

미이용 버섯자원을 활용한 기능성다당류 생산 및
이용기술 개발에 관한 연구

Development of Utilization Technology and
Production of Functional Polysaccharide from
Unused Mushroom Resources

부산대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “미이용 버섯자원을 활용한 기능성다당류 생산 및 이용기술 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2009 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 부산대학교
주관연구책임자 : 김 근 기
세부연구책임자 : 김 선 구
연 구 원 : 김 용 균
연 구 원 : 박 현 철
연 구 원 : 강 한 석
연 구 원 : 신 택 순
연 구 원 : 이 용 재
연 구 원 : 김 정 현
연 구 원 : 이 상 범
연 구 원 : 전 상 윤
연 구 원 : 최 지 선
연 구 원 : 최 영 하
협동연구기관명 : 동아대학교
협동연구책임자 : 최 용 락
연 구 원 : 이 용 석
연 구 원 : 박 인 혜

요 약 문

I. 제 목

미 이용 버섯자원을 활용한 기능성다당류 생산 및
이용기술 개발에 관한 연구

제 1세부과제 : 기능성 다당류 추출분리기술 및 제품개발

제 2세부과제 : 기능성 다당류 함유 제품 생산

협동과제 : 기능성 다당류 생성 우수 미생물 선발 및 유전육종

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

새송이버섯이 우리나라에 보급된지 10여년에 국내에 600만 농가에서 연간 87,000톤 이상 생산되어 연간 3,000억원의 시장을 형성하고 있으며, 맛과 기능성이 뛰어나 소비자가 선호하고 있고, 우리나라가 세계에서 생산 인프라가 가장 잘 구축되어 있어 수출시장도 넓혀가고 있는 새송이버섯 종주국으로 자리매김을 하고 있다.

새송이버섯은 재배와 생산과정에 있어서 작은 충격에도 쉽게 형태를 상실하여 상품성을 잃는 경우가 많고, 수확 후 상품화과정에 생성되어지는 부산물 및 재배 중에 다수의 애기송이도 발생되어져 상품으로 미 이용되는 부위 즉, 미 이용자원이 많이 발생한다. 현재까지 새송이버섯의 미 이용자원은 연간 15,000톤으로 발생이 많으나 뚜렷한 이용방안이 없어 버려지거나 사료로서 활용되어 경제적 가치가 크게 하락된다. 이러한 미 이용부위를 이용하여 건강보조식품이나 의약품 원료를 개발할 수 있다. 버섯의 미 이용부위는 팽이버섯에서도 마찬가지다. 팽이버섯의 경우도 약 1/3을 버려진다.

본 연구에서 새송이버섯과 팽이버섯 그 자체나 미 이용자원을 이용한 제품개발의 기술을 개발하고, 부가가치의 재창출이 가능한 제품개발에 목표를 두고 있으며, 버섯재배농가와 계란 및 육계생산 농가의 소득증대에 기여하는 것이 연구수행의 최종 목표이다.

2. 경제적·산업적 중요성

○ 세계적으로 연간 버섯생산량의 400만톤이고 중국의 경제성장을 고려한다면 우리나라의 버섯농가의 수출전망은 밝다고 볼 수 있다. 따라서 버섯의 생산량의 증가와 동반하여 버섯 부산물 생산량도 증가할 것이며, 연간 10만톤 이상의 미 이용 버섯자원을 이용한 제품개발과 산업형성은 경제적으로 매우 중요하다.

○ 버섯자원을 이용한 기능성물질의 개발과 재활용은 경제적 뿐만이 아니라 새로운 산업의 창출의 의미도 가지고 있다.

○ 버섯자원에서 기능성다당류의 개발은 정상효과로 대장암의 예방, 변비해소, 유해물질의 흡수억제, 면역기능 향상 등의 효과가 있고, 혈당강하작용, 혈중 지질조절효과, 비만, 혈압강하, 담석예방 등 사회적으로 문제시되는 성인병예방과 국민보건에 크게 기여할 것이다.

○ 현재 수용성 식이섬유는 전량 수입하고 있어 외화손실이 크다. 이를 국내에서 개발되어진다면 외화절감에 크게 기여를 할 것이다.

○ 현재 식이섬유 생산은 주로 물리·화학적인 방법으로 제조하기 때문에 인체에 부작용을 초래하는 경우가 있으나, 효소시스템을 이용한 본 과제 개발계획은 자연친화적이며 인체에 부작용이 없는 기능성다당류 생산방법으로 개발의 가치는 아주 높다.

○ 계란 시장에 기능성에 대한 많은 논란이 있지만, 버섯 미생물분해산물을 급여한 기능성 계란과 닭고기를 생산은 양계농가에 경제적인 과급효과는 아주 클 것이다.

○ 버섯 미 이용부위로부터 다당류를 분리하여 변비해소와 다이어트에 기능성을 나타내는 분말과 우유를 생산하여 위축되어가는 우유산업 활성화와 축산업농가의 소득증가에 크게 기여할 것이다.

3. 연구개발 필요성

○ 식생활의 변화에 의해 고단백질·고지방 식품과 유연한 식품을 많이 섭취하는 식생활의 문화가 급속히 서구화로 되어가고, 장질환이 증가하고 있어, 다당류의 섭취로 예방이 절실히 요구되므로 다당류의 연구와 제품개발이 이루어져야한다.

○ 다당류의 생리적 기능을 보면, ① 변비를 해소시켜준다. ② 장내환경을 정돈하고 비타민을 합성하며, ③ 혈당치를 조절하고, 당뇨병을 예방·개선한다. ④ 고혈압 예방효과가 있고, ⑤ 동맥 경화를 예방해 준다. ⑥ 암을 예방·억제하고, ⑦ 콜레스테롤과 담석형성을 저해한다. ⑧ 간장의 기능을 돕고, 활성화하는 효과가 있으며, ⑨ 위를 보호하고, 위궤양과 십이지장궤양 등을 예방한다. 그리고 ⑩ 환경호르몬(다이옥신 등)의 배설을 촉진하는 등의 다양한 효과가 있어 다당류의 개발은 절대적으로 필요하다.

○ 한국식품의약품안전청에 따르면 1일 식이섬유 섭취 권장량이 20~25g이라는 기준이 재설정 되어졌으나, 실제 섭취량은 평균 12g에도 미치지 못하고 있다. 따라서 다당류 공급을 위하여, 먹기 쉽고 기능성을 갖춘 제품개발이 절실히 요구되고 있다.

○ 생물체로부터 분리한 다당류의 연구는 활엽수와 보릿짚을 대상으로 구조적인 해석도 이루어져 있으나, 버섯류와 침엽수에 대한 연구는 이루어져있지 않다.

○ 현재 물리·화학적 방법으로 생산하고 있지만 미생물 등을 이용한 인체친화적인 방법으로 생산할 수 있는 기술개발이 필요하다.

○ 최근 우리전통식품과 건강지향식품에 관심이 크게 고조되는 근원은 기능성다당류의 생리활성을 보고자하는 것이다. 다당류 개발의 국내 기술수준은 아직 초보적이므로 다양한 기술이 개발되어야 한다.

○ 기능이 탁월하여 세계적으로 각광을 받고 있는 기능성다당류개발은 미 이용 버섯자원 이용차원을 넘어서서, 바이오신소재개발수준으로 평가되어져 이용기술을 적극적으로 개발해야 한다.

○ 양계산업이 최근 상당히 위축되고 있으며, 소비량도 극감하고 있다. 버섯의 기능성을 부여한 축산물을 생산하여 축산산업의 활성화가 요구된다.

○ 동물 중 급여한 사료에 포함된 물질을 가장 잘 이용하는 것이 닭이다. 따라서 미 이용 버섯자원의 미생물분해물을 급여한 기능성계란과 닭고기생산 연구는 중요한 의미를 갖는다.

○ 우유소비가 급격히 감소하여 우유관련 산업이 침체화 되고 있는 상황이므로, 기능성우유의 개발로 우유산업 활성화가 시급한 실정이다.

○ 여성에게 가장 관심 있는 것이 다이어트와 변비다. 따라서 본 과제에서는 다이어트 우유와 변비예방 및 치료 우유를 개발하고자한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 제 1세부 과제

기능성 다당류 추출분리기술 및 제품개발

가. 연구개발 내용 및 범위

1) 다당류 추출

○ 버섯 다당류 추출 및 확인

- Hemicellulose

- Xylose

○ 미생물분해물의 다당류 추출

- 1차 저온조건 추출

- 2차 고온조건 추출

○ 다당류 추출 조건에 따른 추출량 등의 확인

2) 버섯 미 이용부분 미생물 분해물 추출 및 동정

○ 버섯유래 다당류 추출 및 동정

- 수용성 다당류 추출법 확립

- 비수용성 다당류 추출법 확립

- 온도별 추출물의 확인

- Xylan 및 다당류 분리방법 확립

3) 계란 내 다당류 분석

- 다당류분리 분석
 - 버섯분해산물 급여 닭이 생산한 계란의 물질 분석
- 4) 기능성 제품 개발
 - 기능성다당류 함유 우유개발
 - 기능성 우유 개발
 - 의약품 및 건강보조식품 후보물질 개발

2. 제 2세부 과제

기능성 다당류 추출분리기술 및 제품개발

가. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 미생물 분해물 급여한 닭 사육
 - 산란계, 육계 구입과 사육
- 2) 미생물 분해물의 영양학적 효과조사
 - 다당류의 분자량을 달리한 미생물 분해물의 닭에 급여
- 3) 미생물분해유기물의 적정 급여수준 결정
 - 기능성다당류 첨가 급여시험
 - 급여수준 및 급여기간에 따른 생산성 조사
- 4) 미생물분해유기물 섭취 계란 및 닭고기생산
 - 기능성다당류 섭취 계란생산 및 품질조사
 - 기능성다당류 섭취 닭고기생산 및 품질조사
- 5) 급여량과 급여기간별 계란성분 조사
 - 기능성을 갖는 계란 생산
 - 기능성을 갖는 닭고기생산
- 6) 급여량과 급여기간별 닭고기성분 조사
 - 급여량 및 급여기간에 따른 성분분석
 - 투여량에 의한 계란 및 닭고기의 xylan 및 Cholesterol 함유율조사

3. 협동 과제

기능성다당류생성 우수 미생물 선발 및 유전육종

가. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 균주분리 및 특성조사
- 2) Hemicellulose 분해능 우수 미생물의 선발
 - 유기물 분해 관련 효소활성 우수 미생물 screening 및 동정
- 3) 선발균주의 유기물 분해 활성조사
 - 선발균주의 분해 관련 각종 효소의 활성조사

- 분리균주의 최적 효소생산 조건 및 영양원의 최적 조건 검토
- 4) 선발균주의 배양학적 특성 및 생성 효소의 특성 조사
- 5) 선발균주의 생육 조건과 효소활성의 조사
 - 선발균주의 생육특성 조사
 - pH, Temp. 조건 및 생화학적 특성
- 6) 선발균주의 효소학적 특성 조사
 - 우수균주의 Cellulase, Hemicellulase, endoxylanase의 분리 정제
- 7) 버섯 섬유소 분해관련 유전자의 발굴 및 이용
- 8) 효소특성조사
 - Hemicellulase, endoxylanase의 효소 kinetics 조사
- 9) 버섯 섬유소 분해관련 유전자의 클로닝 및 분자적 해석
 - 버섯 섬유소 분해관련 효소 유전자의 단리 및 분석
- 10) 유전적 육종
 - 분해관련 효소 유전자를 이용한 미생물 분자육종

IV. 연구개발 결과

제 1세부과제 :

기능성 다당류 추출분리기술 및 제품개발

1. 새송이버섯 미 이용자원으로부터 다당류 추출

가. 새송이버섯으로부터 다당류 추출

새송이버섯의 미 이용자원으로부터 다당류를 추출한 결과, 미 이용자원 100g에 대한 고압열수추출법에서는 15g의 추출물을 얻었고, methanol과 열수추출법에서는 5g의 다당류를 얻었다. 10% NaOH로 추출한 것에서는 3g을 얻고, 유기용매와 alkaline으로 hemicellulose 추출법에 의해서는 2.1g의 다당류 추출물을 얻어 다당류의 추출을 위해서는 고압열수추출법을 이용하는 것이 가장 좋았고, 목적 당류의 추출을 위해서는 용매와 pH 조절이 유용하다.

나. 새송이버섯, 발효 새송이버섯, 팽이버섯으로부터 β -glucan 추출

β -glucan은 다양한 생리활성을 갖고 있어 새송이버섯과 팽이버섯 그리고 발효 새송이버섯 건조분말 20g으로부터 β -glucan을 추출하였다. 새송이버섯에서는 35.6mg의 β -glucan을 얻었고, 발효시킨 새송이버섯에서는 164.3mg, 팽이버섯으로부터는 18.6mg의 β -glucan을 얻었다. 발효 새송이버섯에서 발효시키지 않은 새송이버섯보다 3배이상 많은 량의 β -glucan이 추출되어졌다.

β -glucan추출과정에 에탄올침전물을 이용한 항혈전활성 측정에서는 발효 새송이버섯 에탄올 침전물이 새송이버섯과 팽이버섯보다 각각 200%, 150% 높은 활성을

보였다.

2. 유기용매를 이용한 버섯의 기능성 물질 추출

가. 새송이버섯과 팽이버섯의 Wax 성분분석

새송이버섯의 미 이용 자원을 chloroform과 methanol 혼합용매로 wax를 추출하였다. 많은 물질들이 추출되어졌고, 물질 분리시스템을 확립하였으며, 항산화활성과 항혈전활성을 확인하였으며, 항혈전활성은 아스피린보다 30배이상의 높은 활성을 보였다.

나. 새송이버섯과 팽이버섯의 lignin 산화물 분석

새송이버섯과 팽이버섯 lignin 산화물을 GC/MS로 분석한 결과 새송이버섯에서는 13종 이상의 물질이 확인되어졌고, 팽이버섯에서는 4종류의 물질이 확인되어졌다. 새송이버섯의 lignin 산화물의 주성분은 9-Octadecenoic acid(C18:1)이 65%로 아주 높은 함량을 보였으며, 그 외에 hexadecanoic acid, propanoic acid, hexanoic acid, benzeneacetic acid 순이었다.

다. 유기용매를 이용한 새송이버섯 물질추출

1) Hexane 추출물의 생리활성과 물질분리

새송이버섯의 유기용매 추출물 중에서 hexane 추출물이 강력한 항산화 활성을 나타냄으로써 column chromatography와 TLC로서 물질분리를 실시하였다. 분리과정 중에 항산화활성은 아주 광범위하게 많은 물질들이 활성을 나타냈으며, 특이하게 형광성을 나타내는 물질도 다수 확인을 하였다.

2) Hexane 추출물로부터 항혈전활성 물질 순수분리 및 동정

새송이버섯 추출물의 column 분획물 각각 0.02mg과 aspirin 0.2mg, 0.5mg 및 무처리, DMSO를 처리하여 비교한 결과, aspirin 0.5mg을 처리한 곳에서는 control보다 3배 늦게 fibrin이 형성되어졌다. Column 회수물 H1-3, 4, 5, 7에서는 아주 강력한 항혈전활성을 나타냈다. TLC R_f 0.38에 강한 형광을 나타내는 물질(H-5)은 control보다 약 3.7배의 활성을 보였고, aspirin보다 25배의 적은 양(0.02mg)을 처리했지만 활성은 더 높게 나타났고, 반복실험에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 1차 컬럼의 결과 H1-5물질이 항혈전활성이 가장 높았으므로 2차 컬럼을 실시하였다. 그 결과 Column 회수물 전체에서 대조구과 비교했을 때 활성이 높게 나타났으며, 분획 회수물 H2-1, -2는 225%와 285%로 다소 낮은 thrombin 저해 활성을 보였으나, H2-3, -6, -7에서는 각각 520%, 552%, 532%의 thrombin 저해활성을 나타냈고, R_f 0.2 근처 형광물질이 주성분인 H2-4와 H2-5 분획물에서는 0.02mg 처리에 fibrin이 형성되어지지 않는 아주 강력한 항혈전활성을 나타냈다.

3차 TLC에서는 H3-3(R_f 0.45), -4(R_f 0.51), -5(R_f 0.59)의 화합물은 0.02mg 농도에서 thrombin 효소저해활성을 완전히 저해함으로써 fibrinogen에서 fibrin으로의 반응이 일어나지 않았다. H3-3물질을 순수분리하여 GC/MS분석을 실시한 결과 하나

의 peak를 확인했으며, 분자량 130의 2-ethylhexanol로 동정이 되었다.

3) Chloroform 추출물로부터 향산화물질 순수분리

새송이버섯을 chloroform으로 추출하여 normal col.을 두 차례 실시하고, reverse col.을 3차로 실시하여 향산화 활성물질을 순수분리 하였다. 순수 분리한 향산화물질은 구조동정과 다양한 생리활성 assay를 하는 중이다.

4) Methanol 추출물로부터 당 결정화

새송이버섯 methanol추출물을 column을 실시하여 물질을 순수분리 하였다. 그 과정 중에 3종류의 당을 결정화하여 분리하였다. 결정 당을 동정을 위한 실험 중에 있다.

라. 새송이버섯과 새송이 발효산물의 성분분석

새송이버섯의 섬유소를 분해시켜 기능성 당류를 얻기 위하여 유기물 분해능이 우수한 미생물을 접종하여 발효시켜 다당류와 용매 추출물을 얻어 분석을 하였다. 일반화합물은 새송이버섯 추출물 분석에서 24종이 검출되어진 반면, 새송이 발효산물에서는 33종으로 많은 종류가 검출되어졌고, 일부 물질은 양이 줄어들고 늘어나는 것을 확인 할 수 있다. 이는 미생물이 생육하면서 새송이버섯을 이용하여 양의 차이를 보이는 것으로 보인다.

3. 새송이버섯 급여 닭의 계란성분분석

가. 새송이버섯 분말 급여 계란의 성분분석

새송이버섯 분말을 1.5%~4.5%까지 사료에 첨가하여 급여한 닭이 생산한 계란의 난황과 난백을 비교분석한 결과, 개체간의 TLC상 성분의 차이는 난백의 Methanol 추출물에서 Rf 0.6~0.9까지의 녹색형광을 나타내는 물질이 버섯을 첨가한 난백에서는 량에 따라 점차 줄어들었다. 성분의 구체적인 분석은 흥미로운 결과를 줄 것으로 사료된다. 계란의 난백을 CHCl₃로 추출하여 그 성분을 비교한 결과 처리구에서는 새송이를 급여하지 않은 control보다 대부분의 성분들이 높게 나타났으며, 특히 Benzenedicarboxylic acid는 4.5% 사료를 급여한 란에서는 무려 110%의 증가를 보였다. 난황을 CHCl₃으로 추출한 결과 control보다 대부분의 성분들이 난백과 같이 높게 나타났으며, 특히 Stearic acid는 4.5% 사료를 급여한 란에서는 94%의 증가를 보였다.

난황을 MeOH로 추출하여 그 성분을 비교한 결과 새송이버섯 처리량 증가에 따라 cholesterol의 량이 감소되어졌다. 계란의 cholesterol 저하의 효과는 아주 흥미로운 결과로 사료된다.

나. 새송이버섯 발효산물 급여 계란의 성분분석

새송이 발효산물을 1%, 2%, 3% 첨가하여 생산된 계란으로부터 난황성분을 분석한 결과, 사료에 3% 첨가하여 급여한 난에서는 지질의 함량이 96%로 줄어드는 것을 확인했다.

2차로 새송이버섯 발효 분말을 3%, 5%, 7% 혼합하여 급여하여 생산된 계란의 난황 지방산을 추출하여 비교한 결과, 많은 성분에 차이를 보였고 control보다 대부분의 지방함량이 낮게 나타났으며, cholesterol 그룹들도 낮아지는 현상을 볼 수 있었다.

4. 새송이버섯 분말과 추출물의 변비해소 효과

가. 마우스(Balb/C)에 대한 변비해소 효과

1) 새송이버섯 열수추출물의 소화관 이동률

새송이버섯 열수추출물의 변비해소 효과를 조사하기 위하여 열수추출물을 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml를 처리했을 때 소화관이동률이 155.2%, 166.2%, 190.1% 증가하였으며, 조 등과 백 등이 발표한 무추출물과 함초추출물에 의한 소화관이동률과 비교하였을 때 1.0배~1.6배 증가하는 결과를 얻었다.

2) 새송이 발효산물 열수추출물의 소화관 이동률

새송이버섯을 발효시킨 후 열수추출물을 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml 농도로 처리했을 때 각각 114.1%, 126.3%, 180.9%로 처리량에 따라 직선적으로 증가했으며, 논문에 보고된 무추출물과 함초추출물 보다 1.0~1.5배 증가하였다.

3) 새송이버섯 열수추출물과 우유 혼합조성물의 소화관이동거리 측정

새송이버섯 열수추출물과 식수 대신 우유를 20% 첨가하여 만든 조성물의 소화관이동률을 조사하였다. 조성물 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml 농도 처리에서 소화관이동률이 각각 158.3%, 233.3%, 294.1%로 처리량에 따라 현저히 증가했으며, 무추출물과 함초추출물 보다 적게는 1.4배, 많게는 2.5배 증가하였다. 열수추출물만을 처리했을 때보다 이동률이 현저히 증가한 것은 추출물과 우유의 상호작용에 의한 것으로 판단된다.

4) 새송이버섯 발효산물 열수추출물과 우유 혼합조성물의 변비해소 효과

새송이버섯 발효산물 열수추출물과 식수 대신 우유를 20% 첨가하여 만든 조성물을 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml 농도로 처리했을 때 소화관이동률이 각각 180.0%, 212.5%, 258.3%로 처리량에 따라 직선적으로 증가했으며, 무추출물과 함초추출물 보다 각각 1.6배, 1.9배, 2.2배로 높게 증가하였다.

5) 새송이버섯 열수추출물의 효소분해산물에 의한 변비해소 효과

새송이버섯 열수추출물을 cellulase와 hemicellulase로 가수분해 시켜 효소분해산물을 0.72mg/ml와 1.5mg/ml 농도로 처리했을 때 204.6%와 316.4%로 처리량에 비례해서 소화관이동률이 증가하였다. 효소에 의해 긴 다당류사슬을 적당한 길이로 짧게 해줌으로서 장내의 이동을 쉽게 해주고, 음식물과 잘 혼합됨으로서 소화관이동을 촉진시킨 것으로 판단된다.

6) 새송이버섯 분말의 변비해소 효과

새송이버섯 분말을 일반사료에 3%와 5%첨가하여 급여했을 때, 소화관이동률을 167.3%, 192.9% 향상시켰다. 이 결과를 볼 때 새송이버섯을 가공 없이 그대로 섭취하더라도 변비해소효과는 있는 것으로 확인되었으나 적정 섭취량의 연구는 더 필요할 것이다.

7) 새송이버섯 발효 분말의 변비해소 효과

발효 새송이버섯 분말을 3%와 5% 첨가하여 만든 사료를 급여한 마우스의 소화관이동거리 측정에서는 각각 128.2%와 216.6%로 소화관이동률을 증가시켰다.

나. 변비유발 랫드(Sprague-DawleyC)에 대한 변비개선 효과

새송이버섯 열수추출물을 식수에 2mg/ml, 3mg/ml, 그리고 4mg/ml 농도로 처리했을 때 변의 무게가 각각 128.4%, 140.5%, 157.3%로 증가했으며, 변의 개수도 각각 121.6%, 132.1%, 133.7%로 증가하였고, 변의 수분함량도 각각 173.0%, 239.9%, 251.7%로 증가 하였다.

다. 열수추출물을 급여한 마우스의 혈액분석

1) 새송이버섯 열수추출물을 급여한 마우스의 혈액분석

새송이버섯 열수추출물을 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml 농도로 식수에 녹여 급여를 했을 때, LDL-cholesterol 함량은 각각 21.8%, 33.6%, 40.0%로 처리량에 따라 감소했으며, Total cholesterol은 각각 8.4%, 10.1%, 12.1%로 처리량에 따라 cholesterol함량이 줄어들었다.

2) 발효 새송이버섯 열수추출물을 급여 마우스의 혈액분석

발효 새송이버섯 열수추출물 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml 농도로 급여를 했을 때, LDL-cholesterol 함량이 0.72mg, 1.5mg 처리군에서 7.5%, 24.7%로 감소했으며, Total cholesterol은 9.2%, 10.6%, 17.8% 감소했다.

3) 새송이버섯 열수추출물과 우유 혼합 조성물을 급여한 마우스의 혈액분석

새송이버섯 열수추출물과 우유를 혼합한 조성물을 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml를 처리했을 때, LDL-cholesterol 함량이 19.4%, 19.4%, 26.2%로 량에 따라 감소했으며, Total cholesterol 또한 1.9%, 4.7%, 8.9% 감소했다.

4) 발효 새송이버섯 열수추출물과 우유 혼합 조성물 급여 마우스의 혈액분석

발효 새송이버섯 열수추출물과 우유 혼합 조성물을 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml 농도로 급여했을 때, LDL-cholesterol 함량은 15.5%, 22.2%, 33.3%로 감소했고, Total cholesterol은 5.9%, 8.6%, 9.7%로 처리농도에 비례해서 감소했다.

5) 새송이버섯 분말 사료를 급여한 마우스의 혈액분석

새송이버섯 분말을 사료에 3%, 5% 첨가하여 마우스에 급여시켰을 때 LDL-cholesterol 함량은 대조구에 비해서 각각 18.2%와 7.5% 감소했으며, Total cholesterol은 6.9%와 7.7% 감소하였다.

6) 발효 새송이버섯 분말사료를 급여한 마우스의 혈액분석

발효 새송이버섯 분말을 사료에 3%, 5% 첨가하여 마우스에 급여시켰을 때 LDL-cholesterol 함량은 각각 37.9%증가와 24.7% 감소하였다. Total cholesterol도 3% 처리군에서 13.3% 증가하였으며, 5% 처리군은 20.5% 감소하였다.

라. 새송이버섯 열수추출물을 급여한 랫드(Sprague-DawleyC)의 혈액분석

새송이버섯 열수추출물을 2mg/ml, 3mg/ml, 4mg/ml를 급여한 랫드의 혈액성분 중 LDL-cholesterol 함량은 32.0%, 39.6%, 35.8% 감소했으며, Total cholesterol

은 15.0%, 24.2%, 32.4%로 감소했다.

5. 새송이버섯재배의 주요 병원균 분리 및 방제

가. 새송이버섯 주요 병원균 분리

새송이버섯 재배에 있어 가장 문제가 되는 것은 병원균 및 잡균의 오염으로 농가소득에 큰 손실을 가져온다. 곰팡이 6종류와 세균 3종류를 분리하였다. 곰팡이 F1, F3는 새송이버섯 균주보다 성장속도가 빨라 새송이버섯 보다 먼저 배양병을 선점하여 새송이버섯의 발이에 문제를 일으키고, 포자를 형성하기 때문에 재배실 전체를 오염시킨다. F2와 F4는 새송이버섯 균주의 생육을 억제하기 때문에 초기에 발생하면 새송이버섯의 발이를 막고, 발이 후에 발생하면 상품성이 떨어지거나 푸른색으로 포자를 형성하기 때문에 제품출하가 어렵다.

최근 새송이버섯 수확 전에 발생하는 병원균 F5와 F6을 분리 동정하였다. F5균의 피해현상은 배지에서 처음 발생하여 새송이버섯 자실체를 덮어버리며, 시간이 지나면 자실체가 물러지는 현상이 나타난다. F5균을 현미경으로 보면 눈꽃이 피는 듯한 생육특성이 있고, 포자가 형성되면서 분홍빛을 나타낸다. 분생자경이 직립으로 형성하고, 분생포자는 사슬이 엉켜진 모양으로 보이며, 대부분이 1개의 격막을 갖고 있으며, 다수를 갖는 것도 있었다. 이러한 형태학적 특성으로 *Cladobotryum* sp.와 일치하여 동정을 하였다.

F6균은 초기에 흰색을 나타내다가 차츰 검은색을 띄어 상품성을 없애버리는 피해를 준다. 현미경관찰에서 초기에는 흰색으로 투명성을 지닌 균사가 그물망처럼 나타나다가 차츰 검은 점들의 포자가 나타며 균사가 갈색을 띄며 포자낭경이 길고 공기중으로 형성된다. 포자낭경의 끝에 검고 둥근 포자낭을 형성하며, 포자낭은 수많은 구형의 포자낭포자를 갖는 특성이 있고, 가근을 형성하며 가근과 가근사이는 포복균사를 형성하여 연결하는 *Rhizopus*의 균학적 특성을 모두 갖고 있어 *Rhizopus* sp.로 동정을 하였다.

나. 새송이버섯 병원균에 대한 길항균 항균스펙트럼

새송이버섯 재배에 가장 큰 손실이 병원균에 의한 피해로, 새송이버섯도 곰팡이고 오염균도 곰팡이일 경우에는 선택적인 약제를 사용하는 것이 불가능하다. 본 연구실에서 가지고 있는 길항균과 농촌진흥청 공동연구에 사용한 길항균 53종을 갖고 새송이버섯균과 오염균에 대한 항균스펙트럼을 조사한 결과, 228균주만 병원균 F1, F2, F3에 대한 길항활성을 갖고 있고, 새송이버섯 균주의 생육에는 초기에 저해하는 듯했지만 후기생육에는 문제가 없었다. 228균은 *Pseudomonas* sp.로서 새송이버섯 재배의 생물농약으로 개발의 가능성을 확인하였다.

제 2세부과제 :

미 이용 버섯자원을 이용한 계란 및 닭고기 생산

1. 건조처리 미 이용 버섯자원에 의한 계란 생산

가. 건조처리 미 이용 버섯자원에 의한 계란 생산

계란생산에 대한 건조처리 미 이용 버섯자원의 급여효과를 검토하기 위하여 50주령의 하이라인 산란계 224수를 4개 그룹으로 나누어 대조구(C)는 기초사료만 급여하였고, 시험 1구(T1)는 기초사료에 건조처리 된 미 이용 팽이버섯 1%를, 시험 2구(T2)는 건조처리 된 미 이용 팽이버섯 3%를, 시험 3구(T3)는 건조 처리된 미 이용 팽이버섯 5%를 7주 동안 급여하였다. 이어서 60주령의 하이라인 224수를 4개 그룹으로 나누어 대조구(C)는 기초사료만 급여하였고, 시험 1구(T1)는 기초사료에 건조 처리된 미 이용 팽이버섯 1%를, 시험 2구(T2)는 건조 처리된 미 이용 팽이버섯 3%를, 시험 3구(T3)는 건조 처리된 미 이용 팽이버섯 5%를 7주 동안 급여하였다. 얻어진 결과는 다음과 같다.

1) 건조처리 새송이버섯과 팽이버섯을 기초사료에 0.0%, 1.5%, 3.0%, 4.5% 급여 때 시험기간 중 산란율, 사료섭취량, 사료요구율은 처리 간에 유의차가 없었다.

2) 건조처리 새송이버섯을 급여한 경우 T2와 T3 에서 E. coli균수가 유의하게 감소하였으며($p < 0.05$), T3에서 Salmonella균수가 감소하였다($p < 0.05$). 건조처리 팽이버섯을 급여한 경우는 T1, T2, T3에서 Salmonella균수와 E. coli균수가 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

3) 건조처리 새송이버섯을 1%이상 급여구에서 계분 내 암모니아가스 발생량이 감소하였다($p < 0.05$).

4) 건조처리 새송이버섯이나 팽이버섯을 첨가 급여 하였을 때 난중은 처리 간에 차이가 없었다.

5) 건조처리 새송이버섯이나 팽이버섯을 첨가급여 하였을 때 난백고와 호우유니트가 다소 향상되었으나, 유의차가 인정되지 않았다. 난황색은 처리 간에 차이가 없었다.

6) 건조처리 새송이버섯이나 팽이버섯을 첨가 급여 하였을 때 모든 처리구에서 난각질이 개선되었다($p < 0.05$).

7) 건조처리 새송이버섯을 첨가급여 시 급여수준이 증가할수록 계란저장기간이 길어졌다($p < 0.05$).

이상의 결과를 종합적으로 고찰해 볼 때 건조처리 미 이용 버섯을 산란계 사료에 첨가 급여하면 산란계 맹장 내용물 중 병원성 미생물의 구를 감소시키고, 계분 내 암모니아 가스 발생량을 감소시키며, 난각질을 개선하고, 계란의 저장기간을 연장 시킬 수 있다고 판단된다.

2. 발효처리 미 이용 버섯자원에 의한 계란 생산

계란생산에 대한 발효처리 미 이용 버섯자원의 급여효과를 검토하기 위하여 60주령의 이사브라운 산란계 20수를 4개 그룹으로 나누어 대조구(C)는 기초사료만 급여하였고, 시험 1구(T1)는 기초사료에 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 1%를, 시험 2구(T2)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 3%를, 시험 3구(T3)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 5%를 7주 동안 급여하였다. 이어서 60주령의 하이라인 30수를 6개 그룹으로 나누어 대조구(C)는 기초사료만 급여하였고, 시험 1구(T1)는 기초사료에 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 1%를, 시험 2구(T2)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 2%를, 시험 3구(T3)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 3%를, 시험4구(T4)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 4%를, 시험5구(T5)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 5%를 5주 동안 급여하였다. 얻어진 결과는 다음과 같다.

가. 발효처리 미 이용 새송이버섯과 발효처리 팽이버섯을 기초사료에 1%에서 5%까지 첨가급여 하였을 때 산란율, 사료섭취량, 사료요구율에는 처리 간에 차이가 없었다.

나. 발효처리 미 이용 팽이버섯을 첨가 급여 시 T1, T2, T3에서 Salmonella균수가 감소하였고($p < 0.05$), T4와 T5에서는 E. coli균수가 감소하였다($p < 0.05$). 발효처리 미 이용 팽이버섯을 첨가 급여 시 암모니아 가스 발생량은 대조구에 비하여 T1, T2, T3에서 유의적으로 감소($p < 0.05$)하였으나, T4와 T5에서는 차이가 없었다.

라. 발효처리 새송이버섯과 발효처리 팽이버섯 첨가급여 시 급여 4주 후에 난백고가 향상되어 난백질이 개선되었다($p < 0.05$). 그러나 난황색은 처리 간에 차이가 없었다.

마. 발효처리 미 이용 새송이버섯 첨가급여 시 T1, T2, T3에서 난각질 개선이 나타났다($p < 0.05$)

바. 발효처리 미 이용 새송이버섯 첨가급여 시 혈반과 육반의 출현율은 처리 간에 차이가 없었다.

사. 발효처리 미 이용 새송이버섯 첨가급여 시 급여수준이 증가할수록 계란 저장기간이 길어졌다($p < 0.05$).

아. 발효처리 미 이용 새송이버섯의 첨가 급여수준이 증가할수록 난황 내 포화지방산 함량이 감소하고, 불포화지방산 함량이 높아졌다($p < 0.05$).

이상의 결과를 종합하면 발효처리 미 이용 버섯자원을 산란계에 급여하면 장내 병원성 미생물의 감소, 계분 내 암모니아 가스 발생량의 감소, 난백질의 개선, 난각질의 개선, 계란 저장기간의 연장, 난황 내 지방산 조성의 개선을 기대할 수 있다고 본다.

3. 건조처리 미 이용 버섯자원에 의한 닭고기 생산

닭고기 생산에 대한 건조처리 미 이용 팽이버섯의 급여효과를 검토하기 위하여 육계 병아리 96수를 4개 그룹으로 나누어 대조구(C)는 기초사료만 급여하였고, 시험 1구(T1)는 기초사료에 건조처리 된 미 이용 팽이버섯 1%를, 시험 2구(T2)는 건조처리 된 미 이용 팽이버섯 3%를, 시험 3구(T3)는 건조처리 된 미 이용 팽이버섯 5%를 6주 동안 급여하였다. 얻어진 결과는 다음과 같다.

가. 건조처리 미 이용 팽이버섯을 기초사료에 0, 1, 3, 및 5% 첨가하여 급여하여도 증체와 사료섭취량 및 사료요구율에서 처리 간에 유의차가 없었다.

나. 건조 미 이용 팽이버섯을 급여한 경우 맹장 내 Salmonella균수가 현저하게 감소하였으나($p < 0.05$), E. coli수는 감소하지 않았다.

다. 계분의 암모니아가스 발생량은 건조 미 이용 팽이버섯 급여 수준이 높을수록 현저하게 감소하였다($p < 0.05$).

라. 도체율은 대조구에 비하여 T1, T2와 T3에 낮은 경향이였다. 그러나 유의성은 인정되지 않았다.

마. 가슴근육과 다리근육의 저장 중 지방산패도는 대조구와 T1에 비하여 T2와 T3에서 유의적으로 낮았다($p < 0.05$).

바. 육색의 적색도는 미 이용 팽이버섯 급여 시 가슴근육에서는 낮았으나 대퇴근육에서는 높았으며($p < 0.05$), 황색도는 미 이용 팽이버섯 급여수준이 높을수록 가슴과 다리근육에서 향상되었다($p < 0.05$).

사. 건조 미 이용 팽이버섯 급여 시 가슴근육의 가열감량은 높아졌으나($p < 0.05$), 보수력은 낮아졌으며($p < 0.05$), 다리근육에서는 차이가 없었다.

아. 수용성 단백질의 용해성은 가슴근육과 다리근육에서 대조구에 비하여 처리구에서 낮았으나($p < 0.05$), 염용성 단백질의 용해성은 높게 증가하였다($p < 0.05$).

자. 가슴근육의 조지방 함량은 건조처리 미 이용 팽이버섯 급여수준이 높을수록 감소하였고($p < 0.05$), 다리근육의 조지방 함량은 증가하였다($p < 0.05$).

차. 가슴근육의 아미노산 함량은 대조구에 비하여 모든 처리구에서 높았고, 다리근육의 아미노산 함량은 건조처리 미 이용 팽이버섯 급여수준이 높을수록 높게 나타났다.

카. 건조처리 미 이용 팽이버섯을 첨가 급여한 경우 가슴근육에서 지방산 조성은 포화 지방산 함량을 감소시키고 불포화 지방산의 함량을 증가시켰다($p < 0.05$).

이상의 결과를 종합고찰하면 건조처리 미 이용 팽이버섯을 육계생산에 이용하면 장내살모넬라균수의 감소, 계분 내 암모니아 가스 발생량의 감소, 다리근육에서 적색도

의 향상, 가슴과 다리근육에서 황색도의 향상, 닭고기의 염용성 단백질의 용해성 증가, 가슴근육과 다리근육에서 아미노산함량의 증가, 닭고기의 저장성 향상, 가슴근육에서 불포화 지방산 증가를 기대할 수 있다고 본다.

4. 발효처리 미 이용 버섯자원에 의한 닭고기 생산

닭고기 생산에 대한 발효처리 미 이용버섯의 급여효과를 검토하기 위하여 육계 병아리 96수를 4개 그룹으로 나누어서 대조구(C)는 기초사료만 급여하였고, 시험 1구(T1)는 기초사료에 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 1%를, 시험 2구(T2)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 3%를, 시험 3구(T3)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 5%를 6주 동안 급여하였다. 얻어진 결과는 다음과 같다.

가. 발효처리 된 미 이용 팽이버섯을 기초사료에 1, 3, 5% 첨가 시 증체량과 사료 섭취량은 대조구와 차이가 없었다. 그러나 사료요구율은 대조구에 비하여 다소 개선되었다.

나. 발효처리 미 이용 팽이버섯의 급여수준을 높일수록 Salmonellarbs과 E. coli균 수가 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

다. 계분 중 암모니아가스 발생량은 발효 처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 증가하였다.

라. 도체율은 대조구에 비하여 T1, T2, T3에서 다소 낮았으나 유의차는 없었다.

마. 발효 처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 저장 6일과 9일에 다리근육의 지방산패도는 낮아졌으나($p < 0.05$), VBN값은 대조구에 비하여 증가하였다.

바. 발효처리 미 이용 팽이버섯 급여 시 가슴근육과 다리근육에서 적색도와 황색도는 낮아졌으며($p < 0.05$), 명도의 차이는 분명하지 않았다.

사. 발효처리 미 이용 팽이버섯 급여 시 다리근육에서는 가열감량과 보수력이 개선되었으나($p < 0.05$), 가슴근육에서는 저하 되었다.

아. 가슴근육과 다리근육의 수용성 및 염용성 단백질 용해성은 T2에서 가장 높았으며($p < 0.05$), T3에서 가장 낮았다.

자. 가슴근육과 다리근육의 조지방 함량은 발효처리 미 이용 팽이버섯 급여 수준이 높아짐에 따라 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

차. 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 가슴근육과 다리근육에서 아미노산 함량이 대조구에 비하여 증가하였으나 T1과 T3에 비하여 T2에서 다소 낮은 경향이였다.

카. 발효 처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 가슴근육과 다리근육 내 불포화 지방산 함량이 유의적으로 증가하였으며($p < 0.05$), 포화지방산에 대한 불포화지방산의 비율도 증가하였다.

이상의 결과를 종합 고찰하면 발효 처리 미 이용 팽이버섯을 육계생산에 이용 시 장내 병원성 미생물의 감소, 다리근육에서 가열감량과 보수력의 증진, 가슴과 다리근육에서 아미노산함량의 증가, 불포화지방산 증가 및 지방산조성의 개선을 기대할 수 있다고 본다.

협동과제:

기능성다당류생성 우수 미생물 선발 및 유전육종

토양 샘플로부터 기능성 올리고당을 생산하는 박테리아를 분리하였다. CMC, xylan, soluble chitosan, colloidal chitin, glucomannan, locust bean gum 및 soluble starch가 첨가된 LB 고체배지에서 분리된 박테리아를 37°C에서 배양한 후 congo-red로 염색한 결과, 균 주변으로 오렌지색의 존을 형성함을 관찰하였다. 여러 종류의 다당류를 가수분해하는 균주 ZY-03, ZY-08 및 Sc인 3종의 16S rDNA 염기서열을 결정하여 phylogenetic 분석을 한 결과, 각각 *Paenibacillus xylanilyticus*, *P. illinoisensis* 및 *Klebsiella* sp.로 동정하였다.

분리 균주 *P. illinoisensis* ZY-08로부터 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) 유전자를 Fosmid Library Production Kit를 이용하여 동정하였다. DNA 염기서열을 분석한 결과, 718개의 아미노산을 암호화하고 있는 2,157 bp의 염기서열로 이루어져 있는 것으로 밝혀졌다. 단백질의 N-말단영역에 34 잔기로 구성되어진 신호서열이 존재하였으며, 최종 단백질은 684개의 아미노산으로 구성되어진 것으로 추측되어졌다. *P. illinoisensis* ZY-08의 CGTase 단백질 서열은 기존의 밝혀진 *Bacillus licheniformis* 균주 유래의 CGTase와 99%의 상동성을 나타내었다. 그리고 세균성 CGTase에서 공통적으로 관찰할 수 있는 1개의 Ca²⁺ binding domain을 비롯하여 4개의 보존 영역이 존재하였다. 위 단백질은 cold expression 벡터인 pCold I 벡터와 Hig-tag 친화성 크로마토그래피를 이용하여 분리·정제하였다. 순수 정제된 단백질의 분자량은 대략 74 kDa 정도였으며, 40°C에서 최적 온도를 나타내었으며, pH 7.4에서 최적 pH를 나타내었다. 위 단백질은 soluble starch를 이용하여 쉽게 β-cyclodextrin으로 변환하였으며, 새송이버섯 분말과 팽이버섯 분말을 이용하여서도 β-cyclodextrin을 생산하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 기존에 폐기되던 농업 부산물을 이용하여 유용한 물질을 생산함으로써 산업화 적용에 유용할 것으로 예상된다.

CMCase를 생산하는 *Klebsiella* sp. Sc를 부산 인근의 토양에서 분리하였다. 이 균주는 16S rDNA와 *rpoB* (RNA polymerase B subunit) 유전자의 유전적 계통 분석을 통하여 동정을 시행하였다. 그 결과 *Klebsiella* sp. 속들의 균주들과 99% 이상의 상동성을 나타내었다. CMCase 유전자는 Sc의 게놈 라이브러리를 구축하여 찾

왔다. CMCCase 유전자는 37,666 Da의 분자량을 가지는 333개의 아미노산을 암호화하고 있는 1,002개의 뉴클레오티드들로 구성된 것으로 밝혀졌다. 추정된 CMCCase의 단백질 서열은 *Cellulomonas uda*와 단백질과 95%의 identity와 97%의 positive를 가지는 것으로 나타났으며, *Erwinia chrysanthemi*와는 각각 58%와 72%를 가지는 것으로 나타났다. 그리고 CMCCase는 ASDGDTLIAWALLRAQKQW와 같은 보존영역을 가지고 있었는데, 이는 glycosyl hydrolase family 8의 보존영역 (A-[ST]-D-[AG]-D-X(2)-[IM]-A-[SA]-[LIVM]-[LIVMG]-A-X(3)-[FW])와 일치하는 것으로 나타났다. 이는 *Klebsiella* sp. Sc의 CMCCase는 glycosyl hydrolase family 8에 속한다는 것을 나타냄을 확인하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 논문발표

- 1) Song, O. R., S. J. Lee, Y. S. Lee, S. C. Lee, K. K. Kim, Y. R. Choi, 2008, Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil, BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, 17(8), 1121-1128.
- 2) 박인혜, 김선희, 이상철, 이용석, 하순옥, 김근기, 최용락, 2006, *Bacillus* sp. DYL130 균주의 Biosurfactant의 정제 및 특성, 한국해양바이오학회지, 1(4), 268-274.
- 3) 이용석, 박인혜, 쯔우위, 김근기, 최시림, 최용락, 2008, 세포벽분해 효소의 생산균주 분리 및 CMCCase의 특성, J. Life Science, 18(5), 639-645.
- 4) 김근기, 김용철, 최영환, 신태순, 박기도, 강위금, 최용락, 박현철, 2008, *Bacillus* sp. AB02를 이용한 식물병원균에 대한 생물검정, J. Life Science, 18(6), 858-864.

나. 특허출원

1) *Klebsiella* sp.의 CMCsae 특허

가) 발명의 명칭

국문 : 식물 세포벽을 구성하는 다양한 다당류를 분해하는 효소를 생산하는 클렙시엘라 속 미생물

영문 : *Klebsiella* sp. Producing Cell Wall Degrading Enzyme

나) 출원번호

10-2008-0097846

다) 출원일자

2008. 10. 06

2) 새송이버섯 변비해소효과

가) 발명의 명칭

국문 : 장 기능개선 및 변비해소용 새송이버섯 가공방법 및 이로부터 얻어진 약학적 조성물과 건강기능식품

영문 : A method for powders from *Pleurotus eryngii* having improved intestinal action and constipation disorder and a pharmaceutical composition or food thereof

나) 출원일자

2009. 4. 15 : 출원(안) 완료 - 특허사무소 최종검토 후 완료

3) 팽이버섯 미 이용자원을 활용한 고급육계 생산

가) 발명의 명칭

국문: 팽이버섯 폐기물을 육계용 사료 첨가제로 재활용하는 방법 및 이로부터 얻어진 육질을 개선시킨 육계 급여용 사료첨가제

영문 : A method for reusing disused mushroom resource as feed additives for broiler chick and feed additives for feeding broiler chick having improved chicken meat quality

나) 출원일자

2009. 4. 10 : 출원(안) 완료 - 특허사무소 최종검토 후 완료

다. 기술지도

일자	기술지도 의뢰 내용	기술지도 내용	비고
2006. 6.	새송이버섯 오염문제	<ul style="list-style-type: none"> - 장마기의 재배사 버섯생육환경 검토: 습도를 낮게 하여 오염균의 생육 환경을 차단. - 재배사 온도를 오전, 오후 1회씩 상승시켜 재배사 내의 습도를 조절 	가야 농산
2006. 8.	새송이버섯 종균보관 의뢰	<ul style="list-style-type: none"> - 사용 중인 종균을 초저온 냉동고에 보관 	남경 농산
2006. 9.	버섯생육의 불량	<ul style="list-style-type: none"> - 버섯 배지의 C/N을 조사 - 중국수입 콘의 N함량 조사 	남경 농산
2007. 4.	버섯 유통문제에 따른 가격하락의 문제	<ul style="list-style-type: none"> - 버섯농가와 유통구조에 대한 토의 및 대책방안 모색 검토 	가야 농산
2007. 6.	재배농가의 버섯오염문제	<ul style="list-style-type: none"> - 오염균 분리 - 배지 굵기실 환경개선 검토 - 농가의 재배사 환경이 문제 	남경 농산
2007. 7.	새송이버섯 수출 검토	<ul style="list-style-type: none"> - 유럽인들의 새송이 선호 - 미국수출을 위한 유통기간을 연장할 수 있는 방안 모색 - 포장지(필름) 개발과 출하전의 수분 조절 	남경 농산
2007. 9.	재배사와 버섯 종의 선택	<ul style="list-style-type: none"> - 재배사주위의 환경이 여름철의 농작물에 의한 오염균 전이차단이 중요 - 재배사의 환기를 위한 필터시스템으로 도입하여 양압을 걸어주는 것이 필요 	가야 농산
2008. 6.	배지 살균과 오염문제	<ul style="list-style-type: none"> - 배지살균 온도 조절에 따른 오염실태 조사가 필요 - 배지의 영양밸런스가 맞지 않으면 종균의 기세가 약하고, 오염의 발생 빈도가 높다 - 수입 미송을 배지로 사용하기 전 전처리로 이물질 제거가 중요 	남경 농산
2008. 8.	새로운 버섯개발 검토	<ul style="list-style-type: none"> - 새송이균주 이후의 균주개발을 위한 일본의 버섯정보 문헌 제공 - 만가닥버섯의 개발전망 검토 	남경 농산
2009. 2.	새송이 버섯재배에 있어서 수확전의 오염문제	<ul style="list-style-type: none"> - 오염균주 순수분리 - 오염균 동정과 균주의 생육특성과 이동상 등 정보제공 - 오염균의 방제를 위한 방제안 검토 	남경 농산

라. 기술개발

1) 제 1세부과제

가) 새송이버섯으로부터 기능성물질 분리기술 개발

- 항혈전물질, 항산화물질 분리기술 개발
- 버섯용매 추출법과 chromatography법 기술

나) 변비해소 기능성 당류 추출법 및 조성물제조 기술 개발

- 새송이버섯을 이용한 조성물의 변비해소 효과 - 특허출원 중
- 기능성 당류를 이용한 혈중 cholesterol 감소효과 - 출원특허 중

다) 길항균을 이용한 새송이버섯 병원균 생물학적 방제

- 새송이버섯 병원균 분리 및 동정
- 병원균에 대한 선택적 길항 균주 확보

라) 버섯 미 이용자원 활용기술 개발

- 기능성 다당류 추출
- 기능성물질 추출 및 분리

2) 제 2세부과제

가) 버섯 미 이용자원을 이용한 닭 사료급여 체계 개발

- 장내 병원성 미생물 감소

나) 기능성 계란 생산

- cholesterol 저하, 난각질과 난백질 개선 및 저장기간 연장 계란 생산
- 난황내 지방산 조성 개선 계란 생산

다) 기능성 육계 생산

- 색도 향상: 다리근육의 적색도 향상, 가슴과 다리근육의 황색도 향상
- 단백질 향상: 염용성 단백질의 용해성 증가, 가슴근육과 다리근육의 아미노산함량 증가
- 지방산 조성 변화: 가슴근육에서 불포화 지방산 증가, 지방산 조성 개선
- 저장성 변화: 저장성 향상

3) 협동과제

가) 기능성 다당류생성 미생물의 체계적인 동정 방법 확립

- 다양한 환경으로부터 우수 미생물 선발을 위한 screening 및 동정 방법 확립
- 선발 균주의 분해 관련 각종 효소의 활성 조사 방법 확립
- 기능성 다당류 생성 우수 균주 확보

나) 우수 미생물을 이용한 미 이용 새송이 버섯 발효 방법 확립

- 우수 미생물로부터 생산되는 유기물 분해 효소의 특성 조사 방법 확립
- 우수 미생물에 의한 미 이용 새송이 버섯으로부터 기능성 다당류 생산을 위한 최적의 발효 조건 확립

다) 미생물 분자 육종

- 우수 미생물로부터 생산되는 유기물 분해 효소의 정제 방법 개발
- 유기물 분해 효소의 유전자 탐색 및 유전자 분석 방법 개발
- Hemicellulase와 같은 유기물 분해 효소의 kinetics 조사 방법 확립

2. 성과활용

가. 제 1세부과제

1) 새송이버섯으로부터 기능성물질 추출 분리기술의 활용

국내에서는 생활수준의 향상으로 새송이버섯을 비롯한 버섯의 수요가 증가하고 있는 실정이다. 특히 새송이버섯은 기능성과 유통기간에 장점을 갖고 있어, 유럽과 미국에 수출이 증가하고, 중국의 경제성장으로 수요가 늘어나고 있다. 하지만 중국은 아직 재배기술이 취약하며, 일본에서의 수입은 경제적인 부담으로 우리나라에서 수입을 하고 있다. 여러 가지 이유에 의해서 생산이 증가함과 동시에 미 이용 자원부분도 증가하고 있다.

새송이버섯이나 팽이버섯의 미 이용자원부분을 이용한 항산화물질과 항혈전물질의 개발에 본 연구에서 개발한 추출법과 분리 기술을 활용하면 건강보조식품이나 기능성 바이오소재 개발을 할 수 있다.

- 새송이버섯의 기능성물질을 이용한 건강보조식품개발에 활용
- 항산화제와 항혈전제의 기능성 바이오소재 개발에 새송이버섯 활용

2) 변비해소 기능성 당류 추출법 및 조성물제조 기술의 활용

사회구조의 변화에 따른 식생활패턴이 서구화됨으로서 변비 등 장 질환의 발생빈도가 아주 높아졌다. 새송이버섯의 미 이용자원을 활용하여 추출하고, 분리한 당류가 변비해소에 높은 활성을 보이며, 혈중 cholesterol 등 지질의 함량을 감소시키는 작용을 한다.

- 변비해소와 치료식품 개발에 새송이버섯 다당류를 활용
- 새송이버섯 다당류의 혈중 cholesterol 함량 저하 효과를 활용한 건강보조식품 개발에 새송이버섯 활용

3) 새송이버섯 병원균의 생물학적 방제기술의 활용

새송이버섯 재배농가에 있어서는 재배 중에 발생하는 병원균이 가장 큰 피해를 준다. 버섯은 생산된 원형 그대로 섭취를 하기 때문에 농약이나 화학적인 약제를 처리할 수 없으며, 버섯도 균이기 때문에 더욱 그렇다.

- 새송이버섯의 생육에 무해한 생물학적 제제 개발

나. 제 2세부과제

가) 버섯 미 이용자원을 이용한 닭 사료 개발

새송이버섯이나 팽이버섯의 미 이용자원을 분말화하여 이용하거나, 미 이용자원을 유기물분해활성이 뛰어난 미생물을 이용해 발효시킨 후 분말로 만들어 사료에 첨가하여 사육한 결과 닭의 장내 병원성미생물이 감소하고, 난백질과 난각질 등이 개선되었으며, 계란의 cholesterol 함량을 저하시켰다. 그리고 저장기간을 연장시키는 효과도 얻을 수 있었다.

- 버섯 미 이용자원을 첨가한 기능성 닭사료 개발에 활용

나) 기능성계란 생산

새송이버섯과 팽이버섯 미 이용자원을 닭 사료에 첨가하여 사육한 결과 계란 내의 cholesterol이 저하되어졌고, 난각질과 난백질이 개선되어졌으며, 저장기간 연장되어졌다. 버섯 발효산물을 사료에 첨가한 결과는 앞의 결과에 난황 내 불포화지방산의 함량을 증가시키는 지방산조성을 개선시키는 결과를 얻었다.

- cholesterol저하와 저장기간 연장의 기능성계란 생산
- 불포화지방산 함량증가 계란 생산

다) 기능성 육계 생산

새송이버섯과 팽이버섯 미 이용자원을 닭 사료에 첨가하여 사육한 결과 닭고기의 성분변화가 발생하였다. 다리근육의 적색도가 향상되었고, 가슴과 다리근육에서 황색도가 향상되었으며, 가슴근육과 다리근육의 아미노산함량 증가하는 결과를 얻었다. 고기에서 불포화지방산이 증가하는 지방산의 조성변화도 나타났다. 이러한 실험결과를 토대로 버섯 미 이용자원을 이용한 사료급여로 고급육을 생산할 수 있다.

- 닭고기의 색도를 향상시킨 고급육계생산
- 닭고기의 불포화지방산함량을 증가시킨 지방산 조성 변화 고급육계 생산

다. 제 3세부과제

- 1) 유기물분해능이 우수한 미생물제제를 개발하여, **유용미생물의 특허를 신청** 하고, 정부기관에 수탁하여 **생물 유전자원을 체계적으로 관리 활용**한다.
- 2) 우수미생물의 특성과 효소유전자를 조사하고, **유전적 육종을 통한 지속적 활성 증진을 유도**한다.
- 3) 기능성다당류의 고분자를 저분자로 분해하는 기술을 개발하여, 다양한 제품 개발에 활용한다.
- 4) 본 연구결과 및 세부적인 기술은 이전을 요구하는 산업체 및 농민에게 기술전수로 기업과 농민의 소득증대에 기여할 수 있도록 활용한다.
- 5) 미생물을 이용한 유기물분해기술, 분리정제법 및 가축사육법을 확립함으로써 기능성식품과 건강보조식품, 의약후보물질, 기능성 축산물 등을 개발할 수 있다.

SUMMARY

King oyster mushroom, *Pleurotus eryngii* has nutritionally many advantages to human body as having a diversity of biologically active substances. We developed this mushroom not only as food but also health assistance food, disease therapeutics and disease preventer. Unused products of King oyster mushroom are generated continually during commercialization and cultivation. However, under present condition, unused products were deposited or used as fodder and fertilizer.

The objective of this research developed products by extracting polysaccharide and functional food from unused products.

The research about bioactive components and isolation of materials was conducted by extracting polysaccharide and materials from unused products under various conditions. We obtained three different amount of polysaccharide, that are 15g, 5g, and 2.1g, using a wide variety of methods including high pressure hot water extraction, hot water extraction, salt extraction, organic chemicals and alkaline extraction from 100g of dried king oyster mushroom.

After inoculation of *B. subtilis* and *Klebsiella* sp. to King Oyster Mushroom, we obtained three different concentrations of β -glucan, 35.6mg, 164.3mg, 18.6mg from each fermented king oyster mushroom, king oyster mushroom and golden mushroom. As the result of experiment of coagulation activity using intermediates from the extraction process of β -glucan, coagulation activity of dried king oyster mushroom showed 200% higher than king oyster mushroom and 150% than golden mushroom.

We studied a variety of materials and physiological activity which were extracted from King Oyster Mushroom by using organic materials. The materials were isolated from wax components of King Oyster Mushroom using methanol mixing materials and Chloroform. Seven species of antioxidant were identified by two times of column chromatography tests and showed that the treatment of 0.02mg King Oyster Mushroom extract presented a similar level of coagulation activity effects to treatment of aspirin 0.5mg. This result a high level of activity, showing more than twenty times than We detected unique fluorescence materials from UV 365nm and also Antioxidant activity materials from the isolation process of materials using hydrophobic solvent to King Oyster Mushroom. This material has character of coagulation activity. The materials having anti-thrombotic activity were isolated and we did identification of structure after NMR analysis. The species of sugar crystallization and materials showing anti-thrombotic activity from King Oyster Mushroom extract with methanol which is polar solvents.

We studied constipation relief effect to Balb/C male mouse and Sprague–DawleyC strain male by measurement of charcoal meal transit in Balb/C mice and also tested constituent parts of the blood to verify effect of polysaccharide to blood. When extraction materials from King Oyster Mushroom was dissolved in water with three different concentrations, 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml and inoculated to mouse, charcoal meal transit was each 155.2%, 166.2%, 190.1% and was increased in proportion to the amount of treatment. Extraction materials from Fermented King Oyster Mushroom also showed similar result with those of King Oyster Mushroom, being increasement with 114.1%, 126.3%, 180.9%. When extraction solution mixed with milk and treated with three different concentrations, 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml, charcoal meal transit was each 158.3%, 233.3%, 294.1% and also was increased with the amount of treatments. In case of fermented King Oyster Mushroom, similar result was obtained. When treated with cellulase and hemicellulase to extraction materials from King Oyster Mushroom and then measured rate of charcoal meal transit, treatment with 0.72mg/ml and 1.5mg/ml increased charcoal meal transit with 204.6% and 316.4%.

The experiment that was inoculation using extraction materials from King Oyster Mushroom to loperamide–induced constipation in Sprague Dawley rats to know constipation relief effect showed distinct good effect to fecal amounts and defection as increasement of water contents in feces. When we analysed blood constituent of mouse inoculated with three different concentrations of extraction materials (0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml) from King Oyster Mushroom, total cholesterol was increase of 8.4%, 10.1%, 12.1%. When extraction materials from King Oyster Mushroom was dissolved in water with three different concentrations, 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml and inoculated to loperamide–induced constipation in Sprague Dawley rats, the amount of LDL–cholesterol was decrease of 32.0%, 39.6%, 35.8% and also Total cholesterol was decrease of 15.0%, 24.2%, 32.4%.

This study was conducted to investigate the effect of disused mushroom on egg and chicken meat production and their qualities. By–products of *Pleurotus eryngii* and *Flammulina velutipes* collected from local mushroom farm were dehydrated under room temperature condition and fermented with *Bacillus subtilis* and *Klebsiella* sp. Sc. By using the prepared mushroom following four trials were carried out.

Trial 1. Production of hen egg by using dehydrated disused mushroom

Two hundreds and twenty four Hyline layers, 50 weeks old age, were divided into four groups: 1) Control(basal diet), 2) T1(supplemented with 1% dehydrated mushroom), 3) T2(supplemented with 3% dehydrated mushroom), 4) T3(supplemented with 5% dehydrated mushroom) and raised for 7 weeks. The results obtained were as follows.

1) There were no significantly difference among treatments in egg production rate, feed intake and feed conversion in case of feeding by dehydrated *Pleurotus eryngii* and *Flammulina velutipes*.

2) The number of *E. coli* was decreased in T2 and T3, and the number of Salmonella was decreased in T3 in case of feeding by dehydrated *Pleurotus eryngii*. And the number of *E. coli* and Salmonella were significantly decreased in case of feeding by dehydrated *Flammulina velutipes*.

3) The amount of fecal NH₃ gas significantly decreased in T1, T2 and T3 by supplement of dehydrated *Pleurotus eryngii*.

4) There were no significantly difference among treatments in egg weight in case of feeding by dehydrated *Pleurotus eryngii* and *Flammulina velutipes*.

5) Albumen hight and Haugh unit of egg were improved in treatments compared to control. However, there were no significantly difference among treatments.

6) The quality of egg shell was improved by supplement of dehydrated *Pleurotus eryngii* and *Flammulina velutipes*($p < 0.05$).

7) The storage period of eggs was prolonged in accordance with increasing the feeding level of dehydrated *Pleurotus eryngii* ($p < 0.05$).

Trial 2. Production of hen egg by using fermented disused mushroom

Twenty Isa Brown layers, 60 weeks old age, were divided into four groups: 1) Control(basal diet), 2) T1(supplemented with 1% fermented *Pleurotus eryngii*), 3) T2(supplemented with 3% fermented *Pleurotus eryngii*), 4) T3(supplemented with 5% fermented *Pleurotus eryngii*) and raised for 7 weeks.

Thirty Hyline Layers, 60 weeks old age, were divided into six groups: 1) Control(basal diet), 2) T1(supplemented with 1% fermented *Flammulina velutipes*), 3) T2(supplemented with 2% fermented *Flammulina velutipes*), 4) T3(supplemented with 3% fermented *Flammulina velutipes*), 5) T4(supplemented with 4% fermented *Flammulina velutipes*), 6) T5(supplemented with 5% fermented *Flammulina velutipes*), and raised for 5 weeks. The results obtained were as follows.

1) There were no significant difference among treatments in egg production rate, feed intake and feed conversion in case of feeding by dehydrated *Flammulina velutipes*.

2) The number of *Salmonella* was decreased in T1, T2 and T3, and the number of *E. coli* was decreased in T4, T5 in case of feeding by fermented *Flammulina velutipes*.

3) The amount of fecal NH_3 gas was significantly decreased in T1, T2 and T3, but not decreased in T4 and T5 in case of supplement of fermented *Flammulina velutipes*.

4) The quality of albumen was improved by supplement of fermented *Pleurotus eryngii* and *Flammulina velutipes*. But there were no difference among treatments in yolk colour.

5) The quality of egg shell was improved in T1, T2 and T3 by supplement of fermented *Pleurotus eryngii* and *Flammulina velutipes* ($p < 0.05$).

6) The storage period of eggs was prolonged in accordance with increasing the feeding level of fermented *Pleurotus eryngii* ($p < 0.05$).

7) Fatty acid composition of egg yolk was improved by fermented *Flammulina velutipes* ($p < 0.05$). Unsaturated fatty acid contents was increased in accordance with increasing the feeding level of fermented *Flammulina velutipes*.

Trial 3. Production of chicken meat by using dehydrated disused mushroom

Ninety-six broiler chicks (HanHyup No. 3) were divided into four groups: 1) Control (basal diet), 2) T1 (supplemented with 1% dehydrated mushroom), 3) T2 (supplemented with 3% dehydrated mushroom), 4) T3 (supplemented with 5% dehydrated mushroom) and raised for 6 weeks. The results obtained were as follows.

1) There were no significant difference among treatments in weight gain, feed intake and feed efficiency.

2) The number of *Salmonella* in cecum was significantly decreased in T1, T2 and T3 ($p < 0.05$). However, the number of *E. coli* was decreased in T2 and increased in T1 and T3.

3) The amount of fecal NH_3 gas was significantly decreased in accordance with increasing the feeding level of dehydrated mushroom ($p < 0.05$).

4) Carcass ratios of broiler chicks were lower in T1, T2 and T3 than in control. However, there was no significant difference.

5) a* value of breast meat in T1, T2 and T3 was lower than control, but that of thigh meat was higher ($p < 0.05$). b* value of breast and thigh meat was

increased in accordance with increasing the feeding level of dehydrated mushroom($p<0.05$).

6) Cooking loss of breast meat was increased in T1, T2 and T3, but water-holding capacity of breast meat was decreased in T1, T2 and T3($p<0.05$).

7) Water soluble protein solubility was lower in T1, T2 and T3 than in control and salt soluble protein solubility in T1, T2 and T3 was higher than that in control($p<0.05$).

8) Crude fat of breast meat was decreased and those of thigh meat were increased in accordance with increasing the feeding level of dehydrated mushroom($p<0.05$).

9) Free amino acid contents of breast meat were appeared highly in T1, T2 and T3 compared to in control and those of thigh meat were appeared highly in accordance with increasing the feeding level of dehydrated mushroom

10) TBARS of breast meat and thigh meat during the storage of 9 days were significantly lower in T2 and T3 than in control and T1($p<0.05$).

11) Fatty acid composition of breast meat was improved by dehydrated mushroom($p<0.05$). Unsaturated fatty acid contents of breast meat were higher in T1, T2 and T3 than in control ($p<0.05$)

Trial 4. Production of chicken meat by using fermented disused mushroom

Ninety-six broiler chicks(HanHyup No.3) were divided into four groups: 1) Control(basal diet), 2) T1(supplemented with 1% fermented mushroom), 3) T2(supplemented with 3% fermented mushroom), 4) T3(supplemented with 5% fermented mushroom) and raised for 6 weeks. The results obtained were as follows.

1) Weight gain and feed intake were not affected by supplementation of 1~5% fermented disused mushroom. However, feed/gain was lightly improved in T1, T2, T3($p<0.05$).

2) The number of Salmonella and E. coli in cecum were significantly decreased in T1, T2 and T3($p<0.05$).

3) The amount of fecal NH₃ gas for 9days was increased in T1, T2 and T3 compared to the control group.

4) The carcass ratio was lower in T2 and T3 than in control. But there was no significantly difference.

5) a* value and b* value of breast meat and thigh meat were decreased by feeding of fermented disused mushroom($p<0.05$). However, L* value of breast meat and thigh meat was not affected.

6) By supplement of fermented disused mushroom, cooking loss was increased

in breast meat and decreased in thigh meat, and water-holding capacity was decreased in breast meat and increased in thigh meat($p < 0.05$).

7) Water soluble protein solubility and salt soluble protein solubility of breast and thigh meat were the highest in T2 and the lowest in T3($p < 0.05$).

8) Crude fat of breast meat and thigh meat were increased in accordance with increasing the feeding level of fermented mushroom($p < 0.05$).

9) Free amino acid contents of breast meat and thigh meat were appeared highly in T1, T2 and T3. However, those of breast meat and thigh meat were appeared lowly in T2 compared to T1 and T3 group.

10) TBARS of thigh meat during the storage of 6 and 9 days were lower in T1 and T2 than in control ($p < 0.05$). VBN value of breast meat and thigh meat were increased T1, T2 and T3 compared to the control group.

11) Unsaturated fatty acid contents of breast meat and thigh meat were higher in T1, T2 and T3 than in control ($p < 0.05$). The ratios of USFA/SFA were increased in accordance with increasing the feeding level of fermented mushroom($p < 0.05$).

Key words : Mushroom resource, *Pleurotus eryngii*, *Flammulina velutipes*, Egg production and quality, Chicken meat production and quality

Bacteria that can produce functional oligosaccharides were isolated from soil samples. They formed clear zone on LB agar plates containing CMC, xylan, soluble chitosan, colloidal chitin, glucomannan, locust bean gum and soluble starch by staining with congo-red. ZY-03, ZY-08, and Sc were identified as *Paenibacillus xylanilyticus*, *P. illinoisensis* and *Klebsiella* sp. by sequencing of its 16S rDNA and phylogenetic analysis, respectively.

A cyclodextrin glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) gene from *P. illinoisensis* was isolated and cloned into *Escherichia coli*. Analysis of the nucleotide sequence revealed the presence of an open reading frame of 2,157bp (718 amino acids). The N-terminal position encoded a 34-amino acids of a signal peptide and followed by the mature enzyme (684 amino acids). The deduced amino acid sequence of the CGTase from *P. illinoisensis* ZY-08 exhibited 99% positivity to the CGTase sequence from *Bacillus licheniformis*. The four consensus regions of carbohydrate converting domain and Ca^{2+} binding domain could be identified in the sequence. The CGTase was purified by using cold expression vector, pCold

I, and His-tag affinity chromatography. The molecular weight of the purified enzyme was about 74 kDa. The optimum temperature and pH of the enzyme were 40°C and pH 7.4, respectively. The enzyme easily converted soluble starch to β -cyclodextrin, also weakly converted king oyster mushroom powder and enoki mushroom powder to β -cyclodextrin.

A CMCase-producing bacterium, *Klebsiella* sp. Sc, was isolated from Busan area's soil sample. This strain was identified on the basis of phylogenetic analysis of the 16S rDNA and *rpoB* (RNA polymerase B subunit) sequences. The gene encoding CMCase was cloned by genome library. The CMCase gene consisted of an open reading frame of 1,002 nucleotides and encodes 333 amino acids with a deduced molecular weight of 37,666 Da. The deduced amino acid sequence of the CMCase from *Klebsiella* sp. exhibits 95% identities and 97% positives to those from *Cellulomonas uda* and 58% identities and 72% positives to those from *Erwinia chrysanthemi*. The CMCase contain a conserved motif with the consensus sequence, ASDGDTLI AWALLRAQKQW. This result shows CMCase protein from *Klebsiella* sp. Sc belongs to glycoside hydrolase family 8, A-[ST]-D-[AG]-D-X(2)-[IM]-A-[SA]-[LIVM]-[LIVMG]-A-X(3)-[FW].

The *Paenibacillus xylanilyticus* ZY-03 was newly isolated from Konjack field, and produced of β -mannanase (900 U/ml) when grown on glucomannan as a carbon source. The β -mannanase was purified 34 fold to homogeneity with a final recovery of 15% and specificity of 169 U/mg protein as judged by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular mass was approximately 39 kDa. The optimal temperature and pH for mannanase activity was 60°C and pH 5.0, respectively. The activity was stable up to 60°C at pH 5.0 and it was stable within pH 5.0-7.0. The mannanase was highly specific towards glucomannan and galactomannan, but exhibited low activity towards chitin, CMC and mushroom powder. These unique properties of the purified β -mannanase from *Paenibacillus xylanilyticus* ZY-03 make this enzyme attractive for industrial applications.

CONTENTS

Summary	23
Chapter 1. Introduction and objectives	44
Chapter 2. Research status of domestic and abroad	49
Chapter 3. Research contents and results	52
Section 1.	
Development of functional polysaccharide extraction and isolation technique from mushroom.	
I. Introduction	52
II. Extraction of functional polysaccharide from unused king oyster mushroom	54
1. Introduction	54
2. Materials and Methods	55
가. Extraction of polysaccharide	55
3. Results	61
가. Extraction of polysaccharide from king oyster mushroom	61
나. Isolation of water soluble and water insoluble polysaccharide	63
다. Extraction of β -glucan	64
라. Anticoagulation activity of intermediate in β -glucan extraction	68
III. Extraction of functional compounds from king oyster mushroom and golden mushroom	64
1. Introduction	64
2. Materials and Methods	64
가. Analysis of wax compounds in king oyster mushroom and golden mushroom	64
나. Biological activities of the wax compound of king oyster mushroom ..	65
다. Analysis of lignin oxidants of king oyster mushroom and golden mushroom	66
라. Extraction with organic solvent from king oyster mushroom	67

마.	Column chromatography of hexane extract	68
바.	Anticoagulation activity of hexane extract	68
사.	Extraction of chloroform and methanol	69
아.	Purification of antioxidant from king oyster mushroom	70
자.	Crystallization of sugar from king oyster mushroom	70
차.	Analysis of the compounds of king oyster mushroom and fermented king oyster mushroom	71
3.	Results	71
가.	Analysis of wax compounds in king oyster mushroom and golden mushroom	71
나.	Isolation of the wax compound of king oyster mushroom	73
다.	Analysis of lignin oxidants of king oyster mushroom and golden mushroom	77
라.	Extraction with organic solvent from king oyster mushroom	78
마.	Column chromatography of hexane extract	79
바.	Anticoagulation activity of hexane extract	83
사.	Purification of antioxidant from king oyster mushroom	86
아.	Isolation from methanol extract	89
IV.	Analysis of fatty acids from Egg	93
1.	Introduction	93
2.	Materials and Methods	94
가.	Extraction of fatty acid from yolk and albumen	94
나.	Analysis of GC/MS	94
3.	Results	95
가.	Analysis of chemical composition of yolk and albumen	95
V.	Constipation relief effect of the extract of king oyster mushroom	100
1.	Introduction	102
2.	Materials and Methods	102
가.	Materials and reagents	102
나.	Experimental animals	103
다.	Manufacture of constipation relief agent from water extract	103
라.	Enzymatic hydrolysis of water extract	104
마.	Manufacture of mushroom feed	105

바. Constipation relief effect of the mushroom extract	105
3. Results	107
가. Constipation relief effect for Balb/C	107
나. Constipation relief effect for Sprague-DawleyC	112
다. Blood analysis of Balb/C	113
라. Blood analysis of Sprague-DawleyC	116
VI. Biological control to pathogens of king oyster mushroom	118
1. Introduction	118
2. Materials and Methods	118
가. Isolation of pathogens	118
나. Identification of pathogens	119
다. Antifungal spectrum of pathogens	119
3. Results	119
가. Isolation of main pathogens	119
나. Antifungal spectrum of antagonistic fungi to pathogens	122

Section 2.

Production of egg and chicken meat by using disused mushroom

I. Introduction	124
II. Production of egg and chicken meat by using disused mushroom	126
1. Materials and Methods	126
가. Preparation of disused mushroom	126
나. Preparation of Basal feed	128
다. Breeding of Laying hen and Egg production	130
라. Test of pathogenic microorganism and NH ₃ gas	131
마. Evaluation of egg quality	133
바. Analysis of lipids in yolk	133
사. Breeding of Chicken and chicken meat Production	134
야. Evaluation of chicken carcass	135

자. Analysis of physico-chemical properties of chicken meat	8
차. Stasistical analysis	140
2. Results and discussion	140
가. Egg production by using dehydrated disused mushroom	140
나. Egg production by using fermented disused mushroom	153
다. Chicken meat production by using dehydrated disused mushroom	167
라. Chicken meat production by using fermented disused mushroom	181
3. General discussion	198
가. Egg production by using dehydrated disused mushroom	198
나. Egg production by using fermented disused mushroom	199
다. Chicken meat production by using dehydrated disused mushroom	200
라. Chicken meat production by using fermented disused mushroom	201

Section 3.

Selection and genetically breeding of fountional oligosaccharide producing microbes

I. Introduction	203
II. Selection and identification of fountional oligosaccharide producing microbes	205
1. Materials and Method	205
2. Results	206
III. Cloning, purification, charactorization of CMCCase and xylanase gene from mushroom Klebsiella sp. Sc	223
1. Materials and Method	223
2. Results	225
IV. Cloning, purification, charactorization of Cyclodextrinb Glucanotransferase (CGTase) gene	237
1. Materials and Method	237

2. Results	240
V. Identification, purification, characterization of β -mannanase	249
1. Materials and Method	250
2. Results	251
VI. Use of unused mushroom sources producing microbe fermented products	252
1. Materials and Method	255
2. Results	256
Chapter 4. Achievements and Contribution of the Study	259
Chapter 5. Application plan of results	262
Chapter 6. Collection of foreign technique information	266
Chapter 7. References	269

목 차

제 1장 연구개발과제의 개요	44
제 2장 국내외 기술개발 현황	49
제 3장 연구개발수행 내용 및 결과	52
제 1세부과제 : 기능성 다당류 추출분리기술 및 제품개발	52
제 1절 서 론	52
제 2절 새송이버섯 미 이용자원으로부터 다당류 추출	54
1. 서언	54
2. 재료 및 방법	55
가. 다당류 추출	55
1) 고압열수 추출	55
2) 용매와 열수추출	56
3) NaOH와 acetone 침전에 의한 다당류 분리	57
4) 유기용매와 alkaline 추출	58
5) 새송이버섯으로부터 수용성과 비수용성 다당류 분리	58
6) 새송이버섯과 팽이버섯으로부터 β -glucan 추출	9
7) β -glucan 추출 중간산물의 항혈전활성 측정	60
3. 연구결과	61
가. 새송이버섯의 다당류 추출	61
나. 새송이버섯으로부터 수용성과 비수용성 다당류분리	61
다. 새송이버섯, 발효 새송이버섯 및 팽이버섯으로부터 β -glucan 추출	61
라. β -glucan 추출 중간산물의 항혈전활성 측정	62
제 3절 유기용매를 이용한 버섯의 기능성 물질 추출	64
1. 서언	64
2. 재료 및 방법	64

가. 새송이버섯과 팽이버섯의 wax 성분분석	64
나. 새송이 wax성분의 물질분획과 생리활성 조사	65
다. 새송이버섯과 팽이버섯의 lignin 산화물 분석	66
라. 유기용매를 이용한 새송이버섯 물질 추출	67
마. Hexane 추출물의 column chromatography	68
바. Hexane추출물의 항혈전활성 측정	68
사. Chloroform과 methanol을 이용한 새송이버섯 물질 추출	69
아. Chloroform 추출물로부터 항산화물질 순수분리	70
자. Methanol 추출물로부터 물질분리	70
차. 새송이버섯과 새송이버섯 발효산물의 성분분석	71
3. 연구결과	71
가. 새송이 버섯과 팽이버섯의 wax 성분분석	71
나. 새송이버섯 wax추출물의 물질분리	73
1) 1차 column chromatography	73
2) 2차 column chromatography	74
3) 새송이버섯 wax추출물의 항혈전활성	75
다. 새송이버섯과 팽이버섯의 lignin 산화물 분석	77
라. 유기용매를 이용한 새송이버섯 물질추출	78
마. 새송이버섯 hexane 추출물에서 항혈전물질 순수분리	79
1) 1차 column chromatography	79
2) Hexane 추출물 1st column 후의 항혈전활성	80
3) 2차 column chromatography	81
4) H2-4, 5 항혈전활성 물질의 TLC 분리	82
5) 항혈전활성물질 H3-3의 순수분리	83
6) 항혈전활성물질 H3-3 동정	84
바. Chloroform추출물에서 항산화물질 순수분리	85
사. Methanol 추출물로부터 물질분리	86
아. 새송이버섯과 새송이버섯 발효산물 성분분석	89

1) 새송이버섯과 새송이버섯 발효산물의 성분분석	90
제 4절 계란의 지방산 추출	93
1. 서언	93
2. 재료 및 방법	94
가. 난황과 난백으로부터 지방산 추출	94
나. GC/MS 분석	94
3. 연구결과	95
가. 난황과 난백의 성분비교	95
나. 새송이버섯을 급여한 계란의 난황과 난백의 성분분석 GC/MS	96
다. 새송이버섯 발효산물 차별급여에 따른 난황의 지질함량	98
라. 새송이버섯 발효산물 급여 계란의 성분분석	99
제 5절 새송이버섯 추출물의 변비해소 효과	102
1. 서언	102
2. 재료 및 방법	102
가. 실험재료 및 시약	102
나. 실험동물 및 사육환경	103
다. 변비해소 실험용 열수추출물 제조	103
라. 열수추출물의 효소분해	104
마. 버섯 분말을 이용한 사료제조	105
바. 변비해소효과	105
1) 새송이버섯 변비해소 효과와 혈액분석	105
2) 새송이버섯 추출물과 우유 혼합물의 변비해소 효과 및 혈액분석	106
3) 버섯분말 사료의 변비해소 효과와 혈액분석	106
4) 변비유발 랫드에 대한 변비해소 효과	108
3. 연구결과	107
가. 마우스(Balb/C)에 대한 변비해소 효과	107
1) 새송이버섯 열수추출물의 변비해소 효과	107
2) 새송이 발효산물 열수추출물의 변비해소 효과	108

3) 새송이버섯 열수추출물과 우유 혼합조성물의 변비해소 효과	109
4) 새송이버섯 발효산물 열수추출물과 우유 혼합조성물의 변비해소 효과 ..	109
5) 새송이버섯 열수추출물의 효소분해산물에 의한 변비해소 효과	110
6) 새송이버섯 분말의 변비해소 효과	111
7) 새송이버섯 발효산물의 변비해소 효과	111
나. 변비유발 랫드(Sprague-DawleyC)에 대한 변비해소 효과	112
다. 열수추출물을 급여한 마우스의 혈액분석	113
1) 새송이버섯 열수추출물을 급여한 마우스의 혈액분석	113
2) 발효 새송이버섯 열수추출물을 급여 마우스의 혈액분석	114
3) 새송이버섯 열수추출물과 우유 혼합 조성물을 급여한 마우스의 혈액분석	114
4) 발효 새송이버섯 열수추출물과 우유 혼합 조성물 급여 마우스의 혈액분석	115
5) 새송이버섯 분말 사료를 급여한 마우스의 혈액분석	115
6) 발효 새송이버섯 분말사료를 급여한 마우스의 혈액분석	116
라. 새송이버섯 열수추출물을 급여한 랫드(Sprague-DawleyC)의 혈액분석 ..	116
제 6절 새송이버섯재배의 주요 병원균 분리 및 방제	118
1. 서언	118
2. 재료 및 방법	118
가. 새송이버섯 재배 중에 나타나는 병원균 분리	118
나. 병원균 동정	119
다. 보유 길항균을 이용한 항균 spectrum 조사	119
3. 연구결과	119
가. 새송이버섯 주요 병원균 분리	119
나. 새송이버섯 병원균에 대한 길항균 항균스펙트럼	122
제 2세부과제 : 기능성다당류 함유 제품 생산	124
제 1절 서 론	124
제 2절 미 이용 버섯자원을 이용한 계란 및 닭고기 생산	126
1. 연구수행방법	126

가. 미 이용 버섯의 준비	126
1) 미생물 발효 버섯 유기물 생산	126
나. 기초사료 준비	128
다. 산란계의 사육과 계란생산	130
1) 건조처리 미 이용 버섯자원의 급여	130
2) 발효처리 미 이용 버섯자원의 급여	131
3) 산란율 및 사료섭취량 측정	131
라. 장내 미생물 및 계분의 가스발생량 조사	131
1) 장내 병원성 미생물	131
2) 계분의 가스 발생량	133
마. 계란의 품질 조사	133
1) 계란의 품질	133
2) 계란의 저장성	133
바. 계란의 지질성분 분석	133
사. 육계의 사육과 닭고기 생산	134
1) 건조처리 미 이용 버섯 자원의 급여	134
2) 발효처리 미 이용 버섯 자원의 급여	134
3) 체중 및 사료섭취량 측정	135
4) 닭고기 생산	135
아. 닭고기 도체 특성 조사	135
1) 도체특성	135
2) 닭고기의 저장성	135
자. 닭고기의 이화학적특성 조사	136
1) pH(수소이온지수)	136
2) 육색(Meat color)	136
3) 가열감량(Cooking loss) 및 총 수분함량(Total water content)	137
4) 보수력(Water-holding capacity)	137
5) 수용성 및 염용성 단백질 용해성(Water and Salt soluble protein solubility)	137

6) 아미노산 함량	138
7) 조지방 함량	139
8) 지방산 조성	139
차. 통계 분석	140
2. 연구수행 내용 및 결과	140
가. 건조처리 미 이용 버섯의 급여에 의한 계란생산	140
1) 건조처리 새송이버섯이 계란생산 및 품질에 미치는 영향	140
2) 건조처리 팽이버섯이 계란생산 및 품질에 미치는 영향	147
나. 발효처리 미 이용 버섯의 급여에 의한 계란생산	153
1) 발효처리 새송이버섯이 계란생산 및 품질에 미치는 영향	153
2) 발효처리 팽이버섯이 계란생산 및 품질에 미치는 영향	159
다. 건조처리 미 이용 버섯의 급여에 의한 닭고기 생산	167
1) 증체량 및 사료 요구율	167
2) 장내 병원성 미생물 및 계분의 가스발생량	168
3) 도체 특성 및 닭고기 저장성	170
4) 닭고기의 이화학적 특성	172
라. 발효처리 미 이용 버섯의 급여에 의한 닭고기 생산	181
1) 증체 및 사료효율	181
2) 장내 미생물 및 계분의 가스발생량	183
3) 도체특성 및 닭고기 저장성	185
4) 닭고기의 이화학적 특성	188
3. 종합고찰	198
가. 건조처리 미 이용 버섯자원에 의한 계란 생산	198
나. 발효처리 미 이용 버섯자원에 의한 계란 생산	199
다. 건조처리 미 이용 버섯자원에 의한 닭고기 생산	200
라. 발효처리 미 이용 버섯자원에 의한 닭고기 생산	201

협동과제: 기능성 다당류 생성 우수 미생물의 선발 및 유전육종	203
제 1절 서 론	203
제 2절 버섯을 이용한 기능성 다당류 생성 균주의 선발 및 동정	205
1. 연구수행 방법	205
1) 유용효소 생성 균주의 분리	205
2) 균주별 기능성당류 생성능 유무 시험	205
3) 분리된 균주의 동정 및 유연관계 분석	206
2. 연구 수행 결과	206
1) 기능성 다당류 생성 균주의 분리	206
2) 선별된 기능성 다당류 생성 균주의 동정	214
제3절 버섯으로부터 기능성 다당류 생성을 위한 <i>Klebsiella</i> sp. Sc로부터 CMCase 와 xylanase유전자 클로닝, 정제 및 특성	223
1. 연구수행 방법	223
1) rpoB 유전자를 이용한 Sc 균주의 세부 동정	223
2) 게놈 라이브러리의 구축	223
3) Affinity chromatography를 이용한 정제를 위한 재조합 플라스미드의 구축	224
4) 재조합 단백질 CMCase 및 xylanase의 정제	224
2. 연구 수행 결과	226
1) 달팽이 유래 기능성당류를 생성하는 미생물 Sc의 세부동정	226
2) 분리 균주 Sc로부터 CMCase 유전자의 클로닝 및 분석	227
3) 분리 균주 Sc로부터 xylanase의 cloning 및 분석	230
4) GST fusion 정제 시스템을 이용한 CMCase 및 xylanase의 정제	234
제 4절 <i>Paenibacillus illinoisens</i> ZY-08로부터 Cyclodextrin Glucanotransferase (CG Tase) 유전자의 클로닝, 정제 및 특성	237
1. 연구수행 방법	237
1) Fosmid library kit를 이용한 게놈라이브러리의 구축	237

2) CGTase 유전자의 subcloning과 screening	237
3) Affinity chromatography를 이용한 정제를 위한 재조합 플라스미드의 구축	237
4) 재조합 단백질 CGTase의 정제	238
5) enzyme assay	238
6) CGTase 활성의 pH와 온도의 영향	239
7) Nucleotide sequence accession number	239
2. 연구 수행 결과	240
1) <i>P. illinoisensis</i> ZY-08 균주의 CGTase 유전자의 클로닝	240
2) ZY-08 균주의 CGTase와 기존의 다른 CGTase들과의 비교	242
3) CGTase의 분리 정제	247
4) <i>P. illinoisensis</i> ZY-08 균주의 CGTase의 특성	247
제 5절 <i>Paenibacillus xylanilyticus</i> ZY-03로부터 β -mannanase의 동정, 정제 및 특성	249
1. 연구수행 방법	250
1) Chemicals and Media	250
2) mannan을 분해하는 균주 선별	250
3) ZY-03의 mannanase 정제	250
4) SDS-PAGE와 zymogram	250
5) Mannanase assay	250
6) mannanase의 온도와 pH별 활성 효과 측정	251
7) 기질 특이성과 효소 반응 속도론	251
8) N-말단 아미노산 서열 결정	251
2. 연구 수행 결과	251
1) mannanase의 생산 및 정제	252
2) 온도별, pH 별 효소의 활성 효과	252
3) 금속이온과 유기용매별 효소의 활성 효과	253
4) 기질 특이성과 효소 반응 속도론	253
제6절 미 이용 버섯 자원을 이용한 미생물 발효 산물의 생산	255

1. 연구수행 방법	255
1) 미 이용 버섯 자원을 이용한 미생물 발효를 위해 사용된 균주	255
2) 버섯 분말 제조	255
3) 버섯을 이용하여 분리 균주에 의해 생성된 당 회수 방법	255
4) 추출당의 구성 성분 조사	255
2. 연구수행 결과	256
1) 버섯 분말 첨가 배지에서의 기능성당 생성량	256
2) 시간 변화에 따른 기능성당 생성량	256
3) 생성된 기능성당의 구성 성분 분석	257
4) 미이용 버섯 자원을 이용한 미생물 발효 산물의 생산	258
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	259
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	262
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	266
제 7 장 참고문헌	269

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발 목적

버섯은 고유의 맛과 향을 가지고 있으면서 다양한 기능을 가지고 있어서 식품 및 질환치료와 개선의 목적으로 수요가 꾸준히 늘고 있으며, 선진국을 비롯하여 경제적 수준을 갖고 있는 국민이나 계층에서는 버섯에 대한 관심이 증가하고 있다.

새송이버섯이 우리나라에 보급 된지 10여년에 국내에 600만 농가에서 연간 87,000톤 이상 생산되어 연간 3,000억원의 시장을 형성하고 있으며, 맛과 기능성이 뛰어나 소비자가 선호하고 있고, 우리나라가 세계에서 생산 인프라가 가장 잘 구축되어 있어 수출도 하고 있으면서 새송이버섯의 종주국으로 자리매김을 하고 있다.

새송이버섯은 재배와 생산과정에 있어서 작은 충격에도 쉽게 형태를 상실하여 상품성을 잃는 경우가 많고, 수확 후 상품화과정에 생성되어지는 부산물 및 수확단계에 재배 병에 다수의 애기송이도 형성되어져 상품으로 미 이용되는 부위 즉, 미이용자원이 많이 발생한다. 현재까지 새송이버섯의 부산물은 연간 11,000톤으로 발생이 많으나 뚜렷한 이용방안이 없어 버려지거나 사료로서 활용되어 경제적 가치가 크게 하락하게 된다. 이러한 미 이용부위를 이용하여 건강보조식품이나 의약품 원료를 개발할 수 있다.

본 연구에서 새송이버섯 그 자체나 미 이용자원 및 팽이버섯의 미 이용자원을 이용한 부가가치의 창출이 가능한 기술개발에 목표를 두고 있으며, 재배농가의 소득증대에 크게 기여하는 것이 연구수행의 목적이다.

1) 경제적·산업적 중요성

○ 버섯의 기능성과 웰빙문화의 확산으로 버섯생산량이 점차 증가하고 있다. 우리나라 연간 버섯생산량은 15만톤 정도에 이르고, 2004년 연간생산액은 4,849억원 정도이다. 이는 이웃 일본의 43만톤에 비하면 아주 적고, 세계생산량의 2.7%에 지나지 않는다.

○ 세계적으로 연간 버섯생산량의 400만톤이고 중국의 경제성장을 고려한다면 우리나라의 버섯농가의 수출전망은 밝다고 볼 수 있다. 따라서 버섯의 생산량의 증가와 동반하여 버섯 부산물 생산량도 증가할 것이며 이의 처리는 매우 중요하다.

○ 버섯자원을 이용한 기능성물질의 개발과 재활용은 경제적 뿐만이 아니라 산업적으로도 매우 중요하며, 새로운 산업의 창출의 의미도 가지고 있다.

○ 다당류들은 정장효과로 대장암의 예방, 변비해소, 유해물질의 흡수억제, 면역기능 향상 등의 효과가 있고, 혈당강화작용, 혈중 지질조절효과, 비만, 혈압강하, 담석예방 등 다양한 생리효과를 가지고 있어 개발이 절실히 요구된다.

○ 버섯자원에서 기능성다당류의 개발은 사회적으로 문제시되는 성인병예방과 국민보건에 크게 기여할 것이다.

○ 버섯자원을 이용한 바이오소재개발은 폐자원의 재활용과 고부가가치창출이라는 효과를 얻을 수 있어 경제적 산업적으로 상당한 가치를 갖는다.

○ 국내에 기능성다당류 관련 산업은 1990년도부터 음료에 도입되기 시작하여 100억원 규모였으나 2004년에는 1,500억원의 규모로 급속히 신장을 하였다.

○ 현재 수용성 식이섬유는 전량 수입하고 있어 외화손실이 크다. 이를 국내에서 개발되어진다면 외화절감에 크게 기여를 할 것이다.

○ 현재 식이섬유 생산은 주로 물리·화학적 방법으로 제조하기 때문에 인체에 부작용을 초래하는 경우가 있으나, 효소시스템을 이용한 본 과제의 개발계획은 자연친화적이며 인체에 부작용이 없는 기능성다당류 생산방법이다.

○ 연간 10만톤 이상의 미 이용 버섯자원을 이용한 제품개발과 산업형성은 경제적 효과가 클 것이다.

○ 식생활문화의 변화에 따른 당뇨병, 변비, 대장암 등 성인병환자의 급증에 따른 예방과 치료물질의 개발이 시급한 실정이다. 기능성다당류는 이러한 질환에 뛰어난 효과를 갖고 있기 때문에 기능성다당류개발은 폭발적인 경제효과를 가져 올 것이다.

○ 버섯자원을 포함한 농업 부산물을 이용한 새로운 물질의 개발은 산업창출과 고용창출의 효과를 가져 올 수 있다.

