

천연물을 이용한 담자균의 균사체 배양

김선희 · 이종숙¹ · 박경숙² · 이재성^{1*} · 이항우³ · 박 신

대구대학교 농화학과, ¹영남대학교 식품가공학과
²대구공업대학 식품영양학과, ³영남대학교 생물학과

Liquid Culture of Basidiomycetes on Natural Media

Seon-Hee Kim, Jong-Suk Lee¹, Kyung-Sook Park², Jae-Sung Lee^{1*},
Hang-Woo Lee and Shin Park

Department of Agricultural Chemistry, Taegu University, Kyungsan 713-714, Korea

¹Department of Food Science and Technology, Yeungnam University,

Kyungsan 712-749, Korea

²Department of Food and Nutrition, Taegu Technical College, Taegu 704-350, Korea

³Department of Biology, Yeungnam University, Kyungsan 712-749, Korea

ABSTRACT: This study was designed to develop functional drink from jujube extract through a simple submerged culture of three basidiomycetes species. The optimum Brix and pH of the jujube extract for culturing the *Ganoderma lucidum* appeared to be 5 Brix and pH 4. Ten days of culture period produced maximum mycelium. The optimum Brix and pH of the jujube extract for culturing the *Coriolus versicolor* appeared to be 5 Brix and pH 5. Ten days of culture period produced maximum mycelium. The optimum Brix and pH of the jujube extract for culturing the *Phellinus igniarius* appeared to be 3 Brix and pH 5. For the maximum mycelial production eighteen days of culture period was required for *Phellinus igniarius*. The antitumor activity of the polysaccharides extracted from the fermented drinks was demonstrated through the tumor cell line experiments. The IC₅₀ values of the jujube drinks fermented with *Ganoderma lucidum* and *Phellinus igniarius* against stomach cancer cell line appeared to be one fourth that of the jujube drink which was not fermented with basidiomycetes.

KEYWORDS: *Coriolus versicolor*, Functional drink, *Ganoderma lucidum*, *Phellinus igniarius*

버섯의 액체배양은 1948년 미국에서 Humfeld(1948)가 *Agaricus campestris*에 대해 최초로 시도하였으며, 국내에서는 이 등(1975)이 *Agaricus bisporus*의 균사체를 진탕배양법에 의하여 처음으로 배양하였으며, 최근에는 *Ganoderma lucidum*을 비롯한 여러 균주에 대한 액체배양 연구도 많이 이루어지고 있다(박 등, 1991; 정 등, 1991; 이 등, 1992; 이 등, 1994; 이 등, 1995). 이러한 액체 배양 방법은 조작의 간편, 생산 기간의 단축 및 생산량 증대의 장점을 가지며, 항상 일정한 조건에서의 배양이 가능하다. 특히 액체 배양 균사체의 열수 추출로 얻은 다당체는 균주에 따라 차이가 있으나 대체적으로 자실체와 마찬가지로의 생리적 기능을 가지는 것으로 밝혀지고 있으므로(이, 1990; 이 등, 1991), 자실체 형성을 필요로 하지 않는 산업적 용도로 많이 이용되고 있다.

이제까지는 담자균의 자실체를 이용하거나 이들 균사체를 액체배양으로 대량 생산 후 특정 성분을 추출하거나 정제하여 식품이나 의약품으로 이용하고 있다. 그러나 이 방법을 통한 제품의 생산은 추출 및 정제 공정을 필요로 하므

로 생산 공정의 효율이 낮고 환경오염의 문제점을 야기시킬 수 있으며, 상황버섯 등과 같은 특정 버섯은 가격이 너무 높아 대중화가 어려운 실정이다.

본 연구에서는 추출 및 정제 등의 고비용 공정을 생략하고 간단한 가공공정을 거쳐서 식용 가능한 기능성 음료를 개발하기 위하여 영양 성분이 풍부한 대추 추출액을 천연 배지로 이용하여 실용적 배양 방법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에서는 농업과학기술원 응용미생물과에서 분양받은 *Ganoderma lucidum* 7094, *Phellinus igniarius* 26005, *Coriolus versicolor*를 본 연구실에서 계대 배양하면서 공시 균주로 사용하였다.

