

## Air-lift 및 Jar Fermenter에 의한 *Hericium erinaceum* 심부배양의 배양특성 및 Scale-up

<sup>1</sup>정재현 · 이근억 · †이신영  
강원대학교 생물공학과, <sup>1</sup>충주대학교 식품공학과  
(접수 : 2005. 8. 5., 게재승인 : 2005. 10. 22.)

## Cultural Characteristics and Scale-up for Submerged Cultivation of *Hericium erinaceum* Through Air-lift and Jar Fermenter System

Jae-Hyun Jung<sup>1</sup>, Keun-Eok Lee and Shin-Young Lee†

Department of Biotechnology and Engineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Chungju National University, Chungju 380-702, Korea

(Received : 2005. 8. 5., Accepted : 2005. 10. 22.)

For the study of *Hericium erinaceum* as a useful functional foods and materials, liquid cultivation under two different bioreactors (air-lift fermenter and jar fermenter) which was not studied systematically until now, was conducted as a method of mass cultivation for *H. erinaceum*. A batch cultivation in an air-lift fermenter and a jar fermenter was examined for enhancing the productivity because of small amounts of mycelial weight and slow growth in case of a liquid culture for *H. erinaceum*. We found that air lift fermenter system was more effective than jar fermenter for mycelial production of *H. erinaceum*, and mycelial morphology was a critical factor of the growth. By scale-up and cultivation based on morphological analysis, the conditions for mass production with 30 L and 500 L jar fermenter was 200 and 150 rpm of agitation speed at 1vvm of aeration rate, respectively, and mycelial dry weight under these conditions was enhanced to about 13~14 g/L.

**Key Words** : *Hericium erinaceum*, mycelium, submerged culture, morphology, air-lift and jar fermenter, scale-up

### 서 론

최근 버섯의 산업적 생산체제가 확대되면서 이의 액체 배양 연구가 활발히 진행되고 있다. 노루궁뎅이 버섯 (*Hericium erinaceum* (Bull.ex.Fr) Pers.)은 건강기능성 및 의약품으로서의 잠재력이 높은 버섯의 하나로(1, 2), 각종 생리활성에 관한 연구가 진행 중이지만 아직 대량 생산에 적합한 액체배양에 관한 연구수준은 매우 미미한 실정이다.

지금까지의 노루궁뎅이의 액체배양 연구는 플라스크 배양 수준이었으며, 더구나 다른 버섯에 비하면 균사체의 생산 수율이 낮고 (2.7-9.2 g/L), 배양기간도 10일 정도로 길다(3, 4). 따라서 노루궁뎅이 버섯 균사체의 생산성 향상을

위하여는 보다 적합한 새로운 형태의 fermenter를 설계 고안하고, 새로운 액체배양 system을 적용하는 연구의 필요성이 매우 높은 실정이다.

일반적으로 담자균류는 단세포의 효모나 세균과 달리 다세포의 균사상으로서 크고, 긴 사상의 균사형태로 자라며, 균사는 생육함에 따라 clamp나 pellet과 같은 구조를 형성하는데, 생육속도가 느리고 wall growth의 특징을 갖는다(5, 6). 따라서 산업적으로 널리 이용되는 jar fermenter의 경우 교반 시에 일어나는 전단응력으로 각종 생리적 변화를 받기 쉽고, 특히, 높은 전단력이 존재하는 통기 교반형의 장치에서는 국부적으로 강한 전단응력의 생성으로 세포 증식의 억제 또는 pellet상 균사의 파괴 등이 뒤따른다(7). 그러므로 버섯의 대량액체배양을 위해서는 impeller type 배양장치의 동력소모를 줄이며, shear stress에 의해 균사체 pellet의 파편화를 방지할 새로운 발효장치가 필요하다(8).

한편, 기포 통기형 배양장치 (air-lift fermenter)는 통기교반형 배양장치와는 달리 높은 전단응력장이 존재하지 않으므로 균사가 pellet상인 경우 액의 혼합, 균일화 및 용이

† Corresponding Author : Department of Biotechnology and Engineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

Tel : +82-33-250-6273, Fax : +82-33-243-6350

E-mail: sylee@kangwon.ac.kr

한 산소공급으로 국부적인 강한 전단응력으로 세포증식이 억제되는 경우나 파괴되는 경우에 유리하다(9, 10).

지금까지 air-lift fermenter를 이용한 버섯의 액체배양 연구로서 Song and Cho(11)는 표고 (*Lentinus. edodes*)의 균사체 배양에서 새로운 합성배지로부터 균체의 수율을 플라스크 배양시보다 5배나 증가시켰음을 보고하였다. 표고버섯의 균사체의 pilot scale 생산(12)이나 영지 (*Ganoderma lucidum*)의 항암세포의 다당류 생산에 이 air-lift fermenter를 사용한 바 있으나(13, 14) *H. erinaceum*에 대해서는 보고된 바가 없다. 하지만 air lift fermenter의 산업적 이용은 크게 제한되어 있어 jar fermenter에서의 검토는 불가피한 경우가 대부분이다.