○ 현재 생산, 시판되어지고 있는 기능성다당류를 포함한 식이섬유는 물리·화학적 방법으로 생산되어지기 때문에 인체에 친화적이지 못하지만 본 과제에서는 완전히 해결할 수 있다.

○ 기능성을 갖는 계란과 닭고기를 생산한다면 양계농가에 경제적인 파급효과는 아주 클 것이다.

○ 변비해소와 다이어트 기능성우유를 생산한다면 위축되어가는 우유산업 활성화와 축산업농가의 소득증가에 크게 기여할 것이다.

2. 연구개발 필요성

○ 생물체로부터 분리한 다당류의 연구는 활엽수와 보릿짚에 대한 다당류의 구조적인 해석도 이루어져 있으나, 버섯류와 침엽수에 대한 연구는 이루어져있지 않다.

○ 다당류의 생리적 기능을 보면, ① 변비를 해소시켜준다. ② 장내환경을 정돈하고 비타민을 합성하며, ③ 혈당치를 조절하고, 당뇨병을 예방·개선한다. ④ 고혈압 예방효과가 있고, ⑤ 동맥 경화를 예방해 준다. ⑥ 암을 예방·억제하고, ⑦ 콜레스테롤과 담석형성을 저해한다. ⑧ 간장의 기능을 돕고, 활성화하는 효과가 있으며, ⑨ 위를 보호하고, 위궤양과 십이지장궤양 등을 예방한다. 그리고 ⑩ 환경호르몬(다이옥신 등)의 배설을 촉진하는 등의 다양한 효과가 있어 다당류의 개발은 절대적으로 필요하다.

○ 현재 물리·화학적 방법으로 생산하고 있지만 미생물 등을 이용한 인체친화적인 방법으로 생산할 수 있는 기술개발이 필요하다.

○ 식생활의 변화에 의해 고단백질·고지방 식품과 유연한 식품을 많이 섭취

하는 식생활의 문화가 급속히 서구화로 되어가고, 다당류의 섭취가 감소하고 있어 다당류의 섭취권장을 위한 기능성을 해명이 필요하다.

○ 한국식품의약품안전청에 따르면 1일 식이섬유 섭취 권장량이 20~25g이라는 기준이 재설정 되어졌으나, 실제 섭취량은 평균 12g에도 미치지 못하고 있다. 따라서 다당류 공급을 위하여 관련제품개발이 절실히 요구되고 있다.

○ 최근 우리전통식품과 건강지향식품에 관심이 크게 고조되는 근원은 기능성다당류의 생리활성을 보고자하는 것이다. 다당류 개발의 국내 기술수준은 아직 초보적이므로 다양한 기술이 개발되어져야한다.

○ 기능이 탁월하여 세계적으로 각광을 받고 있는 기능성다당류개발은 미 이용 버섯자원 이용차원을 넘어서서, 바이오신소재개발수준으로 평가되어져 이용기술을 적극적으로 개발해야 한다.

○ 식생활문화가 급속히 서구화로 되어가면서 고단백질·고지방 식품과 유연한 식품을 많이 섭취하여 장 질환이 증가하고 있어, 다당류의 섭취로 예방이 절실히 요구되므로 다당류의 연구와 제품개발이 이루어져야한다.

○ 양계산업이 최근 상당히 위축되고 있으며, 소비량도 극감하고 있다. 다당류의 기능성을 부여할 수 있는 축산물 생산 연구가 요구된다.

○ 동물 중 급여한 사료에 포함된 물질을 가장 잘 이용하는 것이 닭이다. 따라서 미 이용 버섯자원의 미생물분해물을 급여한 기능성계란과 닭고기생산 연구는 중요한 의미를 갖는다.

○ 우유소비가 급격히 감소하여 우유관련 산업이 침체화 되고 있는 상황이므로, 기능성우유의 개발로 우유산업 활성화가 시급한 실정이다.

○ 여성에게 가장 관심 있는 것이 다이어트와 변비다. 따라서 본 과제에서는 다이어트 우유와 변비예방 및 치료 우유를 개발하고자한다.

3. 연구개발 내용 및 범위

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차 년도	2006	1 세부과제: 기능성 다당류 추출분리기술 및 제품개발		
		○ 다당류 추출	<ul style="list-style-type: none"> ○ 버섯 다당류 추출 ○ 미생물분해물의 다당류 추출 ○ 다당류 추출의 최적 조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 버섯 다당류 추출 및 확인 <ul style="list-style-type: none"> - . Hemicellulose - . Xylose ○ 미생물분해물의 다당류 추출 및 확인 <ul style="list-style-type: none"> - . 1차 저온조건 추출 - . 2차 고온조건 추출 ○ 다당류 추출 조건에 따른 추출량 등의 확인

		2 세부과제: 기능성다당류 함유 제품 생산	
○ 닭 사육	○ 미생물 분해물 급여 ○ 미생물 분해물의 영양학적 효과조사	○ 산란계, 육계 구입과 사육 ○ 다당류의 분자량을 달리한 미생물 분해물을 닭에 급여	
		협동과제: 기능성다당류생성 우수 미생물 선발 및 유전육종	
○균주 분리 및 특성조사	○ Hemicellulose 분해능 우수 미생물의 선발 ○ 선발균주의 유기물 분해 활성조사	○ 유기물 분해 관련 효소활성 우수 미생물 screening 및 동정 ○ 선발균주의 분해 관련 각종 효소의 활성조사 ○ 분리균주의 최적 효소생산 조건 및 배양에 필요한 각종 영양원의 최적 조건 검토	

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
2차 년도	2007	1 세부과제: 기능성 다당류 추출분리기술 및 제품개발		
		○ 미생물 분해산물 추출 및 동정	○ 버섯분해물 추출 및 동정 ○ 계란 내 다당류 분석	○ 버섯유래 다당류 추출 및 동정 -. 수용성 다당류 추출법 확립 -. 비수용성 다당류 추출법 확립 -. 온도별 추출물의 확인 -. Xylan 및 다당류 분리방법 확립 ○ 다당류분리 분석 -. 버섯분해산물 급여 닭이 생산한 계란의 물질 분석
		2 세부과제: 기능성다당류 함유 제품 생산		
		○ 미생물 분해물 급여 계란생산	○ 미생물분해유기물 섭취 계란 및 닭고기생산 ○ 미생물분해유기물의 적정급여수준결정	○ 기능성다당류 첨가 급여시험 ○ 급여수준 및 급여기간에 따른 생산성 조사 ○ 기능성다당류 섭취 계란생산 및 품질조사 ○ 기능성다당류 섭취 닭고기생산 및 품질조사
		협동과제: 기능성다당류생성 우수 미생물 선발 및 유전육종		
		○ 선발균주의 배양학적 특성 및 생성 효소의 특성 조사	○ 선발균주의 생육 조건과 효소활성의 조사 ○ 선발균주의 효소학적 특성 조사	○ 선발균주의 생육특성 조사 pH, Temp. 조건 및 생화학적 특성 ○우수균주의 Cellulase, Hemicellulase, endoxylanase의 분리 정제 및 효소의 특성 조사

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
3차 년도	2008	1 세부과제: 기능성 다당류 추출분리기술 및 제품개발		
		○ 제품개발	○ 기능성 제품 개발	○ 기능성다당류 함유 우유개발 - 기능성 우유 개발 ○ 의약품 및 건강보조식품 후보물질 개발
		2 세부과제: 기능성다당류 함유 제품 생산		
		○ 기능성 고품질 식품 생산	○ 급여량과 급여기간별 계란성분 조사 ○ 급여량과 급여기간별 닭고기성분 조사	○ 기능성을 갖는 계란 및 닭고기생 산 ○ 급여량 및 급여기간에 따른 성 분분석 - 투여량에 의한 계란 및 닭고기의 xylan 및 Cholesterol 함유율조사
		협동과제: 기능성다당류생성 우수 미생물 선발 및 유전육종		
○ 버섯 섬유소 분해관련 유전자의 발굴 및 이용	○ 효소특성조사 ○ 버섯 섬유소 분해관련 유전자의 클로닝 및 분자적 해석 ○ 유전적 육종	○ Hemicellulase, endoxylanase의 효소 kinetics 조사 ○ 버섯 섬유소 분해관련 효소 유전자의 단리 및 분석 ○ 분해관련 효소 유전자를 이용한 미생물 분자육종		

제 2 장 국내외 기술개발 현황

생물자원유래의 식이섬유를 이용한 다양한 산업이 형성되어지고 있다. 최근 바이오에너지개발에 대한 세계적관심이 집중됨으로서 각국에서 식물섬유소에 개발에 막대한 투자를 하고 있는 실정이다. 바이오에너지는 주로 식물을 중심으로 이루어지고 있으나, 식품개발과 의약품개발에는 타당하지 않는 점이 있다. 벼의 식이섬유는 식품이나 의약품개발에 이물질에 대한 부작용이 없고, 전처리가 필요 없기 때문에 큰 장점을 갖고 있다.

세계적으로 선진국에서는 벼의 소비가 많다. 우리나라와 중국도 벼의 소비가 증가하고 있으며, 중국의 벼시장은 크게 성장을 할 것이다. 우리나라도 생활수준의 향상과 사회구조의 변화로 식생활이 서구화되어져 성인병이나 대장이나 위의 질환이 급증하고 있다. 따라서 식이섬유를 이용한 기능성 다당류를 개발 연구하여 국민들에게 보급을 해야 한다.

벼의 풍부한 다당류를 기능성물질과 함께 개발하는 기술은 아직 미약하며, 앞으로의 발전 가능성과 개발의 필요성은 절실하다.

1. 세계적 수준

○ 다당류가 인체생리에 미치는 긍정적인 효과가 밝혀짐으로 전 세계적으로 식품산업계에서도 다당류의 활용에 대한 관심이 증대되어 왔으며, 특히 가용성 다당류와 불용성 다당류의 생리작용이 상이하다는 것이 알려지면서(Schneeman, 1987, Topping, 1991) 각각의 기능적 성질을 이용한 식품소재가 계속 연구개발 되어지고 있다.

○ 유기성 폐자원을 이용하는 정도는 국가별 상이한 차이를 보이고 있으며, 선진국에서는 그 이용률이 다소 높다. 선진국에서도 식물성 폐자원으로서 퇴비화 사료화 및 식품의 보조제로 개발·이용되어지고 있으나 아직 미흡한 실정이다.

○ 최근 일본에서는 다당류를 이용한 건강보조식품과 의약품의 개발이 급증하고 있는 실정에 있다.

○ 미국을 비롯한 선진외국에서는 쌀겨를 이용하여 제빵, 제과, 건강보조식품 및 의약품으로 개발이 활발히 진행되어, 1989년에 24개의 신제품이 개발되어졌는데 2000년에 들어서면서 100품목이상으로 증가하였다.

○ 해조류, 식물체 및 그 종자, 미생물 등에서 얻어지는 수용성 다당류들은 각종식품의 증점제, 안정제 등으로 널리 사용되어왔는데 최근에는 이들을 부분적으로 가수분해하여 저분자화 함으로써 수용성 다당류 소재로서의 용도를 확장하기 위한 연구개발이 활발히 이루어지고 있다.

○ 벼의 미 이용자원을 이용한 기능성 다당류 개발보고는 점차 증가하게 될 것이다.

2. 국내수준

○ 국내 식이섬유도입은 1990년도 음료에 도입하기 시작하여 100억원 규모이었으나 2004년에는 14배나 증가를 했고, 현재까지 수용성 식이섬유는 대부분 수입에 의존하고 있는 실정이다.

○ 미국을 비롯한 선진외국에서는 제품개발 및 산업화가 이루어진 것에 반해, 국내에서는 수용성 다당류를 수입해서 음료로 사용하는 정도의 낙후된 기술수준이다.

○ 다당류를 이용한 음료가 개발되어지고 있으며, 다당류를 이용한 식품산업에서의 수요는 계속 증대될 것으로 전망된다.

○ 임산폐자원을 이용해서 화학적인방법으로 분해를 한 다음 퇴비와 사료에 이용되어지고 있다.

○ 식이섬유를 이용한 건강보조식품과 의약품의 개발은 미흡한 실정이다.

○ 국내의 다당류의 연구는 다양한 식물폐자원을 화학처리에 의한 가수분해방법으로 분리하여 분석한 경우가 보고되고 있다.

○ 본 연구팀을 비롯 국내 몇 연구팀에서 식물성유기물과 해조류유기물 분해활성이 우수한 미생물을 보유하고 있으며, 제품개발에 투자를 하고 있다.

○ 버섯의 미 이용자원을 활용한 기능성다당류개발 기술은 아직 개발되어져 있지 않다.

3. 국내·외의 연구현황

○ 국내 연구현황은 대부분 식물성 유기폐자원을 원료로 해서 알칼리와 산을 처리하는 방법으로 다당류를 추출하는 방법 등을 연구논문으로 보고하고 있다.

○ 버섯의 경우는 상품 그 자체를 이용하여 화학적인 방법을 이용해서 추출연구를 하고 있다.

연구수행 기관		연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
국내	인천대학교	저령(<i>Grifola umbellate</i>)의 균핵에서 추출한 조다당류의 면역활성 및 항암효과 연구	과학재단연구비에 의한 연구수행, 논문발표
	고려대학교	구름버섯 알칼리 추출물에서 분리한 항응고성 다당류 연구	농촌진흥청특정과제 수행, 논문발표
국외	Nissin Food Products Co.	식이섬유를 이용한 식품개발 연구	식이섬유를 라면에 첨가
	TOYOHASHI RYOSHOKU INDUSTRY CO.,LTD.	보리의 식이섬유를 이용한 식품, 사료, 미곡개발 연구	보리쌀, 밀가루, 빵 제조
	Aby Co., LTD	식물성 식이섬유 이용 개발 연구	건강보조식품

4. 과제 수행결과가 기술개발에 차지하는 위치

○ 새송이버섯과 팽이버섯 미 이용부분을 이용한 변비해소 조성물 개발 기술은 현재 특허 출원 중에 있으며, 향후 버섯시장의 증가와 함께 중요한 산업기술이 될 것이다.

○ 새송이버섯과 팽이버섯의 미 이용부분을 유기물분해활성 미생물처리로 생리활성을 갖는 기능성다당류의 생산기술은 국내 유일의 기술이다.

○ 새송이버섯과 팽이버섯의 미 이용부분을 분말로 하여 변비해소효과와 혈중 콜레스테롤저하의 효과는 버섯 미 이용자원을 활용한 최고의 기술이다.

○ 새송이버섯과 팽이버섯 및 발효산물을 이용한 기능성계란과 고급육계 생산은 국내최초로 특허출원 중에 있다.

○ 유기물 분해 활성이 뛰어난 다양한 균주의 선발과 육종은 유기물분해 효소 확보와 유전자원의 확보에 아주 큰 의미를 갖는다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1세부과제 : 기능성 다당류 추출분리기술 및 제품개발

제 1절 서론

새송이버섯(*Pleurotus eryngii*)은 원산지가 남유럽이며(Rajaratnam 등 1987, Stamets, 1993) 우리나라에는 1997년 경남농업기술원에서 국내 최초로 재배, 개발하여 보급하였다. 우리나라에서는 큰느타리버섯으로 품종등록이 되어있으며, 상품명은 새송이버섯으로 정착되어 있다(Kang 등, 2000, Cho 등, 2001). 현재 연간 90,000톤 이상 생산되어 연간 3,000억원의 시장을 형성하고 있으며, 우리나라가 세계에서 생산 인프라가 가장 잘 구축되어 있어 새송이버섯의 중주국으로 자리매김을 하고 있다.

새송이버섯은 외형적 형태와 조직의 질감이 아주 유사하여 송이버섯섭취의 효과를 주기 때문에 소비자의 선호도가 아주 높다(Kim 등, 1995, Yoon 등, 2004). 송이버섯과 차이점은 향을 갖고 있지 않다는 점이지만, 영양학적으로는 아주 우수한 버섯으로 전당(90%)과 조지방(0.6%), 무기질은 식용버섯 중에서 가장 많이 함유하고 있다. 또 다른 버섯에 없는 비타민 B6와 B12가 다량 함유되어 있으며, 비타민C는 느타리버섯의 7배, 팽이버섯의 10배로 매우 높은 함량을 갖는 것이 특징이다. 뿐만 아니라 새송이버섯은 수분함량이 적어 유통과 저장을 오래가져갈 수 있어 다른 버섯보다 수출에도 큰 장점을 갖고 있다. 또한 새송이버섯은 식이섬유가 풍부하여 식이섬유를 이용한 다양한 제제나 건강보조식품으로 개발이 가능할 것으로 예측을 한다(Kim 등, 1992; Kim 등, 1993; Yoshioka 등, 1985).

새송이버섯은 재배와 유통과정에 있어서 충격에 갓부분이 손상을 받아 상품성을 잃는 경우가 있고, 수확 후 상품화과정에 생성되어지는 부산물 및 수확 중에 다수의 애기송이도 형성되어져 미 이용부위 즉, 미 이용자원이 많이 발생한다. 현재까지 새송이버섯의 부산물은 연간 11,000톤으로 발생이 많으나 뚜렷한 이용방안이 없어 버려지거나 사료로서 활용되는 즉, 경제적 가치가 크게 하락하게 된다. 이러한 부산물을 이용하더라도 충분히 식품가공원료와 기능성 바이오소재로서 개발이 가능하고, 이를 이용한 건강보조식품이나 의약품 원료를 개발할 수 있어 새송이버섯 및 새송이 미 이용자원을 이용한 부가가치의 재창출을 할 수 있어 재배농가의 소득증대에 크게 기여할 수 있다(Guide and Directory, 2007).

최근 생활수준의 향상으로 고지방과 고단백질이 함유된 육류와 인스턴트식품의 섭취가 증가하는 식습관의 변화와 사회구조의 변화에 따라 여성의 사회참여도가 증가하여, 직장여성이나 사무직 근로자들에게 변비의 발생 빈도가 아주 높게 나타나고 있고 변비는 여성전용이라고 여겨지던 것이 남성의 발생빈도도 아주 높아지고 있는 추세다. 변비는 예로부터 만병의 근원으로 변의 독소가 장으로 흡수되어 혈액이행으로 피부노화, 두통, 피부발진, 치질 등이 나타나며 심하면 대장암의 원인이

된다. 이러한 변비치유에는 식습관과 생활습관을 먼저 바꿔야하고, 대장의 기능을 향상시키는 것이 이루어져야한다. 대장의 기능을 향상시키는 데는 식이섬유와 장의 연동운동을 도와주는 기능성식품을 섭취하는 것이다(Kang 등, 2001, Hwang 등, 2003).

새송이버섯은 식이섬유를 다량함유하고 있어서 식이섬유를 목적으로 하는 제품개발에는 아주 유용하며, 재배와 상품화과정에 생산되어지는 미 이용부분의 이용으로 충분한 가능성을 갖고 있다.

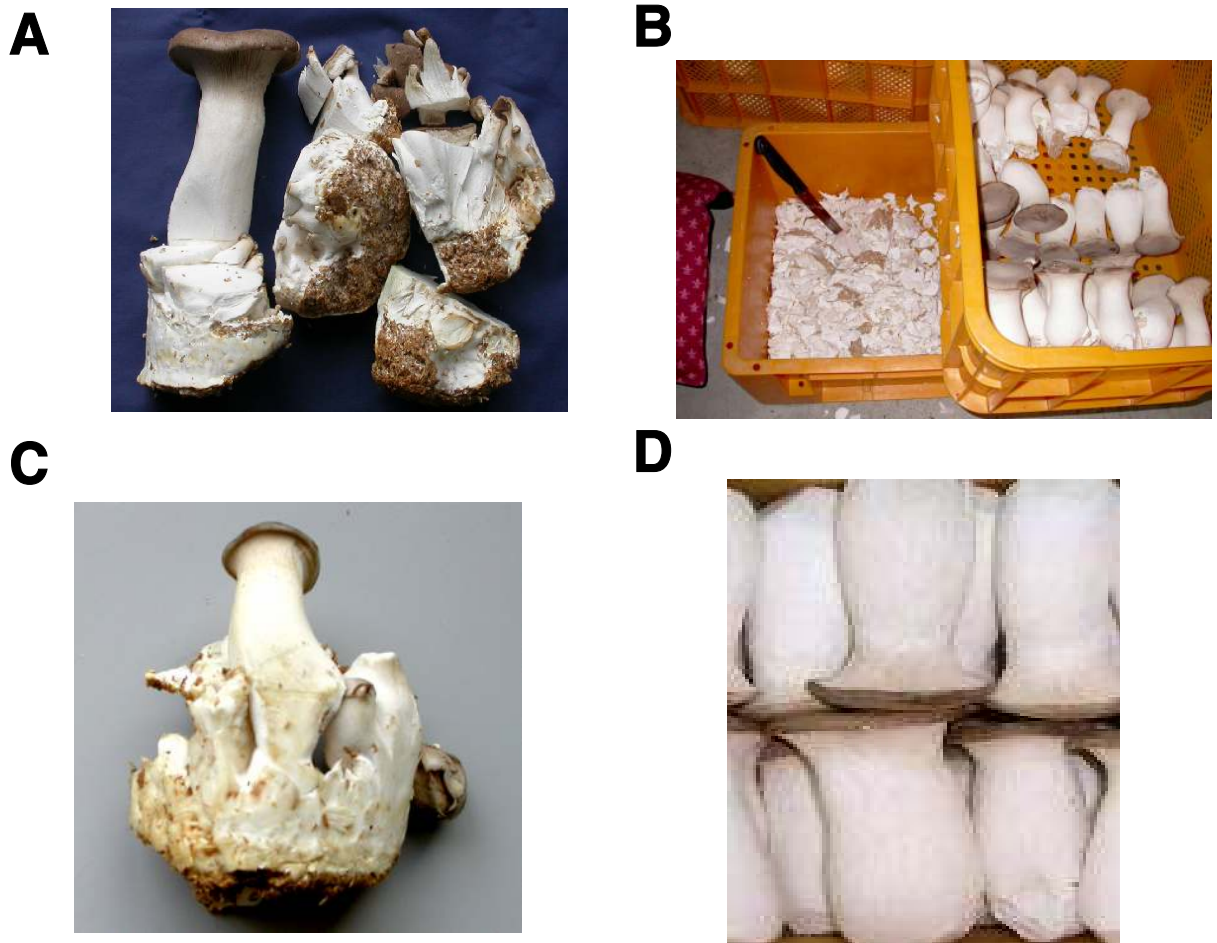


Fig. 1. 새송이버섯 재배와 제품화 과정의 새송이버섯

A: 새송이버섯의 재배 병으로부터 수확한 버섯과 미 이용 버섯부분, B: 새송이버섯 상품화 과정 중에 발생하는 미 이용 버섯부분, C: 수확 후 재배 병에 남아있는 애기새송이, D: 새송이버섯 상품

제 2절 새송이버섯 미 이용자원으로부터 다당류 추출

1. 서언

버섯을 고등균류로 외형을 보면 미세하고 실 같은 균사로 이루어져 있으며, 수많은 균사의 집합체가 균사체를 이루며 이들이 모여서 자실체를 형성하는 버섯의 형태를 갖게 된다. 버섯은 예로부터 불로장생의 식품으로 여겨졌다. 현대 성인병의 민간요법으로 많이 이용되어지고 있으며, 의학적으로도 많은 약리성분 등이 연구와 상용화가 이루어지고 있다(Lee 등, 1998, Melo 등, 2004, Kiviharju 등, 2002, Kim 등, 1994). 버섯은 항암, 성인병, 폐병, 신장병, 이뇨, 부인병, 항균성 제재로 널리 사용되어지고 있다. 건강식품으로서의 효능면에서 뿐 아니라, 그 맛과 향이 뛰어난 별미요리여서 많은 수요를 갖고 있다. 버섯은 단백질, 지질, 탄수화물이 적어 에너지원으로의 가치는 적으나 비타민 B2와 나이아신이 비교적 많이 들어 있으며 비타민 D 뼈의 구성 성분인 칼슘과 인의 흡수를 촉진시키며, 칼륨은 나트륨과 함께 산알칼리 및 수분 평형을 조절하는 생리기능 등을 갖고 있다. 또한 지질의 용해를 도와 지방산을 이송하며 열량대사와 산알칼리의 균형 유지에도 관여한다(Guillen 등, 2000, Hwang 등, 2003, Kang 등, 2001).

최근에 다이어트와 건강식품으로 다당류가 관심을 끌고 있는데, 특히 말린 버섯에 다당류가 풍부하다. 다당류는 비소화성 물질로 영양소면에서는 가치가 없으나 체내에서는 건강에 유익한 많은 장점을 가지고 있다. 우리나라의 식생활이 점차 서구화되고 식품 산업의 발달로 고열량 고지방의 가공식품이 늘어남에 따라 음식에서의 식이섬유의 섭취가 줄어들어짐으로써 비만이나 당뇨병 등 성인병이 늘어나는 추세에 있다. 그래서 요즘에 식이섬유의 보충을 다양한 형태로 공급하기위한 식이성 식품이 개발되어져 있고 소비자들이 찾고 있다. 다당류가 이점으로서서는 첫째 장의 연동운동을 촉진하여 변통을 좋게 함으로써 변비와 대장암의 예방에 효과가 있다. 둘째 대장의 내압을 떨어뜨려 계실염, 과민성 대장증후군의 발병을 막아준다. 셋째 혈중 콜레스테롤치를 저하시키고 혈당의 급격한 상승을 방지함으로써 동맥경화증, 담석증 및 당뇨병 예방에 효과가 있다(Pamela 등, 1999).

즉 다당류는 콜레스테롤과 담즙을 흡착하여 체외로 배설시켜 체내 콜레스테롤치를 저하시키므로 농축된 고열량 고지방식의 과잉 영양으로 유발되기 쉬운 동맥경화증, 담석증 및 당뇨병의 예방에 효과가 좋으며, 최근에는 남녀노소를 불문하고 관심이 높은 비만치료에 효과가 더욱 좋다. 그러므로 버섯을 이용한 요리를 평상시에 많이 먹으면 일거양득의 효과를 볼 수 있다(Kang 등, 2001).

버섯의 다당류들의 기능성에는 항암작용과 면역 활성화효과 대한 다수의 보고가 있으며, 베타글루칸은 인간의 정상적인 세포조직의 면역기능을 활성화시켜 암세포의 증식과 재발을 억제하고 면역세포의 기능을 활발하게 하는 인터글루칸, 인터페론의 생성을 촉진시킨다.

새송이버섯 다당류를 다양한 방법으로 추출하여 생리활성을 조사하고 물질을 규명하는데 의미를 두고자한다.

2. 재료 및 방법

가. 다당류 추출

새송이버섯 다당류를 다양한 조건으로 추출을 하여 추출효율을 보고, 특정 종류의 다당류를 추출하여 실험에 이용하고자 다양한 조건과 시약으로서 추출을 하였다.

1) 고압열수 추출

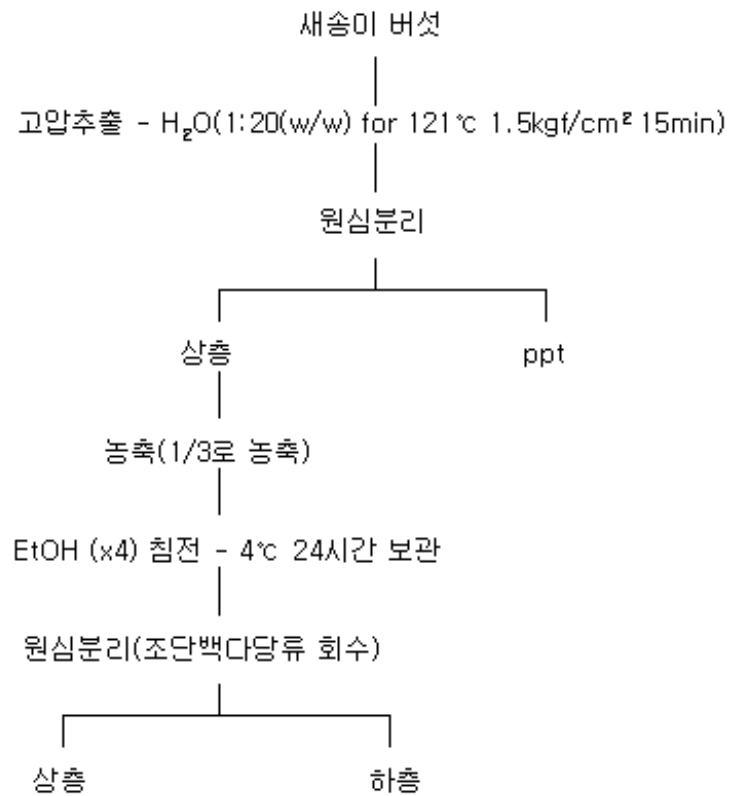


Fig. 2. 고압열수에 의한 새송이버섯의 단백다당류추출

2) 용매와 열수추출

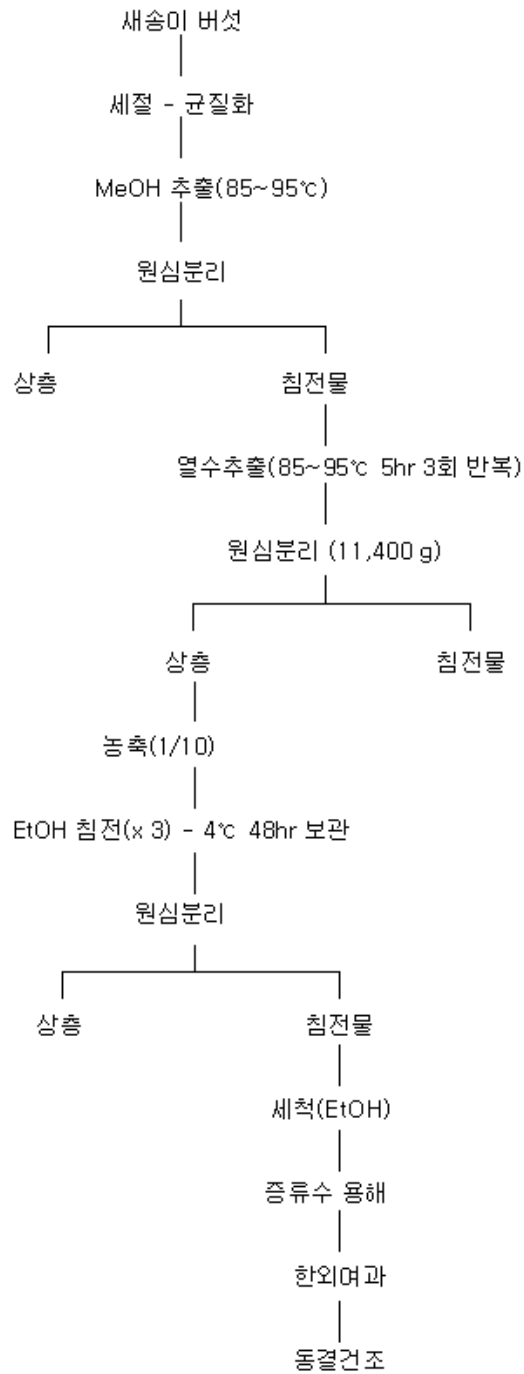


Fig. 3. 용매와 열수를 이용한 다당류 추출법

3) NaOH와 acetone 침전에 의한 다당류 분리

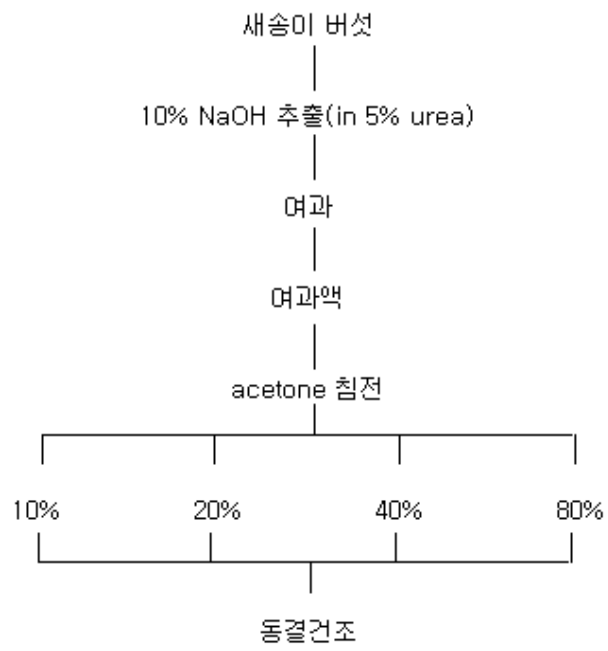


Fig. 4. NaOH를 이용한 다당류 추출법

4) 유기용매와 alkaline 추출

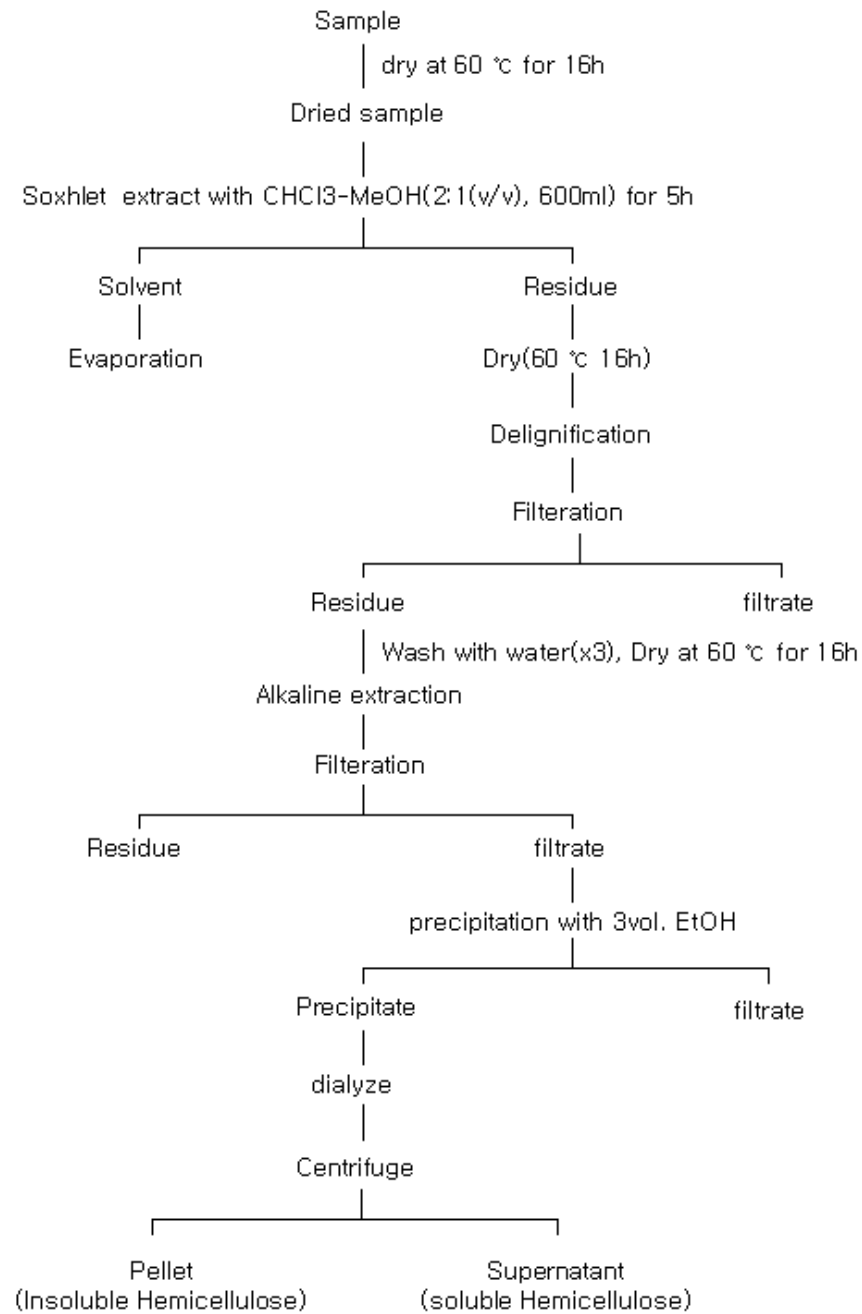


Fig. 5. 유기용매와 염을 이용한 다당류추출법

5) 새송이버섯으로부터 수용성과 비수용성 다당류 분리

새송이버섯과 발효 새송이버섯으로부터 다당류를 분리 확인하여 다당류의 변화와 생성 및 계란에서의 다당류 이행 등을 확인하기 위하여 수용성과 비수용성 다당류를 분리하였다. 분리방법은 Fig. 6에 상세히 나타냈다.

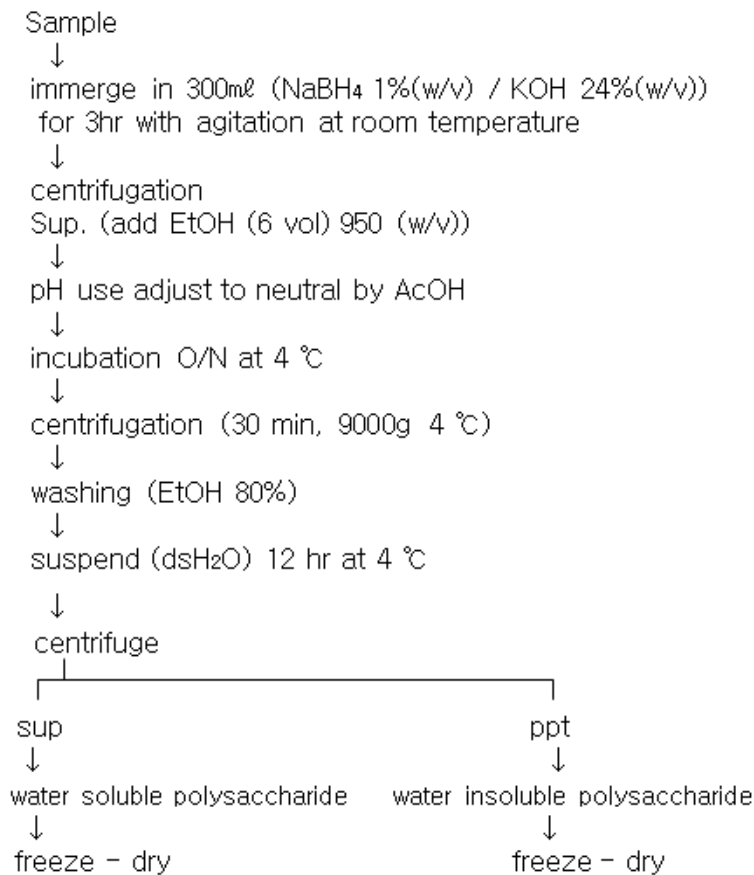


Fig. 6. 새송이버섯으로부터 수용성과 비수용성 다당류분리

6) 새송이버섯과 팽이버섯으로부터 β -glucan 추출

새송이버섯과 새송이를 발효시킨 버섯 그리고 팽이버섯으로부터 β -glucan을 추출하였다. 새송이버섯과 팽이버섯을 통풍이 잘되고 직사광선을 피한 곳에서 건조를 시킨 다음 분쇄를 하여 추출시료로 사용을 하였고, 미생물분해를 시킨 새송이버섯은 헵동과제에서 분리한 미생물로 생분해를 시키고 분말로 한 다음 추출사료로 하였다. 지질을 제거하기위한 1차 용매추출은 chloroform과 methanol을 2:1로 혼합한 용매를 각 시료의 5배의 량으로 첨가한 다음 60°C에서 3시간씩 환류추출을 3회 반복하여 지질을 제거하였다. 추출 후에는 상온에서 냉각을 하고 여과를 하여 용매를 제거하고 잔여물을 얻었다. 잔여물에서 분자량이 적은 물질들을 제거하기 위하여 methanol과 물을 4:1로 혼합한 용매를 잔여물의 5배를 첨가한 다음 지질제거방법과 같은 방법으로 실시하였다. 추출 후에 용매는 제거하고 잔여물은 β -glucan을 얻기 위한 3차 추출에 이용하였다. 잔여물 10배의 물을 첨가하고 100°C에서 6시간 동안 6번의 추출을 실시하였다. 추출 후에 상온에서 냉각을 한 다음, 여과하여 잔여물들을 제거하고 물은 3배량의 ethanol을 첨가하여 다당류를 침전시켰다. 침전물을

회수하여 48시간동안 수돗물에 투석을 실시하고, ethanol침전을 실시하여 재침전을 시킨 다음 침전물을 동결건조하였다. 동결건조물을 물을 이용하여 다시 녹인 다음 4℃에서 보관한 다음 원심분리를 하여 gel상태의 β -glucan을 얻었다.

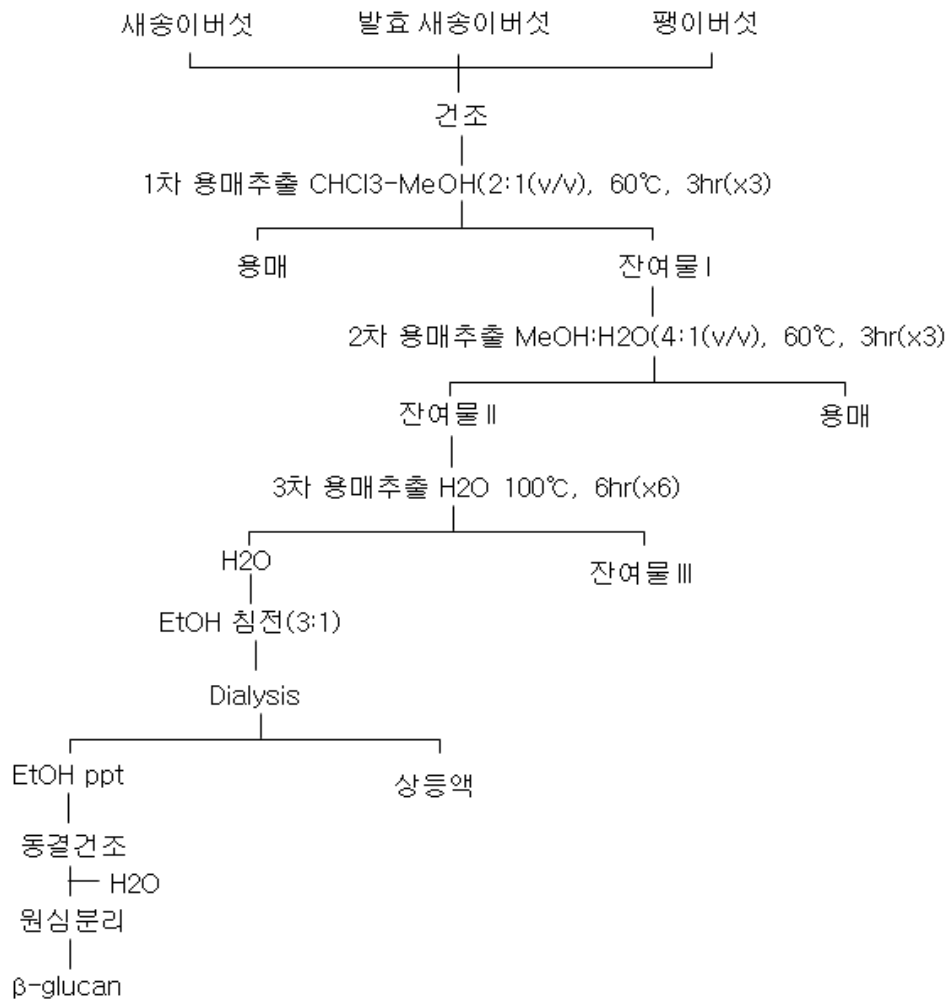


Fig. 7. 새송이버섯, 발효 새송이버섯 및 팽이버섯으로부터 β -glucan추출

7) β -glucan 추출 중간산물의 항혈전활성 측정

새송이버섯, 발효시킨 새송이버섯 그리고 팽이버섯으로부터 β -glucan추출과 분리 과정에 생성되어지는 중간산물을 이용하여 항혈전활성을 측정하였다. 3차 용매인 물로 추출한 후에 ethanol 침전물을 소량 취하여 정량을 하고 항혈전활성을 측정하였다. 항혈전활성 측정방법은 hexane 추출물 항혈전활성 측정법과 동일하게 했다.

3. 연구결과

가. 새송이버섯으로부터의 다당류 추출

새송이버섯의 미이용자원을 완전히 건조시킨 다음 다양한 조건으로 다당류를 추출하였다. 그 결과 버섯 미 이용자원 100g에 대한 고압열수에 의한 추출법에서는 15g의 추출물을 얻었고, methanol로 1차 추출하여 일반화합물을 제거한 다음 열수로 추출한 것에서는 5g의 다당류를 얻었다. 10% NaOH로 추출한 것에서는 3g을 유기용매와 alkaline으로 hemicellulose 추출법에 의한 것에서는 2.1g의 다당류 추출물을 얻었다. 다당류의 추출을 위해서는 고압열수추출법을 이용하는 것이 가장 좋고, 목적 당류의 추출을 위해서는 용매와 pH 조절법이 유용하다.

나. 새송이버섯으로부터 수용성과 비수용성 다당류 분리

새송이 버섯자실체로부터 수용성 다당류와 비수용성 다당류를 분리했다.

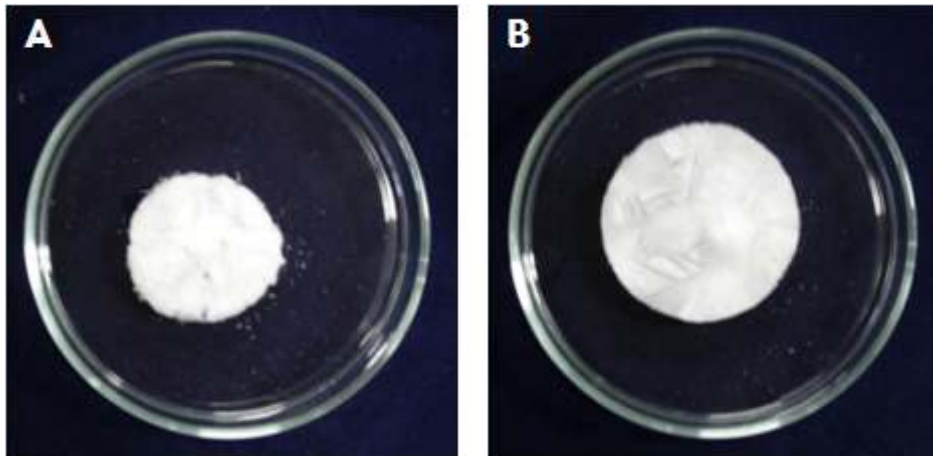


Fig. 8. 새송이버섯으로부터 수용성과 비수용성 다당류 분리

A: 수용성다당류, B: 비수용성 다당류

다. 새송이버섯, 발효 새송이버섯, 팽이버섯으로부터 β -glucan 추출

β -glucan의 다양한 생리활성이 알려짐으로서 다양한 버섯으로부터 β -glucan을 추출하여 상품화하고 있다. 본 과제에 이용한 새송이버섯과 팽이버섯 그리고 발효 새송이버섯으로부터 β -glucan을 추출하였다. 유기용매를 이용한 지질성분과 저분자량의 물질을 제거하고, 물을 이용한 고온에서 장시간과 반복추출을 통하여 목적의 β -glucan 추출하였다. 20g의 각 sample로부터 새송이에서는 35.6mg의 β -glucan을 얻었고, 발효시킨 새송이버섯에서는 164.3mg, 팽이버섯으로부터는 18.6mg의 β -glucan을 얻었다.(Fig. 9)

발효한 새송이버섯에서의 β -glucan생성이 많은 것의 해명은 차후의 연구로 계획을 하고 있다.

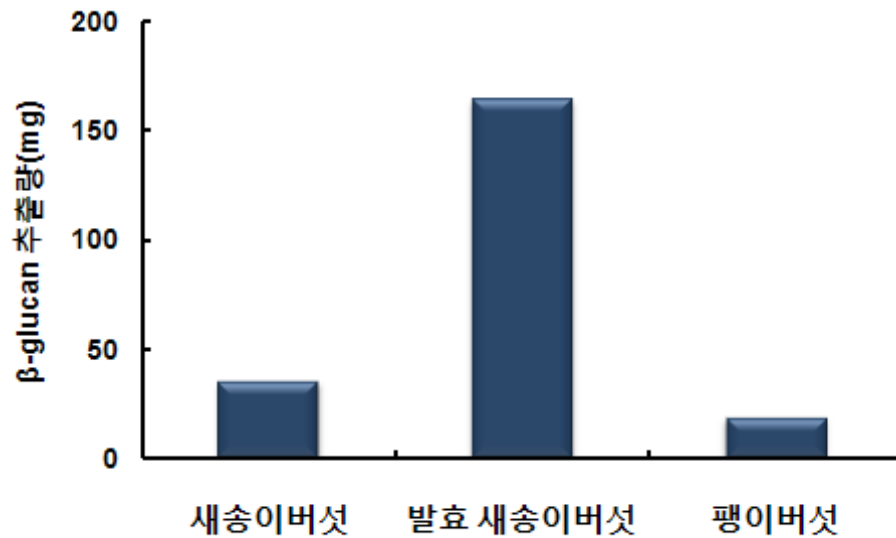


Fig. 9. 새송이버섯, 발효 새송이버섯, 팽이버섯으로부터 β-glucan 추출

라. β-glucan 추출 중간산물의 항혈전활성 측정

새송이버섯과 새송이 발효버섯 그리고 팽이버섯으로부터 β-glucan 추출과정 중에 열수 추출을 하고 ethanol로 침전을 하는 단계가 있다. 그 침전물을 각각 0.02mg을 처리하여 항혈전활성을 측정한 결과 새송이 발효버섯에서 얻은 추출물은 새송이버섯과 팽이 버섯보다 200%와 150%의 활성이 높았다(Fig. 10). 발효 새송이버섯에서의 항혈전활성 증가와 β-glucan의 추출량의 증가는 매우 흥미로운 결과로 사료되며, 그 주체 물질의 구명과 다른 버섯을 이용한 실험 등이 필요할 것으로 사료된다.

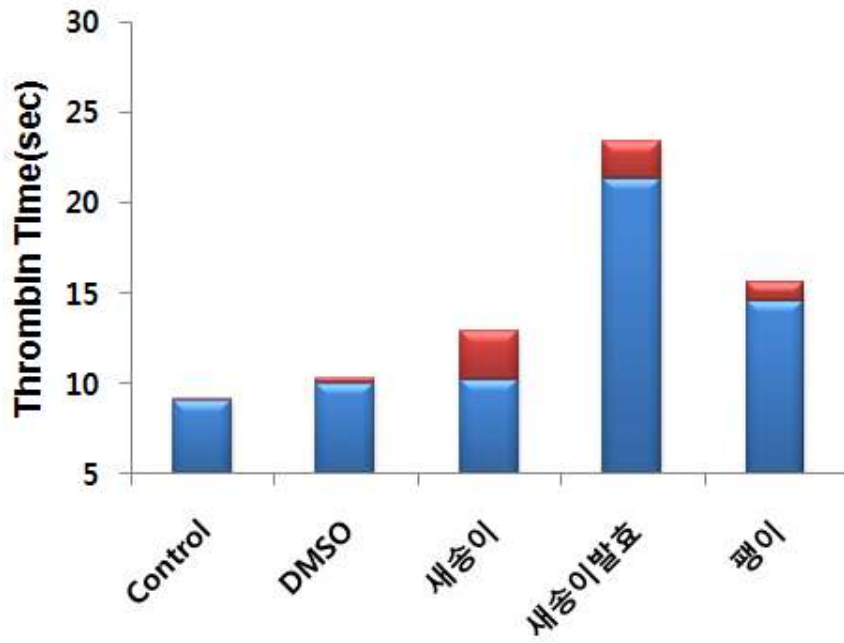


Fig. 10. 새송이버섯, 새송이 발효버섯, 팽이버섯으로부터 β -glucan 추출분리 과정 중간산물의 항혈전활성

제 3절 유기용매를 이용한 버섯의 기능성 물질추출

1. 서언

버섯에는 다양한 생리활성을 나타내는 물질들이 연구되어지고 있다. 표고버섯의 erytatenin성분은 콜레스테롤 저하작용(choi 등, 2000), 항암작용(Song 등, 2001), 간 보호작용(Park 등, 2004) 인터페론 생성유발작용(Byrd 등, 2000) 대장암 세포 증식 및 세포사멸 등이 있고(Guillen 등, 2000), 팽이버섯, 입새버섯, 흰송이버섯, 흰목이 버섯도 유사한 활성을 갖고 있다. 영지버섯의 ganoderic acids U, V, W, X, Y, Z와 lucidenic acids 성분은 간암세포를 직접 억제한다는 보고가 있고, C30의 ganoderic acid류, C27의 lucidenic acid류, C24의 lucidone류로 분류된다. 그 외에도 많은 버섯류에서 다양한 물질들이 보고되어져 있으나 새송이버섯은 이용량에 비하면 물질의 연구가 부족한 실정이다.

새송이버섯은 일본에서 개발과 상품화가 처음 이루어졌지만, 현재는 우리나라가 품종개발과 생산시설의 첨단화와 대형화를 함으로써 상품의 품질과 생산량 우위 및 유럽과 구미지역 수출 등으로 기술력과 생산력이 일본을 앞질러 종주국의 역할을 하고 있다. 새송이버섯 산업의 신장은 새송이버섯의 특성에 기인한다.

새송이버섯은 수분함량이 다른 버섯류보다 낮아 유통과 저장성에 장점이 있으며, 비타민 C가 느타리버섯의 7배, 팽이버섯의 10배로 매우 높고, B12는 다른 버섯에 볼 수 없지만 새송이버섯은 함유하고 있고(Kim 등, 2004, Hwang 등, 1998) 무기질 함량도 타 버섯에 비해 높다. 새송이버섯은 맛과 향이 뛰어나고 다양하게 요리 할 수 있어 수요가 계속 늘고 있다. 새송이버섯은 영양학적인 우수성만아니라 생리활성물질의 함유와 기능에 대해서도 보고가 되어지고 있다. 새송이버섯 추출물은 비장세포의 증식을 향상시켜 면역력의 증강작용을 갖고 있으며, 열수추출물은 대장암 세포인 HT-29 및 Caco-2에 처리하여 caspase-3의 활성증가로 세포사멸기작에 의해 세포증식을 억제하는 등의 연구와(Oh 등, 2006) 70% methanol 추출물이 항산화 효과가 있는 것으로도 보고되어졌다.

새송이의 다양한 생리활성 기능은 계속 연구가 이루어져야 하며(Lee 등 1998), 그 근원의 해명도 중요하다. 본 연구에서는 새송이버섯의 용매추출물을 이용하여 항산화 활성과 항혈전활성을 조사하고, 그 물질들을 순수분리하여 화학적인 구조동정을 이루며, 새송이버섯의 새로운 기능성을 찾고, 과학적으로 해명하여 새송이버섯 산업에 기여하고 새송이버섯 농가의 수익증대에 기여하고자한다.

2. 재료 및 방법

가. 새송이버섯과 팽이버섯의 Wax 성분분석

새송이버섯으로부터 wax성분을 얻기 위하여 기업체로부터 새송이버섯의 미이용자원을 공급받아 세절을 하여 60℃ dry oven에서 16시간 완전 건조를 실시한 다

음, 다시 믹스기를 이용하여 분말화 하였다. 분말을 soxhlet 장치로 chloroform과 methanol의 혼합용매로 5시간 추출을 실시하여 wax추출물을 rotary evaporator로서 농축을 하여 새송이버섯 wax추출물을 얻고, 저온에 보관을 하면서 성분분석의 재료로 활용하였다. 성분분석은 새송이버섯과 팽이버섯추출물을 chloroform로 먼저 용해시켜 용해되는 물질을 chloroform용해물로 하고, chloroform 용해물을 정치해두면 상하층으로 분리가 이루어진다. 상층회수물을 chloroform 용해물로 하고, 하층 회수물을 chloroform-1 용해물로 하여 실험을 계속했다. chloroform 용해물을 제외한 wax추출물을 methanol로 재 용해시켜 얻어진 물질을 methanol 용해물로 하였다. 그 나머지는 H₂O로 용해시켜 H₂O 용해물로 하여 다음 실험을 실시하였다.

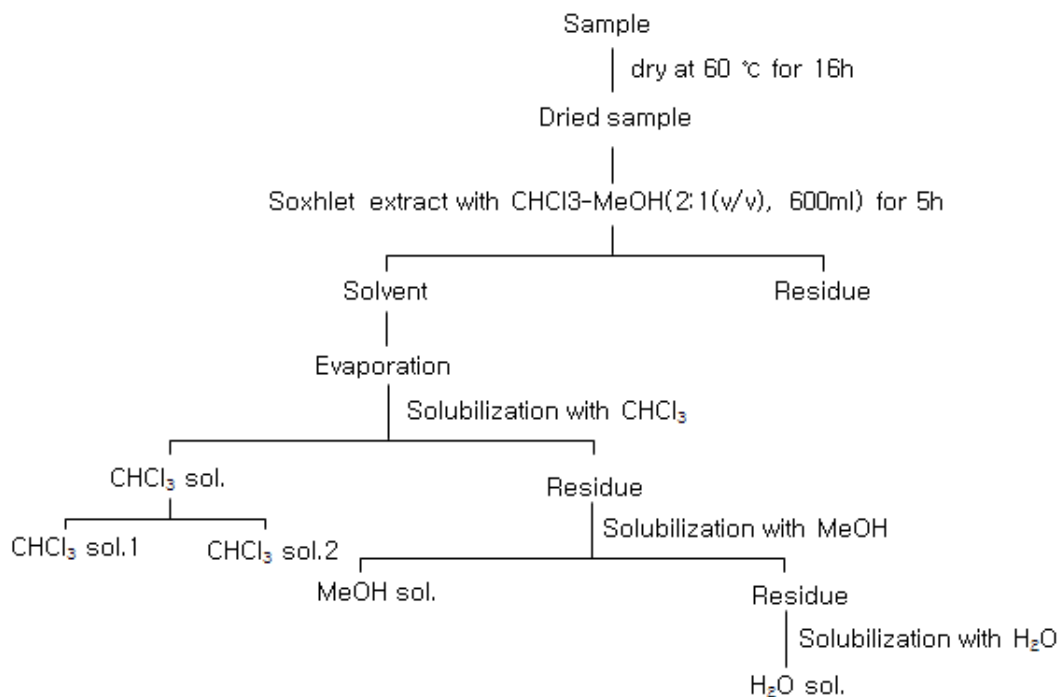


Fig. 11. 새송이버섯으로부터 wax 성분추출

나. 새송이 wax성분의 물질분획과 생리활성 조사

새송이버섯 wax추출물의 물질분리를 위하여 1차 순상 column chromatography를 이용하여 물질을 분획하였다. 컬럼충진물은 순상 silica gel을 이용하였으며, 이동상으로서의 용매조성은 hexane과 EtOAc 비율을 100:0에서 1:1까지 높여가며 106개의 분획물을 얻었다. 얻어진 분획물의 물질 패턴을 알아보기 위하여 TLC를 실시하였으며, 전개용매로는 hexane과 ether(10:1.5)를 이용하였고, 분획물의 물질패턴 확인은 254nm와 365nm로 확인하였다. 확인된 물질의 패턴에 기초하여 이동거리가 비슷한 물질을 그룹으로 하여 9개의 그룹 W1~9로 나누었다. 1차 column 에서 항산화 활성을 보이는 그룹을 이용하여, 2차 순상 column chromatography를

수행하였다. 이때 이동상으로서의 용매의 조성은 hexane과 EtOAc 비율을 100:0에서 1:1까지 높여가며 73개의 분획을 얻었다. 얻어진 분획물에 대한 물질의 패턴 확인은 1차 컬럼에서와 동일한 방법으로 수행하였으며, TLC plate에 DPPH를 spray하여 항산화활성을 조사하였다. 1차 column chromatography의 9개 그룹물질들을 이용하여 항혈전활성을 조사하였다.

항혈전활성은 Thrombin time(TT)측정으로 Thrombotimer 2® 제품을 사용하였으며, Thrombin 1unit(50 μ l/unit)와 분획물 0.02mg/10 μ l DMSO, borate buffer 40 μ l를 cell에 첨가하여 37°C에서 5분간 가온한 후, Fibrinogen 200 μ l을 첨가하여 응고가 될 때까지의 시간을 측정하였다. 대조구로는 시료용해에 사용한 DMSO를 사용하였고, 시료 대조구로는 Aspirin을 사용하여 시료의 항혈전 활성을 측정하였다. 트롬빈 저해에 따른 항혈전 활성은 3회 이상 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며, 시료 첨가후의 응고시간을 용매 대조구의 응고시간으로 나눈 값에 100을 곱하여 %로 나타내었다.

다. 새송이버섯과 팽이버섯의 lignin 산화물 분석

새송이버섯의 hemicellulose를 분리하기 위해서는 lignin을 산화시켜서 제거해야한다. lignin은 다양한 생리활성을 갖는 물질들이 있기 때문에 lignin 산화물에 대한 분석을 실시하였다. 새송이버섯의 미 이용자원을 공급받아 계절을 하여 60°C dry oven에서 16시간 완전건조를 실시한 다음, 다시 믹스기를 이용하여 분말화하였다. 분말을 soxhlet 장치로 chloroform과 methanol의 혼합용매로 5시간 추출을 실시하여 wax추출물을 제거하고, 분말을 60°C dry oven에서 16시간 재 건조하였다. 건조 후 분말을 delignification을 acetic acid와 sodium chloride를 첨가하고 열을 가해서 산화를 시키고 여과하여 산화물을 얻었다(Fig. 12). 새송이버섯과 팽이버섯 리그닌 산화물을 GC/MS를 이용하여 물질을 분석하였다.

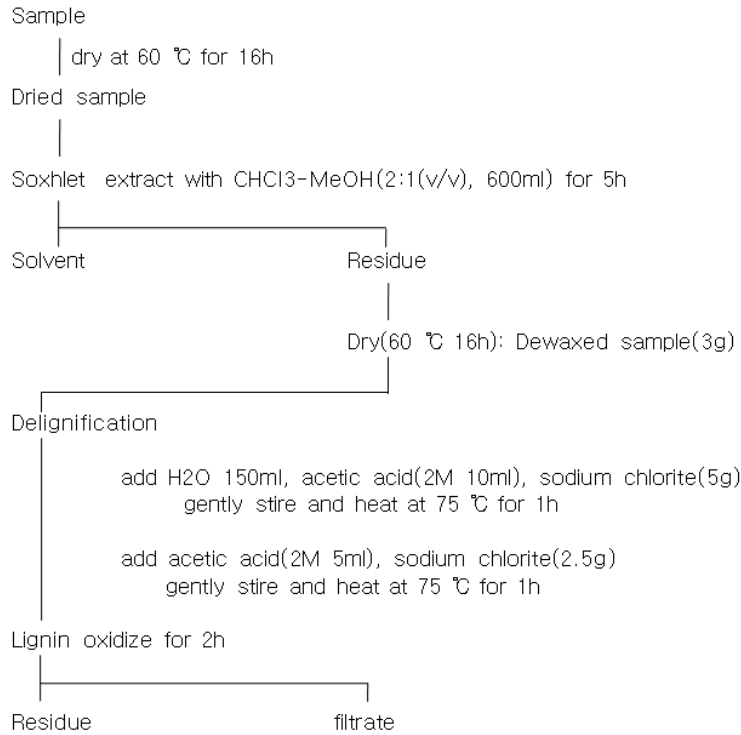


Fig. 12. 새송이버섯 미이용자원으로부터 lignin산화물 추출

라. 유기용매를 이용한 새송이버섯 물질 추출

새송이버섯 미 이용자원을 통풍이 잘되는 그늘진 곳에서 건조를 하고, homogenizer로서 균질화를 시킨 다음 hexane을 새송이버섯 중량의 10배 볼륨을 넣고 진탕추출을 2회 반복하였다. 추출물을 원심분리하여 버섯잔사를 침전시키고, 상등액을 회수하여 농축하고 hexane 추출물로 하여 다음 실험에 이용하였다. 버섯잔사는 건조를 한 후에 ethylacetate 추출을 hexane 추출법과 동일하게 실시하여 ethylacetate 추출물을 얻었다.

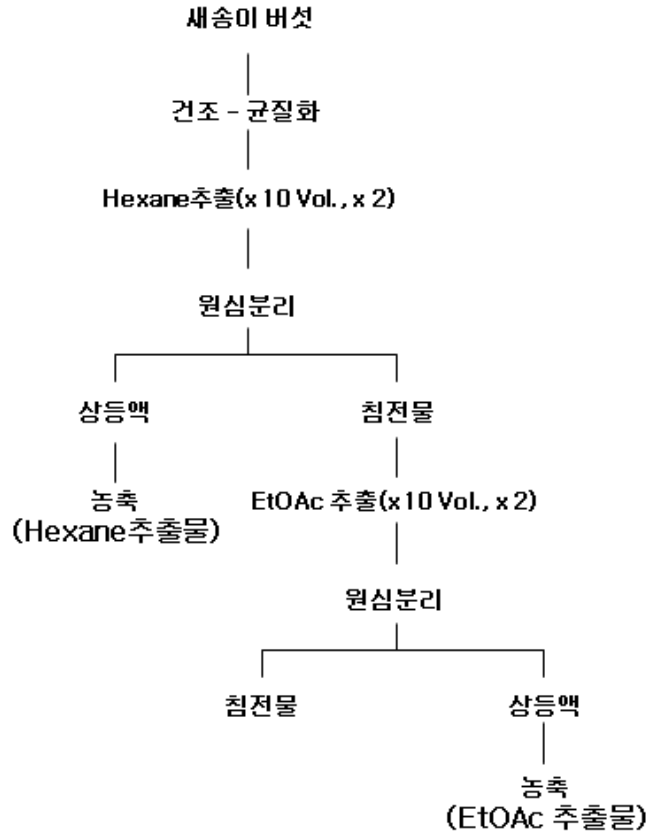


Fig. 13. Hexane과 Ethylacetate를 이용한 새송이버섯 물질추출

마. Hexane 추출물의 column chromatography

Hexane 추출물 5g을 1차 순상 column chromatography를 이용하여 물질을 분획하였다. 컬럼충진물은 순상 silica gel을 이용하였으며, 이동상으로서의 용매조성은 hexane과 EtOAc 비율을 100:0에서 ethylacetate 100%까지 9단계에 걸쳐 극성을 높여가며 103개의 분획물을 얻었다. 얻어진 분획물의 물질패턴을 알아보기 위하여 TLC를 실시하였으며, 전개용매로는 hexane과 ethylacetate(10:1)를 이용하였다. 또한, 분획물 물질패턴확인에는 단파장 자외선등(254nm)과 장파장 자외선등(365nm)으로 확인하였고, 확인된 물질의 패턴에 기초하여 이동거리가 비슷한 물질을 그룹으로 하여 7개의 그룹으로 나누었다. 그룹 5번의 분획물은 2차 순상 column chromatography와 prep. TLC를 통하여 순수분리를 하였다. 각 단계별 물질의 항산화력측정은 DPPH를 이용하여 색의 변화에 따라 확인을 하였다.

바. Hexane추출물의 항혈전활성 측정

Hexane 추출물의 1차 column에서 얻어진 분획물을 이용하여 항혈전활성을 측정하였다. 항혈전활성은 Thrombin time(TT)측정으로 Thrombotimer 2® 제품을 사용하였으며, Thrombin 1unit(50µl/unit)와 분획물 0.02mg/10µl DMSO, borate buffer 40µl를 cell에 첨가하여 37°C에서 5분간 가운한 후, Fibrinogen 200µl을 첨가

하여 응고가 될 때까지의 시간을 측정하였다. 대조구로는 시료용해에 사용한 DMSO를 사용하였고, 시료 대조구로는 Aspirin을 사용하여 시료의 항혈전 활성을 측정하였다. 트롬빈 저해에 따른 항혈전활성은 3회 이상 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며, 시료 첨가후의 응고시간을 용매 대조구의 응고시간으로 나눈 값에 100을 곱하여 %로 나타내었다.

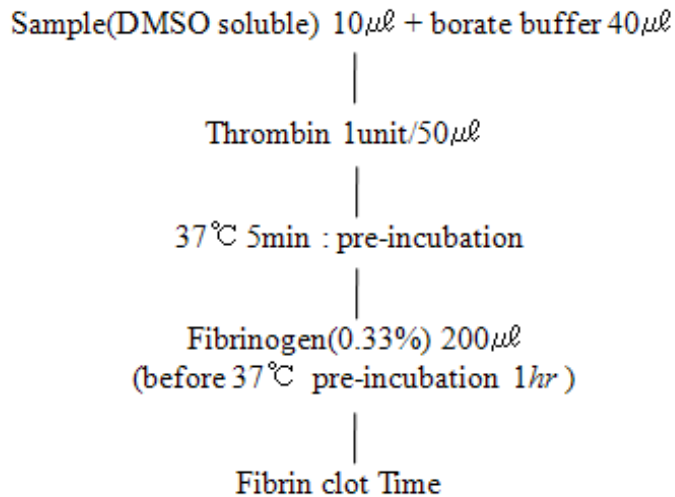


Fig. 14. Hexane 추출물을 이용한 항혈전활성 측정

사. Chloroform과 methanol을 이용한 새송이버섯 물질 추출

새송이버섯 미이용자원을 통풍이 잘되는 그늘진 곳에서 건조를 하고, homogenizer로서 균질화를 시킨 다음 chloroform을 새송이버섯 중량의 10배 볼륨을 넣고, 진탕추출을 2회 반복하였다. 추출물을 원심분리하여 버섯잔사를 침전시키고, 상등액을 회수하여 농축하였다. 농축물을 chloroform 추출물로 하여 다음 실험에 이용하였다. 버섯잔사는 건조를 한 후에 methanol 추출을 chloroform 추출법과 동일하게 실시하여 methanol 추출물을 얻었다.

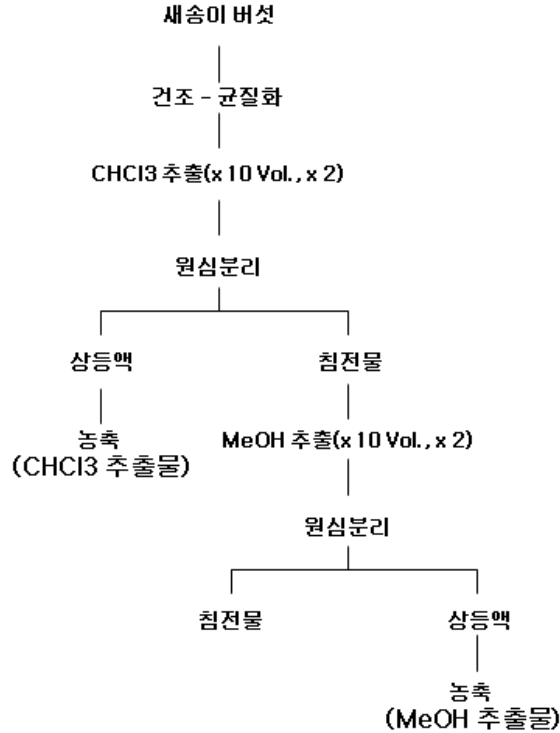


Fig. 15. Chloroform과 methanol을 이용한 새송이버섯 물질추출

아. Chloroform 추출물로부터 향산화물질 순수분리

Chloroform 추출물 5g을 3차 역상 column chromatography를 이용하여 물질을 분획하였다. 컬럼충진물은 역상 silica gel을 이용하였으며, 이동상으로서의 용매 조성은 H₂O와 acetonitrile 혼합비율을 1:100에서 acetonitrile 100%까지 그리고 acetonitrile과 ethylacetate 혼합비율을 100:1에서 1:1까지 9단계에 걸쳐 극성을 낮추면서 110개의 분획물을 얻었다. 얻어진 분획물의 물질 패턴을 알아보기 위하여 TLC를 실시하였으며, 전개용매로는 acetonitrile과 ethylacetate(5:1)를 이용하였다. 또한, 분획물 물질패턴확인에는 단파장 자외선등(254nm)과 장파장 자외선등(365nm)으로 확인하였고, 확인된 물질의 패턴에 기초하여 이동거리가 비슷한 물질을 그룹으로 하여 4개의 그룹으로 나누었다. 그룹 1번의 분획물을 prep. TLC를 통하여 순수분리를 하였다. 각 단계별 물질의 향산화력측정은 DPPH를 이용하여 색의 변화에 따라 확인을 하였다.

자. Methanol 추출물로부터 물질분리

Methanol 추출물 5g을 1차 순상 column chromatography를 이용하여 물질을 분획하였다. 컬럼충진물은 순상 silica gel을 이용하였으며, 이동상으로서의 용매 조성은 hexane, EtOAc, MeOH, H₂O를 각각 두 용매를 혼합하며 11단계에 걸쳐 극성을 높여가며 102개의 분획물을 얻었다. 얻어진 분획물의 물질 패턴을 알아보기 위하여 TLC를 실시하였으며, 전개용매로는 hexane과 ethylacetate(3:2)를 이용하였다.

또한, 분획물 물질패턴확인에는 단파장 자외선등(254nm)과 장파장 자외선등(365nm)으로 확인하였고, 확인된 물질의 패턴에 기초하여 이동거리가 비슷한 물질을 그룹으로 하여 8개의 그룹으로 나누었다. 분획물의 항산화력측정은 DPPH를 이용하여 색의 변화에 따라 확인을 하였다.

차. 새송이버섯과 발효 새송이버섯의 성분분석

새송이버섯 미 이용부분을 회수하여 협동과제에서 미생물로 발효를 시킨 후 동결건조를 하고, chloroform과 methanol로 물질을 추출하여 GC/MS로서 미생물처리하지 않은 것과 물질을 비교 분석하였다.

3. 연구결과

가. 새송이 버섯과 팽이버섯의 Wax 성분분석

새송이버섯의 미 이용 자원부분으로부터 다당류를 얻기 위하여, chloroform : methanol(2:1, V:V) 혼합용매로 추출을 하면 버섯류의 wax를 제거할 수 있다. 혼합용매 추출물을 농축한 다음, 각 용매로서 용해물을 얻고, 각 용해물-1은 추출물을 각 용매로서 용해를 시킨 후 정치시키면 상층과 하층으로 구분이 되었는데 하층을 각 용해물-1로 했다. 각 용해물의 물질을 확인하기위해 TLC전개를 실시한 결과 origin부터 Rf 0.9까지 다양한 물질들을 확인할 수 있었다. 특히 chloroform 용해물에서 많은 물질들이 확인되어졌고, short wave와 long wave에 다양한 물질들이 나타났다. 그리고 C는 DPPH를 이용한 항산화활성을 조사한 것으로서 새송이버섯과 팽이버섯의 chloroform 추출물에서 항산화활성이 많이 나타났으며, 팽이버섯의 chloroform 추출물에서는 항산화활성이 높게, 다양하게 나타나 항산화 활성을 이용한 기능성 소재로서의 개발가능성이 높다.

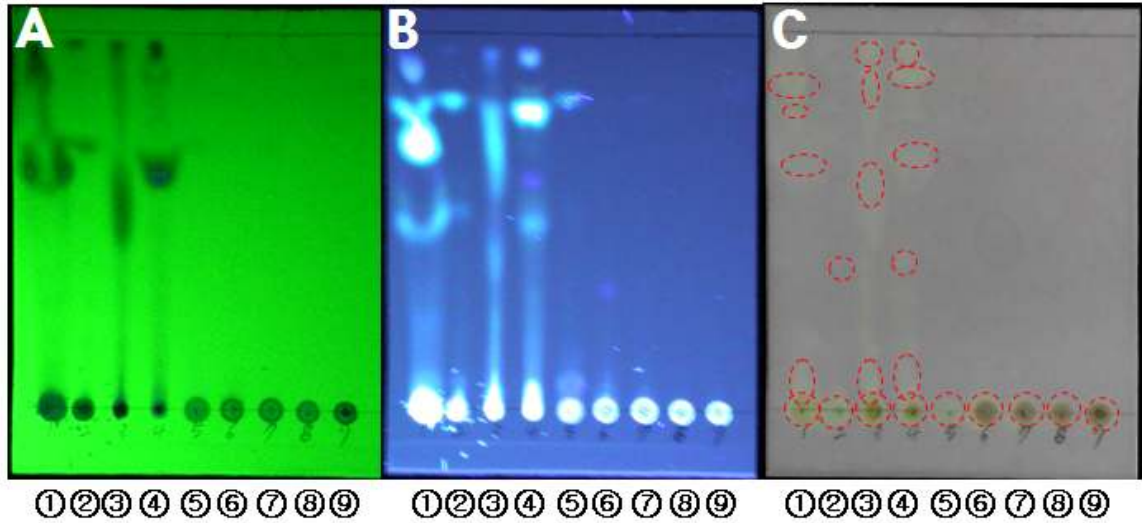
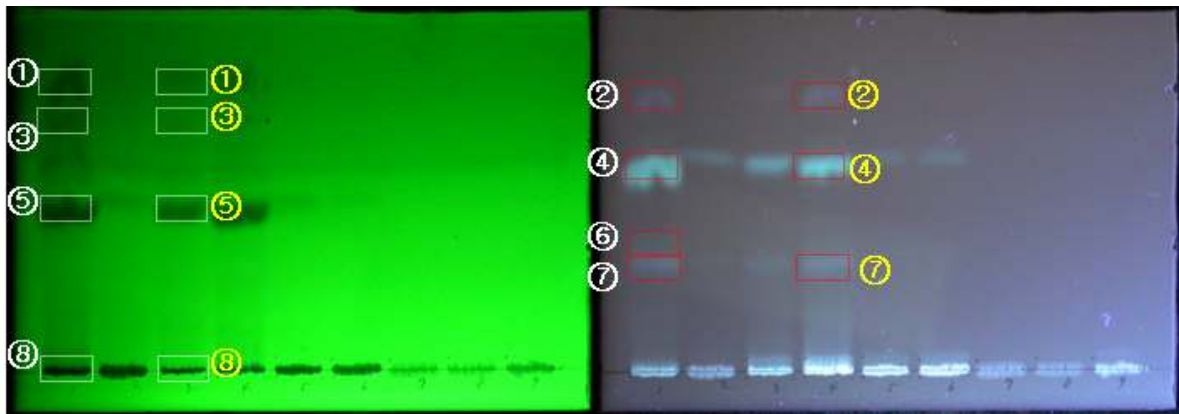


Fig. 16. 새송이버섯과 팽이버섯 용매추출물의 TLC 전개

A: Short wave, B: long wave, C: 항산화활성; Sample 1: 새송이버섯 추출물의 CHCl_3 soluble, 2: 새송이버섯 추출물의 MeOH soluble, 3: 팽이버섯 추출물의 CHCl_3 soluble, 4: 팽이버섯 추출물의 CHCl_3 -1 soluble, 5: 팽이버섯 추출물의 MeOH soluble, 6: 팽이버섯 추출물의 MeOH-1 soluble, 7: 새송이버섯 추출물의 H_2O soluble, 8: 새송이버섯 추출물의 H_2O -1 soluble, 9: 팽이버섯 추출물의 H_2O soluble.

Fig. 17은 새송이버섯과 팽이버섯의 용매추출물의 구성성분을 조사하기 위하여 TLC를 실시한 다음 물질을 회수하여 GC/MS분석을 실시하였다. 같은 R_f 값의 물질들이 다른 물질로 확인이 되어졌고, R_f 0.37의 benzoic acid는 새송이버섯에서만 나타났다.

A



B

Sample No.	TLC <i>R_f</i>	Compound	
		새송이버섯	팽이버섯
1	0.87	Octamethyl cyclotetra siloxane	Gentisic acid Tritms
2	0.8	Dehydroiridodial	Methyl oleate
3	0.72	Tetramethyl phosphinic amide	Cyclohexyl butyl phthalate
4	0.59	Isocineole	Cineole
5	0.48	Palmitic acid	Linoleic acid
6	0.37	Benzoic acid	-
7	0.3	Oleic acid	Terpineol
8	0.0	Linoleic acid, Glycerol	Glycerol

Fig. 17. 새송이버섯과 팽이버섯 용매추출물의 성분비교

A: TLC전개 후 UV short wave와 Long wave에서 확인한 물질 pattern, B: TLC에서 회수한 물질의 GC/MS 분석결과.

나. 새송이버섯 wax추출물의 물질분리

1) 1차 column chromatography

새송이버섯 chloroform 추출물을 hexane, ethylacetate, methanol 혼합용매를 이용하여 1차 silicagel column에서 106개의 fraction을 얻었다. 물질의 용출 pattern(Fig. 18)을 TLC 전 후에 UV 254nm와 365nm에서 확인을 한 결과 물질의 분리가 양호하게 이루어졌으며, 물질의 성질이 비슷한 것으로 9개의 그룹으로 나누어 회수를 했다. TLC plate에 DPPH를 이용한 항산화활성을 조사한 결과 Fig. 18의 A사진 Rf 0.9와 0.85(붉은 타원표시부분)부근에서 항산화활성이 나타났으며, B사진의 붉은 타원으로 표시한 부분에서도 항산화활성이 나타났다. 새송이 버섯의 유기용매 추출물에서 항산화물질을 얻을 수 있음을 확인했다.

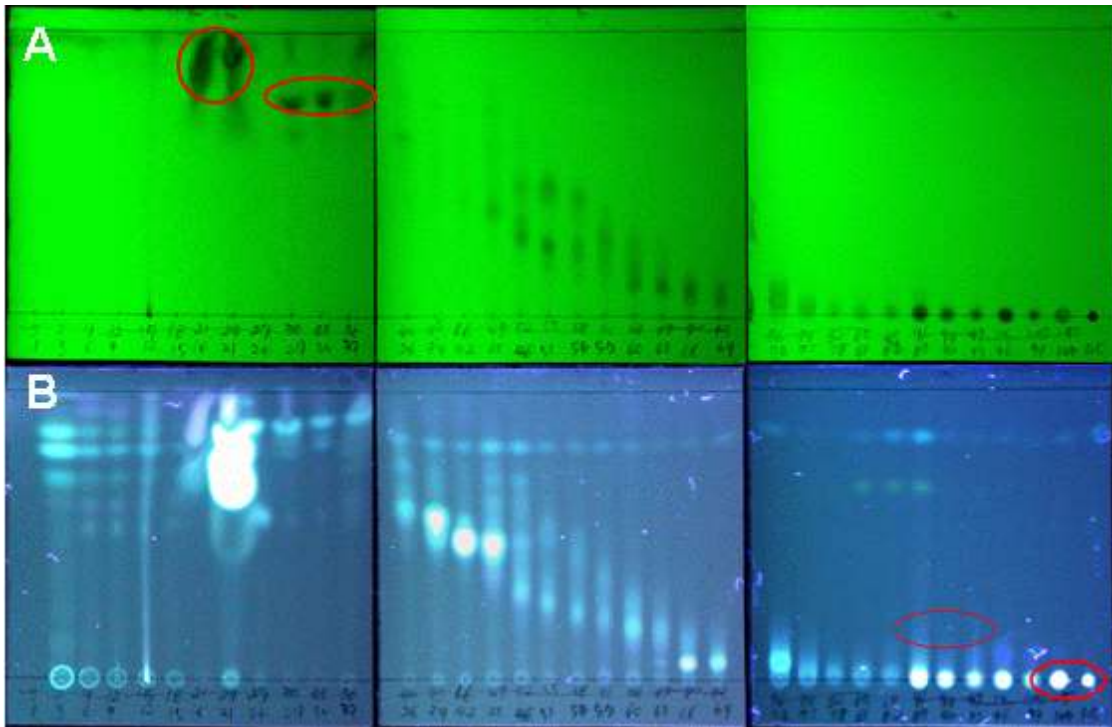


Fig. 18. 새송이버섯 chloroform 추출물의 1st column chromatography.

A: Column 분획물의 TLC전개 후 UV short wave에서의 물질 pattern, B: TLC전개 후 Long wave에서 확인한 물질 pattern.

2) 2차 column chromatography

1차 column에서 회수한 2번 그룹, 항산화 활성이 나타나는 부분을 hexane, ethylacetate 혼합용매를 이용한 2차 column을 실시하여 73개의 fraction을 얻었다. 물질의 용출 pattern을 TLC 전개 후에 UV254nm와 365nm에서 확인을 한 결과를 Fig. 19의 A, B에 나타냈으며, C는 DPPH를 이용한 항산화활성을 조사한 것으로 흰색을 띄는 부분이 항산화효과를 나타내는 부분이다. Rf 07과 Rf 0.37에서 가장 강력한 항산화 활성을 나타냈다.

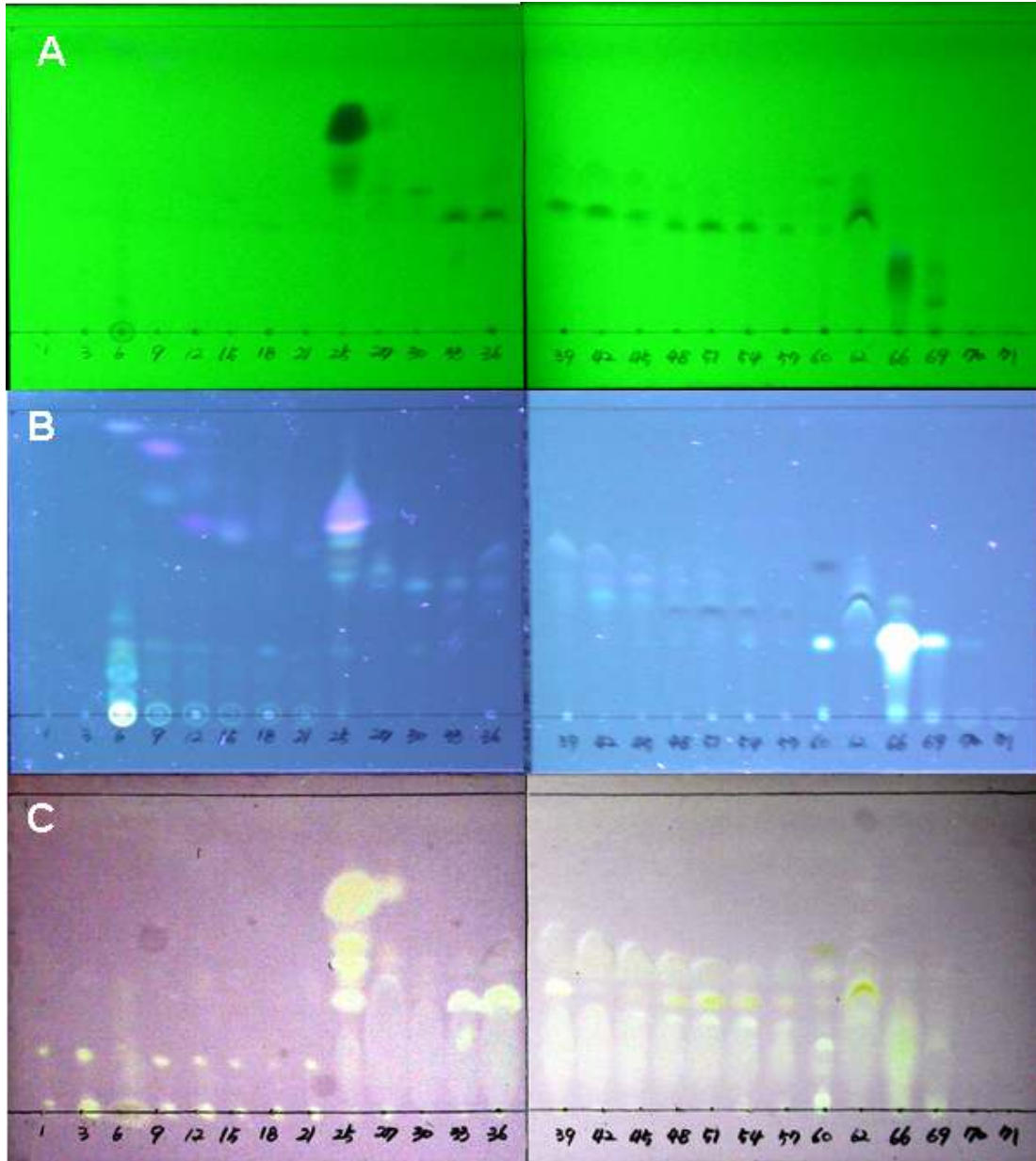


Fig. 19. 새송이버섯 chloroform 추출물의 2차 column chromatography

A: Column 분획물의 TLC전개 후 UV short wave에서 확인한 물질 pattern, B: TLC전개 후 Long wave에서 확인한 물질 pattern, C: DPPH를 이용한 항산화활성 확인

3) 새송이버섯 Wax추출물의 항혈전활성

1차년도 cellulose와 hemicellulose 추출과정에서 생성된 wax층의 물질을 조사하기 위하여 column chromatography 실시하였다. column 후에 얻어진 분획물 106개를 TLC전개 후에 물질의 성질이 유사한 것을 9개 그룹으로 나누어 항혈전활성을 측정하였다. 그 결과 Rf 0.5(W-6)의 물질과 start line(W-8, W-9)의 물질에서 강한 활성을 나타냈고(Fig. 20), 세 그룹의 물질은 short wave와 long wave에 형광을 나

타내는 물질이었다. W-5, W-8, W-9의 물질은 0.02mg 처리에도 aspirin 0.5mg을 처리한 것과 활성도가 비슷하게 나타났으므로 항혈전활성이 아주 높은 것으로 나타났다.(Fig. 20)

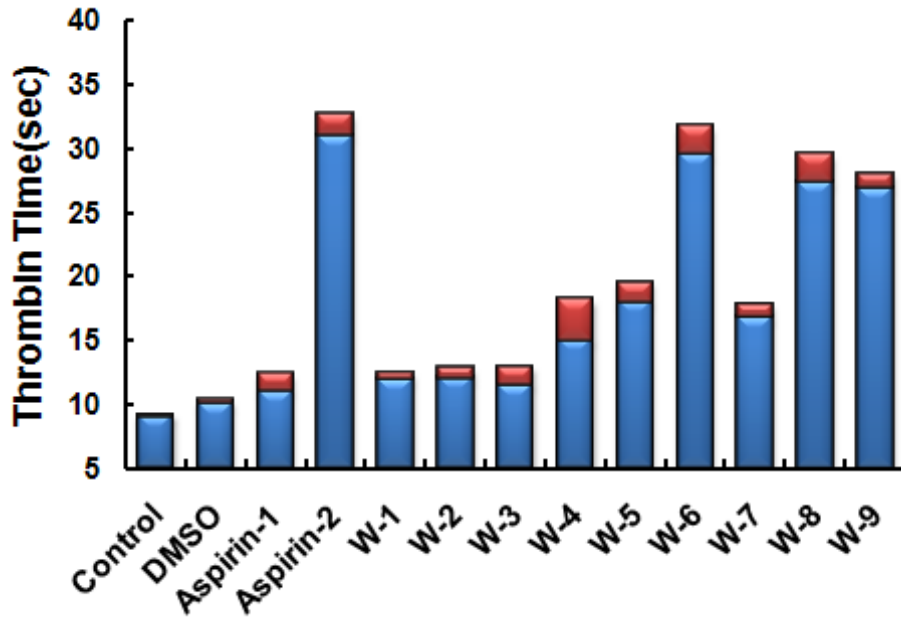


Fig. 20. 새송이버섯 wax층을 1차 column chromatography 후에 회수한 분획물의 항혈전활성.
 Aspirin-1: 0.2mg 처리, Aspirin-2: 0.5mg 처리, W-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: 0.02mg 처리

다. 새송이버섯과 팽이버섯의 lignin 산화물 분석

새송이버섯과 팽이버섯의 Hemicellulose 추출과정에 lignin을 산화하여 제거하는 과정이 있다. 이때 산화되어진 lignin 부분을 ethylacetate로 추출하여 GC/MS로 분석한 결과를 새송이 분석결과는 Table 1에 팽이버섯의 분석결과는 Table 2에 나타냈다. 새송이의 lignin 산화물의 용매추출물에서는 13종 이상의 물질이 확인되었고, 팽이버섯의 lignin산화물 추출물에서는 4종류의 물질이 확인 되어졌다. 이것은 새송이버섯 자실체의 갖에 함유되어져있는 lignin계통의 화합물에서 기인된 것으로 보여지며 다양한 유기산 화합물들을 볼 수 있다.

Table 1. 새송이버섯 lignin 분획물 GC/MS분석

Retention time (min)	물 질 명	함량 (%)
4.243	Benzene, 1, 3-dimethyl	0.39
8.142	9-Octadecenoic acid	65.07
9.755	Propanoic acid, 2-methyl	1.23
10.495	Pentadecanoic acid	1.24
10.958	Hexadecanoic acid	6.30
11.743	Propanoic acid	3.05
12.912	Hexanoic acid	8.47
14.018	Heptanoic acid	0.71
15.071	Octanoic acid	1.78
16.079	Nonanoic acid	2.72
16.294	Pentanedinitrile	1.04
18.657	Benzene acid	3.13
20.041	Benzeneacetic acid	4.88

Table 2. 팽이버섯 lignin 분획물 GC/MS분석

Retention time(min)	물 질 명	함량 (%)
4.243	Acetic acid	49.92
8.142	methyl dihydromalvalate	38.22
9.755	Benzeneacetic acid	3.51
10.495	Hexadecanoic acid	8.36

라. 유기용매를 이용한 새송이버섯 물질추출

새송이버섯의 생리활성물질을 조사하기 위하여 Hexane과 EtOAc를 이용하여 추출을 실시하였다. 먼저 Hexane을 이용한 반복 추출한 다음 여과로서 용매와 버섯잔사를 분리하고 용매는 감압농축으로 완전히 용매를 제거하고 hexane추출물로 사용을 하였다. 잔사에 다시 ethylacetate를 첨가하여 반복추출로 hexane과 동일하게 실시하여 추출물을 얻었다. 완전히 농축한 각각의 농축물에 사용한 용매를 이용하여 용해되어지는 것과 불용인 것으로 용매분획을 한 뒤 Hexane추출물-1, 2, Ethylacetate 추출물-1, 2로 하여 다음 실험의 시료로 사용하였다.(Fig. 21) 각각의 추출물을 TLC를 실시하여 물질의 양상을 확인한 결과 Fig. 21에 나타냈으며, hexane 추출물의 1, 2에서 물질의 pattern 차이는 볼 수 없었으나, long wave(365nm)에서 물질 pattern을 확인한 결과 Rf 0.61, 0.38, 0.1 그리고 start line에서 강력한 발광이 되어지는 spot을 확인할 수 있었다. Ethylacetate 추출물에서도 UV에 의한 물질 pattern에서는 큰 차이가 없었다. 항산화활성을 조사하기 위하여 DPPH를 이용하여 조사하였다. 그 결과 hexane추출물 1과 2에서 동일한 Rf에서 항산화활성을 확인할 수 있었다. Rf 0.9, 0.77, 0.2~0.58, 0~0.2까지 광범위하게 항산화활성이 나타났다. 특히 Rf 0.2에서 0.58까지는 강력하게 나타났으며, short wave와 long wave에서 물질도 확인이 되어짐으로 항산화물질의 개발연구에 가능성을 나타내고 있다. Ethylacetate 추출물에서도 Rf 0.28과 start line에 항산화활성이 나타나지만 hexane 추출물에는 크게 미치지 못하고, 3번 line의 Rf 0.28물질은 hexane 추출물의 잔여물로 여겨진다.

