

흰목이 균사 액체배양 조건

장현유* · 이찬¹ · 최성우² · 윤정원³

한국농업대학, 중앙대학교, 수원대학교, 대구대학교

Liquid culture condition of *Tremella fuciformis* mycelia

Hyun-You Chang*, Chan Lee¹, Sung-Woo Choi² and Jong Won Yun³

Department of Mushroom Science, Korea National Agricultural College, 448-890, Korea

¹Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Ansong, Gyeonggi 456-756, Korea

²Department of Bioengineering and Genetic Engineering, College of Natural Science, The University of Suwon, Hwaseong, Gyeonggi, 445-743, Korea

³Department of Biotechnology, Daegu University, Kyungsan, Kyungbuk 712-714, Korea

ABSTRACT : The optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exopolysaccharide (EPS) production in an edible mushroom *Tremella fuciformis* were studied in shake flasks and bioreactors. The temperature of 28°C and pH 8 in the beginning of fermentation in agitated flasks was the most efficient condition to obtain maximum mycelial biomass and EPS. The optimal medium constituents were as follows (g l⁻¹): glucose 20, tryptone 2, KH₂PO₄ 0.46, K₂HPO₄ 1 and MgSO₄·H₂O 0.5. The fungus was cultivated under various agitation and aeration conditions in a 5L stirred-tank bioreactor. The maximum cell mass and EPS production were obtained at a relatively high agitation speed of 200 rpm and at an aeration rate of 2 vvm. The flow behavior of the fermentation broth was Newtonian and the maximum apparent viscosity (35 cP) was observed at a highly aerated condition (2 vvm). The EPS productivity in an airlift reactor was higher than that in the stirred-tank reactor. The EPS was protein-bound polysaccharides consisted of mainly mannose, xylose, and fructose. The molecular weights of EPS were determined to be 1.3-1.5×10⁶.

KEYWORDS : *Hypoxylon* sp., Liquid culture, *Tremella fuciformis*

서 론

흰목이 종균은 지금까지는 톱밥종균만 사용하였다. 이 톱밥종균은 흰목이 균과 그의 공생균으로 알려진 *Hypoxylon* spp.을 혼합하여 사용하였다. 본 연구에서는 흰목이의 톱밥종균의 두가지 균의 혼합사용하는 것이 복잡하여 액체 배지를 이용한 종균을 생산하기 위하여 배양조건을 확립하고자 한다. 흰목이 균사의 액체배양 연구는 많으나 흰목이 자실체 생산을 위한 종균 사용에 관한 연구는 거의 전무한 상태이다. 액체배지의 자실체 형성에 관한 연구는 표고에 대하여 시험한 결과가 있다. 한천배지 상에서 표고 자실체의 형성은 비록 긴 시간이 소요되지만 실험적으로 성공한 보고가 있다(Komatsu, M and Kimura, K., 1968; Tokimoto, K, 1974; Tokimoto, K. and Kawai, A., 1975). 미생물의 EPS(exopolysaccharides)는 넓은 다양성을 지닌 산업 응용 가치가 있는 고가의 생물 고분자물질 그룹이다(Looijestijn 등, 1999). 특히 EPS의 많은 종류

는 버섯의 액체배양으로부터 생산되어왔다(Bae 등, 2000, 2001; Park 등, 2001; Kim 등, 2002a, 2002b, 2003; Hwang 등, 2003). 이 액체 배양한 흰목이 균사체는 노화 감소를 위한 것과 면역부전을 개선하는 생리적 활성의 다양성 때문에 의학적 목적으로 사용되어 왔다(Cheung, 1996; Gao 등, 1996; Reshetnikov 등, 2000).

재료 및 방법

미생물 및 배지

흰목이 균은 속리산에서 채취하여 포자분리법으로 흰목이 균사를 순수 분리하였다. 분리된 균주는 계통학적으로 ITS-5.8S rDNA 스퀀스 분석에 의해 분리 동정되었다. 흰목이 배양 균주는 한달에 한번 계대 배양하였고 PDA(potato dextrose agar) 배지에서 저장하였다. 원균 흰목이균은 25°C에서 17일간 배양하였다.

