

Agaricus bisporus 705 균사체의 액체배양에 의한 1-octen-3-ol 생산을 위한 배양조건의 최적화

변 태 강

건양대학교 식품공학과

Optimization of Cultural Conditions for 1-octen-3-ol Production in the Submerged Cultures of *Agaricus bisporus* 705 Mycelia

Tae-Gang Byun

Department of Food Science and Technology, Konyang University

Abstract

For the production of 1-octen-3-ol, the main chemical responsible for mushroom flavor, culture conditions were investigated in the submerged culture of *Agaricus bisporus* 705. In flask culture, optimal initial pH, temperature and inoculum level for the production of 1-octen-3-ol were 5.5, 25°C and 5%(v/v), respectively. The level of biomass and 1-octen-3-ol obtained in a 2.5 L stirred fermentor was lower than the level of those obtained in flask culture, but culture time was reduced by 4 days. Maximum 1-octen-3-ol concentration was obtained when agitation speed and aeration rate were 150 rpm and 0.5 vvm, respectively.

Key words: mushroom flavor, 1-octen-3-ol, submerged culture, *Agaricus bisporus* 705

서 론

세계적으로 식품향료 시장은 매년 큰폭으로 매출 신장을 보이고 있고 국내향료 수요도 최근 국민 소득의 증가와 음식 문화의 변화, 소비재의 고급화 추세로 급속적으로 증가하고 있다. 저가이고 안정적으로 공급될 수 있는 합성향료가 전체 사용량의 70% 이상을 차지하고 있지만 천연향료가 안정성이나 기호도에서 선호되고 있는데 생물공학 기술에 의해 생산된 식품 소재는 천연물로 인정되고 있기 때문에 최근 미생물, 효소, 조직 배양 등을 이용하여 향료 관련 물질을 생산하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다(Falconnier *et al.*, 1994; Sharpell, 1985). 우리나라의 경우 식품 향료의 원료를 대부분 수입에 의존하는 형편이며, 향료는 부가 가치가 매우 높은 기술 집약적 제품이기 때문에 생물공학 기술을 향료 산업에 접목시켜 향료 산업에서 필요로 하는 고품질의 상품을 개발하는 것은 매우 시급하고 중대한 과제라고

하겠다.

버섯향은 독특한 향미를 지녔고, 식품첨가물로 다양하게 활용될 수 있다(Kerr *et al.*, 1985). 버섯은 대부분 고체 배양법에 의하여 재배 생산되고 있으나 그 작업이 번잡하므로 버섯 균사체를 액체배지에서 대량 배양하여 버섯 향기 성분을 생산하는 기술이 향상되어야 한다고 사료된다. 버섯 향미(mushroom flavor)는 단일 성분이 아니라 여러 가지 향미 성분이 복합적으로 작용하여 향을 나타내는 complex flavor의 일종이며 이들 중 가장 중요한 향기 성분은 1-octen-3-ol 이다(Kinderlerer, 1989).

본 연구에서는 1-octen-3-ol 생산성 향상을 위한 최적 배양조건을 플라스크 및 stirred fermentor에서 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에서 사용한 버섯균주는 플라스크 배양을 통해 선별된 우수균주(변태강, 1999)인 *Agaricus bisporus* 705를 이용하였다. 균주 보관용 배지는 PDA

Table 1. Medium composition for the production of 1-octen-3-ol by *Agaricus bisporus* 705

Component	Concentration (g/L)
Glucose	10.0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.0
Corn steep liquor	2.0
Soybean oil	1.5
KH ₂ PO ₄	0.8
MgSO ₄ 6H ₂ O	0.2
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01
MnSO ₄ 4-5H ₂ O	0.003
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.006
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.008
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.003

배지(Potato Dextrose Agar, Difco)를 사용하여 계대배양 하였고, 종균용 및 본배양용 액체배지 조성은 Table 1과 같다.

