

*Phellinus linteus*의 균사체 액상배양에서 단백다당체(β -D-glucan)의 생산성 향상을 위한 균주 개량과 배양형태 조절의 중요성

신우식 · 권영중* · 정용섭** · 전계택†

강원대학교 BT특성화학부대학
200-701 강원도 춘천시 효자 2동 192-1
*강원대학교 화학공학과
200-701 강원도 춘천시 효자 2동 192-1
**전북대학교 응용생물공학부
561-756 전북 전주시 덕진구 덕진동 1가 664-14
(2009년 2월 26일 접수, 2009년 3월 13일 채택)

Importance of Strain Improvement and Control of Fungal cells Morphology for Enhanced Production of Protein-bound Polysaccharides(β -D-glucan) in Suspended Cultures of *Phellinus linteus* Mycelia

Woo-Shik Shin, Yong Jung Kwon*, Yong-Seob Jeong** and Gie-Taek Chun†

School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, 192-1, Hyoja 2-dong, Chuncheon, Kangwon 200-701, Korea

*Department of Chemical Engineering, Kangwon National University, 192-1, Hyoja 2-dong, Chuncheon, Kangwon 200-701, Korea

**Faculty of Biotechnology, Chonbuk National University, 664-14, 1 Ga, Duckjin-dong, Duckjin-gu, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea

(Received 26 February 2009; accepted 13 March 2009)

요 약

본 연구에서는 *Phellinus linteus* 균사체의 액상배양을 통한 면역증강 생리활성 효능의 단백다당체 생산공정을 개발하기 위한 시도로서, 우선 생산균체의 원형질체 형성을 통한 고생산성 균주를 개발하고자 하였으며, 발효기 액상배양 시 최적 배양형태의 유도를 통해 균사체와 단백다당체의 생산성을 극대화하고자 하였다. 본 연구실에서 채취한 생산 균주를 ITS rDNA sequencing 방법과 blast search 방법에 의해 조사한 결과 다양한 *Phellinus linteus* 종들과 99.67% 이상의 유사성 확인되어, 이 균주를 *Phellinus linteus*라고 최종적으로 동정할 수 있었다. 이 동정된 균주로부터 균주 개량을 시도하기 위해 *Phellinus linteus* 균사체로부터 대량의 원형질체 형성 및 재생에 의한 단일 콜로니 획득 방법을 개발함으로써 균주를 신속하게 개량할 수 있었다. Sorbitol을 이용한 banding filtration 방법을 이용하여 원형질체를 회수한 결과 $10^5 \sim 10^6$ protoplasts/ml를 얻을 수 있었으며, 원형질체 재생률은 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ 로 나타났다. 균주개량을 위해 원형질체 재생배지와 고체배양배지에서 고성장성 및 고안정성을 보이는 균주들을 지속적으로 대량 선별하여, 액상 생산배양을 수행하였다. 그 결과 균사체량은 13~15 g/L로 대부분 비슷하게 자랐으며, 조단백다당체의 함량 또한 5.8~6.4%로 거의 비슷하게 분포하는 것으로 나타났는데, 이로부터 고체배양배지에서 빠른 성장속도를 보여주는 균주들이 대부분 액상 생산배양에서도 고생산성 및 고안정성을 보여주는 것을 확인할 수 있었다. 한편 *Phellinus linteus* 균사체의 경우 조단백다당체의 함량이 세포 무게당 거의 일정한 양을 함유하고 있는 것으로 확인되었으므로, 조단백다당체의 생산성을 증가시키기 위해서는 최종 생산배양에서의 균체량 증가가 가장 중요한 것으로 판단되어, 균사형성 고등균류의 균사체 배양 시 균체량 증가에 가장 중요한 요인 중의 하나인 생산균주의 배양형태적 특성에 대해 집중적으로 조사하였다. 균주개량 실험을 통해 고생산성 균주로 최종 결정된 AR147 균주를 이용해서 다양한 배양조건에서 발효조 배양을 수행한 결과, 최종 생산발효조로의 접종원이 고농도의 균사모양인 경우에 생산균주의 배양형태가 매우 작은 compact한 펠렛 모양(대부분 직경 0.5 mm 이하)을 유지하는, 이상적인 균사체 액상배양 공정이 이루어지는 것으로 확인되었다. 즉 생산 발효조배양에서 직경 0.5 mm 이하의 compact한 펠렛 모양의 배양형태가 유도되었을 경우, lag phase 시간의 획기적 감소와 1.5배 이상의 높은 세포비성장속도로 인해, 최종 균사체생산성이 다른 배양형태를 유도한 경우에 비해 약 3.3배 더 높은 주목할 만한 배양결과를 얻을 수 있었다. 이로부터 균사 형성 *Phellinus linteus*의 산업용 발효조 배양 시, 각 배양단계에서의 생산균체의 배양형태가 최종 균체생산성, 궁극적으로는 최종 단백다당체의 생산성에 심각한 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gtchun@kangwon.ac.kr

‡이 논문은 서울대학교 최창균 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

Abstract – Strain improvement and morphology investigation in bioreactor cultures were undertaken in suspended cultures of *Phellinus linteus* mycelia for mass production of protein-bound polysaccharides(soluble β -D-glucan), a powerful immuno-stimulating agent. *Phellinus sp.* screened for this research was identified as *Phellinus linteus* through ITS rDNA sequencing method and blast search, demonstrating 99.7% similarity to other *Phellinus linteus* strains. Intensive strain improvement program was carried out by obtaining large amounts of protoplasts for the isolation of single cell colonies. Rapid and large screening of high-yielding producers was possible because large numbers of protoplasts ($1 \times 10^5 \sim 10^6$ protoplasts/ml) formed using the banding filtration method with the cell wall-disrupting enzymes could be regenerated in relatively high regeneration frequency($10^{-2} \sim 10^{-3}$) in the newly developed regeneration medium. It was demonstrated that the strains showing high performances in the protoplast regeneration and solid growth medium were able to produce 5.8~6.4%(w/w) of β -D-glucan and 13~15 g/L of biomass in stable manners in suspended shake-flask cultures of *P. linteus* mycelia. In addition, cell mass increase was observed to be the most important in order to enhance β -D-glucan productivity during the course of strain improvement program, since the amount of β -D-glucan extracted from the cell wall of *P. linteus* mycelia was almost constant on the unit biomass basis. Therefore we fully investigated the fungal cell morphology, generally known as one of the key factors affecting cell growth extent in the bioreactor cultures of mycelial fungal cells. It was found that, in order to obtain as high cell mass as possible in the final production bioreactor cultures, the producing cells should be proliferated in condensed filamentous forms in the growth cultures, and optimum amounts of these filamentous cells should be transferred as active inoculums to the production bioreactor. In this case, ideal morphologies consisting of compacted pellets less than 0.5mm in diameter were successfully induced in the production cultures, resulting in shorter period of lag phase, 1.5 fold higher specific cell growth rate and 3.3 fold increase in the final biomass production as compared to the parallel bioreactor cultures of different morphological forms. It was concluded that not only the high-yielding but also the good morphological characteristics led to the significantly higher biomass production and β -D-glucan productivity in the final production cultures.

Key words: *Phellinus linteus*, β -D-glucan, Protoplast, Morphology, Bioreactor Cultures

1. 서 론

천연물 유래 생리활성물질 및 기능성 식품의 개발을 통한 질병의 치료 및 예방에 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져 있는 약용버섯은 분류학적 군류(Fungi) 중 진균류(Eumycetes)에 속하며 대부분은 담자균류(Basidiomycetes)의 일종이다[1, 2]. 약용버섯은 단백질, 아미노산, 비타민, 무기염류, 당 등과 같이 인체에 중요한 각종 영양성분을 함유하고 있고 광범위한 약리작용을 가지고 있어 전통적으로 민간약의 제제로 널리 활용되어 왔다[3]. 최근 여러 종류의 버섯 자실체 및 균사체 배양물의 면역증강 작용에 의한 항암활성효과가 과학적으로 입증됨에 따라 의약품이나 생리활성물질로서 그 용도가 크게 증가하고 있다[4].

