

건강식품 소재화를 위한 신령버섯 균사체의 배양조건 최적화

백경숙 · 배장순 · 오경근
단국대학교 공업화학전공

Optimization of Culture Conditions of *Agaricus blazei* for the Raw Material of Health Food

Kyeong Sook Baik, Jang Soon Bae and Kyeong Keun Oh

Department of Industrial Chemistry, Dankook University

Abstract

The optimization of conditions for the cultivation of *Agaricus blazei* was conducted in order to do mass production of mycelia by submerged cultivation. The carbon source and nitrogen source of medium were selected with high fructose syrup and soybean flake, and their optimized concentrations were determined as 8% and 3% respectively. Operation conditions were also optimized as the culture temperature of 25°C and pH of 6.5. The production of mycelia in the fermenter with optimized culture conditions has reached to 8.04 g/L, which was about 3 times as much as that of conventional flask cultivation. In the fed-batch cultivation, the productivity of *Agaricus blazei* mycelia was 12.01 g/L during 10 days.

Key words: *Agaricus blazei*, mycelia, submerged culture, mass production, medium optimization

서 론

현대 사회는 과학과 의학의 발달로 인간의 삶을 풍요롭게 하였다. 특히 의학의 발달은 인류의 삶에 수명 연장, 출생 비율 등 많은 변화를 주었다. 사람들은 건강과 질병 예방에 많은 관심을 갖게 되었으며, 특히 대체의학에 많은 관심을 갖게 되었고, 대체분야 중 식품분야는 식이요법의 손쉬운 방법으로 질병을 예방 할 수 있어 더욱 흥미와 관심을 모으고 있다. 대체 의학 식품 중에는 버섯류, 야채류, 산나물, 자연식품, 인삼류, 과일류 등이 있다. 이 중 버섯은 고대 시대부터 각종 질병 치료에 이용되어 왔으며, 특히 많이 건강식품으로 이용되어 왔다. 또한 최근의 여러 연구에서 버섯이 암 등의 성인병 질병의 예방과 치료에 탁월한 효과를 보인다는 결과가 발표되어 더욱 관심을 모으고 있다. 이러한 효과를 보이는 수많은 버섯 중에 신령버섯(*Agaricus*

blazei)은 암과 같은 질병에 탁월한 효과를 보여 많은 기대와 관심을 갖게 되었다(Martins *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2002).

*Agaricus blazei*는 브라질 산 버섯으로 'Sun mushroom' 또는 'Himematsutake'으로 잘 알려져 있다. 현재 이 버섯의 효과를 과학적으로 증명하고 개발하기 위해 일본 미국 등에서 연구가 진행되고 있다. *Agaricus blazei*는 들버섯속 송이과에 속하는 버섯으로 다른 들버섯 보다 형태적으로 대가 굵고 길며 포자의 흑변이 낮다. 갓 직경은 6~12 cm 이며 갓 표면에는 작은 인편이 있다. 갓 색은 백색, 연갈색, 갈색 이고 대의 길이는 백색이다(Barbisan *et al.*, 2002; Luiz *et al.*, 2003; Delmanto *et al.*, 2001). *Agaricus blazei*의 조성을 보면 85~87%가 물로 되어 있다. 건조물의 성분함량은 단백질 40~45%, 당질 38~45%, 섬유질 6~8%, 회분 5~7%, 지방분 3~4%의 조성으로 되어 당질과 단백질이 풍부한 버섯이며 비타민 B, B, 에르고스테롤 등의 생리 활성물질도 함유되어 있다. 지방산은 리놀산을 주체로 불포화지방산 함유량이 전지방산의 70~78% 정도이다. 미네랄은 대부분이 칼륨이고 이 외에도 인, 마그네슘, 칼슘, 나트륨, 철

Corresponding author: Kyeong Keun Oh, Dept. of Industrial Chemistry, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea.
Phone: 041-550-3558
E-mail: kkoh@dankook.ac.kr

등이 함유되어 있다(Bellini *et al.*, 2001).

