

Studies on Optimum Conditions for Polysaccharide Production from *Schizophyllum commune* in flask Culture

Min-Suk Kim and Eock-Kee Hong

School of Biotechnology and Bioengineering Kangwon National University

TEL: 033-250-6275, FAX: 033-243-6350

Abstract

Schizophyllum commune belongs to Basidiomycetes is able to produce an extracellular polysaccharide, beta-glucan, which has been well known as an effective immune stimulator. In other to obtain the optimum conditions for the polysaccharide production, *Schizophyllum commune* was cultivated in different cultivation media containing various carbon and nitrogen sources. For the cell growth and the polysaccharide production, the optimum synthetic medium was developed with YMP medium an a basal midium. The flask culture conditions for the polysaccharide production were 27°C and 150rpm with the initial pH 5.5.

서 론

치마버섯(*Schizophyllum commune* Fr.)은 Singer, R.의 분류서에 의하면 분류학상으로 담자균류의 주름버섯목 송이과 치마버섯속에 속하는 목질 부후균으로, β -1,3 glucan을 기본구조로 β -1,6 glucan 의 분지를 갖는 다당류를 세포외로 생산하는 균주이다. 치마버섯(*Schizophyllum commune*)은 고목 등에 자생하는 각질의 버섯으로 버섯 자실체로 이용이 어려우나 액체배양된 균사체나 배양여액으로부터 추출된 β -glucan 은 anti-tumor activity, macrophages stimulation, anti-biotic activity의 면역학적 효과와 자외선에 의한 노화 억제, 보습효과 등의 생리적 특성을 가지고 있다. 하지만, 그 구조에 따라 다른 생리 활성이 나타난다고 알려져 있다. 지금까지 치마버섯(*Schizophyllum commune*) 종균개발 과 액체배양을 통한 세포외 다당체 생산을 위한 배양조건에 관한 연구는 많이 보고 되고는 있지만, 다당체의 화학적 구조특성은 , 탄수화물 구조의 복잡성 때문에 구조를 결정하는 정해진 방법이 없이 다양하게 시도되고 있다. 따라서 본 연구에서는 액체배양에 의한 세포외 다당체 생산은 일정한 조건하에서 생산이 가능하기 때문에, 구조분석에 필요한 균일

한 다당체를 균사체 및 배양액에서 얻을 수 있으므로, *Schizophyllum commune* 생산을 위한 최적 배지조성을 확립하여 *Schizophyllum commune*의 액체배양을 통한 세포외 다당의 생산 수율을 높이는데 그 목적이 있으며, flask를 이용한 균주배양을 시도함과 동시에 유용 다당체의 생산성 향상을 위한 발효 배양조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 담자균류의 일종인 *Schizophyllum commune*을 KCTC 6482를 분양 받아서 사용하였으며, 보관용 배지로는 PDA(potato dextrose agar)를 사용하였다. 균주 배양을 위한 기본배지로서는 fungi의 기본배지로 사용되고 있는 YMK media를 사용하였으며, 그 조성은 glucose 20g/L, yeast extract 5g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1g/L, KH₂PO₄ 2g/L 으로 구성되어 있다.

배양조건

전배양에서는 냉동보관된 10ml의 활성화된 stock을 YMK media 100ml에 접종하여 진탕배양기에서 27℃, 150rpm으로 7일간 배양하였으며, 본 배양은 전배양액을 homogenizer (heidolph co., DIAX 600)를 이용하여 충분히 균질화한 후 전배양액을 5%를 접종하였다. Flask 배양은 shaking incubator (Vision Scientific Co., VS-8480SR)에서 온도 27℃, 150 rpm, 초기 pH 5.5로 조절하여 배양하였다.

균체 및 세포외 다당체 정량

본 균주가 생산하는 세포외 다당체 생산량을 정량하기 위하여 배양 후 원심분리를 통하여 균사체와 배양여액을 분리한 후 배양여액에 2배의 ethanol을 가하여 부유된 다당체를 filter paper를 사용하여 배양액과 ethanol의 혼합용액에서 분리하였다. 이렇게 분리된 다당체를 80℃ dry oven에서 24시간 동안 충분히 건조시킨 후 그 함량을 측정하였다. 또한 균체량은 세포외 다당체 분리하여 얻은 균사체를 증류수로 수회 세정한 후 filter paper를 사용하여 분리한 후 80℃에서 함량이 될 때까지 24시간 건조한 후 건조중량을 측정하였다.

결과 및 고찰

기본배지의 검토

균주의 생육에 미치는 기본배지의 결정을 위해서 균체량과 다당체 생성량을 비교·검토하였다(Fig. 1). 균체량 및 다당체 생성량은 YMP medium에서 각각 2.56 g/L과 6.33 g/L로써 가장 높았다.

탄소원의 영향

균주의 생육에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 여러 종류의 탄소원에 대한 다당체 생성량과 세포성장을 비교·검토하였다(Fig. 2). 균체의 세포성장은 fructose를 사용하였을 경우 11.73g/L로 가장 높은 균체 성장을 보였고, 다당체 생성량은 검토된 탄소원중 starch가 가장 높은 1.52g/L를 나타내었다. 하지만, starch의 경우 소비되지 않은 starch가 다당체와 같이 침전하여 그 측정값을 신뢰할 수 없었다. 따라서 산업적인 경제성과 세포의 다당체 생성 효율을 고려하여 탄소원 중에서 glucose를 탄소원으로 선택하였다.

