

Cheese whey를 기본배지로 사용한 영지버섯 및 잎새버섯의 균사체 액체배양

정 건 섭
(미생물연구실)

I. 서 론

버섯은 영양학적 가치 뿐만 아니라 독특한 향기와 맛을 지니고 있어 기호성 식품으로 널리 이용되어 왔으며, 항균성(竹内 등, 1976)과 항종양작용(千原, 1976)이 인정되어 근년에는 버섯의 소비량이 점차 증가되고 있다. 버섯은 대부분 고체배양법에 의하여 재배생산되고 있으나 그 생산과정에 많은 시간이 소모되며 많은 노동력과 넓은 면적이 요구될 뿐만 아니라 그 작업이 번잡하기 때문에 액체배양에 의한 버섯균사체생산에 대한 연구가 되고 있다(Humfeld & Sugihara, 1949, Lee 등, 1975, Sakamoto 등, 1978).

영지버섯은 한방에서 滋補强壯, 消積, 혈중지질강하, 거담, 관상동맥의 혈류량증대, 혈압강하등의 약리효과, 항암효과 및 면역증강효과가 있는 것으로 알려져 있다(안, 1987). 잎새버섯은 식용담자균류의 일종으로 향과 맛이 좋아서 송이버섯과 더불어 고급버섯으로 취급되며, 잎새버섯의 다당류인 glucan 등은 항암성 및 항게양성이 있는 것으로 알려져 있다(Takashi 등, 1985). 한편 식품공업의 발전으로 유제품의 소비도 점차 증가되어 감에 따라 치즈생산이 연간 약 30% 정도씩 증가하고 있으며 이에 따라 부산물인 유청(whey) 생산량도 급증하고 있다. 현재 국내의 유청은 농축 혹은 건조하여 동물사료나 식품첨가물로 사용하고 있는 실정이다. 최근 해외에서는 ultrafiltration, reverse osmosis, electrodialysis 등의 방법을 이용하여 유청을 탈염시키고 단백질과 유당등의 성분을 분리하여 고부가가치의

식품첨가물 생산이나 유당을 발효기질로 효모, 알코올 및 음료등을 생산 한다(Kim 등, 1981). 이러한 유청을 이용하여 버섯균사를 값싸게 생산하여 식품가공용 소재 및 버섯균생산에 이용할 수 있다면 유청의 부가가치를 높이는 것으로 바람직하다고 생각된다.

유청을 기본배지로 사용하여 영지버섯과 잎새버섯의 균사체를 생산하는 조건과 배양여액 내의 생리활성물질로 항균성물질과 효소활성억제물질의 생산을 조사하였기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양

본실험에 사용한 버섯균주 중 영지버섯(*Ganoderma lucidum* NG-L)은 서울대 농생물학과에서 분양 받았으며, 잎새버섯(*Grifola frondosa* ATCC48688)은 ATCC로 부터 분양받아 사용하였다. 균주보관용 배지로는 YM agar 를 사용하였으며, 액체배지는 유청(cheddar cheese제조후 생성된 부산물)을 ultrafiltration(FS50pp membrane, flow rate 3.5 L/hr)하여 얻어진 여액을 pH6.0으로 조정하고 가압살균한후 Toyo No.51 여과지로 재여과한 액을 기본배지로 사용하였다. 균사체의 액체배양은 250ml 삼각플라스크에 40ml 의 배지를 넣고 30℃에서 180rpm으로 7-10 일간 진탕배양 하였으며, 종균은 종배양한 균사를 균질기로 10,000rpm에서 15초씩 균질화하여 사용하였다.

2. 건조균사량 측정

배양한 균사체를 미리 평량한 여과지에 흡입 여과하여 증류수로 1회 세척후 18시간 동안 동결건조하여 건조균사량을 측정하였으며 배양액 liter 당 gram 수로 표기하였다.

3. 배양조건 검토

최적탄소원은 기본배지로 사용한 유청에 각 탄소원들을 1%(W/V)씩 첨가한 배지를 조제하여 생육을 비교하였다. 최적질소원은 영지버섯의 경우는 CMC(carboxymethyl cellulose), 잎새버섯 겨우는 soluble starch를 각기 0.8%(W/V), 2.0%(W/V)씩 첨가한 배지에 각 질소원을 첨가하여 생육을 비교하였으며 이때 유기질소원은 0.2%(W/V), 무기질소원은 질소함량 기준으로 0.052%(W/V)되도록 첨가하였다.