배양 방법

종균배양은 petri-dish 상에서 25°C, 8일간 배양한 균사체를 직경 5 mm cork borer로 일정하게 절취하여 배지 100 mL를 넣고 121°C에서 15분간 가압 살균한 250 mL Erlenmeyer flask에 접종하여 7일간 25°C에서 회전 진탕배양하였다. 이 배양액을 균질기(IKA, Ultra-turrax T25)로 1~2 분간 무균적으로 균질화한 후 배양액의 5%(v/v)를 배지 100 mL를 넣은 250 mL 삼각 플라스크에 접종하여 같은 조건 하에서 4일간 배양하여 종균액으로 사용하였다.

플라스크 배양은 종균 배양액을 다시 균질화 시킨 후 배지 100 mL를 함유한 250 mL 삼각 플라스크에 접종하여 14일간 25°C, 120 rpm에서 진탕배양하였다. 배양온도가 균사체 성장 및 1-octen-3-ol 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 배양온도를 15, 20, 25, 30, 35, 40°C로 조절하였으며, pH의 영향은 초기 pH의 범위가 4.5~7.5이 되도록 조정하여 검토하였다. 접종비의 영향은 종균 배양액을 1~10%(v/v)로 변화시켜 접종하고, 진탕 회전속도는 100~300 rpm 범위로 변화시켜 조사하였다.

2.5 L stirred fermentor(한국발효기)를 사용하는 경우 10일간 배양하면서 시간 경과에 따른 균사체량과 1-octen-3-ol량 등을 측정하였다. 배지액량은 1.5 L로 하여 pH 5.5, 온도 25°C, 접종비 5%(v/v) 조건에서 교반속도와 통기속도가 1-octen-3-ol 생산성에 미치는 영향을 조사하여 적정 교반속도와 최적 통기속도를 결정하였다.

측정 방법

균사체의 건조 균체량은 배양액을 2500×g에서 30 분간 원심분리 한 후 수거하여 85°C에서 24시간 건조하여 평량하였다. 배양액 중의 잔존 glucose 농도는 DNS(dinitrosalicylic acid)법(Miller, 1959)을 이용하여 575 nm에서 흡광도를 구한 후, 표준곡선으로부터 환산하여 구하였다. 주 향기성분인 1-octen-3-ol은 액체배양액을 원심분리한 후 침전물인 균사체에 3배량의 0.1 M phosphate buffer를 첨가하여 균질화시켰다. 이 때 내부 표준물질(internal standard)로서 1-nonanol을 첨가한 후 1 mL n-pentane을 첨가하여 다시 균질화 시키면서 1-octen-3-ol을 추출하였다. 유기용매층을 무수황산나트륨으로 탈수한 후 2 L 시료를 GC(Shimadzu, GC-14B)에서 분석하였다. 분석을 위한 조건은 아래와 같고, column의 온도는 95°C에서 185°C까지 15°C/min로 높였으며, detector와 injector의 온도는 각각 250, 230°C로 하였다(Belinky *et al.*, 1994).

Detector: FID detector

Column: 2-m, 10% Carbowax-20 M packed column on WHP

Carrier gas: Helium

결과 및 고찰

신선한 버섯에서 확인된 휘발성 향기성분은 많은 종류가 있으나, 1-octen-3-ol이 주성분이며 전체 휘발성 향기성분에서 차지하는 비율이 *Agaricus bisporus*에서 59.0%라고 보고되었다(Macleod와 Panchasara, 1983). 따라서 본 연구에서 버섯향은 1-octen-3-ol 만 관찰하였다.

플라스크 배양

배양온도가 1-octen-3-ol 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 배양온도를 15~40°C로 조절하였으며 Fig. 1에서 보는 바와 같이 25°C에서 가장 높은 농도로 1-octen-3-ol이 생산되었다. 배지의 초기 pH는 4.5, 5.5, 6.5, 7.5로 조정하였고 pH가 5.5일 때 1-octen-3-ol 생산이 가장 우수했다(Fig. 2). 일반적으로 버섯 균사체의 증식을 위한 최적치는 산성 쪽에 있다고 보고되고 있으며 pH 5~5.5가 좋다는 보고가 대부분이다(강창울 등, 1981; 고한규 등, 1997). 본 실험에서 초기 pH가 균사체 증식에 미치는 영향은 4.5~6.5의 범위에선 크게 차이가 없었으나 7.5에서는 균체의 성장이 급격히 저하되었다.