*Agaricus blazei*의 환경 조건은 본산지인 브라질의 환경조건에서 볼 수 있듯이 매우 까다롭다. *Agaricus blazei*는 매우 높은 습도의 환경에서 자라며 생 버섯은 스스로의 산소작용에 의해 녹아 버려 장기간 보존이 힘들고 운반에 어려움이 따른다. 또한 고체 배양을 통한 자실체 생산에는 제품의 균일성의 문제와 낮은 생산 수율로 많은 시간을 필요로 하여 상품화가 어렵다. 액체 배양을 통한 균사체 배양은 배양기간이 짧고 노동력을 단축시키며 균일한 품질의 대량 배양이 가능하다는 장점이 있다(임영수, 1999).

본 연구에서는 이러한 *Agaricus blazei*의 성장 특성을 이해하고 산업용 배지를 이용한 액체배양을 통하여 균사체의 대량 생산을 목적으로 성장 특성, 배지 선정 및 생물 반응의 설계 등에 관하여 알아 보았다.

재료 및 방법

균주

신령버섯종균으로 *Agaricus blazei* KCCM 60527 (ATCC 76739)를 (주)닥터즈메디코아로부터 공급받아 실험하였다. 기본 배지로는 1 L당 yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 10 g을 성분으로 하는 YMB 배지와 1 L당 yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 10 g, agar 20 g을 성분으로 하는 YMA를 사용하였다. 종균은 agar plate에 도말하여 4°C에 보관한 다음 기본배지 YMB에 25°C, 150 rpm으로 5일간 플라스크 배양한 균을 접종하여 사용 하였다.

배양 조건

산업용 배지에 따른 균사체 생육의 효과를 알아보기 위해 다양한 탄소원과 질소원을 사용하여 배양 실험을 하였다. 탄소원으로는 포도당, 옥수수 가공 공정의 부산물인 저당 그리고 고과당(H.F.S; High Fructose Syrup)을 (주)두산곡산(이천, 경기) 으로부터 공급받았으며, 질소원으로는 CSL(Corn Steep Liquor, (주)두산곡산, 경기도 이천), 대두박(주)제일제당, 충북 음성)을 공급 받아 사용 하였다. 배양 온도와 초기 pH의 최적화를 위해 온도는 23, 25 및 27°C, pH는 4.5, 5.5, 6.5 및 7.5로 조절하여 실험하였다. pH 조절은 1N HCL과 1N NaOH를 사용하여 조절하였다. 종균의 접종은 250 mL 플라스크의 20%

를 작업 용량으로 하여 25°C에서 7일간 배양 하였다. 회분식 배양과 유가식 배양은 2.5 L의 발효조(자체 제작)를 사용하여 선정된 배지를 1 L 작업 용량으로 하여 통기량 1 vvm, 교반속도 150 rpm으로 실험을 진행하였다. 균사체의 생육이 진행되면서 탄소원의 고갈에 대비하여 중간대수 증식기인 3일째부터 50%의 고과당을 24시간마다 100 mL씩 간헐적으로 배양 배지에 투입하여 유가식 배양을 수행하였다.

분석 방법

당의 측정은 DNS(3-amino-5-nitrosalicylic acid) 방법(Lee *et al.*, 1992)으로 흡광도를 측정하여 정량 분석 하였다. 환원당의 정량분석을 위하여 시료의 흡광도를 표준곡선과 비교하여야 하는데, 당에 따라서 환원력이 다르기 때문에 분석 하려는 당과 동일한 당을 사용하여 표준곡선을 작성하여 오차의 발생을 줄였다. 균체량의 측정은 최종 얻어진 균체를 살균수로 3회 세척한 후 여과하여 상정액을 분리시킨 후 50°C에서 48시간 동안 건조시켜 건조 균사체 중량을 측정하였다.

