Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 28, No. 5, 285–290 (2000)

Phellinus linteus WI-001 균사체의 성장에 미치는 용존산소농도의 영향 및 자동 조절방법 개발

김종래[1,2] · 권호균[1] · 전계택[2] · 이계관[1]
[1]환인제약(주) 중앙연구소, [2]강원대학교 자연과학대학 생명과학부

Effect and Development of Automatic Control of Dissolved Oxygen on Growth of *Phellinus linteus* WI-001. **Kim, Jong-Lae[1,2], Ho-Kyun Kwon[1], Gie-Taek Chun[2], and Kye-Kwan Lee[1].** *[1]Department of Biotechnology, Central Research Center, Whanin Pharm. Co., Ltd., 150, Sinsohyun-Dong, Ansung, Kyunggi, Korea, [2]Division of Life Science, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon 200-701, Korea* – The effects of dissolved oxygen (DO) concentration and DO control modes on cell growth in a 4 L computer-controlled bioreactor system were investigated using *Phellinus linteus* WI-001, a producer of protein-polysaccharides having potent anticancer activities. When DO was controlled at about 20%, maximum cell concentration and specific growth rate of the strain were observed to increase 36% and 64%, respectively, as compared to the experiment performed without DO control. By adopting cascade automatic control of DO at 20% saturated level, 18 g/L of maximum cell concentration was obtained. Notably when DO was maintained at about 20% in a mixed automatic control mode using computer-controlled program, 19.5 g/L of maximum cell concentration was obtained. These results showed that the mixed automatic control mode was the effective method for enhancing cell growth of the shear sensitive *Phellinus linteus*.

Key words: polysaccharides, *Phellinus linteus*, dissolved oxygen, automatic control

예로부터 버섯은 한방에서 자양강장, 소자, 혈중지질 강하, 거담, 관상 동맥의 혈류량 증대, 혈압강하 등의 약리효과와 면역증강 효과가 있는 것으로 알려져 왔다. 버섯류에 관한 연구는 중국, 일본 및 한국에서 활발히 이루어지고 있으며 일본의 경우 기능성 식품으로 표고버섯 균사체 추출물이 이미 일반화 되어 있다. 또한 1992년 아가리쿠스버섯(흰들버섯) 자실체로부터 추출한 고분자 다당체가 암세포 증식 억제 뿐만 아니라 류머티스 관절염이나 만성기관지염, 위염처럼 면역기능 약화가 원인인 모든 질병에 효능이 있다고 알려지면서 그 활용방안에 대한 연구가 큰 진전을 보이고 있으며, 최근 기능성 식품으로 상품화 되었다[7]. 버섯의 성분 중 면역증강작용을 나타내는 것은 다당체이며 일반적으로 β-1,3 glucan의 골격에 β-1,6의 가지 구조를 갖는 단일물질임에도 불구하고 생체기능에 다양한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[5].

본 연구에서 사용한 균주인 상황(*Phellinus linteus*) 버섯은 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae)의 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 백색부후균으로, 자실체 추출물에서 96.7%의 매우 강력한 종양저지율을 나타냄이 알려져 관심이 증대되었다[3]. 최근에 와서는 상황을 비롯한 이들 버섯 균사체 추출물의 항 종양작용, 면역조절 효과[1,6] 및 임상실험에 의한 안정성이 입증되었으며[4] 또한 자실체 배양은 많은 시간과 노동력이 요구되고 그 작업이 복잡하기 때문에 액체배양된 버섯 균사체가 의약 및 식품가공용으로 이용되는 추세에 있다.

그러나 지금까지 약용버섯에 관한 대부분의 연구는 자실체 추출물의 약리작용이나 약효성분 분석에 관한 것이 주를 이루고 있으며 버섯 균사체의 액체배양에 관한 연구는 부족한 실정이다.

용존산소는 산업적 미생물을 배양하는데 있어서 매우 중요한 인자로 알려져 있다. 특히 균사를 형성하는 미생물의 경우 독특한 3차원적인 균사구조로 인해 균주의 성장에 따른 발효배양액의 급속한 점도증가 현상이 생물반응기내의 산소전달 능력을 급격히 감소시켜 균주의 생리에 심각한 변화를 초래하는 것으로 알려져 있다. *Streptomyces niveus*같은 균사체 배양에서는 임계용존산소농도가 50%이상으로 알려져 있으며 *Penicillium chrysogenum*의 경우는 산소공급이 부족할 경우 치명적인 생리적 변화를 초래하는 것으로 보고된 바 있다[9,10].