그러므로 본 연구에서는 식용은 물론 각종 약리효과를 나타내는 *H. erinaceum*의 기능성 식품의 제품화 연구 일환으로, 지금까지 체계적으로 연구된 바 없는 air lift fermenter와 jar fermenter의 서로 다른 배양 시스템 하에서 영상분석(image analysis)에 의한 균사형태 변화를 조사하였다. 또 이에 기반하여 두 반응기에서의 *H. erinaceum* 액체배양을 비교하고, 이 버섯의 액체배양 특성을 규명하였으며, 이로부터 대량배양의 기초 자료를 마련하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

공시 균주는 본 연구실에 보관중인 노루궁뎅이 버섯 (*Hericium erinaceum*)이며, PDA (Potato-Dextrose Agar) 배지에 사면배양하여 보존하였다. 액체배양은 16종 배지로부터 선발된 배지의 최적화에 의해 얻은 glucose 30 g/L, yeast extract 2 g/L, polypeptone 2 g/L (또는 yeast extract 2 g/L, polypeptone 2 g/L, malt extract 10 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 g/L, pH 5.5)를 사용하였으며, 이 때 pH는 필요시 0.1N HCl 또는 0.1N NaOH로 조절하였다.

### 배양 방법

플라스크 배양의 경우는 500 mL 플라스크를 사용하여 최적 배지 (pH 5.7) 하에서 접종비 13%, 온도 23℃, 진탕속도 100 rpm으로 10일간 실시하였다. Air-lift fermenter system에서는 자체 제작한 3 L 용량의 발효조에서 역시 접종비를 13%로 하여 온도 23℃, 통기속도 2.5 vvm으로 4일간 배양하였다. Air-lift fermenter는 내부에 1개의 draft tube를 설치하였고, 수직으로 고정된 stainless pipe를 통하여 온도를 조절하도록 제작하였으며, 내경과 외경의 직경비는 0.667, 외경과 배양액까지의 높이비는 4, 상승부와 하강부의 단면적비는 0.8이었다(6).

한편, 5 L jar fermenter (Kobiotec) 배양에서는 온도 23℃, 통기속도 1~2 vvm, 교반속도 (100~400 rpm)로 6일간 배양하였으며, 대량 생산 시에는 500L jar fermenter (Kobiotec)로 실시하였다.

### 분석

액체 배양의 균사 생육은 원심분리 (8000 rpm, 15min.)

후, 70℃에서 12시간 건조하여 건조 균체량으로 측정하였고, 세포의 생성물인 다당류 생성량은 아세톤 침전법으로 조사하였다(15, 16).

한편, 액체배양의 균사형태는 image analysis system (Optimas Co. USA)으로 분석하였다. 장치는 CCD camera (Parasonic, WV-CP410), PCI video frame grabber (Flashpoint Ver. 3.11, Integral Tech., Inc.) 및 PC로 구성된 것을 사용하였다. 이 때 면적, 길이, 원형도, roughness (%) 등의 각종 형태변수는 Image software (Optimas)를 사용하여 구하였다. 분석시 CCD camera의 화상은 640 × 640 pixels 및 256 grey level의 해상도로 촬영하였고, 오차를 최소화하기 위해 400 × 400 pixels로 수정하였다. 또 roughness는 pellet의 면적을 이용하여 다음 식에 의해 구하였다(17).

$$\text{Roughness (\%)} = \frac{(\text{whole pellet area} - \text{core pellet area})}{(\text{whole pellet area})} \times 100$$

## 결과 및 고찰

### Jar fermenter에서의 회분 배양

Jar fermenter 하의 버섯류 액체배양시에 교반속도는 균사증식이나 물질 및 산소 경유를 통한 생물활성 물질의 생산에서 매우 중요한 역할을 한다(19). 만약, 교반속도가 낮으면 산소 및 물질전달이 느려서 낮은 증식을 나타낼 것이며, 큰 pellet을 형성하게 될 것이다. 하지만 담자균류에 대한 이들 효과에 대해서는 별로 보고된 바가 없고, 특히, 노루궁뎅이 버섯인 경우는 이러한 자료가 전무하여 scale-up에 어려움이 있다. 따라서 5 L jar fermenter에서 일정 통기속도 (1.5 vvm)하에 서로 다른 교반조건 (100~400 rpm)으로 5일 (또는 6일)간 *H. erinaceum*의 액체배양을 수행하였으며, 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

배양경과에 따라 교반속도와 상관없이 pH는 초기 5.5로부터 서서히 감소하여 약 4.0 내외로 감소하였다. 기질소비(잔존당) 역시 배양경과에 따라 감소하였으며, 비교적 교반속도의 증가에 따라 기질 소비도 증가하였다. 그러나 배양 말기에도 기질인 당의 소비가 매우 낮아서 거의 50%가량 잔존되는 특징을 보였는데, 이러한 과잉 탄소원 존재하의 생육은 다른 버섯의 액체배양에서도 잘 나타나는 현상이다. 또, 기질소비에 따라 세포의 다당이 생성되었으며, 교반속도의 증가에 따라 그 생성량도 증가하였다.

