

영지(*Ganoderma lucidum*) 균사체의 액체배양에 의한 세포외 생물고분자의 생산조건과 특성

이신영* · 강태수

강원대학교 발효공학과, 연세대학교 생물산업소재연구센터

Production Conditions and Characterization of the Exo-biopolymer Produced by Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum* Mycelium. Shin-Young Lee* and Tae-Su Kang. Department of Fermentation Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea - For the screening and the development of the new bio-material, cultural conditions for the exo-biopolymer (EBP) production through the submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium were investigated. Also, the fractionations and the purifications of the exo-biopolymer were carried out and the chemical compositions of the exo-biopolymer were examined. The optimal culture conditions for the exo-biopolymer production were pH 5.0, 30°C and 100 rpm of agitation speed in the medium containing of 5% (w/v) glucose, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.1% (w/v) (NH₄)₂HPO₄, and 0.05% (w/v) KH₂PO₄. In the flask cultivation for 7 days under these conditions, the concentration of the maximum exo-biopolymer and the cell mass were 15.4 g/l and 18.8 g/l, respectively. The specific growth rate was 0.039 hr⁻¹. In addition, the substrate consumption rate, and the exo-biopolymer production rate were 0.043 gg⁻¹hr⁻¹ and 0.025 gg⁻¹hr⁻¹, respectively. The exo-biopolymer was fractionated into BWS (water soluble exo-biopolymer) and BWI (water insoluble exo-biopolymer) by the water extraction, and the sugar contents of two fractions were higher than 97% (based on dry basis). The components sugar of BWS and BWI fractions were glucose, galactose, mannose, xylose, and fucose. Their molar ratios were 3.6 : 1.5 : 2.1 : 0.5 : trace and 2.9 : 3.1 : 2.0 : 1.6 : 0.3, respectively.

Ganoderma lucidum(靈芝)은 다공균과 불로초속에 속하는 담자균의 한 종(species)으로, 옛부터 한방 및 민간 생약의 우수상품약으로서 사용되어 왔다(1-3). 최근에는 암 등의 난치병에도 효과가 있음이 밝혀지고 있으며, 점차 영지버섯의 자실체나 균사체 추출물이 체질개선 및 각종 병의 예방 효과 등으로 건강식품이나 의약품의 소재로서 그 용도가 증가하고 있는 실정이다(4). 특히, 영지버섯 유래의 다당류는 암세포에 대한 직접적인 작용보다는 숙주의 면역능을 활성화하여 제암작용을 나타내므로 독성 및 부작용이 거의 없는 장점을 갖고 있어 이에 대한 유용성분의 추출, 분리 및 정제공정의 개발에 대한 연구의 필요성이 매우 높은 실정이다(5). 따라서 근년에는 영지 유래의 항암활성 다당류를 얻기 위하여 영지 균사를 액체배지에 접종하고 심부배양을 행하는 연구들이 활발히 시도되고 있다(6-8).

버섯류의 액체배양은 1948년 미국에서 Humfeld(9)가 *Agaricus campestris*에 대해 최초로 시도한 이래, 1952년에는 Humfeld와 Sugihara(10)가 역시 *Agaricus campestris*의 액체배양을 행하였고, 1963년에는 Litchfield 등(11)이, 그리고 1968년에는 Torev(12)가 당밀을 이용한 느타리버섯의 액체배양을 각각 시도하였다. 영지버섯의 액체배양은 80년대 이후 시도되기 시작하여 Sone 등(6),

Tseng 등(7) 및 강 등(8)에 의한 연구 보고가 있으나 이들 대부분의 연구는 균사체 추출물에 대한 성분조사 및 생물활성 탐색에 국한하였다. 만약 세포외로 세포내 다당류와 같은 생물 활성 및 약리효능을 갖는 생물고분자가 분리된다면 균사체로부터의 추출 공정이 생략되어 경제성이 높은 생물고분자의 산업적 생산도 가능할 것으로 생각되나, 세포외 다당 생산을 목적으로 한 액체배양에 관한 연구는 거의 이루어진 바 없다.

따라서 본 연구에서는 새로운 생물산업소재의 개발, 연구의 일환으로 영지균사체의 액체배양을 통하여 세포외 생물고분자를 생산하고, 이의 생산조건 및 배지조성을 검토하였으며, 아울러 생물고분자를 분획정제하여 성분 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

균주는 *Ganoderma lucidum*(영지 1호)이며, 수원 농촌진흥원으로부터 분양받아 사용하였다. Potato 10 g/l, glucose 50 g/l, peptone 5 g/l, yeast extract 5 g/l, K₂HPO₄ 1.5 g/l, MnSO₄ 0.5 g/l, agar 15 g/l의 조성을 갖는 P.D.A. (potato dextrose agar : pH 5.5) 배지(13)에서 30°C로 7일간 배양한 후 4°C에서 보존하였으며, 8주 마다 계대배양하면서 사용하였다.

종균용 및 본배양용 액체배지는 glucose 50 g/l, malt

*Corresponding author.

Key words: *Ganoderma lucidum*, submerged cultivation, exo-biopolymer

extract 4 g/l, yeast extract 1 g/l, K₂HPO₄ 0.5 g/l, KH₂PO₄ 0.5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/l의 조성을 갖는 Sone 등(6)이 *Ganoderma applanatum*의 진탕배양용 배지(pH 6.8)로, pH는 0.1N HCl 또는 0.1N NaOH로 조절하였다.

배양 방법 및 조건

종균배양은 P.D.A. 평판배지에서 생육한 균사체를 직경 5 mm의 mycelium disk를 만든 다음, 본배양 배지 20 ml를 넣은 100 ml 삼각 플라스크에 접종하고, 30°C에서 7일간 진탕배양하였다. 다시 이 배양액 5%(v/v)를 본배양 배지 50 ml를 함유한 250 ml의 삼각 플라스크에 접종하고 30°C에서 4일간 회전 진탕배양하여 종균배양액으로 하였다.

