

최 종
연구보고서

흰목이버섯 인공재배 대량생산 시스템 구축
및 실용화 연구

Establishment of mass production of
Tremella fuciformis and its application

주 관 연 구 기 관
중 앙 대 학 교
위 탁 연 구 기 관
한 국 농 업 전 문 학 교

농림수산식품자료실



0016212

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “흰목이버섯 인공재배 대량생산 시스템 구축 및 실용화 연구”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 24일

주관연구기관명 : 중 앙 대 학 교
총괄연구책임자 : 이 찬
세부연구책임자 : 이 찬
연 구 원 : 윤 정 원
연 구 원 : 이 희 석
연 구 원 : 정 진 호
연 구 원 : 방 선 녀
연 구 원 : 유 인 숙
위탁연구기관명 : 한국농업전문학교
위탁연구책임자 : 장 현 유
연 구 원 : 박 기 훈
연 구 원 : 박 종 권

요 약 문

I. 제목

흰목이버섯 인공재배 대량생산 시스템 구축 및 실용화 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

White fungus 또는 은이(silver ear)이라 불리우는 흰목이버섯은 분류학적으로 이담자균강에 속하며, 흰목이목, 흰목이과, 흰목이속이다. 흰목이버섯균(*Tremella fuciformis* Berk)은 전세계적으로 약 40여종이 있으며, 수국꽃 같은 형태와 반투명의 젤리질이 주요한 자실체의 특성이다. 이 버섯은 국내에는 그다지 알려지지 않은 버섯으로 6월, 7월 장마철에 나무 등, 활엽수 잡목지대와 고사목에서 투명한 형태로 자란다. 흰목이버섯은 공생균(*Hypoxylon* sp.)의 도움하에 자실체를 형성한다. 공생균이 필요한 이유는 흰목이버섯균이 섬유소, 리그닌, 전분 등을 분해하는 효소를 생산하지 못하기 때문에 공생균(*Hypoxylon* sp.)의 도움을 받아야만 자실체 성장발육에 필요한 영양소를 공급받을 수 있기 때문이다.

중국에서는 흰목이버섯이 전통적으로 항고지혈증, 항염증, 항당뇨, 간보호, 항산화능이 있다고 알려져 있다. 실제로 흰목이버섯 산성다당체는 항암성물질로 밝혀져 있으며, glucuronoxylomannan은 경구 투여시 항당뇨효과가 있다고 보고되었다. 한편, 이 다당류의 다이어트 작용 및 콜레스테롤 증가 억제가 보고되었다. 이 외 단백다당체(glycoprotein)의 인터페론의 유도 증진효과가 보고되었으며, 체액성 면역과 세포면역 증진효과와 암환자에게 방사능치료 부작용으로 나타나는 natural killer cell의 활성저하와 IL-2 합성저하를 억제하는 활성이 알려져 있다.

흰목이버섯을 가장 먼저 인공재배한 곳은 중국의 사천성 통강지역이다. 이 지역에서 인공재배가 1894년 시작되었으며, 1954년 '생물학 통보'라는 잡지에 흰목이

버섯 포자 균종의 분리와 접종기술이 발표 된 후 귀주성, 호북성, 섬서성, 복건성으로 그 재배방법이 전해졌다. 최근에는 인공재배에 대한 활발한 연구로 중국의 복건성, 절강성, 운남성, 사천성 등지와 대만, 베트남, 라오스, 태국 등 동남아시아에서 흰목이버섯이 생산되고 있다. 이와 같이 중국에서 흰목이버섯 인공재배에 대한 연구가 활발하게 진행되어 그 기술이 비약적으로 발전되었으나, 국내에서는 현재까지 흰목이버섯의 인공대량생산에 대한 시도와 연구가 이루어지지 않았다. 그러므로 국내, 외에서 대량으로 생산, 소비되고 있는 이 버섯의 생산기술을 확립하고 가공기술을 개발시 흰목이버섯의 국내 활용가치가 증대되게 되며, 농가의 소득확대에 중요한 역할을 담당한다.

흰목이버섯의 재배방법은 다른 버섯에 비해 다소 까다로우며, 공생균을 활용하는 특수한 재배기술이 필요하다. 국내에서 흰목이버섯을 재배하기 위해서는 우리나라의 자연환경을 극복할 수 있는 연중재배방법 개발이 절실하며, 단기 대량생산법의 체계를 확립하는 것이 시급한 실정이다. 즉, 고온다습한 조건에서만 흰목이버섯의 안정적인 생산이 가능하며, 사계절이 뚜렷한 기후조건을 극복하기 위한 특수한 재배법이 개발되어야 한다. 이와 같은 배경하에 본 연구에서는 국내 현실에 맞는 인공재배 대량생산법을 개발하고 흰목이버섯의 대량생산 체계를 확립하고자 한다. 한편 흰목이버섯의 식품학적 특성을 분석하고, 생리활성 규명 및 유효성분의 추출 및 정제방법을 확립하며, 식품소재화의 방법을 제시하여 흰목이버섯을 실용화 하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

이 연구에서는 흰목이버섯의 대량재배법을 개발하고 흰목이버섯의 생리활성 물질을 규명하여 흰목이버섯의 활용도를 높이고자 한다. 흰목이버섯의 재배방법은 다른 버섯에 비해 다소 까다로우며, 공생균을 활용하는 특수한 재배기술이 필요하다. 국내에서 흰목이버섯을 재배하기 위해서는 우리나라의 자연환경을 극복할 수 있는 연중재배방법 개발이 절실하며, 단기 대량생산법의 체계를 확립하는

것이 시급한 실정이다. 즉, 고온다습한 조건에서만 흰목이버섯의 안정적인 생산이 가능하며, 사계절이 뚜렷한 기후조건을 극복하기 위한 특수한 재배방법이 개발되어야 한다. 이와 같은 배경하에 본 연구에서는 우리나라의 자생 흰목이버섯균 수집이나 분리 동정을 하여 고유의 유전자원 확보를 하고, 흰목이버섯의 인공재배법을 확립하고자 한다. 또한, 국내 현실에 맞는 인공재배 용기를 개발하고 흰목이버섯의 대량생산 체제를 확립하여 흰목이버섯 인공재배를 실용화 하고자 한다. 그리고 흰목이 버섯의 유효 생리활성을 규명하고 식품소재화 연구를 진행하여 실용화를 도모하고자 한다.

<연차별 연구개발 내용 및 범위>

1 차 년도	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1세부 과제	흰목이버섯 생리활성 규명	<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 유효물질 추출 방법 확립 ● 흰목이버섯 유효물질 항암(암세포독성)활성 확인 ● 흰목이버섯 유효물질 라디칼형성억제활성 확인 ● 흰목이버섯 유효물질 면역활성 연구 ● 흰목이버섯 항헬리코박터 활성 확인
위탁 과제	종균 배양법 개발 및 종균배지 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯균 수집 분리 및 동정 ● 액체 배양 및 고체 종균배양법 연구 ● 혼합 종균제조방법 연구 ● 고체, 액체, 종균 배지최적화 연구

2 차 년도	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1세부 과제	유효 물질 분리, 정제, 분석 및 활용	<ul style="list-style-type: none"> ● 선별된 흰목이버섯 유효물질의 추출조건 최적화 ● 생리활성 유효물질 분리 및 정제 ● 생리활성 유효물질 성분 분석 ● 조건별 유효물질 확인
위탁 과제	흰목이버섯 대량재배 방법 및 환경 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ● 액체배지상 및 고체배지상 생육조건 분석 ● 용기재배 최적화 ● 봉지재배 최적화 ● 원목재배 최적화

3 차 년도	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1세부 과제	자실체와 유효 성분의 소재화 및 저장, 유통 조건 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 자실체 저장 및 건조방법 연구 ● 흰목이버섯 자실체 포장방법 연구 ● 흰목이버섯 자실체 건조방법 및 건조 후 저장 연구 ● 흰목이버섯 유효성분의 대량생산 및 소재화
위탁 과제	농가 실증 재배 및 대량생산 체계 확립	<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 공생균 분비물질 영향 ● 농가 현장 대량 재배 ● 대량재배시 환경적 요인 조사 ● 대량 재배 방법의 현실화 및 농가 보급안 마련

IV 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 1절 연구개발 결과

1. 흰목이버섯 자실체의 대량생산을 위하여 흰목이버섯 우량균주를 국내에서 수집, 분리하여 동정하였다. 선발된 우량균주의 안정적인 대량재배를 위한 재배용기를 개발하였으며, 배지를 최적화하였다. 한편, 흰목이버섯의 주요 성분과 생리활성을 규명하여 흰목이버섯 활용범위를 확대하고자 하였다.
2. 분리된 흰목이버섯균은 5.8S rDNA의 ITS 영역 서열 분석시 알려진 *Tremella fuciformis* AF042409와 99%일치하는 것으로 확인되었다. 그리고 함께 분리된 공생균은 *Annulohyphoxylon stygium* AJ390406과 99%일치하는 것을 확인하였다. 분리된 흰목이버섯균 KG 103과 공생균 KG 201의 생육은 MCM배지에서 가장 우수하였다. 흰목이버섯균 KG 103 균주의 생육최적온도는 25℃ 이었으며, 공생균 KG 201은 흰목이버섯균과 유사한 최적온도를 나타내었다. 흰목이버섯균 KG 103 균과 공생균 KG 201균의 생육최적 pH는 5.0으로 밝혀졌다. 흰목이버섯 종균용 최적 배지로는 참나무톱밥 77.5%, 미강 20%, 석고 1.5%, 황백당 1% 가 선정되었다.
3. 흰목이버섯균 KG103의 액체배양시 세포 중량 증가와 exopolysaccharide (EPS) 생산을 살펴보았다. 액체배양시 환원성 2당류인 maltose와 lactose를 적합한 탄소원으로 사용하는 것으로 밝혀졌다. 흰목이버섯균 KG103, 혼합균, 공생균 KG201 모두 oligopeptide와 amino acid를 주성분으로 하는 peptone이 최적 질소원으로 나타났다. Fumaric acid를 액체배양시 첨가하면 흰목이버섯 공시균주의 생육이 촉진되었다. 액체배양에서 C/N ratio가 20일때 흰목이버섯균의 액체배양 생육이 양호하였다. 발효기를 이용한 액체배양시 28℃와 pH 8이 초기 발효를 위한 최적온도로 판별되었으며, 200 rpm의 회전속도와 2 vvm의 공기소통이 최적의 조건이었다.

4. 흰목이버섯 재배를 위한 고체종균제조시 참나무와 포플라 톱밥이 적합하였으며, 공생균의 생육에는 아카시나무 톱밥이 가장 좋은 재료이었다. 흰목이버섯균의 톱밥배지에서 균사생장은 pH 5.0일때 가장 양호하였으며 공생균도 유사한 최적 범위를 나타내었다. 흰목이버섯균, 공생균, 혼합균 모두 맥주박을 첨가재료로서 사용하였을 때 균사생장과 밀도가 양호하였다. 톱밥배지에 calcium carbonate 0.1~5.0% 첨가함으로써 흰목이버섯균의 생육이 촉진되었으며, magnesium sulfate 를 0.1~5% 첨가시 생육이 무처리에 비해 현저히 촉진되었다. Sucrose를 처리시 무처리에 비해 흰목이버섯균의 생육이 촉진되었다.

5. 병재배시 용량보다 850ml 병 용량이 B.E가 높은 것은 발생에 필요한 표면적이 상대적으로 1800ml 병이 넓어 B.E가 높아진 것으로 추정된다. 병재배의 경우 참나무 톱밥 재배시 흰목이버섯균의 생육에 따른 톱밥 중량 감소율이 매우 작았다. 혼합균은 톱밥 재배시 20일동안 왕성한 톱밥중량 감소율을 나타내었다. 종균제조시 1차부터 5차 종균의 차이가 거의 없었으며, 흰목이버섯 톱밥재배시에는 균굽기를 하지 않는 것이 수량이 높음을 확인하였다. 흰목이버섯 원목재배시 참나무 원목에서 수량이 가장 좋았으며 눅혀두기할때 균사밀도가 가장 양호하였다.

6. 흰목이버섯의 저비용 대량생산법 개발연구에서 콘코브가 77%일 때 흰목이버섯 자실체의 크기가 9.25cm로 가장 좋은 결과를 보였으며, 참나무 톱밥과 면실파가 77%일 때 각각 5.3 cm, 4.9 cm의 저조한 생육을 나타내었다. 콘코브를 주재료로 사용 하였을 때 흰목이버섯이 가장 월등하게 성장 하는 것을 확인 할 수 있었다. 보조재료로서 미강과 밀기울은 차이를 보이질 않았으며, 수분함량이 55%에 가장 많은 흰목이버섯 생산량을 관찰할 수 있었다. 톱밥배지에 흰목이버섯균 단독 배양한 균을 접종하면 균사생장이 거의 이루어지지 않은 반면 흰목이버섯균과 공생균을 공동 배양한 균을 접종하면 균사생장이 현저히 촉진되어 자실체의 원기를 형성한다.

7. 생산된 흰목이버섯 자실체의 식품학적 특성을 조사하였다. 흰목이버섯균 KG 103의 자실체는 수분, 회분, 조단백, 조지방, 조섬유 그리고 탄수화물 함량은

각각 85.87, 1.14, 1.29, 0.25, 0.2, 11.25% 함유하고 있는 것으로 나타났다. 구성 성분의 대부분은 탄수화물이 차지하였으며 단백질 성분이 기타 성분 중에서 제일 많았다. 흰목이버섯은 palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0)와 불포화 지방산인 oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2)를 다량 함유하고 있다. 지방산 중 oleic acid의 함량이 51.2%로 가장 높았으며 palmitic acid (16:0)가 15.8%로 나타났다. 흰목이버섯 자실체 아미노산 분석시 glutamic acid가 15.68%로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 필수 아미노산인 lysine, arginine이 8.98%과 1.49%로 전체아미노산 중 총 10%이상을 함유하고 있는 것으로 분석되었다. 흰목이버섯 자실체에는 galactose의 함량이 높은 것으로 나타났으며, trehalose가 가장 작은 함량을 나타내었다. 흰목이버섯 자실체의 총페놀함량을 caffeic acid, chlorogenic acid, catachin과 ferulic acid로 계산시 각각 738.63 $\mu\text{g/g}$, 2253.97 $\mu\text{g/g}$, 2599.06 $\mu\text{g/g}$, 2008.90 $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났으며 페놀화합물의 양이 높은 것으로 분석되었다.

8. 흰목이버섯의 생리활성을 측정하기 위하여 3 가지 방법을 사용하여 추출물을 제조하였다. 추출방법 I에서는 메탄올로 가용성분을 추출 한 후, 헥산(hexan), 클로르포름(CHCl_3), 에틸아세테이트(EtOAc), 부탄올(n-BuOH) 순으로 극성차이에 따른 용매분획을 한 후, 감압 농축하여 추출하였다. 추출방법 II에서는 에테르(ether), 에틸아세테이트(EtOAc), 클로르포름, 에탄올(EtOH), 그리고 물(H_2O) 순으로 가온 추출하였다. 추출방법 III에서는 클로르포름과 에테르처리에서 순서를 달리하여 추출하였다.

9. 흰목이버섯 추출물이 DLD-1(결장암), LOX-IMVI(피부암), LXFL-529(폐암), RKO(대장암), SNB-19(뇌암) 와 SNU-1(위암) cell lines에 대하여 세포 독성이 있는 것으로 나타났다. 추출방법 I에서 나온 hexane, chloroform, ethyl acetate 분획은 모든 암세포 주에 대하여 세포 독성을 나타냈으며, 추출방법 II에서는 ether 추출물에서만 모든 세포들에 대하여 강한 세포독성을 나타냈다. 추출방법 III에서 나온 chloroform, ethyl acetate, ether 세 추출물들은 모든 암세포들에 대하여 독성을 나타내었다.

10. 추출방법 I로 추출된 추출물이 DPPH 활성을 나타내어 항산화 활성이 높은 것으로 판명 되었다. 특히 chloroform 분획의 활성이 분획 중 가장 높은 것으로 나타났다. 추출물들은 superoxide 라디칼($\cdot O_2^-$) 소거활성을 나타내지 않았다. 흰목이버섯 추출분획 중 방법 1에 의하여 추출된 분획 중 chloroform 분획이 높은 ABTS⁺ 소거활성인 TEAC 값을 나타내었으며, 강한 LDL 산화억제활성을 보여 주었다. 추출방법 I, II, III에서 나온 추출물들은 *Helicobacter pylori*의 생육을 저해하는 것으로 나타났다.
11. EtOH 추출로부터 얻어진 분획 중 항산화 활성과 항암세포 활성을 보인 물질들을 HPLC를 이용하여 분리하였다. 정제된 peak 1, 8 그리고 9 중 peak 8이 IC₅₀ 84 ppm으로 세 물질 중 가장 높은 항산화 활성을 나타냈으며, peak 1 또한 IC₅₀ 310 ppm로 낮은농도에서 항산화 활성을 보였다. Peak 1과 8은 각각 linoleic acid와 oleic acid로 확인되었으며 암세포 독성도 강하게 나타났다. 한편, peak 9는 GC-MS spectra data bases 검색결과 5개 지방산의 혼합물로 확인되었으며, palmitic acid, stearic acid, margaric acid, linoleic acid and oleic acid임으로 각 피크가 확인되었다.
12. Response surface methodology (RSM)을 이용하여 흰목이버섯 에탄올 추출의 최적조건을 설정하였다. EtOH 농도 72.5%, 회전속도 125 rpm, 24시간에서 최대추출량을 나타내었다. 반응표면 분석법을 시행시 EtOH의 농도 68.7%, 회전속도 193.4 rpm 그리고 추출시간 25.3이 최적의 조건이었으며, 44.8 g이 예상 값이었다. 실제 추출시 약 43 g의 추출량을 얻을 수 있었다. 같은 방법으로 항산화성물질이 함유된 추출물을 결정하는 최적의 조건을 결정하였다. EtOH의 농도 79.9%, 추출 시 회전속도 112.8 rpm 그리고 추출시간 61.5시간이 반응표면분석에 의한 최적조건이었으며, 추출물(1000 ppm)의 EDA는 34.9%이라 예상했으며 확인 결과 약 34.2%의 실제 항산화활성을 나타내었다.
13. 흰목이버섯의 열풍건조시 저온인 40-50℃가 건조에 적합함을 알 수 있었다. 건조버섯을 PE, PP, Ny 3가지 포장재에 밀봉포장시 모든 포장재에서 색도의 변화가 매우적음을 알 수 있었으며, 포장재 간의 큰 차이가 없음을 발견하였

다. 흰목이버섯은 건조 후 색상의 변화가 매우 적어 상품성이 매우 높음을 알 수 있었다. 흰목이버섯 자실체를 수확 후 저온저장시 coliform은 검출이 되지 않았으며, 무균적으로 재배되었기 때문에 미생물에 의한 오염이 매우 적음을 알 수 있었다. 한편, 수확된 14일간 저온저장시 색+도와 경도가 적어도 10일 이상 변화없이 유지되었다.

14. 흰목이추출물을 이용한 음료제조시 열수추출물 첨가 모델음료 제조시 사과즙 첨가(1.4%)와 배즙 첨가(1.3%)가 모델음료의 향에 유의적인 차이를 부여함을 알 수 있었다. 과즙 첨가가 흰목이버섯 열수추출물 첨가 모델음료의 향과 단맛 면에서 일정한 영향을 미친다고 판단된다. 그러나 에탄올 추출물첨가 모델음료의 경우 배즙 첨가구와 과즙 미첨가구에서 향의 유의적인 차이가 관찰되었으나, 전체적인 기호도면에서 세 실험구가 같은 점수를 보이고 있다. 이 결과로부터 과즙 첨가가 의미가 크지 않다고 볼 수 있다.

제 2 절 활용에 대한 건의

1. 버섯 농가의 품종 다양화에 활용
2. 버섯 농가에 대량생산기술 이전
3. 새로운 버섯 재배용 용기의 홍보 및 활용확대
4. 흰목이버섯의 생리활성 규명으로 유용성 확대
5. 산업화를 위한 기초자료 활용
6. 특허등록 및 인공재배기술 홍보
7. 흰목이버섯 가공식품개발의 후속연구 가능

SUMMARY

I. Title

Development of mass production method for the production of *Tremella fuciformis* and its application

II. Objectives and Significance

The white jelly mushroom. *T. fuciformis* is one of approximately 40 fungi species in the genus *Tremella* and found mainly in Eastasia. The body of *T. fuciformis* used as a common food and clinically in traditional medicine in China. This mushroom is also an excellent source of industrial enzymes

Investigation of the active compounds in the fruiting body of *T. fuciformis* to date has been limited. Soluble extracts of *T. fuciformis*, however, have been studied intensively. because of various noted biological effects, such as enhancing immunefunctions, anti-tumor and hypoglycemic activities.

In this report, we developed artificial cultivation method for the production of *T. fuciformis* fruiting body and media was optimized. Furthermore the biological activity of extract of *T. fuciformis* was elucidated to apply its active compound to the functional foods..

III Results

1. The stromatal forms of *T. fuciformis* and the mycelia of symbiotic fungi were collected from limb of *Quercus* sp. In this study, mass production method for the production of *T. fuciformis* using artificial media was optimized and biological activity of extract of *T. fuciformis* was elucidated to produce its product.

2. The DNA sequences in the ITS region of the 5.8S ribosomal genes were analyzed and compared with the gene sequences of *T. fuciformis* and its symbiotic fungi in the EMBL/GenBank database. The sequence of isolated strain strain KG201 was very similar to that of *T. fuciformis* in the EMBL/GenBank database, with a homology of over 99%. The symbiotic fungi KG201, also exhibited high homology with *Annulohyphoxylon stygium*, one of the symbiotic strains for cultivating *T. fuciformis*. Mushroom Complete Medium(MCM) exhibited the best mycelial growth for *T. fuciformis* and its symbiotic fungi. Optimum culture conditions for the micelial growth were pH 7 at 25°C.

3. The optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exopolysaccharide (EPS) production in an edible mushroom *Tremella fuciformis* were studied in shake flasks and bioreactors. The temperature of 28°C and pH 8 in the beginning of fermentation in agitated flasks was the most efficient condition to obtain maximum mycelial biomass and EPS. The maximum cell mass and EPS production were obtained at a relatively high agitation speed of 200 rpm and at an aeration rate of 2 vvm. Peptone is most suitable nitrogen source and optimal C/N ratio is 20.

4. *T. fuciformis* showed fast mycelial growth on the saw dust of oak and poplar tree sawdust in seed culture using sawdust and symbiotic fungi grew well on that of accacia sawdust. Maximal mycelial growth was observed at pH 5.0 and beer waste is one of good supplement for the seed culture. Addition of calcium carbonate, magnesium sulfate and sucrose increased the growth rates of *T. fuciformis* and its symbiotic fungi. In bottle culture, 1800ml bottle exhibited more higher B.E value than 850ml bottle, because the former has large surface area. Mixed culture exhibited high decrease rate of sawdust in bottle. Oak tree was the most proper tree for the artificial cultivation of *T. fuciformis* on tree and maximul yield was observed when the mushroom grows on the laid tree.

5. In artificial cultivation of *T. fuciformis* in bottle with sawdust medium, *T. fuciformis* and symbiotic fungi showed fast mycelial growth on corn cob media followed by oak tree sawdust and cotton seed meal. The optimal temperature for mycelial growth of *T. fuciformis* and synbiotic fungi on corn cob media was 25°C at 55% of moisture.

6. The fruiting body of *T. fuciformis* consisted mainly of carbohydrate (11.25%), followed by protein (1.29%), ashes (1.14%) and fat (0.25%). The mushroom

contains large amount of palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0), oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2). The level of oleic acid was 51.2% and that of palmitic acid (16:0) was 15.8%. Ten amino acids including glutamine, tyrosine, serine, glycine, lysine, and alanine were found in protein as major amino acids. Glucose was the main monosaccharide in this mushroom and small amount of trehalose was found. The level of total phenolic compounds were 738.63 $\mu\text{g/g}$, 2253.97 $\mu\text{g/g}$, 2599.06 $\mu\text{g/g}$, 2008.9 $\mu\text{g/g}$ for caffeic acid, chlorogenic acid, catachin and ferulic acid as standards. The concentration of flavonoids were determined as 19.38 $\mu\text{g/g}$ for quercetin as a standard.

7. A three-fold experimental design was used to prepare the extracts to investigate biological activities of *T. fuciformis* fruit body. In the first extraction system freeze dried mushroom powder was extracted with methanol, and the methanol extract was further extracted using liquid/liquid partition procedure by hexane chloroform, ethyl acetate, *N*-butanol and aqueous extraction. In second system (II) the milled powder of *T. fuciformis* was extracted with ether and the residue was further extracted sequentially with ethylacetate, chloroform, ethanol and water. In the third system (III), chloroform was used first instead of ether as the initial extraction solvent and ethylacetate, ether, ethanol and water applied sequentially and in the same manner.
8. To elucidate possible similar anticancer activities of the *T. fuciformis* mushroom, DLD-1, LOX-IMVI, LXFL-529, RKO, SNB-19 and SNU-1 cell lines the DLD-1 human colon adenocarcinoma cell line was chosen and its viability was examined in the presence of various extracts of *T. fuciformis*. Hydrophobic components, which were restricted to the hexane, chloroform and ethyl acetate subfractions exhibited cytotoxic effect on the cancer cell lines (system I). Some extracts in experimental setting II were cytotoxic to the cell line and in a dose dependent manner. The viability of the cancer cell line was shown to be decreased by the addition of ether, ethyl acetate and chloroform extracts. In experimental setting III, three extracts including chloroform, ethyl acetate and ether exhibited relative strong dose-dependent cytotoxic effects on the cancer cell lines.
9. Antioxidative activities including scavenging activity of ABTS⁺ radical cation, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, superoxide dismutase (SOD) - like activity and inhibition of human LDL oxidation were tested with methanol extract of white jelly mushroom. Among tested subfractions of the methanol extracts, the chloroform extract exhibited strong antioxidant activity. The TEAC value of this subfraction was $7.89 \pm 0.08 \mu\text{M}$ trolox / mg which are 1.9 times higher than that of the water subfraction.

This fraction scavenged also DPPH radicals by 60% and 80% at 1000 and 5000 ppm and the LDL oxidation was inhibited by 40% and 80% at 100 and 1000 ppm with this fraction.

10. After the chloroform subfraction was further partitioned with n-hexane and aqueous layer, three main peaks in n-hexane layer exhibiting antioxidative activity were identified as linoleic acid (peak 1), oleic acid (peak 8) and mixture of five fatty acids (palmitic acid, stearic acid, margaric acid, linoleic acid and oleic acid, peak 9) by GC-MS analysis.
11. Optimization of extraction conditions of white jelly mushroom, *T. fuciformis* in aqueous ethanol was carried out using response surface methodology (RSM). The three independent variables were the concentration of ethanol (x_1), time of extraction (x_2), and R.P.M. (x_3), with each having 3 levels : 1, 0, and +1. The optimal extraction condition concentration, R.P.M and extraction time for antioxidant activity were found at about 68.7%, 193.4 rpm and 25.3 hr, respectively by models. The model predicted a maximum response of 44.4g for this point and extraction yields observed 43g
12. Extraction conditions of antioxidant activity compounds from white jelly mushroom was optimized according to the same RSM technology. The optimal extraction condition concentration, R.P.M and extraction time for antioxidant activity were found at about 79.9%, 112.8 rpm and 61.5 hr, respectively by models. The model predicted a maximum response of 34.9% for this point and extraction yields observed 34.2%.
13. Optimum temperature for the hot air drying was between 40 and 50 °C. When dried mushroom was stored with various packing film (PE, PP, and Ny) for 4 weeks, very little changes in colour was observed and there was no remarkable differences between packing materials. The quality of dried fruiting body of *T. fuciformis* maintained very well. Coliform microorganism could not be detected on the fruiting body of *T. fuciformis*, because the mushroom was cultivated under aseptic condition. Colour and rigidity of the fresh mushroom did not change during 10 days at low temperature (10 °C)
14. Model drink containing hot water extract of *T. fuciformis* fruit body was prepared and the effect of the fruit juice on the organoleptic property was studied. Addition of apple juice (1.4%) and pear juice had a positive effect significantly on the sensory characteristics of model drink containing hot water

extract. However the addition of fruit juice at this level did not increased the organoleptic properties of model drink with ethanol extract.

IV Suggestion of application

1. The technology to produce fruiting body of *T. fuciformis* will be transferred to the agricultural industry
2. The technology will be apply in various industrial fields including foods and bioindustry.

CONTENTS

Chapter 1. Intruduction	20
Section 1. Background	20
Section 2. Objectives	24
Section 3. Contents	25
Chapter 2. Material and methods	28
Section 1. Isolation and identification of <i>Tremella fuciformis</i>	28
Section 2. Optimization of liquid culture	30
Section 3. Development of seed culture	32
Section 4. Artificial culture with sawdust and tree	34
Section 5. Development of low-cost mass production method	36
Section 6. Analysis of symbiotic relationship between <i>Tremella</i> <i>fuciformis</i> and its symbiotic fungi.	38
Section 7. Environmental parameter for the culture of <i>Tremella fuciformis</i>	42
Section 8. Analysis of components from <i>Tremella fuciformis</i>	43
Section 9. Biological activities of <i>Tremella fuciformis</i>	46
Section 10. Anti-cancer activity	47
Section 11. Extraction and analysis of active compound of <i>Tremella fuciformis</i>	50
Section 12. Separation and purification of active compound	51
Section 13. Storage conditions	51
Section 14. Application in Foods	53
Chapter 3. Results and Discussion	54
Section 1. Development of seed culture and optimization of its media	54
Section 2. Optimization of culture on agar media	58

Section 3. Optimization of liquid culture	63
Section 4. Optimization of liquid culture in fermenter	71
Section 5. Culture in bottle and on tree	78
Section 6. Development of low-cost mass production method	100
Section 7. Analysis of symbiotic relationship between <i>Tremella fuciformis</i> and its symbiotic fungi.	107
Section 8. Analysis of components from <i>Tremella fuciformis</i>	117
Section 9. Biological activities of <i>Tremella fuciformis</i>	123
Section 10. Anti-oxidative activity	128
Section 11. Extraction and analysis of active compound of <i>Tremella fuciformis</i>	135
Section 12. Separation and purification of active compound	147
Section 13. Storage conditions	161
Section 14. Quality Changes of <i>Tremella fuciformis</i> During Cold Storage	163
Section 15. Application in Foods	164
Chapter 4. Achievement of Purpose	166
Chapter 5. Application of Results	167
Chapter 6. Collected Scientific Informations	168
Chapter 7. References	170
<Supplements>	

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
SUMMARY	11
CONTENTS	16
목 차	18
제 1 장 서론	20
1절. 연구개발 배경	20
2절. 연구목적	24
3절. 연구내용	25
제 2 장. 재료 및 방법	28
1절. 흰목이버섯균 개발	28
2절. 액체배양 최적화	30
3절. 흰목이버섯 종균제조법 연구	32
4절. 흰목이버섯 톱밥재배 및 원목재배	34
5절. 흰목이버섯 저비용 대량생산법 개발(용기내 재배법)	36
6절. 흰목이버섯균과 공생균의 공생관계분석	38
7절. 농가 현장 대량재배시 환경적 요인조사 및 현실화	42
8절. 흰목이버섯의 식품학적 특성분석	43
9절. 흰목이버섯 추출물의 주요 생리활성	46
10절. 항암활성 규명	47
11절. 흰목이버섯 유효생리활성물질의 추출 및 분석	50

12절. 흰목이버섯 유효생리활성물질의 추출 및 분리, 정제	51
13절. 흰목이버섯 유통 및 저장조건 확립	51
14절. 흰목이버섯 소재 식품화	53
제 3 장. 결과 및 고찰	54
1절. 흰목이버섯 종균 배양법 개발 및 종균배지 최적화	54
2절. 흰목이버섯균(KG 103)과 공생균 KG 201의 고체배양	58
3절. 흰목이버섯 액체배양 최적화	63
4절. 흰목이버섯 발효기 진탕 액체배양 최적화	71
5절. 용기재배, 원목재배 최적화	78
6절. 흰목이버섯 저비용 대량생산법 개발	100
7절. 흰목이버섯균과 공생균의 공생관계분석	107
8절. 흰목이버섯의 식품학적 특성분석	117
9절. 흰목이버섯의 주요 생리활성	123
10절. 흰목이버섯 추출물의 항산화활성	128
11절. 흰목이버섯 유효생리활성물질의 대량 추출조건 최적화	135
12절. 흰목이버섯 유효생리활성물질의 대량생산 및 분리, 정제	147
13절. 흰목이버섯의 저장 조건확립	161
14절. 흰목이버섯의 저온저장시(5℃) 품질변화	163
15절. 흰목이버섯 추출물을 이용한 기능성 음료제조	164
제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도	166
제 5 장 연구결과의 활용계획	167
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	168
제 7 장 참고문헌	170

<보충자료>

제 1 장 서론

1절. 연구개발 배경

1. 흰목이버섯의 특징

흰목이버섯은 분류학적으로 이담자균강에 속하며, 이담자균아강, 흰목이목, 흰목이과, 흰목이속이다.(Lowy, 1971) 흰목이버섯균의 학명은 *Tremella fuciformis* Berk.이고 영문명은 white fungus 또는 silver ear이다. 흰목이버섯은 전세계적으로 약 40여종이 있으며(Sawada, 1942, Lowy, 1971), 수국꽃 같은 형태와 반투명의 켈리질이 주요한 자실체의 특성이다. 흰목이버섯은 국내에는 그다지 알려지지 않은 버섯으로 6월, 7월 장마철에 숲속에서 투명한 형태로 자라면서 눈에 잘 보이지 않는 버섯이다. 그리고 이 버섯은 전국적으로 참나무 등, 활엽수 잡목지대와 고사목에서 광범위하게 발견된다.

흰목이버섯은 상식하면 면역체계가 활성화되어 암과 노화를 방지하고 고혈압, 동맥경화, 당뇨병 예방에 도움이 된다고 중국에서 알려져 있다. 그리고 이 버섯은 예로부터 약용버섯으로 널리 애용되고 있고, 극상품으로 취급되어 경제적 가치가 비교적 높은 식용버섯으로 알려져 있다. 흰목이버섯은 영양이 풍부하고 단백질, 지방, 탄수화물, 섬유질, 무기염류와 각종 비타민 등, 다양한 생리활성 성분을 함유하고 있다. 그리고 보양식품으로 오랫동안 명성을 누려왔다. 중국의 주요 의서인 “본초시해약성주” 중에 기록된 것에 따르면“이 버섯은 맥문동처럼 촉촉하나 차지 않고, 등글레의 달콤함은 있으나 느끼하지 않고, 폐를 윤택하게 해 정력을 돌구어 주며, 즉히 인삼, 녹용, 제비집과 견줄만하다.” 라고 하였다. “중국 약물대사전” 중 기록을 보면 ‘본 상품은 폐, 비장, 위, 신장, 대장의 기능을 좋게 해주며, 폐의 열을 없애고 위를 좋게 해주고 신장이 건조하지 않게 할 수 있다’라고 하였다. 여러 연구를 통해서 흰목이 다당체는 인체 면역력을 높여주는 작용을 하며 노년의 만성 기관지염, 폐원성심장병에도 현저한 효과가 있다고 밝혀졌다. 또한 간장의 해독능력을 제고하여 간을 보호하는 작용을 하며 방사능 노출에 대한 방어력도 갖고 있다고 하였다. 중국의 임상의학에서는 흰목이가 종양, 고혈압, 고지혈 및 백혈구감소 등 증상에 현저한 치료효과가 있는 기능성식품으로서 암 치료에 보조적 약품이라고 정의되고 있다. 1940년대 중국에서 흰목이버섯 3g에 은한 덩어리의 값으로 팔렸으며, "인삼, 녹용, 제비집, 흰목이버섯은 4대 진품 중 하나에 속하였다고 한다.

2. 흰목이버섯균과 공생균의 관계

흰목이는 균사체와 자실체로 구분되며 담자포자에서 발아된 균사체가 영양기관이 되어 단핵균사와 자실체를 형성하는 이핵균사형태로 존재한다. 담자포자는 적합한 조건하에서 한쪽 끝 혹은 측면에서 하나 혹은 두 개의 균사체가 발아하여 직경 1~1.5미크론(μ)이 되며 1개의 핵을 가지고 있는 단핵균사가 된다. 두 개의 서로 다른 단핵균사가 서로 결합하여 이핵균사를 이루는데 이핵균사는 직경 1.5~3미크론이 되며 격막이 있고 연쇄상 형태로 결합해 있다. 이핵균사는 쉽게 자실체를 형성하며 흰목이버섯 자실체는 공생균 (*Hypoxylon* sp.)의 도움이 있어야만 생육을 할 수 있다(Huang, 1982). 흰목이버섯균은 스스로 섬유소, 리그닌, 전분을 분해하는 효소를 갖지 못하여 이를 영양원으로 이용할 수 없어 공생균(*Hypoxylon* sp.)의 도움을 받아야만 자실체 성장발육을 할 수 밖에 없는 불가분의 관계를 이루며 생육한다. 자실체는 번식기관이며 사람들이 먹는 부분이며 반투명의 얇은 꽃잎형태를 하고 있고 가장자리가 구불구불한 형태로 연결되어 있으며 부드럽고 연하며 새하얗고 탄력성이 풍부하다. 자실체의 표면에는 담자기가 있고 담자포자가 있고 가늘고 긴 측사가 복잡하게 엉켜있는 구조를 하고 있다(Fig. 1-1).

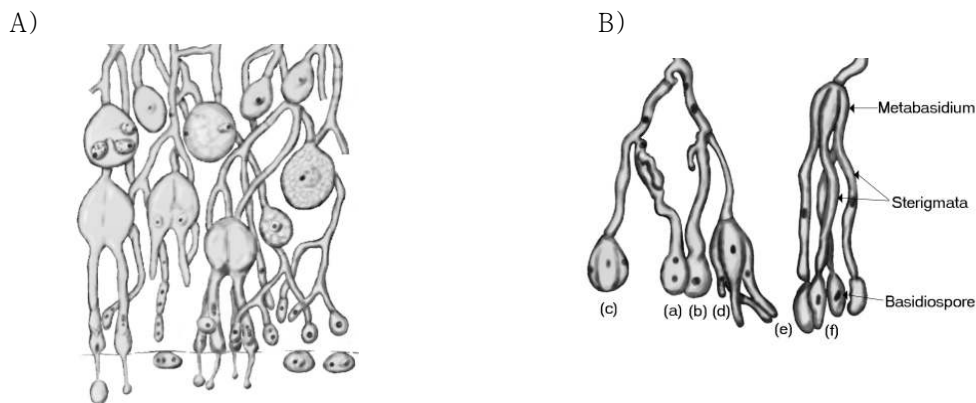


Fig 1-1. Basidia in various stages of development (A) and developing phragmobasidia of *Exidia nucleata* in hymenium (B) within gel of *T. mesenterica* (a) dikaryotic probasidium (b) diploid probasidium (c) metabasidium (d) sterigmata developing (e) nuclei migration (f) basidiospore borne

흰목이버섯 생활사는 비교적 복잡하며 유성세대와 몇 개의 작은 무성세대를 이루며 생활을 하고 있다(Fig 1-1). 흰목이버섯 생활사의 시작은 담자포자가 발아하여 새로운 담자포자를 형성하고 끝을 맺는다. 흰목이버섯은 이종간 결합을 하며 전형적인 4극성이며(Bandoni, 1963), 1개 담자기는 네 가지 종류의 다른 담자포자(AB,ab,Ab,aB)를 만들어 낸다. 담자포자는 적절한 조건하에서 발아하여 단핵균사가 되며 단핵균사는 생장발육 하면서 인접한 단핵균사와 서로 결합하여 쇠사슬과 같이 결합하여 이핵균사를 형성한다. 이핵균사가 생장 발육함에 따라 흰 곰팡이 덩치가 되고 교질화되어 흰목이버섯 원기를 형성한다. 원기는 좋은 영양과 적합한 환경 조건하에서, 끊임없이 분열해 마지막에는 투명하고 빛나는 새하얀 흰목이버섯을 형성한다. 성숙한 자실체는 완전히 공기 중에 노출되고 뒤이어 자실체 표면에서 수십만개의 담자포자가 형성된다. 담자포자는 일정한 조건아래에서 제2차 담자포자를 만들거나 혹은 싹틔워 번식하여 대량의 효모형태의 아포형태의 포자로 증식하면서 적절한 조건에서 싹을 틔워 단핵균사를 형성하기도 하지만 좋지 않은 환경조건에서는 많은 마디로 분열하여 절포자를 형성하기도 한다.

3. 흰목이버섯 국내외 재배 동향

흰목이버섯은 깊은 산과 무성한 숲의 썩은 나무에 자라며 자연적인 악조건을 견뎌내고 알맞은 온도와 습도 환경이 되면 균사 또는 포자가 발아하여 자실체를 형성한다. 야생 흰목이버섯은 주로 아열대기후와 열대지방 그리고, 온대지방 등에 폭넓게 분포한다. 사천성에서는 흰목이버섯을 1832년부터 재배하였다는 기록이 있다. 최근에는 인공재배에 대한 활발한 연구로 중국의 복건성, 절강성, 운남성, 사천성 등지와 대만, 베트남, 라오스, 태국 등 동남아시아에서 흰목이버섯이 생산되고 있다.

흰목이버섯을 가장 먼저 인공재배한곳은 중국의 사천성 통강지역이다. 이 지역에서 인공재배가 1894년 시작되어 귀주성, 호북성, 섬서성, 복건성으로 그 재배방법이 전해졌다. 1940년대에 흰목이버섯의 효모상 포자 균종 분리방법 및 흰목이버섯 포자 현탁액을 사용한 인공재배가 시도되었으며, 1954년 ‘생물학 통보’라는 잡지에 흰목이버섯 포자 균종의 분리와 접종기술이 발표되었다. 이후 중국에서 흰목이버섯 인공재배에 대한 연구가 활발하게 진행되어 그 기술이 비약적으로 발전되었으나, 국내에서는 현재까지 흰목이버섯의 인공대량생산에 대한 시도와 연구가 이루어지지 않았다.

4. 흰목이버섯의 주요 생리활성 및 기능성 가공제품 현황

흰목이버섯은 아미노산 17종을 함유하고 있다. 흰목이버섯 추출물의 산성다당체인 polysaccharide는 항암성물질로 항종양 활성을 실험시 37-64%의 종양저해를 나타낸다고 Ukai 등(1972)이 보고 하였다. 또한 흰목이버섯에서 추출된 산성 다당류인 glucuronoxylomannan을 복강주사 및 경구 투여할 때 항당뇨효과가 있다고 보고되었다.(Kiho, T. 등 1994). 한편, 흰목이버섯은 다이어트 작용을 지니고 있으며, 콜레스테롤의 증가를 억제한다고 보고되었다(Cheng, P. C. K. 1996., Cheng, H. H. 등 2003). 최와 김(2003)은 흰목이버섯(*Tremella fuciformis*)으로부터 신경성장인자 활성화에 도움이 되는 추출물을 생산하는 대량생산 방법을 연구하였으며, 흰목이로부터 분리한 다당체인 glycoprotein이 인터페론의 유도를 효과적으로 증진시켜준다고 보고하였다. 그리고 흰목이버섯에서 추출된 mannose, xylose, glucose로 이루진 polysaccharide가 고형암 증식을 억제(40%) 한다고 알려졌다(하 등, 2003). 동물실험을 할 경우, 흰목이버섯 추출물이 체액성 면역과 세포면역을 증진에 기여한다는 보고가 있으며, 암환자에게 방사능치료 부작용으로 나타나는 natural killer cell의 활성저하와 IL-2 합성저하 등에 방어기작을 가진다는 것이 알려졌다(丁과 丁, 2001). 이밖에도 흰목이버섯 추출물의 항고지혈증, 항염증, 항당뇨, 간보호, 항산화능이 연구되고 있으며, 상처치유 촉진 및 당뇨병에 의해 야기된 피사와 같은 다른 조직의 손상 치료용 약제제조에 관한 특허가 스웨덴의 샤우 류-젠에 의해 등록되었다.

중국에서는 예로부터 흰목이버섯을 고관과 귀인만이 향유하는 귀중한 산에서 나는 보배로 여겨 왔으며, 최근에 대량재배 시스템 구축으로 가격이 저렴해져 국민들의 식탁위에 오르는 대중화된 요리가 되어가고 있는 실정이다. 그러나 국내에서는 현재까지 흰목이버섯이 재배되고 있지 않고 있으며, 중국요리점에서 소요되는 전량이 중국에서 수입되고 있는 실정이다. 그러므로 국내외에서 대량으로 생산소비되고 있는 이 버섯의 생산기술을 확립하고 가공기술을 개발시 흰목이버섯의 국내 활용가치가 증대되게 되며, 농가의 소득확대에 중요한 역할을 담당한다.

현재 국내에서의 흰목이버섯의 소비는 중국식당의 고급요리에 다양하게 사용되고 있으며, 주요 호텔에서 고급요리에 다양하게 사용되고 있다. 그리고 2005년

에는 흰목이 버섯을 이용한 기능성 제품들이 출시되기 시작하였으며, (주)풀무원 생활건강에서 다양한 제품들을 출시하고 있고 준비를 하고 있다. 그리고 미용제품으로 흰목이 추출물이 포함된 화장품 ‘이쉴린 노블 에센스 파운데이션’이 제품화 되었다. 또한, 흰목이버섯 추출물을 포함하는 기능성 식품인 ‘버섯 생활’ 등이 있으며, 수험생용 영양제인 ‘그린체 트레아이 DHA’ 에 흰목이 추출물을 포함시켜 제품을 출시하고 있다.

2절. 연구목적

이 연구에서는 흰목이버섯의 대량재배법을 개발하고 흰목이버섯의 생리활성 물질을 규명하여 흰목이버섯의 활용도를 높이고자 한다. 흰목이버섯의 재배방법은 다른 버섯에 비해 다소 까다로우며, 공생균을 활용하는 특수한 재배기술이 필요하다. 국내에서 흰목이버섯을 재배하기 위해서는 우리나라의 자연환경을 극복할 수 있는 연중재배방법 개발이 절실하며, 단기 대량생산법의 체계를 확립하는 것이 시급한 실정이다. 즉, 고온다습한 조건에서만 흰목이버섯의 안정적인 생산이 가능하며, 사계절이 뚜렷한 기후조건을 극복하기 위한 특수한 재배방법이 개발되어야 한다. 이와 같은 배경하에 본 연구에서는 우리나라의 자생 흰목이버섯균 수집이나 분리 동정을 하여 고유의 유전자원 확보를 하고, 흰목이버섯의 인공재배법을 확립하고자 한다. 또한, 국내 현실에 맞는 인공재배 용기를 개발하고 흰목이버섯의 대량생산 체계를 확립하여 흰목이버섯 인공재배를 실용화 하고자 한다. 그리고 흰목이 버섯의 유효 생리활성을 규명하여 그 기능성을 밝히고자 한다.

