

## 영지 액체 배양의 Wall Growth에 미치는 Polyacrylic Acid의 첨가 효과

### Effect of Polyacrylic Acid Addition on Wall Growth in Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum*

이 신 영\* 이 학 수\*\*  
Lee, Shin-Young Lee, Hak-Su

#### Abstract

This study was carried out to screen the effective polymeric additives preventing wall growth during mycelial submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*. Effects of additives on mycelial growth and exo-polysaccharide (EPS) production in flask culture and jar fermenter system under 3 different pH processes were investigated, and changes of mycelial morphology were also examined. From flask culture of *G. lucidum* with additives of different concentrations, 0.1%(w/v) polyacrylic acid was effective for EPS production. As the polyacrylic acid of 0.1%(w/v) was added in medium, wall growth of *G. lucidum* mycelium grown in jar fermenter system could be protected. The addition of 0.1%(w/v) polyacrylic acid to medium was also improved the mycelial growth and EPS production in the later of submerged culture of *G. lucidum* and no changes of mycelial morphology were observed.

키워드 : 영지, 벽면생육, polyacrylic acid, 심부배양, 소형발효조 시스템

Key words: *Ganoderma lucidum*, wall growth, polyacrylic acid, submerged culture, jar fermenter system.

#### 1. 서론

대부분의 균류들은 진탕 배양 시에 pellet 또는 filament 균사를 형성하는데, 담자균류들도 다양한 크기의 균사 응집체를 형성하며, 이러한 균사의 응집으로 인하여 심각한 wall growth가 발생한다. 특히, jar fermenter system에서는 교반날개나 방해판 및 각종 sensor에 부착하여 생육하는 이들 wall growth의 동반으로 교반 및 통기에 의한 물질전달을 어렵게 하고, 이로 인하여 균사 생육 및 생성물의 생산이 저해되는 문제점이 발생한다(1).

그 동안 저자 등은 이러한 문제점의 해결 방안

으로서 air-lift fermenter를 일부 사용하여 왔으나 (2,3), air lift fermenter의 이용 여건은 아직은 미흡한 실정이다. 따라서 jar fermenter에서의 배양이 불가피한 경우가 대부분인데, 이 때는 wall growth의 방지수단이 강구되어야 한다. 큰 규모의 fermenter에서는 wall growth breaker가 부착되어 있으나 적은 규모의 jar fermenter 배양에서는 이 wall growth의 방지수단으로 그 동안 natural polymer (alginate, starch, dextran), modified polymer (carboxymethyl cellulose) 및 synthetic polymer (carboxypoly-methylene, polyvinyl pyrrolidone, polyacrylic acid) 등이 널리 사용되어 왔다(1). 그 중 polyacrylic acid와 sodium polyacrylate의 효과가 비교적 뛰어난 것으로 알려져 있으나 최근 널리 실시되고 있는 영지 등 버섯

\* 강원대학교 환경생물공학부 교수, 공학박사

\*\* 동방미래화학 기술연구소, 연구원

류의 액체배양에는 보고된 바가 없어 이에 대한 검토의 필요성이 높은 편이다.

그러므로 본 연구에서는 jar fermenter system을 이용한 영지 액체배양에 의한 효율적인 세포의 다량 생산 공정의 개발 연구 일환으로, wall growth 방지법의 확립을 목표로 polyacrylic acid와 sodium polyacrylate의 첨가 효과를 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 균주 및 보존

본 연구에서 사용한 균주는 *Ganoderma lucidum* ASI 7004이다. P.D.A. (potato dextrose agar) 평판 배지에서 30°C로 7일간 배양한 후 4°C에서 보존하였고, 3개월마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

### 2.2. 배지 조성

본 실험에서 종균 배양에 사용한 배지는 *Ganoderma applanatum*에 대해 보고된 진탕배양용 배지이며(4), 본 배양에는 이 등(3)이 *G. lucidum*의 액체배양에 의한 세포의 다량 생산의 최적 배지로 보고한 배지를 사용하였다. 배지는 121°C에서 15분간 가압 살균 후 사용하였고, 살균시 염의 침전을 방지하기 위하여 탄소원, 질소원, 무기염류는 각각 분리 살균한 후 혼합하여 사용하였다. pH는 필요시 1N NaOH 또는 1N HCl로 조절하였다.