본 배양은 종균 배양액을 균질기(homogenizer, 동양(주) model 0820)로 균질화 시킨 후 본 배양배지 50 ml를 함유한 250 ml의 삼각 플라스크에 접종하여 30°C에서 100 rpm으로 7일간 회전 진탕배양하였다.

접종비의 영향은 접종비를 1~9%(v/v)로 변화시켜서 조사하였고, 배지액량의 영향은 250 ml 삼각 플라스크에 배지용량을 5~50%(v/v)로 변화시켜서 검토하였다. 또 교반속도의 영향은 접종비 및 배지액량의 실험결과를 이용하여 교반속도를 0~250 rpm으로 조사하였으며, 이때 pellet의 크기는 grid를 이용하여 측정하였다.

pH의 영향은 초기 pH의 범위가 4~8이 되도록 조절하여 검토하였으며, 온도의 영향은 20~40°C의 범위에서 7일간 진탕배양한 후 조사하였다. 이상의 조건을 이용하여 10일간 배양하면서 경시변화에 따른 영향을 검토하였다.

배지 조성

탄소원의 영향은 기본배지 조성에서 glucose 대신 각종 탄소원을 5%(w/v) 농도로 첨가하여 30°C에서 7일간 진탕배양하고 균사체 및 생물고분자의 건조중량을 측정하여 조사하였다. 질소원의 영향은 최적 탄소원 농도하에서 기본배지의 질소원 대신 각종의 질소원을 0.5%(w/v) 첨가하여 탄소원에서와 마찬가지로 방법으로 조사하였다.

한편, 무기염류의 영향은 위의 배지조성 검토 결과를 이용하여 탄소원과 질소원을 고정하고 각종의 무기염류를 0.15%(w/v) 농도로 첨가하여 조사하였다.

이상의 최적 배지조성으로 배양시간에 따른 기질소비량, 균체생육 및 생물고분자 생산량의 변화 등을 조사하였으며, 대수기에서 비생육속도 μ , 비생산속도 q_p , 비기질소모율 q_s , 균체수율 $Y_{x/s}$, 생산수율 $Y_{p/s}$ 등의 각종 동력학적 매개변수값들을 각각 구하였다(14).

분석방법

균체량은 배양액을 2500×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 균사체를 증류수로 2~3회 수세하고, 60°C에서 24

시간 건조한 다음 건조중량을 측정하여 정량하였고, 세포의 생물고분자는 원심분리하여 얻은 여액에 2배량의 acetone을 가하여 침전물을 얻었으며, 60°C에서 24시간 건조한 다음 구하였다.

배양액중의 잔존 glucose 농도는 DNS(dinitrosalicylic acid)법(15)을 이용하여 575 nm에서 흡광도를 구한 후, 각각 표준곡선으로부터 환산하여 구하였으며, 전당은 phenol-sulfuric acid법(16)을 이용하여 정량하였다. 또, 단백질은 Lowry법(17)을 이용하여 표준물질인 BSA(Bovine serum albumin)를 여러농도로 조제하여 정량하고 이로부터 얻은 표준곡선을 이용하여 구하였다.

한편, 생물고분자의 정색반응은 시료(BWS, BWI, MWS)를 용해 또는 가수분해하여 0.1%(w/v) 농도로 조제하고 Anthrone 반응을 비롯하여 Fehling 반응, Carbazole-sulfuric acid 반응, 요오드-전분반응, Ninhydrin 반응, Elson-Morgan 반응, Biuret 반응 및 Seliwanoff 반응 등을 상법(18, 19)에 따라 발색시켜 관찰하였다.

또, 구성당은 이 등(20)의 방법에 따라 시료를 가수분해시킨 후 TMS(trimethylsilylation)화하여 gas liquid chromatograph(Varian Star 3400CX)로 분석하였으며, 이때 3% OV-101 packed column을 사용하여 0.2 cm/min의 chart speed로 분석하였다.

분리 및 정제

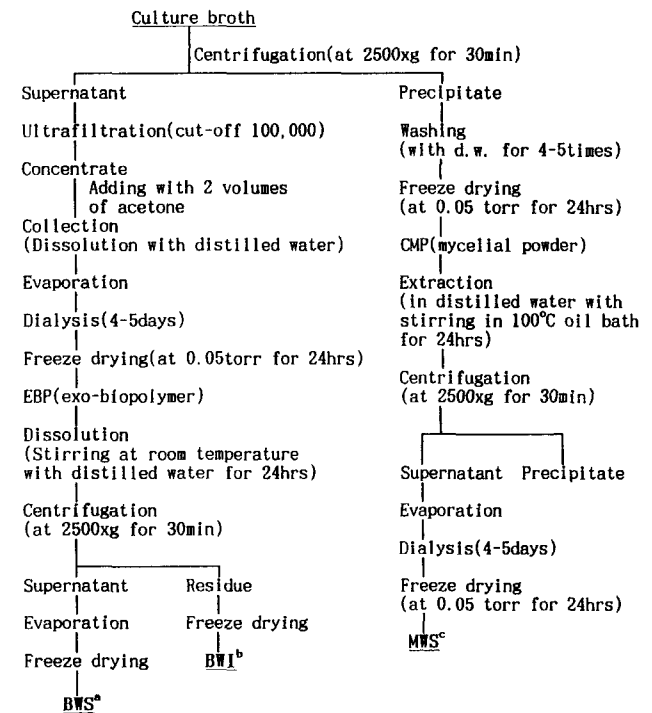


Fig. 1. Fractionation and purification of biopolymers.
^aBWS: water soluble exo-biopolymer from culture fluid.
^bBWI: water insoluble exo-biopolymer from culture fluid.
^cMWS: water soluble biopolymer from mycelial cell.

배양여액 및 균사체추출물로부터의 생물고분자는 Fig. 1과 같이 분리, 정제하였다.

