

최 종  
연구보고서

수목추출물을 이용한 버섯생장영양제 및  
그린몰드의 bio-control 제제 개발

Development of nutrient for mushroom growth and  
agent for bio-control of green molds

주관연구기관  
경북대학교

협동연구기관  
경상대학교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “수목추출물을 이용한 버섯생장영양제 및 그린폴드의 bio-control 제제 개발”  
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4월 24일

주관연구기관명 : 경 북 대 학 교

총괄연구책임자 : 이 종 윤

세부연구책임자 : 이 종 윤

연 구 원 : 최 익 준

우 혜 인

정 민 지

협동연구기관명 : 경 상 대 학 교

협동연구책임자 : 양 재 경

연 구 원 : 김 지 운

여 희 동

협동연구기관명 : (주)유림하이텍

협동연구책임자 : 임 부 국

연 구 원 : 홍 성 철

황 지 혜

# 요 약 문

## I. 제목

수목 추출물을 이용한 버섯생장영양제 및 그린몰드의 bio-control 제제 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 국민건강생활에 대한 관심과 웰빙의 열풍으로 비타민, 무기물, 핵산 등을 다량으로 함유하고 있는 버섯은 국민의 식생활에 큰 부분을 차지하고 있다. 특히 최근에는 버섯에 함유된 항암 물질 및 항산화물질 ( $\beta$ -glucan, lentinan 등)에 대한 관심이 증대로 인한 버섯의 소비증가로 인하여 버섯 생산 및 관련 산업이 급속하게 확장되고있으며, 천연식품으로서 맛과 향기가 독특한 버섯은 국내 소비량이 급증하여 연간 버섯소비량이 1990년 1.27kg/인에 불과하던 것이 2003년에는 3.28 kg/인 으로 주요한 식품으로 자리를 굳히고 있으며 버섯 소비량은 국민소득과 비례하여 상승함으로 앞으로도 소비량이 계속 신장될 것으로 추정되어진다.

그러한 소비에 맞추어서 버섯 재배에 영향을 미치는 종균이나 품종을 개발하고 있으며, 버섯 생장에 영향을 주는 외부환경조건을 극복하고자 국내의 버섯재배는 재배사 생산방식으로 많이 전환되었으며, 국내에서 재배되고 있는 버섯재배사의 크기는 40-200평/동으로, 재배규모는 점차 대규모화, 기업화되는 경향을 나타내고 있다. 국내의 버섯산업은 많은 투자에도 불구하고 일부의 병 재배를 제외하고는 기계화가 미흡하고 생산시설 낙후로 노동력이 많이 소요되는 산업이다. 이에 따라서 버섯생산비의 절감을 위해서 배지의 버섯 생산주기를 확대하는 것이 가장 바람직한 방법이며, 이를 위해서 사용될 수 있는 버섯생장영양제의 개발이 시급한 상황에 있다.

특히 천연 수목자원으로부터 버섯생장영양제의 개발은 버섯전문가들도 충분한 잠재력을 인정하지만, 유효 추출물을 경제적이고 저렴하게 추출할 수 있는 방법 도출이 어렵기 때문에 대부분의 업체들은 제품화 가능성을 회의적으로 관망하고 있다. 버섯생장영양제의 사용 효과는 버섯의 수확량 증대 및 배지의 생산원가 절감, 노동력 절감을 유도 할 수 있으며, 다수확, 고품질의 버섯을 생산할 수 있다.

버섯의 푸른곰팡이병 감염 및 전염은 버섯농사의 존폐를 결정하는 중요한 요인의 하나이며 이들

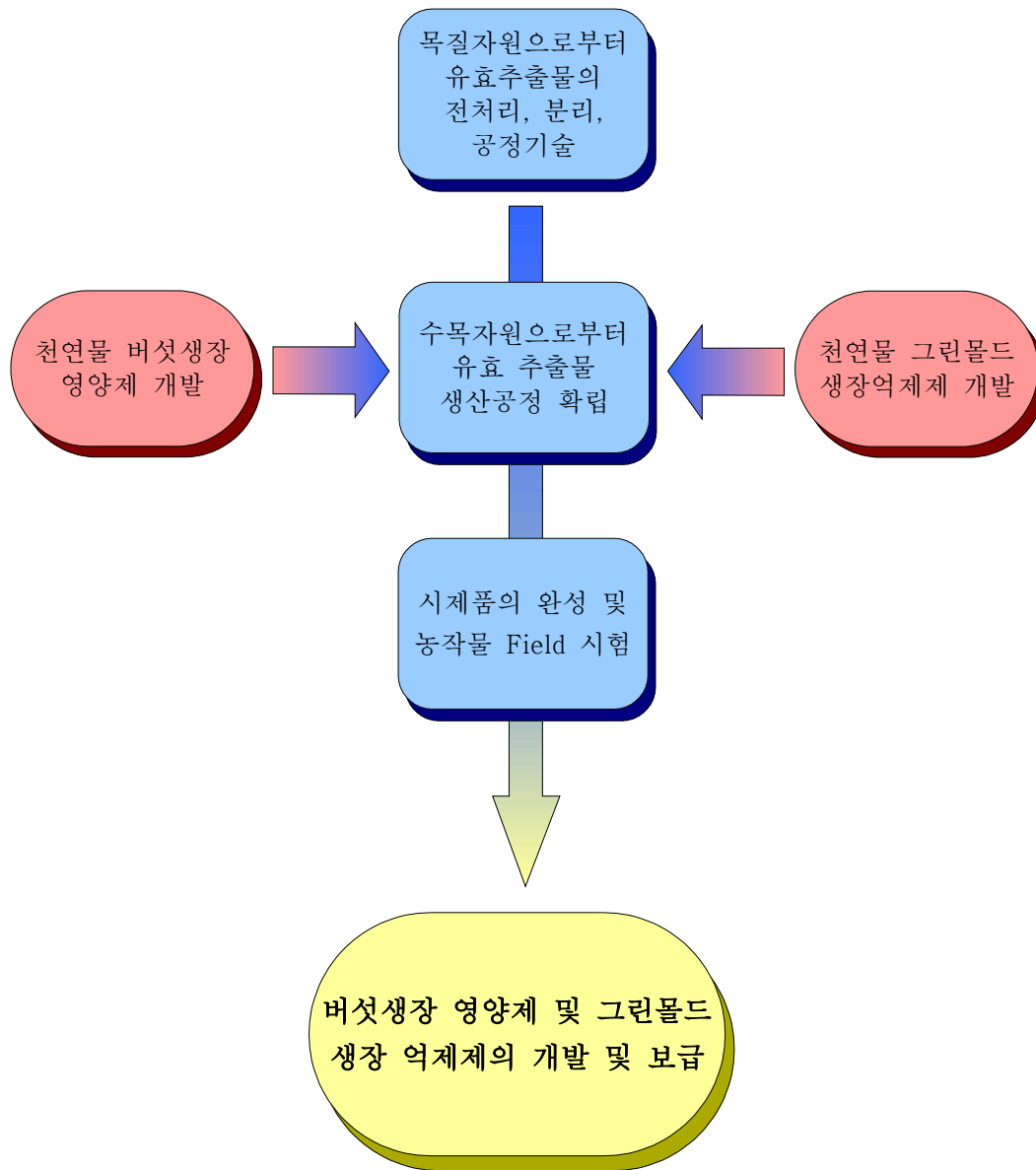
을 효과적으로 제어할 수 있는 버섯 재배용 항 곰팡이제제의 개발이 절실히 필요하다고 생각되어진다. 곰팡이 감염으로 인한 버섯배지의 폐상 및 배지의 폐기는 농가의 엄청난 경제적 손실을 초래되고 있으며, 이들 곰팡이 병해를 방지할 수 있는 bio-control제제 개발은 전 버섯재배 농가의 희망이다. 현재까지 푸른곰팡이병을 방제하기 위해 합성 살균제를 사용하여 왔고, 이들의 오, 남용은 버섯 상품의 잔류독성 문제점으로 남아있다. 최종 소비자들은 저농약, 무농약, 농산물에 대한 선호가 지속적으로 증가되고 있으며, 합성살균제의 대안으로서 인체독성이 거의 없으면서 자연 환경에 노출시 잘 분해되는 환경 친화적인 천연물질 유래 살균제를 원하는 재배업자들 요구가 증대되고 있다.

따라서 본 연구과정에서 수행되는 푸른 곰팡이 생장억제 제품을 합성 살균제가 아닌 천연 수목으로부터 전처리, 분리, 추출된 화합물로부터 획득 하는 것은 친환경 농산물 생산에 있어서 필수적인 요건으로, 버섯 재배의 bio-control제제의 개발로 농가의 필요충족은 물론, 소비 계층의 안정성 확보에 이르는 것이 최종적인 목적이다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 과제는 산업적으로 이용되지 못하고 폐기되거나 임지에 버려지는 임산자원의 전처리를 통하여 추출물을 분리하고 이들 추출물을 버섯산업에서 그린몰드의 생장을 억제시키는 친환경적인 생장영양제로 이용하기위한 제품을 개발하는 연구를 수행하였다.

본 연구에서 수행한 주요 연구내용 및 범위는 다음과 같다.



연구개발의 내용	연구범위
·버섯 균주의 확보 및 계대배양 기술확립 ·버섯균사생장 최적 환경인자 탐색 및 결정 ·버섯균사생장을 증가시킬 수 있는 목질원료의 전처리 조건 연구 ·전처리 원료로부터 버섯균사생장에 관여된 유효물질의 분리 및 추출조건 연구	- 버섯재배 농가로부터 표고버섯 및 양송이균주의 확보 및 지속적인 계대배양 - 버섯균사생장을 위한 최적 pH, 최적온도, 최적 고체배지선정 - 협동기관(기업) 으로부터 제공받은 전처리 목질원료를 버섯 균사생장에 도입, 시험하고 최적의 전처리 조건을 도출함 - 최적의 전처리 목질원료로부터 버섯균사생장에 유효한 추출물 탐색을 위하여 각종의 추출을 시도, 이로부터 추출된 화합물질균을 군사 성장시험함
·그린몰드의 수집 및 계대배양 기술 확립 ·그린몰드의 성장환경인자 탐색 및 확립 ·수목의 잎으로부터 분리된 휘발성 화합물을 이용한 그린몰드의 성장 억제 연구 ·목부로부터 그린몰드의 성장 억제 화합물의 분리법 연구	- 농가 및 외국의 연구기관으로부터 그린몰드 균주를 수집하고 이를 지속적으로 계대배양 - 농가로부터 제공받은 천연배지 및 고체배지를 이용하여 그린몰드의 성장 조건(pH, 함수율, 온도)을 검토 - 향균방이화합물을 내포하는 수목의 잎을 hydro-distillation법에 의해 화합물을 분리하고 그린몰드 성장억제를 하는 화합물을 선발 - 침엽수재 톱밥(소나무 및 잣나무)으로부터 추출된 화합물을 그린몰드 성장억제 시험에 적용하여 최적의 추출물그룹을 도출
·임산자원의 전처리기술 공정 검토 ·버섯균사 및 그린몰드생장 제어 관련 추출물의 대량생산을 위한 전처리 공정 확립 ·전처리 원료로부터 버섯 및 그린몰드 생장에 유효한 물질들의 분리공정 확립 ·Lab 수준에서 제조된 화합물의 농가 실연 시험	- 임산자원을 고압처리공정 및 열수처리공정을 현장에서 실시하여 추출물의 적용여부를 검토 - 선택된 전처리기술을 현장 라인에서 구축하고 공정 material balance를 확립 - 전처리원료로부터 유효추출물을 분리하기 위한 분리공정을 현장수준에서 구축 - 제1세부 및 제 1협동과제에서 조제된 버섯 및 그린몰드 원료를 버섯재배농가에 현장 적용하여 그 효과를 검토하고 각 과제에 통보

연구개발의 내용	연구범위
·버섯생장 영양제의 효능향상을 위한 탄소 원 발굴 및 첨가 효능시험 ·버섯생장 영양제의 효능향상을 위한 질소 원 발굴 및 첨가 효능 시험 ·버섯생장 영양제의 효능향상을 위한 제당 부산물의 첨가 검토 시험 ·버섯영양제의 효능향상을 위한 첨가물의 formulation 도출 시험	- Pentose, hexose 당류들을 후보 탄소원으로 하여 군사생장시험을 실시하여 효능이 우수한 탄소원을 발굴함 - 아미노테 질소원들을 후보 질소원으로 이들 중 개선효과가 우수한 질소원을 선발함 - 제당업체 부산물을 배지에 첨가하여 군사생장 증진 효과를 검토함. - 발굴된 첨가물(탄소원, 질소원, 부산물)의 복합화에 의한 최적의 formulation 도출
·수목의 잎 추출물 및 목부 추출물의 그린 몰드생장억제력 최종평가 및 선택 ·잎 추출물과 목부 추출물의 복합화에 의한 그린몰드 성장억제력 평가 시험 ·시판 유기계 화합물 첨가에 의한 그린몰드 성장억제력 평가 시험 ·그린몰드 bio-control 제제의 formulation 완성시험	- 수목의 잎 추출물 및 목부 추출물을 원료로 하여 그린몰드의 성장억제력을 최종적으로 시험하여 그 효능을 평가 - 잎 추출물과 목부 추출물을 각종의 비율로 혼합하여 그린몰드 성장억제력을 평가하고 최적 혼합비율을 도출 - 시판 유기계 화합물을 추출물 원료에 첨가하여 그린몰드 성장억제력을 평가함 - Feed back 기법에 의한 추출물원료 및 첨가물의 formulation 결정 및 성장억제 시험
·버섯생장영양제 및 그린몰드 bio-control 제제의 배지 투입방법 연구 ·버섯생장영양제의 농가실현 및 성능 평가 시험 ·그린몰드 bio-control제제의 농가 실현 및 성능평가 시험 ·그린몰드 제제와 버섯생장영양제의 상호 보완성 검토 ·버섯생장영양제 및 그린몰드 bio-control 제제의 시제품 제조	- 버섯생장제 및 그린몰드 bio-control 제제의 효능 발휘를 위하여 버섯배지에 투입하는 방법을 시험, 도출 - 농가의 버섯배지에 직접 버섯생장 영양제를 투입하고 그 실증효과를 검증하고, 최적의 농도 및 투입량을 결정 - 그린몰드 bio-control 제제의 성장억제 효과 및 발생예방효과를 직접 버섯 재배농가의 배지에 투입하여 시험 - 그린몰드제제 및 버섯생장영양제간의 영향 및 버섯 생산성 검토 - 버섯생장영양제 및 그린몰드 bio-control 제제의 시제품을 제조하고, 버섯재배 농가에 소량 무상공급 후, 그 질적 평가를 실시

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구는 수목 추출물로부터 버섯 성장에 방해가 되는 그린몰드를 control하는 성분을 찾아 버섯 성장 영양제를 개발하고 시제품으로 생산하여 현장 적용을 통해 버섯 영양제로 이용에 대한 경제적인 효과를 기대하였다. 그 내용은 본문에서 자세하게 설명되어 질 것이며, 그 결과에 대한 요약문은 다음과 같다.

### 1. 버섯균사 성장에 유효한 수목추출물의 탐색 및 발굴

(1) 버섯 균주의 확보 및 계대배양 기술 확립 : 경남 산청군 소재의 “지리산신등 표고버섯농원”으로부터 표고버섯, 대구시 달성군 하빈면 소재의 농가로부터 양송이버섯 균주 1종을 확보하였다.

(2) 버섯균사성장 최적 환경인자 탐색 및 결정 : 표고버섯과 양송이버섯의 균사는 25℃, pH 5.0에서 최적으로 성장하였다.

(3) 버섯균사생장을 증가시킬 수 있는 목질원료의 전처리 조건 연구 : 목질원료의 전처리 조건을 탐색하여 수증기처리의 의한 고온·고압 방법이 수행되어졌다.

(4) 전처리 원료로부터 버섯균사생장에 관여된 유효물질의 분리 및 추출조건 연구 : 시료의 전처리 및 고온·고압 전처리 공정을 거친 시료로부터 버섯 균사생장에 관여된 유효물질의 분리를 위해서 공시재료의 화학적 전처리 및 성분을 분석한 결과 시료를 autoclaving함으로써 균사 생장의 저해 물질이 제거되어 성장 성능이 상승되었다.

### 2. 버섯생장 영양제의 효능 향상을 위한 첨가 영양원 개발

(1) 버섯생장 영양제의 효능향상을 위한 탄소원 발굴 및 첨가 효능시험 : 탄소원의 첨가로 인해 균사생장에 미치는 효과를 연구한 결과 표고버섯(*Lentinula edodes*)에서는 2%의 glucose를 첨가한 경우, 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)에서는 2%의 starch를 첨가한 경우의 균사생장 효능이 가장 상승되었다.



(2) 버섯생장 영양제의 효능향상을 위한 질소원 발굴 및 첨가 효능시험 : 질소원의 첨가로 인한 균사생장에 미치는 효과를 연구한 결과 표고버섯(*Lentinula edodes*)에서는 0.5%의 peptone을 첨가한 경우, 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)에서는 0.5%의 ammonium tartrate를 첨가한 경우의 균사생장 효능이 가장 상승되었다.

(3) 버섯생장 영양제의 효능향상을 위한 제당 부산물의 첨가 검토 시험 : (주)유림하이텍으로부터 제공받은 제당부산물을 첨가한 결과 균사생장 효능이 상승되었다.

(4) 버섯영양제의 효능향상을 위한 첨가물의 formulation 도출 시험 : 발굴된 첨가물의 복합화를 위한 실험으로 최종적으로 glucose 2% 첨가와 peptone 0.5%첨가, 제당부산물의 첨가하는 formulation을 완성하였다.

### 3. 그린폴드의 생장억제를 나타내는 수목 추출물의 탐색 및 최적화

(1) 그린폴드의 수집 및 계대배양 : *Trichoderma* spp. 5종의 포자와 균사체의 모양은 모두 거의 유사하였지만, 포자의 형태가 부분적으로 다르게 나타났다.

(2) 그린폴드의 생장환경인자 탐색 : *Trichoderma* 의 생장에 있어서 최적배양온도는 25℃로 확인되었고, *Trichoderma* spp. 균주 5종의 최적생장 pH는 5.0으로 확인되었고, pH 11.0 이상에서는 거의생장되지 않았다. *Trichoderma* spp. 5종 균주의 벗짚배지에서 최적 균사생장 함수율은 75%였다.

(3) 수목의 잎으로부터 분리된 휘발성 화합물을 이용한 그린폴드의 생장억제 : 수목(*Pinus densiflora*, *Chamaecyparis obtusa*) 의 잎으로부터 hydro-distillation법에 의해 추출된 수용성 정유의 수율은 약 4% 이하 수준이었고, 획득된 정유의 농도는 약 550 mg/L였다. 소나무(*Pinus densiflora*) 잎 수용성 정유의 항균활성은 1250 ppm부터 나타났으며 5000 ppm에서 *T. aggressivum* 9.4%, *T. atroviride* 7.2%, *T. harzianum* 13.4%, *T.koningii* 5.2%, *T. viride* 1.0%였다.

편백(*Chamaecyparis obtusa*) 잎 수용성 정유의 항균활성은 1250 ppm - 5000 ppm에서 나타났으며 5000 ppm에서 *T. aggressivum* 13.4%, *T. atroviride* 8.1%, *T. harzianum* 8.1%, *T. koningii* 5.7% 및 *T. viride* 9.0%였다. 소나무(*Pinus densiflora*) 잎 또는 편백(*Chamaecyparis obtusa*) 잎 수용성 정유 단독으로는 *Trichoderma* 5종 균

주에 대한 항균제제의 개발은 어렵다고 판단되었다.

(4) 목부로부터 그린몰드의 생장 억제 화합물의 분리법 연구 : *Trichoderma* 5종 균주에 대한 소나무(*Pseudotsuga menziesii*) 목부 추출물의 항균활성은 최대 61%(100℃, 1시간)로 나타냈으며, 1시간 또는 3시간이 최적 추출조건으로 도출되었다. *Trichoderma* 5종 균주에 대한 100℃, 3시간 추출조건에 따른 낙엽송(*Larix leptolepis*) 추출물의 항균활성은 약 15% 이하로 항균제제로서는 원료로서 의미가 낮았다. *Trichoderma* 5종 균주에 대한 100℃, 3시간 추출조건에 따른 소나무 목부(*Pseudotsuga menziesii*) 추출물의 항균활성은 1000 ppm에서 18% - 43%의 항균활성을 나타내었다.

낙엽송(*Larix leptolepis*) 및 소나무(*Pseudotsuga menziesii*) 목부 추출물에 그린몰드의 생장을 저해하는 물질이 함유되어 있다는 사실을 추측할 수 있었으며, 최소 1000ppm 정도에서 상업성이 있다고 판단되었다.

낙엽송 열수추출물의 *n*-hexane 용해부가 *Trichoderma* 5종 균주에 대하여 가장 높은 항균활성을 나타냈으며, 이때 항균활성은 70 - 80%였다. 소나무(*Pseudotsuga menziesii*) 목부 추출물을 각 용제별로 다단 추출한 결과, water 용해부 65%, *n*-hexane 용해부 8%, methylene chloride 용해부 13%, ethyl acetate 용해부 14%였다.

#### 4. 그린몰드의 생장억제력 증진을 위한 유효첨가물 개발

##### (1) 수목의 잎 추출물 및 목부 추출물의 그린몰드 생장억제력 최종평가 및 선택 :

*Trichoderma* 5종 균주에 대한 편백 잎 수용성 정유의 항균활성은 4000 ppm에서 5.9% - 22.0 %로 나타나 단일항균제제로 사용 가능성이 낮았다. *Trichoderma* 5종 균주에 대한 편백 잎 수불용성 정유의 항균활성은 4000 ppm에서 40.2 - 63.2 %로 나타나 단독 항균제제로서 사용이 가능하다고 판단되었다. 수불용성 정유는 휘발성물질로 후처리가 비교적 간단하여 버섯농가에서 발생하는 *Trichoderma*에 대한 항균제제 원료로서의 가능성을 확인하였다. *Trichoderma* 5종 균주에 대한 소나무(*Pseudotsuga menziesii*) 목부로부터 분리된 수목추출물의 항균활성은 1000 ppm에서 약 33.4%의 항균활성을 나타냈으며, 수목추출물의 *n*-hexane 추출물의 항균활성은 1000 ppm에서 47% - 65%였다.

소나무(*Pseudotsuga menziesii*) 목부로부터 분리된 수목추출물의 *n*-hexane 추출물은 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 단일항균제제로서의 사용 가능성을 확인하였다.

**(2) 잎 추출물과 목부 추출물의 복합화에 의한 그린몰드 생장억제력 평가 시험 :**

*Trichoderma* 5종 균주에 대한 복합제제(소나무 목부 추출물, 편백 잎 수불용성 정유 혼합)의 항균활성은 10 : 1의 혼합비율에서 최대 32%의 항균활성을 나타냈지만, 소나무 (*Pseudotsuga menziesii*) 목부 추출물의 항균활성(35%)과 비교할 경우 항균활성이 낮아지는 결과를 나타내어 복합화의 의미가 낮다고 판단되었다.

**(3) 시판 유기계 화합물 첨가에 의한 그린몰드 생장억제력 평가 시험 :** *Trichoderma*

5종 균주에 대한 유기계혼합제제(소나무 목부 추출물, 시판유기계 화합물 혼합)의 항균활성은 소나무(*Pseudotsuga menziesii*) 목부 추출물과 시판유기계 화합물의 혼합비율 0.5 : 1(w : w) 처리구에서 53% - 83%로 확인하였고, 소나무(*Pseudotsuga menziesii*) 목부 추출물의 단일사용보다는 시판유기계 화합물을 첨가하는 것이 항균제제로서 성능이 우수하여 산업화 가능성이 있다고 판단되었다.

**(4) 그린몰드 bio-control 제제의 formulation 완성시험 :** *Trichoderma* 5종 균주에 대

하여 유기계혼합 formulation(소나무 목부 추출물 : 시판유기계 화합물 = 0.5 : 1(w : w))활성은 1000 ppm에서 49% ~ 69%로 가장 효과가 좋았으며 항균제로서 산업화 가능성이 있다고 판단되었다.

*Trichoderma* 5종 균주에 대한 최적 formulation은 소나무(*Pseudotsuga menziesii*) 목부 추출물, 시판유기계 화합물, 시판항균제품(SP, BN)을 중량비 1 : 1 : 1(w : w : w)로 혼합하여 제제화한 것이고, 이때 항균활성은 63 ppm에서 100%에 가까운 항균활성을 나타냈다.

**5. 유효추출물의 분리를 위한 전처리 및 분리 공정 개발**

**(1) 임산자원의 전처리기술 공정 검토 :** 수목의 전처리 기술 연구과정을 통하여 연구한 결과 25kg/cm<sup>2</sup>의 고온·고압 처리의 압력에서 6분 처리가 최적의 전처리로 나타났다.

**(2) 버섯균사 및 그린몰드 생장 제어 관련 추출물의 대량 생산을 위한 전처리 공정 확립 :** 대량 생산을 위한 전처리 공법을 위하여 1회 처리량 최대 15kg으로 하는 생산 공정을 확립하였다.

**(3) 전처리 원료로부터 버섯 및 그린몰드 생장에 유효한 물질들의 분리공정 확립 :** 전

처리된 수목 추출물을 회수하여 증발장치에 투입하여 증발기 내부 온도를 70℃에서 진공 상태가 되며, 압력 540~580kg/cm<sup>2</sup> setting되어 증발하여 물질을 분리하였다.

(4) Lab. 수준에서 제조된 화합물의 농가 실연시험 : 3주기에서 5주기까지 버섯 수확되는 양송이버섯에서 버섯 균사 생장 유효물질을 500배 처리한 처리구에서 대조구 간에 버섯의 발생속도가 약 6시간이상 빨랐으며, 수확량에서도 대조구에 비해 약 20~30% 정도 증가하였고, 상품성에 있어서도 처리구에서 상품의 비율이 약 10% 증품의 비율이 약 15% 정도 증가하였다.

## 6. 버섯생장영양제 및 그린폴드 bio-control 제제의 제품화 및 농가실연

(1) 버섯생장영양제 및 그린폴드 bio-control 제제의 제품화 및 농가실연 : 확립된 공정을 통하여 제품을 생산하고, 개발된 버섯영양제의 효능 시험을 위하여 농가와 연계하여 직접 상품의 효능을 실연하였다.

(2) 버섯생장영양제의 농가 실현 및 성능 평가 시험 : 본 연구에서 개발된 버섯생장영양제의 농가 실연을 통하여 생장 속도의 증가와 버섯의 상품성이 향상되는 것을 확인하였다.

(3) 그린폴드 bio-control 제제의 농가 실현 및 성능평가 시험 : 버섯의 그린폴드에 대한 저항성을 가지는 것으로 확인하였다.

(4) 그린폴드 제제와 버섯생장영양제의 상호보완성 검토 : 농가 실연을 통하여서 얻어진 결과를 바탕으로 보완해야할 부분과 효능에 대한 검토를 실시하였다.

(5) 버섯생장영양제 및 그린폴드 bio-control 제제의 시제품 제조 : 효능 향상을 위한 첨가물을 혼합하여 formulation을 완성한 bio-control 제제의 시제품을 제조하였다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of nutrient for mushroom growth and agent for bio-control of green molds.

## II. Objective and necessity of this research

With the increasing interest on citizen healthy life and wellbeing, mushroom, which contains amounts of vitamin, organic materials and nucleic acid etc, takes a big role in dietary life of the citizen. Especially, concerns on anti-cancer and antioxidant materials ( $\beta$ -glucan, lentinan etc.) in mushroom is greater recently, so with increasing on consumption on mushroom, mushroom production and related industries are expanding quickly. Mushroom, as a natural foods, with unique taste and fragrance, the consumption quantity increased rapidly to 3.28 kg/person in 2003 from only 1.27kg/person in 1990. Therefore, mushroom becomes one of the main foods and mushroom consumption quantity is expected to increase continuously in proportion with national incomes.

To meet the consumption needs, fungi and species on mushroom cultivation are being developed. In order to overcome external environment on mushroom cultivation, domestic mushroom cultivation methods are under change, the size of domestic mushroom cultivation company is 40 - 200 m<sup>2</sup>/동, There has a tendency to become large scales and industrialize gradually.

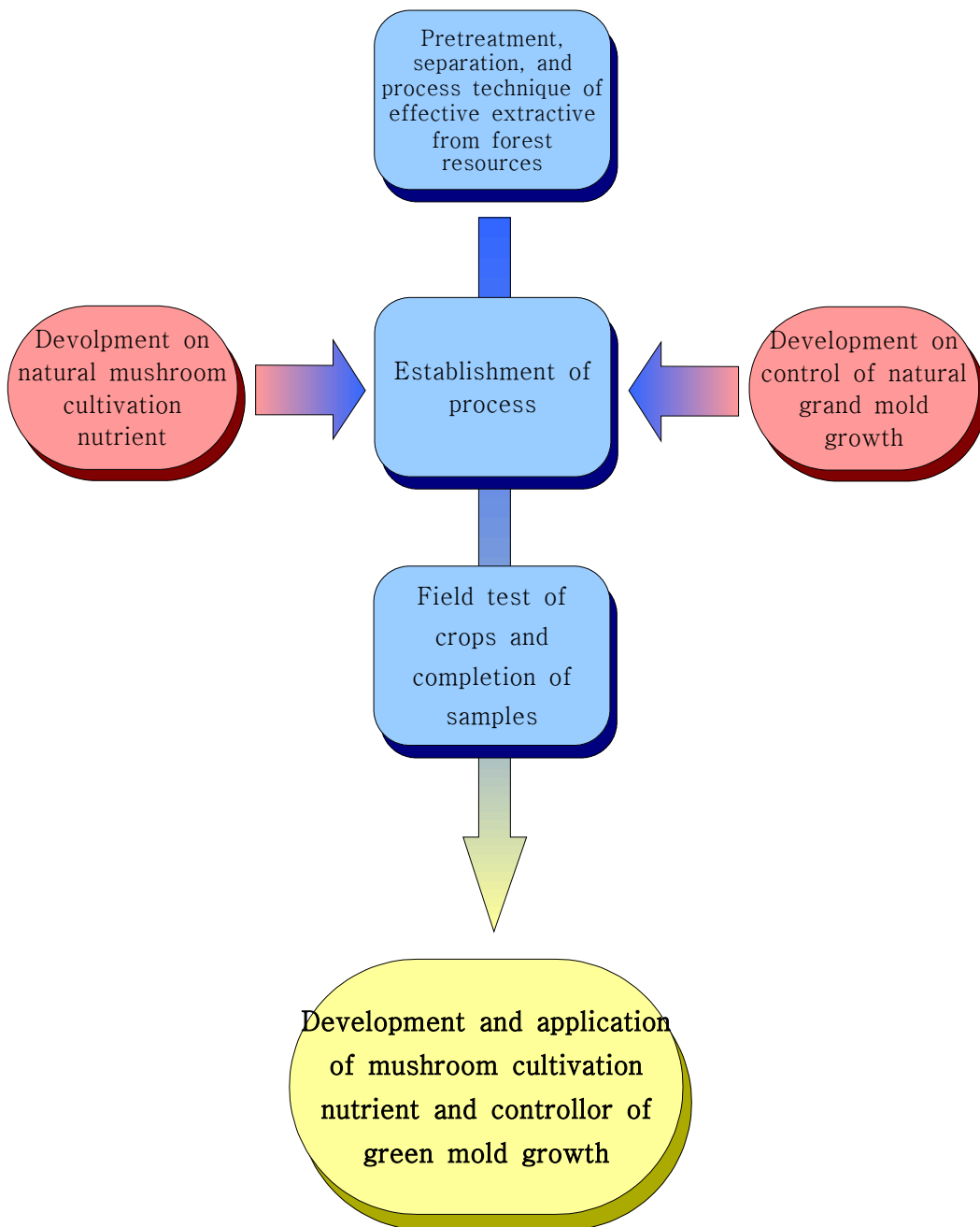
In spite of many investment, Domestic mushroom industry except part of bottle cultivation needs many labor and the production mechanization falls behind. According to this, it is advised

to magnify mushroom production period of badge for decreasing cost of mushroom production. Therefore, it is an urgent situation to develop available mushroom cultivation nutrient. Particularly, mushroom specialists admitted that development on mushroom cultivation nutrient from natural wood resources is completely potential, but it is difficult to propose a method how to extract effective extractives economically and cheaply. So most companies take a skeptical view of production possibility. The use of mushroom cultivation nutrient are able to induce increase in yield of mushroom, decrease in cost of mushroom badge and labor, and to produce high yield, high quality of mushroom. Infection and contagion of green mold of mushroom is one of important factors of determining the existence of mushroom farming and it come to be thought that it is badly necessary to develop green mold resistant to mushroom cultivation. It brings about economical big lost to farmers of disuse of badge caused by infection of green mold. It is hope of farmers of development on bio-control resistant to prevent green mold. Till now compound bactericide has been used to prevent green mold. The misuse or overuse causes problem of poisonous components remaining in mushroom products. Finally, consumers preference to less or no agricultural chemicals to agricultural products is continuously increasing. Instead of synthesis sterilizer, request of environmental friendly sterilizer derived from natural materials with almost no poisonous to human being and degradation thoroughly when exposed. Therefore, it is not synthesis sterilizer but environmental friendly compounds pretreated, separated, and extracted from natural wood in this research. The final object is to reach the stability security of consuming class as well as farmers of course with development on bio-control resistant to mushroom cultivation.

### III. Contents and scope of this research

The subject accomplished the research on developing products of environmental friendly growth nutrient for controlling green mold growth in mushroom industry by using extractives separated from pretreated forest resources which are useless in industry or/and dumped randomly.

Main research contents and scope of this research are as follows:



Research Contents
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Certification of mushroom bacterial strain and establishment of subculture technique</li> <li>· Optimum environmental factors of mushroom fungi cultivation</li> <li>· Research on pretreatment conditions of wood materials capable of increasing mushroom hyphae growth</li> <li>· Separation of effective materials and research on extractive conditions concerning mushroom hyphae growth from pretreated materials</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Collection of green mold and establishment of subculture technique</li> <li>· Environment factors of green mold growth</li> <li>· Research on green mold growth resistant using volatile compounds separated from tree leaves</li> <li>· Research on separation methods of green mold growth resistant from wood</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Process of pretreatment technique of forest resources</li> <li>· Establishment of pretreatment process on large scale production of wood extractives related to mushroom hyphae and green mold growth resistant</li> <li>· Establishment of separation process on effective materials to mushroom and green mold growth from pretreated materials</li> <li>· Field test on manufactured compounds on lab level</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Carbon searches and test to effect improvement of mushroom cultivation nutrient</li> <li>· Nitrogen searches and test to effect improvement of mushroom cultivation nutrient</li> <li>· Different activated materials addition searches and test to effect improvement of mushroom cultivation nutrient</li> <li>· Formulation test of mushroom cultivation nutrient</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Final evaluation and selection of green mold growth resistant of leaves and wood extractives</li> <li>· Evaluation test of green mold growth resistant of synthesis of leaves and wood extractives</li> <li>· Evaluation test of green mold growth resistant effectiveness of adding market organic compounds</li> <li>· Formulation test of green mold bio-control resistant</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Research on badge input methods of mushroom cultivation nutrient and green mold bio-control resistant</li> <li>· Field test and evaluation test of properties of mushroom cultivation nutrient</li> <li>· Field test and evaluation test of properties of green mold bio-control resistant</li> <li>· Complementary evaluation of green mold resistant and mushroom cultivation nutrient</li> <li>· Manufacture of mushroom cultivation nutrient products and green mold bio-control resistant</li> </ul>



# CONTENTS

Chapter 1. Outline of research and development

Section 1. objective of research development

Section 2. Necessity of research development

Chapter 2. Status technique development home and abroad

Section 1. making technology of mushroom cultivation nutrient from wood extractives.

Section 2. making technology of bio-control remove of green mold from wood extractives.

Chapter 3. Contents and Results achieved in this research and development

Section 1. Investigation of mushroom bacterial strain and establishment of subculture technique

1. Certification of mushroom bacterial strain and establishment of subculture technique

2. Optimum environmental factors of mushroom fungi cultivation

3. Research on pretreatment conditions of wood materials capable of increasing mushroom hyphae growth

4. Separation of effective materials and research on extractive conditions concerning mushroom hyphae growth from pretreated materials

Section 2. Formulation test to effect improvement of mushroom cultivation nutrient

1. Carbon searches and test to effect improvement of mushroom cultivation nutrient

a. Material and methods

b. Density test of carbon

c. Carbon searches

2. Nitrogen searches and test to effect improvement of mushroom cultivation nutrient

- a. Material and methods
- b. Density test of nitrogen
- c. Nitrogen searches
- 3. Different activated materials addition searches and test to effect improvement of mushroom cultivation nutrient
  - a. Material and methods
  - b. Results and consideration
- 4. Formulation test of mushroom cultivation nutrient
  - a. Material and methods
  - b. Results and consideration

Section 3. Test and optimize of wood extractive with green mold growth resistant

- 1. Collection of green mold and establishment of subculture technique
  - a. Collection of green mold and establishment
- 2. Environment factors of green mold growth
  - a. Material and methods
  - b. Environment of green mold growth
- 3. Research on green mold growth resistant using volatile compounds separated from tree leaves
  - a. Material and methods
  - b. Green mold growth resistant using volatile compounds separated from tree leaves
- 4. Research on separation methods of green mold growth resistant from wood
  - a. Material and methods

Section 4. Development on effective additives for increasing resistant to green mold growth

- 1. Final evaluation and selection of green mold growth resistant of leaves and wood extractives
  - a. Material and methods
  - b. Green mold growth resistant of leaves and wood extractives

2. Evaluation test of green mold growth resistant of synthesis of leaves and wood extractives
  - a. Material and methods
  - b. Green mold growth resistant of synthesis
3. Evaluation test of green mold growth resistant effectiveness of adding market organic compounds
  - a. Material and methods
  - b. Organic compounds of antibiotic activity
4. Formulation test of green mold bio-control resistant
  - a. Material and methods
  - b. Formulation of bio-control remove of green mold

Section 5. Pretreatment and development of separation process for separation of effective extractives.

1. Process of pretreatment technique of forest resources
2. Establishment of pretreatment process on large scale production of wood extractives related to mushroom hyphae and green mold growth resistant
3. Establishment of separation process on effective materials to mushroom and green mold growth from pretreated materials
4. Field test on manufactured compounds on lab level

Section 6. Production and field test of mushroom cultivation nutrient and green mold bio-control resistant.

1. Research on badge input methods of mushroom cultivation nutrient and green mold bio-control resistant
2. Field test and evaluation test of properties of mushroom cultivation nutrient
3. Field test and evaluation test of properties of green mold bio-control resistant
4. Complementary evaluation of green mold resistant and mushroom cultivation nutrient
5. Manufacture of mushroom cultivation nutrient products and green mold bio-control resistant

Chapter 4. Achievement and contribution

Chapter 5. Results and application of research and development

Chapter 6. Oversea technique information collected during the research and development

Chapter 7. References

# 목 차

제 출 문 .....	1
요 약 문 .....	2
SUMMARY .....	12
CONTENTS .....	16
목 차 .....	20
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	28
제 1 절 연구개발의 목적 .....	28
제 2 절 연구 개발의 필요성 .....	29
1. 연구개발대상 기술의 경제적 · 산업적 중요성 .....	29
가. 연구개발 대상기술 .....	31
1) 버섯생산 및 재배에 따른 현실적 문제점 .....	31
2) 버섯생장영양제의 정의 및 활용 .....	32
3) 버섯과 그린몰드 .....	33
4) 현재의 그린몰드 방제 기술 .....	34
나. 경제적 · 산업적 중요성 .....	35
1) 국내의 간벌재 및 폐잔재의 이용 가능성 .....	35
2) 버섯재배업 및 버섯제품 시장 발전 .....	35
3) 임가 및 농·산촌 소득원 확보 .....	37
다. 연구개발의 필요성 .....	37
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	39

제 1 절 수목 추출물로부터 버섯생장영양제 제조기술 .....	39
제 2 절 수목추출물로부터 그린몰드 bio-control 제제 제조기술 .....	9
1. 세계적 수준 .....	40
2. 국내 수준 .....	40
2. 국내 · 외의 연구현황 .....	41
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	42
제 1 절 버섯균사 생장에 유효한 수목추출물의 탐색 및 발굴 .....	42
1. 버섯 균주의 확보 및 계대배양 기술 확립 .....	42
가. 농가로부터 표고버섯 균주와 양송이버섯 균주의 확보 및 계대배양 .....	42
2. 버섯균사생장 최적 환경인자 탐색 및 결정 .....	43
가. 농가로부터 제공받은 버섯균주의 고체배지의 최적 배양온도 및 pH탐색 .....	43
3. 버섯균사생장을 증가시킬 수 있는 목질원료의 전처리 조건연구 .....	46
가. 협동기관((주)유림하이텍)으로부터 제공받은 목질원료의 물리적 파괴에 의한 전처리 .....	46
4. 전처리 원료로부터 버섯균사생장에 관여된 유효물질의 분리 및 추출조건 연구 .....	51
가. 공시재료의 목재 조성분 분석 .....	51
나. 전처리 원료로부터 유효 추출물 탐색 .....	52
다. 전처리 원료의 고온 추출 .....	54
라. 전처리 원료의 버섯균사 성장시험 .....	57
제 2 절 버섯생장 영양제의 효능 향상을 위한 첨가 영양원 개발 .....	59
1. 버섯생장 영양제의 효능향상을 위한 탄소원 발굴 및 첨가효능시험 .....	59
가. 재료 및 방법 .....	60
1) 공시균주 .....	60
2) 기본배지 제조 .....	60
나. 탄소원 농도 시험 .....	61
1) 재료 및 방법 .....	61
2) 결과 및 고찰 .....	61
다. 탄소원 선발 시험 .....	63
1) 재료 및 방법 .....	63

2) 결과 및 고찰 .....	64
2. 버섯생장영양제의 효능향상을 위한 질소원 발굴 및 첨가 효능 시험 .....	67
가. 재료 및 방법 .....	67
1) 공시균주 .....	67
2) 기본배지 제조 .....	67
나. 질소원 농도 시험 .....	67
1) 재료 및 방법 .....	67
2) 결과 및 고찰 .....	68
다. 질소원 선발 시험 .....	70
1) 재료 및 방법 .....	70
2) 결과 및 고찰 .....	70
3. 버섯생장영양제의 효능향상을 위한 해당 부산물의 첨가 검토 시험 .....	73
가. 재료 및 방법 .....	73
1) 공시균주 .....	73
2) 기본배지 제조 .....	74
3) 실험방법 .....	74
나. 결과 및 고찰 .....	75
4. 버섯영양제의 효능향상을 위한 첨가물의 formulation 도출 시험 .....	76
가. 재료 및 방법 .....	76
나. 결과 및 고찰 .....	78
제 3 절 그린몰드의 생장억제를 나타내는 수목추출물의 탐색 및 최적화 .....	81
1. 그린몰드의 수집 및 계대배양 기술 확립 .....	81
가. 그린몰드의 수집 및 계대배양 .....	81
1) 공시균주 .....	81
나. 그린몰드의 육안적 성장형태 .....	82
2. 그린몰드의 성장환경인자 탐색 및 확립 .....	83
가. 재료 및 방법 .....	83
1) 공시균주 .....	83
2) 그린몰드 균주의 고체배지에 있어서 최적 배양온도 및 pH .....	84
3) 그린몰드 균주의 천연배지(벗짚배지)에 있어서 최적 함수율 탐색 .....	84

4) 통계분석 .....	84
나. 그린몰드의 성장환경인자 .....	85
1) 그린몰드의 최적 배양온도 및 pH .....	85
2) 천연배지에 있어서 그린몰드 균주의 최적 함수율 .....	87
3. 수목의 잎으로부터 분리된 휘발성 화합물을 이용한 그린몰드의 성장 억제 연구 .....	89
가. 재료 및 방법 .....	89
1) 공시수종 .....	89
2) 수목의 잎으로부터 hydro-distillation법에 의한 화합물 분리 .....	98
3) 휘발성 화합물에 의한 그린몰드 성장 억제력 평가 .....	90
4) 통계분석 .....	91
나. 수목의 잎으로부터 분리된 휘발성 화합물에 의한 그린몰드의 성장억제 .....	91
1) 수목의 잎으로부터 hydro-distillation법에 의한 화합물 분리 .....	91
2) 휘발성 화합물에 의한 그린몰드 성장 억제력 .....	92
가) 소나무 수용성 정유의 향균활성 .....	92
나) 편백 잎 수용성 정유의 향균활성 .....	99
4. 목부로부터 그린몰드의 성장 억제 화합물의 분리법 연구 .....	106
가. 재료 및 방법 .....	106
1) 공시균주 .....	106
2) 목부로부터 열수추출물의 획득 .....	106
3) 그린몰드에 대한 추출물의 향균활성 .....	106
4) Partition extraction에 의한 그린몰드 성장억제 화합물 그룹 분리 .....	107
가) Partition extraction에 의한 화합물 그룹 분리 .....	107
나) Partition extraction에 의해 분리된 화합물 그룹의 향균활성 .....	107
5) 통계분석 .....	107
나. 그린몰드에 대한 추출물의 향균활성 .....	107
1) 낙엽송 추출물의 향균활성 .....	107
2) 미송 추출물의 향균활성 .....	116
3) 최적 추출조건에 의한 낙엽송 추출물의 향균활성 .....	124
4) 최적추출조건에 따른 미송 추출물의 향균활성 .....	131
다. Partition extraction에 의한 그린몰드 성장억제 화합물 그룹 분리 .....	139



1) Partition extraction에 의해서 분리된 화합물 분리 .....	139
2) Partition extraction에 의해 분리된 화합물 그룹의 항균활성 .....	140
가) 낙엽송으로부터 분리된 화합물 그룹의 항균활성 .....	140
나) 미송 화합물 그룹의 항균활성 .....	148
제 4 절 그린몰드의 생장억제력 증진을 위한 유효첨가물 개발 .....	156
1. 수목의 잎 추출물 및 목부 추출물의 그린몰드생장억제력 최종평가 및 선택 .....	156
가. 재료 및 방법 .....	156
1) 공시균주 .....	156
2) 수목추출물의 조제 .....	156
가) 편백 잎 추출물 .....	156
나) 수목 추출물 조제 .....	156
3) 그린몰드에 대한 추출물의 항균활성 .....	157
4) 통계분석 .....	157
나. 수목의 잎 추출물 및 목부 추출물에 의한 그린몰드 생장억제 .....	157
1) 그린몰드에 대한 추출물의 항균활성 .....	157
가) 수용성 정유의 항균활성 .....	157
나) 수불용성 정유의 항균활성 .....	170
다) 수목추출물의 항균활성 .....	183
라) <i>n-Hexane</i> 추출물의 항균활성 .....	195
2. 잎 추출물과 목부 추출물의 복합화에 의한 그린몰드 생장억제력 평가시험 .....	210
가. 재료 및 방법 .....	210
1) 공시균주 .....	210
2) 복합화제제의 조제 .....	210
3) 복합화제제에 의한 그린몰드의 항균활성 .....	210
4) 통계분석 .....	210
나. 그린몰드에 대한 복합제제의 항균활성 .....	211
3. 시판 유기계 화합물 첨가에 의한 그린몰드 생장억제력 평가 시험 .....	222
가. 재료 및 방법 .....	222
1) 공시균주 .....	222
2) 유기계혼합제제의 조제 .....	222

3) 유기계혼합제제에 의한 그린몰드의 향균활성 .....	222
4) 통계분석 .....	222
나. 유기계혼합제제의 향균활성 .....	223
4. 그린몰드 bio-control 제제의 formulation 완성시험 .....	224
가. 재료 및 방법 .....	234
1) 공시균주 .....	234
2) 제제의 formulation .....	234
가) 유기계혼합 formulation .....	234
나) 시판향균제품 .....	234
다) 최적 formulation .....	234
3) 그린몰드에 대한 formulation 제제의 향균활성 .....	235
4) 통계분석 .....	235
나. 그린몰드 bio-control제제의 formulation .....	235
1) 제제의 formulation .....	235
가) 유기계혼합 formulation의 향균활성 .....	235
나) 시판 향균제품의 향균활성 .....	239
다) 최적 formulation의 향균활성 .....	243
제 5 절 유효추출물의 분리를 위한 전처리 및 분리 공정 개발 .....	255
1. 임산자원의 전처리기술 공정 검토 .....	255
가. 공시재료의 조성분 분석 .....	255
나. 수증기 처리재의 성상 .....	258
다. 수증기 처리재의 입자분포 측정 .....	258
라. 전처리 목질원료의 추출물 .....	259
2. 버섯균사 및 그린몰드 생장 제어 관련 추출물의 대량생산을 위한 전처리 공정 확립 .....	261
가. 고온·고압 전처리 공정 확립 .....	261
3. 전처리 원료로부터 버섯 및 그린몰드 생장에 유효한 물질들의 분리공정 확립 .....	264
가. 전처리 원료로부터 유효성분 분리공정 구축 .....	264
4. Lab. 수준에서 제조된 화합물의 농가 실연시험 .....	266
가. 주관기관으로부터 제공받은 버섯균사 생장 유효물질의 효능 평가 .....	266

나. 협동기관(경상대학교)로부터 제공받은 그린몰드 생장 억제 물질의 효능 평가	268
제 6 절 버섯생장영양제 및 그린몰드 bio-control 제제의 제품화 및 농가실연	271
1. 버섯생장영양제 및 그린몰드 bio-control 제제의 배지 투입방법 연구	271
2. 버섯생장영양제의 농가 실연 및 성능 평가 시험	271
가. 농가적용사례1	271
(1) 경북 영덕군 H농가 적용과정	271
(2) 농가적용결과	272
나. 농가적용사례2	273
(1) 경북 영덕군 K농가 적용과정	273
(2) 농가적용결과	274
3. 그린몰드 bio-control 제제의 농가 실연 및 성능평가 시험	275
가. 농가적용사례1	275
4. 버섯생장영양제와 그린몰드 제제의 농가 시연 설문조사	276
가. 버섯생장영양제 시제품의 농가 시연 설문조사	280
나. 그린몰드제제 시제품의 농가 시연 설문조사	287
5. 그린몰드 제제와 버섯생장영양제의 상호보완성 검토	294
6. 생산된 버섯의 항산화 물질 (폴리페놀)함량 측정	294
가. 재료 및 방법	294
나. 결과 및 고찰	296
7. 버섯생장영양제 및 그린몰드 bio-control 제제의 시제품 제조	297
가. 버섯생장영양제의 시제품 제조 과정	298
나. 그린몰드제제의 시제품 제조 과정	299
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	301
1. 연구목표 달성도	301
2. 관련분야 기여도	304
3. 기대성과	305
가. 기술적 측면	305
나. 경제적·산업적 측면	305

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	306
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	308
제 7 장 참고문헌 .....	313

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

우리나라의 버섯 총 재배면적은 2002년 1,225ha이며 그 중 느타리버섯은 총 재배면적의 58%인 716ha를 차지하고 있고, 생산량도 72,348톤으로 전체 버섯생산량의 51%를 차지하고 있다. 1980년도 후반부터 시설재배 농가의 증가와 더불어 생산량이 늘어난 팽이버섯은 38,072톤으로 27%를 차지하고 있으며, 양송이버섯이 21,277톤으로 16%를 차지한다. 버섯재배면적은 95년 이후 증가 되지 않고 있으나 생산량은 꾸준히 증가하고 있는데, 이는 농가당 재배 규모가 점차 확대되고 전업화되어 가고 있으며 재배기술의 발전과 시설재배 농가의 증가로 인하여 단위면적당 생산량이 증가하였기 때문으로 생각된다.

또한 버섯의 농가생산가액은 약 7,000억원(01)으로 농산물 생산량 중 3%를 차지하는 작목이며 점점 전업농 규모가 늘고 있고, 환경 친화적이면서 식품적 가치 및 약리효과가 높은 건강보조식품으로 소비량이 계속 증가될 것으로 예상된다.

한편 버섯의 수출은 송이, 표고가 주종을 이루고 있으나, 생산비가 높고 국제경쟁력이 약화되어 1995년도 수출량 1,465톤에서 2001년도 587톤으로 감소하였고, 수입은 1995년 8,129톤에서 2001년도 13,951톤으로 증가하였으며, 게다가 중국의 WTO가입으로 생버섯 및 종균의 수입증가가 예상되는데 표고, 영지버섯 등 건조버섯은 중국에 비해 가격경쟁력이 낮아 중국으로부터 수입이 계속 늘고 있는 반면, 국내생산량은 점차 감소되고 있어 건조 유통이 가능한 버섯들에 대한 생산성 향상으로 국제경쟁력을 높이는데 주력해야 한다.

우리나라에서 재배되고 있는 버섯은 주로 식용으로 10여종이 재배되고 있으나, 느타리버섯이 전체 버섯생산량의 51%를 차지하고 있어 일부 품종에 대한 편중재배가 심하고 계절별 출하량의 차이가 커서 봄, 가을에 가격이 낮고, 여름·겨울철에 가격이 상승하여 연중 안정된 버섯물량의 수급조절이 필요하며 이를 위해서는 냉·난방기의 보급률을 높여 외기의 영향을 받지 않고 연중재배가 가능한 시설의 보급이 필요하다.

또한 버섯은 수확 후 저장기간이 짧아 산지에서 소비자에 이르기까지 유통과정에서 변질되기 쉬워 cold chain system의 도입이 요구되며, 미국이나 유럽 등지로 수출확대를 위해서는 무엇보다도 포장재, 포장디자인 개발, 저장 및 유통기간 연장 기술 등에 주력하여 해외로 소비시장을 개척하는 것이 시급한 과제로 대두되고 있다.

2002년 국내버섯재배 농가는 9,085호이며 재배면적은 95년 이후 정체상태에 있으나, 생산량은 병, 봉지, 상자재배 기술보급과 전업농의 연중 안정생산체계 확립으로 매년 20%정도 증가되었다.

버섯 소비량도 국민생활수준의 향상으로 연 15%이상 증가 추세이며, 기능성물질을 함유한 동충하초, 상황버섯, 큰느타리버섯 등 재배품목이 다양화되어 가고 있고 총생산액은 약 7,000억원으로 농림업중 차지하는 비율이 높아지고 있는 추세이다. 버섯은 지방함량이 낮고, 섬유소와 단백질 미네랄이 풍부하여 칼로리는 낮고 몸에 유익한 성분이 많아 기능성 건강식품으로 알려져 있다. 경제 수준이 높아지고 삶의 질이 향상되면서 먹거리에도 건강과 기능성을 고려하여 선택하는 경향이 높아지고 있어 앞으로도 버섯의 소비는 꾸준히 증가될 것으로 예상된다. 이러한 버섯 소비를 배경으로 버섯 재배농가의 더 나은 재배 환경을 연구함으로써 고부가 가치를 창조하여 버섯 영양제 시장의 확대를 목표로 하고 있다.

본 연구 과정에서는 임산자원(간벌, 폐잔재 포함)으로부터 버섯균사 및 그린월드 생장을 제어할 수 있는 유효 화합물의 추출 분리, 공정을 도출하고 이를 원료로 하여 버섯생장 영양제 및 그린 월드 bio-control 제제를 개발하는 것을 최종 목표로 하고 있다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성

국민건강생활에 대한 관심과 웰빙의 열풍으로 비타민, 무기물, 핵산 등을 다량으로 함유하고 있는 버섯은 국민의 식생활에 큰 부분을 차지하고 있다. 특히 최근에는 버섯에 함유된 항암 물질 및 항산화물질 ( $\beta$ -glucan, lentinan 등)에 대한 관심이 증대로 인한 버섯의 소비증가로 인하여 버섯 생산 및 관련 산업이 급속하게 확장되고 있다.

천연식품으로서 맛과 향기가 독특한 버섯은 국내소비량이 급증하여 연간 버섯소비량이 1990년 1.27 kg/인에 불과하던 것이 2003년에는 3.28 kg/인 으로 주요한 식품으로 자리를 굳히고 있으며 버섯 소비량은 국민소득과 비례하여 상승함으로 앞으로도 소비량이 계속 신장될 것으로 추정되고 있다.

년도	생산량 (톤)						
	양송이	표고 (건)	느타리	영지(건)	팽이	기타	계
1965	106	75					181
1970	5,957	187					1,144
1975	25,153	456	400				26,009
1980	25,575	1,027	6,739			42	33,383
1985	17,341	880	26,752	125	13	165	45,276
1990	10,281	1,648	43,732	810	404	48	56,992
1995	15,723	2,824	72,801	3,346	3,867	81	98,642
2000	21,813	4,722	70,759	653	23,837	552	122,336
2002	21,277	5,247	72,348	531	38,072	9,397	146,872

Table 1-2-1. 국내주요버섯의 생산량

버섯종류	농가호수(호)	재배면적(ha)	생산비율(%)
느타리	7,088	715.7	51.1
양송이	993	168.8	15.0
영 지	223	94.2	0.4
팽 이	174	96.6	26.9
상 황	207	63.0	0.5
기 타	400	86.5	6.1
계	9,085	1,224.8	100

Table 1-2-2. 국내 주요버섯의 재배면적 및 생산비율(2002년 농림부)

국내에서의 버섯재배는 타 작물보다 소득이 월등히 높아서 향후 재배전망 또한 희망적이라고 판단되며, 특히 쌀의 소득지수 100을 기준으로 할 때, 팽이버섯 484, 느타리 330, 양송이 490 수준으로 고 소득 작물임 국내의 버섯산업은 양송이, 느타리, 영지, 표고, 팽이버섯 재배에 주로 국한되어 있지만 국제경쟁력이 비교적 높아서 농가소득 작물로 각광을 받고 있다.

버섯재배의 최종목표는 염가의 배지로 양질의 버섯을 많이 수확하는데 있으며 버섯재배에 영향을 미치는 유전적인 요인은 종균이나 품종의 고정정도에 영향을 미치지만, 생리적인 요인은 외부환경조건에 의해 결정됨 외부환경조건을 극복하고자 국내의 버섯재배는 재배사 생산방식으로 많이 전환되었으며, 국내에서 재배되고 있는 버섯재배사의 크기는 40-200평/동으로, 재배규모는 점차 대규모화, 기업화되는 경향을 나타내고 있다.

## 가. 연구개발 대상기술

### 1) 버섯생산 및 재배에 따른 현실적 문제점

버섯은 분류학상으로 진균류에 위치하며 대부분 담자균류에 속하나 일부는 자낭균류(안장버섯, 곰보버섯, 동충하초)에서 볼 수 있다. 이러한 버섯은 미세하고 실 같은 균사로 되어 있으며 수많은 균사의 집합체를 균사체라고하고 이들이 모여서 자실체(버섯)라는 것을 형성하게 된다.



버섯의 균사에는 세포벽이 있다는 점에서 세균이나 동물의 세포와 다르고, 반면에 세포벽의 조성분 중에 셀룰로스는 없고 키틴질이 있다는 점과 엽록소가 없다는 점에서 식물과 다르다. 버섯은 미생물로써 엽록소가 없어 식물체처럼 태양에너지를 고정할 능력이 없으므로 다른 영양체를 포식하여 생활에 필요한 에너지를 얻게 된다.

버섯은 미생물로써 엽록소가 없어 식물체처럼 태양에너지를 고정할 능력이 없으므로 다른 영양체를 포식하여 생활에 필요한 에너지를 얻게 된다.

버섯균은 유기물을 분해하여 양분을 흡수하므로 인위적인 버섯재배를 성공적으로 이끌기 위해서는 이들 버섯이 자생하는 장소에서 환경조건과 생리생태를 정확히 파악하는 것이 중요하다.

이러한 버섯재배의 우리나라의 경우에는 신라시대부터 야생버섯을 채취하여 이용하여 왔으나 인공재배가 시작된 것은 1935년 일본으로부터 순수배양 표고종균이 도입된 것이 시초라 여겨진다. 그 후 1955년에는 양송이가 경기도 임목양묘장에서 시험 재배 되면서 서울근교와 경남 진해 등지에서도 동굴을 이용하여 재배되었으며 1959년에는 제주도에 동굴 및 반지하식 시험재배가 이루어졌다.

1960년에는 산림조합연합회 특수임산사업소에서 일본임업시험장으로부터 종균을 도입하였고,



1961~1962년에는 미국, 일본으로부터 양송이 종균을 도입하여 배양한 것을 전남 광주의 제일농산과 인천근교의 방공호에서 시험 재배하였고, 1964년에는 정부의 지원으로 대한산림조합회 특수임산사업소에서 종균을 배양하여 전국에 보급함으로써 철도터널, 지하방공호, 연초건조창 등을 이용한 재배면적이 확대되었다. 버섯산업의 중요성에 대한 인식이 한층 진전되던 중 1967년 농촌진흥청에 균이과가 신설되면서 양송이 벗질재배에 대한 본격적인 연구가 추진되었으며 70년대 느타리버섯의 원목과 벗질재배가 시작되었다. 80년대 들어 다양한 인공재배법이 확대 보급되었으며, 1992년 경기도농업기술원 버섯시험장이 설립되었다. 이러한 지속적인 연구를 바탕으로 버섯재배는 급속도로 발전하여 기술적인 부분에서 많은 성과를 이루었다. 하지만 버섯재배에 있어서 몇 가지 문제점이 있음을 볼 수 있다.

버섯은 주로 식용으로 10여종이 재배되고 있으나, 느타리버섯이 생산량의 51%를 차지하고 있어 계절별 가격변동이 심하다. 그리고 버섯균의 수집, 보존과 물질탐색, 약효검정 및 품종의 다양화가 요구되어진다. 버섯의 육종은 수량과 품질을 목표로 느타리, 팽이, 표고 등에 국한되어 주로 교배육종을 하고 있으며, 형질전환이나 게놈 연구는 매우 미흡한 수준에 있다. UPOV 가입에 따라 버섯 품종의 국제경쟁력을 향상시키기 위해서 민간업체에도 고유의 우량품종 육성을 할 수 있는 기반조성이 필요하며, 버섯재배의 자동기계화 및 수확후의 저장, 가공, 유통 등에 관한 연구가 매우 미흡한 시점에 있다. 병해충 방제는 약제방제에 치중되어 있으며, 병해충에 대한 분류 전문기술 부족 및 생물학적 방제 등 친환경적인 방제연구가 부족하다. 영세한 간이재배시설이 70%로 연중안정생산을 위한 자동화 재배시설 및 생력기계화 확충이 시급하며 표고, 영지버섯 등 건조버섯은 중국에 비해 가격경쟁력이 낮아 중국으로부터 수입이 늘고 있는 반면 국내생산량은 점차 감소되고 있다.

세계 각국의 농산물 수입개방에 대응하여 국내 버섯생산은 국제 가격력이 비교적 높아서 농가 소득 작물로 각광을 받으면서 대규모 재배 단지화 및 기업화 추세 있다. 재배사를 이용한 버섯의 대규모 재배는 다수확 개념의 도입된 이후로, 1회 종균 접종 후 수차례 수확할 수 있는 장점이 있지만, 일반적으로 3주기 수확 이후에는 버섯균사의 세력 약화 및 영양 공급이 원활치 못하여 버섯 수확량 감소 및 품질저하가 초래되고 있다.

동일한 장소, 동일한 종균, 동일한 환경적 조건에서 버섯을 대규모로 생산, 재배함으로써 버섯에서 발생될 수 있는 병충해 피해가 점차 증가되는 실정에 있으며, 이러한 병충해의 침입 혹은 감염이 감지되거나 징후가 나타나면, 다른 작물과는 달리 버섯은 colony를 형성하는 균사체임으로 수확이 급격히 감소되고 상품성이 없다.

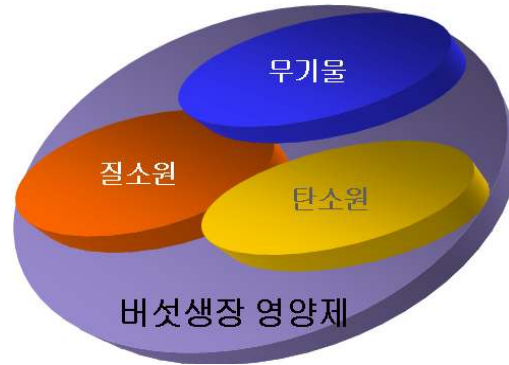
## 2) 버섯생장영양제의 정의 및 활용

버섯생장영양제는 버섯의 균사체 성장, 자실체 발생 및 생장을, 수확량 상승을 개선시킬 목적으로 버섯배지에 투입되는 천연영양제를 의미하며, 버섯의 수확 주기를 늘릴 수 있고, 수확량 증가

및 고품질의 버섯 생산이 가능하다.

버섯은 광합성을 할 수 없기 때문에 탄소를 공기 중에서 얻지 못하므로 자연계에 존재하는 목재, 볏짚, 낙엽, 부식질 등에 함유되어 있는 화합물을 분해하여 기생하며, 버섯의 성장에 관여하는 영양원으로는 탄소원, 질소원, 무기영양원이 있으며, 식물체의 cellulose는 균사체의 효소작용에 의하여 가수분해되어 균사세포에 흡수되고 hemicellulose 균사체 효소에 의해 단당이나 이당까지 분해되어 균사체내로 흡수한다. 자연계에 존재하는 목재, 볏짚과 같은 부식질에 함유되어 있는 단백질과 아미노산 질소를 버섯균사체가 효소를 분비하여 가수분해하여 아미노산으로 전환시키고 이를 균사체내로 흡수하게 된다.

무기원소는 균사체 성분의 구성요소가 될 뿐만 아니라 생화학반응에 꼭 필요한 물질로 인산, 칼륨, 마그네슘, 유황이고 필요량은 버섯종류에 따라서 차이가 있지만 대략 50-500 mg이며, 버섯재배 시 흔히 사용하는 칼슘은 균사생장을 다소 억제시키지만 자실체 발생에는 효과가 있다.



현재 국내에서는 Eco biotec (주)에서 굴의 폐각으로부터 활성칼슘을 추출하는 방법을 특허 등록하여 이를 응용하여 버섯성장영양제 개발을 시도하고 있다.

북한에서는 식물추출물과 비타민을 혼합한 버섯성장촉진제를 개발하여 버섯재배에 시험하고 있으며, 이에 대한 효능은 버섯의 수확주기를 2회 이상 증가시킬 수 있다고 알려져 있다. 그리고 캐나다에서는 콩의 부산물로부터 버섯성장영양제인 Pro-Mush라는 제품을 최근 생산하여 남미 및 아시아 지역 시장을 겨냥하고 영양제의 품질을 평가하고 있다.

국내의 버섯생산업체는 다수확, 고품질의 버섯을 생산할 수 있는 천연물질로부터 유래된 즉, 인해 무해한 버섯성장영양제의 개발을 요구하고 있으며, 이에 대한 수요가 증가 할 것으로 예상되어지고 있다. 이러한 시장을 바탕으로 현재 수목의 천연 추출물 분리 및 영양원 formulation 기술을 이용한 버섯성장영양제 제조기술 개발이 시급하다.

### 3) 버섯과 그린폴드

버섯의 병은 거의 대부분 버섯균과 병원균의 경쟁하는 형태로 나타나고 그 피해의 정도는 기주(버섯균)의 활성 또는 균상의 상태와 병원균의 병원성에 달려 있으며 온도와 습도, 대기 등의 환경요인도 병 발생에 큰 영향을 미치고 있다.

버섯재배 시 병해 방제는 재배의 성패를 크게 좌우하나, 일반 작물과는 다르게 농약사용에 의한

높은 방제효과는 얻을 수 없으므로 병충해를 예방하기 위해서는 오직 철저한 재배관리에 의해 균상과 버섯을 튼튼하게 키워야하며 농약은 병충해 전염원을 줄이는 보조적 수단으로 사용하여야만 하고, 버섯재배의 관리소홀에 의한 부적절한 재배환경조건은 병해 발생으로 직결된다.

버섯의 병해 중에서 가장 방제가 어렵고 버섯의 발생 및 수확에 가장 큰 영향을 미치는 대표적인 병의 하나인 푸른 곰팡이병은 버섯 균상에 균사 성장 후 포자를 형성하여 푸른 색택을 띄는 병의 총칭이다. 푸른곰팡이병은 그린몰드(green mold)에



의해 발생하며, 표고버섯, 느타리, 양송이, 팽이등 버섯의 종류에 관계없이 발생되고 있고, 푸른 곰팡이병을 일으키는 곰팡이로는 *Trichoderma*, *Gliocladium*, *spergillus*, *Penicillum* 등이 현재 알려져 있다.

#### 4) 현재의 그린몰드 방제 기술

푸른곰팡이 병원균은 균사성장 시 균상에 발생하여 버섯균의 균사생장을 방해하거나 기생하여 사멸시키며, 균사 성장 시 균사의 세력이 약화되면 즉시 감염되어 버섯수확기에도 병해를 발생시키고 있다.

일반적으로 나타나는 푸른곰팡이 병원균은 병의 발생이 종균 접종 후 5-7일 이내에 균상에 나타나고 초기 발견이 힘들며, 초기에 버섯균사가 성장하다가 정지되면서 성장되었던 균사가 소멸되어 버리는 현상이 나타난다.

버섯균사가 완전히 성장하여 하온 후 또는 1 주기에 수확 후 벗짚의 중간 부위에 감염되었던 푸른 곰팡이균이 상부로 세력을 확장하면서 버섯균사를 용해하면서 수확시기에 버섯이 발생되지 않는다. 현재 버섯 재배농가에서는 버섯균사성장 기간 동안에 푸른곰팡이병의 발생을 억제하기 위하여 버섯배지 살균 전에 균상표면에 벤레이트, 판마쉬, 스포르곤수화제를 1000배액으로 평당 5~6g을 살포하는 것이 최대의 방제법이다.

국내에서 발생하는 푸른곰팡이류는 현재까지 6종으로 알려져 있으며, 푸른곰팡이류 중 *Trichoderma viride*와 *Trichoderma harzianum* (흑부병균)은 보통 90% 이상의 상대습도에서 발아하고, 산도(pH)는 4~11에서 93~100%가 발아하였고, 방제를 위하여 산도가 매우 낮은 목초액이나 산도가 매우 높은 석회를 사용한다고 할지라도 푸른곰팡이에게 직접 닿지 않고 물에 희석되어 산도의 변화가 일어나서 큰 효과가 없었다고 보고되어지고 있다.

국내의 버섯협회에서 제시하는 푸른곰팡이 방제는 기존의 농약으로 등록된 살균제인 판마시 수

화제를 사용하는 방법을 추천하고 있지만 이들을 실제 재배에 사용하기 위해서는 추가 실험 및 인체에 대한 영향을 고려해야 할 필요성이 있다.

자연계의 수목으로 추출된 천연물질로부터 버섯 병해의 주범인 그린몰드의 생장을 제어하는 천연 인체 무해한 제제를 개발하면 버섯농가의 소득증대 뿐만 아니라, 국민들의 먹거리 질 향상에도 도움이 되리라 생각되어 진다.

나. 경제적·산업적 중요성

1) 국내의 간벌재 및 폐잔재의 이용 가능성

최근 일본정부에서 간벌재 사용을 규정화한 그린(green) 구입법을 실행함에 따라 국내에서도 간벌재나 폐잔재의 이용에 대한 구체적인 방안 마련이 필요하다고 사료되어 진다. 목재를 비롯한 임산폐재는 친환경소재이기 때문에 이를 합리적으로 사용한다는 것은 매우 중요한 의미를 내포하고 있으며, 국내에서는 매년 약 150 만 m<sup>3</sup>의 간벌재가 생산되며, 그 일부만이 표고버섯 자목, 펄프 칩, 톱밥으로 이용되고 있다. 산업적으로 이용 되지 못하고 폐기되거나 임지에 버려지는 임산자원의 전 처리를 통하여 추출물을 분리하고 이들 추출물을 버섯산업에 이용하게 된다면 그 경제적인 중요성은 무한하다고 판단된다.

(단위 : ha, m<sup>3</sup>)

구분	합계	주벌	수종갱신	간벌	육림(무육·천보)	기타
벌채재적	1,230,578	474,079	296,806	273,237	-	90,363
발생량	48,918	8,263	6,106	26,312	-	4,875

Table 1-2-3. 임지 폐목재 발생량(2002)

2) 버섯재배업 및 버섯제품 시장 발전

버섯생장영양제 사용으로 버섯의 생산원가의 대부분을 차지하고 있는 배지 원료의 생산주기를 증대함으로써 버섯생산원가를 감소시킬 수 있고, 이를 통하여 농가 경영비 절감을 유도 할 수 있다.

고품질의 천연 버섯생장제를 저렴한 가격에 공급함으로써 버섯생산단가가 저하되고 버섯을 원료로 이용하는 국내 제약업, 식품산업, 건강산업의 발전을 기대할 수 있다. 건강에 대한 관심증대로 기

능성식품의 선호도가 증가하여 버섯소비가 커질 것으로 예상되며, 차세대 건강식품으로 버섯이 차지하는 범위가 넓어질 것으로 예상된다.

버섯생장 영양제 및 그린몰드 bio-control 제제의 사용은 국내산 버섯의 품질 상승 유도 및 생산원가 절감의 결과를 가져오고 현재 중국산 버섯보다 10배 비싼 국내 버섯 가격을 더 낮춤으로서 수입절감의 효과를 가져 올 수 있다.

국내 순수기술로 제조된 천연 버섯생장 영양제 및 푸른곰팡이 방제제의 제조 및 사용은 국내 버섯자재 회사의 세계시장 진출을 촉진 시킬 수 있고 해외로부터 성능이 검증도 없이 무분별하게 유입되는 버섯영양제 및 곰팡이 방제제의 수입을 억제하고 새로운 시장 질서를 확립할 수 있다.

버섯의 무공해, 무농약 재배를 실현함으로써 국민건강 증진 및 삶의 질을 상승 시킬 수 있고, 유럽, 북미, 일본으로의 버섯수출이 용이하게 되리라 판단되어 진다.