### 2.3. 배양

P.D.A. 평판배지에서 생육한 균사체를 직경 5mm의 stainless steel pipe로 mycelium disk를 만든 다음, 이 disk 4-5개를 50ml의 배지를 넣은 250ml 삼각 플라스크에 접종하였다. 30°C에서 7일간 배양한 다음 전 배양액으로 하였다. Flask 배양은 종균용 배지 50ml를 함유한 250ml의 삼각 플라스크에 5%(v/v)의 전 배양액을 접종하였고, 30°C에서 100rpm으로 5일간 진탕배양하였다. 이 때 전 배양액은 균질기(동양(주), model 0820)로 30초 동안 균질화시켜 본 배양의 접종용으로 사용하였고, 매 실험마다 새로이 배양하여 사용하였다.

한편, 발효조 배양은 2.6L의 jar fermenter (Marubishi, MD-250)에서 전배양액을 5%(v/v)로 접종하여 온도 30°C, 3가지의 pH 조건(초기 pH 6.0, 일정 pH 6.0 및 배양 6시간 후 pH를 3에서 6으로 조정하는 pH shift)(6), 배지액량 1.5L, 통기속도 1vvm 및 교반속도 400rpm의 배양 조건으로 실시하였다. pH는 필요시 1N HCl 또는 1N NaOH를 사용하여 조절하였고, 통기로 인하여 발생한 거품은 Antifoam 289(Sigma Co.)를 사용하여 제거하였다. 이 때 균사체 생육으로 인한 wall growth를

방지하기 위하여 polymer인 polyacrylic acid와 sodium polyacrylate(Wako Chemical Co.)를 0.1%(w/v)를 첨가하여 균사의 생육, 형태변화 및 세포의 다량의 생성량의 변화를 조사하였다.

### 2.4. 균사체, 세포의 다량 및 잔존 당의 정량

균체량은 배양액을 10,000×g에서 15분간 원심분리하고 침전된 균사체를 filter paper (No. 2, Whatman)로 여과한 다음, 증류수로 2~3회에 걸쳐 수세하였고, 70°C에서 24시간 건조한 후, desiccator에서 향량이 될 때까지 방치하면서 건조중량 (mycelial dry weight, MDW)을 측정하여 정량하였다.

또한, 세포의 다량은 원심분리 (10,000×g, 15분)하여 균사체를 제거한 후 얻어진 배양 여액에 2배량의 acetone을 가하여 침전물로 얻었으며, 이를 70°C에서 24시간 건조한 다음중량을 측정하여 조다당 (crude exo-polysaccharide)로 정량하였다. 또 배양액 중의 잔존 glucose의 농도는 DNS (dinitrosalicylic acid) 법(7)을 이용하여 575nm에서 흡광도를 구한 후, 각각 표준곡선으로부터 환산하여 구하였다.

### 2.5. 균사체의 형태 관찰

균사의 형태 관찰을 위하여 시료 1ml를 무작위로 취한 다음, 동량의 고정화 용액(13ml 40% formaldehyde + 5ml glacial acetic acid + 200ml 50% ethanol)으로 고정시켜 10배로 희석한 후, glass cube(가로 4cm×세로 3cm×높이 1.5cm)의 시료로 사용하였다(8). 균사체 형태는 image capturing board를 사용하여 PC에 연결한 image analysis system(Optimas Co., U.S.A)으로 관찰하였다(9).

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. Wall growth 방지용 첨가제의 선정

0.05-0.3%(w/v) 범위의 농도를 달리한 polyacrylic acid와 sodium polyacrylate의 첨가가 균사체 생육 및 세포의 다량 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 플라스크 배양으로 검토하였으며, 그 결과는 Fig. 1과 같다. 그림에서 보는 바와 같이, 두 첨가제 모두 균사체 생육에는 농도에 상관없이 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 EPS 생성에 있어서는 polyacrylic acid의 첨가 효과가 sodium acrylate보다 다소 우수하였고, 특히 0.1% polyacrylic acid 첨가구에서 균체량 및 다량의 생성이 가장 우수하였다.