배양액을 원심분리하여 얻은 상등액을 Ultrafiltration system(Sartocon Mini SM 17521, Germany)으로 배제 분자량(molecular weight cut-off)이 100,000인 여과막을 사용하여 농축한 여액에 2배량의 acetone을 가하여 침전물을 얻었다. 침전물을 농축하여 4~5일간 투석하고 0.05 torr에서 48시간 동안 동결건조하여 세포외 생물고분자(exo-biopolymer, EBP)로 하였다. 이를 다시 실온의 증류수로 24시간동안 교반 용해한 후 상등액 및 침전물로부터 수용성의 세포외 생물고분자(water soluble biopolymer from culture fluid, BWS) 및 불용성 분획(water insoluble exo-biopolymer from culture fluid, BWI)을 각각 얻었다.

한편, 균사체 추출물은 원심분리하여 얻은 침전물로부터 균사체를 얻고 이를 증류수로 수 회에 걸쳐 수세하고 동결건조하여 황색의 균사체 분말(crude mycelial powder, CMP)을 얻었다. 이를 100°C의 oil 수조내에서 24시간 동안 증류수로 환류추출하여 상등액을 농축하고, 4~5일간 투석한 다음, 동결건조하여 황색의 수용성 균사체 추출분획(water soluble biopolymer from mycelial cell, MWS)을 얻었다.

정제도 검정

생물고분자 시료들의 정제도는 이중면역 확산법(two dimensional immunodiffusion test)(21)을 이용하여 확인하였다.

Petri-dish(60×15 mm)에 1%(w/v)의 agarose(0.85% saline buffered with 0.1M sodium phosphate, pH 7.2)를 부어 agar plate를 만들고 스텐레스 스틸 실린더(ID 0.65×L 0.7 cm)를 올려 놓았다. 여기에 다시 agarose를 부어 이중의 plate를 만든 후, 핀셋으로 실린더를 제거한 다음, Concanavalin A(Con A) 및 각 시료를 여러농도(1~9 mg/0.15M NaCl)로 조제하여 well에 분주하고 20~25°C에서 12~24시간 반응시키며 침전 band의 유무 및 형태를 관찰하여 정제의 정도를 조사하였다.

결과 및 고찰

세포외 생물고분자의 생산조건

세포외 생물고분자의 생산을 위한 배양조건을 알아보기 위하여 접종비, 배지액량, 교반속도, pH 및 온도의 영향을 검토하였으며, 그 결과를 종합하여 Table 1에 나타내었다.

세포외 생물고분자 생산의 최적 접종비는 5%(v/v)로 접종비가 증가할수록 균체생산도 증가하였으나 7%(v/v) 이상에서는 거의 일정하였다. 또 배지액량은 10%(v/v)일 때 가장 높은 균체 및 생물고분자 생산량을 나타내었으며, 그 이상으로 액량이 증가하면 균체 및 생물고분자

Table 1. Optimal culture conditions for the production of exo-biopolymer

Inoculum size	5%(v/v)
Medium volume	10%(v/v)
Agitation speed	100 rpm
pH	5.0
Temperature	30°C
Culture time	7 days

생산량도 다소 감소하였다. 이는 대부분의 곰팡이류가 절대 호기성 혹은 호기성이라는 사실(12)을 고려할 때, 본 균주의 경우에 있어서도 균체생육 및 생물고분자 생산이 호기적 조건하에서 보다 양호한 것으로 생각되었다. 교반속도는 100 rpm일 때, 균체 및 생물고분자의 생산성이 가장 좋았으며, 그 이상에서는 다소 감소 하였다. 이는 100 rpm 이상의 교반속도하에서는 전단력의 증가로 인하여 정상적인 균체 생육이 어렵기 때문이라 생각되었고, 반면 100 rpm 이하의 낮은 교반속도하에서는 균사체의 크기가 증가함에 따라 균체내로의 산소 전달 및 배지영양 성분의 흡수나 이용이 곤란하여 균사체의 생육이 저하되기 때문이라 생각되었다. Natarayan 등(22)은 *Lentinus cladopus*의 액체배양시 clamp connection에 의한 균체의 생육 정도가 정지배양에서는 95%나 되지만 회전진탕 배양시에는 51%로 떨어진다고 보고한 바 있다.

한편, Fig. 2에서 보는 바와 같이 교반속도에 따른 pellet의 크기는 교반 속도가 증가함에 따라 작아져서 100 rpm일 때는 2~3.5 mm 정도이었고, 150 rpm 이상에서는 1~2.5 mm 정도이었다. 따라서 세포외 생물고분자의 최적 생산을 위한 균사체의 적정 크기는 2~3.5 mm 정도이며, 100 rpm의 교반 속도가 최적인 것으로 판단되었다.

초기 pH의 영향은 pH 5에서 균체 및 세포외 생물고분자의 생산이 가장 양호하였고, pH 4~7에서는 생육이 비교적 양호하였으나, pH 8에서는 균체 생육 및 세포외 생물고분자의 생산량이 모두 급격히 감소하였다. 일반적으로 fungi의 종류에 따라 차이는 있으나, 대개 생육 최적 pH는 약산성 내지 중성으로 알려져 있으며, 강 등(23)도 *Ganoderma lucidum*의 액체배양 배지의 초기 최적 pH는 5.0이라 하였다.

한편, 온도는 25~30°C의 범위에서 균체생육 및 생물고분자의 생산성이 양호하였으며, 균체의 생육은 25°C에서 가장 좋은 반면, 세포외 생물고분자의 생산은 30°C에서 다소 높았다. 그러나 30°C 이상에서는 균체생육 및 생물고분자의 생산량이 급격히 감소하는 결과를 보여 최적 배양온도는 30°C로 결정하였다.

이상의 배양조건들을 적용하여 10일동안 플라스크 배양하면서 경시변화를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다.

