

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 미차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리, 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락, 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명 확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

미것은 이용허락규약(Legal Code)을 미해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer 🖳





2005年 2月碩士學位論文

백영고 버섯의 공학적 기법을 이용한 액체배양에 관한 연구

朝鮮大學校大學院

化學工學科

南 亨 根

백영고 버섯의 공학적 기법을 이용한 액체배양에 관한 연구

A Study on the Liquid Culture of

Pleurotus nebrodensis Inzenga

Using Engineering Technique

2004年 10月 日

朝鮮大學校大學院

化學工學科

南 亨 根

백영고 버섯의 공학적 기법을 이용한 액체배양에 관한 연구

指導敎授 차 월 석

이 論文을 工學碩士學位 申請 論文으로 提出함.

2004年 10月 日

朝鮮大學校大學院

化學工學科

南 亨 根

南亨根의 碩士學位 論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 權 圭 赫 印

委 員 朝鮮大學校 教授 李 重 憲 印

委 員 朝鮮大學校 教授 車 月 石 印

2004年 11月 日

朝鮮大學校大學院

목 차

List of Tables	iii
List of Figures	iv
ABSTRACT	vi
I. 서론 ···································	1
II. 문헌연구	5
II-1. 느타리속(<i>Pleurotus</i> spp)버섯의 생산	5
II-1-1. 고체배양 ·····	5
II-1-2. 액체배양 ·····	6
II-2. Pleurotus spp의 약리적 특징	8
II-3. 균사체 생산	10
II-3-1. 산소공급조건	10
II-3-2. Pellet형과 filamentous형 균사체 비증식 속도	11
II-4. 항종양성 다당류	14
III. 재료 및 방법	21
III-1. 균주 및 보존	21
III-2. 접종원 ·····	21
III-3-1 Flask 배양 조건	21
III-3-2 영양요구성	22
III-4 Jar-fermentation	23
III-5 분석방법 ·····	24

IV. 결과 및 고찰 ··································	26
IV-1. 온도의 영향 ·····	26
IV-2. 접종원의 배양일수 및 접종량의 영향	28
IV-3. 초기의 pH의 영향	30
IV-4. Surface aeration의 영향	32
IV-5. Shaking speed의 영향 ·····	34
IV-6. 영양요구성	36
IV-6-1. 탄소원의 선발 및 최적 농도	36
IV-6-2. 질소원 선발 및 최적농도	40
IV-6-3. 무기염류 선발 및 최적농도	45
IV-7. Jar fermentation	50
IV-7-1. Agitation speed의 영향	50
IV-7-2 Aeration의 영향	52
IV-7-3 최적 배양조건하에서의 time profile	54
V. 결론 ···································	56
참고문헌	58

List of Tables

Table 1. Med	icinal effects of <i>Pleurotus nebrodensis</i> Inzenga	9
Table 2. Cell	specific growth rate of <i>Pleurotus nebrodensis</i> Inzenga	
myce	elium ·····	12
Table 3. Anti-	-tumor activity of basidiomycetes	17
Table 4. Effec	ct of initial pH on <i>Pleurotus nebrodensis</i> Inzenga mycelial	
grow	vth and Exo-polysaccharide production	31
Table 5. Effec	ct of surface aeration on Pleurotus nebrodensis Inzenga	
myce	elial growth and exo-polysaccharide production with flas	k
cultu	ıre ·····	33
Table 6. Effec	cts of carbon sources on Pleurotus nebrodensis Inzenga	
myce	elial growth and exo-polysaccharide production with flas	k
cultu	are ······	38
Table 7. Effec	cts of nitrogen sources on Pleurotus nebrodensis Inzenga	
myce	elial growth and exo-polysaccharide production with flas	k
cultu	are	42
Table 8. Effec	cts of mineral sources on Pleurotus nebrodensis Inzenga	
myce	elial growth and exo-polysaccharide production with flas	k
cultu	ıre ·····	47

List of Figures

Fig.	1.	Pleurotus nebrodensis Inzenga (fruiting body) 8
Fig.	2.	Possible immune mechanism : β -D-glucan biological response
		modifier (BRM) 18
Fig.	3.	Primary molecular diagram of mushroom β-D-glucan 19
Fig.	4.	Molecular model of the right-handed triple spiral helix of
		antitumor active beta-D-glucan (Schizophyllan) 20
Fig.	5.	Experimental procedure in this study 25
Fig.	6.	Effect of temperature on the Mycelial growth of Pleurotus
		nebrodensis Inzenga on YMGA medium 27
Fig.	7.	Effects of inoculum age and inoculum volume on Pleurotus
		nebrodensis Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide
		production 29
Fig.	8.	Effect of shaking speed on <i>Pleurotus nebrodensis</i> Inzenga mycelial
		growth and exo-polysaccharide production with flask culture at
		$25^{\circ}\mathrm{C}$ and initial pH 6.5
Fig.	9.	Effect of glucose concentration on Pleurotus nebrodensis Inzenga
		mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask
		culture
Fig.	10	. Effect of polypeptone concentration on <i>Pleurotus nebrodensis</i>
		Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production
		with flask culture 43
Fig.	11	. Effect of yeast extract concentration on Pleurotus nebrodensis
		Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production

	with flask culture	44
Fig. 1	2. Effect of K ₂ HPO ₄ concentration on <i>Pleurotus nebrodensis</i>	
	Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production	
	with flask culture	48
Fig. 1	3. Effect of MgSO ₄ \cdot 7H ₂ O concentration on <i>Pleurotus nebrodensis</i>	
	Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production	
	with flask culture	49
Fig. 1	4. Effect of agitation speed on Pleurotus nebrodensis Inzenga	
	mycelial growth and Exo-polysaccharide production with jar	
	fermentation at 25 $^{\circ}\text{C}$, pH 6.5 and 0.5 vvm $$	51
Fig. 1	5. Effect of aeration rate on <i>Pleurotus nebrodensis</i> Inzenga	
	mycelial growth and exo-polysaccharide production with jar	
	fermentation at 25 $^{\circ}\text{C}$, pH 6.5 and 200 rpm $$	53
Fig. 1	6. Changes of <i>Pleurotus nebrodensis</i> Inzenga Mycelial growth ar	ıd
	exo-polysaccharide production with jar fermentation at $25^\circ\!$	
	pH 6.5, 1.5 vvm, and 200 rpm	55

ABSTRACT

A Study on the Liquid Culture of Pleurotus nebrodensis Inzenga Using Engineering Technique

Hyung-Gun Nam

Advisor : Prof. Wol-Suk Cha Ph.D.

Department of Chemical Engineering,

Graduate School of Chosun University

The objective of the present study was to determine the optimal culture conditions and medium composition for production of mycelial and exopolysacchride in liquid-state fermentation from *Pleurotus nebrodensis* Inzenga. Optimal culture conditions for mycelial growth and exo-polysaccharide production in flask culture were determined in this research. The optimal temperature and pH were $25\,^{\circ}\mathrm{C}$, and 6.5, respectively. The optimal culture volume was 50 mL in a 300 mL flask and shaking speed was 150 rpm. The optimal inoculum age and volume percent were 7 days and 5%(w/v), respectively. Among the 10 carbon source tested, glucose was the best carbon source. The maximum mycelial growth and exo-polysaccharide production were achieved in a 5%(w/v) glucose. The best nitrogen sources were polypeptone and yeast extract, respectively. The optimal concentrations of polypeptone and yeast extract were 1.0% (w/v) and 0.8% (w/v), respectively. K_2HPO_4 (0.12%(w/v)) and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.12%(w/v)) were the

most effective inorganic salts for mycelial growth and exo-polysaccharide production. In summary, the optimal medium composition was glucose 5%, polypeptone 1.0%, yeast extract 0.8%, K_2HPO_4 0.12% and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12% (w/v). Jar fermentations were carried out to optimize the culture conditions for mycelial growth and exo-polysaccharide production. The optimal agitation speed and aeration rate were 150 rpm and 1.5 v.v.m., respectively. Under optimal culture conditions, the maximum mycelial growth and exo-polysaccharide production after 11 days with a 5 L jar fermenter containing the optimized medium were 12.84 g/L and 4.85 g/L, respectively. However, the fundamental information obtained this study is insufficient in the development of a efficient process for mycelial growth and exo-polysaccharide production from P. nebrodensis Inzenga. To meet the requirements of large-scale mycelial and exo-polysaccharide production, therefore, further studies are needed, including configuration of suitable reactor, optimization of culture conditions and characterization exo-polysaccharide produced from *P. nebrodensis* Inzenga.

I. 서 론

버섯(mushroom)은 칼로리(calories), 나트륨(sodium), 지방(fat), 그리고 콜레스테롤(cholesterol)이 낮은 반면, 단백질(proteins), 탄수화물(carbohydrates), 섬유(fiber), 비타민(vitamins), 그리고 무기질(minerals) 등이 풍부한 영양학적 특성을 지녀 매우 좋은 건강식품으로 각광받고 있다[1-2].

예로부터 버섯은 한방에서 자양강장, 소자, 혈중지질강하, 거담, 관상동맥의 혈류량 증대, 혈압강하 등의 약리효과와 면역증강 효과가 있는 것으로 알려져왔다. 버섯류에 관한 연구는 중국, 일본 및 한국에서 활발히 이루어지고 있으며 일본의 경우 기능성 식품으로 표고버섯 균사체 추출물이 이미 일반화되어있다. 또한, 1992년 Agaricus blzei 자실체로부터 추출한 고분자 다당체가 암세포 증식억제뿐만 아니라, 류머티스관절염이나 만성기관지염, 위염처럼 면역기능 약화가원인인 모든 질병에 효능이 있다고 알려지면서 그 활용방안에 대한 연구가 큰진전을 보이고 있으며, 최근 기능성 식품으로 상품화 되었다[3].

버섯의 성분 중 면역증강작용을 나타내는 것은 다당체이며, 일반적으로 β-1,3 glucan의 골격에 β-1,6 glucan의 가지 구조를 갖는 단일물질임에도 불구하고 생태기능에 다양한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[4]. 버섯으로부터 세포의다당류(exo-polysaccharide)에 관한 최근의 연구들은 생물학적 활성들에 대하여보고되었다[5]. Lentinus edodes의 Lentinan[6], Schizophyllum commune의Schizophyllan[7], 그리고 Coriolus Versicolor의 Krestin[8] 등과 같은 버섯 추출물들로부터 생산된 여러 항암성 물질들이 현재 상업적으로 이용되고 있다.

지난 수십년 동안 버섯의 인공생산은 급속도로 증가하였고, 버섯의 생산과 소비는 아시아 특히, 중국, 일본 및 한국에서 주로 이루어지고 있다. 이러한 상 황에도 불구하고 버섯의 고체배양을 위한 생리적(physiological), 환경적 (environmental) 배양조건에 대한 연구가 광범위하게 이루어지지 않았기 때문 에 버섯 생산성의 향상은 다소 제한적인 상황에 놓여있다[9-14].

그 동안 담자균류(basidomycetes) 대부분은 자실체(fruit body)를 이용하며, 고체배양에 의해 재배 및 생산되고 있으나 많은 노동력과 시간을 소비하므로 액체배양에 의한 발효조 내에서의 균사체 배양을 통한 효율적인 생산이 바람직하다[15,16]. 또한, 액체 배양은 곰팡이에 의한 오염발생의 위험이 덜하고 조밀한 공간과 짧은 시간에 균사체 대량 생산의 이점을 가지고 있다[17]. 그동안 많은 연구자들이 여러 종의 버섯으로부터 균사체 생산과 생리활성물질(세포외 다당류)을 생산하기 위한 최적 액체배양 조건을 얻기 위하여 많은 연구가 있었음에도 불구하고 액체배양을 위한 영양요구성(nutritional requirement) 및 배양조건에 대하여 광범위하게 이루어지지 않은 상황에 있다[18-23].

본 연구에서 연구하고자 하는 버섯은 백영고(*Pleurotus nebrodensis* Inzenga)로 새송이버섯(*Pleurotus eryngii*)의 변이종으로서, 담자균류의 느타리버섯과 (*Pleurotaceae*), 느타리버섯속(*Pleurotus*)에 속하는 버섯의 일종이다(Fig. 1).

중국의 Chinese Food Examination Center의 보고에 따르면 백영고는 14.7% 의 단백질을 함유하고 있고, 비타민 C, D 및 E가 다른 버섯들보다 수배정도 많이 함유되어 있다고 하였으며, 특히 다당류(Polysacchrides)가 19%에 달하고 면역계(Immune System)를 강화시키는 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[24]. 또한, 백영고는 식용버섯 중에서 가장 육질이 풍부하고 송이의 맛과 향을가지고 있어 다른 버섯에 비하여 식용가치가 높으면서도 생장주기가 짧으며,생산량이 높고, 질이 좋아서 개발전망이 매우 높은 버섯이다.