배양과정에서 산소전달이 제한될 때 일반적으로 교반속도를 증가시키거나 공기 공급량을 증가시킴으로써 산소전달을 개선시킬 수 있다. 그러나 균사형성 미생물은 배양액 내의 용존산소를 높게 유지하기 위하여 교반속도를 과도하게 증가시킬 경우 강한 전단력으로 인해 균사체의 성장이 저해를 받는 것으로 알려져 있다[8].

따라서 본 연구에서는 배양액 내의 용존산소를 여러 농

*Corresponding author
Tel. 82-31-673-2041, Fax. 82-31-676-4671
E-mail: kimjl@whanin.co.kr

도로 조절하여 상황버섯을 배양하고 각 배양조건의 최종 건조균체량과 최대 비성장속도를 조사하여 용존산소가 상황버섯의 성장에 미치는 영향을 검토하였다. 또한 배양액 내의 용존산소농도를 최적의 조건으로 유지하는 동시에 교반속도와 통기량을 정밀 조절함으로써 전단력에 의한 상황버섯의 균사체 성장 저해를 최소한으로 줄일 수 있는 산소공급전략을 연구하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용한 *P. linteus* WI-001은 강원도 양양에서 채집한 자실체로부터 균사체를 분리하였으며, 이 자실체로부터 균사조직을 무균적으로 떼어 내어 준비된 고체배지상에 옮겨 순수 분리 배양하였다.

균주는 PDA slant에 배양하여 4°C 냉장고에 보관하면서 필요할 때마다 PDA 고체배지에 이식한 후 균사체 직경이 5 cm 이상 자랐을 때 균사체 가장자리에서 의료용 무균칼로 가로 5 mm, 세로 5 mm의 절편을 떼어 균사체 확대배양을 하였다.

배지 및 시약

종배양을 위해 사용된 성장배지는 potato dextrose agar (Difco) 고체배지 및 potato dextrose broth(Difco) 액체배지를 사용하였다. *P. linteus* 배양을 위한 생산배지의 조성은 Table 1과 같다. 실제 생산배지의 성분은 문헌조사에 근거하여 균사체가 가장 잘 자라는 배지에서 점차적으로 최적화를 통해 확립하였다. 배지의 열 멸균시 침전과 갈변현상을 방지하기 위해 당과 무기염류를 농축용액으로 만들어 멸균한 후에 무균상태에서 나머지 배지용액과 혼합하여 사용하였다.

배양방법

배지 및 시약에서 언급한 성장배지 및 생산배지의 조성을 기본으로 하여 1차 종배양은 100 ml의 생장배지를 넣은 500 ml의 baffle 삼각플라스크에 접종하여 진탕배양기에서 25°C, 120 rpm으로 7일간 배양하였다. 1차 종배양 완료 후 균사체 ball을 균질화 시키고자 waring blender (Cole parmer Co.)로 5초간 균질화 시킨 후 2차 종배양으로 200 ml 생산배지를 넣은 1 L baffle 삼각플라스크에 10%(V/V)로 접종한 후 25°C, 120 rpm으로 7일간 진탕배양하였다.

Table 1. Component and composition of WIM liquid medium for *P. linteus* culture

Component	Composition (g/L)
Glucose	20
Peptone	6
Yeast extract	4
$MgSO_4$ $7H_2O$	1.5
KH_2PO_4	0.4
K_2HPO_4	0.2
pH	5.5

배양에 사용된 발효기는 7 L 용량(working volumn 4 L)의 상부형 발효기(주식회사 한국발효기)로서 자동 온도 조절기, 교반속도 조절기, 용존산소농도(DO) 센서 및 pH 센서를 부착하고 있으며 데이터 수집 및 제어 프로그램(주식회사 로카스)과 연결되어 자동으로 제어된다. 산소의 공급은 공기압축기를 이용하여 여과필터를 거쳐 발효기 안으로 투입되게 하였으며 유량은 0.25~1.5 vvm 범위내에서 조절하였다. 교반속도는 100~150 rpm으로 용존산소농도에 따라 변화시키면서 배양하였다. pH는 배양초기에 5.5로 유지시킨 후에는 조절하지 않았다.

분석방법

균사체농도를 측정하기 위하여 매시간 마다 채취한 시료를 여과장치에서 whatman paper 2로 여과한 후 균사체를 증류수로 세척하고 다시 여과하였다. 이 과정을 2회 반복한 후에 수분측정기(Mettler toledo, HR73)에서 온도를 105 °C로 조정한 후 건조무게를 측정하였다.

균사체를 제거한 여과액 10 μl를 glucose analyzer(YSI 2700 SELECT)를 이용하여 발효 배양액 중에 남아있는 glucose의 농도를 정량분석하였다.