0.1% polyacrylic acid의 첨가는 균사체 생육 및 세포의 다량 생산에 positive 효과를 나타내었으며

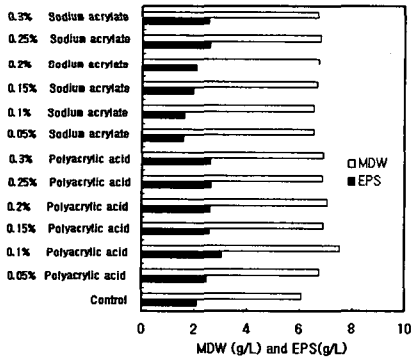


Fig. 1. Effect of polymer addition on the MDW and EPS production of *G. lucidum*.

로 이를 jar fermenter system에 적용하였다. Fig. 2는 jar fermenter에서 회분배양 종료 후 0.1% polyacrylic acid의 첨가구와 무첨가구의 wall growth를 비교한 결과로, 0.1% polyacrylic acid의 첨가구는 대조구에 비하여 현저하게 wall growth를 방지된 것을 볼 수 있었다.

### 3.2. 균사체 생육 및 다당 생성에 미치는 polyacrylic acid의 첨가 영향

Fig. 3은 서로 다른 3가지 pH process하의 jar fermenter system에서 0.1% polyacrylic acid 첨가 시 균사체량의 변화를 나타낸다. 초기 pH 6일 때 (uncontrolled pH process) polyacrylic acid 무첨가구의 균체량은 배양 4일 후 거의 일정하였으나, 첨가구의 경우는 배양말기까지 계속 증가하여 균체량 5.84g/L의 최대값을 얻었다. 또한 pH를 조절한



Fig. 2. Photographic view of fermenter grown batch culture of *Ganoderma lucidum* in medium with (left) and without (right) polyacrylic acid (0.1%, w/v).

경우(controlled pH 또는 bistaged pH shift process)는 균체량이 다소 감소하였지만 polyacrylic acid 첨가구의 경우가 첨가하지 않은 대조구의 경우보다 다소 높은 균체량을 나타내어 polyacrylic acid의 첨가가 pH의 변화에 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 아울러 Fig. 4에서 보는 바와 같이, 다당의 생성도 polyacrylic acid를 첨가한 경우에 약 1.1~1.3배의 다소 높은 값을 나타내어 positive effect를 나타내었고, pH의 변화에도 영향을 받지 않았으며, 자료로는 나타내지 않았지만 기질의 소비에서도 다소 높거나 비슷한 결과를 나타내었다. 따라서, polyacrylic acid의 첨가는 배양 시 pH 변화에 영향을 주지 않으며, 또한 균체량 및 다당의 생산도 다소 증가시키는 역할을 하는 것으로 판단하였다.

*Penicillium chrysogenum*의 경우는 PVP(poly-

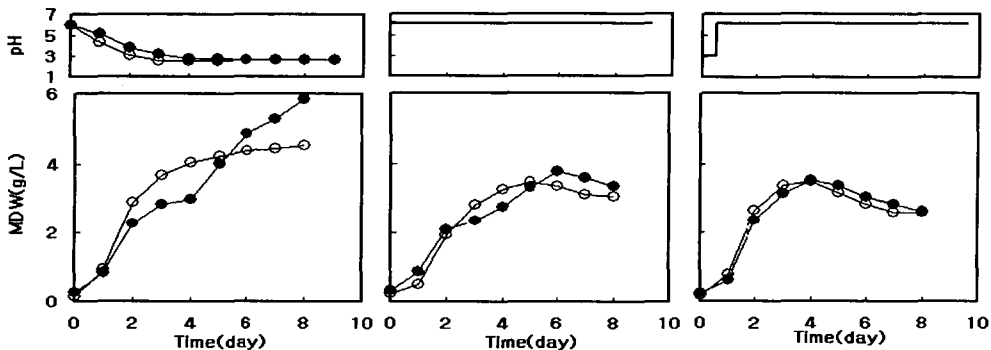


Fig. 3. Effect of polymer addition on the MDW of *G. lucidum* under different pH processes.