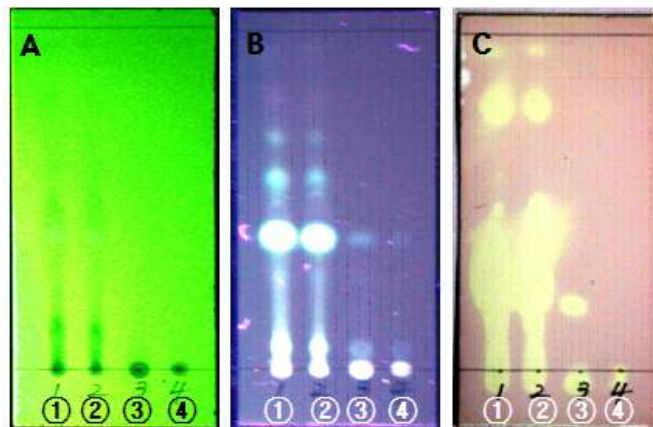


Fig. 21. 새송이버섯 Hexane추출물과 Ethylacetate추출물의 항산화효과

A: Short wave에서 확인된 추출물의 물질, B: Long wave에서 확인된 추출물의 물질, C: DPPH를 이용한 추출물의 항산화활성, ①: Hexane추출물-1, ②: Hexane추출물-2, ③: Ethylacetate추출물-1, ④: Ethylacetate추출물-2

마. 새송이버섯 hexane 추출물에서 항혈전물질 순수분리

1) 1차 column chromatography

Hexane 추출물에서 강력한 항산화 활성이 나타남으로서 물질분리를 위한 목적으로 column chromatography를 실시하였다. 1차 column은 normal phase 로서 용출용매는 hexane과 ethylacetate 농도구배로 실시했으며, 마지막에 methanol로 용출을 실시하였다. 총 103개의 분획을 얻었으며, TLC에서 물질의 Rf와 UV 확인양상에 따라 그룹을 7개로 나누어 회수를 하였다. Fig. 22의 C에 흰색막대로 group을 표시하고 있으며, 전 group에서 항산화활성을 확인 할 수 있었다. Rf 0.38의 물질은 short wave에서 특이하게 푸른색의 형광을 띄었고, long wave에서도 아주 강한 형광을 나타냈다. 회수 group 2의 Rf 0.5에서도 강한 형광을 나타냈다. 회수그룹 1의 Rf 0.3의 물질은 UV에서 확인이 되지 않았지만 항산화활성을 볼 수 있었다.

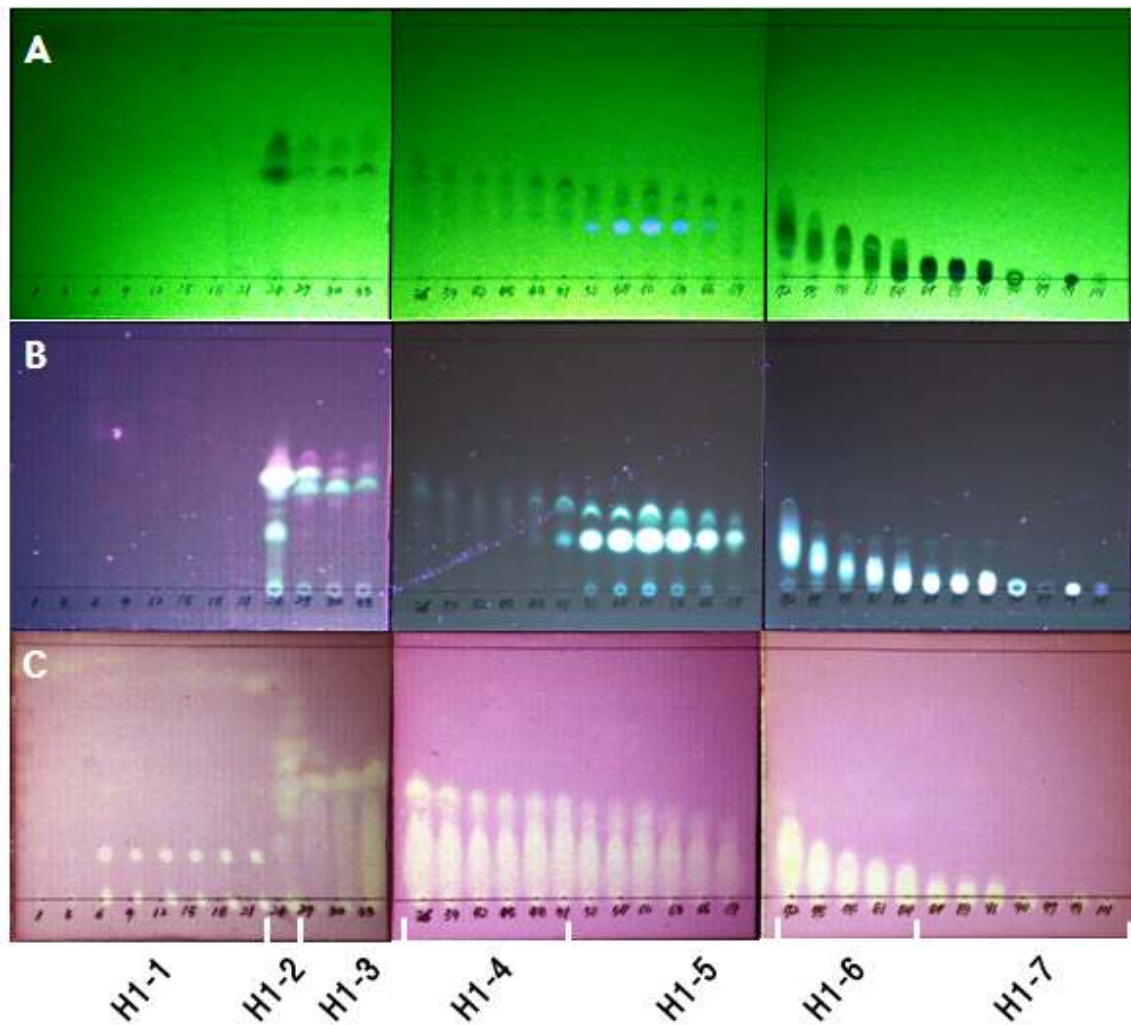


Fig. 22. 새송이버섯 Hexane추출물의 1차 column의 물질분리 pattern

A: Short wave에서 확인된 분획물의 물질 pattern, B: Long wave에서 확인된 분획물의 물질 pattern, C: DPPH를 이용한 항산화활성

2) Hexane 추출물 1차 column 후의 항혈전활성

Hexane 추출물이 항산화활성이 뛰어나 구성성분 및 항산화물질을 순수분리하기 위하여 column chromatography를 실시하였으며, 얻어진 fraction으로 항혈전활성을 조사하였다. 항혈전활성은 Thrombin Time을 측정하여 조사하였으며, 대조구로는 aspirin을 사용하였다. 그 결과는 Fig. 23에 나타냈으며, aspirin-1은 0.2mg 처리구이고, aspirin-2는 0.5mg 처리를 했다. 새송이버섯 추출물의 column 분획물은 각각 0.02mg 처리하여 Thrombin time을 측정하였다. 그 결과 Aspirin 0.2mg 처리한 곳에서는 무처리의 control과 시료용해 용매로 사용한 DMSO보다 약간 늦게 fibrin이 형성되어졌고, 0.5mg을 처리한 곳에서는 control보다 3배 늦게 fibrin이 형성되어졌다. Column 회수물 H1-1과 -2는 DMSO와 차이가 없었고, 회수물 H1-3, -4, -5, -7에서는 아주 강력한 항혈전활성을 나타냈다. *Rf* 0.38에 강한 형광을 나타내는 물질 회수물 H1-5번은 control 보다 약 3.7배의 활성을 보였고, aspirin보다 25배의 적은 양(0.02mg)을 처리했지만 활성은 더 높게 나타났다. 반복실험에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었으며, 회수물 H1-4번에서는 control보다 2.6배, 회수물 H1-7번에서는 2.7배의 높은 활성을 확인할 수 있었다. 현재 물질의 순수분리와 활성측정을 동시에 해나가고 있다.

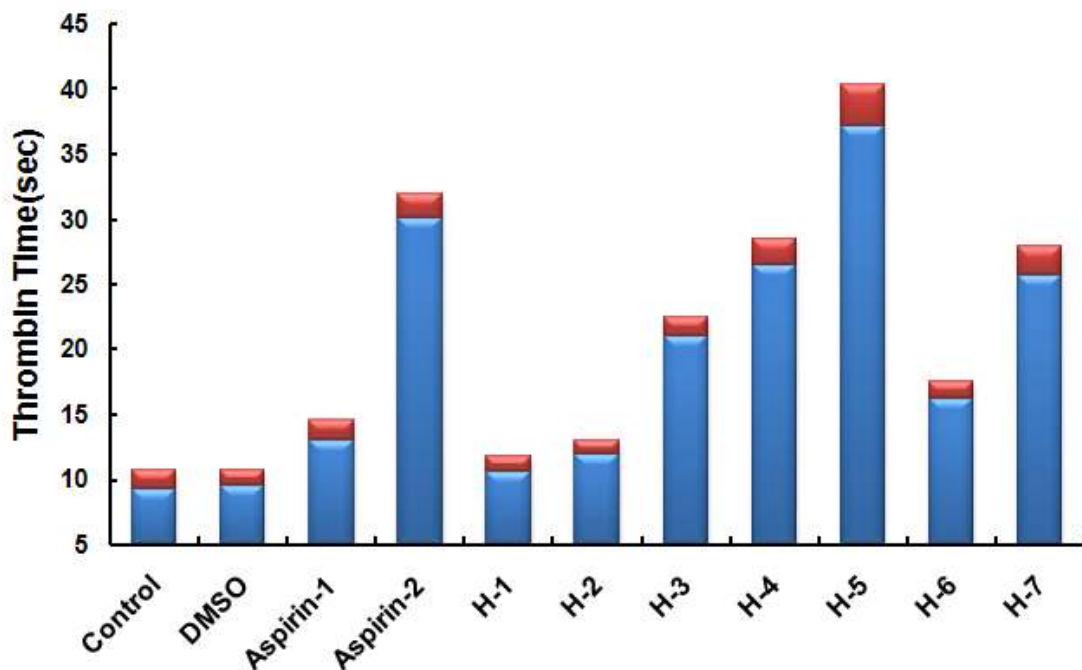


Fig. 23. 새송이버섯 Hexane추출물의 1차 column 분획물의 항산화활성

Control: H₂O 처리, DMSO: 시료용해 용매 처리, Aspirin-1: 0.2mg 처리, Aspirin-2 0.5mg 처리, H-1: Hexane 추출물 1차 column의 회수물 1 0.02mg 처리, H-2: Hexane 추출물 1차 column의 회수물 2의 0.02mg 처리, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7은 각각 column 회수물 0.02mg 처리

3) 2차 column chromatography

Hexane 추출물 1차 column chromatography에서 항혈전활성이 뛰어난 H1-5를 사용하여 2차 column chromatography를 실시하였으며, 얻어진 fraction으로 항혈전활성을 조사하였다. 항혈전활성은 Thrombin Time을 측정하여 조사하였으며, 대조구로는 aspirin을 사용하였다. 그 결과는 Fig. 24에 나타냈으며, aspirin-1은 0.2mg 처리, aspirin-2는 0.5mg 처리를 했고, 새송이버섯 추출물의 2차 column 분획물들은 0.02mg씩 처리하여 측정하였다. 그 결과 aspirin 0.2mg 처리한 곳에서는 무처리의 control과 시료용해 용매로 사용한 DMSO보다 152% fibrin 형성이 저해되어졌고, 0.5mg을 처리한 곳에서는 fibrin이 형성되어지지 않았다. Column 회수물 전체에서 대조구와 비교했을 때 활성이 높게 나타났으며, 분획 회수물 H2-1과 H2-2는 225%와 285%로 다소 낮은 thrombin 저해 활성을 보였으나, H2-3, -6, -7에서는 각각 520%, 552%, 532%의 thrombin 저해활성을 나타냈고, *Rf* 0.2 근처 형광물질이 주 성분인 H2-4와 H2-5 분획물에서는 0.02mg 처리에 fibrin이 형성되어지지 않는 아주 강력한 항혈전활성을 나타냈다. 따라서 2차 column chromatography 회수 그룹 H2-4와 H2-5를 다음 분리과정으로 TLC를 실시하였다.

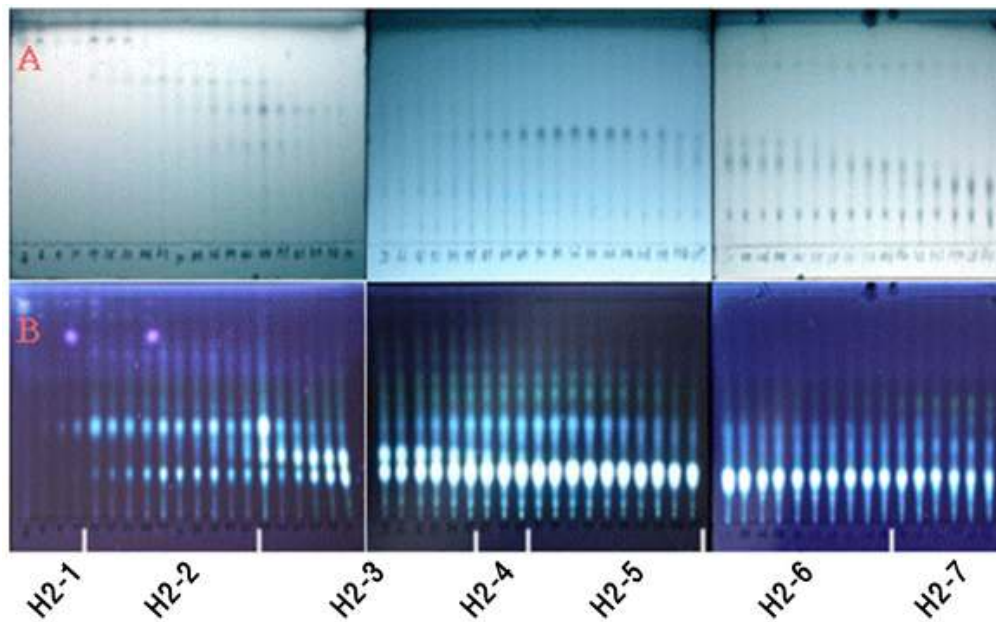


Fig. 24. 새송이버섯 Hexane추출물의 2차 column의 물질분리 pattern

A: Short wave, B: Long wave

Table 3. 새송이버섯 Hexane추출물의 2차 column 분획물의 항혈전활성

Treatments	Treat amount(μ g)	Inhibition(%)
H ₂ O	–	100
DMSO	–	100
Aspirin	500	n.c
	200	152
H2-1	20	225
H2-2	20	285
H2-3	20	520
H2-4	20	n.c
H2-5	20	n.c
H2-6	20	552
H2-7	20	532

n.c: not coagulation

4) H2-4, 5 항혈전활성 물질의 TLC 분리

2차 column chromatography에서 항혈전활성이 뛰어난 H2-4, 5를 사용하여, TLC 전개 후, 8개 band로 분리 회수하여 용출시켰다. 대조구와 시료는 1차 column 회수물과 같은 양을 처리하여 항혈전활성을 조사하였다. 그 결과 Aspirin 0.2mg 처리한 곳에서는 무처리의 control과 시료용해 용매로 사용한 DMSO보다 162% fibrin 형성이 저해되어졌으며, TLC band 회수물 전체에서 대조구과 비교했을 때 활성이 높게 나타났다. 분획 회수물 H3-1과 2는 266%와 275%로 다소 낮은 thrombin 저해 활성을 보였고, 6, 7, 8에서는 각각 417%, 603%, 610%의 thrombin 저해활성을 나타냈으며, H3-3(*Rf* 0.45), -4(*Rf* 0.51), -5(*Rf* 0.59)의 화합물은 0.02mg 농도에서 thrombin 효소 저해활성을 완전히 저해함으로서 fibrinogen에서 fibrin으로의 반응이 일어나지 않았다. 새송이버섯으로부터 강력한 항혈전활성을 갖는 물질 3종류를 얻었다.

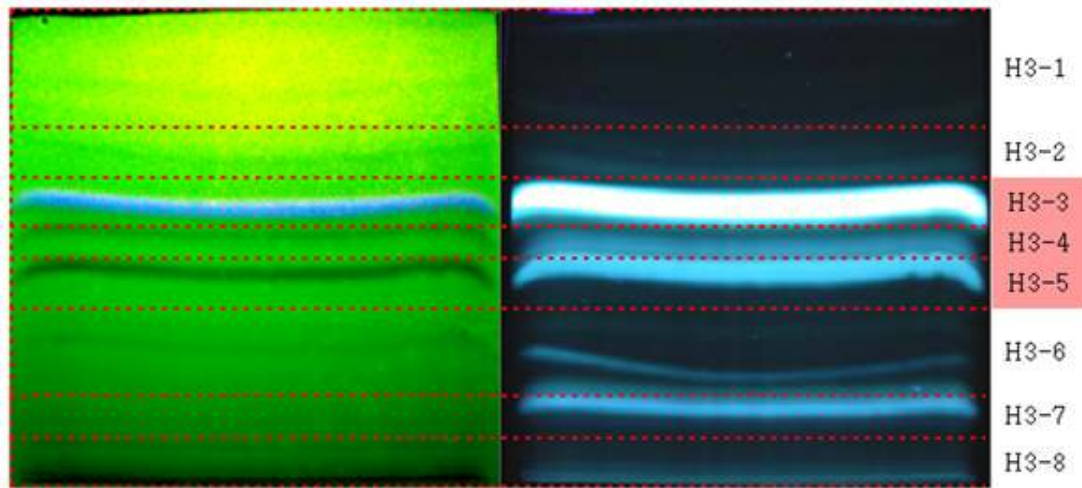


Fig. 25. 새송이버섯 Hexane추출물 H2-4, H2-5의 TLC 분리

Table 4. 새송이버섯 Hexane추출물 TLC band 회수물의 항혈전활성

Treatments	Treat amount(μg)	Inhibition(%)
H ₂ O		100
DMSO		100
Aspirin	400	n.c
	200	162
H3-1	20	266
H3-2	20	275
H3-3	20	n.c
H3-4	20	n.c
H3-5	20	n.c
H3-6	20	417
H3-7	20	603
H3-8	20	610

n.c: not coagulation

5) 항혈전활성물질 H3-3의 순수분리

새송이버섯 Hexane 추출물의 1차 column 회수물 5를 normal phase로 2차 column을 실시한 다음, 3차로 TLC를 실시하여 R_f 0.3에서 나타나는 물질을 순수하게 분리하였다(Fig. 26). 물질의 구조와 특성을 알아보기 위하여 현재 기기분석과 bioassay를 실시하고 있다.

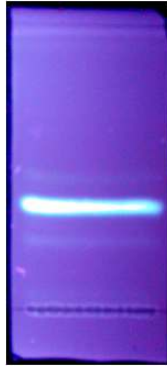


Fig. 26. 새송이버섯 UV long wave 형광물질의 순수분리

6) 항혈전활성물질 H3-3 동정

새송이버섯 hexane추출물 항혈전활성물질 중의 H3-3을 순수분리 하여 GC/MS를 분석한 결과, 분자량 130의 2-ethylhexanol로 확인이 되어졌다.

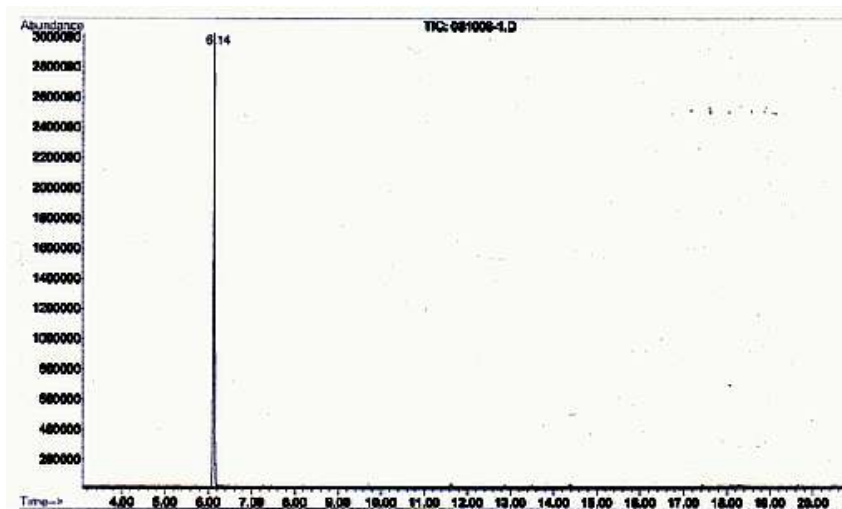


Fig. 27. 새송이버섯 hexane 추출물 H3-3의 GC/MS분석

바. Chloroform추출물에서 항산화물질 순수분리

1차년도에 chloroform으로 먼저 새송이버섯을 추출하고, 잔사를 methanol로 추출하여 사용한 것으로 1차, 2차는 순상컬럼을 실시하여 분리하고, 3차는 역상컬럼을 실시하였다. 역상컬럼에 사용한 용매는 H₂O : CH₃CN : EtOAc 조합으로 극성을 낮추어가며 110개의 분획물을 얻었다. 물질분리 pattern은 Fig. 28에 나타냈으며, TLC Rf 치가 유사한 물질과 long wave에 형광을 나타내는 물질을 기준으로 4개의 그룹으로 회수를 하였으며, DPPH를 이용하여 항산화 활성을 조사하였고 그 결과는 Fig. 28 A에 나타냈다. 회수그룹 1번의 항산화물질은 TLC를 반복하여 순수하게 분리하였으며, 항산화활성을 조사한 것은 Fig. 29에 나타냈다. Rf 0.55에 단일성분으로서 항산화 활성을 확인할 수 있었다. 분리한 물질은 다양한 생리활성 검정과 구조동정에 이용하고 있다.

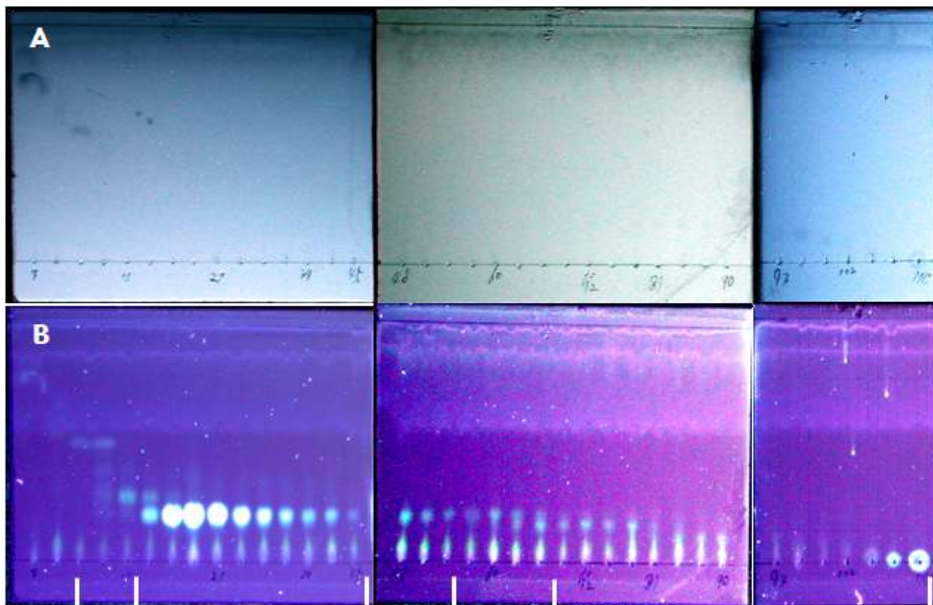


Fig. 28. 새송이버섯 CHCl₃ 추출물의 3차 column chromatography

A: UV short wave에서 확인된 물질 pattern, B: Long wave에서 확인된 물질 pattern

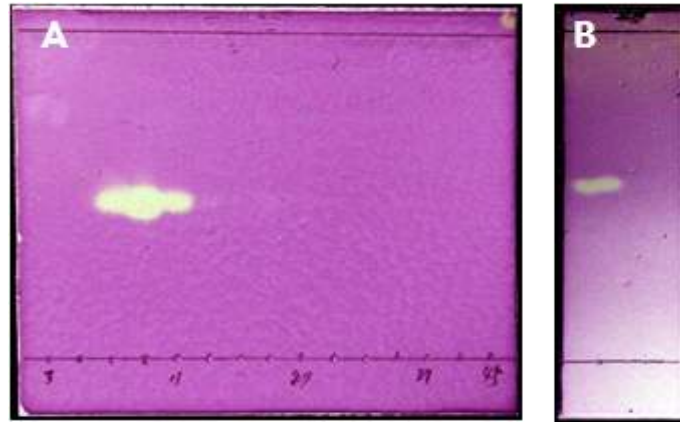


Fig. 29. 새송이 CHCl_3 추출물로부터 항산화물질의 순수분리

A: 3차 column 분획물에 대한 항산화활성, B: 순수분리한 항산화물질과 항산화 활성

사. Methanol 추출물로부터 물질분리

새송이버섯의 생리활성물질을 조사하기 위하여 chloroform으로 먼저추출을 한 다음 잔사에 methanol을 이용하여 새송이버섯의 추출물을 얻어 methanol추출물로 하고 다음 실험에 이용하였다. 다른 용매의 추출물에서도 다양한 생리활성을 나타냄으로서 methanol 추출물도 물질분리를 위한 목적으로 column chromatography를 실시하였다. 1차 column은 normal phase 로서 용출용매는 hexane과 ethylacetate 농도구배, ethylacetate와 methanol 농도구배로 실시했으며, 마지막에 H_2O 로 용출을 실시하였다. 총 102개의 분획을 얻었으며, TLC에서 물질의 R_f 와 UV 확인양상에 따라 그룹을 8개로 나누어 회수를 하였다. Fig. 30의 C에 검은색막대로 group을 표시하고 있으며, group 6, 7, 8에서 항산화활성을 확인 할 수 있었다. start line의 group 8에서 강한 항산화활성을 확인할 수 있었다.

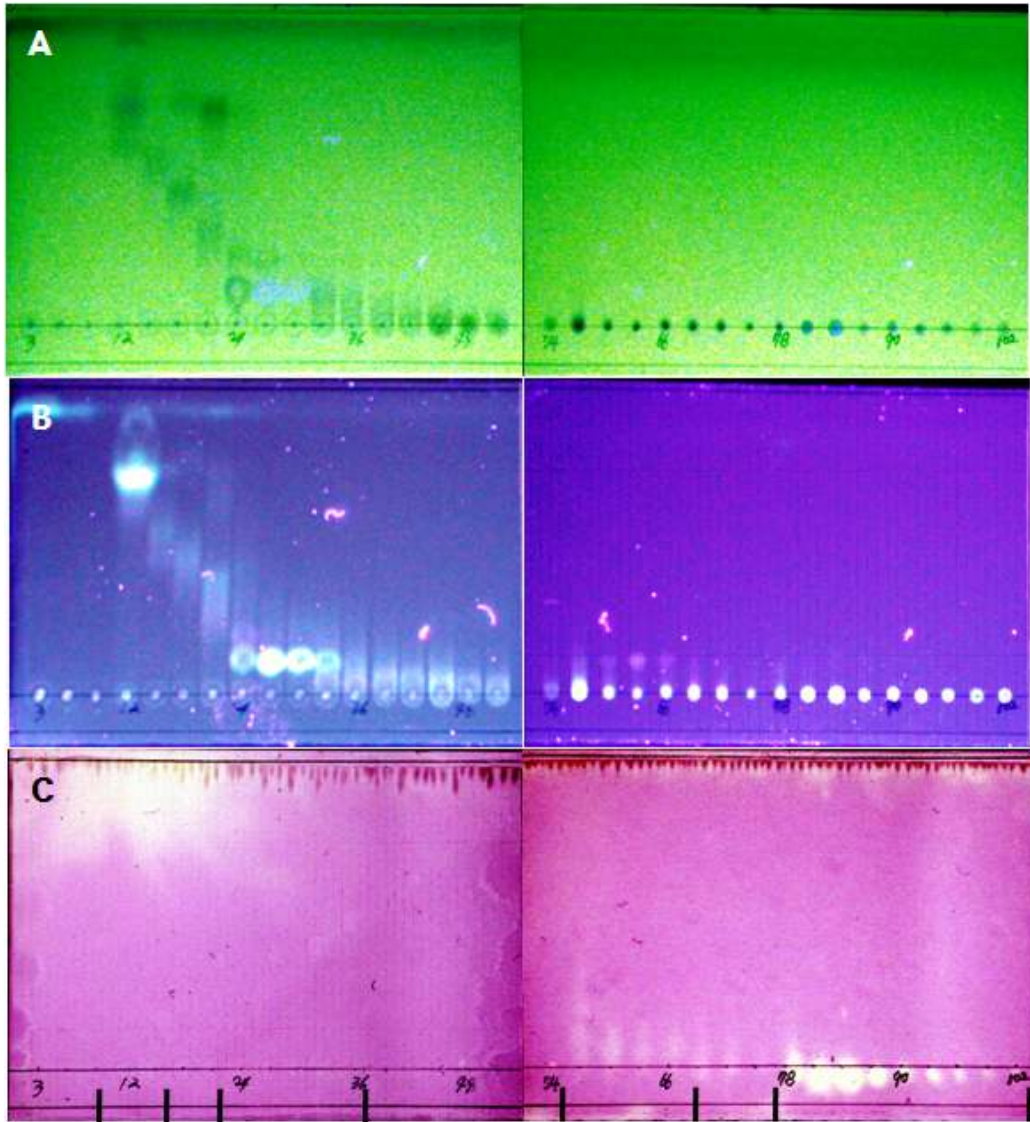


Fig. 30. 새송이 MeOH 추출물 1차 column chromatography

A: UV short wave에서 확인된 물질 pattern, B: Long wave에서 확인된 물질 pattern, C: DPPH를 이용한 항산화활성

Methanol 추출물에서는 3가지물질을 결정화에 성공하였다. 새송이버섯에는 다양한 생리활성물질이 함유되어져있을 것으로 추측되어져, 다양한 조건으로 추출과 분리분석을 실시하였다. Methanol 추출물의 결정화 실험에서 3가지 결정을 얻었다. 1차 column에서 회수한 group 8번에서 얻어낸 결정의 모양은 Fig. 31에 나타냈으며, 특히 회수 group 8에는 항산화활성도 강하여 결정물질이 항산화 활성의 주요물질로 기대되어진다. A는 78번 분획물에서 결정화를 하였고, B는 86번 분획물에서, C는 84번 분획물에서 각각 결정을 만들었다.

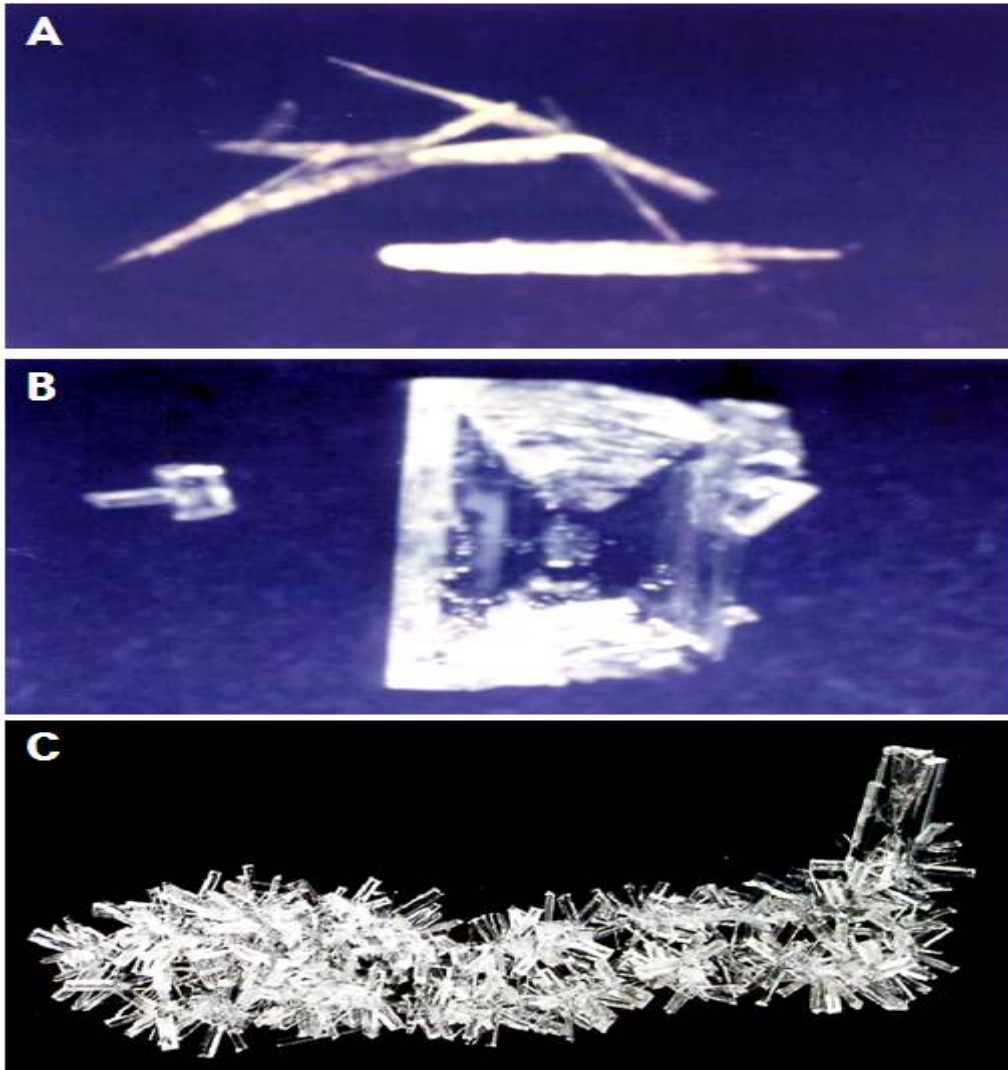


Fig. 31. 새송이버섯 MeOH 추출물로부터 당 결정화

아. 새송이버섯과 발효새송이버섯 발효산물 성분분석

새송이버섯을 미생물로 이용하여 분해를 하면 버섯의 다당류가 어느 정도 크기로 잘려지고 그 외의 구성성분도 다양한 변화가 예상된다. 새송이버섯 발효산물을 닭에 급여시켜 버섯분해산물이 계란에 전이되게 하여 기능성 계란을 생산하고자 하는 것이다. 따라서 새송이버섯과 미생물분해를 시킨 새송이버섯을 용매로 추출하여 성분을 비교한 것이 Fig. 32에 나타났다. 물질의 변화에는 크게 차이가 없는 것으로 보여지며, 1차년도에서 GC/MS로 성분의 차이를 조사한 결과 발효 새송이버섯에서 새로운 성분이 검출되어지고, 몇 종은 성분의 함량이 다르게 나타났다. 이번 실험에서 또 다른 분해산물이 있어 용매추출과 TLC 등으로 성분을 비교했다. 그 결과 발효 새송이버섯 CHCl₃ 추출물에서 Rf 0.67부근에 항산화력을 띄는 물질을 확인할 수 있었다.

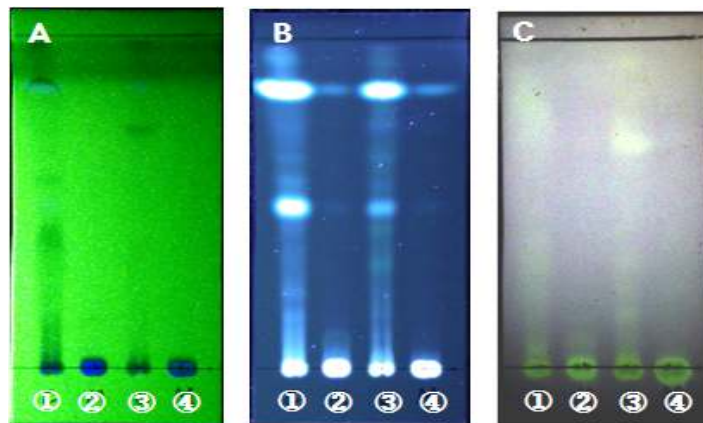


Fig. 32. 새송이버섯과 발효 새송이버섯 용매추출물의 TLC전개 pattern

A: Short wave에서 확인된 추출물의 물질 pattern, B: Long wave에서 확인된 추출물의 물질 pattern, C: DPPH를 이용한 항산화활성, ①: 새송이버섯 CHCl₃ 추출물, ②: 새송이버섯 MeOH 추출물, ③: 발효 새송이버섯 CHCl₃ 추출물, ④: 발효 새송이버섯 MeOH 추출물

1) 새송이버섯과 새송이버섯 발효산물의 성분분석

새송이버섯의 미 이용자원으로부터 다당류를 개발하기위하여 유기물 분해능이 우수한 미생물을 접종하여 발효시켜 다당류를 분리하게 된다. 이때 다당류 뿐만 아니라 일반화합물의 변화를 관찰하기위하여 유기용매로 추출하여 GC/MS로 성분을 분석하였다. Table 5에 미생물발효산물과 비 발효물의 성분 비교를 할 수 있다. 비 발효물에 비해 발효산물에서 많은 물질들이 확인 되어졌으며, 일부 물질은 양이 줄어들고 늘어나는 것을 확인 할 수 있다. 이는 미생물이 생육하면서 새송이버섯을 이용하여 양의 차이를 보이는 것으로 보여지고, 미생물의 2차 대사산물에 의한 물질도 있을 것으로 사료된다.

Table 5. 새송이버섯과 새송이 발효버섯의 성분분석

Retention Time	물 질 명		함유량(%)		비고
	비 발 효	발 효	비 발 효	발 효	
4.970min	2 - Heptenal[E]	1.4 - Dioxane	15.27	4.51	
5.085min	•	propanoic acid, methyl ester	•	2.06	
5.216min	Hexanoic acid	•	15.57	•	
5.879min	•	3-amino-1-propanol	•	0.56	
6.428min	•	Methyl-d3 2-Butenyl Ether	•	59.85	
6.611min	•	Methyl - d3 1 - Methyl - 2 - propenyl Ether	•	10.31	
6.782min	•	Ethanamine. N - ethyl - N - hydroxy	•	1.57	
7.651min	•	2 - Nonenal, (E)	•	1.17	
7.725min	•	octanoic acid	•	0.86	
7.737min	octanoic acid	•	13.81	•	
8.622min	•	Benzeneacetic acid	•	9.75	
8.760min	2 - Decenal,(Z)	•	13.89	•	
8.765min	•	2 - cyclohexen - 1 - 01	•	4.66	
9.097min	2, 4-Decadienal, (E, Z)	•	12.95	•	
9.297min	•	4H-pyran-4-one. tetrahydro	•	3.03	
9.326min	Decadienal	•	12.74	•	
9.526min	Fuian. tetrahydro-2, 4-dimethyl-cis	•	15.77	•	
9.760min	•	2 - docecen - 1 - al	•	1.93	
9.834min	•	2-pentene, 2-methoxy	•	1.24	

Table 5. 새송이버섯과 새송이 발효산물의 성분분석

Retention Time	물 질 명		함유량(%)		비고
	비 발 효	발 효	비 발 효	발 효	
10.040min	Methyl 6 - methyl heptanoate	•	0.62	•	
10.760min	Aminopyrimidin - 1 - oxide	•	2.34	•	
11.131min	•	Acetamide, N-(2-phenylthyl)	•	0.83	
11.629min	10-Undcenoic acid, methyl ester	•	1.11	•	
12.103min	cycloheptane, methyl	•	1.47	•	
12.360min	•	(E) - Farnesene	•	0.65	
12.395min	•	delta, - Fenchane	•	0.75	
12.686min	•	Tetradecanoic acid	•	3.77	
12.955min	Tetradecanoic acid	Tetradecanoic acid	3.62	1.99	
13.406min	•	Thiosulfuric acid (H2S2O3), S-(2-aminoethyl)ester	•	2.25	
13.424min	bihydro iso - jasmone	•	1.52	•	
13.469min	•	Tetradecanoic acid, 12-methyl-, (S)	•	11.58	
13.566min	•	trans - 2 - tridecenal	•	1.42	
13.663min	•	pentadecanoic acid	•	8.51	
13.669min	pentadecanoic acid	•	16.28	•	
14.098min	•	hexadecanoic acid	•	8.36	
14.109min	hexadecanoic acid, methyl ester	•	10.12	•	
14.235min	chloromethyl 6-chlorododecanoate	2 - Tetradecanol	3.90	3.39	
14.286min	•	(R)-(-)-(Z)-14-Methyl-8-hexadecen-1-ol	•	2.16	
14.361min	hexadecanoic acid	•	53.30	•	
14.349min	•	hexadecanoic acid	•	43.94	
14.435min	1.2 - Benzenedicarboxylic acid, butyl 2 - ethylhexyl ester	1.2 - Benzenedicarboxylic acid, dabutyl ester	4.55	7.89	
14.841min	•	phosphonic acid, dioctadecyl ester	•	2.49	
14.972min	trans -2 - hexenal	•	1.17	•	

Table 5. 새송이버섯과 새송이 발효산물의 성분분석

Retention Time	물 질 명		함량(%)		비고
	비 발 효	발 효	비 발 효	발 효	
14.984min	•	Amino-2, 2-dimethylcyclopropanecarbonitrile	•	2.21	
15.098min	•	1H-indene, octahydro-, cis-	•	1.22	
15.332min	•	3,4-octadiene, 7-methyl-	•	2.00	
15.333min	9, 12-octadecanoic acid, methyl ester, (E,E)-	•	21.54	•	
15.367min	9-octadecenoic (Z)-, methyl ester	9.17-octadecadienal, (Z)	12.43	1.85	
15.555min	octadecanoic acid, methyl ester	•	0.75	•	
15.675min	•	Linoleic acid	•	92.72	
15.693min	Linoleic acid	•	63.10	•	
15.893min	3 - octadecyne	•	2.14	•	

제 4절 계란의 지방산 추출

1. 서언

최근 우리나라는 국민소득의 증가로 채식위주의 식생활이 육식 위주로 바뀌면서 과잉의 지방과 포화지방산의 섭취로 인한 동맥경화증을 비롯한 심혈관 질환, 뇌 혈전, 암 발생에 의한 사망률이 증가되어 식생활에 적절한 지방의 양과 지방산 섭취에 대한 관심이 증가하고 있다(Nieman 등, 1992, Kritchevsky 등, 1991, Sabate와 Hook, 1996, Grundy, 1994).

달걀은 일상 식생활에서 조리가공제품으로서 중요한 위치를 차지하고 있으며, 소화 흡수율이 좋고 단백질과 비타민 및 무기질을 풍부하게 함유하고 있어 영양가가 매우 높은 식품이다. 하지만 달걀은 콜레스테롤을 다량 함유하고 있기 때문에 동맥경화 등의 질병에 관계가 있다는 이유로 다량 섭취를 꺼리는 식품이기도 하다. 따라서 지방과 콜레스테롤 함량이 낮은 기능성 식품을 선호하는 국민 소비에 발맞추어 달걀 또한 콜레스테롤 함량이 낮고, 포화지방산보다 불포화지방산 함량이 높으며, 혈액콜레스테롤을 낮추어 심혈관의 질환을 예방해주는 오메가 -3계열 지방산과 항 알레르기 효과, 지방간 억제, 생리통의 경감에 효과가 있는 오메가 -6 지방산함량을 높인다면, 달걀의 소비에 큰 변화가 있을 것으로 기대된다.

버섯은 독특한 맛과 향기를 지닌 기호성 높은 식품으로서 영양소가 일반 채소류 이상으로 골고루 함유되어 있어 예부터 널리 이용되어 왔다(Kang 등, 2000, Cho 등, 2001). 문헌에 의한 의학적 가치로는 한국, 중국, 일본에서 고혈압, 신장염, 신경쇠약, 불면증, 천식, 위궤양에 오랫동안 사용되어 왔다. 반면, 고혈압에 의해 유발되는 많은 성인병들은 이미 심각한 문제로 대두되고 있는데, 그 식이성 인자로는 콜레스테롤, 포화 지방산, 당질의 과잉섭취, 식이섬유소 섭취부족 등을 들 수 있다. 이러한 요인들은 혈청 콜레스테롤 농도를 상승시키며 지단백질 조성의 변화를 초래한다고 알려져 왔다. Cheung(Cheung, 1996)은 고콜레스테롤 식이에 풀버섯 액체배양액의 다당류인 β -glucan을 1%첨가한 식이로 사육한바 혈청의 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 농도를 감소시켰다. 그리고 식이성 fiber를 많이 섭취하면 변의 배설량을 증가시키고 담즙산을 흡착해 변으로 배설하므로 콜레스테롤을 감소시켜 혈청 중 콜레스테롤치를 저하시킨다고 하였다.

따라서 본 연구는 식이성 fiber 함량이 풍부하고, 여러 가지 효능이 있는 버섯을 이용하여 산란계에게 급여함으로써 생산물인 달걀의 난황 내에서 포화지방산과 불포화지방산의 비율과 더불어 콜레스테롤 함량을 분석함으로써 웰빙을 선호하는 현대인의 기호에 맞는 달걀생산이 가능한지 연구해보았다.

2. 재료 및 방법

가. 난황과 난백으로부터 지방산 추출

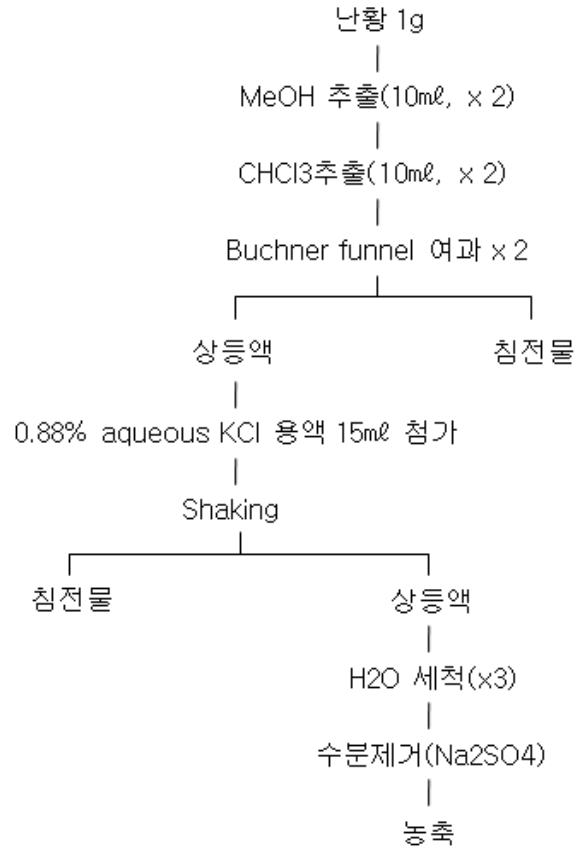


Fig. 33. 난황으로부터 지방산 추출

나. GC/MS 분석

새송이버섯의 구성성분과 새송이버섯 급여 닭이 생산한 계란의 성분을 조사하기 위한 GC-MS 분석은 Agilent 6890 GC에 연결된 Agilent 5973 MS를 사용하였고 carrier gas는 He gas를 1ml/min의 속도로 흘려보냈다. Ionization voltage는 70eV이었고, splitless mode로 분석하였다. 사용된 GC는 HP 6890 gas chromatography이었고 HP-5MS(30mx0.25mmx0.25 μ m) column 및 flame ionization detector를 이용하였다. GC의 온도프로그램은 70 $^{\circ}$ C에서 1분간 유지시킨 후 분당 20 $^{\circ}$ C로 승온하여 200 $^{\circ}$ C에서 10분간 유지시킨 후 분당5 $^{\circ}$ C로 승온하여 280 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지시킨다. GC의 주입구 및 검출기의 온도는 260 $^{\circ}$ C로 하였고 carrier gas는 MS와 동일한 속도로 흘려보냈다. GC 컬럼에서 분리된 물질은 GC에 장착된 MSD(Mass Selective Detector)에 의해 검출되고 동정되어 얻어진 TIC(total ion chromatogram)와 각 피크의 mass spectrum을 확인하기 위하여 Wiley275 library의 mass spectrum data searching을 통해 동정하였다.

Table 6. GC/MS 분석조건

GC	Agilent 6890
Column	HP-5MS (30m×0.25mm×0.25 μ m)
Oven temperature	70 $^{\circ}$ C (1min) $\xrightarrow{15^{\circ}$ C/min} 200 $^{\circ}$ C (10min) $\xrightarrow{5^{\circ}$ C/min} 280 $^{\circ}$ C (5min)
Injection temperature	260 $^{\circ}$ C
MSD	Agilent 5973
Interface temperature	260 $^{\circ}$ C
Ionization voltage	70eV
Carrier gas	He (flow rate : 1ml/min)

3. 연구결과

가. 난황과 난백의 성분비교

새송이버섯의 미 이용자원을 잘 건조하여 분말화한 다음 사료에 일정량씩 첨가하여 닭사육에 급여를 하였다. T-1은 새송이버섯 분말을 1.5% 첨가하였고, T-2는 3%, T-3은 4.5%의 새송이버섯 미 이용자원 분말을 첨가하여 사료로 급여하였다. control과 첨가사료를 급여한 개체간의 TLC상 성분의 차이는 난백의 Methanol 추출물에서 Rf 0.6~0.9까지의 녹색형광을 나타내는 물질이 점차 줄어들었다. 성분의 구체적인 분석은 흥미로운 결과를 줄 것으로 사료된다.

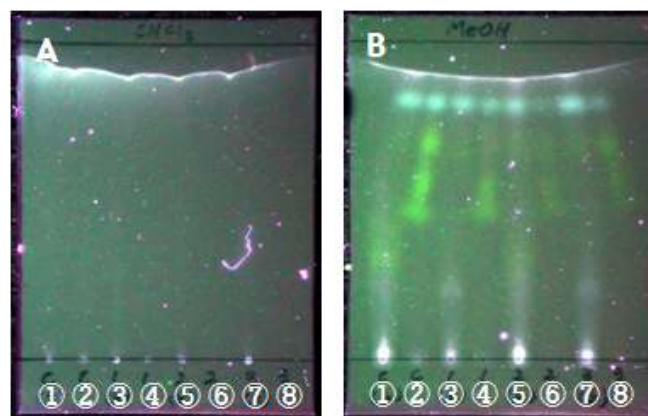


Fig. 34. 동결건조 난황으로부터 물질추출 새송이버섯과 미생물분해 새송이버섯 용매추출물의 TLC 전개 pattern

A: Long wave에서 확인된 난황 CHCl_3 추출물의 물질 pattern, B: Long wave에서 확인된 난황 MeOH 추출물의 물질 pattern, ①: Control 난황, ②: Control 난백, ③: T-1 난황, ④: T-1 난백, ⑤: T-2 난황, ⑥: T-2 난백, ⑦: T-3 난황, ⑧: T-3 난백

나. 새송이버섯을 급여한 계란의 난황과 난백의 성분분석 GC/MS

새송이버섯을 건조하고 분말화하여 닭 사료에 혼합비를 달리하여 급여했다. T-1은 사료에 새송이버섯의 분말을 1.5%, T-2는 3%, T-3은 4.5% 혼합하여 급여를 하여 생산된 계란의 난백을 CHCl₃로 추출하여 그 성분을 비교하였다. 많은 성분에 차이를 보였으나, Table 7에는 함량이 높은 대표물질의 함량변화를 나타냈다. 처리구에서는 새송이버섯을 급여하지 않은 control보다 대부분의 성분들이 높게 나타났으며, 특히 Benzenedicarboxylic acid는 4.5% 사료를 급여한 란에서는 무려 110%의 증가를 보였다.

Table 7. 새송이버섯을 급여하여 생산된 계란의 난백 지방산의 주요물질 변화

화합물명	처리구			
	control	T-1	T-2	T-3
2-methyl-propanoic acid	1.0	15.4	32.0	16.2
3-ethyl-3-methylheptane	1.0	2.1	3.4	1.8
Hexadecanoic acid	1.0	1.9	22.5	3.7
1,2-Benzenedicarboxylic acid. dibutyl ester	1.0	1.0	3.4	11.0
1,2-Benzenedicarboxylic acid	1.0	34.0	57.6	110.0

*. T-1: 새송이버섯 1.5 % 첨가, B: 새송이버섯 3.0 % 첨가, C: 새송이버섯 4.5 %

새송이버섯의 분말을 사료에 량을 달리해서 생산한 계란의 난황을 CHCl₃로 추출하여 그 성분을 비교하였다. 많은 성분에 차이를 보였으나, Table 8에는 함량이 높은 대표물질의 함량변화를 나타냈다. 처리구에서는 새송이버섯을 급여하지 않은 control보다 대부분의 성분들이 난백과 같이 높게 나타났으며, 특히 Stearic acid는 4.5% 사료를 급여한 란에서는 94%의 증가를 보였다.

Table 8. 새송이버섯을 급여하여 생산된 계란의 난황 CHCl₃추출물의 주요물질 변화

화합물명	처리구			
	control	T-1	T-2	T-3
Hexadecanoic acid	1.0	1.91	2.38	2.48
1,2-Benzenedicarboxylic acid	1.0	36.67	34.04	39.95
Octadecanoic acid	-	1.0	1.49	1.87
Dodecanemide, N-(2-hydroxyethyl)	1.0	32.06	40.26	47.50
Stearic acid	1.0	60.36	87.65	94.18

*. T-1: 새송이버섯 1.5 % 첨가, B: 새송이버섯 3.0 % 첨가, C: 새송이버섯 4.5 %

새송이버섯의 분말을 사료에 첨가량을 달리 급여하여 생산한 계란의 난백을 MeOH로 추출하여 그 성분을 비교하였다. 많은 성분에 차이를 보였으나, Table 9에는 난백 methanol 추출물의 대표물질 함량변화를 나타냈다. 처리구에서는 새송이버섯을 급여하지 않은 control보다 대부분의 성분들이 낮게 나타났으며, T-1과 T-2에서 대부분 낮게 나타났고, T-3 처리구에서는 일부성분이 높게 나타났다.

Table 9. 새송이버섯을 급여하여 생산된 계란의 난백 MeOH 추출물의 주요물질 변화

화합물명	처리구			
	control	T-1	T-2	T-3
Hexadecanoic acid	1.0	0.66	0.53	0.95
Cholestroacetate	1.0	37.65	0.43	0.34
Hexadecanoic acid	1.0	0.74	0.60	0.53
Cholest-5-en-3-ol(3.beta.)	1.0	1.92	0.70	3.77
9-Octadecanoic acid(Z)	1.0	0.55	0.62	1.44
Octadecanoic acid	1.0	0.45	0.72	3.43

*. T-1: 새송이버섯 1.5 % 첨가, B: 새송이버섯 3.0 % 첨가, C: 새송이버섯 4.5 %

새송이버섯의 분말을 사료에 양을 달리 공급해서 생산한 계란의 난황을 MeOH로 추출하여 그 성분을 비교하였다. Table 10에 결과를 볼 수 있듯이 cholesterol 성분들이 모두 줄어들어가는 결과를 얻었다. 대부분의 처리구에서 처리량을 증가시킴으로서 cholesterol의 양이 감소되어졌다. 계란의 cholesterol 저하의 효과는 아주 흥미로운 결과로 사료된다.

Table 10. 새송이버섯을 급여하여 생산된 계란의 난황 MeOH 추출물의 주요물질 변화

화합물명	처리구			
	control	T-1	T-2	T-3
Hexadecanoic acid	1.0	0.72	0.64	0.51
Cholest-5-en-3-ol(3.beta.)	1.0	0.97	0.54	0.50
Cholest-5-en-3-ol-1	1.0	0.87	0.95	0.30
Cholest-5-en-3-ol-2	1.0	0.88	0.91	0.39
Cholest-5-en-3-ol-3	1.0	0.40	0.92	0.10

*. T-1: 새송이버섯 1.5 % 첨가, B: 새송이버섯 3.0 % 첨가, C: 새송이버섯 4.5 %

다. 새송이버섯 발효산물 차별급여에 따른 난황의 지질함량

새송이버섯 미이용자원 부분을 협동과제에서 미생물로 분해를 시키고 건조시켜 분말로 만든 다음 사료에 첨가하였다. 2세부과제에서 닭의 사육에 T-1은 1% 첨가, T-2는 2%첨가, T-3는 3% 첨가하여 생산된 계란으로부터 난황을 취하여 지질을 추출하여 총량을 비교하였다. 1% 첨가하여 사육한 난에서는 control보다 많은 지질의 함량을 보였고, 3% 첨가한 사료를 급여한 난에서는 지질의 함량이 96%로 줄어드는 것을 확인했다.

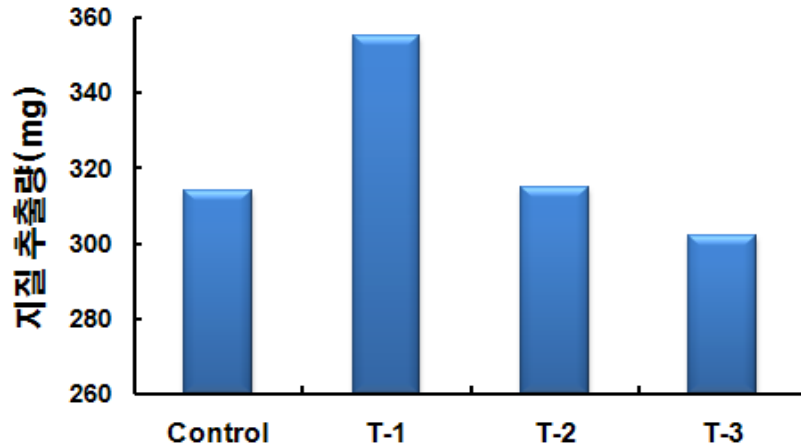


Fig. 35. 새송이버섯 발효산물을 급여하여 생산된 계란 난황의 지질 함량

T-1: 새송이 발효버섯 1% 첨가, B: 새송이 발효버섯 2% 첨가, C: 새송이 발효버섯 3% 첨가

라. 새송이버섯 발효산물 급여 계란의 성분분석

새송이버섯 미이용자원을 회수하여 건조하고, 분말을 협동과제에서 미생물로 분해시켜 다시 분말화하여 닭 사료에 첨가비율을 달리하여 급여했다. T-1은 사료에 새송이 발효버섯의 분말을 3%, T-2는 5%, T-3은 7% 혼합하여 급여를 했다. 생산된 계란의 난황의 지방산을 추출하여 methylation시켜서 그 성분을 비교하였다. 많은 성분에 차이를 보였으나, GC의 spectrum은 Fig. 37에 나타냈고, 처리구에 따른 지방산의 함량을 변화를 나타낸 것은 Table 11에서 볼 수 있다. 처리구에서는 발효 새송이를 급여하지 않은 control보다 대부분의 성분들이 낮게 나타났으며, cholesterol 그룹들도 낮아지는 현상을 볼 수 있었다.

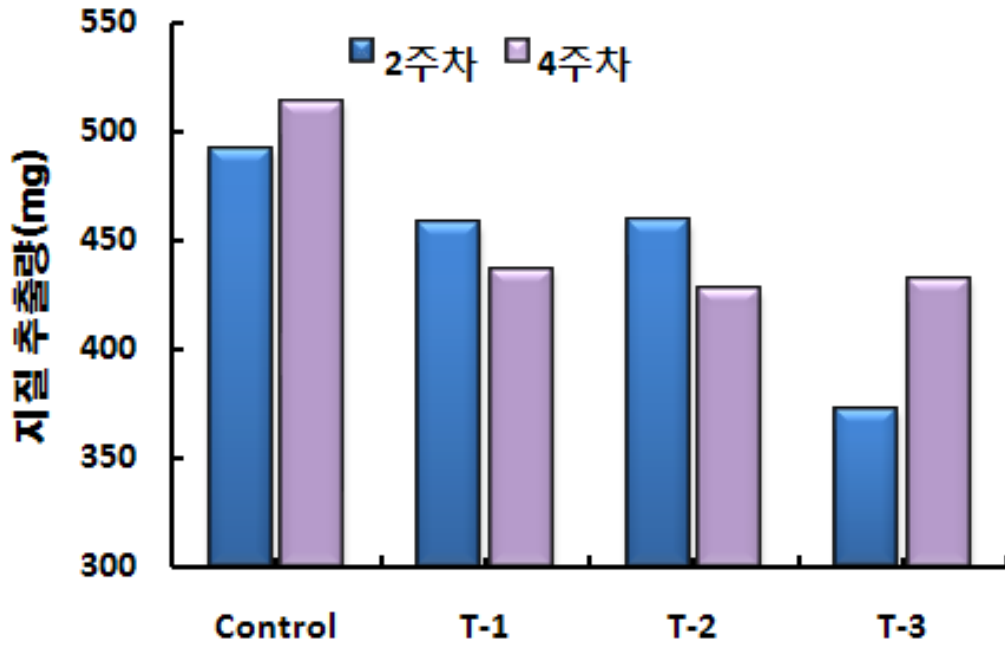


Fig. 36. 발효 새송이버섯을 사료에 첨가하여 생산한 계란의 난황지질량
 T-1: 새송이 발효버섯 3% 첨가, T-2: 새송이 발효버섯 5% 첨가, T-3: 새송이 발효버섯 7% 첨가

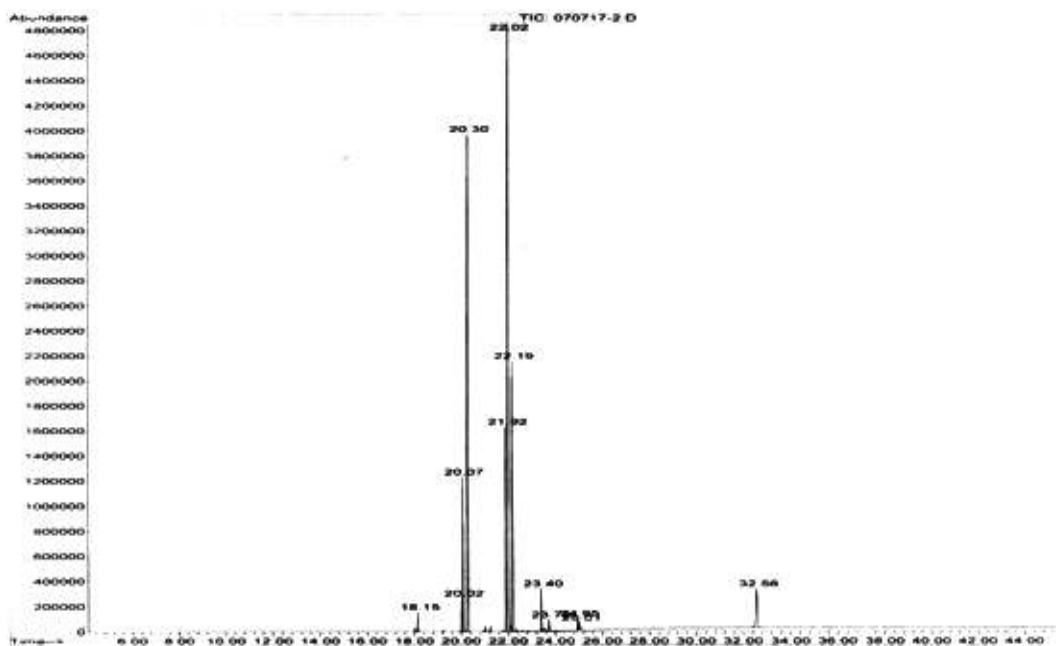


Fig. 37. 새송이 발효버섯을 급여한 계란의 지방산분석 spectrum

Table 11. 새송이 발효버섯을 급여하여 생산된 계란난황의 주요 지방산함량

<i>Rt</i> (min)	화 합 물 명	처 리 구			
		Control	T1	T2	T3
20.07	9-Hexadecenoic acid, methyl ester	1.0	0.93	0.59	0.85
20.30	Hexadecenoic acid, methyl ester	1.0	0.97	0.96	0.91
21.92	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	1.0	1.09	1.05	1.25
22.02	13-Octadecenoic acid, methyl ester	1.0	0.98	0.96	0.93
22.19	Octadecanoic acid, methyl ester	1.0	1.01	1.06	0.97
23.40	Methyl arachidonate	1.0	0.67	1.06	0.64
32.56	Cholest-5-en-3-ol (3.beta.)	1.0	0.89	1.13	0.99

제 5절 새송이버섯 분말과 추출물의 변비해소 효과

1. 서언

변비는 예로부터 만병의 근원으로 일컬어지고 있으며 식욕부진과 복부팽만의 상태가 지속되고, 배변이 이루어지지 않으므로 변의 독소가 장으로 흡수되어 혈액이 행으로 피부노화, 두통, 피부발진, 치질 등이 나타나며 심하면 대장암의 원인이 된다(김애정 등, 2005, Corazziari, 1999, 이희삼 등, 2000).

근래 생활수준의 향상과 식습관의 변화로 고지방과 고단백질이 함유된 육류와 인스턴트식품 등의 고칼로리 식품의 섭취가 증가된 반면 채소나 섬유질을 함유하는 식품의 섭취가 감소됨으로써 성인병과 비만, 변비 환자가 날로 증가되고 있다(조영심 등, 2008, Muller, 1999). 변비를 치료하기 위해서는 충분한 섬유소를 섭취하는 것이 좋다(Gordon, 1992, Gordon, 1989).

식이섬유는 대장통과시간이 지연된 만성 변비환자에서 점액질 섬유소인 차전자피가 특별한 부작용 없이 환자의 변비증상을 호전시키고 대장통과시간을 단축시키는 효과가 있다고 하였으며(Chung 등, 1996), 섬유소 섭취 후 대장통과시간이 2.4일에서 1.6일로 단축되는 경우 등을 볼 수 있다(Cumming, 1973, Burkitt 등, 1974).

새송이버섯은 섬유소가 풍부하며 기능성물질도 함유하고 있어, 새송이버섯과 미이용부분을 활용하여 장 기능개선과 변비개선 효과에 뛰어난 제품개발이 가능하다. 제품개발에는 새송이버섯을 건조하여 분말화 하거나 새송이버섯을 물이나 용매추출과 정제로서 기능성물질을 분리하여 사용가능하며, 새송이버섯 분말에 유기물분해 활성이 높은 미생물을 접종하여 다당류를 적당한 길이로 절단하여 이용하게 되면 보다 높은 장 기능개선의 활성효과를 얻을 수 있다.

2. 재료 및 방법

가. 실험재료 및 시약

본 실험에 사용된 새송이버섯과 새송이버섯 미 이용부분은 경북청도군에 위치한 (주)남경농산에서 공급받아 사용하였고, 분쇄기는(Cutting Mil, (주) 지시코, sieve mesh 60mesh)를 사용하였다. 그리고 추출한 다당류의 효소분해를 위한 Hemicellulase (1.50units/mg, from *A. niger*)와 Cellulase(1.38units/mg, from *A. niger*)는 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 열수추출에 사용한 물은 3차 증류수를 사용하였고, 유기용매로는 99% 에탄올을 사용하였다. 또한, 활성탄(Shinyo. Pure Chemicals Co., Japan, S.P.C. GR Reagent)은 S.P.C에서 구입하여 사용하였고, 아라비아검(arabic acid, sigma), loperamide(loperamide hydrochloride)는 시그마에서 구입하여 사용하였다. 생화학적 혈액성분 분석은 혈액자동분석기(TOSHIBA, ACCUTE, TBA-40FR)를 사용하였다.

나. 실험동물 및 사육환경

소화관이동률 효과를 측정하기 위한 실험동물은 평균체중 24g~26g의 Balb/C 수컷으로서 (주)오리엔트바이오에서 구입하여 사용하였고, 변비유발 모델을 이용한 변비개선 효과 실험에 사용한 실험동물은 평균체중 220~230g의 Sprague-DawleyC계 수컷 랫드(부산대학교 청정실험동물센터)를 사용하였으며, 동물실험은 부산대학교 청정동물센터에서 실시하였다. 실험기간 동안의 사육환경은 온도 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $60\pm 5\%$, 인공조명(12시간 간격, 08:00~20:00)로 유지되었으며, 사료는 (주)samtako, 방사선멸균사료 등을 기초 사료로 사용하였고, 음용수는 필터를 이용하여 여과 후 멸균하여 자유 급여하였다.

다. 변비해소 실험용 열수추출물 제조

새송이버섯, 발효 새송이버섯 또는 미 이용부분을 잘 건조하여 분쇄기(Cutting Mil, (주) 지시코, sieve mesh 60mesh)로 분말을 만들어 열수추출을 실시하였다. 구체적으로는, 새송이버섯 분말 일정량을 추출용기에 넣고, 새송이버섯 분말과 발효 새송이버섯 분말을 중량의 20배량 물을 첨가하여, 100°C 에서 5시간 추출을 하였다. 이어 동량의 물을 첨가하고 반복 추출한 후 상기 추출물과 합하여 열수추출물로 하였다. 열수추출물을 3,000rpm으로 5분간 원심분리하여 추출물을 얻었다. 추출물에 ethanol 농도가 80%되게 첨가를 하여 당류침전을 유도하고, 당류의 침전효율을 상승시키기 위하여 4°C 에서 18시간 이상 저온처리를 하였다. 18시간 이상 저온처리한 추출물을 원심분리(5,000rpm, 4°C , 10분)하여 침전물을 얻고, 침전물에 함유되어 있는 에탄올은 감압농축으로 제거하고, 동결건조기로 동결건조하여 열수추출물을 얻었다. 열수추출물을 마우스에 급여를 할 때 식수에 용해시켜 공급하거나, 우유를 20% 첨가하여 급여하는 방법으로 소화관 이동을 측정하였다.

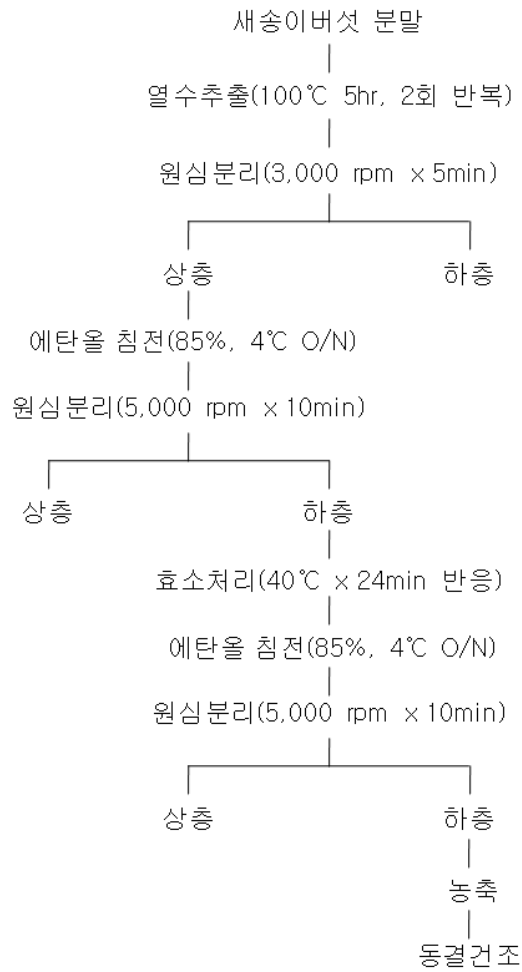


Fig. 38. 새송이버섯 또는 새송이버섯 미 이용자원으로부터 장 기능 개선 및 변비해 소효과 추출물 제조과정

라. 열수추출물의 효소분해

열수추출 후 용매침전으로 얻은 추출물 5g을 50mM sodium acetate buffer 300 ml에 현탁시켜 Hemicellulase (1.50units/mg, from *A. niger*, Sigma)와 Cellulase(1.38units/mg, from *A. niger*, Sigma)를 7.5unit 처리한 후, 40°C에서 24시간 반응을 시킨 다음, 에탄올 농도가 80%되게 ethanol을 가하여 당류를 침전시켰다.

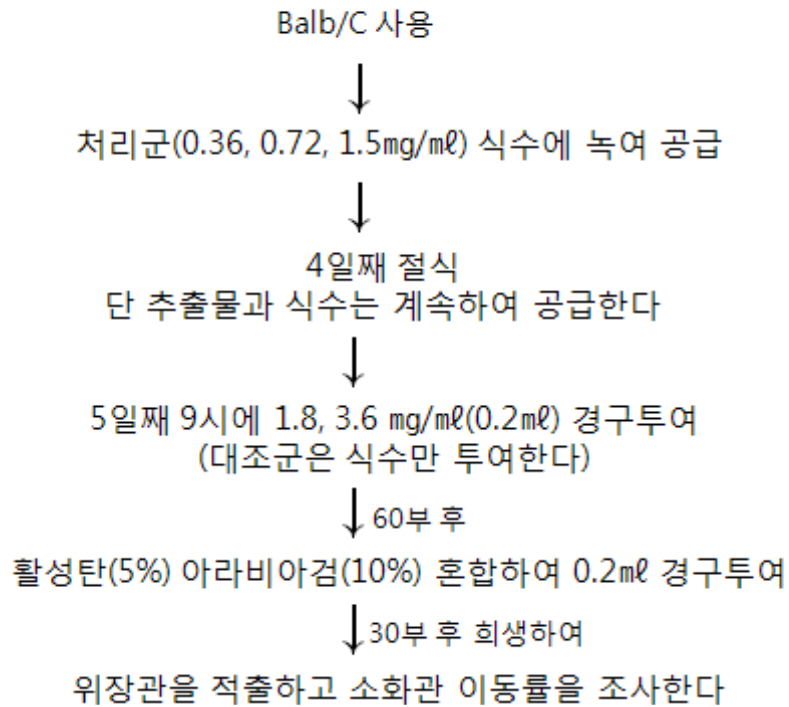


Fig. 39. 소화관이동률 실험 과정

마. 버섯 분말을 이용한 사료제조

새송이버섯과 발효 새송이버섯 분말을 일반 시판 사료에 첨가하여 사료를 만들어 마우스에 공급하였을 때 변비해소효과를 조사하기 위하여 사료를 만들었다. 먼저 일반사료를 구입하여 분쇄기(Cutting Mil, (주) 지시코, sieve mesh 60mesh)로 분말을 만들고, 새송이버섯과 발효 새송이버섯을 같은 분쇄기로 분말을 만들어 각각 3%와 5%로 첨가하여 다시 사료제조 업체에 의뢰하여 방사선조사까지 실시하여 사료를 만들었다.

바. 변비해소효과

1) 새송이버섯 변비해소 효과와 혈액분석

가) 소화관이동률 측정

새송이버섯 열수추출물을 이용한 소화관이동거리를 측정하기 위하여 사용한 실험동물은 평균체중 24~26g의 Balb/C 수컷 마우스로 대조군과 처리군으로 나누어 각 군당 5마리씩 구성하여 실험을 실시하였다. 대조군에는 식수만 공급하고, 처리군에는 열수추출물을 식수에 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml 농도로 녹여 4일간 공급하고, 114시간 이후부터 절식을 실시하였다. 절식 중에도 열수추출물을 식수에 녹여 계속 공급하였으며, 129시간 이후부터는 열수추출물을 0.9mg/ml, 1.8mg/ml,

3.6mg/ml의 농도로 식수에 녹여 0.2ml 경구투여 하고, 60분후 활성탄과 아리비아검을 각 5%, 10%의 중량 비로 혼합한 활성탄 식이 0.2ml을 경구 투여한 후 30분 뒤 혈액채취 후 희생시켜 위장관을 적출하였다. 적출한 위장관의 십이장에서 회장까지의 활성탄 이동거리로서 소화관이동률을 조사하였다.

나) 혈액성분 검사

실험동물의 혈액은 원심튜브에 담아 20~30분간 실온에 방치하여 한 후 원심분리기를 사용하여 4℃, 3,000rpm, 5분 정도 원심분리를 하여 혈청을 채취하여 생화학적 혈액성분 분석은 자동분석기(TOSHIBA, ACCUTE, TBA-40FR)를 사용하여 검사하였다.

2) 새송이버섯 추출물과 우유 혼합물의 변비해소 효과 및 혈액분석

가) 소화관이동률 측정

새송이버섯 열수추출물과 우유를 혼합한 조성물을 이용하여 소화관이동거리를 측정하였다. 사용한 실험동물은 평균체중 24~26g의 Babl/C 수컷 마우스로 대조군과 처리군으로 나누어 각 군당 5마리씩 구성하여 실험을 실시하였다. 대조군에는 식수만 공급하고, 처리군에는 열수추출물을 식수에 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml농도로 공급하는 것과 그것에 식수대신에 우유를 20%되게 첨가하여 각각 4일간 공급하고, 114시간 이후부터 절식을 실시하였다. 절식 중에도 열수추출물을 식수에 녹여 계속 공급하였으며, 129시간 이후부터는 열수추출물을 0.9mg/ml, 1.8mg/ml, 3.6mg/ml의 농도와 우유 20%를 혼합하여 0.2ml 경구투여 하고, 60분후 활성탄과 아리비아검을 각 5%, 10%의 중량 비로 혼합한 활성탄 식이 0.2ml을 경구 투여한 후 30분 뒤 혈액채취 후 희생시켜 위장관을 적출하였다. 적출한 위장관의 십이장에서 회장까지의 활성탄 이동거리를 측정하여 소화관 이동률을 조사하였다.

나) 혈액성분 검사

채취한 혈액은 원심튜브에 담아 20~30분간 실온에 정치한 후 원심분리(3,000rpm, 5min, 4℃)를 실시하여 혈청을 취하고, 혈액분석은 생화학적 분석법으로 혈액 자동분석기(TOSHIBA, ACCUTE, TBA-40FR)를 사용하여 분석하였다.

3) 버섯분말 사료의 변비해소 효과와 혈액분석

가) 소화관이동거리 측정

새송이버섯 분말과 발효 새송이버섯 분말을 3%, 5% 첨가한 사료와 일반사료를 급여하여 소화관이동거리를 활성탄 식이로 활성탄의 소화관 이동거리를 조사하였다. 사용된 실험동물은 평균체중 24~26g의 Babl/C 수컷 마우스로 대조군과 처리군으로 나누어 각 군당 5마리씩 구성하여 실험을 실시하였다. 대조군과 처리군에 식수는 동일하게 공급하고, 처리군에는 버섯분말 첨가사료를 30g/day 공급하였다. 버섯첨가 사료를 5일간 공급하고, 138시간 이후부터 절식을 실시하였다. 절식 중에도 식수는 계속 공급하였으며, 153시간 이후부터는 식수 0.2ml 경구투여 하고, 60분 후 활성탄과 아리비아검을 각 5%, 10%의 중량비로 혼합한 활성탄 식이 0.2ml을 경

구 투여한 후 30분 뒤 혈액채취 후 희생시켜 위장관을 적출하였다. 적출한 위장관에서 활성탄 이동거리로서 소화관 이동률을 조사하였다.

나) 혈액성분 검사

채취한 혈액은 원심튜브에 넣고, 실온에서 20~30분간 정치시킨 후 원심분리(3,000rpm, 5min, 4℃)를 실시하여 혈청을 취하고, 혈액분석은 생화학적 분석법으로 혈액 자동분석기(TOSHIBA, ACCUTE, TBA-40FR)를 사용하여 분석하였다.

4) 변비유발 랫드에 대한 변비개선 효과

가) 배변량 측정

배변량과 변의 수분함량 등을 측정하여 변비개선 효과 조사하였으며, 사용된 실험동물은 평균체중 220~230g의 Sprague-DawleyC(부산대학교 청정실험동물센터) 수컷 랫드로 대조군과 처리군으로 나누어 각 군당 5마리씩 구성하여 실험을 실시하였다. 대사케이지에서 3일간 환경 적응시키고, 4일째부터 변비를 유발시키기 위해 loperamide를 사료 1mg/3g 함유하는 사료를 공급하였다. 대조군에는 식수만 공급하고, 처리군에는 열수추출물을 식수에 2mg/ml, 3mg/ml, 4mg/ml농도로 녹여 7일간 공급하였다. 배변은 매일 일정한 시간에 채취하여 무게, 개수, 수분함량을 측정하고, 사료섭취량 및 음수량도 측정을 하였다. 168시간 이후부터 절식시키고, 절식 중에도 새송이버섯 열수추출물은 식수에 녹여 계속 공급하였으며, 180시간 이후에 혈액채취 후 희생시켰다.

나) 혈액성분 검사

채취한 혈액은 원심튜브에 넣어 실온에서 20~30분간 정치시키고, 원심분리(3,000rpm, 5min, 4℃)를 실시하여 혈청을 취하고, 혈액분석은 생화학적 분석법으로 혈액 자동분석기(TOSHIBA, ACCUTE, TBA-40FR)를 사용하여 분석하였다.

3. 연구결과

가. 마우스에 대한 변비해소 효과

1) 새송이버섯 열수추출물의 변비해소 효과

새송이버섯 열수추출물의 변비해소 효과를 조사하기 위하여 열수추출물을 식수에 첨가하여 대조구와 비교했을 때, 열수추출물을 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml를 처리했을 때 소화관이동률이 155.2%, 166.2%, 190.1% 증가하였으며 처리량에 따라 직선적으로 소화관이동률이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 기존에 발표되어진 조 등과 백 등이 발표한 무추출물과 함초추출물에 의한 소화관이동률과 비교하였을 때 0.36mg/ml 처리농도에서는 무물 추출보다 1.04배, 함초추출물 보다 1.4배 증가하였고, 0.72mg/ml 처리농도에서는 무추출물 보다 1.6배, 함초추출물 보다는 1.5배 증가하였으며, 1.5mg/ml 처리농도에서는 무추출물 보다 1.4배, 함초추출물 보다 1.6배 증가하는 결과를 얻었다. 이는 식이섬유질을 섭취함으로써 수분보유

력이 증가하고, 장의 통과시간의 감소로 변비해소에 효과가 있다는 보고와 일치하며, 새송이버섯 열수추출물의 소화관이동률 증가는 새송이버섯 열수추출물의 섬유질에 의한 것이라고 생각된다.

Table 12. 새송이버섯 열수추출물의 소화관이동거리 측정

Experimental groups (mg/ml + mg/ml)	Shifting distance (cm)	Transit (%)
Control	16.3 ± 3.39	100
Water extract 1 (0.36 + 0.9)	25.3 ± 3.09	155.2
Water extract 2 (0.72 + 1.8)	27.1 ± 2.24	166.2
Water extract 3 (1.5 + 3.6)	31.0 ± 4.24	190.1

2) 새송이버섯 발효산물 열수추출물의 변비해소 효과

새송이버섯에 섬유소분해 활성이 뛰어난 미생물을 처리하여 새송이버섯 발효산물을 얻고, 열수 추출하여 얻은 추출물을 이용하여 마우스 소화관 이동거리를 측정하였다. 발효 새송이버섯 열수추출물을 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml 농도로 처리했을 때 대조구에 비해 소화관이동률이 각각 114.1%, 126.3%, 180.9%로 처리량에 따라 직선적으로 증가했으며, 논문에 보고된 무추출물 보다는 각각 1.03배, 1.2배, 1.3배 증가하였으며, 함초추출물 보다는 각각 1.5배, 1.1배, 1.5배 증가하였다.

새송이버섯 그대로 이용하는 것과 발효시킨 새송이버섯의 열수추출물이 마우스 소화관이동거리에 미치는 영향은 큰 차이가 없었으며, 차라리 발효시키지 않은 새송이버섯 열수추출물이 소화관이동률을 증가시켰다.

Table 13. 발효 새송이버섯 열수추출물의 소화관이동거리 측정

Experimental groups (mg/ml + mg/ml)	Shifting distance (cm)	Transit (%)
Control	16.3 ± 3.39	100
Water extract 1 (0.36 + 0.9)	18.6 ± 0.84	114.1
Water extract 2 (0.72 + 1.8)	20.6 ± 1.31	126.3
Water extract 3 (1.5 + 3.6)	29.5 ± 1.41	180.9

3) 새송이버섯 열수추출물과 우유 혼합조성물의 변비해소 효과

새송이버섯 열수추출물과 식수대신에 우유를 20% 첨가하여 만든 조성물을 이용하여 Balb/C 마우스의 소화관이동률을 조사하였다. 조성물을 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml 농도로 처리하여 대조구와 소화관이동거리를 측정하여 비교했을 때, 소화관이동률이 각각 158.3%, 233.3%, 294.1%로 처리량에 따라 현저히 증가했으며, 논문으로 보고된 무추출물과 함초추출물 보다 각각 1.4배, 2.1배, 2.5배 증가하였다. 열수추출물만을 처리했을 때보다 이동률이 현저히 증가한 것은 추출물과 우유의 상호작용에 의한 것으로 판단된다. 따라서 새송이버섯 추출물을 우유제조에 첨가한다면 기능성우유 제품개발이 가능할 것이다.

Table 14. 새송이버섯 열수추출물과 우유 혼합조성물의 소화관이동거리 측정

Experimental groups (mg/ml + mg/ml)	Shifting distance (cm)	Transit (%)
Control	12.0 ± 0.81	100
Water extract 1 (0.36 + 0.9)	19.0 ± 0.81	158.3
Water extract 2 (0.72 + 1.8)	28.0 ± 1.63	233.3
Water extract 3 (1.5 + 3.6)	35.3 ± 0.94	294.1

4) 새송이버섯 발효산물 열수추출물과 우유 혼합조성물의 변비해소 효과

발효 새송이버섯 열수추출물과 식수대신에 우유를 20% 첨가하여 만든 조성물을 이용하여 Balb/C 마우스의 소화관이동률을 조사하였다. 조성물을 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml 농도로 처리하여 대조구와 소화관이동거리를 측정하여 비교했을 때, 소화관이동률이 각각 180.0%, 212.5%, 258.3%로 처리량에 따라 직선적으로 증가했으며, 논문에 보고된 무추출물과 함초추출물 보다 각각 1.6배, 1.9배, 2.2배로 높게 증가하였다. 발효 새송이버섯 열수추출물에 우유를 혼합한 것도 새송이버섯 추출물의 우유 혼합물보다 소화관 이동률은 낮게 나타났다.

Table 15. 발효 새송이버섯 열수추출물과 우유 혼합조성물의 소화관이동거리

Experimental groups (mg/ml + mg/h)	Shifting distance (cm)	Transit (%)
Control	12.0 ± 0.81	100
Water extract 1 (0.36 + 0.9)	21.6 ± 4.49	180.0
Water extract 2 (0.72 + 1.8)	25.5 ± 3.18	212.5
Water extract 3 (1.5 + 3.6)	31.0 ± 6.53	258.3

5) 새송이버섯 열수추출물의 효소분해산물에 의한 변비해소 효과

새송이버섯 열수추출물을 섬유소분해효소인 cellulase와 hemicellulase를 처리하여 일정시간 가수분해 시킨 다음 Balb/C 마우스에 소화관이동률을 측정하였다. 효소분해산물을 0.72mg/ml와 1.5mg/ml 농도로 처리했을 때 대조구와 소화관이동률의 비교에서 204.6%와 316.4%로 처리량에 비례해서 소화관이동률이 증가하였다. 새송이버섯 열수추출물을 그대로 이용한 것보다 이동률이 증가하였는데 이것은 긴 다당류사슬을 어느 정도 길이로 분해하여 길이를 짧게 해줌으로서 장내의 이동을 쉽게 해주고, 음식물과 잘 혼화됨으로서 소화관이동을 촉진시킨 것으로 판단된다. 그리고 적당히 잘려진 다당류는 소화관 벽을 자극하여 장의 운동을 촉진하였을 것으로 판단되며 이는 향후 연구에서 보완이 필요할 것이다.

Table 16. 새송이버섯 열수추출물의 효소분해 산물에 의한 소화관이동거리

Experimental groups (mg/ml + mg/ml)	Shifting distance (cm)	Transit (%)
Control	10.67 ± 1.55	100
Water extract 1 (0.72 + 1.8)	21.83 ± 2.49	204.6
Water extract 2 (1.5 + 3.6)	33.76 ± 3.06	316.4

6) 새송이버섯 분말의 변비해소 효과

새송이버섯은 식용버섯이기 때문에 특별한 가공 없이도 섭취가 가능하다. 따라서 열수추출이나 효소분해 가공 없이 새송이버섯을 이용했을 때 소화관이동거리에 미치는 영향을 조사하고자 새송이버섯 분말을 사료에 일정량씩 첨가하여 급여시켜 조사하였다. 새송이버섯 분말을 일반사료에 3%와 5%첨가하여 사료를 만들고, 일반 사료를 급여한 대조구와 소화관이동거리로 변비해소효과를 측정하였다. 그 결과 3% 첨가한 사료에서는 소화관이동거리를 167.3% 향상시켰고, 5%첨가한 사료는 소화관이동거리를 192.9% 향상시켰다. 이 결과를 볼 때 새송이버섯을 가공 없이 그대로 섭취 하더라도 변비해소효과는 있는 것으로 확인되었으나 적정 섭취량의 연구는 더 필요할 것이다.

Table 17. 새송이버섯 분말의 소화관이동률

Experimental groups (%)	Shifting distance (cm)	Transit (%)
Control	15.6 ± 1.88	100
Water extract 1 (3%)	26.1 ± 1.31	167.3
Water extract 2 (5%)	30.1 ± 1.43	192.9

7) 새송이버섯 발효산물의 변비해소 효과

발효 새송이버섯 분말을 3%와 5% 첨가하여 만든 사료를 급여한 마우스의 소화관이동거리 측정에서는 각각 128.2%와 216.6%로 소화관이동거리를 증가시켰다. 분말을 그대로 사료하는 것과 열수추출 및 효소분해산물을 처리하는 것을 비교했을 때 발효 새송이버섯 분말의 사료급여 마우스에서 소화관이동률이 높게 나왔다. 열수추출과 효소분해하기 전에 미생물을 이용한 섬유소분해과정을 거쳤는데 다시 물리적, 화학적 처리는 소화관이동률 향상에는 역효과적인 영향을 미치는 것으로 추정된다.

Table 18. 발효 새송이버섯 분말의 소화관이동률

Experimental groups (%)	Shifting distance (cm)	Transit (%)
Control	15.6 ± 1.88	100
Water extract 3 (3%)	20.0 ± 0.86	128.2
Water extract 4 (5%)	33.8 ± 1.64	216.6

나. 변비유발 랫드(Sprague-DawleyC)에 대한 변비개선 효과

배변량과 변의 수분함량 등을 측정하여 변비개선 효과 조사하는 실험에 랫드(Sprague-DawleyC)를 이용하여 새송이버섯 열수추출물을 식수에 2mg/ml, 3mg/ml, 그리고 4mg/ml 농도로 처리했을 때 변의 무게가 각각 128.4%, 140.5%, 157.3%로 처리농도에 따라 배변량이 증가했으며, 변의 개수도 각각 121.6%, 132.1%, 133.7%로 증가하였고, 변의 수분함량도 각각 173.0%, 239.9%, 251.7%로 처리량에 따라 직선적으로 증가 하였다. 따라서 새송이버섯 열수추출물이 마우스의 소화관이동률뿐만 아니라 변비유발 모델의 배변량 증가에도 영향을 미치며, 변의 수분함량을 높여 배변을 원활하게 해주는 효과도 얻을 수 있다.

Table 19. 변비유발 랫드에 대한 새송이버섯 열수추출물의 배변량증가 효과

Experimental groups (mg/ml)	Shifting distance (g)	Transit (%)
Control	2.0681 ± 0.1051	100
Water extract 1 (2mg/ml)	2.6561 ± 0.0165	128.43
Water extract 2 (3mg/ml)	2.9075 ± 0.1185	140.58
Water extract 3 (4mg/ml)	3.2532 ± 0.4496	157.30

Table 20. 새송이버섯 열수추출물이 변비유발 랫드의 변갯수 증가 효과

Experimental groups (mg/ml)	Shifting distance (ea)	Transit (%)
Control	18.95 ± 0.15	100
Water extract 1 (2mg/ml)	23.05 ± 0.25	121.63
Water extract 2 (3mg/ml)	25.05 ± 0.75	132.19
Water extract 3 (4mg/ml)	25.35 ± 0.25	133.77

Table 21. 새송이버섯 열수추출물이 변비유발 랫드의 변 수분함량 증가 효과

Experimental groups (mg/ml)	Shifting distance (g)	Transit (%)
Control	0.6724 ± 0.0009	100
Water extract 1 (2mg/ml)	1.1636 ± 0.0478	173.05
Water extract 2 (3mg/ml)	1.6132 ± 0.0563	239.91
Water extract 3 (4mg/ml)	1.6929 ± 0.1977	251.77

다. 열수추출물을 급여한 마우스의 혈액분석

1) 새송이버섯 열수추출물을 급여한 마우스의 혈액분석

새송이버섯 열수추출물을 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml 농도로 식수에 녹여 급여를 했을 때, LDL-cholesterol 함량은 각각 21.8%, 33.6%, 40.0%로 처리량에 따라 감소했으며, Total cholesterol은 각각 8.4%, 10.1%, 12.1%로 처리량에 따라 cholesterol 함량이 줄어들었다. 이는 다당류와 기능성 성분이 cholesterol 흡수억제 및 담즙산 형태의 배설을 촉진함으로써 혈중 지질상태를 개선한다는 보고와 동일한 경향을 보였다. 새송이버섯 열수추출물을 급여한 마우스의 혈액성분 분석결과에서 LDL-cholesterol과 Total cholesterol 함량이 감소하는 것은 새송이버섯의 풍부한 식이섬유에 의한 효과라 사료된다. HDL-cholesterol의 함량변화에는 큰 차이가 없었고 이는 다른 보고서에서도 동일한 결과가 나타났다.

Table 22. 새송이버섯 열수추출물의 마우스혈액 중 지질함량 감소 효과

	Groups			
	Control	0.36mg/ml	0.72mg/ml	1.5mg/ml
Total cholesterol	138.0 ± 3.74	126.3 ± 7.36	124.0 ± 2.94	121.3 ± 7.58
HDL-cholesterol	111.2 ± 5.10	109.0 ± 5.61	107.5 ± 4.59	101.7 ± 5.73
LDL-cholesterol	11 ± 2.82	8.6 ± 1.24	7.3 ± 0.94	6.6 ± 1.24

2) 발효 새송이버섯 열수추출물을 급여 마우스의 혈액분석

발효 새송이버섯 열수추출물 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml 농도로 식수에 녹여 급여를 했을 때, LDL-cholesterol 함량이 0.36mg의 처리군에서는 유의적인 차이가 없었으며, 0.72mg, 1.5mg 처리군에서는 7.5%, 24.7%로 량에 따라 감소했으며, Total cholesterol은 9.2%, 10.6%, 17.8% 감소했다. 새송이버섯 열수추출물보다 발효시킨 것에서 활성이 낮게 나타났다.

Table 23. 발효 새송이버섯 열수추출물의 마우스혈액 중 지질함량 감소 효과

	Groups			
	Control	0.36mg/ml	0.72mg/ml	1.5mg/ml
Total cholesterol	138.0 ± 3.74	125.3 ± 2.62	123.3 ± 7.71	113.3 ± 4.49
HDL-cholesterol	111.2 ± 5.10	104.2 ± 1.34	106.6 ± 3.42	101.9 ± 7.11
LDL-cholesterol	9.3 ± 0.47	9.3 ± 0.94	8.6 ± 1.69	7.0 ± 0.81

3) 새송이버섯 열수추출물과 우유 혼합 조성물을 급여한 마우스의 혈액분석

새송이버섯 열수추출물과 우유를 혼합한 조성물을 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml를 처리했을 때 대조구에 비해 LDL-cholesterol 함량이 19.4%, 19.4%, 26.2%로 량에 따라 감소했으며, Total cholesterol 또한 1.9%, 4.7%, 8.9% 감소했으며, 량에 따라 직선적으로 감소하였다. 이는 식이섬유소와 기능성 성분이 콜레스테롤 흡수억제 및 담즙산 형태로의 배설을 촉진함으로써 혈중 지질상태를 개선한다는 보고와 유사한 경향을 보였다. 새송이버섯 1차 조성물과 우유를 혼합한 조성물의 혈액성분 분석 측정시 LDL-cholesterol, Total cholesterol 함량이 감소하는 결과는 새송이버섯의 1차조성물과 우유를 혼합한 조성물의 섬유질에 의한 것이라고 생각된다.