결과 및 고찰

산업용 배지의 선정

배양 배지 내의 탄소원은 미생물의 세포 구성성분이나 미생물 대사에 필요한 에너지원으로 이용되고 있다. 대부분의 미생물들이 가장 잘 이용하는 탄소원으로는 포도당, 과당 등과 같은 6탄당과 수크로오스, 말토오스 등 2당류들이 많이 이용되고 있다. 탄소원으로 고과당, 저당, 그리고 포도당을 이용하여 배양 배지를 제조하고, YMB 배지를 대조균으로 *Agaricus blazei* 균사체 생산에 적합한 산업용 배지를 선정하고자 하였다. Fig. 1은 탄소원을 달리하여 *Agaricus blazei*를 배양하였을 때 얻어진 균사체량을 비교한 결과이다.

7일간(168시간) 배양 후 기본 배지 YMB에서는 0.95 g/L의 균사체량이 얻어졌는데 비해 고과당에서는 7.60 g/L의 균사체량을 얻을 수 있었다. 질소원은 미생물 균체의 단백질, 핵산 등의 합성에 필요로 하는 주요한 배지 성분이다. 질소원의 선정 실험을 위한 배지로는 2% 고과당을 탄소원으로 고정시킨 후 yeast extract, CSL, 대두박, ammonium sulfate를 각각 1%씩 배지에 혼합하여 배양 실험하였다. Fig. 2를 보

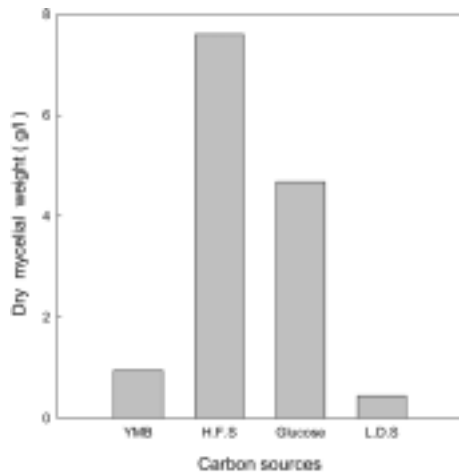


Fig. 1. Production of *Agaricus blazei* mycelia with various carbon sources
(H.F.S: High Fructose Syrup, L.D.S: Low Dextrin Sugar).

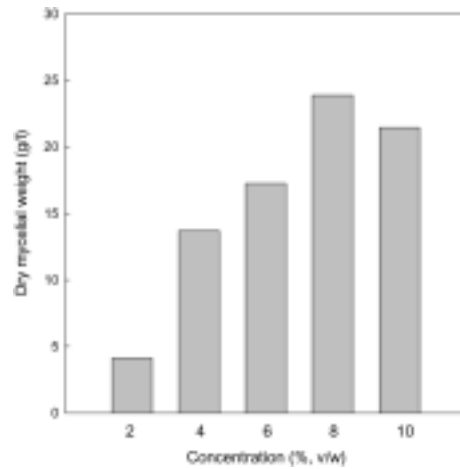


Fig. 3. Effect of the concentration of high fructose syrup on the production of *Agaricus blazei* mycelia.

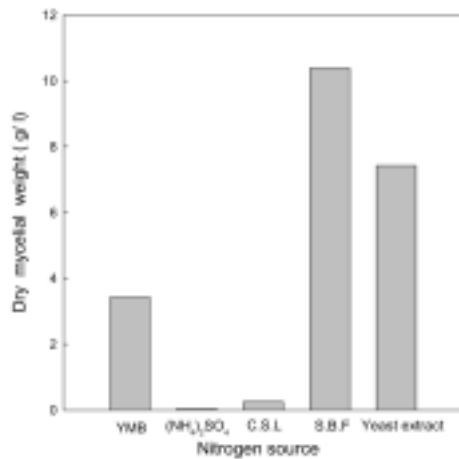


Fig. 2. Production of *Agaricus blazei* mycelia with various nitrogen sources
(C.S.L: Corn Steep Liquor, S.B.F: Soy Bean Flake).

