

Lentinus edodes 액체배양을 통한 세포외 다당체 생산

이희환 · ¹조재열 · †홍억기
강원대학교 생물공학과, ¹바이오산업공학부
(접수 : 2007. 2. 2., 게재승인 : 2007. 2. 20.)

Exo-Polysaccharide Production from Liquid Culture of *Lentinus edodes*

Hee-Hwan Lee, Jae-Youl Cho¹, and Eock-Kee Hong[†]

Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

¹School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

(Received : 2007. 2. 2., Accepted : 2007. 2. 20.)

The optimum liquid culture conditions were investigated for cell growth and polysaccharide production from liquid culture of *Lentinus edodes*. In flask culture, the optimal medium compositions for the polysaccharide production contained glucose 60 g/L, yeast extract 10 g/L, KH₂PO₄ 2.0 g/L, and MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g/L. The maximum mycelial growth and polysaccharide production were 11.01 g/L and 1.64 g/L, respectively. In bioreactor, through the variation of aeration in order to increase mycelial growth and polysaccharide production, the maximum mycelial growth and polysaccharide production were 55.9 g/L at 8th day and 7.34 g/L at 7th day of cultivation with 1.5 vvm, respectively.

Key Words : *Lentinus edodes*, polysaccharide, mycelial growth

서 론

표고버섯 (*Lentinus edodes*)은 담자균류강 주름버섯목 느타리과 잣버섯속에 속하는 식용버섯으로 봄에서 가을에 걸쳐 주로 온대지방의 참나무류 등 활엽수의 나무토막, 그루터기위에 단생 또는 군생하는 목재 백색부후균이며 한국, 중국, 일본, 동남아시아, 뉴질랜드 등지에 분포되어 있고, 우리나라에서 가장 많이 재배되고 있는 임산버섯 중 하나이다(1). 표고버섯은 수분량이 많고 각종 아미노산, 비타민, 단백질, 당질, 섬유질 효소 무기질 등의 영양학적 가치와 표고만이 가지는 독특한 향으로 천연 조미 소재로도 연구가 되어지고 있고, 식품으로서 뿐만 아니라 강장, 이뇨, 고혈압, 신장염, 신경쇠약, 불면증, 천식, 위궤양 등의 치료에 효능이 있는 것으로 알려져 있다(2). 표고버섯의 약리효과는 자실체 뿐만 아니라 액체 배양액에서도 여러 효능을 가지는 물질이 확인되고 보고되어지고 있는데, 자실체 및 배양액에 존재하는 성인병 예방과 인터페론 생성을

촉진하는 다당체가 종양에 대한 생체고유의 방어력을 높여줌으로써 간접적으로 종양세포의 증식을 저해하거나(3), 암세포나 병원성균을 직접 사멸시키는 중요한 역할을 담당하는 대식세포의 수를 증가시키는 작용을 하는 것으로 보고되어 있다(4). 특히 다당류에 의한 항암효과는 암세포를 직접 파괴하며 세포독성을 나타내는 화학요법제와는 달리 정상세포의 면역증강효과에 기인하여 항암효과를 나타내기 때문에 최근에 그 중요성이 커지고 있다(5-7).

미생물의 세포외 다당류는 세포벽의 일부로서 세포벽 주위에 협막 (capsule)을 형성하거나 세포벽 외부에 점진물로서 (slime) 발효 중에 가장 다량으로 생성되는 다당류이며, 세포내 다당이나 세포벽 다당과는 달리 배양액으로부터 회수가 쉽고, 정제 비용이 적게 들므로 상업적인 잠재력이 가장 높은 다당류이다. 하지만 담자균류는 균사형태의 다양성, 비교적 느린 증식속도, 낮은 균체량 및 계대 배양의 불안정성으로 대량생산이 매우 어렵다(8). 일반적으로 사상균은 배지조성이나 배양조건 등에 따라 균사체의 생리가 변화되며, 그 결과로서 균사체 농도의 증가와 함께 필라멘트 또는 펠렛 형태의 다양한 균사형태 변화를 동반 한다. 또 배양액의 물성도 크게 변하여 물질전달 및 열전달 등의 전달현상에 큰 영향을 미치게 된다. 이러한 물성의 변화는 다시 균사생육 및 균사형태를 변화시키며, 결국 생성물의 생산성을 크게 변화시키는 등, 복잡한 상관관계

* Corresponding Author : Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

Tel : +82-33-250-6275, Fax : +82-33-243-6350

E-mail : ekhong@kangwon.ac.kr

를 갖게 된다(9, 10).

그러므로 본 연구에서는 새로운 생물산업소재 개발의 일환으로 *Lentinus edodes* 액체배양에서 C/N ratio 및 통기량 등 배양에 미치는 영향을 검토하여 세포와 다당체 생산량 증대를 목적으로 최적의 배양조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지조성

본 실험에 사용된 균주는 담자균류의 일종인 *Lentinus edodes* (KCTC6734)를 사용하였다. 보관용 배지로는 PDA (potato dextrose agar : pH 5.5)를 사용하였으며 4주마다 계대 배양하였다. 전배양에서 사용된 접종원은 glucose 20 g/L, yeast extract 5 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L의 조성을 갖는 YMK medium을 기본배지로 사용하여 5일간 배양한 후 homogenizer (Heidolph Co., DIAx 600)를 이용하여 균질화한 후 5 mL을 취하여 멸균된 glycerol 5 mL과 20 mL vial에서 혼합한 후 -70°C에서 냉동 보관하여 사용하였다.

