

## *Phellinus linteus* WI-001 균사체의 고밀도 배양을 위한 배양학적 특성 연구

김종래\* · 권호균 · 전계택<sup>1</sup> · 김규중<sup>2</sup> · 이계관

환인제약(주) 중앙연구소, <sup>1</sup>강원대학교 자연과학대학 생명과학부, <sup>2</sup>강릉대학교 자연과학대학 생물학과

**Studies on Cultural Characteristics for High Density Fermentation of *Phellinus linteus* WI-001. Kim, Jong-Lae\*, Ho-Kyun Kwon, Gie-Taek Chun<sup>1</sup>, Kyu-Joong Kim<sup>2</sup>, and Kye-Kwan Lee.** Department of Biotechnology, Central Research Center, Whanin Pharm. Co., Ltd., 150, Sinsohyun-Dong, Ansung, Kyunggi, Korea, <sup>1</sup>Division of Life Science, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon 200-701, Korea, <sup>2</sup>Department of Biology, Kangnung National University, Kangnung, Kangwon 210-702, Korea – Various environmental factors such as pH, temperature and initial glucose concentration were investigated for enhancing cell growth in fermentations of *Phellinus linteus* WI-001, a producer of polysaccharides with potent anticancer activities. Optimal pH and temperature were around 5.5 and 28°C, respectively. Relatively little variation of pH was observed ranging between 5.5 and 6.5 during the whole fermentation period. Maximum cell concentration and specific growth rate were investigated in the media containing initial glucose concentrations of 0.5%, 1%, 2%, 3% and 4%. High initial glucose concentration enhanced biomass production but showed negative effect on specific growth rate. In bioreactor experiments with various feeding strategies, increases of 28% and 42% in final cell concentration were obtained as compared to conventional batch process, by adopting pulse and continuous supplement of 2% glucose solution, respectively.

**Key words:** polysaccharides, *Phellinus linteus*, feeding strategy, environmental factors

노인기에 많이 나타나는 만성 퇴행성 질환으로는 면역기능 저하에 기인한 질환, 암, 간장질환, 관절염, 당뇨병, 혈관 및 뇌혈관 장애, 치매증, 골조송증 등을 대표적으로 들 수 있다. 면역증강제는 면역기능 저하에 사용되며, 또한 세포 면역기능 장애의 개선과 치료를 목적으로 사용되고 있다 [9]. 따라서 면역증강제의 응용영역은 매우 다양하다고 할 수 있다. 최근에는 빨리 증식하고 있는 세포를 죽이는 기전에 의한 직접적인 항암효과 외에 면역체계를 활성화시킴으로서 간접적인 항암효과를 나타내는 면역학적 요법이 위암, 대장암, 직장암등 소화기 관련 암 치료에 있어서 외과요법, 화학요법 및 방사선요법에 대한 보조치료요법으로 응용되고 있다.

버섯의 성분 중 면역증강작용을 나타내는 것은 다당체이다. 버섯 다당체는 일반적으로  $\beta$ -1,3 glucan의 골격에  $\beta$ -1,6의 가지 구조를 갖는 단일물질임에도 불구하고 생체기능에 다양한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 [5]. 일본의 경우 기능성 식품으로 표고버섯 균사체 추출물이 이미 일반화 되어 있으며, 또한 1992년 아가리쿠스버섯 (흰들버섯) 자실체로부터 추출한 고분자 다당체가 암세포 증식 억제 뿐만 아니라 류머티스 관절염이나 만성기관지염, 위염처럼 면

역기능 약화가 원인인 모든 질병에 효능이 있다고 알려지면서 그 활용방안에 대한 연구가 큰 진전을 보이고 있으며, 최근 기능성 식품으로 상품화 되었다 [7]. 의약품의 경우 면역증강효과에 의한 암 치료(보조)제로 사용되고 있으며 구름(운지)버섯 배양 균사체에서 추출한 단백다당체 PSK가 항암성 면역증강제 Krestin산제로, 치마버섯 균사체 배양의 배양여액에서 추출한 세포의 다당체 Shizophyllan이 항암성 면역증강제 Sizofilan주사제로 그리고 표고버섯 자실체에서 추출한 단백다당체 Lentinan이 항암성 면역증강제 Lentinan 주사제로 판매되고 있다 [8]. 이 다당체는 균사체의 생체성분으로서 균사체 생장에 비례하여 증가하는 특성을 가지고 있다 [10].

본 연구에서 사용한 균주인 상황(*Phellinus linteus*) 버섯은 소나무비늘버섯과(*Hymenochaetaceae*)의 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 백색부후균으로, 자실체 추출물에서 96.7%의 매우 강력한 종양저지율을 나타냄이 알려져 왔다 [3]. 최근에 와서는 상황을 비롯한 이들 버섯 균사체 추출물의 항 종양작용, 면역조절 효과 [6] 및 임상실험에 의한 안정성이 입증되었으며 [4], 따라서 각종의 산업적 응용연구가 활발히 진행되기에 이르렀다.

