

구름버섯의 고체발효에 의한 단백다당류 생산

박경숙 · 박 신¹ · 정인창 · 하효철 · 김선희 · 이재성*

영남대학교 농축산대학 식품가공학과

¹대구대학교 농과대학 농화학과

Production of protein-bound polysaccharides by solid-state fermentation of *Coriolus versicolor*

Kyung-Sook Park, Shin Park¹, In-Chang Jung, Hyo-Cheol Ha,
Seon-Hee Kim and Jae-Sung Lee*

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and
Animal Science Yeungnam University, Kyongsan, Korea

¹Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture Daegu University

ABSTRACT: The possibility of solid-substrate fermentation of *Coriolus versicolor* for the production of protein-bound polysaccharides(PBP) was studied. Zeolite and orchid-pot soil were used as solid materials for the culture because of the desirable physical properties. Glucose, sucrose and starch showed to be good carbon sources for the production of PBP by the solid-substrate fermentation of *C. versicolor*. Among the nitrogen sources, bactosoyton and peptone were very effective for the PBP production. The optimum pH for solid-substrate culture for the production of PBP was at the range of 5-6. The yields of PBP reached to 5-6 mg per 100 g solid-substrate.

KEYWORDS: proteoglycan, *Coridus versicolor*, solid-state fermentation, antitumor, polysaccharide

서 론

담자균류인 버섯에서 생산되는 항암성분에 관하여는 많은 연구가 보고되었다(Hirase 등, 1976 ; Hirase 등, 1976 ; Ohno 등, 1988 ; Roland 등, 1960 ; Shinohara 등, 1988 ; Tshkagoshi 등, 1974). 국내에서도 여러가지 버섯의 항암효과에 대하여 Kim 등 (1988)과 Shim(1981)이 발표한 바 있으나, 버섯의 항암 효과의 주성분으로 추정되고 있는 다당류 및 단백다당류의 생산성을 높이기 위한 연구는 아직 국내에서 활발하지 못하고 다만 Park 등(1989)에 의하여 구름버섯의 액체 배양 및 다당류 추출에 관한 논문이 발표되었다.

구름버섯(*C. versicolor*(L.ex Fr.))은 자연에 널리

자생하고 있는데 이에 의하여 생산되는 단백다당류는 다른 담자균류의 단백다당류에 비하여 항암작용이 뛰어난 것으로 보고된 바 있다(Park 등, 1989).

본 연구자들은 산업적으로 단백다당류를 생산하기 위한 기초연구로써 각 균주배양을 위한 영양배지 조성 및 배양조건의 최적화 실험을 보고한 바 있으며(Park 등, 1991) 또한 균사배양체로부터 단백다당류를 보다 순수하게 분리정제하는 방법과 추출수율을 높이기 위한 추출방법등을 보고한 바(Park 등, 1992) 있다.

다당류 및 단백다당류를 추출하기 위하여는 고체 또는 액체 배양법에 의해서 균사체를 배양할 수 있는데, 교반을 겸한 액체배양이 고체배양보다 더 유리하다고 알려져 있다. 따라서 액체배양에 의한 다당류생산이 현재 산업적으로 많이 사용되고 있다. 그러나 대량의 배양액으로부터 다당류를 침전시켜

*Corresponding author

회수하는 과정에서 많은 양의 에탄올이 소비되어 원가상승 요인이 되며 또한 다량의 폐수를 처리하여야 하는 문제점을 안고 있다. 그러므로 고체재료 발효 방법은 적절한 재료가 확보되고 배양조건이 확립되면 소량의 추출용액을 사용하여 다당류를 회수할 수 있게 되어 경제적이고 실용적인 산업기술이 될 것으로 생각된다.

여기에서는 다양한 고체재료를 기질로 사용한 구름버섯의 고체배양에 의한 단백다당류 생산시험의 결과를 보고 하는 바이다.

재료 및 방법

균주

본 연구에 사용된 균주는 *C.vercolor*(L.ex Fr) Quel 16002로써 본 연구실에서 보관 중인 균주를 사용하였다.