구분(년도)	면적(ha)	생산량(M/T)
1990	532	55,274
1991	598	62,162
1992	790	69,707
1993	839	68,495
1994	1,028	72,318
1995	1,173	95,818
1996	1,128	93,530
1997	1,154	114,521
1998	1,240	113,594
1999	1,183	123,271
2000	1,103	117,614
2001	1,128	129,646
2002	1,225	141,625

Table 1-2-4. 연도별 재배면적과 생산량(농림부 2002)

### 3) 임가 및 농산촌 소득원 확보

현재 산촌 및 농촌의 경제 상황이 좋지 못하여 인구수가 줄어들고 있어 이들의 소득원을 다양화 또는 대안을 마련해줄 필요성이 있다.

산지에 대부분 방치되어 버려 지고 있는 임가 및 농가의 임산부산물을 버섯생장영양제 및 그린 몰드 방제제의 원료산업에 이용한다면 이들 원료 공급에 따른 비용을 임가 및 농가에게 지불함으로써 임가 및 농가의 소득원이 될 수 있다.

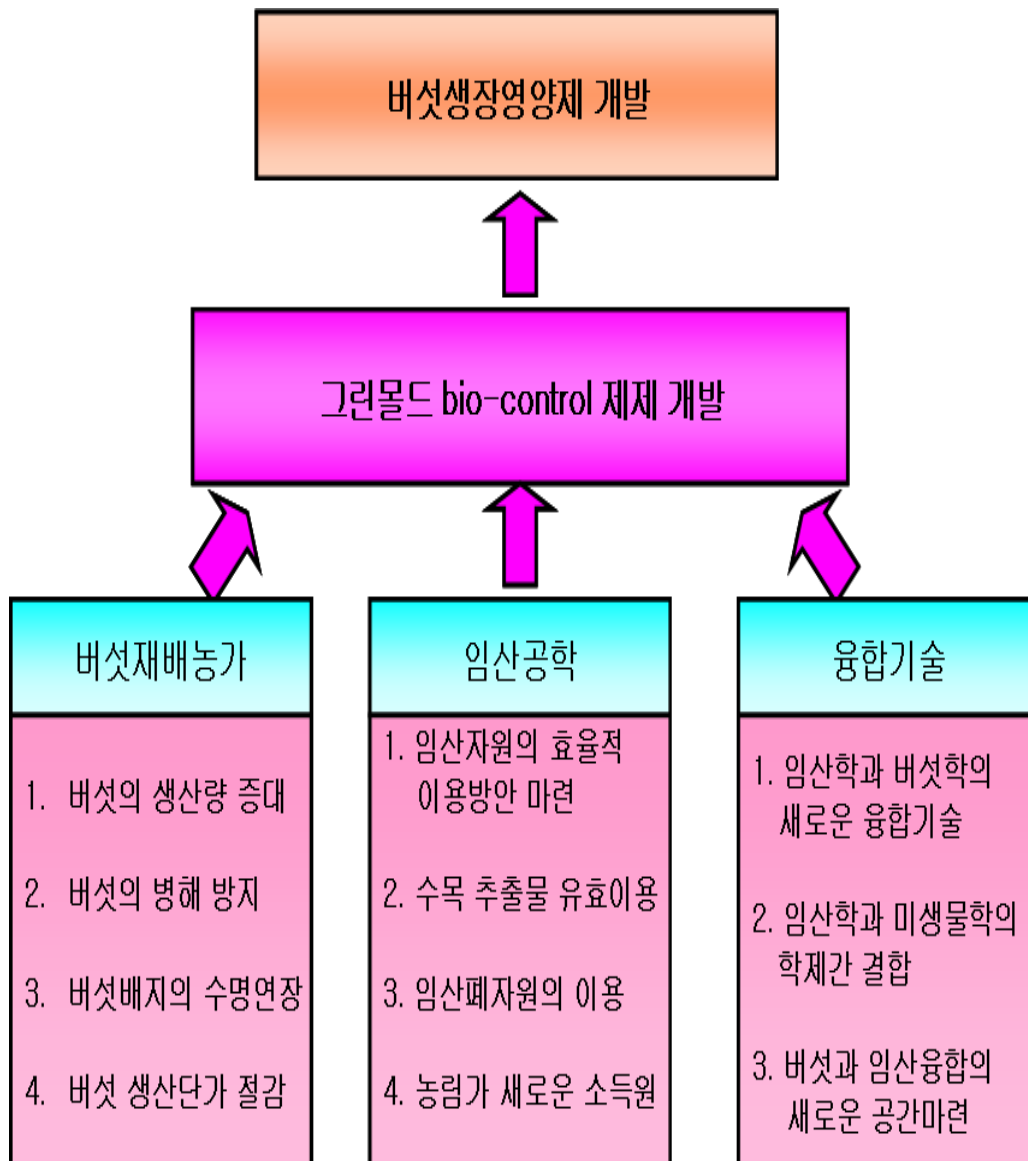
#### 다. 연구개발의 필요성

국내의 버섯산업은 많은 투자에도 불구하고 일부의 병 재배를 제외하고는 기계화가 미흡하고 생산시설 낙후로 노동력이 많이 소요되는 산업이다. 버섯생산비의 절감을 위해서 배지의 버섯 생산 주기를 확대하는 것이 가장 바람직한 방법이며, 이를 위해서 사용될 수 있는 버섯생장영양제의 개발이 시급하다. 특히 천연 수목자원으로부터 버섯생장영양제의 개발은 버섯전문가들도 충분한 잠재력을 인정하지만, 유효 추출물을 경제적이고 저렴하게 추출할 수 있는 방법 도출이 어렵기 때문에 대부분의 업체들은 제품화 가능성을 회의적으로 관망하고 있다.

버섯생장영양제의 사용 효과는 버섯의 수확량 증대 및 배지의 생산원가 절감, 노동력 절감을 유도 할 수 있으며, 다수확, 고품질의 버섯을 생산할 수 있다. 버섯의 푸른곰팡이병 감염 및 전염은 버섯농사의 존폐를 결정하는 중요한 요인의 하나이며 이들을 효과적으로 제어할 수 있는 버섯 재배용 항 곰팡이제제의 개발이 절실히 필요하다. 곰팡이 감염으로 인한 버섯배지의 폐상 및 배지의 폐기는 농가의 엄청난 경제적 손실을 초래되고 있으며, 이들 곰팡이 병해를 방지할 수 있는 bio-control제제 개발은 전 버섯재배 농가의 희망이다. 현재까지 푸른곰팡이병을 방제하기 위해 합성 살균제를 사용하여 왔고, 이들의 오, 남용은 버섯 상품의 잔류독성 문제점으로 남아있다.

최종 소비자들은 저농약, 무농약, 농산물에 대한 선호가 지속적으로 증가되고 있으며, 합성살균제의 대안으로서 인체독성이 거의 없으면서 자연 환경에 노출 시 잘 분해되는 환경 친화적인 천연물질 유래 살균제를 원하는 재배업자들 요구가 증대되어지고 있다.

푸른 곰팡이 생장억제 제품을 합성 살균제가 아닌 천연 수목으로부터 전처리, 분리, 추출된 화합물로부터 획득 하는 것은 친환경 농산물 생산에 있어서 필수적인 요건이다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 수목 추출물로부터 버섯생장영양제 제조기술

버섯류는 대부분이 종속영양생장으로 자연환경에서 목재, 낙엽, 볏짚 등 탄수화물이나 질소 화합물을 주요 영양원으로 생활하고 있다. 버섯을 인공적으로 배양 또는 생산하기 위해서는 각종 영양원이 함유된 배지(culture medium)가 필요하며, 그 주요화합물은 탄소원, 질소원 및 무기물로 구성되어있어야 한다.

버섯의 수확량 증가를 위해서는 버섯이 자라는 배지에 충분한 영양원이 있어야 하며, 인공적으로 만든 배지에서 영양원이 결핍될 경우, 버섯균사 성장 불량이나 자실체 미형성이 발생하게 된다.

버섯재배농가에서는 천연배지를 이용하는 것이 대부분인데, 이들 배지의 조성은 천연자연물로 구성되어 있으며, 경우에 따라서 그 화학적 조성이 정확히 밝혀지지 않은 배지도 있다.

버섯재배농가에서는 천연배지를 이용하여 수확할 수 있는 버섯 재배양은 한계가 있으며, 그 이상의 수확을 위해서는 외부에서 유효한 성분을 인위적으로 투입하는 것이 경제적으로 훨씬 유리한 장점이 있다.

### 제 2 절 수목 추출물로부터 그린몰드 bio-control 제제 제조기술

버섯의 배지종류에 관계없이 발생하는 푸른곰팡이병은 주로 *Trichoderma* 속의 곰팡이(green mold)에 의해 발생되며, 성장 균사는 백색이지만 포자는 푸른색으로 보이므로 푸른곰팡이병(green mildew)이라 불리어진다.

푸른곰팡이는 성장초기에 균사가 백색이므로 버섯균사와 구분이 힘들어 초기 방제가 어려우며, 이들은 colony를 형성하고 버섯균사를 분해하여 버섯발생을 거의 zero 상태로 만든다.

현재 알려져 있는 방제법으로는 농약으로 허가된 베노밀 수화제(합성살균제)를 미리 배지에 살포하는 방법이 최선이다. 수목추출물을 이용한 그린몰드 억제제는 전 세계적으로 연구 단계에 있으며, 제품화 단계로 진입하지 못하는 이유는 그린몰드 성장만 억제하고 버섯균사 성장에는 영향이 없는 추출물을 찾기가 힘들고, 또한 수목추출물을 경제적으로 추출할 수 있는 방법 도출이 힘들기 때문이다.

개념정립 단계		기업화 단계	○	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--



## 1. 세계적 수준

미국 Pennsylvania State University에 재직중인 Dr. Peter Romaine 교수는 100여종의 수목을 잎, 줄기, 뿌리 3부분으로 구분하고 이들의 열수추출물, 알콜추출물을 이용하여 버섯의 생장에 미치는 영향을 연구하고 있다. 캐나다에서는 콩으로부터 추출된 버섯생장영양제의 시제품(Pro-Mush)을 남미 및 북미의 버섯재배농을 대상으로 하여 현재 실증시험을 하고 있다.

중국의 Shanghai Pudong Tian Chu Mushroom (Co.)에서는 Dr. Yin-Fang Zhang을 중심으로 하여 버섯생장영양제를 곡류로부터 추출하는 연구를 진행 중에 있으며, 현재 제품화 단계는 아니다.

캐나다의 University of Guelph의 Dr. Danny Lee Rinker 교수는 칩엽수재 추출물을 이용하여 그린폴드 생장 억제 효과를 연구하고 있다.

## 2. 국내수준

본 연구과제의 연구책임자인 L 교수는 산림청 국립산림과학원과 공동으로 표고버섯배지 연구 과제를 수행 중이며, 배지에 질소원 후보물질을 첨가함으로써 버섯균사생장이 빠르게 진행되는 사실을 논문으로 발표한바 있다.

이와 동시에 L 교수는 칩엽수재에 존재하는 버섯균사생장 저해물질을 발견하였으며, 이를 버섯 곰팡이병에 응용하기 위하여 물질 분리 연구에 박차를 가하고 있다.

(주) Eco-biotec이 미네랄로부터 유래된 천연화합물을 이용하여 버섯생장영양제를 개발하고 있다. 천연물을 이용한 버섯생장영양제 및 버섯 곰팡이 생장억제제 시장은 아직 미개척 분야이고, 특히 국내에서 이 분야의 기업적인 수준에서 연구, 개발은 미미한 실정이며, 현재 특허청에 등록된 버섯영양제 관련 특허는 약 3-4건에 불과하고, 버섯곰팡이 방제 관련 특허는 4-5건에 지나지 않는다.

국내에서 천연물을 이용하여 제조된 버섯 생장영양제 및 버섯곰팡이 생장 억제제와 관련된 제품은 전무하다.

분류	출원인	출원의 명칭	등록일시
버섯영양제	양한철 외	버섯재배를 위한 신규의 배양배지 및 그를 이용한 버섯재배방법	1993. 06. 01
	(주) 호만기업	버섯생장 향상 및 칼슘 강화를 위한 배지 첨가제	2003. 03. 26
	장현유 외	고품질의 버섯을 저비용으로 다수확하기 위한 버섯증수개량제 조성물	2004. 03. 15
버섯 곰팡이 방제	김영기 외	느타리 버섯 갈변병 방제용 약제 조성물	1998. 07. 15
	김운익 외	버섯재배를 위한 항해균제조성물 및 이를 이용한 살균방법	1999. 07. 05
	한국화학연구 원	영지버섯 노랑병 방제 약제	1999. 07. 09
	대한민국, 산림청	후추추출물을 유효성분으로 하는 살충 및 살균성 조성물	2005. 05. 23

Table 2-1-1. 국내 특허 기술 현황

### 3. 국내외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Pennsylvania State University (미국)	수목의 열수추출물, 알콜추출물을 이용하여 버섯의 생장에 미치는 영향 (버섯생장영양제)	연구단계 (진행중)
Shanghai Pudong Tian Chu Mushroom (중국)	버섯생장영양제를 곡류로부터 추출하는 연구	연구단계 (진행중)
University of Guelph (캐나다)	침엽수재 추출물을 이용하여 그린몰드 생장억제 효과	연구단계 (진행중)
경북대학교(한국)	침엽수에 존재하는 버섯균사생장억제 화합물 구조 연구	연구단계 (진행중)

Table 2-1-2. 국내외의 연구현황

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 버섯균사 생장에 유효한 수목추출물의 탐색 및 발굴

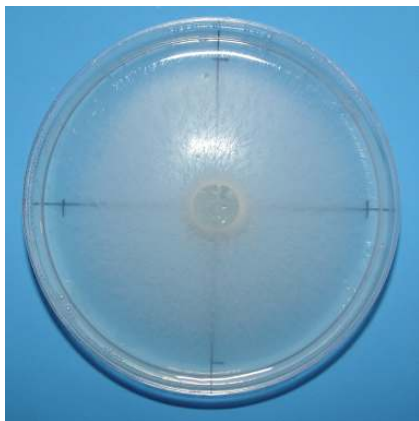
#### 1. 버섯 균주의 확보 및 계대배양 기술 확립

##### 가. 농가로부터 표고버섯 균주와 양송이버섯 균주의 확보 및 계대배양

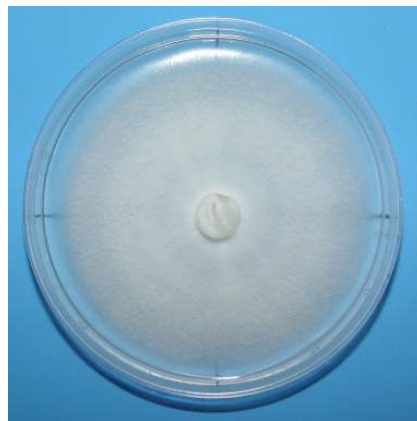
본 연구에서 사용된 표고버섯 균주는 경남 산청군에 소재하고 있는 “지리산신등 표고버섯 농원”으로부터 균주 1종(*Lentinus edodes* - No.290, Japan)을 확보하였으며, 양송이버섯 균주는 대구시 달성군 하빈면에 소재하고 있는 양송이버섯 재배농가로부터 균주 1종(*Agaricus bisporus* - No.A15, Australia)을 확보하였다.

각 농가에서 확보된 표고버섯과 양송이버섯 균주는 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco, France) 배지에 접종하여 25℃ 배양기에서 8일간 배양하였으며 지속적인 계대배양으로 균주를 확보하였다.

Fig. 3-1-1에 *Lentinus edodes*와 *Agaricus bisporus*를 PDA배지에 충분히 성장시킨 사진을 나타내었다. 표고버섯, 양송이버섯 균사생장은 9일 만에 각각 9cm의 페트리 디쉬 전체를 채울 수 있었다.



*Lentinus edodes* - No.290



*Agaricus bisporus* - No.A15

Fig. 3-1-1. Growth of *Lentinus edodes* and *Agaricus bisporus* on the potato dextrose agar medium at 25°C.

## 2. 버섯균사생장 최적 환경인자 탐색 및 결정

### 가. 농가로부터 제공받은 버섯 균주의 고체배지(PDA)의 최적 배양온도 및 pH 탐색

공시균주는 경남 산청군에 소재하고 있는 지리산신등 표고버섯농원으로부터 표고버섯 균주 1종(*Lentinus edodes* - No.290, Japan)과 대구시 달성군 하빈면에 소재하고 있는 양송이버섯 재배농가로부터 양송이버섯 균주 1종(*Agaricus bisporus* - No.A15, Australia)을 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco, France)에 접종하여 25℃에서 배양된 것을 사용하였다.

고체배지에서 표고버섯과 양송이버섯의 적정 배양 온도를 탐색하기 위해 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco, France) 배지에 균주를 접종 후 배양 온도를 각각 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃로 설정하여 배양하였다.

표고버섯과 양송이버섯의 최적 생장 pH를 탐색하기 위해 PDA배지 멸균 후 2M의 NaOH와 2M의 HCl을 사용하여 배지를 pH 3.0, pH 5.0, pH 7.0, pH 9.0, pH 11.0로 조절한 후, 최적 생장온도에서 배양하여 균사의 생장속도를 평가하였다.

균사생장시험에서 대조구 생장배지는 산이나 알칼리가 첨가되지 않은 PDA배지를 사용하였다.

버섯의 최적 생장온도와 최적 pH 결정을 위해 고체배지에서 균사생장은 petri-dish에서 생장된 가로와 세로 폭을 버니어캘리퍼스로 측정한 후, 이들 평균값을 사용하였으며, 5반복 평균값을 사용하였다(Fig. 3-1-2 참조).

표고버섯과 양송이버섯 균주의 최적 생장온도 및 pH에 대한 균사생장 결과는 5반복이상의 값을 표준편차를 계산하였다.

Fig. 3-1-3은 표고버섯과 양송이버섯을 PDA배지에 접종한 다음, 배양온도를 각각 다르게 하여 8일간 배양하였을 때 균사생장 길이를 나타낸 결과이다.

표고버섯과 양송이버섯의 생육은 온도에 따라 균사 생장속도가 종에 관계없이 거의 비슷한 경향을 나타냈으며, 15℃부터 25℃까지는 생장속도가 증가하다가 30℃부터는 생장속도가 감소하였고, 35℃에서는 표고버섯과 양송이버섯이 거의 생장하지 못하였다.

표고버섯과 양송이버섯의 균사 생육온도는 25℃가 최적이며, 35℃부터는 균사생장이 어렵다는 결과를 확인하였다.

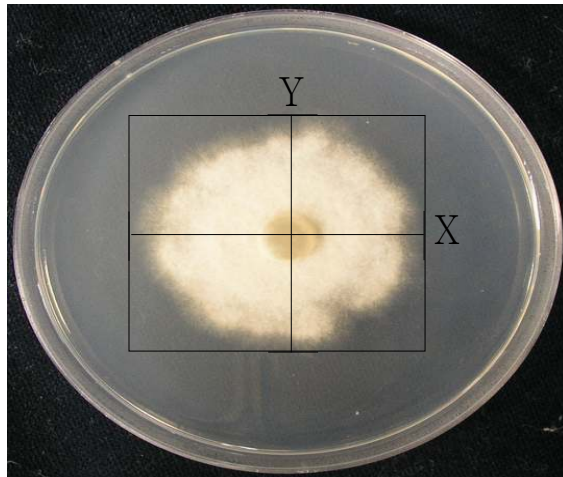


Fig. 3-1-2. Calibration method of fungal growth diameter.

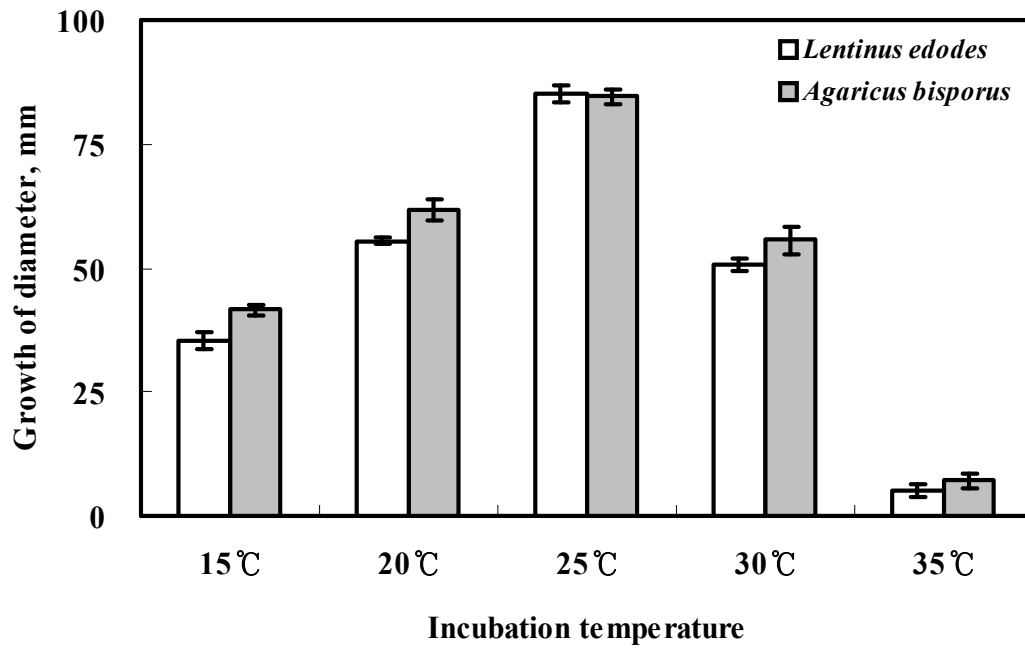


Fig. 3-1-3. Effect of temperature on mycelial growth of *L. edodes* and *A. bisporus* for 8 days.

Fig. 3-1-4는 표고버섯과 양송이버섯의 최적 성장 pH를 탐색하기 위해 이들 균주를 각각 다른 pH 조건의 PDA배지에 접종한 다음 25°C에서 성장시킨 다음, 균사생장 길이를 측정한 결과이다.

표고버섯과 양송이버섯은 pH 5에서 가장 높은 균사생장 길이를 나타냈으며, pH를 조절하지 않은 대조구 PDA배지와 거의 동일한 성장속도를 나타냈다.

pH에 따른 표고버섯과 양송이버섯의 균사생장 측정결과, 최적 성장 pH는 5.0으로 확인되었으며, pH 11로 조절된 PDA배지에서는 균사생장이 거의 되지 않았다.

표고버섯과 양송이버섯 균주의 고체배지 탐색에서 MA(Malt Agar, Difco, France)배지와 PDA배지를 비교한 결과, MA배지와 PDA배지에서 온도와 pH 조건에 상관없이 거의 동일한 균사생장을 보였다.

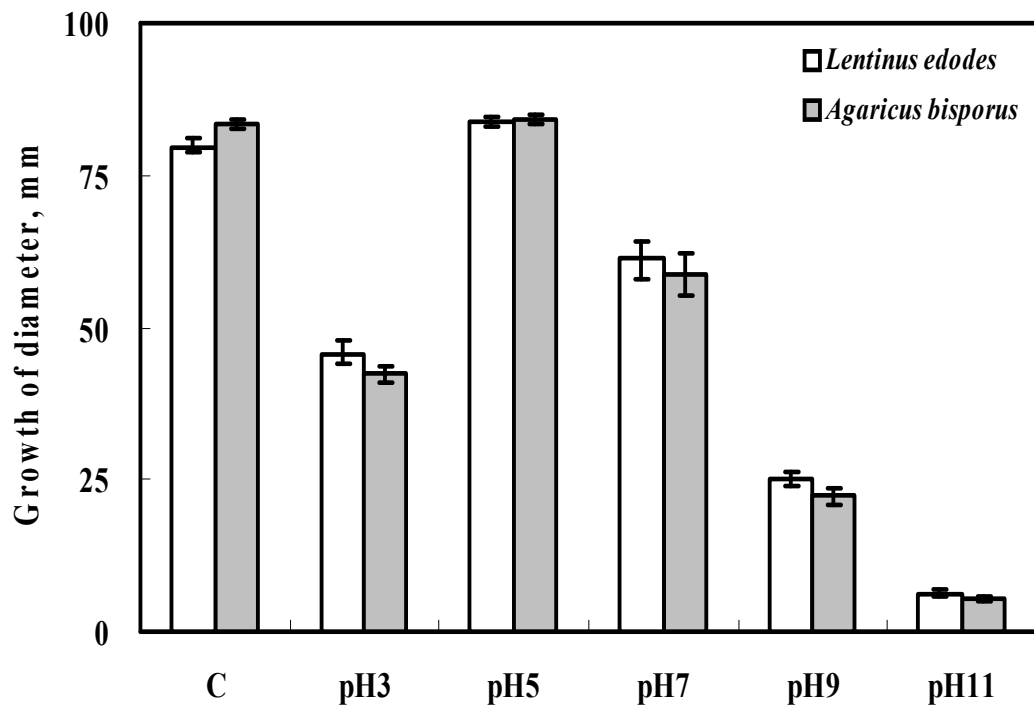


Fig. 3-1-4. Effect of pH on mycelial growth of *L. edodes* and *A. bisporus* for 8 days.

3. 버섯균사생장을 증가시킬 수 있는 목질원료의 전처리 조건 연구

가. 협동기관((주)유림하이텍)으로부터 제공받은 목질원료의 물리적 파괴에 의한 전처리

본 연구에 사용된 공시재료는 협동기관인 (주)유림하이텍으로부터 제공받은 신갈 나무를 사용하였으며, 신갈나무는 물리적 파괴를 용이하게 하기위해 일정크기의 chip으로 조제하였다.

신갈나무 칩으로부터 목분, 수증기 전처리 목분, 수증기 처리 목분으로 조제한 홀로셀룰로오스를 공시재료로 이용하였으며, 각기 물리적인 전처리 용이성을 판단하기 위해 각 공시재료의 비표면적을 포화염 수용액에 의한 조습법과 흡습법에 의해 측정하였다. 각 상대습도 조건에서의 평형함수율은 다음 식(1)에 의해 산출하였다.

$$EMC(\%) = \frac{W - W_0}{W_0} \times 100 \text{-----}(1)$$

EMC : 평형함수율 (Equilibrium moisture content)

W : 각 상대습도에 있어서 평형에 도달한 시료질량(g)

W<sub>0</sub> : 시료의 전건질량 (g) 이다.

한편 내부표면적을 계산하기 위해서 상대수증기압 x(=P/P<sub>0</sub>)와 수분흡착량 V(g-water/ g-wood)를 실험으로부터 측정하고, 이 x와 V로부터 BET plot에 필요한 x/V(1-x)를 다음 식(2)에 의하여 계산하였다.

$$\frac{x}{V(1-x)} = \frac{C-1}{V_m \cdot C} \cdot x + \frac{1}{V_m \cdot C} \text{-----}(2)$$

식(2)의 기울기와 절편으로부터  $V_m$ 과  $C$ 를 구할 수가 있다. 이  $V_m$ 으로부터 내부 표면적  $S$ 는 다음 식(3)으로 구할 수 있다.

$$S = \frac{a \cdot N \cdot V_m}{M} \times 10^{-4} (m^2/g) \text{-----} (3)$$

단,  $S$  : 내부표면적 ( $m^2/g$ ),  $x$  : 상대수증기압,  $V$  : 흡착량 ( $g/g$ )

$a$  : 물분자 한 개가 점유하는 면적 ( $=14.8 \times 10^{-6} cm^2$ )

$N$  : 아보가드로 수 ( $=6.02 \times 10^{23}$ ),  $V_m$  : 단분자층 흡착량 ( $g$ )

$M$  : 물분자량 ( $=18$ ) 이다.

평형 함수율의 변화에서는 목분과 시간에 따른 조건에서 수증기 처리한 목분의 평형 함수율 결과를 나타내었으며, 탈리그닌 처리한 목분 및 수증기 처리 목분 평형 함수율을 나타내었다.

Table 3-1-1은 목분과 각각의 조건에서 수증기 처리한 목분의 평형함수율 결과를 나타낸 것이며, Table 3-1-1에서 보는 바와 같이 동일한 상대습도 하에서는 무 처리 목분의 EMC가 가장 높게 나타났다. 이와 같은 현상들은 수증기처리시의 고온·고압에 의하여 헤미셀룰로오스가 분해 및 변질이 심하게 되었고, 고온에 의해 분해된 리그닌이 비교적 수분과 결합력이 높은 헤미셀룰로오스와 셀룰로오스를 둘러싸고 있기 때문이라고 추정되었다.



Steam explosion conditions (kgf/cm <sup>2</sup> · min)	Equilibrium moisture contents(%)								
	Relative humidity(%)								
	11	22	33	43	54	66	75	85	95
wood meal	2.5	4.2	5.3	6.6	8.0	9.4	12.0	13.6	15.5
25 - 3	1.2	2.0	2.6	3.4	4.7	5.5	7.7	9.6	11.3
6	1.6	2.2	2.6	3.3	4.0	5.0	6.9	8.4	9.8
9	1.1	1.7	2.3	3.0	3.9	5.0	6.9	8.5	10.2
30 - 3	1.5	2.0	2.1	2.4	2.9	4.0	5.8	7.5	9.3
6	1.4	2.6	2.2	2.9	3.6	4.7	6.3	7.9	9.4
9	1.3	1.9	2.4	3.1	3.6	4.9	6.5	8.0	9.5

Table 3-1-1. Equilibrium moisture contents(%) of control wood meal and steam exploded wood meal were treated under various condition(25℃) for wood.

Table 3-1-2는 탈리그닌 처리한 목분 및 수증기처리 목분의 평형함수율 결과를 나타낸 것이며, 목분과 수증기 처리재 목분을 탈리그닌 처리하여 실험한 결과, 탈리그닌 처리 전보다 비교적 더 높은 평형함수율을 나타냈는데 이것은 탈리그닌 처리에 의해서 목재중의 리그닌이 제거됨으로써 시료중의 수분흡착면적이 증가되었기 때문으로 추정된다.

Steam explosion conditions (Kgf/cm <sup>2</sup> · min.)	Equilibrium moisture contents(%)								
	Relative humidity(%)								
	11	22	33	43	54	66	75	85	95
wood meal	3.8	4.9	6.2	7.0	7.7	8.5	10.4	14.5	17.9
25-3	4.0	4.1	4.7	5.4	6.4	7.5	9.5	10.9	13.2
6	2.4	3.4	4.4	5.1	6.2	7.0	8.9	10.5	11.6
9	2.4	3.6	4.7	5.2	6.5	7.3	8.8	10.3	11.2
30-3	3.0	3.5	4.9	5.8	6.6	7.1	8.8	10.2	12.1
6	2.2	3.0	3.0	4.3	5.6	6.6	8.1	9.3	11.8
9	2.7	3.9	4.5	5.6	6.8	7.8	10.0	10.8	12.9

Table 3-1-2. Equilibrium moisture contents(%) of delignified control wood meal and steam exploded wood meal were treated under various conditions(25°C) for wood.

비표면적 변화는 목분과 시간에 따른 조건에서 수증기 처리한 목분의 비표면적 변화를 나타내었고, 탈리그닌 처리한 목분 및 수증기 처리 목분의 비표면적 변화를 나타내었다.

Table 3-1-3은 목분과 각기 다른 수증기처리조건으로 수증기 처리한 목분의 비표면적 변화를 나타내었으며, 수증기 처리한 목분은 대조구인 목분에 비해 비표면적이 상당량 감소하였다. 먼저 동일처리시간에 있어서 수증기처리압력에 대한 비표면적의 변화를 보면 처리시간이 3분과 6분의 경우는 수증기처리 압력이 강해질수록 비표면적은 점차 감소하였다. 반면에 처리시간 9분의 경우는 수증기처리 압력이 강해져도 비표면적의 큰 차이는 보이지 않았다.

Steam explosion condition (Kg/㎠ <sup>2</sup> · min.)	$\frac{C-1}{V_m \cdot C}$	$\frac{1}{V_m \cdot C}$	r	$V_m$ (g/g)	S (m <sup>2</sup> /g)
wood meal	20.579	2.488	0.997	0.043	215
25-3	37.883	6.060	0.998	0.023	113
6	48.213	2.449	0.998	0.020	98
9	43.561	6.727	0.998	0.020	98
30-3	73.679	-0.770	0.995	0.014	68
6	59.019	0.937	0.964	0.017	83
9	46.94	4.511	0.998	0.020	96

Table 3-1-3. Specific surface areas(S), amount of monomolecular vapor adsorption( $V_m$ ) of wood meal and steam exploded wood meal for the various conditions of poplar wood.

r : Regression coefficients.

Table 3-1-4는 탈리그닌 처리한 목분 및 탈리그닌 처리한 수증기처리 목분의 비표면적 변화를 나타내었고, 대조구인 목분의 비표면적은 탈리그닌 전의 결과와 동일하게 수증기처리 목분에 비해 상당히 높게 나타났으며, 수증기처리시간 및 처리압력에 대한 비표면적 변화는 탈리그닌 전의 경우와는 큰 차이를 보였다. 먼저 동일처리 시간에 있어서 수증기처리압력에 대한 비표면적의 변화를 보면, 수증기처리압력이 강해져도 비표면적은 거의 같거나 큰 변화를 보이지 않았다.

Steam explosion condition (Kg/cm <sup>2</sup> · min.)	$\frac{C-1}{V_m \cdot C}$	$\frac{1}{V_m \cdot C}$	r	$V_m$ (g/g)	S(m <sup>2</sup> /g)
wood meal	23.107	0.636	0.998	0.042	209
25-3	33.865	-0.623	0.999	0.030	149
6	29.700	1.765	0.998	0.032	157
9	28.622	1.693	0.991	0.033	163
30-3	26.783	1.511	0.992	0.035	175
6	40.169	1.299	0.974	0.024	120
9	28.416	1.313	0.998	0.034	167

Table 3-1-4. Specific surface areas(S), amount of monomolecular vapor adsorption( $V_m$ ) of wood meal and steam exploded wood meal for the various conditions of poplar wood.

r : Regression coefficients.

#### 4. 전처리 원료로부터 버섯균사생장에 관련된 유효물질의 분리 및 추출조건 연구

##### 가. 공시재료의 목재 조성분 분석

고온·고압 처리된 시료를 (주)유림하이텍으로부터 제공받아, 이를 충분히 기건시킨 후, 공시재료로 하였으며, 냉수 추출물, 온수추출물, 알칼리추출물 및 유기용제 추출물의 정량은 목재과학 실험서에 의거하여 분석하였다.

고온·고압 처리된 시료의 리그닌 함량의 측정은 유기용제 추출한 시료 1g을 황산법에 의하여 정량하였으며, holocellulose 함량은 아염소산나트륨을 사용한 Wise 방법으로 정량하였다.

Table 3-1-5에 고온·고압 전처리된 원료목재(신갈나무)의 화학적 조성을 나타냈었으며, 냉수추출물을 비롯한 대부분의 추출물 함량은 일반 목분에 비해서 대단히 높은 수준을 나타냈다.

Characters	Contents, %
Cold water extractives	5.3
Hot water extractives	18.5
Alkali extractives	44.2
Alcohol-benzene extractives	33.2
Klason lignin	19.3
Holocellulose	78.4
Ash	0.6

Table 3-1-5. Chemical compositions of wood(%).

전처리된 원료 목재의 추출물 함량을 일반목분(신갈, *Quercus mongolica*)과 비교해보면 냉수추출물은 약 2~3배, 열수추출물은 약 3~4배, 알칼리추출물은 약 2배, 유기용제추출물은 약 12~13배 증가되는 경향을 나타냈었으며, 이러한 경향은 고온·고압 하에서 원료목재를 구성하고 있는 목재 세포벽이 파괴됨과 동시에 목재를 구성하고 있는 주요성분인 cellulose, hemicellulose, lignin의 화학적 변화로 인하여 각종 추출물 함량이 증가 된 것으로 생각된다. 즉 목재의 주요 구성성분이 고온·고압 하에서 일부 열적 변환 및 분해로 인한 저분자화로의 전환 때문에 각종 추출약품에 의한 추출물량이 증가된 것으로 판단된다.

한편 전처리된 원료목재를 알콜, 벤젠으로 탈지 처리한 다음, 이를 시료로 하여 lignin 함량 및 holocellulose 함량을 측정된 결과, 일반목분에서 나타나는 결과와 큰 차이가 없었다. 이것은 목재를 고온·고압 처리하면, 각종의 유기용제 추출가능성이 증가되지만, 원료 목재를 구성하고 있는 cellulose, hemicellulose 및 lignin의 함유비율에는 큰 영향을 미치지 못한다고 생각된다.

#### 나. 전처리 원료로부터 유효 추출물 탐색

본 연구에서는 시료의 전처리 및 고온·고압 전처리 공정을 거친 시료로부터 버섯

균사생장에 관여된 유효물질의 분리를 위해서 공시재료의 화학적 전처리 및 성분 분석을 하였다.

공시재료 5 g을 500 ml 삼각플라스크에 넣고 1% 수산화 나트륨 용액 250 ml 를 첨가하여 실온에서 2시간 교반한 후 glass filter (1G3)로 여과한 다음, 그 잔사를 증류수, 10% 초산용액으로 순차 세척하였다. 한편 화학적 전처리재는 alditol-acetate법에 의해 구성당 분석을 하고 Klason lignin법에 의해 lignin함량을 정량하였다.

Material No.	Sugar composition <sup>1)</sup> (%)						Lignin content (%)
	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose	Rhamnose	
EQ 25-3	0.7	18.6	1.6	T <sup>2)</sup>	78.9	28.3	28.3
EQ 25-6	0.5	11.4	1.4	T	86.7	33.5	33.5
EQ 25-9	0.4	5.9	1.0	T	92.4	38.0	38.0

Table 3-1-6. Sugar composition of steam exploded the *Quercus monglica*

1) Based on total carbohydrates

2) T: trace, below 0.1%

본 연구의 목적은 고온·고압 처리에 의한 목재의 주요 성분 변화를 검토하고자 실시하였다. 공시재료인 신갈나무 고온·고압재의 고온·고압 처리 조건에 따른 고온·고압재의 탄수화물 조성 및 리그닌 함량 측정 결과는 Table 3-1-6에 나타냈다.

신갈나무 고온·고압재는 고온·고압처리 조건에 따라서 고온·고압재를 구성하는 탄수화물의 각 구성성분 함량이 달라졌다. 고온·고압 처리 시 동일 압력에서 처리시간이 길어질수록 헤미셀룰로오스의 함량이 감소되었으며, 특히 xylose잔기의 함량이 급격히 감소되었다.

또한 동일처리시간에서 고온·고압 처리의 압력이 높아질수록 같은 경향을 나타냈

다. 이는 활엽수 중에 존재하는 xylan 등의 pentose계 당류가 고온 및 목재 중의 acetyl기에서 유래된 산에 의해 탈수소화반응이 진행되어 furfural (2-furaldehyde)로 변화되었기 때문이라고 추측된다.

동일한 고온·고압 처리의 압력에서 처리시간이 길어질수록, 또한 같은 고온·고압 처리 시간에서 고온·고압 처리의 압력이 높아질수록 탄수화물 중의 글루코오스잔기의 함량비가 상대적으로 증가되었다. 이는 헤미셀룰로오스의 변질 및 분해로 인하여 고온·고압재에 잔존하는 셀룰로오스의 성분이 상대적으로 증가하기 때문이라고 생각된다.

25 kg/cm<sup>2</sup>이상의 압력으로 고온·고압 처리했을 때 고온·고압재 중에 존재하는 탄수화물의 80% 이상이 글루코오스잔기로 구성되어 있다는 사실에서 목재 중에 존재하는 헤미셀룰로오스 대부분이 저분자 용출되었다.

#### 다. 전처리 원료의 고온 추출

협동기관인 (주)유림하이텍으로부터 전처리된 목질원료(신갈나무 chip)를 실온에서 기건 시킨 다음, Willey mill로 분쇄하여 40 mesh pass- 80 mesh on 부분을 분리하여 공시재료로 사용하였다.

시료 2g (전건중량, oven dry weight)을 250 mL 삼각플라스크에 투입하고 증류수 50 mL을 첨가하여 항온진탕기 (SI-900R, Jeio tech. co., Korea)를 사용하여 실온에서 1.5시간, 3시간, 6시간 반응시켰으며, 또한 오토클레이브 (HB-506-4, Hanhaek co., Korea)에서 120℃, 15분, 30분, 60분간 반응시켰다. 반응종료 후, 2G3 glass filter로 여과한 다음, 증류수로 충분히 세척, 건조하여 추출물 수율을 측정하였다.

전처리된 목재 원료에 증류수만을 투입하여 실온에서 항온진탕기 (SI-900R, Jeio tech. co., Korea)를 사용하여 실온에서 1.5시간, 3시간, 6시간 반응했을 때 추출물 수율을 Fig. 5에 나타내었다. 그 결과, 전처리 조건과 추출물 수율 간에는 유의성이 나타났으며, 목재원료의 전처리 시간이 10분 보다는 5분 처리가 추출물 수율 측면에서 높게 나타났으며, 가장 높은 추출물 수율은 전처리 조건 5분, 반응 시간 6시간에서 나타났으며, 이때 추출물 수율은 193 mg 였다.

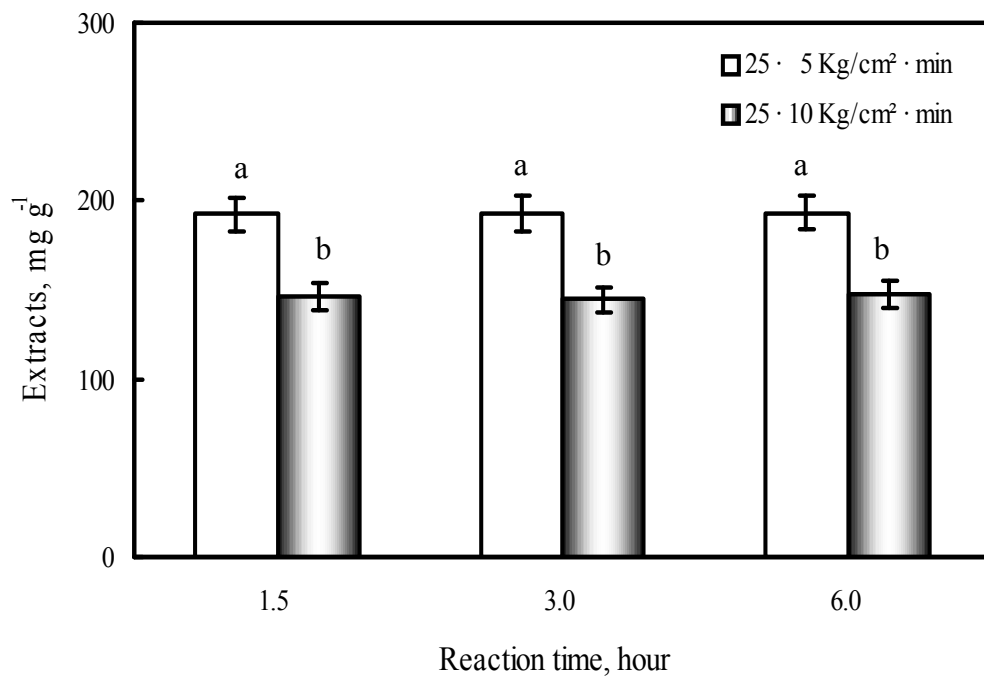


Fig. 3-1-5. Yield of extracts with water from pretreated wood at room temperature

Notes: 1) Based on the oven dry weight of the pretreated wood.

2) The vertical bars the standard errors of individual means.

3) Bars followed by the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ ) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.



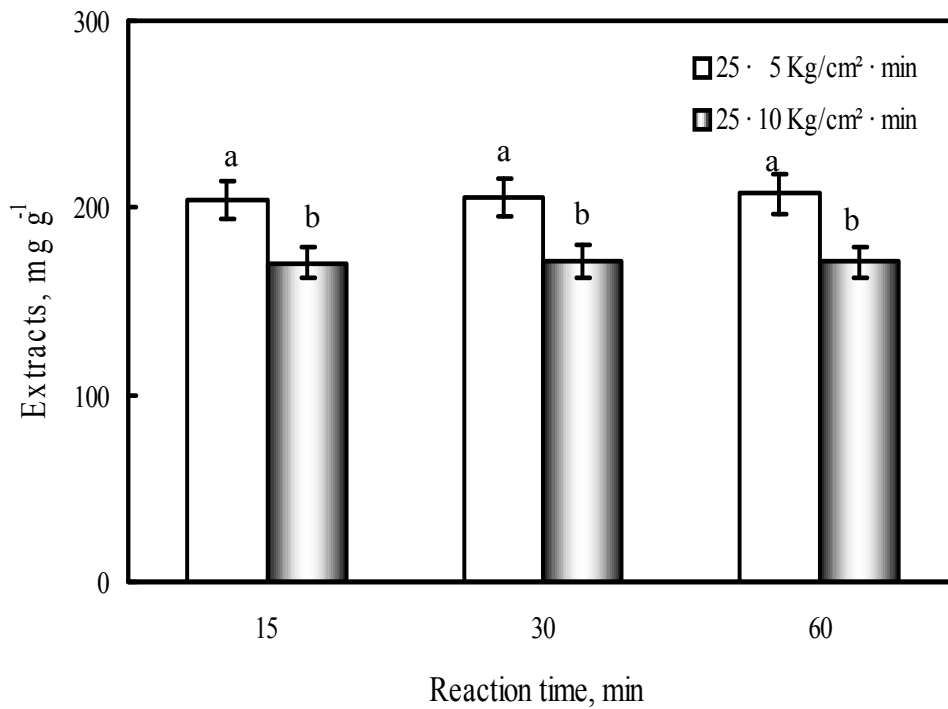


Fig. 3-1-6. Yield of extracts with water from pretreated wood at 120°C

- Notes: 1) Based on the oven dry weight of the pretreated wood.  
 2) The vertical bars the standard errors of individual means.  
 3) Bars followed by the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ ) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

전처리된 목재원료에 증류수만을 투입하여 120°C에서 15분, 30분, 60분 반응시켰을 때, 추출물 수율을 Fig. 3-1-6에 나타내었다. 그 결과, 목재원료의 전처리 조건과 추출물 수율 간에는 유의성이 인정되었지만, 반응시간과 추출물 수율 간에는 일정한 경향이 없이 거의 유사한 값을 보였으며, 원료의 전처리 시간이 짧을수록 추출물 수율은 높게 나타났으며, 목재원료 전처리 시간 5분, 반응시간 60분, 반응온도 120°C의 조건에서 207 mg의 최대 추출물 수율을 얻을 수 있었다.

라. 전처리 원료의 버섯균사 성장시험

기건 시킨 목질원료(신갈나무)에 증류수를 일정량 첨가(액비 20/1), 혼합한 다음, 30분 동안 120℃에서 반응시킨 후 반응 잔사와 반응액을 분리하고, 반응 잔사는 증류수를 사용하여 충분히 세척하였다. 세척된 반응 잔사는 공기 중에서 충분히 건조시켰다. 고온·고압 처리된 시료의 버섯균사성장 성능을 측정하기 위해, 균류인 *Lentinus edodes*를 선택하여 균사생장을 시험하였다. 전처리된 원료의 전건중량을 기준으로 sucrose 3%, KNO<sub>3</sub> 0.4%, CaCO<sub>3</sub> 0.6%를 첨가하여 충분히 혼합하여 배지를 조제한 다음, 증류수를 첨가하여 함수율을 63-65%로 조절하였다. 직경 9cm의 페트리디쉬에 배지를 일정량(23g) 첨가하여 배지의 가비중을 0.8로 조절한 다음, PDA배지에서 충분히 성장된 *Lentinus edodes*균을 1cm의 코르크 볼러로 편칭하여 페트리디쉬의 중앙부에 접종하였다. 이때 표고버섯 균사성장 성능은 균의 성장환의 직경으로 평가하였으며, 대조구로는 참나무 톱밥을 원료로 하여 제조된 배지를 사용하였다.

Fig. 3-1-7에 나타난 바와 같이 고온·고압 처리된 시료에서의 균사성장속도는 대조구에 비해 60% 수준에도 미치지 못하였다. 특히 고온·고압 처리한 시료를 다시 재분쇄한 경우에는 표고버섯의 균사성장 성능이 현저히 떨어졌다.



Fig. 3-1-7. 전처리된 목재가 *Lentinus edodes*의 성장에 미치는 영향

고온·고압 처리된 시료를 직접적으로 버섯균사생장 원료로 사용하려 한다면, 분쇄하지 않는 것이 유리하다고 판단되지만, 이것은 버섯균사 생장의 원료로서 가치는 거의 없다고 판단되었다. 고온·고압 처리한 시료를 autoclaving 함으로서 균사생장 속도는 대조구인 참나무 톱밥수준까지 상승시킬 수 있었다. 즉, 고온·고압 처리된 목재를 버섯균사 생장 원료로서 이용하기 위해서는 전처리로서 autoclaving 처리가 가장 유리하다고 할 수 있다. 전처리 목재원료를 autoclaving 처리한 시험구에서 표고버섯 균사생장 성능이 상승원인은 autoclaving 처리로 인한 균사생장 저해 물질의 제거 때문인 것으로 추측할 수 있으며, 이러한 공정은 버섯배지의 원료로서의 잠재성을 가지고 있다고 생각되어진다.

## 제 2 절 버섯생장 영양제의 효능 향상을 위한 첨가 영양원 개발

### 1. 버섯생장 영양제의 효능향상을 위한 탄소원 발굴 및 첨가 효능시험

버섯은 송이와 같이 일반적으로 활물 기생을 하며, 균근을 형성하는 소수의 버섯을 제외하고는 대부분 중속 영양 생장으로, 자연 환경에서 목재, 낙엽, 볏짚 등 탄수화물이나 질소화합물을 주요 영양원으로 하여 생활하고 있다. 따라서 버섯의 왕성한 성장을 위해서는 버섯이 자라는 배지에 충분한 영양원이 있어야 한다. 특히 인공적으로 만든 배지에서 영양원이 부족할 경우 버섯의 균사 생장이 불량하거나 자실체의 형성도 적다. 그러나 너무 많은 영양원의 공급이 균사의 생장이나 자실체의 발생을 저해하는 경우도 있다. 특히 다량의 질소원과 C/N율의 불균형은 버섯 생장에 나쁜 영향을 끼친다.

영양 요구성은 동일한 종류의 버섯이라도 그 균주에 따라서 탄소원, 질소원, 무기염류 및 비타민 등에 따라 차이가 난다. 특히 인공 배양에서 각종 영양원 간의 균형이 중요한데, 배지의 영양원 농도뿐만 아니라 영양원 상호간의 양적인 비율도 중요하다. 탄소원과 질소원의 양적 비율인 C/N율은 영양 생장과 생식 생장의 경우 각각의 최적치가 다르다. 버섯의 생장은 영양 생장과 생식 생장(자실체 형성)으로 구분되며, 영양 생장을 하고 있는 균사는 일정한 조건이 주어지면 생식 생장을 하여 자실체인 버섯을 형성하는데, 탄소원, 질소원, C/N율, 산소 요구량 등에 있어서 양자의 최적 조건이 달라진다.

탄소원은 버섯의 생활 에너지원으로 이용되는 주요한 영양원이다. 일반적으로 버섯은 각종 효소를 분비하여 목재나 낙엽 등을 분해시킴으로써 자연 상태에서 탄소원을 얻는다. 버섯의 종류에 따라 다양한 탄소원을 이용하며, 그 양에도 차이가 난다. 탄소원으로서 단당류, 이당류, 다당류를 이용하지만, 그중에서도 자연 산물인 리그닌, 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스 등이 버섯의 생장에서 주요한 탄소원이다. 대부분의 버섯이 이용하는 포도당은 일반적으로 실험실에서 가장 많이 쓰이고, 또 다른 당류에 비하여 성장도 양호하다. 이러한 버섯 영양원에 대한 바탕으로 본 연구에서 개발된 버섯생장 영양제의 효능 향상을 위한 방법을 검토하기 위하여 효능 향상에 적합한 영양원 선별하기 위한 실험을 실시하였다. 영양원 중 탄소원을 선별하기 위해 MCM(Mushroom Complete Medium)배지를 기본배지로 하여 6종의 탄소원 (Arabionse, Xylose, Glucose, Mannose, Fructose, Sucrose)을 선별하여 실험하였다.

가. 재료 및 방법

1) 공시균주

본 연구에서 사용된 표고버섯(*Lentinula edodes*) 균주는 1년차 연구과정에서 확보한 경남 산청군 소재의 “지리산신등 표고버섯 농원”으로부터 균주 1종 (*Lentinula edodes* - No.290, Japan)을 사용하였으며, 양송이버섯(*Agaricus bisporus*) 균주는 달성군 하빈면에 소재하고 있는 양송이버섯 재배농가로부터 균주 1종 (*Agaricus bisporus* - No. A15, Australia)을 사용하였다.

분양받은 균주는 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco, France)배지에 배양한 후 접종원으로 사용하였다.

2) 기본배지 제조

본 연구에서는 MCM(Mushroom Complete Medium)를 사용하였다.

MCM배지의 성분은 Table 3-2-1에 나타내었다. MCM(Mushroom Complete Medium)를 Table 3-2-1과 같이 제조하여 Petri Dish에 분주하여 사용하였다.

Media ingredients	Content(g/L)
Soucrose	20.0
Yeast extract	3.0
Peptone	2.0
Magnesium sulfate (MgSO <sub>4</sub> )	0.5
Potassium dihydrogen phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.46
Dispotassium hydrogen phosphate (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.0
Agar	20.0

Table 3-2-1. Composition of culture media of *Lentinula edodes* and *Agaricus bisporus*.

## 나. 탄소원 농도 시험

탄소원 선발 시험에 앞서 적정 탄소원 농도 선정을 위한 농도측정 시험을 실시하였다.

### 1) 재료 및 방법

시험균주의 균사생장에 적합한 탄소원의 농도를 선발하기 위하여 MCM (Mushroom Complete Medium)배지에 탄소원(Glucose 사용)의 농도를 0~7%(w/v)로 배지를 조제하여 시험균주를 접종하여 25℃에서 표고버섯(*Lentinula edodes*)은 7일, 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)은 14일 배양하여 측정하였다.

### 2) 결과 및 고찰

탄소원 농도에 따른 균사생장 측정 실험결과 표고버섯(*Lentinula edodes*), 양송이버섯(*Agaricus bisporus*) 모두의 경우 Table 3-2-2, Table3-2-3에서와 같은 결과를 나타내었다. 대표 탄소원인 glucose의 농도의 차이를 두고, 7일 동안 25℃에서 표고버섯(*Lentinula edodes*) 균을 배양하여 균사 생장 길이를 측정한 결과 glucose를 첨가하지 않은 대조구에서는 60.1mm의 성장을 보였고, 각각 0.5%는 65.6mm, 1%는 72.4mm, 2%는 81.3mm, 5%는 79.6mm, 7%의 농도에서는 78.9mm의 길이 성장을 나타내었다.

양송이버섯(*Agaricus bisporus*)을 접종한 경우에는 14일 동안 25℃에서 배양한 결과 대조구는 51.4mm, 0.5%에서는 54.7mm, 1%에서는 60.5mm, 2%의 농도에서는 62.7mm, 3%의 농도에서는 61.9, 5%는 60.5mm, 7%는 59.1mm의 성장을 하였다.

표고버섯(*Lentinula edodes*)과 양송이버섯(*Agaricus bisporus*) 두 경우 모두 2%의 농도에서 가장 생장이 활발한 것으로 나타내었다.

glucose함량이 증가함에 따라서 균사 생장이 점점 증가한 것으로 나타내다가 5% 이상이 되면 성장 속도가 낮아짐을 볼 수가 있는데, 농도가 높아짐에 따라서 상대적으로 균사 생장이 증가되는 것이 아니라, 최적 농도에 도달한 이상부터는 농도에 따른 증가도가 없어지는 것으로 확인되었다.

이에 따라서 결론적으로 함량에 따른 균 성장속도의 차이를 나타내어 보면 glucose 함량 2%의 농도에서 균사생장 효능이 가장 상승되었다. 따라서 본 연구과정에서 탄소원 선발 실험에 2%함량을 첨가는 농도를 사용하는 것으로 결론을 내었다. 이에 따른 표고버섯과 양송이버섯 균주의 탄소원 농도 선정 실험 결과는 Table 3-2-2, Table3-2-3에 5반복의 값을 계산하였다.

Content (%)	Mycelial growth (mm/7days)
	<i>Lentinula edodes</i>
0	60.1
0.5	65.6
1	72.4
2	81.3
3	80.7
5	79.6
7	78.9

Table 3-2-2. Effect of different concentrations of glucose on the mycelial growth of *Lentinula edodes* in the MCM(Mushroom complete complete medium) agar basal medium.

Content (%)	Mycelial growth (mm/14days)
	<i>Agaricus bisporus</i>
0	51.4
0.5	54.7
1	60.5
2	62.7
3	61.9
5	60.5
7	59.1

Table 3-2-3. Effect of different concentrations of glucose on the mycelial growth of *Agaricus bisporus* in the MCM(Mushroom complete complete medium) agar basal medium.

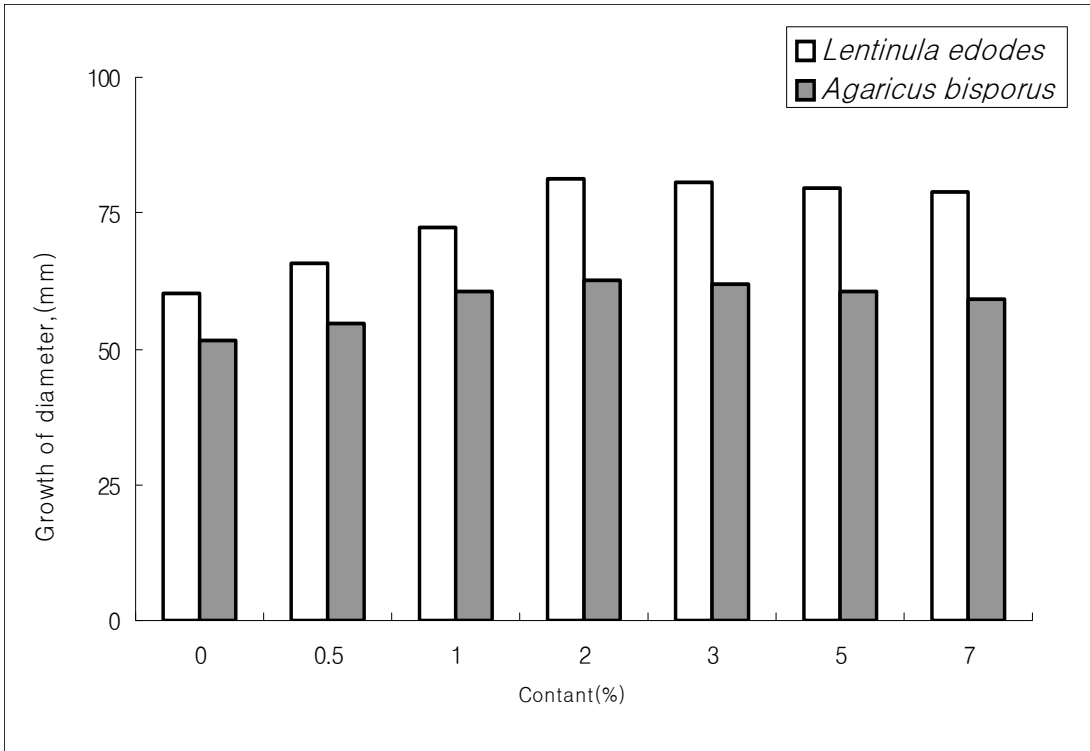


Fig. 3-2-1. Effect of different concentrations of glucose on the mycelial growth of *Lentinula edodes* and *Agaricus bisporus* in the MCM(Mushroom complete complete medium) agar basal medium.

#### 다. 탄소원 선발 시험

##### 1) 재료 및 방법

효과적인 탄소원을 선발하기 위하여 Table 3-2-4와 같이 6종 (Arabinose, Xylose, Glucose, Mannose, Fructose, Sucrose)을 탄소원 농도 측정 시험결과에 따른 최적 탄소원 농도 2%로 배지를 조제하여 시험균주를 접종하여 25℃온도에서 표고버섯(*Lentinula edodes*)의 경우에는 7일, 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)은 14일 배양하여 측정하였다. 실험 결과는 5반복의 값을 계산하였다.



Carbon sources (%)
Arabinose
Xylose
Glucose
Mannose
Fructose
Sucrose

Table 3-2-4. Kinds of Carbon sources to add

## 2) 결과 및 고찰

탄소원 선발 실험은 탄소원 농도 실험에서 최적의 균사 생장을 보인 2%의 농도에서 5탄당, 6탄당등 다당의 탄소원을 선발하여 첨가한 결과 표고버섯(*Lentinula edodes*) 균을 접종하였을 때 7일 동안 생장한 결과를 보면 Arabinose는 80.1mm, Xylose는 75.4mm, Glucose는 81.3mm, Mannose는 77.5mm, Fructose는 69.4mm, Sucrose는 68.5mm의 길이 생장을 보여 표고버섯(*Lentinula edodes*)의 경우는 Glucose에서 가장 빠른 균 성장 속도를 가지는 것으로 나타내었다.

양송이버섯(*Agaricus bisporus*)의 경우에 14일 동안 25℃에서 배양한 결과 Arabinose에서는 50.4mm, Xylose는 51.6mm, Glucose는 62.7mm, Mannose는 48.9mm, Fructose는 41.5mm, Sucrose는 71.4mm의 균 생장을 보여 결론적으로 Sucrose에서 가장 빠른 성장 속도를 보였다.

결론적으로 표고버섯(*Lentinula edodes*)의 경우에는 Glucose를 첨가, 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)의 경우에는 Sucrose를 첨가한 경우의 균사생장 효능이 가장 상승되었으며, 버섯균에 따라서 최적 탄소원이 다르며, 당의 수량이 많고, 적음과는 큰 영향이 없음을 본 연구에서 잠정 결론 내었으며, 경제적인 손익을 계산하여 본 연구 과정에서는 glucose를 최종 첨가 탄소원으로 결정하였다.

탄소원에 따른 세부적인 결과는 Table3-2-5, Table3-2-6과 Fig. 3-2-2에 나타내었다.

Carbon sources	Mycelail growth (mm/7days)	
	<i>Lentinula edodes</i>	
Arabinose	80.1	
Xylose	75.4	
Glucose	81.3	
Mannose	77.5	
Fructose	69.4	
Sucrose	68.5	

Table 3-2-5. Effect of carbon sources on the mycelial growth of *Lentinula edodes* in the MCM(Mushroom complete medium) agar basal medium.

Carbon sources	Mycelail growth (mm/14days)	
	<i>Agaricus bisporus</i>	
Arabinose	50.4	
Xylose	51.6	
Glucose	62.7	
Mannose	48.9	
Fructose	41.5	
Sucrose	71.4	

Table 3-2-6. Effect of carbon sources on the mycelial growth of *Agaricus bisporus* in the MCM(Mushroom complete medium) agar basal medium.

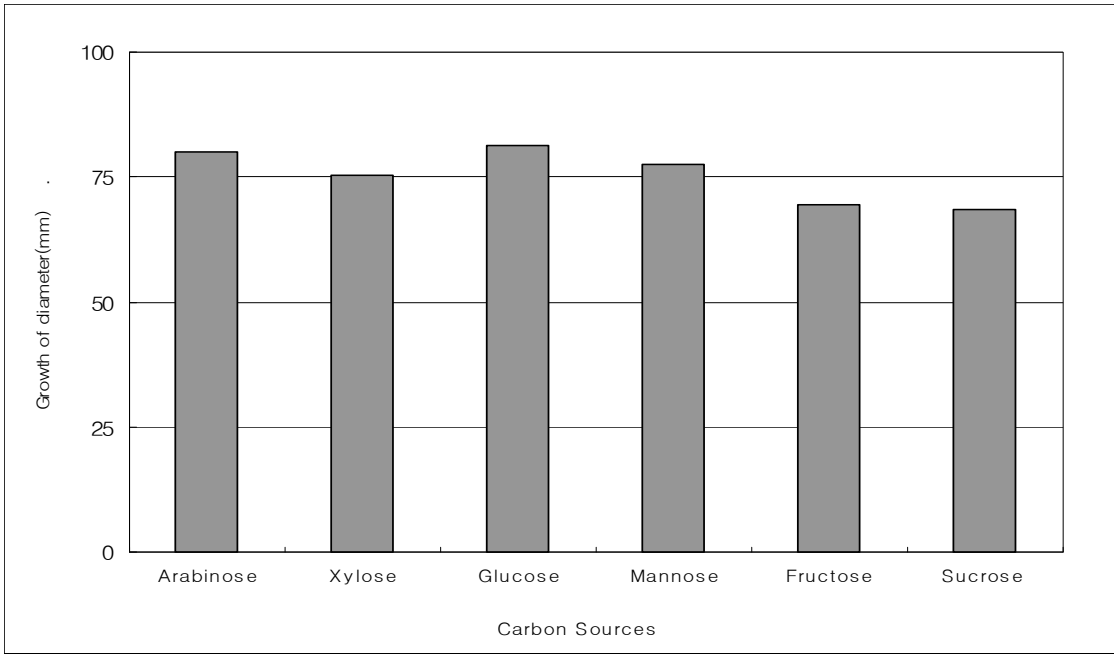


Fig 3-2-2. Effect of carbon sources on the mycelial growth of *Lentinula edodes* in the MCM(Mushroom complete medium) agar basal medium.

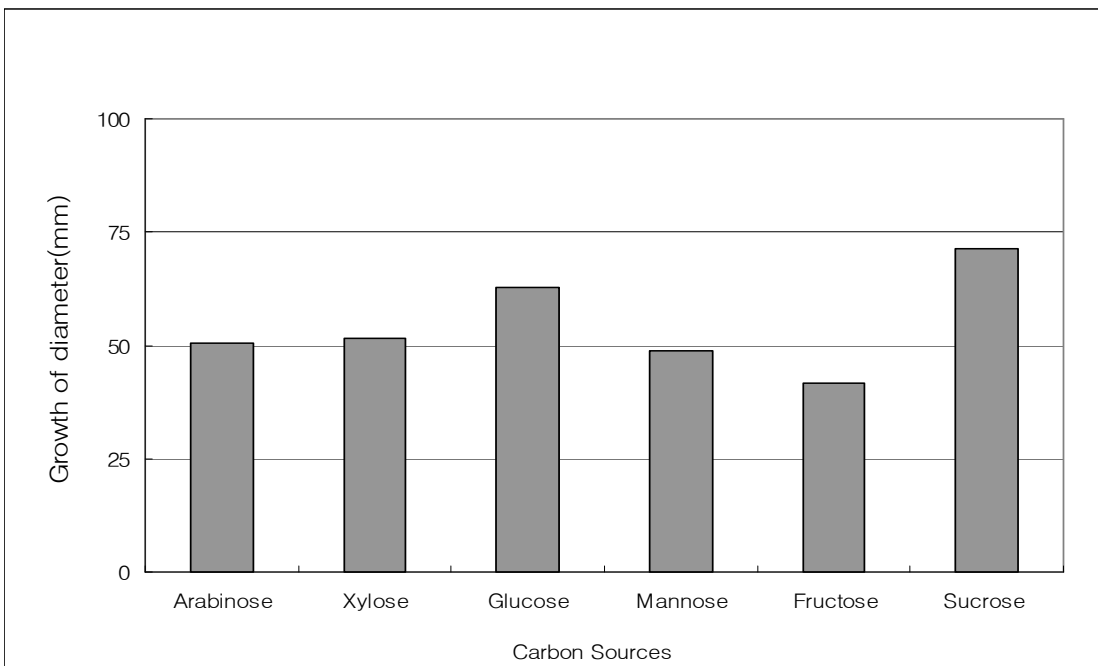


Fig. 3-2-3. Effect of carbon sources on the mycelial growth of *Agaricus bisporus* in the MCM(Mushroom complete medium) agar basal medium.

## 2. 버섯생장 영양제의 효능향상을 위한 질소원 발굴 및 첨가 효능 시험

질소원은 버섯의 생장에 있어서 탄소원 다음으로 많은 양을 차지하며, 아미노산, 단백질, 효소의 합성에 필수적인 영양원이다. 질소원으로는 무기태 질소원, 유기태 질소원, 복합 질소원 등이 있다.

본 연구에서 개발된 버섯생장 영양제의 효능 향상을 위한 방법을 검토하기 위하여 효능 향상에 적합한 영양원 선별하기 위한 실험을 실시하였다. 영양원 중 질소원을 선별하기 위해 MCM(Mushroom Complete Medium)배지를 기본배지로 하여 유기태 질소원과 무기태 질소원 총 6종의 질소원 ( Threonine, Peptone, Glycine, Yeast extract, Ammonium chloride, Ammonium tartrate)을 선별하여 실험하였다.

### 가. 재료 및 방법

#### 1) 공시균주

본 연구에서 사용된 표고버섯(*Lentinula edodes*) 균주는 1년차 연구과정에서 확보한 경남 산청군 소재의 “지리산신등 표고버섯 농원”으로부터 균주 1종 (*Lentinula edodes* - No.290, Japan)을 사용하였으며, 양송이버섯(*Agaricus bisporus*) 균주는 달성군 하빈면에 소재하고 있는 양송이버섯 재배농가로부터 균주 1종 (*Agaricus bisporus* - No. A15, Australia)을 사용하였다.

분양받은 균주는 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco, France)배지에 배양한 후 집종원으로 사용하였다.

#### 2) 기본배지 제조

본 연구에서는 MCM(Mushroom Complete Medium)를 사용하였다.

MCM배지의 성분은 Table 3-2-1에 나타내었다. MCM(Mushroom Complete Medium)를 Table 3-2-1과 같이 제조하여 Petri Dish에 분주하여 사용하였다.

### 나. 질소원 농도 시험

질소원 선별 시험에 앞서 적정 질소원 농도 선정을 위한 농도측정 시험을 실시하였다.

#### 1) 재료 및 방법

시험균주의 균사생장에 적합한 탄소원의 농도를 선별하기 위하여 MCM(Mushroom Complete Medium)배지에 질소원(peptone 사용)의 농도를 0~1.0%(w/v)로 배지를 조제하여 시험균주를 접종하여 25℃에서 표고버섯(*Lentinula edodes*)은 7일, 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)은 14일 배양하여 측정하였다.

## 2) 결과 및 고찰

질소원 농도에 따른 균사생장 측정하기 위하여 대표적인 질소원으로 사용되어지는 peptone을 첨가하여 실험한 결과를 나타내었다. 표고버섯(*Lentinula edodes*)을 접종하여 25℃ 온도에서 7일 동안 배양한 결과 대조구는 60.1mm, 0.05%에서는 62.1mm, 0.1%에서는 64.0mm, 0.3%에서는 69.8mm, 0.5%에서는 73.6mm, 1.0%에서는 53.1mm의 균 생장을 보여 0.5%의 농도에서 가장 효율적으로 자라는 것으로 나타났으며, 질소원의 농도가 증가함에 따라 균 성장속도가 증가하다가 0.5% 이상이 되면 낮아지는 것으로 질소원의 농도도 최적 농도를 가지고 있는 것으로 확인되었다.

양송이버섯(*Agaricus bisporus*)을 접종한 경우에는 대조구는 51.4mm, 0.05%에서는 53.2mm, 0.1%에서는 54.9mm, 0.3%에서는 61.0mm, 0.5%에서는 63.7mm, 1.0%에서는 60.8mm의 균 생장을 보여, 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)의 경우에도 표고버섯(*Lentinula edodes*)을 접종한 경우와 동일하게 0.5%에서 가장 효율적인 성장 속도를 보였다.

결론적으로 Table 3-2-7, Table3-2-8에서와 보는 것과 같이 0.5%의 농도에서 균사생장 효능이 가장 상승되었다. 표고버섯과 양송이버섯 균주의 질소원 농도 선정 실험 결과는 5반복의 값을 계산하여 Table 3-2-7, Table3-2-8에 나타내었다.

Content (%)	Mycelail growth (mm/7days)	
	<i>Lentinula edodes</i>	
0	60.1	
0.05	62.1	
0.1	64.0	
0.3	69.8	
0.5	73.6	
1.0	53.1	

Table 3-2-7. Effect of different concentrations of peptone on the mycelial growth of *Lentinula edodes* in the MCM(Mushroom complete complete medium) agar basal medium.

Content (%)	Mycelial growth (mm/14days)
	<i>Agaricus bisporus</i>
0	51.4
0.05	53.2
0.1	54.9
0.3	61.0
0.5	63.7
1.0	60.8

Table 3-2-8. Effect of different concentrations of peptone on the mycelial growth of *Agaricus bisporus* in the MCM(Mushroom complete complete medium) agar basal medium.

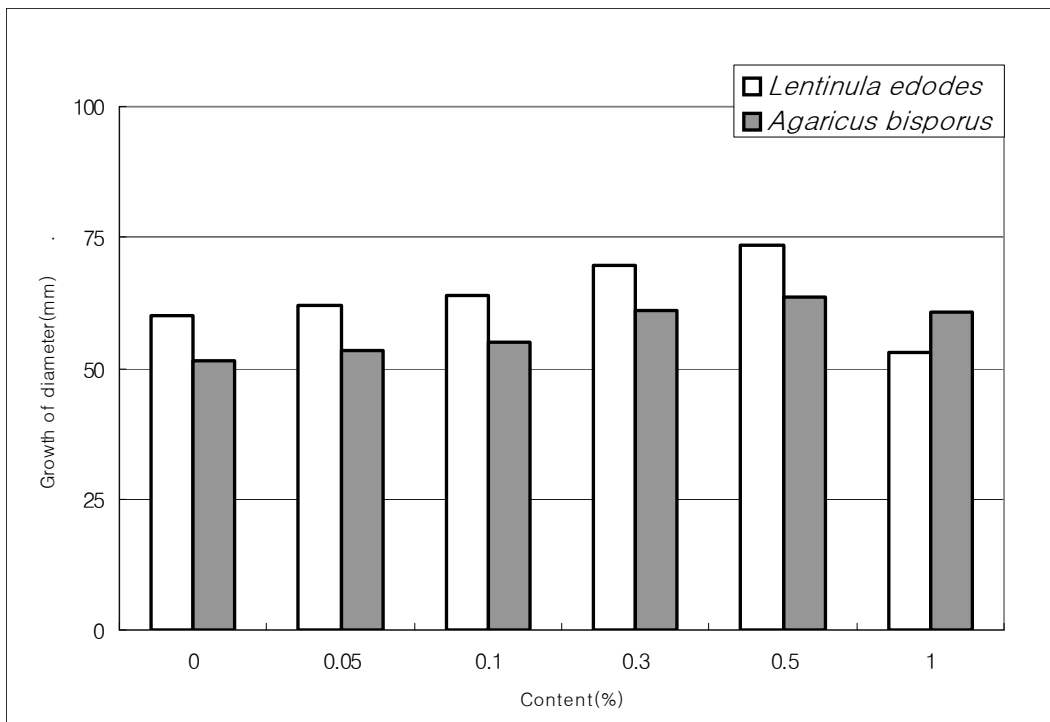


Fig. 3-2-4. Effect of different concentrations of peptone on the mycelial growth of *Lentinula edodes* and *Agaricus bisporus* in the MCM(Mushroom complete complete medium) agar basal medium.