● : 0.1% polyacrylic acid      ○ : Control

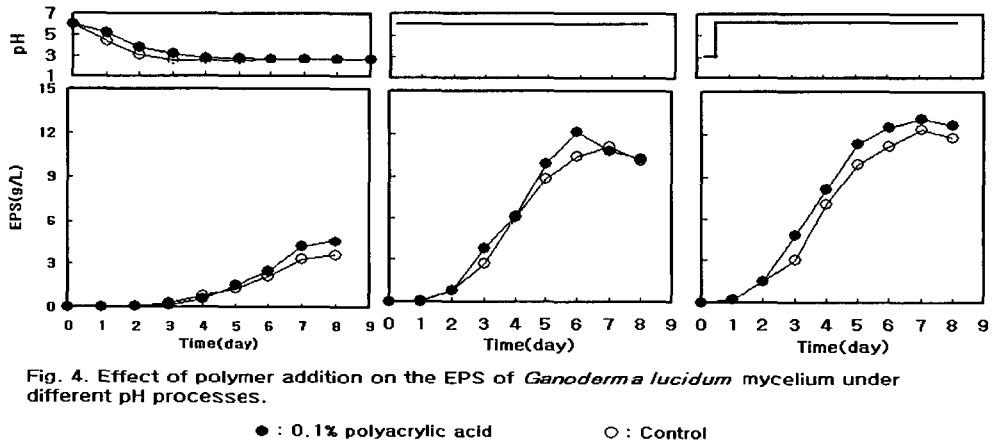


Fig. 4. Effect of polymer addition on the EPS of *Ganoderma lucidum* mycelium under different pH processes.

● : 0.1% polyacrylic acid      ○ : Control

vinylpyrrolidone)의 첨가로 생성된 penicillin 농도가 약 40% 증가되며, *Rhizopus*와 *Aspergillus*의 경우는 CMC (carboxy-methylcellulose)의 첨가에 의해 amylase의 활성이 1.5~1.8배 정도 증가하는 것으로 보고되었다(9).

3.3. 균사 형태에 미치는 polyacrylic acid의 첨가 영향  
서로 다른 3가지 pH process에서 0.1% polyacrylic acid의 첨가 시 균사형태의 변화를 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. Polyacrylic acid 첨가구는 첨가하지 않은 대조구의 경우와 큰 차이를 보이지 않았으며, 단지 pH 변화의 차이만을 보였다. Bi-staged pH로 배양한 경우에는 uncontrolled pH process나 controlled pH process의 경우보다 더

많은 양의 다당을 생성하였고, 기 보고한 air-lift fermenter 배양에서의 결과와 잘 일치하였다(3,10).

특히, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata* 및 *Phlebia gigantea*에서는 polyacrylic acid의 첨가 시 균사가 필라멘트 형태로, 그리고 *Bjerkandera adusta*, *Coprinus cinereus* 및 *Pleurotus ostreatus*에서는 작은 펠렛 형태로 생육함이 보고되었는데(1), 본 실험의 균주인 영지의 경우는 polyacrylic acid 첨가로 거의 형태 변화를 보이지 않는 특징을 나타내었다.

따라서 polyacrylic acid의 첨가는 영지 액체배양의 wall growth의 방지 수단으로 사용할 수 있으며, 대수기를 연장시켜 균체량 및 다당 생성을 향상시킬 수 있는 효과가 있음을 확인하였다.

