Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 21, No. 6, 609-614 (1993)

표고버섯 균사체의 배양특성 및 Pilot Scale 생산

이병우* · 임근형 · 김동욱[1] · 박기문 · 손세형 · 손태화[2]
오뚜기 중앙연구소, [1]고려대학교 식품공학과, [2]경북대학교 식품공학과

Cultural Characteristics and Pilot Scale Fermentation for the Submerged Mycelial Culture of *Lentinus edodes*

Lee, Byung-Woo*, Geun-Hyung Im, Dong-Wook Kim[1], Ki-Moon Park, Se-Hyung Son and Tae-Hwa Shon[2]
Ottogi Research Center, Anyang 430-070, Korea
[1]Dept. of Food Technology, Korea University, Seoul 135-075, Korea
[2]Dept. of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract — The optimum conditions for the submerged mycelial culture of *Lentinus edodes* SR-1 were elucidated to be incubation temperature of 25℃, initial pH 4.0, agitation of 300 rpm, inoculation of 10.0%(v/v), and aeration of 1.0 v/v/m in TGY medium. The optimum C/N ratio and economic yield coefficient for the submerged mycelial culture were 13.1:1 and 0.45 respectively. As the plant growth hormones test, SCM medium containing 0.5ppm of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid increased mycelial yield in 1.1%, but 6-benzylaminopurine was not effcetive.

표고버섯(*Lentinus edodes*)은 참나무류, 밤나무, 서어나무 등의 활엽수에 사물기생하는 담자균류로서 향미성분과 약리효과 때문에 식용 및 약용으로 이용하고 있으며(1), 최근 여러 종류의 균사체에서 항암효과와 혈중콜레스테롤 저하효과가 있다는 것으로 알려진 이래 많은 연구가 진행되고 있다. 그 중 *Lentinus edodes*(2, 3)의 자실체로부터 얻어진 고분자 β, 1-3 glucan인 lentinan을 분리하였으며 *Coriolus versicolor*의 배양균사체로부터 얻어진 단백다당체인 PS-K에서 항암성이 있다고 보고되었다(4). 그리고 *Ganoderma lucidum*(5), *Lepiota procera*(6), *Grifola frondosa*(7), *Lyophyll umulmarium*(8), *Ganderma applanatum*(9), *Pleurotus ostreatus*(10) 등으로부터 얻은 단백다당체가 항암효과가 있다고 보고되고 있다.

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 바람직하다(11, 12). 식용버섯 균사체 액체배양은 Lambert에 의하여 시작되었으며, Hunfeld(13)가 진탕 및 산소를 공급하면서 양송이 균사체를 액체배양하였으며, Frase(14)는 yeast extract와 casein 분해물이 양송이 균사체 생육을 촉진한다고 보고하였다. Kawaier(15)는 송이버섯 균사체의 액체배양시 비타민, 식물성장 호르몬 및 금속이온이 균사체의 생성에 영향을 미친다고 하였다. Kurtzman 등(16)은 *Pleurotus sapidus*의 액체배양시 corn oil을 첨가한 경우 균사의 생육을 촉진한다고 발표하였다. 국내에서는 정(17), 박(18)이 *Ganoderma lucidum, Grifola frondosa* 균사체 배양시 식물성장호르몬, 인삼박 추출물, hyponex 등을 사용하여 균사체의 수율향상에 연구를 하였다. 균사체 액체배양은 다른 미생물에 비하여 생육속도가 느리며 배양중 오염의 가능성이 높아서 산업화하기가 어렵고, 또한 균사체의 생성을 위한 경제적인 면 즉, 배지의 가격, 배양기간의 단축 그리고 높은 수율을 고려해야만 된다. 경제적 측면에서 가장 중요한 것은 사용배지 성분의 결정이다. 실험실 규모에서는 물론이고 특히 pilot scale 및 본격적인 생산규모의 배양에 있어서 사용되는 배지조성은 생산원가결정에 있어 주요

Key words: *Lentinus edodes*, mycelial
*Corresponding auther

인자로 작용하는 경우가 많다(19, 20). 그러나 이들 산업용 배지의 원료는 발효중 품질관리의 변화를 줄 수 있고 또 비발효성 물질를 함유하고 있어서 최종 발효산물의 분리에 어려움을 줄 경우도 있다. 그러므로 합성배지를 사용하되 산업적으로 값이 싸고, 쉽게 이용할 수 있어야 하며(21, 22), 가능한 발효시간이 짧아야 오염의 가능성이 적고 발효생산성을 높여주게 되는 것이다.