약용버섯의 성분 중 면역증강작용을 나타내는 것은 β -D-glucan 구조를 갖는 단백당체인 것으로 보고되었다. 단백당체는 일반적으로 β -1,3 glucan의 골격에 β -1,6의 가지 구조를 갖는 단일물질임에도 불구하고 생체기능에 다양한 효과를 나타낸다[5-7]. 약용버섯 유래 단백당체의 생리활성기능으로는 면역증강작용 이외에도 간 기능 개선작용, 고지혈증 개선작용 및 혈당강하작용을 갖는 것으로 밝혀져 있다. 일본의 경우 기능성 식품으로 표고버섯 균사체 추출물이 이미 일반화되어 있으며, 의약품의 경우 면역증강효과에 의한 암치료(보조)제로 사용되고 있다. 즉 구름(운지)버섯 배양 균사체에서 추출한 단백당체 PSK는 항암성 면역증강제인 Krestin으로, 치마버섯 균사체 배양의 배양여액에서 추출한 세포외다당체 Shizophyllan은 항암성 면역증강제인 Sizofilan 주사제로, 그리고 표고버섯 자실체에서 추출한 단백당체는 항암성 면역증강제인 Lentinan 주사제로 판매되고 있다[8].

항암효과가 특히 뛰어난 것으로 알려진 단백당체의 생산균주이며 담자균류에 속하는 *Phellinus linteus*는 성장조건이 까다로워 번식이 잘 되지 않아 야생의 것은 매우 비싸고 희귀하다. 담자균류의 면역증강 작용의 항암성분으로 밝혀진 단백당체는 특별히 고안된

정제과정을 거쳐 정제된 조단백당체 내에도 5% 이하의 함량을 나타내는 미량성분이다. 최근 들어 인공재배에 의해 자실체를 생산하고 있으나 긴 생산기간과 낮은 생산성으로 인해 소비자가 원하는 저렴한 가격에 판매가 어려운 실정이다. 현재까지 *Phellinus linteus*에 대한 대부분의 연구는 고체배양을 통하여 얻어진 자실체 추출물의 약리작용 및 약효성분, 구조분석에 관한 것이 주를 이루고 있을 뿐 액체배양을 통하여 균사체를 대량으로 배양하고 이로부터 단백당체를 대량 생산하는 연구는 부족한 실정이다. 자실체의 고체배양에 의해 단백당체를 생산하는 방법은 대량생산 시 품질관리가 힘들며 자실체 재배를 위한 많은 노동력과 시간이 요구됨에 따라 생산성도 떨어지는 단점이 있다[9]. 이와는 대조적으로 균사체 액상배양을 통한 단백당체 생산공정은 기존의 자실체 고체배양을 통해 생산하는 방법에 비해 보다 잘 규명된 조건하에서 대량생산이 가능하며 배양기간 또한 단축시켜 생산성을 높일 수 있는 장점이 있다[9, 10].

본 연구에서는 *Phellinus linteus* 균사체의 액상배양에 적합하고, 동시에 단백당체 고생산성의 특성을 갖는 우량균주를 획득하기 위해 원형질체를 형성하는 방법을 개발하고자 하였다. *Phellinus linteus*의 경우 균사체 액상배양 시 포자를 형성하지 않기 때문에 단일 유전자를 보유한 균주의 선별이 어려우며 이러한 점은 고생산성 균주 개발에 있어서 반드시 해결해야 할 부분이다. 따라서 본 연구에서는 균사체로부터 세포막을 제거하여 형성된 원형질체로부터 단일 핵을 보유한, 성장속도가 우수한 우량 균주를 선별하여, 이로부터 유효성분인 단백당체 고생산성 균주를 개발하고자 하였다. 이를 위해 원형질체 재생을 위한 재생배지와 고체성장배지에서 빠른 성장속도를 보이는 생산균주를 분리하여 플라스크와 발효조 액상배양을 통해 이들의 배양 생리적 특성을 재조사하였다.

한편 *Phellinus linteus*와 같은 균사형성 고등균류의 액상배양의 경우 일반적으로 두 가지 배양형태인 펠렛(pellet) 모양과 균사(filamentous) 모양으로 성장하는데, 이와 같은 배양형태는 배양액의

물리화학적 특성을 변화시키고 용존산소 및 배지 성분의 물질전달속도에 영향을 줌으로써 결과적으로 단백질당체의 생산성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[11]. 즉 배양액내의 물질전달속도는 발효기의 물리적 특징과 배지성분 또는 생산균주의 성장형태에 의해서 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 *P. linteus* 균사체의 액상배양을 통한 면역증강 생리활성 효능의 단백질당체 생산공정을 개발하기 위한 시도로써, 발효기 액상배양 시 최적 배양형태의 유도를 통해 균체량과 단백질당체의 생산성을 극대화하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 배지 종류, 계대배양, 정치배양 및 균주 보관

사용된 배지는 배양 목적에 따라 계대배양용 고체배지(MYA), 정치배양 배지(SGM), 액상 종배양용 성장배지(GM)와 액상 생산배양용 생산배지(PM)로 구분하였다. 각 배지의 조성은 다음과 같다:

- MYA medium : malt extract 20 g/L, yeast extract 2 g/L, agar powder 20 g/L
- SGM : glucose 22.5 g/L, yeast extract 2 g/L, soytone peptone 2 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 0.6 g/L
- GM : glucose 30 g/L, brown rice powder 10 g/L, yeast extract 8 g/L, soytone peptone 4 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 0.6 g/L, FeSO_4 0.01 g/L
- PM : glucose 30 g/L, brown rice powder(enzyme treated) 10 g/L, yeast extract 8 g/L, soytone peptone 4 g/L, KH_2PO_4 5 g/L, MgSO_4 1 g/L, FeSO_4 0.01 g/L.

멸균은 침전과 갈변현상을 방지하기 위하여 당과 질소원, 무기염류를 분리하여 121 °C에서 15분간 멸균하여 사용하였으며 때에 따라 0.45 μm 의 filter를 이용하여 멸균을 수행하였다. 생산균주는 강원도 인제군에서 분리한 *Phellinus linteus* strain을 이용하였다. 계대배양용 MYA 고체배지에서 자라난 균사체를 자체 제작한 직경 1cm의 agar-cutting용 stainless 칼을 이용하여 1 piece씩 떼어내어 미리 만들어 놓은 다른 MYA 배지로 옮겨준 후 14일 동안 28 °C에서 계대배양하는 과정을 반복 수행하였다.

2-2. 종균 액상배양을 위한 정치배양 조건 확립 및 균주보관

본 연구에서는 종배양(성장배양)의 초반 단계에서 정치배양 방법을 추가로 도입하여 종배양에서 원하는 균사모양의 배양형태를 유도하고자 하였다. 정치배양을 위해 MYA 배지에서 자란 균사체를 직경 1cm의 agar-cutting용 cork borer No.3을 이용하여 15 piece씩 떼어내어 정치배양용 SGM 배지로 무균상태에서 옮겨준 후 28 °C에서 7일간 배양하였다. 균주보관을 위해서는 정치배양에서 성장한 균사체를 blending하여 종배양용 GM 배지에서 약 5일간 액상배양을 수행한 후, 생산균주가 포함된 배양액 2.4 ml를 50%의 glycerol 용액 1.6 ml와 혼합한 20% glycerol stock을 만들어 -80 °C에 보관하였고, 필요시 마다 보관된 stock을 꺼내어 100 mm petridish의 고체 MYA 배지에 접종하여 약 14일 동안 28 °C에서 재활성화(reactivation)한 후 일련의 배양공정(즉 계대용 고체배양, 정치배양, 액상 종배양(성장배양), 액상 생산배양)을 수행하였다.

2-3. 단일 콜로니 획득을 위한 원형질체 형성, 회수 및 재생 방법

균주개량을 위해, *P. linteus* 균사체로부터 세포막을 제거하여 단일

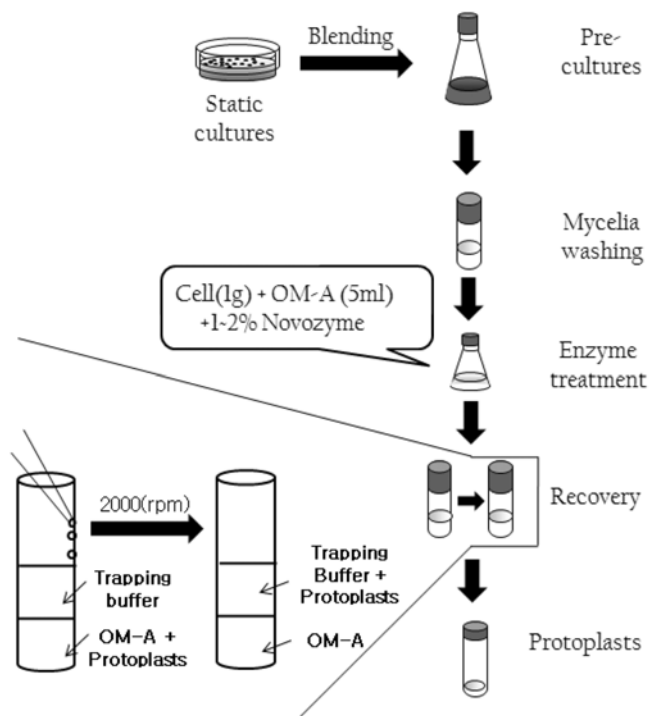


Fig. 1. Procedure for the protoplast formation (protoplast banding technique).