현재 국내에서는 상황버섯 균사체를 대형 발효탱크에서 생산하고, 항암활성이 있는 균사체의 추출물을 항암제로 시판하고 있으나 상황버섯의 액체배양에 의한 대량 생산 체제를 갖추는데 필요한 기초적인 연구는 아직 미흡한 실정

\*Corresponding author

Tel. 82-334-673-2041, Fax. 82-334-676-4671

E-mail: kimjl@whanin.co.kr

이다. 따라서 본 연구에서는 액체배양에 의한 상황버섯 균사체의 발효공정을 개선하기 위한 방법으로서 최적의 온도, pH 조건을 확립한 후 그 조건을 기초로 초기 균사체 성장이 가장 왕성한 발효배지 조건을 확립하였다. 또한 유기식 배양공정의 일환으로 배지 공급 속도를 조절함으로써 최적의 세포 성장 속도와 영양분 소비 속도가 균형을 이룰수 있도록하는 대량 생산을 위한 기초자료를 마련하고자 하였다[1].

또한 이러한 배양 방법은 탄소원인 glucose 농도에 영향을 받거나 성장 인자에 제한을 받는 미생물의 배양뿐만 아니라 짧은 배양 시간 내에 고밀도의 균체량을 얻는데에도 유용하다[2,11].

따라서 본 연구에서는 배지내의 glucose 양을 적정 범위로 유지함으로써 동화역제를 극복하고 배지내의 점도를 낮게 유지함으로써 고밀도의 세포 배양이 가능한 유기식 배양 방법을 시도하였다. 먼저 발효시간에 따른 glucose의 농도를 측정하여 glucose의 공급시기를 결정하였고 glucose의 공급방법을 달리하여 각각 균체량과 용존산소, 배지의 산도에 미치는 영향을 비교 검토하여 최적의 유기식 배양 방법을 결정하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 실험에 사용한 *Phellinus linteus* WI-001은 강원도 양양에서 채집한 자실체로부터 균사체를 분리하였으며, 이 자실체로부터 균사조직을 무균적으로 떼어 내어 준비된 고체배지상에 옮겨 순수 분리 배양하였다. 표준균주인 *P. linteus* ATCC-26710은 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다.

균주보존은 4°C 냉장실에 20 ml 시험관에 PDA slant로 보관하면서 필요할 때마다 PDA 고체배지에 이식한 후 균사체 직경이 5 cm 이상 자랐을 때 균사체 가장자리에서 의료용 무균칼로 가로 5 mm, 세로 5 mm의 절편을 떼어 균사체 확대배양을 하였다.

### 배지 및 시약

종배양을 위해 사용된 성장배지는 potato dextrose agar (Difco) 고체배지 및 potato dextrose broth (Difco) 액체 배지를 사용하였다. *Phellinus linteus* 배양을 위한 생산배지의 조성은 Table 1과 같다. 실제 생산배지의 성분은 문헌조사에 근거하여 균사체가 가장 잘 자라는 배지에서 점차적으로 최적화를 통해 확립하였다. 배지의 열 멸균시 침전과 갈변현상을 방지하기 위해 당과 무기염류를 농축용액으로 만들어 멸균한 후에 무균상태에서 나머지 배지용액과 혼합하여 사용하였다.

유기식 배양을 위한 glucose는 40% stock으로 제조하여

**Table 1. Component and composition of WIM liquid medium for *P. linteus* culture**

component	composition
Glucose	20
Peptone	6
Yeast extract	4
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2
pH	5.5

peristaltic pump (Cole parmer Co., Masterplex L/S)를 이용하여 공급하였다.

### 배양방법

**플라스크 배양** 앞에서 언급한 성장배지 및 생산배지의 조성을 기본으로 하여 1차 종배양은 100 ml의 성장배지를 넣은 500 ml의 baffle 삼각플라스크에 접종하여 진탕배양기에서 25°C, 120rpm으로 7일간 배양하였다. 1차 종배양 완료 후 균사체 ball을 균질화 시키고자 waring blender (Cole parmer Co.)로 5초간 균질화 시킨 후 2차 종배양으로 300 ml 생산배지를 넣은 1L baffle 삼각플라스크에 10% (V/V)로 접종한 후 25°C, 120rpm으로 5일간 진탕배양하였다.

**생물반응기 배양** 실험에 사용된 발효기는 7L 용량 (working volume 5L)의 상부형 발효기 (B. E. Marubishi Co., LTD)로서 자동 온도 조절기, 교반속도 조절기, 용존산소농도 (DO) 센서 (TOA Electronics Ltd., DY220) 및 pH 센서 (TOA Electronics Ltd., D26)을 부착하고 있으며 제어저시기 (B. E. Marubishi Co., LTD., MDR-4CR)와 연결되어 자동으로 제어된다. 산소의 공급은 공기압축기를 이용하여 여과필터를 거쳐 발효기 안으로 투입되게 하였으며 유량은 0.1-1.0 L/min 범위내에서 조절하였다. 교반속도는 70-150rpm으로 용존산소농도에 따라 변화시키면서 배양하였다.

### 분석조건

**균체농도의 분석** 균체농도를 측정하기 위하여 매 시간마다 채취한 시료를 여과장치에서 whatman paper 2로 여과한 후 균사체를 증류수로 세척하고 다시 여과하였다. 이 과정을 2회 반복한 후에 수분측정기 (Mettler toledo, HR73)에서 온도를 80°C로 조정한 후 수분이 완전히 증발한 후 건조무게를 측정하였다.

**배양액중의 잔류 carbohydrate 분석** 배양액에 남아있는 glucose를 분석하기 위하여 Dinitrosalicylic acid (DNS)법을 변형하여 사용하였다. 매 시간마다 채취한 시료를 여과

장치에서 whatman paper 2로 여과한 후 균사체는 제거하고 여과액 50  $\mu$ l를 DNS시약 150  $\mu$ l와 혼합하고 5분간 끓는 물에서 증탕시킨 후 상온으로 냉각시킨 후 UV-Visible Spectrophotometer (HP 8453)를 사용하여 540 nm에서 흡광도 (OD)를 측정하였다.

