

Optimization of Cultural Conditions for Mycelial Growth and Exo-Polysaccharide Production in Jar Fermentation

by *Fomitopsis pinicola*

Wol-Suk Cha, Ding Jilu, Choon-Beom Lee, Hyung-Geun Nam,

Jun-Han Lee, Jeung-Moo Maeng, Hwan-Hee Lim

Dept. of Chemical Engineering, Chosun University, Kwangju, Korea

TEL: +82-62-230-7218, FAX: +82-62-230-7226

Abstract

The Study was carried out to investigate in the optimal mycelial growth and Exo-Polysaccharides of *Fomitopsis pinicola*. Jar fermentations were carried out to optimize the culture conditions for mycelial growth and exo- polysaccharide production. The optimal agitation speed and aeration rate were 200 rpm and 1.5 v.v.m., respectively. Under optimal culture conditions, the maximum mycelial growth and exo-polysaccharide production after 11 days with a 5 L jar fermenter containing the optimized medium were 10.21 g/L and 3.56 g/L, respectively. However, the fundamental information obtained this study is insufficient in the development of a efficient process for mycelial growth and exo-polysaccharide production from *Fomitopsis pinicola*.

서 론

버섯류의 항종양 활성은 1960년대 일본에서 보고된 mouse에 대한 고형 암세포 sarcoma-180에 대한 저해 활성이 보고되면서 관심이 높아졌다. 그 후 많은 연구자에 의해 버섯류에 대한 고형 암세포 sarcoma-180에 대한 연구가 진행되어 왔다. 버섯류의 열수 추출물이 sarcoma-180에 대하여 항종양활성을 대부분 나타내고 있으며 소나무잔나비버섯(학명 : *Fomitopsis pinicola*) 성분(α -glucan, B- glucan, Heterogalactan)으로 위암, 심장병, 항종양, 간암, 콜레스테롤 배출 등에 약효가 있는 것으로 조사되었으며. 항종양 활성물질은 대부분 다당류인 glucan류로 그들의 독특한 화학구조 특성에 따라 일부 작용기작이 다르다. 버섯류의 B-glucan은 주로 숙주 매개성 면역활성을 통한 항암작용을 하는 것으로 보고되면서 직접적으로 암세포에 대한 세포 독성에 의한 제암 작용보다 면역체계의 강화를 통한 면역조절 작용에 대한 연구가 이루어

지고 있다.

본 연구에서는 소나무잔나비 버섯의 최적 배양상태의 조건을 연구하여 mycelial growth 와 exo-polysaccharide의 생산성을 높이고자 하였다.

재료 및 방법

세포주 및 배양

본 연구에서 사용한 균주는 소나무잔나비(*Fomitopsis pinicola*)버섯으로 충남 가야 백송 종균배양소에서 분양받아 사용하였으며, Potato dextrose agar(PDA)배지에서 25°C, 7일간 배양한 후 4°C에서 보존하였고, 2주마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

접종원의 준비는 냉장보관하던 균주를 300 mL 플라스크에 50 mL의 기본배지(glucose 40 g/L, yeast extract 5 g/L, malt extract 10 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L and MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L)를 121°C, 15분간 고압멸균한 후 5mm cork borer로 mycelium disk 4 - 5개를 절취하여 접종한 후 25°C, 8일간 진탕배양한 다음, 배양액을 균질기로 무균적으로 30 sec 동안 균질화하여 접종원으로 사용하였다.

발효조 배양

발효조 배양에서 발효조는 5 L 용량(working volume 2 L)의 Jar fermenter (Kobiotech, Korea)로써 자동온도조절기, 교반속도 조절기, 용존산소농도(DO)센서 및 pH센서를 부착하고 있다. 유량(aeration)은 0.5 vvm과 1.5 vvm으로 달리하여 aeration에 따른 균사생장과 세포의 다당류 생산을 조사하였고 교반속도는 100, 200, 300 rpm으로 변화를 주면서 교반속도에 따른 영향을 조사하였다.

