

최 종
연구보고서

뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의
인공재배기술개발 및 기능성 물질의
이용연구

Development of mass cultivation method of honey
mushroom(*Armillaria mellea*) and rooting
shank(*Oudemansiella radicata*), and utilization of
their physiologically functional substances

주관연구기관 : 인천대학교

협동연구기관 : 동국대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 인공재배기술개발 및 기능성 물질의 이용연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 23일

주관연구기관명 : 인천대학교

총괄연구책임자 : 이 태 수

세부연구책임자 : 이 태 수

연 구 원 : 이 우 윤

연 구 원 : 김 성 환

연 구 원 : 김 상 범

연 구 원 : 이 건 우

협동연구기관명 : 동국대학교

협동연구책임자 : 이 민 응

연 구 원 : 이 윤 수

연 구 원 : 심 재 욱

연 구 원 : 장 광 준

요 약 문

I. 제 목

뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 인공재배기술개발 및 기능성 물질의 이용연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1990년대 세계무역기구(WTO)가 설립되기 이전, 국내시장을 보호하기 위한 정책을 추진했던 나라들은 WTO 설립이후 무역장벽을 철폐하고 대외적으로 자국의 시장을 개방해야 하는 국제적 압력에 봉착하게 되었다. 최근 외국으로부터의 개방에 의한 손실을 최소화하고 자국의 시장을 보호하기 위해 많은 나라들이 다른 나라들과의 자유무역협정(FTA)의 체결을 시도하고 있다. 비록 우리나라는 미국과 자유무역협정을 최근에 체결하였지만, 극복해야 할 많은 난관이 앞에 놓여있다. 세계시장에서 우리 농산물의 경쟁력은 외국의 농산물에 비하여 상대적으로 가격경쟁력이 취약하기 때문에 자유무역협정의 체결로 발생하는 외국농산물의 무분별한 수입은 우리의 농업에 막대한 피해를 초래할 수 있다. 그러므로 우리의 농산물의 경쟁력을 높이기 위한 특단의 대책수립이 필요한 시점이다.

그러한 목적의 일환으로서, 우리나라에서는 버섯을 포함한 우리의 고유한 생물자원의 실태를 파악하려는 사업이 1980년대 중반부터 시작되어 현재까지 20년 이상 수행해왔다. 만일 우리 고유의 버섯자원이 외국보다 우수한 천연 의약품이나 기능성 건강식품을 만드는데 이용될 수 있다면, 우리의 버섯자원은 외국 농산물과 비교하여 우리 농업의 경쟁력을 높이는데 크게 기여할 것이다. 버

섯은 세계적으로 8000종 이상이 분포하고 있다고 알려져 있으며 그들 중 약 100여종이 식용 혹은 의약용으로 여러나라에서 널리 사용되고 있다.

이러한 유용버섯 중에서 뿡나무버섯(*Armillaria mellea*)의 자실체는 의학적으로 중요한 화합물의 하나인 단백 다당물질을 함유하고 있다고 알려졌다. 뿡나무버섯의 단백 다당물질은 식도암, 고혈압 및 중풍에 효과가 있다고 보고되어 있다. 김 등(2006)은 뿡나무버섯의 조다당류가 생쥐의 육종암 세포인 Sarcoma 180을 억제하는데 탁월한 효과가 있음을 보고하였다. 민긴뿌리버섯(*Oudemansiella radicata*)의 자실체는 의학적으로 중요한 화합물의 하나인 oudenone을 함유하고 있다. 민긴뿌리버섯의 oudenone은 고혈압과 고형암 치료에 탁월한 효과를 나타낸다고 알려졌다. 또한 민긴뿌리버섯 균사체를 액체배양하게 되면 oudemansin이라는 물질이 생산되는데, 그 물질은 *Penicillium notatum*, *Ustilago nuda* 및 *Alternaria alternata*과 같은 식물병원균에 우수한 항균력을 나타내는 것으로 알려졌다. 뿡나무버섯이나 민긴뿌리버섯과 같은 식·의약용 버섯은 외국뿐만 아니라 우리나라에도 분포되어 있다. 이미 차 등(1981)과 김 등(1992)이 뿡나무버섯의 대량생산 가능성을 주장하였음에도 불구하고 아직도 뿡나무버섯의 인공적인 재배는 우리나라에서 실현이 되지 못하고 있는 실정이다. 특히 식용이나 의약용으로 사용하기 위해 반드시 필요한 민긴뿌리버섯의 자실체 대량생산과 기초임상 연구가 우리나라에서 수행되고 있지 않아서 조금 늦은 감은 있지만 앞으로 이 분야 연구에 대한 활성화가 필요하다고 판단된다.

따라서 본 연구는 뿡나무버섯과 민긴뿌리버섯 자실체의 대량생산과 또한 자실체에 함유된 유용물질의 의학적인 효과와 생리증진 효과를 밝혀내고 이를 이용하여 위한 방안을 찾기 위해 수행되었다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯은 식의약용 버섯으로 주로 우리나라 국립공원 등 자연보존이 잘 이루어진 지역에 분포하고 있으며 사람에게 발생하는 여러 종류의 질병에 탁월한 치료효과 및 억제효과를 발휘하는 것으로 알려졌다. 본 과제에서는 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 이러한 효과를 연구하기 위하여 버섯의 자실체로부터 추출한 물질을 이용하여 항암능력과 세포 독성을 조사하였다. 특히 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 의학적 효과를 밝혀내기 위해서는 자실체를 필요로 하기 때문에 1절에서는 이들 버섯 자실체의 대량생산법을 개발하기 위해 버섯균사의 배양에 적합한 환경조건과 영양원에 대한 연구가 수행되었고 제 2절에서는 자실체를 인공적으로 대량생산하기 위한 연구가 수행되었고, 3절에서는 이들 버섯의 자실체에 함유된 물질의 효과에 대한 연구가 동물세포주와 실험동물을 대상으로 수행되었으며, 4절에서는 PCR을 이용하여 이들 버섯의 유전적 유연관계를 밝히고, 5절에서는 이들 버섯을 이용하여 인체에 유용한 제품을 개발하였다. 따라서 본 연구를 수행하여 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 뽕나무버섯의 연구

1) 배양조건의 탐색

뽕나무버섯의 균사생장에 적합한 조건은 25℃와 pH9였다. 또한 뽕나무버섯의 균사는 Hamada 배지에서 가장 양호한 성장을 나타내었다. 뽕나무버섯 종균을 배양하기 위한 최적의 액체배지는 PDMS(potato dextrose malt sprout) 배지였다. 뽕나무버섯의 균사생장을 높이는 탄소원과 질소원은 각각 lactose와 arginine이었다. 기본배양기에 탄소원으로 glucose를 2% 정도로 첨가하고 탄소

와 질소의 비율(C/N비율)을 30:1로 조정하였을 때 뽕나무버섯의 균사는 가장 빠르게 성장하였다.

2) 3종류의 톱밥배지로부터 뽕나무버섯 자실체의 생산

야외에서 채집한 야생의 뽕나무버섯과 외국으로부터 도입한 일부 뽕나무버섯 균주로부터 순수분리한 균주를 대상으로 자실체 형성에 적합한 균주를 선발하였다. 7종의 뽕나무버섯 균주중에서 *A. mellea* IUM 949만 톱밥배양기에서 원기를 형성하고 자실체를 생산하였다. 따라서 포플러톱밥, 소나무톱밥 및 참나무톱밥 등 3종류의 톱밥배지를 이용하여 *A. mellea* IUM 949의 자실체 인공 생산 실험을 수행하였다. 톱밥배양기를 제조하기 위하여 각각의 톱밥에 미강 30%(v/v)를 혼합된 후 마쇄된 당근으로 톱밥의 표면을 피복하였다. *A. mellea* IUM 949의 원기는 균사가 배양병 내에 있는 톱밥배지에서 완전히 다 자란 후 10일후에 형성되었으며 자실체는 원기발생 후 7일이 지나서 형성되었다. 자실체의 중량은 참나무톱밥배지에서 23.9gram(bottle/465g)으로 나타나 참나무톱밥배지가 소나무톱밥배지나 포플러톱밥배지에 비해 자실체 생산이 우수한 것으로 나타났다.

3) 뽕나무버섯 자실체에서 추출한 물질의 항암 및 세포독성효과

뽕나무버섯 자실체로부터 중성염용액, 열수 및 메탄올을 이용하여 조다당류 추출물을 분리하고 이를 생쥐에 주사하여 항암 및 면역증강효과를 조사하였다. Sarcoma 180 복수암 세포를 주사하고 뽕나무버섯 조다당류를 투여한 실험군의 생쥐가 투여하지 않은 대조군의 생쥐에 비해 생명연장효과가 67.5%로 매우

높게 나타났다. 세포독성 실험의 결과 NIH3T3과 sarcoma 180 세포주는 중성 염용액, 열수 및 메탄올 추출물 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 배양하였을 때 70% 내외의 생존율을 보였으며, 각 농도 구간에서 세포독성은 나타나지 않았다. 중성 염용액 추출물을 투여한 생쥐의 B 임파구 alkaline phosphate 활성은 대조군에 비하여 약 3.0배 내외의 증가율을 보였으며 총 복강 세포수도 대조군에 비해 최고 3.5배 가량 증가하였으며, 혈액 중 백혈구의 수도 대조군에 비하여 약 2.5배 증가하였다. 그리고 면역에 관련된 장기인 간, 비장 및 흉선의 체중도 대조군에 비하여 증가된 것을 확인하였다. 따라서 뽕나무버섯의 조다당류 추출물을 투여한 생쥐는 sarcoma 180에 대한 항암효과는 면역활성의 증가에 의한 것으로 판단되었다. 따라서 이 버섯을 적정량 섭취하면 면역증강에 의한 항암효과가 있을 것으로 사료된다.

뽕나무버섯 자실체를 중성염을 이용하여 추출한 항암성과 면역증강 효과를 나타내는 물질을 분석한 결과 94.15%의 다당류와 3.20%의 단백질로 구성되어 있었다. 또한 Thin Layer Chromatography(TLC)를 통해 느타리의 β -D-glucan과 비교한 결과, 이 물질의 성분은 느타리의 β -D-glucan과 매우 유사하며 glucose 또는 mannose와 약간의 galactose로 구성되어 있는 것으로 분석되었다.

4) 뽕나무버섯속의 유연관계 분석

가) 뽕나무버섯 ITS region의 염기서열 분석

총 27균주의 뽕나무버섯(*Armillaria mellea*)과 41균주의 뽕나무버섯부치(*Armillaria tabescens*) 등 총 68균주의 뽕나무버섯속 균주의 유연관계를 ITS

region의 염기서열을 분석하여 조사하였다. 계통간 유연관계의 분석은 Neighbor-Joining method와 UPGMA method 등의 두가지 방법을 이용하여 실시하였다. ITS5 primer와 ITS4 primer에 의하여 증폭된 균주들의 ITS region의 염기수는 뽕나무버섯의 경우 845~860 bps, 뽕나무버섯부치는 810~820 bps를 나타내었다. 뽕나무버섯과 뽕나무버섯부치 간의 ITS region 염기수는 40~50 bps 내외의 차이를 보였다. Neighbor-Joining method를 이용한 뽕나무버섯속 68균주를 버섯을 분석한 결과, 뽕나무버섯의 경우 2개의 그룹, 뽕나무버섯부치의 경우 3개의 그룹으로 나뉘어진 것으로 나타났다. UPGMA method를 이용한 경우 뽕나무버섯과 뽕나무버섯부치의 균주들은 각각 ITS region의 염기서열이 크게 5개의 그룹으로 나뉘는 것으로 나타났다.

나) PCR-RAPD 분석

14균주의 뽕나무버섯(*Armillaria mellea*)을 10mer oligonucleotide로 구성된 5종류의 random primer를 이용하여 PCR-RAPD 분석을 수행하여 각 균주의 DNA band pattern을 분석한 결과 공시균주들이 크게 5그룹으로 구분되는 것이 관찰되었다.

5) 뽕나무버섯 균사체를 이용한 버섯쌀의 제조

감자 포도당 맥아즙(potato dextrose malt extract) 배지에서 20일 배양한 뽕나무버섯 액체종균을 현미, 백미 및 보리쌀밥에 접종하고 20일 배양하여 이들 곡물밥에 균사체를 정착시켜 기능성 버섯쌀을 제조하였다. 이들 버섯쌀은 현미, 백미 및 보리쌀의 식이섬유와 뽕나무버섯의 항암, 면역증강, 혈압강하, 고지혈증 치료 등의 기능성 성분이 풍부하게 함유된 건강식품이다.

2. 민긴뿌리버섯의 연구

1) 민긴뿌리버섯 최적 배양조건의 탐색

민긴뿌리버섯의 균사생장에 최적인 조건은 25℃와 pH6였다. 또한 민긴뿌리버섯의 균사는 Lilly 배지에서 양호한 생장을 나타낸 반면, 균사의 밀도는 Hamada배지에서 양호하였다. 민긴뿌리버섯 종균을 배양하기 위한 최적 액체 배지에는 PDB 배지가 선발되었다. 민긴뿌리버섯의 균사생장을 높이는 탄소원과 질소원은 각각 xylose와 alanine이었다. 기본배양기에 탄소원으로 glucose를 3% 정도로 첨가하고 탄소와 질소의 비율(C/N비율)을 20:1로 조정하였을 때 민긴뿌리버섯의 균사가 가장 왕성하게 성장하였다.

2) 톱밥배양기로부터 민긴뿌리버섯 자실체의 생산

야외에서 채집한 야생의 민긴뿌리버섯으로부터 순수분리한 균주를 대상으로 자실체 생산을 위한 실험을 수행하였다. 참나무톱밥, 소나무톱밥, 포플러톱밥을 기질에 미강을 첨가한 톱밥배지에 민긴뿌리버섯 균주를 접종하여 25℃, 암조건 하에서 배양하였다. 민긴뿌리버섯은 배양처리 후 30일이 지나면서 참나무톱밥 배지 표면에 있는 적갈색의 균사덩이로부터 원기가 형성되기 시작하였다. 원기는 *O. radicata* IUM 1259와 IUM 1260 균주에서 맨처음 관찰되었다. 참나무톱밥, 소나무톱밥, 포플러톱밥배지 등 3종류의 톱밥배양기 중 참나무톱밥배지에서 자실체 생산이 가장 우수하게 나타났다. 민긴뿌리버섯의 자실체는 미강을 10% (v/v) 혼합한 참나무톱밥배지에서 가장 많이 생산되었다.

3) 민긴뿌리버섯 자실체에서 추출한 조다당류의 항암 및 세포독성효과

민긴뿌리버섯 자실체로부터 중성염용액, 열수 및 메탄올을 이용하여 조다당류 추출물을 분리하고 이를 생쥐에 주사하여 항암 및 면역증강효과를 조사하였다. Sarcoma 180 복수암 세포를 주사하고 3종류의 뽕나무버섯 조다당류를 투여한 각각의 실험군 생쥐가 투여하지 않은 대조군의 생쥐에 비해 생명연장효과가 42.9%~66.7%로 높게 나타났다. 중성염용액 추출물을 투여한 생쥐의 B 임파구 alkaline phosphatase 활성은 대조군에 비하여 약 1.4배 내외의 증가율을 보였으며 총 복강 세포수도 대조군에 비해 증가하였다. 메탄올로 추출한 조다당류 투여한 실험군의 혈액 중 백혈구의 수도 대조군에 비하여 약 2.5배 증가하였다. 그리고 면역에 관련된 장기인 간, 비장 및 흉선의 체중도 대조군에 비하여 증가한 것이 확인되었다. 따라서 민긴뿌리버섯의 조다당류 추출물을 투여한 생쥐는 sarcoma 180에 대한 항암효과는 면역활성의 증가에 의한 것으로 판단되었다.

4) 민긴뿌리버섯속의 유연관계 분석

가) ITS region의 염기서열 분석

총 7종 36균주의 민긴뿌리버섯속 버섯들의 유연관계는 ITS region 염기서열을 이용하여 분석하였다. 얻어진 각각의 염기서열을 Neighbor-Joining method와 UPGMA method 등을 이용하여 분석을 실시하였다. ITS5 primer와 ITS4 primer에 의하여 증폭된 민긴뿌리버섯속 버섯들의 ITS region은 전체적으로 550~820 bps의 염기수를 나타내었고 각각의 중간 ITS region 염기수는 300 bps 내외의 큰 차이를 보였다. Neighbor-Joining method를 이용한 분석의 경

우, 각 균주들이 전체적으로 각각의 종에 따라 각각 서로 다른 그룹으로 묶이는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 민긴뿌리버섯(*O. radicata*)과 끈적긴뿌리버섯(*O. mucida*)의 경우 분석결과 동일한 그룹으로 묶인 것이 확인되었다. 이는 형태적으로 전혀 다른 2종의 버섯이 같은 버섯종으로 오인될 수 있다는 것을 나타낸 것으로 ITS region의 염기서열 분석하여 유연관계를 밝히는데 큰 오류가 발생할 수 있다고 사료된다. 또한 유럽의 Czech 공화국 미생물연구소에서 분양받은 민긴뿌리버섯속의 *O. brunneomarginata* IUM2595 균주의 유전적 유연관계는 다른 민긴뿌리버섯속 균주들에 비해 가장 멀리 떨어져있는 것으로 나타났다.

UPGMA method를 이용하여 분석한 경우, 민긴뿌리버섯속의 버섯들이 종에 따라 각기 다른 그룹으로 묶이는 것을 확인할 수 있었다. 이 분석방법의 경우 Neighbor-Joining method와 달리 민긴뿌리버섯과 끈적긴뿌리버섯은 서로 다른 그룹으로 나누어진 것으로 나타났다. 따라서 이 분석방법이 Neighbor-Joining method에 비해 효과적인 것으로 사료되었다.

나) PCR-RAPD 분석

10균주의 민긴뿌리버섯(*Armillaria mellea*)을 10mer oligonucleotide로 구성된 5종류의 random primer를 이용하여 PCR-RAPD 분석을 수행하였다. 각 균주의 DNA band pattern을 분석한 결과 공시균주들이 크게 4그룹으로 묶이는 것을 관찰하였다. *O. radicata* IUM767 균주와 *O. radicata* IUM1175 균주의 상동성이 매우 높은 것으로 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, IUM1054 균주와 IUM766 균주가 나머지 균주들과 비교적 상동성이 먼 것으로 나타났다.

5) 민긴뿌리버섯 균사체를 이용한 버섯쌀의 제조

감자 포도당 맥아즙(potato dextrose malt extract) 배지에서 10일 배양한 민긴뿌리버섯 액체종균을 현미, 백미 및 보리쌀밥에 접종하여 15일 동안 균사체를 이들 곡물에 배양시켜 기능성 버섯쌀을 제조하였다. 이 식품은 현미, 백미 및 보리쌀의 식이섬유와 민긴뿌리버섯의 항암, 면역증강, 혈압강하 등의 기능성 성분이 풍부하게 함유된 건강식품으로 섭취하면 버섯을 섭취한 것과 같은 효과가 나타날 것으로 사료된다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯 균사체의 배양특성

본 연구는 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯 균사체의 최적배양조건을 규명하고자 수행하였으며, 본 연구에서 밝혀진 배지조성, 배양온도, pH 등의 결과는 자실체의 인공재배를 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

2. 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 대량 재배기술 개발

본 연구에서 공시된 야생균주중 자실체 형성능이 높은 균주를 선발하고 적합한 톱밥배지를 제조한 후 이 배지에 선발된 균주를 접종하여 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯 자실체의 대량생산 가능성을 입증하였다. 따라서 본 연구결과에 대한 활용방안은 다음과 같다.

가. 개발된 버섯재배기술의 소개

- 1) 버섯재배에 관련된 리플렛 발간, homepage 소개 및 버섯전문신문 등에 개발된 재배법 소개 및 수록

나. 개발된 재배기술의 보급

- 1) 버섯종균 생산회사 및 재배농가에 재배기술을 보급하여 새로운 버섯의 재배로 인한 새로운 소득의 창출
- 2) 자실체가 기능성 식·약품으로 개발되어 대량소비될 경우 이미 검증된 생산시스템으로 대량 공급이 가능

3. 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯 유래 기능성 물질의 이용

최근 우리나라에서는 상황이나 영지에서 추출한 물질을 이용하여 항암과 관련된 대체의약품을 개발하여 출시하고 있다. 그러나 본 연구를 통해 항암과 면역활성이 뛰어난 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯을 이용한 항암성 면역치료제의 개발 연구는 아직 이루어지지 않고 있다. 이에 앞으로 이들 버섯 자실체에서 추출한 조다당류 성분을 이용하여 인체에 부작용이 없으면서 면역기능이 활성화되어 각종 암을 치료할 수 있는 항암 대체의약품이 개발될 수 있을 것이다.

4. 버섯의 자실체와 균사체를 이용한 기능성 식품의 개발

- 1) 뽕나무버섯쌀과 민긴뿌리버섯쌀을 이용한 기능성 버섯쌀 제조기술을 상환이나 동충하초쌀을 생산하여 판매하는 업체에 보급하여 생산품목을 추가하게 하여 새로운 소득원의 창출을 지원할 수 있다.
- 2) 뽕나무버섯 자실체를 이용한 약용환을 제조하여 국민의 건강증진에 기여할 수 있음

SUMMARY

I. The purpose and importance of the study

Since the foundation of WTO(World Trade Organization) in 1990s, many countries established the policies for lessening barriers of international trade and opening their domestic markets to foreign trade partners. To protect domestic markets from cheap foreign agricultural commodities, many countries have been tried to dealed FTA(Free Trade Agreement) with other countries. Although our government signed FTA with the United States goverment lately, it is necessary to overcome many difficulties caused by FTA. Since the competitive power of our agricultural products are weaker than those of foreign agricultural products, it is apparent that the imported foreign agricultural products though FTA can be resulted in a serious blow to our agricultural industries. Therefore, it is necessary to make decisive counter measures to promote the competitive power of our agricultural products in the international trade markets.

Thus, survey for making lists of Korean native biological resources including mushrooms was started from middle of 1980s and then, the project are still continuously carried out for more than 20 years. Therefore, if our native mushroom resources can be used for manufacturing good medicinal

products or functional health foods superior to foreign mushroom products, then our mushroom goods can keep competitive power with imported foreign mushroom products. More than 8000 species of mushrooms are distributed throughout the world, and more than 100 mushroom species have been used for a medicinal or an edible purposes for many countries.

The fruiting body of *Armillaria mellea* has been known to possess medicinally important substances. The substances within fruiting bodies have been known to exhibit good therapeutic and inhibitory effects against esophagus cancer, hypertension and paralysis(Kim *et al.*, 1983). Kim *et al.*(2006) reported that crude polysaccharide extracted from *A. mellea* exhibited outstanding inhibitive effects on the sarcoma 180 of mouse. The fruiting body of *Oudemansiella radicata* has been known to possess oudenone, one of medicinally important chemical compounds, which exhibit outstanding therapeutic and inhibitory effects against hypertension and Ehrlich carcinoma of mouse. In the submerged culture, *O. radicata* has been known to produce oudemansin, which has been known to exhibit antifungal activities against plant pathogenic fungi such as *Penicillium notatum*, *Ustilago nuda* and *Alternaria alternata*. These two useful mushrooms are distributed in areas of national parks in Korea. Although Cha(1981) and Kim *et al.*(1992) suggested the possibility of artificial cultivation of *A. mellea*, the artificial mass production of *A. mellea* has not been realized in Korea. Thus, it is a little regrettable that fruiting body production and clinical research on *O. radicata* have never been fully initiated in Korea.

This study was carried out to develop the mass artificial cultivation method and identify a medicinal or functional effects of *A. mellea* and *O. radicata*. Results from the study were published partly in the previous papers(Kim *et al.*, 2006; Shim *et al.*, 2006a, 2006b).

II. The scope of study

Medicinal and edible mushrooms such as *A. mellea* and *O. radicata* have been known to be distributed in Korea and to exhibit outstanding therapeutic and inhibitory effects against human diseases. To investigate a medicinal or functional effects of *A. mellea* and *O. radicata*, inhibitive and cytotoxicity tests against sarcoma 180 and cell lines were performed several times by using substances extracted from fruiting body of *A. mellea* and *O. radicata*. To develop mass production method of the fruiting bodies of *A. mellea* and *O. radicata*, studies on optimal culture conditions and fruiting body production were performed in synthetic media and sawdust media.

The obtained results were as follows;

1. The study on *A. mellea*

1) The optimal culture conditions of *A. mellea*

The optimal culture conditions for the mycelial growth of *A. mellea* were 25°C and pH9, respectively. The mycelia of *A. mellea* showed the favorable

growth in Hamada medium. In submerged culture, the optimum mycelial growth was obtained in potato dextrose malt sprout(PDMS) medium. The carbon and nitrogen sources promoting the mycelial growth of *A. mellea* were lactose and arginine, respectively. The optimum C/N ratio was 30:1 in case that 2% glucose was supplemented to the basal medium as a carbon source.

2) Fruiting body production from 3 sawdust media

To induce fruiting body formation from 7 strains of *A. mellea*, the suitable strains of *A. mellea* were screened. Of 7 strains, only *A. mellea* IUM 949 formed primordia on the sawdust medium. Popular sawdust(Cotton wood, *Populus deltoides*), pine sawdust(Douglas fir, *Pseudotsuga mezesii*) and oak sawdust (Oriental oak, *Quercus variabilis*) media were used for fruiting body production of *A. mellea* IUM 949. To prepare sawdust media, each of 3 sawdust media was mixed with rice bran of 30%(v/v) and surface of media were covered with ground raw carrots, then autoclaved for 90 min. The primordia of *A. mellea* IUM 949 were formed 10 days after a complete colonization of the media, and the fruiting bodies were produced 7 days after primordia formation. The weight of fruiting body amounted to 23.9 grams(g/bottle) in oak sawdust. Fruiting body production of *A. mellea* IUM 949 was better in oak sawdust medium than pine sawdust or popular sawdust media. These results can be applied for commercial mass production of fruiting body of *A. mellea*.

3) Immuno-modulatory and anticancer effects of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Armillaria mellea*

Neutral salt soluble(0.9% NaCl), hot water soluble and methanol soluble substances (hereinafter referred to Fr. NaCl, Fr. HW and Fr. MeOH, respectively) were extracted from fruiting body of *A. mellea*. *In vitro* cytotoxicity tests, crude polysaccharide was not cytotoxic against cancer cell lines such as NIH3T3 and sarcoma 180 at the concentration of 1000 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$. Intraperitoneal injection with crude polysaccharides exhibited life prolongation effect of 60–67.5% in mice inoculated with sarcoma 180, respectively. Fr. NaCl improved the immunopotentiating activity of B-lymphocyte by increasing the alkaline phosphatase activity by 1.8~3.0 folds, respectively. In case of Fr. NaCl, the numbers of peritoneal exudate cells and circulating leukocytes were increased by 1 and 2 folds, respectively. These experimental results suggested that extracts isolated from *A. mellea* can be used for improving immunopotentiating activity and preventing cancer.

The chemical analysis of the crude extracts of honey mushroom which showed anticancer and immuno-modulatory effects were consist of polysaccharide and protein. The polysaccharide and protein contents of the extract were 94.15% and 3.20%, respectively and thin layer chromatography analysis indicated that the polysaccharide moiety was consisted of glucose or mannose and a little galactose.

4) Phylogenetic relationships among *Armillaria* species

Phylogenetic relationships of 27 strains of *Armillaria mellea* and 41 strains of *Armillaria tabescens* were analyzed.

The internal transcribed spacer regions (ITS) of the ribosomal DNA of *Armillaria* species were amplified with polymerase chain reaction (PCR) and sequenced. The analysis of ITS sequences with Neighbor-Joining method showed that *A. mellea* and *A. tabescens* were classified into 2 and 3 clusters, respectively. The analysis of ITS sequences with Neighbor-Joining method showed that *A. mellea* and *A. tabescens* were divided into 5 clusters. Their spacer regions (ITS1-5.8S-ITS2) were 810~860 bases in length.

Five RAPD primers of 10mer oligonucleotide were used to assess phylogenetic relationships among *A. mellea*. The analysis of PCR-RAPD of 14 strains of *A. mellea* were classified into 5 clusters. RAPD primers also produced strain-specific polymorphic bands. Genetic similarities based on RAPD was 77 to 95%.

5) Production of functional foods by inoculating honey mushroom mycelia

Honey mushroom rice was manufactured by inoculating cooked polishing rice, brown rice and barley grains with 20 days old liquid mycelial culture of honey mushroom. The inoculated polishing rice, brown rice and barley grains were incubated for 20 days, and then the rice and barley grains were

fully colonized by the mycelia. The mushroom rice were harvested and dried at 60C about 10 hr. The mushroom rice were put into polypropylene bags and preserved them in refrigerator for further use. The functional effectiveness of the mushroom rice are good as fruiting bodies of those mushrooms.

2. The study on *O. radicata*

1) The optimal culture conditions of *O. radicata*

The optimal culture conditions for the mycelial growth of *O. radicata* were 25°C and pH6, respectively. *A. mellea* showed the favorable mycelial growth in Lilly medium, whereas compact mycelial density was found in Hamada medium. In submerged culture, the optimum mycelial growth was obtained from PDB(potato dextrose broth) medium. The carbon and nitrogen source promoting the mycelial growth of *A. mellea* were xylose and alanine, respectively. The optimum C/N ratio was about 20:1 in case that 3% glucose supplemented to the basal medium as a carbon source.

2) Fruiting body production of *O. radicata* in the sawdust media

O. radicata has been started to form primordia from its red-brown mycelial crusts covering the surface of oak sawdust medium 30 days after incubation at 25°C in dark condition. The primordia have been observed firstly from *O. radicata* IUM 1259 and IUM 1260, respectively. Of 3 sawdust media(popular sawdust, pine sawdust and oak sawdust), oak sawdust medium was the best for fruiting body production. Generally, fruiting bodies of *O. radicata* were produced intensively on oak sawdust media mixed with 10%(v/v) rice bran. These results indicated the commercial mass production of fruiting body of *O. radicata* is possible.

3) Immuno-modulatory and anticancer effects of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Oudemansiella radicata*

Neutral salt soluble (0.9% NaCl), hot water soluble and methanol soluble substances (hereinafter referred to Fr. NaCl, Fr. HW and Fr. MeOH, respectively) were extracted from the mushroom. Intraperitoneal injection with Fr. NaCl exhibited antitumor activity with life prolongation effect of 42.9~66.7% in mice inoculated with Sarcoma 180. Fr. NaCl improved proliferation of spleen cells and the immunopotentiating activity of B lymphocyte by increasing the number of spleen cells and alkaline phosphatase activity by 1.4 folds, respectively. Intraperitoneal injection with Fr. MeOH increased the numbers of peritoneal exudate cells and circulating leukocytes by one and two folds, respectively. The antitumor effect of *O. radicata* against Sarcoma 180 of mice was due to immunopotentiating activity.

4) Phylogenetic relationships among *Oudemansiella* species

(1) Phylogenetic relationship of nine strains of *Oudemansiella radicata*, 5 strains of *O. mucida*, 4 strains of *O. platyphylla* were analyzed. Sequencing data of ITS region of 4 strains of *O. australis*, 4 strains of *O. canarii* and 7 strains of *O. pudens* were obtained from NCBI and compared with the data obtained from this experiment, and the phylogenetic relationships among *Oudemansiella* species were analyzed.

(2) The internal transcribed spacer regions (ITS) of the ribosomal DNA of *Oudemansiella* species were amplified with polymerase chain reaction (PCR) and sequenced. The analysis of ITS sequences with Neighbor-Joining method indicated that *Oudemansiella* spp. were classified into 5 clusters. Their spacer regions(ITS1-5.8S-ITS2) were 550~820 bases in length.

Five RAPD primers of 10mer oligonucleotide were used to assess phylogenetic relationships. The sequence analysis PCR-RAPD showed that 10 strains of *Oudemansiella radicata* were classified into 4 clusters. Five RAPD primers produced strain-specific polymorphic bands.

5) Production of functional foods by inoculating mycelia of rooting shank mushroom

Root shank mushroom rice was produced by inoculating cooked polishing rice, brown rice and barley grains with 10 days old liquid culture of rooting shank mushroom. The inoculated polishing rice, brown rice and barley grains were incubated for 15 days, and then the rice and barley grains were fully colonized by the mycelia. The mushroom rice were harvested and dried at 60C about 10 hr. The dried mushroom rice were put into polypropylene bags and preserved them in refrigerator for further use. The functional effectiveness of the mushroom rice are good as fruiting bodies of those mushrooms.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	26
Section 1. The purpose and importance of the study	26
Section 1. The scope of study	30
Chapter 2. Technological development of mushroom research in Korea and foreign countries	38
Chapter 3. The results and discussions of the study	39
Section 1. The optimal culture conditions of <i>A. mellea</i> and <i>O. radicata</i>	39
Section 2. The development of artificial cultivation technique of <i>A. mellea</i> and <i>O. radicata</i>	74
Section 3. The analysis of phylogenetic relationships of <i>A. mellea</i> and <i>O. radicata</i>	105
Section 4. The search for functional substances of <i>A. mellea</i> and <i>O. radicata</i>	136
Section 5 The production of functional health food by <i>A. mellea</i> and <i>O. radicata</i>	178
Chapter 4. The achievement of purposes and contributions for related fields of study	186
Chapter 5. The application program of study achievement	190

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	26
제 1 절 연구개발의 필요성	26
제 2 절 연구개발의 범위	30
제 2 장 국내외 기술개발 현황	38
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	39
제 1 절 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 배양조건 탐색	39
제 2 절 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 인공재배기술 개발	74
제 3 절 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 유전적 유연관계 분석	105
제 4 절 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 기능성 유용 물질의 탐색	136
제 5 절 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 기능성 식품제조	178
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	186
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	190

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1990년대 세계무역기구(WTO)가 출범하고 세계의 여러나라가 FTA를 체결하고 있는 요즘 세계의 시장경제는 상호 호혜원칙에 따른 시장 개방 압력의 거대한 흐름으로 그 동안 지속되었던 각 나라의 보호무역주의 정책이 시장을 개방하는 무한 자유경쟁으로 전환되는 새로운 양상이 전개되고 있다. 이러한 새로운 무역질서는 부존자원이 부족하고 세계의 무역시장에서 상품 경쟁력이 약한 우리 나라에 심각한 영향을 주고 있다. 특히 농산물의 경우는 시장의 개방으로 인하여 외국으로부터 저렴한 가격의 농산물 수입이 증대됨에 따라 외국의 농산물이 국내 시장을 급속히 잠식하고 있는 실정이다. 그러므로 저렴한 외국 농산물의 급속한 국내시장의 잠식은 결국 농민들의 영농의욕을 저하시켜 단기적으로는 국내농산물의 생산과 수급에 차질을 초래하여 영농규모의 축소를 유도할 뿐 아니라 장기적으로는 농촌경제의 황폐화를 초래할 것이다. 따라서 세계 여러 나라들은 자국의 경제적인 생존을 위한 정책을 추진하는 과정에서 자국의 자연자원을 포함한 농림자원을 보호하고 그 자원을 이용하고 개발하는데 역점을 두고 있다.

우리 나라에서도 이러한 목적을 위해 지난 10여 년간 생물자원을 목록화 하기에 이르러 야생 동식물 및 미생물의 종분포를 조사하여 종다양성을 파악하고, 아울러 희귀종에 대한 보호대책을 서둘러 왔다. 특히 1980년대 중반부터 환경부는 “자연생태계 전국조사”와 같은 연구를 시작하였으며 (환경부, 1988;

1989; 1990; 2002), 1990년대 중반부터 정부의 주도하에 자원보존과 개발 및 이용성의 극대화를 꾀하고 있는 실정이다. 특히, 균학의 분야에서도 국내의 버섯 자원에 관한 현황을 파악하고 이를 자원화 하기 위한 연구가 꾸준히 진행되었다(농진청, 1987; 이, 1988; 김과 김, 1991; 이 등, 1998; 이 등, 2000).

균류 중에서 버섯자원은 전 세계적으로 8000여종이 알려져 있으며 버섯은 인간에 의해 오랜 세월 동안 식용 및 약용으로서 널리 활용되어왔다. 버섯은 많은 식물성 단백질과 식이섬유, 키틴, 비타민 및 무기염류를 함유하고 있기 때문에 버섯을 섭취하면 건강이 증진된다는 것이 많은 연구결과에 의해 입증되고 있는데(심, 1980; 水野, 1989; 안, 1992; 유와 홍, 1992), 이들의 연구 결과는 버섯이 인체의 영양 보강 및 생리적 항상성을 유지시켜 질병에 대한 저항성을 갖게 할 뿐 아니라, 항암작용, 면역조절 및 진정효과도 함께 갖고 있다고 보고하고 있다. 특히 버섯의 자실체 성분 중 다당류 등이 Sarcoma 180과 Ehrlich 복수암 등과 같은 동물에 발생하는 암세포에 대해 현저한 항암 활성을 나타내는 것이 알려짐으로써 많은 주목을 받게 되었고, 이들의 유효성분은 주로 버섯의 자실체나 균사체가 가수분해에 의해 발생하는 다당류인 β -D-glucan인 것이 밝혀졌다. 이 다당류의 항암기작은 기존의 암을 사멸시키는 화학요법과는 달리 숙주의 면역기능을 증강시킴으로써 암세포의 증식을 억제하여 치료하는 것으로 알려졌다. 최근에 일본에서는 버섯의 자실체, 균사체, 배양액 등으로부터 추출한 다당체를 이용한 항암제를 개발하여 실용화하고 있는데, 버섯이 지니는 그 외의 약리효과는 간염, 생체항상성작용, 뇌졸중, 심장병 등과 같은 성인병에 대한 예방 및 치료에 탁월하며, 콜레스테롤의 저하작용, 항혈전, 혈당강하 및 노인성 질병에도 효과가 있다는 사실도 보고되었다(水野와 川습, 1992).

세계적으로 널리 분포하고 있는 뿔나무버섯균(*Armillaria mellea*)은 균사속

(rhizomorph)을 형성하며, 침엽수 및 활엽수에 기생하여 수목의 뿌리썩음병을 유발하는 목재부후균으로 우리 나라에서는 잣나무, 참나무, 낙엽송 등에서 흔히 발견되고 있다(Sung 등, 1989). 또한, 이 뿔나무버섯균은 난과식물에 속하는 천마(*Gastrodia elata*)와 구멍장이버섯과에 속하는 약용버섯인 저령(*Grifola umbellata*)의 생육에도 공생균으로서 큰 도움을 주는 것으로 알려져 있다. 사람들은 우수한 식용균(edible fungi)으로 각광을 받는 이 뿔나무버섯의 자실체를 야외에서 채집해 이용해 왔으며(이, 1988), 이 버섯의 주요한 약리작용에는 간염, 중풍, 두통, 불면증, 신경쇠약, 간질, 야맹증 및 여자의 하혈과 같은 다수의 질병을 치료하는 효과가 있을 뿐 아니라(Obuchi 등, 1990; 안, 1992; 유와 흥, 1992), 자실체로부터 추출한 다당류 및 단백질에는 항암성분이 들어 있는 것으로 밝혀졌다(김 등, 1983). 이러한 뿔나무버섯균에 대한 연구는 영국, 캐나다 그리고 중국과 일본에서도 활발히 연구되어 왔는데(Morrison, 1982; Watanabe, T., 1986; 郭과 徐, 1992; Anderson *et al.*, 1987; Togashi and Takizawa, 1994, 1995), 우리 나라에서 뿔나무버섯균의 배양에 관한 연구의 대부분은 공생균으로서 천마 및 저령의 생육을 촉진시키기 위한 뿔나무버섯균의 균사 및 균사속의 배양에 관한 연구(홍 등, 1990a, 1990b; 장, 1999; 이 등, 2000; 김 등, 2003)가 있는 반면, 고 등(1992)은 톱밥배지를 이용하여 뿔나무버섯의 자실체를 형성할 수 있는 가능성을 보고하였으며, 성 등(1989)은 뿔나무버섯균을 잣나무뿌리썩음병을 유발시키는 병원체로 동정하였다. 그러나 뿔나무버섯균의 자실체 형성을 보고하여 자실체의 대량재배가능성을 보여주었던 고 등(1992)의 연구가 있는 후 12년이 지난 오늘날까지도 우리 나라에서 뿔나무버섯의 대량재배는 아직도 실현되고 있지 않다.

민긴뿌리버섯(*Oudemansiella radicata*)은 우리 나라에서 자생하며 분류학적으로 송이과(Tricholomataceae)에 속하는 맛이 좋은 식용버섯이고(이, 1988),

그 자실체에 함유된 oudenone 성분은 고혈압을 치료하는 혈압강하제로서 큰 효과가 있으며, Sarcoma 180 등과 같은 동물의 암세포에 대해 현저한 항암 활성을 갖고 있다는 사실이 근래에 중국에서 밝혀짐에 따라 중국의 복건성과 운남성 등에서 본격적인 대량재배 시험을 진행 중에 있다(黃, 1997). 그러나 우리나라에서 자생하는 민긴뿌리버섯(*O. radicata*)은 설악산, 지리산 및 속리산 등의 깊은 산 속에서 가끔 발견되고 있으나 아직도 이 버섯을 식·의약용으로 이용하기 위한 구체적인 연구는 국내에서 진행되지 않고 있다. 그러나 민긴뿌리버섯이 혈압강하, 항암작용 및 항진균 작용과 같은 탁월한 약리효과를 갖고 있다고 알려진 중국에서는 이미 이 버섯을 대량재배 하려는 연구가 진행되고 있어서, 가까운 장래에 재배법이 개발되어 대량생산이 이루어질 것으로 전망됨에 따라 우리나라에서 이 버섯의 새로운 수요가 생길 것으로 생각된다. 그러므로 본 연구과제에서는 맛있는 식용버섯으로 간염과 부인병의 치료 및 항암효과를 나타내는 뽕나무버섯(*Armillaria mellea*)과 혈압강하와 항암 효과가 높은 민긴뿌리버섯(*Oudemansiella radicata*)을 연구과제의 대상으로 선정하였다.

