

표고버섯의 고체배양에 의한 단백 다당류 생산

박 경 속

대구공업대학 식품영양과

Production of Protein-bound Polysaccharides by Solid-substrate Fermentation of *Lentinus edodes*

Kyung-Sook Park

Dept. of Food and Nutrition, Taegu Technical College, 831-Bondong, Taegu, Korea

Abstract

The possibility of solid-substrate fermentation of *Lentinus edodes* for the production of protein-bound polysaccharides(PBP) was studied. Zeolite and orchid-pot soil were used as solid materials for the culture because of the desirable physical properties. Sucrose and starch were good carbon sources for the production of PBP by the solid-substrate fermentation of *L. edodes*. Among the nitrogen source, bactosoyton was very effective for the PBP production. The optimum pH for solid-substrate fermentation for the production of PBP was at pH of 5.5. The PBP production reached to 5~5.5mg per 100g solid-substrate.

Key words : *Lentinus edodes*, solid-substrate fermentation.

서 론

표고버섯(*Lentinus edodes* (Berk) Sing)은 송이과(*Tricholoma taceae*)에 속하는 대표적인 식용버섯으로, 자실체에서 분리한 다당체인 LC-33이 Sarcoma 180에 대한 저항력이 있다는 보고¹⁾ 이후 항암 실험이 이루어지고 있고, 고혈압 신장염 신경쇠약 등에 효능이 있는 것으로 알려져 왔다.

식용버섯에서 단백 다당류를 함유한 자실체나 균사 배양물에 대한 실험으로 단백다당류는 우수한 항암효과를 나타내는 것으로 확인되었다^{2,3,4,5)}.

그리고, 항암효과를 지니는 단백다당류의 규명하는 연구가 진행되고 있다⁶⁻¹²⁾.

본 연구자는 단백다당류를 생산하기 위한 균주배양을 위한 영양배지 조성 및 배양조건 최적화 실험결과를 보고한 바 있다¹³⁾. 또한 균사체로부터 단백 다당류를 더 순수하게 분리정제하는 방법과 추출 수율을 높이는 방법 등을 보고한 바 있다^{14,20)}.

다당류 및 단백 다당류 추출에는 교반을 겸한 액체

배양이 고체 배양보다 유리하다고 알려져 있다. 그러나 배양액으로부터 단백다당류를 침전시켜 회수하는 과정에서 많은 양의 에탄올이 소비되어 원가가 상승되고 폐수가 다량 발생하는 등 많은 문제점을 가지고 있다. 그러므로 재료가 확보되고 배양조건이 확립되면 고체 배양은 소량의 추출용액으로 다당류를 회수할 수 있게 되므로 경제적이고 실용적인 산업기술이 될 것이다.

본 연구자 등은 구름 버섯(*Coriolus versicolor*)의 고체 배양에 대하여 보고한 바 있으며⁹⁾, 본 연구는 표고버섯의 고체배양에 의한 단백다당류 생산 시험에 대한 결과이다.

재료 및 방법

1. 균 주

Lentinus edodes(산조 1호)로써 본 실험실에 보관 중인 균주를 사용하였다.

Corresponding author : Kyung-Sook Park

2. 배 지

균의 보존용 배지는 malt extract 1.0%, yeast extract 0.4%, glucose 0.4%, agar 1.5%인 MYG 배지(Yanagi 등, 1994)¹²⁾를 사용하였고 균사 접종을 위한 액체 진탕용 배지는 표고버섯이 가장 잘 자라는 것으로 보고된 LEM 배지(Park 등 1991)¹³⁾를 사용하였다.

고체 배지에서 균사의 성장 속도를 비교하기 위한 배지는 MCM, ACM, MYG, LEM, GCM(배지 조성은 Table 5) 등을 사용하였다

3. 균사배양

쌀, 밀, 스폰지, zeolite, 왕겨, 난 재배용 토양 등의 재료를 LEM 배지에 4시간 이상 충분히 침지시켜, 배지 성분을 흡착시킨 고체 재료를 100ml Elenmyer flask에 1/3 높이까지 채운 후 121℃에서 40분간 멸균시켰다.