발효조 배양에 사용한 배지는 flask 배양에서 영양요구성 실험을 통하여 얻어진 최적 배지를 사용하였고, 조업 온도와 pH는 각각 25°C, 6.0 으로 하여 배양기간 동안 일정하게 유지되도록 조절하였고, 배양기간은 8 - 12일간 배양하여 균사생장과 세포의 다당류 생산을 조사하였다.

분석 방법

균체량의 배양액을 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 침전된 균사체를 증류수로 2~3 회에 걸쳐 세척한 건조기에서 항량이 될 때까지 방치한 후 건조중량을 측정하였다. 세포

외다당류는 원심분리하여 얻은 상등액에 미리 냉장보관중인 4배의 95%(v/v)에탄올을 가하여 4℃에서 24시간 침전시켜 침전물을 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 회수하였고, 이를 감압여과하여 60℃에서 24시간동안 건조시킨 후, 함량이 될 때까지 항온조에 방치하여 건조중량을 측정하였다. 잔여 글루코스 농도는 DNS 방법에 의해 측정되었다.

결과 및 고찰

Fig. 1 는 다른 agitation speed하에서 배양기간 동안의 균사생장과 세포외 다당류 생산에 관한 것으로 결과에서 보는 바와 같이 agitation speed는 균사생장과 세포외 다당류 생산에 영향을 미치고 있음을 알 수 있다. Agitation speed가 200 rpm이상까지 증가시켜 주었을 때 균사생장과 세포외 다당류 생산을 감소하고 있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 agitation speed가 증가할수록 impeller에 의한 강한 shear stress가 발생하여 발효조 내의 균사에 손상을 입혀 균사생장과 세포외 다당류 생산에 부정적인 영향을 끼쳤기 때문인 것으로 사료된다. 8일 동안의 최대 균사생장과 세포외 다당류 생산은 200 rpm의 agitation speed 조건하에서 얻어졌으며 그 생산량은 각각 7.05 g/L 와 2.59 g/L로 나타났다.

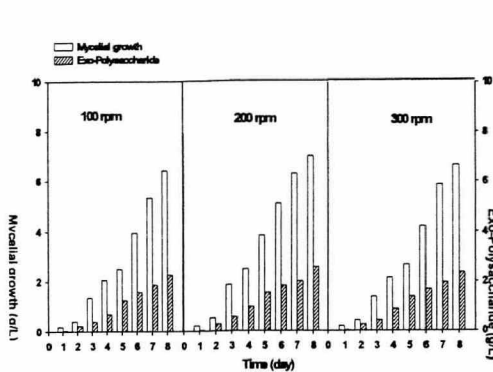


Fig. 1. Effects of agitation speed on the mycelial growth and Exo-polysaccharide production by *Fomitopsis pinicola* in a jar fermenter at 25 °C, pH 6.0 and 0.5 vvm

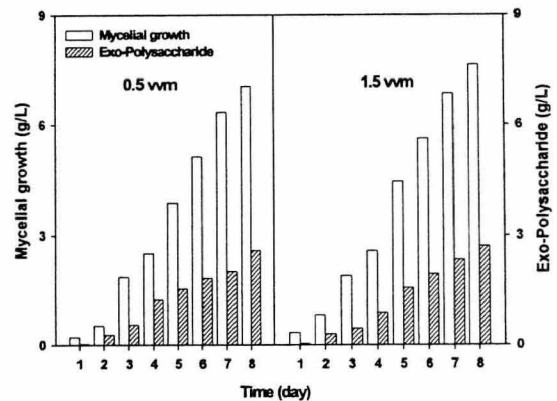


Fig. 2. Effects of aeration on the mycelial growth and Exo-polysaccharide production by *Fomitopsis pinicola* in a jar fermenter at 25 °C, pH 6.0 and 200rpm

Jar fermenter에서의 aeration에 따른 균사생장과 세포외 다당류생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 aeration을 각각 0.5 vvm과 1.5 vvm으로 하여 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 1.5 vvm의 aeration 공급에서 최대 균사생장(7.63 g/L)와 세포외

다당류 생산(2.71 g/L)을 나타냈다. 이러한 결과는 aeration 공급이 증가할수록 배양액 내의 산소전달속도가 증가하여 소나무잔나비버섯의 균사생장에 유리한 환경을 조성하게 되어 결국 균사생장과 세포의 다당류 생산의 수율 향상에 긍정적인 영향을 미친 것으로 사료된다.