접종원 제조 및 플라스크 배양

흰목이는 처음에 페트리디쉬 PDA 배지에서 자란 것을

*Corresponding author: <hychang@kn.ac.kr>

5mm 콜크보러로 접종원에 이식하였다. 접종원은 250ml 삼각플라스크에 MCM 배지(20g glucose, 2g yeast extract, 2g peptone, 0.5g $MgSO_4 \cdot H_2O$, 1g K_2HPO_4 , 0.46 KH_2PO_4)를 50ml씩 분주하여 150rpm으로 3일 동안 28에서 배양하였다. 플라스크(250ml)에 접종원 2% (v/v)를 접종한 후 50ml를 액체배지가 되도록 하였다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

생물반응 발효조

발효배지는 접종원의 2%가 접종되었고 산도와 용존산소 전극이 설치된 5L 발효조(KoBioTech, Incheon, Korea)에서 28°C로 배양하였다. 특별한 경우를 제외하고 발효조는 온도 28°C, 공기율 2vvm, 진동속도 200rpm, 최초 산도 8, 배양액 3L에서 실시하였다.

셀 건조중 및 EPS 농도

여러 시간 간격으로 행해진 샘플은 20분 동안 12,000rpm에서 원심 분리하였다. 균사 바이오매스의 건조중은 90에서 하루 밤 동안 건조하고 증류수로 균사체를 반복하여 세척한 후 측정하였다. 여과필터로 여과한 액은 굴절 인덱스 디텍터(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)가 달린 Aminex HPX-42C column(0.78 x 30cm, Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 HPLC (Shimadzu Co., Kyoto, Japan)로 잔여 글루코스에 대한 양적인 분석을 하였다. 상층액은 순수 에탄올을 4배로 혼합하여 4°C에서 하루 밤 두면서 뒤섞었다. 침전된 EPS는 10,000rpm에서 20분간 원심분리하여 그 상층액은 버렸다.

아미노산과 탄수화물의 분석

EPS의 총 당함량은 표준으로서 글루코스를 사용하면서 페놀 황산법(Dubois 등, 1956)에 의해 분석하였다. 당의 구성은 화염 이온탐지기와 실리카 모세관(Na form, 300mm x 0.25 mm, Supelco Inc., Bellefonte, PA)를 가지고 있는 가스 크로마토그래피(Varian Co., Model: Star 3600CX, Lexington, MA)에 의해 분석하였다.

총 단백질함량은 표준으로서 보바인 혈청 알부민으로 Lowry method (Lowry et al., 1951)에 의해 분석하였다. 아미노산의 구성성분은 high performance ion exchange column (No. 3906, 200mm x 4.6mm)를 가진 아미노산 분석기(Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Model: Pharmacia Biochrom 20, Cambridge, UK)로 분석하였다.

영상분석 순서

샘플의 자세한 형태적 분석은 카메라(Matsushita Communication Industrial Co., Ltd., Yokohama, Japan)를 통한 광학현미경(Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan)의 소프트웨어를 가진 이미지분석기(Matrox Electronic System Ltd., Dorval, Quebec, Canada)로 하였다.

EPS(exopolysaccharide)의 특성 평가

EPS의 분자량은 MALLS system (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA)을 가진 SEC에 의해 평가하였다. EPS 샘플은 SEC/MALLS 시스템으로 주사하기 전에 0.025mm 필터 멤브레인 필터(Millex HV type, Millipore Co., Bedford, MA)를 통하여 필터하였고 0.01% sodium azide를 함유한 인산완충액(ionic strength=0.1, pH 6.1)에 용해하였다.

가스크로마토그래피 시스템은 degasser (Degasys, DG-1200, uniflow, HPLC Technology, Macclesfield, UK)로 구성되어있고 a high performance pump (Model 590 Programmable Solvent Delivery Module, Waters Co., Milford, MA), an injection valve (Rheodyne, Inc., Cotati, CA) fitted with a 100 μ l loop, SEC columns (Shodex PROTEIN KW-803, 804, Showa Denko K.K., Tokyo, Japan)는 시리즈로 연결되어있다. 흐름 속도율은 0.7ml/min이었고 injection volume과 농도는 각각 100 μ l와 3mg/ml로 하였다. EPS의 분자량을 계산하는 동안 dn/dc값 (specific refractive index increment)은 문헌(Jumel et al., 1996) 데이터에 의해 사용하였고 dn/dc는 0.14 ml/g로 평가되었다. 각 EPS에 대한 분자량 계산은 Astra 4.72 software (Wyatt Technology)에 의해 실시하였다.

