

## Optimization of Submerged Culture Conditions for Exo-biopolymer Production by *Paecilomyces japonica*

배준태, Jayanta Sinha, 윤종원\*

대구대학교 생물공학과 효소공학연구소

전화 (053) 850-6556, FAX (053) 850-6509

### ABSTRACT

Optimization of submerged culture conditions for the production of exo-biopolymer from *Paecilomyces japonica* was studied. Maltose, yeast extract and potassium phosphate were the most suitable sources of carbon, nitrogen, and inorganic salt, respectively, for both production of the exo-biopolymer and mycelial growth. The optimal culture conditions in flask culture were pH 5.0, 25°C and 150 rpm in a medium containing of 30 g maltose, 6 g yeast extract, 2 g polypeptone, 0.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.2 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O in 1-L distilled water. Exo-biopolymer production and mycelial growth in the suggested medium were significantly increased in a 2.5-L jar fermentor, where the maximum biopolymer concentration was 8 g/l.

### 서론

불안전 세대형 동충하초인 눈꽃동충하초 (*Paecilomyces japonica*)는 기주를 누에번데기로 이용하여 배양된 자실체나 균사체의 추출이 각종 병의 예방 효과와 건강식품, 의약품의 소재로서 그 용도가 증가하고 있는 현실이다. 특히, 눈꽃동충하초의 다당체는 면역증강, 노화방지효과 그리고 암을 억제하는 항암효과가 높은 것으로 알려져 많은 연구가 활발히 시도되고 있다. 하지만 대부분의 연구는 자실체나 균사체의 추출물에 대한 기능성 물질 개발에 편중되어 있는 반면에, 세포외로 분비되는 다당체 및 기능성 물질에 대한 연구는 미비한 상태이다. 세포외로 세포내 다당류와 같은 생리 활성 및 약리효능을 갖는 생물고분자가 분비된다면 균사체로부터의 추출공정이 생략되어 경제성이 높은 생물고분자의 산업적 생산도 가능할 것으로 판단된다.<sup>1)</sup> 따라서 본 연구는 액체배양을 통한 눈꽃동충하초 (*P. japonica*)의 최적 배양 조건에 의한 세포외 생물 고분자물질인 다당류의 생산 조건과 2.5-L jar fermenter를 이용한 다당류의 최대 수율을 높이기 위한 기초자료를 획득하고자 수행하였다.

### 재료 및 방법

**균주 및 배지** 본 연구에서 사용한 균주는 *Paecilomyces japonica*로서 분양받은 균주를 사용하였다. 균주 보관용 배지로는 potato dextrose agar 배지를 사용하여

25°C 에서 7일간 배양한 후 4°C에서 보존하였으며 6주 마다 계대배양하여 사용하였다. Lilly-Barneet medium (glucose 10g, peptone 2g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g,  $KH_2PO_4$  1.0g, water 1 liter)을 응용한 배지를 기본배지로 하였다.<sup>2)</sup>

**배양방법 및 조건**    중균배양은 PDA 평판배지에서 생육한 균사체를 직경 5mm cork borer로 절단한 다음, 기본 배지 100 ml을 넣은 500 ml 삼각 플라스크에 접종하여 25°C에서 5일간 진탕배양하였다. 이 배양액을 다시 5일간 기본 배지에 계대배양하여 중균배양액으로 사용하였다. 배양 배지 pH의 영향은 초기 pH의 범위가 4~8이 되도록 조절하여 검토하였으며, 온도의 영향은 20°C, 25°C 그리고 30°C의 범위에서 조사하였다.

**분석방법**    균체량은 배양액을 7일 동안 배양한 후 여과지 (Whatman No. 2)로 균사체를 여과하여 90°C에서 12시간 동안 건조시켜 건조중량을 측정하여 정량하였고, 여과액은 다시 memberane filter (0.45  $\mu$ m, Millipore)로 여과한 후, Aminex HPX-42C column (0.78×30 cm, Bio-rad)이 장착된 HPLC (Shimadzu Co, Kyoto, Japan)로 정량하였다.

## 결과 및 고찰

**탄소원의 영향**    *Paecilomyces japonica*의 균체생육에 미치는 탄소원의 영향을 조사한 결과 maltose, sucrose, cellobiose, mannitol 첨가시 균체생육이 우수하였으며, 그중 maltose가 가장 우수하였다. 따라서 maltose를 최적 탄소원으로 결정하였고, 이의 농도를 달리하여 실험한 결과 maltose 농도가 2~4 % (w/v)일 때 균체 생산량이 비슷하여 최적 maltose 첨가농도를 3 % (w/v)로 결정하였다<sup>1)</sup> (Fig. 1).

**질소원의 영향**    각종 유기 및 무기질소원의 영향을 조사한 결과는 다음과 같다. 균체생육이 가장 우수한 것으로 유기질소원으로는 yeast extract였으며, polypeptone을 첨가했을 경우 생산성이 더 증가하였다. 최적 질소원은 yeast extract였으며 적정농도 0.6 % (w/v)이고, polypeptone은 0.2 % (w/v)이었다<sup>3)</sup> (Fig. 2).

**무기염류의 영향**    maltose와 yeast extract를 대조구로 하여 각종 무기염류의 영향을 조사한 결과,  $K_2HPO_4$ 가 대조구에 비해 균체생육이 가장 좋았으며, 최적 농도는 0.05 % (w/v)이었다. 또한  $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 각각 최적 농도로 0.02 % (w/v)로 하여 첨가했을 경우, 균체생육이 우수하였다.