그러므로, 세계의 시장에서 고부가가치를 지닌 버섯자원으로서 점차 각광을 받고 있는 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯에 대한 대량재배법의 개발과 그 버섯의 균사체를 이용한 기능성 물질의 개발을 위한 연구는 농가의 높은 영농수익의 달성과 향후 수입대체 가능성을 위해서 중요할 뿐 아니라 세계무역기구(WTO) 및 자유무역협정(FTA)에 의해 주도되는 세계무역의 새로운 질서 속에서 부가가치가 높고 경쟁력이 있는 상품으로서 수출의 촉진을 기대할 수 있다.

제 2 절 연구개발의 범위

1. 연구개발의 목적

우리 나라의 국가 경제력의 향상은 인구의 고령화를 촉진시키는 반면 산업의 발달로 인한 환경조건의 악화에 비례하여 각종 난치병이 증가함에 따라 국민의 의식수준은 점차 건강식품을 선호하는 추세이다. 그러므로, 식용 및 약용으로 사용하는 버섯 및 버섯을 이용한 기능식품의 이용이 급격히 증가하고 있다. 이러한 배경을 바탕으로 하여 이래와 같은 개발 연구 목표인 인공재배 기술과 유용물질을 이용하여 버섯재배농가의 소득 향상은 물론 본 연구를 통해 개발한 버섯을 우리나라의 소비자들이 많이 이용할 경우 국민건강증진에 크게 기여할 수 있을 것이다.

가. 공시버섯(뽕나무버섯, 민긴뿌리버섯)균사의 최적 배양조건 및 배양기법의 확립

나. 공시버섯 자실체 생산을 위한 배양기질의 선발 및 톱밥재배 기술 확립

다. 공시버섯의 유용물질의 추출과 *in vitro* 및 *in vivo*의 효과 검정

라. 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 유전적 유연관계 분석

마. 공시버섯에서 유용물질을 이용한 기능성 식품제조

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

뽕나무버섯의 인공재배와 면역활성 효과에 대한 그 동안의 국내외적 연구를 국내외적으로 고찰 해 보면, 주로 중국과 일본에서만 활발한 연구가 이루어져 왔다(Obuchi 등, 1990; 郭과 徐, 1992; Togashi and Takizawa, 1994, 1995). 특히, 우리 나라에서는 뽕나무버섯이 약용식물인 천마(*Gastrodia elata*)와 다른 약용버섯인 저령(*G. umbellata*)의 생육을 촉진시키는 공생균으로서 역할이 주로 강조되어 왔기 때문에, 뽕나무버섯에 관련된 대부분의 연구가 뽕나무버섯의 자실체 생산 및 면역활성을 위한 연구보다는 주로 뽕나무버섯의 균사 및 균사속(rhizomorph)의 생장에 관한 부분에 국한된 경향을 보이고 있다. 그러므로 부가가치가 높은 기능성 상품을 개발하기 위해서 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 대량생산을 위한 인공재배기술의 개발이 필요한 시점에 와 있다. 민긴뿌리버섯에 대한 연구는 근래에 밝혀진 oudenone성분에 의한 약리효과를 바탕으로 중국 복건성 등의 연구소에서 대량재배를 위한 연구가 진행중이고(黃, 1997), 생리·생장에 대한 기초연구는 중국 운남성의 대학에서 진행중에 있지만(Li, 2002), 국내에서는 아직도 민긴뿌리버섯에 대한 어떠한 연구도 시도되지 않았다는 점에서 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯은 연구할 목적과 가치가 충분히 있다고 사료된다. 이러한 시도는 버섯재배의 새로운 기술과 새로운 수요의 창출을 도출할 수 있고, 버섯재배의 비약적인 발전과 함께 향후 국내의 버섯산업에 있어서 기술적인 측면이나 경제적인 측면에서도 큰 기여를 할 것으로 사료된다.

나. 경제·산업적 측면

뽕나무버섯(*A. mellea*)의 항암작용은 김 등(1983)에 의하여 처음 보고되었으며, 김 등(1983)은 뽕나무버섯에 함유된 다당류 및 단백질 성분이 암세포를 직접 공격하는 거식세포(macrophage)의 수치를 크게 증가시켰다고 하였다. 민긴뿌리버섯(*O. radicata*)의 ouddenone성분도 고혈압을 치료하는 혈압강하제와 항암제로 큰 효과가 있을 뿐 아니라 항진균 작용도 있다는 사실이 임상실험을 통하여 증명되었다(黃, 1997). 국내에서는 1980년대부터 여러 연구자들에 의해서 담자균의 항암성분 및 항암효과에 대한 여러 가지의 연구가 수행되어 왔으며, 수행된 이러한 연구결과를 바탕으로 하여 구름버섯(*Coriolus versicolor*)의 추출물을 의약품으로 개발하였고 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 균사체를 이용한 기능성 식품까지도 개발되고 있는 실정이다. 그러므로 뽕나무버섯(*A. mellea*) 자실체의 대량재배 방법의 확립과 민긴뿌리버섯(*O. radicata*)의 자실체 생산방법의 개발은 국내농가의 소득에 큰 공헌을 할 수 있으며, 이러한 기능성 버섯을 이용하여 국민의 건강에 유익한 기능성 식품을 개발할 경우, 버섯산업의 선진화에 큰 기여를 할 뿐 아니라 버섯과 관련된 산업분야인 식품, 음료, 화장품, 제약산업 등의 활성화를 촉진시킴과 함께 수입대체를 통하여 외화를 절약하며, 그리고 미국을 비롯한 여러 나라와 자유무역협정(FTA)으로 이루어지는 국제적인 무역의 흐름 속에서 고부가가치의 상품으로 개발하여 외화의 획득에도 크게 기여할 것이다.

다. 사회·문화적 측면

인간이 생활하는 지구촌에서 문화와 과학의 발달에 의해 유발된 대기 및 수질의 오염, 농약에 의한 토양과 농작물의 오염 등은 우리에게 여러 가지 질병

을 발생시킨다. 21세기의 우리 사회는 문화가 발달하고 국민 소득이 향상되면서 점차 고령화 사회로 진입하고 있는 것과 비례하여 암과 같은 난치성 질환과 여러 가지 성인병도 크게 증가하고 있는데, 이러한 질환을 치료하기 위해 사용되는 의약품의 대부분은 일시적인 치료 효과만을 가지고 있어서 근본적인 치료가 되지 못하는 것에 문제점이 있다. 그러므로 질병을 예방하기 위해 요즘 주로 논의되는 대안적인 방법 중의 하나는 인체에 거의 부작용이 없이 이러한 질병을 예방할 수 있는 능력을 지닌 건강식품의 일상적이고 장기적인 섭취를 들 수가 있다. 최근 일본 등 아시아 지역의 여러 나라에서는 잎새버섯, 표고, 영지 등의 균사체를 배양하여 추출한 물질(β -D-glucan)을 암의 치료에 사용하고 있다. 그러므로 뽕나무버섯의 균사체를 사용하여 톱밥배지에서 자실체의 형성을 유도함으로써 대량재배방법을 확립하거나, 민긴뿌리버섯을 톱밥배지에서 대량 인공재배법을 개발하는 등의 연구의 결과를 통하여 향후 기능성 식품의 개발을 위한 타당성의 확립은 의료 및 사회·문화적인 분야에서 큰 공헌을 할 것이며, 또한 국민의 건강은 물론 사회적 안정과 발전에도 기여할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

3. 연구개발의 범위

가. 1년차 : 공시 균(뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯)의 배양 조건의 탐색

- 1) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 수집
- 2) *in vitro*에서 버섯의 생장을 위한 최적배양 조건 및 최적기질 선별
- 3) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 배양을 통한 최적 고체배지의 선별

- 4) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 균사체 배양을 통한 최적 액체배지 선발
- 5) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 톱밥처리실험

나. 2년차: 공시 균의 인공재배조건의 확립 및 기능성 유용물질의 탐색

- 1) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 생장을 위한 우량 톱밥배지 선발
- 2) *in vitro* 및 *in vivo*에서 버섯의 자실체로부터 분리된 유용성분의 분석
- 3) *in vitro* 및 *in vivo*에서 버섯의 균사체와 배양액으로부터 분리된 유용 성분의 확인 및 효과 분석
- 4) 자실체, 균사체 및 배양액의 동물처리의 효과분석
- 5) 기능성 물질의 상품화 가능성 제시 및 실증화

다. 3년차 : 공시 균의 인공 대량재배법 확립 및 기능성 유용물질의 이용

- 1) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 자실체 대량생산기법의 확립
- 2) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 유전적 특성
- 3) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯에서 분리한 생리활성물질의 규명
- 4) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯에서 분리된 생리활성물질의 인간 및 동물세포 배양을 통한 면역증강 및 항암효과 규명
- 5) 기능성 유용물질의 실용화

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 방법
1 차 년 도	공시균의 최적 증식조건 및 증식기법의 확립	<p>1) 공시 균주의 채집과 분리</p> <p>① 야외채집을 시행하여 사용할 공시균주를 채집</p> <p>② 채집한 공시버섯을 항생제가 포함된 PDA 배지에서 순수분리 방법을 통해 공시균주를 분리·배양</p> <p>③ 공시균주의 배양을 통한 활성을 조사하여 최적 상태의 균주 확보</p> <p>2) <i>In vitro</i>에서 공시 균주의 배양을 위한 최적 액체 및 고체 배지의 개발</p> <p>① 공시균주의 배양을 위한 최적조건의 연구를 통해 최적배지의 개발을 시도</p> <p>② 배지의 pH(6-9), 배양온도(15℃-35℃) 및 배지의 종류에 따른 최적 균사생장 조건을 탐색</p> <p>③ 배지의 탄소원, 질소원 및 탄소원과 질소원의 비율에 따른 균사생장을 비교하여 최적의 영양원을 탐색</p>
	공시균주의 배양기질 선발과 툽밥 및 배양	<p>1) 공시 균주의 채집과 분리;</p> <p>① 야외채집을 시행하여 사용할 공시균주를 채집</p> <p>② 채집한 공시버섯을 항생제가 포함된 PDA 배지에서 순수분리 방법을 통해 공시균주를 분리·배양</p> <p>2) 공시 균주의 균사체의 배양과 액체배지의 선발</p> <p>균사의 생장이 느린 공시균을 대상으로 균사체의 대량증식을 유도할 수 있는 기존의 액체배지의 효과를 조사</p> <p>① 증류수 1ℓ, 과당(fructose) 20g, 목재 엑기스(wood extract) 10ml, 건조효모(yeast powder) 5g을 첨가하여 만든 액체배지를 제조</p> <p>② 증류수 1ℓ, 설탕(sucrose) 20g, 농업 부산물(예, 옥수수 꼭지에 부착된 줄기 추출액) 3 ml를 첨가하여 기준배지 제조</p> <p>③ 증류수 1ℓ, 포도당(glucose) 20g, 미강 엑기스 10ml를 첨가하여 만든 액체배지 제조</p> <p>④ 포도당(glucose) 20g, 펩톤과 무기염류(FeSo₂)를 넣고 산림 부식토 엑기스(humus extract)를 첨가하여 액체배지 제조</p> <p>①-④의 액체배지에 공시균을 접종하고 온도(15℃-25℃), pH(3-9)별 및 첨가제에 따른 공시균의 액체배양 조건 조사</p> <p>3) 공시 균주의 툽밥처리</p> <p>공시 균주의 성장과 자실체 형성에 기여할 수 있는 툽밥 및 원목의 선발</p> <p>① 공시 균주의 접종: 참나무툽밥과 미강을 8:2의 비율로 혼합하고 함수율을 70%로 조절한 배지에 공시균을 접종·배양, 툽밥과 미강의 첨가비율 및 첨가제에 따른 툽밥배양조건 조사</p>

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 방법
2 차 년 도	<p>유용물질의 추출과 <i>In vitro</i> 및 <i>in vivo</i>의 효과검정</p>	<p>1) 공시 버섯의 균사체와 배양액에서 유용물질의 추출 및 정제</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 자실체와 균사체를 수확하여 동결건조 시킨 후 분쇄 ② 공시균의 재료를 80% methanol에 48시간 침지 시킨 후 여과하여 감압 농축함으로써 메탄올 추출물 분리 ③ 메탄올 추출 후 0.9% 중성염 용액에 24시간 침지시켜 여과한 여과액을 투석·동결건조하여 중성염 추출물 분리 ④ 중성염 추출 후 회수한 재료에 증류수를 첨가하고 95℃에서 10시간 가열하여 열수 추출물을 분리 <p>2) 추출한 유용물질을 사용하여 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i>에서 유용물질의 효과검정</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 정상세포(NIH3T3), 복수암세포(Sarcoma 180), 간암세포(HepG2), 위암세포(HT29) 등의 암세포에 각 추출법으로 추출한 crude β-D-glucan을 첨가하여 세포독성을 조사 ② 항종양 효과의 검정법으로 실시하여 마우스의 복강에 Sarcoma 180을 접종하여 복수암을 유발한 후 추출한 crude β-D-glucan을 주사하여 각 추출물이 복수암 세포(sarcoma 180)에 미치는 효과를 검정
	<p>공시균주의 배양기질 선발과 톱밥 및 배양</p>	<p>1) 공시균의 배양기질(톱밥)의 선발; 톱밥처리법과 2종구 처리법을 통해 자실체 형성을 확인하고 우수한 톱밥을 선발</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 참나무(혹은 졸참나무) 및 밤나무로 제조된 각각의 100개 정도의 목편(직경 9mm×길이 17mm)을 종구로 하여 혼합톱밥에 넣고 톱밥과 골고루 섞은 후 121℃로 1시간 이상 고압살균 ② 뽕나무버섯 균사를 톱밥배지(목편+톱밥)에 접종하여 25℃에서 3개월간 배양하고 백색균사의 성장(full growth)을 확인한 후 공시된 참나무(혹은 졸참나무 및 밤나무 등의 골목(직경 10cm x 길이 50cm)에 2종구 접종법(균사 배양 목편+무배양 목편)으로 처리하고 표면을 살균제(예, 디오파네트 메틸 계통)로 도포한 후 일정기간 배양 ③ 공시된 톱밥에 미강이나 부식토 등을 일정비율(예, 8:2; 7:3; 6:4 등)로 혼합하고 배양병(1500 ml)에서 민긴뿌리버섯의 균사를 접종하여 배양한 후, 접종원을 공시 원목에 접종하고 온·습도가 조절되는 야외의 공간에 처리하여 자실체의 형성을 유도 <p>2) 선발된 톱밥에 대한 공시균의 배양;</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 우수한 톱밥에 대한 공시 균의 자실체 형성을 위해 야외 실험 및 실내실험을 실시

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 방법
3 차 년 도	공시버섯의 유전적 특성 규명 및 생리활성 물질의 실용화	<p>1) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 유전적 특성 규명</p> <p>① ITS region의 염기서열 분석을 통한 균주의 유전적 특성분석</p> <p>② PCR-RAPD 분석을 통한 균주간 유연관계 분석</p> <p>2) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 생리활성물질 검정</p> <p>① 공시버섯에서 분리한 생리활성물질의 규명</p> <p>② 공시버섯에서 분리된 생리활성물질의 cell 세포배양을 통한 효과 규명</p> <p>3) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 유전적 특성 규명</p> <p>① 기능성 물질의 상품화 가능성 제시 및 실증화</p> <p>② 기능성 유용물질의 실용화</p>
	공시균의 자실체 대량생산 기법의 확립	<p>1) 선발된 톱밥에 대한 공시균의 배양;</p> <p>① 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 자실체 대량생산기법의 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 공시버섯의 자실체 대량생산기법 확립 - 자실체 대량생산을 위한 새로운 수종의 톱밥배지의 개발 - 자실체 대량생산을 위해 톱밥만이 아닌 비트펄프, 면실박 등의 새로운 종류의 배지의 개발 - 온도, 습도 및 광도 등 환경조건의 규명 - 자연 자원을 이용한 자실체형성 유효배지의 개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내에서는 영지, 상황, 차가버섯 등 약용버섯의 면역증강 효과와 이들의 유효성분을 이용하기 위한 연구가 활성화되고 있다. 최근 서양 외국에서는 주로 동양에서 재배되고 있는 버섯 중 그들 나라에서 재배되지 않고 맛있는 식용버섯재배에 노력을 기울이고 있으나 의약용 버섯에 대해서는 큰 관심을 기울이고 있지 않다. 단, 중국에서는 오래전부터 한의서에 수록된 약용버섯을 야생에서 채집하여 이들 버섯에 대한 인공재배와 그 이용에 대해 연구를 수행하고 있다.

그러나 현재까지 국내에서 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯을 비롯한 식·의약용 버섯의 인공대량재배에 성공한 사례가 없으며, 중국이나 일본을 비롯한 외국에서도 이들 버섯의 대량재배에 성공했다는 보고는 없다. 특히 본 연구과제인 버섯이 암이나 고혈압에 대한 높은 효과가 있고 독성은 없다고 국내외의 문헌에는 소개되어 있으나 동물실험을 통한 실증자료는 국내외에 없는 실정이다. 따라서 본 연구를 통해 뽕나무버섯이나 민긴뿌리버섯의 인공재배기술의 개발은 물론 이들 버섯이 갖고 있는 약효와 독성 여부를 생쥐의 생체실험이나 여러 종류의 cancer cell line을 이용한 실험을 통해 검증함으로써 이들 버섯을 소비자들이 안심하고 소비하여 재배 농가의 소득향상은 물론 국민건강에 기여하고자 하는 것이 본 과제에서 추구하는 목표이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 썩나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 배양조건 탐색

1. 서 론

고등균류(higher fungi)에 속하는 버섯은 인간에 의해서 오랜 세월동안 약 용이나 식용으로 이용이 되었는데, 특히 썩나무버섯(*Armillaria mellea*)의 단백질(polysaccharide)은 인체에서 항암 및 면역증강에 높은 효과가 있으며, 중풍을 치료하는데 큰 효과를 나타내고 있음이 증명되었다. 또한 민긴뿌리버섯(*Oudemansiella radicata*)에 함유된 oudenone성분도 혈압의 강하와 항암활성을 촉진할 뿐 아니라 탁월한 항진균 약리효과가 증명됨으로써 중국의 복건성과 운남성에서 이들의 버섯에 대한 본격적인 연구가 진행되고 있다. 그러나 국내에서는 김(1992) 등이 톱밥재배를 통하여 썩나무버섯의 자실체 생산을 위한 가능성을 언급한 이후 지금까지 대량재배를 위한 여러 가지의 시도가 있었음에도 불구하고 썩나무버섯에 대한 자실체의 대량재배는 아직도 실현되지 못하였을 뿐 아니라 민긴뿌리버섯에 대한 기초적인 연구도 전혀 없었다. 버섯은 종속영양생물이기 때문에 외부로부터 각종의 영양원을 균체로 흡수하여 생장을 한다. 그러므로 버섯재배를 위한 연구를 시행함에 있어서 먼저 염두에 두어야 할 것은 우수한 균주를 선발하는 것과 함께 그 버섯균주가 충분히 생장할 수 있는 적절한 배지를 선발하는 것이 필요하다.

그 이유는 버섯균이 배양기에서 양호한 균사생장을 하거나 배양기 위에서 자실체를 생산하기 위해서 배양기에 그 버섯균의 생장에 적합한 탄소원 및 질

소원 등의 영양원이 함유되어야 할 뿐 아니라 온도, 습도, 배양기의 pH 및 일조 등과 같은 배양에 적합한 주변의 환경조건도 함께 갖추어져 있어야 하기 때문이다. 그러므로 톱밥배양기에 접종한 버섯균주로부터 자실체를 대량생산을 하거나 또는 생산된 자실체로부터 생리활성물질을 추출하려고 한다면 무엇보다도 먼저 해야 할 것은 톱밥배양기에 처리할 접종균사체(mycelial inoculum)를 충분히 확보할 수 있는 우수한 합성배지를 기존의 배양기로부터 선발하거나 또는 우수한 합성배지를 새로 개발해야 한다. 그러므로 본 연구는 뽕나무버섯 혹은 민긴뿌리버섯이 배양기 위에서 양호한 균사의 성장을 나타낼 수 있는 환경 조건 및 기초 영양생리에 대한 규명을 하기 위해 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시균주의 채집과 분리

1) 공시균주의 채집

실험에 사용하는 공시균으로 16종의 뽕나무버섯(*A. mellea*)과 9종의 민긴뿌리버섯(*O. radicata*)을 국내외에서 각각 채집하고 분리한 후 사용하였다(Table 1-1). 순수분리한 공시균은 PDA에 접종한 후 공시균의 균사배양을 위한 최적 조건의 조사, 공시균의 양호한 균사배양을 위한 최적 배지의 선발을 위한 시료로 사용하였다.

Table 1-1. List of *Armillaria mellea* and *Oudemansiella radicata* strains used in this study

Scientific name	Geographical origins	Scientific name	Geographical origins
<i>A. mellea</i> IUM 184	Korea	<i>A. mellea</i> IUM 950	Czech
<i>A. mellea</i> IUM 185	Korea	<i>A. mellea</i> IUM 955	Czech
<i>A. mellea</i> IUM 186	Korea	<i>A. mellea</i> IUM 957	Czech
<i>A. mellea</i> IUM 535	Korea	<i>O. radicata</i> IUM 762	Korea
<i>A. mellea</i> IUM 644	Korea	<i>O. radicata</i> IUM 766	Korea
<i>A. mellea</i> IUM 734	Korea	<i>O. radicata</i> IUM 767	Korea
<i>A. mellea</i> IUM 741	Korea	<i>O. radicata</i> IUM 770	Korea
<i>A. mellea</i> IUM 787	Korea	<i>O. radicata</i> IUM 779	Korea
<i>A. mellea</i> IUM 788	Korea	<i>O. radicata</i> IUM 780	Korea
<i>A. mellea</i> IUM 791	Korea	<i>O. radicata</i> IUM 781	Korea
<i>A. mellea</i> IUM 887	Korea	<i>O. radicata</i> IUM 1259	China
<i>A. mellea</i> IUM 911	Korea	<i>O. radicata</i> IUM 1260	China
<i>A. mellea</i> IUM 949	Czech		

2) 공시버섯균주의 분리

본 실험을 위하여 2004년 5월부터 2005년 2월말까지 전국의 국립공원과 자연보호가 잘된 산을 대상으로 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯을 채집하였으며, 이외에도 이들 버섯의 연구가 활발한 중국과 체코에서도 이들 버섯균주를 도입하였다. 채집한 균주는 자실체의 갓과 자루를 70% 알코올로 표면 살균하여 내부 조직을 메스로 잘라낸 후, 그 절편을 streptomycin(200 μ g/ ℓ)이 첨가된 PDA 배지에 옮겨 순수분리한 후 PDA에 이식하여 25 $^{\circ}$ C에서 암배양한 다음, 인천대학교 야생버섯균주은행에 보관하여 실험에 사용하였다.

나. 공시균의 최적 균사배양을 위한 배양조건의 규명

1) 공시균의 최적 배양을 위한 환경조건 및 영양원의 조사

공시균의 최적 배양조건을 조사하기 위한 pH, 온도, 영양원, C/N ratio 등의 실험에서 각각 처리를 달리한 배지를 제조하여 공시균을 접종한 후 균사의 생장에 최적인 환경조건과 영양원의 규명을 다음과 같이 조사하였으며 모든 항목의 실험은 4반복으로 처리하여 결과를 도출하였다.

가) 온도

공시균에 있어서 균사생장을 위한 최적 온도를 조사하기 위하여 뽕나무버섯 16 균주와 민긴뿌리버섯 9 균주의 균사절편(직경 6mm의 mycelial disc) 각각을 PDA에 접종하여 15℃, 20℃, 25℃, 30℃ 및 35℃의 온도조건에서 뽕나무버섯 균주는 20일 동안, 민긴뿌리버섯 균주는 10일 동안 암배양을 한 후 균사의 생장을 조사하였다.

나) pH

1N의 NaOH와 1N의 NaCl를 이용하여 pH를 4~9의 범위로 조절된 PDA를 plate에 분주한 후 뽕나무버섯 16 균주와 민긴뿌리버섯 9 균주의 균사절편(직경 6mm mycelial disc) 각각을 접종하고 25℃의 온도로 뽕나무버섯 균주는 20일 동안, 민긴뿌리버섯 균주는 10일 동안 암배양을 한 다음, 균사의 생장에 가장 적합한 pH를 규명하기 위해 균사의 생장을 측정하였다.

다) 탄소영양원

균사 생장에 최적인 탄소영양원 선발을 위한 기본 배지를 peptone 0.5g, $MgSO_4$ 0.05g, KH_2PO_4 0.46g, K_2HPO_4 1.0g, Thiamine-HCl 120 μ g, agar 20g/D.W. 1ℓ 로 조성한 후, 11종류의 탄소영양원을 0.1M/ℓ 로 첨가하여 배지를 제조하였다. 각 배지에 뽕나무버섯 16 균주와 민긴뿌리버섯 9 균주의 균사절편(직경 6mm mycelial disc) 각각을 접종한 후, 25℃에서 뽕나무버섯 균주는 20일, 민긴뿌리버섯은 10일 동안 암배양하여 각각의 균사생장을 측정하였다.

라) 질소영양원

탄소원 선발 실험과 같은 기본 배지에 2% glucose와 16 종류의 0.02 M 농도의 nitrogen source를 첨가하고 균사절편(직경 6mm mycelial disk)의 각각을 접종한 후 25℃에서 각각 20일과 10일 동안 암배양 한 후 각각의 균사생장을 측정하였다.

마) 최적 질소원과 탄소원의 비율(C/N ratio)

다)항 및 라)항과 동일한 기본 배지에 탄소원으로서 glucose를 1, 2, 3, 4% (w/v)의 비율로 각각 첨가하고, glucose에 대한 질소원인 $NaNO_3$ 의 비율을 10:1, 20:1, 30:1, 40:1로 조절하였다. 각각의 배지에 균사절편(직경 6mm mycelial disc)를 접종한 후, 25℃에서 각각 20일과 10일 동안 암배양 한 후 각각의 균사생장을 측정하였다.

2) 공시균의 균사생장을 위한 최적 고체 및 액체배지의 선발

가) 고체배지의 선발

고체배지에서 균사 생장에 적합한 배지를 선별하기 위해 기존에 사용하고 있는 총 11 종류의 배지(Table 1-2)를 이용하였으며, 배지의 pH는 6.0으로 조정하였다. 각각 PDA에서 20일 배양한 뽕나무버섯 균주와 10일 배양한 민긴뿌리버섯 균주를 직경 6mm의 cork borer로 떼어낸 각 균사체의 절편(mycelial disc)을 11종류의 배지에 접종하여 25℃에서 뽕나무버섯 균주는 20일, 민긴뿌리버섯은 10일 동안 암배양하여 균사의 생장과 밀도를 측정하였다.

Table 1-2. Composition of 11 media for the mycelial growth of *Armillaria mellea* and *Oudemansiella radicata*

	Czapek Dox	Ebiose	Hamada	Hennerberg	Glucose Peptone	Glucose triptone	Lilly	Mushroom complete	PDA	PD(M)	YM
Asparagine							2				
Dextrose			10						20	20	10
Ebiose		5	5								
Hyponex			3								
Glucose				50	10	5					
Malt extract					15			20		5	3
Maltose							10				
Peptone					10			2			5
Potato									200	200	
Sucrose	30										
Triptone						10					
Yeast extract			3		10	3		2			3
NaNO ₃	3			2							
K ₂ HPO ₄	1							1			
MgSO ₄	0.5			0.5			0.5	0.5			
KCl	0.5										
FeSO ₄	0.01										
CaCl ₂				0.1							
KH ₂ PO ₄				1			1	0.5			
KNO ₃				2							

나) 액체배지의 선발

(1) 뽕나무버섯

뽕나무버섯의 경우, 고체배지에서 비교적 균사 생장이 우수했던 Hamada, Glucose peptone, Mushroom complete, PDA, YM 등 5종류의 배지를 1차 선발하고 또한 이들 배지 성분 중 뽕나무버섯의 균사생장을 촉진시키는 영양원인 Potato extract, Dextrose, Malt sprout이 함유된 PDMS(Potato Dextrose Malt Sprout; Potato 200g, Dextrose 20g, Malt Sprout 50g) 배지를 추가로 조성하여 총 6종류의 배지를 액체배지로 제조하여 실험에 사용하였다. 버섯의 균사체 생산에 이용되는 액체배지 50ml에 PDA에서 20일 배양한 뽕나무버섯 16균주와 민긴뿌리버섯 9균주의 균사체(6mm의 직경) 5개씩을 액체배지에 접종하고 25℃에서 20일 동안 진탕배양(150 rpm)한 후 수거하여 건조 균체량을 측정하였다.

(2) 민긴뿌리버섯

민긴뿌리버섯은 뽕나무버섯에 비해 고체배지에서 균사의 생장이 왕성하고 성장속도도 빠르기 때문에 기존의 고체배지 실험에서 사용한 배지 중 균사생장이 양호했던 6개의 배지를 액체배지로 선발하여 실험에 사용하였다. 액체배지 실험에는 Hamada, Glucose peptone, PD(M), YM, Mushroom complete와 Lilly 등 6종류의 배지가 사용되었다. 선발된 각각의 6종류 배지 50ml당 각각 PDA에서 10일 배양한 6mm 직경의 균사체(mycelial disc) 5개씩을 접종하여 25℃에서 10일 동안 배양한 후 수거하여 건조 균체량을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 공시균의 최적 균사배양을 위한 배양조건의 규명

1) 공시균의 최적 배양을 위한 환경조건 및 영양원의 조사

가) 최적 온도 및 pH의 조건

뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 균사생장에 최적 온도는 25℃인 것으로 밝혀졌다.(Fig. 1-1 및 Fig. 1-2). 또한, 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 최적 균사생장은 약산성의 범위를 나타내는 pH6에서 균사가 양호한 성장을 나타내는 것으로 밝혀졌다(Fig. 1-3 및 Fig. 1-4). 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 균사생장은 각각 25℃와 pH6을 정점으로 온도와 pH의 범위가 높아질수록 균사의 생장은 점차 감소하는 경향을 보였다.

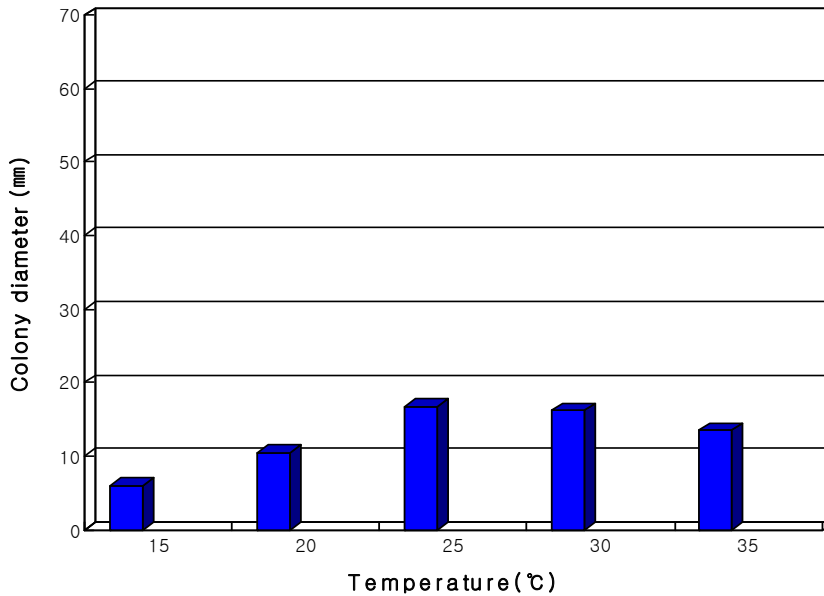


Fig. 1-1. Mycelial growth of 16 strains of *Armillaria mellea* on PDA in different temperatures after 20 days of incubation

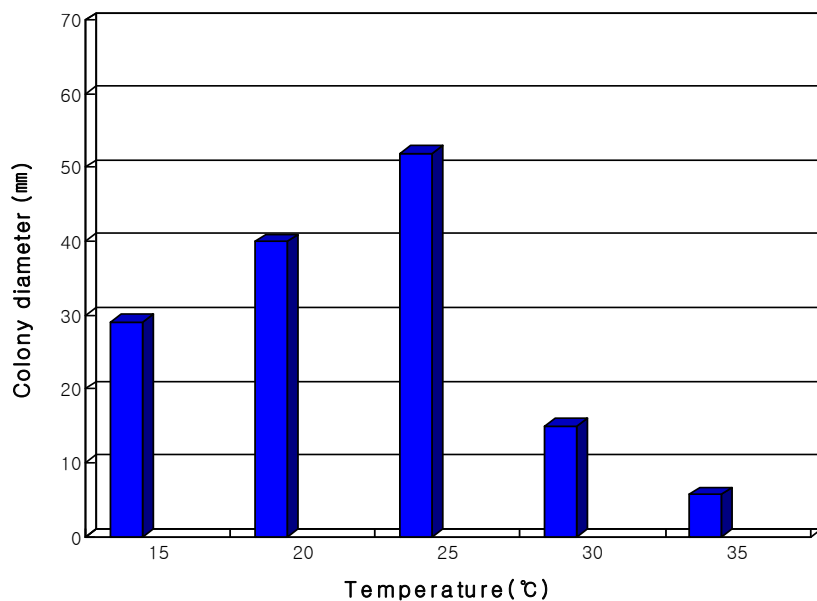


Fig. 1-2. Mycelial growth of 9 strains of *Oudemansiella radicata* on PDA in different temperatures after 10 days of incubation

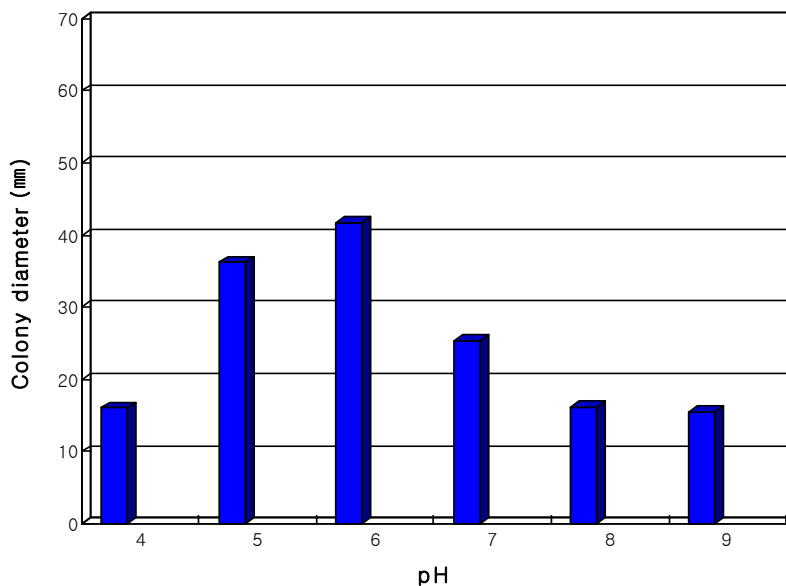


Fig. 1-3. Mycelial growth of 16 strains of *Armillaria mellea* on PDA in different pHs after 20 days of incubation at 25°C

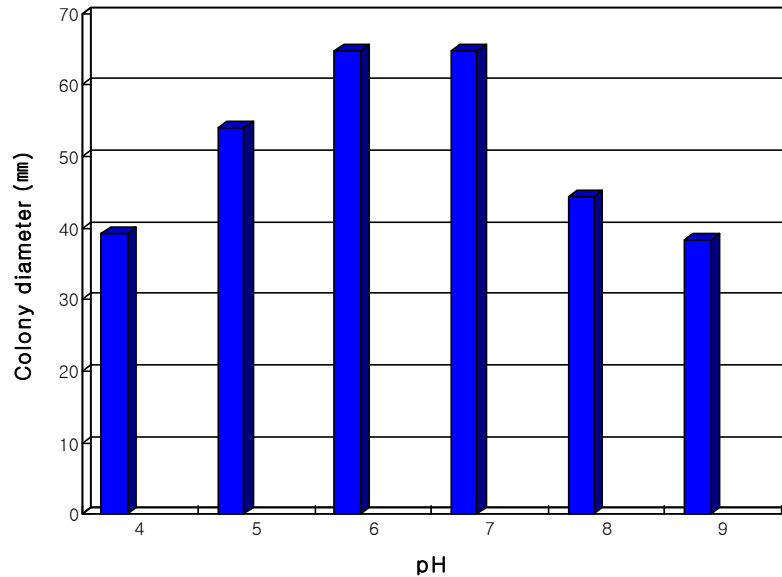


Fig. 1-4. Mycelial growth of 9 strains of *Oudemansiella radicata* on PDA in different pHs after 10 days of incubation at 25°C

나) 최적 영양원의 조사

(1) 탄소영양원의 효과

균사생장을 위한 최적의 탄소원은 뽕나무버섯의 경우 lactose가 첨가된 배지에서 균사의 생장이 가장 양호한 반면, 민긴뿌리버섯의 균사는 xylose가 첨가된 배지에서 각각 양호한 생장을 나타내었다(Table 1-3 및 Table 1-4). 균사의 밀도는 뽕나무버섯의 경우 11종의 탄소원이 각각 첨가된 모든 기본배지에서 조밀한 생장을 나타낸 반면, 민긴뿌리버섯은 xylose, dextrin 및 ribose가 첨가된 배지에서만 다소 조밀한 특징을 나타내었는데, 3종의 탄소원에서 균사의 성장 효과는 xylose에서 약간 높았으나 큰 차이는 없는 것으로 관찰되었다.

Table 1-3. Mycelial growth of *Armillaria mellea* on 11 different carbon sources^a

Carbon source ^b	Colony diameter(mm) ^c	Mycelial density ^d
Dextrin	42.83	C
Fructose	43.99	C
Galactose	39.48	C
Glucose	44.27	C
Lactose	46.76	C
Maltose	43.83	C
Mannitol	41.96	C
Mannose	46.00	C
Ribose	25.98	C
Sucrose	43.49	C
Xylose	29.24	C

^aThe basal medium is composed of peptone 5g, MgSO₄ 0.05 g, KH₂PO₄ 0.46 g, K₂HPO₄ 1.0 g, Thiamine-HCl 120 μ g, agar 20 g and D.W. 1000 ml.

^bEach carbon source was added to the basal media at the concentration of 0.1M.

^cThe colony diameter was a mean of 16 strains of *A. mellea* and measured after 20 days of incubation at 25°C.

^dMycelial density: C; Compact, SC; Somewhat compact, ST; Somewhat thin, T; Thin

Table 1-4. Mycelial growth of *Oudemansiella radicata* on 11 different carbon sources^a

Carbon source ^b	Colony diameter(mm) ^c	Mycelial density ^d
Dextrin	63.48	SC
Fructose	53.53	ST
Galactose	61.24	T
Glucose	58.69	ST
Lactose	46.18	T
Maltose	58.89	T
Mannitol	53.06	T
Mannose	56.80	T
Ribose	62.09	SC
Sucrose	54.73	T
Xylose	64.70	SC

^aThe basal medium is composed of peptone 5g, MgSO₄ 0.05 g, KH₂PO₄ 0.46 g, K₂HPO₄ 1.0 g, Thiamine-HCl 120μg, agar 20 g and D.W. 1000 ml.

^bEach carbon source was added to the basal media at the concentration of 0.1M.

^cThe colony diameter was a mean of 9 strains of *O. radicata* and measured after 10 days of incubation at 25°C.

^dMycelial density: C; Compact, SC; Somewhat compact, ST; Somewhat thin, T; Thin

(2) 질소영양원의 효과

균사생장을 위한 최적의 질소영양원의 선발은 뽕나무버섯은 arginine을 첨가한 배지에서 양호한 균사생장과 밀도를 나타낸 반면(Table 1-5), 민긴뿌리버섯은 alanine을 첨가한 배지에서 양호한 균사생장과 밀도를 나타내는 것으로 밝혀졌다(Table 1-6). 특히 뽕나무버섯의 경우에는, ammonium oxalate를 첨가한 배지에서 균사의 밀도는 매우 조밀하였으나 균사의 생장은 6.12mm로 매우 저조하게 나타났다.

Table 1-5. Mycelial growth of *Armillaria mellea* on 16 different nitrogen sources^a

Nitrogen source ^b	Colony diameter(mm) ^c	Mycelial density ^d
Alanine	35.28	C
Ammonium acetate	24.93	SC
Ammonium oxalate	6.12	C
Ammonium phosphate	25.74	C
Arginine	39.20	C
Asparagine	31.58	SC
Glutamic acid	33.27	C
Glutamine	31.23	SC
Glycine	33.49	C
Histidine	27.63	SC
Methionine	29.34	SC
Phenylalanine	37.25	SC
Potassium nitrate	22.32	ST
Sodium nitrate	25.59	T
Valine	22.43	ST
Urea	27.47	C

^aThe basal medium was composed of glucose 20g, MgSO₄ 0.05 g, KH₂PO₄ 0.46 g, K₂HPO₄ 1.0 g, Thiamine-HCl 120µg, agar 20 g and D.W. 1000 ml.

^bEach nitrogen source was added to the basal media at the concentration of 0.1M.

^cThe colony diameter was a mean of 16 strains of *A. mellea* and measured after 20 days of incubation at 25°C.