LEM 배지에서 7일간 액체 배양된 균사체를 Homogenizer(Nissei-AN-11)로 1분간(3,000rpm)균질화하고, 이를 멸균시킨 고체 재료 배지에 10ml씩 접종하여 28℃에서 배양하였다.

4. 단백다당류의 생산 및 회수

각 고체재료에서 자란 균사체에 일정량의 끓는 물을 가하여 100℃에서 4시간 동안 추출한 후 여과하였다. 이 여과액을 감압 농축기로 1/10이 되도록 농축한 후 3배량의 에탄올을 가하여 4℃에서 하룻밤 동안 방치하였다. 생성된 침전물은 15,000rpm에서 30분간의 원심분리로 수지한 뒤 이를 소량의 증류수에 녹이고 24시간 동안 증류수로 투석한 다음 동결 건조하여 조단백다당류를 얻었다(Scheme 1).

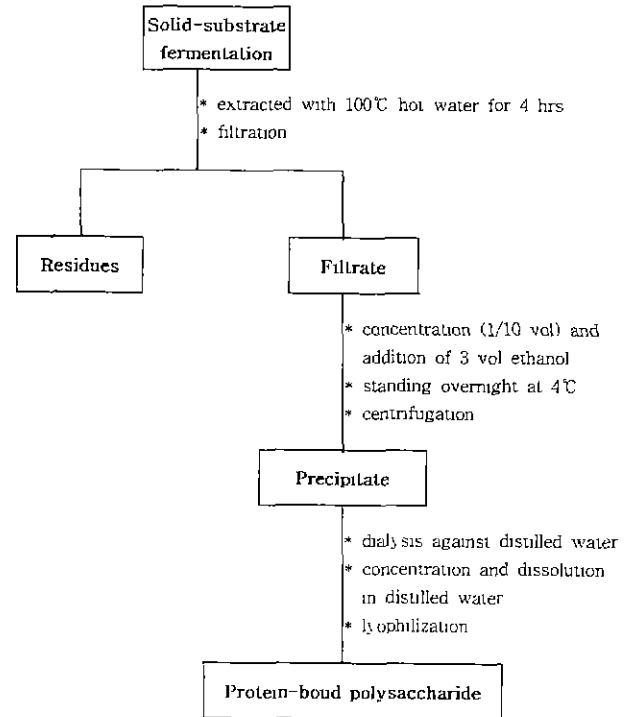
5. 최적 pH

각 고체재료에서 단백다당류 생산에 가장 적합한 pH를 규정하기 위하여 4단계의 pH로 조절된 0.05M citrate phosphate buffer에 배지 성분을 넣고 용해시킨 다음, pH를 측정하고 (pH 4.3, 5.5, 6.8, 8.5) 28℃에서 배양시켰다.

각 고체 재료 배양에서 추출한 단백 다당류를 동결 건조하여 단백 다당류 생산에 미치는 pH의 영향을 검토하였다.

1. 고체 재료별 균사성장 및 다당류의 수율

배지 성분을 고체 재료에 흡착시킨 다음 균사를 접종하여 배양한 고체 발효에서, 균사의 성장은 대부분 양호하였다(plate 1).



Scheme. 1. Extraction and fractionation of the protein-bound polysaccharide from solid-substrate fermentation of *L. edodes*.

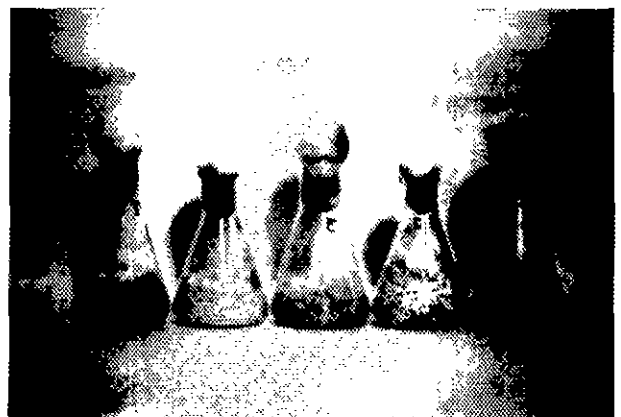


Plate. 1. Mycelium growth of *Lentinus edodes* from different solid-substrate fermentation.