배지 및 배양방법

균의 보존용 배지로는 MYG 배지(Malt extract 1 g, Glucose 0.4 g, Yeast extract 0.4 g, Agar 1.5 g, D.W 100 ml)를 사용하였으며 *Ganoderma lucidum* 7094는 7일, *Phellinus*

*Corresponding author <E-mail: jslee@yu.ac.kr>

igniarius 26005는 12일, *Coriolus versicolor*는 4일 동안 평판배양한 다음 균사의 가장자리 일정부위를 5 mm cork borer로 절단하여 접종원으로 사용하였다. 액체 배지의 원료로는 대추(당질 69.08%, 단백질 5.88%, 조섬유 3.70%, 조회분 2.67%, 조지방 1.37%, 수분 17.3%)를 이용하였으며, 대추 중량의 10배의 증류수를 가하여 3시간 동안 끓는 온도에서 추출한 액을 당도와 pH를 조절하여 100 ml 삼각 flask에 50 ml씩 분주한 후 가압멸균시켜 사용하였다. 배양은 대추 추출액 배지에 균사체를 접종한 다음 28°C에서 진탕배양(125 rpm)하였다.

배양액의 당도

배양액의 최적 당도 조건을 찾기 위하여 대추 추출액의 당도를 1~11° Brix로 조정된 대추 추출액에 균사를 접종하여, 13일 동안 진탕배양(28°C, 125 rpm)시킨 후 균사체의 건물량을 측정하였다.

배양액의 pH

최적 당도로 조절된 대추 추출액을 구연산과 구연산 나트륨으로 pH를 2~7의 범위로 조정하여 13일 동안 진탕배양(28°C, 125 rpm)시킨 후 균사체의 건물량을 측정함으로써 배양 최적 pH를 구하였다.

배양기간

최적 배양기간을 찾기 위해 최적 당도와 최적 pH로 조정된 대추 추출액에 균사를 접종하여 7, 10, 13, 16, 18, 23, 28일 동안 배양한 후 배양 기간별로 균사체의 건물량, 배지의 pH, 당도, 색도 변화를 조사하였다.

균사체의 건물량

균사체의 건물량은 건조중량이 미리 측정된 여과지(Whatman No. 2)로 배양액을 여과하여 균사체를 회수한 다음 70°C에서 24시간 건조시켜 중량을 측정하였으며, 여기에서 여과지 중량을 제한 중량을 균사체의 건물량으로 하였다.

pH와 당도

배양액의 각 기간별 시료의 pH 변화는 시료 20 ml를 취하여 pH meter(ORION, model 420A)를 이용하여 측정하였으며, 당도변화는 휴대용 굴절계(Atago, Japan)를 이용하여 측정하였다.

색도

각 배양기간별 시료의 색도는 배양액 40 ml씩을 1회용 petri-dish에 부어서 Digital Color Measuring/Difference Calculating Meter(Model CR-200 Minolta, Japan)로 측정하고, Hunter의 "L" "a" "b" 값으로 표현하였으며, 이때 사용한 표준 백색판의 색도는 L = 97.51, a = -0.18, b = 1.67이었다.

