

Agaricus blazei 균사체 배양기술을 통한 효율적인 β -glucan의 생산

이승현 · 임환미 · 김태영 · 조남석 · 박준성 · 유연우¹ · 김무성*

(주) 태평양 생화학 사업부, ¹아주대학교 분자과학기술학과

아가리쿠스(*Agaricus blazei*) 버섯의 균사체 배양조건을 최적화하여 유효성분인 β -glucan의 생성을 극대화시키고자 하였다. 아가리쿠스 균사체 배양 시 탄소원과 질소원의 농도 및 종류별 배지를 검토한 결과 배지 조성은 glucose 5% (w/v), yeast extract 0.5% (w/v), malt extract 0.5% (w/v), KH_2PO_4 0.1% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% (w/v)가 최적이었다. 30L 발효조에서의 배양 조건은 pH 5.0, 28°C, 1 vvm, 300 rpm에서 균사체의 생육과 β -glucan의 생성이 가장 효과적이었다. 위 조건 중에서 세포 외 β -glucan의 생성을 증가시키기 위해 초기 glucose의 첨가량을 4%로 낮추어 glucose에 의한 균사체 성장 저해작용을 최소화하는 한편, 배양 70시간 시점에 glucose 3%, yeast extract 0.1%, malt extract 0.1%의 추가 배지를 첨가하여 배양함으로써 batch 배양에 의한 2.8 g/L에 비해 2배 정도 증가한 5.2 g/L의 세포 외 β -glucan을 얻을 수 있었다. 또한 균사체 내의 세포벽 β -glucan을 효과적으로 추출하기 위해 세포벽분해효소인 lytic enzyme과 단백분해효소인 bromelain의 연속적인 효소반응으로 추출량이 3.5 g/L로 증가하여 균사체의 단순 열수추출에 비해 약 4배의 추출 수율이 향상되었다.

Key words □ *Agaricus blazei*, β -glucan, extracellular

아가리쿠스(*Agaricus blazei*) 버섯은 브라질 피에다데 지방에서 자생하는 버섯으로 항암(2, 16), 면역활성(6, 13), 콜레스테롤 저하(1) 등의 기능을 증가시키는 효능이 있다고 널리 알려져 왔다. 아가리쿠스 버섯은 주로 자실체 추출물과 균사체 추출물을 이용하는데 주요 유효성분은 β -glucan으로 밝혀져 많이 연구되었으며(9, 17), 특히 아가리쿠스 β -glucan은 구조적으로 β -(1,6)-D-glucan이 결합된 β -(1,3)-D-glucan으로 β -(1,6)결합이 항암/항종양 활성을 나타낸다고 보고되었다(8, 12, 17).

버섯 균사체의 β -glucan을 효율적으로 획득하기 위한 방법으로는 액체 배양에 의한 생성량 증대가 많이 연구되어 왔으며(18, 19), 특히 세포 외로 생성되는 β -glucan에 대한 연구가 영지(4, 5), 운지(3) 등을 대상으로 활발히 진행되어 왔다. 아가리쿠스 버섯의 액체 배양에 대해서는 중국(22)과 일본(20)을 중심으로 활발히 연구가 진행되어 왔으며, 국내에서는 홍 등(7)이 다당체 생성을 위주로 한 아가리쿠스 균사체의 배양 방법 등에 대해 연구하였고 일부 산업적 용도의 특허들이 발표되었지만, 대부분 조다당체(crude polysaccharide)에 관한 것으로 β -glucan을 목적으로 정확한 생성량을 측정된 결과는 거의 알려지지 않았다.

이에 본 실험에서는 아가리쿠스 β -glucan 생성량의 증대를 목적으로 균사체 배양 시 세포 외 β -glucan을 효율적으로 생성하게 하는 배양방법을 찾고자 하였다. 또한, 단백질이나 기타 세포벽의 구조 고분자와 결합한 형태(11, 21)로 존재하여 추출 효율이 높지 않은 균사체 내 세포벽 β -glucan의 회수를 향상시키는 방법

을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

균주

아가리쿠스 균주는 (주) 태평양 생화학사업부에서 보관중인 균주(*Agaricus blazei* PL03)를 사용하였으며, PDA (potato dextrose agar) 평판배지에서 28°C에서 7일간 배양 후 4°C에서 냉장 보관하고, 2개월 간격으로 계대배양하여 실험에 이용하였다.