그러나 백영고의 영양학적·약리적 효능이 매우 우수한 것으로 기대되지만, 느타리속의 다른 버섯에 대한 많은 연구에 비하여 국내·외적으로 매우 드문실정이다. 따라서 본 연구에서는 액체배양을 이용하여 백영고의 균사체 대량생산 및 세포외 다당류 생성에 미치는 영양요구성 및 배양조건의 최적화를 검토하였다.

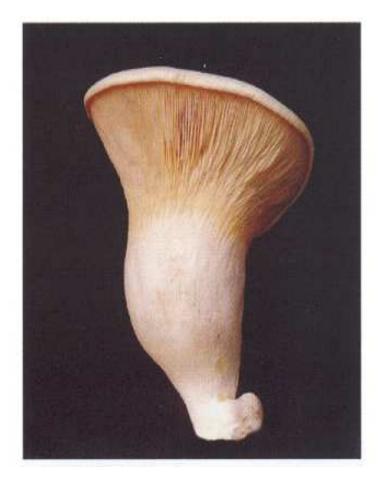


Fig. 1. Pleurotus nebrodensis Inzenga (fruiting body)

Ⅱ. 문헌연구

II-1. 느타리속(Pleurotus spp) 버섯의 생산

II-1-1. 고체배양

Pleurotus osteatus는 맛있고 영양학적 가치가 높은 식용버섯으로 "Oyster mushroom", 또는 "Hiratlke"로써 잘 알려져 있다. Pleurotus osteatus는 세계에서 가장 많이 재배되고 있는 버섯들에 속한다[25]. 이 버섯의 생산은 1986년과 1990년 사이에 4배로 증가하였고 현재 년간 일백만톤 정도로 추산되고 있다 [26]. 1996년에 중국의 경우 약 70만톤 정도 생산하고 있고, 미국에서는 양송이 버섯(Agaricus bisporous)다음으로 많이 생산되고 있다. 1995년에 미국의 Pleurotus osteatus 생산은 880만톤 정도 생산되었는데 이는 1994년도의 94%정도 증가한 것이다[27]. Pleurotus osteatus는 칼로리(calories), 나트륨(sodium), 지방 (fat), 그리고 콜레스테롤(cholesterols)이 낮은 반면, 단백질(proteins), 탄수화물 (carbohydrates), 섬유(fiber), 비타민(vitamins), 그리고 무기질(minerals) 등이 풍부하여 좋은 건강식품으로 평가되고 있다.

느타리속의 야생종들 가운데 *Pleurotus eryngii*의 경제적 중요성은 많이 인식되고 있는데, 그 자실체의 맛과 향기의 특성은 다른 느타리속의 버섯보다 뛰어난 것으로 평가되고 있다[28]. Mau등[29]은 *Pleurotus eryngii*에 함유된 향기성분에 관하여 조사하였는데 그들 대부분은 휘발성(volatiles) 및 미각 성분인 것으로 보고하였다.

Pleurotus spp는 Cotton Stalks, 밀/볏 짚, 그리고 톱밥 등과 같은 기질이 함유된 lignin과 Cellulose에서 재배되는 사물기생(saprophytic)균류이다. 이러한 기질을 이용하기 위해서는 peoxidases, laccases, cellulases, hemicellulases, 및

xylanases와 같은 효소들을 분비하여야 하는데, Pleurotus spp는 이러한 효소들을 분비하는 특성을 지니고 있다. Pleurotus spp의 이점 중의 하나는 퇴비화 (composting)와 Casing layer가 필요없이 lignocellulosic 기질에서 재배할 수 있다는 점이다. 이러한 담자균류(basidomycetes)의 상업적 생산기술은 잘 개발되었으며 가장 상업적으로 재배되고 있는 버섯인 A. bisporous의 경우와 비교하였을때 비교적 단순한 특징을 지니고 있다[30]. Pleurotus spp는 화학적 또는 생물학적 전처리 없이 효율적으로 lignocellulose를 분해할 수 있기 때문에 다양한 lignocellulose계 부산물들을 이용 및 재활용할 수 있다. Pleurotus spp의 기질로서 연구되어진 농업부산물로는 coffee pulp, flax shive, corn cob, sugareane bagasse 및 rice hulls등이 있다.

Cotton은 세계적으로 중요한 작물중의 하나이며 지역 농업부산물중에서 가장 많이 발생하고 있다. 버섯재배를 위한 기질로서 cotton stalks를 사용하는데 가장 큰 장애물은 보관상의 문제점이다. 이들은 밀짚(wheat straw)의 0.4 - 1.4% 와 비교하였을 때, 2 - 4%의 수용성 탄수화물을 함유하고 있고, 수분함량이 매우 높기 때문이다[31]. 지질은 급속하게 사상균(mold)이 무성하게 자라 결국 부패와 호기성 분해를 가져오게 된다. Silage생산은 Silanikove 등[32]에 의하여연구가 이루어졌는데, 이러한 물질은 수확 후 9개월까지 상업적 pleurotus 생산을 위해 사용될 수 있다.

II-1-2. 액체배양

Pleurotus spp는 fungal protein, 종균(spawn) 또는 향기성분의 생산을 위하여 액체배양을 통하여 균사배양을 할 수 있다. Hadar과 Cohen- Arazi[33]는 cotton straw에서 생산된 *P. ostreatus* 자실체와 액체배양에서 생산된 균사체의 화학적 성분을 조사하였다. 자실체와 균사체의 총 단백질, 아미노산, 지방산 등

의 조성은 거의 유사한 것으로 나타났다.

식용버섯의 자실체들은 특유의 향미 및 향기성질로 잘 알려져 있다. 식용버섯 양미 성분 중의 휘발성 화합물 중에 1-octan-3-ol은 버섯 특유의 향미를 나타내는 주요한 화합물이라고 알려져 있다[34]. 액체배양에 의해 생산된 균사체는 매우 적은 정도의 향미성분을 가지고 있어 이러한 기술은 여전히 중요한 과제가 되고 있다[35]. 사실 Belinky 등[36]은 P. pulmonarius의 액체배양에서 성장배지에 Soybean flour와 Soybean oil을 첨가하여 자실체에서 생산된 1-octan-3-ol 함유량보다 유사 내지 더 높은 정도의 1-octan-3-ol 생성을 증가시켰다. Lipoxygenase는 불포화지방산(주로 linoleic acid)의 hydroperoxides의 형성을 통하여 향미 성분의 생합성에 주요한 효소로 간주되고 있다. Assaf등[37]은 P. pulmonarius의 균사체 균질액(homogenate)에 의해 linoleic acid가 13-hydroperoxylinoleate와 1-octan-3-ol로 전환된다고 보고하였다.

II-2. Pleurotus spp의 약리적 특징

버섯추출물들은 향균성(antibacterial), 혈액학적(hematological), 항바이러스 (antiviral), 항암성(antitumor), 고혈압과 간보호 효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다[38,39]. Pleurotus spp는 약리학적 특징을 지니고 있어 한방에서 많이 애용되어 왔고 잘 알려진 약용버섯이다[40]. Waser와 Weis[39]는 고등 담자균류(즉 버섯)로부터 약용으로 사용이 가능한 물질을 분리 및 동정하였다. 지난수십년동안 Pleurotus spp를 비롯한 담자균류의 자실체로부터 많은 성분들이 분리되었고 약리학적 특성을 가지고 있는 점으로 나타났다[41]. Table. 1 은 여러종류의 Pleurotus spp의 약리학적 효과들을 나타낸 것이다.

_
2
O
7.
53
7
2
5
3
2
leu
\neg
Ť
0
TO
Ť
ec
e.
Ĕ
3
_
=
2
Ξ
.22
٠ž
7
edi
ĕ
2
÷
0
$\overline{}$
ab
4

Medicinal effect	Fungus	Substance	References
Antibiotic	Pleurotus	Mycelia Polysaccharide	[42] [43]
Antibacterial	P. ostreatus Pleurotus spp	β-D-Glucan (pleuran) -	[44] [45]
Antiviral	Pleurotus spp P. citrinopileatus P. ostreatus	- Polysaccharide Ubiquitin-like protein	[46] [47,48] [49]
Immunomodulating	P. ostreatus	Glucan	[50,51]
Antitumor	P. ostreatus P. ostreatus Pleurotus spp Pleurotus spp P. ostreatus P. ostreatus P. ostreatus	Glycopeptides Mushroom grown on corncobs Mushroom Lectin β-D-Glucan (pleuran)	[52] [53] [54] [55] [56] [57]
Antiinflammatory	Pleurotus spp	î	[58]
Anticholesterolic	P. eryngii P. ostreatus P. cornucopiae P. ostreatus	Lovastatin Mushrrom Lovastatin Mushroom	[59] [60] [61] [62,63]
Hemagglutination	P. cornucopiae	Lectin	[64]
Antioxidant	P. ostreatus	β-D-Glucan (pleuran)	[99]

II-3 균사체 생산

버섯의 식품학적 가치는 맛뿐만 아니라, 아미노산, 당, 비타민 등을 풍부하게 함유한 건강식품으로 평가되고 있으며 버섯 균사체의 심부배양도 식품이나 사료를 목적으로 한 것[65-67], 배양 균사체의 비타민이나 질소함량[68, 69] 등의 성분, 그리고 원료비의 절감을 위한 폐자원의 이용[69-71]등에 관하여 많은 검토가 이루어진 바가 있다. 또한 버섯류에는 세균, 곰팡이, 효모 및 방선균 등과같이 생리활성물질 생산균의 탐색대상이 되고 있어 여러 종의 항생물질[72,73], 항암물질[74,75], 효소[76] 및 기타 여러 가지 물질[77,78]등이 보고된 바가 있다.따라서, 심부배양에 의한 유용물질 생산을 위한 버섯 균사체의 배양은 급속도로 이루어지고 있기 때문에 배양공학 측면에서의 버섯 균사체 대량 생산에 미치는 여러 배양조건 등에 관하여 조사하고자 한다.

II-3-1 산소공급조건[79]

각종 미생물 배양에 있어서 배지조성과 산소공급조건이 미생물 증식에 커다란 영향을 미치듯이 균사체의 심부배양에서도 산소공급조건에 따라 균사체 생장에 영향을 미친다. 심부배양을 할 경우 균사체 생장에 필요한 영양원의 경우에 산소공급조건이 필수적인데 물에 대한 산소의 용해도는 10^3 이하로 매우 낮기 때문에 배양기간 동안에는 산소가 배지에 용해되도록 공급하여야한다. 산소용해속도와 액중에서의 이동속도가 극히 낮기 때문에 산소공급이 기포에서 세포내로 산소공급이 원활히 이루어져야 할 필요성이 대두된다. 이러한 산소공급을 원활하게 하기 위한 수단으로 배양액의 강제교반 또는 강제통기가 이용되며이 조작에 들어가는 동력은 큰 것으로 산소공급도 버섯 균사체의 심부배양에 있어서 없어서는 안될 중요한 환경인자가 된다. 산소공급 조건의 바로메이터로

서 배지의 산소흡수속도(kd)인데, kd는 대기압의 공기보다 단위체적당의 배지에서의 단위시간당 들어가는 산소량으로 진탕배양의 경우 배양액량과 진탕속도에의해 영향을 받으며, 통기교반의 경우 kd의 측정에 아류산소다법이 많이 쓰이고 있다. 산소공급이 과잉상태가 되면 공급과잉에 따른 생장저해효과가 나타나며 버섯 균사체 배양에 있어서 최적 kd값은 버섯 종에 따라 다른 것으로 조사되고 있다.

II-3-2 Pellet형과 filamentous형 균사체 비증식 속도

버섯과 같이 세포가 개개로 분리, 연결되어 균사(mycelia)를 형성하는 미생물을 액체배양하면 대부분의 경우 균사체가 덩어리 상태로 되어 증식되는데 배양조건에 따라 구형(Pellet)과 섬유상(filamentous)형태로 증식된다. 섬유상 세포가 Pellet을 형성할 때의 증식은 증식속도가 세포량의 세제곱으로 비례한다고 제안했다[80].

심부배양에 있어서 균사체의 증식속도에 영향을 미치는 인자로서 균사체 증식형태(Pellet 또는 filamentous)와 산소공급조건을 고려할 수 있다. Table. 2에서 보는 바와 같이 Pellet으로 증식하는 균사체보다 섬유상 증식 균사체의 세포비증식속도(cell specific growth rate, μ , $g/g \cdot hr$)가 높게 나타나고 있다. 따라서 Pellet형태로 증식하게 된 균사체에서도 균질화(homogenation)하게 되면 균사가 분산상태가 되어 세포비성장속도(μ)는 증가하게 된다.