결과 및 고찰

플리스크 배양에서 최초 산도와 온도의 영향

EPS 생산과 셀 성장을 위한 적정온도를 찾기 위해 흰목이는 25, 28, 31, 34°C에서 진탕 배양되었고 34°C보다 높은 온도에서는 소수의 셀 건조중을 나타내었고 28°C와 기타 다른 온도에서는 차이가 없는 것으로 분석되었다(Fig. 1, 2).

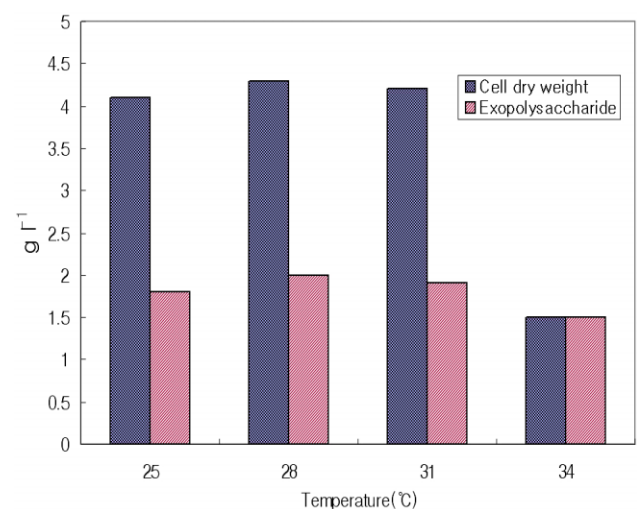


Fig. 1. Effect of temperature on cell growth and exopolysaccharide production in shake flask culture of *Tremella fuciformis*.

EPS에 관련하여 온도간에 차이가 별로 발생하지 않았다. 28℃의 온도는 다른 종류의 버섯 액체배양으로부터 얻어진 결과에서 본바와 같이 생장에 적당하였다(Hwang et al., 2003; Xu et al., 2003). 세포생장과 EPS 생산에 최초 pH의 영향을 조사하기 위하여 세포는 진탕 플라스크 배양에 다른 최초 산도(5.0~9.0)하에서 배양되었다. 그림 2에서 본바와 같이 배양초기에 pH값에 관련하여 세포생장에 유의차가 없었다. 큰 표준편차로 그림 2는 EPS가 pH 8과 9에서 더 높았다.

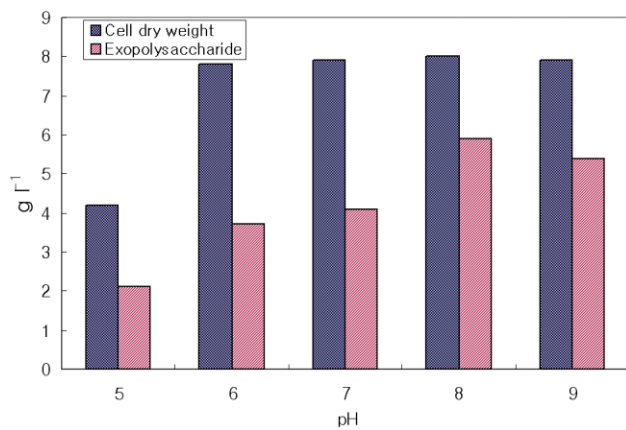


Fig. 2. Effect of initial pH on cell growth and exopolysaccharide production in shake flask culture of *Tremella fuciformis*.

Hwang 등(2003)은 최대 세포생장과 EPS 형성은 약용 버섯인 상황버섯류의 정치배양에서 pH 9.0 알카리성에서 좋았다고 보고하였다. 많은 다른 버섯류의 최적 pH는 중성인 산도에서 세포생장과 EPS 생산이 적당하다고 보고하였다(Lee et al., 2004; Lim et al., 2004).