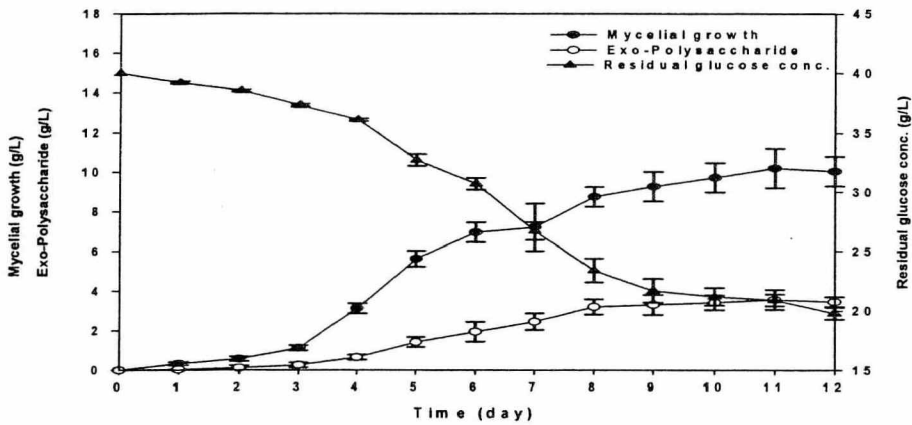


Fig. 3 Time course of the mycelial growth and Exo-polysaccharide production, and glucose concentration by *Fomitopsis pinicola* in a jar fermentor with optimal medium.

Fig. 3은 배양시간에 따른 소나무잔나비버섯의 균사생장과 세포의 다당류 생산 및 잔존 glucose 농도의 변화를 나타낸 것이다. 결과에서 보는 바와 같이 균사생장의 경우 배양시간 3일 이후부터 균사생장이 급격히 이루어져 배양시간 11일 경에 최대 균사생장(10.21 g/L)을 보인 다음 그 이후 균사생장이 다소 억제되고 있음을 알 수 있고, 세포의 다당류 배양시간 4일경에 0.65g/L의 생산을 보이기 시작하여 배양 11일 경에 최대 세포의 다당류 생산(3.56 g/L)을 보인다음 그 이후에 균사생장의 억제됨에 따라 세포의 다당류 생산도 저하되고 있음을 알 수 있다. 또한 소나무잔나비 균사체의 균사생장이 급격히 증가하기 시작하는 시점에서 배지내의 기질인 glucose의 이용도 급격히 증가하고 있으며, 배양기간 동안 배지 내의 glucose 농도는 40 g/L에서 19.8 g/L 정도로 감소하였다. 이러한 결과는 소나무잔나비버섯의 세포의 다당류 생산 방식이 증식 연동형 방식인 것으로 판단되는데, 이에 대한 보다 많은 연구가 필요한 것을 사료된다.

요 약

발효기에서의 균사체 성장과 세포의다당류의 생산을 위한 최적 배양조건을 조사하기

위하여 회분식 반응기를 이용하여 연구한 결과 최적 회전속도와 통기량은 각각 200 rpm 과 1.5 vvm 였다. 최적 배양 환경하에서 5L 발효기(working volume 2 L)에서 배양한 결과 각각 10.21 g/L 와 3.56 g/L의 mycelial growth와 exo- polysaccharide를 얻었다.

감 사

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업의 연구결과로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Kiho, T., J. Hui, A. Yamane, and S. Ukai. 1993. Polysaccharides in fungi. XXXII. Hypoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharide from the cultural mycelium of *Cordyceps simensis*. *Biol. Pharm. Bull.* 16:1291-1293.
2. Lee, J. H. 1994. Anti-tumor and immunostimulating activity of fungal polysaccharide. *The Microorganisms and Industry* 20: 14-21.
3. Song, C. H., C. H. Lee, J. H. Ahn, B. S. Hong and H. C. Yang. 1995. Standarization of chemically defined medium for the production of mycelium and Basidiocarps in *Flammulina velutips*. *Kor. J. Mycol.* 23: 53-60.
4. 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.