

생물반응기 유형에 따른 잔나비불로초(*Ganoderma applanatum*)의 균사체 및 수용성 다당체 생산 특성

이위영* · 박영기 · 안진권 · 박소영

국립산림과학원 생물공학과

Production of Mycelia and Water Soluble Polysaccharides from Submerged Culture of *Ganoderma applanatum* Using Different Types of Bioreactor

Wi Young Lee*, Youngki Park, Jin Kwon Ahn and So Young Park

Div. of Biotechnology, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

(Received September 9, 2005)

ABSTRACT: In order to select a suitable bioreactor type for the submerged cultivation of *Ganoderma applanatum*, both growth characteristics and polysaccharides production were compared among four different types of bioreactor. These include an external-loop type air-lift bioreactor (ETAB), a balloon type air bubble bioreactor (BTBB), a column type air bubble bioreactor (CTBB) and a stirrer type bioreactor (STB). The mycelial biomass produced from the reactors were in decreasing order: ETAB (7 g/l) > BTBB (6.2 g/l) > STB (6 g/l) > CTBB (5 g/l). Maximal soluble exopolysaccharides (1 g/l) and endopolysaccharides (2.7%) were also obtained from ETAB. Thus, the ETAB was most suitable for submerged culture of *G. applanatum* mycelium. Based on the results, ETAB was chosen for further detailed study. The most effective aeration rate for the mycelial growth in ETAB ranged from 0.05 to 0.1 vvm. For the maximal production, the mycelium at the initial growth stage needed low aeration rate to reduce cell damages by fluid flow. However, as the mycelia grew, the culture became viscous and thus needed higher aeration. The molecular weight of exopolysaccharides obtained from the culture grown in ETAB was higher than that from the culture grown in other bioreactors.

KEYWORDS: Air-lift bioreactor, Endopolysaccharide, Exopolysaccharide, *Ganoderma applanatum*, Mycelial culture

담자균류로부터 항종양, 면역조절작용, 항바이러스 등의 작용을 하는 다당체(Engstad *et al.*, 2002; Tsukada *et al.*, 2003; 정 등, 1999) 생산을 위하여 생물반응기를 이용한 균사체 심부배양에 대한 연구가 진행되고 있다(Hwang *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). 일반적으로 균사체 배양에 쓰이는 생물반응기는 공기부양식과 교반식의 생물반응기로 크게 분류할 수 있다. 공기부양식 생물반응기는 균사체의 벽면 부착생장이 적고, 유체의 흐름에 의한 배양체의 분산과 산소 공급이 비교적 용이하고, 교반식 생물반응기에 비해 전단력이 적다는 잇점이 있어 세포가 파괴되기 쉬운 배양체에 적합하다는 것으로 보고(Paek *et al.*, 2001; van't Riet and Tramper, 1991)되고 있으며, 교반식 생물반응기는 배양체의 혼합과 산소공급이 유리하여(Belmar-Beiny and Thomas, 1991) 배양체의 밀도가 높거나 과도한 점도를 지닌 미생물 배양에 이용되고 있으나 과도한 전단력으로 배양체에 손상을 입히는 단점이 있다(Smith *et al.*, 1990; Cui *et al.*, 1997). 이러한

두 종류의 서로 다른 특성으로 인하여 특정 균류 배양시에 적합한 생물반응기를 선택할 필요가 있다.

최 및 이(1999)는 상황(*Phellinus linteus*) 심부배양에, Lee *et al.*(2004)은 *Grifola frondosa* 심부배양에 공기부양식 보다 교반식 생물반응기가 공기 공급율이 높아 적합하다고 보고 하였으며, Kowagoe *et al.*(1994, 1996)은 상황 및 송이(*Tricholoma matsutake*) 심부배양에, 이 등(2003)은 송이 심부배양에 공기부양식 생물반응기가 적합하다고 보고하였다. 이러한 차이는 균사체 종류에 따른 성장특성과 공기 부양식 생물반응기라도 그 형태에 따른 특성이 다르기 때문이다.