종균배양

종균을 배양하기 위해 glucose 30 g/L, yeast extract 3 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L의 조성으로 배지를 조제하여, 1L 진탕 플라스크에 200 mL씩 넣고 121°C에서 15분간 가압 멸균하였다. 여기에 평판배지에서 배양한 아가리쿠스 균사체를 0.5 cm × 0.5 cm 크기로 4조각을 접종하고 28°C, 100 rpm 조건으로 7일간 진탕배양하여 종균을 얻었다.

Fermenter 배양

본 배양은 30 L (MSJ U3, Marubishi, Tokyo, Japan) fermenter에 working volume을 18 L로 하여 배지를 조제한 후 종균액을 5% (v/v)로 접종하여 배양하였다. 회분배양 시에 배지 조성, pH, 온도, aeration, agitation이 배양에 미치는 영향을 조사하기 위해 다음과 같이 실험하였다. 배지 조성에서 질소원과 무기염류를 yeast extract 0.5% (w/v), KH_2PO_4 0.1% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% (w/v)로 고정한 상태에서, 탄소원인 glucose를 3~8% (w/v)의 농도로 변화시키면서 균사체의 생육과 β -glucan의

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-491-9691(300), Fax: 031-492-5368
E-mail: moodkim@amorepacific.com

생성, glucose의 잔존량 등에 대한 영향을 측정하였다. 다음으로, 질소원은 yeast extract 0.5% (w/v)와 유기질소원 0.5% (w/v), 무기질소원 0.1% (w/v)로 따로 혼합하여 종류별로 배지에 첨가하고 7일간 배양하여 결과를 측정하였다. 기타 무기염류의 경우, KH_2PO_4 와 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 0.05~0.2% (w/v)의 농도로 변화시키면서 배양결과를 측정하였다. 그리고, pH 3~8, 온도 25~35°C, aeration 0.25~1.25 vvm 각각의 조건변화에 따른 균사체의 생육과 β -glucan의 생성량의 결과를 측정하였다.

시료의 제조

세포 외 β -glucan은 균사체 배양액을 7000×g에서 20분간 원심분리 (CR20B2, Hitachi, Tokyo, Japan)한 후, 상등액에 3배 부피의 에탄올을 첨가하여 얻어지는 침전물을 45°C에서 24시간 건조하여 사용하였다. 또, 상등액을 분리하고 남은 침전물은 동결 건조하여 균사체 시료로 사용하였다. 함량의 비교자료로 사용한 자실체는 경동시장에서 구입하여 80°C에서 24시간 건조한 후 분쇄하여 실험에 사용하였다.

건조 균체량 및 총 당 측정

건조 균사체량은 상기한 시료제조 과정 중에 얻어지는 균사체의 중량으로 하였고, 총 당의 정량은 페놀-황산법(10)에 준하여 측정하였다.

β -Glucan 분석

시료의 β -glucan 분석은 Megazyme사 (Wicklow, Ireland)의 β -glucan 분석법인 'Mushroom and Yeast Beta-Glucan Assay(15)' 법을 변형하여 다음과 같이 실험하였다. 분석시료 10 mg을 glass cap tube (14×120 mm)에 넣고, 70°C의 D.W. 3 ml을 넣어 교반하였다. 시료를 냉각시킨 후 99% ethanol 6 mL을 넣어 침전이 형성되면 2000×g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 버리고 50% ethanol을 5 ml 첨가하여 교반하고 2000×g에서 10분간 원심분리하였다. 다시 상등액을 따라 버린 후 2 M TFA (trifluoroacetic acid) 5 ml을 넣고 교반하여 120°C, oil bath에서 40분간 방치하였다. 시료를 냉각시키고, 여기에 2 N KOH 5 ml을 첨가하여 중화시켰다. 이를 50 mL 용량 플라스크에 옮겨 담고, 0.1 M Na-acetate (pH 4.5) 완충액으로 50 mL을 채웠다. 용량 플라스크를 magnetic stirrer를 이용하여 교반하였다. 시료액에 생기는 불용성 물질은 원심분리하여 제거하였다. 시료액 100 μ l에 exo-1,3- β -glucanase (Megazyme, Wicklow, Ireland), β -glucosidase (Megazyme, Wicklow, Ireland)를 각각 50 μ l씩 첨가한 후 40°C에서 60분간 반응시켰다. Glucose 정량 kit인 Glu CII(Wako, Tokyo, Japan)를 사용하여 glucose를 정량하여 계산법에 의해 β -glucan으로 환산하였다.

