

# 영지의 액체배양에 의한 세포외 다당 생산의 Scale Up 연구

이학수<sup>1</sup> · 이신영<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>동방미래화학(주) 기술연구소, <sup>2</sup>강원대학교 생물공학과

## Scaling Up Study of Exopolysaccharide Production through Mycelial Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum*

Hak-Su Lee<sup>1</sup> and Shin-Young Lee<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Technique Research Institute, Dongbang Future Chemical Co., Ltd., Gyunggi 445-920, Korea,

<sup>2</sup>Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

**Abstract** A scaling up study for the exopolysaccharide (EPS) production by submerged culture of *Ganoderma lucidum* was carried out in jar fermenter systems (2.6, 20 and 75 L) under bi-staged pH process. Profiles of dissolved oxygen (DO) and volumetric coefficient of oxygen transfer ( $k_{La}$ ) as a function of operating variables (agitation speed and aeration rate) was investigated, and a correlation between  $k_{La}$  and operating variables was analysed statistically. Under bi-staged pH process, no limitation of DO was observed at agitation speeds tested in the range of 200 and 600 rpm, and the highest EPS production was obtained at the level of DO of 40~80%. From the regression analysis, the relation between  $k_{La}$ , gas velocity ( $V_s$ ), stirrer speed ( $N$ ) and impeller diameter ( $D_i$ ) could be expressed as :

$$k_{La} = 0.555 \times V_s^{0.42} \times (N^3 \times D_i^2)^{0.33} \quad (R^2 = 0.925, p < 0.05)$$

It was found that under 2.6 L jar fermenter, the optimum agitation speed and aeration rate was 400 rpm and 1 vvm, respectively, obtaining the EPS production of 15.43 g/L. Under the submerged cultivation of *G. lucidum* in jar fermenters of 2.6~75 L, the similar EPS yields at each fermenter were achieved during scaling up based on  $k_{La}$ , and  $k_{La}$  value for maximum EPS production was  $85.4 \pm 26.70 \text{ h}^{-1}$ .

**Keywords:** *Ganoderma lucidum*, scale up,  $k_{La}$ , submerged culture, regression analysis, bi-staged pH process

### 서 론

영지버섯 유래의 다당류는 점차 각종 기능성 식품소재 및 의약품 소재로의 잠재적 가능성이 매우 높은 것으로 인식되고 있으며, 산업적인 관심도 매우 고조되어 있는 실정이다(1-4).

그러나 버섯의 자실체나 균사체 유래의 생리 활성 다당류는 추출 공정이 복잡하고 수율이 낮기 때문에 최근에는 이들 단점을 극복할 수 있는 액체배양법에 의한 세포외 다당의 생산이 널리 시도되었고, 다당의 효율적 생산을 위

한 유망 대체수단으로 많은 관심을 받았다(5-11).

저자 등도 그동안 air-lift 또는 jar fermenter system을 이용하여 영지의 액체배양에 의한 세포외 다당 생산의 연구를 수행하였고, 세포외 다당의 성분 및 구조규명, 배양 동력학적 특성, 배지 및 배양 최적화, 생물활성 탐색, 균사의 형태분석 등에 관한 각종의 연구결과를 보고하였다(12-24). 특히, 균사체 생육과 세포외 다당 생산의 최적 pH가 각각 3 및 6으로 크게 달랐으므로 초기 6시간 동안 pH 3으로 배양하다가 이후 pH 6으로 shift하여 배양하는 bi-staged pH process를 개발함으로써 세포외 다당의 생산을 크게 향상시키는 결과를 얻은 바 있다(16, 18, 23). 이들 연구 결과에 따르면 영지 세포외 다당은 분자량 약  $10^6$  dalton의 1,6 가지를 갖는  $\beta$ -1,3 glucan을 함유하는 heteropolysaccharide로 항종양 다당 및 식유섬유로서의 성분특성을 나타내었

### \*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6273, Fax: +82-33-243-6350

e-mail: syllee@kangwon.ac.kr

으며, 껍질화능이 우수하여 껍질체로서의 용도적성을 갖는다. 또 *in vitro*에 의한 생리기능의 조사결과, 포도당 및 bile acid에 의한 흡수지연효과를 나타내어 식이섬유소재로서의 혈당 및 콜레스테롤 저하식품소재로서의 가능성이 있다. 아울러, 이들 다당은 항암활성, 면역증강 기능, 세포증식 및 분화능 등을 나타내어 생리 기능성 다당소재로서의 잠재력이 매우 높은 것으로 기대되었다.

하지만 아직도 산업적 생산 체제를 갖추기에는 미흡한 실정이어서 대량생산 공정의 개발을 위한 검토의 필요성이 높은 실정이다. 특히, 산업적 규모의 jar fermenter에 의한 발효생산은 실험실 규모 발효생산의 기질 전환율 및 생산성과 일치하여야 하며, 이를 위해 scale up의 연구가 필요하다.

Scale-up의 기준으로는 발효조 내의 전단력과 밀접한 관련을 갖는 impeller tip speed ( $\pi NDi$ ), 단위용적당 소비 동력 ( $P/V$ ) 및 Reynolds 수 ( $N_{Re}$ ) 등의 각종 인자들이 사용된다. 일반적으로 산소요구도가 큰 호기적 미생물 발효의 scale-up에는 산소이동용량계수 ( $k_La$ )에 기준한 scale up의 방법이 가장 널리 이용된다(25, 26). 하지만 영지버섯의 액체배양에서  $k_La$ 를 기준으로 한 성공적인 scale up을 위해서는 균체나 생성물이 전단에 영향을 받지 않는 것이 중요하며, 따라서 이를 위한 적정 교반 및 통기조건이 확립이 필요하다.