Table 24. 새송이버섯 열수추출물과 우유 혼합 조성물을 급여한 마우스의 혈액 중 지질함량 감소효과

	Groups			
	Control	0.36mg/ml	0.72mg/ml	1.5mg/ml
Total cholesterol	133.6 ± 10.33	131.0 ± 4.32	127.3 ± 12.68	121.6 ± 3.29
HDL-cholesterol	107.8 ± 4.69	105.7 ± 4.80	99.8 ± 5.59	111.2 ± 6.81
LDL-cholesterol	10.3 ± 1.24	8.3 ± 2.62	8.3 ± 2.05	7.6 ± 1.69

4) 발효 새송이버섯 열수추출물과 우유 혼합 조성물 급여 마우스의 혈액분석
 발효 새송이버섯 열수추출물과 우유를 혼합한 조성물을 식수에 0.36mg/ml, 0.72mg/ml, 1.5mg/ml 농도로 녹여 급여했다. 혈액성분은 대조군과 비교했고, LDL-cholesterol 함량은 15.5%, 22.2%, 33.3%로 감소했고, Total cholesterol은 5.9%, 8.6%, 9.7%로 처리농도에 비례해서 감소했다. 우유를 첨가하지 않은 실험에서보다 지질함량이 처리량에 따라 유의적으로 감소했다. 이는 우유가 식이섬유를 소화관내에서의 변비해소작용에 효과를 상승시키는 것으로 사료된다.

Table 25. 발효 새송이버섯 열수추출물과 우유 혼합 조성물을 급여한 마우스의 혈액 중 지질함량 감소효과

	Groups			
	Control	0.36mg/ml	0.72mg/ml	1.5mg/ml
Total cholesterol	133.6 ± 10.33	125.6 ± 9.87	122.0 ± 3.55	120.6 ± 2.35
HDL-cholesterol	107.8 ± 4.69	98.7 ± 6.20	102.7 ± 3.41	104.8 ± 1.49
LDL-cholesterol	9.0 ± 0.81	7.6 ± 0.94	7.0 ± 0.81	6.0 ± 0.81

5) 새송이버섯 분말 사료를 급여한 마우스의 혈액분석
 새송이버섯분말을 사료에 3%, 5% 첨가하여 마우스에 급여시켰을 때 LDL-cholesterol 함량은 대조구에 비해서 각각 18.2%와 7.5% 감소했으며, Total cholesterol은 6.9%와 7.7% 감소하였다. 새송이버섯을 가공하지 않고 그대로 섭취하더라도 체내의 혈액 중 지질의 함량을 감소시키는 효과가 있었지만, 처리량에 유의성 있게 지질함량이 감소하지 않았다.

Table 26. 새송이버섯 분말사료를 급여한 마우스의 혈액 중 지질함량 감소효과

	Groups		
	Control	3%	5%
Total cholesterol	125.3 ± 10.87	116.6 ± 2.35	115.6 ± 3.09
HDL-cholesterol	98.8 ± 2.77	97.6 ± 6.40	98.3 ± 2.45
LDL-cholesterol	9.3 ± 1.88	7.6 ± 0.47	8.6 ± 3.39

6) 발효 새송이버섯 분말사료를 급여한 마우스의 혈액분석

발효 새송이버섯 분말을 사료에 3%, 5% 첨가하여 마우스에 급여시켰을 때 LDL-cholesterol 함량은 대조구에 비해서 각각 37.9% 증가했고, 5% 처리군은 24.7% 감소하였다. Total cholesterol은 3% 처리군에서 13.3% 증가하였으며, 5% 처리군은 20.5% 감소하였다. 발효 새송이버섯 분말사료의 경우는량을 많이 첨가한 것에서는 TG와 LDL이 감소하였지만 처리량적 유의성에는 부족한 점이 있었다. 위의 결과와 종합을 해보면 버섯분말을 이용한 변비해소 효과는 얻을 수 있지만 혈액성분의 개선효과에는 추출물의 결과를 뒷받침하지 못했다. 하지만 양적인 증가를 검토하면 좋은 결과가 있을 것이며, 분말제제로 하여 복용을 하면 혈액성분개선효과가 있을 것으로 사료된다.

Table 27. 발효 새송이버섯 분말사료를 급여한 마우스의 혈액 중 지질함량 감소 효과

	Groups		
	Control	3%	5%
Total cholesterol	125.3 ± 10.87	142.0 ± 1.41	99.6 ± 5.90
HDL-cholesterol	98.8 ± 2.77	117.9 ± 2.36	89.0 ± 4.11
LDL-cholesterol	9.3 ± 1.88	13.0 ± 1.63	7.0 ± 1.41

라. 새송이버섯 열수추출물을 급여한 랫드(Sprague-DawleyC)의 혈액분석

새송이버섯 열수추출물을 2mg/ml, 3mg/ml, 4mg/ml를 식수에 녹여 급여한 랫드의 혈액성분 중 LDL-cholesterol 함량은 32.0%, 39.6%, 35.8% 감소했으며, Total cholesterol은 15.0%, 24.2%, 32.4%로 감소했으며, 급여량에 따라 감소하였다. 새송이버섯의 열수추출물이 랫드의 변비해소 효과뿐만 아니라 혈액으로 cholesterol

흡수를 억제하고 배설을 촉진함에 따라 혈중 지질상태를 개선하는 것으로 보인다.

Table 28. 새송이버섯 열수추출물의 랫드 혈중 지질함량 감소효과

	Groups			
	Control	2mg/ml	3mg/ml	4mg/ml
Total cholesterol	109.5 ± 1.5	93 ± 9.0	83 ± 9.0	74 ± 4.0
HDL-cholesterol	123.3 ± 1.3	115.2 ± 1.5	103.45 ± 8.1	87.8 ± 7.4
LDL-cholesterol	26.5 ± 0.5	18 ± 1.0	16 ± 2.0	17 ± 3.0

제 6절 새송이버섯 재배의 주요 병원균 분리 및 방제

1. 서언

새송이버섯 재배에 있어 주로 발생하는 병해는 배지원료에 기주하는 각종 미생물과 재배 중 주위환경으로부터 오염되는 두 가지 경로가 주된 오염경로이며, 그 외에도 종균의 오염, 작업환경의 불량 및 종균의 활력저하도 하나의 원인이 된다. 이 균들은 배지에 기생하면서 새송이버섯균과의 양분경쟁으로 버섯종균의 생육에 피해를 일으키는 부후성 병해와 병원균(Healey와 Harvey, 1989, Wells 등, 1996)이 직접 버섯에 기생하며 피해를 일으키는 병원성 병해로 나눌 수 있다.

새송이버섯 재배의 주요병해에는 *Pantoea* sp.와 *Pseudomonas* sp.에 의한 세균성 버섯무름병, *Trichoderma* sp.와 *Penicillium* sp.에 의한 푸른곰팡이병, *Rhizopus* sp.에 의한 cobweb disease, *Cladobotryum* sp.에 의한 흰곰팡이병, 붉은빵곰팡이(*Monilia* sp.), 흑회색용단곰팡이(*Trichurus* sp.) 등이 있다(Kim 등, 1994, Kim 등, 1995, Nutkins 등, 1991, Paine, 1919, Seo, 2001).

세균성 무름병은 습도와 온도가 세균의 번식에 가장 큰 역할을 하므로 지나친 가습과 온도관리가 잘 못되면 세균의 확산을 조장할 수 있다. 따라서 장마철이나 습한 날씨에는 습도의 관리를 철저히 해야 하고, 온도와 배지의 pH도 세균성 병해의 조절에는 중요한 인자이다.

곰팡이에 의한 병발생들은 종균오염과 작업환경의 불량으로 많이 발생하며, 농작물 재배작기 등에 의한 주위환경도 주요원인이 된다. 특히 푸른곰팡이병원균은 담자균에 속하는 어떠한 버섯에서나 재배 전과정에 걸쳐 발생되어지는 대표적인 병해이며, 심할 경우에는 재배지를 옮겨야할 정도로 큰 피해를 준다. 거미줄곰팡이와 흰곰팡이는 재배 후기에 발생하여 수확이 어렵게 하는 경우가 발생하므로 버섯재배 농가에서 생육실 환경관리가 중요하다. 이러한 곰팡이병해는 배지의 영양분에 손실을 가져다주고, 자실체의 발이를 억제하고, 자실체에 직접 기생하며 균사를 용해시키거나 독소를 분비하여 균사의 성장을 억제시킨다.

새송이버섯의 재배 중 발생하는 오염균들의 피해는 단순 원인보다는 복합적인 원인에 의해 병해가 일어나며, 발생되어지면 버섯 재배환경 특성에 의해 빠르게 확산되어진다. 병징과 오염균의 발생이 확인되어지면 습도나 온도조절 등으로 방제가 어렵고, 기타 약재도 사용할 수 없기 때문에 신속하게 배양실에서 격리시켜 살균하여 폐기하는 것이 좋다.

2. 재료 및 방법

가. 새송이버섯 재배 중에 나타나는 병원균 분리

새송이버섯 자실체나 재배병의 배지부분에서 발생하는 병원균의 오염상태나

병징을 보고 균을 분리하였다. 버섯자실체로부터는 조직의 절편을 취해서 material dilution agar methods로 분리하고, 배지는 일정량을 취한다음 material dilution agar methods로 분리하였다.

병원성 곰팡이 분리는 병징을 보이는 자실체나 배양병으로부터 조직 등을 취하여 PDA배지에 연속적인 계대배양을 하면서 순수분리를 하였다.

병원성 세균은 병징을 보이는 자실체나 배양병으로부터 조직 등을 취하여 NA배지에 연속적인 계대배양을 하면서 순수분리를 하였다.

나. 병원균 동정

병원성 곰팡이의 동정은 연속 계대배양으로 순수 분리한 다음 현미경을 이용한 균의 morphology 관찰로 균사와 포자경, 포자 등의 특성으로 동정을 하였다.

다. 보유 길항균을 이용한 항균 spectrum 조사

버섯 자실체와 버섯재배 배지에서 분리한 6개의 병원 곰팡이에 대한 항균 spectrum을 실험실에 보유 중인 길항균, 228과 AK-17을 이용하여 plate 대치배양 방법으로 항균활성을 조사하였다.

3. 연구결과

가. 새송이버섯 주요 병원균 분리

새송이버섯 재배에 있어 가장 문제가 되는 것은 병원균 및 잡균의 오염으로 농가소득에 큰 손실을 가져온다. Fig. 40 A의 곰팡이 F1, F3는 새송이버섯 균주보다 성장속도가 빨라 새송이버섯 보다 먼저 배양병을 선점하여 새송이버섯의 발이에 문제가 되고, 포자를 형성하기 때문에 재배실 전체를 오염시키기 때문에 오염의 징후가 보이면 빠르게 제거를 해주는 것이 중요하다. F2와 F4는 새송이버섯 균주의 생육을 억제하기 때문에 초기에 발생하면 새송이버섯의 발이를 막고, 발이 후에 발생하면 상품성이 떨어지거나 푸른색으로 포자를 형성하기 때문에 제품출하가 어렵다. F1과 F3 마찬가지로 재배실 전체를 오염시킬 수 있어 오염균의 발생 등의 철저한 관리가 필요하다. 세균은 새송이버섯의 생육에 자실체가 괴형현상을 초래하고, 자실체가 물러지는 현상이 나타나기 때문에 상품으로서 가치를 상실하게 된다.

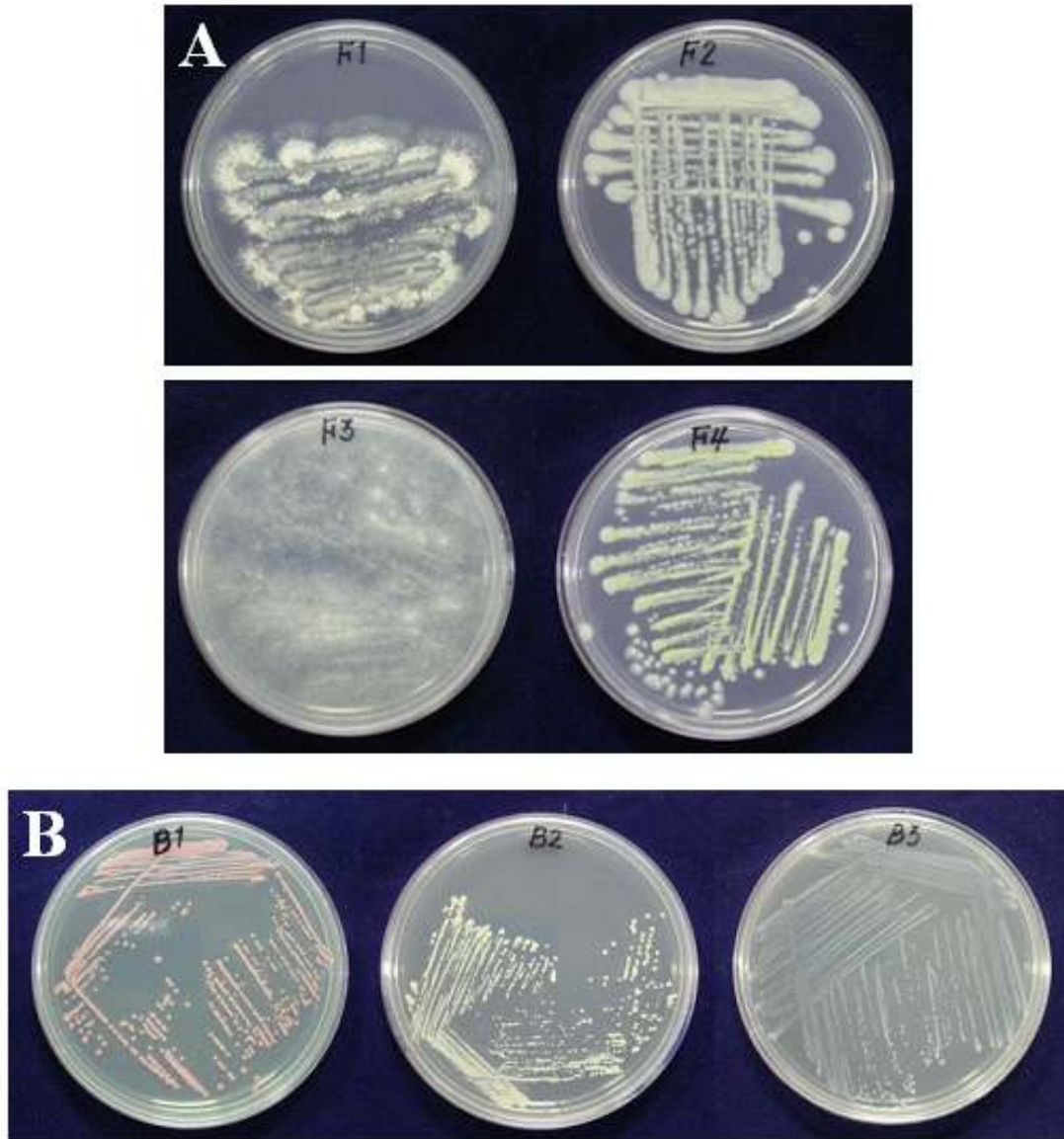


Fig. 40. 새송이버섯 재배의 주요 오염균

A: 곰팡이, B: 세균

Fig. 41은 새송이버섯 수확 전에 발생하는 병원균 F5의 피해양상과 오염균의 동정을 나타낸 것이다. A는 새송이버섯 자실체 아랫부분에 발생한 오염균의 피해현상이고, 시간이 지나면 물러지는 현상이 나타나며 자실체를 제거하고 나면 오염균에 의해 물러지는 현상과 균사에 의해 분홍색의 균사체를 볼 수 있다. B는 오염균을 순수 분리한 다음, 현미경의 사진으로 눈꽃이 피는 듯한 균의 생육을 볼 수 있다. 배양기간을 늘리면 포자가 형성되면서 분홍빛을 나타낸다. C는 균의 동정을 위하여 균사와 포자의 형태를 현미경으로 관찰하여 동정을 한 결과 분생자경이 직립으로 형성하고, 분생포자는 사슬이 엉켜진 모양으로 보이며, 대부분이 1개의 격막을 갖고 있으며, 다수를 갖는 것도 있었다. 이러한 형태학적 특성으로 *Cladobotryum* sp.로

동정을 하였다.

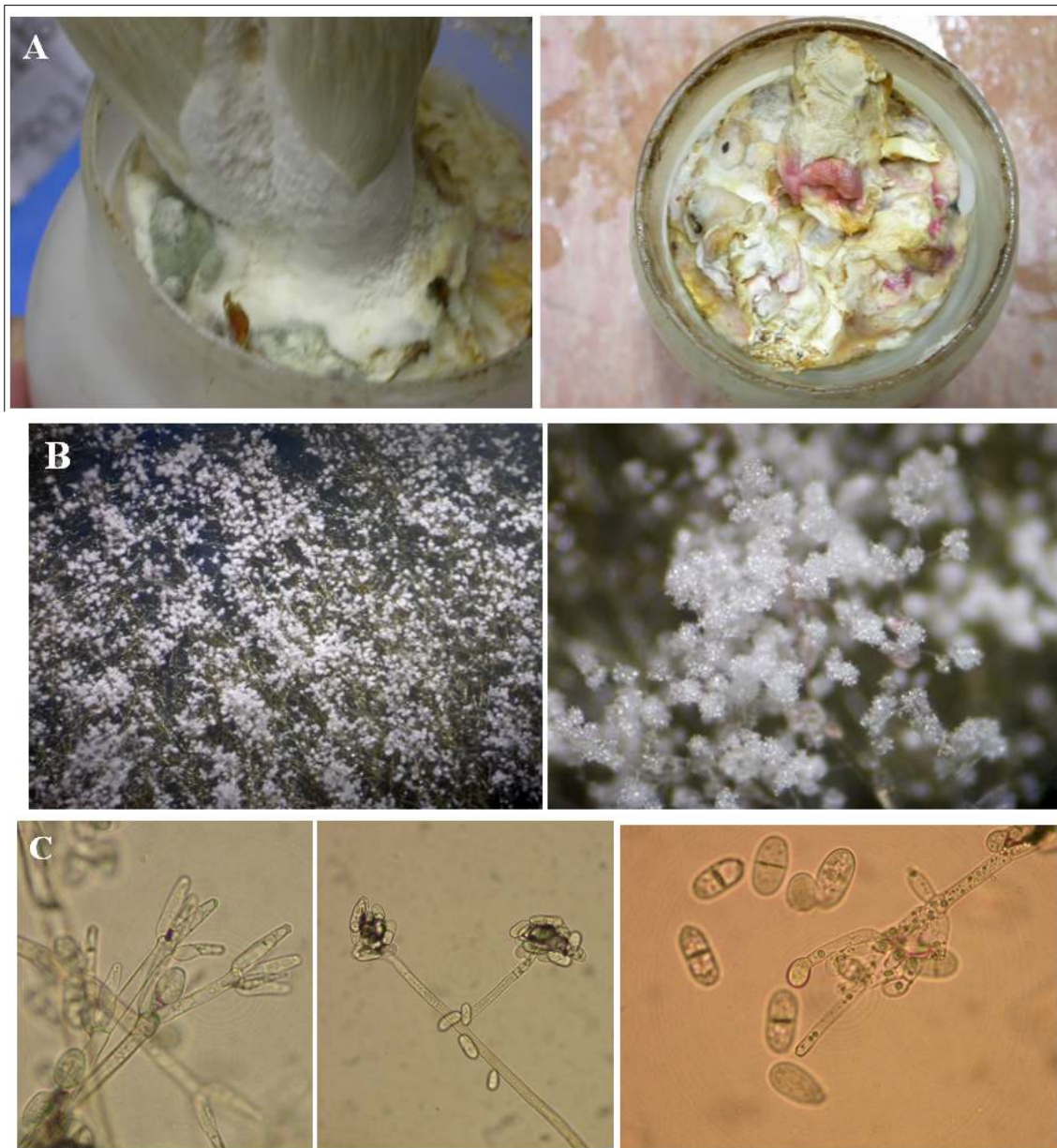


Fig. 41. 새송이버섯 재배 중의 병원균 *Cladobotryum* sp. 분리와 동정

A: 새송이버섯 피해양상, B: 순수분리한 병원균, C: 병원균의 균사와 포자

Fig. 42도 새송이버섯 수확 전에 피해를 주는 또 하나의 병원균 F6으로 초기에는 흰색을 나타내다가 차츰 검은색을 띄어 새송이버섯의 상품성을 없애버리는 피해를 준다. Fig. 42. A는 피해를 입은 새송이버섯으로부터 분리한 균을 순수분리한 후 petri plate에서 배양한 후 현미경으로 관찰한 사진이다. 초기에는 흰색으로 투명성을 지닌 균사가 그물망처럼 나타난다. 차츰 포자가 형성되면서 검은 점들이 나타나는데, B의 사진을 보면 균사가 갈색을 띄며 포자낭경이 길고 공기중으로 형성된다.

포자낭경의 끝에 검고 둥근 포자낭을 형성하며, 포자낭은 수많은 구형의 포자낭포자를 갖는 특성이 있고, 가근을 형성하고 가근과 가근사이는 포복균사를 형성하여 연결하는 *Rhizopus*의 균학적 특성을 모두 갖고 있어 *Rhizopus* sp.로 동정을 하였다. 일명 거미줄곰팡이라고 하는 균이며, 버섯재배사 인근에 과일이나 야채를 재배하는 곳이 있으면 포자가 바람에 날려 재배사로 이동하여 오염을 일으킬 가능성이 크다.

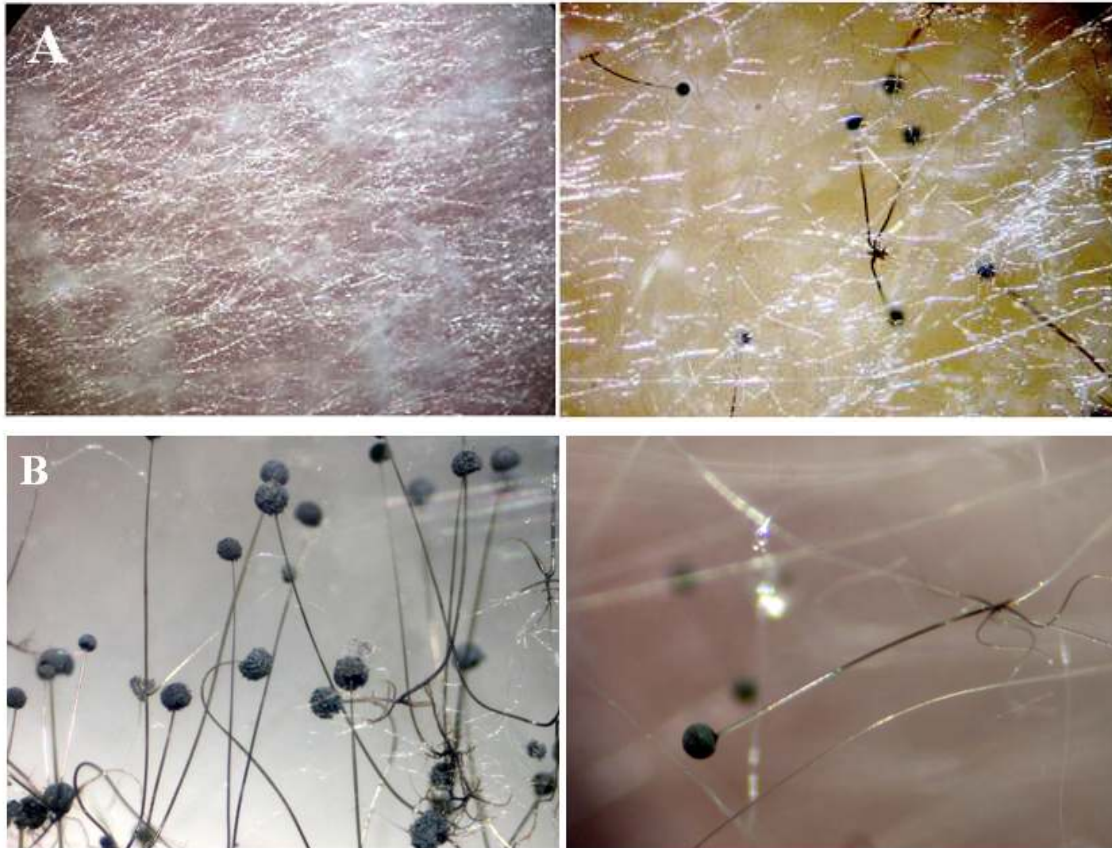


Fig. 42. 새송이버섯 재배중의 병원균 *Rhizopus* sp. 분리와 동정

A: 순수분리한 병원균의 현미경사진 B: 순수분리한 병원균의 균사와 포자

나. 새송이버섯 병원균에 대한 길항균 항균스펙트럼

새송이버섯 재배에 가장 큰 손실이 병원균의 오염으로, 오염에 대한 이해와 관리만 이루어지면 재배농가에는 큰 손실이 없다. 실제 농가에서 계절과 기후 및 주변 농작물 재배 등 많은 요인들이 오염을 일으키며, 방제를 위한 방법도 쉽지 않다. 새송이버섯도 곰팡이고 오염균도 곰팡이일 경우에는 선택적인 약제를 사용하는 것이 불가능하다. 본 연구실에서 가지고 있는 길항균과 농촌진흥청 공동연구에 사용한 길항균 53종을 갖고 새송이버섯균과 오염균에 대한 항균스펙트럼을 조사한 결과, 한 가지 균주만 특이성을 보였다(Fig. 43). AK-17은 각 병원균에 대한 길항력이 우수했지만 새송이버섯 균주의 생육에도 길항작용이 나타나서 새송이버섯 재배

에는 사용이 어렵다. 하지만 228균주는 병원균 F1, F2, F3에 대한 길항활성을 갖고 있으며, 새송이버섯 균주의 생육에는 초기에 저해하는 듯했지만 크게 생육에는 문제가 없었다(Fig. 43). 228균은 *Pseudomonas* sp.로서 새송이버섯 재배의 생물농약으로 개발의 가능성을 확인하였으며, 처리시기와 농도를 조절하면 새송이버섯 재배 농가에 큰 경제적 이득을 주게 될 것이다.

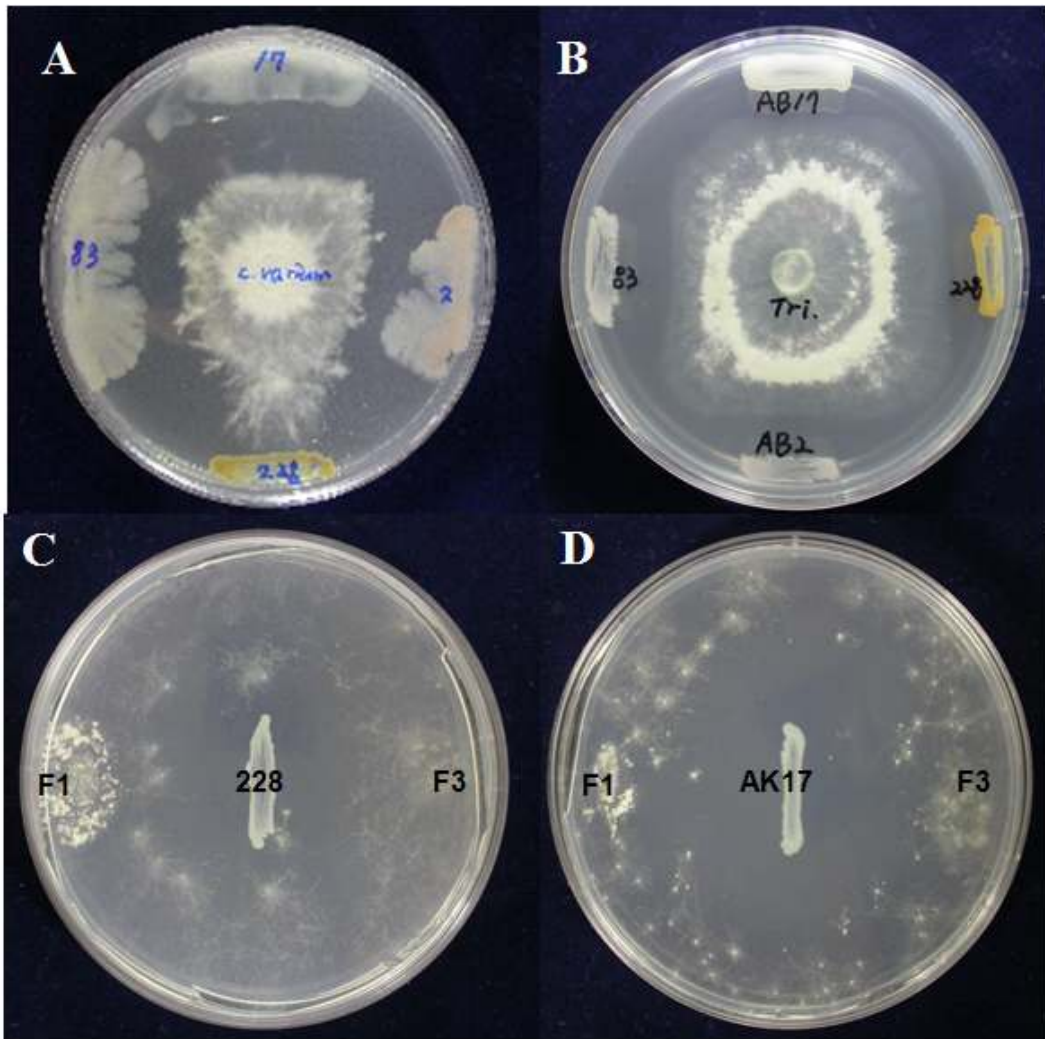


Fig. 43. 길항균을 이용한 새송이버섯균과 오염균에 대한 항균 스펙트럼

A: 새송이버섯균에 대한 길항균들의 항균작용, B: F2균에 대한 길항균들의 항균작용, C: 228균의 F1, F3에 대한 항균작용, D: AK-17의 F1, F3에 대한 항균작용

제 2세부과제 : 기능성다당류 함유 제품 생산

제1절. 서 론

산야에 자생되는 버섯은 고대 문명사회로부터 인간에 의하여 채취·이용되었으며 영양학적인 면보다는 기호식품으로 주로 이용되어왔다. 버섯은 그 자체로도 영양원이 풍부하지만 근래 들어서는 버섯 배지에 기능성 소재나 특수 성분을 함유한 원료를 첨가하여 균사체 및 자실체를 생산함으로써 그 성분이 버섯으로 이행되어 특수성을 갖는 버섯을 인위적으로 생산하기에 이르렀으며, 버섯의 영양가와 약용가치가 점차 밝혀짐에 따라 그 수요도 증가하고 있다.

최근에 버섯의 생물학적 활성에 관하여 국내외의 많은 보고가 있으며(Jung 등, 1992; Kim 등, 1992; Kim 등, 1993; Yoshioka 등, 1985), 한국 버섯류에 관한 항종양 활성에 관한 연구들도 보고되었다(Chai, 2001; Kim 등, 1980; Chang과 Miles, 1989). 활성성분의 대부분은 버섯 자실체나 액체 배양된 균사체로부터 추출되고 있는데 이들은 생체 내에서 면역기능을 회복시켜 주거나 감염 방어 등의 면역기능을 활성화하여 치료효과를 나타내므로 식용 및 의료용으로 장기간 복용하여도 독성 및 부작용이 거의 없는 것으로 알려져 있다(Hamuro와 Wagner, 1978). 그러므로 버섯 곰팡이인 담자균은 대량배양기술에 의해서 항암성 물질인 다당류의 생산에 이용되고 있다(Jung 등, 1996).

이와 같이 버섯은 일반식품에 비하여 무 농약 천연식품으로서 다른 농작물에서 합성이 적은 라이신 등 필수아미노산이나 무기질 등이 비교적 다양하게 함유되어 있으며, 버섯 성분 중에는 단백질, 아미노산 등이 풍부할 뿐만 아니라 β -glucan, 비타민 및 미량원소 등이 함유되어 있어서 새로운 기능성 소재로 각광을 받고 있다(Lee 등, 1997; Hui 등, 2002; Furlani와 Godoy, 2007; Yang 등, 2002; Smiderle 등, 2006).

버섯균은 자연생태계에서 유기물을 분해하면서 생성되는 에너지를 이용하는 분해자로서 역할을 주로 한다. 따라서 버섯균은 섬유소 분해능이 우수하여 일반 세균이나 효모균이 분해하기 어려운 리그닌 복합체도 포도당 등의 단당류 형태로 분해하여 토양 미생물의 증식을 조장하기도 한다(Bumpus 등, 1985; Cripps 등, 1990; Ready, 1995).

Lignin은 난분해성 페놀 고분자 화합물에 속하므로 동물에 의하여 소화가 어렵지만 담자균류 중 백색 부후균은 리그닌분해효소인 ligninase를 분비함으로 이를 사료첨가제로 이용하려는 시도가 이루어 졌고(박 등, 1978; 이와 김, 1982), 오 등(1984)은 느타리버섯 재배 배지를 육계에 이용할 수 있는 범위로서, 밀기울 4% 대체가 가능한 것으로 보고한 바 있다.

팽이버섯(*Flammulina velutipes*)은 담자균류의 주름버섯목(Agaricales) 송이과(Tricholomataceae)에 속하는 균으로 야생에서 팽나무, 뽕나무, 사시나무 등의 활엽수 줄기나 뿌리를 분해하는 백색 부후균의 하나로서(Chai, 2001), 오래 전부터 인공

재배에 의해 생산되어 왔는데, 최근에는 버섯재배의 기계화를 통하여 재배농장이 확대되어 매일 약 75 톤(연간 23,000 톤)의 생산체계를 갖추게 되어 농가소득의 주요 작목으로 정착 되었다(Chung, 1999). 재배된 팽이버섯을 수확하여 식용으로 가공되는 과정에서 폐기 처리되는 균사체(뿌리부분)의량은 연간 8,200 톤에 이르고 있어(농진청, 2006), 부존자원 및 폐기자원의 사료화는 자원의 효율적 활용 및 환경오염의 방지 측면에서 중요하다고 판단된다.

따라서, 본 연구에서는 폐기 균사체를 재이용하기 위한 방안의 일환으로 폐기 처리되는 새송이 및 팽이버섯 균사체를 산란계와 육계에 급여하여 계란과 닭고기의 생산의 효율성과 그 생산물에 대한 품질을 조사하여 산업적인 이용방안을 제시코자 하였다.

제 2절 미 이용 버섯자원을 이용한 계란 및 닭고기 생산

1. 연구수행방법

가. 미 이용버섯의 준비

1) 미생물 발효 버섯 유기물 생산

본 연구에 이용된 미 이용 버섯자원은 경상남도 청도군 소재 버섯재배농장에서 생산된 새송이버섯과 팽이버섯이다. 버섯을 수확한 후 배지에 남겨진 뿌리부분이나 포장작업에서 폐기되는 부산물을 신선하게 유지하여 톱밥을 제거하고, 건조시킨 후 사료분쇄기(Cutting Mill-J-NCM, 지시코 주식회사)를 이용하여 Sieve mesh를 20 mesh로 분말을 만들어서 시험에 이용하였고, 건조된 미 이용 버섯자원을 미생물을 이용하여 발효 처리 후 다시 시험에 이용하였다.

건조된 버섯의 미생물 발효는 먼저 고상발효를 위하여 다양한 형태의 다당류 들을 분해하는 *Bacillus subtilis* A8-8과 *Klebsiella* sp. Sc 균주(Figure 1)를 LB 배지 (polypepton 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L, glucose 1 g/L)에 접종하여 각각 37°C에서 2일간 배양 하였다. 이어서 고상배양액들을 건조된 버섯 분말과 1:1:1 (v:v:w)의 비율로 골고루 혼합한 다음, 이를 실온에서 2주 동안 발효시켰다. 이후 발효산물을 완전히 동결 건조시킨 후 Mixer를 이용하여 완전히 과쇄하고 사료 첨가물로 사용하였다.

본 실험에 사용된 미 이용 버섯자원의 구성성분은 Table 1에 표시 되었고, 새송이 버섯과 팽이버섯으로부터 미 이용부분의 분리와 건조 및 발효처리 준비과정은 Figure 2와 Figure 3에 나타내었다.

Table 1. Chemical composition of disused *Pleurotus eryngii* and *Flammulina velutipes*(%)

	Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude fiber	Crude Ash	Ca	P
새송이	14.30	15.35	0.61	5.52	8.70	0.003	0.181
팽이	10.52	23.04	2.56	7.69	6.82	0.017	0.759

1. All values are expressed on a dry matter basis.

새송이 버섯과 팽이버섯의 일반성분 분석은 AOAC법에 따라 실시하였다. 수분함량은 105°C 상압가열 건조법으로 측정 하였으며, 조단백질은 semi-micro kjeldahl 법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조섬유는 1.25% H₂SO₄ 및 NaOH 분해법으로 각각 측정하고 나머지는 가용성 무질소물로 나타내었다. 또한 회분은 550°C 건식 회화법으로 분석하였으며, 무기성분은 습식분해법으로 분석하였다.

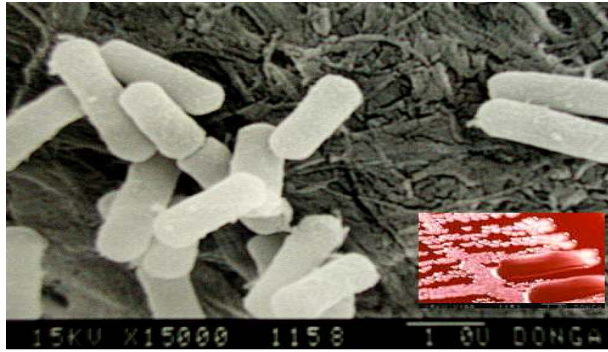


Figure 1. *Bacillus subtilis* A8-8 and *Klebsiella* sp. Sc



Growing *Pleurotus eryngii*



Growing *Flammulina velutipes*



Harvested *Pleurotus eryngii*



Harvested *Flammulina velutipes*



Disused *Pleurotus eryngii*



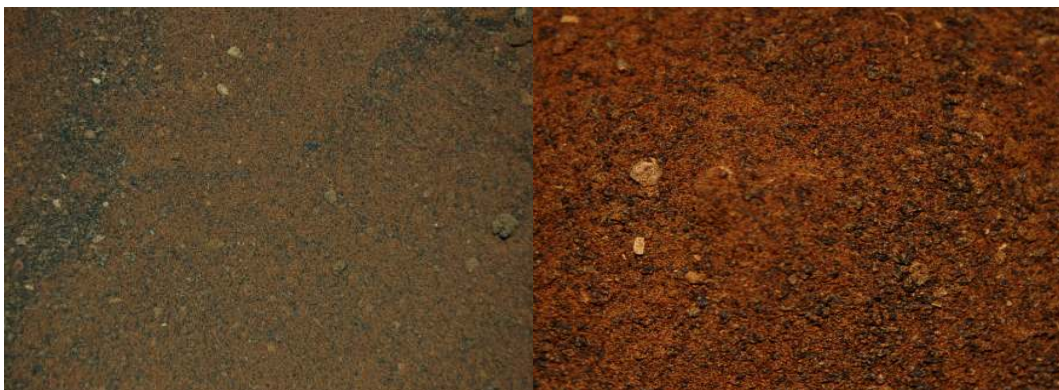
Disused *Flammulina velutipes*

Figure 2. Producing process of disused *Pleurotus eryngii* and *Flammulina velutipes*



Dehydrated *Pleurotus eryngii*

Dehydrated *Flammulina velutipes*



Fermented *Pleurotus eryngii*

Fermented *Flammulina velutipes*

Figure 3. Dehydrated and fermented *Pleurotus eryngii* and *Flammulina velutipes*

나. 기초사료 준비

본 연구에 이용된 기초사료는 농협에서 제조된 산란계 및 육계전용사료이다. 산란계의 사양을 위하여 옥수수-소맥피-대두박 위주로 배합된 조단백질 15.70 %, MEn 2,764 kcal/kg인 산란계사료를 시험 전 기간 급여하였다(Table 2).

Table 2. Ingredients and chemical composition of basal diets for layer
(Calculated values)

Ingredients	%
Corn grain(CHI)	60.34
Mixed grain(wheat)	5.52
Soybean M/L LOC	15.62
Corn gluten M/L	2.24
Animal fat	1.00
Salt dehydrated	0.20
DCP(18.5/23.0)	1.40
Limestone(1mm)	8.68
LIQ-Methionine(HYMETBI+)	0.13
The others*	4.87
Total	100.00
Chemical composition	
ME(kcal/kg)	2,763.90
Crude protein(%)	15.70
Crude fat(%)	3.73
Crude Ash(%)	12.88
Crude fiber(%)	3.00
Ca(%)	3.82

The others*

1. LIQ-Cholin Chloride 50%, 0.06; VIT Premix(Poultry-3), 0.15; Minpremix(Poultry-3), 0.15; Avizyme-1500, 0.025; Smuos, 0.1; Oxizory-D, 0.03.

육계의 사양을 위하여서는 4주령 이전은 옥수수-소맥피-대두박 위주 조단백질 19.50% 이상, MEn 3,050 kcal/ kg 이상인 육계전기사료<크럼블>과 4주령 이후는 옥수수-대두박 위주 조단백질 19.50% 이상, MEn 3,100 kcal/ kg 이상인 육계후기 사료<펠렛>를 기초 사료로 급여하였다(Table 2).

Table 3. Ingredients and chemical composition of basal diets for broiler
(Calculated values)

Ingredients	Starter (%)	Finisher (%)
Corn grain(CHI)	51.46	55.24
Mixed grain(wheat)	6.00	5.00
Soybean M/L LOC	27.34	25.24
Corn gluten M/L	5.00	5.00
Animal fat	5.00	5.00
Salt dehydrated	0.25	0.25
DCP(18.5/23.0)	2.12	1.96
Limestone(1mm)	0.94	0.92
LIQ-Methionine(HYMETBI+)	0.33	0.29
The others*	1.49	1.10
Total	100.00	100.00
Chemical composition		
ME(kcal/kg)	3,050.00	3,100.00
Crude protein(%)	19.50	19.50
Crude fat(%)	4.50	5.50
Crude Ash(%)	8.00	8.00
Crude fiber(%)	6.00	6.00
Ca(%)	0.80	0.85
Available P(%)	1.50	1.50

The others*

1. Starter - Declazulil, 0.05; Neomycin 77G(neocin), 0.024; Avilamycine, 0.4; L-Lysine(A, A-4), 0.274; LIQ-Cholin Chloride 50%, 0.08; VIT Premix(Poultry-3), 0.15; Minpremix(Poultry-3), 0.15; Avizyme-1500, 0.03; Smuos, 0.15; Oxizory-D, 0.03; Pastron, 0.05; Odor kare, 0.004; ALL-Mix, 0.15.
2. Finisher - Maduramicin(10 g), 0.05; Avilamycine, 0.024; L-Lysine(A, A-4), 0.168; LIQ-Cholin Chloride 50%, 0.07; VIT Premix(Poultry-3), 0.15; Min Premix(Poultry-3), 0.15; Avizyme-1500, 0.03; Smuos, 0.15; Promax(Berberine), 0.05; Oxizory-D, 0.03; BZF-Galicin, 0.05; Odor kare, 0.004; Pig-koll, 0.02; All-Mix, 0.15.

다. 산란계의 사육과 계란생산

1) 건조처리 미 이용 버섯자원의 급여

미 이용 새송이 버섯자원의 급여량 결정시험을 위하여 50주령의 하이라인 산란계 224수를 4개 처리구에 처리당 4반복으로 시험설계하고, 반복당 산란계 14수씩을 배치하였다. 대조구(Control)는 시험 전기간 동안 기초사료만을 급여 하였고, 시험1구(Treatment 1)는 기초사료에 건조처리 새송이 버섯 1.5%를 첨가, 시험2구(Treatment 2)에는 건조처리 새송이 버섯 3.0%를 첨가, 시험3구(Treatment 3)에는 건조처리 새송이 버섯 4.5%를 첨가하여 7주간 급여하였다.

또한 미 이용 팽이 버섯자원의 급여량 결정시험을 위하여 60주령의 하이라인 산란계 224수를 4개 처리에 처리 당 4반복으로 시험설계하고, 반복 당 산란계 14수씩을 배치하였다. 대조구(Control)는 시험 전기간 동안 기초사료만을 급여 하였고, 시험1구(Treatment 1)는 기초사료에 건조처리 팽이 버섯 1.5%를 첨가, 시험2구(Treatment 2)에는 건조처리 팽이 버섯 3.0%를 첨가, 시험3구(Treatment 3)에는 건조처리 팽이 버섯 4.5%를 첨가하여 7주간 급여하였다.

2) 발효처리 미이용 버섯자원의 급여

발효처리 미 이용 새송이 버섯자원이 계란의 품질에 미치는 영향을 조사하기 위하여 60주령의 이사브라운 갈색 산란계 20수를 4개 처리 구에 처리 당 5수씩을 배치하였다. 대조구(Control)는 시험 전기간 동안 기초사료만을 급여 하였고, 시험1구(Treatment 1)는 기초사료에 발효처리 새송이 버섯 1.0%를 첨가, 시험2구(Treatment 2)에는 발효처리 새송이 버섯 3.0%를 첨가, 시험3구(Treatment 3)에는 건조처리 새송이 버섯 5.0%를 첨가하여 7주간 급여하였다.

또한 발효처리 미 이용 팽이 버섯자원이 계란의 품질에 미치는 영향을 조사하기 위하여 60주령의 하이라인 산란계 30수를 6개 처리 구에 처리 당 5수씩을 배치하였다. 대조구(Control)는 시험 전 기간 동안 기초사료만을 급여 하였고, 시험1구(Treatment 1)는 기초사료에 발효처리 팽이 버섯 1.0%를 첨가, 시험2구(Treatment 2)에는 발효처리 팽이 버섯 2.0%를 첨가, 시험3구(Treatment 3)에는 발효처리 팽이 버섯 3.0%를 첨가, 시험4 구(Treatment 4)에는 발효처리 팽이버섯 4.0%를 첨가, 시험 5구(Treatment 5)에는 발효처리 팽이버섯 5.0%를 첨가하여 5주간 급여하였다.

3) 산란율 및 사료섭취량 측정

각 처리별 산란 수는 매일 조사한 후 닭 사육수수로 나누어 산란율을 구하였으며, 난중을 곱하여 총 산란량을 계산하였다.

사료섭취량은 사료 총 급여량에서 잔량을 제하여 총 섭취량을 측정 하였으며, 이어서 사육수수로 나누어 1수당 사료섭취량을 표시하였다, 사료요구율은 총 사료섭취량을 계란 총생산량으로 나누어 계산하였다.

라. 장내 미생물 및 계분의 가스발생량 조사

1) 장내 병원성 미생물

시험 종료 후 닭을 에틸 에터를 이용하여 마취시키고 의료용 가위와 핀셋을 이용해 오른쪽 복부(외복사근, 내복사근)를 절개하여 맹장을 고정시킨 후 10 cm정도 위치에서 실로 묶은 다음 잘라서 맹장을 채취하였다. 채취된 맹장을 1 cm정도 절개하여 내용물을 3 g정도 수거한 후 멸균된 50 ml conical type 튜브에 넣고 멸균된 생리식염수로 희석하였다. 먼저 10^{-1} 로 희석하고 $10^{-1} \sim 10^{-9}$ 까지 계단 희석을 실시하였고, 희석 중 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 에서 각각 0.1 ml를 선택 배지에 접종하여 37°C에서 배양하였다. *E. coli*와 *salmonella*의 colony수는 각각 DIGITAL COLONY COUNTER(KT00 -74A, Kartech, Korea)를 이용하여 측정 하였다. 배지는 S,S agar(Item No. 29081, 아산제약, Korea)와 MacConkey agar(Item No. 29021, 아산제약, Korea)를 이용하였으며, 각 배지의 특성 과 배양 조건은 Figure 2과 Table 4에 나타내었다. 조사된 미생물의 수는 \log_{10} 을 취하여 나타내었다.

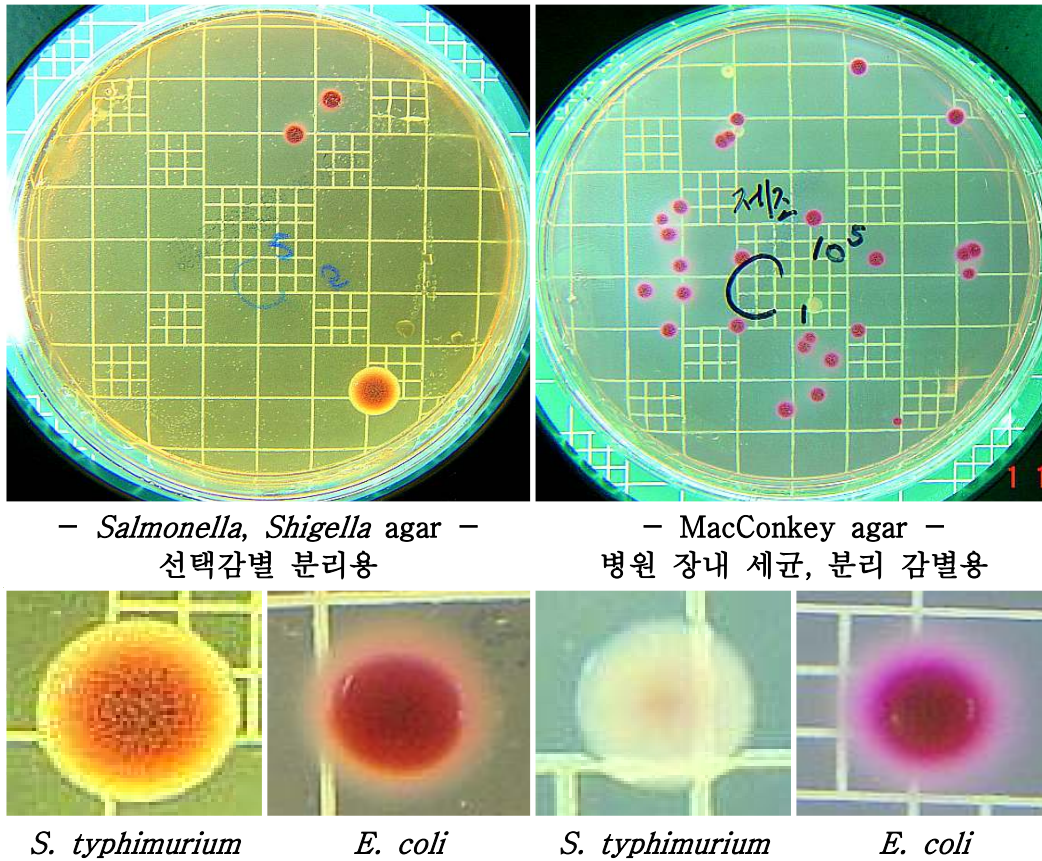


Figure 4. Media and counting conditions for *Salmonella* and *E.coli*.

Table 4. Media and culturing conditions

Selective media	Micro organisms	ATCC	reaction	Incubation method	Incubation time(days)
S,S agar ¹	<i>S. typhimurium</i>	14028	colorless black centers colonys	Aerobic condition	1
	<i>S. flexneri</i>	12022	colorless colonies	"	"
	<i>E. faecalis</i>	29212	Inhibition(complete)	"	"
	<i>E. coli</i>	25922	Inhibition(partial), colonies pink to rose-red	"	"
Mac Conkey agar ²	<i>E. coli</i>	25922	pink color	Aerobic condition	1
	<i>S. typhimurium</i>	14028	colorless colony	"	"
	<i>P. mirabilis</i>	12453	colorless colony, swarming Inhibition	"	"
	<i>E. faecalis</i>	29212	Inhibition	"	"

¹*Salmonella, Shigella* agar: Selection discrimination separation(Item No. 29021, 아산제약, Korea)

²MacConkey agar: Pathogenic Intestinal bacillus, separation discrimination(Item No. 29081, 아산제약, Korea)

2) 계분의 가스 발생량

사양시험이 종료된 시점에 각 처리별로 24시간 내에 배설된 신선 배설물을 수거한 다음 처리당 3반복으로 각 1.6 L 페트병 속에 순수 배설물 70 g씩 정량하여 채운 후 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15일, 1일 이후 3일 간격으로 가스 포집기(GV-100S, Gastec, Japan)를 이용하여 NH₃ 가스를 측정하였다. 이 때 배설물이 들어있는 병의 입구는 공기의 유통이 가능하게 천으로 가볍게 봉한 후 상온(20℃ 전후)에 보관하였으며, 가스측정 튜브(Detector tube, Gastec, Japan)는 NH₃ 량(ppm)에 따라 No. 3L(0.5~78 ppm), No. 3La(2.5~200 ppm), No. 3M(10~1,000 ppm)를 교환하여 측정하였다.

마. 계란의 품질 조사

1) 계란의 품질

계란의 품질은 각 처리별로 이상란을 제거하고 정상란으로 판단되는 것만을 선별하여 매 주마다 조사하였다. 조사당일 생산된 계란을 QCM+System Egg Quality Microprocessor(Technical Services Supplies, York, England)를 이용하여 난중, 난각중, 난각색, 난황색, 난백고, 호우유니트, 난각밀도 및 난각두께를 측정하였다. 여기서 난중은 계란 전체의 무게이며 난각 중은 난각막이 포함된 건조난각의 무게이다. 난각색은 백색에 대한 난각색의 농담 비율(%)을 나타낸 것이며, 난황색은 Roche Yolk Colormeter에 의하여 측정된 것이다. 난백고는 농후난백의 높이이며, 호우유니트는 난중과 난백고로부터 다음공식에 의하여 계산된 것이다. $HU=100\log(H-1.7W^{0.37}+7.6)$. 난각밀도는 난각 cm² 중의 μg 이며, 난각두께는 계란 중심부의 두께를 3회 측정하여 평균한 것이다.

2) 계란의 저장성

계란을 처리별로 선별하여 상온에 4주 동안 보존하면서 물리적 품질의 변화를 조사하였다.

바. 계란의 지질성분 분석

동결 건조된 계란 Sample에서 난황 1g을 유리튜브에 옮겨 담고 유리막대로 마쇄시킨다. Sample에 MeOH와 CHCl₃를 10ml : 20ml(1 : 2)로 넣고 Voltex시킨 후 초음파 세척기에 1분간 침지시키고, 30분 방치시키는 작업을 2회 반복한다. 상층을 여과하면서 Buchner funnel에 옮겨 담고, 0.88% aqueous KCl 용액을 15ml넣은 후 Shaking시키고 층 분리되면 하층은 버리고, 상층은 다시 funnel에 옮겨 담는다. H₂O를 추출액의 1/4 만큼 넣고 Shaking하여 3회 반복하여 세척시킨 후 상층액을 Round flask에 넣고 Rotary Vacuum evaporator에서 농축시킨다. 농축액을 Vial에 담고 Isooctane 1ml와 2N KOH(in MeOH) 100 μ l를 넣은 후 1min Vortex시키고 3min Centrifuging한다. Centrifuging 후 분리된 상층액을 다시 Vial에 옮겨 담고 Saturated aqueous ammonium acetate를 0.5ml넣고, 1min 간 Vortex 후 3min Centrifuging하고 동일한 방법으로 H₂O를 넣고 Vortex, Centrifuging한다. 상층을 Na₂SO₄에 CHCl₃와 함께 흘려보내 H₂O를 완전히 제거시킨 뒤 질소가스로 CHCl₃를 완전히 제거한다. 보관 후 GC/MS 분석한다. GC/MS 분석 조

건은 Table 5.에 나타내었다.

Table 5. GC/MS

GC	Agilent 6890
Column	HP-5MS(30m×0.25mm×0.25 μ m)
Oven temperature	170 $^{\circ}$ C(3min) $\xrightarrow{15^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 280 $^{\circ}$ C (7min)
Injection temperature	260 $^{\circ}$ C
MSD	Agilent 5973
Interface temperature	260 $^{\circ}$ C
Ionization voltage	70eV
Carrier gas	He(flow rate : 1ml/min)

○ GC/MS 분석

버섯을 급여한 닭이 생산한 계란의 성분을 조사하기 위한 GC-MS 분석은 Agilent 6890 GC에 연결된 Agilent 5973 MS를 사용하였고, carrier gas는 He gas를 1ml/min의 속도로 흘려보냈다. Ionization voltage는 70ev이었고, splitless mode로 분석하였다. 사용된 GC는 HP 6890 gas chromatography이었고, HP-5MS(30m×0.25mm×0.25 μ m) column 및 flame ionization detector를 이용하였다. GC의 온도프로그램은 170 $^{\circ}$ C에서 3분간 유지시킨 후 분당 15 $^{\circ}$ C로 승온하여 280 $^{\circ}$ C에서 7분간 유지시켰다. GC의 주입구 및 검출기의 온도는 290 $^{\circ}$ C로 하였고 carrier gas는 MS와 동일한 속도로 흘려보냈다. GC 컬럼에서 분리된 물질은 GC에 장착된 MSD(Mass Selective Detector)에 의해 검출되고 동정되어 얻어진 TIC(total ion chromatogram)와 각 피크의 mass spectrum을 확인하기 위하여 Wiley275 library의 mass spectrum data searching을 통해 동정하였다.

사. 육계의 사육과 닭고기 생산

1) 건조처리 미 이용 버섯 자원의 급여

육계병아리 96수를 4개 처리구에 처리당 3반복으로 실험설계하고 반복 당 병아리 8수씩 배치하였다. 대조구(Control)는 시험 전 기간 동안 기초사료만을 급여하였고, 시험1구(T1)는 기초사료에 건조처리 팽이버섯 1% 첨가, 시험2구(T2)는 기초사료에 건조처리 팽이버섯 3% 첨가, 시험3구(T3)는 건조처리 팽이버섯 5%를 각각 첨가하여 6주간 급여하였다.

2) 발효처리 미 이용 버섯 자원의 급여

육계병아리 96수를 4개 처리구에 처리당 3반복으로 실험설계하고 반복 당 병아

리 8수씩 배치하였다. 대조구(Control)는 시험 전 기간 동안 기초사료만을 급여하였고, 시험1구(T1)는 기초사료에 발효처리 팽이버섯 1% 첨가, 시험2구(T2)는 기초사료에 발효처리 팽이버섯 3% 첨가, 시험3구(T3)는 발효처리 팽이버섯 5%를 각각 첨가하여 6주간 급여하였다.

3) 체중 및 사료섭취량 측정

체중은 시험개시 후 매주마다 조사하였으며, 증체량(weight gain)은 1주일간의 총 증체량을 사육수수로 나누어 1수당 증체량으로 표시하였다. 사료섭취량(feed intake)은 사료 총 급여량에서 잔량을 제하여 총섭취량을 구하고 사육수수로 나누어 1수당 섭취량으로 표시하였으며, 사료요구율(feed/gain)은 사료섭취량을 1주일 증체량으로 나누어 계산하였다.

4) 닭고기 생산

시험 종료 시에 생체중을 측정하고 외면혈관절단법을 사용하여 신속히 방혈을 유도한 다음 중탕탈모법(59~60°C, 20~60 sec)으로 탈모시켰다. 이어서 머리와 발목 및 내장전체를 제거한 다음 냉수로 세척하고 냉각 시켰다. 가식내장(근위, 간, 심장)은 따로 분리 하였고, 닭고기의 이화학적 특성을 조사하기 위해서 가슴근육과 다리근육을 채취하였다.

아. 닭고기의 도체특성 조사

1) 도체특성

육계를 도살하기 전에 생체중을 측정하고, 방혈과 탈모 그리고 머리와 발목 및 내장전체를 제거한 다음 도체중을 측정하였다. 도체의 부분육은 경부(제1경추에서 제14경추사이), 익부(좌우 양쪽 날개부위), 흉부(흉골과 늑골이 포함된 가슴육), 척부(제1흉추와 17흉추사이), 요부(장골과 좌골이 포함된 골반부), 대퇴부(대퇴골과 경골 및 비골을 포함한 근육)로 분할하여 조사하였다. 가식내장으로 근위, 간, 심장의 무게를 각각 측정하였다.

2) 닭고기의 저장성

도체의 가슴과 대퇴부위의 껍질을 제거하고, 과도한 지방과 결체조직을 제거한 후 근육(Lean meat)부분만을 취하여 소비자용 랩(wrap)에 포장하여 냉장실(2±1°C)에서 저장하면서 0, 3, 6, 9일에 각각 TBARS(지방산패도)과 VBN(휘발성 염기태 질소)을 측정하였다.

TBARS(지방산패도)는 Witte 등(1970)의 방법에 따라 세절한 시료 10 g을 20%

trichloroacetic acid(in 2M phosphoric acid) 25 ml를 첨가하여 균질화(14,000 rpm, 2 min)한 후 증류수로 100 ml를 맞춘 다음 농도를 동일하게 하기 위해 유리막대로 shaking한 후 여과(Whatman No 1.)하였다. 여과액 5 ml와 0.005 M 2-thiobarbituric acid 용액 5 ml를 시험관에서 반응시켜 실온 암소에서 15시간 방치한 후, 자외-가시선 분광광도계(UV-9100, HUMAN, USA)에서 530 nm으로 측정하고 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{○ TBARS(mg of malonaldehyde / kg sample)} = \text{absorbance at 530 nm} \times 5.3$$

VBN(휘발성 염기태 질소)의 측정은 高坂(1975)의 미량화산법을 이용하여 세절한 시료 10 g를 취해서 증류수 90 ml와 함께 혼합하고 Homogenizer(T25, 동양과학, Korea)에서 14,000 rpm으로 5분간 Homogenizing한 다음 여과지(Whatman No 1.)에 여과하였다. 상기 여과액 3 ml를 Conway unit 외실에 넣고, 내실에는 0.01 N boric acid 1 ml와 Conway reagent 50 μ l(0.066% methyl red : bromocresol green/EtOH = 1 : 1)를 3방울 떨어뜨렸다. 뚜껑과 접착부위에 글리세린을 바르고 뚜껑을 닫은 후 50% Potassium carbonate(K_2CO_3 50 g / D.W. 100 ml) 1 ml를 외실에 주입 후 즉시 밀폐시켰다. (단, 공시험구에는 50% Potassium carbonate 용액을 외실에 주입하지 않는다.) 밀폐시킨 Conway unit 용기를 수평으로 교반시킨 다음 35°C에서 120분간 방치 후 0.02 N sulfuric acid(H_2SO_4)로 내실의 boric acid의 용액을 신속히 적정하였다. 시료를 S g, 공 시험 측정치를 b ml, 본 실험 적정치를 a ml, 0.02N H_2SO_4 의 표준화 지수를 F라고 할 때, 다음 식에 의해서 VBN값을 산출하였다.

$$\text{○ VBN mg\% (mg/100 g sample)} = (a-b) \times F(0.98) \times 28 \times 100/S(\text{sample의 량})$$

$$\text{○ F: } 0.02N - H_2SO_4 \text{ 표준화 지수} = \text{이론치 실제치} \\ 28 = 0.02 N - H_2SO_4 \text{ 1 ml 소모하는데 필요한 N의 양.}$$

자. 닭고기의 이화학적 특성 조사

1) pH(수소이온지수)

가슴과 다리 근육의 pH는 근막, 지방 등을 제거한 후 세절한 시료 10 g을 증류수 90 ml와 함께 Homogenizer(동양과학, T25)에서 14,000 rpm으로 10초간 균질한 다음 pH-meter(pHM210 Standard pH Meter, Consort, BE/C835, France)로 측정하였다.

2) 육색(Meat color)

육색은 가슴 천흉근(superficial pectorial m.)과 상오구근(brachral biceps m.) 그리고 정강이 대퇴2, 4두근(biceps, quadriceps femoris m.)과 비복근(gastrocnemius m.)의 단면을 이용하여 Chroma meter(Minolta, JP/CR.300, Japan)를 사용하여 Hunter 값의 명

도(lightness)를 나타내는 L*값, 적도색(red)를 나타내는 a*값과 황색도(yellow)를 나타내는 b*값을 고루 9회 반복 측정하여 평균값을 이용하였고, 이때의 표준색은 y 값이 92.40, x 값이 0.3136, y 값이 0.3196인 백색타일의 calibration plate를 표준으로 사용하여 측정하였다.

3) 가열감량(Cooking loss) 및 총 수분함량(Total water content)

가열 감량은 시료를 일정하게 절단하여 철망에 넣은 후 시료를 넣은 철망을 원심 분리 튜브에 넣고, Laboratory Film(Fara film, Menasha, USA)으로 원심분리 튜브 상단을 밀봉하였다. 밀봉한 원심분리튜브를 70°C의 항온수조에 30분간 가열하고 꺼내어 10분간 냉각 후 1,300 rpm에서 10분간 원심분리를 하고 무게를 측정하였다. 가열감량은 다음의 공식에 의하여 산출하였다.

$$\text{Cooking loss}(\%) = \frac{\text{가열전시료중량} - \text{가열후시료중량}}{\text{가열전시료중량}} \times 100$$

총 수분함량은 유리살레의 무게를 잰 후 시료를 일정하게 절단하여 유리살레에 올려놓고 무게를 재었다. 그런 후 Drying oven(대한랩테크, LDO-080N, Korea)에서 102°C로 하여 16시간 동안 건조시킨 후 2 hrs, 1 hrs, 30 min, 15 min마다 측정하여 변화가 없을 때의 수치를 측정하였다. 지문이 묻지 않도록 비닐장갑을 끼고 이동하였으며, Directer balance(XB220A, Precisa, swiss)에서 0.000단위까지 측정하였다.

$$\text{총수분 함량}(W(\%)) = \frac{(c-d)}{b} \times 100$$

○ 철망무게 = a , 시료무게 = b , a + b = c , 항량시 무게 = d

4) 보수력(Water-holding capacity)

보수력 측정은 $\frac{\text{총수분함량}(W) - \text{유리수분함량}(F)}{\text{총수분함량}(W)} \times 100$ 으로 산출하였다.

5) 수용성 및 염용성 단백질 용해성(Water and Salt soluble protein solubility)

단백질의 용해성은 Saffle과 Galbreath(1964)의 방법에 따라서 실험하였다. 수용성 단백질 추출은 시료 2 g에 증류수 12 ml를 가하여 Homogenizer(T25, 동양과학, Korea)를 사용하여 10,000 rpm에서 1분간 균질하고 이것을 원심분리기(KR/Union 5KR, Hanil, Korea)에서 2,450 rpm, Rotor code 1, 온도 15°C에서 Centrifuging하여 상등 액을 취해 비커에 넣은 다음 남은 잔사에 증류수 12 ml를 넣어 다시 Centrifuging 한 뒤 상층 액을 취하여 비커에 모은 후 그 추출액을 가지고 시험관에 Burret 시약* 과 Burret 시약 : 추출액을 3 : 2로 섞어 자외-가시선 분광광도계(UV-9100, HUMAN, USA)를 이용하여 540 nm에서 측정하는 Biuret 법(Cooper, 1977)으로 측정하였다. 염용성 단백질 추출은 수용성 단백질 추출을 하고 남은 잔사에 동일한

방법으로 증류수 대신 NaCl을 12 ml 넣고 두 번 상층액을 걸러 비커에 모은 후 그 추출액을 가지고 Biuret 시약과 혼합한 후 자외-가시선 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. 용해된 단백질량은 mg/ g으로 나타내었다.

○ Biuret 시약* = (CuSO₄ H₂O(3 g) + KOOCCH(OH) CH(OH) COONa 4H₂O(9 g) + 0.2N NaOH(8 g) + Potassium iodine(K.I)(5 g))

○ 0.2N NaOH 8 g을 1000 ml에 녹인 후 500 ml을 따서 CuSO₄ H₂O와 KOOCCH(OH) CH(OH) COONa 4H₂O를 녹인 후 나머지 500 ml에 요오드화칼륨인 Potassium iodine(K.I) 5 g을 녹여 혼합 후 1 L를 제조한다.

일반성분분석과 동일한 도축방법, 저장방법으로 -21℃ 냉동고에 저장한 후 실험시 해동하여 조지방 함량과 아미노산 분석 실험을 실시하였다.

6) 아미노산 함량

세절한 시료 10 g을 증류수 50ml와 혼합하여 Homogenizer(T25, 동양과학, Korea)에서 약 1,400 rpm에서 5분간 균질화시킨 다음 Slurry를 Centrifuging(4,000 rpm/20 min)시켜 Whatman No 2.로 여과시켰다. 여과액에 12% TCA solution을 증류수와 같은 동량 50 ml을 첨가시켜 침전시킨 다음 냉건소에서 1시간 침전 시켰다. 침전된 것을 균형을 바르게 하기 위해 Centrifuging(4,000 rpm/20 min)시킨 후 상등액을 분별깔때기(Separatory Funnel)에 넣고, 상등액에 Ethyl ether 50 ml를 가하여 TCA와 lipid를 제거하기 위해 3회 반복하여 하층을 재추출하였다. 이렇게 회수한 하층을 evaporator(40℃)로 흡수나 남아있을 12% TCA solution 과 Ethyl ether를 감압 건조하여 증발시킨 후 농축액 3 ml와 0.2M Lithium citrate loading buffer(pH 2.2) 7 ml를 희석시켜 10 ml를 만든 후 membrane filter(0.45 μm)로 여과하여 자동 아미노산 분석기 (Bioteck Biochrom 30, Pharmacia., UK)에 40 μl를 주입하여 분석하였다. 아미노산 분석은 Table 6과 같은 조건에서 분석하였다.

Table 6. Operating conditions for the analysis of amino acid by amino acid analyzer

Item	Condition
System	Pharmacia bioteck boichrom 30, UK
Data analysis	Amino acid analyzer
Injection volume	40 μl
Buffer	Lithium citrate buffer
Temp. range	Reaction coil : 40 to 145℃
Column	20 to 99℃

7) 조지방 함량

조지방 함량은 Folch법(1957)을 이용하여 조지방 함량 구하였다. 세절한 시료(A) 3 g(오차허용기준 : 3.00 ± 0.03 g)을 50 ml conical type 튜브에 넣고 Folch I인 혼합 solvent(Chloroform : methanol(2 : 1))를 15 ml를 첨가한 다음 Homogenizer(T25, 동양과학, Korea)를 이용하여 2,500 rpm에서 3분간 균질화시켰다. Homogenizer에 묻은 지질 조각을 Folch I 5 ml를 이용하여 50 ml conical type 튜브에 모은 후 균질화된 시료에서 조지방의 추출액이 완전히 빠져 나오도록 하기 위해 2시간 동안 항온실에 방치하였다. 방치 후 추출액을 100 ml 메스실린더에 설치된 여과지(Whatman No 1.)에 여과시켰고, 50 ml conical type 튜브에 남아있는 지질 조각도 포함시키기 위해 Folch I solvent 5 ml을 50 ml conical type 튜브에 넣고 세척시켜 함께 여과시켰다. 여과지에 다시 Folch I solvent를 골고루 5 ml 넣어 조지방을 추출을 유도한 후 메스실린더에 0.88% NaCl를 총 여액의 1/3 정도 첨가하여 shaking시켜 상층(methanol, 증류수, NaCl)과 하층(조지방, Chloroform)을 분리시켰다. 분리된 하층의 높이(B)를 측정한 후 Aspirator(VE11, JEOTECH, Korea)를 이용하여 연결된 모세관으로 상층액을 버리고 하층(lipid layer)만을 취하였다. lipid layer에서 10 ml(C)를 dish에 넣고 Dry Oven(LDO-080N, 대한랩테크, Korea) 60°C 이상에서 30분 동안 Chloroform을 완전히 건조시켰다. 건조시킨 dish 무게에서 dish무게를 빼 조지방 무게(D)를 구했다.

$$\text{○ 조지방(\%)} = (D \times B) / C / A \times 100$$

8) 지방산 조성

Chloroform이 증발되고 조지방만 남은 Al-dish에 Methylene chloride(Dichloromethan) 1ml을 첨가하여 지방을 녹여준 후 Teflon이 붙어있는 20ml glass tube(with cap)에 옮겨 담았다. Dichloromethan으로 지방을 녹인 glass tube에 0.5N NaOH(in Methanol)을 1ml 첨가 후 Heating Block에 90°C에서 10분간 가열하고 가열이 끝나면 실온에서 식혀주었다. 식은 후 BF₃(Boron Trifluoride Methanol Solution)를 1ml 첨가시킨 후 다시 90°C에서 10분간 가열하고 가열이 끝나면 실온에서 식혀주었다. Methylation이 끝난 glass tube에 Hexane 3ml와 증류수 8ml를 넣고 Vortexing을 해준 후 원심분리기(Hanil, KR/union 5KR)에서 원심분리(1,000rpm, 10min)를 해주었다. 2ml Test tube를 준비해서 Na₂SO₄를 소량 넣고, 상층(지방산 추출물)에서 1.5~2ml 채취하여 넣어 수분을 제거한 후 상층을 유리 Syringe에 filtering(0.2μm filter)시키면서 GC분석용 Vial병에 넣고 -21°C에서 보관하였다. GC 분석 시 Vial병에서 1μl를 10μl Syringe에 취하여 GC에 주입 후 지방산을 분리 정성, 정량하였다. 이때 GC 분석 조건은 Table 7와 같다.

Table 7. GC/MS

GC	Agilent 6890
Column	HP-5MS(30m×0.25mm×0.25 μ m)
Oven temperature	170 °C(3min) $\xrightarrow{15^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 280°C (7min)
Injection temperature	260 °C
MSD	Agilent 5973
Interface temperature	260 °C
Ionization voltage	70eV
Carrier gas	He(flow rate : 1ml/min)

차. 통계 분석

시험 및 분석 등을 통해서 얻어진 성적들은 SAS package(2008)의 ANOVA Procedure로 분산분석을 실시하였고, Duncan's의 New multiple range test를 이용하여 유의성 검정을 실시하였다.

2. 연구 수행내용 및 결과

가. 건조처리 미 이용 버섯의 급여에 의한 계란생산

1) 건조처리 새송이 버섯이 계란생산 및 품질에 미치는 영향

가) 산란율과 사료요구율

미 이용 새송이 버섯을 건조처리 후 산란계에 첨가급여 시 처리별 산란율과 사료 섭취량 및 사료요구율의 변화는 각각 Table 1-1, Table 1-2, Table 1-3에서 보는 바와 같다. 건조처리 미 이용 새송이버섯을 급여사료의 0.0%, 1.5%, 3.0% 및 4.5%를 첨가 급여 하였을 때 산란율은 처리 간에 약간의 차이가 관찰 되었다. 전체적으로 산란율이 83~91%의 범위를 유지했으나 미 이용 새송이 버섯을 첨가한 경우에서 다소 높아지는 경향이었으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 양 등(2003)은 산란계 사료 내 녹차가공 부산물을 첨가한 경우 산란율이 증가하였다고 하였으나, 김 등(2006)은 약용식물 가공부산물을 사료내 첨가하여도 산란율에 변화가 없었다고 하여 본 결과와 유사하였다.

시험기간 중 사료섭취량은 Table 1-2에서 보는 바와 같이 시험초기에는 처리 간에 차이가 없었으나, 시험 중기 이후부터 새송이 버섯을 첨가한 경우 사료섭취량이 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 그러나 사료요구율은 Table 1-3에서 보는 바와 같이 처리 간에 차이가 없었다. 산란계사료에 장식의 첨가는 사료섭취량을 떨어뜨린다(고 등, 2005)고 한 반면 타우린을 첨가하면 사료섭취량이 감소하였다(김 등, 2002)고 하

여 첨가제의 종류에 따라 사료섭취량은 차이가 나타날 수 있다. 일반적으로 사료의 에너지가 높으면 사료섭취량이 감소한다는 사실로 볼 때 새송이 버섯을 첨가함으로써 사료의 에너지를 다소 높혔던 것으로 볼 수 있다.

Table 1-1. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on egg production rate(%)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	86.3±1.6 ^{ab}	88.0±1.4	90.0±0.8	85.3±1.1	83.7±3.4 ^b	86.7±1.6	85.0±1.8 ^b
T1	85.0±2.0 ^b	87.3±3.1	88.7±3.1	88.0±4.4	89.0±3.5 ^{ab}	88.5±4.5	90.0±3.9 ^a
T2	90.3±1.8 ^a	91.5±2.8	88.8±3.9	89.0±3.3	88.3±4.4 ^{ab}	91.0±3.2	90.0±5.0 ^a
T3	86.3±0.5 ^{ab}	87.0±2.3	92.0±0.4	88.0±0.9	91.0±2.9 ^a	90.3±2.7	86.0±1.5 ^b

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

¹⁾ C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 1-2. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on feed intake(g/hen/d)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	127.7±3.0 ^a	125.5±5.0	122.3±3.9 ^b	137.8±1.6 ^a	130.6±3.3 ^a	122.7±2.3 ^a	132.4±1.7 ^a
T1	121.4±3.4 ^{ab}	125.2±8.8	124.3±0.9 ^{ab}	126.5±2.3 ^c	121.1±1.9 ^b	112.9±4.4 ^b	116.0±3.9 ^b
T2	120.6±5.5 ^b	121.4±2.2	124.7±1.1 ^{ab}	126.2±2.2 ^c	117.1±0.8 ^b	119.1±4.8 ^{ab}	120.0±3.9 ^b
T3	123.0±3.9 ^{ab}	129.3±2.6	126.8±1.3 ^a	131.0±2.4 ^b	121.1±3.4 ^b	121.1±1.9 ^{ab}	128.9±0.9 ^a

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

¹⁾ C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 1-3. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on feed conversion(feed/egg mass)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	2.37±0.08	2.25±0.07	2.10±0.02	2.56±0.06	2.37±0.11	2.21±0.06	2.45±0.08
T1	2.26±0.14	2.20±0.18	2.24±0.11	2.31±0.15	2.17±0.09	2.00±0.14	2.10±0.16
T2	2.15±0.08	2.17±0.04	2.25±0.12	2.26±0.09	2.07±0.11	2.19±0.13	2.21±0.12
T3	2.29±0.03	2.34±0.06	2.20±0.02	2.39±0.07	2.16±0.11	2.17±0.09	2.45±0.06

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

¹⁾ C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

나) 장내 병원성 미생물 및 계분 내 가스발생량

건조처리 미 이용 새송이 버섯 첨가 급여 시 산란계의 맹장 내용물 중 병원성 미생물의 수는 Table 1-4와 같고, 계분 중의 NH₃ 가스 발생량은 Table 1-5에서 보는 바와 같다. 맹장 내 *Salmonella*균수는 C, T1, T2, T3 각각 4.930, 4.867, 4.822, 0.546으로 건조처리 새송이버섯 5%급여한 경우 유의적으로 낮았다($p < 0.05$). 대장균인 *E. coli* 수도 새송이버섯 3%수준 이상 급여 시에 유의적으로 낮았다($p, 0.05$). 병원성 미생물은 장내에서 산소를 이용하므로 장내 혐기성유산균의 증식을 촉진시키면 유해 미생물의 증식을 억제할 수 있다고 하였다(Rose, 1980; Stark and Wilkinson, 1989). 따라서 효모나 유산균을 급여한 경우 가금의 장내 유해 세균수를 감소시켜 영양소 흡수를 좋게 하며(Tonkinson et al, 1965), 난각질을 개선시킨다(Thayer et al, 1978)고 하였다. 본 시험 결과 새송이 버섯의 급여에 의하여 장내 유해미생물의 억제 효과를 다소 기대할 수 있다고 사료된다.

Table 1-5에 표시된 계분 내의 가스발생량은 저장 9일까지 암모니아가스 발생량이 증가하고 그 이후 감소하였다. 그러나 대조구에 비하여 T1, T2, T3에서 가스발생량은 유의적($p < 0.05$)으로 낮게 나타났다. 김 등(2002)은 계분 내 암모니아 가스발생량은 배분 후 3일부터 6일까지 최대로 발생하며 생균제를 급여하면 발생량이 현저하게 감소한다고 하였다. 본 실험 에서도 건조처리 새송이 버섯의 급여에 의하여 계분 내 암모니아 가스 발생량을 중일 수 있을 것으로 기대된다. 닭의 소화기관 내 암모니아가스 발생은 유해균에 의하여 발생하므로 사료 첨가제로 장내환경을 개선 해 주면 난중과 산란율 향상(Nahason et al., 1994), 사료효율 및 난백품질 개선(Tortuero and Fernandez, 1995), 난황 콜레스테롤 감소(Haddadin et al., 1996) 등을 기대할 수 있다고 하였다.

Table 1-4. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on *Salmonella* and *E. coli* in cecal contents of laying hen(log₁₀ cfu/g contents)

Treatment ¹⁾	<i>Salmonella</i>	<i>E. Coli</i>
C	4.930±0.033 ^a	4.966±0.027 ^a
T1	4.867±0.021 ^a	4.929±0.008 ^a
T2	4.822±0.028 ^a	4.513±0.040 ^b
T3	4.546±0.048 ^b	4.387±0.027 ^c

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly($p < 0.05$)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 1-5. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on NH₃ emission in layer excreta(ppm)

Treatment ¹⁾	Days						
	0	1	3	6	9	12	15
C	13.8±1.2 ^a	13.2±1.1	102.2±10.1 ^a	203.3±7.3 ^a	222.2±19.5 ^a	131.1±10.7 ^a	44.7±5.7
T1	13.7±0.9 ^a	14.9±1.2	101.1±7.4 ^a	202.2±13.4 ^a	216.7±5.3 ^a	111.1±4.8 ^{ab}	49.8±2.8
T2	13.2±0.7 ^a	14.4±1.3	93.3±6.0 ^a	200.0±17.0 ^a	170.4±6.6 ^b	123.3±5.3 ^{ab}	40.4±1.9
T3	9.0±1.7 ^b	9.8±0.5	47.8±3.2 ^b	93.6±3.6 ^b	135.1±6.9 ^c	104.4±3.4 ^b	38.4±3.7

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

다) 계란의 외부 품질

건조처리 미이용 새송이 버섯 첨가급여 시 난각색과 난중에 대한 효과는 Table 1-6과 Table 1-7에 각각 표시하였다. 난각색은 유전적인 영향에 의하여 지배되는 형질이므로 사료의 영향은 적은 형질이다. 따라서 본 시험결과 처리 간에 분명한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 새송이 버섯을 급여한 경우 난각색의 농도가 다소 떨어지는 경향이였다.

난중은 전체적으로 볼 때 61~65g 범위에서 분포하고 있다. 건조처리 팽이 새송이 버섯을 급여한 경우 3주 이후부터 난중이 다소 무거워 지는 경향이였다. Nahashon et al(1994)은 유산균 급여하였을 때 난중과 산란율이 향상되었다고 하였다. 이것은 사료 첨가에 의하여 닭의 장내 환경을 개선시킨 결과로서 본 시험과 유사하다고 본다.

Table 1-6. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on shell colour index(%)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	28.4±1.01 ^b	27.8±0.77	29.7±0.81	29.6±0.81	29.7±0.83 ^b	32.0±0.88	31.0±1.11 ^b
T1	30.4±1.07 ^{ab}	28.3±0.75	31.8±0.74	31.9±0.83	31.6±1.10 ^{ab}	32.1±0.91	32.3±1.04 ^{ab}
T2	32.0±0.75 ^a	28.0±0.64	31.3±0.71	31.8±0.79	34.0±0.90 ^a	32.1±0.72	34.4±1.14 ^a
T3	30.5±0.67 ^{ab}	26.8±0.78	30.8±0.69	30.0±0.90	32.0±1.00 ^{ab}	32.7±0.79	30.2±0.90 ^b

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 1-7. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on egg weight(g)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	61.6±1.01 ^b	63.6±0.77	62.9±0.81 ^b	62.5±0.81	63.5±0.83	63.7±0.88 ^{ab}	62.5±1.11 ^b
T1	61.9±1.07 ^b	63.3±0.75	63.7±0.74 ^{ab}	63.6±0.83	63.9±1.10	64.7±0.91 ^{ab}	64.8±1.04 ^a
T2	62.7±0.75 ^{ab}	63.3±0.64	63.4±0.71 ^{ab}	62.9±0.79	63.5±0.90	63.0±0.72 ^b	63.1±1.14 ^{ab}
T3	64.1±0.67 ^a	35.3±0.78	65.0±0.69 ^a	63.9±0.90	65.1±1.00	65.3±0.79 ^a	64.2±0.90 ^{ab}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

라) 계란의 내부품질

계란 난백의 품질인 난백고와 호우유니트는 각각 Table 1-8과 Table 1-9에 나타내었으며, 난황의 품질인 난황색은 Table 1-10에 나타나 있다. 건조처리 새송이 버섯을 급여한 경우 3주 이후에 난백고가 높아졌다. 이에 따라 난백고와 난중에 의하여 계산되는 호우유니트도 건조처리 새송이 버섯을 급여한 경우 급여기간이 진행됨에 따라 높아지는 경향이었다. 호우유니트는 계란의 신선도를 나타내는 지표로써 계란의 내부 품질을 결정하는 주요 요인이다.

계란 난황색의 농도는 Table 1-10에서 보는 바와 같이 처리 구 간에 차이가 없었다. 그러나 건조처리 새송이 버섯 급여기간이 진행됨에 따라 난황색의 농도는 열어지는 경향을 나타내었다. 계란의 난황색은 캐로티노이드계의 Xanthophyll의 축적에 의하여 이루어지므로 새송이 버섯에서는 이러한 색소가 없다고 판단된다. 홍 등(2001)은 한약제 부산물을 첨가해도 난황색에 차이가 없었으며, 김 등(2006)도 약용식물가공부산물의 첨가가 난황색에 차이를 나타내지 않았다고 하였다.

Table 1-8. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on albumen height(mm)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	9.36±1.01 ^b	9.49±0.77	9.19±0.81	9.26±0.81 ^b	9.31±0.83 ^b	9.26±0.88 ^b	8.93±1.11
T1	9.95±1.07 ^a	9.79±0.75	9.48±0.74	9.51±0.83 ^{ab}	9.38±1.10 ^{ab}	9.71±0.91 ^a	8.86±1.04
T2	9.94±0.75 ^a	9.71±0.64	9.32±0.71	9.64±0.79 ^a	9.38±0.90 ^{ab}	9.66±0.72 ^a	9.21±1.14
T3	9.66±0.67 ^{ab}	9.77±0.78	9.45±0.69	9.64±0.90 ^a	9.69±1.00 ^a	9.73±0.79 ^a	9.41±0.90

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 1-9. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on Haugh units(HU)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	95.7±1.01 ^b	95.2±0.77	94.1±0.81	95.2±0.81	95.2±0.83 ^{ab}	95.0±0.88	93.4±1.11
T1	97.1±1.07 ^{ab}	97.2±0.75	95.3±0.74	95.8±0.83	96.0±1.10 ^{ab}	96.2±0.91	94.4±1.04
T2	97.5±0.75 ^a	96.7±0.64	95.1±0.71	96.8±0.79	94.7±0.90 ^b	96.4±0.72	95.8±1.14
T3	97.0±0.67 ^{ab}	96.8±0.78	96.4±0.69	96.7±0.90	97.0±1.00 ^a	96.4±0.79	96.0±0.90

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 1-10. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on yolk colour index(Roche)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	10.4±1.01 ^a	10.4±0.77	10.2±0.81 ^{ab}	10.3±0.81	10.0±0.83 ^a	10.1±0.88 ^a	9.8±1.11 ^a
T1	10.5±1.07 ^a	10.6±0.75	10.2±0.74 ^{ab}	10.1±0.83	9.7±1.10 ^{ab}	9.8±0.91 ^{ab}	9.6±1.04 ^{ab}
T2	10.3±0.75 ^a	10.5±0.64	10.6±0.71 ^a	10.2±0.79	9.8±0.90 ^{ab}	9.6±0.72 ^b	9.2±1.14 ^b
T3	10.0±0.67 ^b	10.3±0.78	10.1±0.69 ^b	10.1±0.90	9.6±1.00 ^b	9.6±0.79 ^b	9.6±0.90 ^{ab}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

마) 난각의 질

건조처리 새송이 버섯 급여 시 처리 별 난각중, 난각밀도, 난각두께는 각각 Table 1-11, Table 1-12, Table 1-13에 나타나 있다. 전체적으로 볼 때 대조구에 비하여 처리구에서 난각중이 무겁고, 난각밀도가 높았으며, 난각두께가 두꺼워지는 경향을 보였다(p<0.05). 이러한 경향은 새송이 버섯을 급여하고 4주경부터 나타났으며, 급여 수준 간에는 차이가 없는 것으로 보였다. 홍 등(2001)은 한약제 부산물 첨가급여 시 난각강도나 난각두께에 유의적인 차이를 발견하지 못하였다고 하였으며, 김 등(2006)도 약용식물 가공부산물의 첨가 급여 시험에서 같은 결과를 발표하였다. 본 시험에서 전기간에 걸쳐 현격한 차이는 보이지 않았으나 새송이 버섯의 첨가급여에 의하여 난각질이 개선 여지는 확실하다고 사료된다.

Table 1–11. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on shell weight(g)

Treatment 1)	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	5.78±1.01 ^b	5.75±0.77	5.73±0.81	5.79±0.81 ^b	5.94±0.83	5.88±0.88	5.80±1.11 ^b
T1	5.79±1.07 ^b	5.77±0.75	5.76±0.74	5.94±0.83 ^{ab}	5.96±1.10	6.10±0.91	6.22±1.04 ^a
T2	5.88±0.75 ^{ab}	5.87±0.64	5.88±0.71	5.88±0.79 ^{ab}	5.92±0.90	6.08±0.72	6.18±1.14 ^a
T3	6.06±0.67 ^a	5.92±0.78	5.93±0.69	6.06±0.90 ^a	6.02±1.00	6.00±0.79	6.26±0.90 ^a

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 1–12. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on shell density(mg/cm²)

Treatment 1)	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	79.6±1.01 ^b	77.0±0.77 ^b	77.2±0.81 ^c	78.6±0.81 ^b	79.6±0.83	79.0±0.88 ^b	79.5±1.11 ^c
T1	81.9±1.07 ^a	79.2±0.75 ^a	79.0±0.74 ^{bc}	81.8±0.83 ^a	81.4±1.10	82.6±0.91 ^a	82.2±1.04 ^b
T2	81.7±0.75 ^a	80.7±0.64 ^a	81.5±0.71 ^a	81.7±0.79 ^a	81.0±0.90	83.2±0.72 ^a	84.9±1.14 ^a
T3	83.3±0.67 ^a	80.4±0.78 ^a	80.9±0.69 ^{ab}	82.0±0.90 ^a	81.3±1.00	82.4±0.79 ^a	83.7±0.90 ^{ab}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 1–13. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on shell thickness(μm)

Treatment 1)	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	354.7±1.01 ^b	348.2±1.01 ^b	351.6±1.01 ^{ab}	359.6±1.01 ^b	361.6±1.01	361.5±1.01 ^b	359.0±1.01 ^b
T1	360.2±1.07 ^{ab}	351.7±1.07 ^b	350.8±1.07 ^b	372.8±1.07 ^a	368.8±1.07	376.6±1.07 ^a	379.3±1.07 ^a
T2	360.8±0.75 ^{ab}	363.3±0.75 ^a	360.9±0.75 ^{ab}	373.8±0.75 ^a	366.7±0.75	369.9±0.75 ^{ab}	381.8±0.75 ^a
T3	368.4±0.67 ^a	366.9±0.67 ^a	362.4±0.67 ^a	376.4±0.67 ^a	370.4±0.67	374.1±0.67 ^a	375.4±0.67 ^a

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

바) 계란저장성

건조처리 미 이용 새송이 버섯을 첨가 급여하여 생산된 계란들의 저장성을 조사하기 위하여 실온에서 3주간 보관하였을 때 계란의 난백고와 호우유니트 변화는 Table 1-14와 Table 1-15에 나타나 있다. 저장기간이 진행됨에 따라 난백고와 호우 유니트가 현저하게 감소하였다. 저장 3주 후 난백고는 C, T1, T2, T3에서 각각 4.35mm, 5.12mm, 5.17mm, 5.76mm로서 처리 간에 현저한 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 또한 저장 3주 후 호우유니트는 C, T1, T2, T3에서 각각 60.9, 66.8, 67.2, 71.6으로서 처리 간에 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 일반적으로 식란으로서 계란의 호우유니트가 60인 점을 감안할 때 저장성의 향상은 계란의 품질결정에 중요한 요인이 된다. 건조처리 새송이 버섯을 1%이상 첨가급여 시 계란난백의 질을 향상시켰으며, 그 결과 저장성이 높아졌다.

Table 1-14. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on the change of albumen height during the storage of eggs(mm)

Treatment ¹⁾	Week		
	1	2	3
C	6.92±1.01 ^A	5.67±0.77 ^{bB}	4.35±0.81 ^{cC}
T1	6.27±1.07 ^A	5.90±0.75 ^{bB}	5.12±0.74 ^{bC}
T2	6.78±0.75 ^A	6.18±0.64 ^{abB}	5.17±0.71 ^{bC}
T3	6.41±0.67 ^A	6.55±0.78 ^{aA}	5.76±0.69 ^{aB}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly($p < 0.05$)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 1-15. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on the change of Haugh units during the storage of eggs(HU)

Treatment ¹⁾	Week		
	1	2	3
C	78.0±1.01 ^A	69.5±0.77 ^{bB}	60.9±0.81 ^{cC}
T1	80.3±1.07 ^A	71.0±0.75 ^{abB}	66.8±0.74 ^{bC}
T2	82.0±0.75 ^A	72.1±0.64 ^{abB}	67.2±0.71 ^{abC}
T3	81.9±0.67 ^A	74.1±0.78 ^{aB}	71.6±0.69 ^{aB}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly($p < 0.05$)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

2) 건조처리 팽이버섯이 계란생산 및 품질에 미치는 영향

가) 산란율과 사료요구율

건조처리 팽이버섯을 산란계 사료에 0.0%, 1.5%, 3.0%, 및 4.5%를 첨가 급여하였을 때 처리별 산란율과 사료섭취량 및 사료요구율의 변화는 Table 1-16, Table 1-17, Table 1-18에 나타나 있다. 산란율은 시험 전 기간 동안 모든 처리구에서 일정한 수준을 유지 하였으며, 처리구 간에 차이를 나타내지 않았다.

산란계 1수당 1일 사료섭취량은 C구에 비하여 T1에서 다소 낮았으나 T2와 T3에서는 동일한 수준이었으며, 전체적으로 볼 때 유사한 경향을 나타내었다.

계란 1kg생산에 소요된 사료소비량으로 표시된 사료 요구율은 전기간 모든 처리구에서 동일하게 나타났다. 이와 같은 결과는 건조처리 새송이 버섯 급여시험 결과와 유사하였다. 따라서 산란율과 사료 요구율에 대한 건조처리 버섯의 효과는 새송이 버섯과 팽이버섯 사이에 차이가 없다고 판단된다. 또한 건조처리 새송이 버섯이나 팽이버섯을 사료의 4.5%까지 첨가 급여하여도 계란 생산성에 차이가 없다고 사료된다.

