

## *Agaricus blazei*의 유가식 배양을 통한 균사체 및 세포외 다당체 생산

김 현 한 · <sup>1</sup>나 정 걸 · † 장 용 근 · <sup>1</sup>이 상 종  
한국과학기술원 생명화학공학과, <sup>1</sup>(주)에스티알 바이오텍  
(접수 : 2004. 11. 23., 게재승인 : 2004. 12. 23.)

### Production of Mycelium and Exopolysaccharides by Fed-batch Culture of *Agaricus blazei*

Hyun Han Kim, Jeong-Geol Na<sup>1</sup>, Yong Keun Chang<sup>†</sup>, and Sang Jong Lee<sup>1</sup>  
Department of Chemical and Biomolecular Engineering,  
Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), Daejeon 305-701, Korea  
<sup>1</sup>STR Biotech CO., Ltd, Hi-Tech Venture Town, Chuncheon 200-160, Korea  
(Received : 2004. 11. 23., Accepted : 2004. 12. 23.)

DO-stat fed-batch cultures of *Agaricus blazei* were carried out using various feeding solutions, for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides (EPS). It was observed to be more effective to use a feeding solution containing both carbon and nitrogen sources than that containing only carbon source. The best result was obtained when a feeding solution containing 450 g/l glucose, 60 g/l yeast extract, 30 g/l soytone peptone was used. The maximum mycelial biomass and EPS concentrations were 36.5 g/l and 10.9 g/l, respectively, at 100 hours of cultivation. The mycelial and EPS productivities were 0.37 g/l-h and 0.11 g/l-h, respectively. As compared with the batch culture, the mycelial biomass concentration and its productivity were 6.0- and 2.2-folds increased, respectively. The EPS concentration and its productivity were increased by 4.7 times and 1.8 times, respectively.

**Key Words :** *Agaricus blazei*, Fed-batch culture, Exopolysaccharides production

#### 서 론

현대의학의 발전에도 불구하고 최근 심장질환, 암질환 등과 같은 각종 질병의 발생률 및 이로 인한 사망률은 오히려 증가하는 경향을 나타내고 있어 국내외적으로 채소, 과일, 곡류 등 천연물을 이용한 약품 및 기능성 식품의 개발에 많은 관심이 고조되고 있다(1, 2).

특히, 질병의 치료 및 예방에 효과가 있는 천연물 중 가장 주목받고 있는 버섯은 분류학상 균류 (Fungi) 중 진균류 (Eumycetes)에 속하며 대부분은 담자균류 (Basidiomycetes)의 일종이다. 이러한 버섯은 단백질, 아미노산, 비타민, 무기염류, 당 등과 같이 인체에 중요한 각종 영양성분을 함유하고 있고 광범위한 약리작용을 가지고 있어 전통적으로 민간약 제제로 널리 활용되어 왔다. 최근에 와서 여러 중

류의 버섯 자실체 및 균사체 배양물들의 항암활성효과가 과학적으로 입증됨에 따라 건강식품이나 의약품으로써의 용도가 크게 증가하고 있는 실정이다(3). 이러한 버섯의 항암활성효과를 나타내는 주요 성분은 버섯 속에 함유되어 있는  $\beta$ -D-글루칸 (glucan) 다당체로써 일반적으로  $\beta$ -1,3-글루칸의 골격에  $\beta$ -1,6의 가지구조를 갖는다. 현재까지의 연구결과에 의하면 신령버섯 (*Agaricus blazei*)으로부터 생산된 다당체의 항암활성효과는 지금까지 밝혀진 다른 담자균류 유래 다당체보다 가장 월등한 것으로 알려져 있다(4).