본 연구는 항암목적의 민간요법에 주로 사용되어 왔으며, 항암효과(김 등, 1998), 다당체의 면역조절효과(Usui *et al.*, 1983; Nishittoba *et al.*, 1988), 수용성 추출물의 항인플루엔자바이러스 효과(정 등, 1999) 등이 보고되는 잔나비불로초를 대상으로 하여 생물반응기를 이용한 균사체 및 다당체의 생산에 적합한 생물반응기를 선발하고자 공기부양식인 칼럼형, 풍선형, 기포통기형 및 교반식 생물반응기를 대상으로 균사체 및 다당체의 생산 특성을 비교하고 생

*Corresponding author <E-mail: lwy20@foa.go.kr>

물반응기에서의 적정 공기공급율을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 균주 조제

시험에 사용한 잔나비볼로초의 균사체는 국립산림과학원의 KFRI 646으로 자실체로부터 분리한 것을 사용하였다. 전배양으로 PDA 배지에 배양중인 잔나비겉상버섯 균사체를 500 ml 삼각플라스크에 잘게 썰어 넣어 100 rpm의 진탕기로 24°C에서 액체배양을 실시하였다. 액체배양된 균사체를 호모게나이저(Ingenieurbüro, X1030 D)로 13,000 rpm에서 8초간 분쇄, 균질화하여 생물반응기 처리 등 아래의 실험에 사용하였다. 액체배양 배지의 조성은 glucose 25 g/l, yeast extract 2 g/l, glutamic acid 1 g/l, biotin 0.5 g/l, thiamine 0.1 g/l, KH₂PO₄ 2 g/l, MgSO₄ 0.5 g/l, 0.1 M FeCl₃ 5 ml/l 및 0.1 M MnSO₄ 5 ml/l로 하였다.

생물반응기 형태 및 균사 배양

심부배양하기위한 생물반응기로 풍선형 공기부양식 생물반응기는 자체 제작한 풍선형의 공기부양식 생물반응기를, 칼럼형 공기부양식 생물반응기는 원통형으로서 지름 75 mm, 높이 350 mm인 것을, external-loop형의 기포통기형 생물반응기는 상승 및 하강관의 지름이 40 mm이고, 높이가 300 mm인 것을 사용하였다(이 등, 2003). 공기 공급율은 0.1 vvm으로, 배양액 부피(working volume)는 2~4 l로 하였다. 교반식 생물반응기는 5 l급 생물반응기(한국발효기)를 사용하였고 교반속도는 80 rpm, 공기 공급율은 0.1 vvm으로, 배양액 부피는 4 l로 하였다. 배지의 조성은 상기의 액체배양 배지 조성으로 동일하다. 배지의 초기 pH는 4.5로 조절하였고, 배양은 24°C에서 7~8일간 배양하였다.

균사 생장량 및 배지내 glucose 함량 분석

배양된 균사체는 6000 rpm에서 원심분리하여 균사체와 배지 성분을 분리하였다. 분리된 균사체는 수회 증류수로 세척하였다. 세척된 균사체는 냉동하여 동결건조하였다.

생물반응기내에서의 균사체의 생장량은 균사 접종 후 2 일마다 충전 세포용량(packed cell volume)으로 측정하였고, 최종 수확된 균사체는 흐르는 물로 세척하고 70°C 건조기에서 3일간 건조 후 건조량을 측정하였다.

균사 배양중의 기질 소비량을 측정하기 위해 배양액을 2일 간격으로 분취하여 즉시 0.45 µm filter로 여과 후 여액을 -40°C에 냉동보관하여 잔존 glucose 분석용 시료로 사용하였다.

배지내 잔존 glucose 함량은 HPLC(TSP operating system, USA)를 이용하고, ELSD(Alltech 2000, USA) 검출기를 사용하여 정량하였다. Column은 Carbohydrate ES(Alltech,

5 µm, 4.6×250 mm)를, 이동상은 acetonitrile : water = 72 : 28의 혼합용액을 사용하였다.