4. 항균력 측정

버섯균사체 배양액의 항균력 측정은 paper disk diffusion 방법으로 행하였다. 피검균을 접종한 한천 배지에 paper disk를 올려 놓고 이에 버섯균사체 배양액을 15 μ l씩 접종하여 각 피검균의 생육적정 온도에서 배양한후 피검균의 생육저지를 관찰하였다. 항균력측정에 사용한 피검균은 Gram 양성균으로는 *Bacillus subtilis* ATCC9372, *Staphylococcus aureus* KFCC11764, Gram 음성균으로는 *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* IFO3899, 진균류로 *Candida albicans* IFO1594, *Saccharomyces cerevisiae* IFO0250, *Trichophyton tonsurans* IFO5946이었다.

III. 결과 및 고찰

1. 탄소원 첨가

기본배지인 유청에 추가할 탄소원 및 그 농도를 설정하기 위해 몇가지 당류를 1%(W/V)씩 첨가하여 배양한 결과는 Fig.1 에서 보는 바와 같이 영지버섯은 CMC 첨가가 균사생육에 좋았다. 이 결과는 홍 등(1986)의 *G. lucidum* CAFM9065 액체배양에

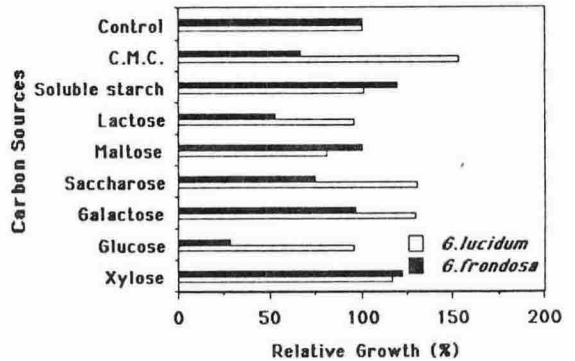


Fig. 1. Effect of carbon sources on the mycelial growth. Each carbon sources were added to the milkwehy as 1w/v%.

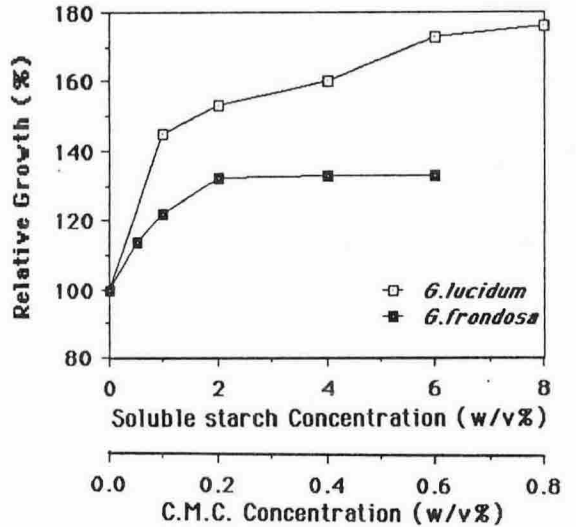


Fig. 2. Effect of carbon sources concentrations on the mycelial growth.

의한 섬유소분해효소 생산 연구에서 균사생육에는 soluble starch 와 cellobiose, 효소생산에는 CMC와 cellobiose 가 우수하였다는 보고와는 약간의 차이가 있었다. 이는 기본배지조성의 차이 및 균주계통간의 차이에 기인하는 것으로 생각되어 진다. 잎새버섯은 soluble starch와 단당류인 xylose가 균사생육에 좋은 탄소원이었으며 이중 비교적 가격이 저렴한 soluble starch를 앞으로 실험의 탄소원첨가로 사용하였다.

Fig. 2는 CMC 및 soluble starch 농도별 첨가에

따른 버섯균사의 생육효과를 타나낸 것으로 영지버섯은 CMC 농도 0.8% 첨가까지 생육이 증가하여 기본배지만을 사용했을 때보다 약 1.7배의 균사생육을 보였으나, 그 이후 농도의 CMC 첨가는 높은 점성 때문에 실험하지 못하였다. 잎새버섯은 soluble starch를 0-6% 범위에서 조사한 결과 2% 첨가하였을 때까지 균사생육이 증가하였고 그이상의 농도에서는 더이상의 변화가 없었으며 이때 균사생육은 대조군에 비해 약 1.3배 정도 증가하였다.