신령버섯 유래 다당체는 자실체, 균사체, 그리고 배양액에 포함되어 있다. 그러나 현재까지 신령버섯에 대한 대부분의 연구는 고체배양을 통하여 얻어진 자실체 추출물의 약리작용 및 약효성분, 구조분석에 관한 것이 주를 이루고 있을 뿐 액체배양을 통하여 균사체를 대량으로 배양하고 이로부터 다당체를 추출하는 동시에 발효액 중의 세포외 다당체를 회수하는 것에 관한 연구는 부족한 실정이다(5). 자실체의 고체배양에 의해 다당체를 생산하는 방법은 대량생산 시 품질관리가 힘들며 자실체 재배를 위한 많은 노동력과 시간이 요구됨에 따라 생산성도 떨어지는 단점이 있다(6). 그러나 균사체 액체배양에 의해 다당체를

† Corresponding Author : Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon 305-701, Korea  
Tel : +82-42-869-3927, Fax : +82-42-869-3910  
E-mail : ychang@kaist.ac.kr

생산하는 방법은 기존의 자실체 고체배양을 통해 생산하는 방법에 비해 잘 규명된 조건하에서 대량 생산이 가능하며 배양기간 또한 단축시켜 생산성을 높일 수 있는 장점이 있다. 균사체의 열수 추출에 의한 다당체 회수는 자실체의 경우와 마찬가지로 추출수율이 낮고 에너지 소모가 크며 고형폐기물 발생 등의 환경오염 유발 요인을 갖는다. 반면 세포의 다당체는 배양여액으로부터 추출과정 없이 간단한 비용매 침전 과정만을 통하여 분리할 수 있으므로 매우 경제적으로 생산될 수 있다. 따라서 균사체 배양시, 균사체는 물론 세포의 다당체의 생산을 극대화하는 것이 바람직하다.

현재 국내 및 국외에서는 신령버섯의 액체배양에 의한 대량 생산 체제를 갖추는데 필요한 연구는 부족한 실정이다. 이에 본 연구진은 선행연구를 통하여 신령버섯의 액체배양을 위한 물리화학적 환경조건 (pH, 접종량, 배지조성, 용존산소농도 등)을 최적화하였다(7, 8, 9).

본 연구에서는 앞선 선행연구 결과를 바탕으로, 신령버섯의 유가식 배양에 있어서 기질 공급액 조성을 최적화함으로써 균사체 및 세포의 다당체 생산을 극대화하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 보존

본 연구에 사용한 균주는 담자균류의 일종인 신령버섯 (*A. blazei*)이며 (주)에스티알 바이오텍으로부터 제공받았다. 제공받은 liquid stock 10 ml을 40 ml의 M1 배지(Table 1)가 담긴 250 ml 삼각플라스크에 접종하여 5일간 배양한 후, 이 중 10 ml을 동일 배지 90 ml가 담긴 500 ml 삼각플라스크에 접종하여 2일간 추가 배양하였다. 균질화한 배양액 8 ml을 멸균된 50% glycerol 2 ml와 혼합한 후 -80°C에서 동결 보관하였다. 이 보관 균주를 추후 실험에 사용하였다.

Table 1. Media composition

Components	Concentration [g/l]		
	M1	M2	M3
Glucose	10	3	3
Dextrin	40	12	12
Yeast extract	4	2	2
Soytone peptone	2	1	1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.6	0.6	0.6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	2	2
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0002	0.0002	0.0002
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O			0.5

### 배지

종균 배양, 회분식 배양, 그리고 유가식 배양을 위해 사용된 배지는 각각 M1, M2, 그리고 M3 배지이며 그 조성은 Table 1과 같다. 배지 성분 중 당과 무기염류는 열멸균 시 발생하는 침전과 갈변현상을 방지하기 위해 농축 제조한 후 121°C, 1.2기압에서 15분간 멸균하였고, 이를 무균상태에서 나머지 성분들을 포함하는 배지와 혼합하여 사용

하였다.

### 종균 배양

1차 종균 배양을 위해, 동결보관 중인 10 ml stock을 40 ml의 M1 배지가 담긴 250 ml 삼각플라스크에 접종한 후 진탕배양기 (KMC 8480SF, Vision Scientific Co., Korea)에서 28°C, 150 rpm으로 5일간 배양하였다. 1차 종균 배양 후 배양액 10 ml을 동일 배지 90 ml가 담긴 500 ml 삼각플라스크에 접종한 후 28°C, 150 rpm으로 2일간 추가 배양하였고, 배양액을 약 10초간 균질화한 후 본 배양의 접종액으로 사용하였다.