현미경 관찰

배양 조건에 따른 균사체의 균사 발달 형태를 관찰하기 위하여 위상차 현미경(Olympus BX50F4)을 이용하였다. 배양된 균사체를 직접 채취하여 슬라이드글라스에 옮긴후 40배와 100 배의 배율로 관찰한 후 현미경에 연결되어 있는 디지털카메라(Olympus CAMEDIA C-2020Z)로 촬영하였다. 현미경 사진은 image analyzer system(Image Scope 2.3, Kyungil High Technology)을 이용하여 균사체의 균사발달 정도를 분석하였다.

용존산소농도의 조절

발효 배양액의 용존산소농도(DO)를 조절하기 위하여 배양액의 DO 농도를 실시간으로 측정하여 아날로그 신호를 A/D 변환기를 통해 디지털 신호로 변환하여 컴퓨터로 전달되도록 하였다. 정해진 DO 고정값(set point)으로부터 실제 측정된 DO 농도값이 벗어난 정도에 따라서 교반 속도와 공기 공급량을 자동으로 감소 또는 증가시켰다. DO 농도를 원하는 고정값으로 조절하기 위하여 Fig. 1과 같이 세 가지 방법을 사용하였다. 방법 1은 수동제어로서 배양액의 DO 농도가 고정값에 도달한 시점부터 mass flow controller (MFC, ALBOG)를 이용하여 미리 설정해 놓은 하한값과 상한값 사이에서 공기 공급량만을 자동조절하고 발효기의

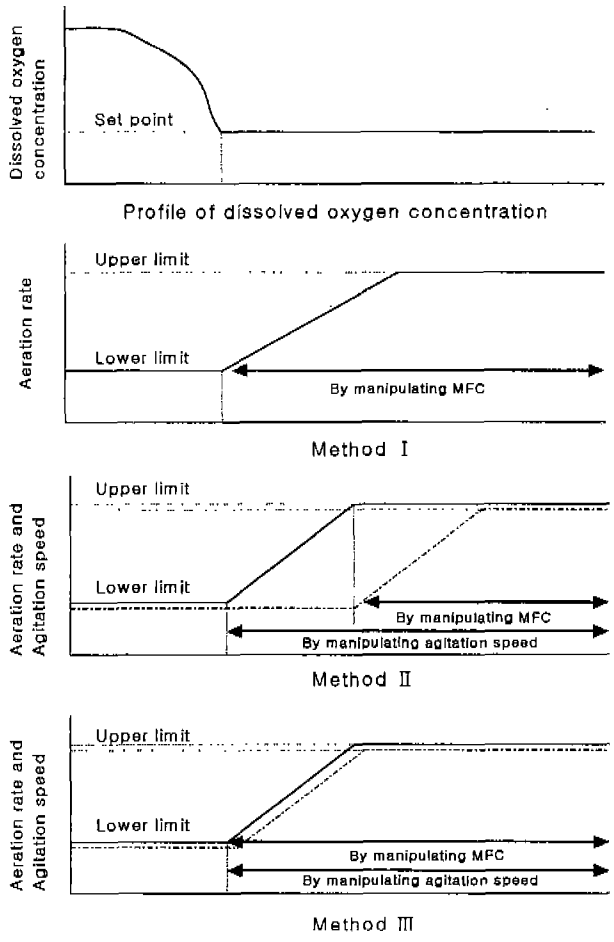

Fig. 1. Various methods for controlling dissolved oxygen (DO) concentration.

교반 속도는 발효 상황에 따라 수동으로 조절한 방법이다. 방법 2는 순차제어로서 배양액의 DO 농도가 고정값을 벗어났을 경우 일차적으로 교반속도를 상한값까지 증가시킨 후 이차적으로 MFC를 이용하여 공기 공급량을 정해진 상한값까지 증가시키는 조절방법이다. 방법 3은 복합제어로서 DO 농도를 정해진 고정값으로 조절하기 위해 교반속도와 공기 공급량이 복합적으로 동시에 조절되는 방법이다. 세 가지 방법 모두 교반속도와 공기공급량을 상한과 하한값인 100~150 rpm, 0.25~1.5 vvm 사이에서 작동되도록 제어프로그램을 작성 및 조작하였다.