3절. 연구내용

1. 1차년도

1차 년도	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1세부 과제	흰목이버섯 유효물질 주요 생리활성 규명	<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 유효물질 추출 방법 확립 · 균사체(액체, 고체배양) 및 자실체의 유효물질 추출방법 확립
		<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 유효물질 항암(암세포독성)활성 확인 · 균사체(액체, 고체배양)와 자실체 추출물 암세포독성활성검색 · A549, SK-OV3, SK-MEL2, XF498, HCT15 암세포주 이용
		<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 유효물질 라디칼형성억제활성 확인 · 균사체(액체, 고체배양), 자실체추출물 라디칼억제활성검색
		<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 유효물질 면역활성 연구 · 균사체(액체, 고체배양)와 자실체 추출물 면역활성 확인 · Macrophage 활성화능 측정, mitogen 활성 측정
		<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 항헬리코박터 활성 확인 · 균사체(액체, 고체배양)와 자실체 추출물 암세포독성활성검색 · <i>Helicobacter pylori</i>를 이용한 in vitro test
위탁 과제	흰목이버섯 종균 배양법 개발 및 종균배지 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯균 수집 분리 및 동정 · 국내 및 국외, 지역별 수집
		<ul style="list-style-type: none"> ● 액체 배양 및 고체 종균배양법 연구 · 흰목이버섯균 및 공생균의 액체, 고체 배양 배지 선정 및 종균 제조
		<ul style="list-style-type: none"> ● 혼합 종균제조방법 연구 · 흰목이버섯 및 공생균의 액체 종균법과 고체배양법 혼합
		<ul style="list-style-type: none"> ● 고체, 액체, 종균 배지최적화 연구 · 톱밥 : 수종별 선별, 톱밥 입자별 최적화, · 고체 액체 배지의 최적 보조재료 규명

2. 2차년도

2 차 년도	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1세부 과제	흰목이버섯 유효 물질 분리, 정제, 분석 및 활용	<ul style="list-style-type: none"> ● 선별된 흰목이버섯 유효물질의 추출조건 최적화 <ul style="list-style-type: none"> · 최대 생리활성 분획의 최적 추출조건 확립
		<ul style="list-style-type: none"> ● 생리활성 유효물질 분리 및 정제 <ul style="list-style-type: none"> · 최대 생리활성 분획의 유효성분 정제 · Column chromatography, ion exchange chromatography, HPLC, electrophoresis
		<ul style="list-style-type: none"> ● 생리활성 유효물질 성분 분석 <ul style="list-style-type: none"> · NMR analysis, Mass analysis
		<ul style="list-style-type: none"> ● 조건별 유효물질 확인 <ul style="list-style-type: none"> · 배지 성분에 따른 유효물질 함량 및 조성 확인 · 보조재료 첨가가 유효물질의 함량 및 조성에 미치는 효과
위탁 과제	흰목이버섯 대량재배 방법 및 환경 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ● 액체배지상 및 고체배지상 생육조건 분석 <ul style="list-style-type: none"> · 흰목이버섯균 및 공생균 군사생장에 필요한 공시배지, 배양온도, pH조건 규명 · 탄소원 질소원 규명 및 첨가물 효과
		<ul style="list-style-type: none"> ● 용기재배 최적화 <ul style="list-style-type: none"> · 온도, 산소요구도, 습도의 최적화, 균급기 비교 · 초발이 소요일수, 수량, 최적 용기 결정 · 대량 생산용 배지의 최적화
		<ul style="list-style-type: none"> ● 봉지재배 최적화 <ul style="list-style-type: none"> · 온도, 산소요구도, 습도의 최적화, 균급기 비교 · 초발이 소요일수, 수량, 최적 용기 결정 · 대량 생산용 배지의 최적화
		<ul style="list-style-type: none"> ● 원목재배 최적화 <ul style="list-style-type: none"> · 원목 수종별 수량, 회수율, 군사 활착기간, 초발이 소요일수 · 원목에 군사활착 중간접종, 생육관리 조건확립

3. 3차년도

3 차 년도	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1세부 과제	흰 목 이 버 섯 자실체와 유 효성분 의 소 재화 및 저장, 유통 조 건 의 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 자실체 저장 및 건조방법 연구 <ul style="list-style-type: none"> · 5℃, 10℃, 15℃, 20℃에서 저장, 식품학적 품질변화 관찰 · 저장 및 건조시 포장재질별 포장효과관찰
		<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 자실체 포장방법 연구 <ul style="list-style-type: none"> · 포장재질별 포장효과관찰 · PE, PP, AF등의 포장 재질 최적화 연구
		<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 자실체 건조방법및 건조 후 저장 연구 <ul style="list-style-type: none"> · 상온, 30℃, 40℃, 50℃, 60℃ 건조조건 확립 · 건조 자실체의 색, 수분함량, 식품학적 특성 조사 · 5℃, 10℃, 15℃, 20℃에서 저장, 품질변화 관찰
		<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 유효성분의 대량생산 및 소재화 <ul style="list-style-type: none"> · 유효성분의 식품소재화 연구 · 추출물 및 유효성분을 이용한 식품적용 연구(모델식품제조) · 유효성분 함유 식품의 산업화 연구
위탁 과제	농가 실증 재 배 및 대량생 산 체계 확립	<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 공생균의 분비물질 영향 및 톱밥분해능 조사 <ul style="list-style-type: none"> · 흰목이 버섯이 분비하는 효소활성 조사 · 공생균 분비물질이 흰목이버섯균의 생육에 미치는 효과 조사
		<ul style="list-style-type: none"> ● 농가 현장 대량 재배 <ul style="list-style-type: none"> · 농가 현장재배의 문제점 파악 및 해결책 제시
		<ul style="list-style-type: none"> ● 대량재배시 환경적 요인 조사 <ul style="list-style-type: none"> · 병충해 오염요인 조사 · 흰목이버섯 재배에 필요한 재배사의 요인 분석
		<ul style="list-style-type: none"> ● 대량 재배 방법의 현실화 및 농가 보급안 마련 <ul style="list-style-type: none"> · 농가 보급용 대량 간편 재배 지도안 마련

제 2 장. 재료 및 방법

<흰목이버섯 대량생산 연구: 주관기관, 위탁기관>

1절. 흰목이버섯균 개발

1. 흰목이버섯균과 공생균의 분리 및 동정

흰목이 버섯을 포자와 조직, 골목 분리의 세가지 방법으로 분리하였다. 조직분리를 위하여 살균수로 자실체를 10회 세척한 후 무균적으로 내부의 조직을 절취하여 PDA 배지에 이식하여 25℃ 항온기에서 배양하였다. 포자분리를 위하여 살균수로 자실체를 5회 세척하여 탈지면으로 살균수를 흡수시킨 후 PDA 배지가 들어 있는 petri-dish 뚜껑에 자실체가 밑으로 향하게 taping하였다. 8시간 마다 일정한 간격으로 4회 회전하여 포자를 배지 위에 떨어지게 하고, 최후에 회전하여 떨어진 포자를 PDA 배지에 옮겨 25±2℃에서 배양하여 균주로 이용하였다. 골목분리시 자실체를 제거한 골목내에서 여러 가지 균사가 혼재한 부분에서 흰목이버섯균주와 공생균을 순수 분리하였다(Table 2-1).

Table 2-1. Optimum temperature on growth of *Tremella fuciformis*

Compartment	The range of growth temp.	Optimum temp.
Spore	15 ~ 32℃	22 ~ 25℃
Mycellium	6 ~ 32℃	22 ~ 26℃
Fruit body	15 ~ 30℃	23 ~ 25℃

흰목이 공생균 분리를 위하여 자실체를 제거한 후 3일 만에 자실체 착생 부위로부터 0.5cm 깊이의 골목내 흑색 부분을 떼내어 PDA(Potato dextrose agar) 배지 위에 올려 놓았다. 25±2℃ 항온기에 5일 동안 배양한 후 성장한 균사체를 모두 분리하여 균사체와 흰목이버섯을 혼합배양하여 자실체 형성 유무를 관찰하였다. 흰목이버섯 자실체를 형성하는 흰목이버섯균과 공생균을 PDA배지에서 배양하여 ITS-5.8S rDNA 서열분석을 하였으며, database를 검색하여 을 동정하였다.

2. 흰목이버섯과 공생균의 배지 최적화

흰목이버섯균(KG 103)과 공생균(KG 201) 균주를 각각 PDA 배지에서 14일간 배양하였으며 (25℃), 특히 흰목이는 젤라틴 형태의 질긴 조직을 핀셋으로 적당량을 취하여 접종원으로 사용하였다. 흰목이버섯균과 공생균, 각각의 균사생장에 가장 적합한 배지를 선발하고자 PDA, MCM, YM, Czapek, MEA, OA, SA와 같은 배지를 만들어 배양상태를 비교하였으며 배양온도와 적정 pH를 알아보았다 (Table 2-2).

Table 2-2. Composition of the used media

Nutritional reagents	Medium (g/L)						
	PDA	MCM*	YM	Czapek	MEA	OA	SA
potato	200						
dextrose	20		10				40
sucrose				30			
peptone		2.0	5.0		5.0		10
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.5		5.0			
KH ₂ PO ₄		0.5		1.0			
K ₂ HPO ₄		1.0					
malt extract		2.0	3.0		20		
yeast extract			3.0				
NaNO ₃				2.0			
KCl				0.5			
FeSO ₄ ·7H ₂ O				0.01			
oatmeal						30	
agar	20	20	20	20	20	20	20

*MCM(Mushroom Complete Medium), MEA(Malt Extract Agar), PDA(Potato Dextrose Agar), YM(Yeast Malt), OA(Oatmeal Agar), SA(Sabouraud Agar)

균사생장을 위한 배지로 Table 2-2.의 배지로 실험하여 선정된 배지를 기본배지로 선택하고, 적정 배양온도 실험을 15°C ~ 35°C까지 5°C간격으로 시행하였다. 최적pH를 결정하기 위하여 pH 4.0~8.0 까지 0.5 간격으로 1N HCl과 1N NaOH를 이용하여 pH를 조정한 배지를 준비하였으며, 25°C에서 14일간 배양한 후 균사생장을 조사하였다.

공시균주의 균사생육 시 적합한 탄소원, 질소원, 각종비타민, C/N률 등은 장 (1997)의 논문을 참고로 하였으며 본 연구는 흰목이버섯 대량생산을 위한 최적배지 조성에 주안점을 두고 연구하였다.

2절. 액체배양 최적화

1. 흰목이버섯균 및 공생균의 배지최적화

선발된 기본배지(액체)에 흰목이버섯균과 공생균을 각각 100ml 삼각 플라스크에 접종한 다음 1일 간격으로 균사량의 경시적 변화를 조사하였다. 흰목이버섯균과 공생균은 한달에 한번 계대배양 (25°C에서 7일) 하였으며, potato dextrose agar(PDA) 슬랜트 상에서 4°C에 보관하였다. 기본배지를 바탕으로 최적온도와 최적 pH를 결정하였다.

2. 탄소원, 질소원, C/N율

공시균주의 균사생육 시 적합한 탄소원을 선발하기 위하여 합성배지인 Czapek를 기본배지로 하여 glucose 등 단당류 3종, sucrose 등 이당류 3종, manitol 등 다당류 3종 총 9종의 탄소원 농도를 sucrose 30g과 동일한 탄소량이 되도록 조절하여 배지를 조제하였으며 최적 pH와 온도에서 15일간 배양하여 균사 성장량을 조사하였다. 질소원을 선발하기 위하여 선발된 탄소원으로 탄소원을 고정화 후 ammonium tatrte 등 무기 질소원, urea 등 유기 질소원 3종, alanine 등 아미노산류 3종 총 9종의 질소원 농도를 NaNO₃ 2.0g과 동일한 질소 함량이 되도록 조절하였으며 기타는 탄소원 선발 시험과 동일하게 하였다. 기본배지에 선발된 탄소원과 질소원을 고정하여 C/N비가 10, 20, 30, 40, 50이 되도록 조절하여 균사생장이 우수한 최적 C/N비를 선발하였다.

3. 접종원 제조 및 플라스크 배양

페트리디쉬 PDA배지에서 자란 흰목이버섯균을 5 mm 콜크보러로 접종원에 이식하였다. 250 ml 삼각플라스크에 기본배지로 선정된 MCM배지(20 g glucose, 2 g yeast extract, 2 g peptone, 0.5 g MgSO₄H₂O, 1 g K₂HPO₄, 0.46 g KH₂PO₄)를 50 ml씩 분주하여 150 rpm으로 3일 동안 28°C에서 접종원을 배양하였다. 플라스크(250ml)에 접종원 2%(v/v)를 접종한 후 배양하여 실험하였다. 모든 실험은 3 반복으로 실시하였다. 생물반응 발효조실험에서는 발효배지에 접종원의 2%가 접종되었고 산도와 용존산소전극이 설치된 5 L 발효조(KoBioTech, Incheon, Korea)에서 25°C로 배양하였다. 특별한 경우를 제외하고 발효조실험은 온도 25°C, 공기율 2 vvm, 진동속도 200 rpm, 최초 산도 8, 배양액 3 L에서 실시되었다.

4. 흰목이버섯균 건조중량 및 EPS(Exopolysaccharide) 분석

여러 시간 간격으로 회수된 샘플은 20분 동안 12,000x g에서 원심분리되었다. 90°C에서 하루 밤 동안 건조하고 증류수로 균사체를 반복하여 세척한 후 다시 건조하여 균사 바이오매스의 건조중량을 측정하였다. 여과필터로 여과한 발효액을 HPLC(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)로 분석하여 잔류 글루코스의 양을 측정하였다. 이때 굴절 인덱스 디텍터(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)가 달린 Aminex HPX-42C column(0.78 x 30cm, Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하였다. 여과된 발효액의 상층액을 순수 에탄올을 4배로 혼합하여 4°C에서 하루밤 방치하여 EPS를 침전시켰다. 침전된 EPS를 10,000rpm에서 20분간 원심분리하여 회수한 후 함량을 측정하였다. 액체배양 중 흰목이버섯균의 형태를 CCD 카메라(Matsushita Communication Industrial Co., Ltd., Yokohama, Japan)를 통하여 관찰하였으며, 광학현미경(Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan)이 부착된 미지분석기(Matrox Electronic System Ltd., Dorval, Quebec, Canada)로 정밀 분석하였다.

5. EPS(exopolysaccharide)의 특성 평가

EPS의 분자량을 MALLS 가스크로마토그래피 system (Wyatt Technology, Santa Babara, CA)에서 SEC 컬럼(Shodex PROTEIN KW-803, 804, Showa Denko K.K., Tokyo, Japan)으로 분석하였다. EPS 샘플을 SEC/MALLS 시스템으로 분석전에 0.025mm 필터 멤브레인 필터(Millex HV type, Millipore Co., Bedford, MA)를 통하여 필터하였고 0.01% sodium azide를 함유한 인산완충액(ionic strength=0.1, pH 6.1)에 용해하였다. 흐름속도율은 0.7ml/min이었고 injection volume과 농도는 각각 100 μ l 와 3mg/ml으로 하였다. EPS의 분자량을 계산시 dn/dc값(specific refractive index increment)은 문헌(Jumel et al., 1996) 데이터를 참고하였으며, 이때 dn/dc는 0.14 ml/g로 결정되었다. 각 EPS에 대한 분자량 계산을 Astra 4.72 software (Wyatt Technology)에 의해 실시하였다.

3절. 흰목이버섯 종균제조법 연구

1. 배지 및 배양조건(최적온도와 최적 pH)

흰목이버섯균과 공생균주를 PDA 배지에 접종하여 28 $^{\circ}$ C 항온기에서 5일간 배양하였다. 이때 특히 흰목이버섯 균주는 bacteria를 배양할 때처럼 scratching하여 배양한 후 내경이 6 mm cork borer로 찍어 떼어낸 절편을 접종원으로 사용하였다. 한편, 흰목이버섯 균주를 PDA 배지에 10일간 배양한 다음 그 위에 공생균을 접종하고 다시 10일간 배양하여 혼합균의 접종원으로 사용하였다. 공시균주의 균사생장에 가장 적합한 배지를 선발하고자 Table 2-2 과 같은 조성으로 배지를 조제하여 사용하였으며, 고압 살균기로 121 $^{\circ}$ C에서 20분간 살균하여 무균상내에서 plastic Petri-dish(직경 9cm)에 25ml씩 분주하여 접종원을 접종하였다. 이 배양 접시를 25 \pm 2 $^{\circ}$ C로 조절된 항온기에서 10일간 배양한 후 colony의 직경을 조사하였다. 공시균주의 균사생장 최적온도를 구명하기 위하여 우량배지로 선발된 MCM 액체배지 25ml를 삼각 flask(250ml)에 일정하게 분주하여 공시균주를 각각 접종하고 15, 20, 25, 30 $^{\circ}$ C로 조절된 항온기에서 15일간 배양한 다음 건조 균체량을 측정하였다. 균사생장의 최적배지로 선발된 MCM 배지를 기본배지로 하고 1N HCl

과 1N NaOH를 이용하여 배지의 pH를 4.0~8.0 까지 0.5 간격으로 조절하였으며 살균, 접종, 배양 등은 위의 균사생장 최적온도 선발의 방법과 동일하게 하여 최적온도에서 15일간 배양한 후 균사 성장량을 조사하였다.

2. 흰목이버섯균과 공생균의 액체 혼합종균 제조방법

흰목이버섯을 재배하기 위해서는 다른 버섯 재배방법과 달리 공생균을 이용해야 되는 특수한 기술을 개발하여야 한다. 흰목이버섯균(KG 103)과 공생균(KG 201), 2가지의 균을 혼합접종을 위한 최적배지 조성과 흰목이 버섯균과 공생균이 잘 혼합 할 수 있도록 혼합방법을 연구하였다.

흰목이버섯균(KG 103)과 공생균(KG 201) 균주를 PDA 배지에서 26℃ 항온기에서 14일간 배양하여 접종균으로 사용하였다. 특히, 흰목이는 젤라틴 형태의 길긴조직을 핀셀으로 적당량을 취하여 접종원으로 사용하였다. 각각 배양한 두가지 균을 동시에 선발한 배지에 접종하여 25℃ 항온기에서 30일간 배양하여 1차 접종원을 제조하였으며 대량의 종균을 확보하기 위하여 2차, 3차 계대접종 배양하여 종균으로 사용하였다.

액체종균 생산을 위하여 흰목이버섯균과 공생균주를 PDA 배지에 25℃ 항온기에서 5일간 배양하여 접종원으로 사용하였다. 한편, 흰목이버섯균을 PDA 배지에 10일간 배양한 다음 그 위에 공생균을 접종하고 다시 10일간 배양하여 혼합균의 접종원으로 사용하였다.

혼합종균제조의 최적온도를 결정하기 위하여 15, 20, 25, 30℃로 조절된 항온기에서 15일간 배양한 다음 균사생장량을 조사하였으며, pH를 4.0~8.0 까지 0.5 간격으로 1N HCl과 1N NaOH를 이용하여 조제한 배지에서 균사생장 최적온도 선발의 방법과 동일하게 균사생장량을 조사하였다.

혼합종균균주의 균사생육 시 적합한 탄소원과 질소원 농도를 액체배양 시와 동일하게 측정하였다. NaNO_3 2.0g과 동일한 질소함량이 되도록 조절하였으며 기타는 탄소원 선발 시험과 동일하게 하였다. 기본배지에 선발된 탄소원과 질소원을 첨가하고 9종의 유기산을 0.1%씩 첨가하여 배지를 조제하였다.

각종 비타민을 살균수에 0.01g/L씩 첨가한 후 희석하여 Whatman membrane filter(0.2 μm)로 여과하여 조제된 flask내 배양액 25ml에 각각 250 μl 씩 주입하고 15일간 배양하여 균사생장량을 조사하였다. 기본배지에 선발된 탄소원과 질소원을

고정하여 C/N비가 10, 20, 30, 40, 50이 되도록 조절하여 군사생장이 우수한 최적 C/N비를 선발하였다. Kanayama(1984)가 사용한 방법에 의하여 액체 배양된 군사 및 배양여액을 건조하여 무게가 측정된 여과지(whatmann No.2, 직경 9cm)로 여과시킨 후 이를 80±2℃로 조절된 건조기에 항량이 될때까지 건조시킨 후 순수 건조된 균체 무게를 환산하였다. 공시균의 생육시 요구되는 영양원을 구명하기 위하여 천연배지가 혼합되지 않는 합성배지인 czapek's 배지를 사용하였다.

4절. 흰목이버섯 톱밥재배 및 원목재배

1. 고체종균제조에 적합한 톱밥선정

공시균주를 각각 MCM 배지에 12일간 배양하여 250 ml 삼각 flask에 톱밥과 미강을 80 : 20 (V/V)으로 혼합한 후 70%의 수분을 첨가하여 고압 살균한 다음 MCM에서 배양한 군사를 접종하였다. 이를 15일간 배양하여 각 처리간의 접종원으로 사용하였다. 공시균의 군사생장에 적합한 톱밥을 선발하기 위하여 졸참나무 (*Quercus serrata*), 아카시나무(*Robinia pseudo-acacia*), 이태리 포플러(*Populus canadensis*), 오리나무(*Alnus japonica*), 소나무(*Pinus densiflora*)등 5종의 톱밥을 사용하였다.

2. 고체 종균제조시 최적 첨가재 결정 및, 최적수분, 온도, pH 조사

선발된 최적 톱밥에 적합한 첨가재를 선발하고자 신선한 건조 쌀겨, 밀기울, 맥주박, 콩비지 등을 각각 10%, 20%, 30% (V/V)의 비율로 배합한 다음 수분함량이 65±2% 되게 조절하였다. 톱밥배지를 시험관 (Φ3.0×20.0cm)에 50 g (가비중 0.21)씩 일정하게 충전하고 121℃에서 30분간 고압살균한 다음 미리 배양한 톱밥 접종원을 3~5g씩 접종하였다. 공시균이 접종된 시험관을 25±2℃로 조절된 배양실에서 15일간 배양한 후 군사생장을 조사하였다.

흰목이버섯균의 배양시 최적 수분함량을 규명하고자 선발된 참나무 톱밥(흰목이버섯균, 혼합균)과 아카시나무 톱밥(*Hypoxylon* sp.)에 첨가재료로 선발된 맥주박을 20% (V/V) 비율로 각각 균일하게 혼합한 후 수분함량을 40~75%까지 5%간

격으로 조절하여 시험관에서 (3.0×20.0 cm) 균사밀도와 균사생장 길이를 조사하였다. 톱밥배지의 적정온도를 선발하기 위하여 공시균의 선발된 톱밥과 첨가재료, 수분함량을 맞춘 다음 10~35℃까지 5℃간격으로 배양온도를 조절한 후 각 공시균의 균사 길이와 밀도를 측정하였다. 톱밥의 적정 pH를 결정하기 위하여 공시균의 선발된 톱밥, 첨가재료, 수분함량, 온도를 톱밥에 맞춘 후 배지의 pH를 McIlvain buffer로 3.0~11.0까지 1.0 간격으로 조절한 후 최적 pH를 조사하였다.

3. 톱밥 종균제조시 첨가재료의 최적 함량

공시균의 선발된 첨가재료인 맥주박을 0~50%(V/V)까지 10%간격으로 혼합한 후 균사생장과 균사밀도를 조사하여 첨가재료의 최적함량을 선발하였다. 각 공시균의 선발된 맥주박 첨가함량에 calcium carbonate, MgSO₄, sucrose를 각각 0.1, 0.2, 1.0, 5.0% 첨가하고 침엽수(V)의 sulfite pulp배액 고형분을 10%의 물에 용해한 후 증류수로 투석 농축하여 5배의 ethanol로 침전한 LVD를 0.001, 0.01, 0.1, 0.2, 1, 5%씩 각각 첨가하여 공시균의 균사생장과 밀도를 조사하였다.

4. 공생균과 흰목이버섯균의 첨가 비율 결정

흰목이버섯균과 공생균의 혼합 비율에 따른 흰목이버섯균의 배양 기간, 초발이 소요기간, 수량을 조사하기 위하여 흰목이버섯균과 *Hypoxylon* sp.의 혼합비율을 100 : 100, 100 : 50, 100 : 25, 100 : 12.5, 100 : 6.2로 접종원을 조제하여 균사배양 후 자실체의 수량을 조사하였다.

5. 혼합종균을 이용한 흰목이 톱밥 및 원목재배

흰목이버섯균을 MCM 배지가 들어있는 시험관(직경 12 mm)에 30℃의 항온기에서 15일간 배양시킨 다음 petri-dish (ψ9cm)의 MCM 배지에 *H. sp.*를 25℃의 항온기에서 7일간 前배양한것을 cork borer (ψ6mm)로 절취하여 15일간 시험관에 배양한 흰목이버섯균 위에 1개씩 접종하여 30℃에서 10일간 배양시킨 것을 1차 혼합균이라 하였다. 이를 다시 30℃에서 15일간 시험관에 배양한 흰목이버섯균 위에 접종한 것을 2차 혼합균, 2차 혼합균을 다시 흰목이버섯균에 접종한 것을 3차 혼합균이라 하였으며 4차, 5차 혼합균도 이러한 방식으로 혼합균을 만들었다. 250 ml 삼각 flask에 참나무 톱밥과 맥주박을 80 : 20 (V/V) 비율로 혼합하고 수

분함량을 65%로 조절한 톱밥 100 g씩 넣고 고압 살균기(1.2 기압)에 40분간 살균한 후 1, 2, 3, 4, 5차 접종원으로 사용하였다.

재배방법은 원목과 톱밥 용기재배로 하였으며 배양 완성일수는 종균을 접종한 날로부터 균사가 배지 전면에 만연되었을 때까지의 일수, 초발이 소요일수는 배양 완성일로부터 원기가 형성된 날까지의 일수, 생육 소요일수는 초발이로부터 수확한 날까지의 일수로 표시하였다. 생물학적 효율(B.E)은 배지 건조중량에 대한 버섯의 생체중을 백분율로 표시하였다.

5절. 흰목이버섯 저비용 대량생산법 개발(용기내 재배법)

1. 흰목이버섯 용기내 재배를 위한 배지선발

흰목이버섯의 재배최적조건의 고온다습한 까다로움으로 인하여 우리나라 기온에서는 6월, 7월에 산중에서 장마철에만 볼 수 있는 희귀버섯으로 자연환경을 이용한 재배는 거의 불가능하다. 설령 향온, 향습 시스템을 구축한 재배사에서 흰목이버섯을 재배 할 수 있으나 많은 비용과 저 효율성으로 국제경쟁력을 갖출 수 없을 뿐더러 양질의 버섯을 연중 계획생산하기에는 어려움이 있다. 흰목이버섯을 최적의 조건으로 생산할 수 있는 대량재배법을 확립하기 위하여 기존의 병버섯 재배용 용기를 활용하여 고온다습 조건을 맞추어 줄 수 있었으며 생육관리 또한 수월하였다. 선행연구를 기초하여 대량생산을 위한 저비용 고효율의 최적배지 선발에 주력하였다. 배지 최적화를 위하여 국내에서 일반적인 버섯재배에 많이 사용되고 있고 쉽게 구입할 수 있는 배지원료를 위주로 선별하였으며 주재료로 참나무 톱밥과 면실피, 콘코브와 보조재료인 밀기울, 미강 등을 첨가하여 비교 실험하였다. 그리고 배양액중의 유기 탄소 공급원으로서 균사의 증식과 생장에 유리하게 하기 위하여 황백당을 1%를 첨가하며, 배지의 산염기도를 조절하여 위하여 섞고, 탄산칼슘을 1~2%를 사용하였다. 그리고 황산마그네슘은 배지의 조성에서 일반적으로 0.3~0.5% 사용하며 효소를 활성화시키고 대사를 촉진하여 균사의 생장을 돕는다.

2. 저비용 대량 연중생산을 위한 재배용 용기 개발

통상 버섯재배에 사용되는 용기는 공기의 통풍을 원활하고 이물질과 세균의 유입이 되지 않고, 통상 좁은 입구가 형성된 원통형의 용기를 사용해야 한다. 기존의 버섯 재배용기에서 버섯을 재배하는 경우 버섯이 외부에 노출되면서 재배가 이루어지게 되므로 버섯의 생육에 필요한 적정한 습도를 유지하기가 곤란하였다. 흰목이버섯을 재배하기 위해서는 고온다습한 조건을 유지해 주기 위하여 용기재배 방법을 고안하였다. 또한, 용기의 투명성을 높여 버섯의 재배 과정을 관찰할 수 있도록 하였으며 버섯의 수확 시 이물질이 전혀 묻지 않은 상태로 버섯을 수확할 수 있으며 내부에 채워진 버섯을 규격화된 형태로 수확할 수 있게 하였다.

흰목이버섯 용기내 재배는 배지혼합, 용기에 배지충진, 살균, 냉각, 접종, 배양, 생육, 수확 단계를 거치며 다른 버섯과 달리 배양과 동시에 자실체가 발생하는 생육특성과 고온 다습한 조건 등 까다로운 습성으로 인하여 각 단계별로 최적조건을 규명하였다.

3. 저비용 대량생산을 위한 톱밥, 콘코브, 면실피의 비교

T. fuciformis KG 103의 재배에서 배지의 최적화를 위한 주재료의 배지선발실험 시 국내에서 일반적으로 버섯재배에 많이 이용되고 있고 값이 비교적 저렴하며 쉽게 구입할 수 있는 배지원료를 위주로 사용하였다. 비교 실험 배지재료는 참나무 톱밥, 면실피 그리고 콘코브를 비교 실험하였다(Table 2-3). 그리고 보조재료로는 미강을 첨가하였고 첨가제로는 sugar, 1%, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5% 를 사용하였다. 이 배지를 사용하여 흰목이버섯 용기내 재배를 위한 배지최적화에 대한 연구가 되었다.

Table 2-3. The comparison of various media on fruiting body of *T. fuciformis* KG 103.

NO	main materials		
	Oak sawdust	Corn cob	Cotton seed meal
1	77	0	0
2	52		25
3	27	25	25
4	0	77	0
5		52	25
6	25	27	25
7	0	0	77
8	25		
9	25	25	27

(1,2,3,4,5,6,7,8,9; + yellow sugar (1%) + CaSO₄·2H₂O(1.5%) + MgSO₄·7H₂O(0.5%)

6절. 흰목이버섯균과 공생균의 공생관계분석

1. 공생균의 분비물질 영향

공생균이 분비한 물질에 의한 흰목이버섯균의 균사생장 촉진효과를 관찰하기 위하여 cellophane을 petri-dish(직경 9cm)에 맞추어 자른 다음 여과지 사이에 끼워 121℃에서 15분간 살균하였다. 살균된 cellophane을 무균상에서 MCM 배지 위에 깔고 공생균을 8일간 배양한 후 공생균이 자란 cellophane을 걷어낸 자리에 흰목이 균사를 접종하여 균사생장을 조사하였다(Dennis, 1971).

2. Xylanase 활성 조사

T. fuciformis, 공생균 및 두 균주를 혼합 배양한 혼합균을 PDA 배지에 5일간 배양한 후 균총의 가장자리에서 직경 7mm의 균총을 떼어내어 기본배지(Table 2-4)에 접종하여 25℃에서 10일간 배양하였다. 배지의 최적 탄소원을 조사하기 위하여 기본배지에서 질소원을 NaNO₃로 0.2%가 되게 고정하고 glucose의 4가지의

탄소원을 비교하였으며, 최적 질소원을 조사하기 위해 탄소원을 malt extract로 0.1%가 되게 고정하고 NaNO_3 와 4가지의 질소원을 각각 첨가한 후에 배양 일수 별로 xylanase 활성을 측정하였다.

pH의 영향을 조사하기 위하여 꼭지가 긴 500ml flask에 선발된 기본배지를 100ml씩 넣고 접종하여 최대 활성을 나타내는 배양일수 동안 배양하고 그 배양액을 12,000rpm으로 15분간 원심분리하여 그 배양여액을 4°C에서 80% ammonium sulfate로 하룻밤 염석(precipitation)한 후 투석(dialysis)한 것을 냉동건조기(ISE SUR-QUICK)로 freezing dry하여 조효소로 사용하였다. 조효소에 대한 pH의 영향을 측정하기 위해 0.1M McIlvaine buffer로 pH 4-8까지, 0.1M Tris-HCl buffer로 pH 8-11까지 조절하여 xylanase 활성을 측정하였다. Xylanase 활성 측정 방법으로 Somogyi-Nelson법(Somogyi, 1952, Nelson, 1964)을 사용하였다.

Table 2-4. Composition of the basal medium for screening enzyme production

Components	Content
KH_2PO_4	2.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 g
CaCl_2	0.3 g
Trace elements*	400 μl
Carbon sources**	0.1 %
Nitrogen sources***	0.2 %
Distilled water	1 L
pH	6.0

* Trace elements : $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50mg/ml, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14mg/ml
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 16mg/ml, CoCl_2 20mg/ml

** Carbon sources : glucose, xylose, sucrose, lactose, malt extract

*** Nitrogen sources : NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, yeast extract, polypeptone

3. Ligninase와 laccase의 활성 조사

효소생산을 위하여 malt extract agar(2%) 배지(pH 6.5)에서 흰목이버섯균(T)과 공생균(H), 혼합균(T+H)은 25°C에서 각각 배양하였다. Ligninase 생성 제고를 위한 공시균의 기본배지는 B III배지(Table 2-5)로 여기에 탄소원으로는 glucose를 최종 농도가 56mM이 되도록 각각 조절하여 첨가하였고 배지의 산도 변화를 막기 위해 buffer 용액으로는 10mM trans aconitic acid(T.A.A. pH 4.2)를 사용하였다. Blended mycelia의 제조를 위하여 1000ml 삼각 flask에 BIII 배지와 시험관에서 배양된 공시균의 균사 및 배양액을 합쳐 40ml를 주입한 후 25°C에서 15일 정지배양한 균사체를 멸균수로 2~3회 세척한 후 5초간 homogenizer(Nissei, AM-7; Japan)로 균질화시켜 blended mycelia로 사용하였다.

배양 조건은 공시균을 125ml Erlenmeyer flask에 blended mycelia(최종 20% 농도)와 detergent인 Tween 20(T.20)을 0.1%, veratryl alcohol (V.A.)을 1mM 농도로 각기 조절하여 첨가하였고, 공시균에 따른 ligninase, laccase 효소생산의 차이를 검토하고자 배양액을 15, 30, 45, 50, 60, 75ml로 하였으며 이와는 별도로 T.20 및 V.A를 넣지 않고 benzyl alcohol(B.A.)를 6mM로 조절하여 blended mycelia (20% 농도)와 배지 혼합액을 45ml로 하여 대조하였다. 모든 처리는 5반복으로 실시하였고 배양은 25°C 왕복 진탕기(150rpm, 2.5cm diameter cycle)를 사용하였고 매일 산소를 1분간 주입시켜 포화상태로 한 후 마개를 막아 배양하였다.

Laccase activity 측정(산화 활성도법) 방법은 배양액 200 μ l를 취해서 1~2분 원심분리한 후 상등액 90 μ l(효소액) + 23.3mM ABTS(2,2-azinobis) 100 μ l + glycine buffer (pH 3.0) 100 μ l + 증류수 210 μ l 혼합(총액이 500 μ l)하여 흡광도 436nm에서 15초 간격으로 2분간 scanning 하여 효소 unit는 O.D값/반응시간(分)으로 계산하였다.

Ligninase activity 측정(V.A.의 H₂O₂-dependent 산화법) 방법은 200 μ l의 배양액을 취하여 1~2분 원심분리한 후 상등액 90 μ l+증류수 225 μ l+10mM V.A 40 μ l+10mM H₂O₂ 20 μ l+0.25N Na-tartrate buffer(pH 3.0) 125 μ l 혼합하여 310nm에서 5초 간격으로 scanning (Kinetics/time) Unit를 계산하였다.

Table 2-5. Composition of the basal medium

Medium	Component	Contents	Remarks
B III sterilized	KH ₂ PO ₄	2.0 g	Autoclaved
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g	"
	CaCl ₂	0.1 g	"
	(NH ₄) ₂ tartrate	0.2 g	Filter
	Thiamine-HCl	1.0 mg	"
	700 ×TES	10.0 ml	"
700×TES (Trace element solution)	Nitriloacetate	10.5g	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10.5g	
	MnSO ₄ ·H ₂ O	21.0g	
	NaCl	3.5 g	
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	7.0 g	
	CoCl ₂	0.7 g	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.7 g	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.7 g	
	AlK(SO ₄) ₂ ·12	0.7 g	
	H ₂ O	0.7 g	
	H ₃ BO ₃	0.7 g	
	NaMoO ₄	0.7 g	
Distilled water	1000ml		

4. 공생균이 생산하는 자실체 형성 유도물질 탐색

흰목이의 자실체 형성을 유도하는 공생균이 생산하는 자실체 형성 유도물질 (Fruiting body inducing substance, FIS)은 paper disc 방법과 배지 첨가원으로 사용하여 검정하였다. FIS 탐색은 공생균의 배양 균사체 및 여액을 얻어 사용하였으며 배양여액은 직접 혹은 클로로포름과 에틸 아세테이트 용매 추출로 얻은 분획을 사용하였다. 균사체 추출의 경우 물과 메탄올은 실온과 90℃에서 각각 추출하여 사용하고 에탄올, 아세톤은 실온에서 추출하였으며, 이들 각 분획은 직접 흰목이 균사체 배양 과정중에 처리하여 자실체 형성 유무로 유도물질의 탐색을 실시하였다.

7절. 농가 현장 대량재배시 환경적 요인조사 및 현실화

1. 톱밥 중량 감소율, holocellulose, lignin 분석

참나무 톱밥을 50mesh로 선별한 후 수분을 정확히 65%로 조절한 톱밥배지에 공시균을 각각 접종하여 25±2℃로 조절된 항온기에서 20, 40, 60, 80, 100, 120일간 배양하여 80±2℃의 건조기로 항량 (W_2)이 될 때까지 건조하여 중량 감소율을 계산하였다. 계산은 $E = (W_1 - W_2) / W_2 \times 100$ 식으로 하였으며 E는 중량감소율, W_1 은 처리전 시험체의 평균중량 (g), W_2 는 처리 후 시험체의 평균중량 (g)을 나타냈다. Holocellulose 분석의 시료 조제는 톱밥 중량 감소율 측정 방법과 같은 요령으로 조제하여 alcohol : benzene을 1 : 2 (V/V)로 혼합한 액으로 탈지한 시료 2.5 g을 250 ml 삼각 flask에 넣고 증류수 150 ml와 아염소산나트륨 1 g을 첨가하여 80℃ 수조에서 1시간 가열한 다음 내용물을 glass filter(1G3)로 여과하여 건조기에서 건조한 후 평량하였다(아염소산나트륨법). 계산은 전섬유소(%) = $(W_3 - G) / W_0 \times 100$ 식으로 하였으며 W_3 : glass filter무게 (g) + 처리후 시료의 전건무게 (g), G : glass filter 무게, W_0 : 처리전 시료의 전건무게(g)를 나타냈다(Seifert, K. 1965). Lignin 분석의 시료조제는 톱밥 중량 감소율 측정방법과 같은 요령으로 조제하여 alcohol : benzene을 1 : 2(V/V)로 혼합한 액으로 탈지한 시료 1.0 g에 72% 황산 15.0 ml를 가하여 실온에서 자주 교반하면서 2시간 동안 가수분해시켰다. 이것을 1000ml 삼각 flask에 정량적으로 옮기고 증류수 560ml를 첨가하여 황산 농도를 3%가 되도록 희석한 후 냉각기를 부착시켜 4시간 동안 반응시켰다. 이 반응액을 glass filter(1G4)로 여과하여 건조기에서 건조한 후 평량하였다(Klason lignin : TAPPI STANDARD T 222 om - 83). 계산은 Lignin(%) = $(W_3 - G) / W_0 \times 100$ 식으로 하였으며 W_3 : glass filter 무게(g) + 처리후 시료의 전건무게(g), G : glass filter 무게(g), W_0 : 처리전 시료의 전건무게(g)를 나타냈다.

2. 수량 및 건조율 조사

발이유기 방법에 따른 자실체 수량 비교를 하기 위하여 참나무 톱밥과 맥주박을 80 : 20(V/V)의 비율로 잘 섞어 수분을 65%로 조절하여 톱밥배지를 850 ml 병에 충전 후 121℃에서 60분간 고압 살균하여 접종하고 균사가 완전히 다 자란

다음 팽이버섯 병 재배 시 사용하는 균굽기 기계로 배지의 상단부를 균일하게 긁은 것과 배양 후 균굽기를 하지 않은 것을 비교하여 수량과 초발이 소요일수를 조사하였다.

종균 저장기간에 따른 자실체 수량 및 효소활성 조사는 250 ml 삼각 flask에 참나무 톱밥과 맥주박을 80 : 20(V/V) 비율로 잘 섞어 50 g씩 충전하고 121°C에서 40분간 고압 살균하여 미리 배양한 혼합균을 접종하여 배양이 완료된 직후, 15일후, 30일후, 45일후, 60일후까지 15°C에서 저장한 것을 850 ml 용량의 병에 참나무 톱밥과 맥주박을 80 : 20 (V/V) 비율로 혼합 후 살균하고 접종하여 초발이 소요일수, 수량, 효소활성을 조사하였다. 수확 및 건조율 조사는 850 ml 톱밥 용기와 원목에 종균을 접종한 후 자실체가 형성될 때까지의 소요일수와 형성된 자실체의 갓 직경, 수량을 조사하고 건조방법을 상온, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C로 하여 자실체의 선택과 건조에 적당한 온도, 건조율을 계산하였다.

< 흰목이버섯 실용화연구: 주관기관 >

8절. 흰목이버섯의 식품학적 특성분석

1. 일반성분 분석

본 실험에는 흰목이 버섯(*T. fuciformis* KG 103)의 자실체가 사용되었다. 흰목이 버섯의 일반성분을 Official Method of Analysis (AOAC, 1980)으로 분석하였다. 즉, 수분함량을 105°C에서 건조하여 측정하였고, 직접회화법으로 버섯을 105°C에서 건조시킨 후 550°C 회화로 에서 회화시킨 다음 회화 잔사의 무게를 측정하여 회분함량을 구하였다. 조지방의 함량을 측정하기 위하여 Soxhlet 추출법을 사용하였으며 사용된 ether를 완전 제거한 후, 칭량하여 조지방의 함량을 측정하였다. Kjeldahl식 질소정량법으로 조단백질의 함량을 측정하였다.

2. 지질 성분 분석

흰목이버섯균 버섯을 25°C에서 10일간 선정된 최적 고체배지에서 배양하여 얻은 다음 동결 건조하고 -20°C에 보관하면서 지질 분석 시료로 사용하였다. 지질 성분분석을 위하여 시료에 CHCl₃ : MeOH (1 : 1) 용액을 처리하여 추출하고 이 과정을 3번 반복 하였다. 추출물들을 혼합하고 CHCl₃ : MeOH : water (8 : 1 : 4) 용액을 가하여 진탕한 다음 용매 분획을 얻어 0.9% KCl 용액으로 세 번 세척하였다. 세척된 용매 분획은 N₂ 가스를 공급하면서 감압 농축하고 클로로포름 소량에 용해하여 -20°C에서 보관하면서 사용하였다.

총 지질의 함량을 Amenta의 방법에 따라 확인하였으며, 지방산을 BF₃-methanol을 사용하여 methylation한 다음에 methyl esters 유도체를 만든 다음 GC(gas chromatography)(Varian, USA)로 분석, 동정하였다. 동결건조한 자실체에 methanolic KOH(6%)를 처리한 다음 C₆H₆로 unsaponifiable lipid를 추출하고 SiO₂ TLC로 지질 성분 중 sterol을 분리하였다.

분리된 sterol을 AC₂O : pyridine (1 : 2)를 상온에서 처리하여 Acetylation화한 다음 분석하였다.

3. 탄수화물 분석

흰목이버섯 내 탄수화물 함량을 Bertrand 방법으로 측정하였으며, 자실체의 유리 탄수화물분석을 위하여 건조된 시료를 70% 메탄올 추출, 농축 과정을 거친 다음 hexane을 가하여 지질 성분을 제거한 다음 건조하였다. 이 샘플을 HPLC로 분석하였다. 준비된 시료를 0.45 μ m filter로 여과한 다음 HPLC에 5 μ l를 주입하여 분석하였으며, Sugar Pak 컬럼을 사용하여 탄수화물을 분리하고 RI로 detection 하였다.

4. 아미노산 성분 분석

Cap tube에 동결 건조된 흰목이버섯 3 g을 넣고 미리 조제된 개미산 20 ml을 가하고 마개를 닫았다. 4°C의 냉장고에 넣고 15시간 정도 방치한 후 시료를 꺼내어 회전농축증발기에 cap tube를 연결하여 50°C에서 개미산을 휘발시켜 농축하였다. 6N HCl 40 ml를 가한 후 시험관 내부의 산소를 제거하기 위하여 질소 gas를 약 1분간 주입하여 공기를 치환하였고 110°C dry oven에서 24시간 방치하여 가수

분해가 이루어지도록 하였다. 가수분해가 끝나면 회전농축증발기에 감압 농축하여 염산을 증발시켰다(2회 반복). 완전히 증발 시킨 후 증류수를 약 40 ml 가하여 용해시킨 다음 여과지로 여과하여 50 ml 용량플라스크로 정용하여 아미노산 자동 분석기로 분석하였다.

아미노산 분석을 위하여 시료 10 g을 75% 에탄올 100 ml를 가하여 환류장치로 80°C에서 15분간 추출한 다음 이 과정을 2~3회 반복 추출하였다. 각 추출물은 합하여 75% 에탄올을 가하여 250 ml로 정량한 다음 -20°C에서 1일간 보관하였다. 침전이 생기면 원심분리하여 상층액을 얻어 감압농축한 후 아미노산 분석 시료로 사용하였다. 아미노산은 Pico-tag 법에 따라 분석하였다.

5. 페놀 및 플라보노이드 함량분석

흰목이버섯(KG 103)의 총 페놀함량을 측정하기 위하여 Folin-Denis방법을 사용하였다. 메탄올 추출 시료용액 1 ml에 3차 증류수 3 ml을 첨가한 후 Folin & Ciocalteu's phenol reagent 1 ml를 넣고 5분간 27°C의 shaking bath에서 혼합하였다. 혼합한 용액을 10% Na₂CO₃ 용액 1 ml을 넣어 다시 혼합한 다음 한 시간 방치 시킨 후 640 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 caffeic acid, chlorogenic acid, catechin, ferulic acid을 이용하여 작성된 표준곡선을 이용하여 총 페놀 함량을 계산하였다.

흰목이버섯(KG 103)의 총 플라보노이드 함량을 Nieva Moreno 등(2000)의 방법에 의해 측정하였다. 메탄올 추출 시료용액 2 ml에 용매를 농축하여 날린 후 80% 에탄올 1 ml에 녹인 후 100 µl를 취하여 10% aluminum nitrate 100 µl, 1 µM potassium acetate 100 µl, 그리고 80% 에탄올 4.7 ml을 혼합한 후 실온에서 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로 부터 함량을 구하였다.

9절. 흰목이버섯 추출물의 주요 생리활성

1. 유효성분 추출법 확립

흰목이버섯 자실체의 추출을 다음과 같이 3가지 추출법에 의하여 행해졌다 (Fig. 2-1). 첫 번째 추출법 (I)에서는 동결 건조한 흰목이버섯 100 g을 분쇄기를 사용하여 분말로 만든 후, 10배에 해당하는 메탄올을 첨가하여 24시간 동안 상온에서 추출을 한 후 여과하였다. 메탄올 추출물을 물에 현탁시킨 뒤, 헥산(hexane), 클로르포름(CHCl₃), 에틸아세테이트(EtOAc), 부탄올(*N*-BuOH)순으로 극성차이에 따른 용매분획을 하여 여과한 다음 감압농축하여 얻은 각각의 분획물을 시료로 사용하였다. 두 번째 추출법 (II)에서는 환류냉각기를 부착한 플라스크에 시료중량의 10배의 에테르(Ether), 에틸아세테이트(EtOAc), 클로르포름, 에탄올(EtOH), 그리고 물(H₂O) 순으로 가하여 수욕상에서 가온 추출하였다. 불순물을 제거하기 위하여 Whatman filter paper No.4 여과지로 여과한 다음, 감압농축하여 각각의 추출물 시료로 사용하였다. 세 번째 추출법(III)은 (II)와 같은 방법으로 클로르포름과 에테르의 순서를 바꿔 추출한 뒤 각각의 추출물 시료로 사용하였다.