그러므로 본 연구에서는 영지 액체배양의 균사체 및 세포의 다당의 대량생산을 위해 2.6, 20 및 75 L용량의 jar fermenter system을 사용하여 세포의 다당 생산의 현저한 향상이 가능하였던 bi-staged pH process(16)하의 배양을 통하여 통기 및 교반속도에 따른 용존산소 및 산소이동용량계수 ( $k_La$ )의 변화를 조사하였다. 아울러, 이들의 상관관계를 통계분석하여 해석함으로써 scale up의 조건을 확립하였으며, 이로부터 영지의 액체배양에 의한 균사체 및 세포의 다당 생산의 산업적 응용자료를 마련하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 보존

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

### 배지조성

본 실험에서 종균배양에 사용한 배지는 Sone 등(27)이 보고한 진탕배양용 배지이며, 본 배양에는 이 등(12)이 *G. lucidum*의 액체배양에 의한 세포의 다당 생산의 최적배지로 보고한 배지를 사용하였다. 배지는 121°C에서 15분간 가압 살균 후 사용하였고, 살균 시 염의 침전을 방지하기

위해 탄소원, 질소원, 무기염류는 각각 분리 살균한 후 혼합하여 사용하였다. pH는 필요시 1N NaOH 또는 1N HCl로 조절하였다.

### 전 배양

P.D.A. 평판배지에서 생육한 균사체를 직경 5 mm의 stainless steel pipe로 mycelium disk를 만든 다음, 이 disk 4-5개를 50 mL의 배지를 넣은 250 mL 삼각 플라스크에 접종하였다.

30°C에서 7일간 배양한 다음 이를 1차 전 배양액으로 하였다. 다시 종균용 배지 50 mL를 함유한 250 mL의 삼각 플라스크에 5% (v/v)의 1차 전 배양액을 접종하였고, 30°C에서 100 rpm으로 5일간 진탕배양하여 2차 전 배양액으로 하였다. 이 때 각 전 배양액은 균질기 (동양(주), model 0820)로 30초 동안 균질화시켜 본 배양의 접종용으로 사용하였고, 매 실험마다 새로이 배양하여 사용하였다.

### 발효조 배양

2.6-L jar fermenter 배양 : 2.6 L의 jar fermenter (Marubishi, MD-250)에서 전 배양액을 5% (v/v)로 접종하여 온도 30°C, bi-staged pH (배양 6시간 후 pH를 3에서 6으로 조정), 배지액량 1.5 L, 통기속도 0.5~2.0 vvm 및 교반속도 100~600 rpm의 배양 조건으로 실시하였다. pH는 필요시 1 N HCl 또는 1 N NaOH를 사용하여 조절하였고, 통기로 인하여 발생한 거품은 Antifoam 289 (Sigma Co.)를 사용하여 제거하였다. 또 균사체 생육으로 인한 wall growth를 방지하기 위하여 polymer인 polyacrylic acid (Wako Chemical Co.)를 0.1% (w/v)를 첨가하였다(21).  
20 L jar fermenter 및 75 L pilot fermenter 배양 : 20 L의 jar fermenter (Bioengineering, L1523) 및 75 L의 pilot fermenter (Bioengineering, LP351)를 사용하여 접종비를 5% (v/v)로 하여 전자는 온도 30°C, pH (초기 pH 6.0 또는 pH shift)의 조건, 배지액량 12 L, 통기속도 1.0 vvm 및 교반속도 200~600 rpm의 배양 조건으로, 그리고 후자는 온도 30°C, pH shift (pH 3 → pH 6), 배지액량 50 L, 통기속도 0.3~1.0 vvm 및 교반속도 100~300 rpm의 배양 조건에서 실시하였다.

### 균사체, 세포의 다당 및 잔존당의 측정

균사체량은 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 항량이 될 때까지 방치하면서 건조중량 (mycelial dry weight, MDW)을 측정하여 정량하였다. 또한, 세포의 다당은 원심분리 (10,000 × g, 15분)하여 균사체를 제거한 후 얻어진 배양 여액에 2

배양의 acetone을 가하여 침전물로 얻었으며, 이를 70°C에서 24시간 건조한 다음 중량을 측정하여 조다당 (crude exopolysaccharide)으로 정량하였다.

한편, 배양액 중의 잔존 glucose 농도는 DNS (dinitrosalicylic acid) 법(28)을 이용하여 575 nm에서 흡광도를 구한 후, 표준곡선으로부터 환산하여 구하였다.

**산소이동용량계수 (k<sub>L</sub>a)의 측정**

균체를 포함한 배양액의 k<sub>L</sub>a는 다음 식 (1)과 같은 산소 흡수속도 (Q<sub>O2</sub> · X)와 용존산소 (D.O.)와의 관계식으로부터 계산하였다(29).

$$k_{La} \text{ (1/hr)} = \frac{Q_{O_2} \cdot X}{(C^* - C_1)} \quad (1)$$

이 식을 적분하여 다시 정리하면, 다음 식 (2)를 얻을 수 있다.

$$k_{La}t = \ln \frac{C_0 - C}{C_0 - C_1} \quad (2)$$

식 (1)과 식 (2)에서 C\*는 포화 용존산소 농도 (% saturation), C<sub>0</sub>는 통기 정지시의 용존산소 농도이고, C<sub>1</sub>은 임의의 시간에서의 용존산소 농도이며, t는 임의의 배양 경과시간이다.

**중회귀분석**

설명변수인 통기속도 (V<sub>s</sub>, X1), 교반속도 및 impeller 지름 (NDi, X2)과 목적변수인 산소이동용량계수 (k<sub>L</sub>a, Y)의 중회귀분석은 MS Excell (Microsoft Co.)을 사용하여 실시하였다(30).