핵을 보유한 각각의 원형질체를 분리한 후, 이들을 재생하여 배양 생리적 특성이 우수한 균주를 선별하는 방법을 채택하였다. 원형질체를 형성하기 위해 100 mm의 petridish에서 7일간 정치배양을 통해 수확된 생산균주를 blender로 잘 갈아준 다음, 40 ml의 전배양배지(PGM) (glucose 22.5 g/L, yeast extract 2 g/L, soytone peptone 2 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 0.6 g/L)에서 37 °C, 120 rpm으로 48시간 동안 진탕배양하였다. 전배양을 통해 회수한 균사체를 pore size 20~25 μm (Whatman NO.4)의 filter를 통해 배지 등의 잔여물을 세척한 후 순수한 균사체를 수거하였다. Filtration을 통해 얻은 균사체를 0.6 M MgSO_4 로 2번 washing한 뒤 1 g(wet weight)의 균사(mycelia)를 측정하고, 이 균사에 Novozyme 234와 cellulase를 각각 2% 농도로 함께 처리하여 원형질체를 형성하였다. 이들 효소들은 OM-A buffer(1.2 M MgSO_4 , 0.2 M phosphate buffer, pH 5.8) 5 ml에 완전히 용해시켜 사용하였다. 원형질체 형성반응은 30 °C, 50 rpm에서 수행되었는데, 30분 간격으로 원형질체가 형성되는 상태를 관찰하며 처리시간을 조절(2~4시간)하였다.

형성된 원형질체를 회수하기 위해 회수 시 삼투압과 물리적 충격이 매우 적은 회수방법인 protoplast banding technique 방법(Fig. 1)을 적용하였다. 즉 형성된 원형질체를 centrifuge tube에 조심스럽게 담은 후 protoplast trapping buffer(0.6 M sorbitol, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0)를 천천히 10~20 ml 첨가하였다. 이들을 피펫을 이용해서 천천히 섞어준 후 2,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하면 형성된 원형질체는 trapping buffer 층으로 분리되고 나머지 잔여물은 아래의 OM-A 층으로 가라앉으므로 trapping buffer만을 회수하여 원형질체를 분리해낼 수 있었다(Fig. 1). 이러한 과정을 2~3번 반복하여 회수한 원형질체를 washing buffer인 STC buffer(1.2 M sorbitol, 10 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 7.5)를 이용해서 3,000 rpm으로 조심스

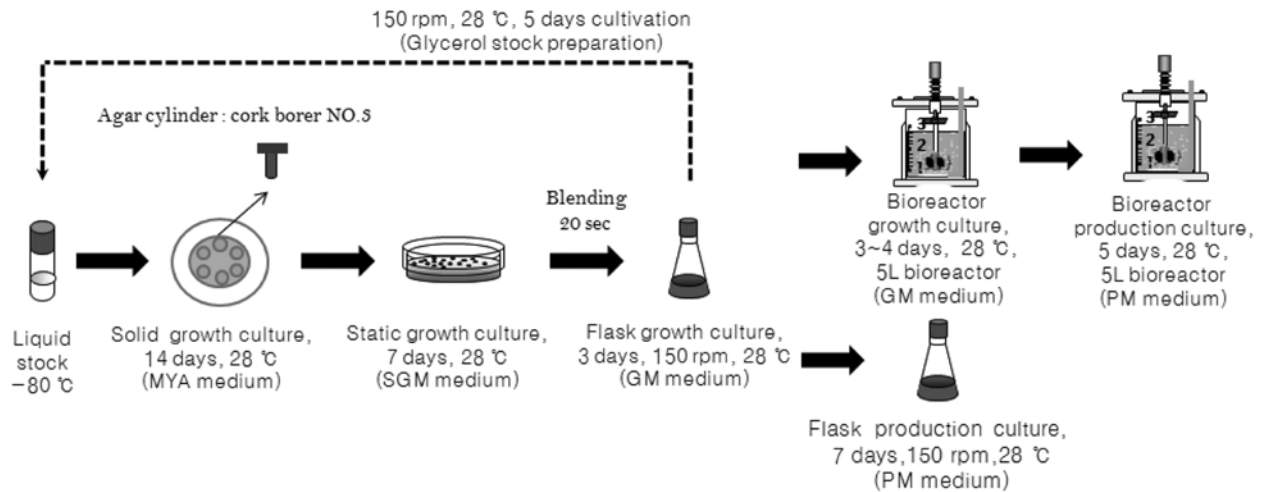


Fig. 2. Schematic diagram for the liquid stock preparation, solid growth culture, static growth culture, flask growth and production cultures, and bioreactor growth and production cultures.

럽게 2번 세척하여 효소 및 잔여물을 washing하였다. Washing 과정을 거쳐 분리된 순수한 원형질체를 STC buffer를 이용하여 적당히 희석한 후 원형질체 재생용 고체 soft 배지(1.2 M sobitol이 첨가된 최소배지) 5 ml에 0.1 ml씩 첨가한 후, 원형질체 재생용 고체배지 위에 pour plating하였다. 1.2 M sorbitol로 재생배지의 삼투압을 조절하였으며, soft 재생배지에는 1%의 agar를 첨가하였다. 원형질체의 세포벽을 효율적으로 재생하기 위해 여러 종류의 재생배지를 조사하는 실험을 수행하였는데, 각 재생배지에서 3~4일 동안 배양한 후 재생된 원형질체(regenerants)를 측정하였다.

2-4. 고생산성 균주선별을 위한 플라스크에서의 종배양 및 생산배양

플라스크에서의 액상 생산배양을 위한 접종액을 준비하기 위해, 선행된 정치배양을 거친 균사체를 Waring^R blender(Model: 51BL30)를 이용하여 low 상태에서 20초간 갈아줌으로써 균질한 접종원을 마련하였다. 이후 250 ml flask에서 액상 종배양(성장배양)을 3일 동안 수행하였으며(50 ml의 성장배지(GM) 이용), 이로부터 10% 접종량을 이용하여 250 ml 플라스크에서 150 rpm, 28 °C에서 7일 동안 최종 액상 생산배양(50 ml의 생산배지(PM) 이용)을 수행하여, 배양 생리적 특성이 우수한 고생산성의 우량균주를 선별하였다. 본 연구에서 사용한 계대배양, 정치배양, 플라스크 성장배양, 플라스크 생산배양, 발효조 성장배양 및 발효조 생산배양에 관한 일련의 배양 공정을 Fig. 2에 도식적으로 제시하였다.

2-5. 발효조 종배양의 접종원 마련을 위한 플라스크 배양에서의 종배양(성장배지 이용)

정치배양된 적정량의 균사체를 Waring^R blender를 이용하여 상기와 동일한 실험방법에 의해 잘 갈아준 후, 500 ml 플라스크(70 ml의 성장배지(GM) 이용)를 이용해서 150 rpm, 28 °C에서 3일 동안 1차 종배양을 수행하였다. 이 플라스크에서 배양된 균사체를 다시 500 ml flask(100 ml의 성장배지(GM)) 3개에 각각 30%씩 접종하여 28 °C에서 3일 동안 배양한 후(2차 종배양), 이 과정을 다시 반복하여 총 9개의 500 ml flask에서 균사체 배양액 900 ml를 마련하여(3차 종배양), 이를 5 liter 성장발효조에서의 종배양을 위한 접종원으로 사용하였다(Fig. 2).

2-6. 발효조에서의 종배양 및 최종 생산배양

발효조에서의 종배양은 30%(v/v)의 접종량으로 5 L 교반배양기(3 L 성장배지 사용)에서 3~4일 동안 수행하였으며, 배양온도는 28 °C, 교반속도는 100~300 rpm까지로 적절히 조절하여 용존산소 농도가 배양 기간 내내 20% 이상이 유지되도록 하였다. 사용된 발효기는 5 L 하부형 반응기(KF5, 코바이오택)이며, 여기에 테이터 수집 및 제어프로그램 (Autolab LK 930, Lokas automation Co., Korea)을 연결하여 사용하였다. 1vvm으로 공기를 공급하였으며, 배양과정 중에 배양액의 pH는 조절하지 않았다. 이와 같이 성장발효기에서 배양한 균사체를 최종 생산배양을 위한 5 L 발효조로 10%(v/v)로 접종하여 최종 생산배양(3 L 생산배지 사용)을 약 5일간 수행하였다(Fig. 2). 성장발효조에서 생산발효조로의 접종은 오염원을 효율적으로 차단하기 위해 발효조에 직접 연결된 연동펌프를 이용하여 on-line 상에서 수행하였다. 이와 같이 발효조에서 성장배양을 수행한 이유는 성장 발효조에서 생산균주의 배양형태를 인위적으로 유도함으로써, 최종 생산발효조로 접종한 균주의 상태가 생산배양에 미치는 영향을 조사하기 위함이었다.