^dMycelial density: C; Compact, SC; Somewhat compact, ST; Somewhat thin, T; Thin

Table 1-6. Mycelial growth of *Oudemansiella radicata* on 16 different nitrogen sources^a

Nitrogen source ^b	Colony diameter(mm) ^c	Mycelial density ^d
Alanine	66.06	C
Ammonium acetate	64.75	C
Ammonium oxalate	53.36	SC
Ammonium phosphate	61.10	SC
Arginine	51.76	SC
Asparagine	60.97	T
Glutamic acid	45.60	SC
Glutamine	50.29	ST
Glycine	52.26	SC
Histidine	27.23	T
Methionine	61.12	ST
Phenylalanine	58.76	SC
Potassium nitrate	48.62	T
Sodium nitrate	37.23	T
Valine	31.20	ST
Urea	45.90	ST

^aThe basal medium is composed of glucose 20g, MgSO₄ 0.05 g, KH₂PO₄ 0.46 g, K₂HPO₄ 1.0 g, Thiamine-HCl 120µg, agar 20 g and D.W. 1000 ml.

^bEach nitrogen source was added to the basal media at the concentration of 0.1M.

^cThe colony diameter was a mean of 9 strains of *O. radicata* and measured after 10 days of incubation at 25°C.

^dMycelial density: C; Compact, SC; Somewhat compact, ST; Somewhat thin, T; Thin

(3) 최적 탄소원과 질소원의 첨가비율(C/N ratio)의 효과

뽕나무버섯의 경우, glucose를 2% 첨가한 후 질소원을 첨가하여 탄소원과 질소원의 최종 첨가비율을 30:1(C/N)로 조정한 배지에서 균사의 생장이 가장 양호한 반면(Table 1-7), 민긴뿌리버섯은 탄소원으로 glucose를 3% 정도 첨가한 후 탄소원과 질소원의 최종 첨가비율을 20:1(C/N)로 조정한 처리군에서 균사생장이 최적인 것을 확인되었다(Table 1-8).

Table 1-7. Mycelial growth of *Armillaria mellea* on various C/N ratios in the basal medium^a

C/N ratio ^b	Colony diameter(mm) ^c on 4 different D-glucose concentrations (%)			
	1	2	3	4
10:1	36.06	39.44	33.85	30.34
20:1	37.72	40.34	34.76	34.64
30:1	38.48	45.49	33.37	38.45
40:1	40.90	39.35	34.33	28.22

^aThe basal medium is composed of MgSO₄ 0.05 g, KH₂PO₄ 0.46 g, K₂HPO₄ 1.0 g, Thiamine-HCl 120 µg, agar 20 g and D.W. 1000 ml.

^bThe colony diameter was a mean of 16 different strains of *A. mellea* and measured after 20 days of incubation at 25°C.

^cThe ratios of NaNO₃ versus D-glucose were adjusted to the rate of 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, respectively.

Table 1-8. Mycelial growth of *Oudemansiella radicata* on various C/N ratios in the basal medium^a

C/N ratio ^b	Colony diameter(mm) ^c on 4 different D-glucose concentrations (%)			
	1	2	3	4
10:1	52.98	54.76	43.57	45.30
20:1	54.16	53.01	55.74	50.40
30:1	49.88	51.81	54.21	48.58
40:1	49.89	49.36	47.29	45.60

^aThe basal medium is composed of MgSO₄ 0.05 g, KH₂PO₄ 0.46 g, K₂HPO₄ 1.0 g, Thiamine-HCl 120 μg, agar 20 g and D.W. 1000 ml.

^bThe colony diameter was a mean of 9 different strains of *O. radicata* and measured after 10 days of incubation at 25°C.

^cThe ratios of NaNO₃ versus D-glucose were adjusted to the rate of 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, respectively.

나. 공시균의 균사생장을 위한 최적 고체 및 액체배지의 선발

1) 고체배지의 선발

뽕나무버섯의 경우 균사의 생장과 밀도는 Hamada배지에서 가장 효과적이었던 반면(Table 1-9), 민긴뿌리버섯은 Glucose peptone 배지에서 가장 빠른 69mm의 생장과 조밀한 균사의 생장을 나타냄으로써 양호한 결과를 얻을 수 있었다(Table 1-10, Fig. 1-5~1-8). 특히 민긴뿌리버섯의 경우 Hamada 및 PD(M)배지에서도 균사의 생장이 각각 68.67mm와 68.39mm를 나타내고 균사의 밀도도 조밀하였는데, 이는 균사를 양호하게 성장시키기 위해서는 Hamada 및 PD(M)배지는 물론 Glucose peptone배지도 함께 사용할 수 있다는 것을 보여준 나타낸 것으로 사료된다(Fig. 1-9~20).

Table 1-9. Mycelial growth of *Armillaria mellea* on 11 different solid media

Culture medium	Colony diameter(mm) ^a	Mycelial density ^b
Czapek dox	16.01	ST
Ebiose	23.32	C
Hamada	57.46	C
Hennerberg	15.97	ST
Glucose peptone	21.41	C
Glucose triptone	21.16	C
Lilly	17.71	C
Mushroom complete	23.23	C
PDA	45.03	C
PD(M)	34.90	C
YM	25.19	C

^aThe colony diameter was a mean of 16 strains of *A. mellea* and measured after 20 days of incubation at 25°C.

^bMycelial density: C; Compact, SC; Somewhat compact, ST; Somewhat thin, T; Thin

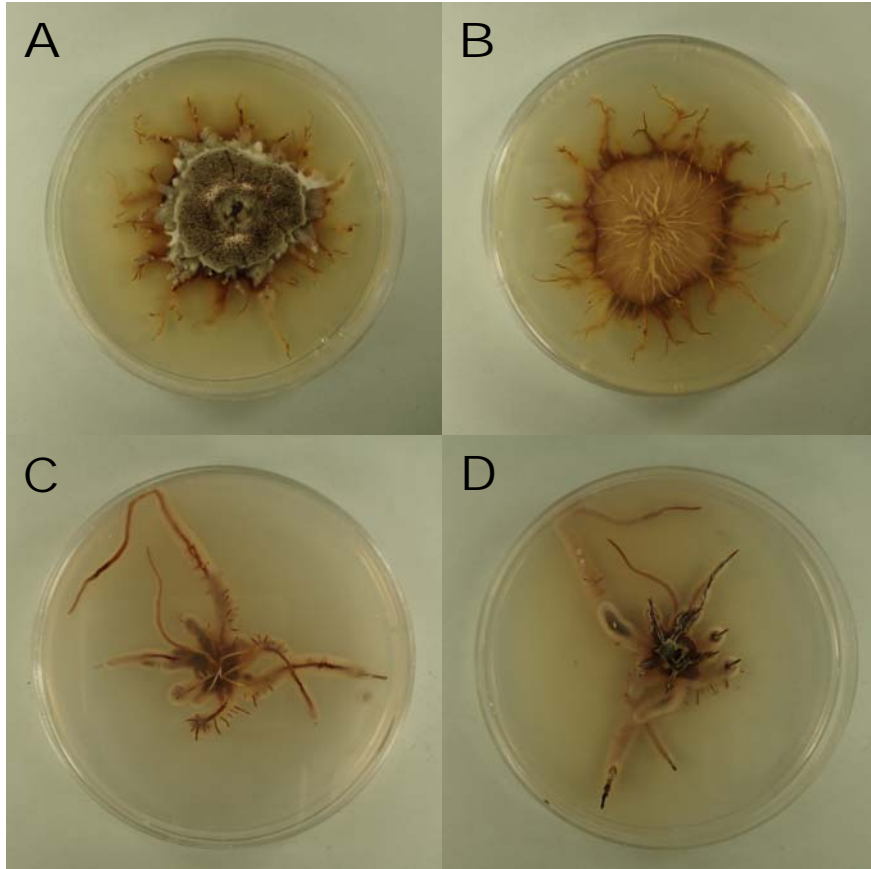


Fig. 1-5. Colony morphology of *Armillaria mellea* isolates on PDA at 25°C for 20 days.

A; IUM 791, upward, B; IUM 791, downward

C; IUM 949, upward, D; IUM 949, downward

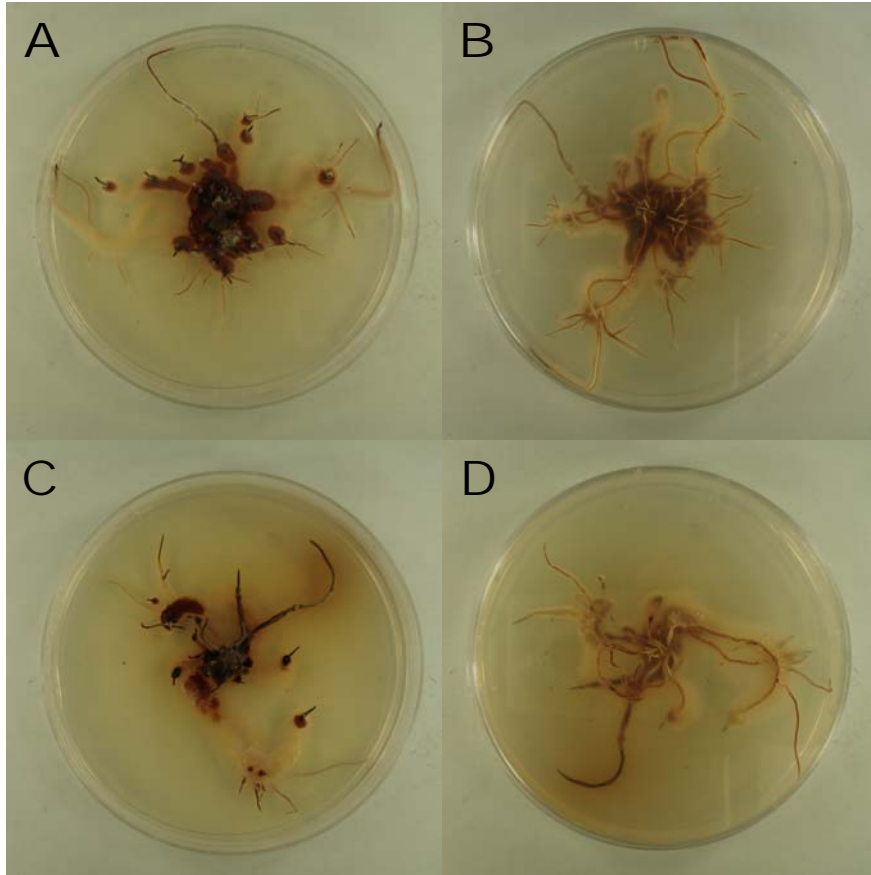


Fig. 1-6. Colony morphology of *Armillaria mellea* isolates on PDA at 25°C for 20 days.

A; IUM 535, upward, B; IUM 535, downward

C; 184, upward, D; 184, downward

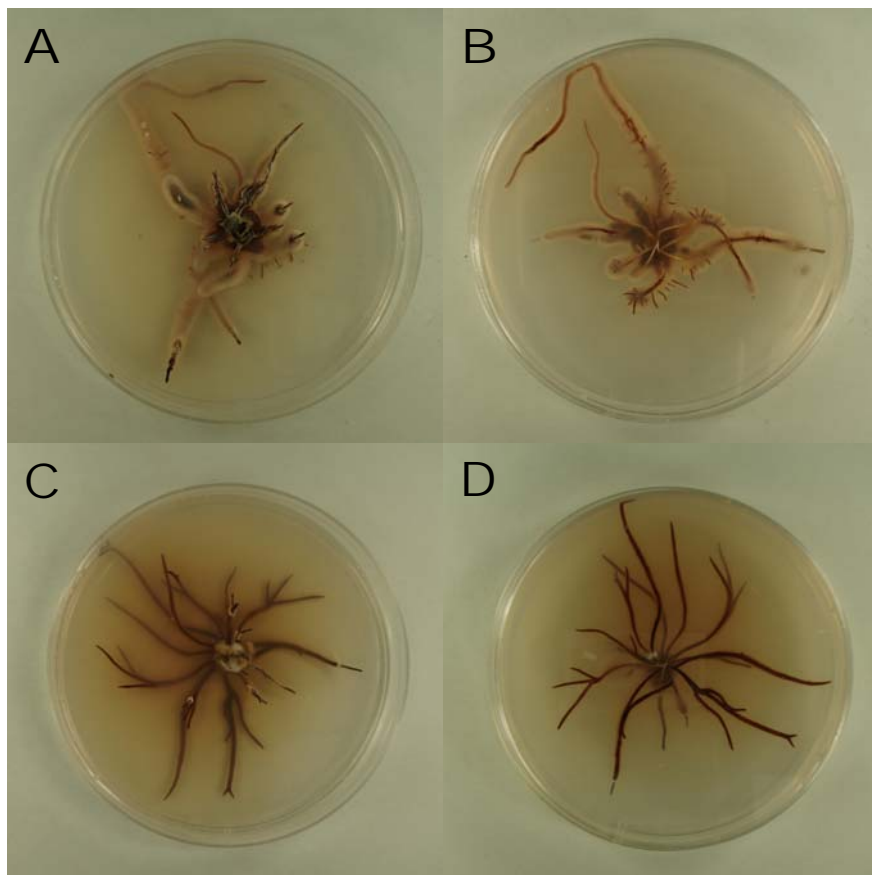


Fig. 1-7. Colony morphology of *Armillaria mellea* isolates on PDA at 25°C for 20 days.

A; 185, upward, B; 185, downward

C; 186, upward, D; 186, downward

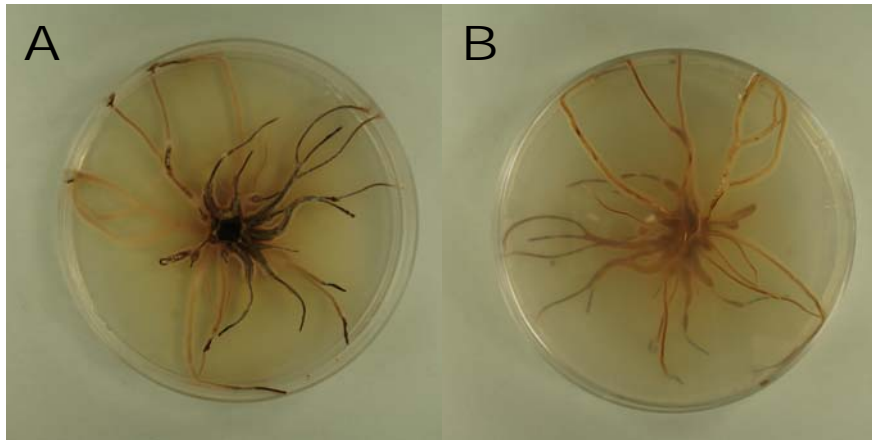


Fig. 1-8. Colony morphology of *Armillaria mellea* isolates on PDA at 25°C for 20 days.

A; 741, upward, B; 741, downward

Table 1-10. Mycelial growth of *Oudemansiella radicata* on 11 different solid media

Culture medium	Colony diameter(mm) ^a	Mycelial density ^b
Czapek dox	56.67	T
Ebiose	43.16	T
Hamada	68.67	C
Hennerberg	37.17	T
Glucose peptone	69.00	C
Glucose triptone	52.57	ST
Lilly	68.43	ST
Mushroom complete	60.51	SC
PDA	50.88	SC
PD(M)	68.39	C
YM	62.44	SC

^aThe colony diameter was a mean of 9 strains of *O. radicata* and measured after 10 days of incubation at 25°C.

^bMycelial density: C; Compact, SC; Somewhat compact, ST; Somewhat thin, T; Thin

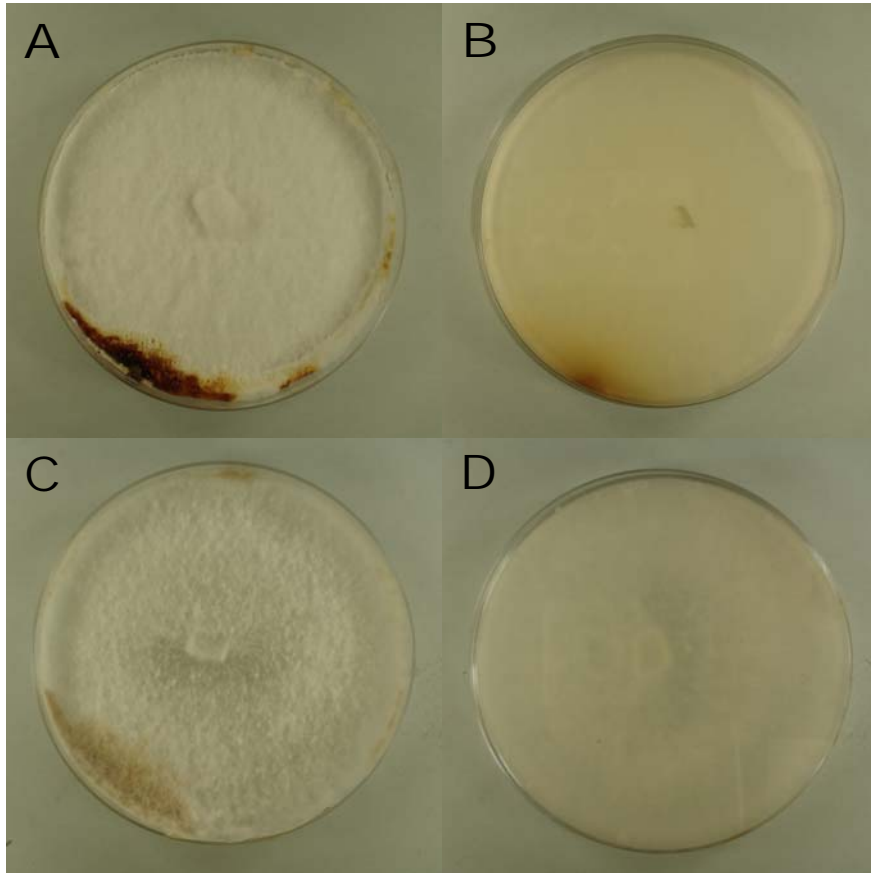


Fig. 1-9. Colony morphology of *Oudemansiella radicata* isolates on PDA at 25°C for 20 days.

A; IUM 762, upward, B; IUM 762, downward

C; IUM 767, upward, D; IUM 767, downward

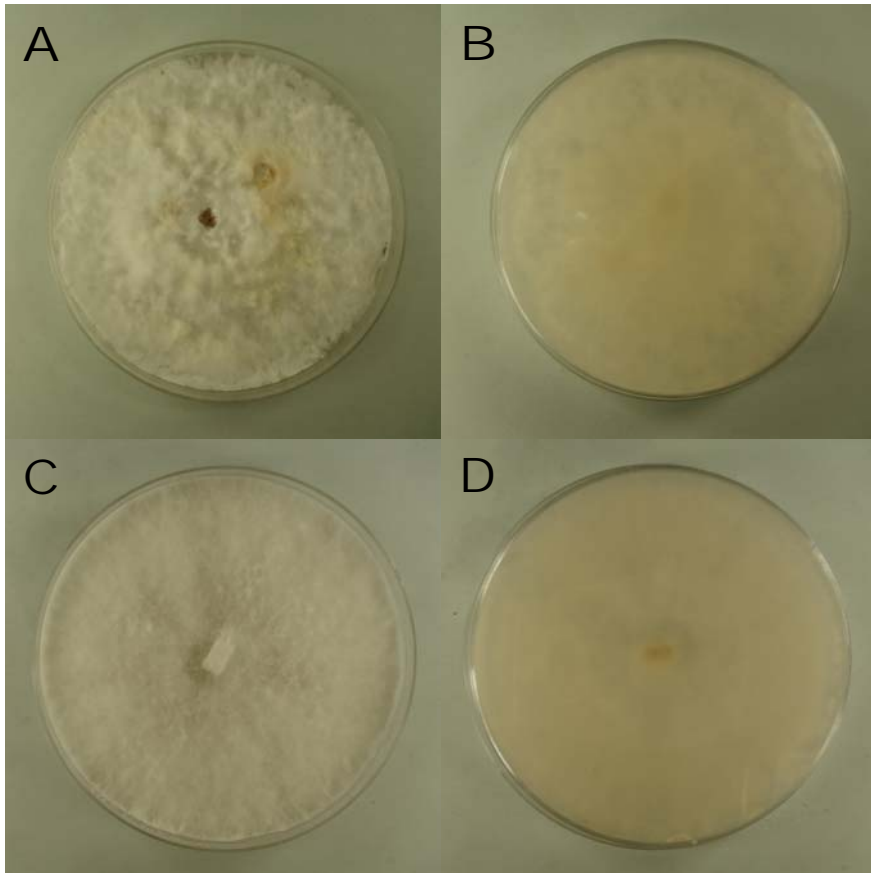


Fig. 1-10. Colony morphology of *Oudemansiella radicata* isolates on PDA at 25°C for 20 days.

A; IUM 781, upward, B; IUM 781, downward

C; IUM 766, upward, D; IUM 766, downward

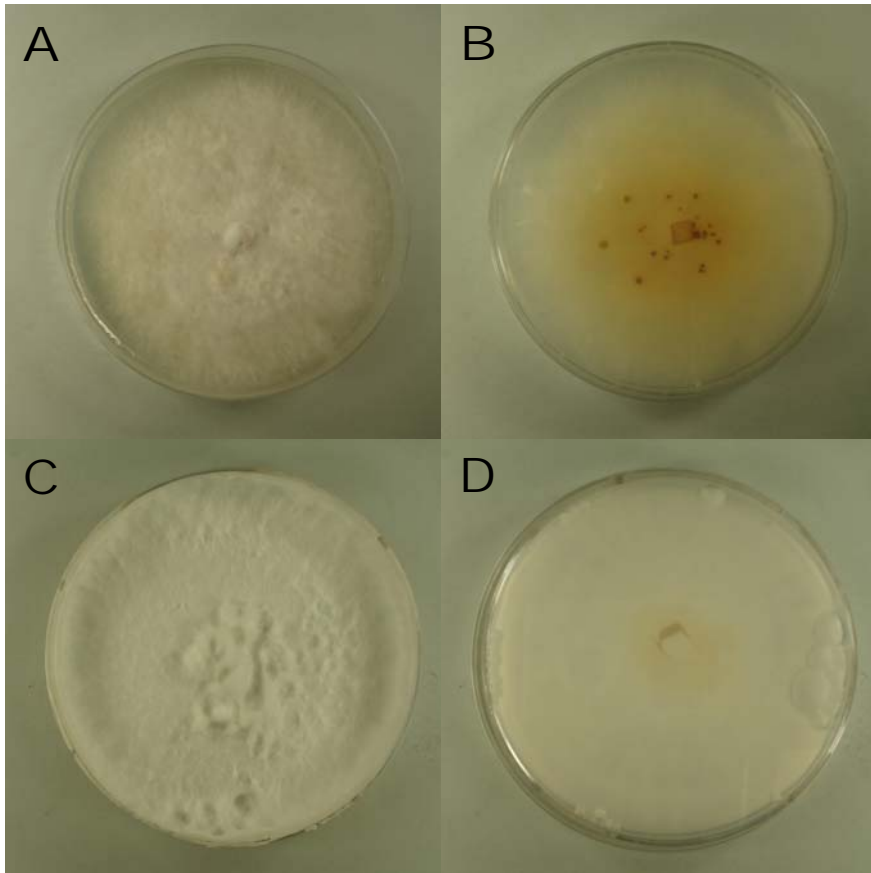


Fig. 1-11. Colony morphology of *Oudemansiella radicata* isolates on PDA at 25°C for 20 days.

A; IUM 779, upward, B; IUM 779, downward

C; IUM 780, upward, D; IUM 780, downward

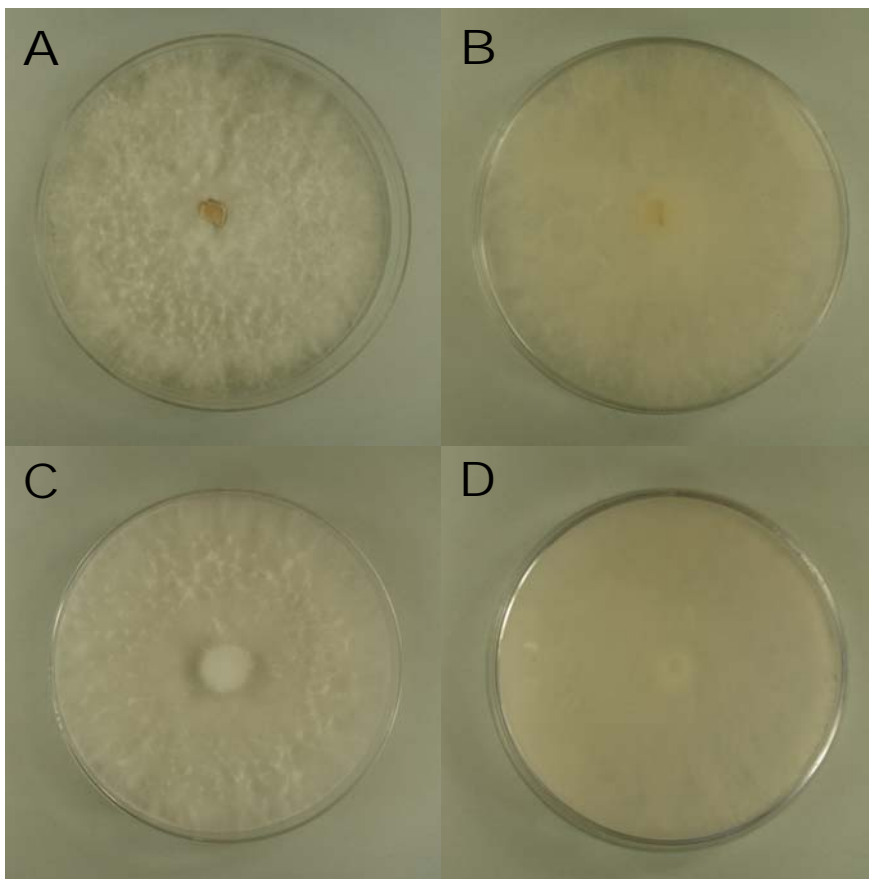


Fig. 1-12. Colony morphology of *Oudemansiella radicata* isolates on PDA at 25°C for 20 days.

A; IUM 770, upward, B; IUM 770, downward
C; IUM 1259, upward, D; IUM 1259, downward

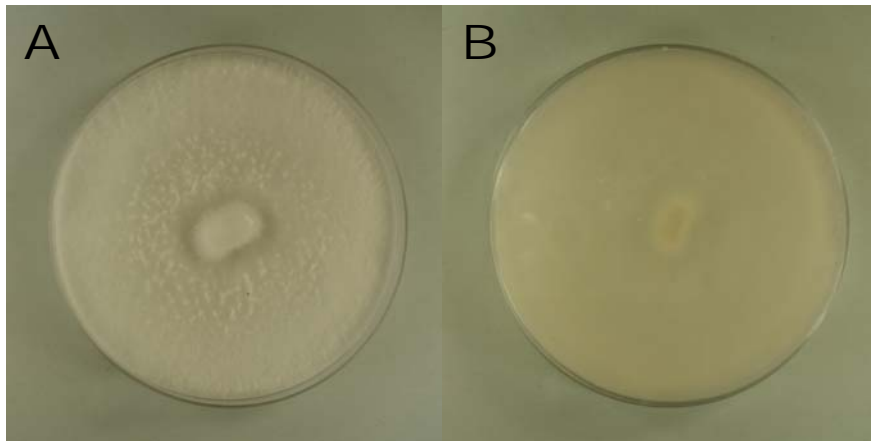


Fig. 1-13. Colony morphology of *Oudemansiella radicata* isolates on PDA at 25°C for 20 days.
A; IUM 1260, upward, B; IUM 1260, downward

2) 액체배지의 선발

가) 뽕나무버섯

뽕나무버섯의 균체량을 조사한 결과, 균사체 생장은 PDMS(감자맥아즙 배지)에서 가장 양호하였고 그 다음으로는 Hamada, PDA, YM(Yeast malt), MCM(Mushroom complete), Lilly 순이었다(Table 1-11). 본 실험결과 PD(Potato Dextrose)에 맥아(Malt Sprout)가 첨가된 PDMS(Potato Dextrose Malt Sprout)액체배지가 뽕나무 버섯의 균사생장에 가장 좋은 결과를 나타낸 것은 맥아즙 배지의 주성분에는 전분, 맥아당 및 단백질과 Mg, P, K 등의 여러 종류의 무기질, Vitamin B₁, B₂, C, E 등의 성분이 배지에 풍부하게 함유되어 있기 때문에 이 배지에서 뽕나무버섯의 균사체 생장이 우수했던 것으로 사료된다. 따라서 PDGM 액체배지에서 배양한 뽕나무버섯 균주를 톱밥배지에 접종하여 인공자실체를 형성하는 실험에 사용할 경우 효과가 높을 것으로 판단된다.

Table 1-11. Mycelial growth of *Armillaria mellea* on 6 different liquid media

Culture medium	Dry weight (g) ^a
Hamada	2.32
Glucose peptone	1.36
Mushroom complete	0.93
PDB	2.04
YM	1.43
PDMS	2.40

^aThe dry weight was a mean of 16 strains of *A. mellea* and measured after 20 days of incubation in 50ml of each medium at 25°C.

가) 민긴뿌리버섯

민긴뿌리버섯의 경우, 균사체 생장은 감자 포도당 맥아 배지(Potato Dextrose Malt extract, PDM) 배지에서 가장 양호하였고 그 다음으로는 Glucose peptone, Lilly, Hamada, YM, Mushroom complete 순이었다(Table 1-12). 고체배지 성장실험에서 균사가 가장 빠르게 성장했던 Glucose peptone 배지는 액체배지의 선발을 위해 공시한 6종류의 배지 중에서도 균사의 건조 균체량이 PD(M)배지의 다음으로 높게 나타났는데, 그러한 결과는 *O. radicata* 균주가 Glucose peptone의 고체배지나 액체배지를 효율적으로 이용하고 있어서 좋은 균사체 성장을 나타낸 것으로 보여진다.

Table 1-12. Mycelial growth of *Oudemansiella radicata* on 6 different liquid media

Culture medium	Dry weight (g) ^a
Hamada	3.34
Glucose peptone	3.41
Lilly	3.39
PDM	3.43
YM	3.01
Mushroom complete	2.83

^aThe dry weight was a mean of 9 strains of *O. radicata* and measured after 10 days of incubation in 50ml of each medium at 25°C.

4. 참고문헌

- Kim, M. K., Choi, H. S., Park, H. S. and Kim, S. J. 2003. Optical condition for mycelial production of *Armillaria mellea*. *Kor. J. Mycol.* **31**(3): 187-191.
- 전창성, 김광포, 신철우. 2000. 느타리버섯 종균의 미강함량이 재배에 미치는 영향. *한국균학회지* **28**(1): 1-3.
- 조우식, 류영현, 김창배, 최성국. 2002. 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)의 톱밥재배 기술에 관한 연구. *한국균학회지* **30**(2): 109-112.
- 이대진, 김광포, 이병의. 2003. 큰느타리(*Pleurotus eryngii*)의 인공재배에 관한 연구. *한국균학회지* **31**(3): 192-199.
- Obuchi, T., Kondoh, H., Watanabe, N., Tamai, M., Omura, S., Yang, J. S. and Liang, X. Armillaric acid, a new antibiotic produced by *Armillaria mellea*. *Planta Medica* **56**: 198-201.
- Shim, J. O., Son, S. G., Kim, Y. H., Lee, J. Y., Lee, T. S. and lee, M. W. 1997. The Cultural Conditions Affecting the Mycelial Growth of *Grifola umbellata*. *Kor. J. Mycol.* **25**(3): 209-218.
- Togashi, I. 1996. Effects of substrates and seeding method on fruiting body production in the bottle cultivation of *Armillaria* species. *Jpn. J. For. Produc.* **42**(2): 186-193.
- Zhang, W. J. and Li, B. F. 1980. Biological relationship of *Gastrodia elata* and *Armillaria mellea*. *Acta. Botanica. Sinica.* **22**: 57-62.
- 衣川 堅二郎, 小川 眞. 2000.きのこハンドブック. 朝倉書店. p., 448.
- 郭順星, 徐錦堂. 1992. 蜜環菌索發育的研究. 中國 真菌 學報. **11**(4): 308-313.

- 劉波. 1978. 中國 藥用真菌. 中國 山西省 人民出版社. 1-302.
- 水野 卓, 川合正允. 1992. キノコの化學・生化學, 學會出版センター. p., 13.
- 黃年來. 1997. 中國 食用菌 百科. 中國 農業 出版社. p., 125.
- 김진숙, 최응칠, 김혜령, 이종길, 이정옥, 정경수, 심미자, 김병각. 한국산 고등
균류의 성분연구-뽕나무버섯의 항암성분. 한국균학회지 **11(4)**: 151-157.
- 김현중, 고민규, 이창근, 성재모. 1992. 뽕나무버섯의 인공재배. 한국균학회지
20(3): 273-276.
- 김명곤, 최한석, 박효숙, 김성준. 2003. 뽕나무버섯(*Armillaria mellea*)균사체
생산의 최적화. 한국균학회지 **31(3)**: 187-191.
- 고민규. 1994. *Armillaria*속균과 *Gastrodia elata* Blume와의 공생에 관한 조
직학적 연구. 동국대 박사학위 논문. p., 96.
- 성재모, 차주영, 김양섭. 1989. 잣나무뿌리썩음병에 관여하는 *Armillaria*균의
분리동정과 배양적 특성.
- 안덕균. 1992. 한국산 약용균류. 한국균학회지 **20(2)**: 154-166.
- 이지열. 1988. 한국의 버섯도감. 아카데미 출판사. p., 97.
- 태중, 홍문화. 1992. 식품사전. 생활한방연구소, 서울. p., 462.
- 장현유. 1999. 뽕나무버섯균을 이용한 천마의 재배기술. 약용버섯재배 신기술
개발(한국균학회 출판). p., 116-140.
- 환경부. 1990. 자연생태계 전국조사. 환경부. 1-246.
- 홍재식, 김명곤, 소규호, 김영희. 1990. *Armillaria mellea*의 균사배양 및 균사
속 생산에 관한 연구. 한국균학회지 **18(3)**: 149-157.
- 홍재식, 김명곤, 이재홍, 김형무. 1990. 알코올 및 휘발성 유기산류가 뽕나무
버섯의 균사속 생산에 미치는 연구. 한국균학회지 **18(3)**: 158-163.

이민웅, 이상선, 이태수, 이윤수, 심재욱, 손서규, 오창호. 2000. 유용 버섯자원의 발굴과 대량 재배기술 개발. 농림부 연구보고서. 1-227.

제 2 절 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 인공재배기술 개발

1. 서 론

뽕나무버섯(*A. mellea*)은 균사속(rhizomorph)을 형성하고 침엽수 및 활엽수에 기생하여 수목의 뿌리썩음병을 유발하는 목재부후균으로 우리나라의 잣나무, 참나무 및 낙엽송에서 흔히 발견되고 있다(Sung 등, 1989). 또한, 뽕나무버섯균은 난과식물인 천마(*Gastrodia elata*)와 약용버섯으로 각광을 받는 저령(*Grifola umbellata*)과도 공생하는 균이다. 특히, 뽕나무버섯(*A. mellea*)의 자실체에서 추출한 단백질다당류(protein-polysaccharide)는 항암 및 면역증강의 효과는 물론 고혈압과 중풍의 치료에도 탁월한 효과가 있다고 알려졌다(김 등, 1983).

민긴뿌리버섯(*O. radicata*)은 우리나라에 자생하는 송이과(Tricholomataceae)에 속하는 식용버섯으로서 활엽수의 부후조직이나 산림토양의 표면에서 주로 발견되며 그 자실체에 함유된 ouidenone성분이 인체의 혈압강화와 항암활성작용에 탁월한 효과가 있음이 입증되었다. 그동안 뽕나무버섯의 배양과 재배에 대한 연구(郭과 徐, 1986; Iwao and Namio, 1994, 1995; Namio, 1996)와 민긴뿌리버섯의 배양 및 재배에 관한 연구(Umezawa 등, 1973; Semerdzieva 등, 1988; Tsantrizos 등, 1999)는 주로 외국에서 활발히 진행되었으나, 우리나라에서 아직까지도 뽕나무버섯 자실체의 대량재배는 아직까지도 실현되지 못하고 있다. 또한, 우리나라의 설악산, 지리산 및 속리산 등의 깊은 산 속에서 가끔 발견되는 민긴뿌리버섯에 대한 자실체 생산 및 임상실험에 대한 연구도 오늘날까지 전혀 수행되고 있지 않는 실정이다.

그러므로 우리는 세계의 시장에서 유망한 버섯자원으로서 점차 각광을 받고 있는 뿔나무버섯과 민긴뿌리버섯에 대한 인공재배법의 확립을 위한 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 사용된 균주

본 연구를 위하여 *A. mellea* IUM 949를 포함한 7종의 뿔나무버섯균과 *O. radicata* IUM 762를 포함한 9종의 민긴뿌리버섯균을 선발하여 연구에 사용하였다(Table 2-1).

Table 2-1. Strains of *Oudemansiella radicata* and *Armillaria mellea* used for sawdust culture

Scientific name	Geographical origins	Scientific name	Geographical origins
<i>O. radicata</i> IUM762	Korea	<i>O. radicata</i> IUM1260	China
<i>O. radicata</i> IUM767	Korea	<i>A. mellea</i> IUM791	Korea
<i>O. radicata</i> IUM781	Korea	<i>A. mellea</i> IUM949	Korea
<i>O. radicata</i> IUM766	Korea	<i>A. mellea</i> IUM535	Korea
<i>O. radicata</i> IUM779	Korea	<i>A. mellea</i> 184	Korea
<i>O. radicata</i> IUM780	Korea	<i>A. mellea</i> 185	Czech
<i>O. radicata</i> IUM770	Korea	<i>A. mellea</i> 186	Czech
<i>O. radicata</i> IUM1259	China	<i>A. mellea</i> 741	Czech

나. 공시균의 균사생장과 영양원과의 관계

1) 뽕나무버섯균(*A. mellea*)의 균사생장

가) 액체종균 접종원(liquid inoculum)의 제조

7종의 뽕나무버섯균 각각에 대한 액체접종원을 제조하기 위해 PDA평판배지로부터 떼어낸 각 균주의 균사절편(mycelial disc, 1.2cm)을 살균(121℃, 20분)된 100ml의 PDB(potato broth+malt extract, pH6)에 접종하고 회전배양기(150rpm/min.)에 처리하여 20일 이상 24±1℃의 온도로 배양한 후 다음 단계의 실험에 사용하였다.

나) 균사생장의 측정을 위한 톱밥배지의 제조

버섯재배를 위한 톱밥배지에 영양원으로 많이 사용되는 기질에는 미강이 있다. 본 실험에서는 미강기질을 첨가하여 *A. mellea*를 배양할 경우 *A. mellea*의 균사생장에 도움을 주어 궁극적으로 자실체 형성에도 기여할 수 있다고 판단되고 참나무 톱밥에 10%, 20% 및 30%의 비율(v/v)로 미강(rice bran)을 각각 첨가하고 수분함량을 70%로 조정하여 참나무톱밥배지를 제조하였다. 또한 대조구로 사용하기 위해 미강을 첨가하지 않은 순수한 참나무톱밥배지를 함께 제조하였다. 제조된 톱밥배지는 둥근 유리시험관(2×22cm)속에 일정량을 넣은 후 120℃의 온도로 90분 동안 고압살균을 한 다음, column test를 위한 톱밥배지로 사용하였다.

다) *A. mellea*의 배양 및 균사생장 측정

가)의 방법에 따라 액체종균 접종원(liquid inoculum)으로 제조된 7종의 *A. mellea*를 유리시험관(2×22cm)속의 톱밥배지 표면에 0.5ml 정도씩 접종하고 30일, 24±1℃의 온도에서 암배양하면서 *A. mellea* 균사의 생장을 7일 간격으로 측정하여 *A. mellea*의 균사생장을 위한 영양원의 적정혼합비율을 결정하였다.

2) 민긴뿌리버섯균(*O. radicata*)의 균사생장

가) 접종원의 배양

PDA평판배지에 9종의 *O. radicata* 각각을 접종하여 24±1℃의 온도로 7일정도 배양한 다음 톱밥배지의 균사생장 측정을 위한 접종용 균주로 사용하였다.

나) 톱밥배지의 제조

*O. radicata*의 균사생장에 도움을 주고 자실체 형성에 기여할 수 있는 톱밥배지 첨가영양원을 선별하기 위해 버섯의 톱밥배지에 영양원으로 흔히 첨가하는 미강(rice bran), 메주가루(fermented soybean powder) 및 밀기울(wheat bran)과 같은 영양원을 각각 참나무톱밥에 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 및 30%의 비율로 혼합·첨가하고 수분함량을 70%로 조정하여 톱밥배지를 제조하였으며, 대조구로 사용하기 위해 기질이 첨가되지 않은 순수한 톱밥만이 함유된 배지를 함께 제조하였다. 제조된 톱밥배지는 둥근 유리시험관(2×22cm) 속에 일정량을 넣은 후 120℃의 온도로 90분 동안 고압살균을 한 다음, column test를 위한 톱밥배지로 사용하였다.

다) *O. radicata*의 배양 및 균사생장 측정

PDA배지에서 7일 정도 배양된 *O. radicata* IUM 762 등을 포함한 9종의 민긴뿌리버섯균(*O. radicata*)을 이용하여 접종용 질편(disc, 0.5cm)을 제조한 후 둥근 유리시험관(2×22cm) 속에 든 각 톱밥의 표면에 접종한 다음, 30일, 24±1℃의 온도에서 암배양하면서 5일에 1회씩 균사의 생장을 측정하였다.