질소원의 영향

질소원의 영향을 검토하기 위하여 탄소원인 glucose를 1%첨가한 배지에 여러 종류의 질소원을 각각 0.5%씩 첨가하여 균체의 생육과 세포의 다당체 생성량을 비교·검토하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 유기질소원인 bulk yeast extract (조흥화학) 에서 각각 5.87g/L, 1.046g/L로 높은 균체 생육을 나타내었다.

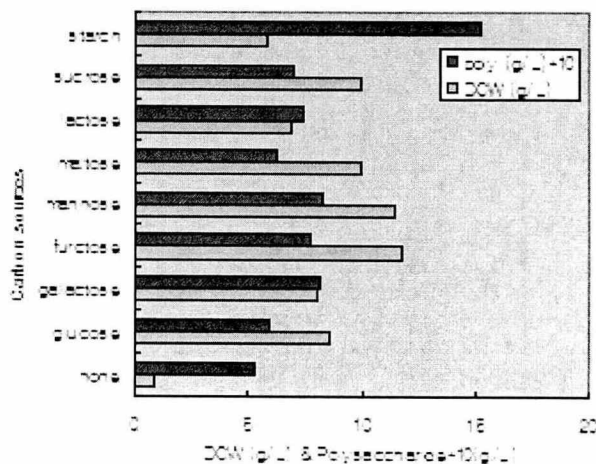


Fig. 1. The effect of various media on the cell growth and the polysaccharide production.

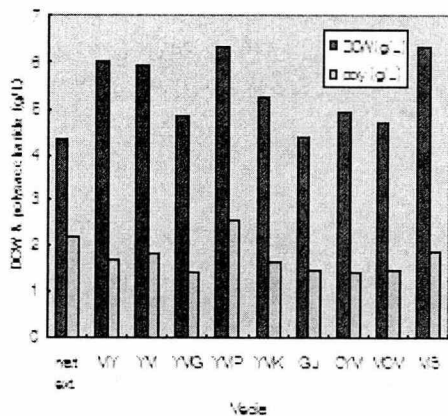


Fig. 2. The effect of carbon sources on the cell growth and the polysaccharide production.

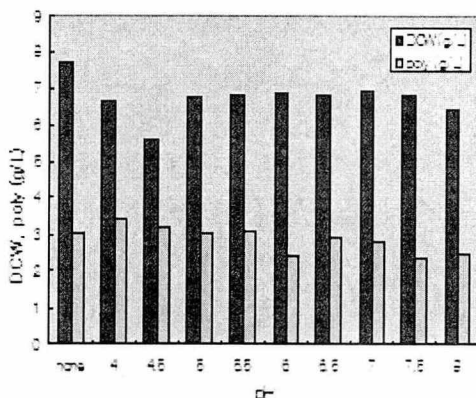


Fig. 3. The effect of nitrogen sources on the cell growth and the polysaccharide production.

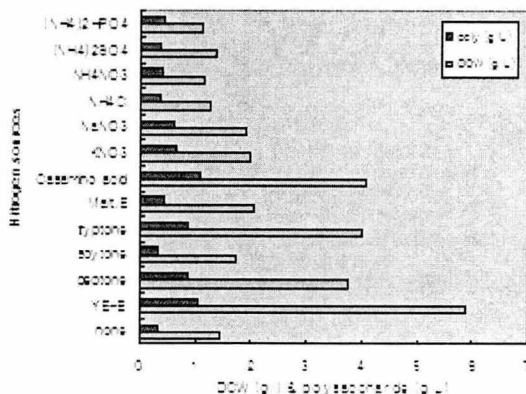


Fig. 4 The effect of various pH on the cell growth and the polysaccharide production.

요 약

*Schizophyllum commune*의 균체 생육 및 다당체 생성에 미치는 여러 가지 배지성분의 영향을 조사하였다. 탄소원으로는 산업적인 경제성과 높은 다당체 생성량을 나타낸 glucose를 선택하였고, 무기질소원은 유기질소원에 비해 현저히 낮은 다당체 생성량을 나타내었으며, 그 결과 균체량과 다당체 생성량에서 높은 효과를 나타낸 yeast extract를 질소원으로 선택하였다.

References

1. S. C. Jong, J. M. Birmingham, and S. H. Pai (1991), Immunomodulatory substance of fungal origin, *J. Immunol. Immunopharmacol.* **11**, 115-122.
2. S. Kikumoto, T. Miyajima, S. Yoshizumi, S. Fujimoto, and K. Kimura (1970), Polysacchride produced by *Schizophyllum commune*. I. Formation and some properties of an extracellular polysacchride, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **44**, 337-342.
3. M. -D. Han, J. -W. Lee, and H. Jeong (1995), The effect of carbon sources on antitumor and anticomplementary activities of ganoderan extracted from the mycelium of *Ganoderma lucidum* IY009, *Kor. J. Mycology.* **23**, 209-225.
4. H. Itoh, H. Ito, H. Amano, and H. Noda (1994), Inhibitory action of a (1→6)-β-D-glucan-protein complex isolated from *Agaricus blazei* Murill(“Himematsutake”) on meth a fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor, mechanism, *Jpn. J. Pharmacol.* **66**, 265-271.