

## 곰보버섯 균사체 배양에 관한 연구

신성의\* · 차월석 · 이등병 · 정길록

조선대학교 화학공학과

Received October 11, 2003 / Accepted December 20, 2003

**A study on the Mycelial Growth of *Morchella esculenta*.** Sung-Euy Shin\*, Wol-Suk Cha, Dong-Byung Lee and Ji-Lu Ding. Department of Chemical Engineering, Chosun University, Gwang-Ju 501-759, Korea – This study was carried out to get the basic conditions for the mycelial growth of *Morchella esculenta* in shaking flask culture. The optimal temperature and initial pH of mycelial growth of *Morchella esculenta* were  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  and 6.5, respectively. The optimal medium was BG medium. Among the carbon sources tested, fructose was favorable for the mycelial growth and optimal fructose concentration was 5.0% (w/v). As nitrogen sources, peptone and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  appeared to be favorable and optimal concentration was 4.0% [(w/v), ratio of 1:1].

**Key words** – *Morchella esculenta*, Mycelial growth, Shaking flask culture, Carbon source, Nitrogen source

과학기술의 발달과 더불어 다양한 생물자원 중 “대형진균” 혹은 “버섯균” 등의 균류생물은 식품, 제약, 농업, 임업 등 다양한 분야에서 중요한 연구 및 개발대상으로 주목받고 있다. 통계에 의하면 대형진균은 약 1만여 종으로 추정되고 있지만 그 중에서 직접 이용 가능한 종은 약 5000종으로 보고되어 있다. 또한 배양, 분석, 추출, 검중기술 등의 발달에 의한 인공재배법이 개발되어 약리, 생리활성, 식품, 식품가공 등을 위한 버섯의 성분들이 밝혀짐에 따라 버섯의 이용과 개발이 급속하게 이루어지고 있다[10].

버섯은 맛과 향이 좋고 옛날부터 불로장수의 약으로 귀하게 여겨지고 있으며 혈액중의 Cholesterol 저하작용과 항암작용이 우수하여 성인병에도 효과가 있는 것으로 밝혀져 있으며[11] 또한 버섯의 성분 중 면역증강 작용을 나타내는 것은 다당체이며 일반적으로  $\beta$ -1,3 glucan의 골격에  $\beta$ -1,6가지 구조를 갖는 단일물질임에도 불구하고 생체기능에 다양한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[13]. 현재 상업적으로 이용되고 있는 버섯 유래 다당체로는 *Lentinus edodes* [2]의 Lentinan, *Schizophyllum commune* [26]의 Schizophyllan 그리고 *Coriolus versicolor* [17]의 Krestin이 있다.

많은 연구자들이 심부배양보다는 고체 인공배지에서 버섯을 배양하는데 많은 노력을 기울여 왔다[19,21]. 고체배지에서 버섯을 배양하는데 많은 노동력과 시간이 소요되기 때문에 심부 균사체배양을 이용한 균사체 및 유효 물질들을 얻기 위한 많은 시도가 있었다[23,27].

심부배양은 오염의 가능성이 적고 조밀한 공간과 짧은 시간에 균사체 대량 생산에 있어서 고체배양보다 상당한 이점이 있다[3,29]. 많은 연구자들이 여러 버섯들로부터 균사체 및

다당체 생산을 위한 최적 심부배양 조건을 얻기 위한 시도가 있었음에도 불구하고, 심부배양을 위한 영양요구성에 관한 연구는 광범위하게 이루어지지 않는 실정이다[14-16,25].

본 연구에서 연구하고자 하는 곰보버섯(*Morchella esculenta*)은 분류학적으로 진균문 중에서 자낭균아강(Ascomycotina), 곰보버섯속(Morchellaceae), 곰보버섯과(Morchella)에 속하는 야생식용버섯으로 전 세계적으로 분포하는 버섯이며[1, 20,22], 많은 나라에서 양송이 버섯보다 영양가의 평판이 높고 풍부한 맛으로 인하여 미식가들의 사랑을 받아왔을 뿐만 아니라 식용으로 이용된 버섯이라고 보고하고 있다[18]. 우리나라에서는 아직 곰보버섯에 관한 인공재배방법이 밝혀지지 않았으며 또한 그에 따른 연구도 매우 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 곰보버섯(자실체) 인공대량 생산방법 개발 및 심부배양에서 균사체 및 다당체 대량생산 공정 개발을 위한 기초자료를 얻고자 shaking flask culture를 이용한 곰보버섯 균사체 생육특성에 관하여 조사하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 보존