본 연구에서는 한국산 표고버섯 균사체의 대량생산을 위한 산업화의 기초 자료로써 균사체 배양조건의 최적화를 검토하였다.

재료 및 방법

균주배양 및 배지조성

실험에 사용한 표고버섯(*Lentinus edodes*) 균주는 버섯 종균 배양소에서 구입한 산련 1호 균주를 사용하였으며, 버섯균주는 PDA(potato dextrose agar) 배지에 보존하였으며, 종균용(starter) 배지는 이 등(23)이 보고한 TGY배지를 사용하여 3 L(working volume) 발효조에서 최적 배양조건을 조사하였다. 배지의 조성은 trypton 1%, glucose 0.5%, yeast extract 0.5%이며 접종량은 5%(v/v%)로 하였다. 그리고 pilot 배양은 50 L 발효조(working volume 30 L, Bioengineering, Swiss)에서 실시하였으며 사용한 배지는 버섯 완전배지(mushroom complete medium)(1)를 변형하여 산업용 원료를 이용하여 C/N비를 변화시키면서 최적의 C/N비를 조사한 후 심부배양용 배지(submerged culture medium ; SCM)로 사용하였다. 배지의 조성은 Table 1과 같다.

균사체 배양 방법은 이 등(24)의 방법에 따라 배양하였다.

Table 1. Composition of submerged culture medium

Consitituent	Amount(g/l)
Glucose	30.0
Yeast extract*	10.0
KH_2PO_4	0.46
K_2HPO_4	1.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
Sucrose	20.0/pH 4.0

*조흥화학에서 구입

균사체의 건물량 측정

배양액을 여과하여 얻은 균사체를 동결건조하여 건조 균사체량을 측정하여 배양액 liter당 gram수로 표시하였다.

환원당 측정

환원당의 함량은 Somogyi법으로 측정하였다.

아미노태 질소 함량 측정

아미노태 질소 함량은 formalin 중화법으로 측정하였다. 즉 증류수에 녹인 시료를 0.1 N NaOH로 pH 8.4로 중화시킨 다음 formalin 50 ml를 가한 다음 다시 0.1 N NaOH로 pH 8.4가 될 때까지 적정하였다.

Economic yield coefficient

Economic yield coefficient는 yield of product(g/l) /total substrate(carbon source)로 표시하였다(25).

결과 및 고찰

온도의 영향

균사체 증식에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 TGY 배지에 균사를 접종한 후 15~40℃ 범위에서 5℃ 간격으로 배양하여 균사체의 증식량을 조

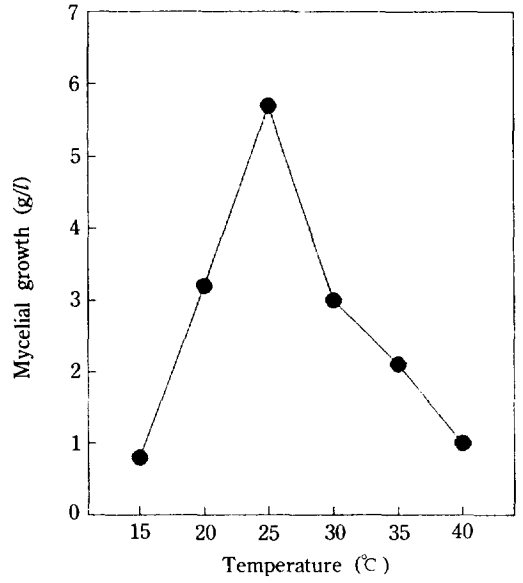

Fig. 1. Effect of temperature on the mycelial growth of *Lentinus edodes* in TGY medium.