한편, 균사생육의 경우는 배양경과에 따라 배양 초기부터 비교적 급격히 증가하여 배양 2~3일 후 최대값을 보였으며, 이후 이 수준을 유지하거나 감소하는 경향을 보였다. 교반속도가 낮은 경우 (100~200 rpm)는 비교적 시간 경과에 따른 생육속도가 낮고, 최대 균체량 (3.90~5.19 g/L)도 낮았고, 이에 도달하는 시간도 길었다(3일). 반면, 교반속도가 높은 경우 (300~400 rpm)는 균사 생육속도도 빠르고 균사체량의 최대값에 도달하는 시간 짧고 (2 day) 최대 균사체량 (6.83~7.01 g/L)도 높았으나 최대값의 도달 이후 균사체의 감소현상을 보였다. 이러한 균사체 생육의

감소는 교반 날개나 방해판 등에 의한 균사의 손상 또는 단편화 및 fermenter 내부의 각종 sensor 등에 부착하여 생육하는 이른바, wall growth와 이에 의한 적정 펠렛 크기의 유지 곤란 등에 의한 것으로 생각되었다.

3에서 보는 바와 같이, 배양 후기 균사 생육의 감소현상은 관찰되지 않았고, 균사체량의 최대값도 약 9 g/L로 다소 증가하였다. 하지만 다른 버섯류에 비하면 낮은 값 범위이어서 균사체의 손상 및 파편화를 방지할 수 있는 배양장치에서의 검토 필요성이 있었다.

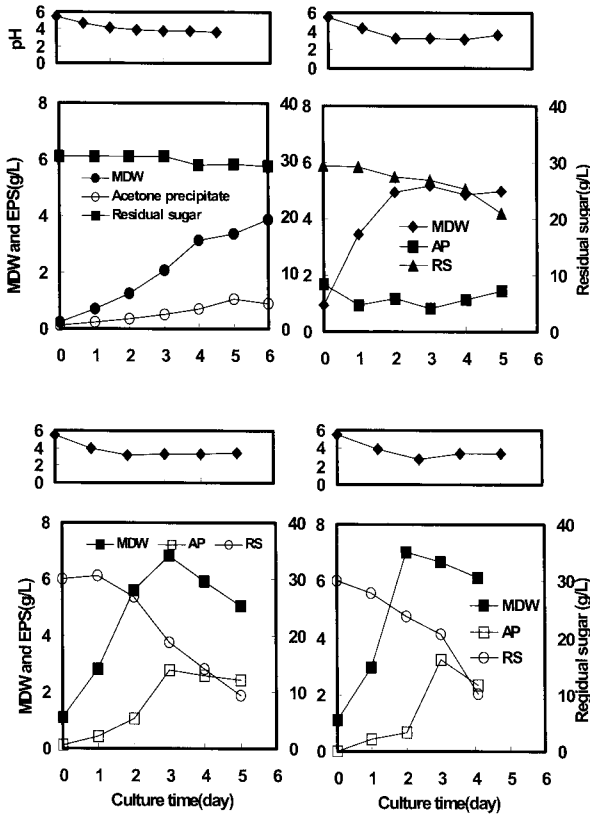


Figure 1. Time course of mycelial dry weight (MDW), exopolysaccharide (EPS) and residual sugar (RS) of *H. erinaceum* under 5 L-jar fermenter system at 100, 200, 300 and 400 rpm.

이를 보다 상세하게 알아보기 위해 impeller의 회전속도에 따른 균사체의 형태변화를 관찰하였으며, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 2에서 볼 수 있는 바와 같이 100~200 rpm에서는 작은 크기의 pellet 형태로 생육하는 반면, 300~400 rpm의 경우는 보다 큰 pellet으로 생육하다가 filament형 (펄프형)으로 생육하였다. 이는 jar fermenter 배양시 impeller의 고속회전 및 baffle과의 충돌에 의해 균사체가 손상 또는 파편화(fragmentation)되기 때문인 것으로 생각되며, 이에 따라 점도상승 등에 의한 물질전달 저해나 균사 밀도가 낮아져 건조 균체량이 감소한 것으로 생각된다. 이 등(16, 17)도 영지버섯의 액체 배양에서 적정 크기 (3~5 mm)의 pellet을 형성하지 못하는 것이 균사 생육 감소의 한 원인임을 제시한 바 있다.

한편, fermenter 내부의 각종 sensor, impeller 및 baffle 등에 부착하여 생육하는 이른바, wall growth나 배양 후기의 응집현상도 균사 생육의 한 요인으로 생각되었으므로 wall growth의 방지목적으로 0.04%의 antifoam (LS-300, 다우코닝사)을 첨가하여 400 rpm에서 재실험하였다. 그 결과 Fig.

