

Optimum culture conditions of cell growth and polysaccharide production by *Paecilomyces japonica* in batch culture

박석재¹, 변학규¹, 한대석², 홍억기¹

¹강원대학교 생물공학과, ²한국식품개발연구원

전화 (033) 250-6275, FAX (033) 243-6350

Abstract

To examine effects of agitation and aeration as well as adding of glucose and yeast extract on cell growth and polysaccharide production by *Paecilomyces japonica*, batch culture was carried out at 5L jar fermenter at 27°C with the initial pH 7 for 7 days cultivation (inoculum size 2%, working volume 3L). Media compositions (g/L) were 30 glucose, 20 yeast extract, 0.5 KH₂PO₄, 0.1 CuCl₂ · 2H₂O. Optimum culture conditions of agitation and aeration in batch culture were 400 rpm and 1.0 vvm, resulting in 23.1 g/L biomass and 2.5 g/L polysaccharide. Additional feeding of glucose and yeast extract with a pulse mode conferred an advantage on cell growth and polysaccharide production with showing the results of 29.2 g/L and 3.3 g/L, respectively.

서 론

세계적으로 약 150종의 주요한 식용버섯이 알려져 있고 그 중에서 약 60여종이 상업적으로 배양되고 있을 뿐만 아니라 기술과 생산적인 면에서도 공업적인 규모로 발전하고 있는 실정이다¹. 이밖에 곤충을 침입하는 곰팡이균은 약 800여 종으로, 이들 중 버섯을 형성하는 것으로 알려진 대표적인 균은 대부분 자낭균류의 동충하초속에 속하는 균들로서 약 300여 종이 보고되었으며, 한국에서도 번데기동충하초 등 현재까지 76 종이 채집되어 분리 동정되었다². 동충하초는 여러 유용한 생리활성물질들이 있어서, 민간요법, 건강 기능성 식품소재, 의약품등에 폭넓게 활용되고 있다. 최근 고체배양에 의한 자실체로부터 유용한 생리활성물질을 얻고 있으나 액체배양은 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 액체배양에 의한 균사체 및 배양여액으로부터 생리활성물질 생산의 경우는 일정한 환경조건을 부여하며, 조작의 간편 또한 고체배양보다 훨씬 생육이 빨라 배양기간을 단축시킬 수 있어 대량배양이 가능하다는 장점이 있다. 특히 액체배양에서 균사체 및 배양여액에서 얻는 다당체는 균주에 따라 차이가 있으나 대체적으로 자실체와 마찬가지로의 생리적 기능을 가지는 것으로 밝혀지고 있다³. 따라서 본 연구는 *Paecilomyces japonica*의 액체배양 공정

을 최적화하여 균사체와 더불어 다당체 생성을 대량 생산하기 위하여 생물반응기에서 교반속도 및 통기량에 대한 영향과 배지공급에 대한 효과를 비교·검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 자낭균류의 일종인 *Pacilomyces japonica*를 사용하였으며, 보관용 배지로는 PDA(potato dextrose agar)를 사용하였다. 전배양용 배지는 YMP medium로서 그 조성은 glucose 10 g/L, yeast extract 10 g/L, malt extract 15 g/L 및 peptone 10 g/L이었다. 본배양은 3일동안 전배양한 것을 2% 접종하였으며, 배지조성은 glucose 30 g/L, yeast extract 20 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L 및 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L이었다.

배양조건

전배양에서는 8 mL의 활성화된 stock culture를 접종하여 진탕배양기에서 27°C, 200rpm 그리고 초기 pH(멸균 후 pH 6.3)를 7로 조절하여 3일간 배양한 다음 다시 같은 조건에서 접종량 2%로 하여 전배양을 실시하였다. 본배양에서는 5L jar fermenter에 working volume 3L로 하여 접종량 2%인 60 mL의 전배양액을 접종하였다.