## 다. 질소원 선발 시험

### 1) 재료 및 방법

효과적인 질소원을 선발하기 위하여 6종 ( Threonine, Peptone, Glycine, Yeast extract, Ammonium chloride, Ammonium tartrate)을 질소원 농도 측정 시험결과에 따른 최적 질소원 농도 0.5%로 배지를 조제하여 시험균주를 접종하여 25℃온도에서 표고버섯(*Lentinula edodes*)의 경우에는 7일, 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)은 14일 배양하여 측정하였다. 실험 결과는 5반복의 값을 표준편차 계산하였다. 질소원의 종류는 Table 3-2-9.에 나타내었다.

Nitrogen sources(%)
Threonine
Peptone
Glycine
Yeast extract
Ammonium chloride
Ammonium tartrate

Table 3-2-9. Kinds of Nitrogen sources to add

### 2) 결과 및 고찰

질소원 선발 실험에서 표고버섯(*Lentinula edodes*)을 접종하여 25℃에서 7일간 배양한 결과 hreonine에서 70.7mm, Peptone에서 73.6mm, Glycine은 65.1mm, Yeast extract 64.3mm, Ammonium chloride는 59.1mm, Ammonium tartrate 58.4mm의 균생장을 보여 표고버섯 (*Lentinula edodes*)을 접종한 경우에는 peptone에서 가장 빠른 균 생장을 보였다. 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)을 접종하여서 14일 동안 25℃에서 배양한 경우에는 Threonine에서 56.1mm, peptone은 63.7mm, Glycine은 58.4mm, Yeast extract 63.5mm, Ammonium chloride는 64.1mm, Ammonium tartrate는 69.5mm로 성장하여 Ammonium tartrate에서 가장 높은 균생을 보였다.

결론적으로 표고버섯(*Lentinula edodes*)은 유기태 질소인 peptone에서, 양송이버섯

(*Agaricus bisporus*)의 경우에는 무기태 질소인 Ammonium tartrate에서 가장 활발한 균 생장을 보였다.

따라서 버섯균에 따라 유기태와 무기태 질소에 영향에 따라서 성장속도가 달라짐을 확인하였고, 양송이버섯에 경우 Ammonium tartrate 다음으로 peptone를 첨가한 경우에서 균 속도가 빨라짐을 확인하여, 본 연구과정에서는 경제성을 분석하여 최종적으로 질소원으로 peptone을 선발하여 첨가하였다. 본 연구에서 진행되어진 세부적인 결과는 Table3-2-10, Table3-2-11과 Fig. 3-2-5에 나타내었다.

Nitrogen sources	Mycelail growth (mm/7days)
	<i>Lentinula edodes</i>
Threonine	70.7
Peptone	73.6
Glycine	65.1
Yeast extract	64.3
Ammonium chloride	59.1
Ammonium tartrate	58.4

Table 3-2-10. Effect of nitrogen sources on the mycelial growth of *Lentinula edodes* in the MCM(Mushroom complete medium) agar basal medium.



Nitrogen sources	Mycelial growth (mm/14days)
	<i>Agaricus bisporus</i>
Threonine	56.1
Peptone	63.7
Glycine	58.4
Yeast extract	63.5
Ammonium chloride	64.1
Ammonium tartrate	69.5

Table 3-2-11. Effect of nitrogen sources on the mycelial growth of *Agaricus bisporus* in the MCM(Mushroom complete medium) agar basal medium.

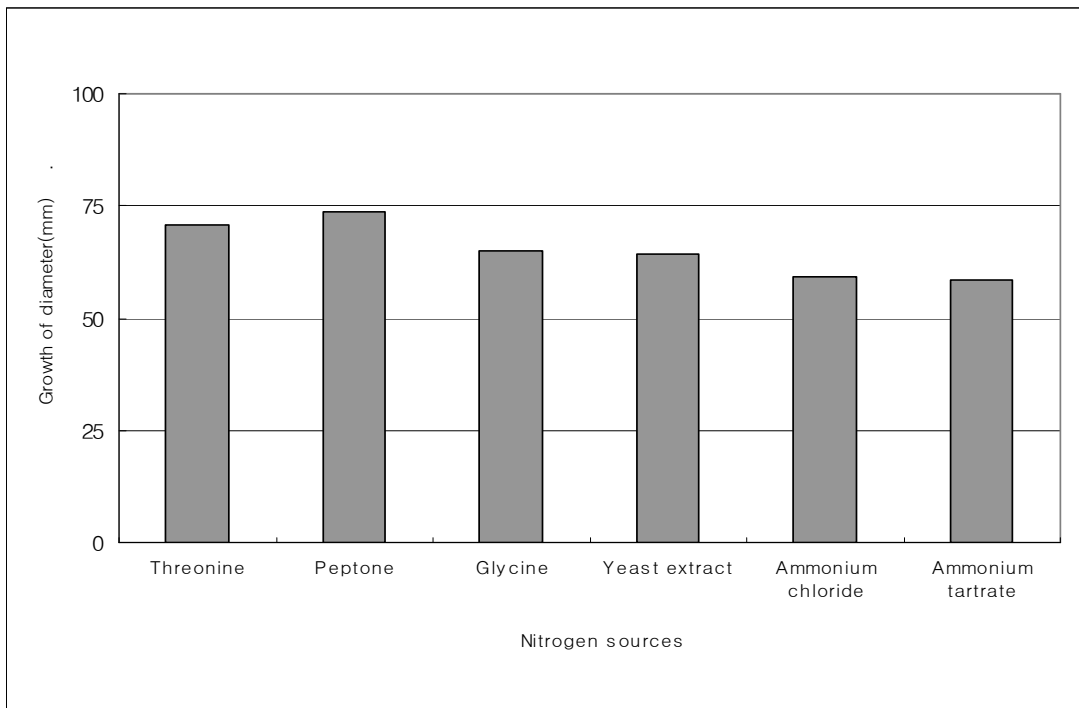


Fig.3-2-5. Effect of nitrogen sources on the mycelial growth of *Lentinula edodes* in the MCM(Mushroom complete medium) agar basal medium.

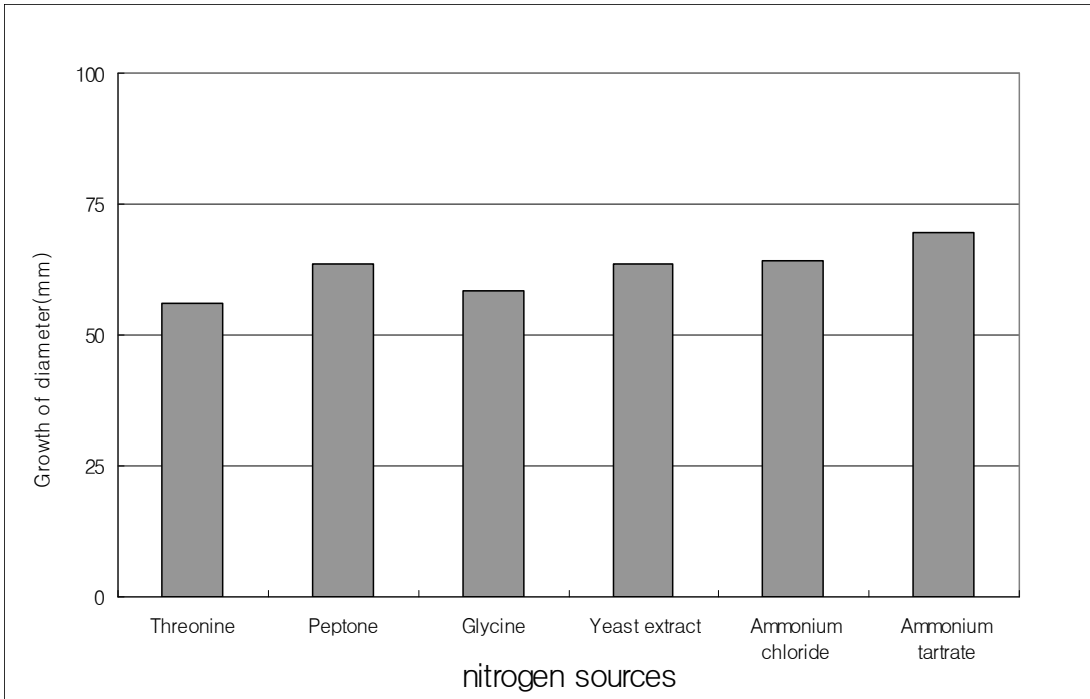


Fig.3-2-6. Effect of nitrogen sources on the mycelial growth of *Agaricus bisporus* in the MCM(Mushroom complete medium) agar basal medium.

### 3. 버섯생장 영양제의 효능향상을 위한 제당 부산물의 첨가 검토 시험

탄소원, 질소원 외에 버섯영양제의 효능 향상을 위하여 추가적인 활성물질의 첨가 실험으로 균사 생장에 미치는 효과를 알아보하고자 (주) 유림하이텍으로부터 제공받은 생리활성물질(액상)을 첨가하는 실험을 실시하였다.

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 공시균주

본 연구에서 사용된 표고버섯(*Lentinula edodes*) 균주는 1년차 연구과정에서 확보한 경남 산청군 소재의 “지리산신등 표고버섯 농원”으로부터 균주 1종 (*Lentinula edodes* - No.290, Japan)을 사용하였으며, 양송이버섯(*Agaricus bisporus*) 균주는

달성균 하빈면에 소재하고 있는 양송이버섯 재배농가로부터 균주 1종 (*Agaricus bisporus* - No. A15, Australia)을 사용하였다.

분양받은 균주는 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco, France)배지에 배양한 후 접종원으로 사용하였다.

## 2) 기본배지 제조

본 연구에서는 MCM(Mushroom Complete Medium)를 사용하였다.

MCM배지의 성분은 Table 3-2-12에 나타내었다. 배지는 액체 배지로 제조하여 균체의 성장 속도 및 성장량을 측정하였다.

Media ingredients	Content(g/L)
Soucrose	20.0
Yeast extract	3.0
Peptone	2.0
Magnesium sulfate (MgSO <sub>4</sub> )	0.5
Potassium dihydrogen phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.46
Dispotassium hydrogen phosphate (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.0

Table 3-2-12. Composition of culture media of *Lentinula edodes* and *Agaricus bisporus*.

## 3) 실험방법

제조된 MCM배지 1 L 내에 생리활성물질(액상)을 각 0ml, 0.5ml, 1ml, 1.5ml, 2ml 농도로 투입하여 균을 접종한 후 25°C, 120rpm Shaking incubator에서 15일간 배양한 후에 균체를 여과하여 105°C 건조기에서 건조 후 균체량을 측정하였다. 실험 결과는 5반복의 값을 표준편차 계산하였다.

나. 결과 및 고찰

(주) 유립하이텍으로부터 제공받은 생리활성물질(액상)을 농도를 달리하여 15일 동안 액체배지에 표고버섯(*Lentinula edodes*) 배양하여 전건중량을 측정 한 결과 대조구는 412.3mg, 0.5ml 투입 시 415.1mg, 1ml 투입 시 420.2mg, 1.5ml 투입 시 419.2mg, 2ml 투입 시 418.8mg의 균이 성장되어 생리 활성 물질을 투입한 결과 1ml 투입 시 균사생육이 가장 좋은 결과를 나타내었다.

양송이버섯(*Agaricus bisporus*)을 접종하였을 때에는 대조구는 379.5mg, 0.5ml 투입 시 382.4mg, 1ml 투입 시 388.6mg, 1.5ml 투입 시 374.5mg, 2ml 투입 시 372.9mg의 균이 성장되어 양송이 버섯 역시 1ml를 투입한 경우가 가장 활발한 균 성장을 보이는 것으로 나타내었다. 수행된 세부적인 결과는 Table 3-2-13, Table 3-2-14에 표시하였다.

Content of activated materials (ml)	Mycelail growth (mg/15days)	
	<i>Lentinula edodes</i>	
0	412.3	
0.5	415.1	
1	420.2	
1.5	419.2	
2	418.8	

Table 3-2-13. Mycelial growth of *Lentinula edodes* on MCM(Mushroom Complete Medium) with different activated materials addition.

Content of activated materials (ml)	Mycelial growth (mg/15days)
	<i>Agaricus bisporus</i>
0	379.5
0.5	382.4
1	388.6
1.5	374.5
2	372.9

Table 3-2-14. Mycelial growth of *Agaricus bisporus* on MCM(Mushroom Complete Medium) with different activated materials addition.

#### 4. 버섯영양제의 효능향상을 위한 첨가물의 formulation 도출 시험

발굴된 첨가물 (탄소원, 질소원, 첨가물)의 복합화에 의한 최적의 Formulation 도출을 위해서 농도 조절에 의한 균체의 성장 속도를 관찰하는 실험을 실시하였다. 각각에 선발된 첨가물의 농도를 달리하여 배지를 만든 후 균을 접종하여 버섯의 성장을 관찰하였다.

##### 가. 재료 및 방법

최종적으로 선발된 탄소원으로는 glucose, 질소원으로는 peptone을 그리고 추가 생리활성물질을 각각 농도를 달리하여 배지를 제조하고, 공시균주를 접종하여, 25℃, 7일간 배양한 후 균사생장 밀도를 측정하여 균사 성장 효능을 실험하였다. 배양된 균사의 밀도는 육안으로 관찰하여 1~5단계(+, ++, +++, +++++, ++++++)로 나타내었으며, 5단계에서의 균사 밀도가 가장 높은 경우이다.

배지합성 농도는 Table 3-2-15, 3-2-16, 3-2-17에 나타내었다.

sample	glucose(%)	peptone(%)	different activated materials (ml)
A-1	0	0.5	1
B-1	1	0.5	1
C-1	1.5	0.5	1
D-1	2	0.5	1
E-1	2.5	0.5	1

Table 3-2-15. Mycelial growth of *Lentinula edodes* and *Agaricus bisporus* on the different medium composition.

sample	glucose(%)	peptone(%)	different activated materials (ml)
A-2	2	0	1
B-2	2	0.1	1
C-2	2	0.3	1
D-2	2	0.5	1
E-2	2	0.7	1

Table 3-2-16. Mycelial growth of *Lentinula edodes* and *Agaricus bisporus* on the different medium composition.

sample	glucose(%)	peptone(%)	different activated materials (ml)
A-3	2	0.5	0
B-3	2	0.5	0.5
C-3	2	0.5	1
D-3	2	0.5	1.5
E-3	2	0.5	2

Table 3-2-17. Mycelial growth of *Lentinula edodes* and *Agaricus bisporus* on the different medium composition.

#### 나. 결과 및 고찰

발굴된 첨가물의 복합화를 위한 실험으로 일차적으로 peptone과 제당부산물(생리활성물질)의 농도는 각각 0.5%와 1ml로 동일하게 적용하고, glucose의 양은 대조구, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%로 달리하여 균을 접종한 다음 버섯의 성장 밀도를 측정하여 최적 농도를 선정하였다. glucose의 양은 Table 3-2-18에서 보는 것과 같이 표고버섯 (*Lentinula edodes*)은 D-1, 즉 2% 농도에서 가장 밀도가 높았으며, 양송이버섯 (*Agaricus bisporus*)의 경우에는 D-1, E-1, 즉 glucose의 농도가 2%, 2.5%일 때 가장 밀도가 높았으며, 그 이상의 농도에서는 균 성장 밀도가 더 감소되는 것으로 나타났다.

sample	Mycelial density(7day)	
	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Agaricus bisporus</i>
A-1	+	+
B-1	+	++
C-1	++++	++++
D-1	+++++	+++++
E-1	++++	+++++

Table 3-2-18. Mycelial growth of *Lentinula edodes* and *Agaricus bisporus* on the different medium composition.

두 번째로 시행된 적정 질소원(peptone)의 농도 선정을 위해서 peptone의 양은 대조구, 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7%로 나누어 Table 3-2-16과 같이 배지를 제조하여 버섯 균을 접종하였다. 그 결과 표고버섯(*Lentinula edodes*), 양송이버섯(*Agaricus bisporus*) 두 경우 모두 D-2 즉, 0.5%의 농도에서 가장 밀도가 높았으며 그 이상의 농도가 되는 경우에는 생장 밀도가 더 낮아지는 결과를 나타내었다.

sample	Mycelial density(7day)	
	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Agaricus bisporus</i>
A-2	++	+
B-2	++	+++
C-2	+++	++++
D-2	+++++	+++++
E-2	++++	+++

Table 3-2-19. Mycelial growth of *Lentinula edodes* and *Agaricus bisporus* on the different medium composition.



세 번째로 시행된 적정 제당부산물(생리활성물질)의 첨가 농도 선정을 위한 실험에서 대조구, 0ml, 0.5ml, 1ml, 1.5ml, 2ml로 농도를 달리하여 Table 3-2-17에서와 같이 배지를 제조하여 버섯균을 접종하여 실험을 실시하였다. 그 결과 C-3에서 표고버섯 (*Lentinula edodes*), 양송이버섯(*Agaricus bisporus*) 두 경우 모두 가장 높은 성장 밀도를 나타내었다. 따라서 본 연구의 수행결과 버섯생장영양제의 효능향상을 위한 formulation으로 최종적으로 glucose 2%, peptone 0.5% 첨가, 생리활성물질 1ml 첨가의 formulation을 완성하였다. 제당부산물인 (주)유림하이텍으로부터 제공받은 생리활성물질의 효능에 관해서는 성분분석을 통한 구체적인 실험이 더 필요하다고 생각되어진다.

sample	Mycelial density(7day)	
	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Agaricus bisporus</i>
A-3	+++	+++
B-3	+++	+++
C-3	+++++	+++++
D-3	+++++	+++++
E-3	+++	+++++

Table 3-2-20. Mycelial growth of *Lentinula edodes* and *Agaricus bisporus* on the different medium composition.

### 제 3 절 그린몰드의 생장억제를 나타내는 수목 추출물의 탐색 및 최적화

#### 1. 그린몰드의 수집 및 계대배양 기술 확립

##### 가. 그린몰드의 수집 및 계대배양

##### 1) 공시균주

연구에 사용된 그린몰드 균주는 Canada의 University of Guelph, Mushroom Lab. 으로부터 4종 (*Trichoderma aggressivum* UG 1565, *Trichoderma atroviride* UG 1550, *Trichoderma koningii* UG 2906, *Trichoderma viride* UG 2662), 한국생명공학연구원 유전자원센터 유전자은행(KCTC)로부터 1종(*Trichoderma harzianum* KCTC 6426)을 제공받아 공시균주로 사용하였다. 균주는 Malt agar (MA, Difco, France)배지에 접종하여 25℃ 배양기 내에서 지속적으로 계대배양하여 실험에 사용하였다.

Species	Species number	Origin
<i>Trichoderma aggressivum</i>	UG 1565	University of Guelph, Canada
<i>Trichoderma atroviride</i>	UG 1550	University of Guelph, Canada
<i>Trichoderma harzianum</i>	KCTC 6426	Korean Collection for Type Cultures
<i>Trichoderma koningii</i>	UG 2906	University of Guelph, Canada
<i>Trichoderma viride</i>	UG 2662	University of Guelph, Canada

Table 3-1-1. Species of *Trichoderma* spp. originated from Canada and Korea

수집된 균주는 MA (Malt Agar, Difco, France) 배지에 접종하여 25 ° C 배양기에서 3일간 배양 하였으며 지속적인 계대배양으로 균주를 확보하였다. *Trichoderma* 5종 균주는 MA배지에 접종 후 25 ° C에서 배양하였으며, 배양시간 경과에 따른 균사 성장 모양을 관찰하였다. 최종적으로 포자가 형성된 *Trichoderma* 5종 균주를 needle 을 이용하여 슬라이드글라스에 접촉시키고 염색시약 (Lactophenyl cotton blue)으로 염색하여 커버글라스를 덮은 후 *Trichoderma* 5종 균주의 형태를 관찰하였다.

*Trichoderma* 5종 균주 균주의 관찰 및 사진 촬영은 디지털이미지기록장치 (TDI 200, Janpan)가 장착된 광학현미경 (BX-51, Olympus, Japan)을 사용하여 400배 배율에서 포자 및 균사의 모양을 관찰하였다.

#### 나. 그린몰드의 육안적 성장형태

Fig. 3-3-1.에 *Trichoderma* spp. 5종 균주를 MA배지에 만연시킨 후 포자가 형성된 사진을 나타내었다. *Trichoderma* spp. 5종 균주의 균사생장은 3일 만에 직경 9cm의 petridish 전체에 만연되었으며, 포자는 3-4일후에 대부분 녹색으로 나타났고 균주의 종류에 따른 균사체 성장속도는 약간의 차이가 있었다.

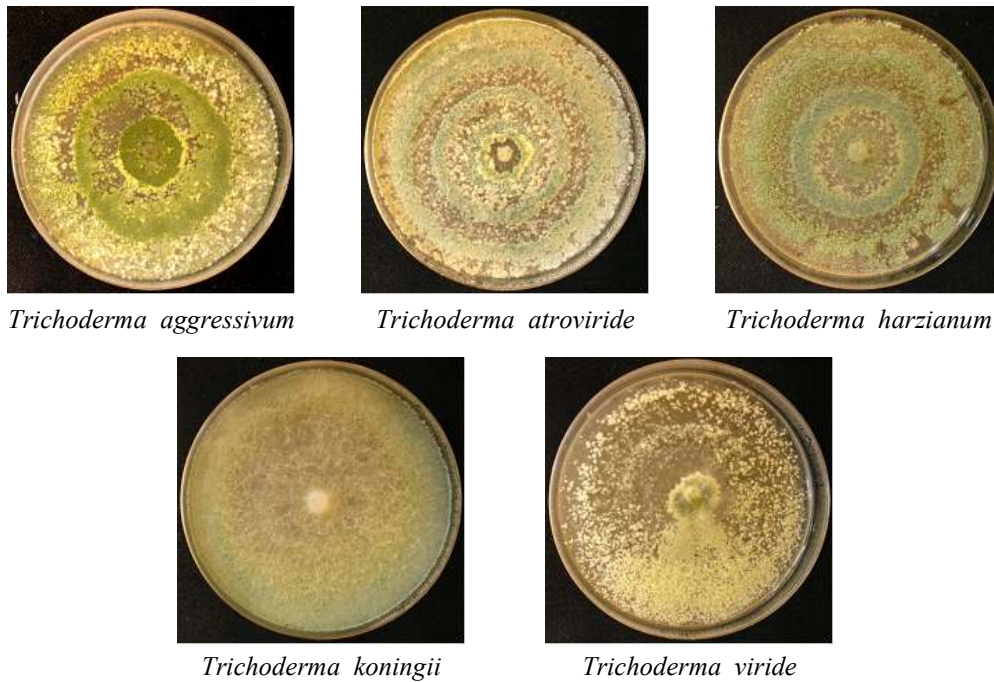


Fig. 3-3-1. Growth of *Trichoderma* spp. on the malt agar medium at 25°C.

Fig. 3-3-2는 *Trichoderma* spp. 5종의 포자와 균사체를 디지털이미지기록장치가 장착된 광학 현미경을 이용하여 400배의 배율에서 사진촬영 한 결과이다.

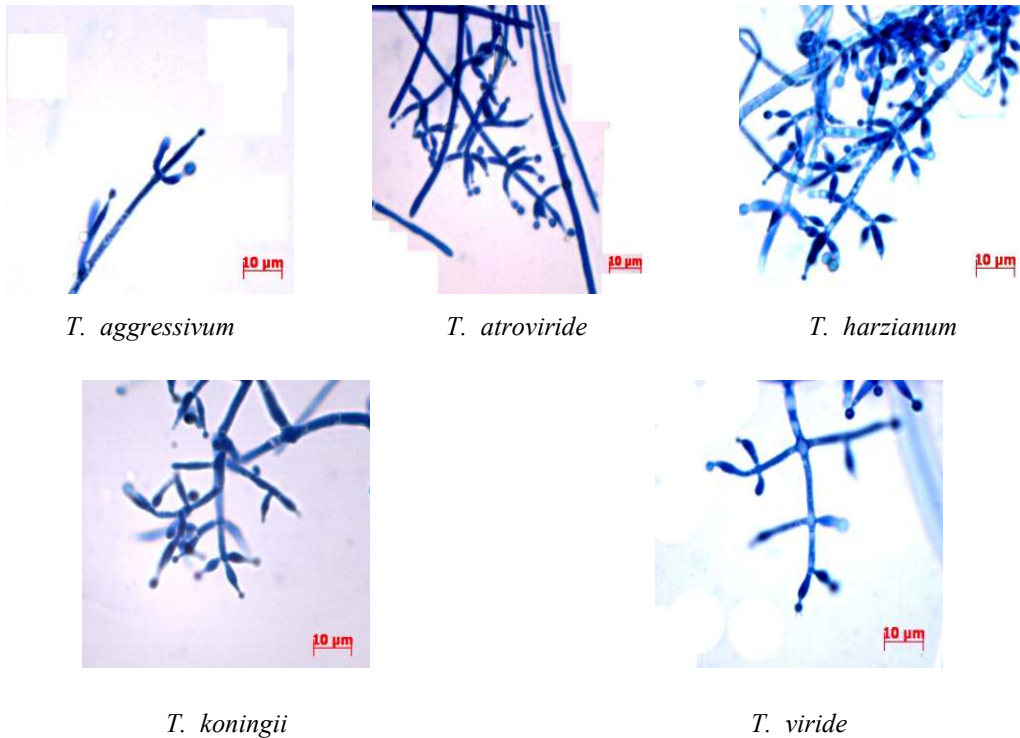


Fig. 3-3-2. *Trichoderma* spp. spore and mycelium by microscope ( $\times 400$ ).

*Trichoderma* spp. 5종의 포자와 균사체의 모양은 모두 거의 비슷하였지만, 포자의 형태가 부분적으로 다르게 나타났다. 포자의 형태에 의한 *Trichoderma*속의 종의 구분은 본 연구진의 수준에서는 어렵다고 판단되었으며 종의 구분은 University of Guelph(Canada)의 mushroom laboratory에서 동정, 확인받았다.

## 2. 그린몰드의 성장환경인자 탐색 및 확립

### 가. 재료 및 방법

#### 1) 공시균주

연구에 사용된 그린몰드 균주는 Canada의 University of Guelph, Mushroom Lab. 으로부터 4종(*Trichoderma aggressivum* UG 1565, *Trichoderma atroviride* UG 1550, *Trichoderma koningii* UG 2906, *Trichoderma viride* UG 2662), 한국생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행(KCTC)로부터 1종(*Trichoderma harzianum* KCTC 6426)을 제공받아 공시균주로 사용하였다.

균주는 Malt agar (MA, Difco, France)배지에 접종하여 25°C 배양기 내에서 지속적으로 계대배양하여 실험에 사용하였다.

## 2) 그린몰드 균주의 고체배지(MA배지)에 있어서 최적 배양온도 및 pH

고체배지에서 *Trichoderma* 5종 균주의 적정 배양 온도를 탐색하기 위하여 MA (Malt agar, Difco, France) 배지에 균주를 접종 후 배양 온도를 각각 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C로 설정하여 배양하였다. *Trichoderma* 5종 균주의 최적 성장 pH를 탐색하기 위하여 MA배지 멸균 후 2M의 NaOH와 2M의 HCl을 사용하여 배지를 pH 3.0, pH 5.0, pH 7.0, pH 9.0, pH 11.0로 조절한 후, 최적성장온도에서 배양하여 균사의 성장속도를 평가하였다. 이때 대조구로는 MA배지를 사용하였다.

## 3) 그린몰드 균주의 천연배지(벼집배지)에 있어서 최적 함수율 탐색

*T. aggressivum*, *T. atroviride*, *T. koningii*, *T. viride* 및 *T. harzianum* 균주는 MA배지(Malt agar, Difco, France)를 사용하여 25°C에서 계대배양된 것을 사용하였다.

실제로 농가에서 발생하는 *Trichoderma* 균주의 최적 환경을 찾고자 벼짚을 실온에서 건조한 다음 이를 Willey mill로 분쇄하여 55%, 65%, 75%의 함수율로 조절한 다음, 지름 90mm의 패트리디쉬에 첨가하여 가비중 38.9 g/cm<sup>3</sup>으로 조절한 다음, 멸균하여 공시균주를 접종 한 다음 25°C에서 성장시켰다. 조제된 배지에 계대배양된 *Trichoderma* 5종의 공시균주 pellet을 각각 접종하고 25°C에서 3일 - 8일간 배양한 다음 균총의 평균직경을 측정하였다.

## 4) 통계분석

통계분석을 위하여 각 계통의 5반복 값을 Micro office EXCEL을 이용하여 표준편차

를 나타내었으며, 각 실험 구 사이의 유의성은 SAS Corporate Statistics GLM의 Release 8.01을 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 Duncan의 multiple-range test로 분석하였다.

#### 나. 그린몰드의 성장환경인자

##### 1) 그린몰드의 최적 배양온도 및 pH

Fig 3-3-3은 *Trichoderma* spp. 5종 균주를 MA 배지에 접종한 다음, 배양온도를 각기 다르게 하여 3일간 배양하였을 때 균사생장 길이를 나타낸 결과이다.

*Trichoderma* 5종 균주의 배양온도를 각기 다르게 하여 성장시킨 결과 25℃에서 가장 높은 생장을 나타냈고 35℃에서는 균사생장이 거의 불가능하였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 *Trichoderma* 5종 균주는 15℃-30℃에서 생장 가능 하다고 판단된다.

*T. aggressivum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii* 및 *T. viride*는 25℃ 및 30℃에서 최적 균사 생장을 나타냈다. 특히 *T. koningii*는 25℃와 30℃에서의 균사생장은 유의성이 없었다. *T. viride*는 *Trichoderma* 5종 균주 중 가장 낮은 균사생장속도를 나타냈으며, 다른 4종 균주와 달리 30℃ 및 35℃에서 균사생장은 매우 낮게 나타났다.

*Trichoderma*의 온도에 따른 균사생장속도는 종에 관계없이 거의 비슷한 경향을 나타냈는데, 15℃부터 25℃까지는 생장속도가 증가하다가 30℃이후에서는 생장속도가 감소되었으며, 35℃에서는 *Trichoderma* spp. 5종 균주 모두 거의 생장하지 못하였다. 결과적으로 *Trichoderma* spp. 5종 균주의 최적생장온도는 25℃이며, 35℃부터는 생장이 어렵다는 사실을 알 수 있었다. 그러므로 *Trichoderma* 5종 균주의 최적배양 온도는 25℃로 판단되었다.

Fig. 3-3-4는 *Trichoderma* spp. 5종의 최적 생장 pH를 탐색하기 위하여, 각각 pH를 달리하는 MA배지에 균주를 접종한 다음 25℃의 온도에서 성장시킨 후 균사생장 길이를 측정된 결과이다. 이때 대조구로는 pH를 조절하지 않은 시판 MA배지를 사용하였다. *Trichoderma* spp. 5종은 그 종류에 관계없이 pH 5.0에서 가장 높은 균사생장 길이를 나타냈으며, 대조구와 거의 같은 생장속도를 나타냈다. pH 11.0의 배지에서는 균사생장이 거의 되지 않았으며, 이러한 결과는 향후 그린몰드의 방제를 위해서 pH를 조절하는 방법도 가능할 것으로 판단되었다.

Fig. 3-3-5은 pH 5.0에서 거의 완벽한 균사생장을 나타내는 *Trichoderma* spp.를 보여주고 있다. 결과적으로 *Trichoderma* spp. 균주 5종의 최적생장 pH는 5.0으로 판단되었고 pH 11이상에서는 거의 생장이 일어나지 않았다고 판단되었다.

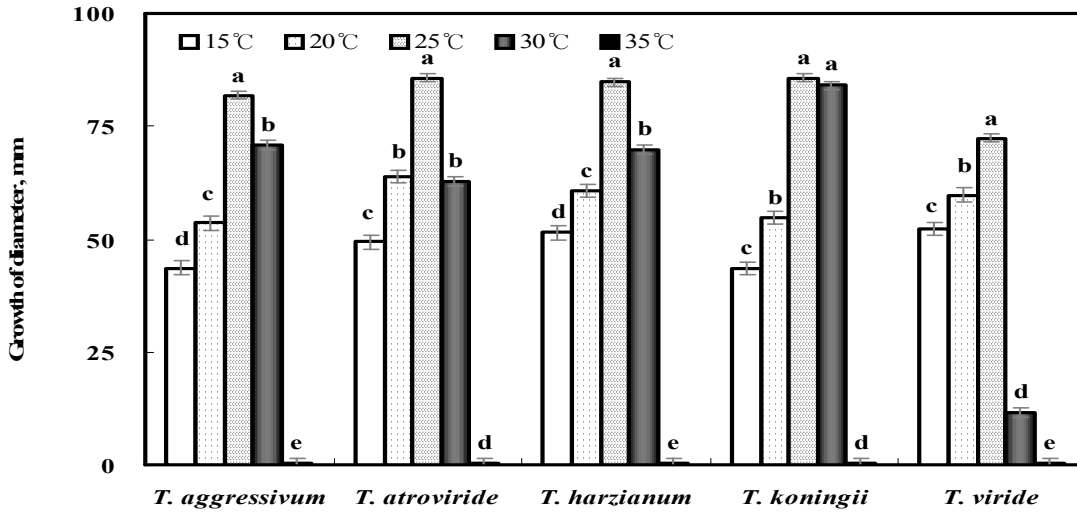


Fig. 3-3-3. Effect of growth temperature on mycelial growth of *Trichoderma* spp. for 3 days.

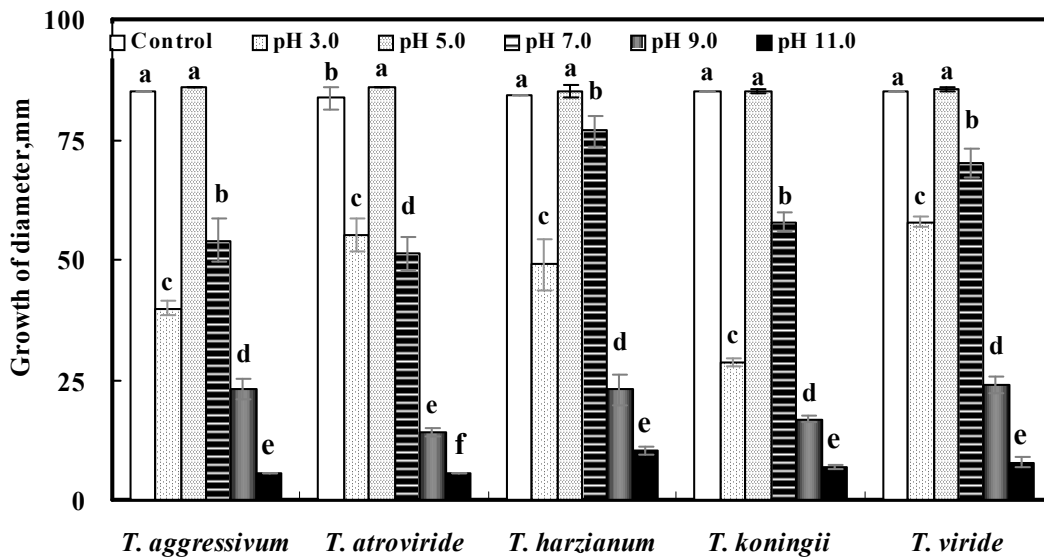


Fig. 3-3-4. Effect of pH on mycelial growth of *Trichoderma* spp. for 3 days.

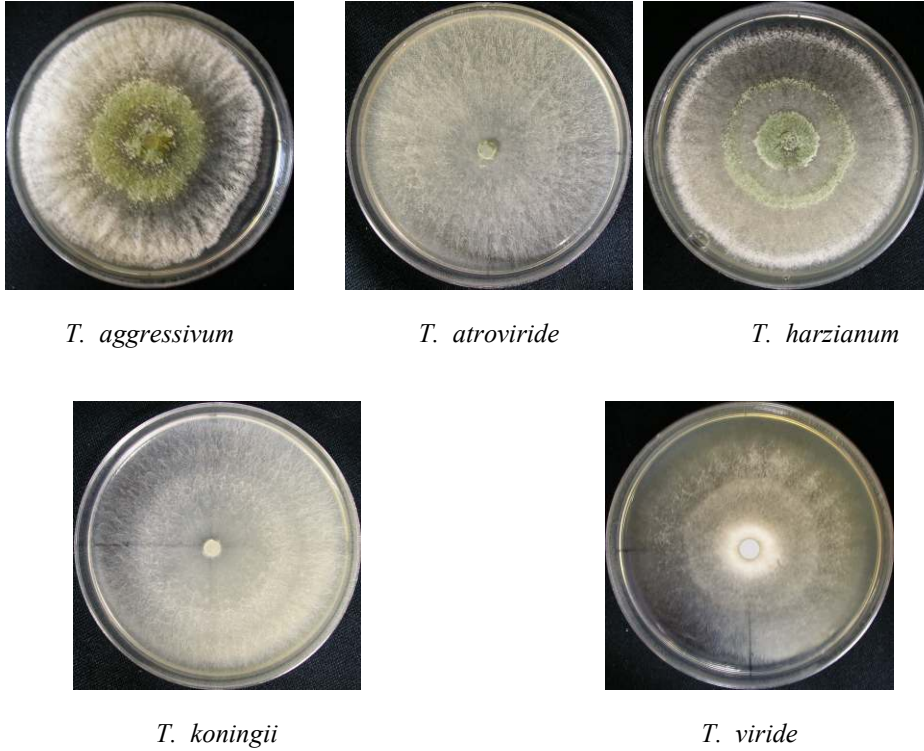


Fig. 3-3-5. Mycelial growth of *Trichoderma* spp. on the pH 5.0 medium.

2) 천연배지에 있어서 그린몰드 균주의 최적 함수율

Fig. 3-3-6은 함수율이 각기 다른 볏짚배지에서 *Trichoderma* 5종 균주의 성장을 나타낸 결과로, 대조구는 MA배지를 사용하였다. 75% 함수율에서 *Trichoderma* 5종 균주의 종류에 관계없이 균사생장이 가장 우수하였다. 이때 균사생장은 대조구인 MA배지와 거의 비슷한 성장을 나타냈다.

*T. aggressivum*과 *T. atroviride*는 함수율에 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며, *Trichoderma* spp. 5종 균주의 균사생장은 함수율의 차이에 따라서 5% 수준에서 유의성이 나타났다.

Fig. 3-3-7은 75% 함수율의 볏짚배지에서 성장되고 있는 *Trichoderma* 5종 균주의 사진으로 균주의 종류에 따라서 성장속도는 다르게 나타났다. 특히 *T. viride*는 다른 4종 균주에 비해 천연배지의 균사 성장 속도가 느리게 나타났다.



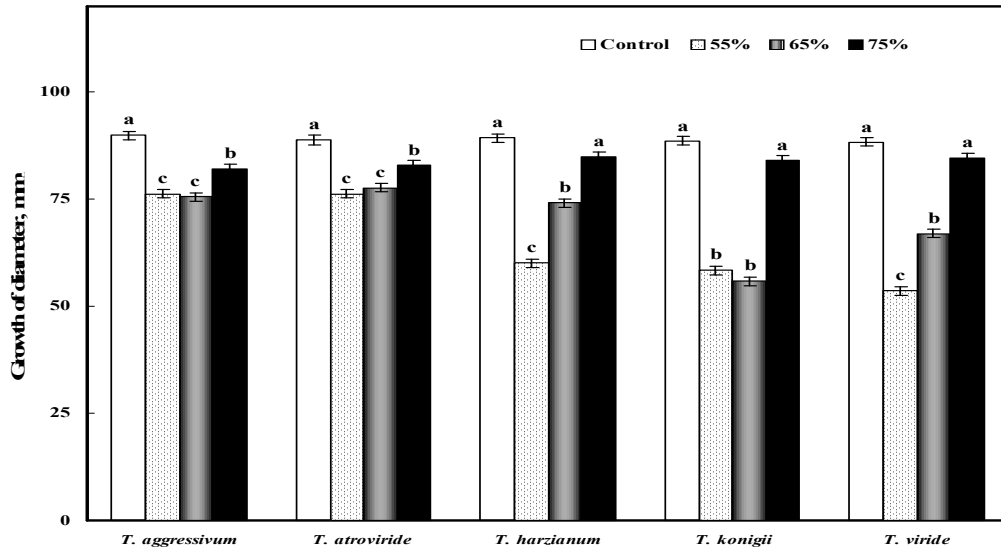


Fig. 3-3-6. Effect of moisture content on mycelial growth of *Trichoderma* spp. at natural medium.

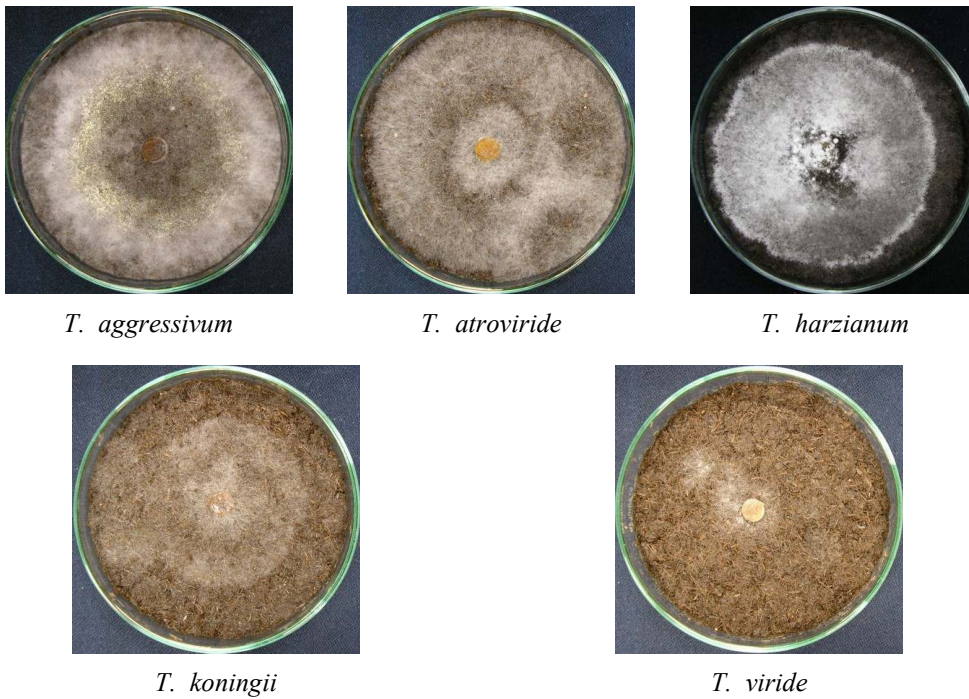


Fig. 3-3-7. Effect of moisture content on mycelial growth of *Trichoderma* spp. at natural medium with 75% moisture.

### 3. 수목의 잎으로부터 분리된 휘발성 화합물을 이용한 그린몰드의 성장 억제 연구

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 공시수종

수목의 잎으로부터 휘발성 화합물의 추출을 위하여 사용된 공시수종은 소나무 (*Pinus densiflora*)와 편백 (*Chamaecyparis obtusa*)으로 이들 수종의 잎은 경상대학교(경남 진주시 가좌동 소재)에서 채취하였다. 채취된 잎은 5℃에서 밀봉하여 보관한 다음 시료로 사용하였다.

##### 2) 수목의 잎으로부터 hydro-distillation법에 의한 화합물 분리

편백 잎 추출물은 생체상태의 편백 잎(전건중량 300g)을 정유추출기(K-22D-10L, Kashiwabara Engineering Co., Japan)에 투입하여 2시간동안 추출하여 수용성 정유를 분리, 수집 하였다(Fig. 3-3-8참조).

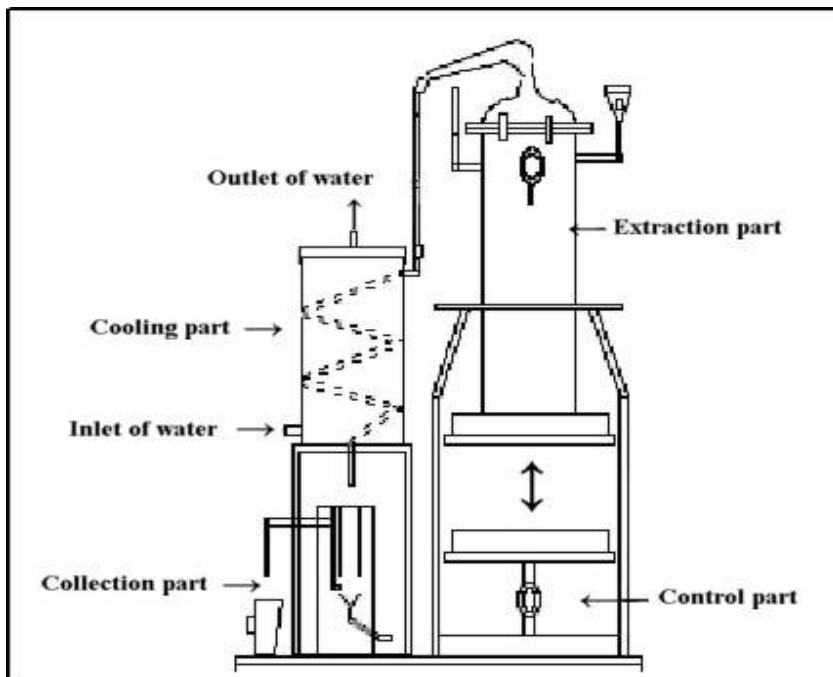


Fig. 3-3-8. Gas assisted process (GAP) used for the extraction of water soluble essential oil from leaves.

소나무 잎과 편백 잎 300g (전건 중량 기준)에 증류수 3L를 첨가하여 수용성 정유 2L를 획득하였으며(약 100분 소요), 이때 잎으로부터 획득된 수용성 정유의 수율은 식 1에 의거하여 계산하였다.

$$\frac{\text{추출전 잎의 전건 중량} - \text{추출후 잎의 전건 중량}}{\text{추출 전 잎의 전건 중량}} \times 100(\%) \dots \text{식 1}$$

### 3) 휘발성 화합물에 의한 그린몰드 성장 억제력 평가

소나무와 편백 잎으로부터 GAP 장치에 의해 획득된 수용성 정유는 멸균된 MA배지에 625ppm, 1250 ppm, 2500 ppm, 5000 ppm의 농도로 첨가하여 배지를 조제하였다. 수용성 정유가 첨가된 배지에 *Trichoderma* 5종 균주를 접종하고 25℃ 배양기에서 3일간 배양한 다음 균총의 직경(mm)을 측정하고 항균활성을 다음의 식 2에 의거하여 계산하였다. 이때 대조구는 추출물이 첨가되지 않은 MA배지를 사용하였다 (Fig. 3-3-9).

$$\text{항균활성}(\%) = 1 - [\text{처리구의 균총직경}(\text{mm}) / \text{대조구의 균총직경}(\text{mm})] \times 100 \dots \text{식 2}$$

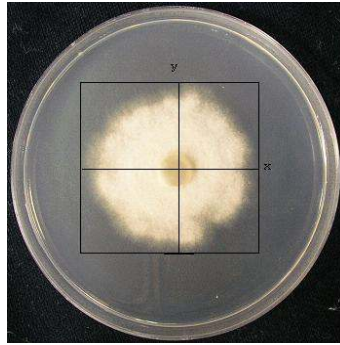


Fig. 3-3-9. Measurement method of mycelial growth for *Trichoderma* spp. on the malt agar

Note : Measurement of mycelial growth length of horizontal direction on the basis of inoculation surface (mm).

#### 4) 통계분석

통계분석을 위하여 각 계통의 5반복 값을 Micro office EXCEL을 이용하여 표준편차를 나타내었으며, 각 실험 구 사이의 유의성은 SAS Corporate Statistics GLM의 Release 8.01을 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 Duncan의 multiple-range test로 분석하였다.

#### 나. 수목의 잎으로부터 분리된 휘발성 화합물에 의한 그린몰드의 생장억제

##### 1) 수목의 잎으로부터 hydro-distillation법에 의한 화합물 분리

Table 3-3-2는 정유추출기에 의해 소나무와 편백나무 잎으로부터 추출된 수용성 정유의 수율을 나타낸 표이다.

소나무와 편백 잎으로부터 추출된 수용성 정유의 수율은 약 4% 이하 수준으로 큰 차이가 없었으며, 잎의 함수율도 거의 비슷한 수준이었고, 또한 최종적으로 획득된 정유의 증량은 약 570mg/L, 540 mg/L 였다.

Wood species	Moisture content of leaves, %*	Extraction yield, %*	Weight of extracts, mg/L
<i>Pinus densiflora</i>	62.3	3.9	570
<i>Chamaecyparis obtusa</i>	62.3	3.7	540

Table 3-3-2. Water soluble essential oil from leaves of *Pinus densiflora* and *Chamaecyparis obtusa* by the gas-assisted process

\* Based on the oven dry weight

## 2) 휘발성 화합물에 의한 그린몰드 성장 억제력

### 가) 소나무 수용성 정유의 항균활성

Fig. 3-3-10은 소나무 잎으로부터 획득된 수용성 정유가 *Trichoderma* 5종 균주의 군사생장에 미치는 영향을 나타낸 결과로, 이때 대조구로는 수용성 정유를 첨가하지 않은 MA배지를 사용하였다. 군사생장 저해효과는 1250 ppm부터 나타났다.

5000 ppm농도에서 *T. aggressivum*이 9.4%, *T. atroviride*가 7.2%, *T. harzianum*이 13.4%, *T. koningi*가 5.2%, *T. viride*가 1.0%의 군사 생장 저해 효과가 나타났다.

*Trichoderma* 5종 균주의 종류에 따라서 수용성 정유의 군사생장 저해효과 차이는 거의 없었다. 결과적으로 소나무 잎으로부터 획득된 수용성 정유는 *Trichoderma* 5종 균주의 군사생장억제 기능을 소유하지 못한다고 판단되었다.

Fig. 3-3-11부터 Fig. 3-3-15까지 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 소나무 잎으로부터 획득된 정유의 군사 생장억제 효과를 나타냈으며 *Trichoderma* 5종 균주는 육안적으로 약 2500 ppm 이상의 농도에서 약간의 생장저해 효과를 확인할 수 있었다.

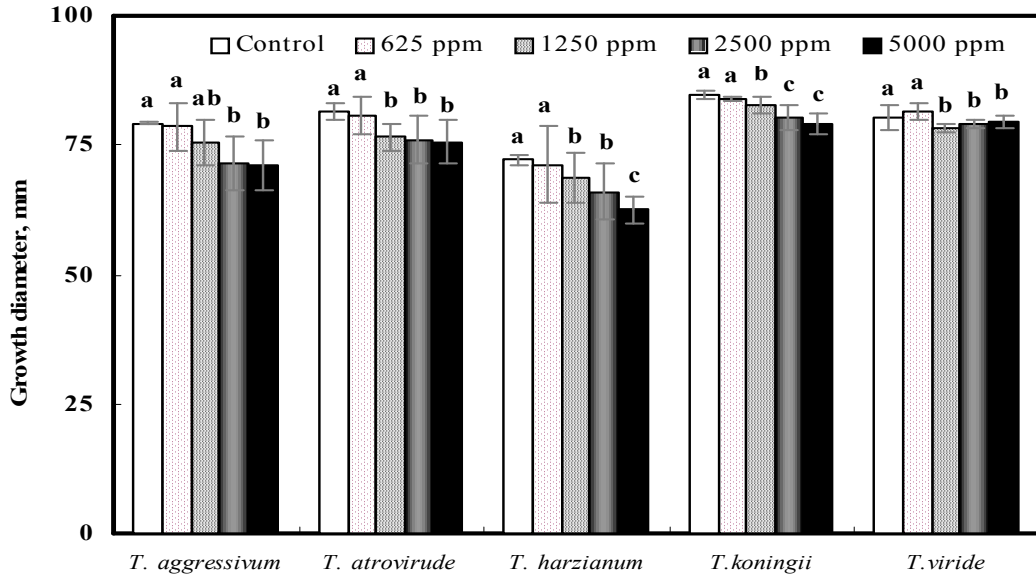


Fig. 3-3-10. Effect of *Pinus densiflora* water soluble essential oil on mycelial growth of *Trichoderma* spp.

Fig. 3-3-11과 3-3-12는 *T. aggressivum*과 *T. atroviride*에 대한 소나무 잎으로부터 획득된 수용성 정유의 성장저해효과를 나타냈다. *T. aggressivum*은 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 625ppm 이상의 농도에서 분명하게 구분할 수 있었고 균사의 성장 형태는 불규칙원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 625 ppm농도를 제외한 모든 농도에서 높게 나타났다. 또한 대조구에서는 포자가 형성되어 황녹색을 띠고 있었지만 수용성 정유가 첨가된 배지에서는 포자가 형성되지 않았다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 수용성 정유가 높은 균사생장억제 효과를 나타내지는 않았지만 포자 형성을 방지하는 데는 효과가 있다는 것을 추측할 수 있었다.

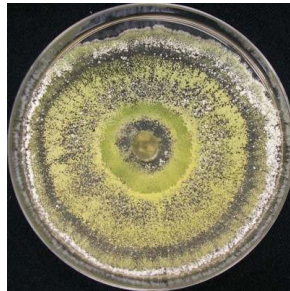
Fig. 3-3-12의 *T. atroviride*는 625 ppm에서 성장저지환이 확인 되었으며 균사의 성장 형태는 완만한 원형으로 성장하였다. 균사의 밀도는 모든 농도에서 균일하였다. 또한 *T. aggressivum*과 마찬가지로 대조구에서는 포자가 형성되어 녹색을 띠고 있었지만 수용성 정유가 첨가된 배지에서는 포자가 형성되지 않았다는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 3-3-13은 *T. harzianum*에 대한 소나무 잎의 수용성 정유에 대한 성장저해효과를 나타냈다. 대조구와 비교했을 때 모든 농도에서 균사생장저해를 육안으로 확인할 수 있었으며, 5000ppm 농도에서 균사밀도가 가장 높았다. 균사의 성장 형태는

불규칙 원형으로 성장하였으며 5000ppm 농도에서 초기에 접종된 pellet위로 균사가 성장하였다.

Fig. 3-3-14과 3-3-15는 *T. koningii*와 *T. viride*에 대한 소나무 잎으로부터 획득된 수용성 정유의 성장저해효과를 나타냈다. *T. koningii*는 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 모든 농도에서 확인하기 어려웠고, 균사의 성장 형태는 원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 5000 ppm 농도에서 높았다.

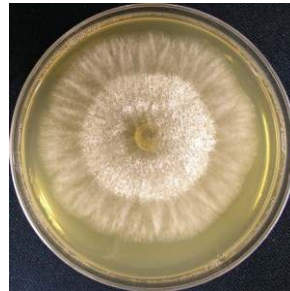
Fig. 3-3-15의 *T. viride*는 625 ppm에서 성장저지환이 확인 되었으며 균사의 성장 형태는 불규칙 원형으로 성장하였다. 균사의 밀도는 5000 ppm 농도에서 높았다. *T. viride*는 모든 농도에서 균사 밀도 및 균사성장 모양이 다르게 나타났다.



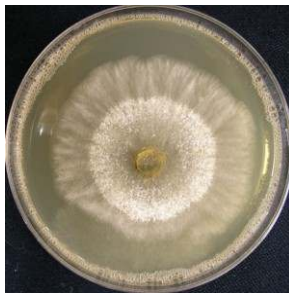
Control



625 ppm



1250 ppm



2500 ppm



5000 ppm

Fig. 3-3-11. Growth inhibition of *Pinus densiflora* water soluble essential oil on mycelial growth of *Trichoderma aggressivum*.



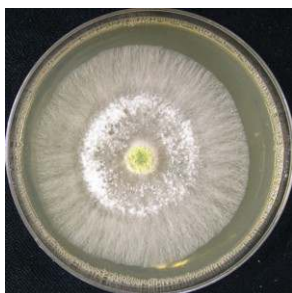
Control



625 ppm



1250 ppm



2500 ppm



5000 ppm

Fig. 3-3-12. Growth inhibition of *Pinus densiflora* water soluble essential oil on mycelial growth of *Trichoderma atroviride*.





Control



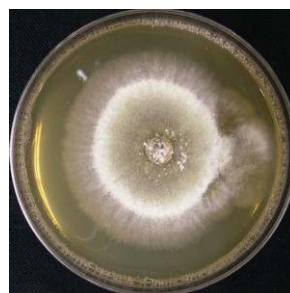
625 ppm



1250 ppm



2500 ppm



5000 ppm

Fig. 3-3-13. Growth inhibition of *Pinus densiflora* water soluble essential oil on mycelial growth of *Trichoderma harzianum*.



Control



625 ppm



1250 ppm

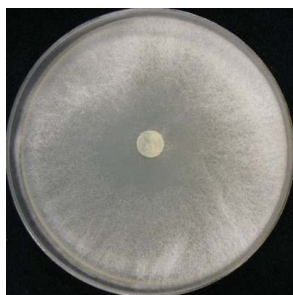


2500 ppm



5000 ppm

Fig. 3-3-14. Growth inhibition of *Pinus densiflora* water soluble essential oil on mycelial growth of *Trichoderma koningii*.



Control



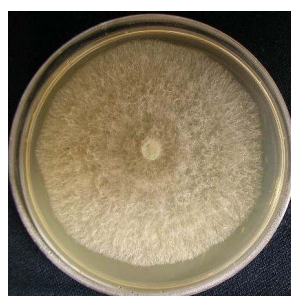
625 ppm



1250 ppm



2500 ppm



5000 ppm

Fig. 3-3-15. Growth inhibition of *Pinus densiflora* water soluble essential oil on mycelial growth of *Trichoderma viride*.

나) 편백 잎 수용성 정유의 항균활성

Fig. 3-3-16은 편백 잎으로부터 획득된 수용성 정유에 대한 *Trichoderma* 5종 균주의 성장억제 효과를 나타낸 결과로, 소나무 잎 정유와 마찬가지로 1250 ppm - 5000 ppm 수준에서 성장억제 효과가 나타났지만, 그 효과는 기대 이하였으며 유의성은 5% 수준에서 인정되었다. 편백 잎 정유에 의한 *Trichoderma* 5종 균주의 성장억제율은 대조구와 비교했을 때 5000 ppm 농도에서 *T. aggressivum* 13.4%, *T. atroviride* 8.1%, *T. harzianum* 8.1%, *T. koningii* 5.7% 및 *T. viride* 9.0%의 균사생장 저해 효과를 나타냈다. 종합적으로 수목의 잎으로부터 GAP 장치에 의해 획득된 수용성 정유는 *Trichoderma* 5종 균주 성장 억제 효과는 기대보다 못 미치는 약 10% 수준이었으며, 결과적으로 편백 잎 수용성 정유 단독으로는 *Trichoderma* 5종 균주 방제제의 개발은 어렵다고 판단되었다.

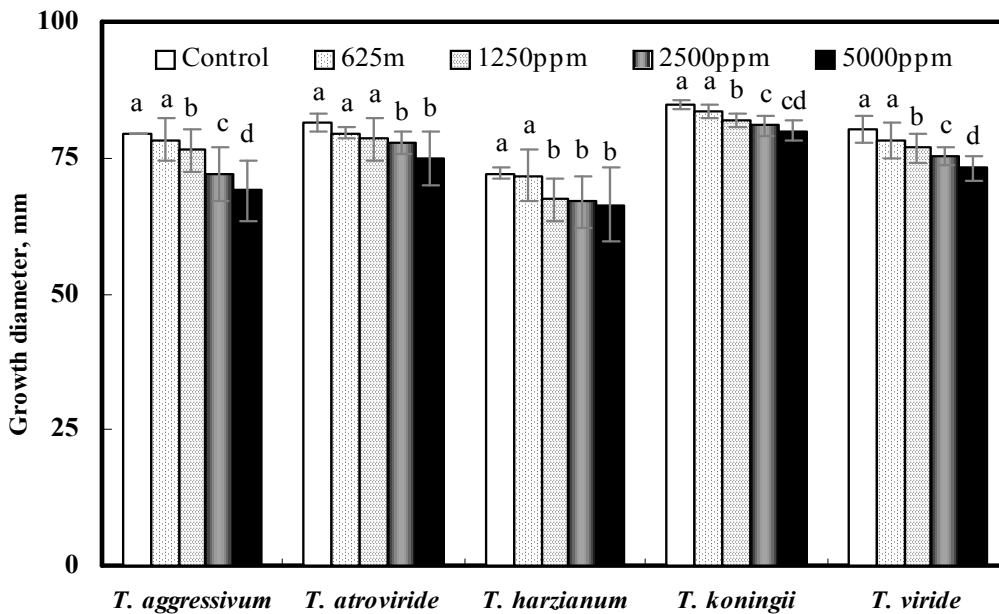


Fig. 3-3-16. Effect of *Chamaecyparis obtusa* water soluble essential oil on mycelial growth of *Trichoderma* spp.

Fig. 3-3-17과 3-3-18은 *T. aggressivum*과 *T. atroviride*에 대한 편백 잎으로부터 획득된 수용성 정유의 성장저해효과를 나타냈다. *T. aggressivum*은 대조구와

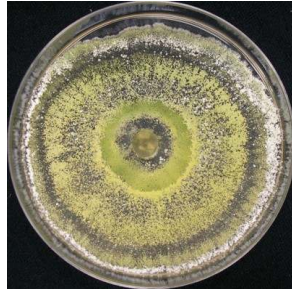
비교하였을 때 성장저지환은 625ppm부터 뚜렷하게 확인할 수 있었고 균사의 성장 형태는 불규칙원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 5000 ppm농도에서 가장 높았고, 대조구에서는 포자가 형성되었지만 수용성 정유가 첨가된 처리구에서는 포자가 형성되지 않았다. 이러한 결과는 수용성 정유가 포자형성을 저해하는 역할을 할 수 있다고 추측된다.

Fig. 3-3-18의 *T. atroviride*는 625 ppm에서 성장저지환이 확인 되었으며 균사의 성장형태는 불규칙 원형으로 성장하였다. 균사의 밀도는 5000 ppm농도에서 가장 높았다. 대조구에서 녹색의 포자가 형성되었지만 수용성 정유의 처리구에서는 포자가 형성되지 않았다.

Fig. 3-3-19는 *T. harzianum*에 대한 편백 잎의 수용성 정유의 성장저해효과를 나타냈다. 대조구와 비교했을 때 균사의 밀도가 높은 부분에서 원형의 형태로 나타났다. 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였으며 2500 ppm 및 5000 ppm 농도에서 pellet위로 균사가 성장하였다. *Trichoderma* 5종 균주 중 *T. harzianum*에서 편백 잎의 수용성 정유에 의한 항균활성이 가장 높았다.

Fig. 3-3-20과 3-3-21은 *T. koningii*와 *T. viride*에 대한 편백 잎으로부터 획득된 수용성 정유의 성장저해효과를 나타냈다. *T. koningii*는 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 모든 농도에서 확인하기 어려웠고 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 모든 농도에서 일정하였다.

Fig. 3-3-21의 *T. viride*는 625 ppm에서 성장저지환이 미약하게 확인 되었으며 5000 ppm에서 확실히 나타났다. 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 5000 ppm 농도에서 가장 높았다.



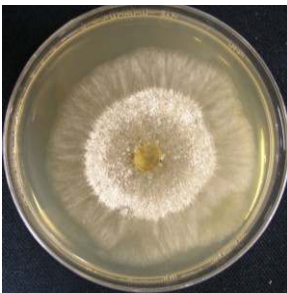
Control



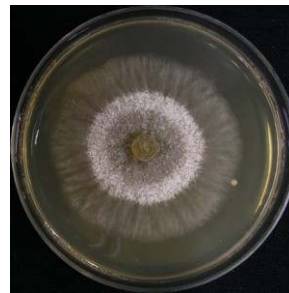
625 ppm



1250 ppm



2500 ppm

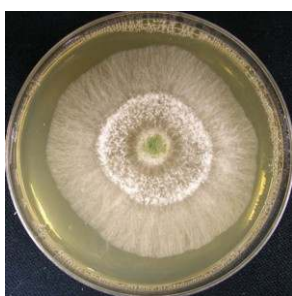


5000 ppm

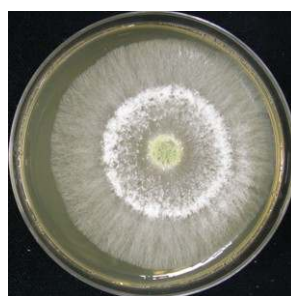
Fig. 3-3-17. Growth inhibition of *Chamaecyparis obtusa* water soluble essential oil extracts on mycelial growth of *Trichoderma aggressivum*.



Control



625 ppm



1250 ppm



2500 ppm



5000 ppm

Fig. 3-3-18. Growth inhibition of *Chamaecyparis obtusa* water soluble essential oil extracts on mycelial growth of *Trichoderma atroviride*.



Control



625 ppm



1250 ppm



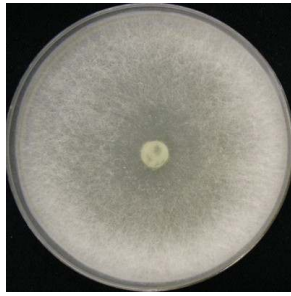
2500 ppm



5000 ppm

Fig. 3-3-19. Growth inhibition of *Chamaecyparis obtusa* water soluble essential oil extracts on mycelial growth of *Trichoderma harzianum*.





Control



625 ppm



1250 ppm



2500 ppm

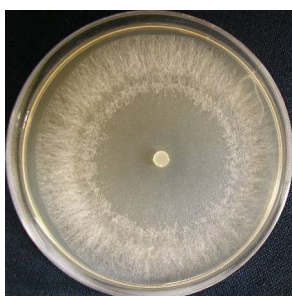


5000 ppm

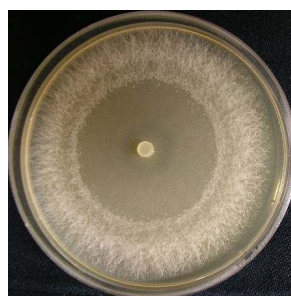
Fig. 3-3-20. Growth inhibition of *Chamaecyparis obtusa* water soluble essential oil extracts on mycelial growth of *Trichoderma koningii*.



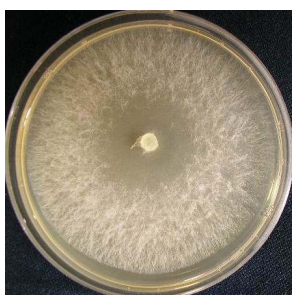
Control



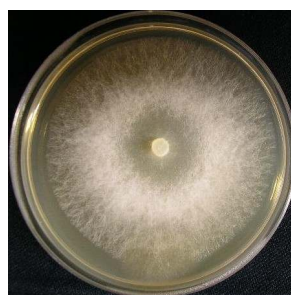
625 ppm



1250 ppm



2500 ppm



5000 ppm

Fig. 3-3-21. Growth inhibition of *Chamaecyparis obtusa* water soluble essential oil extracts on mycelial growth of *Trichoderma viride*.

#### 4. 목부로부터 그린몰드의 생장 억제 화합물의 분리법 연구

##### 가. 재료 및 방법

###### 1) 공시균주

연구에 사용된 그린몰드 균주는 Canada의 University of Guelph, Mushroom Lab. 으로부터 4종(*Trichoderma aggressivum* UG 1565, *Trichoderma atroviride* UG 1550, *Trichoderma koningii* UG 2906, *Trichoderma viride* UG 2662), 한국생명공학연구소 유전자원센터 유전자 은행(KCTC)로부터 1종(*Trichoderma harzianum* KCTC 6426)을 제공받아 공시균주로 사용하였다.

균주는 Malt agar (MA, Difco, France)배지에 접종하여 25℃ 배양기 내에서 지속적으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

###### 2) 목부로부터 열수추출물의 획득

공시수종 톱밥은 20 mesh pass 80 mesh on 부분의 톱밥만을 선별하여 추출에 사용하였다. 추출은 250 g(기건중량)의 톱밥과 증류수 1.5 L를 플라스크에 투입한 다음, 100 °C (heating mantle 사용), 121 °C (autoclave 사용)에서 각각 1시간, 3시간 추출하였다. 추출 후 filter paper No. 2 (Whatman, England)로 여과하여 50 °C에서 농축 후 동결 건조하여 열수추출물 분말을 조제하였다.

###### 3) 그린몰드에 대한 추출물의 항균활성

낙엽송 및 미송 열수추출물은 MA(Malt agar, Difco, France)배지에 1000 ppm 농도로 혼합하였다. 낙엽송 및 미송 열수 추출물이 1000 ppm으로 첨가된 MA배지에 계대 배양된 *Trichoderma* spp. 5종 균주를 각각 접종 한 다음 25 °C에서 3-4일간 성장시킨 후 최적 추출 처리조건을 확립하였다.

낙엽송과 미송 톱밥이 *Trichoderma* 5종 균주에 대하여 가장 강한 균사생장 저해력을 나타낸다고 판단되는 최적 추출 처리조건으로 추출물을 획득한 다음, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm 농도로 MA배지에 첨가하여 *Trichoderma* 5종 균주를 접종하고 25℃ 배양기에서 3일간 배양한 다음 균총의 직경(mm)을 측정하고 항균활성을 식 2에 의거하여 계산하였다. 이때 대조구는 추출물이 첨가되지 않

은 MA배지를 사용하였다

#### 4) Partition extraction에 의한 그린몰드 생장억제 화합물 그룹 분리

##### 가) Partition extraction에 의한 화합물 그룹 분리

동결 건조된 열수 추출물 분말 1 g을 증류수 25 ml에 용해한 다음 300 ml의 *n*-hexane, methylene chloride, ethyl acetate를 각각 순서대로 투입하여 각각의 용해부를 획득하였다. *n*-Hexane, methylene chloride, ethyl acetate 용해부는 감압 농축 건조하여 수율을 측정하였다. 이때 수율은 전건중량 1 g의 열수추출물을 기준으로 하였다.

##### 나) Partition extraction에 의해 분리된 화합물 그룹의 항균활성

분리된 화합물의 항균활성은 *n*-hexane, methylene chloride, ethyl acetate 용해부를 MA(Malt agar, Difco, France)배지에 1000 ppm 농도로 혼합한 다음 *Trichoderma* 5종 균주를 각각 접종하고 25℃ 배양기에서 3일간 배양한 다음 균총의 직경(mm)을 측정하고 항균활성을 식 2에 의거하여 계산하였다. 이때 대조구는 추출물이 첨가되지 않은 MA배지를 사용하였다

#### 5) 통계분석

통계분석을 위하여 각 계통의 5반복 값을 Micro office EXCEL을 이용하여 표준편차를 나타내었으며, 각 실험 구 사이의 유의성은 SAS Corporate Statistics GLM의 Release 8.01을 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 Duncan의 multiple-range test로 분석하였다.

#### 나. 그린몰드에 대한 추출물의 항균활성

##### 1) 낙엽송 추출물의 항균활성

낙엽송 톱밥으로부터 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 생장억제 화합물의 최적 추출 조건을 결정하기 위하여 각기 다른 추출조건에서 획득된 추출물을 *Trichoderma* 5종

균주 생장에 적용한 다음 균사생장 길이 및 균사생장 저해력을 Table 3-3-3과 Fig 3-3-22에 나타냈다.

Extracts	Fungal growth (mm)				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
Control*	85.6 ± 0.1a**	85.6 ± 0.2a	85.6 ± 0.1a	85.6 ± 0.1a	85.7 ± 0.1a
100°C, 1hr.	68.2 ± 2.3b	71.1 ± 4.4c	73.7 ± 1.3e	85.6 ± 0.1a	71.9 ± 1.3b
100°C, 3hrs.	69.0 ± 3.7b	73.6 ± 3.6c	75.4 ± 0.9d	84.7 ± 1.9a	72.6 ± 2.1b
121°C, 1hr.	67.9 ± 3.0b	72.9 ± 4.2c	79.5 ± 1.8c	85.3 ± 0.9a	72.3 ± 1.7b
121°C, 3hrs.	85.7 ± 0.2a	77.3 ± 3.1b	83.2 ± 2.1b	85.6 ± 0.2a	74.6 ± 7.4b

Table 3-3-3. Effect of hot water extracts of *Larix leptolepis* on mycelial growth of *Trichoderma* spp.

\* MA (Malt agar) medium used for fungal growth.

\*\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different ( $P < 0.05$ ) according to Duncan's new multiple-range test ( $n=5$ )

Table 3-3-3 과 Fig. 3-3-22에서 낙엽송 열수추출물은 *T. aggressivum*의 생장을 약 20% 저해할 수 있었으며, 121°C, 3시간 추출물은 생장저해 효과가 나타나지 않았다. *T. atroviride*, *T. harzianum* 및 *T. viride*에서는 100°C, 1시간 추출물이 공통적으로 높게 나타났으며, *T. koningii*는 추출물에 의한 생장저해 효과는 일어나지 않았다. 121°C, 1시간 추출물이 121°C, 3시간 추출물보다 모든 *Trichoderma* 5종 균주에서 높은 생장 저해력을 나타냈으며, 이는 *Trichoderma* 5종 균주에 대하여 생장억제를 나타내는 화합물이 고온에서 장시간 반응할 경우 분해되거나 변질된다는 사실을 추측할 수 있었다. 전체적으로 *T. koningii*를 제외한 나머지 *Trichoderma* 5종 균주에서 낙엽송 추출물은 약 15-20% 수준의 생장 저해력을 나타냈다.