항암실험

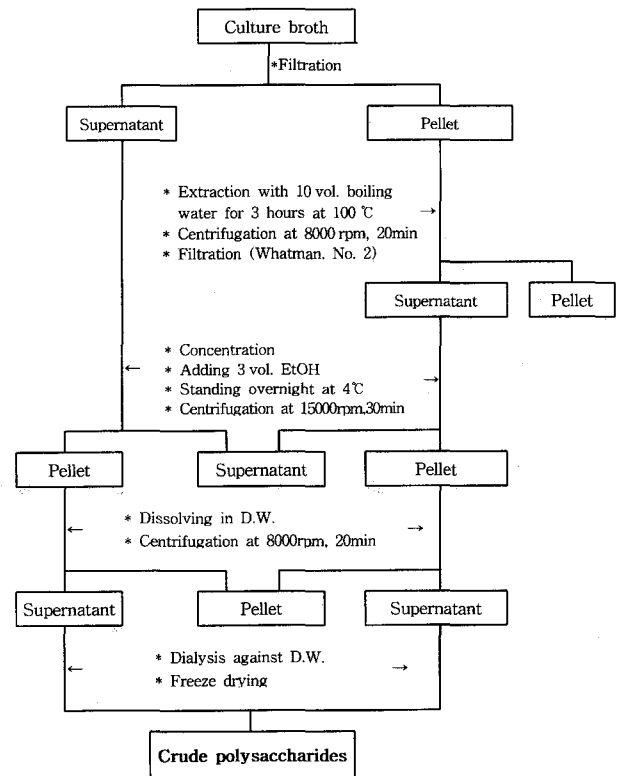


Fig. 1. The extraction procedure of crude polysaccharides.

담자균이 배양된 액체 배양물로부터 추출한 조다당류를 시료로 사용하였다. 암세포주는 사람의 위암세포주 SNU-1과 백혈병세포주 HL 60을 사용하였으며, 한국 세포주 은행으로부터 분양받았다. 사용한 시약 중 MTT(3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyltetrazolium bromide: Thiazolyl blue), colcemid, trypsin(1 : 250), DMSO(dimethyl sulfoxide)는 Sigma사, RPMI 1640은 Gibco사, Iron supplemented bovine serum은 Hyclone사 제품을 사용하였다.

담자균 배양액을 여과하여 균사체와 배양액을 분리한 다음 각각 다음의 방법으로 다당류를 추출하였다(Fig. 1).

SNU-1 및 HL 60 세포주는 10% iron supplemented bovine serum과 50 µg/ml의 gentamicin이 첨가된 RPMI 1640을 배양액으로 사용하여 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다.

SNU-1 및 HL 60 세포주를 먼저 midlog phase로 배양하여 세포들을 50 ml 원심분리관에 각각 옮긴 후 1,500×g에서 10분간 원심분리하였다. 상징액을 버리고 10 ml의 PBS(8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄/L, pH 7.4)를 가한 후 세포를 잘 분산시키고, 세포 수를 측정한다. 다음 1,500×g에서 10분간 원심분리하였다. 상징액을 버리고 10 ml의 RPMI 1640 배양액을 가한 후 다시 세포를 잘 분산시켜 96 well plates에 SNU-1 세포주는 well당 5000 cells, HL 60 세포주는 7500 cells이 되도록 분주하였다. 담자균 배양액을 추출한 조다당류를 0.15 M NaCl에 녹인 후 멸균된 0.45 µm filter로 여과하여 각각을 농도별로 첨가하

였다. 이산화탄소 배양기(37°C, 5%)에서 4일간 배양하여 MTT assay를 시행하였다. MTT assay는 먼저 PBS 용액에 MTT를 2 mg/ml 농도가 되도록 녹인 후, 멸균된 0.45 µm filter로 여과한 MTT용액을 사용하였다. Well당 200 µl가 든 세포용액에 MTT용액을 50 µl씩 넣고 4시간 후 220 µl 상정액을 제거하고 형성된 MTT formazan을 DMSO 205 µl를 첨가하여 녹였다. Biorad사의 Microplate Reader로 파장 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료와 동일한 양의 배양액을 시료대신 첨가하였다. 각 시료의 농도에 따른 세포 생존 정도는 MTT assay를 시행한 결과에서 대조군의 흡광도에 대한 상대적인 값을 percent로 나타내었다.

결과 및 고찰

당도의 영향

액체 배지의 당도가 균사배양에 미치는 효과를 조사하기 위하여 건조대추를 대추 중량 10배의 증류수로 3시간 추출한 대추 추출액의 당도를 증류수로 조정하여, 당도별 균사체 배양 효율을 측정하였다. 그 결과는 Table 1과 같다.