균체 및 세포의 다당체 정량

세포의 다당체 생산량을 정량하기 위하여 배양후 filtration를 통하여 균사체와 배양여액을 분리한 후 배양여액에 2배의 ethanol을 가하여 침전된 것을 원심분리하여 상등액과 분리하였다. 이렇게 분리된 침전물을 80°C dry oven에서 12-24시간 동안 충분히 건조시킨 후 그 함량을 측정하였다. 또한 균체량은 세포의 다당체 분리 후 얻은 균사체를 증류수로 세정한 후 80°C에서 함량이 될 때까지 12-24시간 건조한 후 건조중량을 측정하였다.

결과 및 고찰

교반속도 및 통기량의 영향

교반속도의 영향을 검토하기 위해서 1.0 vvm 조건에서 100~500 rpm까지 100 rpm 단위로 변화시켜 균체성장과 다당체 생성량을 비교·검토하였다(Fig. 1). Fig. 1의 결과를 살펴보면 400 rpm에서 균체량이 배양 2일째 23.1 g/L로 가장 높았다. 한편 가장 낮은 100 rpm에서는 균체성장이 느리게 이루어졌는데 이는 산소공급제한 때문인 것으로 판단된다. Fig. 2를 보면 다당체 생성에 있어서도 400 rpm에서 가장 높은 2.5 g/L를 생성하였다. 그림에 나타나진 않았지만 통기량의 영향은 거의 비슷하였으나 1.0

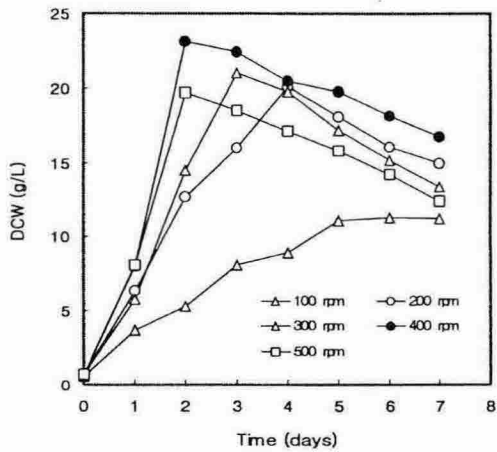


Fig. 1 The effect of agitation rate on cell growth in modified medium

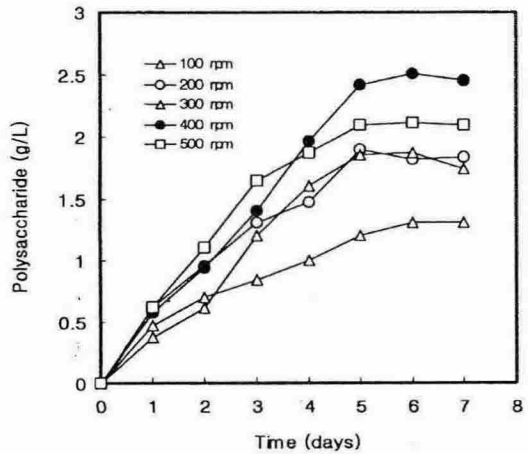


Fig. 2 The effect of agitation rate on polysaccharide production in modified medium

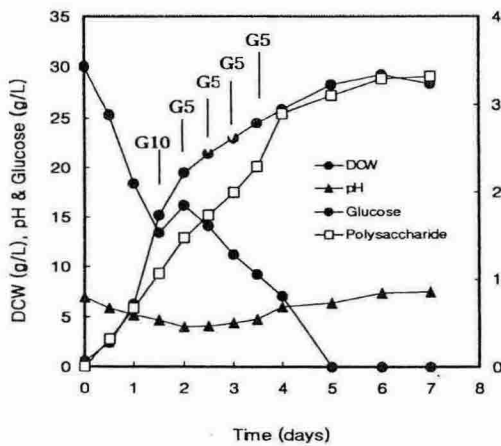


Figure 3. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with adding glucose (at 1.5day, 2day, 2.5day, 3day, 3.5day). G5 and G10 mean the addition of glucose with 5 g/L and 10 g/L, respectively