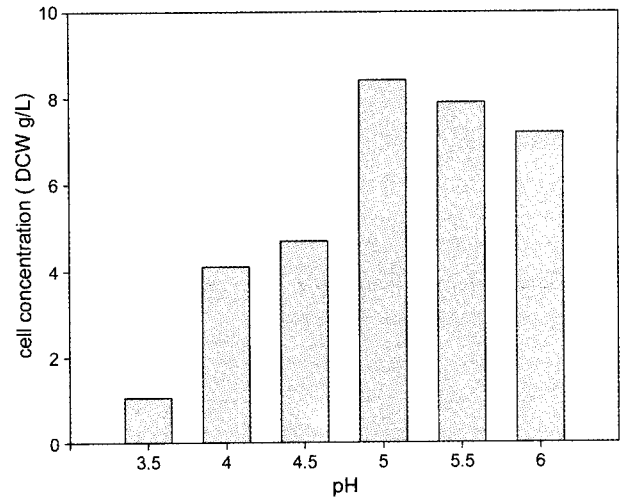
**결과 및 고찰**

**초기 pH와 온도에 따른 *P. linteus* WI-001 배양특성**

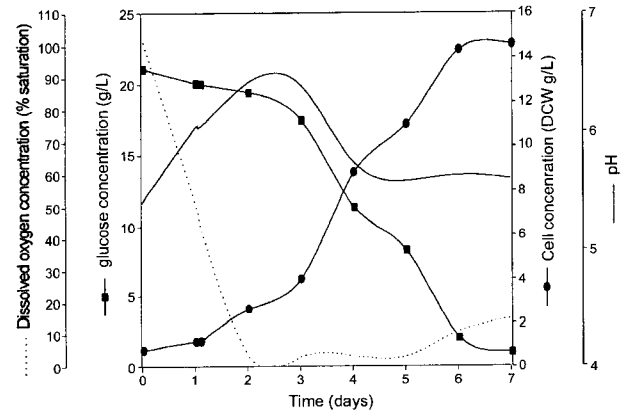
버섯 균사체 배양에 영향을 미치는 물리화학적 요인을 구명하기 위하여 탄소원 농도를 2%로 제한한 배양배지에서 온도 및 pH 등에 대하여 최적화 실험을 실시하였다. 종균 및 본배양에서의 균사체 배양을 위한 최적 성장온도를 조사하기 위하여 *P. linteus* WI-001과 *P. linteus* ATCC 26710을 대상으로 PDA 고체배지상에서 23°C, 25°C, 28°C, 30°C 및 32°C로 배양온도를 설정한 후 균사체 성장속도를 조사하여 보았다. 그 결과 배양온도 28°C에서 배양한 균사체의 반지름이 22 mm로서 성장속도가 가장 빠른 것으로 나타났으며, 배양온도 25°C 이하 또는 30°C 이상에서는 균사체 성장속도가 떨어지는 결과를 얻었다. 배양온도에 따른 PDB 액체배지상에서의 균사체 생산량을 조사한 결과에서도 28°C에서 균사체 생산량이 12 g/L로서 고체배지상의 결과와 일치하는 경향을 보였다(Table 2). 또한 WIM 완전배지에서 초기 pH에 따른 균사체 생산량을 플라스크 배양을 통해 조사한 결과 초기 pH가 5.0에서 5.5사이가 적합한 것으로 조사되었다(Fig. 1).

또한 종균 배양기간 설정을 위한 *P. linteus* 균사체의 성장곡선 및 탄소원 소모도를 7L 생물반응기 배양을 통해 조사하였다(Fig. 2). 실험결과 배양 6일째까지 균사성장이 왕성한 것으로 조사되었으며, 배지내 탄소원도 아직 완전히 고갈되지 않은 상황이므로 균사체에 stress로 작용하지 않은 것으로 나타났다. 따라서 본배양을 위한 종균 배양일은 6일을 넘지 않은 종균을 사용하였다.

WIM 완전배지에서 균사체의 성장속도에 따른 pH 변화를 조사하였다. WIM 완전배지에서 배양배지의 초기 pH를 5.5, 탄소원인 glucose 농도를 2%로 설정하여 실험한 결과 배양 3일째까지는 pH가 6.5 까지 상승한 후 다시 배양 7일까지 pH가 5.5로 떨어지는 경향을 나타냈으며(Fig. 2) 배양기간 동안 최적 pH 범위를 크게 벗어나지 않았다. 이



**Fig. 1.** Effect of different pH in WIM liquid medium on cell growth.



**Fig. 2.** Time-course profiles of DO, pH, cell and glucose concentration in *P. linteus* WI-001 batch fermentation.

러한 pH 변화 양상은 배양 초기 3일까지는 균사체가 배지 성분의 질소원 구성성분인 아미노산을 왕성하게 이용하면서 배지에서 방출된 암모니아가 배지중의 H<sup>+</sup> 이온과 결합하여 배지의 pH가 상승하는 것으로 보인다.