기질은 배양 1일째부터 급속히 소모되다가 4일 이후부터는 완만하게 소모되었으며, pH는 당의 대사과정중에

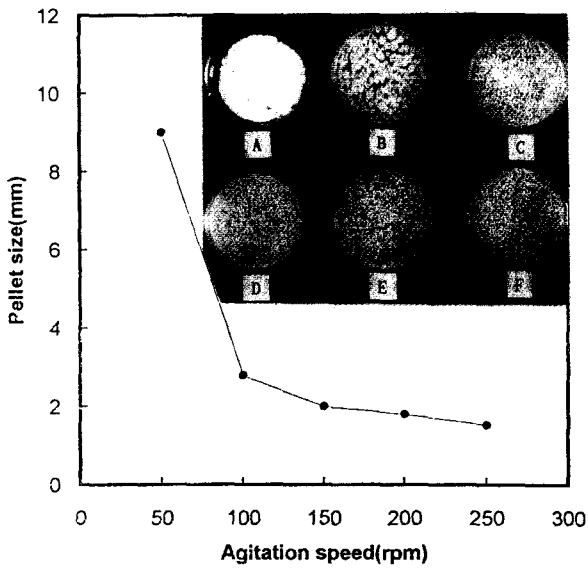


Fig. 2. Effect of agitation speed on the pellet size. (A) 0 rpm, (B) 50 rpm, (C) 100 rpm, (D) 150 rpm, (E) 200 rpm, (F) 250 rpm

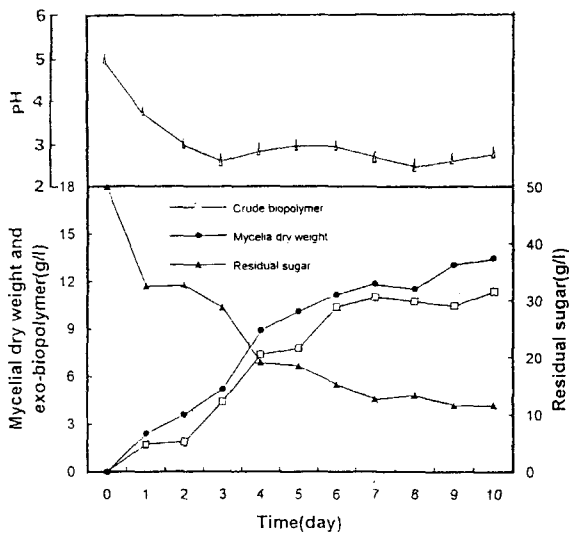


Fig. 3. Time course of the exo-biopolymer production and mycelial growth from basal medium.

생성되는 각종 유기산들의 영향으로 배양 8일째 pH가 2.49까지 떨어지는 결과를 보였다. 균체의 생육은 접종 후 6일까지는 비교적 빠르게 생육하였으나 그 이후는 완만한 증가를 나타내었다. 반면, 세포의 생물고분자의 생산성은 배양 2일부터 6일까지 급속히 증가하였고, 그 이후에서는 완만한 증가를 보였다. 따라서 총 배양 시간은 균체의 생육 및 세포의 생물고분자의 생산성 등을 고려하여 7일로 결정하였다.

배지 조성

탄소원의 영향을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다.

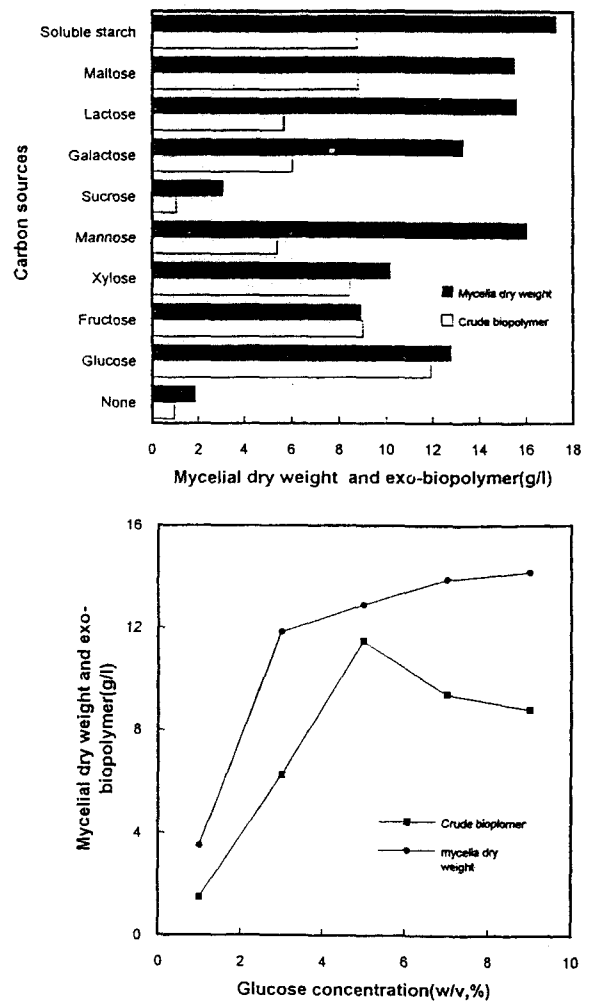


Fig. 4. Effect of carbon sources (top) and glucose concentration (bottom) on the exo-biopolymer production and mycelial growth.