**결과 및 고찰**

**세포의 다당 생성 및 용존산소의 경시변화에 미치는 pH process와 교반속도의 영향**

Fig. 1은 20 L 교반 발효조에서 통기속도 1 vvm하에서 서로 다른 pH process 및 교반속도에 따른 영지 배양(8일간)의 경시변화이다.

pH의 조절이 없이 초기 pH 3으로 배양한 경우는 기질 소비에 따라 배양 7일에 약 12.3 g/L 및 약 5.8 g/L의 최대 균사체량과 세포의 다당 생성량을 각각 나타내었다. 하지만 초기 pH 3으로 배양하다가 6시간 후 pH 6으로 shift 하여 배양한 bi-staged pH process(16)에서는 pH의 조절

이 없는 경우와 비교하여 기질소비경향은 거의 차이가 없었음에도 불구하고 균사체 및 다당 생성은 그 경향이나 양에서 큰 차이를 보였다. 즉, bi-staged pH process에서는 교반속도가 200에서 600 rpm으로 증가함에 따라 균사체량은 증가경향을 보였으나 세포의 다당 생성과 기질소비는 오히려 반대의 경향을 보였다. 특히, pH 조절이 없는 경우에 대응하는 교반속도 (400 rpm)에서 비교해 보면 균사체 생성량은 크게 낮아졌으나 (12.3 → 5.2 g/L) 세포의 다당 생성은 매우 높아졌다 (5.8 → 14.5 g/L). 따라서 bi-staged pH process에 의해 세포의 다당 생성의 현저한 향상 (약 2.5배)이 있음을 확인할 수 있었으며, air lift 발효조 시스템에 의한 앞선 보고사실과 잘 일치하였다(16, 18).

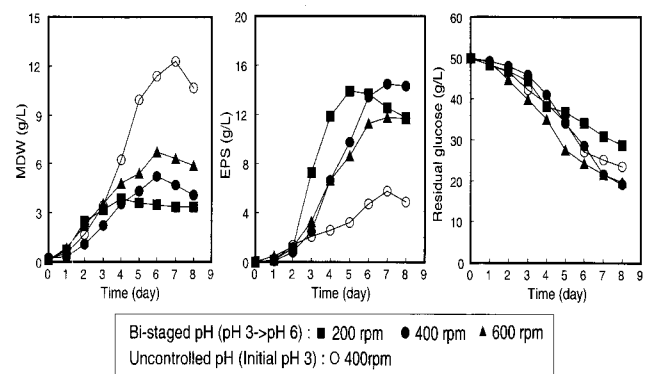


Fig. 1. Effect of agitation and different pH processes on MDW, EPS and residual glucose of *G. lucidum* mycelium in 20 L jar fermenter (Aeration rate = 1 vvm).

일반적으로 액체배양에 의한 균류의 발효공정 수행시 가장 큰 문제점의 하나는 낮은 산소전달이며, 실제로 세포의 다당의 생성은 용존산소와 밀접한 관련을 가진다. 따라서 Fig. 1의 결과를 용존산소와 관련하여 알아보기 위해서 서로 다른 pH process 및 교반속도에 따른 용존산소의 변화를 정리하여, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

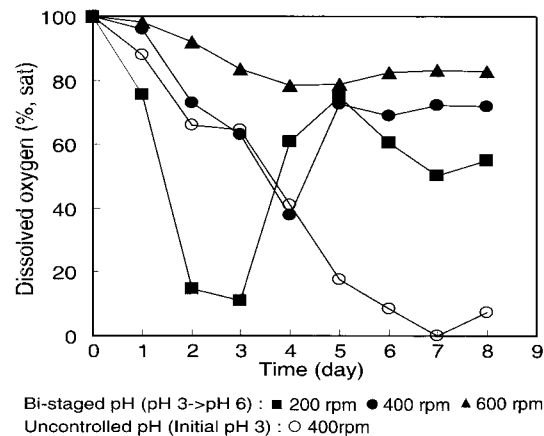


Fig. 2. Effect of agitation and different pH processes on dissolved oxygen of *G. lucidum* mycelium in 20 L jar fermenter (Aeration rate = 1 vvm).

Bi-staged pH 조절하에서 교반속도가 200~600 rpm으로 증가함에 따라 용존산소의 농도도 증가하였다. 200 rpm에서 배양 2~3일 후의 용존산소 농도는 10% 정도로 떨어졌고, 3일 후에 다시 증가하기 시작하여 5일째 최고 75%를 나타내었다. 또 배양 6일 후에는 다시 감소하기 시작하였고, 배양말기에는 54.8%이었다. 반면, 400 rpm일 때의 용존산소 농도는 배양 4일째 37.6%까지 감소하였고, 5일째는 72.7%로 증가하여 배양말기까지 계속 유지되었다. 600 rpm으로 교반속도를 증가시켰을 때는 용존산소 농도가 4일째 78%까지 감소하였으나, 6일 후 다시 증가하여 82% 수준에서 배양말기까지 유지되었다.

Fig. 1과 관련하여 살펴보면 각 교반속도에서 용존산소 농도가 가장 낮을 때가 균체의 생육이 왕성하였으나, 교반속도가 증가할수록 대체로 최소의 용존산소 수준은 높아졌다. 이는 교반속도의 증가로 산소이동용량계수가 증가되었기 때문이라 생각되며, Gibbs와 Seviour(31)도 impeller 차이에 따른 산소이동 용량계수의 차이가 용존산소의 변화로 나타남을 보고한 바 있다. 또, 배양말기에, 특히 높은 교반속도하에서는 일정수준으로 용존산소의 농도가 유지되었는데, 이는 더 이상의 균체량의 증가가 없기 때문이라고 볼 수 있다.

하지만, pH를 조절하지 않은 경우 용존산소의 농도는 배양 7일째까지 계속 감소하여 거의 0%에 이르렀고, 배양 말기에는 다소 증가하였다. Bi-staged로 pH를 조절했을 때와 비교하면, 배양 4일후에는 용존산소농도의 차이가 매우 크게 나타났다. 이것은 균체량의 현저한 증가로 배양액의 점도가 증가하기 때문인 것으로 보인다. 앞서 보고된 바에 의하면, 실제로 bi-staged pH 조절하에서는 pH를 조절하지 않은 경우에 비해 배양 중의 점도 증가가 거의 없었다(16).

하지만 pH를 조절하지 않은 경우는 용존산소가 제한될 때 균체량과 다당이 생성되었는데, 이 때의 균사체 생육은 매우 높았지만 다당생성은 다소 낮았다. 반면, bi-staged pH 조절시는 대수증식기 이후 용존산소의 농도수준이 높을수록 균체량은 증가하였고, 다당의 생성은 오히려 감소하였다. 특히, 다당 생성은 대수증식기 이후 용존산소농도 수준이 80%이상 일 때 감소하여 높은 수준의 용존산소 농도는 다당 생성에 부의 영향 (negative effect)을 주는 것으로 나타났다. 그러나 pH 조절이 없는 경우와 같이 제한되지는 않았으며, 40~80%의 용존산소 수준이 적합한 것으로 나타났다.