**초기 Glucose 농도에 따른 *P. linteus* WI-001 배양특성**  
7L 발효기에서 온도 28°C, pH 5.5, turbin type impeller 및 micro-hole type sparger를 고정시키고 WIM 완전배지

**Table 2.** Effect of various temperatures on cell growth in *P. linteus* fermentation

Temperature (°C)	<i>P. linteus</i> WI-001		<i>P. linteus</i> ATCC 26710	
	균사체반지름 (mm)	균사체 생산량 (g/L)	균사체반지름 (mm)	균사체 생산량 (g/L)
23	15	7.2	14	7.1
25	18	10.4	18	9.2
28	22	12.0	19	11.4
30	21	10.8	17	10.3
32	17	7.8	13	6.9

의 초기 탄소원 농도를 변화시켜 *P. linteus* WI-001의 균사체 성장을 관찰하였다. 초기 glucose 농도를 1%로 조절 한 배지에서의 균사체 건조중량은 약 10 g/L, 2% 농도의 배지에서 균사체 건조중량은 약 15 g/L, 4% 농도에서는 균사체 건조중량이 24 g/L로 나타났다(Fig. 3). 초기 탄소원 농도가 증가할수록 균사체 최종 생산량은 증가하는 양상을 보이지만, 균사체 성장속도는 초기 glucose 농도가 낮을 수록 빠른 양상을 보였다. Fig. 3의 결과를 토대로 초기 glucose 농도변화에 따른 균사체 비성장속도 ( $\mu$ )를 비교하여 보았다(Fig. 4). 초기 glucose 농도가 0.5% 및 1%일 경우 균사체 비성장속도 ( $\mu$ )는 각각 0.027 h<sup>-1</sup> 및 0.029 h<sup>-1</sup>로 나타났으며, 초기 glucose 농도가 2%, 3% 및 4%일 경우 균사체 비성장속도 ( $\mu$ )는 0.016 h<sup>-1</sup>, 0.015 h<sup>-1</sup> 및 0.013 h<sup>-1</sup>으로 나타났다. 이 결과로 볼 때 상황버섯 균사체 성장속도에 미

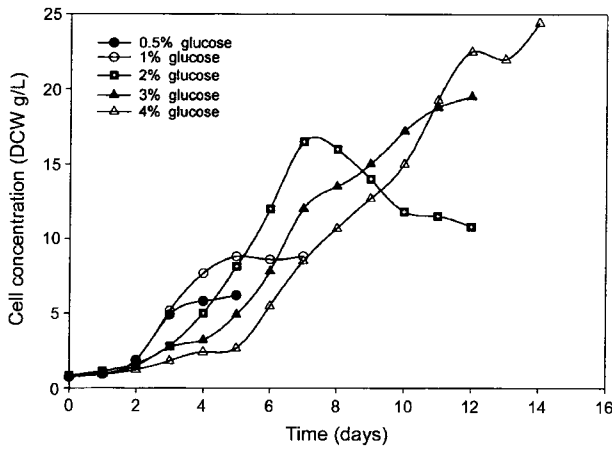


Fig. 3. Effect of different initial glucose concentration on cell growth in *P. linteus* WI-001 fermentations.

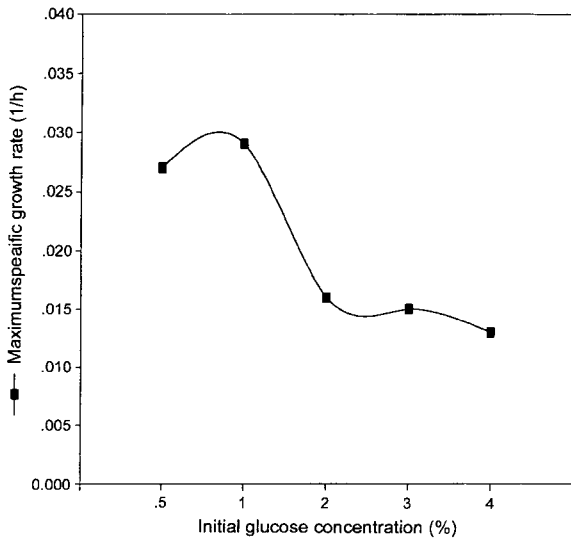


Fig. 4. Comparison of specific growth rate( $\mu$ ) in *P. linteus* WI-001 batch fermentations with different initial glucose concentration.

치는 초기 glucose 농도는 1%를 기준으로 큰 차이를 보이고 있다. 따라서 균사체가 활력있게 성장하기 위해서 초기 glucose 농도를 1% 이하로 조절하면 균사체 비성장속도 ( $\mu$ )는 0.027 h<sup>-1</sup> 이상을 유지할 수 있음을 제시하고 있다.

유기식 배양을 통한 *P. linteus* WI-001 균사체 생산성

버섯 균사체 배양을 통한 단백당당체 생산에 있어서 경제성을 확보하기 위해 Fig. 4의 결과를 토대로 균사체 생산량 증가 및 배양기간 단축을 위한 유기식 배양 (fed batch culture)을 시도하였다. 균사체 비성장속도가 가장 우수한 초기 1% glucose 조건하에서 배양하다가 탄소원 고갈에 따라 추가로 1% 농도의 glucose를 간헐적 공급방식 (intermittent feeding) 및 지속적 공급방식 (continuous feeding)에 의해 공급하였다. Glucose 추가 공급은 glucose 소모도를 예측하여 40% glucose stock을 배양 3일째부터 배양 5일째까지 24시간 간격으로 간헐적 feeding에 의해 균사체를 배양한 결과 최종 균사체량은 18 g/L였다(Fig. 5).