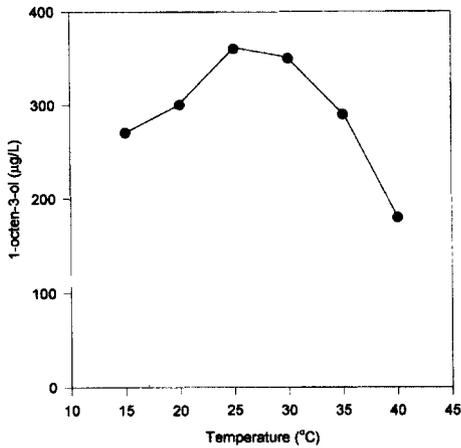


Fig. 1. Effect of temperature on 1-octen-3-ol production in flask culture.

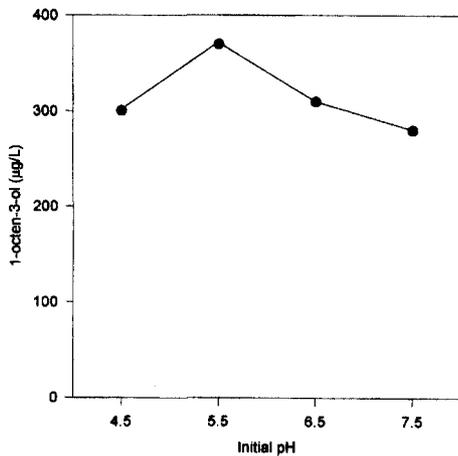


Fig. 2. Effect of initial pH on 1-octen-3-ol production in flask culture.

접종비의 영향을 검토한 결과 접종비가 5%(v/v) 이상의 경우 거의 일정한 균사체 생육 및 1-octen-3-ol 생산을 나타내었다. 진탕 회전속도의 영향을 조사한 결과 100~300 rpm 범위에서는 진탕 회전속도는 1-octen-3-ol 생산에 커다란 영향을 주지 못했다.

초기 pH 5.5, 온도 25°C, 진탕 회전속도 120 rpm 조건하에서 14일간 플라스크 배양하면서 균사체량, 1-octen-3-ol 및 잔존당을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 균사체는 접종 후 10일 이후에 빠르게 생육하였으며, 1-octen-3-ol의 생성은 6일 이후에 관찰되어 완만한 증가를 보였다. 최종적으로 1-octen-3-ol 430 µg/L, 균체량 5.2 g/L을 얻었다(Table 2). *A. bisporus*

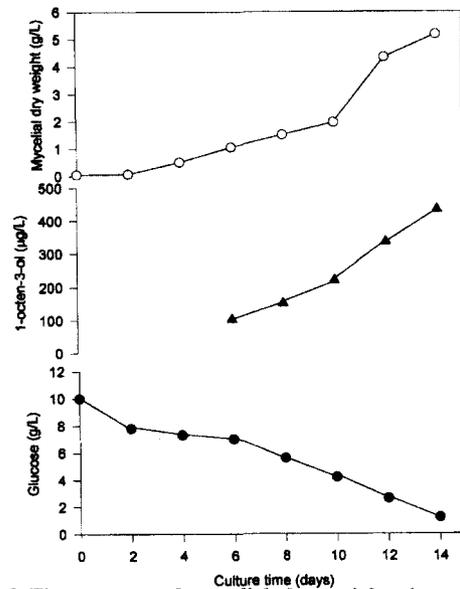


Fig. 3. Time course of mycelial dry weight, 1-octen-3-ol and residual glucose in flask culture.

705의 균사체 형태는 작은 pellet을 이루고 있었다.

Stirred fermentor에서의 배양

Stirred fermentor에서 배양한 결과 균사체 생장은 10일 후 균사체 건조 중량이 4.7 g/L로서 flask에서 배양했을 때 보다 배양 기간을 4일 정도 단축할 수 있었다. 그러나 Stirred fermentor를 이용한 배양에서는 플라스크 배양시 보다 균체량 및 1-octen-3-ol 생산량 (380 µg/L)이 모두 감소하였는데(Table 2) 원인은 교반 날개나 방해판 등에 의한 균사의 손상 또는 단편화 및 각종 sensor에 부착하여 생육하는 wall growth 등으로 인한 적정 pellet size 유지곤란으로 사료된다.