결과 및 고찰

상황버섯 균사체의 생장에 미치는 용존산소농도의 영향

1000 ml 삼각플라스크에서 다양한 배지액량으로 상황버섯 균사체를 배양하면서 DO가 균사체 성장에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 2). 균사체 배양 5일째에는 배지액량에 따른 건조균사체량의 차이를 발견할 수 없었으며, 배양 10일째에는 배지액량의 증가에 따라 건조균사체량이 감소하는 경향을 나타냈다. 배양 5일째의 건조균체량이 모든 실험군에서 일정하게 나타난 것은 아직 균사체량이 적고 DO가 제한되지 않아 균사체 성장에 큰 영향을 미치지 않았으며 균사체량이 증가함에 따라 산소요구량이 커져 DO 제한에 의한 영향이 나타난 것으로 사료된다. 150 ml의 배지액량으로 배양한 경우가 건조균사체량이 11.54 g/L로 가장 우수하였고 배지액량이 증가함에 따라 건조균사체량이 점차 감소하여 DO 농도가 상황버섯의 성장에 중요한 요소로 작용함을 알 수 있었다. 50 ml과 100 ml의 배지액량에서 건조균체량이 감소한 것은 DO에 의한 영향보다는 shear에 의한 부정적 영향이 더 강하게 작용했기 때문인 것으로 사료되어 현미경 관찰을 시도하였다(Fig. 3). 50 ml과 150 ml의 배지액량에서 배양된 균사체를 40배와 100배의 배율로 각각 균사체 발달 양상을 관찰한 결과 50 ml의 배지액량에서 배양된 균사체의 경우 pellet의 밀도가 매우 높고 pellet 주위의 균사체가 대부분 분리되어 pellet 표면이 매끄러운 반면 150 ml의 배지액량에서 배양된 균사체는 pellet의 밀도가 낮고 pellet의 표면에 균사가 매우 발달되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 결과적으로 50 ml의 배지액량에서 배양된 균사체가 150 ml의 배지액량에서 배양된 균사체보다 전단력에 의한 성장저해가 더 심각한 것을 알 수 있었다. 따라서 DO 제한과 shear stress를 일으키지 않는 범위에서 교반과 공기공급이 정밀 조절되어야 함을 알 수 있었다.

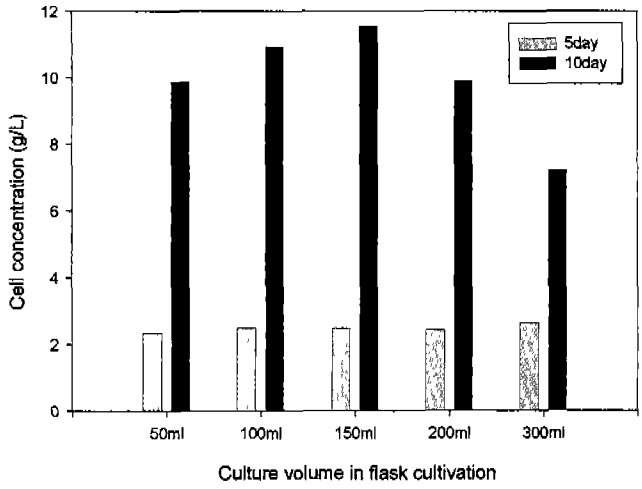

Fig. 2. Effect of culture volume of flask on cell growth.

수동제어방식에 의한 용존산소농도 조절

7 L 발효조에서 DO 농도가 버섯 균사체 배양에 미치는 영향을 구명하기 위하여 DO 농도를 100% 포화용존산소의 10%, 20%, 30%로 조절하여 실험하였다. DO의 보정을 위해 질소가스를 계속적으로 공급하여 배양액 내의 DO가 완전히 제거된 상태를 0% DO 농도로 정하였고, 배양액 내로 1 기압의 공기를 계속적으로 공급하여 DO 농도가 포화상태에 도달한 점을 100% 포화용존산소농도로 정하였다.

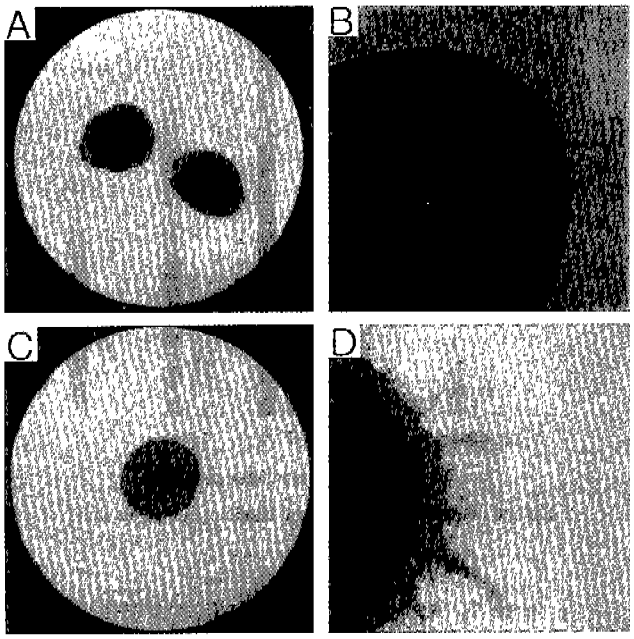

Fig. 3. Mycelial morphologies of *P. linteus* WI-001 in flask cultivation.
A: culture volume 50 ml (×40), B: culture volume 50 ml (×100), C: culture volume 150 ml (×40), D: culture volume 150 ml (×100).