배지

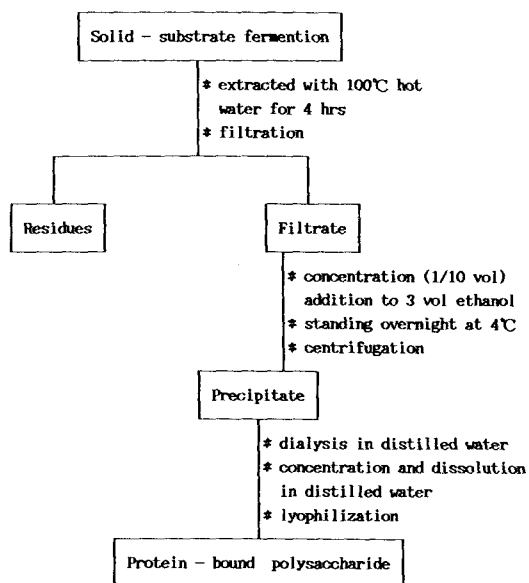
균의 보존용 배지는 조성이 malt extract 1.0%, yeast extract 0.4%, glucose 0.4%, agar 1.5%인 MYG배지(Yanagi등, 1984)를 사용하였고, 균사 접종을 위한 액체 진탕용 배지는 구름버섯이 가장 잘 자라는 것으로 보고된 CVM배지(Park등, 1991)를 사용하였다. 고체배지에서 균사의 성장속도를 비교하기 위한 배지는 MCM, ACM, MYG, CVM, GCM (배지 조성은 Table 5)등을 사용하였다.

균사배양

쌀, 밀, 스폰지, zeolite, 왕겨, 난 재배용 토양등의 재료를 CVM 배지에 4시간 이상 충분히 침지시켜 배지성분을 흡착시킨다. 배지를 흡착시킨 고체재료를 100 ml Elenmyer flask에 1/3 높이까지 충전한 후, 121°C 에서 40분간 멸균시켰다. CVM 배지에서 7일간 액체배양된 균사체를 Homogenizer(Nissei-AN-11)로 1분간(3,000 rpm) 균질화하고, 이를 멸균시킨 고체재료 배지에 10 ml씩 접종하여 28°C 에서 배양하였다.

단백다당류의 생산 및 회수

각 고체재료에서 자란 균사체에 일정량의 끓는 물을 가하여 100°C 에서 4시간 동안 추출한 후 여



Scheme 1. Extraction and fractionation of the protein-bound polysaccharide at solid-substrate culture of *C. versicolor*.

과하였다. 이 여과액을 감압농축기로 1/10이 되도록 농축한 후 3배량의 에탄올을 가하여 4°C 에서 하룻밤 동안 방치하였다. 생성된 침전물은 15,000 rpm에서 30분간의 원심분리로 수거한 뒤 이를 소량의 증류수에 녹이고 24시간 동안 증류수로 투석한 다음 동결건조하여 조단백다당류를 얻었다(scheme 1).

최적 pH

각 고체재료에서 단백다당류 생산에 가장 적합한 pH를 규정하기 위하여 4단계의 pH로 조절한 0.05 M citrate phosphate buffer에 배지 성분을 넣고 용해시킨 다음, pH를 측정하고(pH 4.3, 5.5, 6.8, 8.5) 28°C 에서 배양시켰다. 각 고체재료 배양에서 추출한 단백다당류를 동결건조하여 단백다당류 생산에 미치는 pH의 영향을 검토하였다.

결과 및 고찰

고체 재료별 균사생장 및 다당류의 수율

배지성분을 고체재료에 흡착시킨 다음 균사를 접종하고 배양한 고체 발효에서 균사의 생장은 대부분 양호하였다(plate 1). 그러나 전통적인 고체발효 식품의 원료로 많이 사용되는 쌀, 밀의 경우, 전분질이

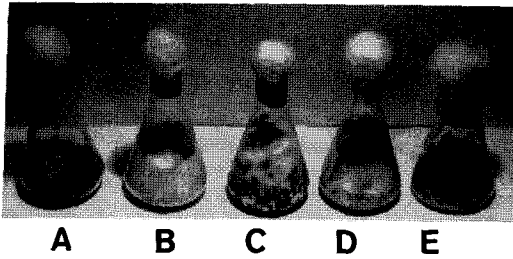


plate 1. Mycelium growth of *Coriolus versicolor* with different Solid-substrate fermentation. A : Rice hull, B : Rice, C : Zeolite, D : Wheat, E : Sponge. * : Solid-substrate fermentation was done at 28°C for 9 days.

Table 1. Effect of carbon sources on protein-bound polysaccharide yield at solid-substrate culture of *C. versicolor* on zeolite

Carbon source	Yield of PBP(mg)
Glucose	2.53± 0.42
Fructose	1.91± 0.28
Sucrose	2.12± 0.06
Maltose	1.85± 0.08
Sorbitol	0.97± 0.01
Starch	2.47± 0.17

* : Cultured at 28°C for 17 days in the solid medium containing each carbon source with potassium nitrate. ** : The values were calculated on the basis of 100 g solid-substrates.