효소를 이용한 세포 내 β -glucan 추출

세포벽에 함유된 β -glucan을 추출하기 위한 효소로서 TunicaseTM (DAIWA, Japan), chitinase (Sigma, St. Louis, MO, USA), lysozyme (Inovatec, Canada), ECONASE CETM (Rohm Enzyme,

Finland)와 자체 제조한 lytic enzyme (*Trichoderma* sp., (주) 태평양)를 사용하였고, 단백질 분해효소는 bromelain (Biochem, Thailand)을 사용하였다. 균사체 시료는 배양액 100 mL을 원심분리 한 후 상등액을 버리고 남은 균사체 침전물에 100 mL의 D.W.를 첨가하고 교반하였다. 여기에 각각의 효소를 0.5%(w/v)으로 첨가하여 반응시켰다. 이때, 세포벽 분해효소는 20시간, 단백질 분해효소는 4시간 반응시켰다. 반응 종료 후 100°C, 2시간 열수추출하여 얻은 다당체 추출물을 건조하여 각 반응군의 β -glucan을 측정하였다. 이때, 효소 처리하지 않은 단순 열수추출물을 대조군으로 하였다.

효소를 조합하여 반응을 시킬 때에는 1차 효소반응액을 100°C, 10분간 열처리하여 효소를 실패시키고, 다시 pH와 온도를 보정한 후 2차 효소반응을 하였다.

결과 및 고찰

배지조성의 영향

탄소원으로는 기초 실험으로서 시험한 타 당류에 비해 현격한 차이를 나타내었고, 경제성 측면에서 유리한 glucose를 기본으로 glucose 농도의 영향을 위주로 시험하였다. Glucose의 농도에 따른 균사체와 β -glucan의 생성량은 Table 1과 같았다. 초기 배양액의 glucose 농도가 5%(w/v)일 때 균사체는 21.3 g/L, 세포 외 β -glucan은 2.2 g/L로 가장 우수한 결과를 나타내었다. 이보다 낮은 3%(w/v)와 4%(w/v)일 때는 잔존하는 glucose의 농도가 낮고 β -glucan의 생성량이 1.8 g/L에 그쳐 추가적인 β -glucan의 생성은 어려울 것으로 생각되었다. 또한, 6%(w/v) 이상에서는 배양종료 시 잔존하는 glucose 농도가 높아 glucose에 대한 이용률이 급격히 떨어지는 것으로 판단되었다. 실험 결과, 탄소원으로서의 glucose는 5%에서 이용 효율이 가장 높고 균사체와 β -glucan의 생성량이 최대값을 나타내었다.

탄소원을 glucose 5%로 고정하고 다양한 질소원에 대하여 배양 실험한 결과는 Table 2와 같았다. 표에서, yeast extract 단독으로 사용한 것과 비교하여 무기 질소원 및 유기 질소원을 혼합 사용했을 때에 균사체의 양은 증가했지만, β -glucan의 생성량은

Table 1. Effect of glucose concentration on the mycelial growth and β -glucan production.

Glucose (%) (w/v)	Dry weight of mycelia (g/L)	β -glucan (g/L)	Residual glucose (%) (w/v)
3	15.6	1.8	0.2
4	18.4	1.8	0.3
5	21.3	2.2	0.8
6	17.7	2.0	1.4
7	16.5	1.3	2.5
8	13.0	1.1	2.7
9	12.2	1.0	3.8

All growth media contained 0.5% yeast extract, 0.1% KH_2PO_4 and 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in common. Results were obtained after seven days' cultivation.

Table 2. Effect of nitrogen sources on the mycelial growth and β -glucan production.

Nitrogen source	Dry weight of mycelia (g/L)	β -glucan (g/L)
Yeast extract	21.3	2.2
Yeast extract ^{a)}	18.3	1.6
Malt extract	17.8	1.4
Peptone	16.9	1.3
Beef extract	13.9	1.2
Yeast extract + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	23.1	1.9
Yeast extract + NH_4Cl	21.2	2.0
Yeast extract + NH_4NO_3	22.0	1.8
Yeast extract + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	21.6	1.9
Yeast extract + malt extract	22.8	2.6
Yeast extract + beef extract	22.3	1.7
Yeast extract + peptone	22.1	2.0

a): 1.0 % added

Organic nitrogen sources were added to the media at the concentration of 0.5%, and inorganics were 0.1%. All growth media contained 5% glucose, 0.1% KH_2PO_4 and 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in common. Results were obtained after seven days' cultivation.