Soluble starch에서 균체생육이 가장 좋았고, 세포의 생물고분자의 생산은 glucose에서 가장 우수하였으며, fructose, xylose, maltose, 및 soluble starch에서도 비교적 양호하였다. 정 등(24)은 *Ganoderma lucidum*의 액체배양에서 균체생육에 미치는 탄소원의 영향을 조사한 결과, soluble starch와 cellobiose가 우수하였다고 보고한 바 있다. 따라서 glucose를 최적 탄소원으로 결정하였고, 이의 농도를 달리하여 실험한 결과에서는 역시 Fig. 4에서 보는 바와 같이 glucose 농도의 증가에 따라 3%(w/v)까지는 급격히 증가하다가 그 이상의 농도에서는 완만하게 증가하였고, 생물고분자의 경우는 5%(w/v) 이상에서 오히려 감소하였다. 이 때 고농도에서의 생물고분자 생산량의 감소는 탄소원이 다당류로의 전환효율이 저하되는 것으로 생각되었다. 그러나 세포의 생물고분자의 생산은 5%(w/v)에서 최대값을 나타내어 최적 glucose 농도는 5%(w/v)로 하였다.

또, 각종의 유기 및 무기질소원의 영향을 검토한 결

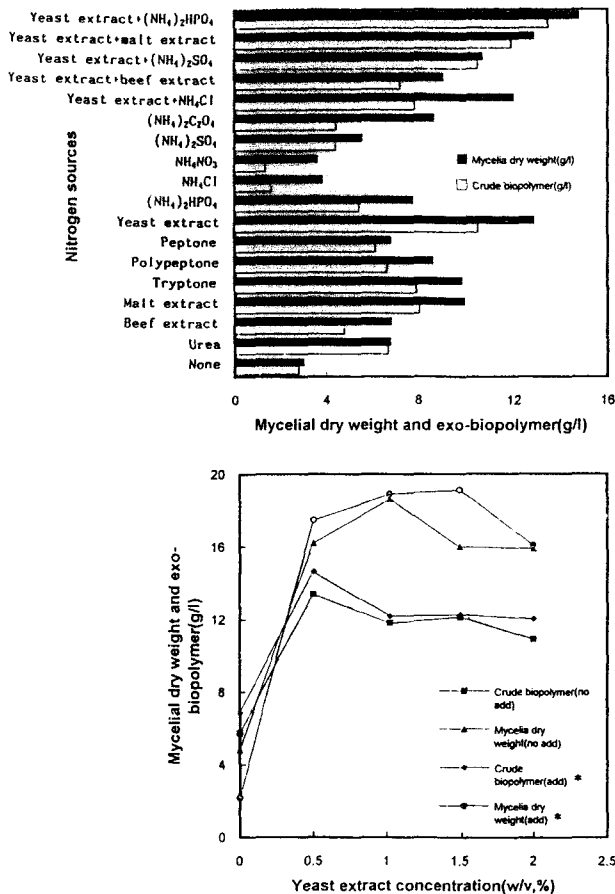


Fig. 5. Effect of nitrogen sources (top) and yeast extract concentration (bottom) on the exo-biopolymer production and mycelial growth.
*Added concentration of $(NH_4)_2HPO_4$ was 0.1% (w/v)

과는 Fig. 5와 같다.

균체 및 세포의 생물고분자의 생산성은 유기질소원인 yeast extract와 malt extract의 혼합첨가시에도 좋았으나, yeast extract와 무기질소원인 $(NH_4)_2HPO_4$ 를 혼합하여 첨가했을 경우에 생산성이 다소 증가되었다. 최대 세포의 생물고분자의 생산성을 보인 것은 yeast extract 0.4%(w/v)와 $(NH_4)_2HPO_4$ 0.1%(w/v) 농도를 첨가하였을 경우이었으며, 이의 최적 질소원 농도는 yeast extract 0.5%(w/v) 및 $(NH_4)_2HPO_4$ 0.1%(w/v)이었다.

한편, 일반적으로 균체의 생육에 대한 최적 C/N비의 연구 결과를 보면, Litchfield 등(25)은 *Morchella* sp.의 액체배양시 C/N비가 5 : 1~10 : 1의 범위에서 균사체의 수율이 가장 높았다고 하였고, 또 Moustafa(26)는 *Agaricus campestris*의 액체배양시 C/N비가 20 : 1~30 : 1 범위일 때, 당의 소비율 및 균사체의 수율이 최대값을 나타냈다고 보고하였는데, 본 실험의 C/N비는 약 8.3 : 1로 Litchfield 등(25)이 *Morchella* sp.에서 얻은 결과와 비슷한 값 범위이었다.

한편, 무기염류 영향을 조사한 결과는 Fig. 6에서 보는

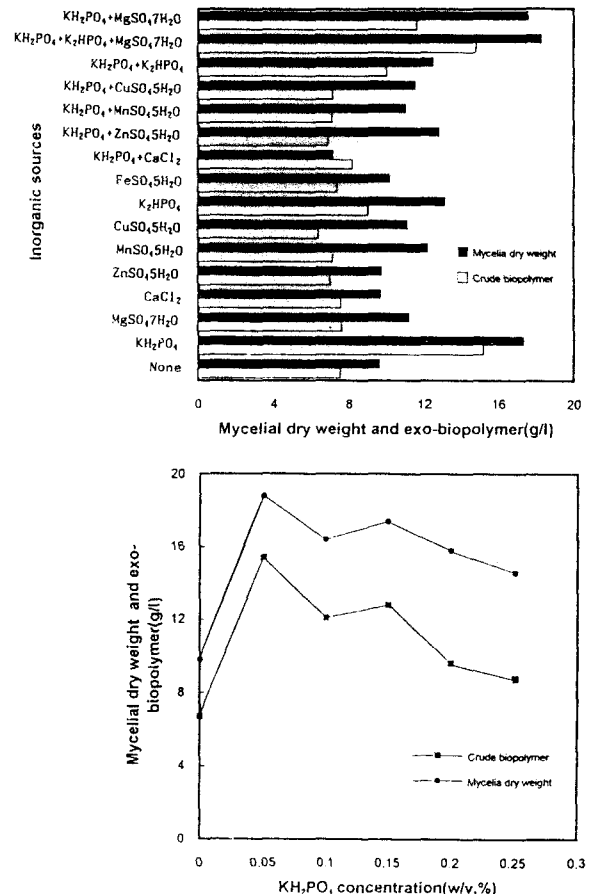


Fig. 6. Effect of inorganic salts (top) and KH_2PO_4 concentration (bottom) on the exo-biopolymer production and mycelial growth.