면 질소원으로 대두박을 이용 하였을 때 10.386 g/L로 가장 많은 균사체량을 얻을 수 있었다. 본 실험에서는 탄소원으로는 고과당이, 질소원으로는 대두박이 *Agaricus blazei* 배양에 가장 적합한 배지로 선정되었다.

산업용 복합 배지의 최적화

1% 대두박을 질소원으로 고정시킨 후 고과당 농도를 2, 4, 6, 8 및 10%로 변화시켜 균사체 배양 실험을 수행하였다(Fig. 3). 고과당의 농도가 증가함

에 따라 건조 균사체 중량도 증가하는 경향을 보였으며, 고과당의 농도가 8% 일 때 건조 균사체 중량이 23.85 g/L 얻어져 가장 높은 생산성을 보였다. 10%의 고과당 농도에서는 생산성이 오히려 감소하는 것으로 보였다. 이 같은 현상은 배지 내의 당 농도가 균주의 최적 당 농도 이상으로 증가하면 고농도 당에 의해 오히려 생육 저하 작용이 일어나기 때문으로 생각된다.

질소원으로 선정된 대두박의 농도 최적화하기 위하여 2% 고과당을 탄소원으로 고정시킨 후 대두박 농도를 1, 2, 3 및 4%로 변화시켜 배양 실험을 하였다. 대두박은 온수(50~60°C)을 이용해 약 2시간 동안 진탕시킨 다음 그 상정액을 질소원으로 사용하였다. Fig. 4에서 보여 지는 것처럼 대두박 농도가 3%까지는 균사체의 농도는 대두박 농도에 비례하여 증가하였으며, 대두박 농도가 4%에서는 오히려 감소하였다.

본 실험을 통하여 고과당의 최적 농도는 8%, 대두박의 최적 농도는 3%로 각각 결정하였다.

배양 운전 조건 최적화

일반적인 미생물들은 발효 온도에서는 각각 다른 최적 발육온도를 가지고 있고, 그 온도에서 최대증식이 이루어진다. 배양온도가 최적 발육온도 이상이 되면 미생물들은 대사 효소계의 불활성화를 초래하며, 성장을 저해받게 된다(Pirt *et al.*, 1975).

본 실험에서는 배지의 최적 pH를 구하여 배양 운

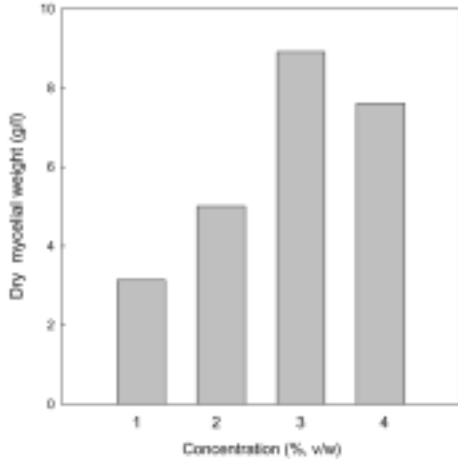


Fig. 4. Effect of the concentration of soy bean flake on the production of *Agaricus blazei* mycelia.

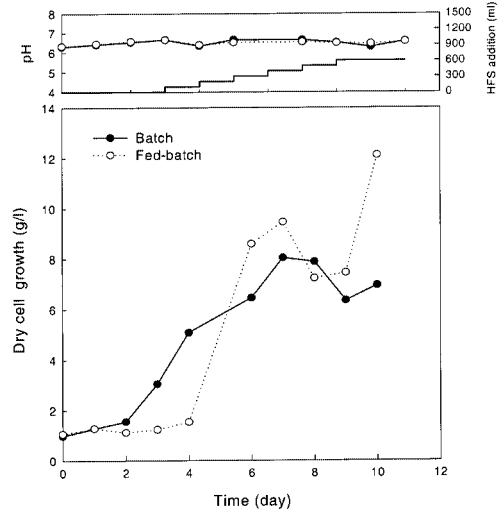


Fig. 6. Comparison the production of *Agaricus blazei* mycelia of batch cultivation with that of fed-batch cultivation.