*Ganoderma lucidum*과 *Coriolus versicolor*를 각각 13일 동안 액체 배양한 결과 5 Brix 당도의 액체배지에서 균사체 수율이 각각 303 mg/50 ml, 172 mg/50 ml로 균사 생장이 가장 양호하였으며, *Phellinus igniarius*를 배양한 경우에는 상대적으로 균사 생장이 저조하였는데, 그 중에서는 3 Brix 당도의 배지에서 얻은 54 mg/50 ml가 가장 높은 수율이었다.

Table 1. Effect of the brix of the jujube extract solution on the mycelial growth

Species ¹⁾	Dry weight of mycelium (mg/50 ml)					
	Concentration (Brix)					
	1	3	5	7	9	11
<i>Ganoderma lucidum</i>	148	200	303	224	41	45
<i>Phellinus igniarius</i>	24	54	38	36	47	49
<i>Coriolus versicolor</i>	49	97	172	157	161	152

¹⁾All species were cultured at 28°C in shaking incubator (125 rpm) for 13 days.

Table 2. Effect of the pH of the jujube extract solution on the mycelial growth

Species	Dry weight of mycelium (mg/50 ml)						
	pH						
	2	3	4	5	6	7	
<i>Ganoderma lucidum</i> ¹⁾	22	17	318	220	205	24	
<i>Phellinus igniarius</i> ²⁾	36	21	158	179	97	43	
<i>Coriolus versicolor</i> ¹⁾	26	39	223	339	183	41	

¹⁾The species were cultured in jujube extracts media of 5 Brix.

²⁾*Phellinus igniarius* was cultured in jujube extracts media of 3 Brix. All species were cultured at 28°C in shaking incubator (125 rpm) for 13 days.

pH의 영향

균사체 배양을 위한 최적 pH를 조사하였다. 대추 추출액을 최적 당도실험의 결과를 근거로 하여 가장 생장이 양호한 당도로 조절하여, 다시 구연산을 이용하여 pH 2에서 7 범위로 조정하여 균사체 배양 효율을 측정하였다. 그 결과, *Ganoderma lucidum*은 pH 4에서의 건조균사체량이 318 mg/50 ml로 가장 높았으며(Table 2), 이는 정(1996)이 합성배지를 이용하여 이 균의 균사 생장을 보았을 때 pH 4.5에서 가장 양호하였으며, 알칼리보다 산성쪽 배지에서 잘 자랐다는 결과와 유사하게 나타났다. *Coriolus versicolor*는 pH 5에서 건조 균사체량이 339 mg/50 ml로 가장 높았는데 이는 박 등(1991)이 합성배지를 이용하여 최적 pH를 5.2~5.6으로 나타낸 보고와 유사한 결과로 볼 수 있다. *Phellinus igniarius*는 pH 5에서 건조 균사체량이 179 mg/50 ml로 높게 나타났으며, 정 등(1996)이 합성배지를 이용하여 최적 pH 7.0에서 균사생장이 가장 양호했다는 보고와는 상당히 차이가 있다. 배지에서 균사체의 성장속도는 당도와 pH 이외에 영양적인 요소는 물론 미량원소 및 생장요인과 같은 많은 요소에 영향을 받는다. 더욱이 여러 요인간에는 상호교호작용도 예상되므로 대추추출액과 같은 천연배지에서 균사체 수율을 합성배지의 수율과 직접 비교하기는 어려운 점이 있다. 또한 같은 균주에서도 액체배양에 접종하는 접종량 및 접종원의 활성에 차이가 있을 수 있으므로 매 실험실시때마다 균사생장속도가 차이가 있을 수 있다. 즉 *Ganoderma lucidum*의 경우, pH 실험에서는 최적 당도 및 pH 조건임에도 불구하고 균사체 수율이 당도 실험의 최적 수율에 비하여 떨어지는 현상도 보이는 것이다.

보편적으로 담자균은 pH 4~5 범위의 산성에서 배양이 잘 되는 것으로 알려져 있으며, 대추 추출액 배지에서도 그와 일치하였다.