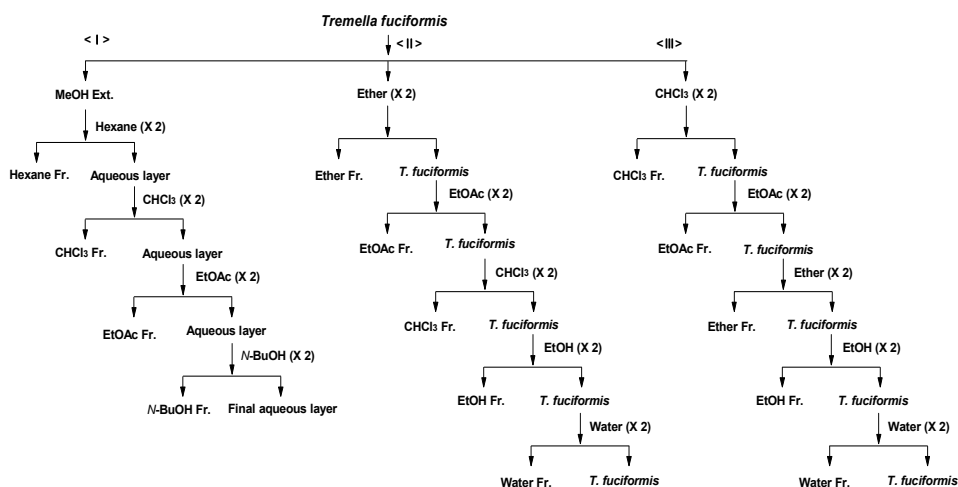


Fig. 2-1. Sequential extraction system for the preparation of extracts

10절. 항암활성 규명

1. 암세포 배양

DLD-1(결장암), LOX-IMVI(피부암), LXFL-529(폐암) RKO(대장암), SNB-19(뇌암), SNU-1(위암)의 6가지 세포가 사용되었으며, SNB-19을 제외한 나머지 세포들의 배양을 위하여 RPMI-1640(Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS)를 혼합하고 sodium bicarbonate, HEPES, P/S(penicillin / streptomycin)(Grand Island, NY, USA)을 첨가한 배지를 준비하였다. SNB-19의 배양을 위하여 DMEM(Grand Island, NY, USA)에 10% FBS를 혼합하고 sodium bicarbonate, HEPES, P/S을 첨가한 배지를 준비하였다. 암세포를 CO₂ (5%) incubator에서 37°C로 배양하였으며, 배양 후 trypsin 용액을 사용하여 세포를 분리하였다.

2. MTT assay를 이용한 세포 성장률의 측정

암세포 독성을 측정하기 위하여 각각의 암세포를 96 well plate에 10⁴으로 분주하고 각각의 sample을 dimethylsulfoxide (DMSO)(Sigma, MO, USA)에 녹여 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, 1000 ppm으로 처리하였다. 72시간 배양 후 배지를 제거하고 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT)(Sigma, MO, USA)를 첨가한 후 37°C, CO₂ (5%) incubator에서 5 hr 배양 후 0.01 N HCl/isopropyl alcohol을 첨가하여 micro plate reader(Bio-Red, 3550, USA)를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험을 3번 반복 한 후 평균값으로 그 결과를 나타내었다. IC₅₀는 추출물을 처리하지 않은 실험군에 비하여 처리한 실험군의 흡광도를 50% 감소시키는 농도로 하였다.

3. 항산화물질 규명

흰목이버섯(*T. fuciformis* KG 103) EtOH추출물 및 정제된 생리활성물질들의 DPPH radical에 대한 소거능력을 Blois 방법에 의해 측정하였다. 흡광도 값이 0.95~1.00의 DPPH solution과 추출물들을 혼합하여 37°C에서 30분간 방치한 후 518nm에서 UV/Vis spectrophotometer(Uvikon 933, Milan, Italy)로 흡광도를 측정하였다.

4. α - α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl radicals(DPPH)의 소거활성

흰목이버섯(*T. fuciformis* KG 103)의 DPPH radical에 대한 소거능력을 Blois 방법에 의해 측정하였다. 흡광도 값이 0.95~1.00의 DPPH solution과 추출물들을 혼합하여 실온에서 10분간 방치한 후 518 nm에서 UV/Vis spectrophotometer로 흡광도를 측정하였으며, 각 시료 추출물의 유리 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀값으로 나타내었다.

5. SOD 유사활성

흰목이버섯(*T. fuciformis* KG 103)에 대한 효소계 시스템에서의 라디칼 소거능을 측정하고자 SOD 유사활성 검색하였다. Superoxide 라디칼($\cdot O_2^-$) 소거활성은 Iio 등 (1985)의 방법에 따라 xanthine-xanthine oxidase cytochrome C 환원법으로 측정하였다. 즉, 시료 0.2 ml, 50 mM PBS(phosphate buffered saline) 완충용액(pH 7.8) 1.2 ml, 1 mM xanthine 0.2 ml와 0.05 mM cytochrome C 0.2 ml를 혼합하였다. 여기에 550 nm에서 분당 흡광도의 변화가 0.02가 되도록 희석한 xanthine oxidase 0.2 ml를 가하여 3분간의 흡광도 변화를 측정하였다. 이때 superoxide anion의 소거능은 아래의 식으로부터 구하였다.

$$\text{Superoxide anion scavenging activity} = \left(1 - \frac{\text{Abs}}{\text{Abs}_0}\right) \times 100$$

Abs₀ : absorbance of control at 550 nm

Abs : absorbance after sample treatment at 550 nm

6. ABTS radical 소거활성

흰목이버섯(*T. fuciformis* KG 103)의 ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS+ \cdot cation decolourisation assay방법에 의하여 시행하였다. 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 방치하여 ABTS \cdot 을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70(± 0.02)이 되게 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 용액과 추출물들을 혼합하여 실온에서 1분간 방치 후 흡광도를 측정하였으며, 각 시료 추출물의 유리 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀값으로 나타내었다.

7. Macrophage 활성화능 (Macrophage lysosomal enzyme activity)

6~8 주령의 ICR mouse의 복강에 5% thioglycollate medium을 2.5 ml 주사한 후 72~96시간 내에 유도된 복강 macrophage를 회수하여 RPMI 1640으로 2~3회 세척하고 세포수를 1×10^6 cell/ml로 조정하여 96well plate에 200 μ l씩 분주하였다. 이들은 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 배양하여 macrophage monolayer를 형성시키고 각 well에 시료를 첨가하여 24시간 배양한다. 활성화된 macrophage monolayer는 RPMI 1640으로 세척한 후, Triton X-100을 가하여 세포막을 용해하였다. Lysosomal phosphatase를 기질인 p-NPP와 반응시킨 후 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. Mitogen 활성 측정 (Splenic lymphocyte proliferation)

ICR mouse에서 비장을 적출하여 lymphocyte를 획득한 후 적혈구를 제거하고 RPMI 1640으로 2~3회 세척하여 세포수를 5×10^6 cell/ml이 되도록 조정하였다. 이때 얻어진 세포 부유액은 96 well plate에 90 μ l씩 분주하고 10 μ l의 시료용액을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양하며 그 증식 정도를 MTT(RPMI 1640 with 10% FBS) 방법을 통하여 mitogen 활성화능을 측정하였다. 각 well에 MTT용액을 첨가하여 5시간 배양 후, 형성된 MTT formazan의 양을 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. *Helicobacter pylori* 배양과 항균력 test

배지는 Muller-Hinton calf serum(MHCS)을 사용하였고, *Helicobacter pylori* 균체를 백금이로 접종 후 37°C CO₂ incubator에서 4일간 배양하였다. 4일간 배양된 균체 두 백금이를 9 ml의 생리 멸균수에 현탁을 하여 저해환 측정용 plate에 1.5 ml씩 분주하고, MHCS 배지로 pour planting을 실시하였다. 그 후 배지를 굳힌 다음 penicylinder 또는 paper disc를 올려놓았다. Methanol의 *Helicobacter pylori*에 대한 영향을 알아보기 위해 positive control로 200 μ l을 penicylinder 또는 paper disc에 주입하였으며 시료인 *T. fuciformis* KG 103 추출물을 30 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l씩 주입한 다음에 고온 다습한 37°C CO₂ incubator에 4일 동안 배양하여 agar diffusion method로 측정하였다.

11절. 흰목이 버섯 유효생리활성물질의 추출 및 분석

1. 유효성분 추출 최적화

흰목이 버섯의 항산화 물질 추출을 위한 최적화를 위하여 반응표면분석법을 이용하였으며, Design Expert (version 6, Minneapolis, MN, USA) software 모델의 Central composite design (CCD) program을 이용하여 실험계획을 수립하였다. 흰목이 버섯의 EtOH 추출시 EtOH의 농도, 추출 시 회전 속도 그리고 추출 시간 등을 독립변수로 3 level~3 factor의 fractional factorial block을 정하였다 (Table 2-6). 추출량, 항산화 활성, 그리고 총 페놀 함량을 종속변수로 설정한 후 각 독립변수 간의 관계를 다중회기분석 및 분산분석을 실시하였으며, 이를 반응표면분석법을 이용하여 등고 분석과 3차원 분석을 실시함으로써 최적 추출조건을 설정하였다.

Table 2-6. Fractional factorial block of experimental design

Serial No.	Independent variables		
	Concentration	RPM	Time
	$X_1(x_1)$	$X_2(x_2)$	$X_3(x_3)$
1	72.5 (0)	50 (-1)	48 (0)
2	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)
3	95 (1)	50 (-1)	72 (+1)
4	95 (1)	200 (+1)	24 (-1)
5	50 (-1)	125 (0)	48 (0)
6	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)
7	50 (-1)	50 (-1)	24 (-1)
8	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)
9	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)
10	72.5 (0)	200 (+1)	48 (0)
11	95 (1)	125 (0)	48 (0)
12	50 (-1)	200 (+1)	72 (+1)
13	72.5 (0)	125 (0)	24 (-1)
14	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)
15	72.5 (0)	125 (0)	72 (+1)

12절. 흰목이버섯 유효생리활성물질의 추출 및 분리, 정제

1. 추출 및 분획

동결 건조된 흰목이버섯 자실체 3 kg을 분쇄 한 후 약 30 L의 EtOH로 상온에서 추출한 후 1/5로 감압 농축하였다. 농축 되어진 액을 냉장상태에서 방치하여 미황색의 난용성 침전을 얻었으며, 용해된 용액은 여과를 거친 다음에 완전 농축하였다. 그 후 EtOH 추출물을 열수에 녹여 물 가용분획과 불용분획으로 나누었다. 수용성 분획은 다시 n-hexane을 이용하여 분리한 다음에 물 분획은 silica gel을 거친 뒤 HPLC로 compound 1, 2를 분리했으며, n-hexane은 HPLC로 compound 3~9을 분리하였다(Fig 2-1).

2. 활성분획의 정제 및 생리활성 측정

흰목이버섯 자실체의 EtOH 추출로부터 얻어진 분획 중 항산화 활성과 항암세포 활성을 보인 물질들을 silica gel column에 걸고 n-hexane : ethyl acetate 혼합 용매를 10 : 0 ~ 0 : 10로 비율의 변화를 주면서 분리한 뒤 HPLC를 이용하여 정제하였다. Crom-sil pack ODS preparative column (1.0×25cm)을 이용하여 acetonitrile-water (60:40, v/v) solution을 분당 4 ml의 유속으로 하여 picrate transfer 하는 compound를 분리하였다. 분리한 compound는 다시 Shiseido pack C₁₈ column을 이용하여 acetonitrile : water (70:30, v/v) solution을 분당 1 ml의 유속으로 정제하였다. 정제되어진 물질들의 생리활성은 DPPH를 이용하여 항산화 활성을 측정하였고, 항암세포 활성은 결장암 세포인 DLD-1을 사용하여 IC₅₀를 결정하였다.

13절. 흰목이버섯 유통 및 저장조건 확립

1. 흰목이버섯의 건조조건 확립

수확한 생버섯을 40°C, 50°C, 60°C, 70°C의 조건으로 열풍건조시켜 색차계 (ultraScan PRO, hunterLab, USA)를 이용하여 L(lightness), a(redness), b(yellowness)값을 구하여 명도가 제일 높은 조건을 최적의 건조조건으로 결정하였다.

2. 건조버섯의 최적포장재 선정

필름은 low density polyethylene film (이하 PE, 두께 0.05mm) 밀봉구, polypropylene film (이하 PP, 두께 0.05mm) 밀봉구, 진공포장지(PP+Nylon+PE) 밀봉구로 구분하여 25℃에서 저장하면서 색도를 측정하여 갈변현상이 가장 늦게 일어나는 것을 최적포장재로 결정하고자 하였다.

3. 생버섯의 저온저장시(5℃) 품질변화

생버섯을 진공포장하여 5℃에서 14일간 저장하면서 분석에 사용하였다.

4. 흰목이버섯의 coliform 측정

시료를 중량비 2배의 peptone water를 가하여 homogenizer로 60s 균질화시키고, 각각 1ml를 취하여 3M petrifilm에 plating하여 37℃에서 24시간 배양하여 2일 간격으로 coliform수를 측정하였다.

5. 흰목이버섯의 색도 측정

14일간 저장하면서 2일 간격으로 생버섯을 분쇄기를 이용하여 곱게 갈아서 랩을 씌운 후 색차계를 이용하여 측정하였다. 색도계는 보정판으로 표준화를 거친 후 사용하였으며, 매번 3개씩 선별하여 측정하여 평균값을 산출하였다.

6. 흰목이버섯의 경도 측정

흰목이버섯을 취하여 배지부분과 바로 인접된 뿌리부분을 검은색의 배지가 보이지 않도록 자른다. 1.5cm×1.5cm×1.5cm되게 잘라서 3토막을 취하여 Texture Analyser model HDi를 이용하여 측정하였다. 사용된 probe는 □2.0cm의 stainless steel rod형이며, 선반 이동속도는 0.5mm/sec, 이동거리 10%로 고정하였고, 측정결과는 force(g)로 표시하였다. 14일간 저장하면서 2일 간격으로 측정하였다.

14절. 흰목이버섯 소재 식품화

1. 흰목이추출물을 이용한 모델음료 제조 및 그에 대한 관능검사

건조된 흰목이를 분쇄하고, 10배량의 95% 에탄올을 가하여 25℃에서 48시간 추출한다. 여과하여 얻은 여액 중 에탄올을 휘발시키고, 99.9% 에탄올에 용해시켜 1000ppm농도가 되게 음료수에 가한다. 에탄올 추출을 거친 버섯을 미리 준비한 부직포주머니에 넣어 autoclaver를 이용하여 125℃에서 30분씩 3번 추출한다.(물 첨가량 1.5L/회) 추출물은 1000ppm농도가 되게 음료수에 첨가하였다.(에탄올 추출물의 항산화능은 500ppm에서 21.5%, 1000ppm에서 38.4%, 2000ppm에서 76.0% 였는데 2000ppm의 농도에서 사람들이 거부반응을 보였기에 1000ppm을 최적농도로 선정하였다.) 음료수의 배합조성은 Table 2-7에 나타내었다.

Table 2-7. Composition of model drink for the preparation of *T. Fuciformis* extract

조성(%)	열수	열수	열수	에탄올	에탄올	에탄올
	추출물	-배즙	-사과즙	추출물	-배즙	-사과즙
추출액	16.66	16.66	16.66	1.00	1.00	1.00
과즙	0.00	1.30	1.40	0.00	1.30	1.40
구연산	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
구연산Na	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
설탕	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
과당	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Vit C	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
정제수	70.09	68.79	68.69	85.75	84.45	84.35
합계	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

버섯음료수의 버섯음료의 맛을 증진하기 위하여 100% 사과즙 및 배즙을 첨가하여 과즙 미첨가구와 함께 비교하여 관능평가를 실시하였다. 관능평가는 품질지표가 될 수 있는 향, 신맛, 단맛, 전체적인 기호도를 7점 채점법에 따라 평가하였으며 조사패널은 중앙대학교 식품공학과 대학생 및 대학원생 25명을 대상으로 조사하였다. 조사한 결과는 SAS programe을 사용하여 ANOVA 분석 후 $\alpha=0.05$ 에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 그 유의성을 검증하였다.

제 3 장. 결과 및 고찰

<흰목이버섯 대량생산연구 : 위탁기관, 주관기관>

1절. 흰목이버섯 종균 배양법 개발 및 종균배지 최적화

1. 흰목이버섯과 공생균의 분리 및 동정

흰목이버섯균과 공생균의 채집을 위하여 경기도 홍천, 전라도 지리산, 강원도 치악산 등의 야산과 표고버섯 재배사 근처에서 야생 흰목이버섯을 수집하였으며, 다수의 흰목이버섯균과 공생균을 분리하였다. 분리된 균들 중 오염이 되지 않고 활력이 있는 균주를 선발하였다(KG 101, 102, 103, 104 균주 채집자 : 장현유, 이찬, 윤정원, 최성우). 우량균주의 균사생장에 가장 적합한 배지를 선발하고자 표와 같은 조성으로 배지를 조제하여 사용하였다. 각각의 배지는 고압 살균기로 121°C에서 20분간 살균하여 무균상내에서 1회용 무균 petri-dish(직경 9cm)에 25 ml씩 분주하여 접종원을 접종하였으며 25°C±2°C로 조절된 항온기에서 10일간 배양한 후 균총(colony)의 직경을 조사하였다.

한편, 한국 농촌진흥청에서 보관중인 *Tremella fuciformis* ASI 6041과 ASI 6042균을 비교 균주로 사용하였다.

2. 흰목이 버섯균주 선발을 위한 균사생장과 밀도

KG 101-104중 103균주가 PDA와 MCM배지에서 균사체 직경이 14.6 mm/14 days로 균사생장률이 가장 높았다. 4가지 균주 모두 PDA배지에서 균사생장과 밀도가 가장 높았으며, 그 다음은 MEA, YM, Czapek 순이었다. 공생균도 PDA에서 가장 왕성한 균사생장을 나타냈다(Table 3-1).

3. KG 103, KG 201의 ITS 5.8S rDNA sequencing

분리된 균주 중 KG 103균주와 KG 201균을 실험에 사용하였다. 두 균을 각각 PDA배지에서 배양한 후 ITS 5.8S rDNA sequencing 하여 유전자 서열을 분석한

후 Gene Bank Data homology search를 통하여 균주를 동정하였다.

Table 3-1. Mycelial growth and density of *T. fuciformis* KG 103 and *A. stygium* KG 201 at different media.

(mm/15 days)

Strains (KG)	Medium				
	PDA	MCM	YM	Czapek	MEA
101(강원도 홍천)	11.4	13.4	10.7	9.3	9.3
	++	+++	++	++	++
102(지리산)	10.8	11.8	10.9	8.6	9.4
	+++	+++	+++	++	+++
103(치악산1)	11.9	14.1	10.1	9.2	13.1
	+++	+++	+++	+++	+++
104(치악산2)	10.5	11.2	9.3	7.7	7.1
	+++	+++	+++	++	+++
201(강원도 홍천)	75	83	68	52	63

PDA : Potato Dextrose Agar, MEA : Malt Extract Agar, MCM : Mushroom Complete Media, YM : Yeast Extract Media

Mycelial density : +; Poor, ++; Good, +++; Excellent

분리된 균주는 흰목이버섯균인 *Tremella fuciformis* AF042409와 99%의 유전자 상동성을 나타내는 것으로 확인되었다. 분리된 공생균도 같은 방법으로 유전자 서열을 분석하였다.

4. 흰목이버섯균 (KG 103)의 ITS 5.8S rDNA sequencing

채집된 흰목이버섯균 5.8s rDNA의 ITS 유전자 서열은 다음과 같으며 Gene Bank Data homology search를 통하여 분리된 균주는 흰목이버섯균인 *Tremella fuciformis* AF042409와 99%의 유전자 상동성을 나타내는 것으로 확인되었다(Fig. 3-1, 3-2).

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGAGATTACACCGGGCCACGA
GGCCCTTCCAAACACCTGTGCACATCGGACCGCGCCCCGGGCCGGGCCG
CCTTCACACAAACATATGTCAAGAACGTAATGCATCATAACATGAAACAA
CTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
TTGCGAAAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACCTTGCGCCTTTTGGTATTCCGAAAGGCATGCCTGTTTGAGTGT
CATGTAGACTCAACCCCTGGGTTTCTGACCCGGCGGTGTTGGATTTGGG
CCCTGCCTCTCTGGCTGGCCTTAAATGCGTTAGTGGTTTCACGCAGACGT
CGTAAGTTACGCGTCGACTGTGGGCCGCTCACAACCCCTTTACTTTTGC
ACTCTGGCCTCAAATCAGGTAGGGCTACCCGCTGAACTTAAGCATATC

Fig. 3-1. ITS-5.8S rDNA sequence of KG 103

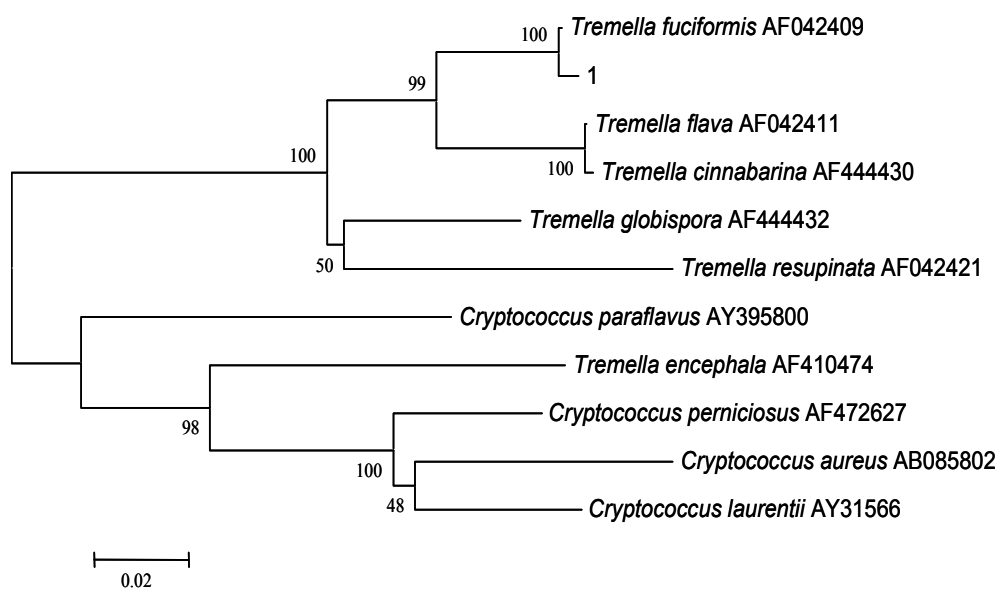


Fig. 3-2. Phylogenetic analysis of ITS-5.8S rDNA sequence of strain KG103 (1: KG 103).

5. 공생균 KG 201의 ITS 5.8S rDNA sequencing

분리된 공생균을 PDA배지에 배양한 후 ITS-5.8S rDNA sequencing을 하여 유전자 서열을 분석하였다. 이 rDNA의 유전자 서열은 다음과 같으며 Gene Bank Data homology search를 통하여 분리된 균주는 흰목이버섯 공생균인 *Hypoxyylon sp.*(*Annulohypoxyylon stygium* AJ390406)와 유전자 서열상 99% 상동성을 보여주는 것으로 확인되었다(Fig. 3-3).

```
CTGAGTTATCAAAAACCTCCAACCCTTTGTGACCTACCTATGTTTCCTCCG
GCGTACCGCTTTAGCCTACCCACAGGGCTCCCCTAAGGGGGGGTTCTGCT
GGGGAGGTGCCTGAGTGCTACCCATCCTTCGGGGTACGGTTAGTGCAGTG
AAGGTGCTGACCAAGGCCTCGGCGGCGCCGAGTAGGACCGCTCCAAACTT
AAGCACCTAGTGCATCCAACCCCGCGTTGAACAACCTATCGAAAATCTGCT
TTTGCTTTTTTTTCTTTACGCTAAAACGCTTTTCCTGGTTGGAATTATTGC
TCGAAATAATAATTTCTTTACCCCTGCAGTCGTTTGTTCCTCAAGCTACAAT
ATCTGCTCGAAAATTGTTCAAAGCTCTGAGGGGTCTGAATGAATTCATAA
AATTGGCAAAAAGCCACCTATAAACTACGGTTCTTAGGGGGTGATCAAACC
AAGGTTTTTAAAAACCAAATACGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG
TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG
CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGT
ATTCTAGTGGGCATGCCTATTCGAGCGTCATTACAACCCCTTAAGCCTTGT
AGCTTAGCGTTGGGAATCTACCCCTCACTGAGGGGTAGTTCCTTAAATTT
AGTGGCGGGGTTATAGCACACTCTAAGCGTAGTAGTTTAACTCGCTTTCA
GGGAGGCTGTAGCTGCTTGCCGTAAAACCCCTATAACTTATAGT
```

Fig. 3-3. ITS-5.8S rDNA sequence of symbiotic fungi (KG 201)

분리된 공생균을 PDA배지에 배양한 후 ITS-5.8S rDNA sequencing을 하여 유전자 서열을 분석하였다. 이 rDNA의 유전자 서열은 다음과 같으며 Gene Bank Data homology search를 통하여 분리된 균주는 흰목이버섯 공생균인 *Annulohypoxyylon stygium* AJ390406 과 유전자 서열상 99% 상동성을 보여주는 것으로 확인되었다(Fig. 3-4).

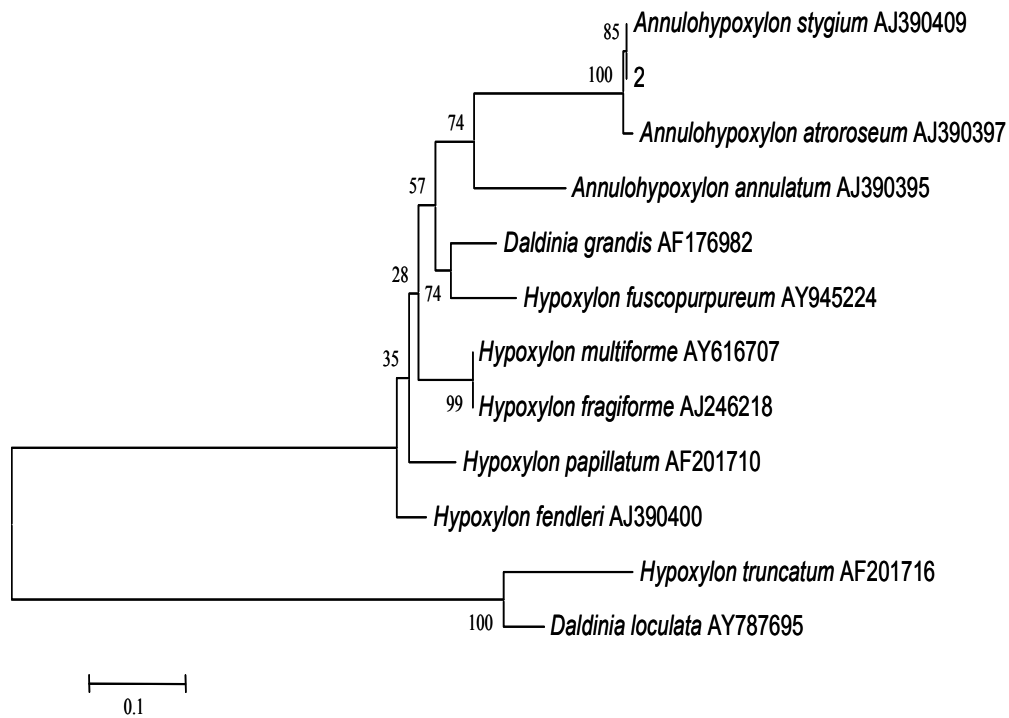


Fig. 3-4. Phylogenetic analysis of ITS-5.8S rDNA sequence of symbiotic *Hypoxylon* sp. (KG 201).

2절. 흰목이버섯균(KG 103)과 공생균 KG 201의 고체배양

1. 우량균주 배지 선발

분리된 *T. fuciformis* KG 103 공생균주를 PDA 배지에 28℃ 항온기에서 5일간 배양하였으며, bacteria를 배양할때 처럼 scratching하여 배양한 후 내경이 6mm cork borer로 찍어 떼어낸 절편을 접종원(T)으로 사용하였다. 같은 방법으로 분리된 공생균 (KG201)을 배양하고 접종원으로 사용하였다(H). 한편 *T. fuciformis* KG 103을 PDA 배지에 10일간 배양한 다음 그 위에 공생균 KG 201을 접종하고

다시 10일간 배양하여 혼합균의 접종원(T + H)으로 사용하였다(Fig. 3-5).

흰목이버섯 공시균주의 균사생장은 MCM배지에서 14mm/10일로 가장 우수하였고 OA, SA, Czapek배지는 저조하였다. 흰목이의 공생균 및 흰목이 공시균주와 공생균을 혼합배양한 균은 흰목이에 비해 균사생장이 현저히 왕성하였으며 역시 MCM배지에서 각각 85mm/10일로 가장 우수하였고, OA, SA, Czapek배지는 저조하였다. Quimio(1981)에 의하면 목이버섯(*Auricularia* spp.)은 glucose, yeast extract, kauffmans, potato dextrose, V-8 juice agar를 첨가하였을 때 균사생장이 우수하다고 하였으며, 장(1997)에 의하면 장수버섯(*Fomitella fraxinea*)균사량은 MCM배지에서 균사생장이 가장 저조한 특징이 있었다고 보고한 바 버섯균사에 따라 최적배지는 상반되는 경우가 있었으며 또한 흰목이버섯균에 공생균을 혼합배양하면 공생균 단독배양한 것과 비교하면 거의 비슷하거나 약간 양호한 균사생장을 나타내었다(Table 3-2).

Table 3-2. Mycelial growth of *T. fuciformis*, *Hypoxylon* sp. and co-cultured fungi at different media

(mm/10 days)

	Culture media						
	PDA	MCM	YM	Czapek	MEA	OA	SA
<i>T. fuciformis</i>	12 ^b	14 ^a	12 ^b	9 ^c	13 ^{ab}	8 ^c	8 ^c
<i>Hypoxylon</i> sp.	81 ^{bc}	85 ^a	81 ^{bc}	78 ^c	83 ^{ab}	81 ^{bc}	81 ^{bc}
Co-culture	83 ^b	85 ^a	82 ^b	79 ^c	83 ^b	79 ^c	78 ^c

* Radial growth(mm) of colony after 10 days in 9cm petri-dish and represent the average of five separate cultures for each treatment.

* The different letters(a, b, c, d) differ significantly(p=0.05) according to Duncun's multiple range test.

A) KG 103



B) KG 201



Fig 3-5. Growth of *T. fuciformis* KG 103 and its symbiotic strain KG 201 on different agar media.

2. 흰목이버섯균(KG 103)과 공생균(KG 201)의 고체 배양최적온도

흰목이버섯균(KG 103)의 균사체 생육은 25°C에서 14mm/14days로 가장 양호하였으며 35°C이상 고온과 15°C이하 저온에서는 현저하게 균사 생장이 억제됨을 관찰할 수 있었다. 그리고 공생균(KG 201)은 흰목이버섯균과 유사한 온도 범위에서 양호 하였으며 20°C~30°C까지 양호하게 성장하는 것을 관찰할 수 있었다.

Huang (1982)이 *T. fuciformis*의 균사는 25~26°C의 범위에서 잘 자랐으며 최적배양 온도는 23~28°C라고 보고한 것과 거의 일치하는 결과를 얻었다(Table 9, Fig. 11). 또한 차(1981)에 의하면 목이버섯(*Auricularia auricuala-Judae*)의 균사 성장 최적온도는 30°C라고 보고하였으며 Cheng과 Hou (1975)는 24~30°C, Quimio (1981)는 28°C라고 보고한 것과 같이 흰목이버섯균보다 목이버섯균이 고온성을 나타내었다.

Table 3-3. Mycelial growth of *T. fuciformis* KG 103 and *A. stygium* KG 201 on PDA at different temperatures.

(mm/14 days)

Strain	Temperature (°C)				
	15	20	25	30	35
<i>T. fuciformis</i> KG 103	3±1	12±2	14±2	11±1	2±1
<i>A. stygium</i> KG 201	43±2	75±2	86±4	70±5	34±2

Radial growth(mm) of colony after 14 days in 9 cm petri-dish and represent the average of five separate cultures for each treatment.

3. 흰목이버섯균 (KG 103)과 공생균(KG 201)의 고체배양 최적 pH

흰목이버섯균 (*T. fuciformis* KG 103) 균주는 pH 5.0에서 14 mm/14 days으로 최대의 균사생장을 나타내었으며, 비교적 낮은 pH에서 잘 자라는 경향이 관찰되었다. 그리고 pH 6.0이상에서부터 균사의 증식이 급격히 억제됨을 관찰할 수 있었다(Table 3-4). 공생균인 KG 201 균주도 흰목이버섯 균주와 마찬가지로 pH 5.0에서 86 mm/14 days의 최대 균사생장을 나타내었다. 그리고 흰목이버섯균과 유사한 pH 4.0~pH 6.0 사이의 산성 pH가 생육에 필요하다고 분석되었다.

Chang(1997)이 흰목이버섯균은 pH 5.5에서, 공생균은 pH 5.0에서 균사생장이 가장 양호하였다고 보고한바와 같이 유사한 결과를 얻었으며, Chen과 Hou(1978)가 흰목이 균사생장의 pH범위는 pH 5.2~7.2이나 최적산도는 pH 5.2~5.8이라고 보고한 것과 거의 일치하는 결과이었다. 목이버섯의 경우 균사체 성장에는 pH 6.5~7.5의 약간 높은 최적 pH를 나타낸다고 보고되었다(Khan 등, 1991).

Table 3-4. Mycelial growth of *T. fuciformis* KG 103 and *A. stygium* KG 201 on the basal medium at different pH ranges.

(mm/14 days)

Strain	pH						
	4.0	5.0	5.5	6.0	7.0	8.0	9.0
<i>T. fuciformis</i> KG 103	13±2	14±1	11±3	7±1	5±1	3±1	2±1
<i>A. stygium</i> KG 201	78±4	86±5	84±3	74±5	46±3	21±2	13±1

Radial growth(mm) of colony after 14 days in 9 cm petri-dish and represent the average of five separate cultures for each treatment.

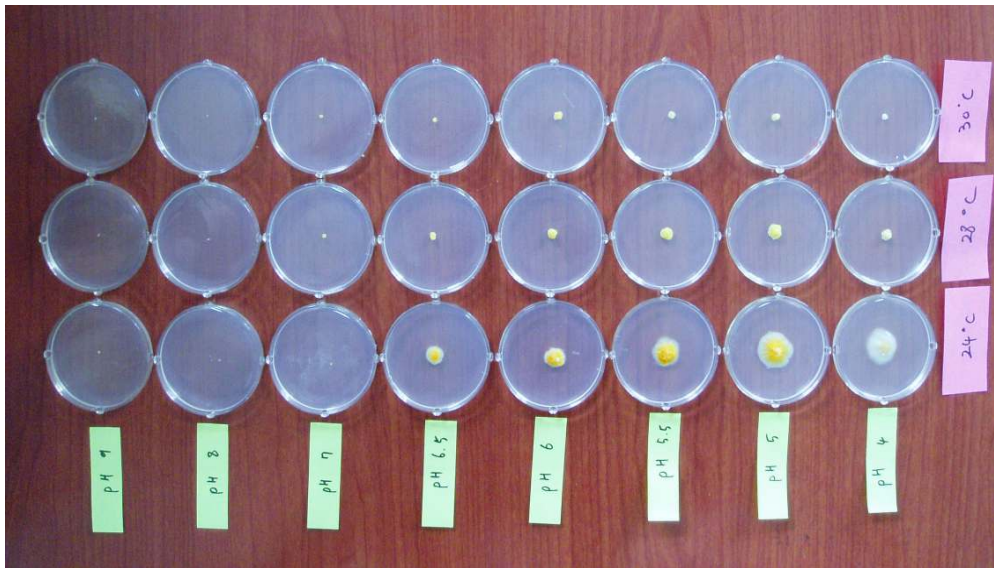


Fig. 3-6. Growth of *T. fuciformis* KG 103 at various temperatures and pHs.

3절. 액체배양 최적화

1. 흰목이버섯균 (KG 103)과 공생균(KG 201)의 균사체 액체 배양 최적화

흰목이버섯 공생균주(*T. fuciformis* KG 103)는 30°C에서 21mg/15일, 공생균 및 흰목이버섯균과 혼합배양한 균은 25°C에서 각각 330mg /15일, 308mg/15일로 가장 양호하였다. Huang(1982)이 *T. fuciformis*의 균사는 5~38°C의 범위에서 자라며 최적배양 온도는 23~28°C라고 보고한 것과 거의 일치하는 결과를 얻었으며 35°C 이상 고온과 15°C 이하 저온에서는 현저하게 균사생장이 저조하였고 공생균 단독 배양한 것보다 공생균과 흰목이버섯균을 혼합배양하면 상승효과가 있어 균사생장이 보다 촉진되었다(Table 3-5). 또한 차(1981)에 의하면 목이버섯 (*Auricularia auricuala-Judae*)의 균사생장 최적온도는 30°C라고 보고하였으며 Cheng과 Tu(1975)는 24~30°C, Quimio(1982)는 28°C라고 보고한 바 흰목이버섯

균보다 목이버섯균이 고온성을 나타내었다.

Table 3-5. Mycelial growth of *T. fuciformis* on the basal medium at different temperatures

(mg/25ml/15 days)

Strain	temperature (°C)				
	15	20	25	30	35
T	5 ^d	9 ^c	17 ^b	21 ^a	11 ^c
H	101 ^d	236 ^c	308 ^a	254 ^b	96 ^e
T + H	243 ^d	317 ^c	330 ^a	326 ^b	132 ^e

Mycelial density : +; Poor, ++; Good, +++; Excellent

* The different letters(a, b, c, d) differ significantly(p=0.05) according to Duncun's multiple range test.

2. 액체배양 최적 pH

흰목이버섯 공시균주(*T. fuciformis* KG 103)는 pH 5.5에서 27mg/15일, 혼합균은 pH 5.5에서 342mg/15일, 공생균은 pH 5.0에서 310mg/15일로 균사생장이 가장 양호하였으며 혼합균이 흰목이버섯균 단독으로 배양한것이나 공생균보다 각 pH에서 균사생장이 훨씬 양호하였다(Table 3-6).

이는 Chen Hou(1978)가 흰목이 균사생장의 pH 범위는 5.2~7.2이나 최적산도는 5.2~5.8이라고 보고한 것과 거의 일치하는 결과이었다. 그러나 목이버섯은 pH 6.5~7.5가 최적이다(Borromeo, 1967)고 하여 흰목이버섯 균사는 훨씬 산성쪽에서 균사생장이 우수한 특징이 있었다.

Table 3-6. Mycelial growth of *T. fuciformis* on the basal medium at different pH ranges

(mg/25ml/15 days)

Strain	pH								
	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
T	5 ^f	9 ^{de}	11 ^d	27 ^a	20 ^b	18 ^b	14 ^c	8 ^e	3 ^f
H	95 ^g	236 ^e	310 ^a	306 ^b	274 ^c	257 ^d	172 ^f	96 ^g	84 ^h
T + H	103 ^h	249 ^e	330 ^b	342 ^a	292 ^c	284 ^d	176 ^f	125 ^g	95 ⁱ

* The different letters(a, b, c, d) differ significantly(p=0.05) according to Duncun's multiple range test.

3. 탄소원의 선발

흰목이버섯 공시균주(*T. fuciformis* KG 103)는 환원성 2당류인 maltose와 lactose를 첨가한 배지에서 균체량이 41~43mg/15일로 가장 양호하였으며 전분을 화학적이나 효소적 방법으로 저분자화한 dextrin을 첨가한 배지에서 18mg/15일로 가장 저조하였다. 혼합균, 공생균 모두 2당류인 maltose를 첨가한 배지에서 각각 357mg, 328mg/15일로 가장 양호하였고 당 alcohol의 일종인 manitol를 첨가한 배지에서 각각 330mg, 307mg/15일 가장 저조하였다(Table 3-7). 이 결과는 목이버섯이 glucose, fructose, galactose 첨가 배지에서 균사생장이 우수하였으며 lactose 첨가 배지에서 가장 저조하였다고 보고 (Bais et al. 1970) 한바 흰목이버섯과는 상반되는 결과이었다.

Table 3-7. The effects of carbon sources on mycelial growth of *T. fuciformis* in liquid culture

(mg/25ml/15 days)

Strain	Carbon source									
	Cont	GL	XY	AR	SU	LA	MA	MAN	CE	DE
T	0 ^f	28 ^c	21 ^d	35 ^b	37 ^b	41 ^a	43 ^a	26 ^c	20 ^{de}	18 ^e
H	0 ^f	312 ^d	317 ^c	310 ^{de}	320 ^c	324 ^b	328 ^a	307 ^e	327 ^{ab}	320 ^c
T + H	0 ^g	346 ^d	350 ^c	339 ^e	353 ^b	349 ^c	357 ^a	330 ^f	350 ^c	342 ^e

* Cont: control, GL: glucose, XY: xylose, AR: arabinose, SU: sucrose, LA: lactose, MA:

maltose, MAN: manitol, CE:: cellulose, DE: dextrin

* The different letters(a, b, c, d) differ significantly(p=0.05) according to Duncun's multiple range test.

4. 질소원의 선발

흰목이버섯 (*T. fuciformis* KG 103), 혼합균, 공생균 모두 oligopeptide, amino acid를 주성분으로하는 복합질소원인 peptone을 첨가한 배지에서 각각 56mg, 367mg, 362mg/15일로서 가장 양호하였으며, 흰목이버섯균과 혼합균은 암모니아태 무기태 질소원인 ammonium chloride를 첨가한 배지에서 28mg, 332mg/15일, 공생균은 단백질을 구성하는 염기성 아미노산의 일종인 arginine을 첨가한 배지에서 326mg/15일로 가장 저조하였다(Table 3-8).

목이버섯균의 최적 질소원은 peptone과 ammonium nitrate이며 ammonium sulphate이 가장 저조하였다고 보고(Bais et al. 1970)하여 흰목이버섯균과 비슷한 경향이였으나 버섯균사 생장에 알맞은 합성배지를 만들때 주로 유기태 질소가 사

용되나 무기태 질소를 사용할 경우는 대체적으로 암모니아태 질소가 질산태 질소보다 유리하다고 보고한것(홍과 강, 1983)과는 달리 흰목이버섯균과 혼합균은 암모니아태 무기태 질소원인 ammonium chloride를 첨가한 배지에서 저조한 생장을 나타내는 특징이 있었다.

Table 3-8. The effects of nitrogen sources on mycelial growth of *T. fuciformis* in liquid culture

(mg/25ml/15 days)

Strain	Carbon source									
	Cont	AT	UR	AC	SO	PE	Ala	Tyr	Arg	Gln
T	7.5 ^h	44 ^d	47 ^c	28 ^g	31 ^f	56 ^a	50 ^b	46 ^{cd}	40 ^e	39 ^e
H	12 ⁱ	347 ^c	352 ^b	336 ^e	332 ^{fg}	362 ^a	342 ^d	335 ^{ef}	326 ^h	330 ^g
T + H	14 ^g	349 ^b	351 ^b	332 ^f	339 ^e	367 ^a	344 ^{cd}	341 ^{de}	339 ^e	345 ^c

* Cont: control, AT: ammonium tartrate, UR: urea, AC: ammonium chloride, SO: sodium nitrate, PE: peptone, Ala : alanine, Tyr : tyrosine, Arg : arginine, Gln : glutamine.

* The different letters(a, b, c, d) differ significantly(p=0.05) according to Duncun's multiple range test.

5. 유기산의 선발

효모, 세균의 발효 생산물의 하나이며 fumaric acid의 환원에 의하여 생기는 succinic acid를 첨가하였을때 흰목이버섯 공시균주(*T. fuciformis* KG103)의 균사생장은 68mg/15일로 가장 양호하였으며 oxalic acid, propionic acid, acetic acid 첨가 배지에서 저조한 경향이 있었으며, 혼합균과 공생균의 균사생장은 단백질을

구성하는 산성 아미노산의 일종인 glutamic acid를 첨가한 배지에서 각각 379mg, 376mg/15일로 가장 양호하였으며 혼합균은 oxalic acid, propionic acid, maleic acid, acetic acid를 첨가한 배지에서 가장 저조하였고 공생균은 maleic acid, lactic acid, acetic acid를 첨가한 배지에서 가장 저조하였다(Table 3-9). 흰목이버섯균, 혼합균, 공생균 모두 acetic acid를 첨가한 배지에서 균사생장이 저조한 결과를 나타내는 특징이 있었다.

Table 3-9. The effects of organic acids on mycelial growth of *T. fuciformis* in liquid culture

Strain	Organic acid									
	Cont	AC	CI	GLUC	Glu	LA	MA	OX	PR	SU
T	57 ^e	58 ^{de}	63 ^{bc}	64 ^b	60 ^{c-e}	61 ^{b-d}	60 ^{c-e}	59 ^{de}	59 ^{de}	68 ^a
H	361 ^e	365 ^d	373 ^b	374 ^{ab}	376 ^a	364 ^{de}	364 ^{de}	366 ^{cd}	367 ^{cd}	369 ^c
T + H	366 ^d	368 ^{cd}	376 ^b	374 ^b	379 ^a	370 ^c	368 ^{cd}	367 ^{cd}	367 ^{cd}	375 ^b

* Cont : control, AC : acetic acid, CI : citric acid , GLUC : glucanic acid , Glu : glutamic acid, LA : lactic acid , MA : maleic acid , OX : oxalic acid , PR : propionic acid , SU : succinic acid

* The different letters(a, b, c, d) differ significantly(p=0.05) according to Duncun's multiple range test.

6. 비타민 선발

흰목이버섯 공시균주 (*T. fuciformis* KG103), 혼합균, 공생균의 균사생장은 모두 thiamine을 첨가한 배지에서 각각 71mg, 382mg, 381mg/15일로 가장 양호하였으

나 비타민의 종류에 의한 균사생장 차이는 탄소원, 질소원의 종류에 의한 차이보다 적은 특징이 있었다. 아미노산 대사에 관여하는 효소의 보조소로서 중요한 역할을 하는 pyridoxine과 coenzyme A의 성분인 pantothenic acid를 첨가한 배지에서 흰목이버섯균의 균사생장은 66mg/15일로 저조하였고 혼합균의 균사생장은 pyridoxine과 비타민 B군의 일종인 biotine을 첨가한 배지에서 387mg/15일로 저조한 경향을 나타내었다(Table 3-10). 공생균의 균사생장은 보조효소 NAD 및 NADP의 활성기인 nicothine amide, riboflavin, flavin nucleotide의 성분인 panthothenic acid, biotin을 첨가한 배지에서 374~375mg/15일로 비교적 저조하였으나 vitamin 종류간의 차이는 크지 않았다.

Table 3-10. The effects of vitamins on mycelial growth of *T. fuciformis* in liquid culture
(mg/25ml/15 days)

Strain	Vitamine							
	Cont	TH	BI	RI	PN	IN	NI	PA
T	63 ^d	71 ^a	68 ^{a-c}	69 ^{ab}	66 ^c	67 ^{bc}	69 ^{a-c}	66 ^c
H	372 ^c	381 ^a	375 ^{bc}	375 ^{bc}	379 ^a	376 ^b	379 ^a	374 ^{bc}
T + H	376 ^c	382 ^a	378 ^{bc}	379 ^{a-c}	378 ^{bc}	379 ^{a-c}	380 ^{ab}	379 ^{a-c}

* Cont : control, TH : thiamine.HCl, BI : biotine, RI : riboflavin, PN : pyridoxine, IN : inositol, NI: nicotine amide, PA : pantothenic acid

* The different letters(a, b, c, d) differ significantly(p=0.05) according to Duncun's multiple range test.