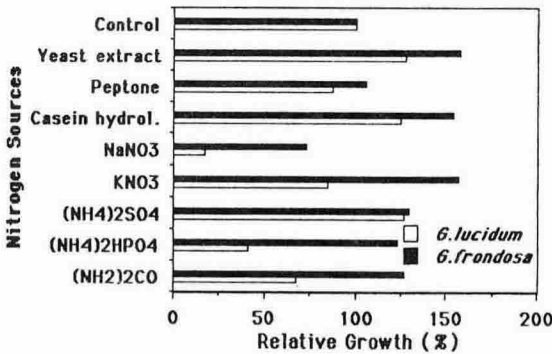


Fig. 3. Effect of nitrogen sources on the mycelial growth. Each organic nitrogen sources were added 0.2 w/v% and the inorganic nitrogen sources were added 0.052 w/v% as nitrogen base to the milkwhey.

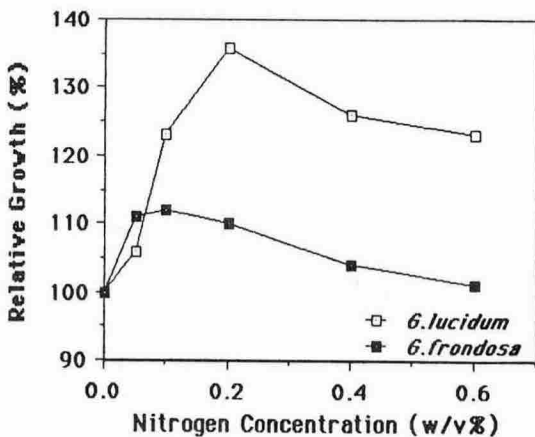


Fig. 4. Effect of nitrogen sources concentrations on the mycelial growth.

2. 질소원 첨가

최적질소원 첨가를 조사하기 위하여 기본배지에 0.8% CMC와 2% soluble starch를 첨가하고 몇가지 유기질소원 0.2%씩, 무기질소원은 질소함량으로 0.052%씩 첨가하여 균사생육을 비교하였다. Fig.3에 나타난 바와 같이 영지버섯은 대조군에 비해 유기질소원으로 yeast extract, 무기질소원으로 (NH₄)₂SO₄를 첨가해 주었을 때 균사생육이 가장 좋았으며, 잎새버섯은 유기질소원으로 yeast extract, 무기질소원으로 KNO₃ 첨가군이 우수하였다. 한편 앞으로의 실험에서는 무기질소원을 사용하기로 정하고 (NH₄)₂SO₄와 KNO₃를 0.6%까지 농도별로 첨가하여 영지버섯과 잎새버섯을 각기 배양한 결과 대조군에 비교해 영지버섯은 (NH₄)₂SO₄ 0.2% 첨가시 약 1.3배, 잎새버섯은 KNO₃ 0.1% 첨가시 약 1.1배 균사생육이 증가되었다(Fig.4).

3. 식물생장호르몬 첨가

식물생장호르몬중 식물의 줄기와 마디신장, 생장점신장, 뿌리신장등의 작용을 하는 물질로 식물조직배양시 세포분열 및 뿌리분화촉진을 위해 사용하는 auxin 계열물질에서 indole-3-acetic acid(IAA)와 α-naphthalene acetic acid(NAA), 식물체의 분열 및 짝의 분화에 작용하며 식물조직배양시에는 callus나 조직으로 부터 세포분열 및 생장분화시키기 위해 사용하는 cytokinin 계열물질에서 kinetin, 시험관내에서 胚로부터 묘목을 생장시키는 물질로 알려져

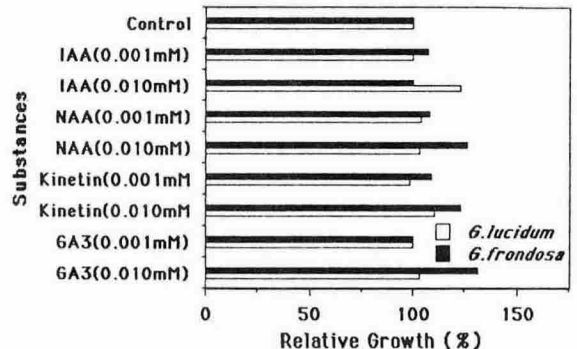


Fig. 5. Effect of plant growth hormones on the mycelial growth.

있는 gibberellin 계열물질에서 gibberellin A₃-3-acetate(GA₃)를 첨가하여 생육을 비교하였다. 그 결과는 Fig.5에 나타난 바와 같이 영지버섯은 IAA를 10⁻²mM 첨가하였을 때 대조군에 비해 약 1.2배, 잎새버섯은 GA₃를 첨가하였을 때 약 1.3배 정도 균사생육이 증가 되었다.