Gibbs와 Seviour(32)도 *Aureobasium pullulans*에 의한 pullulan 생성시 용존산소의 농도가 70%이상 유지되었을 때는 용존산소가 제한되거나 다소 낮은 값을 유지할 때의 1/2에 불과하다고 하였다. 하지만 Peter 등(33)은 *Xanthanomonas campestris*를 이용한 xanthan 생산에 있어서, 교반속도의 증가에 의한 용존산소의 증가는 xanthan 생성량과 밀접한 관계를 가지며, xanthan 발효에서 낮은 교반속도로 인한 산소 공급의 저해는 xanthan 생성량의 감소를 가져온다고 하였다.

*Schizophyllum commune*와 *Sclerotium glucanicum*에 의한 schizophyllan 및 scleroglucan 생성의 경우에는 용존산소가

제한될 때 다당의 생산성이 향상된다고 하였지만, *Alcaligenes faecalis*에 의한 curdlan의 생성 및 *Aureobasidium pullulans*에 의한 pullulan의 생성시에는 충분한 산소의 공급이 필요하다고 하였다(34-36).

영지의 경우 대수증식기 이후의 용존산소 농도의 적정 수준(40~80%) 유지가 중요한 것으로 나타났는데, 본 결과와 비슷한 용존산소의 분포는 Brown과 Zainudeen(37)에 의해서도 얻어졌다. 이들은 집중량의 증가에 따라 용존산소의 분포가 깊고, 좁은 형태를 나타내며, 배양말기에 80% 수준으로 증가하는데, 이는 호흡활성의 감소와 일치한다고 보고하였다.

따라서, 영지에 의한 세포외 다당의 생성에는 용존산소의 제한이나 높은 농도에서는 다당 생성이 저해되므로 용존산소의 적정 수준의 유지가 필요하며, 이를 위해 적정 통기 및 교반조건이 매우 중요한 것으로 판단되었다.

### 조작변수와 $k_La$ 의 해석

일반적으로 scale up의 기준에는 여러 가지가 있지만 Pessoa 등(38)은 *Candida kefyr* DSM 70106을 이용한 inulinase 생산시 전단에 의해서 균체와 효소의 구조가 영향을 받지 않을 때 산소이동용량계수가 scale up의 기준으로 적합하다고 하였다.

앞서 살펴본 바와 같이, 영지 배양의 경우에도 교반속도 및 용존산소의 변화가 균사체 및 다당 생성에 크게 영향을 미치므로 scale up의 기준으로서 산소이동 용량계수 ( $k_La$ )가 적합할 것으로 생각되었다. 따라서 scale up의 중요 기준인  $k_La$  값을 2.6, 20 및 75 L의 발효조에서 교반 및 통기속도를 달리하여 측정하였으며, 그 결과는 Table 1 및 Fig. 3과 같다.

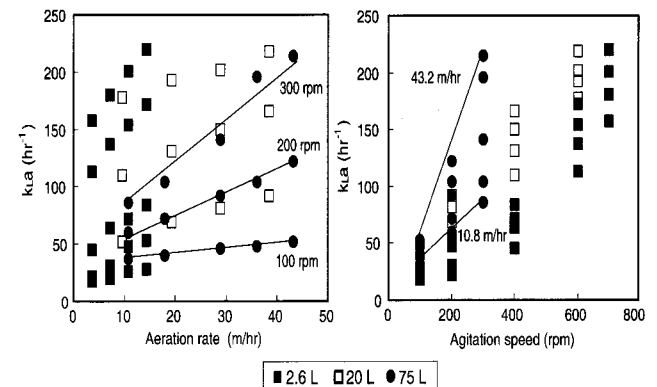


Fig. 3. Effects of agitation speed and aeration rate on  $k_La$ .

Table 1에서 보면 발효조의 용량에 상관없이 각 발효조에서 통기속도 및 교반속도의 증가에 따라  $k_La$  값은 증가하는 경향을 보였고, 발효조 용량이 증가할수록 대응하는 통기속도 및 교반속도에 따라  $k_La$  값은 증가하였다. 통기속도 및 교반속도의 증가에 따른  $k_La$ 의 경향을 보다 더 상

세히 살펴보기 위하여 그림으로 나타낸 결과, Fig. 3에서와 같이, 직선적으로 증가하였으며, 발효조 용량이 커질수록  $k_{La}$  값도 커져서 큰 용량일수록 물질전달 효과가 양호한 결과를 나타내었다. 그러나 각 발효조에서 대응하는 통기 및 교반에 대한  $k_{La}$  값의 직선관계로부터 구한 기울기 값은 교반속도의 쪽이 더욱 커서 산소이동용량계수는 통기속도의 변화보다는 교반속도의 변화에 더욱 민감함을 알 수 있었다.

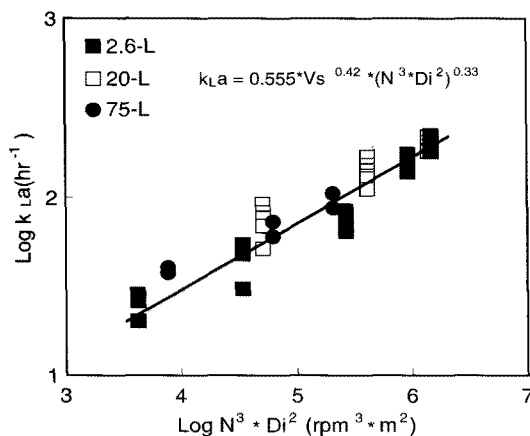
**Table 1.** Results of  $k_{La}$  ( $hr^{-1}$ ) measured in different fermenter scales and operating variables