배양일자의 영향

균사생장이 가장 양호한 당도와 pH로 조절된 대추 추출액 배지에 *Ganoderma lucidum*, *Coriolus versicolor*, *Phell-*

Table 3. Mycelial growth of basidiomycetes in the optimized concentrations of jujube extract solution

Species	Dry weight of mycelium (mg/50 ml)						
	Culture days						
	0	7	10	13	18	23	28
<i>Ganoderma lucidum</i> ¹⁾	34	120	688	-	-	-	-
<i>Phellinus igniarius</i> ²⁾	28	47	69	86	116	103	99
<i>Coriolus versicolor</i> ³⁾	24	233	579	488	448	312	338

¹⁾*Ganoderma lucidum* was cultured in jujube extracts media of 5 Brix and pH 4.

²⁾*Phellinus igniarius* was cultured in jujube extracts media of 3 Brix and pH 5.

³⁾*Coriolus versicolor* was cultured in jujube extracts media of 5 Brix and pH 5.

All species were cultured at 28°C in shaking incubator (125 rpm).

*inus igniarius*를 접종하여 배양기간별로 균사체 수율, 배양액의 당도와 pH 및 배양액의 색도를 측정하였다(Table 3). *Ganoderma lucidum*은 액체 배양에서 지속적인 증가를 보이다가 배양 10일째 건조 균사체량이 688 mg/50 ml로 나타났으나 그 이후 배양액이 gelatin화 되는 현상이 일어나 여과가 용이하지 않았다. Gelatin화가 나타나는 이유는 담자균류의 경우 균사체 성장시 접액성 물질이 균사체 외각을 덮는데 이는 (1→3)-β 및 (1→6)-β-glucan의 구조를 갖는 mucilage로써 균사체 세포벽을 통과하여 배양액 내로 분비되어 배지의 gelatin화를 유발하기 때문인 것으로 사료된다(정 등, 1997). *Coriolus versicolor*의 경우는 배양 10일째 579 mg/50 ml로 균사체 건물량이 가장 높게 나타난 반면, *Phellinus igniarius*의 경우 균사체 건물량이 다른 담자균에 비해 전반적으로 낮은 수치를 나타내었으며 배양 18일째 116 mg/50 ml로 균사체 건물량이 가장 높게 나타났다.

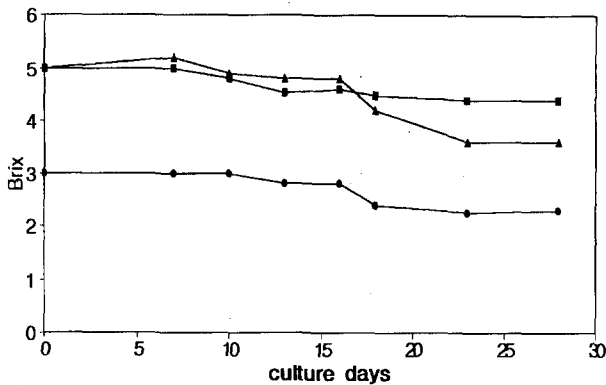


Fig. 2. Changes in brix of culture solution of basidiomycetes through culture days. -●-: *Phellinus igniarius*, -■-: *Ganoderma lucidum*, -▲-: *Coriolus versicolor*. All species were cultured at 28°C in shaking incubator (125 rpm).

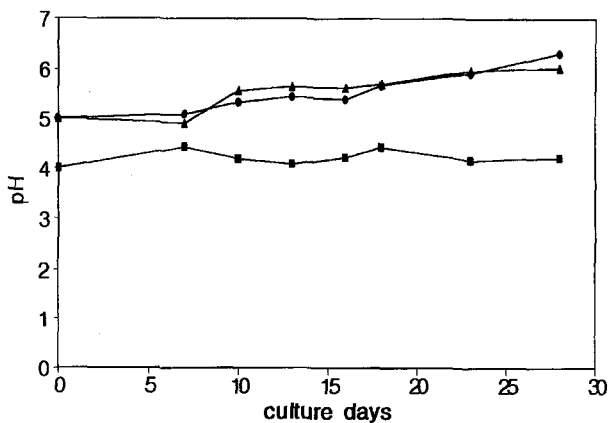


Fig. 3. Changes in pH of culture solution of basidiomycetes through culture days. -●-: *Phellinus igniarius*, -■-: *Ganoderma lucidum*, -▲-: *Coriolus versicolor*. All species were cultured at 28°C in shaking incubator (125 rpm).