### 회분식 배양

회분식 배양에 사용된 발효기는 7 L 하부형 반응기 (LA-150, KoBiotech Co., Korea)이며 이에 데이터 수집 및 제어 프로그램 (Autolab LK 930, Lokas automation Co., Korea)을 연결시켜 자동화하였다. 산소 공급을 위해 여과 필터를 거친 압축 공기를 발효기 안으로 주입하였으며 통기량은 1 vvm으로 조절해 주었다. 회분식 배양시 조업부피는 3 L, 접종량은 10% (v/v), 배양온도는 28°C이었다. 배양액 중 pH는 2 N HCl과 2 N NH<sub>4</sub>OH를 사용하여 5.0으로 조절해 주었다. 용존산소농도 (DO)는 20%로 조절하였다.

### 유가식 배양

초기 조업부피는 3 L이었고, 접종량은 10% (v/v)였으며, 배양온도는 28°C이었다. 통기량과 DO는 각각 1 vvm과 20%로 유지해 주었다.

유가식 발효 공정 제어방법으로는 되먹임 제어방법의 일종인 DO-스텝 (DO-stat)을 사용하였다. 배지 중의 영양분이 고갈되면 용존산소농도가 일시적으로 증가하므로 이를 설정치인 20%에 유지하기 위해 교반속도가 감소하게 된다. 이렇게 교반속도가 감소하는 시점에서 기질 공급액 100 ml를 공급해 주었다. 세 가지 종류의 기질 공급액이 사용되었으며 각각의 1 L당 조성은 다음과 같다. i) 포도당, 90 g; 덱스트린, 360 g. ii) 포도당, 90 g; 덱스트린, 360 g; 효모 추출물, 60 g; soytone peptone, 30 g. iii) 포도당, 450 g; 효모 추출물, 60 g; soytone peptone, 30 g.

### 분석방법

균사체 농도는 건조 중량을 구하여 측정하였다. 건조 중량 측정을 위해, 균사체 배양액을 여과지 (Whatman #1, Whatman Inc., NJ)로 여과하여 균사체를 회수하였다. 회수된 균사체를 증류수로 2회 세척한 후 미리 무게를 잰 은 박접시에 담아 80°C 건조오븐 (drying oven)에서 항량이 될 때까지 약 24시간 건조한 후 무게를 측정하였다. 배양액 중에 남아있는 포도당 농도를 측정하기 위하여 균사체를 제거한 여과액 10 ul를 glucose analyzer (YSI 2700, Yellow Springs Instruments Co., OH)에 주입하여 정량분석하였다. 세포의 다당체 농도를 측정하기 위하여 균사체를 제거한 여과액을 HPLC (P626, Waters Co., MA)로 분석하였다. 사용한 컬럼은 Ultrahydrogel™ 1000 (0.78 × 30 cm, Waters Co., MA)이었으며, 이동상인 물의 유량은 0.6 ml/min이었다. 검

출기로는 ELSD (SEDEX 75, Sedere Co., France)를 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 회분식 배양

본 연구진의 선행연구(7, 9)에서 최적화된 환경에서 행한 회분식 배양 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 배양 12시간까지 덱스트린의 분해가 활발히 일어나 포도당 농도가 높아졌으며 이후 급격하게 감소하기 시작하였다. 이 때를 전후하여 세포의 다당체 생산이 시작되었다. 배양 12시간까지의 세포의 비증식속도는  $0.10 \text{ h}^{-1}$ 이었다. 포도당이 고갈된 36시간에서의 최대 균사체 및 세포의 다당체 농도는 각각 6.1 g/l, 2.3 g/l를 나타내었다. 교반속도는 활발한 균사체 성장에 따른 산소요구량의 증가로 인하여 배양 36시간까지 점차적으로 증가하였으며, 이후 포도당의 고갈로 인한 산소요구량의 감소로 인하여 급격히 감소하기 시작하였다. 또한 배양 말기에 세포의 다당체가 분해되어 그 농도가 크게 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 장기간 배양된 균사체의 경우 배지로 분비된 수용성 다당체의 양이 감소된다는 Bush의 연구결과와 일치하기도 하는바, 배양 말기 세포의 다당체가 감소하는 이유는 균사체로부터 (1-3)- $\beta$ -글루카네이즈((1-3)- $\beta$ -glucanase)가 분비되어 세포의 다당체를 분해시키고 이 때의 분해산물들은 세포 벽성 다당체 합성에 재사용되기 때문이다(10).