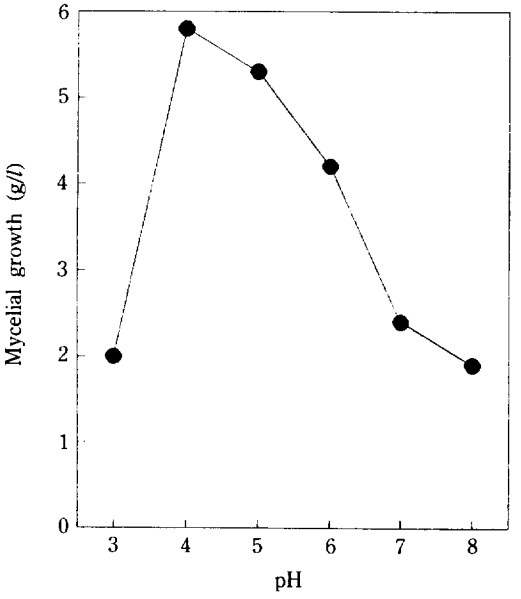

Fig. 2. Effect of pH on the mycelial growth of *Lentinus edodes* in TGY medium.

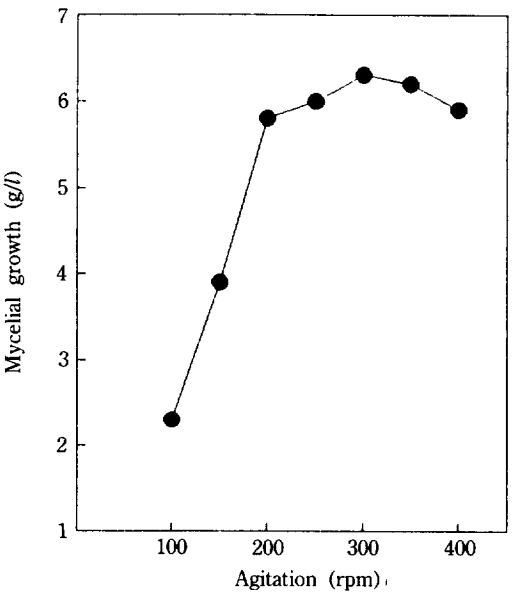

Fig. 3. Effect of agitation on the mycelial growth of *Lentinus edodes* in TGY medium.

사한 결과 Fig. 1과 같이 25℃에서 균사체의 생성량 5.7 g/*l*(dry·wt)으로 가장 많았으며 Fuji 등(3)이 보고한 온도와 비슷한 경향이었다. 이때 pH는 조정하지 않았으며 교반속도와 통기량는 각각 200 rpm, 0.5 v/v/m이었다.

초기 pH의 영향

배지의 초기 pH가 균사생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양온도는 25℃로 유지하고 교반속도와 통기량는 각각 200 rpm, 0.5 v/v/m하였다. TGY 배지 pH를 3.0~8.0의 범위에서 배양하여 균사체의 증식량을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 pH 4.0일 때 균사체의 생성량 5.8 g/*l*(dry·wt)으로 가장 많았다. 정(26), 박 등(27)이 보고한 pH 5.5와 다소 차이가 있으며, pH 7.0을 넘을 경우 균사체의 생성이 급격히 감소하였다. 균사체의 배양에서 초기pH가 대부분 약산성에서 시작되며 배지의 pH가 균사 세포내의 pH를 변화시켜 균사성장을 억제하며, 발효중 영양물질을 흡수하고 불필요한 대사산물을 분비하여 발효중 pH의 자동조절이 필요하게 된다(22).

교반(agitation)의 영향

TGY 배지로 균사체의 배양에서 교반속도를 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 rpm으로 배양하여 교반속도에 대한 영향을 조사한 결과 Fig. 3과 같이 300 rpm일 때 6.3 g/*l*(dry·wt)일 때 균사체의 생성량이 가장 좋았으며 교반속도가 증가되면 균사체의 생성량이 약간씩 감소함을 알 수 있었다. 교반속도의 증가는 발효과정중 산소 전달의 능력을 증가시키지만 균사체 pellet 크기에 영향을 주고 궁극적으로 균사체 성장에 불리하게 작용하는 것으로 생각된다. 이때 배양온도는 25℃, 통기량는 0.5 v/v/m이었으며 pH는 조정하지 않았다.

