를 달리하였을 때는 1 vvm에서 최대값 (15.54 g/L)을 얻었다. 영지의 균사체 증식은 logistic 모델과 잘 일치하였고, 다당의 생산 및 기질소비는

Luedeking-Piret 및 modified Luedeking-Piret 모델로 잘 설명되었다. 교반 및 통기속도의 따른 다당 생산은 증식연동형과 비증식 연동형이 함께 존재하는 혼합형의 발효 양식이었으며, 기질은 증식 연동형으로 소비되었다.

감사의 글

본 논문은 연세대학교 생물산업소재연구센터의 일부 연구비지원(97-K3-0437-02- 02-2)에 의거 수행된 연구결과입니다.

## REFERENCES

1. Eyal, J. (1991), Mushroom Mycelium Grown in Submerged Culture -Potential Food Applications. In *Biotechnology and Food Ingredients*. I. Goldberg and R. Williams Eds., pp31-42, Van Nostrand Reinhold. New York.
2. Jong, S. C. and J. M. Birmingham (1992), Medicinal Benefits of the Mushroom *Ganoderma*. *Adv. Appl. Microbiol.*, **37**, 101-134.
3. Mizuno, T. M., K. Kato, K. Totsuka, K. Takenaka, K. Shinkai, and M. Shimizu (1984), Fractionation, Structural Features and Antitumor Activity of Water-soluble Polysaccharide from "Reishi", the Fruitbody of *Ganoderma lucidum*. *Nippon Noeikagaku Kaishi*, **58**, 873-879.
4. Jong, S. C. and J. M. Birmingham, and S. H. Pai (1991), Immunomodulatory Substances of Fungal Origin. *J. Immunol. Immunopharmacol.* **11**, 115-122.
5. Samamoto, R., T. Niimi, and S. Takahashi (1978), Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Submerged Culture of Edible Fungi, *Agric. Biol. Chem.*, **52**(2), 75-81.
6. Boa, J. M., and A. LeDuy (1987), Pullulan from Peat Hydrolyzate Fermentation Kinetic. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 463-470.
7. Klimek, J. and D. F. Ollis (1980), Extracellular Microbial Polysaccharides : Kinetics of *Pseudomonas sp.*, *Azotobacter vinelandii*, and *Aureobasidium pullulans* Batch Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 2321-2341.
8. Weiss, R. M. and D. F. Ollis (1980), Extracellular Microbial Polysaccharides. I. Substrate, Biomass and Product Kinetic Equations for Batch Xanthan Gum Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 859-873.
9. Tsuchiya, H. M. (1970), Introductory Comments, *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 645-649.
10. Mulchandani, A. and J. H. T. Luong (1988), Batch Kinetics of Microbial Polysaccharide Biosynthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 639-646.
11. Bailey, J. E. and Ollis, D. F. (1986), *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., pp373-456, McGraw-Hill, New York.
12. Aiba, S., A. E. Humphrey, and N. F. Millis (1973), *Biochemical Engineering*, 2nd ed., pp114-115, University of Tokyo Press, Tokyo.
13. Carroad, P. A. and C. R. Wilke (1977), Exponential Growth Kinetics for *Polyporus versicolor* and *Pleurotus ostreatus* in Submerged Culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**(4), 871-873.
14. Luedeking, R. and E. L. Piret (1959), A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation, Batch Processes at Controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Tech. & Eng.*, **1**, 393-412.
15. Ollis, D. F. (1983), Simple Batch Fermentation Model: Theme and Variations, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **413**, 144-146.
17. Lee, S. Y. and T. S. Kang (1996), Production Conditions and Characterization of Exo-biopolymer Produced by Submerged Cultivation of *G. lucidum* Mycelium. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**(1), 111-118.
18. Miller, G. L. (1959), Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chem.* **31**, 426-428.
19. Gibbs, P. A., and R. J. Seviour (1996), Does the Agitation Rate and/or Oxygen Saturation Influence Exopolysaccharide Production by *Aureobasidium pullulans* in Batch Culture?. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 503-510.
20. Pak, Y. S., N. Ohta, and M. Okabe (1993), Effect of Dissolved Oxygen Concentration and Impeller Tip Speed on Itaconic Acid Production by *Aspergillus terreus*. *Biotechnol. Lett.*, **15**(6), 583-586.
21. Bulmer, M. C., B. J. Catley, and P. J. Kelly (1987), The Effect of Ammonium ions and pH on the Elaboration of the Fungal Extracellular Polysaccharide, Pullulan, by *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 362- 365.