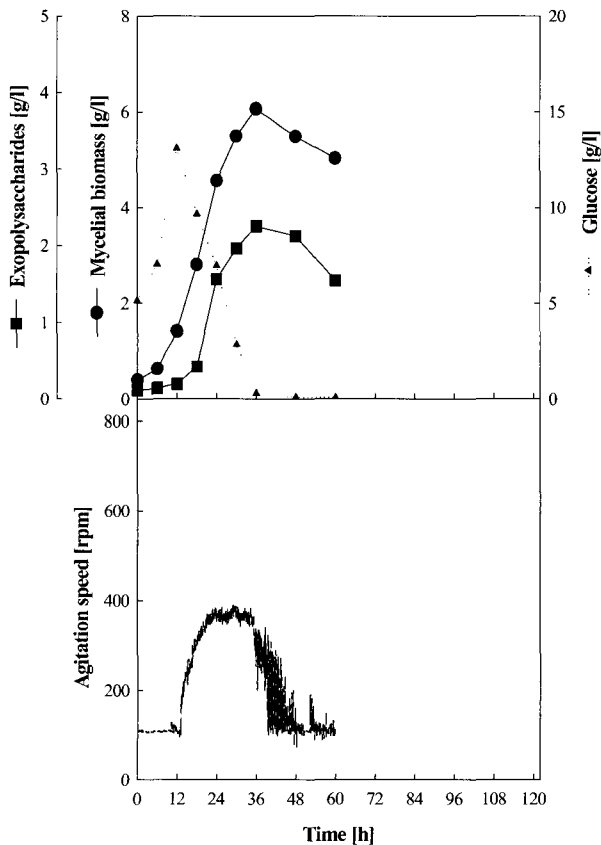


Figure 1. Time profiles of mycelial growth and EPS production in batch culture of *A. blazei*.

#### 유가식 배양

전술한 바와 같이 탄소원이 완전 고갈됨에 따라 산소 요구량이 감소하면서 용존산소농도는 증가하였고 이를 20%로 조절하기 위해 교반속도는 즉시 감소하였다. 이에 본 연구에서는 교반속도가 감소하는 시점에서 기질을 일정량 공급해 주는 DO-스텝 유가식 배양을 수행하였다.

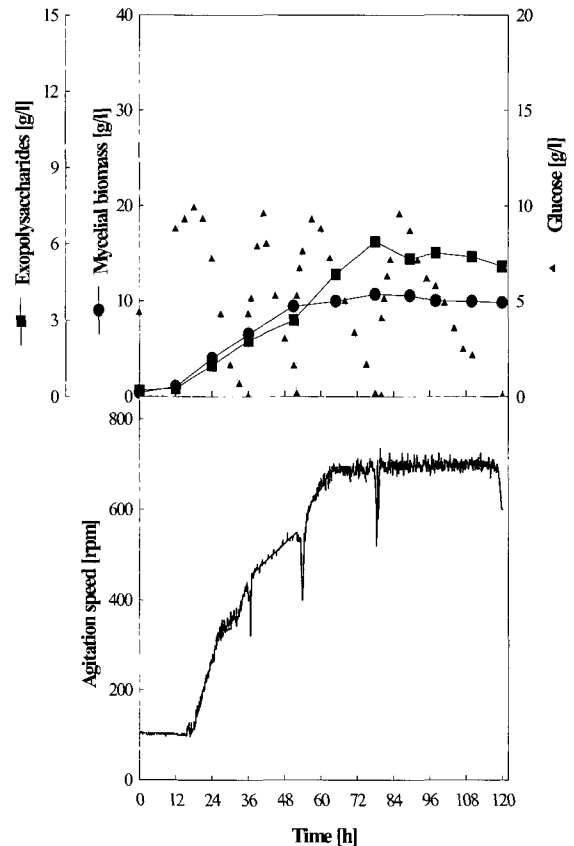


Figure 2. Time profiles of mycelial growth and EPS production in fed-batch culture of *A. blazei* (Feeding solution composition: glucose, 90 g/l; dextrin, 360 g/l).

