

액체배양에서 잣버섯 균사체 배양에 관한 연구

신성의* · 차월석 · 강시형

조선대학교 화학공학과

A study on the Mycelial Growth of *Lentinus lepideus* in Liquid Culture

Sung-Euy Shin*, Wol-Suk Cha and Si-Hyung Kang

Department of Chemical Engineering, Chosun University, Guang-Ju 501-759, Korea

Abstract

This study was carried out to get the basic data for the mycelial growth of *Lentinus lepideus* in liquid culture. The optimal temperature and initial pH of mycelial growth of *Lentinus lepideus* were 25°C and pH 5.5, respectively. The optimal medium was YMG medium. Among the carbon sources tested, glucose was effected to the mycelial growth and optimal glucose concentration was 4% (w/v). As nitrogen sources, malt extract and yeast extract appeared to be favorable and optimal malt extract and yeast extract [ratio (w/w) of 1:1] concentration was 1.5% (w/v).

Key words – *Lentinus lepideus*, mycelial growth, liquid culture, carbon source, nitrogen source

서 론

예로부터 버섯은 한방에서 자양강장, 소자, 혈중지질강하, 거담, 관상동맥의 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 되어있다. 또한 1992년 아가리쿠스 버섯 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 있으

며, 최근 기능성 식품으로 상품화 되었다[15]. 버섯의 성분 중 면역 증강 작용을 나타내는 것은 다당체이며 일반적으로 β -1,3 glucan의 골격에 β -1,6 가지 구조를 갖는 단일물 질임에도 불구하고 생체기능에 다양한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[13].

그동안 담자균류 대부분은 자실체(fruit body)를 이용하며, 고체배양에 의해 재배생산 되고 있으나 많은 노동력과 시간을 요하므로 액체배양법에 의한 발효조 내에서의 균사체 배양을 통한 효율적인 생산이 바람직하다고 보고하였다[19,21]. 식용버섯 균사체 액체배양에 관한 연구에서 Hunfeld [7]가 진탕 및 산소를 공급하면서 양송이 균사체를 액체배양하였으며, Fraser [3]는 yeast extract와 casein 분해물이 양송이 균사체 생육을 촉진한다고 보고하였다. Kawai [10]는 송이버섯 균사체의 액체배양시 비타민, 식물 성장 호르몬 및 금속이온이 균사체의 생성에 영향을 미친

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 062-230-7151, Fax : 062-230-7226
E-mail : seshin@chosun.ac.kr

다고 하였다. Kurtzman [12] 등은 *Pleurotus sapidus*의 액체 배양시 corn oil을 첨가한 경우 균사의 생육을 촉진한다고 발표하였다. 국내에서는 Park [16] 등이 *Coriolus versicolor* 균사체 배양시 식물성장호르몬, 인삼박추출물, hyponex 등을 사용하여 균사체의 수율 향상에 관한 연구를 하였다. 균사체 액체배양은 다른 미생물에 비하여 생육속도가 느리며 배양중 오염의 가능성이 높아서 산업화하기가 어렵고, 또한 균사체의 생산을 위한 경제적인 면 즉, 배지의 가격, 배양기간의 단축 그리고 높은 수율을 고려해야만 한다. 실험실 규모에서는 물론이고 특히 pilot scale 및 본격적인 생산규모의 배양에 있어서 사용되는 배지의 조성은 생산원가 결정에 있어 주요 인자로 작용하는 경우가 많다[14]. 그러나 이들 산업용 배지의 원료는 발효중 품질의 변화를 줄 수 있고 또 비발효성 물질을 함유하고 있어서 최종 발효산물의 분리에 어려움을 줄 경우도 있다. 그러므로 합성배지를 사용하되 산업적으로 값이 싸고 쉽게 이용할 수 있어야 한다[14].

