

Effects of medium components on Mycelial Growth and Polysaccharide production in Liquid Culture of *Coriolus versicolor*

Min-Gu Choi and Eock-Kee Hong

School of Biotechnology and Bioengineering Kangwon National University, Chunchon.

전화 (033) 250-6275, FAX (033) 243-6350

Abstract

This study was executed to investigate the effects of medium components on liquid culture in the flask culture of *Coriolus versicolor*. This work was focused on raising the mycelial growth and the polysaccharide production. In order to optimize the medium, different carbon and nitrogen sources were investigated. Glucose and yeast extract were chosen for the production of mycelia and polysaccharide as carbon and nitrogen sources, respectively, in the flask culture. For the mycelia growth and polysaccharide production, the medium contained glucose 20g/L, yeast extract 6g/L, KH_2PO_4 0.46g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L. The liquid culture conditions for the mycelial growth were 27°C, 200rpm and working volume 100mL using 250mL flask.

서 론

고등 균류인 버섯은 우리 식생활과 밀접한 관계를 가져 식용 뿐만아니라 산업용, 약용 등으로 널리 이용되어 오고 있다. 이에 따른 여러 가지 균학적 의미에서의 기본적인 연구 및 생리적 특성 특히 항암성분에 대한 연구가 활발히 진행되어 오고 있다. 이중 *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Lepiota procera*, *Grifola frondosa*, *Lyophyllum ulmarium*, *Ganoderma applanatum* 등으로부터 얻은 단백당당체가 항암효과가 있다고 보고되고 있다.

구름버섯(*Coriolus versicolor* (Fr.) Quél.=*Polysticus versicolor* Fr.)은 구멍장이 버섯과(*Polyporaceae*)에 속하는 담자균류로서 서울, 경기도 광릉지방, 기타 전국 각지, 세계 각지에 분포하며 여름철에 많이 볼 수 있고 특히 다른 담자균류에 비해 항암작용에 뛰어난 것으로 보고되어 온 이래로 이에 대한 약리작용의 연구가 활발하게 진행되어 Tsukagoshi(1974) 등은 자실체를 열수 추출하여 단백당당체를 얻었

는데 이것이 sarcoma-180에 대하여 항암작용이 있음을 밝힌바 있다. 그리고 현재 *Coriolus versicolor*에서 추출된 상업적 polysacchropeptides는 심부배양에 의한 발효에 의한 균사체에서 생산하였다. 그 임상학적으로 증명된 주된 단백다당체는 PSK와 PSP라 불려진다.

이에 본 연구는 flask culture를 통하여 구름버섯 균사체 배양액에서 단백다당체를 얻기 위한 균주와 배지 간에 영향을 실험을 통하여 증대하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 KCTC에서 분양 받았고, 보관용 배지로는 PDA(potato dextrose agar)를 사용하였다. 균주 배양을 위한 기본배지의 조성은 glucose 20g/L, yeast extract 6g/L, KH_2PO_4 0.46g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L이다.

배양조건

플라스크 배양에 사용된 접종원은 PDA에서 30일간 배양한 균사를 가로 세로 2 mm 크기로 10조각을 잘라서 기본배지에 27℃에서 7일간 진탕배양(200rpm)하여 사용하였다. 이를 다시 기본배지에 접종해 3일간 배양하여 기본배지에서 배양을 실시하였다. 배양기는 shaking incubator(Vision Scientific Co., VS-8480SFN)을 사용하였으며 27℃, 200 rpm, pH는 조절하지 않았다.

균체량 측정

균체량은 건조균체량을 이용하였다. 건조균체량은 세포배양액을 filter paper(Whatman #4)를 이용하여 여과한 후 증류수로 2회 세척하여 80℃에서 항량이 될 때까지 약 24시간동안 건조하여 건조중량을 측정하였다.

Polysaccharide 정량

Polysaccharide 측정은 세포배양액을 filter paper(Whatman #4)를 사용하여 균체와 배양여액을 분리한 후 배양여액에 2배의 ethanol을 가하여 4℃에서 24시간 방치하여 침전된 침전물을 6000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 분리한 후 80℃에서 24시간 항량이 될 때까지 건조시켜 정량하였다.