배양조건

냉동 보관된 10 mL의 활성화된 stock solution을 YMK medium이 들어있는 250 mL 플라스크 (working volume 100 mL)에 접종하여 7일간 1차 전배양을 실시하고 2차 전배양은 1차 전배양액을 homogenizer (Heidolph Co., DIAx 600)를 이용하여 균질화한 후 1차 전배양액 10% (v/v)를 취하여 다시 접종하였으며 3일간 배양 후 본배양의 접종원으로 사용하였다. 플라스크 배양은 shaking incubator (Vision Scientific Co., VS-8480SR)에서 배양온도 25°C, 교반속도 150 rpm으로 하였으며 초기 pH는 조절하지 않았다.

생물반응기 배양은 5 L 생물반응기 (Korea Fermentor Co., KF-5L)에서 전배양액을 10%로 접종하여 배양온도 24°C, working volume 3 L로 하였으며, 공기의 주입속도는 0.5~1.5 vvm, 교반속도는 300 rpm, 그리고 초기 pH는 조절하지 않은 상태로 9일간 배양을 실시하였다. 배양기간 동안 pH는 조절하지 않았고, 필요에 따라 소포제를 첨가하였다.

분석방법

균체량 측정은 세포 배양액을 5000 rpm에서 20분간 원심분리하고 침전된 균사체를 중류수를 이용하여 3회 수세하였고, filter paper (Whatman #4)를 사용하여 여과한 후, 60°C에서 약 24시간동안 건조하였다. 건조된 균체는 desiccator에서 항량이 될 때까지 방치시킨 후 건조균체량 (dry cell weight, DCW)을 측정하였다. Polysaccharide 정량은 세포 배양액을 5000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체와 배양여액을 분리한 후 배양여액에 3배 부피의 ethanol 을 가하여 4°C에서 24시간 방치하였고, 상층에 위치하는 부유된 다당체를 filter paper (Whatman #4)를 사용하여 분리하였으며 dry oven에서 항량이 될 때까지 건조시켰다. 건조된 조다당체 (crude polysaccharide)를 desiccator에서 항량이 될 때까지 방치시킨 후 정량하여 배양액 부피당

crude polysaccharide량으로 표시하였다. 배양액 중의 잔존 glucose 농도는 세포 배양액을 5000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 1 mL씩 취하고 -20°C에서 냉동보관하여 시료로 사용하였다. 시료를 DNS (dinitrosalicylic acid) 시약으로 반응시켜 발색시킨 후 분광광도계 (GENESYS 5, Spectronic Co.)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시료로서 glucose를 사용하여 표준곡선을 작성하여 검량하였다.

결과 및 고찰

Flask 배양

경시변화

*Lentinus edodes*의 균사체 성장 및 polysaccharide 생성에 대한 특성을 검토하기 위하여 YMK medium 배지에서의 경시적 변화를 관찰하였다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 배양 중에 균체량은 배양 3일째까지 미미한 증가폭을 보이다가 배양 3일에서 6일째까지 조금 높은 증가폭을 보이고 8일째부터 서서히 감소하는 추세를 보였다. pH는 배양 중 조금씩 낮아지는 경향을 보였다. Glucose는 배양 하루가 지나면서 소비되기 시작하여 10일이 지나면서 약 9.4 g/L로 잔존하였다. Polysaccharide의 생성량은 균체가 성장하면서 같이 증가하여 균체성장이 멈추면 생성량이 줄어드는 growth-associated type의 양상을 띠는 것을 알 수 있었다. 최대 균체량은 배양 8일째 약 6 g/L이었고, polysaccharide 생성량은 배양 7일째 1.15 g/L로 가장 높았다.

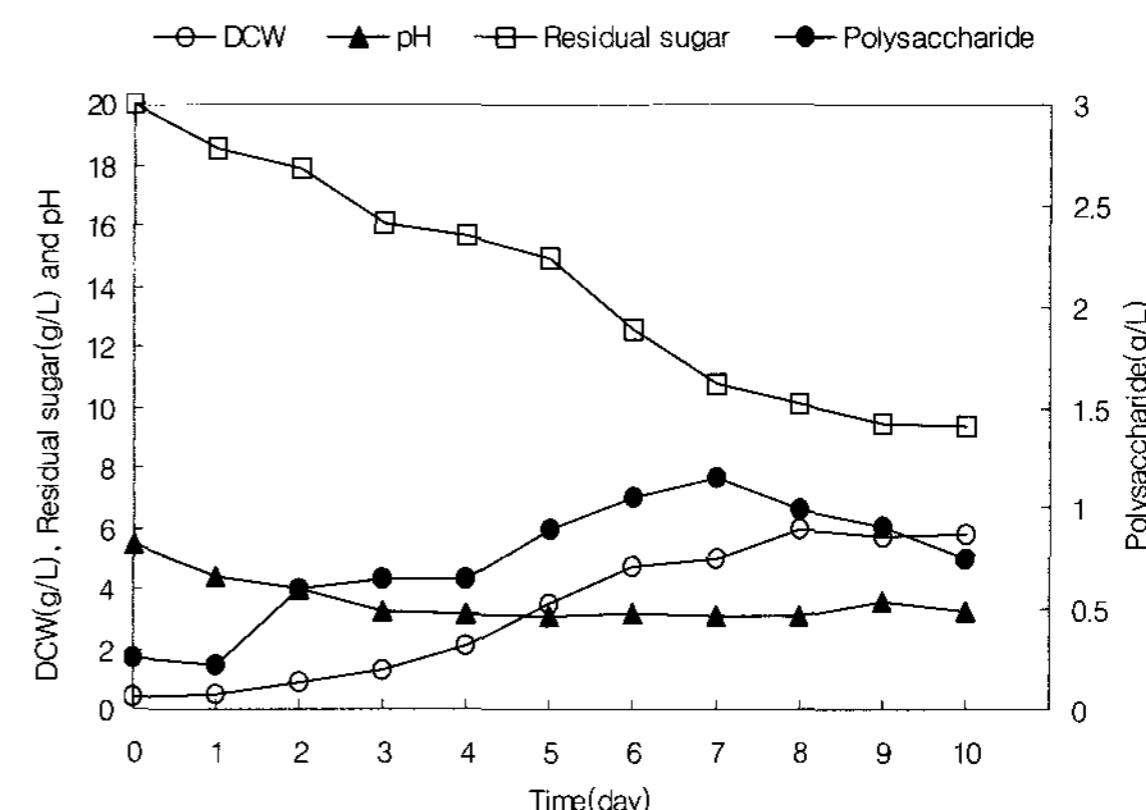


Figure 1. The profiles of the cell growth, polysaccharide production, pH, and residual sugar in YMK medium.