전을 최적화 시키고자 하였다. 배양 온도를 23, 25 및 27°C로 하고 각 온도별로 pH 4.5, 5.5, 6.5 및 7.5로 조절하여 배양 실험하였다. pH 조절은 1N HCl과 1N NaOH를 사용하여 조절하였다. 이때 배양배지 농도는 고과당 2% 그리고 대두박 1%로 고정하여 배양 실험을 수행하였다. Fig. 5에서 보는 것처럼, 23°C에서는 pH 6.5에서 2.3 g/L의 가장 많은 건조 균사체 중량을 얻었다. 25°C에서는 pH 6.5와 5.5에서 각각 4.1 g/L 및 3.65 g/L의 균사체량을 얻을 수 있었으며, 27°C에서는 pH 6.5와 7.5에서 각 4.17 g/L 및 3.56 g/L을 얻을 수 있었다.

본 실험의 결과 *Agaricus blazei*의 최적배양온도의 조건으로 온도 25°C, pH 6.5로 각각 선정되었다.

Agaricus blazei 균사체 생산

회분식 배양은 미생물의 배양에 있어 통기와 교환 속도 조절이 용이하여 대량생산이 가능하다는 장점을 갖고 있다. 이 실험에서의 배양조건은 2L의 생물 반응기에서 초기 작업용량 1L로 하여 25°C, 150 rpm 및 1 vvm으로 실시하였으며, 배지는 앞의 실험에서 선정된 배지를 사용하였다. 한편 회분식 배양에서는 균사체가 성장함에 따라 배지성분이 점차 고갈되어가기 때문에 cell의 성장에 한계가 있을 수 있다. 유가식 배양이란 회분식 배양에서 연속적으로 배지를 첨가하는 미생물 배양을 말하는데, 일정시간 간격으로 일정량의 배지를 첨가함으로써 균사체를 오랜 기간 동안 성장시킬 수 있을 뿐만 아니라 그 양도 증가시킬 수 있는 장점이 있다(Pirt et al., 1975). 본 실험에서는 회분식 배양의 조건과 동

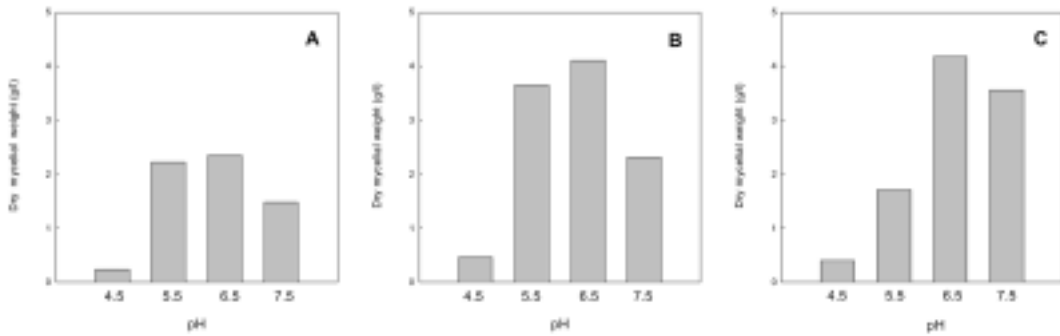


Fig. 5. Effect of initial pH on the production of *Agaricus blazei* mycelia with various temperatures A: 23°C, B: 25°C, and C: 27°C.

일한 조건에서 유가식 배양을 수행하였으며, 첨가 되는 배지는 50% (v/v)의 고과당을 중간 대수 증식 기인 3일째부터 24시간에 한번씩 1분 동안 100 mL 을 첨가하였다.