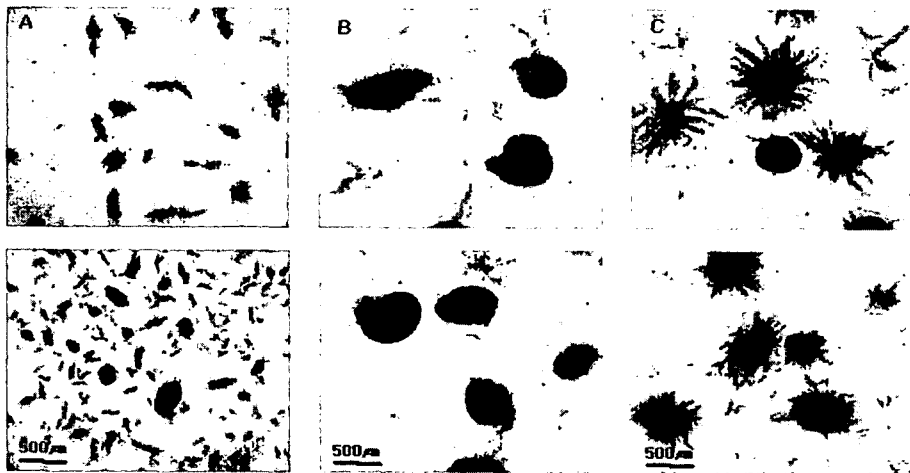


Fig. 5. Morphological forms of *G. lucidum* mycelium cultured without (top) and with 0.1% polyacrylic acid addition (bottom) under different pH processes (after 8 day of batch cultivation).

A : uncontrolled pH 6 B : controlled pH 6 C : bi-staged pH (shift from pH 3 to 6)

#### 4. 결 론

영지의 액체배양 시 효율적으로 wall growth를 방지하는 첨가제 (polyacrylic acid 및 sodium acrylate)를 탐색하기 위한 연구를 수행하였다. 플라스크 및 서로 다른 3가지 pH process하의 jar fermenter system에서 균사체 생육 및 세포의 다당 생성에 미치는 첨가제의 영향을 검토하였고, 균사 형태의 변화도 조사하였다. 첨가제 농도를 달리한 플라스크 배양 실험 결과, 0.1% polyacrylic acid의 첨가가 세포의 다당 생산에 가장 효과적이었다. 또 3가지 pH process하의 jar fermenter system에서 액체배양한 결과, 0.1% polyacrylic acid의 첨가는 현저한 wall growth의 방지 효과를 보였다. 이 때 0.1% polyacrylic acid의 첨가는 배양 중 균사의 형태를 변화시키지 않았으며, 배양 말기 균사체 생육 및 세포의 다당의 생산을 다소 증가시켰다.

#### 참고문헌

- [1] Jones, P., Shahab, B. A., Trinci, A. P. J. and Moore. D., Effect of Polymeric Additives, especially Junlon and Hostacerin, on Growth of Some Basidiomycetes in Submerged Culture. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **90**(4), 577-583(1988)
- [2] Lee, S. Y., Kang, T. S., and Lee, M. C., Condition of Exopolysaccharide Production from Submerged Mycelial Culture of *Ganoderma lucidum* by Using Air-Lift Fermenter System. *Kor. J. Biotech Bioeng.*, **13**(5), 547-553(1998)
- [3] Lee, K. M., Lee, S. Y., and Lee, H. Y., Bistage Control of pH for Improving Exopolysaccharide Production from Mycelia of *Ganoderma lucidum* in an Air-lift Fermentor. *J. Biosci. Bioeng.*, **88**(6), 646-650(1999)
- [4] Sone, Y., Okuda, R., Wada, A., Kishida, A. and Misaki, A., Structures and Antitumor Activities of the Polysaccharides Isolated from Fruiting Body and the Growing Culture of Mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.*, **49**(9), 2642-2650(1985)
- [5] Lee, S. Y. and Kang, T. S., Production Conditions and Characterization of Exopolysaccharide Produced by Submerged Cultivation of *G. lucidum* Mycelium. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**(1), 111-118(1996)
- [6] Miller, G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chem.* **31**, 426-428 (1959)
- [7] Packer, H. L. and Thomas, C. R., Morphological Measurements on Filamentous Microorganism by Fully Automatic Image Analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 870-881 (1990)
- [8] Cox, P. W. and Thomas, C. R., Classification and Measurement of Fungal Pellets by Automated Image Analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**(9), 945-952 (1992)
- [9] Metz. B. and Kossen, N. W. F., Biotechnology Review : The Growth of Molds in the Form of Pellets. *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 781-799(1977)
- [10] Lee, S.Y. and Lee, K.M., Effect of Different pH Processes on Branched  $\beta$ -1,3-Glucan Production from Submerged Culture of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Industrial Technology*, Kangwon National Univ., Korea, No. 20, 45-50(2000)