접종비, 배지액량, 온도 및 교반속도의 영향

Fig. 2는 최적의 배양조건을 알아보기 위하여 각각 접종비, 배지액량, 온도, 교반속도를 달리하여 그에 따른 균체량과 polysaccharide 생산량의 차이를 알아본 결과이다. (a)는 균체성장과 polysaccharide 생산에 미치는 접종량의 영향을 검토한 결과이다. 일반적인 균류의 최적 접종량은 5~10%로 알려져 있다. 실험결과 10%에서 최대의 균체성장과 polysaccharide 생산량을 보였다.

(b)에서는 250 mL 용량의 삼각플라스크에서 배지액량을

달리하여 실험한 결과이다. 통기량이 좋을수록 즉, 배지액 량이 적을수록 균체량과 polysaccharide의 양이 증가하였다. 배지액량이 증가할수록 균체량은 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 polysaccharide의 감소량은 배지액량 100 mL까지는 별다른 차이를 보이지 않았다. 일반적으로 polysaccharide의 생산균주는 충분한 산소공급 하에서 목적 산물의 생산량이 높은 것으로 알려져 있다.

(c)는 균체성장 및 polysaccharide 생성에 미치는 배양온도의 영향을 규명하고자 배양온도를 22~30°C로 달리하여 실험을 실시한 결과를 나타낸 것이다. 24°C에서 균체량과 polysaccharide 생성량 모두 가장 높은 값을 나타내었다. 일반적으로 담자균류의 균체배양은 20~35°C의 온도범위에서 는 양호하다고 보고되고 있으나, 본 균주는 24°C 이상의 배양온도에서는 균체성장 및 polysaccharide 생성이 모두 조금씩 감소하는 결과를 나타내었다.

(d)는 shaking incubator의 교반 속도에 의한 영향을 검토한 것이다. 교반속도가 높아질수록 높은 균체량의 증가를 보였고 polysaccharide 역시 증가하는 양상을 보였다. 100 rpm과 그 이하의 rpm에서는 균체성장과 polysaccharide 생성량이 둔해지며 pellet size가 커지는 현상을 보였다. 이는 낮은 교반속도로 인하여 pellet size가 커져 균사체 내로의 산소전달 및 배지의 영양성분의 효과적인 공급에 저해를 받은 것으로 판단된다. 300 rpm에서 가장 높은 균체량

7.78 g/L와 polysaccharide 1.15 g/L을 보였다.

앞서 실험한 배지액량과 교반속도가 미치는 영향을 고려해 볼 때 본 균주는 통기량을 높여 산소를 원활히 공급 할수록 많은 polysaccharide를 생산해 내는 호기적 균주인 것으로 판단된다.

C/N ratio의 영향

Fig. 3은 균체 성장과 polysaccharide 생성에 있어서 가장 중요한 요소 중의 하나인 C/N ratio의 영향을 검토하기 위하여 glucose의 농도를 40, 60, 80 g/L, yeast extract의 농도를 5, 10, 15, 20 g/L로 각각 변화를 주어 균체성장과 polysaccharide의 생성을 조사한 결과이다. 배양조건은 접종량 10%이며, 24°C, 300 rpm으로 하고 초기 pH는 조절하지 않았으며, 배양 7일후 균체량과 polysaccharide 생성량을 측정하였다.

(a)와 (b)는 glucose와 yeast extract의 농도를 각각 달리하여 균체량과 polysaccharide의 생성량을 알아본 결과이다. 균체량과 polysaccharide 생성량 모두 glucose 농도가 60 g/L이며 yeast extract의 농도가 10 g/L일 때 높게 나타났다.

(c)와 (d)는 (a)와 (b)에서의 결과를 C/N ratio로 나타낸 결과이다. C/N ratio가 4~6 사이에서는 균체량 뿐만 아니라 polysaccharide 생성량 역시 높아지고 C/N ratio가 그 이하이거나 그 이상이 되면 점점 더 낮아지는 경향을 알 수 있