공기량(aeration)의 영향

TGY 배지로 균사체의 배양에서 공기량을 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 v/v/m으로 공급하여 균사체의 생성량을 조사한 결과 Fig. 4와 같이 공기량이 증가할수록 균사체의 생성량이 증가하였으며 공기량이 1.0 v/v/m 이상일 때 균사체의 증가는 둔화되었으며, 배양중 거품의 발생이 심하여 소포제의 사용이 많아졌다. 假組治下(28)는 발효과정중 소포제의 사용이 증가하면 수율이 현저히 감소하고 최종 생산물 추출이 어렵다고 보고하였다. 따라서 공기량은 1.0 v/v/m(13.0 g/*l*, dry·wt)일 때가 가장 좋았다. 이때 온도는 25℃, 교반속도 200 rpm이었으며 pH는 조정하지 않았다.

접종량(inoculum ratio)의 영향

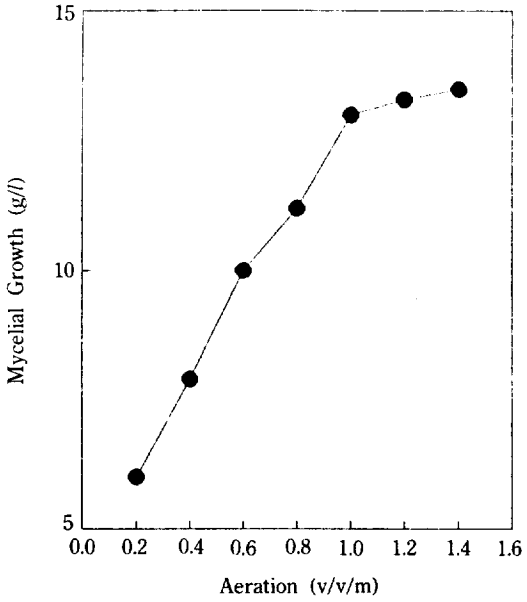

Fig. 4. Effect of aeration on the mycelial growth of *Lentinus edodes* in TGY medium.

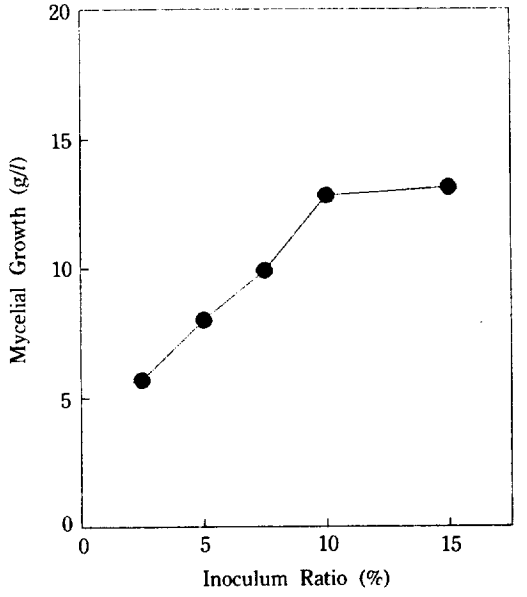

Fig. 5. Effect of inoculum ratio on the mycelial growth of *Lentinus edodes* in TGY medium.

TGY 배지에서 균사체 배양시 무균적으로 균질화한 종균을 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0%(v/v%)로 접종한 후 접종량에 따른 균사체의 생성량을 조사한 결과 Fig. 5와 같이 접종량이 증가할수록 균사체의 생성량은 증가하는 경향이나 10.0%(12.8 g/*l*, dry·wt)이상부터는

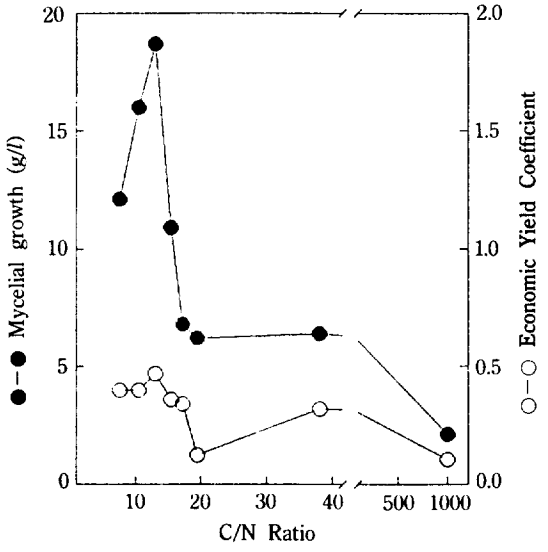

Fig. 6. Mycelial growth of *Lentinus edodes* in the SCM medium.

