

Mycelial Growth Enhancement in Liquid Cultivation of *Hericium erinaceus*

김민석, 서정식, 홍억기

강원대학교 바이오산업공학부

전화 (033) 250-6275, FAX (033) 243-6350

Abstract

Erinacine which is produced from *Hericium erinaceus* mycelia is known to have a stimulating activity of nerve growth factor(NGF) synthesis. Thus, this work was concentrated on the maximum production of *Hericium erinaceus* mycelia. In order to maximize cell growth, the cultivation was performed with varying the agitation rate and applying the additional medium. As the results, the mycelium concentration was 24.2g/L.

서론

현재 많은 버섯들은 식용 뿐만 아니라 생리활성물질에 대해서도 많은 연구가 진행되고 있다. 본 실험에서는 분류학상 민주름버섯목(*Aphylllophorales*), 턱수염 버섯과(*Hydnaeae*), 산호침버섯속(*Hericium*)에 속하는 *Hericium erinaceus*를 이용하여 실험을 수행하였다. 본 실험에서는 erinacine이라는 diterpenoid-xyloside 구조를 가진 물질에 대한 연구를 목적으로 한다. Erinacine은 현재 NGF(nerve growth factor)와 관련된 물질로서 신경성장인자의 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 일반적으로 균사체로부터 추출되는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험의 목적도 최대의 균사체를 배양하여 최대의 erinacine 생산을 목적으로 한다. 그러므로 본 실험에서는 회분배양을 이용한 최적 조건을 검토하고 생물공학 공정개발 방법을 이용하여 균체 생산을 극대화하고, erinacine 생산을 증대하는 것이 본 실험의 목적이다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 *Hericium erinaceus*를 사용하였으며, 보관용 배지로는 PDA(potato dextrose agar)를 사용하였다. 전배양은 Glucose 20g/L, Yeast extract 10g/L사용하여 배양하였다. 본 실험에서 역시 flask culture에서의 최적조건을 이용하여

glucose 20g/L와 yeast extract 10g/L를 포함하는 배지조성을 선정하였다.

배양 조건

전배양에서는 미리 PDA로부터 배양된 것을 250mL flask에 접종하여 배양된 것을 다시 몇 차례 옮겨서 활성화된 후 seed로 사용하였다. 본 배양에서는 전배양된 것을 homogenizer를 사용하여 cell을 균질화 한 후 23°C, 200rpm에서 4일간 전배양을 실시하였으며, 본 배양의 회분배양에서는 working volume 3L로 시작하였고 23°C, pH 5.5, 공기 주입 속도 1vvm으로 유지하였다. 발효조의 용존산소의 농도를 높여주기 위하여 교반속도조절(200rpm-300rpm)을 하였으며, 기질공급은 기질소모속도가 빠른 부분에서 간헐적으로 주입하였다.