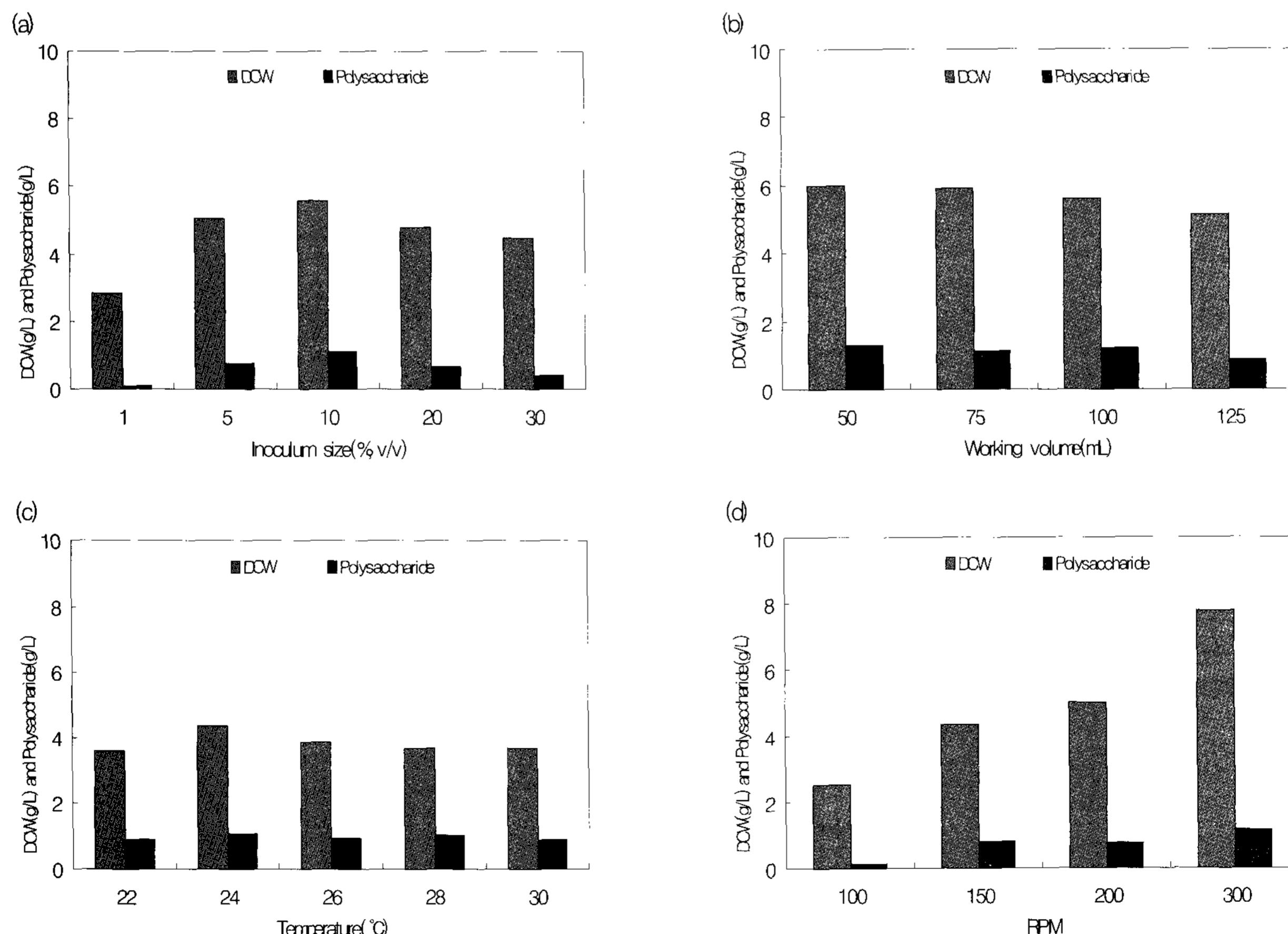


Figure 2. The effects of (a) inoculum size, (b) working volume, (c) temperature and (d) rpm on cell growth and polysaccharide production in YMK medium.

었다. (c)에서와 같이 최대 균체량은 C/N ratio 6일 때 12.55 g/L이었고, (d)에서와 같이 최대 polysaccharide 생산량은 역시 C/N ratio 6일 때 1.76 g/L로 나타났다.

일반적으로 많은 세균과 일부 곰팡이에서 C/N ratio가 높아야 다당류의 생산이 향상되었고, 다당류의 생산은 질소원 제한에 의하여 촉진된다고 보고되어 있다(11). 그러나

본 실험에서는 C/N ratio가 6이 넘어가면서 균체량과 polysaccharide 양이 점점 감소하는 것을 알 수 있었다. 이는 고농도의 배지가 균체와 polysaccharide의 생성을 방해한 것으로 판단되어진다. 또한 yeast extract가 질소원 뿐만 아니라 다른 성분도 포함하고 있기 때문에 yeast extract는 균체성장과 polysaccharide 생산에 어느 정도의 농도까지는