영향이 없거나 다소 줄어들기도 하였다. 질소원의 혼합사용 및 비율의 증가는 균사체의 생육을 증가시킬 수 있지만, 세포 외 β -glucan의 생성을 위해서는 yeast extract만 0.5%(w/v) 첨가하는 것이 효율적인 것으로 나타났다. 하지만, yeast extract와 malt extract를 혼합 사용하였을 경우, 균사체는 22.8 g/L, 세포 외 β -glucan은 2.6 g/L로 가장 우수한 결과를 얻을 수 있었다.

기타 무기염류는 첨가 농도 변화에 따라 건조 균사체량의 5% 정도로 영향을 주었지만, β -glucan의 생성에는 거의 변화가 없었다. 0.05-0.2% (w/v)의 농도변화가 결과에 미치는 영향은 미미했지만, 반복 실험을 통한 통계학적인 결과를 토대로 KH_2PO_4 는 0.1% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 0.05% (w/v)를 최적조건으로 정했다. 이상으로부터 glucose 5%(w/v), yeast extract 0.5% (w/v), malt extract 0.5% (w/v), KH_2PO_4 0.1% (w/v)와 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% (w/v)를 최적 배지조성으로 하였다.

배양조건의 영향

상기와 같이 조성된 배지를 기초로 배양에 대한 pH, 온도, aeration, agitation의 영향에 대해 실험하였다.

초기 배지의 pH에 대한 영향은 Fig. 1과 같았다. β -glucan의 생성은 pH 5.0에서 가장 좋았으며, pH 4-6에서 우수한 결과를 나타내었다.

배양온도를 25-32°C로 변화시켰을 때 28°C에서 균사체와 β -glucan의 생성량이 21.3 g/L와 2.2 g/L로 최적의 결과를 나타냈고, 그 영향은 Fig. 2와 같다. 배양온도가 30°C 이상일 경우, 균사체는 크게 영향을 받지 않는 반면, β -glucan의 생성량은 현저하게 떨어지는 것으로 보아 β -glucan의 생성에 있어 배양 온도가 매우 중요한 요소임을 알 수 있었다.

Aeration에 대한 영향은 0.5, 0.75 vvm에서 우수한 결과가 나

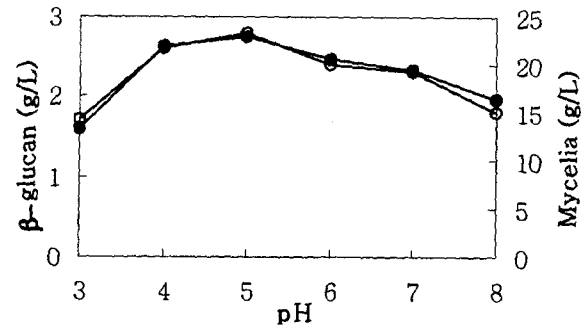


Fig. 1. Effect of pH on the mycelial growth and β -glucan production (○ - ○, β -glucan; ● - ●, mycelia). Medium; 5% glucose, 0.5% yeast extract, 0.5% malt extract, 0.1% KH_2PO_4 and 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Temperature; 28°C. Aeration; 1.00 vvm. Results were obtained after seven days' cultivation.

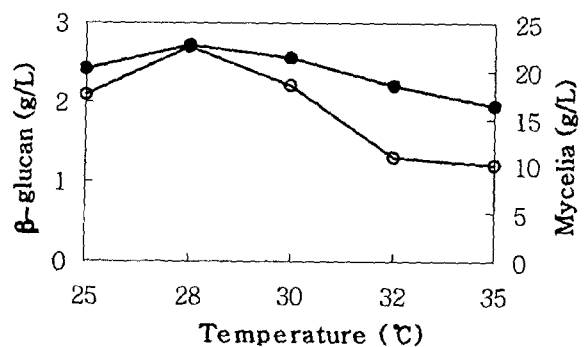


Fig. 2. Effect of temperature on the mycelial growth and β -glucan production (○ - ○, β -glucan; ● - ●, mycelia). The experimental conditions were the same as in the Fig. 1.

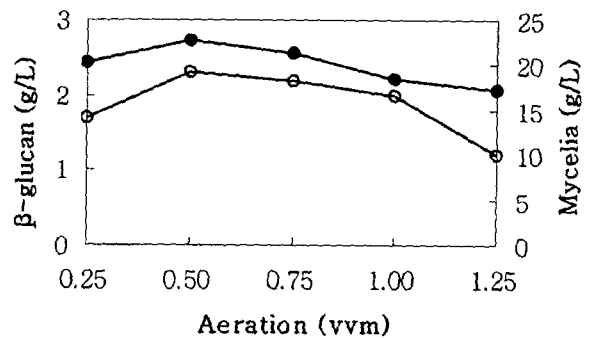


Fig. 3. Effect of aeration on the mycelial growth and β -glucan production (○ - ○, β -glucan; ● - ●, mycelia). The experimental conditions were the same as in the Fig. 1.