다. 톱밥배지에서 공시균의 자실체 생산

1) 뽕나무버섯균(*A. mellea*)의 자실체 생산

가) 액체종균 접종원(liquid inoculum)의 제조

9종의 *A. mellea*에 대한 액체종균 접종원의 제조는 나-1-가)항의 방법과 같은 방법으로 제조하여 사용하였다.

나) 당근 첨가제(*Daucus carota*; ground raw carrots)의 제조

자실체의 형성을 유도하기 위한 부수적인 첨가제로서 당근을 마쇄하여 사용하였다. 먼저 수돗물로 당근을 깨끗이 세척한 다음 Blender(Warning, U. S, A.)로 5분 정도 처리하여 마쇄를 시킨 후 각각의 톱밥배지(즉 참나무톱밥, 포플러톱밥 혹은 미송톱밥 70%+미강 30%)와 마쇄된 당근의 혼합물을 각각 1:1(v/v)의 비율로 조절하여 사용하였다.

다) *A. mellea*의 자실체 생산을 위한 톱밥배지의 제조

*A. mellea*의 자실체의 생산을 위해 우수한 톱밥기질을 선발하려는 목적에 따라 3종류의 톱밥배지 모두를 사용하여 톱밥배지에서 발생하는 원기 및 자실체의 생산을 비교하였다. *A. mellea*의 자실체의 생산을 위해 참나무톱밥배지(참나무톱밥 70%+미강 30%), 포플러톱밥배지(포플러톱밥 70%+미강 30%), 미송톱밥배지(미송톱밥 70%+미강 30%)의 각각에 수돗물을 가하여 70%의 수분함량을 갖도록 조정된 후, 각 배양병(700ml, 9×13cm)에 넣고 그 위에 당근첨가물, 즉 각각의 톱밥배지(즉 참나무톱밥, 포플러톱밥 혹은 미송톱밥 70%+미강 30%)와 마쇄된 당근이 각각 1:1(v/v)의 비율로 혼합된 당근첨가물을 3종류의 톱밥배지 각각의 표면에 1cm 정도의 두께로 피복시킨 다음, 그 톱밥배지의 중심부위로부터 아래쪽으로 접종구멍(직경 1.5cm×깊이 8cm)을 조성하였다. 그 후, 121℃에서 90분 동안 살균처리를 하여 각각의 톱밥배지를 제조하였다.

라) *A. mellea*의 접종과 자실체의 생산

(1) 액체종균 접종원(liquid inoculum)의 배지접종

나-1-가)항의 방법으로 PDB(potato broth+malt extract, pH6)용액에서 배양한 7종의 *A. mellea* 접종액(10ml)을 배양병(700ml, 9×13cm)속의 각각의 톱밥배지 표면에 골고루 접종한 다음, 25℃에서 30일 이상을 암배양하여 *A. mellea*의 균사가 톱밥배지의 표면부터 밑바닥까지 완전한 성장하도록 하였다.

(2) 원기(primordia)의 유도 및 자실체(fruiting bodies)의 생산

톱밥배지에서 *A. mellea* 균사가 완전히 성장(complete colonization)된 것이

확인되면 배지의 표면을 균꺾기 한 후 신선한 물로 3시간 정도 물대기를 하였다. 그 후, $15\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 온도,와 $90\pm 5\%$ 의 습도와 12시간의 광도(350 lux)가 유지되는 발이실로 옮겨서 원기의 발생을 유도하였다. 원기의 발생을 유도하는 동안 배지의 표면이 건조해 지지 않고 양호한 통풍을 조성하기 위해 배양병의 입구에 필터가 장착되지 않은 ST-cap을 씌우고 10일 이상 배양하면서 원기의 형성을 주기적으로 관찰하였다. 원기가 형성된 후에는 자실체의 신속한 생산을 촉진하기 위해 배양병에 부착한 ST-cap을 제거하였다.

2) 민긴뿌리버섯(*O. radicata*)의 자실체 생산

가) 톱밥종균의 제조

9종의 민긴뿌리버섯균의 톱밥종균을 제조하기 위해 참나무톱밥에 미강(rice bran)을 10% 비율(v/v)로 첨가하여 혼합한 후 삼각플라스크(100ml)에 넣고 121°C 의 온도로 90분간 살균하여 접종용 톱밥배지를 제조하였다. 10일 배양된 PDA평판배지로부터 떼어낸 9종의 민긴뿌리버섯 균사절편(mycelial disc, 1.2 cm)을 톱밥배지에 접종하고 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 온도로 10일 정도 암배양하여 접종용 톱밥종균을 제조하였다.

나) 미강(rice bran)을 첨가한 톱밥배지에서 *O. radicata*의 자실체 생산

톱밥배지에 미강(rice bran), 메주가루(fermented soybean powder) 및 밀기울(wheat bran)과 같은 영양원을 첨가하여 *O. radicata*의 균사생장을 측정하였던, 즉 나-2) 항의 균사생장실험을 통해 *O. radicata*의 균사생장에 도움을 주는 영양원으로 미강을 선발하였다. 그러므로 미강이 어느 정도의 비율로 톱밥

에 혼합될 경우 *O. radicata*의 자실체를 많이 생산할 수 있는지를 파악하기 위해 참나무톱밥에 미강을 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 및 30%의 비율로 처리 (v/v)하고 톱밥배지의 수분함량을 70% 정도로 조정한 후 배지의 표면에서 접종구멍(두께 1.5×깊이 8cm)을 만든 다음, 121℃의 온도로 90분 동안 살균하였다. 살균한 참나무톱밥배지(800ml)의 표면에 *O. radicata* IUM 762 등 9종의 종균(spawn) 각각을 20g씩 접종하였다.

그 후, 접종된 톱밥배지는 25℃의 온도를 유지하는 배양실로 옮긴 후 30일 정도 암배양하여 균사를 완전히 활착시킨 다음, 톱밥배지의 표면에서 원기(primordia)의 발생을 유도하기 위해 16~17℃의 온도와 85~95%의 습도를 갖는 환경조건으로 옮긴 후 배지의 상면을 살균한 부엽토와 배양토로 2~3cm 덮고 충분히 관수한 후, 1일에 12시간 정도의 광조건(350 lux)에 2일간 처리하였다. 그 후, 9종의 *O. radicata*는 22±1℃의 온도, 90±5%의 습도와 1일에 12시간의 광조건(350 lux)이 유지되는 발이실에 옮겨 배양하면서 원기 및 자실체의 형성을 관찰하였다.

다) *O. radicata*의 자실체 생산을 위한 톱밥기질의 선발

다른 식용버섯의 재배에도 많이 사용하는 기존의 톱밥, 즉 포플러톱밥(Cotton wood, *Populus deltoides*), 미송톱밥(Douglas fir, *Pseudotsuga mezesii*)에 미강을 10% 정도 첨가하여 혼합한 후 톱밥배지를 제조하고 9종의 *O. radicata* 각각을 다-2)-나)의 방법으로 접종·배양하였다. 그 후, 포플러 및 미송톱밥과 같은 2종의 톱밥에서 확인한 원기 및 자실체 형성의 결과는 동일한 방법으로 먼저 처리하였던 참나무톱밥(Oriental oak, *Quercus variabilis*)의 결과와 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 톱밥배지에서 공시균의 군사생장

1) 뽕나무버섯균(*A. mellea*)의 군사생장

톱밥배지에 영양원으로 미강을 첨가하여 *A. mellea*를 배양할 경우 *A. mellea*의 신속한 군사생장에 도움을 주며 그 군사생장을 통하여 궁극적으로 자실체 형성에도 기여할 수 있는 영양원의 적정혼합비율을 파악하기 위한 목적으로 참나무 톱밥에 10%-30%의 비율(v/v)로 미강(rice bran)을 첨가하여 참나무톱밥배지를 제조하였다. *A. mellea* IUM 791을 포함한 9종의 *A. mellea* 모두는 30%의 미강이 첨가된 참나무톱밥배지에서 군사가 비교적 활발하게 성장하였다(Fig. 2-1). 톱밥배지에 미강의 첨가비율이 증가함에 따라 군사의 생장이 증진되었으며 군사밀도도 점차 조밀한 경향을 나타내었다.



Fig. 2-1. Twenty days of mycelial growth and density of *A. mellea* in oak sawdust medium mixed with various ratios of rice bran at 25°C
A:0%, B:10%, C:20%, D:30%

2) 민긴뿌리버섯균(*O. radicata*)의 균사생장

미강(rice bran)을 첨가한 톱밥배지에서 *O. radicata* 균사의 생장과 균사밀도는 대체적으로 5-10%의 미강이 첨가된 배지에서 양호하였다(Table 2-2). 균사의 생장은 5%의 미강이 첨가된 배지에서 균사의 생장이 평균 19.6cm를 나타내어 미강이 첨가된 모든 처리구에서 가장 높았고, 또한 10%의 미강이 첨가된 배지의 평균 19.3cm보다도 높았다. 그러나 균사의 밀도는 5%의 미강이 첨가된 배지가 10%의 미강이 첨가된 배지에 비해 *O. radicata* IUM 781, IUM 779, IUM 780 및 IUM 1259에서 낮게 나타났다. 일반적으로 톱밥배지에 미강 영양원의 첨가비율이 증가함에 비례하여 균사의 생장은 점차 낮아지는 부의 상관관계를 보였다.

메주가루(fermented soybean powder)를 첨가한 톱밥배지에서 *O. radicata* 균사의 생장은 5%의 메주가루가 첨가된 배지에서 균사의 생장이 평균 18.4cm를 나타내어 모든 처리구에서 가장 높았다. 그러나, 5%의 처리구의 균사의 밀도는 9종의 *O. radicata* 균주 중 2종의 균주에서 밀도가 다소 낮았다(Table 2-3). 따라서, 메주가루 영양원의 첨가비율이 톱밥배지에서 증가함에 비례하여 균사의 생장은 다소 낮아지는 경향을 나타내었다.

밀기울(wheat bran)을 첨가한 톱밥배지에서 *O. radicata* 균사의 생장은 10%의 밀기울이 첨가된 배지에서 평균 19.3cm를 나타내어 모든 처리구에서 가장 높았다. 그러나 10%의 처리구에서 나타난 균사의 밀도는 9종의 *O. radicata* 균주 중 2종의 균주에서 밀도가 낮게 나타났다(Table 2-4). 또한 25% 및 30%의 비율로 밀기울이 첨가된 배지의 균사밀도는 9종의 *O. radicata* 균주에서 양호하였으나, 균사의 생장은 각각 평균 17.8cm와 17.3cm를 나타내어 10%의 밀기울이 처리된 배지의 평균 19.3cm보다도 훨씬 낮게 나타났다.

Table 2-2. The effect of rice bran for the mycelial growth of *Oudemansiella radicata* in oak sawdust media

Strains	Mycelial growth ^a of <i>O. radicata</i> (cm/60 days)											
	Rice bran ^b											
Content of rice bran (%)	<i>O. radicata</i> IUM(2)		<i>O. radicata</i> IUM(2)		<i>O. radicata</i> IUM(2)		<i>O. radicata</i> IUM(1)		<i>O. radicata</i> IUM(1)		<i>O. radicata</i> IUM(3)	
	770	767	766	762	779	780	781	1259	1260			
0	8.0±0.82T ^d	9.7±0.16T	9.1±0.28T	20.0±0.13ST	20.0±0.15ST	20.0±0.14ST	20.0±0.17T	20.0±0.16T				
5	20.0±0.82C	19.6±0.14C	20.0±0.82C	18.5±3.04C	20.0±0.13ST	20.0±0.16ST	18.6±2.9ST	20.0±0.15C				
10	20.0±0.86C	20.0±0.82C	20.0±1.85C	18.3±0.49C	18.6±2.90C	20.0±0.16C	18.5±4.86C	20.0±0.16C				
15	20.0±0.95C	20.0±1.82C	19.7±0.22C	11.8±0.95C	12.9±0.26C	12.7±0.41C	12.0±1.36C	20.0±0.08C				
20	20.0±1.65C	17.8±0.14C	20.0±1.84C	12.1±0.80C	12.3±0.95C	10.9±3.14C	12.0±0.69C	16.3±4.42C				
25	10.6±0.16C	14.8±0.28C	13.2±0.14C	9.1±2.12ST	11.8±0.50C	10.6±1.21C	10.8±0.54C	12.3±2.37C				
30	20.0±1.24T	17.7±0.14C	14.0±1.63ST	8.9±3.31ST	10.6±0.81ST	8.5±4.21C	8.0±1.19C	10.8±1.65ST				

^aThree of 9 strains were selected randomly, inoculated on the sawdust media and cultured to measure their mycelial growth.

^bEach of 3 additives was mixed with oak sawdust(*Quercus variabilis*) at the ratio of 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and 30%, respectively and then put in the glass column (2×33cm).

^cValues are means of 4 replications. and, within columns with different letters are significantly different at p=0.05.

^dC; Compact, ST; Somewhat thin, T; thin.

Table 2-3. The effect of fermented soybean powder for the mycelial growth of *Oudemansiella radicata* in oak sawdust media.

Strains	Mycelial growth of <i>O. radicata</i> (cm/60 days) ^a											
	Fermented soybean powder ^b											
Content of fermented soybean powder (%)	<i>O. radicata</i> IUM(2)	<i>O. radicata</i> IUM(2)	<i>O. radicata</i> IUM(2)	<i>O. radicata</i> IUM(2)	<i>O. radicata</i> IUM(2)	<i>O. radicata</i> IUM(2)	<i>O. radicata</i> IUM(1)	<i>O. radicata</i> IUM(1)	<i>O. radicata</i> IUM(1)	<i>O. radicata</i> IUM(3)	<i>O. radicata</i> IUM	<i>O. radicata</i> IUM
0	770	767	766	762	779	780	781	1259	1260			
5	9.3±0.28T	9.4±0.37T	20.0±0.13ST	20.0±0.15ST	20.0±0.14ST	20.0±0.17T	20.0±0.16T	20.0±0.17T	20.0±0.16T	20.0±0.17T	20.0±0.17T	20.0±0.16T
10	14.3±0.16C	20.0±0.82C	16.8±3.9C	16.8±3.9C	20.0±0.3ST	20.0±0.5C	15.1±4.5ST	20.0±0.60C	20.0±0.40C	20.0±0.60C	20.0±0.60C	20.0±0.40C
15	14.7±0.16T	16.3±0.29T	17.1±0.45ST	18.2±3.6C	20.0±0.7ST	20.0±0.3C	18.7±2.6C	20.0±0.40C	20.0±0.71C	20.0±0.40C	20.0±0.40C	20.0±0.71C
20	11.3±0.16ST	13.2±0.14ST	20.0±1.65ST	18.6±2.8C	20.0±0.41C	18.9±2.30C	15.2±3.25C	20.0±0.31C	20.0±0.52C	20.0±0.31C	20.0±0.31C	20.0±0.52C
25	17.2±0.16ST	13.4±0.14ST	13.2±0.14C	15.0±1.08C	17.8±2.60C	16.6±2.33C	14.1±2.0C	19.2±1.55C	20.0±0.43C	19.2±1.55C	19.2±1.55C	20.0±0.43C
30	14.9±0.14C	12.0±0.41ST	16.8±0.57ST	12.0±0.86ST	12.4±0.54ST	12.1±2.27C	13.2±1.57ST	10.8±3.45ST	17.3±3.15C	10.8±3.45ST	10.8±3.45ST	17.3±3.15C
	9.5±0.41C	12.9±0.08C	10.7±0.22C	11.2±0.64ST	11.6±0.85ST	11.2±1.95ST	11.3±1.06ST	7.0±0.1ST	12.6±0.78ST	7.0±0.1ST	7.0±0.1ST	12.6±0.78ST

^aThree of 9 strains were selected randomly, inoculated on the sawdust media and cultured to measure their mycelial growth.

^bEach of 3 additives was mixed with oak sawdust(*Quercus variabilis*) at the ratio of 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and 30%, respectively and then put in the glass column (2×33cm).

^cValues are means of 4 replications. and, within columns with different letters are significantly different at p=0.05.

^dC; Compact, ST; Somewhat thin, T; thin.

Table 2-4. The effect of wheat bran for the mycelial growth of *Oudemansiella radicata* in oak sawdust media

Content of wheat bran (%)	Mycelial growth ^a of <i>O. radicata</i> (cm/60 days)											
	Strains						Wheat bran ^b					
	<i>O. radicata</i> IUM(2)	<i>O. radicata</i> IUM(2)	<i>O. radicata</i> IUM(2)	<i>O. radicata</i> IUM(2)	<i>O. radicata</i> IUM(1)	<i>O. radicata</i> IUM(1)	<i>O. radicata</i> IUM(1)	<i>O. radicata</i> IUM(1)	<i>O. radicata</i> IUM(3)	<i>O. radicata</i> IUM	<i>O. radicata</i> IUM	<i>O. radicata</i> IUM
0	770	767	766	762	779	780	781	781	1259	1260		
5	8.2±0.57T ^d	9.8±0.36T	9.7±0.16T	20.0±0.13ST	20.0±0.15ST	20.0±0.14ST	20.0±0.17T	20.0±0.17T	20.0±0.17T	20.0±0.16T		
10	8.3±0.36C	20.0±2.35C	20.0±0.82C	18.3±0.45C	20.0±0.32ST	18.6±2.75ST	16.5±4.95ST	16.5±4.95ST	20.0±0.13C	20.0±0.47C		
15	20.0±0.82C	20.0±0.82C	17.0±2.13C	18.1±3.90C	20.0±0.63C	18.6±2.75C	20.0±0.81ST	20.0±0.81ST	20.0±0.71C	20.0±0.41ST		
20	13.8±0.24ST	17.0±3.6ST	20.0±0.82C	18.4±3.30C	20.0±0.57C	20.0±2.43C	6.3±1.69C	6.3±1.69C	18.7±2.60C	20.0±0.49C		
25	6.6±0.33C	14.4±2.1C	20.0±0.82C	16.9±3.59C	20.0±0.82C	20.0±0.15ST	14.5±4.10C	14.5±4.10C	20.0±0.81C	20.0±0.71C		
30	13.5±0.71C	20.0±1.35C	15.1±1.35C	15.6±5.55C	19.0±2.10C	20.0±0.49C	16.7±3.79C	16.7±3.79C	20.0±0.33C	20.0±0.34C		
	15.9±0.36C	14.5±0.56C	16.2±0.64C	15.5±0.21C	20.0±0.33C	20.0±0.48C	13.6±1.48C	13.6±1.48C	20.0±0.56C	20.0±0.67C		

^aThree of 9 strains were selected randomly, inoculated on the sawdust media and cultured to check their mycelial growth.

^bEach of 3 additives was mixed with oak sawdust (such as sawdust of *Quercus variabilis*) at the ratio of 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and 30%, respectively and then put in the column (2×33cm).

^cValues are means of 4 replications, and within columns are significantly different at p=0.05.

^dC, Compact; ST, Somewhat thin; T, thin.

따라서 3종의 영양원을 첨가한 톱밥배지에서 균사의 성장과 밀도를 관찰하여 볼 때, 미강(rice bran)이 *O. radicata*의 자실체를 형성하는데 가장 중요한 균사의 빠른 성장과 밀도를 높이는데 필요한 영양원으로 판단되었다.

나. 톱밥배지에서 공시균의 자실체 생산

1) 뽕나무버섯균(*A. mellea*)의 자실체 생산

가) 자실체 형성을 위한 우량균주의 선발

미강(rice bran)을 참나무톱밥에 30% 정도(v/v) 비율로 첨가하여 혼합하고 마쇄된 당근(ground raw carrots)을 참나무톱밥배지 표면에 처리하여 제조한 배지 위에 *A. mellea* IUM 949를 포함한 9종의 액체종균을 각각 접종하여 배양한 결과, 9종의 *A. mellea* 중에서 오직 *A. mellea* IUM 949에서만 자실체가 형성된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2-2). 이러한 결과는 뽕나무버섯의 인공재배를 위해 야생의 뽕나무버섯을 채집하여 이를 재배를 위한 시험균주로 이용할 경우, 대부분의 야생 뽕나무버섯은 인공적인 상태에서 자실체 형성빈도가 매우 낮아 성공적인 자실체를 생산하기 위해서는 실험에 더 많은 수의 야생 뽕나무버섯 균주를 사용할 필요가 있다고 판단된다. 그러나 이에 본 실험에서는 위의 결과에 따라 *A. mellea* IUM 949 균주만을 자실체의 대량재배를 위한 균주로 사용하였다.

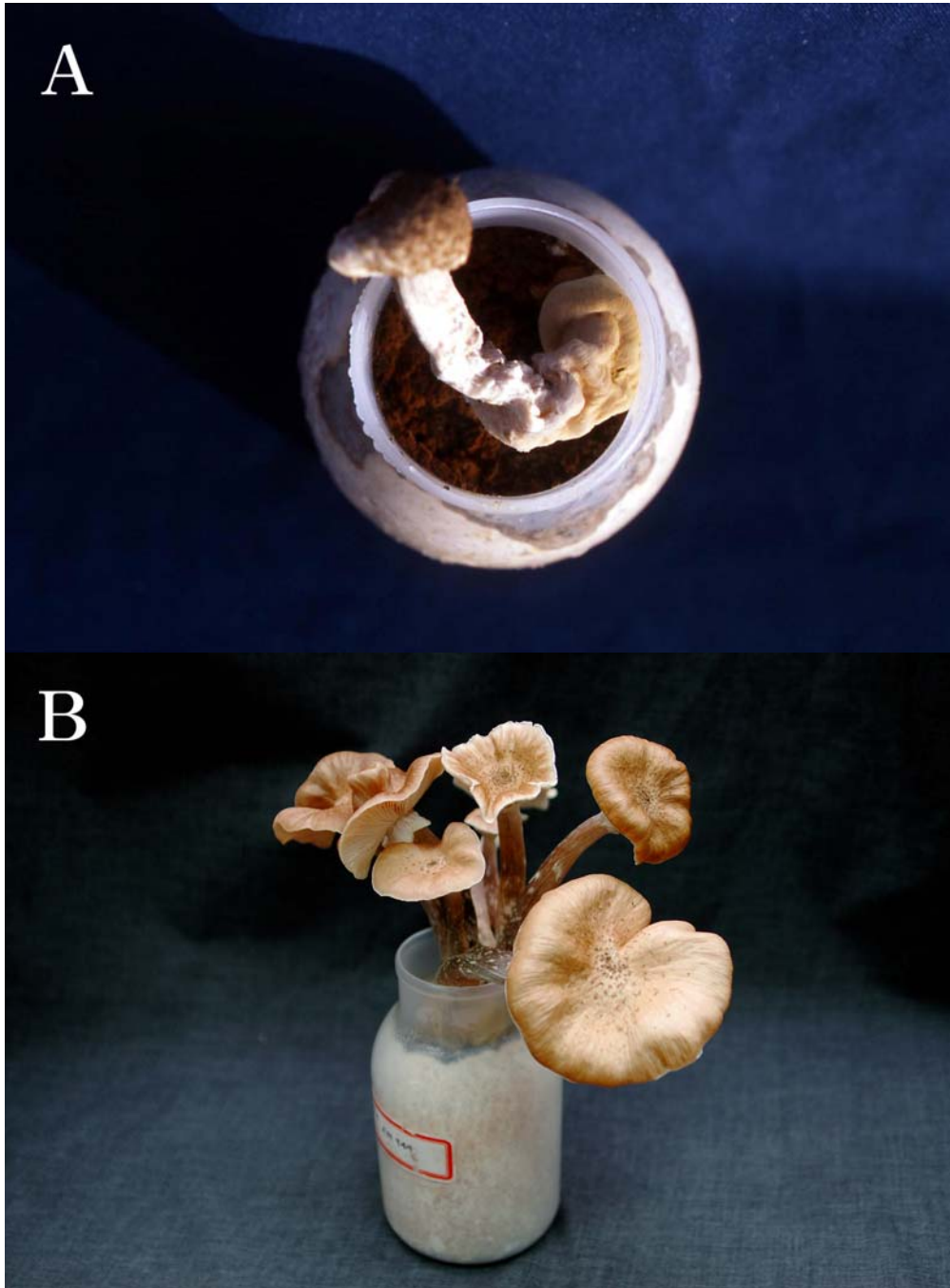


Fig. 2-2. Fruiting body (A and B) of *Armillaria mellea* IUM 949 on oak sawdust medium

나) 3종의 톱밥배지에서 *A. mellea* IUM 949의 자실체 생산

미강(rice bran)이 30%(v/v) 첨가된 참나무톱밥(Oriental oak, *Quercus variabilis*), 포플러톱밥(Cotton wood, *Populus deltoides*) 및 미송톱밥(Douglas fir, *Pseudotsuga mezesii*) 등 3종의 톱밥배지에 우량균주로 선발된 *A. mellea* IUM 949의 액체종균을 접종하고 30일간 배양하여 균사의 활착(complete colonization)이 확인된 *A. mellea* IUM 949를 저온 발이실로 옮겨 배양한 결과, 10일이 경과하면서 최초의 원기(primordia)가 참나무톱밥배지에 형성되었다(Fig. 2-3). 또한, 원기의 형성이 확인된지 7일이 경과하면서 마침내 성숙한 자실체를 관찰할 수 있었다(Fig. 2-4). 배양병 1개에 형성된 자실체의 수는 참나무톱밥배지에서 평균 9개를 나타냈으며, 미송톱밥에서는 4개를 나타낸 반면, 포플러톱밥에서 5개를 나타내었다(Table 2-5). 또한, 배양병 1개로부터 수확된 자실체의 전체 생중량은 참나무톱밥배지에서 평균 23.9g을 나타냈으며, 미송톱밥에서는 17.5g을 나타낸 반면, 포플러톱밥에서 17.6g을 나타내었다(Table 2-5). 김 등(1992)은 *A. mellea*를 접종하여 자실체를 수확할 때까지의 기간은 대략 90일에서 100일이 소요된다고 보고하였으나 본 실험의 결과 뽕나무버섯을 참나무톱밥 배지에 접종한 후 자실체가 생산될 때까지 소요된 기간은 47일부터 50일 정도였다. 이는 김 등(1992)의 뽕나무버섯 인공재배 실험에서 자실체가 형성되는데 걸린 기간의 절반에 해당하는 것이다. 이렇게 재배기간이 단축된 것은 톱밥배지의 표면을 덮은 마쇄된 당근속에 함유된 여러 생리활성 물질이 자실체 형성을 촉진시킨 결과로 사료된다.

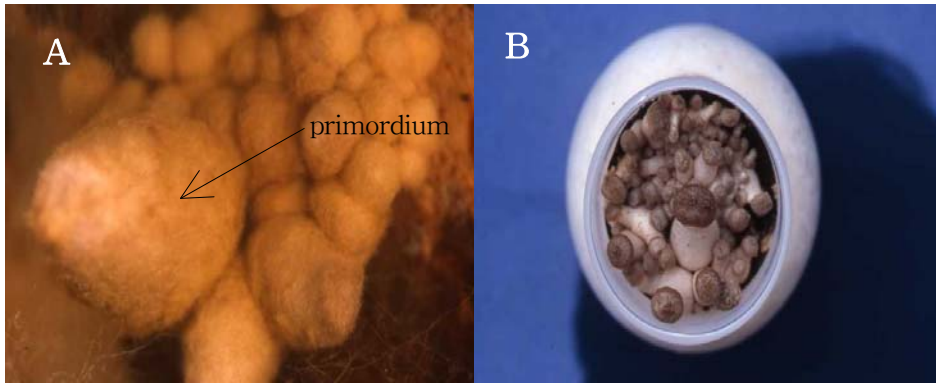


Fig 2-3. The primordium of *Armillaria mellea* IUM 949 formed on oak sawdust media covered with ground raw carrots

- A. The primitive primordia(18x) of *Armillaria mellea* IUM 949 on the surface of oak sawdust media.
- B. Primordia of *Armillaria mellea* IUM 949 on the surface of oak sawdust media after 3 days of primordium formation.



Fig 2-4. The fruiting body of *Armillaria mellea* IUM 949 on oak sawdust media covered with ground raw carrots

Table 2-5. The fruiting body of *Armillaria mellea* IUM 949 produced on 3 sawdust media

^a Fruiting body of <i>Armillaria mellea</i> IUM 949				
Sawdust media	Total number of fruiting body	Length of stipe(cm)	Diameter of Cap(cm)	Total weight(g/bottle)
Oak sawdust	9.0±7.7	8.0±2.3	3.9±2.6	23.9±14.5
Pine sawdust	4.0±3.5	8.9±1.2	5.2±2.0	14.5±6.8
Popular sawdust	5.0±3.4	8.0±1.1	4.2±1.5	17.6±6.6

^aThe values are means of 24 replications and standard deviation.

외국의 연구결과(Iwao and Namio, 1994, 1995; Iwao, 1996)는 톱밥배지에서 *A. mellea*의 균사가 신속히 성장하여 원기를 형성하는 데 있어서 당근에 함유된 물질의 중요성을 언급하고 있다. Iwao(1996)는 당근에 함유된 미확인 활성 물질이 톱밥배지의 표면에 있는 *A. mellea*의 검은 균사 피막에 자극을 주어 원기의 발생을 촉진시키는 가능성을 주장하였다. 향후 추가 연구를 통하여 당근에 존재하는 어떠한 활성물질이 원기의 형성을 촉진할 수 있는지를 확인해야 할 필요가 있을 것으로 사료된다.

이 연구에 사용된 3종의 톱밥은 우리나라에서 느타리를 비롯한 다른 버섯의 자실체의 생산을 위하여 많이 사용되고 있는데, 이 3종의 톱밥 중에서 참나무 톱밥이 가장 많은 자실체를 형성하였다. 3종의 톱밥 모두로부터 자실체가 형성되었다는 것은 향후 *A. mellea*의 자실체를 대량생산하는데 있어서 재배기질의 다양화를 위한 좋은 사례가 될 수 있을 것이다.

2) 민긴뿌리버섯균(*O. radicata*)의 자실체 생산

가) *O. radicata*의 자실체 생산을 위한 톱밥기질의 선발

포플러톱밥(Cotton wood, *Populus deltoides*), 미송톱밥(Douglas fir, *Pseudotsuga mezesii*)에 미강을 10% 정도 첨가하여 혼합한 후 톱밥배지를 제조하고 9종의 *O. radicata* 각각을 다-2)-나)의 방법으로 접종·배양하였다. 2종의 톱밥에서 확인된 원기 및 자실체 형성의 결과는 동일한 방법으로 처리하였던 참나무톱밥(Oriental oak, *Quercus variabilis*)의 결과와 비교하면 포플러톱밥과 미송톱밥에서 균사의 생장은 매우 저조할 뿐 아니라 참나무톱밥에 비하여 배지의 오염도 심하였다. 또한, 포플러톱밥과 미송톱밥에서 *O. radicata*의

균사는 일정한 시간이 경과함에 따라서 흰 균사의 색깔이 점차 탈색되어 톱밥 배지와 유사한 황갈색으로 변하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2-5). 포플러톱밥배지에서는 *O. radicata* IUM 766, IUM 781, IUM 770 및 IUM 1259 균주에 서만 1-2개 정도의 빈약한 자실체를 형성할 수 있었다. 미송톱밥배지에서도 포플러톱밥배지와 같이 *O. radicata* IUM 766, IUM 767, IUM 780, IUM 770 및 IUM 781 균주에서 자실체의 형성이 매우 빈약하였다. 이러한 결과를 종합해 보면, *O. radicata*의 자실체 생산을 위해 적합한 배지는 참나무톱밥배지인 것으로 판단되었다.

나) 미강(rice bran)을 첨가한 참나무톱밥배지에서 *O. radicata*의 자실체 생산

균사가 위에서부터 밑까지 참나무톱밥배지에서 완전히 배양된 *O. radicata*의 상면을 살균한 부엽토로 충분히 덮은 후 발이실로 옮겨 30일 정도 배양하면 배지의 표면을 덮고 있는 적갈색의 균사체로부터 서서히 원기가 형성되었다(Fig. 2-6). 그 원기의 형성은 *O. radicata* IUM 1259와 IUM 1260으로부터 처음 형성되었으며, 원기의 형성이 관찰된 후 4-5일의 기간이 경과하면서 성숙한 자실체가 형성되기 시작하였다(Fig. 2-7). *O. radicata*의 자실체는 미강이 혼합된 모든 처리구에서 생산되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 미강이 10%의 비율(v/v)로 처리된 톱밥배지에서 가장 많은 자실체가 생산되는 것을 관찰할 수 있었다(Table 2-6).

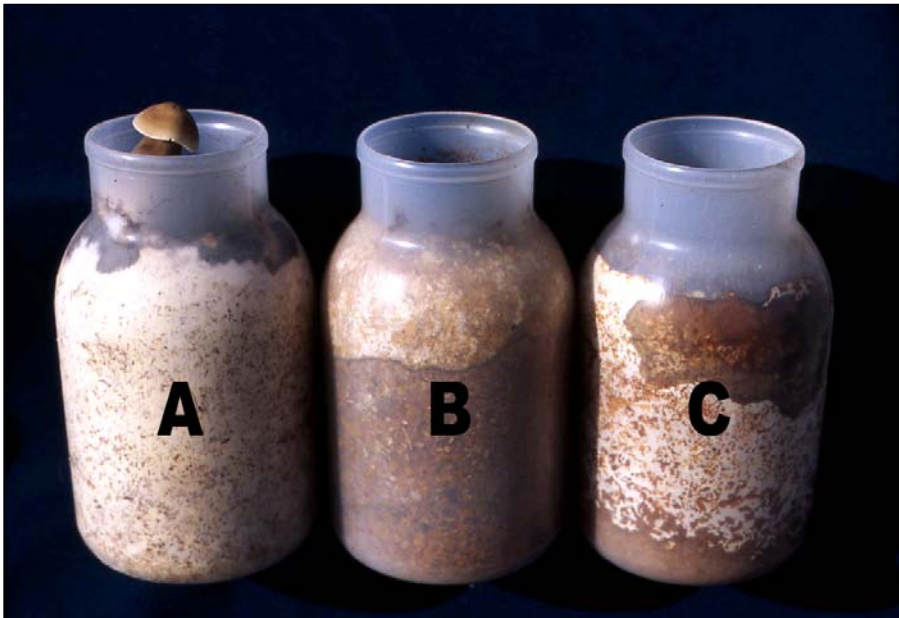


Fig. 2-5. The mycelial growth of *Oudemansiella radicata* at 3 sawdust media
A; *Q. variabilis*; B; *P. deltoides*; C; *P. meziessii*

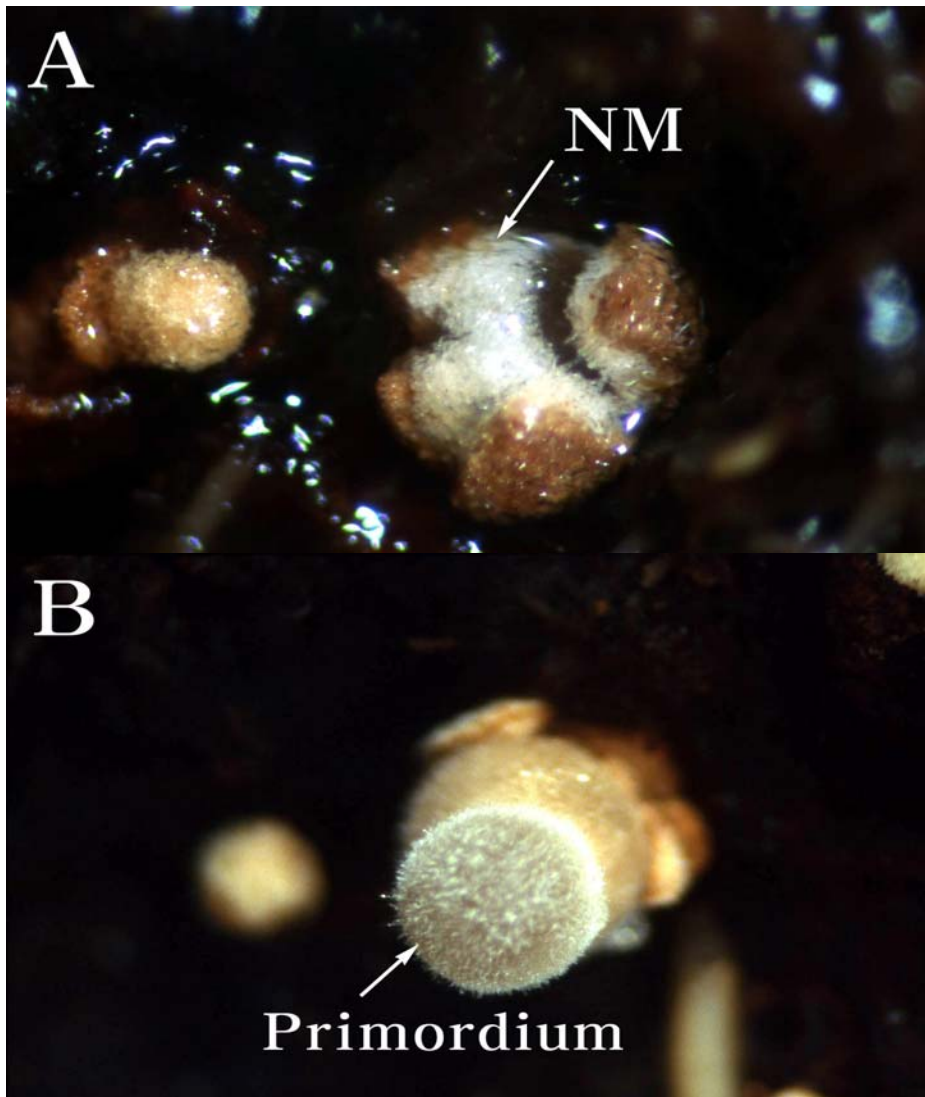


Fig. 2-6. The primordium of *Oudemansiella radicata* formed on sawdust media of *Quercus variabilis* mixed with 10% rice bran

- A; The protrusion(18X) of new mycelium(NM) originated from a mycelial mass of *O. radicata* covering the surface of oak sawdust media
- B; The primitive primordium(18X) of *O. radicata* on the surface of oak sawdust media



Fig. 2-7. The fruiting bodies of *Oudemansiella radicata* on sawdust media of *Q. variabilis* supplemented with 10% rice bran

Table 2-6. The fruiting body formation of *Oudemansiella radicata* on oak sawdust media^a

Content of rice bran (%)	Numbers of fruiting body											Mean
	<i>Oudemansiella radicata</i>											
	IUM 762	IUM 767	IUM 781	IUM 766	IUM 779	IUM 780	IUM 770	IUM 1259	IUM 1260			
0	-	3	4	6	-	2	3	-	8			2.9
5	16	12	14	21	20	24	3	8	30			16.4
10	3	34	8	41	10	30	26	20	35			23.0
15	10	26	17	24	12	19	6	20	3			15.2
20	6	49	12	4	15	25	14	11	20			17.3
25	2	25	16	39	12	26	9	4	4			15.2
30	2	7	10	14	2	20	16	23	12			11.8

^aThe sawdust of oriental oak (*Quercus variabilis*) was supplemented with 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and 30% rice bran(v/v), respectively.

^bEach of nine *O. radicata* strains was treated by 5 replications.

9종의 균종 간에 비교된 자실체의 중량은 미강의 혼합이 5%, 10%, 15%, 20% 및 25%의 비율로 처리된 톱밥배지에서 유의성을 나타내었고(Table 2-7), 역시 9종의 균종 간에 비교된 갓(cap)의 직경은 미강의 혼합이 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 및 30%의 비율로 처리된 톱밥배지에서 유의성을 보였으며(Table 2-8), 대(stipe)의 길이는 5%, 10%, 20% 및 25%로 처리된 배지에서 유의성을 나타내었다(Table 2-9).

따라서 제 1절과 2절의 실험결과인 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 균사생장과 자실체 형성의 최적배양 조건을 종합하여 정리하면 다음과 같다.