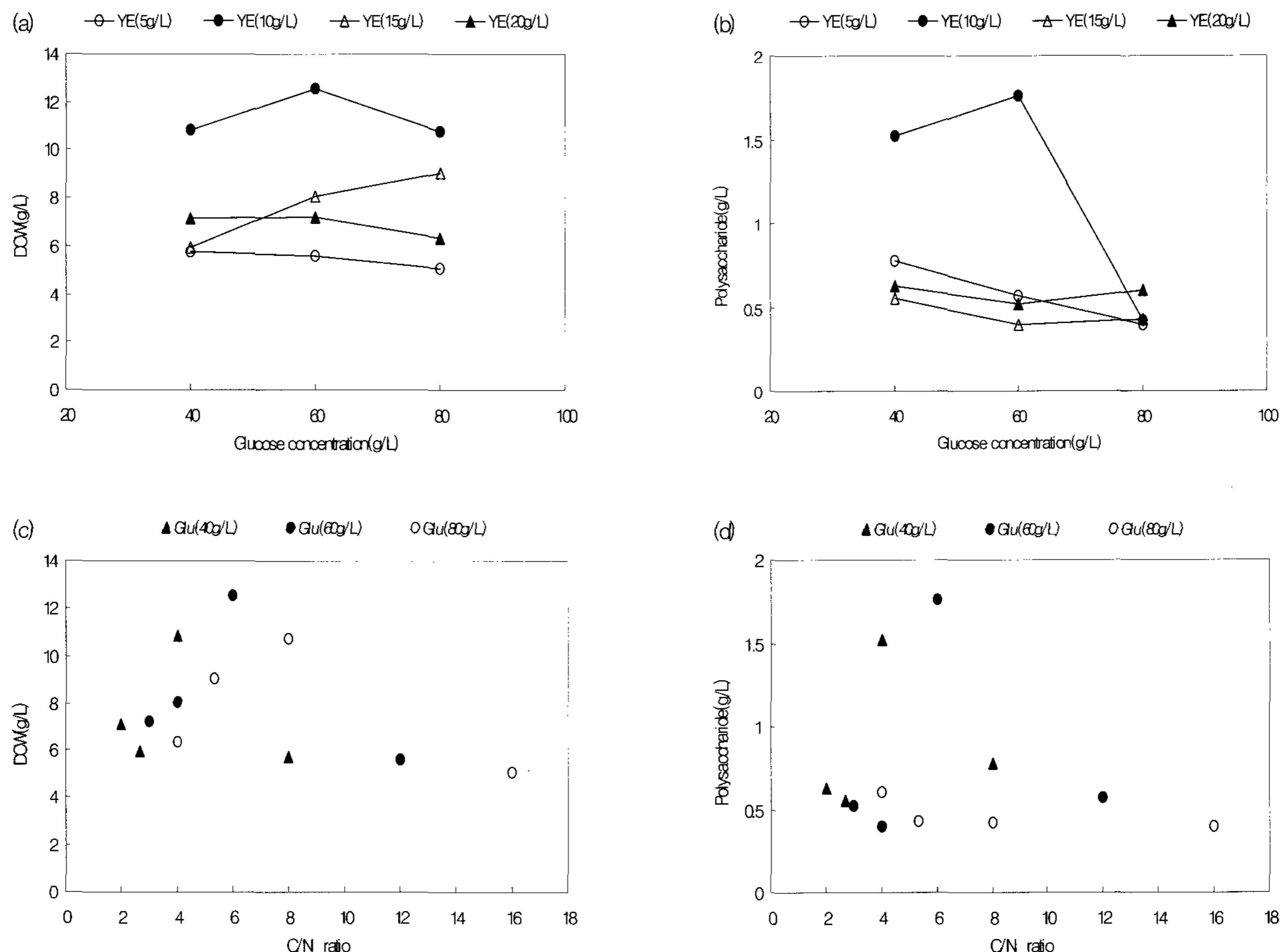


Figure 3. The effects of glucose and yeast extract concentrations and C/N ratio on cell growth (a, c) and polysaccharide production (b, d) in YMK medium.

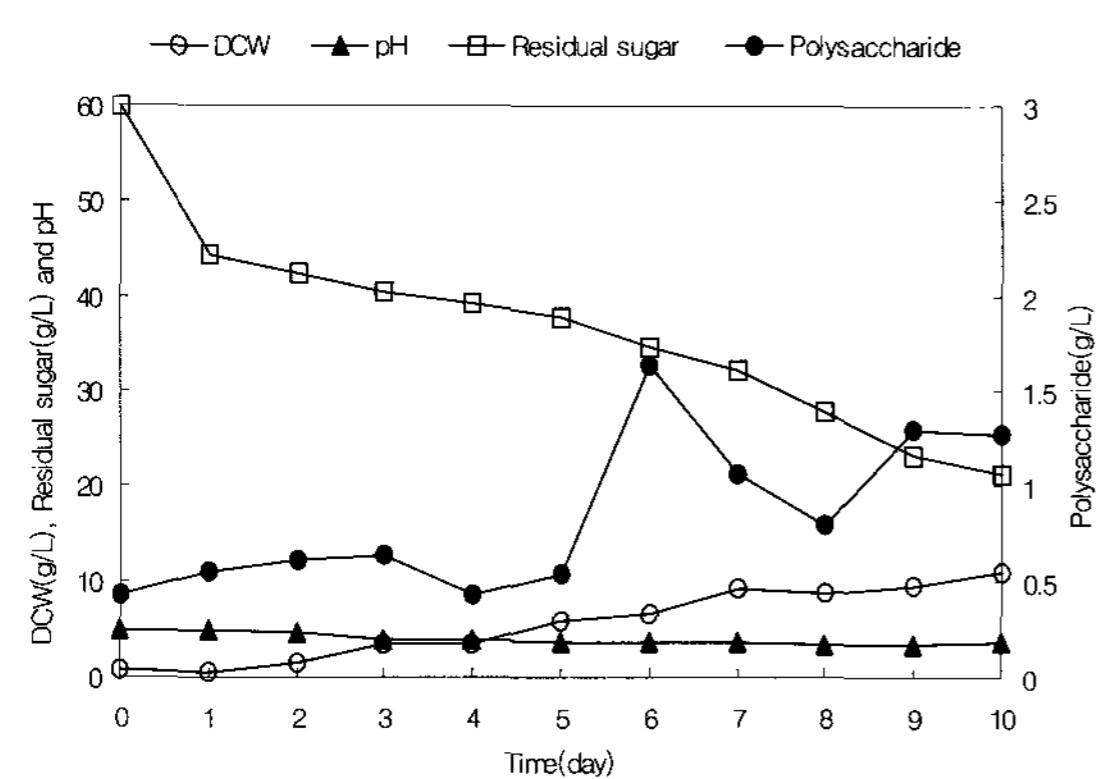


Figure 4. The profiles of the cell growth, polysaccharide production, pH, and residual sugar in flask culture with modified medium.