본 연구에서 사용한 균주인 *Lentinus lepideus*는 분류학적으로 송이목 송이과(Tricolomataceae)에 속하는 목재부후균의 일종으로써 우리나라에서도 자생하는 버섯이다. 잣버섯에 관한 연구로 Reginald [18], Pegler [17] 등의 잣버섯 자실체에 관한 몇 편의 논문이 보고된 바 있지만 균사체 배양에 관한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 잣버섯 균사체의 대량생산을 위한 산업화의 기초자료로써 균사체 배양의 최적배지 및 배양조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 보존

본 연구에 사용한 균주는 *Lentinus lepideus* (KACC 50120)

로 농촌진흥청 농업과학기술원 응용미생물과에서 분양 받아 사용하였으며, potato dextrose agar (PDA)배지에서 25℃, 8일간 배양한 후 4℃에서 보존하였고, 4주마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

접종원

PDA평판배지에서 생육한 균사체를 직경 5mm의 cork borer로 절취한 균사절편 4~5개를 100mL PDB (potato dextrose broth)배지를 넣은 300mL 삼각플라스크에 접종하였다. 25℃, 110rpm으로 7일간 배양한 다음, 배양액을 균질기로 30초동안 균질화시켜 본 배양의 접종원으로 사용하였고, 매 실험마다 새로이 배양하여 사용하였다.

배양조건

잣버섯의 균사생육에 가장 좋은 최적 온도를 조사하기 위하여 PDA배지를 조제하여 121℃에서 15분간 고압살균하고 petri dish에 20mL씩 분주하여 굳힌 다음, 접종원을 접종하고 20, 25, 30℃의 온도 범위로 조절된 항온기에서 8일간 배양하면서 균사의 성장 정도를 하루 간격으로 조사하였다.

균사생육이 가장 좋은 최적배지를 선별하기 위하여 Table 1에 공시된 9종의 배지를 300mL 삼각플라스크에 각각 100mL씩 분주한 후, 121℃, 15분간 고압 살균한 다음, clean bench에서 무균적으로 균질화된 접종원을 5%(v/v) 접종하여, 25±1℃로 110rpm으로 14일간 진탕배양하였다.

균사체 생육 최적 초기 pH를 조사하기 위하여 선정된 최적배지(YMG)를 300mL 삼각플라스크에 100mL씩 분주하여 1N HCl과 NaOH로 초기 pH 범위를 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 그리고 8.0으로 달리하여 조절한 다음, 121

Tabale 1. Composition of media used in this study

Medium	Composition (g/L)
PYG	Peptone 2.5, Yeast extract 2.5, Glucose 38
MCM	Peptone 2, Yeast extract 2, Glucose 20, K ₂ HPO ₄ 1, KH ₂ PO ₄ 0.46, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.5
TGY	Tryptone 20, Glucose 10, Yeast extract 10
YMG	Yeast extract 8, malt extract 20, Glucose 8
YMK	Glucose 40, Yeast extract 10, MgSO ₄ · 7H ₂ O 2, KH ₂ PO ₄ 4
SYP	Starch 15, Glucose 5, Yeast extract 3, Peptone 1, KH ₂ PO ₄ 1, MgSO ₄ 0.5
GP	Glucose 60, Peptone 6, K ₂ HPO ₄ 20, MgSO ₄ 1.4
GYNK	Glucose 100, Yeast extract 10, (NH ₄) ₂ HPO ₄ 2, KH ₂ PO ₄ 1
MMM	Glucose 20, K ₂ HPO ₄ 1, KH ₂ PO ₄ 0.46, MgSO ₄ 0.5

℃에서 15분간 고압 살균하여 무균적으로 균질화된 접종원을 5%(v/v) 접종하여 25±1℃, 110rpm으로 14일간 진탕배양하였다.

탄소원 선발 및 최적농도

최적배지에 탄소원으로서 glucose와 11종의 당류를 각각 0.8%(w/v)씩 첨가하고 배지의 pH를 5.5로 조절한 다음 300mL 삼각플라스크에 100mL씩 분주하여 121℃에서 15분간 고압살균 후 접종원을 5%(v/v)로 접종하여 25±1℃, 110rpm으로 14일간 진탕배양하였고, 선발된 탄소원의 농도를 0~10%(w/v)까지 달리하여 탄소원 선발 실험조건과 같은 방법으로 수행하였다.