바와 같이, 세포의 생물고분자의 생산은 KH_2PO_4 를 0.15% (w/v) 농도로 단독 첨가하였을 경우가 좋았으며, 이의 최적 농도는 0.05%(w/v)이었다.

따라서 이상으로부터 glucose 0.5%(w/v), yeast extract 0.15%(w/v), ammonium phosphate dibasic 0.1%(w/v) 및 potassium phosphate monobasic 0.05%(w/v)를 최적 배지조성으로 하였으며, 이 최적 배지를 사용하여 플라스크배양하면서 균체생육 및 세포의 생물고분자 생산의 경시변화를 조사한 결과는 Fig. 7과 같다.

배양 1일째부터 기질이 일정하게 소비되며 균체생육과 세포의 생물고분자의 생산량도 비례하여 증가하였으며, 배양 6일 이후에는 미미한 증가를 보였다.

Fig. 7로부터 각종 동력학적 매개변수값들을 구하였으며, 기본배지 조성으로부터 얻은 Fig. 3과 비교 검토하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 표에서 보는 바와 같이 modified media의 값들이 basal media에서의 값들보다 높았다. Basal media의 경우, 비증식속도, 균체 수율 및 생산수율은 0.022 hr^{-1} , $0.25(\text{g/g})$ 및 $0.22(\text{g/g})$ 이었고, modified media의 경우는 0.039 hr^{-1} , $0.49(\text{g/g})$ 및 $0.39(\text{g/g})$ 이었다. 따라서, modified media에서 균체

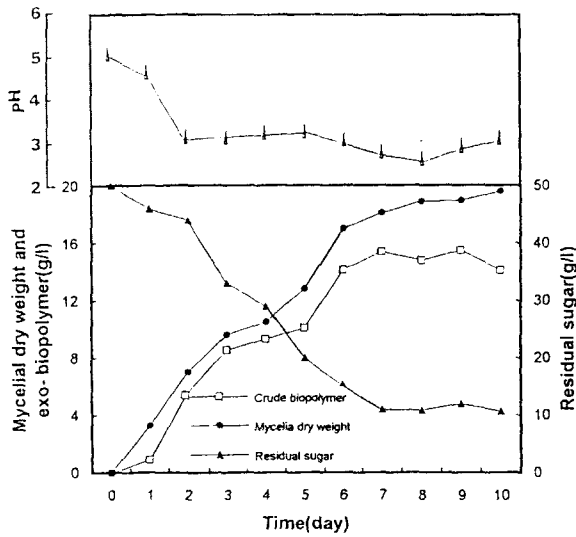


Fig. 7. Time course of the exo-biopolymer production and mycelial growth from modified medium.

Table 2. Kinetic parameters for *Ganoderma lucidum* in basal media and modified media

Parameter	M1 ^a	M2 ^b
Specific growth rate, μ (h ⁻¹)	0.022	0.039
Specific production rate, q_p (gg ⁻¹ h ⁻¹)	0.012	0.025
Specific substrate uptake rate, q_s (gg ⁻¹ h ⁻¹)	0.021	0.043
Cell yield, $Y_{x/s}$ (g/g)	0.251	0.488
Product yield, $Y_{p/s}$ (g/g)	0.220	0.385

^aBasal media, ^bModified media

생육 및 세포의 생물고분자 생산성이 우수한 것으로 판단되었다.

한편, 균체의 비증식속도(μ)는 basal media와 modified media가 각각 0.022 hr⁻¹와 0.039 hr⁻¹로 모두 낮았는데, 이는 담자균류인 버섯류들의 생육속도와 doubling time이 늦기 때문이다.

일반적으로 *Aspergillus* sp.나 *Penicillium* sp. 등의 fungi류에 있어서 최대 비증식속도(maximum specific growth rate)는 0.09~0.61 hr⁻¹ 정도로 알려져 있다(27).

이상에서 최종적으로 얻은 세포의 생물고분자의 생산량은 15.4 g/l, 균체는 18.8 g/l이었고, 대당수율은 각각 30.8 및 38%이었다.

생물고분자의 정제 및 특성

두 생물고분자 시료(BWS, MWS)에 대한 정제도를 확인한 결과는 Fig. 8과 같다.

그림에서 보는 바와 같이 두 시료 모두 균일한 band가

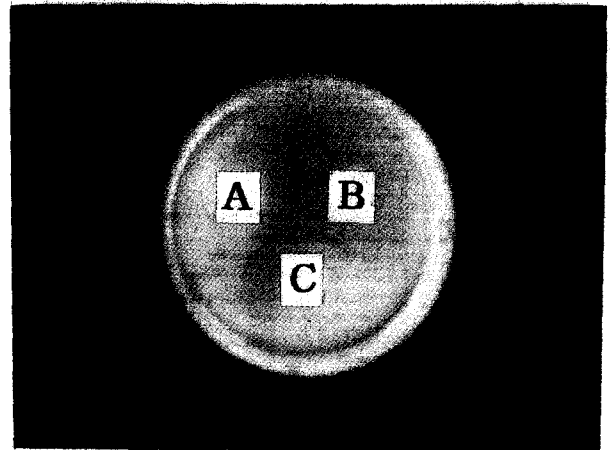


Fig. 8. Two dimensional immunodiffusion precipitation test with Concanavalin A in agarose gel plate. A: BWS, B: MWS, C: Concanavalin A

형성되어 정제가 잘 된 것을 알 수 있었다. 일반적으로 Concanavalin A는 α 형의 glucan, 즉 glycogen이나 starch 등의 다당류가 함유된 agar gel 내에서 이들 성분과 결합하여 band를 형성하며, 이때 다당류가 homogeneous 하면 band는 하나의 날카로운 형태로 나타나고, heterogeneous 하면 변동이 심하고 여러개의 band가 형성된다(28). 따라서 두 분획은 모두 α -형의 glucan이 존재하는 것으로 판단되었다.

