

Maximization of cell growth and polysaccharide production from *Agaricus blazei* by fed-batch cultivation

황정민¹, 서정식¹, 권명상², 최정우³, 한진수⁴, 홍억기¹

¹강원대학교 환경·생물공학부, ²수의학과, ³서강대학교 화학공학과, ⁴삼성생명과학연구소
전화 (0361) 250-6275, FAX (0361) 243-6350

Abstract

In order to maximize the cell growth and the polysaccharide production in *Agaricus blazei*, two kinds of fed-batch fermentation processes were performed with varying the feeding medium compositions and the feeding process. The relationship between dissolved oxygen and polysaccharide production in batch fermentation was applied to fed-batch fermentation. The biomass concentration was 18.2 g/L and the polysaccharide production was 10.4 g/L.

서 론

질병의 치료 및 예방에 효과가 있는 천연물중 가장 주목받고 있는 버섯은 분류학상 균류(Fungi)중 진균류(Eumycetes)에 속하며 대부분은 담자균류(Basidiomycetes)의 일종으로, 최근에는 여러 종류의 버섯들이 항암효과가 있음이 과학적으로 검증되었는데 항암효능을 나타내는 주요 성분은 버섯속에 함유되어 있는 다당체라고 밝혀져 있다(1,2). 이러한 담자균류 유래의 다당은 항종양활성을 나타내며, 일반적으로 항종양활성을 갖는 다당체의 그 기본 구조는 β -(1,6)-glucosyl 분지를 가진 β -(1,3)-glucan 이다. 또한 이러한 다당체는 분지의 정도(degree of branch) 및 구성 성분, 구성당, 분자량, 화학적 구조 등과 같은 특성의 차이에 의해 많은 종류가 존재하고 있으며, 그러한 특성의 차이로 인해 항종양활성의 현격한 차이를 나타낸다(3,4). *Agaricus blazei*로부터 생산된 다당체의 항종양활성은 지금까지 밝혀진 담자균류 유래 다당체보다 월등한 것으로 보고되고 있다. 그러나 현재 *Agaricus blazei*에 대한 연구경향은 자실체를 이용한 다당체의 추출 및 항종양활성에 관한 연구 수준에 머무르고 있다(5). 따라서 본 연구에서는 *Agaricus blazei*의 균체량 및 다당체 생산을 향상시키기 위해 회분배양을 통하여 교반속도, 통기량 및 용존산소에 따른 균체량 및 다당체 생산성에 대한 연구를 기초로 유가배양에서는 회분배양에서의 비증식속도와 균체수율 값으로 기질 소모속도를 예측하여, 균체증식에 따라 공급배지의 조성과 공급속도에 변화를 주어 균체량과 다당체 생산에 미치는 영향을 비교·검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 담자균류의 일종인 *Agaricus blazei*을 사용하였으며, 보관용 배지로는 PDA(potato dextrose agar)를 사용하였다. 균주 배양을 위한 기본배지로서는 fungi의 기본배지로 사용되고 있는 YMK media를 사용하였으며 그 조성은 glucose 20g/L, yeast extract 5g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/L, KH_2PO_4 2g/L으로 구성되어 있다. 본 배양의 생물반응기를 이용한 회분배양과 유가식 배양에서는 modified medium(6% glucose, 1.5% yeast extract, 0.2% KH_2PO_4 , 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% $MnSO_4 \cdot 5H_2O$)을 사용하여 수행하였다.