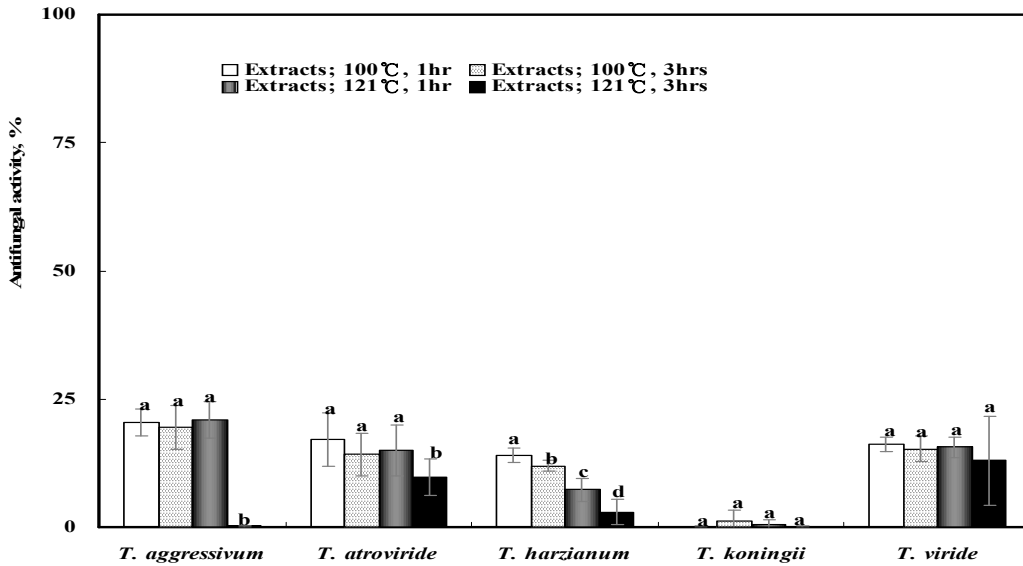


Fig. 3-3-22. Antifungal activity of *Larix leptolepis* hot water extracts (1000 ppm) against *Trichoderma* spp.

Fig. 3-3-23 ~ Fig. 3-3-27은 각 추출조건에 따라 획득된 추출물을 *Trichoderma* 5종 균주에 적용시켰을 때 균사생장을 나타낸 사진이다.

Fig. 3-3-23과 3-3-24는 *T. aggressivum*과 *T. atroviride*에 대한 낙엽송 열수 추출물의 성장저해효과로 *T. aggressivum*은 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 100°C, 1시간과 100°C, 3시간 및 121°C 1시간 추출조건에서 나타났으며 균사의 성장형태는 불규칙원형으로 성장하였다. 121°C, 3시간 추출조건에서는 대조구와 비교했을 때 성장저해효과가 나타나지 않았다.

Fig. 3-3-24의 *T. atroviride*는 100°C, 1시간, 100°C, 3시간 및 121°C, 1시간 추출조건에서 성장저지환이 나타났으며 균사의 성장형태는 완만한 원형으로 성장하였다. 균사의 밀도는 모든 농도에서 균일하였다.

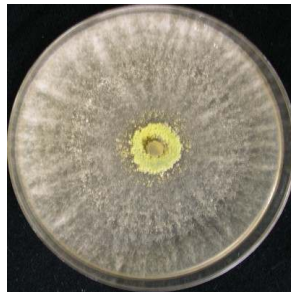
Fig. 3-3-25는 *T. harzianum*에 대한 낙엽송의 열수추출물의 성장저해효과를 나타냈다. 대조구와 비교했을 때 모든 추출조건에서 성장저지환이 나타났으며 균사밀도도 추출조건에 상관없이 일정하게 나타났다. 100°C, 1시간 추출조건에서 가장 높은 성장저해효과를 나타냈다.

Fig. 3-3-26과 3-3-27은 *T. koningii*와 *T. viride*에 대한 낙엽송으로부터 획득된 열수추출물의 성장저해 효과를 나타냈다. *T. koningii*는 대조구와 비교하였을 때

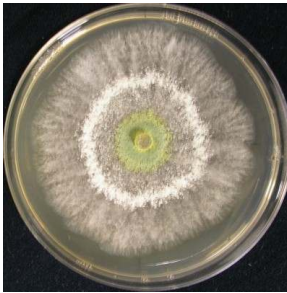
생장저지환은 모든 추출조건에서 확인하기 어려웠고 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 모든 추출조건에서 일정하였다.

Fig. 3-3-27의 *T. viride*는 100℃, 1시간, 100℃, 3시간 및 121℃, 1시간 추출조건에서 성장 저지환이 나타났으며 균사의 성장형태는 완만한 원형으로 성장하였다. 균사의 밀도는 100℃, 1시간 추출 조건에서 가장 높았으며 pellet위로 균사가 성장하였다.

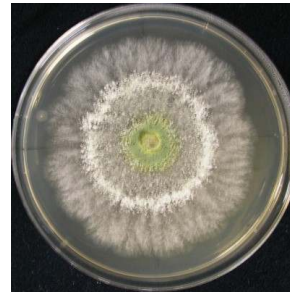
*T. koningii*를 제외한 *Trichoderma* 4종 균주에 대하여 낙엽송의 열수추출물은 100℃, 1시간 추출조건에서 가장 높은 성장저해효과를 나타냈다. 이때 균사생장저해수준은 15 - 20% 였다.



Control



100°C, 1hr.



100°C, 3hrs.



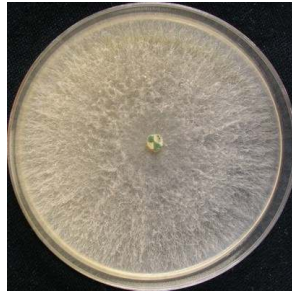
121°C, 1hr.



121°C, 3hrs.

Fig. 3-3-23. Growth inhibition of *Larix leptolepis* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma aggressivum*.

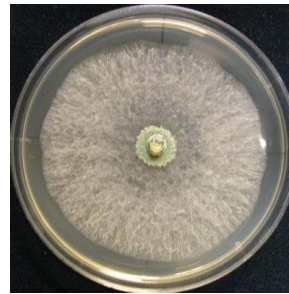




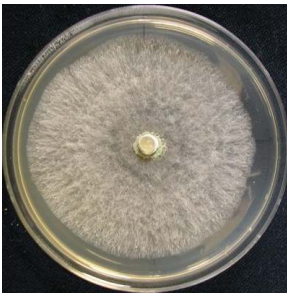
Control



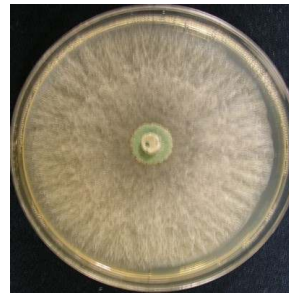
100°C, 1hr.



100°C, 3hrs.



121°C, 1hr.



121°C, 3hrs.

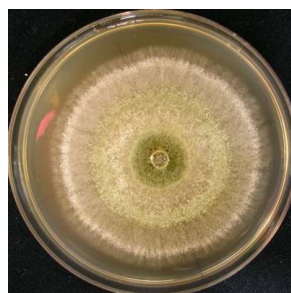
Fig. 3-3-24. Growth inhibition of *Larix leptolepis* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma atroviride*.



Control



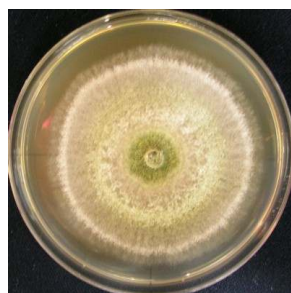
100°C, 1hr.



100°C, 3hrs.

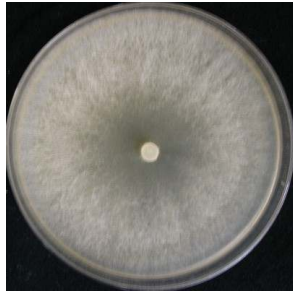


121°C, 1hr.



121°C, 3hrs.

Fig. 3-3-25. Growth inhibition of *Larix leptolepis* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma harzianum*.



Control



100°C, 1hr.



100°C, 3hrs.



121°C, 1hr.

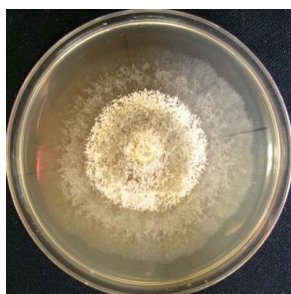


121°C, 3hrs.

Fig. 3-3-26. Growth inhibition of *Larix leptolepis* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma koningii*.



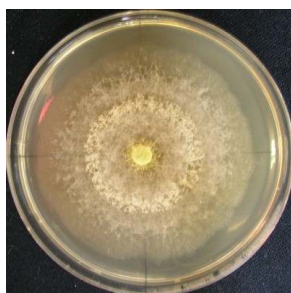
Control



100°C, 1hr.



100°C, 3hrs.



121°C, 1hr.



121°C, 3hrs.

Fig. 3-3-27. Growth inhibition of *Larix leptolepis* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma viride*.

2) 미송 추출물의 항균활성

Table 3-3-4는 미송 톱밥의 추출조건에 따라 획득된 추출물을 MA배지에 1000 ppm의 농도로 투입한 다음 *Trichoderma* 5종 균주를 접종했을 때 균사의 성장 길이를 나타낸 결과이다.

Dose level (ppm/plate*)	Fungal growth (mm)				
	Strain				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
Control*	85.6 ± 0.1a**	85.6 ± 0.2a	85.6 ± 0.1a	85.6 ± 0.1a	85.7 ± 0.1a
100°C, 1hr.	33.2 ± 0.8d	51.5 ± 2.8d	46.1 ± 1.6c	58.4 ± 2.2c	44.1 ± 1.6e
100°C, 3hrs.	34.0 ± 1.5d	45.5 ± 3.0e	40.9 ± 1.2e	54.6 ± 2.4d	46.2 ± 2.0d
121°C, 1hr.	35.7 ± 1.7c	64.2 ± 3.0c	44.9 ± 1.0d	59.8 ± 2.9c	49.8 ± 2.0c
121°C, 3hrs.	53.4 ± 2.0b	68.2 ± 4.9b	61.5 ± 1.2b	72.5 ± 1.5b	56.6 ± 1.5b

Table 3-3-4. Effect of *Pseudotsuga menziesii* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma* spp.

\* MA (Malt agar) medium used for fungal growth.

\*\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different ( $P < 0.05$ ) according to Duncan's new multiple-range test ( $n=5$ ).

Table 3-3-4와 Fig. 3-3-28은 미송 추출물의 추출조건에 따른 *Trichoderma* 5종 균주의 균사생장 저해 결과를 나타냈으며, 전체적으로 Fig. 3-3-22의 낙엽송 추출물에 비해 균사생장 저해력이 높게 나타났다. *Trichoderma* 5종 균주에 대하여 강한 성장저해력을 가지는 미송 톱밥의 추출조건은 100°C, 1시간 또는 3시간 처리

였으며, *Trichoderma* 5종 균주의 종류에 관계없이 거의 유사한 경향을 나타냈다. 특히 미송 추출물은 다른 균주에 비해 *T. aggressivum*에서 가장 높은 저해력을 나타냈다.

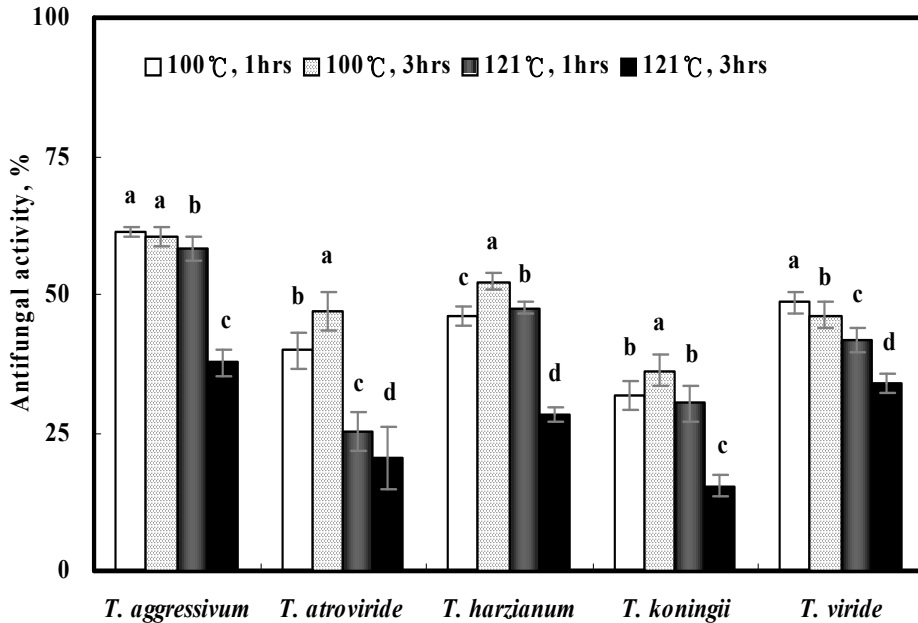


Fig. 3-3-28. Antifungal activity of *Pseudotsuga menziesii* hot water extracts (1000 ppm) against *Trichoderma* spp.

Fig. 3-3-29 ~ Fig. 3-3-33은 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 미송톱밥 추출물의 균사생장저해를 나타낸 사진이다.

Fig. 3-3-29와 3-3-30은 *T. aggressivum*과 *T. atroviride*에 대한 미송으로부터 획득된 열수추출물의 성장저해효과를 나타냈다. *T. aggressivum*은 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 모든 추출조건에서 분명하게 나타났으며 균사의 성장형태는 불규칙원형으로 성장하였다. 이때 균사의 성장저해효과는 100°C, 1시간이 다른 조건에 비해 높게 나타났다.

Fig. 3-3-30의 *T. atroviride*는 모든 추출조건에서 성장저지환이 나타났으며 균사의 성장형태는 불규칙원형으로 성장하였다. 균사의 밀도는 모든 농도에서 균일하였

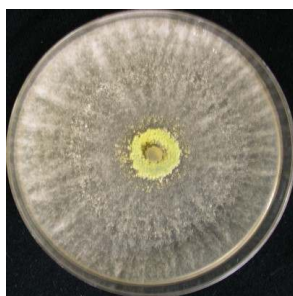
고 모든 농도에서 pellet위로 균사가 성장하였다. 균사성장저해효과는 100℃ 1시간과 100℃ 3시간 처리조건이 다른 추출조건들에 비해 높게 나타났다.

Fig. 3-3-31은 *T. harzianum*에 대한 미송톱밥 추출물의 성장저해효과를 나타냈다. 대조구와 비교했을 때 모든 추출조건에서 성장저지환이 분명하게 나타났으며 100℃, 1시간, 100℃, 3시간 및 121℃, 1시간 추출조건에서 높은 균사성장저해효과를 나타냈으며 균사의 성장형태는 원형이었다.

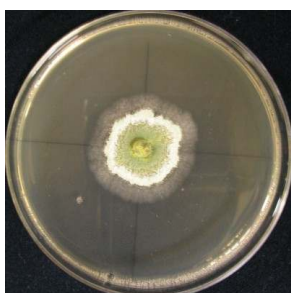
Fig. 3-3-32와 3-3-33은 *T. koningii*와 *T. viride*에 대한 미송으로부터 획득된 열수추출물의 성장저해효과를 나타낸 사진으로 *T. koningii*는 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 모든 처리 조건에서 나타났고, 100℃, 1시간, 100℃, 3시간 및 121℃, 1시간 추출조건에서 높은 균사성장저해 효과를 나타냈으며 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였다.

Fig. 3-3-33의 *T. viride*는 모든 추출조건에서 성장저지환이 분명하게 나타났으며 균사의 성장형태는 불규칙 원형으로 성장하였다. 균사성장저해 정도는 100℃, 1시간, 100℃, 3시간 및 121℃, 1시간 추출조건에서 높았다.

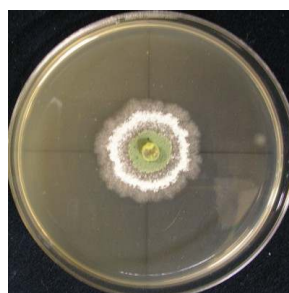
*Trichoderma* 5종 균주에 대하여 낙엽송 추출물은 최고 20%의 항균활성을 나타냈지만, 미송추출물은 최고 61%의 항균활성을 나타낸 것으로 보아 미송추출물이 보다 효과적이라고 판단된다. 미송추출물은 전반적으로 121℃ 보다 100℃ 추출조건이 좋았고 그중 3시간 추출조건이 1시간 추출조건보다 우수하였다.



Control



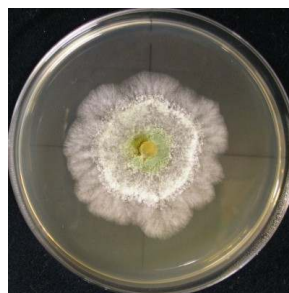
100°C, 1hr.



100°C, 3hrs.



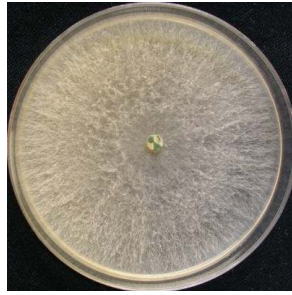
121°C, 1hr.



121°C, 3hrs.

Fig. 3-3-29. Growth inhibition of *Pseudotsuga menziesii* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma aggressivum*.





Control



100°C, 1hr.



100°C, 3hrs.



121°C, 1hr.



121°C, 3hrs.

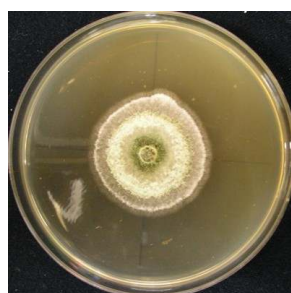
Fig. 3-3-30. Growth inhibition of *Pseudotsuga menziesii* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma atroviride*.



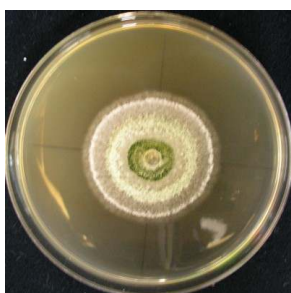
Control



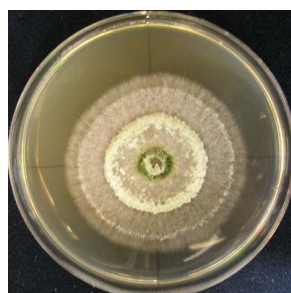
100°C, 1hr.



100°C, 3hrs.



121°C, 1hr.



121°C, 3hrs.

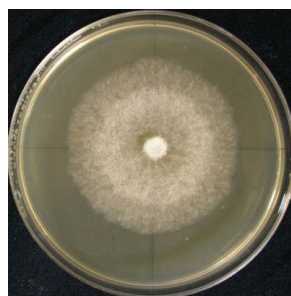
Fig. 3-3-31. Growth inhibition of *Pseudotsuga menziesii* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma harzianum*.



Control



100°C, 1hr.



100°C, 3hrs.



121°C, 1hr.

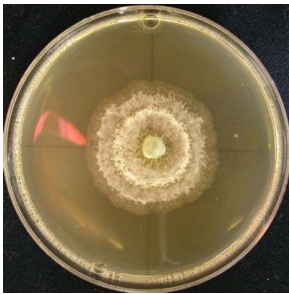


121°C, 3hrs.

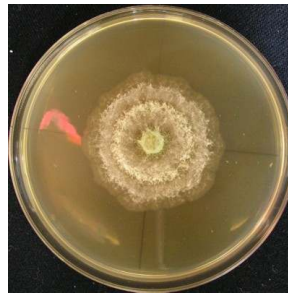
Fig. 3-3-32. Growth inhibition of *Pseudotsuga menziesii* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma koningii*.



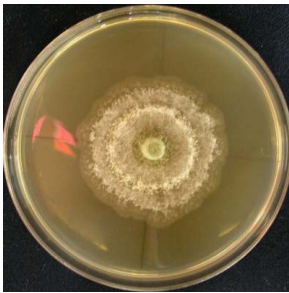
Control



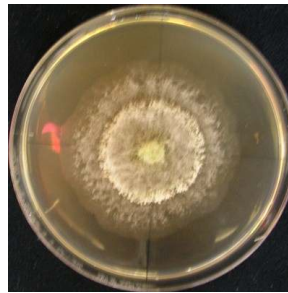
100°C, 1hr.



100°C, 3hrs.



121°C, 1hr.



121°C, 3hrs.

Fig. 3-3-33. Growth inhibition of *Pseudotsuga menziesii* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma viride*.

### 3) 최적 추출조건에 의한 낙엽송 추출물의 항균활성

Table 3-3-5는 낙엽송 톱밥을 100℃, 3시간 추출하여 *Trichoderma* spp. 5종의 균사생장저해 효과를 나타낸 결과로 추출물의 농도 변화와 균사생장 길이는 5% 수준에서 유의성이 인정되었다. 대조구와 비교했을 때 1000 ppm과 500 ppm에서는 균사생장 저해효과가 나타났다. 그러나 항균활성 수준은 약 15% 이하로 그 효과가 낮았다.

Fig. 3-3-34는 추출물 농도별 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 항균활성을 나타낸 결과로 추출물 농도에 따른 항균활성은 5% 수준에서 유의성이 나타났다. 하지만 항균활성은 매우 낮아 단독 제제로서는 원료로서 의미가 적었다.

Fig. 3-3-35 ~ Fig. 3-3-39는 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 낙엽송 톱밥 추출물의 농도에 따른 균사생장저해를 나타낸 사진이다.

Fig. 3-3-35와 3-3-36은 *T. aggressivum*과 *T. atroviride*에 대한 낙엽송 열수 추출물의 생장저해효과를 나타낸 사진이다. *T. aggressivum*은 대조구와 비교하였을 때 생장저지환은 500 ppm 및 1000ppm에서 확인할 수 있었고 균사의 생장형태는 불규칙원형이었으며 균사의 밀도는 1000 ppm농도에서 가장 높았다.

Fig. 3-3-36의 *T. atroviride*는 모든 농도에서 생장저지환을 확인할 수 없었으며 균사의 밀도는 모든 농도에서 균일하였다.

Fig. 3-3-37은 *T. harzianum*에 대한 낙엽송 열수추출물의 생장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교했을 때 125 ppm에서 1000 ppm까지 생장저지환을 확인할 수 있었으며 균사의 생장 형태는 원형이었다.

Fig. 3-3-38과 3-3-39는 *T. koningii*와 *T. viride*에 대한 낙엽송 열수추출물의 생장저해효과를 나타낸 사진이다. *T. koningii*는 대조구와 비교하였을 때 생장저지환은 모든 농도에서 확인하기 어려웠다.

Fig. 3-3-39의 *T. viride*는 125 ppm에서 1000 ppm 까지 생장저지환이 확인 되었으며 균사의 생장 형태는 불규칙원형으로 생장하였다. 균사의 밀도는 1000 ppm 농도에서 가장 높았다.

결론적으로 낙엽송 열수 추출물은 1000 ppm 이하에서는 항균활성이 낮게 나타났으며 항균제제로서의 단독 사용이 불가능하다고 판단된다.

Dose level (ppm/plate*)	Fungal growth (mm)				
	Strain				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
Control*	82.6 ± 0.8a**	88.2 ± 0.9a	82.0 ± 1.2a	88.1 ± 0.6a	81.2 ± 0.9a
1000 ppm	72.8 ± 2.3d	82.4 ± 1.5d	69.9 ± 0.9d	74.6 ± 0.6e	72.5 ± 1.8c
500 ppm	77.5 ± 0.6c	84.3 ± 1.1c	76.1 ± 0.8c	79.6 ± 0.5d	76.5 ± 0.8b
250 ppm	80.5 ± 0.9b	86.4 ± 0.4b	77.1 ± 1.3b	82.9 ± 0.8c	78.8 ± 0.5b
125 ppm	81.8 ± 0.6ab	87.2 ± 0.1ab	76.0 ± 1.5b	85.3 ± 0.8b	78.7 ± 0.9b

Table 3-3-5. Effect of *Larix leptolepis* extracts on mycelial growth of *Trichoderma* spp.

\* MA (Malt agar) medium used for fungal growth.

\*\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to Duncan's new multiple-range test (n=5).

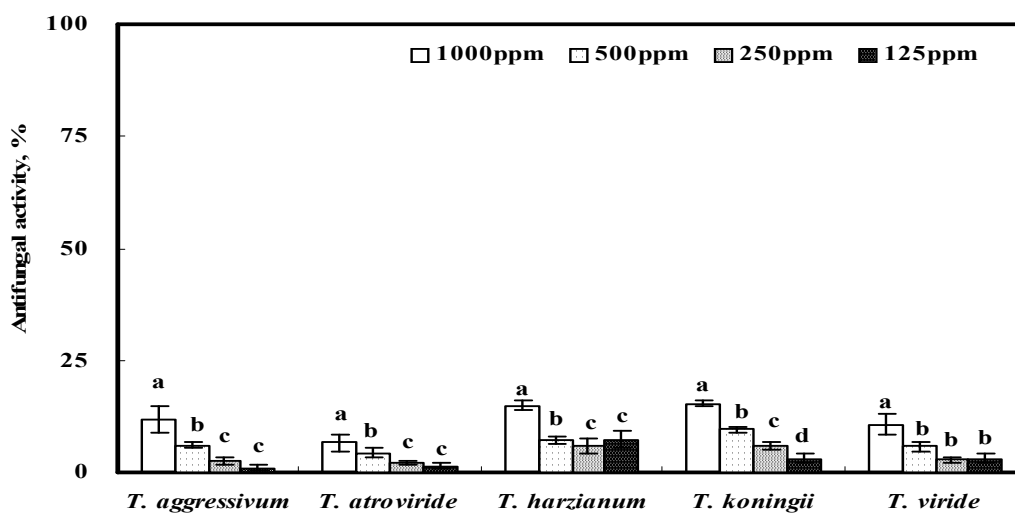


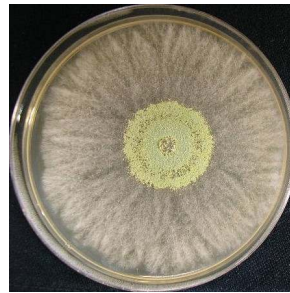
Fig. 3-3-34. Antifungal activity of *Larix leptolepis* hot water extracts against *Trichoderma* spp.



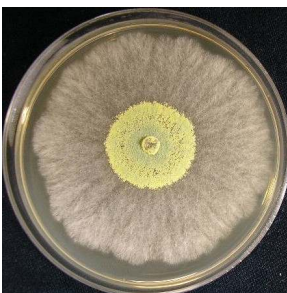
Control



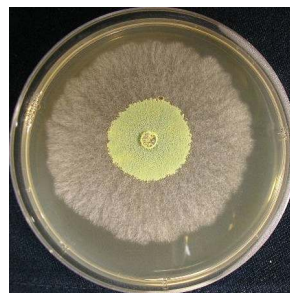
125 ppm



250 ppm



500 ppm

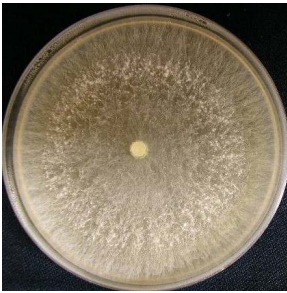


1000 ppm

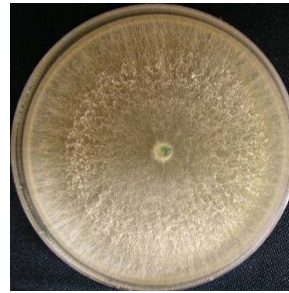
Fig. 3-3-35. Growth inhibition of *Larix leptolepis* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma aggressivum*.



Control



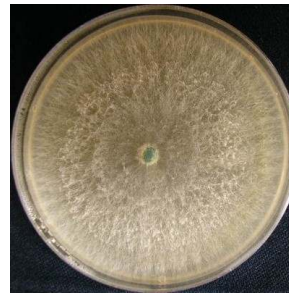
125 ppm



250 ppm



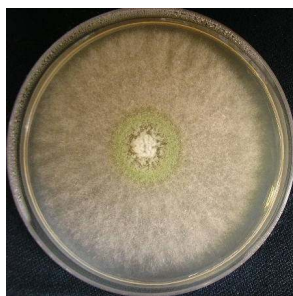
500 ppm



1000 ppm

Fig. 3-3-36. Growth inhibition of *Larix leptolepis* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma atroviride*.

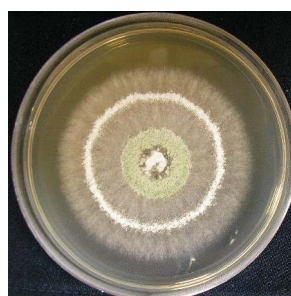




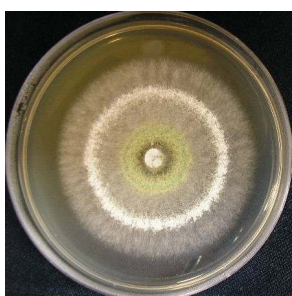
Control



125 ppm



250 ppm



500 ppm

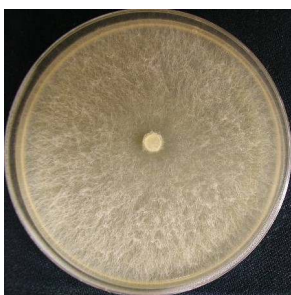


1000 ppm

Fig. 3-3-37. Growth inhibition of *Larix leptolepis* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma harzianum*.



Control



125 ppm



250 ppm



500 ppm



1000 ppm

Fig. 3-3-38. Growth inhibition of *Larix leptolepis* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma koningii*.



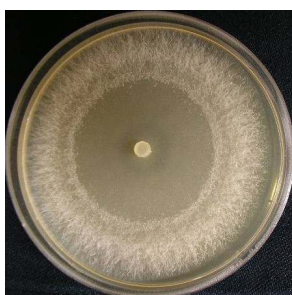
Control



125 ppm



250 ppm



500 ppm



1000 ppm

Fig. 3-3-39. Growth inhibition of *Larix leptolepis* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma viride*.

4) 최적추출조건에 따른 미송 추출물의 항균활성

Table 3-3-6은 미송 톱밥을 100℃, 3시간 추출하여 균사생장에 미치는 영향을 농도별로 나타낸 결과로 추출물 농도가 낮아질수록 균사생장은 빠르게 진행되었다.

Dose level (ppm/plate*)	Fungal growth (mm)				
	Strain				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
Control*	82.6 ± 0.8a**	88.2 ± 0.9a	82.0 ± 1.2a	88.1 ± 0.6a	81.2 ± 0.9a
1000 ppm	46.9 ± 1.2e	71.9 ± 1.2e	49.7 ± 0.6d	52.3 ± 0.8e	48.7 ± 0.7e
500 ppm	49.2 ± 0.7d	79.7 ± 0.8d	56.6 ± 0.5c	63.6 ± 0.7d	58.8 ± 0.9d
250 ppm	57.9 ± 1.1c	81.8 ± 1.1c	61.4 ± 0.6c	68.4 ± 0.8c	59.8 ± 0.7c
125 ppm	64.2 ± 0.7b	85.3 ± 1.9b	67.1 ± 1.1b	78.7 ± 0.5b	64.1 ± 0.6b

Table 3-3-6. Effect of *Pseudotsuga menziesii* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma* spp.

\* MA (Malt agar) medium used for fungal growth.

\*\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to Duncan's new multiple-range test (n=5)

미송 추출물은 낙엽송 추출물에 비해서 동일한 추출물 농도에서 균사생장을 강하게 억제하였으며, 특히 *T. atroviride*를 제외한 나머지 균주에서 높은 균사생장억제력을 나타냈다.

Fig. 3-3-40은 *Trichoderma* spp. 5종 균주에 대한 미송 추출물의 항균활성을 나타낸 결과로 추출물 농도에 따른 항균활성은 5% 수준에서 유의성이 나타났다. 추출물 농도가 낮아짐에 따라 항균 활성도 거의 동일한 경향으로 낮아졌다.

Fig. 3-3-41 ~ Fig. 3-3-45는 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 미송 톱밥 추출물을 농도별로 적용 시켰을 때 균사생장저해력을 나타내는 사진으로 전체적으로 낙엽송 톱밥 추출물에 비해 높은 균사생장저해력을 나타내었다.

Fig. 3-3-41과 3-3-42는 *T. aggressivum*과 *T. atroviride*에 대한 미송 열수추출물의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. *T. aggressivum*은 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 125 ppm부터 1000ppm까지 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 완만한 원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 1000 ppm농도에서 가장 높았다.

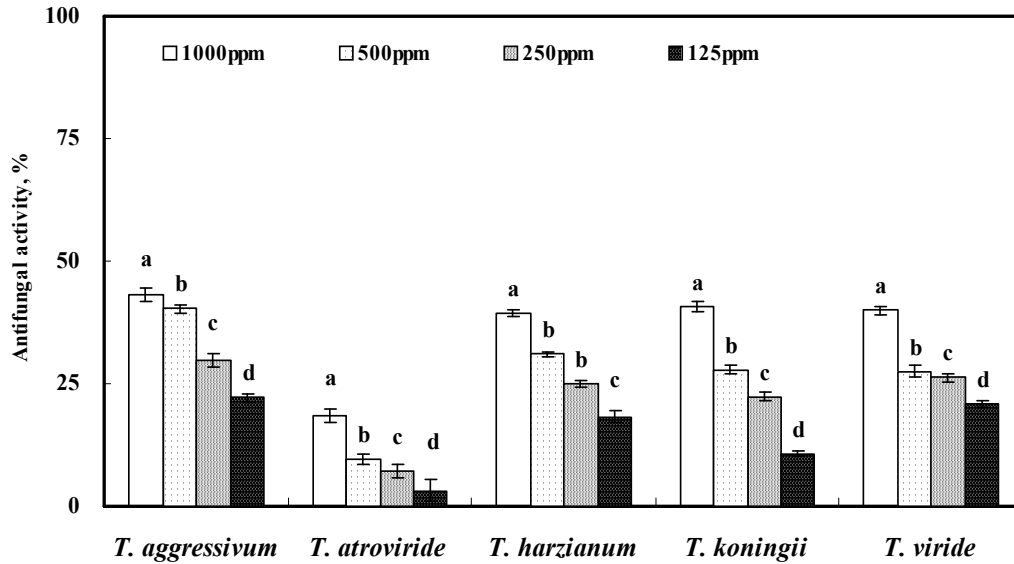


Fig. 3-3-40. Antifungal activity of *Pseudotsuga menziesii* hot water extracts against *Trichoderma* spp.

Fig. 3-3-42의 *T. atroviride*는 1000 ppm에서 성장저지환을 확인할 수 있었으며 나머지 농도에서는 성장저지환을 확인할 수 없었다. 균사의 밀도는 1000 ppm의 농도에서 가장 높았다.

Fig. 3-3-43은 *T. harzianum*에 대한 미송 열수추출물의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교했을 때 모든 농도에서 성장저지환을 확인할 수 있었으며 균사밀도는 1000 ppm에서 가장 높게 나타났고 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였다.

Fig. 3-3-44와 3-3-45는 *T. koningii*와 *T. viride*에 대한 미송 열수추출물의 성장저해효과를 나타냈다.

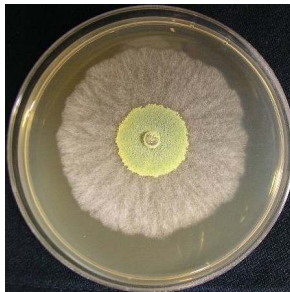
*T. koningii*는 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 250 ppm에서 1000 ppm 까지 확인할 수 있었으며 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였고 균사의 밀도는 모든

농도에서 일정하였다.

Fig. 3-3-45의 *T. viride*는 모든 농도에서 성장저지환이 확인 되었으며 균사의 생장형태는 원형으로 성장하였다. 균사의 밀도는 1000 ppm에서 가장 높았다.



Control



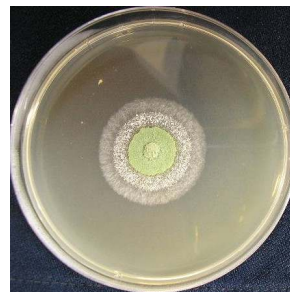
125 ppm



250 ppm



500 ppm



1000 ppm

Fig. 3-3-41. Growth inhibition of *Pseudotsuga menziesii* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma aggressivum*.



Control



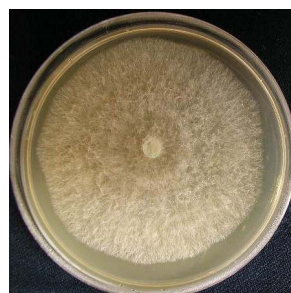
125 ppm



250 ppm

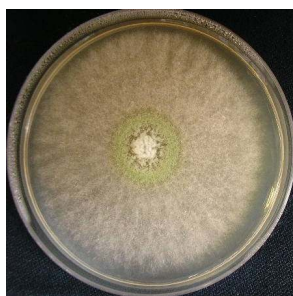


500 ppm

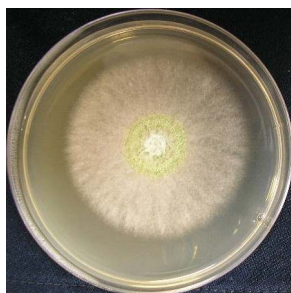


1000 ppm

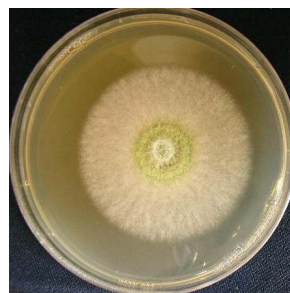
Fig. 3-3-42. Growth inhibition of *Pseudotsuga menziesii* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma atroviride*.



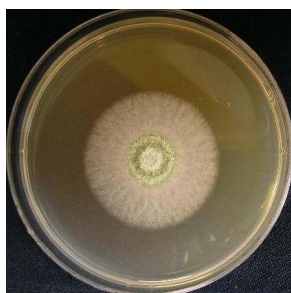
Control



125 ppm



250 ppm



500 ppm



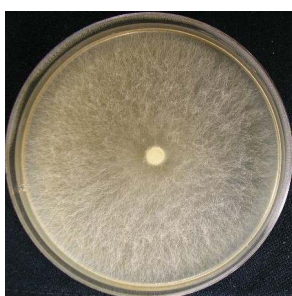
1000 ppm

Fig. 3-3-43. Growth inhibition of *Pseudotsuga menziesii* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma harzianum*.

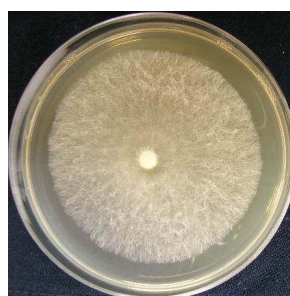




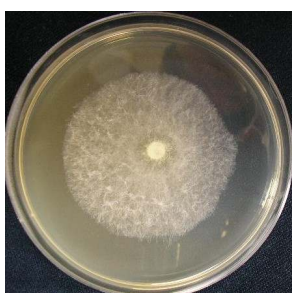
Control



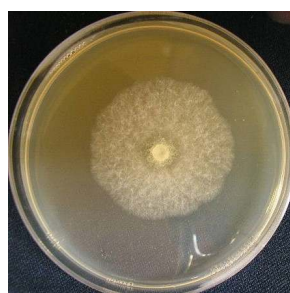
125 ppm



250 ppm



500 ppm



1000 ppm

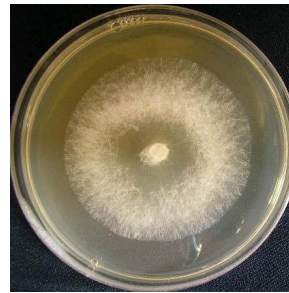
Fig. 3-3-44. Growth inhibition of *Pseudotsuga menziesii* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma koningii*.



Control



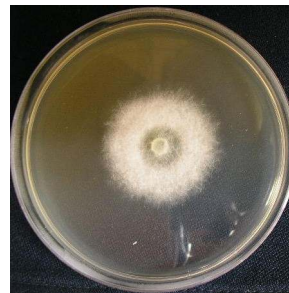
125 ppm



250 ppm



500 ppm



1000 ppm

Fig. 3-3-45. Growth inhibition of *Pseudotsuga menziesii* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma viride*.

미송 추출물 1000 ppm 농도에서 균사생장 저해력은 *T. aggressivum* 43.13%로 *Trichoderma* spp. 5종 균주 중 가장 높은 균사생장 저해를 나타냈으며 추출물 농도에 따른 균사생장저해정도는 5%수준에서 유의성을 나타냈으며 균사생장 최소저해농

도는 125 ppm 이라고 판단된다.

*T. atroviride*는 1000 ppm농도에서 18.42%의 균사생장 저해가 나타났고 균사생장 최소저해농도는 500 ppm 이라고 판단되며, *T. harzianum*은 1000 ppm농도에서 39.42%의 균사생장 저해를 나타냈다. *T. koningi*는 1000 ppm 농도에서 40.71%로, 최소저해농도인 125ppm보다 약 4배의 균사생장 저해를 나타냈으며 5%수준에서 유의성을 나타냈고 *T. viride*는 125 ppm농도에서 최소 저해농도를 나타냈으며 5%수준에서 유의성을 나타냈다.

결과적으로 미송추출물이 낙엽송 추출물에 비해 *Trichoderma* spp. 5종 균주에 대하여 높은 저해 효과를 나타냄을 확인하였고 미송추출물에 *Trichoderma*의 생장을 저해하는 물질이 함유되어 있다는 사실을 추측할 수 있었으며 최소 1000ppm 정도에서 상업성이 있다고 판단된다.

다. Partition extraction에 의한 그린몰드 생장억제 화합물 그룹 분리

1) Partition extraction에 의해서 분리된 화합물 분리

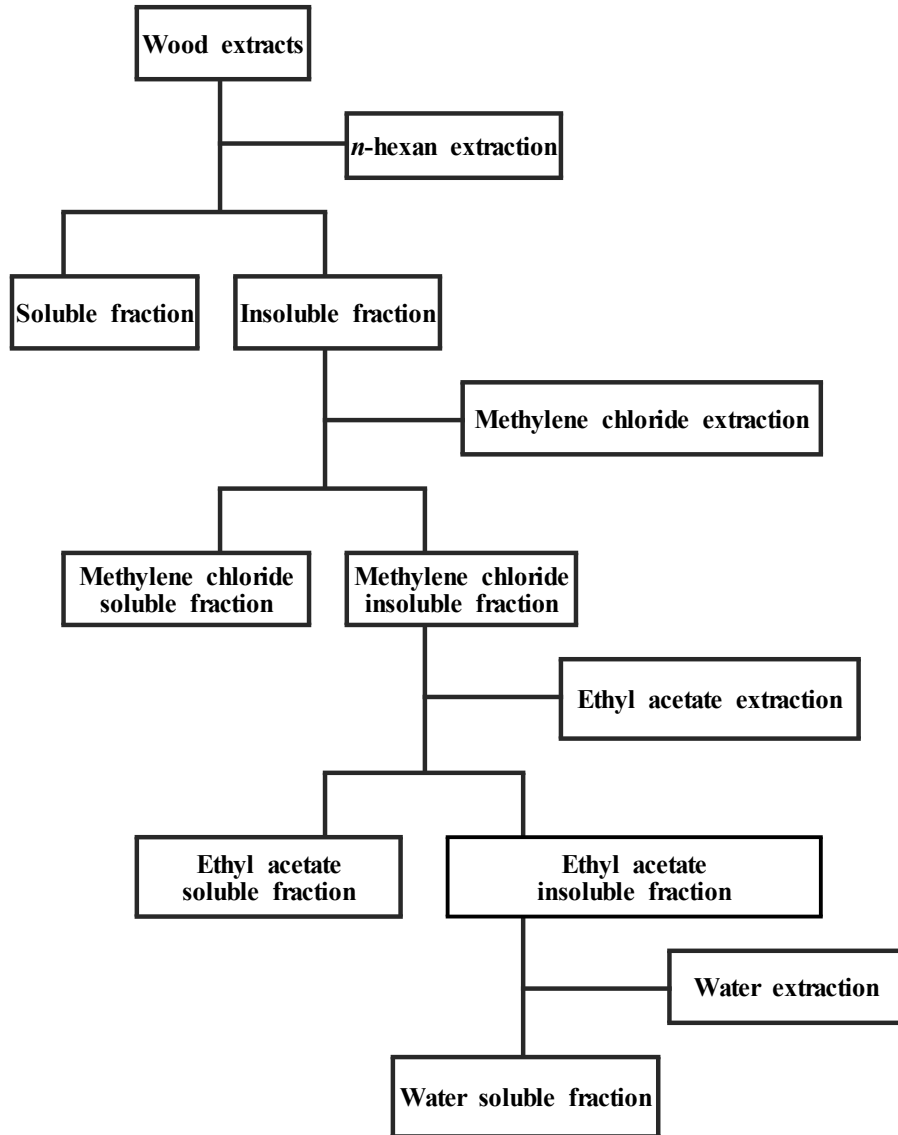


Fig. 3-3-46. Separation of hot water extracts by organic solvent.

2) Partition extraction에 의해 분리된 화합물 그룹의 항균활성

가) 낙엽송으로부터 분리된 화합물 그룹의 항균활성

Table 3-3-7은 낙엽송 열수추출물을 각 용제별로 다단 추출하여 획득된 용제 용해부의 수율을 나타낸 결과로 water 용해부가 82%로 나타났으며, *n*-hexane 용해부 4%, methylene chloride 용해부 6% 및 ethyl acetate 용해부 8%로 나타났다. Water 용해부를 제외하고는 ethyl acetate 용해부가 가장 높게 나타났다.

Fractions	Weight, g*	Yield, %
<i>n</i> -Hexane soluble	0.04 ± 0.01	4.0 ± 0.3
Methylene chloride soluble	0.06 ± 0.01	6.0 ± 0.5
Ethyl acetate soluble	0.08 ± 0.01	8.0 ± 0.6
Water soluble	0.82 ± 0.12	82.0 ± 7.3

Table 3-3-7. Separation of *Larix leptolepis* water extracts by organic solvent

\* Based on the weight of water extract powder, 1g

Table 3-3-8과 Fig 3-3-47은 낙엽송 열수추출물로부터 분리된 각 용제의 용해부를 배지에 첨가한 다음, *Trichoderma* 5종 균주를 성장시킨 결과를 나타냈다.

각 용제 용해부를 *Trichoderma* 5종 균주에 대하여 적용 하였을 때 균사의 생장은 각각 다르게 나타났다. 특히 water 용해부는 *T. atroviride* 및 *T. viride*에 대하여 대조구와 비교했을 때 항균활성을 나타내지 못하였다.

*n*-Hexane 용해부는 *Trichoderma* 5종 균주 모두에 대하여 가장 높은 항균활성을 나타냈으며 이때 항균활성은 70 - 80%였다. *T. viride*를 제외하고는 ethyl acetate 용해부가 *n*-hexane 용해부 다음으로 항균활성이 높게 나타났다.

결과적으로 *Trichoderma* 5종 균주의 성장을 억제하는 화합물은 *n*-hexane 용해부에 존재한다는 것을 알 수 있었으며, 또한 낙엽송으로부터 추출한 열수 추출물에 *Trichoderma* 5종 균주의 성장을 억제하는 화합물을 확인할 수 있었다.

결론적으로 낙엽송 톱밥의 열수추출물로부터 분리된 *n*-hexane 용해부는

*Trichoderma* 균주의 발생을 억제하는 항균 화합물로서의 잠재적 사용 가능성을 확인하였다.

Fractions	Fungal growth (mm)				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
Control*	77.6 ± 1.5a**	84.9 ± 0.5a	80.3 ± 0.8a	85.33 ± 0.23a	85.53 ± 0.10a
<i>n</i> -Hexane soluble	24.1 ± 0.6e	22.0 ± 0.6d	24.4 ± 0.7e	17.75 ± 0.46e	17.20 ± 0.37d
Methylene chloride soluble	49.1 ± 1.0c	58.6 ± 0.6b	55.3 ± 0.5c	49.56 ± 0.94c	50.54 ± 0.65c
Ethyl acetate soluble	46.4 ± 0.6d	54.2 ± 0.7c	52.0 ± 0.7d	37.92 ± 0.86d	55.67 ± 0.92b
Water soluble	64.1 ± 0.6b	84.6 ± 0.6a	70.1 ± 0.8b	72.99 ± 0.84b	85.07 ± 0.45a

Table 3-3-8. Effects of soluble fraction separated from *Larix leptolepis* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma* spp.

\* MA (Malt agar) medium used for fungal growth.

\*\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different

( $P < 0.05$ ) according to Duncan's new multiple-range test ( $n=5$ )

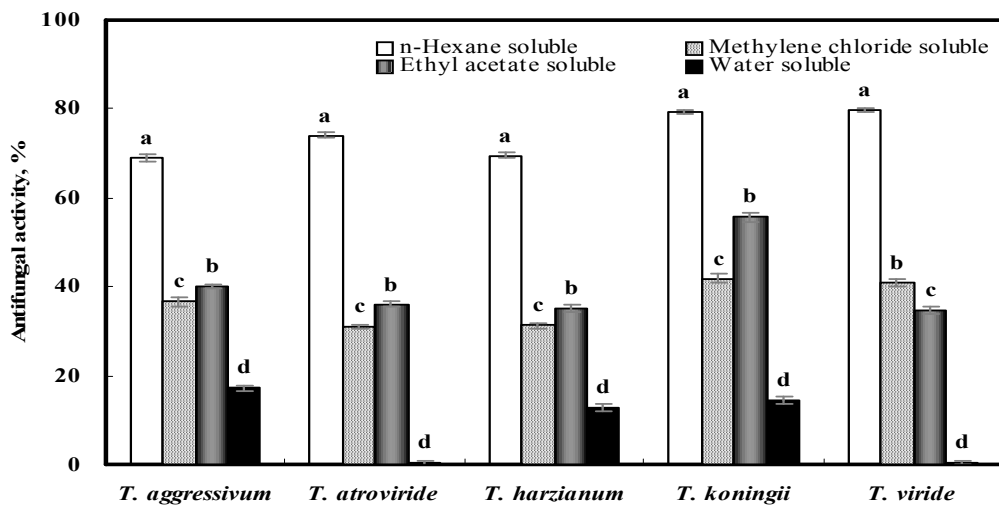


Fig. 3-3-47. Antifungal activity of organic solvent soluble fraction separated from *Larix leptolepis* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma* spp.

Fig. 3-3-48 ~ Fig. 3-3-52는 *Trichoderma* 5종 균주에 대하여 낙엽송 열수 추출물로 분리된 각 유기용제 용해부의 균사생장저해효과를 나타낸 사진이다.

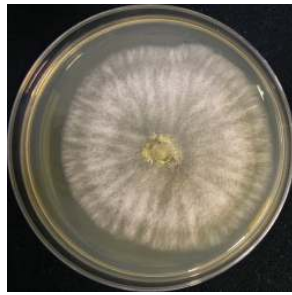
Fig. 3-3-48과 3-3-49는 *T. aggressivum*과 *T. atroviride*에 대한 낙엽송 열수추출물의 다단 추출물에 의한 균사생장저해효과를 나타냈다. *T. aggressivum*은 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 *n*-hexane 용해부에서 가장 높게 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 불규칙원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 *n*-hexane 용해부에서 가장 높았다.

Fig. 3-3-49의 *T. atroviride*에서도 *T. aggressivum*과 마찬가지로 성장저지환은 *n*-hexane 용해부에서 가장 높은 것을 확인할 수 있었다.

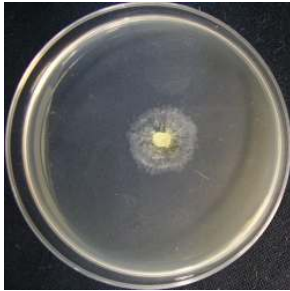
Fig. 3-3-50은 *T. harzianum*에 대한 낙엽송 열수추출물의 다단 추출물에 대한 성장저해효과를 나타낸 사진이다. *n*-Hexane 용해부에서 가장 높은 성장저지환을 확인할 수 있었으며 대조구와 비교 했을 때 모든 농도에서 균사밀도가 낮게 나타났고 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였다.

Fig. 3-3-51과 3-3-52는 *T. koningii*와 *T. viride*에 대한 낙엽송 열수추출물의 다단 추출물에 의한 성장저해효과를 나타낸 사진이다. *T. koningii*는 대조구와 비교하였을 때 *n*-hexane 용해부에서 가장 높은 성장저지환을 확인할 수 있었고 pellet위로 균사가 성장하였으며 균사의 성장형태는 불규칙 원형으로 성장하였다. 균사의 밀도는 *n*-hexane 용해부에서 가장 높았다.

Fig. 3-3-52의 *T. viride*에서도 *T. koningii*와 마찬가지로는 *n*-hexane 용해부에서 가장 높은 성장저지환을 확인할 수 있었으며 균사의 성장형태는 불규칙 원형으로 성장하였다.



Control



*n*-Hexane soluble



Methylene chloride soluble



Ethyl acetate soluble



Water soluble

Fig. 3-3-48. Growth inhibition of organic solvents soluble fraction separated from *Larix leptolepis* extracts on mycelial growth of *Trichoderma aggressivum*.





Control



*n*-Hexane soluble



Methylene chloride soluble

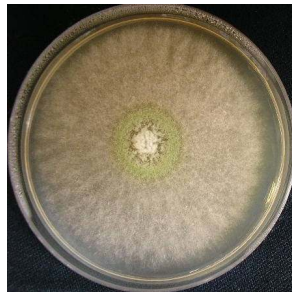


Ethyl acetate soluble

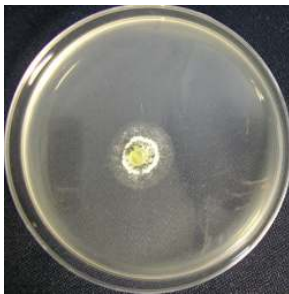


Water soluble

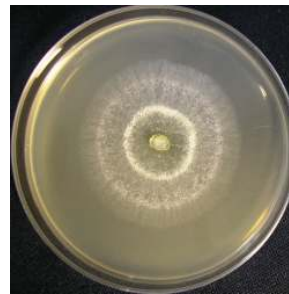
Fig. 3-3-49. Growth inhibition of organic solvents soluble fraction separated from *Larix leptolepis* extracts on mycelial growth of *Trichoderma atroviride*.



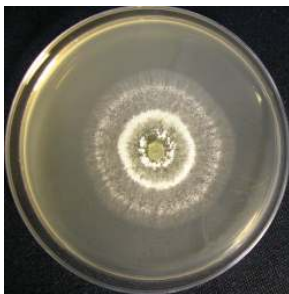
Control



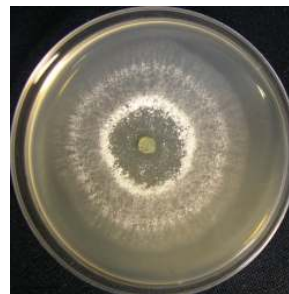
*n*-Hexane soluble



Methylene chloride soluble



Ethyl acetate soluble

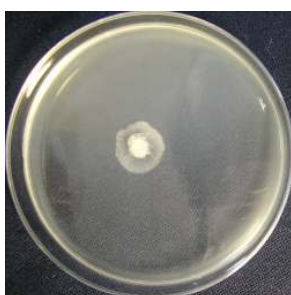


Water soluble

Fig. 3-3-50. Growth inhibition of organic solvents soluble fraction separated from *Larix leptolepis* extracts on mycelial growth of *Trichoderma harzianum*.



Control



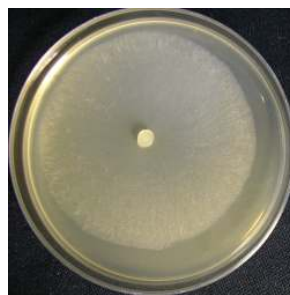
*n*-Hexane soluble



Methylene chloride soluble



Ethyl acetate soluble

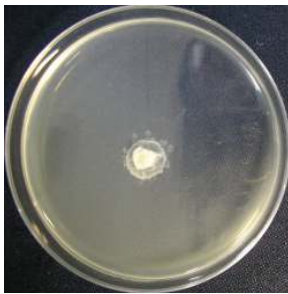


Water soluble

Fig. 3-3-51. Growth inhibition of organic solvents soluble fraction separated from *Larix leptolepis* extracts on mycelial growth of *Trichoderma koningii*.



Control



*n*-Hexane soluble



Methylene chloride soluble



Ethyl acetate soluble



Water soluble

Fig. 3-3-52. Growth inhibition of organic solvents soluble fraction separated from *Larix leptolepis* extracts on mycelial growth of *Trichoderma viride*.

나) 미송 화합물 그룹의 항균활성

Table 3-3-9는 미송 열수추출물을 각 용제별로 다단 추출하여 획득된 용제 용해부의 수율을 나타낸 결과이다. Water 용해부가 65%로 나타났으며, *n*-hexane 용해부 8%, methylene chloride 용해부 13%, ethyl acetate 용해부 14%로 나타났다. Water 용해부를 제외하고는 methylene chloride 용해부와 ethyl acetate 용해부가 높게 나타났다.

Fraction	Weight, g*	Yield, %*
<i>n</i> -Hexane soluble	0.08 ± 0.01	8.0 ± 0.4
Methylene chloride soluble	0.13 ± 0.03	13.0 ± 1.7
Ethyl acetate soluble	0.14 ± 0.02	14.0 ± 1.5
Water soluble	0.65 ± 0.08	65.0 ± 3.8

Table 3-3-9. Separation of *Pseudotsuga menziesii* water extracts by organic solvent soluble fraction

\* Based on the weight of water extract powder, 1g

Table 3-3-10과 Fig 3-3-53은 *Trichoderma* 5종 균주에 대하여 미송 열수추출물로부터 분리된 각 용제의 용해부를 배지에 첨가한 다음, *Trichoderma* 5종 균주를 성장시킨 결과이다. 각 용제 용해부를 *Trichoderma* 5종 균주에 대하여 적용하였을 때 균사의 생장은 각각 다르게 나타났다.

특히 water 용해부는 *T. atroviride* 및 *T. viride*에 대하여 대조구와 비교했을 때 항균활성을 나타내지 못하였다. *n*-Hexane 용해부는 *Trichoderma* 5종 균주 모두에 대하여 가장 높은 항균활성을 나타냈으며, 이때 항균활성은 *T. aggressivum*에서 69.0%, *T. atroviride*에서 71%, *T. harzianum*에서 62%, *T. koningii*에서 76%, *T. viride*에서 82%의 높은 항균활성을 나타냈다.

Ethyl acetate 용해부가 *n*-hexane 용해부 다음으로 항균활성이 높게 나타났다.

미송과 낙엽송의 *n*-hexane 용해부를 비교했을 때, 항균활성은 거의 비슷한 수준으로 나타났다. *Trichoderma* 5종 균주에 대한 미송 추출물의 *n*-hexane 용해부는 항균 화합물로서의 사용이 가능하다고 판단된다.

Fractions	Fungi growth (mm)				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
Control*	77.6 ± 1.5a**	84.9 ± 0.5a	80.3 ± 0.8a	85.3 ± 0.2a	85.5 ± 0.1a
<i>n</i> -Hexane soluble	24.4 ± 0.6e	24.3 ± 0.5e	22.6 ± 0.4e	20.7 ± 0.4e	15.2 ± 0.6d
Methylene chloride soluble	38.8 ± 0.6c	61.9 ± 0.6c	43.1 ± 0.9c	38.9 ± 0.6c	43.4 ± 0.8b
Ethyl acetate soluble	31.8 ± 0.7d	58.3 ± 0.78	34.5 ± 0.6d	30.2 ± 0.6d	35.6 ± 0.6c
Water soluble	65.1 ± 0.9b	83.4 ± 0.8b	63.6 ± 0.5b	73.4 ± 0.6b	85.0 ± 0.2a

Table 3-3-10. Effects of solvent soluble fraction separated from *Pseudotsuga menziesi* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma* spp.

\* MA (Malt agar) medium used for fungal growth. Incubation period was 84 hrs.

\*\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different ( $P < 0.05$ ) according to Duncan's new multiple-range test ( $n=5$ )

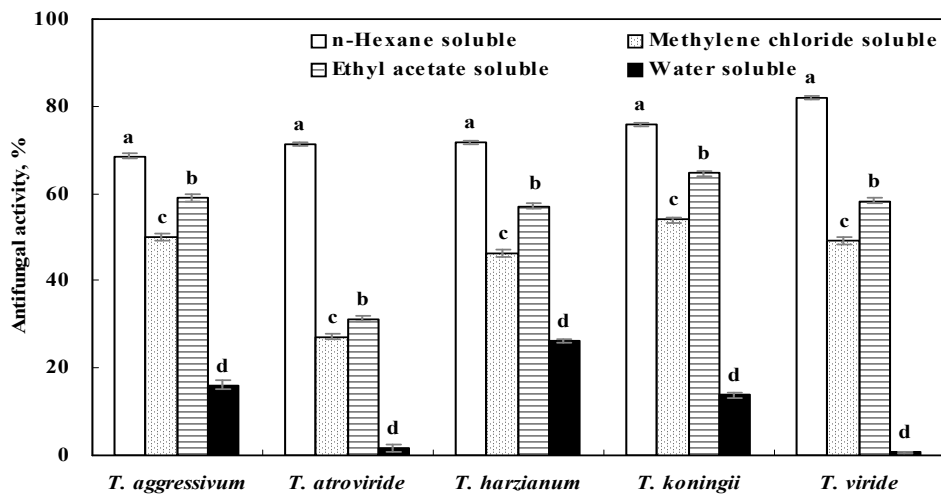


Fig. 3-3-53. Antifungal activity of organic solvent soluble fraction separated from *Pseudotsuga menziesi* hot water extracts on mycelial growth of *Trichoderma* spp.

Fig. 3-3-54 ~ Fig. 3-3-58은 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 미송 열수추출물로부터 분리된 각 유기용제 용해부의 균사생장저해효과를 나타낸 사진이다.

Fig. 3-3-54와 3-3-55는 *T. aggressivum*과 *T. atroviride*에 대한 미송 열수추출물의 다단 추출물에 의한 균사생장저해효과를 나타냈다. *T. aggressivum*은 대조구와 비교하였을 때 모든 유기용제 용해부에서 생장저지환이 확인되었으며 *n*-hexane 용해부에서 가장 높은 생장저해 효과를 확인 할 수 있었고 균사의 생장형태는 완만한 원형으로 성장하였다.

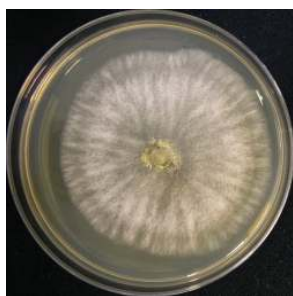
Fig. 3-3-55의 *T. atroviride*에서는 water 용해부를 제외한 *n*-hexane 용해부, methylene chloride 용해부 및 ethyl acetate 용해부에서 생장저지환을 확인할 수 있었으며, 특히 *n*-hexane 용해부에서는 pellet위로 균사가 성장하였다. 균사의 생장형태는 불규칙 원형으로 성장하였다.

Fig. 3-3-56은 *T. harzianum*에 대한 미송 열수추출물의 다단 추출물에 의한 균사생장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교했을 때 모든 유기용제 용해부에서 생장저지환이 확인되었으며 대조구에서는 균사의 포자가 형성되었지만 모든 유기용제 용해부에서는 포자가 형성되지 않았다. 모든 용해부 에서 균사의 생장형태는 원형으로 성장하였다.

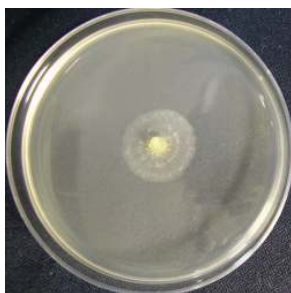
Fig. 3-3-57과 3-3-58은 *T. koningii*와 *T. viride*에 대한 미송 열수추출물의 다단 추출물에 의한 균사생장저해효과를 나타낸 사진이다. *T. koningii*는 대조구와 비교하였을 때 모든 유기용제 용해부에서 생장저지환이 확인되었지만 water 용해부에서는 생장저지환이 미약하였다. *n*-hexane 용해부에서 균사생장 저해효과가 가장 높게 나타났으며 methylene chloride 용해부, ethyl acetate 용해부 순서로 균사생장저해효과가 나타났다. 균사의 생장형태는 원형으로 성장하였다.

Fig. 3-3-58의 *T. viride*에는 *T. koningii*와 마찬가지로는 모든 유기용제 용해부에서 생장저지환이 확인되었지만 water 용해부에서는 생장저지환이 미약하였다. 균사의 생장형태는 불규칙 원형으로 성장하였다.

결론적으로 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 낙엽송 및 미송 열수추출물의 항균활성은 미송 추출물이 낙엽송 추출물보다 높게 나타났지만, 낙엽송과 미송의 *n*-hexane 용해부에 의한 항균활성은 큰 차이가 없었다. 본 결과는 낙엽송 및 미송의 열수추출물로부터 획득된 *n*-hexane 용해부가 *Trichoderma*에 대한 천연 생장억제제 원료로서 충분히 사용가능하다는 사실을 확인할 수 있었다.



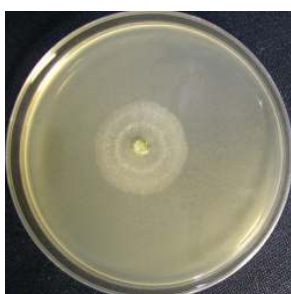
Control



*n*-Hexane soluble



Methylene chloride soluble



Ethyl acetate soluble



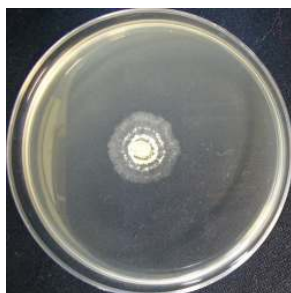
Water soluble

Fig. 3-3-54. Growth inhibition of organic solvents soluble fraction separated from *Pseudotsuga menziesi* extracts on mycelial growth of *Trichoderma aggressivum*.





Control



*n*-Hexane soluble



Methylene chloride soluble



Ethyl acetate soluble



Water soluble

Fig. 3-3-55. Growth inhibition of organic solvents soluble fraction separated from *Pseudotsuga menziesi* extracts on mycelial growth of *Trichoderma atroviride*.



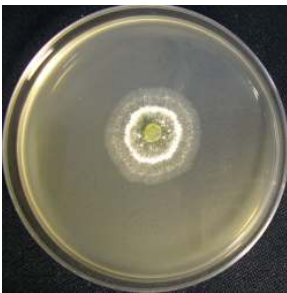
Control



*n*-Hexane soluble



Methylene chloride soluble

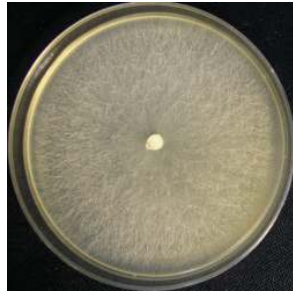


Ethyl acetate soluble

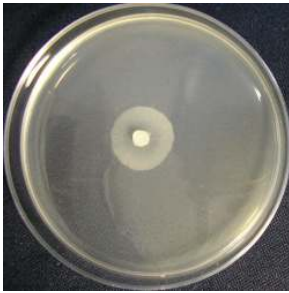


Water soluble

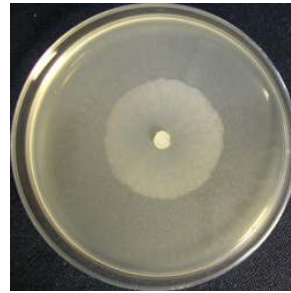
Fig. 3-3-56. Growth inhibition of organic solvents soluble fraction separated from *Pseudotsuga menziesi* extracts on mycelial growth of *Trichoderma harzianum*.



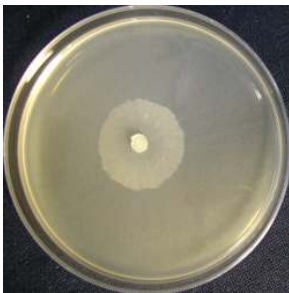
Control



*n*-Hexane soluble



Methylene chloride soluble



Ethyl acetate soluble

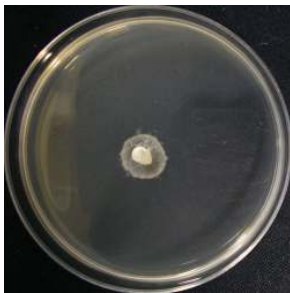


Water soluble

Fig. 3-3-57. Growth inhibition of organic solvents soluble fraction separated from *Pseudotsuga menziesi* extracts on mycelial growth of *Trichoderma koningii*.



Control



*n*-Hexane soluble



Methylene chloride soluble



Ethyl acetate soluble



Water soluble

Fig. 3-3-58. Growth inhibition of organic solvents soluble fraction separated from *Pseudotsuga menziesi* extracts on mycelial growth of *Trichoderma viride*.

## 제 4 절 그린몰드의 생장억제력 증진을 위한 유효첨가물 개발

### 1. 수목의 잎 추출물 및 목부 추출물의 그린몰드생장억제력 최종평가 및 선택

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 공시균주

연구에 사용된 그린몰드 균주는 Canada의 University of Guelph, Mushroom Lab.으로부터 4종(*Trichoderma aggressivum* UG 1565, *Trichoderma atroviride* UG 1550, *Trichoderma koningii* UG 2906, *Trichoderma viride* UG 2662), 한국생명공학연구원 유전자원센터 유전자은행(KCTC)로부터 1종(*Trichoderma harzianum* KCTC 6426)을 제공받아 공시균주로 사용하였다.

균주는 Malt agar (MA, Difco, France)배지에 접종하여 25℃ 배양기 내에서 지속적으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

##### 2) 수목추출물의 조제

#### 가) 편백 잎 추출물

편백 (*Chamaecyparis obtusa*) 잎은 경상대학교(경남 진주시 가좌동)에서 건전한 상태로 성장되고 있는 편백나무로부터 채취하여, 즉시 4℃ 저장고에 암 상태로 밀봉 보관하였으며, 편백 잎 추출물은 생체상태의 편백 잎(전건중량 300g)을 정유추출기(K-22D-10L, Kashiwabara Engineering Co., Japan)에 투입하여 2시간동안 추출하여 수용성 정유와 수불용성 정유를 분리하였다.

#### 나) 수목 추출물 조제

소나무 목분 250 g (전건중량 기준)과 증류수 1.5 L를 혼합한 다음, 속슬렛장치를 사용하여 3시간 추출하였다. 추출물은 glass filter (25G3, Pyrex, Japan)로 여과하여 50℃ 이하에서 감압 농축 한 다음, 동결건조 하여 분말상의 소나무 목부 추출물을 획득하였다. 또한 획득된 소나무 목부 추출물 분말 1 g 에 *n*-hexane 25

mL를 혼합하여 3회 추출한 다음 50°C 이하에서 감압농축하고 동결 건조하여 분말상의 *n*-hexane 추출물을 획득하였다.

### 3) 그린몰드에 대한 추출물의 항균활성

편백 잎으로부터 조제된 수용성 정유와 수불용성 정유가 각각 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm, 4000 ppm 함유된 MA배지(Difco, France)를 조제하였으며, 소나무 톱밥으로부터 조제된 목부추출물과 *n*-hexane 추출물을 각각 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm 함유된 MA배지(Difco, France)를 조제하였다. 조제된 MA배지에 계대배양 된 *Trichoderma* 5종의 공시균주 pellet을 각각 접종하고 25°C에서 3일 - 8일간 배양한 다음 균총의 평균직경을 측정하여 항균활성을 식 2에 의거하여 계산하였다. 이때 대조구는 추출물이 첨가되지 않은 MA배지를 사용하였다.

### 4) 통계분석

통계분석을 위하여 각 계통의 5반복 값을 Micro office EXCEL을 이용하여 표준편차를 나타내었으며, 각 실험 구 사이의 유의성은 SAS Corporate Statistics GLM의 Release 8.01을 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 Duncan의 multiple-range test로 분석하였다.

## 나. 수목의 잎 추출물 및 목부 추출물에 의한 그린몰드 생장억제

### 1) 그린몰드에 대한 추출물의 항균활성

#### 가) 수용성 정유의 항균활성

Table 3-4-1에 편백 잎으로부터 분리된 수용성 정유를 배지에 첨가한 다음, *Trichoderma* 5종균주의 항균활성을 나타냈다. 수용성 정유를 *Trichoderma* 5종균주에 대하여 적용 하였을 때 항균 활성은 각각 다르게 나타났다. 4000 ppm의 농도에서 5.9 - 22.0 %의 항균활성을 나타냈으며, 2000 ppm 이상의 농도에서 추

출물의 항균활성은 *T. viride*를 제외하고는 유의성이 인정되지 않았다.

*Trichoderma* 5종 균주별로 항균활성의 정도는 차이가 있었지만, 전체적으로 낮은 항균활성을 나타냈으며, 4000 ppm 추출물농도에서 *T. aggressivum*이 19%, *T. harzianum*이 22% 수준의 항균활성을 나타냈다. 4000 ppm의 농도에서 항균활성이 최대 22% 수준으로 확인 되었으며, 편백 잎의 수용성 정유는 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 단일제제로 사용 가능성이 낮음으로 복합제제로서의 사용이 가능하다고 평가된다.

Dose level (ppm/plate *)	Antifungal activity (%), mean ± SD				
	Strain				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
500 ppm	7.9 ± 3.9c**	6.4 ± 1.0b	15.6 ± 4.8b	1.7 ± 1.3c	7.9 ± 3.2d
1000 ppm	10.2 ± 3.8b	7.6 ± 3.0b	20.8 ± 3.0a	3.7 ± 1.2b	9.5 ± 2.6c
2000 ppm	15.3 ± 4.8a	8.6 ± 2.0a	21.3 ± 4.7a	4.9 ± 1.8a	11.4 ± 1.8b
4000 ppm	19.2 ± 5.7a	12.0 ± 4.9a	22.0 ± 6.8a	5.9 ± 1.8a	14.0 ± 2.2a

Table 3-4-1. Antifungal activity of water soluble essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma* spp. at 25°C for 5 days

\* MA (Malt agar) medium was used for fungal growth.