균사체의 생성량에 큰 차이를 보이지 않았다. 정 등(17)은 *Ganoderma lucidum*은 10% 이상, *Grifola frondosa*은 8% 이상부터 균사체가 증가하지 않았다고 보고하였다. 이때 배양온도는 25℃로 유지하고 교반속도와 통기량는 각각 200 rpm, 0.5 v/v/m이었다. 한편 pH는 조정하지 않았다.

C/N ratio

균사체 배양 기본조건(온도 25℃, pH 4.0, 300 rpm, 접종량 10.0%, 공기량 1.0 v/v/m)을 기초로 대량생산할 수 있는 액체배지를 조사하기 위하여 SCM(Table 1) 배지중 glucose 2.0~3.0%, yeast extract 0.2~1.2%, peptone 0.0~0.5% 그리고 sucrose 2.0~4.0%의 범위로 변화시키면서 최적의 C/N ratio을 조사한 결과 Fig. 6과 같이 13.1 : 1에서 18.8 g/*l*의 균사체를 생성하였다. 또 배지로 사용한 기질 탄소원이 조직탄소로 전환시키는 생산수율은 C/N ratio 13.1일 때 0.46으로써 가장 높게 나타났다.

Devinder(25)의 보고에 의하면 생산수율은 공급된 기질(탄소원)에 대한 최종 생성량을 의미하는 것으로 주어진 발효환경에 50%의 기질이 소비되면 대량생산을 위한 액체배지로서 적합하다고 하였으며, 옥수수 부산물을 이용한 *Pleurotus sajorcaju*를 배양한 결과 0.49의 생산 수율을 얻었다고 보고하고 있다. 따라서 C/N비를 변화시킨 SCM 배지로 표고버섯 균사체를 액체배양하였을 때 생산수율이 0.46으로 나타나서

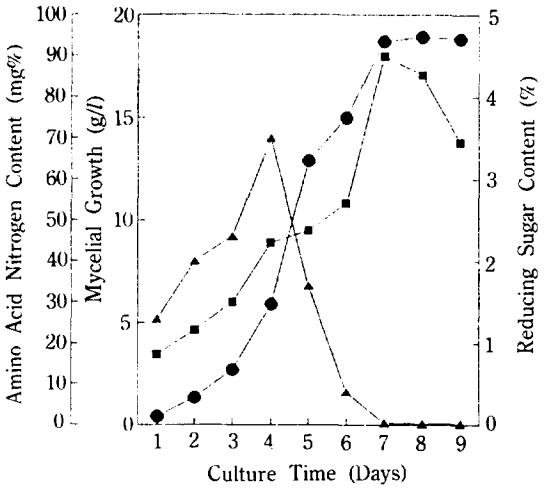

Fig. 7. Changes in reducing sugar content, amino acid nitrogen content and mycelial growth during pilot fermentation.

▲—▲ Reducing sugar, ●—● Mycelial growth, ■—■ Amino acid nitrogen content

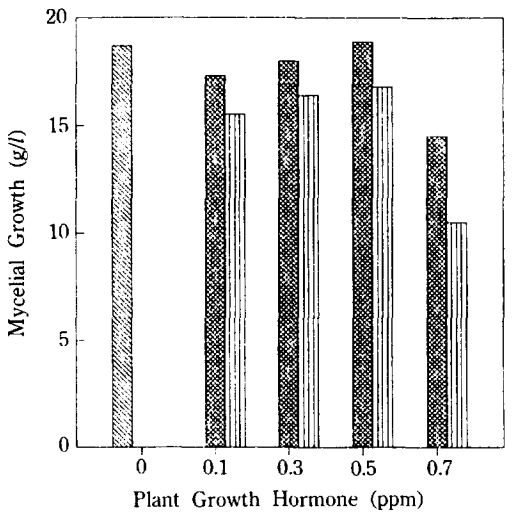

Fig. 8. Effect of plant growth hormone on the mycelial growth.