플라스크 배양의 적절한 배지구성 조합

셀 매스와 EPS의 생산에 있어서 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 여러 가지 탄소원은 20g l⁻¹ 농도에서 적당하였다. 표 1에서 본바와 같이 세포 건조중과 EPS의 높은 수준은 glucose, fructose, sucrose가 탄소원으로 사용되었을 때이었다. 테스트된 탄소원중에서 셀매스의 최대 생산력은 20g l⁻¹. 글루코스를 함유한 배지에서 얻어졌다. 한편 EPS 생산력은 초기 글루코스 함량과 관련이 없었다. 한편 조사된 7가지 질소원 중 tryptone, soy peptone, meat peptone, yeast extract는 상대적으로 흰목이의 세포생장에 좋은 영향을 미쳤다(표 1). 세포 매스와 EPS의 최대생산은 질소원으로서 트립토판 2g l⁻¹이었을 때이었다. 유기 질소원과 비교하여 무기질소원은 상대적으로 더 낮은 세포생장과 EPS 생산을 나타내었다(표 1).

진탕 탱크배양 반응기의 진탕속도의 영향

진탕 바이오횰터의 진동효과를 조사하기위하여 세포는 3가지 진동속도로 배양되었다. 최대 셀매스(7.03 g l⁻¹)

Table 1. Effect of carbon and nitrogen sources on cell growth and exopolysaccharide (EPS)production in shake-flask cultures of *Tremella fuciformis*

	Cell dry weight (g l ⁻¹)	EPS (g l ⁻¹)	Final pH
Carbon sources			
Glucose	6.35 ± 0.22	1.43 ± 0.10	6.29 ± 0.02
Maltose	3.43 ± 0.00	0.94 ± 0.02	6.53 ± 0.04
Fructose	6.04 ± 0.28	1.43 ± 0.16	6.09 ± 0.02
Sucrose	5.64 ± 0.24	1.22 ± 0.02	6.70 ± 0.04
Lactose	0.74 ± 0.01	0.34 ± 0.02	7.43 ± 0.01
Mannitol	5.95 ± 0.60	1.22 ± 0.05	6.70 ± 0.02
Sorbitol	3.57 ± 0.30	1.04 ± 0.35	6.79 ± 0.02
Xylose	4.10 ± 0.95	1.05 ± 0.18	6.00 ± 0.25
Nitrogen source			
Yeast extract	5.77 ± 0.12	1.21 ± 0.03	5.87 ± 0.22
Tryptone	6.79 ± 0.04	1.50 ± 0.32	5.72 ± 0.18
Polypeptone	2.31 ± 0.05	0.80 ± 0.04	5.90 ± 0.14
Meat peptone	5.81 ± 0.33	1.40 ± 0.13	5.80 ± 0.14
Soy peptone	6.35 ± 0.64	1.40 ± 0.13	5.80 ± 0.14
Ammonium sulfate	1.89 ± 0.12	0.32 ± 0.12	4.33 ± 0.34
Ammonium nitrate	2.08 ± 0.03	0.39 ± 0.11	4.60 ± 0.86

* Fermentations were carried out in flasks for 3 days at 28℃ with initial pH 8. Values are mean ± S.D. of triple determinations.