Table 2. Cell specific growth rate of Lentinus edodes mycelium.

	Cell specific growth rate(μ , hr ⁻¹)		
Cultivation	Homogenate of	Homogenate of	
time (hr)	filamentous type	Pellet type	Pellet type mycelium
	mycelium	mycelium	mycenum
24	15.8×10 ⁻²	9.7×10 ⁻²	1.0×10 ⁻²
48	14.0×10 ⁻²	8.1×10 ⁻²	1.0×10 ⁻²

결국 균질화에 의해 산소공급 측면에서 균사생육에 양호한 환경이 조성되어 증식이 빨라지게 되는 것으로 나타났는데 즉, 균사체 배양에 있어 Pellet 형태로 배양하였을 때 균사생장에 불리한 환경이 발생하는데 다시 말하면 균사의 내부에 기질의 농도분포가 존재하여 중심부근에서 기질 부족 부분이 생기기 때문이다.

Pellet형 균사체 내의 물질이동 식

 $\frac{6 \, C\! s D}{R^2 \rho \, Q}$

Cs : 배지중의 기질 농도(mg/mL)

D : 기질 확산계수 (mm^2/min)

R : Pellet형 균사체의 반경(mm)

ρ : Pellet형 균사체의 밀도(mg/mm²)

Q : 호흡속도계수(mgO2/mg cell min) 이다.

이 식을 Table. 2의 표고의 균사체에 관해서 계산하여 보면 산소, 포도당, 질소원 등의 기질 중에서 산소가 연속적으로 기질로 전환되고 있음을 알 수 있다. 따라서 심부배양에 있어서 균사체의 형태는 Humfeld등[81]의 초기연구에서도 보고된 바 있다. 또한 Pellet형 균사체의 내부와 외부에서의 기질 이동의 차이 등에 따라 생육조건의 차이가 발생할 수 있지만, 균사체 전체가 배지에 접하여 있는 상태로 생육하여온 섬유상 균사체는 기질 이동 속도의 일정함을 유지하여 균사체 생육이 양호함을 알 수 있다. Table. 2에서 보는 바와 같이 Pellet형 균사체를 균질화 하였을 때의 세포비생장속도(µ)를 조사하여 보면 Pellet형 균사체를 균질화하여 얻어진 균사체의 μ 는 섬유상 균사체보다 작다. 결론적으로 버섯 균사체의 대량생산을 위해서는 가급적 Pellet을 형성하지 않는 상태에서 배양하는 것이 바람직함을 알 수 있으며, 이에 대한 연구는 균사를 형성하여 생장하는 다른 미생물의 배양학적 측면에서의 연구와 더불어 현재 이에 관한 연구가 계속 추진되고 있다.

II-4 항종양성 다당류

담자균이 생성하는 항생물질에는 항균성이나 항암성을 가지고 있는 것이 많은 것이 하나의 특징이다. 담자균류의 제암성 물질에 관해 가장 많이 연구된 것은 다당류이다. 원숭이안장버섯과 진흙버섯과의 열수추출물이 흰쥐의 Sarcoma-180에 유효한 것으로 나타나 담자균류 유래 다당류의 연구는 활발히 진행되어 왔다. 구름버섯(Coriolus versicolor)의 Psk, 표고버섯(Lentinus edodes)의 Lentinan, 치마버섯(Schizophyllum commune)의 Schizophyllan, 잎새버섯류와 영지버섯류의 다당류들은 폭넓게 연구되어왔으며, 이중 Psk와 Lentinan은 일본에서 실용화되고 있다. 柳進 등[82]은 항종양성 다당류를 형성하는 담자균류를 계통적으로 정리하여 보고하였다(Table. 3). 그러나 대부분의 다당류는 화학적인 검토에서 끝나고 항종양 활성에 관해서는 연구가 많이 이루어지지 않는 상태이다.

이러한 다당류의 효과는 면역 부활작용에 의한다고 한다. 면역을 담당하는 세포는 주로 림파구와 *Macrophage*이다. 림파구에서는 B-cell과 T-cell이 있으며 B세포는 골수에서 항체를 생산하고 체액성 면역의 주체가 된다. T세포는 흉선에서 연유되어 면역응답에 관여하는 Helper -T로 직접 암세포를 공격하는 Kill-T등 여러 종류가 있어 세포성 면역의 주체이다. *Macrophage*는 이물질을 세포내로 들어가게 처리하는 활동이 있다. 이러한 세포는 서로 유기적으로 암세포에 대하여 면역시스템을 활성화시키고 있다(Fig. 2)[18].

담자균 다당류는 T세포를 부활시켜 흉선 의존성 면역반응을 회복한다고 되어있다. 이에 대하여 *Corynebacterium* 균의 다당류나 BCG는 *macrophage*를 활성화하여 세균의 endotoxin이나 lipopolysacchatide(LPS)는 B세포를 부활시키는 작용을 가지고 있다[18].

Psk 및 lentinan에 관해서는 많은 동물실험이 이루어져 왔으나 Krestin은 경 구투여에서도 유효하고 독성은 낮은 것으로 나타났다. 항종양 스펙톨은 잘 알 려져 있어 이물성이 높은 암, 예를 들면 이식암에 극소 X-ray 조사로 이물화된 암에 유효하나 자가암이나 동계암에는 효과가 낮은 결점을 가지고 있으며 어떤 다른 화학요법제와 병용할 경우 효과가 크다.

이러한 것은 액체성 항체 생성에 암상태에서의 세포성 면역의 저하방지에 유효하나, Lentinan은 helper-T로 세포 부활물질이며, Psk는 T세포 부활이외의 기능은 약하기 때문에 직접 암세포를 공격하는 활성은 낮다. 담자균의 다당류는 자실체에서 추출뿐만 아니라 배양균사체에서도 추출되는 것으로도 대량생산이가능하다. 담자균에서 생성하는 당단백질 중에는 Suppressor-T세포를 부활하는 것도 있다. 이 경우는 역으로 과잉된 면역 반응을 억제하는 것으로 알레르기질환에 적용이 검토되고 있다. 담자균 다당의 구조와 활성과의 상관관계는 어느정도 잘 알려져 있다[83]. 일반적으로 활성이 높은 다당류는 수용성으로써 가수분해로 D-glucose만 생성하는 중성 homoglucan이다. 화학구조는 β-(1,3)-D-glucan이 주체로 하여 2-12 glucosyl 잔기당 1개의 β-(1-6)의 분자를 가지고 있다(Fig. 4). 수용액중에는 right-handed 삼중나선구조를 갖는 것으로 알려져 있다(Fig. 5). 분자량은 10^4 - 10^6 이 필요하고 이 분자량 이하에서는 삼중쇄의 분율이 줄어 활성이 저하되는 것으로 알려져 있다.

활성이 높은 수용성 D-glucan의 함량은 적어서 양적으로 많은 알칼리 가용의 β-D-glucan을 화학구조에 따라 활성의 발현이나 개선이 시도되고 있다. 예를 들면 복령의 pachymane은 활성이 없는 β-D-glucan이나 이것을 화학수식된 hydroxyethyl-pachyman 스미스 분해로 β-(1,6) 분자를 제거한 Pachymaran 효소와 가열처리된 U-pachyman은 활성이 있는 것으로 나타났고, 목이버섯의 고분기형 저활성 Curdlan에도 측쇄를 polyol화 하는데서 활성이 현저하게 증가한다. 활성이 없는 직쇄형 Cudlan에도 carboxymethyl화 되어 CM-curdlan으로 변환되면 활성이 증가하게 되는 것으로 알려져 있다[83].

Table 3. Anti-tumor activity of basidiomycetes

Mushroom	Extract	Inhibition (%)
Auricularia auricula-judae	Hot water	42.6
Ganoderma appalanatum	Hot water	64.9
G. tsegae	Hot water, NaOH	77.8
Phellinus linteus	Hot water	96.7
P. igniarius	Hot water	87.4
Coriolus versicolor	Hot water	77.5
C. hirsutus	Hot water	65.0
C. pubescens	Hot water	59.5
Daedaleopsis tricolor	Hot water	70.2
Fomes fomentarius	Hot water	5.7
F. pinicola	Hot water	51.2
Hirshioporus fusco-violaceus	Hot water	45.5
Lenzites betulina	Hot water	23.9
Piptoporus betulinus	Hot water	49.2
Piptotorus betulinus	NaOH	72.4
Trametes gibbosa	Hot water	49.2
T. dickinsii	Water	80.1
Flammulina velutipes	Hot water	81.1
Lentinus edodos	Hot water	80.7
Pholiota nameko	Hot water	86.5
Pleurotus ostreatus	Hot water	75.3
P. spodoleucus	Hot water	72.3
Schizophyllum commune	Medium	100.0
Tricholoma matsutake	Hot water	91.8

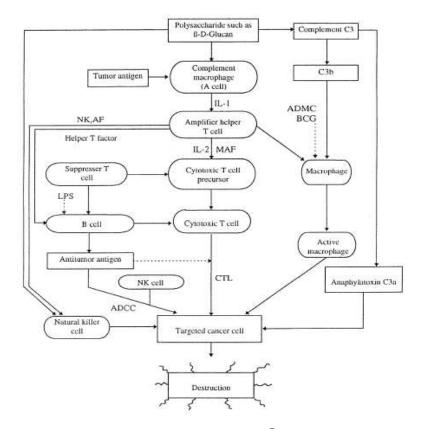


Fig. 2. Possible immune mechanism: β -D-glucan biological response modifier (BRM) [18].

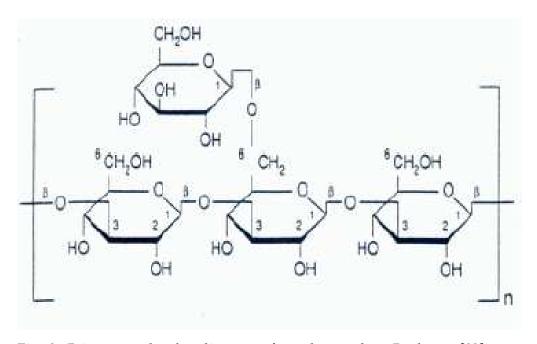


Fig. 3. Primary molecular diagram of mushroom beta-D-glucan [83].

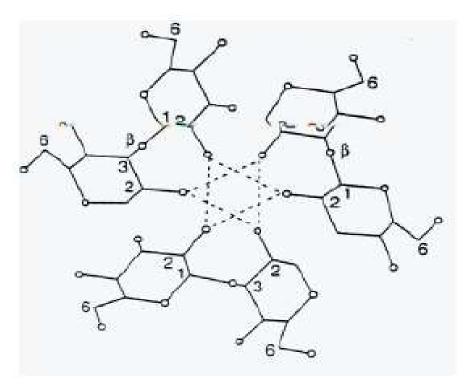


Fig. 4 Molecular model of the right-handed triple spiral helix of antitumor-active-beta-D-glucan (Schizophyllan) [84].

Ⅲ. 재료 및 방법

III-1. 균주 및 보존

본 연구에서 사용한 균주는 백영고($Pleurotus\ nebrodensis\ Inzenga$)버섯으로 충남 가야 백송 종균배양소에서 분양받아 사용하였으며, Patoto dextrose agar(PDA)배지에서 25° C, 7일간 배양한 후 4° C에서 보존하였고, 2주마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

III-2 접종원

접종원의 준비는 고체배양의 경우, 냉장보관하던 균주를 YMGA배지(malt extract 10 g/L, glucose 4 g/L, yeast extract 4 g/L and agar 20 g/L)의 중앙부에 5mm cork borer로 절취한 mycelium disk를 접종하여 25±1℃의 항온기에서 배양한 후 실험에 사용하였으며, 액체배양의 경우는 300 mL 플라스크에 50 mL의 기본배지 (YMG: glucose 20 g/L, yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L and MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L)를 121℃, 15분간 고압멸균한 후 5mm cork borer로 mycelium disk 4 - 5개를 절취하여 접종한 후 25℃, 8일간 진탕배양한 다음, 배양액을 균질기로 무균적으로 30 sec 동안 균질화하여 접종원으로 사용하였다.

III-3-1 Flask 배양 조건

백영고버섯의 균사생육에 가장 좋은 최적 온도를 조사하기 위하여 YMGA 배지를 조제하여 121℃에서 15분간 고압멸균하고, petri-dish에 20 mL 씩 분주하여 굳힌 다음, 접종원을 접종하고 20, 25, 30℃의 온도 범위로 조절된 항온기에서 10일간 배양하면서 균사의 생육 정도를 하루 간격으로 조사하였다.