배양중 glucose 농도가 고갈되지 않는 조건을 기초로 하

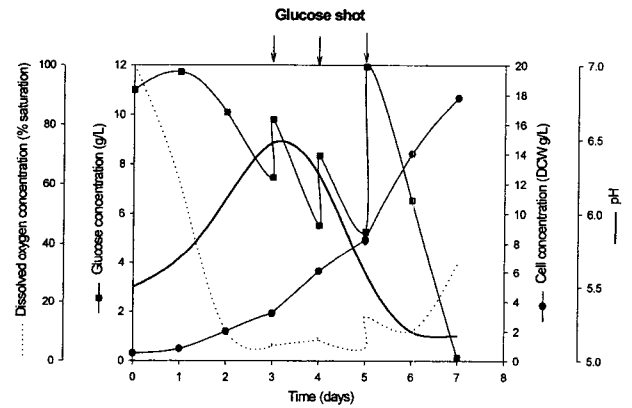


Fig. 5. Time-course profiles of DO, pH, cell and glucose concentration in *P. linteus* WI-001 intermittent fed batch fermentation.

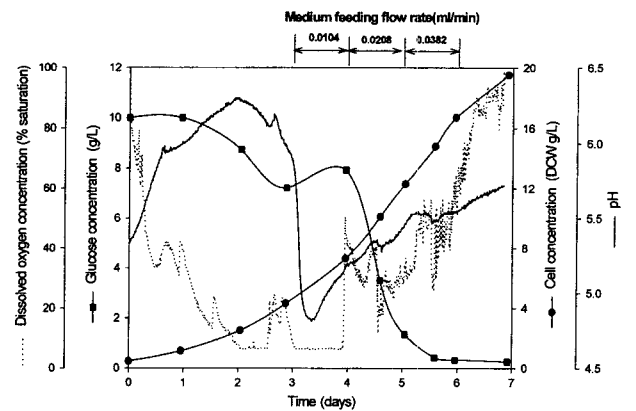


Fig. 6. Time-course profiles of DO, pH, cell and glucose concentration in *P. linteus* WI-001 intermittent fed batch fermentation.

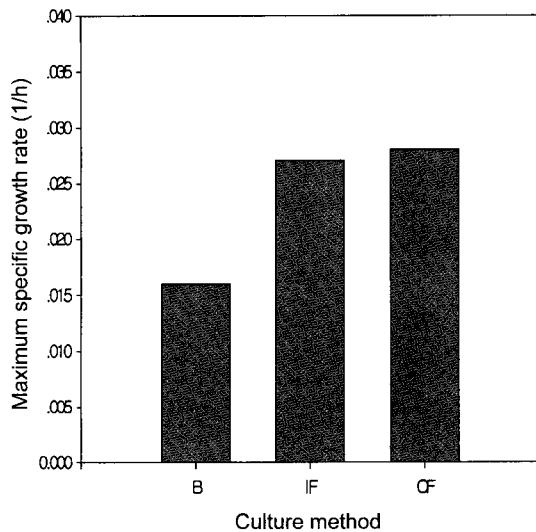


Fig. 7. Comparison of specific growth rate ( $\mu$ ) in *P. linteus* WI-001 fermentations with different culture method.

B; batch culture (initial glucose concentration, 2%)

IF; intermittent fed batch culture (total glucose concentration, 2%)

CF; continuous fed batch culture (total glucose concentration, 2%)

여 배양 3일째부터 배양 5일째까지 균사체 성장을 고려하여 3단계로 구분하여 지속적 feeding에 의해 균사체를 배양한 결과 최종 균사체량은 20 g/L였으며(Fig. 6), 회분식 배양 건조균사체 수율 14 g/L에 비해 약 42%의 수율이 향상되었다. 즉, 초기 glucose 농도를 1%로 조정하고 추가로 1%의 glucose를 간헐적 또는 지속적 방식으로 공급하였을 경우 초기부터 2% glucose 농도로 회분식 배양한 경우보다 약 28% 이상 수율이 증가되었다.

균사체 비성장속도 ( $\mu$ )를 조사하여 본 결과, 초기 glucose 농도 2%에서 회분식 배양하였을 경우 균사체 비성장속도 ( $\mu$ )는 약  $0.016 \text{ h}^{-1}$  이었으며, glucose의 간헐적 또는 지속적 공급에 의하여 유기식 배양하였을 경우에는 각각  $0.027 \text{ h}^{-1}$  및  $0.028 \text{ h}^{-1}$  로 조사되었다(Fig. 7). 즉, 초기 glucose 농도를 2%로 조정하여 회분식 배양한 경우보다 유기식 배양한 경우 균사체의 비성장속도 ( $\mu$ )가 약 60% 이상 증가되는 것으로 나타났다.

따라서 의약 산업적으로 각광을 받고 있는 상황에서는 배양학적 측면만을 고려하였을 경우 상당한 수율 향상을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

강력한 항암작용을 나타내는 단백다당체를 생산하는 *Phellinus linteus* WI-001 균주를 대상으로 배양학적 특성 및 초기 배양배지의 탄소원인 glucose 농도에 따른 균사체 생산성을 조사하였다. 배양중 최적 pH와 온도는 각각 5.5와  $28^\circ\text{C}$ 인 것으로 나타났다. 특히 pH의 경우 전 배양기간

에 걸쳐 5.5에서 6.5의 비교적 좁은 범위에서 변화하였다. 초기 glucose 농도를 0.5%, 1%, 2%, 3% 및 4%에서 균사체 생산량 및 세포비성장속도를 조사한 결과 최종 균사체 생산량은 glucose 농도가 증가할수록 높게 나타났으나, 세포비성장속도는 초기 glucose 농도에 반비례하였다. 따라서 비성장속도가 가장 빠르게 나타나는 초기 1% glucose 조건하에서 배양하다가 추가로 glucose를 간헐적 또는 지속적으로 공급하는 전략으로 생산성 향상을 시도하였다. 그 결과 회분식 배양에 비해 간헐적 공급방식에서는 28%, 지속적 공급방식에서는 42%의 수율이 증가되었다.