7. C/N비의 영향

흰목이버섯 공시균주(*T. fuciformis* KG103)의 균사생장은 C/N ratio가 20에서 78mg/15일로 가장 양호하였고 50에서 66mg/15일로 저조하였다. 혼합균의 균사생장은 C/N ratio가 30일때 394mg/15일로 가장 양호하였고 10일때 376mg/15일로

저조하였으며 공생균의 균사생장은 C/N ratio가 40에서 389mg/15일로 가장 양호하였으며 10에서 376mg/15일로 저조하였다(Table 3-11). 흰목이버섯균은 균사생장이 느리기 때문에 탄소원의 농도가 높은것을 그다지 좋아하지 않는 것으로 생각되며 한편 균사생장이 왕성한 혼합균과 공생균은 비교적 탄소원이 높은 30~40에서 균사생장이 왕성함을 확인하였다. Song등(1987)은 표고버섯균사는 C/N ratio가 30일때 양호하였다.

Table 3-11. The effects of C/N ratio on mycelial growth of *T. fuciformis* in liquid culture
(mg/25ml/15 days)

Strain	C/N ratio				
	10	20	30	40	50
T	73 ^b	78 ^a	73 ^b	70 ^c	66 ^d
H	376 ^d	379 ^{cd}	381 ^{bc}	389 ^a	384 ^b
T + H	376 ^e	382 ^d	394 ^a	390 ^b	386 ^c

* The different letters(a, b, c, d) differ significantly(p=0.05) according to Duncun's multiple range test.

8. 흰목이버섯균 및 *Hypoxylon* sp.의 생장곡선

흰목이버섯균은 배양 9일째 24 mg/25ml로 peak를 나타내고 그 이후의 생장은 완만한 상태를 유지하였다. 단백질 함량은 배양 8일째까지 급속히 0.69 μ g/ml로 증가하여 peak를 나타내고 그 이후 완만하게 감소하였다. O.D(optical density)는 배양 6일째 까지 급속히 상승하다가 8일째에 peak를 이루고 그 이후는 완만하게 감소하였다(Fig. 3-7(a)). *Ypoxylon* sp.의 균사생장은 배양 15일까지 계속 증가하여 14.6mg/25ml이 되었으나 배양 3일째부터 배양 11일째까지 생산 증가 속도가

급속히 증가하였고 그 이후는 완만한 증가를 나타내었다. *Hypoxyylon* sp.의 단백질 함량은 배양 11일째에 13.28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 가장 높았으나 그 이후 점차 감소하는 경향을 나타내었다. OD는 배양 10일째에 1.32로 가장 높았으며 그 이후 점차 감소하였다(Fig. 3-7(b)).

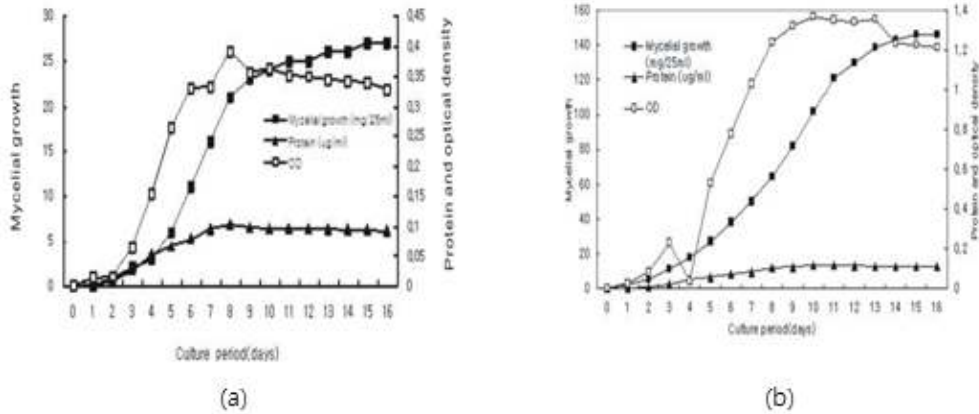


Fig. 3-7. Mycelial growth curve of *T. fuciformis* and *Hypoxyylon* sp.

4절. 흰목이버섯 발효기 진탕 액체배양 최적화

1. 플라스크 배양에서 최초 산도와 온도의 영향

EPS 생산과 셀 성장을 위한 적정온도를 찾기 위해 흰목이버섯은 25, 28, 31, 34 $^{\circ}\text{C}$ 에서 진탕배양되었고 34 $^{\circ}\text{C}$ 보다 높은 온도에서는 소수의 셀 건조중을 나타내었고 28 $^{\circ}\text{C}$ 와 기타 다른 온도에서는 차이가 없는 것으로 분석되었다(Fig. 3-8). EPS에 관련하여 온도 간에 차이가 별로 발생하지 않았다. 세포생장과 EPS 생산에 최초 pH의 영향을 조사하기 위하여 세포는 진탕 플라스크 배양에 다른 최초 산도(5.0~9.0)하에서 배양되었다. Fig. 3-9 에서 본바와 같이 배양초기에 pH값에 관련하여 세포생장에 유의차가 없었다. 큰 표준편차로 Fig. 3-9 는 EPS가 pH 8과 9에서 더 높았다.

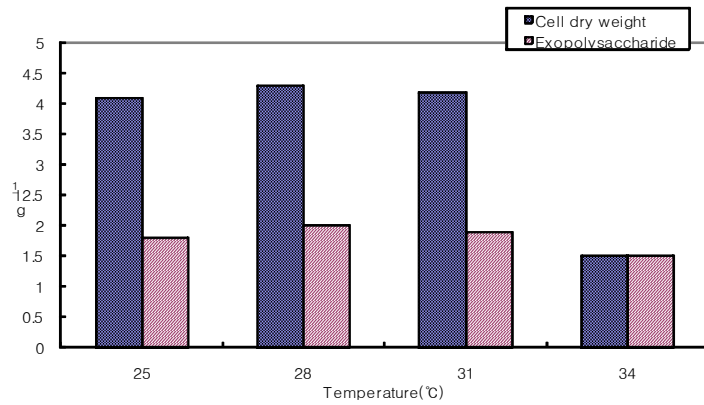


Fig. 3-8. Effect of temperature on the cell growth and exopolysaccharide production in shake flask culture of *T. fuciformis*

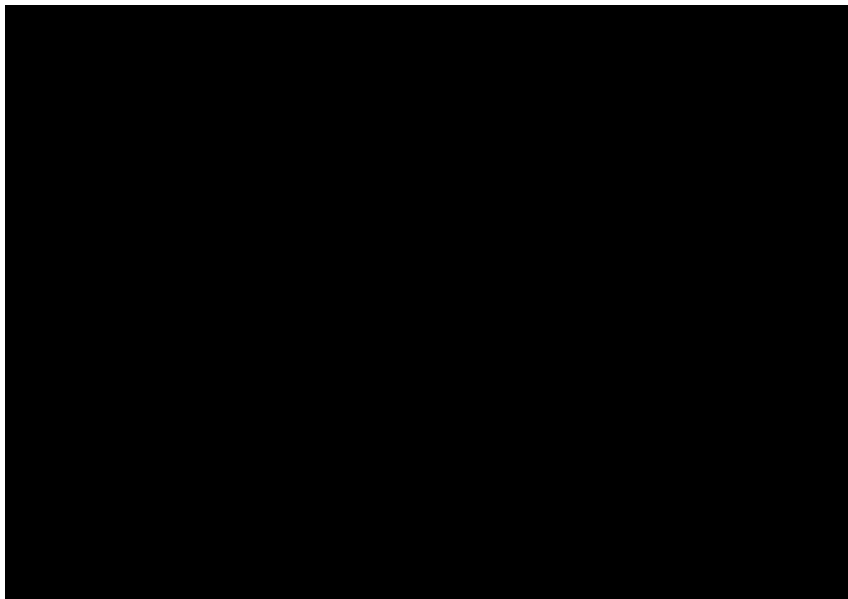


Fig. 3-9. Effect of pH on the cell growth and exopolysaccharide production in shake flask culture of *T. fuciformis*

2. 플라스크 배양의 적정한 배지구성 조합

셀 매스와 EPS의 생산에 있어서 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 여러 가지 탄소원은 20 g/L 농도에서 적당하였다. Table 3-12 에서 본바와 같이 세포 건조중과 EPS의 높은 수준은 glucose, fructose, sucrose가 탄소원으로 사용되었을 때 이었다. 테스트된 탄소원 중에서 셀매스의 최대 생산력은 20 g/L 글루코스를 함유한 배지에서 얻어졌다. 한편 EPS 생산력은 초기 글루코스 함량과 관련이 없었다. 한편 조사된 7가지 질소원 중 tryptone, soy peptone, meat peptone, yeast extract는 상대적으로 흰목이의 세포생장에 좋은 영향을 미쳤다(Table 3-12). 세포 매스와 EPS의 최대생산은 질소원으로서 트립토판 2 g/L이었을 때이었다. 유기질소원과 비교하여 무기질소원은 상대적으로 더 낮은 세포생장과 EPS 생산을 나타내었다(Table 3-12).

Table 3-12. Effect of carbon and nitrogen sources on cell growth and exopolysaccharide (EPS)production in shake-flask cultures of *Tremella fuciformis*

	Cell dry weight (g/L)	EPS (g/L)	Final pH
Carbon sources			
Glucose	6.35±0.22	1.43±0.10	6.29±0.02
Maltose	3.43±0.00	0.94±0.02	6.53±0.04
Fructose	6.04±0.28	1.43±0.16	6.09±0.02
Sucrose	5.64±0.24	1.22±0.02	6.70±0.04
Lactose	0.74±0.01	0.34±0.02	7.43±0.01
Mannitol	5.95±0.60	1.22±0.05	6.70±0.02
Sorbitol	3.57±0.30	1.04±0.35	6.79±0.02
Xylose	4.10±0.95	1.05±0.18	6.00±0.25
Nitrogen source			
Yeast extract	5.77±0.12	1.21±0.03	5.87±0.22
Tryptone	6.79±0.04	1.50±0.32	5.72±0.18
Polypeptone	2.31±0.05	0.80±0.04	5.90±0.14
Meat peptone	5.81±0.33	1.40±0.13	5.80±0.14
Soy peptone	6.35±0.64	1.40±0.13	5.80±0.14
Ammonium sulfate	1.89±0.12	0.32±0.12	4.33±0.34
Ammonium nitrate	2.08±0.03	0.39±0.11	4.60±0.86

* Fermentations were carried out in flasks for 3 days at 28°C with initial pH 8. Values are mean \pm S.D. of triple determinations.

3. 진탕 탱크배양 반응기의 진탕속도의 영향

진탕 바이오리액터의 진탕효과를 조사하기 위하여 세포는 3가지 진탕속도로 배양되었다. 최대 셀매스(7.03 g/L)와 EPS 생산(2.00 g/L)은 200rpm에서 얻어졌다 (Fig. 3-10). 50rpm 진탕속도에서 극히 용존산소의 낮은 값은 발효의 초기로부터 표시되었는데 그것에 대하여 셀매스와 EPS생산의 더 낮은 효율로 인도되었다 (Fig. 3-10). 셀매스와 EPS의 가장 높은 생산은 200rpm에서 얻어졌는데 소비 (YP/S)된 배지에서 EPS 효율과 특별한 성장률(μ)은 각각 0.25 d^{-1} 과 0.09 g/g 이었다.

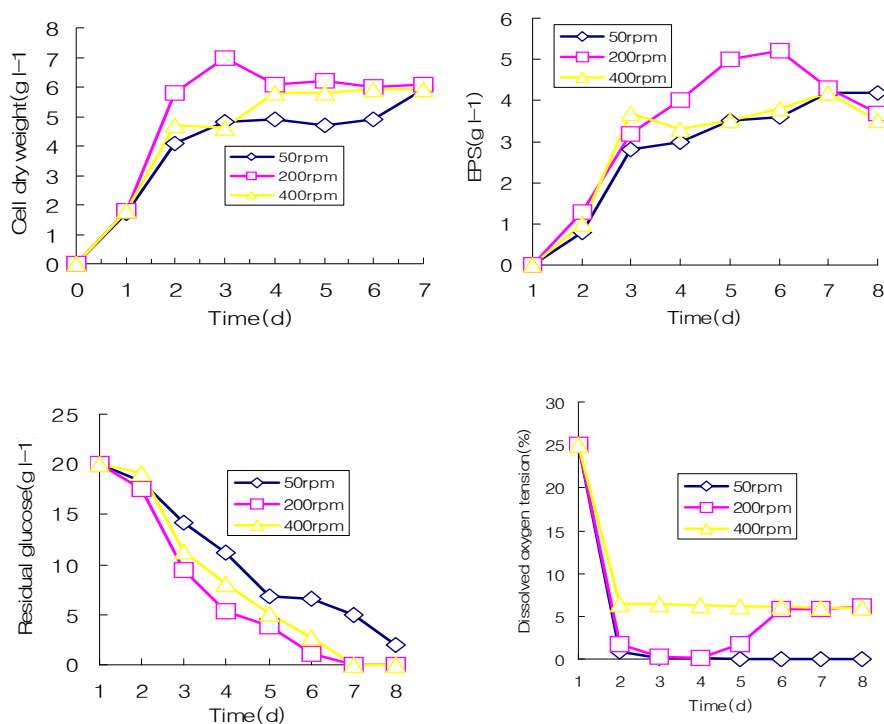


Fig. 3-10. Time profiles of Cell dry weight(g l⁻¹), EPS production(g l⁻¹), Residual glucose(g l⁻¹), and dissolved oxygen during submerged culture of *Tremella fuciformis* in a 5-L stirred-tank reactor at different agitation speeds.

4. 진탕 탱크배양 반응기의 공기주입율의 영향

EPS 생산과 세포생장에 관한 공기유통의 결정적인 영향은 Fig. 4와 같이 관찰되었다. 셀매스(10.12 g/L)의 높은 수준과 EPS 생산(2.32 g/L)은 2 vvm 공기 유통율에서 관찰되었다. 거의 완전한 당 고갈을 한 다른 두 가지 공기유통 조건(0.5과 1 vvm)은 4일후 2 vvm에서 관찰되었다(Fig. 3-11). 테스트된 모든 에어레이션 비율에서 용존산소는 2~3일에 약 0~10%로 발효 처음에 100%로부터 기울어지기 시작되었다. 2 vvm의 공기 유통율에만 용존산소 수준이 생장이 정지상에 들어가면서 급히 증가하였다. 용존산소 수준이 50%이상은 발효 말기를 향하여 유지되었다(Fig. 3-11).

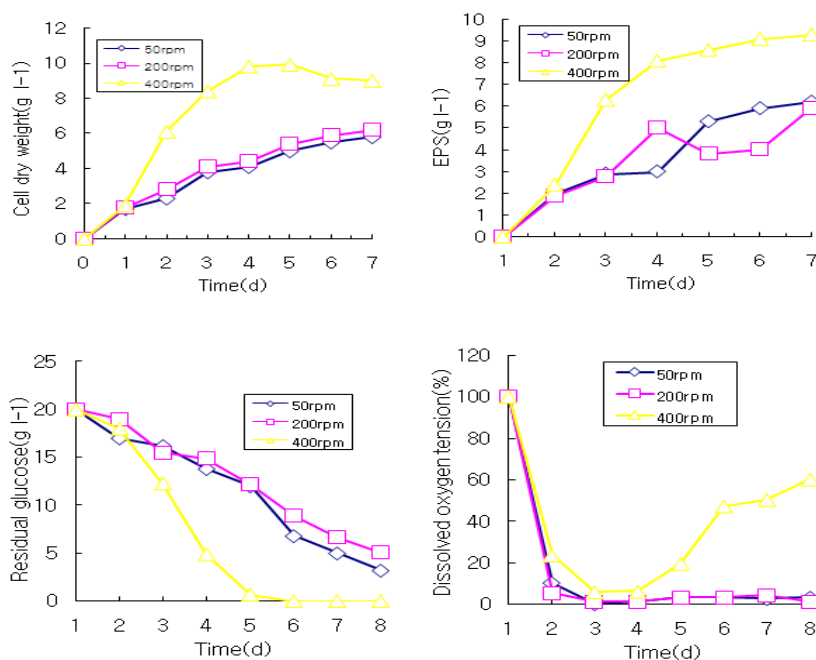


Fig. 3-11. Time profiles of cell dry weight, EPS production, residual glucose, and dissolved oxygen during submerged culture of *Tremella fuciformis* in a 5-L stirred-tank reactor at different aeration rates.

2vvm의 공기유통율은 이 연구에서 균주에 대하여 분명히 초과 공기유통이라는 것을 시사하였다. 이 결과는 높은 용존산소 수준의 유지는 흰목이 발효에서 EPS 형성과 세포성장 모두를 위하여 중요하다는 것을 제시한다.

5. 공기주입식 반응기에 발효 결과

비교연구를 위하여 발효는 또한 진탕 탱크 반응기를 사용하여 적절한 작동 조건하에서 5 L 공기주입 반응기로 실행하였다. 진탕 탱크 반응기에서 기계적인 변형은 대개 세포 형태와 생산형성에 관한 바람직하지 않은 원인이 된다. 대조적으로 공기주입 반응기는 기계적인 진탕을 요구하지 않으며 줄어드는 영향은 상당히 진탕탱크 반응기에서 보다 덜하다. 공기주입 반응기에서 최대 세포 건조중과 EPS 농도는 각각 10.30과 3.05 g/L이다(Fig. 3-12). 이들 결과는 생물반응기의 실행이 많은 연구자들에 의해 설명된 바대로 상당히 줄어드는 영향에 의해 조정된 세포의 형태적 특성에 의해 영향을 크게 받는다.

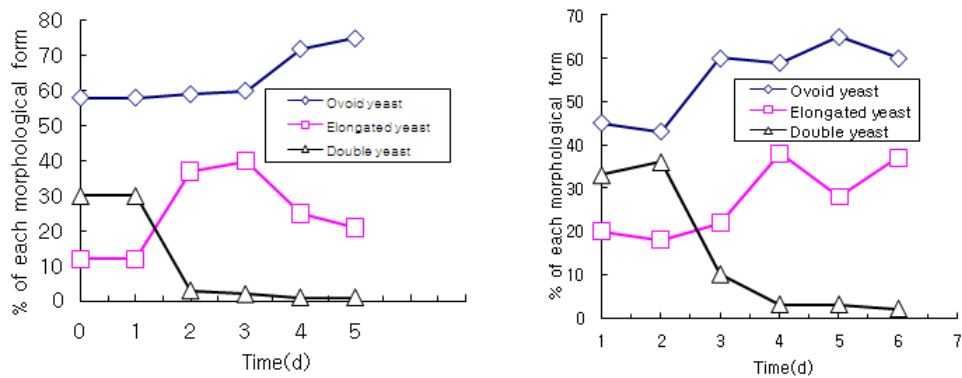


Fig. 3-12. Typical time courses of cell growth, exopolysaccharide production and distribution of cell morphologies during the cultivation run in the stirred-tank reactor and airlift reactor.

6. 진탕탱크와 공기주입식 생물반응기의 형태적 관찰

대표적인 효모상 동종이형 곰팡이인 *A. pullulans*는 많은 연구자들에 의해 심도있게 EPS 생산과 형태적인 연구가 되어왔다. 현재 형태적인 연구는 흰목이가 동종이형 균이나 대부분 모든 조건에서 효모상으로 자란다는 것을 나타내고 있다. 발효 전 기간 나타난 세포의 분류는 Fig. 3-13 에 나타나있다. 비록 균사형태는 어떤 정해진 시간에 조사되었지만 그의 밀도는 무시하였다. 전 발효기간 동안 3가지 형태적으로 다른 형태 즉 ovoid, elongated, double yeast forms으로 관찰되었다. 반응기의 2가지 형태에 발효기간을 통한 가장 많은 독특한 형태는 ovoid 효모 상이었고 이중효모상의 비중이 전형적인 형상일 때는 감소되었다. 대조적으로 elongated yeast의 비율은 반응기 둘 다 전형적인 형상동안 증가되었다. Elongated yeast의 밀도가 아마도 증가된 EPS 생산에 기여하였다. elongated yeasts는 진탕탱크반응기에서 3일후 감소되었고 한편 발효의 말기에 공기주입반응기에 유지되었다.

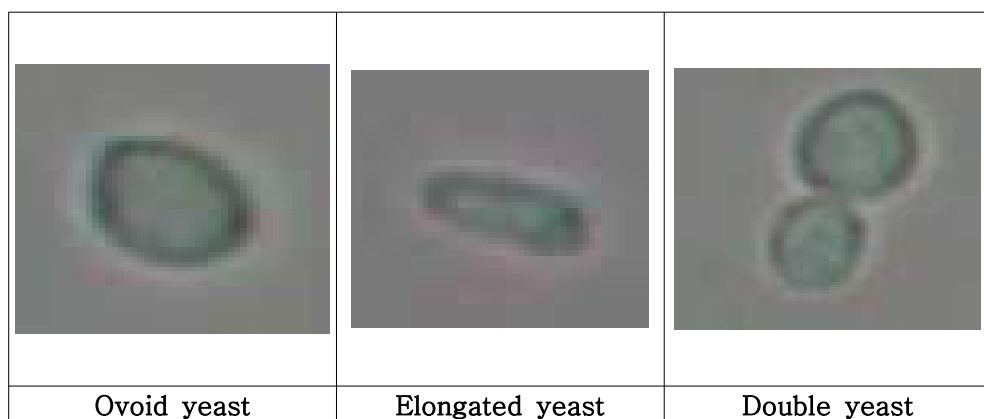


Fig. 3-13. Division of cells before fermentation

7. EPS의 특성

EPS의 분자매스는 MALLS 시스템으로 커플된 SEC에 의해 결정되었다. EC/MALLS 시스템은 중합체의 분자 특징의 분석에 앞서 분획 순서를 실행함이 없이 EPS의 분자량을 얻는데 유용하다. 진탕 탱크와 공기주입반응기에서 생산된 EPS는 극히 높은 분자량(1.3×10^6 and 1.5×10^6)을 가지고 있었다. 그리고 그것은

Tremella aurantia (1.5×10^6)의 자실체로부터 분리된 다당체와 유사하였다. 구성 성분의 분석은 진탕탱크와 공기주입식 생물반응기로부터 얻어진 EPS는 탄수화물(89.12%, 86.48%)과 단백질(10.88%, 13.52%)로 각각 구성되어진 proteoglycan이었다. EPS는 11가지 아미노산으로 구성되어있는데 주로 단백질 일부분인 isoleucine(11.97%, 11.26%), glutamic acid(14.70%, 17.42%), serine(12.14%, 13.38%)와 3가지 단당류(mannose, xylose, fucose)이다. EPS의 화학적 구성과 분자체인 길이가 shearing 효과에 의해 조정되고 반응기 타입에 의해 변경된다는 것은 흥미있는 일이다.

5절. 용기재배, 봉지재배, 원목재배 최적화

1. 흰목이버섯 재배용 고체 혼합종균제조

분리된 *T. fuciformis* KG 103 공시균주를 PDA 배지에 26°C 항온기에서 14일간 배양하였으며, 젤라틴형태로 배양된 것을 4~8등분하여 떼어낸 절편을 접종원 T로 사용하였다. 같은 방법으로 분리된 *A. stygium* KG 201을 배양하여 접종원 H로 사용하였다. 떼어낸 절편 접종원 T와 H를 동시에 종균배양용 배지인 참나무 톱밥 77.5%, 미강 20%, 석고 1.5%, 황백당 1%에 접종하여 26°C에서 30일 동안 배양을 한 후 1차, 2차, 3차 계대 접종하여 종균을 확보하였다. 그리고 혼합 배양된 *T. fuciformis* KG 103와 *A. stygium* KG 201균이 서로 잘 섞이도록 혼합하여 종균을 제조하는 것이 중요하였다. 자체 제작한 파쇄기를 이용하여 골고루 섞어서 접종원인 종균을 제조하였다.

2. 흰목이버섯균 및 *Hypoxylon* sp.의 종균 고체 톱밥배지 선발

주재료로서 흰목이버섯균은 참나무와 포플라 톱밥이 양호하였고 소나무 톱밥이 가장 저조하였으며 혼합균은 참나무 톱밥이 가장 양호하고 포플라 톱밥이 가장 저조하였으며 *Hypoxylon* sp.는 아카시나무 톱밥이 가장 양호하고 오리나무 톱밥이 가장 저조하였다. 첨가재료는 공시균 모두 맥주박이 가장 양호하였다(Table 3-13). Huang(1986)은 흰목이 종균제조에 쓰이는 주재료로서 활엽수 톱밥 79kg

을 혼합한다고 보고하였고, Ting(1987)은 목화씨 껍질을 이용한 plastic bag재배라는 보고에서 목화씨 껍질 100 kg, 석고 4 kg, 황산마그네슘 0.5 kg, 물 100~120kg을 혼합한 배지와 목화씨 껍질 50 kg, 분쇄 옥수수속 50 kg, 밀기울 25 kg, 석고 4 kg, urea 0.4 kg, 물 100~120 kg을 각각 첨가한 배지를 사용하였으며 중국의 Fujian 지방의 Gutian 지역에서는 본 실험에서 사용하지 않은 목화씨 껍질을 사용하여 톱밥보다는 높은 수량을 나타내었다고 하였으나 국내에서는 목화씨 껍질을 자원이 부족한바, 각종 톱밥 종류에 따른 주재료를 선발한 바 참나무 톱밥이 가장 양호한 결과를 나타내었고 첨가재료로서는 맥주박이 양호하였다. 사용된 배지 구성은 톱밥 84%, 밀기울 12%, 설탕 1%, 콩가루 1%, 석고 1%, 황산마그네슘 1%, 수분함량 70~75%이었다. 본 실험에서는 ascomycetes에 속하는 *Hypoxylon* sp.와 혼합 배양함으로써 흰목이버섯균의 군사생장 촉진은 물론 자실체를 형성시켰으며 배지는 선발된 참나무 톱밥과 맥주박을 사용하였다.

흰목이버섯균의 군사생장에 적합한 톱밥은 참나무 톱밥과 포플러 톱밥에서 각각 15.9mm, 16.0 mm/15day로 가장 양호하였고 소나무 톱밥에서 14.8 mm/15day로 가장 저조하였으며, 군사밀도는 어느 톱밥에서나 매우 약하였다. 혼합균은 참나무 톱밥에서 74 mm/15day로 가장 양호하였으며 포플러 톱밥에서 63.1 mm/15day로 가장 저조했기 때문에 재질이 비교적 단단한 참나무 톱밥이 재질이 연한 포플러 톱밥 보다 군사생장이 우수한 경향이였다. *Hypoxylon* sp.는 아카시나무 톱밥에서 66.8 mm/15day로 가장 우수하였고 오리나무 톱밥에서 48.2mm/15day로 가장 저조하였다. 군사생장에 적합한 첨가재료는 흰목이버섯균, 혼합균, *Hypoxylon* sp. 모두 맥주박을 혼합한 처리구에서 각각 16.4 mm, 76.2 mm, 64.8 mm/15day로 가장 우수하였고 미강을 혼합한 처리구에서 각각 13.9mm, 57.2 mm, 47.2 mm/15day로 가장 저조하였다(Table 3-14).

흰목이의 톱밥과 원목 인공재배를 하기 위해 *Hypoxylon* sp.와 흰목이버섯균의 종균 배양적 특성은 반드시 알아야한다. 일반적으로 재배되고 있는 부생성 버섯은 톱밥, 볏짚등 농산부산물을 주재료로 이용한다. 버섯에 따라 군사생장에 적당한 톱밥 종류가 다른데 목이버섯은 포플러 톱밥, 아카사아 톱밥(Khan 등, 1991), 표고와 잎새버섯은 참나무 톱밥, 포플러 톱밥, 목이버섯의 경우 참나무 톱밥, 뽕나무버섯은 포플러, 참나무톱밥이 좋다고 하였으나 흰목이는 참나무류가 가장 좋았다.

Table 3-13. Effect of the various supplements to sawdust media on the mycelial growth and density

(mm/15 days)

Kinds of sawdust	supplements	Mycelial growth and density					
		<i>T. fuciformis</i>		Mixed fungi		<i>Hypoxylon.</i> sp.	
Oak	Rice bran	14	-	63	++	48	++
	wheat pollard	16	-	73	++	55	++
	Beer waste	17	-	85	+++	72	+++
	Bean curd	17	-	75	+++	70	+++
Accacia	Rice bran	14	-	60	++	55	++
	wheat pollard	15	-	70	++	65	++
	Beer waste	16	-	77	+++	75	+++
	Bean curd	16	-	75	++	72	++
Poplar	Rice bran	14	-	48	++	45	++
	wheat pollard	15	-	67	++	55	++
	Beer waste	18	-	74	+++	65	+++
	Bean curd	17	-	65	+++	61	+++
Alder	Rice bran	14	-	58	++	40	++
	wheat pollard	15	-	75	+++	68	+++
	Beer waste	16	-	75	+++	43	+++
	Bean curd	15	-	63	+++	43	+++
Pine	Rice bran	14	-	57	++	48	++
	wheat pollard	15	-	67	++	67	++
	Beer waste	15	-	70	+++	70	+++
	Bean curd	15	-	67	+++	63	+++

* Content of supplements : 20%

* Mycelial density : -; almost nothing ++; good +++; excellent

Table 3-14. Summary of good sawdust media and supplements on the mycelial growth

(mm/15 days)

Sawdust and supplements	Mycelial growth		
	T	H	T+H
Oak	15.9 ^a	61.2 ^b	74.0 ^a
Accacia	15.2 ^{ab}	66.8 ^a	70.5 ^b
Poplar	16.0 ^a	56.4 ^c	63.1 ^e
Alder	15.0 ^{ab}	48.2 ^d	67.8 ^c
Pine	14.8 ^b	61.9 ^b	65.3 ^d
Rice bran	13.9 ^c	47.2 ^c	57.2 ^c
wheat pollard	15.2 ^b	61.8 ^b	70.1 ^b
Beer waste	16.4 ^a	64.8 ^a	76.2 ^a
Bean curd	16.0 ^{ab}	61.7 ^b	69.0 ^b

* The different letters(a, b, c, d) differ significantly(p=0.01) according to Duncun's multiple range test.

* T : *T. fuciformis* H : *Hypoxylon* sp. T + H : *T. fuciformis* + *Hypoxylon* sp.

3. 톱밥배지의 최적 배양온도, pH, 수분, 첨가제 함량

적정 톱밥과 첨가재료에 공시균을 접종하여 온도별로 처리한 결과 흰목이버섯균은 25~30℃에서 17mm/15일, *Hypoxylon* sp.는 30℃에서 113 mm/15day, 혼합균은 25℃에서 93 mm/15day로 균사 생장이 가장 양호하였고, *Hypoxylon* sp. 단독으로 배양한 것보다 혼합 배양한 균이 균사생장이 양호한 경향을 나타내었으며 10℃ 이하와 35℃ 이상에서는 성장되지 않았다. 균사밀도는 25℃에서 가장 좋았으며 그보다 높거나 낮을 경우 밀도가 현저히 낮아지는 경향이었으며 흰목이버섯균은 어느 온도에서나 균사밀도는 매우 낮았다(Table 3-15).

Table 3-15. Effect of temperature to oak sawdust media on the mycelial growth and density

(mm/15 days)

	Temperature(°C)					
	10	15	20	25	30	35
<i>T.</i>	0 ^c	0 ^c	11 ^b	17 ^a	17 ^a	0 ^c
<i>fuciformis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Hypoxyton</i>	0 ^e	5 ^d	36 ^c	93 ^a	85 ^b	0 ^e
sp.	+	+	++	+++	++	-
Co-culture	0 ^g	4 ^d	42 ^c	102 ^d	113 ^a	0 ^d
	-	+	++	+++	++	-

* Mycelial density : -; almost nothing +; poor ++; good +++; excellent

* The different letters(a, b, c, d, e) differ significantly(p=0.01) according to Duncun's multiple range test.

흰목이버섯균의 톱밥배지에서 균사생장은 pH 범위는 5.0~8.0이나 pH 5.0일때 21 mm/15day로 가장 양호하였으며 균사밀도는 어느 pH에서나 매우 낮았다. 혼합균은 pH 6.0에서 106 mm/15day로 가장 우수하였으며 균사밀도는 pH 5.0~9.0까지 매우 높았다. *Hypoxyton* sp.는 pH 범위와 균사밀도가 혼합균과 일치하였으며 pH 6.0에서 100mm/15일로 혼합균에 비해 *Hypoxyton* sp.은 균사생장이 약간 늦은 경향이였다(Table 3-16).

흰목이버섯균의 균사생장은 톱밥 배지의 수분함량이 40~55%에서 21~22 mm/15day로 균사생장이 양호하였고 60~75%로 비교적 수분이 많을 경우 균사생장이 저조하였다. 그러나 균사밀도는 어느 수분함량에서도 매우 약하였다. 혼합균과 *Hypoxyton* sp.도 40~45%에서 116~119 mm/15day로 균사생장이 빨랐고 점차 수분함량이 많아짐에 따라 균사생장이 느렸으나 균사밀도는 반대로 수분함량이 적을수록 낮았으며 수분함량이 60% 이상일 때 밀도가 높은 경향을 나타내었으며 *Hypoxyton* sp.에 비해 혼합균이 균사생장이 양호하였다(Table 3-17).

Table 3-16. Effect of pH to oak sawdust media on the mycelial growth and density

(mm/15 days)

	pH								
	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>T. fuciformis</i>	7 ^{de}	14 ^c	21 ^a	18 ^b	17 ^b	17 ^b	13 ^c	9 ^d	6 ^e
<i>Hypoxylon</i> sp.	74 ^d	85 ^c	95 ^b	100 ^a	95 ^b	87 ^c	85 ^c	77 ^d	62 ^e
Co-culture	70 ^e	88 ^c	97 ^b	106 ^a	98 ^b	85 ^{cd}	83 ^d	70 ^e	65 ^f
	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++

* Mycelial density : -; almost nothing ++; good +++; excellent

* The different letters(a, b, c, d, e, f) differ significantly(p=0.01) according to Duncun's multiple range test.

* pH adjusted with MclLvaine buffer

Table 3-17. Effect of moisture content to oak sawdust media on the mycelial growth and density

(mm/15 days)

	Moisture content(%)							
	40	45	50	55	60	65	70	75
<i>T. fuciformis</i>	22 ^a	22 ^a	21 ^{ab}	21 ^{ab}	19 ^b	19 ^b	19 ^b	19 ^b
<i>Hypoxylon</i> sp.	114 ^a	113 ^{ab}	110 ^b	108 ^b	107 ^b	98 ^c	85 ^d	74 ^e
Co-culture	119 ^a	116 ^{ab}	113 ^{bc}	110 ^c	109 ^c	101 ^d	87 ^e	76 ^f
	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++

* Mycelial density : -; almost nothing +; poor ++; good +++; excellent

* The different letters(a, b, c, d, e) differ significantly(p=0.01) according to Duncun's multiple range test.

흰목이버섯균, *Hypoxylon* sp., 혼합균 모두 맥주박을 첨가재료로서 사용하였을 때 균사생장과 밀도가 양호한 바 이를 첨가함량에 따라 균사생장과 밀도를 조사한 결과, 흰목이버섯균은 맥주박 첨가량이 20~50%일 때 16~27 mm/15day로서 비교적 양호하였으며 무처리에 비해 맥주박을 처리한 것이 균사생장이 좋았으나 균사밀도는 어느 처리에서나 매우 약하였다. 혼합균, *Hypoxylon* sp.는 맥주박 10% 첨가구에서 90 mm/15day로서 균사생장이 빨랐으나 균사밀도가 낮았으며 맥주박 첨가량이 많을수록 균사생장은 늦어지고 균사밀도는 높아지는 경향을 나타내었다 (Table 3-18).

Table 3-18. Effect of beer waste content to oak sawdust media on the mycelial growth and density

(mm/15 days)

	Beer waste content(%)					
	0	10	20	30	40	50
<i>T.</i>	13 ^b	15 ^{ab}	16 ^a	16 ^a	17 ^a	17 ^a
<i>fuciformis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Hypoxylon</i>	80 ^{bc}	90 ^a	85 ^{ab}	85 ^{ab}	78 ^{cd}	73 ^d
sp.	+	++	+++	+++	+++	+++
Co-culture	86 ^b	90 ^a	88 ^{ab}	88 ^{ab}	82 ^c	75 ^d
	+	++	+++	+++	+++	+++

* T : *T. fuciformis* H : *Hypoxylon* sp. T + H : *T. fuciformis* + *Hypoxylon* sp

* Mycelial density : -; almost nothing +; poor ++; good +++; excellent

* The different letters(a, b, c, d) differ significantly(p=0.01) according to Duncun's multiple range test.

Huang(1987)은 톱밥배지에 calcium carbonate를 전체 배지 무게의 1%(w/w), Ting(1987)은 목화씨를 이용한 배지에 1.7%(w/w), *T. aurantia*와 ascomycetes인 *Stereum hirsutum*과의 혼합배양시 1%를 혼합 사용하여 효과가 인정된다고 보고한 바 본 실험에서도 기본배지에 calcium carbonate를 0.1, 0.2, 1.0, 5.0%를 각각 첨가한 결과, 흰목이버섯균은 0.1~5.0% 첨가함으로써 무처리에 비해 현저하게 균사생장이 24~25 mm/15day로 빨라졌으나 균사밀도는 차이가 없었다. 그러나 혼합균의 균사생장은 0.2% 첨가 시 118 mm/15day로 가장 양호하였으며 5.0% 이상 첨가 시에는 무처리에 비해 균사생장이 저해되었고 균사밀도는 무처리에 비해 첨가 시에 균사밀도가 높았다. *Hypoxylon* sp.는 0.2% 첨가시 123mm/15일로 가장 좋았고 그 이상 첨가 시 점점 균사생장이 저해되며 균사밀도는 무처리에 비해 높아짐을 알 수 있었다(Table 3-19).

Table 3-19. Effect of calcium carbonate content to oak sawdust media on the mycelial growth and density

(mm/15 days)

	Calcium carbonate(%)				
	0	0.1	0.2	1.0	5.0
<i>T.</i>	17 ^b	24 ^a	25 ^a	25 ^a	25 ^a
<i>fuciformis</i>	-	-	-	-	-
<i>Hypoxylon</i>	91 ^d	101 ^c	123 ^a	114 ^b	98 ^c
sp.	++	+++	+++	+++	+++
Co-culture	92 ^{ab}	107 ^{ab}	118 ^a	109 ^{ab}	81 ^b
	++	+++	+++	+++	+++

* Mycelial density : -; almost nothing ++; good +++; excellent

* The different letters(a, b, c, d) differ significantly(p=0.05) according to Duncun's multiple range test.

Magnesium sulfate 첨가 효과를 구명하기 위하여 0.1, 0.2, 1.0, 5.0%를 각각 혼합 첨가한 결과, 흰목이버섯균은 0.1~5% 첨가시 24~25 mm/15day로 무처리 17 mm/15day에 비해 현저히 촉진되었으며 균사밀도는 어느 처리에서나 매우 약하였다. 혼합균은 0.2% 첨가 시 102 mm/15day, *Hypoxylon* sp.는 0.1% 첨가 시 119 mm/15day로 균사생장이 가장 양호하였으며 그 이상 첨가 시 점차 균사생장이 저해되었고 균사밀도는 무처리에 비해 처리 시 훨씬 높았다(Table 3-20).

Table 3-20. Effect of magnesium sulfate content to oak sawdust media on the mycelial growth and density

		Magnesium sulfate (%)				
		0	0.1	0.2	1.0	5.0
<i>T. fuciformis</i>	17 ^b	24 ^a	25 ^a	25 ^a	25 ^a	
	-	-	-	-	-	
<i>Hypoxylon</i> sp.	91 ^d	119 ^a	106 ^c	114 ^b	101 ^c	
	++	+++	+++	+++	+++	
Co-culture	92 ^d	98 ^c	120 ^a	111 ^b	102 ^c	
	++	+++	+++	+++	+++	

* Mycelial density : -; almost nothing ++; good +++; excellent

* The different letters(a, b, c, d) differ significantly(p=0.01) according to Duncun's multiple range test.

Sucrose를 0.1, 0.2, 1.0, 5.0%씩 첨가하여 균사생장과 밀도를 조사한 결과, 흰목이버섯균은 무처리에 비해 처리 시 23 ~ 26 mm/15day로 양호하였고 균사밀도는 어느 처리에서나 매우 낮았다. 혼합균은 0.1% 첨가 시 119 mm/15day, *Hypoxylon* sp.는 0.1% 첨가 시 117 mm/15day로 가장 양호하였고 0.1% 이상 첨가 시 균사생장이 점차 저해되었다(Table 3-21).

Table 3–21. Effect of sucrose content to oak sawdust media on the mycelial growth and density

(mm/15 days)

	Sucrose content(%)				
	0	0.1	0.2	1.0	5.0
<i>T.</i>	17 ^b	26 ^a	26 ^a	23 ^a	23 ^a
<i>fuciformis</i>	–	–	–	–	–
<i>Hypoxylon</i>	91 ^c	117 ^a	116 ^{ab}	110 ^b	110 ^b
sp.	++	+++	+++	+++	+++
Co–culture	92 ^d	119 ^a	115 ^b	110 ^c	110 ^c
	++	+++	+++	+++	+++

* Mycelial density : – almost nothing ++; good +++; excellent

* The different letters(a, b, c, d) differ significantly(p=0.01) according to Duncun's multiple range test.

Table 3–22. Effect of LVD content to oak sawdust media on the mycelial growth and density

(mm/15 days)

	L V D(%)						
	0	0.001	0.01	0.1	0.2	1.0	5.0
<i>T.</i>	17 ^c	20 ^b	24 ^a	25 ^a	21 ^b	19 ^{bc}	17 ^c
<i>fuciformis</i>	–	–	–	–	–	–	–
<i>Hypoxylon</i> sp.	91 ^d	113 ^{bc}	120 ^{ab}	121 ^a	115 ^{a-c}	109 ^c	90 ^d
	++	++	++	+++	+++	+++	+++
Co–culture	92 ^f	116 ^c	121 ^b	125 ^a	118 ^{bc}	110 ^d	98 ^e
	++	++	++	+++	+++	+++	+++

* Mycelial density : –; almost nothing ++; good +++; excellent

* The different letters(a, b, c, d, e, f) differ significantly(p=0.01) according to Duncun's multiple range test.

* LVD is sulfite pulp purified from coniferous

또한 LVD의 첨가효과를 구명하기 위하여 0.001, 0.01, 0.1, 0.2, 1.0, 2.0, 5.0% 농도를 배지에 처리한 결과, 흰목이버섯균은 0.01~0.1% 첨가 시 24~25 mm/15day, 혼합균과 *Hypoxylon* sp.은 LVD 0.1% 첨가 시 각각 125 mm/15day, 121 mm/15day로 균사생장이 가장 좋았고, 0.1% 이상 첨가 시 점차 균사생장이 저지 되었으며 균사밀도는 0.1 ~ 5.0% 첨가 시에 높았다. (Table 3-22).

흰목이는 주로 아열대 지역에서 발견되지만 온도는 중온성(mesophilic)이며 균사는 5 ~ 38℃의 범위에서 자라지만 최적온도는 25 ~ 28℃라고 보고(Chen과 Hou, 1978)한 것과 본 실험은 일치하였다. 흰목이버섯균의 톱밥 배양시 적정 수분함량은 65%라고 생각하는데 본 실험에서 40 ~ 50%에서 균사생장은 빨랐으나 균사밀도가 낮아 부적합하였으며, 균사생장 속도는 비교적 느리나 균사 밀도가 높은 65%가 적정 수분함량이라고 생각된다. 종균이나 재배균의 수분함량이 높아야 하는 주된 이유는 효모상 분생자가 수분이 많은 배지에 잘 침투하여 깃털상 균사(feather like mycelium) 즉 *Hypoxylon* sp.와 잘 혼합되기 때문이라고 생각한다.

Huang(1986)이 밝힌 종균제조 주배지재료는 선택된 활엽수 톱밥 79Kg, 미강 또는 밀기울 19Kg, 석회나 석고 1Kg, 설탕 1kg, 적당한 수분을 첨가한 배지와 사탕수수박 79kg, 미강 19kg, 탄산칼슘 1kg, 대두가루 1kg을 혼합한 배지, 또한 Ting(1987)은 목화씨 껍질에 밀기울을 20 ~ 25% 혼합한 배지에서 수량이 가장 높았다고 보고하였으나 본 실험은 주재료로서 참나무 톱밥에 첨가재료로 맥주박을 첨가한 점이 서로 달랐기 때문에 앞으로 자실체 수량 비교의 검토가 필요하다고 생각한다.

목화씨 껍질을 이용한 배지에 magnesium sulfate를 배지 무게의 약 0.2%, *T. aurantia*와 *Stereum hirsutum*과 혼합 배양시 1%의 magnesium sulfate를 혼합 사용하면 효과가 있다고 보고한 바, 본 실험에서는 0.1% 이상 첨가시 균사생장이 촉진되었는데 그 이유는 magnecium이 hexokinase 등의 인산 전이효소와 각종 phosphotase, glutamin synthase 등의 효소반응의 보조효소로서 필요하고 세포구조 유지에 이용됨으로서 균사생장이 촉진되었다고 생각한다. 흰목이버섯균과 *Hypoxylon* sp.은 혼합균에 비해 약간 적은 량의 magnesium sulfate을 요구함에 따라 두 균을 혼합함으로써 효소반응의 보조효소 활성이 높아진 결과라고 추정한다. 톱밥과 미강의 기본배지에 1%의 sucrose, 한 바와 비슷하게 공시균에는 0.1%

첨가시 효과가 있었는데 농도의 차이는 있으나 같은 경향을 나타냄으로서 sucrose는 배양시효과적인 탄소원임이 확인되었다.

Zadrazil(1982)은 아황산 pulp배액에서 분리 정제한 성분인 LVD를 첨가시 *Pleurotus sp. florida*의 균사생육에 양호한 결과를 보고하였다. 이 연구에서 흰목이버섯균과 *Hypoxylon sp.*, 그리고 그 혼합균에 대한 LVD 적정 첨가농도는 0.1%이었으며 표고버섯 균사만큼 현저한 촉진효과는 없었다.

4. 공생균을 이용한 흰목이 톱밥재배 자실체 대량 생산

흰목이버섯의 톱밥 병 재배 시 용기 크기와 수량성과의 관계를 조사한 결과 수량은 1800ml 크기의 병에서 재배하였을 때 가장 좋았으나 850ml 병에 비하여 회수율은 감소하였으며 초발이 소요일수와 배양 완성일은 더 오랜 기간이 소요되었다. 개체중은 1800ml 병에서 70.5 g으로 850ml 병의 41.2 g 보다 많았으나 회수율이 11.5%로 850 ml의 17.1% 보다 낮아 850 ml 병 용량이 더 유리하였다(Table 3-23).

Table 3-23. Effect of different bottle volume on yields of *T. fuciformis*

Bottle volume (ml)	Yield (g)	BE (%)	DCI (day)	DPI (day)	IW (g)
850	41.2	17.1	27	37	41.2
1800	70.5	11.5	52	63	70.5

BE : Biological efficiency(flesh mushrooms / dry substrate)×100 = %

DCI : Day required for colonization after inoculation

DPI : Day required for primordial formation after inoculation

IW : Individual weight



Fig. 3-14. Formation of fruiting body of *T. fuciformis* in sawdust media

Xiang(1991)에 의하면 *T. aurantiaba*의 재배 용기의 용량에 따른 재배방법을 3가지로 구분하였는데 double layer재배방법은 배양 완성일이 25~30일이며 100%의 자실체가 발생하였고 biological efficiency(B.E)가 75g/100 g, single layer재배방법은 배양 완성일이 30~60일, 10~15%의 자실체 발생, B.E가 0.2 g/g, 원목에 재배하였을 때 6~8개월의 배양 완성 기간과 60~80%의 자실체 발생, 4.5kg/m³의 B.E를 나타내었다고 보고한바 본 실험의 1800 ml 병 용량보다 850 ml 병 용량이 B.E가 높은 것은 발생 표면적이 상대적으로 많아 B.E가 높아진 것으로 추정된다. 참나무 톱밥에 공시균의 생육에 따른 톱밥 중량 감소율의 변화를 시험한 결과 흰목이버섯균은 감소율이 매우 약하여 중량 감소율이 20일 후에 0.23%, 120일 후에 2.8%로서 매우 완만하였으며, 혼합균은 20일 후에 1.9%, 120일 후에 17.8%로서 3균주중 가장 왕성한 감소율을 나타내었고 *Hypoxylon* sp.은 20일 후에 1.4%, 120일 후에 17.2%로서 비교적 왕성하나 혼합균에 비하면 약간 낮은 경향이였다 (Table 3-24).