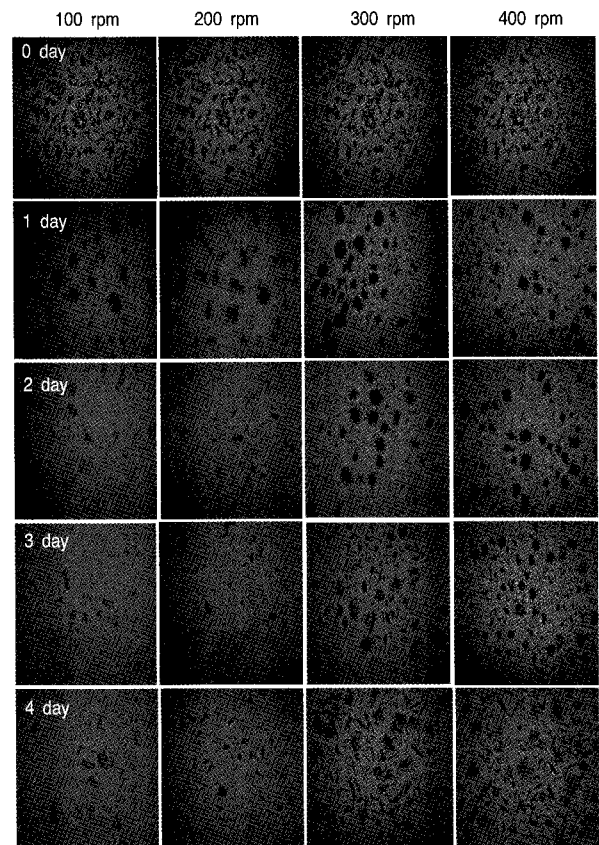


Figure 2. Time courses of morphological forms of *H. erinaceum* mycelium in an 5 L jar fermentor with different agitation speeds.

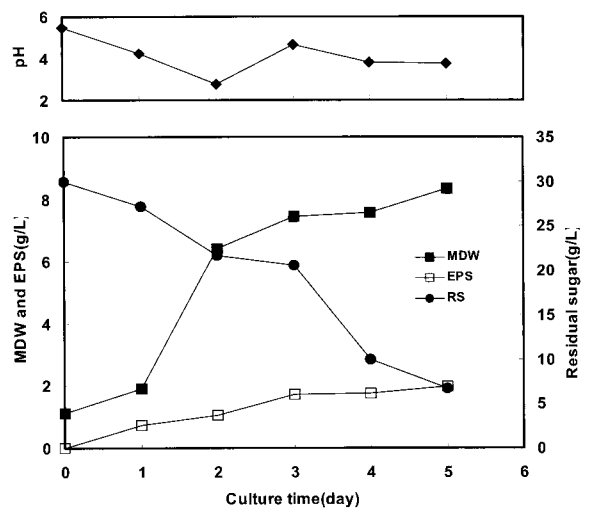


Figure 3. Time course of MDW (mycelial dry weight), EPS (exo-polysaccharide) and RS (residual sugar) of *H. erinaceum* under 5 L-jar fermenter system at 400 rpm.

**Air-lift fermenter에서의 희분 배양**

Jar fermenter하의 노루궁뎅이 버섯 배양은 다른 버섯에 비해 낮은 균사체량과 배양 후기 균사 생육의 감소가 관찰되었으므로 보다 높은 생산성의 향상을 위해서는 균사체량의 증가와 더불어 이에 도달하는 기간을 단축시킬 수 있는 새로운 형태의 fermenter를 설계 고안하고, 새로운 배양 system을 적용하는 추가 연구의 필요성이 높은 것으로 판단되었다. 따라서 *H. erinaceum* 균사체의 새로운 액체 배양장치로서 air-lift fermenter를 자체 제작하였고, 이 배양 장치에서 균사체의 생육 특성을 조사하였다. Fig. 4는 최적 배지 및 최적 배양조건을 이용하여 air lift fermenter 하에서 *H. erinaceum* 균사체를 액체배양 한 경우의 경시변화이다.

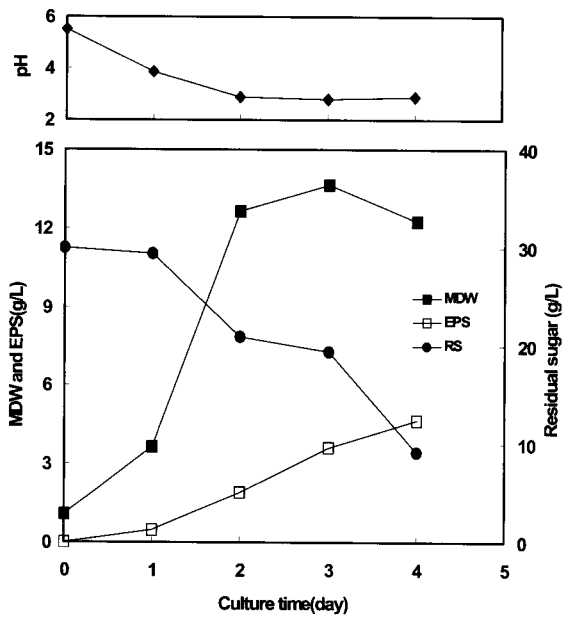


Figure 4. Time course of MDW (mycelial dry weight), EPS (exopolysaccharide) and RS (residual sugar) of *Hericium erinaceum* with air-lift fermenter.

pH는 배양경과에 따라 서서히 감소하여 초기 pH 5.5에서 배양 2일 후 약 4까지 감소하였다. 탄소원 기질인 포도당이 서서히 감소하면서 균사체가 증가하여 배양 3일 후 약 14 g/L가 되었고, 세포의 다당도 약 4.7 g/L가 생성되었다. 이는 플라스크 배양(18)과 비교할 때 균사체 양은 약 1.6배, 배양 기간은 약 2.7배 단축된 결과로서 결국, 4.3 (= 1.6 × 2.7)배의 수율을 향상시킨 결과라 할 수 있다. 또 jar fermenter 배양과 비교하여서는 배양기간의 단축은 없으나 균사 생산량은 약 1.5~2배 향상된 결과이다.