Glucose 분석

배양액 중의 glucose농도는 세포 배양액을 filter paper (Whatman #4)를 사용하여 균체와 배양액을 분리한 후 얻은 배양여액을 glucose kit (Sigma Chemical Co., 510-A)를 사용하여 측정하였다. 분석범위는 0.25 ~ 3.0 g/L로 하여 배양여액을 이 범위에 들어가도록 희석하여 사용하였으며, 낮은 농도 (0.25 g/L 이하)에서는 분석 절차상 희석을 생략하였다. 반응은 37°C에서 30분간 행하였으며, 반응이 끝난 후 분광광도계 (Spectronic Co., GENESYS 5)를 사용하여 440 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 영향

최소배지에서 탄소원의 영향을 살펴보기 위해 임의의 질소원 yeast extract을 1%로 고정하고 다당류, 이당류, 단당류의 탄소원을 선정하여 각각 1% 씩 첨가하여 임의의 culture conditions(27°C, 200rpm)에서 배양하여 비교하였다(Fig.1). 균체량에 있어서는 갈락토오스를 제외한 단당류에서 4g/L 수준을 보였고 그 중에 glucose가 가장 높았다. 다당체는 락토오스와 말토오스에서 다른 탄소원보다 높았다. 하지만 균체량에서 가장 낮은 수준에 생장을 보였기 때문에 균체량과 다당체 생산에 유리한 glucose를 선정하였다.

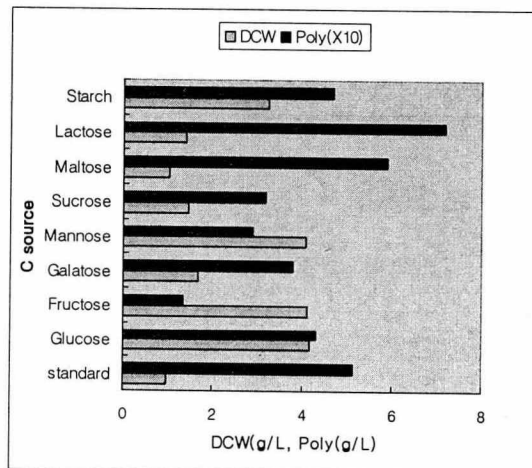


Fig. 1. The effects of carbon source on mycelial growth and polysaccharide production at 27°C and 200rpm.

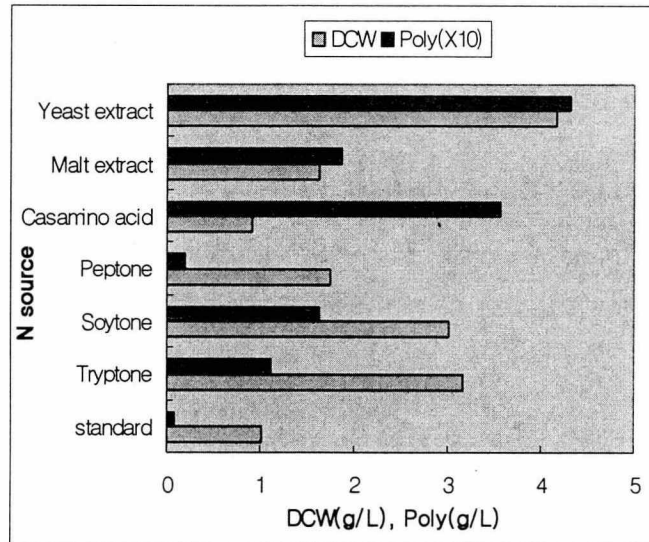


Fig. 2. The effects of nitrogen source on mycelial growth and polysaccharide production at 27°C and 200rpm.

질소원의 영향

선정된 탄소원 glucose를 1%로 고정한 최소배지에 일반적으로 사용되는 여러 질소원을 1%씩 첨가하여 임의의 culture conditions(27°C, 200rpm)에서 구름 버섯 배양에 미치는 영향을 살펴보았다. Yeast extract를 비롯한 soytone과 trytone은 균체 성장에 우수한 효과를 보였다. 다당체 생산에 있어선 yeast extract와 casamino acid가 좋은 결과를 보였다. 결과적으로 균체량과 다당체 생산 모두에 있어서 다른 질소원보다 yeast extract가 구름 버섯 배양에 우수하여 질소원으로 선정하였다.

요 약

본 연구에서는 담자균류 중에 항암효과가 입증된 *Coriolus versicolor*의 균사체 생육과 다당체 생성에 유리한 배지를 선정하기 위하여 flask culture를 통하여 검토하였다. 임의의 배양조건 27°C, 200rpm을 선택해 여러 탄소원과 질소원을 검토하여 각각 glucose와 yeast extract를 선택하였다.

References

1. B. W. Lee, M. S. Lee, K. M. Park, C. H. Kim, P.U. An, and C. U. Choi,

- Antitumor activities of the extract from the mycelia of *Coriolus versicolor* (1992), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20(3), 311-315.
2. C. Jian, and C. Yusuf, Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: Physiological activity, uses and production (2003), *Biotechnol. Advances*, 21, 109-122.
 3. C. H. Shu, and M. Y. Lung, Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures (2003), *Process Biochemistry xxx*, 1-7.
 4. K. S. Park, and J. S. Lee, Optimization of media composition and culture conditions for the mycelial growth of *Coriolus versicolor* and *Lentius edodes* (1991), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 6(1), 91-98.