Table 1-16. Effects of dietary dehydrated *Plammulina velutipes* on egg production rate(%)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	85.0±0.6	86.5±1.0	87.0±2.4	89.3±1.3	89.0±2.5	86.8±1.9	87.0±3.1
T1	84.8±3.4	88.8±1.9	86.8±1.3	86.3±3.2	87.0±3.7	86.8±2.7	88.3±2.5
T2	82.3±2.4	86.0±3.1	88.5±2.4	89.3±1.5	85.5±3.2	89.0±2.3	86.8±2.4
T3	87.0±2.9	87.5±2.3	86.5±2.3	88.3±2.5	87.8±3.4	86.8±2.7	86.8±5.3

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 1-17. Effects of dietary dehydrated *Plammulina velutipes* on feed intake(g/hen/d)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	127.3±0.5	134.2±0.3 ^b	136.5±0.5	136.7±0.8 ^a	134.2±1.0	138.8±0.7 ^a	137.5±1.1
T1	129.1±0.3	135.2±1.5 ^b	134.2±1.6	130.1±1.4 ^b	130.1±1.4	133.2±1.3 ^b	132.4±1.4
T2	131.9±3.8	136.2±1.0 ^b	134.2±2.4	133.7±3.4 ^a	130.6±2.4	140.6±0.9 ^a	133.4±3.3
T3	130.9±2.1	139.8±1.1 ^a	138.5±1.1	134.2±1.3 ^a	134.7±1.8	139.3±2.9 ^a	136.2±1.5

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 1-18. Effects of dietary dehydrated *Plammulina velutipes* on feed conversion(feed/egg mass)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	2.28±0.02	2.37±0.03	2.40±0.07	2.34±0.05	2.30±0.07	2.44±0.05	2.42±0.08
T1	2.34±0.10	2.33±0.07	2.36±0.03	2.31±0.08	2.29±0.09	2.35±0.06	2.30±0.07
T2	2.49±0.12	2.46±0.09	2.34±0.03	2.32±0.08	2.37±0.05	2.44±0.06	2.39±0.11
T3	2.32±0.05	2.46±0.07	2.47±0.06	2.34±0.06	2.37±0.11	2.47±0.07	2.43±0.14

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

나) 장내 병원성 미생물 및 계분 내 가스발생량

건조처리 미 이용 팽이버섯을 첨가 급여하였을 때 산란계의 맹장 내용물 중 병원성 미생물의 수는 Table 1-19에 나타냈으며, 계분 중의 NH₃ 가스발생량은 Table 1-20에 표시된 바와 같다. 맹장 내용물 1g중에서 조사된 *Salmonella*균의 수는 C, T1, T2, T3에서 각각 4.959, 4.744, 4.548, 4.535이었고, *E. Coli* 대장균 수는 각각 4.689, 4.529, 4.387 및 4.188이었다. 맹장 내 *Salmonella*균수는 건조처리 팽이버섯을 급여한 경우 유의적으로 낮아졌으며(p<0.05), *E. Coli* 대장균 수도 건조처리 팽이버섯을 급여수준을 증가함에 따라 유의적으로(p<0.05) 낮아졌다.

계분 내 가스 발생량은 저장 초기에는 모든 처리 구에서 비슷하였으나 저장기간이 진행됨에 따라 처리 간에 차이를 나타내었다. NH₃ 가스발생량은 저장 9일까지 증가하고 그 이 후 감소하였다. 건조처리 팽이버섯을 첨가 급여한 경우 가스발생량이 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 이와 같은 결과는 건조처리 새송이 버섯을 첨가 급여한 경우와 유사한 결과로서 건조처리 버섯 급여가 닭의 장내환경을 개선하여 생산성의 향상과 계란의 품질향상을 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 1-19. Effects of dietary dehydrated *Plammulina velutipes* on *Salmonella* and *E. coli* in cecal contents of laying hen(log₁₀ cfu/g contents)

Treatment ¹⁾	<i>Salmonella</i>	<i>E. Coli</i>
C	4.959±0.014 ^a	4.689±0.026 ^a
T1	4.744±0.017 ^b	4.529±0.003 ^b
T2	4.546±0.048 ^c	4.387±0.027 ^c
T3	4.535±0.029 ^c	4.188±0.040 ^d

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 1-20. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on NH₃ emission in layer excreta(ppm)

Treatment ¹⁾	Days						
	0	1	3	6	9	12	15
C	10.4±1.2	8.7±1.1 ^{bc}	124.4±17.0	134.4±7.3	211.1±19.5 ^{ab}	135.6±10.7 ^a	46.9±5.7 ^a
T1	10.4±0.9	12.4±1.2 ^a	115.6±7.4	138.9±13.4	244.4±5.3 ^a	148.9±4.8 ^a	44.6±2.8 ^a
T2	11.6±0.7	11.2±1.3 ^{ab}	108.9±6.0	134.4±3.2	214.4±6.6 ^{ab}	82.2±5.3 ^b	44.2±1.9 ^a
T3	10.2±1.7	7.1±0.5 ^c	110.6±10.1	132.2±3.6	191.1±6.9 ^b	78.9±3.4 ^b	19.4±3.7 ^b

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

다) 계란의 외부품질

건조처리 미 이용 팽이버섯 첨가 급여 시 난각색의 변화는 Table 1-21에 나타내었으며, 난중의 변화는 Table 1-22에 표시하였다. 시험기간 중 난각색의 변화가 나타났으나 이것은 표본 추출 또는 측정조건에 따른 차이로 사료되며 처리의 효과는 없는 것으로 판단된다.

난중은 64.8g에서 68.1g 사이에 분포를 보였으며, 대조구에 비하여 팽이버섯 급여구에서 다소 높은 경향을 나타내었다. 닭에 유산균을 급여하여 장내환경을 개선시켰을 때 산란율과 난중이 개선되었다(Nahashon et al, 1994)는 보고가 있는 바 건조처리 팽이버섯 첨가급여에 따른 간접효과가 나타난 것으로 추정된다.

Table 1-21. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on shell colour index(%)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	32.1±1.01	25.9±0.77	27.5±0.81 ^b	28.7±0.81	30.1±0.90 ^a	32.9±0.79 ^a	25.9±1.11
T1	32.3±1.07	26.5±0.75	27.0±0.74 ^b	29.2±0.83	28.9±1.10 ^{ab}	29.2±0.91 ^{bc}	26.8±1.04
T2	31.5±0.75	26.9±0.64	27.8±0.71 ^b	29.7±0.79	26.8±0.83 ^b	30.2±0.72 ^b	28.0±1.14
T3	31.8±0.67	26.5±0.78	29.9±0.69 ^a	30.6±0.90	28.5±1.00 ^{ab}	27.8±0.88 ^c	27.0±0.90

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 1-22. Effects of dietary dehydrated *Plammulina velutipes* on egg weight(g)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	65.5±1.01 ^b	65.0±0.77 ^b	65.3±0.81	65.3±0.81	65.7±0.83	64.8±0.88 ^b	65.9±1.11
T1	66.4±1.07 ^{ab}	67.0±0.75 ^a	65.7±0.74	66.7±0.83	67.7±1.10	67.4±0.91 ^a	66.7±1.04
T2	67.4±0.75 ^a	66.0±0.64 ^{ab}	66.5±0.71	66.8±0.79	67.5±0.90	65.8±0.72 ^{ab}	66.1±1.14
T3	68.1±0.67 ^a	65.9±0.78 ^{ab}	66.8±0.69	66.7±0.90	67.3±1.00	67.2±0.79 ^a	66.0±0.90

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

라) 계란의 내부품질

건조처리 팽이버섯 첨가 급여 시 난백고, 호우유니트 및 난황색의 변화는 Table 1-23, Table 1-24, 및 Table 1-25에 표시된 바와 같다. 난백고는 처리 간에 뚜렷한 유의차를 나타내지 않았다. 시험개시 시에 대조구에서 난백고가 높았으나 시험이 진행됨에 따라 처리 간에 차이가 없거나 팽이버섯 급여구에서 다소 높은 경향을 나타내었다. 또한 호우유니트도 이와 비슷한 경향을 나타내었던 바 건조처리 팽이버섯 첨가급여에 따른 난백고와 호우유니트의 개선효과는 크지 않은 것으로 사료된다.

난황색도 처리구 간에 차이가 분명하지 않게 나타났으며, 건조처리 팽이버섯 첨가 급여에 의하여 색도가 낮아지는 경향을 보였다. 이와같은 결과는 새송이 팽이버섯 급여에서의 경향과 유사하였다.

Table 1-23. Effects of dietary dehydrated *Plammulina velutipes* on albumen height(mm)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	9.57±1.01	8.93±0.77 ^a	8.83±0.81	8.12±0.81 ^b	8.50±1.00	8.68±0.88	8.29±0.90 ^c
T1	9.16±1.07	8.66±0.75 ^{ab}	8.75±0.74	8.35±0.83 ^{ab}	8.45±1.10	8.57±0.91	9.10±1.04 ^a
T2	9.36±0.75	8.37±0.64 ^b	8.96±0.71	8.06±0.79 ^b	8.55±0.90	8.65±0.72	8.49±1.14 ^{bc}
T3	9.26±0.67	8.68±0.78 ^{ab}	8.68±0.69	8.83±0.90 ^a	8.82±0.83	8.70±0.79	8.84±1.11 ^{ab}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 1-24. Effects of dietary dehydrated *Plammulina velutipes* on Haugh units(HU)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	92.2±1.01	90.1±0.77	90.6±0.81	86.0±0.81 ^b	88.9±1.00	91.0±0.88	86.9±0.90 ^b
T1	92.8±1.07	88.5±0.75	90.2±0.74	86.6±0.83 ^b	88.2±1.10	91.2±0.91	92.3±1.04 ^a
T2	93.0±0.75	88.7±0.64	92.2±0.71	86.4±0.79 ^b	90.6±0.90	90.8±0.72	90.2±1.14 ^a
T3	91.9±0.67	90.0±0.78	90.9±0.69	90.3±0.90 ^a	91.0±0.83	90.2±0.79	91.0±1.11 ^a

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 1-25. Effects of dietary dehydrated *Plammulina velutipes* on yolk colour index(Roche)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	9.18±1.01	9.23±0.77 ^a	9.38±0.81	9.33±0.81	9.20±0.83	9.28±0.88 ^a	9.10±1.11
T1	9.18±1.07	9.30±0.75 ^a	9.50±0.74	9.25±0.83	9.18±1.10	8.93±0.91 ^b	9.08±1.04
T2	9.25±0.75	9.08±0.64 ^{ab}	9.55±0.71	9.28±0.79	9.25±0.90	9.13±0.72 ^{ab}	9.10±1.14
T3	9.40±0.67	8.98±0.78 ^b	9.45±0.69	9.20±0.90	9.08±1.00	9.03±0.79 ^{ab}	8.98±0.90

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

마) 난각의 질

건조처리 팽이버섯 첨가 급여 시 난각중, 난각밀도, 난각두께의 변화는 Table 1-26, Table 1-27, Table 1-28에서 보는 바와 같다. 난중은 처리 간에 뚜렷하게 차이가 드러나지 않았지만 건조처리 팽이버섯을 첨가 급여한 경우 난중이 무거워지는 경향이였다. 이러한 경향은 난각밀도와 난각두께에서 분명하게 나타났다. 따라서 건조처리 팽이버섯 급여가 난각의 질을 개선할 것으로 판단된다.

Table 1-26. Effects of dietary dehydrated *Plammulina velutipes* on shell weight(g)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	5.68±1.01 ^c	6.02±0.77 ^b	6.11±0.81	6.05±0.81	6.09±0.83	5.93±0.88 ^b	5.97±1.11
T1	5.87±1.07 ^{bc}	6.26±0.75 ^a	6.11±0.74	6.01±0.83	6.19±1.10	5.98±0.91 ^{ab}	6.01±1.04
T2	5.98±0.75 ^{ab}	6.26±0.64 ^a	6.19±0.71	6.04±0.79	6.11±0.90	5.87±0.72 ^b	5.98±1.14
T3	6.14±0.67 ^a	6.41±0.78 ^a	6.25±0.69	6.10±0.90	6.21±1.00	6.16±0.79 ^a	6.01±0.90

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 1-27. Effects of dietary dehydrated *Plammulina velutipes* on shell density(mg/cm²)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	74.1±1.01 ^b	78.1±0.77 ^c	76.9±0.81 ^b	77.1±0.81 ^b	77.5±0.83 ^b	77.4±0.88 ^b	76.4±1.11 ^b
T1	77.6±1.07 ^a	81.8±0.75 ^b	80.2±0.74 ^a	79.6±0.83 ^a	81.6±1.10 ^a	79.3±0.91 ^{ab}	78.8±1.04 ^a
T2	77.3±0.75 ^a	82.4±0.64 ^{ab}	81.4±0.71 ^a	80.2±0.79 ^a	79.7±0.90 ^a	79.5±0.72 ^{ab}	79.4±1.14 ^a
T3	77.8±0.67 ^a	84.2±0.78 ^a	81.1±0.69 ^a	80.7±0.90 ^a	81.7±1.00 ^a	79.7±0.79 ^a	79.9±0.90 ^a

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 1-28. Effects of dietary dehydrated *Plammulina velutipes* on shell thickness(μm)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	331.2±1.01 ^b	350.3±1.01 ^c	358.8±1.01	349.0±1.01 ^b	353.7±1.01 ^b	352.6±1.01	346.0±1.01
T1	349.3±1.07 ^a	357.7±1.07 ^{bc}	366.1±1.07	353.3±1.07 ^{ab}	360.0±1.07 ^{ab}	361.2±1.07	349.5±1.07
T2	344.0±0.75 ^a	366.9±0.75 ^{ab}	366.3±0.75	357.3±0.75 ^{ab}	368.2±0.75 ^a	357.6±0.75	352.9±0.75
T3	351.0±0.67 ^a	371.6±0.67 ^a	361.8±0.67	362.6±0.67 ^a	367.6±0.67 ^a	361.2±0.67	351.5±0.67

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

나. 발효처리 미 이용 버섯에 의한 계란 생산

1) 발효처리 새송이 버섯이 계란생산 및 품질에 미치는 영향

가) 산란율과 사료요구율

미 이용 새송이 버섯 발효 유기물을 첨가 급여 시 산란율, 사료섭취량 및 사료요구율은 Table 2-1, Table 2-2 및 Table 2-3에 표시 되어있다.

새송이 버섯 발효 유기물을 산란계에 각각 0.0%, 1.0%, 3%, 5%를 첨가 급여하였을 때 산란율, 사료섭취량 및 사료요구율은 처리구 간에 약간의 차이를 나타내었다. 대조구에 비하여 T1과 T2에서 산란율이 다소 낮았으나 T3에서는 거의 비슷하였으며, 산란율의 변화에 따라 사료섭취량에도 약간의 차이가 나타났다. 그러나 사료요구율은 차이가 없었다. 이러한 결과는 실험동물들의 수가 제한되어 있어서 동물 간의 개체차에 의하여 기인된 것으로 보인다. 따라서 새송이 버섯 발효유기물 첨가가 계란생산성

에 에 대한 영향은 적은 것으로 평가되었다. 각종 사료첨가제 급여시 산란율에 대하여 유산균 첨가(김 등, 2006), 생효모 배양물 첨가(이 등, 2006), 팽이버섯배지 첨가(나 등, 2006)가 산란율에 영향을 미치지 않은 다고 하였다.

Table 2-1. Effects of dietary fermented *Pleurotus eryngii* on egg production rate(%)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	74.8±3.8 ^b	89.5±3.5	93.0±4.0	89.5±3.5 ^b	103.5±10.7 ^b	93.0±04.0 ^b	93.0±4.0
T1	75.0±1.1 ^{ab}	78.8±7.3	78.5±9.3	71.5±8.4 ^b	85.8±5.9 ^a	96.5±3.5 ^a	82.3±9.0
T2	60.8±9.0 ^b	78.5±9.3	82.3±3.8	82.0±10.8 ^a	93.0±4.0 ^a	96.5±3.5 ^a	89.3±6.9
T3	71.0±0.0 ^a	89.3±6.9	89.5±3.5	86.0±0.0 ^b	107.0±4.0 ^a	93.0±4.0 ^{ab}	96.5±3.5

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 2-2. Effects of dietary fermented *Pleurotus eryngii* on feed intake(g/hen/d)b

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	100.0±5.9	82.5±23.3	119.7±6.1	125.0±4.1	116.3± 1.4 ^b	124.1±2.3	137.0±4.7
T1	91.3±6.0	103.1±4.1	112.7±8.3	130.5±9.9	140.4± 7.2 ^a	132.5±14.4	133.6±12.6
T2	88.1±6.9	115.4±6.6	123.2±5.7	130.2±6.5	106.2±28.6 ^b	119.1±10.6	128.4±9.2
T3	100.6±4.2	111.4±1.9	123.2±3.7	128.1±8.5	122.2± 9.5 ^b	127.7±25.4	122.7±16.9

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 2-3. Effects of dietary fermented *Pleurotus eryngii* on feed conversion(feed/egg mass)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	1.87±0.16	2.00±0.12	2.09±0.06	2.27±0.10	2.02±0.22 ^{ab}	2.18±0.13	2.40±0.16
T1	1.64±0.23	2.00±0.16	2.27±0.41	2.91±0.53	2.50±0.27 ^a	2.07±0.27	2.57±0.45
T2	2.07±0.36	2.38±0.26	2.35±0.03	2.59±0.30	2.05±0.53 ^{ab}	1.92±0.12	2.40±0.13
T3	1.87±0.08	1.96±0.15	2.14±0.07	2.31±0.15	1.78±0.20 ^b	2.09±0.35	1.96±0.23

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

나) 계란의 외부 품질

발효처리 새송이 버섯 첨가 급여 시 난각색과 난중의 변화는 Table 2-4 와 Table 2-5에 표시 되었다. 계란의 외부품질을 나타내는 난각색과 난중에 대한 새송이 버섯 발효유기물의 영향을 조사했던 바 난각색의 농도는 T1과 T2에서 다소 짙어졌으나 발효유기물 급여량이 많으면 오히려 옅은 결과였으나 일관된 경향을 보이지 않았다. 난중은 61.9g과 65.3g 사이에 분포되었으며, 발효유기물 급여에 의하여 다소 무거운 경향을 보였다. 산란계에 대하여 유산균 첨가(김 등, 2006), 생효모 배양물 첨가(이 등, 2006), 복합생균제 첨가(나 등, 2006)는 난중의 증가를 가져왔다고 했던 바 본 시험결과와 유사하였다.

Table 2-4. Effects of dietary fermented *Pleurotus eryngii* on shell colour index(%)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	28.4±1.01 ^b	27.8±0.77	29.7±0.81	29.6±0.81	29.7±0.83 ^b	32.0±0.88	31.0±1.11 ^b
T1	30.4±1.07 ^{ab}	28.3±0.75	31.8±0.74	31.9±0.83	31.6±1.10 ^{ab}	32.1±0.91	32.3±1.04 ^{ab}
T2	32.0±0.75 ^a	28.0±0.64	31.3±0.71	31.8±0.79	34.0±0.90 ^a	32.1±0.72	34.4±1.14 ^a
T3	30.5±0.67 ^{ab}	26.8±0.78	30.8±0.69	30.0±0.90	32.0±1.00 ^{ab}	32.7±0.79	30.2±0.90 ^b

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 2-5. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on egg weight(g)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	61.6±1.01 ^b	63.6±0.77	62.9±0.81 ^b	62.5±0.81	63.5±0.83	63.7±0.88 ^{ab}	62.5±1.11 ^b
T1	61.9±1.07 ^b	63.3±0.75	63.7±0.74 ^{ab}	63.6±0.83	63.9±1.10	64.7±0.91 ^{ab}	64.8±1.04 ^a
T2	62.7±0.75 ^{ab}	63.3±0.64	63.4±0.71 ^{ab}	62.9±0.79	63.5±0.90	63.0±0.72 ^b	63.1±1.14 ^{ab}
T3	64.1±0.67 ^a	35.3±0.78	65.0±0.69 ^a	63.9±0.90	65.1±1.00	65.3±0.79 ^a	64.2±0.90 ^{ab}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

다) 계란의 내부품질

발효처리 미 이용 새송이 버섯을 첨가 급여 시 난백고, 호우유니트, 난황색에 대한 효과는 각각 Table 2-6, Table 2-7 및 Table 2-8에 제시하였다. 난백고에 대한 발효처리 새송이 버섯의 효과는 급여 3주 이후 차이를 보였다(p<0.05). 그러나 급여수준 간에는 차이가 없었다. 계란신선도의 지표인 호우유니트에는 유의적인 차이를 인정할

수 없었다 그러나 발효처리 버섯의 첨가급여에 의하여 높아지는 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 유산균 첨가(김 등, 2006), 생효모 배양물 첨가(이 등, 2006), 복합생균제 첨가(나 등, 2006)에서와 비슷하였다.

한편 난황색의 농도는 발효처리 새송이버섯을 첨가 급여한 경우 대조구와 같거나 낮게 나타났다. 나 등(2006)은 복합생균제 급여 시 난황색이 대조구에 비하여 유의적으로 낮았다고 하였다.

Table 2-6. Effects of dietary fermented *Pleurotus eryngii* on albumen height(mm)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	9.36±1.01 ^b	9.49±0.77 ^b	9.19±0.81	9.26±0.81 ^b	9.31±0.83 ^b	9.26±0.88 ^b	8.86±1.04 ^b
T1	9.95±1.07 ^a	9.79±0.75 ^a	9.48±0.74	9.51±0.83 ^{ab}	9.38±1.10 ^{ab}	9.71±0.91 ^a	8.93±1.11 ^a
T2	9.94±0.75 ^a	9.71±0.64 ^a	9.32±0.71	9.64±0.79 ^a	9.38±0.90 ^{ab}	9.66±0.72 ^a	9.21±1.14 ^a
T3	9.66±0.67 ^{ab}	9.77±0.78 ^a	9.45±0.69	9.64±0.90 ^a	9.69±1.00 ^a	9.73±0.79 ^a	9.41±0.90 ^a

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 2-7. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on Haugh units(HU)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	95.7±1.01 ^b	95.2±0.77	94.1±0.81	95.2±0.81	95.2±0.83 ^{ab}	95.0±0.88	93.4±1.11
T1	97.1±1.07 ^{ab}	97.2±0.75	95.3±0.74	95.8±0.83	96.0±1.10 ^{ab}	96.2±0.91	94.4±1.04
T2	97.5±0.75 ^a	96.7±0.64	95.1±0.71	96.8±0.79	94.7±0.90 ^b	96.4±0.72	95.8±1.14
T3	97.0±0.67 ^{ab}	96.8±0.78	96.4±0.69	96.7±0.90	97.0±1.00 ^a	96.4±0.79	96.0±0.90

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 2-8. Effects of dietary fermented *Pleurotus eryngii* on yolk colour index(Roche)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	10.4±1.01 ^a	10.4±0.77	10.2±0.81 ^{ab}	10.3±0.81	10.0±0.83 ^a	10.1±0.88 ^a	9.8±1.11 ^a
T1	10.5±1.07 ^a	10.6±0.75	10.2±0.74 ^{ab}	10.1±0.83	9.7±1.10 ^{ab}	9.8±0.91 ^{ab}	9.6±1.04 ^{ab}
T2	10.3±0.75 ^a	10.5±0.64	10.6±0.71 ^a	10.2±0.79	9.8±0.90 ^{ab}	9.6±0.72 ^b	9.2±1.14 ^b
T3	10.0±0.67 ^b	10.3±0.78	10.1±0.69 ^b	10.1±0.90	9.6±1.00 ^b	9.6±0.79 ^b	9.6±0.90 ^{ab}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

라) 난각의 질

미생물 발효 새송이버섯 유기물 급여 시 난각중, 난각밀도 및 난각의 두께는 각각 Table 2-9, Table 2-10 및 Table 2-11에서 보는 바와 같다. 난각중은 미생물발효 새송이 버섯을 급여함으로써 향상되는 경향이었으나 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 난각밀도와 난각두께에서는 모두가 미생물발효 새송이 버섯을 급여함으로써 향상된 결과를 나타내었다(p<0.05). 그러나 첨가수준에 따른 차이는 보이지 않아서 미생물발효 새송이 버섯 1%수준이 적당할 것으로 사료된다. Theyer et al(1978)과 Day et al(1987)는 저인사료에 효모배양물 첨가 시 난각질이 개선되었다고 하였으나 나 등(2006)은 복합생균제의 급여가 난각질에 영향을미치지 않았다고 하였다.

Table 2-9. Effects of dietary fermented *Pleurotus eryngii* on shell weight(g)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	5.78±1.01 ^b	5.75±0.77	5.73±0.81	5.79±0.81 ^b	5.94±0.83	5.88±0.88	5.80±1.11 ^b
T1	5.79±1.07 ^b	5.77±0.75	5.76±0.74	5.94±0.83 ^{ab}	5.96±1.10	6.10±0.91	6.22±1.04 ^a
T2	5.88±0.75 ^{ab}	5.87±0.64	5.88±0.71	5.88±0.79 ^{ab}	5.92±0.90	6.08±0.72	6.18±1.14 ^a
T3	6.06±0.67 ^a	5.92±0.78	5.93±0.69	6.06±0.90 ^a	6.02±1.00	6.00±0.79	6.26±0.90 ^a

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 2-10. Effects of dietary fermented *Pleurotus eryngii* on shell density(mg/cm²)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	79.6±1.01 ^b	77.0±0.77 ^b	77.2±0.81 ^c	78.6±0.81 ^b	79.6±0.83	79.0±0.88 ^b	79.5±1.11 ^c
T1	81.9±1.07 ^a	79.2±0.75 ^a	79.0±0.74 ^{bc}	81.8±0.83 ^a	81.4±1.10	82.6±0.91 ^a	82.2±1.04 ^b
T2	81.7±0.75 ^a	80.7±0.64 ^a	81.5±0.71 ^a	81.7±0.79 ^a	81.0±0.90	83.2±0.72 ^a	84.9±1.14 ^a
T3	83.3±0.67 ^a	80.4±0.78 ^a	80.9±0.69 ^{ab}	82.0±0.90 ^a	81.3±1.00	82.4±0.79 ^a	83.7±0.90 ^{ab}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 2-11. Effects of dietary fermented *Pleurotus eryngii* on shell thickness(μm)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	354.7±1.01 ^b	348.2±1.01 ^b	351.6±1.01 ^{ab}	359.6±1.01 ^b	361.6±1.01	361.5±1.01 ^b	359.0±1.01 ^b
T1	360.2±1.07 ^{ab}	351.7±1.07 ^b	350.8±1.07 ^b	372.8±1.07 ^a	368.8±1.07	376.6±1.07 ^a	379.3±1.07 ^a
T2	360.8±0.75 ^{ab}	363.3±0.75 ^a	360.9±0.75 ^{ab}	373.8±0.75 ^a	366.7±0.75	369.9±0.75 ^{ab}	381.8±0.75 ^a
T3	368.4±0.67 ^a	366.9±0.67 ^a	362.4±0.67 ^a	376.4±0.67 ^a	370.4±0.67	374.1±0.67 ^a	375.4±0.67 ^a

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly($p<0.05$)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

마) 혈반 및 육반 발생률

미생물 발효 새송이 버섯 유기물 첨가급여 시 계란 내 혈반 및 육반의 발생비율이 Table 2-12와 Table 2-13에 표시 되었다. 혈반과 육반의 계란의 품질을 저하시키고 소비자의 계란 구매력을 떨어뜨리는 원인이 된다. 배란 중 모세혈관의 파열되어 나타 난다고 알려졌으나 발생원인은 아직 명확하지 않다. 본 시험 결과 발생빈도가 산발적 이어서 경향성을 예측할 수 없었다. 따라서 미생물 발효 유기물의 첨가급여와는 무관 한 것으로 나타났다.

Table 2-12. Effects of dietary fermented *Pleurotus eryngii* on Blood spot(%)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	15.0±1.01	5.0±0.77	10.0±0.81	5.0±0.81 ^{ab}	8.0±0.83	0.0±0.88	10.0±1.11
T1	13.0±1.07	15.0±0.75	10.0±0.74	0.0±0.83 ^b	3.0±1.10	5.0±0.91	5.0±1.04
T2	10.0±0.75	8.0±0.64	10.0±0.71	13.0±0.79 ^a	5.0±0.90	5.0±0.72	0.0±1.14
T3	10.0±0.67	13.0±0.78	10.0±0.69	3.0±0.90 ^{ab}	0.0±1.00	8.0±0.79	10.0±0.90

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly($p<0.05$)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 2-13. Effects of dietary fermented *Pleurotus eryngii* on Meat spot(%)

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	5.0±1.01	0.0±0.77 ^b	5.0±0.81	3.0±0.81	10.0±0.83 ^a	8.0±0.88	15.0±1.11
T1	0.0±1.07	0.0±0.75 ^b	3.0±0.74	8.0±0.83	5.0±1.10 ^{ab}	5.0±0.91	15.0±1.04
T2	3.0±0.75	8.0±0.64 ^a	3.0±0.71	3.0±0.79	3.0±0.90 ^{ab}	10.0±0.72	0.0±1.14
T3	3.0±0.67	0.0±0.78 ^b	0.0±0.69	0.0±0.90	0.0±1.00 ^b	3.0±0.79	15.0±0.90

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly($p<0.05$)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

바) 계란 저장성

발효처리 미 이용 새송이 버섯을 첨가 급여하여 생산된 계란들의 저장성을 조사하기 위하여 실온에서 4주간 보관하였을 때 계란의 난백고의 변화는 Table 2-14에 나타냈으며, 호우유니트 변화는 Table 2-15에 나타나 있다. 저장기간이 진행됨에 따라 난백고와 호우 유니트가 현저하게 감소하였다. 저장 4주 후 난백고는 C, T1, T2, T3에서 각각 4.18mm, 4.92mm, 5.03mm, 5.21mm로서 처리 간에 현저한 차이를 나타내었다 ($p < 0.05$). 또한 저장 4주 후 호우유니트는 C, T1, T2, T3에서 각각 59.8, 64.9, 65.1, 69.5 버섯발효 유기물 급여 시 저장성이 향상되었다. 그러나 버섯발효 유기물 급여수준을 높혀도 저장성의 향상상에 괄목할만한 효과는 없는 것으로 보였다.

Table 2-14. Effects of dietary fermented *Pleurotus eryngii* on the change of albumen height during the storage of eggs

Treatment ¹⁾	Week			
	1	2	3	4
C	8.56±1.01 ^A	5.53±0.77 ^B	5.41±0.81 ^B	4.18±0.81 ^{bC}
T1	8.63±1.07 ^A	5.97±0.75 ^B	5.60±0.74 ^B	4.92±0.74 ^{aC}
T2	8.46±0.75 ^A	6.06±0.64 ^B	5.69±0.71 ^B	5.03±0.71 ^{aC}
T3	8.48±0.67 ^A	6.00±0.78 ^B	5.72±0.69 ^{BC}	5.21±0.69 ^{aC}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly($p < 0.05$)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

Table 2-15. Effects of dietary fermented *Pleurotus eryngii* on the change of Haugh units during the storage of eggs

Treatment ¹⁾	Week			
	1	2	3	4
C	88.8±1.01 ^A	70.9±0.77 ^B	69.7±0.81 ^B	59.8±0.81 ^{bC}
T1	88.8±1.07 ^A	72.2±0.75 ^B	71.8±0.74 ^B	64.9±0.74 ^{aC}
T2	89.2±0.75 ^A	72.8±0.64 ^B	73.0±0.71 ^B	65.1±0.71 ^{aC}
T3	87.9±0.67 ^A	74.8±0.78 ^B	74.4±0.69 ^B	69.5±0.69 ^{aC}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly($p < 0.05$)

1) C, none; T1, 1% *Pleurotus eryngii*; T2, 3% *Pleurotus eryngii*; T3, 5% *Pleurotus eryngii*

2) 발효처리 팽이버섯이 계란생산 및 품질에 미치는 영향

가) 산란율과 사료요구율

미 이용 팽이버섯 발효 유기물을 첨가급여 시 산란율, 사료섭취량 및 사료요구율

은 Table 2-16, Table 2-17 및 Table 2-18에 나타나 있다. 팽이버섯 발효 유기물을 각각 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%수준으로 첨가 급여 했던바 산란율, 사료섭취량 및 사료요구율에서 처리 간에 차이가 없었다. 이와 같은 결과는 발효처리 새송이 버섯을 급여한 시험결과와 같다고 본다. 본 시험결과는 공시동물 수의 제약 때문에 확실한 결론을 내릴 수 없으므로 좀 더 면밀한 검토가 필요하다고 본다.

Table 2-16. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on egg production rate(%)

Treatment ¹⁾	Week				
	1	2	3	4	5
C	71.4± 8.3	76.2± 9.5	95.2±4.8	95.2± 4.8	90.5± 9.5
T1	71.4± 0.0	75.2±12.4	90.0±0.0	78.6±12.4	92.9± 4.1
T2	71.4± 8.3	85.7± 8.3	80.9±4.8	90.5± 9.5	90.5± 4.8
T3	75.7± 8.3	76.2± 4.8	90.5±9.5	85.7± 8.3	85.7± 8.3
T4	71.4± 0.0	78.1± 8.3	90.5±4.8	80.9± 9.5	80.9±12.6
T5	79.4±19.0	85.7± 0.0	90.5±9.5	95.2± 4.8	90.5± 4.8

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 2-17. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on feed intake(g/hen/d)

Treatment ¹⁾	Week				
	1	2	3	4	5
C	134.2±1.5	132.1±2.5 ^b	139.6±2.0	141.0±1.6	146.7±3.3
T1	141.8±1.7	146.2±4.4 ^a	147.0±0.4	138.3±1.1	144.1±1.4
T2	135.1±2.8	136.0±1.1 ^{ab}	139.2±0.6	131.9±1.1	137.4±0.8
T3	135.8±1.7	138.9±4.4 ^{ab}	141.3±0.4	136.7±1.1	143.6±1.4
T4	135.4±2.8	133.1±1.1 ^b	146.0±0.6	142.5±1.1	149.4±0.8
T5	133.9±2.0	136.5±1.3 ^{ab}	146.2±0.6	141.7±1.5	146.2±1.7

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 2-18. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on feed conversion(feed/egg mass)

Treatment ¹⁾	Week				
	1	2	3	4	5
C	2.91±0.35	2.80±0.38	2.26±0.14	2.27±0.10	2.47±0.27
T1	2.91±0.05	2.62±0.44	2.21±0.08	2.43±0.44	2.27±0.10
T2	2.78±0.30	2.38±0.26	2.64±0.08	2.12±0.17	2.29±0.07
T3	2.55±0.38	2.86±0.23	2.42±0.43	2.34±0.15	2.54±0.15
T4	3.00±0.12	2.95±0.56	2.50±0.16	2.72±0.21	2.75±0.48
T5	2.71±2.05	2.50±0.10	2.53±0.45	2.31±0.24	2.45±0.02

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

나) 장내 병원성 미생물과 계분 내 가스발생량

발효처리 미 이용 팽이버섯 유기물 급여 시 산란계의 맹장 내용물 중 병원성 미생물의 수는 Table 2-19에 나타냈으며, 계분 중의 NH₃ 가스발생량은 Table 2-20에 표시된 바와 같다. 맹장 내용물 1g중에서 조사된 *Salmonella*균의 수는 C, T1, T2, T3, T4, T5에서 각각 4.729, 4.490, 4.450, 4.308, 4.555, 4.444로서 대조구에 비하여 유의적으로 감소하였다(p<0.05). 또한 미생물 발효 버섯 유기물의 급여수준이 3%까지는 감소하였으나 그이상의 급여수준에서는 증가 하였다. *E. Coli* 대장균 수는 버섯발효 유기물 급여수준이 2%이 후 감소하였으나 유의적인 감소효과는 4%이상 급여하였을 때 나타났다.

계분 내 가스 발생량은 저장 3일부터 6일 사이에 현저히 증가하였고, 9일 이후 감소하였다. 암모니아 가스 발생량은 저장 초기에는 모든 처리 구에서 비슷하였으나 저장 6일 째 T2에서만 유의적으로 낮았으며, T1과 T3에서도 낮은 수준을 유지 하였다. 저장 9일째 대조구에 비하여 처리구에서 유의적으로 낮아졌다(P<0.05). 따라서 미생물 발효 버섯 유기물 급여에 의하여 효과로서 닭의 장내환경을 개선할 수 있다고 판단된다.

Table 2-19. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on *Salmonella* and *E. coli* in cecal contents of laying hen(log10 cfu/g contents)

Treatment ¹⁾	<i>Salmonella</i>	<i>E. Coli</i>
C	4.729±0.036 ^a	5.896±0.020 ^a
T1	4.490±0.006 ^{bc}	5.928±0.017 ^a
T2	4.450±0.015 ^c	5.749±0.012 ^a
T3	4.308±0.010 ^d	5.618±0.039 ^{ab}
T4	4.555±0.032 ^b	5.317±0.306 ^{bc}
T5	4.444±0.046 ^c	5.141±0.014 ^c

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 2-20. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on NH3 emission in layer excreta(ppm)

Treatment ¹⁾	Days						
	0	1	3	6	9	12	15
C	14.4±1.2 ^a	15.1±1.1 ^a	172.2±10.1 ^a	457.8±13.4 ^{ab}	330.0±19.5 ^a	136.7±10.7 ^a	55.8±5.7 ^a
T1	11.3±0.9 ^b	9.8±1.2 ^{bc}	135.6±7.4 ^{ab}	407.8±13.4 ^{ab}	220.0±5.3 ^b	58.9±4.8 ^d	32.7±2.8 ^b
T2	4.7±0.7 ^c	7.7±1.3 ^{cd}	105.2±6.0 ^b	368.9±17.0 ^b	185.6±6.6 ^b	63.3±5.3 ^d	45.6±1.9 ^{ab}
T3	9.6±1.7 ^b	10.6±0.5 ^b	154.4±3.2 ^a	435.6±3.6 ^{ab}	242.2±6.9 ^b	116.7±3.4 ^b	33.3±3.7 ^b
T4	10.4±1.2 ^b	15.6±1.1 ^{de}	141.1±10.1 ^{ab}	493.3±7.3 ^a	224.4±19.5 ^b	95.0±10.7 ^c	43.8±5.7 ^{ab}
T5	11.3±0.9 ^b	14.4±1.2 ^e	164.4±7.4 ^a	492.2±7.3 ^a	254.4±5.3 ^{ab}	88.9±4.8 ^c	45.1±2.8 ^{ab}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

다) 계란의 외부품질

발효처리 미 이용 팽이버섯 유기물을 첨가 급여 시 난각색과 난중의 변화는 Table 2-21 과 Table 2-22에 표시 되어있다. 계란의 외부품질을 나타내는 난각색에 대하여 T4와 T5에서 다소 색도가 짙어진 경향이었으나 팽이 버섯 발효유기물의 급여효과는 기대할 수없다고 사료된다. 난중은 64.2g과 69.9g 사이에 고른 분포를 보이고 있어서 발효유기물 급여에 의한 효과는 기대할 수 없었다. T1에서 다소 높은 경향이었으나 그 외는 시험말기에 이르러 오히려 난중이 감소하는 경향을 보였다. 산란계에 대하여 유산균의 첨가(김 등, 2006)와 생효모 배양물 첨가(이 등, 2006) 및 복합생균제 첨가(나 등, 2006)에 의하여 난중을 증가시켰다는 보고와는 다른 결과였다.

Table 2-21. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on shell colour index(%)

Treatment ¹⁾	Week				
	1	2	3	4	5
C	34.8±1.01 ^a	32.2±0.77 ^{ab}	31.8±0.81 ^a	29.8±0.81 ^b	33.0±0.83 ^a
T1	33.0±1.07 ^{ab}	31.8±0.75 ^{ab}	27.2±0.74 ^b	31.1±0.83 ^{ab}	29.8±1.10 ^{ab}
T2	29.3±0.75 ^c	29.6±0.64 ^b	25.8±0.71 ^{bc}	31.1±0.79 ^{ab}	26.8±0.90 ^{bc}
T3	30.2±0.67 ^{bc}	34.4±0.78 ^a	30.5±0.69 ^a	34.4±0.90 ^a	31.2±1.00 ^{ab}
T4	25.0±0.75 ^d	21.9±0.64 ^c	24.2±0.71 ^{bc}	24.7±0.79 ^c	29.8±0.90 ^{ab}
T5	29.9±0.67 ^{bc}	25.2±0.78 ^c	24.0±0.69 ^c	26.3±0.90 ^c	23.6±1.00 ^c

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 2-22. Effects of dietary dehydrated *Pleurotus eryngii* on egg weight(g)

Treatment ¹⁾	Week				
	1	2	3	4	5
C	66.4±1.01	63.3±0.77 ^b	64.6±0.81	65.4±0.81	67.0±0.83
T1	69.3±1.07	69.9±0.75 ^a	68.7±0.74	69.9±0.83	68.5±1.10
T2	65.3±0.75	68.1±0.64 ^a	65.3±0.71	69.7±0.79	66.5±0.90
T3	66.6±0.67	67.1±0.78 ^{ab}	66.9±0.69	69.1±0.90	66.8±1.00
T4	65.5±0.75	65.9±0.64 ^{ab}	65.0±0.71	65.8±0.79	64.2±0.90
T5	66.0±0.67	66.2±0.78 ^{ab}	66.5±0.69	65.0±0.90	66.1±1.00

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

라) 계란의 내부품질

발효처리 미 이용 팽이 버섯을 첨가 급여 시 난백고, 호우유니트, 난황색에 대한 효과는 각각 Table 2-23, Table 2-24 및 Table 2-25에 제시하였다. 발효처리 팽이 버섯 첨가급여 시 4주 이후 난백고가 다소 높은 경향이나 유의적인 차이는 없다고 판단 되었다. 그러나 계란신선도의 지표인 호우유니트에는 4주 이후 유의적인 차이를 나타내었다(p<0.05). 이것은 발효처리 버섯의 첨가급여에 의하여 난백고가 높아진 결과 호우유니트에 영향을 미친 것으로 본다. 이와 같은 결과는 유산균 첨가(김 등, 2006), 생효모 배양물 첨가(이 등, 2006), 복합생균제 첨가(나 등, 2006) 시험결과 비슷하였다.

한편 난황색의 농도는 발효처리 새송이버섯을 첨가 급여한 경우 대조구와 같거나 낮게 나타났다. 나 등(2006)은 복합생균제 급여 시 난황색이 대조구에 비하여 유의적으로 낮았다고 하였다.

Table 2–23. Effects of dietary fermented *Plammulina velutipes* on albumen height(mm)

Treatment ¹⁾	Week				
	1	2	3	4	5
C	7.89±1.01 ^b	6.66±0.77 ^b	7.57±0.81 ^b	7.77±0.81 ^c	7.66±0.83 ^b
T1	7.88±1.07 ^b	7.32±0.75 ^b	8.35±0.74 ^{ab}	8.63±0.83 ^{bc}	9.38±1.10 ^a
T2	8.25±0.75 ^b	7.40±0.64 ^b	7.71±0.71 ^b	8.80±0.79 ^{ab}	8.90±0.90 ^a
T3	8.21±0.67 ^b	6.98±0.78 ^b	8.45±0.69 ^{ab}	7.91±0.90 ^{bc}	8.64±1.00 ^{ab}
T4	9.41±0.75 ^a	8.64±0.64 ^a	8.84±0.71 ^a	9.58±0.79 ^a	9.70±0.90 ^a
T5	8.10±0.67 ^b	7.50±0.78 ^b	8.31±0.69 ^{ab}	8.15±0.90 ^{bc}	8.74±1.00 ^a

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 2–24. Effects of dietary fermented *Plammulina velutipes* on Haugh units(HU)

Treatment ¹⁾	Week				
	1	2	3	4	5
C	86.9±1.01 ^b	79.8±0.77 ^b	85.5±0.81 ^b	86.5±0.81 ^b	85.0±0.83 ^b
T1	84.9±1.07 ^b	82.5±0.75 ^b	88.9±0.74 ^{ab}	90.3±0.83 ^b	94.4±1.10 ^a
T2	89.2±0.75 ^b	83.4±0.64 ^b	85.8±0.71 ^b	91.1±0.79 ^{ab}	92.6±0.90 ^a
T3	88.7±0.67 ^b	81.1±0.78 ^b	89.4±0.69 ^{ab}	86.5±0.90 ^b	91.2±1.00 ^a
T4	95.2±0.75 ^a	91.1±0.64 ^a	92.3±0.71 ^a	96.0±0.79 ^a	97.0±0.90 ^a
T5	88.0±0.67 ^b	84.1±0.78 ^b	89.1±0.69 ^{ab}	87.7±0.90 ^b	91.6±1.00 ^a

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 2–25. Effects of dietary fermented *Plammulina velutipes* on yolk colour index(Roche)

Treatment ¹⁾	Week				
	1	2	3	4	5
C	8.10±1.01 ^a	7.50±0.77	7.80±0.81 ^{ab}	7.90±0.81 ^{ab}	7.60±0.83
T1	8.18±1.07 ^a	7.60±0.75	7.70±0.74 ^{ab}	7.20±0.83 ^c	7.20±1.10
T2	7.09±0.75 ^c	7.40±0.64	7.90±0.71 ^a	7.60±0.79 ^{bc}	7.00±0.90
T3	7.64±0.67 ^b	7.80±0.78	7.60±0.69 ^{ab}	7.80±0.90 ^{ab}	7.40±1.00
T4	8.36±0.75 ^a	7.40±0.64	7.70±0.71 ^{ab}	8.30±0.79 ^a	7.60±0.90
T5	7.45±0.67 ^{bc}	7.70±0.78	7.30±0.69 ^b	7.60±0.90 ^{bc}	7.40±1.00

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)
 1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

마) 난각의 질

미생물 발효 팽이버섯 유기물을 첨가 급여 시 난각중과 난각의 두께는 각각 Table 2-26과 Table 2-27에서 보는 바와 같다. 난각중과 난각두께 모두가 미생물발효 팽이버섯을 급여함으로써 부분적으로 향상된 결과를 나타내었다. 그러나 일관된 경향을 보이지 않았다. 발효처리 새송이 버섯 급여가 난각질 개선에 효과적인 반면 발효처리 팽이버섯의 급여는 효과를 나타내지 않았다.

Table 2-26. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on shell weight(g)

Treatment ¹⁾	Week				
	1	2	3	4	5
C	6.07±1.01 ^a	6.01±0.77	6.16±0.81	6.14±0.81	5.92±0.90 ^a
T1	6.04±1.07 ^a	6.08±0.75	6.18±0.74	6.04±0.83	6.00±1.10 ^{ab}
T2	5.51±0.75 ^b	6.15±0.64	6.05±0.71	6.11±0.79	5.88±0.90 ^a
T3	6.08±0.67 ^a	6.19±0.78	6.41±0.69	6.37±0.90	6.24±1.00 ^{ab}
T4	6.06±0.75 ^a	6.44±0.64	6.39±0.71	6.47±0.79	6.46±0.83 ^b
T5	6.21±0.67 ^a	6.19±0.78	6.38±0.69	6.23±0.90	6.12±1.00 ^{ab}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)
 1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 2-27. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on shell thickness(μm)

Treatment ¹⁾	Week				
	1	2	3	4	5
C	367.5±1.01 ^{ab}	375.2±1.01 ^{ab}	379.9±1.01	384.5±1.01 ^{ab}	376.4±1.01 ^{ab}
T1	354.2±1.01 ^{bc}	363.3±1.01 ^b	365.3±1.01	366.9±1.01 ^b	361.4±1.01 ^b
T2	341.7±1.01 ^c	368.0±1.01 ^b	369.2±1.01	359.2±1.01 ^b	355.8±1.01 ^b
T3	373.4±1.01 ^{ab}	379.6±1.01 ^{ab}	383.6±1.01	383.5±1.01 ^{ab}	382.8±1.01 ^{ab}
T4	374.0±1.01 ^{ab}	396.8±1.01 ^a	387.2±1.01	398.8±1.01 ^a	400.4±1.01 ^a
T5	379.2±1.01 ^a	372.7±1.01 ^{ab}	373.2±1.01	383.5±1.01 ^{ab}	369.6±1.01 ^{ab}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)
 1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

바) 난황 내 지방산 조성

미생물 발효 팽이버섯 유기물을 첨가 급여 시 난황 내 지방산의 조성은 Table 2-28에 제시되었다. 미생물 발효 팽이버섯 유기물을 첨가 급여에 의하여 난황의 지방산 조성에 현저한 변화를 보였다. 미생물 발효 팽이버섯 유기물을 첨가 급여수준이 증가함에 따라 C18:0의 감소가 현저하게 나타났으며, 반면에 C18:2(n-6)와 C18:3(n-3)의 함량이 현저하게 증가하였다($p < 0.05$). 또한 C20:4와 C22:6(n-3)의 함량도 증가하였다. 필수지방산 인 C18:2(n-6)와 C18:3(n-3) 및 C20:4는 미생물 발효 팽이버섯 유기물을 첨가 수준이 증가 할수록 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 본 결과의 난황 내 지방산조성 비율은 박 등(1997)의 발표한 계란의 지방산조성과 유사하였다.

미생물 발효 팽이버섯 유기물의 첨가 수준이 증가 할수록 포화지방산의 함량은 감소하였으며($p < 0.05$), 반면에 불포화지방산의 함량은 현저히 증가하였다($p < 0.05$). 또한 n-6와 n-3의 비율이 C, T1, T2, T3, T4 및 T5에서 각각 9.76, 8.78, 8.95, 8.80, 7.71 및 7.39로서 미생물 발효 팽이버섯 유기물의 첨가 수준이 증가 할수록 n-3의 함량이 높았다. 미국(Harris, 1989)에서 잠정적으로 권장하는 n-6와 n-3의 비율이 4:1~10:1인 점을 감안하면 본 시험결과 난황의 지방산 조성이 우수하다고 본다. Fernandes and Venkartraman(1993)은 계란의 n-3의 비율을 강화하면 혈중 콜레스테롤의 저하와 심장혈관질환 및 암 그리고 류마치스성 관절염 방어에 효과가 있다고 하였다.

Table 2-28. Effects of dietary fermented *Plammulina velutipes* on fatty acid composition of egg yolk(%)

Fatty acid	Treatment ¹⁾					
	C	T1	T2	T3	T4	T5
C14:0	0.30±0.01	0.32±0.02	0.23±0.01	0.24±0.02	0.27±0.02	0.23±0.01
C16:0	25.70±0.23	25.39±0.09	24.33±0.20	24.46±0.12	23.06±0.07	23.10±0.32
C16:1	1.82±0.12 ^{ab}	1.97±0.08 ^a	1.88±0.31 ^{ab}	1.71±0.05 ^b	1.85±0.04 ^{ab}	1.88±0.07 ^{ab}
C17:0	0.23±0.02 ^b	0.29±0.04 ^a	0.22±0.01 ^b	0.22±0.01 ^b	0.25±0.02 ^{ab}	0.24±0.06 ^a
C18:0	11.70±0.09 ^a	10.59±0.21 ^{ab}	9.93±0.02 ^b	9.56±0.02 ^b	8.16±0.34 ^c	8.40±0.51 ^c
C18:1	40.40±0.30 ^b	41.00±0.32 ^b	41.70±0.21 ^{ab}	41.80±0.28 ^{ab}	42.70±0.36 ^c	42.00±0.21 ^b
C18:2(n-6)	14.20±0.02 ^c	14.40±0.01 ^c	15.50±0.03 ^b	15.70±0.02 ^b	16.80±0.01 ^a	16.90±0.02 ^a
C18:3(n-3)	0.28±0.01 ^c	0.39±0.01 ^{bc}	0.48±0.02 ^{bc}	0.53±0.02 ^b	0.91±0.02 ^a	1.09±0.02 ^a
C20:4	4.20±0.03 ^c	4.41±0.01 ^{bc}	4.47±0.03 ^{bc}	4.53±0.01 ^b	4.73±0.03 ^{ab}	4.96±0.02 ^a
C22:5(n-3)	0.02±0.01	0.02±0.00	0.01±0.01	0.01±0.01	0.02±0.00	0.02±0.01
C22:6(n-3)	1.16±0.02 ^c	1.23±0.02 ^b	1.24±0.01 ^{ab}	1.24±0.01 ^{ab}	1.25±0.02 ^a	1.18±0.01 ^c
SFA ¹	37.92±0.30 ^a	36.58±0.34 ^a	34.72±0.26 ^b	34.48±0.36 ^b	31.74±0.57 ^c	31.97±0.33 ^c
USFA ²	62.08±0.30 ^d	63.42±0.34 ^c	65.28±0.26 ^b	65.52±0.36 ^b	68.26±0.57 ^a	68.03±0.33 ^a
USFA/SFA	1.64±0.03 ^d	1.73±0.02 ^c	1.88±0.04 ^b	1.90±0.03 ^b	2.15±0.02 ^a	2.13±0.02 ^a
n-6/n-3	9.76±0.21 ^a	8.78±0.25 ^b	8.95±0.07 ^b	8.80±0.09 ^b	7.71±0.10 ^c	7.39±0.17 ^c

Values are means of 5 egg yolks.

C14:0(myristic acid), C16:0(palmitic acid), C16:1(palmitoleic acid), C17:0(margaric acid), C18:0(stearic

acid), C18:1(oleic acid), C18:2(linoleic acid), C18:3(linolenic acid), C20:4(arachidonic acid), C22:5(DPA:Docosapentaenoic acid), C22:6(DHA:Docosahexaenoic acid).

1 USFA(Unsaturated fatty acid) : C16:1, C18:1, C18:2, C18:3, C20:4.

2 SFA (Saturated fatty acid) : C14:0, C16:0, C17:0, C18:0.

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

a,b,c Means with different superscripts within a row differ significantly(p<0.05).

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

다. 건조처리 미 이용 버섯에 의한 닭고기 생산

1) 증체량 및 사료요구율

가) 체중변화

건조처리 미 이용 팽이버섯을 육계의 사료에 0%(C), 1%(T1), 3%(T2), 5%(T3)를 첨가하여 급여 시 체중 변화는 Table 3-1에서 보는 바와 같다. 주령별 체중에서 T1과 T2에서 대조구보다 초기에 체중이 증가하는 경향을 보였으나 5주령부터는 체중이 낮아졌으며, T3에서는 전체 주령에서는 다른 시험구에 비해 낮은 경향을 나타내었다. 그러나 전 주령에서 처리 간에 유의차는 인정되지 않았다.

Table 3-1. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on body weight in broiler chicks

Treatment ¹⁾	Week					
	2	3	4	5	6	7
C	151.3±2.5	286.7±4.4	494.1± 7.9	727.1± 9.2	1002.8±16.1	1276.8±42.9
T1	154.0±4.0	290.4±2.5	506.3±10.9	730.4±24.5	1011.1±37.3	1242.4±26.6
T2	154.4±1.6	290.8±0.8	502.5± 8.1	704.8± 8.8	974.9±20.7	1231.0±23.0
T3	151.9±3.1	280.4±4.7	475.4±19.4	696.0±14.0	960.6±16.4	1231.4±27.4

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

박과 송(1997)은 한약재 부산물을 육계사료에 10%수준까지 첨가하여도 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율에 대조구와 차이가 없다고 하였으며, 강 등(2003)은 동충하초 접종사료를 육계에 대체 급여 시 성장률 전 후기 간에 차이를 보였으며, 동충하초 접종배합사료는 5% 대체가 적정수준이라고 하였던 바 본 연구결과와 유사하였다. 육계 사료에 썩을 첨가한 경우에도 일정한 범위에서는 성장에 영향을 미치지 않았다고 하였다(김, 2006; Haw 등, 1985).

나) 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율

증체량, 사료섭취량 및 사료요구율은 Table 3-2에서 보는 바와 같다. 2주령에서 7주령까지 증체량은 미 이용버섯을 첨가 급여한 경우 대조구에 비하여 다소 낮아지는 결과이었으나 통계적인 유의차는 없었다.

Table 3-2. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on the weight gain, feed intake, feed efficiency in broiler chicks

	Week	Treatment ¹⁾				Pooled SE
		C	T1	T2	T3	
Weight Gain (g/bird)	2~4	342.9± 6.08	352.3± 7.13	348.1± 8.93	323.5±16.60	5.582
	5~7	782.6±35.06	736.1±15.65	728.5±31.11	746.0±11.87	13.257
	2~7	1125.50±41.11	1088.4±22.76	1076.6±22.25	1079.5±25.32	13.665
Feed intake (g/bird)	2~4	597.3± 4.45	609.7± 6.49	607.1±10.46	597.3± 6.46	3.542
	5~7	1693.4±35.67	1656.5±29.91	1712.8±28.67	1695.0±32.33	14.881
	2~7	2290.8±38.38	2266.2±33.83	2319.8±27.95	2292.3±38.74	15.980
Feed /Gain	2~4	1.743±0.035	1.732±0.020	1.745±0.016	1.854±0.079	0.024
	5~7	2.169±0.065	2.252±0.061	2.359±0.102	2.242±0.035	0.036
	2~7	2.039±0.055	2.084±0.047	2.157±0.058	2.124±0.020	0.024

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

전체 사양기간인 2주령에서 7주령까지 1수당 사료섭취량은 T1에서 다른 처리구보다 30~40 g정도 적게 섭취를 하였으나 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 증체 당 사료섭취량은 미 이용버섯 첨가수준이 높을수록 증가하는 경향을 나타내었다. 전체적으로 미 이용 버섯첨가수준을 높일수록 증체량은 낮아지고, 사료요구율은 높아지는 경향을 나타내었으나 유의성은 없었다.

박과 김(1996)은 육계사료에 두충잎을 2, 4, 6%첨가 급여하였을 때 증체량과 사료 섭취량 및 사료효율 에서 차이가 없었다고 보고하였으며, 박과 유(1999)는 한약재부산물을 4% 및 8% 첨가 시 육계의 증체량과 사료섭취량 및 사료요구율에 차이가 없었다고 하여 본 연구결과와 유사하였다. 또한 유 등(2003)은 육계사료에 마늘분말을 3% 및 5% 첨가 시 증체량이 유의하게 증가하였다고 보고 하였다. 이러한 결과로 보아 건조된 미 이용 팽이버섯을 사료의 5%까지 첨가해도 육계생산에 지장이 없는 것으로 사료된다.

2) 장내 병원성 미생물 및 계분의 가스발생량

가) 장내 병원성 미생물

건조처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 첨가 급여 시 육계 맹장 내용물중의 병원성 미생물(*Salmonella*와 *E. coli*) 수는 Table 3-3에서 보는 바와 같다. 관찰 된 미생물의 수는 Log10으로 환산하여 표시하였다.

Table 3-3. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on *salmonella* and *E. coli* in cecum of broiler chicks (log10 cfu/g content)

Treatment ¹⁾	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>
C	5.036±0.051 ^a	5.405±0.299 ^c
T1	3.720±0.035 ^b	6.003±0.028 ^b
T2	3.323±0.089 ^c	4.759±0.019 ^d
T3	3.031±0.020 ^d	6.327±0.028 ^a

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

맹장 내 *Salmonella*균수는 건조 처리 미 이용 팽이버섯 첨가에 의하여 현저하게 감소한 결과였으며(p<0.05) 첨가 수준에 따라 살모넬라 균수는 계속 감소하였다. 그러나 대장균인 *E. coli*수는 대조구에서 5.405인데 비하여 T1, T2, T3에서 각각 6.003, 4.759, 6.327으로 팽이버섯 급여수준이 높을 경우 오히려 증가하는 경향을 나타내었다(p<0.05). 본 실험 결과 팽이버섯 급여는 병원성 미생물인 *Salmonella*균수를 감소시켰으나, 대장균인 *E. coli*에 대해서는 감소 효과가 없는 것으로 판단되었다.

김 등(2004)은 옷나무 추출액을 급여한 결과 유산균, *E. coli* 및 *Salmonella*균수가 처리 간에 차이가 없었다고 보고하였으며, 박 등(2008)은 한약재(황련) 추출물(Herb extract)을 급여 결과 소장 내 *E. coli*, Yeast 및 *Lactobacillus* 균수가 통계적인 차이는 나타내지 않았지만 개선되는 경향을 보였다고 하였다.

나) 계분의 가스 발생량

건조처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 첨가 급여 시 계분 중의 암모니아가스 발생량을 측정된 결과는 Table 3-4에서 보는 바와 같다.

Table 3-4. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on fecal NH₃ gas in manure of broiler chicks (ppm)

Treatment ¹⁾	Day						
	0	1	3	6	9	12	15
C	153.34±1.9 ^{aD}	526.22±10.5 ^{abB}	652.13±2.9 ^{aA}	362.22±3.0 ^{aC}	54.44±2.9 ^{bE}	27.50±0.5 ^{aF}	21.67±1.4 ^{aF}
T1	143.20±0.8 ^{abD}	548.89±10.3 ^{aB}	615.83±3.0 ^{ba}	356.67±5.8 ^{aC}	63.33±1.9 ^{aE}	25.00±0.6 ^{aF}	20.78±1.4 ^{aF}
T2	137.75±1.3 ^{bc}	479.56±6.2 ^{ba}	441.60±0.9 ^{cb}	126.67±1.9 ^{bd}	34.17±1.4 ^{ce}	25.00±1.2 ^{aF}	16.28±0.2 ^{bg}
T3	118.20±7.6 ^{cC}	372.89±12.7 ^{cb}	393.07±0.1 ^{da}	96.67±9.0 ^{cd}	22.22±0.6 ^{de}	12.11±1.2 ^{be}	5.29±0.6 ^{ce}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

A,B,C,D,E,F,G : Values(Mean±SE) within row with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

계분의 암모니아가스 발생량은 모든 처리구에서 3일까지는 현저하게 증가하였으며 6일 이후부터 빠른 속도로 감소하는 경향을 나타내었다. 3일째 암모니아 발생량은 C 구, T1구, T2구, T3구에서 각각 652.13, 615.83, 441.60, 393.07 ppm으로서 대조구에 비하여 처리구에서 가스발생량이 현저하게 감소하였으며($p < 0.05$), 건조 미 이용 팽이버섯 첨가수준이 증가 할수록 가스발생량이 낮아지는 결과를 보였다. 이와 같은 결과는 6일 이후에도 뚜렷하여 팽이버섯첨가가 계분의 가스발생량을 줄이는 효과가 있는 유효한 것으로 판단된다.

계사에서 발생하는 암모니아 가스는 육계 생산성에 영향을 주는 가장 큰 요인(Homidan 등, 2003)으로 사료 내 단백질 수준을 낮추거나(Hobbes 등, 1996), 소화기 관내의 pH를 조절하여 미생물 군을 조정하면 냄새를 줄일 수 있다고 하였다(van Heugten 과 van Kempen, 1999). 본 연구결과 미 이용 팽이버섯 첨가가 소화기 내 미생물 군을 변화시켜 가스발생량을 감소시킨 것으로 본다.

3) 도체 특성 및 닭고기 저장성

가) 도체특성

건조처리 미 이용 팽이버섯을 육계에게 0%(C), 1%(T1), 3%(T2), 5%(T3) 첨가 급여 시 처리별 도체생산량과 도체율은 Table 3-5에서 보는 바와 같다.

Table 3-5. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on carcass characteristic in broiler chicks

	Treatment ¹⁾					
	C	T1	T2	T3		
Live weight(g)	1352.92 ^a	1372.00 ^a	1259.00 ^b	1270.43 ^b		
Carcass weight(g)	886.15 ^a	877.80 ^a	797.17 ^b	810.42 ^b		
Carcass ratio(%)	65.50 ^a	64.01 ^a	63.35 ^a	63.80 ^a		
Gizzard, g(%)	19.08(1.41) ^c	20.11(1.47) ^b	18.78(1.49) ^{ab}	19.85(1.56) ^a		
	Giblets	Liver, g(%)	34.83(2.58) ^c	37.68(2.75) ^b	38.72(3.08) ^a	34.50(2.72) ^{bc}
		Heart, g(%)	8.67(0.64) ^{ab}	8.61(0.63) ^b	7.72(0.61) ^b	8.63(0.68) ^a
Cut-ups	Breast, g(%)	162.33(12.00) ^b	184.50(13.45) ^a	151.33(12.02) ^b	156.50(12.32) ^b	
	Thigh, g(%)	226.50(16.74) ^a	225.67(16.45) ^a	207.33(16.47) ^a	213.33(16.79) ^a	
	Wing, g(%)	91.67(6.78) ^a	97.33(7.10) ^a	90.00(7.15) ^a	89.67(7.06) ^a	
	Neck, g(%)	65.67(4.66) ^a	63.00(4.79) ^a	57.67(4.58) ^{ab}	50.67(3.99) ^b	
	Chest, g(%)	54.75(4.05) ^{ab}	66.00(4.74) ^a	58.75(4.63) ^a	55.50(4.51) ^a	
	Waist, g(%)	99.75(7.24) ^a	107.25(7.88) ^a	80.25(6.26) ^c	84.75(6.67) ^{bc}	

a,b,c : Values(Mean±SE) within row with no common superscript differ significantly($p < 0.05$)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

도체중이 C, T1, T2, T3에서 각각 886.15, 877.80, 797.17, 810.42 g인데 비하여 도체율은 C 65.50, T1 64.01, T2 63.35, T3 63.80%로서 미 이용버섯 첨가 시 도체율이 다소 낮아지는 경향이였다. 그러나 통계적인 유의차는 인정되지 않았다. 유 등(2002)은 미생물 제제의 급여 시 육계의 도체율이 증가한 반면에 복강지방이 감소한다고 했으며, 박과 유(1999)는 한약재 부산물을 첨가한 경우 육계의 도체율이 유의적으로 낮았다고 하여 첨가되는 사료에 따라 도체율에 차이가 있음을 예시하였다. 생체중에 대한 근위의 무게비율은 대조구보다 T1, T2, T3에서 유의적으로 무거웠으며($p < 0.05$), 간 또한 T1, T2, T3에서 유의적으로 무거웠다($p < 0.05$). 박 등(2000)은 린코마이신과 남은 음식물의 첨가·급여 시에 간의 비율이 현저하게 감소하였다고 보고하였으나 본 실험에서는 건조 미 이용 팽이버섯을 급여한바 근위와 간에서 대조구보다 유의적으로 증가되었다($p < 0.05$).

부분육에서 가슴육 생산율은 T1에서 다른 처리구보다 높게 나타났으며, 대퇴육 생산율은 차이가 없었다. 날개육 생산율은 대조구와 차이가 없었다. 이러한 결과는 미 이용 팽이버섯을 첨가 급여하여도 도체생산에 차이가 없으나 가식 내장의 생산은 높아졌다고 본다.

나) 닭고기의 저장성

TBARS(지방산패도)

건조처리 미 이용 팽이버섯을 육계에게 첨가 급여 후 생산된 닭고기의 저장 중 지방산패도의 변화는 Table 3-6 과 Table 3-7에 나타나 있다.

Table 3-6. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on TBARS in breast of broiler chicks

Treatment ¹⁾	Day			
	0	3	6	9
C	0.066±0.000 ^{aC}	0.074±0.003 ^{bB}	0.134±0.001 ^{aA}	0.138±0.003 ^{aA}
T1	0.022±0.008 ^{bD}	0.087±0.002 ^{bC}	0.106±0.002 ^{bB}	0.143±0.003 ^{aA}
T2	0.021±0.002 ^{bC}	0.106±0.005 ^{aA}	0.083±0.001 ^{cB}	0.098±0.003 ^{cA}
T3	0.012±0.002 ^{cC}	0.062±0.002 ^{dB}	0.062±0.002 ^{dB}	0.118±0.003 ^{bA}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly($p < 0.05$)

A,B,C,D : Values(Mean±SE) within row with no common superscript differ significantly($p < 0.05$)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

가슴근육의 저장기간 중 TBARS 변화는 저장기간이 경과함에 따라 모든 처리구에서 높게 나타났다. 저장 3일 후 TBARS가는 C구와 T1, T2, T3구에서 각각 0.074, 0.087, 0.104, 0.062로서 T2에서 가장 높았다. 그러나 저장 6일 후 TBARS가는 각각 0.134, 0.106, 0.083, 0.062로서 C구에서 현저히 높았고($p < 0.05$), 저장 9일 후에는 각각 0.138, 0.143, 0.098, 0.118로서 C구와 T1구에서 높았고 T2, T3구에서는 유의적으로 낮

왔다($p < 0.05$).

Table 3-7. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on TBARS in thigh of broiler chicks

Treatment ¹⁾	Day			
	0	3	6	9
C	0.014±0.000 ^{bD}	0.074±0.002 ^{bC}	0.120±0.002 ^{bB}	0.127±0.003 ^{bA}
T1	0.021±0.002 ^{aC}	0.062±0.001 ^{cB}	0.164±0.006 ^{aA}	0.157±0.002 ^{aA}
T2	0.025±0.002 ^{aC}	0.084±0.001 ^{aB}	0.086±0.002 ^{cB}	0.148±0.005 ^{abA}
T3	0.024±0.002 ^{aD}	0.058±0.003 ^{cC}	0.093±0.004 ^{cB}	0.168±0.008 ^{aA}

a,b,c : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly($p < 0.05$)

A,B,C,D : Values(Mean±SE) within row with no common superscript differ significantly($p < 0.05$)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

다리근육에서 저장 중의 처리구간 TBARS 변화는 Table 16에서 보는 바와 같이 저장기간이 경과함에 따라 TBARS가는 모든 처리구에서 높아졌다. 저장 6일 후 TBARS가는 C구와 T1, T2, T3구에서 각각 0.120, 0.164, 0.086, 0.093으로 C구와 T1구에서 높은 반면 T2, T3구에서는 훨씬 낮았다($p < 0.05$). 저장 9일 후 TBARS가는 각각 0.127, 0.157, 0.148, 0.168로서 대조구에 비하여 처리구에서 높게 나타났다. 전체적으로 볼 때 건조 미 이용 팽이버섯의 첨가는 닭고기 가슴육의 저장성을 향상시킬 것으로 평가된다. 김(2006)은 육계에 2%이상의 썩을 급여한 경우 항산화효과가 보였다고 하였으며, Kwon 등(1993)과 Faure 등(1990) 및 Lee 와 Lee(1994)는 식물체 조직에 존재하는 lignin 류, flavonoid 류, phenol 류 등은 항산화 작용이 크다고 하였던 바 팽이버섯에 이러한 성분의 존재여부에 대한 별도의 검토가 필요하다고 본다.

4) 닭고기의 이화학적 특성

가) pH(수소이온지수)

건조처리 미 이용 팽이버섯을 육계사료에 첨가 급여 시 닭고기의 pH의 변화는 Table 3-8에서 보는 바와 같다.

Table 3-8. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on pH of breast and thigh in broiler chicks

Treatment ¹⁾	Breast	Thigh
C	5.75±0.015 ^{bc}	6.46±0.048 ^b
T1	5.83±0.017 ^a	6.43±0.023 ^b
T2	5.73±0.028 ^c	6.30±0.014 ^c
T3	5.81±0.010 ^{ab}	6.64±0.009 ^a

a,b,c : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

가슴부위와 대퇴부위 근육 모두에서 대조구와 처리구간의 유의차는 인정되지 않았다. 가슴근육은 pH 5.7~5.8범위에 있었고, 다리근육은 pH 6.3~6.6범위를 나타내었다. 근육의 pH는 도축 후 24시간 이내에 pH 7.0에서 pH 5.4~5.8까지 떨어진다(Penny, 1977)는 사실에 비추어 볼 때 정상의 범위라고 본다. 박과 유(1999)는 한약재부산물을 첨가하여 급여 시 닭고기의 pH가 대조구에 비하여 높았다고 하여 본 결과와 다른 견해를 보였다.

나) 육색(Meat color)

건조처리 미 이용 팽이버섯을 육계사료에 첨가 급여 시 육색의 변화는 Table 3-9에서 보는 바와 같다. 명도를 나타내는(L*)값은 가슴근육에서는 T2와 T3에서 유의적(p<0.05)으로 높았으며, 다리근육에서는 T2에서 가장 높게 나타났다.

Table 3-9. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on meat color of breast and thigh in broiler chicks

Treatment ¹⁾	Breast			Thigh		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
C	49.08±0.14 ^c	4.02±0.04 ^a	9.75±0.03 ^b	53.11±0.15 ^b	10.03±0.39 ^c	11.62±0.15 ^b
T1	49.15±0.32 ^c	3.89±0.17 ^a	9.86±0.07 ^b	52.50±0.33 ^b	11.53±0.19 ^b	11.77±0.10 ^{ab}
T2	50.26±0.37 ^b	3.77±0.19 ^a	10.10±0.28 ^{ab}	54.63±0.07 ^a	7.59±0.17 ^d	11.87±0.21 ^{ab}
T3	51.40±0.37 ^a	2.69±0.00 ^b	10.53±0.20 ^a	51.01±0.66 ^c	14.19±0.39 ^a	12.21±0.10 ^a

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

닭고기의 밝고 어두움을 나타내는 명도의 값은 육질 평가에 영향을 주는 요인 중에 하나로서, 윤(2005)은 다리고기에서 더욱 밝게 나타났으며, 이것은 닭고기의 지방함량이 가슴고기보다는 다리고기에 많기 때문이라고 하였다.

Bendall과 Swatland(1988)는 고기의 낮은 명도는 높은 pH와 관련이 있다고 하였으나, 박 등(1998)은 명도가 높아도 닭고기의 pH에는 변화가 없었다고 하였다. 박 등(1998)은 육계사료에 건지황을 첨가하면 명도가 높았다고 하였고, 박과 유(1999)는 한약재 부산물을 첨가하면 명도가 낮아지는 경향이었다고 하여 첨가사료에 따라 닭고기의 명도에 차이가 있음을 시사하였다.

적색도를 나타내는(a*)값의 가슴근육에서는 T3구가 다른 처리에 비하여 유의적으로 낮아졌으며(p<0.05), 다리근육에서는 대조구에 비하여 T1과 T3에서 높았다(p<0.05). 또한 황색도를 나타내는(b*)값의 가슴과 다리근육에서 첨가제를 많이 급여할수록 모든 처리구간에 높아지는 경향을 나타내었다(p<0.05).

채 등(2004)은 현미를 급여했을 때 닭고기의 명도(L*)는 대조구에 비하여 현미 급

여수준을 높였을 때 점자 감소하는 경향을 나타냈으며, 황색도(b*)도 현미 수준이 증가할수록 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다고 하여 본 결과와 다른 견해를 보였다. 이것은 버섯과 현미의 성분차이가 육색에 반영되어 나타난 것으로 사료된다.

다) 가열감량(Cooking loss), 총 수분함량(Total water) 및 보수력(Water - Holding Capacity) 측정

건조처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 첨가 급여 후 생산된 닭고기에 대한 가열감량(Cooking loss), 총 수분함량(Total water) 및 보수력(Water - Holding Capacity)은 Table 3-10에 나타내었다.

Table 3-10. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on the cooking loss¹, total water², water-holding capacity³ of breast and thigh in broiler chicks

Treatment ¹⁾	Breast			Thigh		
	C.L ¹	T.W ²	W.H.C ³	C.L ¹	T.W ²	W.H.C ³
C	7.49±0.14 ^d	74.58±0.37	89.96±0.17 ^a	17.37±1.85	76.59±0.23	77.66±2.46
T1	14.57±0.07 ^b	73.64±0.18	80.24±0.14 ^c	16.02±0.71	76.32±0.93	78.88±1.17
T2	16.14±0.33 ^a	74.19±0.13	78.25±0.46 ^d	17.06±0.42	77.46±0.38	78.06±0.47
T3	12.14±0.31 ^c	74.59±0.39	83.78±0.48 ^b	15.56±0.89	75.88±0.36	79.41±1.14

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

가슴근육의 가열감량은 C 7.49%에 비하여, T1 14.57, T2 16.14, T3 12.14%로 처리구에서 유의적으로 높았다(p<0.05). 반면 다리근육에는 팽이버섯을 급여한 경우 감소하는 경향을 나타내었으나 처리 간에 유의적 차이는 없었다.

총 수분함량은 가슴과 다리근육 모두에서 처리간의 유의적 차이를 보이지 않았다.

보수력은 가슴근육에서 대조구 89.96, T1 80.24, T2 78.25, T3 83.78%로 처리간의 유의적 차이를 나타내었고(p<0.05), 버섯을 급여한 경우 낮은 결과를 보였다. 그러나 다리근육에서는 처리 간에 유의적인 차이는 보이지 않았다.

가열감량은 단백질 변성에 의하여 변화하며, 보수력에도 영향을 미친다(Winger과 Fennema, 1976)는 사실을 감안할 때 본 연구에서 가열감량이 높은 처리구에서 보수력이 낮아지는 결과와 유사하였다. Roseiro 등(1994)은 보수력은 육의 외관과 조리 및 제품 제조 시 큰 영향을 주는 요소라고 하였으며, 송 등(1984)은 보수력이 높은 고기는 식육가공 시 제품의 수분함량을 크게 하고 조직감을 좋게 하며 품질을 향상시킨다고 하였다. 본 연구에서 팽이버섯 급여는 가슴근육의 보수력을 저하시키는 것으로 평가되었다.

라) 수용성 및 염용성 단백질 용해성

Table 3-11. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on water soluble protein solubility¹, salt soluble protein solubility² of breast and thigh in broiler chicks (mg/ g)

Treatment ¹⁾	W.S.P.S ¹		S.S.P.S ²	
	Breast	Thigh	Breast	Thigh
C	0.42±0.041 ^a	0.45±0.020 ^a	0.45±0.018 ^c	0.40±0.017 ^c
T1	0.34±0.003 ^b	0.43±0.003 ^{ab}	0.58±0.012 ^b	0.37±0.000 ^c
T2	0.30±0.010 ^b	0.43±0.006 ^{ab}	0.78±0.002 ^a	0.54±0.011 ^b
T3	0.28±0.009 ^b	0.41±0.008 ^b	0.48±0.018 ^c	0.65±0.024 ^a

a,b,c : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

건조처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 첨가 급여 시 가슴과 다리근육 내 수용성 단백질 및 염용성 단백질의 용해성은 Table 3-11에서 보는 바와 같다.

가슴근육에서 수용성단백질의 용해성은 팽이버섯 급여수준이 높을수록 유의적으로 감소(p<0.05)하는 경향이었고, 다리근육에서도 다소 감소하였다(p<0.05). 염용성단백질의 용해성은 가슴근육에서 대조구 0.45에 비하여 T1 0.58, T2 0.78로 유의적으로 증가하였지만(p<0.05), T3에서는 0.48로 대조구와 비슷한 수준으로 나타났으며, 다리근육에서는 1%의 팽이버섯을 급여한 T1에서 대조구와 비슷하였으나 T2 와 T3 에서는 유의적으로 증가(p<0.05)하였다. 염용성 단백질은 근원섬유단백질로서 육가공 산업에서 중요한 의미를 가지고 있는바 팽이버섯 급여에 의하여 용해도가 높아지는 것으로 나타났다.

마) 조지방 함량

건조처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 첨가 급여 후 생산된 닭고기의 조지방 함량은 Table 3-12에서 보는 바와 같다.

Table 3-12. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on crude fat of breast and thigh in broiler chicks (%)

Treatment ¹⁾	Breast	Thigh
C	2.96±0.047 ^a	3.16±0.099 ^c
T1	1.79±0.017 ^b	4.62±0.008 ^b
T2	1.65±0.019 ^c	7.16±0.101 ^a
T3	1.35±0.028 ^d	7.11±0.021 ^a

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

가슴근육에서 조지방 함량은 건조처리 미 이용 팽이버섯의 첨가수준이 높을수록 현저하게 감소하였으나($p < 0.05$), 다리근육에서는 반대로 C구 3.16, T1 4.62, T2 7.16, T3 7.11%로 건조 미 이용 팽이버섯의 급여로 인한 조지방 함량이 크게 증가하였다($p < 0.05$). 이는 근내지방의 함량이 높을수록 불포화지방산인 Oleic acid 함량이 높고, Oleic acid와 같은 불포화지방산은 조리중 휘발성 육향을 발산해 관능적 후각을 자극하는 특유의 향을 지니고 있으며, 맛의 풍미를 느끼게 하는 주요 요인으로 (Wasserman과 Talley, 1968) 건조 미 이용 팽이버섯의 급여는 다리근육의 조지방 함량과 불포화 지방산 함량의 증가로 특유의 향과 맛의 풍미를 높이는데 좋은 효과가 있을 것으로 사료된다.

박과 유(1999)는 한약재 부산물 첨가 시 닭고기의 지방함량이 감소한다고 하였으며, 윤 등(2005)은 목초액을 노계에 급여한 결과 가슴고기에서는 조지방 함유량이 낮아진 반면 다리고기에서는 많은 경향을 보였다고 하여 본 결과를 간접적으로 뒷받침한다고 본다. Hulan 등(1990)은 육계의 가슴육에서 지방함량은 평균 0.9%였다고 보고하였고, 류(1997)는 1.114%라고 하였던 바 본 연구에서는 평균 1.36~2.96%로 앞의 보고에 비하여 지방함량이 높았음을 나타내었다.

바) 아미노산 조성

건조처리 미 이용 팽이버섯을 육계에게 첨가 급여 시 닭고기 중의 아미노산 조성량과 함량은 Table 3-13과 Table 3-14 및 Figure 5과 Figure6에 나타내었다.

Table 3-13. Effects on dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on free amino acid in breast of broiler chicks (%)

Free amino acid	Treatments ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
alanine	2.72	2.70	2.68	2.76
arginine	1.26	1.43	1.32	1.50
asparagine	0.63	0.70	0.66	0.55
asparatic acid	0.00	0.00	0.00	0.00
cysteine	0.16	0.10	0.11	0.05
glutamic acid	2.15	3.50	2.67	2.47
glycine	0.83	0.88	1.11	1.20
histidine	0.48	0.62	0.65	0.75
isoleucine	0.63	0.74	0.89	0.95
leucine	1.11	1.54	1.65	1.84
lysine	1.19	1.45	1.93	2.12
methionine	0.34	0.40	0.55	0.58
phenylalanine	0.68	1.00	0.80	0.97
proline	0.86	0.00	0.04	0.03
serine	1.52	1.80	2.05	2.15

threonine	1.00	1.38	1.57	1.75
tyrosine	0.80	0.95	1.14	1.35
valine	0.85	1.05	1.24	1.31
Total	17.21	20.24	21.06	22.33

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

가슴근육 중의 아미노산 함량은 Table 13에서 보는 바와 같이 C, T1, T2, T3에서 각각 17.21, 20.24, 21.06, 22.33%으로 대조구에 비하여 T1, T2 T3 에서는 증가하였다. 특히 glutamic acid는 C 및 T1, T2, T3구에서 각각 2.15, 3.50, 2.67, 2.47%으로 팽이버섯 첨가에 의하여 상당 수준 높아졌다. 그러나 alanine함량은 C구의 2.72% 비하여 T1, T2 및 T3구에서 각각 2.70, 2.68, 2.76%으로 팽이버섯 첨가수준을 높혀도 함량이 변화가 적었으며, cystine의 함량은 오히려 감소한 결과를 나타내었다. 그러나 주요 아미노산 성분은 팽이버섯 첨가에 의하여 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 건조처리 팽이버섯의 급여수준을 1%이상 증가 시켜도 아미노산 함량이 크게 증가하지는 않았다.

Figure 5에서 보는 바와 같이 전체적으로 볼 때 처리구에서 아미노산 함량이 높게 나타났는데, arginine, histidine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, serine, threonine, valine등 주요 아미노산들은 팽이버섯 급여수준이 1% 이상인 경우 함량이 높게 나타났다.

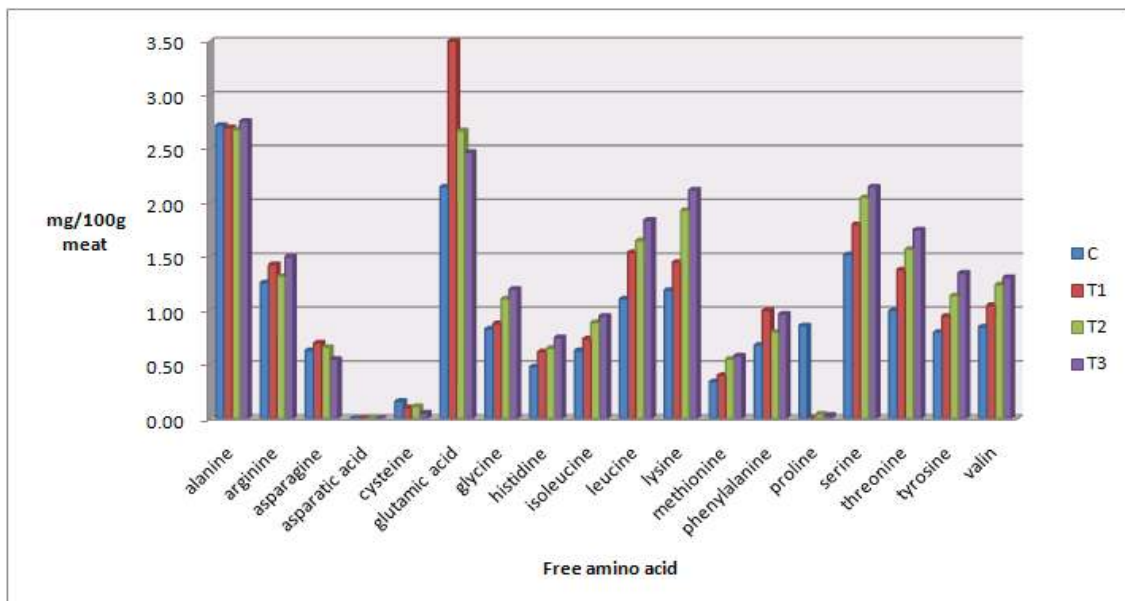


Figure 5. Content of free amino acid in breast meat of broiler chicks fed dehydrated *Flammulina velutipes*.

Table 3-14. Effects on dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on free amino acid composition in thigh of broiler chicks (%)

Free amino acid	Treatments ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
alanine	3.22	3.00	3.72	2.80
arginine	1.80	1.18	2.15	2.10
asparagine	0.93	0.53	0.99	1.29
asparatic acid	0.00	0.00	0.00	0.00
cysteine	0.02	0.18	0.16	0.12
glutamic acid	2.74	3.79	3.14	4.43
glycine	1.55	1.42	1.35	1.31
histidine	0.49	0.65	0.46	0.75
isoleucine	0.35	0.38	0.41	0.40
leucine	0.64	0.72	0.78	0.76
lysine	1.85	2.00	2.16	2.13
methionine	0.14	0.15	0.23	0.22
phenylalanine	0.43	0.50	0.50	0.47
proline	1.18	1.13	1.15	1.24
serine	2.53	2.41	3.44	3.48
threonine	0.95	1.68	1.76	1.26
tyrosine	0.50	0.51	0.52	0.58
valine	0.53	0.55	0.63	0.63
Total	19.85	20.78	23.55	24.30

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

다리근육 중의 아미노산 함량은 Table 14에서 보는 바와 같이 C, T1, T2, T3에서 각각 19.85, 21.45, 23.55, 24.30%으로 건조처리 팽이버섯 급여 시 높았다. 특히 glutamic acid의 함량이 현저하게 높았으며, lysine, methionine, phenylalanine 함량이 증가하였다.

아미노산의 종류별 함량 분포는 Figure 6와 같이 alanine은 처리 간에 일정한 경향을 나타내지 않았으나, glutamic acid는 C구와 T1, T2, T3구에서 각각 2.74, 2.84, 3.14, 4.43%으로 팽이버섯 첨가수준이 높을수록 함량이 크게 증가하였으며, cystine의 함량도 비슷한 경향을 나타내었다. 그러나 glycine 함량은 건조처리 미 이용 팽이버섯을 급여한 처리에서 오히려 감소되었다. T2, T3구에서 높게 나타난 아미노산은 arginine, leucine, methionine, phenylalanine, serine, valine 등이며, asparagine과 histidine은 T3구에서 높았다. 전반적으로 볼 때 가슴근육에서는 건조처리 미 이용 팽이버섯 급여 수준이 1%일 때 아미노산 함량이 높았고, 다리근육에서는 건조처리 미 이용 팽이버섯 급여수준이 3~5%일 때 아미노산 함량이 높게 나타났다. 유리아미노산은 펩티드, 아민, 당, 유기산, 핵산 등의 비휘발성 화합물들과 함께 가열할 때 맛을 나타내는 바 (Cambero 등, 1992), 건조 미 이용 팽이버섯을 사료에 첨가함으로써 닭고기의 풍미향

상에 효과가 있을 것으로 사료된다.

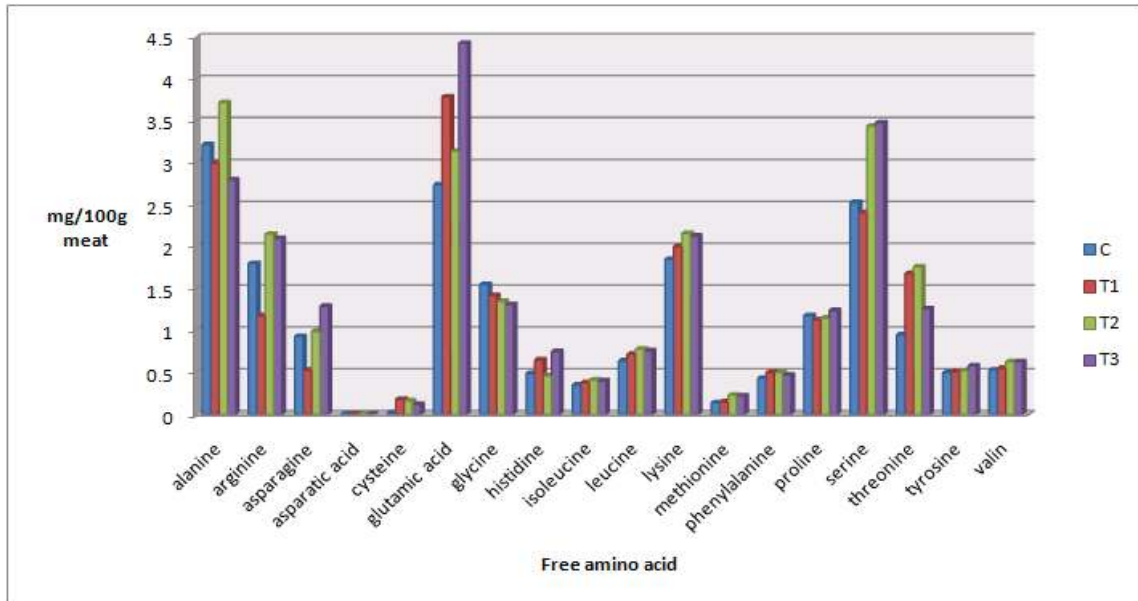


Figure 6. Content of free amino acid in thigh of broiler chicks fed dehydrated *Flammulina velutipes*

사) 지방산 조성

건조처리 미 이용 팽이버섯을 육계에게 첨가 급여 시 닭고기 중의 지방산 조성은 Table 13-15와 Table 3-16에 나타내었다. 가슴근육에서 지방산 조성은 건조처리 미 이용 팽이버섯을 첨가 급여함으로서 포화지방산 중 C14:0와 C18:0의 감소하였고 ($p < 0.05$), 반면 C16:1과 C17:0의 함량은 증가하였다. 불포화 지방산 중에는 C18:3(n-3)과 C22:5(n-3)의 함량이 유의적으로 증가 하였으며, 포화지방산에 대한 불포화 지방산의 비율이 높아졌다($p < 0.05$).

한편 다리근육에서도 건조처리 미 이용 팽이버섯을 첨가급여 함으로써 지방산 조성에 많은 변화를 가져왔다. C14:0과 C16:0가 약간 증가하였으며, C16:1과 C17:0가 감소하였다($p < 0.05$). 또한 불포화 지방산에서 C18:3(n-3)가 증가하였으며($p < 0.05$), C22:6(n-3)은 다소 감소하였다. 포화 지방산에 대한 불포화 지방산의 비율이 약간 증가하였으나 유의차는 없었다.

이상의 결과를 볼 때 건조처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 가슴근육의 지방산 조성을 개선시킬 수 있을 것으로 사료된다.

Table 3–15. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on fatty acid composition in breast of broiler chicks(%)

Fatty acid	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
C14:0	1.45±0.01 ^a	1.40±0.01 ^b	1.42±0.01 ^{ab}	1.40±0.01 ^b
C16:0	23.43±0.21	23.63±0.08	23.48±0.35	23.30±0.37
C16:1	5.07±0.04 ^b	5.20±0.08 ^b	5.62±0.12 ^a	5.39±0.17 ^{ab}
C17:0	0.16±0.01 ^b	0.25±0.01 ^a	0.24±0.02 ^a	0.22±0.02 ^a
C18:0	7.93±0.50 ^a	6.82±0.27 ^b	6.13±0.21 ^b	5.85±0.16 ^b
C18:1	44.16±0.22	45.31±0.50	45.07±0.66	45.19±0.36
C18:2(n-6)	13.82±0.12 ^{ab}	13.31±0.14 ^b	13.72±0.13 ^b	14.34±0.28 ^a
C18:3(n-3)	0.47±0.01 ^b	0.52±0.02 ^{ab}	0.53±0.02 ^a	0.57±0.01 ^a
C20:4	2.57±0.03	2.61±0.01	2.84±0.18	2.77±0.09
C22:5(n-3)	0.41±0.03 ^b	0.45±0.00 ^{ab}	0.44±0.01 ^{ab}	0.47±0.02 ^a
C22:6(n-3)	0.53±0.01	0.50±0.02	0.51±0.02	0.51±0.01
SFA ¹	32.97±0.30 ^a	32.10±0.34 ^{ab}	31.27±0.40 ^{bc}	30.77±0.51 ^c
USFA ²	67.03±0.30 ^c	67.90±0.34 ^{bc}	68.73±0.40 ^{ab}	69.24±0.51 ^a
USFA/SFA	2.03±0.03 ^c	2.12±0.03 ^{bc}	2.20±0.04 ^{ab}	2.26±0.06 ^a
n-6/n-3	9.80±0.12 ^a	9.08±0.08 ^b	9.29±0.24 ^b	9.21±0.09 ^b

Values are means of 4 egg yolks.