결과 및 고찰

일반적으로 탄소원은 세포구조와 에너지원으로 사용되는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험은 균체성장에 저해를 주지 않는 농도로 대수기에 간헐적으로 공급함으로써 균체량과 erinacine양을 극대화하고자 하였다. Fig. 1은 초기 교반속도를 200 rpm으로 하여 2일째 300 rpm으로 변화를 주었고, Fig. 2는 초기 교반속도를 200 rpm으로 하여 2일째 300 rpm으로 변화를 주었으며, 배양 3일째 5 g/L의 glucose를 첨가하여 실험한 결과이다. 배양초기에 균체성장은 원활하게 이루어졌으며 배양 3일째 5 g/L의 glucose를 균체성장의 저해 없이 성장하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 배양 4.5일째 14 g/L의 균체량을 기록하였으며, 그 이후 급속한 균체량의 감소는 관찰되지 않았다. 이는 첨가된 glucose가 균체량이 증가하는데 크게 도움이 되지 않았지만 균주 활성을 유지하는데 도움이 되는 것으로 판단되었다. Fig. 3에서는 Fig. 2와 같은 조건에서 배양 3일째 10 g/L의 glucose를 첨가함으로써 균체성장의 영향을 관찰하였다. 배양 3일째 feeding 후 균체성장이 저해를 받은 것을 알 수 있었다. 따라서 배양 3일째 5 g/L의 feeding을 시작으로 1일째마다 계속하여 feeding을 하였을 경우 균체성장의 영향을 검토하고자 하였다. Fig. 4는 배양 2일째 교반속도의 변화를 주었으며, 또한 배양 3일째 5 g/L의 glucose를 첨가함으로써 균체성장을 극대화 하고자 하였다. Glucose의 첨가 후 균체성장에 저해 받는 현상은 관찰할 수 없었으며, 최대 균체량은 배양 6일째 24.2 g/L이었다. 따라서 Fig. 2와 비교하였을 때 보다 많은 균체량을 생산하였으며, 균체활성 또한 오래 지속되는 것으로 관찰되었다. 그러므로 Fig. 4는 flask 및 회분배양에서 얻어진 균체량 11 g/L와 비교하였을 때 약 2배 이상의 균체량이 증가한 결과이었다.

본 실험에 사용된 erinacine은 erinacine (A~H), erinacine (P,Q)중 erinacine A를 사용하였다. 분석에 사용된 sample은 최적 회분배양 조건에서 배양 4.5일째 균사체로부터 Fig. 5의 과정으로 추출하였다. Fig. 6은 HPLC를 이용한 *Hericium erinaceus* 균사체로부터 erinacine에 대한 분석결과를 나타낸 것이다. 그림은 균사체와 erinacine 혼합물에 대한 결과이며, 시료의 분석조건으로 mobile phase는Methanol/Water (9:1)이었고, flow rate은 0.7 mL/min이었다. Fig. 6에서 표준물질과 같은 시간(7.537분)에 추출된 물질은 정확히 표준물질과 일치하는 것을 알 수 있었다. 액체배양 균사체내에서의 erinacine 농도는 0.4 mg/g cell이었으며, Fig. 4에서의 균체 생산량(24.2 g/L)을 고려하면 9.68 mg/L의 erinacine 생산성을 얻을 수 있었다.

요 약

생물반응기를 이용한 회분배양에서 균체량 생산에 있어서 조건은 200 rpm, 1 vvm으로 선정하였으며, 이때 균체량은 11 g/L이었고, polysaccharide는 0.6 g/L이었다. 또한 pH를 초기 pH인 5.5로 고정하여 배양한 결과 pigment들로 인한 균사체의 활성이 떨어지는 것으로 나타났다. 균체량을 증가시키기 위한 최적의 회분배양 조건에서는 초기 200 rpm으로 배양을 시작하여 300 rpm으로 증가시키고 glucose 5 g/L를 간헐적으로 첨가함으로써 균체량은 24.2 g/L, polysaccharide는 2.2 g/L로 나타났다. 또한 erinacine A의 분석은 HPLC를 사용하였으며 배양 4.5일째 균사체로부터 추출하여 mobile phase를 Methanol/Water (9:1)로 flow rate은 0.7 ml/min으로 실험한 결과 erinacine A는 0.4 mg/g cell 로 측정되었다.

참고문헌

1. Kawagishi, H., A. Shimada, R. Shirai, K. Okamoto, F. Ojima, H. Sakamoto, Y. Ishiguro, and S. Furukawa, "Erinacine A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor(NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*"(1994), *Tetrahedron Lett.*, 35(10), 1569-1572.
2. Mizuno, T., "Yamabushitake, *Hericium erinaceum*: Bioactive substances and medicinal utilization"(1995), *Food Reviews International*, 11(1), 173-178.
3. Bulmer, M. A., B. J. Catley, and P. J. Kelly, "The effect of ammonium ions and pH on the elaboration of the fungal extracellular polysaccharide, pullulan, by *Aureobasidium pullulans*"(1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 362-365
4. Kim, J. B., M. J. Kwon, H. S. Nam, J. H. Kim, and S. W. Nam, "Fed-Batch Fermentation of High-Content RNA Yeast by Using Molasses Medium"(2001), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29(4), 234-239