배양액으로부터 수용성 조 세포외 다당체(crude exopolysaccharide) 분리 및 정량

각 처리별로 균사체를 일정기간 배양 후 배양액을 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상등액에 4배의 95% EtOH를 첨가하여 4°C 냉장고에 24시간 방치 후 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 침전물을 분리하였다. 침전된 다당체를 증류수에 녹여 다시 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 상등액을 동결건조하여 세포외 다당체를 정량하였다.

균사체로부터 수용성 조 세포내 다당체(crude endopolysaccharide) 추출 및 정량

각 처리별로 생산된 균사체 일정량(1 g)에 80% EtOH를 넣어 overnight 후 원심분리를 실시하였다. 침전물에 다시 80% EtOH를 첨가하여 교반 후 원심분리하여 침전물을 분리하였다. 침전물에 증류수 30 ml를 첨가하여 121°C 고압멸균기에서 1시간 동안 감압멸균을 실시하였다. 6,000 rpm에서 20분간 원심분리를 하여 상등액과 침전물을 얻었다. 상등액은 상기의 세포외 다당체 정량하는 방법으로 분리, 동결건조하여 수용성 조 세포내 다당체로 정량하였다.

세포외 다당체 분자량 결정

분리된 세포외 다당체를 정제하기 위하여 4°C 증류수에서 3일간 투석(M.W > 12,400, Sigma Co.)하였고, 투석한 세포외다당체를 분자량 결정에 사용하였다. 세포외 다당체의 분자량은 HPLC(TSP system; ELSD detector)를 이용하여 결정하였다. 칼럼은 Shodex Sugar KB-805 column (0.8×30 cm; Showa Denko K.K., Tokyo, Japan)을 사용하였으며 이 칼럼은 이미 텍스트란으로 분자량이 표준화되어있다. 이동상으로 H₂O를, 유속은 0.7 ml/min으로 하였다.

결과 및 고찰

생물반응기 형태에 따른 잔나비볼로초 균사체 생장

잔나비볼로초 균사체 배양에 적합한 배양기 형태를 선별하기위하여 공기 부양식의 풍선형, 칼럼형 및 기포통기형 생물반응기와 교반식(교반형) 생물반응기를 대상으로 균사체 생장량을 비교하였다(Fig. 1). 기포통기형에서 균사체 생산량이 7.0 g/l 가장 높았고, 이어서 풍선형(6.2 g/l), 교반형(5.2 g/l), 칼럼형(5.0 g/l)의 순이었다. 배지액 1l 당의 1일 단위 균사체 생장량도 기포통기형에서 1.0으로 가장 높았고, 칼럼형이 0.62로 가장 낮았다(Table 1). 한편, 이 등(2003)은 송이 균사체의 경우 풍선형에서 가장 생산량

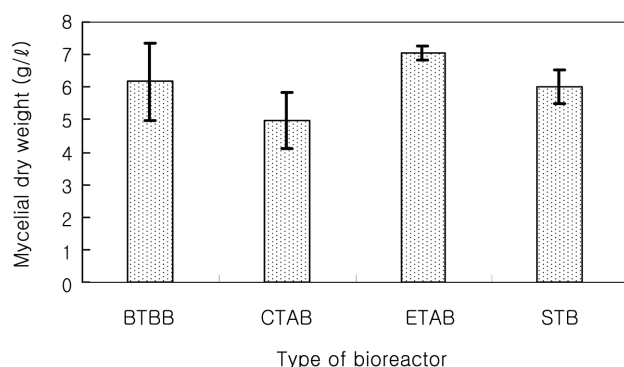


Fig. 1. Comparison of mycelial growth of *Ganoderma applanatum* grown in four different types of bioreactor (BTBB: a balloon type air bubble bioreactor; CTBB: a column type air bubble bioreactor; ELAB: an external-loop type air-lift bioreactor; and STB: a stirrer type bioreactor). The mycelia were cultivated at 21°C for 7 days.