2-7. 건조무게(DCW) 측정, 조단백다당체 측정 및 glucose 분석

발효조 배양의 경우, 매 12시간마다 배양액 20 ml를 sampling하여 원심분리에 의해 3번의 세척과정을 거친 후 90 °C oven에서 12시간 동안 균사체를 건조시킨 후 건조무게(DCW)를 측정하였다. 또한 각 생산균주의 조단백다당체 함량은 다음의 분석방법에 의해 수행되었다.

- 선별된 균주의 액상배양 균사체 회수를 위해 filtration하였다.
- 균사체는 증류수로 3번 washing하고, 배양여액은 분석을 위해 따로 샘플을 취해 놓았다.
- 균사체 wet 무게의 10~50 배수의 물을 넣고 blending하여 microwave extraction 시료를 준비하였다.
- Microwave oven의 setting을 150 °C, 10분간 50 PSI로 하여 조단백다당체를 추출하였다.
- 시료가 식으면 Whatman paper(6 μ m)로 filtration하고, 다시 0.45 μ m syringe filter로 여액을 거른 뒤 HPLC로 균체내 조단백다당체의 농도를 분석하였다. 분석칼럼은 Ultrahydrogel 2000(Phenomenex^R)이며 이동상은 3차 증류수를 1.2(ml/min)의 유속으로 ELSD detector

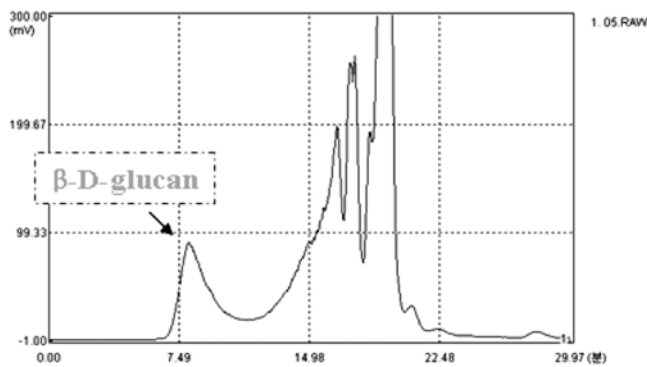


Fig. 3. HPLC chromatogram for the protein-bound polysaccharides (soluble β -D-glucan) extracted from the cell walls of the cultured mycelia of *P. linteus*.

를 이용하여 분석하였다. 조단백다당체 분석에 대한 chromatogram을 Fig. 3에 나타내었다.

한편 발효조 배양액내의 잔류 당 측정은 하기의 HPLC 운전조건에 의해 수행되었다:

- Column : SUPELCO, inc 25.0 cm \times 4.6 mm SUPECOSIL LC-NH₂ (5 micron)
- Column No : 091264AE
- Mobile phase : 75:25 Acetonitrile : Water
- Flow rate : 1.5 ml/min
- Detection : RI detector

3. 결과 및 고찰

3-1. 균주 동정

지금까지 *Phellinus*에 속한 다양한 담자균류들이 보고되었고 또한 각각의 종들로부터 단백다당체들의 추출과 생산이 이루어지고 있다. 현재까지 보고된 바에 의하면 *Phellinus linteus* 중에서 분리한 β -D-glucan 구조의 수용성 단백다당체가 항종양 작용 및 면역증강 효과에 있어서 매우 우수한 효과를 나타내고 있으므로[12], 본 연구에서는 *Phellinus linteus*의 균사체 액상배양을 통해 면역 활성 물질인 조단백다당체를 생산하고자 하였다. 본 연구를 위해 강원도 인제군에서 분리한 균주에 대해 ITS rDNA sequencing 방법을 의해 균주동정을 의뢰하였다. ITS rDNA sequencing은 동정하고자 하는

균주의 특정 염기서열을 이용하여 이미 알려진 *Phellinus linteus*들의 염기서열과 비교분석함으로써, 그 유사성을 분석하고 계통적으로 증명하는 방법이다[13, 14]. 본 실험에서는 712 bp의 염기 서열을 이용하였다. 이 sequence들을 다른 균주들과 비교하였을 때 유사성이 99%에서 100%까지 일치함을 확인하였고, 그 결과를 Table 1에 제시하였다. 결과적으로 ITS 부분의 염기서열에 의해 blast searching을 수행한 결과 여러 *Phellinus linteus*와 상당히 높은 유사성을 보임을 알 수 있었다. 99.67% 이상의 유사성을 나타내는 균주는 유전자의 증폭 및 염기결정 시 오차를 감안할지라도 같은 종 및 같은 균주라고 볼 수 있으므로 이 균주를 *Phellinus linteus*라고 최종 동정하였다.

3-2. 단일 콜로니 획득을 위한 원형질체 형성 및 재생 방법 확립

고생산성 균주의 개발은 산업적으로 이용되는 미생물에 있어서 생산성 향상과 공정 간소화를 위해 가장 중요한 부분이다. *Phellinus linteus*와 같은 담자균류의 경우 균사체 액체배양 시 포자를 형성하지 않기 때문에 단일 유전자를 보유한 균주의 선별이 어려우며 이러한 점은 균주개발에 있어서 반드시 해결해야 하는 부분이다[15-17]. 따라서 본 연구에서는 균사체로부터 세포벽을 제거하여 각각의 단일 핵을 보유한 원형질체를 분리하고, 이들을 재생하여 일차적으로 우수한 품종의 균주를 선별해 내고자 하였다. 아울러 원형질체를 분리할 수 있는 최적 조건과 재생 조건을 조사하였다.

원형질체 형성에 사용하기 위한 균사체 배양은 정치배양에서 7일 동안 자란 균사체를 수거하여 2일간 28 °C에서 진탕 배양하고 이들을 다시 계대하여 2일 동안 배양한 어리고 대사작용이 활발한 균사체를 이용하였다. 그 이유는 원형질체 형성에 있어서 가장 중요한 요인은 균사체의 상태인 것으로 확인되었기 때문이다. 균사가 충분히 자라 세포벽이 단단해진 뒤에는 원형질체를 분리해 내기 어려운 것으로 관찰되었다. 균체가 pellet을 형성하지 않고 성긴 균사(loose filamentous) 형태로 자라는 것이 좋으며 배양기간은 짧게 하여 어린 균사체를 사용하는 것이 유리했다. 또한 세포벽 제거를 위해 Novozyme 234를 사용하였을 때 원형질체형성률이 높았으며 특별히 cellulase를 함께 처리했을 때 좀더 빠르게 원형질체가 분리되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4(A)).

균사체로부터 원형질체를 형성 후에는 순수한 원형질체를 나머지 잔여물로부터 회수해 내는 것이 중요하다. 만약 원형질체로 형성되지 않은 균사체를 제거하지 못했을 경우 원형질체형성률이 감소하게 된다. 본 연구에서는 순수한 원형질체를 선별하기 위해 Sorbitol을 이용한 banding filtration 방법을 시도해 보았다. Sorbitol을 이용하여 원형질체를 회수하는 방법은 Fig. 1에 제시한 바 있다. 즉 OM-A buffer에 존재하는 원형질체에 0.6 M의 Sorbitol이 포함된 trapping buffer를 가하고 2,000 rpm으로 원심분리를 하게 되면 sorbitol이 포함된 buffer 층으로 원형질체가 흡수되고 잔여물들은 아래로 가라앉는 것으로 관찰되었다. 20~25 μ m의 pore size(Whatman NO 4.)의 filter paper를 이용하여 buffer 층으로부터 원형질체를 최종 회수한 결과 10^5 ~ 10^6 (protoplasts/ml)의 가장 순수한 원형질체를 얻을 수 있었다(Fig. 4(B)).