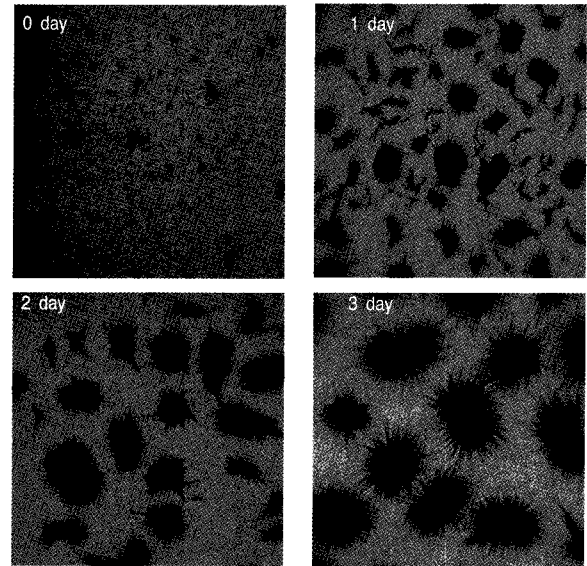


Figure 5. Time course of mycelial morphology during the batch cultivation of *Hericium erinaceum*.

한편, 균사체는 Fig. 5에서 보는 바와 같이, 배양 1일 후 pellet의 형태로 정단 성장하기 시작하여 배양 3일 후 최대 크기의 rough pellet 형태(8)로 생육하였다. 또 배양 경과에 따라 균사 형태 변수들을 조사한 결과(Fig. 6), 장축, 폭, 둘레, 면적, 원형도 및 roughnees (%) 등이 증가하면서 활

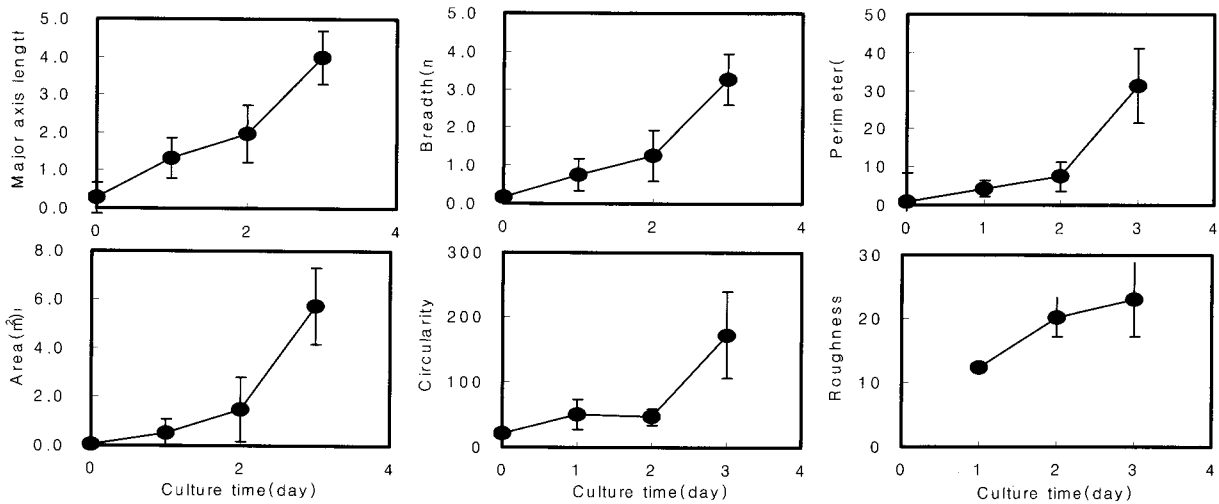


Figure 6. Time changes of morphological parameters by image analysis during batch cultivation of *H. erinaceum*.

발히 생육하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 이들 형태 및 형태변수를 적절히 비교, 분석함으로써 *H. erinaceum*의 액체배양 특성을 보다 상세하게 관찰할 수 있을 것으로 생각되었다.