이 높았음을 보고하였다. 이러한 차이는 균사체의 성장 특성과 관련 된 것으로서 송이 균사체보다 잔나비불로초 균사체의 배양배지 점도가 매우 높아 기포통기형이 칼럼형이나 풍선형보다 배지내의 공기흐름을 강하게 유지하여 균사체를 고루 분산되도록 하고 공기의 체류시간을 높여 주는 효과가 있기 때문이다. Fig. 2는 교반형과 기포통기형에서의 배양기간에 따른 상대 용존산소량을 나타낸 것이다. 용존산소량은 배양 4일까지 급격히 감소하다가 부피성장 정체기인 6일 경에 거의 0에 가깝게 떨어졌다.

그러나 기포통기형이 교반형보다 용존 산소량이 높게 유지하는 것으로 나타났다. 이 등(2001)은 *Ganoderma lucidum* 균사배양에서, Xu and Yun(2004)은 *Paecilomyces tenuipes*의 균사배양에서 통기속도를 높일수록 균체의 생산량이 증가 하였다 하여 점도가 있는 균사체 배양에 있어 공기 공급이 유리한 경우 더욱 많은 균사체를 생산하는 것으로 사료된다.

한편 최와 이(2000)는 공기부양식과 교반형 생물반응기에서 상향 균사체를 심부배양하여 교반형에서 산소공급량이 높았고 균사체 생산량도 높았음을 보고하였다. 본 실험

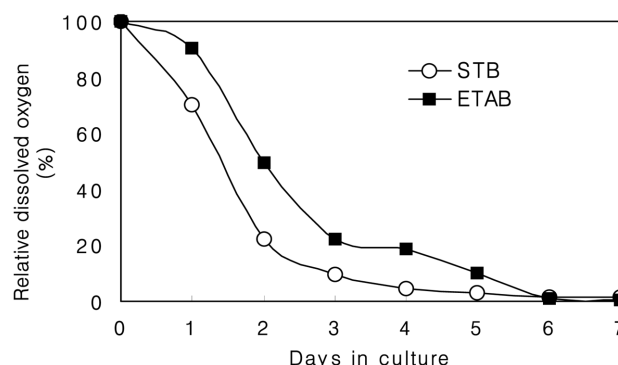


Fig. 2. The time course of relative dissolved oxygen change (%) in the media during the submerged culture of *Ganoderma applanatum* in ETAB (external-loop type air-lift bioreactor) and STB (stirrer type bioreactor).

험에서 기포통기형 보다 교반형 생물반응기에서 성장량이 낮은 것은 임펠라에 의한 전단력 증가의 원인(Smith *et al.*, 1990; Cui *et al.*, 1997)과 더불어 실험에 사용한 교반형 생물반응기의 높이가 낮고, 공기가 임펠라에 의해 분산은 되지만 기포입자의 크기가 다른 생물반응기에 비해 커서 배양액 단위 면적당 공기 접촉 표면적이 낮아 공기 용존율이 낮았기 때문인 것으로 추정된다(Fig. 2). 따라서 교반식 생물반응기의 형태, 임펠라 및 공기입자의 크기 조절 등으로 산소 용존율을 조절할 수 있을 것으로 추정되어 공기부양식 생물반응기와 비교를 위해서는 다양한 이러한 특성들에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것이다(최와 이, 2000).

생물반응기 형태에 따른 잔나비불로초 균사체의 다당체 생산 특성

잔나비불로초 균사체 배양 목적은 높은 수율의 다당체 생산에 있다. Table 2는 생물반응기 형태별에 따른 세포 내 및 세포의 수용성 다당체의 함량을 비교하였다. 공기 부양식 생물반응기간의 세포내 다당체 함량은 기포통기형에서 2.7%로 가장 높게 함유하고 있었고 교반식(2.1%) 생물반응기에서 가장 낮은 경향을 나타냈다. 세포외 다당

Table 1. The growth characteristics of submerged cultures of *Ganoderma applanatum* mycelium in four different types of bioreactor at the same cultivation conditions

Type of bioreactor	Cell concentration (g/l) ^a	Stagnant time (day)	Overall cell yield $Y_{x/s}$ ^b	Overall growth rate R_x (g/d/l) ^c
BTBB ^d	6.2	7	0.24	0.88
CTBB	5.0	8	0.20	0.62
ETAB	7.0	7	0.28	1.00
STB	6.0	7	0.21	0.74

^aMycelial dry weight at 7th day.