\*\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to Duncan's new multiple-range test (n=5).

Fig. 3-4-1에 *T. aggressivum*에 대한 수용성 정유의 항균활성을 나타냈다. *T. aggressivum*에 대하여 모든 농도에서 항균활성이 나타났으며, 500 ppm에서 약 8%, 4000 ppm에서 19.2%의 항균활성을 확인할 수 있었다. 2000 ppm에서 15.3%의 항균활성을 나타냈지만 4000 ppm과 비교했을 때 유의성이 인정되지 않았다.

Fig. 3-4-2에 *T. atroviride*에 대한 수용성 정유의 항균활성을 나타냈다. *T.*

*atroviride*에 대하여 수용성 정유는 모든 농도에서 항균활성이 나타났으며, 500 ppm 농도에서 6.4%, 1000 ppm 농도에서 7.6%, 2000 ppm 농도에서 8.6% 그리고 4000 ppm 농도에서 12%의 항균활성을 나타냈다. 500 ppm과 1000 ppm 농도는 유의성이 인정되지 않았고, 2000 ppm 과 4000 ppm 사이에서도 유의성은 인정되지 않았다.

Fig. 3-4-3에 *T. harzianum*에 대한 수용성 정유의 항균활성을 나타냈다. *T. harzianum*에 대하여 수용성 정유는 4000 ppm 농도에서 22%의 항균활성을 나타냈다. 1000 ppm, 2000 ppm 및 4000 ppm 사이에 유의성은 인정되지 않았다.

Fig. 3-4-5에 *T. koningii*에 대한 수용성 정유의 항균활성을 나타냈다. *T. koningii*에 대한 수용성 정유의 항균활성은 *Trichoderma* 5종 균주 중 가장 낮게 나타났고, 4000 ppm 농도에서 약 6%의 항균활성을 나타냈다. 2000 ppm과 4000 ppm사이에 유의성은 인정되지 않았다.

Fig. 3-4-6에 *T. viride*에 대한 수용성 정유의 항균활성을 나타냈다. 모든 농도의 수용성 정유에서 항균활성이 나타났으며 4000 ppm 농도에서 14%의 항균활성이 나타났다. 최소저해농도는 500 ppm이라고 판단되며 모든 농도에서 5%수준의 유의성이 인정되었다.

*Trichoderma* 5종 균주에 대한 수용성 정유의 항균활성은 *T. harzianum*, *T. aggressivum*, *T. viride*, *T. atroviride*, *T. koningii* 순으로 항균활성이 확인되었다. *Trichoderma* 5종 균주에 대한 수용성 정유의 항균활성은 농도에 따라 유의성이 나타났으며, 각 균주별로 다르게 나타났다.

4000 ppm 수준에서 *T. aggressivum* 및 *T. harzianum*에 대하여 약 19 -22%의 항균활성을 나타냈고, *T. viride*에 대하여 14%의 항균활성을 나타냈다(Fig. 3-4-7).



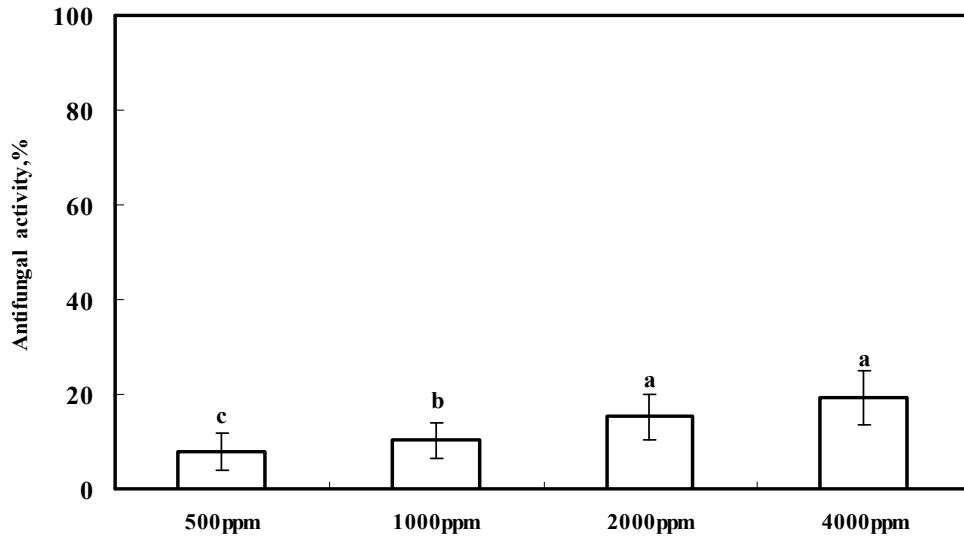


Fig. 3-4-1. Antifungal activity of water soluble essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma aggressivum*.

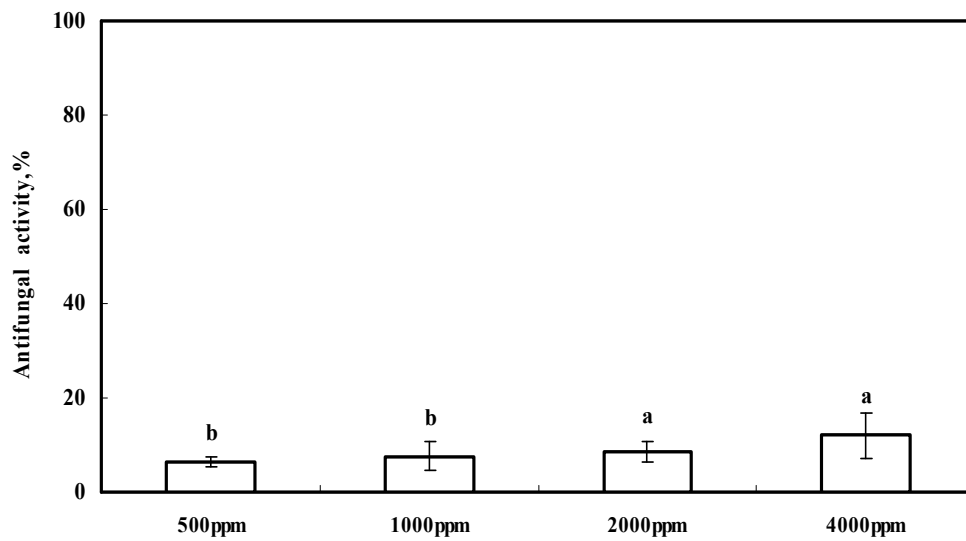


Fig. 3-4-2. Antifungal activity of water soluble essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma atroviride*.

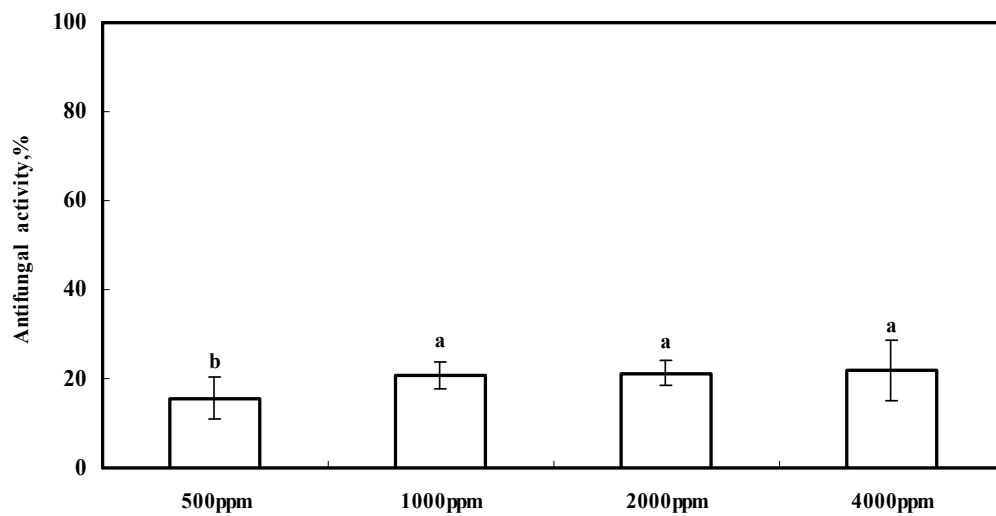


Fig. 3-4-3. Antifungal activity of water soluble essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma harzianum*.

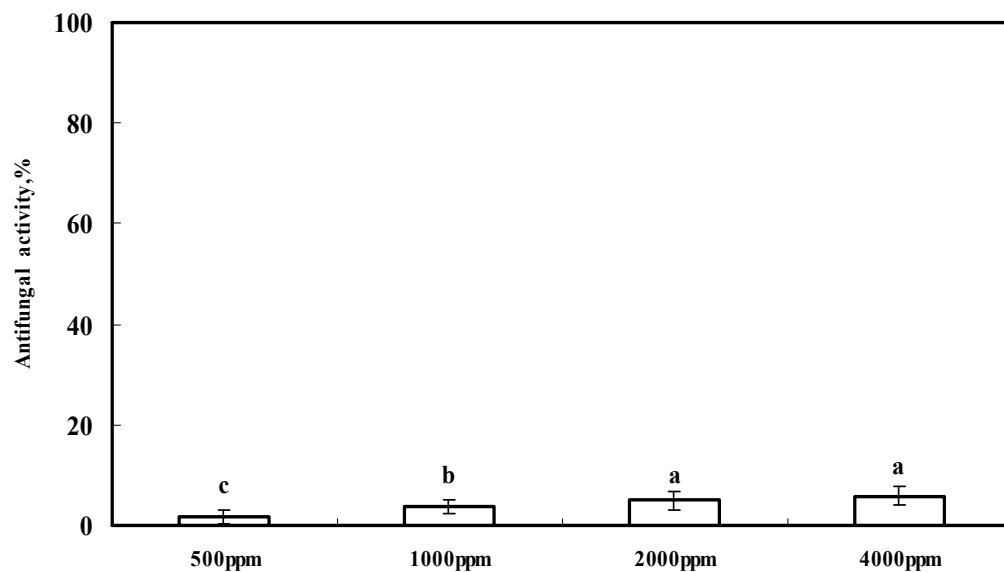


Fig. 3-4-5. Antifungal activity of water soluble essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma koningi.i*

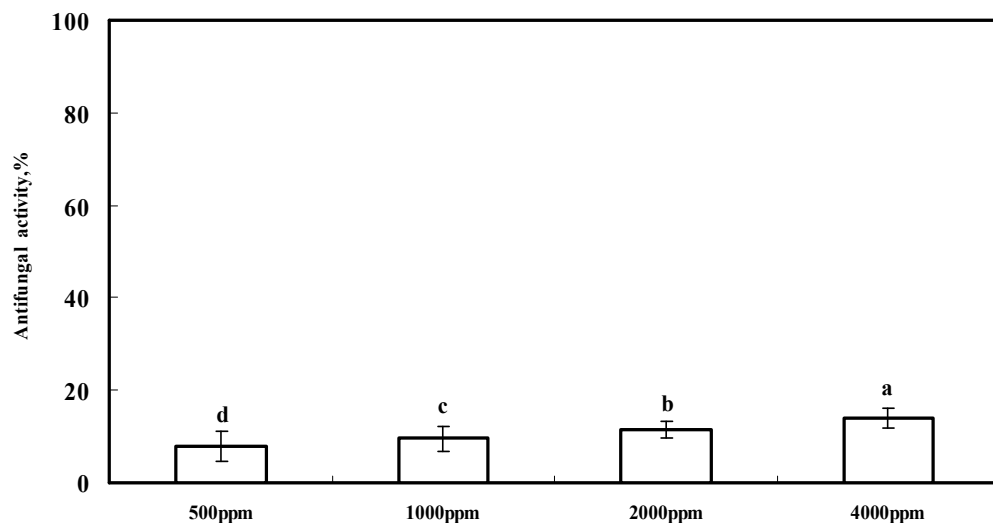


Fig. 3-4-6. Antifungal activity of water soluble essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma viride*.

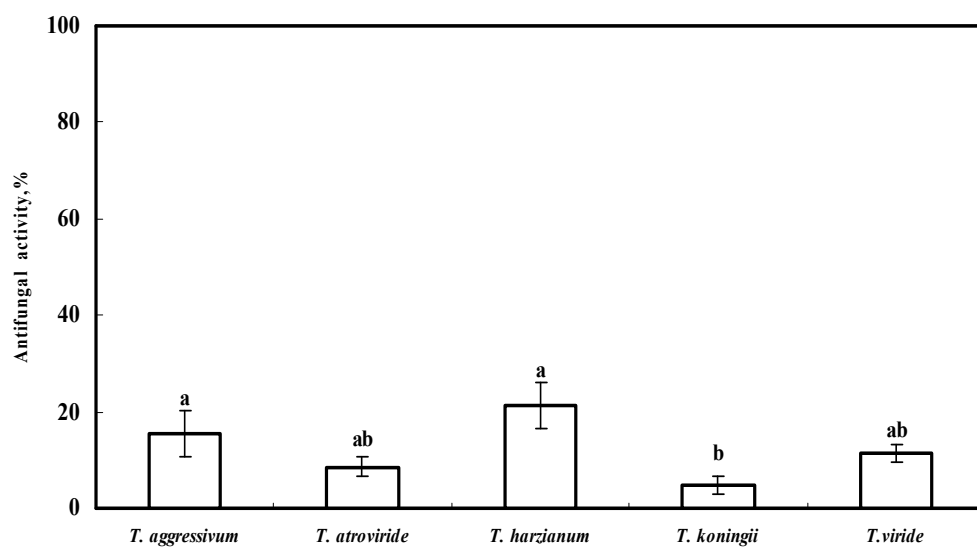


Fig. 3-4-7. Antifungal activity of water soluble essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma* spp. at 2000 ppm.

Fig. 3-4-8 와 Fig. 3-4-9은 *T. aggressivum* 과 *T. atroviride*에 대한 수용성 정유의 생장저해효과를 나타낸 사진이다. *T. aggressivum*에 있어서 대조구와 비교하였을 때 생장저지환은 500 ppm - 4000 ppm의 모든 농도에서 확인할 수 있으며 균사의 생장형태는 불규칙 원형으로 생장하였다. 또한 대조구에서는 포자가 형성되었지만 시험구에서는 포자가 형성되지 않았다.

Fig. 3-4-9은 *T. atroviride*에 대한 수용성 정유의 생장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 생장저지환은 500 ppm - 4000 ppm까지 확인할 수 있었다. 균사의 생장형태는 원형으로 생장하였으며 대조구와 비교하였을 때 모든 농도에서 균사의 밀도가 높았다. 또한 대조구에서는 포자가 형성되었지만 시험구에서는 포자가 형성되지 않았다.

Fig. 3-4-10은 *T. harzianum*에 대한 수용성 정유의 생장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 모든 농도에서 생장저지환을 확인할 수 있었으며 모든 농도에서 균사의 생장형태는 원형으로 생장하였다.

Fig. 3-4-11은 *T. koningii*에 대한 수용성 정유의 생장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교 하였을 때 2000 ppm, 4000 ppm 농도에서 육안으로 생장저지환을 확인할 수 있었다. 균사는 대조구와 유사한 밀도로 생장하였다.

Fig. 3-4-12는 *T. viride*에 대한 수용성 정유의 생장저해효과를 나타냈으며 대조구와 비교했을 때 500 ppm - 4000ppm 까지 생장저지환을 확인할 수 있었다. *T. viride*의 균사생장형태는 모든 농도에서 원형으로 생장하였으며 2000 ppm부터 4000 ppm까지 균사밀도가 증가하였다.

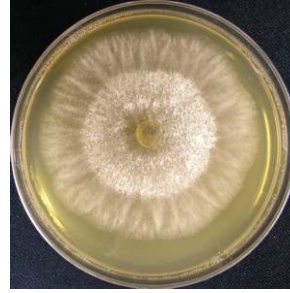
Fig. 3-4-13은 편백 잎의 수용성 정유를 2000 ppm 농도로 배지에 투입한 다음 *Trichoderma* 5종 균주를 접종했을 때 균사생장저해효과를 나타낸 사진이다. *T. aggressivum*과 *T. harzianum*이 다른 균주에 비해서 균사생장 저해가 높게 나타났다.



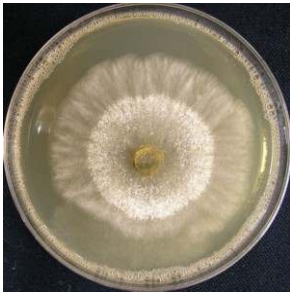
Control



500 ppm



1000 ppm



2000 ppm



4000 ppm

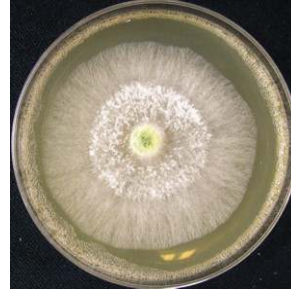
Fig. 3-4-8. Growth inhibition of water soluble essential oil from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma aggressivum*.



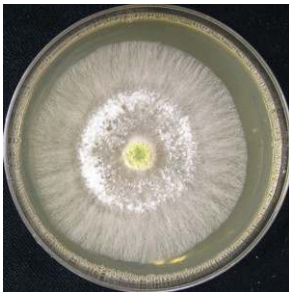
Control



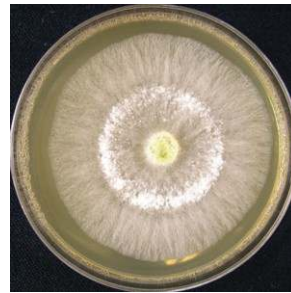
500 ppm



1000 ppm



2000 ppm



4000 ppm

Fig. 3-4-9. Growth inhibition of water soluble essential oil from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma atroviride*.



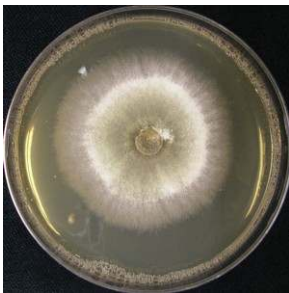
Control



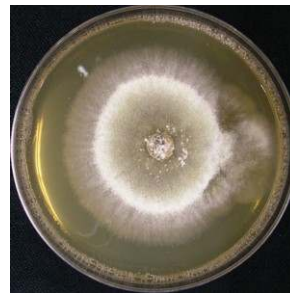
500 ppm



1000 ppm



2000 ppm



4000 ppm

Fig. 3-4-10. Growth inhibition of water soluble essential oil from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma harzianum*.



Control



500 ppm



1000 ppm



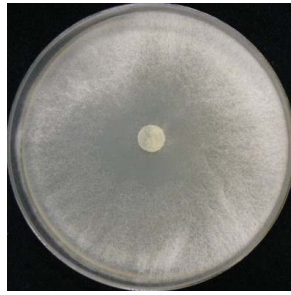
2000 ppm



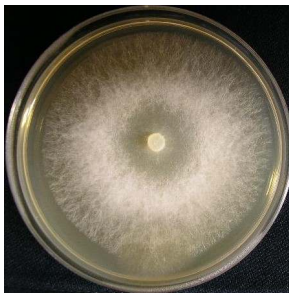
4000 ppm

Fig. 3-4-11. Growth inhibition of water soluble essential oil from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma koningii*.





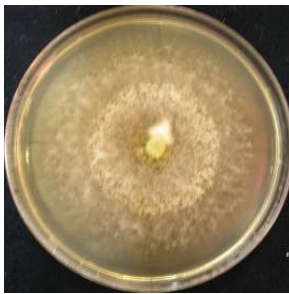
Control



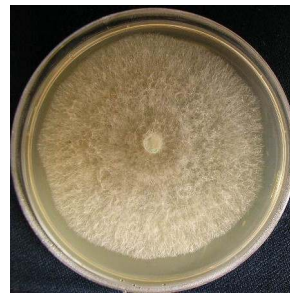
500 ppm



1000 ppm



2000 ppm

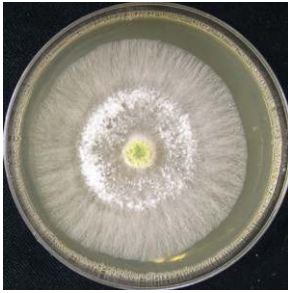


4000 ppm

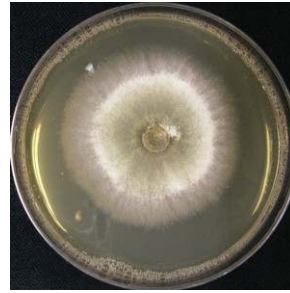
Fig. 3-4-12. Growth inhibition of water soluble essential oil from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma viride*.



*Trichoderma aggressivum*



*Trichoderma atroviride*



*Trichoderma harzianum*



*Trichoderma koningii*



*Trichoderma viride*

Fig. 3-4-13. Growth inhibition of water soluble essential oil from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma* spp. at 2000 ppm.

나) 수불용성 정유의 항균활성

Table 3-4-2에 편백 잎으로부터 분리된 수불용성 정유를 배지에 첨가한 다음, *Trichoderma* 5종 균주에 대한 항균활성을 나타냈다. 수불용성 정유를 *Trichoderma* 5종 균주에 적용 하였을 때 항균활성은 각각 다르게 나타났다. 4000 ppm의 농도에서 40.2% - 63.2%의 항균활성을 나타냈으며, *Trichoderma* 5종 균주에 대하여 수불용성 정유의 모든 농도에서 추출물의 항균활성은 5% 수준에서 유의성이 인정되었다. *Trichoderma* 5종 균주별로 항균활성의 정도는 차이가 있었지만, 전체적으로 높은 항균활성을 나타냈으며, 4000 ppm 농도에서 *T. harzianum*에서 59.3%, *T. viride*에서 63.2%의 항균활성을 나타냈다. 4000 ppm의 농도에서 항균활성이 최대 63.2% 수준으로 확인되었으며, 편백 잎의 수불용성 정유는 편백 잎의 수용성 정유와 달리 *Trichoderma* 5종 균주에 대하여 단독항균제제로서 사용이 가능하다고 판단되었다.

Dose level (ppm/plate*)	Antifungal activity (%), mean $\pm$ SD				
	Strain				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
500 ppm	3.0 $\pm$ 0.8d**	5.6 $\pm$ 1.3d	12.3 $\pm$ 1.4d	1.7 $\pm$ 1.6d	5.4 $\pm$ 1.1d
1000 ppm	30.7 $\pm$ 1.3c	17.3 $\pm$ 1.2c	40.0 $\pm$ 1.6c	21.7 $\pm$ 1.9c	16.3 $\pm$ 1.7c
2000 ppm	46.2 $\pm$ 1.2b	23.6 $\pm$ 1.3b	47.8 $\pm$ 1.3b	35.9 $\pm$ 2.0b	35.4 $\pm$ 2.5b
4000 ppm	59.1 $\pm$ 1.6a	40.2 $\pm$ 1.1a	59.3 $\pm$ 1.9a	43.0 $\pm$ 1.0a	63.2 $\pm$ 4.1a

Table 3-4-2. Antifungal activity of essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma* spp.

\* MA (Malt agar) medium was used for fungal growth.

\*\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to Duncan's new multiple-range test (n=5).

Fig. 3-4-14는 *T. aggressivum*에 대한 수불용성 정유의 항균활성을 나타냈다. 500 ppm에서 3%, 1000 ppm에서 30.7%의 항균활성을 나타냈다. 4000 ppm 농도에서 59%로 500 ppm과 비교했을 때 약 20배 높은 항균활성을 나타냈다. 1000 ppm에서 항균활성이 급격히 증가하였으며 모든 농도에서 5%수준에서 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-15는 *T. atroviride*에 대한 수불용성 정유의 항균활성을 나타냈다. 500 ppm에서 5.6%의 항균활성을 나타냈고 4000 ppm에서 40%의 항균활성을 나타냈으며 5%수준에서 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-16은 *T. harzianum*에 대한 수불용성 정유의 항균활성을 나타냈다. 500 ppm에서 12.3%의 항균활성을 나타냈고 4000 ppm에서 59.3%의 항균활성을 나타냈다. 1000 ppm 농도에서 40%로 500 ppm과 비교하였을 때 항균활성이 급격히 증가하였으며 모든 농도에서 5%수준의 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-17은 *T. koningii*에 대한 수불용성 정유의 항균활성을 나타냈다. 500 ppm에서 1.7%의 항균활성을 나타냈고 4000 ppm에서 43%의 항균활성을 나타냈다. 500 ppm 농도에서 항균활성을 확인하기 어려웠으며 1000 ppm과 500 ppm의 항균활성을 비교하였을 때 약 3배의 높은 항균 활성을 나타냈다. *T. koningii*에 대한 수불용성 정유의 모든 농도에서 5%수준의 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-18은 *T. viride*에 대한 수불용성 정유의 항균활성을 나타냈다. 500 ppm에서 5.4%의 항균활성을 나타냈고 4000 ppm에서 63.2%의 항균활성을 나타냈다. *T. viride*에 대한 수불용성 정유의 모든 농도에서 5%수준의 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-19에 편백 잎으로부터 추출된 수불용성 정유를 2000 ppm의 농도로 배지에 첨가한 다음 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 항균활성을 나타냈다. *T. harzianum*, *T. aggressivum*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. atroviride* 순서로 항균활성이 점차 낮게 나타났다. 항균활성의 정도는

*T. harzianum*과 *T. aggressivum* 이 거의 비슷하게 나타났으며 *T. koningii*와 *T. viride* 또한 비슷하게 나타났다.

Fig. 3-4-20은 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 수용성 정유와 수불용성 정유의

항균활성을 나타냈다. 2000 ppm 농도에서 수불용성 정유가 수용성 정유에 비해 높은 항균활성을 나타냈고, 수불용성 정유는 2000 ppm 농도에서 23.6% - 47.8%의 항균활성을 나타냈다. 수불용성 정유의 최적 사용 가능한 농도는 2000 ppm이라고 판단된다.

수불용성 정유는 거의 모든 곰팡이류에 유효한 항균력을 가지고 있다고 알려져 있어 수목추출물로부터 분리된 천연 항균 신소재로서의 가능성을 인정받아 음료업체 및 제약업체등에서 산업, 기술적 응용에 주력하고 있는 소재로 알려져 있다.

본 연구에서는 이러한 점에 착안하여 *Trichoderma* 5종 균주의 균사생장저해실험에 적용한 결과 강한 항균활성이 나타났고, 정유가 휘발성물질로 후처리가 비교적 간단하여 버섯농가에서 발생하는 *Trichoderma*에 대한 항균제제 원료로서의 가능성을 확인 하였다.

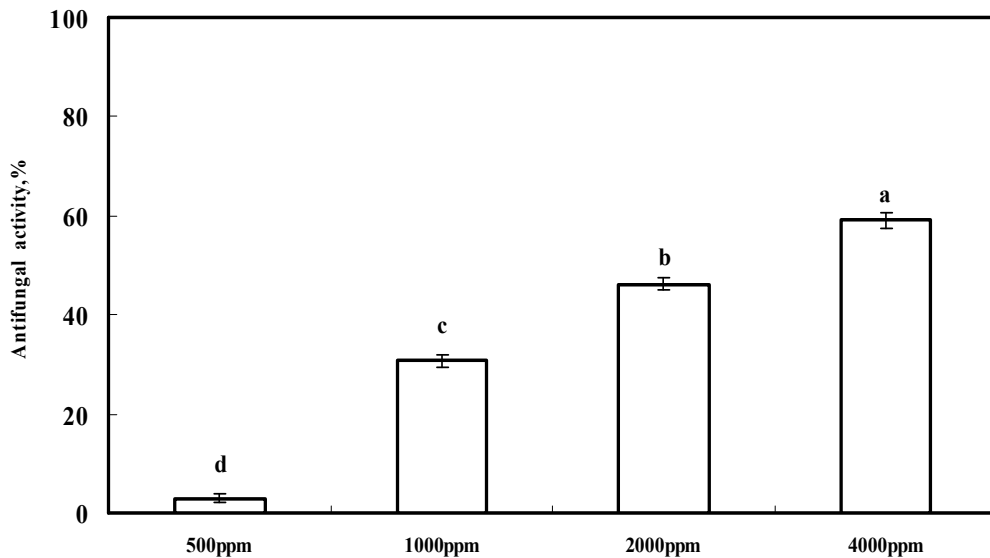


Fig. 3-4-14. Antifungal activity of essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma aggressivum*.

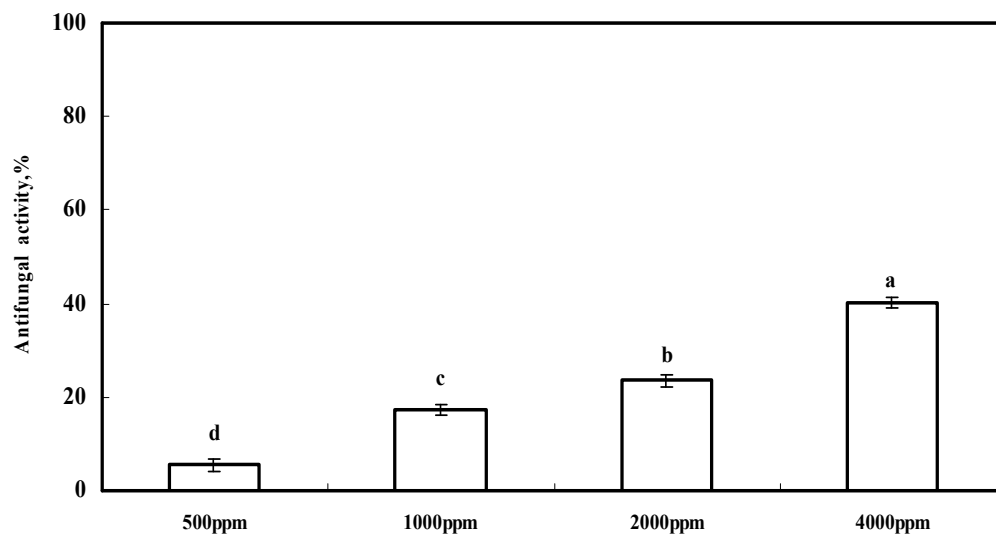


Fig. 3-4-15. Antifungal activity of essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma atroviride*.

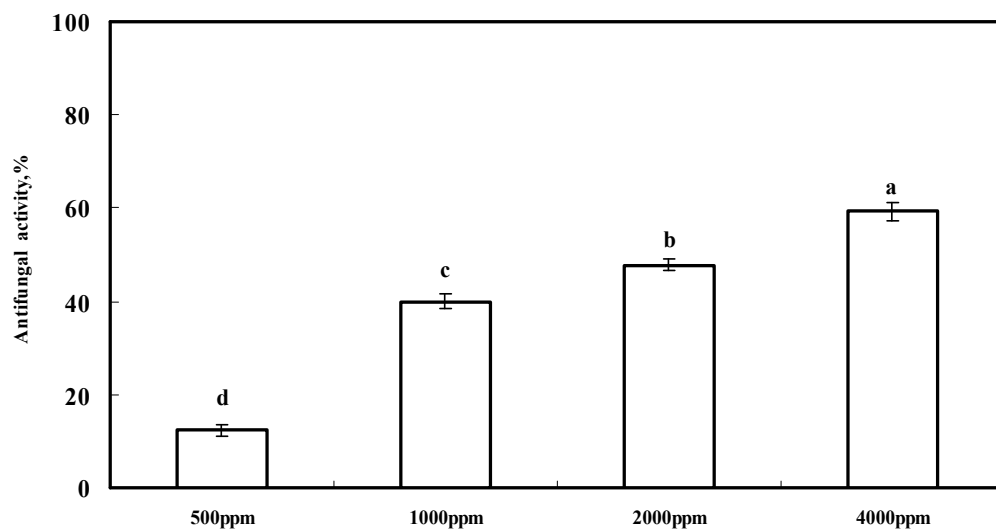


Fig. 3-4-16. Antifungal activity of essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma harzianum*.

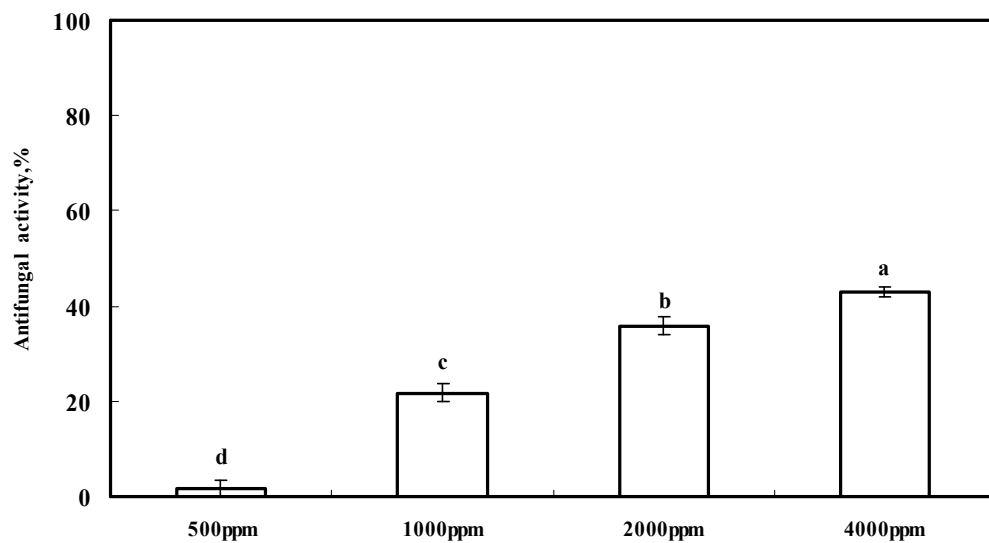


Fig. 3-4-17. Antifungal activity of essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma koningii*.

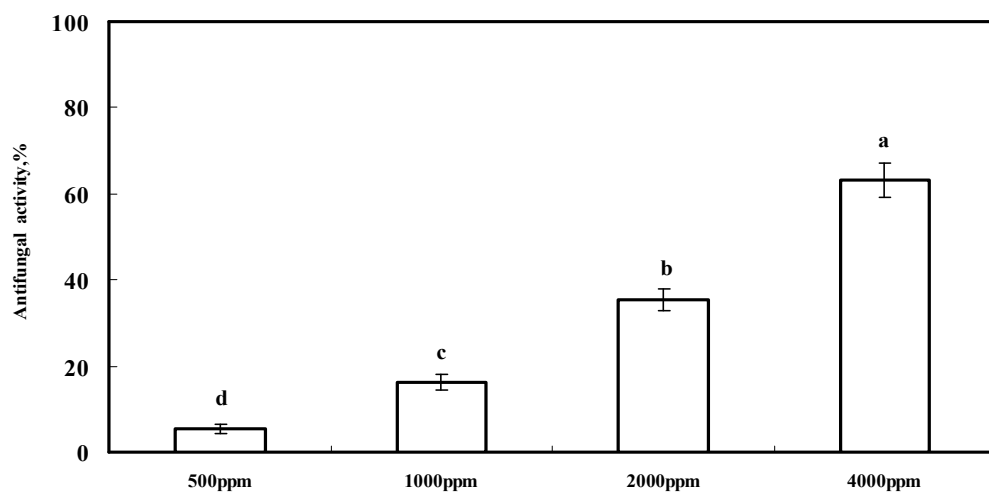


Fig. 3-4-18. Antifungal activity of essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma viride*.

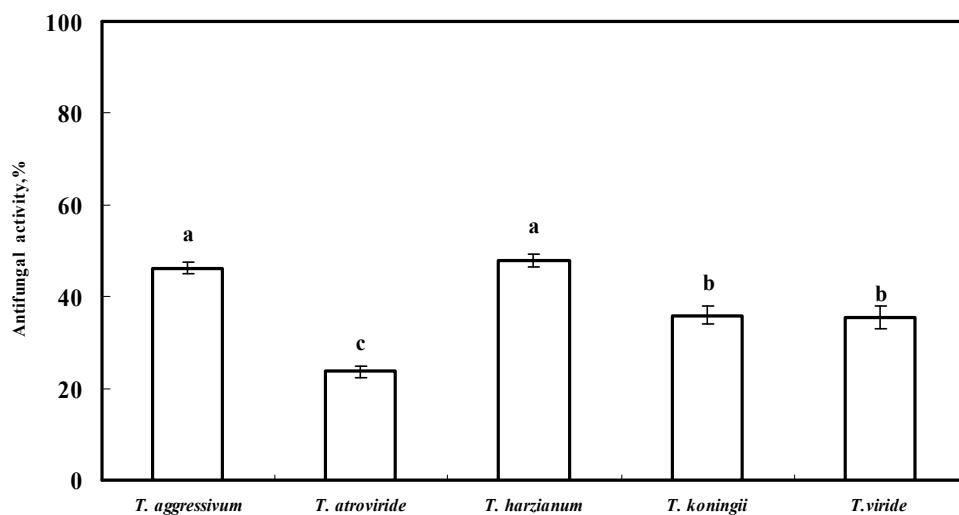


Fig. 3-4-19. Antifungal activity of essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma* spp. at 2000 ppm.

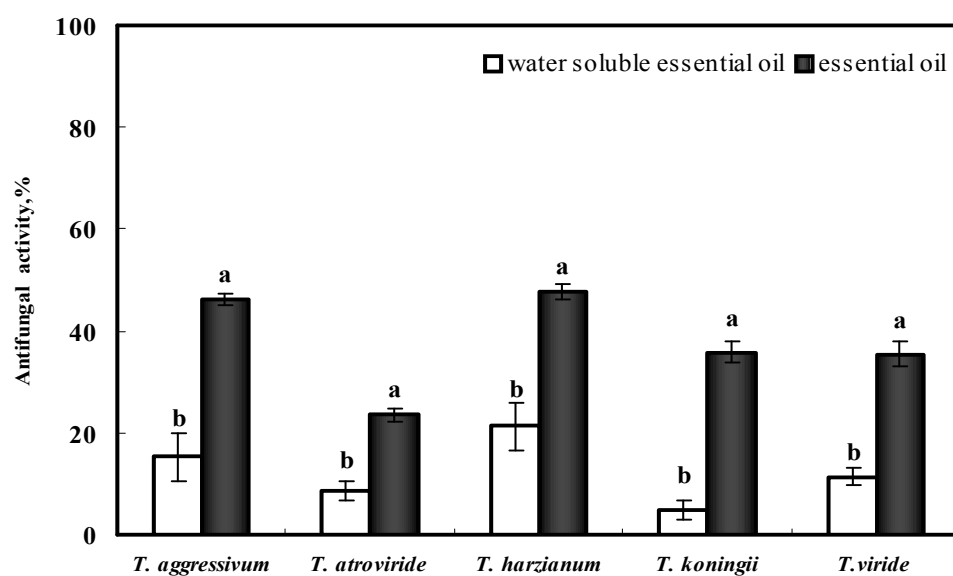


Fig. 3-4-20. Antifungal activity of water soluble essential oil and essential oil extracted from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma* spp. at 2000 ppm.



Fig. 3-4-21 과 Fig. 3-4-22는 *T. aggressivum* 과 *T. atroviride*에 대한 수불용성 정유의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. *T. aggressivum*은 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 1000 ppm - 4000 ppm 까지 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 완만한 원형으로 성장하였으며 4000 ppm의 농도에서 균사밀도가 가장 높았다.

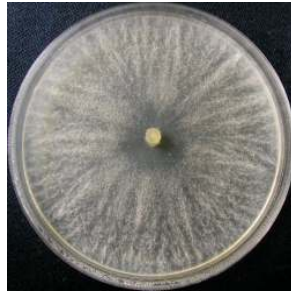
Fig. 3-4-22는 *T. atroviride*에 대한 수불용성 정유의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 500 ppm - 4000 ppm까지 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 모든 농도에서 일정하였다.

Fig. 3-4-23은 *T. harzianum*에 대한 수불용성 정유의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 500 ppm - 4000 ppm까지 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 완만한 원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 4000 ppm에서 가장 높았다. 4000 ppm은 수불용성 정유의 저해효과로 인하여 균사가 pellet 위로 성장하였다.

Fig. 3-4-24은 *T. koningi*에 대하여 수불용성 정유의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 1000 ppm - 4000 ppm 까지 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 4000 ppm에서 가장 높았다.

Fig. 3-4-25는 *T. viride*에 대하여 수불용성 정유의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교 하였을 때 성장저지환은 1000 ppm - 4000 ppm 까지 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 4000 ppm에서 가장 높았다.

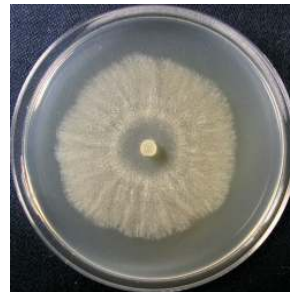
Fig. 3-4-26은 편백나무로부터 추출된 수불용성 정유를 *Trichoderma* 5종 균주에 적용하였을 때 (2000 ppm) 각 균주의 균사생장을 나타낸 결과로 수불용성 정유에 대한 각 균주의 성장저해 효능은 다르게 나타났다. *T. aggressivum*과 *T. harzianum*이 성장저해를 많이 받았다. 그리고 각 균주의 균사생장 형태는 각각 다르게 나타났다.



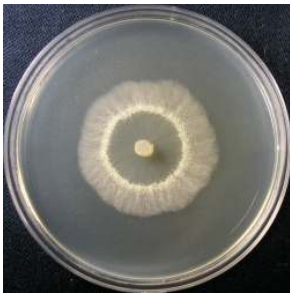
Control



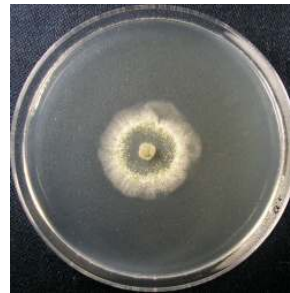
500 ppm



1000 ppm



2000 ppm

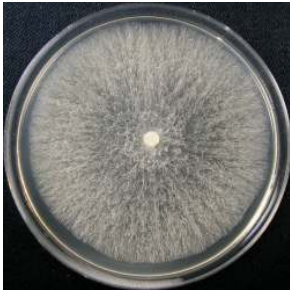


4000 ppm

Fig. 3-4-21. Growth inhibition of essential oil from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma aggressivum*.



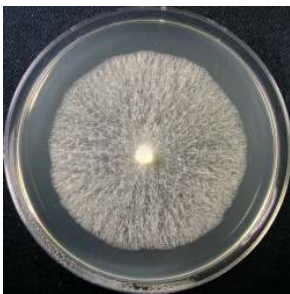
Control



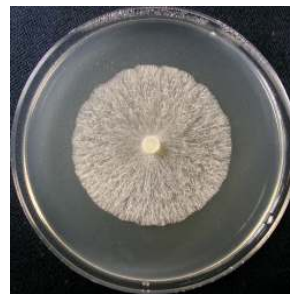
500 ppm



1000 ppm

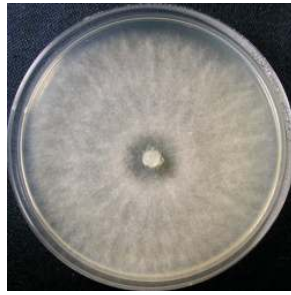


2000 ppm

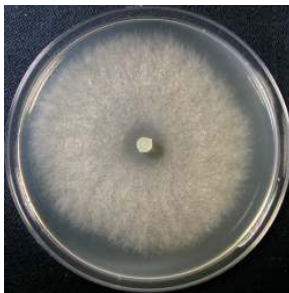


4000 ppm

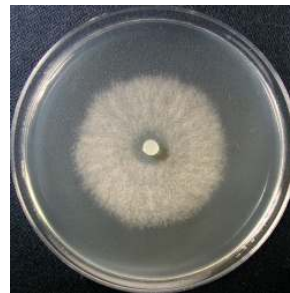
Fig. 3-4-22. Growth inhibition of essential oil from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma atroviride*.



Control



500 ppm



1000 ppm



2000 ppm



4000 ppm

Fig. 3-4-23. Growth inhibition of essential oil from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma harzianum*.



Control



500 ppm



1000 ppm



2000 ppm



4000 ppm

Fig. 3-4-24. Growth inhibition of essential oil from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma koningii*.



Control



500 ppm



1000 ppm

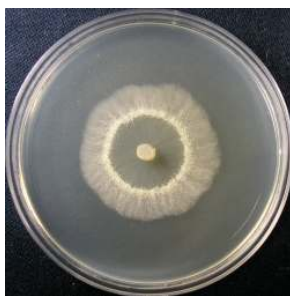


2000 ppm



4000 ppm

Fig. 3-4-25. Growth inhibition of essential oil from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma viride*.



*Trichoderma aggressivum*



*Trichoderma atroviride*



*Trichoderma harzianum*



*Trichoderma koningii*



*Trichoderma viride*

Fig. 3-4-26. Growth inhibition of essential oil from *Chamaecyparis obtusa* leaves against *Trichoderma* spp. at 2000 ppm.

다) 수목추출물의 항균활성

Table 3-4-3에 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 미송으로부터 분리된 수목 추출물의 항균활성을 나타냈다. 수목추출물을 *Trichoderma* 5종 균주에 대하여 적용하였을 때 항균활성은 각각 다르게 나타났다. 1000 ppm의 농도에서 30.7% - 35.7%의 항균활성을 나타냈으며, 모든 농도에서 추출물의 항균활성은 *T. koningii*의 125 ppm과 250 ppm을 제외하고는 5% 수준에서 유의성이 인정되었다.

*Trichoderma* 5종 균주 각각에 대한 항균활성의 정도는 차이가 있었으며, 1000 ppm 추출물농도에서 *T. atroviride*가 35.7%, *T. harzianum* 이 34.9%의 항균활성을 나타냈다. 125 ppm의 저농도에서는 최저 6.6%의 항균활성을 나타냈지만 1000 ppm에서는 평균 33.4%의 항균활성을 나타내는 것으로 확인되었으며, 미송으로부터 분리된 수목추출물은 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 항균제제로서 사용 가능성을 확인하였다.

Dose level (ppm/plate*)	Antifungal activity (%), mean ± SD				
	Strain				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
125 ppm	3.9 ± 1.3d**	10.7 ± 1.4d	7.1 ± 1.2d	6.6 ± 1.4c	4.5 ± 0.8d
250 ppm	12.7 ± 1.8c	14.0 ± 1.1c	11.6 ± 1.3c	6.2 ± 0.4c	7.6 ± 1.0c
500 ppm	21.7 ± 0.6b	21.4 ± 1.3b	23.6 ± 1.5b	21.0 ± 1.0b	16.4 ± 0.8b
1000 ppm	34.7 ± 1.4a	35.7 ± 2.2a	34.9 ± 1.6a	31.0 ± 1.3a	30.7 ± 1.4a

Table 3-4-3. Antifungal activity of wood extract of *Pseudotsuga menziesii* (10 0°C 3hrs)

\* MA (Malt agar) medium used for fungal growth.

\*\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to Duncan's new multiple-range test (n=5)



Fig. 3-4-27은 *T. aggressivum*에 대한 수목추출물의 항균활성을 나타냈다. 125 ppm에서 3.9%의 항균활성을 나타냈고 1000 ppm에서 34.7%의 항균활성을 나타냈다. *T. aggressivum*에 대한 수목추출물의 항균활성은 125 ppm - 1000 ppm까지 5%수준에서 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-28은 *T. atroviride*에 대한 수목추출물의 항균활성을 나타냈다. 250 ppm에서 14%, 1000 ppm에서 35.7%의 항균활성을 나타냈다. *T. atroviride*에 대한 수목추출물의 항균활성은 125 ppm - 1000 ppm까지 5%수준에서 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-39는 *T. harzianum*에 대한 수목추출물의 항균활성을 나타냈다. 125 ppm에서 7.1%, 1000 ppm에서 34.9%의 항균활성을 나타냈다. 500 ppm 농도부터 항균활성이 급격하게 증가하였으며, 125 ppm - 1000 ppm까지 5% 수준에서 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-30은 *T. koningii*에 대한 수목추출물의 항균활성을 나타냈다. 125 ppm과 250 ppm에 있어서 항균활성은 약 6.4%로, 농도에 따른 항균활성은 유의성이 없었다. 1000 ppm에서 31%의 항균활성을 나타냈다. 500 ppm부터 항균활성이 증가하였으며 250 ppm, 500 ppm 및 1000 ppm 사이에서 5% 수준의 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-31은 *T. viride*에 대한 수목추출물의 항균활성을 나타냈다. 125 ppm에서 4.5%, 250ppm에서 7.6%, 500 ppm에서 16.4%, 1000 ppm에서 30.7%의 항균활성을 나타냈다. *T. viride*에 대한 수목추출물의 항균활성은 125 ppm - 1000 ppm농도에서 5% 수준의 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-32는 소나무(미송) 목부로부터 추출된 수목추출물의 *Trichoderma* spp. 5종 균주에 대한 항균활성을 비교한 것으로 *T. aggressivum*, *T. atroviride* 및 *T. harzianum*의 균주별 항균활성은 5% 수준에서 유의성이 없었으며 *T. koningii*와 *T. viride*는 이들 그룹과 항균활성이 다르게 나타났다.

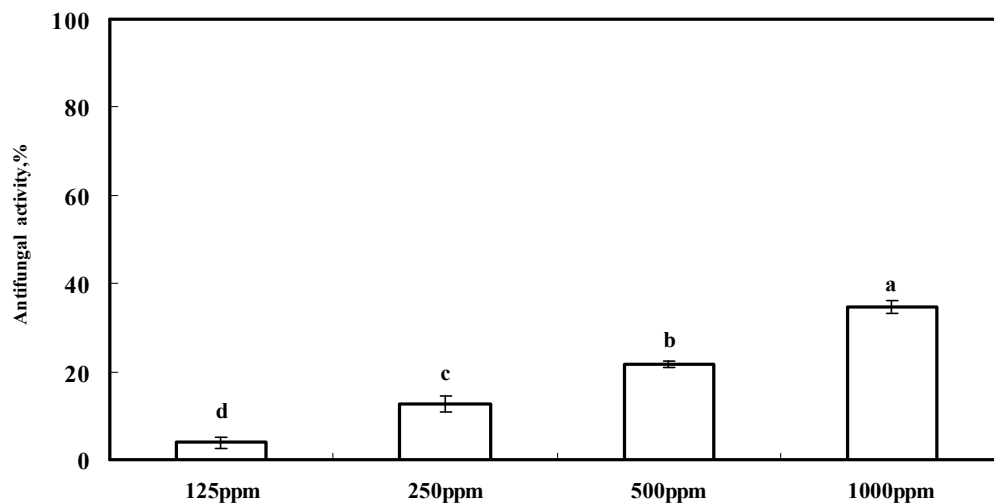


Fig. 3-4-27. Antifungal activity of wood extract of *Pseudotsuga menziesii* (100°C, 3hrs) against *T. aggressivum*.

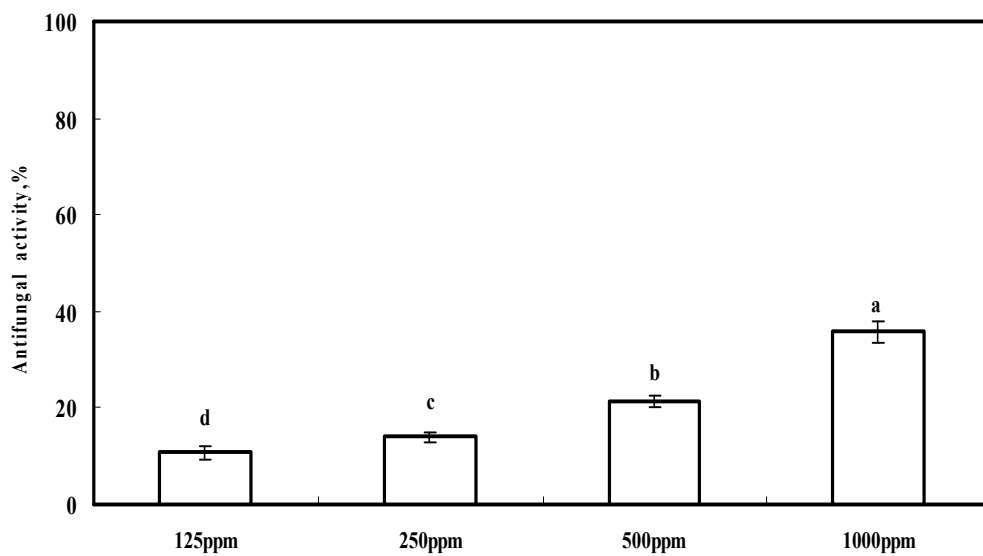


Fig. 3-4-28. Antifungal activity of wood extract of *Pseudotsuga menziesii* (100°C, 3hrs) against *T. atroviride*.

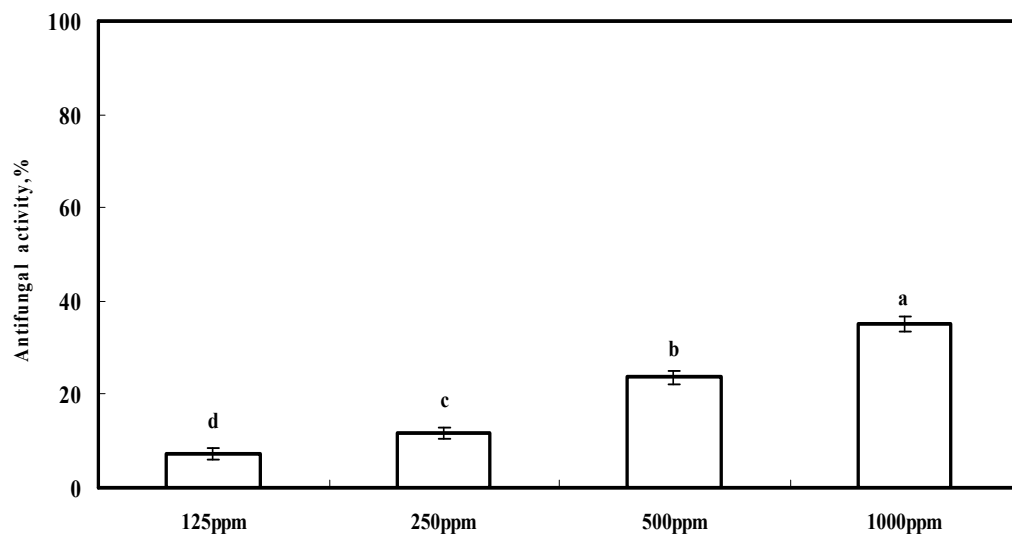


Fig. 3-4-29. Antifungal activity of wood extract of *Pseudotsuga menziesii* (100°C, 3hrs) against *T. harzianum*.

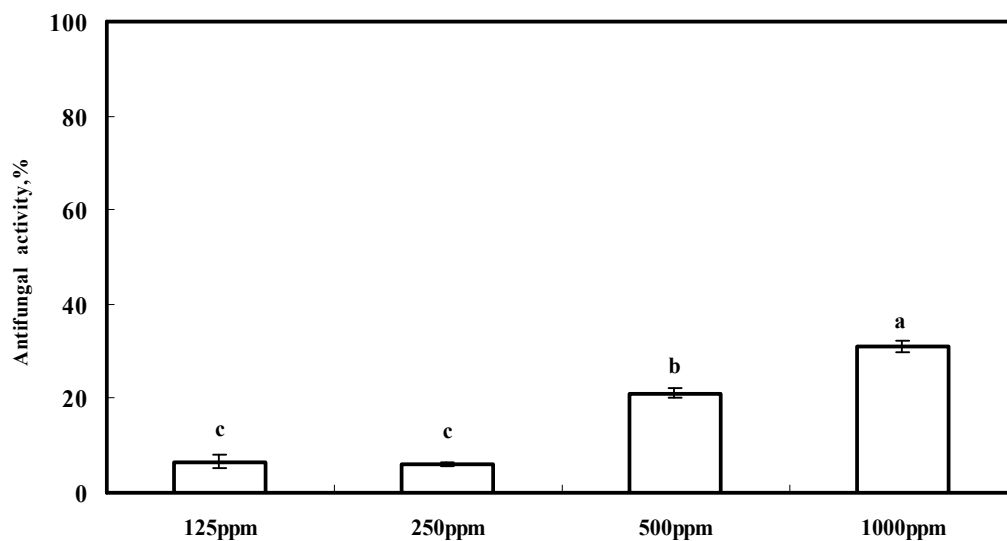


Fig. 3-4-30. Antifungal activity of wood extract of *Pseudotsuga menziesii* (100°C, 3hrs) against *T. koningii*.

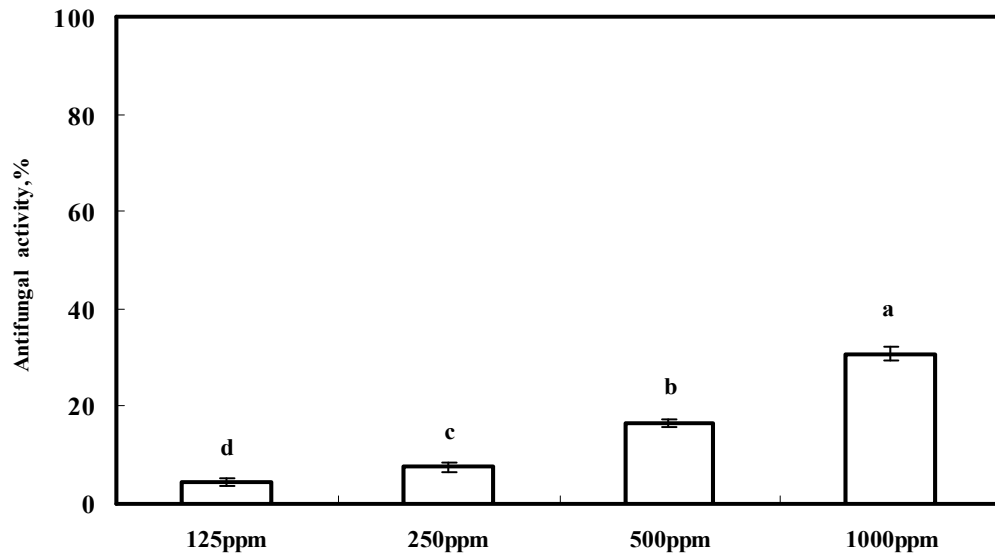


Fig. 3-4-31. Antifungal activity of wood extract of *Pseudotsuga menziesii* (100°C 3hrs) against *T. viride*.

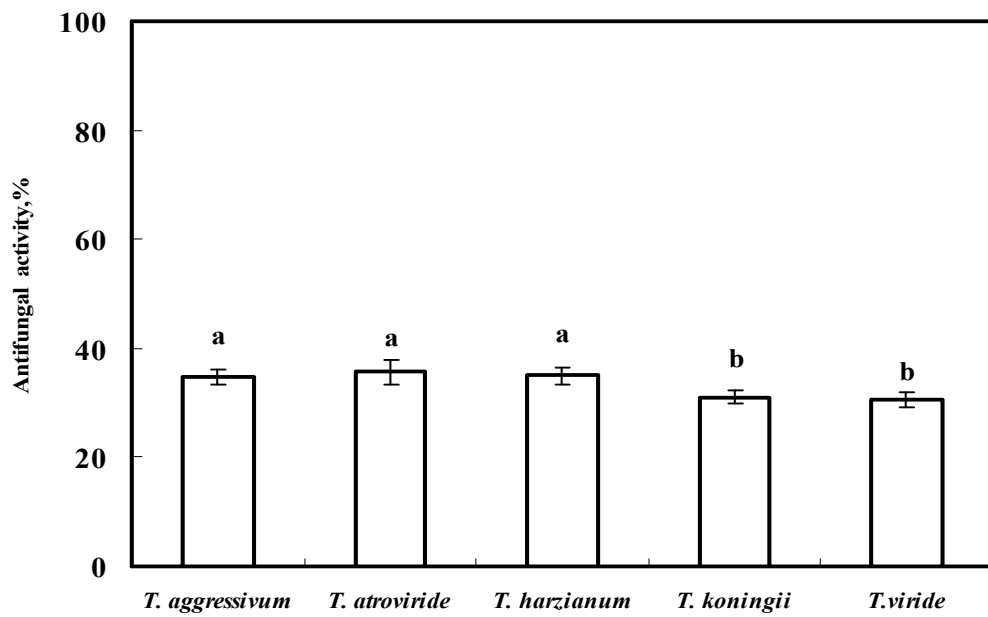


Fig.3-4-32. Antifungal activity of wood extract of *Pseudotsuga menziesii* (100°C 3hrs) against *Trichoderma* spp. at 1000 ppm.

Fig. 3-4-33 과 Fig. 3-4-34은 *T. aggressivum*과 *T. atroviride*에 대한 수목추출물의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. *T. aggressivum*에서는 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 125 ppm - 1000ppm까지 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 농도 별로 균일하였다.

Fig. 3-4-34는 *T. atroviride*에 대한 수목추출물의 성장저해효과를 나타냈다. 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 500 ppm - 1000 ppm까지 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 불규칙 원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 농도별로 균일하였다.

Fig. 3-4-35는 *T. harzianum*에 대한 수목추출물의 성장저해효과를 나타냈다. 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 125 ppm부터 - 1000 ppm까지 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 불규칙 원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 농도별로 균일하였다.

Fig. 3-4-36은 *T. koningii*에 대한 수목추출물의 성장저해효과를 나타냈다. 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 500 ppm부터 - 1000 ppm까지 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 1000 ppm 농도에서 가장 높았다.

Fig. 3-4-37은 *T. viride*에 대한 수목추출물의 성장저해효과를 나타냈다. 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 500 ppm부터 뚜렷하게 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 농도별로 균일하였다.

Fig. 3-4-38은 소나무(미송) 목부로부터 추출된 수목추출물의 *Trichoderma* spp. 5종 균주에 대한 균사생장 저해효과를 비교한 것으로 *T. aggressivum*, *T. atroviride* 및 *T. harzianum*는 균사생장 저해효과가 비슷한 수준이었으며 *T. koningii* 와 *T. viride*는 이들 그룹과 균사생장저해효과 가 다르게 나타났다.



Control



125 ppm



250 ppm



500 ppm



1000 ppm

Fig. 3-4-33. Growth inhibition of wood extract of *Pseudotsuga menziesii* (100°C, 3hrs) against *T. aggressivum*.



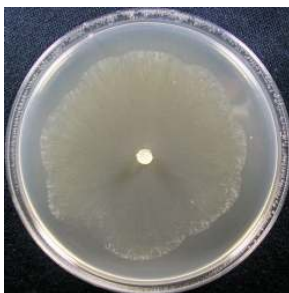
Control



125 ppm



250 ppm



500 ppm



1000 ppm

Fig. 3-4-34. Growth inhibition of wood extract of *Pseudotsuga menziesii* (10 °C, 3hrs) against *T. atroviride*.



Control



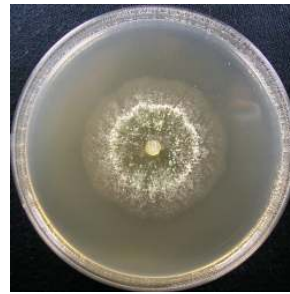
125 ppm



250 ppm



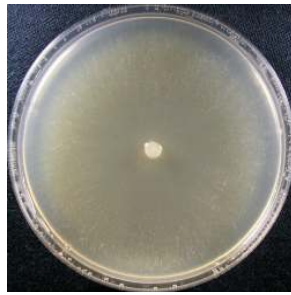
500 ppm



1000 ppm

Fig. 3-4-35. Growth inhibition of wood extract of *Pseudotsuga menziesii* (10 °C, 3hrs) against *T. harzianum*.

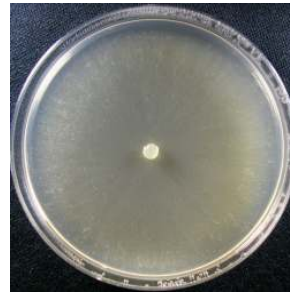




Control



125ppm



250 ppm



500 ppm

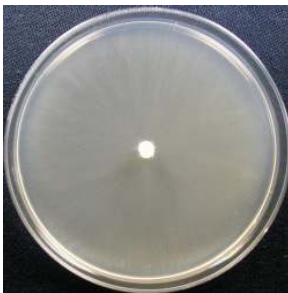


1000 ppm

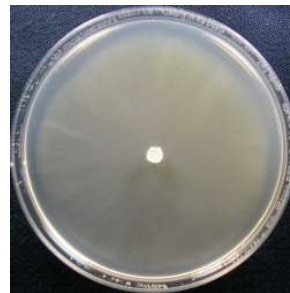
Fig. 3-4-36. Growth inhibition of wood extract of *Pseudotsuga menziesii* (10 °C, 3hrs) against *Trichoderma koningii*.



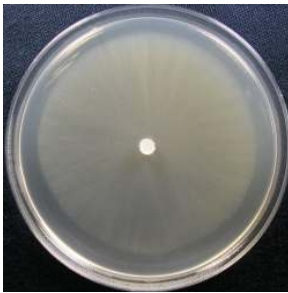
Control



125 ppm



250 ppm

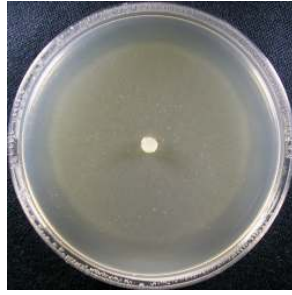


500 ppm

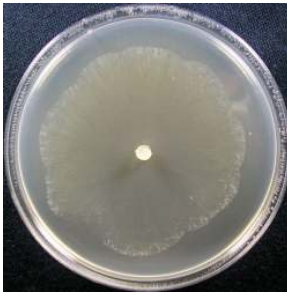


1000 ppm

Fig. 3-4-37. Growth inhibition of wood extract of *Pseudotsuga menziesii* (10 °C, 3hrs) against *T. viride*.



*Trichoderma aggressivum*



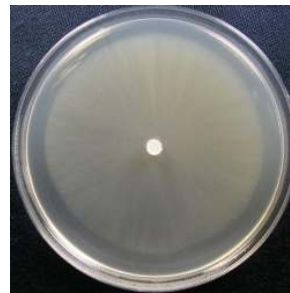
*Trichoderma atroviride*



*Trichoderma harzianum*



*Trichoderma koningii*



*Trichoderma viride*

Fig. 3-4-38. Growth inhibition of wood extract of *Pseudotsuga menziesii* (10 °C, 3hrs) against *Trichoderma* spp. at 1000 ppm.

라) *n*-Hexane 추출물의 항균활성

Table 3-4-4에 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 미송 목분 추출물로부터 분리된 *n*-hexane 추출물의 항균활성을 나타냈다. *n*-Hexane 추출물을 *Trichoderma* 5종 균주에 대하여 적용 하였을 때, 1000 ppm의 농도에서 47% - 65 % 의 항균활성을 나타냈으며, 250 ppm 에서는 약 22% - 49%의 높은 항균활성을 나타냈다. *T. atroviride*는 125 ppm 에서 36.7%의 항균활성을 나타내어 *T. aggressivum*의 250 ppm 보다 높은 항균활성을 나타냈으며 나머지 3종 균주에 대한 500 ppm 의 항균활성과 비슷하게 나타났다. *Trichoderma* 5종 균주별로 항균활성의 정도는 차이가 있었다. 1000 ppm의 농도에서 항균활성이 최대 65.6% 수준으로 확인되었으며, *n*-hexane 추출물은 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 단일항균제제로서의 사용 가능성을 확인 하였다.

Dose level (ppm/plate*)	Antifungal activity (%), mean $\pm$ SD				
	Strain				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
125 ppm	29.2 $\pm$ 2.9d**	36.7 $\pm$ 5.5d	16.8 $\pm$ 0.8d	22.3 $\pm$ 0.8d	12.2 $\pm$ 1.6d
250 ppm	35.2 $\pm$ 0.7c	49.0 $\pm$ 1.8c	25.0 $\pm$ 1.0c	26.9 $\pm$ 2.1c	22.1 $\pm$ 1.0c
500 ppm	48.5 $\pm$ 0.5b	61.2 $\pm$ 0.6b	38.8 $\pm$ 0.7b	39.6 $\pm$ 2.3b	40.3 $\pm$ 0.8b
1000 ppm	52.3 $\pm$ 0.5a	65.6 $\pm$ 0.8a	47.1 $\pm$ 2.2a	48.5 $\pm$ 1.8a	51.1 $\pm$ 1.2a

Table 3-4-4. Antifungal activity of *n*-hexane soluble fraction separated from wood extract of *Pseudotsuga menziesii*

\* MA (Malt agar) medium used for fungal growth.

\*\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different ( $P < 0.05$ ) according to Duncan's new multiple-range test ( $n = 5$ )

Fig. 3-4-39에 *T. aggressivum*에 대한 수목추출물로부터 분리된 *n*-hexane 추출물의 항균활성을 나타냈다. 125 ppm에서 29.2%, 250 ppm에서 35.2%, 500 ppm에서 48.5% 1000 ppm에서 52.3%의 항균활성을 나타냈다. 500 ppm에서 항균활성이 크게 증가되는 것을 확인할 수 있었으며 5%수준에서 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-40에 *T. atroviride*에 대한 수목추출물로부터 분리된 *n*-hexane 추출부의 항균활성을 나타냈다. 500 ppm에서 61.2%, 1000 ppm에서 65.6%로 나타났으며 *T. aggressivum*에 대한 *n*-hexane 추출물의 항균활성은 모든 농도에서 5% 수준의 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-41에 *T. harzianum*에 대한 수목추출물로부터 분리된 *n*-hexane 추출부의 항균활성을 나타냈다. 125 ppm에서 16.8%, 1000 ppm에서 47.1%로 나타났다. *T. harzianum*에 대한 수목추출물의 *n*-hexane 추출물의 항균활성은 모든 농도에서 5%수준의 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-42에 *T. koningii*에 대한 수목추출물로부터 분리된 *n*-hexane 추출부의 항균활성을 나타냈다. 125 ppm에서 22.5%, 1000 ppm에서 48.5%의 항균활성을 나타냈다. *T. koningii*에 대한 *n*-hexane 추출물의 항균활성은 모든 농도에서 5%수준의 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-43에 *T. viride*에 대한 수목추출물로부터 분리된 *n*-hexane 추출부의 항균활성을 나타냈다. 500 ppm에서 40.3%, 1000 ppm에서 51.1%의 항균활성을 나타냈으며 500 ppm에서 항균활성이 급격히 증가하였다.

*T. viride*에 대한 *n*-hexane 추출물의 항균활성은 모든 농도에서 5%수준의 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-44에 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 *n*-hexane 추출물의 항균활성을 비교하였다. *T. atroviride*가 *T. aggressivum*, *T. harzianum*, *T. koningii* 및 *T. viride*보다 항균활성이 높게 나타났으며 *T. harzianum*, *T. koningii* 및 *T. viride*에 대한 항균활성은 5% 수준에서 유의성이 인정되지 않았다.

Fig. 3-4-45는 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 수목추출물과 *n*-hexane 추출물

의 항균활성을 비교하였다. 5종 균주에 대한 수목추출물의 항균활성은 비교적 균일하게 나타난 반면 *n*-hexane 추출물은 항균활성 정도의 차이가 있었다. 모든 균주에서 *n*-hexane 추출물이 수목추출물보다 높은 항균활성을 나타냈다. 그러나 유기용제인 *n*-hexane 추출물은 제제화 공정 및 천연추출물의 제제화에 있어서 현실적으로 추출비용의 상승 및 인체유해성으로 인한 이용의 한계가 있다고 판단된다.

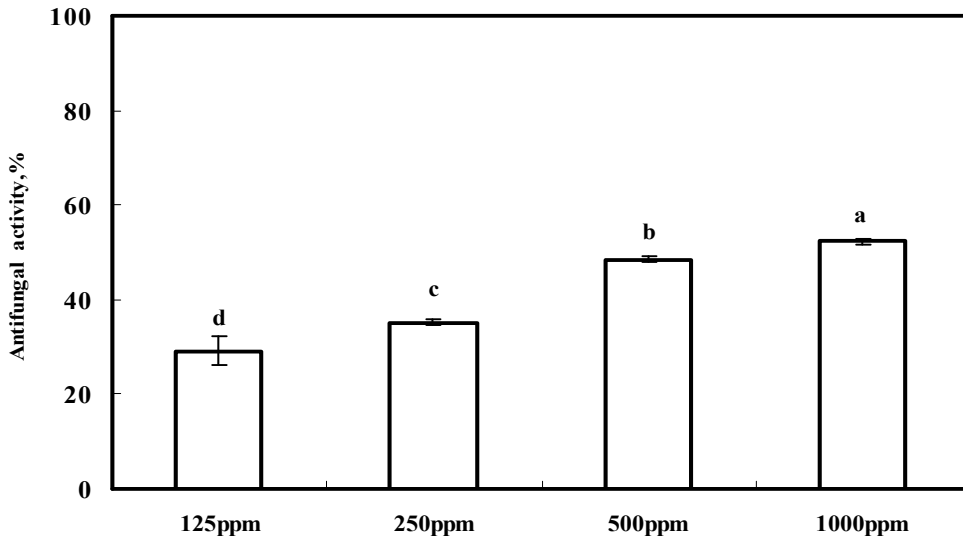


Fig. 3-4-39. Antifungal activity of *n*-hexane soluble fraction separated from wood extract of *Pseudotsuga menziesii* against *T. aggressivum*.

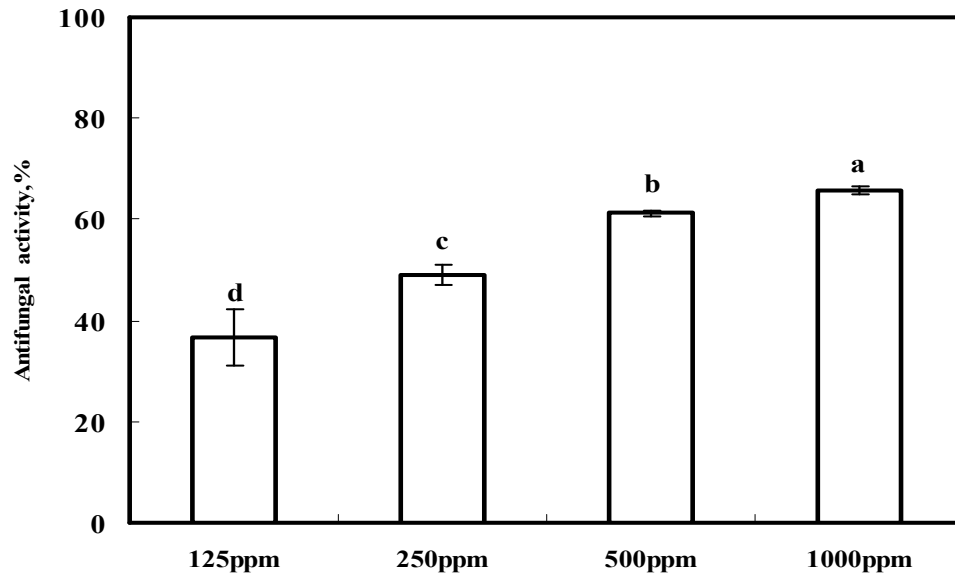


Fig. 3-4-40. Antifungal activity of *n*-hexane soluble fraction separated from hot water extract of *Pseudotsuga menziesii* against *T. atroviride*.