백영고버섯의 균사생장에 관한 접종원의 배양일수와 접종량에 따른 영향을 조사하기 위하여 300 mL 삼각플라스크에 기본배지를 50 mL씩 분주하여, 121℃에서 15분간 고압멸균 한 후, 미리 준비된 접종원을 각각 1, 3, 5, 7, 10%(v/v)로 달리하여 접종하여 25±1℃, 100rpm의 조건하에서 shaking incubator에서 5 - 10일 동안 배양하여 균사생장과 세포외다당류 생산을 조사하였다.

균사체 생장 최적 초기 pH를 조사하기 위하여 기본배지를 300 mL 삼각플라스크에 50 mL씩 분주하여 1N-HCl과 1N-NaOH로 초기 pH를 4.0 - 8.0 범위로 달리하여 조절한 다음, 121 ℃, 15분간 고압멸균하여 무균적으로 균질화된 접종원을 5%(v/v) 접종하여 25±1 ℃, 100rpm으로 8일간 진탕배양 하였다.

체적에 따른 공기의 영향을 조사하기 위하여 300 mL 삼각플라스크에 기본배지를 50 - 200 mL 씩 달리하여 pH를 6.5로 조절한 다음 121 ℃, 15분간 고압멸균한 후, 무균적으로 균질화된 접종원을 25±1 ℃, 100 rpm으로 8일간 진탕배양하였다.

III-3-2 영양요구성

탄소원에 따른 균사체 생장과 세포외 다당류 생산을 조사하기 위하여 glucose외 9 종의 당류를 각각 2%(w/v)씩 첨가하고 배지의 pH를 6.5로 조절한 다음 300 mL 삼 각풀라스크에 50 mL씩 분주하여 121℃에서 15분간 고압멸균한 후, 접종원을 5%(w/v)로 접종하여 25±1℃, 150 rpm으로 12일간 진탕배양하였고, 선발된 최적 탄 소원의 농도에 따른 영향을 조사하기 위하여 각각 1 - 10%(w/v)씩 달리하여 탄소원 선발실험과 같은 방법으로 조사하였다.

최적 탄소원인 glucose를 5%(w/v) 첨가된 기본배지에 yeast extract와 11종의 질소원을 0.6% 씩 달리하여 조제하고 pH를 6.5로 조절한 다음 300 mL 삼각풀라스크에 50 mL씩 분주하여 121℃, 15분간 고압멸균한 후 접종원을 5%(w/v)로 접종하여 25±1℃, 150 rpm을 12일간 진탕배양 하였고, 선발된 최적 질소원 농도에 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 최적 질소원의 농도를 각각 0.2 - 2.0%(w/v)씩 달리하여 질소원 선발 실험 조건과 같은 방법으로 조사하였다.

최적 무기염류의 선발 및 농도를 조사하기 위하여 MgSO4 외 8종의 무기염류를 최적 탄소원과 질소원으로 선발된 glucose 5.0%(w/v), poly- peptone 1.0%(w/v), 그리고 yeast extract 0.8%(w/v)인 배지에 0.15% 씩 달리하여 조제한 다음 pH를 6.5로 조절하여 300 mL 삼각플라스크에 50 mL씩 분주하여 12 1℃, 150 rpm으로 12일간 진탕배양 하였고, 선발된 최적 무기 염류의 농도에따른 영향을 조사하기 위하여 최적 무기염류의 농도를 0.02 - 0.3 %(w/v)씩 달리하여 무기염류 선발 실험조건과 같은 방법으로 균사생장과 세포외 다당류 생산을 조사하였다.

III-4 Jar-fermintation

발효조 배양에서 발효조는 5 L 용량(working volume 2 L)의 Jar fermemter(Kobiotech, Korea)로써 자동온도조절기, 교반속도 조절기, 용존산소농도 (DO)센서 및 pH센서를 부착하고 있다. 산소의 공급은 공기 압축기를 이용하여 여과 필터를 거쳐 발효기 안으로 유입되게 하였으며, 배양시 발생하는 거품을 제거하기 위하여 Silicon 소포제를 사용하였다. 유량(areation)은 0.5 vvm과 1.5 vvm으로 달리하여 areation에 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산을 조사하였고 교반속도는 100, 200, 300 rpm으로 변화를 주면서 교반속도에 따른 영향을 조사하였다.

발효조 배양에 사용한 배지는 flask 배양에서 영양요구성 실험을 통하여 얻어진 최적 배지를 사용하였고, 조업 온도와 pH는 각각 25℃, 6.5로 하여 배양기간 동안 일정하게 유지되도록 조절하였고 배양기간은 8 - 12일간 배양하여 균사생장과 세포외 다당류 생산을 조사하였다.

III-5 분석방법

고체배지에서 균사생장 측정은 접종된 균사절편의 중심을 직교하는 수직선과 수 평선을 평판배지인 petri-dish의 밑면에 유성펜으로 그렸으며, 하루 간격으로 배양이 완료될 때까지 종축과 횡축의 직경을 측정한 후 두 값을 평균하여 균사의 생장 직경 을 측정하였다[85].

액체배양에서의 건조 균체량은 배양액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전된 균사체를 2 - 3회에 걸쳐서 수세한 다음, 60℃에서 24시간 건조하고 deciccator에서 항량이 될 때가지 방치하여 건조중량을 측정하였고, 상등액은 4배의 95% ethanol을 첨가하여 4℃에서 하루 동안 방치한 후 침전된 세포외 다당류를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 분리한 다음 60℃에서 하루 동안 건조하여 desiccator에서 항량이 될 때까지 방치하여 건조중량을 측정하였다. 기질중의 glucose 정량은 DNS(di-nitrosalicyclic acid)법에 준하여 정량하였다(Fig. 5)[86].

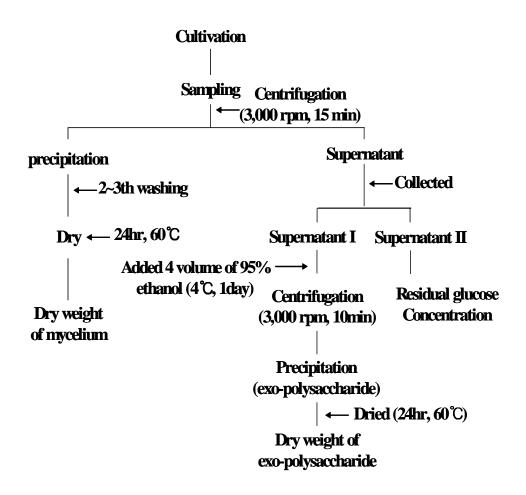


Fig. 5. Experimental procedure in this study

Ⅳ. 결과 및 고찰

IV-1 온도의 영향

백영고버섯 균사체의 균사생육에 적합한 최적 배양온도를 검토한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 20℃ 이하와 30℃이상에서는 백영고버섯 균사체 생육이 급속히 저하되는 것을 알 수 있으며, 25℃에서 균사생육이 가장 양호하여 최적 배양온도는 25℃임을 알 수 있다.

이러한 결과는 같은 느타리속인 Pleurotus eryngii는 25℃, Pleurotus ostreatus 와 Pleurotus fiorida는 30℃인 보고[87]와 Fomitella fraxinea(Fr)는 25 - 30℃라는 보고[88], Lentinus lepideus는 25℃라는 보고[89], 그리고 Naematoloma Sublateritium(Fr.)는 25℃라는 보고[90]와 거의 유사한 결과임을 알 수 있고, Phellinus igniarius[91]와 Ganoderma lucidum[92]은 최적 배양온도가 30℃라는 보고와는 상반된 경향을 보여주고 있어 버섯 종류마다 최적 배양온도는 다소 차이가 있는 것으로 나타났다.

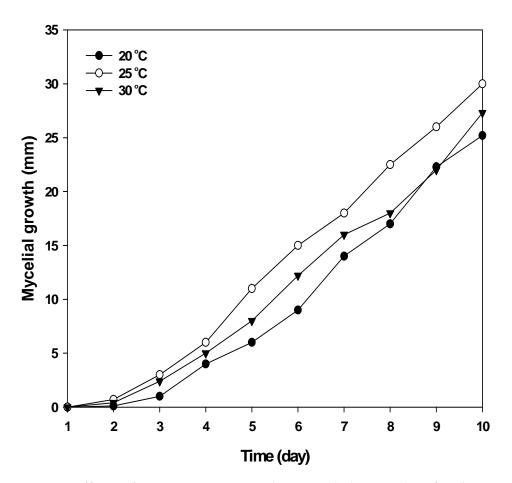


Fig. 6. Effect of temperature on the mycelial growth of *Pleurotus* nebrodensis Inzenga on YMGA medium

IV-2. 접종원의 배양일수 및 접종량의 영향

접종원(inoculum)의 배양기간 및 접종량의 최적화를 통하여 균사 배양기간 동안의 변이(varience)를 최소화하고자 접종원의 배양기간과 접종량에 Efms 균 사생장과 세포외 다당류 생산의 특성을 조사하였다.

그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이 접종원의 배양기간과 접종량에 따라 균사생장과 세포외 다당류 생산에 영향을 미치고 있음을 알수 있다. 10일 동안 배양한 접종원을 1 - 10%(w/v) 접종량으로 배양한 시험군은 5일과 7일간 배양한 접종원 시험군의 균사생장보다 저조하였는데 이는 접종원의 균사체가 사멸기(dying phase)상태에 있었고, 배양 환경이 급속히 악화되었기 때문에 균사생장과 세포외 다당류 생산이 급격히 저하된 것으로 사료된다 전체적으로 5%(w/v)의 접종량으로 시험한 군들은 최대 균사생장과 세포외다당류 생산을 나타냈으며, 5%(w/v) 이상 또는 이하의 접종량 시험군들의 균사생장과 세포에 다당류 생산은 다소 저조한 것으로 나타났다. 접종량이 증가할수록 균사생장과 세포외 다당류 생산이 증가하지 않는 이유는 분명하지 않지만, 배지내의 영양분을 이용하는데 있어서 다소 제한을 받게 되어 균사생장이저조하게 된 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 백영고버섯 균사체의 균사생장과 세포외 다당류 생산을 위한 최적 접종원의 조건은 7일간 배양한 균사체를 5%(w/v)의 접종량으로 접종하는 것이 가장 효과적인 것으로 나타나 이후의 실험에서는 7일간 배양한 균사체를 5%(w/v)의 접종량으로 접종하여 실험을 수행하였다.

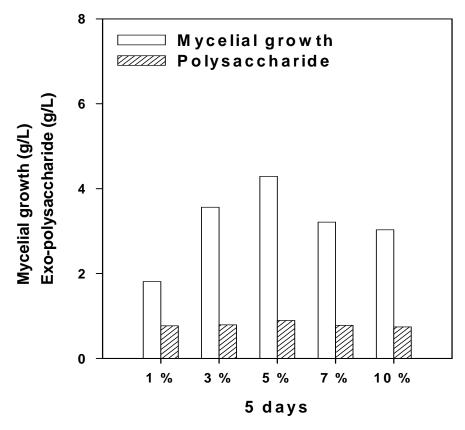


Fig. 7-1. Effects of inoculum age and inoculum volume on *Pleurotus nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production.

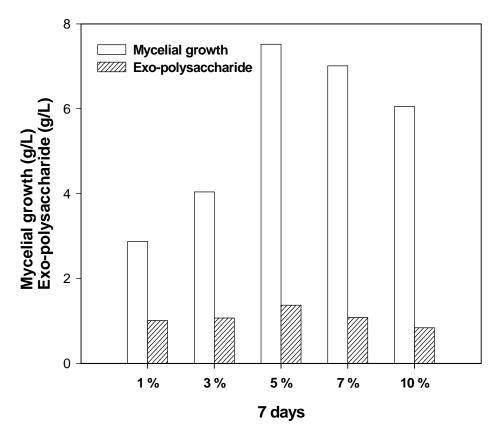


Fig. 7-2. Effects of inoculum age and inoculum volume on *Pleurotus nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production.

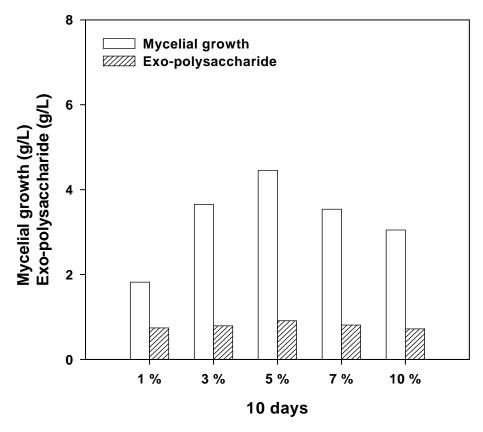


Fig. 7-3. Effects of inoculum age and inoculum volume on *Pleurotus nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production.