본 연구에 사용한 균주는 *Morchella esculenta*로 Sichuan Mianyang Edible Fungi Research Institute (Sichuan Province, China)에서 구입하여 사용하였으며, potato dextrose agar (PDA)배지에서  $25^\circ\text{C}$ , 8일간 배양한 후  $4^\circ\text{C}$ 에서 보존하였고, 4주마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

### 접종원

PDA평판배지에서 생육한 균사체를 직경 5 mm의 cork borer로 절취한 균사절편 3개를 100 mL PDB (potato dextrose broth)배지를 넣은 300 mL 삼각플라스크에 접종하였다.  $25^\circ\text{C}$ , 100 rpm으로 7일간 배양한 다음, 배양액을 균질기

### \*Corresponding author

Tel : +82-62-230-7151, Fax : +82-62-230-7226

E-mail : seshin@chosun.ac.kr

로 30초동안 균질화시켜 본 배양의 접종원으로 사용하였고, 매 실험마다 새로이 배양하여 사용하였다.

**배양조건**

곰보버섯의 균사생육에 가장 좋은 최적 온도를 조사하기 위하여 PDA배지를 조제하여 121℃에서 15분간 고압살균하고 petri dish에 20 mL씩 분주하여 균한 다음, 접종원을 접종하고 20, 25, 30, 35℃의 온도 범위로 조절된 항온기에서 7일간 배양하면서 균사의 생장 정도를 하루 간격으로 조사하였다.

균사생육이 가장 좋은 최적배지를 선발하기 위하여 Table 1에 공시된 6종의 배지를 300 mL 삼각플라스크에 각각 100 mL씩 분주한 후, 121℃, 15분간 고압 살균한 다음, clean bench에서 무균적으로 균질화 된 접종원을 5% (v/v) 접종하여, 25±1℃로 100 rpm으로 7일간 진탕배양하였다.

균사체 생육 최적 초기 pH를 조사하기 위하여 선정된 최적배지(BG)를 300mL 삼각플라스크에 100 mL씩 분주하여 1 N 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℃에서 15분간 고압 살균하여 무균적으로 균질화된 접종원을 5% (v/v) 접종하여 25±1℃, 100 rpm으로 7일간 진탕배양 하였다.

**탄소원 선발 및 최적농도**

최적배지에 탄소원으로서 glucose의 7종의 당류를 각각 1% (w/v)씩 첨가하고 배지의 pH를 6.5로 조절한 다음 300 mL 삼각플라스크에 100 mL씩 분주하여 121℃에서 15분간 고압살균 후 접종원을 5% (v/v)로 접종하여 25±1℃, 100 rpm으로 7일간 진탕배양 하였고, 선발된 탄소원의 농도를 0~10% (w/v)까지 달리하여 탄소원 선발 실험조건과 같은 방법으로 수행하였다.

**질소원 선발 및 최적농도**

최적배지에 질소원으로서 yeast extract 외 5종의 질소원을 혼합 또는 단독으로 각각 총 질소 함량이 1% (w/v)가 되게 첨가하고 배지의 pH를 6.5로 조절한 다음 300 mL 삼각플라스크에 100 mL씩 분주하여 121℃에서 15분간 고압살균 후 접종원을 5% (v/v)로 접종하여 25±1℃, 100 rpm으로 7일간 진탕배양 하였고, 선발된 최적 질소원을 1:1의 비율로 질소원 농도를 0~5% (w/v)까지 달리하여 질소원 선발 실험조건

과 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 측정한 후 두 값을 평균하여 균사의 생장직경을 측정하였다[4]. 액체배양에서의 건조균체량은 배양액을 3,000 rpm에서 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**