질소원 선발 및 최적농도

최적배지에 질소원으로서 yeast extract 의 5종의 질소원을 혼합 또는 단독으로 각각 총 질소 함량이 2.8%(w/v)가 되게 첨가하고 배지의 pH를 5.5로 조절한 다음 300mL 삼각플라스크에 100mL씩 분주하여 121℃에서 15분간 고압살균 후 접종원을 5%(v/v)로 접종하여 25±1℃, 110rpm으로 14일간 진탕배양하였고, 선발된 최적 질소원을 1:1의 비율로 질소원 농도를 0~3.5%(w/v)까지 달리하여 질소원 선발 실험조건과 같은 방법으로 수행하였다.

분석방법

고체배지에서 균사생장 측정은 접종된 균사절편의 중심을 직교하는 수직선과 수평선을 평판배지인 petri dish의 밑면에 유성펜으로 그렸으며, 하루 간격으로 배양이 완료될 때까지 종축과 횡축의 직경을 측정하고 후 두 값을 평균하여 균사의 생장직경을 측정하였다[5]. 액체배양에서의 건조중량은 배양액을 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 침전된 균사체를 2~3회에 걸쳐 수세한 다음, 60℃에서 24시간 건조하고, desiccator에서 항량이 될 때까지 방치하여 건조중량을 측정하였다.

결과 및 고찰

최적 배양 온도

갯버섯의 균사 배양 최적온도를 조사하기 위하여 배양 온도를 달리하여 균사 생육을 조사한 결과 Fig. 1에서와 같

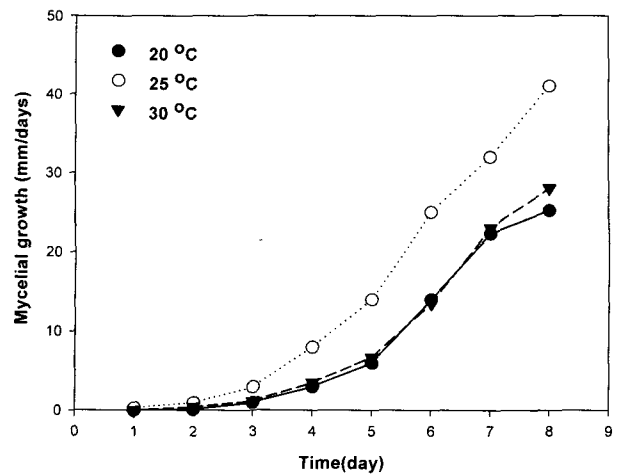


Fig. 1. Effect of temperature on the mycelial growth of *Lentinus lepideus* in PDA.

이 25℃에서 균사생육이 가장 양호하였다. Kim[11]등의 갯버섯의 균사 생육 최적 온도가 25℃라고 한 보고와 일치하는 경향이였다.

최적 배지 선발

갯버섯의 균사생육에 가장 좋은 최적 배지를 선발하기 위하여 Table 1에서와 같이 공시된 9종의 배지를 조성하여 균사 생육을 조사한 결과 YMG 배지에서 5.30g/L로 최대 균사체 생육을 나타내었고, 그 다음으로는 YMK, SYP 배지 순으로 균사체 생육이 양호하였다(Table 2). Kim[11]등은 갯버섯 균사체가 GPB배지에서 196mg/50mL로 최대 균사체 생육을 보였다고 보고하였고, Chi [2]등은 *Phellinus linteus*의 최적 배지는 YM배지가 적합하다고 보고하였다. 이와같

Table 2. Mycelial growth of *Lentinus lepideus* on different media

Medium	Mycelial dry weight (g/L)
PYG	3.04
MCM	3.93
TGY	4.02
YMG	5.30
YMK	5.13
SYP	4.07
GP	2.81
GYNK	3.98
MMM	0.56

은 실험결과로 버섯은 종류에 따라 최적배지가 다르다는 것을 알 수 있으며, 본 연구에서 사용한 잣버섯의 균사생육은 복합 질소원이 함유된 배지들에서 양호한 것을 알 수 있었다.