▨—▨ Control, ▩—▩ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, ▥—▥ 6-Benzylaminopurine

대량생산에 적합한 배지로 사료된다.

Pilot 생산

최적의 배양조건 및 배지조성으로 50*l* 발효조에 SCM 배지를 넣어 배양한 결과 Fig. 7과 같이 균사체의 건물량이 배양 3일까지 서서히 증가하다가 배양 4일째부터 급격히 증가하여 배양 7일째 최대 생성량을 보여주었다. 즉 배양 4일째 5.8 g/*l*이었던 것이 7일째 3배가 넘는 18.8 g/*l*까지 증가함을 알 수 있었다. 또 환원당은 배양 4일째부터 급격히 감소하여 7일째 거의 다 소모되었음을 보여주었으며, 아미노태 질소량의 변화는 배양일수가 경과함에 따라 증가를 나타내었다.

식물성장호르몬 사용

균사체 수율의 증가를 위하여 SCM 배지 30*l*가 들어있는 발효조에 10%의 종균을 접종하고 최적배양조건(온도 25℃, pH 4.0, 300 rpm, 공기량 1.0 v/v/m)하에서 식물성장호르몬인 auxin류 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)와 cytokinins류 BA(6-Benzylaminopurine)를 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 ppm의 농도로 첨가하여 각각 액체배양을 실시한 결과 Fig. 8과 같이 2,4-D를 0.5 ppm을 첨가한 배양에서 대조구(564 g/30 *l*, dry basis)보다 수율이 1.1% 증가한 620 g/30 *l*이지만, BA를 첨가하였을 때 대조구에 비하여 수율이 감소하여 균사체 수율 향상에 식물성장호르몬 BA는 효과가 없었다. 한편 정 등(17)은 *Ganoderma lucidum*에 IAA를 10^{-2} mM 첨가하였을 때 수율이 1.2배, *Grifola frondosa*에 gibberelline A_3-acetic acid를 10^{-2} mM 첨가하였을 때 수율이 1.3배 증가하였다고 보고하였다. 따라서 호르몬의 종류, 사용량 및 균사체의 종류에 따라 생산수율에 차이가 나타남을 알 수 있었다.

요 약

Lentinus edodes 산련 1호의 최적배양 조건을 TGY 배지로 조사한 바 배양 최적온도 25℃, 초기 pH 4.0, 교반속도 300 rpm, 접종량 10.0%로 하고 산소 통기량을 1.0 v/v/m일 때 최적배양조건이었으며 산업용 배지로 대량생산하기 위한 액체배지에서 최적의 C/N ratio 13.1 : 1로 7일간 배양하였을 때 건조 균사체량은 18.8 g/*l*을 얻었다. 또 수율 증가를 위하여 식물성장호르몬인 2,4-D, BA를 첨가한 실험에서는 2,4-D 0.5 ppm을 첨가하여 배양하였을 때 대조구보다 1.1% 수율이 증가하였지만, BA를 첨가하였을 때 대조구에 비하여 수율이 감소하여 균사체 수율향상에 식물성장호르몬 BA는 효과가 없었다.

참고문헌

1. 차동열, 유장현, 김광포. 1989. 최신 버섯 재배기술.