## 감사의 글

본 연구는 1998년도 산업자원부 산업기반기술개발사업으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Chen, W., C. Graham, and R. B. Ciccarelli, 1997. Automated fed-batch fermentation with feed-back controls based on dissolved oxygen (DO) and pH for production of DNA vaccines. *J. Indust. Microbiol. & Biotechnol.* **18**: 43-48.
- Collins, L. D. and A. J. Daugulis, 1997. Biodegradation of phenol at high initial concentration in two-phase partitioning batch and fed-batch bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 155-162.
- Ikekawa, T., M. Nakanishi, N. Uehara, G. Chihara and F. Fukuoka, 1968. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann.* **59**: 155-157.
- Jong, S. C., J. M. Birmingham, and S. H. Pai, 1991. Immunomodulatory substances of fungal origin. *J. Immunol. Immunopharmacol.* **11**: 115-122.
- Lee, J. H. 1994. Anti-tumor and immuno-stimulating activity of fungal polysaccharides. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 14-21.
- Lee, J. H., S. M. Cho, K. S. Song, S. B. Han, H. M. Kim, N. D. Hong and I. D. Yoo, 1996. Immunostimulating activity and characterization of polysaccharides from mycelium of *Phellinus linteus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 213-218.
- Nanba, H. and H. Kuroda, 1988. Potentiation of host-mediated antitumor activity by orally administered mushroom (*Agaricus bisporus*) Fruit bodies. *Chem. Pharm. bull.* **36**: 1437-1444.
- Park, Y. D., Y. K. Hong, W. K. Whang, J. D. Huh, and S. Park, 1989. Comparisons of protein-bound polysaccharide contents obtained from mycelial cultured broth and fruit body of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Mycol.* **17**: 223-228.
- Tshkagoshi, S. and F. Ohashi, 1974. Protein bound polysaccharide preparation, PSK, effective against mouse sarcoma-180 and ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann.* **65**: 557-558.
- Yang, B. K., Y. J. Jeon, S. C. Jeong, D. H. Kim, J. Y. Ha, J. W. Yun, D. H. Shon, G. I. Go, and C. H. Song, 1999.

Hepatoprotective effect of exo-polysaccharide Produced from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* WK-003 by using industrial grade medium. *Kor. J. Mycol.* **27**: 82–86.

11. Yamane, T., M. Fukunaga, and Y. W. Lee. 1996. Increased

PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer. *Bio-technol. Bioeng.* **50**: 197–202.

**(Received March 17, 2000)**

의 초기 탄소원 농도를 변화시켜 *P. linteus* WI-001의 균사체 성장을 관찰하였다. 초기 glucose 농도를 1%로 조절 한 배지에서의 균사체 건조중량은 약 10 g/L, 2% 농도의 배지에서 균사체 건조중량은 약 15 g/L, 4% 농도에서는 균사체 건조중량이 24 g/L로 나타났다(Fig. 3). 초기 탄소원 농도가 증가할수록 균사체 최종 생산량은 증가하는 양상을 보이지만, 균사체 성장속도는 초기 glucose 농도가 낮을 수록 빠른 양상을 보였다. Fig. 3의 결과를 토대로 초기 glucose 농도변화에 따른 균사체 비성장속도 ( $\mu$ )를 비교하여 보았다(Fig. 4). 초기 glucose 농도가 0.5% 및 1%일 경우 균사체 비성장속도 ( $\mu$ )는 각각 0.027 h<sup>-1</sup> 및 0.029 h<sup>-1</sup>로 나타났으며, 초기 glucose 농도가 2%, 3% 및 4%일 경우 균사체 비성장속도 ( $\mu$ )는 0.016 h<sup>-1</sup>, 0.015 h<sup>-1</sup> 및 0.013 h<sup>-1</sup>으로 나타났다. 이 결과로 볼 때 상황버섯 균사체 성장속도에 미

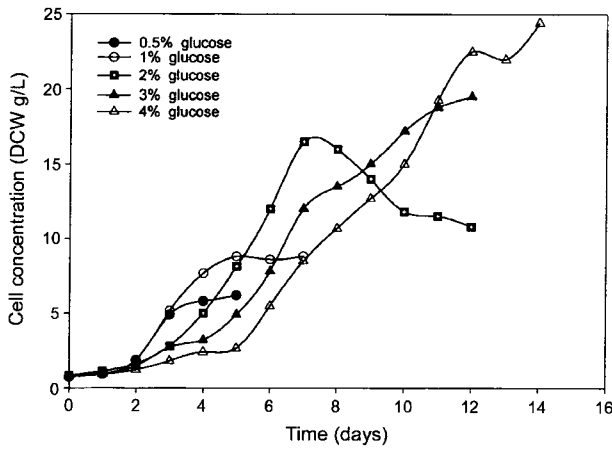


Fig. 3. Effect of different initial glucose concentration on cell growth in *P. linteus* WI-001 fermentations.