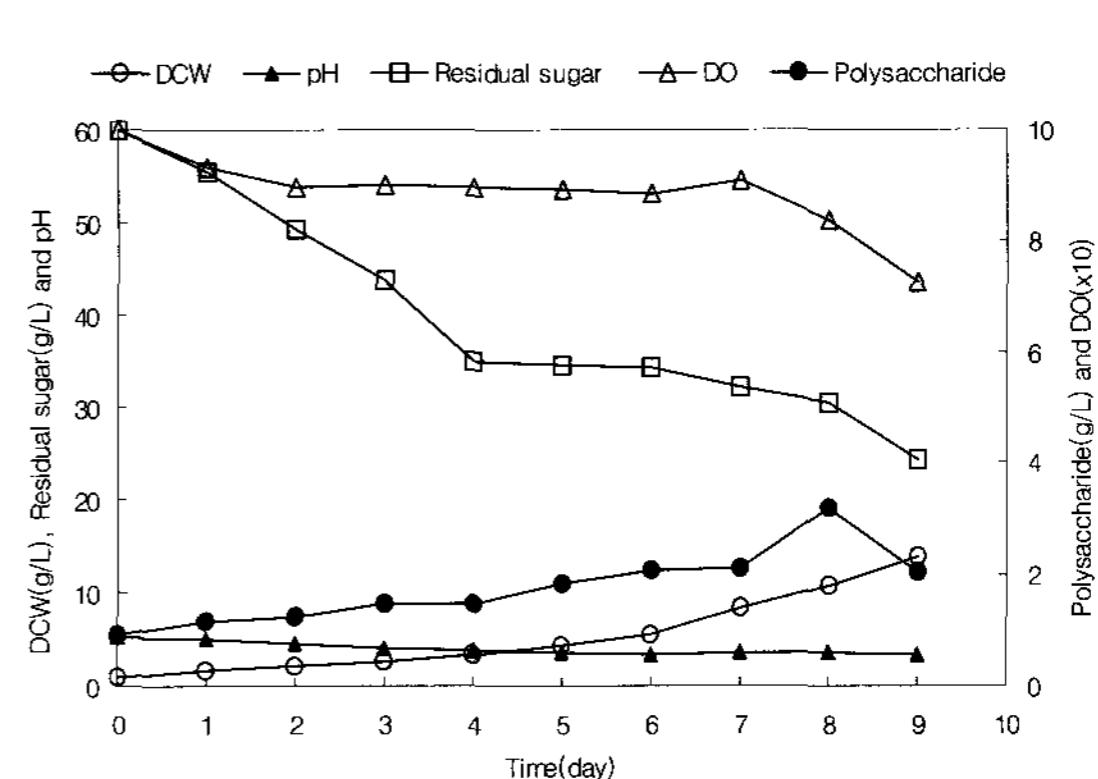


Figure 5. The profiles of the cell growth, polysaccharide production, pH, DO and residual sugar in 5 L fermenter culture with 0.5 vvm.

좋은 영향을 미치는 것으로 판단되어진다.

이와 같은 결과를 토대로 균체량과 polysaccharide 생성량의 수율이 가장 좋은 C/N ratio가 6인 glucose 60 g/L와 yeast extract 10 g/L를 최적의 농도로 결정하였고, Fig. 4는 이러한 배지조성을 바탕으로 한 modified medium으로 flask 배양을 한 결과이다. 이 때 최대 균체량은 11.01 g/L이었으며, polysaccharide 생성량은 1.27 g/L이었다.

Fermenter 배양

경시변화

회분배양의 배양조건은 5 L 생물반응기에서 working volume을 3 L로 하여 접종량 10%, 배양온도 24°C, 교반속도는 300 rpm으로 하였으며, 통기량은 0.5 vvm으로 배양하였다. 회분배양의 배지는 modified medium으로 하여 배양을 실시하여 Fig. 5에 경시변화를 나타내었다. 균체 성장은 배양 9일까지 계속적인 성장을 보였고 그중 6일째부터 활발한 성장을 이루었다. 배양 9일째 13.74 g/L로 가장 높은 균체량을 나타내었으며, 배양 8일째 가장 높은 3.19 g/L의 polysaccharide를 얻었다. pH의 변화수준은 flask 배양에서와 거의 비슷하게 균체가 증가하면서 조금씩 낮아지는 경향이 나타났다. 잔존당 역시 flask 배양과 유사하게 감소하였으나 배양초에서 4일까지에 감소폭이 배양후기보다 조금 큰 특징을 보이며, 9일째 24.2 g/L로 꾸준히 감소하는 경향이 나타났다. 하지만 그다지 많은 양을 소비하지는 못하였다.

본 배양에서 균체가 배양 9일째까지 낮은 증가폭으로 지속적인 상승을 보이는데, 이는 배양시 빠른 균체성장을 위한 일부 조건들이 충족되지 못하여 원활한 균체성장이 저해를 받는 것으로 판단되며, 그로 인해 polysaccharide의 생성량도 낮은 것으로 판단된다.

통기량의 영향

앞에서의 플라스크 배양 실험에서 본 균주가 호기성 균주일 것이라는 판단 하에 회분배양에서 통기량에 차이를 두어 polysaccharide의 생성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

Fig. 6과 Fig. 7은 각각의 통기량을 1 vvm과 1.5 vvm으로 달리하여 실험한 결과이다. 통기량이 높을수록 보다 높은 균체량과 polysaccharide의 생산량을 보였다. 균체의 증가와 더불어 polysaccharide의 양도 증가하였고, 균체량의 대수 증식기가 끝나면 polysaccharide의 양은 서서히 감소하는 경향을 보였다. pH는 배양이 진행되면서 조금씩 감소하는 경향을 보였고, 통기량이 높을수록 감소량이 조금 더 커졌는데 유의적인 차이는 없었다. 잔존당 역시 배양기간동안 조금씩 낮아졌지만 통기량에 따른 차이는 찾아보기 힘들었고, 0.5, 1.0, 1.5 vvm 모두 많은 당을 소모하지는 못하였다.

1 vvm(Fig. 6)에서는 배양 4일째부터 균체량이 큰 폭으로 증가하기 시작하였고, polysaccharide의 양은 소폭의 증감을 보이다가 5일째부터 증가하여 8일째 최대 균체량과 polysaccharide 량을 나타내었으며 각각 33.28 g/L과 4.44 g/L 이었다. DO값은 배양 7일째까지 서서히 감소하다가 8

일째 급격히 감소하였다가 다시 증가하기 시작하였다. 급격히 감소할 때 배양액의 점도가 급격히 높아졌고 이것으로 인하여 공기의 공급이 원활하지 못하였으며 wall growth 현상이 심하게 나타나 이 이후의 DO값은 실제 배양환경의 DO값으로 단정지울 수 없을 것으로 판단되며 이런 현상은 고점성을 지니는 플루란의 생산에서도 보고되었다(12).