공시균의 균사 배양 중 lignin 감소율을 시험한 결과, 흰목이버섯균은 20일 후에 0.4%, 100~120일 후에는 1.9%이며, 혼합균은 20일 후에 7.8%, 120일 후에는 26.8%, *Hypoxylon* sp.는 20일 후에 6.9%, 120일 후에는 25.9%이었다. 공시균 모두 100일 후부터는 매우 완만한 감소율을 나타내었다(Table 3-25).

Table 3-24. Changes of weight loss on oak sawdust by culture of *T. fuciformis*, *Hypoxylon* sp. and mixed fungi

(Units : %)

	Days					
	20	40	60	80	100	120
<i>T. fuciformis</i>	0.23	0.57	1.3	1.8	2.3	2.8
<i>Hypoxylon</i> sp.	1.4	3.9	6.6	9.8	13.6	17.2
Co-culture	1.9	4.5	7.6	10.3	14.5	17.8

Table 3-25. Changes of lignin degradation rate on oak sawdust by culture of *T. fuciformis*, *Hypoxylon* sp. and mixed fungi

(Units : %)

	Days					
	20	40	60	80	100	120
<i>T. fuciformis</i>	0.4	0.7	1.1	1.5	1.9	1.9
<i>Hypoxylon</i> sp.	6.9	9.1	12.8	18.0	25.2	25.9
Co-culture	7.8	9.4	13.7	18.4	26.5	26.8

공시균의 균사 배양 중 holocellulose 감소율을 시험한 결과, 흰목이버섯균은 20일 후에 0.08%, 120일 후에는 0.7%, 혼합균은 20일 후에 0.8%, 120일 후에 12%, *Hypoxylon* sp.은 20일 후에 0.7%, 120일 후에 11.6%이었다(Table 3-26).

홍(1992)에 의하면 *Poria cocos*의 톱밥 배지 균사 배양시 톱밥중량 감소율은 60일 후에 9.4%이라고 한 것에 비하면 흰목이버섯균은 1.3%로서 현저히 낮았으며 혼합균과 *Hypoxylon* sp.는 각각 7.6%, 6.6%로서 *P. cocos*에 비하여 낮아 목재분해력은 다른 담자균에 비하여 그다지 높은 편은 아니나 효소적 생성작용의 역할이 자실체 형성에 영향이 큰 것으로 추정된다.

Lignin 감소율은 60일 후에 3.1%인 *P. cocos*에 비하면 흰목이버섯균은 1.1%로서 보다 낮았으나 혼합균과 *Hypoxylon* sp.은 각각 13.7%, 12.8%로서 *P. cocos*에 비해 약 4배 정도 높은 lignin 감소율을 나타내었으나 그에 따른 톱밥 감소율은 *P. cocos*에 비해 낮았다.

Table 3-26. Changes of holocellulose degradation rate on oak sawdust by culture of *T. fuciformis*, *Hypoxylon* sp. and mixed fungi
(Units : %)

	Days					
	20	40	60	80	100	120
<i>T. fuciformis</i>	0.0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.7
<i>Hypoxylon</i> sp.	0.7	2.1	4.8	8.1	11.5	11.6
Co-culture	0.8	2.5	5.1	8.3	11.8	12.0

Cellulose 감소율은 공시균 모두 배양 80일 후까지는 비례적으로 감소하다가 그 이후 완만한 감소율을 나타내었으며 흰목이버섯균은 60일 후에 0.3%, 혼합균은 5.1%, *Hypoxylon* sp.은 4.8%로 현저히 낮은 경향을 나타내었으나 *Hypoxylon* sp.균은 흰목이버섯균에 비해 16배의 높은 감소율을 나타냄으로서 *Hypoxylon* sp.균은 톱밥 배양 과정 중 holocellulose와 lignin의 감소율이 *P. cocos*에 비해 낮지만 흰목이버섯균과 감소 속도를 병행하여 흰목이버섯균의 자실체를 유도하는 것으로 추정한다. 이와 같이 흰목이버섯균만 배양하면 균사생장이 거의 되지 않을 뿐만 아니라 자실체가 발생되지 않으나 *Hypoxylon* sp.를 공동 배양하면 균사가

잘 자라면서 자실체가 형성되는데 이에 대한 EFS factor(External Fruiting Stimulus)에 대한 연구가 *Agaricus bisporus*에 대하여 많은 연구가 되어 있다 (Eger, 1961, 1972). *A. bisporus*의 공동 배양에 의해 균사 성장과 자실체 형성에 촉진적으로 작용하는 것으로서 streptomycetes는 22균주 중 19균주가 촉진적이며, ascomycetes는 7균주 중 6균주가 억제적으로 작용하였다고 하였는데 흰목이버섯균은 ascomycetes의 일종인 *Hypoxylon*. sp.가 촉진적으로 작용하였다.

흰목이버섯균과 *Hypoxylon* sp.의 혼합량에 따른 1차 종균부터 5차 종균을 제조하여 접종한 후 수량을 조사한 결과, 1차 종균은 41.2g/850ml 병이며 2차 종균은 39.9 g, 3차 종균은 42.4 g, 4차 종균은 41.4 g, 5차 종균은 42.6 g이었으며 생물적 효율은 17.5~18.5%, 배양 완성일은 27~28일, 초발이 소요일수는 35~37일, 개체중은 39.9~42.4g으로서 1차부터 5차 종균의 차이가 거의 없었다(Table 3-27).

Table 3-27. Effect of co-culture spawn of *T. fuciformis* and *Hypoxylon* sp. in sawdust cultivation

Co-culture spawn	Yield	BE	DCI	DPI	IW
	(g/850ml)	(%)	(day)	(day)	(g)
1st	41.2	18.0	27	37	41.2
2nd	39.9	17.5	27	36	39.9
3rd	42.4	18.5	27	36	42.4
4th	41.4	18.2	28	35	41.5
5th	42.6	18.5	28	35	42.1

BE : Biological efficiency(flesh mushrooms/ dry substrate)×100 = %

DCI : Day required for colonization after inoculation

DPI : Day required for primordial formation after inoculation

IW : Individual weight

균 배양이 완성된 후 균굽기를 한 것과 하지 않은 처리를 하여 발이유기 시켰을 때 초발이 소요일수와 생물적 효율, 수량을 조사한 결과 27일 동안 배양한 것에 균굽기 한 것은 초발이 소요일수가 46일로서 균굽기를 하지 않는 것에 비해 9일이 늦었으며 균굽기를 실시함으로써 개체중이 절반 이상으로 감소하였는데 이는 발이가 한군데에서 유기되지 않고 2~3개소에서 유기되었기 때문이며 균굽기를 하지 않은 것은 1개소에서 발이가 되었다. 또한 수량은 균굽기를 한것은 35.5 g인 것에 비해 하지 않은 것은 41.2 g으로 하지 않음으로서 16%가 증수되었고 따라서 B.E도 15.6%에 비해 17.1%로 증가하여 흰목이 톱밥재배 시에는 균굽기를 하지 않는 것이 수량이 높음을 확인하였다(Table 3-28).

Table 3-28. The comparison of yield according to removing method of inoculation spawn after colonization

Method	Yield (g/850ml)	BE (%)	DCI (day)	DPI (day)	IW (g)
RI	35.5	15.6	27	46	17.6
NRI	41.5	17.1	27	37	41.2

RI : Removing inoculation spawn after colonization

NRI : No removing inoculation spawn after colonization

BE : Biological efficiency(flesh mushrooms/ dry substrate)×100 = %

DCI : Day required for colonization after inoculation

DPI : Day required for primordial formation after inoculation

IW : Individual weight

Table 3-29. Effect of spawn storage period on yield and enzyme activity of *T. fuciformis*

Storage period	Yield	BE	Enzyme	activity
(days)	(g/850ml)	(%)	Xylanase(U)	Laccase(U×10 ⁻²)
0	41.2	18.0	0.076	1.25
15	37.5	16.4	0.043	0.94
30	11.1	4.9	0.025	0.64
45	8.2	3.6	0.018	0.24
60	4.0	1.8	0.011	0.15

BE : Biological efficiency(flesh mushrooms/dry substrate)×100 = %

종균 저장기간에 따른 수량은 균사 배양이 완료된 직후 종균으로 사용한 경우와 15, 30, 45, 60일 후에 종균으로 사용하였을 경우 수량과 효소의 활성을 조사한 결과, 배양 완료된 직후에 종균으로 사용하였을 때 수량이 41.2g/850ml로 가장 높았고, 15일 후에 37.5 g, 30일 후에는 4.0 g으로 오래 저장할수록 수량이 감소하였으며 따라서 B.E.도 배양완료 직후에 18%까지 감소하였다. 효소 중 섬유소 분해효소인 xylanase 활성과 리그닌 분해효소인 laccase 활성은 배양완료 직후에 각각 0.076(U), 1.25(U×10⁻²)로 가장 높고 저장기간이 오래되면 수량과 동시에 xylanase와 laccase 활성이 감소됨으로서 깊은 상관관계가 있었다(Table 3-29).

5. *Hypoxyylon* sp.를 이용한 흰목이 원목재배 자실체 대량 생산

흰목이버섯의 원목재배는 표고버섯과 비슷하여 1~3월 사이 원목에 구멍을 뚫고 접종을 하는데 구멍 크기는 원목의 크기에 따라 다르나 직경은 1~1.5cm, 깊이는 1.5~3cm, 구멍의 배열은 배양 위치에 따라 일정하게 하고 구멍의 수는 원목의 직경에 따라 달라지는데 원목길이가 100cm이고 직경이 6cm일때 구멍수가 21개가 되며 10cm일 때 35개, 20cm일 때 70개가 된다. 원목 길이가 120cm이고 직경이 6cm일 때 구멍수가 27개가 되며 10cm일 때 45개, 20cm일 때 90개가 된다

Table 3-30. Approximate inoculation numbers of the bed log

Length of bed log(cm)	Diameter of bed log(cm)					
	6	8	10	12	15	20
100	21	28	35	42	56	70
120	27	36	45	54	72	90



Fig. 3-15. Formation of fruiting body of *T. fuciformis* on oak tree.

원목의 수종에 따른 수량은 원목 수종에 따른 초발이 소요일수, 개체중, 수량을 조사한 결과, 참나무 원목에서 초발이 소요일수가 63일, 개체중이 83.5 g, 수량이 7940 g/m³로서 가장 좋았으며 오리나무, 포플러, 아카시 순으로 수량이 많았고 소나무에서는 발이가 되지 않는 특징이 있었다. 생물적 효율도 참나무 원목이 11.6%로 가장 높았으며 초발이 소요일수는 포플러 원목이 55일로 가장 빨랐으나 아카시 원목이 67일로 가장 늦었다(Table 3-31). 골목장에서 균사배양(laying) 기간은 5가지 수종 모두 45일 동안 둔 후에 자실체 발생을 자극하기 위하여 습도를

높이고 관수의 빈도를 늘려서 수분을 85~90% 정도 유지되도록 하는 raising 작업을 포플러 원목은 10일, 아카시 원목은 22일간 함으로써 초발이가 되었다(Table 3-32). 놓혀두기(laying)할때 온도는 20~25℃에서 균사밀도가 가장 양호하였으며 기간은 35 ~ 45일간 laying하였을 때 가장 양호하였다(Table 3-32, 3-33). Raising 할 때의 상대습도는 80~90%로 조절하였을 때 자실체 出現이 57일로 가장 빨랐으며 수확 기간도 6 ~ 7개월로 가장 길었다(Table 3-34).

Table 3-31. Effect of different wood logs in *T. fuciformis* yield

Wood logs	Yield	BE	Laying	Raising	IP	IW
(ml)	(g/0.1m ³)	(%)	(days)	(days)	(days)	(g)
Oak	797	11.6	45	18	—	83.5
Alder	714	10.3	45	14	59	78.1
Poplar	695	10.1	45	10	55	71.4
Accacia	681	9.9	45	22	67	64.3
Pine	—	—	45	—	—	—

BE : Biological efficiency(flesh mushrooms/ dry substrate) × 100 = %

DPI : Day required for primordial formation after inoculation

IW : Individual weight

Table 3-32. Optimum temperature of mycelial development and density

Mycelial development temperature(°C)	Mycelial density
15 ~ 20	+
20 ~ 25	+++
25 ~ 30	++

Table 3-33. Optimum laying operation period for mycelium density

Laying operation period(days)	Mycelial density
15	+
25	++
35	+++
45	+++

Table 3-34. Requirement of raising in management and harvesting by relative humidity

Relative humidity	Apperance of fruiting body after inoculation	Production period
(%)	(days)	(months)
60~70	75	3~4
70~80	64	4~5
80~90	57	5~6

버섯의 톱밥재배시 반드시 균균기를 실시하는 대표적 버섯인 팽이버섯은 균균기를 함으로써 균일한 발이와 자실체 형성 촉진에 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 흰목이 버섯은 대(stem)가 없어 발이가 한곳에서 시작되면 그 부위를 중심으로 뭉쳐서 자실체가 형성되므로 균균기를 하지 않는 것이 효과적이었다. 흰목재배에 사용할 나무의 벌채시기는 모든 버섯에서 매우 중요한데 흰목이 버섯을 재배하기 위해서는 늦가을부터 이른 봄에 벌채한다. 이때 벌채함으로써 나무껍질이 벗겨지는 것과 다른 곰팡이의 오염이 최소화되며 흰목내 당함량과 영양분이 많이 축적되며 당함량은 균사생장에 영향을 미친다(Chen과 Hou, 1978). 흰목에 구멍을 뚫은 후 종균을 구멍에 꼭 맞게 충분히 넣고 스티로폼 마개나 파라핀으로 밀봉하여 종균이 떨어져 나가는 것을 방지하여야하나 너무 단단히 막으면 공기의 이동이 되지 않아 균사생장이 잘 되지 않는다. Huang(1982)은 흰목이버섯재배에 적당한 수종으로 *Rhus senvialata*, *Aleurites montana*, *Sapium discolor*, *Alniphyllum fortunei*, *Plantanas orientalis*, *Pterocarya*, *Liquidamber formosana*, *Quercus variabilis*, *Acaccia confusa* 등 이라고 한바 본 실험과 일치하는 수종으로 참나무, 아카시나무이었으나 흰목이버섯이 아카시나무에서 자실체가 형성된다고 하는 것은 담자균에서 보기 드문 독특한 특징으로 다른 버섯류가 이용하지 못하는 아카시나무의 자원을 흰목이 버섯재배에 활용할 수 있을 것으로 기대한다.

6절. 흰목이버섯 저비용 대량생산법 개발

1. 흰목이버섯 병속 재배법 개발

흰목이버섯의 재배최적조건의 고온다습한 까다로움으로 인하여 흰목이버섯을 최적의 조건으로 생산할 수 있는 대량재배법을 확립하기 위하여 일반적으로 버섯 재배 시 국내에서 많이 사용 되고 구입이 손쉬운 배지들을 사용하여 최적의 혼합 비율에 대한 실험으로 최적배지를 선발하여 생산성을 높일 수 있었다.

흰목이버섯의 영양은 유기물에 대한 분해와 동화를 거쳐 자체에 필요한 영양분을 섭취하기 때문에 면실피, 활엽수톱밥, 콘코브 등의 섬유소 및 조직으로부터 탄소를 얻는다. 흰목이버섯이 이용하는 탄소원은 주로 유기탄소화합물로서 cellulose, hemicellulose, lignine, pectine, pantotanic acids, lactic acids, alcohols 류들을 이용한다. glucose, sacharose 등 당류 들은 각종 식물성 원료인 면실피, 활엽수 톱밥, 콘코브, 사탕수수박 등 원료에서 온다. 질소성분은 흰목이버섯 단백질핵산과 효소류를 합성하는 주요원료이며 밀기울, 미강, 대두분 등 질소화합물에 의해 제공된다. 참고로 톱밥의 탄소함량은 49.18%이고 질소함량은 0.1% 이며, 초본식물의 C/N율은 30~80:1이며 목본식물의 C/N율은 200~350:1이다. 장 (1998)이 C/N율이 30:1 일 때 양호하였으며 10:1 일 때 저조하였다고 보고하였다. 흰목이버섯균사가 성장하는데는 탄소와 질소의 비율은 20:1이 적합하며, 자실체 생육 시 탄소와 질소의 비율은 30:1이 적합하다고 하였다(丁과 丁, 2001).

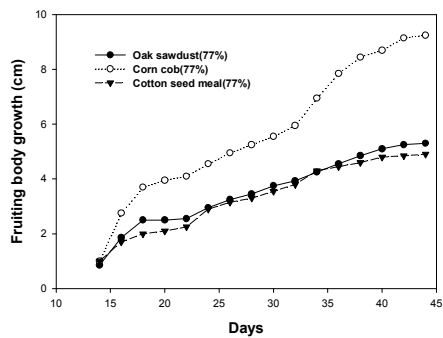
첨가제로서는 황백당, 석고, 황산마그네슘 등을 0.5~3%를 첨가하여 흰목이버섯 균사와 자실체의 성장발육에 필요한 유기탄소, 산도 조절 그리고 무기염 등을 공급해 주기 위하여 첨가하였다. 황백당은 배양액중의 유기 탄소 공급원으로서 균사의 증식과 성장에 유리하게 하기 위하여 배지조합 중 1%를 첨가하였으며, 석고는 약산성으로 배지의 산염기도를 조절하여 주고 배지 조합 중 1.5%를 사용하였다. 그리고 황산마그네슘은 효소를 활성화시키고 대사를 촉진하여 균사의 성장을 돕기 위하여 배지조성에 0.5% 사용하였다.



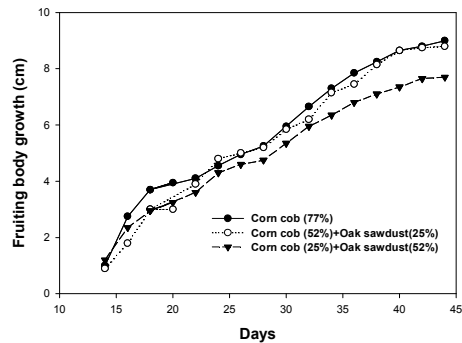
Fig.3-16. Culture of *T. fuciformis* in culture bottle

2. 주재료인 톱밥, 콘콕, 면실피의 비교

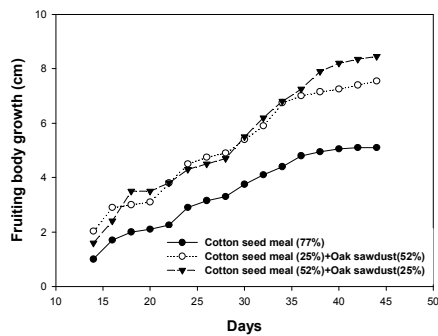
T. fuciformis KG 103의 재배에 있어 배지 최적화를 위하여 주재료 배지선발 실험에서는 국내에서 일반적으로 버섯재배에 많이 사용되고 있고, 값이 비교적 저렴하고 쉽게 구입할 수 있는 배지원료를 위주로 선별하였으며 비교 실험 배지 재료는 참나무 톱밥, 면실피 그리고 콘콕브를 비교 실험하였다. 톱밥, 콘콕브 그리고 면실피 중 주재료를 선별하기 위하여 각각에 대하여 흰목이버섯 자실체 생육에 미치는 영향에 대한 결과를 Fig. 3-17 에 나타내었다. 콘콕브가 77%일 때 9.25 cm로 가장 좋은 결과를 보였으며, 참나무 톱밥 과 면실피가 77%일 때 각각 5.3 cm, 4.9 cm로 생육이 극히 저조하였다. 콘콕브를 주재료로 사용하였을 때 가장 월등하게 성장하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3-17(a)).



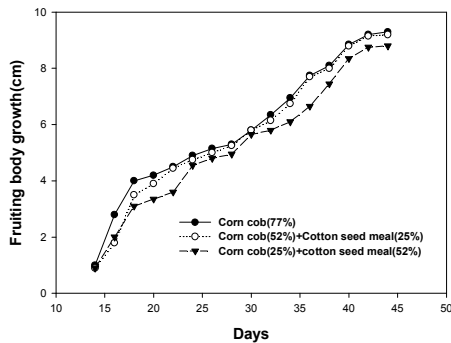
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 3-17 . Comparison of main materials (a-c) for the culture of KG 103 and effects of rice bran and wheat bran (b)

장(1997)에 의하면 참나무와 포플라톱밥 등 활엽수 톱밥이 양호하였고 소나무 톱밥이 가장 저조하였으며 공생균은 아카시나무 톱밥이 가장 양호하고 오리나무 톱밥이 가장 저조하였다고 보고하였다. 최상의 배지조성 연구를 통하여 자실체로의 전환률을 높이기 위한 연구를 지속적으로 할 필요가 있다.

결과가 좋지 않은 참나무 톱밥을 제외하고 콘코브와 면실파에 의해서 흰목이 버섯 자실체 생육에 어떤 영향을 끼치는 것에 대하여 실험하였다. 역시 콘코브를 77%로 했을 때 9.3 cm로 가장 좋았으며, 52%일 때 9.2 cm로 77%일 때와 차이를

별로 보이지 않았으며, 25%일 때는 8.9 cm로 다소 저조함을 볼 수 있었다(Fig. 3-17(b)). 이와 같이 콘코브 함량을 줄일수록 생육이 저조해짐을 알 수 있었다. 그리고 면실피를 77%로 단독으로 사용했을 때 톱밥과 마찬가지로 4.9 cm로 저조하였으나, 콘코브를 혼용하였을 때는 생육상태가 좋아지는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3-17(c)).

Huang(1986)에 의하면 흰목이버섯 종균제조에 쓰이는 주재료로서 활엽수톱밥 79 kg을 혼합한다고 보고하였고, Ting(1987)은 목화씨 껍질을 이용한 plastic bag 재배라는 보고에서 목화씨 껍질 100 kg, 석고 4 kg, 황산마그네슘 0.5 kg, 물 100~120 kg을 혼합한 배지와 목화씨 껍질 50 kg, 분쇄 옥수수숙 50 kg, 밀기울 25 kg, 석고 4 kg, urea 0.4 kg, 물 100~120 kg을 각각 첨가한 배지를 사용하였으며, 중국의 Fujian 지방의 Gutian 지역에서는 목화씨 껍질을 사용하여 톱밥보다는 높은 수량을 나타내었다고 보고한 바와 같이 가장 이상적인 주 배지원료로는 초본류인 콘코브 및 면실피 등이 버섯생육에 유리함을 본 실험을 통해서 확인할 수 있었다.

3. 보조재료인 미강과 밀기울의 비교

미강과 밀기울의 성분표를 보면 N함량(43.6% : 47%)과 C함량(2.45% : 2.48%)으로 대동소이 하며 C/N률(18 : 19) 역시, 차이를 보이지 않아서 그런지 아무재료나 써도 별 차이가 없음을 확인하였다. N함량이 많으면 과영양으로 흰목이버섯균사가 부단히 영양분을 분해, 흡수하여 영양생장시간을 연장한다. 그러므로 보조재료로 사용되는 미강과 밀기울의 함량은 흰목이버섯 재배에 있어 중요한 배지재료로써 C/N비를 조절해주며, 질소와 비타민, 무기염을 제공하였다. 생육용 배지에서 C/N율은 흰목이버섯의 생물학적 효율에 직접적인 영향을 미친다. 미강, 밀기울에 대한 비교 실험결과 Fig. 3-17(d)에서 보듯이 생육 44일째에 생육길이가 미강을 첨가하였을 때는 9.1 cm였고, 밀기울은 8.6 cm로 다소 미강이 우수한 것으로 나타났다.

4. 흰목이버섯 재배시 적정 수분함량

T. fuciformis KG 103와 *A. stygium* KG 201을 혼합 배양된 종균을 집종하여 배지수분함량에 따른 생산량을 비교하였다. 영양생장에 있어서는 수분함량이 다

소 낮은 것이 균사생장이 빨랐으며 수분농도가 높을수록 균사생장이 더디었다. 높은 수분농도에서는 균사생장이 느려서 충분한 균사가 확산되지 않아 배지의 영양분을 충분히 이용하지 못하여 생산량에서 저조함을 관찰할 수 있었다. Table 3-35 를 보면 55%에서 140 g/bottle으로 가장 많은 생산량을 관찰할 수 있었다. 톱밥 배지의 수분함량이 40~55%에서 21~22 mm/15 day로 균사생장이 양호하였고 60~75%로 비교적 수분이 많을 경우 균사생장이 저조하였다. 장(1998)이 보고한 것과 일치하는 결과를 보였다.

Chen과 Hou(1978)에 의하면 배지의 수분은 1차 종균의 경우 건조가 잘되지 않기 때문에 50%, 생육배지는 55~60%정도로 조절해야하며 이 같은 수분은 흰목이버섯 균사생장에 적당하다고 하였다.

Table 3-35. Effect of moisture content to growth fruiting body of *T. fuciformis* KG 103.

(cm / growth)

Strain	Moisture content (%)						
	40	45	50	55	60	65	70
<i>T. fuciformis</i> KG 103	5.2	7.4	8.6	9.3	8.9	6.5	2.9
& <i>A. stygium</i> KG 201							

5. 흰목이버섯 대량생산을 위한 재배용기 개발

본 연구는 흰목이버섯 대량재배법을 확립하기위하여 기존의 병버섯 재배용 용기를 활용하여 고온다습 조건을 맞추어 주어야 하는 까다로움을 병속 재배로 해결하였고 입병작업, 접종작업, 생육관리, 수확 등의 전반적으로 모든 과정에서 불편하여 새로운 용기를 개발하게 되었다. 국내의 사계절이 뚜렷한 자연환경을 극복할 수 있는 연중 계획생산을 위하여 재배용기를 개발하게 되었으며 각종 다른 버섯류 재배에 있어 일정한 온, 습도가 요구되는 버섯류를 쉽게 재배할 수 있도록 고안되었다.

흰목이버섯을 재배함에 있어서, 버섯 배지용기에서 자라게 되는 버섯의 습도를 일정하게 유지한 채로 생육이 되도록 하였으며 버섯 배지용기의 상부를 투명용기로 씌워 주어 버섯이 투명용기 내부에서 자라는 모습을 외부에서 생육관찰이 가능하도록 하였다. 그리고 버섯 재배용 배지는 담기는 용기와 버섯이 자라나게 되는 것을 감싸주는 용기를 분리함으로써 버섯이 배지와 분리된 채로 재배될 수 있도록 하였다.

흰목이버섯을 재배하기 위한 버섯 재배 용기(100)는 버섯의 배지(50)가 담기는 배양부 용기(10)와, 상기 배양부 용기(50)를 덮어주고 내측필터(40)가 끼워지는 중간캡(20)과, 상기 중간캡(20)의 상부에 끼워지고 중간캡(20)의 구멍(22)을 통하여 버섯이 생육하게 되며 상측으로 배출홈(32)이 형성된 생육부 용기(30)로 개발되었다(Fig. 3-18).

흰목이버섯의 생육은 배지(50)와 중간캡(20)으로 분리되어 생육부 용기(30)에서 자라게 되고, 배지(50)는 배양부 용기(10)에 채워져 있어 버섯이 자라는데 필요한 습도를 일정하게 유지시킬 수 있어 버섯의 성장조건을 맞추어 주기가 용이하고 또한, 버섯과 배지가 완전히 분리되므로, 버섯을 깨끗이 생육시킬 수 있으며 특히, 버섯이 생육되는 모습을 생육부 용기(30)를 통하여 용이하게 관찰할 수 있게 된다(Fig. 3-19)). 특히 어린아이들의 관찰학습에 효과적으로 이용될 수 있게 된다. 따라서 이 재배용기는 흰목버섯재배에 있어 최상의 환경조건을 맞추어 줄 수 있을 뿐만 아니라, 가정에서도 여러 가지 버섯류들을 재배관찰을 할 수 있으며 아이들의 학습용으로도 활용할 수 있도록 재배편의성과 활용도를 높였다.

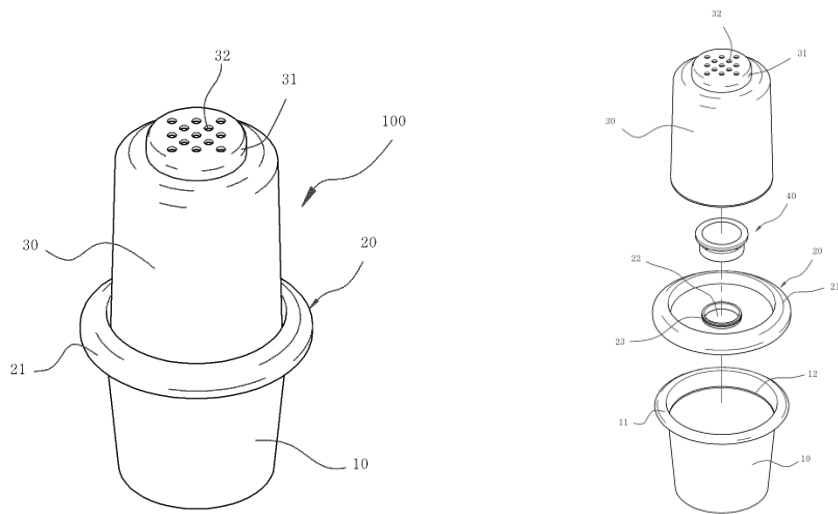


Fig. 3-18. Schematic diagram of mushroom bottle.
 10: culture bottle 20: middle cap 22: growth hole 30: mushroom culture cap 40:
 inner filter 50: medium 100: mushroom culture bottle

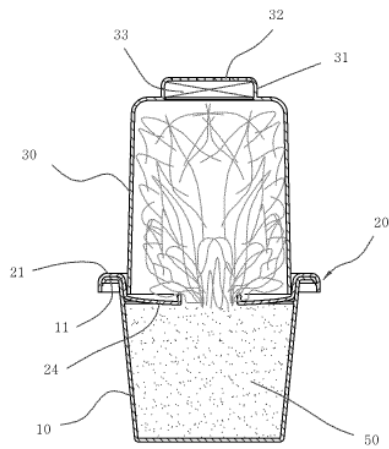


Fig. 3-19. Sectional view of mushroom bottle covering with top cap showing
 the growth of *T. fuciformis* KG 103.

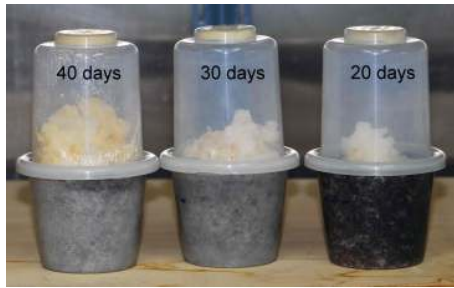


Fig. 3-20. Fruiting body growth of *T. fuciformis* KG 103 by cotton seed meal and corn cob(+rice bran(20%)+sugar(1%)+CaSO₄·2H₂O(1.5%)+MgSO₄·7H₂O(0.5%)).

7절. 흰목이버섯균과 공생균의 공생관계분석

1. 공생균의 분비물질 영향

MCM 배지 위에 cellophane을 깔고 공생균을 접종하여 10일간 배양한 후 cellophane을 걷어내고 *T. fuciformis*를 접종, 배양한 결과, *T. fuciformis* 단독으로 배양한것은 8.2mm/10일이고 cellophane 처리를 한 것은 9.8mm/10일로서 19.5%의 촉진효과가 있었다. 이 촉진 효과는 공생균이 분비하는 효소물질에 의한 것으로 추정하고 많은 종류의 효소 중 버섯에 있어서 섬유소 분해효소 중 xylanase와

리그닌 분해효소 중 ligninase와 laccase의 활성을 측정한 결과, *T. fuciformis*를 단독 배양한 경우 xylanase는 0.562(U)이나 공생균과 공동 배양하면 2.424(U)로서 4.3배 효소활성이 증가하였으며 ligninase는 *T. fuciformis* 단독 배양시 0.135(U)이나 공동 배양시 1.374(U)로 10.2배 증가, laccase는 0.061(U)가 공동 배양시 0.871(U)로 14.3배나 증가하였다(Table 3-36). 공동배양시 *T. fuciformis*의 섬유소, 리그닌 분해력을 공생균이 그 분해를 도움으로서 그 촉진 효과가 나타난다고 추정하고 xylanase와 ligninase, laccase에 대한 효소적 성질에 대해서 더욱 자세히 연구 검토해야 할 과제라 생각하여 그 효소적 성질을 고찰하고자 한다. 또한 톱밥배지에 흰목이버섯균 단독 배양한 균을 접종하면 균사생장이 거의 이루어지지 않은 반면 흰목이버섯균과 공생균을 공동 배양한 균을 접종하면 균사생장이 현저히 촉진되어 자실체의 원기를 형성한다.

Table 3-36. Promotion rate of mycelial growth of *T. fuciformis* by the *Hypoxyylon.sp.*

Treatment	Mycelial growth (mm/10days)	Promotion rate (%)	Enzyme activity(U)		
			XY	LI	LA
T	8.2	-	0.562	0.135	0.061
T+H	9.8	19.5	2.424 (4.3)^^^	1.374 (10.3)	0.087 (14.3)

* XY : xylanase LI : ligninase LA : laccase

** *T. fuciformis* was inoculated after removal the cultivated *H. sp.* on the cellophane medium

*** () is multiple of increase

2. Xylanase 생산에 미치는 탄소원의 영향

흰목이버섯균, 공생균, 혼합균으로부터 분비되는 extracellular xylanase의

활성이 높은 배지를 선발하기 위해 탄소원으로서 glucose, xylose, sucrose, lactose, malt extract를 각각 0.1%씩 첨가하여 xylanase activity를 측정한 결과 흰목이버섯균의 경우 xylose를 첨가하였을 때 0.564(U)로 가장 높았으며 maltose, glucose, lactose, sucrose 순이었다. 공생균과 혼합균의 경우도 xylose를 첨가하였을 때 1.947, 2.465(U)로서 control은 물론 다른 처리보다 현저히 높았다(Fig. 3-21).

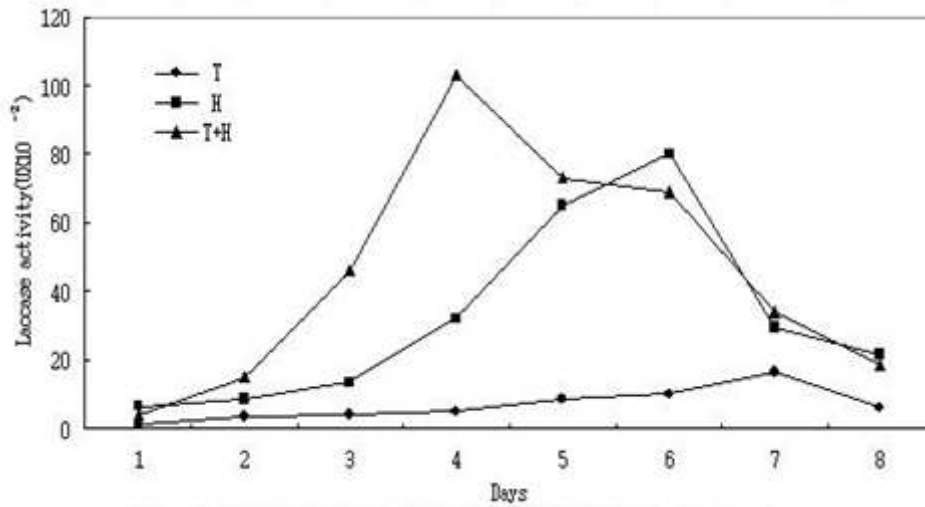


Fig. 3-21. Time course of lacase production by *T. fuciformis*

3. 질소원의 영향

기본배지에 활성도가 높은 탄소원인 0.1% xylose를 첨가한 후 NaNO₃, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, yeast extract, polypeptone를 각각 0.2%씩 첨가하여 xylanase activity를 측정한 결과, 흰목이버섯균과 공생균은 무기질소 화합물인 potassium nitrate(KNO₃) 첨가 배지에서 각각 0.425, 1.862(U), 혼합균은 ammonium sulfate((NH₄)₂SO₄) 첨가 배지에서 2.145(U)로 가장 높았다(Fig. 3-22).

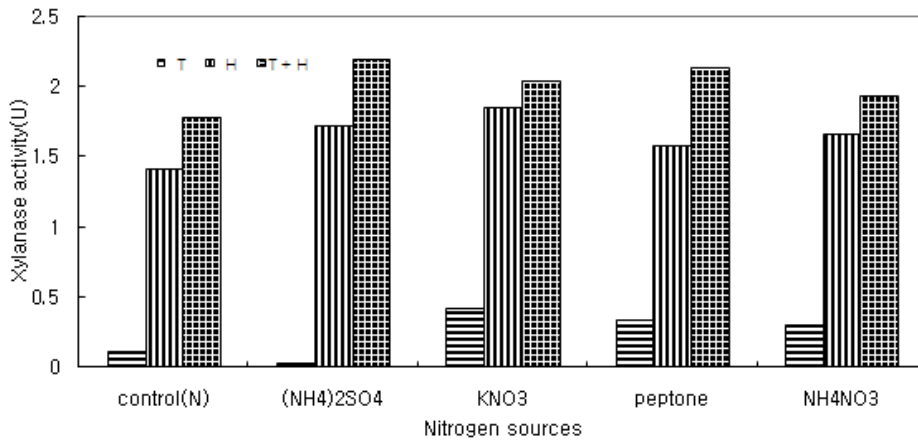


Fig. 3-22. Effect of nitrogen sources of xylanase production

4. 효소생산에 미치는 pH 및 온도의 영향

탄소원으로 xylose 0.1%와 질소원으로 흰목이버섯균과 공생균은 potassium nitrate, 혼합균은 ammonium sulfate를 각각 0.2%씩 첨가한 기본배지에 8일간 배양하면서 매일 xylanase production을 조사한 결과 흰목이버섯균은 배양 7일째, 공생균은 6일째, 혼합균은 5일째에 최고치를 나타냈다. Xylanase 활성은 혼합균, 공생균, 흰목이버섯균 순으로 각각 2.424, 1.738, 0.562(U)로 높았고, 최대 활성을 나타내는 배양일수도 혼합균, 공생균, 흰목이버섯균 순으로 짧았다.

Xylanase 효소는 Fig. 3-23 에서 보는 바와 같이 흰목이균은 pH 7에서 0.575 (U), 공생균과 혼합균은 pH 6에서 1.601, 1.656 (U)으로 가장 생산이 많이 되었으며, 혼합균, 공생균, 흰목이균 순으로 활성도가 높았다.

온도가 xylanase의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 흰목이균의 경우 45℃, 공생균과 혼합균의 경우 40℃에서 가장 높았으며 그보다 높거나 낮을 때 급속히 낮아졌다(Fig. 3-24).

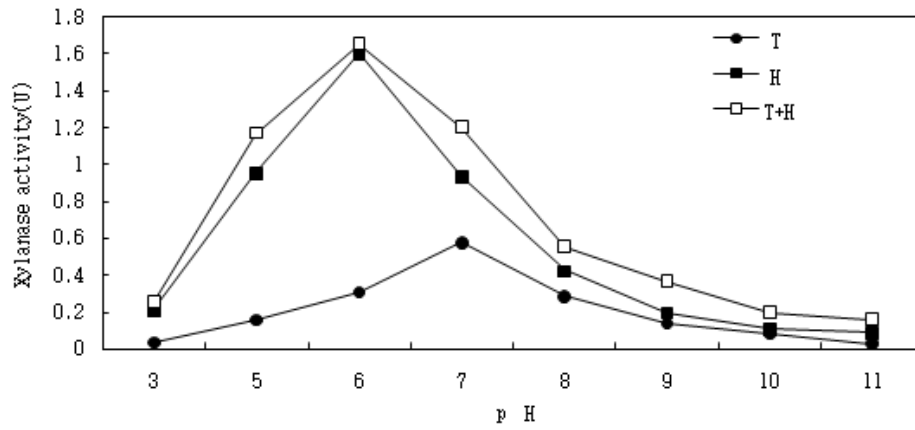


Fig. 3-23. Effect of pH on the xylanase production

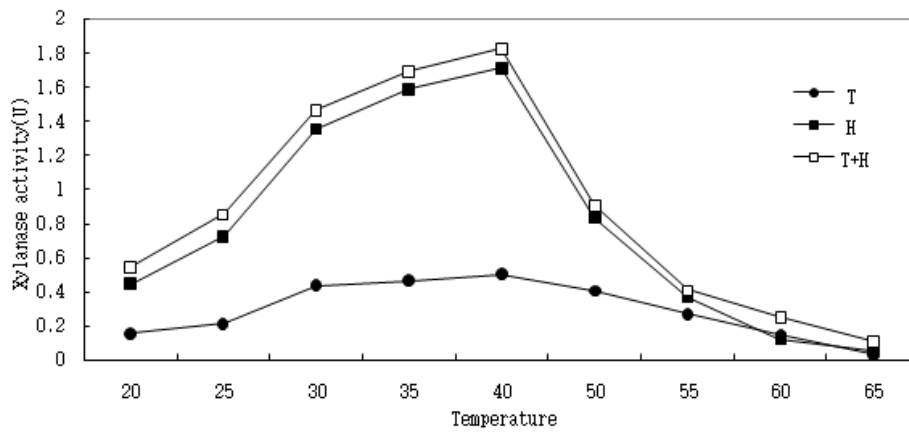


Fig. 3-24. Effect of temperature on the xylanase production

5. Ligninase와 laccase 생산에 미치는 접종량의 효과

Ligninase 활성은 접종량이 60ml일때 흰목이버섯균은 $1.53(U \times 10^{-2})$, 공생균은 $10.51(U \times 10^{-2})$, 혼합균은 $13.05(U \times 10^{-2})$ 로서 가장 활성도가 높았으며 접종량이 60ml 이상일 때 활성도가 모두 낮아졌으나 Benz. 첨가구에서 제일 낮았으며 15, 30, 45ml 순으로 높았다(그림 27). 배양액량에 따라서 효소 활성도가 다른 것은 진탕할 때 효소 분획이 달라지고 균체의 pellet 크기가 달라지기 때문이다(Reid 등, 1985). Laccase 활성도는 흰목이버섯균의 경우 30ml 접종량에서 $0.34(U \times 10^{-2})$ 로 가장 양호하였으며 그 보다 많거나 적을 때 활성도가 떨어졌다. 공생균과 혼합균의 경우 45ml 접종량에서 각각 7.14, 8.51($U \times 10^{-2}$)로 가장 양호하였다(Fig. 3-25).

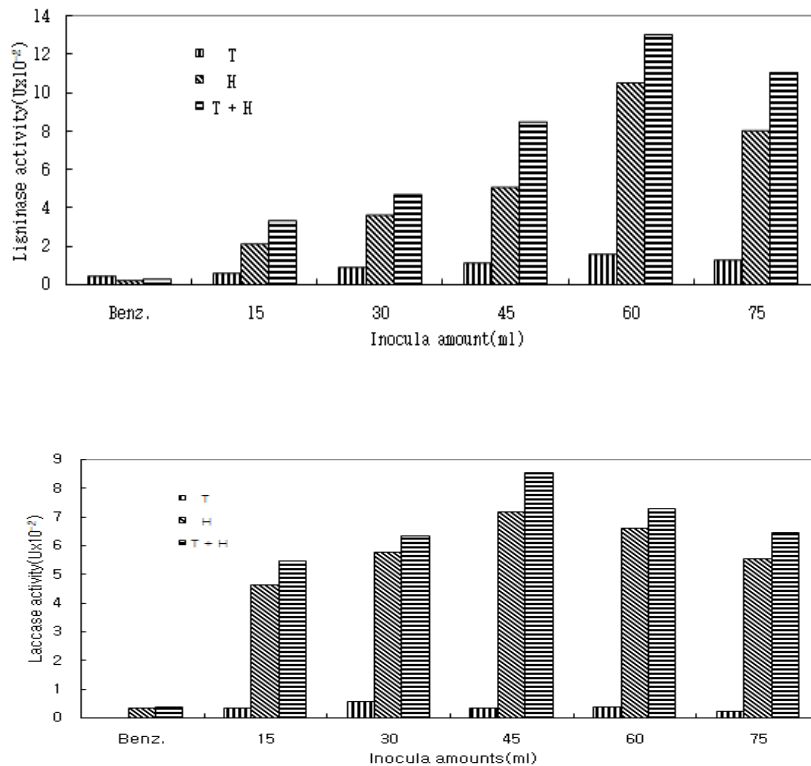


Fig. 3-25. Effect of different inocula amount in lignase and laccase production

6. 배양조건에 따른 ligninase, laccase 활성

공시균의 ligninase와 laccase 활성을 제고시키기 위한 배양조건을 검토한 바 ligninase 활성이 가장 높은 처리는 흰목이버섯균, 공생균, 혼합균 모두 ME(malt extract) + YE(yeast extract) + TW(tween 20) + VA(veratryl alcohol) 처리구에서 각각 1.35, 11.52, 13.74($U \times 10^{-2}$)로 가장 양호하였으며 ME + YE + TW + BA 처리구, ME + YE + VA 순으로 활성도가 높았다(Fig. 3-26). Laccase 활성도도 흰목이버섯균, 공생균, 혼합균 모두 ME + YE + TW + VA 처리구에서 각각 0.61, 7.41, 8.71($U \times 10^{-2}$)로 가장 양호하였으며 ligninase 활성도와 같은 경향을 나타내었다.