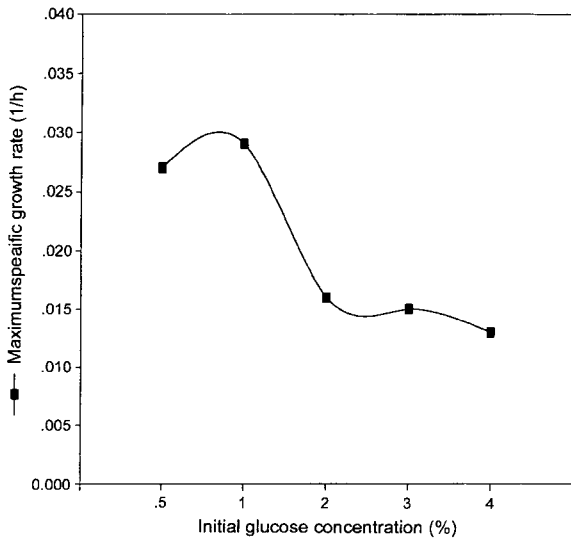


Fig. 4. Comparison of specific growth rate( $\mu$ ) in *P. linteus* WI-001 batch fermentations with different initial glucose concentration.

치는 초기 glucose 농도는 1%를 기준으로 큰 차이를 보이고 있다. 따라서 균사체가 활력있게 성장하기 위해서 초기 glucose 농도를 1% 이하로 조절하면 균사체 비성장속도 ( $\mu$ )는 0.027 h<sup>-1</sup> 이상을 유지할 수 있음을 제시하고 있다.

유기식 배양을 통한 *P. linteus* WI-001 균사체 생산성

버섯 균사체 배양을 통한 단백당당체 생산에 있어서 경제성을 확보하기 위해 Fig. 4의 결과를 토대로 균사체 생산량 증가 및 배양기간 단축을 위한 유기식 배양 (fed batch culture)을 시도하였다. 균사체 비성장속도가 가장 우수한 초기 1% glucose 조건하에서 배양하다가 탄소원 고갈에 따라 추가로 1% 농도의 glucose를 간헐적 공급방식 (intermittent feeding) 및 지속적 공급방식 (continuous feeding)에 의해 공급하였다. Glucose 추가 공급은 glucose 소모도를 예측하여 40% glucose stock을 배양 3일째부터 배양 5일째까지 24시간 간격으로 간헐적 feeding에 의해 균사체를 배양한 결과 최종 균사체량은 18 g/L였다(Fig. 5).

배양중 glucose 농도가 고갈되지 않는 조건을 기초로 하

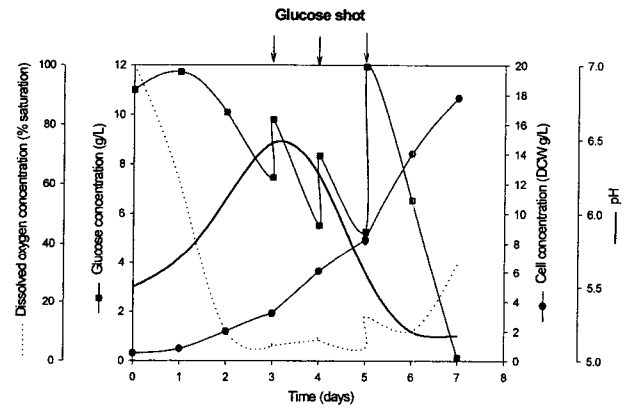


Fig. 5. Time-course profiles of DO, pH, cell and glucose concentration in *P. linteus* WI-001 intermittent fed batch fermentation.

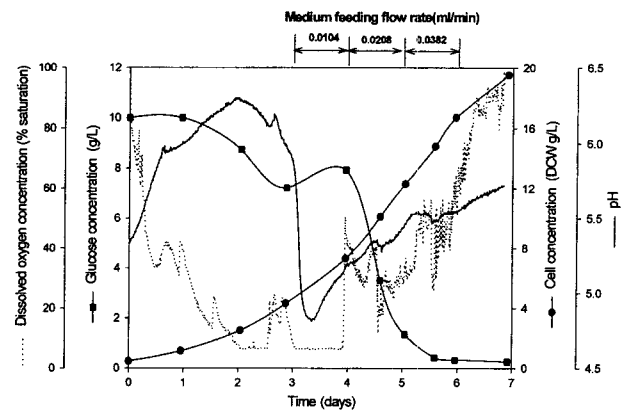


Fig. 6. Time-course profiles of DO, pH, cell and glucose concentration in *P. linteus* WI-001 intermittent fed batch fermentation.

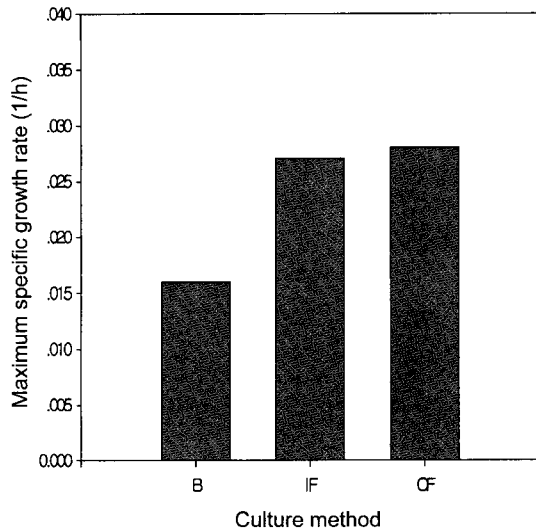


Fig. 7. Comparison of specific growth rate ( $\mu$ ) in *P. linteus* WI-001 fermentations with different culture method.