Fermenter	N (rpm)	Superficial gas velocity (m/hr)				
		3.6	7.2	10.8	14.4	
2.6 L jar fermenter Working volume = 1.5 L Impeller diameter = 0.065 m	100	18	20.16	25.92	28.44	
	200	22.5	30.6	47.54	53.5	
	400	45.2	64	72	84	
	600	112.68	134.82	154	172	
	700	157.68	180	201	220	
		9.6	19.2	28.8	38.4	
20 L jar fermenter Working volume = 12 L Impeller diameter = 0.08 m	200	51.58	68.93	81.43	91.65	
	400	110	131	150	166	
	600	177.66	193	201.6	218.34	
		10.8	18	28.8	36	43.2
75 L jar fermenter Working volume = 50 L Impeller diameter = 0.088 m	100	37.44	42.3	55	67	77
	200	59.6	72	92	104	122
	300	124	145	172.34	195.66	214.38

이들 관계를 보다 정량적으로 조사하기 위하여 통기속도 ( $V_s$ ), 교반속도 및 impeller 지름 ( $N \cdot D_i$ )을 독립변수로 하고,  $k_{La}$  값을 종속변수로 하여 2차 회귀 분석하였으며, 그 결과를 Fig. 4 및 Table 2에 나타내었다.

**Table 2.** Results of multiple regression analysis

	Regression coefficient	Standard error
Y-intercept	0.555	0.308
$V_s$ (X1)	0.417	0.056
$N^3 \times D_i^2$ (X2)	0.334	0.05



**Fig. 4.** Relationship of  $k_{La}$  and  $N^3 \times D_i^2$  at different aeration rates.

Fig. 4에서 보는 바와 같이, 서로 다른 통기속도에서  $\log k_{La}$ 와  $\log N^3 D_i^2$ 의 관계는 직선관계를 나타냈으며, 이들 관계를 이용하여 2차 회귀분석하여(Table 2) 산소이동용량계수 ( $k_{La}$ ), 통기속도 ( $V_s$ ), 교반속도 및 impeller 지름 ( $N D_i$ )과의 상관관계를 조사한 결과 다음과 같은 관계 식으로 나타낼 수 있었다.

$$k_{La} = 0.555 \times V_s^{0.42} \times (N^3 \times D_i^2)^{0.33}$$

이 식으로부터  $k_{La}$  값은 통기속도보다는 교반 및 impeller의 지름, 즉 impeller tip speed의 영향이 크음을 알 수 있으며, Fig. 3의 결과와 잘 일치한다.

Table 3은 이들 독립변수와 종속변수의 다중상관계수와 잔차를 요인으로 하여 이 식의 종속변수에 대한 독립변수의 영향을 검토한 분산분석 (ANOVA : Analysis of Variance)의 결과이다.

회귀식의 제곱합은 20.65, 잔차의 제곱합은 3.51이었고, 0.925의 다중회귀계수를 얻었다. 또 유의수준도  $p < 0.05$ 의 양호한 값을 나타내어 종속변수와 독립변수의 상관관계가 뛰어난 것을 알 수 있었다.

**Table 3.** ANOVA table

Factor	Square sum	Degree of freedom	Square mean	F ratio
Regression	20.65	2		
Error	3.51	44	10.48	131.28**
Total	24.16	46	0.079	

$R^2 = 0.925.$

$R = 0.856.$

**균사체 및 다당 생성의 scale-up 시험**

조작변수와  $k_{La}$  값의 상관관계로부터 얻어진 식을 적용하여 bi-staged control process하에서 scale up 시험을 수행하였다. 이 때, 실제의 배양 중에는 균체의 생육으로 인하여  $k_{La}$  값이 감소하기 때문에 2.6 L jar fermenter에서의 최적 통기속도 및 교반속도인 400 rpm 및 1 vvm일 때의 산소이동용량계수( $64 h^{-1}$ )를 기준으로 20 L 및 75 L의 fermenter에 적용하였다.

Fig. 5는 2.6 L 발효조에서의 발효경시변화로 상단에서 보는 바와 같이 bi-staged pH control 하, 즉 균사체 증식이 가장 높았던 pH 3에서 6시간 배양 후, 세포의 다당 생산이 가장 양호하였던 pH 6으로 shift하여 배양하였을 때 서서히 균사생육을 보이면서 4일째 최대값 3.66 g/L를 나타내었고, 다당은 배양 2일째부터 급격히 증가하기 시작하여 배양 7일째 15.43 g/L의 최대값을 나타내었다. 이 때, 기질의 소비는 균체의 증식이 끝난 후에도 계속 감소하므로 다당의 생성에 이용되는 것으로 생각되었다.

반면, Fig. 6은 역시 pH 3에서 배양 6시간 후 pH 6으로 전환하는 bi-staged pH control하에서 2.6 L 발효조에서와

비슷한  $68.93 \text{ h}^{-1}$ 의 산소이동 용량계수 값을 나타낸 20 L의 200 rpm, 1 vvm 조건으로 얻은 기질, 균사생육 및 세포외 다당생성의 경시변화이다. 기질이 서서히 소비되면서 균체량도 서서히 증가하면서 용존산소는 급격히 저하하였고, 배양 4일째 3.853 g/L의 최대 균사량을 나타내었다. 반면, 다당의 생성은 용존산소가 급격히 저하한 배양 2일째부터 현저히 증가하여 배양 5일째 13.93 g/L로 최대값을 보였다. 배양 5일후 더 이상의 균체 증식은 없었으며, 기질은 서서히 감소된 반면, 다당의 분해가 다소 빠르게 진행되었는데, 2.6 L 발효조에 비해 균체의 감소량이 거의 없기 때문에 분해된 다당을 기질로 이용하는 것으로 생각되었다. Rau 등(34)도 *Schizophyllum commune*의 경우 탄소원의 고갈로 인한 glucan의 분해 효소에 의해 생성물인 schizophyllan을 분해하고 기질로 이용한다고 보고하였다.