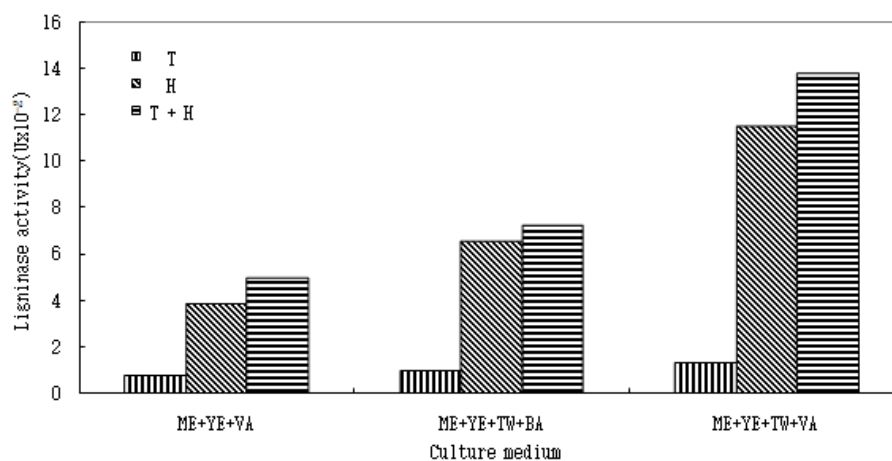
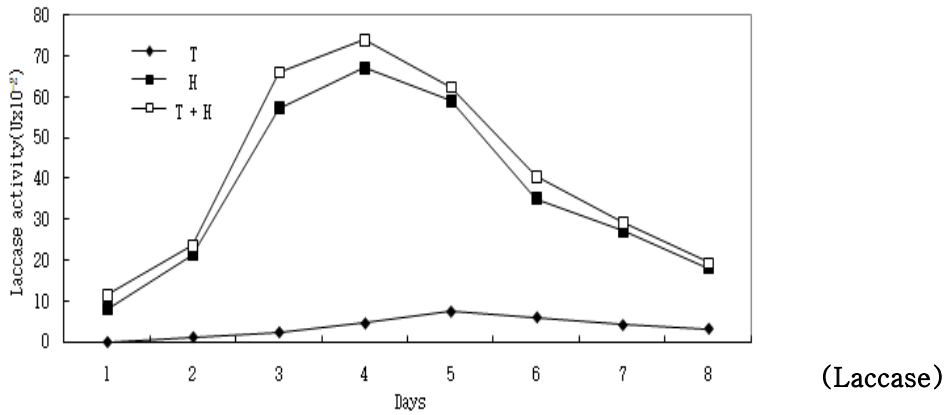


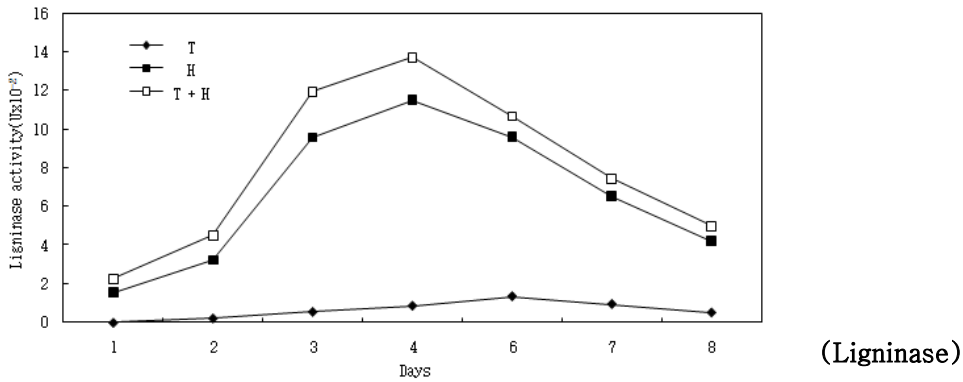
Fig. 3-26. Effect of culture medium containing different detergents

7. 배양일수의 영향

흰목이버섯균의 ligninase와 laccase의 활성은 배양 6일째에 각각 1.34($U \times 10^{-2}$), 0.61($U \times 10^{-2}$), 공생균은 4일째에 각각 11.51($U \times 10^{-2}$), 6.72($U \times 10^{-2}$), 혼합균도 4일째에 각각 13.72($U \times 10^{-2}$), 7.41($U \times 10^{-2}$)로 가장 높았다.



(Laccase)



(Ligninase)

Fig. 3-27. Time course of ligninase and laccase production

8. *Hypoxyylon* sp.가 생산하는 자실체 형성 유도물질 탐색

흰목이의 자실체 형성에 관여하는 유도 성분을 탐색하기 위하여 공생균을 7일간 27°C에서 YM 배지에 배양하여 배양여액과 균사체를 각종 용매에 추출 후 paper disc 방법과 살균된 톱밥 배지에 처리한 결과, 공생균의 배양여액은 활성이 전혀 없었다. 그러나 균사체 추출물 가운데 메탄올을 가한 후 85°C에서 추출한 여액은 흰목이의 균사 성장을 대조구에 비해 촉진하였으며 paper disc에 적정하여 실시한 실험에서는 자실체 형성의 1차 과정인 원기의 형성이 보였다.

9. 수확, 건조 및 병해충관리

성숙된 흰목이 버섯의 자실체는 국화꽃 같은 모습을 나타내었고 직경이 8~12cm에 달했으며 갓이 귀 모양이었다. 수확을 너무 일찍 하면 수량이 낮고 반대로 수확이 너무 늦으면 자실체의 밑 부분이 검게 변하여 부패하기 시작하여 버섯 품질에 나쁜 영향을 미쳤다. 따라서 수확 적기는 귀 모양의 형태가 완전히 열렸을 때, 색깔이 투명한 색에서 하얀색으로 변할 때, 자실체의 바깥 부분이 부드러워지면서 밑으로 처지기 시작할 때 자실체와 원목(배지)이 닿는 부분을 날카로운 칼로 베어 수확하면 고품질의 것을 얻을 수 있다(Table. 3-37).

Table 3-37. Optimal harvesting time of fruiting body in *T. fuciformis*

Type	Harvesting time
Ear-shaped structures	Completely open
Colour	From transparent to white
Outside part of fruiting body	Soften and droop

수확한 자실체를 4가지 방법으로 건조시킨 결과, 48시간 동안 햇볕에 건조한 것은 자실체 색깔이 흰색을 유지하여 가장 좋았으며 다음이 30℃에서 4시간동안 버섯 표면을 건조시킨 후 60℃에서 4시간 동안 건조시킨 것도 자실체의 색깔이 흰색으로 좋았다. 그러나 80℃에서 8시간 동안 건조시키면 자실체 색깔이 적황색을 띠어 품질이 불량하게 되었으며 이 4가지 건조 방법으로 건조한 자실체의 건조율은 모두 8% 이었다(Table 3-38).

Table 3-38. Drying and storing process of *T. fuciformis* fruiting body

Drying process temperature(℃)	Drying process time(hours)	Colour of fruiting body	Air flow	Dry weight rate(%)
30→60	4→4	white	strong	8
80	8	redish yellow	strong	8
Room	72	yellow white	-	8
Sun drying	48	white	-	8

흰목이 자실체가 발생되어 있는 원목을 쪼개어 *Hypoxylon* sp.를 분리하는 과정중 원목 내외부에 서식하고 있는 병충으로 *T. viridae* 외 6가지 곰팡이와 1종의 *Pseudomonas* sp. 세균, 원목 주위에 흰개미, 버섯파리, 딱정벌레류가 발견되었다(Table 3-39). 이들 곰팡이류의 해균과 해충이 자실체에 침입하여 흰색의 자실체 색깔을 회황색으로 변화시키고 썩게 만들어 商品성을 떨어뜨리게 하는 원인이 되었다. Olive(1958)에 의하면 *Sphaeriaceae*와 *Phemiceae*균은 흰목이 버섯 품질에 나쁜 영향을 주기 때문에 'Nakaiomyces'라고 이름이 주어졌다고 하였으며 버섯파리 등 해충은 자실체를 파괴 할 뿐만 아니라 병을 옮기는 carrier 역할을 하는데 *Lentinus edodes*나 *Auricularia auricula-judae* 재배시에도 비슷한 병해충이 발생한다고 보고하였다.

Table 3-39. Diseases and pests occurrence during cultivating of *T. fuciformis*

Diseases	Pests
<i>Trichoderma viridae</i> , <i>Streptomyces</i> sp.	ants
<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	fly
<i>Saccharomyces</i> sp., <i>Rizopus</i> sp.	beetle
<i>Monilia</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	



Fig. 3-28. Contamination of *Trichoderma* and *Saccharomyces*

8절. 흰목이버섯의 식품학적 특성분석

1. 일반성분 분석

최적배지에서 *T. fuciformis* KG 103의 균사체 및 자실체의 일반성분을 식품성분 분석법에 따라 수분, 총 단백, 총 지질, 회분, 총 당량으로 측정하여 분석하였다. 흰목이버섯 자실체의 일반성분을 A.O.A.C 법 (1980)에 따라 분석하였다. Table 3-40 에서 나타낸 것처럼 수분, 회분, 조단백, 조지방, 조섬유 그리고 탄수화물 함량은 각각 85.87, 1.14, 1.29, 0.25, 0.2, 11.25%로 나타났다. 구성 성분의 대부분은 탄수화물이 차지하였으며 단백질 성분이 기타 성분 중에서는 제일 많았다.

Table 3-40. Chemical compositions of *T. fuciformis* KG 103.

Items	Composition (%)
	Fruit body
Moisture	85.87
Ash	1.14
Crude protein	1.29
Crude fat	0.25
Crude fiber	0.20
Carbohydrate	11.25
Total	100

2. 지질 성분 분석

흰목이버섯은 palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0)와 불포화 지방산인 oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2)를 다량 함유하고 있다. 지방산 중 oleic acid의 함량이 51.2%로 가장 높았으며 palmitic acid (16:0)가 15.8%로 나타났다(Table 3-41). 흰목이버섯에 함유된 지질 성분에는 sterol 계열인 비타민 D 전구체(ergosterol)가 82.78%로 다량 함유되어 있음을 알 수 있었다(Table 3-42).

장(1998)은 흰목이버섯에는 palmitic acid가 16.7%, oleic acid가 52%, 그리고 linoleic acid가 26.8% 함유되고 있는 것으로 보고하였다. Oleic acid의 함량이 여러 지방산 중 가장 높았으며 비타민 D의 전구체인 ergosterol이 88.06% 함유되어 있다고 발표하였으며, 이 연구와 유사한 결과를 분석할 수 있었다.

Table 3-41. Fatty acids composition of *T. fuciformis* KG 103.

Fatty acids	<i>T. fuciformis</i> KG 103
	Fruiting body(%)
14:2	
16:0	15.8
16:1	
17:0	
17:1	
18:0	3.2
18:1	51.2
18:2	25.4
18:3	
Others	
Total amount of FA	3.9(μ g/mg)

% : from total lipid

Table 3-42. Sterols composition of *T. fuciformis* KG 103.

Sterols	<i>T. fuciformis</i> KG 103
	Fruiting body(%)
4 α -Methylfecosterol	0.21
4.4-Dimethylfecosterol	0.21
Episterol	7.02
Ergosterol	82.78
Ergostaterraenol	2.42
Eburicol	0.56
Ergosta-7.22-dien-3 β ol	3.22
Fecosterol	1.24
Lanosterol	0.1
Other sterols	0.3
Total amount of sterols	1.94(μ g/mg)

% : from total sterols

3. 아미노산 성분 분석

흰목이버섯의 단백질가치를 측정하기 위하여 아미노산 조성을 조사하였다. 아미노산 분석시 glutamic acid가 15.68%로 가장 높은 함량을 나타내었으며, tyrosine, serine, glycine, lysine, alanine의 함량이 각각 12.56, 10.03, 9.76, 8.98, 8.50로 나타났다. 필수 아미노산인 lysine, arginine이 8.98%, 1.49%로 전체아미노산 중 총 10%이상을 함유하고 있는 것으로 분석되었으며, 이는 식품학적으로 중요한 점이라 판단된다. 그리고 Glutamic acid의 함량이 높은 것은 흰목이 버섯의 맛에 관여하는 중요한 인자이며, 식품학적으로 흰목이버섯이 지니고 있는 중요한 특성이다(Table 3-43). 장(1998)도 유사한 결과를 보고하였으며, 흰목이버섯에는 aspartic acid, glycine, alanine, threonine, arginine 및 serine등의 아미노산류가 다량 함유되어있다고 발표하였다.

Table 3-43. Amino acids composition of *T. fuciformis* KG 103.

Amino acids	Contents(mg/100 g)	Composition(%)
Aspartic acid	15.47	2.96
Threonine	44.31	8.49
Serine	52.37	10.03
Glutamic acid	81.86	15.68
Glycine	50.99	9.76
Alanine	44.38	8.50
Valine	33.04	6.33
Leucine	14.20	2.72
Tyrosine	65.59	12.56
Lysine	46.88	8.98
Arginine	7.80	1.49
Total	522.18	100.00

4. 구성당 분석

흰목이버섯 및 *Hypoxylon* sp.의 유리당을 sugar alditol acetate 유도체화시켜 GC로 분석하고 HPLC로 80% 메탄올 추출물을 농축한 다음 elution buffer로 녹여 분석한 결과 유리당 중 6탄당인 galactose와 glucose, 5탄당인 fructose, 이당류인 trehalose를 함유하고 있는 것으로 나타났다(Table 3-44). 흰목이버섯 자실체에는 galactose의 함량이 높은 것으로 나타났으며, trehalose가 가장 작은 함량을 나타내었다.

Table 3-44. Contents of sugars* of *T. fuciformis* and *Hypoxyton* sp.

Sugar	<i>T. fuciformis</i>
	Fruit body
Galactose	22.5
Glucose	33.6
Fructose	1.2
Trehalose	42.6
Total sugars ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	8.7

* Percent(%) of total sugar

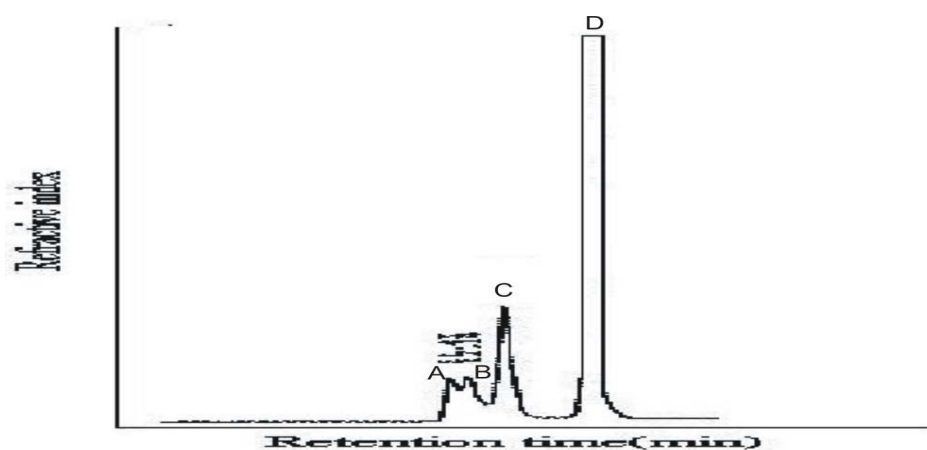


Fig. 3-29. Chromatography of free sugars of fruit bodies of *T. fuciformis* extracted with 80% aqueous EtOH.

Letters assignments: A, trehalose; B, fructose; C, glucose; D, galactose

5. 유기산, 아미노산 분석

유기산 성분의 분석은 butyl ester 유도체를 GC로 분석한 결과 Table 17과 같이 formic acid를 비롯한 10종의 유기산이 분석되었다. 이러한 결과는 다른 담자균類의 유기산 분석 결과와 유사하고 특히 *Hypoxylon* sp.류의 경우도 자낭균류임에도 유기산의 성분은 흰목이와 유사한 양상을 보였다(Table 3-45).

Table 3-45. Organic acid compositions of *Tremella fuciformis* and *Hypoxylon* sp.

Organic acid	<i>T. fuciformis</i>	<i>Hypoxylon</i> sp.
	Fruit body	
Formic acid	0.7	4.2
Acetic acid	3.4	12.6
Lactic acid	1.5	33.7
Nitric acid	22.2	35.1
Succinic acid	2.7	71.5
Fumaric acid	235.2	193.2
Ascorbic acid	39.3	833.1
α -Keto glutaric acid	0.8	64.2
Proglutamic acid	0.3	1028.3
Citric acid	0.4	1028.3

6. 페놀 및 플라보노이드 함량 분석

T. fuciformis KG 103의 총 페놀 함량을 구하기 위하여 caffeic acid, chlorogenic acid, catechin 그리고 ferulic acid의 4가지 표준물질로 함량을 계산하였다. Caffeic acid, chlorogenic acid, catechin과 ferulic acid로 계산시 총페놀 함량은 각각 738.63 $\mu\text{g/g}$, 2253.97 $\mu\text{g/g}$, 2599.06 $\mu\text{g/g}$, 2008.90 $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났으며 페놀화합물의 양이 높은 것으로 분석되었다(Table 3-46). 페놀화합물의 양이 높은 것은 식품소재의 기능적인 측면에서 중요하다. 특히 항산화 활성의 대부분

은 페놀화합물에서 나타나므로 흰목이버섯의 항산화활성이 높을 것으로 예측되어진다(Carlo 등, 1999). 항산화활성을 나타내는 주요한 인자인 flavonoid 화합물의 양은 quercetin을 표준물질로 사용하여 측정하였을 때 19.38 $\mu\text{g/g}$ 으로 확인되었다.

Table 3-46. The contents of total phenol and flavonoids *T. fuciformis* KG 103 according to phenolic standards.

($\mu\text{g/g}$)

Strain	Total Phenol			Flavonoids	
	Caffeic acid	Chlorogenic acid	Catechin	Ferulic acid	Quercetin (mg/g)
<i>T. fuciformis</i> KG 103	738.63	2253.97	2599.06	2008.90	17.38

9절. 흰목이버섯의 주요 생리활성

1. 흰목이버섯 추출물 제조

흰목이버섯의 생리활성을 측정하기 위하여 다음과 같이 3가지 방법을 사용하여 추출물을 제조하였다(Table 3-47). 방법 I 에서는 버섯에서 1차로 제조한 메탄올 추출물속의 화학적 성분을 계속적으로 극성이 증가하는 용매에 의하여 순차적으로 추출하였다. 결과로 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 그리고 water 분획으로 분리되었다. 세포 건조량의 약 6 % (w/w)에 해당하는 세포추출물이 methanol속에 포함되어 있었으며, 순차적으로 추출 시 대부분의 성분이 butanol과 수용액층에 포함되어 있었다.

N-butanol 추출물에 추출물중 총고형 함량의 50%가 함유되어 있었으며 물속

에도 세포 건조량의 2.69% 에 해당하는 성분이 포함되어 있었다. 이 방법과 비교해서 방법 II와 III에서는 모든 추출과정이 고온하에 수행되었다. 그러므로 방법 I에 비하여 추출되는 성분의 양이 많았으며, 대부분의 성분이 에탄올과 물 추출물속에 포함되고 나머지 분획들은 함량이 매우 낮았다(Table 3-47).

Table 3-47. Total dried extracts of *T. fuciformis* KG 103 by various solvents.

I		II		III	
Solvents	Yield(%)	Solvents	Yield(%)	Solvents	Yield(%)
Hexane	0.46	Ether	0.39	Chloroform	0.17
Chloroform	0.05	Ethyl acetate	0.12	Ethyl acetate	0.21
Ethyl acetate	0.06	Chloroform	0.04	Ether	0.13
<i>N</i> -buthanol	3.17	Ethanol	0.57	Ethanol	1.61
Water	2.69	Water	18.70	Water	23.80

2. 흰목이버섯 추출물의 암세포독성

Table 3-48 은 추출방법 I에서 나온 분획들의 DLD-1, LOX-IMVI, LXFL-529, RKO, SNB-19 and SNU-1 cell lines에 대한 세포 독성을 기술하였

다. Hexane, chloroform, ethyl acetate 분획은 모든 조사한 암세포주에 대하여 세포 독성을 나타냈으며 IC₅₀ 값은 500 ppm 이하로 나타났다. 추출방법 I에서 나온 분획들에 대하여 SNU-1 세포주가 40 ppm으로 가장 민감하였으며, LOX-IMVI 세포주는 hexane과 chloroform 분획이 IC₅₀ 값을 각각 60 ppm, 71 ppm을 나타냈다(Table 3-49). 기타 분획은 세포독성을 나타내지 않았다. Table 3-49 을 보면 추출방법 II에서 나온 분획들이 세포독성을 나타내고 있는 것을 알 수 있다. 그리고 추출방법 I과 비교하여 ether 추출물이 모든 세포들에 대하여 강한 세포독성을 나타냈으며 다른 분획들은 세포독성이 없는 것으로 밝혀졌다. DLD-1 세포주의 경우는 ether 추출물 이외에도, ethyl acetate 와 chloroform 추출물에 의하여 생육이 저해 되었으며 IC₅₀ 값은 각각 175 ppm, 800 ppm 그리고 850 ppm이었다. 추출방법 III에서는 추출방법 II의 첫 번째 추출용매로 chloroform을 ether대신 사용하였다.(Table 3-50) 즉 chloroform, ethyl acetate, ether 순으로 추출되었으며 이 세 추출물들은 모든 암세포들에 대하여 독성을 나타내었다. 특히 RKO 세포주가 추출물로 처리된 경우 세포의 생육에 많은 저해를 나타내었으며 IC₅₀ 값은 세 가지 추출물에 대하여 각각 200 ppm, 40 ppm 그리고 36 ppm이었다. 이 세 가지 방법에 의하여 추출된 추출물들의 dose-dependent 실험결과를 Fig. 22-39까지 나타냈다. 버섯류의 항암활성은 두 가지 그룹에 의하여 주로 나타나는데 그중 첫 번째 그룹은 다당류이며 두 번째 그룹은 polyphenol 혹은 flavonoid 류 이다. 고분자량의 항암성 버섯 다당류는 Pilat 등(2003), Lavia 등(2006) 등이 보고하였으며 다당류와 단백질 복합체인 lentinan, krestin, schizophyllan 이 *Schizophyllum commune* 으로 부터 (Fukushima, 1989) 알려져있다. 또한 Jong과 Donovick(1898)이 항암성 polysaccharide-protein 복합체에 대하여 보고 하였다. Polyphenols 과 flavonoids 들도 항암성이 나타나는 것으로 보고되었으며 (Carlo 등., 1999) 그 메카니즘이 Pomilio 등(1994)에 의하여 밝혀졌다.

흰목이버섯에서 polysaccharide 계통의 항암성 물질(Ukai 등, 1972)이 보고된 적이 있으나, 소수성 계열의 세포독성 물질이 보고된 바 없으나, 본 실험의 결과 소수성 화합물들이 저농도에서 강력한 암세포독성을 보여 줌을 알 수 있었다.

Table 3-48. IC₅₀ Values of fractions from experimental setting I to various cancer cell lines.

Subfractions	IC ₅₀ (ppm)					
	DLD-1	LOX -IMVI	LXFL -529	RKO	SNB-19	SNU-1
Hexane	400	60	360	440	460	450
Chloroform	450	71	500	120	100	480
Ethyl acetate	500	600	550	440	750	600
<i>N</i> -buthanol	–	–	–	–	–	–
Water	–	–	–	–	–	–

Table 3-49. IC₅₀ Values of fractions from experimental setting II to various cancer cell lines.

Subfractions	IC ₅₀ (ppm)					
	DLD-1	LOX -IMVI	LXFL -529	RKO	SNB-19	SNU-1
Ether	175	490	810	400	395	490
Ethyl acetate	800	–	–	–	–	–
Chloroform	850	–	–	–	–	–
Ethanol	–	–	–	–	–	–
Water	–	–	–	–	–	–

Table 3-50. IC₅₀ Values of fractions from experimental setting III to various cancer cell lines.

Subfractions	IC ₅₀ (ppm)					
	DLD-1	LOX -IMVI	LXFL -529	RKO	SNB-19	SNU-1
Chloroform	400	490	190	200	350	420
Ethyl acetate	450	400	320	40	420	60
Ether	450	260	220	36	460	210
Ethanol	-	-	-	-	-	-
Water	-	-	-	-	-	-

흰목이버섯은 전통적으로 중국에서 항암제, 강장제 등으로 사용되어 왔으나 그 외의 중요한 생리활성 물질은 보고되지 않았다. 그러므로 본 연구에서 얻은 암세포독성결과는 흰목이버섯의 중요한 생리작용 중의 하나이다.

Table 3-51. The extraction yields, total phenolic and flavonoid contents of various subfraction in system I from fruit bodies of *T. fuciformis*.

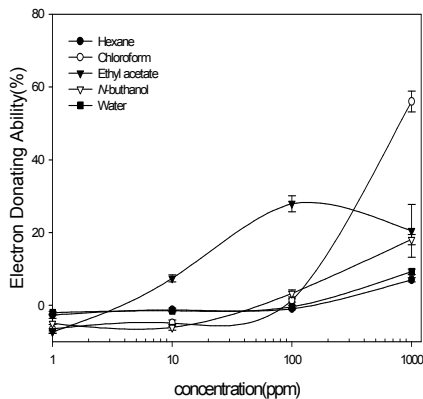
Solvents	Yield (%)	Chlorogenic acid eq. (μg/mg)	Quercetin eq. (μg/mg)
Hexane	0.46 ± 0.07	39.07 ± 2.90	3.86 ± 0.95
Chloroform	0.05 ± 0.0065	66.31 ± 8.46	7.12 ± 0.88
Ethyl acetate	0.06 ± 0.071	25.61 ± 4.70	4.06 ± 0.32
<i>N</i> -buthanol	3.17 ± 0.21	8.97 ± 0.82	2.43 ± 0.16
Water	2.69 ± 0.35	2.97 ± 0.93	1.43 ± 0.57

10절. 흰목이버섯 추출물의 항산화활성

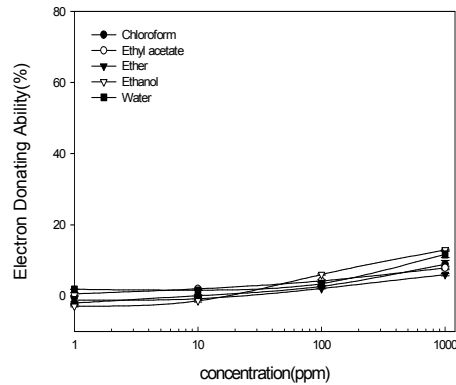
1. DPPH radical 소거능력

흰목이버섯(*Tremella fuciformis*)의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical에 대한 소거능력을 Bloise(1958) 방법에 의해 측정하였다. 흡광도 값이 0.95~1.00의 DPPH solution과 추출물들을 혼합하여 실온에서 10분간 방치한 후 518nm에서 UV/Vis spectrophotometer로 흡광도를 측정하였으며, 각 시료 추출물의 유리 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC_{50} 값으로 나타내었다. Fig. 3-30 에서처럼 세가지 방법 중 방법 I에 의해서 추출된 추출물이 DPPH 활성을 나타내는 것으로 측정 되었다. 특히 chloroform 분획의 활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 이 분획은 DPPH radical을 1000 ppm과 5000ppm에서 각각 60%와 80% 소거하는 것으로 나타났다. 다른 분획은 1000 ppm에서 20%보다 낮은 소거 능력을 나타내었다

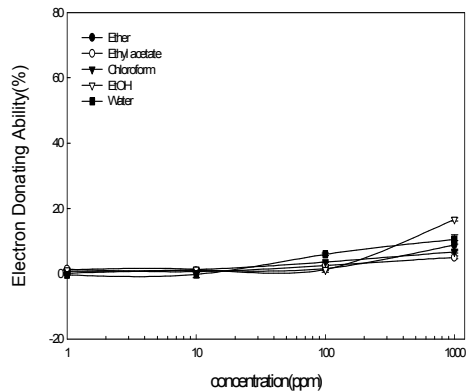
Mau et al. (2004) 등은 흰개미버섯(*Termitomyces lbuminosus*), 마이타케버섯(*Grifola frondosa*) 과 곰보버섯(*Morchella esculenta*) 이 10 mg/ml 농도에서 각각 78.8%, 79.4% and 94.1% 의 DPPH소거 능력이 있다고 보고하였다.



(A) 추출방법 I



B) 추출방법 II



(C) 추출방법 III

Figure. 3-30. DPPH radical scavenging activity of extracts from *T. fuciformis*

그리고 이 농도이하에서 곰보버섯은 세가지 버섯 중 가장 강한 항산화 능력을 지닌 것으로 보고하였다. Huang (2000) 은 안트로디아버섯(*Antrodia camphorata*) 과 상황버섯의 균사체의 메탄올 추출물이 5 mg/ml.에서 각각 97.1%와 98.8%의 DPPH radicals 소거 능력을 지닌 것으로 발표하였다. Tsai (2002)는 found that the methanolic extracts from mycelia of 버들송이(*Agrocybe cylindracea*) and 영지버섯 (*Ganoderma tsugae*) 메탄올 추출물이 10 mg/ml 농도에서 91.4%와 95.6%의 DPPH radicals 소거능력을 나타내었다고 보고하였다. 이 연구에서 비타민C는 1mg/ml의 농도에서 93% 활성을 나타내었으며, α -tocopherol, BHA BHT 는 86-90%의 활성을 지닌 것으로 분석되었다. BHA와 α -tocopherol은 좋은 항산화제로 알려져 있지만 실제로 DPPH radicals 소거능력이나 환원력이 낮은 것으로 나타났으며, 실제로 이들은 식품에서 mg 수준의 농도로 사용되고 있다.

이 연구에서 흰목이버섯 추출물이 보여준 DPPH radical소거능력은 다른 버섯의 추출물과 비교시 비교적 높은 것으로 나타났으며, 이는 흰목이버섯의 유용성을 입증하는 주요한 결과중의 하나이다.

방법 II와 III은 고온에서 장시간 추출되는 관계로 추출물 속에 포함된 성분들이 산화되어 항산화 활성을 나타내지 않는 것으로 추측된다.

2. SOD 유사활성 및 ABTS radical 소거 활성

Fig. 3-31 에서 보이는 것과 같이 추출방법 II에 의해 제조된 추출물들은 Superoxide 라디칼($\cdot O_2^-$) 소거활성 및 ABTS radical 소거 활성을 나타내지 않았다. 일반적으로 버섯 추출물들은 항산화력을 많이 나타내고 있으므로(Lee 등 2005, Chi 등 2005, Cheung 등 2003). DPPH 라디칼 소거활성 실험에서와 마찬가지로 열처리를 하지 않는 추출방법 I로 제조된 추출물들은 SOD활성 및 ABTS radical 소거활성을 나타낼 것으로 추측되었다. (Table 3-52)

(A) SOD 활성

(B) ABTS 활성

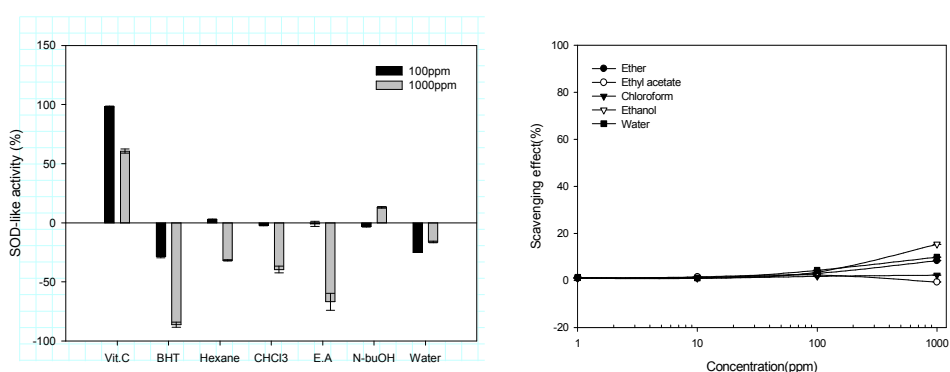


Fig. 3-31. SOD activity and ABTS radical scavenging activity of extracts from *T. fuciformis*.

Table 3-52. The scavenging activity of ABTS⁺ radical cation of various extracts from fruit bodies of *T. fuciformis*. (system I)

Solvents	TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) (μM trolox / mg of sample)
Hexane	5.07 ± 0.49
Chloroform	7.89 ± 0.08
Ethyl acetate	6.54 ± 0.36
<i>N</i> -buthanol	3.47 ± 0.85
Water	1.10 ± 1.41

ABTS⁺소거능력은 ABTS를 potassium persulfate로 직접 산화하여 탈색되는 정도를 측정하는 정도로서 TEAC 값으로 표현된다. 조사된 흰목이버섯 메탄올 추출물의 순차적 추출분획 중 chloroform 분획이 높은 TEAC 값을 나타내었으며, 이 분획은 다른 수요성 분획들에 비하여 약 2배 높은 활성을 나타내었다. 이 결과로부터 흰목이버섯 메탄올 추출물의 순차적 분획 시 대부분의 항산화성 물질이 소수성 물질들임을 예측할 수 있다.

흰목이버섯 추출물의 SOD 활성(O_2^- -scavenging ability)에 관련된 항산화력은 Tadashi 등 (2003)에 의하여 보고되었으나 활성 유효물질에 대한 성분분석이나 구조 규명은 현재까지 이루어지고 있지 않다. Superoxide radical은 세포성분에 매우 유해한 것으로 알려져 있으며, 훨씬 더 해로운 반응성 산소종의 전구체이다(Halliwell & Gutteridge, 1999). 생물학적 시스템에서 이 물질에 의해 발생하는 해로움은 superoxide dismutase (SOD)에 의하여 제거 될 수 있으며, 이 효소와 유사한 활성을 가진 물질을 개발하는 것이 주요한 연구관심중의 하나이다.(Chung et al. 2005). 흰목이버섯 추출물의 superoxide radical 소거활성이 Fig. 3-31 에 보여주고 있다. Pyrogallol은 superoxide를 생성하는데 이것은 즉시 자동산화되며, 이때 SOD과 반응에 참여한다. 그러므로 pyrogallol의 자동산화는 SOD나 SOD-유사활성물질이 존재하면 억제된다. L-ascorbic acid는 상대적으로 높은 SOD 유사활성을 나타내지만, 다른 항산화제인 BHT는 pyrogallol의 자동산화를 촉진한다. 흰목이버섯 추출물의 경우 순차적 추출분획모두가 SOD유사활성을 나타내지 않았다.

3. LDL 산화억제 활성

LDL 산화과정은 동맥경화의 주요한 과정중의 하나이다(Steinberg 1989). 다양한 버섯들의 LDL 산화과정에 관련된 TBARS 생성억제 활성들이 human LDL을 대상으로 5 μM CuSO₄을 산화과정의 개시제로 측정되고 있다.

흰목이버섯 추출물의 LDL 산화저해활성이 Fig. 3-32에 나타나고 있다. 방법 1에 의하여 추출된 분획 중 chloroform 추출물이 가장 강한 LDL 산화억제활성을 보여 주었다. 이 분획은 100, 1000 ppm에서 각각 40%와 80%의 저해활성을 나타냈으며, ethyl acetate추출물의 경우 1,000 ppm에서 약 60.2%의 활성을 저해하였다. 기타 분획들은 1000 ppm에서 40%이하의 활성을 보여 주었다.

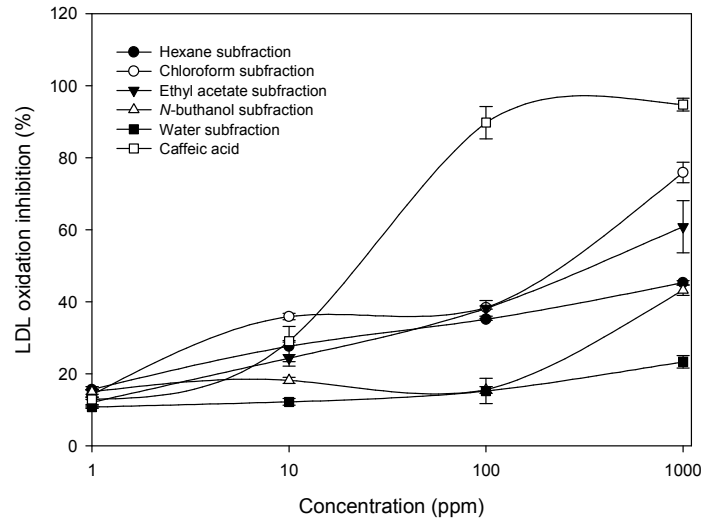


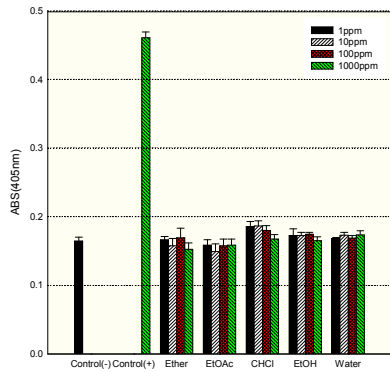
Fig. 3-32. Inhibition of human LDL oxidation of extracts from fruit bodies of *T. fuciformis*.

Cheung 등(2003)은 rat의 뇌 현탁물에 대한 지질의 peroxidation 저해효과를 상황버섯 (*Lentinusedodes*)과 풀비단털버섯(*Volvariella volvacea*)에서 분석하였으며, 이 버섯추출물들은 0.297 and 0.109 mg/ml 의 IC50값을 나타내었다. Lo등 (2005)은 LDL 산화로 인한 TBARS 생성이 for the ethyl acetate fraction from *Agrocybeaegerita*와 caffeic acid가 0.5mg/ml의 농도에서 각각 3.09 ± 0.38 과 2.69 ± 0.16 이라고 보고하였다.

4. 흰목이버섯 추출물의 면역활성

본 연구에서 사용한 추출방법 I, II, III에서 나온 추출물들은 Fig. 3-33에 나타난 것처럼 아주 미약한 면역활성을 나타내었으나 positive control보다 효과가 너무 적어서 면역활성이 나타나지는 않는 것으로 나타났다.

(A)



(B)

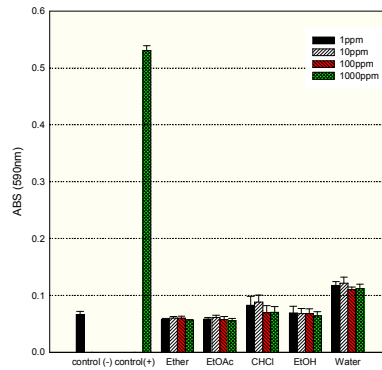


Fig. 3-33. Macrophage activating activity (A) and Mitigen activating activity (B) of extracts from *T. fuciformis* 103

5. 흰목이버섯 추출물의 *Helicobacter pylori*에 대한 항균력

T. fuciformis KG 103 추출물의 항균력은 diethyl ether추출물에서 관찰되었으며 Tf-e로 명명하였다. 이 때 추출물을 농축하여 methanol에 녹인 pH는 5.75였다. *T. fuciformis* KG 103 추출물 주입 후 4일 동안 배양된 *Helicobacter pylori*에 대한 성장 저해율은 0.1%의 N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylene diamine 용액 10 ml로 반응으로 시켜 저해율을 관찰하였다(Fig. 3-34).

Table 3-53. Inhibition of *T. fuciformis* KG 103 extracts on the growth of *Helicobacter pylori*.

Extracts	solvents			
	methanol	ethanol	ether	chloroform
ID	N	N	25mm±3	N

N : not detected

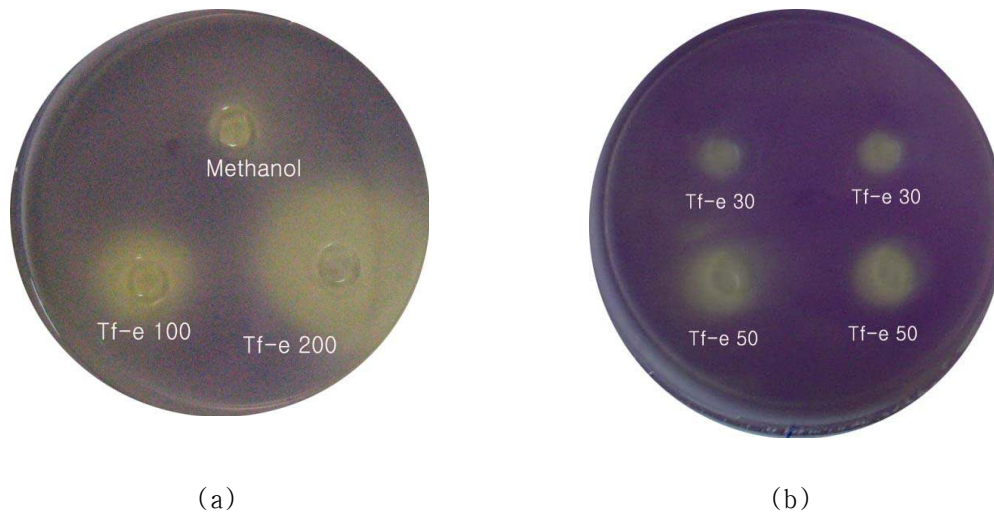


Fig. 3-34. Inhibition zones of *T. fuciformis* KG 103 extracts by *Helicobacter pylori* (30 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l).

Positive control로 사용된 methanol에서는 성장 저해가 거의 없음이 확인되었고, Tf-e의 양에 따라 저해환 크기의 변화로 보아 *Tremella fuciformis* 추출물에 대해 *Helicobacter pylori*의 생장이 민감하다는 것을 알 수 있었다.

Table 3-54. Inhibition of *T. fuciformis* KG 103 ethanol extracts by *Helicobacter pylori*.

Extracts	ethanol extracts			
	30 μ l	50 μ l	100 μ l	200 μ l
ID	10mm \pm 1	10mm \pm 2	13mm \pm 2	13mm \pm 3

11절. 흰목이 버섯 유효생리활성물질의 대량 추출조건 최적화

1. 흰목이버섯 유효성분 EtOH 추출 fractional factorial block

Design Expert (version 6, Minneapolis, MN, USA) software 모델의 Central composite design (CCD) program을 이용하여 3 level-4 factor로 설계하여 추출량을 종속변수로 하여 조사한 결과는 Table 3-55와 같다.

EtOH 농도 72.5%, 추출 시 회전속도 125 rpm, 추출 시간 24시간에서 추출량 2.0122 g으로 최대량을 나타냈고, EtOH 농도 95%, 추출 시 회전속도 50 rpm, 추출 시간 72시간에서 추출량 0.1453 g으로 최소량을 보였다(Table 3-55).

2. 추출조건의 최적화

흰목이 버섯(*T. fuciformis* KG 103)의 EtOH 추출에서 추출량을 증가시키기 위하여 EtOH의 농도, 추출 시 회전 속도 그리고 추출 시간 등을 독립변수로 설정하고 추출량을 종속변수로 설정하여 다중회기분석을 수행한 결과 model식 $Y = 1.565337 - 0.3522X_1 + 0.08425X_2 - 0.49135X_3 - 0.98981X_1^2 + 0.098241X_2^2 + 0.024041X_3^2 - 0.66923X_1X_2 - 0.25973X_1X_3 + 0.068475X_2X_3$ 를 얻었다. 다중회기분석 전체에 대한 분산분석의 결과는 Table 25와 같다.

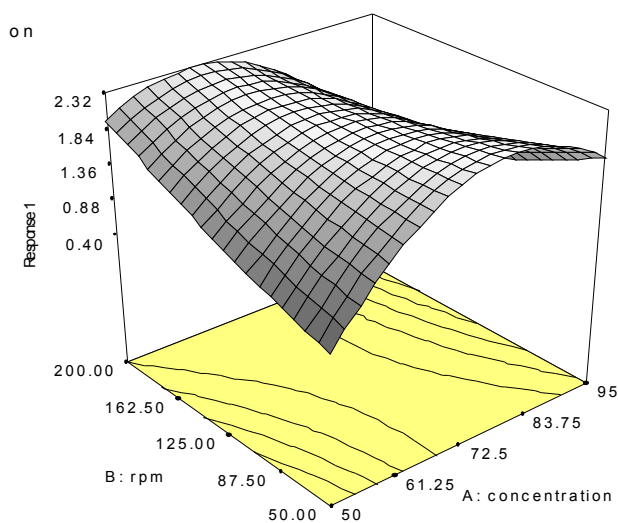
적합결여검증 ($P > 0.05$)에 있어서는 본 실험의 이차식의 설계가 유의함을 나타냈으며, 위에서 얻은 model식에 대한 반응표면 분석법을 시행하여, Fig. 3-35와 같은 결과를 얻었다. EtOH의 농도 68.7%, 추출 시 회전속도 193.4 rpm 그리고 추출시간 25.3 시간으로 나타냈으며, 추출량은 흰목이버섯(*T. fuciformis* KG 103) 1 kg을 EtOH 추출 시 44.8 g이라 예상했으며 확인 결과 약 43 g의 추출량을 얻을 수 있었다.

Table 3-55. Effect of extract condition on dependent variable.

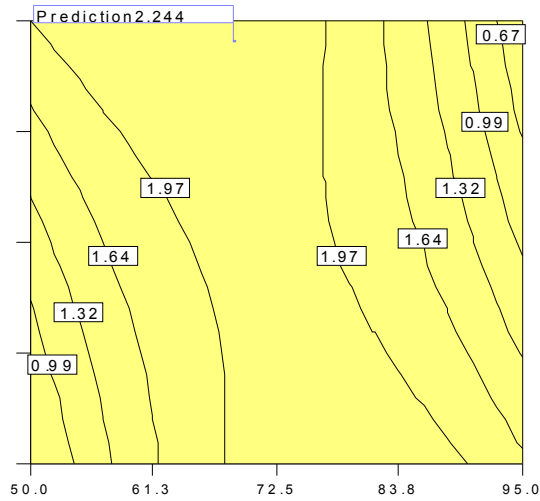
Serial No.	Independent variables			Dependent variables
	Concentration	RPM	Time	Yield (g)
	X ₁ (x ₁)	X ₂ (x ₂)	X ₃ (x ₃)	Y
1	72.5 (0)	50 (-1)	48 (0)	1.5108
2	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)	1.9072
3	95 (1)	50 (-1)	72 (+1)	0.1453
4	95 (1)	200 (+1)	24 (-1)	0.4775
5	50 (-1)	125 (0)	48 (0)	0.8592
6	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)	1.8888
7	50 (-1)	50 (-1)	24 (-1)	0.6309
8	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)	1.5301
9	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)	1.4456
10	72.5 (0)	200 (+1)	48 (0)	1.6793
11	95 (1)	125 (0)	48 (0)	0.1548
12	50 (-1)	200 (+1)	72 (+1)	1.6746
13	72.5 (0)	125 (0)	24 (-1)	2.0122
14	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)	1.3291
15	72.5 (0)	125 (0)	72 (+1)	1.0295

Table 3–56. ANOVA table for extract yield in terms of coded values of variables.

	Sum of squares	DF	Mean squares	F-value
Model	5.2369	9	0.5819	8.9311
X	0.2481	1	0.2481	3.8079
Y	0.0142	1	0.0142	0.2179
Z	0.4829	1	0.4829	7.4112
X ²	2.5623	1	2.5623	39.3290
Y ²	0.0252	1	0.0252	0.3874
Z ²	0.0015	1	0.0015	0.0232
XY	0.5971	1	0.5971	9.1655
XZ	0.0899	1	0.0899	1.3805
YZ	0.0063	1	0.0063	0.0959
R ²		0.94		



a) Surface



b) contour

Fig. 3-35. Surface (a) and contour (b) plots of extract yield versus extract concentrations.

3. 흰목이 버섯 항산화활성물질 EtOH 추출 fractional factorial block

Design Expert (version 6, Minneapolis, MN, USA) software 모델의 Central composite design (CCD) program을 이용하여 3 level-4 factor로 설계하여 항산화활성을 종속변수로 하여 조사한 결과는 Table 3-57과 같다. EtOH 농도 72.5%, 추출 시 회전속도 125 rpm, 추출 시간 48시간에서 DPPH를 이용하여 항산화활성을 조사한 결과 EDA 40.1%로 가장 높은 활성을 나타냈으며, EtOH 농도 95%, 추출 시 회전속도 200 rpm, 추출 시간 24시간에서 EDA 17.7%로 가장 적은 활성을 보였다.

Table 3-57. Effect of extract condition on dependent variable.