효소 처리를 통해 분리해 낸 원형질체와 여러 종류의 재생배지를 사용하여 세포벽을 재생하기 위한 최적의 조건을 조사하였다. 상기와 같이 분리해 낸 원형질체를 삼투압안정제를 포함한 buffer(1.2 M

Table 1. Identification of *P. linteus* by ITS rDNA sequencing method and blast search

Strain	Accession No.	Similarity	nt differences/ compared
<i>Phellinus linteus</i> MPNU 7016	AF153009	100.00	0/608
<i>Phellinus linteus</i> IFO 6980	AF200226	100.00	0/678
<i>Phellinus linteus</i> KFDA 016	AY436626	100.00	0/700
<i>Phellinus linteus</i> FKDA P38	AY513234	100.00	0/692
<i>Phellinus linteus</i> MPNU 7002	AF300388	100.00	0/678
<i>Phellinus linteus</i> DGUM 25004	AF080458	100.00	0/689
<i>Phellinus linteus</i> DGUM 25003	AF082102	99.72	2/712
<i>Phellinus linteus</i> KCTC 6190	AF077678	99.71	2/694
<i>Phellinus linteus</i> Namsan No. 1	AF080457	99.71	2/688
<i>Phellinus linteus</i> MPNU 7001	AF200237	99.71	2/678
<i>Phellinus linteus</i> ACTC 26710	AF153010	99.67	2/614

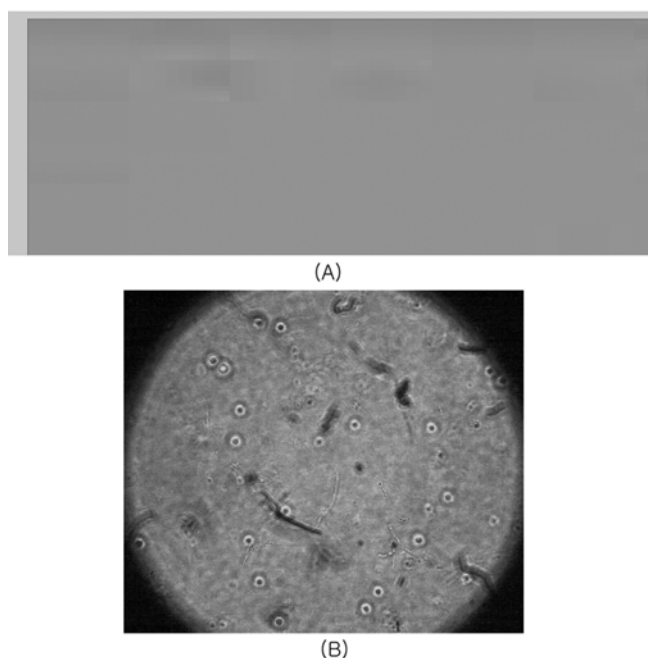


Fig. 4. Microphotographs (400x) for the formation of protoplasts from the mycelia of *Pheillus linteus* (A), and harvested protoplasts using the protoplast banding technique (B).

MgSO₄, 0.2 M phosphate buffer, pH 5.8)를 이용하여 효소 및 잔여 물을 washing하였다. 이 washing 과정은 원형질체를 재생하기 위해 반드시 필요한 과정으로 효소 성분이 남아있을 경우 재생과정에서 세포벽의 재생을 저해하는 것으로 확인되었다. Washing 과정을 거쳐 분리된 순수한 원형질체를 본 실험실에서 개발한 고체 재생배지에 분주(pour plating)하여 그 재생 정도를 조사하였다. 원형질체를 10⁴~10⁵ protoplasts/ml가 되도록 희석한 후 재생 고체배지 위에 같은 성분의 soft 배지 5 ml에 0.1 ml씩 원형질체를 첨가하여 pour plating하여 재생된 콜로니를 계수한 결과, 원형질체 재생률은 약 10⁻²~10⁻³로 나타났으며, 재생기간은 4일 정도가 적당한 것으로 확인되었다.

3.3. 단일 콜로니 획득의 원형질체 형성 및 재생을 통한 조단백당체 고생산성 균주 개발

상기의 원형질체 형성방법을 이용해서 기존의 균주를 더 좋은 배양 형태적 특성 및 배양 생리적 특성을 보이는 생산균주로 개량하기 위해 형성된 원형질체로부터 단일 colony를 얻고자 하였다. 원형질체를 이용한 초기 단계에서 개발된 생산균주들의 액상 플라스크 배양 결과를 Fig. 5에 제시하였다. 원형질체 형성을 통해 얻은 단일 균주(single cell)들을 각각 이용하여 최종 플라스크 액상 생산배양을 수행한 결과 단일 균주(single cell)들의 성장속도가 다양하게 분포하고, 또한 균주마다 분비하는 pigment도 조금씩 차이를 알 수 있었다. 그 중 모균주(wild type) (#20번 균주)보다 상당히 높은 성장속도를 보이는 균주가 다량 확인되었는데, 특히 #21번과 #42번 균주의 경우 모균주에 비해 150% 이상 높은 균사체 생산성을 보여주었다. 균사체 생산성이 높은 균주들은 공통적으로 배양 시 큰 덩어리로 뭉치는 현상이 나타나지 않았고, 매우 적은 펠렛 모양의 배양형태를 보여 주었다. 또한 이들의 조단백당체 함량을 조사한 결

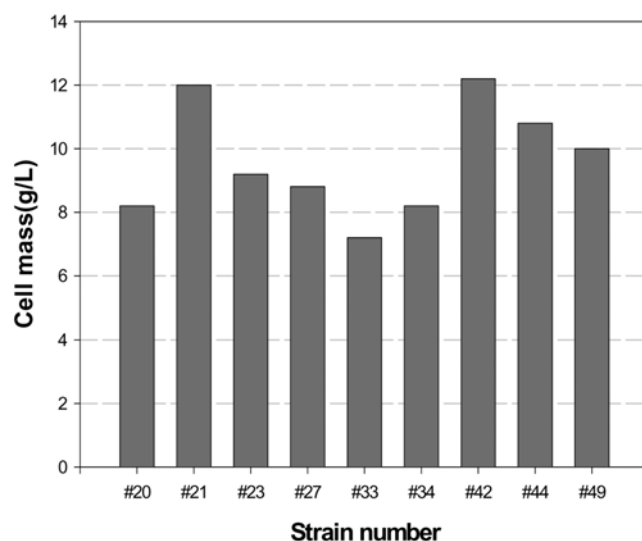


Fig. 5. Comparison of cell mass in shake flask cultures of *P. linteus* obtained from the single colonies regenerated from the respective protoplast in the initial stage of strain improvement program.

과, 고성장성 균주들은 대부분 5% 이상으로 거의 비슷한 양의 조단백당체를 함유하고 있는 것으로 나타났다.

상기의 초반 균주개량 연구에서 주목할 점은 고체 배양배지에서 빠른 성장속도를 보여주는 균주들이 대부분 액상 생산배양에서도 고성장성을 보여주는 것으로 관찰되었다는 점이다. 따라서 이후의 균주 개발 실험에서는 단일 콜로니로 선별한 콜로니를 고체배지에서 일정기간 동안 배양해서 균체생산성이 높은 균주들을 선별하고자 하였다. 원형질체를 이용하여 선별한 단일콜로니의 고체배양 시, 각 단일 콜로니마다 고체 배양배지에서의 세포성장률이 각기 다르게 나타나는 특성을 Fig. 6에 제시하였다. 회수한 원형질체를 재생 배지에 pore plating을 하여 약 12일 동안 배양한 후 형성된 colony를 선별하고, 이 각각의 재생균주를 고체배양 배지로 옮겨서 배양하였다. 고체 배양배지에서 12일 동안 성장한 균사체의 직경을 측정할 결과 모균주인 APL-7 strain(직경 32.1 mm)보다 직경이 매우 큰 일부의 균주들을 선별할 수 있었다(Fig. 6). 이는 모균주로부터 원형질체가 형성되는 과정에서 경우에 따라 핵의 융합으로 인한 유전자의 교환이 이루어져 새로운 균주가 만들어지는 것으로 추측되는데, 그 결과 대부분의 균주들은 모균주의 유전학적 특징을 가지게 되지만 일부의 균주들에게 있어서는 유전자 교환과정에서 돌연변이가 발생하여 모균주보다 빠른 성장을 보이는 고성장성 균주가 발생하는 것으로 보인다[15]. 따라서 이로부터 새로이 AP27, 32, 37, 107, 183의 5개의 고성장성 균주를 선별할 수 있었으며 균주들의 활성을 지속적으로 조사한 결과, 성장성이 우수한 단일균주인 AK59 균주를 선별할 수 있었다. 이 균주를 모균주로 다시 이용하여 지속적인 균주개량을 수행한 결과, Fig. 7과 8에 제시한 바와 같이 균주의 성장속도가 대부분 높게 나타났으며, 균체성장 histogram의 X축 상에서 오른쪽으로 치우쳐 존재함을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 균주개량을 거듭함에 따라 선별된 대부분의 균주들이 wild type으로부터 분리해낸 초기의 균주들에 비해 배양특성이 점점 안정화되어, 배양에 적합할 뿐만 아니라 생산성도 크게 향상되었음을 제시해 준다. Fig. 8로부터 균사체 생산성이 우수한 10개의 균주를