곰보버섯의 균사 배양 최적온도를 조사하기 위하여 배양 온도를 달리하여 균사 생육을 조사한 결과 Fig. 1에서와 같이 25℃에서 균사생육이 가장 양호하였고, 35℃에서 균사 생육이 가장 저조하였다. 이러한 결과는 느타리버섯의 균사 생육 최적온도가 25℃이고, 양송이버섯의 효소생산과 균사생육 최적온도가 30℃라는 보고[6]에서 균주가 다른 차이는 있지만 최적배양온도는 일반적인 버섯 균사생육 온도인 25~30

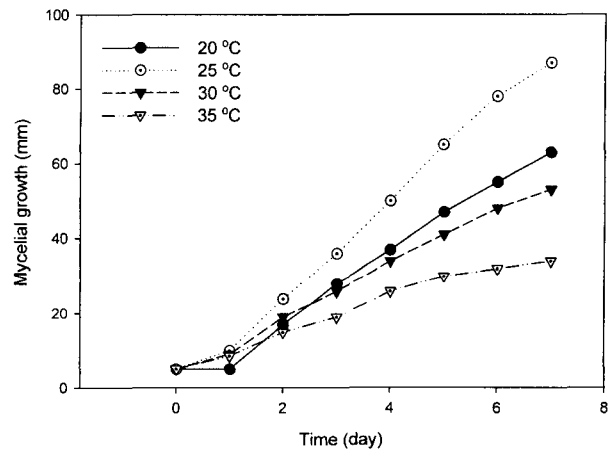


Fig. 1. Effect of temperature on the mycelial growth of *Morchella esculenta* in PDA.

Tabale 1. Composition of media used in this study

Medium	Composition (g/L)
PDB	Potato Starch 4.0, Dextrose 20
YSB	Yeast extract 4, Starch 10, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 1.5, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.0
MGB	Malt extract 10, Glucose 10, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 1.5, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.0
GPB	Glucose 10, Peptone 2, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 1.0, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.0
BG	Beef extract 10, Glucose 10, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 1.5, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.0
Czapek	Sucrose 10, NaNO <sub>3</sub> 2, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.0, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 1.5, KCl 0.5, FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.01

℃와 유사한 경향이였다.

**최적 배지 선발**

곰보버섯의 균사생육에 가장 좋은 최적 배지를 선발하기 위하여 Table 1에서와 같이 공시된 6종의 배지를 조성하여 균사 생육을 조사한 결과 BG 배지에서 3.14 g/L로 최대 균사체 생육을 나타내었고, 그 다음으로는 Czapek, PDB배지 순으로 균사체 생육이 양호하였다(Table 2).

**초기 pH의 영향**

곰보버섯의 균사체의 최적 pH를 조사한 결과는 Fig. 2에서 보는바와 같이 pH 6.5에서 3.56 g/L로 최대 균사생장을 보였으며, pH 6.0~7.0범위에서 모두 양호한 균사생육을 보였지만 pH 8.0에서는 균사 생육이 가장 저조한 것으로 나타났다. pH 범위는 버섯에 따라서 달라서 느타리는 6.2~6.5 [5], 표고는 4.0~4.5 [24], 복령은 4.0 [9]으로 보고되었으며, Wolprot[28]가 담자균류의 균사생장 최적pH 범위에 대하여 pH 4.0-7.0이라고 보고한 결과와 다소 차이는 있지만 거의 유사한 경향임을 알 수 있었다.

**최적 탄소원 선발 및 최적농도**

각종 탄소원이 곰보버섯의 균사생육에 미치는 효과를 조

Table 2. Mycelial growth of *Morchella esculenta* on different media at 25℃ for 7days

Medium	Mycelial dry weight (g/L)
PDB	2.76
YSB	2.35
MGB	1.26
GPB	0.75
BG	3.14
Czapek	2.93

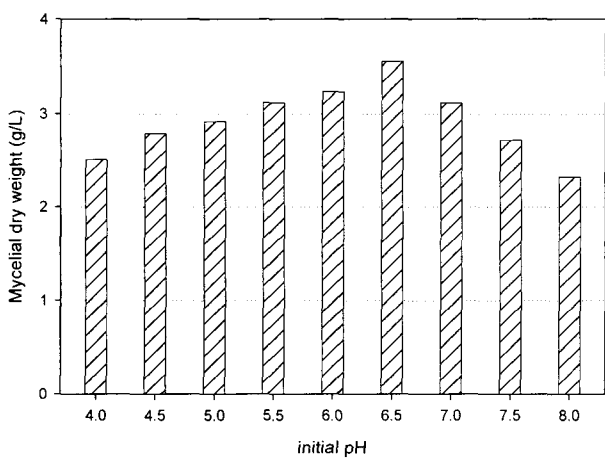


Fig. 2. Effect of initial pH on the mycelial growth of *Morchella esculenta* in BG medium at 25℃ for 7days.