C14:0(myristic acid), C16:0(palmitic acid), C16:1(palmitoleic acid), C17:0(margaric acid), C18:0(stearic acid), C18:1(oleic acid), C18:2(linoleic acid), C18:3(alpha - Linolenic acid), C20:4(arachidonic acid), C22:5(DPA:Docosapentaenoic acid), C22:6(DHA:Docosahexaenoic acid)

1 USFA(Unsaturated fatty acid) : C16:1, C18:1, C18:2, C18:3, C20:4, C22:5, C22-6

2 SFA (Saturated fatty acid) : C14:0, C16:0, C17:0, C18:0

n-6/n-3: C18:2 / (C18:3, C22:5, C22:6)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 3-16. Effects of dietary dehydrated *Flammulina velutipes* on fatty acid composition in thigh of broiler chicks(%)

Fatty acid	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
C14:0	0.77±0.08 ^{bc}	0.69±0.01 ^c	0.90±0.03 ^{ab}	1.03±0.03 ^a
C16:0	23.43±0.15 ^{ab}	23.63±0.27 ^{bc}	23.48±0.08 ^c	23.30±0.32 ^a
C16:1	6.00±0.12 ^a	5.94±0.15 ^a	5.50±0.06 ^b	5.47±0.14 ^b
C17:0	0.29±0.02 ^a	0.21±0.00 ^b	0.21±0.00 ^b	0.21±0.01 ^b
C18:0	7.02±0.20	6.88±0.19	7.03±0.31	6.53±0.17
C18:1	43.65±0.48	43.97±0.31	44.29±0.42	43.47±0.18
C18:2(n-6)	14.64±0.28	15.11±0.21	15.26±0.28	15.26±0.14
C18:3(n-3)	0.50±0.02 ^b	0.56±0.01 ^a	0.53±0.02 ^{ab}	0.57±0.01 ^a
C20:4	2.69±0.05	2.71±0.01	2.72±0.01	2.72±0.01
C22:5(n-3)	0.47±0.01	0.52±0.02	0.50±0.03	0.53±0.02
C22:6(n-3)	0.54±0.02 ^a	0.49±0.02 ^{ab}	0.54±0.02 ^a	0.46±0.01 ^b
SFA ¹	31.52±0.41	30.71±0.31	30.66±0.24	31.51±0.33
USFA ²	68.48±0.41	69.29±0.31	69.34±0.24	68.49±0.33
USFA/SFA	2.18±0.04	2.26±0.04	2.26±0.03	2.17±0.03
n-6/n-3	9.73±0.12	9.65±0.08	9.74±0.30	9.80±0.17

Values are means of 4 egg yolks.

C14:0(myristic acid), C16:0(palmitic acid), C16:1(palmitoleic acid), C17:0(margaric acid), C18:0(stearic acid), C18:1(oleic acid), C18:2(linoleic acid), C18:3(alpha - Linolenic acid), C20:4(arachidonic acid), C22:5(DPA:Docosapentaenoic acid), C22:6(DHA:Docosahexaenoic acid)

1 USFA(Unsaturated fatty acid) : C16:1, C18:1, C18:2, C18:3, C20:4, C22:5, C22-6

2 SFA (Saturated fatty acid) : C14:0, C16:0, C17:0, C18:0

n-6/n-3: C18:2 / (C18:3, C22:5, C22:6)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

라. 발효처리 미 이용 버섯자원의 급여에 의한 닭고기 생산

1) 증체 및 사료효율

가) 체중변화

발효처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 0%(C), 1%(T1), 3%(T2), 5%(T3) 첨가 급여 시 체중 변화는 Table 4-1에서 보는 바와 같다.

Table 4-1. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on body weight in broiler chicks

Treatment ¹⁾	Week						
	1	2	3	4	5	6	7
C	40.6±0.1 ^a	139.0±2.5	279.7± 8.0 ^a	457.3±10.8	703.0±21.6	959.7±31.0	1228.3±55.2
T1	40.6±0.1 ^a	143.7±0.9	271.3± 4.1 ^a	462.1± 8.1	707.3±13.9	974.3±12.4	1325.7±47.3
T2	40.0±0.2 ^b	137.7±3.8	255.0±12.8 ^{ab}	421.0±12.8	672.3±31.2	927.0±38.4	1228.0±55.2
T3	40.6±0.1 ^a	133.7±1.8	239.3± 3.2 ^b	411.4±22.9	632.3±38.8	933.0±28.0	1237.4±25.1

a,b : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

사양초기 병아리들의 주령별 체중은 대조구에 비하여 발효처리 버섯을 첨가한 경우 다소 낮은 경향이였다. 그러나 3주령 이후 체중에서는 처리 간에 유의차가 인정되지 않았다. 특히 7주령에서 체중은 대조구가 1228.3, T1 1325.7, T2 1228.0, T3 1237.4 g 으로 발효처리 버섯을 급여한 경우 대조구와 체중이 같거나 상회하였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 건조 미 이용 팽이버섯에서와 같이 육계사료에 발효처리 미 이용 팽이버섯을 5%까지 급여하여도 증체에 지장이 없는 것으로 보인다.

나) 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율

발효처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 첨가 급여 시 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율은 Table 4-2에서 보는 바와 같다.

Table 4-2. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on weight gain , feed intake, feed efficiency in broiler chicks

	Week	Treatment ¹⁾				Plood SE
		C	T1	T2	T3	
Weight Gain (g/bird)	2~4	318.3± 8.84	318.5± 8.80	283.3± 9.21	277.8±21.14	8.010
	5~7	770.9±46.29	863.5±39.41	807.0±42.44	826.0± 6.02	18.791
	2~7	1089.3±54.15	1182.0±47.89	1090.3±51.54	1103.8±23.42	22.734
Feed intake (g/bird)	2~4	571.9±17.64	576.7± 9.68	556.7±21.54	524.3±13.91	9.293
	5~7	1720.2±59.54	1793.9±43.79	1695.9±66.90	1663.0±18.13	26.028
	2~7	2292.0±76.58	2370.6±50.28	2252.5±88.35	2187.4±23.66	34.085
Feed/Gain	2~4	1.796± 0.01	1.813± 0.04	1.964± 0.02	1.901± 0.09	0.030
	5~7	2.239± 0.06 ^a	2.082± 0.05 ^b	2.105± 0.03 ^{ab}	2.013± 0.01 ^b	0.031
	2~7	2.108± 0.04 ^a	2.009± 0.05 ^{ab}	2.068± 0.02 ^{ab}	1.983± 0.03 ^b	0.021

a,b : Values(Mean±SE) within row with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

2~4주령까지 증체량을 보면 유의성은 나타나지 않았으나, 첨가수준을 높일수록 감소하는 경향을 나타내었고, 5~7주령에서는 오히려 대조구보다 처리구가 높은 증체량을 보였다. 전체 증체량을 나타낸 2~7주령에서도 대조구보다 처리구가 높은 증체량을 보였으며, 1% 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여한 T1에서 2~4주령, 5~7주령, 2~7주령 모두에서 다른 처리구보다 높은 증체량을 보였는데, 이와 같은 결과는 첨가수준 1%한해서 증체량이 개선되는 경향을 보이는 것으로 사료된다.

사료 섭취량은 대조구와 비교하여 1% 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여한 T1 처리구가 전체적으로 높은 경향을 보였으며, 첨가%를 높일수록 사료 섭취량이 줄어드는 경향을 나타내었다.

사료 요구율은 2~4주령에는 처리구가 대조구보다 높은 경향을 나타냈지만, 5~7주령에는 처리구가 대조구보다 사료요구율이 급격히 감소하여($p < 0.05$), 2~7령에서는 1%급여구와 3%급여구에서 통계적인 차이를 보이지 않았으나 감소하는 경향을 나타내어 결국 사료효율이 개선되었음을 알 수 있다.

홍 등(2001)은 육계에게 생약제 급여 시 생산성에 유의한 차이가 없었다고 하였으며, Guo 등(2004)은 육계에게 plant extract 처리구가 항생제 처리구보다 증체량이 감소한다고 보고하였고, 오 등(2007) 또한 민들레와 민들레 생균제의 첨가는 오히려 증체량과 사료 요구율이 나빠졌다고 보고하여 본 실험 2~4주령과 유사한 결과를 보였으나, 5~7주령과 2~7주령에서는 박 등(1998)이 보고한 육계에 생약제인 건지황을 급여하면 생산성이 개선된다고 보고하였고, Wenk(2003)는 herbs 및 essential oil 단위 동물에서 기호성을 증진시켜 사료 섭취를 증가시켜 생산성을 개선한다고 보고하였으며, 조(1995)는 육계에 생약제인 당귀를 급여하면 증체량, 사료 섭취량이 증가되고, 특히 사료 요구율이 유의적으로 개선되는 경향이 있다고 보고한 결과와 유사한 결과를 보였다.

이와 같은 결과는 실험 1에서 건조 미 이용 팽이버섯 첨가 시 사료요구율의 개선이 보이지 않은 반면 발효 미 이용 팽이버섯을 급여한 결과 사료요구율이 개선된 것은 육계에 있어서 발효에 의한 팽이버섯의 소화이용성이 개선됨이 입증되었다.

2) 장내 미생물 및 계분의 가스발생량

가) 장내 병원성 미생물

발효처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 첨가 급여 시 육계 맹장 내용물중의 병원성 미생물(*Salmonella* 와 *E. coli*) 수는 Table 4-3에서 보는 바와 같다. 관찰된 미생물의 수는 Log10으로 환산하여 표시하였다.

맹장 내 병원성 미생물조사 결과 *Salmonella*균수는 대조구 5.445, T1구 5.277, T2구 5.201, T3구 5.049로서 발효처리 미 이용 팽이버섯 첨가수준이 높을수록 *Salmonella*균수는 현저하게 감소하는 경향을 보였다($p < 0.05$). 대장균인 *E. coli* 역시 대조구 5.579, T1구 5.355, T2구 5.292, T3구 5.188으로 발효처리 미 이용 팽이버섯 첨가수준이 높을수록 현저하게 감소하였다($p < 0.05$).

Table 4-3. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on *Salmonella*, *E. coli* in cecum of broiler chicks (log10 cfu/g content)

Treatment ¹⁾	<i>Salmonella</i>	<i>E. Coli</i>
C	5.445±0.049 ^a	5.579±0.041 ^a
T1	5.277±0.047 ^b	5.355±0.023 ^b
T2	5.201±0.030 ^b	5.292±0.047 ^b
T3	5.049±0.068 ^c	5.188±0.076 ^c

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

이 등(1997)은 효모를 육계에 급여하면 발효과정을 거치면서 장내의 용존산소를 사용하게 되므로 유해균이 감소한다고 하였다. 본 실험 결과 미생물 발효 처리된 팽이버섯 급여는 육계의 맹장 내 병원성 미생물인 *Salmonella*와 *E. coli*의 수를 현저하게 감소시켜 생산성 향상에 기여할 것으로 판단되었다.

나) 계분의 가스 발생량

발효처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 첨가 급여 시 계분의 암모니아가스 발생량 측정치는 Table 4-4에서 보는 바와 같다.

Table 4-4. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on fecal NH₃ gas in broiler chick (ppm)

Treatment ¹⁾	Day						
	0	1	3	6	9	12	15
C	0.13±0.01 ^{dG}	38.22±1.4 ^{bF}	130.52±0.9 ^{bE}	205.62±1.5 ^{dB}	211.53±2.8 ^{cA}	192.58±2.5 ^{cC}	176.50±2.3 ^{aD}
T1	0.26±0.02 ^{cG}	41.67±1.9 ^{bF}	127.11±0.7 ^{bE}	330.08±4.2 ^{aA}	276.17±6.6 ^{aB}	258.21±1.8 ^{aC}	156.64±0.6 ^{bD}
T2	0.49±0.01 ^{aG}	77.33±2.5 ^{aF}	137.51±0.8 ^{aE}	273.73±5.3 ^{bA}	247.29±2.6 ^{bB}	213.33±5.1 ^{bC}	156.28±2.6 ^{bD}
T3	0.35±0.01 ^{bG}	42.89±2.1 ^{bF}	100.23±1.1 ^{cE}	224.12±3.2 ^{cB}	244.07±4.6 ^{bA}	174.98±2.2 ^{dC}	131.48±1.1 ^{cD}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

A,B,C,D,E,F,G : Values(Mean±SE) within row with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

대조구인 C에서 생계분의 가스발생량은 저장 9일에 최고치에 이르렀고 그 이후 감소하는 경향을 나타내었으며, 처리구 인 T1, T2, T3에서 가스발생량은 저장 6일에 최고치를 나타내고 그 이후 감소하는 경향을 나타내었다. 저장 6일의 가스발생량은 C, T1, T2, T3에서 각각 205.62, 330.08, 273.73, 234.12 ppm이었고, 저장 9일에는 각각 211.53, 276.17, 247.29, 244.07 ppm으로서 시간의 경과에 따른 가스발생량의 변화는 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 더 높아진 결과였다. 한 등(1975)은 규산염 광물질을 첨가 시 단백질의 소화를 개선하며, 축 분의 탈취효과를 인정할 수 있었다(Killing과 Zuarles, 1974)고 하였으며, van Heugten과 van Kempen(1999)는 소하기관

내 pH를 조절하거나 미생물 균을 조정하면 냄새를 줄일 수 있다고 하였다. 본 시험 결과 장내 병원성 미생물의 수를 줄였음에도 불구하고 가스발생량이 증가되어 상반된 현상이 도출되었다. 이에 대해서는 좀더 면밀한 검토가 필요하다고 본다.

3) 도체특성 및 닭고기 저장성

가) 도체특성

발효 처리 미 이용 팽이버섯을 육계에게 첨가 급여 시 도체특성은 Table 4-5에 나타나 있다.

Table 4-5. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on carcass characteristic in broiler chicks

	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
Live weight(g)	1284.58 ^d	1388.25 ^a	1302.00 ^c	1322.08 ^b
Carcass Weight(g)	824.25 ^b	887.25 ^a	807.53 ^b	846.08 ^b
Carcass ratio(%)	64.16 ^a	63.91 ^a	62.02 ^a	63.99 ^a
Total viscera, g(%)	246.08(19.16) ^a	257.37(18.54) ^a	222.48(17.09) ^a	225.08(17.03) ^a
Gizzard, g(%)	12.58(0.98) ^a	12.33(0.89) ^a	12.46(0.96) ^a	11.97(0.91) ^a
Giblets				
Liver, g(%)	35.42(2.76) ^a	34.90(2.52) ^a	31.85(2.45) ^a	34.14(2.58) ^a
Hear, g(%)	8.92(0.69) ^a	7.65(0.55) ^a	8.40(0.65) ^a	8.89(0.67) ^a

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within row with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

도체율은 대조구가 64.16, T1 63.91, T2 62.02, T3 63.99%로서 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여한 결과 모든 처리구에서 낮게 나타났으나 처리 간에 유의차가 인정되지 않았다. T2에서 다소 낮았으나 T1, T3에서는 대조구와 동일한 수준에 이르러서 발효처리 미 이용 팽이버섯 첨가가 도체율에 미치는 영향은 적다고 판단되었다.

생 체중에 대한 총 내장의 무게비율은 첨가 급여수준에 따라 감소하는 경향이었으나 유의성은 인정되지 않았고, 건조처리 미 이용 팽이버섯을 급여시킨 시험 I 과 반대로 가식내장의 무게비율은 발효처리 미 이용 팽이버섯을 첨가한 처리구가 대조구보다 낮게 나왔으나, 근위와 간 그리고 심장의 무게 또한 처리 간에 차이를 나타내지 않았다. 이와 같은 결과는 미생물 제제의 급여 시 육계의 도체율이 증가한 반면에 복강지방이 감소한다는 유 등(2002)의 보고와는 다른 결과였으나, 유산균이나 약용식물 추출물 및 식물추출물의 첨가급여는 간, 비장 및 복강지방에 있어서 차이는 관찰되지 않았다는 김(2007)의 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 본 실험의 결과 도체율과 총 내장, 가식내장 즉, 전체적인 도체특성에서 발효처리 미 이용 팽이버섯 급여에 의한 발달 영향은 없는 것으로 판단된다.

나) 닭고기의 저장성

(1) TBARS(지방산패도)

발효처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 첨가 급여 시 TBARS가는 Table 4-6와 Table 4-7에 나타낸 바와 같다.

Table 4-6. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on TBARS in breast of broiler chicks

Treatment ¹⁾	Day			
	0	3	6	9
C	0.055±0.002 ^{aD}	0.210±0.005 ^{aC}	0.290±0.002 ^{aB}	0.374±0.004 ^{bA}
T1	0.045±0.002 ^{bD}	0.209±0.003 ^{aC}	0.295±0.003 ^{aB}	0.333±0.002 ^{cA}
T2	0.054±0.002 ^{aD}	0.180±0.002 ^{bC}	0.204±0.004 ^{bB}	0.373±0.002 ^{bA}
T3	0.050±0.002 ^{abD}	0.163±0.004 ^{cC}	0.297±0.002 ^{aB}	0.396±0.002 ^{aA}

a,b,c : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

A,B,C,D : Values(Mean±SE) within row with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

가슴근육의 TBARS가는 저장기간이 경과함에 따라 점차적으로 증가하였다. 저장기간 3일까지 TBARS가의 변화는 발효처리 미 이용 팽이버섯 첨가량을 높일수록 대조구보다 낮은 값을 나타내었다(p<0.05). 이러한 결과는 발효처리 미 이용 팽이버섯에 의하여 항산화효과가 나타난 것으로 보였다. 그러나 저장 6일 이후에는 처리 간에 차이가 거의 없었으며, 9일은 대조구 0.374, T1구 0.333, T2구 0.373, T3구 0.396으로 T1구를 제외하고는 대조구보다도 높았다. 따라서 저장기간이 진행됨에 따라 가슴근육에서 발효처리 미 이용 팽이버섯에 의한 항산화효과는 감소되는 것으로 사료된다.

Table 4-7. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on TBARS in thigh of broiler chicks

Treatment ¹⁾	Day			
	0	3	6	9
C	0.056±0.001 ^{bD}	0.229±0.002 ^C	0.368±0.036 ^{abB}	0.587±0.002 ^{aA}
T1	0.043±0.001 ^{cD}	0.239±0.003 ^C	0.356±0.006 ^{bB}	0.514±0.003 ^{bA}
T2	0.070±0.001 ^{aD}	0.233±0.003 ^C	0.285±0.003 ^{cB}	0.495±0.005 ^{cA}
T3	0.060±0.001 ^{bD}	0.233±0.003 ^C	0.419±0.002 ^{aB}	0.493±0.003 ^{cA}

a,b,c : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

A,B,C,D : Values(Mean±SE) within row with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

다리근육에서 TBARS값의 변화는 Table 4-7에서 보는 바와 같이 저장 3일 까지는 처리 간에 차이가 없었다. 그러나 저장 6일 이후 TBARS값은 처리구인 T1과 T2에

서 낮아졌다($p < 0.05$). 저장 9일 이 후 TBARS값은 C구에서 0.587, T1구 0.514, T2구 0.495, T3는 0.493으로 발효처리 미 이용 팽이버섯의 급여수준이 증가할수록 TBARS 값은 유의적으로 낮아졌다($p < 0.05$). 따라서 다리근육에서 발효처리 미 이용 팽이버섯의 항산화효과는 저장기간이 진행 될수록 향상되었다고 보이며, 그 효과는 3% 급여 시 높다고 사료된다.

(2) VBN(휘발성 염기태 질소)

발효처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 첨가 급여 시 VBN 함량은 Table 4-8과 Table 4-9에 나타난 바와 같다.

Table 4-8. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on VBN in breast of broiler chicks (mg/100g)

Treatment ¹⁾	Day			
	0	3	6	9
C	1.791±0.039 ^{bD}	17.018±0.183 ^{cC}	37.151±1.232 ^{bB}	41.186±0.387 ^{bA}
T1	2.359±0.124 ^{aD}	22.876±0.266 ^{aC}	42.028±0.154 ^{aB}	44.614±0.207 ^{aA}
T2	1.782±0.015 ^{bC}	17.024±0.000 ^{cB}	44.245±0.177 ^{aA}	44.623±1.306 ^{aA}
T3	2.173±0.018 ^{aD}	17.769±0.230 ^{bC}	44.289±0.813 ^{aA}	39.723±0.494 ^{bB}

a,b,c : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly($p < 0.05$)

A,B,C,D : Values(Mean±SE) within row with no common superscript differ significantly($p < 0.05$)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

단백질의 변패정도를 나타내는 VBN 값은 Table 4-8에서 보는바와 같이 모든 처리구에서 저장기간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 그러나 가슴근육에서 VBN 값은 처리 간에는 뚜렷한 변화를 나타내지 않았다. 저장 6일 이후 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여한 처리구 모두에서 VBN 값이 대조구에서 보다 높게 나타났으며, 저장 9일 후에도 같은 경향을 나타내었다. 식육은 숙성되는 과정에서 효소들에 의해서 단백질이 분해되고 유리아미노산과 비단백태 질소화합물이 증가(Field과 Chang, 1969)되는 바 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 숙성을 촉진하였던 것으로 사료된다.

다리근육에서 저장기간 경과에 따른 VBN값의 변화(Table 4-9)는 모든 처리구에서 유사하게 진행 되었다. 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여한 처리구에서는 첨가수준에 관계없이 대조구에서 보다 VBN값이 더 높게 나타났다. 저장 3일에 VBN값은 C, T1, T2, T3에서 각각 11.589, 13.462, 14.337, 15.822이었고, 저장 6일에는 각각 33.915, 36.265, 39.235, 41.498로서 저장기간이 진행됨에 따라 VBN값의 변화는 선명하게 차이를 나타내었다. 김(2006)은 썩과 정어리유를 첨가급여 하였을 때 계육의 VBN 변화는 썩을 급여한 구에서 저장 0일과 3일에는 높은 함량을 나타내었으나 저장 7, 10일에는 유의성이 인정되지 않았다고 하였으나 본 결과에서는 다른 양상을 나타내었다.

Table 4-9. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on VBN in thigh of broiler chicks (mg/100g)

Treatment ¹⁾	Day			
	0	3	6	9
C	0.931±0.000 ^{dD}	11.589±0.210 ^{cC}	33.915±0.154 ^{dB}	36.442±0.307 ^{cA}
T1	1.499±0.024 ^{cD}	13.462±0.222 ^{bC}	36.265±0.320 ^{cB}	41.629±0.384 ^{bA}
T2	1.711±0.009 ^{bD}	14.337±0.384 ^{bC}	39.235±0.230 ^{bB}	43.302±0.189 ^{aA}
T3	2.137±0.024 ^{aD}	15.827±0.554 ^{aC}	41.496±0.691 ^{aB}	44.195±0.395 ^{aA}

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

A,B,C,D : Values(Mean±SE) within row with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

이상의 결과로 보아 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여는 계육의 품질보존을 위한 저장성을 개선시키지 못하였고, 오히려 단백질 변패 수치를 높여서 저장성이 나빠질 수 있을 것으로 사료된다.

4) 닭고기의 이화학적 특성

가) pH(수소이온지수)

발효처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 첨가 급여 시 닭고기의 pH는 Table 4-10에서 보는 바와 같다.

Table 4-10. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on pH of breast and thigh in broiler chicks

Treatment ¹⁾	Breast	Thigh
C	5.69±0.006 ^b	6.037±0.013 ^c
T1	5.81±0.009 ^a	6.407±0.024 ^a
T2	5.82±0.029 ^a	6.233±0.023 ^b
T3	5.71±0.000 ^b	6.210±0.010 ^b

a,b,c : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

가슴근육의 pH는 대조구보다 처리구에서 다소 높은 수치를 나타내었다. T3에서는 큰 차이를 나타내지 않았으나, T1과 T2에서는 유의적으로 높게 나타났다(p<0.05). 다리근육에서도 pH는 대조구보다 처리구에서 유의적으로 높은 수치를 나타내었다(p<0.05).

축육은 도축 후 혈액 공급이 차단과 함께 근육 세포에 산소공급 또한 중단되어 협

기 상태의 근육세포에서 유산을 생성하기 때문에 pH가 상승하게 된다(Bendall, 1978). 박과 유(1999)는 한약재 부산물을 급여한 닭고기의 pH는 대조구에 비하여 낮았다고 하였던 바 본 연구결과와는 상반된 견해를 보였다. 사료 첨가제로서 발효처리 미 이용 팽이버섯이 닭고기의 pH를 상승시키는 원인에 대해서는 좀 더 면밀한 검토가 필요하다고 본다.

나) 육색

발효처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 첨가 급여 시 육색은 Table 11에서 보는 바와 같다.

가슴근육에서는 명도를 나타내는(L*)값 대조구에 비하여 T1에서 다소 낮았으나 ($p < 0.05$), T2와 T3에서는 대조구와 차이가 없어 발효처리 미 이용 팽이버섯의 첨가에 따른 변화를 나타내지 못하였다. 또한 다리근육에서도 처리 간에 유의차가 인정되지 않았다.

Table 4-11. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on meat color of breast and thigh in broiler chicks

Treatment ¹⁾	Breast			Thigh		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
C	53.62±0.38 ^a	4.43±0.08 ^a	11.66±0.32 ^a	50.76±0.65	12.01±0.39 ^a	15.23±0.30 ^{ab}
T1	52.30±0.27 ^b	4.31±0.10 ^a	11.37±0.28 ^{ab}	50.06±0.38	12.64±0.17 ^a	16.22±0.51 ^a
T2	52.91±0.12 ^{ab}	3.41±0.05 ^c	10.89±0.12 ^b	50.70±0.44	11.01±0.40 ^b	14.48±0.05 ^b
T3	53.36±0.12 ^a	3.89±0.05 ^b	11.30±0.06 ^{ab}	49.31±0.27	10.98±0.09 ^b	11.08±0.19 ^c

a,b,c : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly($p < 0.05$)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

적색도를 나타내는(a*)값은 가슴과 다리근육 모두에서 대조구보다 처리구에서 낮았으며, 발효처리 미 이용 팽이버섯 첨가수준이 높을수록 적색도는 낮아지는 결과였다($p < 0.05$),

황색도를 나타내는(b*)값은 가슴과 다리근육 모두에서 대조구보다 처리구에서 낮은 편이었다. 가슴근육에서 황색도는 처리 간 큰 차이를 보이지 않았지만 다리근육에서는 발효처리 미 이용 팽이버섯 첨가수준이 높을수록 황색도가 낮아졌다. 그러나 T1에서는 황색도가 대조구와 유사하거나 높았다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 발효처리 미 이용 팽이버섯을 1%수준에서 첨가는 육색에 영향이 없으나 3%와 5% 수준에서는 적색도와 황색도가 낮아졌다고 본다.

다) 가열감량, 총 수분함량 및 보수력

발효처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 첨가 급여 후 생산된 닭고기의 가열감량, 총

수분함량 및 보수력은 Table 4-12에서 보는 바와 같다.

Table 4-12. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on the cooking loss¹, total water², water-holding capacity³ of breast and thigh in broiler chicks

Treatme nt ¹⁾	Breast			Thigh		
	C.L ¹	T.W ²	W.H.C ³	C.L ¹	T.W ²	W.H.C ³
C	20.72±0.06 ^c	64.06±0.40 ^{bc}	67.65±0.10 ^a	31.05±0.01 ^a	68.37±0.08 ^b	54.56±0.09 ^d
T1	21.93±0.34 ^b	64.66±0.13 ^b	66.09±0.46 ^b	29.67±0.22 ^b	67.01±0.22 ^c	55.46±0.28 ^c
T2	22.59±0.27 ^b	63.47±0.03 ^c	64.42±0.45 ^c	29.62±0.17 ^b	70.05±0.08 ^a	57.66±0.28 ^b
T3	24.51±0.18 ^a	65.60±0.22 ^a	62.64±0.15 ^d	26.22±0.49 ^c	67.34±0.05 ^c	59.55±0.15 ^a

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

가슴근육에서 가열감량은 대조구 20.72, T1 21.93, T2 22.59, T3 24.51%로서 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 가열감량이 유의성 있게 증가하는 경향을 나타내었다(p<0.05). 반면 다리근육에서는 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 가열감량이 유의적으로 줄어드는 경향을 보였다(p<0.05). 이와 같은 결과는 채 등(2004)이 현미급여 결과 가슴근육의 가열감량이 약간씩 증가했다는 보고와 유사하였다.

총 수분함량은 가슴근육에서 대조구 64.06, T1 64.66, T2 63.47, T 65.60%이었고, 다리근육에서는 대조구 68.47, T1 67.01, T2 70.05, T3 67.34%로서 처리 간에 유의성은 인정되었으나 일관된 경향을 나타내지 않았다.

보수력은 가슴근육에서는 대조구 67.65, T1 66.09, T2 64.42, T3 62.64%로 발효처리 미 이용 팽이버섯 첨가수준이 높을수록 보수력은 유의적으로 감소하였고(p<0.05), 다리근육에서는 대조구 54.56, T1 55.46, T2 57.66, T3 59.55%로 첨가수준이 높을수록 유의적으로 증가하였다(p<0.05). 박과 유(1999)는 한약재 부산물 기본사료에 8% 첨가한 결과 계육의 수분 함량이 낮아지며, 최(2005)는 황토를 첨가한 결과 육계의 보수력이 유의적으로 증가하였다고 하였다. 그러나 본 연구 결과는 발효처리 미 이용 팽이버섯 첨가 급여가 가슴근육 보다는 다리근육에서 가열감량을 낮추고 보수력을 향상시키는 효과를 나타내었음을 의미한다.

라) 수용성 및 염용성 단백질 용해성

발효처리 미 이용 팽이버섯을 육계에게 첨가 급여 시 닭고기 가슴근육과 다리근육에 대한 수용성단백질 및 염용성 단백질 용해성은 Table 4-13에서 보는 바와 같다.

Table 4-13. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on water soluble protein solubility¹, salt soluble protein solubility² in breast and thigh of broiler chicks (mg/ g)

Treatment ¹⁾	W.S.P.S ¹		S.S.P.S ²	
	Breast	Thigh	Breast	Thigh
C	0.37±0.002 ^c	0.50±0.002 ^c	0.42±0.002 ^c	0.84±0.009 ^c
T1	0.36±0.003 ^d	0.56±0.014 ^b	0.43±0.004 ^b	0.85±0.011 ^{bc}
T2	0.43±0.006 ^a	0.68±0.007 ^a	0.48±0.004 ^a	0.96±0.010 ^a
T3	0.40±0.002 ^b	0.44±0.003 ^d	0.43±0.004 ^{bc}	0.88±0.007 ^b

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

식육에 함유되어 있는 단백질은 그 용해성에 따라 수용성단백질, 염용성단백질 및 유기질단백질로 분류된다. 본 연구결과 수용성단백질의 용해성은 가슴과 다리근육 모두에서 T2에서 가장 높았으며(p<0.05), T3에서는 낮아진 결과를 보였다. 염용성단백질의 용해성 또한 T2에서 가장 높았으며(p<0.05), T3에서는 낮아진 결과를 보였다.

이러한 결과는 발효처리 미 이용 팽이버섯 급여는 수용성단백질과 염용성단백질의 함량을 높여주는 작용을 하였을 것으로 사료되는데, 육가공에 있어서 수용성단백질은 풍미에 기여하며, 염용성단백질은 근원섬유를 구성하는 단백질로 육가공 산업에 매우 중요한 의미를 가진다. 이 결과 수용성, 염용성단백질의 용해성에 대한 발효처리 미 이용 팽이버섯의 적당한 첨가 급여수준은 사료의 3%인 것으로 판단되었다.

마) 조지방 함량

발효처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 첨가 급여 시 닭고기의 조지방 함량은 Table 4-14에서 보는 바와 같다.

Table 4-14. Effects on dietary fermented *Flammulina velutipes* on crude fat of breast and thigh in broiler chicks

Treatment ¹⁾	Breast	Thigh
C	1.11±0.035 ^b	1.62±0.033 ^c
T1	1.16±0.012 ^{ab}	1.95±0.054 ^b
T2	1.22±0.056 ^{ab}	2.01±0.073 ^b
T3	1.25±0.031 ^a	2.23±0.050 ^a

a,b : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

발효처리 미 이용 팽이버섯의 급여에 따른 조지방 함량은 가슴과 다리근육 모두에

서 급여수준을 높일수록 증가하는 경향을 나타내었다. 가슴근육에서 조지방 함량이 C구에서 1.11, T1 1.16, T2 1.22, T3 1.25%로 팔목할 만한 차이는 나타나지 않았으나 점차 증가 되었다. 다리근육에서는 조지방 함량이 C구에서 1.62, T1 1.9 5, T2 2.01, T3 2.23%으로 발효처리 미 이용 팽이버섯의 급여수준이 증가함에 따라 유의적으로 증가 하였다($p < 0.05$).

본 연구 결과 발효처리 미 이용 팽이버섯의 급여는 육계의 근 내 지방함량을 높여 육질을 개선시키는 것으로 판단된다.

바) 아미노산 조성

발효처리 미 이용 팽이버섯을 육계에 첨가 급여 시 닭고기의 아미노산 조성과 함량은 Table 4-15와 Table 4-16 및, 7와 Figure 8에 나타내었다.

Table 4-15. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on the free amino acid in breast of broiler chicks (%)

Free amino acid	Treatments ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
alanine	1.96	2.41	2.12	2.40
arginine	1.43	1.72	1.53	1.74
asparagine	0.76	0.90	0.81	1.02
asparatic acid	1.19	1.51	1.19	1.39
cysteine	0.00	0.00	0.00	0.09
glutamic acid	2.74	3.37	3.28	3.58
glycine	0.82	1.01	0.82	0.91
histidine	0.61	0.91	0.83	0.97
isoleucine	0.70	0.88	0.76	0.87
leucine	1.44	1.72	1.47	1.69
lysine	1.44	1.84	1.39	1.85
methionine	0.52	0.64	0.55	0.62
phenylalanine	0.84	1.00	0.85	0.97
proline	0.00	0.87	0.37	0.94
serine	1.51	1.85	1.63	1.83
threonine	1.13	1.41	1.52	1.41
tyrosine	0.98	1.23	1.05	1.25
valine	1.02	1.29	1.12	1.27
Total	19.09	24.56	21.29	24.80

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 4-15에서 보는 바와 같이 가슴근육에서 아미노산 함량은 C, T1, T2, T3에서 각각 19.09, 24.56, 21.29, 24.80%으로 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 전체 아미노산 함량이 증가하였다. 성분별 변화는 Figure 7에 나타난 바와 같이 alanine, arginine, asparagine, aspartic acid는 발효처리 미 이용 팽이버섯 급여수준이 증가함에 따라 함량이 높게 나타났으며, glutamic acid는 상당한 수준으로 높아졌다. Glycine, histidine, isoleucine, leucine은 대조구에 비하여 처리구에서 대체로 높았으며, lysine, methionine, phenylalanine은 T1과 T3에서는 높았으나 T2에서는 대조구와 비슷한 수준을 나타내었다. Proline은 대조구에서는 검출되지 않았으나 처리구에서만 함량이 인지되었다. Serine, threonine, tyrosine, valine들도 발효처리 미 이용 팽이버섯 급여구에서 높게 나타났다. 양 등(2008)은 감글부산물을 토종닭 육계에 급여 시 가슴살의 아미노산 함량에 차이가 없었으나 성분별로는 차이가 있었다고 하였다. 이상의 결과로 볼 때 발효처리 미 이용 팽이버섯에 많은 아미노산 합성인자들이 존재하여 함량과 조성에 변화를 가져온 것으로 여겨진다.

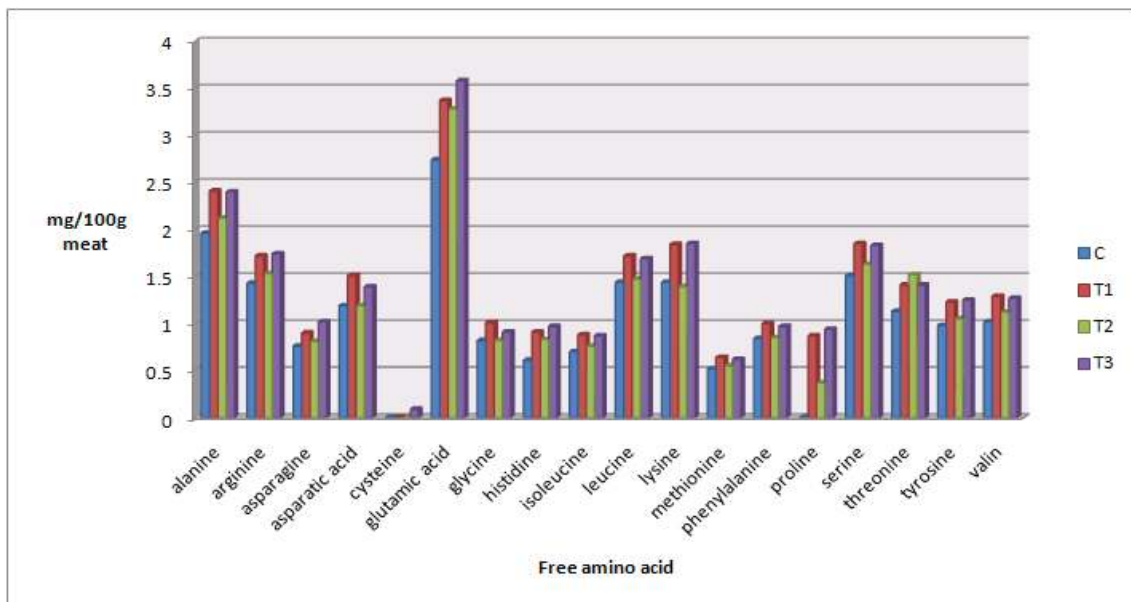


Figure 7. Content of free amino acid in breast meat of broiler chicks fed fermented *Flammulina velutipes*

다리근육에서 아미노산 함량은 Table 4-16에서 보는 바와 같이 C, T1, T2, T3에서 각각 17.46, 25.95, 20.90, 26.36%으로 대조구에 비하여 T1, T2, T3에서 현저하게 증가하였다. 그러나 T2에서는 T1,과 T3에 비하여 낮게 나타나서 좀 더 검토가 필요하다고 본다.

아미노산 종류별 함량은 Figure 8에 표시된 바와 같이 대부분의 아미노산들이 T1, T2, T3에서 높게 나타났다. Glutamic acid, alanine, arginine, aspartic acid 의 함량이 높은 수준을 나타내었으며 대조구에 비하여 처리구에서 현저한 증가를 나타내었다. 그 외의 주요 아미노산들도 처리구에서 함량이 높았는 바 특히 lysine, serine, valine 등이 현저한 증가를 나타내었다. 그러나 발효 팽이버섯 급여수준을 증가 시켜

도 그에 상응하여 아미노산 함량이 증가하지 않았다. 따라서 다리근육의 아미노산함량을 높이기 위해서는 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여수준 1~5%범위에서 적절히 이용할 수 있으나 1%수준에서 급여하여도 무방하다고 본다.

Table 4-16. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on free amino acid in thigh of broiler chicks (%)

Free amino acid	Treatments ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
alanine	2.14	2.74	2.47	2.63
arginine	1.28	2.04	1.29	1.70
asparagine	0.80	1.18	1.03	0.44
asparatic acid	1.46	1.90	1.60	2.22
cysteine	0.07	0.04	0.12	0.04
glutamic acid	3.41	4.00	3.57	3.46
glycine	1.20	1.60	1.33	2.11
histidine	0.55	0.82	0.69	0.75
isoleucine	0.50	0.75	0.54	0.75
leucine	0.99	1.35	1.05	1.31
lysine	1.46	2.60	1.45	1.96
methionine	0.36	0.53	0.39	0.43
phenylalanine	0.56	0.78	0.59	0.72
proline	0.43	1.71	1.80	1.31
serine	1.76	2.70	2.10	2.66
threonine	1.15	1.78	1.71	1.63
tyrosine	0.73	1.03	0.76	0.98
valine	0.75	1.14	0.84	0.96
Total	17.46	25.95	20.90	26.36

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

사) 지방산 조성

발효처리 미 이용 팽이버섯을 육계사료에 첨가 급여 시 닭고기의 지방산 조성은 Table 4-17과 Table 4-18에 제시되었다. 가슴근육의 지방산 조성은 Table 4-17에서 보는 바와 같이 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 많은 변화가 나타났다. 포화지방산 중 C14:0, C16:0, C16:1, 및 C17:0 함량이 증가하였고, C18:0이 감소하였다. 불포화지방산에서는 C18:2(n-6)가 다소 증가하였으며, C18:3(n-3)과 C20:4가 유의적으로 증가하였다(p<0.05). 불포화 지방산 함량이 C, T1, T2, T3에서 각각 67.69%, 67.71%, 68.85% 및 69.76%으로 많이 증가하였으며(p<0.05), USFA/SFA 비율도 현저하게 변화하였다(p<0.05).

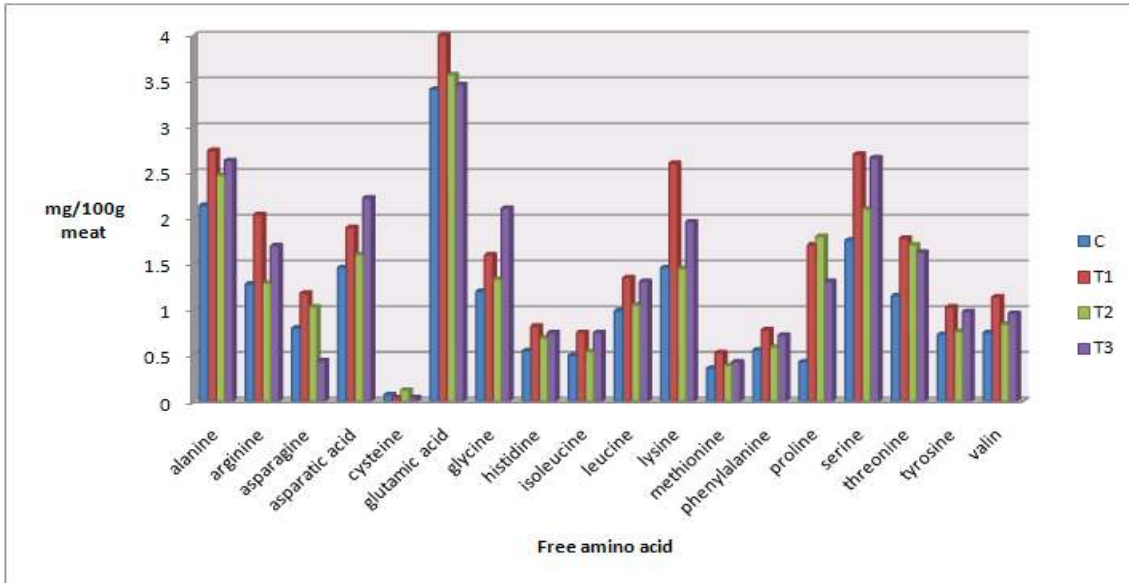


Figure 8. Content of free amino acid in thigh meat of broiler chicks fed fermented *Flammulina velutipes*

한편 다리근육의 지방산 조성은 Table 4-18에서 보는 바와 같이 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 많은 변화가 나타났다. 포화지방산 중 C16:0이 유의적으로 감소한 반면 C16:1은 증가하였다. 불포화지방산 중에는 C18:2(n-6), C18:3(n-3), C22:5(n-3)가 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$).

불포화 지방산 함량이 C, T1, T2, T3에서 각각 68.53%, 70.38%, 70.79% 및 72.22%를 나타내었다($p < 0.05$), USFA/SFA 비율도 현저하게 변화하였다($p < 0.05$).

이상의 결과로 보아 발효처리 미 이용 팽이버섯을 육계사료에 첨가 급여함으로써 가슴근육과 다리근육의 지방산 조성을 개선하는 효과가 클 것으로 사료 된다.

Table 4–17. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on fatty acid composition in breast of broiler chicks(%)

Fatty acid	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
C14:0	1.41±0.00 ^b	1.44±0.02 ^b	1.59±0.03 ^a	1.54±0.07 ^{ab}
C16:0	22.89±0.30 ^a	23.71±0.91 ^a	22.51±0.40 ^{ab}	21.14±0.29 ^b
C16:1	5.05±0.04 ^b	5.23±0.11 ^b	5.62±0.12 ^a	5.05±0.14 ^b
C17:0	0.17±0.01 ^c	0.23±0.01 ^b	0.30±0.00 ^a	0.32±0.02 ^a
C18:0	7.84±0.02 ^a	6.91±0.39 ^b	6.75±0.26 ^b	7.25±0.11 ^{ab}
C18:1	44.72±0.25 ^b	44.26±0.48 ^a	44.64±0.31 ^a	45.19±0.24 ^a
C18:2(n-6)	13.89±0.18 ^b	14.11±0.05 ^b	14.21±0.17 ^b	15.08±0.23 ^a
C18:3(n-3)	0.52±0.00 ^b	0.57±0.03 ^{ab}	0.63±0.02 ^a	0.59±0.01 ^a
C20:4	2.57±0.02 ^b	2.62±0.04 ^{ab}	2.86±0.11 ^a	2.87±0.10 ^a
C22:5(n-3)	0.42±0.03	0.47±0.01	0.44±0.01	0.48±0.01
C22:6(n-3)	0.53±0.01 ^a	0.45±0.02 ^c	0.46±0.01 ^{bc}	0.50±0.02 ^{ab}
SFA ¹	32.31±0.31 ^a	32.29±0.63 ^a	31.15±0.46 ^{ab}	30.24±0.22 ^b
USFA ²	67.69±0.31 ^b	67.71±0.63 ^b	68.85±0.46 ^{ab}	69.76±0.22 ^a
USFA/SFA	2.10±0.03 ^b	2.10±0.06 ^b	2.21±0.05 ^{ab}	2.31±0.02 ^a
n-6/n-3	9.47±0.29	9.50±0.14	9.30±0.22	9.60±0.14

Values are means of 4 egg yolks.

C14:0(myristic acid), C16:0(palmitic acid), C16:1(palmitoleic acid), C17:0(margaric acid), C18:0(stearic acid), C18:1(oleic acid), C18:2(linoleic acid), C18:3(alpha – Linolenic acid), C20:4(arachidonic acid), C22:5(DPA:Docosapentaenoic acid), C22:6(DHA:Docosahexaenoic acid)

1 USFA(Unsaturated fatty acid) : C16:1, C18:1, C18:2, C18:3, C20:4, C22:5, C22–6

2 SFA (Saturated fatty acid) : C14:0, C16:0, C17:0, C18:0

n-6/n-3: C18:2 / (C18:3, C22:5, C22:6)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

Table 4–18. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* on fatty acid composition in thigh of broiler chicks(%)

Fatty acid	Treatment ¹⁾			
	C	T1	T2	T3
C14:0	0.80±0.08	0.67±0.02	0.68±0.03	0.74±0.02
C16:0	23.04±0.21 ^a	21.85±0.17 ^b	20.81±0.25 ^c	19.58±0.15 ^d
C16:1	5.88±0.09 ^b	6.50±0.15 ^a	6.50±0.06 ^a	6.72±0.13 ^a
C17:0	0.26±0.02 ^a	0.22±0.01 ^b	0.22±0.00 ^b	0.26±0.00 ^a
C18:0	7.37±0.05 ^a	6.89±0.14 ^b	7.50±0.17 ^a	7.21±0.13 ^{ab}
C18:1	43.78±0.30	43.41±0.17	43.52±0.40	43.78±0.17
C18:2(n-6)	14.59±0.14 ^d	16.02±0.01 ^c	16.32±0.09 ^b	17.12±0.08 ^a
C18:3(n-3)	0.56±0.03 ^c	0.74±0.01 ^a	0.65±0.01 ^b	0.77±0.02 ^a
C20:4	2.71±0.10	2.79±0.06	2.74±0.13	2.82±0.03
C22:5(n-3)	0.48±0.02 ^{bc}	0.45±0.01 ^c	0.56±0.01 ^a	0.53±0.03 ^{ab}
C22:6(n-3)	0.53±0.06	0.48±0.01	0.50±0.02	0.47±0.02
SFA ¹	31.47±0.27 ^a	29.63±0.08 ^b	29.21±0.36 ^{ab}	27.78±0.04 ^b
USFA ²	68.53±0.27 ^b	70.38±0.08 ^b	70.79±0.36 ^{ab}	72.22±0.04 ^a
USFA/SFA	2.18±0.03 ^b	2.38±0.01 ^b	2.43±0.04 ^{ab}	2.60±0.01 ^a
n-6/n-3	9.27±0.31	9.60±0.04	9.56±0.02	9.67±0.10

Values are means of 4 egg yolks.

C14:0(myristic acid), C16:0(palmitic acid), C16:1(palmitoleic acid), C17:0(margaric acid), C18:0(stearic acid), C18:1(oleic acid), C18:2(linoleic acid), C18:3(alpha - Linolenic acid), C20:4(arachidonic acid), C22:5(DPA:Docosapentaenoic acid), C22:6(DHA:Docosahexaenoic acid)

1 USFA(Unsaturated fatty acid) : C16:1, C18:1, C18:2, C18:3, C20:4, C22:5, C22-6

2 SFA (Saturated fatty acid) : C14:0, C16:0, C17:0, C18:0

n-6/n-3: C18:2 / (C18:3, C22:5, C22:6)

1) C, none; T1, 1% *Flammulina velutipes*; T2, 3% *Flammulina velutipes*; T3, 5% *Flammulina velutipes*

3. 종합고찰

본 연구는 미 이용버섯자원이 계란과 닭고기의 생산과 품질에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수행되었다. 지역의 버섯재배 농장에서 미 이용 새송이 버섯과 팽이버섯을 수거하여 건조과정을 거친 다음 당 분해 미생물을 접종·발효시킨 후 다음과 같이 4개의 시험에 사용하였다.

가. 건조처리 미 이용 버섯자원에 의한 계란 생산

계란생산에 대한 건조처리 미 이용 버섯자원의 급여효과를 검토하기 위하여 50주령의 하이라인 산란계 224수를 4개 그룹으로 나누어 대조구(C)는 기초사료만 급여하였고, 시험 1구(T1)는 기초사료에 건조처리 된 미 이용 팽이버섯 1%를, 시험 2구(T2)는 건조처리 된 미 이용 팽이버섯 3%를, 시험 3구(T3)는 건조처리 된 미 이용 팽이버섯 5%를 7주 동안 급여하였다. 이어서 60주령의 하이라인 224수를 4개 그룹으로 나누어 대조구(C)는 기초사료만 급여하였고, 시험 1구(T1)는 기초사료에 건조처리 된 미 이용 팽이버섯 1%를, 시험 2구(T2)는 건조처리 된 미 이용 팽이버섯 3%를, 시험 3구(T3)는 건조처리 된 미 이용 팽이버섯 5%를 7주 동안 급여하였다. 얻어진 결과는 다음과 같다.

1) 건조처리 새송이버섯과 팽이버섯을 기초사료에 0.0%, 1.5%, 3.0%, 4.5% 급여 하였을 때 시험기간 중 산란율, 사료섭취량, 사료요구율은 처리 간에 유의차가 없었다.

2) 건조처리 새송이버섯을 급여한 경우 T2와 T3 에서 *E. coli*균수가 유의하게 감소하였으며($p < 0.05$), T3에서 *Salmonella*균수가 감소하였다($p < 0.05$). 건조처리 팽이버섯을 급여한 경우는 T1, T2, T3에서 *Salmonella*균수와 *E. coli*균수가 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

3) 건조처리 새송이버섯을 1%이상 급여구에서 계분 내 암모니아가스 발생량이 감소하였다($p < 0.05$).

4) 건조처리 새송이버섯이나 팽이버섯을 첨가 급여 하였을 때 난중은 처리 간에 차이가 없었다.

5) 건조처리 새송이버섯이나 팽이버섯을 첨가급여 하였을 때 난백고와 호우유니트가 다소 향상되었으나, 유의차가 인정되지 않았다. 난황색은 처리 간에 차이가 없었다.

6) 건조처리 새송이버섯이나 팽이버섯을 첨가 급여 하였을 때 모든 처리구에서 난각질이 개선되었다($p < 0.05$).

7) 건조처리 새송이버섯을 첨가급여 시 급여수준이 증가할수록 계란저장기간이 길어졌다($p < 0.05$).

이상의 결과를 종합적으로 고찰해 볼 때 건조처리 미 이용 버섯을 산란계 사료에 첨가 급여하면 산란계 맹장 내용물 중 병원성 미생물의 구를 감소 시키고, 계분 내 암모니아 가스 발생량을 감소시키며, 난각질을 개선하고, 계란의 저장기간을 연장 시킬 수 있다고 판단된다.

나. 발효처리 미 이용 버섯자원에 의한 계란 생산

계란생산에 대한 발효처리 미 이용 버섯자원의 급여효과를 검토하기 위하여 60주령의 이사브라운 산란계 20수를 4개 그룹으로 나누어 대조구(C)는 기초사료만 급여하였고, 시험 1구(T1)는 기초사료에 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 1%를, 시험 2구(T2)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 3%를, 시험 3구(T3)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 5%를 7주 동안 급여하였다. 이어서 60주령의 하이라인 30수를 6개 그룹으로 나누어 대조구(C)는 기초사료만 급여하였고, 시험 1구(T1)는 기초사료에 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 1%를, 시험 2구(T2)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 2%를, 시험 3구(T3)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 3%를, 시험4구(T4)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 4%를, 시험5구(T5)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 5%를 5주 동안 급여하였다. 얻어진 결과는 다음과 같다.

1) 발효처리 미 이용 새송이버섯과 발효처리 팽이버섯을 기초사료에 1%에서 5%까지 첨가급여 하였을 때 산란율, 사료섭취량, 사료요구율에는 처리 간에 차이가 없었다.

2) 발효처리 미 이용 팽이버섯을 첨가 급여 시 T1, T2, T3에서 *Salmonella*균수가 감소하였고($p < 0.05$), T4와 T5에서는 *E. coli*균수가 감소하였다($p < 0.05$).

3) 발효처리 미 이용 팽이버섯을 첨가 급여 시 암모니아 가스 발생량은 대조구에 비하여 T1, T2, T3에서 유의적으로 감소($p < 0.05$)하였으나, T4와 T5에서는 차이가 없었다.

4) 발효처리 새송이버섯과 발효처리 팽이버섯 첨가급여 시 급여 4주 후에 난백고가 향상되어 난백질이 개선되었다($p < 0.05$). 그러나 난황색은 처리 간에 차이가 없었다.

5) 발효처리 미 이용 새송이버섯 첨가급여 시 T1, T2, T3에서 난각질 개선이 나타났다($p < 0.05$)

6) 발효처리 미 이용 새송이버섯 첨가급여 시 혈반과 육반의 출현율은 처리 간에

차이가 없었다.

7) 발효처리 미 이용 새송이버섯 첨가급여 시 급여수준이 증가할수록 계란 저장기간이 길어졌다($p < 0.05$).

8) 발효처리 미 이용 새송이버섯의 첨가 급여수준이 증가할수록 난황 내 포화지방산 함량이 감소하고, 불포화지방산 함량이 높아졌다($p < 0.05$).

이상의 결과를 종합하면 발효처리 미 이용 버섯자원을 산란계에 급여하면 장내 병원성 미생물의 감소, 계분 내 암모니아 가스 발생량의 감소, 난백질의 개선, 난각질의 개선, 계란 저장기간의 연장, 난황 내 지방산 조성의 개선을 기대할 수 있다고 본다.

다. 건조처리 미 이용 버섯자원에 의한 닭고기 생산

닭고기 생산에 대한 건조처리 미 이용 팽이버섯의 급여효과를 검토하기 위하여 육계 병아리 96수를 4개 그룹으로 나누어 대조구(C)는 기초사료만 급여하였고, 시험 1구(T1)는 기초사료에 건조처리 된 미 이용 팽이버섯 1%를, 시험 2구(T2)는 건조처리 된 미 이용 팽이버섯 3%를, 시험 3구(T3)는 건조처리 된 미 이용 팽이버섯 5%를 6주 동안 급여하였다. 얻어진 결과는 다음과 같다.

1) 건조처리 미 이용 팽이버섯을 기초사료에 0, 1, 3, 및 5% 첨가하여 급여하여도 증체와 사료섭취량 및 사료요구율에서 처리 간에 유의차가 없었다.

2) 건조 미 이용 팽이버섯을 급여한 경우 맹장 내 *Salmonella*균수가 현저하게 감소하였으나($p < 0.05$), *E. coli*수는 감소하지 않았다.

3) 계분의 암모니아가스 발생량은 건조 미 이용 팽이버섯 급여 수준이 높을수록 현저하게 감소하였다($p < 0.05$).

4) 도체율은 대조구에 비하여 T1, T2와 T3에 낮은 경향이였다. 그러나 유의성은 인정되지 않았다.

5) 가슴근육과 다리근육의 저장 중 지방산패도는 대조구와 T1에 비하여 T2와 T3에서 유의적으로 낮았다($p < 0.05$).

6) 육색의 적색도는 미 이용 팽이버섯 급여 시 가슴근육에서는 낮았으나 대퇴 근육에서는 높았으며($p < 0.05$), 황색도는 미 이용 팽이버섯 급여수준이 높을수록 가슴과 다리근육에서 향상되었다($p < 0.05$).

7) 건조 미 이용 팽이버섯 급여 시 가슴근육의 가열감량은 높아졌으나($p < 0.05$), 보수력은 낮아졌으며($p < 0.05$), 다리근육에서는 차이가 없었다.

8) 수용성 단백질의 용해성은 가슴근육과 다리근육에서 대조구에 비하여 처리구에서 낮았으나($p < 0.05$), 염용성 단백질의 용해성은 높게 증가하였다($p < 0.05$).

9) 가슴근육의 조지방 함량은 건조처리 미 이용 팽이버섯 급여수준이 높을수록 감소하였고($p < 0.05$), 다리근육의 조지방 함량은 증가하였다($p < 0.05$).

10) 가슴근육의 아미노산 함량은 대조구에 비하여 모든 처리구에서 높았고, 다리근육의 아미노산 함량은 건조처리 미 이용 팽이버섯 급여수준이 높을수록 높게 나타났다.

11) 건조처리 미 이용 팽이버섯을 첨가 급여한 경우 가슴근육에서 지방산 조성은 포화 지방산 함량을 감소시키고 불포화 지방산의 함량을 증가시켰다($p < 0.05$).

이상의 결과를 종합고찰하면 건조처리 미 이용 팽이버섯을 육계생산에 이용하면 장내살모넬라균수의 감소, 계분 내 암모니아 가스 발생량의 감소, 다리근육에서 적색도의 향상, 가슴과 다리근육에서 황색도의 향상, 닭고기의 염용성 단백질의 용해성 증가, 가슴근육과 다리근육에서 아미노산함량의 증가, 닭고기의 저장성 향상, 가슴근육에서 불포화 지방산 증가를 기대할 수 있다고 본다.

라. 발효처리 미 이용 버섯자원에 의한 닭고기 생산

닭고기 생산에 대한 발효처리 미 이용버섯의 급여효과를 검토하기 위하여 육계 병아리 96수를 4개 그룹으로 나누어서 대조구(C)는 기초사료만 급여하였고, 시험 1구(T1)는 기초사료에 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 1%를, 시험 2구(T2)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 3%를, 시험 3구(T3)는 발효처리 된 미 이용 팽이버섯 5%를 6주 동안 급여하였다. 얻어진 결과는 다음과 같다.

1) 발효처리 된 미 이용 팽이버섯을 기초사료에 1, 3, 5% 첨가 시 증체량과 사료섭취량은 대조구와 차이가 없었다. 그러나 사료요구율은 대조구에 비하여 다소 개선되었다.

2) 발효처리 미 이용 팽이버섯의 급여수준을 높일수록 *Salmonella* spp.와 *E. coli* 균수가 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

3) 계분 중 암모니아가스 발생량은 발효 처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 증가하였다.

- 4) 도체율은 대조구에 비하여 T1, T2, T3에서 다소 낮았으나 유의차는 없었다.
- 5) 발효 처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 저장 6일과 9일에 다리근육의 지방산패도는 낮아졌으나($p < 0.05$), VBN값은 대조구에 비하여 증가하였다.
- 6) 발효처리 미 이용 팽이버섯 급여 시 가슴근육과 다리근육에서 적색도와 황색도는 낮아졌으며($p < 0.05$), 명도의 차이는 분명하지 않았다.
- 7) 발효처리 미 이용 팽이버섯 급여 시 다리근육에서는 가열감량과 보수력이 개선되었으나($p < 0.05$), 가슴근육에서는 저하 되었다.
- 8) 가슴근육과 다리근육의 수용성 및 염용성 단백질 용해성은 T2에서 가장 높았으며($p < 0.05$), T3에서 가장 낮았다.
- 9) 가슴근육과 다리근육의 조지방 함량은 발효처리 미 이용 팽이버섯 급여 수준이 높아짐에 따라 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).
- 10) 발효처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 가슴근육과 다리근육에서 아미노산 함량이 대조구에 비하여 증가하였으나 T1과 T3에 비하여 T2에서 다소 낮은 경향이였다.
- 11) 발효 처리 미 이용 팽이버섯을 급여함으로써 가슴근육과 다리근육 내 불포화지방산 함량이 유의적으로 증가하였으며($p < 0.05$), 포화지방산에 대한 불포화지방산의 비율도 증가하였다.

이상의 결과를 종합 고찰하면 발효 처리 미 이용 팽이버섯을 육계생산에 이용 시 장내 병원성 미생물의 감소, 다리근육에서 가열감량과 보수력의 증진, 가슴과 다리근육에서 아미노산함량의 증가, 불포화지방산 증가 및 지방산조성의 개선을 기대할 수 있다고 본다.

협동과제 : 기능성 다당류 생성 우수 미생물의 선발 및 유전육종

제 1절 서론

Hemicellulose나 cellulose등은 지구상에 많이 존재하는 바이오매스로서 자연계에 풍부하게 존재하는 다당류이다. 이러한 다당류들은 사람에게 의해 분해되지 못하기 때문에 박테리아와 곰팡이로부터 생산되는 다당류를 분해하는 효소를 이용하기 위한 연구가 수행 중이다. 대표적인 Hemicellulose인 mannan은 mannose잔기들이 β -1,4결합으로 직쇄사슬로 이루어진 mannan, mannan의 기본골격에 α -1,6결합으로 galactose가 결합된 galactomannan 및 mannose와 glucose가 무작위적으로 β -1,4결합으로 연결되어 있는 glucomannan으로 구성되어있다. Mannan의 생물학적 분해는 β -mannanase에 의해 mannan 다당류의 β -1,4결합이 가수분해되어 짧은 길이의 올리고당이 된다. 생성된 다양한 길이의 올리고당은 장내세균인 *Bifidobacterium*의 좋은 에너지원으로 성장을 촉진시키는 성장원으로서 작용하며, 대장 내에 유해 미생물의 증식 저해작용을 나타내어 일본 태양화학에서는 면역증진 기능과 유해균 흡착을 통한 질병차단 및 유해세균 증식 억제하는 만노올리고당을 개발하기도 하였다. 최근 mannanase는 펄프의 표백공정에 사용되고 있으며, 콩과식물에서 유래한 가축사료의 단백질원인 대두박은 antinutritional factor로 작용하여 사료 효율을 저하시키기 때문에 mannanase를 이용하여 galactomannan을 분해하여 사료효율을 증진시키는 사료 첨가제로 사용되고 있다.

cellulose는 포도당이 β -1,4결합으로 이루어진 중합체로서 식물 생체 건조 중량의 약 40% 이상을 차지하고 있으며, 이러한 cellulose를 기본 구성당인 glucose나 ethanol으로의 변환에 대해서 많은 연구되어지고 있다. 이러한 cellulase에 의한 cellulose의 분해기작은 sequential mechanism에 의한 상승작용이 관여함이 받아들여지고 있으며, Wood와 Eriksson은 endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) 및 β -glucosidase (EC 3.2.1.21) 가 동시에 존재할 때 이들의 상승작용에 의하여 결정형 cellulose를 분해할 수 있다고 보고 하였다. 이러한 glycosidases (EC 3.2.1.X)의 catalytic domain은 아미노산 서열들의 유사성 정도에 따라서 적어도 83 개 이상의 그룹으로 분류 될 수 있다. Glycosyl hydrolase family 8의 경우, 6개의 내부와 6개의 외부의 α -헬릭스 형태를 가진 $(\alpha/\alpha)_6$ barrel 형태로 고차구조를 형성하는 것으로 알려져 있으며, 대략 20개 정도의 conserved region이 존재하며 이들 중 aspartate (D) 잔기가 촉매 반응에 있어서 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 미생물 유래의 cellulase를 이용하여 섬유 가공, 세제 첨가제로 산업적으로 이용 가능하다. 사람이 분해하기 어려운 다당류 기질을 가수분해함으로써 생성되는 올리고당을 식품 첨가제 또는 사료 첨가제로서 이용 가능함으로써 산업적으

로 잠재적인 가치가 있을 것으로 사료된다.

cyclodextrins(CD)은 α -1,4글루코시딕 결합으로 이루어진 cyclic oligosaccharides이다. 이러한 CD생산을 촉매하는 효소는 CGTase(1,4- α -D-glucan 4- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferase)이다. 이 효소는 녹말, 아밀로오스, 다른 다당류 기질을 다른 transglycosylation 단계를 촉진시킴으로써 비환원당의 cyclic dextrin을 생산한다. CGTase의 분자량은 60-110 kDa으로 다양하며, 박테리아에서 발견되어지고 있다. *Bacillus species*로부터 CGTase생산이 일반적으로 가장 널리 알려져 있다. CDs는 내부에 소수성 부위를 가진 고리모양의 구조를 가지고 있어 많은 소수성 물질을 가두는 봉합체를 형성할 수 있다. 이러한 특성으로 인해 식품, 유기화학, 제약 및 섬유 산업뿐만 아니라 생명공학, 농업 등의 분야에서 다양하게 적용되어질 수 있다. 식품분야에서는 콜레스테롤 제거와 체중조절을 위한 식이섬유와 칼로리 대체 물질로 이용 가능하며, 제약 생산을 위한 중간물질과 불용성 화합물의 수용화 등에 이용될 수 있다. 폭넓게 적용 가능한 CGTase를 이용하여 분해된 다당류는 잠재적으로 산업적 가치가 높을 것으로 예상된다.

본 연구는 미 이용 버섯 자원을 효율적으로 이용할 수 있는 생물학적인 효소의 개발을 목적으로 기능성 다당류 생성하는 능력을 지닌 균주를 여러 지역의 토양 샘플로부터 분리하였으며, 이 중 우수한 균주를 선별하여 균주로부터 생산되는 유용효소의 유전자 클로닝, 유용효소의 정제 및 특성을 조사하였다.

제2절 버섯을 이용한 기능성 다당류 생성 균주의 선발 및 동정

1. 연구수행 방법

1) 유용효소 생성 균주의 분리

본 연구에 사용된 균주는 여러 지역의 토양 시료를 채집하여 이 시료 1g에 멸균수 10ml에 넣고 vortexing mixer를 이용 강하게 교반한 후 6단계 희석 평판 법으로 LB 평판배지(Polypeptone 10g, Yeast extract 5g, NaCl 5g, Agar 15g /1L)에 도말하여 colony를 도출시켰다.

다당류인 곤약 재배지로부터 유용효소 생성 균주를 분리하기 위하여, 곤약 재배지의 토양 샘플 2 kg을 채취하여, 500 g의 고체 형태의 곤약과 혼합하여 3일 동안 배양하였다. 배양 후, 액체 형태로 변한 1 ml의 곤약을 고체 형태의 곤약 100 g과 혼합하여 액체 형태로 변할 때까지 배양하였으며, 3회 반복 배양하였다. 이렇게 3회 반복한 배양액을 0.5%의 xylan, CMC (carboxymethylcellulose), glucomannan과 chitin이 첨가된 고체배지 (0.5% polypepton, 0.5% yeast extract, 0.1% KH_2PO_4 , 0.02% MgSO_4)에 도말하여 colony를 도출시켰다.

2) 균주별 기능성당류 생성능 유무 시험

버섯을 이용하여 분리 균주에 의해 기능성 당류를 생산하기 위한 분리 균주의 가수분해 효소의 유무는 agar-diffusion 방법에 의해서 시행하였다. 각 시험의 기질로 CMC, xylan, soluble chitosan, colloidal chitin, glucomannan, locust bean gum 및 soluble starch를 사용하였다. 각각의 기질은 대략 0.5%가 되게 평판배지에 첨가하였다. 기질이 첨가된 평판배지에 균을 접종한 뒤 37°C에 2일 동안 배양하였다. 그 후, CMC와 xylan이 함유된 평판 배지는 0.1% congo red 용액으로 10분간 염색한 뒤, 1M NaCl 용액으로 탈색하였다. CMC와 xylan, glucomannan 및 locust bean gum을 분해하는 능력을 가진 균주는 붉은색 백그라운드에 비해 균주 주변으로 오렌지색을 환이 나타났다. Soluble starch가 함유된 평판배지는 2% KI/0.2% I_2 용액으로 염색한 후 균주 주변으로 투명환이 나타나는 균주를 soluble starch를 분해하는 능력을 가진 균주로 판별하였다. 그 외의 다당류인 colloidal chitin과 soluble chitosan의 경우는 염색을 하지 않은 채, 투명환을 관찰하였다.

Soluble chitosan은 chitosan 분말 10g을 멸균수 400ml에 마그네틱바를 이용하여 교반하는 동안 1M 초산 용액을 90ml을 첨가하였다. 완전히 녹인 후 1M sodium acetate를 이용하여 pH를 5.0으로 보정하며 1L를 맞추었다.

Colloidal chitin은 Robert-Selitrennikoff 방법에 준하여 제조하였다. Chitin 분말 20g (C9213, Sigma)에 포화 HCl 350ml을 첨가한 후 4°C에서 휘저으며 밤새 분해시켰다. 이 혼합액에 2L의 차가운 95% 에탄올을 첨가한 후 강하게 교반하며 밤새 -3

5°C에서 보관하였다. 다음 5,000g, 4°C에서 20분간 원심분리 하여 침전물을 회수 한 후, 멸균수를 이용하여 침전물을 씻으며 pH가 중성 (7.0)이 되도록 보정하였다. 각각의 다당류 기질이 첨가된 고체배지에서 우수한 활성을 보이는 몇 종의 균주를 분리하였으며, 계속해서 다음 실험을 진행하였다.

3) 분리된 균주의 동정 및 유연관계 분석

선별된 균주는 Bergey's manual의 Systematic bacteriology를 근거로 형태학적, 생리학적, 생화학적 특성을 파악하였다. 또한 선별된 균주의 정확한 동정을 위하여 선별된 균주의 DNA를 분리하여 다음과 같이 분리하였다. 전 배양한 균주를 LB배지에 20 ml에 접종하여 37°C shaking incubator에 12시간동안 진탕 배양하였다. 배양된 균주를 집균하여 1 X TE buffer (50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 현탁하고, 현탁액을 -70°C에서 30분간 동결시켰다. 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)에 10 mg/ml의 농도로 용해한 lysozyme 용액 400 µl를 첨가하여 가끔 혼합해주면서 실온에서 용해한 후 얼음에 45분간 방치하였다. 800 µl STEP buffer (0.5% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 400 mM EDTA, 1 mg/ml proteinase)를 첨가해 50°C에서 1 시간동안 lysis하고 phenol-chloroform으로 정제하였고, 정제한 sample을 99% 에탄올로 침전시켜 가느다란 유리봉으로 염색체 DNA를 감아 회수하였다. 70% 에탄올로 세정하여 건조한 후 멸균수에 용해시켜 염색체 DNA를 분리하였다. 이렇게 분리된 DNA를 주형으로 하여 PCR반응을 수행하였으며, PCR에 사용된 primer는 E. coli 의 16S rDNA의 upstream 9-27bp와 downstream 1,542-1,525bp의 영역을 oligonucleotide로 작성하였다 (primer 1 : 5'-GAGTTTGATCCTGGCTAG-3', primer 2 : 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'). PCR은 Thermal cycler (Takara thermal cycler)를 사용하여, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분의 조건으로 30회 수행한 다음 최종 72°C에 10분간 신장 단계를 수행하였다. 증폭된 단편은 pGEM-T easy vector (promega, USA)에 cloning하여 16S rDNA 유전자의 염기서열을 결정한 다음 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST를 통해 상동성을 비교했다. 동정된 균주와 유사한 종들간의 유연관계를 알아보기 위해 16S rDNA를 기초로 하여, ClustalX program을 이용하여 phylogenetic analysis를 수행하였다.

2. 연구 수행 결과

1)기능성 다당류 생성 균주의 분리

(1)승학산 인근 토양에서의 기능성당류를 생성하는 미생물의 분리

승학산 인근 토양에서 버섯을 이용하여 기능성당류를 생성 가능한 미생물을 분리하

기 위해 샘플을 채취하여 6단계 희석 평판법으로 콜로니를 도출시킨 후, 각각의 균주를 LS02, LS03, MC03, MC04, MR03, RS01, RS07과 RS08로 명명하였다. 모든 균주들을 각각의 다당류가 함유된 평판배지에서 2일간 배양한 후 그 활성의 유무를 판별하였다(그림1-1, Table 1-1). Soluble chitosan을 함유한 평판배지에서는 MC03, MC04, LS02, RS07과 RS08이 강한 활성을 나타내었으며, RS01, LS03과 MR03에서도 약한 활성을 관찰할 수 있었다. Soluble starch가 함유된 평판배지에서는 RS01, RS04, RS07, RS08, MR03, MC01, MC02, MC03, MC04, LS02과 LS03이 강한 활성을 나타내었으며, MR03도 약한 활성을 나타내었다. CMC가 함유된 평판배지에서는 RS01과 LS03이 강한 활성을 나타내었다.

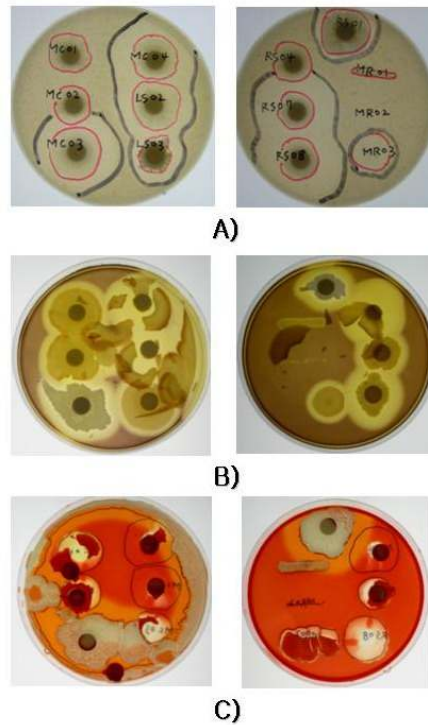


그림 1-1. 승학산 인근 토양에서 분리한 균주들의 기능성 다당류 생성능 유무 판별 시험

A) soluble chitosan, B) soluble starch, C) CMC

Table 1-1. 승학산 인근 토양에서의 분리 균주에 의해 기능성당 생성을 위해 이용 가능한 다당류

	RS01	RS04	RS07	RS08	MR01	MR02	MR03
soluble chitosan	0	-	⊙	⊙	-	-	0
soluble starch	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
CMC	⊙	-	-	-	-	-	-
	MC01	MC02	MC03	MC04	LS02	LS03	
soluble chitosan	-	-	⊙	⊙	⊙	0	
soluble starch	-	-	⊙	⊙	⊙	⊙	
CMC	-	-	-	-	-	⊙	

⊙; 강한 활성, 0; 약한 활성, -; 활성 없음.

(2) 덕유산 인근 토양에서의 기능성당류를 생성하는 미생물의 분리

덕유산 인근 토양에서 버섯을 이용하여 기능성당류 생성이 가능한 미생물을 분리하기 위해서 샘플을 채취하여 6단계 희석 평판법으로 콜로니를 유발시켜 40 종의 single 콜로니를 획득하였다. 각각의 균주를 DAU1001, DAU1002, DAU1003 ~ DAU1039, DAU1040으로 명명하였다. 모든 균주들을 각각의 다당류가 함유된 평판 배지에서 2일간 배양한 후 그 활성의 유무를 판별하였다(그림1-2, 3, 4, Table 1-2). Soluble chitosan이 함유된 평판배지에서는 DAU1005, DAU1007, DAU1010, DAU1018, DAU1019, DAU1025과 DAU1040 균주들이 활성을 나타내었으며, colloidal chitin을 함유한 평판배지에서는 DAU1030, DAU1034, DAU1038 그리고 DAU1039의 균주들이 양성의 활성을 나타내었다. Soluble starch를 함유한 평판배지에서는 DAU1004, DAU1007, DAU1010, DAU1018, DAU1019, DAU1025의 균주가 강한 활성을 나타내었으며, DAU1034, DAU1036, DAU1038 그리고 DAU1040의 균주가 약한 활성을 나타내었다. 그리고 CMC가 함유된 평판 배지에서는 DAU1004, DAU1008, DAU1010, DAU1018, DAU1019와 DAU1025의 균주가 강한 활성을 나타내었으며, DAU1006, DAU1007, DAU1012, DAU1016, DAU1017 그리고 DAU1040의 균주는 약한 활성을 나타내었다. 그리고 DAU1025와 DAU1045는 xylan을 분해하는 활성을 가진 것으로 확인되었으며, 특히 DAU1002, DAU1006, DAU1012, DAU1016, DAU1023, DAU1030과 DAU1040은 유류(tributyryn) 분해 활성을 가진것을 확인 할 수 있었다.

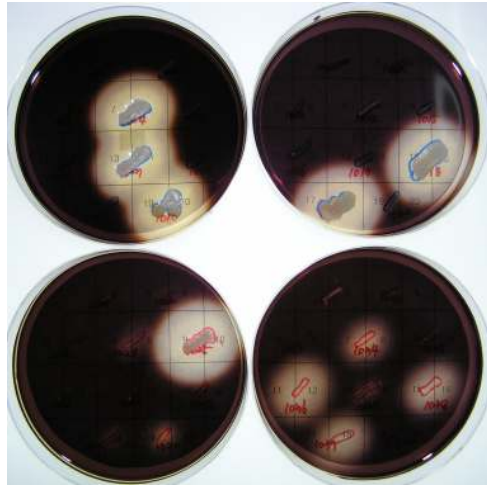


그림 1-2. 덕유산 인근 토양에서의 분리 균주들의 soluble starch를 이용한 기능성 다당류 생성능 유무 판별 시험

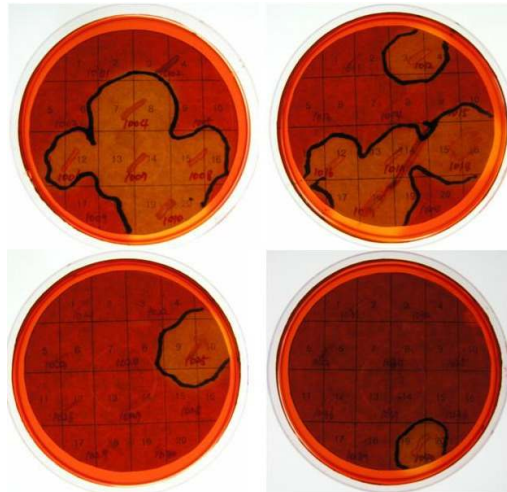


그림 1-3. 덕유산 인근 토양에서의 분리 균주들의 CMC를 이용한 기능성 다당류 생성능 유무 판별 시험

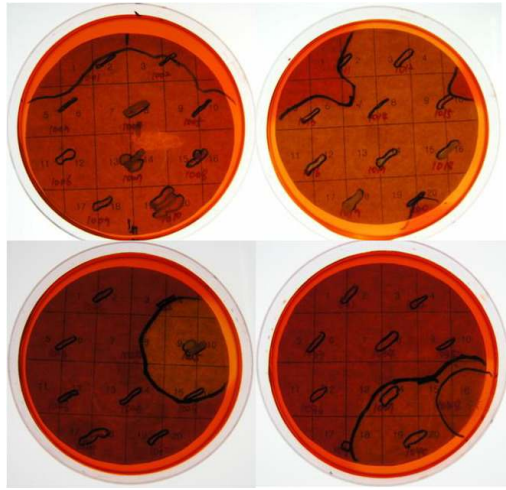


그림 1-4. 덕유산 인근 토양에서의 분리 균주의 xylan을 이용한 기능성 다당류 생성능 유무 판별 시험

Table 1-2. 덕유산 인근 토양에서의 분리한 균주들의 기능성당 생성을 위해 이용 가능한 다당류

	Soluble chitosan	Colloidal chitin	CMC	Soluble starch	Xylan	Tributyryn
DAU1001						
DAU1002						◎
DAU1003						
DAU1004			◎	◎		
DAU1005	◎					
DAU1006			○			○
DAU1007	◎		○	◎		
DAU1008			◎			
DAU1009						
DAU1010	◎		◎	◎		
DAU1011						
DAU1012			○			
DAU1013						
DAU1014						
DAU1015						
DAU1016			○			◎
DAU1017			○			
DAU1018	◎		◎	◎		
DAU1019	◎		◎	◎		
DAU1020						
DAU1021						
DAU1022						
DAU1023						◎
DAU1024						
DAU1025	◎		◎	◎	◎	
DAU1026						
DAU1027						
DAU1028						
DAU1029						
DAU1030		◎				◎
DAU1031						
DAU1032						
DAU1033						
DAU1034		◎		○		
DAU1035						
DAU1036				○		
DAU1037						
DAU1038		◎		○		
DAU1039		◎		○		
DAU1040	◎		○		◎	

◎; 강한 활성, ○; 약한 활성.

(3) 달팽이 유래 기능성당류를 생성하는 미생물의 분리

달팽이에서 여러 다당류의 분해능이 우수한 미생물을 분리하기 위해서 샘플을 채취

하여 6단계 희석 평판법으로 콜로니를 유발시킨 후, 각각의 균주를 Sa, Sb, Sc, Sb1, Sb2, Sb3, Sb4, Sb6으로 명명하였다. 모든 균주들을 각각의 다당류가 함유된 평판배지에서 2일간 배양한 후 그 활성의 유무를 판별하였다(그림1-5, Table 1-3). Soluble chitosan이 함유된 평판배지에서는 Sb와 Sc가 활성을 나타내었으며, starch가 함유된 평판배지에서는 Sc, Sb1, Sb4와 Sb6가 활성을 나타내었다. CMC가 첨가된 평판배지에서는 Sc, Sb1 그리고 Sb6가 활성을 나타내었으며, 특히 xylan은 Sc가 이용 가능하였으며, colloidal chitin은 Sb6가 이용 가능하였다.

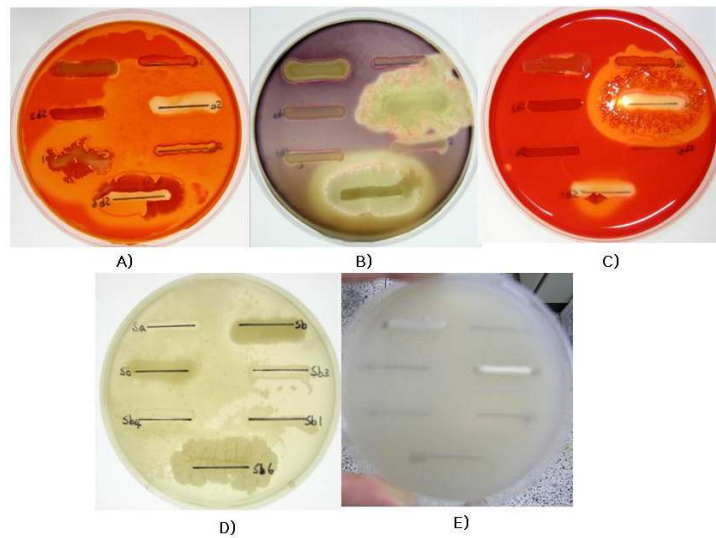


그림 1-5. 달팽이로부터 분리한 균주들의 기능성 다당류 생성능 유무 판별 시험
A) CMC, B) soluble starch, C) xylan, D) colloidal chitin, E) soluble chitosan

Table 1-3. 달팽이로부터 분리한 균주의 기능성당 생성의 위해 이용 가능한 다당류

	Sa	Sb	Sc	Sb1	Sb2	Sb3	Sb4	Sb6
Colloidal chitin								◎
Soluble chitosan		◎	◎					
Xylan			◎					
Soluble starch			◎	◎			◎	◎
CMC			◎	◎				◎

◎; 강한 활성.

(4) *Amorphophallus konjac* (곤약)재배지 유래의 기능성 다당류 생성 미생물의 분리

Mannanase를 생산하는 균주를 분리하기 위해서 곤약 재배지의 토양을 채취하여 곤약을 기질로 첨가하여 콜로니를 도출하였다. 분리된 콜로니들 중 활성이 우수한 2종의 균주를 분리하여 ZY-03과 ZY-08로 명명하였다. 0.5% polypepton, 0.5% yeast extract, 0.1% KH_2PO_4 , 0.02% MgSO_4 로 구성된 고체배지에 각각 0.5%의 xylan, CMC, glucomannan과 chitin을 첨가하여 선별된 균주 ZY-03와 ZY-08을 그어 37°C에서 24시간동안 정지 배양하였다. 각각의 활성을 관찰하기 위하여 KI/I_2 로 염색한 결과, 각각의 기질이 첨가된 고체 배지에서 활성 존을 확인하였다(그림 1-6, 1-7). ZY-03은 xylan, CMC와 chitin이 첨가된 배지에서 우수한 활성을 나타내었으며, glucomannan이 첨가된 배지에서도 우수한 활성을 관찰하였으나, 다른 기질이 첨가된 배지에서 비해 상대적으로 약한 활성을 나타내었다. YZ-8도 역시 4종류의 기질을 분해하여 고체배지에서 활성 존을 나타내었으며, 특히, xylan, chitin 및 glucomannan에서 활성을 보였으며, Glucomannan과 galactomannan중에서 glucomannan을 보다 더 쉽게 이용하는 것으로 나타났다.

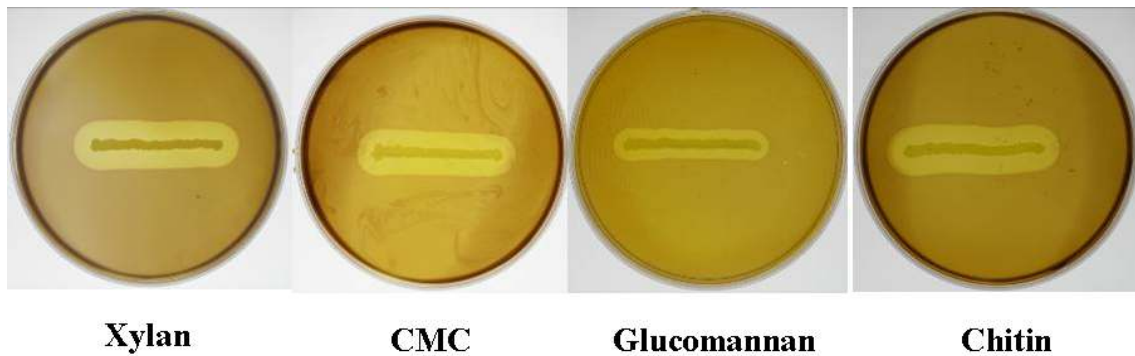


그림 1-6. 곤약 재배지로부터 분리한 ZY-03의 기능성 다당류 생성 유무 판별 시험

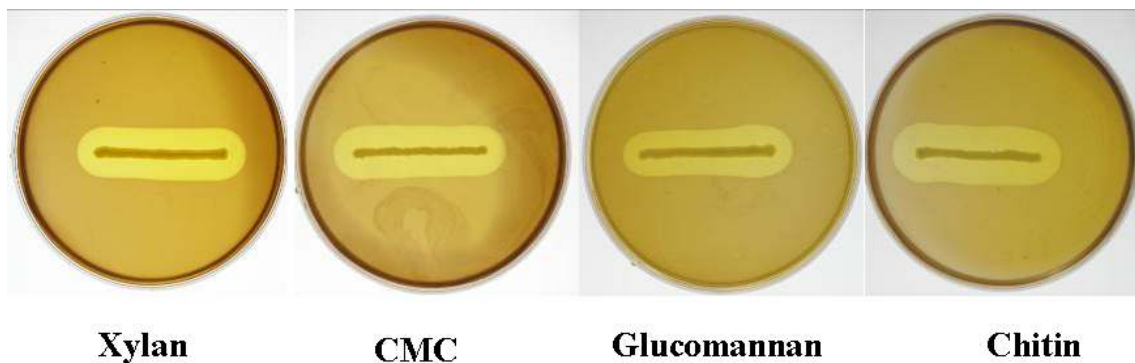


그림 1-7. 곤약 재배지로부터 분리한 ZY-08의 기능성 다당류 생성 유무 판별 시험

(5) 울산 인근 토양에서의 기능성당류를 생성하는 미생물의 분리

울산 인근 토양에서 버섯을 이용하여 기능성당류를 생성 가능한 미생물을 분리하기 위해서 샘플을 채취하여 6단계 희석 평판법으로 콜로니를 유발시킨 후, 각각의 균주를 여러 종류의 다당류가 함유된 평판배지에서 2일간 배양한 후 그 활성의 유무를 판별하였다(그림1-8). 그 중 다양한 형태의 다당류를 분해하는 능력을 가진 균주를 선별하여 Z라고 명명하였다. 이 분리 균주는 arabic gum, colloidal chitin, CMC, locust bean gum, soluble starch와 xylan과 같은 다양한 형태의 다당류들을 분해하는 능력을 가졌다.

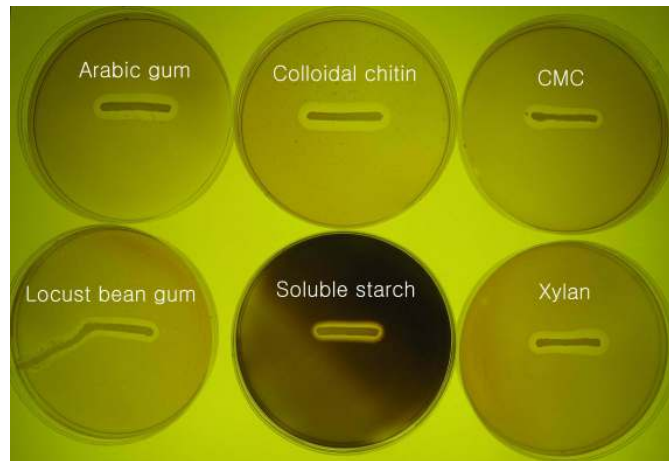


그림 1-8. 분리 균주 Z의 기능성 다당류 생성능 유무 판별 시험

(6) 실험실 보유 균주

실험실에서 보유하고 있는 다당류 분해능을 가진 우수한 *Bacillus subtilis* A8-8균주를 기능성 다당류 생성을 위해 사용하였다.

2) 선별된 기능성 다당류 생성 균주의 동정

(1) 송학산 인근 토양에서의 기능성당류 생성 미생물의 동정

다당류 분해능이 우수한 선발 균주들의 16S rDNA 염기서열을 PCR을 통해서 증폭하여 다른 종들과 유전적 연관을 조사 하였다. 균주의 염색체 DNA를 분리하였으며, 이를 주형으로 PCR반응을 수행하여 대략 1.5kb 정도의 16S rDNA 단편을 얻었다. 얻어진 PCR단편은 pGEM T-easy vector(Promega Co., USA.)를 사용하여 클로닝 한 후 양방향으로 염기서열을 결정하였다. 결정된 16S rDNA 염기서열을 NCBI blastn를 통해서 유사 종들과의 상동성을 조사하였으며, ClustalX program을 이용하여 유사한 종들과의 유전학적인 연관성을 조사하였다(Table 1-4, 그림 1-9). 그 결과, LS02의 16S rDNA는 *Bacillus cereus*와 99% 상동성을 가졌으며, LS03은 *B. subtilis*와 99%, *B. licheformis* 99% 그리고 *B. polyfermenticus*와도 99%의 상동성을 나타내었다. MC03과 MC04은 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*와 각각 99%의 상

동성을 나타내었으며, MR03과 RS07은 *B. cereus*, *B. thuringiensis* 그리고 *B. anthracis*와 각각 99%의 상동성을 나타내었다. RS01은 *B. subtilis*와 99%의 상동성을 나타내었고, RS07은 *B. thuringiensis* 그리고 *B. anthracis*와 각각 99%의 상동성을 나타내었다.

Table 1-4. 승학산 인근 토양에서의 분리 균주와 유사 종들과의 16S rDNA의 상동성

	LS02	LS03	MC03	MC04	MR03	RS01	RS07	RS08
<i>B. subtilis</i>		99%				99%		
<i>B. licheniformis</i>		99%						
<i>B. polyfermenticus</i>		99%						
<i>B. cereus</i>	99%		99%	99%	99%			99%
<i>B. thuringiensis</i>			99%	99%	99%		99%	99%
<i>B. anthracis</i>							99%	99%

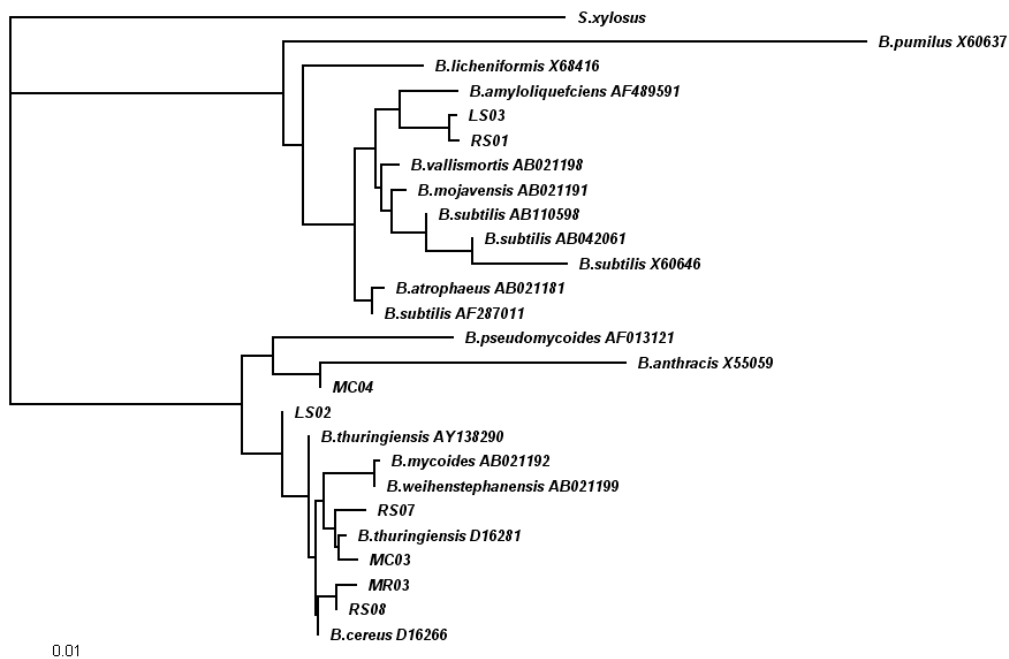


그림 1-9. 승학산 인근 토양에서의 분리 균주의 16S rDNA와 유사 종들과의 유전적 유연관계 트리 Outgroup으로 *Staphylococcus xylosus*(AF515587)을 사용하였음.

(2) 덕유산 인근 토양에서의 기능성당류를 생성하는 미생물의 동정
 분리 균주들 중에서 여러 다당류를 기능성당 생성에 이용할 수 있는 능력을 가진 균주를 선별하여 그 균주의 16S rDNA 염기서열을 PCR을 통해서 증폭하여 다른 종들과 유전적 연관을 조사 하였다(Table 1-5, 그림 1-10,11). 그 결과, DAU1002, DAU1005, DAU1007, DAU1010, DAU1014 그리고 DAU1034의 균주들은 *Bacillus*

*subtilis*와 각각 99% 이상의 상동성을 나타내었으며, DAU1018, DAU1019 그리고 DAU1025는 *B. subtilis* 그리고 *B. licheniformis*와 각각 99% 이상의 상동성을 나타내었다. 그리고 DAU1023, DAU1038과 DAU1039는 *Staphylococcus saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. brasiliensis*, *S. cohnii* 그리고 *S. succinus*와 각각 99% 이상의 상동성을 나타내었다.