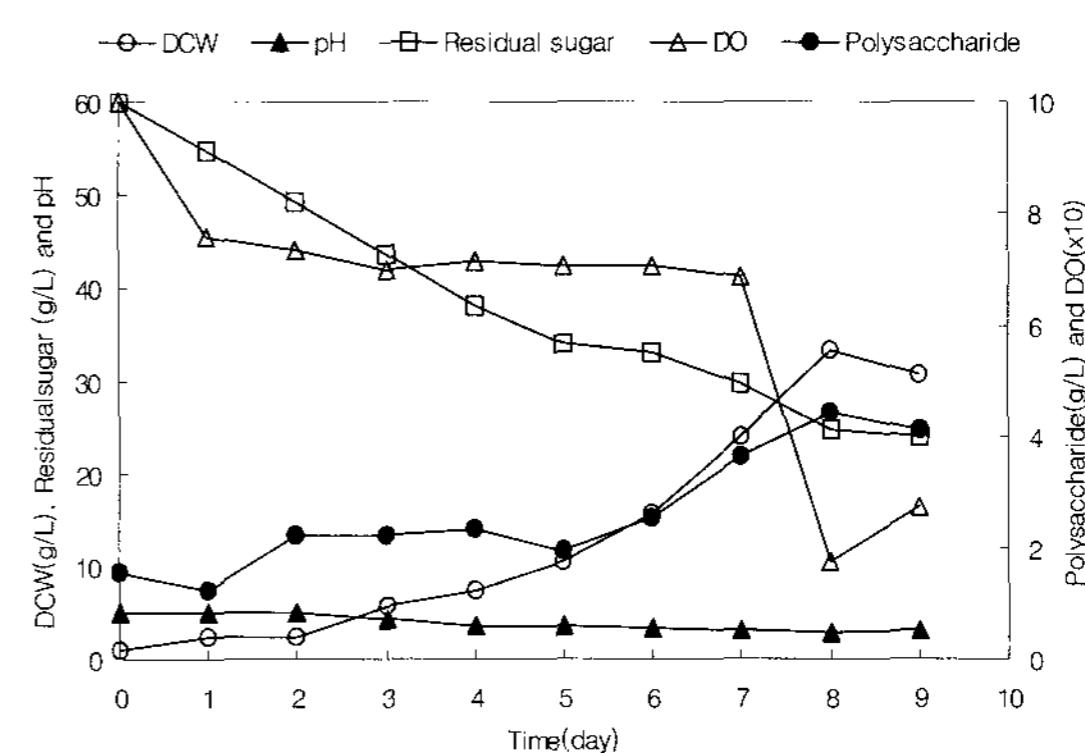


Figure 6. The profiles of the cell growth, polysaccharide production, pH, DO and residual sugar in 5 L fermenter culture with 1 vvm.

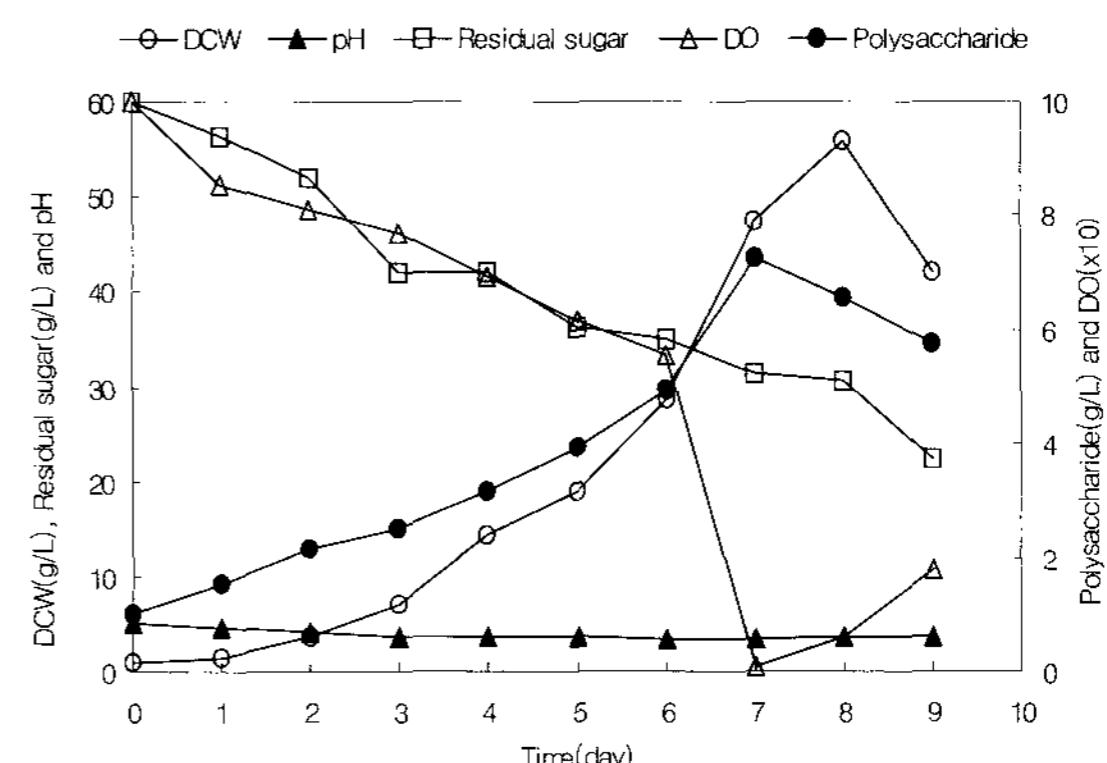


Figure 7. The profiles of the cell growth, polysaccharide production, pH, DO and residual sugar in 5 L fermenter culture with 1.5 vvm.