일반적으로 세포의 다당체를 생산하는 담자균류에 있어서 세포의 다당체 생산은 질소원이 제한되고 과량의 탄소원 존재하에서 이루어지는 반면, 높은 농도의 질소원이 배지 내에 존재할 경우 균사체 성장은 원활히 이루어지나 세포의 다당체 생산은 억제된다고 알려져 있다(11). 일례로 *A. faecalis*에 의한 curdlan의 생산에 있어서 질소원을 제한한 배지를 사용하여 회분식 배양을 수행한 결과 질소원을 충분히 넣어준 결과에 비해 세포의 다당체 생산성이 약 20% 증가되었다(12).

따라서 본 연구에서는 기질 공급액으로 탄소원만을 사용하여 질소원을 제한시킴으로써 균사체 및 세포의 다당체 생산에 미치는 영향을 알아보았다. 포도당 농도와 덱스트린 농도가 각각 90 g/l와 360 g/l인 기질 공급액 100 ml를 매번 교반속도가 감소하는 시점에 공급하였다. 그 결과 Fig. 2에서와 같이 배양 36시간 이후 시작 배지의 탄소원이 고갈됨에 따라 첫 번째 기질 공급이 시작되었고 총 3회의 기질 공급이 이루어졌다. 균사체 및 세포의 다당체 농도는 세 번째 기질 공급

이 시작되는 시점인 배양 78시간에 각각 10.7 g/l, 6.1 g/l를 나타내었으며, 이는 회분식 결과와 비교하여 각각 1.8배 및 2.7배 증가한 결과이다. 또한 균사체 및 세포의 다당체 생산성은 각각 0.14 g/l-h 및 0.08 g/l-h를 나타내어 회분식 결과와 비교하여 세포의 다당체 생산성은 1.3배 증가하여 서로 비슷하였으나 균사체 생산성은 오히려 약 20% 감소하였다. 세 번째 기질 공급 이후 포도당 및 텍스트린은 균사체의 유지 에너지로만 사용되어 소모 속도가 급격히 느려졌으며 균사체 및 세포의 다당체 생산량은 더 이상 증가하지 않았다. 이는 세 번째 기질 공급이 이루어진 시점을 전후하여 시작 배지 중의 질소원이 모두 고갈되어 나타난 결과라 판단되었다. 이로부터 본 실험에 사용한 균주인 *A. blazei*의 경우 단순히 탄소원만을 포함하는 기질 공급액을 사용함으로써 질소원을 제한시키는 방법은 균사체 및 세포의 다당체 생산에 크게 효율적이지 않음을 알 수 있었다.