Fig. 6은 시간에 따른 균사체의 증가 곡선을 회분식 배양과 유가식 배양을 통해 각각 비교한 것이다. 회분식 배양에서는 균사체 성장이 2일째 부터 증가하여 7일째 최고 값 (8.04 g/L)에 도달한 후에 균사체량이 감소함을 알 수 있었으며, 플라스크 배양과 비교해 보면, 최고점에 도달하는 균사체의 양이 2.87 g/L에서 8.04 g/L로 약 3배 정도 증가하는 것을 확인하였다. 그러나 그 생산성은 비슷한 경향을 나타내었다. 유가식 배양에서는 3일째 고과당 첨가 후에 급속하게 균사체가 생육하였으며, 그 후의 고과당 첨가 시에는 잠시 생육 속도의 큰 변화가 없다가 9 일째부터 다시 균사체의 생육이 증가하는 것을 알 수 있었으며, 균사체의 생산량 또한 12.01 g/L 로 플라스크 배양에 비해 생산성이 약 4배 증가하였다. 유가식 배양에서 균사체의 성장이 9일째부터 다시 성장하는 것으로 보아 당 뿐만 아니라 질소원도 유가식으로 공급해 주게 되면, 좀 더 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각 된다. 또한 균사체량의 차이가 그렇게 크지 않았었던 것은 높은 고과당의 농도가 오히려 균사체의 성장에 역제 영향을 미친 것으로 판단된다.

결 론

플라스크에서 액체 배양을 통해 신령버섯 균사체의 생육특성에 대하여 조사하였다. 공업적으로 응용하기 위하여 비교적 가격이 싼 산업용 복합배지를 선정하였으며, 2L 발효조를 이용하여 회분식, 유가식 배양을 통해 균사체의 생산성을 비교해 보았다. *Agaricus blazei* 균사체 배양에서 산업용 배지로는 탄소원으로 8% 고과당, 질소원으로 3% 대두박을 사용하였을 때 가장 높은 균사체 생산을 나타내었다. 배양조건으로 온도 25°C, pH 6.5에서 우수한 결과를 얻을 수 있었다. 회분식과 유가식의 배양을 비교하였을 때, 균사체의 성장이 유가식 배양에서 9일째부터 다시 성장하는 것으로 보아 당 뿐만 아니라 질소원도 유가식으로 공급해 주게 되면, 좀 더 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단되었다.

본 실험 결과를 토대로 질소원의 유가식 공급, 공급 배지성분의 당농도, 규모 확대 등 일련의 연구가 수행 된다면, *Agaricus blazei* 균사체를 식품 소

재용으로 산업화시키기 위한 결과가 얻어질 수 있을 것이라고 기대된다.

감사의 글

이 연구는 2003학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- 임영수. 1999. 석사학위논문. 강원대학교 대학원. 대한민국
- Lee, J.M. 1992. *biochemical Engineering*. Prentice-Hall. New Jersey, USA. pp. 94
- Martins de Oliveira, J., B.Q. Jordao, L.R. Ribeiro, A. Ferreira da Eira and M.S. Mantovani. 2002. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom in mammalian cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology* **40**: 1775-1780
- Barbisan, L.F., M. Miyamoto, C. Scolastici, D.M.F. Salvadori, L.R. Ribeiro, A.F. Eira and J.L. Viana de Camargo. 2002. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. *J. of Ethnopharmacology* **83**: 25-32
- Bellini, M.F., N.L. Giacomini, A.F. Eira, L.R. Ribeiro and M.S. Mantovani. 2003. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. *Toxicology in Vitro* **17**: 465-469
- Fang, Q.H. and J.J. Zhong. 2002. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* **37**: 769-774
- Luiz, R.C., B.Q. Jordao, A.F. da Eira, L.R. Ribeiro and M.S. Mantovani. 2003. Mechanism of anticlastogenicity of *Agaricus blazei* Murill mushroom organic extracts in wild type CHO(K1) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. *Mutation research* **528**: 75-79
- Delmanto, R.D., P.L. Alves de Lima, M.M. Sugui, A. Ferreira da Eira, D.M.F. Salvadori, G. Speit and L.R. Ribeiro. 2001. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutation Research* **496**: 15-21
- Pirt, S.J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. John Wiley and Sons. New York, USA. pp. 137-140 and pp. 216-218
- Jang, Y.J. and J.J. Zhong. 2002. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology* **31**: 20-28