높은 회전수에서 배양하는 경우 전단응력에 의해 버섯 균사체가 파괴될 수 있고, 저속으로 교반시 산소전달 효과가 감소되어 생산성에 영향을 미칠 수 있

Table 2. Dry biomass and 1-octen-3-ol concentration grown in shaken flasks or stirred fermentor

Mushroom source	Dry biomass (g/L)	1-octen-3-ol (g/L)
Shaken flasks ¹⁾	5.2	430
Stirred fermentor ²⁾	4.7	380

Culture conditions: 25°C, 5%(v/v) inoculum ratio.

¹⁾initial pH 5.5, agitation speed 120 rpm, culture time 14 days.

²⁾pH 5.5, agitation speed 150 rpm, aeration rate 0.5 vvm, culture time 10 days.

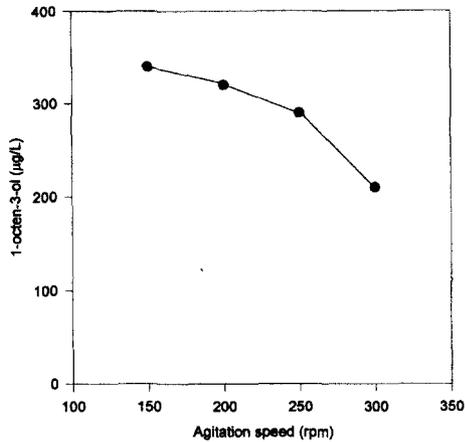


Fig. 4. Effect of agitation speed on 1-octen-3-ol production in stirred fermentor.

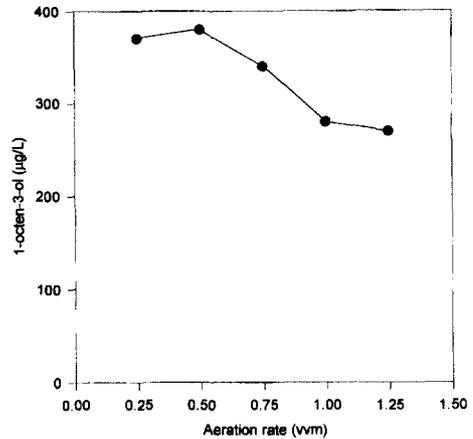


Fig. 5. Effect of aeration rate on 1-octen-3-ol production in stirred fermentor.

으므로 적정 교반속도를 조사하였다. 교반속도를 150 300 rpm으로 변화시켜 1-octen-3-ol 생산을 비교하였다(Fig. 4). 교반속도가 150 rpm 일 때 균사체 및 1-octen-3-ol의 생산성이 가장 좋았으며 그 이상의 속도에서는 감소하였다. 교반속도가 증가함에 따라 pellet의 크기는 작아지며, 동시에 1-octen-3-ol의 생산량이 감소하는 것이 관찰되었다. 영지 균사체를 진탕배양하여 세포의 생물 고분자를 생산하는 경우에도 교반속도에 따른 pellet의 크기는 교반속도가 증가함에 따라 작아져서 100 rpm일 때는 2~3.5 mm 정도이었고, 150 rpm 이상에서는 1~2.5 mm 정도로서 세포의 생물 고분자의 최적 생산을 위한 균사체의 적정 크기는 2~3.5 mm 정도로 보고된 바 있다(이신영과 강태수, 1996).

버섯 균주들은 일반적으로 호기적 특성을 가지고 있으므로 액체 배양할 경우 적당한 통기가 필요하다. 따라서 stirred fermentor에서 통기속도(air flow rate)를 변화시켜 배양하고 향기성분 생산량을 측정하여 통기속도의 영향을 조사하여 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 0.25~0.5 vvm에서 1-octen-3-ol의 생산이 좋았으나 그 이상의 값에서는 감소하여 과잉으로 산소를 공급하여 주는 경우 1-octen-3-ol의 생산성이 떨어지는 것으로 생각된다. 이 결과에서 산소공급이 1-octen-3-ol의 생산에 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