^bThe value of $Y_{x/s}$ was defined as the cell mass obtained per one gram of glucose in media.

^cThe value of R_x was defined as the cell mass at the end of the culture divided by the total cultivation time (day).

^dBTBB: balloon type air bubble bioreactor, CTBB: column type air bubble bioreactor, ELAB: external-loop type air-lift bioreactor, STB: stirrer type bioreactor.

Table 2. Crude endopolysaccharides and exopolysaccharides produced by *Ganoderma applanatum* mycelium cultivated in four different types of bioreactor

Type of bioreactor	Endopolysaccharide (%)	Exopolysaccharide (g/l)
BTBB ^a	2.34±0.21	0.94±0.22
CTBB	2.30±0.27	0.90±0.03
ELAB	2.72±0.58	1.00±0.13
STB	2.08±0.33	0.97±0.07

^aBTBB: balloon type air bubble bioreactor, CTBB: column type air bubble bioreactor, ELAB: external-loop type air-lift bioreactor, STB: stirrer type bioreactor.

체의 경우 기포통기형 및 교반형에서 1 g/l 전후로 가장 높았고, 이어서 풍선형, 칼럼형 순으로 낮아 졌다. 세포내 다당체는 펠렛형과 같이 균사체가 묻쳐 자란 공기부양식에서 균사체 g 당 함량이 높았고, 또한 균사체 성장량이 좋을수록 세포내 다당체 함량도 높은 경향이였다. 세포외 다당체생산량은 Lee *et al.*(2004)이 *Grifola frondosa* 심부배양에서 균사체 생산량이 높았던 교반형에서 공기부양식 보다 세포외 다당체 함량이 높았음을 보고하였고, 본 실험에서도 성장량이 가장 높았던 기포통기형에서 높게 생산되어 균사체 성장량과 밀접한 관계가 있는 것으로 추정된다. 한편 이 등(2001) 및 Xu and Yun (2004)은 세포외 다당체 생산량은 일정 이상으로 균사체가 성장할 경우 균사체의 성장량과 비례하지 않음을 보고하여 다당체 생산의 최적화를 위해서는 특정 균사체에 맞는 배양조건이 규명 되어야 할 것이다.

생물반응기 형태별에 따른 세포외 다당체의 분자량을 비교하였다(Table 3). 세포외 다당체의 생리활성작용은 분자량과 관련이 있으며(Calazans *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2004) 일반적으로 분자량이 클수록 항종양 효과가 높다고 보고되고 있다(Mizuno, 1999a, b). 한편 이러한 세포외 다당체 분자량은 배양방법에 따라 달리 나타날 수 있다(Shu and Lung, 2003). 본 실험에서 분자량은 세포외 다당체를 칼럼으로 분리하여 나타난 대표적으로 큰 2개 피크로부터 측정하였다. 기포통기형에서 세포외 다당체의

Table 3. Molecular weight of exopolysaccharides produced by *Ganoderma applanatum* mycelium cultivated in four different types of bioreactor

Type of bioreactor	Molecular weight (kDa)	
	Fraction 1	Fraction 2
BTBB ^a	2,240	1,030
CTBB	1,900	1,080
ELAB	3,410	1,420
STB	3,080	1,500

^aBTBB: balloon type air bubble bioreactor, CTBB: column type air bubble bioreactor, ELAB: external-loop type air-lift bioreactor, STB: stirrer type bioreactor.

분자량이 가장 큰 것으로 나타났으며 이어서 교반형, 풍선형, 칼럼형 순으로 낮게 나타났다. 분자량의 크기는 성장량이 높았던 기포통기형에서 가장 크고, 성장량이 저조했던 칼럼형에서 가장 낮아 균사체 성장량과도 관계가 있을 것으로 추정된다. 다만 생장이 저조했던 교반형에서 비교적 높은 분자량을 나타낸 것은 균사체가 깃털처럼 가늘게 퍼져 자라는 배양 균사의 형태적 특성(Kim *et al.*, 1983; Sinha *et al.*, 2001)에서 오는 것으로 추정된다.