왔고, 0.5 vvm 이하에서는 통기량의 감소로 β -glucan의 생성이 저해되며, 1.0 vvm 이상에서는 균사체와 β -glucan의 생산량 모두 감소하는 것을 알 수 있었다. 결과는 Fig. 3에 나타내었다. Agitation은 사용된 fermenter의 특성, 그리고 배양액의 전단응력 등을 고려하여 물질전달의 효과를 높이고 교반이 가장 원활하게 이루어지는 300 rpm으로 결정하였다. 배지 및 기타 여러 가지 배양조건을 Table 3에 정리하였다.

Table 3. Culture conditions and optimized medium composition for submerged culture and semi-fed batch.

Component	Initial (g/L)	Feeding (g/L)
Glucose	40	30
Yeast extract	5	1
Malt extract	5	1
KH ₂ PO ₄	1	-
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	-

Other conditions were as followed: pH 5.0, temperature 28°C, aeration 0.5 vvm and agitation 300 rpm.

아가리쿠스 배양 시 배양조건은 균사체의 생육에 현격한 차이를 보일 만큼의 영향을 끼치지 않았다. 다만, β-glucan은 이와 같은 최적조건에서 멀어질수록 생성량의 급격한 감소를 보였다. 위의 배지조성과 배양조건에 따른 균사체의 최대 생성량은 23.1 g/L이고, 세포 외 β-glucan은 2.8 g/L였다.

배지 feeding

배지 조성 및 배양 조건에 따른 결과를 Fig. 4(A)와 같이 정리하여 배양기간 동안의 균사체와 β-glucan 생성, glucose의 소비 경향을 파악하였다. 이에 대해 자세히 설명하면, 우선 균사체의 생성량은 배양기간 동안 균일한 증가를 보였으며, β-glucan은 60시간 이후 생성량이 증가함을 알 수 있다. 잔존 glucose도 60시간까지 4% 이상의 농도를 유지하다가 60~100시간 사이에 2% 정도의 소비가 이루어졌다. 또한, 배양 초기에 관찰되는 과량의 glucose에 의한 균사체 성장의 저해작용을 최소화하기 위해 초기 glucose의 농도를 4%로 줄이고 glucose의 소비량이 급증하는 70시간 시점에 3%의 glucose를 추가로 접종하는 semi-fed batch 방법을 사용하여 실험하였다. 추가로 접종하는 배지의 조성은 glucose 3% (w/v), yeast extract 0.1% (w/v), malt extract 0.1% (w/v)로 하였다. 추가 배지에 따른 배양 결과를 Fig. 4(B)와 같이 정리하였다. 이를 Fig. 4(A)의 결과와 비교해보면, 세포 외 β-glucan의 함량이 5.2 g/L로 급격히 증가함을 알 수 있었다.

시료의 분석

본 연구에서 사용한 시료에 대한 β-glucan의 함량은 Table 4와 같다. 세포 외 다당체의 β-glucan의 함량은 65.3% (w/w)이고, 균사체 내의 β-glucan의 함량은 32.7% (w/w)였다. 또한, 세포 외 다당체의 최종 수득 건조물은 7.96 g/L로 함량을 고려하여 계산하면 β-glucan으로 5.2 g/L였다. 균사체의 경우, 최종 건조물의 양은 26.6 g/L로 β-glucan으로는 8.7 g/L였다. 결과적으로, β-glucan은 세포 외 다당체와 비교하여 균사체 내의 세포벽에 1.5 배 이상 많이 존재함을 알 수 있었다. 한편, 자실체 건조물의 β-glucan 함량은 5.2% (w/w)로 균사체에 비해 상대적으로 낮았다.