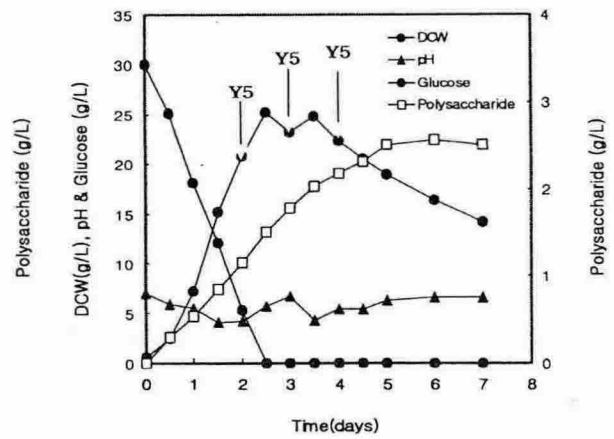


Figure 4. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with adding 5g/L of yeast extract(at 2day, 3day, 4day)

vvm에서 보다 우수한 균체량과 다당체를 생성하였다. 따라서 회분배양에서 균체 성장과 다당체 생성을 위한 최적의 조건은 400 rpm과 1.0 vvm이었다. Fig. 3은 최적의 회분배양 조건에 잔존당이 다 소모되기 전인 대수기에 glucose를 첨가해 배양 3.5일째까지 계속적으로 공급해준 결과이다. 그 결과 균체성장은 잔존당이 다 소모될 때 까지 계속 성장하여 배양 6일째 29.2 g/L로서 아주 높은 균체량을 보였다. 또한 다당체 생성에 있어서도 3.3 g/L로 회분배양보다 약 30%이상 증가하였다. Fig. 4에서는 잔존당이 거의 소모되는 배양 2일째에 yeast extract를 5 g/L씩 2, 3, 4일째에 첨가하였다. 그 결과 균체량은 2.5일째 25.2 g/L, 다당체 생성은 2.6 g/L로서 최적의 회분배양 조건에서의 결과에 비해 다소 낮은 결과를 보였다.

요 약

회분배양에서 교반속도와 통기량에 대한 영향을 살펴본 결과 400 rpm과 1.0 vvm의 조건에서 균체량은 25.1 g/L, 다당체는 2.5 g/L로 가장 높게 생성되었다. 회분배양을 기초로 균체량과 다당체 생성을 높이기 위해 glucose를 대수기에 공급한 결과 배양 6일째 균체량은 29.2 g/L, 다당체 생성은 3.3 g/L로 회분배양보다 우수한 결과를 보였다.

참고문헌

1. Lee, J.-Y., W.-G. An, and J.-D. Lee, " Studies on the submerged culture of *Lentinula edodes* mycelia in brewer's yeast extract medium " (1994), *Kor. J. Mycol.*, 22, 266-275
2. Sung, J.-M., H.-K. Lee, and K.-J. Yang, " Classification of *Cordyceps* spp. by morphological characteristics and protein banding pattern " (1995), *Kor. J. Mycol.*, 23, 92-104
3. Kim, S.-H., J.-S. Lee, K.-S. Park, J.-S. Lee, H.-W. Lee, and S. Park, " Liquid culture of basidiomycetes on natural media " (1999), *Kor. J. Mycol.*, 27, 373-377
4. Choi, I.-Y., J.-S. Choi, and W.-H. Lee, " The production of artificial fruiting body of *Paecilomyces japonica* " (1999), *Kor. J. Mycol.*, 27(2), 87-93
5. Tadashi, K., T. Hajime, and U. Shigeo, " A minor, protein-containing gaclactomannan from a sodium carbonate extract of *Cordyceps sinensis* " (1986), *Carbohydr. Res.*, 156, 189-197