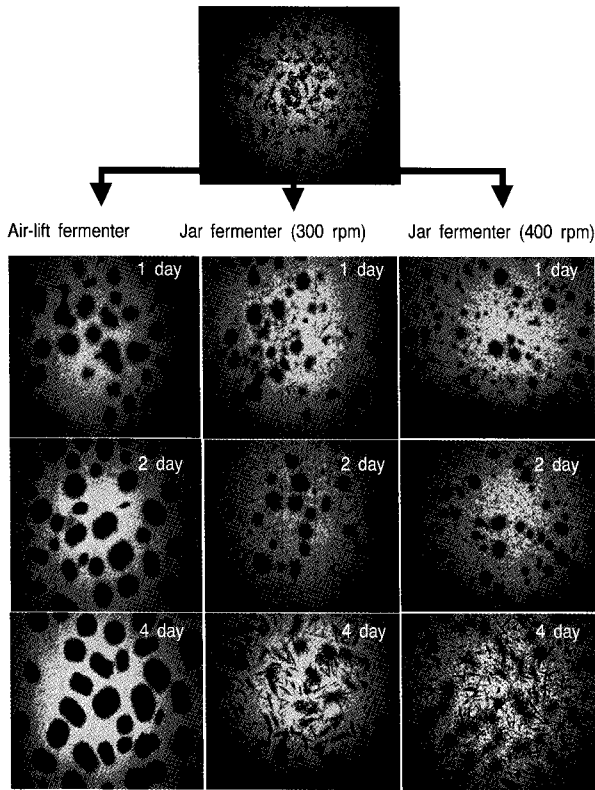


Figure 7. Time courses of morphological forms of *H. erinaceum* mycelium with different fermenter systems (Air-lift and jar fermenter).

그러므로 fermenter 형식에 따른 균사형태의 경시 변화를 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 7과 같다.

Jar fermenter 배양 시는 대부분이 dispersed mycelium이나 작은 pellet으로 존재하는 반면, air-lift fermenter의 경우는 비교적 큰 pellet 형태로 생육하였다.

이러한 형태는 배양 경시변화와 매우 양호한 상관관계를 보이므로 적정 크기 (2~4 mm)의 펠렛을 유지하는 장치나 조건이 노루궁뎅이 버섯의 대량 액체배양에서 중요 요소임을 알 수 있었으며, air-lift fermenter가 jar fermenter보다 유리한 것으로 판단하였다.

**Jar fermenter 회분 배양의 scale-up 검토**

*H. erinaceum*의 액체배양에서 air-lift fermenter가 jar-fermenter보다 유리한 결과를 얻었으나 산업적인 대량 생산에서는 air-lift fermenter의 이용이 크게 제한되므로 pilot 규모 (30 L, 500 L)의 jar fermenter에서 적정 크기 (2~4 mm)의 펠렛을 유지할 수 있는 조건을 검토하였다. 즉, jar fermenter보다 더 유리했던 air-lift fermenter로 종균 배양하고, 이를 종균으로 하여 30 및 500 L jar fermenter에서의 본 배양을 수행하는 scale-up 시험을 실시하였다. 이 때, scale-up의 지표는 주로 air lift fermenter에서와 같은 적정 크기 (2~4 mm)의 pellet 형태로 자랄 수 있도록 교반속도 및 통기속도를 조정하였다.

대체로 교반 및 통기속도가 증가할수록 배양후기 펠렛의 유지가 곤란하였는데, 대표적인 예로서 Fig. 8에서와 같이, 30 L 및 500 L jar fermenter에서 각각 200 rpm, 1 vvm 및 150 rpm, 1 vvm일 때 배양 전기간 중 균사체의 형태가 pellet 형태를 잘 유지함을 확인할 수 있었다.