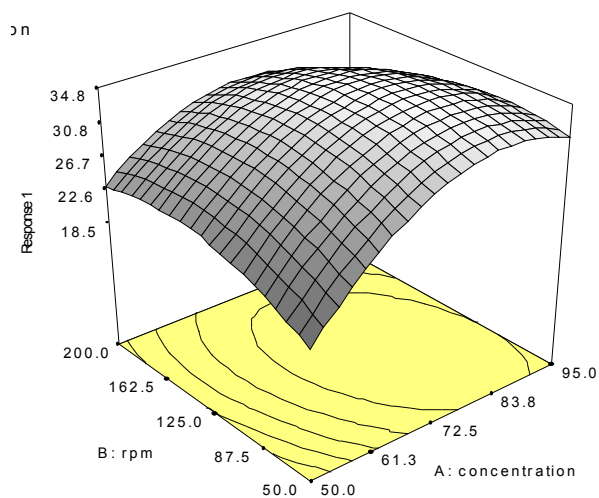
Serial No.	Independent variables			Dependent variables
	Concentration	RPM	Time	EDA %
	n			
	X ₁ (x ₁)	X ₂ (x ₂)	X ₃ (x ₃)	Y
1	72.5 (0)	50 (-1)	48 (0)	32.2
2	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)	40.1
3	95 (1)	50 (-1)	72 (+1)	30.9
4	95 (1)	200 (+1)	24 (-1)	17.7
5	50 (-1)	125 (0)	48 (0)	25.6
6	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)	32.7
7	50 (-1)	50 (-1)	24 (-1)	21.5
8	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)	33.7
9	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)	31.5
10	72.5 (0)	200 (+1)	48 (0)	30.4
11	95 (1)	125 (0)	48 (0)	30.6
12	50 (-1)	200 (+1)	72 (+1)	21.7
13	72.5 (0)	125 (0)	24 (-1)	32.3
14	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)	31.0
15	72.5 (0)	125 (0)	72 (+1)	34.1

4. 항산화활성 증가 조건의 최적화

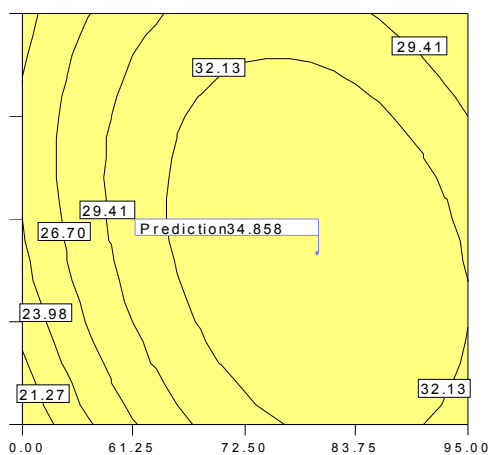
흰목이버섯(*T. fuciformis* KG 103)의 EtOH 추출에서 항산화활성을 증가시키기 위하여 EtOH의 농도, 추출 시 회전 속도 그리고 추출 시간 등을 독립변수로 설정하고 EDA%를 종속변수로 설정하여 다중회기분석을 수행한 결과 model식 $Y = 34.12157 + 2.5X_1 - 0.9X_2 + 0.9X_3 - 6.42353X_1^2 - 3.22353X_2^2 - 1.32353X_3^2 - 2.45X_1X_2 + 2.35X_1X_3 + 1.15X_2X_3$ 를 얻었다. 다중회기분석 전체에 대한 분산분석의 결과는 Table 3-58과 같다.

Table 3-58. ANOVA table for the extract yield of antioxidant activity in terms of coded values of variables.

	Sum of squares	DF	Mean squares	F-value
Model	409.5453	9	409.5453	4.0857
X	12.50	1	12.50	1.1223
Y	1.62	1	1.62	0.1454
Z	1.62	1	1.62	0.1454
X ²	107.9153	1	107.9153	9.6892
Y ²	27.1768	1	27.1768	2.4401
Z ²	4.5814	1	4.5814	0.4113
XY	8.0033	1	8.0033	0.7185
XZ	7.3633	1	7.3633	0.6611
YZ	1.7633	1	1.7633	0.1583
R ²		0.88		



a) Surface



b) contour

Fig. 3-36. Surface (a) and contour (b) plots of extract yield of antioxidant activity versus extract concentrations.

적합결여검증 ($P>0.05$)에 있어서는 본 실험의 이차식의 설계가 유의함을 나타냈으며, 위에서 얻은 model식에 대한 반응표면 분석법을 시행하여, Fig. 3-36과 같은 결과를 얻었다. 항산화활성의 증가를 위한 최적 추출 조건은 EtOH의 농도 79.9%, 추출 시 회전속도 112.8 rpm 그리고 추출시간 61.5시간이라 나타났으며, 이때 추출물(1000 ppm)의 EDA는 34.9%이라 예상했으며 확인 결과 약 34.2%의 실제 항산화활성을 나타내었다.

5. 흰목이 버섯 총페놀함량 EtOH 추출 fractional factorial block

Design Expert (version 6, Minneapolis, MN, USA) software 모델의 Central composite design (CCD) program을 이용하여 3 level-4 factor로 설계하여 총 페놀 함량을 종속변수로 하여 조사하였으며 그 함량은 caffeic acid를 이용하여 측정 하였다(Table 3-59). EtOH 농도 72.5%, 추출 시 회전속도 125 rpm, 추출 시간 48시간에서 DPPH를 이용하여 총 페놀 함량을 조사한 결과 20.33 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높은 함량을 나타냈으며, EtOH 농도 95%, 추출 시 회전속도 200 rpm, 추출 시간 24시간에서 11.26 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 적은 함량을 보였다.

6. 페놀성 화합물의 추출조건 최적화

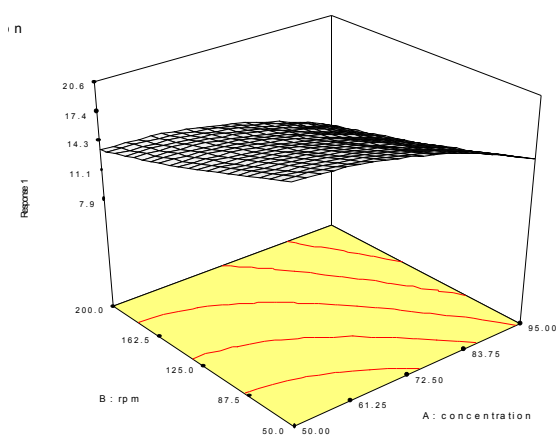
흰목이버섯(*T. fuciformis* KG 103)의 EtOH 추출에서 페놀성 화합물 추출을 증가시키기 위하여 EtOH의 농도, 추출 시 회전 속도 그리고 추출 시간 등을 독립변수로 설정하고 추출량을 종속변수로 설정하여 다중회기분석을 수행한 결과 model식 $Y = 16.06451 - 1.47X_1 - 2.885X_2 - 0.125X_3 - 1.36765X_1^2 + 0.377353X_2^2 - 2.29265X_3^2 + 0.275X_1X_2 - 2.265X_1X_3 - 0.67X_2X_3$ 를 얻었다. 다중회기분석 전체에 대한 분산분석의 결과는 Table 3-60 와 같다. 적합결여검증 ($P>0.05$)에 있어서는 본 실험의 이차식의 설계가 유의함을 나타냈으며, 위에서 얻은 model식에 대한 반응표면 분석법을 시행하여 Fig. 3-37과 같은 결과를 얻었다. 총 페놀함량 증가를 위한 최적 추출 조건은 EtOH의 농도 51.9%, 추출 시 회전속도 50.3 rpm 그리고 추출시간 64시간이라 나타났으며, 총 페놀 함량은 흰목이 버섯(*T. fuciformis* KG 103) EtOH 추출 시 20.5 $\mu\text{g/g}$ 이라 예상했으며 확인 결과 약 20.4 $\mu\text{g/g}$ 의 실제 총 페놀 함량을 보였다.

Table 3-59. Effect of extract condition on dependent variable.

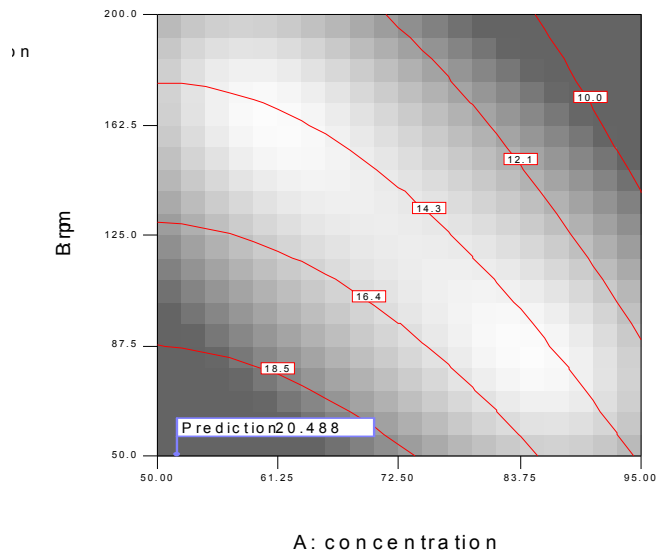
Serial No.	Independent variables			Dependent
	Concentration	RPM	Time	variables
	$X_1(x_1)$	$X_2(x_2)$	$X_3(x_3)$	Cont. of total phenol ($\mu\text{g/g}$)
	$X_1(x_1)$	$X_2(x_2)$	$X_3(x_3)$	Y
1	72.5 (0)	50 (-1)	48 (0)	18.22
2	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)	20.33
3	95 (1)	50 (-1)	72 (+1)	11.70
4	95 (1)	200 (+1)	24 (-1)	11.26
5	50 (-1)	125 (0)	48 (0)	17.17
6	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)	14.39
7	50 (-1)	50 (-1)	24 (-1)	14.10
8	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)	15.80
9	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)	14.70
10	72.5 (0)	200 (+1)	48 (0)	14.56
11	95 (1)	125 (0)	48 (0)	14.23
12	50 (-1)	200 (+1)	72 (+1)	12.06
13	72.5 (0)	125 (0)	24 (-1)	14.90
14	72.5 (0)	125 (0)	48 (0)	13.20
15	72.5 (0)	125 (0)	72 (+1)	14.65

Table 3-60. ANOVA table for concentration of total phenol in terms of coded values of variables.

	Sum of squares	DF	Mean squares	F-value
Model	57.51959	9	6.391066	1.297342
X	4.3218	1	4.3218	0.877296
Y	16.64645	1	16.64645	3.379114
Z	0.03125	1	0.03125	0.006344
X ²	4.891968	1	4.891968	0.993036
Y ²	0.372418	1	0.372418	0.075598
Z ²	13.74706	1	13.74706	2.790559
XY	0.100833	1	0.100833	0.020468
XZ	6.8403	1	6.8403	1.388534
YZ	0.598533	1	0.598533	0.121498
R ²			0.75	



a) Surface



b) contour

Fig. 3-37. Surface (a) and contour (b) plots of concentration of total phenol versus extract concentrations.

7. EtOH 추출에 의한 추출량, 항산화활성, 총페놀함량 유의성 검정

흰목이 버섯(*T. fuciformis* KG 103) EtOH 추출에 의한 추출량, 항산화 활성 그리고 총 페놀함량간의 상관관계를 조사하기 위해 SAS system을 이용하여 상관분석을 실시하였다. 추출량과 항산화 활성간의 상관성을 조사한 결과는 Table 3-61과 같은 분석 결과가 보였으며, R^2 값이 0.1964로 추출량과 항산화 활성간의 상관성은 매우 낮은 것으로 나타났다. 항산화 활성과 총페놀함량 간의 상관분석을 실시한 결과 Table 3-62와 같은 결과가 나타났으며 R^2 값이 0.6273으로 추출량과 항산화 활성의 상관성에 비해 높게 나타났다.

Table 3-61. Significance test table of extract yield and antioxidant activity.

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	<i>F</i> -value	Pr > <i>F</i>
Model	1	1.09274	1.09274	3.18	0.0980
Error	13	4.46992	0.34384		
Corrected Total	14	5.556266			
R ²			0.1964		

Table 3-62. Significance test table of antioxidant activity and total phenol concentration.

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	<i>F</i> -value	Pr > <i>F</i>
Model	1	43.31504	43.31504	14.5	0.0022
Error	13	38.83593	2.98738		
Corrected Total	14	82.15097			
R ²			0.6273		

12절. 흰목이버섯 유효생리활성물질의 대량생산 및 분리, 정제

1. 추출 및 분획

흰목이버섯 자실체 3 kg을 30 L의 EtOH로 추출한 뒤 항산화 활성과 항암세포 활성을 보인 water soluble fr. 30 g을 물 가용 분획 (20 g)과 불가용 분획 (8 g)으로 나누었다. 물 가용 분획은 silica gel column에 걸고 n-hexane과 ethyl acetate 혼합용액을 이용 column chromatography를 실시하여 6개의 분획으로 나누었다. 나눈 분획은 각각 HPLC의 C₁₈ column 을 이용 ACN : water (0.01% phosphoric acid) = 70 : 30의 조건으로 흘려줘 Fig. 3-39,,40,,41 과 같은 결과를 얻었으며 단일 peak인 compound 1, 2, 3 확인하였다. 불가용 분획은 역시 HPLC의 C₁₈ column 을 이용하여 Fig. 3-45 와 같은 chromatogram을 얻었으며 이를 통해 compound 6, 7, 8, 그리고 9을 확인하였다.

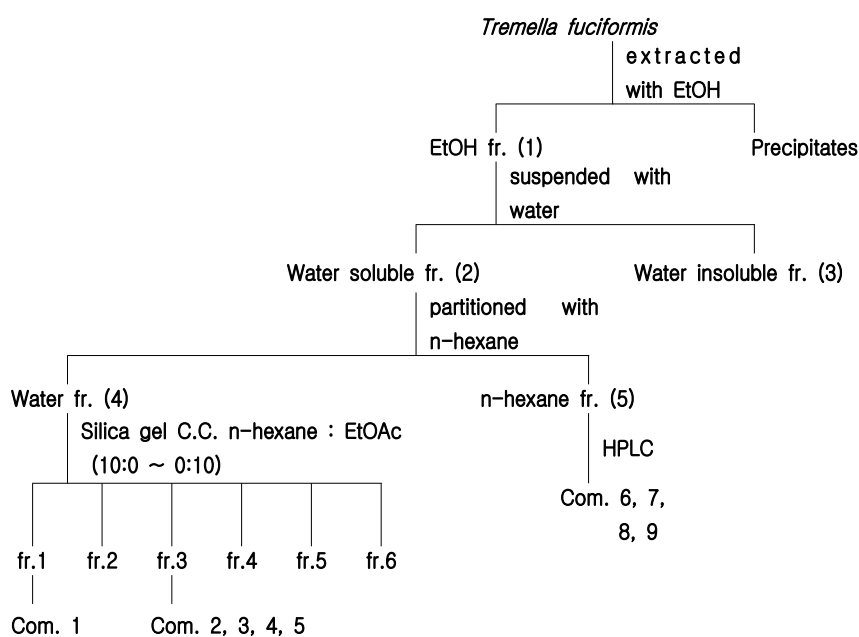


Fig. 3-38. Diagram of extraction and isolation of compound 1~9 from dried fruit body of *T. fuciformis* KG 103.

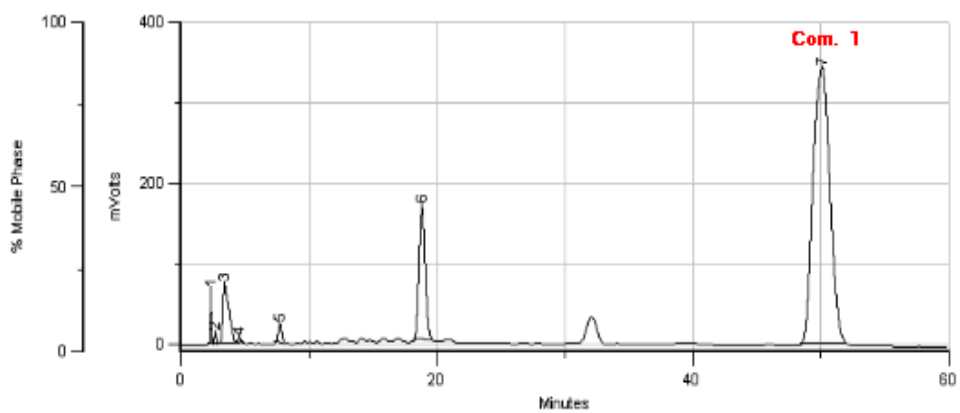


Fig. 3-39. HPLC chromatogram of 100% n-hexane fraction (fr.1).

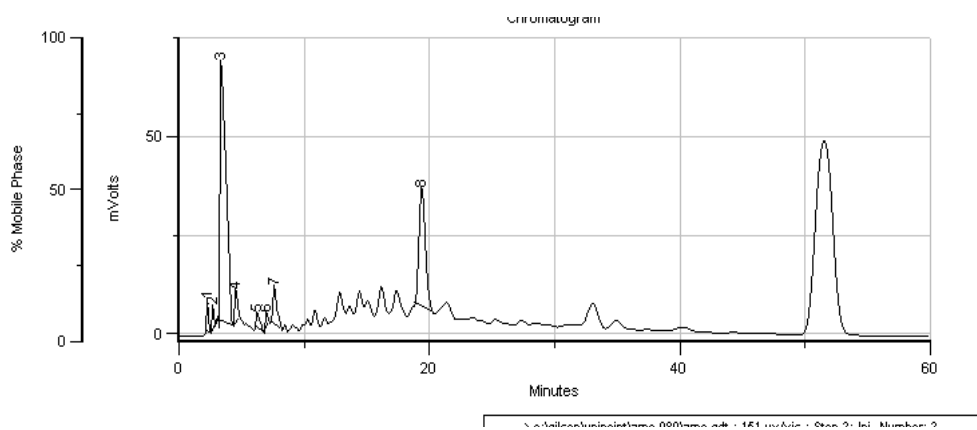


Fig. 3-40. HPLC chromatogram of 80% n-hexane and 20% ethyl acetate fraction (fr.2).

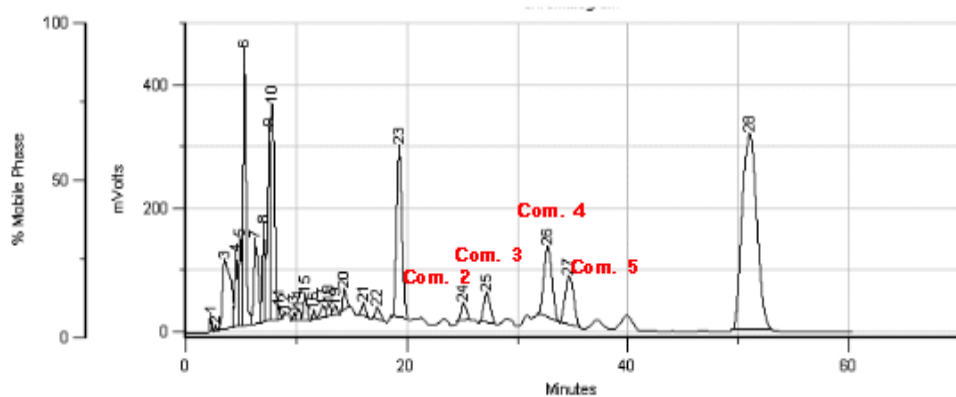


Fig. 3-41. HPLC chromatogram of 60% n-hexane and 40% ethyl acetate fraction (fr.3).

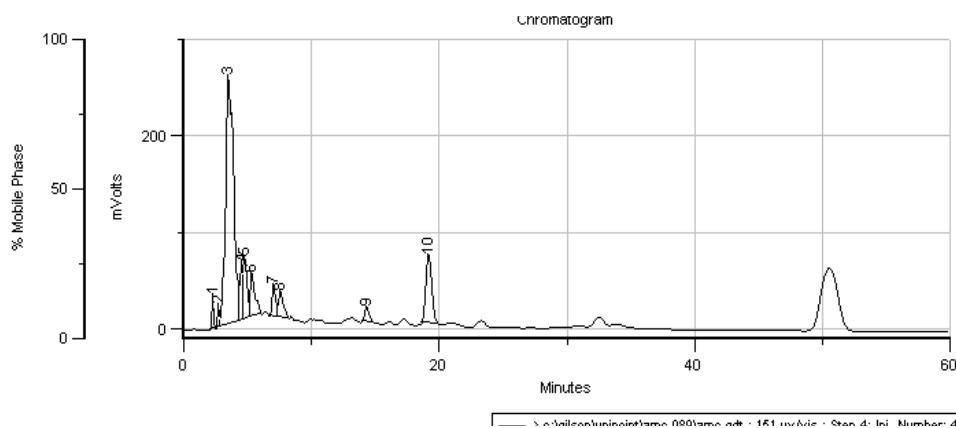


Fig. 3-42. HPLC chromatogram of 40% n-hexane and 60% ethyl acetate fraction (fr.4).

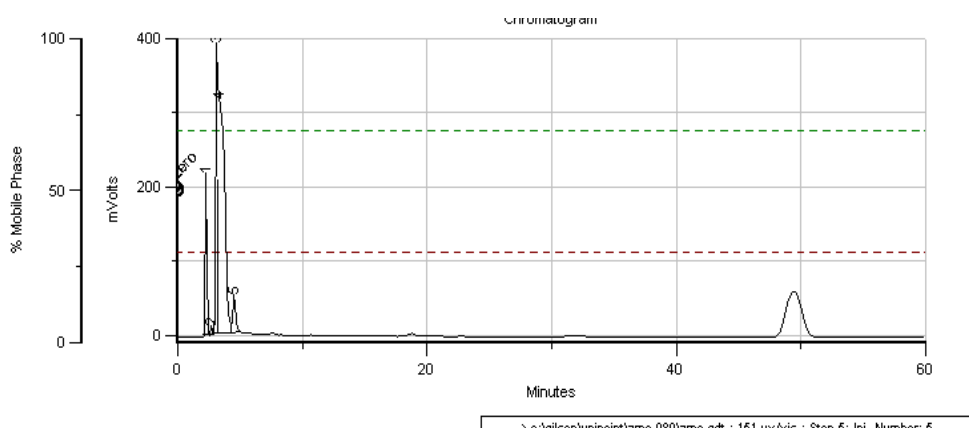


Fig. 3-43. HPLC chromatogram of 20% n-hexane and 80% ethyl acetate fraction (fr.5).

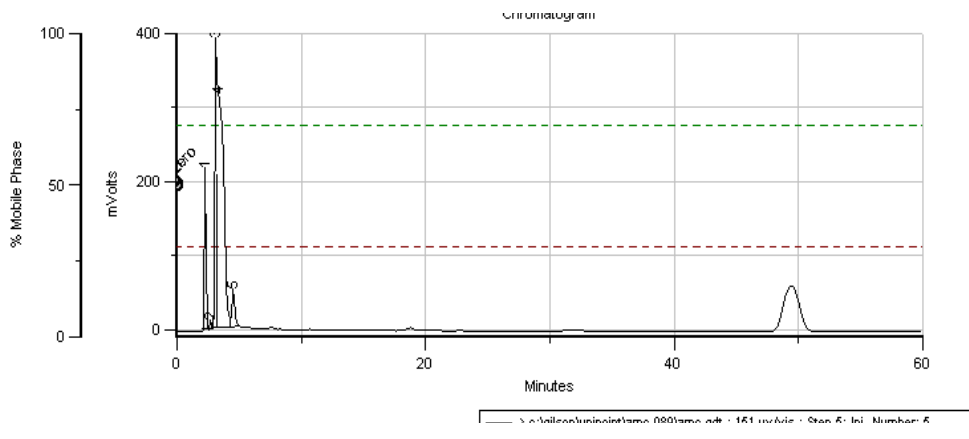


Fig. 3-44. HPLC chromatogram of 100% ethyl acetate fraction (fr.6).

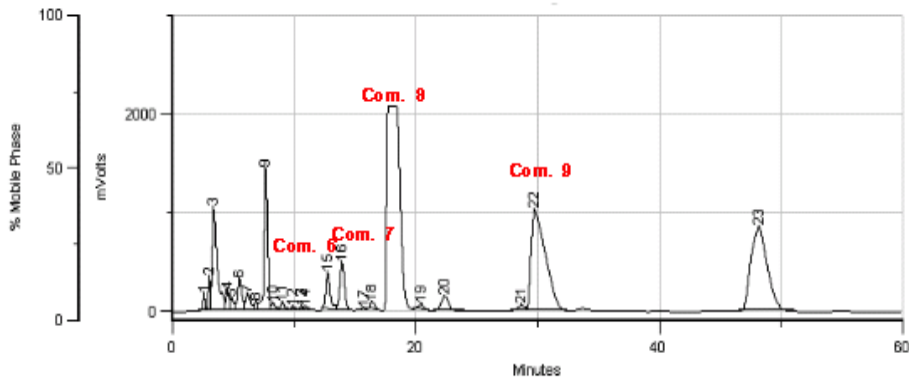


Fig. 3-45. HPLC chromatogram on C₁₈ column of n-hexane fraction (5).

2. 분획 별 항산화활성

본 실험에 이용한 DPPH의 hydrazyl은 질소 원자가 불안정한 상태에 있으므로 쉽게 수소원자를 받아들이는 성질을 가지고 있어 항산화 물질과 반응하여 수소원자를 받아들임으로써 자체의 정체성을 잃는 성질을 이용하여 흰목이버섯 자실체의 항산화 활성을 측정하고 activity guided fractionation 방법에 따라 그 활성 성분을 추적하고자 건조되어진 흰목이버섯 자실체의 EtOH fr.(1), water soluble fr.(2), water insoluble fr.(3), water fr.(4) 그리고 n-hexane fr.(5) 에 대한 항산화 활성 정도를 DPPH에 대한 전자공여능으로 측정하였다. 일반적으로 버섯 추출물들은 항산화력을 많이 나타낸다고 보고되었으며(Lee 등, 2005., Chi 등, 2005., Cheung 등, 2003) 흰목이버섯 자실체의 EtOH 추출물에서는 EDA%가 약 76%로 나타났으며, 그 활성은 n-hexane fr.(55%)과 water soluble fr.(51%)의 순으로 항산화활성을 보였다(Table 3-63, Fig. 3-46).

Table 3-63. The radical scavenging effects of extracts and fractions from dried fruit body of *T. fuciformis* KG 103.

EDA %	Sample					
	Ascorbic acid	EtOH extract	Water soluble fr.	Water insoluble fr.	Water fr.	n-hexane fr.
5	69.8±0.3	—	—	—	—	—
10	95.3±0.1	—	—	—	—	—
50	97.5±0.2	4.5±1.5	3.0±0.2	3.0±1.3	4.4±0.3	6.6±0.6
100	97.6±0.1	6.2±0.04	5.0±0.6	4.4±0.5	5.2±1.4	7.8±0.2
500	—	21.5±0.3	8.5±0.04	10.9±0.3	13.4±0.5	12.0±0.7
1000	—	38.4±0.9	15.7±0.5	15.5±0.6	15.1±0.1	15.4±3.2
2000 (ppm)	—	76.0±0.2	51.0±0.2	17.4±0.6	23.0±0.2	55.0±0.2

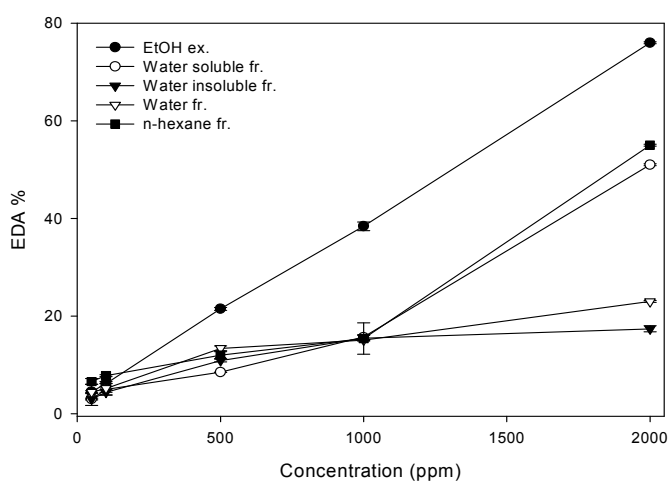


Fig. 3-46. The radical scavenging effects of extracts from dried fruit body of *T. fuciformis* KG 103.

3. 분획별 암세포독성

흰목이버섯(*T. fuciformis* KG 103) EtOH 추출물을 정제해가면서 얻은 분획들의 항암세포 활성을 DLD-1 cell line을 이용하여 조사한 결과 Fig. 3-47와 같은 결과를 나타냈다. EtOH fr.를 시점으로 water soluble, insoluble fr. 그리고 n-hexane fr.에서 대체로 높은 활성을 보인 반면에 water fr.에서는 상대적으로 낮은 활성을 보였다. EtOH fr., water soluble, insoluble fr. 그리고 n-hexane fr.의 IC₅₀은 각각 68 ppm, 67 ppm, 63 ppm 그리고 48.8 ppm으로 나타났으며, water fr.의 IC₅₀은 1000 ppm으로 비교적 낮게 나타났다.

흰목이버섯에서 polysaccharide 계통의 항암성 물질(Ukai 등, 1972)이 보고된 적이 있으나, 소수성 계열의 세포독성 물질이 보고된 바 없으며, 본 실험의 결과 소수성 화합물들이 저 농도에서 매우 강력한 암세포독성을 나타냄을 알 수 있었다.

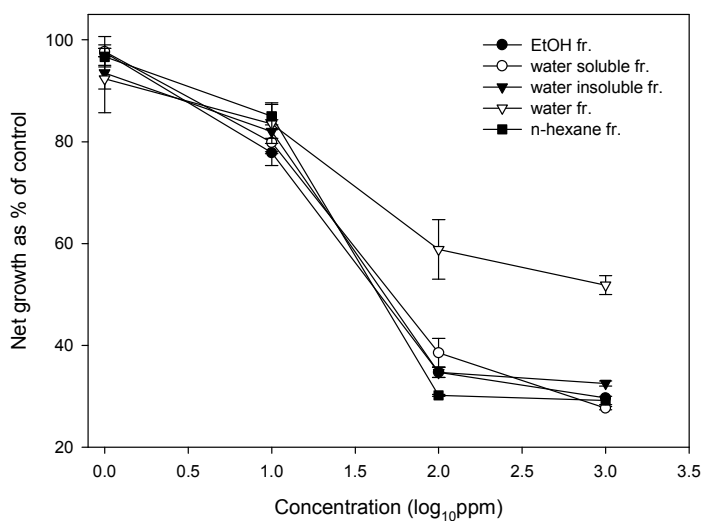


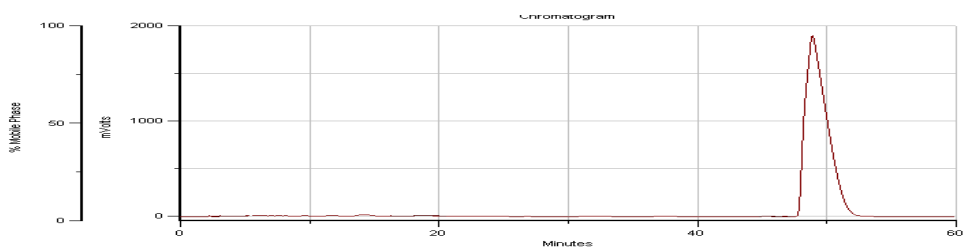
Fig. 3-47. Cytotoxicity of extracts from fruit body of *T. fuciformis* KG 103 against DLD-1 cell line.

4. 활성분획 정제

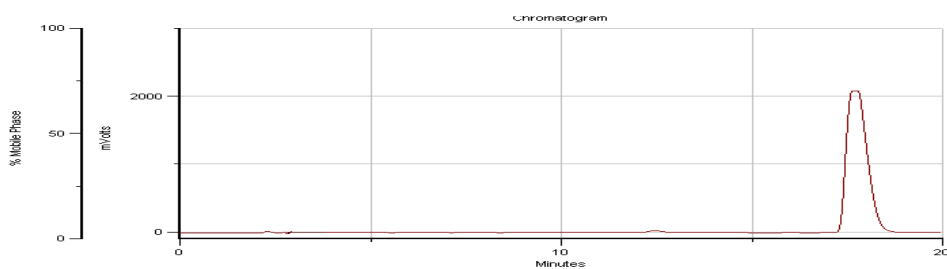
흰목이버섯(*T. fuciformis* KG 103) 자실체의 EtOH 추출로부터 얻어진 분획 중 항산화 활성과 항암세포 활성을 보인 물질들을 HPLC를 이용하여 정제한 결과 Com. 1, 8, 9 으로 단일물질로 정제되었음을 확인하였다(Fig. 3-48).

Crom-sil pack ODS preparative column (1.0×25cm)을 이용하여 acetonitrile-water (0.01% phosphoric acid) 를 60:40 (v/v) 조건으로 분당 4ml의 유속으로 하여 1차 정제를 실시하였다. 1차 분리를 거친 물질들은 순수한 단일 peak로 분리되지 않고 함량을 많이 차지하고 있는 물질들과 같이 검출되었다. 그래서 1차 분리 후 다시 Shiseido pack C18 column을 이용하여 acetonitrile-water (0.01% phosphoric acid) (70:30, v/v) solution을 분당 1ml의 유속으로 정제하여 단일 peak로 정제할 수 있었다. Tsai 등에 의해 흰목이버섯 추출물의 항산화 활성은 보고되어진 바 있으나, 아직 그 활성을 보인 물질들의 정제 및 구조 동정의 보고는 미비한 상황이었다.

a)



b)



c)

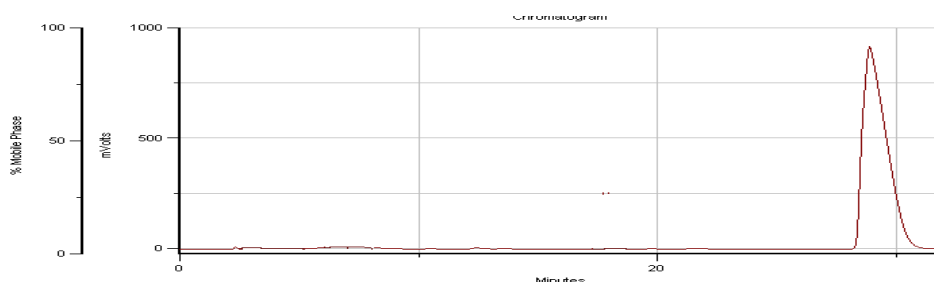


Fig. 3-48. HPLC chromatogram of purified compound

a) fraction 1, b) fraction 8, c) fraction 9

5. 정제분획의 암세포독성

흰목이버섯(*T. fuciformis* KG 103) EtOH 추출물로부터 단일 peak로 분리, 정제되어진 compound 1, 8 그리고 9의 항암세포 활성을 DLD-1 cell line을 이용하여 실험하였다. compound 8이 IC₅₀ 84 ppm으로 세 물질 중 가장 높은 활성을 나타냈으며, compound 1 또한 IC₅₀ 310 ppm로 낮은농도에서 활성을 보였다. 그러나 세 물질 가운데 항산화 활성이 가장 높았던 compound 9는 항암세포 활성은 거의 나타나지 않았다(Fig. 3-49).

세포독성은 항암활성을 측정하는 기본활성이다. 버섯류의 항암활성은 두가지 그룹에 의하여 주로 나타나는데 그중 첫 번째는 다당류이며 두 번째 그룹은 polyphenol 혹은 flavonoid류이다. 고분자량의 항암성 버섯 다당류는 Pilat 등 (2003)이 보고하였으며 다당류와 단백질 복합체인 lentinan, krestin, schizophyllan 등이 *Schizophyllum commune*로 부터 (Fukushima, 1989) 알려져 있다. Polyphenols 과 flavonoids들도 항암성이 나타나는 것으로 보고되었으며 (Carlo 등, 1999) 그 메카니즘이 (Pomilio 등, 1994)에 의하여 밝혀진 바 있다.

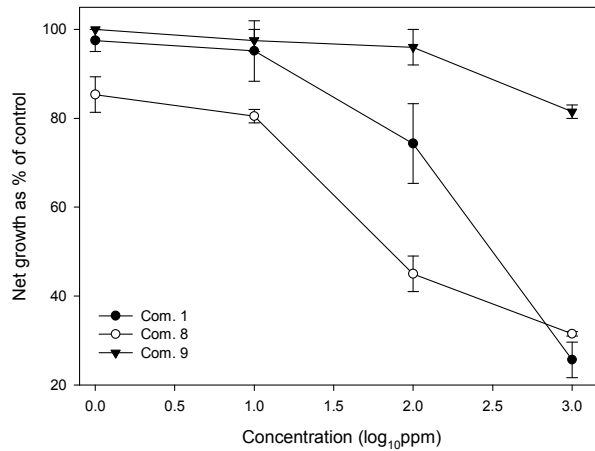


Fig. 3-49. Cytotoxicity of compound 1, 8, and 9 from *T. fuciformis* KG 103 against DLD-1 cell line.

6. 정제되어진 활성분획의 항산화 활성

Water fr.의 물 가용성 분획으로부터 분리되어진 Com. 1과 불가용 분획으로부터 분리 정제된 Com. 8, 9의 항산화 활성을 DPPH를 이용하여 조사한 결과 Table 3-64 와 Fig. 3-50 으로 나타났다. 세 가지의 물질 중 2000 ppm에서 13.0 ± 0.3 의 활성을 보인 Com. 1이 가장 낮은 항산화 활성을 보인 반면, 불가용성 분획에서 분리되어진 Com. 9는 2000 ppm에서 87.2 ± 0.2 의 가장 높은 활성을 나타냈다. 이 결과는 positive control로 사용된 ascorbic acid에 비하면 그 활성이 낮은 편이지만 Com. 9는 높은 활성을 보이므로 식품소재의 기능학적 측면에서 중요한 결과라 예측되어진다.

일반적으로 버섯 추출물들은 높은 항산화 활성을 나타낸다고 보고되어지고 있으며, 이 연구의 결과 역시 다른 연구들과 맥락을 같이한다 할 수 있다. Tsai 등 (2003)에 의해 흰목이 버섯 추출물의 항산화 활성은 보고되어진 바 있으나, 아직 그 활성을 보인 물질들의 정제 및 구조 동정의 보고는 미비한 상태이다(Lee 등, 2005, Chi 등, 2005, Cheung 등, 2003). Tsai 등, (2003)에 의해 보고되어진 흰목이

버섯 추출물의 $\cdot O_2^-$ -scavenging ability에 관련된 항산화 활성과 비슷한 결과를 나타내었다.

Table 3-64. The radical scavenging effects of compound 1, 8 and 9 from *T. fuciformis* KG 103.

Sample	EDA %						
	5	10	50	100	500	1000	2000
	(ppm)						
Ascorbic acid	79.8±0.3	90.3±0.1	93.5±0.2	95.6±0.1	-	-	-
Com. 1	-	-	6.0±0.1	10.7±0.1	27.2±0.2	52.1±0.5	70.8±0.2
Com. 8	-	-	7.2±0.2	11.0±0.1	33.1±0.4	68.8±0.3	87.2±0.2
Com. 9	-	-	3.5±0.5	10.0±0.3	11.0±0.5	12.3±0.1	23.0±0.3

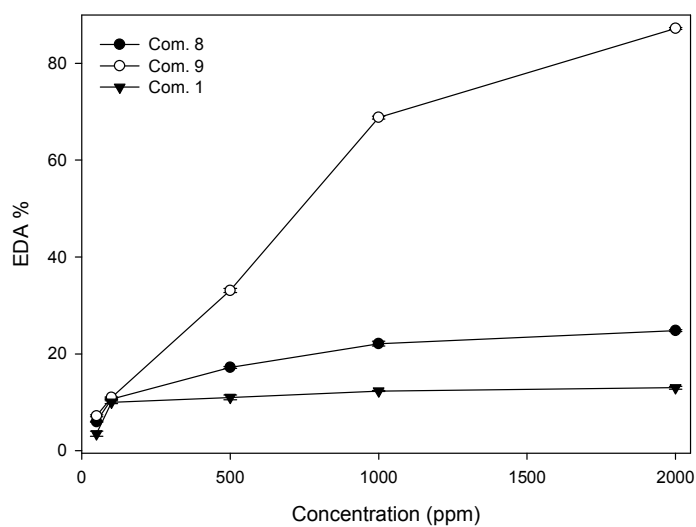


Fig. 3-50. Antioxidant activity of compound 1, 8 and 9 from *T. fuciformis* KG 103.

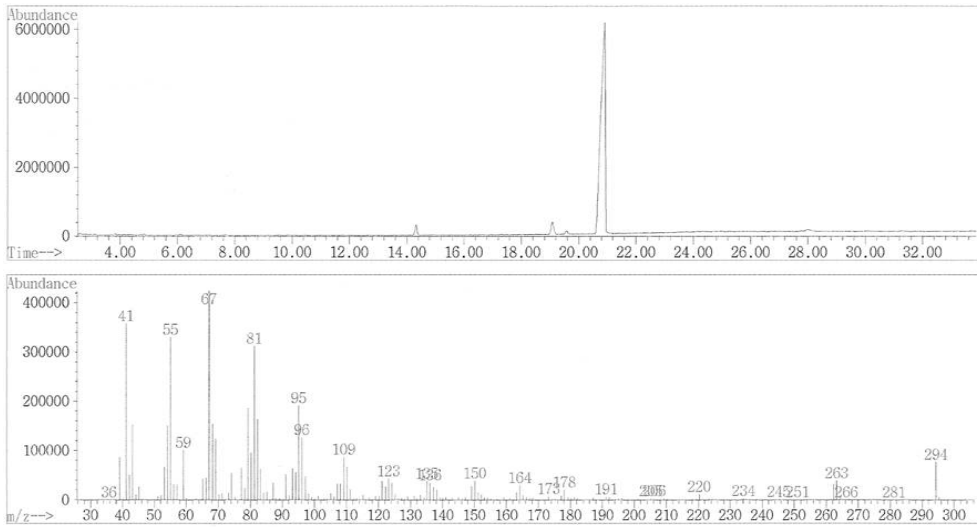


Fig. 3-51. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of compound 1.

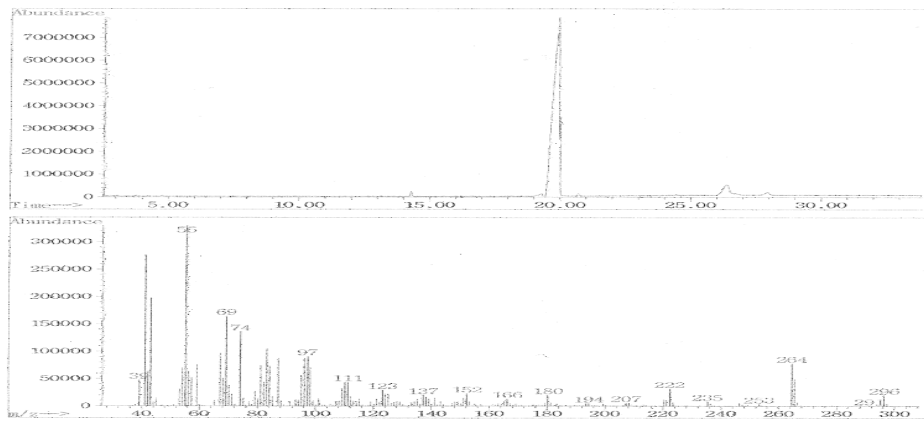


Fig. 3-52 . Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of compound 8

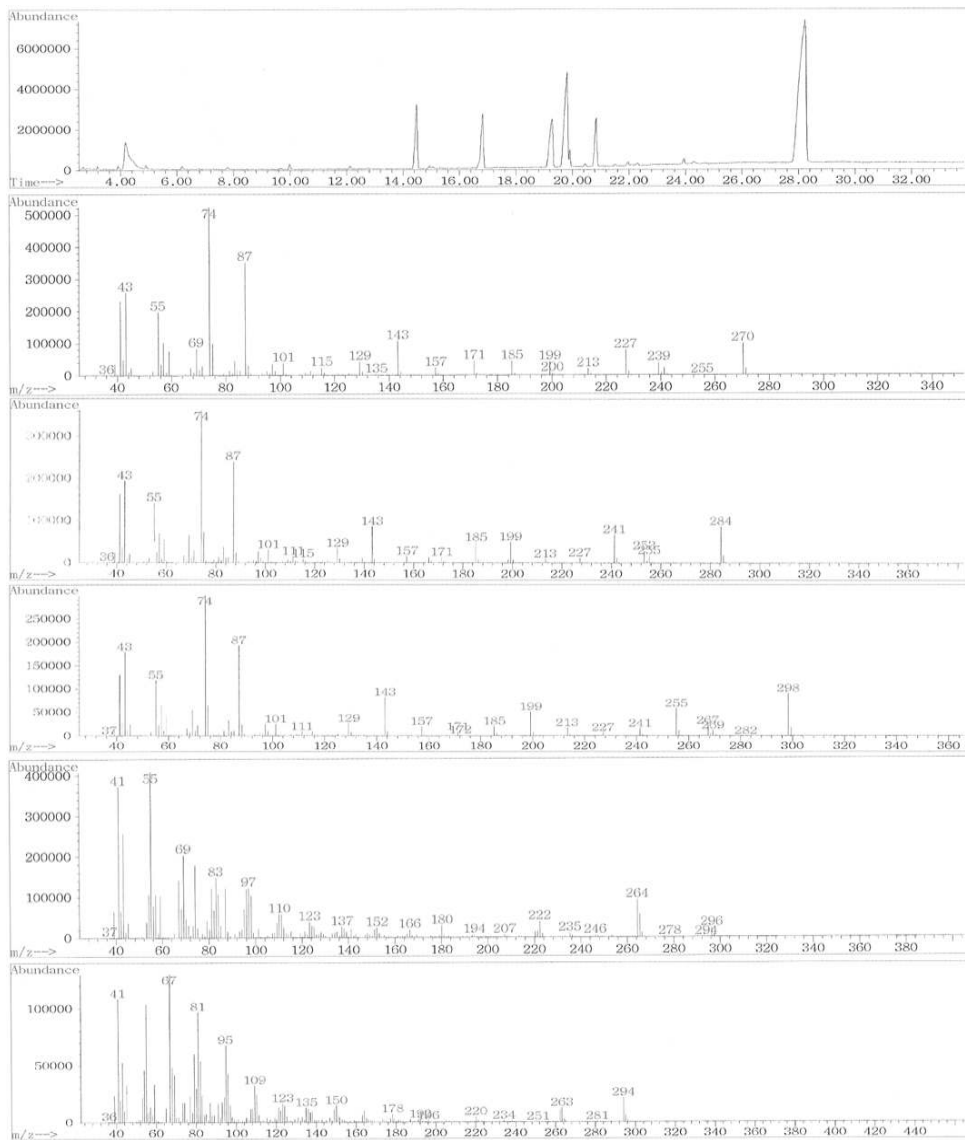


Fig. 3-53 . Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of compound 9.

흰목이버섯 추출물이 여러 단계의 분획으로 구분되어지고 각 분획의 항산화 활성이 확인되었다(Liu et al. 2007). 그러나 각 성분을 정제하지 않은 상태에서는 그 활성을 정확히 구분하기가 어려웠다. 이 연구에서는 추출물의 성분중 항산화

활성 및 세포독성을 나타내는 분획을 확보하고 계속적으로 정제하여 1, 8, 9번의 활성물질을 확보하였으며, 각 물질의 구조 분석 GC massspectrometry를 통하여 시행하였다. 각 화합물의 상대적 체류시간 (relative retentiontime,Rt)와 mass spectra를 표준물질과 비교한 결과 (Fig. 3-51, 52, 53) 화합물 1과 2는 각각 linoleic acid와 oleic acid로 확인되었다. (99.9%이상의 확률) 한편, 화합물 3은 GC-MS spectra data bases 검색결과 5개 지방산의 혼합물로 확인되었으며, palmitic acid, stearic acid, margaric acid, linoleic acid and oleic acid임으로 각 피크가 확인되었다.

흰목이버섯 자실체의 성분분석시 흰목이버섯은 palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0)와 불포화 지방산인 oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2)를 다량 함유하고 있었다. 지방산 중 oleic acid의 함량이 51.2%로 가장 높았으며 palmitic acid (16:0)가 15.8%로 나타났다(Table 3-65). 장(1998)의 연구에서도 흰목이버섯에는 palmitic acid가 16.7%, oleic acid가 52%, 그리고 linoleic acid가 26.8% 함유되고 있는 것으로 나타났다

암세포독성 및 항산화활성 연구를 통하여 흰목이 버섯의 주요 생리활성물질이 다양한 지방산임을 확인할 수 있었으며, 특히 linoleic acid가 항산화활성 및 암세포독성을 나타내는 가장 중요한 성분임을 알 수 있었다.

Table 3-65. Identification of purified peaks.

Fraction	Compound
1	linoleic acid
8	oleic acid
	palmitic acid
	stearic acid
9	margaric acid
	linoleic acid
	oleic acid

13절. 흰목이버섯의 저장 조건확립

1. 흰목이 버섯의 건조조건 확립

열풍을 이용하여 건조한 흰목이버섯을 색도를 색차계를 이용하여 측정하였고 그 결과는 Table 3-66 과 같다.