뽕나무버섯의 균사생장 최적조건

1. 온도: 25℃에서 가장 양호하였고, 그 다음으로는 30℃이었음
2. pH: 6에서 가장 양호하였고, 그 다음으로는 5이었음
3. 탄소영양원: Lactose 첨가배지에서 가장 양호하였고, 그 다음으로는 Mannose이었음
4. 질소영양원: Arginine 첨가배지에서 가장 양호하였고, 그 다음으로는 Alanine이었음
5. C/N 비율: 2%의 Glucose를 첨가한 배지의 30:1(C/N) 조건에서 가장 양호하였음
6. 고체배지: Hamada배지에서 가장 양호하였고, 그 다음으로는 PDA배지였음
7. 액체배지: Hamada배지에서 가장 양호하였고, 그 다음으로는 PDMS배지였음

뽕나무버섯의 자실체형성 최적조건

1. 톱밥배지의 조성 비율: 참나무톱밥 : 미강 : 당근 (30% : 69% : 1%)
2. 톱밥배지의 균사체 배양조건: 65~75%의 상대습도에서 25℃로 30일 배양
3. 원기형성 조건: 톱밥배지에서 균사배양이 끝난 배지를 균 굵기 후 상대습도가 85~95% 유지되는 배양실에서 17~18℃로 10일 배양하여 원기를 형성
4. 자실체 생산조건: 원기가 형성된 배지를 상대습도가 75~85% 유지되는 재배실에서 20℃로 7일 생육하여 자실체를 생산하였음
5. 자실체생산 소요기간: 톱밥배지에 균사를 접종해서 자실체를 형성하기까지 총 47일이 소요되었음

민간뿌리버섯의 균사생장 최적조건

1. 온도: 25℃에서 가장 양호하였고, 그 다음으로는 20℃이었음
2. pH: 6에서 가장 양호하였고, 그 다음으로는 7이었음
3. 탄소영양원: Xylose에서 가장 양호하였고, 그 다음으로는 Dextrin이었음
4. 질소영양원: Alanine에서 가장 양호하였고, 그 다음으로는 Ammonium acetate이었음
5. C/N 비율: 3%의 Glucose를 첨가한 배지의 20:1(C/N) 조건에서 가장 양호하였음
6. 고체배지: Glucose peptone배지에서 가장 양호하였고, 그 다음으로는 PD(M)배지였음

7. 액체배지: PDM배지에서 가장 양호하였고, 그 다음으로는 Glucose peptone배지였음

민긴뿌리버섯의 자실체형성 최적조건

1. 톱밥배지의 조성 비율: 참나무톱밥 : 미강 (30% : 70%)
2. 톱밥배지의 배양조건: 상대습도가 65~75% 유지되는 배양실에서 25℃로 30일 배양
3. 원기형성 조건: 균사배양이 끝난 톱밥배지를 균 굵기를 하지 않고 배지의 상면을 살균한 부엽토나 배양토로 2~3cm 정도 덮은 후 충분히 관수를 하고 상대습도가 85~95% 유지되는 배양실에서 15~16℃로 25~30일 배양하여 원기를 형성하였음
4. 자실체 생산조건: 원기가 형성된 배지를 상대습도가 75~85%로 유지되는 재배실에서 22~23℃로 5일 생육하여 자실체를 생산하였음
5. 자실체생산 소요기간: 톱밥배지에 균사를 접종해서 자실체를 형성하기까지 총 60~65일이 소요되었음

Table 2-7. The weight of fruiting body of *Oudemansiella radicata* harvested from oak sawdust media

Strains of <i>O. radicata</i>	Weight(g) ^a of fruiting body											F-value
	<i>Oudemansiella radicata</i>											
	IUM 762	IUM 767	IUM 781	IUM 766	IUM 779	IUM 780	IUM 770	IUM 1259	IUM 1260			
0	-	8.6	5.0	7.3	-	11.7	6.3	-	7.2	F=0.247(NS)		
5	7.4 ^a	5.6 ^a	7.9 ^a	5.3 ^a	5.2 ^a	7.4 ^a	9.5 ^a	21.1 ^b	6.9 ^a	F=2.961 ^{**}		
10	18.8 ^b	6.1 ^a	8.4 ^a	5.5 ^a	3.9 ^a	5.9 ^a	4.6 ^a	9.3 ^a	8.5 ^a	F=2.476 ^{**}		
15	11.9 ^a	9.3 ^a	4.1 ^a	5.8 ^a	6.5 ^a	6.0 ^a	7.7 ^a	7.6 ^a	34.3 ^b	F=5.857 ^{**}		
20	3.8 ^a	5.9 ^{ab}	4.9 ^a	3.4 ^a	7.8 ^{ab}	9.5 ^{ab}	9.4 ^{ab}	11.4 ^{ab}	14.6 ^b	F=2.152 [*]		
25	8.4 ^{ab}	3.8 ^a	4.4 ^a	7.6 ^{ab}	9.0 ^{ab}	5.6 ^{ab}	6.0 ^{ab}	14.8 ^b	49.8 ^c	F=16.916 ^{**}		
30	2.5	2.2	5.8	8.6	1.8	5.4	6.7	8.8	13.3	F=1.652(NS)		

^aNumbers with a different letter are significantly different at p=0.05 according to Duncan's multiple range test

^bRice bran was mixed with oak sawdust (*Quercus variabilis*) at the ratio of 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and 30%(v/v), respectively.

Table 2-8. The cap size of *Oudemansiella radicata* harvested from oak sawdust media

Strains of <i>O. radicata</i>	Size(cm) ^a of cap											F-value	
	<i>Oudemansiella radicata</i>												
	IUM 762	IUM 767	IUM 781	IUM 766	IUM 779	IUM 780	IUM 770	IUM 1259	IUM 1260				
0	-	3.7	2.8	4.9	-	7.4	4.6	4.9	-	4.6	4.9	4.9	F=0.751(NS)
5	4.6 ^a	2.8 ^a	3.3 ^a	4.4 ^a	4.3 ^a	4.4 ^a	7.8 ^b	4.3 ^a	6.7 ^b	4.3 ^a	4.3 ^a	4.3 ^a	F=3.487 ^{**}
10	8.4 ^c	2.7 ^a	2.7 ^a	4.4 ^b	3.9 ^{ab}	4.8 ^b	4.5 ^b	4.3 ^b	4.8 ^b	4.3 ^b	4.3 ^b	4.3 ^b	F=7.943 ^{**}
15	5.4 ^b	3.6 ^{ab}	2.6 ^a	4.6 ^b	5.1 ^b	4.6 ^b	5.0 ^b	4.4 ^{ab}	4.4 ^{ab}	8.2 ^c	8.2 ^c	8.2 ^c	F=4.358 ^{**}
20	4.3 ^{bc}	3.0 ^{ab}	2.5 ^a	4.4 ^{bc}	5.4 ^c	5.8 ^c	5.5 ^c	5.9 ^c	5.9 ^c	6.1 ^c	6.1 ^c	6.1 ^c	F=9.710 [*]
25	4.7 ^{ab}	3.1 ^{ab}	2.6 ^a	4.7 ^{ab}	5.1 ^b	5.0 ^b	4.9 ^b	5.2 ^b	5.2 ^b	10.8 ^c	10.8 ^c	10.8 ^c	F=10.642 ^{**}
30	4.3 ^{abc}	2.0 ^a	2.5 ^{ab}	4.6 ^{bc}	2.9 ^{ab}	4.6 ^{bc}	5.1 ^{bc}	5.1 ^{bc}	5.1 ^{bc}	5.7 ^c	5.7 ^c	5.7 ^c	F=3.691 ^{**}

^aNumbers with a different letter are significantly different at p=0.05 according to Duncan's multiple range test

^bRice bran was mixed with oak sawdust (*Quercus variabilis*) at the ratio of 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and 30%(v/v), respectively.

Table 2-9. The stipe length of *Oudemansiella radicata* harvested from oak sawdust media

Content ^b of rice bran (%)	Strains of <i>O. radicata</i>		Length(cm) of stipe ^a										F-value
	<i>Oudemansiella radicata</i>												
	IUM 762	IUM 767	IUM 781	IUM 766	IUM 779	IUM 780	IUM 770	IUM 1259	IUM 1260				
0	-	17.2	13.3	11.1	-	13.5	10.4	-	12.8	F=0.751(NS)			
5	10.8 ^{ab}	13.0 ^{abc}	15.7 ^{abc}	10.2 ^a	11.1 ^{ab}	12.7 ^{abc}	14.8 ^{abc}	16.2 ^c	12.5 ^{abc}	F=2.334*			
10	18.2 ^b	13.2 ^a	12.3 ^a	11.2 ^a	10.7 ^a	10.6 ^a	10.7 ^a	11.0 ^a	12.7 ^a	F=2.127*			
15	12.2	13.0	10.8	10.2	10.8	10.7	12.5	11.9	17.3	F=1.825(NS)			
20	9.3 ^{ab}	13.6 ^{bc}	11.9 ^{abc}	8.3 ^a	9.5 ^{ab}	13.3 ^{bc}	11.0 ^{abc}	14.5 ^c	12.6 ^{abc}	F=2.145*			
25	10.9 ^{ab}	9.5 ^{ab}	9.5 ^{ab}	10.2 ^{ab}	10.4 ^{ab}	8.9 ^a	10.0 ^{ab}	13.5 ^b	18.8 ^c	F=4.781**			
30	6.6	11.9	12.1	11.1	6.9	8.9	10.1	11.7	10.0	F=1.748(NS)			

^aNumbers with a different letter are significantly different at p=0.05 according to Duncan's multiple range test

^bRice bran was mixed with oak sawdust (*Quercus variabilis*) at the ratio of 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and 30%(v/v), respectively.

4. 참고문헌

- Cha, D. Y. 1981. Investigation on artificial cultures for new edible wild mushrooms(Ⅱ). *Kor. J. Mycol.* **9**: 123-128.
- Iwao, T. and Namio, T. 1994. Effect of adding carrot, *Dacus carota* variety *sativa*, to media in the rhizomorph production of *Armillaria* species. *Mokuzai gakkaiishi* **40**: 213-219.
- Iwao, T. and Namio, T. 1995. Effects of primordium formation method and moisture content of medium on fruiting body production of *Armillaria* species. *Mokuzai gakkaiishi* **41**: 211-217.
- Iwao, T. 1996. Effects of substrates and seeding methods on fruiting body production in the bottle cultivation of *Armillaria* species. *Mokuzai gakkaiishi* **42**: 186-193.
- Semerdzieva, M., Buchalo, A. S. Hubsch, P., Zakordonec, O. A., Wasser, S. P. and Musilek, V. 1988. Comparative study of cultures of four species of the genus *Oudemansiella*. *Folia Microbiol.* **33**: 115-120.
- Tsantrizos, Y. S., Yang, X. and McClory, A. 1999. Studies on the biosynthesis of the fungal metabolites oudenone. 2. synthesis and enzymatic cyclization of an diketone, open-chain precursor into oudenone in culture of in cultures of *Oudemansiella radicata*. *J. Org. Chem.* **64**: 6609-6614.
- Umezawa, H., Tanabe, O. and Takeuchi, T. 1973. A new hypotensive agent, oudenone, its salts and processes for production and preparation thereof. Microbial Chem. Res Found [JP] -patent No., GB 1333935(Complete Specification).

- 郭順星, 徐錦堂. 1992. 密環菌索發育的研究. 中國 真菌 學報. **11**(4): 308-313.
- 김진숙, 최응칠, 김혜령, 이종길, 이정옥, 정경수, 심미자, 김병각. 1983. 한국 산 고등균류의 성분연구= 뽕나무버섯의 항암성분. 한국균학회지 **11**(4): 151-157.
- 김현중, 고민규, 이창근, 성재모. 1992. 뽕나무버섯의 인공재배. 한국균학회지. **20**(3): 273-276.
- 성재모, 차주영, 김양섭. 1989. 잣나무뿌리썩음병에 관여하는 *Armillaria*균의 분리동정과 배양적 특성. 한국식물병리학회지 **5**(3): 317-327.

제 3 절 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 유전적 유연관계 분석

1. 서 론

과거 버섯의 계통 분류는 주로 버섯 자실체의 형태적인 특징인 크기, 색깔, 모양과 담자포자의 색깔, 형태, 크기 등을 기준으로 하였다(Park *et al.*, 1997). 이러한 형태적인 분류방법은 환경적 차이에 의해 나타나는 변이 때문에 정확하게 버섯을 동정하기가 어려웠다(Park *et al.*, 1997). 이러한 문제점을 극복하기 위하여 다양한 방법들이 개발되었는데(Park *et al.*, 1997), 단백질의 전기영동 밴드 패턴(Kawamura & Goto, 1980, Itavaara, 1998)이나 여러 종류의 동위효소(isozyme)양상 분석(Zwevakis *et al.*, 1992; Damaj *et al.*, 1993)과 같은 생화학적인 방법들이 많이 사용되었다. 그러나 단백질의 전기영동 분석방법은 그 밴드수가 너무 많거나 또는 적어서 각 균주의 분화에 대해 충분한 설명을 해주지 못하거나(Lee *et al.*, 1997) 때로는 배양조건의 차이에 의해 실험결과가 다르게 나타나기도 한다(Song *et al.*, 1996). Polymerase Chain Reaction (PCR) 기법이 개발되면서(Khush *et al.*, 1991) 이 기법이 생물체의 유전정보를 보존하고 있는 DNA의 분자생물학 연구에 이용되게 되었다(Erich *et al.*, 1998). Saiki(1988)가 PCR 기법을 이용하여 β -globin의 genomic sequences를 증폭할 수 있다는 등의 연구를 보고한 후 이 기법을 특정 유전자의 확인, 식물병원체의 동정, cDNA의 제조 및 발현 등 생물학의 여러 분야에서 폭넓게 이용되고 있다.(Park *et al.*, 1997). 최근 PCR 반응을 통해 증폭된 DNA 길이 차이에 의해 유전적 다형성을 구분하는 방법으로 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNAs)법이 개발되었다. 이 방법은 AFLP나 RFLP(Chiu *et al.*, 1993)법과 비교해 실험절차가 간단하고 소량의 DNA만을 사용하므로 시간과

경제성에서 RFLP보다 뛰어나(Lee *et al.*, 1997) 미생물의 계통분류 연구에 많이 사용되고 있다. 특히 Williams 등 (1990)이 AP-PCR에 의해 증폭된 DNA 단편들을 유전자 표지인자(DNA markers)로 사용할 수 있다고 보고한 후, Lee *et al.*,(1997) 등도 한국 표고 품종에 대한 RAPD를 실시하여 품종간의 구분이 가능하다는 것을 보고한 바 있다.

최근 담자균강의 계통분류에 개발된 새로운 시도 중 가장 활발하게 연구되는 것에는 ribosomal RNA 유전자의 염기서열 분석과 관련된 분야가 있다. 균류를 포함한 진핵생물의 ribosomal DNA의 전사단위는 18S, 5.8S, 28S의 순으로 되어 있으며 그 rDNA는 18S, 5.8S, 28S의 차례로 2개의 internal transcribe spacer(ITS)로 분리 연결되어 있다. 초기에는 5.8S 부위에 대한 염기서열의 비교가 분류의 근거로 주로 이용되어져 왔지만, 이 부위는 염기수가 120개 전후로 길이가 상당히 짧고, 매우 보존적이어서 유사한 종들간의 변이가 거의 없고 동일한 염기서열을 갖고 있기 때문에 이들 상호간을 구별하는데에는 거의 사용될 수가 없었다. rDNA의 18S 및 28S 염기서열은 버섯의 종에 따라 5.8S 부위에 비해 약간의 변이가 존재해 통계적으로 이용할 수 있는 정보를 가지고 있다. 예를 들면 18S와 28S rDNA의 부위는 염기의 변이가 거의 없는 부분, 중간 정도의 변이가 있는 부분, 변이가 매우 심한 부분이 같이 존재하므로 계통분화의 분석을 위한 적합한 자료를 포함하고 있다. 그러나, 18S와 28S의 염기수는 각각 1600 bp 정도와 3300~4800 bp 정도가 되기 때문에 전체의 염기서열을 결정하기에는 많은 시간, 노력 그리고 비용이 들기 때문에 실용화하기에 어려운 점이 많다.

그러나 ITS 영역중 일부 영역에서 염기서열을 분석하여 계통분류에서 유효하게 사용되고 있는 영역이 있는데 이는 ITS region 가운데 위치한 5.8S 부위

를 포함한 500bp 정도의 영역이다. 이 부위는 염기수가 적어 염기서열을 결정하기가 간편하기 때문에 많은 종을 대상으로 하는 분류학적 연구에 적합하다. 또한 비교적 보존성이 높은 5.8S 부위를 포함하고 있으므로 ITS 부위와의 비교가 가능하다. 따라서 ITS 부위의 분석은 동일 속내의 속간 및 종간의 유연관계 연구에 많이 이용되고 있다.

본 연구에서는 현 진균류의 계통분류에서 분류방법으로 이용되고 있는 rDNA ITS region(ITS1-5.8S-ITS2)의 염기서열 분석을 통해 뽕나무버섯속과 민긴뿌리버섯속의 염기서열을 조사하여 그 차이점을 계통분류학적으로 분석하였고 또한 RAPD를 통해 공시버섯균주들 간의 유전적 근연관계를 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 버섯균주별 ITS region 분석에 의한 공시균주의 유전적 특성

1) 공시버섯균주

가) 뽕나무버섯

본 실험에서는 앞의 균사체 배양실험과 자실체 형성실험에서 사용했던 균주를 포함하여 추가로 인천대학교 생물학과 내 야생버섯균주은행(Culture Collection of Wild Mushroom species, CCWM)에서 수집하여 보관중인 뽕나무버섯 (*Armillaria mellea*)과 뽕나무버섯부치(*Armillaria tabescens*) 균주들을 추가로 분양받아 각각 뽕나무버섯 27균주와 뽕나무버섯부치 41균주 등 68개 균주를 실험에 사용하였으며 이외에도 NCBI에 저장된 *Armillaria* 속에 속하는 *A. gallica* 6개 균주와 *A. ostoyae* 5개 균주의 ITS 염기서열 자료를 받아 비교분석에 사용하였으며, 그 내용은 Table 3-1과 같다.

나) 민긴뿌리버섯

본 실험에서 민긴뿌리버섯은 총 7종 32균주의 민긴뿌리버섯속 (*Oudemansiella*) 버섯들의 ITS region 염기서열 자료를 계통분류분석에 사용하였으며 그 내용은 Table 3-2와 같다. 이들 균주는 앞의 균사체 배양실험과 자실체 형성실험에서 사용했던 균주를 포함하여 추가로 인천대학교 생물학과 내 야생버섯균주은행(Culture Collection of Wild Mushroom species, CCWM)에 보관중인 민긴뿌리버섯(*Oudemansiella radicata*), 끈적긴뿌리버섯(*O. mucida*), 넓

은주름긴뿌리버섯(*O. platyphylla*), 갈색날긴뿌리버섯(*O. brunneomarginata*) 등 균주들을 분양받아 실험에 사용하였다. 또한 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록된 *O. australis*, *O. canarii* 그리고 *O. pudens*의 ITS sequence 자료를 추가로 받아 본 실험결과와 비교분석하였다.

Table 3-1. The strains of *Armillaria* spp. used in this study

No.	Species	No.	Species
1	<i>Armillaria mellea</i> IUM523	35	<i>Armillaria tabescens</i> IUM114
2	<i>Armillaria mellea</i> IUM524	36	<i>Armillaria tabescens</i> IUM127
3	<i>Armillaria mellea</i> IUM525	37	<i>Armillaria tabescens</i> IUM371
4	<i>Armillaria mellea</i> IUM643	38	<i>Armillaria tabescens</i> IUM440
5	<i>Armillaria mellea</i> IUM644	39	<i>Armillaria tabescens</i> IUM477
6	<i>Armillaria mellea</i> IUM734	40	<i>Armillaria tabescens</i> IUM716
7	<i>Armillaria mellea</i> IUM787	41	<i>Armillaria tabescens</i> IUM720
8	<i>Armillaria mellea</i> IUM788	42	<i>Armillaria tabescens</i> IUM722
9	<i>Armillaria mellea</i> IUM854	43	<i>Armillaria tabescens</i> IUM723
10	<i>Armillaria mellea</i> IUM887	44	<i>Armillaria tabescens</i> IUM726
11	<i>Armillaria mellea</i> IUM911	45	<i>Armillaria tabescens</i> IUM738
12	<i>Armillaria mellea</i> IUM950	46	<i>Armillaria tabescens</i> IUM789
13	<i>Armillaria mellea</i> IUM955	47	<i>Armillaria tabescens</i> IUM790
14	<i>Armillaria mellea</i> IUM956	48	<i>Armillaria tabescens</i> IUM844
15	<i>Armillaria mellea</i> IUM957	49	<i>Armillaria tabescens</i> IUM958
16	<i>Armillaria mellea</i> IUM964	50	<i>Armillaria tabescens</i> IUM965
17	<i>Armillaria mellea</i> IUM1056	51	<i>Armillaria tabescens</i> IUM966
18	<i>Armillaria mellea</i> IUM1185	52	<i>Armillaria tabescens</i> IUM967
19	<i>Armillaria mellea</i> IUM1192	53	<i>Armillaria tabescens</i> IUM968
20	<i>Armillaria mellea</i> IUM1239	54	<i>Armillaria tabescens</i> IUM969
21	<i>Armillaria mellea</i> IUM791	55	<i>Armillaria tabescens</i> IUM971
22	<i>Armillaria mellea</i> IUM949	56	<i>Armillaria tabescens</i> IUM972
23	<i>Armillaria mellea</i> IUM535	57	<i>Armillaria tabescens</i> IUM973
24	<i>Armillaria mellea</i> 184	58	<i>Armillaria tabescens</i> IUM975
25	<i>Armillaria mellea</i> 185	59	<i>Armillaria tabescens</i> IUM1173
26	<i>Armillaria mellea</i> 186	60	<i>Armillaria tabescens</i> IUM1174
27	<i>Armillaria mellea</i> 741	61	<i>Armillaria tabescens</i> IUM1184
28	<i>Armillaria tabescens</i> IUM853	62	<i>Armillaria tabescens</i> IUM1187
29	<i>Armillaria tabescens</i> IUM862	63	<i>Armillaria tabescens</i> IUM1188
30	<i>Armillaria tabescens</i> IUM910	64	<i>Armillaria tabescens</i> IUM1189
31	<i>Armillaria tabescens</i> IUM970	65	<i>Armillaria tabescens</i> IUM1190
32	<i>Armillaria tabescens</i> IUM441	66	<i>Armillaria tabescens</i> IUM1196
33	<i>Armillaria tabescens</i> IUM487	67	<i>Armillaria tabescens</i> IUM1300
34	<i>Armillaria tabescens</i> IUM109	68	<i>Armillaria tabescens</i> IUM1724

Table 3-2. The strains of *Oudemansiella* spp. used in this study

No.	Species	No.	Species
1	<i>Oudemansiella radicata</i> IUM762	17	<i>Oudemansiella brunneomarginata</i> IUM2595
2	<i>Oudemansiella radicata</i> IUM766	18	<i>Oudemansiella australis</i> AF321472(NCBI)
3	<i>Oudemansiella radicata</i> IUM767	19	<i>Oudemansiella australis</i> AF321473(NCBI)
4	<i>Oudemansiella radicata</i> IUM770	20	<i>Oudemansiella australis</i> AF321474(NCBI)
5	<i>Oudemansiella radicata</i> IUM779	21	<i>Oudemansiella australis</i> AF321475(NCBI)
6	<i>Oudemansiella radicata</i> IUM780	22	<i>Oudemansiella carnarii</i> AF321476(NCBI)
7	<i>Oudemansiella radicata</i> IUM781	23	<i>Oudemansiella carnarii</i> AF321477(NCBI)
8	<i>Oudemansiella radicata</i> IUM1054	24	<i>Oudemansiella carnarii</i> AF321478(NCBI)
9	<i>Oudemansiella radicata</i> IUM1175	25	<i>Oudemansiella carnarii</i> AF321479(NCBI)
10	<i>Oudemansiella radicata</i> IUM1260	26	<i>Oudemansiella pudens</i> AF321487(NCBI)
11	<i>Oudemansiella mucida</i> IUM290	27	<i>Oudemansiella pudens</i> AF321488(NCBI)
12	<i>Oudemansiella mucida</i> IUM2410	28	<i>Oudemansiella pudens</i> AF321489(NCBI)
13	<i>Oudemansiella mucida</i> IUM2411	29	<i>Oudemansiella pudens</i> AF321490(NCBI)
14	<i>Oudemansiella mucida</i> IUM2412	30	<i>Oudemansiella pudens</i> AF321491(NCBI)
15	<i>Oudemansiella platyphylla</i> IUM300	31	<i>Oudemansiella pudens</i> AF321492(NCBI)
16	<i>Oudemansiella platyphylla</i> IUM301	32	<i>Oudemansiella pudens</i> AF321493(NCBI)

2) Total genomic DNA 분리

순수분리된 plate상의 균사들을 5mm cork borer로 조각내어 액체배지인 Potato Dextrose Broth(PDB) 배지에 100ml당 5조각씩 접종하고 120 rpm의 회전으로 25°C에서 10일간 배양하였다. 또한 액체배양된 균사들은 동결건조(freezing dry)하여 막자와 막자사발로 곱게 마쇄하였다. 이때 액체질소를 사용하여 급속냉동된 상태에서 마쇄하여 샘플이 용해되는 것을 방지하였다.

1.5ml micro tube에 마쇄된 균사 500mg와 500 μ l의 protein lysis buffer(50mM Tris-HCl(pH 7.5), 50mM EDTA(pH 8.0), 1% sarkosyl)를 첨가하여 강하게 섞어준 후 65°C에서 1시간 가량 반응시켰다. 반응 후에는 500 μ l의 P.C.I(Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol, 25 : 24 : 1)를 첨가하여 섞어준 후 실온에서 30분 가량 정치하고 12,000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하였다.

원심분리한 후 상등액만 취하여 새로운 tube로 옮기고 500 μ l의 에탄올을 넣어 4°C에서 5분 동안 12,000 rpm으로 원심분리 하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 제외한 나머지 용액은 제거하고 500 μ l의 70% 에탄올을 넣어 12,000 rpm, 4°C에서 5분 동안 원심분리하여 응집된 DNA를 세척하였다.

그후 tube내의 에탄올을 제거한 후 순수한 DNA pellet에 멸균수를 넣어 DNA를 녹이고, spectrophotometer를 사용하여 260nm와 280nm에서의 흡광도를 측정하여 순도와 양을 계산한 후 PCR 실험에 사용하였다. 실험에 사용하고 남은 DNA는 -20°C에 보관하여 후의 실험에 사용하였다.

나. 균주별 ribosomal DNA의 ITS영역 증폭

PCR(중합효소연쇄반응)은 BIONEER사의 Taq polymerase kit을 사용하였으며 tube 당 반응액의 부피가 20 μ l가 되도록 각 첨가물의 양을 조절하였다. 14.2 μ l의 3차 멸균수; 2 μ l의 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.3); 1.6 μ l의 dNTPs (0.2 mM의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0.5 μ l (50 pmol/ μ l)의 ITS5 primer; 0.5 μ l (50 pmol/ μ l)의 ITS4 primer; 0.2 μ l의 Taq DNA polymerase (5U/ μ l, Bioneer, Korea); 1 μ l의 DNA 희석액 (100 μ g/ μ l)을 섞어주었다. PCR반응은 96°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 순으로 30 cycle의 조건으로 실시하였으며, 이 과정에 의해 증폭되는 ribosomal DNA의 부위는 Fig. 2와 같이 18S rDNA의 일부분과 ITS1, 5.8S rDNA, ITS2의 전체, 그리고 28S rDNA의 일부분이다. PCR 산물을 정제하기 위해 2X volume의 100% 에탄올과 1/10 volume의 3M sodium acetate (pH 4.8)을 첨가하여 -80°C에서 45분간 처리한 후, 15분간 15,000 rpm에서 원심분리하여 DNA를 침전시키고 다시 70% 에탄올로 세척하여 건조하여 20 μ l TE buffer에 녹였다.

Table 3-2. Primer design for PCR amplification of ITS region used in this study

Primer	Direction	Sequence (5'-3')	Reference ^a	Length
ITS5	forward	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	1745-1766 bps (SSU)	22mer
ITS4	reverse	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	60-41 bps (LSU)	20mer

^aSSU; small subunit (18S ribosome), LSU; Large subunit (28S ribosome)

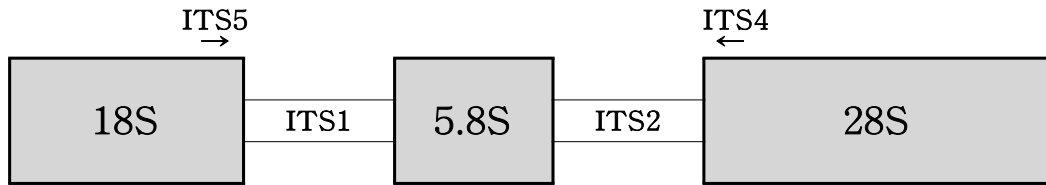


Fig. 3-1. A structure of ribosomal DNA gene cluster of higher fungi

다. 전기영동

반응후의 PCR product를 6X loading dye와 반응시킨 후 1.0% agarose gel 상에서 50~100V로 한시간 동안 전기영동하였다. 그후 gel을 Gel Documentation system (UVP Co.)로 옮겨 전기영동 결과를 컴퓨터 상에서 확인하였다.

라. 염기서열 결정

PCR이 끝난후 생성된 PCR product의 염기서열을 밝혀내기 위하여 sequencing을 전문으로 하는 회사인 SOLGENT사에 시퀀싱을 의뢰하였으며 밝혀진 염기서열과 기타 data는 email로 전달받아 분석에 사용하였다.

이때 sequencing 과정에서 염기가 제대로 밝혀지지 않은 부분의 보완을 위해 모든 sequence들을 수작업으로 보정하였으며 밝혀진 sequence들은 유전자 은행인 NCBI (National Center for Biotechnology Information) website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 기존에 등록되어있는 버섯들의 rDNA ITS region sequence들과 상동성을 비교하여 PCR 증폭의 성공여부를 확인하였다.

마. 염기서열 분석 및 계통학적 유연관계 분석 및 염기서열의 등록

계통학적 유연관계를 분석하기 위해 이용된 rDNA ITS부위의 염기서열은 ClustalX1 프로그램을 이용하여 정렬시킨 후 CLC free Workbench 프로그램 (CLC bio A/S, <http://www.clcbio.com>)의 neighbor joining과 UPGMA 분석법을 이용하여 evolutionary distance matrix를 작성하였고 이들 자료를 통해 생성된 계통수(phylogenetic tree)를 작성하였다. 그리고, 계통학적 유연관계에 대한 통계적 안정성을 검증하기 위해 1000회의 resampling에 근거한 bootstrap 분석을 반복 실시하였다.

바. PCR-RAPD를 이용한 유연관계 분석

종내의 계통분류학적 유연관계를 분석하기 위해 PCR-RAPD법을 이용하여 분석을 수행하였다. RAPD를 위해 사용된 10mer random primer를 OPERON사에서 구입하여 실험에 사용하였고 그 내용은 Table 3-3과 같다.

Table 3-3. The random primers used for PCR-RAPD in this study

Primers	Sequences (5'-3')	Length
OPO-3	CTGTTGCTAC	10 mer
OPO-9	TCCCACGCAA	10 mer
OPO-11	GACAGGAGGT	10 mer
OPO-12	CAGTGCTGTG	10 mer
OPO-16	TCGGCGGTTC	10 mer

PCR 반응은 BIONEER사의 Taq polymerase kit을 사용하여 수행하였으며 tube 당 반응액의 부피가 20 μ l가 되도록 각 첨가물의 양을 조절하였다. 14.2 μ l의 3차 멸균수; 2 μ l의 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.3); 1.6 μ l의 dNTPs (0.2 mM의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 1.0 μ l (10 pmol/ μ l)의 random primer; 0.2 μ l의 Taq DNA polymerase (5U/ μ l, Bioneer, Korea); 1 μ l의 DNA 회석액 (100 μ g/ μ l)을 섞어주었다. PCR 조건은 96 $^{\circ}$ C에서 30초간 denaturation, 35 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension 순으로 35 cycle의 조건으로 실시하였다.

PCR product는 ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에서 100V, 3시간 동안 전개한 후 Gel documentation system(UVP Co.)에서 밴드를 관찰하고 컴퓨터로 영상을 전송하여 저장하였다.

각 균주간 밴드를 분석한 자료는 NTSYSpc program ver. 2.2를 이용하여 유사도를 계산하고 UPGMA(Unweighted Paired Group Methods with Arithmetic average) method로 dendrogram을 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 균주별 ITS region의 계통분류학적 분석

1) 뿔나무버섯 ITS region의 염기서열 분석

총 27균주의 뿔나무버섯(*Armillaria mellea*)과 41균주의 뿔나무버섯부치(*Armillaria tabescens*) 등 총 68균주의 뿔나무버섯속 균주를 실험에 사용하였다. 이외에도 본 실험의 재료로 사용되지는 않았으나 ITS region 염기서열 자료가 저장되어 있는 *A. gallica* 6개 균주, *A. ostoyae* 5개 균주도 비교 분석하였다. 계통간 유연관계의 분석은 1000회의 resampling에 근거한 bootstrap으로 Neighbor-Joining method와 UPGMA method의 두 가지 분석방법을 실시하였다.

ITS5 primer와 ITS4 primer에 의하여 증폭된 공시균주들의 ITS region은 뿔나무버섯의 경우 845~860 bps 내외의 염기수를 나타내었고 뿔나무버섯부치는 810~820 bps 범위의 염기수를 나타내었다. 또한 뿔나무버섯과 뿔나무버섯부치 간의 ITS region 염기수는 40~50 bps 내외의 차이를 보였다(Table 3-4, 3-5)

Neighbor-Joining method를 이용한 뿔나무버섯속 2종 버섯을 분석한 결과, 뿔나무버섯의 경우 2개의 그룹, 뿔나무버섯부치의 경우 3개의 그룹으로 나뉘어진 것으로 나타났다. 또한 본 유연관계 분석에서는 균주가 확보되지 않은 *A. gallica*와 *A. ostoyae*의 경우 NCBI에 등록된 ITS region 염기서열을 비교한 결과 각각 이들 두 종은 한국산 *A. mellea*와는 다른 그룹에 속하는 것으로 나타나서 우리나라에 서식하는 *A. mellea*와는 유연관계가 낮은 것으로 나타났다(Fig. 3-2).

UPGMA method를 이용한 경우 뽕나무버섯과 뽕나무버섯부치의 균주들의 ITS region의 염기서열을 분석한 결과 *A. mellea*는 크게 2개의 그룹, *A. tabescens*는 3개 그룹으로 나뉘는 것으로 나타났다. *A. gallica*와 *A. ostoyae*도 Neighbor-Joining method의 분석과 유사하게 *A. mellea*와는 다른 그룹으로 나누어져서 유연관계가 낮은 것으로 나타났다(Fig. 3-3).

Table 3-4. ITS sequence of *Armillaria mellea* IUM949 amplified by ITS5 and ITS4 primers

***Armillaria mellea* IUM949 / 852 bps**

1 ggaaggatca ttattgaact tgaatcgtag cattgagaac tgttgctgac ctgttaaagg
61 gtatgtgcac gttcgacgtg ttgcgttcta ttcaccacc tgtgcacctt tgtagacttg
121 attaaactttc gctctcgagc ggttagaagg gttgctttcg agctcccttt gtctatcaag
181 tctatgtcta tataatctct tgtatgtcta gaatgtcttg tttatgggac gcaagtccct
241 taaatccttat acaactttca acaacggatc tcttggctct cgcacgcatg aagaacgcag
301 cgaaatgcga taactaatgt gaattgcaga attcagtgaa tcatcgagtc tttgaacgca
361 ccttgcgccc ttgggtattc cgaagggcat gcctgtttga gtgtcattaa attctcaacc
421 tccccttctt tcattaggag tgcggcggat tggatatggg ggtttgctgg tttctaacga
481 gatcagctcc tctgaaatgc attagcagaa accgtttgac tttggctgct aggctgtgat
541 aatatctacg cctttagatt aggtcggaat accgagtcac acagtggtaa ctaatcagggc
601 tttcgggtct ggcttagaat cggtttggaa ggtgcttaac ggctcccttct gctttcttcc
661 ttgvcggaga tacttgtccg attctaagag aggagttgct tagcvcgagc ttagctttcc
721 ttgatthttc cctttgactc tgtagaagga ttcagcttct aaccgtccat tgacttggac
781 aatttattga ctatttgacc tcaaatcagg taggactacc cgctgaaactt aagcatatca
841 ataagcggag gg

Table 3-5. ITS sequence of *Armillaria tabescens* IUM910 amplified by ITS5 and ITS4 primers

***Armillaria tabescens* IUM910 / 812 bps**

1 cgtaggtgaa cctgcggaag gatcattaat gaaacttgaa tcgtagcatc gaaagctggtt
61 gctgaccccc taagggtagt gcaaggttcg acgtgttcg ttctattcat ccacctgtgc
121 acctttgtag acttggttaa ctttcgcctt agggcggata gaagggttgc tttcgagctc
181 cttttgtctt accaagtcta tgtctatata atctcttcta tgcctagaat gtcttgttta
241 taggacgcaa gtcctttaaa tcttatataa ctttcaacaa cggatctctt ggctctcgca
301 tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataac taatgtgaat tgcagaattc agtgaatcat
361 cgagtcctttg aacgcacctt gcgccctttg gtattccgaa gggcatgcct gtttgagtg
421 cattaaaattc tcaacctccc ctcttttcat taggagtcgc gcggattgga ttatgggggc
481 ttgctggact cttagcgaga tcagctcctc tgaaatgcat tagcagaaac cgtttgactt
541 tggctgctag gctgtgataa tatctacgcc ttgtagttga tccggaatac gagtcaattac
601 tcaggctttc gactctggct taggatcggg ttggagggta gcttaacggc tccttctgct
661 ttctccctta gaggagatac ttgtccgatg cttagagagg atcgcgtaa gctttccttg
721 attcttgact ttgtagaagg attcagcttc taacggtcca ttgacttggg caatttatg
781 actattgacc tcaaatcagg tagacacccc ct

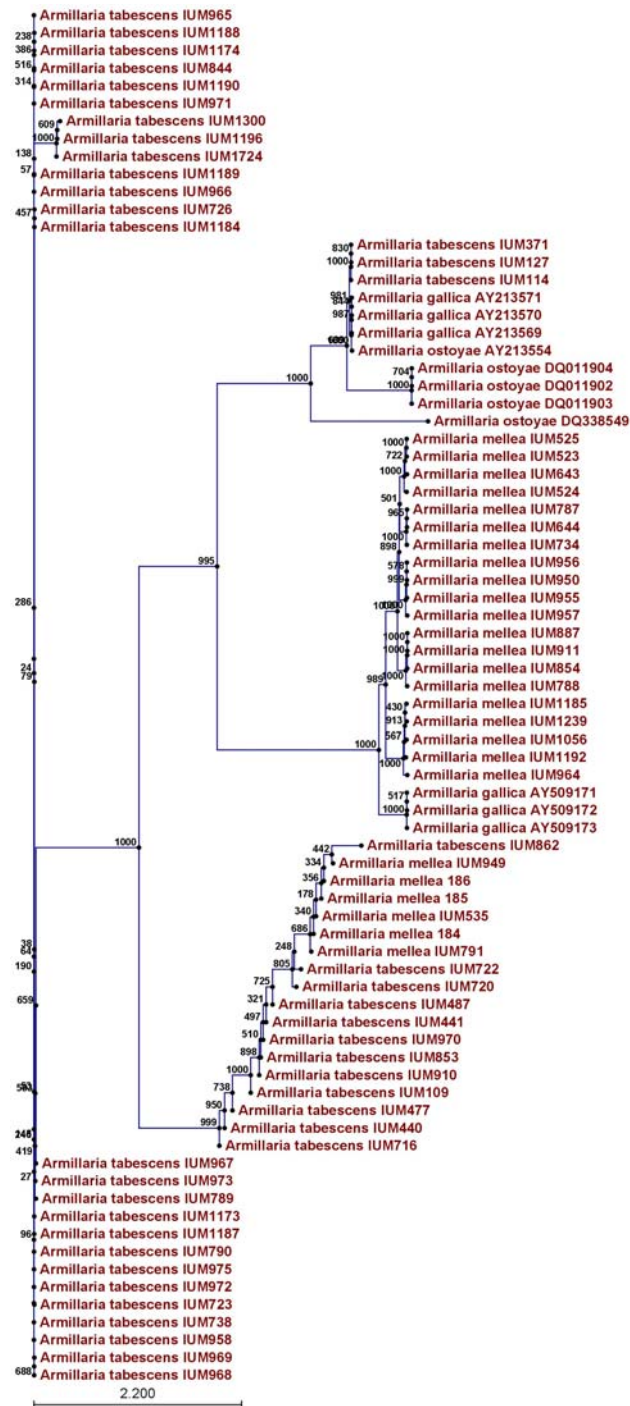


Fig 3-2. Dendrogram of phylogenetic relationship of *Armillaria* spp. based on ITS region using neighbor joining method with 1000 bootstrapping

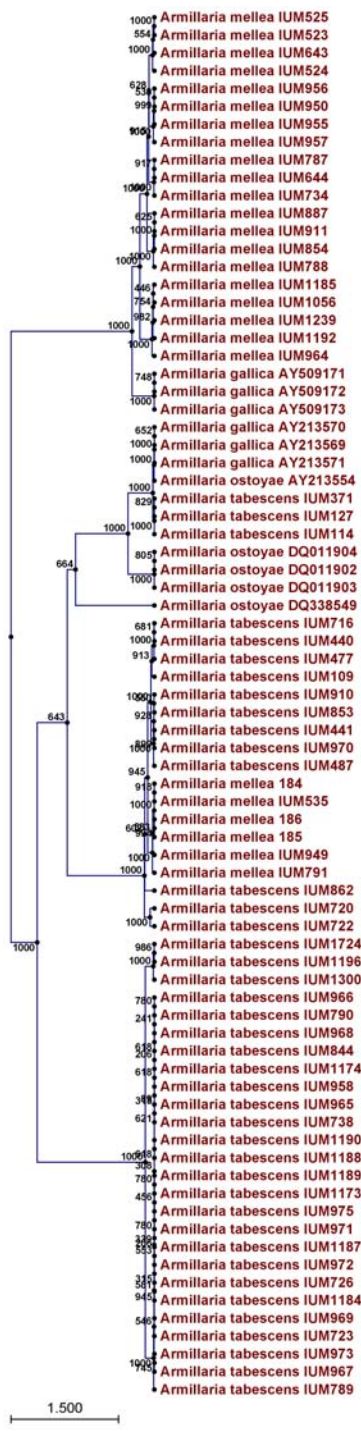


Fig 3-2. Dendrogram of phylogenetic relationship of *Armillaria* spp. based on ITS region using UPGMA method with 1000 bootstrapping

2) 뽕나무버섯의 PCR-RAPD 분석

14균주의 뽕나무버섯(*Armillaria mellea*)을 10mer oligonucleotide로 구성된 5 종류의 random primer를 이용하여 PCR-RAPD 분석을 수행하였다(Fig. 3-3). 각 primer들의 결과를 종합하여 각 균주의 DNA band pattern을 분석한 결과는 Fig. 3-4와 같다. 공시균주들이 크게 5그룹으로 구분되는 것이 관찰되었다. *A. mellea* 186 균주와 *A. mellea* IUM523 균주의 상동성이 95% 이상 매우 높은 것으로 나타났다.