IV-3. 초기의 pH의 영향

백영고 버섯 균사체의 균사생장에 최적 pH를 규명하기 위해 실험한 결과는 Table. 4에서 보는 바와 같이 pH 6.0 이상의 범위에서 균사생장과 세포외 다당류 생산이 양호한 것으로 나타났으며, pH 4.0 - 5.5 범위에서는 균사생장과 세포외 다당류 생산은 다소 억제되는 경향이었다.

초기 pH 6.5에서 균사생장과 세포외 다당류 생산은 각각 6.35 g/L 와 2.07 g/L이었고, pH 7.0에서 균사생장은 5.95 g/L이지만 세포외 다당류 생산은 2.09 g/L 로 최대 생산량을 보였다. 그러나 균사생장과 세포외 다당류 생산 측면에서 검토하였을 때, 백영고버섯 균사체의 최적 초기 pH는 6.5임을 알 수 있다.

버섯에 따른 최적 pH범위는 Lentinus lepideus의 최적 초기 pH는 4.2이며 pH 5.0이상에서는 균사생장이 모두 정지되었다는 보고[93], Formitella fraxinea[94]는 6.0, Ganoderma lucidum[92]는 5.0, Pleurotus ostreatus[95]는 6.2 - 6.5, Lentinus edoes[96]은 4.0 - 4.5, Poria cocos[97]은 4.0, Phelinus edoes[98]는 4.2, Pleurotus eryngii[99]는 6.0인 것으로 보고하였는데, 이러한 경향은 다소 차이는 있지만 담자균류의 균사생장 최적 pH의 범위에 대하여 Wolport[100]가 pH 4.0 - 7.0이라는 보고와 거의 일치한다는 경향임을 알 수 있다.

Table 4. Effect of initial pH on *Pleurotus nebrodensis Inzenga* Mycelial growth and Exo-polysaccharide production

рН	Mycelial growth (g/L)	Exo-polysaccharide (g/L)
4.0	1.84	0.59
4.5	2.21	0.60
5.0	3.41	0.76
5.5	4.75	0.86
6.0	5.58	1.79
6.5	6.35	2.07
7.0	5.95	2.09
7.5	5.55	1.85
8.0	5.10	1.58

IV-4. Surface areation의 영향

액체배양에 있어서 배지조성과 함께 산소공급조건이 균사생장을 크게 좌우하는 인자인데, 산소의 용해도는 물에 대하여 10^{-3} 이하로 극피 낮아 배양기간 중에는 공기가 배지에 용해되도록 공급해야 하는데, 이는 산소의 용해하는 속도와 액중에서의 이동속도가 극히 낮기 때문에 산소공급이 기포에서 세포내에로산소공급단계가 좋아야 하기 때문이다.

배양부피에 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산에 관한 결과는 Table. 5에서 나타낸 바와 같이 배양부피가 작을수록 산소공급이 원활하여 균사생장과 세포외 다당류 생산이 훨씬 향상되고 있음을 알 수 있으며, 최대균사생장(6.69 g/L)과 세포외 다당류 생산(1.91 g/L)을 보인 배양부피는 50 mL 이었다.

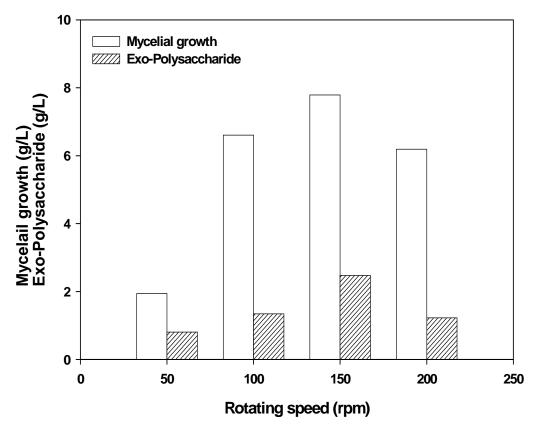
이러한 결과는 백영고버섯 균사체의 균사생장과 세포외 다당류 생산을 위해 서는 산소의 용해하는 속도와 액중에서의 이동속도가 원활하도록 적절한 배양 부피를 유지하여 주는 것이 더욱 효과적임을 알 수 있다.

Table 5. Effect of surface aeration on *Pleurotus nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture

Volume (mL)	Mycelial growth (g/L)	Exo-polysaccharide (g/L)
50	6.69	1.91
100	5.05	1.24
150	4.78	1.27
200	1.43	0.46

IV-5 Shaking speed의 영향

배양액 내의 점성(viscosity)는 배양기간 동안의 균사생장과 더불어 세포외 다당류 생산물 등의 배양액 내의 축적으로 인하여 증가하게 된다. 따라서 물질 전달을 용이하게 하기 위한 효율적인 혼합(mixing)은 균사생장과 세포외 다당류 생산 수율 향상을 증가시킬 수 있는 주요한 환경인자이다. 따라서 shaking speed에 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Shaking speed에 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산에 대한 결과는 Fig. 8에서 보는 바와 같이 최대 균사생장과 세포외 다당류 생산은 150 rpm의 shaking speed에서 얻어졌으며, shaking speed가 증가할수록 양호한 균사생장과 세포외 다당류 생산을 보였다. 이러한 결과는 shaking speed가 증가할수록 물질전달속 도가 증가함에 따라 균사생장과 세포외 다당류 생산에 더욱 효과적임을 알 수 있다. 그러나 150 rpm 이상에서의 shaking speed는 균사생장과 세포외 다당류 생산은 100 rpm에서의 경우보다 다소 낮은 경향을 보였는데, 이는 배양액 내의 균사체에 증가된 shear stress가 작용하여 균사체의 손상으로 인한 것으로 사료된다. 따라서 flask culture에서의 최적 shaking speed는 150 rpm임을 알수 있다.



IV-6. 영양요구성

IV-6-1. 탄소원의 선발 및 최적 농도

탄소원은 균류에 있어서 탄수화물, 단백질, 지질, 핵산 등의 합성과 에너지 공급원으로서 균주의 생장에 필수적인 영양원이다. 백영고버섯 균사체의 생장에 미치는 10종의 탄소원을 가각 2%(w/v)로 첨가하여 배양한 결과 Table. 6에서와 같이 균사생장에 대하여 단당류인 glucose(6.48 g/L) 첨가구에서 가장 양호하였고, 이당류인 fructose(5.68 g/L)와 maltose(5.27 g/L), mannose (4.59 g/L) 순으로 양호하였으며 arabinose(2.25 g/L)로 무첨가구보다 매우 적은 균사생장을 보였다. 세포외 다당류 생산에 있어서 glucose(2.64 g/L) 첨가구에서 가장 우수하였고, fructose(1.39 g/L), maltose(1.20g/L)순으로 비교적 양호하였지만 다른 첨가구에서의 세포외 다당류 생산은 무첨가구에서의 세포의 다당류보다 저조한 세포외 다당류 생산을 보였다.

이러한 결과는 Lentinus edoes[101]를 액체배양 하였을 때 glucose가 가장 양호하였다는 보고와 Poria cocos[102]의 최적 탄소원이 glucose라는 것을 보고한결과와 일치하는 경향이었다. 또한, 백영고버섯 균사체의 세포외 다당류 생산경향은 균사생장과 더불어 증가하고 있는데 이는 탄소원이 세포외 다당류 생산수율을 향상시키는데 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다. 박등[104]은 양호한 균사생장이 protein-bound 다당류 생산과 일정한 관계를 가지고 있다는 보고와 일치하는 경향임을 알 수 있다.

최적 탄소원으로 선발된 glucose의 농도에 따른 균사생장과 세포외 다당류생산에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 9에서 백영고버섯 균사체의 최대 균사생장과 세포외 다당류 생산은 glucose 5%(w/v) 첨가구에서 얻어졌으며, 5%(w/v) 농도 이상 또는 이하의 첨가구에서는 균사생장과 세포외 다당류 생산은 저조한 것으로 나타났다.

이러한 결과는 Miko등[105]이 *Schizophyllum commune*의 균사 배양에 있어서 5%(w/v) glucose 농도이상 또는 이하로 첨가하였을 때 균사생장과 L-malic acid 생산이 저해하는 효과를 나타낸다는 보고와 일치함을 알 수 있다. 따라서 균사생장과 세포외 다당류 생산을 위한 glucose 농도는 5%(w/v)임을 알 수 있다.

Table 6. Effects of carbon sources on *Pleurotus nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture

Carbon source	Mycelial dry weight (g/L)	Exo-polysaccharide (g/L)
Control(none)	2.89	0.77
Glucose	6.48	2.64
Mannose	4.59	1.20
Galactose	2.96	0.59
Fructose	5.68	1.39
Arabinose	2.25	0.64
Xylose	3.54	0.72
Maltose	5.27	1.29
Lactose	3.01	0.60
Sucrose	3.05	0.53
Manitol	3.62	0.56

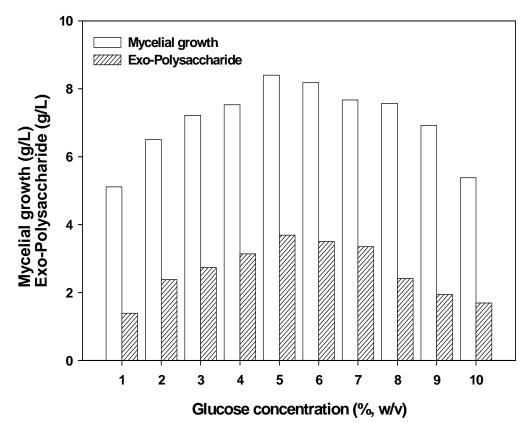


Fig. 9. Effect of glucose concentration on *Pleurotus nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture

IV-6-2. 질소원 선발 및 최적농도

질소원은 세포질을 구성하고 있는 주요 성분의 합성에 필수적인 영양원으로 본 연구에서 질소원이 백영고 버섯의 균사생장 및 세포외 다당류생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 최적 탄소원인 glucose를 5%(w/v)로 첨가된 배지에 유기태 질소원 및 무기태 질소원 등 12종을 첨가하여 조사한 결과 Table. 7에서와 같이 유기태 질소원인 polypeptone과 yeast extract 첨가구에서 가장 양호한 균사생장과 세포외 다당류 생산을 보였으며, 다른 유기태 질소원인 tryptone, peptone, malt extract와 첨가구에서는 다소 억제되는 현상이었다.

무기태 질소원의 경우 유기태 질소원 첨가구에서 보다도 상대적으로 저조한 생산수율을 보이고 있으며, 대체적으로 버섯 균사생장에는 암모니아태 질소가 질산태 질소보다 유리하다는 보고[106]와 비교하였을 때 백영고 버섯 균사체의 경우와 유사한 경향임을 알 수 있다.

균사생장과 세포외 다당류 생산에 최적 polypeptone 농도를 조사하기 위하여 polypeptone 농도를 0.2에서 2%(w/v)씩 달리하여 glucose 5%(w/v)가 함유된 배지에 첨가하여 조사한 결과 Fig. 10에서 보는 바와 같이 polypeptone 1.0%(w/v) 첨가구에서 최대 균사생장 및 세포외 다당류 생산을 나타냈다. 균사생장과 세포외 다당류 생산은 polypeptone 첨가 농도가 1.0%까지 증가하였지만, 1.0%(w/v)이상의 고농도에서는 억제되는 경향이었다.

Yeast extract의 농도에 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산에 미치는 영향을 조사하고자 yeast extract의 농도를 0.1 - 1.0%(w/v)까지 달리하여 glucose 5.0%(w/v)와 polypeptone 1.0%(w/v)가 함유된 배지에 첨가하여 조사하였다. Fig. 11에서 보는 바와 같이 균사생장과 세포외 다당류 생산은 polypeptone 1.0%(w/v)만 첨가된 경우보다 0.8%(w/v)의 yeast extract가 첨가되었을 때의 균사생장과 세포외 다당류 생산은 훨씬 더 향상된 생산수율을 보였다.

따라서 최적 질소원인 polypeptone과 yeast extract의 최적 첨가농도는 각각

1.0%(w/v)와 0.8%(w/v)임을 알 수 있다.

Table 7. Effects of nitrogen sources on *Pleurotus nebrodensis Inzenga*mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture.