A : rice hulls, B : rice, C : zeolite, D : wheat, E : sponge. *: Solid-substrate were cultured at 28℃ for 7 days.

결과 및 고찰

그러나 전통적인 고체 발효 식품의 원료로 많이 사용되는 쌀 밀의 경우 전분질이 우리나라와 단백다당류 추출을 위한 여과나 원심분리가 매우 어렵다. 또한 스펀지, 왕겨 등은 추출과정에서 부스러져서 열수 추출에 의한 단백다당류를 얻는 방법으로는 문제점이 많았다.

그래서 본 연구에서는 고체발효에 적합한 성질을 가진 고체 재료 중 균사성장율이 높은 zeolite와 난재배양 토양을 중심으로 발효 시험하였다. 단백 다당류 생성에 미치는 탄소원의 영향은 6종류의 탄소원을 사용하였다. 농도는 평판배지에서 균사의 성장이 양호했던 2%로 설정하여 단백 다당류 수율을 비교하였다.

Zeolite의 경우 균사의 성장이나 밀도가 우수한 글루코오스와 전분에서 단백 다당류 생산량도 높게 나타났다. 즉 균체 생산량이 높은 탄소원이 다당류 생산성도 높게 나타났다(Table 1).

난 재배양 토양의 경우(Table. 2)와 같이 전분과 수크로오스에서 생산성이 높게 나타났다는 보고⁹⁾와 같이 난재배양 토양의 성분이 수크로오스에 의한 균사의 성장을 증가시킨 것으로 보이지만, 연구를 통해서 밝혀져야 할 것으로 생각한다.

탄소원으로 소르비톨을 사용하면 균사성장이나 밀도가 불량할 뿐 아니라 단백다당류 생산량도 크게 낮았다.

질소원의 종류별 단백다당류 생산성을 조사하기 위하여 7종류의 질소원을 최적 농도인 0.6으로 조절하여 실험한 결과(Table 3, 4) 균사 성장이 좋은 유기질소원이 무기질소원에 비하여 단백다당류 생산성이 높았다.

Zeolite나 난 재배양 토양 모두 bacto soytone은

Table 1. Effect of carbon sources on protein-bound polysaccharide yield from solid-substrate culture of *Lentinus edodes* on zeolite

Carbon source	Yield of protein-bound polysaccharide(mg)
Glucose	1.90±0.35
Fructose	1.32±0.09
Sucrose	1.69±0.42
Maltose	1.12±0.17
Sorbitol	0.51±0.04
Starch	1.98±0.21

a : Cultred at 28°C for 17 days in the solid medium containing each carbon source with potassium nitrate. b : The values were calculated on the basis of 100g solid-substrates.

Table 2. Effect of carbon sources on protein-bound polysaccharide yield from solid-substrate culture of *Lentinus edodes* on orchid-pot soil

Carbon source	Yield of protein-bound polysaccharide(mg)
Glucose	1.86±0.11
Fructose	1.18±0.15
Sucrose	1.94±0.14
Maltose	1.09±0.28
Sorbitol	0.50±0.03
Starch	1.91±0.18

a : Cultred at 28°C for 17 days in the solid medium containing each carbon source with potassium nitrate. b : The values were calculated on the basis of 100g solid-substrates.

Table 3. Effect of nitrogen sources on of protein-bound polysaccharide yield from solid-substrate culture of *Lentinus edodes* on zeolite

Nitrogen source	Yield of protein-bound polysaccharide(mg)
Peptone	3.11±0.10
Tryptone	3.02±0.14
Bacto soytone	3.37±0.11
Ammonium tartrate	2.21±0.08
Ammonium sulfate	2.01±0.14
Ammonium nitrate	2.05±0.14
Potassium nitrate	2.51±0.16

a : Cultred at 28°C for 17 days in the solid medium containing each nitrogen source with starch. b : The values were calculated on the basis of 100g solid-substrates.