배양조건

전배양에서는 YMK medium을 기본배지로 사용하여 냉동 보관된 12 mL의 활성화된 stock을 250 mL flask (working volume 50 mL)에 접종하여 27°C, 150 rpm, 초기 pH 5.5로 조절하여 7일간 전배양을 실시하였으며, 본배양은 전배양액을 homogenizer (Heidolph Co., DIAX 600)를 통하여 균질화한 후 전배양액 5%를 취하여 접종하였다. 본 배양의 생물반응기를 이용한 회분배양과 유가식 배양에서는 5L 생물반응기를 사용하여 수행하였다. 유가식 배양에서는 working volume 2 L로 시작하였고, 27°C, 초기 pH 5.5, 공기의 주입속도는 1 vvm으로 유지하였다. 발효조의 용존산소 농도를 20%이상으로 유지하기 위해 교반속도조절(100~200 rpm) 및 혼합공기(air + pure oxygen)를 1 vvm으로 맞추어 배양하였다. 기질의 공급은 peristaltic pump를 이용하여 균체증식에 따라서 주입속도를 조절하였다.

결과 및 고찰

회분배양 결과 균체증식과 다당체 생산에 가장 좋았던 조건으로 통기량은 1 vvm이었으며 rpm은 100-200 rpm이었다. DO는 20%를 유지하는 것이 균체증식과 다당체 생성에 가장 좋은 조건이었다. 따라서 유가식 배양에서는 회분배양에서의 비중식속도와 균체수율 값으로 기질 소모속도를 예측하여 균체증식에 따라 공급배지의 공급속도를 달리하였다. Fig 1.은 공급배지를 2% yeast extract를 사용하여 배양 2.5일째부터 공급을 시작하여 12시간마다 기질의 공급속도를 21.6 ml씩 선형증가적으로 공급하였다. 최대 균체량과 다당체 생성량은 각각 17.2 g/L, 6.7 g/L이었다. 배지공급이 끝난 6일째 이후에도 균체 및 다당체 생성은 계속 증가하며 유지되었으나, 7.5일째 이후부터 다소 감소하였다. Fig 2.에서는 공급배지를 8% glucose로 하여 배양 2.5일째부터 7일째까지 균체증식에 맞추어 선형증가적으로 배지를 공급하였다. 최대 균체량은 13.3 g/L이었고 최대 다당체 생성량은 6.7 g/L이었다. 배지공급이 끝난 후에도 균체증식과 다당체 생성은 계속 유지되었으나 균체증식은 공급배지로서 yeast

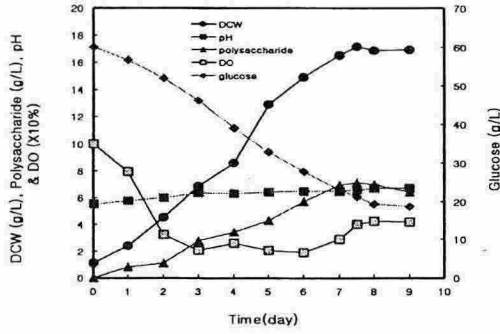


Fig 1. The profiles of cell growth, glucose, pH, DO and polysaccharide production under the DO control(over 20%) with linear-increase feeding rate(feeding medium : 20 g/L yeast extract)

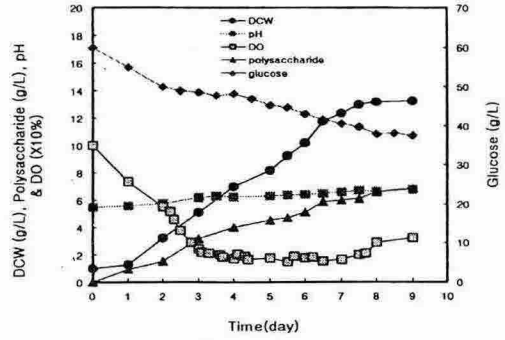


Fig 2. The profiles of cell growth, glucose, pH, DO and polysaccharide production under the DO control(over 20%) with linear-increase feeding rate(feeding medium : 80 g/L glucose)