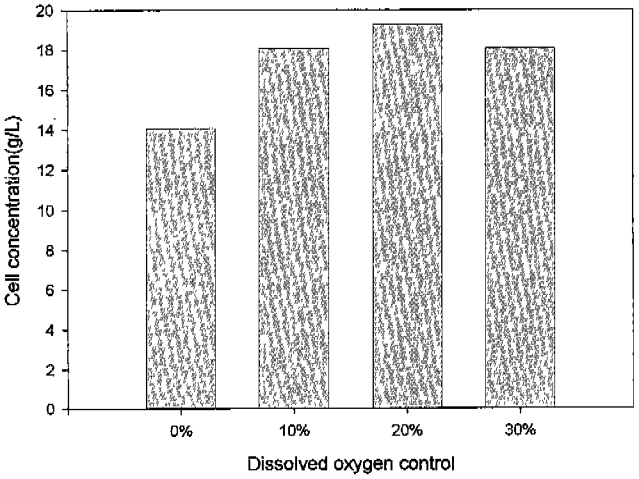

Fig. 4. Comparison of final cell concentration in *P. linteus* WI-001 fermentation performed with different methods of DO manual control.

DO 농도의 조절은 Fig. 1에서 언급한 조절 방법 중 첫 번째 방법, 즉 공기 공급량은 0.25 vvm, 교반은 100 rpm으로 고정하여 배양하다가 DO 농도가 원하는 고정값보다 낮아질 경우 공기 공급량을 제어 프로그램에 따라 0.25~1.5 vvm의 범위에서 자동으로 조절되도록 하였으며 교반은 배양 상태에 따라 최고 150 rpm 까지 수동으로 조절하였다. 대조군으로서 배양 초반부터 배양 말기까지 공기를 0.25 vvm으로 공급하고 교반속도를 100 rpm으로 고정하여 DO 농도가

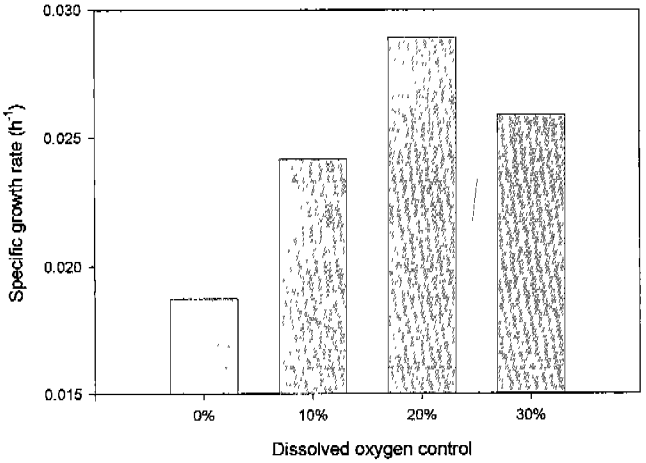

Fig. 5. Comparison of specific growth rate in *P. linteus* WI-001 fermentation performed with different methods of DO manual control.

제한된 조건을 만들어 주었다.

각각의 DO 농도 조절 조건에서 최종 건조균사체량을 비교해 본 결과 Fig. 4와 같이 DO 농도를 조절한 경우가 DO 농도를 조절하지 않은 경우보다 적어도 28% 이상 높은 건조균사체량을 나타내었다. 그러나 DO를 10%, 20%, 30%로 조절한 각각을 비교한 결과 각 조건에서 건조균사체량의 큰 차이는 보이지 않았으나 DO 농도가 높게 유지됨에 따라 최종 건조균체량도 증가하다가 DO를 30%로 조절한 경우에서는 다시 감소하는 경향이 나타났다. 이는 균사체의 발달정도를 관찰해 본 결과 Fig. 3의 50 ml 배지액량에서 배양한 균사체의 발달정도와 유사하게 나타난 것으로 보아 DO 농도를 30%로 유지하기 위해 교반속도가 과도하게 증가될 경우 오히려 shear stress로 작용하여 버섯균사체의 성장에 부정적인 영향으로 작용한 것으로 사료된다.