효소반응에 의한 β-glucan 추출의 영향

일반적으로 균사체 내에 단백질이나 기타 고분자와 결합된 구조(11, 14, 21)로 추출효율이 높지 않은 β-glucan을 추가로 추출하기 위해, 세포벽 분해효소를 처리하고 열수추출하였다. 얻어진

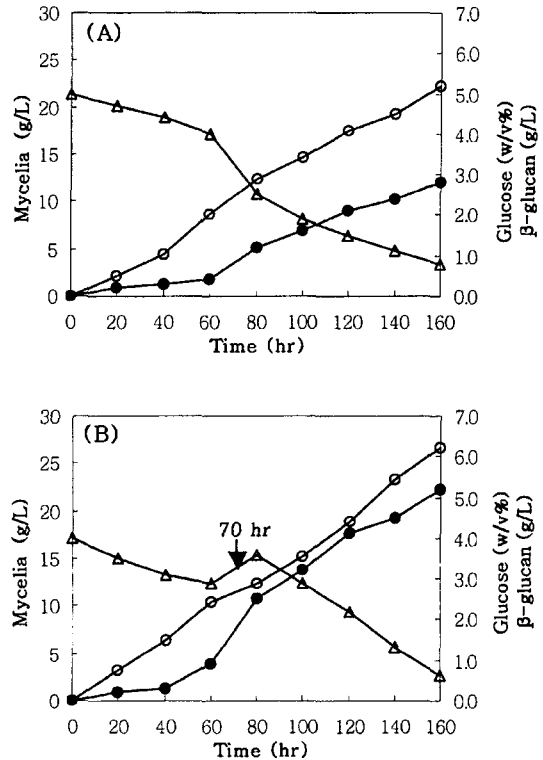


Fig. 4. Time course of the mycelial growth, β-glucan production and glucose consumption by the cultivation of *Agaricus blazei* (A) without feeding or (B) with feeding at the point of 70 hours. (○ - ○, mycelia; ● - ●, β-glucan; △ - △, residual glucose). Medium: 5% glucose, 0.5% yeast extract, 0.5%, malt extract, 0.1% KH₂PO₄ and 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, pH 5.0. Temperature: 28°C. Aeration: 1.00 vvm.

추출물에 대한 결과는 Fig. 5와 같았다. Lytic enzyme를 처리했을 때 2.7 g/L, Tunicase™는 2.4 g/L로 비교적 높은 함량이었으며, 그 밖의 효소반응에 의해서는 1-1.5 g/L의 β-glucan을 얻을 수 있었다. 또한, 상기한 실험에서 높은 수율을 나타낸 lytic enzyme, Tunicase™에 대하여 따로 bromelain 효소반응 추가에 따른 β-glucan 추출효과를 비교하였다. 각 효소반응의 순서가 최종 수율에 미치는 영향 및 각 효소균에 대한 β-glucan 추출수율을 Fig. 6에 나타내었다. 단백질 분해 효소인 bromelain으로 β-glucan에 결합되어 있는 단백질을 분해함으로써 균사체 내의 β-glucan의 추출을 용이하게 하였다.

우선, 반응의 순서에 있어 1차적으로 lytic enzyme, Tunicase™

Table 4. Comparison of the β-glucan contents between samples

Sample	β-glucan (%) (w/w)
Fruiting body	5.2
Mycelia (cell wall)	32.7
Extracellular polysaccharides	65.3

Samples were analysed by the modified method of 'Mushroom and Yeast Beta-Glucan Assay (15)'.

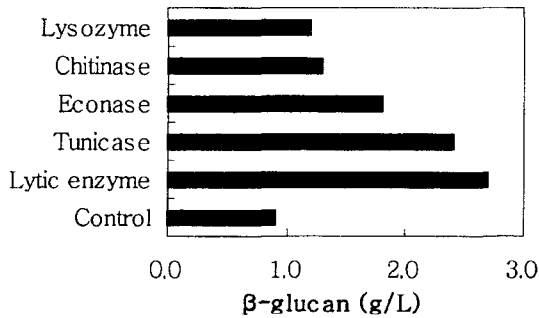


Fig. 5. Effect of enzyme treatment for the extraction of β-glucan from mycelia. Mycelia as a substrate was prepared by centrifuging 100 mL of culture solution and set to 100 mL with distilled water to the precipitate. Each enzyme was added to the mycelia solution at the concentration of 0.5%(w/v). After 20 hr reaction, it was extracted with hot-water for 2 hr and dried. Control was only hot-water extracted mycelia.

효소반응 후 bromelain 효소반응을 할 경우 3.5 g/L, 3.2 g/L로 가장 높은 추출수율을 보였다. 하지만, bromelain 효소반응을 먼저 했을 때에는 lytic enzyme, Tunicase™ 단독 처리군보다 거의 같거나 약간의 증가량만 보였다. 이는 β-glucan의 추출수율 증가가 1차적으로 세포벽 분해에 의한 세포 내에 존재하는 다량의 β-glucan 추출로 인해 이루어지며, 1차 세포벽 분해에 의해 복잡한 구조로 결합된 다당체의 골격이 부분적으로 분해되면서 단백질과 결합된 다당체구조가 드러나 2차 단백질 효소의 접근과 공격을 용이하게 해 주어 효소에 의한 추출효율이 높아졌기 때문으로 생각된다.