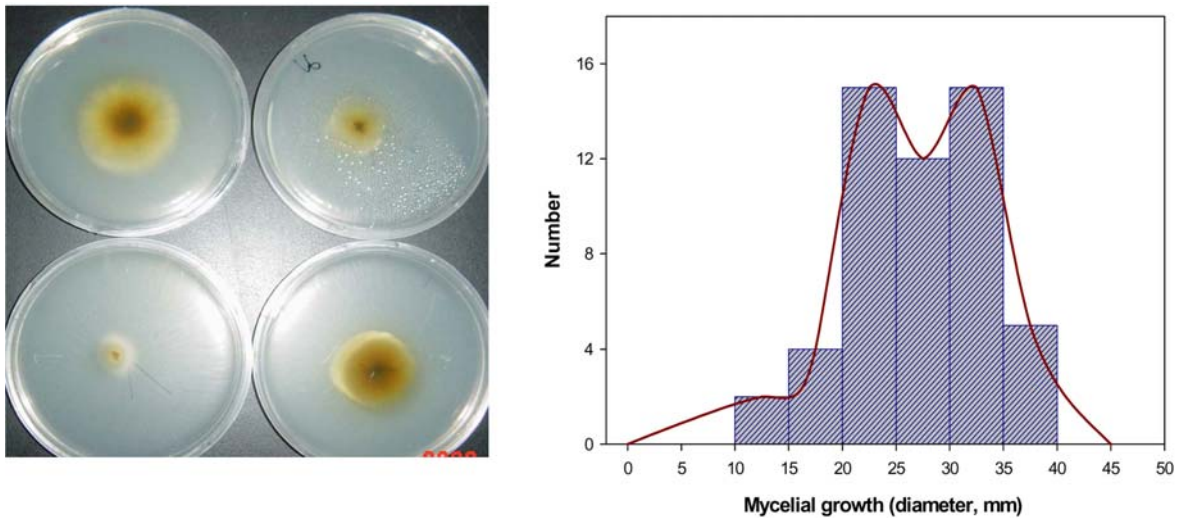


Fig. 6. Photographs and histogram for the mycelial growth of the various regenerants (*P. linteus* mycelial cells derived from the 1st screening program).

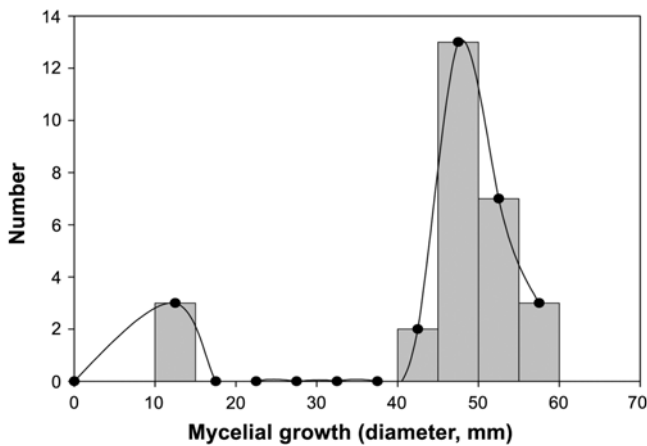


Fig. 7. Histogram for the mycelial growth of the various regenerants (*P. linteus* mycelial cells derived from the 2nd screening program).

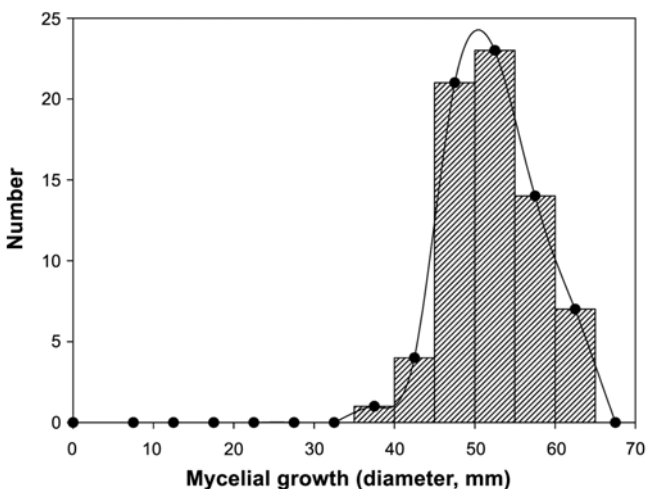


Fig. 8. Histogram for the mycelial growth of the various regenerants (*P. linteus* cells derived from the 3rd screening program).

선별하여 플라스크 액상 생산배양으로 각각의 균주들의 세포 생산성 및 단백질당체 생산성을 조사한 결과, 균사체량은 13~15 g/L로서 대

회학공학 제47권 제2호 2009년 4월

부분 비슷한 성장속도를 보였으며, 조단백다당체의 함량 또한 5.8~6.4%로 거의 비슷하게 분포하는 것으로 관찰되었다(이로부터 가장 우수한 균주인 AR147 균주를 개발할 수 있었으며, 이 균주를 이용하여 하기의 발효조 배양을 통한 배양 형태의 중요성에 대한 연구를 수행하였음). 이상의 결과를 요약하면 반복 screening cycle 을 통해 균주를 개량한 결과 초기에 사용한 wild type 균주보다 성장 속도가 월등히 우수하여 액상 배양시간이 단축될 뿐만 아니라, 배양 형태를 조절하기가 매우 어려운 플라스크 배양임에도 불구하고 종균 배양(성장배양) 시에는 균사 모양(filamentous morphology)으로, 그리고 액상 생산배양 조건에서는 1 mm 이하의 작은 pellet을 형성하는 고성장성(모균주에 비해 약 200% 증가)의 우수한 균주들을 선별할 수 있었다.

3-4. 발효조 액상 성장배양과 액상 생산배양시 배양형태의 중요성

상기의 균주 선별 연구 결과에 따르면 *Phellinus linteus* 균사체의 경우 조단백다당체의 함량이 세로 무게 당 거의 일정한 양을 함유하고 있는 것으로 관찰되었으므로 조단백다당체의 생산성을 증가시키기 위해서는 생산배양에서의 균체량 증가가 가장 중요한 것으로 판단되었다. 따라서 균사형성 미생물의 발효기 배양시 균체량 증가에 가장 중요한 요인 중의 하나로 알려진[18, 19] 생산균주의 배양 형태적 특성에 대해 집중적으로 조사하였다.

상기의 균주개량 프로그램을 통해 최종 선별된 AR147 균주(모균주는 AK59 균주임)를 이용해서 배양형태가 균체생산성에 미치는 연구를 수행하였다. 이 생산균주도 대부분의 균사형성 고등균류에서 관찰되는 바와 같이[20, 21], 접종된 균사체의 활성, 균사체의 접종량, 그리고 배양배지의 조성이 배양형태에 가장 중요한 영향을 미치는 것으로 관찰되었는데, 본 연구에서는 특별히 균사체의 접종량을 변화시킴으로써 다양한 배양형태를 유도하고자 하였다. 즉 5리터 발효기를 이용한 성장배양 공정에서, 발효조로의 균사체의 접종량을 변경시킴으로써 동일한 성장배지(GM)를 사용했음에도 불구하고 균사모양(filamentous form)과 펠렛모양(pellet form)으로 성장하는 배양형태(morphology)를 유도할 수 있었다. 본 생산균주의 경우 플라스크 배양에서 성장발효조로의 접종량을 증가시킴에 따라 생산균체의 배양형태가 펠렛모양에서 균사모양으로 점차로 변화함을 확