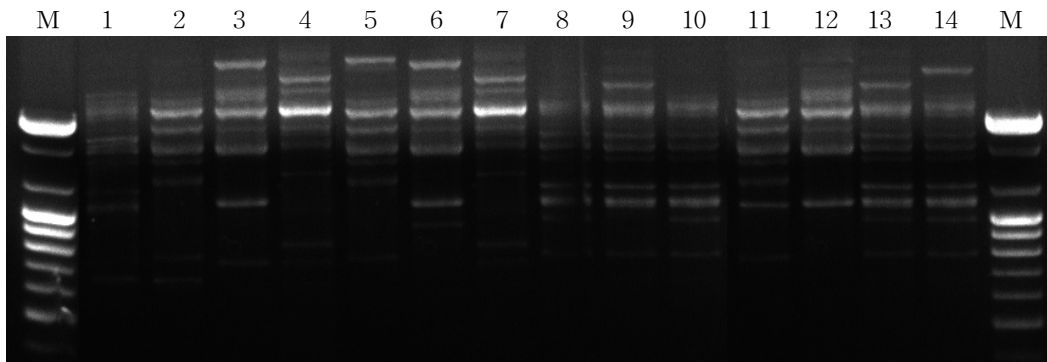


Fig. 3-3. PCR-RAPD band pattern of *Armillaria mellea* generated by OPO-12 primer

M: Marker(1kb), 1; IUM791, 2; IUM949, 3; IUM535, 4; 184, 5; 185, 6; 186, 7; 741, 8; IUM523, 9; IUM644, 10; IUM854, 11; IUM950, 12; IUM1056, 13; IUM1185, 14; UM955

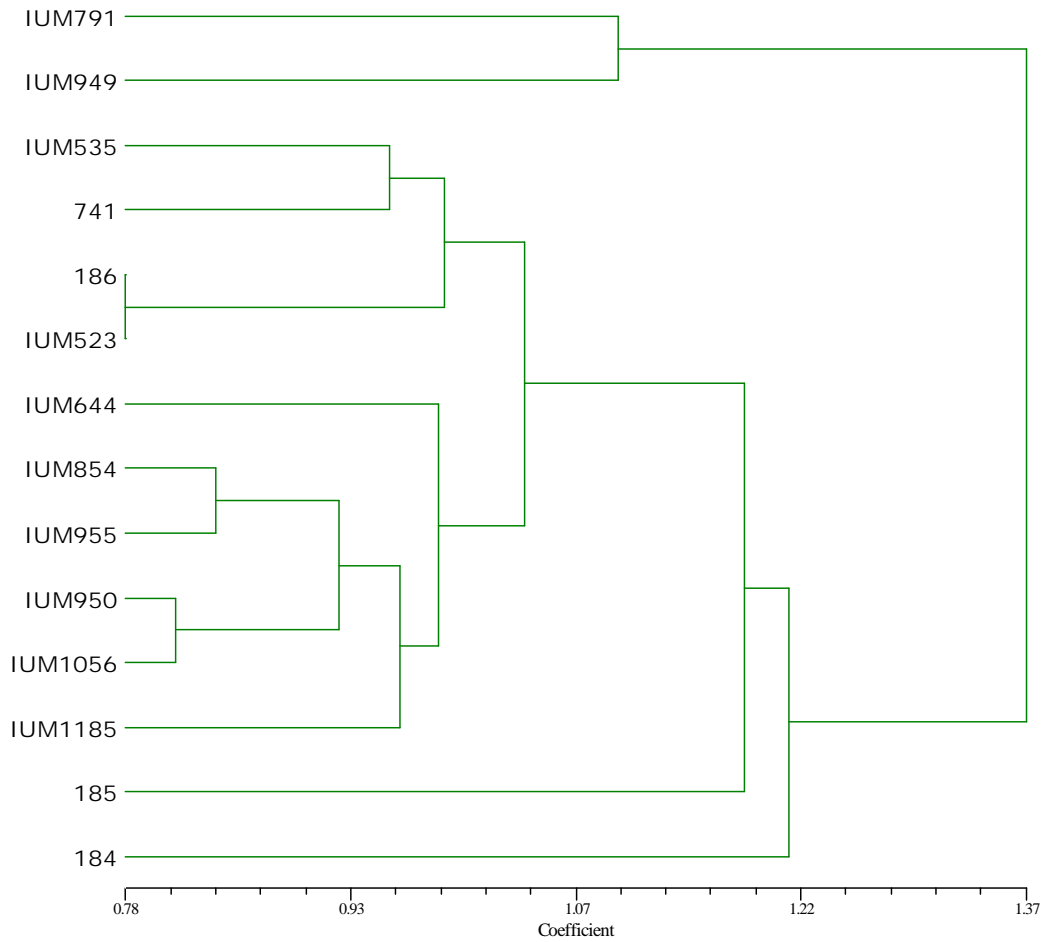


Fig. 3-4. Dendrogram of 14 strains of *Armillaria mellea* by PCR-RAPD analysis using UPGMA method

3) 민긴뿌리버섯 ITS region의 염기서열 분석

총 7종 36균주의 민긴뿌리버섯속 버섯들의 ITS region 염기서열을 이용하여 각각의 유연관계를 분석하였다. 또한 1000회의 resampling에 근거한 bootstrap으로 Neighbor-Joining method와 UPGMA method의 두가지 분석을 실시하였다.

ITS5 primer와 ITS4 primer에 의하여 증폭된 민긴뿌리버섯속 버섯들의 ITS region의 염기수는 전체적으로 550~820 bps를 나타내었고 각각의 종간 ITS region의 염기수는 300 bps 내외의 큰 차이를 보였다(Table 3-6~3-9).

Neighbor-Joining method를 이용하여 분석한 경우, 각 균주들이 전체적으로 각각의 종에 따라 각각 서로 다른 그룹으로 묶이는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 민긴뿌리버섯(*O. radicata*)과 끈적긴뿌리버섯(*O. mucida*)의 경우 분석결과와 동일한 그룹으로 묶인 것이 확인되었다. 이는 본 실험에서 Neighbor-Joining method의 분석방법 결과가 형태적으로 전혀 다른 2종의 버섯이 같은 버섯종으로 오인되게 할 수 있다는 것을 보여준 사례로 ITS region의 염기서열 분석결과를 이용하여 종을 구분할 경우 큰 오류가 발생할 수 있다는 가능성을 보여준 예로 사료된다. 또한 유럽의 Czech 공화국 미생물연구소에서 분양받은 *O. brunneomarginata* IUM2595 균주의 경우 유전적 유연관계가 다른 *Oudemansiella*속 종의 균주들에 비해 가장 먼 거리에 있는 것으로 나타났다(Fig. 3-4). 이 종은 현재 아시아 지역에서는 거의 발견되지 않고 유럽에서 잘 발견되는 고유종이다.

UPGMA method를 이용하여 분석한 경우, 민긴뿌리버섯속의 버섯들이 종에 따라 각기 다른 그룹으로 묶이는 것을 확인할 수 있었다. 이 분석방법의 경우 Neighbor-Joining method와 달리 민긴뿌리버섯과 끈적긴뿌리버섯은 서로 다른 그룹으로 나누어진 것으로 나타났다. 따라서 Neighbor-Joining method에 비해 이 방법이 민긴뿌리버섯속의 종을 구분하는 데에 효과적인 것으로 사료되었다. 또한 *O. brunneomarginata* IUM2595 균주의 경우에는 Neighbor-Joining method 분석에서와 같이 유전적 유연관계가 다른 민긴뿌리버섯속 균주들에 비해 가장 멀리 떨어져있는 것으로 분석되었다(Fig. 3-5).

Table 3-6. ITS sequence of *Oudemansiella radicata* IUM770 amplified by ITS5 and ITS4 primers

***Oudemansiella radicata* IUM770 / 786 bps**

```
1 tccgtaggtg aacctgcgga aggatcatta ttgaaaacac tgaacggcttg tggcttcact
61 tctgttgctg actttcctta gggggagtat gtgcacgttt gaagtcgctc gcctcttctt
121 tgtccacctg tgcacctttt gtagatctgg ttgggaagct cacttgaagt ggattttgaa
181 gggtttgctt gcgtcccctt tgtccggcca ggtctatgct tcacatcctc tctttgcatg
241 tttagaatgt ctgttttatt ggacttgatc gtcctttaaa aaacttaata caactttcaa
301 caacggatct cttggctctc gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat aactaatgtg
361 aattgcagaa ttcagtgaat catcgagtct ttgaacgcac cttgcgccct ttggatctc
421 gaagggcatg cctgtttgag tgtcagtaaa tttctcaacc cttcttactt ttttgtaag
481 gatgggattg gatagtgag gcttgccgga tgttcaacgt tcggctcctc tgaaatgcat
541 tagcggta caaccatttact tgggctacgc taagctgtga taatatctaa gctagctggg
601 tcagagtgtt ggcggagttc gggcttttga agggttttgc ctccggctc ccttcgggtt
661 ctctcttcgg agggatacct atgcgactct gtgaaaaaagt gttgttcggt cttctaatacg
721 tctcttgaaa ctgggacaaa ccttttaaac tgattatttg acctcaaatc aggtagacag
781 ctcgat
```

Table 3-7. ITS sequence of *Oudemansiella mucida* IUM290 amplified by ITS5 and ITS4 primers

***Oudemansiella mucida* IUM290 / 811 bps**

1 ggaagtaaaa gtcgtaacaa ggtttctgca agtgactgcg gaggtcatta ttgaaaaactc
61 tgaacgcttg tggcttcact tctgttgctg actcttgagt atgtgcacgt tttgaaagtcg
121 ctcgccctct ctttgccac ctgtgcacct tttgtagatc tggttggggg tgaagggtgag
181 gttcgccctc cttcgtttcc tccgggtcta tgcttcatat catctcttgc atgttttagaa
241 tgtcttcggt tatgggactt caccgtcctc taaaacaact taatacaact ttcaacaacg
301 gatctcttgg ctctcgcatc gatgaagaac gcagcgaat gcgataacta atgtgaattg
361 cagaattcag tgaatcatcg agtctttgaa cgcaccttgc gcccttgggt atccgaaagg
421 gcatgcctgt ttgagtgtca gtaaaactctc aaccttctt acttgttttc gagttcgaat
481 ggtgttggat ggtggaggct tgccggacct ttcaatgggt tcagctcctc tgaaatgcat
541 tagcagtacg aaccattact tgggctacgc taagctgtga taatatctaa gctagcttgg
601 ttcagagtgt tggcagagct cgggtgtttg aagggtttgc ctccggctc cctttgtgtt
661 ctctctccgg agagatacct atgcgactct gtgaaagggt tttgcgaccg cttcgaaccg
721 tcttcttgac tgagacaact ttaactgatt atttgacctc aaatcaggta ggactaccg
781 ctgaaacttaa gcatatcaat aagcgggagg a

Table 3-8. ITS sequence of *Oudemansiella platyphylla* IUM300 amplified by ITS5 and ITS4 primers

***Oudemansiella platyphylla* IUM300/ 660 bps**

```
1 ccgtaggtga acctgcgga ggcattacc tgaagaaatg cgtagttagt tgagctggct
61 tcccttaagg agaaggcctt ggtaaatcgc tttttcaaa ttcttccacg tgccccccct
121 tgttgggttt atgataaagg ttaagaagg cattcatctg cttgctttca actttttgta
181 gcctatgtct tacacaaact cctttgatag tcttatgaat gtgtgtatcc aaattggctc
241 ttgatccaat acaagtcata tatacaactt tcagcaacgg atctcttggc tctcgcatcg
301 atgaagaacg cagcgaatg cgataagtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga
361 atctttgaac gcaccttgca ctccttgggt attccgagga gtagcctgtt ttgagtgtca
421 ttatatctc aaaaaaccta actgttttct gaatggctag gcttttttggg tgtgagggat
481 tgctggcctt cgagtcgggc tcccttcaaa tgcattagtg gttgcttcat tcaattagag
541 tgtgatagta tatctacgcc tgttacagtg aactgatata aatcatccgc ttccaactg
601 tcttgatttg aacataaca gacattttga ctattgacct caaatcagta gacaccccag
```

Table 3–9. ITS sequence of *Oudemansiella brunneomarginata* IUM2595 amplified by ITS5 and ITS4 primers

<i>Oudemansiella brunneomarginata</i> IUM2595 / 590 bps	
1	TGGAAGTAAA AATCGTAACA AGGTCCTCCGT TGGTGAACCA GCGGAGGGAT CATTACCGAG
61	TTATTCAACT CATCAACCCCT GTGAACATAC CTAACCGITG CTTCCGGCGG AATAGACGGC
121	CCCGTGAAAC GGGCCGCCCC CGCCAGAGGA CCCTTAACTC TGTTCCTATA ATGTTTCTTC
181	TGAGTAAAAA AAGCAAATAA ATTAATAACTT TCAACAACCG ATCTCTTGGC TCTGGCATCG
241	ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT GAATCATCGA
301	ATCTTTGAAC GCACATTGGC CCCGCCAGTA TTCTGGCGGG CATGCCCTGT CGAGCGTCAT
361	TACAACCCCTC AGGCCCCCGG GCCTGGCGTT GGGGATCGGC GGAGCCCCCC GTGGGCACAC
421	CCCGTCCCCC AAATACAGTG GCGGTCCCGC CGCAGCTTCC ATCGCGTAGT AGCTAACACC
481	TCGCGACTGG AGAGCGGCGC GGCCACGCCG TAAAACACCC AACTCTTCTG AAGTTGACCT
541	CGAATCAGGT AGAATCCCGC TGAACCTAAG CATATCAATA AGCGGAGGAA

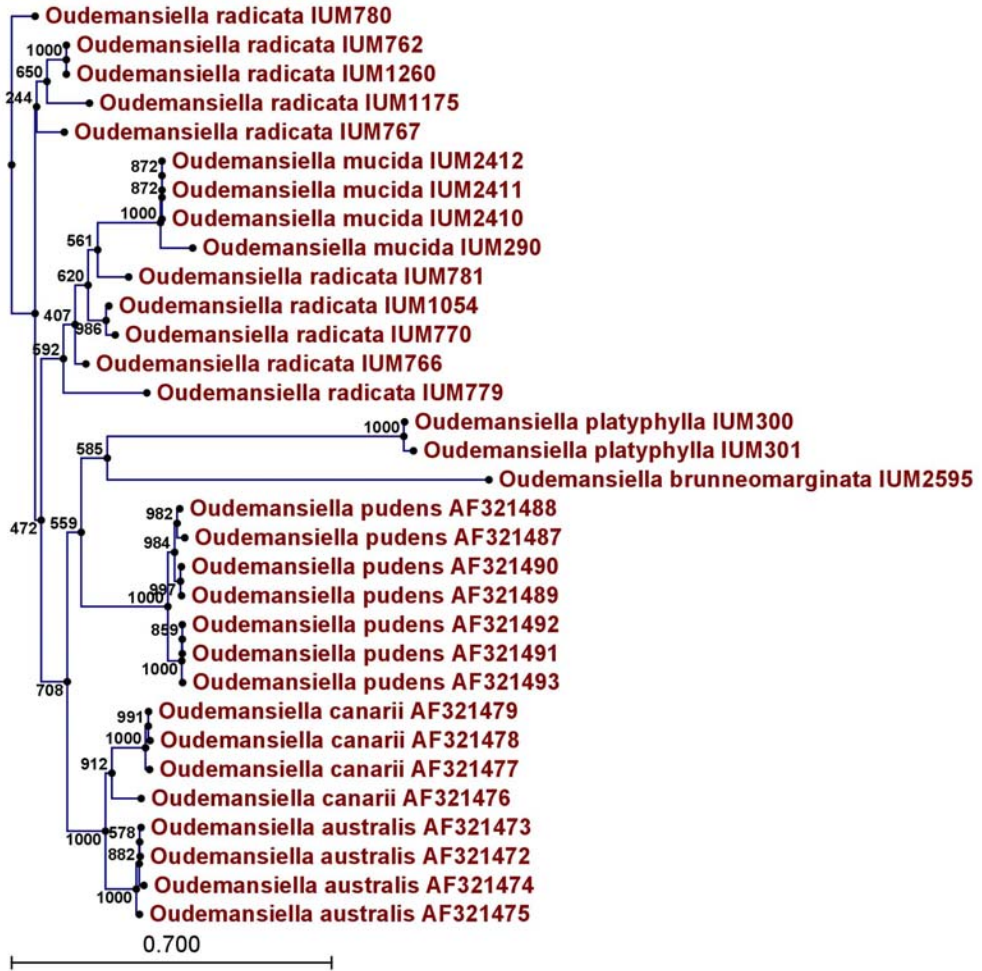


Fig 3-4. Dendrogram of phylogenetic relationship of *Oudemansiella* spp. based on ITS region using neighbor joining method with 1000 bootstrapping

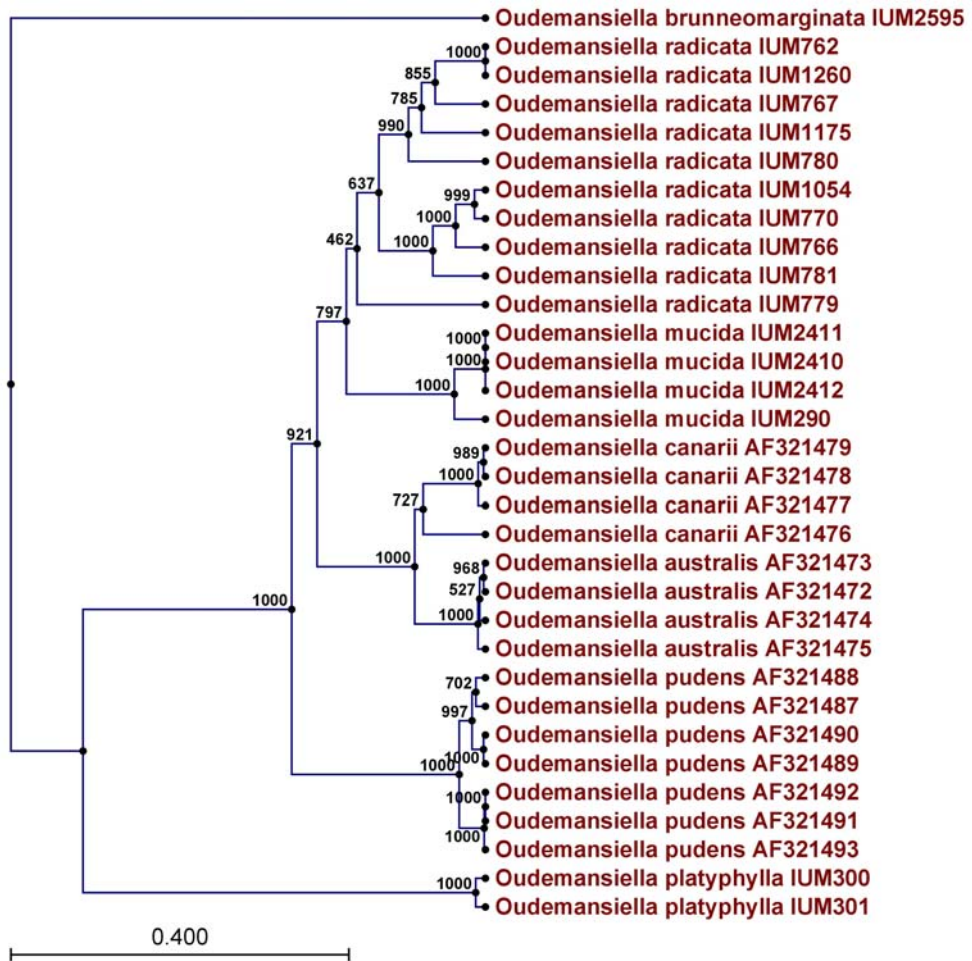


Fig 3-5. Dendrogram of phylogenetic relationship of *Oudemansiella* spp. based on ITS region using UPGMA method with 1000 bootstrapping

4) 민긴뿌리버섯의 PCR-RAPD 분석

10균주의 민긴뿌리버섯(*Armillaria mellea*)을 10mer oligonucleotide로 구성된 5종류의 random primer를 이용하여 PCR-RAPD 분석을 수행하였다(Fig. 3-6). 각 primer들의 결과를 종합하여 각 균주의 DNA band pattern을 분석한 결과는 Fig. 3-6과 같다. 공시균주들이 크게 4그룹으로 묶이는 것을 관찰하였다. *O. radicata* IUM767 균주와 *O. radicata* IUM1175 균주의 상동성이 매우 높은 것으로 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, IUM1054 균주와 IUM766 균주가 나머지 균주들과 비교적 먼 상동성이 먼 것으로 나타났다.

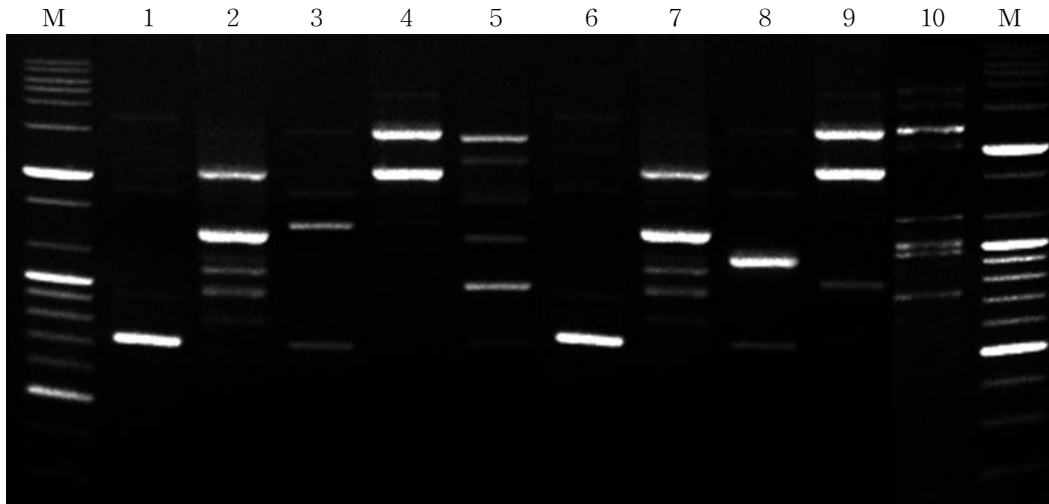


Fig. 3-6. PCR-RAPD band pattern of *Oudemansiella radicata* generated by OPO-3 primer

M; Marker(1kb), 1; IUM000, 2; IUM000, 3; IUM000, 4; IUM000, 5; IUM000, 6; IUM000, 7; IUM000, 8; IUM000, 9; IUM000, 10; IUM000

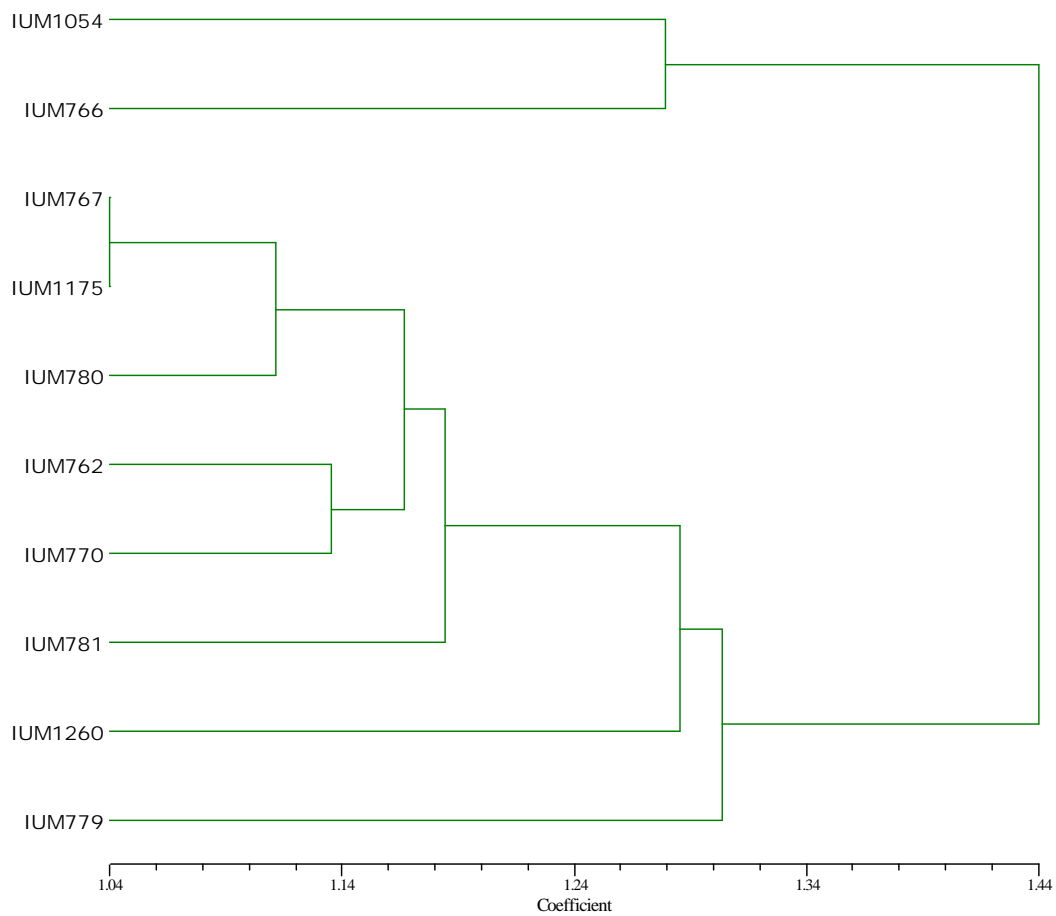


Fig. 3-7. Dendrogram of 10 strains of *Oudemansiella radicata* by PCR-RAPD analysis using UPGMA method

4. 참고문헌

- Buswell, and Philip, G. Miles. Gordon and Breach science. Publishers.
U.S.A Damaj, M., Jabaji Hare, S.H and Chares st, P.M. 1993. Isozyme variation and genetic relatedness in binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytopathology* **83**: 864-871.
- Chiu, S.W., Kwan, H.S. and Cheng, S.C. 1993. Application of arbitrarily primed polymerase chain reaction in molecular studies of mushroom species-species with emphasis on *Lentinus edodes*. In Genetics and Breeding of Edible Mushroom. Edited by Shu-Ting Chang, John. A.
- Daniel, W., Munch, J. C., Botton, B. and Buscot, F. 1996. DNA polymorphism in Morels: Complete sequences of the internal transcribed spacer of genes coding for rRNA in *Morchella esculenta*(yellow morel) and *Morchella conica*(black morel). *Appl. Env. Microbiol.* **62**: 3541-3543.
- Erlich, H.A., Gelfand, D.H. and Sninsky, J.J. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science.* **252**: 1643- 1651
- Fischer, M. 1994. Pairing tests in the *Phellinus pini* group. *Mycologia* **86**: 524-539
- Fukuda, M. and Tokomoto, K. 1991: Variation of isozyme patterns in the natural population of *Lentinus edodes*. *Proc. Jpn. Acad.* **67**: 43-47
- Itavaara, M. 1988. Identification of shiitake strains and some other basidiomycetes: protein profile, esterase and acid phosphatase zymograms as an aid in taxonomy. *Transactions of the British Mycological Society* **91**: 205- 304

- Kawamura, N. and M. Goto. 1980. Biochemical characteristics of the isolates of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). Reports of the Tottori Mycological Institute. **18**:217-224.
- Mitchell, J. I., Robert, P. J. and Moss, S. T. 1995. Sequence or Structure?/A short review on the application of nucleic acid sequences information on fungal taxonomy. Mycologist **9**(2): 67-75.
- Moncalvo, J. M., Wang, H. H. and Hseu, R. S. 1995. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. Mycologia **87**: 223-238.
- Nishida, J. and Sugiyama, J. 1993. Phylogenetic relationships among *Taphrina*, *Saitoella* and other higher fungi. Mol. Biol. Evol. **10**: 431-436.
- O'Donell, K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic Ascomycete *Fusarium sambucinum*. Curr Genet **22**: 213-220.
- Parmasto, E. 1995. Corticioid fungi: a cladistic study of a paraphyletic group. Can. J. Bot. **73**(S): 843-852.
- White, T. J., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Eds., M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, San Diego, California, 482 p.
- 박동석, 고승주, 김양섭, 석순자, 송재경, 이운수, 류진창, 성재모. 1999. 먹물버섯류의 ITSII 영역 염기서열에 의한 유연관계 분석. 한국균학회지 **27**(1): 27-31.
- 박동석, 고승주, 김양섭, 석순자, 류진창, 성재모. 1999. 먹물버섯속

- (*Coprinus*)과 눈물버섯속 (*Psathyrella*)의 ITS 영역 염기서열에 의한 계통학적 유연관계분석. 한국균학회지 **27**(4): 274-279.
- 박완희, 이호득. 1991. 한국의 버섯. 교학사. 508pp.
- 박완희, 이호득. 1999. 한국약용버섯도감. 교학사. 758pp.
- 이미정, 전상철, 황일기, 최한구, 김규중. 2005. 강원도 지역 구름버섯균의 rDNA의 ITS 부위 염기서열 분석. 한국균학회지 **33**(1): 1-10.
- 이지열. 1988. 원색 한국의 버섯. 아카데미. 365pp.
- 이창수, 상병찬, 1995, RAPD분석법에 의한 소 품종 판별용 표지인자의 검출 최적화 연구, 한국식품학회지. **15**: 35-39
- 이태수, 이지열. 2000. 한국 기록종버섯 재정리목록. 임업연구원. 87pp.
- 조덕현. 2003. 원색한국버섯도감. 아카데미서적. 436pp.

제 4 절 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 기능성 유용 물질의 탐색

1. 서 론

버섯의 항암 성분에 관한 실용적인 연구는 Chihara 등 (1970)이 표고 (*Lentinus edodes*)의 자실체로부터 β -1,3-glucan를 분리하여 이 다당체가 Sarcoma 180 종양에 강한 억제 효과가 있다는 것을 보고한 후 lentinan이라는 이름으로 상업화에 성공하였고, Komatsu 등 (1969)은 치마버섯 (*Schizophyllum commune*)의 배양여액으로부터 항암성을 지닌 고분자 물질인 β -1, 3; β -1, 6-glucan을 분리하여 이를 대체의약품 항암제인 schizophyllan으로 개발하였다. 버섯 유래의 항암성 고분자다당류는 일반적으로 기존의 인공합성 항암제와는 달리 암세포에 직접 작용하기보다는 숙주매개성 면역기능을 증진시켜 면역계와 관련된 보체와 대식세포를 활성화하여 치료 효과를 나타내기 때문에 독성과 부작용이 거의 없다는 장점이 있다(Sugihara et al., 1972). Suzuki 등 (1982)은 치마버섯에서 추출한 schizophyllan의 항암작용 기전이 숙주의 면역세포인 대식세포와 T 림프구 등의 활성화에 의한 것임을 보고하였다.

뽕나무버섯(*Armillaria mellea*)은 분류학적으로 송이과(Tricholomataceae), 뽕나무버섯속(*Armillaria*)에 속하는 버섯으로서 봄부터 가을에 걸쳐 침엽수, 활엽수의 생나무 밑둥, 그루터기, 죽은 나무 위에 속생하는 버섯이다. 난과 식물인 천마와 공생하고, 구멍장이버섯과에 속하는 약용버섯인 저령과도 공생하는 다양한 생활사를 갖고 있다. 형태적으로 살펴보면 갓은 지름 4~12cm로 초기에는 평반구형이나 후에 편평형이 되고, 갓 표면은 담갈색~담황갈색이며, 중앙부에는 흑갈색의 섬유상 털이 나 있고, 갓 둘레에는 방사상의 선이 있다. 주름살은 내린형이며 약간 성기고, 초기에는 백색이나 후에 담갈색이 된다. 대는 4~5

× 0.6~2cm로 섬유질이며, 상부는 백색~담황색이고 백색~황백색의 턱반이가 있으며, 하부는 흑갈색이고 기부에는 흑색의 균사속을 형성한다. 포자는 7~8.5 × 4.5~6.5 μ m로 타원형이며, 표면은 평활하고, 포자문은 백색이다.

뽕나무버섯은 동의보감에 의하면 영양이 풍부하고 약효가 우수한 식·약용 버섯이다. 일본과 중국의 연구자들 실험결과에 의하면 뽕나무버섯에서 추출한 단백다당류를 생쥐에 주사하거나 경구 투여할 경우 sarcoma 180 암세포에 대해 높은 저지율과 대식세포의 수를 현저히 증가시키는 등 항암 및 면역증강 효과가 있다는 것이 보고되었다. 또한 이 버섯의 추출물이 투여된 허혈성 중풍환자는 동맥의 혈류량이 증가하여 뇌에 산소 공급이 원활해지면서 중풍 증상이 많이 개선되고 혈압이 떨어지는 등의 효과가 나타나는 것은 물론 혈액내의 고지혈증도 완화되는 치료효과가 보고되었다. 또한 최근 중국에서는 천마 공생균인 뽕나무버섯 균사체에서 추출한 물질을 치매환자에 투여한 결과 그 개선효과가 수천년 동안 치매의 치료제로 사용해온 천마에 못지않게 높게 나타나고 있는 것이 확인되면서 뽕나무버섯을 치매의 치료제로 이용하기 위한 연구가 활성화되고 있다.

민긴뿌리버섯(*Oudemansiella radicata*)은 분류학적으로 송이과(Tricholomataceae), 민긴뿌리버섯속(*Oudemansiella*)에 속하는 버섯으로서 봄부터 가을에 걸쳐 땅속에 묻힌 활엽수의 썩은 나무나 낙엽이 잘 분해된 땅위에 단생한다. 자실체는 지름이 4~10cm로 처음에는 반구형이나 평판구형을 거쳐 볼록한 편평형으로 표면에는 약간의 주름이 있다. 갓 표면은 담갈색~담회갈색이며, 습하면 점성이 있고 조직은 회갈색~백색이다. 대의 상부는 백회색이고 가늘며 기부는 약간 굽어졌다가 가늘어진 뿌리모양으로 땅 속 3~4cm의 깊이까지 뻗어있다. 민긴뿌리버섯은 맛과 향기가 뛰어나 식용으로서의 가치도 매우

높으며 예로부터 중국에서는 암, 고혈압, 진균감염증 등의 치료에 이용해왔다.

이와 같이 버섯으로부터 추출한 물질이 면역체계를 활성화시켜 항암효과를 나타내거나 고혈압이나 진균증의 치료에 이용이 가능하다는 것이 밝혀짐에 따라 많은 종류의 버섯을 대상으로 유용한 생리활성물질을 검색하여 이를 실용화 하려는 연구가 활성화되고 있다. 따라서 본 연구에서는 공시버섯인 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯을 인공재배하여 얻어진 자실체로부터 중성염용액(0.9%), 메탄올(80%) 및 열수를 이용하여 생리활성 성분을 추출한 후 이들 성분이 *in vitro*와 *in vivo*에서 생쥐의 항암능력과 면역성을 증가시키는 효과가 있는지 알아보려고 실험을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 실험재료

본 실험에 사용된 뿔나무버섯(*Armillaria mellea*)과 민긴뿌리버섯(*Oudemansiella radicata*)은 제3절의 실험을 통해 생산된 신선한 자실체를 50℃에서 24시간 동안 건조한 후 마쇄하여 실험에 사용하였다(Fig. 4-1).

나. 성분의 추출 및 분리

1) 중성염 추출물 (Fr. Na)

건조된 자실체를 분쇄기로 마쇄한 후 80% 메탄올 10ℓ에 48시간 동안 상온에서 침지하였으며, 메탄올 추출물을 제거하고 남아 있는 자실체에 0.9% NaCl 4ℓ를 첨가하여 2회 반복 추출하였다. 이 추출물을 여과한 다음 동결건조(Operon Co.)하고 300 ml의 3차 증류수를 가하여 용해시킨 후 이 용액을 투석막(MW: 12,000, Sigma Co.)을 사용하여 4℃에서 48시간 동안 투석하였다. 투석막 내 액에 4배 용량의 ethanol을 가한 뒤 4℃에서 24시간 정치시킨 후 10,000×g로 20분간 원심 분리(Vision Co., VS23STM)하여 다당류 침전물을 얻었다. 침전물을 3차 증류수로 현탁하여 위의 방법으로 재투석하고 동결건조하여 최종적인 중성염 추출물을 얻었다(조 등, 1995).

2) 열수 추출물 (Fr. HW)

중성염 추출 후 회수한 자실체에 물 5ℓ를 첨가하여 95℃에서 12시간 동안 추출하였다. 다당류를 침전시키기 위하여 추출액에 4배 용량의 95% ethanol을 첨가하고 4℃에서 24시간 동안 정치시킨 후 원심 분리하였다. 침전물을 3차 증

류수 500 ml에 용해시켜 4℃에서 48시간 동안 투석한 후, 투석막 내의 액을 동결건조하여 분말형태의 열수 추출물을 얻었다(조 등, 1995).

3) 메탄올 추출물 (Fr. MeOH)

메탄올 자실체를 상온에서 48시간 methanol에 침지후 얻어진 Whatman No.3 여과지로 회수한 methanol 추출물을 여과한 다음 rotary evaporator (Tokyo Rikakikai Co., N-1)로 감압농축하였다. 농축액을 동결건조한 후 ethyl-acetate와 증류수를 1:1 (v/v)로 혼합한 용액으로 추출하여 물 층의 여액을 얻어 감압농축시킨 다음, 동결건조하여 추출물을 얻었다(한 등, 2000).

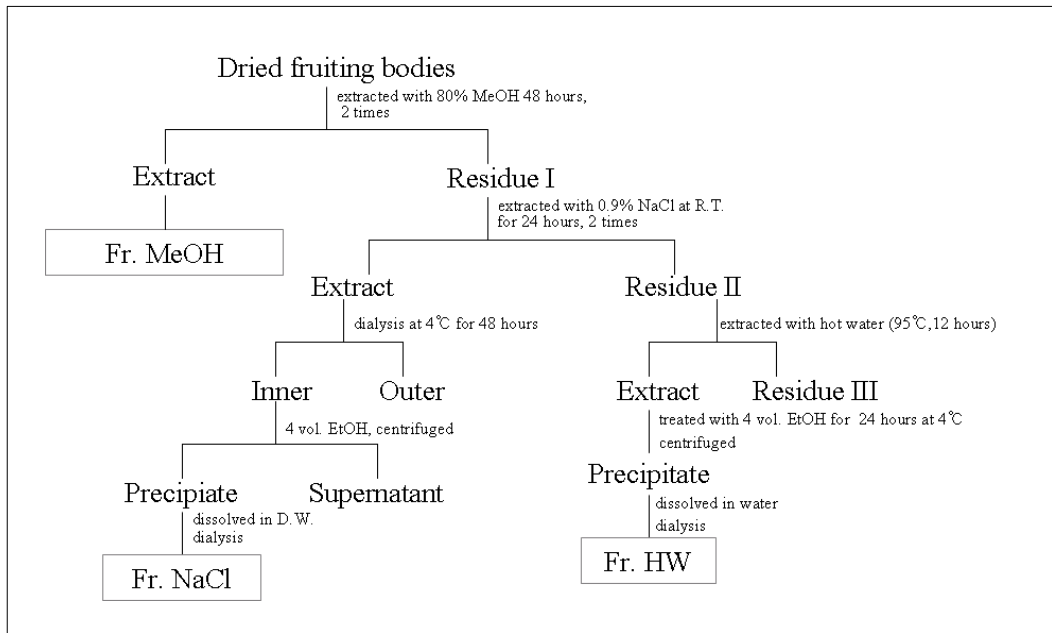


Fig. 4-1. The extraction procedures of crude β -D-glucan from *Armillaria mellea* and *Oudemansiella radicata*

다. 암세포에 대한 세포독성

마우스 복수암세포인 Sarcoma 180과 마우스 섬유아세포인 NIH3T3에 대한 메탄올과 중성염, 그리고 열수 추출물의 세포독성 및 항암 효과를 Denizot(1986)의 방법으로 검정하였다. 각각의 추출물을 PBS buffer (Phosphate Buffer Saline, Gibco BRL)에 0, 10, 100, 1000, 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 녹여 암세포에 농도별로 처리함으로써 세포의 생존력을 측정하였다. Sarcoma 180과 NIH3T3 세포주는 서울대학교 한국세포주은행에서 분양받아 계대배양후 실험에 사용하였다.

Sarcoma 180 세포주는 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco BRL)을 첨가한 RPMI 1640 (Gibco BRL) medium에서 세포 밀도가 2×10^6 cells/ml 이상으로 자랄 때까지 37°C에서 5%의 CO₂의 조건으로 배양하였다. 배양액을 300 ×g에서 3분 동안 원심분리한 후 PBS buffer로 2회 세척하고 뭉쳐진 세포들을 새로운 RPMI 1640 medium에 고르게 풀어주었다.