따라서 이와 같이 얻어진 200 rpm, 1 vvm 및 150 rpm, 1

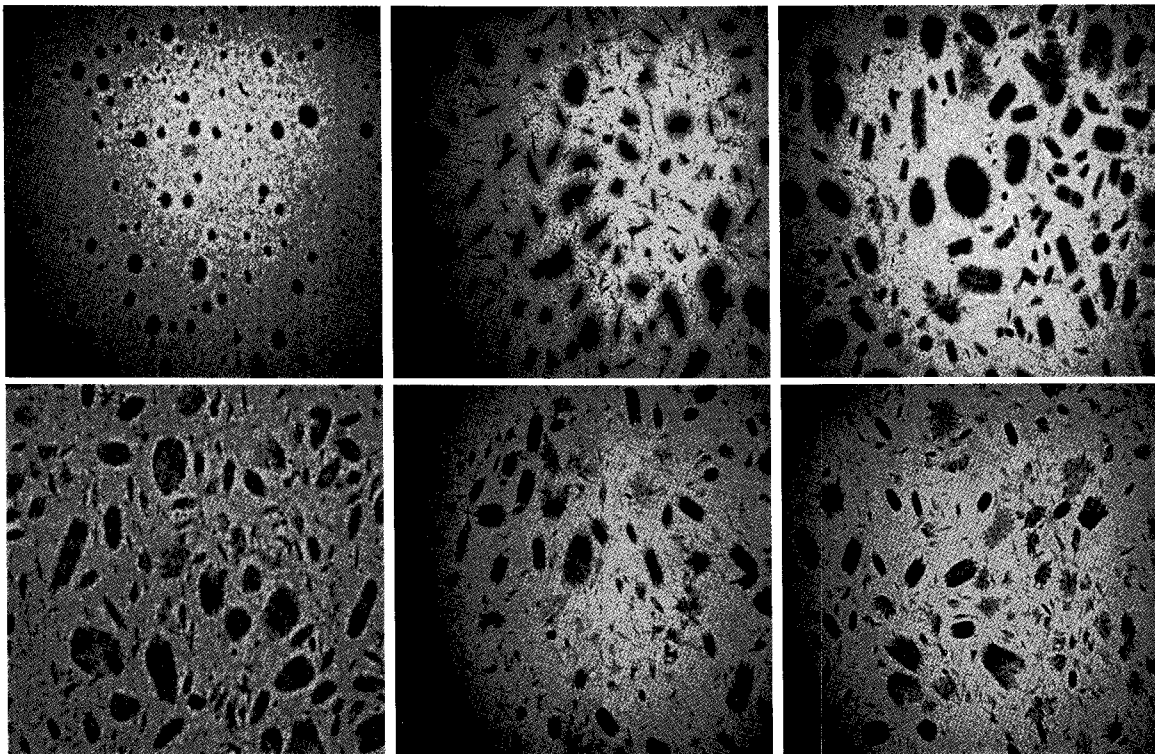


Figure 8. Time course of morphological form of *H. erinaceum* mycelium in a 500 L-jar fermenter system.

vvm을 최적 교반 및 통기조건으로 하여 30 및 500 L 발효조에서 배양 경시변화를 조사하였으며, 그 결과는 각각 Fig. 9 및 10과 같다.

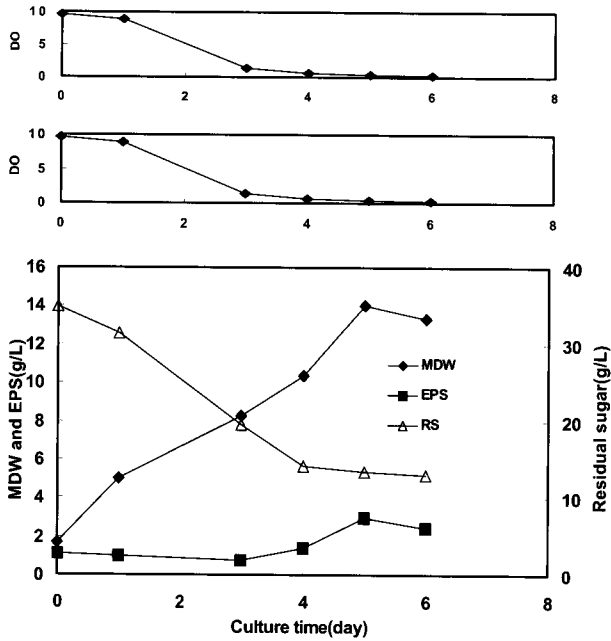


Figure 9. Time course of MDW (mycelial dry weight), EPS (exo-polysaccharide) and RS (residual sugar) of *H. erimacium* under the batch cultivation in an 30 L-jar fermentor (200 rpm and 1 vvm).

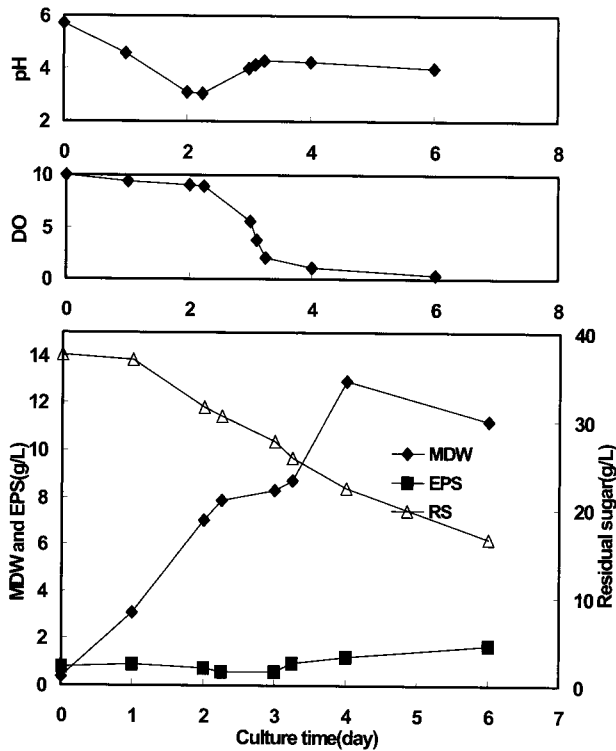


Figure 10. Time course of MDW (mycelial dry weight), EPS (exo-polysaccharide) and RS (residual sugar) of *H. erimacium* under the batch cultivation in an 500 L-jar fermentor (150 rpm and 1 vvm).

30 L의 경우는 배양 3일 후 용존산소 (DO)의 고갈과 더불어 균사체량이 증가하여 배양 5일 후 약 13.7 g/L까지 생육함으로써 거의 air-lift fermenter 수준에 달하였다. 그리고 500 L의 경우도 30 L의 경우와 비슷한 경향으로 12.9 g/L까지 균사체 증식을 보였다.