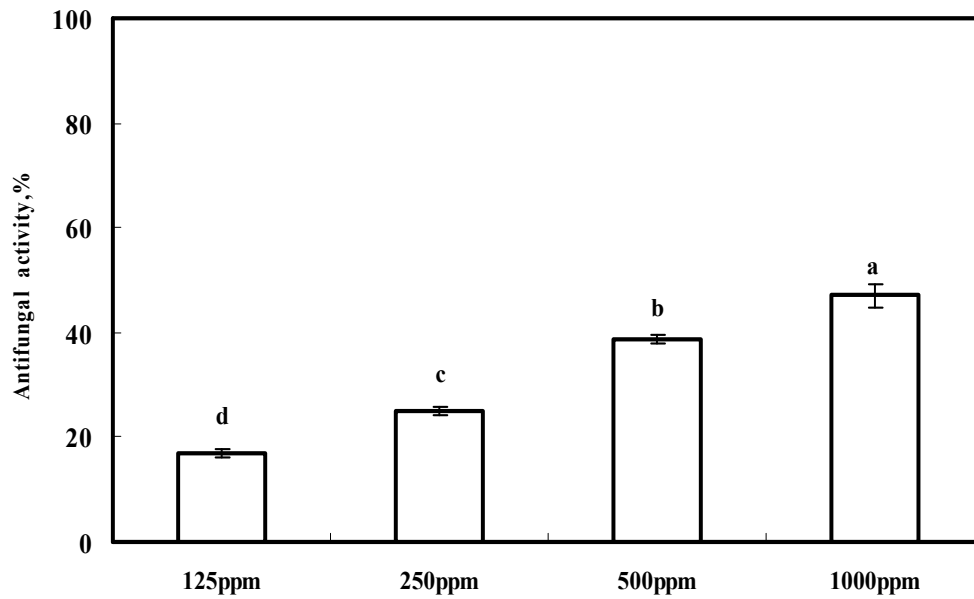


Fig. 3-4-41. Antifungal activity of *n*-hexane soluble fraction separated from wood extract of *Pseudotsuga menziesii* against *T. harzianum*.

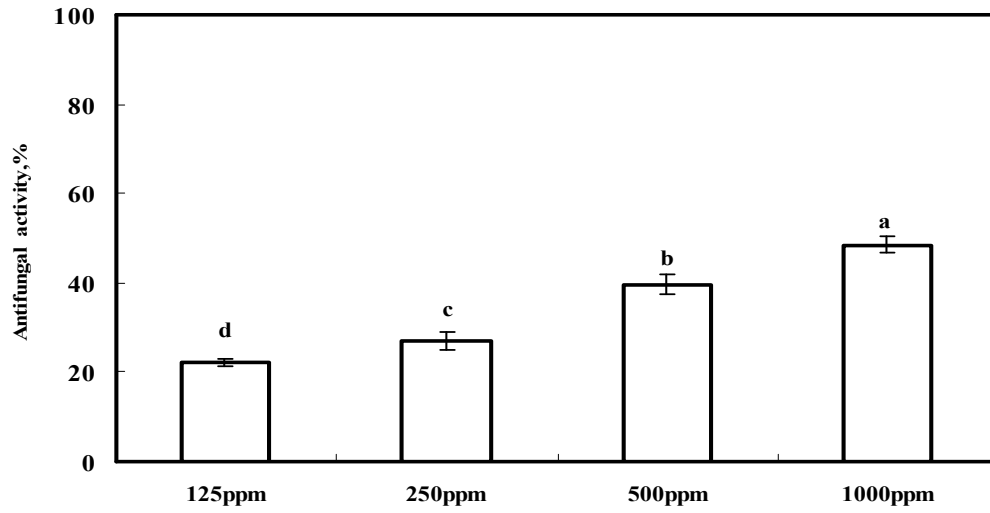


Fig. 3-4-42. Antifungal activity of *n*-hexane soluble fraction separated from wood extract of *Pseudotsuga menziesii* against *T. koningii*.

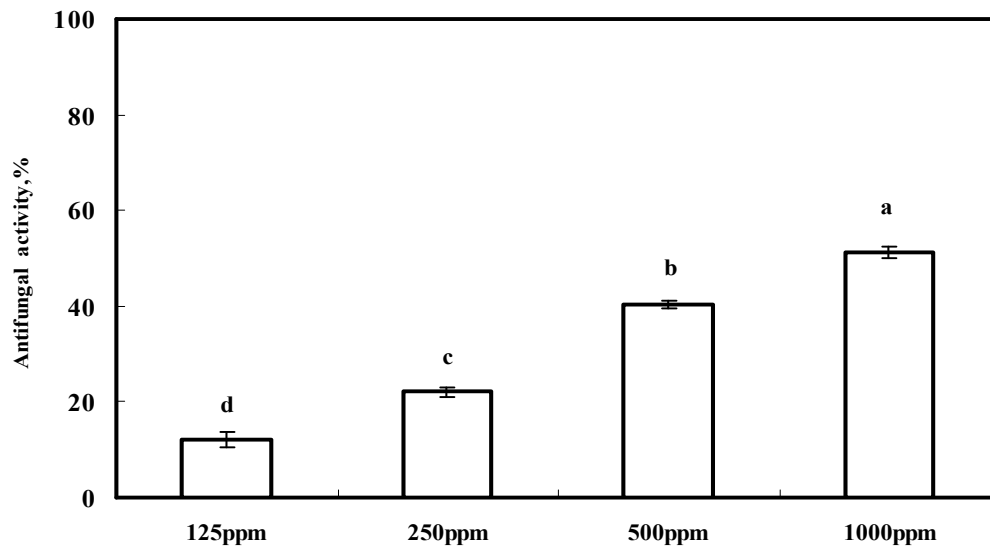


Fig. 3-4-43. Antifungal activity of *n*-hexane soluble fraction separated from wood extract of *Pseudotsuga menziesii* against *T. viride*.



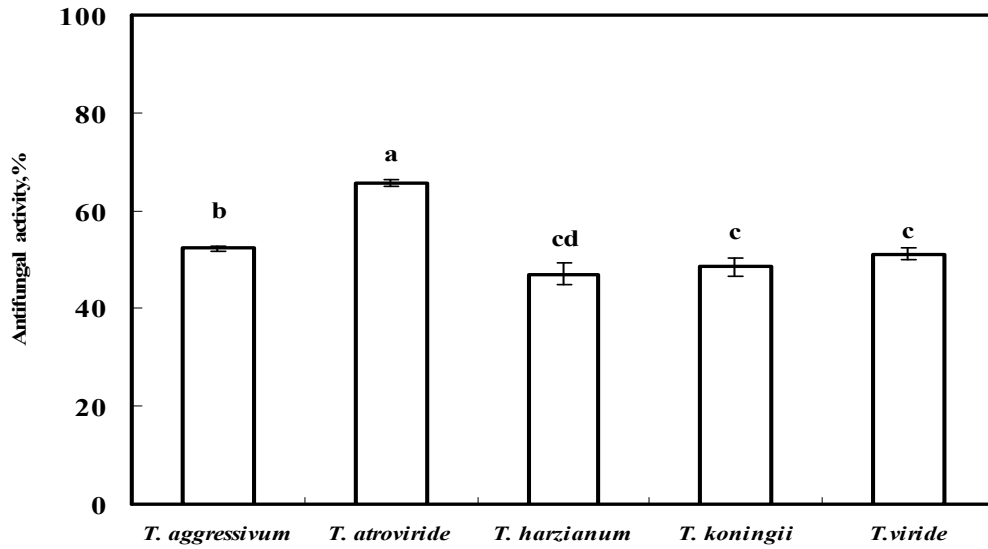


Fig. 3-4-44. Antifungal activity of *n*-hexane soluble fraction separated from wood extract of *Pseudotsuga menziesii* against *Trichoderma* spp. at 1000 ppm.

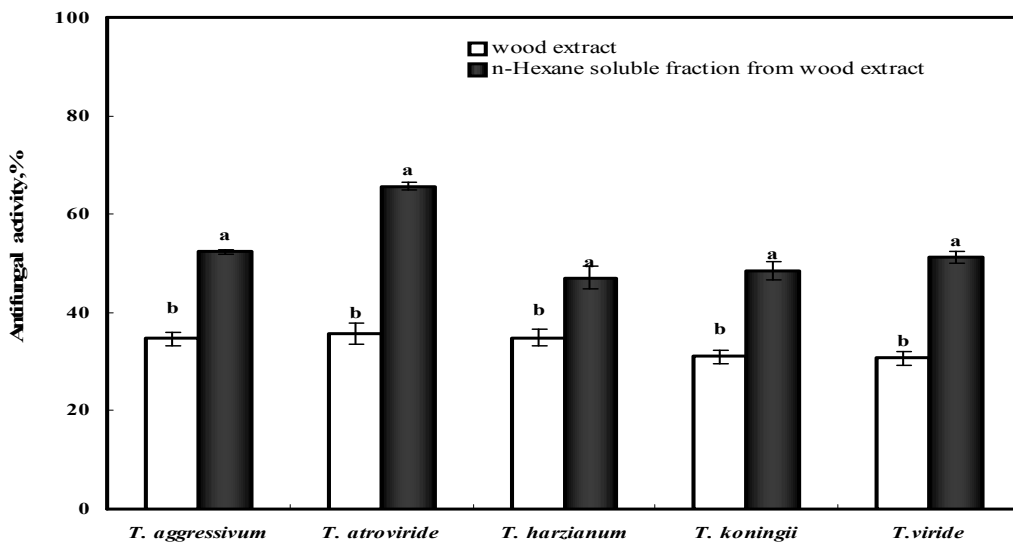


Fig. 3-4-45. Antifungal activity of wood extract and *n*-hexane soluble fraction separated from wood extract of *Pseudotsuga menziesii* against *Trichoderma* spp. at 1000 ppm.

Fig. 3-4-46은 *T. aggressivum*에 대한 *n*-hexane 추출물의 생장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 생장저지환은 125 ppm - 1000ppm 까지 확인할 수 있었고 균사의 생장형태는 원형으로 생장하였으며 균사의 밀도는 1000 ppm에서 가장 높게 나타났다.

Fig. 3-4-47은 *T. atroviride*에 대한 *n*-hexane 추출물의 생장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 생장저지환은 125 ppm - 1000ppm 까지 확인할 수 있었고 균사의 생장형태는 불규칙원형으로 생장하였으며 균사의 밀도는 1000 ppm에서 가장 높게 나타났다. 1000 ppm농도에서 균사의 생장형태는 pellet 위로 생장하였다.

Fig. 3-4-48은 *T. harzianum*에 대한 *n*-hexane 추출물의 생장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 생장저지환은 125 ppm - 1000ppm 까지 확인할 수 있었고 균사의 생장형태는 원형으로 생장하였으며 균사의 경계가 형성되었다. 균사의 밀도는 농도별로 균일하였다.

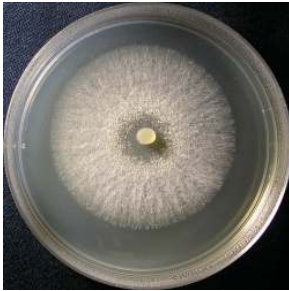
Fig. 3-4-49는 *T. koningii*에 대한 *n*-hexane 추출물의 생장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 생장저지환은 125 ppm - 1000ppm 까지 확인할 수 있었고 균사의 생장형태는 원형으로 생장하였으며 균사의 밀도는 250 ppm과 500 ppm에서 높게 나타났다.

Fig. 3-4-50은 *T. viride*에 대한 *n*-hexane 추출물의 생장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 생장저지환은 125 ppm - 1000ppm 까지 확인할 수 있었다. 125 ppm - 500 ppm 까지 균사의 생장형태는 불규칙 원형으로 생장하였지만 1000 ppm 에서는 원형으로 생장하였다.

Fig. 3-4-51은 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 *n*-hexane 추출물의 1000 ppm 농도에서 균사생장저해효과를 나타낸 사진이다. 균사의 생장형태에 있어서 *T. aggressivum*, *T. koningii* 및 *T. viride*는 원형이었으며 *T. atroviride* 및 *T. harzianum*은 다른 3종 균주와 차이가 나타났다. 특히 *T. atroviride*가 균사생장저해효과가 가장 높게 나타난 것을 육안으로 확인할 수 있었다.



Control



125 ppm



250 ppm

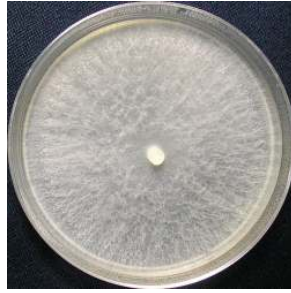


500 ppm

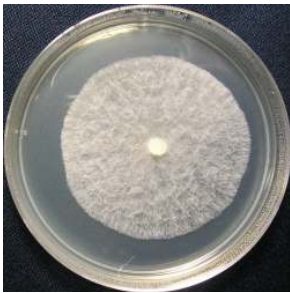


1000 ppm

Fig. 3-4-46. Growth inhibition of *n*-hexane soluble fraction separated from wood extract of *Pseudotsuga menziesii* against *T. aggressivum*.



Control



125 ppm



250 ppm



500 ppm

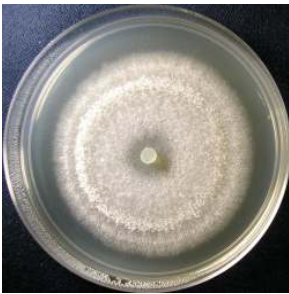


1000 ppm

Fig. 3-4-47. Growth inhibition of *n*-hexane soluble fraction separated from wood extract of *Pseudotsuga menziesii* against *T. atroviride*.



**Control**



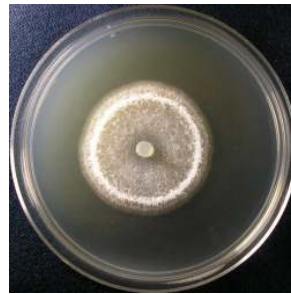
**125 ppm**



**250 ppm**

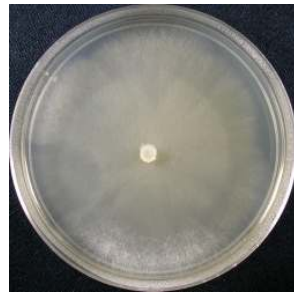


**500 ppm**

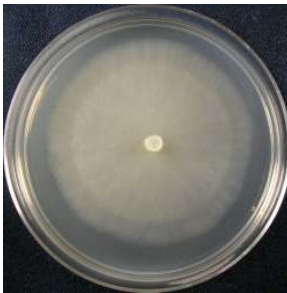


**1000 ppm**

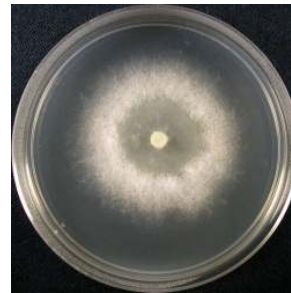
Fig. 3-4-48. Growth inhibition of *n*-hexane soluble fraction separated from wood extract of *Pseudotsuga menziesii* against *T. harzianum*.



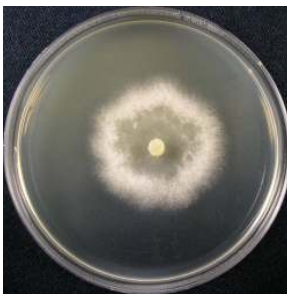
Control



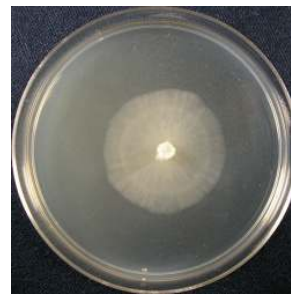
125 ppm



250 ppm

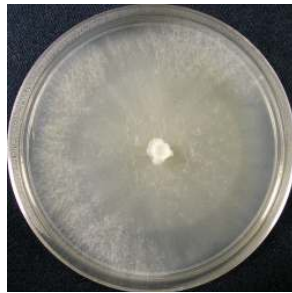


500 ppm



1000 ppm

Fig. 3-4-49. Growth inhibition of *n*-hexane soluble fraction separated from wood extract of *Pseudotsuga menziesii* against *T. koningii*.



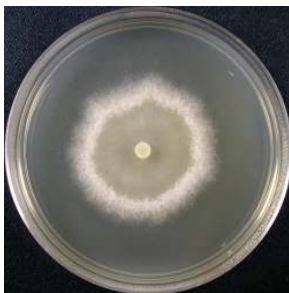
Control



125 ppm



250 ppm



500 ppm



1000 ppm

Fig. 3-4-50. Growth inhibition of *n*-hexane soluble fraction separated from wood extract of *Pseudotsuga menziesii* against *T. viride*.



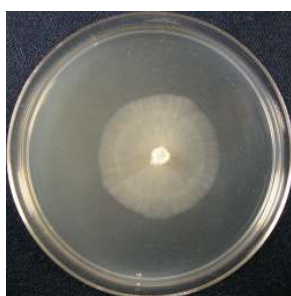
*Trichoderma aggressivum*



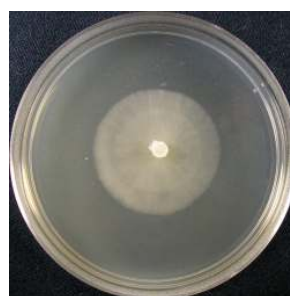
*Trichoderma atroviride*



*Trichoderma harzianum*



*Trichoderma koningii*



*Trichoderma viride*

Fig. 3-4-51. Growth inhibition of *n*-hexane soluble fraction separated from wood extract of *Pseudotsuga menziesii* against *Trichoderma* spp. at 1000 ppm.



Table 3-4-5와 Fig. 3-4-52는 미송의 수용성 정유, 미송의 수불용성 정유, 수목추출물 및 수목추출물로부터 분리된 *n*-hexane 추출물을 *Trichoderma* 5종 균주에 대하여 1000 ppm 농도로 적용하였을 때 항균활성을 비교하였다.

*Trichoderma* 5종 균주에 대하여 수용성 정유는 항균활성이 나타났지만 다른 추출물과 비교했을 때 매우 낮은 항균활성을 나타내어 단일 항균제제로서 사용이 어렵다고 판단되었다.

수목추출물로부터 분리된 *n*-hexane 추출물이 다른 추출물과 비교하였을 때 가장 높은 항균활성을 나타냈지만, 추출시 유기용매를 사용하였기 때문에 다른 추출물에 비하여 제제의 실용화가 불리하다고 판단된다.

본 연구 결과에서 수불용성 정유보다 높은 항균활성을 나타낸 수목추출물이 *Trichoderma* 5종 균주에 대하여 비교적 높은 항균력을 가진 것으로 판단된다. 그러나 약 33%의 항균활성을 나타낸 수목추출물은 단독 항균제제로서의 사용은 시장 측면에서 효율성이 낮다고 판단된다.

Dose level (ppm/plate*)	Antifungal activity (%), mean ± SD				
	Strain				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
Water soluble essential oil	10.2 ± 3.8d**	7.6 ± 3.0d	20.8 ± 3.0d	3.7 ± 1.2d	9.5 ± 2.6d
Essential oil	30.7 ± 1.3c	17.3 ± 1.2c	40.0 ± 1.6b	21.7 ± 1.9c	16.3 ± 1.7c
Wood extract	34.7 ± 1.4b	35.7 ± 2.2b	34.9 ± 1.6c	31.0 ± 1.3b	30.7 ± 1.4b
<i>n</i> -hexane soluble fraction	52.3 ± 0.5a	65.6 ± 0.8a	47.1 ± 2.2a	48.5 ± 1.8a	51.1 ± 1.2a

Table 3-4-5. Antifungal activity of extracts of *Pseudotsuga menziesii* against *Trichoderma* spp. at 1000 ppm

\* MA (Malt agar) medium used for fungal growth.

\*\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different ( $P < 0.05$ ) according to Duncan's new multiple-range test ( $n = 5$ )

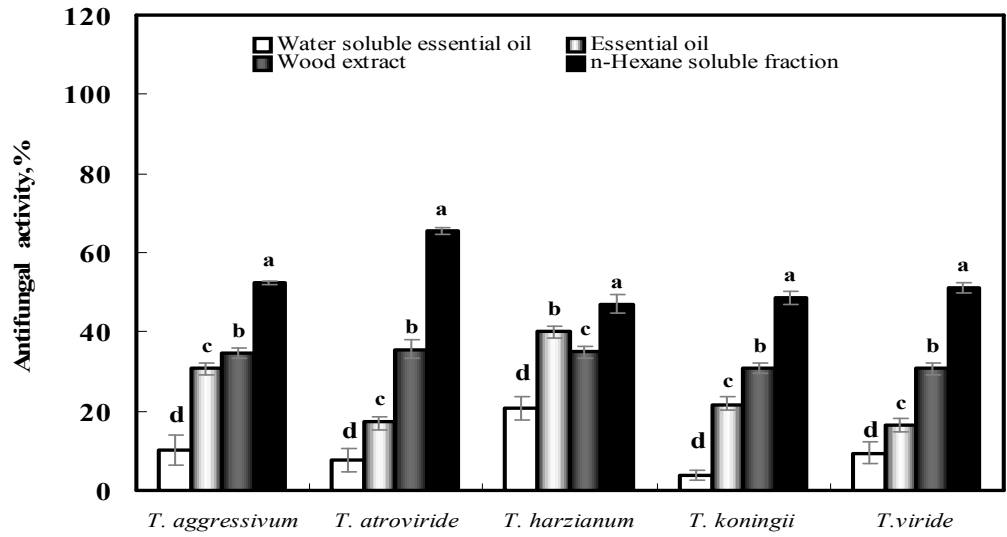


Fig. 3-4-52. Antifungal activity of extracts of *Pseudotsuga menziesii* against *Trichoderma* spp. at 1000ppm

## 2. 잎 추출물과 목부 추출물의 복합화에 의한 그린몰드 생장억제력 평가 시험

### 가. 재료 및 방법

#### 1) 공시균주

본 연구에 사용된 그린몰드 균주는 Canada의 University of Guelph, Mushroom Lab.으로부터 4종(*Trichoderma aggressivum* UG 1565, *Trichoderma atroviride* UG 1550, *Trichoderma koningii* UG 2906, *Trichoderma viride* UG 2662), 한국생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행(KCTC)로부터 1종(*Trichoderma harzianum* KCTC 6426)을 제공받아 공시균주로 사용하였다.

균주는 Malt agar (Difco, France)배지에 접종하여 25℃ 배양기 내에서 지속적으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

#### 2) 복합화제제의 조제

본 실험에서 사용된 복합화제제는 소나무 목부추출물(수목 추출물)과 수불용성 정유를 10:1, 10:2, 10:4, 10:8(w/w)의 비율로 혼합한 다음 121℃에서 멸균된 MA배지에 첨가하여 1000 ppm 농도로 조절하였다. 이때 조제된 복합화제제와 MA 배지의 혼합을 위하여 Tween 80을 첨가하였다.

#### 3) 복합화제제에 의한 그린몰드의 항균활성

복합화제제가 첨가된 MA배지에 계대배양된 *Trichoderma* 5종 공시균주 pellet을 각각 접종하고 25℃에서 3일 - 8일간 배양한 다음 균총의 평균직경을 측정하여 항균활성을 (식1)에 의거하여 계산하였다. 이때 대조구는 MA배지와 수목추출물이 함유된 MA배지를 사용하였다.

#### 4) 통계분석

통계분석을 위하여 각 계통의 5반복 값을 Micro office EXEL을 이용하여 표준편차를 나타내었으며, 각 실험 구 사이의 유의성은 SAS Corporate Statistics GLM의 Release 8.01을 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 Duncan의 multiple-range test로 분석

하였다.

나. 그린몰드에 대한 복합제제의 항균활성

Table 3-4-6에 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 미송 목분 열수추출물과 편백 잎으로부터 분리된 수불용성 정유를 혼합하여 조제한 복합제제의 항균활성을 나타냈다. *Trichoderma* 5종 균주에 대한 복합제제의 항균활성은 정유의 혼합 비율이 증가함에 따라서 낮게 나타났다. 열수추출물과 수불용성 정유의 복합제제보다는 열수추출물의 단독사용이 더욱더 유리하다고 판단된다.

*T. aggressivum*에서는 수목추출물의 항균활성이 34.7%로 나타났지만 수불용성 정유의 혼합비율이 증가함에 따라 항균활성은 20% - 15% 수준으로 낮아졌다. *T. atroviride*에서는 수목추출물의 항균활성이 35.7%로 나타났으며 수불용성 정유의 혼합비율이 증가함에 따라 항균활성은 14 - 1.2%로 나타났다. *T. harzianum*에서 수불용성 정유의 혼합비율이 증가함에 따라 다른 *Trichoderma* 4종 균주와 비교했을 때 가장 높은 항균활성을 나타냈지만 수목추출물보다 낮은 항균 효과를 나타냈다.

*T. koningii*는 열수추출물에서 31%의 항균활성을 나타냈으며 수불용성 정유의 혼합비율이 증가함에 따라 항균활성은 26% - 7%의 항균활성을 나타냈다. *T. viride*는 수불용성 정유의 혼합비율이 증가함에 따라 20% - 18%의 항균활성을 나타냈지만 수목추출물의 항균활성에는 근접하지 못하였다.

Dose level (1000ppm/plate*)	Antifungal activity (%), mean ± SD				
	Strain				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
Wood extract	34.7 ± 1.4a**	35.7 ± 2.2a	34.9 ± 1.6a	31.0 ± 1.3a	30.7 ± 1.4a
10/1***	20.4 ± 1.2b	14.0 ± 1.5b	32.2 ± 1.1a	26.8 ± 0.6b	19.0 ± 2.0b
10/2	19.7 ± 0.7b	7.3 ± 0.5c	31.6 ± 0.9a	20.9 ± 0.7c	20.5 ± 1.0b
10/4	16.8 ± 2.4b	5.2 ± 1.5d	25.8 ± 0.8b	14.5 ± 1.4d	19.2 ± 2.0b
10/8	15.0 ± 1.9b	1.2 ± 0.6e	22.5 ± 1.5c	7.3 ± 2.0e	18.3 ± 0.7b

Table 3-4-6. Antifungal activity of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and *Chamaecyparis obtusa* essential oil at 1000ppm

\* MA (Malt agar) medium used for fungal growth.

\*\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different ( $P < 0.05$ ) according to Duncan's new multiple-range test ( $n = 5$ )

\*\*\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / *Chamaecyparis obtusa* essential oil = w / w

Fig. 3-4-53에 *T. aggressivum*에 대한 복합제제의 항균활성을 나타냈다. 대조구인 수목추출물이 34.1%의 항균활성을 나타냈고 복합제제에 수용성 정유의 첨가비율이 증가 할수록 항균활성이 낮아졌다. 모든 복합제제는 5% 수준에서 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-54에 *T. atroviride*에 대한 복합제제의 항균활성을 나타냈다. 대조구인 수목추출물이 35.7%의 항균활성을 나타냈고 복합제제에 수용성 정유의 첨가비율이 증가 할수록 항균활성이 낮아졌다. 복합제제의 첨가비율이 10/2 처리 구 에서 7.3%로 대조구인 수목추출물과 비교하였을 때 약 20% 수준의 항균효과를 나타냈으며 첨가비율이 10/8 처리구 에서는 1.2%의 매우 낮은 항균 활성을 나타냈다.

Fig. 3-4-55에 *T. harzianum*에 대한 수목추출물과 수불용성 정유의 복합제제의 항균활성을 나타냈다. 대조구인 수목추출물이 34.9%의 항균활성을 나타냈고 복합제

제의 첨가비율이 10/1 및 10/2 처리구에서 약 32%로 대조구인 수목추출물과 비교하였을 때 5% 수준에서 유의성이 나타나지 않았다. 10/8 처리 구 에서는 22.5%의 항균활성을 나타내어 *Trichoderma* 5종 균주 중 가장 높은 항균활성을 나타냈다.

Fig. 3-4-56에 *T. koningii*에 대한 복합제제의 항균활성을 나타냈다. 대조구인 수목추출물이 31%의 항균활성을 나타냈고 복합제제의 첨가비율이 10/1 처리 구에 서 26.8%로 대조구인 수목추출물과 비교하였을 때 항균효과가 낮게 나타났으며 수 불용성 정유의 혼합비율이 높아질수록 낮은 항균활성을 나타내는 경향이 있었다.

Fig. 3-4-57에 *T. viride*에 대한 복합제제의 항균활성을 나타냈다. 대조구인 수 목추출물과 비교했을 때 모든 처리구의 항균활성은 대조구보다 낮은 값을 나타냈으 며, 이 값은 5% 수준에서 유의성이 인정되었다.

복합제제는 *T. aggressivum*, *T. atroviride*, *T. koningii*, *T. viride*에 대하여 최대 32%의 항균활성을 확인할 수 있었지만 대조구인 수목추출물의 항균활성과 비교할 경우 수불용성 정유의 혼합비율이 높아질수록 항균활성이 낮아지는 결과를 나타냈 다. *T. harzianum*만이 유일하게 수목추출물과 비슷한 항균활성을 나타냈다. *T. atroviride*와 *T. koningii*는 수불용성 정유에 대하여 큰 영향을 받지 않고 오히려 열 수추출물에 대해서 영향을 받았다는 것을 확인할 수 있었다. 그러므로 *T. atroviride* 와 *T. koningii*는 열수 추출물의 단독 사용이 유리하다는 것을 알 수 있었다.

결론적으로 복합제제(열수추출물, 수불용성 정유)는 열수 추출물 단독제제보다 높 은 항균활성을 나타내지 못했기 때문에 복합화의 의미가 낮다고 판단된다.

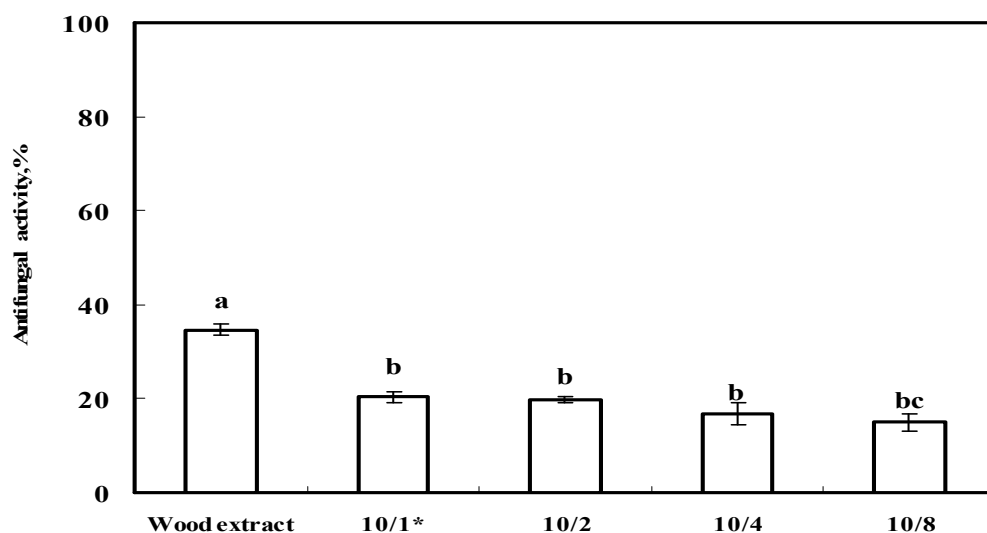


Fig. 3-4-53. Antifungal activity of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and *Chamaecyparis obtusa* essential oil against *T. aggressivum*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / *Chamaecyparis obtusa* essential oil = w / w

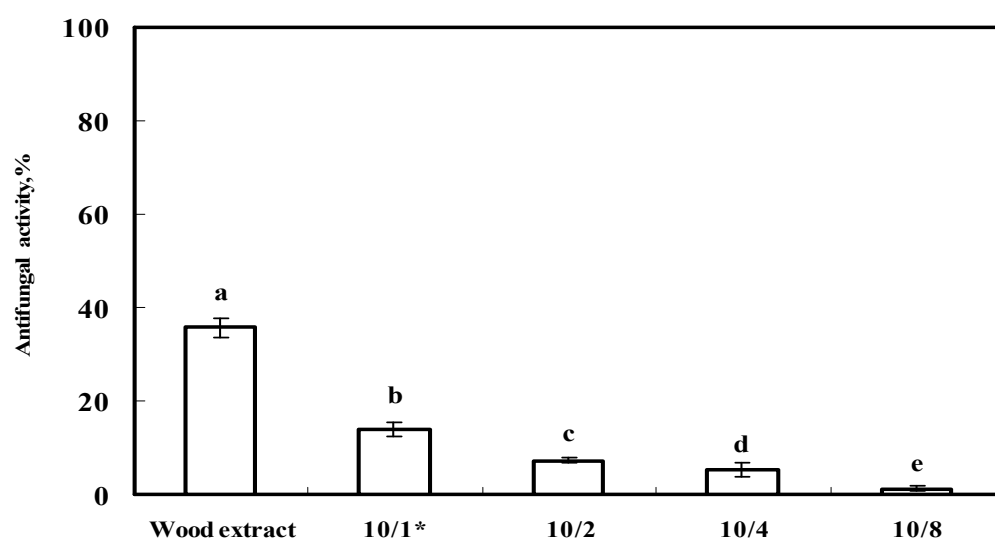


Fig. 3-4-54. Antifungal activity of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and *Chamaecyparis obtusa* essential oil against *T. atroviride*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / *Chamaecyparis obtusa* essential oil = w / w

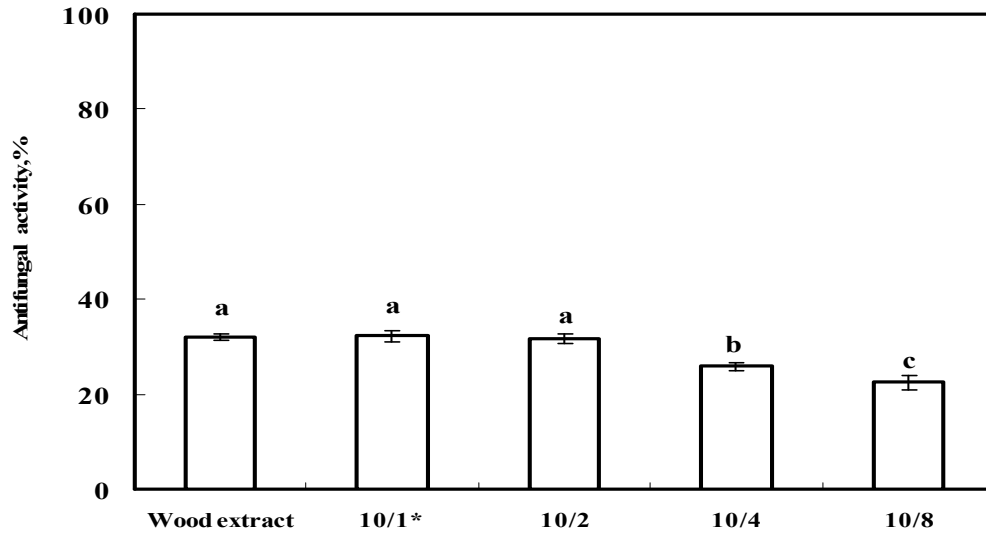


Fig. 3-4-55. Antifungal activity of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and *Chamaecyparis obtusa* essential oil against *T. harzianum*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / *Chamaecyparis obtusa* essential oil = w / w

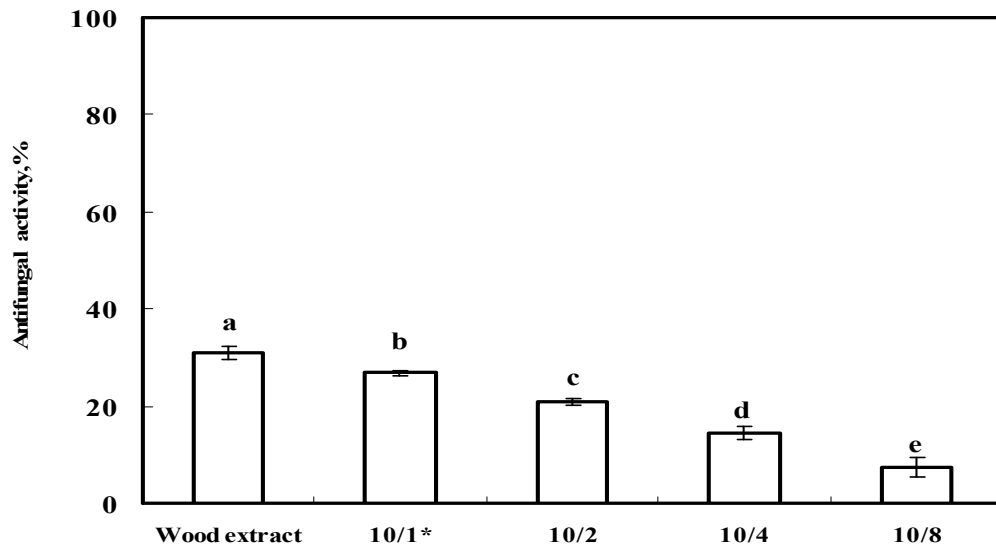


Fig. 3-4-56. Antifungal activity of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and *Chamaecyparis obtusa* essential oil against *T. koningii*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / *Chamaecyparis obtusa* essential oil = w / w



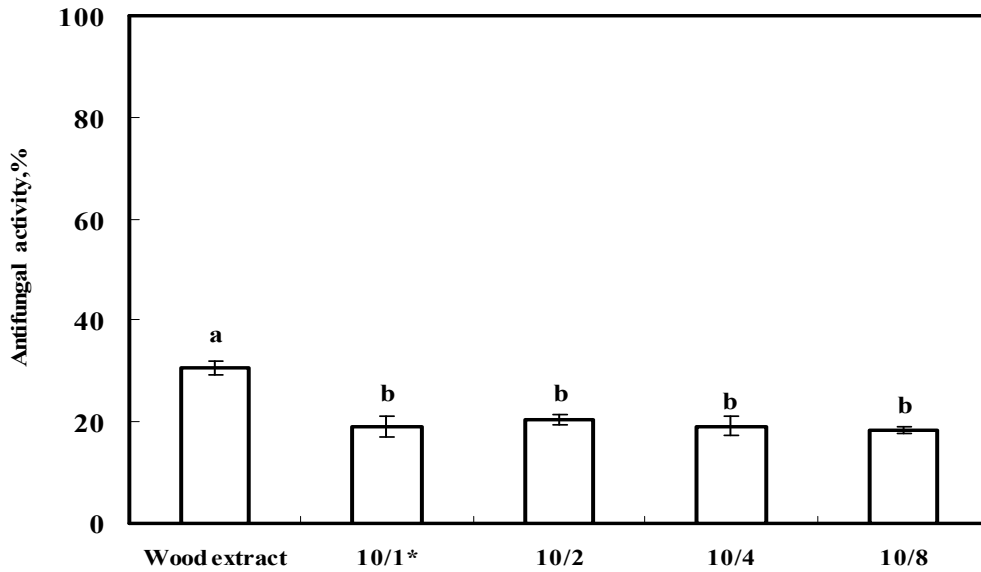


Fig. 3-4-57. Antifungal activity of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and *Chamaecyparis obtusa* essential oil against *T. viride*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / *Chamaecyparis obtusa* essential oil = w / w

Fig. 3-4-58 와 Fig. 3-4-59는 *T. aggressivum* 과 *T. atroviride*에 대한 복합제제의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. *T. aggressivum*에 있어서 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 모든 농도에서 뚜렷하게 확인할 수 있었고 수불용성 정유의 첨가비율이 높아질수록 균사의 성장형태는 불규칙 원형으로 성장하였다.

Fig. 3-4-59는 *T. atroviride*에 대한 복합제제의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 10/8농도의 처리구를 제외한 모든 농도에서 뚜렷하게 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 불규칙원형으로 성장하였다.

Fig. 3-4-60은 *T. harzianum*에 대한 복합제제의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 모든 농도에서 뚜렷하게 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 완만한 원형으로 성장하였으며 균사의 밀도는 모든 농도에서 균일하였다. Fig. 3-4-61은 *T. koningii*에 대한 복합제제의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교 하였을 때 성장저지환은 모든 농도에서 뚜렷하게 확인할 수 있었고 10/4 혼합비율의 처리구를 제외한 모든 농도에서는 균사가 원형으로 성장하였다.

Fig. 3-4-62는 *T. viride*에 대한 복합제제의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 모든 농도에서 뚜렷하게 확인할 수 있었고 모든 혼합비율에서 균사가 원형으로 성장하였다. 수불용성 정유의 첨가비율이 높아질 수록 균사성장저해효과는 낮게 나타났다.

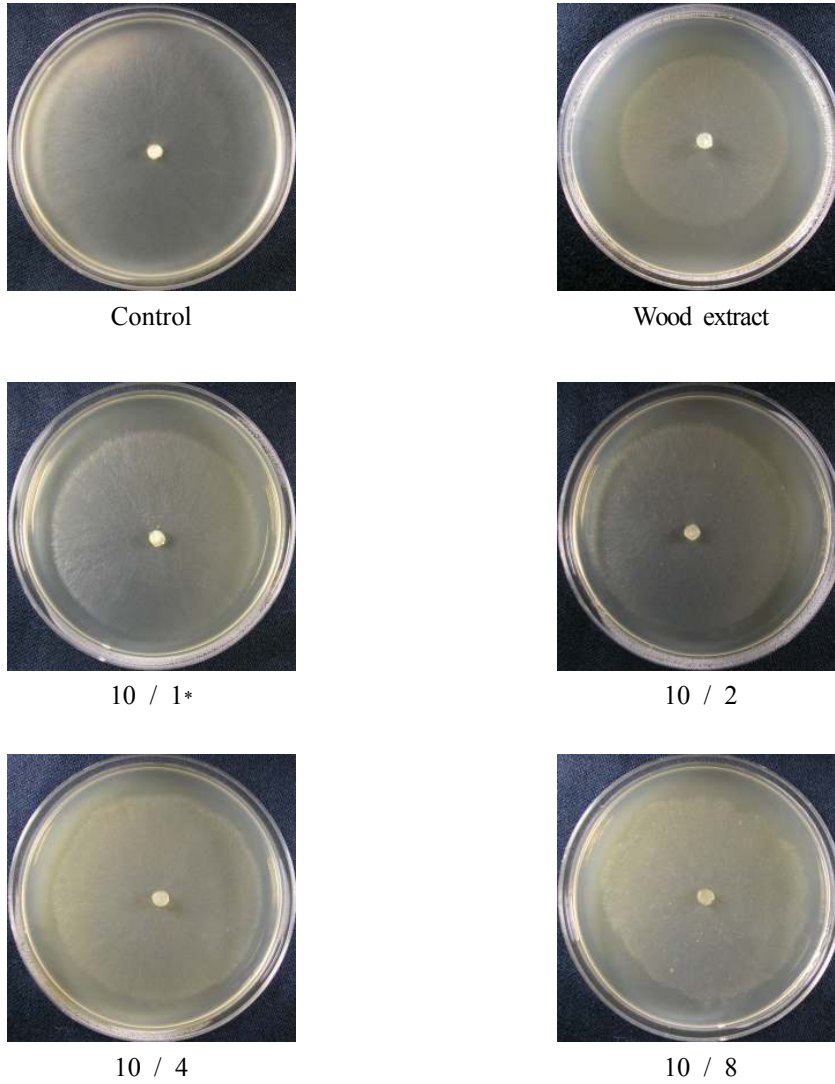


Fig. 3-4-58. Growth inhibition of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and *Chamaecyparis obtusa* essential oil against *T. aggressivum*.

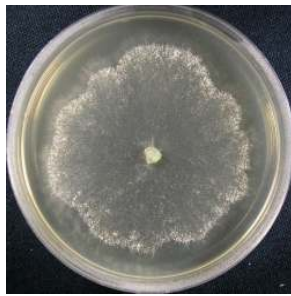
\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / *Chamaecyparis obtusa* essential oil  
= w / w



Control



Wood extract



10 / 1\*



10 / 2



10 / 4



10 / 8

Fig. 3-4-59. Growth inhibition of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and *Chamaecyparis obtusa* essential oil against *T. atroviride*.

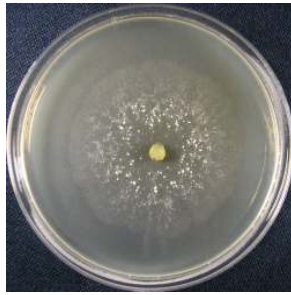
\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / *Chamaecyparis obtusa* essential oil  
= w / w



Control



Wood extract



10 / 1\*



10 / 2



10 / 4



10 / 8

Fig. 3-4-60. Growth inhibition of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and *Chamaecyparis obtusa* essential oil against *T. harzianum*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / *Chamaecyparis obtusa* essential oil = w / w



Control



Wood extract



10 / 1\*



10 / 2



10 / 4



10 / 8

Fig. 3-4-61. Growth inhibition of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and *Chamaecyparis obtusa* essential oil against *T. koningii*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / *Chamaecyparis obtusa* essential oil  
= w / w



Control



Wood extract



10 / 1\*



10 / 2



10 / 4



10 / 8

Fig. 3-4-62. Growth inhibition of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and *Chamaecyparis obtusa* essential oil against *T. viride*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / *Chamaecyparis obtusa* essential oil  
= w / w

### 3. 시판 유기계 화합물 첨가에 의한 그린몰드 생장억제력 평가 시험

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 공시균주

본 연구에 사용된 그린몰드 균주는 Canada의 University of Guelph, Mushroom Lab.으로부터 4종(*Trichoderma aggressivum* UG 1565, *Trichoderma atroviride* UG 1550, *Trichoderma koningii* UG 2906, *Trichoderma viride* UG 2662), 한국생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행(KCTC)으로부터 1종(*Trichoderma harzianum* KCTC 6426)을 제공받아 공시균주로 사용하였다. 균주는 Malt agar (Difco, France)배지에 접종하여 실험에 사용하였다.

##### 2) 유기계혼합제제의 조제

본 실험에서 사용된 유기계 화합물은 C사에서 생산된 유기계 제품을 사용하였다. 수목추출물과 시판 유기계 화합물을 1:0.5, 1:1, 0.5:1(w/w)의 혼합비율로 MA배지(Difco, France)에 첨가하여 1000 ppm 농도로 조제 하였다.

##### 3) 유기계혼합제제에 의한 그린몰드의 항균활성

유기계혼합제제가 첨가된 MA(Difco, France)배지에 계대배양 된 *Trichoderma* 5종 균주의 pellet을 각각 접종하고 25℃에서 3일 - 8일간 배양한 다음 균총의 평균 직경을 측정하여 항균활성을 식 2에 의거하여 계산하였다. 이때 대조구는 MA배지와 수목추출물이 함유된 MA배지를 사용하였다.

##### 4) 통계분석

통계분석을 위하여 각 계통의 5반복 값을 Micro office EXEL을 이용하여 표준편차를 나타내었으며, 각 실험 구 사이의 유의성은 SAS Corporate Statistics GLM의 Release 8.01을 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 Duncan의 multiple-range test로 분석하였다.

나. 유기계혼합제제의 항균활성

Table 3-4-7에 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 미송 열수추출물과 시판유기계 화합물을 혼합하여 조제한 혼합제제의 항균활성을 나타냈다. *Trichoderma* 5종 균주에 대한 유기계혼합제제의 항균활성은 시판유기계 화합물의 혼합 비율이 증가함에 따라서 높게 나타났다. 열수추출물보다 시판유기계 화합물의 첨가량이 높을수록 항균활성이 높게 나타났다. *T. aggressivum*에서는 수목추출물의 항균활성이 34.7%로 나타났지만 시판유기계 화합물의 혼합비율이 증가함에 따라 항균활성은 46% - 53% 수준으로 높아졌다. *T. atroviride*에서는 수목추출물의 항균활성이 35.7%로 나타났으며 시판유기계 화합물의 혼합비율이 증가함에 따라 항균활성은 55 - 66%로 나타났다. *T. harzianum*에서 수목추출물의 항균활성이 34.9%로 나타났고 시판유기계 화합물의 혼합비율이 증가함에 따라 43% - 56%의 항균활성을 나타냈다.

*T. koningii*는 열수추출물에서 31%의 항균활성을 나타냈으며 시판유기계 화합물의 혼합비율이 증가함에 따라 항균활성은 63% - 68%로 나타났다. *T. viride*는 시판유기계 화합물의 혼합비율이 증가함에 따라 30% - 82%의 항균활성을 나타냈고 *Trichoderma* 5종 균주 중 가장 높은 항균활성을 나타냈다.

결론적으로 수목추출물의 단일사용보다는 시판유기계 화합물을 첨가하는 것이 항균제제로서 성능이 우수하다고 판단되며 산업화 가능성이 있다고 판단된다.

Dose level (1000 ppm/plate*)	Antifungal activity (%), mean ± SD				
	Strain				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
Wood extract	34.7 ± 1.4d**	35.7 ± 2.2d	34.9 ± 1.6d	31.0 ± 1.3c	30.7 ± 1.4d
1 / 0.5***	46.1 ± 0.3c	55.0 ± 2.4c	43.3 ± 0.6c	63.7 ± 0.6b	50.2 ± 1.0c
1 / 1	50.3 ± 1.4b	62.7 ± 0.9b	52.9 ± 0.5b	63.7 ± 0.4b	78.1 ± 0.7b
0.5 / 1	53.4 ± 1.0a	66.1 ± 0.7a	56.4 ± 1.0a	68.6 ± 2.3a	82.8 ± 0.5a

Table 3-4-7. Antifungal activity of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and organic compound at 1000 ppm

\* MA (Malt agar) medium used for fungal growth.

\*\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to Duncan's new multiple-range test (n=5)

\*\*\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / organic compound = w / w



Fig. 3-4-63에 *T. aggressivum*에 대한 유기계혼합제제의 항균활성을 나타냈다. 0.5/1 혼합비율의 농도에서 53.4%로 수목추출물에 비해 약 19% 높은 항균활성을 나타냈다. 수목추출물의 첨가량이 줄어들고 시판 유기계 화합물의 첨가량이 증가되면 항균활성이 증가되었으며 모든 농도에서 5% 수준의 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-64에 *T. atroviride*에 대한 유기계혼합제제의 항균활성을 나타냈다. 0.5/1 혼합비율의 농도에서 66.1%의 항균활성으로 수목추출물에 비해 약 30% 높은 항균활성을 나타냈다. 수목추출물의 첨가량이 줄어들고 시판 유기계 화합물의 첨가량이 증가되면 항균활성이 증가되었으며 모든 농도에서 5%수준의 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-65에 *T. harzianum*에 대한 유기계혼합제제의 항균활성을 나타냈다. 수목추출물이 34.9%의 항균활성을 나타냈는데 비해 1/1 및 0.5/1의 혼합비율에서 52.9%, 56.4%의 높은 항균활성을 나타냈다. 수목추출물에 비해 시판유기계 화합물의 첨가량이 증가되면 항균활성이 증가되었으며 모든 농도에서 5%수준의 유의성이 인정되었다.

Fig. 3-4-66에 *T. koningii*에 대한 유기계혼합제제의 항균활성을 나타냈다. 수목추출물이 31%의 항균활성을 나타냈지만 0.5/1의 혼합비율에서 68.6%로 2배 이상의 항균활성을 나타냈다.

시판 유기계 화합물의 첨가량이 증가함에 따라 항균활성은 63% - 68%로 확인되었다. 열수추출물과 시판유기계 화합물의 첨가 비율이 1/0.5에서 항균활성이 63.7%로 나타났지만 이 수준 이상으로 유기계 혼합제제의 첨가는 큰 의미가 없다고 판단된다.

Fig. 3-4-67에 *T. viride*에 대한 유기계혼합제제의 항균활성을 나타냈다. 수목추출물이 30.7%의 항균활성을 나타낸 반면 1/1 및 0.5/1의 혼합비율에서 78.1%, 82.8%로 *Trichoderma* 5종 균주 중 가장 높은 항균활성을 나타냈다. 혼합비율 1/1에서부터 항균활성이 급격하게 증가하였다. 혼합비율 1/1이 최적의 비율이라고 판단되며 시판유기계 화합물의 첨가량이 증가하더라도 항균활성의 증가는 미미하였다. 모든 혼합비율에서 5% 수준의 유의성이 인정되었다.

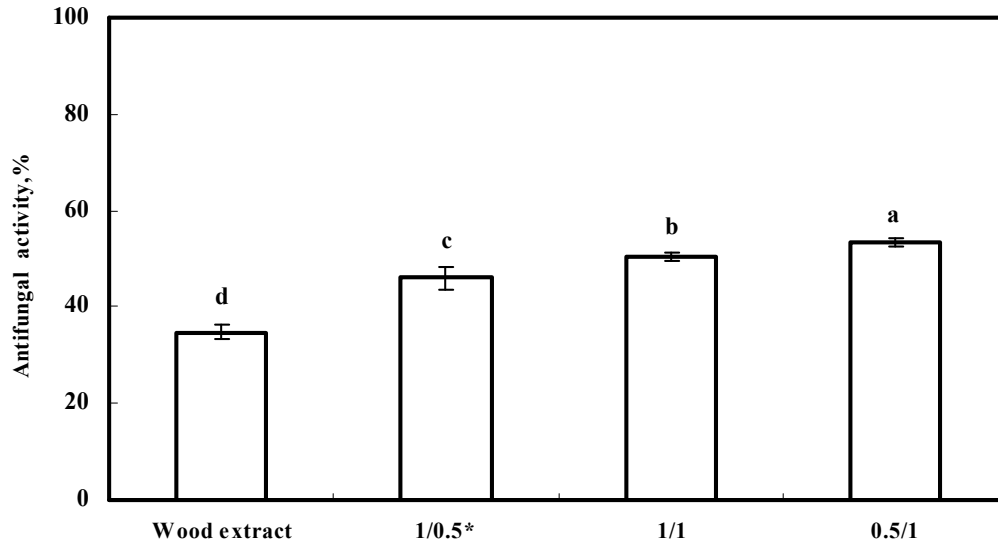


Fig. 3-4-63. Antifungal activity of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and organic compound against *T. aggressivum*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / organic compound = w / w

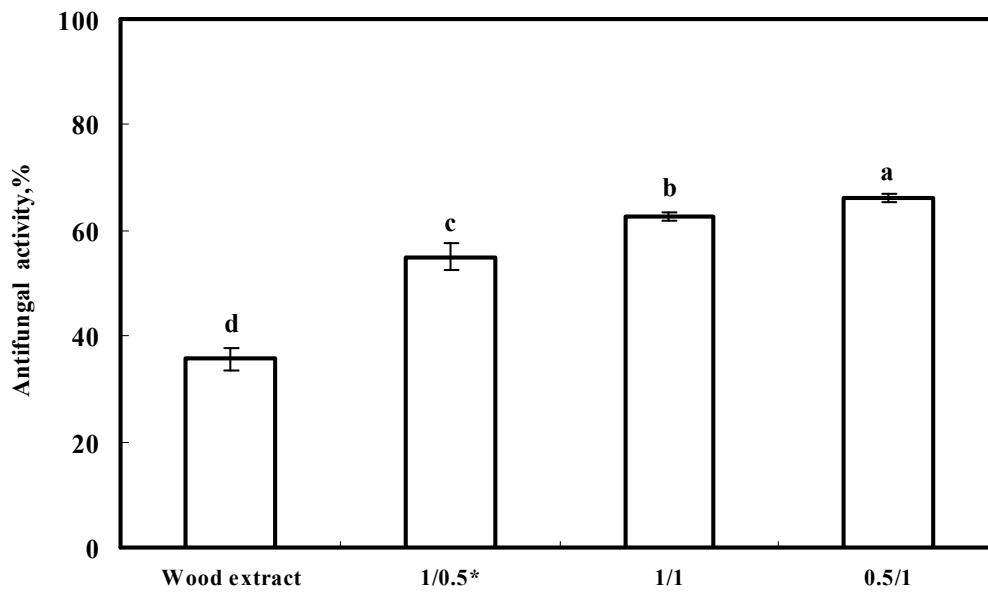


Fig. 3-4-64. Antifungal activity of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and organic compound against *T. atroviride*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / organic compound = w / w

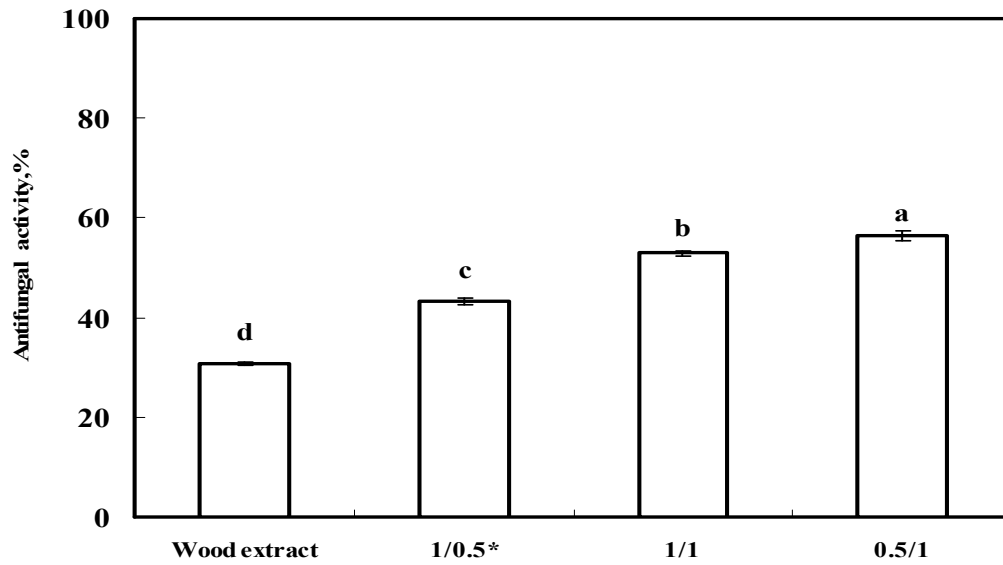


Fig. 3-4-65. Antifungal activity of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and organic compound against *T. harzianum*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / organic compound = w / w

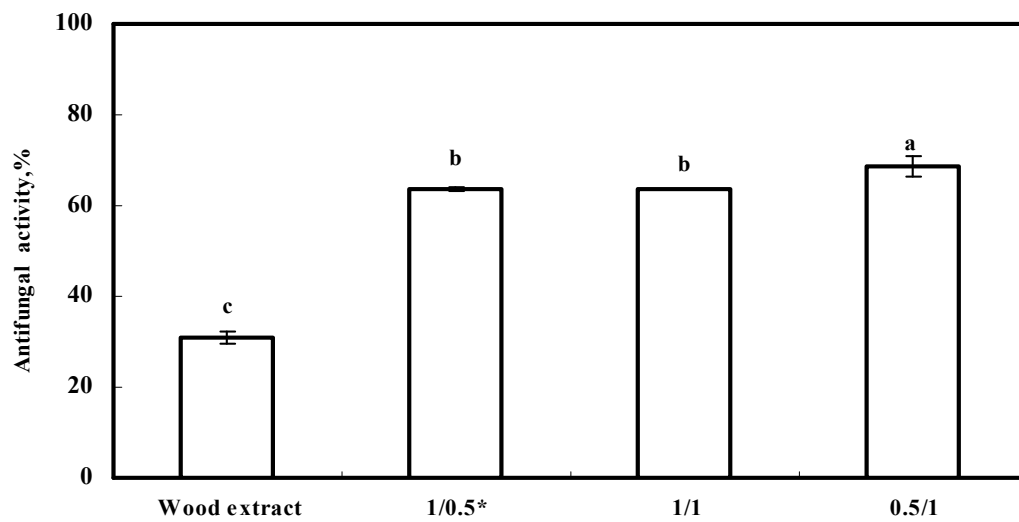


Fig. 3-4-66. Antifungal activity of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and organic compound against *T. koningii*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / organic compound = w / w

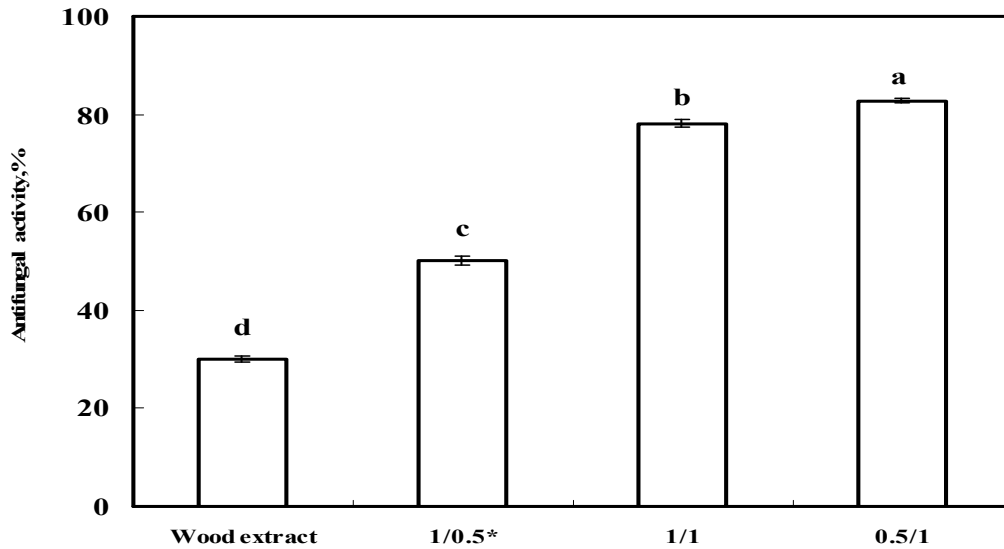


Fig. 3-4-67. Antifungal activity of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and organic compound against *T. viride*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / organic compound = w / w

Fig. 3-4-68은 *T. aggressivum*에 대한 유기계혼합제제의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 모든 혼합비율에서 뚜렷하게 확인 할 수 있었고 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였으며 0.5/1의 혼합비율에서 균사 밀도가 가장 높았다. 또한 시판유기계 화합물의 첨가량이 증가할수록 균사성장저해 효과가 높아지는 것을 육안으로 확인할 수 있었다.

Fig. 3-4-69는 *T. atroviride*에 대한 유기계혼합제제의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 모든 혼합비율에서 뚜렷하게 확인 할 수 있었고 균사의 성장형태는 불규칙원형으로 성장하였으며 수목추출물 처리구를 제외한 모든 혼합비율의 처리구에서 균사가 pellet위로 성장하였다. 0.5/1의 혼합비율에서 균사밀도가 가장 높았다. 또한 시판유기계 화합물의 첨가량이 증가할수록 균사성장저해효과가 높아지는 것을 육안으로 확인할 수 있었다.

Fig. 3-4-70은 *T. harzianum*에 대한 유기계혼합제제의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 모든 혼합비율에서 뚜렷하게 확인

할 수 있었고 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였다. 수목추출물 처리구를 제외한 모든 혼합비율의 처리 구에서 균사밀도가 높았다.

Fig. 3-4-71은 *T. koningi*에 대한 유기계혼합제제의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 모든 혼합비율에서 뚜렷하게 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였다. 1/0.5, 1/1 및 0.5/1의 처리구에서 균사는 pellet위로 성장하였다. 육안적 수준에서 1/0.5 혼합비율 이상의 시판유기계 화합물의 혼합은 균사생장을 저해하지 못하였다.

Fig. 3-\*4-72는 *T. viride*에 대한 유기계혼합제제의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 성장저지환은 모든 혼합비율에서 뚜렷하게 확인할 수 있었고 균사의 성장형태는 원형으로 성장하였다. 1/1 및 0.5/1 혼합비율의 처리구에서 균사는 pellet위로 성장하였다. 혼합비율 1/1 이상으로 시판유기계 화합물의 첨가량의 증가는 균사생장 저해효과에 큰 영향이 없었다. 그러므로 *T. viride*에서는 1/1의 혼합비율이 항균제제로서 우수하다고 판단되었다.

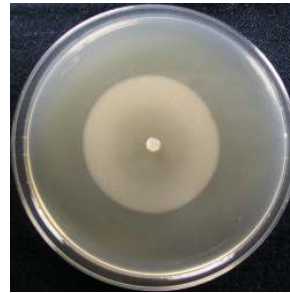
*Trichoderma* 5종 균주에 대한 유기계혼합제제(미송 열수추출물 및 시판유기계 화합물)의 항균 활성은 미송 열수추출물보다 모두 높게 나타났고 항균제제로서의 사용 가능성이 높았다. *Trichoderma* 5종 균주에 대한 유기계혼합제제의 최적 혼합비율은 0.5/1이라고 판단되었지만 실제로 산업화에서는 1/1의 혼합비율도 가능하다고 판단된다.



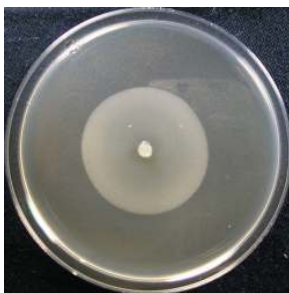
Control



Wood extract



1 / 0.5\*



1 / 1



0.5 / 1

Fig. 3-4-68. Growth inhibition of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and organic compound against *T. aggressivum*.

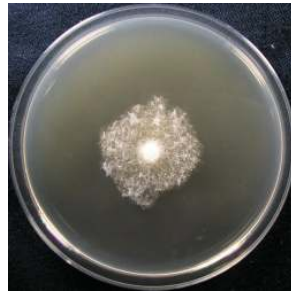
\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / organic compound = w / w



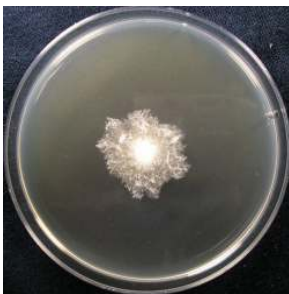
Control



Wood extract



1 / 0.5\*



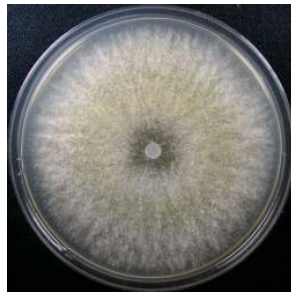
1 / 1



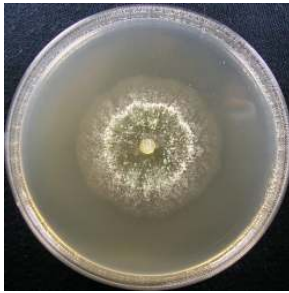
0.5 / 1

Fig. 3-4-69. Growth inhibition of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and organic compound against *T. atroviride*.

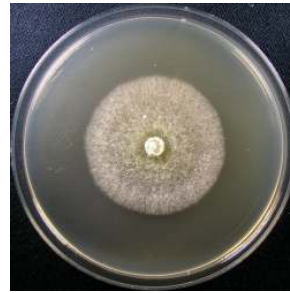
\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / organic compound = w / w



Control



Wood extract



1 / 0.5\*



1 / 1



0.5 / 1

Fig. 3-4-70. Growth inhibition of mixture of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and organic compound against *T. harzianum*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / organic compound = w / w





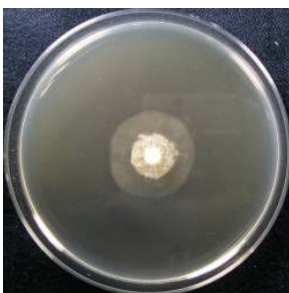
Control



Wood extract



1 / 0.5\*



1 / 1



0.5 / 1

Fig. 3-4-71. Antifungal activity of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and organic compound

against *T. koningii*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / organic compound = w / w



Control



Wood extract



1 / 0.5\*



1 / 1



0.5 / 1

Fig. 3-4-72. Growth inhibition of *Pseudotsuga menziesii* wood extract and organic compound against *T. viride*.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / organic compound = w / w

#### 4. 그린몰드 bio-control 제제의 formulation 완성시험

##### 가. 재료 및 방법

###### 1) 공시균주

본 연구에 사용된 그린몰드 균주는 Canada의 University of Guelph, Mushroom Lab.으로부터 4종(*Trichoderma aggressivum* UG 1565, *Trichoderma atroviride* UG 1550, *Trichoderma koningii* UG 2906, *Trichoderma viride* UG 2662), 한국생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행(KCTC)로부터 1종(*Trichoderma harzianum* KCTC 6426)을 제공받아 공시균주로 사용하였다. 균주는 Malt agar (MA, Difco, France)배지에 접종하여 25℃ 배양기 내에서 지속적으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

###### 2) 제제의 formulation

###### 가) 유기계혼합 formulation

본 실험에서 사용된 유기계 화합물은 C사에서 생산된 유기계 제품(PS)을 사용하였다. 수목추출물과 시판 유기계 화합물을 1:0.5, 1:1, 0.5:1(g/g)의 혼합하여 유기계혼합 formulation을 완성하였다.

###### 나) 시판 향균제품

시판 향균제품은 H 농약사(경남 진주시)로부터 SP(스포르곤) 및 BN(베노밀) 2종을 구매하였으며 이 제품의 표준 시비 기준량은 20 g / 20 L (1000 ppm)이다.

###### 다) 최적 formulation

수목추출물, 시판 유기계 화합물(PS)과 시판 향균제품(SP, BN)을 1 : 1 : 1(w/w)의 비율로 혼합하여 최적 formulation을 완성하였다.

### 3) 그린몰드에 대한 formulation 제제의 항균활성

Formulation 제제의 항균활성 시험을 위하여 각 제제를 MA배지에 혼합하여 항균활성을 측정하였다.

유기계혼합 formulation제제를 MA배지에 63 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm 로 첨가하여 시험배지를 조제하였고, 시판 항균제품(SP, BN)은 배지에 63 ppm, 125 ppm, 250 ppm 농도로 첨가하였다. 또한 최적 formulation제제를 63 ppm, 125 ppm, 250 ppm 농도로 MA배지(Difco, France)에 혼합하여 시험배지를 조제하였다.

조제된 시험배지에 계대배양 된 *Trichoderma* 5종 균주로부터 pellet을 분리하여 각각 접종하고 25℃에서 3일 - 8일간 배양한 다음 균총의 평균직경을 측정하여 항균활성을 식 2에 의거하여 계산하였다. 이때 대조구는 추출물이 첨가되지 않은 MA배지를 사용하였다.

### 4) 통계분석

통계분석을 위하여 각 계통의 5반복 값을 Micro office EXCEL을 이용하여 표준편차를 나타내었으며, 각 실험 구 사이의 유의성은 SAS Corporate Statistics GLM의 Release 8.01을 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 Duncan의 multiple-range test로 분석하였다.

## 나. 그린몰드 bio-control제제의 formulation

### 1) 제제의 formulation

#### 가) 유기계혼합 formulation의 항균활성

Table 3-4-8에 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 유기계혼합제제(수목추출물, 시판 유기계 화합물)의 항균활성을 나타냈다. *T. aggressivum*에 대한 유기계혼합제제는 모든 농도에서 항균활성을 나타냈으며 125 ppm에서 10%의 항균활성을 나타냈지만 1000 ppm에서는 125 ppm과 비교하였을 때 5배 높은 53%의 항균력을 나타냈다. *T. aggressivum*에 대하여 유기계혼합제제는 125 ppm부터 항균활성이 증가되었고 63 ppm이 최소저해농도라고 판단되었으며 5%수준에서 유의성이 인정되었다.

Dose level (ppm/plate*)	Antifungal activity (%), mean ± SD				
	Strain				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
63 ppm**	3.8 ± 1.3e*	11.3 ± 1.1d	19.9 ± 0.9e	4.9 ± 0.8e	13.0 ± 1.5d
125 ppm	10.4 ± 1.9d	27.8 ± 1.7c	19.4 ± 1.9d	7.7 ± 1.4d	17.3 ± 2.3c
250 ppm	26.6 ± 1.7c	32.3 ± 1.8b	32.4 ± 1.5c	38.6 ± 2.2c	30.2 ± 1.3b
500 ppm	39.2 ± 0.8b	33.6 ± 1.0b	41.5 ± 0.9b	43.5 ± 1.7b	33.4 ± 4.3b
1000 ppm	53.4 ± 1.0a	66.1 ± 0.7a	56.4 ± 1.0a	68.6 ± 2.3a	82.8 ± 0.5a

Table 3-4-8. Antifungal activity of mixture of wood extracts and organic compound soluble fraction mixture against *Trichoderma* spp. at 25°C for 5 days

\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different (P<0.05) according to Duncan's new multiple-range test (n=5)

\*\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / organic compound = w / w

*T. atroviride*에 대하여 유기계혼합제제는 모든 농도에서 항균활성이 나타났으며 250 ppm 농도에서 30%이상의 높은 항균활성이 나타났다. 1000 ppm에서 66%의 항균활성을 나타났으며 *T. atroviride*에 대하여 유기계혼합제제는 63 ppm이 최소저해농도라고 판단된다.

*T. harzianum*에 대하여 유기계혼합제제는 모든 농도에서 항균활성이 나타났고 1000 ppm 농도에서 56%이상의 높은 항균활성이 나타났다. 63 ppm과 125 ppm 농도에서 19%로 최소저해농도는 63 ppm이라고 판단되었다.