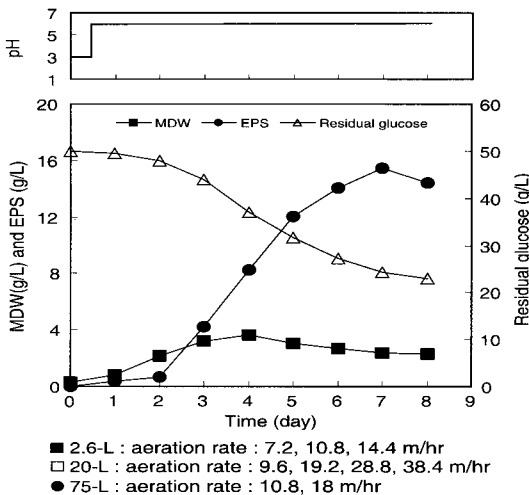


Fig. 5. Time course of MDW, EPS and residual glucose consumption of *G. lucidum* under bi-staged pH control process in 2.6 L jar fermenter (400 rpm, 1 vvm).

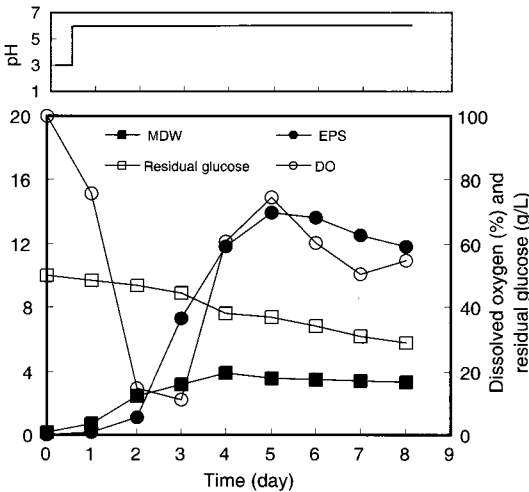


Fig. 6. Time course of MDW, EPS, residual glucose and dissolved oxygen of *G. lucidum* under bi-staged pH control process in 20 L jar fermenter (200 rpm, 1.0 vvm).

한편, Fig. 7은 75 L pilot fermenter를 이용하여 각각  $67 \text{ h}^{-1}$  및  $72 \text{ h}^{-1}$ 의 산소이동 용량계수를 나타낸 100 rpm/1.0 vvm과 200 rpm/0.5 vvm으로 bi-staged pH control process하에서의 배양 결과이다.

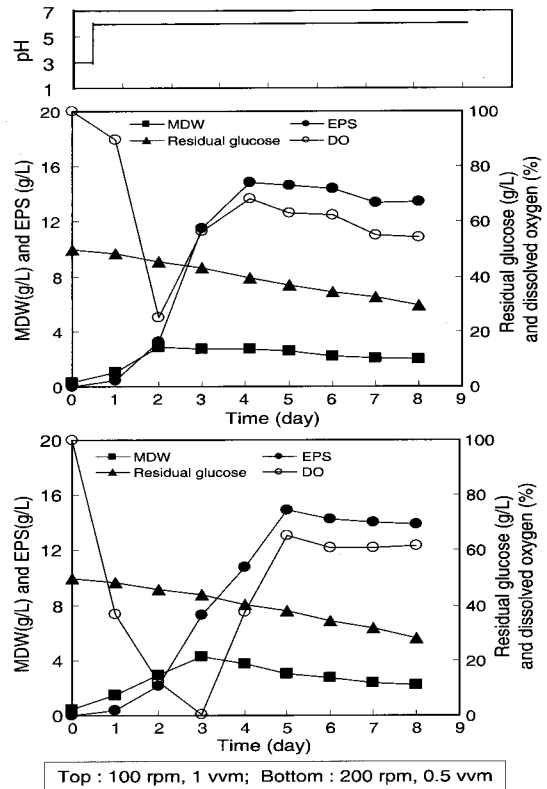


Fig. 7. Time course of MDW, EPS, residual glucose and dissolved oxygen consumption of *G. lucidum* under bi-staged pH control process in 75 L jar fermenter.

100 rpm의 경우 균체량은 2일째 2.89 g/L이었고, 다당의 생성은 4일째 14.64 g/L의 최대값을 나타내었다. 반면, 200 rpm의 경우 균체량은 3.75 g/L를 나타내었고, 다당의 생성량은 5일째 14.88 g/L가 되었으며, 비슷한 산소이동 용량계수를 가질 때 교반속도는 통기속도에 비해 균체량 및 다당 생성에 더 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

2.6 L jar fermenter에서 최적 조건일 때의 최적 산소이동 용량계수와 비슷한 수준의 값으로 20 L 및 75 L로 scale up하였을 때 균체량은 20 L 발효조의 경우는 다소 증가하였으나, 다당의 생성량은 약 1.5 g/L 감소하였다. 반면, 75 L 발효조에서 100 rpm일 때는 균체량이 다소 감소하였으나 200 rpm일 때는 증가하였다. 또, 이 때 다당의 생성량은 각각 14.64 및 14.88 g/L로 2.6 L 발효조의 결과에 비해 0.6~0.8 g/L 정도 감소하였다. 이것은 통기에 의한 전단의 영향으로 균사의 형태가 변하기 때문이라 생각된다.

따라서, 비슷한 산소이동 용량계수 값은 발효조 용량에 상관없이 균체량 및 다당 생성량도 서로 비슷한 값을 보여서 scale up 조건으로 적당하다고 판단되었다.

**Table 4.** Kinetic parameters of submerged culture of *G. lucidum* in 2.6 L, 20 L and 75 L jar fermenters

Parameter	Fermenter volume (L)												
	2.6 L				20 L				75 L				
$k_{La}$ ( $h^{-1}$ )	20.16	30.6	45.2	64	72	84	134.82	68.93	131	193	67	72	124
Aeration rate (vvm)	1.0	1.0	0.5	1.0	1.5	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5	0.3
Agitation speed (rpm)	100	200	400	400	400	400	600	200	400	600	100	200	300
$\mu$ ( $hr^{-1}$ )	0.036	0.037	0.034	0.035	0.037	0.041	0.028	0.044	0.035	0.044	0.049	0.032	0.028
MDW* (g/L)	3.174	3.313	2.7	3.66	3.775	4.945	2.73	3.853	5.217	6.735	2.892	3.754	3.94
EPS** (g/L)	12.5	13.14	12.66	15.43	14.7	13.31	6.81	13.93	14.52	11.78	14.64	14.88	14.84
Yx/s (g/g)	0.386	0.35	0.35	0.28	0.364	0.209	0.028	0.322	0.244	0.262	0.353	0.383	0.361
Yp/s (g/g)	0.762	0.756	0.463	0.6	0.546	0.505	0.511	1.055	0.509	0.413	1.115	1.224	0.911
$q_p$ ( $gg^{-1}hr^{-1}$ )	0.144	0.147	0.16	0.146	0.144	0.111	0.07	0.16	0.096	0.076	0.246	0.128	0.106
$q_s$ ( $gg^{-1}hr^{-1}$ )	0.094	0.106	0.097	0.124	0.102	0.198	0.153	0.137	0.141	0.167	0.075	0.084	0.078

\* MDW : mycelial dry weight. \*\* EPS : exo-polysaccharide.