Nitrogen source	Mycelial dry weight (g/L)	Exo-polysaccharide (g/L)
Control(none)	1.14	0.49
$Ca(NO_3)_2$	2.20	0.81
$NaNO_3$	0.01	N.D.
$(NH_4)_2SO_4$	0.75	N.D.
NH_4NO_3	0.71	N.D.
NH ₄ H ₂ PO ₄	3.68	1.07
(NH ₄) ₂ HPO4	3.01	1.02
KNO_3	1.09	0.36
Malt extract	2.22	1.44
Peptone	3.04	1.59
Tryptone	4.65	1.79
Yeast extract	6.19	2.45
Polypeptone	6.84	3.55

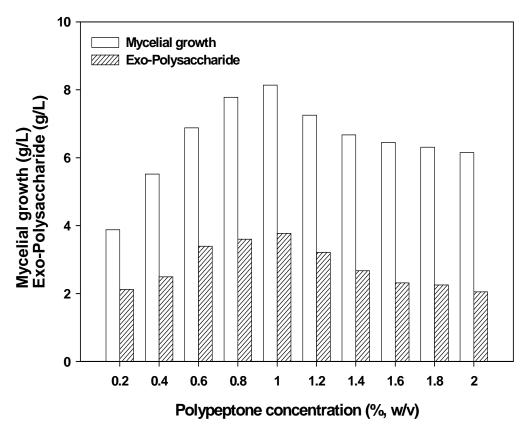


Fig. 10. Effect of polypeptone concentration on *Pleurotus nebrodensis Inzenga* mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture

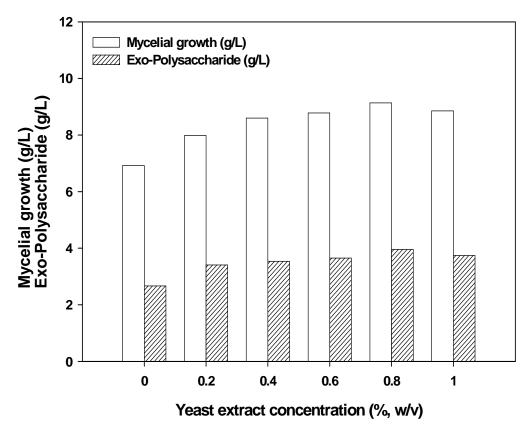


Fig. 11. Effect of yeast extract concentration on *Pleurotus nebrodensis Inzenga* mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture

IV-6-3 무기염류 선발 및 최적농도

균사생장과 세포외 다당류생산에 관한 무기염류의 영향을 조사하기 위하여 glucose 5%(w/v), polypeptone 1.0%(w/v), yeast extract 0.8%(w/v)가 함유된 배지에 9종의 무기염류를 각각 0.15%(w/v)씩 첨가하여 조사하였다. 그 결과 Table 8에서 보는 바와 같이 6종의 무기염류는 백영고 버섯 균사생장에 효과적이었고 그 중에서도 K_2HPO_4 와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 첨가구에서 균사생장과 세포외다당류 생산이 가장 우수하였다.

이러한 결과는 Chen과 Liy[107]가 Aspergillus japonicus의 효소생산에 있어서 K_2HPO_4 와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 첨가가 효과적이었음을 보고한 결과와 유사한 경향임을 알 수 있다. 또한 buffering reagent로 작용하는 PO_4^{3-} , 세포구조를 형성하는 K^+ , 그리고 균류의 세포벽의 생합성 및 이온 투과성에 영향을 미치는 Mg^{2+} 의 효과에 의하여 균사생장과 세포외 다당류 생산수율을 향상시킨 것으로 사료된다.

최적 무기염류로 선발된 K_2HPO_4 의 첨가농도에 따른 영향을 조사하고자 glucose 5%(w/v), polypeptone 1.0% (w/v), yeast extract 0.8%(w/v)가 함유된 배지에 0.02 - 0.3%(w/v)씩 첨가하여 조사한 결과 Fig. 12에서와 같이 0.12%(w/v)농도의 K_2HPO_4 첨가구에서 최대 균사생장(12.9 g/L)과 세포외 다당류 생산(4.15 g/L)을 보였다.

또한 MgSO₄·7H₂O의 첨가에 의해 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산을 조사하기 위하여 glucose 5%(w/v), polypeptone 1.0%(w/v), yeast extract 0.8%(w/v), K₂HPO₄ 0.12 %(w/v)가 함유된 배지에 0.02 - 0.3%(w/v)씩 첨가하여 조사한 결과 Fig. 12에서와 같이 균사생장은 MgSO₄·7H₂O 첨가에 따른 수율증가 효과는 나타내지 않았지만, MgSO₄·7H₂O 0.12%(w/v) 농도가 첨가된 시험군에서의 세포의 다당류 생산의 수율은 K₂HPO₄의 첨가 농도에 따른 실험 결과에서 나타난 세포외 다당류 생산보다 향상된 수율을 보였다.

따라서 백영고버섯 균사체의 균사생장과 세포외 다당류의 생산을 위한 최적무기염류인 K_2HPO_4 와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 최적 첨가농도는 똑같이 0.12%(w/v)임을 알 수 있다.

Table 8. Effects of mineral sources on *Pleurotus nebrodensis Inzenga*mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask
culture

Mineral source	Mycelial dry weight (g/L)	Exo-polysaccharide (g/L)
Control(none)	7.15	1.90
$MgSO_4$	6.84	2.51
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7.30	0.54
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.16	N.D.
$MgCl_2$	8.57	1.48
MgSO ₄ ·7H ₂ O	9.69	3.34
Na ₂ HPO ₄	7.32	1.27
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	6.64	1.02
K_2HPO_4	10.92	3.75
KH ₂ PO ₄	8.31	2.64

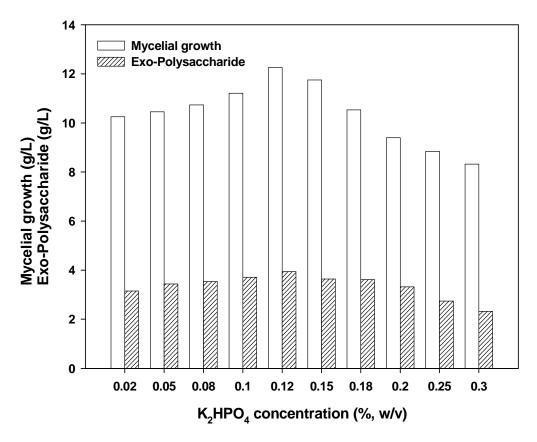


Fig. 12. Effect of K_2HPO_4 concentration on *Pleurotus nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture

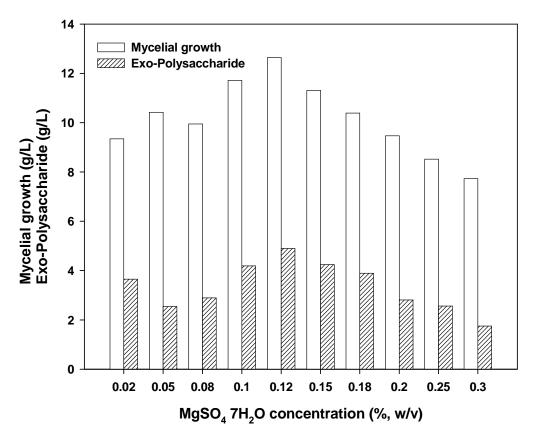


Fig. 13. Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on *Pleurotus nebrodensis Inzenga* mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture

IV-7 Jar fermentation

IV-7-1. Agitation speed의 영향

백영고버섯의 균사생장과 세포외 다당류 생산에 관한 agitation speed의 영향은 5 L jar fermentation에서 100 - 300 rpm으로 달리하여 조사하였다. 배양온도, pH 및 aeration은 각각 25℃, 6.5, 그리고 0.5 vvm으로 배양기간 동안 일정하게 유지되도록 조절하였다. Fig. 14는 다른 agitation speed하에서 배양기간동안의 균사생장과 세포외 다당류 생산에 관한 것으로 결과에서 보는 바와 같이 agitation speed는 균사생장과 세포외 다당류 생산에 영향을 미치고 있음을알 수 있다. Agitation speed가 200 rpm이상까지 증가시켜 주었을때 균사생장과 세포외 다당류 생산을 감소하고 있음을알 수 있다. 이러한 결과는 agitation speed가 증가할수록 impeller에 의한 강한 shear stress가 발생하여발효조 내의 균사에 손상을 입혀 균사생장과 세포에 다당류 생산에 부정적인 영향을 끼쳤기때문인 것으로 사료된다. 최대 균사생장과 세포외 다당류 생산은 150 rpm의 agitation speed 조건하에서 얻어졌으며 그 생산량은 각각 8.08 g/L와 3.23 g/L로 나타났다. 따라서 최적 agitation speed는 150 rpm임을알 수 있다.

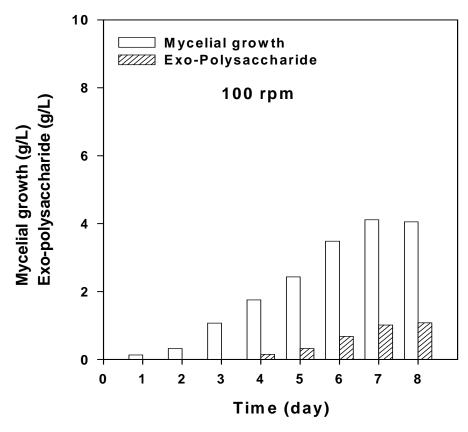


Fig. 14-1. Effect of agitation speed on *Pleurotus nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with jar fermentation at $25\,^{\circ}$ C, pH 6.5 and 0.5 vvm

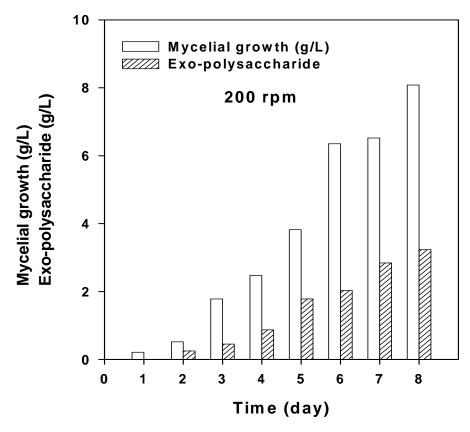


Fig. 14-2. Effect of agitation speed on *Pleurotus nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with jar fermentation at $25\,^{\circ}$ C, pH 6.5 and 0.5 vvm

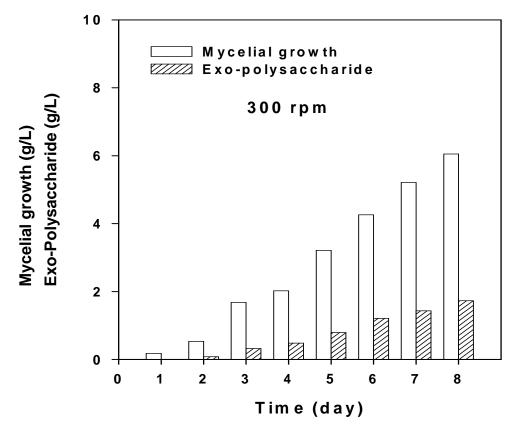


Fig. 14-3. Effect of agitation speed on *Pleurotus nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with jar fermentation at $25\,^{\circ}$ C, pH 6.5 and 0.5 vvm

IV-7-2 Aeration의 영향

Jar fermenter에서의 aeration에 따른 균사생장과 세포외 다당류생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 aeration을 각각 0.5 vvm과 1.5 vvm으로 하여 조사하였다. 배양온도와 pH, 및 agitation speed는 각각 25℃, 6.5, 그리고 150 rpm으로 하여 배양기간 동안 일정하게 유지되도록 조절하였다.

Fig. 15에서 보는 바와 같이 1.5 vvm의 aeration 공급에서 최대 균사생장 (8.53g/L)와 세포외 다당류 생산(3.54g/L)을 나타냈다.

이러한 결과는 aeration 공급이 증가할수록 배양액 내의 산소전달속도가 증가하여 백영고버섯의 균사생장에 유리한 환경을 조성하게 되어 결국 균사생장과 세포외 다당류 생산의 수율 향상에 긍정적인 영향을 미친 것으로 사료된다.