*T. koningii*에 대하여 유기계혼합제제는 전 농도에서 항균활성을 나타났으며 250 ppm 농도에서 38%이상의 항균활성이 나타났고 125 ppm 및 63 ppm에서 4.9% 및 7.7%의 낮은 항균활성을 나타냈지만 250 ppm부터 급격히 증가하였다. 500 ppm 농도에서 *Trichoderma* 5종 균주 중 가장 높은 43%의 항균활성을 나타냈으며 1000 ppm에서 68%의 항균활성을 나타냈다. *T. koningii*에 대하여 유기계혼합제제의 농도 별 항균활성은 5%수준에서 유의성이 인정되었으며 63 ppm이 최소저해농도라고 판단된다.

*T. viride*에 대하여 유기계혼합제제는 모든 농도에서 항균활성을 나타냈고 63 ppm 농도에서 13.0%, 1000 ppm 농도에서 82%의 항균활성이 나타났고 250 ppm에서부터 항균활성이 30%로 급격히 증가하였으며 최소저해농도는 63 ppm이라고 판단된다.

*Trichoderma* 5종 균주에 대하여 유기계혼합제제의 항균활성은 1000 ppm에서 53% - 82%로 가장 효과가 좋다고 판단되며 항균제제로서 산업화 가능성이 있다고 판단된다.

Fig. 3-4-73은 *T. viride*에 대한 유기계혼합제제의 성장저해효과를 나타낸 사진이다. 대조구와 비교하였을 때 125 ppm부터 뚜렷한 성장저지환을 확인할 수 있었으며 *T. viride*의 균사의 형태는 모든 농도에서 원형으로 균사가 성장하였다.

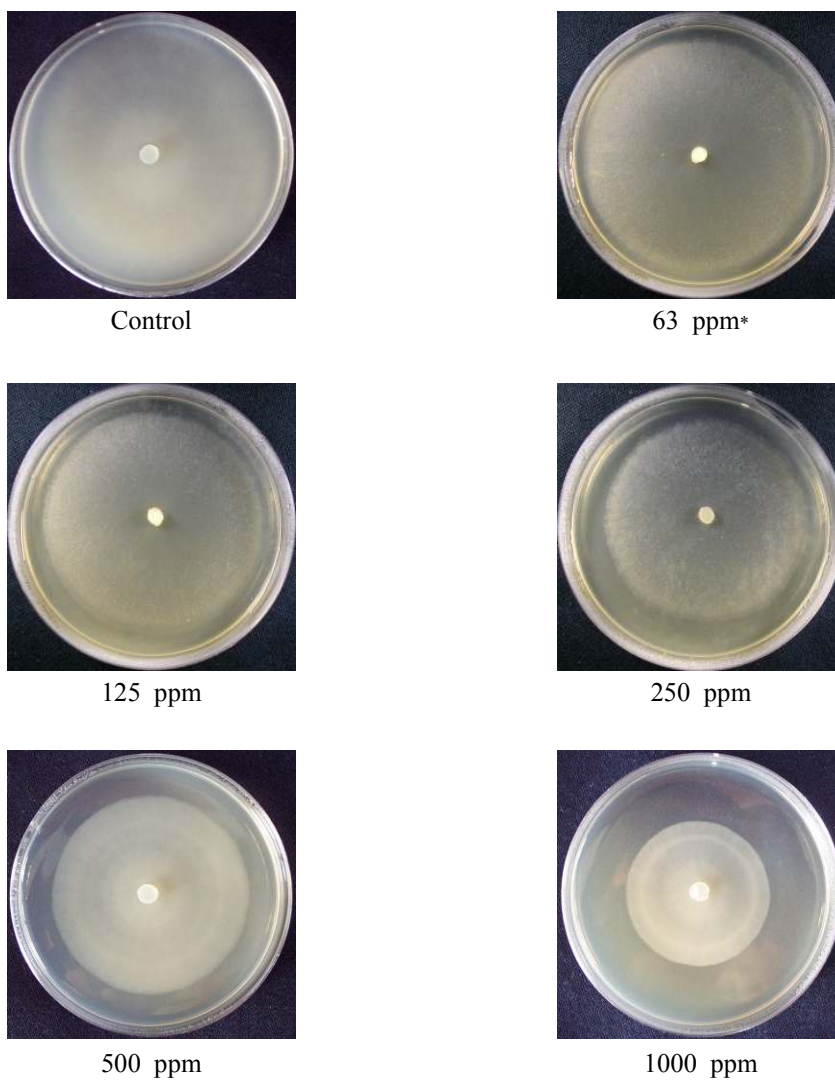


Fig. 3-4-73. Growth inhibition of mixture of wood extracts and organic compound mixture against *Trichoderma viride* at 25°C for 5days.

\* *Pseudotsuga menziesii* wood extract / organic compound = 1 / 1(w / w)

나) 시판 항균제품의 항균활성

Dose level (ppm/plate)	Antifungal activity (%), mean $\pm$ SD				
	Strain				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
SP** 63ppm	100a*	80.9c $\pm$ 0.2	65.5c $\pm$ 1.9	90.5b $\pm$ 0.2	100a
125ppm	100a	83.1b $\pm$ 0.4	81.8b $\pm$ 0.3	100a	100a
250ppm	100a	100a	100a	100a	100a
500ppm	100a	100a	100a	100a	100a
1000ppm	100a	100a	100a	100a	100a
BN** 63ppm	100a	100a	100a	100a	100a
125ppm	100a	100a	100a	100a	100a
250ppm	100a	100a	100a	100a	100a
500ppm	100a	100a	100a	100a	100a
1000ppm	100a	100a	100a	100a	100a

Table 3-4-9. Antifungal activity of commercial product (SP, BN) against *Trichoderma* spp. at 25°C for 5 days

\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different ( $P < 0.05$ ) according to Duncan's new multiple-range test ( $n=5$ )

\*\* SP, BN : commercial product

Table 3-4-9에 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 시판 항균제품(SP 및 BN)의 농도별 항균활성을 나타냈다.

*T. aggressivum*에 대한 모든 농도에서 100%의 항균활성을 나타냈지만 *T. atroviride*에 대하여 시판 항균제품(SP)은 63 ppm에서 80%, 125 ppm에서 83%의 항균활성을 나타냈다.



*T. harzianum*에 대한 시판 항균제품(SP)의 항균활성은 250 ppm부터 1000 ppm 까지 100%의 항균활성을 나타냈지만 125 ppm에서는 항균활성이 81%로 나타났다.

*T. koningii*에 대한 시판 항균제품(SP)의 항균활성은 *T. harzianum*과 마찬가지로 250 ppm부터 1000 ppm 까지 100%의 항균활성을 나타냈지만 63 ppm에서 항균활성이 90% 였다.

*T. viride*에 대한 시판 항균제품(SP)의 항균활성은 모든 농도에서 100%의 항균활성을 나타냈다.

*T. aggressivum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii* 및 *T. viride*에 대한 시판 항균제품(BN)의 모든 농도에서 100%의 항균활성을 나타냈다.

Fig. 3-4-74는 *T. atroviride*에 대한 시판 항균제품(SP)의 성장저해효과를 나타냈으며 대조구와 비교하였을 때 모든 농도에서 균사가 성장하지 않았다.

Fig. 3-4-75는 *T. aggressivum*에 대한 시판 항균제품(BN)의 성장저해효과를 나타냈으며 대조구와 비교하였을 때 모든 농도에서 균사가 성장하지 않았다.



Control



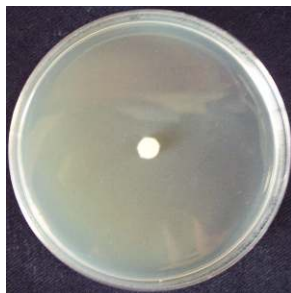
SP 63\* ppm



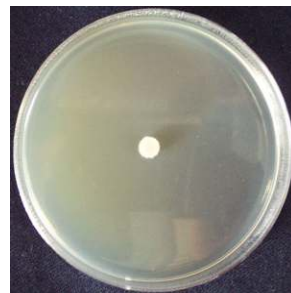
SP 125 ppm



SP 250 ppm



SP 500 ppm



SP 1000 ppm

Fig. 3-4-74. Growth inhibition of commercial product(SP) against *Trichoderma atroviride* at 25°C for 5days.

\* SP : commercial product



Control



BN\* 63 ppm



BN 125 ppm



BN 250 ppm



BN 500 ppm



BN 1000 ppm

Fig. 3-4-75. Growth inhibition of commercial product(BN) against *Trichoderma aggressivum* at 25°C for 5days.

\* BN : commercial product

다) 최적 formulation의 항균활성

Dose level (ppm/plate)	Antifungal activity (%), mean $\pm$ SD				
	Strain				
	<i>T. aggressivum</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>
WE+PS+SP** 63ppm	100a*	100a	82.1b $\pm$ 0.7	70.8c $\pm$ 1.3	85.1b $\pm$ 3.9
125ppm	100a	100a	86.4a $\pm$ 0.6	75.3b $\pm$ 0.9	87.0b $\pm$ 1.7
250ppm	100a	100a	86.4a $\pm$ 0.8	85.6a $\pm$ 0.5	100a
WE+PS+BN** 63ppm	100a	100a	100a	100a	100a
125ppm	100a	100a	100a	100a	100a
250ppm	100a	100a	100a	100a	100a

Table 3-4-10. Antifungal activity of wood extracts, organic compound and commercial products

mixture against *Trichoderma* spp. at 25°C for 5 days

\* Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different ( $P < 0.05$ ) according to Duncan's new multiple-range test ( $n=5$ )

\*\* WE : Wood extract, PS : organic compound, SP(BN) : commercial product = 1 : 1 : 1(w : w : w)

Table 3-4-10에 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 최적 formulation제제(수목추출물, 시판유기계 화합물, 시판항균제품)의 농도별 항균활성을 나타냈다.

*T. aggressivum*과 *T. atroviride*에 대하여 최적 formulation제제의 모든 농도에서 100%의 항균활성을 나타냈다.

*T. harzianum*에 대한 시판 항균제품 BN이 첨가된 최적 formulation제제의 항균활성은 모든 농도에서 100%의 항균활성을 나타냈지만, 시판 항균제품 SP가 첨가된 최적 formulation제제에서는 63 ppm에서 82%, 250 ppm에서 86%의 항균활성을 나타냈다. 최적 formulation제제는 최종 혼합 함유량이 63 ppm, 125 ppm, 250 ppm이므로 적은 양의 화학약품을 첨가하여도 높은 항균효과를 확인할 수 있었다.

*T. koningii*에 대한 시판 항균제품 BN이 첨가된 최적 formulation제제의 항균활성은 모든 농도에서 100%의 항균활성을 나타냈고 시판 항균제품 SP가 첨가된 최적 formulation제제에서는 63 ppm에서 70%, 125 ppm에서 75%, 250 ppm에서 85%의 항균활성을 나타냈다.

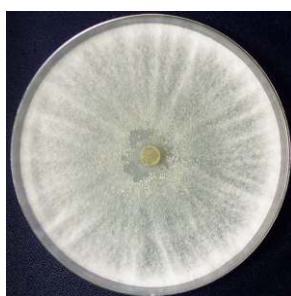
*T. viride*는 최적 formulation제제의 모든 농도에서 항균활성을 나타냈으며 시판 항균제품 SP가 첨가된 62 ppm 및 125 ppm에서는 각각 85% 및 87%의 항균활성을 나타냈다.

결론적으로 *Trichoderma* 5종 균주에 대한 최적 formulation제제는 수목추출물, 시판유기계 화합물 및 시판항균제품(BN)을 1:1:1로 혼합하여 제조하는 것이다. 이때 시판항균제품 BN 만으로도 63 ppm에서 항균활성이 100%에 도달하였지만 화학약품의 첨가량을 줄이기 위하여 수목 추출물 및 시판유기계 화합물이 대체 사용되었다.

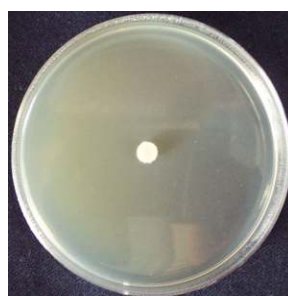
Fig. 3-4-76은 *T. agroviride*에 대한 최적 formulation제제의 농도별 항균활성을 나타냈으며 대조구와 비교하였을 때 모든 농도에서 균사가 성장하지 않았음을 확인할 수 있었다.

Fig. 3-4-77은 *T. koningii*에 대한 최적 formulation제제의 농도별 항균활성을 나타냈으며 대조구와 비교하였을 때 63 ppm, 125 ppm 및 250 ppm농도에서 균사가 pellet 위로 성장한 것을 확인할 수 있었으며 63 ppm 및 125 ppm 농도에서 균사의 성장형태는 원형모양으로 성장하였다.

Fig. 3-4-78은 *T. viride*에 대한 최적 formulation제제의 농도별 항균활성을 나타냈으며 대조구와 비교하였을 때 63 ppm 및 125 ppm농도에서 균사가 원형으로 성장하였으며 균사밀도는 낮게 나타남을 알 수 있었다.



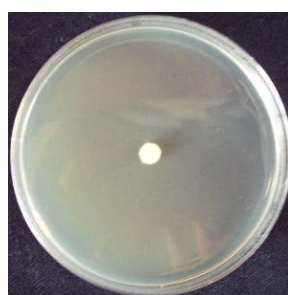
Control



WE+PS+SP\* 63 ppm



WE+PS+SP 125 ppm



WE+PS+SP 250 ppm

Fig. 3-4-76. Growth inhibition of wood extracts, organic compound and commercial product (SP) mixture against *Trichoderma atroviride* at 25°C for 5 days.

\* WE : Wood extract, PS : organic compound, SP(BN) : commercial product

WE + PS + SP(BN) = 1 : 1 : 1 (w : w : w)



Control



WE+PS+SP\* 63 ppm



WE+PS+SP 125 ppm



WE+PS+SP 250 ppm

Fig. 3-4-77. Growth inhibition of wood extracts, organic compound and commercial product (SP) mixture against *Trichoderma koningii* at 25°C for 5 days.

\* WE : Wood extract, PS : organic compound, SP(BN) : commercial product

WE + PS + SP(BN) = 1 : 1 : 1 (w : w : w)

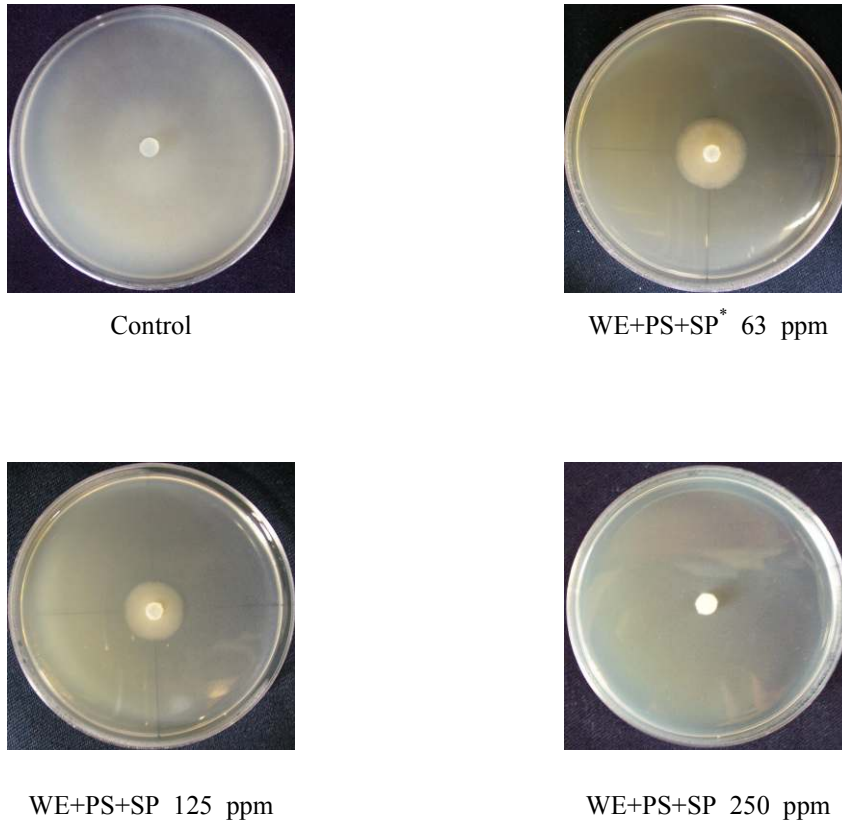


Fig. 3-4-78. Growth inhibition of wood extracts, organic compound and commercial product (SP) against *Trichoderma viride* at 25°C for 5 days.

\* WE : Wood extract, PS : organic compound, SP(BN) : commercial product  
 WE + PS + SP(BN) = 1 : 1 : 1 (w : w : w)

Fig. 3-4-79에 *T. agtroviride*에 대한 최적 formulation제제의 농도별 항균활성을 나타냈으며 대조구와 비교하였을 때 모든 농도에서 균사가 성장하지 않았음을 확인할 수 있었다.

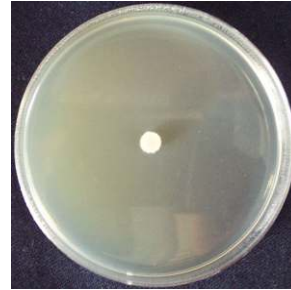
Fig. 3-4-80에 *T. koningii*에 대한 최적 formulation제제의 농도별 항균활성을 나타냈으며 대조구와 비교하였을 때 모든 농도에서 균사가 성장하지 않았음을 확인할 수 있었다.



Fig. 3-4-81에 *T. viride*에 대한 최적 formulation제제의 농도별 항균활성을 나타냈지만 대조구와 비교하였을 때 모든 농도에서 균사가 성장하지 않았음을 확인할 수 있었다.



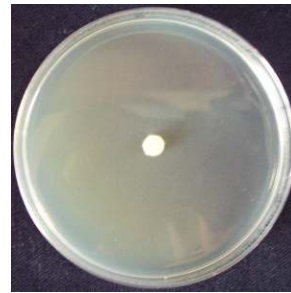
Control



WE+PS+BN\* 63 ppm



WE+PS+BN 125 ppm



WE+PS+BN 250 ppm

Fig. 3-4-79. Growth inhibition of wood extracts, organic compound and commercial product (BN) mixture against *Trichoderma atroviride* at 25°C for 5 days.

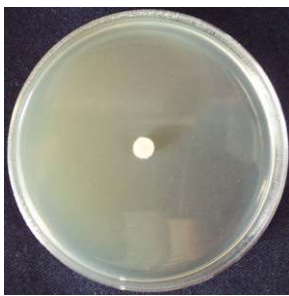
\* WE : Wood extract, PS : organic compound, SP(BN) : commercial product  
 WE + PS + SP(BN) = 1 : 1 : 1 (w : w : w)



Control



WE+PS+BN 63 ppm



WE+PS+BN 125 ppm

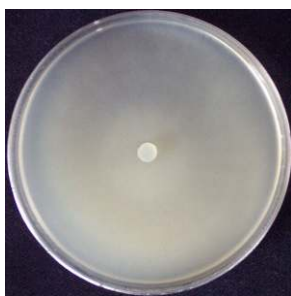


WE+PS+BN 250 ppm

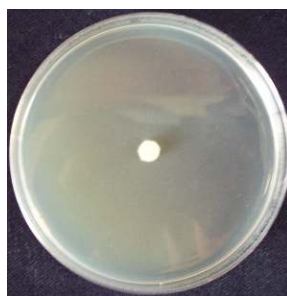
Fig. 3-4-80. Growth inhibition of wood extracts, organic compound and commercial product (BN) mixture against *Trichoderma koningii* at 25°C for 5 days.

\* WE : Wood extract, PS : organic compound, SP(BN) : commercial product

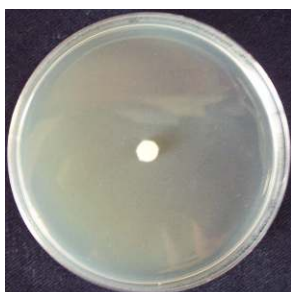
WE + PS + SP(BN) = 1 : 1 : 1 (w : w : w)



Control



WE+PS+BN 62.5 ppm



WE+PS+BN 125 ppm



WE+PS+BN 250 ppm

Fig. 3-4-81. Growth inhibition of wood extracts, organic compound and commercial product (BN) mixture against *Trichoderma viride* at 25°C for 5 days.

\* WE : Wood extract, PS : organic compound, SP(BN) : commercial product

WE + PS + SP(BN) = 1 : 1 : 1 (w : w : w)

Fig. 3-4-82의 *T. aggressivum*과 Fig. 3-4-83의 *T. atroviride*에 대한 각 formulation 제제의 항균활성을 나타낸 그래프로 수목추출물, 시판유기계 화합물 및 시판항균제품(SP 또는 BN)을 혼합한 제제가 63 ppm에서 100%의 항균활성을 보였다. 그러므로 *T. aggressivum*의 균사생장저해를 위해서는 기존의 항균제품을 사용하는 것 보다 수목추출물 및 시판유기계 화합물을 첨가하여 사용함으로써 시판항균제품의 사용량을 줄일 수 있다고 판단된다.

Fig. 3-4-84의 *T. harzianum*, Fig. 3-4-85의 *T. koningii* 및 Fig. 3-4-86의 *T. viride*에 대한 각 formulation 제제의 항균활성을 나타낸 그래프로 수목추출물, 시판유기계 화합물 및 시판항균제품(BN)을 혼합한 제제가 63 ppm에서 100%의 항균활성을 보였다.

결과적으로 *T. aggressivum*과 *T. atroviride*의 최적 항균제제는 소나무 목부추출물, 시판유기계화합물 및 시판 항균제품 SP (또는 BN)을 1 : 1 : 1 (w : w : w)의 비율로 혼합하여 조제하는 것 이라고 판단되며 이를 63 ppm의 농도로 현장에 적용하면 그린몰드의 생육을 억제시킬 수 있다고 생각된다.

*T. harzianum*, *T. koningii* 및 *T. viride*의 최적 항균제제는 소나무 목부추출물, 시판유기계화합물 및 시판 항균제품 BN을 1 : 1 : 1 (w : w : w)의 비율로 혼합하여 조제하는 것 이라고 판단되며 이를 63 ppm의 농도로 현장에 적용하면 그린몰드의 생육을 억제시킬 수 있다고 생각된다.

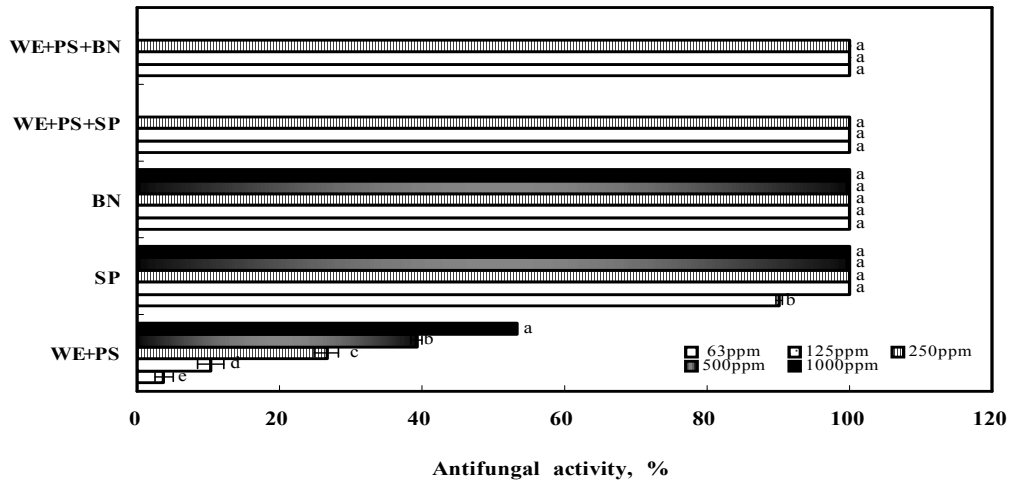


Fig. 3-4-82. Antifungal activity of wood extracts, organic compound and commercial products against *Trichoderma aggressivum* at 25°C for 5 days.

WE : Wood extract, PS : organic compound, SP(BN) : commercial product

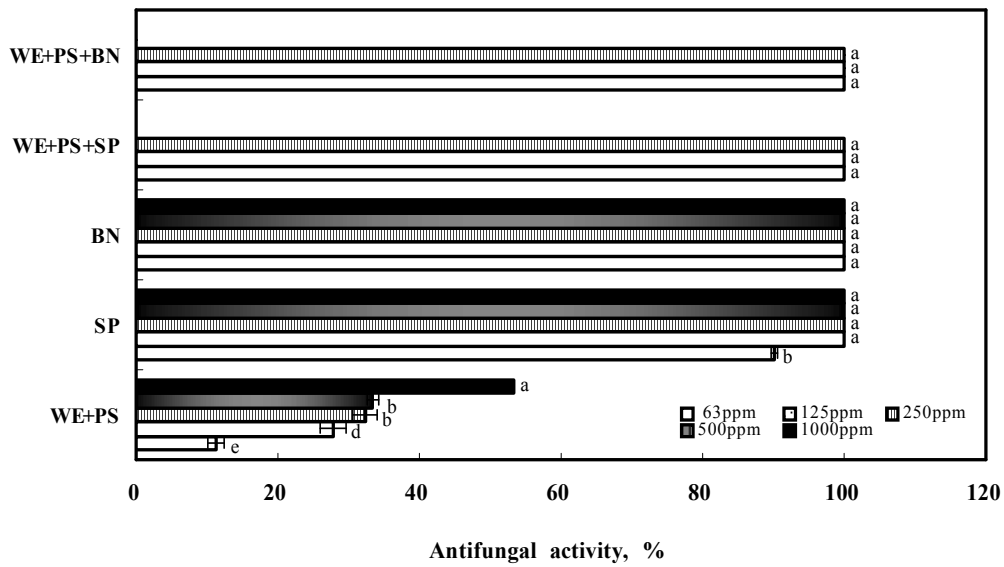


Fig. 3-4-83. Antifungal activity of wood extracts, organic compound and commercial products against *Trichoderma atroviride* at 25°C for 5 days.

WE : Wood extract, PS : organic compound, SP(BN) : commercial product

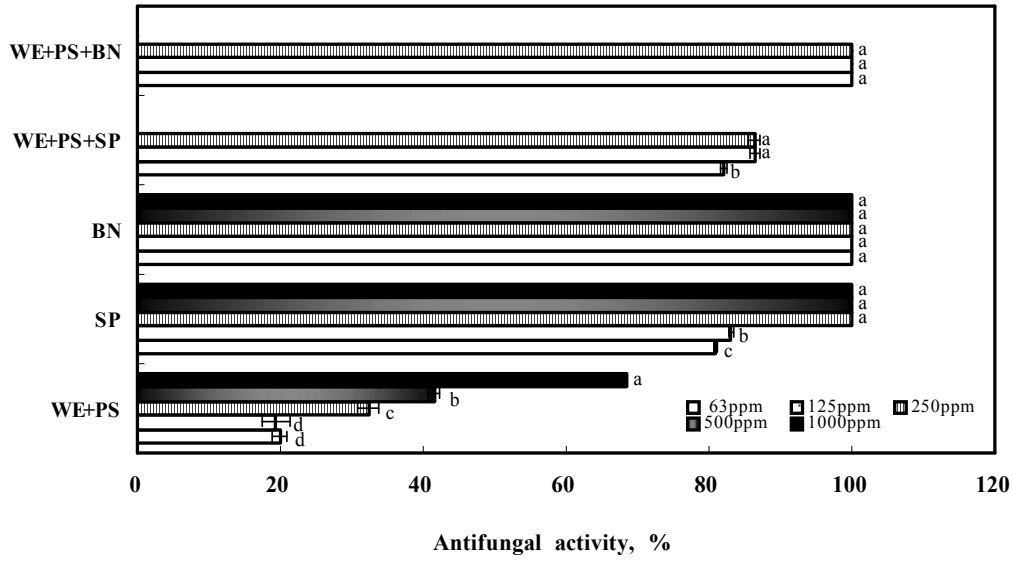


Fig. 3-4-84. Antifungal activity of wood extracts, organic compound and commercial products against *Trichoderma harzianum* at 25°C for 5 days.  
 WE : Wood extract, PS : organic compound, SP(BN) : commercial product

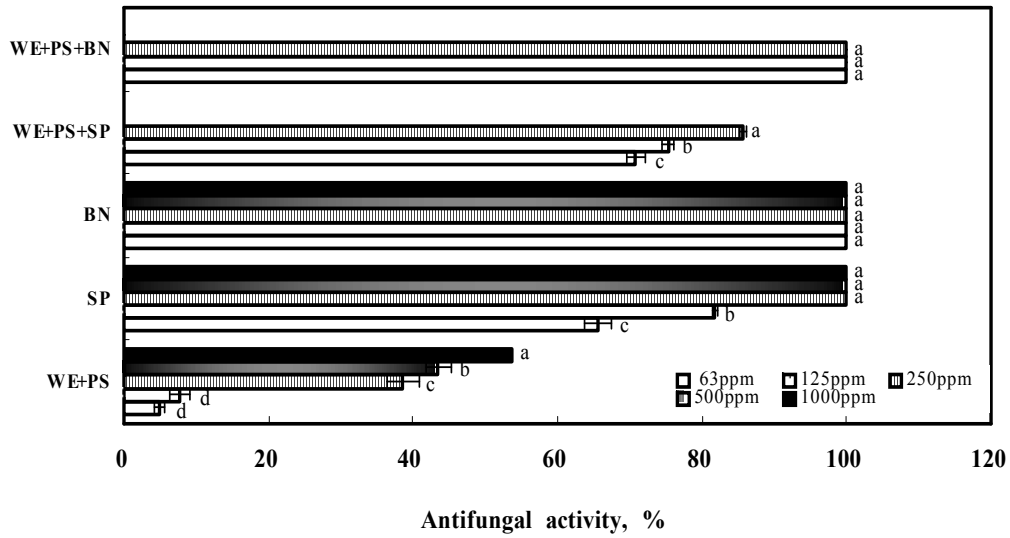


Fig. 3-4-85. Antifungal activity of wood extracts, organic compound and commercial products against *Trichoderma koningii* at 25°C for 5 days.  
 WE : Wood extract, PS : organic compound, SP(BN) : commercial product

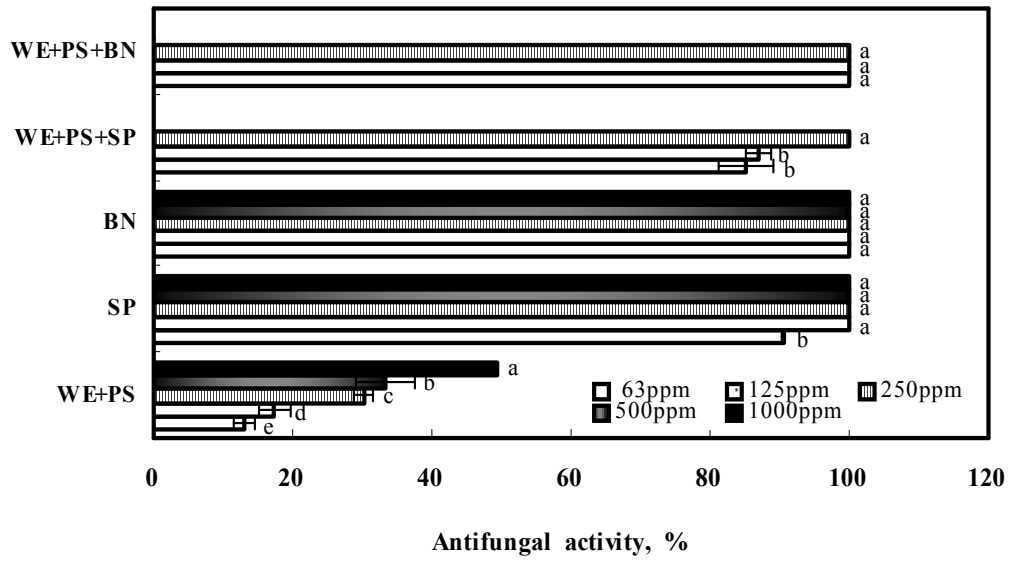


Fig. 3-4-86. Antifungal activity of wood extracts, organic compound and commercial products against *Trichoderma viride* at 25°C for 5 days.  
 WE : Wood extract, PS : organic compound, SP(BN) : commercial product

## 제 5 절 유효추출물의 분리를 위한 전처리 및 분리 공정 개발

### 1. 임산자원의 전처리기술 공정 검토

#### 가. 공시재료의 조성분 분석

목재의 화학적 조성은 주성분으로 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 및 리그닌이 있으며, 부성분으로는 무기성분, 질소화합물, 지방족화합물, 방향족화합물 및 펙틴 등이 있는데, 이러한 조성은 목재의 이용에 있어서 중요한 지표가 된다.

본 연구에서 사용된 공시재료인 신갈나무의 화학적 조성분은 냉수, 온수, 유기용제, 알칼리 추출물, Klason lignin 함량 및 무기물 함량(ash)을 분석하였으며, 그 결과는 Table 3-5-1에 표시하였다.

알칼리 추출물 함량이 다른 추출물에 비해 양이 많은 이유는 알칼리 가열처리에 의해 냉수, 온수 추출물 및 유지, 수지, 밀납, 정유, 리그닌 및 헤미셀룰로오스의 일부가 동시에 추출되기 때문이다.

리그닌 함량이 약 20%로, 침엽수재 보다 약 10% 정도 낮은 것은 침엽수재와 활엽수재 간의 리그닌 함량 및 리그닌 종류의 차이에 의한 것으로 활엽수재가 침엽수재 보다 탈리그닌 처리에 있어서 유리함을 나타낸다.

목재 중의 무기물 함량을 표시하는 회분 함량은 1.0% 이하로, 상기의 결과는 기준에 보고된 분석결과와 거의 일치하였다.

Characters	<i>Quercus mongolica</i>
Cold water extractives	2.0
Hot water extractives	4.8
Ethanol-benzene extractives	2.6
Alkali(1% NaOH) extractives	24.2
Klason lignin	20.8
Ash	0.6

Table 3-5-1. Chemical compositions of wood(%)



본 연구에 사용된 공시재료인 신갈나무의 탄수화물(중성당) 분석은 alditol-acetate법에 의해서 G.C.로 분석하였으며, 내부 표준물질로는 inositol을 사용했다. 그 분석 결과는 Table 3-5-2에 나타났다.

Species	Sugar composition(%)					
	Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glu.	Rham.
<i>Quercus</i>	2.7 <sup>a</sup>	29.8	1.6	1.2	64.6	T
<i>mobgolica</i>	(2.0) <sup>b</sup>	(21.8)	(1.2)	(0.9)	(47.3)	(T)

Table 3-5-2. Sugar composition of wood measured by alditol-acetate method

Note; a: based on total carbohydrate

b: based on wood meal

T: Trace, below 0.5%

신갈나무 원료 전체의 탄수화물 중 글루코오스잔기의 함량이 신갈나무 64.6%였고, 이 때 글루코오스잔기는 거의 대부분 셀룰로오스에서 유래되지만 일부는 헤미셀룰로오스에서도 유래되는 것으로 알려져 있다.

활엽수재 헤미셀룰로오스의 주체인 4-O-methylglucuronoxylan으로 부터 유래되었다고 생각되는 xylan잔기는 신갈나무에서 약30%로 나타났다. 따라서 본 연구에 사용된 목재의 헤미셀룰로오스는 거의 대부분 xylose잔기로 구성되어 있다고 추정할 수 있다.

Arabinose와 galactose 잔기는 arabinogalactan에서 유래되며, 활엽수재 헤미셀룰로오스에는 galactiglucomannan이 존재하지 않기 때문에 mannose잔기는 glucomannan에서 유래되었다고 생각된다.

나. 수증기 처리재의 성상

수증기 처리재의 구성당 분석 및 리그닌함량 측정은 신갈나무의 칩을 수증기 처리한 후, 냉동 건조기로 충분히 건조시켜 분쇄한 시료를 사용하였다. 본 실험의 목적은 수증기처리에 의한 목재의 주요 성분 변화를 검토하고자 실시하였다.

신갈나무 수증기 처리재의 탄수화물 분석 및 리그닌 함량 측정 결과를 Table 3에 나타냈다.

신갈나무 수증기 처리재는 수증기처리 조건에 따라서 수증기 처리재를 구성하는 탄수화물의 각 구성성분 함량이 달라졌다.

수증기 처리시 동일압력에서 처리시간이 길어질수록 헤미셀룰로오스의 함량이 감소하였으며, 특히 xylose잔기의 함량이 급격히 감소하였다. 또한 동일처리시간에 수증기 처리압력이 높아질수록 같은 경향을 나타냈다.

이는 활엽수 중에 존재하는 xylan 등의 pentose계 당류가 고온 및 목재 중의 acetyl기에 유래된 산에 의해 탈수소화 반응이 진행되어 furfural(2-furaldehyde)로 변화되었기 때문이라고 추측된다 (Fengel, D. and Wegener. G.).

Species	Material No. <sup>a</sup>	Sugar composition <sup>b</sup> ( % )						Klason lignin <sup>c</sup> (%)
		Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glu.	Rham.	
<i>Quercus mongolica</i>	EQ 25-3	0.7	18.6	1.6	T	78.9	0.2	28.3
	EQ 25-6	0.5	11.4	1.4	T	86.7	T	33.5
	EQ 25-9	0.4	5.9	1.0	T	92.4	0.3	38.0
	EQ 30-3	0.3	10.3	0.8	T	88.6	T	36.3
	EQ 30-6	0.7	3.8	1.0	T	94.5	T	42.8
	EQ 30-9	0.4	2.1	0.5	T	97.0	T	45.1

Table 3-5-3. Sugar composition and lignin content of steam exploded wood

Note; a: EQ, steam exploded *Quercus mongolica* wood

b: Based on total carbohydrates

c: Based on exploded wood

T: Trace, below 0.1%

동일한 고온·고압에서 처리시간이 길어질수록, 또한 같은 수증기 처리 시간에서 수증기 압력이 높아질수록 탄수화물 중의 글루코오스 잔기의 함량비가 상대적으로 증가하였다. 이는 헤미셀룰로오스의 변질 및 분해로 인하여 수증기재에 잔존하는 탄수화물의 대부분이 셀룰로오스로 구성되어있기 때문이라고 생각된다.

25 kgf/cm<sup>2</sup> 이상의 압력으로 수증기 처리 했을 때, 수증기 처리재 중에 존재하는 탄수화물의 80%이상이 글루코오스 잔기로 구성되어 있다는 사실에서 목재 중에 존재하는 헤미셀룰로오스 대부분이 제거되었고, 셀룰로오스만으로 이루어진 탄수화물이 존재함을 추측할 수 있다.

수증기 처리재 중의 리그닌 함량은 Klason lignin 법에 의해 측정하였으며, 동일 압력에서 처리시간이 길어질수록 함량이 증가하며, 또한 동일 처리 시간에서 압력이 높아질수록 리그닌 함량이 증가하였다.

Kuwahar 등이 나왕(*Shorea sp.*), 미송(*Pseudotsugataxifolia*)과 낙엽송(*Larix leptolepis*)을 고압(2.55, 3.54, 4.51 MPa)에서 0.5-20분간 고온·고압 처리한 결과 4.51 MPa(46 kgf/cm<sup>2</sup>)압력에서 10분 이상 고온·고압 처리를 했을 때, 시료 중의 holocellulose 함량은 급격히 감소하였고, Klason lignin 양은 명백히 증가하였다고 보고하였다.

고온·고압 처리 조건이 강해질수록 목재 중의 헤미셀룰로오스 가수분해 및 탈수소화 반응이 진행되고, 또한 가수분해 및 탈수소화 반응이 진행된 헤미셀룰로오스가 2차적으로 변화를 일으켜 furfural 등으로 변질되어 유실됨으로서 수증기 처리재의 리그닌 함량이 상대적으로 높아졌다고 생각된다.

고온·고압 처리 동안에 목재 중의 헤미셀룰로오스의 glucoside 결합이 가수 분해되어 저분자화 되었기 때문으로 추측된다.

수증기 처리재 중의 리그닌에 당류가 결합하여 산가수 분해에 대한 저항성 증가 및 용출된 리그닌의 탄수화물 코팅으로 인하여 리그닌 정량시 영향을 미친 것으로 추측되었다.

#### 다. 수증기 처리재의 입자분포 측정

Table 3-5-4는 신갈나무 칩을 여러 가지 수증기 처리조건에서 각각 수증기 처리한 후, 기건시켜 입자분포를 측정한 결과이다.

신갈나무 수증기 처리시 동일압력에서 처리시간이 길어짐에 따라 20 mesh 이상 부분이 감소하고, 80 mesh 이하 부분이 증가하는 경향을 보였으며, 또한 동일 처리

시간에서 압력을 증가시킴에 따라 20 mesh 이상 부분이 감소하고 80 mesh 이하 부분이 증가하는 경향을 나타냈다.

이러한 결과는 처리압력 및 처리시간이 증가함에 따라서 즉 수증기 처리 조건이 강해질수록 수증기 처리재 입자는 미세화 된다는 것을 알 수 있었다.

Material No. <sup>a</sup>	Size distribution(mesh, %) <sup>b</sup>				
	20on	20-40	40-60	60-80	80pass
EQ 25 - 3	88.1	5.8	2.0	1.9	2.2
EQ 25 - 6	80.4	9.7	2.8	2.3	4.8
EQ 25 - 9	76.5	11.5	1.7	2.9	7.4
EQ 30 - 3	76.3	13.6	3.2	2.4	4.3
EQ 30 - 6	68.8	15.5	4.2	3.9	7.6
EQ 30 - 9	55.1	18.3	8.6	7.3	10.7

Table 3-5-4. Size distribution of steam exploded wood treated under the different conditions

Note: a: EQ, steam exploded *Quercus monglica* wood

b: Based on oven-dry weight

#### 라. 전처리 목질원료의 추출물

본 연구에 사용된 신갈나무는 경북대학교 연습림 (경북 청송소재)에서 벌채하여 박피 후, 5×5 cm 각목으로 제재하였으며, 유효성분 분리를 용이하게 하기 위해서 chipper를 이용하여 2×2×0.2 cm의 크기로 chip을 조제하였다. 제조된 chip은 고온·고압 전처리의 재료로 사용되었다.

공시재료의 화학적 전처리 (탈리그닌 처리)에 따른 수율 및 잔존 리그닌 함량 측정은 Table 21와 같다. 고온·고압 중의 리그닌 함량은 Table 21에서 보는 바와 같이 동일압력에서 처리시간이 길어질수록 함량이 증가하며, 또한 동일처리 시간에서 압력이 높아질수록 리그닌 함량이 증가하였다.

고온·고압 처리 조건이 강해질수록 목재 중의 헤미셀룰로오스 가수분해 및 탈수

소화 반응이 진행되고, 또한 가수분해 및 탈수소화 반응이 진행된 헤미셀룰로오스가 2차적으로 변화를 일으켜 furfural 등으로 변질되어 유실됨으로써 고온·고압재의 리그닌 함량이 상대적으로 높아졌다고 생각된다.

또한, 고온·고압 처리 동안에 목재 중의 헤미셀룰로오스의 glucoside 결합이 가수분해되어 저분자화되었기 때문에 판단되며, 그리고, 고온·고압재 중의 리그닌에 당류가 결합하여 산가수분해에 대한 저항성 증가 및 용출된 리그닌의 탄수화물 코팅으로 인하여 리그닌 정량시 영향을 미친 것으로 판단된다.

신갈나무 고온·고압재의 수산화나트륨 용액 처리에 따른 탈리그닌 처리 후, 그 잔사의 수율을 살펴보면, 고온·고압 처리 시간이 증가함에 따라 감소되었으며, 고온·고압 처리시간 6분 이후에는 수율에 큰 변화가 없었다.

잔존 리그닌 함량이 감소되었으며, 탈리그닌 처리효과는 고온·고압 처리 시간이 길어짐에 따라 높게 나타났다. 또한 고온·고압 처리 시간을 기준으로 리그닌 함량을 고려해 볼 때, 6분 이상의 고온·고압 처리재는 수율이 저하되고 잔존 리그닌 함량은 거의 변화가 없었으며, 탈리그닌을 또한 큰 변화가 없었다.

이러한 사실로 미루어 보아, 25 kg/cm<sup>2</sup>의 고온·고압 처리의 압력에서 6분 이상의 고온·고압 처리재는 수산화나트륨 용액에 의한 실온처리만을 기준으로 할 때 큰 의미가 없다고 판단되어 25 kg/cm<sup>2</sup>에서 6분 처리가 최적의 고온·고압 처리 조건으로 판단된다.

Materials No.	Yield of residue (%)	Lignin content (%)	Delignification rate (%)
EQ <sup>1)</sup> 25-3 <sup>2)</sup>	78.0	13.5	62.8
EQ 25-6 <sup>3)</sup>	59.2	7.6	86.6
EQ 25-9 <sup>4)</sup>	58.0	7.3	88.9

Table 3-5-5. Yield, lignin content and delignification rate of steam exploded wood treated with 1% sodium hydroxide solution

- 1) EQ: Steam explosion of *Quercus monglica*
- 2) EQ: 25-3: Steam explosion of *Quercus monglica* (25 kg/cm<sup>2</sup>, 3 min)
- 3) EQ: 25-6: Steam explosion of *Quercus monglica* (25 kg/cm<sup>2</sup>, 6 min)
- 4) EQ: 25-9: Steam explosion of *Quercus monglica* (25 kg/cm<sup>2</sup>, 9 min)

## 2. 버섯균사 및 그린몰드 생장 제어 관련 추출물의 대량 생산을 위한 전처리 공정 확립

### 가. 고온·고압 전처리 공정 확립

일반적인 리그노셀룰로오스계 물질의 전처리에는 화학적인 방법, 물리적인 방법, 생물학적인 방법이 있으며, 이러한 전처리 방법은 그 방법에 따라 장단점이 있다. 그러나 에너지 측면 및 환경적 측면을 고려 할 때 고온·고압 처리방법이 가장 효율적인 방법으로 사료된다.

본 연구에 사용된 신갈나무는 경북대학교 연습림 (경북 청송소재)에서 벌채하여 박피 후, 5×5 cm 각목으로 제제하였으며, 유효성분 분리를 용이하게 하기 위해서 chipper를 이용하여 2×2×0.2 cm의 크기로 chip을 조제하였다. 제조된 chip은 고온·고압 전처리의 재료로 사용되었다.

본 연구에서는 목질원료(신갈나무 chip)의 전처리방법으로 고온·고압 처리방법을 선택하였으며, 이 방법은 리그노셀룰로오스계 물질의 전처리에 있어 가장 효율적인 방법 중의 하나라고 알려져 있음. 본 연구에서 사용된 고온·고압 처리장치는 현재 주관기관에서 보유중인 장치를 사용하였다(Fig. 3-5-1).



Fig. 3-5-1. 본 연구에 사용된 시료 전처리 장치

목질원료의 최적 처리조건에서 우선시 검토 되어야 할 사항은 1회 처리량이며, 처리 조건에 따른 처리 수율 및 파쇄상태를 육안적으로 검토해야 할 필요성이 있다.

본 연구에서 사용된 고온·고압 처리장비의 최대 1회 처리량은 15kg으로 규명되었고, 이때 처리 수율은 약 97%로 나타났다. 약 3%의 손실은 처리시 시료를 완전하게 회수하기가 불가능하였으며, 일부는 처리과정 동안 휘발성분 등이 열에 의해 휘발되기 때문으로 생각되어진다. 본 연구에서 행해진 처리의 육안적인 조사 사진을 fig. 3-5-2에 나타내었다.



목질원료(신갈나무 chip)



고온·고압처리된 후의 파쇄 상태

Fig. 3-5-2. 고온·고압처리에 의한 목질원료의 파쇄 상태

고온·고압 전처리는 목재를 고온 (200℃ 이상), 고압 (20~40 kg/cm<sup>2</sup>) 포화수증기 하에서 단시간 (3~9분) 처리한 후 대기중에 노즐을 통하여 순간적으로 방출하여 팽창과 마찰력에 의하여 목재 조직의 파쇄와 해섬화를 도모하며, 이 전처리방법은 비교적 처리 효율이 높고 후처리 및 주요 성분의 분리가 용이하고, 물 이외에 다른 약품을 사용하지 않기 때문에 버섯균사 및 그린월드 생장 제어 관련 추출물 생산을 위한 전처리 공정으로서 매우 유리하다고 생각된다. 그리고 고온·고압에서 목재 중의 acetyl기의 탈리로 초산이 생성되면서 산가수분해에 의한 셀룰로오스의 중합도 저하와 헤미셀룰로오스의 분리가 용이해진다.

본 연구에서 행해진 고온·고압 처리는 기건시킨 신갈나무를 Table 3-5-6과 같은 조건으로 고온·고압 처리하였으며, 고온·고압 처리한 시료는 밀봉하여 4℃의 저온 시료저장고에 보관하였다.

Species	Materials No.	Steam explosion condition	
		Pressure (kg/cm <sup>2</sup> )	Time (min.)
<i>Quercus monglica</i>	EQ <sup>1)</sup> 25-3 <sup>2)</sup>	25	3.
	EQ 25-6 <sup>3)</sup>	25	6
	EQ 25-9 <sup>4)</sup>	25	9

Table 3-5-6. Steam explosion condition for *Quercus monglica* chip

- 1) EQ: Steam explosion of *Quercus monglica*
- 2) EQ: 25-3: Steam explosion of *Quercus monglica* (25 kg/cm<sup>2</sup>, 3 min)
- 3) EQ: 25-6: Steam explosion of *Quercus monglica* (25 kg/cm<sup>2</sup>, 6 min)
- 4) EQ: 25-9: Steam explosion of *Quercus monglica* (25 kg/cm<sup>2</sup>, 9 min)



### 3. 전처리 원료로부터 버섯 및 그린몰드 생장에 유효한 물질들의 분리공정 확립

#### 가. 전처리 원료로부터 유효성분 분리공정 구축

본 연구에서 있어서 목질자원(신갈나무 칩)으로부터 버섯 및 그린몰드 생장에 유효한 원료물질인 목재 추출물을 생산하기 위해 1차적으로 목재 칩(리그노셀룰로오스)을 고온·고압 처리한 다음, 분리 및 정제 공정을 하였다.

신갈나무 (*Quercus monglica*) chip 원료는 전처리 공정으로 고온 (200°C 이상), 고압 (20~40 kg/cm<sup>2</sup>) 포화수증기하에서 단시간 (9분) 처리한 후 대기중에 노즐을 통하여 순간적으로 방출하여 팽창과 마찰력에 의하여 목재 조직의 파쇄와 해섬화를 도모하였으며, 이 고온·고압 처리된 시료는 목재의 유효 성분을 추출하기 위하여 물을 일정량 첨가(액비 9:1), 혼합한 다음, 1시간 동안 60°C에서 교반시킨 후 반응잔사 (고온·고압 처리된 시료)와 반응액 (추출액)을 filter로 추출액만을 분리한다.

Filter로 분리된 추출액은 다시 증발장치에 투입 (100 L)하고, 증발기 내부 온도 70°C에서 진공상태가 되며, 압력 540~580 kg/cm<sup>2</sup> setting되어 증발하기 시작하는데 1시간 20분 증발시키면 50%의 증발된 액을 회수 할 수 있다.

목재원료로부터 버섯 및 그린몰드 생장에 유효한 목재 추출물의 분리 및 정제 공정은 Fig. 3-5-3과 같다.



원료



고온·고압 처리



고온·고압된 원료 회수과정



온수추출



탈수· 1차 여과



2차 여과액 회수과정



회수액 증발처리



목재 유효성분 분리

Fig. 3-5-3. 버섯 및 그린몰드 생장에 유효한 목재 유효성분 분리 공정

4. Lab. 수준에서 제조된 화합물의 농가 실연시험

가. 주관기관으로부터 제공받은 버섯균사 성장 유효물질의 효능 평가

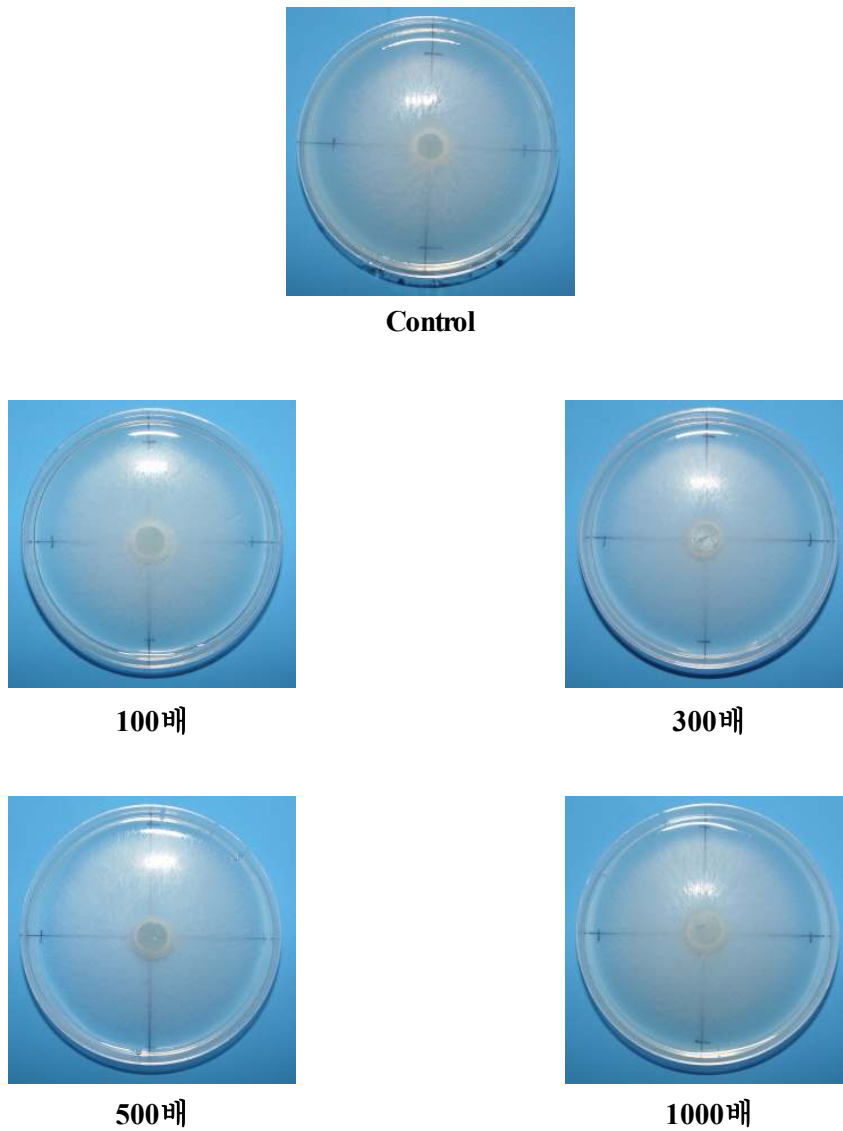


Fig. 3-5-4. Effect of *Quercus monglica* extracts on mycelial growth of *Lentinus edodes*.

버섯균사 생장 유효물질은 주관기관인 경북대학교에서 제공한 신갈나무 추출액을 100배, 300배, 500배, 1000배 희석 농도별로 PDA배지에서 25℃, 8일간 배양하여 균사생장을 측정하였다. 그 결과는 Fig. 3-5-4에 나타난 것처럼 500배와 1000배에서 대조구 보다 각각 약 15%와 12%정도 균사 생장율이 우수하였다.

버섯균사 생장 유효물질을 양송이버섯 재배농가(대구시 달성군 하빈면)에 물과 500배 비율로 희석하여 양송이버섯 배지에 복토를 한 다음, 복토에 양송이버섯 균이 보일 때 수분공급 기간 중에 1번/3일(日) 버섯균사생장유효물질을 적용하였으며, 1주기 버섯 수확에서 폐상하는 시점까지 적용하여 버섯균사 생장 유효물질의 성능을 평가하였다(Fig. 3-5-5 참조).

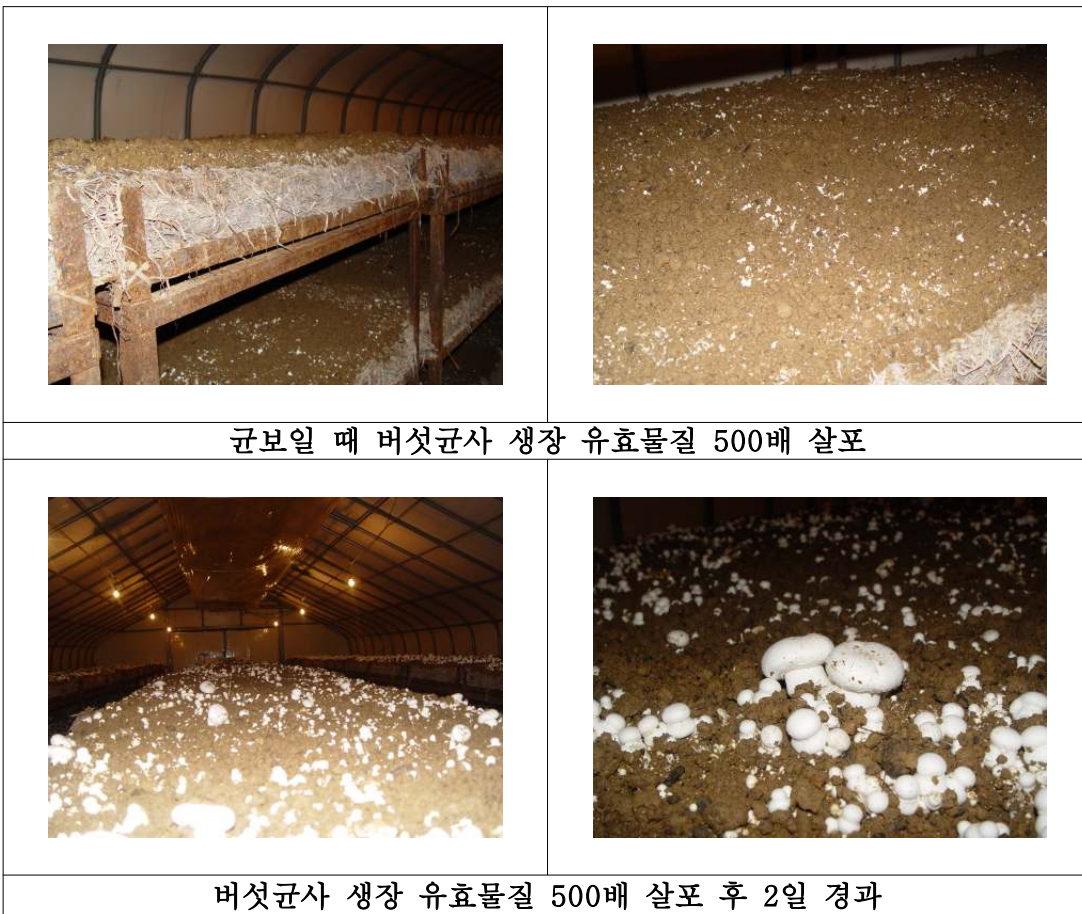


Fig. 3-5-5. 양송이버섯 농가에 적용한 버섯균사 생장 유효물질의 효능 평가

버섯균사 생장 유효물질 성능 평가는 유효물질을 처리하지 않은 대조구와 유효물질을 처리한 처리구를 비교하였으며, 동일한 버섯배양실에서 대조구와 처리구에서 발생하는 버섯의 발생속도, 수확량, 상품성을 평가하였다.

1주기와 2주기 버섯 수확시기에는 버섯균사 생장 유효물질을 처리한 처리구와 대조구 간에 뚜렷한 차이점이 발견되지 않았으며, 단지 버섯의 경도가 우수하다고 농가에서 평가하였다.

3주기에서부터 5주기까지 버섯 수확되는 양송이버섯에서는 버섯균사 생장 유효물질을 500배 처리한 처리구에서 대조구 간에 버섯의 발생속도가 약 6시간이상 빨랐으며, 수확량에서도 대조구에 비해 약 20~30% 정도 증가하였고, 상품성(상, 중, 하로 평가함)에 있어서도 처리구에서 상품의 비율이 약 10%, 중품의 비율이 약 15% 정도 증가하였다.

나. 협동기관(경상대학교)로부터 제공받은 그린몰드 생장 억제물질의 효능 평가

그린몰드 생장 억제물질은 그린몰드 생장 억제 연구 결과에서 도출된 낙엽송 열수 추출물의 *n*-hexane 용해부를 협동기관인 경상대학교로부터 제공받았다.

양송이버섯 재배농가(대구시 달성군 하빈면)에 병원균에 감염된 배지에 그린몰드 생장 억제 물질인 낙엽송 열수 추출물의 *n*-hexane 용해부를 물과 혼합하여 125배, 250배, 500배, 1000배 농도로 적용하였으며, 적용한 날로부터 3일동안 병원균생장을 측정하였다.

양송이버섯 배지에 감염된 병원균의 균사 생장율은 식 (1)에 의하여 계산하였으며, 이때 대조구는 그린몰드 생장 억제물질을 처리하지 않은 구역을 정하였고, 10반복 평균값으로 평가하였다.

$$\text{균사생장율}(\%) = \left\{ 1 - \frac{\text{대조구의 생장길이}(mm) - \text{처리구의 생장길이}(mm)}{\text{대조구의 생장길이}(mm)} \right\} \times 100 \dots\dots \text{식 (1)}$$

Fig. 69은 배지에 감염된 병원균에 대한 그린몰드 생장 억제물질의 생육 억제 성능을 시험하기위해 병원균에 감염된 배지의 상태를 나타냈다.

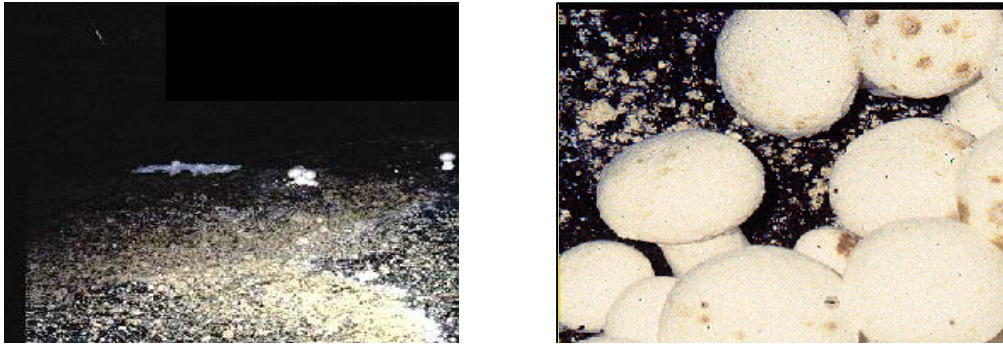


Fig. 3-5-6. 양송이버섯 재배농가의 병원균 감염 배지

- 그린몰드 균사생장 억제물질을 처리하지 않은 배지균을 대조구로 하였으며, 그린몰드 균사생장 억제물질을 처리한 배지균을 처리구로하였으며, 농도별로 처리하여 그린몰드 균사생장 억제 성능을 평가하였다. 그 결과는 Fig. 3-5-7에 나타냈다.

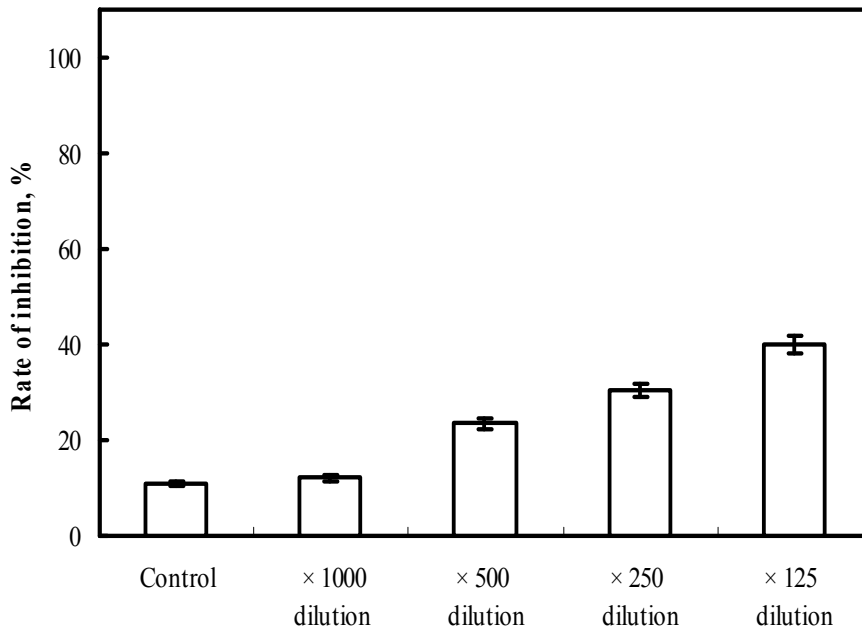


Fig. 3-5-7. 그린몰드 생장 억제물질 농도에 따른 토마토 작물에 감염된 병원균의 균사 저해율(%)

그린몰드 군사생장억제 물질을 처리한 125배~1000배 조건에서 군사생장 억제 효과가 나타났으며, 희석농도가 낮아질수록 곰팡이 군사생장 억제성능은 높아졌고, 각 희석농도에 따른 군사생장 억제력은 유의성 있게 나타났고, 125배 희석된 배지에서는 약 40%의 군사생장억제력이 발휘되었다.

Fig. 3-5-8은 그린몰드 생장 억제물질 125배 희석한 처리한 배지를 20일 경과 후에 호전된 양송이버섯 배지 상태를 나타낸 것이다.



Fig. 3-5-8. 그린몰드 군사생장 억제물질 처리구 (20일 경과)

## 제 6 절 버섯생장영양제 및 그린몰드 bio-control 제제의 제품화 및 농가 실연

### 1. 버섯생장영양제 및 그린몰드 bio-control 제제의 배지 투입방법 연구

본 연구 과정에서 개발된 버섯생장영양제, 그린몰드 bio-control 제제의 효능발휘를 위하여 버섯 재배 배지의 투입하는 방법을 시험 도출하였다. 모든 종류의 버섯에 적용 가능하도록 하는 방법으로 버섯 배지 제조 시 영양제를 투입하는 방법과 균 전종 후에 수분 공급 시 엽면 살포하는 방법으로 투입방법을 연구한 결과, 균의 오염도가 낮은 발아기부터 적용하여, 생육동안에 적용하며, 수확 후에도 주기적으로 사용하여 다음 생육에 영향을 주도록 영양제를 적용하였다.

그린몰드에 대한 control 제제의 경우 125배 희석하여 그린몰드가 발생한 배지에 처리하여 그린몰드의 성장이 억제됨을 확인하였으며, 배지의 상태 또한 호전되어 물과 혼합하여 배지에 투입 하는 방법을 채택하였다.

### 2. 버섯생장영양제의 농가 실연 및 성능 평가 시험

버섯 균사 생장에 유효한 물질로 수목으로부터 추출한 성분과 영양제의 효능 향상을 위하여 탄소원, 질소원, 제당부산을 첨가하여 제조된 버섯생장영양제의 성능평가 시험을 위하여 농가 실연을 실시하였다.

#### 가. 농가적용사례 1

##### (1) 경북 영덕군 H농가 적용과정





Fig. 3-6-1 경북 영덕군 H농가

경북 영덕군 영덕읍 천전리의 H농가 느타리버섯 재배 농가(60평, 하우스 전체 2동 중 1동 적용)에 물과 500배 비율로 희석하여 배지에 적용하고, 균이 보일 때 수분공급시기에 1번/3일 적용하였으며, 수확에서 폐상하는 시점까지 적용하여 버섯생장영양제의 성능을 평가하였다. (Fig 3-6-1)

## (2) 농가 적용 결과

버섯생장영양제의 적용결과 느타리버섯 발생률이 처리하기 전보다 훨씬 좋아졌고, 버섯의 경도와 색이 향상되었으며, 수확되는 느타리버섯의 상품성이 향상되었다. 느타리버섯 농가에서 느타리버섯이 건강하게 생산되었는지는 버섯의 대 하단 부분에 균사체가 하얗게 피었는지를 보고 판단한다고 하였는데, 농가의 의견으로 버섯생장영양제 적용 전에 간혹 확인 할 수 있던 것이 적용 후에는 대부분 확인 가능하다고 평가하였다. (Fig 3-6-2)

또한 버섯 영양제의 적용 결과 버섯의 발생에 있어서 다발성으로 많이 발생되어, 하우스 1동으로 약 20%의 생산량 증가와 상품성 향상으로 실질적인 소득 증가는 약 30%의 효과가 발생되었다고 평가하였다.



Fig. 3-6-2 경북 영덕군 H농가 적용

나. 농가적용사례2

(1) 경북 영덕군 K농가 적용과정

경북 영덕군 영덕읍 천전리의 K농가 느타리버섯 재배 농가(600평, 하우스 전체 5동 적용)에 물과 500배 비율로 희석하여 배지에 적용하고, 균이 보일 때 수분 공급 시기에 1번/3일 적용 하였으며, 수확에서 폐상하는 시점까지 적용하여 버섯성장영양제의 성능을 평가하였다. (Fig 3-6-3)



Fig. 3-6-3 경북 영덕군 K농가

(2) 농가 적용 결과

버섯성장영양제의 적용결과 느타리버섯의 대가 처리하지 않은 곳 보다 굵어진다고 농가에서 평가하였다. 또한 버섯의 경도가 더 있어졌고, 처리하지 않은 곳 보다 싱싱해져 보인다고 평가하였으며, 버섯의 품질이 1~3주기 생산되어지는 버섯의 품질과 동일 수준으로 생산되었다고 평가하였다. (Fig 3-6-4)



Fig. 3-6-4 경북 영덕군 K농가 적용

또한 1~2번 사용해서는 정확하게 효과가 나타나지 않았지만, 지속적인 사용결과 버섯 영양제의 적용 결과 배지가 탄력이 있어지고, 상태가 양호하다고 평가하였다.

### 3. 그린몰드 bio-control 제제의 농가 실현 및 성능평가 시험

#### 가. 농가적용사례

그린몰드제제를 대구시 달성군 하빈면의 양송이버섯 재배 농가의 감염된 배지에 125배 희석하여 적용한 결과 약 40%의 균사생장 억제력이 발휘 되었으며, 그 결과는 Fig 3-6-5에 나타내었다.



Fig. 3-6-5 대구시 달성군 하빈면 농가 적용

#### 4. 버섯생장영양제와 그린폴드 제제의 농가 시연 설문조사

본 연구과정에서 제조된 버섯생장영양제와 그린폴드제제를 사용한 30농가를 대상으로 설문 조사를 실시하여 제품에 대한 평가와 개선점에 대하여 조사하였다.

##### □ 설문조사의 목적

본 설문조사는 버섯생장영양제와 그린폴드제제 사용농가를 대상으로 사용효과와 제품에 대한 전반적인 사항에 대한 의견 등을 조사함으로써 제품의 품질 향상을 위한 차후의 연구를 위한 기초 자료수집에 그 목적이 있다.

##### □ 조사 설계 : 제품 사용 농가 설문조사

- 모집단 : (주)유림하이텍에서 제조한 버섯생장영양제와 그린폴드제제를 사용한 농가
- 표본크기 : 버섯생장영양제 사용, 그린폴드제제 사용 각각 30농가
- 조사방법 : 직접방문에 의한 1:1 개별 면접
- 조사도구 : 구조화된 설문지 (Structured Questionnaire)
- 조사기간 : 2008년 1월 16일 ~ 1월 18일

##### □ 조사분석 도구 및 분석기법

###### - 분석도구

본 설문조사에서는 일반적으로 사회과학의 연구방법론에서 널리 사용되고 있는 통계패키지 프로그램인 SPSS PC<sup>+</sup>로 분석하였다.

###### - 분석기법

본 연구의 특성상 빈도분석을 하였으며, 모집단에서 추출된 표본들은 신뢰성분석에 기초하여 95% 유의수준으로 유의한 값을 가지고, 표본오차는  $\pm 2.5\%$ 에 속한다. 따라서 모집단에서 추출된 표본들은 모집단의 성격을 그대로 반영하는 대표성을 가진다고 볼 수 있다.

□ 설문조사 문항(버섯성장영양제)

1. 본사 버섯성장영양제의 적용시 희석배율이 적정하다고 생각되십니까?

- ① 적정하다
- ② 희석배율이 진하여 약해가 우려된다
- ③ 희석배율이 연하여 효과가 없다
- ④ 잘 모르겠다

2. 본사 버섯성장영양제를 적용해본 결과 가장 두드러진 효과는 어떤 것입니까?

- ① 경도 증가
- ② 색도 증가
- ③ 생산량 증가
- ④ 상품성 향상
- ⑤ 기타 ( )

3. 본사 버섯성장영양제를 적용해본 결과 생산량이 어느 정도 증가하였습니까?

- ① 10% 이상
- ② 20% 이상
- ③ 30% 이상
- ④ 10% 미만
- ⑤ 전혀 증가하지 않음
- ⑥ 감소하였음

4. 본사 버섯성장영양제를 적용해본 결과 귀하의 실질적인 소득이 어느 정도 향상 되었다고 생각하십니까?

- ① 10% 이상
- ② 20% 이상
- ③ 30% 이상
- ④ 10% 미만
- ⑤ 전혀 증가하지 않음
- ⑥ 감소하였음

5. 귀하께서는 본사 버섯성장영양제가 출시된다면 구입하실 의사가 있으십니까?

- ① 적극 구입하겠다
- ② 구입하겠다
- ③ 구입하지 않겠다
- ④ 잘 모르겠다

6. 귀하께서는 본사 버섯성장영양제의 소비자가격은 어느 정도가 적정하다고 생각하십니까?

- ① 3만원대
- ② 4만원대
- ③ 5만원대
- ④ 6만원대

7. 본사 버섯성장영양제의 출시시 보완할 점은 무엇이라고 생각하십니까?

- ① 희석배율
- ② 제품효과
- ③ 제품포장
- ④ 제품설명서
- ⑤ 기타 ( )



③ 5만원대

④ 6만원대

7. 본사 그린몰드 Bio-control 제제의 출시시 보완할 점은 무엇이라고 생각하십니까?

① 희석배율

② 제품효과

③ 제품포장

④ 제품설명서

⑤ 기타 ( )

8. 귀하께서 평소 본사의 제품을 사용하시면서 제품에 보완할 점이나 저희 회사에 바라시는 점을 적어주십시오.