Table 1-5. 덕유산 인근 토양에서의 분리 균주와 유사 종들과의 16S rDNA의 상동성

	1002	1005	1006	1007	1009	1010	1012	1014	1016
<i>B. subtilis</i>	99%	99%		99%		99%		99%	
<i>B. licheniformis</i>									
<i>B. pumilus</i>			99%		99%		99%		99%
<i>S. xylosus</i>									
<i>S. saprophyticus</i>									
<i>S. brasiliensis</i>									
<i>S. cohnii</i>									
<i>S. succinus</i>									
	1017	1018	1019	1023	1025	1034	1038	1039	1040
<i>B. subtilis</i>		99%	99%		99%	99%			
<i>B. licheniformis</i>		99%	99%		99%				
<i>B. pumilus</i>	99%								99%
<i>S. xylosus</i>				99%			99%	99%	
<i>S. saprophyticus</i>				99%			99%	99%	
<i>S. brasiliensis</i>				99%			99%	99%	
<i>S. cohnii</i>				99%			99%	99%	
<i>S. succinus</i>				99%			99%	99%	

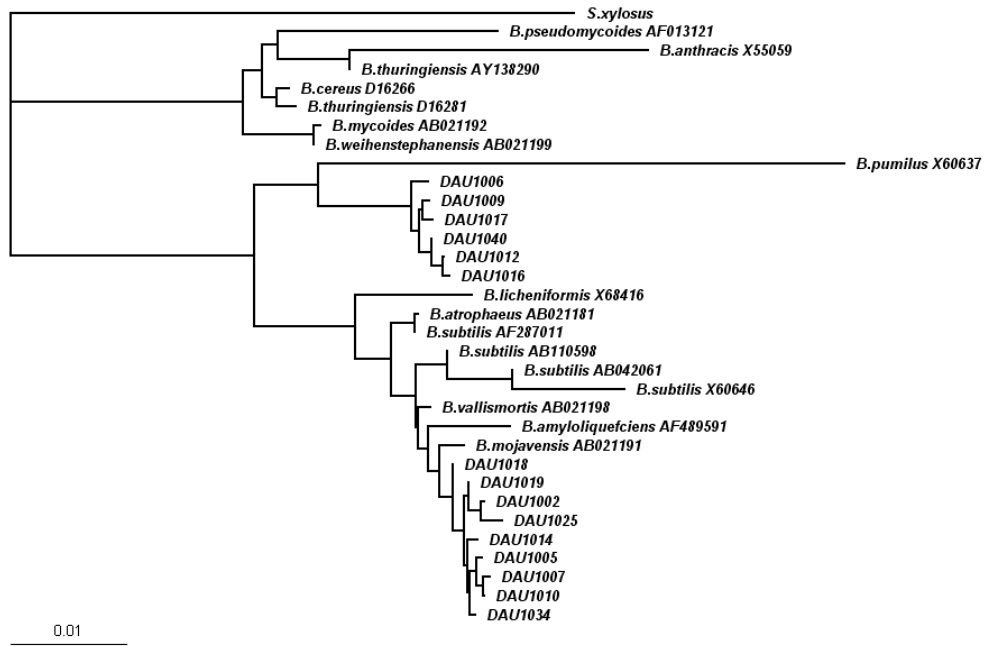


그림 1-10. 덕유산 인근 토양에서의 분리 균주의 16S rDNA와 *Bacillus* sp. 종들과의 유전적 유연관계 트리

Outgroup으로 *Staphylococcus xylosus* (AF515587)을 사용하였음.

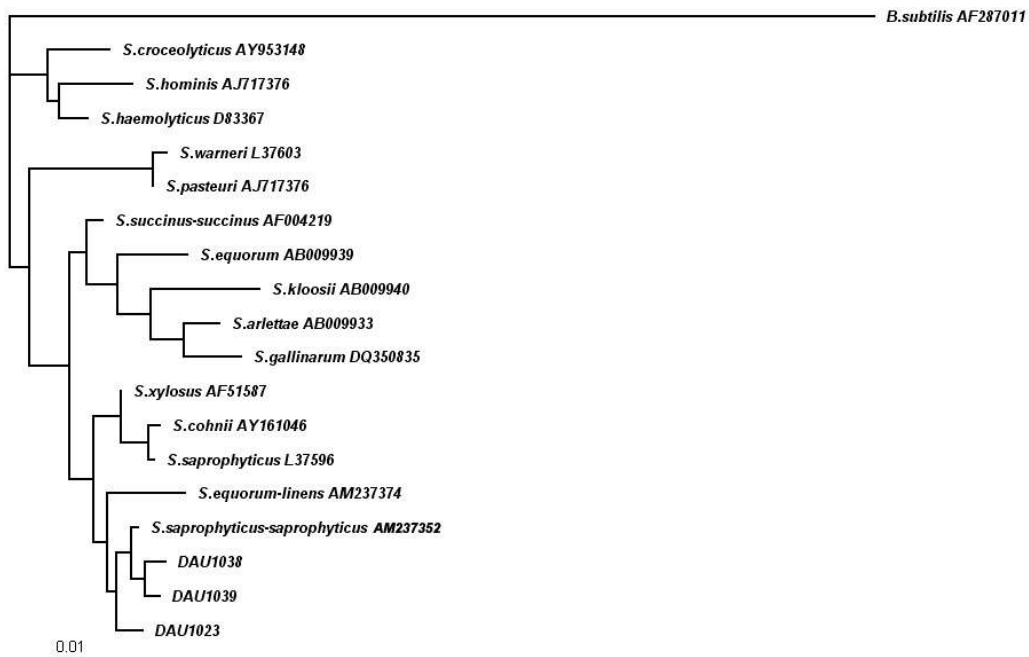


그림 1-11. 덕유산 인근 토양에서의 분리 균주의 16S rDNA와 *Staphylococcus* sp. 종들과의 유전적 유연관계 트리

Outgroup으로 *Bacillus subtilis* (AF287011)을 사용하였음.

(3) 달팽이 유래 기능성당류를 생성하는 미생물의 동정

분리 균주들 중에서 여러 다당류를 분해하는 능력을 가진 균주를 선별하여 그 균주의 16S rDNA 염기서열을 PCR을 통해서 증폭하여 다른 종들과 유전적 연관을 조사 하였다(Table 1-6, 그림 1-12,13,14). 그 결과, Sa와 Sb1은 *Staphylococcus epidermidis*와 각각 99% 이상의 상동성을 나타내었으며, Sb2는 *Bacillus atrophaeus*와 99% 이상의 상동성을 나타내었다. Sb와 Sc는 *Klebsiella pneumoniae*와 각각 99% 이상의 상동성을 나타내었으며, Sb3과 Sb4는 *S. hominis*와 각각 99% 이상의 상동성을 나타내었고 Sb6는 *S. pasteurii* 그리고 *S. warneri*와 각각 99% 이상의 상동성을 나타내었다.

Table 1-6. 달팽이로부터 분리한 균주와 유사 종들과의 16S rDNA의 상동성

	Sa	Sb	Sc	Sb1	Sb2	Sb3	Sb4	Sb6
<i>B. atrophaeus</i>					99%			
<i>K. pneumoniae</i>		99%	99%					
<i>K. milletis</i>			99%					
<i>S. epidermidis</i>	99%			99%				
<i>S. hominis</i>						99%	99%	
<i>S. pasteurii</i>								99%
<i>S. warneri</i>								99%

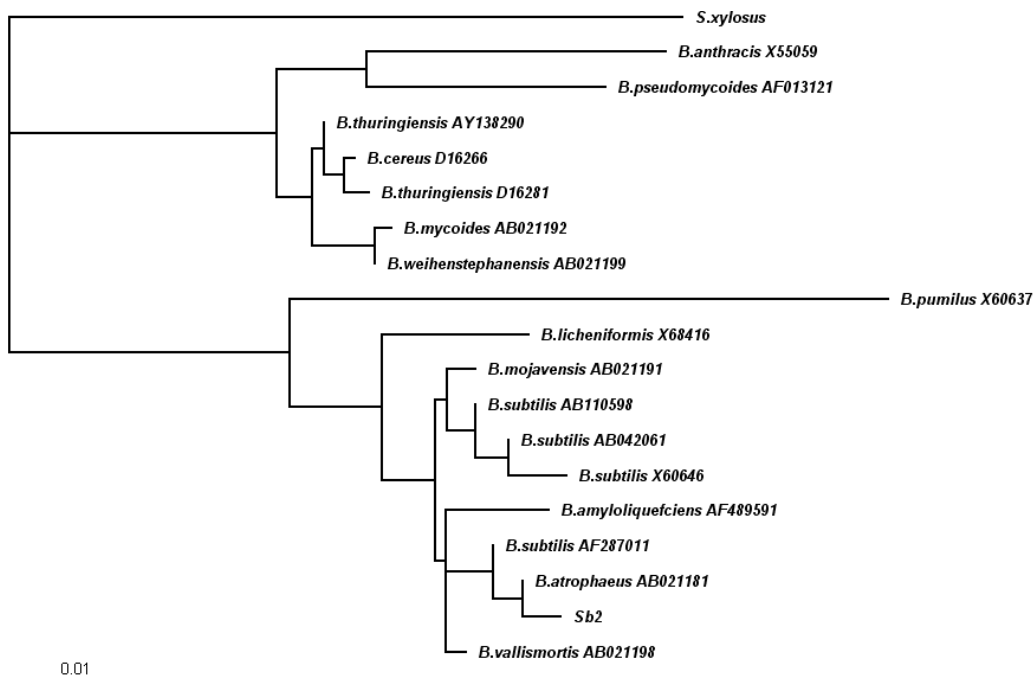


그림 1-12. 달팽이로부터 분리한 Sb2 균주의 16S rDNA와 *Bacillus* sp. 종들과의 유전적 유연관계 트리 Outgroup으로 *S. xylosus* (AF515587)을 사용하였음.

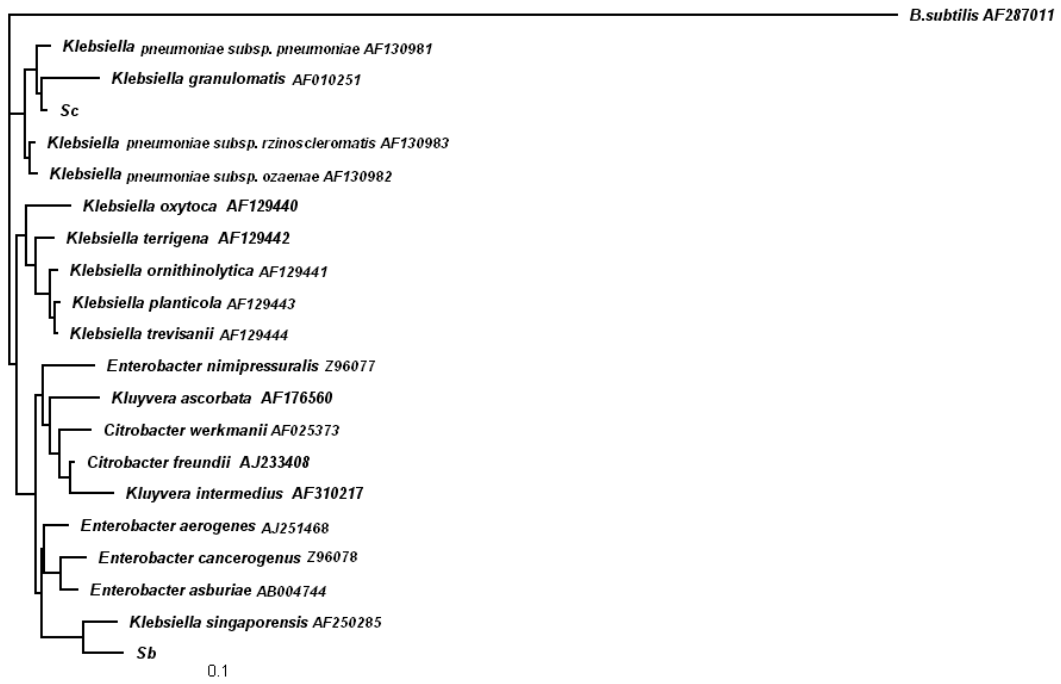


그림 1-13. 달팽이로부터 분리한 Sb와 Sc 균주의 16S rDNA들과 *Klebsiella* sp. 종들과의 유전적 유연관계 트리 Outgroup으로 *B. subtilis* (AF287011)을 사용하였음.

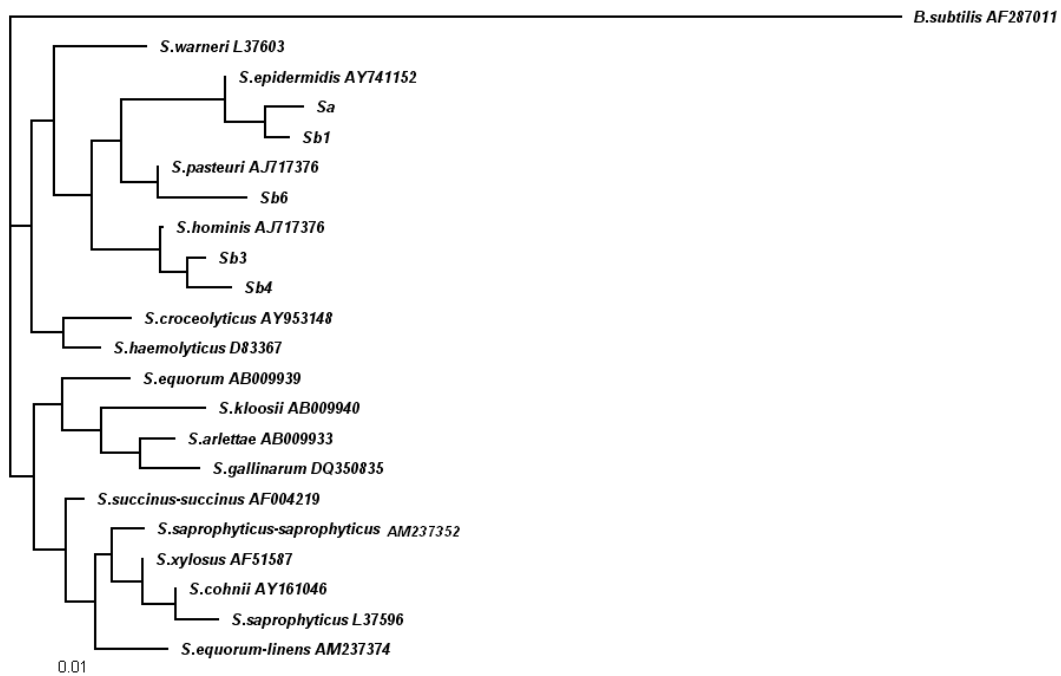


그림 1-14. 달팽이로부터 분리한 Sa, Sb1, Sb3, Sb4와 Sb6 균주의 16S rDNA들과 *Staphylococcus* sp. 종들과의 유전적 유연관계 트리 Outgroup으로 *B. subtilis* (AF287011)을 사용하였음.

(4) 곤약 경작지 유래의 기능성 다당류 생성 미생물의 동정

균주의 동정을 위해서 16S rDNA를 이용하여 유전학적 연관 관계를 확인한 결과, 분리균주 ZY-03은 *P. xylanilyticus* XIL14과 99%의 상동성을 보였으며, *P. illinoisensis*와 높은 상동성을 나타내었다(그림 1-15). 이러한 결과를 바탕으로 *P. xylanilyticus* ZY-03으로 명명하였다. 분리 균주 ZY-08는 *Paenibacillus illinoisensis* (AB073192)와 99%의 높은 상동성을 나타내었으며, *P. xylanilyticus* (AY427832)와는 98%, *P. amylolyticus* (D85396)와는 96%, *P. pabuli* (X60630)와 *P. favisporus* (AY208751)와는 95%, *P. turicensis* (AF378694)와는 93%, *P. macquariensis* (X57305), *P. chibensis* (D85395)와 *P. graminis* (AJ223987)와는 92%를 나타내었으며 *P. glucanolyticus* (D88514)와는 90%의 상동성을 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 하여 분리 균주를 *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08로 명명하였다(그림 1-16).

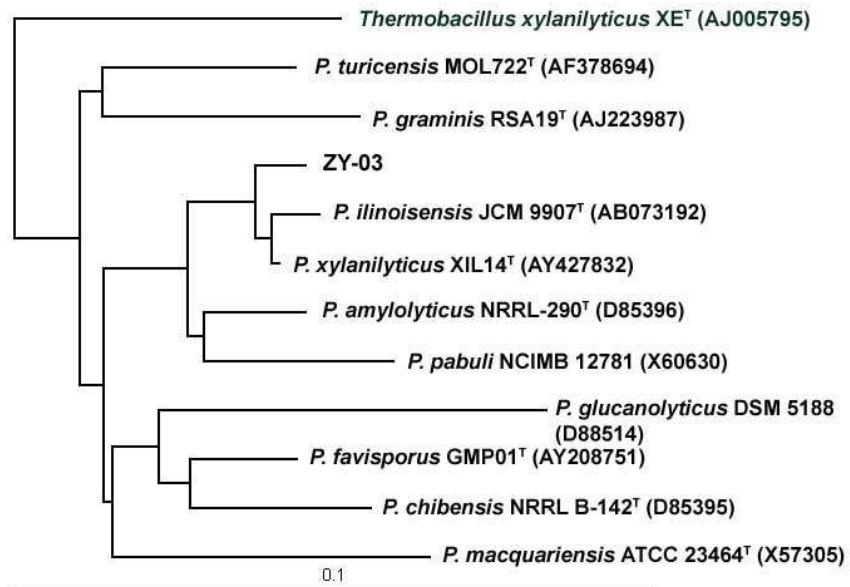


그림 1-15. 곤약 재배지로부터 분리한 ZY-03 균주의 16S rDNA과 *Paenibacillus* sp. 종들과의 유전적 유연관계 트리

Outgroup으로 *B. subtilis* (AF287011)을 사용하였음.

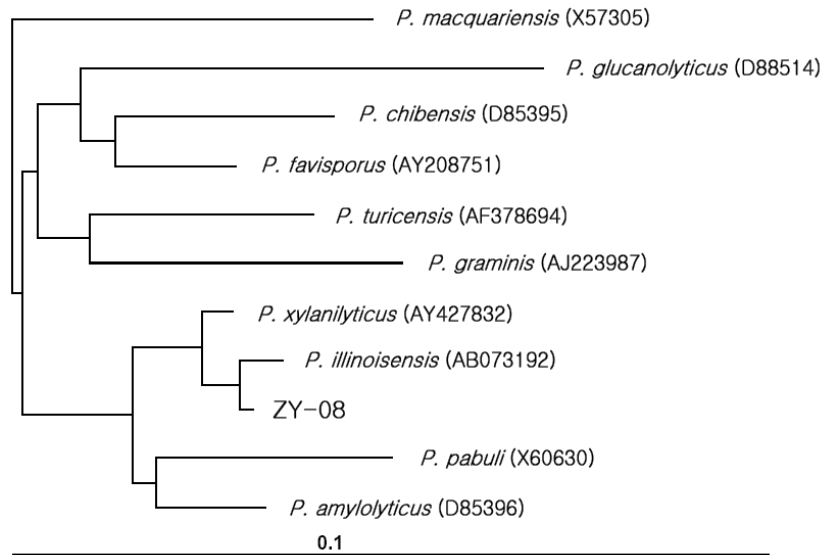


그림 1-16. 곤약 재배지로부터 분리한 ZY-03 균주의 16S rDNA과 *Paenibacillus* sp. 종들과의 유전적 유연관계 트리

Outgroup으로 *Staphylococcus xylosus* (AF515587)을 사용하였음.

(5)울산 인근 토양에서의 기능성당류를 생성하는 미생물의 동정 유전학적 동정을 위해서 16S rDNA를 이용해서 분석한 결과, *Chryseobacterium taeanense*와 *C. taiwanense*들과 97%의 상동성을 나타내었으며, *C. wanjuense*, *C. daeguense*, *C. taichungense*, *C. daecheongense*와 각각 96%의 상동성을 나타내었으며, 이 분리균주를 *Chryseobacterium* sp. Z로 명명하였다(그림 1-17,18).

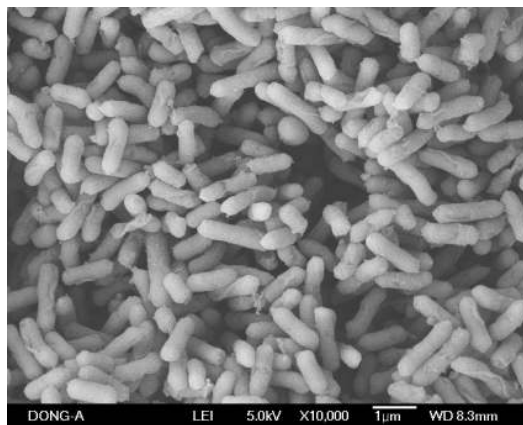


그림 1-17. 분리균주 Z의 주사전자 현미경 사진

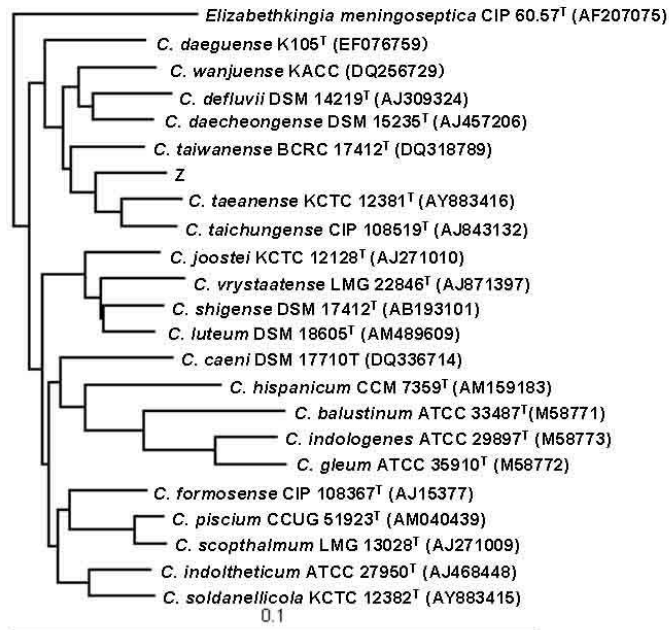


그림 1-18. 분리균주 Z의 16S rDNA 유전자와 *Chryseobacterium* sp. 종들과의 유전적 연관관계 트리

제3절 버섯으로부터 기능성 다당류 생성을 위한 *Klebsiella* sp. Sc로부터 CMCase와 xylanase 유전자 클로닝, 정제 및 특성

1. 연구수행 방법

1) rpoB 유전자를 이용한 Sc 균주의 세부 동정

rpoB 유전자의 증폭을 위해서 두 개의 프라이머 5'-AACCAGTTCCTCGTTGGCCTGG-3', 5'-CCTGAACAACA CGCTCGGA-3'를 사용하였다. 두 종류의 유전자를 증폭시키기 위한 PCR수행방법은 다음과 같다. 초기 변성 단계는 95°C 1분을 시작으로 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분을 30 cycle 수행하고 최종 72°C에 10분간 신장 단계를 수행하였다. 이렇게 얻어진 PCR 산물은 pGEM T-easy vector(Promega사, USA)속에 재조합하여 결정된 염기서열을 이용하여 GenBank Database에서 상동성을 비교하고, ClustalX program을 이용하여 phylogenetic tree를 제작하였다.

2) 게놈 라이브러리의 구축

(1) Shot-gun 방법을 이용한 게놈라이브러리의 구축

다당류 가수분해능이 우수한 *Klebsiella* sp. Sc로부터 버섯으로부터 기능성 다당류를 생성하는 효소로서 이용 가능한 유용효소의 유전자를 탐색하기 위해 2가지 방법을 이용하여 유전자를 탐색하였다. *Klebsiella* sp. Sc로부터 준비된 DNA를 제한 효소 *Pst*I (5'CTGCAG3')을 이용하여 부분 절단을 한 후, 0.6% 아가로스 겔에 전기 영동하여 대략 1~5 kb 정도의 단편들을 회수 하였다. 회수한 DNA 단편들은 제한효소 *Pst*I과 calf intestinal alkaline phosphatase 처리된 pUC18 플라스미드에 재조합되어졌다. 재조합된 플라스미드는 다시 *E.coli* JM109에 형질전환 하였다. 형질 전환된 균주는 37°C에서 암피실린(50µg/ml)와 0.5% CMC가 함유된 LB고체배지에 배양하였다. 2일 배양 후, 0.5% congo red로 염색하여 1M NaCl로 탈색하였을 때 CMC가 분해되어 clear zone이 형성되는 균주를 생산하는 재조합 균주로 선별하였으며 염기서열을 분석하였다.

(2) Fosmid library kit를 이용한 게놈라이브러리의 구축

Fosmid library 구축은 Epicentre사에서 판매되는 EpiFos™ Fosmid Library Production Kit를 이용하여 구축하였다. Fosmid library 구축을 위해서 분리균주로부터 분리한 게놈 DNA(2.5ug)를 200여회의 피펫팅을 통해서 대략 40kb 정도의 단편으로 절단하였다. 이렇게 절단한 단편을 End-repair 효소를 이용하여 각 단편의 말단을 blunt end화 하였다. 이후 Et-Br이 함유되지 않은 1% low melting agarose

겔에 전기 영동하여 대략 40kb 부근의 DNA 단편을 회수하였다. 이 회수 단편을 pEpiFOS-5 벡터와 몰 비율이 10:1이 되게 섞어서 라이게이션 하였다. 이를 MaxPlax Lambda Packaging Extracts를 이용하여 packaging 하여 *E.coli* EPI100-T1에 형질도입 하였다.

3) Affinity chromatography를 이용한 정제를 위한 재조합 플라스미드의 구축
Glutathione S-transferase (GST) 융합 단백질과 His 융합 단백질을 구축하기 위하여 바이오니아사에서 합성한 oligonucleotides 프라이머들을 사용하였다. 이 프라이머들은 GST tag 융합 단백질의 발현 벡터인 pGEX-6P-1와 His tag 융합 단백질의 벡터인 pET32-a에 쉽게 클로닝하기 위해서 프라이머 내부에 제한효소 *EcoRI*과 *XhoI*의 자리를 삽입하였다. PCR 반응액 50ul 속에는 100pmol의 프라이머, 200ng의 주형 DNA, 20mM의 각각의 dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)와 1.0U의 Taq DNA Polymerase를 함유하였다. 증폭 과정은 다음 단계를 30회 반복 하였다: pre-denaturation 95°C에서 60초를 실시한 후, denaturation 95°C에서 60초, annealing 55°C에서 60초, extension 72°C에서 90초를 30회 반복하였으며, 이후 마지막 extension 반응으로 72°C에서 10분간 실시하였다. 증폭된 DNA 단편은 제한효소 *EcoRI*과 *XhoI*으로 처리한 후, *EcoRI*과 *XhoI* 처리를 하고 5'-인산기가 제거된 pGEX-6P-1 벡터에 클로닝하였다. 그 결과, GST-CMCase 융합 플라스미드인 pGESCMC를 구축 하였다.

4) 재조합 단백질 CMCase 및 xylanase의 정제

GST-CMCase fusion 플라스미드를 가진 *E.coli* BL21 (DE3)는 지수 성장기의 초기에 0.1mM의 IPTG를 첨가하여 과발현 유도하였으며, 이후 37°C에서 3시간정도 더 배양하였다. 세포는 4°C, 6,000rpm에서 15분간 원심분리를 통해서 집균 하였으며, 1X PBS 버퍼 (10X PBS를 희석사용: 1.4M NaCl, 27mM KCl, 100mM Na₂HPO₄, 18mM KH₂PO₄ [pH 7.3])를 이용하여 Washing하였으며, 1X PBS를 이용하여 재현탁하였다. 세포는 sonication을 통하여 파쇄 하였으며, 그 상등액은 4°C, 13,000 rpm에서 30 분간 원심 분리하여 수집하였다. 상등액은 1X PBS로 평형화 되어있는 GSTrap FF column에 통과 시킨 후, 10mM reduced glutathione을 이용해서 용출하였다. 용출 속도는 분당 1ml의 속도를 유지 하였다. 용출된 fraction은 PreScission cleavage 버퍼 (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT [pH7.0])로 투석하고 Amicon Ultra-4를 이용하여 농축하였다. 농축된 GST-CMCase 융합 단백질은 PreScission protease를 이용하여 5°C에서 12 시간동안 반응시켜 GST 영역을 제거 하였다. 이 분리된 단백질들은 다시 GSTrap FF column에 다시 통과시켜 컬럼에 결합하지 않은 unbounded 단백질을 회수하여 정

제한 단백질로 사용하였다.

2. 연구 수행 결과

1) 달팽이 유래 기능성당류를 생성하는 미생물 Sc의 세부동정

16S rDNA 염기서열의 결과 Sc 균주의 경우 *Klebsiella pneumoniae*와 99% 이상의 상동성을 나타내었다. 그리고 세부동정을 위해서 RNA polymerase B subunit를 코딩하는 *rpoB* 유전자를 이용하여 세부동정을 실시하였다. *rpoB* 유전자는 16S rDNA와 함께 미생물의 유전학적 진화를 비교 분석 하는데 사용되는 것으로 알려져 있다.

그 결과, *Klebsiella pneumoniae* (U77444, AF129445, AF129446)와 *K.granulomatis* (AF218573)와 각각 99% 정도의 상동성을 나타내었으며, *K.oxytoca* (AF129442), *K.planticola* (AF129449), *K.trevisanii* (AF129450), *K.ornithinolytica* (AF129447)와는 각각 94%의 상동성을 나타내었으며, *K.terrigena* (AF129448)와는 93%의 상동성을 나타내었다. 그리고 특이하게 *Citrobacter freundii* (U77434)와도 96%의 상동성을 나타내었다 (Table 2-1, 그림2-1).

Table 2-1. 분리 균주 Sc와 유사 종들과의 *rpoB*의 상동성

	Identities
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (U77444)	99%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> (AF129445)	99%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> (AF129446)	99%
<i>Klebsiella granulomatis</i> (AF218573)	99%
<i>Citrobacter freundii</i> (U77434)	96%
<i>Klebsiella oxytoca</i> (U77442)	94%
<i>Klebsiella planticola</i> (AF129449)	94%
<i>Klebsiella trevisanii</i> (AF129450)	94%
<i>Klebsiella ornithinolytica</i> (AF129447)	94%
<i>Klebsiella terrigena</i> (AF129448)	93%

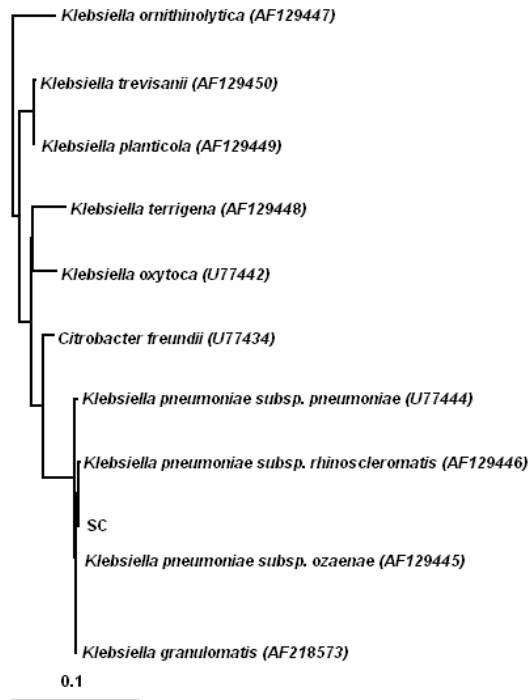


그림 2-1. 분리 균주 Sc의 *ropB* 유전자와 *Klebsiella* sp. 종들과의 유전적 연관관계 트리. outgroup으로 *Bacillus atrophaeus* 16s rDNA를 사용하였다.

2) 분리 균주 Sc로부터 CMCCase 유전자의 클로닝 및 분석

다양한 유용 당을 생산할 수 있는 효소를 생산 활성을 보이는 Sc균주로부터 CMCCase를 클로닝 하기 위해서 Sc균주의 게놈 DNA를 분리하였다. 분리된 게놈 DNA를 *Pst*I 제한효소를 이용하여서 부분 분해하였다. 이를 제한효소 *Pst*I과 CIAP 처리된 pUC118 벡터에 라이게이션 한 다음 *E. coli* JM109에 형질전환 시켰다. 이 재조합체들은 0.5% CMC가 함유된 LB고체배지에서 배양되었으며, 2일이 경과한 후, 0.5% Congo Red용액으로 염색한 후, 1M NaCl로 washing 하였을 때, 콜로니 주변에 오렌지색의 존을 나타내는 클론을 CMC를 분해하는 효소를 생산하는 재조합체로 선별하였다. 대략 2,000개의 ampicillin 저항성 콜로니들 중에서 오직 하나의 콜로니만이 오렌지색의 존을 나타내었다(그림2-2).

이 재조합체를 분석한 결과, CMCCase 유전자는 37,666 Da의 분자량을 가지는 333개의 아미노산을 암호화하는 1,002개의 뉴클레오티드로 구성되어 있었다. CMCCase는 N-말단 영역에 23개의 아미노산으로 이루어진 신호서열을 가지고 있었으며 23번째의 Ala과 24번째의 Asp 사이가 절단되는 것으로 SignalP (<http://www.csb.dtu.dk/services/SignalP/>) 사이트를 통해서 예측하였다(그림2-3). CMCCase의 아미노산 서열을 기존에 밝혀진 5종류의 박테리아 유래의 CMCCase와 상동성을 ClustalW를 이용하여 비교하였다. CMCCase는 glycoside hydrolase family 8에 속하는 것으로 나타났으며(그림2-4), *Cellomonas uda*와는 87%의 상동성을 나타내었으며

Enterobacter sp.와는 63%, *Erwinia chrysanthemi*와는 55%, *Erwinia rhapsodica*와는 각각 47%의 상동성을 나타내었다. 이러한 결과들로 미루어 보아 지금까지 밝혀진 박테리아 유래 여러 CMCase와는 상당히 다른 새로운 단백질로 밝혀졌다 (그림2-5, Table 2-2).

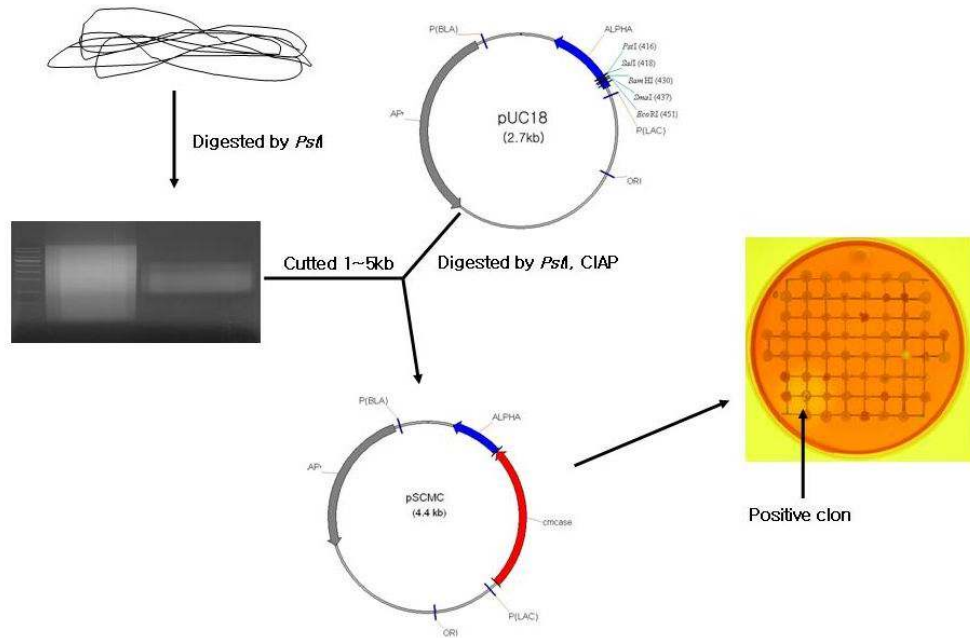


그림 2-2. 분리 균주 Sc로부터 CMCase 유전자를 가진 재조합 플라즈미드, pSCMC를 얻기 위한 Shot-gun library 구축

```

1 CTGCAGCGTGAGCGGGTGTCTCCGTCTCTGACGTTTCAGTTTCTCTACTACCATCCATAA
61 AGAGTGAATTTATGCCCTGCGTGCTTTAGTGCCGGTGATAGTGACAACGGTAGTGATGC
  M P L R A L V A V I V T T V V M 16
121 TGGTGCCCGAGGGCGTGGGCGGATACGGCCTGGGAGCGCTATAAGGCCGTTTTATGATGC
  L V P R A W A D T A W E R Y K A R F M M 36
181 CGGATGGTCGTATCATTGATACCGCAATGCCAATGTGTCGCATACGGAAGGTGAGGGCT
  P D G R I I D T A N G N V S H T E G Q G 56
241 TCGCCATGCTCCTGGCGGTGGCGAATAACGATCGTCCGGCGTTCGACAAGCTGTGGCAGT
  F A M L L A V A N N D R P A F D K L W Q 76
301 GGACGGACAACACCCTGCGCAACAAGTCTAACGGGCTGTTTTACTGGCGCTATAACCCGG
  W T D N T L R N K S N G L F Y W R Y N P 96
361 TGGGCGGACCCCTATCGCGGATAAAAAACAACGCCCTCGGATGGCGATACCCTGATCGCCT
  V A P D P I A D K N N A S D G D T L I A 116
421 GGGCGCTGCTGCGCGCGCAAAAACAGTGGCAGGATAAGCGCTATGCGATTGCCTCTGACG
  W A L L R A Q K Q W Q D K R Y A I A S D 136
481 CCATCACCGCCGCCCTGCTGAAGTCTACGGTGGTGACTTTCGCCGGTCCGCAAGGTGATGC
  A I T A A L L K S T V V T F A G R Q V M 156
541 TCCCGGGCGTGAAAGGGTTCAACCTCAATGATCACCTGAACCTTAACCCCTTCTATTTCA
  L P G V K G F N L N D H L N L N P S Y F 176
601 TCTTCCGGCGCTGGCGCGCCTTCGCGGAGCGGACGCATCTCACCGCCTGGCGGACATTGC
  I F P A W R A F A E R T H L T A W R T L 196
661 AGACGGACGGACAGGCGCTGCTGGGCGAGTGGGCTGGGGGAAATCTCATCTACCCAGCG
  Q S D G Q A L L G Q M G W G K S H L P S 216
721 ACTGGGTGGCGCTGCGGGCGGATGGCAAGATGCTGCCAGCCAAGAGTGGCCGCGCGGA
  D W V A L R A D G K M L P A K E W P P R 236
781 TGAGTTTCGATGCGATCCGATCCCGCTGTATCTCTCGTGGGCGATCCGCACAGCGCCT
  M S F D A I R I P L Y L S W A D P H S A 256
841 TGCTCGCGCCCTGGAAGGCGTGGATGCAGAGTTACCCGCGCCTGCAAACCCGCGCTGGA
  L L A P W K A W M Q S Y P R L Q T P A W 276
901 TCAACGTCAGCACCAACGAGGTGGCCCCCTGGTATATGGCCGCGCGCCTGCTGGCGGTGC
  I N V S T N E V A P W Y M A G G L L A V 296
961 GCGATCTGACGCTGGGTGAACCGCAGGAGCGCGCAGATTGACGACAAGGATGATTATT
  R D L T L G E P Q E A P Q I D D K D D Y 316
1021 ACTCTGCCAGCCTCAAGCTGTTGGTCTGGCTGGCGAAACAGGATCAGCGCTAAATACGGT
  Y S A S L K L L V W L A K Q D Q R * 333
1081 GATTGATTTGCCGCTTCCCGCCCGTATGCCTGCGGGCTGAGAAGGTGGAATGGGAACG
1141 TCTCACGATGTAAGGCCGCCAACATAGGCGGCCCTTGTGCTTATTGCGGATAAGGCACCC
1201 AGCTACGCCATTTCAGCTGGACATAAGGCTTGCCTGATACTGGATGACGATGGCGTTGG
1261 CGTTCGCGATACCGCCGCGCTCTGCGGACGTTGGCGACATACTGCTGCCAGTTGACGC
1321 TGTCTCGCTGAACATTTTCCGCTCGAGGGCGCGCACACCAGCTCCGACACCGCCAGAT
1381 AACTGCTGGGCTGATCGATGATAATCGGCGCCCTTCATGCGGCGCTTCATGCCGAAGA
1441 ATTTACCGCCGTCGGGACGTTAGTGATCGACGGGCTCGGGATATCGCGCAGGCCAGAGA
1501 CCTGCATCTTATCGCCCTTACGCGCGCCGCGTGTCCGGCACCCACCACCACCATCACTT
1561 TCCGCCCGATTCTCCAGCTCGGTGAAGAAGTTATCCAGGTCATCAAACAGCTTCTGCG
1621 CCCGCACTTGTAGTCTGCGGTTTTGCTTTGTCCCGGAAGTGTTGCCGTCATGCAGCG
1681 GCAGGGTGTATAGAAGGTGGCGTTCGCGGATTGCTGCTGGCCTCTTCGGTCTTCAGCC
1741 AGCGGTTGAGGACCGCCAGATCCTCATACACCGGGGAGCCGTCAAACGCTGCGAG

```

그림 2-3. 분리 균주 Sc의 *cmcase* 유전자와 코딩 아미노산 서열.

underline; 신호서열이 제거된 후의 단백질의 추정된 N-말단 서열, back-square; 제한효소 *Pst*I 자리

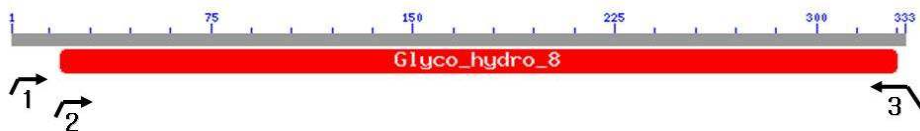


그림 2-4. 분리균주 Sc의 CMCCase의 기능적 도메인의 탐색

```

1 ----MLKPHWRGVILHLNVWFSUSATAATGVETYKSRFHTADGRIQDTGNKNUSHTEGQ
2 ----HMAMFRAGIILLALVLGLSQASAEWGTFKTRFLTSEGRIQDTGNNNUSHTEGQ
3 MLIKKTRRFVFTACULFGLLSAAUQAQDPGWQFKSRFLKPDGRIUDSCNHDISHTEGQ
4 ----MPLRALVAUIUTTAUMLUPRAWAQTAMERYKARFHMPDARIIDTANGNUSHTEGQ
5 ----MPLRALVAUIUTTUUMLUPRAWADTAMERYKARFHMPDARIIDTANGNUSHTEGQ
6 ----MRKPACAALAUHMHIFSPFSQAGQAVESYKARFLMPDGRUUDTGNGNUSHTEGQ
      . : : . * : * * : . : * : * . * : * * * * *
1 GFANLMAUHYDDRAAFDNLVNWTDHLKNTUNGLFYWRYPAAASNPUADRNNASDGDULI
2 GYANLMAUYNDRTTFDRLVAWTQTHLSNPKNDLFYWKYIPGNADPUSDKNNASDGDULI
3 CFGMLLAULNDKPTFDLSLHNWTKLTYNKDTELSWRYPENAKUKUADKNNATDGDULI
4 GFANLLAVANNDRPAFDKLVQWTDSTLRDKSNGLFYWRYPNUPADPIADKNNATDGDULI
5 GFANLLAVANNDRPAFDKLVQWTDNTRLRNKSNGLFYWRYPNUPADPIADKNNASDGDULI
6 GFANLMAVASDDKTAFDKLVHWTDSTLRKNSNGLFYWRYPNUPADPIADKNNASDGDULI
      * . * * * * * : * . : * * * * * : * * * * * : * . * * * * * : * . * * * * *
1 AVALLKAGNKWQDNRYLQASDGIQKAIISNEIIQFAGRTUHLPGAYGFHNKSYUULNPSY
2 AVALKQAGEKWDQSYLQHSDRIRAIITAHNUIITFAGRTIHLPGAQGFNKTSYUULNPSY
3 AVALLLAGDKWQNSDYITQSNKIQSAVIKHTUINFAGVHIHLPGASSFNHTSYUULNPSY
4 AVALLLAQKQWQDKRYATASDAITASLLKYTUUTFAGRQUHLPGUKGFNRNDHLNLPSPY
5 AVALLLAQKQWQDKRYATASDAITAAALKSTUUTFAGRQUHLPGUKGFNLNDHLNLPSPY
6 AVALLKADARWHDARYSQASDAITKSLUARTUIRYAGYRUHLPGAQGFHLNSEUILNPSY
      * * * * * * : * * * * * * : * * * * * * : * * * * * * : * * * * * * : * * * * * *
1 FLFPAWRDFANRSHLQVWRQLIDDSLSLIGEMRFGQTGLPTDUALHADGSHAPATAWPS
2 FLFPAWRDFARRSHLKVVNTLIDDGVALLEHFRFGDSALPLDWUANNADGSLAPATAWPP
3 YIFPAWQAFYQYSHLKIWQDLNSDAIKQLSTHKLKGVNLPTDWUAIQSDGSFTPANGWPA
4 FIFPAWRFAERTHLTAVRTLQSDGQALLGQHGWGKSHLPSDWUALRADGKMLPAKEWPP
5 FIFPAWRFAERTHLTAVRTLQSDGQALLGQHGWGKSHLPSDWUALRADGKMLPAKEWPP
6 FIFPAWQAFADRSHLQVWRELIDQGHKULGKMGGTANLPTDVMSLAAGGKLTAPANAWPP
      : * * * * * * : * * * * * * : * * * * * * : * * * * * * : * * * * * *
1 RFSYDAIRIPLYLYVYDAKTHALUPFQLYWRNYPRLATPAWUDULSNHTAPYSHQGGLLA
2 RFSYDAIRIPLYLYVYDPAQLUPFQRFVWNFQRLQTPAVIDUHSNDKAPYAHAGGLLA
3 RFSYDAIRIPLYLSVGNANKNALTPFTRYWQGFARLETPAWUNUTGATAEYSLPPGMLA
4 RNSYDAIRIPLYISWDPHSAALLAPUKAWHQSYPRLQTPAVINUSTNEVAPVNHAGGLLA
5 RNSYDAIRIPLYISWDPHSAALLAPUKAWHQSYPRLQTPAVINUSTNEVAPVNHAGGLLA
6 RNSYDAIRIPLYIHWSSPQSPSLTPVRSWFGQFSREKTPAWUNUTNEVAPVNHAGGLLA
      * : * * * * * * * : * . * . * : : * * * * * * * : . * : : * * * *
1 URDLTHGSFDGLSDQPGAEDYYSSSLRLLUALARGR-----
2 URDLTLGETGYLNDLSHDEDFYASLRLLTWLAFKDH-----
3 URDLTLGHLSQLTYTLLPEEDYYSCLRLLSWAAKQP-----
4 URDLTLGEPLEARR-LTTRMIITPPASSCSWGWNRISASAVHALQUSQPUCRAERKEQ
5 URDLTLGEPQEAQP-IDDKDDYYSASLKLULWAKQDQR-----
6 URDLTHGQASGEPD-ITAKDDYYSASLKLULWALADQ-----
      * * * * * * : * * * * * *

```

그림 2-5. 분리균주 Sc의 CMCCase와 미생물유래 다른 CMCCase들의 얼라이먼트 결과

- 1; *Erwinia chrysanthemi* (AAG49556), 2; *Erwinia rhapontici* (CAB89803)
- 4; *Yersinia mollaretii* (ZP_00826375), 4; *Cellulomonas uda* (AAA23090)
- 5; *Klebsiella* sp. Sc, 6; *Enterobacter* sp. (EAV84763)

Table 2-2. 분리균주 Sc와 다른 미생물유래 CMCCase의 상동성

	Identities
<i>Cellumonas uda</i>	87%
<i>Enterobacter sp.</i>	63%
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	55%
<i>Erwinia rhapontici</i>	54%
<i>Yersinia mollaretii</i>	47%

3) 분리 균주 Sc로부터 xylanase의 cloning 및 분석
 분리 균주 Sc로부터 xylanase 유전자를 얻기 위해서 Fosmid library kit를 이용해서

genome library를 구축하였다. genome library 구축 과정은 그림2-6에 그림으로 묘사하였다. 그 결과, 대략 5,000개의 재조합 균체를 획득하였다. 이들을 0.5% xylan이 함유된 LB 고체배지에서 2일간 배양하였다. 이후 2% KI와 0.2% I가 함유된 용액을 부어서 콜로니 주변에 clear zone이 형성되는 것을 positive clone으로 선별하였다. 이를 p1301이라고 명명하였다. 이 재조합체는 대략 40kb 정도의 큰 insert 단편을 가지고 있었다. 이 단편을 다시 *Bam*HI과 *Sa*II과 같은 제한효소들로 단계별로 절단하여서 그 사이즈 단편을 줄이며 활성을 가진 유전자를 찾아갔다. 최종적으로 대략 2.5 kb의 insert 단편을 가지는 positive 재조합체를 선별하였다. 이를 pSCXYN 이라고 명명하였다. 이 재조합체를 분석한 결과, 63kDa의 분자량을 가지는 559개의 아미노산을 코딩하는 1,680개의 염기서열로 xylanase가 존재한다는 것을 밝혀내었다. 신호 서열 같은 경우는 분리 균주 Sc의 xylanase에는 존재하지 않는 것으로 분석되었다(그림2-7). 그리고 xylanase은 glycosyl hydrolase family 43 혹은 xynB의 기능적 도메인으로 구성되어 있는 것으로 분석되어졌다(그림2-8).

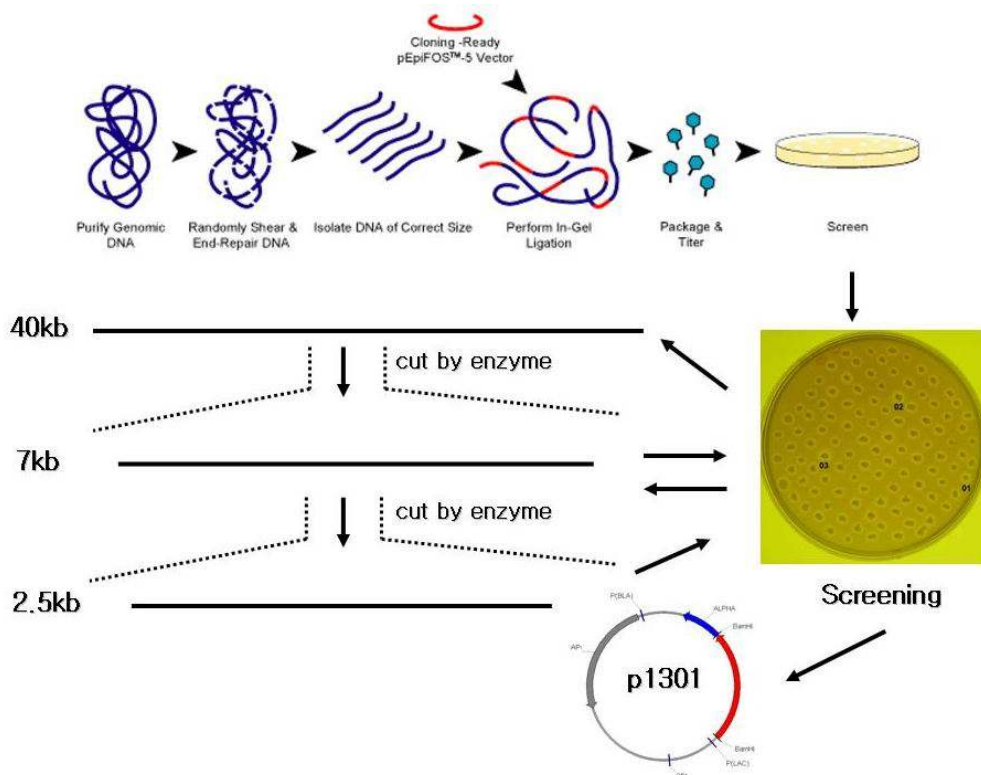


그림 2-6. Fosmid library kit를 이용한 분리 균주의 genome library 구축 모식도

GCTGGATGAGATCCGCGTGTAGTTAAAAAATTATAAATCAGACCGATCCT
TAACTTTCCATTTTAAAAGGTGTAATGAAATGTCACTTATTCAAACCCGA
M S L I Q N P I
TATTACGGGCTTTAATGCCGACCCAGTATTATTCGCGTGCAGGATACGT
L R G F N A D P S I I R V E D T Y
ACTATATTGCCAACTCGACGTTTGAGTGGTCCCGGGCGTGC GTTTACATG
Y I A N S T F E W F P G V R L H E
AGTCCAAAAGACCTGAAAACTGGAACCTGCTGCCTTCGCGCTCTCCACCA
S K D L K N W N L L P S P L S T T
CCACCTGCTGGATATGAAGGGCAACCCCTCCTCCGGCGGCATTTGGGCGC
T L L D M K G N P S S G G I W A P
CGGCGCTCTCCTGGGCCGACGGGCAATTCTGGTTGGTGTATACCGATGTGA
A L S W A D G Q F W L V Y T D V K
AGGTCACCGAAGGGCGCTTCAAAGACATGACCAACTATCTGACCACCGCAA
V T E G A F K D M T N Y L T T A K
AGGATATTCGGGGCCGTGGAGCGACCCGATCAAGCTGAACGGCGTCGGGT
D I R G P W S D P I K L N G V G F
TTGACGCTCGCTGTTCCATGACGACGATGGCCGAAATATATCGTCCAGC
D A S L F H D D D G R K Y I V Q Q
AAACCTGGGATCACCGGGAGTACCATCACCCCTTCGATGGCATTACCTTAA
T W D H R E Y H H P F D G I T L T
CGGAGCTGGATACCAACACGCTGAAGTTAATGCCGAAACCGCGCGCACCA
E L D T N T L K L M P E T A R T I
TCTACCGCGGCACCGCGTGGCGCTGGTCGAGGGGCCGCACCTCTATAAAC
Y R G T A V A L V E G P H L Y K L
TGAACGGCTACTACTATCTGTTTGCCGCCAGGGCGGCACCGTGTTTACCC
N G Y Y Y L F A A Q G G T V F T H
ACCAGGAGGTGGTGGCGGGTCGAAAACCCCTCGAGCCGACAGCTTCGAAA
Q E V V A R S K T L E A D S F E T
CCGAGCCGGTGACGTGTTCTTAACCAACGTCGACACGCCGGACAGCTACA
E P G D V F L T N V D T P D S Y I
TCCAGAAACAGGGCCATGGCGCGCTGGTCTCCACCCCGAAGGCGAATGGT
Q K Q G H G A L V S T P E G E W Y
ATTACGCTCGCTCTGCGCCCGCCATGGAATCGCCGGGGGAATCCATCT
Y A S L C A R P W N R P G E S I Y


```

ACGACCCGCGGGCTGGTCAACCCTCGGCCGGGAAACCGCGATCCAGAAAG
  D P R G W S T L G R E T A I Q K V
TGTA CTGGGACGACGAAGGCTGGCCGCGTATTGAAGGCGGTACGGCGGGA
  Y W D D E G W P R I E G G H G G K
AAACCTTTGTGCAAGGGCCGAAAGACGCCATCTTCACCGAAAGCGCCAGCG
  T F V E G P K D A I F T E S A S D
ATAATAGCCAGCAGGATGACTTTACCTCGCCAGCGCTCGACCCGAACTGGA
  N S Q Q D D F T S P A L D P N W N
ATACCCTGCGGGTCCGTTTACGGCCAAAATGGGCACCACCGGCAACGGCA
  T L R V P F T A K M G T T G N G K
AATTAACCTTAATCGGCCAGGGTTCGTTAGCCAATACGCATGACCTGTCGC
  L T L I G Q G S L A N T H D L S L
TGATTGCCCGCCGCTGGCAGGCCCTTCTATTTTGACGCCGCGGTGAAGGTGA
  I A R R W Q A F Y F D A A V K V K
AATTCGAACCCCTCAGCTACCAGCAGATGGCCGGGTTAACGAATTACTATA
  F E P F S Y Q Q M A G L T N Y Y N
ACGACCGCCACTGGAGCTTCGTCTTCTGACCTGGAATGAAATTAACGGCA
  D R H W S F V F L T W N E I N G K
AGGTCATCGAAGTCGGCGAAAATAACCGCGGAAATACACGTCGTACCTGA
  V I E V G E N N R G K Y T S Y L K
AAGATAACGCCATCAAGGTGCCGGACGGCGTCAATACGTCTGGTTCCGGA
  D N A I K V P D G V E Y V W F R T
CCAAGGTCCGCAAGCAGACCTACAGCTATGAATACAGCTTCGATGGCGTGA
  K V R K Q T Y S Y E Y S F D G V T
CCTTCACCGAGATCCCGGTTACAGCTGGATGCCGCGGTACTGTCCGATGACT
  F T E I P V Q L D A A V L S D D Y
ATGTGTTGCAGAGCTACGGCGGGTCTTTACCGGGCGTTCGTTCGGCCTGG
  V L Q S Y G G F F T G A F V G L A
CGGCGGTAGACTACGCCGGTACGGCACCCAGGCTGAGTTTTATCAGTTCCG
  A V D Y A G Y G T Q A E F Y Q F E
AGTATCAGGAGCTGGGCGATAGGTTAGCGCCGATGGCAGCTACAGCTGGG
  Y Q E L G D R L A A D G S Y S W E
AGGCTGGCGAGACCGGGATAAGTAAGAGAGGGCGGGCCACGCTACCGGT
  A G E T R D K *
GAGGTAGCGTGGGGTTTTGTGCTGTGTGTGATGTAATTAAGCGAGTGCTG
TCGGATGTCAGTCTGCGGGGCGCAGCCGGCCTTCAGCTCTTCGGGAGTAA

```

그림 2-7. 분리 균주 Sc의 xylanase 유전자와 코딩 아미노산 서열

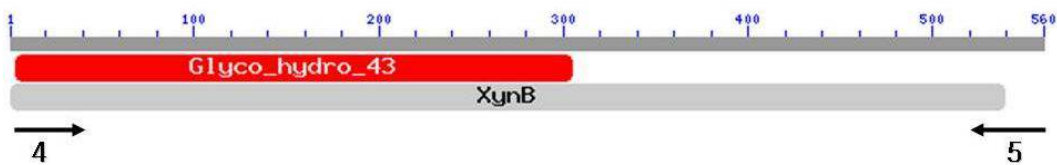


그림 2-8. 분리균주 Sc의 xylanase의 기능적 도메인의 탐색

4) GST fusion 정제 시스템을 이용한 CMCase 및 xylanase의 정제

분리 균주 Sc의 CMCase와 xylanase를 GST과 His tag를 이용한 affinity 크로마토 그래피를 통해서 정제하였다. 이를 위해서 pGEX-6P-1와 pET32-a 벡터를 이용하였다. 벡터 pGEX-6P-1는 GST (Glutathione-S-transferase)와 같은 affinity 크로마토 그래피용 tag를 가지고 있으면 pET32-a는 His tag를 가지고 있다. CMCase와 xylanase를 코딩하는 유전자를 각각 pGEX-6P-1과 pET32-a에 재조합하였다. Host cell은 BL21(DE3)와 BL21(trxB)를 사용하였는데, BL21(DE3)는 일반적인 정제를 위한 host cell로 많이 이용되어지는 균주이고, BL21(trxB)는 pET32-a 벡터와 함께 사용하여 대장균의 세포질 속에서 이황화 결합(S-S bond)의 형성을 유도해 주는 thioredoxin reductase를 생산하여 insoluble 형태로 생산되는 단백질의 soluble 형태로의 전환을 도와주는 것으로 알려진다.

재조합 플라스미드를 만드는데 있어서 CMCase의 경우, 유전자의 염기서열 속에 신호서열이 존재하였으므로 하나의 플라스미드에는 신호서열이 존재하는 것으로 디자인 하였으며 다른 하나의 플라스미드에는 신호서열을 제거하는 것으로 디자인 하였다. Xylanase의 경우, 유전자의 염기서열 속에 신호서열이 존재하지 않아 전체서열을 이용하여 재조합 플라스미드를 디자인하였다(Table2-3).

Host cell은 pGEX-6P-1의 경우, BL21(DE3)와 BL21(trxB) 두 종류의 host cell에 모두 형질전환 시켰지만, pET32-a의 경우에는 BL21(trxB)의 균주에만 형질전환 시켰다.

이러한 재조합 균주들은 IPTG에 의해 단백질의 대량 발현이 유도되었으며, GSTrap FF 컬럼과 PreScission protease를 사용하여 CMCase와 xylanase를 정제하였다(그림2-9,10). 대량 발현된 단백질들은 SDS-PAGE를 통해서 발현의 유무를 확인한 뒤, 고체배지위에서 활성의 유무를 확인하였다(그림2-11). 확인 결과, 모든 재조합 단백질들이 활성을 가지는 것으로 밝혀졌다(Table 2-4). 이 단백질들을 이용해서 앞으로 여러 가지 효소의 특성 실험을 수행할 계획이다.

정제된 CMCase와 xylanase의 기질 특이성을 조사한 결과, CMCase의 경우 CMC를 분해하는 활성을 100%로 보았을 때, lichenan에 대해서는 70%, laminarin에 대해서는 60%의 활성을 가지는 것으로 보였으며 xylan에 대해서는 10%, soluble starch는 분해하지 못하는 것으로 관찰되었다(Table2-5). Xylanase의 경우, xylan을 분해하는 활성을 100%로 보았을 때, laminarin에 대해서는 30%, lichenan에 대해서는 20%, CMC에 대해서는 10% 정도의 활성을 가지며 soluble starch에 대해서는 분해활성을 가지지 못하는 것으로 관찰 되었다(Table2-6).

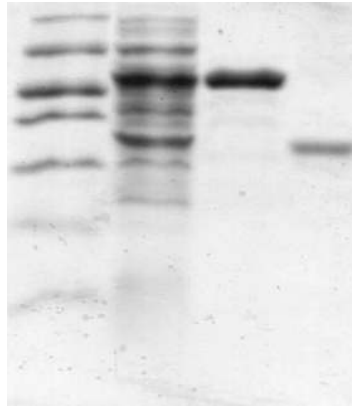


그림 2-9. GST fusion 정제 시스템을 이용한 CMCase의 정제

Table 2-3. 재조합 플라스미드 구축을 위한 프라이머들의 이름 및 염기 서열

번호	primer names	sequences
1	SC-CMC-Fus-F+ SP	5'-ATAAAGAGT <u>GAATTC</u> ATGCCCCTGCGT-3'
2	SC-CMC-Fus-F-SP	5'-AGGGCG <u>GAATTC</u> GATACGGCCGG-3'
3	SC-CMC-Fus-R	5'-TATCAGG <u>CTCGAG</u> CCTTATGTCCAGCT-3'
4	SC-Xyn-Fus-F	5'-AGGTGTAAT <u>GAATTC</u> ATGTCACCTTATTC-3'
5	SC-Xyn-Fus-R	5'-CCT <u>CTCGAG</u> TACTTATCCCGCGTCTC-3'

Table 2-4. 본 연구에 사용되어진 각 재조합체들의 특성

names	plasmid	gene	host
pGESCMC/BL21(DE3)	pGEX-6P-1	CMCase-SP	BL21(DE3)
pGESCMC+ SP/BL21(DE3)	pGEX-6P-1	CMCase+ SP	BL21(DE3)
pGESCXYN/BL21(DE3)	pGEX-6P-1	xylanase	BL21(DE3)
pETSCMC-SP/BL21(trxB)	pET32-a	CMCase-SP	BL21(trxB)
pETSCMC+ SP/BL21(trxB)	pET32-a	CMCase+ SP	BL21(trxB)
pGESCMC/BL21(trxB)	pGEX-6P-1	CMCase-SP	BL21(trxB)
pGESCMC+ SP/BL21(trxB)	pGEX-6P-1	CMCase+ SP	BL21(trxB)
pGESCXYN/BL21(trxB)	pGEX-6P-1	xylanase	BL21(trxB)

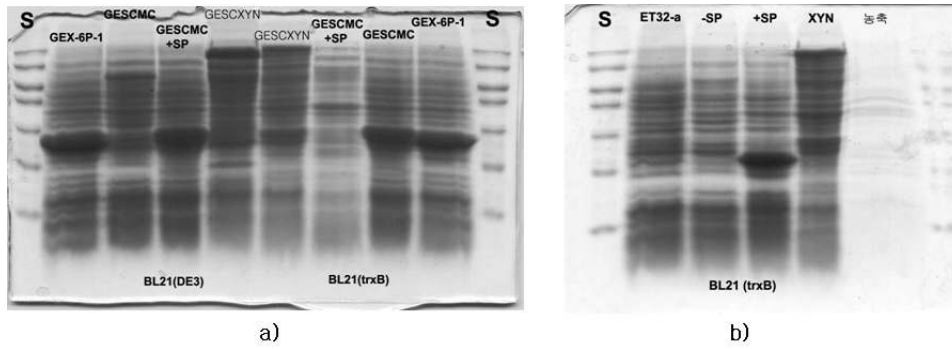


그림 2-10. SDS-PAGE를 통한 여러 재조합 단백질들의 발현 확인

a); pGEX-6P-1을 사용한 재조합체들, b) pET32-a를 사용한 재조합체들

S; protein standard marker,

GEX-6P-1; pGEX-6P-1

GESCMC; pGESCMC,

GESCMC+SP; pGESCMC+SP

GESCXYN; pGESCXYN,

ET32-a; pET32-a

-SP; pETSCMC

+SP; pETSCMC+SP

XYN; pETSCXYN

농축; *Klebsiella* sp. Sc의 배양상등액 농축

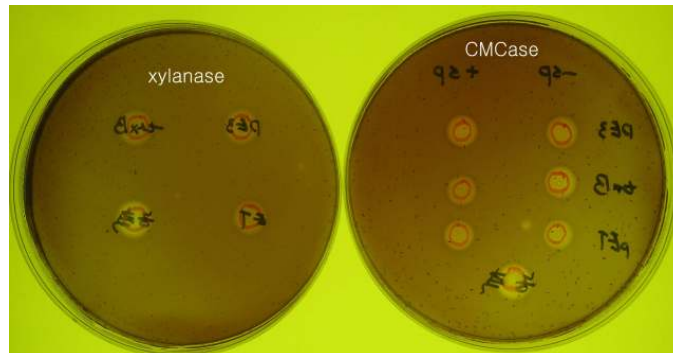


그림 2-11. 각각의 기질이 함유된 고체배지에서 발현 단백질의 활성 유무 확인

Table 2-5. 정제된 CMCase의 다양한 기질 특이성

Substrate	relative activity (%)
CMC	100
xylan	20
soluble starch	ND
lichenan	70
laminarin	60

Table 2-6. 정제된 xylanase의 다양한 기질 특이성

Substrate	relative activity (%)
CMC	10
xylan	100
soluble starch	ND
lichenan	20
laminarin	30

제4절 *Paenibacillus illinoisens* ZY-08로부터 Cyclodextrin Glucanotransferase (CGTase) 유전자의 클로닝, 정제 및 특성

1. 연구수행 방법

1) Fosmid library kit를 이용한 게놈라이브러리의 구축

Fosmid library 구축은 Epicentre사에서 판매되는 EpiFos™ Fosmid Library Production Kit를 이용하여 구축하였다. Fosmid library 구축을 위해서 분리 균주로부터 분리한 게놈 DNA(2.5ug)를 200여회의 피펫팅을 통해서 대략 40kb 정도의 단편으로 절단하였다. 이렇게 절단한 단편을 End-repair 효소를 이용하여 각 단편의 말단을 blunt end화 하였다. 이후 Et-Br이 함유되지 않은 1% low melting agarose 겔에 전기 영동하여 대략 40kb 부근의 DNA 단편을 회수하였다. 이 회수 단편을 pEpiFOS-5 벡터와 몰 비율이 10:1이 되게 섞어서 라이게이션 하였다. 이를 MaxPlax Lambda Packaging Extracts를 이용하여 packaging 하여 *E.coli* EPI100-T1에 형질도입 하였다(그림3-1).

2) CGTase 유전자의 subcloning과 screening

게놈 라이브러리를 starch와 chloramphenicol이 함유된 고체 LB배지에 도말하였다. 배양 2일 후, 고체 배지위에 phenolphthalein 용액으로 염색해서 분홍색 백그라운드 에 콜로니 주변으로 클리어 존이 형성되는 콜로니를 CGTase를 생산하는 재조합 균주로 선별하였다. 선별된 클론의 플라스미드 DNA를 분리하여 제한효소 *Sau3AI*을 이용하여 부분 절단 하여 대략 1-4 kb 정도의 분리하여 pUC118 /BamHI/BAP 벡터에 삽입하였다. Subclon들을 다시 starch와 ampicillin이 함유된 고체 LB 배지 위에 도말하여 상기의 방법으로 활성 체크를 하여 투명환을 나타내는 콜로니를 재차 선별하여 유전자 서열을 밝혔다. 유전자 서열들은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST (N) 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 상동성 조사는 MacVector 6.5 소프트웨어의 CLUSTAL W 프로그램을 이용하여 수행하였다. 유전자 서열에 존재하는 프로모터 영역은 프로모터 예언 프로그램인 NNPP 버전2.2 (<http://www.fruitgly.org/cgi-bin/seqtools/promoter.html>)를 이용하여 분석하였다.

3) Affinity chromatography를 이용한 정제를 위한 재조합 플라스미드의 구축

His-tag 융합 단백질을 구축하기 위하여 바이오니아사에서 합성한 프라이머들을 사용하였다. 5'-GCTTCCGCGATTGAGCTCGATGCGGATACGGCT-3' 와 5'-AT

GAATTATAAGCTTTTATTGCCAGTTTAC-3', 이 프라이머들은 His tag 융합 단백질의 벡터인 pCold I에 쉽게 클로닝하기 위해서 프라이머 내부에 제한효소 *SacI*과 *HindIII*의 자리를 삽입하였다. PCR 반응액 50ul 속에는 100pmol의 프라이머, 200ng의 주형 DNA, 20mM의 각각의 dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)와 1.0U의 Taq DNA Polymerase를 함유하였다. 증폭 과정은 다음 단계를 30회 반복하였다: pre-denaturation 95°C에서 60초를 실시한 후, denaturation 95°C에서 60초, annealing 55°C에서 60초, extension 72°C에서 90초를 30회 반복하였으며, 이후 마지막 extension 반응으로 72°C에서 10분간 실시하였다. 증폭된 DNA 단편은 제한효소 *SacI*과 *HindIII*으로 처리한 후, *SacI*과 *HindIII* 처리를 하고 5'-인산기가 제거된 pCold I 벡터에 클로닝 하였다.

4) 재조합 단백질 CGTase의 정제

His-CGTase fusion 플라스미드를 가진 *E.coli* BL21 (DE3)는 37°C에서 지수 성장기의 초기 단계인 OD 0.4-0.5정도 까지 배양하였다. 이 배양액을 15°C에서 30분 방치한 다음, 최종 0.1mM의 IPTG를 첨가하여 과발현 유도하였으며, 이후 15°C에서 O/N 더 배양하였다. 세포는 4°C, 6,000rpm에서 15분간 원심분리를 통해서 집균 하였으며, binding buffer (20mM sodium phosphate buffer [pH 7.4], 0.5M NaCl, 5mM imidazole)를 이용하여 Washing하였으며, binding buffer를 이용하여 재현탁 하였다. 세포는 sonication을 통하여 파쇄 하였으며, 그 상등액은 4°C, 13,000 rpm에서 30 분간 원심 분리하여 수집하였다. 상등액은 binding buffer로 평형화 되어있는 HisTrap HP column에 통과 시킨 후, elution buffer(20mM sodium phosphate buffer [pH 7.4], 0.5M NaCl, 0.5M imidazole)을 이용해서 용출하였다. 용출 속도는 분당 1ml의 속도를 유지 하였다. 용출된 fraction은 Amicon Ultra-4를 이용하여 농축하였으며 이를 효소 특성 연구에 사용하였다.

5) enzyme assay

(1) alpha-cyclodextrin

Alpha-cyclodextrin은 Lejeune의 방법을 변형하여 수행하였다. 반응액은 1% soluble starch 50ul, 20mM sodium phosphate (pH 7.4) 100 ul와 정제된 enzyme (대략 1ug)을 첨가하여 최종 250ul가 되게 만들었으며 이를 40°C에서 30분 동안 반응 시켰다. 효소 반응은 0.1ml의 1.2M HCl을 첨가함으로써 전체 효소 반응을 정지시켰다. 반응액에 존재하는 cyclodextrin은 methyl orange solution을 0.75ml 첨가하여 15°C에서 30분간 반응 후 507nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성 1U는 분당 1umol의 α -cyclodextrin을 생산하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

(2) beta-cyclodextrin

에탄올에 녹인 4mM Phenolphthalein (PHP) stock 용액, 125mM Na₂CO₃ 용액, 20mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), β-cyclodextrin 용액 (500 ug/ml)을 조제하였다. working PHP 용액은 stock 용액 1ml과 4ml의 에탄올을 125mM Na₂CO₃ 용액 100ml에 섞어서 만들었다. 반응액은 1% soluble starch 50ul, 20mM sodium phosphate (pH 7.4) 100 ul와 정제된 enzyme (대략 1ug)을 첨가하여 최종 250ul가 되게 만들었으며 이를 40°C에서 30분 동안 반응 시켰다. 반응액에 존재하는 cyclodextrin은 working PHP solution을 0.75ml 첨가하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성 1U는 분당 1umol의 β-cyclodextrin을 생산하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

(3) gamma-cyclodextrin

Gamma-cyclodextrin은 bromocresol green (BCG)를 이용한 Kato와 Horikoshi의 방법을 변형하여 수행하였다. 반응액은 1% soluble starch 50ul, 20mM sodium phosphate (pH 7.4) 100 ul와 정제된 enzyme (대략 1ug)을 첨가하여 최종 250ul가 되게 만들었으며 이를 40°C에서 30분 동안 반응 시켰다. 반응 후, 에탄올에 녹인 5mM BCG 50ul를 반응액에 첨가하여 실온에서 BCG와 γ-cyclodextrin 복합체 형성이 용이하도록 20분가량 반응시켰다. 반응액에 존재하는 cyclodextrin은 630nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성 1U는 분당 1umol의 γ-cyclodextrin을 생산하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

6) CGTase 활성의 pH와 온도의 영향

최적 온도는 20-80°C의 다양한 온도에서 glucomannan을 기질로 제공하여 수행하였다. 버퍼는 20mM sodium phosphate (pH 7.4)를 이용 하였다. 온도 안정성은 각각의 온도에서 효소를 30분 동안 pre-incubation 한 후, 기질을 첨가하여 40°C에서 30분 동안 반응 시켜 효소 활성을 측정하였다. 최적 pH는 다양한 범위의 buffer를 이용하여 수행하였다. 20mM citrate buffer (pH 3-6), 20mM sodium phosphate (pH 6-8), 20mM Tris-HCl (pH 8-9)와 glycine-NaOH (pH 9-11)를 이용하였다. pH 안정성은 4°C에서 각각의 버퍼와 효소를 12시간 동안 pre-incubation 한 뒤, 기질을 첨가하고 40°C에서 30분 동안 반응 시켜 효소 활성을 측정하였다.

7) Nucleotide sequence accession number

이 보고서에 기재된 *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08의 CGTase는 GenBank에 FJ232954로 등록 하였다.

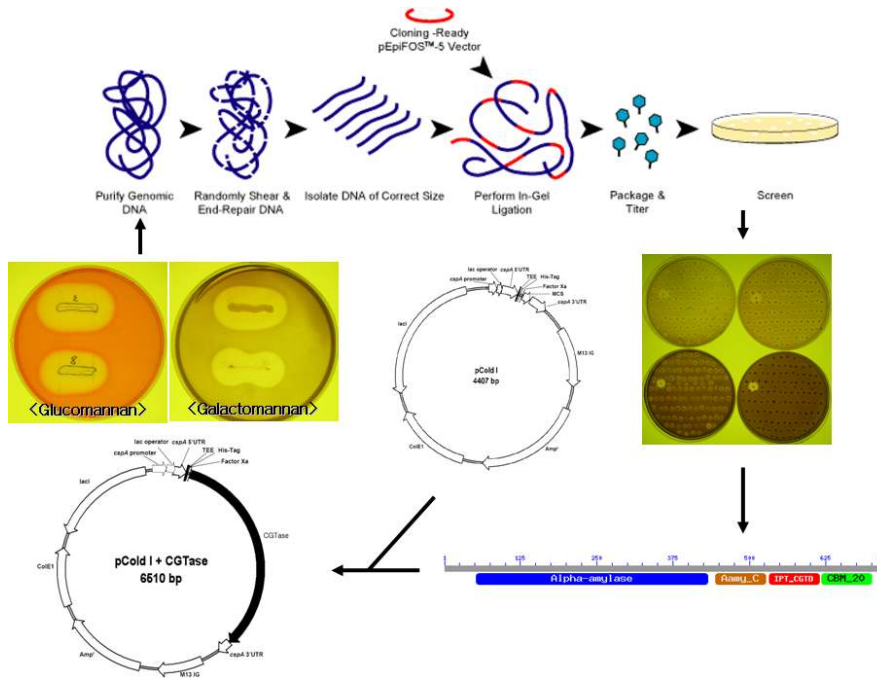


그림 3-1. *P. illinoisensis* ZY-08로부터 CGTase 유전자 탐색을 위한 genome library 구축 모식도

2. 연구 수행 결과

1) *P. illinoisensis* ZY-08 균주의 CGTase 유전자의 클로닝

Fosmid Library Production Kit (Epicentre)를 이용하여 *P. illinoisensis* ZY-08균주의 게놈 라이브러리를 구축하였다. 많은 수의 재조합체 중에서 soluble starch를 기질로 가진 LB-chloramphenicol 고체 배지에서 분해 활성을 가지는 클론을 선별하였다. 선별 클론의 플라스미드 DNA의 사이즈가 너무 크기 때문에 재차 *Sau3AI* 제한효소를 부분절단 후, pUC118/*Bam*HI/BAP 이용하여 라이브러리를 구축하였다. 재차 soluble starch를 기질로 가진 LB-ampicillin 고체 배지에서 분해 활성을 가지는 클론을 선별하였다.

ZY-08 균주의 CGTase 유전자를 분석한 결과, 2개의 ATG 개시 코돈을 가지는 한 개의 open reading frame이 존재하였다. 첫 번째 ATG를 진정한 개시 코돈으로 여긴다면 전체 718개의 아미노산을 암호화하고 있는 2,157개의 ORF로 밝혀졌다. 개시 코돈의 7 bp 앞쪽에서 전형적인 ribosome binding site (5'-GAAGGGTGA-3')를 확인 할 수 있었으며, 대략 60-115 bp의 상류 영역에 -10영역 (5'-TATT ATT-3')과 -35영역 (5'-AAGTCT-3')을 확인 할 수 있었다. N-터미널 영역은 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 사이트를 통해서 예측하였다. 분석한 결과, 시그널 펩타이드의 절단 부위는 Ala-34과 Asp-35번 사이인 것으로 나타났다. 그래서 최종 단백질은 분자량 74 kDa를 가진 684개의 아미노산으로 구성된 단백질인 것으로 밝혀졌다(그림3-2).

```

GATCATAACTCGAGGGCCATGCTTTTAAACCCAAGCGGTTTAGGACAACCCCGGTAACCCCGAGGAGATACCGGGGTTGTTGCGGTGC 90
Sau3AI
GAAGGAGGGAAGTCTTTAAGCCACGGGATGTCTCCTCGTACAATTGTAAGCGGTATTATTCAAGAGCCAGGTTAGTTGTTTTGTTGAAA 180
      -35                               -10
ACTACTACATTGATGAAGGGTGGATTACCATGTTTCAAATGGCCAAACGCGTTCTCCTCAGTACCACGCTAACGTTTACGCTTCTTGCCG 270
      SD           M F Q M A K R V L L S T T L T F S L L A
GCAGTGCATTGCCTTTCTGCTGCTTCCGCGATTTATGCCGATGCGGATACGGCTGTCACCAACAAGCAAAATTCAGTACCGATGTCA 360
G S A L P F L P A S A I Y A D A D T A V T N K Q N F S T D Y
      ↑
TCTATCAAGTTTTACGGACCGGTTTCTGGATGGTAACCCATCCAACAACCCCTACCGGAGCTGCCTTTGACGGCACATGCAGCAACCTGA 450
I Y Q V F T D R F L D G N P S N N P T G A A F D G T C S N L
      Ca2+ binding domain
AACTGTACTGCGGGCGGCGACTGGCAGGGGCTGATTAACAAAATCAATGACAACATTTTCACTGACCTGGGTGTCACTGCCCTCTGGATCT 540
K L Y C G G D W Q G L I N K I N D N Y F S D L G V T A L W I
CCCAGCGTGTGAAAATATTTTCGCTACCATCAACTACAGCGGTGTAACCAACACGGCTTATCACGGCTATTGGGCACGGGATTTCAAGA 630
S Q P V E N I F A T I N Y S G V T N T A Y H G Y W A R D F K
AGACCAATCCATATTTCCGGAACCATGACCGATTTTCCAGAACTCGGTGACCACCGCCATGCCAAAGGCATCAAATCATTATTGATTTCCG 720
K T N P Y F G T M T D F Q N L V T T A H A K G I K I I I D F
      Region I / Domain A1
CGCCAAACCATACGTCGCCCTGCCATGGAAACCGATACCTCCTTCGCTGAGAACGGCAAACCTGTACGACAACGGCAGCCTGGTTGGCGGGT 810
A P N H T S P A M E T D T S F A E N G K L Y D N G S L V G G
      ←→ Domain B
ACACCAATGATACGAACGGGATATTTCCACCACAATGGCGGCTCCGATTTCTCCACGCTTGAGAATGGCATTACAAAAACCTCTACGATC 900
Y T N D T N G Y F H H N G G S D F S T L E N G I Y K N L Y D
TGGCCGATCTGAATACAATAACAGCAGCATCGATACATATTTCAAAGACGCCATCAAGCTGTGGCTGGATATGGGCGTGGACGGCATCC 990
L A D L N H N N S T I D T Y F K D A I K L W L D M G V D G I
      Domain B ←→ Domain A2
GTGTAGATGCGGTCAAGCACATGCCTCAGGGCTGGCAGAAAACTGGATGTCATCCATCTATGCACACAAGCCGGTATTACCTTCGGTG 1080
R V D A V K H M P Q G W Q K N W M S S I Y A H K P V F T F G
      Region II
AATGGTTCTGGGGTCCGGTGCATCCGATGCAGATAACACGGATTTTGCCAATGAATCCGGCATGAGCCTACTTGATTTCCGTTTCAATT 1170
E W F L G S A A S D A D N T D F A N E S G M S L L D F R F N
      Region III
CGGCTGTGCGCAACGTGTTCCGGGATAACACCTCCAACATGTACGCGCTGGATTCCATGCTTACGGCTACAGCAGCAGATTACAATCAAG 1260
S A V R N V F R D N T S N M Y A L D S M L T A T A A D Y N Q
TGAATACCAAGTCACTTTCATTGACAACCATGATATGGACCGCTTCAAACAAGTGCGGTGAACAACCGCCGCTGGAACAGGCTCTGG 1350
V N D Q V T F I D N H D M D R F K T S A V N N R R L E Q A L
      Region IV

```

그림 3-2. *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08의 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) 유전자의 염기서열과 아미노산 서열

프로모터 영역에서 예상되는 -35와 -10서열과 ribosome-binding site (SD)는 두 줄로 표시하였으며, 신호서열은 화살표로 표시하였다. CGTase의 A-E도메인의 시작과 종결 지점을 표시하였다.

```

CCTTCACGCTGACCTACGCGGTGTACCTGCCATCTATTATGGTACCGAGCAGTATCTGACCGGGAACGGTGATCCGGATAACCGGGCA 1440
A F T L T S R G V P A I Y Y G T E Q Y L T G N G D P D N R G 410
AAATGCCTTCTCTCAAATCGACCACAGCGTTCAACGTGATCAGCAAGCTGGCACCTCTGCGCAAATCCAACCGCGGATTCGCTACG 1530
K M P S F S K S T T A F N V I S K L A P L R K S N P A I A Y 440
Domain A2 ←
GTTCCACACAGCAGCGCTGGATCAACAATGATGATATATCTATGAGCGCAAGTTTGGCAAAGCGTTGCCGTGTTGCCGTTAACCGCA 1620
G S T Q Q R W I N N D V Y I Y E R K F G K S V A V V A V N R 470
↳ Domain C
ATCTTACGACGCCAACCGATTACGAACCTGAATACGTGCTCCATCAGGAACATACACCGATGTGCTGGGCGGCGTGTGTAACGGAA 1710
N L T T P T S I T N L N T S L P S G T Y T D V L G G V L N G 500
ACAACATCAGCTCCAGTGGAGGCAATATTTCTTCTCAGCTCGCAGCAGGAGCTACCGCTGTGTGGCAGTATACGGCAAGTAAACGA 1800
N N I T S S G G N I S S F T L A A G A T A V W Q Y T A S E T 530
Domain C ← Domain D
CGCCAACCATCGGTACGTTGGCCCTGTAATGGGTAAACCAGGTAACGTCGTTACCATCGACGGACCGGGTTCCGGCTCTGCCAAAGGTA 1890
T P T I G H V G P V M G K P G N V V T I D G R G F G S A K G 560
CCGTCTACTTCGGTACAACAGCGTTACGGGCTCAGCCATCACTTCATGGGAAGACACTCAGATCAAAGTACCATTCCACCCGTAGCAG 1980
T V Y F G T T A V T G S A I T S W E D T Q I K V T I P P V A 590
GGGTGACTATGCAGTGAAGTAGTCCCAATGGTGTAAATAGCAATGCCTATAACGATTTTACCATCCTAAGCGGGATCAGGTCTCGG 2070
G G D Y A V K V A A N G V N S N A Y N D F T I L S G D Q V S 620
Domain D ← Domain E
TTCGGTTCGTCATCAATAATGCCACAACCTGCGCTGGGTGAAACATCTACCTGACGGGCAACGTGTCGGAACCTGGGAACTGGACCACAG 2160
V R F V I N N A T T A L G E N I Y L T G N V S E L G N W T T 650
GTGCGGTTCCATTGGACAGCTTTCAATCAGGTCAACCGCTACCGACTTGGTATTATGACGTAAGTGTTCAGCGGGGAAACAGC 2250
G A A S I G P A F N Q V I H A Y P T W Y Y D V S V P A G K Q 680
TGGAAATCAAGTTCTCAAGAAGAATGGCGCTACCATTACGTGGGAAGTGGATCCAATCACACCTTTACAACACCGACCGGACTG 2340
L E F K F F K K N G A T I T W E G G S N H T F T T P T S G T 710
CCACAGTAACGGTAACTGGCAATAACTAGCCATAATTCAATAGGAAGCCCGGAGCAGCGCTTATGCAGCATAACGCTCCGGGTTTGAC 2430
A T V T V N W Q * 718
GTTTCATCTGTTTCTGGTTCATCGGTAAGTTCGAATGGACTTCAATGTGGTCGCGGCAAGGATTCCGGTTGCGAGCAGCAGCGTGCCGA 2520
GTCCCTCCAGCACCGCCGCTGCCCCACTGATCAGCCATCAGCAGACAACGTCAATCCAGGATAGGCGCGTGTGTAATTGTAC 2610
CGACAACACCATAGATTCTCCCTGCAGCTCATCGGGTACTGCTGTTCTTAGCATGATCTGGGTGAGCATCGTGCAGCAGGCAACATCG 2700
CTCCCCGCCACGATGAGCGGAAGTGCCATCATGGCGGAAGTACCAGGACAGGAGAATATAGAGCGGCCCCAGAACACGACAGCCGA 2790
TGAATACCATCGCCCTCTCGCTTCACTGTTCCCGATGCGATCAACACTCCCGATCCAAGCATATAACCAAGCGGAATACACGTTT 2880
CAATCAATCCAACTGTACGGGCTGCTGCCATACCTTGACTGCCATCACCTGAACACGATCATGGCTGACATAAAAAATAAATCA 2970
CGAGTGGATTAAGCAATAACAATCGACCGAATTAGTGGACTGCGATAGATATAGGAGAATGATC 3033
Sau3AI

```

그림 3-2. (continued)

2) ZY-08 균주의 CGTase와 기존의 다른 CGTase들과의 비교

P. illinoisensis ZY-08 균주의 CGTase 아미노산 서열을 세균 유래의 다른 CGTase들과 BLAST 프로그램을 이용해서 비교 분석하였다(Table3-1, 그림 3-3,4,5). 다음과 같은 identity와 similarity를 나타내었다. *Bacillus licheniformis* (BACLI, 99%, 99%), *B. circulans* 18 (BACCI2, 91%, 96%), *Bacillus* sp. 6.6.3 (BACSS, 91%, 95%), alkalophilic *Bacillus* sp. 17.1 (BAC11, 73%, 85%), *B. circulans* 251 (BACCI1, 73%, 83%), *Bacillus* sp. 1018 (BACS8, 73%, 83%), alkalophilic *Bacillus* sp. 1.011 (BACS0, 72%, 84%) alkalophilic *Bacillus* sp. 38.2 (BACS3, 71%, 83%), *Thermoanaerobacterium. thermosulfurines* EM1 (THETU, 66%, 80%), *Paenibacillus marcerans* (PAEMA1, 65%, 80%), *P. marcerans* (PAEMA2, 64%, 76%), *B. stearothermophylus* NO2 (BACST, 60%, 75%), *Brevibacillus brevis* CD162 (BREBE, 59%, 74%), alkalophilic *Bacillus* sp. 1.1 (BACS2, 58%, 75%), *B. obhensis* (BACOH, 58%, 74%)와 *Klebsiella pneumoniae* (KLEOX, 35%, 53%). 멀티 얼라이언트 결과, 5개의 구조적 활성 영역 (A, B, C, D 와 E)과 I-IV의 4종류의 아주 높은 conserved region의 존재를 확인 할 수 있었다

(Table3-2). CGTase의 활성 부위에 존재하는 3개의 catalytic residues (Asp-263, Glu-291와 Asp-362)를 확인 할 수 있었으며, 이는 기존에 밝혀진 *Bacillus circulans* strain 251의 CGTase에 존재하는 3개의 catalytic residues (Asp-257, Glu-229와 Asp-328)와 유사한 것으로 밝혀졌다. 그리고, 기질 결합과 cyclization 반응에 중요한 기능한 것으로 알려진 Lys-93, Tyr-123, Asn-128, Phe-217, Asn-227, Leu-228, Tyr-229, Asp-230, Phe-317와 Asp-405의 존재도 확인 할 수 있었다.