우리 나라 단백질다당류 추출을 위한 여과나 원심분리가 대단히 어렵다. 또한 스폰지, 왕겨 등은 추출 과정에서 부서져서 열수추출에 의한 단백질다당류를 얻는 방법으로는 문제점이 많은 것으로 보여졌다. 그래서 본 연구에서 zeolite와 난 재배양 토양을 중심으로 고체발효를 실시하였다.

단백다당류 생성에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 *C. versicolor*의 최적 배지 실험에 사용한 것과 같이 6종류의 탄소원을 사용하여 단백질다당류의 수율을 검토한 결과는 Table 1과 2와 같다.

즉 zeolite나 난 재배양 토양을 고체재료로 사용한 고체발효에서 균사의 성장이나 밀도가 우수한 glucose, sucrose 및 starch에서 단백질다당류의 생산량도 높게 나타났다. 일반적으로 균체량의 증식이 양호

Table 2. Effect of carbon sources on protein-bound polysaccharide yield at solid-substrate culture of *C. versicolor* on orchid-pot soil

Carbon source	Yield of PBP(mg)
Glucose	2.34± 0.14
Fructose	1.82± 0.10
Sucrose	2.38± 0.03
Maltose	1.80± 0.09
Sorbitol	0.86± 0.00
Starch	1.96± 0.04

* : Cultured at 28°C for 17 days in the solid medium containing each carbon source with potassium nitrate. ** : The values were calculated on the basis of 100 g solid-substrates.

Table 3. Effect of nitrogen sources on protein-bound polysaccharide yield at solid-substrate culture of *C. versicolor* on zeolite

Nitrogen source	Yield of PBP(mg)
Peptone	1.96± 0.07
Tryptone	1.75± 0.16
Bacto soytone	2.07± 0.07
Ammonium tartrate	0.97± 0.10
Ammonium Sulfate	0.62± 0.14
Ammonium nitrate	0.85± 0.06
Potassium nitrate	0.93± 0.13

* : Cultured at 28°C for 17 days in the solid medium containing each nitrogen source with glucose. ** : The values were calculated on the basis of 100 g solid-substrates.

하였을 때 단백질다당류의 생산성이 높았다.

탄소원으로서 sorbitol을 사용하였을 경우 균사생장이나 밀도가 불량할 뿐 아니라 단백질다당류의 생산량도 크게 낮았다.

질소원의 종류별 단백질다당류의 생산성 실험에서 7종류의 질소원을 0.6% 농도로 조절하여 배양한 결과는 Table 3, 4와 같다. 역시 균사생장이 좋은 유기질소원이 무기질소원에 비하여 전반적으로 높은 단백질다당류 생산성을 나타내었다. 고체배양에 의한 단백질다당류 생산성 실험에서 zeolite나 난 재배양 토양을 고체재료로 하여 배양하였을 경우 bacto so-

Table 4. Effect of nitrogen sources on protein-bound polysaccharide yield at solid-substrate culture of *C. versicolor* on orchid-pot soil

Nitrogen source	Yield of PBP(mg)
Peptone	2.12 ± 0.23
Tryptone	1.66 ± 0.11
Bacto soytone	1.98 ± 0.10
Ammonium tartrate	0.93 ± 0.01
Ammonium Sulfate	0.54 ± 0.13
Ammonium nitrate	0.86 ± 0.08
Potassium nitrate	0.89 ± 0.08

* : Cultured at 28°C for 17 days in the solid medium containing each nitrogen source with glucose. ** : The values were calculated on the basis of 100 g solid-substrates.

ytone과 peptone을 질소원으로 한 배지에서 단백질 다당류 생산수율이 높았다. 유기질소원 중에는 tryptone이 bacto soytone이나 peptone에 비하여 낮은 생산성을 보였다.

배지조성별 단백질다당류의 생산성

각종 버섯균의 최적영양 배지로써 일반적으로 사용되고 있거나 본 연구실에서 조성을 확립한 CVM, MYG, ACM, MCM, GCM을 사용하였다.

zeolite와 난 재배용 토양을 고체 재료로 하여 이들 5종류의 배지성분을 이용하여 배양하였을 경우 단백질다당류 생산성은 Table 5, 6과 같다.