초기 pH의 영향

잣버섯의 균사생육에 최적 pH를 구명하기 위해 실험한 결과는 Fig. 2에서 보는바와 같이 pH 5.5에서 5.46g/L로 최대 균사 생육을 보였으며, pH 4.0~6.0까지는 비교적 양호한 균사생육을 보였지만 pH 6.5이상 약알칼리성에서는 균사 생육이 다소 억제되는 경향이였다. pH 범위는 버섯에 따라 달라서 Hashimoto [6]등은 느타리의 최적 pH는 6.2~6.5, Song [20]등은 표고의 최적 pH는 4.0~4.5, Kim [11]등은 잣버섯의 최적 pH는 4.2이며 pH 5.0이상에서는 균사 생육이 모두 정지되었다고 보고 하였다. 이러한 차이점은 배지구성 성분, 이온결합에 따른 배지성분 변화 및 균주의 특성에서 비롯되었겠지만 같은 속의 균주에서도 최적 pH가 다른 것으로 생각된다.

탄소원 선별 및 최적농도

탄소원은 균류에 있어서 탄수화물, 단백질, 지질, 핵산 등의 합성과 에너지 공급원으로서 균주의 생육에 필수적인 영양원이다. 탄소원이 잣버섯의 균사 생육에 미치는 영향을 조사한 결과 Table 3에서와 같이 당류에 대하여 광범위한 적응성을 보이고 있으나 단당류인 glucose에서 5.47

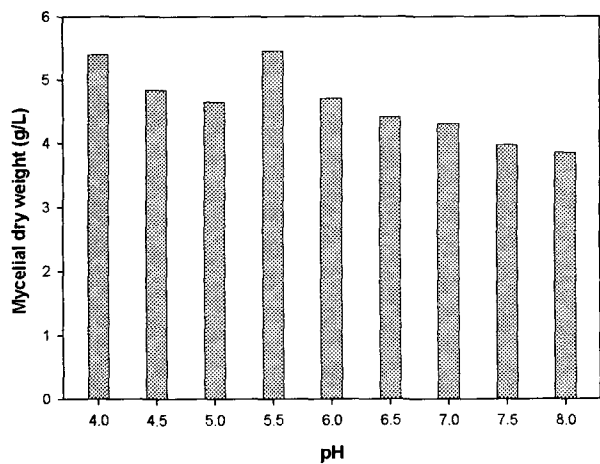


Fig. 2. Effect of initial pH on the mycelial growth of *Lentinus lepideus* in YMG medium.

Table 3. Effect of various carbon sources on the mycelial growth of *Lentinus lepideus*

Carbon sources	Mycelial dry weight (g/L)
Glucose	5.47
Fructose	4.43
Mannose	3.53
Galactose	4.78
Xylose	4.42
Arabinose	2.24
Maltose	5.21
Sucrose	3.32
Lactose	3.25
Starch	3.14
Dextrin	2.92
Mannitol	1.58

g/L로 최대 균사 생육을 보였고 이당류인 maltose와 단당류인 galactose에서 균사의 생육은 양호하였다. 이러한 결과는 Ishikawa [8]가 *Lentinus edodes*를 액체배양하였을때 glucose가 가장 양호하며 Kanayama [9]등의 장수버섯의 배양적 특성에서 soluble starch와 glucose등을 잘 이용한다고 보고하였다. 그리고 Kim [11]등의 잣버섯의 각종 탄소원에 대한 결과로서 단당류 중 6탄당인 galactose에서 균사 생육이 가장 양호하였고, 그 다음으로 이당류인 maltose에서 양호하였다고 보고 하였는데 이러한 결과는 다소의 차이는 있지만 일치하는 경향을 보였다. 탄소원 선별 실험결과 최대 균사 생육을 보인 glucose의 최적 농도 실험을 한 결과 Fig. 3에서 보는바와 같이 4.0%(w/v)에서 균사생육이 가장 양호하였고 이후의 실험에서는 glucose농도를 4.0%(w/v)로 고정하여 실험을 수행하였다.