Table 3-1. 서열 얼라이먼트와 phylogenetic tree 구축에 사용된 CGTases의 목록

Homologous protein	Origin	Identity (%)	Positive (%)	GenBank	Reference
BACLI	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	99	P14014	36
BACCI2	<i>Bacillus circulans</i> 8	91	96	P30920	37
BACSS	<i>Bacillus</i> sp. 6.6.3	91	95	P31747	38
BAC11	Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. 17.1	73	85	P30921	39
BACCI1	<i>Bacillus circulans</i> 251	73	83	P43379	40
BACS8	<i>Bacillus</i> sp. 1018	73	83	P17692	41
BACS0	Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. 1011	72	84	P05618	42
BACS3	Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. 38.2	71	83	P09121	43
THETU	<i>T. thermosulfurines</i> EM1	66	80	P26827	44
PAEMA1	<i>Paenibacillus macerans</i>	65	80	P31835	45
PAEMA2	<i>Paenibacillus macerans</i>	64	76	P04830	46
BACST	<i>Bacillus stearothermophilus</i> NO2	60	75	P31797	46
BREBE	<i>Brevibacillus brevis</i> CD162	59	74	O30565	47
BACS2	Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. 1.1	58	75	P31746	48
BACOH	<i>Bacillus obhensis</i>	58	74	P27036	49
KLEOX	<i>Klebsiella pneumoniae</i> M5a1	35	53	P08704	50

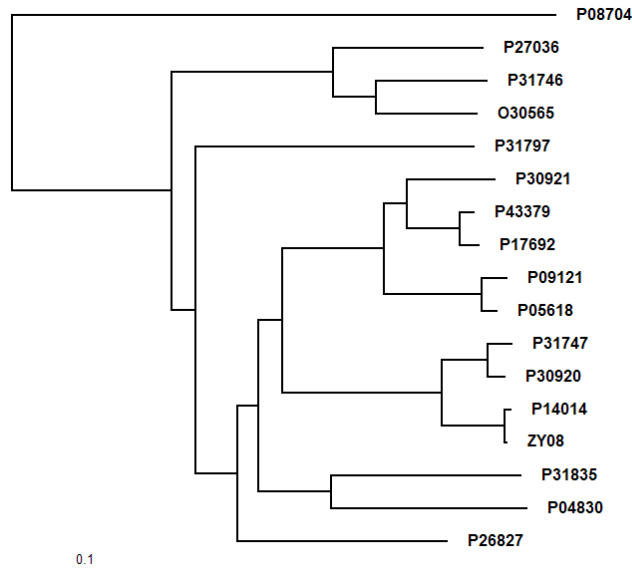


그림 3-3. ZY-08과 비교되어진 CGTase의 서열 얼라이먼트의 Phylogenetic tree

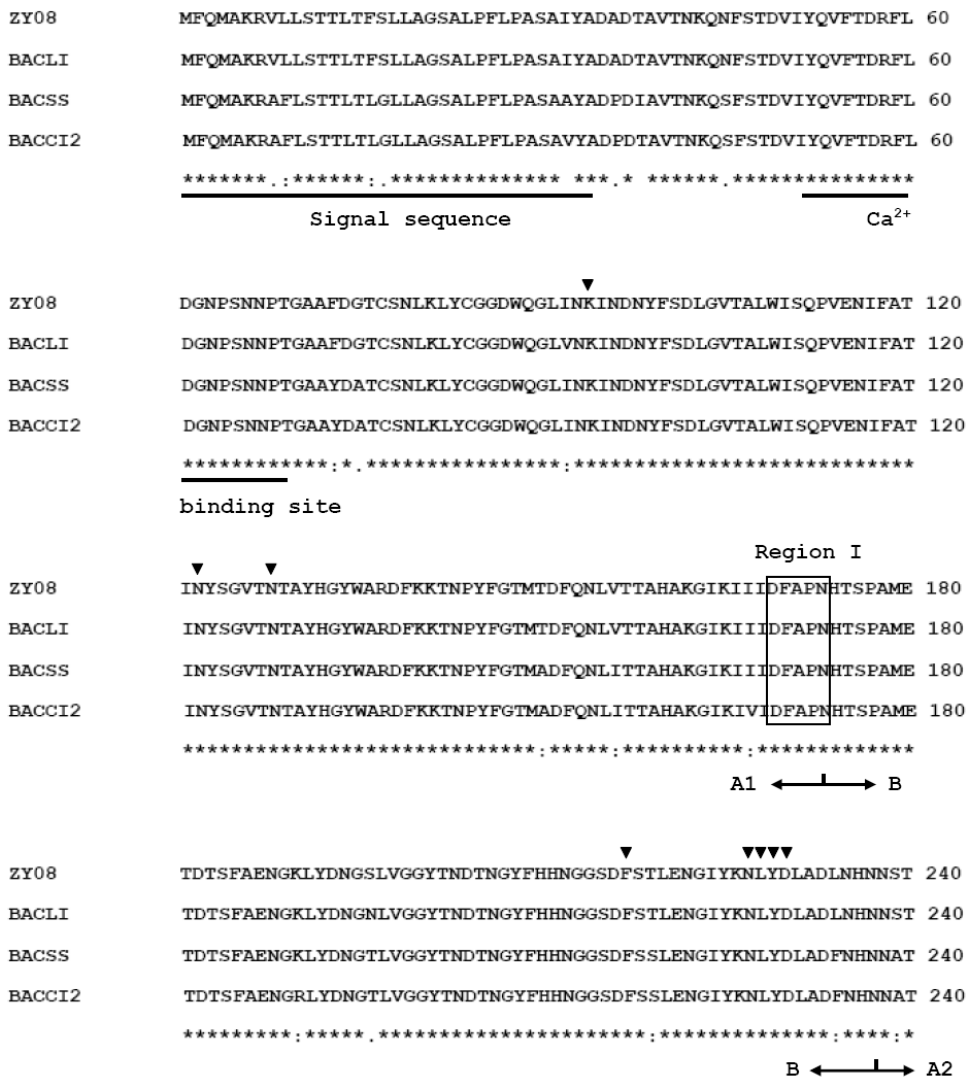


그림 3-4. 박테리아의 CGTases의 아미노산 서열 얼라이먼트

		Region II		Region III	
ZY08	IDTYFKDAIKLWLDMGVD	GIRVDAVKHMPQGWQKNWMS	SIYAHKPVFTFG	EWFL	BSAASD 300
BACLI	IDTYFKDAIKLWLDMGVD	GIRVDAVKHMPQGWQKNWMS	SIYAHKPVFTFG	EWFL	GSAAPD 300
BACSS	IDKYFKDAIKLWLDMGVD	GIRVDAVKHIALGWQKSWMS	SIYVHKPVFTFG	EWFL	GSAASD 300
BACCI2	IDKYFKDAIKLWLDMGVD	GIRVDAVKHMPLGWQKSWMS	SIYAHKPVFTFG	EWFL	GSAASD 300
	**.*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*				
				Region IV	
ZY08	ADNTDFANESGMSLLDFR	NSAVRN	VFRDNTSNMYALDSMLTATAADYNQVNDQVTFIDN		360
BACLI	ADNTDFANESGMSLLDFR	NSAVRN	VFRDNTSNMYALDSMLTATAADYNQVNDQVTFIDN		360
BACSS	ADNTDFANKSGMSLLDFR	NSAVRN	VFRDNTSNMYALDSMINSTATDYNQVNDQVTFIDN		360
BACCI2	ADNTDFANKSGMSLLDFR	NSAVRN	VFRDNTSNMYALDSMINSTATDYNQVNDQVTFIDN		360
	*****.*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*				
ZY08	HD	MDRFKTSAVNNRRL	EQALAF	TLTSRGVPAIYYGTEQYLTGNGDPDNRGKMPFSFKSTT	420
BACLI	HD	MDRFKTSAVNNRRL	EQALAF	TLTSRGVPAIYYGTEQYLTGNGDPDNRGKMPFSFKSTT	420
BACSS	HD	MDRFKTSAVNNRRL	EQALAF	TLTSRGVPAIYYGTEQYLTGNGDPDNRGKMPFSFKSTT	420
BACCI2	HD	MDRFKTSAVNNRRL	EQALAF	TLTSRGVPAIYYGTEQYLTGNGDPDNRGKMPFSFKSTT	420
	*****.*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*				
ZY08	AFNVISKLAPLRKSNPAI	AYGSTQQRWINNDVYIYERKFGKSVAVVAVNRL	TTPTSITN		480
BACLI	AFNVISKLAPLRKSNPAI	AYGSTQQRWINNDVYIYERKFGKSVAVVAVNRL	TTPTSITN		480
BACSS	AFNVISKLAPLRKSNPAI	AYGSTQQRWINNDVYVYERKFGKSVAVVAVNRL	STPANITG		480
BACCI2	AFNVISKLAPLRKSNPAI	AYGSTQQRWINNDVYVYERKFGKSVAVVAVNRL	STASITG		480
	*****.*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*				
		A2 ← → C			

그림 3-4. (continued)

ZY08 LNTSLPSGTYTDVLGGVNLGNNTSSGGNISSFTLAAGATAVWQYTASETTPTIGHVGPV 540
 BACLI LNTSLPSGTYTDVLGGVNLGNNTSSGGNISSFTLAAGATAVWQYTASETTPTIGHVGPV 540
 BACSS LSTSLPTGSYTDVLGGVNLGNNTSSNGSVNSFTLAAGATAVWQYTAETTPPTIGHVGPV 540
 BACCI2 LSTSLPTGSYTDVLGGVNLGNNTSTNGSINNFTLAAGATAVWQYTTAETTPPTIGHVGPV 540
 *,****;*:*****:*. . . *****:*****
 c ←→ d

ZY08 MGKPGNVVTIDGRGFGSAKGTVYFGTTAVTGSAITSWEDTQIKVTIPPVAGGDYAVKVAA 600
 BACLI MGKPGNVVTIDGRGFGSAKGTVYFGTTAVTGSAITSWEDTQIKVTIPPVAGGDYAVKVAA 600
 BACSS MGKPGNVVTIDGRGFGSTKGTVYFGTTAVTGAAITSWEDTQIKVTIPPSVAAGNYAVKVAA 600
 BACCI2 MGKPGNVVTIDGRGFGSTKGTVYFGTTAVTGAAITSWEDTQIKVTIPPSVAAGNYAVKVAA 600
 *****:*****:*****. *. * :*****

ZY08 NGVNSNAYNDFTLISGDQVSVRFVINNATTALGENIYLTGNVSELGNWTTGAASIGPAFN 660
 BACLI NGVNSNAYNDFTLISGDQVSVRFVINNATTALGENIYLTGNVSELGNWTTGAASIGPAFN 660
 BACSS NGVNSNAYNHFTILTGDQVTVRFVINNASTTLGQNIYLTGNVAELGNWSTGSTAIGPAFN 660
 BACCI2 SGVNSNAYNFTILTGDQVTVRFVNNASTTLGQNLILTGNVAELGNWSTGSTAIGPAFN 660
 .*****. ****;****;****;****;*:**:*:*****:*****:***:;*****
 D ←→ E

ZY08 QVIHAYPTWYDVSVPAGKQLEFKFFKNGATITWEGGSNHTFTTPTSGTATVTVNWQ 718
 BACLI QVIHAYPTWYDVSVPAGKQLEFKFFKNGATITWEGGSNHTFTTPTSGTATVTINWQ 718
 BACSS QVIHQYPTWYDVSVPAGKELEFKFFKNGSTITWEGGSNHKFTTPASGTATVTVNWQ 718
 BACCI2 QVIHQYPTWYDVSVPAGKQLEFKFFKNGSTITWESGSNHTFTTPASGTATVTVNWQ 718
 **** *****:*****:*****. ****. ****:*****:***

그림 3-4. (continued)

ZY08	47	S	T	D	V	I	Y	Q	V	F	T	D	R	F	L	D	G	N	P	S	N	N	P	T	G	A	A	F	D	G	T	C	S	N	L	K	L	Y	C	G	G	D	W	Q	G	L	91
BACLI	47	S	T	D	V	I	Y	Q	V	F	T	D	R	F	L	D	G	N	P	S	N	N	P	T	G	A	A	F	D	G	T	C	S	N	L	K	L	Y	C	G	G	D	W	Q	G	L	91
BACCI2	47	S	T	D	V	I	Y	Q	V	F	T	D	R	F	L	D	G	N	P	S	N	N	P	T	G	A	A	Y	D	A	T	C	S	N	L	K	L	Y	C	G	G	D	W	Q	G	L	91
BACSS	47	S	T	D	V	I	Y	Q	V	F	T	D	R	F	L	D	G	N	P	S	N	N	P	T	G	A	A	Y	D	A	T	C	T	N	L	K	L	Y	C	G	G	D	W	Q	G	L	91
BAC11	40	S	T	D	V	I	Y	Q	I	F	T	D	R	F	S	D	G	N	P	A	N	N	P	T	G	P	A	F	D	G	T	C	T	N	L	R	L	Y	C	G	G	D	W	Q	G	I	84
BACCI1	40	S	T	D	V	I	Y	Q	I	F	T	D	R	F	S	D	G	N	P	A	N	N	P	T	G	A	A	F	D	G	T	C	T	N	L	R	L	Y	C	G	G	D	W	Q	G	I	84
BACS8	40	S	T	D	V	I	Y	Q	I	F	T	D	R	F	S	D	G	N	P	A	N	N	P	T	G	A	A	F	D	G	T	C	T	N	L	R	L	Y	C	G	G	D	W	Q	G	I	84
BACS0	40	S	T	D	V	I	Y	Q	I	F	T	D	R	F	S	D	G	N	P	A	N	N	P	T	G	A	A	F	D	G	S	C	T	N	L	R	L	Y	C	G	G	D	W	Q	G	I	84
BACS3	40	S	T	D	V	I	Y	Q	I	F	T	D	R	F	S	D	G	N	P	A	N	N	P	T	G	A	A	F	D	G	S	C	T	N	L	R	L	Y	C	G	G	D	W	Q	G	I	84
THETU	40	S	T	D	V	I	Y	Q	I	V	T	D	R	F	V	D	G	N	T	S	N	N	P	T	G	D	L	Y	D	P	T	H	T	S	L	K	K	Y	F	G	G	D	W	Q	G	I	84
PAEMA1	40	S	T	D	T	V	Y	Q	I	V	T	D	R	F	V	D	G	N	S	A	N	N	P	T	G	A	A	F	S	S	D	H	S	N	L	K	L	Y	F	G	G	D	W	Q	G	I	84
PAEMA2	40	S	T	D	V	I	Y	Q	I	V	T	D	R	F	A	D	G	R	T	N	N	P	A	G	D	A	F	S	G	D	R	S	N	L	K	L	Y	F	G	G	D	W	Q	G	I	84	
BACST	41	T	S	D	V	V	Y	Q	I	V	V	D	R	F	V	D	G	N	T	S	N	N	P	S	G	A	L	F	S	S	G	C	T	N	L	R	K	Y	C	G	G	D	W	Q	G	I	85
BREBE	29	S	K	D	V	I	Y	Q	I	V	T	D	R	F	S	D	G	N	P	A	N	N	P	S	G	A	I	F	S	Q	N	C	S	D	L	H	K	Y	C	G	G	D	W	Q	G	I	73
BACS2	38	S	K	D	V	I	Y	Q	I	V	T	D	R	F	S	D	G	N	P	G	N	N	P	S	G	A	I	F	S	Q	N	C	I	D	L	H	K	Y	C	G	G	D	W	Q	G	I	82
BACOH	38	T	R	D	V	I	Y	Q	I	V	T	D	R	F	S	D	G	D	P	S	N	N	P	T	G	A	I	Y	S	Q	D	C	S	D	L	H	K	Y	C	G	G	D	W	Q	G	I	82
KLEOX	41	R	K	E	T	I	Y	F	L	F	L	D	R	F	S	D	G	D	P	S	N	N	A	G	F	N	S	A	T	Y	D	P	N	N	L	K	L	Y	T	G	G	D	L	R	G	L	85

* * *

그림 3-5. *P. illinoisensis* ZY-08과 기존에 보고된 박테리아의 CGTase의 Ca²⁺ binding domain 얼라이먼트

Table 3-2. CGTases에서 amylase의 I- IV 보존된 영역

Homologous protein	Consensus																												
	Region I					Region II					Region III				Region IV														
	Residue	D	A	V	I	N	H	Residue	G	F	R	L	D	A	A	K	H	Residue	E	V	I	D	Residue	F	V	D	N	H	D
ZY08	169	D	F	A	P	N	H	259	G	I	R	V	D	A	V	K	H	291	E	W	F	L	357	F	I	D	N	H	D
BACLI	169	D	F	A	P	N	H	259	G	I	R	V	D	A	V	K	H	291	E	W	F	L	357	F	I	D	N	H	D
BACCI2	169	D	F	A	P	N	H	259	G	I	R	V	D	A	V	K	H	291	E	W	F	L	357	F	I	D	N	H	D
BACSS	169	D	F	A	P	N	H	259	G	I	R	V	D	A	V	K	H	291	E	W	F	L	357	F	I	D	N	H	D
BAC11	162	D	F	A	P	N	H	252	G	I	R	M	D	A	V	K	H	284	E	W	F	L	350	F	I	D	N	H	D
BACCI1	162	D	F	A	P	N	H	252	G	I	R	M	D	A	V	K	H	284	E	W	F	L	350	F	I	D	N	H	D
BACS8	162	D	F	A	P	N	H	252	G	I	R	M	D	A	V	K	H	284	E	W	F	L	350	F	I	D	N	H	D
BACS0	162	D	F	A	P	N	H	252	G	I	R	V	D	A	V	K	H	284	E	W	F	L	350	F	I	D	N	H	D
BACS3	162	D	F	A	P	N	H	252	G	I	R	V	D	A	V	K	H	284	E	W	F	L	350	F	I	D	N	H	D
THETU	161	D	F	A	P	N	H	251	G	I	R	L	D	A	V	K	H	283	E	W	F	L	349	F	I	D	N	H	D
PAEMA1	162	D	F	A	P	N	H	252	G	I	R	F	D	A	V	K	H	285	E	W	F	L	351	F	I	D	N	H	D
PAEMA2	162	D	F	A	P	N	H	252	G	I	R	F	D	A	V	K	H	285	E	W	Y	L	352	F	I	D	N	H	D
BACST	162	D	F	A	P	N	H	252	G	I	R	M	D	A	V	K	H	284	E	W	F	L	350	F	I	D	N	H	D
BREBE	148	D	F	T	P	N	H	237	G	I	R	V	D	A	V	K	H	269	E	W	F	L	335	F	I	D	N	H	D
BACS2	158	D	F	T	P	N	H	247	G	I	R	V	D	A	V	K	H	279	E	W	F	L	345	F	I	D	N	H	D
BACOH	157	D	F	T	P	N	H	249	G	I	R	V	D	A	V	K	H	279	E	W	F	L	345	F	I	D	N	H	D
KLEOX	160	D	Y	A	P	N	H	249	A	I	R	I	D	A	I	K	H	287	E	W	F	G	358	F	M	D	N	H	D

3) CGTase의 분리 정제

제조합 CGTase는 *E. coli* BL21 (DE3)를 이용하여 분리 정제하였다. 대장균 호스트를 이용한 단백질 발현시 문제시 되는 solubility를 높이기 위해서 저온 발현 프로모터를 가지고 있는 pCold I vector를 이용하였다. 단백질은 최종적으로 His-tag 친화성 크로마토그래피를 이용하여 분리하였다. 정제된 단백질은 대략 74 kDa 정도의 분자량을 가지는 것으로 SDS-PAGE를 통해서 확인 할 수 있었다(그림3-6).

4) *P. illinoisensis* ZY-08 균주의 CGTase의 특성

CGTase의 최적 온도는 40°C로 밝혀졌다(그림3-7). 그리고 위 효소는 40°C까지는 안정성을 60% 이상의 활성을 유지하였지만 그 이상의 온도에서는 효소 활성이 급격하게 감소하는 현상을 관찰 할 수 있었다. 최적 pH는 pH 7.4으로 관찰 되어졌으며, pH 6-9 정도까지의 넓은 범위에서 안정성을 나타내는 것을 관찰 할 수 있었다(그림3-8). 다양한 형태의 기질들 (starch, glucomannan, galactomannan, king oyster mushroom, enoki mushroom powder) 기질 특이성을 조사하였다(Table3-3).

Soluble starch를 이용 하였을 때, 가장 강력한 cyclodextrin 생산능력을 보였으며, king oyster mushroom, enoki mushroom powder를 기질로 이용하였을 경우는 약한 활성을 관찰 할 수 있었으며, glucomannan과 galactomannan을 이용하였을 경우에는 거의 관찰 할 수 없었다(그림3-9).

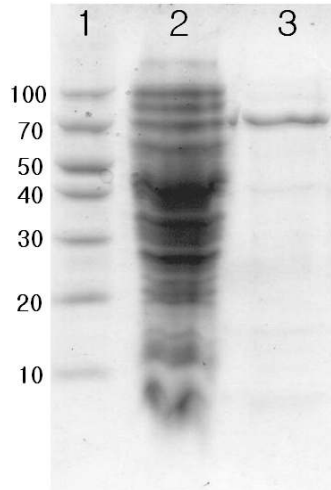


그림 3-6. *P. illinoisensis* ZY-08로부터 CGTase의 정제

Lane 1, protein marker; lane 2, soluble fraction; lane 3, purified CGTase.

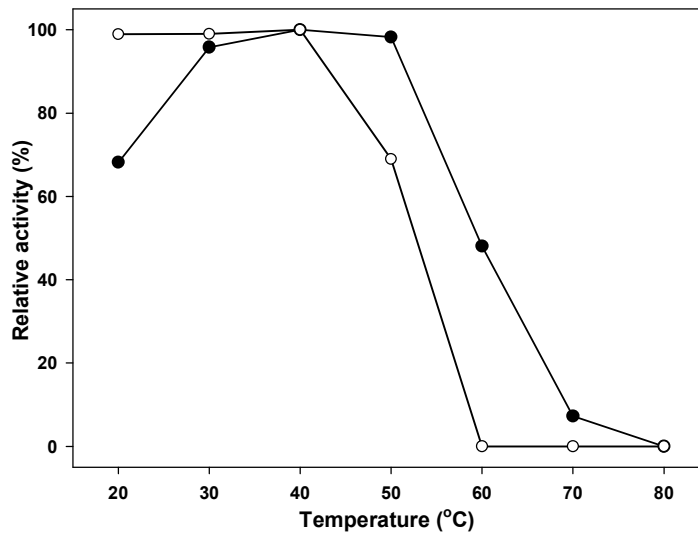


그림 3-7. 정제된 CGTase의 온도별 활성 효과. 최적 온도 (●), 온도안정성 (○).

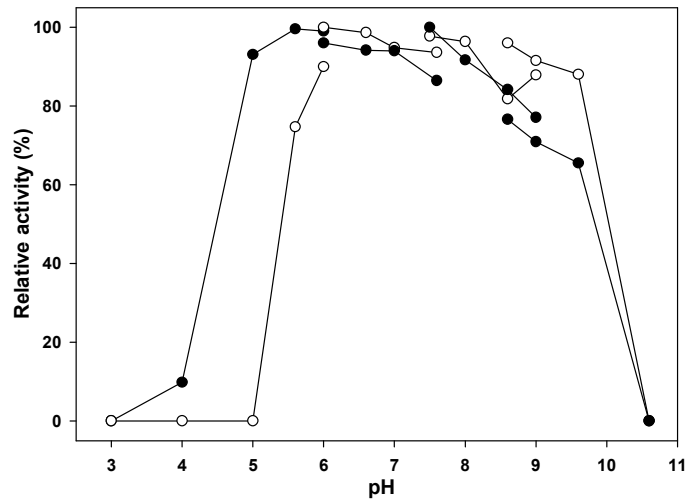


그림 3-8. 정제된 CGTase의 pH별 활성 효과. 최적 pH (●), pH 안정성 (○).

Table 3-3. 정제된 CGTase의 기질 특이성

Substrate	Activity ($\mu\text{mol}/\text{min}$ per mg of enzyme)	Relative activity ^a (%)
Soluble starch	3.57	100
King oyster mushroom	0.63	17.7
Enoki mushroom	0.33	1
Glucomanan	N.D.	N.D.
Galactomannan	N.D.	N.D.

^aThe activity for soluble starch was defined as 100%

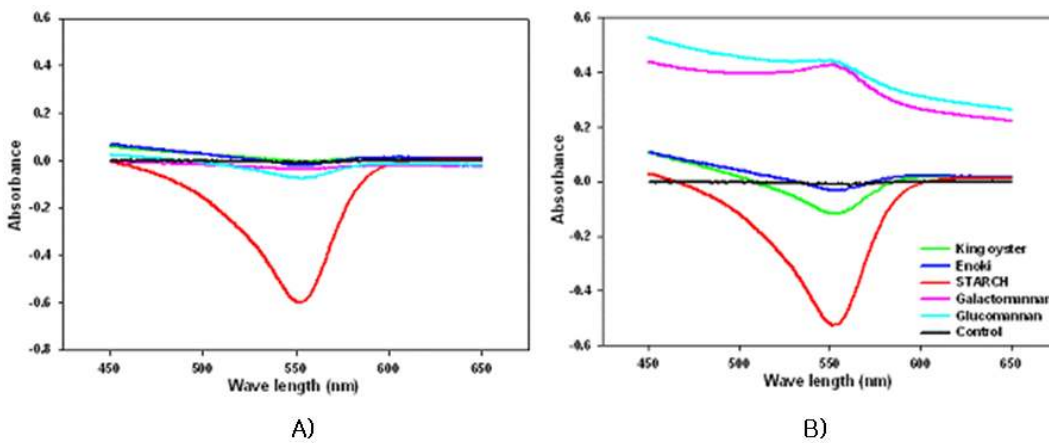


그림 3-9. 다양한 다당류 기질을 사용하여 ZY-08의 CD 생산 비교.

A, ZY-08; B, recombinant clone

제5절 *Paenibacillus xylanilyticus* ZY-03로부터 β -mannanase의 동정, 정제 및 특성

1. 연구수행 방법

1) Chemicals and Media

Locust bean gum (LBG), birchwood xylan, carboxymethyl cellulose (CMC), 와 키틴은 시그마 사에서 구입하였다. Glucomannan은 중국 Hongye사로부터 구매하였으며 곤약은 시중에 판매하는 것으로 하였다. 위 실험에 사용된 기본 배지는 0.2-2%의 glucomannan, 0.1% KH_2PO_4 , 0.02% MgSO_4 와 0.5% polypepton를 함유하였다.

2) 만난을 분해하는 균주 선별

다양한 종류의 다당류를 분해하는 능력을 가지는 선별된 균주들 중 glucomannan을 분해하는 능력이 우수한 *Paenibacillus xylanilyticus* ZY-03를 사용하였다.

3) ZY-03의 mannanase 정제

1L의 배양액을 원심분리를 통하여 불용성 물질들을 제거 하였다. 배양 상등액을 YM-30 membrane이 장착된 ultrafiltration cell unit (Millipore)를 이용하여 최종 30ml이 되게 농축하였다. 이 농축액 DEAE-Sepharose 오픈 컬럼을 이용하여 크로마토그래피를 수행하였다. 컬럼은 20mM sodium phosphate (pH 7.4)를 이용하여 pre-equilibration 하였다. 샘플을 투여한 후, 같은 버퍼 15ml을 흘려서 unbounded protein을 분리하였으며, elution은 NaCl을 이용하여 bounded protein을 분리하였다. 분리한 fraction 중 활성을 나타내는 fraction을 선별하여 sephadex G-50 컬럼을 이용하여 크로마토그래피를 수행하였다.

4) SDS-PAGE와 zymogram

SDS-PAGE는 Laemmli 방법을 응용하여 수행하였다. Zymogram은 poly-acrylamide 겔 속에 glucomannan을 함께 첨가 하여서 겔을 만들었다. SDS-PAGE를 수행한 후, 겔을 25% isopropanol에 담가 겔에 존재하는 SDS를 모두 제거하였으며, 20mM sodium phosphate (pH 7.4) 버퍼에 담가 37°C에서 2시간동안 반응시켰다. 반응 후, 겔을 congo red 용액으로 염색하였으며, 이를 다시 1M NaCl 용액을 이용하여 탈색시켜 관찰 하였다.

5) Mannanase assay

Mannanase 효소활성 측정은 Jiang's 방법을 응용하여 수행하였다. 반응액은 0.5% glucomannan 50ul, 20mM sodium phosphate (pH 7.4) 100 ul와 정제된 enzyme (대략 1ug)을 첨가하여 최종 250ul가 되게 만들었으며 이를 60°C에서 30분 동안 반응 시켰다. 효소 반응은 100°C에서 10분 동안 처리함으로써 전체 효소 반응을 정지 시켰다. 반응액에 존재하는 환원당을 DNS법을 이용하여 측정하였다. 효소 활성 1U는 분당 1umol의 mannose를 생산하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

6)mannanase의 온도와 pH별 활성 효과 측정

최적 온도는 30-90°C의 다양한 온도에서 glucomannan을 기질로 제공하여 수행하였다. 버퍼는 50mM citrate buffer (pH 6.0)를 이용 하였다. 온도 안정성은 각각의 온도에서 효소를 1시간 동안 pre-incubation 한 후, 기질을 첨가하여 효소 활성을 측정하였다. 최적 pH는 다양한 범위의 buffer를 이용하여 수행하였다: 50 mM citrate buffer (pH 3.0-5.0), 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0 & 7.0), 0.6 M Tris-HCl (pH 8.0 & 9.0) and 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 10.0 & 11.0). pH 안정성은 4°C에서 각각의 버퍼와 효소를 1시간 동안 pre-incubation 한 뒤, 기질을 첨가하고 효소 활성을 측정하였다.

7)기질 특이성과 효소 반응 속도론

기질특이성은 50 mM citrate buffer (pH 6.0)에 5mg/ml의 기질과 효소를 첨가하여 60°C에서 10분간 반응하여 측정하였다. 효소 반응 속도론 Km과 Vmax는 pH 6.0, 50°C에서 10분간 반응 후, 50 mM citrate buffer에 0.2-1.0 mg/ml의 농도로 기질을 첨가하여Lineweaver-Burk의 방법으로 결정하였다.

8)N-말단 아미노산 서열 결정

정제된 β -mannanase는 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GE Healthcare)을 이용하여 blotting하였다. N-말단 아미노산 서열은 automated Edman degradation using PROCISE 491 HT protein sequencer (Applied Biosystems, USA)에 의해 결정되었다.

2. 연구 수행 결과

1)mannanase의 생산 및 정제

Paenibacillus xylanilyticus ZY-03은 0.5% glucomannan를 첨가한 배지에서 37°C에서 5일간 배양한 경우, 효소의 양이 900U/ml로 최대의 양을 생산하는 것으로 나타났다. *Paenibacillus xylanilyticus* ZY-03로부터의 정제된 mannanase의 전체 단백질 양과 전체 활성은 각각 0.8mg과 135U을 획득하였다. 회수율은 15%이며, specific

활성은 169U/mg이고, 34배정도 농축됨을 확인하였다. zymogram을 통해 정제된 단백질이 위치한 부분에 오렌지색의 존을 형성하였으며, 분자량은 약 39.0 kDa 정도로 예상되었다(그림4-1). N-말단 아미노산 서열은 D-M-A-E-I-E-K-F-D-K로 결정되었다.

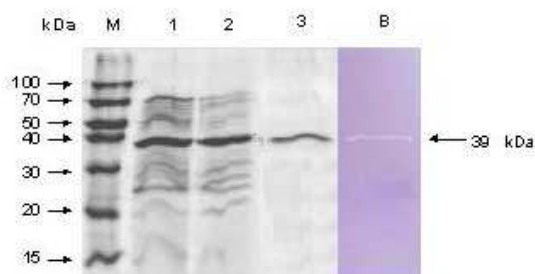


그림 4-1. SDS-PAGE (A), lane M, pre-stained protein size markers (ELPiS); lane 1, DEAE, lane 2, Phenyl-sepharose, lane 3, Hi-Trap phenyl sepharose and Zymogram (B).

2) 온도별, pH 별 효소의 활성 효과

β -mannanase 활성의 최적 온도는 60°C이며, 80°C에서 80% 정도의 활성이 잔존함을 확인하였다(그림4-2). 50-55°C에서 최적의 활성을 가지는 *B. subtilis* strains NM-39와 KU-1에 비해 높은 온도에서 최고 활성을 가지며, *Bacillus licheniformis*와 비슷한 최적 온도에서 활성을 나타내었다. 80°C에서 80%의 활성이 잔존하는 것으로 보아 비교적 높은 온도에서 활성을 보여, 열안정성이 우수하여 산업적으로 잠재적인 가치가 있을 것으로 사료된다. pH 5.0-7.0사이에서 효소의 활성이 안정하였으며, pH 5.0에서 최적의 활성을 보였다(그림4-2). 이는 *B. subtilis* NM-39와 유사한 결과를 나타내며, *B. subtilis* WY4 (pH 6.0)와 *B. subtilis* KU-1(pH 7.0)보다 낮은 pH에서 최적의 활성을 보였다.

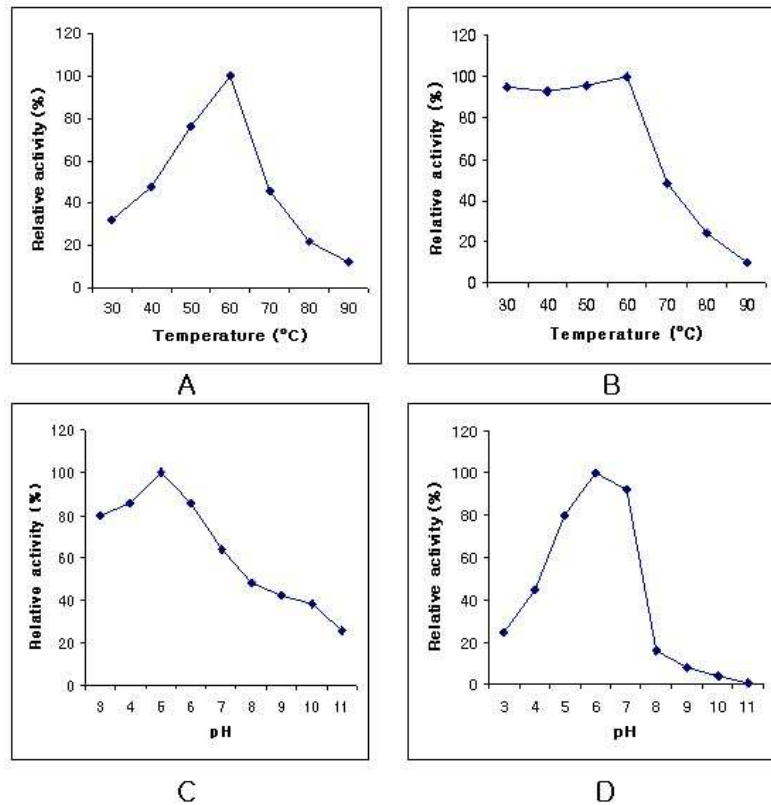


그림 4-2. mannanase의 온도별 활성 (A), 온도 안정성 (B), pH 별 활성 (C), 및 pH 안정성 (D).

3) 금속이온과 유기용매별 효소의 활성 효과

금속이온과 유기용매에 대한 효소의 활성은 1 mM의 다양한 금속이온과 유기용매를 녹인 50 mM citrate buffer (pH 6.0)에 효소를 첨가하여 10분간 50°C에서 반응하여 잔존하는 활성을 측정하였다. 효소 활성은 Fe²⁺(99.8%) 존재 시 안정하였으며, Cu²⁺ (102.9%)와 Li⁺ (101%) 존재 시 활성이 증가하였다. Zn²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ 존재 시 활성이 저해되었다.

4) 기질 특이성과 효소 반응 속도론

정제된 mannanase는 glucomannan (100%)을 기질로 첨가하였을 경우 최대 활성을 보였으며, galactomannan, starch, cellulose, chitosan, CMC, chitin 및 xylan은 각각 86%, 65%, 60%, 58%, 54%, 53% 및 51%로 glucomannan보다 상대적으로 낮은 활성을 보였다.

버섯 분말을 기질로 첨가한 경우 28%정도의 활성을 나타내었다(그림4-3).

효소 반응 속도론은 glucomannan을 이용하여 측정한 결과, Km와 Vmax값은 각각 1.05 mg/ml와 714 U/mg였다.

Bacillus circulans CGMCC 1416의 MANB48은 locust bean gum과 guar gum에서 각각 100%와 26%의 활성을 보인 반면, soluble starch과 methylcellulose는 분해하

지 못하였다. 기존의 보고된 mannanase와 달리, ZY-03의 mannanase는 cellulosic 기질에서 50%정도의 활성을 보이는 것으로 보아 lignocellulose와 산업적인 이용을 증진시킬 수 있는 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

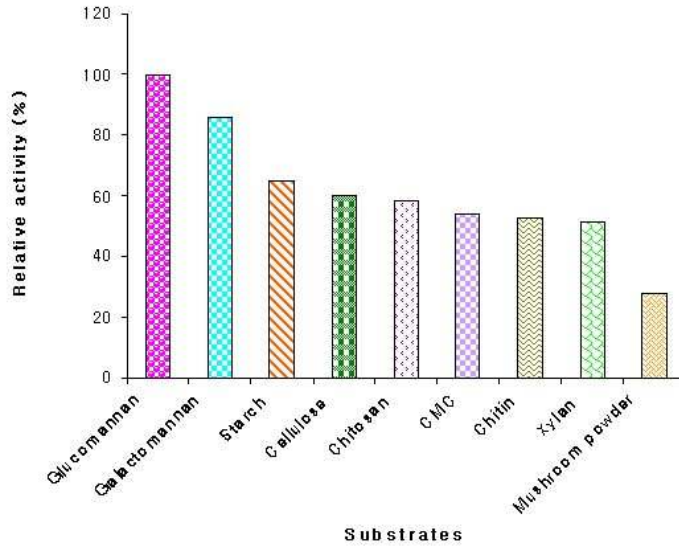


그림 4-3. 정제된 mannanase의 기질 특이성

제6절 미 이용 버섯 자원을 이용한 미생물 발효 산물의 생산

1. 연구수행 방법

1)미 이용 버섯 자원을 이용한 미생물 발효를 위해 사용된 균주

선행 결과를 바탕으로 미 이용 버섯 자원을 이용한 미생물 발효를 위해 다당류 분해능이 우수한 균주 몇 종을 선별하였다. DAU1025, DAU1039와 DAU1040, 실험실 보관 균주인 A8-8, *Klebsiella* sp. Sc 및 *Paenibacillus* sp. ZY-08을 선별하여 미생물 발효에 사용하였다.

2)버섯 분말 제조

본 실험에 사용한 새송이 버섯은 부산대학교 김근기 교수로부터 얻어서 사용하였다. 새송이 버섯을 적당한 크기로 칼을 이용하여 자른 다음에 실온에서 건조시켰다. 이를 60°C dry oven에서 2시간 정도 완전히 건조 시킨 다음 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 실험에 사용하였다.

3)버섯을 이용하여 분리 균주에 의해 생성된 당 회수 방법

(1) NaOH를 이용한 당 회수 방법

1%의 버섯 분말을 함유한 LB배지에 균을 접종한 후, 37°C, 180rpm으로 7일간 배양하였다. 7일후 배양액에 증류수를 가하여 1:1로 희석하고, 여기에 NaOH를 최종 1%가 되게 첨가하여 교반한 다음, 25°C에서 6,000rpm으로 30분간 원심 분리하였다. 균체를 제거한 상등액에 HCl을 이용하여 pH가 중성이 되도록 보정하였으며 70% 에탄올을 가해서 얻은 침전물을 95% 에탄올로 3회 세척한 뒤 감압건조하고 마쇄하였다.

(2) 에탄올을 이용한 당 회수 방법

1%의 버섯 분말을 함유한 LB배지에 균을 접종한 후, 37°C, 180rpm으로 7일간 배양하였다. 원심 분리를 통하여 균체를 제거한 상등액에 3 vol의 99% 에탄올을 첨가한 후 교반하였다. 이를 4°C, 6,000rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 침전물을 획득한 후 감압 건조하였다.

4)추출당의 구성 성분 조사

이는 high pH anion exchange chromatography (HPAEC)를 통하여 분석하였다. 생성된 기능성당 분말 2 mg 정도에 2 M trifluoroacetic acid (TFA, T1647) (dH₂O 340 µl + TFA 60 µl)를 첨가한 후, 100°C에서 4시간 동안 산 가수분해 시켰다. 4시간 경과 후 실온에서 서서히 식혔으며, 최종적으로 SpeedVac이나 동결 건조를 통해서 완전히 건조시켰다. 최종 산물을 dH₂O 100 µl에 용해시켰다. 이후 기기 분석

은 한국기초과학지원연구원 (KBSI) 단백질구조연구부 글라이코믹스팀에 의뢰하여 분석하였다.

2. 연구수행 결과

1) 버섯 분말 첨가 배지에서의 기능성당 생성량

선행의 실험에서 분리된 균주들 중에서 다당류 분해 능력이 우수한 DAU1025, DAU1039와 DAU1040 그리고 실험실 보관 균주인 A8-8을 사용하여 7일간 배양하였다. A8-8의 결과에서 나타나듯이 최소 배지인 M9 배지에는 1.54%의 회수율을 나타내었는데 비해서 농후배지인 LB배지를 사용하는 것에서는 좀 더 높은 1.65%의 당 회수율을 나타내었다(Table6-1). 이는 풍부한 영양 상태에서 많은 양의 가수분해효소를 생산하여 버섯 분말을 좀 더 잘 분해하는 것으로 관찰 되어진다. 10g 정도의 버섯 분말을 사용하였을 때 A8-8의 경우에는 2.51%의 회수율을 나타내었으며, DAU1025, DAU1039와 DAU1040은 각각 1.41, 1.62와 1.60%의 회수율을 나타내었다. 이러한 결과들은 분리한 균주들이 생산하는 과수분해 효소들에 의해서 불용성 버섯 분말이 분해되어서 수용성 다당 또는 올리고당의 형태로 배양 상등액에 존재하는 것을 관찰 할 수 있었다.

Table 6-1. 버섯 분말과 분리 균주의 배양 후 기능성의 생성량 및 회수율

균주명	배지	버섯 첨가량	생성량 (g)	회수율 (%)
A8-8	M9	100 g/l	1.080	1.54
A8-8	LB	100 g/l	1.160	1.65
A8-8	LB	10 g/100 ml	0.176	2.51
DAU1025	LB	10 g/100 ml	0.099	1.41
DAU1039	LB	10 g/100 ml	0.114	1.62
DAU1040	LB	10 g/100 ml	0.112	1.60

버섯분말 10g당 당 함량; 7g

2) 시간 변화에 따른 기능성당 생성량

버섯 분말을 에너지원 및 기질로 제공하여 분리 균주를 7L jar fermenter에 배양하며 시간에 따라 회수되는 당의 양을 측정하였다(그림6-1). 위 실험에는 다양한 탄소원을 이용가능 하였던 *Klebsiella* sp. Sc를 사용하였다. 초기 5L를 배양하였으며 매 회마다 200 ml씩을 분취하여 에탄올 이용 당 추출법에 준하여 회수된 당량을 측정하였다. 버섯 분말은 0.5 %가 되게 제공하였다. 초기 멸균 과정을 거친 후 대략 0.121 g의 당이 회수되었으며 시간이 경과할수록 당 회수량이 증가하였으며 증가폭도 점차 증가하였다. 배양 9일이 되었을 때 당 생성 증가 폭이 최대를 나타내었고 이후에는 회수되는 당량은 증가하였지만, 그 증가폭은 이전에 비해서 감소하였다.

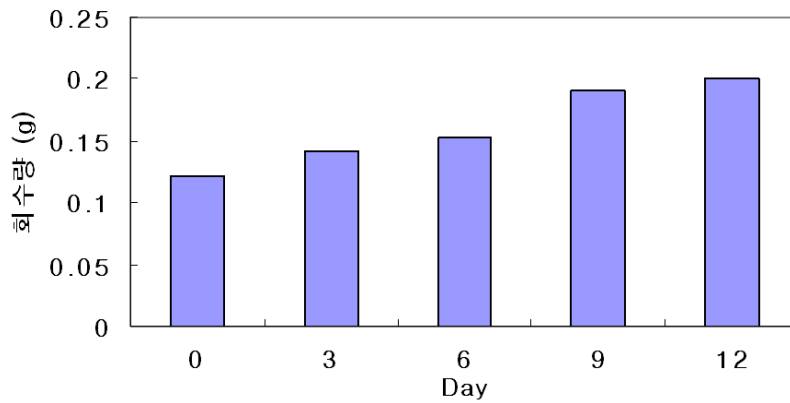


그림 6-1. 시간의 변화에 따른 *Bacillus* sp. A8-8의 기능성당 생성량의 변화

3) 생성된 기능성당의 구성 성분 분석

버섯 분말을 에너지원으로 제공하여 실험실 보관 균주 중 다양한 탄소원을 에너지원으로 이용 가능한 *Bacillus* sp. A8-8을 7일간 배양한 다음 NaOH 당회수법에 준하여 당을 회수하였다. 이후의 기기분석은 한국기초과학지원연구원 단백질구조연구부 글라이코믹스팀에 의뢰하여 분석하였다(그림6-2). 분석 결과, 전체 회수된 당 중 galactose는 22.42%, glucose는 35.12%, mannose는 23.54% 그리고 xylose가 11.65%를 구성하고 있는 것으로 밝혀졌다. 일반적 버섯추출물의 경우는 glucose가 많은 부분을 차지하지만 위의 결과는 glucose 이외의 여러 단당으로 구성되어 있으므로 보다 기능성이 뛰어난 올리고당의 회수가 기대된다(Table6-2).

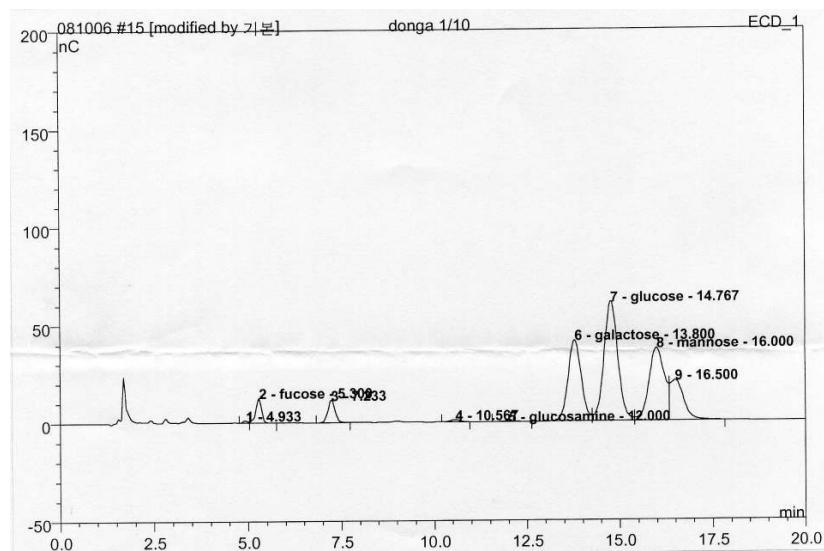


그림 6-2. 생성된 기능성당의 HPAEC를 통한 구성 성분 분석

Table 6-2. 생성된 기능성당의 HPAEC를 통한 구성 성분 함량표

Retention Time (min)	Peak Name	Height (nC)	%
5.30	Fucose	12.74	2.98
13.80	Galactose	41.59	22.42
14.77	Glucose	61.02	35.12
16.00	Mannose	37.38	23.54
16.50	Xylose	20.64	11.65

4) 미이용 버섯 자원을 이용한 미생물 발효 산물의 생산

미이용 새송이 버섯의 부산물을 수거하여 완전히 통풍 건조하여 분쇄기를 이용하여 미립자가 될 때까지 완전히 분쇄하였다. 이를 세포벽 분해 관련 효소를 생산하는 *Bacillus* sp. A8-8, *Klebsiella* sp. Sc 및 *Paenibacillus* sp. ZY-08과 같은 다양한 균주를 배양한 배양액과 1:3(W/V)의 비율로 섞었다. 이때, 사용되어진 배양액은 각각 분리되어 37°C에서 180rpm으로 이틀 동안 배양된 배양액을 사용하였다. 배양액과 버섯 부산물을 섞은 것을 향온 향습이 되는 배양기에서 2주간 배양하였다. 이때 대략 10~20% 정도의 수분이 공기 중에 존재하도록 조절하였다. 배양이 완료된 후, 이를 다시 음지에서 완전히 통풍 건조 시키고 분쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 이를 이용하여 양계사료의 첨가물 및 발효산물의 성분 분석에 사용하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연구개발목표의 달성도

구분	과제	세부연구개발 목표	달성도 (%)
1차년도 (2006)	1세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ■ 다당류 추출 - 버섯류로부터 다당류 추출 - 협동과제로부터 공급받은 미생물분해산물 추출 	100
	2세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ■ 미생물 분해물 급여 닭 사육 - 협동과제로부터 공급받은 미생물분해산물로 닭 급여조건 확립 	100
	협동과제	<ul style="list-style-type: none"> ■ 균주분리 및 특성조사 - Hemicellulose 분해능 우수 미생물의 선발 - 선발균주의 유기물 분해 활성 조사 	100
2차년도	1세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ■ 미생물 분해산물 추출 및 동정 - 버섯분해산물의 추출 및 동정 - 다당류분리 분석 	100
	2세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ■ 미생물 분해물을 급여 계란생산 - 분해유기물의 닭에 대한 급여체계 확립 - 분해유기물급여 닭의 계란생산 	100
	협동과제	<ul style="list-style-type: none"> ■ 선발 균주의 배양학적 특성 및 생성효소의 특성 조사 - 선발균주의 생육 조건과 효소 활성의 조사 - 선발균주의 효소학적 특성조사 	100
3차년도	1세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ■ 기능성 제품개발 - 변비해소 다당류 분말 개발 	100
	2세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ■ 기능성 고품질 축산물 생산 - 기능성을 갖는 계란생산 	100
	협동과제	<ul style="list-style-type: none"> ■ 버섯 섬유소 분해 관련 유전자의 발굴 및 이용 - 효소특성조사 - 버섯 섬유소 분해 관련 유전자의 클로닝 및 분자적 해석 - 유전적 육종 	100
최종목표	1세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ■ 기능성 다당류분리 및 제품개발 	100
	2세부과제	<ul style="list-style-type: none"> ■ 기능성 축산물생산- 계란, 육계 	100
	협동과제	<ul style="list-style-type: none"> ■ 우수미생물선발 및 특성조사 	100

제 2절 관련분야에의 기여도

버섯재배가 늘어남으로서 버섯의 미 이용부분이 급증하게 되고, 이를 자원화하는 것은 매우 중요하다. 버섯 미 이용자원을 유기물분해활성이 뛰어난 미생물을 이용한 유기물분해기술을 확립하고, 기능성 다당류의 분리정제 기술 및 가축사육법을 확립함으로써 기능성식품과 건강보조식품, 의약후보물질, 기능성 축산물 등을 개발할 수 있다. 기능성다당류의 다양한 생리기능을 이용함으로써 사회적으로 문제시되는 성인병예방과 국민보건에 크게 기여할 수 있다.

1. 제 1세부과제

- 미 이용 버섯자원을 활용한 기능성 바이오소재 개발 효과가 크다.
 - 항산화활성 물질 순수분리 : 항산화물질 개발에 소재제공
 - 항혈전활성물질 순수분리 : 항혈전물질 개발에 소재제공
- 기능성다당류를 이용한 건강보조식품 및 의약후보물질의 개발은 경제적인 효과뿐만 아니라 국민건강증진에 크게 기여한다.
- 버섯 유래의 기능성 다당류를 이용한 변비해소 분말 개발로 국민보건에 기능성식품을 개발함으로써 경제적인 효과는 아주 크다.
- 버섯 유래의 기능성 다당류를 이용한 기능성우유개발은 우유산업의 침체를 활성화하는데 크게 기여할 수 있다.
- 국내에서도 매년 생산되면서 미이용 버섯자원을 이용하여 고부가가치의 기능성 다당류를 산업화함으로써 버섯농가 소득증대에 기여할 수 있다.
- 버섯뿐만 아니라 농산부산물의 재활용에도 활용을 하면 고 부가가치를 창출할 수 있다.

2. 제 2세부과제

- 미 이용 버섯자원의 미생물분해산물이 축산물에 다양한 기능성을 부여함으로써 축산산업의 활성화에 기여효과
- 미 이용 버섯자원을 발효시켜 사료로 개발하여, 기능성 계란 생산으로 계란의 고품질화 및 양계산업을 활성화 시킬 수 있다.
- 기능성 사료를 급여한 고품질 닭고기는 양계산업에 활력과 국민의 영양보급에 기여한다.
- 양계농가의 영세성과 소득감소를 기능성 고품질 닭고기와 계란의 생산으로 농가의 소득에 기여하게 된다.

3. 협동과제

- 유기물 분해 산업화에 미생물 적용 모델을 제시함으로써 다양한 산업에 적용 가능
- 유전공학적 기법을 이용하여 우수 미생물의 유용 유전자를 이용한 유전육종 기술 개발 확립

- 유기물 분해 활성이 탁월한 효소의 특성을 규명하여 새로운 효소제 개발 효과
- 미생물을 이용한 자연친화적인 유기물분해 생산기술 개발 효과
- 연간 버섯생산량이 15만 톤에 4,849억원의 생산액을 나타낸다. 미용자원이 6만 톤 정도 생성되므로 이를 재이용하면 2,000억원 이상의 새로운 경제적 파급효과 기대
- 우수한 미생물의 유전육종으로 유기물 분해 산업에 큰 영향 기대
- 미생물을 이용한 생활폐기물 처리에 활용 기대

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절 연구개발 성과

1. 제 1세부과제 연구개발 성과

가. 새송이버섯이나 팽이버섯의 미 이용자원부분을 이용한 항산화물질과 항혈전물질의 개발에 본 연구에서 개발한 추출법과 분리 기술을 활용하면 건강보조식품이나 기능성 바이오소재 개발을 하였다.

- 새송이버섯의 기능성물질을 이용한 건강보조식품 개발
- 항산화제와 항혈전제의 기능성 바이오소재 개발

나. 변비해소 기능성 당류 추출법 및 조성물제조 기술의 활용

사회구조의 변화에 따른 식생활패턴이 서구화됨으로서 변비 등 장 질환의 발생빈도가 아주 높아졌다. 새송이버섯의 미 이용자원을 활용하여 추출하고, 분리한 당류가 변비해소에 높은 활성을 보이며, 혈중 cholesterol 등 지질의 함량을 감소시키는 작용을 한다.

- 변비해소와 치료식품 개발에 새송이버섯 다당류를 활용
- 새송이버섯 다당류의 혈중 cholesterol 함량 저하 효과를 활용한 건강보조식품 개발에 새송이버섯 활용

다. 새송이버섯 병원균의 생물학적 방제기술의 활용

새송이버섯 재배농가에 있어서는 재배 중에 발생하는 병원균이 가장 큰 피해를 준다. 버섯은 생산된 원형 그대로 섭취를 하기 때문에 농약이나 화학적인 약제를 처리할 수 없으며, 버섯도 균이기 때문에 더욱 그렇다.

- 새송이버섯의 생육에 무해한 생물학적 제제 개발

2. 제 2세부과제 연구개발 성과

가. 버섯 미 이용자원을 이용한 닭 사료 개발

새송이버섯이나 팽이버섯의 미 이용자원을 분말화하여 이용하거나, 미 이용자원을 유기물분해활성이 뛰어난 미생물을 이용해 발효시킨 후 분말로 만들어 사료에 첨가하여 사육한 결과 닭의 장내 병원성미생물이 감소하고, 난백질과 난각질 등이 개선되었으며, 계란의 cholesterol 함량을 저하시켰다. 그리고 저장기간을 연장시키는 효과도 얻을 수 있었다.

- 버섯 미 이용자원을 첨가한 기능성 닭 사료 개발에 활용

나. 기능성계란 생산

새송이버섯과 팽이버섯 미 이용자원을 닭 사료에 첨가하여 사육한 결과 계란 내의 cholesterol이 저하되어졌고, 난각질과 난백질이 개선되어졌으며, 저장기간 연장되어졌다. 버섯 발효산물을 사료에 첨가한 결과는 앞의 결과에 난황내 불포화지방산의 함량을 증가시키는 지방산조성을 개선시키는 결과를 얻었다.

- cholesterol저하와 저장기간 연장의 기능성계란 생산
- 불포화지방산 함량증가 계란 생산

다. 기능성 육계 생산

새송이버섯과 팽이버섯 미 이용자원을 닭 사료에 첨가하여 사육한 결과 닭고기의 성분변화가 발생하였다. 다리근육의 적색도가 향상되었고, 가슴과 다리근육에서 황색도가 향상되었으며, 가슴근육과 다리근육의 아미노산함량 증가하는 결과를 얻었다. 고기에서 불포화지방산이 증가하는 지방산의 조성변화도 나타났다. 이러한 실험결과를 토대로 버섯 미 이용자원을 이용한 사료급여로 고급육을 생산할 수 있다.

- 닭고기의 색도를 향상시킨 고급육계생산
- 닭고기의 불포화지방산함량을 증가시킨 지방산 조성 변화 고급육계 생산

3. 제 협동과제 연구개발 성과

가. 유기물분해능이 우수한 미생물제제를 개발하여, 유용미생물의 특허를 신청하고, 정부기관에 수탁하여 생물 유전자원을 체계적으로 관리 활용한다.

나. 우수미생물의 특성과 효소유전자를 조사하고, 유전적 육종을 통한 지속적 활성 증진을 유도한다.

다. 기능성다당류의 고분자를 저분자로 분해하는 기술을 개발하여, 다양한 제품 개발에 활용한다.

라. 본 연구결과 및 세부적인 기술은 이전을 요구하는 산업체 및 농민에게 기술전수로 기업과 농민의 소득증대에 기여할 수 있도록 활용한다.

마. 미생물을 이용한 유기물분해기술, 분리정제법 및 가축사육법을 확립함으로써 기능성식품과 건강보조식품, 의약후보물질, 기능성 축산물 등을 개발할 수 있다.

제 2절 연구결과의 활용방안

국내 버섯생산량 중에 새송이버섯과 팽이버섯이 차지하는 비율은 아주 높고, 다른 버섯과 달리 새송이버섯과 팽이버섯은 미 이용부분이 많이 발생한다. 이러한 특성에 착안하여 본 과제에서는 버섯의 미 이용자원을 활용한 다양한 산업에 적용시키고, 산업화를 시키는 것에 활용의 목적을 두고 과제를 수행했다.

1. 1세부과제의 연구결과 활용방안

다당류가 인체생리에 미치는 긍정적인 효과가 밝혀짐으로 세계적으로 식품산업계에서도 다당류의 활용에 대한 관심이 증대되어 왔다. 으며, 특히 수용성 다당류와 비수용성다당류의 생리작용이 상이성을 이용한 각각의 기능적 성질을 이용한 식품소재가 계속 연구개발 되고 있다.

- 미 이용 버섯자원의 기능성을 구명하였으므로 **기능성 식품개발에 활용**할 수 있다.
- 기능성 다당류를 **정제법을 확립하였으므로 분말제제 및 캡슐제제 개발에 활용**가능하게 되었다.
- 버섯재배농가에서 폐기처분하고 싼값에 처리되는 미 이용자원을 활용할 수 있게 되었으므로 **고 부가가치의 상품개발로 버섯 재배농가의 소득을 향상**시킨다.
- 미생물분해산물 및 유기물에서 **기능성다당류 추출, 분리·분석시스템을 확립**하였으므로 생물유기자원의 개발에 활용할 수 있다.

2. 2세부과제의 연구결과 활용방안

- 버섯 미 이용자원을 급여한 닭 사육에서 생산한 계란이 **cholesterol이 저하되고, 난백과 난각질이 개선되어졌으며 저장기간이 연장되어졌으므로 기능성계란 생산이 가능하다.** 양계산업의 활성화에 활용한다.
- 버섯 미 이용자원을 급여한 닭 사육에서 각 근육의 **색도개선과 불포화지방산 함량 증가, 단백질 함량 증가 등의 닭고기의 육질개선으로 기능성 고품질 닭고기생산이 가능하다.** 고급 육계생산에 적극 활용한다.
- 수입에 의존하는 사료산업에 기능성 사료의 원료공급으로 **사료와 축산물에 기능성을 부여**할 수 있다.

3. 협동과제의 연구결과 활용방안

다당류의 활용도를 높이기 위해 고분자를 저분자화하는 연구개발이 활발히 이루어지고 있고, 기술개발이 이루어지면 식품산업을 비롯한 관련업계에서의

활용범위는 급격히 늘어날 것으로 전망된다.

- 유기물분해능이 우수한 미생물제제를 개발하여, 유용미생물의 특허를 신청하고, 정부기관에 수탁하여 생물 유전자원을 체계적으로 관리 활용한다.
- 우수미생물의 특성과 효소유전자를 조사하고, 유전육종을 통한 지속적 활성 증진을 유도한다.
- 기능성다당류의 고분자를 저분자로 분해하는 기술을 개발하여, 다양한 제품개발에 활용한다.
- 본 연구결과 및 세부적인 기술은 이전을 요구하는 산업체 및 농민에게 기술전수로 기업과 농민의 소득증대에 기여할 수 있도록 활용한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 버섯의 미 이용자원의 발생을 및 영양분의 양에 관한 정보

버섯의 폐배지의 생성량은 배지원료와 배합비 및 재배방식에 따라 그 형태가 다양한데, 원료 투입량에 대해 팽이버섯은 1.5배, 느타리버섯 및 새송이버섯은 약 1.9배 가량 발생되며, 병재배 새송이버섯은 버섯 생산량의 약 6.5% 정도의 폐배지가 발생된다고 보고 하였으며, 이는 새송이버섯의 미 이용자원을 이용하여 건강보조식품이나 의약품 원료를 개발할 수 있어 새송이버섯 및 새송이 미이용자원을 이용한 부가가치의 재창출을 할 수 있어 재배농가의 소득증대에 크게 기여할 수 있다.

2. 새송이버섯의 기능성에 관한 정보

새송이버섯은 분류학적으로 담자균아문(*Basidiomycotina*), 주름버섯목(*Agaricales*), 느타리버섯과(*Pleurotaceae*), 느타리버섯속(*Pleurotus*)에 속하는 식용버섯이다(Hilber, 1989)새송이 버섯의 영양학적 연구에서는 식이섬유, 베타글루칸, 키틴 및 총 페놀성분 등을 분석하였으며, 당질, 단백질, 비타민, 무기질 등의 영양소가 풍부할 뿐 아니라(Pamela 등, 1999)노화억제와 항암작용 등의(Guillen 등, 2000) 약리 효과가 있는 것으로 보고(Guillen 등, 2000)되었다. 이러한 새송이버섯의 유용성분을 추출하여 음료나 차의 형태로 가공하거나 건강식품으로 개발한다면 새송이버섯의 부가가치를 높이게 되어 농가 소득원이 될 것이라고 생각된다.

3. 새송이버섯의 열수추출물을 이용한 변비개선효과에 관한 정보

식이섬유소의 변비 개선효과는 여러 문헌을 통해 보고되었다. 대장통과시간이 지연된 만성 특발성 변비환자에서 점액질 섬유소인 차전피가 특별한 부작용이 없이 환자의 변비 증상을 호전시키고 대장통과시간을 단축시키는 효과가 있다고 보고 하였으며(Hwang 등, 2003). 또한 식이섬유소 섭취 후 대장통과시간이 2.4일에서 1.6일로 단축되었음을 보고하였다. 식이 섬유소는 변비환자의 장운동 및 대장통과시간을 단축시켜주며(Cumming 등, 1992). 이는 식이섬유질의 섭취가 장 통과시간을 감소시킨다는 보고와 일치하였다(1995, Jenkins 등, 1979). 새송이버섯의 미 이용자원을 이용하여 변비치료제 및 기능성 식품의 원료로 사용될 수 있어 재배농가의 새로운 소득원이 될 수 있다고 생각된다.

4. 새송이버섯의 열수추출물을 이용한 혈청분석에 관한 정보

수용성 식이 섬유소는 gvl을 형성하여 영양소의 흡수를 지연시키고, 담즙산과 결합하여 혈중 콜레스테롤함량을 낮추고, 중금속 흡수 억제 및 정장작용 등의 작용을 갖는다고 보고 하였다(Harris 등, 1983). 또한 느타리버섯 분말을 쥐에 급여하여 혈청과 간의 콜레스테롤 농도가 유의하게 감소하였으며(1997, Bobek and Jalbavy, 1998), 고콜레스테롤 식이에 풀버섯 배양체의 다당류 β -glucan을 1% 첨가한 식이로 2주간 사육한바 혈청의 총콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 농도를 감소시키고(Mattson, 1972), 식물성 fiber을 많이 섭취하면 변의 배설량을 증가시키며 담즙산을

흡착해 변으로 배설하므로 콜레스테롤을 감소시키고 혈청중 콜레스테롤 함량을 저하시킨다고 보고하였다(Hollenbach and Kligman, 1975). 이와 같이 새송이버섯을 활용하여 비만이나 심혈관계 질환의 예방이나 치료제 등의 원료로 사용 될 수 있어 고부가가치 산업으로 소득 증대 및 경제적 파급효과가 클 것으로 기대된다.

Reference

1. Bobek, P., L. Ozdin. and S. Galbavy. 1998. Dose- and time-dependet hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats. Nutrition 14, 282-286.
2. Cumming, J. H., Bingham, S. A., heaton, K. W. and Estwood, M. A. 1992. Fecal weight, colon cancer risk and dietary intake of nonstarch polysaccharides(dietary fiver). Gastroenterol., 102, 1783-1789.
3. Guillen F, Munoz C, Gomez-Toribio V, Martinez AT, Jesus Martinez M. 2000. Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. Appl Environ Microbiolgy 66: 170-175.
4. Harris, W. S., Conner, W. E. and McMurray, M. P. 1983. A comparative reductions of the plasma lipids and lipoproteins by dietary polyunsaturated fat, salmon oil versus vegetable oils. Metabolism, 32, 179.
5. Hilber, O. 1989. Valid, invalid and confusing taxa of the *enus pleurotus*. Mushroom Sci., 12:241-248.
6. Hollenbach, E. J. and Kligman, A. M. 1975. Effect of fiber fermentation and bile acid excretion in rats. Am. J. Clin. Nutr., 28, 726.
7. Hwang YJ, Nam HK, Kim SH. 2003. Effect of *Lentinus edodes* and *Pleurotus eryngii* extracts on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines. J Korean Soc Food Sci Nutr 31: 217-222.
8. Jenkins, D. J., Reymolds, D., Leeds, A. R., Waller, A. L and Cummings, J. H. 1979. Hypocholesterolemic acition of dietary fiber unrelatid to fecal bulking effect. Am. J. Clin. Nutr. 32: 2430-2435.

9. Mattson, F. h., Erickson, B. A. and Kligman, A. M. 1972. Effect of dietary cholesterol on serum cholesterol in man. *Am, J. Clin. Nutr.*, 25, 589.
10. Pamela, M., Loreta, G., Stefania, M., Vittorio, V and Laura, P. 1999. Nutrients in edible mushroom: an inter-species comparative study. *Food Chemistry*, 65: 447-482.

제 7 장 참고문헌

제 1세부과제

1. 고진복, 이충언. 2005. 새송이버섯이 고지방 식이를 급여한 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. 34, 626-631.
2. 김애정, 김선여, 최미경, 김명환, 한명륜, 정건섭. 2005. 뽕잎분말이 고 콜레스테롤 식이 투여 흰쥐의 지질대사에 미친 영향. 한국식품과학회지. 37, 636-641.
3. 김현진, 김순임, 한영실. 2008. 다시마와 다시마 요구르트의 변비해소 효과. 한국식품조리과학회지. 24, 59-67.
4. 박민경, 진영건, 김동건, 진주연, 이영재. 2007. 표고버섯 추출액이 Loperamide로 유도된 변비에 미치는 영향. 한국식품과학회지. 39, 88-93.
5. 백순옥, 김현경, 이유희, 김영숙, 류명현. 2004. 무(*Raphanuse sativa* var. *nigra* L.) 물 추출물로부터 장기능 및 변비질환 개선을 위한 활성 분획의 제조. 한국응용생명화학회지. 47, 315-320.
6. 서화중, 정두례. 1997. 흰쥐에 양과즙 투여가 혈액 지질량에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. 26, 1164-1172.
7. 서화중. 1999. 흰쥐에 마늘 투여로 혈액의 지질량과 그 외 혈액성분 변화 고찰. 한국식품영양과학회지. 28, 1339-1348.
8. 성인숙, 김명주, 조수열. 1997. 도토리추출물이 흰쥐의 체내 지질대사에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. 26, 327-333.
9. 이재준, 이유미, 정승기, 김근영, 이명렬. 2008. 식이뽕잎이 흰쥐의 Loperamide로 유도된 변비에 미치는 영향. 한국식품저장유통학회지. 15, 280-287.
10. 이충언. 2006. 콜레스테롤 식이를 섭취한 흰쥐에 새송이버섯이 지질대사 및 효소활성에 미치는 영향. 생명과학회지. 16, 1127-1132.
11. 이희삼, 김선여, 이완주, 이상덕, 문재유, 류강선. 2000. 식이 뽕잎분말이 흰쥐의 장기능에 미치는 영향, 한국식품영양과학회지, 29, 865-869.

12. 조영심, 김순임, 한영실. 2008. 함초 추출물의 장 기능 개선과 변비 해소 효과. 한국식품과학회지. 40, 326-331.
13. Byrd, J. C., Park, J. H. Y., Schaffer, B. S., Garmroudi, F. and MacDonald, P. G. 2000. Dimerization of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. J Biol Chem 25: 18647-18656.
14. Cheung, P. C, K. 1996. The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom, Nutr Res 16: 1953-1957.
15. Cho, S. H., Lee, S. D., Ryu, J. S., Kim, N. G. and Lee, K. S. 2001. Changes in quality of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) during modified atmosphere storage. Korean J Postharvest Sci Technol 8: 367-373.
16. Choi, M. Y., Lim, S. S. and Chung, T. Y. 2000. The effects of hot water soluble polysaccharides from *Lentinus edodes* on lipid metabolism in the rats fed butter yellow. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 294-299.
16. Grundy, S. M. 1994. Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acid. AM J Clin Nutr 60: 986S-990S.
17. Guide & directory for Agro-Food export in Korea. 2007. Ministry of Agriculture and Forestry. Korea Agro-Fisheries Trade Corporation. pp. 197-199.
18. Guillen, F., Munoz, C., Gomez-Toribio, V., Martinez, A. T., Jesus. and Martinez, M. 2000. Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. Appl Environ Microbiolgy 66: 170-175.
19. Healey, K. W. and J. M. Harvey. 1989. A biological control agent for the mushroom industry. Proceedings Eighth Aust. Biotechnol. Conference 322-324..
20. Hwang, Y. J., Nam, H. K. and Kim, S. H. 2003. Effect of *Lentinus edodes* and *Pleurotus eryngii* extracts on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines. J Korean Soc Food Sci Nutr 31: 217-222.
21. Hwang, Y. K., Kim, D. C., Hwang, W. I. and Han, Y. B. 1998. Inhibitory

- effect of artemisia princeps Pampan. extract on growth of cancer cell lines. Korean J Nutr 31: 799–808.
22. Kang, M. S., Kag, T. S., Kang, A. S., Shoon, H. R. and Jung, J. M. 2000. Studies on mycelial growth and artificial cultivation of *Pleurotus eryngii*. Korean J Mycol 28: 73–80.
 23. Kang, T. S., M. S. Kang, J. M. Sung, A. S. Kang, H. R. Shon and S. Y. Lee. 2001. Effect of *Pleurotus ernyii* on the blood glucose and cholesterol in diabetic rats. Korean J. Mycol. 29, 86–90.
 24. Kang, T. S., Kang, M. S. and Lee, S. Y. 2001. Effect of *Pleurotus eryngii* on the blood glucose and cholesterol in diabetic rats. Korean J Mycology 29: 86–90.
 25. Kim, B. K., Kwun, J. Y., Park, Y. I. and Choi, E. C. 1992. Antitumor component of the cultured mycelia of *Calvatia craniformis*. J Kor Cnacer Assoc 24: 57–63.
 26. Kim, J. S., J. S. Han and J. S. Lee. 1995. A study for the mechanical and sensory characteristics of mushrooms by various cooking methods. Korean J. Food Cook. Sci. 11, 44–50.
 27. Kim, J. Y., Kang, H. I. and Seo, K. I. 2004. Antioxidative and antitumor activities of crude polysaccharide fraction *Pleurotus eryngii*. J Korean Soc Food Sci Nutr 33: 1589–1593.
 28. Kim, J. W., K. H. Kim. and H. J. Kang. 1994. Studies on the pathogenic *Pseudomonas* causing bacterial disease of cultivated mushrooms in Korea. 1. On the causal organisms of the rots of *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. Korean J. Plant Pathol. 10, 197–210.
 29. Kim, J. W., S. I. Kwon. and H. J. Kang 1995. Studies on the pathogenic *Pseudomonas* causing bacterial disease of cultivated mushrooms in Korea. 2. Bacteriological characteristics of *P. tolaasi* causing mushroom brown blotch and white line reacting organisms. Korean J. Plant Pathol. 11, 353–360.
 30. Kiviharju, T. M., Lecane, P. S., Sellers, R. G. and Peehl, D. M. 2002. Antiproliferative and proapoptotic activities of triptolide (PG490), a natural product entering clinical trials, on primary cultures of human prostatic

- epithelial cells. Clin Cancer Res 8: 2666–2674.
31. Kritchevsky, D. and Klurfeld, D. M. 1991. Fat and cancer. In Cancer and nutrition. Alfin–Slater RB, Kritchevsky D, ed. Plenum press, New York and London. p 117–140.
 32. Lee, J.Y., Hwang, W. I., Lim. and S. T. 1998. Effect of *Platycodon grandiflorum* DC extract on the growth of cancer cell lines. Korean J Food Sci Technol 30: 13–21.
 33. Melo, P. S., Justo, G. Z., Duran, N and Haun, M. 2004. Natural killer cell activity and anti–tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives. Eur J Pharmacol 487(1–3): 47–54.
 34. Nieman, D. C., Butterworth, D. E. and Nuenab, C. N. 1992. Nutrition. Wm. C. Brown Publishers, Dubuque. p 133–153.
 35. Nutkins, C. J., J. R. Mortishire–Smith, C. L. Packman, L. C. Brodey. and B. P. Rainey. 1991. Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* paine. J. Am. Chem. Soc. 113, 2621–2627.
 36. Oh, I. H., Lim, T. S., See, G. D. and Kim, H. K. 2006. Establishment of Microwave–assisted Extraction Conditions for Antioxidative Extracts from *Pleurotus eryngii*. Korea Food Research Institute, songnam 463–746.
 37. Pamela, M., Loretta, G., Stefania, M., Vittorio, V. and Laura, P. 1999. Nutrients in edible mushrooms: An inter–species comparative study. Food Chemistry 65: 477–482.
 38. Park, J. M., Lee, S. H., Kim, J. O., Park, H. J., Park, J. B. and Sin, J. I. 2004. In vitro and in vivo effects of extracts of *Lentinus edodes* on tumor growth in guman papillomavirus 16 oncogenes–transformed animal tumor model. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 141–146.
 39. Rajarathnam, S. and Bano, Z. 1987. Pleurotus mushrooms. Part 1 A. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding and cultivation. Crit Rev Food Sci Nutr 26: 157–223.
 40. Sabate, J. and Hook, D. G. 1996. Almonds, Waltus and serum lipids. In

Handbook of lipids in human nutrition. Spiller G, ed. CRC Press, Boca Raton. p 137–144.

41. Schneeman, B. O. 1987. Soluble vs. insoluble fiber – Different physiological responses, Food Technol. 41(2):81.
42. Seo, G. S. 2001. Mushroom pathogen and its protection. Mushroom 5, 17–38.
43. Song, J. Y., Yoon, K. J., Yoon, H. K. and Koo, S. J. 2001. Effects of β -glucan from *Lentinus edodes* and *Hordeum vulgare* on blood glucose and lipid composition in alloxan-induced diabetic mice. Korean J. Food Sci. Technol. 33:802–807.
44. Stamets, P. 1993. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten speed Press, Hong Kong. p 304–308.
45. Topping DL. 1991. Soluble fiber polysaccharides effects on plasma cholesterol and colonic fermentation. Nutrition Reviews. Jul, 49(7): 195–203.
46. Yoon, S. J. and M. Y. Lee. 2004. Quality characteristics of sulgidduk added with concentration of *Hericiium erinaceus* powder. Korean J. Food Cook. Sci. 20, 575–580.
47. Yoshioka, Y., Tabeta, R. H., Saito, N. and Fukuoka, F. 1985. Antitumor polysaccharides from *P. ostrestus* (Fr.) Quel: Isolation and structure of α -glucan. Carbohydrate Research 140: 92–100.
48. Wells, J. M., G. M. Sapers, W. F. Felt, J. E. Butterfield, B. Jones, H. Bouzar. and F. C. Miller. 1996. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans* and *P. gingeri*. Phytopathology 86, 1098–1104.

제 2 세부과제

1. AOAC 1995. Official Methods of Analysis. 16th Ed Association of Official Analysis Chemist Washington DC USA.
2. Bendall, J. R., Swatl. and, H. J. A. 1998. A review of the relationships of pH with physical aspects of pork quality. Meat Sci 20(2):85.
3. Bumpus, J. A., Tien, M., Wright, D. and Aust, S. D. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. Science 228:1434-1436.
4. Cambero, M. I., I. Seuss. and Honikel, K. O. 1992. Flavor compounds of beef broth as affected by cooking temperature. J. Food Sci. 57, 1285-1290.
5. Chai, J. K. 2001. Re-cultivation of *Flammulina velutipes* from media used for cultivation of *Flammulina velutipes*. Mushroom 5: 113-124.
6. Chang, S. T. and Miles, P. G. 1989. Mushroom science. In Edible mushrooms and their cultivation. CRC press, Inc. New York. p 3-25.
7. Chung, J. C. 1999. Production of liquid type strains of *Flammulina velutipes* and its technology. Mushroom 3(2): 159-178.
8. Cripps, C., Bumpus, J. A. and Aust, S. A. 1990. Biodegradation of azo and 9. heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl Environ Microbiol 56:1114-1118.
9. Day EJ, Dilworth BC, Omars. 1987. effect of varying levels of phosphorus and live yeast culture in caged layer diets. Poultry Sci. 66:1402-1420.
10. Faure, M., Lissi, E., Torrs, R. T. and Videla, L. A. 1990. Antioxidant activities of lignans and flavonids. Phytochemistry 29:3773-3775.
11. Fernandes G, Venkartraman JT 1993. Role of omega-3 fatty acids in health and disease. Nutr Res 13:S19.
12. Field, R. A. and Chang, Y. D. 1969. Free amino acids in bovine muscle and their relationship to tenderness. J Food Sci 34:329-334.

13. Furlani, R. P.Z. and Godoy, H. T. 2007. Vitamins B1 and B2 contains in cultivated mushrooms. *Food Chem* 106: 816–819.
14. Guo, F. C., Williams, B. A., Kwakkel, R. P., Li, H. S., Li, H. S., Li, X. P., Luo, J. Y., Li, W. K. and Verstegen, M. W. A. 2004. Effect of mushroom and herb polysaccharides, as alternative for an antibiotics, on the cecal microbial ecosystem in broiler chickens. *Poultry Sci* 83:175–182.
15. Haddadin MSY, Abdulrahim SM, Hashilamoun EAR, Robinson RK. 1996. The effect of *Lactobacillus acidophilus* on the preproduction of hens eggs. *Poultry Sci* 18:491–494.
16. Harris WS. 1989. Fish oil and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: A critical review. *J Lipid Res* 30:785.
17. Haw, I. W., Lee, S. D. and Hwang, W. I. 1985. A study on the nutritional effects in rats by feeding basal diet supplemented with mugwort powder. *J Kor Soc Food Nutr* 14(2):123–130.
18. Hobbs, P. J., Pain, B. F., Kay, R. M. and Lee, P. A. 1996. Reduction of odorous compounds in fresh pig slurry by dietary control of crude protein. *J Sci Food and Agric* 71:508.
19. Homidan, A., Robertson, J. F. and Petchey, A. M. 2003. The effect of ammonia and dust concentrations on broiler performance. *Poultry Sci* 59:340–349.
20. Hulan, H. W. 1990. Incorporating omega–3 fatty acid into chicken product lipids. *Western Nutrition Conference Handbook* page 121.
21. Jung, I. C., Shin, P., Park, K. S., Ha, H. C., Kim, S. H., Kwon, Y. I. and Lee, J. S. 1996. Antioxidative effect of fruit body and mycelial extracts of *Pleurotus ostreatus*. *Korean Food Sci Technol* 28: 464–469.
22. Kiling, H. F. and Quarles, C. L. 1974. Effect of atmospheric ammonia and the stress of infectious bronchitis vaccination on Leghorn males. *Poultry Sci* 53:1161–1167.
23. Kim, B. K., Chung, K. S. and Yang, M. S. 1980. Studies on the antinoplastic components of Korean basidiomycetes. *Kor J Mycor* 8: 107–112.

24. Kim, B. K., Kwun, J. Y., Park, Y. I. and Choi, E. C. 1992. Antitumor component of the cultured mycelia of *Calvatia craniformis*. J Kor Cancer Assoc 24: 57–63.
25. Kim, S. H., Kim, H. W., Choi, O. C. and Kim, B. K. 1993. Immunological studies on colluban isolated *Collubia confluens*. J Kor Cancer Assoc 25: 288–298.
26. Kwon, M. N., Choi, J. S. and Byun, D. S. 1993. Effect of flavonoid(+) catechin as stabilizer in rat fed fresh and peroxidized fish oil. J. Korean Soc. Food Nutr. 22(4):381–391.
27. Lee, J. H. and Lee, S. R. 1994. Some physiological activity of phenolic substance in plant foods. Korean J Food Sci Technol 26: 317–323.
28. Nahashon SN, Nakaue HS, Mirpsh LW. 1994. Performance of single comb White Leghorn layers fed a diet supplemented with a live microval during the growth and egg laying phase. Animal Feed Science Technology 57:25–38.
29. Penny, I. F. 1977. The effect of temperature on the drip denaturation and extracellular space of pork longissimus dorsi muscle. J Sci Food Agric 28: 329–334.
30. Reedy, C. A. 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. Curr Biol 6:320–328.
31. Rose AH. 1990. Recent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae*. In: Skinner FA SM Passmore and PP Davenport(ED) Biology and Activities of Yeasts. The Society for Applied Bacteriology Symposium Series NO. 9 Academic Press London p.103–121.
32. Roseiro, L.C., Santana, C. and Melo, R. S. 1994. Muscle pH60 colour(L, a, b) and water holding capacity and the influence of post mortem meat temperature. Meat Sci 38:353.
33. Smiderle, F. R., Carbonero, E. R., Mellinger, C. G., Sasaki, G. L., Gorin Philip, A.J. and Iacomini, M. 2006. Structural characterization of a polysaccharide and a β -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. Phytochemistry 67: 2189–2196.
34. Stark BA, Wilkinson JM. 1989. Probiotics: Theory and Application Chalcombe

publication Berks England.

35. Thayer RH, Burkitt FF, Morrison RD, Murray EE. 1978. Efficiency of utilization of dietary phosphorus by caged turkey breeder hens when fed ration supplemented with live yeast culture. *Anim Sci Res Rep* MP-103 173-181, Oklahoma State University. Stillwater OK USA.
36. Tonkinson LV, Gleaves EW, Dunkelgod KE, Thayer RH, Simy RJ, Morrison RD. 1965. Fatty acid digestibility in laying hens fed yeast culture. *Poultry Sci* 44:159-164.
37. Van Heugten, E. and van Kempen, T. 1999. Methods may exist to reduce nutrient excretion. *Feedstuffs*. 71(15):12. April 26.
38. Wenk. C. 2003. Herb. and botanicals as feed additives in monogastric animal. *Asian-Aust J Animal Sci* 16(2):282-289.
39. Winger, R. T. and Fennema, O. 1976. Tenderness and water holding properties of beef muscle as influenced by freezing and subsequent storage at -3°C or 1°C . *J Food Sci* 41: 1433-1438.
40. Yoshioka, Y., Tabeta, R. H., Saito, N. and Fukuoka, F. 1985. Antitumor polysaccharides from *P. ostrestus* (Fr.) Quel: Isolation and structure of a β -glucan. *Carbohydrate Research* 140: 92-100.
41. 고용균, 황영환. 1999. *Aspergillus Oryzae* 균주로 배양한 효모 배양물의 급여가 부로일러의 육성성적에 미치는 영향. *한국축산학회지* 41(1): 15~22.
42. 고재우, 우칸바야르, 오동환, 배인휴, 조성균, 공일근, 양철주. 2005. 장식의 첨가가 산란계의 생산성 및 난 성분에 미치는 영향. *한국가금학회지* 제 32권 제 3호, 219~224.
43. 김상호, 박수영, 유동조, 나재천, 최철환, 박용윤, 이상진, 류경선. 2000 육계 생산성 및 맹장 내 미생물에 대한 유산균의 첨가 효과. *한국가금학회지* 제 27권 제 1호, 37~41.
44. 김상호, 유동조, 박수영, 이상진, 최철환, 성창근, 류경선. 2002. 유산균 효모 의 단독 및 혼합급여가 산란계의 생산성, 영양소 소화율, 장내미생물 변화 및 분의 암모니아 발생량에 미치는 영향. *한국가금학회지* 제 29권 제3호, 225~231.

45. 김상호, 손장호, 이상진, 최철환, 나재천, 이덕수, 류경선. 2004. 옷나무 추출액의 급여가 육계의 생산성 및 장내미생물에 미치는 영향. 한국가금학회 정기총회 및 학술발표회 한국가금학회 제21차 정기총회 및 학술발표회 PROCEEDINGS, pp. 109 ~110.
46. 김영직. 2006. 썩과 정어리유의 첨가가 계육의 품질 및 저장성에 미치는 영향. 한국가금학회지 제33권 제1호. pp. 1~6.
47. 김정학, 심관섭, 박강희. 2002. 타우린 첨가가 산란계의 난 생산성 및 난질에 미치는 영향. 한국가금학회지 제29권 제3호. 171~176.
48. 김지혁, 김동욱, 강근호, 김상호, 강환구, 유동조, 나재천, 최철환, 서옥석, 김성권. 2007. 약용식물 혼합추출물 및 유기산제의 급여가 육계의 생산성, 장기발달 및 혈액특성에 미치는 영향. 한국가금학회, 한국가금학회 제24차 학술발표회. pp.79-80.
49. 김지혁, 나재천, 김상호, 장병귀, 강희설, 이덕수, 이상진, 좌승협. 2006. 약용식물 가공부산물의 첨가가 산란계의 생산성 및 난질에 미치는 영향. 한국가금학회지 제33권 제2호, 121~126.
50. 나재천, 장병귀, 김상호, 김지혁, 김성권, 강희설, 이덕수, 이상진, 정종천, 이진건. 2005. 팽이버섯 배지 부산물의 급여가 산란계의 생산성 및 난질에 미치는 영향. 한국가금학회지 제32권 제2호, 143-147.
51. 류경선, 박홍선, 류명선, 박수영, 김상호, 송희중. 1999. 생균제의 급여가 산란계의 생산성과 장내 미생물의 변화에 미치는 영향. 한국가금학회지 제26권 제4호, pp.253~259.
52. 류경선, 이문준, 송근섭, 나종삼, 김종승. 1997. 목탄과 목탄액의 첨가가 육계의 생산성 및 육질에 미치는 영향. 한국가금학회, 한국가금학회지 제24권 제3호, pp. 139~143.
53. 박구부, 김진형, 김진성, 진상근, 신태순, 이정일, 박태선, 성필남 1997. 올리브기름, 카놀라기름 및 정어리기름의 급여가 계란의 지방산 조성 및 콜레스테롤 함량에 미치는 영향. 한국가금학회지 24(3):145~151.
54. 박성복, 나재천, 유동조, 방한태, 황인호, 류경선. 2008. 한약재 추출물의 급여가 육계의 생산성, 장내 미생물 및 혈액 성상에 미치는 영향. 한국가금학회, 한국가금학회지 제35권 제1호, pp. 79-84.

55. 박성진, 김만배. 1996. 두층잎의 첨가가 육계의 성장 및 육질에 미치는 영향. 한국가금학회, 한국가금학회지 제23권 제2호, pp. 71~76.
56. 박성진, 박희성, 유성오. 1998. 건지황 첨가가 육계의 성장과 생리적 변화에 미치는 영향. 한국가금학회지 제25권 제4호. pp. 195~202.
57. 박성진, 유성오. 1999. 한약재 부산물 첨가가 육계의 성장과 생리적 변화에 미치는 영향. 한국가금학회, 한국가금학회지 제26권 제3호, pp. 155~201.
58. 박용운, 강태홍, 송기덕, 차동열. 1978. 느타리버섯균 처리 벼짚의 사료가치 연구 시험. 축산연보, 212-218.
59. 박재홍, 김은성, 김상호, 류경선. 2000. 린코마이신과 남은 음식물의 첨가·급여가 육계의 생산성 및 혈액의 성상에 미치는 영향. 한국가금학회, 한국가금학회지 제27권 제3호, pp. 267~277.
60. 송계원, 성삼경, 채영석, 이유방, 김현옥, 강통삼, 송인상, 이무하, 배석현, 하석현. 1984. 식육과 육제품의 과학. 선진문화사. 341.
61. 양승주, 정인철, 문윤희. 2008. 토종닭 고기의 영양성분에 미치는 감귤 부산물 급여 영향, Journal of Science Vol. 18. No. 10. 1369-1376.
62. 양철주, 정영철, 우간바야르. 2003. 녹차가공부산물을 첨가한 산란계 사료의 급여가 난생산성과 난성분에 미치는 영향. 2003. 한국가금학회지 제30권 제1호, 183-189.
63. 오세정, 김법희, 이택원, 조성구. 1984. 육계 병아리 사육에 있어서 느타리버섯 배지 폐벼짚의 사료가치에 관한 연구. 한국가금학회지 11(2): 115-125.
64. 유선종, 신승철, 김성권, 박유현, 안병기, 강창원. 2003. 육계사료내 마늘분말의 첨가 급여가 육계 성장과 콜레스테롤 대사에 미치는 영향.
65. 윤병선, 남기택, 장경만, 황성구, 최일신. 2005. 목초액을 이용한 산란노계의 육질 개선 연구. 한국가금학회, 한국가금학회지 제32권 제2호, pp. 101~106.
66. 이을연, 이봉덕, 지설하, 박홍석. 1995. 생효모 배양물의 급여가 산란계의 생산성에 미치는 영향 한국가금학회지. 22(2): 77~84.
67. 이택원, 김법희. 1982. 느타리버섯 종균의 접종에 의한 벼짚의 사료가치 개선에 관한 연구. 한축지 24(6): 476-481.

68. 이현우, 김인호, 김춘수, 손중천. 1997. 효모의 급여가 육계의 성장 및 장내 대장균의 변화에 미치는 영향. *K.J. Poult. Sci.* 24(2):67~72.
69. 조성구. 1995. 당귀근부 첨가사료가 육계의 생산성과 장기발육 및 혈액성상에 미치는 영향. *한국가금학회지*. 22: 145~153.
70. 채현석, 황보중, 안중남, 유영모, 조수현, 이종문, 최양일. 2004. 현미 급여가 육계의 도체 및 육질 특성에 미치는 영향. *한국가금학회, 한국가금학회지 제31권 제3호*, pp. 165~170.
71. 최일. 2005. 황토 첨가가 육계의 생산성과 육질에 미치는 영향. *한국가금학회지 제32권 제1호*, pp. 1~7.
72. 한인규, 하종규, 김춘수. 1975. Zeolite의 사료화에 관한 연구 1. 육성돈에 대한 zeolite 급여효과에 관한 연구. *한국축산학회지* 17:595-599.
73. 홍성진, 남궁환, 백인기. 2001. 생약제제(Miracle®)가 육계의 생산성과 영양소 이용율, 소장내 미생물 균총 및 면역기능에 미치는 영향. *동물자원과학회지* 43(5): 671-680.
74. 홍종욱, 김인호, 권오석, 이상환, 이제만, 김용철, 민병준, 이원백. 2001. 고온 스트레스하에서 한방 부산물 첨가가 산란계의 계란품질 및 혈청 콜레스테롤에 미치는 영향. *한국가금학회지 제28권 제3호*, 259~265.

제 3 협동과제

1. Alzari, P. M., Souchon, H and Dominguez, R. 1996. The crystal structure of endoglucanase CelA, a family 8 glycosyl hydrolase from *Clostridium thermocellum*. *Structure* 4:265–275.
2. Ash, C., Priest, F. G and Collins, M. D 1993. Molecular identification of rRNA group3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 64:253–260.
3. Beguin, P., Cornet, P and Aubert, J. P. 1985. Sequence of a cellulase gene of the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 162:102–105.
4. Bendtsen, J. D., Nielsen, H. von., Heijne, G and Brunak, S. 2004. Improved prediction of signal peptides:SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340:784–795.
5. Claus, D and Berkeley, RCW. 1986. *Bacillus* Cohn 1972. In: Sneath PHA (Ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 2 (p1105–1139). Baltimore, The Williams and Wilkims Co.
6. Cuevas, WA., Kantelinen, A., Tanner, P., Bodie, B and Leskinen, S. 1996. Purification and characterization of novel mannanases used in pulp bleaching. In Srebotnik, E., Mesner, K., (Eds.), *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* (pp. 123–6). Vienna: Facultas–Universitätsverlag, Austria.
7. Ebglbrecht, A., Harrer, G., Lebert, M and Schmid, G. 1990. Biochemical and genetic characterization of a CGTase from an alkalophilic bacterium forming primary γ -cyclodextrin in Proceeding of the 5th International Symposium on Cyclodextrins (Hubber O, Szejyly J, eds) 25–31, Kluwer Academic.
8. El-Naggar, MY., El-Aassar, S. A., Youssef, A. S., El-Sersy, N. A and Beltagy, E. A. 2006. Extracellular β -mannanase production by the immobilization of the locally isolated *Aspergillus niger*. *Inter J Agri Biol.* 8: 57–62.
9. Ethier, H. M., Talbot, G and Sygusch, J. 1998. Gene cloning, DNA sequencing and expression of thermostable β -mannanase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol* 64: 4428–4432.

10. Ferreira, H. M and Filho, E. X. F. 2004. Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. Carbohydrate Poly 57: 23-29.
11. Francoise, M., Ghakis, C., Dupont, C., Morosoli, R and Kluepfel, D. 1996. Improved production of mannanase by *Streptomyces lividans*. Appl Environ Microbiol 62: 4656-8.
12. Gilkes, N. R., Henrissat, B., Kilburn, D. G., Jr. Miller, R. C and Warren, R. A. J. 1991. Domains in microbial beta-1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. Microbiol. Rev. 55:303-315.
13. Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280:309-316.
14. Henrissat, B., Claeysens, M., Tomme, P., Lemesle, L and Mornon, J. P. 1989. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. Gene 81:83-95.
15. Her, S., Lee, H. S., Choi, S. J., Choi, S. W., Choi, H. J., Yoon, S. S and Oh D. H. 1999. Cloning and sequencing of β -1,4-endoglucanase gene (celA) from *Pseudomonas* sp. YD-15. Lett. Appl. Microbiol. 29:389-395.
16. Hossain, MZ., Abe, J and Hizukuri, S. 1996. Multiple forms of β -mannanase from *Bacillus* sp. KK01. Enzyme Microb Technol 18: 95-98.
17. Janecek, S. 1997. α -Amylase family: molecular biology and evolution. Prog Biophys Mol Biol 67:67-97.
18. Jiang, Z., Wei, Y., Li, D., Li, L., Chai, P and Kusakabe, I. 2006. High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. Carbohydrate Poly 66: 88-96.
19. Martin, Del and Valle, EM. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. Process Biochem 39:1033-1046.
20. Kato, T and Horikoshi, K. 1984. Colorimetric determination of γ -cyclodextrin. Anal. Chem. 56:1738-1740.

21. Kim, J. O., Park, S. R., Lim, W. J., Ryu, S. K., Kim, M. K., An, C. L., Cho, S. J., Park, Y. W., Kim, J. H and Yun, H. D. 2000. Cloning and characterization of thermostable endoglucanase (Cel8Y) from the hyperthermophilic *Aquifex aeolicus* VF5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279:420–426.
22. Kurakake, M and Komaki, T. 2001. Production of β -mannanase and β -mannosidase from *Aspergillus awamori* K4 and their properties. *Current Microbiol* 42: 377–380.
23. Lawson, C. L., van Montfort, R., Strpkoptov, B., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Vries, G. E., Penninga, D., Dijkhuizen, L and Dijkstra, B. W. 1994. Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *J. Mol. Biol.* 236:590–600.
24. Lejeune, A., Sakaguchi, K and Imanaka, T. 1989. A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose (α -cyclodextrin) glucanotransferase. *Anal. Biochem.* 181:6–11.
25. Li, Yanan., Yang, P., Meng, K., Wang, Y., Luo, H., Wu, N., Fan, Y and Yao, B. 2008. Gene Cloning, Expression, and Characterization of a Novel β -Mannanase from *Bacillus circulans* CGMCC 1416. *J Microbiol Biotechnol* 18(1): 160–166.
26. Martins, F. R and Hatii-Kaul, R. 2002. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization . *Enzyme Microb Tehcnol* 30:116–124.
27. McCleary, B. V. 1988. β -Mannanase. *Methods Enzymol* 160: 596–610.
28. Mendoza, N. S., Arai, M., Kawaguchi, T., Yoshida, T and Josen, L. M. 1994a. Purification and properties of mannanase from *Bacillus subtilis*. *World J Microbiol Biotechnol* 10: 551–555.
29. Millet, J., Petre, P., Beguin, P., Raynaud, O and Aubert, J. P. 1985. Cloning of ten cellulases. *FEMS Microbiol. Letts.* 20:145–149.
30. Miller, L. 1959. Use of dinirosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:208–218.

31. Mollet, C. Drancourt, M and Rault, D. 1997. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.* 26:1005–1011.
32. Ozaki, K., Sunotomo, N and Ito, S. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding an endo-1,4-beta-glucanase from *Bacillus* sp. KSM-330. *J. Gen. Microbiol.* 137:2299–2305.
33. Qing, G., Ma, L. C., Khorchid, A., Swapna, G. V., Mal, T. K., Takayama, M. M., Xia, B., Phadtare, S., Ke, H and Acton, T. 2004. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 22:877–882.
34. Sambrook, J., Fritsch, E. F and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Pres.
35. Sohn, C. B., Kim, S. A., Park, Y. A., Kim, M. H., Moon, S. K and Jang, S. A. 1997. Purification and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26:351–357.
36. Takano, T., Fukuda, M., Monma, M., Kobayashi, S., Kainuma, K and Yamane, K. 1986. Molecular cloning, DNA nucleotide sequencing, and expression in *Bacillus subtilis* cells of the *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene. *J. Bacteriol* 166:1118–1122.
37. Talbot, G and Sygusch, J. 1990. Purification and characterization of thermostable β -mannanase and β -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol* 56: 3505-3510.
38. Thomsom, J. D., Higgins, D. G and Gibson, T. J. 1994. clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4773–4680.
39. Uitdehaag, J. C. M., van Alebeek, G. W. M., van der Veen, B. A., Dijkhuizen, L and Dijkstra, B. W. 2000. Structures of maltohexaose and maltoheptaose bound at the donor sites of cyclodextrin glycosyltransferase give insight into the mechanisms of transglycosylation activity and cyclodextrin size specificity. *Biochemistry* 39:7772–7780.

40. Zakaria, M. M., Yamamoto, S and Yagi, T. 1998. Purification and characterization of an endo-1,4- β -mannanase from *Bacillus subtilis* KU-1, FEMS Microbiol Lett 158: 25-31.

주 의

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