4. 초기 pH의 생육효과

초기 pH가 균사생육에 미치는 효과를 조사하기 위하여 기본배지에 각각의 최적 탄소원과 질소원을 첨가한 배지를 pH 4.7-6.5 범위로 조정하여 배양실험을 행한 결과 Fig.6에 나타난 바와 같이 영지버섯은 pH 5.5, 잎새버섯은 pH 5.2일때 균사생육이 가장 좋았다.

5. 종균접종량에 따른 균사체 생성량의 변화

종배양한 균사체를 무균적으로 균질화한 종균을 접종할때 접종량을 1-15%(V/V)로 변화시키며 배양하여 균사체 생성량을 조사한 결과 Fig.7과 같이 종균 접종량이 증가함에 따라 균사체 생성이 증가하다 영지버섯은 10% 이상, 잎새버섯은 8% 이상의 접종량부터는 큰 차이를 보이지 않았다. 영지버섯의 균사체 생성량은 최적 조건인 기본배지에 CMC 0.5%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%를 첨가하고 pH 5.5로 조정한

배지에 7일간 종배양하여 균질화한 종균을 10% 접종하여 9일간 배양하였을 때 10.2g/L 얻어졌다. 이 결과는 홍 등(1986)의 *G. lucidum* CAFM9065 실험에서 12일 배양하였을 때 4g/L 수준이라는 결과와 비교하면 높은 균사생성임을 알 수 있었다. 한편 잎새버섯을 soluble starch 2%, KNO₃ 0.1% 첨가, 초기 pH 5.2 및 종균접종량 8%로 하여 9일간 배양하여 얻어진 균사체량은 6.2 g/L이었다. 이는 정(1986)이 *G. frondosa* 9008를 PDA 배지에서 20일간 배양하여 6.2 g/L 균사체를 얻은데 비교하여 볼때 잎새버섯의 균사체 배양시 배양기간 단축 가능성을 보여주고 있다.

6. 균사체 배양여액의 생리활성물질 검색

버섯균사체 배양여액내의 생리활성물질 검색을 위해 우선 배양액중의 항균성 물질을 조사하였다. Fig.8에서 보는 바와 같이 영지버섯 배양액은 *B. subtilis*와 *P. aeruginosa*에, 잎새버섯은 *B. subtilis*, *Staph. aureus*, *P. aeruginosa* 및 *T. tonsurans*에 대한 항균력을 나타내었다. 이 등(1982)은 *Poria cocos*의 항균력에 관한 연구에서 *Poria cocos*는 Gram 양성 균인 *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*에 대해서는 항균력을 나타냈으나 *Pseudomonas*를 비롯한 Gram 음성균에는 항균력이 없다고 보고 하였다. 이와 비교하여 본 실험의 영지버섯과 잎새버섯은 Gr-

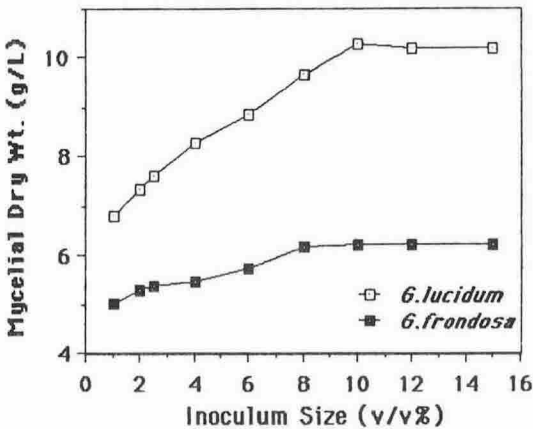


Fig. 6. Effect of initial pH on the mycelial growth.

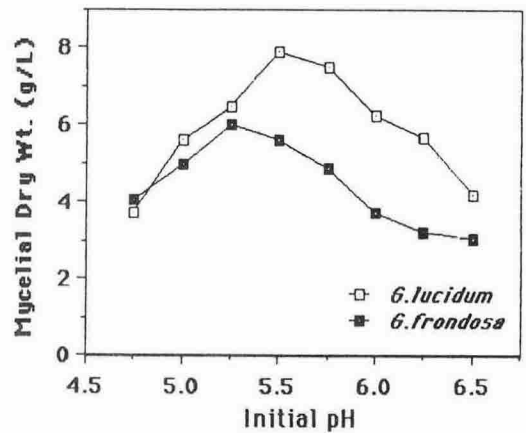


Fig. 7. Effect of inoculum size on the mycelial growth.