Fig. 5에 DO 농도에 따른 세포의 비성장속도의 변화를 나타내었다. Fig. 4와 동일하게 DO 농도를 조절한 경우가 DO 농도를 조절하지 않은 경우보다 적어도 28% 이상 높게 나타났으며 세포비성장속도의 변화 양상도 DO 농도 20%까지는 증가하다가 DO 농도 30%에서 다시 감소하는 것으로 나타났다.

상기 실험을 통해 용존산소의 조절이 버섯균사체의 성장에 필수적임을 알 수 있었고 또한 20%의 DO 조절 조건에서 가장 높은 건조균사체량을 나타냈으므로 이 후의 실험에서는 DO 농도를 20%로 조절하였다.

순차자동제어방식에 따른 용존산소농도 조절

상기 실험을 토대로 본 실험에서는 DO 농도를 20%로 조절하였으나 교반속도를 수동으로 조작하지 않고 재료 및 방법에서 언급한 DO 조절 방법 중 두 번째 방법, 즉 배양 조건에 따라 제어프로그램으로 교반과 공기 공급을 순차적

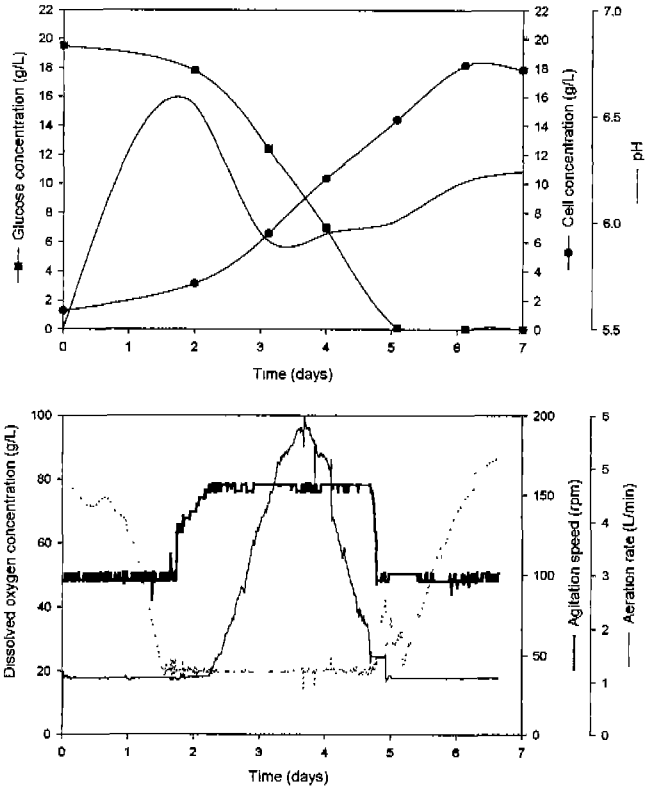

Fig. 6. Time-course profiles of cell and glucose concentrations, DO, aeration rate, and agitation speed in *P. linteus* WI-001 fermentation performed with cascade DO control method.

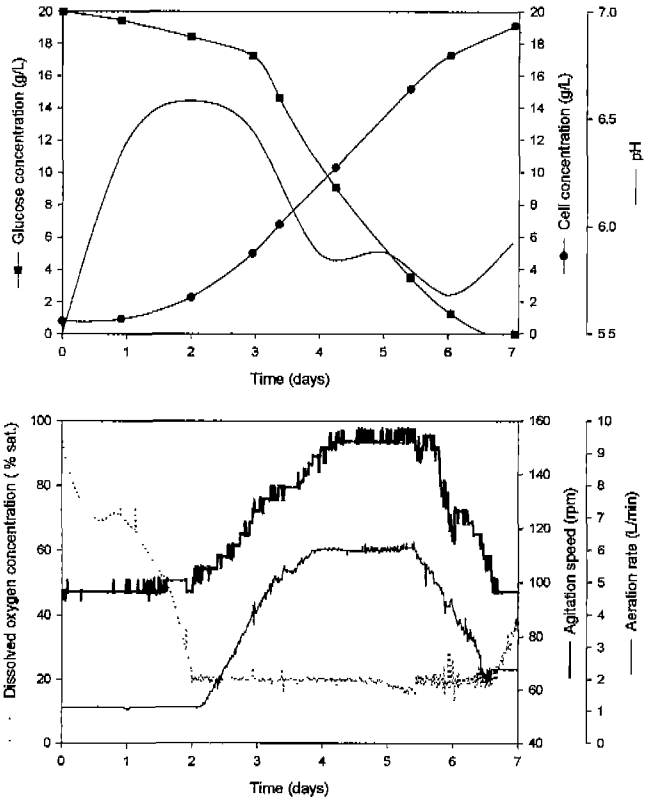

Fig. 7. Time-course profiles of cell and glucose concentrations, DO, aeration rate, and agitation speed in *P. linteus* WI-001 fermentation performed with mixed DO control method.