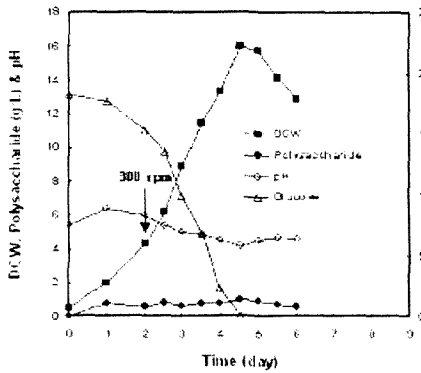


Figure 1 Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production under various agitation (200-300 rpm) and 1.0 l/min

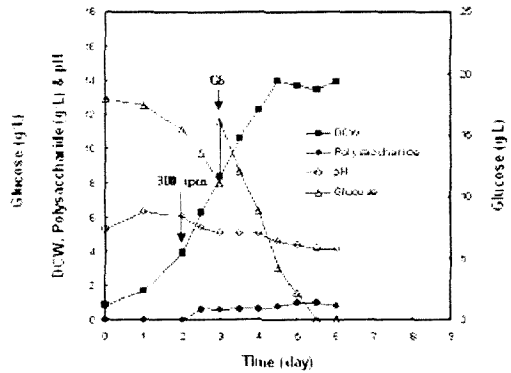


Figure 2 Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with adding glucose 5 g/L(5%) under various agitation (200-300 rpm) and 1.0 l/min

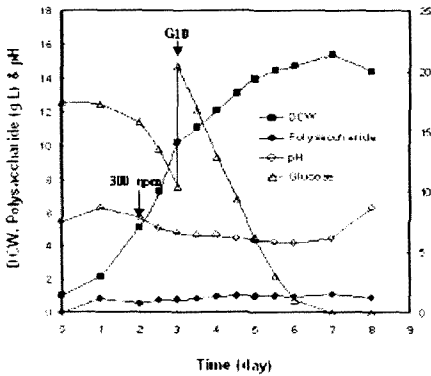


Figure 3 Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with adding glucose 10 g/L(10%) under various agitation (200-300 rpm) and 1.0 l/min

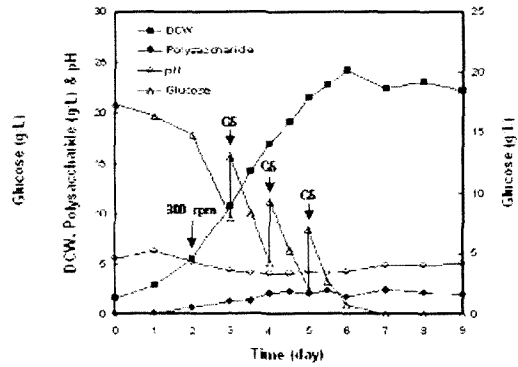


Figure 4 Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with adding glucose 5 g/L(5%) under various agitation (200-300 rpm) and 1.0 l/min



Figure 5. Procedure of erinacine Assay from mycelium

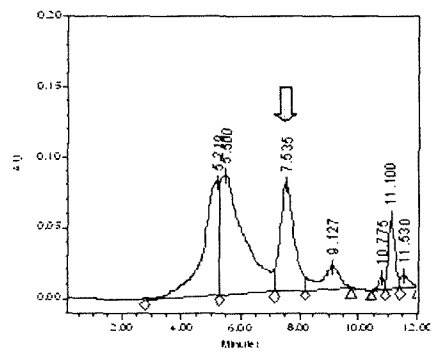


Figure 6 erinacine standard and *m. celum* extract of *m. erinaceus* HPLC chromatogram