기포통기형 생물반응기에서 잔나비벌로초 균사체의 성장 특성

생장이 우수하였던 기포통기형 생물반응기에서의 잔나비벌로초 균사체의 공기공급량에 따른 균사체 성장량과의 관계를 보고자하였다. 생물반응기를 이용한 균사체 배양에서의 적정한 공기공급량 결정은 최적 균사체 생산 및 다당체 생산에 있어 매우 중요한 요인이다(Xu and Yun, 2004). Fig. 3은 공기공급율에 따른 기포통기형 생물반응기에서의 균사체 부피생장을 나타낸 것이다. 잔나비벌로초 균사체는 접종 2일부터 생장을 시작하고 배양 4일경부터 급격한 생장을 하여 배양 7일째에 부피생장이 완료되는 것으로 나타나 일반적으로 다른 목재 부후균이 최적화된 액체 배지에서의 생육정체기는 8일 경에 나타난 것과 같이 유사한 성장형태를 보여 주었다(Lee *et al.*, 1999, 2004).

공기공급율에 따른 단위 균사체 성장량은 0.05 vvm에서 1 g//day로 가장 높게 나타났고, 공기공급을 높일수록 점차 단위 성장량이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이는 공기 공급율이 높을수록 유체의 흐름이 증가하면서 균사체가 스트레스를 받았기 때문으로 추정된다(이 등, 2003). 잔나비벌로초는 0.1 vvm 이상에서 균사체 성장량이 감소하여 물리적 스트레스에 다소 민감한 것으로 나타났다. 한편 공기공급율이 0.05 vvm 보다 낮을 경우 초기 생장은 좋으나 점차 균사체가 펠렛 형태로 묻쳐 자라

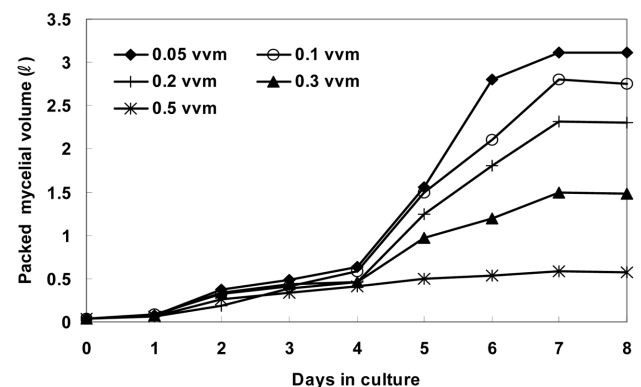


Fig. 3. Effect of aeration rate (vvm) on mycelial growth of *Ganoderma applanatum*. The mycelia were cultivated in external-loop type air-lift bioreactor at 21°C for 8 days.

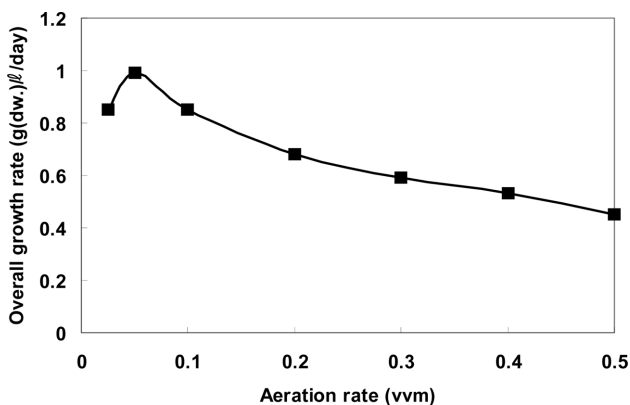


Fig. 4. Overall growth rate (cell d.w g·day⁻¹·l⁻¹) versus aeration rate. The mycelia of *Ganoderma applanatum* were cultivated in external-loop type air-lift bioreactor at 21°C for 8 days.

