Development of continuous process for the production of Exo-biopolymer with *Cordyceps militaris*

Kyoung-ju Kim, Jung-Heon Lee
Department of Chemical Engineering Chosun University
TEL: 062-230-7259, FAX: 062-230-7226

Abstract

The continuous fermentation process for exo-biopolymer production with *Cordyceps militaris* has been developed in this research. With the change of dilution rate, biopolymer production has been changed and the maximal biopolymer production has been achieved when the dilution rate was 0.0225/hr. The maximum mycelium concentration and biopolymer concentration were 8 g/L and 4.2 g/L, respectively.

서 론

*Cordyceps militaris*등 약 7종의 동충하초가 현재 약용으로 이용되고는 있으나, 자연 상태에서의 자실체의 채집은 상당히 어려워 공급이 한정되어 인공적인 자실체의 생산에 큰 관심을 가지게 되었다.[1] 현재 많은 연구결과 인공적인 자실체의 생산은 활발히 이루어지고 있으나, mycelium 및 exo-biopolymer의 산업적 생산에 대하여서는 많은 연구가 필요한 실정이다.

생물공학분야에서 대부분의 생물 반응기를 이용한 세포배양은 생산단가 절감을 위해 고농도 세포배양에 중점적으로 연구되고 있다. 고농도 세포배양은 회수율 증가와 함께 분리비용의 절감이라는 두 가지 문제를 모두 해결해 준다. 이러한 공정개발의 일환으로 유가식 배양을 이용한 고농도 세포배양 방법이 소개되고 있다. 이에 유가식 배양 실험에서 농축배지의 농도를 기본배지 농도의 10배로 하고, 용존산소량을 10~30%로 유지하며 feed rate을 조절한 결과 균체 최대생산량은 12.67g/L 였으며, exo-biopolymer는 4.54 g/L 였다[2] 이처럼 유가식 배양을 통해서도 우수한 수율을 보였지만, *Cordyceps militaris*는 일반적인 버섯의 균사체처럼 pellet의 형태가 아닌 미세한 균사형태로 생장하는 특성을 이용하여 연속 배양 공정을 개발하여 고농도 세포배양과 생성물을 연속적으로 회수할 수 있는 방법을 착안하게 되었다.

본 연구에서는 연속 배양 공정을 이용하여 feed rate 및 배지조성의 변화를 통한 *Cordyceps militaris* 균주의 Mycelium 및 Exo-biopolymer의 최적생산 공정을 개발하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지 본 연구에 사용한 *Cordyceps militaris* 균주는 강원대학교 동충하초은행 (EFCC. Entomopathogenic Fungal Culture Collection)에 보관중인 C738을 공시균주로 사용하였다. 보관용 배지로는 PDA배지를 사용하였으며 25℃ incubator에서 20일간 배양한 후 실험에 접종원으로 사용하였다.

배지조성 본 연구에 사용된 종배양 배지는 PDB배지로 하였으며, 초기 pH는 5.5로 조성하였고, 본 배양 배지 조성은 Glucose 30g/L, Yeast extract 1.5g/L, Peptone 1g/L, KH_2PO4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, trace element 8ml/L($FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 2g, $CaCl_2$ 0.5g, $ZnCl_2$ 1g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 1g /0.1N HCl 1L)이고 초기 pH는 5.5로 하였다. 배지는 121℃에서 15분간 멸균 후에 사용하였으며 반응기의 pH 조절은 1N HCl, 1N NaOH를 사용하였다.

배양방법 본 연구에서는 초기 회분식 배양에서는 본 발효의 5%에 해당하는 flask medium 100mL를 만들어 Shaking incubator(25℃, 12rpm)에서 10일간 배양한 후 1.9L의 본 배지에 접종하였다. 본 배지의 초기 pH는 5.5이고, 배양온도는 25℃로 하였으며, 교반속도는 초기 150rpm에서 200rpm으로 조절하였으며 통기량은 0.5 vvm에서 1.0 vvm으로 조절하여 배양하였다. 연속식 배양 공정은 세포가 최대 활성을 갖게 되는 72시간 후부터 기질의 유입속도를 유량펌프를 사용하여 30 mL/hr에서 60 mL/hr로 조절하여 실험하였다.

결과 및 고찰

유입속도 조절 실험 연속식 배양 공정은 세포가 최대 활성을 갖게 되는 72시간 후부터 기질의 유입속도를 유량펌프를 사용하여 30 ml/hr에서 60 ml/hr로 조절하여 실험하였는데, 72시간부터 186시간까지 관찰한 결과 glucose의 농도가 정상상태를 유지하지 못하고 계속해서 감소하는 추세를 보였으며, 이는 공급속도가 기질소모속도보다 낮은 것이며, 186시간부터 유입속도를 60 ml/hr 로 조절하여 관찰한 결과 glucose의 농도가 정상상태를 유지하지 못하고 계속해서 증가하는 추세를 보였다. 이는 공급속도가 기질소모속도보다 높은 것으로 유입속도를 이들 사

이의 속도로 조절해야 함을 보여주었다. 이에 균체의 기질소모속도를 계산한 결과 0.135 g/hr 임을 알수 있었으며 이는 유입속도가 45 ml/hr임을 알 수 있었다. 실험 결과 균체 생장은 우수하였으나, exo-biopolymer의 생산량은 1.5 g/L에 그쳐 배지 조성에 변화를 주어보았다. 유입속도를 45 ml/hr로 조절하여 실험을 해본 결과 84시간 이후 점차 안정화되는 경향을 보였으며, 균체 농도는 8 g/L, exo-biopolymer는 4.2 g/L를 생산해 trace elements를 첨가하였을 때, 매우 우수한 생산량을 보였다. 이를 통하여 *Cordyceps militaris*의 연속배양생산의 가능성을 확인하였다.

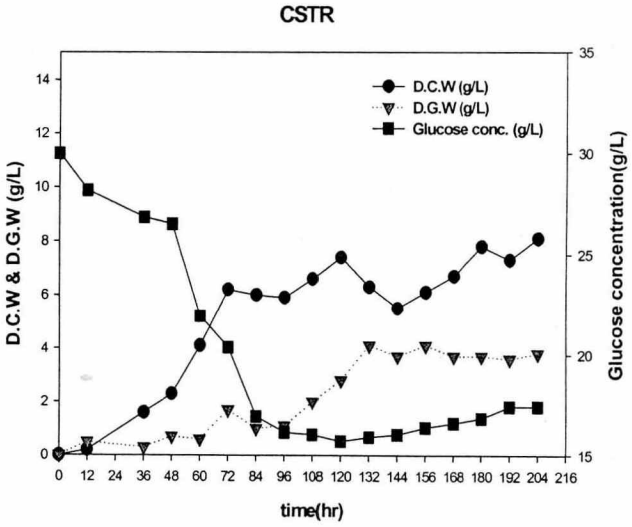

Fig. 1. Time courses of the mycerial growth, exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris* added trace elements to CSTR.

References

1) J. M. Sung, C. H. Kim, K. J. Yang, H. K. Lee and Y. S. Kim, "동충하초속균의 분포 및 *Cordyceps militaris*와 *C. nutans*의 이용에 관한 연구" (1993), *Kor. J. Mycol.* **21**(2), 94-105

2) K. J. Kim, J. H. Lee and K. H. Kwun, "Fed-batch fermentation for the production of mycelium and biopolymer with *Cordyceps militaris*" (2002), 생물공학의 동향X, P205, 169-170