**온도 및 pH의 영향**    균체생육에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 각 최적배지 조건에서 실험한 결과, 25°C에서 균체생육 및 exo-biopolymer의 생산이 가장 양호하여 최적 배양온도로 25°C를 결정하였다. 한편, 초기 pH의 영향은 pH 5.0에서 균체 및 exo-biopolymer의 생산이 가장 양호하였고, 그외 조건에서는 생산량이 감소하는 결과를 보여 초기배양 pH를 5.0으로 결정하였다 (Fig. 3).

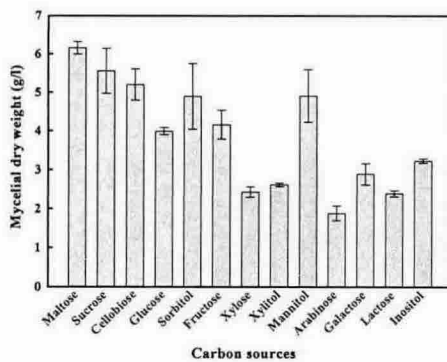
**새로운 합성 배지의 조성**    상기 결과를 토대로 Table 1에서와 같이 새로운 합성

배지를 조성할 수 있었다. 이 최적 배지를 사용하여 플라스크배양과 2.5-L jar fermenter를 통하여 균체생육 및 exo-biopolymer 생산량을 비교 조사한 결과는 Fig. 4와 Fig. 5과 같다.

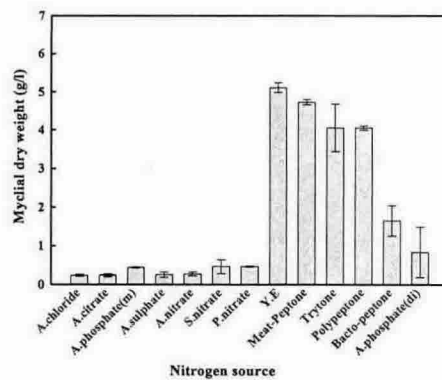
플라스크배양에서 exo-biopolymer의 농도는 최고 5.75 g/l, 균사체의 건조중량은 10.4 g/l 이었으며, batch bioreactor에서는 exo-biopolymer 농도가 40 % 증가된 8.0 g/l 이었다.

**Table 1.** Suggested medium composition for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*.

Chemicals	Concentration (g/l)
Maltose	30
Yeast extract	6
Polypeptone	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.2
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2



**Fig. 1.** Effect of carbon sources on the mycelial growth of *Paecilomyces japonica*.



**Fig. 2.** Effect of nitrogen sources on the mycelial growth of *Paecilomyces japonica*.

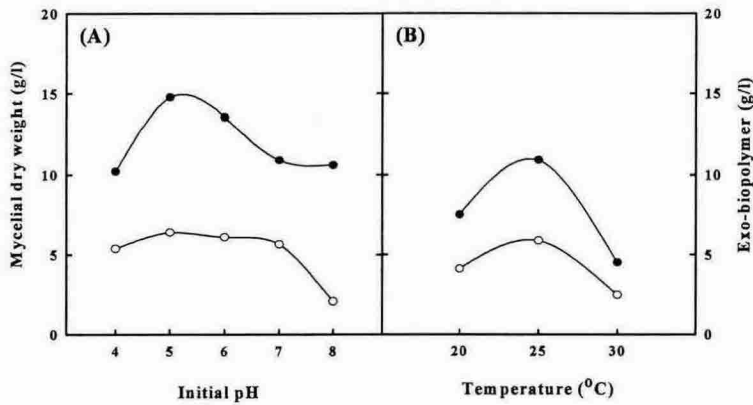


Fig. 3. Effect of temperature (A) and pH (B) on the mycelial growth of *Paecilomyces japonica* and exo-biopolymer production. Mycelial dry weight (●), and exo-biopolymer (○).

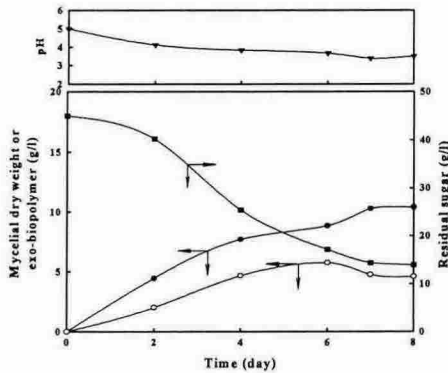


Fig. 4. Time course of exo-biopolymer production in the flask culture.

pH (▼), residual sugar (■), mycelium (●), exo-biopolymer (○).

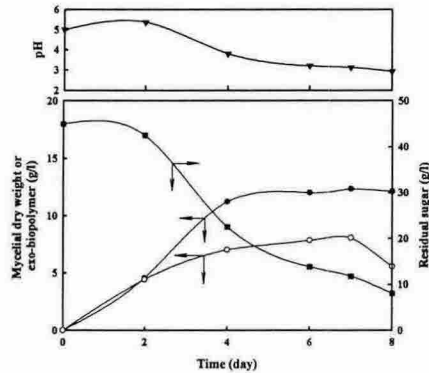


Fig. 5. Time course of exo-biopolymer production in a 2.5-L jar fermenter.

pH (▼), residual sugar (■), mycelium (●), exo-biopolymer (○).

## 참고문헌

1. Lee, S. Y. and T. S. Kang. 1996. Production conditions and characterization of the exo-biopolymer produced by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 111-118.
2. Lilly, V. G. and H. L. Barrent. 1951. *Physiology of the fungi.* McGraw - Hill Book Company. New York. 464.
3. Park, K. S. and J. S. Lee. 1991. Optimization of media composition and culture conditions for the mycelial growth of *Coriolus versicolor* and *Lentinus edodes*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **6**: 91-98.