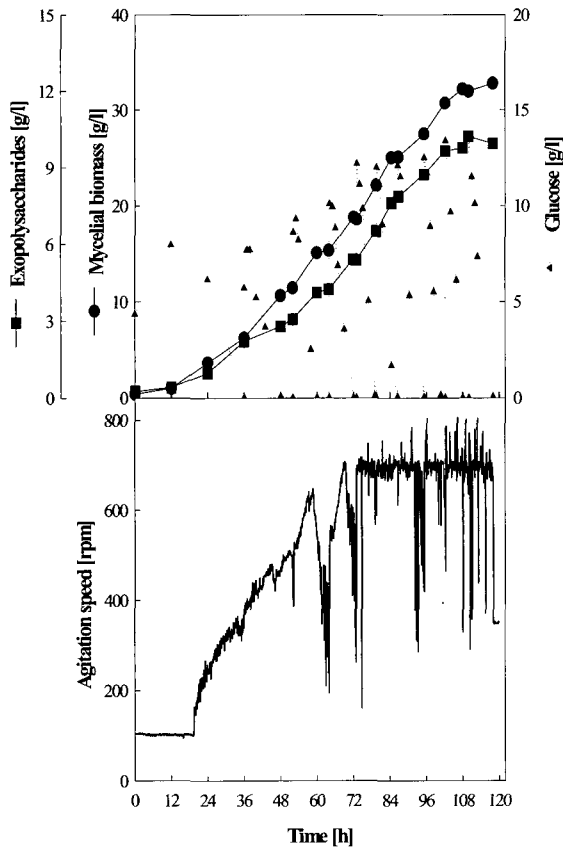


Figure 3. Time profiles of mycelial growth and EPS production in fed-batch culture of *A. blazei* (Feeding solution composition: glucose, 90 g/l; dextrin, 360 g/l; yeast extract, 60 g/l; soytone peptone, 30 g/l).

질소원이 제한되는 조건을 피하기 위해 탄소원 및 질소원을 모두 포함한 기질 공급액을 사용하여 유가식 배양을 수행하였다. 사용한 기질 공급액의 조성은 포도당, 90 g/l; 텍스트린, 360 g/l; 효모추출물, 60 g/l; soytone peptone 30 g/l이었다. Fig. 3에서 알 수 있듯이 시작 배지 중의 탄소원이 완전히 고갈된 배양 36시간에 교반속도가 감소했기 때문에 첫 번째 기질 공급이 이루어졌으며 이후 총 8회의 기질 공급이 추가로 이루어졌다. 포도당 농도의 시간에 따른 변화로부터, 배

양이 진행됨에 따라 첨가된 텍스트린의 포도당으로의 분해 속도가 증가하였으며 네 번째 기질 공급 이후에는 가해진 텍스트린 대부분이 즉시 포도당으로 분해되는 양상을 보임을 알 수 있었다. 배양이 진행되어 균사체 농도가 증가함에 따라 교반속도는 점차적으로 증가하여 세 번째 기질 공급 후에는 한계 교반속도인 700 rpm에 도달하였다. Fig. 3에서 보듯이 균사체 농도는 기질이 공급됨에 따라 지속적으로 증가하였고 세포의 다당체 생산은 배양 12시간 이후 시작되어 균사체의 성장에 비례하여 증가하였다. 배양결과 균사체 및 세포의 다당체 농도는 아홉 번째 기질 공급 시점인 108시간에 모두 최대를 나타내었다. 이 때의 균사체 농도 및 생산성은 각각 32.2 g/l, 0.30 g/l-h이었으며, 세포의 다당체 농도 및 생산성은 각각 10.2 g/l, 0.09 g/l-h이었다. 이는 앞선 유가식 배양 결과와 비교하여 균사체 농도 및 생산성 면에서는 각각 3배 및 2.1배, 세포의 다당체 농도 및 생산성 면에서는 각각 1.7배 및 1.1배 증가한 값이다. 또한 회분식 배양 결과와 비교하여 균사체 농도 및 생산성 면에서는 각각 5.3배 및 1.8배, 세포의 다당체 농도 및 생산성 면에서는 각각 4.4배 및 1.5배 증가한 값이다. 따라서 탄소원과 질소원을 모두 포함한 기질 공급액을 사용하여 유가식 배양을 수행하는 것이 균사체 및 세포의 다당체 생산을 위해 매우 효과적임을 알 수 있었다.