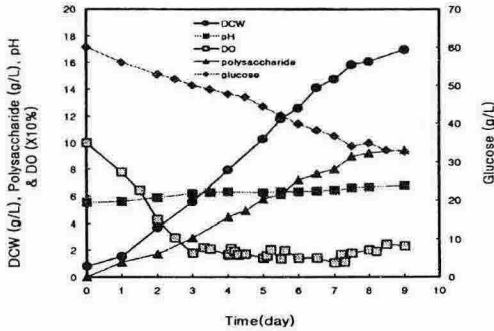


Fig 3. The profiles of cell growth, glucose, pH, DO and polysaccharide production under the DO control(over 20%) with linear-increase feeding rate(feeding medium : 80 g/L glucose and 20 g/L yeast extract)

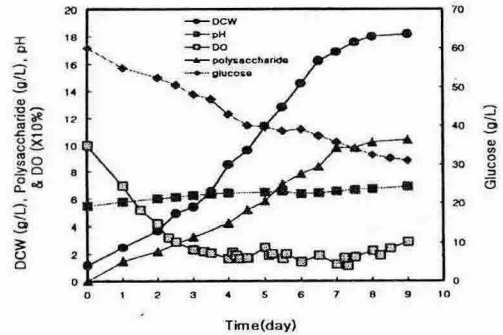


Fig 4. The profiles of cell growth, glucose, pH, DO and polysaccharide production under the DO control(over 20%) with linear-increase feeding rate(feeding medium : 500 ml of 80 g/L glucose and 500 mL of 20 g/L yeast extract)

extract를 사용할 때보다 감소하였다. Fig 3.에서는 공급배지를 8% glucose와 2% yeast extract를 혼합하여 배양 2.5일째부터 Fig 2.에서와 같은 방법으로 기질을 공급하였다. 최대 균체량과 다당체 생성량은 각각 17 g/L 및 9.4 g/L이었으며, 배지공급이 끝난 후에도 균체증식은 지속적으로 증가하였고, 다당체 생성량은 8일째까지 증가하는 경향을 보였다. Fig 4.에서는 2% yeast extract를 2.5일째부터 먼저 공급하여 배양 4.75일째까지 Fig 1.에서와 같은 방법으로 배지공급을 하고, 배양 4일째부터 8% glucose를 균체증식에 맞추어 12시간마다 7.2 mL씩 선형증가적으로 공급하였다. 최대 균체량과 다당체 생성량은 각각 18.2 g/L 및 10.4 g/L이었으며, 배지공급이 끝난 후에도 균체량과 다당체 생성량은 지속적으로 증가 하였다.

요 약

본 연구에서는 fed-batch를 통하여 *Agaricus blazei*의 균체증식과 다당체 생산을 증가시키고자 공급배지와 배지공급속도에 변화를 주어 균체증식과 다당체 생성에 미치는 영향을 비교·검토하였다. 유가식 배양에서의 최종균체량 및 다당체 생성량은 회분식 배양에 비해 훨씬 높았으며, 초기에 균체증식을 위해 공급배지로 yeast extract를 먼저 공급하고 4일째부터 다당체 생성을 위해서 glucose를 공급할 경우 균체량은 18.2 g/L, 다당체 생성량은 10.4 g/L를 생산하여 배양결과 최대 생산량을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Kraus, J., W. Blascheck, M. Schutz, and G. Franz, "Antitumor activity of cell wall β -1,3/1,6-glucans from Phytophthora species"(1992), *Planta Med.*, 58, 214-218.
2. Mizuno, T., H. Saito, T. Nishitoba, and H. Kawagishi, "Antitumor-active substances from mushrooms"(1995), *Food Reviews International*, 11(1), 23-261.
3. Lee, J.-H., "Anti-tumor and immuno-stimulating activity of fungal polysaccharides"(1994), *The Microorganisms and Industry*, 20, 14-21.
4. John, A. and N. James, "(1-3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships"(1995), *Carbohydrate Polymers*, 28, 3-14.
5. Itoh, H., H. Ito, H. Amano, and H. Noda, "Inhibitory action of a (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan-protein complex isolated from *Agaricus blazei* Murill ("Himematsutake") on meth a fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism"(1994), *Jpn. J. Pharmacol.*, 66, 265-271.