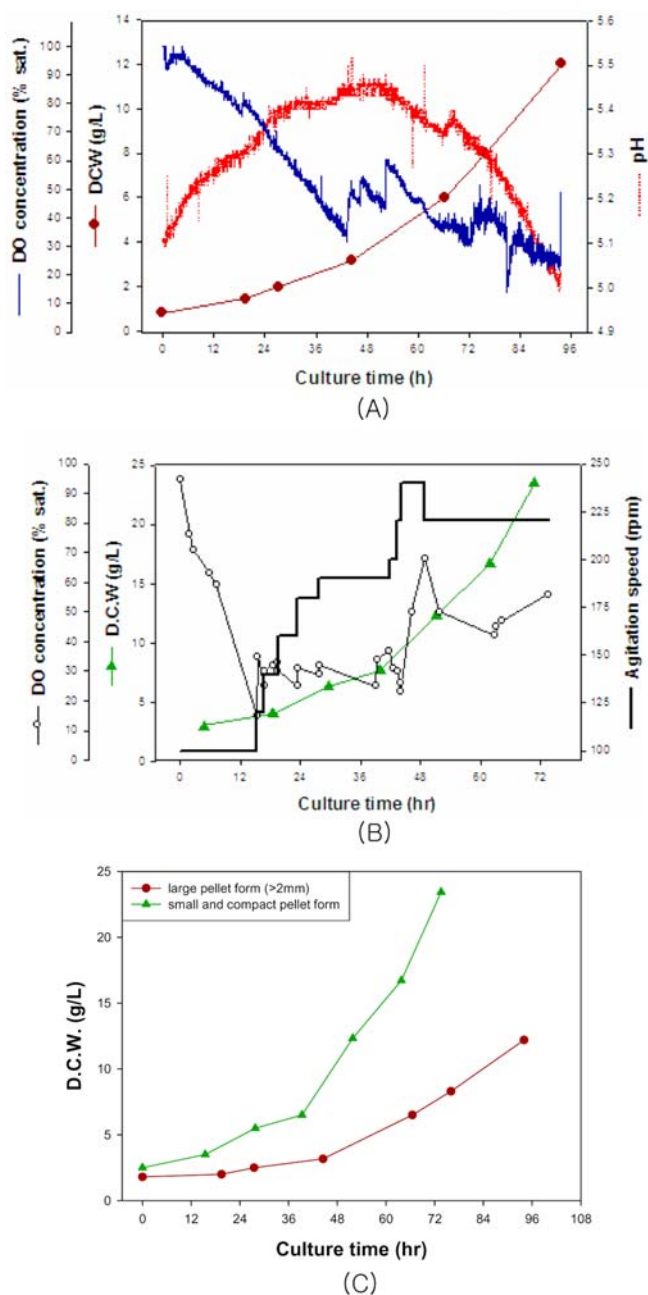


Fig. 9. Growth cultures in 5 liter stirred-tank bioreactor. (A) Growth culture with pellet forms, (B) growth culture with filamentous forms, (C) comparison of cell growth extent in the bioreactor growth cultures.

인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 성장발효조에서 펠렛모양을 유도하기 위해서는 10% 접종량을, 균사모양을 유도하기 위해서는 20%의 접종량을 사용하였다. 그 결과 펠렛 모양의 배양형태를 갖는 성장발효조 배양의 경우 최종 건조균체량(DCW)이 약 12 (g/L) (Fig. 9(A))인 반면, 균사모양의 경우에는 약 23(g/L)로 나타났다(Fig. 9(B)). 주목할 점은 펠렛 형태로 성장할 경우 그 직경이 1 mm 이상으로 형성되는 것으로 관찰되었는데, 이 경우 펠렛 중심부의 산소전달 뿐만 아니라 영양분의 공급이 원활이 이루어지지 않기 때문에 약 4일 경부터 펠렛 중심부에 있는 균사체의 lysis가 일어나 펠렛이 풀리는 현상이 관찰되었고, 그 결과 세포 농도가 비교적 천천

Table 2. Comparison of fermentation parameters according to growth morphology in suspended growth cultures performed with 5 liter stirred-tank bioreactor

Morphological forms in the growth bioreactor	Large pellet morphology	Filamentous morphology
Fermentation parameters in the growth cultures		
Final dry cell weight (g/L)	12.5	23
Maximum specific growth rate (μ) (1/hr)	0.027	0.036
Lag phase period (hr)	48	14

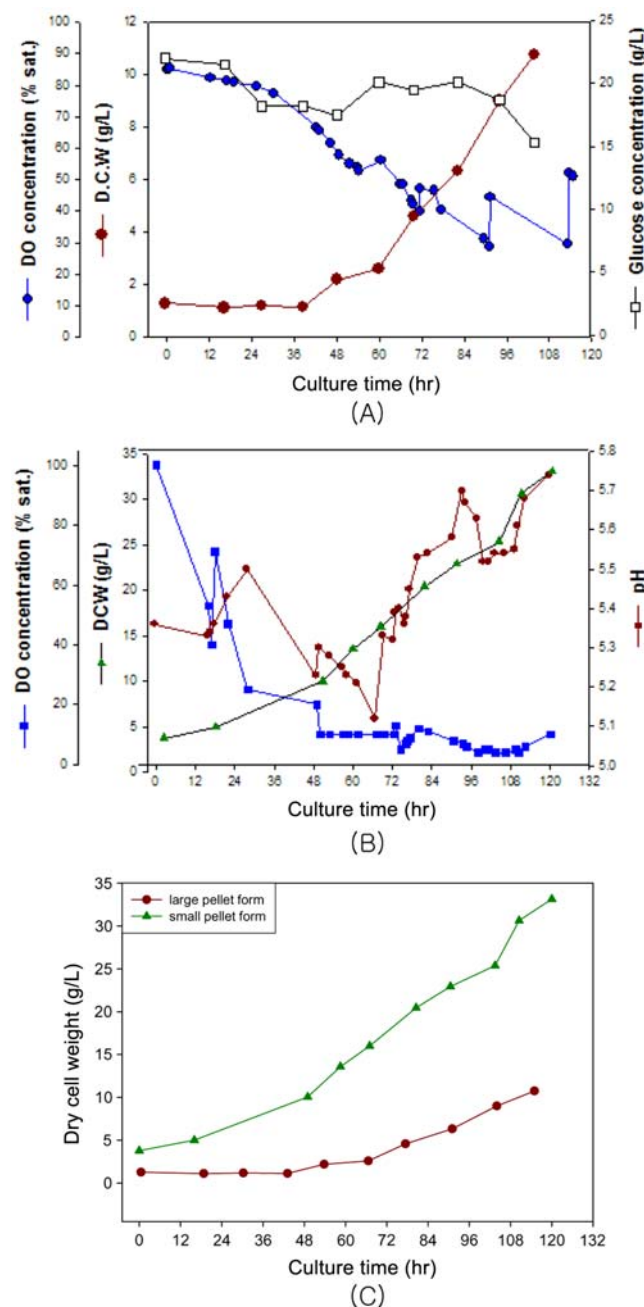


Fig. 10. Production cultures in 5 liter stirred-tank bioreactor. (A) Pellet morphology in the growth culture and larger pellet formation in the production culture, (B) filamentous morphology in the growth culture and small & compact pellet formation in production culture, (C) comparison of cell growth extent in bioreactor production cultures.

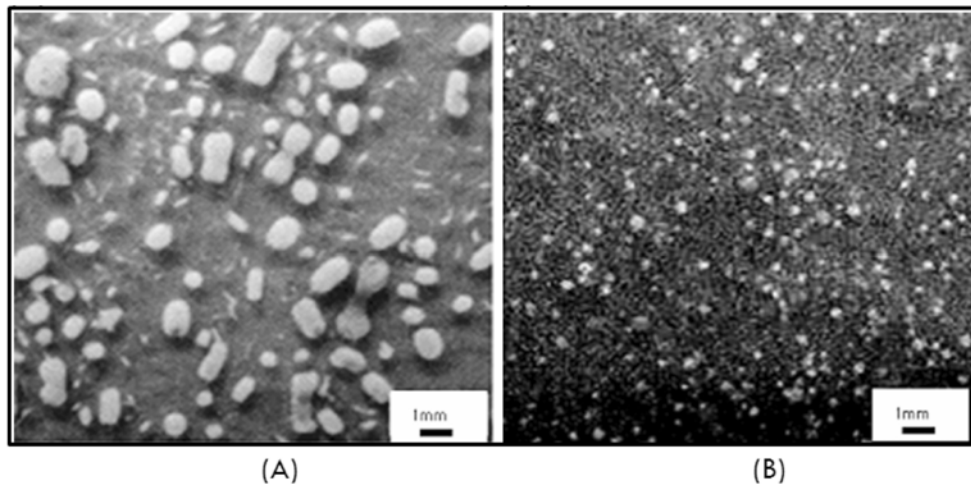


Fig. 11. Morphology in the production bioreactor cultures. (A) Larger pellet formation in the production culture, (B) small & compact pellet formation in the production culture.

Table 3. Comparison of fermentation parameters according to growth morphology in suspended production cultures performed with 5 liter stirred-tank bioreactor.