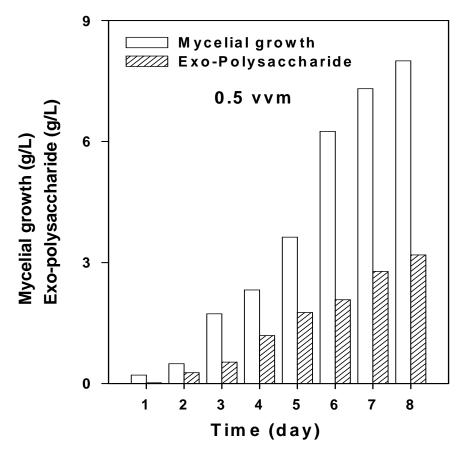


Fig. 15-1. Effect of aeration rate on *Pleurotus nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with jar fermentation at $25\,^\circ\text{C}$, pH 6.5 and 200 rpm

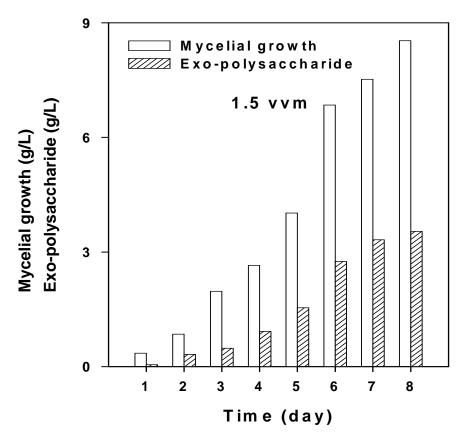


Fig. 15-2. Effect of aeration rate on *Pleurotus nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with jar fermentation at $25\,^\circ\text{C}$, pH 6.5 and 200 rpm

IV-4-3 최적 배양조건하에서의 time profile

Flask culture에서의 영양 요구성 실험 결과 얻어진 최적배지(glucose 5%(w/v), polypeptone 1.0%(w/v), yeast extract 0.8%(w/v), K₂HPO₄ 0.12%(w/v) 및 MgSO₄·7H₂O 0.12%(w/v)) 2.0 L를 5 L jar fermintation에 분주한 후 배양온도 25℃, pH 6.5, agitation speed 150 rpm, 그리고 areation 1.5 vvm 조건하에서 12일동안 배양시간에 따른 균사생장의 세포외 다당류 생산, 그리고 기질인 glucose 소비량을 조사하였다.

Fig. 16은 배양시간에 따른 백영고버섯의 균사생장과 세포외 다당류 생산 및 잔존 glucose 농도의 변화를 나타낸 것이다. 결과에서 보는 바와 같이 균사생장의 경우 배양시간 3일 이후부터 균사생장이 급격히 이루어져 배양시간 11일 경에 최대 균사생장(12.84 g/L)을 보인 다음 그 이후 균사생장이 다소 억제되고 있음을 알 수 있고, 세포외 다당류 배양시간 4일경에 2.78g/L의 생산을 보이기시작하여 배양 11일 경에 최대 세포외 다당류 생산(4.85 g/L)을 보인다음 그이후에 균사생장의 억제됨에 따라 세포외 다당류 생산도 저하되고 있음을 알수 있다. 또한 백영고버섯 균사체의 균사생장이 급격히 증가하기 시작하는 시점에서 배지내의 기질인 glucose의 이용도 급격히 증가하고 있으며, 배양기간동안 배지 내의 glucose 농도는 50 g/L에서 21.3 g/L 정도로 감소하였다. 이러한 결과는 백영고버섯의 세포외 다당류 생산 방식이 증식 연동형 방식인 것으로 판단되는데, 이에 대한 보다 많은 연구가 필요한 것을 사료된다.

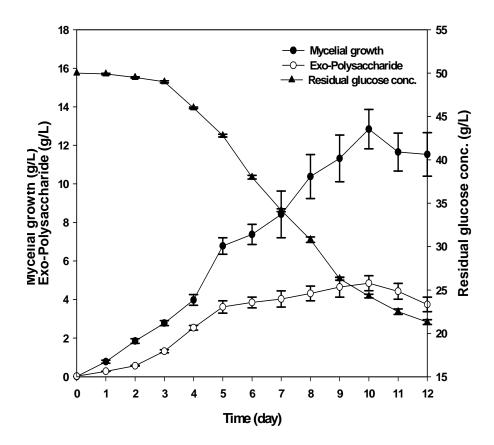


Fig. 16. Changes of P*leurotus nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with jar fermentation at $25\,^{\circ}$ C, pH 6.5, 1.5 vvm, and 200 rpm.

Ⅴ. 결 론

백영고버섯(*Pleurotus nebrodensis* Inzenga)의 균사생장과 세포외 다당류 생산을 위한 액체 배양의 최적 배양 조건 및 배지조성을 flask culture와 jar fermintation을 이용하여 조사하였다.

백영고 버섯 균사체의 균사생장과 새포외 다당류 생산을 위한 최적 온도와 pH는 각각 25±1℃와 6.5로 조사되었고, flask culture에서의 최적 배양부피는 300 mL flask에서 50 mL이었고, shaking speed는 150 rpm으로 나타났다. 백영고버섯 균사체의 균사생장과 세포외 다당류 생산을 위한 최적 접종원의 조건을 조사한 결과, 최적 접종원의 배양일수와 접종량은 7일간 배양한 접종원을 5%(w/v)로 접종 시 가장 효과적인 것으로 나타났다.

영양요구성 인자는 미생물 및 유효성분을 함유한 물질의 생산을 위한 선행조건 중의 하나이다. 그러나 백영고버섯 균사체의 균사생장과 세포외 다당류 생산을 위한 영양 요구성 인자에 대한 연구는 매우 부족한 실정이어서 균사생장 과세포외 다당류 생산을 위한 영양 요구성 인자를 조사하기 위하여 회분식 배양을 실시하였다. 그 결과 최적 배지 조성은 탄소원으로는 glucose 5 %(w/v), 질소원으로는 polypeptone 1.0%(w/v)과 yeast extract 0.8%(w/v)이고, 무기염류는 K_2HPO_4 0.12 %(w/v)와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12 %(w/v)이었다.

5 L jar fermintation에서 최적 교반속도와 통기량은 각각 200 rpm과 1.5 vvm으로 조사되었다. 플라스크 배양에서 고안된 최적 배지 조성을 가지고 배

양온도 25℃, pH 6.5, 교반속도 150 rpm 그리고 통기량 1.5 vvm에서 13일간회분식 배양을 실시한 결과 배양시간 11일 경에 최대 균사 생장 12.84 g/L, 세포외 다당류 생산은 4.85 g/L의 생산수율을 보였으며, 백영고 버섯 균사체의세포의 다당류 생산은 균사생장과 밀접한 관계가 있었으며 이는 증식 연동형임을 알 수 있었다.

그러나 본 연구에서 얻어진 결과는 백영고버섯으로부터 균사생장과 세포외다당류의 생산을 위한 효율적인 공정의 개발에 있어서 불충분한 점이 있다. 따라서 대규모의 균사체 및 세포외 다당류 생산을 위해서는 백영고버섯 균사체로부터 생산되는 세포외 다당류의 특성, 배양조건의 최적화, 적절한 반응기의 구성 및 고안 등의 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

참고문헌

- Buswell, J. A. and Chang, S. T., Edible mushrooms: attributes and applications, In: Chang, S. T., Buswell, J. A. and Miles, P. G., (eds) Genetics and breeding of edible mushrooms, Gordong and Breach, Y-parc, Switzerland, 297-324(1993).
- 2. Rajarathnam, S., Shashireka, M. N. and Bano, Z., Biopotentialities of the Basidiomycetes, *Adv. Appl. Microbiol.*, *64*, 1088-1117(1993).
- 3. Nanba, H. and Kumoda, H., Potention of host-modiated antitutmor activity by orally administered mushroom(*Agaricus bisporous*) fruit bodies, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(4), 1437 1444(1998).
- 4. Lee, J. H., *J. Microbiol Bitechnol.*, **20**(3), 14-21(1994).
- 5. Kim, D. H., Yang, B. K., Jeong, S. C., Park, J. B., Cho, S. P., Das, S., Yun, J. W. and Song, C. H., Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus, Biotechnol. Lett.*, 23, 513-517(2001).
- Chihara, G., Hamuno, T., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F.,
 Fractionation and purification of the polysaccharides with marked
 antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) sing.,
 an edible mushroom, *Cancer Res.*, 30, 2776-2781(1970).
- 7. Tabata, K., Itoh, W., Kojiama, T., Kawabate, S. and Maisaki, K., Ultrasonic degradation of Schizophyllam, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* FRIES., *Carbohydr. Res.,* 89, 121-135(1981).
- 8. Ng, T. B., A review of research on the protein-bound polysaccharide

- (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae), *Gen. Pharm.*, **30**, 1-4(1998).
- Chen, A. W. and Miles, P. G., Cultivation of *Ganoderma bonsai*, In:
 Royse, D. J., (ed) Mushroom biology and mushroom products, *Proc. 2nd Int. Conf.*, University Park, Pa. Penn. State University Press, pp. 325-333(1996).
- Angeli-Papa, J. and Eyme, J., Ultrastructural changes during development of *Agaricus bisporus* and *Agaricus sylvicola*. In: Chang, S. T. and Hayes, W. A., (eds) The biology and cultivation of edible mushrooms, Academic Press, New York, pp. 53-82(1978).
- 11. Kues, U., Life history and developmental processes in the Basidiomycetes *Coprinus cinereus, Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 316-353(2000).
- 12. Scrase, R. J. and Eliott, T. J., Biology and technology of mushroom culture, In: Wood, B. J. B., (eds) Microbiology of fermented food, Vol 2, 2nd edn. Blackie, London, pp. 543-584(1998).
- 13. Chang, S. T. and Miles, P. G., Edible mushrooms and their cultivations, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida(1989).
- 14. Stametes, P. and Chilton, J. S., The mushroom cultivator, Agarikon Press, Olympia, Washington(1983).
- Samul, C., Production of mushroom mycelial of the submerged culture process, pp. 647 - 653, Industrial Microbiology, Reimhold Publishing, Lodon(1959).
- 16. Torev, A., Mushroom Sci., 7, 585-589(1964).
- 17. Friel, M. T. and McLoughlin, A. J., Production of a liquid inoculum/spawn of *Agaricus bisporus*, *Biotechnol. Lett.*, **22**, 351-354(2000).
- 18. Lee, S. Y. and Kang, T. S., Production conditions and characterization of

- the exo-polymer produced by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*, *Kr. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 111-118(1996).
- 19. Sung, J. M., Kim, C. H., Yang, K. J., Lee, H. K. and Kim, Y. S., Studies on distribution and utilization of *Cordyceps militaris* and *C. nutans, Kr. J. Micol.*, 21, 94-105(1993).
- Lee, J. H., Cho, S. M., Kim, H. M., Hong, N. D. and Yoo, I. D., Immunostimulationg activity of polysaccharides from mycelia of *Phellinus linteus* grown under differnt culture conditions, *J. Microbiol. Biotecnol.*, 6, 52-55(1996).
- 21. Lee, S. Y., Kang, T. S. and Lee, M. C., Condition of exo-polysaccharide production from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* by using air-lift fermenter system, *Kr. J. Biotechnol. Bioeng.*, 13, 547-553(1998).
- 22. Choi, K. H., Development of a new synthetic medium composition for the submerged culture of *Phellinus linteus*, *Kr. J. Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 167-173(1999).
- Park, J. P., Kim, S. W., Hwang, H. J. and Yun, J. W., Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production of *Cordyceps militaris*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 33, 76-81(2001).
- Huang, N., Colored illustrations of macrofungi mushrooms of China,
 China Agricultural Press. Beijing(1998).
- 25. Chang S. T., Int J. Med Mushroom, 1, 1-7(1999).
- 26. Chang S. T., Mushroom J. Trop., 11, 45-52(1991).
- 27. Wasser S. P., Weis A. L., Int J. Med Mushroom, 1, 351-370(1999).
- 28. Zadrazil F., Academic Press, New York, 521-524(1978).
- 29. Mau J. L., Lin Y. P., Chen P. T., Wu Y. H. and J. T. Peng, J. Agric Food

- Chem., 46, 4587-4591(1998).
- 30. Wood D. A., and J. F. Smith, Wiley, New York, 309-343(1987).
- 31. Silanikove N. and D. Levanon, J. Sci Food Agric., 38, 117-124(1987).
- 32. Silaikove N., Danai O. and D. Levanon, Biol Wastes, 25, 219-226(1988).
- 33. Hadar Y. and E. Cohen-Arazi, *Appl Environ Microbiol*, **51**, 1352-1354(1986).
- 34. Fischer K. H. and W. Grosch, Lebensm Wiss Technol, 20, 233-236(1987).
- 35. Hadar Y. and C. G. Dosoretz, *Trends Food Sci Technol September*, 214-218(1991).
- 36. Belinky P. A., Masaphy S., Levanon D., Hadar Y. and C. G. dosoretz, *Appl Microbiol Biotechnol*, **40**, 629-633(1994).
- 37. Assaf S., Hadar Y. and C. G. dosoretz, *J. Agric Food Chem*, **43**, 2173-2178(1995).
- 38. Chang S. T. and P. G. Miles, CRC Press, Boca Raton(1989).
- 39. Wasser S. P. and A. L. Weis, Crit Rev Immunol, 19, 65-96(1999a).
- 40. Gunde-Cimerman N., Int J. Med Mushroom, 1, 69-80(1999).
- 41. Kües U. and Y. Liu, Appl Microbiol Biotechnol, 54, 141-152(2000).
- 42. Bianco Coletlo, M. A., Basidiomiceti in relazione all antibiosi. Nota Π. Attivita' antibiotica dei miceli e dei liquidi di coltura, *J. Batteriol. Virol. Immunol.*, 74, 267-274(1981).
- 43. Wang, W. S. and Wang, D. H., Enhancement of the resistance of tilapia and grass carp to experimental *Aeromontas hydrophila* and *Edwardsiella trada* infections by several polysaccharides, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect Dis.*, 20, 261-270(1997).
- 44. Karacsonyi, S. and Kuniak, L, Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble beta-D-glucan.,