한편, 생물고분자 시료들(BWS, BWI, MWS)의 정제반응 결과는 Table 3과 같다.

세포의 생물고분자 시료인 BWS와 BWI는 두 시료 모두 가수분해물 및 비가수분해물 모두에서 단백질은 존재하지 않았고, 가수분해물에서만 아미노당이 존재하였다. 균사체 추출물인 MWS의 경우는 가수분해물 및 비가수분해물 모두 단백질이 존재하였으며, 아미노당은 가수분해물에서만 검출되어 이들 아미노당은 MWS의 주쇄나 잔기에 소량이 결합되어 있을 것으로 생각되었다.

또, 이들 생물고분자의 성분조성을 조사한 결과는 Table 4와 같다.

세포의 생물고분자분획(BWS, BWI)은 두 시료 모두 약 97% 이상의 당을 함유하고 있는 반면, 균사체추출물(MWS)은 단백질함량 48%, 당함량 44.8%로 세포의 생물고분자와는 큰 차이가 있었다.

한편, 구성당 조성을 GC 분석한 결과는 Fig. 8이며, BWS와 MWS는 모두 Table 5에서와 같이 glucose, mannose 및 galactose가 많았고, fucose 및 xylose를 소량 함유한 반면, BWI는 2개의 미확인 당을 포함하여 다량의 glucose, galactose, mannose, xylose 및 소량의 fucose를 함유하였다. Sone 등(6)도 영지의 액체배양에 의하여 세포의 다당을 얻어 열수추출하여 수용성 및 불용성 분획을 얻었으며, 수용성 분획의 경우는 주요 구성 성분이 glucose, mannose 및 소량의 galactose라 하여 본

Table 3. Color reaction of the biopolymers obtained from mycelia cell and culture fluid of *Ganoderma lucidum*

Reaction	Mycelial biopolymer (MWS) ^a		Exo-biopolymers (EBP)			
	Nonhydrolysate	Hydrolysate	Nonhydrolysate		Hydrolysate	
			BWS ^a	BWI ^a	BWS	BWI
Anthrone	+	+	+	+	+	+
Lowry-Folin	+	+	-	-	-	-
Ninhydrin	+	+	-	-	-	-
Fehling	+	+	+	+	+	+
Carbazole-Sulfate	-	+	-	-	+	+
Elson-Morgan	-	+	-	-	+	+
Seliwanoff	-	-	-	-	-	-
Biuret	+	+	-	-	-	-

^aFor illustrate of symbols, see Fig. 1

Table 4. Contents of total sugar and protein of the biopolymers obtained from mycelia cell and culture fluid of *Ganoderma lucidum*

Component	MWS ^a	BWS ^a	BWI ^a
Total sugar (%)	44.8	97.8	99.0
Protein (%)	48.0	N.D.*	N.D.*

^aFor illustrate of symbols, see Fig. 1

*Not determined

Table 5. Sugar composition of the biopolymers obtained from mycelia cell and culture fluid of *Ganoderma lucidum*

Sample	Molar ratio				
	Glucose	Galactose	Xylose	Mannose	Fucose
MWS ^a	4.1	2.5	0.9	1.2	0.5
BWS ^a	3.6	1.5	0.5	2.1	trace
BWI ^a	2.9	3.1	1.6	2.0	0.3

^aFor illustrate of symbols, see Fig. 1

실험의 결과와 유사하였으나, 물불용성 분획의 경우는 glucose로만 구성되어 있다고 보고하여 본 실험의 결과와는 차이가 있었다. 이는 균주의 계통이나 배양법 및 생물고분자의 분리, 정제법 등의 차이에 기인하는 것으로 생각되었다.

요 약

새로운 생물산업소재의 탐색 및 개발연구의 일환으로 *Ganoderma lucidum*(영지 1호) 균사체의 액체배양에 의하여 세포의 생물고분자의 생산을 위한 최적 생산조건을 검토하였고, 생성 생물고분자를 분획 정제하여 이의 성분특성을 조사하였다.

세포의 생물고분자 생산을 위한 최적 배양조건은 glucose 5%, yeast extract 0.5%, (NH₄)₂HPO₄ 0.1% 및 KH₂PO₄ 0.05%(w/v)를 함유한 배지에서 pH 5.0, 온도 30°C

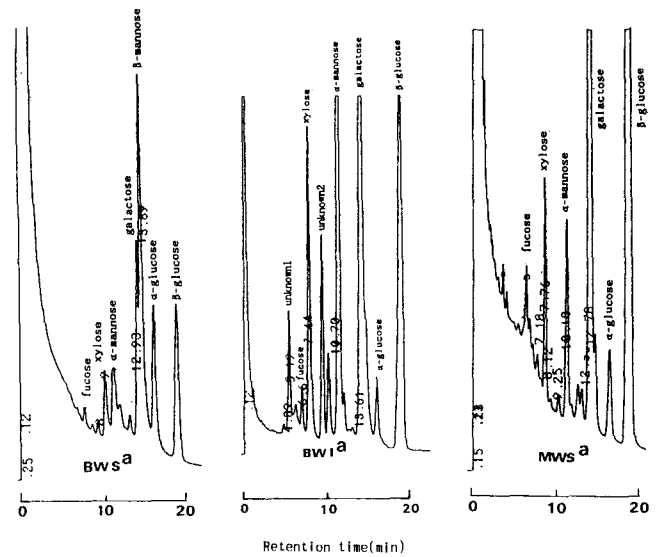


Fig. 9. Gas liquid chromatography patterns of monosaccharides of the biopolymers.