Table 4는 2.6, 20 및 75 L의 규모로 scale up 했을 때의 통기 및 교반에 의한 산소이동 용량계수와 비중식속도, 균체량, 다당 생성량과 이의 수율 및 비생성속도 등의 각종 계수 값들을 나타낸 결과이다.

2.6 L 발효조에서의 결과를 보면, 앞서 살펴본 대로 통기속도 및 교반속도의 증가로 산소이동용량계수가 증가하였는데, 이에 따른 각종 액체배양의 동력학적 매개변수들의 변화는 유의성 있는 뚜렷한 경향을 보이지는 않았다. 대체로 산소이동 용량계수가 64~72  $h^{-1}$  일 때 비교적 목표로 하는 균체생성 및 다당 생성이 우수한 결과를 나타내었으며, 높은 다당생성 수율과 비다당생성속도를 나타내었다. 20 및 75 L 발효조로 scale up하면 2.6 L 발효조에서 보다 비중식속도, 균사수율 및 균사증식은 비슷한 수준이었으나 다당 생성량, 다당생성 수율 및 비다당 생성속도가 증가함을 보였다. 따라서 scale up에 의해 목표로 하는 다당생성 및 이의 수율이 증가됨을 보였는데, 이는 발효조 용량의 증가에 따른 산소이동용량계수의 향상과 이에 따라 상대적으로 더 낮은 통기속도나 교반속도에서 발효가 진행되어 전단력 등에 의한 균사의 손상이 적어지기 때문이라 생각된다(20). 20 L 발효조의 400 rpm, 1 vvm 및 75 L 발효조의 300 rpm, 0.3 vvm 조건에서는 2.6 L 발효조보다 다소 높은 산소이동용량계수인 124~131  $h^{-1}$ 에서도 다당 생성에 좋은 결과를 나타내었는데, 이것은 초기의 산소이동용량계수를 측정된 결과로서 배양 경시 변화에 따른 산소이동용량계수의 값의 차이에 기인한다고 생각된다.

Gaspar 등(39)은 *Penicillium canescens*에 의한 xylanase 생산시 용존산소와 산소이동용량계수는 비슷하게 감소하는 경향을 보였고, 산소이동 용량계수의 향상으로 균체 및 xylanase의 생산이 향상된다고 하였다.

따라서 배양중의 통기 및 교반에 의한 산소이동 용량계수의 변화를 측정함으로써 더 정확하게 발효를 제어할 수 있을 것으로 생각되었는데, 본 실험의 경우 최대의 다당 생성이 예측되는 산소이동 용량계수 값은  $85.4 \pm 26.70 h^{-1}$ 이었다.

### 요약

Bi-staged pH process 하의 jar fermenter system에서 영지의 액체배양 시 효율적인 균사체 및 세포의 다당 생산을 위한 용존산소의 영향을 조사하고, 산소이동용량계수와 발효조 조작변수와의 상관관계를 해석하여 scale up의 조건을 검토, 확립하였다. 교반속도에 따른 용존산소의 농도변화를 살펴본 결과, bi-staged pH process에서 배양 2~4일에 용존 산소의 급격한 감소를 보였으나 용존 산소의 제한은 일어나지 않고, 다시 증가하는 경향을 보였으며, 교반속도가 증가할수록 감소 폭과 깊이는 증가하는 경향을 보였다. 다당 생성은 대수 증식기 이후의 용존산소 농도가 40~80% 범위일 때 가장 높았으며, 이 보다 낮거나 높은 경우 다당의 생성은 저해되었다. 교반 및 통기에 따른 산소이동용량계수 ( $k_{La}$ )와 통기속도 ( $V_s$ ), 교반속도 ( $N$ ) 및 impeller 지름 ( $D_i$ )의 자료로부터 중회귀분석한 결과, 이들 사이의 관계는 다음 식으로 표현할 수 있었다.

$$k_{La} = 0.555 \times V_s^{0.42} \times (N^3 \times D_i^2)^{0.33} \quad (R^2 = 0.925, p < 0.05)$$

2.6 L 발효조의 경우, 15.43 g/L의 최대 다당 생산량은 400 rpm 및 1 vvm에서 얻어졌으며, 2.6 L 발효조의 최적 산소이동용량계수 값을 적용한 20 및 75 L 발효조에서의 scale up 시험 결과는 서로 잘 일치하였다. 최대의 다당 생성을 위한 산소전달계수의 값은  $85.4 \pm 26.70 h^{-1}$ 이었다.

접수 : 2009년 2월 18일, 게재승인 : 2009년 4월 2일

### REFERENCES

- Jong, S. C. and J. M. Birmingham, and S. H. Pai (1991), Immunomodulatory substances of fungal origin.