앞서의 연구결과 *C. versicolor*의 최적배지 조성으로 알려진 CVM 배지를 흡착시킨 zeolite의 경우 고체재료 100 g당 5.56 mg 및 난 재배용 토양의 경우 5.31 mg의 조단백다당류 생산량을 보여 생산성이 가장 높았다.

종합적으로 볼 때 균사생장이 단백질다당류의 생산성에 결정적인 요인이 되고 있음을 확인할 수 있었다.

pH의 영향

단백다당류 생산에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 단백질다당류 생산량은 액체 배양의 최적 pH인 5.0-5.6과 비슷한 pH 5.5에서 zeo-

Table 5. The productivity of various media for protein-bound polysaccharide at solid-substrate culture of *C. versicolor* on zeolite

Media	Yield of PBP(mg)
CVM	5.56 ± 0.04
MYG	4.86 ± 0.04
ACM	5.31 ± 0.11
MCM	4.89 ± 0.15
GCM	4.96 ± 0.17

* : Cultured at 28°C for 9 days. ** : The values were calculated on the basis of amount of 100 g solid-substrates. MCM : glucose 2%, peptone 0.2%, yeast extract 0.6%. GCM : glucose 3%, sucrose 2%, peptone 0.4%, yeast extract 1%, casamino acid 0.5%, KH_2PO_4 0.046%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, agar 1.5%. ACM : starch 2%, bacto-soytone 0.4%, yeast extract 0.6%, KH_2PO_4 0.046%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, agar 1.5%. MYG : malt extract 1%, yeast extract 0.4%, glucose 0.4%, agar 1.5%. CVM : glucose 2%, peptone 0.4%, yeast extract 0.6%, KH_2PO_4 0.046%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, agar 1.5%.

Table 6. The productivity of various media for protein-bound polysaccharide at solid-substrate culture of *C. versicolor* on orchid-pot soil

Media	Yield of PBP(mg)
CVM	5.39 ± 0.11
MYG	4.72 ± 0.11
ACM	4.90 ± 0.10
MCM	4.92 ± 0.10
GCM	5.02 ± 0.15

* : Cultured at 28°C for 9 days. ** : The values were calculated on the basis of amount of 100 g solid-substrates.

lite와 난 재배 토양을 이용한 고체배양에서 고체재료 100 g당 조단백다당류 5.05 mg 및 5.57 mg으로 가장 생산성이 높았다. 그러나 액체배양의 경우 최적 pH 범위를 벗어나면 균사의 건물량이 현저하게 낮아진 것에 반하여 고체배양에서는 pH 6.3에서도 단백질다당류 생산량이 어느 정도 수준을 유지하고 있음이 특이하였다.

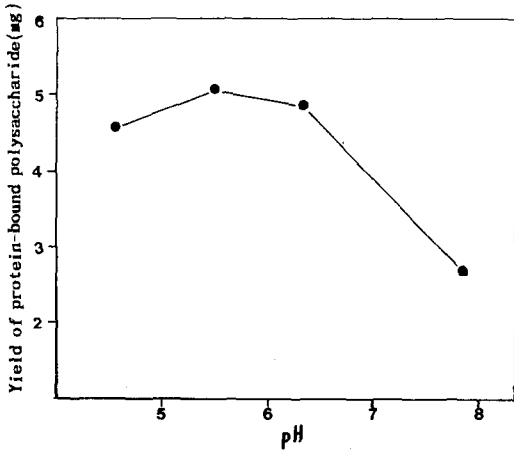


Fig. 1. Effect of pH on protein-bound polysaccharide yield at solid-substrate culture of *C. versicolor* with zeolite. *: Cultured 28°C for 9 days.

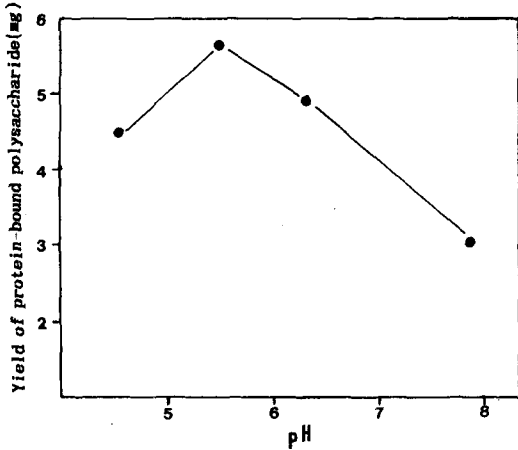


Fig. 2. Effect of pH on protein-bound polysaccharide yield at solid-substrate culture of *C. versicolor* with orchid-pot soil. *: Cultured 28°C for 9 days.