사한 결과는 Table 3에서와 같이 당류에 대하여 광범위한 적응성을 보이고 있음을 알 수 있으며, 특히 단당류인 fructose 첨가구에서 균사생육이 가장 양호하였고 그 다음으로는 sucrose, starch가 가장 양호한 편이었다. 탄소원이 균사생육에 미치는 영향에 관한 보고는 Hashimoto [5]등은 느타리에서 mannose와 starch에서 균사생육이 양호하다고 하였고 Kawai [12]등이 송이버섯(*Tricholoma matsutake*)은 soluble starch, glucose가 균사생장에 양호하였다고 하여 버섯종류별로 적합한 탄소원도 다름을 알 수 있었다. 최적 탄소원으로 선발된 fructose 농도를 5% (w/v) 첨가 시 6.70 g/L로 최대 균사생육을 보였고 5%이상 첨가 시 균사생육이 저하됨을 알 수 있었다(Fig. 3).

**최적 질소원 선발 및 최적농도**

질소원이 곰보버섯 균사생육에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 복합질소원인 peptone과 암모니아태 질소원인 NH<sub>4</sub>Cl을 혼합하여 첨가하였을 때 6.91 g/L로 최대 균사체 생육을 보였으며 복합 질소원인 malt extract와 질산태 질소원인 NaNO<sub>3</sub>는 균사체 생육이 가장 저조하였다. 이러한 결과는 버섯 균사체 생육에는 암모니아태

Table 3. Effect of various carbon sources on the mycelial growth of *Morchella esculenta*

Carbon sources	Mycelial dry weight (g/L)
Dextrin	2.1
Fructose	4.2
Glucose	3.0
Lactose	2.1
Maltose	2.8
Mannitol	2.5
Starch	3.1
Sucrose	3.3

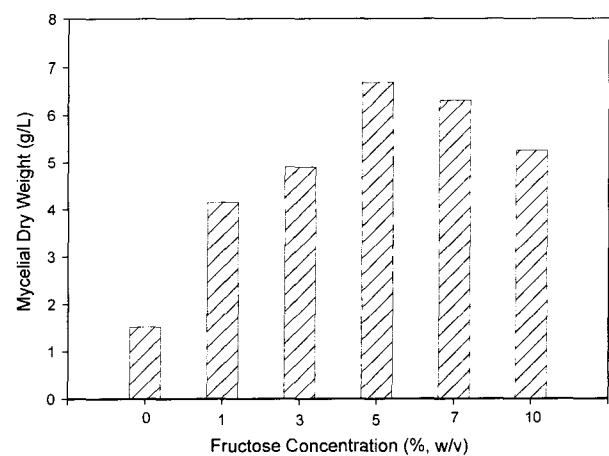


Fig. 3. Effect of fructose concentration on the mycelial growth of *Morchella esculenta*

Table 4. Effect of various nitrogen sources on the mycelial growth of *Morchella esculenta*

Nitrogen sources	Mycelial dry weight (g/L)
Yeast extract	6.17
Malt extract	1.52
Peptone	4.18
Beef extract	5.43
Yeast extract+Malt extract	4.95
Yeast extract+Peptone	6.02
Yeast extract+Beef extract	6.73
Malt extract+Peptone	4.73
Malt extract+Beef extract	3.02
Peptone+Beef extract	6.32
Yeast extract+NH <sub>4</sub> Cl	5.39
Yeast extract+NaNO <sub>3</sub>	6.21
Malt extract+NH <sub>4</sub> Cl	0.97
Malt extract+NaNO <sub>3</sub>	0.83
Peptone+NH <sub>4</sub> Cl	6.91
Peptone+NaNO <sub>3</sub>	6.67
Beef extract+NH <sub>4</sub> Cl	4.52
Beef extract+NaNO <sub>3</sub>	3.25