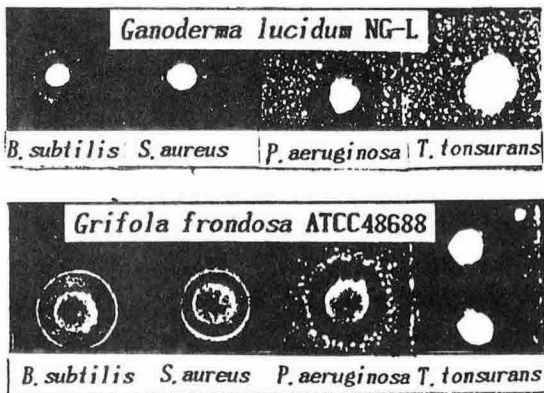


Fig. 8. Antimicrobial activities of *Ganoderma lucidum* NG-L and *Grifola frondosa* ATCC48688.

am 음성균인 *Pseudomonas*에 항균력을 보여주므로 이들이 생산하는 항균성물질이 서로 다를 것으로 추정된다. 한편 배양여액내 효소활성저해물질의 검색을 위하여 배양액과 몇가지 단백질 및 전분분해효소를 preincubation하여 효소활성변화를 조사한 결과 활성의 변화를 관찰할 수 없었다.

IV. 요약

액체배양으로 영지버섯과 잎새버섯의 균사체를 생산하고자 cheese 부산물인 유청을 기본배지로 사용하여 배양최적조건 및 배양여액의 생리활성물질에 대하여 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 영지버섯은 기본배지인 유청에 CMC 0.5%(W/V), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%(W/V)를 첨가하고 pH 5.5로 조정된 배지에 균질화한 종균을 10%(V/V) 접종하여 9일간 배양하여 10.2 g/L의 건조균사를 얻었다.

2. 잎새버섯은 기본배지에 soluble starch 2%(W/V), KNO_3 0.1%(W/V) 첨가, 초기 pH 5.2 및 종균접종량 8%(V/V)의 최적조건에서 9일간 배양하여 얻어진 건조균사는 6.2g/L이었다.

3. 균사생육에 대한 식물생장호르몬 첨가의 영향을 보면 영지버섯은 indole-3-acetic acid를 10^{-2} mM 첨가하여 균사생산이, 1.2배 증가하였으며, 잎새버섯은 gibberellin A₃-3-acetate 10^{-2} mM 첨가로 균사생산이 1.2배 증가하였다.

4. 영지버섯 균사체 배양여액은 *B. subtilis*와 *P. aeruginosa*에, 잎새버섯 배양여액은 *B. subtilis*, *Staph. aureus*, *P. aeruginosa* 및 *T. tonsurans*에 대한 항균력을 나타내었다.

참고 문헌

- Humfeld, H., Sugihara, T.F. (1949) : Mushroom mycelium production by submerged propagation. *Food Technol.* 3, 355-356.
- Kim, K.S., Kang, T.S., Kim, Y.K. (1981) : Studies on the enhancement of dairy by-product(whey) utility. *Annual Report of Food Research Institute of A.F.D.C* pp. 234-249.
- Lee, J.S., Lee, S.R., Yu, T.J. (1975) : Production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in shaking culture. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 7, 22-29.
- Sakamoto, R., Nimi, T., Takahashi, S. (1978) : Effect of carbon and nitrogen sources on submerged culture of edible fungi. *Agri. Chem. Sci. Japan* 52, 75-81.
- Takahashi, M., Keito, O., Naomi, H., Reiko, K. (1985) : Studies on the host-mediated antitumor polysaccharides. *Bull. Fac. Agr. Shizuoka Univ.* No. 35, 49-61.
- 竹内 富雄, 飯沼 寛信 (1976) : 擔子菌の生産する抗生物質. *發酵と工業* 34, 843-850.
- 千原 吳郎 (1976) : 擔子菌類の抗腫瘍作用. *發酵と工業* 34, 942-951.
- 안덕균 (1987) : 고등균류의 한방적 이용. *한국균학회지* 15, 213-215.
- 이극성, 이민용, 이지열 (1982) : 복령의 항균력에 관한 연구. *한국균학회지* 10, 27-31.
- 정환채 (1986) : 잎새버섯 인공재배에 관한 시험. *농업기술연구소보고서* pp. 592-610.
- 홍재식, 최윤희, 윤세익 (1986) : 합성배지에서 불로초가 생산하는 섬유소 분해효소에 관한 연구. *한국균학회지* 14, 121-130.