적 요

구름 버섯균(*C. versicolor*)를 고체배양(solid-substrate culture)하여 단백다당류를 생산하기 위한 각종 조건을 검토하였다. 여러가지 고체재료가 이용될 수 있으나 배양 후 단백다당류의 열수추출 과정에서의 부적합성 등의 이유로 인하여 실질적으로 zeolite나 난 재배용 토양이 이용 가능한 천연고체 재료라고 볼 수 있다.

Zeolite와 난 재배용 토양을 이용한 고체발효에서

단백다당류 생산에 미치는 탄소원의 영향을 검토한 결과 glucose, sucrose 및 starch에서 단백다당류 생산량이 높게 나타났으며, 질소원중에서는 bacto soytone과 peptone이 고체발효에 의한 단백다당류 생산에 가장 적합한 질소원으로 확인되었다.

단백다당류 생산을 위한 고체발효에서 최적 pH 범위는 5-6이었고, 고체재료 100 g당 조단백다당류 생산량이 5-6 mg에 이르렀다.

배지조성별 단백다당류의 생산성 시험의 결과 *C. versicolor*의 최적배지 조성인 CVM에서 최고의 생산성을 보였으며, 종합적으로 균사성장에 적합한 조건에서 단백다당류의 생산성도 높다고 하겠다.

謝 辭

본 연구는 “한국학술진흥재단 자유공모과제”의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사하는 바이다.

參考文獻

Cho, H. J., Choi, E. C. and Kim, B. K. 1988. Studies on Constituents of Higher Fungi of Korea(LV 2) Comparison of Various Antitumor Constituents of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Mycol.* 16(3): 162-174.

Hirase, S., Nakai, S. and Akatsu, T., etc. 1976. Structural Studies on the Antitumor Active Polysaccharides from *Coriolus versicolor*(Basidiomycetes). I. Fractionation with Barium Hydroxide¹⁾. *Yakugaku Zasshi* 96(4): 413-418.

Hirase, S., Nakai, S. and Akatsu, T., etc. 1976. Structural Studies on the Antitumor Active Polysaccharides from *Coriolus versicolor*(Basidiomycetes). II. structures of β -D-Glucan Moieties of Fractionated Polysaccharides. *Yakugaku Zasshi* 96(4): 419-424.

Ohno, N., Kurachi, K and Yadomae, T. 1988. Physicochemical Properties and Antitumor Activities of Carboxymethylated Derivatives of Glucan from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Chem. Pharm. Bull.* 36(3): 1016-1025.

Park, K. S., Lee, J. S. 1991. Optimization of Media Composition and Culture Conditions for the Mycelia Growth of *Coriolus versicolor* and *Lentius edodes*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 6(1): 91-98.

Park, K. S., Lee, J. Y., Lee, S. J., Kim, S. H. and Lee, J. S. 1992. Extration and Separation of protein-bound polysaccharide Produced by *Coriolus versicolor*

- color*(Fx) Quel. *Kor. J. Mycol.* **20**(1): 72-76.
- Park, Y. D., Hong, Y. K., Whang, W. K., H, J. D. and Park, S. 1989. Comparisons of protein bound polysaccharide Contents obtained from Mycelial Cultured Broth and Fruit body of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Mycol.* **17**(4): 223-228.
- Roland, J. F., Chmielewicz, Z. F. and Weiner, B. A., etc. 1960. Calvacin a new antitumor agent. *Science* **23**: 1897.
- Shim, M. J. 1981. Studies on Constituents and Culture of the Higher Fungi of Korea. *Kor. J. Mycol.* **9**(2): 49-66.
- Shinohara, H., Ohno, N and Yadomae, T. 1988. Anti-tumor Activity and Structural Characterization of a (1-3)- β -D-Glucan Extracted with Cold Alkali from Sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395. *Chem. Pharm. Bull.* **36**(2): 819-823.
- Tshkagoshi, S. and Ohashi, F. 1974. Protein bound polysaccharide preparation, PSK, effective against mouse sarcoma-180 and ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann* **65**: 557-558.
- Yanagi, S. O. Takebe, I, 1984. An efficient method for the isolation of Mycelial protoplasts from *Coprinus macrohizus* other basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **19**: 58-60.