Fermentation parameters and characteristics in the production cultures	Morphological forms in the growth bioreactor	Large pellet morphology	Dense filamentous morphology
	Morphological form in the production bioreactor	Larger pellet formation (larger than 1 mm in diameter) (Refer to Figure 11(A))	Small and compact pellet formation (smaller than 0.5 mm in diameter) (Refer to Figure 11(B))
Final dry cell weight (g/L)		10	33
Maximum specific growth rate (μ) (1/hr)		0.02	0.03
Lag phase period (hr)		66	12

히 증가하는 것으로 나타났다. 즉 성장배양 초반에 일단 펠렛이 유도된 경우 펠렛 외부의 균체들만이 영양분을 계속 흡수함으로써 펠렛의 크기가 점점 커지다가 결국에는 펠렛의 내부 세포에서 lysis 현상이 발생하는 악순환이 계속되는 것으로 확인되었다[11]. 균사형성 미생물 배양에 관련된 문헌에 따르면 세포 활성이 높은 고등균류 균사체 배양의 경우 일반적으로 펠렛이 0.5 mm 이내로 형성되어야 탄소원, 특히 용존산소의 물질전달 제한현상을 어느 정도 극복할 수 있는 것으로 알려져 있다[11, 19]. 한편 생산균주의 배양형태를 균사 모양으로 유도한 경우에는 균사체들의 활성이 높을 뿐만 아니라 균사체들이 배양액과 효율적으로 접촉함으로써 영양분의 공급이 원활하게 이루어져 성장발효기 배양에서 세포생장이 높게 지속되는 것으로 관찰되었다(Fig. 9(B)). 또한 용존산소 변화 경향에서도 균사모양 배양의 경우가 약 30시간 정도 빠르게 성장하고 있는 것으로 나타났다. Fig. 9(C)와 Table 2에 상기의 두 종류의 배양 형태를 보이는 성장발효조의 배양 결과를 요약해서 제시하였다. 성장배양 시 균사모양의 형태로 성장하는 경우가 펠렛 형태로 자라는 균주들에 비해 세포 생산성은 2배, 최대 비성장속도(maximum specific growth rate)는 약 1.5배 높은 것을 확인할 수 있었다.

이와 같이 각각의 성장발효조에서 배양한 생산균주를 생산발효조로 10% (v/v)로 동일하게 접종하였다. 5리터 각 생산발효조에서의 최종 생산배양은 생산배지 조성 등의 배양조건이 동일한 가운데 수행되었으며, 그 배양결과를 Fig. 10에 제시하였다. 성장발효조 배양 시 균사모양의 특성을 보이는 생산균체를 생산발효조의 접종원으로

사용한 경우, 배양액의 용존산소 농도가 40% 이하로 떨어지는 시간이 24시간 이내로 상당히 빠른 반면(Fig. 10(B)), 성장배양 시 펠렛 모양의 균체를 생산배양의 접종원으로 사용한 경우에는 70시간이 경과해야 비로소 용존산소가 40% 정도로 감소하였으며, 그 결과 주된 탄소원인 포도당도 매우 느리게 소모되고 있는 것으로 나타났다(Fig. 10(A)). 즉 성장배양에서부터 생산균주가 펠렛 모양을 형성한 경우에는, 생산발효조 배양 시에도 지속적으로 펠렛 크기가 커져갔으며, 그 결과 펠렛 내부로의 영양분과 산소의 공급이 어려워져서 균사체의 활성이 낮아지는 것으로 관찰되었다. 이와는 대조적으로 생산 발효조로의 접종원이 고농도의 균사체 모양인 경우에는 생산배양에서 균사체가 대부분 직경 0.5 mm 이하의 매우 작은 compact한 펠렛 모양의 배양형태를 보이는, 이상적인 균사체의 생산배양 공정이 이루어지는 것으로 확인되었다(Fig. 11). 즉 생산발효조 배양에서 직경 0.5 mm 이하의 compact한 펠렛 모양의 배양형태가 유도되었을 경우, lag phase 시간의 획기적 감소와 1.5배 이상의 높은 세포비성장속도로 인해, 최종 균사체 생산성이 다른 경우에 비해 약 3.3배 더 높은 주목할 만한 배양결과를 얻을 수 있었다(Table 3).

요약하면 *P. linteus*와 같은 균사형성 담자균류의 액상배양 시 단계에 걸쳐 수행되는 성장배양에서 고농도의 균사모양으로 배양형태가 지속적으로 유도되어야만 최종 생산배양 공정에서 이상적인 배양형태인 0.5 mm 이하의 compact한 펠렛 형태가 유도되며, 그 결과 높은 균체생산성을 얻는 것으로 확인되었다. 이는 균사 형성

담자균류의 산업용 발효조 배양 시, 생산균체의 배양형태가 최종 균체 생산성, 궁극적으로는 최종 단백당체의 생산성에 심각한 영향을 미친다는 것을 제시해 주는 좋은 결과로 판단된다.

감 사

본 연구는 2단계 BK21 사업, 강원대학교 생명공학연구소의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee, J. S., Park, M. H. and Bac, M. J., "Studies on Immunomodulating Function of Components Separated from Higher Fungi," *Kor. J. Mycol.* **24**, 142-148(1996).
2. Ahn, D. K., "Medicinal Fungi in Korea," *Kor. J. Mycol.* **20**, 154-166(1992).
3. Ikekawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F., "Antitumor Action of Some Basidiomycetes," Especially *Phellinus Linteus*. *Gann*, **59**, 155-157(1968).
4. Chung, K. S., Koo, Y. J., Yoo, J. Y., Choi, S. Y. and Shin, D. H., "Mycelial Growth of *Ganoderma lucidum* and *Grifola frondosa* in Milk Whey," *Kor. J. Mycol.* **19**, 61-65(1991).
5. Guo, J., Zhu, T., Collins, L. A., Xiao, Z.-X. J., Kim, S.-H. and Chen, C.-Y., "Modulation of Lung Cancer Growth Arrest and Apoptosis by *Phellinus Linteus*," *Mol. Carcinog.* **46**(2), 144-154(2006).
6. Collins, L., Zhu, T., Guo, J., Xiao, Z. J. and Chen, C.-Y., *Phellinus Linteus* Sensitives Apoptosis Induced by Doxorubicin in Prostate Cancer. *Br J Cancer*. Aug 7; **95**(3), 282-288(2006).
7. Kim, G. Y., Lee, J. Y., Lee, J. O., Ryu, C. H., Choi, B. T. and Choi, Y. H., "Partial Characterization and Immunostimulatory Effect of a Novel Polysaccharide-protein Complex Extracted from *Phellinus linteus*," *Biosci Biotechnol Biochem.* **70**(5), 1218-1226(2006).
8. Tshkagoshi, S. and Ohashi, F., "Protein Bound Polysaccharide Preparation, PSK, Effective Against Mouse Sarcoma-180 and Ascites Hepatoma AH-13 by Oral Use," *Gann*. **65**, 557-558(1974).
9. Lee, S. Y., "Optimization of Antitumor Active Expolysaccharide Production Through the Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum* Mycelium," *Korean. J. Biotechnol. Bioeng.* **12**, 139-145(1997).
10. Nielsen, J., Modeling the growth of filamentous fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **46**, 187-223(1992), Springer-Verlag, Berlin.
11. Grimm, L. H., Kelly, S., Krull, R. and Hempel, D. C., "Morphology and Productivity in Filamentous Fungi," *Appl. Micro. Biotechnol.*, **69**, P375-384(2005).
12. Jukes, T. H. and Cantor, C. R., "Evolution of Protein Molecules, *Mammalian Protein Metabolism*," New York: Academy press, 21-132(1969).
13. Saitou, N. and Nei, M., "The Neighbor-joining Method: A new Method for Reconstructing Phylogenetic Tree," *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425(1987).
14. Peberdy, J. F. and Ferenczy, L., "Fungal Protoplasts," *Mycology Series*, **6**, New York(1985).
15. Aldor, I. S. and Keasling, J. D., "Process Design for Microbial Plastic Factories: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoates," *Curr Opin Biotechnol*, **14**, 475-483(2003).
16. Nakamura, Y., Nishio, Y., Ikeo, K. and Gojobori, T., "The Genome Stability in Corynebacterium Species Due to Lack of the Recombinational Repair System," *Gene*, **317**, 149-155(2003).
17. Byrne, G. S. and Ward, O. P., "Effect of Nutrition on Pellet Formation by *Rhizopus Arrhizus*," *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 912-914(1989).
18. Steel, R. and Maxon, W. D., "Dissolved Oxygen Measurements in Pilot and Production-scale Novobiocin Fermentation," *Biotechnol. Bioeng.* **8**, 97-108(1966).
19. Vardar, F., "Problems of Mass and Momentum Transfer in Large Fermentors," *Process Biochem.* **18**, 21-23(1983).
20. Nash, C. H. and Huber, F. M., "Antibiotic Synthesis and Morphological Differentiation of *Cephalosporium Acremorum*," *Appl. Microbial.* **22**, 6-10(1971).
21. Pazouki, M. and Panda, T., "Understanding the Morphology," *Biopro. Eng.* **22**, 127-143(2000).