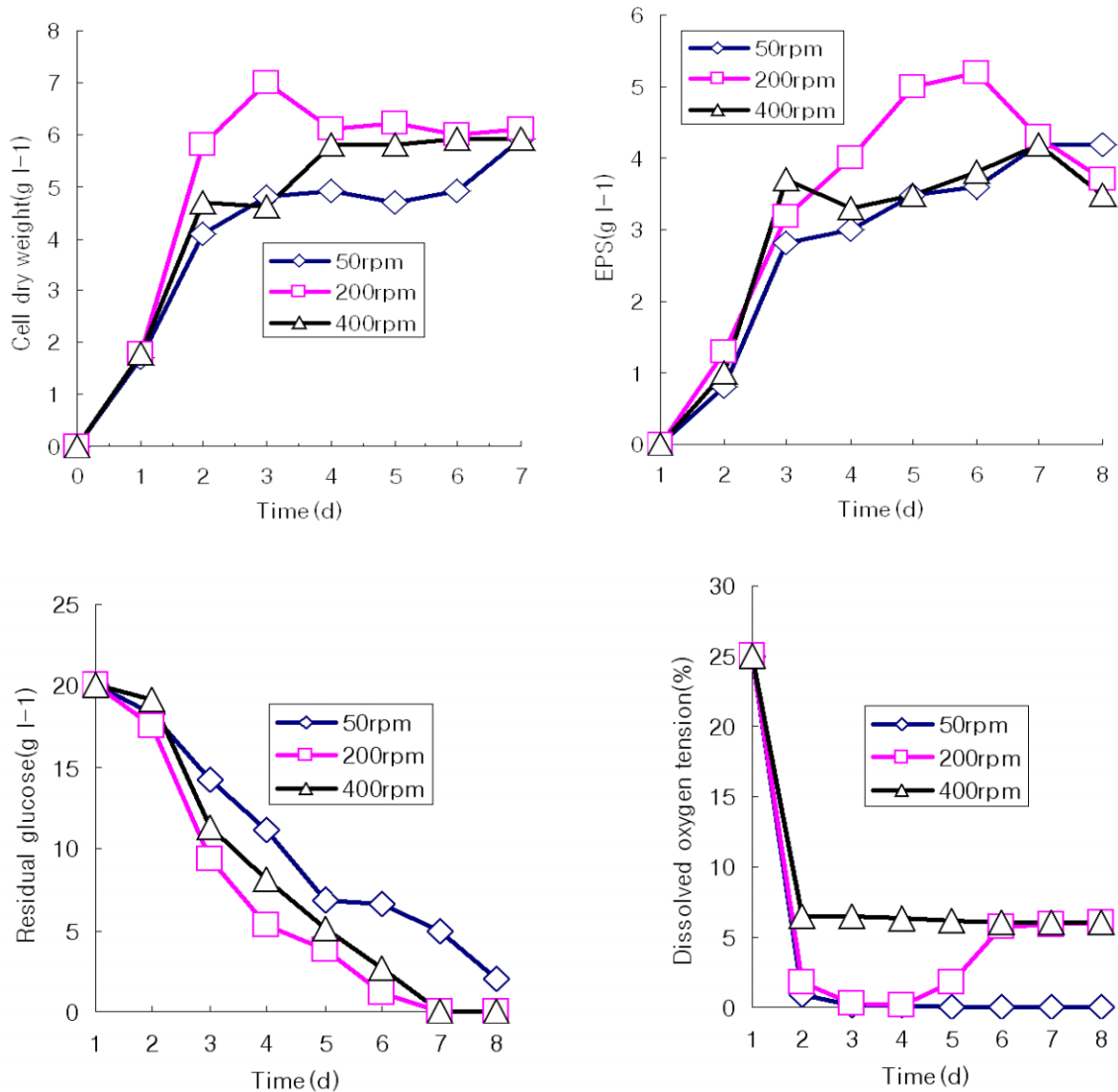


Fig. 3. Time profiles of Cell dry weight (g l⁻¹), EPS production (g l⁻¹), Residual glucose (g l⁻¹), and dissolved oxygen during submerged culture of *Tremella fuciformis* in a 5-L stirred-tank reactor at different agitation speeds.

와 EPS 생산(2.00 g l⁻¹)은 200rpm에서 얻어졌다(그림 3). 50rpm 진동속도에서 극히 용존산소의 낮은 값은 발효의 초기로부터 표시되었는데 그것에 대하여 셀매스와 EPS생산의 더 낮은 효율로 인도되었다(그림 3). 셀매스와 EPS의 가장 높은 생산은 200rpm에서 얻어졌는데 소비(YP/S)된 배지에서 EPS 효율과 특별한 성장률(μ)은 각각 0.25 d⁻¹과 0.09 g g⁻¹이었다. Baets 등(2002)는 또한 다른 종의 흰목이를 정치배양으로 EPS 생산과 셀생장에 감소를 가져오는 원인을 설명하였다.