1.5 vvm(Fig. 7)에서는 배양 3일째부터 균체량이 큰 폭으로 증가하여 8일째 최대량을 나타내었고 그 후로 감소하였다. Polysaccharide의 양은 지속적으로 증가하는 양상을 보이다가 7일째 최대량을 나타내었고 그 후로 감소하였다. 그 값은 균체량 55.9 g/L이었고 polysaccharide량 7.24 g/L 이었다. DO값은 1 vvm에서와 같은 양상으로 서서히 감소하다가 7일째 큰 폭으로 감소한 후 다시 증가하기 시작하였다.

통기량에 따른 그림을 비교해보면 통기량이 증가할수록 균체의 성장속도가 빨라지고 그 생성량도 많아지는 것을 확인할 수 있다. 그에 따라 polysaccharide의 최대 생성량도 많아지고 최대량을 나타내는 배양일수도 단축되는데, 1 vvm에서의 최대량은 배양 8일째이지만 1.5 vvm에서는 배양 7일째로 하루 앞당겨졌다. 하지만 Fig.에 나타내지는 않았지만 통기량이 더 높아지면 심한 wall growth와 form

생성으로 배양이 힘들었으며 균체량과 polysaccharide의 생성량 역시 낮아지는 결과를 보였다.

위의 실험결과로 최대 polysaccharide 생산을 가지는 최적 조건의 배지조성은 glucose 60 g/L, yeast extract 10 g/L, KH₂PO₄ 2.0 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g/L이었고, 배양 조건은 24°C, 300 rpm, 1.5 vvm으로 나타났다. 그때 최대 균체량은 8일째 55.9 g/L이었고 polysaccharide의 최대생성량은 7일째 7.24 g/L 이었다. 이는 Park과 Lee(13)의 보고와 Lee 등(14)의 보고된 내용보다 최대값을 보이는 균체 배양일수가 빠르고 생산량 또한 높게 나타났다.

요 약

*Lentinus edodes*의 액체배양을 통하여 균사체 및 polysaccharide의 최적 생산조건을 조사하였다. 플라스크 배양을 통하여 검토된 균체량 및 polysaccharide 생성을 위한 최적 배지의 조성은 glucose 60 g/L, yeast extract 10 g/L, KH₂PO₄ 2.0 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g/L이었다. 최대 균체량은 배양 10일째 11.01 g/L이었으며 최대 polysaccharide 생성량은 배양 6일째 1.64 g/L를 나타내었다.

생물반응기를 이용한 회분배양에서 균사체와 polysaccharide 생산량을 증가시키기 위하여 통기량을 조절하였다. 그 결과 통기량이 증가할수록 균체량과 polysaccharide의 생성량이 증가하였다. 결과적으로 통기량을 1.5 vvm으로 하여 배양하였을 때 배양 8일째 55.9 g/L의 균체량과 배양 7일째 7.34 g/L의 polysaccharide로 최대생성량을 얻을 수 있었다.

감 사

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Sung, J. M., Y. B. Yu, and D. Y. Cha (1998), *Mushroom Science*, p393, Kyo-Hak Publishing Co., Ltd., Seoul.
- Lee, J. Y. and S. W. Hong (1985), *Illustrated Flora & Fauna of Korea*, Vol. 28, Ministry of Education, Seoul.
- Chihara, G. (1985), Immune modulation agents and their mechanisms (Lentinan, a T-cell oriented immunopotentiator), *NY and Basel*. **19**, 409-436.
- Takehara, M. (1979), Antiviral activity of virus-like particles from *Lentinus edodes* (Shiitake), *Arch Virol*. **59**, 269-280.
- Mori, H., K. Aizawa, T. Inakuma, A. Ichii, R. Yamauchi, and K. Kato (1998), Structural analysis of the β-D-glucan from the fruit-body of *Hericium erinaceum*, *J. Appl. Glycosci.* **45**, 361-365.
- Wang Z., D. Luo, and Z. Liang (2004), Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceus Pers*, *Carbohydrate Polymers* **57**, 241-247.
- Oh-Hashi, F., T. Kataoka, and S. Tsugagoshi (1976), Effect of combined use of anticancer drugs with a polysaccharide preparation, Krestin, on mouse leukemia P388, *Gann*. **67**, 713.
- Samamoto, R., T. Niimi, and S. Takahashi (1978), Effect of carbon and nitrogen sources on submerged culture of edible fungi, *Agric. Biol. Chem.* **52**, 75-81.
- Braun, S. and S. E. Vecht-Lifshitz (1991), Mycelial morphology and metabolite production, *Trends in Biotechnol.* **9**, 63-68.
- Roles, A. J., V. Verg, and R. M. Voncken (1974), Rheology of mycelial broth, *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 181-208.
- Choi, J. H., S. Y. Kim, D. K. Oh, and J. H. Kim (1998), Optimization of culture conditions for production of a high viscosity polysaccharide, methylan, by *Methylobacterium organophilum* from methanol, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 244-249.
- Yang, S. N., S. W. Beak, and N. K. Kim (2000), Effect of aeration and agitation rates on pullulan production, *J. Kor. Indus. Chem. Eng.* **38**, 556-559.
- Park, K. S. and B. L. Lee (1997), Extraction and separation of protein-bound polysaccharide by *Lentinus edodes*, *Kor. J. Food Nutr.* **10**, 503-508.
- Lee, B. W., G. H. Im, D. W. Kim, K. M. Park, S. H. Son, and T. H. Shon (1993), Culture characteristics and pilot scale fermentation for the submerged mycelial culture of *Lentinus edodes*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 609-614.