Sarcoma 180은 4×10^5 cells/ml이 되도록 RPMI 1640 배양액으로 희석하고 96 well plate에 50 μl 씩 주입하였다. 최종농도가 10~2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 PBS buffer로 희석한 각각의 추출물을 50 μl 씩 처리하여 각 well의 총 용적이 100 μl 가 되도록 맞춘 후 37°C에서 5%의 CO₂의 조건으로 24시간 배양하였다. 1 mg/ml 2,3-bis(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT, Sigma Co.) solution 당 phenazine methosulfate (PMS, Sigma Co.) 10 μl 씩 포함된 용액을 well 당 30 μl 씩 처리하여 암 조건에서 2시간 배양한 후 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

NIH3T3의 경우에는 생존 세포수가 2×10^5 cells/ml이 되도록 RPMI 1640 medium으로 희석하고 96 well plate에 100 μl 씩 주입한 후 37°C에서 5%의 CO₂

의 조건으로 24시간 배양하였다. 그리고 여분의 액체배지를 모두 흡입하여 제거한 후 최종 농도가 10~2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 PBS로 희석한 각각의 추출물을 각 well에 100 μl 씩 처리하였으며, 대조군에는 동량의 PBS를 첨가하였다. 농도별로 처리된 NIH3T3 세포주는 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양하였으며 그후 각 well당 살아있는 세포의 수를 세기 위해 well 당 5mg/ml 농도의 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) solution을 10 μl 씩 첨가한 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 4시간 동안 암상태로 배양하였다. 푸른색의 MTT formazan이 생성되면 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 MTT formazan을 용해시켜 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader (UVM340, OASIS Co.)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

각 실험은 4개의 well을 사용하여 그 평균치를 구하였고 아래의 공식과 같이 실험군의 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 생존율을 구하였다.

$$\% \text{ Viability} = (T - B) / (C - B) \times 100$$

T: 실험군의 평균 흡광도

C: 대조군의 평균 흡광도

B: 기준 흡광도

50% inhibition concentration (IC50)은 생존율에 의거 구하였다. 즉, MTT, XTT 검사법에서 흡광도가 대조군에 비하여 50% 감소하는 값을 의미하는 IC50은 추출물의 농도를 X 축으로, 각 well의 흡광도에서 환산한 생존율을 Y 축으로 설정하여 다중회귀방정식에 의하여 산출하였다.

라. Sarcoma 180에 대한 항암효과

1) 실험동물의 사육

5주령의 ICR 생쥐(male, 23~25g body weight)를 Orient Bio사로부터 구입하여 동물사육실에서 실내 온도 24~28℃, 습도 60~65%의 조건으로 명기와 암기를 각각 12시간씩 조절한 상태에서 사육하였다. 사료는 고품사료(Orient Bio Co.)를 사용하고 급수는 수돗물을 사용하였다. 사료와 급수는 제한하지 않는 조건에서 마우스를 사육하였다.

2) 암세포의 실험동물 이식

5주령의 ICR 옹성 마우스를 동물사육실 환경에서 1주간 적응시킨 후 평균 체중이 비슷한 대조군 10마리, 실험군 10마리씩으로 나누었다. 마우스 복수암 세포 Sarcoma 180은 서울대학교 한국세포주은행으로부터 분양받은 세포주를 계대배양하여 사용하였으며 이를 생쥐의 복막에 이식하여 복수암을 유발시켰으며 2주일 간격으로 계대하여 보존하였다(Fig 4-2). 암세포가 실험에 필요할 경우 생쥐를 경추 탈골시켜 희생시킨 후 5 ml의 PBS buffer (pH 7.2)를 주입하고 5 ml 주사기를 이용하여 복막으로부터 복수와 함께 Sarcoma 180을 취했다. 이를 생리식염수와 1:1 비율로 혼합하여 4℃에서 300 ×g으로 3분 동안 원심분리하여 혈구와 Sarcoma 180 세포를 가라앉혔다. 상층액은 버리고 침전된 세포들만을 조심스럽게 회수하여 2~3 차례 생리식염수로 세척한 후 다시 한번 4℃에서 1,000g로 3분 동안 원심분리하여 순수한 암세포만을 분리하였다.



Fig. 4-2. The proliferation of sarcoma 180 cells implanted into mice

3) 항암력 측정

뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 중성염, 열수 및 메탄을 추출물이 마우스 육종 암세포주인 세포 Sarcoma 180에 미치는 항암효과를 확인하기 위하여 생쥐를 10마리씩 대조군과 실험군으로 나누었다. 실험군의 경우 20 mg/kg body weight 에 해당되는 추출물을 0.2 ml의 PBS에 녹여 spore size가 0.2 μm 인 1회용 membrane filter (Sartorius AG)로 여과시키고 Sarcoma 180 투여 전 10일 동안 매일 1회씩 복강에 투여하였다. 추출물 최종 투여 24시간 후에 Sarcoma 180 을 5×10^6 cells/ml이 되도록 부유시켜 0.2 ml 씩 생쥐의 복강에 투여하였으며 Sarcoma 180 투여 후에도 10일간 추출물을 매일 1회 복강 투여하였다. 대조군 에는 같은 방법으로 같은 기간, 동량의 PBS buffer를 투여하였으며 암세포 최종 투여 후 35일까지 생존여부와 체중 등의 변화를 관찰하였다.

(1) 수명연장효과 검사

대조군과 실험군의 생쥐 복부에 5 ml의 차가운 PBS를 주입하고 주사기로 Sarcoma 180을 취한 후 광학현미경(Axiolab, ZEISS) 하에서 hemacytometer를 이용하여 세포 수를 측정하였다. 암세포의 성장 억제 효과는 increase of life span (ILS)으로 평가하였으며, ILS는 Geran 등(1972)이 기술한 다음의 방법으로 구한 median survival time을 이용하여 산출하였다.

$$\text{Median survival time} = \frac{X + Y}{2}$$

$$\text{ILS} = \frac{T - C}{C} \times 100$$

X: 생존수가 전체동물의 1/2이 되는 최초의 시간(일)

Y: 생존수가 전체동물의 1/2에서 1을 뺀 최초의 시간(일)

단, 전체 동물의 수가 홀수인 경우는 median survival time은 $\frac{X}{2}$ 가 된다.

T: 실험군의 median survival time(일)

C: 대조군의 median survival time(일)

마. 면역활성 효과

1) 마우스의 B 임파구 활성화에 미치는 영향

Ohno 등(1986)의 방법에 따라 분화된 B 임파구의 표면에 발현되는 alkaline phosphatase를 측정하였다. 20~25 g의 ICR 계열 웅성 마우스를 경추탈골법으로 치사시키고 무균적으로 비장을 적출하여 100 mesh의 망 위에서 분쇄하였다. 이로부터 얻은 세포 부유액을 lymphocyte separation medium (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.)에 천천히 2:1의 비율로 적가하여 400×g에서 20분 동안 원심분리하였다. 단핵세포층만 조심스럽게 취하여 300×g에서 5분씩 3회 원심분리하였으며, 세척 후, 5×10^5 cells/ml의 농도로 조정하여 well 당 1ml씩 분주하고, 50, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 추출물과 5, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 lipopolysaccharide (LPS, Sigma Co., L4391)를 가함으로써 최종 부피가 2ml가 되도록 하였다. 37°C, 5%의 CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 다음, 실험을 간소화하기 위하여 100 μl 씩 취하였다. 400×g에서 10분 동안 원심분리하여 상등액은 버리고, 남은 침전물에 1mM MgCl₂를 포함한 50 mM sodium carbonate buffer에 1mg/ml이 되도록 p-nitrophenyl phosphate를 첨가한 용액을 1 ml 씩 가한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 반응시켰다. 병냉의 0.3 N NaOH 용액 50 μl 를 가하여 반응을 종결시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였으며, B 임파구의 alkaline phosphatase 활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

Alkaline phosphatase activity

(p-nitrophenol $\mu\text{mol}/5 \times 10^5$ lymphocytes/60 mins.)

= $1.15 \times \text{O. D. at } 405 \text{ nm}$

2) 총 복강 세포 수에 미치는 영향

6주령의 ICR 웅성 마우스를 대조군과 실험군으로 10마리씩 나누는 후 3일간 연속으로 추출물을 50mg/kg body weight의 농도로 복강 내에 투여하였으며, 대조군은 PBS buffer를 투여하였다. 추출물 투여 최종일로부터 24시간 후 경추탈골법에 의해 마우스를 치사시키고 10 ml의 PBS buffer로 복강 내를 잘 씻어준 다음 복강 세포를 복수와 함께 취하였다. 총 복강세포는 Turk's solution으로 염색한 후 혈구계수기를 이용하여 수를 측정하였다.

3) 혈 중 백혈구 수에 미치는 영향

6주령의 ICR 웅성 마우스를 각 군 당 10마리씩으로 나누고 추출물 투여는 10일간 연속으로 복강 내에 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 투여하였으며, 대조군은 PBS buffer를 투여하였다. 추출물 투여 최종일로부터 2일 후 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 용기에 혈액을 채취하여 잘 섞은 다음 Turk's solution으로 염색하고 혈구계수기를 이용하여 백혈구 수를 측정하였다.

4) 부검 및 체중, 장기의 중량 측정

6주령의 ICR 웅성 마우스를 각 군 당 10마리씩으로 나누고 추출물 투여는 10일간 연속으로 복강 내에 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 투여하였으며, 대조군은 PBS buffer를 투여하였다. 전 동물에 대하여 투여 개시일로부터 1일 1회 전자저울로 체중을 측정하였고, 추출물의 투여 최종일로부터 2일 후에도 상대장기중량의 계산을 위해 부검 직전의 체중을 측정하였다. 부검시에는 경추탈골하여 죽인후에 개복하여 간, 비장 및 흉선을 적출하여 중량을 측정하였고 장기의 상대중량은 장기의 중량을 부검 전 체중으로 나누어 백분비를 산출하였다.

바. 항암 및 면역증강 성분의 화학적 분석

오 (2003)의 방법에 따라 느타리(*Pleurotus ostreatus*)로부터 추출한 β -D-glucan (Sigma Co., USA)과 추출물 1 mg을 각각 2M HCl 0.25 ml로 용해시켜 시험관을 teplon으로 봉하고 100°C에서 5시간 동안 가열 분해한 후 thin layer chromatography (TLC)로 분석하였다. Silica gel plate (Merck Co., USA)에 시료액을 점적한 후 1-butanol:acetic acid:water (80:100:15,v/v/v)의 용매로 전개시켰으며, 발색제 (3ml anilone + 3 g diphenylamine + 15 ml phosphoric acid made up to 150ml with methanol)로 분무 건조한 후 10분 동안 100°C에서 가열하여 발색시켰다. 표준당으로는 fructose, galactose, glucose, mannose, ribose, xylose (Sigma Co., USA) 1 mg을 methanol:water (1:1, v/v) 1 ml에 용해시켜 같은 방법으로 TLC 분석을 시행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 조 β -D-glucan의 추출 및 분리

인공재배된 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 자실체를 건조하여 분쇄시킨 후 메탄올에 침지시켜 Fr. MeOH를 얻었으며, 회수한 자실체로부터 0.9% NaCl 용액을 이용하여 Fr. Na를 얻었다. 중성염 용액(0.9% NaCl) 추출 후 남은 자실체를 열수로 추출하여 Fr. HW를 얻었다.

추출방법에 따라 얻어진 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯 추출물의 수득율을 비교하였다(Table 4-1).

$$\text{수득율(\%)} = \frac{\text{추출한 물질의 양(g)}}{\text{사용한 버섯의 양(g)}} \times 100$$

뽕나무버섯의 경우 80% 메탄올 추출물이 13%로 가장 높은 수득율을 나타내었으며, 중성염 추출물과 메탄올 추출물은 각각 2.0%와 2.4%로 비교적 낮은 수득율을 나타내었다. 이는 심 등(2003a)이 매미눈꽃동충하초에 메탄올, 중성염 및 열수로 추출한 조 β -D-glucan의 추출률인 30.6%, 2.2%, 0.9%에 비해 메탄올과 중성염에서는 조 β -D-glucan이 적게 추출되었고 열수에서만 약간 많은 양이 추출되었다. 민긴뿌리버섯의 경우 80% 메탄올을 이용한 추출물이 92.5g로 18.5%의 수득율을 보였으며, 중성염 추출물은 5.3%로 메탄올 추출물보다 낮은 수득율을 보였다. 열수를 이용한 추출물이 1.5%로 가장 적은 수득율을 나타내었다.

반면에 심 등(2003b)의 삼색도장버섯 실험에서는 메탄올, 중성염 및 열수로부터 추출된 다당류의 추출률은 각각 2.7%, 0.4%, 1.0%로 나타나서 민긴뿌리버섯에서 추출한 조 β -D-glucan의 수득률은 삼색도장버섯에 비해서 높게 나타

났다. 특히 80% 메탄올을 이용한 추출물에서는 6~7배 가량 높은 양의 조 β -D-glucan이 추출되었는데 이와 같은 결과는 서로 다른 용매에 의해 추출된 조 β -D-glucan의 양이 버섯의 자실체 종류에 따라 다르다는 것을 보여준 예로 사료된다.

Table 4-1. Recovery rate of crude β -D-glucan extracted from fruiting body of *Armillaria mellea* and *Oudemansiella radicata* according to various extraction methods

Mushroom	Fraction ^a	Weight of the used mushroom (g)	Weight of extract (g)	Recovery rate (%)
<i>A. mellea</i>	Fr. MeOH	400g	52.0	13.0
	Fr. NaCl	400g	7.9	2.0
	Fr. HW	400g	9.4	2.4
<i>O. radicata</i>	Fr. MeOH	500g	92.5	18.5
	Fr. NaCl	500g	26.5	5.3
	Fr. HW	500g	7.5	1.5

^aFr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol; Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water

^bRecovery rate (%) = [Weight of extract (g) / Weight of the used mushroom (g)] × 100

나. 암세포에 대한 세포독성

뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯 추출물의 정상세포와 암세포에 대한 세포독성 실험을 한 결과(Fig. 4-3, 4-4, 4-5, 4-6) 뽕나무버섯의 경우 정상세포주인 NIH3T3와 마우스 육종암세포 Sarcoma 180에 대하여 중성염, 메탄올, 열수 등 3종류의 추출물 1,000 μ g/ml의 농도에서 이들 세포주는 60~80% 내외의 세포생존율을 나타내었다. 매미눈꽃동충하초(심 등, 2003a), 삼색도장버섯(심 등, 2003b)의 추출물을 이용한 연구에서도 이와 유사한 결과가 보고되었는데 이는 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯에서 추출한 조다당류가 생쥐에 대해 독성이 매우 낮았다. 따라서 이들 추출물을 투여한 생쥐에서 나타난 생명연장효과는 암세포에 직접적인 세포독성을 주어 이들 추출물이 암세포의 증식을 저하시키기보다 생체내 면역체계의 증강에 의한 것으로 사료된다.

뽕나무버섯의 열수추출물의 경우 100 mg/ml의 농도에서 마우스 섬유아세포주인 NIH3T3 cell line에 대하여 70% 가량의 세포생존율을 나타내었는데, 이는 민긴뿌리버섯 추출물의 100 mg/ml 농도와는 다른 양상을 보였다.

또한 100 mg/ml의 농도에서 민긴뿌리버섯이 NIH3T3와 Sarcoma 180의 세포생존율에 미치는 영향을 관찰한 결과 전체적으로 80~100% 정도의 스펙트럼을 나타내었는데, 이중 중성염 추출물이 NIH3T3에 대하여 78%, 열수 추출물이 Sarcoma 180에 대하여 72% 가량의 세포생존율을 보여주었다. 따라서 민긴뿌리버섯의 추출물이 일반적으로 암세포나 정상세포에 독성을 갖고 있지 않다는 것을 보여준 예로 사료된다.

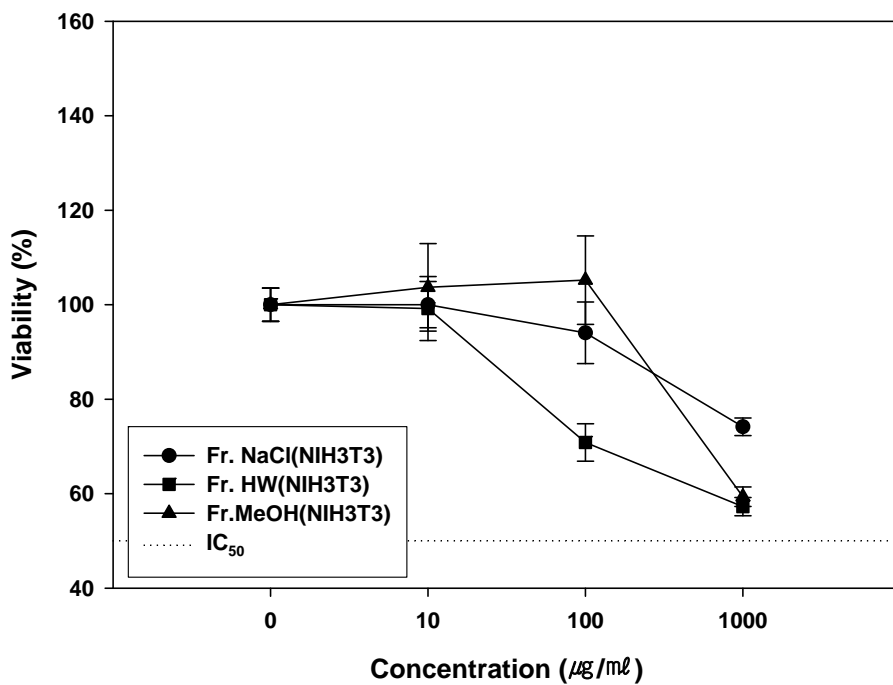


Fig. 4-3 *In vitro* cytotoxicity of fractions extracted from fruiting body of *Armillaria mellea* against NIH3T3. Concentration of cells was 2×10^5 cells/well. The Fr. NaCl fraction was extracted with 0.9% NaCl solution. The Fr. HW fraction was extracted with hot water. The Fr. MeOH fraction was extracted with 80% methanol. IC₅₀ means 50% inhibition concentration.

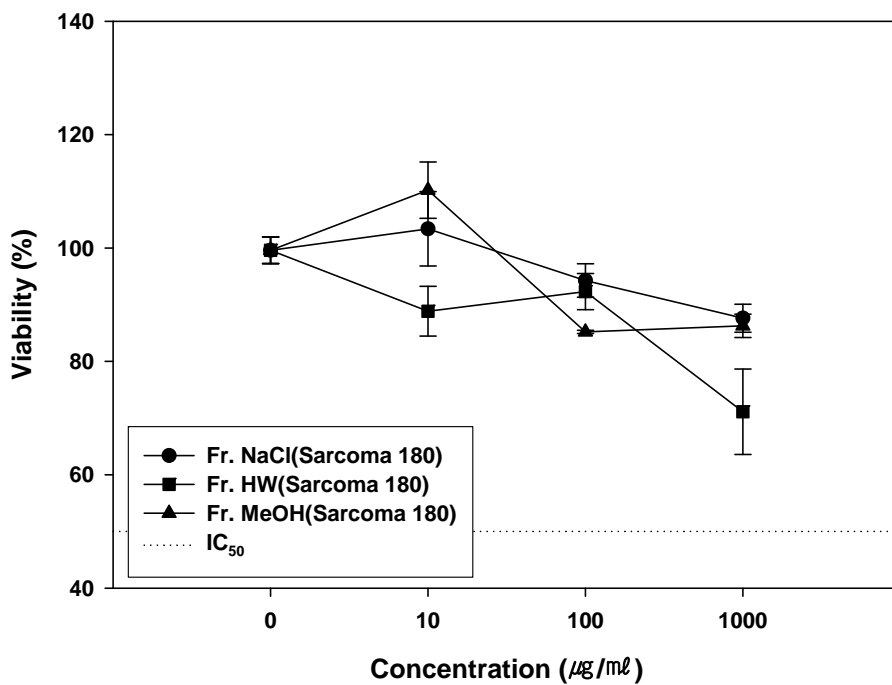


Fig. 4-4. *In vitro* cytotoxicity of fractions extracted from fruiting body of *Armillaria mellea*. against Sarcoma 180, Concentration of cells was 4×10^5 cells/well. The Fr. NaCl fraction was extracted with 0.9% NaCl solution. The Fr. HW fraction was extracted with hot water. The Fr. MeOH fraction was extracted with 80% methanol. IC_{50} means 50% inhibition concentration.

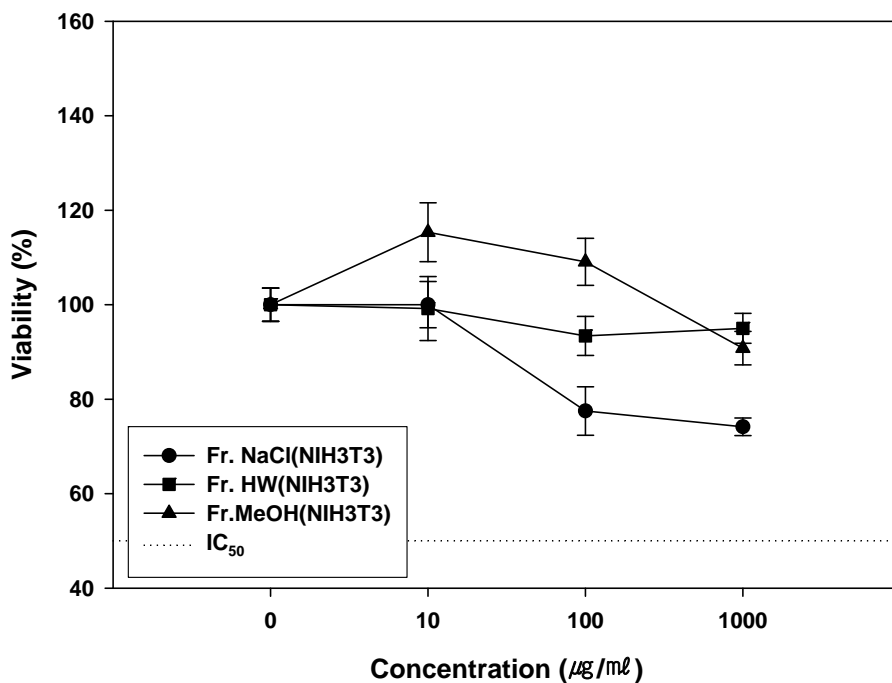


Fig. 4-5. *In vitro* cytotoxicity of fractions extracted from fruiting body of *Oudemansiella radicata* against NIH3T3. Concentration of cells was 2×10^5 cells/well. The Fr. NaCl fraction was extracted with 0.9% NaCl solution. The Fr. HW fraction was extracted with hot water. The Fr. MeOH fraction was extracted with 80% methanol. IC_{50} means 50% inhibition concentration.

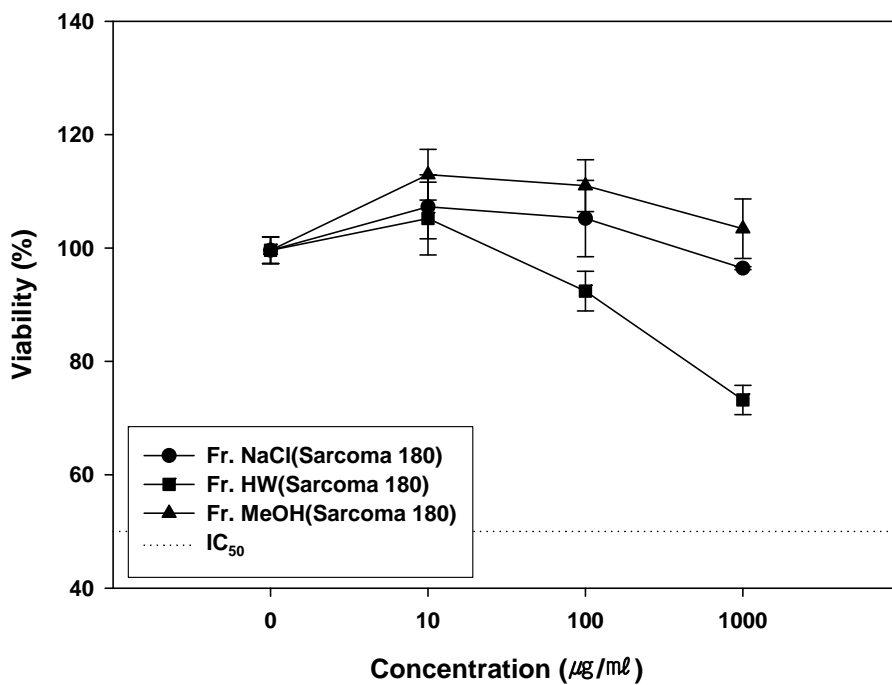


Fig. 4-6. *In vitro* cytotoxicity of fractions extracted from fruiting body of *Oudemansiella radicata*. against Sarcoma 180, Concentration of cells was 4×10^5 cells/well. The Fr. NaCl fraction was extracted with 0.9% NaCl solution. The Fr. HW fraction was extracted with hot water. The Fr. MeOH fraction was extracted with 80% methanol. IC₅₀ means 50% inhibition concentration.

강 등(1981)은 영지의 항암 효과 메카니즘을 밝히기 위해 hemolytic plaque-forming cell을 관찰해 본 결과 항암 성분이 암세포를 직접 공격하는 것이 아니라 암세포에 대한 숙주의 면역 능력을 증가시켜줌으로써 간접적으로 억제 작용이 나타난다는 것을 보고하였다. 또한 Miyazaki 등(1980)은 녹각영지 (*Ganoderma lucidum*)에서 분자량 약 4만의 polysaccharide를 추출한 후 20 mg/kg body weight의 용량으로 10일간 ICR 마우스에 복강 투여한 결과, Sarcoma 180에 대하여 95~98%의 억제율이 있음을 보고하였다. 따라서, 암세포에 대한 직접적인 독성은 보이지 않았으나 *in vivo* 상에서 높은 암 성장 억제를 보인 것은 이들 물질이 체내 면역 체계를 증강시켜 암세포의 증식을 억제시켰을 가능성을 제시해 주고 있다.

항암 활성을 나타내는 담자균류의 다당류에 대한 연구는 주로 다당류의 추출 조건 및 구조 등에 따른 보체계의 활성화, coagulation system, 면역 세포의 증식, 항체 생성, phagocytic cell의 수용체 등에 미치는 영향에 대하여 집중되었으나 항암 작용의 생화학적 기전은 아직도 완전히 밝혀지지 않고 있다. 그러나 연구 결과를 종합해 볼 때 항암능력을 가진 β -D-glucan은 대식세포를 중심으로 한 비특이적인 숙주 저항성을 유도하여 면역계 활성화에 의해 암세포 성장을 억제하는 것으로 여겨진다. 이러한 이전 연구 결과들을 기초로 하였을 때, *in vivo* 상에서 현저한 항암 능력을 나타낸 추출물들의 작용 기전이 면역체계 조절능에 있을 것으로 예상되었다. 실제로 김 등(1979)은 구름버섯 자실체의 열수 추출물이 Sarcoma 180의 증식에 강한 저지력을 보였다고 보고한 바 있고, 오 등(2003)은 저령의 메탄올, 중성염, 열수 추출물이 생쥐의 면역능을 향상시켰다고 보고하였다. 또한 권 등(1999)은 재배한 백복령의 methanol 추출물이 폐암, 난소암, 피부암, 중추신경암, 직장암 등의 생장에 높은 저해활성을 나타내었다고 보고하였다.

김 등(2001)은 눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)로부터 메탄올을 이용해서 추출한 성분이 여러 종양 세포에 대해 직접적인 세포독성을 나타내는 것을 보고하였다. 또한 심 등(2003a, 2003b)의 보고에서도 이와 유사한 결과가 나타난바 있다. 삼색도장버섯(*Daedaleopsis tricolor*) 조다당류가 인간 대장암세포인 HT-29와 마우스 육종암세포인 Sarcoma 180에 독성을 나타냈는데, 본 실험에서는 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 자실체를 메탄올로 추출한 조 β -D-glucan만이 Sarcoma 180에 직접적인 독성을 나타냈다. 이는 추출 과정의 첫번째 단계였던 메탄올 침지 과정에서 세포에 독성을 갖는 물질이 β -D-glucan과 함께 버섯으로부터 추출되었기 때문으로 사료된다. 또한, 추출물의 종류에 따라 각 세포주에 미치는 효능이나 작용 농도가 달랐던 것은 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯이 갖고 있는 유효성분도 다르고 또한 이들 유효성분이 추출에 사용한 용액에 따라 다르게 추출되었기 때문으로 판단된다.

다. Sarcoma 180에 대한 항암효과

마우스 육종암세포주인 Sarcoma 180을 생쥐의 복강에 주사하여 복수암을 유발시킨 결과 복수암이 유발된 생쥐는 보통 2주안에 암세포가 증식을 시작하면서 복수가 차고 대부분의 생쥐가 Sarcoma 180 주사후 5주 이내에 죽는 것이 관찰되었다.

1) 수명연장효과

뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯에서 추출한 조다당류가 *in vivo* 상에서 마우스 육종암 세포인 Sarcoma 180에 미치는 효과를 분석하였다(Table 4-2).

Table 4-2. Effect of crude β -D-glucan isolated from fruiting body of *Armillaria mellea* and *Oudemansiella radicata*. on the life span of ICR mice inoculated with Sarcoma 180 (i.p. injection^a)

	Group ^b	Dose ^c	Survival days ^d	ILS (%) ^e
	Control	0	21±0.65	-
	Fr. MeOH	20	26±2.84	14.3
<i>A. mellea</i>	Fr. NaCl	20	27±2.82	28.6
	Fr. HW	20	35±2.69	67.5
	Fr. MeOH	20	32±0.00	52.4
<i>O. radicata</i>	Fr. NaCl	20	35±0.40	66.7
	Fr. HW	20	30±1.89	42.9

^a i.p. injeccion intraperitoneal injection.

^b Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water, Fr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol. Each experimental group consisted of 10 mice.

^c mg/kg body weight

^d Survival days of each animal in experimental group were counted individually and the mean survival days (M±S.D.:mean±standard deviation) of each groups were calculated.

^e ILS: Increase of life span.

뽕나무버섯의 경우 PBS buffer를 투여한 대조군의 평균 생존 일수는 21일이었으며, 열수 추출물을 투여한 실험군의 평균 생존일수가 35일로 67.5%의 높은 생명연장효과를 나타내었다. 중성염 추출물을 20 mg/kg body weight씩 투여한 생쥐의 경우 실험초기에 4마리가 털이 빠지고 사료를 먹지 않는 등의 증상을 보이며 실험종료시점까지 생존하였지만 육안상으로 건강하지는 않은 것으로 관찰되었다. 이는 사람이 뽕나무버섯을 생식하거나 또는 이를 섭취하는 경우 체질에 따라 약간의 독성이 나타날 수 있다고 보고한 박 등(1999)의 연구와 같은 맥락인 것으로 추정되며, 이는 뽕나무버섯에 함유된 β -D-glucan 성분보다는 다른 성분이 생쥐에 해를 끼친 것으로 사료된다.

심 등(2003b)은 담자균류의 하나인 삼색도장버섯(*Daedaleopsis tricolor*)에서 추출한 조다당류가 Sarcoma 180를 투여한 생쥐에서 투여하지 않은 생쥐에 비해 최고 77.4%의 높은 생명연장효과를 나타낸다는 것을 밝혔고 이러한 결과는 암세포의 증식억제 효과보다는 면역활성의 증가 때문이라는 것을 보고한 바 있다. 따라서 뽕나무버섯에서 추출한 조다당류의 세포독성 실험에서 NIH3T3와 Sarcoma 180 세포주에 대해서는 독성을 나타내지 않고 67.5%의 생명연장효과를 나타낸 것은 면역활성의 증가에 의한 것으로 판단된다.

민긴뿌리버섯에서 추출한 조다당류가 *In vitro*에서 마우스 육종암세포인 Sarcoma 180에 미치는 효과를 분석한 결과 3종류의 추출물을 투여한 실험군에서 42.9~66.7%의 생명연장효과를 나타냈다. 중성염 추출물을 20 mg/kg body weight 투여한 실험군의 평균 생존일수가 35일로 67.5%의 높은 효과를 나타내었다. 따라서 민긴뿌리버섯에서 분리된 조다당류중 메탄올 추출물도 Sarcoma 180 복수암에 대한 생명연장의 효과가 있다고 판단된다.

민긴뿌리버섯의 경우 이 버섯이 가지고 있는 항암효과 외에도 혈압강하의 효

과가 뛰어나 중국에서 민간요법 등의 처방으로 쓰여지고 있는 것으로 알려져 있다(박 등, 1999).

라. 면역활성 효과

실험용 생쥐를 이용한 항암 및 수명연장효과 검증실험에 이어서 면역활성의 작용기전을 알아보기 위하여 조 β -D-glucan이 면역기능에 미치는 영향을 조사하였다.

1) 마우스 B 임파구 활성화에 미치는 영향

뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 조 β -D-glucan이 추출물을 이용하여 생쥐의 비장세포에 처리하고 B 임파구가 분비하는 alkaline phosphatase의 양을 측정하여 B임파구의 활성을 확인하였다(Fig. 4-7, 4-8). alkaline phosphatase는 B cell mitogen의 직접적인 자극을 받는 경우나 T cell mitogen에 의한 lymphokine에 의하여 간접적인 자극을 받음으로써 B 임파구가 형성되는 경우에 활성화되는 것으로 알려져 있으며, 오 등(2004)은 저령(*Grifola umbellata*) 균핵의 중성염용액 추출물이 *Escherichia coli* 0111:B의 LPS(lipopolysaccharide)보다 6배 이상의 alkaline phosphatase 활성을 나타내는 것으로 보고한 바 있다.

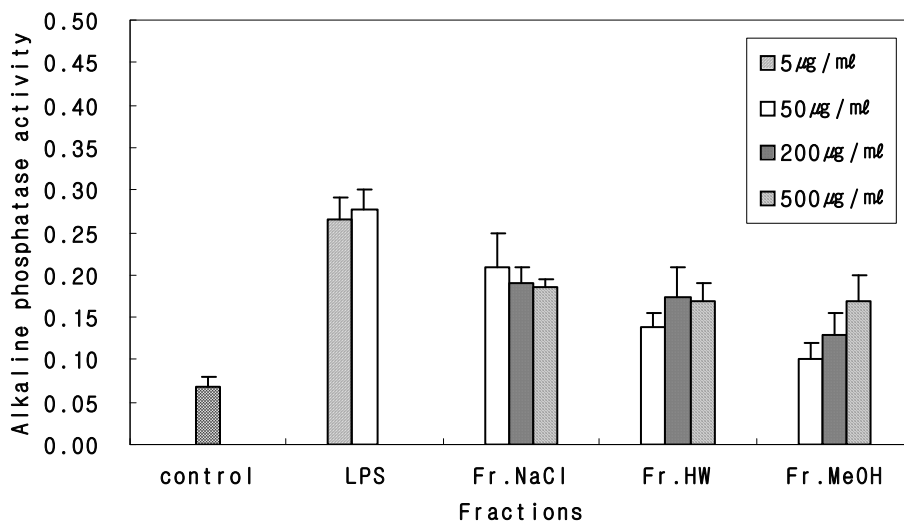


Fig. 4-7. Effect of fractions extracted from fruiting body *Armillaria mellea* on the alkaline phosphatase activity in the murine spleen cells. Alkaline phosphatase activity was calculated as follows : Alkaline phosphatase activity (ρ -nitrophenol $\mu\text{mol}/1 \times 10^5$ lymphocytes/60mins) = $1.15 \times$ optical density at 405 nm. Fr. NaCl fraction was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. Fr. MeOH fraction was extracted with 80% methanol. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.

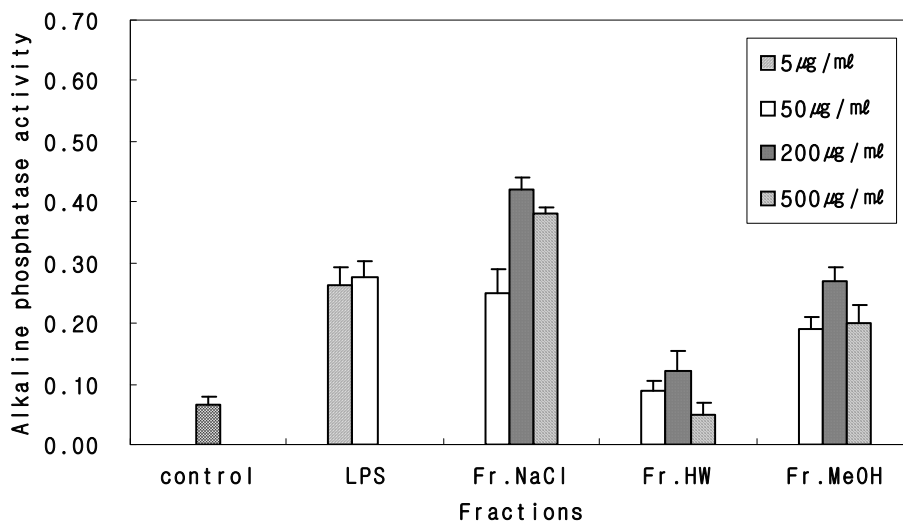


Fig. 4-8. Effect of fractions extracted from fruiting body *Oudemansiella radicata* on the alkaline phosphatase activity in the murine spleen cells. Alkaline phosphatase activity was calculated as follows : Alkaline phosphatase activity (ρ -nitrophenol $\mu\text{mol}/1 \times 10^5$ lymphocytes/60mins) = $1.15 \times$ optical density at 405 nm. Fr. NaCl fraction was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. Fr. MeOH fraction was extracted with 80% methanol. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.

실험결과 3종류의 뽕나무버섯 추출물은 대조군에 비해 전체적으로 B 임파구를 활성화시키는 효과를 나타냈다. 이때 alkaline phosphatase의 양을 측정한 결과(Fig 3) 중성염의 각 농도별 추출물의 활성이 대조군에 비해 약 3배가량 높은 것으로 나타났다. 이런 결과는 뽕나무버섯의 중성염추출물이 비장세포의 증식뿐만 아니라 B임파구의 활성도 증가시키고 있다는 것을 보여주고 있다.

민긴뿌리버섯도 각각의 추출물이 B 임파구를 활성화시키는 것으로 나타났으며, 특히 중성염 추출물을 200~500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 비장세포를 처리한 실험군이 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LPS를 처리한 양성대조군보다 1.4배 높은 alkaline phosphatase 활성을 나타내었다. 이는 뽕나무버섯과 비교하여 더 높은 활성효과를 나타낸 것으로 *In vivo* 상태에서 민긴뿌리버섯이 면역을 증강시키는 효과가 매우 큰 것으로 보여진다.

또한 Ohno 등(1986)은 B cell mitogen에 의해 직접적으로 자극 받거나, T cell mitogen에 의한 lymphokines에 의해 간접적으로 자극 받음으로써 B lymphocyte blast가 형성되는 경우에 alkaline phosphatase가 활성화된다고 보고하였으며, Kasyapa 등(1992)과 Garcia-Rozas 등(1982)도 B cell의 증식 과정에서 alkaline phosphatase의 활성이 향상된다고 보고하였다. 김 등(1996)은 표고버섯과 영지버섯의 원형질 융합체 P22를 배양한 군사체로부터 열수 추출하여 얻은 분획이 대조군과 비교하였을 때 alkaline phosphatase의 활성을 1.6배 촉진시켰다고 보고하였는데 본 민긴뿌리버섯의 실험결과도 이와 유사한 경향을 나타내었다.

2) 총 복강 세포 수에 미치는 영향

뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯에서 메탄올, 중성염 및 열수로 추출한 각각의 조다당류 추출물을 3일간 연속적으로 실험용 ICR 생쥐의 복강에 50 mg/kg body weight의 농도로 투여하고 최종 투여가 끝난 24시간 후 복강에서 복수를 추출하여 세포 수를 측정된 결과는 Figure 4-9, 10과 같다.

두 종의 버섯 추출물에 대한 각각 복강 세포수는 전체적으로 각 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 뽕나무버섯의 경우 대조군 2.09×10^5 cells/ml에 비해 열수 추출물이 농도에 따라 1.72×10^5 cells/ml, 2.80×10^5 cells/ml, 6.89×10^5 cells/ml로 증가하는 것을 볼 수 있었고, 메탄올과 열수추출물도 유사한 양상을 보였다.

민긴뿌리버섯의 경우 메탄올 추출물과 중성염 추출물을 투여한 실험군이 복강세포수가 증가된 양상을 보였다. 열수추출물의 경우 대조군과 비교할 때 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 중성염 추출물을 50 mg/kg body weight으로 투여한 실험군의 경우 대조군에 비해 2배 가까운 증가를 나타내었는데 이 결과도 면적이 증강된 결과로 판단된다.

심 등(2003b)은 삼색도장버섯의 중성염 추출물을 50mg/kg body weight으로 투여한 생쥐의 복강세포수는 대조군에 비해 10배 증가했다고 보고하였다. Gross 등(1980)에 따르면 복강세포 중 polymorphonuclear leukocytes(PMN)와 macrophage 등의 면역세포들은 생체내에서 직접적인 식균작용이나 체액성 및 세포성 면역을 나타내는 역할을 하기 때문에 복강세포수의 증가는 면역체계를 강화시키는 것으로 볼 수 있다고 보고하였다.

특히 Hamuro 등(1978)은 β -(1→3)-glucan-type lentinan을 투여한 생쥐로부터

터 얻어낸 복강 세포가 종양 세포에 대한 세포독성이 대조군에 비하여 훨씬 증가했다고 보고하였다. 또한, 이 등(1987)은 잣빛만가닥버섯(*Lyophyllum decastes*)의 배양 균사로부터 추출한 lyophyllan A를 투여하여 복강 세포를 얻은 후, 이를 Sarcoma 180과 함께 투여한 경우와 Sarcoma 180만을 투여한 경우를 비교한 결과, 전자의 경우가 대조군의 3%에 지나지 않아 lyophyllan A를 주사하여 얻어진 복상세포와 Sarcoma 180을 투여한 군이 더 높은 항암 효과를 나타내었다고 보고하였다. 따라서, 이들 결과와 비교해 볼 때 본 실험에서 복강 세포 수가 증가했다는 것은 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 조 β -D-glucan이 생쥐에 높은 항암효과와 면역증강효과를 나타낸 것으로 사료된다.