으로 조절하였다. 공기 공급과 교반을 각각 0.25 vvm과 100 rpm으로 고정하여 배양하였고 DO 농도가 20%에 도달한 시점부터 일차적으로 교반속도를 150 rpm 까지 자동조절하였으며 교반속도가 150 rpm에 도달한 시점부터 이차적으로 공기 공급량을 1.5 vvm까지 자동으로 조절하여 20%의 DO 농도로 조절되도록 하였다.

Fig. 6은 방법 2를 이용하여 DO 농도를 20%로 유지한 경우의 시간에 따른 건조균사체량과 잔존 glucose의 변화를 나타낸 것이다. 또한 시간에 따른 DO 농도의 변화와 20% DO 농도를 유지하기 위한 교반 속도의 변화, 공기 공급량의 변화를 나타내었다. DO 농도와 교반, 공기 공급량의 변화를 살펴보면 DO 농도가 20%에 이른 지점에서 일차적으로 교반속도가 최고 속도까지 증가하였고 다음으로 공기 공급량이 서서히 증가하여 설정해 놓은 최고 공기 공급량까지 증가하였다. 따라서 제어가 앞에서 언급했던 두 번째 방법 대로 정확히 이루어졌다고 판단하였다.

최대 균체량을 살펴보면 18 g/L로 DO 농도를 조절하지 않은 경우와 비교하여 28%의 수율이 향상되었으며 glucose 소비 경향을 살펴보면 DO 농도를 조절하지 않은 경우는 배양 말기에도 5.91 g/L의 glucose가 잔존했던 반면 DO 농도를 20%로 조절한 경우는 배양말기에 모든 glucose가 완전히 소비된 것으로 보아 산소가 충분히 공급됨으로써 버섯 균사체의 성장속도가 빨라지고 동시에 glucose의 소비가 매우 빠르게 진행된 것으로 사료된다(Fig. 6).

혼합자동제어방식에 따른 용존산소농도 조절

DO 농도를 방법 2에 의해 제어한 경우가 방법 1에 의해 제어한 경우의 건조 균사체량과 비교하여 오히려 더 적은 양을 나타냈는데 이는 교반 속도가 상한선까지 증가한 후에 공기 공급량이 조절되기 시작함에 따라 배양 초반에 균사체가 받는 shear stress가 심각하게 작용한 것으로 사료된다. 따라서 재료 및 방법에서 언급한 DO 농도 조절 방법 3을 이용하여 버섯 균사체의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다.

Fig. 7과 같이 DO 농도가 20%에 도달한 시점부터 교반속도와 공기 공급량이 복합적으로 자동 조절되도록하여 교반 속도와 공기 공급량이 동시에 증가하는 양상을 나타내었다. 최대 건조균사체량은 19.12 g/L로 DO를 조절하지 않은 경우와 비교하여 수율이 36% 향상되었으며 배양액 중의 glucose는 완전히 고갈되었다.

DO 농도의 조절 방법에 따른 최대 건조균사체량을 Fig. 8에 나타내었다. 조절 방법의 형식과 상관없이 DO 농도를

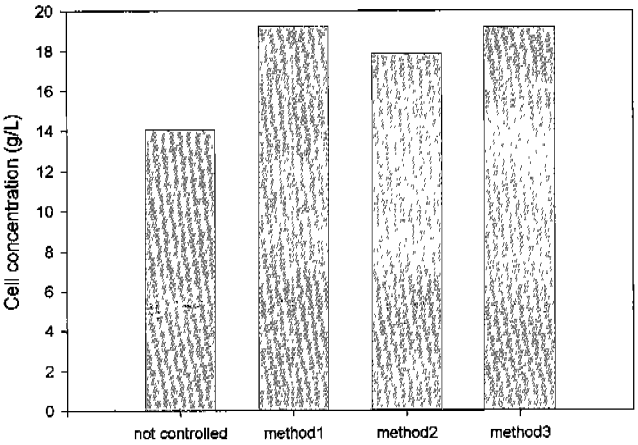

Fig. 8. Comparison of cell concentration in *P. linteus* WI-001 fermentation performed with different DO control methods.