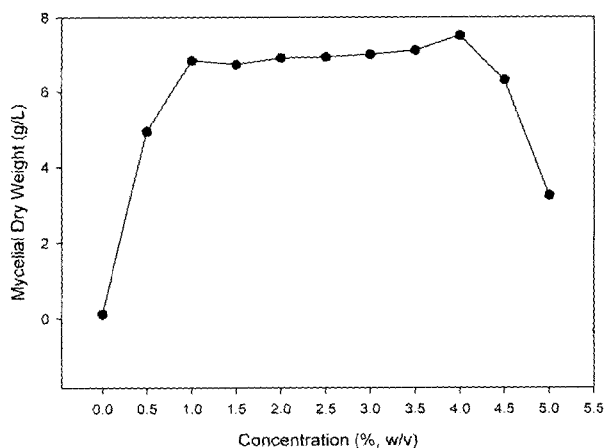


Fig. 4. Effect of Peptone and NH<sub>4</sub>Cl [ratio (w/w) of 1:1] on the mycelial growth of *Morchella esculenta*

질소가 질산태 질소보다 유리하다는 보고[7,8]와 일치하는 결과이다. 최적 질소원으로 선발된 peptone과 NH<sub>4</sub>Cl의 최적농도를 조사하기 위하여 두 질소원을 1:1의 무게비로 총 0-5% (w/v)의 농도로 조절하여 검토한 결과 Fig. 4에서와 같이 1.0% (w/v)에서 7.52 g/L로 최대 균사체 생육을 보였고 4.0% 이상의 농도에서는 균사체 생육이 저하됨을 알 수 있다.

### 감사의 글

본 연구는 2002년도 조선대학교 연구년제 해외파견 연구비에 의하여 수행 되었으며, 이에 감사드립니다.

### 요 약

곰보버섯(*Morchella esculenta*)은 맛과 영양이 풍부한 버섯으로 전 세계적으로 분포하는 버섯이다. 현재까지 우리나라에서 곰보버섯에 관한 체계적인 연구가 이루어지지 않은 상태에서 본 연구는 곰보버섯(자실체) 인공대량 생산방법 개발 및 심부배양을 통한 균사체 및 다당체 대량생산 공정개발을 위한 기초자료를 얻고자 shaking flask culture를 이용한 곰보버섯 균사체 배양특성에 관하여 조사하였다.

곰보버섯 균사체의 최적 배양온도는 25℃이며, 최적 초기 pH는 6.5, 최적배지는 BG 이었다. BG 배지를 기본배지로 하여 영양 요구성 실험을 한 결과 최적탄소원은 fructose이고 최적농도는 5.0% (w/v)이며 질소원 선발 및 최적농도에서는 peptone과 NH<sub>4</sub>Cl를 혼합하여 사용하였을 때 최대 균사체 생육을 보였고, 상기의 두 질소원을 1:1의 무게비로 혼합하여 4.0% (w/v) 농도로 첨가하였을 때 최대 균사체생육을 보였다.