당도와 pH의 변화

배양기간에 따른 액체 배지의 당도와 pH의 변화를 측정한 결과는 Fig. 2, 3와 같다. 배양액의 pH는 *Coriolus versicolor*과 *Phellinus igniarius*에서는 각각 pH 4, 5에서 기간이 지남에 따라 계속적으로 완만한 상승을 보였다. *Ganoderma lucidum*은 다른 배양액과는 다르게 전 배양기간을 통하여 별로 변화하지 않는 현상을 보였다. 배양기간이 경과함에 따라 액체배지의 당도는 모두 점차적으로 감소하는 현상을 나타내었다.

색도의 변화

배양액을 음료로 개발할 경우 배양액의 색도는 제품의 색을 결정하게 된다. 배양기간에 따른 액체 배지의 색도 변화를 비교하기 위해 Hunter "L" "a" "b"값을 나타낸 결과는 Table 4와 같다. 배양기간이 경과함에 따라 *Ganoderma lucidum*과 *Coriolus versicolor*를 배양한 액체배지는 백색도 값인 "L"값이 증가한 반면에 "a" 및 "b"값은 감소하였으며, *Phellinus igniarius*를 배양한 액체 배지는 백색도값인 "L"값과 "b"값이 감소한 반면에 "a"값은 증가하였다. 이것은 *Phellinus igniarius*가 배양되면서 균이 가진 고유의 색인 암갈색으로 인해 "L"값이 낮아지는 것으로 보였다.

항암실험

담자균을 이용한 기능성 음료라는 측면에서 암 세포주를 이용하여 암 세포 억제 실험을 실시하였다(Table 5). 위암세

Table 4. Color value of culture solutions

Species	Culture days	Color		
		L ¹⁾	a ²⁾	b ³⁾
<i>Ganoderma lucidum</i>	0	50.98	+3.89	+36.70
	7	63.99	+4.12	+43.72
	10	67.20	+2.31	+42.34
	13	67.36	-0.03	+39.91
	16	47.35	-3.08	+36.38
	18	91.88	-0.80	+6.62
	23	87.62	+0.30	+0.32
<i>Phellinus igniarius</i>	0	53.55	+0.66	+31.84
	7	56.47	+7.26	+38.58
	10	51.90	+9.21	+37.48
	13	52.18	+9.21	+38.48
	16	33.83	+14.37	+23.06
	18	46.64	+31.16	-24.61
	23	42.82	+31.38	-29.47
<i>Coriolus versicolor</i>	0	52.87	+3.13	+36.35
	7	54.14	+11.42	+46.68
	10	55.26	+9.76	+48.42
	13	57.29	+9.12	+49.21
	16	46.82	+10.75	+41.78
	18	83.58	+4.72	+20.04
	23	71.58	+4.05	+11.54
28	75.86	+8.84	+17.25	

Color measurement recorded as ¹⁾L; lightness, ²⁾a; red, ³⁾b; yellow.

Table 5. The IC₅₀ values for stomach cancer and leukemic cell lines

Group	IC ₅₀ (mg/ml)	
	SNU-1 ¹⁾	HL 60 ²⁾
Jujube extract	2.3	0.88
<i>Ganoderma lucidum</i>	0.46	0.39
<i>Phellinus igniarius</i>	0.5	0.36
<i>Coriolus versicolor</i>	1.2	0.5

¹⁾SNU-1: Human stomach adenocarcinoma cell lines.

²⁾ HL 60: Leukemic cell lines.