버섯향의 생산에 있어 균사체 증식형태도 또한 중요한 인자로 보고되고 있는데 균사피(pellet form)를 이루는 경우에는 버섯향 생산성이 높고, 섬유상으로 증식하는 섬유상(dispersed form) 증식균사체의 경우 버섯향이 거의 생성되지 않는 것으로 알려져 있다(Litchfield, 1967). 일반적으로 섬유상 증식균사체의

경우 균사피를 형성하는 것보다 물질(산소)전달이 용이하며 따라서 비증식속도가 높다. 하지만 Fig. 4와 5에서 보듯이 교반속도와 통기속도가 증가하는 경우 1-octen-3-ol 생산량이 오히려 감소하고 있으며 산소공급 과잉에 의한 저해효과가 나타났다. 따라서 1-octen-3-ol을 생산하기 위하여 일반적인 호기적 조건보다 낮은 산소공급 속도를 유지할 필요가 있다. 그리고 버섯향의 생산량을 높이기 위해서는 pellet의 크기를 일정하게 유지하면서 배양할 수 있는 배양조건이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

Agaricus bisporus 705 균주를 가지고 버섯향기의 주요 향기성분인 1-octen-3-ol을 대량생산하기 위하여 배양조건을 최적화 하는 기본 연구를 수행하였다. 플라스크 배양에서 1-octen-3-ol 생성을 위한 최적 배양 조건은 접종비 5%(v/v), 초기 pH 5.5, 배양온도 25°C 이었다. Stirred fermentor에서 배양 시 플라스크 배양에서 보다 균체량 및 1-octen-3-ol 생산량이 모두 감소하였으나 배양 기간을 4일 정도 단축할 수 있었다. Stirred fermentor에서 교반속도와 통기속도가 향료 생산성에 미치는 영향을 조사한 결과 교반속도 150 rpm, 통기속도 0.5 vvm에서 1-octen-3-ol 생산이 가장 우수하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 핵심전문 연구비(961-0605-

045-2)지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

- Belinky, P.A., S. Masaphy, D. Levanon, Y. Hadar and C. G. Dosoretz. 1994. Effect of medium composition on 1-octen-3-ol formation in submerged cultures of *Pleurotus pulmonarius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 629-633
- Falconnier, B., C. Lapiere, L. Lesage-Meessen, G. Yonnet, P. Brunerie, B. Colonna-Ceccaldi, G. Corrieu and M. Asther. 1994. Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-937: identification of metabolic pathways. *J. of Biotechnology* **37**: 123-132
- Kerr, L.H., R.C. Wiley and M. J. Sheu. 1985. Solid-liquid extraction of mushroom solids and concentration by reverse osmosis. *J. Food Sci.* **50**: 1300-1305
- Kinderlerer, J.L. 1989. Volatile metabolites of filamentous fungi and their role in food flavour. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* **18**: 133s-144s
- Litchfield, J.H. 1967. Submerged culture of mushroom mycelium. In: *Microbial technology*. H.J. Peppler (ed.). Reinhold Publishing, Amsterdam. pp107-144
- Macleod, A.J. and S.D. Panchasara. 1983. Volatile aroma components, particularly glucosinolate products of cooked dried mushroom. *Phytochem.* **22**: 705-712
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.* **31**: 426-428
- Sharpell, F.H. 1985. Microbial flavors and fragrances. In: *Comprehensive biotechnology* (vol 3). Moo-Young, M. (ed.). Pergamon Press. pp965-981
- 강창울, 심미자, 최용철, 이영남, 김병갑. 1981. 한국산 담자균류의 향암성분에 관한 연구. *한국균학회지* **14**: 101-111
- 고한규, 김동명, 박원목. 1997. 노루궁뎅이 버섯의 새로운 균사배양기의 조성. *한국균학회지* **25**(4): 369-376
- 이신영, 강태수. 1996. 영지 균사체의 액체배양에 의한 세포외 생분고분자의 생산조건과 특성. *산업미생물학회지* **24**(1): 111-118
- 변태강. 1999. 버섯 균사체의 심부배양에 의한 버섯향료 생산을 위한 우수 균주의 선별. *건양논총* **7**: 263-270