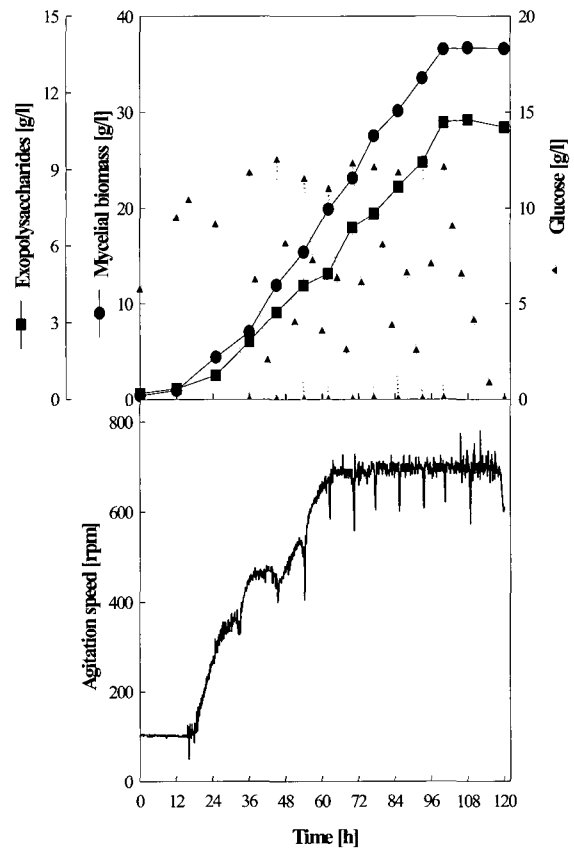


Figure 4. Time profiles of mycelial growth and EPS production in fed-batch culture of *A. blazei* (Feeding solution composition: glucose, 450 g/l; yeast extract, 60 g/l; soytone peptone, 30 g/l).

앞선 실험(Fig. 3)에서 관찰된 바에 의하면 포도당과 함께 사용된 텍스트린의 경우, 공급 즉시 포도당으로 분해가 일어

남을 알 수 있었다. 따라서, 기질 공급액의 탄소원으로 덱스트린을 제외하고 포도당만을 사용하는 유가식 배양을 시도하였다. 이때 사용한 기질 공급액의 조성은 포도당, 450 g/l; 효모추출물, 60 g/l; soytone peptone 30 g/l이었다. 그 결과 앞선 유가식 배양 결과와 전반적으로 유사한 결과를 얻었다 (Fig. 4). 배양 36시간에 첫 번째 기질 공급이 시작되었고, 이후 균사체의 활발한 성장에 의해 교반속도는 점차적으로 증가하여 세 번째 기질 공급 후에 한계 교반속도인 700 rpm에 도달하였다. 또한 균사체 성장 및 세포의 다당체 생산은 상호 비례적으로 증가하여 배양 100시간에 각각 36.5 g/L, 10.9 g/L에 도달하였다. 이 값들은 이전의 유가식 배양들에 비해 가장 높은 값이었다(Table 2).

**Table 2.** Comparison of batch and fed-batch cultures

	Batch	Fed-batch		
		I	II	III
Culture time [h]	36	78	108	100
Maximum cell mass [g/l]	6.1	10.7	32.2	36.5
Maximum EPS concentration [g/l]	2.3	6.1	10.2	10.9
Cellular productivity [g/l-h]	0.17	0.14	0.30	0.37
EPS productivity [g/l-h]	0.06	0.08	0.09	0.11
Specific substrate consumption rate [g/g-h]	0.07	0.05	0.04	0.04
Specific EPS production rate [g/g-h]	0.01	0.01	0.01	0.01
Cellular yield on substrate [g/g]	0.41	0.24	0.24	0.27
EPS yield on substrate [g/g]	0.15	0.14	0.08	0.08

Feeding solution composition:

I : glucose, 90 g/l; dextrin, 360 g/l

II : glucose, 90 g/l; dextrin, 360 g/l; yeast extract, 60 g/l; oytone peptone, 30 g/l