Table 4. Effect of nitrogen sources on of protein-bound polysaccharide yield from solid-substrate culture of *Lentinus edodes* on orchid-pot soil

Nitrogen source	Yield of protein-bound polysaccharide(mg)
Peptone	3.08±0.11
Tryptone	3.02±0.14
Bacto soytone	3.36±0.04
Ammonium tartrate	2.11±0.14
Ammonium sulfate	1.92±0.10
Ammonium nitrate	2.01±0.21
Potassium nitrate	2.39±0.05

a : Cultred at 28°C for 17 days in the solid medium containing each nitrogen source with starch. b : The values were calculated on the basis of 100g solid-substrates.

질소원으로 한 배지에서 단백질다당류 생산수율이 높았다.

유기 질소원 중에는 tryptone의 생산성이 가장 낮았다.

2. 배지조성별 단백질다당류의 생산성

각종 비섯균의 최적 영양 배지로써 본 연구자가 밝힌 LEM, MIG, ACM, MCM, GCM을 사용하여 Zeolite와 난 제배용 토양을 고체 재료로 하여 이들 5 종류의 배지 성분으로 배양시켜서 단백질다당류의 생산성을 비교하였다(Table 5, 6).

*L. edodes*의 경우는 평판배지상 최적 배지를 규명

Table 5. The productivity of various media for protein-bound polysaccharide from solid-substrate culture of *Lentinus edodes* on zeolite

Media	Yield of protein-bound polysaccharide(mg)
LEM	5.26±0.20
MYG	4.92±0.10
ACM	5.10±0.16
MCM	4.90±0.13
GCM	4.56±0.18

a : Cultured at 28°C for 9 days. b : The values were calculated on the basis of 100g solid-substrates. MCM : glucose 2%, peptone 0.2%, yeast extract 0.6%. GCM : glucose 3%, sucrose 2%, peptone 0.4%, yeast extract 1%, casamino acid 0.5%, KH₂PO₄ 0.046%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, agar 1.5%. ACM : starch 2%, bacto-soytone 0.4%, yeast extract 0.6%, KH₂PO₄ 0.046%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, agar 1.5%. MYG : malt extract 1%, yeast extract 0.4%, glucose 0.4%, agar 1.5%. LEM : glucose 2%, starch 2%, bacto-soytone 0.4%, yeast extract 0.6%, KH₂PO₄ 0.046%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, agar 1.5%.

Table 6. The productivity of various media for protein-bound polysaccharide from solid-substrate culture of *Lentinus edodes* on orchid-pot soil

Media	Yield of protein-bound polysaccharide(mg)
LEM	5.21±0.28
MYG	4.71±0.14
ACM	5.19±0.28
MCM	4.74±0.07
GCM	4.58±0.14

a : Cultured at 28°C for 9 days. b : The values were calculated on the basis of 100g solid-substrates.

된 LEM 배지에서 단백질다당류 생산량이 zeolite에서 5.26mg 난 제배용 토양에서 5.21mg으로 가장 양호하였다.

3. pH의 영향

단백질다당류 생산에 미치는 pH의 영향은 Fig 1, 2와 같다.

단백질다당류 생산량은 Park 등(1994)⁹⁾의 보고와 같이 액체 배양의 최적 pH 5.0~5.6과 비슷한 pH 5.5, zeolite, 난 제배 토양을 이용한 고체배양 조건

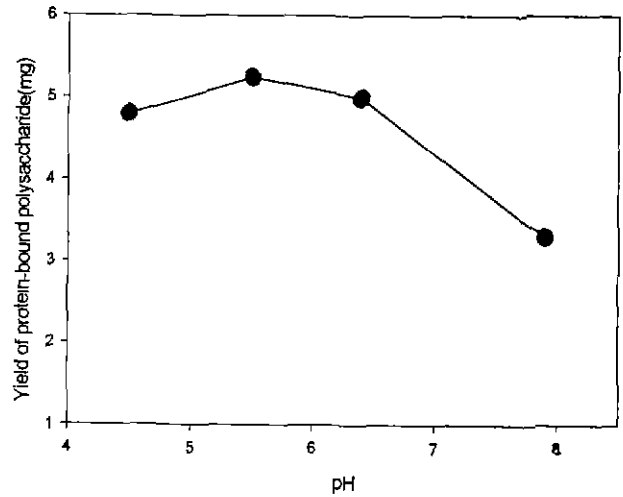


Fig. 1. Effect of pH on protein-bound polysaccharide yield from solid-substrate culture of *Lentinus edodes* with zeolite. * : Cultured 28°C for 17 days.