현재, 항암 및 면역강화의 소재로서 아가리쿠스버섯 추출물과 균사체 추출물이 전세계적으로 널리 사용되고 있으며, 주 효능을

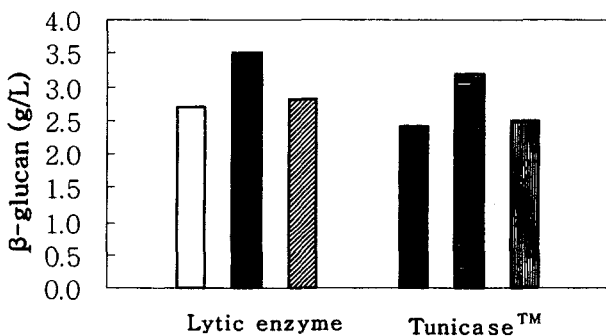


Fig. 6. Effect of mixed enzyme treatment for the production of β-glucan from mycelia (□ : lytic enzyme only, ■ : bromelain after lytic enzyme, ▨ : lytic enzyme after bromelain, ▩ : Tunicase™ only, ▤ : bromelain after Tunicase™, ▥ : Tunicase™ after bromelain) Mycelia as a substrate was prepared by centrifuging 100 mL of culture solution and set to 100 mL with distilled water to the precipitate. Each enzyme was added to the mycelia solution at the concentration of 0.5%(w/v). The cell-wall lysis enzyme was treated for 20 hr and bromelain, 4hr. After enzyme reaction, it was extracted with hot-water for 2 hr and dried.

나타내는 성분인 β-glucan의 효율적인 생산에 대한 필요성이 대두되고 있다. 본 연구에서, 아가리쿠스 배양시 배지의 feeding을 통해 세포 외 β-glucan의 생성량을 2.8 g/L 에서 5.2 g/L로 증가시켰으며, 또한, 균사체 내에 복잡한 구조로 결합되어 있는 β-glucan을 효소반응을 통해 3.5 g/L까지 추출하게 되어, 세포 내외의 β-glucan을 합하여 총 8.7 g/L를 얻을 수 있었다. 기존 홍 등 (7)의 연구에서 glutamic acid의 첨가와 유가 배양에 따른 생산 최적화를 통해 다당체 생성량 11.8 g/L의 결과를 얻은 바 있으나, 주요 유효성분인 β-glucan의 함량에 대한 언급이 없고 발효조의 차이로 인해 직접적인 비교는 어려울 것으로 사려된다. 본 연구의 결과로 얻어진 배지의 조성과 추가 배지의 feeding, 그리고 효소반응 기술을 통해 세포 내외의 총 β-glucan의 획득을 크게 향상시킬 수 있을 것으로 보이며, 이는 향후 아가리쿠스를 건강 및 기능 식품 산업에 보다 유용하게 활용시킬 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- 고진복. 2003. 신령버섯 균사체 배양액이 흰쥐의 성장률, 지질과 단백질 농도 및 효소 활성이 미치는 영향. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32, 887-892.
- 구현옥, 김인천, 박신자, 정상희, 박종명, 이재진, 유한상, 이영순. 1999. 신령버섯(*Agaricus blazei* Murrill)에서 분리한 다당체의 *Staphylococcus aureus* 감염 및 마우스 Sarcoma 180 종양세포에 대한 방어효과. *Kor. J. Lab. Anim. Sci.* 15, 155-158.
- 이병우, 이명섭, 박기문, 김창환, 안평옥, 최춘언. 1992. 운지버섯 균사체 추출물의 항암효과에 관한 연구. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20, 311-315.
- 이신영, 강태수. 1996. 영지(*Ganoderma lucidum*) 균사체의 액체배양에 의한 세포 외 생물고분자의 생산조건과 특성. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 111-118.
- 이신영, 강태수. 1998. Air-lift fermenter system을 이용한 *Ganoderma lucidum* 균사체의 심부 배양에 의한 세포 외 다당류의 생산조건. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 13, 547-553.
- 조수목, 박정식, 김광포, 차동열, 김환목, 유익동. 1999. 신령버섯(*Agaricus blazei*)으로부터 면역증강활성 다당류의 분리 및 화학적 특성. *Kor. J. Mycol.* 27, 170-174.
- 홍역기, 권명상, 오세용, 이문찬. 2000. 생물공학을 이용한 아가리쿠스 버섯의 대량생산 기술 및 가공제품 개발. 농림부제출 연구보고서. 강원대학교.
- Bohn, J.A. and J.N. BeMiller. 1995. (1 → 3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polymers* 28, 3-14.
- Cheung, N.-K.V., S. Modak, A. Vickers and B. Knuckles. 2002. Orally administered β-glucans enhance anti-tumor effects of monoclonal antibodies. *Cancer Immunol. Immunother.* 51, 557-564.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Ito, H., K. Shimura, H. Itoh, and M. Kawada. 1997. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex(ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice. *Anticancer Res.* 17, 277-288.
- Kawagishi, H., T. Kanao, R. Inagaki, T. Mizuno, K. Shimura, H.