질소원 선별 및 최적 농도

질소원은 세포질을 구성하고 있는 주요성분의 합성에 필수적인 영양원으로, 본 연구에서의 최적 질소원 선별 실험 결과 Table 4에서와 같이 복합 질소원인 malt extract와 yeast extract를 혼합하여 첨가하였을 때 6.27g/L로 최대 균사체 생육을 보였고, yeast extract와 peptone을 혼합한 경우와 malt extract와 yeast extract를 단독으로 첨가한 경우에도 균사생육이 양호하였으며 복합질소원과 무기태 질소원을 혼합하여 첨가하였을 경우에는 균사 생육에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 보아 무기태 질소원의 영향은

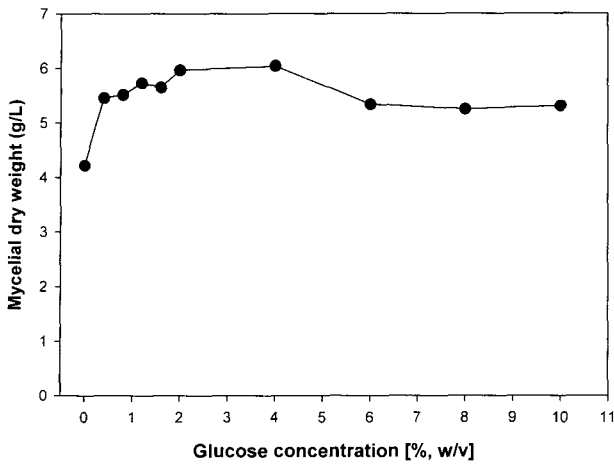


Fig. 3. Effect of glucose concentration on the mycelial growth of *Lentinus lepideus*.

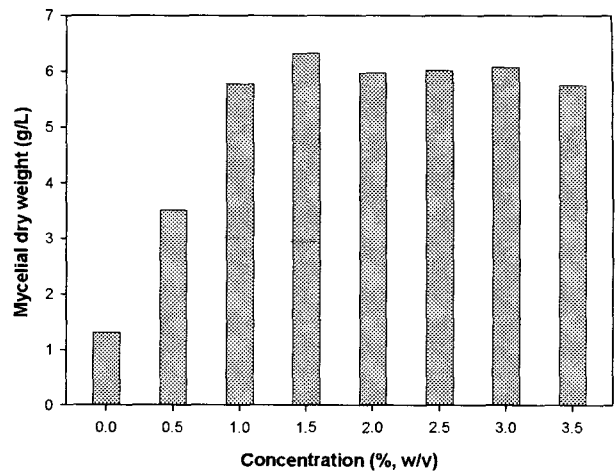


Fig. 4. Effect of malt extract and yeast extract [ratio (w/w) of 1:1] on the mycelial growth of *Lentinus lepideus*.

Table 4. Effect of various nitrogen sources on the mycelial growth of *Lentinus lepideus*

Nitrogen sources	Mycelial dry weight (g/L)
Yeast extract	5.87
Malt extract	5.64
Peptone	4.52
Malt extract + Yeast extract	6.27
Malt extract + Peptone	5.43
Yeast extract + Peptone	5.92
Yeast extract + NH ₄ Cl	3.25
Yeast extract + NaNO ₃	4.74
Yeast extract + KNO ₃	5.02
Malt extract + NH ₄ Cl	3.17
Malt extract + NaNO ₃	4.89
Malt extract + KNO ₃	4.26
Peptone + NH ₄ Cl	2.32
Peptone + NaNO ₃	3.21
Peptone + KNO ₃	2.75

복합질소원 보다 상대적으로 적다는 사실을 알 수 있었다. 최적 질소원으로 선발된 malt extract와 yeast extract의 최적 농도를 조사하기 위하여 두 가지 복합질소원을 1:1의 무게비로 총 0~3.5%(w/v)의 농도로 조절하여 검토한 결과 Fig. 4에서와 같이 1.5%(w/v)에서 6.32g/L로 최대 균사 생육을 보였으며 2.0%이상의 농도에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

요 약

액체배양을 이용한 잣버섯(*Lentinus lepideus* KACC 50120)의 균사체 생육에 관한 결과로는 최적온도는 25℃이고, 최적 pH는 5.5이었다. 공기배지중에서 최대 균사 생육을 보인 최적배지는 YMG 배지로 조사되었다. YMG 배지를 기본배지로 하여 영양 요구성 실험을 한 결과 탄소원 선발 및 최적 농도에서는 최적 탄소원은 glucose이고 최적 농도는 4.0%(w/v)이며 질소원 선발 및 최적 농도에서는 malt extract와 yeast extract를 혼합하여 사용하였을 때 최대 균사 생육을 보였고, 상기의 두가지 복합질소원을 1:1의 무게비로 혼합하여 1.5%(w/v)농도로 첨가하였을 때 균사생육이 가장 양호하였다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 조선대학교 학술 연구비의 지원에 의하여 수행 되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Antonio, M. 1983. Submerged production of edible mushroom mycelium. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 6, 215-217.
- Chi, J. H., T. M. Ha, Y. H. Kim and Y. D. Rho. 1996.

- Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* **24**, 214-222.
3. Fraser, I. M. 1956. The growth promptive effect of several amino acids on the common cultivated mushroom. *Mushroom Sci.* **3**, 190-200.
 4. Ghosh, A. and K. Sengupta. 1982. Influence of some growth factors on the production of mushroom mycelium in submerged culture. *J. Food Sci. Technol.* **19**, 57-60.
 5. Go, S. J., C. H. You and D. Y. Cha. 1981. Studies on the artificial substrate with rice straw and the spawning for the *Pleurotus florida* in Korea. *Kor. J. Mycol.* **9**, 67-72.
 6. Hashimoto, K. and Z. Takahasi. 1974. Studies on the growth of *Pleurotus ostreatus*. *Mush. Sci.* **9**, 585-593.
 7. Hunfeld, H. and T. Sugihara. 1952. The nutrient requirements of *Agaricus campestris* growth in submerged culture. *Mycology* **44**, 605-611.
 8. Ishikawa, H. 1967. Physiological and ecological studies on *Lentinus edodes* (Berk). *Sing. J. Agric. Lab.* **8**, 1-53.
 9. Kanayama, H., N. Adachi and M. Togani. 1983. A new antitumor polysaccharide from the mycelia of *Poria cocoa*. *Wolf. Chem. Pharm. Bull.* **31**, 1115-1118.
 10. Kawai, M. and O. Terada. 1976. Effect of vitamin, nucleic acid relating substance. Phytohoromones and metal ion in media on the vegetative growth of *Tricholoma matsutake*. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **17**, 168-175.
 11. Kim, H. K., J. S. Park, D. Y. Cha, Y. S. Kim and B. J. Moon. 1994. Study on the artificial cultivation of *Lentinus lepideus*(Fr. ex Fr.) Fr. *Kor. J. Mycol.* **22**, 145-152.
 12. Kurtzman, R. 1976. Nutrition of *Pleurotus sapidus* effect of lipids. *Mycologia* **68**, 286-293.
 13. Lee, J. H. 1994. Antitumor and immunostimulating activity of fungal polysaccharides. *The Microorganisms and Industry* **20**, 14-21.
 14. Manu-Tawiah, W. and A. Martin. 1987. Study of operation variable in the submerged growth of *Pleurotus ostreatus* mushroom mycelium. *J. Appl. Biotechnol.* **14**, 221-229.
 15. Namba, H. and H. Kurada. 1988. Potentiation of host-mediated antitumor activity by orally administered mushroom (*Agaricus bisporus*) fruit bodies. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 1437-1444.
 16. Park, Y. D., Y. K. Hong, W. K. Whang, J. D. Huh and S. Park. 1989. Comparisons of protein-bound polysaccharide contents obtained from mycelial cultured broth and fruit body of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Mycol.* **17**, 223-228.
 17. Pegler, D. N. 1983. The genus *Lentinus*: A world monograph London, Her Majesty's Stationery Office, 182-185.
 18. Reginald Buller, A. H. 1905. The reactions of the fruit-bodies of *Lentinus lepideus*, Fr, to external stimuli. *Annals of Botany* **19**, 428-446.
 19. Samuel, C. 1959. Production of mushroom mycelium by the submerged culture process. pp. 647-1153, *Industrial Microbiology* Reinhold Publishing, London.
 20. Song, C. H. and K. Y. Cho. 1987. A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*. *Mycologia* **79**, 866-876.
 21. Torev, A. 1964. Submerged culture of higher fungi mycelium on the industrial scale. *Mushroom Sci.* **7**, 585-589.

(Received May 6, 2003; Accepted August 6, 2003)