III : glucose, 450 g/l; yeast extract, 60 g/l; soytone peptone, 30 g/l

또한 균사체 및 세포의 다당체 생산성은 각각 0.37 g/l-h, 0.11 g/l-h이었다. 이는 기질 공급액의 탄소원으로써 포도당과 덱스트린을 혼합하여 사용한 앞선 실험결과보다 다소 증가한 결과로 큰 차이를 나타내지는 않았으나 기질 공급액의 탄소원으로써 포도당이 효율적이라는 사실을 말해주는 것이다. 그러나 본 연구진의 회분식 배양에 관한 선행 연구에서는, 본 연구에서의 유가식 배양과는 달리, 포도당을 단일 탄소원으로 사용할 경우 균사체 생산량은 비교적 높으나 세포의 다당체 생산량은 매우 저조하였다(5). 이는 덱스트린이 배양 초기에 세포의 다당체 합성 대사경로를 활성화 시키는데 필요하나 이 후에는 별다른 효과를 가지지 않음을 시사하는바, 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

## 요 약

본 연구에서는 *A. blazei*의 DO-스텝 현탁 유가식 배양을 통하여 균사체 및 세포의 다당체 생산을 극대화하고자 하였다. 탄소원만을 포함하는 기질 공급액을 사용하는 경우보다 질소원이 적절히 첨가된 혼합 기질 공급액을 사용하는 것이 균사체 및 세포의 다당체 생산에 보다 효과적이었다. 기질 공급액 중의 탄소원 조성을 달리하여 실험을 수행한 결과, 덱스트린을 배제하고 포도당만을 탄소원으로 사용하였을 때 가장 높은 균사체 및 세포의 다당체 생산성을 얻을 수 있었

다. 이 때의 균사체 농도 및 생산성은 각각 36.5 g/l, 0.37 g/l-h이었으며, 세포의 다당체 농도 및 생산성은 각각 10.9 g/l, 0.11 g/l-h이었다. 이는 회분식 배양 결과와 비교하여 균사체 농도 및 생산성 면에서는 각각 6배 및 2.2배, 세포의 다당체 농도 및 생산성 면에서는 각각 4.7배 및 1.8배 증가한 값이다. 이상의 결과들로부터 *A. blazei*의 고농도 균사체 배양을 위해 유가식 배양 방법이 매우 효과적임을 알 수 있었다.

## 감 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. M. J. Bae *et al.* (1996), Studies on immunomodulating function of components separated from higher fungi, *Kor. J. Mycol.* **24**, 142-148.
2. D. K. Ahn (1992), Medicinal fungi in Korea, *Kor. J. Mycol.* **20**, 154-166.
3. K. S. Chung *et al.* (1991), Mycelial growth of *Ganoderma lucidum* and *Grifola frondosa* in milk whey, *Kor. J. Mycol.* **19**, 61-65.
4. Dong, Q., Yao, J., Yang, X.-T., and Fang, J.-N. (2002), Structural characterization of a water soluble b-D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr, *Carbohydr. Res.* **337**, 1417-1421.
5. H. Ito *et al.* (1997), Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* and its mechanism in tumor-bearing mice, *Anticancer Res.* **17**, 277-284.
6. S. Y. Lee *et al.* (1997), Optimization of antitumor active exopolysaccharide production through the submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **12**, 139-145.
7. Kim, H. H., Na, J.-G., Chun, G.-T., Chang, Y. K., Lee, S. J., and Chung, Y. H. (2004), Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exopolysaccharides production by *A. blazei*, *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 944-951.
8. Na, J.-G., Kim, H. H., Chun, G.-T., Chang, Y. K., Lee, S. J., and Chung, Y. H. (2004), Effects of nitrogen supplementation on b-D-glucans content in *A. blazei* Murrill culture, *J. Microbiol. Biotechnol.* In press.
9. Kim, H. H., Na, J.-G., Chang, Y. K., and Lee, S. J. (2004), Effects of dissolved oxygen control on cell growth and exopolysaccharides production in batch culture of *Agaricus blazei*, *Kor. J. Chem. Eng.* In press.
10. D. A. Bush *et al.* (1972), Structure of a b-D-glucan from the mycelial wall of Basidiomycetes QM 806, *Carbohydr. Res.* **22**, 361-367.
11. R. J. Seviour *et al.* (1992), Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi, *Critical Rev. Biotechnol.* **12**, 279-298.
12. K. Ryu *et al.* (2001), The structure analysis and biosynthesis of b-glucan by *Alcaligenes faecalis*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 409-414.