포와 백혈병세포의 억제 효과에 있어서는 대추 추출액의 다당류보다 균사체를 배양시킨 배양물에서 추출한 다당류가 우수하였다. 즉 *Phellinus igniarius*와 *Ganoderma lucidum* 배양액 모두 대추 추출액에 비하여 위암세포 억제효과가 4배나 되었으며 백혈병 세포억제 효과는 2배가 되었다. *Coriolus versicolor*의 암세포 억제율은 위암세포주(SNU-1)에서는 대추 추출액보다 약 2.0배, 백혈병세포주(HL60)에서는 대추 추출액보다 약 1.8배의 암세포 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

적 요

천연배지를 이용하여 담자균을 배양시킨후 간단한 가공 공정을 거쳐 식이 가능한 기능성 음료를 개발하고자 대추 추출액을 이용하여 균사체 배양조건을 확립하였다. *Ganoderma lucidum*의 경우 대추 추출액을 이용한 액체 배지의 최적 배양 당도와 pH는 5 Brix, pH 4이었으며, 균사체가 생장하는 데에 있어서 최적배양기간은 균사체 건물량, 색도의 변화를 조사한 결과 배양 10일째로 나타났다. *Coriolus versicolor*의 경우 최적 배양 당도와 pH는 5 Brix, pH 5이었으며, 최적배양기간은 10일이었다. *Phellinus igniarius*의 경우 최적 배양 당도와 pH는 5 Brix, pH 5이었으며, 최적 배양기간은 18일이었다. 항암 실험을 실시한 결과, *Phellinus igniarius*와 *Ganoderma lucidum* 배양액이 대추 추출액에 비하여 위암세포(Human stomach adenocarcinoma cell lines) 억제효과가 4배나 되었으며 백혈병 세포(Leukemic cell lines)억제 효과는 2배가 되었다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단의 박사후 연수과제지원에

의하여 수행된 결과로서 이를 수행할 수 있도록 지원하여 주신 것에 감사드립니다.

참고문헌

- 박경숙, 이재성. 1992. *Coriolus versicolor*와 *Lentinus edodes*의 영양배지조성 및 배양조건의 최적화. 한국생물공학회지 **6**: 91-98.
- 이런행, 정 훈, 김영일, 김병각. 1991. 산업폐자원을 이용한 발효에 의한 영지의 항고혈압 성분의 생산. 한국균학회지 **19**: 79-83.
- 이병우, 이명섭, 박기문, 김창한, 안평욱, 최춘언. 1992. 운지버섯 균사체 추출물의 항암효과에 관한 연구. 한국산업미생물학회지 **20**: 311-315.
- 이병우, 임근형, 김동욱, 박기문, 손세형, 손태화. 1993. 표고버섯 균사체의 배양특성 및 Pilot Scale 생산. 한국미생물학회지 **21**: 609-614.
- 이재운, 안원근, 이재동. 1994. 맥주효모 추출물을 이용한 표고버섯 균사체의 심부배양에 관한 연구. 한국균학회지 **22**: 266-271.
- 이재훈, 조수목, 고경수, 유익동. 1995. 배양조건에 따른 상황버섯의 다당류 생산 및 다당류 구성변화. 한국균학회지 **23**: 325-331.
- 이정숙, 이서래, 유태중. 1975. 진탕배양법에 의한 양송이 균사체의 생산. 한국식품과학회지 **7**: 22.
- 이태수. 1990. 한국 기록종 버섯 총목록. 한국균학회지 **18**: 233-238.
- 정진섭, 구영조, 유진영, 최신양, 신동화. 1991. 유청을 이용한 영지버섯과 잎새버섯의 균사체 배양. 한국균학회지 **19**: 61-67.
- 정인창. 1996. 담자균의 배양 및 이용기술, 영남대학교, 박사학위논문.
- 정인창, 김선희, 권용일, 김소연, 이종숙, 박신, 박경숙, 이재성. 1997. 화학합성배지 및 곡물을 이용한 *Phellinus igniarius*의 균사체 배양조건. 한국균학회지 **25**: 133-142.
- Humfeld, H. 1948. The production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in submerged culture. *Science* **107**: 373-379.
- Hunsley, D. and Burnett, J. H. 1990. The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi. *J. Gen. Microbiol.* **60**: 203-208.