따라서 균사형태의 분석이 노루궁뎅이 버섯배양의 scale-up의 유용지표가 될 수 있음을 확인할 수 있었으며, 이로부터 jar fermenter에서의 대량생산 가능성을 기대할 수 있었다.

요 약

*H. erinaceum*의 기능성 소재화 연구의 일환으로, 지금까지 체계적으로 연구된 바 없는 *H. erinaceum*의 액체배양을 시도하고. 이 버섯의 서로 다른 생물반응기하의 액체배양 특성을 규명하고 대량생산을 검토하였다. 5 L 용량의 jar fermenter와 air-lift fermenter에서의 액체배양의 비교실험을 통해 air-lift fermenter의 사용이 종균 배양에 적합한 것으로 나타났으며, 형태 분석을 통해 적정 크기 (2~4 mm)의 pellet 형태의 유지가 대량 생산의 중요인자인 것을 규명하였다. Air-lift fermenter 하의 배양을 종균으로 하고, 적정 크기의 pellet을 유지하는 500 L까지의 jar fermenter를 사용한 회분 배양의 scale-up 실험결과, 30 및 500 L에서의 교반 및 통기속도는 각각 200 rpm, 1 vvm 및 150 rpm, 1 vvm이었다. 이 조건하에서 배양의 전 기간 중 적정 pellet을 유지하였으며, 최대 균사체량은 약 13~14 g/L이었다.

REFERENCES

- Mizuno, T. (1995), Yamabushitake, *Hericum erinaceum*: Bioactive substances and medicinal utilization, *Food Reviews International* 11(1), 173-1752.
- Kawagishi, H., A. Shimada, R. Shirai, K. Okamoto, F. Ojima, H. Sakamoto, Y. Ishiguro, and S. Furukawa (1994), Erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericum erinaceum*, *Tetrahedron Letter* 35(10), 1569-1572.
- Grigansky, A. Ph., E. F. Solomko, and B. Kirchoff (1999), Mycelial growth of medicinal mushroom *Hericum erinaceum* (Bull.:Fr.) Pers. in pure culture, *International Journals of Medicinal Mushrooms* 1(1), 81-87.
- Lomberh, M. L., E. F. Solomko, A. S. Buchalo, and B. Kirchoff (2002), Studies of medicinal mushrooms in submerged cultures, In *Mushroom Biology and Mushroom Products*. H. P. Graciell, and A. V. Adalberto Eds.; Proceedings of the 4th International Conference of Mushroom Biology and Mushroom Products. Feb. 20-22, 2002, Hotel Villa Bejar, Cuernavaca, Mexico
- Braun, S. and S. E. Vecht-Lifshitz (1991), Mycelial morphology and metabolite production, *Trens in Biotechnol.* 9, 63-68.
- Lee, S. Y., T. S. Kang, and M. C. Lee (1998), Condition of exopolysaccharide production from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* by using air-lift fermenter system, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 13(5), 547-553.
- Lee, H. S., J. H. Jung, and S. Y. Lee (2001), Effects and batch kinetics of agitation and aeration on submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 16(3), 307-313.

8. Lee, S. Y. and K. M. Lee (2001), Influence of ammonium phosphate on mycelial morphology during submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*, *Korean J. Mycol.* **29**(2), 91-98.
9. Chisti, M. Y. (1989), *Airlift Bioreactors*. p33, Applied Science Co., New York,
10. Ryu, H. W., Y. K. Chang, and S. D. Kim (1994), Airlift Bioreactors, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **9**(4), 347-364.
11. Song, C. H. and K. Y. Cho (1987), A synthetic mmedium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*, *Mycologia* **79**(6), 866-871.
12. Lee, B. W., G. H. Im, D. W. Kim, K. M. Park, S. H. Son, and T. H. Shon (1993), Cultural characteristics and pilot scale fermentation for submerged mycelial culture of *Lentinus edodes*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**(6), 609-614.
13. Lee, S. Y., T. S. Kang, and M. C. Lee (1998), Condition of exopolysaccharide production from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* by using air-lift fermenter system, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**(5), 547-553.
14. Lee, K. M., S. Y. Lee, and H. Y. Lee (1999), Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in air-lift fermentor, *J. Biosci. Bioeng.* **88**(6), 646-650.
15. Lee, S. Y. and T. S. Kang (1996), Production condition and characterization of exo-polysaccharide production produced by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium, *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**(1), 111-118.
16. Lee, S. Y. and T. S. Kang (1997), Optimization of antitumor active exo- polysaccharide production through the submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium, *Kor. J. Biotech. Bioeng.* **12**(2), 139-145.
17. Cox, P. W. and C. R. Thomas (1992), Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis, *Biotechnol. Bioeng.* **39**(9), 945-952.
18. Chung, J. H., E. K. Lee, and S. Y. Lee (2006), Optimization of submerged cultivation of *Hericium erinaecum*, *Kor. J. Biotech. Bioeng.* **21**(2), 96-102.
19. Vahidi, H. and M. H. Tehrani (2002), Effect of agitation rate of the growth of *Mycena* sp. and production of antifungal agents, *Daru* **10**(1), 24-28.