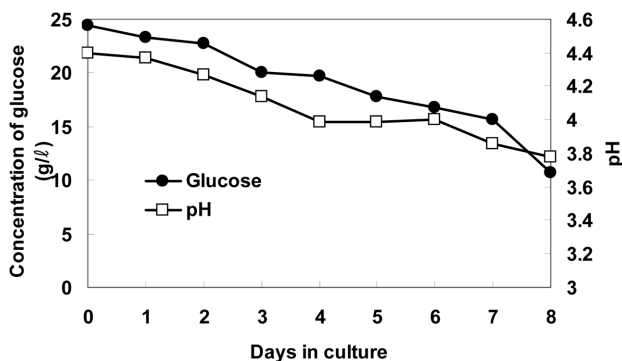


Fig. 5. The time course change in glucose content and pH in media during the submerged culture of *Ganoderma applanatum* in external-loop type air-lift bioreactor at 21°C for 8 days.

면서 균사체가 침전되어 스파자 부분을 막아 생장이 저조하였다. 공기 공급량은 생장 초기에는 0.05 vvm 정도로 낮게 유지하고 균사체 생장량이 증가하면서 점도가 높아지기 때문에 0.1 vvm 내외로 공기공급량을 높여 용존 산소량을 높여주는 것이 바람직 할 것으로 판단된다.

Fig. 5는 배양액의 탄소원 농도를 glucose 25 g/로 하여 배지소모 및 pH 변화를 측정한 것이다. 배양액내의 glucose 량은 8일 배양 후 45% 정도가 잔존하였으나 부피생육정체기인 8일 이후에도 배양액 내의 glucose 량은 계속 감소하였다. 잔나비 불로초 균사체의 초기 적정 배양 pH는 4.5로 나타나서 이 범위로 조절하여 배양하였으며 배양이 진행되면서 pH는 계속 감소하여 배지의 배양 8일째에 3.6의 강산성으로 변하였다. 앞으로 배지 최적화를 위한 연구가 필요한 것으로 사료된다.

적 요

잔나비불로초 배양에 적합한 생물반응기를 선발하기 위

하여 4종류의 생물반응기 형태별 균사체 생장특성과 다당체 생산량을 비교하였다. 균사체 생산량은 기포통기형 생물반응기(7 g/l) > 풍선편 생물반응기(6.2 g/l) > 교반형 생물반응기(6 g/l) > 컬럼형 생물반응기(5 g/l) 순으로 나타났으며, 기포통기형 생물반응기에서 가장 높은 세포외 다당체(1 g/l)와 세포 내다당체(2.7%)를 생산하여 기포통기형 생물반응기가 잔나비불로초 균사체 배양에 가장 적합한 것으로 나타났다. 세포외 다당체의 분자량도 생물반응기의 형태별에 따라 다르게 나타났으며, 기포통기형 생물반응기에서 가장 높은 분자량을 나타냈다. 기포통기형 생물반응기에서의 적절한 공기공급율은 0.05부터 0.1 vvm 사이로 나타났다. 특히 잔나비불로초 균사체는 배양하면서 배지의 점도가 높아져 점차 공기 공급량을 높여 주는 것이 좋은 것으로 판단된다.