- J. Immunol. Immunopharmacol.* **11**, 115-122.
2. Jong, S. C. and J. M. Birmingham (1992), Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Adv. Appl. Microbiol.* **37**, 101-134.
  3. Yang, H. L., T. X. Wu, and K. C. Zhang (2004), Enhancement of mycelial growth and polysaccharide production in *Ganoderma lucidum* by the addition of ethanol. *Biotechnol. Lett.* **26**, 841-844.
  4. Hsieh, C., M. H. Tseng, and C. J. Liu (2006), Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC 36041) under limitations of nutrients. *Enzyme Microb. Technol.* **38**, 109-117.
  5. Yang, F. C. and C. B. Liao (1998), The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochem.* **33**, 547-553.
  6. Tang, Y. J. and J. J. Zhong (2002), Exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus, *Ganoderma lucidum*, grown on lactose in a reactor. *Biotechnol. Lett.* **24**, 1023-1026.
  7. Fang, Q. H. and J. J. Zhong (2002), Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.* **37**, 769-774.
  8. Fang, Q. H., and J. J. Zhong (2002), Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. *Biochem. Eng. J.* **10**, 61-65.
  9. Yang, B. K., S. C. Jeong, and C. H. Son (2002), Hypolipidemic effect of exo-and endo-biopolymers produced from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* in rats. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 872-877.
  10. Wagner, R., D. A. Mitchell, G. L. Sasaki, M. A. L. de A. Amazonas, and M. Berovic (2003), Current techniques for the cultivation of *G. lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides. *Food Technol. Biotechnol.* **41**, 371-382.
  11. Tang, Y.J., L. W. Zhu, H. M. Li, and D. S. Li (2007), Submerged culture of mushrooms in bioreactor-Challenges, Current state-of-the-art, and Future prospects. *Food Technol. Biotechnol.* **45**, 221-229.
  12. Lee, S. Y., and T. S. Kang (1996), Production condition and characterization of exo-polysaccharide production produced by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 111-118.
  13. Lee, S. Y., T. S. Kang, S. O. Moon, I. D. Lew, and M. Y. Lee (1996), Fractionation and antitumor activity of the water-soluble exo-polysaccharide by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 459-464.
  14. Lee, S. Y., and T. S. Kang (1997). Optimization of antitumor active exo-polysaccharide production through the submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium. *Kor. J. Biotech. Bioeng.* **12**, 1391-135.
  15. Lee, S. Y., T. S. Kang, and M. C. Lee (1998), Condition of exo-polysaccharide production from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* by using air-lift fermenter system. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 547-553.
  16. Lee, K. M., S. Y. Lee, and H. Y. Lee (1999), Bistage Control of pH for improving exo-polysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 646-650.
  17. Lee, S. Y. and T. S. Kang (1999), Structural analysis of the antitumor active exo-polysaccharide produced by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium. *Korean J. Mycol.* **27**, 76-81.
  18. Lee, S. Y., and K. M. Lee (2000), Effect of different pH processes on branched  $\beta$ -1,3-glucan production from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Industrial Technology* (Kangwon Natl. Univ.). **20A**, 45-50.
  19. Lee, K. M. and S. Y. Lee (2001), Influence of ammonium phosphate on mycelial morphology during submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*. *The Korean Journal of Mycology* **29**, 91-98.
  20. Lee, H. S., J. H. Jung, and S. Y. Lee (2001), Effects and batch kinetics of agitation and aeration on submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 307-313.
  21. Lee, S. Y. and H. S. Lee (2001), Effect of polyacrylic acid addition on wall growth in submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Industrial Technology* (Kangwon Natl. Univ.). **21A**, 341-345.
  22. Chung, W. T., S. H. Lee, J. D. Kim, Y. S. Park, B. Hwang, S. Y. Lee, and H. Y. Lee (2001), Effect of mycelial culture broth of *Ganoderma lucidum* on the growth characteristics of human cell lines. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 550-555.
  23. Lee, S. Y. and K. M. Lee (Jul. 9, 2002), Exopolysaccharide production from submerged mycelial culture of mushroom. US 6,416,978 B1.
  24. Lee, S. Y., T. S. Kang, and S. O. Moon (2005), Antitumor activity and effect on cell proliferation and differentiation of exopolysaccharide produced by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Industrial Technology* (Kangwon Natl. Univ.). **25B**, 241-251.
  25. Rane, K. D. and K. A. Sims (1994), Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* Y1095. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 131-137.
  26. Dronawat, S. N., C. K. Svihla, and T. Hanley (1995), The Effects of agitation and aeration on the production of gluconic Acid by *Aspergillus niger*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **51**, 347-354.



27. Sone, Y., R. Okuda, A. Wada, A. Kishida, and A. Misaki (1985), Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderam lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2642-2650.
28. Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.* **31**, 426-428.
29. Bandyopadhyay, B. and A. E. Humphrey (1967), Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Biotechnol. Bioeng.* **9**, 533-544.
30. Nho, H. J. (1998), *Investigation Method and Statistical Analysis by Excell* (in Korean), Pumunsa, Seoul, Korea, pp320-333.
31. Gibbs, P. A and R. J. Seviour (1998), The Production of exo-polysaccharide by *Aureobasidium pullulans* in fermenters with low-shear configurations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 168-174.
32. Gibbs, P. A. and R. J. Seviour (1996), Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture?. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 503-510.
33. Peter, H. U., H. Herbst, P. G. M. Hesselink, H. Lunsdorf, A. Schumpe, and W. D. Deckwer (1989), The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol, Bioeng.* **34**, 1393-1397.
34. Rau, U., E. Gura, E. Olszewski, and F. Wagner (1992), Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. *J. Industrial Microbiol.* **9**, 19-26.
35. Lawford, H. and J. Rouseau (1989), Effect of oxygen on the rate of  $\beta$ -1,3-Glucan microbial exopolysaccharide production. *Biotechnol. Lett.* **11**, 125-130.
36. Rho, D., A. Mulchandini, J. H. T. Luong, and A. LeDuy (1988), Oxygen requirement in pullman fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 361-366.
37. Brown, D. E. and M. A. Zainudeen (1978), Effect of inoculum size on the aeration pattern of batch cultures of a fungal microorganism. *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 1045-1061.
38. Pessoa, P., M. Vitolo, and H. Hustedt (1996), Use of  $K_{La}$  as a criterion for scaling up the inulinase fermentation process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57**, 699-709.
39. Gaspar, A., L. Strodiot, and P. Tonart (1998), Improvement of oxygen transfer coefficient during *Penicillium canescens* culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70**, 535-545.