- Carbohydr. Polym., 24, 107-111(1994).
- 45. Noda, S., Antibiotic fungicide extracted from Basidiomycetes culture (e.g. Shitake, *Flammulina velutips, Polyporus, Pleurotus*, etc.)., Jpn. Patent JP. 60190800, JP. 8445268(1998).
- 46. Noda, S., Preparation of an antiviral agent by deep culture Basidiomycetes, Jpn. Patent JP 60054324, JP 83162084(1998).
- 47. Zhang, L., Fei, S. and Zhang, Y., The influence of chemical modification on antiviral (CBS) activity of polysaccharide from *Pleurotu citrinopileatus.*, Sheng Wu Hua Hsueh Zazhi, *10*, 150-154(1994).
- 48. Zhang, L., Zhang, Y., Fei, S. and Liang, Z., The influence of sulfation on the conformation and biological activity of polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus*, Sheng Wu Hua Hsueh Yu Sheng Wu Wu Li Hsueh Pao, 26, 417-421(1994).
- 49. Wang, H. and Ng, T. B., Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostereaus* mushroom with anti-human immuno-deficiency virus, translation-inhibitory and ribonuclease activities, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**, 587-593(2000).
- 50. Paulik, S., Svrcek, S., Huska, M., Moizisov, J., Duroves, A. and Benishek, Z., The effect of fungal and yeast glucan and levamisole on the level of the cellular immune response in vivo and leukocyte phagocytic activity in mice, *Vet. Med.*, 37, 675-685(1992).
- 51. Paulik, S., Svreck, S., Mojzisova, J., Durove, A., Benishek, Z. and Huska, M., The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan (*Pleurotus ostreatus*) on delayed hypersensitivity and phagocytic ability of blood leukocytes in mice, *Zentrabl Vecterinaermed Reihe* B., **43**, 129-135(1996).
- 52. Li, H., Zhang, L., Dong, L. and Cao, J., Preparation and immunologic

- competence of glycopeptides components from *Pleurotus ostreatus* fungi, Shandong Yike Daxue Hsuch Pao, 32, 343-346(1994).
- 53. Zusman, I., Reifen, R., Livni, O., Sminoff, P., Gukevich, P., Sandler, B., Nyska, A., Gal, R., Tendler, Y. and Madar, Z., Role of apoptosis, proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in chemically induced colon cancer in rats fed corncob fiber treated with the fungus *Pleurotus ostreatus, Anticancer Res.*, 17, 2105-2113(1997).
- 54. Hidaka, H. and Ikegawa, T., Anti-cancer agents from edible mushrooms, Jpn. Patent JP48006766, B4 730228 showa(1998).
- 55. Suzuki, W. and Ikegawa, T., Anti-cancer substance emitanin, Jpn. Patent JP 53006494, 780120 showa(1998).
- 56. Bobek, P. and Galbavy, S., Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon, *Br. J. Biomed. Sci.*, **58**, 164-168(2001).
- 57. Bobek, P., Galbavy, S. and Ozdin, L., Effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on pathological changes in dimethylhydrazine-induced rat colon cancer, *Oncol. Rep.*, 5, 727-730(1998).
- 58. Noda, S., A preparation for kindey treatment possessing antiflammatory activity, obtained from Basidiomycetes, e.g. *Lentinus, Pleurotus, Flammulina*, and *Tricholoma*, Jpn Patent JP 61171428, JP 8511888(1998).
- 59. Gunde-Cimerman, N. and Cimerman, A., *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastin, *Exp. Mycol.*, **19**, 1-6(1995).
- 60. Opletal, L., Jahodar, L., Chabot, V., Zdansky, P., Lukes, J., Bratova, M., Solichova, D., Blunden, G., Dacke, C. G. and Patel, A., Evidence for the

- anti-hyperlipidaemic activity of the edible fungus *Pleurotus ostreatus, Br. Biomed. Sci.,* **54**, 240-243(1997).
- Krasnopolskaya, L. M., Makeeva, A. P., Lvova, N. A., Abramova, E. A. and Kodjima, E. V., Macromycetes new producers of inhibitor of cholesterol biosynthesis lovastatin. In: *Proc. 6th Int. Mycol. Congr. IMC*, Jerusalem, p. 165(1998).
- Bobek, P., Ozdin, L. and Kunial, I., Antioxidative effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in hypocholesterolemic rat, *Pharmazie.*, 50, 441-442(1995).
- 63. Bobek, P., Ozdin, L. and Galbavy, S., Dose- and time-dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats, *Nutrition*, **14**, 282-286(1998).
- 64. Oguri, S., Ando, A. and Nagata, Y., A novel developmental stage specific lectin of the Basidiomycete *Pleurotus cornucopiae*, *J. Bacteriol.*, **178**, 5692-5698(1996).
- 65. Fitzpatrick, W. G., Esselen, W. G. and Weir, E., *J. Am. diet. Assoc.*, 22, 318 (1946).
- 66. Mousstafa, A. M., Appl. Microbiol., 8, 62 (1960).
- 67. Falanghe, H., Appl. Microbiol., 12, 330 (1964).
- 68. Humfeld, H., Agr. Yearbook, 242 (1950-1951).
- 69. Reusser, G., Spencer, G. T. and Sallans, A. R., *Appl. Microbiol.*, **6**, 15 (1958).
- 70. Martin, A. M., Can. J. Microbiol., 29, 108 (1983).
- 71. Martin, A. M. and Bailey, V. I., Can. Inst. *Food Sci. Technol.*, *18*, 185 (1985).
- 72. Robins, W. J., Prog. Natl. Acad. Sci., 33, 171 (1947).

- 73. Anchel, M., J. Am. Chen. Soc., 74 (1558), 2943 (1952).
- 74. Lucas et at., antibiotics Ann., 493 (1958-1959).
- 75. Roland, J. Fl, Science, 132, 1897 (1960).
- 76. Petterson, G., Cowling, E. B. and Porath, J., *J. Biochem. Biophys. Acta.*, **67**, 1 (1963).
- 77. Falanghe, J., Arch. biochem. Biophys., 96, 456 (1962).
- 78. Pan. S. C. and Frazier, W. R., biotech. bioeng., 4, 303 (1963).
- 79. 박용환, 최신 버섯학, 한국버섯원균영농조합, pp. 270-271 (1997).
- 80. Bailey, J. E. and Ollis, D. F., Biochemical Engineering Fundamentals, pp. 368, McGraw-Hill Book Co., N.Y. (1977).
- 81. Humfeld et al., Appl. Microbiol., 2, 170 (1954).
- 82. 柳進, 倂田捻, 日菌報, 17, 506 (1976).
- 83. Kidd, P. M., The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer therapy, *Alternative Medicine Review*, 5, 4-27(2000).
- 84. Mizuno, T., The extraction and development of antitumor-activity polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan, *Int. J. Med. Mushrooms*, 1, 9-29(1999).
- 85. Gervais, P., Bensoussan, M. and Grajek, W., Water activity and water content: comparative effect on the growth of *Penicillium roquefortii* on a solid substance, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 389-392(1988).
- 86. Miller, G. L., Use of di-nitrosalicyclic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, 35, 317-325(1959).
- 87. Zadrazil, F., The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cormucopiae* and *Pleurotus eryngii*, *Mushroom Sci.*, **9**, 621-655 (1974).
- 88. Chang, H. Y., Cha, D. Y., Kang, A. S., Hong, I. P., King, K. P., Seok, S.

- J., Ryu, Y. J. and Sung, J. M., Cultural Characteristics of *Fomitella fraxinea* (Fr.) Imaz, *Kor. J. Mycol.*, **23**, 238-245 (1995).
- 89. Kim, H. K., Park, J. S., Cha, D. Y., Kim, Y. S. and Moon, B. J., Study on the artificial cultivation of *Lentinus lepideus* (Fr. ex. Fr.), *Kor. J. Mycol.*, 22, 145-152 (1994).
- 90. Kang, A. S., Cha, D. Y., Hong, I. P., Chang, H. Y. and Yu, S. H., Studies of cultural condition on the mycelial vegetative growth in *Naematoloma sublateritium* (Fr.) Karst, *Kor. J. Mycol.*, 22, 153-159(1994).
- 91. Jung, I. C., Kim, S. H., Kwon, Y. I., Kim, S. Y., Lee, J. S., Park, S., Park, K. S. and Lee, J. S., Cultural condition for the mycelial growth of *Phellinus igniarius* on chemically defined medium and grains, *Kor. J. Mycol.*, 25, 133-142(1997).
- 92. Hong, J. S., Choi, Y. H. and Yun, S. E., Studies on the celluloytic enzymes produced by *Ganoderma lucidum* in synthetic media, *Kor. J. Mycol.*, **14**, 121-130(1986).
- 93. Kim, H. K., Park, J. S., Cha, D. Y., Kim, Y. S. and Moon, B. J., Study on the artificial cultivation of *Lentinus lepideus* (Fr. ex Fr.) Fr.(I)

 -Investigation of mycelial growth conditions-, *Kor. J. Mycol.*, 22, 145-152(1994).
- 94. Chang, H. Y., Cha, D. Y., Kang, A. S., Hong, I. P., Kim, K. P., Seok, S. J., Ryu, Y. J. and Sung, J. M., Cultural characteristics of *Fomitella fraxinea* (Fr.) Imaz, *Kor. J. Mycol.*, 23, 238-245(1995).
- 95. Hashimoto, K. and Takahashi, Z., Studies on the growth of *Pleurotus* ostreatus, Mush. Sci., IX, 585-593(1974).
- 96. Hong, J. S., Lee, K. S. and Choi, D. S., Studies on Basidiomycetes(1) on the mycelial growth of *Agaricus bitorguis* and *Pleurotus ostreatus, Kor. J.*

- Mycol., 9, 19-24(1981).
- 97. Hong, I. P. and Lee, M. W., Studies on the cultural characteristics of *Poria cocos, Kor. J. Mycol.*, **18**, 42-49(1990).
- 98. Chi, J. H., Ha, T. M., Kim, Y. H. and Rho, Y. D., Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus, Kor. J. Mycol.*, 24, 214-222(1996).
- 99. Kim. H. K., Cheong, J. C., Chang. H. Y., Kim, G. P., Cha, D. Y. and Moon. B. J., The artificial cultivation of *Pleurotus eryngii* (I) -Investigation of Mycelial growth conditions-, *Kor. J. Mycol.*, 25, 305-310(1997).
- 100. Wol-port, F. S., Studies on the physiology of fungi. X VII. The growth of certain wood-destroying fungi in relation to the H-ion concentration of the media, *Ann. Misouri Bot. Garden*, 11-97(1924).
- 101. Ishikawa, H., Physiological and ecological studies on *Lentinus edodes*(Berk), *Sing. J. Agric. Lab.*, **8**, 1-53(1967).
- 102. Kanayama, H., Adachi, N. and Togami, M., A new antitumor polysaccharide from the mycelia of *Poria cocos, Wolf. Chem. Pharm. Bull.*, 31, 1115-1118(1983).
- 103. Kim, J. M., Ra, K. S., Noh, D. O. and Suh, H. J., Optimization of submerged culture conditions for the production of angiotensin converting enzyme inhibitor from *Flammulina velutips*, *J*, *Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 292-295(2002).
- 104. Park, K. S., Park, S., Jung, I. C., Ha, H. C., Kim, S. H. and Lee, J. S., Production of protein-bound polysaccharides by solid state fermentation of *Coriolus versicolor, Kr. J. Mycol.*, 22, 184-189(1994).
- 105. Mikio, K., Keiichi, H., Shinichiro, S., Koujirou, M. and Kazumitsu, N.,

- Application of bubble column fermentors to submerged culture of *Schizophyllum commure* for production L-malic acid, *J. Ferment. Bioeng.*, 84, 333-336(1997).
- 106. Garraway, M. O. and Evans, R. C., Nutrition as a basis for the study of fungi, John wiley and Sons, New York, pp. 71-221(1991).
- 107. Chen, W. C. and Liu, C. H., Production of β-fructofuranosidase by *Aspergillus juponicus, Enzyme Microbiol. Technol.,* **18**, 153-160(1996).