### 참 고 문 헌

1. Brock, T. D. 1951. Studies on the nutrition of *Morchella esculenta* fries. *Mycology* **43**, 402-422.
2. Chihara, G., J. Himuri, Y. Y. Maeda, Y. Atai and F. Fukuoka. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially, lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk) Sing. *Cancer Res.* **30**, 2776-2781.
3. Friel, M. T. and A. J. McLoughlin. 2000. Production of a liquid inoculum/spawn of *Agaricus bisporus*. *Biotechnol. Lett.* **22**, 351-354.
4. 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.
5. Hashimoto, K. and Z. Takahasi. 1974. Studies on the growth of *Pleurotus ostreatus*. *Mushroom Sci.* **9**, 585-593
6. Hong, J. S., K. S. Lee and D. S. Choi. 1981. Studies on Basidiomycetes (I) on the mycelial growth of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* **9**, 19-24.
7. Hong, J. S. and K. H. Kang. 1983. Fruit-body formation of *Pleurotus florida* on the synthetic medium. *Kor. J. Mycol.* **11**, 121-128.
8. Hong, J. S., J. Y. Lee, M. S. Kim and D. H. Kim. 1986. Studies on the production mycelium by *Lyophyllum decastes* in submerged culture. *Kor. J. Mycol.* **14**, 131-139.
9. Hong, I. P. and M. W. Lee. 1990. Studies on the cultural characteristics of *Poria cocos*. *Kor. J. Mycol.* **18**, 42-49.
10. Huang, N. L. 1998. Colored illustrations of macrofungi (mushroom) of China. p. 18, China Agricultural Press. Beijing.
11. Kawade, M., T. Sumiya, K. Shimura and H. Ito. 1984. Activation of the reticulo-endothelial system by antitumor polysaccharide from *Agaricus blazei* Iwade. *Med. Biol.* **109**, 299-302.

12. Kawai, M. and S. Abe. 1976. Studies on the artificial reproduction of *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. I. Effect of carbon and nitrogen sources in media on the vegetative growth of *Tricholoma matsutake*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* **17**, 159.
13. Lee, J. H. 1994. Antitumor and immunostimulating activity of fungal polysaccharides. *The Microorganisms and Industry* **20**, 14-21.
14. Lee, J. H., S. M. Cho, H. M. Kim, N. D. Hong and L. D. Yoo. 1996. Immunostimulating activity of polysaccharides from mycelial of *Phellinus linteus* grown under different culture conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 52-55.
15. Lee, S. Y. and T. S. Kang. 1996. Production conditions and characterization of the exo-polymer produced by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 111-118.
16. Lee, S. Y., T. S. Kang and M. C. Lee. 1998. Condition of exo-polysaccharide production from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* by using air-lift fermenter system. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 547-553.
17. Ng, T. B. 1998. A review of research on the protein-bound polysaccharide (Polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae). *General Pharmacology* **30**, 1-4.
18. Ower, R. 1982. Notes on the development of the morel *Ascocarp. Morchella esculenta*. *Mycol.* **74**, 142-168.
19. Pfeufferle, C., U. Theobald, H. Gürtler and H. P. Feidler. 2002. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J. Biotechnol.* **80**, 135-142.
20. Ramsbottom, J. 1953. *Mushrooms and toadstools. A study of the activities of fungi.* Collins, London. p306.
21. Ryu, Y. H., Y. S. Yoon, W. S. Jo, S. D. Park, B. S. Choi and J. K. Kim. 1998. Effect of liquid spawn on *Flammulina velutipes* cultivation. *Kor. J. Mycol.* **26**, 20-24.
22. Singer, R. 1961. *Mushrooms and truffles. Botany, cultivation and utilization.* Leonard Hill, Ltd., London. p272.
23. Sone, Y., Okuda, N. Wada, E. Kishida and A. Misaki. 1985. Structure and antitumor activities of the polysaccharide isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agr. Biolog. Chem.* **49**, 2641-53.
24. Song, C. H. and K. Y. Cho. 1987. A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*. *Mycologia* **79**, 866-876.
25. Sung, J. M., C. H. Kim, K. J. Yang, H. K. Lee and Y. S. Kim. 1993. Studies on distribution and utilization of *Cordyceps militaris* and *C. nutans*. *J. Mycol.* **21**, 94-105.
26. Tabata, K., W. Itoh, T. Kojima, S. Kawabate and K. Misaki. 1981. Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* FRIES. *Carbohydrate Res.* **89**, 121-135.
27. Tseng, T. S., M. S. Shiao, Y. S. Shieh and Y. Y. Hao. 1984. Study on *Ganoderma lucidum* 1. Liquid culture and chemical composition of mycelium. *Bot. Bull. Academia* **25**, 149-157.
28. Wolport, F. S. 1924. Studies on the physiology of fungi. X VII. The growth of certain wood-destroying fungi in relation to the H-ion concentration of the media. *Ann. Missouri Bot. Garden*, 11-97.
29. Yang, F. C. and C. B. Lian. 1998. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochem.* **33**, 547-553.