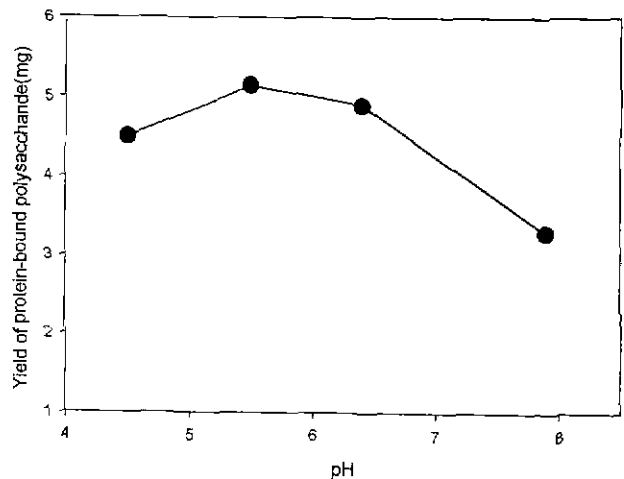


Fig. 2. Effect of pH on protein-bound polysaccharide yield from solid-substrate culture of *Lentinus edodes* with orchid-pot soil. * : Cultured 28°C for 17 days.

에서 고체 재료 100g당 조단백 다당류 5.25mg 및 5.15mg으로 가장 생산성이 높았다. 그러나 액체 배양의 경우 최적 pH 범위를 벗어나면 균사의 건물양이 현저하게 낮아진 것에 반하여 고체 배양에서는 pH 6.3에서도 단백질 다당류 생산량이 비교적 높았다.

요약

표고버섯(*L. edodes*)을 고체배양하여 단백질 다당류를 생산하기 위한 여러 가지 조건을 검토하였다.

여러 가지 고체 재료가 이용될 수 있으나 배양 후 단백질 다당류의 열수 추출 과정에서의 부적합성 등의 이유로 실질적으로 zeolite나 난 재배용 토양이 이용 가능한 천연 고체 재료라고 볼 수 있다.

Zeolite와 난재용 토양을 이용한 고체발효에서 단백질 다당류 생산에 미치는 탄소원의 영향을 검토한 결과 수크로오스, 전분에서 단백질 다당류 생산량도 높게 나타났으며, 질소원중에서는 bacto-soytone이 고체 발효에 의한 단백질 다당류 생산에 가장 적합한 것으로 확인되었다.

단백다당류 생산을 위한 고체발효에서 최적 pH는 5.5 범위였고 고체 100g당 조단백다당류 생산량은 5~5.5mg이 이른다.

배지 조성별 단백질 다당류 생산성 시험의 결과 *L. edodes*의 최적배지 조성인 LEM에서 최고의 생산성을 나타냈으며, 종합적으로 균사 성장이 적합한 조건에서 단백질 다당류 생산성도 높게 나타났다.

감사의 말

본 연구는 1997년도 대구공업대학 교내 연구비에 의해 수행되었다. 이에 감사 드린다.