- Ito, T. Hagiwara and T. Nakamura. 1990. Formolysis of a potent antitumor (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. *Carbohydr. polymers* 12, 393-403.
13. Kenji, S., A. Kazumi, I. Yukari, O. Akira and Y. Sunao. 2001. Secretion of TNF- α , IL-8 and Nitric oxide by Macrophages activated with *Agaricus blazei* Murrill fractions *in vitro*. *Cell Structure Function* 26, 103-108.
14. Manzi, P. and L. Pizzoferrato. 2000. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chem.* 68, 315-318.
15. Megazyme International Ireland Ltd. 2002(10). Mushroom and yeast β -glucan: Assay procedure.
16. Naohito, O., F. Mai, N.M. Noriko, A. Yoshiyuki, M. Masuro and Y. Toshiro. 2001. Antitumor β -glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 820-828.
17. Qun, D., Y. Jian, Y. Xiao-tong and F. Ji-nian. 2002. Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydr. Res.* 337, 1417-1421.
18. Samuel, C. 1959. Production of mushroom mycelium by the submerged culture process. *Industrial Microbiol.* 647-653.
19. Torev, A. 1968. Submerged culture of higher fungi mycelium on an industrial scale. *Mushroom Sci.* 7, 585-589.
20. Yoneyama, M., S. Meguro and S. Kawachi. 1997. Liquid culture of *Agaricus blazei*. *J. Jpn. Wood Res. Soc.* 43, 349-355.
21. Yoshiaki, F., S. Youichi, O. Ko-ichi, K. Hidekazu, M. Koichi, N. Hisako, M. Yonezo, T. Shogo, E. Takusaburo and K. Ryuichi. 1998. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete *Agaricus blazei* Murrill mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol. Immunother.* 46, 147-159.
22. Zhou, X., L. Zhang and K.-C. Zhang. 2002. Studies on submerged culture process of *Agaricus blazei* Murrill. *Pharm. Biotechnol. - Beijing-* 9, 339-343.

(Received February 18, 2004/ Accepted March 9, 2004)

ABSTRACT : Effective Production of β -Glucan by the Liquid Cultivation of *Agaricus blazei*

Seung-Hyun Lee, Hwan-Mi Lim, Tae-Young Kim, Nam-Suk Cho, Jun-Seong Park, Yeon-Woo Ryu¹, and Moo-Sung Kim* (Bio-tech Division, Amorepacific Co., Ltd., Ansan 425-839, Korea, ¹Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea)

β -Glucan has been efficiently produced with higher yield by the optimization of liquid cultivation conditions. The optimal composition of medium for batch culture was 5% (w/v) of glucose as a carbon source, 0.5% (w/v) of yeast and 0.5% (w/v) of malt extract as a nitrogen source, 0.1% (w/v) of KH_2PO_4 and 0.05% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, which had been the base medium for determination of other conditions. The set-up conditions are pH 5.0, 28°C, 1 vvm for aeration and 300 rpm for agitation. In order to minimize the inhibition effect of glucose on the initial growth of mycelia and to maximize the production of extracellular β -glucan, we have reduced the initial glucose feed to 4% and added 2nd feed at the point of 70 hr from the initial feed. The 2nd feed was composed of glucose 3%, yeast extract 0.1% and malt extract 0.1%. It improved the β -glucan yield up to 5.2 g/L in comparison with 2.8 g/L resulted from batch cultivation. Moreover, the serial treatment of a cell wall lytic enzyme and bromelain to the mycelia was effective for extraction of the cell wall bound β -glucan. The yield of β -glucan extraction by the enzyme treatment was 3.5 g/L, which was almost 4 times higher than that by hot-water extraction.