참고문헌

- 김성훈, 이주노, 김선희, 오세종, 안상욱, 이진하, 박영식, 정을권, 이현용. 1998. 잔나비겉상버섯 자실체 및 균사체의 생리활성 탐색. 한국생물공학회지 **26**: 331-337.
- 이위영, 안진권, 가강현, 권영진. 2003. 공기부양식 생물반응기의 형태별 송이균사의 생장특성 비교. 한국균학회지 **31**: 89-93.
- 정선식, 어성국, 김영소, 한성순. 1999. 잔나비겉상버섯 수용성물질의 항인플루엔자 바이러스 작용과 인터페론과의 병용효과. 약학회지 **43**: 469-473.
- 최근우, 이창우. 2000. 교반조 발효기와 공기부양 발효기내에서의 *Phellinus linteus*의 액체 배양. 화학공학 **38**: 310-315.
- Belmar-Beiny, M. T. and Thomas, C. R. 1991. Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: Effect of stirrer speed in batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 456-462.
- Calazans, G., Lima, R., Franca, F. and Lopes, C. 2000. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* leavens. *Int. J. Biolog. Macromol.* **27**: 245-247.
- Cui, Y. Q., van der Lans, R. G. J. M. and Luyben, K. C. A. M. 1997. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 715-726.
- Engstad, C. S., Engstad, R. E., Olsen, J. O. and Osterud. 2002. The effect of soluble β -1,3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood. *Int. Immunopharmacol.* **2**: 1585-1597.
- Hwang, H. J., Kim, S. W., Choi, J. W. and Yun, J. W. 2003. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. *Enzyme Microb. Technol.* **33**: 309-319.
- Kawagoe, M. 1996. Applications of the bubble column in biotechnology. Proceedings of the 4th Japan-Korea symposium on separation technology. Pp 623-626.
- Kawagoe, M., Kawakami, K., Nakamura, Y., Naoe, K., Miki, K. and Noda, H. 1999. Submerged culture of *Tricholoma matsutake* mycelium in bubble column fermenters. *J. Biosci. Bioeng.* **87**: 116-118.
- Kim, H. O., Lim, J. M., Joo, J. H., Kim, S. W., Hwang, H. J., Choi, J. W. and Yun, J. W. 2004. Optimization of submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Biores. Technol.* **96**: 1175-1182.

- Kim, J. H., Lebeault, J. M. and Reuss, M. 1983. Comparative study on rheological properties of mycelial growth in filamentous and pelleted forms. *Euro. J. Appl. Microb. Biotechnol.* **18**: 11-16.
- Lee, B. C., Bae, J. T., Pyo, H. B., Choe, T. B., Kim, S. W., Hwang, H. J. and Yun, J. W. 2004. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme Microb. Technol.* **35**: 369-376.
- Lee, K. M., Lee, S. Y. and Lee, H. Y. 1999. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. *J. Biosci. Bioeng.* **88**: 646-650.
- Mizuno, T. 1999. Bioactive substances in *Hericium erinaceus* (Bull. Fr.) Pers. (Yamabushitake), and its medicinal utilization. *Int. J. Med. Mushr.* **1**: 109-119.
- Mizuno, T. 1999. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. **1**: 9-29.
- Nishitoba, T., Goto, S., Sato, H. and Sakamura, S. 1988. Bitter triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry* **28**: 193-197.
- Paek, K. Y., Hahn, E. J. and Son, S. H. 2001. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *in vitro* cell. *Dev. Biol.-Plant*. **37**: 149-157.
- Peng, Y., Zhang, L., Zeng, F. and Kennedy, J. F. 2005. Structure and antitumor activities of the water-soluble polysaccharides from *Ganoderma tsugae* mycelium. *Carbohydr. Polymer*. **59**: 385-392.
- Shu, C. H. and Lung, M. Y. 2003. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. *Process Biochem.* **39**: 931-937.
- Sinha, J., Bae, J. T., Park, J. P., Song, C. H. and Yun, J. W. 2001. Effect of substrate concentration on growth rheology and fungal morphology during exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica* in a batch bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* **29**: 392-399.
- Smith, J. J., Lilly, M. D. and Fox, R. I. 1990. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 1011-1023.
- Tsukada, C., Yokoyama, H., Miyaji, C., Ishimoto, Y., Kawamura, H. and Abo, T. 2003. Immunopotential of interepithelial lymphocytes in the intestine by oral administrations of β -glucan. *Cellular Immunol.* **221**: 1-5.
- Usui, T., Iwasaki, Y., Mizuno, T., Tanaka, M., Shinkai, K. and Arakawa, M. 1983. Isolation and characterization of antitumor active β -D-glucans from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum*. *Carbohydr. Res.* **115**: 273-280.
- van't Riet, K. and Tramper, J. 1991. Basic bioreactor design. Marcel Dekker, Inc. New York. 465pp.
- Xu, C. P. and Yun, J. W. 2004. Influence of aeration on the production and the quality of the exopolysaccharides from *Paecilomyces tenuipes* C240 in a stirred-tank fermenter. *Enzyme Microb. Technol.* **35**: 33-39.