적 요

현재까지 연구로는 흰목이 균사체에서 EPS 생산과 균사 성장에 대한 적정 정치배양 조건이 연구되었다. 본 연구로

부터 탄소원과 질소원의 처음 농도, 균사 형태와 발효조의 타입의 선택은 흰목이 균사체 EPS 생산에 가장 영향을 미친다는 것을 알게 되었다. 이들 결과는 공기주입식 반응기에서 EPS 생산성은 진탕탱크 반응기 보다 더 높았다는 점을 증명하였다. 또한 흰목이 균사의 정치배양의 생리적 성장에 대한 지식은 아직도 제한적이다.

감사의 글

이 논문은 ARPC(농림기술개발과제) 지원으로 연구되었으며 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

Bae, J.T., Park, J.P., Song, C.H., Yu, C.B., Park, M.K., Yun,

- J.W., 2001. Effect of carbon source on the mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of *Paecilomyces japonica*. *J. Biosci. Bioeng.* 91, 522-524.
- Bae, J.T., Sinha, J., Park, J.P., Song, C.H., Yun, J.W., 2000. Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 482-487.
- Baets, S.D., Laing, S.D., Francois, C., Vandamme, E., 2002. Optimization of exopolysaccharides production by *Tremella mesenterica* NRRL Y-6158 through implementation of fed-batch fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29, 181-184.
- Cheung, P.C.K., 1996. The hypercholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricula* (tree-ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats. *Nutr. Res.* 16, 1721-1725.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Gao, Q., Seljeid, R., Chen, H., Jiang, R., 1996. Characterisation of acidic heteroglycans from *Tremella fuciformis* Berk with cytokine stimulating activity. *Carbohydr. Res.* 288, 135-142.
- Hwang, H.J., Kim, S.W., Xu, C.P., Choi, J.W., Yun, J.W., 2003. Production and molecular.
- Jumel, K., Fiebrig, I., Harding, S.E., 1996. Rapid size distribution and purity analysis of gastric mucus glycoproteins by size exclusion chromatography/multi angle laser light scattering. *Int. J. Biol. Macromol.* 18, 133-139.
- Kim, S.W., Hwang, H.J., Park, J.P., Cho, Y.J., Song, C.H., Yun, J.W., 2002a. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 56-61.
- Kim, S.W., Hwang, H.J., Xu, C.P., Na, Y.S., Song, S.K., Yun, J.W., 2002b. Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exo-biopolymer production in *Paecilomyces sinclairii*. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 389-393.
- Kim, S.W., Hwang, H.J., Xu, C.P., Sung, J.M., Choi, J.W., Yun, J.W., 2003. Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. *J. Appl. Microbiol.* 94, 120-126.
- Komatsu, M. and Kimura, K., Studies on abnormal fruit bodies of hymenomycetous fungi. V. Fruit bodies with white pilei of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., Rep. Tottori Mycol. Inst. (Japan), 6, 9, 1968.
- Lee, B.C., Bae, J.T., Pyo, H.B., Choe, T.B., Kim, S.W., Hwang, H.J., Yun, J.W., 2004. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme Microb. Technol.* 35, 369-376.
- Lim, J. M., Kim, S.W., Hwang, H.J., Joo, J. H., Kim, H.O., Choi J. W., Yun, J.W., 2004. Optimization of medium by orthogonal matrix method for submerged mycelial culture and exopolysaccharide production in *Collybia maculata*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 119, 159-170.
- Looijestienijn, P.J., Boels, I.C., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., 1999. Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5003-5008.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Park, J.P., Kim, S.W., Hwang, H.J., Yun, J.W., 2001. Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 76-81.
- Reshetnikov, S.R., Wasser, S.P., Duckman, I., Tsukor, K., 2000. Medicinal value of the geuns *Tremella* Pers (Heterobasidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms.* 2, 169-193.
- Tokimoto, K. and Kawai, A., Nutritional aspects of fruit body development in replacement culture of *Lentinus edodes*(Berk) Sing. Rep. Tottori Mycol. Inst. (Japan), 12, 25, 1975.
- Tokimoto, K., Formation of callus-like aberrant fruit bodies on agar cultures of *Lentinus edodes*(Berk)Sing., Rep. Tottori Mycol. Inst. (Japan), 11, 23, 1974.
- Xu, C.P., Kim, S.W., Hwang, H.J., Choi, J.W., Yun, J.W., 2003. Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. *Process Biochem.* 38, 1025-1030.