조절한 경우가 조절하지 않은 경우와 비교하여 최대 건조균사체량은 월등히 증가된 양상을 나타내었으며 DO 농도의 조절방법에 따라서는 약간의 차이를 보였다. DO 농도가 20%에 도달한 시점에서 교반속도를 일차적으로 조절한 방법 즉 순차제어 방법이 나머지 조절 방법에 비해 5% 낮은 수율을 나타냈는데 이는 DO농도의 조절을 일차적으로 교반속도에만 의존함으로써 shear에 의해 균사체의 성장이 저해를 받은 것으로 사료된다.

반면 교반속도와 공기 공급량에 의한 복합제어는 교반 속도를 수동으로 조절한 방법 1과 같은 수준의 건조균사체량을 나타냄으로써 건조균사체량의 증가 뿐만 아니라 DO 농도의 조절을 위해 수동으로 조작하던 방법을 제어프로그램을 통해 완전 자동화 할 수 있었다. 결과적으로 본 실험에서 제시한 DO 농도의 조절 방법 중에서 방법 3이 가장 우수한 조절 방법이 될 수 있음을 제시하고 있다.

요 약

강력한 항암작용을 나타내는 단백다당체를 생산하는 *Phellinus linteus* WI-001 균주를 대상으로 용존산소의 농도 및 용존산소농도 조절 방식에 따른 균사체 생산성을 조사하였다. 플라스크에서 배지액량에 따른 건조균사체량의 변화를 살펴본 결과 균사체 성장에 용존산소와 shear stress가 중요한 요소로 작용함을 알 수 있었다. 4 L 발효기 배양시 용존산소농도를 조절하지 않은 경우에 비해 용존산소농도를 10%, 20%, 30%로 수동조절한 경우가 용존산소를 조절하지 않은 경우에 비해 균사체량이 최대 36% 증가하였으며, 각 용존산소농도에서의 세포비성장속도를 조사한 결과 20%의 용존산소농도에서 64% 증가하였다. DO control 방식을 자동화하기 위하여 20%의 용존산소농도로 순차자동제어한 경우 최종 건조균사체량은 18 g/L였다. 용존산소농도의 조절 방법 중 교반 속도와 공기 공급량을 혼합자동제어방식으로 조절한 경우 건조균사체량이 19.5 g/L로서 균사체 생산성이 가장 우수 하였다. 결론적으로 shear sensitive한 *Phellinus linteus*를 배양할 경우 균사체 생산성을 증가시키기 위한 방법으로서 혼합제어방식이 가장 효과적이었다.

REFFERENCES

1. Chung, K. S., S. S. Kim, H. S. Kim, K. Y. Kim, and M. W. Han. 1993. Effect of Kp, an antitumor protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus* on the humoral immune response of tumor-bearing ICR mice to sheep red blood cells. *Arch. Pharm. Res.* **16**(4): 336–338.
2. Collins, L. D. and A. J. Daugulis. 1997. Biodegradation of phenol at high initial concentration in two-phase partitioning batch and fed-batch bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 155–162.
3. Ikekawa, T., M. Nakanishi, N. Uehara, G. Chihara, and F. Fukuoka. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann.* **59**: 155–157.
4. Jong, S. C., J. M. Birmingham, and S. H. Pai. 1991. Immunmodulatory substances of fungal origin. *J. Immunol. Immunophamacol.* **11**: 115–122.
5. Lee, J. H. 1994. Anti-tumor and immuno-stimulating activity of fungal polysaccharides. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**(3): 14–21.
6. Lee, J. H., S. M. Cho, K. S. Song, S. B. Han, H. M. Kim, N. D. Hong, and I. D. Yoo. 1996. Immunostimulating activity and characterization of polysaccharides from mycelium of *Phelliuns linteus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 213–218.
7. Nanba, H. and H. Kuroda. 1988. Potentiation of host-mediated antitumor activity by orally administered mushroom (Agaricus bisporus) Fruit bodies. *Chem. Pharm. Bull.* **36**(4): 1437–1444.
8. Nash, C. H. and F. M. Huber. 1971. Antibiotic synthesis and morphological differentiation of *Cephalosporium acremorium*. *Appl. Microbial.* **22**: 6–10.
9. Steel, M. R. and W. D. Maxon. 1966. Dissolved oxygen measurements in pilot and production-scale novobiocin fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **8**: 97–108.
10. Vardar, F. 1983. Problems of mass and momentum transfer in large fermentors. *Process Biochem.* **18**: 21–23.

(Received July 19, 2000)