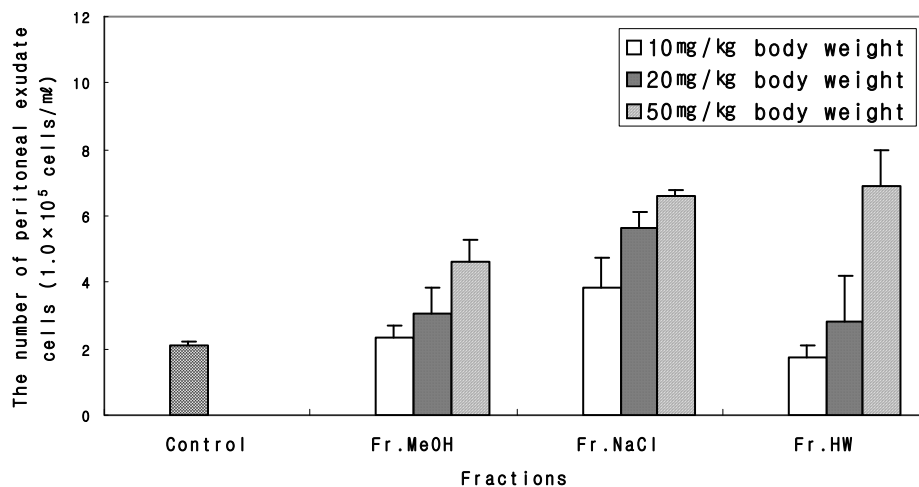


Fig. 4-9. Effect of crude β -D-glucan extracted from fruiting body of *Armillaria mellea* on the number of peritoneal exudate cells in ICR mice. Fr. NaCl fraction was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. Fr. MeOH fraction was extracted with 80% methanol.

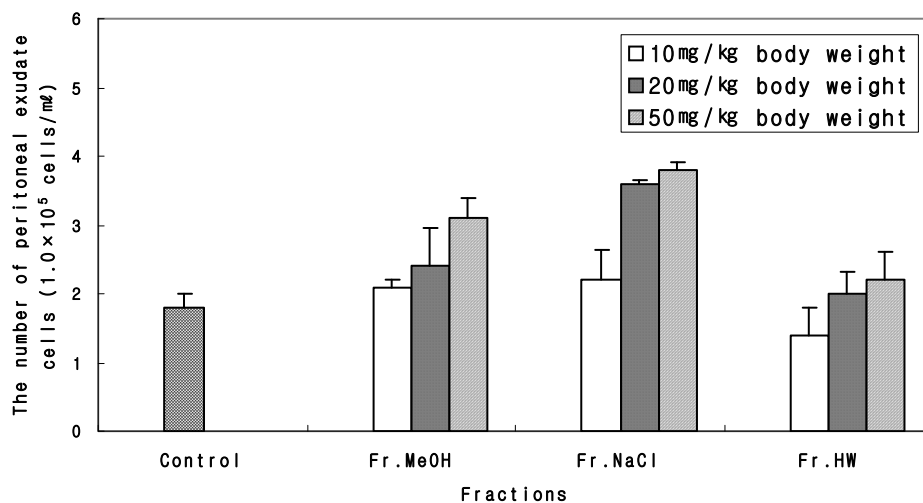


Fig. 4-10. Effect of crude β -D-glucan extracted from fruiting body of *Oudemansiella radicata* on the number of peritoneal exudate cells in ICR mice. Fr. NaCl fraction was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. Fr. MeOH fraction was extracted with 80% methanol.

3) 혈 중 백혈구 수에 미치는 영향

백혈구는 체내 혈액을 구성하는 주요 성분으로 호중구, 호산구, 호염기구, 임파구, 단백구 등으로 구성되어있으며 또한 외부의 감염으로부터 생체를 방어하는 면역반응에 관여하는 1차적 세포로서 중요한 기능을 한다(Arthur and Guyton, 1986).

뽕나무버섯의 경우 혈액 내의 백혈구 수는 대조군 1.5 ± 0.12 에 비하여 중성염용액 추출물 50 mg/kg을 투여했을 때 3.7 ± 0.44 으로 약 2.4배 이상 증가된 결과를 나타내었다(Table 4-3). 메탄올 추출물과 열수 추출물은 같은 농도에서 각각 2배, 1.4배 가량의 증가율을 보였다. 버섯추출물이 생체내에서 백혈구의 수를 증가시키는 경향은 심 등(2003b)이 보고한 삼색도장버섯(*Daedaleopsis tricolor*)과 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 뽕나무버섯의 β -D-glucan는 생체내에서 1차적인 면역체계인 백혈구 수를 증강시키는데에도 효과가 있는 것으로 판단된다.

민긴뿌리버섯의 실험결과(Table 4-4)를 보면 대조군의 백혈구수가 1.7 ± 0.49 인 것에 비하여 메탄올 추출물을 50 mg/kg씩 투여한 실험군은 3.7 ± 0.42 로 약 2.17배 정도 증가된 것으로 나타났다. 이 결과는 뽕나무버섯의 중성염 추출물 실험결과와 유사하였다. 이에 비해 민긴뿌리버섯의 중성염 추출물과 열수 추출물의 생쥐에 대한 백혈구 증가율은 뽕나무버섯의 경우와 비교해 조금 적게 증가하는 경향을 보여주었다.

이러한 백혈구 수의 증가는 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 조 β -D-glucan이 생체 내에서 면역을 증강시킨 결과로 해석될 수 있다. 이는 골수(bone marrow) 등의 기관이 β -D-glucan에 의해 자극을 받아 혈구의 생산을 증가시킨 것으로 보여진다. 따라서 이러한 백혈구 수의 증가는 면역기능 증가의 지표가 될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 4-3. Effect of crude β -D-glucan extracted from fruiting body of *Armillaria mellea* on the number of circulating leukocytes in ICR mice

Group ^a	Dose ^b	No. of mice	No. of leukocytes ($\times 10^6/\text{ml}$)
Control	-	10	1.5 \pm 0.12 ^c
Fr. MeOH	10	10	2.1 \pm 0.47
	20	10	2.8 \pm 0.26
	50	10	3.1 \pm 0.89
Fr. NaCl	10	10	1.9 \pm 0.46
	20	10	3.3 \pm 0.44
	50	10	3.7 \pm 0.13
Fr. HW	10	10	1.7 \pm 0.68
	20	10	1.8 \pm 0.70
	50	10	2.1 \pm 0.97

^aFr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water, Fr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol.

^bmg/kg body weight

^cMean \pm S.D.

Table 4-4. Effect of crude β -D-glucan extracted from fruiting body of *Oudemansiella radicata* on the number of circulating leukocytes in ICR mice

Group ^a	Dose ^b	No. of mice	No. of leukocytes ($\times 10^6/\text{ml}$)
Control	-	10	1.7 \pm 0.49 ^c
Fr. MeOH	10	10	2.2 \pm 0.48
	20	10	3.1 \pm 0.79
	50	10	3.7 \pm 0.42
Fr. NaCl	10	10	2.2 \pm 0.81
	20	10	3.5 \pm 0.19
	50	10	3.5 \pm 0.15
Fr. HW	10	10	1.2 \pm 0.11
	20	10	3.1 \pm 0.51
	50	10	2.7 \pm 0.86

^aFr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water, Fr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol.

^bmg/kg body weight

^cMean \pm S.E.

4) 부검 및 체중, 장기의 중량 측정

뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 각 추출물을 생쥐에게 투여하고, 면역과 관련된 장기인 간, 비장 및 흉선의 무게에 대한 변화를 알아보았다(table 4-11, 4-12). 우선 뽕나무버섯의 경우 3가지 종류의 용매중 중성염으로 추출한 조다당류가 가장 높은 증가율을 보였으나 다른 추출방법에 비해 유의성 있는 결과는 나타나지 않았으며, 전체적으로 체중과 장기의 무게가 증가하는 경향을 나타내었다. 대조군 간의 중량과 체중과의 비를 보면 6.11%인데 비해 중성염 추출물을 10, 20, 50 mg/kg의 비율로 투여하였을 때 각각의 중량비는 6.29, 6.88, 6.92%로 약간 증가하는 경향을 보였다. 그리고 비장과 흉선의 무게도 대조군에 비하여 처리군에서 투여농도가 증가함에 따라 약간 증가하는 무게를 보였다.

민긴뿌리버섯의 의한 면역관련 장기의 중량변화 역시 전체적으로 증가하는 양상을 보였으나 결과는 유의성이 없었다. 간의 경우 대조군의 중량비 5.38%에 비해 메탄올 추출물의 농도가 10, 20, 50 mg/kg body weight 일 때 각각의 중량비가 6.51, 6.50, 6.52%로 대조군에 비하여 1.2배 가량 증가하는 경향을 보였다. 비장과 흉선의 경우 투여한 조다당류의 농도가 높아질수록 중량비가 증가하는 추세를 나타냈다.

심 등(2003b)의 실험에서도 삼색도장버섯의 중성염용액 추출물을 투여한 실험군 생쥐의 간, 비장, 흉선의 무게가 대조군에 비해 증가한 것을 확인되었다. 따라서 앞의 실험결과를 종합해보면 조다당류를 투여한 생쥐의 비장과 간의 무게 증가는 macrophage 등의 면역관련 세포들의 증식으로 인한 것이라고 판단되며 흉선 역시 내분비기관으로서 각각의 추출물에 의해 자극을 받아 증식된 것으로 사료된다. 흉선은 면역계에 관여하는 내분비기관의 하나로 알려져 있다 (Gross et al, 1980).

Table 4-11. Effect of Fr. NaCl^a extracted from fruiting body of *Armillaria mellea* on the body and immunoorgan weight of ICR mice

	Treatment			
	Control	Fr. NaCl	Fr. NaCl	Fr. NaCl
Dose ^b	-	10	20	50
No. of mice	10	10	10	10
Body weight (g)	33.84±3.70 ^b	33.21±1.79	34.15±0.87	33.36±2.51
Liver weight (g)	2.05±0.15	2.09±0.11	2.35±0.25	2.31±0.28
Liver/Body (%)	6.11±0.05	6.29±0.40	6.88±0.51	6.92±0.21
Spleen weight (g)	0.14±0.01	0.15±0.02	0.19±0.01	0.23±0.05
Spleen/Body (%)	0.41±0.06	0.45±0.07	0.55±0.03	0.68±0.07
Thymus weight (g)	0.049±0.01	0.052±0.01	0.056±0.02	0.058±0.01
Thymus/Body (%)	0.14±0.01	0.15±0.01	0.16±0.02	0.17±0.01

^aFr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution

^bmg/kg body weight

^bMean ± S.D.

Table 4-12. Effect of Fr. MeOH^a extracted from fruiting body of *Oudemansiella radicata* on the body and immunoorgan weight of ICR mice

	Treatment			
	Control	Fr. MeOH	Fr. MeOH	Fr. MeOH
Dose ^b	-	10	20	50
No. of mice	10	10	10	10
Body weight (g)	33.42±1.38 ^b	34.04±1.79	34.00±1.72	33.16±1.84
Liver weight (g)	1,798±21.46	2,218±35.00	2,211±21.46	2,165±21.46
Liver/Body (%)	5.38±0.24	6.51±0.32	6.50±0.12	6.52±0.21
Spleen weight (g)	82.2±0.15	83.4±0.41	83.1±0.39	84.6±0.16
Spleen/Body (%)	0.24±0.25	0.24±0.32	0.24±0.12	0.25±0.21
Thymus weight (g)	28.6±1.72	29.7±2.17	29.9±3.28	30.1±2.91
Thymus/Body (%)	0.08±0.35	0.08±0.27	0.08±0.32	0.09±0.11

^aFr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol solution

^bmg/kg body weight

^bMean ± S.D.

마. 향암 성분의 화학적 분석

뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 중성염용액 추출물에 함유된 다당류의 함량을 알아보기 위하여 fructose, glucose, mannose, ribose 및 xylose의 혼합당을 표준당으로 하여 anthrone 시약과 반응시켜 625nm에서 흡광도를 측정된 결과, 다당류의 함량은 94.15%로 확인되었다. 총단백질 함량은 BSA를 표준 단백질로 하여 540nm에서 Bradford 반응을 실시, 검량선을 작성하여 구한 결과, 3.20%이었다. 이로써 뽕나무버섯 중성염용액 추출물은 다량의 다당체와 소량의 단백질로 구성되어 있음이 확인되었다.

TLC 분석에 의해 다당체를 구성하는 단당류를 분석한 결과, 뽕나무버섯의 중성염 추출물은 glucose 또는 mannose와 소량의 galactose를 함유하고 있음이 확인되었다. 느타리 (*Pleurotus ostreatus*)로부터 추출한 β -D-glucan을 Sigma로부터 구입하여 TLC로 비교 분석한 결과, 뽕나무버섯의 중성염용액 추출물과 유사한 유형을 보였다.

조 등 (1995)은 중성염용액으로 아까시재목버섯 (*Fomitella fraxinea*)으로부터 추출한 향암 활성을 나타내는 물질이 주로 glucose로 구성되어 있고 소량의 galactose와 mannose를 포함하고 있음을 보고하였다. Yoshioka *et al*(1975)는 느타리에서 분리된 수용성 다당류에는 향암 기작이 있는 것을 밝혔으며 이 향암 성분의 기본구조는 glucose 성분과 연결되어 있는 β -(1, 3) 구조의 skeleton 이고 이 것에 galactose나 mannose의 가지를 가지고 있는 것으로 추정하였다. 따라서 이들 보고와 본 실험에서의 TLC 유형을 종합해 보면, 뽕나무버섯의 중성염용액 추출물은 glucose 또는 mannose 및 소량의 galactose로 구성되어진 β -D-glucan과 유사한 물질인 것으로 사료된다.

4. 참고문헌

- Arthur, C. and Guyton, M. D. 1986. *Textbook of medical physiology. 7th Ed.* W. B. Saunder company. p. 51-59.
- Chihara, G., Hamuro G., Meada Y., Arai Y. and Fukoka F. 1970. Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan (Pachman). *Nature. 225:* 973-948.
- Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. and Fukuoka, F. 1969. Inhibition of mouse Sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature. 222:* 687-688.
- Choi, S. H., Jun, C. D., Lee, B., S., Park, S. D., Oh, J. S. and Chung, H. T. 1993. Effect of various extrinsic and intrinsic factors on the nitric oxide production of murine macrophage. *Kor. J. BRM. 3:* 15-22.
- Denizot, F. and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods. 89:* 271-277.
- Gross, RL. and Newberne, PM. 1980. Role of nutrition in immunologic function. *Physiol, Rev. 60(1):* 188-302.
- Jan, A. M., Marielle, E. B., Peter, H. N., Pieter, S. H. and Ralph, V. F. 1992. INF- γ induced 1-arginine-dependent toxoplasmastic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α . *J. Immunol., 148:* 568-571
- Kishida, E., Sone, Y., Shibata, S. and Misaki, A. 1981. Preparation and immunochemical characterization of antibody of branched β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan of *Volvariella volvacea* and its use in studies of antitumor

- actions. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 1849-1859.
- Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K. and Saito, G. 1969. Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann.* **60(2)**: 137-44.
- Mossman, B. T. 1983. *In vitro* approaches for determining mechanisms of toxicity and carcinogenicity by asbestos in the gastrointestinal and respiratory tracts. *Environ. Health Perspect.* **53**: 155-161.
- Ohno, N., Arai, Y., Suzuki, I. and Yadomae, T. 1986. Induction of alkaline phosphatase activity in murine spleen cells treated with various mitogens. *J. Pharmacobio-Dyn.* **9**: 593-599.
- Roland, J. F., Chmielewicz, Z. F., Weiner, B. A., Gross, A. M., Boenong, O. P., Luck, J. V., Bardos, T. J., Rerlly, H. C., Sugiura, K., Stock, C. C., Lucas, E. H., Byerrum, R. U. and Stevens, J. A. 1960. Calvacine, a new antitumor agent. *Science.* **132**: 1987.
- Sugihara, T., Yoshioka, Y. and Nishioka, K. 1972. Anticomplementary activity of antitumor polysacchrides. *Nature New Biology.* **235**: 59-60.
- Suzuki, M., Arika, T., Amemiya, T. and Fujiwara, M. 1982. Cooperative role of T lymphocytes and macrophages in antitumor activity of mice pretreated with schizophyllan. *Jpn. J. Exp. Med.* **50**: 59-65.
- Tsugagoshi, S. and Ohashi, F. 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann.* **65**: 557.
- Whistler, R. L., Bushway, A. A., Singh, P. P., Nakahara, W. and Tokuzen, R. 1976. Noncytotoxic, antitumor polysaccharides, edited by Tipson R. S. and Horton D. *Advances in Carbohydrate Chemistry and*

- Biochemistry*. Academic Press, New York. Vol. 32. p. 235-275.
- 水野 卓, 川合正允. 1992.キノコの化學・生物學. 學會出版センタ. pp. 372.
- 구현옥, 김인천, 박신자, 정상희, 박종명, 이재진, 유한상, 이영순. 1999. 신령버섯(*Agaricus blazei* Murill)에서 분리한 다당체의 *Staphylococcus aureus* 감염 및 마우스 Sarcoma 180 종양세포에 대한 방어효과. 한국실용동물학회지. **15(2)**: 155-158.
- 박상신, 유국현, 민태진. 1998. 버섯추출물의 항산화 활성에 관한 연구. 한국균학회지. **26(1)**: 69-77.
- 박완희, 이호득, 1999, 한국약용버섯도감, 교학사, pp.759
- 심성미, 임경환, 이우윤, 김정완, 심미자, 이민웅, 이태수 2003a, 매미눈꽃동충하초(*Paecilomyces sinclairii*)에서 추출한 조다당류의 면역활성 및 항암효과에 관한 연구, 한국균학회지, **31(3)**: 155-160.
- 심성미, 임경환, 김정완, 이우윤, 김하원, 이민웅, 이태수 2003b, 삼색도장버섯(*Daedaleopsis tricolor*)에서 추출한 조다당류의 면역활성 및 항암효과, 한국균학회지, **31(3)**: 161-167.
- 신혜원, 김하원, 최응칠, 도상학, 김병각. 1985. 한국산 영지의 무기 성분 및 면역 증강 작용에 관한 연구. 생약학회지. **16(4)**: 181-190.
- 오윤희, 김상범, 이건우, 김혜영, 심미자, 노현수, 이현숙, 이민웅, 이우윤, 이태수 2006, 흰목이(*Tremella fuciformis*)에서 추출한 조다당류의 면역활성 및 항암효과, 한국균학회지, **34(2)**: 105-111.
- 조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승현, 유익동. 1995. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(I)-중성염 용액 추출 다당류의 특성. 한국균학회지. **23(4)**: 332-339.
- 조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승현, 유익동. 1995. *Fomitella fraxinea*로

부터 분리한 면역활성 다당류(Ⅱ)-열수추출 다당류의 분리 및 특성. 한국
균학회지. **23(4)**: 340-347.

진미림. 1996. 잣버섯 성분의 면역세포 및 전사인자의 활성화 작용에 관한 연
구. 서울대학교 대학원 논문집. p. 1-121.

한만덕, 이은숙, 김영권, 이중우, 정훈, 윤경하. 1998. 영지의 균사체성 β
-glucan에 의한 Raw 264.7 대식세포의 nitric oxide 생성. 한국균학회지.
26(2): 246-255.

제 5 절 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 기능성 식품제조

1. 서 론

버섯은 양질의 단백질과 식이섬유, 비타민 및 무기염류를 함유하고 있기 때문에 버섯을 장기간 복용하면 건강이 증진된다는 것이 많은 연구자들의 연구결과에 의해 입증되고 있다(심, 1980; 水野, 1989; 안, 1992; 유와 홍, 1992). 이들의 연구 결과는 버섯이 인체에 영양보강과 생리적 항상성을 유지시켜 질병에 대한 저항성을 갖게 할 뿐 아니라, 항암작용 및 면역조절효과를 갖고 있다고 보고하고 있다. 특히 버섯의 자실체와 균사체에 함유된 성분 중 다당류 등이 Sarcoma 180과 Ehrlich 복수암 등과 같은 동물에 발생하는 암세포에 대해 현저한 항암 활성을 나타내는 것이 알려짐으로써 많은 주목을 받게 되었다. 이들 유효성분은 주로 버섯의 자실체나 균사체를 가수분해할 때 발생하는 D-glucose를 포함하는 다당류, 즉 β -D-glucan인 것이 밝혀졌다. 이 물질의 항암기작은 기존의 암을 사멸시키는 화학요법과는 달리 숙주의 면역기능을 증강시킴으로써 암세포의 증식을 억제하여 암을 치료하는 것으로 알려졌다. 최근 일본에서는 버섯의 자실체, 균사체 및 배양액 등으로부터 추출한 다당체를 이용한 항암제를 개발하고 상용화하여 연간 7,000여억원 어치가 대체의약품으로 판매되고 있으며 우리나라에도 년 300억원 이상 수출하고 있다. 버섯은 이외에도 간염, 뇌졸중, 심장병 등과 같은 성인병에 대한 예방 및 치료에 효과가 탁월하며, 체내 콜레스테롤의 저하, 항혈전, 혈압강하, 혈당강하 및 노인성 질환에도 효과가 좋다는 사실이 보고되었다(水野와 川습, 1992).

버섯의 항암성분에 관한 본격적인 연구는 일본 학자들에 의해 수행되었다. 그 결과 일본에서는 구름버섯(운지, *Coriolus versicolor*)의 배양 균사체로부터 PS-K라는 항암면역요법제가 개발되어 암의 치료로 사용되고 있으며 국내에서는 야생 구름버섯 자실체로부터 추출한 단백다당체 Copolang이 광동제약에 의해 개발되어 PS-K와 유사하게 암의 치료에 사용된다. 이외에도 표고버섯(*Lentinus edodes*) 자실체로부터 분리한 lentinan, 치마버섯(*Shizophyllum commune*)의 배양여액으로부터 분리된 schizophyllan 등이 일본에서 판매중에 있으며 국내 연구진들에 의해 상황(*Phellinus linteus*)의 액체배양 균사체로부터 추출된 단백다당류 성분이 임상실험을 거쳐 Mesima-Ex(한국신약)라는 상품명으로 암의 치료에 사용되고 있다. 이외에도 영지를 액체배양한 균사체가 기능식품(영지균사체)으로 개발되기도 하였다. 버섯류의 단백다당체중 항암제 뿐만 아니라 간질환 치료제로서도 관심을 끌고 있는 것에는 구름버섯으로부터 추출된 간염치료제인 Licovek(광동제약)이 있다.

그러나 일반적으로 버섯의 유용성분을 의약품으로 개발하는 데에는 많은 시간과 비용이 소요될 뿐만 아니라 보건당국의 엄격하고 경직된 의약품 허가규정을 만족시키기가 현실적으로 어려워서 식용 또는 약용으로 사용되어온 상황이나 영지 등 일부 버섯들중 새로운 생리활성 성분이 밝혀진 경우에 이를 기능성 식품으로 개발하는 것이 국민의 보건에 이바지할 수 있는 보다 현실적인 방법이라 생각할 수 있다.

이에 최근 인공재배가 불가능한 버섯이라도 균사체 배양이 가능한 경우가 많이 보고되고 있다. 이에 인공 재배가 되지않거나 어려운 식·약용 버섯의 균사체를 곡류에 배양하여 이를 기능성 쌀로 개발할 수 있는 기술이 개발되고 있다. 최근의 연구결과에 따르면 버섯쌀은 버섯 못지않은 효과가 있는 것으로 보고되

고 있다. 실험용 쥐에 암세포를 이식하고 버섯 쌀을 먹인 군과 그렇지 않은 군을 비교해 볼 때, 버섯 쌀을 먹인 쥐가 63.9%나 더 오래 살았고 암발생 저지 정도도 78.2%나 됐다고 발표된 바 있다. 현재 버섯의 균사체를 이용하여 제조된 기능성 버섯 쌀은 동충하초 쌀과 상황버섯 쌀 등이 있고 이 식품들은 백화점이나 슈퍼 등에서 주로 항종양 효과가 있는 점을 중점적으로 내세워 고가에 판매되고 있다. 그러나 앞으로 소비자 선택의 폭을 넓혀주기 위해서는 항종양 효과는 물론 사람의 건강에 도움을 줄 수 있는 다양한 성분을 함유한 새로운 종류의 버섯쌀의 생산이 필요한 시점에 와 있다. 따라서 이러한 기능성 쌀을 새로 개발한다면 버섯쌀 생산자의 수익 증대는 물론 국민의 건강 증진에도 크게 기여할 것으로 판단된다.

2. 뽕나무버섯쌀 제조

뽕나무버섯은 고가의 식물 한약제인 난과식물인 천마와 약용버섯인 저령과 공생하는 버섯으로 동의보감에 기재된 식·약용버섯이다. 본 연구결과에 의하면 뽕나무버섯에서 추출한 조다당류를 생쥐(mouse)에 주사한 경우 sarcoma 180 암세포에 대해 높은 저지율과 면역에 관련된 세포의 수를 현저히 증가시키는 등 높은 항암 및 면역증강에 효과를 나타낸다는 것이 입증되었다. 최근 중국의 연구자들에 의하면 이 버섯의 추출물을 투여한 허혈성 중풍환자는 혈액의 고지혈증이 완화되는 것은 물론 동맥의 혈류량이 증가하여 뇌에 산소 공급이 원활해지면서 중풍증상이 많이 완화되는 등 치료효과가 있다는 것이 보고되고 있다. 또한 중국에서는 수천년 동안 치매의 치료제로 사용해온 천마와 유사한 효과가 천마에 공생하는 뽕나무버섯의 균사체에서 발견됨으로써 이 버섯의 균사체 추출물을 치매환자에 투여한 결과 그 효과가 천마에 못지않게 높다는 것이 확인되었다. 따라서 이 버섯을 치매의 예방이나 치료제로 이용하기 위한 연구가 활성화되고 있다.

가. 뽕나무버섯쌀의 액체종균 제조

뽕나무버섯쌀을 제조하기 위해 사용한 액체종균의 배지는 앞의 1절의 실험에서 여러 액체배지중 뽕나무버섯 균사체를 가장 빨리 성장시키는 감자포도당 맥아배지(potato dextrose malt sprout, PDMS)로 이 배지의 조성은, 증류수 1ℓ 당 potato 200g, dextrose 20g, malt sprout 20g으로 구성되어있다.

뽕나무버섯쌀의 액체종균을 제조하기 위하여 PDMB 액체배지 100ml가 들어 있는 250ml의 삼각 플라스크를 121℃, 15파운드의 고압 살균기로 20분간 살균

하였다. 이 액체배지를 충분히 식힌후, 먼저 PDA plate에 균사를 접종하여 균사가 평판면적의 약 70% 정도 자란 균사체의 끝 부분을 직경 5mm의 cork borer로 떼어낸 3~5개의 균사체 disc를 이 삼각플라스크에 접종하였다. 뽕나무버섯 균사체의 disc가 접종된 삼각 플라스크는 회전 진탕 배양기에서 150 rpm으로 25℃에서 20일간 진탕배양하여 액체종균을 제조하였다.

나. 버섯 쌀의 제조

1) 재료 및 방법

가) 재료

현미, 백미 및 보리쌀 등의 3종류의 곡류를 버섯쌀 제조에 사용하였다.

나) 방법

- (1) 각각의 쌀을 깨끗이 씻어 미지근한 물에 각 쌀의 수분 함유율과 도정 정도 등에 따라 시간을 달리하여 쌀을 불렸다. 물에 불리는 정도는 일반적으로 현미와 보리쌀은 3시간, 백미는 2시간 정도 담갔다.
- (2) 불린 쌀은 소쿠리에 건져 1시간동안 물기를 빼고 버섯재배용 병(850cc)에 불린 쌀 20%(w/v)를 담고 이 쌀의 4%에 해당하는 dextrose(w/w)를 첨가한 후 121℃에서 40분간 고압 멸균하였다.
- (3) 고압멸균후 충분히 식힌 각각의 배양병에 액체종균 15ml를 접종한 후 25℃에서 20일간 배양하였다.
- (4) 배양이 완료 된 쌀은 쌀의 원형이 유지되도록 부드럽게 부순 뒤 60℃에서 10시간 건조하여 버섯쌀을 제조하였고 습기가 차단되는 비닐백에 넣어 4℃의 냉장고에 보관하면서 밥을 지을때 사용하였다.

- (5) 일반쌀에 버섯쌀을 넣어 밥을 지을 때에는 버섯쌀이 일반쌀의 10%(v/v)를 넘지 않도록 한다. 만일 10%를 넘는 경우에는 건강에 도움이 되기는 하지만 밥의 풍미가 떨어져 밥맛이 없을 수가 있다.

3. 민긴뿌리버섯쌀 제조

민긴뿌리버섯(*Oudemansiella radicata*)의 자실체는 의학적으로 중요한 물질인 oudenone을 함유하고 있다. oudenone은 한방에서 예전부터 고혈압의 치료에 사용되어왔으며 또한 본 연구의 결과 생쥐의 Sarcoma 180 동물의 고형암에도 탁월한 효과를 나타낸다는 것이 규명되었다. 또한 민긴뿌리버섯 균사체의 배양액에는 oudemansin이라는 물질이 발견되는데, 이 물질은 여러종류의 식물병원진균에 우수한 항균력을 나타내는 것으로 알려져 있어서 앞으로 새로운 항균제를 개발하는데 이용될 수 있는 가능성이 높은 것으로 알려져 있다.

가. 민긴뿌리버섯쌀의 액체종균 제조

민긴뿌리버섯쌀을 제조하기 위해 사용한 액체종균의 배지는 앞의 1절의 실험에서 여러 액체배지중 민긴뿌리버섯 균사체를 가장 빨리 성장시키는 감자포도당맥아배지(potato dextrose malt extract, PDM)로 이 배지의 조성은, 증류수 1ℓ 당 potato 200g, dextrose 20g, malt extract 20g으로 구성되어있다.

민긴뿌리버섯쌀의 액체종균을 제조하기 위하여 PDMB 액체배지 100ml가 들어있는 250ml의 삼각 플라스크를 121℃, 15파운드의 고압 살균기로 20분간 살균하였다. 이 액체배지를 충분히 식힌후, 먼저 PDA plate에 균사를 접종하여

균사가 평판면적의 약 70% 정도 자란 균사체의 끝 부분을 직경 5mm의 cork borer로 떼어낸 3~5개의 균사체 disc를 이 삼각플라스크에 접종하였다. 민긴뿌리버섯 균사체의 disc가 접종된 삼각 플라스크는 회전 진탕 배양기에서 150 rpm으로 25℃에서 10일간 진탕배양하여 액체종균을 제조하였다.

나. 버섯 쌀의 제조

1) 재료 및 방법

가) 재료

현미, 백미 및 보리쌀 등의 3종류의 곡류를 버섯쌀 생산을 위해 사용하였다.

나) 방법

- (1) 각각의 쌀을 깨끗이 씻어 미지근한 물에 각 쌀의 수분 함유율과 도정 정도 등에 따라 시간을 달리하여 쌀을 불린다. 불리는 정도는 일반적으로 현미와 보리쌀은 3시간, 백미는 2시간 정도 담가 불렀다.
- (2) 불린 쌀은 소쿠리에 건져 1시간동안 물기를 빼고 버섯재배용 병(850cc)에 불린 쌀 20%(w/v)를 담고 이 쌀의 4%에 해당하는 dextrose(w/w)를 첨가한 후 121℃에서 40분간 고압 멸균하였다.
- (3) 고압멸균후 충분히 식힌 각각의 배양병에 액체종균 15ml를 접종한 후 25℃에서 15일간 배양하였다.
- (4) 배양이 완료 된 쌀은 쌀의 원형이 유지되도록 부드럽게 부순 뒤 60℃에서 10시간 건조하여 버섯쌀을 제조하였고 습기가 차단되는 비닐백에 넣어 4℃의 냉장고에 보관하면서 필요할 때 사용하였다.
- (5) 일반쌀에 버섯쌀을 넣어 밥을 지을 때에는 버섯쌀이 일반쌀의

10%(v/v)를 넘지 않도록 한다. 만일 10%를 넘는 경우에는 건강에 도움이 되기는 하지만 밥의 풍미가 떨어져 밥맛이 없을 수가 있다.

뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯 액체종균을 현미, 백미 및 보리쌀에 10~20일 정도 배양하여 이들 곡물에 균사체를 배양하여 기능성 버섯쌀을 제조하였다. 이 식품은 현미, 백미 및 보리쌀의 식이섬유와 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 항암, 면역증강, 혈압강하, 고지혈증 치료 등의 기능성 성분이 풍부하게 함유된 건강 식품이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발목표의 달성도

구분	연구개발목표	달성도
1차 년도 (2004)	<p>뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 배양조건 탐색</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 수집 2) <i>in vitro</i>에서 버섯의 생장을 위한 최적배양 조건 및 최적기질 선발 3) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 배양을 통한 최적 고체배지의 선발 4) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 균사체 배양을 통한 최적 액체배지 선발 5) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 톱밥처리실험 	<ul style="list-style-type: none"> - 뽕나무버섯 16균주, 민긴뿌리버섯 9균주를 자실체형성실험을 위해 수집 - 각각 균주의 균사체 성장 최적온도, pH, 탄소영양원, 질소영양원 특성 조사 - 각각 공시균의 최적 고체배지를 선발하기 위해 11종의 고체배지에서 특성조사 - 각각 공시균의 생장이 양호한 고체배지를 기본으로 하여 균사생장 최적 액체배지 선발 - 3종의 톱밥에 배양가능성을 확인
2차 년도 (2005)	<p>뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 인공재배 조건 확립 및 기능성 유용물질의 탐색</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 생장을 위한 우량 톱밥배지 선발 2) <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i>에서 버섯의 자실체로부터 분리된 유용성분의 분석 3) <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i>에서 버섯의 균사체와 배양액으로부터 분리된 유용성분의 확인 및 효과 분석 4) 자실체, 균사체 및 배양액의 동물처리의 효과분석 5) 기능성 물질의 상품화 가능성 제시 및 실증화 	<ul style="list-style-type: none"> - 우량 톱밥배지로 참나무 톱밥배지를 선발 - 유용성분이 조다당류인 것이 확인 - 분리된 조다당류가 항암 및 면역증강에 효과가 있는 것이 확인됨 - 생쥐에 처리하여 1차 면역증강 효과 확인 - 버섯 드링크제 또는 식품화의 가능성을 조사
3차 년도 (2006)	<p>공시균의 인공 대량재배법 확립 및 기능성 유용물질의 이용</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 자실체 대량생산기법의 확립 2) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯의 유전적 특성 3) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯에서 분리한 생리활성물질의 규명 4) 뽕나무버섯 및 민긴뿌리버섯에서 분리된 생리활성물질의 인간 및 동물세포 배양을 통한 면역증강 및 항암 효과 규명 5) 기능성 유용물질의 실용화 	<ul style="list-style-type: none"> - 대량 생산을 위한 병재배법의 완성 - 뽕나무버섯 27, 뽕나무버섯부치 41, 민긴뿌리버섯 10, 끈적긴뿌리버섯 4균주를 PCR-RAPD와 ITS region의 유전적 특성 분석 - 생리활성 물질이 β-D-glucan인 것이 확인 - 각각의 자실체에 3종의 용매를 이용하여 추출한 조다당류를 생쥐에 투여하여 항암 및 면역증강 효과 규명 - 이들 버섯의 균사체를 여러종류의 쌀에 배양하여 기능성 버섯쌀의 제조

2. 관련분야의 기술발전에 대한 기여도

- 가. 식·의약용 버섯인 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 인공대량 재배 기술의 개발로 버섯재배 농가에 새로운 버섯소득 작물의 창출
- 나. 맛과 기능성이 뛰어난 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 개발로 버섯 소비가 증가하여 재배농가의 소득 증진에 기여
- 다. 이들 버섯을 이용한 기능성 식품개발로 국민건강에 기여하고 수출에 의한 외화 획득에 기여

3. 학문적 기여도

- 가. 학술지 게재 논문 : 게재 4편, 게재예정 1편

Shim, J. O., Chang, K. C., Lee, Y. S., Park, C. H., Kim, H. Y., Lee, U. Y., Lee, T. S. and Lee, M. W., 2006, The Fruiting Body Formation of *Armillaria mellea* on Oak Sawdust Medium Covered with Ground Raw Carrots, *Kor. J. Mycol.* **34(4)**: 206-208.

김상범, 이건우, 김혜영, 심미자, 노현수, 이현숙, 이민웅, 이우윤, 이태수, 2006, 뽕나무버섯(*Armillaria mellea*)의 자실체에서 추출한 조다당류가 생쥐의 Sarcoma 180에 미치는 억제효과, *한국균학회지*, **34(2)**: 98-104.

Kim, S. B., Kim S. H., Lee, K. R., Shim, J. W., Lee, M. W., Shim, M. J., Lee, U. Y. and Lee, T. S., 2005, The Optimal Culture Conditions for the Mycelial Growth of *Oudemansiella radicata*, *Kor. J. Mycol.* **33(4)**: 230-234.

Shim, J. O., Chang, K. C., Kim T. H., Lee, Y. S., Lee, U. Y., Lee, T. S.

and Lee, M. W., 2006, The Fruiting Body Formation of *Oudemansiella radicata* in the Sawdust of Oak (*Quercus variabilis*) Mixed with Rice Bran, Kor. J. Mycol. **34(1)**: 30-33.

김상범, 이건우, 심미자, 노현수, 이현숙, 이민웅, 이우윤, 이태수, 2007, 민긴 뿌리버섯(*Oudemansiella radicata*)의 자실체에서 추출한 조다당류의 항암 및 면역증강 효과, 한국균학회지, **35(1)**: 00-000.

나. 국내의 학술대회 발표 : 8편

Lee, G. W., Kim, S. B., Lee, S. H., Shim, J. O., Shim, M. J., Lee M. W., Lee, U Y. and Lee, T. S., 2006, Studies on Antitumor and Immuno-modulatory Effects of Crude Polysaccharides Extracted from *Armillaria mellea*, 균학회소식 **18(2)**: p.77

Kim, S. B., Lee, G. W., Shim, J. O., Shim, M. J., Lee, M. W., Lee, U Y. and Lee, T. S., 2006, Antitumor and Immuno-modulatory Activities of Crude Polysaccharides Isolated from *Oudemansiella radicata*, 균학회소식 **18(2)**: p.78

Kim, Y. I., Chang, K. C., Lee, Y. S., Shim, J. O., Lee, U Y., Lee, T. S. and Lee, M. W., 2006, The Fruiting Body of *Oudemansiella radicata* formed on the sawdust media of *Quercus variabilis* Mixed with Rice Bran, 균학회소식 **17(2)**: p.150

Kim, Y. I., Chang, K. C., Lee, Y. S., Shim, J. O., Lee, U Y., Lee, T. S. and Lee, M. W., 2006, The Fruiting Body of *Oudemansiella radicata* formed on the sawdust media, 균학회소식 **17(1)**: p.101

Shim, J. O., Chang, K. C., Lee, Y. S., Lee, U Y., Lee, T. S. and Lee, M. W., 2006, The Fruiting Body Formation of *Armillaria mellea* in the Sawdust of Oak (*Quercus variabilis*) Mixed with Ground Raw Carrot, 균학회소식 **18(1)**: p.72

Kim, S. B., Lee, G. W., Shim, J. O., Shim, M. J., Lee, M. W., Lee, U. Y.

- and Lee, T. S. 2006. Antitumor and Immuno-modulatory Activities of Crude Polysaccharides Isolated from *Oudemansiella radicata*. *2006 International Meeting of the Ferderation of Korean Microbiological Societies*. p.249
- Lee, G. W, Kim, S. B., Lee, S. H., Shim, J. O., Shim, M. J., Lee, M. W., Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2006. Studies on Antitumor and Immuno-modulatory Effects of Crude Polysaccharides Extracted from *Armillaria mellea*. *2006 International Meeting of the Ferderation of Korean Microbiological Societies*. p.249
- Lee, T. S., Shim M. J. and Lee, M. W. 2006. Immunomodulatory and Antitumor Effects of Crude Polysaccharides Extracted from Korean Wild Medicinal Mushrooms. *8th International Mycological Congress Handbook & Abstracts Book 1*. p.220

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

- 가. 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯의 대량재배법이 개발되어 버섯재배농가의 확대를 가져왔으며 소득증대에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.
- 나. 그러나 농가재배 후 소비단계에서 수요를 창출할 수 있는 맛, 기능성, 요리법 등의 추가적인 연구가 더 보완되어야 하고 또한 재배내용을 좀 더 낮출 수 있는 저렴한 배지의 개발이 필요하다고 판단됨.

2. 타연구에의 응용

- 가. 새로 개발된 기능성버섯의 대량재배가 가능해 짐에 따라 다른 유용한 야생버섯의 인공재배와 자실체를 이용한 기능성 식품개발 연구와 신기능물질의 신약 개발에 응용될 수 있을 것임.

3. 기업화 추진방안

- 가. 뽕나무버섯과 민긴뿌리버섯 같은 기능성버섯의 병재배법이 개발됨으로써 수요를 확보할 수 있으면 현재 팽이버섯 병재배와 같은 대량생산체계가 가능할 것임.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.