각 실험구에서 유의적인 차이는 보이지 않았으나 70℃ 이후에는 L값이 저하되어 건조에 적합한 온도가 아니라고 판단되었다. L값은 60℃까지는 크게 변하지 않았으며, 저온인 40-50℃가 건조에 적합함을 알 수 있었다. 각 처리구에서 a값과 b 값은 크게 차이가 없었으며, 대체적으로 열풍건조시 흰목이버섯의 품질이 잘 유지됨을 알 수 있었다.

Table 3-66. Changes in L-, a- and b-value during drying by Heat.

	L값	a값	b값
40℃	80.07±0.79	3.71±0.41	23.45±0.62
50℃	81.62±0.75	3.53±0.37	23.19±0.23
60℃	80.01±0.49	3.41±0.24	22.42±0.02
70℃	76.96±2.03	3.77±1.22	23.28±1.60

2. 건조버섯의 최적포장재 선정

건조버섯을 PE, PP, Ny 3가지 포장재에 밀봉포장한 후 실온에 4주간 저장하면서 색도의 변화를 관찰하였다. Fig.3-54 에 나타난 것처럼 모든 포장재에서 색도의 변화가 매우적음을 알 수 있었으며, 포장재 간의 큰 차이가 없음을 발견하였다. 흰목이버섯은 건조 후 색상의 변화가 매우 적어 상품성이 매우 높음을 알 수 있었으며, 포장재에 따른 영향이 적어 저렴한 가격의 포장재를 선정하여 사용하는 것이 바람직하다고 판단되었다.

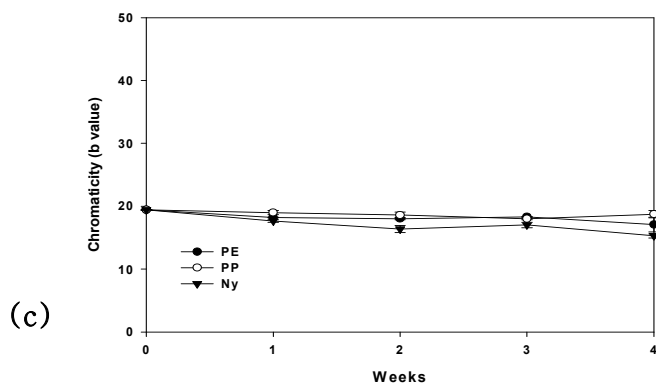
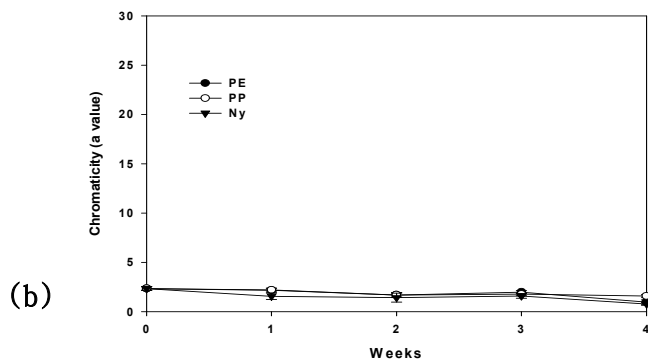
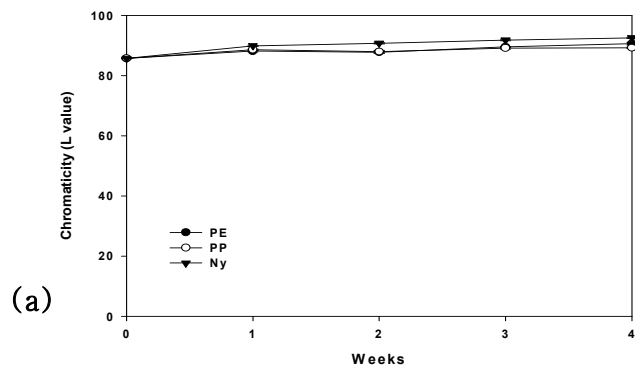


Fig. 3-54. Changes in L-(a), a-(b) and b-(c) values of dried *T. fuciformis* during preservation in various packing materials.

PE : Polyethylene, PP : Polypropylene, Ny : Nylon plus PP and PE

14절. 흰목이버섯의 저온저장시(5℃) 품질변화

1. 흰목이버섯의 품질 변화

흰목이버섯 자실체를 수확 후 저온저장시 coliform은 검출이 되지 않았으며, 무균적으로 재배되었기 때문에 미생물에 의한 오염이 매우 적음을 알 수 있었다 (Data not shown). 미생물학적 오염도 조사는 14일동안 진행되었으며, 흰목이버섯이 용기내 재배된 경우 미생물학적으로 오염이 적어 매우 안전한 식품임을 알 수 있었다.

한편, 14일간 저장시 2일 간격으로 생버섯의 색도를 측정하였다. 결과를 다음에 나타내었다. 저장기간 동안 색상의 변화가 매우 적었으며, 상품성을 유지함을 관찰할 수 있었다.

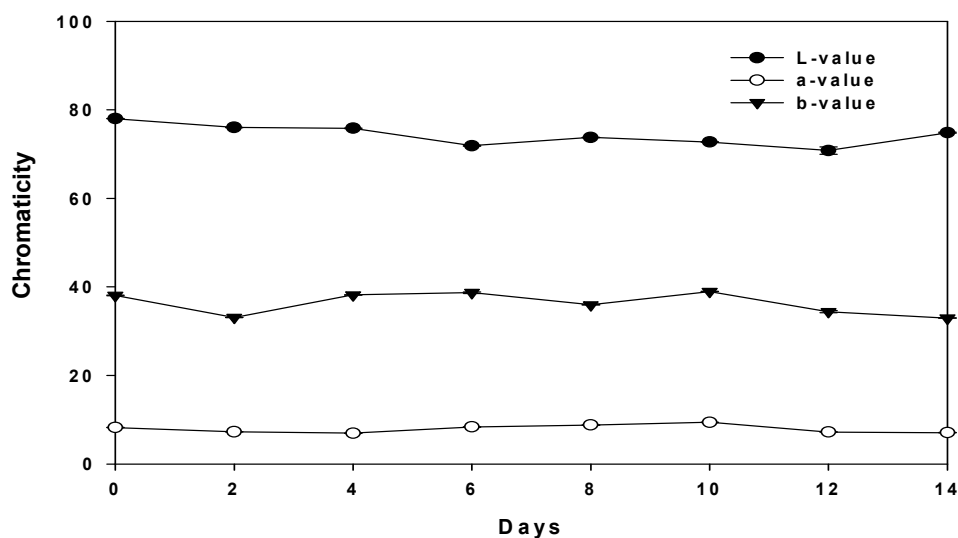


Fig. 3-55. Changes in L-, a- and b- values of *T. fuciformis* fruiting body.

저장기간동안 흰목이버섯 자실체의 경도를 조사시 자실체의 경도가 10일 이후는 다소 감소하는 경향을 나타내었으며 (Fig. 3-55), 10일까지 그 변화가 미미하여 상품성이 유지됨을 알 수 있었다. 흰목이버섯 자실체의 수확후 저온저장시 색

도와 경도가 적어도 10일 이상 변화없이 유지되었으며, 이 사실은 흰목이버섯의 생버섯 유통기간을 설정하는 중요한 자료가 될 수 있다.

15절. 흰목이버섯 추출물을 이용한 기능성 음료제조

1. 흰목이추출물 첨가 모델음료의 제조 및 관능검사

흰목이추출물을 이용한 음료의 맛과 향을 증진하기 위해 100% 사과즙, 배즙을 각각 1-2% 사이 첨가하여 관능검사를 수행하였다. 이때 과즙미첨가구를 대조구로 사용하였으며 그 결과를 Table 3-67 에 나타내었다.

열수추출물 첨가구에서 사과즙 첨가(1.4%)와 배즙 첨가(1.3%)는 모델음료의 향에 유의적인 차이를 부여함을 알 수 있었다. 사과즙 첨가구와 과즙미첨가구의 단맛에서 유의적인 차이가 있었으나 전체적인 기호도면에서 세 실험구가 모두 같은 점수를 보였다. 그러므로 과즙 첨가가 흰목이버섯 열수추출물 첨가 모델음료의 향과 단맛 면에서 일정한 영향을 미친다고 생각된다.

Table 3-67. Sensory quality of model drink prepared with the water extract of *T. fuciformis*.

열수추출물 (1000ppm)	향	신맛	단맛	기호도
사과즙 첨가	4.3±0.9 ^{a1)}	3.4±1.4 ^a	4.8±1.4 ^a	4.2±1.2 ^a
배즙 첨가	3.6±1.4 ^b	4.2±1.6 ^a	4.4±1.4 ^{ab}	3.8±1.5 ^a
과즙 미첨가	3.8±0.8 ^{ab}	3.8±1.3 ^a	3.7±1.1 ^b	3.7±1.3 ^a

¹⁾Mean separation in columns by Duncan's multiple range test.

흰목이버섯 에탄올 추출물첨가 모델음료의 경우 배즙 첨가구(1.3%)와 과즙 미첨가구에서 향의 유의적인 차이가 관찰되었으나, 전체적인 기호도면에서 세 실험구가 같은 점수를 보이고 있다. 이 결과로부터 과즙 첨가가 의미가 크지 않다고 볼 수 있다(Table 3-68).

Table 3-68. Sensory quality of model drink prepared with the ethanol extract of *T. fuciformis*.

에탄올추출물 (1000ppm) 첨가	향	신맛	단맛	기호도
사과즙 첨가	3.8±0.9 ^{ab1)}	4.0±1.2 ^a	4.7±1.1 ^a	3.8±1.2 ^a
배즙 첨가	3.5±1.0 ^b	3.6±1.3 ^a	4.3±1.1 ^a	3.5±1.6 ^a
과즙 미첨가	4.0±0.9 ^a	3.8±1.2 ^a	4.3±1.1 ^a	4.2±1.3 ^a

¹⁾Mean separation in columns by Duncan's multiple range test.

제 4장 목표 달성도

연 도 세부과제 및 주요내용	2005년 (1차년도)	2006년 (2차년도)	2007년 (3차년도)	가중치	달성치 (%)
○ 1세부과제 · 흰목이버섯 주요 생리활성 규명	■			10	100
· 흰목이버섯 유효물질 분리 정제 분석 및 활용		■		20	100
· 흰목이버섯 자실체와 유효성분의 제품화 및 유통조건의 최적화			■	20	100
○ 위탁과제 · 흰목이버섯 종균 배양법 개발 및 우량 균주 확보	■			10	100
· 흰목이버섯 대량재배방법 공생균의 생육조건 규명		■		20	100
· 흰목이버섯과 공생균의 상호작용 규명 농가 실증 재배 확립			■	20	100
사 업 진 도(%)	33	33	34	100	
소 요 인 원(명)	9	9	9		
소 요 예 산(천원)	93,340	93,340	93,340	280,020	
주요연구결과	<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 식품학적 특성 분석 ● 흰목이버섯 유효물질 주요 생리활성규명 ● 흰목이버섯 종균 배양법 개발 및 종균 배지 최적화 ● 흰목이버섯 우량 균주 확보, 분류 및 동정 	<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 유효물질 분리, 정제 ● 흰목이버섯 유효물질 성분 분석 ● 흰목이버섯 대량재배 방법 및 환경 최적화 ● 흰목이버섯 및 공생균의 생육조건 규명 	<ul style="list-style-type: none"> ● 흰목이버섯 자실체와 유효성분의 활용 및 제품화 ● 흰목이버섯 자실체, 유통 조건의 최적화 ● 농가 현장 대량 재배 ● 대량 재배 방법의 현실화 및 농가 보급안 마련 		

제 5장 연구결과의 활용계획

1. 활용분야

- 가. 흰목이버섯 자실체는 생버섯 형태로 식품소재로 활용가능
- 나. 흰목이버섯 건조자실체는 건강기능식품재료의 원료로 활용
- 다. 흰목이버섯 생산방법은 참여기업에 기술이전 및 관련농가에 보급
- 라. 전량 수입되는 흰목이버섯의 수입대체 가능

2. 기술이전 방안

- 가. 버섯농가의 실증시험 완료

<무봉산농원> (박순애)

주소 : 경기도 평택시 진위면 갈곶리 112

처리 : 병재배(1250밧트/16병입), 봉지재배(100밧트)

<경기중균연구소> (최성우)

주소 : 경기도 화성시 정남면 관항리 56-2

처리 : 용기내 재배 (병재배), 1000병

- 나. 경기중균연구소 기술이전 실시중
- 다. 개발된 흰목이버섯 판매신고
- 라. 흰목이버섯 건조가공품 상품화 계획 논의중

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근 3년동안 국내외에서 흰목이버섯에 대하여 발표된 주요 과학기술 정보는 다음과 같다.

1. Eun Jae Cho, Hye Jin Hwang, Sang Woo Kim, Jung Young Oh, Yu Mi Baek, Jang Won Choi, Song Hwan Bae and Jong Won Yun. 2007. Hypoglycemic effects of exopolysaccharides produced by mycelial cultures of two different mushrooms *Tremella fuciformis* and *Phellinus baumii* in ob / ob mice. Applied Microbiology and Biotechnology. 75, 1257-1265

: 흰목이버섯 배양시 생산되는 세포외다당류가 당뇨병의 예방에 도움이 됨.

2. Qiong Wu, Cheng Zheng, Zheng-Xiang Ning and Bao Yang. 2007. Modification of Low Molecular Weight Polysaccharides from *Tremella Fuciformis* and Their Antioxidant Activity in Vitro. International Journal of Molecular Sciences, 8, 670-679

: 흰목이버섯의 저분다량 다당류의 유도체가 항산화 활성을 지님

3. Eun Jae Cho, Jung Young Oh, Hyun You Chang, Jong Won Yun. 2006. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. Journal of Biotechnology, 127,129-140

: 흰목이버섯 진탕배양시 세포외 다당류 생성이 분석됨.

4. Peter C. K. Cheung. 1996. The hypocholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricula* (tree-ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats¹. Nutrition Research, 16, 1721-1725

: 흰목이버섯의 고혈압 억제 기능이 보고됨

5. Qipin Gao, Rolf Seljelid, Huiqun Chen, Reizhi Jiang. 1996. Characterisation of acidic heteroglycans from *Tremella fuciformis* Berk with cytokine

stimulating activity. *Carbohydrate Research*, 288, 135-142

: 흰목이버섯의 산성다당체가 면역시스템을 촉진하는 활성이 있다고 보고됨

6. P Liu, X Gao, W Xu, Z Zhou, X Shen. 2005. Antioxidation activities of polysaccharides extracted from *Tremella fuciformis* Berk. *Chinese journal of biochemical pharmaceuticals*.

: 흰목이버섯 다당체의 항산화 활성이 보고됨

7. Lin, Z.B., and Cui, J.Y. 2000. Effect of *Tremella* polysaccharide on immune function depressed by cyclophosphamide, physical stress and aging in mice. *European Journal of Pharmacology*. 183, 900-906

: 흰목이버섯 다당체의 면역조절기능이 보고됨

7 장 참고문헌

- Abe, Y. 1989. Effect of moisture on the colonization by *Lentinus edodes* and *Hypoxylon truncatum* in wood. *Eur. J. For. Path.* 19 : 423-434.
- Bais, B. S., Singh, S. B. and Singh, D. V. 1970. Effect of different carbon and nitrogen compounds on the growth and sporulation of *Curvularia pallescens*. *Indian phytopath.* 23 : 511-517.
- Bandoni, R. J., 1963. Conjugation in *Tremella mesenterica*. *Can. J. Bot.* 41 : 467-474.
- Bloise M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 26 : 1199-1200.
- Borromeo, J. D. 1967. Some physiological responses and characteristics of *Auricularia polytricha*(Mont.) Sacc. in laboratory culture. *Phill. Agri.* 51(6) : 486-500 (Abst. Mush. Res. Stud. Phil. Edited by T. H. (Quimio. 1977).
- Carlo, G. D., Mascolo, N., Izzo, A. A. and Capaso, F. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science* 65 : 337-353.
- Chi H. Y., Kim K. H., Kong W. S., Kim S. L., Kim J. A., Chung I. M. and Kim J. T. 2005. Antioxidant Activity and Total Phenolic Compounds of *P.eryngii* spp. Extracts. *Korean J. Crop Sci.* 50 : 216-219.
- Chen, P. C. and Hou, H. H. 1978. *Tremella fuciformis* in the biology and cultivating of edible mushrooms. Chang, S. T. and Hays, W. A. Eds, Academic press, New York. 6 : 25.
- Cheng, H. H., How, W. C. and Lu, M. L. 2003. Interactions of lipid metabolism and intestinal physiological with *Tremella fuciformis* Berk. edible mushroom in rats fed a high cholesterol diet with or without nebacitin. *J. Agric. Food*

Chem. 50 : 7438–7443

Cheng, P. C. K. 1996. The hypocholesterolemic effect of two edible mushroom: *Auricularia auricular*(tree ear) and *Tremella fuciformis* (White jelly leaf) in hypocholesterolemic rats. *Nutrition Research.* 16(10) : 1721–1725

Cheng, S. and Tu, C. C. 1975. Ontogeny and development of the fruiting body of *Auricularia polytricha* Mush. *Sci.* 10(1) : 713–722.

Cheng, S. and Tu, C. C. 1975. Ontogeny and development of the fruiting body of *Auricularia polytricha*. *Mush. Sci.* 10(1) : 713–722.

Cheung, L. M., Peter, C. K. and Ooi, E. C. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry.* 81 : 249–255.

Chung, Y.C., Chen, S.J., Hsu, C.K., Chang, C.T. and Chou, S.T. 2005. Studies on the antioxidative activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. *FoodChem.*91,419–424.

Steinberg, D. 1997. A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis.* 134, 197

Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57 : 25 – 39.

Eger, G. 1961. Untersuchungen über die Funktion der Deckschicht bei der Fruchtkörperbildung des Kulturechampignons, *Psalliota bispora* Lge. *Arch. Mikrobiol.* 39 : 313–334.

Eger, G. 1972. Experiments and comments on the action of bacteria on sporophore initiation in *Agaricus bisporus*. *Mushroom Sci.* VIII : 719–725.

Fukushima, M. 1989. The over dose of drugs in Japan. *Nature.* 342 :

850-851.

Ha H. C., Park K. J., Kim H. P., Lee S. Y. and Kim H. S. 2003. Isolation and characterization of the polysaccharides from *Tremella fuciformis*. 한국균학회 춘계학술대회. 31.

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. 1981. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts : The role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBSLett.*128,347-352

Huang, N. L. 1982. Cultivation of *Tremella fuciformis* in Fujian, China, Mushroom News 1. *Trop.* 2(3) : 2.

Huang, N. L. 1986. Cultivation of *Tremella* (in chinese), Promotion of science press. Beijing. 31-104.

Iio, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takai, N. and Fukumoto, M. 1985. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.* 49 : 2173-2182.

Jong, S. C., Donovick, R. 1989. Antitumor substance from fungi. *Adv. Appl. Microbiol.* 34 : 183-261.

Khan, S. M., Mirza, J. H. and Khan, M. A. 1991. Physiology and cultivation of wood's ear mushroom(*Auricularia polytricha*(Mont.)). Science and cultivation of edible mushroom fungi. 573-578.

Kiho, T., Tsujimura, Y., Sakushima, M., Usui, S. and Ukai, S. 1994. Polysaccharides in fungi. XXXIII. Hypoglycemic activity of an acidic polysaccharide(AC) from *Tremella fuciformis*. *Yakugaku zasshi.* 114(5) : 308-315.

Kanayama, H., Fukai, Y. and Dachi, A. N. 1984. On the submerged culture of

mycelia of *Poria cocos*. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 25 : 101–107.

Lavia, I., Friesemb, D., Gereshc, S., Hadarb, Y., and Schwartz, B. 2006. Not only polysaccharide but also polysaccharide and protein complex were reported to exhibit anti-tumor activity. *Cancer Letters*. 20 : 1–10.

Lee S. O., Lee H. J., Yu M. H., Im H. G. and Lee I. S. 2005. Total Polyphenol Contents and Antioxidant Activities of Methanol Extracts from Vegetables produced in Ullung Island. *Korean J. food Sci. technol.* 37 : 233–240.

Lo, K.M., and Cheung, P.C.K. 2005. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *FoodChem*.89,533–539

Lowy, B. 1971. Flora neotropica. Monograph No. 6. *Tremellales*. Hafner Pub. Comp. New York. 153–165.

Ma, L. and Lin, Z. B. 1992. Effect of Tremella polysaccharide on IL-2 production by mouse splenocytes. *Yao Xue Xue Bao*. 27(1) : 1–4.

Nieva Moreno M. I., Isla M. I., Sampietro A. R. and Vattuone M. A. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* 71 : 109–114.

Park, K. J., Oh, Y. J., Ha, H. C., Park, J. M., Park, I. H., Kim, T. S., and Kim, H. S. 2004. Development and Funtional Food Anti-diabetes Derived From Extracted Fraction of *Tremella fuciformis* and *Grifola frondosa*.

Pilat, T. A. Ajith, K., and Janardhanan, K. 2003. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus*(Berk.). *Journal of Ethnopharmacology*. 84 : 157–162.

Pomilio, A. B., Sola, G. A. R., Mayer, A. M. S. and Rumi, L. S., 1994. Antitumor and cytotoxic screen of 5,6,7-trisubstituted flavones from *Gomphrena martiana*. *Journal of Ethnopharmacology*. 44 : 25–33.

Quimio, T. H. 1981. Philippines Auricularia; Taxonomy nutrition and cultivation. *Mush. Sci.* 2 : 685–687.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* 26 : 1231–1237.

Sawada, K. 1942. *Tremella fuciformis* Berk. Descriptive catalogue of Taiwan(Formosan) fungi. 7 : 67–69.

Song. C. H., Cho. K. Y. and Nair. N. G. 1987. A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*. *Mycol.* 79(6) : 866–876.

Tadashi K., Yumiko T., Miho S., Shigeyuki U. and Shigeo U. 1994. Polysaccharides in fungi X X X III. Hypoglycemic activity of an acidic polysaccharides(AS) from *Tremella fuciformis*. *Yakugaku Zasshi.* 114 : 308–315.

Ting, H. G. 1987. High yield technique for cultivation of Tremella in cotton seed hulls in bag culture. *Edible Fungi (in chinese).* 3 : 17–21

Tsai, C. H., Chang, R. C., Chiou, J. F. and Liu, T. Z. 2003. Improved superoxide-generating system suitable for the assessment of the superoxide-scavenging ability of aqueous extracts of food constituents using ultra weak chemiluminescence. *J. Agric Food Chem.* 51(1) : 58–62.

Ukai S., Hirose, K., Kiho, T., Hara, C. and Irikura, T. 1972. Antitumor activity on sarcoma 180 of the polysaccharides from *Tremella fuciformis* Berk. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 20(10) : 2293–2294.

Ukai S., Hirose K., Kiho T. and Hara C. 1974. Polysaccharides in fungi. I. Purification and characterization of acidic heteroglycans from aqueous extract of *Tremella fuciformis* Berk. *Chem pharm Bull.* 22 : 1102–1107.

Y. H. Oh, S. B. Kim, G. W. Lee, H. Y. Kim, M. J. Shim, H. S. Rho, H. S. Lee, M. W. Lee, U. Y. Lee and T. S. Lee. 2006. The immunomodulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Tremella fuciformis* Berk. *The korean journal of Mycology*. 24(2) : 105-111.

Yun, F. S., Chiu, P. M., Zhang, H. S. and zhang, K. F. 1987. Isolation of *Tremella aurantia* Schw. ex Fr. and its pysiological characteristics, (in chinese). Publication of the Shanxi Biological Research Institute, Taiwan, Shanxi Province, China.

Zadrazil F., Grinbergs J. and Gonzalez, A. 1982. "Palo Potrido" decomposed wood used as feed. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15 : 167-171.

Zhibin, L. 1985. *Acta Pharm. Sinica*. 6 : 201-204.

김명곤, 이재홍, 김형무. 1990. *Armillaria mellea*의 군사배양 및 군사속 생산에 관한 연구. *한국균학회지* 18(3) : 149-157.

이상윤. 2006. 치자(*Gardenia jasminoids*. Ellis)와 흰목이버섯(*Tremella fuciformis* Berk) 추출물의 인지능력향상 효과에 대한 연구. 동국대학교 박사논문

장현유 1997. Artificial cultivation of *Tremella fuciformis* Berk. using associated fungus, *Hypoxylon* sp. 강원대학교 박사 논문

丁湖廣, 丁荅揮 편저. 2001. 中國 黑木耳 銀耳 代料栽培 와 加工 : 231-313

정환채, 주현규. 1989. 잎새버섯 우량계통 육성과 인공재배법 개발. *농시논문집* 31(2) : 43-56.

차동열. 1981. 야생식용버섯의 인공재배 검토. *한국균학회지* 9(3) : 123-128.

최수연, 김현수. 2003. Neuritogenic Effects of *Tremella fucifoormis* extract on PC12h cells. *한국미생물학회 춘계학술대회*

홍범식, 김세진, 송치현, 황세영, 양한철. 1992. 느타리버섯 (*Pleurotus sajor-caju*) 재배를 위한 기질 및 재배방법의 개발. 한국균학회지 20(4) : 149-157.

홍재식, 강귀환. 1983. 합성배지를 이용한 고온성 느타리버섯의 자실체 형성에 관한 연구. 한국균학회지 11(3) : 121-128.

<첨부자료>

학회 및 논문 발표, 전시회, 홍보 및 특허자료

P-9	흰목이버섯(<i>Tremellafuciformis</i>)자실체의 주요성분분석및생리활성연구
김경애* ¹⁾ , 최성우 ²⁾ , 윤정원 ³⁾ , 장현유 ³⁾ , 이찬 ¹⁾	
1중앙대학교 식품공학과, 2수원대학교 생명공학과, 3한국농업생명대학 특성화물학과	
<p>흰목이버섯은 white jelly fungus 혹은 silver-ear로 불리지만, 세계적으로 40여종이 분포하고 있는 주요 식용버섯 중의 하나이다. 흰목이버섯은 비타민, 단백질, 당질질, 광물질의 함량이 높은 열형학적으로 우수한 식용이며, 시갈카린이 높고 식용가치가 우수하여 중국에서는 극상품으로 취급되고 있다. 그리고 케일린, 고엘담, 갈기, 비올등에 효과가 풍부하며 고대중국사립물에서는 불로장생의 영약으로 알려져 있다. 본 연구에서는 흰목이버섯 자실체의 식물학적 일반성분을 분석하고 항산화효과를 조사하여 그 결과를 흰목이버섯 연구의 기초자료로 활용하고자 하였다. 흰목이버섯 자실체는 수분을 약 85.87% 함유하고 있으며, 조지방 1.1%, 조지방 0.25%, 조당류 0.19%, 조단백 1.29%, 탄수화물 11.30%으로 구성되어 있다. 흰목이버섯 자실체는Glu, Asp, Tyr, Lys, Ser 등의 11종의 아미노산이 다량 함유되어 있으며 Glu가 15.68%로 가장 많이 함유된 아미노산으로 나타났다. 흰목이버섯자실체 주요 성분의 항산화력을 조사하기 위하여 ether, ethyl acetate, chloroform, 80% ethanol, water의 순으로 흰목이버섯 주요 성분을 추출하였다. 이때 추출의 수율(w/w)은 용매별로 각각 0.34%, 0.9%, 0.96%, 4.73%, 4.74%로 나타났다. 이 용매별로 추출된 성분의 항산화력을 DPPH 라디칼소거능 시험으로 조사시 에탄올 추출물이 항산화력이 가장 높은 것으로 나타났으며, 기타 용매로 추출한 성분은 항산화력을 나타내지 않았다.한편, 흰목이버섯 추출물은 대장암세포인 DLD-1 세포주와 몇몇 암세포주에 대하여 세포 독성을 나타내었으며, lymphocyte mitogenic activity측정법을 통하여 면역활성이 있는 것으로 확인되었다.</p>	

1. 김경애 이찬 흰목이버섯(*Tremella fuciformis*) 자실체의 주요성분분석 및 항산화력 연구. 제 72차 한국식품과학회 학술대회. 2005.06.17

P15-015
Cytotoxicity of Extracts from White Jelly Mushroom, <i>Tremella Fuciformis</i> against Human Carcinoma Cell Lines
Kyung-Ai, Kim*, Hyuk-Hwan Song and Chan Lee Dept. of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Hyun-You Chang Dept. of Mushroom Science, Korea National College, Sung-Woo Choi and Jeong-Weon Yoon Dept. of Bioengineering and Genetic Engineering, College of Natural Science, The University of Suwon
<p>Cytotoxic effect of the extracts from <i>Tremella fuciformis</i> was evaluated on DLD-1, LOX-IMVI, LXF1-529, RKO, SNB-19 and SNU-1 human carcinoma cell lines in dose-dependent manner. In experimental setting I, methanol extract from this mushroom was fractionated sequentially by hexane, chloroform, ethyl acetate and <i>N</i>-butanol. Hexane, chloroform and ethyl acetate subfractions exhibited cytotoxic effect on all tested cell lines and LOX-IMVI cell line was most sensitive to the treatment of these extracts with IC₅₀ values of 60, 71 and 600 ppm, respectively. When the fruiting body of <i>Tremella fuciformis</i> was extracted sequentially with ether, ethyl acetate, chloroform and ethanol (Experimental setting II), ether extract exerted most potent cytotoxicity against tested cell lines. Other extracts had noeffect on the cell viability. If the first extraction solvent was chloroform instead of ether (Experimental setting III), exposure of tested cell lines to chloroform, ethyl acetate and ether extracts led to undergoing of the cell viability. This finding related to cytotoxicity of extracts give support to understand biological function of this mushroom.</p>

2. 김경애, 송혁환, 장현유, 윤정원, 이찬 Cytotoxicity of extracts from white jelly mushroom, *Tremella fuciformis* against human carcinoma cell lines. 제 73차 한국식품과학회 학술대회.2006.06.16

Antioxidant Activity of Various Extracts from White Jelly Mushroom, *Tremella Fuciformis*

Kyung-Ai, Kim*, Hee-Sook Lee and Chan Lee* Dept. of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Hyun-You Chang Dept. of Mushroom Science, Korea Nation Agricultural College, Sung-Woo Choi and Jeong-Weon Yoon Dept. of Bioengineering and Genetic Engineering, College of Natural Science, The University of Suwon

Tremella fuciformis were collected from dead Quercus limbs at Haenam, Jeonnam province in 2003 and cultured in artificial media with *Hypoxyton* sp., a symbiotic fungi. Various extracts were prepared from this cultured mushroom according to three experimental settings and their antioxidant properties were examined. Antioxidant Activity of extracts from *Tremella fuciformis* was evaluated by scavenging activity of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation (ABTS⁺), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and superoxide dismutase(SOD)-like activity. Among the extracts, the chloroform extract from in experimental setting I showed the most potent radical scavenging activity in each assay, showing 56% of DPPH radical scavenging activity at 1000 ppm and 35.7% of ABTS⁺ scavenging activity at 1000ppm. Total phenolic content were estimated in methanol extract by using caffeic acid(0.74 mg/g), chlorogenic acid(2.25 mg/g), catechin(2.6 mg/g) and ferulic acid(2.01 mg/g) as standards. Correlations of phenolic content in each extracts with antioxidant activity will be discussed in this study.

3. 김경애, 이희석, 장현유, 윤정원, 이찬 Antioxidant Activity of Various Extracts from White Jelly Mushroom, *Tremella fuciformis*. 제 73차 한국식품과학회 학술대회.2006.06.16

P10-264

Cytotoxic Effect of Extracts from *Tremella fuciformis* on DLD-1 Human Colon Adenocarcinoma Cell Line

Kyung-Ai Kim* and Chan Lee

Dept. of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Ansong 456-756 Korea

Cytotoxic effect of extracts from *Tremella fuciformis* FB001 was evaluated on DLD-1 human colon adenocarcinoma cell line and the content of polyphenolic compounds in extracts was analyzed. Hexane, chloroform and ethyl acetate subfractions in experimental setting I exhibited cytotoxic effect on DLD-1 cell line with IC₅₀ values of 350, 400, and 450 ppm, respectively. When the mushroom was extracted sequentially with ether, ethyl acetate, chloroform and ethanol (experimental setting II), ether extract exerted potent cytotoxicity with IC₅₀ values of 150 ppm, followed by ethyl acetate and chloroform fractions. If the first extraction solvent was chloroform instead of ether (III), exposure of tested cell line to chloroform, ethyl acetate and ether extracts at 1000 ppm led to dying of the cell. High levels of phenolic compounds were estimated in all hydrophobic extracts, which exhibited cytotoxic effect and this information give support to understand some biological function of this mushroom

4. 김경애, 이찬, Cytotoxic Effect of Extracts from *Tremella fuciformis* on DLD-1 Human Colon Adenocarcinoma Cell Line. 2006 International Symposium and Annual Meeting of the Korean Society of Food science and Nutrition. 2006.10.20

Tremella fuciformis were collected from dead *Quercus* limbs at Haenam, Jeonnam province in 2003 and cultured in artificial media with *Hypoxylon* sp., a symbiotic fungi. Various extracts were prepared from this cultured mushroom according to three experimental settings and their antioxidant properties were examined. Antioxidant activity of extracts from *Tremella fuciformis* was evaluated by scavenging activity of 2,2'-azobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation (ABTS^{•+}), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and superoxide dismutase(SOD)-like activity. Among the extracts, the chloroform extract from in experimental setting I showed the most potent radical scavenging activity in each assay, showing 56% of DPPH radical scavenging activity at 1,000 ppm and 35.7% of ABTS^{•+} scavenging activity at 1,000 ppm. Total phenolic content were estimated in various extract by using caffeic acid, chlorogenic acid, catechin, and ferulic acid as standards. Correlations of phenolic content in each extracts with antioxidant activity will be discussed in this study.

5. 이희석, 이경은, 정진호, 이찬. Inhibitory Effect of *Tremella fuciformis* Extracts against Lipid Peroxidation and their Free Radical-scavenging Activity. 2007 한국버섯학회. 2007.06.13

6. 2007년 임산버섯 생활축제 행사

1차: 숲체원 개원, 2007.9.4

맛마당(버섯샤브, 능이밥, 버섯차, 버섯회) 멋마당(표고, 목이, 흰목이버섯)

2차: '참 나무로' 임산버섯 생활축제 2007년 12월21(금)~22(토)

멋마당: 겨울나무버섯(생표고)전시회 및 흰목이 생산 발표회

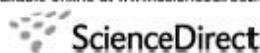
(흰목이 생산 박사논문 발표 임산버섯 부회장 최성우)



7. SCI 논문발표



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Biotechnology 127 (2006) 129–140

Journal of
BIOTECHNOLOGY

www.elsevier.com/locate/jbiotec

Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*

Eun Jae Cho^a, Jung Young Oh^a, Hyun You Chang^b, Jong Won Yun^{a,*}

^a Department of Biotechnology, Daegu University, Kyungsan, Kyungbuk 712-714, Republic of Korea

^b Department of Mushroom Science, Korea National Agricultural College, Ikwansang 445-890, Republic of Korea

Received 27 March 2006; received in revised form 19 May 2006; accepted 22 June 2006

Abstract

The optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exopolysaccharide (EPS) production in an edible mushroom *Tremella fuciformis* was studied in shake flasks and bioreactors. The temperature of 28 °C and pH 8 in the beginning of fermentation in agitated flasks was the most efficient condition to obtain maximum mycelial biomass and EPS. The optimal medium constituents were as follows (g L⁻¹): glucose 20, tryptone 2, KH₂PO₄ 0.46, K₂HPO₄ 1 and MgSO₄·7H₂O 0.5. The fungus was cultivated under various agitation and aeration conditions in a 5 L stirred-tank bioreactor. The maximum cell mass and EPS production were obtained at a relatively high agitation speed of 200 rpm and at an aeration rate of 2 vvm. The flow behavior of the fermentation broth was Newtonian and the maximum apparent viscosity (35 cP) was observed at a highly aerated condition (2 vvm). The EPS productivity in an airlift reactor was higher than that in the stirred-tank reactor. The morphological study revealed that the fungus grows in mainly three different yeast-like forms: ovoid, elongated, and double yeast forms. The high population of the elongated yeast has a very close relationship to high EPS production. The EPS were protein-bound polysaccharides consisted of mainly mannose, xylose, and fucose. The molecular weights of EPS were determined to be (1.3–1.5) × 10⁶. © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Exopolysaccharide; Morphology and rheology; Mushroom; Submerged culture; *Tremella fuciformis*

1. Introduction

The microbial exopolysaccharides (EPS) are a class of high value biopolymers with a wide variety of industrial applications (Looijesteyn et al., 1999; Levander

and Rådström, 2001). In particular, many kinds of EPS have been produced from submerged cultures of mushrooms or entomopathogenic fungi (Bae et al., 2000, 2001; Park et al., 2001; Kim et al., 2002a,b, 2003; Hwang et al., 2003).

Tremella fuciformis, belonging to the order of the *Tremellales* and the family of the *Tremellaceae*, has been appreciated as an edible mushroom. It also has been used for medicinal purposes due to its diverse

* Corresponding author. Tel.: +82 53 850 6556; fax: +82 53 850 6559.

E-mail address: jwyun@daegu.ac.kr (J.W. Yun).

Cytotoxic Effects of Extracts from *Tremella fuciformis* Strain FB001 on the Human Colon Adenocarcinoma Cell Line DLD-1

Kyung-Ai Kim, Hyun-Young Chang¹, Sung-Woo Choi², Jeong-Weon Yoon³, and Chan Lee^{*}

¹Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong, Gyeonggi 456-756, Korea

²Department of Mushroom Science, Korea National Agricultural College, Hwasung, Gyeonggi 445-890, Korea

³Department of Bioprocess Engineering and Genetic Engineering, College of Natural Science, The University of Suwon, Hwasung, Gyeonggi 445-743, Korea

Abstract Cytotoxic effects of extracts from *Tremella fuciformis* strain FB001 were evaluated on the DLD-1 human colon adenocarcinoma cell line and the content of polyphenolic compounds in the extracts were analyzed. Hexane, chloroform, and ethyl acetate subfractions (experimental setting I) exhibited cytotoxic effects on the human colon adenocarcinoma DLD-1 cell line with IC_{50} values of 350, 400, and 450 ppm, respectively. When *T. fuciformis* was extracted sequentially with ether, ethyl acetate, chloroform, and ethanol (experimental setting II), the ether extract demonstrated potent cytotoxicity with an IC_{50} value of 150 ppm, followed by ethyl acetate and chloroform fractions. If the first extraction solvent was chloroform instead of ether (experimental setting III), exposure of the cell line to chloroform, ethyl acetate, and ether extracts at 1,000 ppm led to cell death. High levels of phenolic compounds were estimated for all hydrophobic extracts, which exhibited cytotoxic effects. We propose that this useful information gives additional support to our understanding of the biology and utility of this particular mushroom.

Keywords: extraction methods, white jelly mushroom, *Tremella fuciformis*, cytotoxicity

Introduction

The white jelly mushroom, *Tremella fuciformis*, of the family *Tremellaceae*, class *Hymenozymetes* and division *Basidiomycota* (1-4) is one of approximately 40 fungi species in the genus *Tremella* and found mainly in East Asia. The body of *T. fuciformis* is used as a common food and clinically in traditional medicine in China. This mushroom is also an excellent source of industrial enzymes such as beta-D-mannosidase and beta-N-acetyl-D-hexosaminidase (5).

Investigation of the active compounds in the fruiting body of *T. fuciformis* to date has been limited. Soluble extracts of *T. fuciformis*, however, have been studied intensively (6) because of various noted biological effects, such as enhancing immune functions (7), anti-tumor (8), and hypoglycemic activities (9). The polysaccharide fraction of the soluble extracts has been used clinically in China for cancer patients undergoing treatment with chemotherapeutic agents or radiotherapy to enhance native immune function (7) including cytokine-stimulating activity (10, 11). Further, superoxide-scavenging ability was reported for a soluble extract of *T. fuciformis*, however, the active components remain unknown (12).

Polysaccharides in the soluble extract of the mushroom represent the most promising active anticancer agent (13-16). Polyphenols and flavonoids however, in preliminary chemical examination of non-polar solvent extracts of mushrooms, were regarded as the primary active components (17, 18). Several of these compounds have been reported to possess anti-tumor activity (17). The

main mechanism of tumor inhibition by the flavonoids is poorly studied, however, one possible role would seem to be a decrease in the glycolytic activity through inhibition of the plasma membrane (Na, K)-ATPase (18).

Recently, potent chemopreventive agents for colon and stomach cancer were reported from *shiitake* mushrooms, *Lentinus edodes* and a wild mushroom in Korea, *Polyozellus multiplex* (19-21). To investigate a possible anticancer property of the *T. fuciformis* mushroom, we have examined the cytotoxic effects of hydrophobic extracts on cell cultures of the DLD-1 human colon adenocarcinoma cell line. In this report, we indicate that among several fractions, cytotoxicity to the test cells could be demonstrated and in a dose dependent manner. These cytotoxic effects were evaluated according to the extraction procedures with relation to the content of the extracts phenolic components.

Materials and Methods

Materials Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), RPMI-1640 medium, penicillin, and streptomycin were purchased from Gibco Ltd. (Grand Island, NY, USA). MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), trypsin inhibitor from soybean, fetal bovine serum (FBS), dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Sigma Co. (St. Louis, MO, USA) and all other reagents and solvents for extraction were of analytical grade.

Identification of *T. fuciformis* The stromatal forms of *T. fuciformis* and the mycelia of *Hyposcyton* sp. were collected from limb of *Quercus* sp. within Haenam, Jeonnam province in the summer, 2003. The DNA sequences in the Internal Transcribed Spacer (ITS) region of the 5.8S ribosomal genes were analyzed and compared

*Corresponding author. Tel: 82-31-670-3035; Fax: 82-31-676-8965
E-mail: chanlee@cau.ac.kr

Received July 26, 2006; accepted September 14, 2006

9. 월간버섯 홍보

Jboard

페이지 1 / 1

MushRoom21 <http://www.mushroom21.co.kr>

월간버섯 기사보기

TOPIC 월간버섯 [E-mail]
SUBJECT [10월]원목이버섯 대량생산 및 실용화 연구 추진
HOMEPAGE <http://mushroom21.co.kr>

[특새연구]

원목이버섯 대량생산 및 실용화 연구 추진

중국에서 식용 및 약용버섯으로 널리 재배중인 원목이버섯(Tremella fuciformis Berk.)이 우리나라에서도 재배가 이루어질 것으로 전망된다.
중앙대학교 이찬 교수와 한국농업전문학교 장현우 교수, (사)한국원산버섯생산자단체연합회 최성우 부회장 등으로 구성된 원목이버섯 연구팀이 농림기술개발 과제로 「원목이버섯 인공재배 대량생산 시스템 구축 및 실용화 연구」를 활발하게 추진 중이기 때문이다.
연구팀에 따르면 「원목이버섯은 맛이 좋고 항산화 물질인 Inoleic acid 등의 약용 성분도 다량 함유하고 있으며 기술적·경제 산업적·사회문화적 측면에서도 연구개발의 필요성이 매우 높음에도 불구하고 국내에서는 원목이버섯의 인공재배기술개발 및 기능성에 관한 연구수준이 미약한 수준」이라며 「원목이버섯 인공재배 대량생산 시스템 구축 및 실용화 연구」가 완료될 경우 △우왕관주 선발 및 미래 버섯지천 활용 △재배기술 개발·보급 및 새로운 농가 소득원 창출 △주요생리활성 규명 및 국민 건강 증진 등 다양한 효과가 기대된다」고 밝혔다...

▶ 문의 : (사)한국원산버섯생산자단체연합회
최성우 부회장 mushchol@yahoo.co.kr

[전체기사 : 월간버섯 2006년 10월호 58~59P 참조]

구독 신청하기

2006-10-10 16:08:04

INDEX PREVIOUS NEXT



전체 1개 - 현재 1/1 쪽

H	NO	SUBJECT	TOPIC	FILE	DATE	BIT
<input type="checkbox"/>		[10월]원목이버섯 대량생산 및 실용화 연구 추진	월간버섯		2006-10-10	141



[맨처음] .. [이전] 1 [다음] .. [마지막] [전체글목록]

제목

검색

<http://mushroom21.co.kr/jboard/?p=detail&code=board1&id=1155&p...> 2008-04-13

10. 국내학회지 논문발표

한국비섯학회
한국비섯학회

농업과학기술원 농업생명과학센터
 경기도 수원시 권선구 서둔동 249
 농업과학기술원 응용여성물과
 T: 031-290-0377, 016-752-2137

문서번호	한비권위 2008-06-02
시행일자	2008. 4. 8.
공개여부	공개여부
수신	투고논문 교신저자님
제목	한국비섯학회의 투고논문 1차 논문심사 완료

본 학회에 투고한 다음 논문의 1차 심사가 완료되었기에 저자에게 발송합니다.
 수정 후 기일 임수하시어 편집간사 (농업과학기술원 공원석)에게 동기 응답과 e-mail로 보내주시기 바랍니다.

- 다 음 -

1. 심사논문 및 심사결과

접수번호 (논문번호)	지차	논문제목	심사결과
6-01-02	최성우의 3명	원목이비섯 대량생산을 위한 용기내 계배 최적 화 연구	수정 후 재차

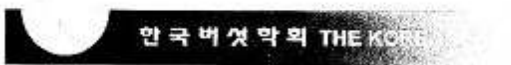
2. 수정 후 다음 서류와 파일을 모두 편집위원회로 함께 보내주시기 바랍니다.

- ① 1차 심사논문 (1부)
- ② 논문심사용지
- ③ 수정 후 논문
- ④ 아래첨자로 작성한 파일
- ⑤ 수정보완 확인서

3. 수정보완기일 : 2008년 4월 19일(토)까지

한국비섯학회편집위원장 장현유

공원석
 (우441-707) 경기도 수원시 권선구 서둔동 249
 농업과학기술원 응용여성물과
 T: 031-290-0377, 016-752-2137



12. 저서 (농가보급안) 2008. 2월 출간

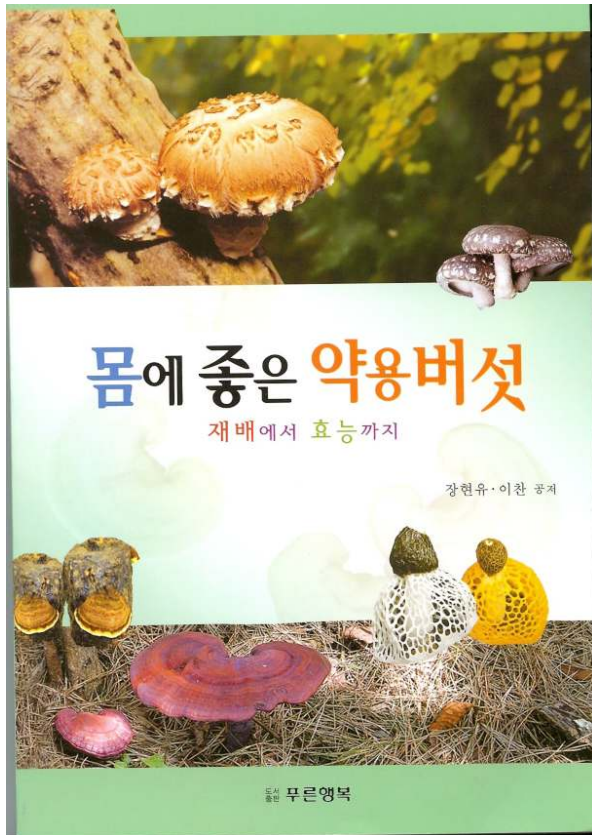


그림 90

제11장 흰목이버섯

1. 형태 및 균학적 특성
2. 흰목이 인공재배 방법
3. 원목재배 방법
4. 특수배지(목화씨 껍질)를 이용한 흰목이재배
5. 황금귀버섯의 인공재배 방법
6. 수확과 가공