참고문헌

1. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. : Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.* 30, 2776~2781 (1970).
2. Maeda, Y. and Chihara, G. L. : A new immunocelerator of cell-mediated responses. *Nature* 229, 634~636 (1971).
3. Yoshioka, Y., Sano, T. and Ikekawa, T. : Studies on antitumor polysaccharides of *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr) sing. I, *Chem. Pharm. Bull.* 21, 1772~1776 (1973).
4. Fukuda, K., Uematsu, T., Hamada, A., Akiya, S., Komatsu, N. and Okubo, S. : The polysaccharide from *Lampteromyces japonicus*. *Chem. Pharm. Bull.* 23, 1955~1959 (1975).
5. Tsukagoshi, S. and Ohashi, F. : Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann*, 65, 557~558 (1974).
6. Hirase, S., Nakai, S., Akatsu, T., Kobayashi, A., Oohara, M., Matsunaga, K., Fujii, M., Kodaira, S., Fujii, T., Furusho, T., Ohmura, Y., Wada, T., Yoshikumi, C., Ueno, S. and Ohmura, S. : Structural studies on the antitumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes). I. Fractionation with barium hydroxide. *Yakugaku Zasshi*, 96, 413~418 (1976).
7. Hirase, S., Nakai, S., Akatsu, T., Kobayashi, A., Oohara, M., Matsunaga, K., Fujii, M., Kodaira, S., Fujii, T., Furusho, T., Ohmura, Y., Wada, T., Yoshikumi, C., Ueno, S. and Ohtsuka, S. : Structural studies on the antitumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes). II. Structures of β -D-glucan moieties of fractionated polysaccharides. *Yakugaku Zasshi*, 96, 419~424 (1976).
8. Cho, H. J., Shim, M. J., Choi, E. C. and Kim, B. K. : Studies on constituents of higher fungi of Korea(L VII) Comparison of various antitumor constituents of comparison of various antitumor constituents of *Corilus versicolor*. *Korean J. Mycol.* 16, 1622~174 (1988).
9. Park, K. S., Park, S., Jun, I. C., Ha, H. C., Kim, S. H. and Lee, J. S. : Production of protein-bound polysaccharides by solid-state fermentation of *Coriolus versicolor*. *Korean J. Mycol.* 22, 184~189 (1994).
10. Park, Y. D., Hong, Y. K., Whang, W. K., Huh, J. D. and Park, S. : Comparisons of protein-bound polysaccharide contents obtained from mycelial cultured broth and fruit body of *Coriolus versicolor*. *Korean J. Mycol.* 17, 112~228 (1989).
11. Park, K. S., Lee, J. Y., Lee, S. J., Kim, S. H. and Lee, J. S. : Extraction and separation of protein of protein-bound polysaccharide produced by *Coriolus versicolor*(Fr) Quel, *Korean J. Mycol.* 20, 72~76 (1992).
12. Yanagi, S. O. and Takebe, I. : An efficient method for the isolation of mycelial protoplasts from *Coprinus macrorhizus* other basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 58~60 (1984).
13. Park, K. S. and Lee, J. S. : Optimization of media composition and culture condition for the mycelial of *Coriolus versicolor* and *Lentinus edodes*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 6, 91~98 (1991).

14. Cooper, T. G. : In *The Tools of Biochemistry*. A Wiley Interscience Publication N. Y., London. p. 136~168 (1977).
15. Carney, S. L., Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. : *Carbohydrate Analysis, a Practical Approach*. IRL Press. Oxford and Washington DC. p. 135 (1986).
16. Faltz, L. L., Reddi, A. H., Hascall, G. K., Martin, D. and Pita, J. C. : Hascall, V. C. Characteristics of proteoglycans extracted from the swarm rat chondrosarcoma with associative solvents, *J. Biol. Chem.*, 254, 1375~1380 (1979).
17. Kjellen, L., Oldberg, A. and Hook, M : Cell-surface heparan sulfate: Mechanisms of proteoglycancell association. *J. Biol. Chem.*, 255, 10407~10413 (1980).
18. Oldberg, A., Kjellen, L. and Hook, M : Cell-surface heparan sulfate: isolation and characterization of a proteoglycan from rat liver membranes. *J. Biol. Chem.* 254, 8505~8510 (1979).
19. Roland, J. F., Chemielewicz, Z. F., Wenine, B.A., Gross, A. M., Boening, O. P., Lucas, E. H., Byerum, R. U., Stevens, J. A. and Calvacin : A new antitumor agent. *Science* 23, (1897).
20. Park K. S. and S. Lee B. L. : Extraction and separation of protein-bound polysaccharide by *Lentinus edodes*. *Korean J. Food Nutr.* 10, 503~508 (1997).

(1998년 12월 4일 접수)