^aFor illustrate of symbols, see Fig. 1

및 교반속도 100 rpm일 때 얻어졌다. 이들 조건하에서 7일간 플라스크 배양하였을 때, 최대의 균체 및 세포의 생물고분자 농도는 각각 15.2 및 18.8 g/l이었으며, 비생육속도, 비기질소비속도 및 비생산속도는 각각 0.039 hr⁻¹, 0.043 gg⁻¹hr⁻¹ 및 0.025 gg⁻¹hr⁻¹이었다. 세포의 생물고분자는 실온의 물추출에 의하여 수용성 및 물불용성 다당류로 분획되었으며, 두 시료 모두 97% 이상의 당을 함유하였다. 수용성 생물고분자 분획(BWS)과 물불용성 분획(BWI)은 모두 glucose, galactose, mannose, xylose 및 fucose를 함유하였으며, 구성당의 몰비는 각각 3.6 : 1.5 : 2.1 : 0.5 : trace 및 2.9 : 3.1 : 2.0 : 1.6 : 0.3이었다.

참고문헌

1. Hseu, R.S. and H.H. Wang. 1991. A New system for identifying cultures of *Ganoderma* Species. Pp. 51-56.

- In M.J. Maher (ed.), *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Vol.1, A.A. Balkema, Rotterdam.
2. 水野 卓, 川合正允. 1992.キノコの 化學 生化學. Pp. 213-217. 新 日本印刷 株式會社.
 - 3.キノコの技術集談會 編輯委員會 編. 1991.キノコの 基礎科學と 最新技術. Pp. 111-119. 農村文化社.
 4. Eyal, J. 1991. Mushroom mycelium grown in submerged culture-potential food applications. Pp. 31-42. In I. Goldberg and R. Williams (ed.), *Biotechnology and Food Ingredients*, Van Nostrand Reinhold, New York.
 5. Jong, S.C. and J.M. Birmingham. 1992. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Advances in Applied Microbiology* **37**: 101-134.
 6. Sone, Y., R. Okuda, A. Wada, A. Kishida, and A. Misaki. 1985. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agri. Biol. Chem.* **49**: 2642-2650.
 7. Tseng, T.C. et al. 1984. Studies on *Ganoderma lucidum* l. liquid culture and chemical composition of mycelium. *Bot. Bull. Acad. sin (Taipei)*. **25**: 149.
 8. 강창울, 심미자, 최응칠, 이영남, 김병각. 1981. 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구. *한국균학회지* **14**: 101-112.
 9. Humfeld, H. 1948. The Production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in submerged culture. *Science* **107**: 373-375.
 10. Humfeld, H. and T.F. Sugihara. 1952. The Nutrient requirements of *Agaricus campestris* grown in submerged culture. *Mycologia* **44**: 605-620.
 11. Litchfield, J.H., R.C. Overback, and R.S. Davidson. 1963. Factors affecting the growth of morel mushroom mycelium in submerged culture. *Agri. and Food Chem.* **11**: 158-162.
 12. Torev, A. 1968. Submerged culture of higher fungi mycelium on an industrial scale. *Mushroom Sci.* **7**: 585-589.
 13. Hunter-Cevera, J.C., M.E. Fonda, and A. Belt. 1986. Isolation of cultures. Pp. 4-21. In Demain, A.L. and N.A. Solomon (ed.), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 14. Torres, E.F., J.J. Allais, and J. Baratti. 1985. Kinetics of batch fermentation for ethanol production with *Zygomonas mobilis* growing on jerusalem artichoke juice. *Biotech. and Bioeng.* **18**: 850-856.
 15. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.* **31**: 426-428.
 16. Chaplin, M.F. and J.F. Kennedy. 1986. *Carbohydrate Analysis*, Pp. 1-13. IRL Press, Oxford.
 17. Bollag, D.M. and S.J. Edelstein. 1991. *Protein methods*, Pp. 56-57. Wiley Liss, Inc., New York.
 18. 水野 卓, 西疫一俊. 1971. 糖質化學便覽. Pp. 287-372. 公立出版.
 19. 日本生化學會編. 生化學實驗講座4. 1976. 糖質の化學(下). Pp. 367-381 (株)東京 化學 同人.
 20. 이준우, 정천희, 정훈, 이권행. 1990. *Lentinus edodes* FY105 알칼리 추출물의 보체계활성 및 항종양효과. *한국산업미생물학회지* **18**: 571-577.
 21. Mizuno, T., M. Kato, A. Totsuka, K. Takenaka, K. Shinkai, and M. Shimizu. 1984. Fractionation, structural features and antitumor activity of water-soluble polysaccharide from "Reishi", the fruit body of *Ganoderma lucidum*. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **58**: 873-879.
 22. Natarajan, K. and N. Raman. 1980. In vitro production of fruit bodies in *Lentinus cladopus* in liquid culture. *Indian Journal of Exp. Biology* **18**: 545.
 23. 강창울, 심미자, 최응칠, 이영남, 김병각. 1981. 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구. *한국균학회지* **14**: 101-111.
 24. 정건섭, 구영조, 유진영, 최신양, 신동화. 1991. 유청을 이용한 영지버섯과 잎새버섯의 균사체 배양. *한국산업미생물학회지* **19**: 61-65.
 25. Litchfield, J.H., R.C. Overback, and R.S. Davidson. 1963. Factors affecting the growth of morel mushroom mycelium in submerged culture. *Agricul. and Food Chem.* **11**: 158-160.
 26. Moustafa, A.M. 1960. Nutrition and development of mushroom flavor in *Agaricus campestris* mycelium. *Applied Microbiology* **8**: 63-67.
 27. Crueger, W. and A. Crueger. 1990. *Biotechnology*. Pp. 64-74. Science Tech., Pub., Wisconsin.
 28. Goldstein, I.J. and C.E. Hayes. 1978. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. Pp. 128-334. In Tipson, R.S. and D. Horton (ed.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Vol. 35, Academic Press, New York.

(Received 8 August 1995)