p. 3. 상록사.
2. Chihara, G., Y. Maeda, G. Hamuro and F. Fukuoka. 1969. Inhibition of mouse sarcoma-180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (berk) sing. *Nature.* **222**: 687-688.
3. Fuji, T., F. Maeda, Suzuki and N. Ishida. 1978. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes. J. Antibiot.* **31**: 1079-1090.
4. Tsukagoshi, S. andF. Ohashi. 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma ah-13 by oral use. *Gann.* **65**: 577-588.
5. Yoshiaki, S., O. Reiko, W. Noriko and M. Akira. 1985. Structural and antitumor activites of the polysaccharide isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum. Agri. Biol. Chem.* **49**: 2641-2653.
6. 김병각, 심미자, 김하원, 최응칠. 1989. 갓버섯의 항암성분. 한국위생학회지 **4**: 109-118.
7. Tizuno, T., W. Ohawa, N. Hagiware and R. Kuboyama. 1986. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from mitake, *Grifola frondosa. Agri. Biol. Chem.* **50**: 1679-1688.
8. Chieko, K., N. Motohiro and K. Ikuzo. 1984. Structural examinationation of watersoluble glucans from fruit-body of *Lyophyllum ulmarium* No. 1 (studies on constitutents of edible fungi; part III). *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish* **37**: 765-772.
9. Taichih, U., I. Yoshio and M. Takashi. 1983. Isolation and characterzation of antitumior activite β-D-glucans from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum. Carbohydrtae Res.* **115**: 273-280.
10. Yuko, Y., T. Ryoko and F. Funoko. 1985. Antitumor polysaccharide from *P. ostreatus* (fr), qual, isolation and structure of a β-glucan. *Carbohydrate Res.* **140**: 93-100.
11. Samuel, C. 1959. Production of mushroom mycelium by the submerged culture process, Pp. 647-153. Industrial Microbiology. Reinhold Publishing, London.
12. Torev, A. 1964. Submerged culture of higher fungi mycelium on the an industrial scale. *Mushroom Sci.* **7**: 585-589.
13. Hunfeid, H and T. Sugihara. 1952. The nutrient requirements of Agaricus campestris growth in submerged culture. *Mycology.* **44**: 605-611.
14. Fraser, I.M. 1956. The growth promptive effect of servial amino acids on the common cultivated mushroom. *Mushroom Sci.* **3**: 190-200.
15. Kawai, M. and O. Terada. 1976. Effect of vitamin, nucleic acid relating substance, phytohormones and metal ion in media on the vegetative growth of *Tricholoma matsutake. Trans. Mycol. Soc. Japan* **17**: 168-175.
16. Kurtzman, R. 1976. Nutrition of Pleurotus sapidus effect of lipids. *Mycologia* **68**: 286-293.
17. 정건섭. 1991. Cheese whey를 기본배지로 사용한 영지버섯 및 잎새버섯의 균사체 액체배양. 식품기술 **4**: 23-27.
18. 박영도. 1989. 구름버섯의 균사배양액 및 자실체로부터 얻어진 단백다당체의 수율비교. 한국균학회지 **17**: 223-228.
19. Ghosh, A. and K. Sengupta. 1982. Influence of some growth factors on the production of mushroom mycelium in submerged culture. *J. Food Sci and Technol.* **19**: 57-60.
20. Antonio, M. 1983. Submerged production of edible mushroom mycelium. *Can. Inst Food Sci Technol. J.* **6**: 215-217.
21. Manu-Tawiah, W. and A. Martin. 1987. Study of operational variable in the submerged growth of Pleurotus ostreatus mushroom mycelium. *J. Appl. Biotechnol.* **14**: 221-229.
22. 박영훈. 1989. 산학협동강좌, 생물공정기술, Pp. 3-37. 한국과학기술원.
23. 이정숙, 이서래, 유태종. 1975. 진탕배양법에 의한 양송이 균사체의 생산. 한국식품과학회지 **7**: 22-29.
24. 이병우, 이명섭, 박기문, 김창한, 안평욱, 최춘언. 1992. 운지버섯 균사체 추출물의 항암효과에 관한 연구. 한국산업미생물학회지 **20**: 311-315.
25. Devinder, S.C. 1989. Production of protein-rich mycelial biomass of a mushroom, *P. sajor-caju,* on corn stover. *J. Ferment. and Bioeng.* **68**: 334-338.
26. 정경수. 1984. 한국산 고등균류의 성분연구(제 4보): *Lentinus edodes* DMC-7 균주의 배양여액의 항암성분. 한국균학회지 **12**: 129-132.
27. 박경숙. 1991. *Coriolus versicolor*와 *Lentinus edodes* 양양배지조성 및 배양조건의 최적화. 한국생물공학회지 **6**: 91-98.
28. 假組治下. 1981. 담자균류의 배양방법. 대한민국특허공고번호 81-1708.

(Received August 17, 1993)