B; batch culture (initial glucose concentration, 2%)

IF; intermittent fed batch culture (total glucose concentration, 2%)

CF; continuous fed batch culture (total glucose concentration, 2%)

여 배양 3일째부터 배양 5일째까지 균사체 성장을 고려하여 3단계로 구분하여 지속적 feeding에 의해 균사체를 배양한 결과 최종 균사체량은 20 g/L였으며(Fig. 6), 회분식 배양 건조균사체 수율 14 g/L에 비해 약 42%의 수율이 향상되었다. 즉, 초기 glucose 농도를 1%로 조정하고 추가로 1%의 glucose를 간헐적 또는 지속적 방식으로 공급하였을 경우 초기부터 2% glucose 농도로 회분식 배양한 경우보다 약 28% 이상 수율이 증가되었다.

균사체 비성장속도 ( $\mu$ )를 조사하여 본 결과, 초기 glucose 농도 2%에서 회분식 배양하였을 경우 균사체 비성장속도 ( $\mu$ )는 약  $0.016 \text{ h}^{-1}$  이었으며, glucose의 간헐적 또는 지속적 공급에 의하여 유기식 배양하였을 경우에는 각각  $0.027 \text{ h}^{-1}$  및  $0.028 \text{ h}^{-1}$  로 조사되었다(Fig. 7). 즉, 초기 glucose 농도를 2%로 조정하여 회분식 배양한 경우보다 유기식 배양한 경우 균사체의 비성장속도 ( $\mu$ )가 약 60% 이상 증가되는 것으로 나타났다.

따라서 의약 산업적으로 각광을 받고 있는 상황에서는 배양학적 측면만을 고려하였을 경우 상당한 수율 향상을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

강력한 항암작용을 나타내는 단백다당체를 생산하는 *Phellinus linteus* WI-001 균주를 대상으로 배양학적 특성 및 초기 배양배지의 탄소원인 glucose 농도에 따른 균사체 생산성을 조사하였다. 배양중 최적 pH와 온도는 각각 5.5와  $28^\circ\text{C}$ 인 것으로 나타났다. 특히 pH의 경우 전 배양기간

에 걸쳐 5.5에서 6.5의 비교적 좁은 범위에서 변화하였다. 초기 glucose 농도를 0.5%, 1%, 2%, 3% 및 4%에서 균사체 생산량 및 세포비성장속도를 조사한 결과 최종 균사체 생산량은 glucose 농도가 증가할수록 높게 나타났으나, 세포비성장속도는 초기 glucose 농도에 반비례하였다. 따라서 비성장속도가 가장 빠르게 나타나는 초기 1% glucose 조건하에서 배양하다가 추가로 glucose를 간헐적 또는 지속적으로 공급하는 전략으로 생산성 향상을 시도하였다. 그 결과 회분식 배양에 비해 간헐적 공급방식에서는 28%, 지속적 공급방식에서는 42%의 수율이 증가되었다.

## 감사의 글

본 연구는 1998년도 산업자원부 산업기반기술개발사업으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Chen, W., C. Graham, and R. B. Ciccarelli, 1997. Automated fed-batch fermentation with feed-back controls based on dissolved oxygen (DO) and pH for production of DNA vaccines. *J. Indust. Microbiol. & Biotechnol.* **18**: 43-48.
- Collins, L. D. and A. J. Daugulis, 1997. Biodegradation of phenol at high initial concentration in two-phase partitioning batch and fed-batch bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 155-162.
- Ikekawa, T., M. Nakanishi, N. Uehara, G. Chihara and F. Fukuoka, 1968. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann.* **59**: 155-157.
- Jong, S. C., J. M. Birmingham, and S. H. Pai, 1991. Immunomodulatory substances of fungal origin. *J. Immunol. Immunopharmacol.* **11**: 115-122.
- Lee, J. H. 1994. Anti-tumor and immuno-stimulating activity of fungal polysaccharides. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 14-21.
- Lee, J. H., S. M. Cho, K. S. Song, S. B. Han, H. M. Kim, N. D. Hong and I. D. Yoo, 1996. Immunostimulating activity and characterization of polysaccharides from mycelium of *Phellinus linteus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 213-218.
- Nanba, H. and H. Kuroda, 1988. Potentiation of host-mediated antitumor activity by orally administered mushroom (*Agaricus bisporus*) Fruit bodies. *Chem. Pharm. bull.* **36**: 1437-1444.
- Park, Y. D., Y. K. Hong, W. K. Whang, J. D. Huh, and S. Park, 1989. Comparisons of protein-bound polysaccharide contents obtained from mycelial cultured broth and fruit body of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Mycol.* **17**: 223-228.
- Tshkagoshi, S. and F. Ohashi, 1974. Protein bound polysaccharide preparation, PSK, effective against mouse sarcoma-180 and ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann.* **65**: 557-558.
- Yang, B. K., Y. J. Jeon, S. C. Jeong, D. H. Kim, J. Y. Ha, J. W. Yun, D. H. Shon, G. I. Go, and C. H. Song, 1999.



Hepatoprotective effect of exo-polysaccharide Produced from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* WK-003 by using industrial grade medium. *Kor. J. Mycol.* **27**: 82–86.

11. Yamane, T., M. Fukunaga, and Y. W. Lee. 1996. Increased

PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer. *Bio-technol. Bioeng.* **50**: 197–202.

**(Received March 17, 2000)**