( )



가. 버섯생장영양제의 농가 시연 설문조사

(1) 버섯생장영양제의 희석배율 걱정성

희석배율의 걱정성에 관한 문항에서는 걱정하다는 응답이 60.0%로 가장 많고, 진하다가 10.0%, 연하다 23.3%, 잘모르겠다가 6.7% 순으로 나타나 전체 응답의 60%가 희석배율이 걱정하다고 응답하였다.

1. 희석배율의 걱정성			
순번	답변	백분율(%)	빈도수(명)
1	걱정하다	60.0%	18
2	진하다	10.0%	3
3	연하다	23.3%	7
4	잘모르겠다	6.7%	2
합계		100.0%	30

Table 3-6-1. 버섯생장영양제의 희석배율의 걱정성에 관한 질의응답 결과

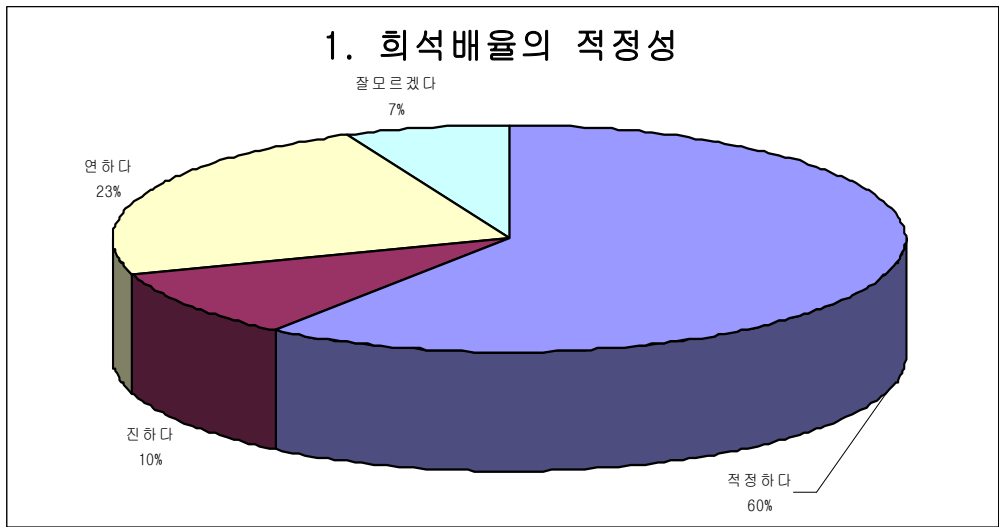


Fig. 3-6-6 버섯생장영양제의 희석배율의 걱정성에 관한 질의응답 결과

(2) 버섯생장영양제의 적용효과

버섯생장영양제의 적용효과에 관한 질의 결과 경도가 증가되었다는 응답이 23.3%, 색도 증가가 20.0%, 생산량 증가 30.0%, 상품성 향상이 23.3%, 기타 응답이 3.3%로 영양제의 효과에 관해서는 전반적으로 다양하게 효능을 나타낸 것으로 생각되어진다.

2. 적용효과			
순번	답변	백분율	빈도수
1	경도 증가	23.3%	7
2	색도 증가	20.0%	6
3	생산량 증가	30.0%	9
4	상품성 향상	23.3%	7
5	기타	3.3%	1
합계		100.0%	30

Table 3-6-2. 버섯생장영양제의 적용효과에 관한 질의 응답 결과

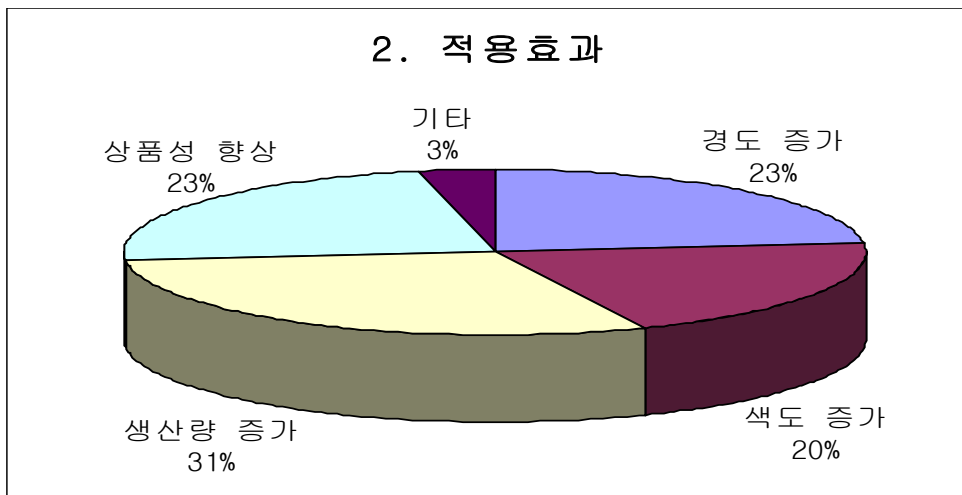


Fig. 3-6-7 버섯생장영양제의 적용효과에 관한 질의응답 결과

(3) 버섯생장영양제의 생산량 증가 정도

버섯생장영양제의 사용으로 생산량의 증가 정도에 관한 문항에서는 10%이상의 증가 효과를 보았다는 응답이 16.7%, 20%이상이 26.7%, 30%이상이 46.7%, 10%미만이 6.7%, 증가가 없었다는 응답이 3.3%로 대체로 30%이상의 생산량 증가를 가져온 것으로 나타났다.

3. 생산량 증가 정도			
순번	답변	백분율	빈도수
1	10% 이상	16.7%	5
2	20% 이상	26.7%	8
3	30% 이상	46.7%	14
4	10% 미만	6.7%	2
5	증가없음	3.3%	1
6	감소	0.0%	0
합계		100.0%	30

Table 3-6-3. 버섯생장영양제의 생산량 증가 정도에 관한 질의 응답 결과

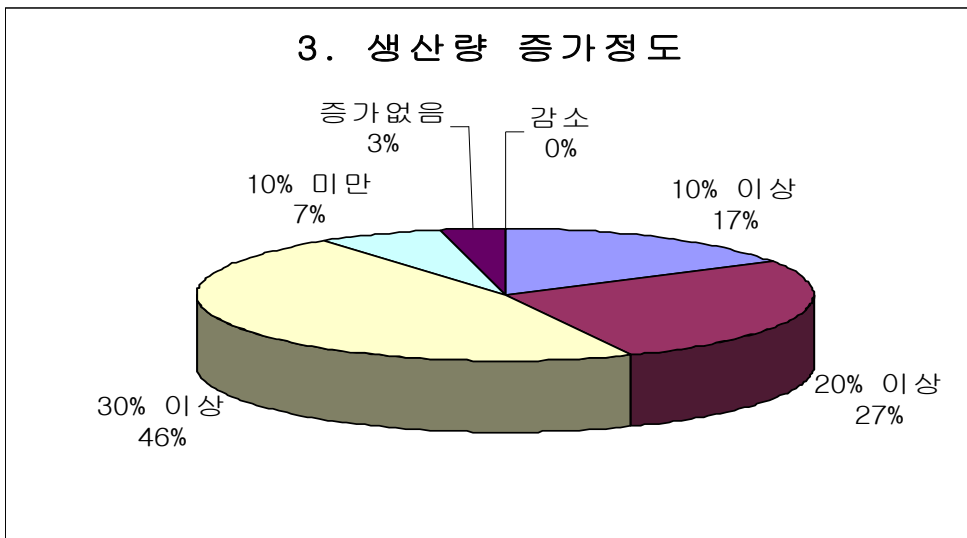


Fig. 3-6-8. 버섯생장영양제의 생산량 증가 정도에 관한 질의 응답 결과

(4) 버섯생장영양제의 소득증대 정도

버섯영양제의 사용으로 농가의 실질적인 소득 증대 정도관한 문항에서는 23.3%가 10%이상의 소득 증대가 있었다고 응답하였고, 20%이상의 증대가 있었다는 농가는 43.3%, 30%이상은 10.0%, 10%미만은 20.0%, 증가가 없었다고 응답한 경우는 3.3%로 버섯영양제의 사용으로 실질적인 농가의 소득 증대를 가져왔다..

4. 소득증대 정도			
순번	답변	백분율	빈도수
1	10% 이상	23.3%	7
2	20% 이상	43.3%	13
3	30% 이상	10.0%	3
4	10% 미만	20.0%	6
5	증가없음	3.3%	1
6	감소	0.0%	0
합계		100.0%	30

Table 3-6-4. 버섯생장영양제의 소득증대정도에 관한 질의 응답 결과

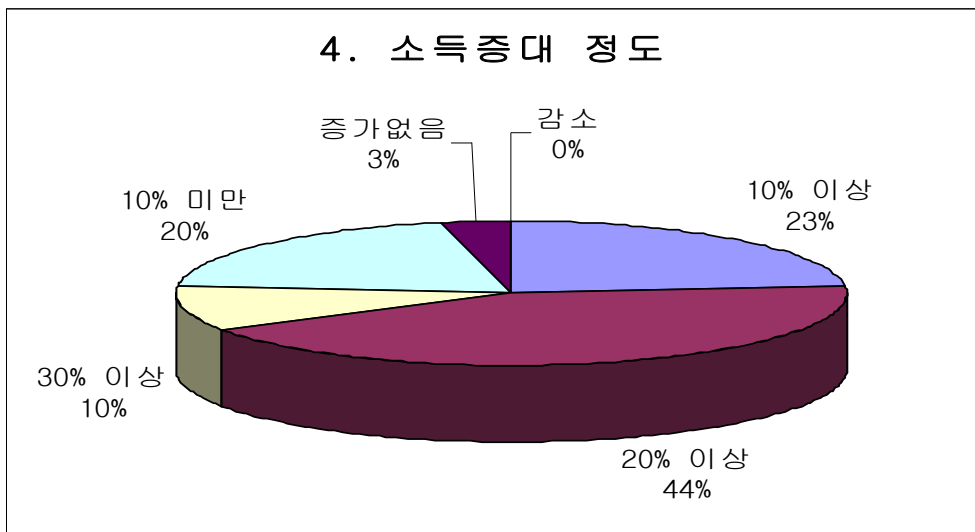


Fig. 3-6-9. 버섯생장영양제의 소득증대정도에 관한 질의 응답 결과

(5) 버섯생장영양제의 구입의사

버섯생장영양제 사용 후 구입의사에 관한 문항에서 적극적으로 구입의사를 밝힌 응답자가 23.3%, 구입하겠다는 응답이 70.0%, 구입하지 않겠다고 3.3%, 잘 모르겠다고는 응답이 3.3%로 대부분 버섯생장영양제에 대한 구입을 희망하였다.

5. 구입의사			
순번	답변	백분율	빈도수
1	적극 구입	23.3%	7
2	구입	70.0%	21
3	구입 않음	3.3%	1
4	잘모르겠다	3.3%	1
합계		100.0%	30

Table 3-6-5. 버섯생장영양제의 구입의사에 관한 질의 응답 결과

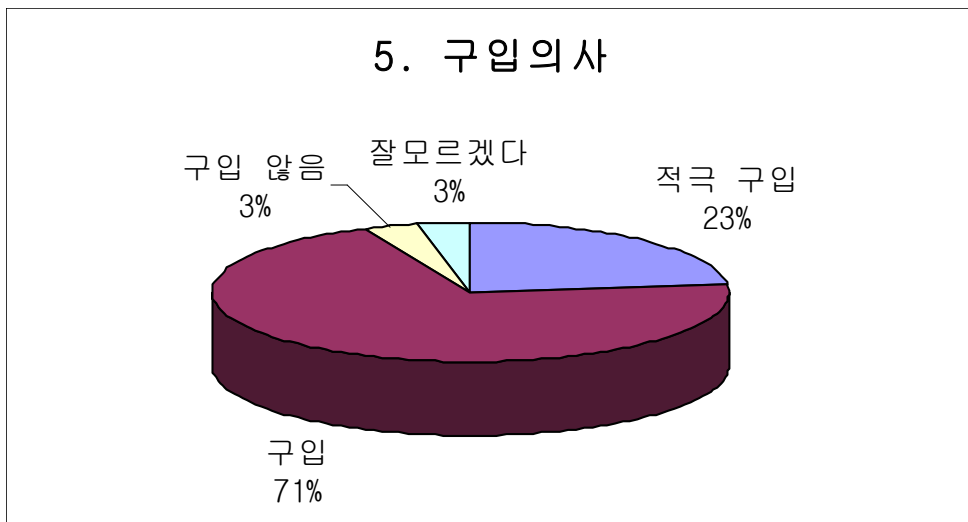


Fig. 3-6-10. 버섯생장영양제의 구입의사에 관한 질의 응답 결과

(6) 버섯생장영양제의 소비자가격 선정

버섯생장영양제의 소비자 가격 선정을 위하여 적정 가격대에 대한 질의를 한 결과 36.7%가 3만원대, 43.3%가 4만원대, 16.7%가 5만원대, 3.3%가 6만원대로 응답하여 버섯생장영양제의 가격은 4만원대를 원하는 것으로 나타났다.

6. 소비자가격			
순번	답변	백분율	빈도수
1	3만원대	36.7%	11
2	4만원대	43.3%	13
3	5만원대	16.7%	5
4	6만원대	3.3%	1
합계		100.0%	30

Table 3-6-6. 버섯생장영양제의 소비자 가격 선정에 관한 질의 응답 결과

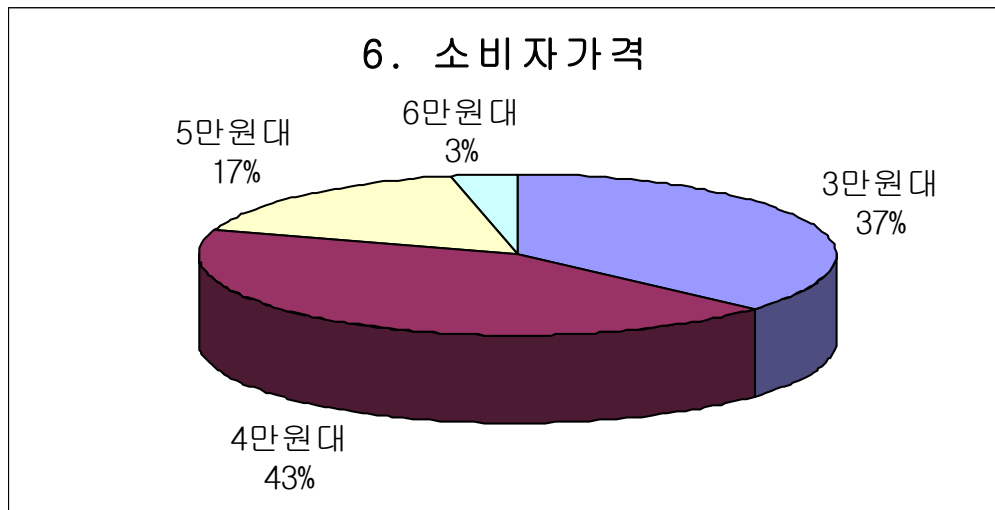


Fig. 3-6-11. 버섯생장영양제의 소비자 가격 선정에 관한 질의 응답 결과

(7) 버섯생장영양제의 보완점

본 연구 과정을 통해서 개발된 버섯생장영양제의 보완점에 관한 문항에서 희석배율의 조정을 원하는 응답자가 20.0%, 제품효과에 대한 보완이 56.7%로 가장 많았으며, 제품의 포장상태가 6.7%, 제품설명서에 대한 보완을 요구하는 응답자가 13.3%였다.

7. 보완점			
순번	답변	백분율	빈도수
1	희석배율	20.0%	6
2	제품효과	56.7%	17
3	제품포장	6.7%	2
4	제품설명서	13.3%	4
5	기타	3.3%	1
합계		100.0%	30

Table 3-6-7. 버섯생장영양제의 보완점에 관한 질의 응답 결과

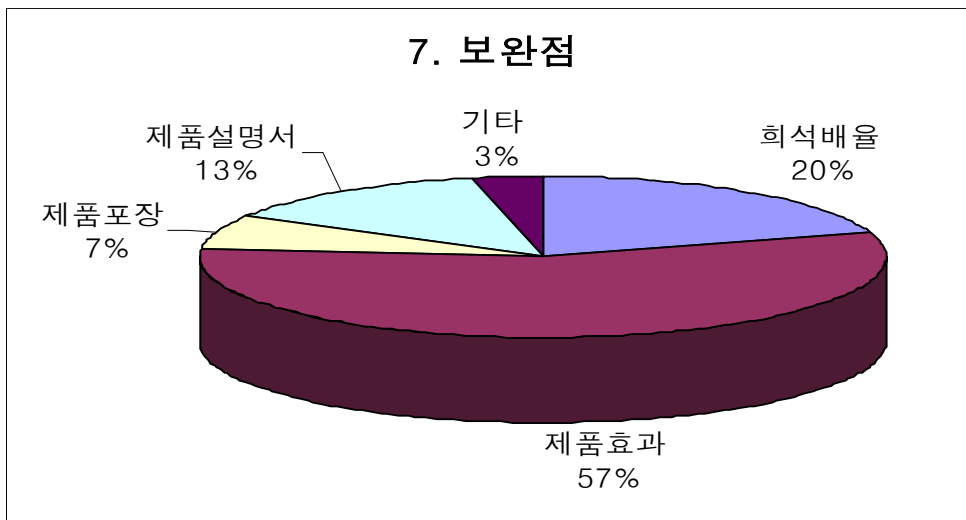


Fig. 3-6-12. 버섯생장영양제의 보완점에 관한 질의 응답 결과

나. 그린몰드제제의 농가 시연 설문조사

(1) 그린몰드제제의 희석배율 적정성

희석배율의 적정성에 관한 문항에서는 적정하다는 응답이 60.0%로 가장 많고, 진하다 20.0%, 연하다 13.3%, 잘모르겠다 6.7% 순으로 나타나 전체 응답의 60%가 희석배율이 적정하다고 응답하였다.

1. 희석배율의 적정성			
순번	답변	백분율	빈도수
1	적정하다	60.0%	18
2	진하다	20.0%	6
3	연하다	13.3%	4
4	잘모르겠다	6.7%	2
합계		100.0%	30

Table 3-6-8. 그린몰드제제의 희석배율 적정성에 관한 질의 응답 결과

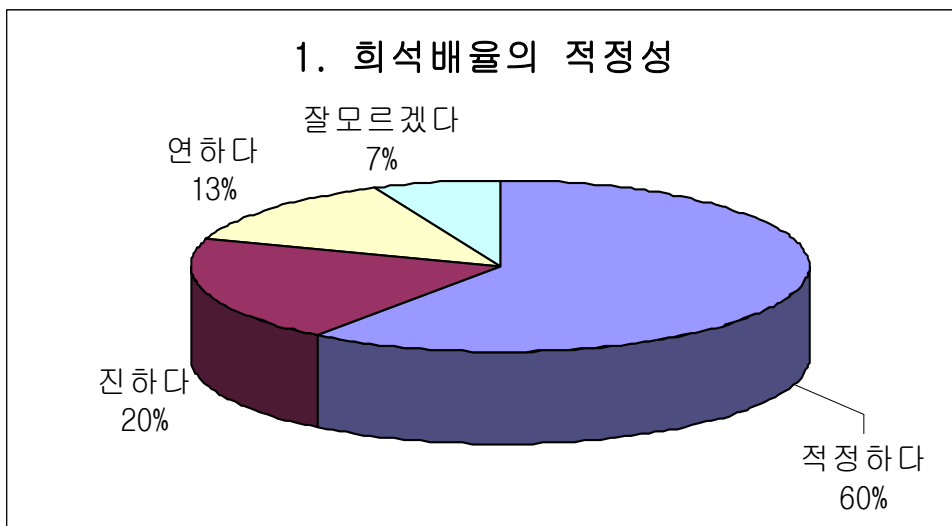


Fig. 3-6-12. 버섯생장영양제의 보완점에 관한 질의 응답 결과



(2) 그린몰드제제의 적용효과

그린몰드제제의 적용효과에 관한 문항에서는 배지상태가 향상되었다는 응답이 16.7%, 곰팡이 오염이 감소되었다가 43.3%, 생산량 증가가 16.7%, 상품성 향상이 23.3%로 응답하여 그린몰드 제제의 평균효과가 농가 실연 시 실질적인 효과로 나타나는 것을 알 수 있었다.

2. 적용효과			
순번	답변	백분율	빈도수
1	배지상태향상	16.7%	5
2	곰팡이오염감소	43.3%	13
3	생산량 증가	16.7%	5
4	상품성 향상	23.3%	7
5	기타	0.0%	0
합계		100.0%	30

Table 3-6-9. 그린몰드제제의 적용효과에 관한 질의 응답 결과

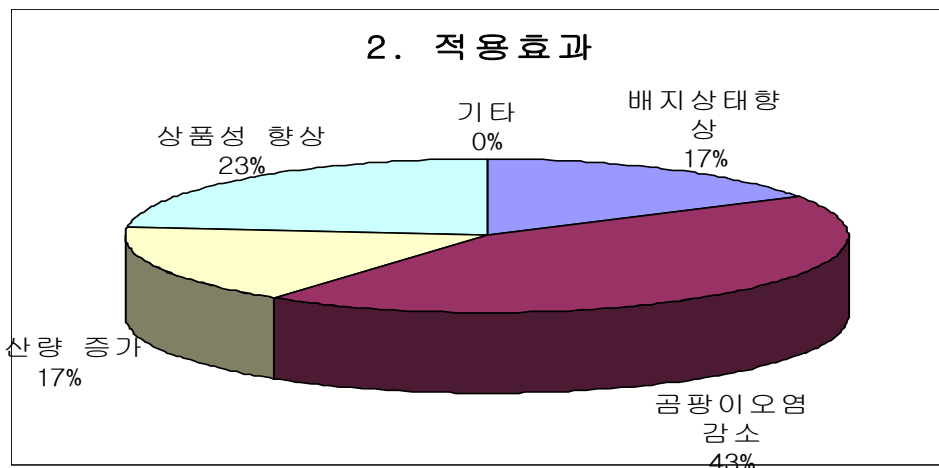


Fig. 3-6-13. 그린몰드제제의 적용효과에 관한 질의 응답 결과

(3) 그린몰드제제의 생산량 증가 정도

그린몰드제제의 사용으로 생산량의 증가 정도에 관한 질의를 한 결과 10%이상 증가되었다가 13.3%, 20%이상 증가되었다가 23.3%, 30%이상 증가되었다가 53.3%, 10%미만으로 증가되었다가 3.3%, 증가되지 않았다는 응답이 6.7%로 대부분의 농가에서 생산량이 증가됨을 확인 할 수 있었다.

3. 생산량 증가 정도			
순번	답변	백분율	빈도수
1	10% 이상	13.3%	4
2	20% 이상	23.3%	7
3	30% 이상	53.3%	16
4	10% 미만	3.3%	1
5	증가없음	6.7%	2
6	감소	0.0%	0
합계		100.0%	30

Table 3-6-10. 그린몰드제제의 생산량 증가 정도에 관한 질의 응답 결과

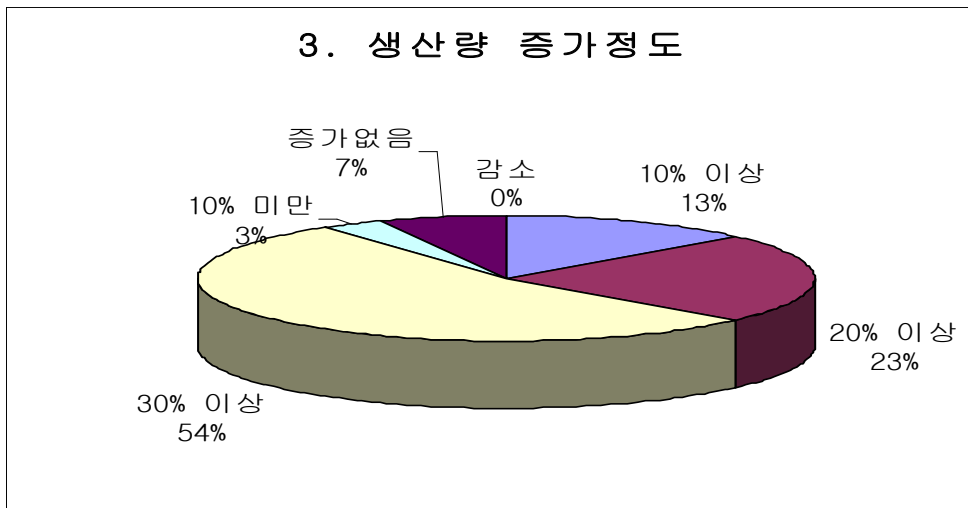


Fig. 3-6-14. 그린몰드제제의 생산량 증가정도에 관한 질의 응답 결과

(4) 그린몰드 제제의 소득증대 정도

그린몰드 제제의 사용으로 소득증대 정도에 관한 질의를 한결과 10%이상 소득이 증가되었다는 응답이 20.0%, 20%이상 증가되었다가 40.0%, 30%이상 증가되었다가 20.0%, 10%미만으로 증가되었다가 16.7%, 증가되지 않았다가 3.3%였다.

4. 소득증대 정도			
순번	답변	백분율	빈도수
1	10% 이상	20.0%	6
2	20% 이상	40.0%	12
3	30% 이상	20.0%	6
4	10% 미만	16.7%	5
5	증가없음	3.3%	1
6	감소	0.0%	0
합계		100.0%	30

Table 3-6-11. 그린몰드제제의 소득증대 정도에 관한 질의 응답 결과

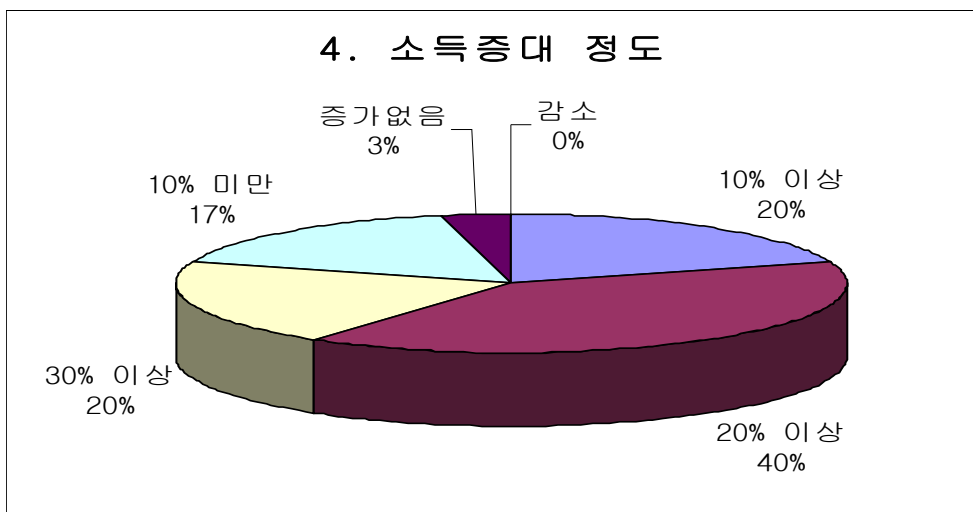


Fig. 3-6-15. 그린몰드제제의 소득증대 정도에 관한 질의 응답 결과

(5) 그린몰드 제제의 구입의사

그린몰드 제제 시연 후 구입의사에 관한 문항에서 적극적으로 구입의사를 밝힌 응답자가 20.0%, 구입하겠다고 한 응답자가 66.7%, 구입하지 않겠다고 6.7%, 잘모르겠다고 6.7%로 응답하여 대부분 그린몰드제제에 대한 구입의사를 밝혔다.

5. 구입의사			
순번	답변	백분율	빈도수
1	적극 구입	20.0%	6
2	구입	66.7%	20
3	구입 않음	6.7%	2
4	잘모르겠다	6.7%	2
합계		100.0%	30

Table 3-6-12. 그린몰드제제의 구입의사에 관한 질의 응답 결과

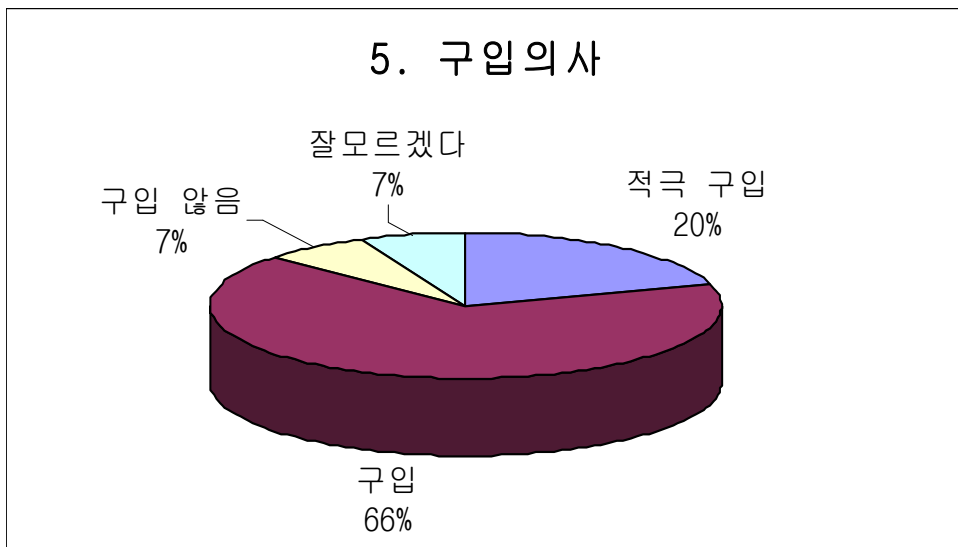


Fig. 3-6-16. 그린몰드제제의 구입의사에 관한 질의 응답 결과

(6) 그린몰드제제의 소비자 가격 선정

그린몰드제제의 적정 가격대 선정을 위한 설문을 한 결과 3만원대가 33.3%, 4만원대가 40.0%, 5만원대가 26.7%, 6만원대가 0.0%로 4만원대의 가격을 원하는 것으로 나타났다.

6. 소비자가격			
순번	답변	백분율	빈도수
1	3만원대	33.3%	10
2	4만원대	40.0%	12
3	5만원대	26.7%	8
4	6만원대	0.0%	0
합계		100.0%	30

Table 3-6-13. 그린몰드제제의 소비자가격에 관한 질의 응답 결과

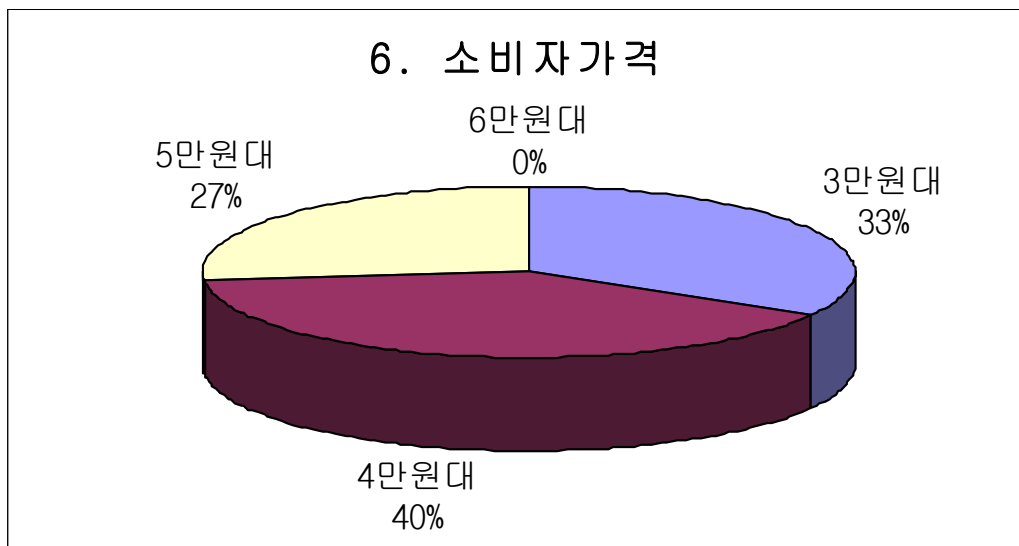


Fig. 3-6-17. 그린몰드제제의 소비자가격에 관한 질의 응답 결과

(7) 그린몰드제제의 보완점

그린몰드제제의 보완점에 희석배율의 조정을 원하는 응답자가 10.0%, 제품효과의 보완을 원하는 응답자가 63.3%, 제품포장의 보완을 원하는 응답자가 3.3%, 제품설명서의 보완을 원하는 응답자가 20.0%였다.

7. 보완점			
순번	답변	백분율	빈도수
1	희석배율	10.0%	3
2	제품효과	63.3%	19
3	제품포장	3.3%	1
4	제품설명서	20.0%	6
5	기타	3.3%	1
합계		100.0%	30

Table 3-6-14. 그린몰드제제의 보완점에 관한 질의 응답 결과

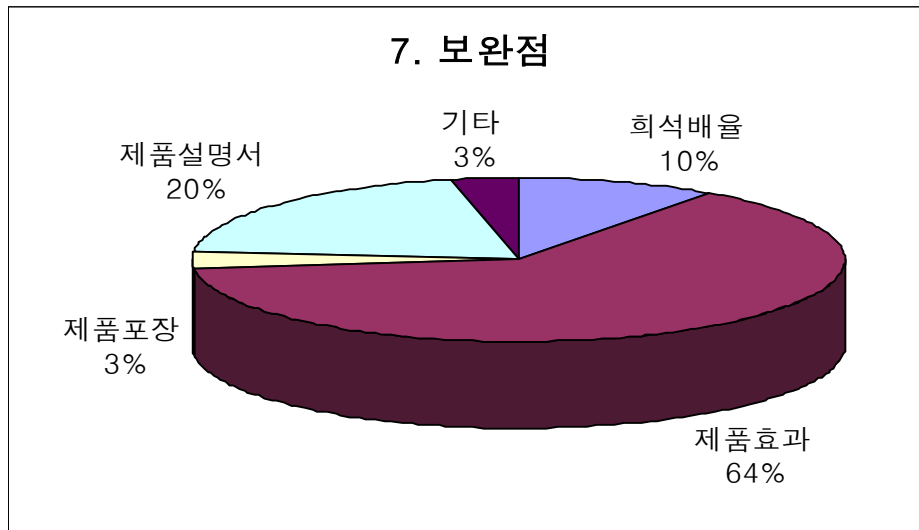


Fig. 3-6-18. 그린몰드제제의 보완점에 관한 질의 응답 결과

## 5. 그린몰드 제제와 버섯생장영양제의 상호보완성 검토

버섯생장영양제의 경우 농가에 적용한 결과 버섯의 생육에 전반적인 영향을 주었으며, 버섯의 품질 향상과 오염 균의 오염을 줄이는 역할을 하였다. 이를 통해서 버섯재배 농가의 경우는 버섯생장영양제를 생육전반에 걸쳐서 적용하여 버섯의 생육을 좋게 하는 재배 방법의 적용이 필요할 것이라 생각되어 지며, 그린몰드 발생 시에 control 제제를 적용하여, 오염균의 확산을 줄이며, 호전되도록 재배 전체적인 관리에서 적용하는 방법을 택해야 할 것으로 생각되어진다.

또한 그린몰드 제제에 버섯생장영양성분을 혼용하여 적용하는 것은 추가적인 연구를 통해서 효과를 높이는 방법이 더 진행되어져야 한다고 생각되어진다.

## 6. 생산된 버섯의 항산화 물질 (폴리페놀)함량 측정

본 연구 과제에서 개발된 버섯생장영양제를 사용하여 재배된 버섯의 기능성 농산물로 생산하여 차별화된 작물로 농가의 소득 증대를 위한 방법을 제시하고자, 버섯의 항산화 물질(polyphenol)의 함량을 측정하는 실험을 실시하였다.

### 가. 재료 및 방법

공시재료 2g을 50% methyl alcohol에 60℃ 120분간 추출한다.

공시재료 추출물 1ml를 채취한 후 증류수 3ml를 첨가하고, 발색시약 A와 발색시약 B를 넣어서 대조구(증류수 4ml)와 같이 각각 발색시킨다. 이 후 각각에 안정제를 5ml씩 첨가하고, 미리 검량되어 있는 검량선을 이용하여 U.V.(자외선 분광광도계)로 700nm에서 측정된 시료의 흡수율을 측정한다.

측정된 흡수율은 아래의 산출식에 의거하여 그 함량을 각각 측정한다.

$$X = Y + 0.075 / 0.007$$

X ;  $\mu\text{g/ml}$ , Y ; U.V. 측정값

$$D(\%) = (X / 1,000,000 \times 30/1 / A) \times 100$$

D ; 시료 중 polyphenol 함량 (%)

1,000,000 ;  $\mu\text{g}$ 을 g단위로 환산한 계수

30/1 ; 총량 보정 계수



Fig.3-6-8. 공시재료 추출물의 발색시약 처리



나. 결과 및 고찰

항산화 물질 (폴리페놀) 함량 측정 결과 Fig. 3-6-9와 같이 대조구 대비 40~50%의 함량이 증가한 것으로 나타났다.

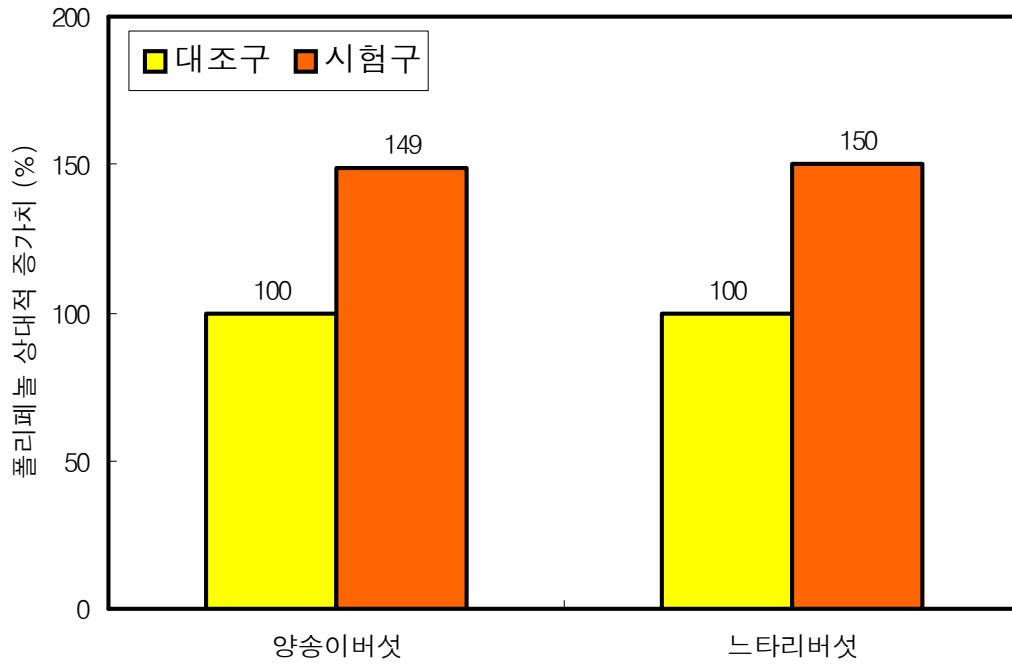


Fig. 3-6-9. 버섯생장영양제 적용 버섯의 폴리페놀 함량 측정 결과

7. 버섯생장영양제 및 그린월드 bio-control 제제의 시제품 제조

가. 버섯생장영양제의 시제품 제조 과정

본 연구과정에서 개발된 버섯생장영양제(머쉬골드)의 최종적인 제품 생산 공정을 Fig 3-6-8에 나타내었다.



Fig 3-6-10. 버섯생장영양제 (머쉬골드)



원료

→



고온·고압 처리

→



고온·고압된 원료 회수공정

→



온수추출

→



탈수· 1차 여과

→



2차 여과액 회수공정

→



회수액 증발처리

→



멸균처리

Fig. 3-6-11 버섯생장영양제 제조공정

나. 그린몰드제제의 시제품 제조 과정

본 연구과정에서 개발된 그린몰드제제(유림크린)의 최종적인 제품 생산 공정을 Fig 3-6-10에 나타내었다.



Fig 3-6-12. 그린몰드제제 (유림크린)



원료

→



전처리

→



회수공정

→



추출공정

→



탈수 여과

→



2차 여과액 회수

→



제품 교반

→



제품주입

Fig. 3-6-13 그린몰드제제 제조공정

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 연구목표 달성도

본 연구과제의 최종 목표는 임산자원(간벌재, 폐잔재 포함)으로부터 버섯 균사 및 그린몰드(Green mold) 생장을 제어할 수 있는 유효 화합물의 추출, 분리 공정을 도출하고 이를 원료로 하여 버섯생장영양제 및 그린몰드 bio-control 제제를 개발하는 것이다.

본 연구의 구체적인 개발 내용과 개발 달성도는 다음과 같다.

사업 년도	연구개발 목표	연구개발 달성도
1차년 도	버섯균사 생장에 유효한 수목추출물의 탐색 및 발굴	<p>1) 버섯균주를 확보하여 지속적인 계대배양으로 관리하였으며, 표고버섯과 양송이버섯의 최적 환경인자를 탐색하여 25℃, pH5.0에서 최적으로 성장하였음.</p> <p>2) 목질원료의 전처리 조건을 탐색하여 수증기 처리에 의한 고온·고압법이 수행되었으며, 균사생장에 유효한 성분을 분리하고, 균사 성장 저해 물질을 제거하는 방법을 확립하였음.</p>
	그린몰드의 생장억제를 나타내는 수목 추출물의 탐색 및 최적화	<p>1) <i>Trichoderma spp.</i> 5종을 수집하여 최적 성장환경이 pH5.0, 함수율 75%임을 확인하였음.</p> <p>2) 소나무 잎 또는 편백 잎 수용성 정유 단독으로는 <i>Trichoderma</i> 5종 균주에 대한 항균제제의 개발은 어렵다고 판단.</p> <p>3) 낙엽송과 소나무 목부로부터 추출된 추출물에 그린몰드의 생장을 저해하는 물질이 함유되어 있다는 사실을 추측하였으며, 최소 1000ppm 정도에서 상업성이 있다고 판단.</p> <p>4) 낙엽송 열수추출물의 n-hexane 용해부가 <i>Trichoderma</i> 5종 균주에 대하여 가장 높은 항균활성을 나타냈으며, 소나무 목부 추출물의 추출결과 water 65%, n-hexane 8%, methylene chloride 13%, ethyl acetate 14%였음.</p>
	유효추출물의 분리를 위한 전처리 및 분리 공정 개발	전처리 공정으로 25kg/cm <sup>2</sup> 의 고온,고압 처리의 압력에서 1회 15kg으로 하여 6분처리하는 생산공정을 확립하고, 추출물은 증발기를 거쳐 분리하였음.

사업 년도	연구개발 목표	연구개발 달성도
2차년 도	버섯생장 영양제의 효능 향상을 위한 첨가 영양원 개발	1) 버섯생장영양제의 효능향상을 위한 첨가제의 발굴을 위한 실험을 실시하여 탄소원은 glucose, 질소원은 peptone, 그리고 (주)유림하이텍으로부터 제공받은 제당부산물의 효능을 검증하고 Formulation을 확증하였음.
	그린몰드의 생장억제력 증진을 위한 유효첨가물 개발	1) 소나무( <i>Pseudotsuga meniesii</i> ) 목부로부터 수목추출물의 n-hexane 추출물은 <i>Trichoderma</i> 5종 균주에 대한 단일항균제제로서의 사용 가능성을 확인. 2) <i>Trichoderma</i> 의 항균성을 위한 복합제제는 소나무 목부 추출물의 항균활성과 비교할 경우 항균활성이 낮아져 복합화의 의미가 낮았음. 3) 목부 추출물과 시판유기계 화합물의 혼합비 0.5:1 처리구에서 항균활성이 높은 것을 확인하여 Formulation을 완성.
	버섯생장영양제 및 그린몰드 bio-control 제제의 제품화 및 농가실연	1) 확립된 공정을 통하여 제품을 생산하고 개발된 버섯영양제 및 그린몰드의 bio-control 제제의 시제품을 생산하고 농가의 실연한 결과 그린몰드의 억제와 버섯생장에 있어서 영향력을 가짐을 확인하였음. 2) 농가 실연과정에서 나타난 실험결과를 바탕으로 보완되어야 할 부분과 효능에 대한 검토를 실시.



## 2. 관련분야 기여도

본 연구과제는 수목으로부터 버섯생장에 유효한 성분을 추출하여 버섯 재배환경을 더욱 향상 시켜 고품질의 농산품을 생산하고, 버섯영양제 및 그린몰드제제를 천연추출물로 제조하는 기술로 본 기술의 개발이 성공적으로 수행됨에 따라 현재 산업적으로 이용되지 못하고 폐기되거나 임지에 버려지는 임산자원의 전처리를 통하여 추출물을 분리하고, 이들 추출물을 버섯산업에 이용하여 고부가 가치의 경제적인 효과가 이루어 질것으로 예상된다.

국내 순수기술로 제조된 천연 버섯 생장 영양제 및 그린몰드 방제제의 이용은 현재 웰빙(wellbeing) 열풍으로 일어나고 있는 버섯 소비에 따른 버섯 생산량 증대와 이에 따른 시설 및 재배 투자에 대한 농업인에 요구에 대하여 아직까지 빈약한 버섯 영양제 및 그린몰드 제제 시장에서 요구를 충족시킬 것이라 여겨진다. 국내 버섯 자재 회사의 세계시장 진출을 촉진 시킬 수 있고, 해외로부터 성능이 검증도 없이 무분별하게 유입되는 버섯영양제 및 항균제품의 수입을 억제하고 새로운 시장 질서를 확립할 수 있을 것이라고 생각되어 진다.

버섯 소비층에 대해서는 고급의 버섯을 제공하며, 이에 따른 농가의 소득증대도 이루어 질것이다. 또한 산지에 대부분 방치되어 버려 지고 있는 임가 및 농가의 임산부산물을 버섯생장영양제 및 그린몰드 방제제의 원료산업에 이용한다면 이들 원료 공급에 따른 비용을 임가 및 농가에 지불함으로써 임가 및 농가의 또 다른 소득원이 되어 질것이라고 생각한다.

본 연구에서 개발된 제품은 현재 (주)유림하이텍에서 버섯생장영양제 및 항균성 제품으로 지판되고 있으며, 농가의 실질적인 적용으로 그 효과를 거두어 버섯 생산 농가의 소득 증대와 농작물의 가격 안정화를 이루고 있으며, 소비자에게도 고품질의 버섯을 제공하여 신뢰성을 고현하고 있는 것으로 판단되어 진다.

### ○ 과학기술인력양성 및 활용성과

총 지원 인원 (명)	지원대상 (학위별)(명)				성별(명)		지역별(명)	
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	지방
5	1	1	3	-	3	2	-	5

(2006~2008년)

### 3. 기대성과

#### 가. 기술적 측면

- (1) 목재 및 목질자원으로부터 신기능성 추출물의 분리 및 신용도 개발
- (2) 버섯균사 및 그린몰드의 생장에 관여하는 수목추출물의 분리 기술 확립
- (3) 임산공학과 버섯학의 새로운 융합기술 토대 마련
- (4) 국내 최초의 천연물로부터 그린몰드 생장억제제 제조기술 개발

#### 나. 경제적·산업적 측면

- (1) 외국으로부터 수입 예상되는 버섯생장영양제 및 그린몰드 생장억제제를 국내 순수 기술로 개발함으로써 수입대체 효과 및 수출효과 기대
- (2) 농림가 및 버섯재배농가의 소득향상 및 생산단가 절감
- (3) 버섯생산영양제 및 그린몰드 생장억제제라는 새로운 버섯기능성 제제 시장 개척
- (4) 버섯병해 방제제의 개발로 인한 버섯의 수확 향상 및 소득 증대
- (5) 버섯생장제의 개발로 인한 버섯수확기간의 단축 및 배지의 장기간 사용가능
- (6) 수목추출물의 새로운 용도개발로 인한 임산공업의 도약을 위한 새로운 기회 포착

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제의 최종목표는 임산자원으로부터 버섯균사 및 그린몰드(green mold) 생장을 제어할 수 있는 유효 화합물의 추출, 분리 공정을 도출하고 이를 원료로 하여 버섯생장영양제 및 그린몰드 bio-control제제를 개발하는 것이다.

이에 따라서 버섯영양제를 개발하는 것과 그린몰드의 bio-control 제제를 개발하는 것, 그리고 제품화와 효능을 검토하는 세부과제로 나누어서 연구가 수행되어졌으며, 수행결과 공정을 개발하고, 버섯생장을 촉진시키며, 그린몰드를 control하는 제품을 생산하여 제품의 안정성 및 성능을 확인하였다. 본 연구의 수행결과의 활용계획과 이에 따르는 기술 효과는 다음에 나타내었다.

- 천연물에 의한 친환경적인 버섯 생산으로 환경적인 측면과 국민 건강 요구 수용에 활용
- 버섯생산의 품질 상승효과로 버섯재배 농가의 소득 증대와 농작물의 가격 안정화 도모에 활용
- 단위면적당 생산 수율 증가로 인한 버섯재배 농가의 생산 단가 저하 유도
- 고품질의 버섯생산으로 시장의 기대치 상승효과 작용
- 해외로부터 수입 예상되는 버섯생장영양제 및 그린몰드 생장억제제를 국내 순수 기술로 개발함으로써 수입대체 효과 및 수출효과

이러한 기술 활용효과를 바탕으로 본 연구에서 개발된 제품을 버섯 재배사에 직접 적용한 결과 버섯 생장을 촉진하며, 그린몰드 control하는 제제로서의 역할을 하였으며, 이로 인하여 연구 목표의 기대치에 달성하였다.

시제품은 (주)유림하이텍의 각 지사 및 지점 그리고 대리점을 통해 판매되어 최종적으로 버섯 재배사에서 사용되어지고 있다. 아래의 표는 제품의 판매 실적을 나타낸 것이다.

2년에 걸친 연구로 실용화 단계에 도달하여 상용화되는 연구 성과물이 개발되었다. 이것은 버섯 영양제로서 판매실적을 올리고 있으며, 본 기술 개발이 성공적으로 수행됨에 따라 가치가 낮은 임산자원으로부터 부가가치를 창조하여 기업의 소득 증대 및 수익 증진에 기여하고, 또한 친환경적인 제품 Control 제제로써 농업 기술의

항상 뿐 아니라 버섯영양제 시장에서 수입에 의존하고 있는 부분에 대체할 수 있는 국내 자체 기술을 확보하였으며, 고품질의 버섯 생산으로 국민의 건강에도 기여한 것으로 판단되어지고 있다.

판매제품명	판매금액 (백만원)	판매일	판매경로	판매국가
머쉬골드	50	2007.05 - 2008.04	각 지사 및 지점	대한민국
유림크린	50			

< 제품 판매 내역 >

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 버섯에 발생하는 녹색 곰팡이 전염병의 원인 곰팡이 규명

(정보출처 : <http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/dec02/mush1202.htm>)

미국 농무부(USDA)의 통계에 의하면 Pennsylvania주 농민들이 다른 어떤 주의 농민들보다 더 많은 버섯을 재배하고 있다고 한다. 그러나 미국에서 가장 많은 버섯이 재배되고 있는 곳인 Chester County의 농민들은 지난 1990년대 중반 녹색 곰팡이의 유행으로 그들이 재배한 버섯의 30 내지 100%를 손실한 쓰라린 경험을 가지고 있다. 처음에는 이 녹색 곰팡이에 대해 상업 용도로 사용되고 있는 일반적인 곰팡이의 한 종류인 *Trichoderma harzianum*이라 생각했었으나 최근, ARS Systematic Botany and Mycology Laboratory(SBML)연구원들에 의해 이 에메랄드빛 침략자들의 정체는 *Trichoderma* 이라는 것이 밝혀졌다. *T. harzianum*은 이용 가치가 높은 것으로 오래 전부터 알려져 온 미생물로서, 식물체에 질병을 초래하는 다른 곰팡이들을 통제하는데 사용될 수 있으며, 또한 토양 내의 살충제를 분해시키고 곰팡이독합성을 방지하는 역할을 가지고 있다.

그렇다면 *T. harzianum*이 녹색 곰팡이 전염병을 유발시킨 원인 곰팡이라 가정할 경우 이러한 곰팡이를 상업 용도로 사용한다는 것은 커다란 위험이 아닐 수 없을 것이다.

SBML의 곰팡이 전문가인 Gary Samuels와 Sarah Dodd은 이러한 *T. harzianum*이 녹색 곰팡이 전염병의 원인 곰팡이가 아니라는 데에 확신을 가지고 있었다. 형태학적인 연구와 분자 수준에서의 연구를 통해 이러한 전염병의 원인 곰팡이는 *T. harzianum*이 아닌 *Trichoderma*속에 속하는 새로운 곰팡이라는 것을 밝혀내었다. 이들이 이러한 곰팡이에 대해 *T. aggressivum*라는 이름을 붙인 것은 이들 곰팡이가 가지고 있는 버섯에 대한 고유의 공격성에 기인한 것이다.

버섯은 셀레늄, 칼륨 및 구리에 대한 좋은 급원이며 일부 버섯의 경우 B군에 속하는 세 가지 비타민을 상당량 함유하고 있다고 한다. 이에 관한 보다 자세한 내용은 웹사이트를 통해 볼 수 있다.

## 2. 임업 폐기물처리 퇴비화 시설 ( 정보출처 : Kenplatz )

고노이케구미는 야마나시현 농림수산성 임야청 보조 사업인 「임업 폐기물처리 시설」 건설 공사를 수주했다. 이 처리 시설은 기타쓰루 삼림조합에 반입된 삼나무나 사이프러스의 간벌재를 주로 하고 그 밖에 고스게 마을내에 있어 발생한 음식쓰레기, 농촌 취락 배수 오니 등 유기계 폐기물을 복합 처리하여 새로운 제품(퇴비 등)을 만들어 「목질계 자원 순환 시스템」을 실현한 것이다. 고스게촌은 이 시설의 건설에 의하여 임업 폐기물을 유기계 자원으로서 유효 활용을 도모한 「지역 순환형 사회 시스템」의 구축을 도모할 예정이다.

이 처리 시설 「목재 자원 순환 시스템」의 자원 흐름은

- (1) 간벌재로부터 톱밥 가루를 제조하고 버섯 재배의 균상 등 마을내의 산업에 사용한 후 폐 톱밥 가루로서 회수한다.
- (2) 균상 이외에도 마을내에서 발생한 유기계 오니 등의 수분 조정이나 탈취재로서 사용한다.
- (3) 최종적으로는 퇴비화 시설에서 음식 쓰레기등과 복합 처리를 하고 퇴비(토양 개량제)를 제조한다.
- (4) 그것을 마을내의 농지에 환원하고 토지의 회복을 도모한다.

이 시스템은 크게 「톱밥 제조 장치」 「식물 생육 저해 물질 제거 장치」 「혼합 퇴비화 장치」로 구성된다. 「식물 생육 저해 물질 제거 장치」란 삼나무·사이프러스 등 침엽수를 톱밥 가루로 이용할 때 특히 사이프러스에 많이 포함되고 있는 식물 생육 저해 물질 (축합성 타닌, 페놀 산류)을 제거할 수 있는 장치이다. 식물 생육 저해 물질이 제거된 삼나무·사이프러스 등 침엽수 톱밥 가루는 버섯 재배 균상이나 낙농 깔개 재료로 시작하고 목질계 유기물의 원료로서 광엽수 톱밥 가루와 같은 수준의 이용을 도모할 수 있다. 또 이 장치는 열처리의 과정에서 부산물로서 공기 청정 필터에의 적용이나 방충제 등 약제, 방향제 원료로서 주목을 받고 있는 「사이프러스 향수의 원료」 등을 같이 회수할 수 있다.

고노이케구미는 환경 사업 분야의 안의 하나로 목재를 포함한 「유기계 폐기물 재활용」 분야를 연구해 왔다. 고노이케구미는 이 처리 시설을 지역의 새로운 사회 인프라가 된 「지역 순환형 사회 시스템」 플랜트 시설로 평가하고 이들을 일괄 수주하여 금후 동일한 과제가 있는 지역에서의 「퇴비화」를 중심으로 한 「유기계 폐기물 재활용」 사업에의 영업 전개를 도모할 예정이다.

### 3. 버섯 배지에 양파 외피 혼합하여 고품질화 (일본)

홋카이도립 임산시험장은 균상 표고버섯의 배지(培地)재료로 양파 외피(外皮)가 유효하다고 밝혔다. 수확량이 늘어날 뿐 아니라 M사이즈 이상 크기의 표고버섯을 많이 수확할 수 있다. 이 기술은 농업폐기물인 양파외피의 재활용 방법으로도 주목을 받고 있다. 양파는 보통 외피를 벗겨 출하하는 경우가 많다. 외피는 쉽게 썩지 않아 밖에 쌓아 두는 경우가 많은데, 처리가 문제였다.

지금까지 실험에서는 양파 외피를 광엽수 톱밥에 10% 섞은 혼합배지가 유효했다. 2.5킬로그램의 균상에서 945그램의 표고버섯을 수확할 수 있는데, 이는 보통의 배지보다 35%나 수확량이 많은 것이다. 특히 한 개의 균상에서 M사이즈 이상의 대형 표고버섯이 평균 640그램 정도 수확되어 전체수확량의 70% 가까이를 차지하고 있는 것도 특징 중의 하나이다.

수확량이 증가하는 것은 이와 같은 대형 표고버섯이 많이 생산되기 때문으로 보여진다. 도립 임산시험장은 「양파외피를 대량으로 사용할 수 있는 것은 아니지만, 광엽수 톱밥에 비해 비용이 절감되고 품질과 수확량이 향상된다면, 이용할 가치는 충분히 있다」고 말한다.

### 4. 배지 연구로 버섯 양산체제 구축 (일본)

미야기현(宮城縣)의 나메코(버섯의 일종, 담자균)생산조합은 벗나무 톱밥을 사용하여 균상(菌床) 버섯재배의 연구를 거듭한 결과 배양기간을 28일로 크게 단축시키는데 성공했다. 이로써 회전율을 높이게 되어 생산을 확대할 수 있게 되었다. 설립당시와 같은 병수(瓶數)로 생산량을 3배 이상이나 늘렸다. 同조합이 보유하고 있는 병의 개수는 800cc병으로 약 48만개 정도다.

초기의 재배형태는 70일간 배양하여, 45일간 발생의 3회 채취로, 1회전이 약 115일간 이었다.

년 3회전 사이클로 생산목표는 125톤이었다. 기존시설을 풀 회전시켜 생산량을 늘린다는 방침으로 경영을 확대해 왔다. 현재는 년 5.2회전, 생산량은 약400톤으로 당초목표보다 3배 가까이 늘어났다. 「배양기간을 단축시키고 품질수확량을 향상시키기 위해서는 배지조성(培地組成)이 중요하다」고 스가하라 조합장은 말한다. 배지에 대해 연구를 거듭하면서 톱밥은 벗나무를 중심으로 하였다. 광엽수 중에서 상수리나 줄참나무는 종균(種菌)이 잘 되지 않아 제외하였다. 영양제도 독자적으로 연구한 것

을 사용하여 배양기간을 단축시켰다. 현재는 42일간 배양, 28일간 발생의 2회 채취로 1회전이 70일간으로 빨라졌다. 보유 병 수는 설립초기와 변함이 없다. 회전율을 높여 기존시설을 풀 가동시킴으로써 생산을 확대해 나갈 방침이다. 올해는 28일간 배양, 28일간 발생으로 1회전을 56일로까지 단축시키는 재배에 도전, 실현을 목전에 두고 있다.

## 5. 팡이버섯 병재배의 새로운 방법개발 (일본)

나가노현 야채화훼시험장은 팡이버섯의 병재배법에서 5월(구멍)접종으로 하면 균 돌림이 빨라져서 수량도 5%가량 증가하는 것을 확인하고 이를위해 개량 착공기를 개발하였다. 옥수수이삭의 속살분쇄물을 배지로 하는 농가의 증가에 따른 기술개선으로 제작회사와 공동으로 제작한 착공기는 이달부터 판매되고 있다. 현장의 배양방식이 톱밥, 쌀겨배지에서 옥수수속 분쇄물배지로 변했기 때문에 종래의 한구멍접종으로서는 균의 돌림이 4~7일 늦어진다. 그래서 그 개선책으로 구멍수를 증가시키는 접종법을 검토해본 결과 5월로 하면 배지내의 가스빠기가 좋아져서 배양일수도 종래의 배지와 동등수준까지 가져갈 수 있음을 알았다. 다만 온도가 높아지기 때문에 배양의 관리면에서 주의가 필요하다고 한다. 시험에서는 5개소의 구멍을 어떻게 만드는가도 검토하고 구멍뚫기 막대의 굵기나 구멍뚫기 방법등을 여러 가지 예를 들어 시험하였다. 최종적으로 중심막대는 직경 20mm의 다각 송곳으로 하고, 송곳면이 주위 4개의 막대쪽으로 향하지 않도록 배치하였다.

중심막대를 둘러싼 네 개의 막대는 각각 직경 10mm로 하고 중심막대의 높이는 다른 막대보다 20mm 낮게 하였다.

구멍뚫기 작업은 한 번의 기계동작으로 가능하나 중심막대와 주위의 다른 4개 막대의 높이에 어긋남이 있기 때문에 배지를 필요 이상으로 눌러 콧을 필요는 없다고 한다. 배지상 유리한 이 구조에 대하여는 제작회사와 공동으로 특허출원하고 있다. 동시험장 균이부의 야마모토연구원은 「이 5월접종법이라면 배지의 생리활성이 높아져서 균의 돌림이 빨라진다. 품질향상과 증수에 연계되는 방법이고 장치이다」고 말하고 있다.



## 6. 팽이버섯 폐균상(廢菌床) 활용하여 머쉬룸 재배

나가노(長野)현의 나가노시농협이 팽이버섯재배 배지(培地)로 사용한 콘코브(옥수수 심을 부순 것)를 다시 배지로 이용하여 머쉬룸을 생산하는 기술을 개발했다. 종래 머쉬룸재배 배지로 사용되는 퇴비 대신 이용된다. 아직 실험재배단계이기는 하나, 농협은 「팽이버섯과 시메지, 담자균버섯에 이은 새로운 품목」이라고 말한다. 동(同)농협의 팽이버섯생산량은 연간 3만 톤을 넘는다(일본 1위). 콘코브는 사용 후 퇴비로써 채소나 과수재배에 이용돼왔다. 관내에서는 약 260호의 생산자로부터 연간 5만 톤의 콘코브가 나오고 있다. 이에 동(同)농협은 신(新)품목의 도입과 아울러 폐(廢)배지의 유효이용을 모색해왔다.

그리고 머쉬룸에 주목하여 작년 실험한 결과 콘코브 배지에서 발생을 확인했다. 금년에는 배양센터에 위탁하여 컨테이너재배를 실험했다. 팽이버섯 수확 후 콘코브 찌꺼기에 물을 부어 수분을 조정한 다음, 컨테이너포트에 넣어 살균한다. 그리고 머쉬룸종균을 섭취하여 20도에서 40일간 배양한다. 이후 흙을 덮고 물을 주어 다시 10일간 배양하고 균(菌)을 심는다. 균을 심은 후, 빠른 것은 10일째부터 수확할 수 있다. 수확량은 화이트종이 1평(3.3제곱미터)당 55~58kg, 브라운종이 50~70kg이었다. 머쉬룸재배는 쇠두염으로 만든 퇴비를 배지로 이용 하는 것이 일반적이다.

그러나 균의 발생이 안정적인 퇴비를 만드는 것이 어렵다. 이에 비해 이 기술은 아직 양분(養分)이 남아 있는 콘코브를 재이용하기 때문에 안정배양이 가능하다. 최근 수 년, 버섯의 공급과잉으로 가격침체가 이어져, 생산자를 어렵게 하고 있다. 동(同)농협은 내년에도 실험재배를 계속하여 시장의 평가와 동향을 지켜볼 계획이다.

「버섯의 복수(複數)경영을 피하여 농가경영의 안정화를 꾀하겠다」(영농부 버섯기술과)고 말한다.

## 제 7 장 참고문헌

1. Chang, L. O., Srb, A.M. and Steward, F.D. 1962. Electrophoresis separation of the soluble proteins of *Neurospora*. *Nature*. London. 193:756-759.
2. Jacobsson, S. 1987. On the correct interpretation of *Pholiota adiposa* and a taxonomic survey of section *Adiposa*. *Winahlia* 17:1-18.
3. Chang, H.Y., Lee, B.H. and Ko, I.W., "*Inonotus obliqua* Strain, Method for Separating It, and Method for Mass Production of Its Fruitbody", Korean Patent No. 10-0339701-0000(2002)
4. Park, K.H. and Lee, J.S., "*Optimization of Media Composition and Culture Conditions for the Mycelial Growth of Coriolus versicolor and Lentinus edodes*", *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 6(1), 91-98(1991)
5. Hong, J. S., Yun, S. E., Kim, Y. S. and Lee, J.B., "*Synthesis of Trehalose by Pleurotus spp. - Cultural Conditions*", *Kor. J. Mycol.*, 15(2), 108-115(1987).
6. Chung, H. Y. and Sung, K.H., "Method for Cultivating *Inonotus obliqua*", Korean Patent Unexamined Publication No. 10-2004-0039936(2004).
7. Kim, J. M. and Kim, W. J., "The Chaga Mycelium Culturing Method by Using Unpolished Rice", Korean Patent No. 10-0431327(2004)
8. Choi, K. H., "Development of a New Synthetic Medium Composition for the Submerged Culture of *Phellinus linteus*", *Kor. J. Biothechnol. Bioeng.*, 14(2), 167-173(199).
9. Park, H. J., Kim, Y. J. and Lee, D. S., "Manufacture Method of a Functional Tea and Food, Using Extract of Mushroom Mycelium by new Extraction Technique", Korean Patent Unexamined Publication No. 10-2003-0072417(2003).

10. Chung, k. H., han, J. J., Lee, C. W., Park, J. D. and Ko, E. C., " Composition Containing Chaga Mushroom Extract as an Active Infredient", Korean patent Unexamined Publication no. 10-2003-0065964(2003).
  
11. Kazuo, S., " Liquid Culture of *Fuscopia Obliqua*(FR.) Aoshima", Japan Patent No. 10,191,783(1997).
  
12. Goun, E. A., Petrichenko, V.M., Solodnikov, S. U., Suhinina, T. V., Kline, M., Cunningham, G., Nguyen C. and Mile, H., " Anticancer and Antithrombin Activity of Russian Plants", *Journal of Ethnopharmacol.*, 81,337-342(2002)
  
13. Ham, S. S., Oh, S. W., Kim, Y.K., Shin, K.S., Chang, H. Y. and Chung, G. H., " Antimutagenic and Cytotoxic Effets of Ethanol Extract from the *Inonotus obliquus*", *J. Korean, Soc. Food Sci. nutr.*, 32(7), 1088-1094(2003)
  
14. Miller, M.W., Jong, S.C., 1987. Commercial cultivation of Shiitake in sawdust filled plastic bags. In : Wuest, P.J., Royse, D.J., bellman, R.B. (Eds.), *Developments in Crop Science*, vol. 10, *Cultivating Edible Fungi*. Elsevier, Amsterdam, pp. 421-426.
  
15. Royse, D.J., 1997. *Cultivation of Shiitake on Synthetic and Natural Logs*. College of Agricultural Sciences, Cooperative Extension, Pennsylvania State University, University Park, PA, USA pp. 12.
  
16. Royse, D.J., 1996. Yield stimulation of shiitake by millet supplementation of wood chip substrate. In : Royse, D.J., (Ed), *Proceedings of the Second International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, University Park, PA 9-12 June, pp. 277-283.
  
17. Chang, L. O., Srb, A. M. and Steward, F. D. 1962. Electrophoresis separation the soluble proteins of *Neurospora. mature*. *London*. 193 : 756-759.
  
18. Yoo, K. H., Kim, J. h. and Seok, S., J. 2001. Studies on the cultural characteristics of *Hohenbuehelia petaloides*. *Kor. J. Mycol.* 29(1) : 52 ~ 60

19. Sung, J. M., Choi, Y. S., Bhushan Shrestha and Park, Y. J. 2002. Cultural characteristics of mycelial growth by *Cordyceps militaris*. Kor. J. Mycol. 30(1) : 1~5
20. Shim, J. O., Son, S. G., Jeong, K. C. Yoon, J. T. and Choi, B. S. 2000. Cultural characteristics and fruitbody formation of *Phellinus pini*. Kor. J. Mycol. 28(1) : 11~15.
21. Bew, Y. H., Jo, W. S., Jeong, K. C., Yoon, J. T. and Choi, B. S. 2000. Cultural characteristics and fruitbody formation of *Phellinus pini*. Kor. J. Mycol. 28(1) : 11~15.
22. Lee, J. K., Choi, Y. S. and Sung, J. M. 2000. Investigation on cultural characteristics of mycelial growth y *Cordyceps scarabaeicola*. Kor. J. Mycol. 28(2) : 81~87.
23. Kang, A. S., Kang, T. S., Cho, S. M. and Yu, S. H. 2001. Studies on submerged culture and mycelial components of *Naematoloma sublateritium* mycelia. J. Mycol. 29(1) : 22~27.
24. Hong J. S. and Kim, T. H. (1989) Contents of free amino acids and total aminoacids in *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. Korean J. Food sci. Technol 21. 58-62
25. Muraoka, S. and Miura, T. (2004) Inhibition of xanthine oxidase by phytic acid and its antioxidative action. Life Sci. 74, 1691-1670.
26. Bankole. S. A and A. Adebajo., 1996. Biocontrol of brown blotch of cowpea caused by *Colletotrichum truncatum* with *Trichoderma viride*. Crop Protection. 15(7), 633-636.
27. Batta. Y. A., 2004. Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. Crop Protection. 23, (1), 19-26.
28. Brimmer. Theresa A. and Greg J. Boland., 2003. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. Agriculture, Ecosystems & Environment. 100(1), 3-16.

29. Cho Chen–Fu and Wen–Chien Lee., 1999. Formulation of a biocontrol agent by entrapping biomass of *Trichoderma viride* in gluten matrix. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87(6), 822–824.
30. Elad Y., 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection*. 19(8–10), 709–714.
31. Figueras–Roca Marta , Caterina Cristani and Giovanni Vannacci., 1996. Sensitivity of *Trichoderma* isolates and selected resistant mutants to DMI fungicides. *Crop Protection*. 15(7), 615–620.
32. Gil, S. Vargas., S. Pastor and G.J. March., 2007. Quantitative isolation of bio control agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Microbiological Research*, In Press, Corrected Proof, Available online
33. Hanson Linda E and Charles R. Howell., 2002. Biocontrol efficacy and other characteristics of protoplast fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens*. *Mycological Research*. 106(3), 321–328.
34. Hermosa. M. Rosa., Emma Keck., Isabel Chamorro., Belén Rubio., Luis Sanz., Juan A. Vizcaíno., Isabel Grondona and Enrique Monte., 2004. Genetic diversity shown in *Trichoderma* bio control isolates. *Mycological Research*. 108(8), 897–906.
35. Juan A. Vizcaino., Luis Sanz., Angela Basilio., Francisca Vicente., Santiago Gutierrez., M. Rosa Hermosa and Enrique Monte., 2005. Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. *Mycological Research*. 109(12), 1397–1406.
36. Mausam Verma., Satinder K. Brar., R.D. Tyagi., R.Y. Surampalli and J.R. Valéro., 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*. 37(1), 1–20.
37. Mortuza. M. Golam and Lina L. Ilag., 1999. Potential for Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. in Banana Fruits by *Trichoderma* Species. *Biological Control*. 15(3), 235–240.
38. Nampoothiri. K. Madhavan., T. V. Baiju., C. Sandhya., A. Sabu., George Szakacs

- and Ashok Pandey., 2004. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. Process Biochemistry. 39(11), 1583–1590.
39. Noël Andrée., Caroline Levasseur., Van Quy Le and Armand Séguin., 2005. Enhanced resistance to fungal pathogens in forest trees by genetic transformation of black spruce and hybrid poplar with a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene. Physiological and Molecular Plant Pathology. 67(2), 92–99.
40. Okemo. Paul O., Harsh Pal Bais., Jorge M. Vivanco., 2003. In vitro activities of *Maesa lanceolata* extracts against fungal plant pathogens. Fitoterapia. 74(3), 312–316.
41. Perelló. A., C. Mónaco., M. R. Simón., M. Sisterna and G. Dal Bello., 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. Crop Protection. 22(9), 1099–1106.
42. Prabavathy. V. R., N. Mathivanan., E. Sagadevan., K. Murugesan and D. Lalithakumari., 2006. Self-fusion of protoplasts enhances chitinase production and biocontrol activity in *Trichoderma harzianum*. Bioresource Technology. 97(18), 2330–2334.
43. Roberts. Daniel P., Scott M. Lohrke., Susan L.F. Meyer., Jeffrey S. Buyer., John H. Bowers., C. Jacyn Baker., Wei Li., Jorge T. de Souza., Jack A. Lewis and Soohee Chung., 2005. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. Crop Protection. 24(2), 141–155.
44. Sébastien Massart and Haissam M. Jijakli., 2007. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal bio control agents. Journal of Microbiological Methods. 69(2), May , 229–241.
45. Sitohy Mahmoud., Mahmoud Doheim and Haitham Badr., 2007. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. Food Chemistry. 104(3), 971–979.
21. Szekeres András., László Kredics., Zsuzsanna Antal., Ferenc Kevei and László Manczinger., 2004. Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiology Letters. 233(2), 215–222.

46. Valero Ana., Vicente Sanchis., Antonio J. Ramos and Sonia Marín., 2007. Studies on the interaction between grape-associated filamentous fungi on a synthetic medium. *International Journal of Food Microbiology*. 113(3), 271–276.
47. Vina W. Yang and Carol A. Clausen., 2007. Antifungal effect of essential oils on southern yellow pine. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 59(4), 302–306.
48. Viterbo Ada., Shoshan Haran., Dana Friesem., Ofir Ramot and Ilan Chet., 2001. Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. *FEMS Microbiology Letters*. 200(2), 169–174.
49. 김창한등 6인(1995) 일반미생물학, 유한문화사
50. 농촌진흥청 (1994) 특용작물 전문기술교재, 농진청
51. 장현유 등 3인 (1996) 버섯실험의 이론과 실제, 한국과학

## 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.